

活動報告

平成 14 年度前期構造生物学坂部プロジェクトの活動

運営委員会委員長
坂部 知平

I. SBSP 用第 1 実験ステーション BL6B

1. 利用状況

平成 14 年度前期のチームタイムは平成 14 年 4 月 5 日（金）午前 9 時に開始され、7 月 1 日（月）午前 9 時に終了した。予約状況を表 1 に示す。前回と同様bonus日(入射器のマシINSTADIEE)を予備日とし、それ以外の予備日は取らなかった。bonus timeは1週間前迄に急を要する要求がなければキャンセルを行った。6月18日以降は昼夜を問わず利用された。

2. チームラインアシスタント

今期は 3 人の方々をお願いした。

今期のチームラインアシスタント名簿を掲載すると共に諸氏に感謝する。

氏名	所属	期間
村岡 真	長岡技科大・野中研	4月4日～4月24日
北谷 友也	大阪府立大・多田研	5月8日～6月3日
鈴木 喜大	筑波大学・水野研	6月2日～7月1日

3. 装置の状況

1) R-AXIS ++の導入

第8回運営委員会の決定に基づき、4月25日～27日にBL6Bのカメラ部を下記のように改作し、R-AXIS ++を設置しテスト運転後、5月15日より公開し、今期末までこの状態で運用した。

ポラロイドカセット以降のヘリウムチェンバーを取り外す。

R-AXIS ++用架台の設置。滑車によりカメラ距離を150mm～300mm間を可変とした。

従来の大型IP用カメラとしても利用できるよう配慮されており、そのためのポラロイドカセット取り付け台も用意された。

R-AXIS ++の搬入、搬出用のつり金具を用意した。

ゴニオメーター、シャッターなど検出器関係以外のものは従来のカメラ部品を利用して、光軸合わせ、結晶のセンタリング及び軸立時には手動で2箇所のコネクターを差し替える必要があった。これの簡素化を三浦俊典氏に依頼し7月に完成した。

表 1 . 平成 1 4 年度前期 B L 6 B ビームタイム使用状況

LAST UPDATE: 6/20/2002 16:32

USER NAME _a:administer _c:industry _d:non-industry -:free

A:50% area for long works, B:50% area for short works

day: am:9.00-pm:9.00 night: pm9.00-am:9.00(the next day)

4/ 5 FRI A	Kirin_Brewery_c (day)	- (night)
4/ 6 SAT A	- (day)	- (night)
4/ 7 SUN A	- (day)	- (night)
4/ 8 MON A	machine_study (day)	machine_study (night)
4/ 9 TUE A	bonus_time (day)	bonus_time (night)
4/10 WED A	Yamanouchi_Pharm._c (day)	- (night)
4/11 THU A	Banyu_Pharm._c (day)	- (night)
4/12 FRI A	- (day)	- (night)
4/13 SAT A	- (day)	- (night)
4/14 SUN A	- (day)	- (night)
4/15 MON B	machine_study (day)	machine_study (night)
4/16 TUE B	bonus_time (day)	bonus_time (night)
4/17 WED B	Kyowa_Hakko_Kogyo_c (day)	- (night)
4/18 THU B	Fujisawa_Pharm._c (day)	- (night)
4/19 FRI B	- (day)	- (night)
4/20 SAT B	- (day)	- (night)
4/21 SUN B	- (day)	- (night)
4/22 MON A	machine_study (day)	machine_study (night)
4/23 TUE A	Banyu_Pharm._c (day)	- (night)
4/24 WED A	Banyu_Pharm._c (day)	- (night)
4/25 THU A	- (day)	- (night)
4/26 FRI A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
4/27 SAT A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
4/28 SUN A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
4/29 MON A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
4/30 TUE A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
5/ 1 WED A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
5/ 2 THU A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
5/ 3 FRI A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
5/ 4 SAT A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
5/ 5 SUN A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
5/ 6 MON A	NO_beam (day)	NO_beam (night)
5/ 7 TUE A	machine_study (day)	machine_study (night)
5/ 8 WED A	machine_study (day)	machine_study (night)
5/ 9 THU A	Camera_maintenance (day)	Camera_maintenance (night)
5/10 FRI A	Camera_maintenance (day)	Camera_maintenance (night)
5/11 SAT A	- (day)	- (night)
5/12 SUN A	- (day)	- (night)
5/13 MON B	machine_study (day)	machine_study (night)
5/14 TUE B	- (day)	- (night)
5/15 WED B	Fujisawa_Pharm._c (day)	- (night)
5/16 THU B	Yamanouchi_Pharm._c (day)	- (night)
5/17 FRI B	Daiichi_Pharm._c (day)	- (night)
5/18 SAT B	setting_test (day)	setting_test (night)
5/19 SUN B	setting_test (day)	setting_test (night)
5/20 MON A	machine_study (day)	machine_study (night)

表 1 . 平成 14 年度前期 B L 6 B ビームタイム使用状況 (続き)

5/21	TUE	A	bonus_time (day)	bonus_time (night)
5/22	WED	A	setting_test (day)	- (night)
5/23	THU	A	Banyu_Pharm._c (day)	- (night)
5/24	FRI	A	Eisai_Co._Ltd_c (day)	- (night)
5/25	SAT	A	- (day)	- (night)
5/26	SUN	A	- (day)	- (night)
5/27	MON	B	machine_study (day)	machine_study (night)
5/28	TUE	B	bonus_time (day)	bonus_time (night)
5/29	WED	B	- (day)	- (night)
5/30	THU	B	Yamanouchi_Pharm._c (day)	- (night)
5/31	FRI	B	Eisai_Co._Ltd_c (day)	- (night)
6/ 1	SAT	B	- (day)	- (night)
6/ 2	SUN	B	- (day)	- (night)
6/ 3	MON	A	machine_study (day)	machine_study (night)
6/ 4	TUE	A	bonus_time (day)	bonus_time (night)
6/ 5	WED	A	Mitsubishi_Chem._c (day)	Mitsubishi_Chem._c (night)
6/ 6	THU	A	Banyu_Pharm._c (day)	- (night)
6/ 7	FRI	A	Daiichi_Pharm._c (day)	- (night)
6/ 8	SAT	A	- (day)	- (night)
6/ 9	SUN	A	- (day)	- (night)
6/10	MON	A	machine_study (day)	machine_study (night)
6/11	TUE	A	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
6/12	WED	A	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
6/13	THU	A	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
6/14	FRI	A	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
6/15	SAT	A	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
6/16	SUN	A	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
6/17	MON	B	machine_study (day)	machine_study (night)
6/18	TUE	B	Eisai_Co._Ltd_c (day)	Tanaka_Nobutada_d (night)
6/19	WED	B	Yamanouchi_Pharm._c (day)	Sankyo_Co._Ltd_c (night)
6/20	THU	B	Banyu_Pharm._c (day)	Yamanouchi_Pharm._c (night)
6/21	FRI	B	Fujisawa_Pharm._c (day)	Liang_Dong-cai_b (night)
6/22	SAT	B	Liang_Dong-cai_b (day)	Liang_Dong-cai_b (night)
6/23	SUN	B	Chang_Wen-rui_b (day)	Chang_Wen-rui_b (night)
6/24	MON	A	machine_study (day)	machine_study (night)
6/25	TUE	A	bonus_time (day)	bonus_time (night)
6/26	WED	A	Kyowa_Hakko_Kogyo_c (day)	Chang_Wen-rui_b (night)
6/27	THU	A	Kyowa_Hakko_Kogyo_c (day)	Eisai_Co._Ltd_c (night)
6/28	FRI	A	Eisai_Co._Ltd_c (day)	Tsuge_Hideaki_d (night)
6/29	SAT	A	Sakabe_Noriyoshi_d (day)	Sakabe_Noriyoshi_d (night)
6/30	SUN	A	Konno_Michiko_d (day)	setting_test (night)

1) 可動状態

今期station checking sheetに書かれた故障やコメントを表 2 に示す。

表 2 今期発生した装置の問題点

月 日	装置名	エラーの種類
3月 9日	I P 5	バックセンサーエラー
5月 11日	I P 6	エラー(これ以上の記載無し)
5月 15日	R-AXIS	IP-真空エラー
5月 15日	低温吹付装置	途中で試料が白濁(ビームラインアシスタントに風除けのための覆いをつけて貰った、)
6月 26日	R-AXIS	イメージの上半分が真っ黒。
6月 27日	R-AXIS	Disturb

この他、コメントとして

5月 17日 Crystal Clear R-AXIS ±が逆と気付くのが遅れた。
Direct beam 測定し直したらY=1602.0でした。朝のアライメント後
測定しなおして見るのは如何でしょうか
上記の補足として:Crystal Clear 振動軸の設定変更、Utility-Header /
Database Editorでrotation vector を0 -1 0に変更

5月 30日 Crystal Clear用Dell、もう少しvirtual swapが欲しいです。
これに対する処置; R-AXIS ++制御専用pentium- を設置し、Dellは
データ処理専用にした。

今回購入したR-AXIS ++の状態が必ずしも良くなかったので、7月にコンピュータを除く全てをそっくり交換して頂いた。その後のテストではエラーは皆無である。

. S B S P 第 2 実験ステーション B L 6 C

1. モノクロメーター

波長の再現性のテストを行った。

一旦 = 8度に設定しその後下記の条件でSeのXAFS(吸収)自動測定を実行し、得られたグラフより目視により中点を求めた。

波長測定範囲 8.9 9.1 度、ステップ幅 0.0001度

3回測定し次の値を得た: 8.9935、8.994、8.994 度

平均すると 8.99383 ± 0.00024度

= 8.99383はresetにより変更できるのであまり意味がない。

重要なのは0.00024/8.99383 = 2.7 × 10⁻⁵ であり、この値はMAD法に使用できる十分な再現性があると言える。

但し、一旦 = 10度にした後、9.1 8.9度(前述とは逆の方向)にスキャンした場合には8.98775 ± 0.00025度である。両者の差は0.006度あり、これがこのモノクロメーターのラグに相当する。従って、波長設定はどちらか一方に決めておく必要がある。そこで今後増加方向にスキャンを行う事に決定した。

2. 消去部の補修

消去部のA-B(消去部 消去全部)間でIPカセットを移動する際エラーが出るようになって

た。原因はエアシャフト部のクロスローラーガイドを保持している台のネジが緩んでいたためであった。補修後エラーは全く出なくなった。

3. カメラ部 2 ラグ急増とその対策

6月19日測定中、急に反射が出なくなった。これはカメラの光軸がビームからずれた事によるものであった。最下部と2回転台間にダイヤルゲージを上流と下流2箇所に付け、IPカセットをカメラ部から出し入れしてビーム強度の変化を測定した結果2回転方向にラグが見付かった。これはカメラ部へ500kgもあるIPカセットを出し入れする際、2を制御するボールネジに大きな負荷が掛かりその部分のネジが緩んだためと思われる。ショックアブソーバーとして小型のエアシリンダーが付けてあるが、それだけでは未だ不十分であったのであろう。

カメラ部の重量は約4トン、しかもその最下部に近い場所にこの原因がある。ネジを締めるだけだが、上部についている3トン近い重量物を分解しないと修理できない。応急処置としてKEK金属工作室の舟橋義聖氏に2用レールを跨いだ鞍状の金具を作ってもらい、ショックを和らげるためにオートバイのタイヤを切って接触部に貼り付け、2を固定する事が出来た。このようなブレーキは今後も必要であるから、波長変更時以外は将来自動的にブレーキが掛かるように此处も自動化したい。また、念のため2以外の場所の動きも測定した結果、上下及び μ 回転の動きに異常は見付からなかった。最上部の並進機構に僅かな変動が見付かった。これはマグネチックチャックで固定する事が出来た。このような応急処置後、京大熊谷研の鈴木先生が調整して下さったGGTのSe誘導体結晶を用い、Cryo条件でMAD用に0.9794、0.940、0.97868、0.8856のデータを集める事が出来た。残念ながらこの結晶は双晶なので解析まではいたっていない。本格的な修理は本年9月に行う予定である。

4. 新記録に挑戦

ヒトリコンビナント2Znインシュリン結晶を105Kで測定し分解能0.75のデータ測定に成功した。これは良質結晶に恵まれた事もあるが、Galaxyが半径400mmの円筒形IPカセットで露光角を180度まで広げることができるよう設計されているためである。

測定条件は振動角 = 2 deg、振動速度 = 1.0deg/sec、N=30回 (120sec/frame)、スクリーン開き角 $4 = 180\text{deg}$ (2 frame/cassette)、測定範囲 288degである。overall completenessは92.1%、分解能0.77-0.75領域のcompletenessも83.5%である。accepted observationsは457,151 (full)、99,338 (partial)、でありrejected observationsは僅か1,235 (full)、897 (partial)であった。亦、average redundancyは5.65であり、独立な反射数は98,885であった。この条件でのR mergeは10.25%で内訳を見ると、9.94full、11.3partialである。1以上のデータではR merge=8.75%である。現在このデータを用いて亜鉛原子のd-電子が蛋白質結晶中でも観察できる事を証明するため構造の精密化を行っている。d-電子観察の可能性に付いてはブタ2亜鉛インスリン結晶を常温で測定した分解能1.2のデータを用いた解析により測定温度が常温から世界最初の発表(N.Sakabe, K.Sakabe and K.Sasaki, Method and applications in crystallographic computing, Oxford Univ. Press 273-285, 1984)が行われた。今回ブタ2Znインスリンからリコンビナントヒト2Znインシュリン結晶に変わったこと、及び測定温度がCryo条件に変わったことなどから、蛋白質の構造のみならず結晶中の溶媒や水等のパラメーターを精密に検討する必要がある。それには年のオーダーが必要であると思われるが、現在のところ異方性温度因子を用いた精密化でoverall Rは全データで22.6%、2以上のデータに対し11.3%、亦、R1(free)は16.85% (反射数4以上のデータ、反射数1526)である。本研究は名大環境学研究科の佐々木研究室と共同で行われている。

・コンピュータ関係

1. ネットワークとデータサーバの利用状況

ネットワークとサーバはトラブルもなく順調に稼働している。ビームタイムの始まる前にサーバの /home および /save 領域の整理を行った。/home については1ヶ月以前に作られたファイルは全て消去した。/save 領域については多量に使用しているユーザにemailを送り移動/消去を依頼した。ほとんどのユーザは自主的に不要なファイルを消去しておられるが、一部に多量の測定データを/saveに入れたままで消去せずに帰られる場合が見受けられるので注意して頂きたい。4月から7月の間にサーバに書き込まれた測定データの総量を図1に示す。

2. R-AXIS ++ データのサーバへの書き込み

5月からBL6BでR-AXIS ++ が利用できるようになった。この装置のコントロールはCOMPAQ DESKPRO、測定したデータはデータ処理用のコンピュータDELLのOPTIPLEX-GX150のDディスクにまず書き込まれる。そこでこのデータを直接データサーバの各自のディスク領域に書き込めるようにして欲しいとの要望が多くあった。そのため6月27日よりローカルハードディスクに保存していたデータを直接データサーバに書き込むように設定変更を行い運用を試みた。しかしその後問題は起こっていないので、10月からはこの運用形式を続けることを予定している。

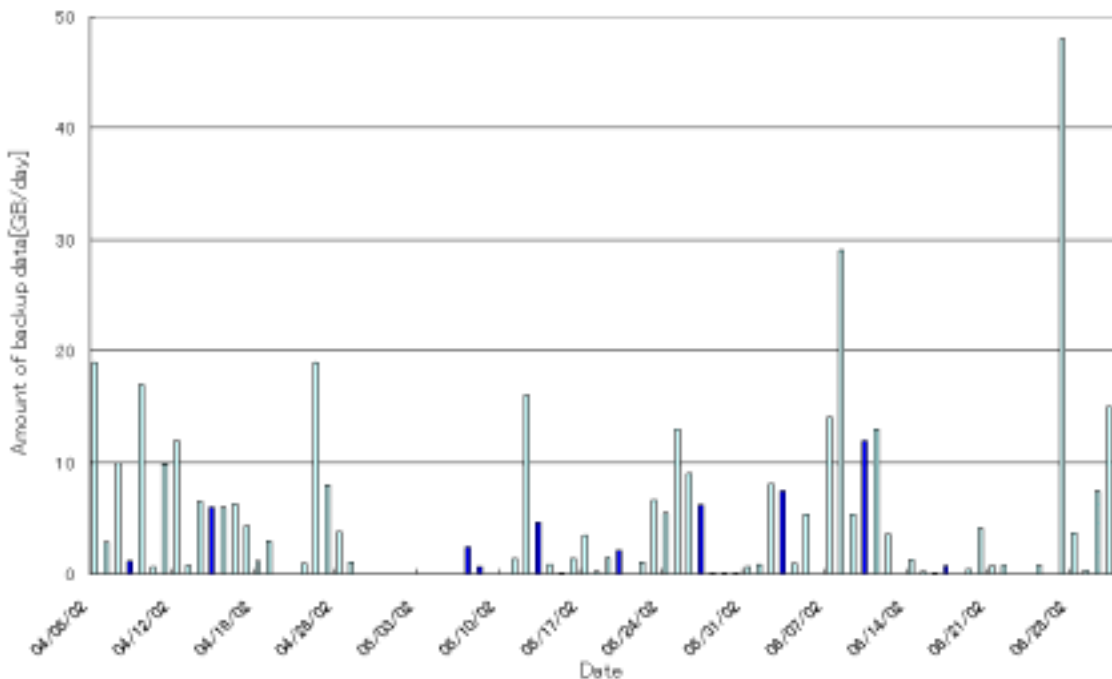


図1 . 4月～7月期におけるデータサーバ利用状況

・各種委員会報告

1. 運営委員会

BL6Cを今年度中期のビームタイムから公開するにあたり、メールによる運営委員会を開催し、以下の決定がなされた。

1) SBSP出資企業で且つ学振169委員会メンバー企業は、10月以降はBL6Bを含めて年5日即ち10コマの枠内でBL6C(Galaxy)も利用できる。

2) SBSPの出資企業を除く学振145委員会及び169委員会に属する企業は維持費として年間400万円を支払う事により、BL6Cを年間5日間(10コマ)使用することが出来る(BL6Bを使用することはできない)。

2. 行事委員会報告

BL6Bを自動化するために平成14年5月7日~9日にR-AXIS ++ が設置され、順調に稼動し、BL6CのGALAXYも立ち上げ実験も順調に進んだ段階で、BL6BとBL6C関連の講習会の希望についてアンケートを取り、その結果に基づき、講習会を6月4日(火)と6月5日(水)の両日に渡って開催した。

6月4日(火)はBL6B(R-AXIS ++)に関する講習で、午前中は理学電機㈱の三浦俊典氏による「波長変更(XAFS・アライメント)」, 午後は理学電機㈱の前山氏による「R-AXIS ++ によるデータ収集の手順と処理プログラムの使い方」であった。参加者は13名。

6月5日(水)はBL6C(GALAXY)に関する講習で、坂部知平氏によるGALAXYによるデータの収集(自動結晶軸立てを含む)の説明に引き続き、坂部知平氏と坂部貴和子氏によりワイセンベルグ法によるCitidine、及び振動法によるLysozyme結晶のデータ収集とそれに平行したデータ処理の実演がPROCESS-AUTOを実装化したGUIを主に使ってBL6Cにおいて行われた。この方法の導入により、ユーザーは構造因子を持ち帰ることができるようになった。参加者は9名。

3. 編集委員会

第21回編集委員会が2002年8月30日開催された。出席者は、幾田まり、栗原宏之、坂部貴和子、坂部知平、祥雲弘文、曾我部智(五十音順)の6名であった。

石川弘紀氏が配置換えのため編集委員長を辞任され、栗原宏之氏が編集委員長に決定された。

構造生物Vol. 8, No. 2の原稿最終チェックならびに印刷等のスケジュール確認が行われた。続いて、次号(Vol.8, No. 3)の内容についての検討が行われ、執筆をお願いする方々を決定した。

. 業績紹介

1. 伊藤秀一郎(三共)、畠 忠(三共)

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on a Fab fragment of the mouse anti-human Fas monoclonal antibody HFE7A

Acta. Cryst. **D57**, 1700-1702 (2001)

Shuichiro Ito, Tomoko Takayama, Hiroyuki Hanzawa, Kimihisa Ichikawa, Jun Ohsumi, Nobufusa Serizawa, Hideyuki Haruyama and Tadashi Hata

Biomedical Research Laboratories, Sankyo Co. Ltd. 1-2-58 Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140.8710, Japan

Summary

The Fas-Fas ligand system is involved in apoptosis. The mouse antihuman Fas monoclonal antibody HFE7A (m-HFE7A) has a potential use in human therapy against autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. Information on the three-dimensional structure is essential for antibody humanization. Crystals of an antigen-binding fragment (Fab) of m-HFE7A were obtained by the hanging-drop vapour-diffusion method using sodium citrate as a precipitant and 2-methyl-2,4-pentanediol as an additive. Fast optimization to produce single crystals suitable for X-ray analysis was achieved by the streakseeding technique. The crystals belong to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 43.4$, $b = 74.0$, $c = 133.8$. The crystals diffract at least to 2.5 resolution.

2 . 伊藤秀一郎 (三共)、畠 忠 (三共)

Crystal Structure of the Antigen-Binding Fragment of Apoptosis-Inducing Mouse Anti-Human Fas Monoclonal Antibody HFE7A

J.Biochem.131, 137-143 (2002)

Shuichiro Ito, Tomoko Takayama, Hiroyuki Hanzawa, Kimihisa Ichikawa, Jun Ohsumi, Nobufusa Serizawa, Tadashi Hata, and Hideyuki Haruyama

Biomedical Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., 140-8710

Summary

Binding of Fas ligand to Fas induces apoptosis. The Fas-Fas ligand system plays important roles in many biological processes, including the elimination of autoreactive lymphoid cells. The mouse anti-human Fas monoclonal antibody HFE7A (m-HFE7A), which induces apoptosis, has been humanized based on a structure predicted by homology modeling. A version of humanized HFE7A is currently under development for the treatment of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. For a deeper understanding of the protein engineering aspect of antibody humanization, for which information on the three-dimensional structure is essential, we determined the crystal structure of the m-HFE7A antigen-binding fragment (Fab) by X-ray crystallography at 2.5 resolution. The main-chain conformation of the five loops in the six complementarity-determining regions (CDRs) was correctly predicted with root-mean-square deviations of 0.30-1.04 based on a comparison of the crystal structure with the predicted structure. The CDRH3 conformation of the crystal structure, which was not classified as one of the canonical structures, was completely different from that of the predicted structure but adopted the conformation which followed the "H3-rules." The results of charge distribution analysis of the antigen-binding site suggest that electrostatic interactions may be important for its binding to Fas.

3 . 福山恵一 (阪大)

Atomic Resolution Structures of Oxidized [4Fe-4S] Ferredoxin from *Bacillus thermoproteolyticus* in Two Crystal Forms: Systematic Distortion of [4Fe-4S] Cluster in the Protein

J. Mol. Biol. 315. 1155-1166 (2002)

Keiichi Fukuyama, Toshihiro Okada, Yoshimitsu Kakuta and Yasuhiro Takahashi

Department of Biology Graduate School of Science Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka Osaka 560-0043, Japan

Summary

Diffraction data of two crystal forms (forms I and II) of [4Fe-4S] ferredoxin from *Bacillus thermoproteolyticus* have been collected to 0.92 and 1.00 resolutions, respectively, at 100 K using synchrotron radiation. Anisotropic temperature factors were introduced for all non-hydrogen atoms in the refinement with SHELX-97, in which stereochemical restraints were applied to the protein chain but not to the [Fe-4S] cluster. The final crystallographic R-factors are 9.8,% for 7.0-0.92 resolution data of the form I and 11.2% for the 13.3-1.0 Å resolution data of the form II. Many hydrogen atoms as well as multiple conformations for several side-chains have been identified. The present refinement has revised the conformations of several peptide bonds and side-chains assigned previously at 2.3 resolution; the largest correction was that the main-chain of Pro1 and the side-chain of Lys2 were changed by rotating the C-C bond of Lys2. Although the overall structures in the two crystal forms are very similar, conformational differences are observed in the two residues at the middle (Glu29 and Asp30) and the C-terminal residues, which have large temperature factors. The [4Fe-4S] cluster is a distorted cube with non-planar rhombic faces. Slight but significant compression of the four Fe-S bonds along one direction is observed in both crystal forms, and results in the D_{2d} symmetry of the cluster. The compressed direction of the cluster relative to the protein is conserved in the two crystal forms and consistent with that in one of the clusters in *Clostridium acidurici* ferredoxin.