

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。我々はアクチンフィラメントは極めて動的でその構造は多くの準安定な構造の間を揺らいでいる、そして特定の準安定状態が特定のメカニズムに関与していると考えている。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、さらに動態と機能の関係を解明するという、現代生物学の中心問題の1つに迫る。

本年度は筋収縮のカルシウム調節の中心を担うトロポニンの結晶構造を解明して発表した。今後の研究では、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。

また当研究室には藤澤哲郎先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。このビームラインは、高輝度であると同時に単色性がよくかつ寄生散乱が最小に抑えられているため、高速混合型フローセルと併用することにより、精度のよい散乱強度分布をサブミリ秒の時間分解能で測定できるSPring-8の唯一のビームラインである。本年度は、アポミオグロビンの折れ畳み過程の中間体を捉える研究で進展があった。

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（山下；前田（佳）^{*1}（細胞情報伝達研究室））

骨格筋および心筋の収縮調節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。すでに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一層の結晶の改良が必要であろう（国立循環器病センター 武田壮一博士との共同研究）。

(2) 筋肉の細いフィラメント複合体の構造：電子顕微鏡の単粒子解析法（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、我々はヘリックス対称性を前提としないで、アクチンフィラメント複合体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フィラメント複合体の構造を、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。本年度は解析ストラテジーを改良しながら画像の収集を進めた。

(3) 筋肉の細いフィラメント複合体の構造：フィラメント配向ゾルのX線繊維回折法（小田）

ウシ心筋から分離精製した天然アクチンフィラメント（トロポミオシン・トロポニンを含む）複合体をガラス細管中

に配向させたゾルからX線繊維回折強度を得た。それからアクチン重合体の配向ゾルからの強度を差し引いた差強度分布を高低カルシウム濃度について得て、それぞれの円筒パターン関数を得た。低カルシウム濃度ではトロポミオシンの位置は揺らいでいるらしく明瞭ではないが、高カルシウム濃度で明瞭になる。カルシウム結合によりトロポニンは位置を変えフィラメント軸により近くなる。従来、筋から得られた回折強度の変化はトロポミオシンの位置の変化を示すと解釈されてきたが、今回の結果は従来の解釈の変更を迫るものである。

(4) トロポミオシンの結晶化（前田（佳）^{*1}，Meshcheryakov^{*1}）

トロポミオシン（Tm）の機能を理解するには分子の柔軟性を原子構造から理解する必要がある。原子座標解明に適した結晶を得るために、一方では高等生物のTmより短い酵母のTmの結晶化を試みている。他方、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。本年度はそのうち1つの抗体分子のFv断片を大腸菌で発現する系を確立した（マックスプランク生物物理学研究所 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}，前田（佳）^{*1}）

アクチン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、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た中性子散乱法を適用しTnCの構造情報を抽出した。TnCは互いによく似た球状ドメインが中央の一本のヘリックスで連結されている。本研究によ

り、低カルシウム濃度ですでに伸展している TnC の中央ヘリックスはカルシウム結合によってさらに伸展するとの結果が得られた。この TnC の伸展はアクチンフィラメント複合体中の他分子との相互作用による他律的变化であろう。また同様の方法をアクチンフィラメント複合体中のトロポニン I (TnI) に適用する実験を開始し、重水素化率 98.2% の TnI を調製し、それを交換導入してカルシウム調節能を 94% 保持する複合体を調製することができた (日本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)。

(6) 単量体アクチンとトロポニンの複合体の創生 (似内)

アクチンとトロポニンの相互作用を原子レベルで理解するために、両者の複合体結晶の調製を目指している。複合体結晶を得るためには、まずアクチンの無秩序な重合を防ぎ、アクチンを単量体の状態に保つ必要がある。そのため DNase I やゲルソリンセグメント 1 など重合阻害蛋白質を使用した。これら蛋白質が結合するとトロポニンがアクチンに結合しないことが判明した。今後は、低分子性のアクチン重合阻害剤を試みる。

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) アクチン重合体の最良の原子モデルの確立 (小田)

アクチン重合体が担う種々の機能を理解するには重合体の原子構造が必須である。我々は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系を独自に確立した。次にそのゾルからの X 線繊維回折強度と氷包埋した重合体の電顕写真からの位相を総合して、アクチン重合体の原子モデルを確立した。本年度は、基準モード解析法などを用いて精密化を実行し、現在の技術で到達可能な最良の原子モデルを確立した (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 らとの共同研究)。この原子モデルは、アクチン・フィラメント軸に直角方向のサブユニット間結合は弱く、それは 2 つのサブユニット間のヘリックス・ヘリックス相互作用によることを示す。配向ゾルの X 線回折法を用いてアクチン重合体安定化分子 (ファロイジン, ドラスタチン 11) のアクチン重合体への結合位置を決定したところ、それら安定化分子はヘリックス・ヘリックス相互作用を補強することで重合体を安定化すると理解された (米国アリゾナ大学 Bates 研との共同研究)。

(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})

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。昨年度までの研究で、独自に開発したベクターを使用して昆虫細胞 (Sf9) での組換えアクチン発現量を飛躍的に増加できることを示した。本年度は C 端にタグを付けての発現を試みたが、N 端側の修飾の異常によるのかタグ自体の影響によるのか、発現アクチンは重合能が不全であった。それゆえ N 端にタグを付して発現後切除する系を試みている。

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) CapZ のアクチンフィラメント・キャッピングのメカニズム (山下, 成田^{*2})

細胞内でのアクチン重合体は絶えず形成と崩壊を繰り返す動的な構造である。CapZ はその“アクチン・ダイナミクス”の中で重要な蛋白質の 1 つである。我々は 2003 年に CapZ 全分子 (α -, β -ヘテロダイマー) の結晶構造を解明し、それぞれのサブユニットの C 端部分 20~30 残基が分子から“触角”のように突出しこの部分がアクチン重合体 B 端に結合すると“触角”説を提案した。本年度は多数の変異蛋白質を調製しこの“触角”説が正しいことを証明すると同時に、1 対の“触角”が同等ではないとの新たな知見を得た (米国 ワシントン大学 J. Cooper 研との共同研究)。また電子顕微鏡像の単粒子解析法を新たに発展させ、アクチン重合体の B 端に CapZ が結合した複合体の構造解析を進めている。新規の解析ストラテジーを確立し、画像の収集を続けている。

(2) Actin-related protein 1 (Arp1) ミニフィラメントの構造解析 (今井^{*1}, 成田^{*2})

アクチンファミリーの中で骨格筋のアクチンと最も相同性が高い actin-related protein 1 (Arp1) は、生体内で長さの揃ったミニフィラメントを形成し、ダイナクチン複合体 (11 種類の蛋白質から成る分子量約 1MDa) の中核を形成する。ミニフィラメント構築原理の解明と細胞内輸送の調節装置としての機能を解明するために、電子顕微鏡像単粒子解析法を用いて、ダイナクチン複合体の構造解析を行っている。本年度は、精製試料の均一性の定量的評価をめざし、6 通りのダイナクチン複合体精製方法を比較検討した。また均一性の面からニフトリ胚からの精製も検討した (米国 ジョーンズ・ホプキンス大学 T. A. Schroer 研との共同研究)。

(3) アクチンの単量体と重合体の性質の違い (似内)

アクチン結合蛋白質の多くはアクチン単量体には結合しないが、アクチン重合体には強固に結合する。そもそも、数個の単量体からなる短い重合体において、重合体としての性質は徐々に現れるのか、特定の長さで突然変化するのか、またその長さで重合の核との関係はどのようなものか、いずれもまだ解明されていない。現在、蛍光交差分光法等でアクチンの数をモニターしながら、これとアクチン結合蛋白質との相互作用の検出を試みている。

4. 新しい方法の開発, その他

(1) 全反射蛍光単分子方位計測顕微鏡の開発 (山本, Popp^{*1}; 岡本 (ナノフォトンクス研究室))

昨年度構築した全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を使った一分子イメージングシステムの励起光源の 2 波長化を行い、複数の分子の方位を測定できるように改良した。また、四次元光学顕微鏡の立ち上げおよび、それに実装する一分子イメージングシステムについて技術的検討を行った。

(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 (山本, Popp^{*1}, 成田)

アクチンフィラメント上にあるトロポニンはカルシウムを受容しそ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。我々の結晶構造解析の結果は、トロポニンはヘリックスに富む蛋白質であり、その多くはカルシウム結合により方向を大きく変化すると示唆する。

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鏡を開発している。本年度は4つの問題の解決にあたった。(i) 蛍光双極子の方位決定の信頼性を増すために光学系に検光子を挿入する改良法を考案した。(ii) 1分子像から精度よく方位を決定するため、電子顕微鏡像単粒子解析の手法を応用したパターンマッチングのソフトウェアを開発した。(iii) 機能を損なわない範囲でフィラメントの熱揺動を最小に抑える方法を検討した。(iv) トロポニンの機能への影響を最小とする蛍光標識分子を合成した(京都大学 山本行男研との共同研究)。

(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畳ま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、本年度はまずミオシン分子の双頭を含む断片HMMの形態の変化を中性子散乱法で測定し、その慣性半径はリン酸化で増加し、またATPで減少することを解明した。また、中性子溶液散乱法を使ってミオシン分子中での制御軽鎖の形態を知るために、本年度は重水素化した制御軽鎖を交換導入する条件を最適化した(日本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}, 成田)

哺乳類骨格筋はアクチンフィラメントによって調節されるが、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も調節される。両者で収縮メカニズムは共通と考えられるので、両者を比較することによって一見異なる調節機構に共通な側面が解明されると期待される。昨年度はホタテ貝から純度の高いミオシンS1断片を得たが、本年度は迅速凍結・負染色試料のクライオ電子顕微鏡法を使ってこのS1とアクチンフィラメントの複合体の構造解析を実行した。この研究の過程でアクチン-S1複合体の太さの試料では凍結時の水の層の厚さが重要であることが判明しそれを実現する方法を検討した(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ての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 (BL45-XU) の高度化(藤澤, 飯塚^{*3}, 秋山^{*2})

理研構造生物学ビームライン BL45XU は1997年の建設より6年以上の歳月が経ち、老朽化による不具合が顕著になっている。そのため、ビームラインの改造を念頭に入れた作業を技術開発室と共同で行った。本年度はビームライン改造に関する調査、概念設計を行う一方、BL45XU-SAXSとBL45XU-PXの分光器、光学系のソフトを統一化する作業を行った。これにより、JASRI 共用ビームラインとの整合性が増し、効率的なメンテナンスが期待される。また、現状でもユーザーの要望を実現できるよう、中広角取得のための15 cmと30 cmの小角カメラを作製した。

(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^{*1}, 秋山^{*2}, 藤澤)

昨年度観測された骨格筋HMMの圧力応答の絶対転移圧力を求めるため、X線小角散乱用高圧ジャンプ装置の絶対圧力校正を新規製作の低容量圧力計を用いて求め、圧力計なしの状態での圧力校正方法を確立した。

(3) X線回折強度とミオシン頭部結合数の関係(田村^{*1}, 若山^{*1}, 岩本^{*4}, 藤澤)

X線回折強度とその構成蛋白質の個数の関係を知ることは非常に重要なことである。過伸張された骨格筋に外部から様々な濃度のミオシン頭部S1を加え、X線回折強度を測定して細いフィラメントに結合するS1量を推定した。その結果、理論上結合数の2乗と比例関係にあるべき回折強度がS1低濃度では系統的に小さくなった。モデル計算の結果、これはS1の細いフィラメントに対する協同的な結合を示唆する(高輝度光科学研究センター 八木直人氏との共同研究)。

(4) X線小角散乱法によるCooAの転写調節メカニズムの解明(秋山^{*2}, 藤澤)

*Rhodospirillum rubrum*においてCOの酸化反応を担う酵素群の発現量は、CO結合ヘム蛋白質であるCooAによって制御されている。近年米国のグループによりCooAのCO非結合型(-CO型)の結晶構造が解明されたが、CO結合型(+CO型)の結晶構造は知られていない。そこで我々は、CO存在下・非存在下におけるCooAのX線小角散乱曲線を測定し、溶液構造の変化から転写調節メカニズムを明らかにすることを試みた。COの存在に関わらず、観測された散乱曲線は既知の結晶構造から全く説明できなかった。そこで、実験から得られた散乱曲線に合致する低分解能電子密度像を計算し、さらにrigid body refinementを行った。得られたモデル構造は、これまでに提唱されてきた仮説と一線を画するものであり、-CO型の段階で既にDNA結合ドメインがヘムドメインの近傍に位置していることが明らかとなった。COの結合に伴い、DNA結合ドメインは分子の回転対称軸に沿っておよそ8度回転しつつ、僅かにヘムドメインから離れることが示唆された(京都大学大学院工学研究科 石森研との共同研究)。

(5) X線小角散乱によるヒスチジinkinナーゼの低分解能構造解析(秋山^{*2}; 山田(生体物理化学研究室))

ヒスチジinkinナーゼは、結合したATPの γ リン酸基を自身のヒスチジン残基に転移させ、さらにレギュレーター蛋白質へと転移させる。ヒスチジinkinナーゼを構成するサブドメインの単体構造は、NMRや結晶構造解析によって研究されてきた。近年、それら単体構造とジスルフィド・マッピングの結果を基にしたヒスチジinkinナーゼの全体構造モデルが報告された。我々は、提唱されている全体構造モデルの妥当性を検証するに止まらず、リン酸転移を起こす際に形成される「ヒスチジinkinナーゼとレギュレーター蛋白質の複合体」についても研究することを目的とし、X線小角散乱測定するための予備実験を行った。

(6) 時分割溶液散乱によるアボミオグロビンの折れ畳み過程の研究(鶴沢^{*5}, 木村^{*5}, 高橋^{*4}, 秋山^{*2}, 藤澤)

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、アボミオグロビンの折れ畳み運動をサブミリ秒領域で追跡している。折れ畳み運動開始後300マイクロ秒

以内に大規模な主鎖の収縮が起きた後、2次構造と3次構造が段階的に形成することが判明した。この結果から、折り畳みの初期に疎水性残基が集合した収縮ドメインが形成し、主鎖の立体自由度を大幅に制約する疎水性環境を作り出すことで、2次構造と3次構造の形成が誘起されるという折れ畳み運動を提案した。

(7) 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(藤澤; 岩田, 青柳, 藤田(高分子化学研究室))

生分解性プラスチック, ポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート]の引張り過程とらせん構造の変化を知るため, BL45XU-SAXSにて張力とX線回折の同時時分割測定を行った。降伏点までは, 2回らせん構造から構成される α 結晶に由来する回折点の回折強度, 面間隔値, 長周期に変化はなかった。降伏点を越えると, α 結晶に由来する回折点の回折強度は減少し, (110), (020)などの面間隔値も減少した。それに対し, (012)の面間隔は増大し, 平面ジグザグ構造の発現を示唆する新たな回折点が赤道線上に現れた。小角領域でも赤道線上の変化は確認された。

*¹ 協力研究員, *² 基礎科学特別研究員, *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 realizing various conformations. Populations of molecules at particular conformations may be increased or decreased by the interaction with a particular actin binding protein. In order to understand how the actin filament works, we will have to know the structure of the multiple conformations together with the equilibrium and kinetic constants associated therewith. We aim at, on one hand, elucidating the “static” atomic structures of the actin filament complexes and, on the other, understanding the dynamic properties of the complexes. In doing so, we would like to establish the strategies for understanding the mechanisms from the atomic structures, which is one of the central questions the modern biology is addressing.

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

The crystal structure of troponin (the core domain), which plays the central roles in the calcium regulation of muscle contraction, has elucidated intra-molecular structural changes of troponin. X-ray fiber diffraction study of oriented actin filament complexes in glass capillaries indicated that the Ca^{2+} binding diminishes the positional fluctuation of the tropomyosin strands, bringing into a specific position, and shifts the position of troponin closer to the filament axis. The neutron scattering in combination with the contrast variation method have elucidated that Ca^{2+} -induced conformational changes of troponin C within the actin/Tm/Tn complex. At the low $[\text{Ca}^{2+}]$, troponin C, that consists of two similar lobes being connected with a single α -helix, is in a fully extended conformation, whereas upon Ca^{2+} binding, troponin C is further extended passively probably due to the interactions with other components within the complex.

2. Atomic structure and dynamic properties of the actin filament

We have completed our modeling for the atomic struc-

ture of polymerized actin (F-actin). First, well oriented F-actin sols were prepared in glass capillaries. Combining the X-ray diffraction intensities from the sols with the phase information from the cryo-EM picture of a single F-actin, we have obtained an electron density map of F-actin at 20 Å resolution. This year, by use of the normal mode analysis and others, we have refined the atomic model, resulting in the best F-actin model. The model indicates that the inter-subunit interactions between the diagonally related subunits are weaker, being contributed by the helix-helix interaction between the two subunits. By use of the X-ray fiber diffraction from oriented sols, the positions of F-actin stabilizing agents, phalloidin and dolastatin-11, were determined on F-actin. The results indicated that F-actin is stabilized by the enforcement of the helix-helix interactions by these agents.

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 from capping proteins and tropomyosin as a ruler. In 2003, we published the crystal structure of the actin filament B-end-capping protein CapZ (an α -, β - hetero-dimer). The structure made us propose that C-terminal 20-30 residues of each subunit may be protruded from the molecule, being responsible for actin binding. By mutagenesis experiments, we have proven that the “tentacle” hypothesis is correct. Moreover the results also indicated that a pair of “tentacles” are substantially different.

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

In order to visualize conformational changes of troponin molecules within the actin filament complex, we are developing a new optical microscopy method for determining the direction of a single fluorophore attached to the protein.

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

The sub-group within our lab, led by Dr. Tetsuro Fujisawa, is in charge of up-grading the SPring-8 beam line BL45XU-SAXS (for the small angle diffraction) and interacting with outside users of the beam-line. The beam-line has been designed for recording the entire intensity profile with high precision after a short period of time. In combination with the high speed mixing flow cell that was previously developed in collaboration with the lab of Takahashi in Kyoto Univ., we have captured a folding intermediate of short life-time (200 μsec). As an in-house project, we have been constructing an experimental apparatus for measuring protein conformations under high hydrostatic pressure.

Research Subjects and Members of the 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. Atsuko YAMASHITA
 Dr. Yasushi NITANAI
 Mr. Akihiro YAMAMOTO
 Dr. Akihiro NARITA^{*1}
 Dr. Shuji AKIYAMA^{*1}
 Dr. Hiroshi IMAI^{*2}
 Dr. Michael W. LASSALLE^{*2}
 Dr. David POPP^{*2}
 Dr. Vladimir A. MESHCHERYAKOV^{*2}
 Dr. Shungo DESHIMARU^{*2}
 Dr. Junichi WAKAYAMA^{*2}
 Mr. Mitsusada IWASA^{*2}
 Mr. Shigeo KUWAMOTO^{*2}
 Ms. Fumiko MATSUMOTO^{*2}
 Mr. Takumi TAMURA^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

Technical Staff

Mr. Takashi IIZUKA

Assistants

Mr. Syogo TAKEUCHI
 Ms. Sachiko YUKI
 Ms. Junko ITO
 Ms. Junko NAKAMURA

in collaboration with

Dr. Takayuki OKAMOTO (Nanophotonics Lab.)
 Mr. Yoshihiro AOYAGI (Polymer Chemistry Lab.)
 Dr. Masahiro FUJITA (Polymer Chemistry Lab.)
 Dr. Tadahisa IWATA (Polymer Chemistry Lab.)
 Dr. Seiji YAMADA (Biophysical Chemistry Lab.)
 Dr. Kayo MAEDA (Cellular Signaling Lab.)

Visiting Members

Dr. Satoru FUJIWARA (JAERI)
 Dr. Hiroyuki IWAMOTO (JASRI)
 Dr. Soichi TAKEDA (Res. Inst., Natl. Cardiovasc. Cen.)
 Dr. Takayoshi MATSUBARA (Res. Inst., Natl. Cardiovasc. Cen.)
 Ms. Shiho MINAKATA (Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)
 Dr. Satoshi TAKAHASHI (Sch. Technol., Kyoto Univ.)
 Dr. Yojiro TAMURA (Suzuka Natl. Coll. Technol.)
 Dr. Jin-Ye WANG (Shanghai Inst. Org. Chem., Chi. Acad. Sci., China)
 Dr. Kazuo ONUMA (Natl. Inst. Adv. Ind. Sci. Technol.)
 Dr. Sugie FUJIME (JST)

Trainees

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

- Fujisawa T., Kostyukova A., and Maéda Y.: "The shapes and sizes of two domains of tropomodulin, the P-end capping protein of actin-tropomyosin", *FEBS Lett.* **498**, 67-71 (2001). *
- Kimura C., Maeda K., Hai H., and Miki M.: "Ca²⁺- and S1-induced movement of troponin T on mutant thin filaments reconstituted with functionally deficient mutant tropomyosin", *J. Biochem.* **132**, 345-352 (2002). *
- Yamashita A., Endo M., Higashi T., Nakatsu T., Yamada Y., Oda J., and Kato H.: "Capturing enzyme structure prior to reaction initiation: tropinone reductase-II-substrate complexes", *Biochemistry* **42**, 5566-5573 (2003). *
- Wear M. A., Yamashita A., Kim K., Maéda Y., and Cooper J. A.: "How capping protein binds the barbed end of the actin filament", *Curr. Biol.* **13**, 1531-1537 (2003). *
- Fujisawa T., Nishikawa Y., Yamazaki H., and Inoko Y.: "Evaluation and improvements of the Rigaku imaging plate reader(R-Axis IV++) for the use in synchrotron X-ray solution scattering", *J. Appl. Cryst.* **36**, 535-539 (2003). *
- Takahashi Y., Nishikawa Y., and Fujisawa T.: "Evaluation of three algorithms for *ab initio* determination of three-dimensional shape from one-dimensional solution scattering profiles", *J. Appl. Cryst.* **36**, 549-552 (2003). *
- Tanaka M., Machida Y., Nishikawa Y., Akagi T., Hashikawa T., Fujisawa T., and Nukina N.: "Expansion of polyglutamine induces the formation of quasi-aggregate in the early stage of protein fibrillization", *J.*

- Biol. Chem. **278**, 34717–34724 (2003). *
- Oda T., Crane Z. D., Dicus C. W., Sufi B. A., and Bates R. B.: “Dolastatin 11 connects two long-pitch strands in F-actin to stabilize microfilaments”, *J. Mol. Biol.* **328**, 319–324 (2003). *
- Takeda S., Yamashita A., Maeda K., and Maéda Y.: “Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form”, *Nature* **424**, 35–41 (2003). *
- 郭志徹, 高増潔, 山本明弘, 和田智之, 洲之内啓, 加瀬究, 田代英夫: “波長走査干渉計における信号処理”, *精密工学会誌* **69**, 831–835 (2003). *
- (総説)
- 前田雄一郎, 山下敦子: “アクチン・ダイナミクスとアクチン・キャッピングタンパク質の結晶構造”, *遺伝子医学* **7**, 418–422 (2003).
- 前田雄一郎, 武田壮一, 森本幸生, 大槻磐男: “トロポニンの結晶構造とカルシウム調節のメカニズム”, *蛋白質 核酸 酵素* **48**, 1877–1889 (2003).
- 前田雄一郎: “アクチンフィラメント: 複合体の構造解明から動的性質の解明へ”, *日本結晶学会誌* **45**, 32–36 (2003).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Oda T., Heiko S., Makino K., Hasegawa K., Schroeder R. R., Namba K., and Maéda Y.: “3D reconstruction of F-actin using amplitudes from x-ray fibre diffraction and phase from cryoelectron microscopy”, *Gordon Research Conf. on Muscle: Contractile Proteins*, New London, USA, June (2002).
- Maéda Y.: “The actin filament-One motion mode: one function?”, *Mini-Symp. with Ken Holmes*, (Osaka University), Osaka, Mar. (2003).
- Nukina N., Tanaka M., Machida Y., Nishikawa Y., Akagi T., Hashikawa T., and Fujisawa T.: “Structural basis for polyglutamine disease pathogenesis: therapeutic strategy”, *Gordon Research Conf. on CAG Triplet Repeat Disorders 2003*, Barga, Italy, May (2003).
- Kostyukova A., Krieger I., Fujisawa T., Tiktopulo E., Yamashita A., Maeda K., Nitani Y., Greenfield N., Hitchcock-DeGregori S., and Maéda Y.: “Tropomodulin: from expression to atomic structure”, *Int. Symp. on Diffraction Structural Biology (ISDSB2003)*, (The 169th Committee of JSPS), Tsukuba, May (2003).
- Maéda Y.: “Application for Biology”, *Int. Workshop on Laser Wire Monitors and Laser-Compton X-ray Generation*, Kyoto, Nov. (2003).
- Oiwa K., Nakamori R., Fujisawa T., Iwamoto H., and Sakakibara H.: “Conformational changes of chlamydomonas inner-arm dynein subspecies C coupled to ATP hydrolysis studied by tryptic digestion and SAXS analysis”, *43rd Ann. Meet. of American Soc. for Cell Biology*, San Francisco, USA, Dec. (2003).
- Tamura T., Wakayama J., Yagi N., and Iwamoto H.: “Behavior of thin-filament-based X-ray reflections from skeletal muscle fibers during force development”, *48th Ann. Meet. of Biophysical Soc.*, Baltimore, USA, Feb. (2004).
- Wakayama J., Tamura T., Yagi N., and Iwamoto H.: “Mechanism of relaxation of slow skeletal muscle fibers from rigor after caged ATP photolysis”, *48th Ann. Meet. of Biophysical Soc.*, Baltimore, USA, Feb. (2004).
- Iwamoto H., Wakayama J., Tamura T., and Yagi N.: “X-ray cryomicrodiffraction of myofibrils”, *48th Ann. Meet. of Biophysical Soc.*, Baltimore, USA, Feb. (2004).
- (国内会議)
- 若山純一, 田村巧, 井上勝晶, 岡俊彦, 八木直人, 岩本裕之: “Caged ATP 光分解にともなう筋収縮蛋白構造変化の超高速時分割 X 線回折”, *第 40 回日本生物物理学会年会*, 名古屋, 11 月 (2002).
- 若山純一, 田村巧, 井上勝晶, 岡俊彦, 八木直人, 岩本裕之: “Caged ATP 光分解に伴う遅筋型収縮蛋白の構造変化の超高速時分割 X 線回折”, *2003 年生体運動研究合同班会議*, 福岡, 1 月 (2003).
- 前田雄一郎, 小田俊郎: “アクチンフィラメントに複数の状態は存在するか?”, *2003 年生体運動研究合同班会議*, 福岡, 1 月 (2003).
- 瀧景子, 成田哲博, 前田雄一郎, Schroer T.: “ダイナクチン複合体の構成蛋白質の配置”, *2003 年生体運動研究合同班会議*, 福岡, 1 月 (2003).
- 三木正雄, 海宏, 佐伯喜美子, 志鷹裕司, 佐野健一, 前田雄一郎, 若林健之: “筋肉の細いフィラメント上でのトロポミオシンの C 端側の構造変化について”, *2003 年生体運動研究合同班会議*, 福岡, 1 月 (2003).
- 松本富美子, 牧野浩司, 前田佳代, 前田雄一郎, 藤原悟: “中性子散乱による細いフィラメント上のトロポニン C の構造研究”, *2003 年生体運動研究合同班会議*, 福岡, 1 月 (2003).
- 岩田忠久, 青柳佳宏, 藤田雅弘, 藤澤哲郎, 土肥義治: “大型放射光を用いたポリ [(R)-3-ヒドロキシブチレート] フィルムにおける平面ジグザグ構造発現機構の解析”, *第 52 回高分子学会年次大会*, 名古屋, 5 月 (2003).
- 前田雄一郎: “生体中のフィラメント構造をどのように解明するか”, *理研シンポジウム「次世代の生命科学を拓くオングストローム X 線レーザー」*, 和光, 6–7 月 (2003).
- 岩本裕之, 若山純一, 八木直人, 田村巧, 藤澤哲郎: “急速凍結した各種動物横紋筋の筋原線維からの X 線回折”, *日本動物学会第 74 回大会*, 函館, 9 月 (2003).
- 岩佐充貞, 佐野健一, 前田佳代, 前田雄一郎: “ヒト筋肉アクチン発現系の構築”, *第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会*, 新潟, 9 月 (2003).
- 田村巧, 若山純一, 井上勝晶, 岡俊彦, 八木直人, 岩本裕之: “骨格筋張力発生に伴う細いフィラメント由来 X 線反射の 2 次元高速時分割測定”, *第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会*, 新潟, 9 月 (2003).
- 藤原悟, 米澤康滋, 弟子丸俊吾, 藤澤哲郎, 松本富美子: “X 線小角散乱及び CD 測定によるリゾチームアミロイドプロトフィラメント形成過程の解析”, *第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会*, 新潟,

9月(2003).

鶴澤尊規, 木村哲就, 高橋聡, 石森浩一郎, 森島績, 秋山修志, 藤澤哲郎: “アポミオグロビンの折れ畳み過程における主鎖の収縮と三次構造の構築”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

桑本滋生, 藤澤哲郎, 秋山修志, 前田雄一郎, 岡本洋: “骨格筋HMMの溶液中での圧力応答”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

秋山修志, 藤澤哲郎, 前田雄一郎, 石森浩一郎, 森島績, 青野重利: “X線小角散乱法でCooAの転写調節メカニズムに迫る”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

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, 2”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

岩本裕之, 上田太郎, 片山栄作, 若山純一, 田村巧, 大岩和弘, 藤澤哲郎: “粘菌変異ミオシンG680V-S1を灌流した骨格筋線維のX線回折”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

若山純一, 田村巧, 井上勝晶, 岡俊彦, 八木直人, 岩本裕之: “Caged ATP光分解に伴う遅筋型筋収縮蛋白の構造変化の超高速時分割二次元X線回折”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

小田俊郎, 前田雄一郎: “F-actinの構造解析”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

木邑智恵子, 志鷹裕司, 前田佳代, 三木正雄: “カルシウム結合解離に伴う細いフィラメント上のトロポニンTの動きの速度”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

成田哲博, 牧野浩司, 山下敦子, 前田雄一郎: “フィラメント結合タンパク質構造の一般解法を目指して”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同

年会, 新潟, 9月(2003).

松浦圭益, 木邑智恵子, 前田佳代, 三木正雄: “蛍光エネルギー移動法でみるTnC分子内, 及びTn複合体内部での構造変化”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

前田雄一郎, 武田壮一, 小田俊郎: “原子構造から見たアクチンフィラメントの柔らかさ”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

松本富美子, 牧野浩司, 前田佳代, Patzelt H., 前田雄一郎, 藤原悟: “細いフィラメント上における収縮調節蛋白質の中性子溶液散乱による構造解析”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

弟子丸俊吾, 丸田晋策, 松本富美子, 荒田敏昭, 若林克三, 藤原悟: “平滑筋ヘビーメロミオシンの中性子小角散乱”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).

岩田忠久, 青柳佳宏, 藤田雅弘, 山根秀樹, 土肥義治, 藤澤哲郎, 鈴木芳夫, 竹内晃久, 上杉健太郎: “ポリ([R]-3-ヒドロキシブチレート)の高強度化, 高次構造および生分解性”, 第52回高分子討論会, 山口, 9月(2003).

田村巧: “骨格筋張力発生に伴う細いフィラメント由来X線反射の2次元高速時分割測定”, 理研シンポジウム「理研構造生物IXシンポジウムPart1. 脂質メディエーター関連タンパク質の生物学からその応用発展Part2. 放射光構造生物の進展とさらなる飛躍を目指して」, 播磨, 1月(2004).

成田哲博, 牧野浩司, 山下敦子, 前田雄一郎: “フィラメント結合タンパク質構造の一般解法を目指して”, 2004年生体運動研究合同班会議, 東京, 1月(2004).

田村巧, 若山純一, 井上勝晶, 八木直人, 岩本裕之: “細いフィラメント活性化過程の2次元高速X線時分割解析”, 2004年生体運動研究合同班会議, 東京, 1月(2004).

弟子丸俊吾, 丸田晋策, 松本富美子, 荒田敏昭, 若林克三, 藤原悟: “平滑筋ヘビーメロミオシンの中性子小角散乱”, 2004年生体運動研究合同班会議, 東京, 1月(2004).