

生体物理化学研究室

Biophysical Chemistry Laboratory

主任研究員 城 宜嗣

SHIRO, Yoshitsugu

生体内の要所に数多く存在する金属タンパク質・酵素は、電子移動、分子状酸素の結合・活性化、さらには一酸化窒素の生成・消去などの化学反応を通して、生体の物質・エネルギー代謝、恒常性維持など多くの重要な生理作用に関与している。最近では、細胞内情報伝達系の重要な因子として機能していることも知られている。当研究室では、X線結晶構造解析法や各種分子分光法等による分子構造解析と共に、分子生物学・生化学的な手法を駆使した機能解析を併せ、「金属タンパク質・酵素およびその関連生体高分子の構造情報を基にした生理作用の分子レベルでの理解」を目標に研究を行っている。

1. 特異な化学反応を触媒する金属酵素の構造機能研究

(1) 脂肪酸水酸化酵素チトクロム P450_{BSβ} の構造解析 (城, 杉本)

Bacillus subtilis 由来チトクロム P450_{BSβ} は、過酸化水素 (H₂O₂) を利用して長鎖脂肪酸の α 位および β 位の水酸化反応を触媒するユニークなヘム酵素である。P450_{BSβ} の基質 (パルミチン酸) 結合型酵素の結晶構造を 2.1 Å 分解能で明らかにした。基質パルミチン酸は、P450_{BSβ} の疎水性アミノ酸残基でできたチャンネル内に存在しており、末端カルボキシル基は親水的な環境に存在し、活性部位ヘムに近接する I helix に位置する Arg242 残基と静電相互作用で結合していた。さらに、活性部位周辺の構造情報から、基質のカルボキシル基が一般酸・塩基触媒として働き、鉄に配位する H₂O₂ の O-O 結合を開裂する反応機構を提唱した。基質結合部位周辺に存在する残基を他のアミノ酸に置換した変異体をいくつか作成し (Phe71Leu, Val170Phe, Phe71Leu/Val170Phe), それらの活性測定ならびに共鳴ラマン分光測定から P450_{BSβ} による水酸化反応の部位特異性を示すのに重要な酵素-基質相互作用の様式を分子レベルで決定した。

(2) 二原子酸素添加酵素インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ (IDO) の結晶化 (小田^{*1}, 杉本, 城)

哺乳類におけるトリプトファンからキヌレニンの生合成経路の第一段階反応において、IDO はインドール環への二原子酸素添加反応の触媒を担っており、これが経路の律速段階となっている。我々はこの触媒反応機構を原子レベルで理解することを目的にして、ヒト由来の IDO の X 線による構造解析を目指している。良質の結晶を得るために、従来の精製法を改良し、高活性で等電点電気泳動および native PAGE においても単一バンドの試料を調製できた。

(3) 哺乳動物の第四のグロビンタンパク質の構造機能解析 (澤井^{*1}, 牧野^{*2}, 杉本, 城)

サイトグロビンはすべての臓器の組織に分布する、ヘモグロビン、ミオグロビン、ニューログロビンに続く哺乳動物における 4 番目のヘム結合グロビンタンパク質である。肝硬変などの病気で肝臓が繊維化した際にのみ、肝臓の星細胞中に強く発現することも見いだされているが、その生理機能は未だ不明である。サイトグロビンの生理機能を、そ

の構造を基盤に解析するために、昨年度構築した大量発現系を用いて調製した組換えタンパク質ならびにいくつかの変異体を用いて、その分光 (可視光吸収, 赤外吸収および共鳴ラマン) および酸化還元電位測定を行った。その結果、ヘム鉄には中性の His81 と His113 が配位し、外部配位子 (酸素, 一酸化炭素) は His81 と置き換わって鉄に配位することを見いだした。また、4 Å 分解能の X 線回折像を与える単結晶を得た。構造解析可能な結晶を得るための結晶化条件をさらに検討する。

(4) ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶構造解析 (青山, 吉川^{*3})

チトクロム酸化酵素の反応機構を高分解能結晶構造解析により明らかにするため、新しい結晶の作成を試みた。昨年度、新規界面活性剤 3 オキサトリデシル-α-マンノシドを合成し、これを用いて空間群 P2₁2₁2₁ (分解能 2.0 Å) と空間群 C222₁ (分解能 6.0 Å) の 2 種類の結晶が得られた。C222₁ の結晶では、本酵素はこれまでに得られた 3 つ結晶と同じく二量体で存在し、その形成様式も全く同じであった。ところが P2₁2₁2₁ の結晶では単量体であった。どちらの結晶も活性、サブユニット数などは、これまでの結晶と比較して大きな違いはなく、これまでウシ心筋の酵素は二量体であると考えられてきたが、生体膜中では単量体と二量体のどちらでも存在できる可能性が示唆された。

(5) 脱窒菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の膜タンパク質一酸化窒素還元酵素の反応機構 (汲田^{*4}, 城)

脱窒菌由来の一酸化窒素還元酵素 (NOR) は、その脱窒過程において一酸化窒素 (NO) から亜酸化窒素 (N₂O) への還元反応を触媒するチトクロム bc 型膜貫通タンパク質である。アミノ酸配列の解析から、NOR は哺乳類ミトコンドリアチトクロム酸化酵素と高い相同性が見いだされ、生物の呼吸過程の進化を探る上で注目されている。我々は、既に緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来 NOR について精製法を確立し、高純度かつ多量の精製標品を得ることに成功した。本年度は共鳴ラマン、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル等の分光学的手法によって安定な酸化状態における活性中心の構造、電子状態の同定を行った。さらに、ストップフロー法および急速混合・凍結システムにより調製した準安定な反応中間体の ESR スペクトルの測定も行

い、これらの情報を基に NO 還元反応における活性中心の構造について検討中である。

2. 気体濃度センサーとして働く金属タンパク質の構造機能研究

(1) 好熱菌由来ヒスチジinkinase およびそのレスポンスレギュレーター の結晶化 (山田^{*5}, 中村, 城)

バクテリアや一部の真核生物における環境感知・細胞内情報伝達は、環境センサーとしてのヒスチジinkinase (HK) と、レスポンスレギュレーター (RR) の 2 つのタンパク質間の、ATP 依存性のリン酸転移を介して行われ、二成分情報伝達系と呼ばれる。一般に HK は N 末端側より、環境センシングを行う「センサードメイン (SD)」と「ヒスチジinkinase ドメイン (HKD)」に分けられ、さらに、HKD はリン酸化されるヒスチジン残基を含み HK の二量化に寄与している「二量化ドメイン」と ATP の結合およびリン酸の転移を司る「触媒ドメイン」に細分化される。現在までに、国内外のグループにより、HK センサータンパク質の二量化ドメインと触媒ドメインの個別の構造が NMR により決定されている。我々は、高度好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 HKD と RR を用い、HKD の全長構造 (二量化ドメイン-触媒ドメイン) および HKD-RR 複合体の構造を、X 線結晶構造解析と NMR 分光法により決定し、二成分情報伝達系における、「HK の ATP 依存性自己リン酸化機構」および「HK-RR 間におけるリン酸転移機構」の解明を目的としている。現在までに、両タンパク質とも、分子量的に単一の試料を精製し、HKD は分解能 8 Å, RR は 3.5 Å の単結晶を得ており、今後結晶化条件の最適化を行っていく。

(2) 酸素センサータンパク質 FixL/FixJ の情報伝達機構の解析 (中村, 斎藤^{*5}, 穂本^{*6}, 田中^{*2}, 城)

根粒菌のヘム結合型酸素センサー FixL/FixJ タンパク質はそれぞれ二成分情報伝達系の HK と RR である。FixL は酸素存在下 (酸素結合型) では kinase 活性が抑制され、低酸素下 (酸素解離型) では kinase 活性が上昇する。一方、転写因子である FixJ は FixL からリン酸基を受け取ることで活性化され、窒素固定関連遺伝子 (*nifA*, *fixK*) を発現させる。我々は、FixL/FixJ 酸素センサー系において、リガンドの認識機構、リン酸化反応などへの情報変換機構、遺伝子発現機構などの一連の情報の流れを分子または原子レベルで解明することを目的として研究を行っている。 β ガラクトシダーゼを指標とした *in vivo* の大腸菌レポーター系を用いた突然変異体の生化学的解析より、FixJ の Ala93Val, Thr109Ala 変異体はリン酸化されず、かつ単量体で *fixK* プロモーター DNA に結合することを見いだした。このことから、FixJ の N 末端リン酸基受容ドメインの α_4 , α_5 ヘリックスはリン酸基受容、二量化以降の分子内シグナル伝達に重要な役割を果たしていることが分かった。一方、酸素センサー HK である FixL に関して、ヘム鉄が酸化型 (Fe^{3+}) の FixL 二量体における、Cys301 間の不自然なジスルフィド結合の形成が、リン酸化活性に大きな影響をおよぼすことが判明した。さらに詳細な解析をした結果、一酸化炭素 (CO) と NO は自己リン酸化活性を抑制せず、酸素 (O_2) と同じ働きをできないことが判明した。FixL は酸素のみが生理的リガンドとなる、文字どおり酸素センサーであることが明らかとなった。

(3) エチレンセンサータンパク質 ETR1 の活性部位構造解析 (菊地, 中村, 藤嶋^{*1}, 城)

エチレンは植物の発生から成長、枯死、あるいは環境応答などに重要な作用を及ぼす植物ホルモンである。エチレン受容体タンパク質 ETR1 は二成分情報伝達系に属するセンサータンパク質であり、その SD に含まれる銅 (I) イオンにエチレンが結合することにより情報伝達が開始されると言われているが、その詳細は不明である。膜透過型のタグと融合させたフラグメントとして大腸菌に発現させた ETR1 の SD を用いて、フォールディングを調べる実験を行った。まず、タグ部分を切断して SD のみを得る精製法を確立し、SD のみの円二色性 (CD) スペクトルを測定した結果、ランダム構造ではなく、 α ヘリックスを含む構造であることが分かった。さらに、SD の N 末あるいは C 末にアルカリフォスファターゼ (PhoA) を融合させた ETR1 の SD の発現系も構築し、それらの PhoA 活性測定を行った。PhoA はペリプラズムに存在するときのみに活性を示す性質を利用し、ETR1 SD の N 末と C 末の存在場所を確かめた。測定の結果は、ETR1 SD は、アミノ酸配列の疎水性から推定されるような、N 末がペリプラズム側に存在し、3 回膜貫通構造ではない可能性を示している。

3. 新規人工タンパク質の分子設計

(1) 人工ヘムタンパク質 (磯貝, 石田^{*6})

天然のヘムタンパク質が持つ高いヘム親和性や機能と、ヘム結合部位近傍のアミノ酸の種類と配置との関連を明らかにする目的で、人工設計されたヘムタンパク質の進化実験を考案した。すなわち、ランダム変異を導入した人工ヘムタンパク質をファージの外殻タンパク質との融合体としてファージ表面に提示させ、ヘムとの親和性を利用して活性のあるクローンを選択する。そのために、プロトヘムをビオチン化した新規分子 (ビオチンヘム) を合成した。ビオチンヘムは単独で天然ヘムタンパク質のアポ体と結合し、その機能を再構成することができた。また、ストレプトアビジンとビオチンの強く特異的な相互作用を利用して、ビオチンヘムに結合したタンパク質を迅速に回収できることを確認した。さらに、実験室進化の初期分子として、昨年度までに設計した人工グロブリンの他に、ヘムを結合する 4 ヘリックスバンドルを設計した。この人工タンパク質を大腸菌のタンパク質発現系を用いて合成したところ、設計した通りの二次構造を保持し、ヘムを特異的に結合することが分かった。

(2) 人工 DNA 結合タンパク質 (磯貝, 武蔵^{*2})

アミノ酸ロタマーごとにタンパク質分子内環境への適合性を評価できるロタマーポテンシャルを用いて、DNA 結合タンパク質 λ Cro の立体構造を安定化するアミノ酸配列を設計した。最適化計算にはモンテカルロ法を用い、タンパク質全体として塩基性の等電点を持つように組成を制限した。得られた配列は、等電点 9.4 (天然 9.4)、モノマー分子量 6961 Da (同 6719 Da)、天然配列と 26% の一致度を示した。この配列をコードする人工遺伝子を作製し、大腸菌に導入することによって人工タンパク質 (S4) を合成した。S4 は、低濃度で、ほぼターゲットとした二次構造を持つ二量体タンパク質にフォールドした。一方、タンパク質-DNA 複合体の立体構造データベースから作製したアミノ酸-塩基

間の経験ポテンシャルと S4 の構造モデルから設計した人工オペレーターを用いた *in vivo* 実験において、S4 は非特異的で弱い DNA 結合活性を示した。さらに二量体の構造モデル中で単量体間の境界領域を形成する β リボンを β ヘアピンに置換することによって単量体となるような変異体 (S4m) を設計した。合成された S4m は広い濃度領域で単量体の状態をとり、分解の良好な NMR スペクトルを示した。この人工タンパク質に部位特異的突然変異を導入し、昨年度までに作製した実験室進化系を用いて DNA 結合活性に関するセレクションを試行した。

4. タンパク質構造解析測定法の開発と応用

(1) タンパク質結晶の反応中間体結晶構造解析 (足立, 城)

低温ヘリウムガス気流下 (~ 30 K) でタンパク質結晶中に反応中間体を蓄積させ、X 線回折法により反応中間体の結晶構造解析を行うための実験装置を理研構造生物学ビームライン BL44B2 実験ハッチ内に設置した。また反応中間体が蓄積した状態を回折データ測定中に可視吸収スペクトルによって確認するために、オンライン顕微分光装置を開発した。これを用いて、低温条件 (25 K) 下で一酸化炭素 (CO) 結合型ヘモグロビン結晶中の CO を励起光によって解離させた反応中間体の構造解析を 1.5 Å 分解能で行った。ヘモグロビンの四次構造 (R, T) およびサブユニット (α , β) に依存して、CO 解離後の活性部位の構造変化の部位、大きさが大きく異なっていることが明らかとなり、ヘモグロビンの四次構造による酸素親和性の違いがどのような構造要因に起因しているかを直接的に可視化することに成功した。

(2) 血管新生メカニズムに関する研究 (杉本)

高等生物において血管新生が起こる際には、VEGF やアンジオポエチンなどの成長因子が血管内皮細胞上のそれぞれの受容体と結合することで、シグナル経路のスイッチがオフからオンの状態に切り替えられる。本研究では、血管形成後期において血管内皮細胞とその周辺細胞との連携に関与する成長因子であるアンジオポエチンの関係するシグナル伝達機構を構造学的な見地から明らかにしていくことを目的として、アンジオポエチンおよびその受容体 Tie2 の結晶化を試みている。本年度は、受容体を形成する 9 つのドメインのうち、D1, D5, D5-D6 の調製を行った。そのうち D5 を 1.0 Å 解能での結晶構造決定に成功した。アンジオポエチン 1 およびそのアンタゴニストと受容体との分子間相互作用についての知見を得るため、今後これらの複合体の解析を目指す。

(3) CAG リピート病遺伝子産物のモデルタンパク質 PolyQ-ミオグロビンの結晶化 (山田^{*5}, 城)

CAG リピート病と総称されるハンチントン病、脊髄小脳変性症などの遺伝性神経変性疾患は、原因遺伝子上の-CAG-の繰り返し (ポリグルタミン鎖の異常伸長) によって引き起こされ、脳内における不溶性凝集体の形成が特徴である。ところが、その遺伝子産物が極めて不安定かつ容易に凝集し、その単離・精製が非常に困難であるため、ポリグルタミン鎖による凝集体形成の機序は未だ不明である。そこで、既に CAG リピート病遺伝子産物モデルタンパク質として利用可能なことが判明しているミオグロビン (Mb) にポリグルタミン鎖を挿入したキメラミオグロビン PolyQ_n-Mb

($n = 12, 28$)、を用いて、X 線結晶構造解析によるポリグルタミン鎖構造の直視を本研究の目的としている。まず、PolyQ-Mb がアグリゲーションを起さず、かつ、純度を上げる精製法を検討した。HiTrap SP 陽イオン交換カラム、続いて Superdex 75 pg ゲル濾過カラムによる精製が有効であり、純度の高い試料を得ることができた。この試料を用いて Fe^{III} 型、Fe^{II}-CO 型を調製し、結晶化のスクリーニングを行い、PolyQ₂₈-Mb(Fe^{II}-CO) の微結晶を得ることができた。しかし、未だ X 線解析に用いられる良質の結晶ではないため、今後、更なる結晶化条件の検索を行っていく。

(4) X 線吸収スペクトルを利用した金属タンパク質の電子状態の解析 (菊地, 足立, 城)

金属タンパク質中に含まれる金属イオン周辺の電子状態を詳細に理解することは、その機能を探る上で重要である。X 線吸収スペクトル法は、生理学的な条件下で 100 μ M 以下の超希薄溶液でも測定が可能であるため、この目的には最適な手法の 1 つである。中でも、特性吸収端近傍の XANES スペクトルは、金属イオンの周辺の原子配置やポテンシャルに非常に敏感であることが知られているが、その解析には未だに標準的な方法がない。そこで、第一原理の理論計算である DV-X α を用いて金属タンパク質の XANES スペクトルを解析する手法の開発を行った。DV-X α 法は理論 XANES スペクトルを計算することも可能であるため、計算結果が実験事実と一致していることを確認しながら分子軌道や電子密度、共有結合性の評価などの電子状態に関する知見を得ることができる。電子伝達系の銅タンパク質であるアズリンを試料に用いたところ、計算から得られた理論 XANES スペクトルは実測のスペクトルと一致しており、計算から得られた電子状態に関する知見は、単に計算上の電子状態というのではなく、現実のアズリンの電子状態と考えることができる。また、アズリンだけではなく、非ヘム鉄の鉄含有タンパク質でも同様の結果を得ることができた。従って、本手法による XANES スペクトル解析は、金属タンパク質の電子状態を調べる上で適した方法の 1 つであることが明らかとなった。

^{*1} 研修生 (姫工大大学院), ^{*2} 研修生, ^{*3} 客員主管研究員, ^{*4} 基礎科学特別研究員, ^{*5} 協力研究員, ^{*6} ジュニア・リサーチ・アソシエイト (姫工大大学院)

Some metal ions are present in biological system in the form of metal-binding proteins and enzymes, and are involved in physiologically important actions such as biological redox reactions, cellular signal transductions and so on. In Biophysical Chemistry Laboratory, studies are concentrated to understand the functions of such metallo-proteins and metalloenzymes in molecular level on the basis of their molecular structures, which are determined by the SPring-8 RIKEN beam line.

1. Structural and functional analyses of several metalloenzymes

We are studying some redox metalloenzymes such as peroxygenase P450, indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), cytochrome c oxidase (CcO), and bacterial nitric oxide reductase (NOR). Peroxygenase P450 is a unique cytochrome P450 type enzyme, which catalyzes the hydrox-

ylation reaction of fatty acid using hydrogen peroxide (H_2O_2) as an oxidant. The molecular mechanism of the peroxygenation reaction was proposed on the basis of the structure of the enzyme in the substrate-bound form at 2.1 Å resolution. IDO is a heme-dioxygenase that catalyzes the incorporation of dioxygen atoms of molecular oxygen (O_2) into indole rings in the human kynurenine pathway. For the purpose of crystallization, we optimized the expression and purification protocols, and then obtained the functional recombinant IDO with high homogeneity. New crystals were obtained from bovine heart CcO solubilized with 3-oxatridecyl- α -D-mannoside which were synthesized by ourselves. The crystals (Space group $\text{P}2_12_12_1$) diffracted X-rays up to 2.0 Å resolution and the structure showed a monomer. Bacterial NOR is a membrane-bound cytochrome *bc* complex that catalyzes the two-electron reduction of NO to N_2O in bacterial denitrification. This enzyme is considered as an ancestor of CcO. Using highly purified NOR from *Ps. aeruginosa*, structure and electronic state of its active site in the resting and the catalytic intermediate states have been investigated by spectroscopic methods including the stopped-flow, rapid-mixing, and freeze-quench techniques. In addition, we characterized the heme environmental structure of a new heme-containing globin protein, so-called cytoglobin, by spectroscopic, electrochemical, and mutational techniques. This protein contains a six-coordinated heme having neutral imidazole groups of His81 and His113 as axial ligands, and can combine with external ligands such as CO and O_2 after dissociation of His81.

2. Structural and functional analyses of metalloproteins relating to cellular signal transduction

The two-component system plays crucial roles in cellular signal transduction that senses changes of the cell environment. The system consists of two proteins, histidine kinase (HK) and response regulator (RR). For elucidation of the mechanisms of "ATP-dependent autophosphorylation of HK" and "phosphotransfer between HK and RR", we have tried determination of the crystal and the solution structures of the HK and its RR complex using proteins from thermophile. We obtained the crystals of HK and RR, which gave X-ray diffraction at 8 and 3.5 Å resolutions, respectively. Rhizobial FixL/FixJ phospho relay is also the bacterial two-component system, which sense the O_2 tension in the root nodule and controls expression of the nitrogen fixation genes. Genetic and biochemical analyses have elucidated that kinase activity of ferrous FixL (HK) is downregulated only by O_2 binding, not by CO or NO, indicating that FixL function as an oxygen sensor. The α_4 and α_5 of the phospho-receiver domain of FixJ (RR) are also revealed to be involved in the post phosphorylation/dimerization signaling to activate the DNA binding domain. Genetic studies in *Arabidopsis* have provided evidence that ethylene perception in plants is mediated by ETR1, plant two-component system. We have constructed a large-scale expression system of sensor-domain (SD) of ETR1 and studied its structural features. The CD spectrum of ETR1 SD showed the existence of α -helices. The ETR1 protein fused to phosphatase, which is active in only periplasm, was expressed. High activity of phosphatase was observed. The results indicate that ETR1 SD is a membrane-associated but not trans-membrane protein. This is contrary to the prediction by mean of hydrophobic plot of the sequence.

3. Molecular design of *de novo* proteins

Toward *de novo* creation of functional proteins, an experimental system to evolve artificial hemoproteins has been constructed. Besides, four helix bundle hemoproteins were newly designed and synthesized as prototype molecules to be evolved. Furthermore, artificial DNA binding proteins and its operator DNA sequences were computationally designed and synthesized. The interactions between protein and DNA were investigated, and an experimental system was prepared to evolve artificial proteins based on their biological functions.

4. Development and application of new methods to protein structural determination

We also interested in development of new techniques of X-ray crystallography and X-ray absorption spectroscopy in determining the protein structures. A microspectrophotometer and an open-flow helium cryostat were installed at the SPring-8 RIKEN Structural Biology beam line (BL44B2) for freeze-trapping experiments of reaction intermediates in protein crystals. Using these systems, we succeeded in structural analysis of intermediate states of photoactivated carbonmonoxy hemoglobin at 1.5 Å resolution and 25 K. Angiopoietins are a recently discovered family of angiogenic factors that interact with the endothelial receptor tyrosine kinase Tie2. The D1, D5, D5-D6 domains of Tie2 were prepared using bacterial expression systems. The crystal structure of D5 has been determined at the atomic-resolution. CAG repeat disease is a neurodegenerative disease, a pathological hallmark of which is the aggregation of mutant polyglutamine (polyQ) protein, resulting in the formation of inter-nuclear inclusion bodies. To investigate the polyQ structure, we tried crystallization of mutant polyQ-myoglobin (polyQ-Mb), as a model protein of CAG repeat disease. In the Fe^{II} -CO states, the micro crystals of polyQ₂₈-Mb were obtained. This study will open a new field of crystallization of highly aggregated proteins. To study the electronic structure of metalloproteins in detail, XANES spectra provide valuable information on their metal centers, but the analysis method has remained challenging problems. We have analyzed XANES spectra of Cu- and Fe-containing metalloprotein on the basis of the DV-X α method. The agreement of theoretical spectra with experimental data is good enough, indicating the information delivered from the calculation is reliable. Thus, the method must be useful for study electronic structure of metalloproteins.

Research Subjects and Members of Biophysical Chemistry Laboratory

1. Molecular structures and functions of metalloenzymes
2. Structural and functional analyses of signal transducing metalloproteins
3. *De novo* protein design
4. Development and application of new techniques of protein crystallography

Head

Dr. Yoshitsugu SHIRO

Members

Dr. Yasuhiro ISOGAI

Dr. Hiro NAKAMURA
Dr. Shin-ichi ADACHI
Dr. Hiroshi AOYAMA
Dr. Hiroshi SUGIMOTO
Dr. Akihiro KIKUCHI
Dr. Hideyuki KUMITA *¹
Dr. Seiji YAMADA *²
Dr. Ken SAITO *²

*¹ Special Postdoctoral Researcher

*² Contract Researcher

Visiting Members

Mr. Satoru AKIMOTO (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Manabu ISHIDA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Prof. Tsutomu KOYAMA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)
Dr. Genzi KURISU (Protein Res. Inst., Osaka Univ.)
Dr. Yukio MORIMOTO (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Prof. Sam Yong PARK (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)
Dr. Hiroshi YAMAGUCHI (Sch. Sci., Kwansai Gakuin Univ.)
Prof. Shin-ya YOSHIKAWA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Trainees

Ms. Kei FUJISHIMA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Masatomo MAKINO (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Akira MUSASHI (Fac. Eng., Hose Univ.)
Mr. Syun-ichiro ODA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Ms. Hitomi SAWAI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Atsunari TANAKA (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑 誌]

(原 著 論 文) * 印 は 査 読 制 度 が あ る 論 文

- Denisov I. G., Hung S., Weiss K. E., McLean M. A., Shiro Y., Park S. -Y., Champion P. M., and Sligar S. G.: "Characterization of the oxygenated intermediate of the thermophilic cytochrome P450 CYP119", *J. Inorg. Biochem.* **87**, 215–226 (2001). *
- Lee D., Yamada A., Matsunaga I., Ichihara K., Adachi S., Park S. -Y., and Shiro Y.: "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of fatty-acid hydroxylase cytochrome P450BS β from *Bacillus subtilis*", *Acta Cryst. D* **58**, 687–689 (2002). *
- Satoh T., Itoga A., Isogai Y., Kurihara M., Yamada S., Natori M., Suzuki N., Suruga K., Kawachi R., Arahira M., Nishio T., Fukazawa C., and Oku T.: "Increasing the conformational stability by replacement of heme axial ligand in *c*-type cytochrome", *FEBS Lett.* **531**, 543–547 (2002). *
- Ogata H., Mizoguchi Y., Mizuno N., Miki K., Adachi S., Yasuoka N., Yagi T., Yamauchi O., Hirota S., and Higuchi Y.: "Structural studies of the carbon monoxide complex of [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: Suggestion for the initial activation site for dihydrogen", *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11628–11635 (2002). *
- Sakai K., Matsui Y., Kohyama T., Shiro Y., and Adachi S.: "Optical monitoring of freeze-trapped reaction intermediates in protein crystals: a microspectrophotometer for cryogenic protein crystallography", *J. Appl. Crystallogr.* **35**, 270–273 (2002). *
- Hayashi T., Matsuo T., Hitomi Y., Okawa K., Suzuki A., Shiro Y., Iizuka T., Hisaeda Y., and Ogoshi H.: "Contribution of heme-propionate side chains to structure and function of myoglobin: chemical approach by artificially created prosthetic groups", *J. Inorg. Biochem.* **91**, 94–100 (2002). *
- Park S. -Y., Yamane K., Adachi S., Shiro Y., Weiss K. E., Maves A. S., and Sligar G. S.: "Thermophilic cytochrome P450 (CYP119) from *Sulfolobus solfataricus*: high resolution structure and functional properties", *J. Inorg. Biochem.* **91**, 491–501 (2002). *
- Matsui Y., Sakai K., Murakami M., Shiro Y., Adachi S., Okumura H., and Kohyama T.: "Specific damage induced by X-ray radiation and structural changes in the primary photoreaction of bacteriorhodopsin", *J. Mol. Biol.* **324**, 469–481 (2002). *
- Hasegawa K., Ono T., and Noguchi T.: "Ab initio density functional theory calculations and vibrational analysis of zinc-bound 4-methylimidazole as a model of a histidine ligand in metalloenzymes", *J. Phys. Chem. A* **106**, 3377–3390 (2002). *
- Isogai Y., Ota M., Ishii A., Ishida M., and Nishikawa K.: "Identification of amino acids involved in protein structural uniqueness: implication for *de novo* protein design", *Protein Eng.* **15**, 555–560 (2002). *
- Kumita H., Yamada S., Nakamura H., and Shiro Y.: "Chimeric sensory kinases containing O₂ sensor domain of FixL and histidine kinase domain from thermophile", *Biochim. Biophys. Acta* **1646**, 136–144 (2003). *
- Lee D., Yamada A., Sugimoto H., Matsunaga I., Ogura H., Ichihara K., Adachi S., Park S. -Y., and Shiro Y.: "Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*", *J. Biol. Chem.* **278**, 9761–9767 (2003). *

(その他)

- Isogai Y.: "Protein architecture by *de novo* design", *RIKEN Rev.*, No. 41, pp. 96–97 (2001).
- Obayashi E., Shimizu H., Park S. -Y., Nakamura H., Takahashi S., Shoun H., and Shiro Y.: "Molecular mechanism of nitric oxide reduction catalyzed by fungal nitric oxide reductase", *Int. Congr. Ser.* **1233**, 59–62 (2002).

Isogai Y.: "Stability and specificity of protein structure",
RIKEN Rev., No. 46, pp. 48–49 (2002).

[単行本・Proc.]

(その他)

Shiro Y., Isogai Y., Nakamura H., and Iizuka T.: "Physiological functions and molecular structures of new types of hemoproteins", *Molecular Anatomy of Cellular Systems (Progress in Biotechnology, Vol. 22)*, edited by Endo I. and others., Elsevier, Amsterdam, pp. 189–204 (2002).

菊地晶裕, 城宜嗣: "生物化学", X線吸収分光法: XAFS とその応用, 太田俊明 (編), アイピーシー, 東京, pp. 215–220 (2002).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Hoepffner N., Kishino M., and Dowell M. A.: "Octs: A short-lived experiment with long-term perspectives", *Oceans from Space (Venice 2000)*, (Marine Environment Unit and others), Venice, Italy, Oct. (2000).

Shiro Y.: "Heme-based oxygen sensor protein FixL", 2nd Int. Conf. on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-2), Kyoto, June–July (2002).

Sawai H., Kawada N., Yoshizato K., Nakajima H., Aono S., and Shiro Y.: "The heme environmental structure of recombinant human stellate cell activation-associated protein (STAP)", 2nd Int. Conf. on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-2), Kyoto, June–July (2002).

Adachi S., Shimizu H., Park S. -Y., Lee D., and Shiro Y.: "Atomic resolution structure of resting and intermediate states of nitric oxide reductase (cytochrome P450nor)", 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Kikuchi A., Park S. -Y., Sun D., Sato M., Yoshida T., and Shiro Y.: "Crystal structure of rat biliverdin-IX a reductase", 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Sugimoto H., Shiro Y., and Hendrickson W. A.: "Structure of the fifth domain of receptor tyrosine kinase TIE2", 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Shiro Y., Lee D., Yamada A., and Matsunaga I.: "Substrate recognition and reaction mechanism of fatty acid peroxxygenase cytochrome P450BS β from *Bacillus subtilis*", 6th Int. Symp. on Cytochrome P450 Biodiversity, Los Angeles, USA, Aug. (2002).

Kurashima K., Ito Y., Shibata T., Tamura K., Nakamura H., and Shiro Y.: "The structure determination of the C-terminal domain of FixJ", 20th Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems, Toronto, Canada, Aug. (2002).

Kuramitsu S., Kigawa T., Shirouzu M., Muto Y., Maeda

H., Yamazaki T., Tanaka A., Matsuo Y., Tahirov T. H., Kunishima N., Hamada K., Shiro Y., Shibata T., Tashiro H., Konagaya A., Shinozaki K., Sakaki Y., Hayashizaki Y., Hirota H., Miyano M., and Yokoyama S.: "RIKEN Structural Genomics/proteomics Initiative (RSGI)", 2nd KIAS Conf. on Protein Structure and Function: Structure and Mechanism in Protein Science, Seoul, Korea, Sept. (2002).

Kigawa T., Shirouzu M., Muto Y., Maeda H., Yamazaki T., Guentert P., Tanaka A., Matsuo Y., Tahirov T. H., Kunishima N., Hamada K., Shiro Y., Shibata T., Tashiro H., Konagaya A., Shinozaki K., Sakaki Y., Hayashizaki Y., Hirota H., Miyano M., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: "RIKEN Structural Genomics/proteomics Initiative (RSGI)", 2nd Ann. Western Canadian Structural Biology Workshop on Structural Genomics, Canmore, Canada, Oct. (2002).

Nakamura H.: "Genetic and biochemical studies on heme-based oxygen sensor system FixL/FixJ", 2nd Symp. on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Functions, Kyoto, Oct. (2002).

Adachi S.: "Snapshots of photolyzed intermediates of human carbonmonoxy hemoglobin in single crystals at 25K", Symp. on New Developments in Spectroscopic Techniques and Their Applications to Dynamics of Biomolecules, (Kobe University), Kobe, Nov. (2002).

Shibata Y., Itoh S., Ishida M., and Isogai Y.: "Conformational fluctuation of artificial myoglobin observed by time-resolved hole-burning spectroscopy", The 2002 COE Conf. IMS: Dynamical Structures and Molecular Design of Metalloproteins, Okazaki, Nov. (2002).

Kikuchi A.: "3D and electronic structural analysis of metalloproteins by the DV-X α analysis", Asian School of Bioinorganic Chemistry, Okazaki, Mar. (2003).

Kikuchi A.: "Ethylene receptor protein: A new biological function of copper", IMS Sympo. on Molecular Science of Structures and Properties of Copper Proteins, Okazaki, Mar. (2003).

(国内会議)

城宜嗣: "金属を含む気体センサー蛋白質の構造と感知機構", 日本化学会第 81 春季年会, 東京, 3 月 (2002).

城宜嗣: "金属を含む気体センサー蛋白質の構造と感知機構", 日本生化学会東北支部シンポジウム第 68 回例会, 山形, 5 月 (2002).

澤井仁美, 河田則文, 吉里勝利, 中島洋, 青野重利, 城宜嗣: "The heme environmental structure of recombinant human stellate cell activation-associated protein (STAP)", 第 2 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6 月 (2002).

平田邦生, 村本和優, 青山浩, 伊藤・新沢恭子, 吉川信也, 山下栄樹, 月原富武: "ウシ心筋チトクロム酸化酵素の Zn²⁺ 結合型結晶構造から", 第 2 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6 月 (2002).

村本和優, 青山浩, 山下栄樹, 月原富武, 伊藤・新沢恭子, 吉川信也: "ウシ心筋チトクロム酸化酵素のヘム a および H チャンネルの構造変化", 第 2 回日本蛋白質科学会年

- 会, 名古屋, 6月(2002).
- 足立伸一, 朴三用, 柴山修哉, Tame J. R. H., 城宜嗣: “T型およびR型ヘモグロビン-CO光解離中間体の低温結晶構造解析: 配位子結合過程の直接観測”, 第29回生体分子科学討論会, (日本化学会他), 岡崎, 7月(2002).
- 澤井仁美, 河田則文, 吉里勝利, 中島洋, 青野重利, 城宜嗣: “ヒト Stellate Cell Activation-Associated Protein (STAP) のヘム周辺構造について”, 第29回生体分子科学討論会, (日本化学会他), 岡崎, 7月(2002).
- 城宜嗣, 山田朱理, 李東善, 松永勇: “過酸化水素を用いる脂肪酸水酸化酵素チトクロム P450BS β の基質認識と反応機構”, 第29回生体分子科学討論会, (日本化学会他), 岡崎, 7月(2002).
- 菊地晶裕, 谷田肇, 三浦圭子, 城宜嗣: “たんぱく質結晶の回折実験用ステージを用いた微量試料での XAFS 測定”, 第5回 XAFS 討論会, 広島, 8月(2002).
- 太田元規, 磯貝泰弘: “タンパク質をコンピュータでデザインする”, 日本進化学会第4回大会, 東京, 8月(2002).
- 穉本智, 中村寛夫, 飯塚哲太郎, 城宜嗣: “酸素センサー FixL のキナーゼ活性制御機構について”, 第75回日本生化学会大会, 京都, 10月(2002).
- 倉内毅, 村本和優, 小倉尚志, 青山浩, 伊藤・新沢恭子, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶における分子吸光係数の測定”, 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 村本和優, 青波里実, 平田邦生, 青山浩, 伊藤・新沢恭子, 山下栄樹, 月原富武, 横尾信次, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸化還元に伴う His503 のプロトン取り込み機構”, 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 村本和優, 青波里実, 倉内毅, 青山浩, 山下栄樹, 平田邦生, 月原富武, 伊藤・新沢恭子, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素サブユニット III の役割: 酸素透過経路への DCCD 結合構造”, 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 青山浩, 平田邦生, 村本和優, 山下栄樹, 小倉尚志, 伊藤・新沢恭子, 吉川信也, 月原富武: “完全酸化型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の X 線回折強度データ収集”, 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 村本和優, 石田訓康, 原正生, 青波里実, 倉内毅, 横尾信次, 青山浩, 山下栄樹, 平田邦生, 月原富武, 伊藤・新沢恭子, 吉川信也: “呼吸阻害剤(ヘム配位子)結合還元型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析”, 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 磯貝泰弘, 武蔵映, 飯塚哲太郎, 皿井明倫, 太田元規: “人工 Cro 蛋白質のデザイン”, 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 石田学, 磯貝泰弘, 佐藤匡史, 奥忠武, 城宜嗣: “人工ヘムタンパク質のデザインと実験室進化”, 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月(2002).
- 田中敦成, 中村寛夫, 城宜嗣: “酸素センサー蛋白質 FixL の自己リン酸化制御機構”, 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2002).
- 汲田英之, 山田斉爾: “二成分系センサータンパク質におけるシグナル伝達の分子機構”, 理研シンポジウム「モレキュラー・アンサンブル 2002」, 和光, 12月(2002).
- 城宜嗣: “チトクロム P450 の機能多様性と構造多様性”, 第32回先端科学研究所生物資源開発センターセミナー・第7回農学生命科学研究科共同研究開発センターセミナー「Functional Genomics の最前線: 機能ゲノム科学と生物資源開発の接点を探る」, 大阪, 12月(2002).
- 磯貝泰弘, 太田元規: “人工タンパク質のデザインと実験室進化: プロローグ”, 平成14年度国立遺伝学研究所研究会, 三島, 1月(2003).