

構造生物化学研究室

Structural Biochemistry Laboratory

主任研究員 前田 雄一郎

MAÉDA, Yuichiro

細胞において、アクチンフィラメントは様々な重要な機能を担う。これら機能はアクチンフィラメント中の分子の“動き”によって実現される。私たちはアクチンフィラメントは単なる“レール”や“骨格”ではなく、大きなあるいは微妙な形態変化をおこすことによって機能を発現する動的な構造であろうと考えている。我々はアクチンフィラメントの“静的”な原子構造を解明しながら、その言葉で“動態”を捉えるという、現代生物学の中心問題の1つに迫る。

本年度は3つの重要なアクチン結合蛋白質の結晶構造（トロポニン、CapZ、トロポモジュリン）を解明して発表した。今後の研究の中心的な課題は、第一に、より大きな複合体、特にアクチンフィラメント全体の結晶構造を解明すること、第二に、アクチンフィラメント上での蛋白質の動き（構造変化）を捉えることである。その準備として新しい材料や方法を開発することを重視しているが、本年度は、アクチンの大量発現系の確立、短く長さが揃ったアクチン・ミニフィラメントの調製法の検討、蛍光1分子方位測定法の開発などで進捗があった。

特に当研究室には藤澤哲郎前任研究員のグループが所属し、SPRING-8の蛋白質小角散乱ビームライン（BL45-XU）の運用とそれを使っての研究を担当している。本年度は、高静水圧下でのミオシン分子の構造変化の研究を進めると共に、高速混合型フローセルを使ってサブミリ秒の時間分解能でアポミオグロビンの折れ畳み過程の中間体を捉えることに成功した。

1. 筋（骨格筋・心筋）のカルシウム調節のメカニズムの研究

(1) トロポニン・トロポミオシン複合体の構造解析（武田，山下；前田（佳）^{*1}（細胞情報伝達研究室））

骨格筋および心筋は筋肉の細いフィラメント（アクチン・トロポニン（Tn）・トロポミオシン（Tm）複合体）に担われている。本年度はトロポニンの機能部分 Tn46k と Tn52k の構造解析を終了し、論文として発表した。収縮調節機構をさらに詳しく知るためには Tn/Tm 複合体の結晶構造が必要である。Tn と（Tn 結合領域を含む）短い Tm 断片との共結晶化が得られているが、解析に進むためには結晶の改良が必要であろう。

(2) 筋肉の細いフィラメント複合体の構造（成田^{*2}）

筋収縮のカルシウム調節のメカニズムとしてトロポミオシンの立体障害説が提唱されている。これは、トロポミオシンがアクチン上で動き、それによってアクチン上のミオシン結合部が覆われるとの説である。しかしトロポミオシンの位置移動の証拠はない。この問題に決着を付けるために、成田らはヘリックス対称性を前提としないで、細いフィラメントの電子顕微鏡写真を解析する方法を開発してきた。本研究ではこれを用いて細いフィラメントの構造を、カルシウム結合型と非結合型の双方について、20 Å 前後の分解能で解明することを目標としている。本年度は、使用する電子顕微鏡 JEM-3000 EFC について本プロジェクトに最適な条件を決めた。また、細いフィラメントの調製を終え、適当な撮影条件をほぼ決定した。

(3) トロポミオシンの柔軟性と機能（佐野）

トロポミオシン（Tm）は分子の全長にわたって平行な2本鎖の α -helical coiled-coil 構造を取る。Tm 分子は他の coiled-coil 分子より大いに柔軟であるので、その柔軟性が

筋肉の細いフィラメントのカルシウム調節にも重要な役割を果たしている可能性がある。特に、Tm の4番目のアクチン結合領域に柔軟な部分があり、これが機能的にも重要と考えられている。本研究では、それを検証するために、4番目のアクチン結合領域を固くしたウサギ骨格筋 α Tm の変異体を作出した。この変異により、分子の熱安定性は飛躍的に向上し、アクチン結合能は損なわれず、カルシウム調節能も保持することが分かった。これらの結果は、カルシウム調節能には、2本鎖構造の柔軟性は必須ではないことを示唆する。（福井大学工学部生物工学科 志鷹祐司氏、三木正雄氏との共同研究）

(4) 立体特異的モノクローン抗体を使ってのトロポミオシンの結晶化（前田（佳）^{*1}（細胞情報伝達研究室））

トロポミオシン（Tm）の原子座標を得るために結晶を調製する必要があるが、原子座標解明に適した結晶は未だ得られていない。本研究では Tm の立体構造を認識する抗体を得て、この抗体の Fv 断片と Tm の共結晶を得ることを目標としている。強い抗原性を示すロブスター Tm を材料に選び、これまで立体特異的なモノクローナル抗体を発現しているハイブリドーマ細胞を7つ得た。（マックスプランク生物物理学研究所の Dr. Carola Hunte と Prof. Hartmut Michel からの技術支援を受けている）

(5) トロポニン C の構造変化（松本^{*1}，牧野^{*1}；前田（佳）^{*1}（細胞情報伝達研究室））

細いフィラメント複合体中でのトロポニン C（TnC）の構造変化を知るために、中性子散乱法を用いた解析を進めている。この方法では、TnC の選択的重水素化とコントラスト変調法を組み合わせ、TnC の構造情報のみを抽出する。昨年度までに重水素化 TnC の調製などの方法を確立した。本年度の解析から、カルシウムの結合によって、細

いフィラメント中の TnC はその分子の形（慣性半径）は変化せず、位置はフィラメント軸により近くなることが判明した。また同様の方法を使って細いフィラメント複合体中でのトロポニン I (TnI) の構造変化を知るために、重水素化 TnI の調製とフィラメントへの交換導入を検討している。（原子力研究所先端基礎研究センター 藤原悟氏との共同研究）

2. アクチンフィラメントの原子モデルの構築と動態の解明

(1) アクチンフィラメントの原子構造からフィラメントの運動モードの解析（小田）

昨年度までの研究で、まずアクチンフィラメントをガラス細管中に高濃度・高配向度に配向させたゾルのシステムを確立した。次にそのゾルからの X 線繊維回折強度と氷包埋したフィラメントの電顕写真からの位相を総合して、現在の技術で到達可能な最良のアクチンフィラメントの原子モデルを確立した。本年度は、この原子モデルを基に、フィラメントの熱揺動の基準モード分解を実行した。最適な近似法などの検討を行っている。

(2) 昆虫細胞を用いた高効率アクチン発現系の構築（岩佐^{*1}；前田（佳）^{*1}（細胞情報伝達研究室））

アクチンフィラメントの構造変化と機能発現の関係を深く理解するためには、アクチンを組換え蛋白質として大量に得ることが不可欠である。本研究は、世界のどこでも成功していない、高等生物のアクチンを構造生物学研究に十分な量を発現することを目標にしている。我々が発見したロブスター・トロポミオシン由来の発現促進因子（L21）を挿入することにより、昆虫細胞を用いた系で、組換えアクチン発現量の飛躍的増大を確認した。現在は、タグを用いての精製方法の確立と機能確認を行っている。

3. 短く長さの揃ったアクチンフィラメントの構築原理と構造の解明

(1) アクチンフィラメント・キャッピング蛋白質 CapZ の結晶構造解析（山下；前田（佳）^{*1}（細胞情報伝達研究室））

アクチンフィラメントは細胞内のオルガネラ輸送など多くの機能に関与するが、最近の研究で、“骨格”や“レール”のような静的な構造ではなく、絶えず形成と崩壊を繰り返す動的な構造であることが分かってきた。CapZ はその“アクチン・ダイナミクス”の中で最も重要な蛋白質の 1 つである。我々が昨年度に得た CapZ 結晶構造中には重要なアクチン結合部（ β サブユニットの C 端部分）の電子密度を確認できなかった。本年度は、酸性溶液に浸漬した結晶を用いて、この部分が両親媒性の α ヘリックス構造であることを解明した。ヘリックスの疎水性側面の残基はアイソマー間で保存され、ヘリックスの親水性側面の残基はアイソマー特異的であることから、1 つのヘリックスの一面がアクチン結合に、反対側が細胞内での局在決定に使われると提唱した。

(2) CapZ のアクチンフィラメント・キャッピング機構の研究（成田^{*2}）

アクチン-CapZ 複合体、つまりアクチンフィラメントの一端に CapZ が結合した構造について電子顕微鏡単粒子解析の方法を用いての解析を進めている。

(3) ダイナクチン複合体を構成する Arp1 ミニフィラメントの構造解析（瀧^{*1}，成田^{*2}）

ダイナクチン複合体の中核にはアクチン様蛋白質（Arp1）のミニ・フィラメントがある。これは自然界に存在する“長さの揃ったミニ・フィラメント”である。本研究ではミニ・フィラメントの構築原理を解明するために、ダイナクチン複合体の電子顕微鏡単粒子解析を行っている。ダイナクチンは、酵母からヒトに至るまで広く存在し、微小管上をダイニンに結合してゴルジ小胞や染色体を運搬する巨大複合体（11 種の蛋白質からなり、分子量は約 1 MDa）である。現在までに、ウシおよびブタの脳からダイナクチン複合体を分離精製する方法の改良、負染色法の最適化、単粒子解析法の解析戦略の決定をほぼ終えた。また、Arp1 ミニフィラメントのらせん対称性が、アクチンフィラメントとほぼ同一であることが判った。（米国 ジョンズ・ホプキンス大学 Prof. T. Schroer との共同研究）

(4) 短いアクチンフィラメントの調製（似内^{*1}）

これまでに、B 端キャッピング蛋白質である CapZ とアクチンを共存させることにより、数周期程度の短いアクチンフィラメントを調製できること、電子顕微鏡負染色法を使って短いアクチンフィラメントのおおよその長さを比較的容易に区別できることを確認した。現在の問題は、どのような方法で長さを揃えられるかである。トロポミオシン等の使用を検討している。

(5) アクチンとアクチン結合ペプチドの複合体の構造化学的研究（似内^{*1}）

アクチンとアクチンに結合し得る蛋白質との複合体構造を原子レベルで検討するため、(i) アクチン結合蛋白質から、相互作用部位と考えられるペプチドフラグメントを調製し、(ii) このフラグメントとアクチンとの相互作用を調べ、(iii) このフラグメントとアクチンの複合体結晶を調製することを試みている。

4. 新しい方法の開発、その他

(1) 全反射蛍光 1 分子方位計測顕微法の開発（山本，Popp^{*1}；岡本（ナノフォトニクス研究室））

全反射蛍光顕微鏡（TIRFM）を使った 1 分子イメージングシステムを構築した。ポリマー薄膜中にドーブした蛍光分子の放射パターンと、理論にもとづいて計算機によるシミュレーションにより得られた放射強度分布を比較することにより蛍光 1 分子の三次元方位を決定できることを示した。

(2) アクチンフィラメント上の蛋白質分子の方位決定法の開発（Popp^{*1}，山本）

アクチンフィラメントに結合するトロポニンはカルシウムイオン受容蛋白質であり、カルシウム結合のシグナルはアクチンフィラメント全体を“活性化”し、筋収縮を開始する。我々が解明したトロポニンの結晶構造は、トロポニンがヘリックスの固まりであることを示しており、また多くのヘリックスの方向はカルシウム結合により大きく変化すると推察される。ヘリックスの方向変化を直接観測するため蛍光単分子方位計測顕微法を開発している。この測定法のために、以下の条件を満たす実験系を構築した。(i) 蛋白質分子自体は熱揺動しているのに、機能を損なわない範囲で熱揺動を最小に抑えること、(ii) 基準方向（フィラメ

ント軸の方向)を同定できること,(iii)視野中の蛍光単分子が重ならない低密度を実現すること。アクチンフィラメントを脂質単分子膜上に支持することでこれら条件を満たすことができた。

(3) 平滑筋ミオシンの構造変化(弟子丸^{*1})

平滑筋(血管・消化器官など)の調節はミオシン制御軽鎖のリン酸化による。リン酸化によってミオシン分子が折り置かれたコンパクトな形態から伸長した形態へ遷移し、アクチン・ミオシンの ATP 加水分解が活性化する。この形態変化と活性化の関係をj知るために、ミオシン分子の全体の形態と、ミオシン分子中の制御軽鎖の形態を別々に知る必要がある。中性子溶液散乱法を使ってこの目標を実現するために、本年度は重水素化した制御軽鎖を交換導入した平滑筋ミオシンを調製した。現在、交換導入条件の最適化を検討している。(原子力研究所先端基礎研究センター 藤原悟氏; 創価大学 丸田晋策氏; 大阪大学大学院基礎工学研究科 若林克三氏; 大阪大学大学院理学研究科 荒田敏昭氏との共同研究)

(4) ホタテ貝ミオシンのアクチンフィラメントとの相互作用(Popp^{*1})

ホタテ貝ミオシンはミオシン自体へのカルシウム結合によって調節される点で、調節機構の無い哺乳類骨格筋ミオシンと大きく異なる。調節メカニズムが異なっても収縮メカニズムは共通と考えられるので、比較研究の対象としてホタテ貝ミオシンはよく研究され、結晶構造も解明されている。本研究では、播磨で入手できるホタテ貝から純度の高いミオシン S1 断片を得た。その S1 とアクチンフィラメントの複合体から保存のよい電子顕微鏡負染色像を撮影した。今後、X 線回折とクライオ電子顕微鏡を併用して、アクチンフィラメント上でのホタテ貝 S1 の形態を解明する。(ドイツ ハイデルベルグ マックスプランク医科学研究所 Dr. R. Schröder との共同研究)

5. 大型放射光施設を利用した生体高分子溶液および筋肉中での蛋白質の構造研究

(1) 理研ビームライン I (BL45-XU) の高度化(藤澤, 飯塚^{*3}, 秋山^{*4})

使用波長の変更(1.0 Å から 0.9 Å へ)に伴う小角分解能の低下に対応するため 3.6 m カメラを設置した。これにより、小角分解能 1/140 nm を確保した。また、高精度高速型 CCD の採用などによって放射線損傷を軽減した。

(2) 高圧下での蛋白質相互作用研究システムの構築と筋蛋白質への応用(桑本^{*2}, 秋山^{*4}, 藤澤)

5,000 bar まで昇圧可能な X 線小角散乱用高圧ジャンプ装置を使用して、骨格筋 HMM の圧力応答を観察した。この試料は、会合体を形成しやすく、ビーム損傷を受けやすい。これらの問題をクリアするために、測定条件・溶媒条件の最適化を行った。こうして 2,000 ~ 3,000 bar の間での散乱曲線の変化を観察した。(室蘭工大大学院工学研究科 岡本洋氏との共同研究)

(3) 生きた哺乳類および両生類骨格筋からの静的・動的 X 線回折(岩本^{*4}, 藤澤)

収縮中の筋ではアクチン・ミオシンの相互作用に、Rigor 様の(立体特異的な)結合と、非立体特異的結合があると考えられる。これまでのカエル筋の X 線回折研究からは

Rigor 様の結合を示す証拠は得られていない。今回はマウス横隔膜筋を使用した。マウス筋の結果からは低次層線強度の微妙な上昇が測定され、立体特異的結合の存在を示した。この強度変化が収縮の早い時期に起きることから、ATP 消耗によってではなく、一般的な収縮過程に伴うことも明らかである。しかし 6 次層線の大きな強度変化を考慮すると、立体特異的結合は無視できないとしても、骨格筋の力の大半は非立体特異的アクトミオシン複合体に由来すると考えられる。(高輝度光科学財団 八木直人氏, 若山純一氏との共同研究)

(4) CO 結合に伴う CooA の構造変化(秋山^{*4}, 藤澤)

Rhodospirillum rubrum は嫌気的条件下において、一酸化炭素分子(CO)を酸化してエネルギーを得る。CO の酸化反応に関わる酵素群の発現量は転写レベルで調整されており、ヘム蛋白質である CooA がその転写調節因子の 1 つとして働く。CO がヘム鉄に配位すると、CooA の構造が DNA 非結合型から DNA 結合型へと大きく変化すると考えられている。しかし、CO 結合に伴う構造変化の規模や場所を実験的に特定した研究例は少なく、CooA の転写調節メカニズムは十分に理解されていない。この問題に取り組むため、我々は X 線小角散乱法を用いて DNA 非結合型と DNA 結合型の散乱パターンを測定した。得られた散乱曲線から低分解能電子密度像を計算し、CO 結合により誘起される構造変化を推定した。(京都大学大学院工学研究科 石森浩一郎氏との共同研究)

(5) croEL の溶液中の構造(藤澤; 磯貝(生体物理化学研究室))

DNA 結合蛋白質 croEL は 66 残基の単量体が二量体を形成して DNA に結合する。結晶構造解析では C 末端 5 残基が揺らいでいるために原子座標が未確定である。X 線小角散乱測定と Rigid body refinement の結果、結晶中の分子の形を多少湾曲させると溶液中の分子の形に一致することが分かった。C 末端 5 残基の位置と形態を推測することはできなかった。

(6) 時分割溶液散乱によるアポミオグロビンの折れ畳み過程の研究(鷲沢^{*5}, 木村^{*5}, 高橋^{*4}, 秋山^{*4}, 藤澤)

酸性条件下(pH2.2)で変性させたアポミオグロビン(apoMb)は、溶媒条件を中性付近(pH 6.0)に戻すと天然状態構造へと自発的に折れ畳む。この際、apoMb が幾つかの折れ畳み中間体を經由しながら徐々にコンパクト化し、三次構造を構築していくことが示唆されている。しかし、apoMb の折れ畳み初期過程はストップ・フローで追跡できないほど速いため(< ms), 速度論的研究から得られた中間体に関する知識はこれまで限られていた。我々は、高速混合型フローセルと X 線小角散乱法を用いることで、折れ畳み反応開始後 300 マイクロ秒からの回転半径の時間変化を調べた。その結果、分子の大きさや形の良く似た中間体が少なくとも 3 つ存在することが示唆された。その中でも最初の中間体(約 200 マイクロ秒程度の時定数で消失する短寿命の中間体)の存在を初めて明らかにした。

(7) X 線小角散乱法による Pex19 低分解能分子構造の推定(秋山^{*4}, 藤澤; 柴田(速度論的結晶学研究チーム))

動的散乱光にて単分散に近い状態まで精製された蛋白質でも、良質の結晶を生じにくい事例がある。このような蛋白質の 1 つである Pex19p の三次元構造を知るため X 線小

角散乱強度分布を得て，“*ab initio* 解析法”で分子の形を知る研究を始めた。本年度は予備実験を行った。

(8) 生分解性プラスチックフィルムの結晶核形成および結晶相転移機構の初期過程の構造学的研究(岩田, 藤田, 藤澤; 青柳(高分子化学研究室))

生分解性プラスチックフィルムの引っ張り過程と, らせん構造の変化を X 線回折の時間変化により計測する予備実験を行った。その結果 37 msec 間隔で良好な回折像を得ることができた。

*1 基礎科学特別研究員, *2 協力研究員, *3 テクニカルスタッフ, *4 共同研究員, *5 研修生

In living cells, the actin filament plays a wide spectrum of important roles through various modes of molecular motions, or structural changes. Therefore, the actin filament should not be regarded as a stable and passive rail or a scaffold, but as a dynamic structure. Each mode of motion may be enhanced or suppressed by an actin binding protein. We are interested in knowing the structure and dynamics of filamentous protein aggregates consisting of actin and actin binding proteins. We aim at, on one hand, elucidating the “static” atomic structures of the complexes and, on the other, understanding the dynamic properties of the filamentous complexes based on the atomic structures, which is one of the central questions the modern biology is addressing. This year, we have published the crystal structures of tropomodulin, CapZ and troponin. We have also prepared for further studies of the mechanisms in the area given below.

1. Mechanism of calcium regulation and muscle contraction in skeletal and cardiac muscle

The crystal structure of troponin (the core domain), which plays the central role of the calcium regulation of muscle contraction, has suggested that the conformational changes of troponin (Tn) should alter the strain imposed on the tropomyosin (Tm) strands that may be flexible. In order to understand the role played by Tm, we need the crystal structure of Tm. This year we have obtained 7 hybridoma that produce stereo-specific antibodies against lobster Tm, which will be used for co-crystallization with Tm. We have also prepared Tm variants in which the flexible middle segment of the molecule, therefore the entire molecule, is less flexible. Our preliminary results have denied that the substantial changes cause major impairment of the calcium regulation. The single particle analysis methods have been developed and applied to cryo-EM images of the actin/Tm/Tn complex, which will hopefully enable us to know structural changes of the complex by the Ca^{2+} binding. The neutron scattering in combination with the contrast variation method have indicated that, upon binding of Ca^{2+} to Tn, troponin C (TnC) within the actin/Tm/Tn complex does not change the shape of TnC but moves it closer to the filament axis.

2. Atomic structure and dynamic properties of the actin filament

We have previously established the method for orienting F-actin (polymerized actin) in a glass capillary at a high density. Combining the X-ray diffraction intensities from the sols with the phase information from the cryo-EM picture of F-actin, we have obtained an electron density

map of F-actin at 20 Å resolution. Based on this density map and the atomic coordinates of the monomeric actin, we have obtained an improved atomic model of F-actin. Based on the atomic model, we are now undertaking computer simulations of molecular motions by use of the normal modes analysis. On the other hand, we are establishing an expression system of vertebrate actin for the first time. By producing an actin variant that has a particular mode of motion suppressed (or enhanced), we would be able to prove the motion-function relationship.

3. Short actin filaments of a specific length; understanding the design principles and elucidation of the atomic structure

The above described atomic model of F-actin, though it is the best at present, does not tell us details of the inter-monomer interactions, which are of crucial importance to know the functions. Therefore, the crystal structure of the actin filament is essential. In order to crystallize the actin filament, mini-actin filaments of a specific length are to be prepared. On one hand, we want to learn the design concept from the naturally occurring mini-filaments, and on the other we want to assemble artificial mini-filaments by ourselves. This year, we have established the methods for single particle analysis of the dynactin complex, the core of which consists of the mini-filament of actin related protein (Arp1). We have made some progress in preparing actin mini-filaments from actin and CapZ (the B-end capping). We are now testing if Tm limits the length of the mini-filament. In our efforts to understand the mechanism of actin filament end-capping by CapZ, this year the crystal structure including the amphiphilic α -helix at the C-terminus of the β -subunit, which is one of the two actin binding sites, has been elucidated.

4. Establishing new methods for studying motions of large protein complexes

In our efforts to establishing the new optical microscopy, we have completed an optical system and a method for preparing oriented actin filaments, which enable us to determine the 3D direction of a single fluorophore attached on an actin filament.

5. Structural studies on protein solutions using synchrotron small-angle X-ray scattering

In our lab, the team led by Dr. Tetsuro Fujisawa is in charge of up-grading the SPring-8 beam line BL45XU (for the small angle diffraction) and interacting with outside users of the beam-line. As an in-house project, we have been constructing an experimental apparatus for measuring protein conformations under high hydrostatic pressure. This year, we have optimized the methods for protein preparation and measurement to be applied to the study of proteolytic fragment of myosin, HMM. In collaboration with visiting groups, we have succeeded, among others, in capturing a folding intermediate of a short life-time (200 μsec) by using the previously developed high speed mixing flow-cell for SAXS.

Research Subjects and Members of Structural Biochemistry Laboratory

1. Mechanism of calcium regulation and muscle contraction in skeletal and cardiac muscle

2. Atomic structure and dynamic properties of the actin filament
3. Short actin filaments of a specific length; understanding the design principles and elucidation of the atomic structure
4. Establishing new methods for studying motions of large protein complexes
5. Structural studies on protein solutions using synchrotron small-angle X-ray scattering

Head

Dr. Yuichiro MAÉDA

Members

Dr. Tetsuro FUJISAWA
 Dr. Toshiro ODA
 Dr. Soichi TAKEDA
 Dr. Atsuko YAMASHITA
 Dr. Ken-Ichi SANO
 Mr. Akihiro YAMAMOTO
 Dr. Akihiro NARITA^{*1}
 Dr. Shungo DESHIMARU^{*2}
 Dr. Yasushi NITANAI^{*2}
 Dr. David POPP^{*2}
 Dr. Keiko TAKI^{*2}
 Mr. Mitsusada IWASA^{*2}
 Mr. Shigeo KUWAMOTO^{*2}
 Mr. Kouji MAKINO^{*2}
 Ms. Fumiko MATSUMOTO^{*2}
 Ms. Evgenia SHTYKOVA^{*2}
 Mr. Takumi TAMURA^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

Technical Staff

Mr. Tadasu IIZUKA

Assistants

Ms. Sachiko TAMASHIMA
 Mr. Syogo TAKEUCHI
 Ms. Junko NAKAMURA

in collaboration with

Mr. Yoshihiro AOYAGI (Polymer Chemistry Lab.)
 Dr. Masahiro FUJITA (Polymer Chemistry Lab.)
 Dr. Hiroyuki SHIBATA (Kinetic Crystallography Research Team)
 Dr. Yasuhiro ISOGAI (Biophysical Chemistry Lab.)
 Dr. Tadahisa IWATA (Polymer Chemistry Lab.)
 Dr. Kayo MAEDA (Cellular Signaling Lab.)
 Dr. Takayuki OKAMOTO (Nanophotonics Lab.)

Visiting Members

Dr. Shuji AKIYAMA (Sch. Technol., Kyoto Univ.)

Dr. Satoru FUJIWARA (JAERI)
 Dr. Hiroyuki IWAMOTO (JASRI)
 Dr. Takyoshi MATSUBARA (Natl. Inst. Card. Vasc. Res.)
 Ms. Shiho MINAKATA (Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)
 Dr. Satoshi TAKAHASHI (Sch. Technol., Kyoto Univ.)
 Dr. Yojiro TAMURA (Suzuka Natl. Coll. Technol.)

Trainees

Mr. Tetsunari KIMURA (Sch. Technol., Kyoto Univ.)
 Mr. Yoshikazu TAKAHASHI (Toray Res. Cen.)
 Mr. Takanori UZAWA (Sch. Technol., Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑 誌]

(原 著 論 文) * 印は査読制度がある論文

Tanaka M., Machida Y., Nishikawa Y., Akagi T., Morishima I., Hashikawa T., Fujisawa T., and Nukina N.: "The effects of aggregation-inducing motifs on amyloid formation of model proteins related to neurodegenerative diseases", *Biochemistry* **41**, 10277–10286 (2002). *

Krieger I., Kostyukuva A., Yamashita A., Nitana Y., and Maéda Y.: "Crystal structure of the C-terminal half of tropomodulin and structural basis of actin filament pointed-end capping", *Biophys. J.* **83**, 2716–2725 (2002). *

Iwamoto H., Nishikawa Y., Wakayama J., and Fujisawa T.: "Direct X-ray observation of a single hexagonal myofibril lattice in native myofibrils of striated muscle", *Biophys. J.* **83**, 1074–1081 (2002). *

Sano K., Maeda K., Oki M., and Maéda Y.: "Enhancement of protein expression in insect cells by a lobster tropomyosin cDNA leader sequence", *FEBS Lett.* **532**, 143–146 (2002). *

Kuwahara H., Yamasaki T., Hatakeyama T., Aoyagi H., and Fujisawa T.: "Oligomerization process of the hemolytic lectin CEL-III purified from a sea cucumber, *Cucumaria echinata*", *J. Biochem.* **131**, 751–756 (2002). *

Kimura C., Maeda K., Maéda Y., and Miki M.: "Ca²⁺- and S1-induced movement of troponin T on reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence energy transfer spectroscopy", *J. Biochem.* **132**, 93–102 (2002). *

Iwamoto H., Oiwa K., Suzuki T., and Fujisawa T.: "States of thin filament regulatory proteins as revealed by combined cross-linking/X-ray diffraction techniques", *J. Mol. Biol.* **317**, 707–720 (2002). *

Furukawa Y., Imada K., Vonderviszt F., Matsunami H., Sano K., Kutsukake K., and Namba K.: "Interactions between bacterial flagellar axial proteins in their monomeric state in solution", *J. Mol. Biol.* **318**, 889–900 (2002). *

Yamamoto A. and Yamaguchi I.: “Profilometry of sloped plane surfaces by wavelength scanning interferometry”, *Opt. Rev.* **9**, 112–121 (2002). *

Yamashita A., Maeda K., and Maéda Y.: “Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping”, *EMBO J.* **22**, 1529–1538 (2003). *

(総説)

藤澤哲郎: “第3世代放射光を用いた時分割 X 線小角散乱実験”, *生物物理* **43**, 29–32 (2003).

[単行本・Proc.]

(総説)

Fujisawa T. and Kato M.: “The small angle X-ray scattering from proteins under pressure”, *Biological Systems Under Extreme Conditions: Structure and Function*, edited by Taguchi Y., Stanley H. E., and Ludwig H., Springer, Heidelberg, pp. 121–138 (2002).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Akiyama S., Takahashi S., Kimura T., Ishimori K., Morishima I., Nishikawa Y., and Fujisawa T.: “Conformational landscape of cytochrome *c* folding explored by microsecond-resolved small-angle X-ray scattering & circular dichroism techniques”, 4th Int. Conf. on Biological Physics (ICBP 2001), (International Union of Pure and Applied Physics), Kyoto, July–Aug. (2001).

Fujisawa T.: “Comparison of indirect transformation methods”, EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecules, Hamburg, Germany, Sept. (2001).

Fujisawa T.: “Comparison of *ab initio* methods”, EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecules, Hamburg, Germany, Sept. (2001).

Takeda S., Yamashita A., Maeda K., and Maéda Y.: “Crystal structure of troponin ternary complex”, RIKEN Symp. of Int. Workshop on Actin filament: from Structure to Mechanism, Harima, Nov. (2001).

Fujisawa T.: “The application of hydrostatic pressure to protein solutions by using synchrotron small-angle X-ray scattering technique”, RIKEN Symp. of Int. Workshop on Actin filament: from Structure to Mechanism, Harima, Nov. (2001).

Takahashi S., Akiyama S., Ishimori K., Morishima I., Nishikawa Y., and Fujisawa T.: “Stepwise folding dynamics of cytochrome *c* observed using microsecond-resolved circular dichroism and X-ray scattering techniques”, Gordon Research Conf. on Protein Folding Dynamics, Ventura, USA, Jan. (2002).

Takahashi S., Akiyama S., Uzawa T., Kimura T., Ishimori K., Morishima I., Nishikawa Y., and Fujisawa T.: “Stepwise folding dynamics of globular proteins observed using microsecond-resolved circular dichroism and X-ray scattering techniques”, Workshop on Folding, Function and Funnels, (US-Japan Cooperative Science Program), Hawaii, USA, Jan. (2002).

Iwamoto H., Oiwa K., Wakayama J., and Fujisawa T.: “X-ray diffraction pattern recorded from acto-smooth muscle myosin subfragment-1 complex after removal or exchange of light chains”, 46th Ann. Meet. of Biophysical Soc., San Francisco, USA, Feb. (2002).

Maéda Y., Takeda S., Yamashita A., and Maeda K.: “How we can understand the mechanism expressed by the actin filament, being based on the atomic structure of the actin filament complex”, Biophysical Society Discussions, Asilomar, USA, Apr. (2002).

Tanaka M., Machida Y., Nishikawa Y., Akagi T., Morishima I., Hashikawa T., Fujisawa T., and Nukina N.: “Structural and biochemical properties of aggregation-inducing motifs in chimera myoglobins as a model for neurodegenerative diseases”, Cold Spring Harbor Laboratory 2002 Meet. on Molecular Chaperones & the Heat Shock Response, Cold Spring Harbor, USA, May (2002).

Takeda S., Yamashita A., Maeda K., and Maéda Y.: “Molecular switches in troponin complex”, Gordon Research Conf. on Muscle: Contractile Proteins, New London, USA, June (2002).

Watanabe Y., Inoue K., Miura K., Fujisawa T., and Inoko Y.: “A solution X-ray scattering study on the renatured dimer of a membrane protein Porin”, 12th Int. Conf. of Small-Angle Scattering, (International Union of Crystallography), Venice, Italy, Aug. (2002).

Fujisawa T., Nishikawa Y., Yamasaki H., and Inoko Y.: “Evaluation and improvements of Rigaku imaging plate reader (R-AXIS IV++) for the use of synchrotron small-angle X-ray scattering”, 12th Int. Conf. of Small-Angle Scattering, (International Union of Crystallography), Venice, Italy, Aug. (2002).

Takahashi Y., Nishikawa Y., and Fujisawa T.: “The evaluation of three algorithms for *ab initio* determination of three-dimensional”, 12th Int. Conf. of Small-Angle Scattering, (International Union of Crystallography), Venice, Italy, Aug. (2002).

Fujisawa T., Inoue K., and Yagi N.: “Time-resolved visualization of the tertiary structural changes during unfolding reactions using third-generation synchrotron X-ray scattering”, 12th Int. Conf. of Small-Angle Scattering, (International Union of Crystallography), Venice, Italy, Aug. (2002).

Kuwamoto S., Fujisawa T., Nishikawa Y., Maéda Y., and Okamoto Y.: “Pressure response of myosin molecule in solution”, 12th Int. Conf. of Small-Angle Scattering, (International Union of Crystallography), Venice, Italy, Aug.–Aug. (2002).

Maéda Y.: “The actin filament: from static structure to dynamic properties”, Joint Conf. of 8th Keihanna Int. Conf. on Molecular Biophysics and ERATO Symp., (JST), Kyoto, Sept. (2002).

Maéda Y.: “The actin filament: from static structure to dynamic properties”, Motor Protein Meet., (Max-Planck

- Institut fuer Medizinische Forschung), Berlin, Germany, Nov. (2002).
- Yamashita A., Maeda K., and Maéda Y.: "Structural basis for actin filament capping and targeting by CapZ", Biophysical Soc. 47th Ann. Meet., San Antonio, USA, Mar. (2003).
- (国内会議)
- 藤澤哲郎, 西川幸宏: "BL45-SAXS (理研ビームライン I) で開発した溶液散乱用解析ソフトウェア群", SPring-8 研修会「小角散乱実験研修会」, (JASRI), 播磨, 6月(2001).
- 西川幸宏, 藤澤哲郎: "BL45XU 小角ビームラインの現状", 第5回 SPring-8 シンポジウム, (JASRI), 播磨, 10月(2001).
- 高橋聡, 秋山修志, 鶴澤尊規, 木村哲就, 石森浩一郎, 森島績, 西川幸宏, 藤澤哲郎: "Stepwise folding dynamics of globular proteins observed using microsecond-resolved circular dichroism and x-ray scattering techniques", 文科省科研費補助金基盤研究(C) 公開シンポジウム「蛋白質フォールディング研究の現状と将来」, 東京, 12月(2001).
- 岩本裕之, 西川幸宏, 若山純一, 藤澤哲郎: "単一筋原繊維からの X 線回折", 2002 年生体運動研究合同班会議, 千葉, 1月(2002).
- 大岩和弘, Burgess S., Walker M., Trinick J., 藤澤哲郎, 岩本裕之, 中森鈴奈, 榊原斉: "単粒子解析法および X 線溶液散乱法によるクラミドモナス鞭毛内腕ダイニン亜種 c の分子構造", 2002 年生体運動研究合同班会議, 千葉, 1月(2002).
- 田中元雅, 町田陽子, 西川幸宏, 藤澤哲郎, 貫名信行: "X 線小角散乱によるポリグルタミン病モデル蛋白質の凝集体形成機構の解明", 理研シンポジウム「構造生物学 (VII)」, 播磨, 3月(2002).
- 藤澤哲郎: "応用講座 4「溶液散乱」", SPring-8 夏の学校 2002, (JASRI, 姫路工業大学大学院理学研究科), 播磨, 7月(2002).
- 前田雄一郎, 牧野浩司, 難波啓一, Schroeder R. R., Heiko S., 長谷川和也, 小田俊郎: "アクチンフィラメントのモデリング", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 山下敦子, 前田佳代, 前田雄一郎: "アクチンフィラメントキャッピングタンパク質 CapZ の結晶構造とアクチン結合機構", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 松藤智洋, 神保雄次, 和泉義信, 能野秀典, 藤澤哲郎: "ストップフロー小角散乱によるカルモジュリンの標的分子認識機構解明", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 瀧景子, 成田哲博, 前田雄一郎: "ダイナクチン複合体を構成する Arp1 ミニフィラメントの構造解析", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 佐野健一, 志鷹裕司, 三木正雄, 前田雄一郎: "トロポミオシンの柔軟性と機能", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 大岩和弘, Stan A., Matt L., Peter J., John T., 藤澤哲郎, 岩本裕之, 榊原斉: "異なるヌクレオチド状態における鞭毛軸糸ダイニンの分子構造", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 藤澤哲郎, Shtykova E., 桑本滋生, 西川幸宏: "高圧電気泳動装置の開発", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 松本富美子, 牧野浩司, 前田佳代, Patzelt H., 前田雄一郎, 藤原悟: "中性子溶液散乱を用いた細いフィラメント上トロポニン C の構造解析", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 岩本裕之, 大岩和弘, 若山純一, 田村巧, 藤澤哲郎: "調節軽鎖を金属クラスター修飾した平滑筋 S1-アクチン複合体の X 線回折", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 新井亮一, Cong Y., Wriggers W., 西川幸宏, 長棟輝行, 藤澤哲郎: "放射光 X 線小角散乱法を用いた融合蛋白質のドメイン間距離とコンフォメーションの評価", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 山下敦子: "Crystal structure of CapZ: architecture of a heterodimer complex and mechanism for actin filament capping", 理研シンポジウム「構造生物学 (VIII): 蛋白質複合体の構造生物学 構造からメカニズムの理解へ」, 播磨, 1月(2003).
- 小田俊郎: "Modeling of F-actin: Mechanism of F-actin stabilization by natural drugs-phalloidin and dolastatin 11", 理研シンポジウム「構造生物学 (VIII): 蛋白質複合体の構造生物学 構造からメカニズムの理解へ」, 播磨, 1月(2003).
- 武田壮一, 山下敦子, 前田佳代, 前田雄一郎: "ヒト心筋トロポニンの結晶構造", 第80回日本生理学会大会 第76回日本薬理学会合同年会, 福岡, 3月(2003).