

宮野構造生物物理研究室

Structural Biophysics Laboratory

主任研究員 宮野 雅 司
MIYANO, Masashi

脂質は、開放系である細胞さらには細胞内小器官を物理化学的に内と外に区分する細胞膜の主要構成成分であり、最初に知られた脂質メディエーターであるエイコサノイドはもちろん、生物学的に栄養学的希少性から代謝産物としてごく普通の単純脂肪酸まで情報メディエーターとして働いていることが、明らかにされつつある。このため、急激な食生活の変化から脂質過剰摂取に伴う生活習慣病の病因・病態との関連がますます注目されている。脂質関連生体物質の動態・作用に関わるタンパク質群の分子構造・機能研究を通じて、基礎生物学はもちろん医学薬学分野など応用も視野に入れた脂質とタンパク質の機能生物学へと展開することで生物特有の特異性と選択性、さらに複合的多機能性を持つタンパク質の造る複合時空ネットワーク・ダイナミクス的一端について、明らかにすることを目指している。この目的達成に必要な、膜タンパク質など困難タンパク質の発現精製・結晶化の検討さらには関連する先端技術開発について平行して行う。

1. 脂質関連タンパク質の構造解析をもとにした機能の解明

(1) 脂質メディエーターエイコサノイド関連酵素の構造生物学研究 (堀, 吾郷, 宮野, 清水 (孝) *1)

エイコサノイドは研究の進展に伴いその範囲が急速に広がっている多様な生理機能を持つ、脂質メディエーターのうち古典的というべき酵素群である。その非常に生物活性の高いエイコサノイドの濃度はその生成速度と同時に不活性化速度によって動的に決まる。プロスタグランジン、ロイコトリエン生成酵素群についての構造生物学研究は確実に進展してきているが、我々は初めてエイコサノイド不活性化酵素、ロイコトリエン B₄ 12-水酸化酵素/15-ケトプロスタグランジン還元酵素の立体構造を明らかにした。このエイコサノイド不活性化多機能酵素、ロイコトリエン B₄ 12-水酸化酵素/15-ケトプロスタグランジン還元酵素は、脂質メディエーターのうち、化学的に安定なロイコトリエン B₄ (LTB₄) やプロスタグランジン E₂ (PGE₂)、リポキシン A₄ (LXA₄) を積極的に代謝して不可逆的不活性化する。本酵素は LTB₄ の不活性化経路の初発酵素として、LTB₄ の 12 位の水酸基を酸化して LTB₄ を不活性化する。また、15-ケトプロスタグランジン E₂ や 15-ケトリポキシン A₄ の 13 位の二重結合を還元し、PGE₂ や LXA₄ を完全に不活性化する。つまり本酵素は脂質メディエーターの不活性化において、異なる分子の異なる部位の酸化と還元を担う多機能酵素として働いている。また、いくつかの非ステロイド抗炎症薬で活性阻害を受ける。本酵素の分子反応機構を理解するために、結晶構造学的研究を行っている。これまで、本酵素のアポ体、NADP⁺ 複合体、NADP⁺ および 15-ケトプロスタグランジン E₂ との複合体の結晶構造および還元反応の反応機構を明らかにした。また SH3 ドメインを含むタンパク質により本酵素が活性制御を受ける可能性のある PPI-II 様構造を持ち、抗ガン剤によって誘導されるこの酵素が、活性制御を受けうる構造を持っていることで改めて不活性化過程の重要性を再認識すべきことを示唆した。本年度は、NADP⁺ および非ステロイド抗炎症薬の 1 つであ

るインドメタシンとの複合体の結晶構造を明らかにした。インドメタシンは、15-ケトプロスタグランジンと同部位に結合していたので、複数標的薬の典型であるインドメタシンによる本酵素の阻害形式は基質結合部位に対する競合阻害である。

(2) プロスタグランジン D₂ 合成酵素 (PGDS) の構造と機能解析 (吾郷, 宮野, 入倉 *1, 裏出 *1, 井上 (豪) *1, 井上 (勝); 佐藤 (高等動物タンパク質構造解析研究チーム))
多機能酵素であるリポカリン型 (あるいは脳型) PGDS の構造と機能研究を進め、これまでの構造解析に加えて、初めての複合体の精密化を行った結果、精製中に添加したレチノイン酸との複合体であった。L-PGDS の内在性蛍光消光法によって示唆されていたとおり、β イオノン環は予想された芳香環残基群の近傍にあったが、その結合様式は、これまでのレチノイン酸結合タンパク質複合体とは全く異なっていた。さらに、L-PGDS の生成する PGD₂ はその位置異性体で生物作用も逆である PGE₂ などに比べて化学的に不安定であり、脳髄液中に β トレースとして大量に存在する L-PGDS がこの不安定な PGD₂ に対して全く違う生物機能を持つ働きがある可能性を示した。

さらに創薬を視野に入れた研究の一環として、分子進化的に独立なもう 1 つの PGDS である造血器型 PGDS (H-PGDS) に対する阻害薬、HQL-79 の薬効評価を、筋ジストロフィーモデルマウスを用いた実験により行った。現在までに、mdx マウス (筋ジストロフィーモデルマウス) を用いた解析から、このマウスに特徴的な広範囲の骨格筋壊死に対する軽減効果を明らかにした。HQL-79 は経口投与可能な生体内 H-PGDS の酵素阻害が確認されており、すでに共結晶を用いた構造解析により、酵素活性阻害の分子メカニズムが明らかとなっているので、効果・選択性がより高い阻害剤開発を目指した薬剤設計モデルとなる。(大阪バイオサイエンス研究所との共同研究)

(3) 病原性セリウス菌由来スフィンゴリエリン水解酵素の構造機能解析 (吾郷, 宮野, 津下 *1)

生体膜を構成する複合脂質の主要構成リン脂質の 1 つで

あるスフィンゴミエリンの分解産物であるセラミドは、二次情報伝達物質として細胞外からの情報伝達に関わる。また最近、セラミドは外傷性の神経細胞アポトーシスにも関わっていることが示された。スフィンゴミエリンを水解するスフィンゴミエリナーゼ (SMase) のうち、スフィンゴミエリナーゼ C (EC:3.1.4.12) がスフィンゴミエリンを、セラミドとコリン酸に加水分解する。病原性セリウス菌 (*Bacillus cereus*) 由来スフィンゴミエリン水解酵素 (*BcSMase*) は、スフィンゴミエリナーゼ C 活性と溶血活性を持ち、この 2 つの活性は互いに独立に必須金属イオンにより制御を受けると信じられているがその機構は全く知られていない。そして、このおよそ 300 残基のアミノ酸からなる *BcSMase* のアミノ酸配列は、他の細菌由来の SMase と高い相同性を示すばかりでなく、主に脳に分布し外傷性の神経細胞アポトーシスとの関連が指摘されているおよそ 650 残基のアミノ酸からなるヒト由来中性 SMase (nSMase) の後半のアミノ酸配列と有意な相同性を持つ。従って *BcSMase* の立体構造決定と基質認識機構の解明は、酵素活性とアミノ酸配列の相同性から、*BcSMase* と相同な基質認識機構を持つと推定される nSMase の機能と構造の研究にも新たな手がかりを与えると考えられる。そこで、*BcSMase* の金属イオン活性化の分子機構を明らかにするためその立体構造解析を進めた。本年度は X 線結晶構造解析の手法により *BcSMase* の構造決定を行い、活性に必須な金属イオンとの複合体構造を決定した。

2. 結晶構造解析を指向したタンパク質の大量発現精製・結晶化

(1) 膜タンパク質を含む脂質関連タンパク質の大量調製と結晶化 (島村 *2, 吾郷, 堀, 中山 *1, 宮野, 岩田 *1, 入倉 *1, 金岡 *1, 裏出 *1, 井上 (豪) *1, 清水 (孝) *1, 石井 *1; 佐藤 (高等動物タンパク質構造解析研究チーム))

タンパク質全体の約 30% を占めている GPCR を含む膜タンパク質は、開放系である細胞の中と外の間の情報、エネルギー、物質の輸送、伝達等、生物で極めて重要な基本的な働きを担っている。細胞の外と中を結ぶ仲介役としての重要性から創薬のターゲットの約 50% が膜タンパク質であり、膜タンパク質の立体構造を明らかにすることは、応用上からの意義も大きい。しかし膜タンパク質は大量に精製することが難しいため、構造はまだほとんど分かっていない。そこで我々は、数種の膜タンパク質について立体構造の解析を目指し、まず、細菌だけでなく、真核生物由来の膜タンパク質についても発現および精製系の構築を試みた。発現は、主に大腸菌と酵母を用い、精製を容易にするために、His-tag を導入した。その結果、7 種の膜タンパク質について、結晶化の検討を行うに十分な純度と量で精製する系を確立することに成功した。

エイコサノイドなどの脂質メディエーター群は様々な生理活性を持ち、特に炎症やアレルギーの原因物質として考えられる。その多くは G-タンパク質共役型受容体 (GPCR) への結合を通してこうした病的な作用を発揮するので、これらの GPCR の構造情報が創薬開発の鍵となっている。そこで、大量調製・結晶化がさらに困難な GPCR の結晶解析を進められるだけの質と量で調製することを目指して、大量発現系の構築の検討を行っている。本年度は、ロイコト

リエン B₄ 受容体 (BLT1) および血小板活性化因子受容体 (PAFR), プロスタグランジン D₂ (DP1) 受容体の発現系構築を、大腸菌、およびショウジョウバエ細胞を宿主とした系で、様々な発現タグとの融合タンパク質として広範に発現スクリーニングを行った。この結果、DP1 と BLT1 については、恒常産生株を樹立した。

(2) ヒト脂肪細胞由来ロイシニアミノペプチダーゼの構造解析に関する研究 (石嶋 *2, 宮野; 服部, 辻本 (辻本細胞生化学研究室))

ヒト脂肪細胞由来ロイシニアミノペプチダーゼ (A-LAP) は Zn²⁺ 結合型金属メタロプロテアーゼであり、M1 ファミリーに共通で活性発現に不可欠な HEXXH(X)₁₈E モチーフを有している。A-LAP は生体内において小胞体内腔に局在し、その生理学的機能は MHC-I におけるペプチド抗原提示時のトリミングであることが明らかになった。Sf9 細胞を用いて発現・精製した A-LAP の結晶化を試みた。

3. 精密な構造解析を目指したタンパク質構造解析技術に関する研究

(1) マキシマムエントロピー法 (MEM) を利用したタンパク質構造の精密解析の試み (石嶋 *2, 吾郷, 宮野, 西堀 *1, 坂田 *1)

近年、X 線結晶構造解析におけるモデルバイアスの低減に、マキシマムエントロピー法 (MEM) を利用する試みが行われ始めている。タンパク質結晶から得られる回折データは、低分子のそれと比べた場合、一般的に低品質である。このため、フーリエ法で計算される電子密度はモデルの影響 (モデルバイアス) を強く受けるが、MEM は電子密度計算にフーリエ法を使わないためモデルバイアスの影響を受けにくいと考えられる。しかし、タンパク質 X 線結晶構造解析に於ける MEM の効果がいかなるものであるのかが十分に検討されていない。本年度はまず、これらを行う前段階として、MEM 計算を実用的な時間内で終了できる装置の導入を行い、その装置の評価を行った。

4. そのほかのタンパク質の構造と機能解析

(1) 高度好熱菌由来リボース 5 リン酸異性化酵素の結晶構造解析による分子反応機構解明 (石嶋 *2, 吾郷, 宮野)

地上に生きているどの細胞にもあり、きわめてよく保存されているリボース 5 リン酸異性化酵素 (RPI) は酸化的ペントースリン酸回路においてリボース 5 リン酸 (R5P) とリブロース 5 リン酸 (Ru5P) の可逆的な異性化を触媒する。また、RPI は植物のカルビンサイクルにおいても R5P を Ru5P に変換する。我々は RPI の触媒反応機構を原子レベルで理解することを目的に研究を進めてきた。この中ですでに、高度好熱菌 (*Thermus thermophilus* HB8) 由来の RPI により、初めて異性化触媒反応の開環型反応中間体の高分解能複合体の構造をその立体異性阻害剤複合体構造とともに明らかにして、その反応機構を詳細に議論した。この異性化反応は、最初の 5 員環をリボース 5 リン酸が開環することでこの複合体が形成されたものであると考えられているので、開環型形成に先立つ 5 員環の開環も酵素触媒によるものと予想された。そこで、この開環反応についての酵素触媒機構を明らかにするため、RPI の触媒候補の残基に変異を導入し、機能解析とともにその変異体複合体 3

種類の高分解能構造解析を行った。

(2) ホーミングエンドヌクレアーゼ I-Tsp061I の結晶構造に基づく DNA 認識機構の解析 (中山 *1, 島村 *2, 宮野, 津下 *1)

ホーミングエンドヌクレアーゼ (HEase) はイントロンやインテインの水平伝播の鍵酵素である。HEase は長い DNA 配列 (14-40 bp) を認識して切断する部位特異的 DNA エンドヌクレアーゼとして機能する。この長い DNA 配列認識はまた、極めてまれな位置で切断する rare-cutting enzyme として機能する。ゲノム研究において HEase は部位特異的な遺伝子組換えや長い DNA 断片のクローニング (メガベース・クローニング) 等に应用可能である。現在のところ、切断できる対象部位が限定されており、広く応用できるまでには至っていない。この汎用性の低さを克服するため、既存の HEase の認識配列を改変し新規 HEase を作成する事を最終目標としている。HEase の効率的な認識配列改変を行うために、超好熱古細菌 *Thermoproteus sp.* IC-061 株の 16S rDNA イントロン内部の ORF にコードされていた I-Tsp061I を用い、2.0 Å の分解能で X 線結晶構造解析を行った。I-Tsp061I は LAGLIDADG ファミリーに属し、それらに特徴的な触媒活性モチーフを 1 分子内に 2 つ繰り返し持つ単量体型 HEase であった。I-Tsp061I の結晶構造に基づき DNA 複合体モデルを作成し相互作用を検討した。DNA と塩基特異的な相互作用をするアミノ酸残基候補を複数選択し、位置特異変異導入した I-Tsp061I の変異体について、基質特異性変化を検定するために様々な塩基配列を含む基質に対する加水分解活性測定をしている。

(3) 植物由来新規 Ca 結合タンパク質の構造・機能解析 (石嶋 *2, 宮野, 長崎 *3, 前島 *1)

植物細胞に存在する液胞は細胞容積の 80~90% を占め、液胞内 Ca^{2+} の量は ER や細胞壁区画と比べてはるかに多い。生体にとってカルシウムはセカンドメッセンジャーとしてその重要性は当然であるが、まだこうした植物液胞内でのカルシウムの機能はもちろん動態さえ不明である。そこで大根の液胞中に大量に発現している全く新規な Ca^{2+} 結合タンパク質 RVCaB が液胞中で Ca^{2+} を貯蔵する仕組みを解析するため、組換え体 RVCaB のカルシウム結合実験を等温カロリメトリー、円偏光 2 色性熱変性実験などで構造変化熱変化をもとに検討した。

*1 訪問研究員, *2 協力研究員, *3 研修生

The structural biophysics laboratory is focused on the structure-based functional analysis of the enzyme and receptor proteins relevance to lipids, because this class of proteins are not only biologically important but one major target for the development of many therapeutics for inflammation and immuno-modulations. The other objective is to develop new technologies for SR protein crystallography.

1. Structure based functional study of proteins related to lipids

(1) Crystallographic study of an essential multi-eicosanoid inactivating enzyme

The bi-functional leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase (LTB₄ 12-HD/

PGR) is an essential enzyme for eicosanoid inactivation. It is responsible for the clearance of the E and F series of 15-oxo-prostaglandins (15-oxo-PGs), leukotriene B₄ (LTB₄) and 15-oxo-lipoxin A₄ (15-oxo-LXA₄). The crystal structure of the LTB₄ 12-HD/PGR with NADP⁺ and indomethacin as a common NSAID was solved. The bound indomethacin shared the same binding site as 15-oxo-PGE₂, indicating that the indomethacin inhibits LTB₄ 12-HD/PGR competitively.

(2) Structural and functional analysis of the two types of the phylogenetically independent Prostaglandin D synthases (PGDSs)

The lipocalin type PGDS is a multi-functional protein of the enzymatic lipocalin family protein with the binding capability of lipophilic ligands like retinoids. The first complex structure with retinoic acid was solved and refined.

H-PGDS as the other PGDS was abundantly observed in grouped necrotic muscles. We therefore hypothesized that H-PGDS and its product PGD₂ may deteriorate the wound progression, and examined whether a H-PGDS specific inhibitor could be used as an effective substance for dystrophic mice therapy. Oral administration of HQL-79 prevented wound expansion and accelerated the activation of macrophages in the wounded area in the bupivacaine-induced muscular necrosis model and the genetically dystrophin null mice. The H-PGDS inhibitor, HQL-79 realizes the preventive effect for wound expansion by reducing the PGD₂ production of H-PGDS.

(3) Crystallographic analysis of sphingomyelinase

Ceramide is one of the intrinsic lipid mediators. Sphingomyelinase (SMase) is responsible for producing ceramide from sphingomyelin, a component of the plasma membrane. Sphingomyelinase from *Bacillus cereus* (Bc-SMase) is homologous not only to various bacterial SMases but also to the human neutral SMase in the last half of the amino acid sequence. The crystal structures of various divalent metal ions were determined.

2. Production and crystallization of lipid relevant proteins including membrane proteins for structural studies

(1) Production and crystallization of the membrane proteins including GPCRs

The structure determination of membrane proteins is a prerequisite in view of the medical and pharmaceutical needs as well. In order to solve the structures of membrane proteins, we first tried to construct expression and purification systems for several membrane proteins using mainly bacterial and yeast cells, while the targeted membrane proteins contain not only bacterial proteins but also mammalian proteins. The polyhistidine-tag fused proteins facilitate the purification, and we have succeeded in establishing the expression and purification systems for seven membrane proteins with amount and purity enough for the crystallization trials.

In this year, we have tried the expression of the leukotriene B₄ receptor 1 (BLT1), the platelet-activating factor receptor (PAFR) and the prostaglandin D₂ receptor (DP1) by *E. coli* and insect cell systems. Stably transformed insect cells expressing the recombinant GPCR were established and we confirmed the biological activity of the membrane fraction.

(2) X-ray crystal structure analysis of the human adipocyte-derived leucine aminopeptidase

Human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP) belongs to the M1 family of zinc-metallo-proteases,

which contain the consensus sequence HEXXH(X)18E motif. A-LAP was reported to localize in the endoplasmic reticulum and to be involved in the generation of the Major Histocompatibility Complex (MHC) class I-binding peptides by the N-terminal trimming of longer precursors. We have been trying to purify the recombinant protein from an Sf9 cell over-expression system and to construct large expression systems using *E. coli* cells.

3. Development of novel technologies for structure determination of proteins

(1) Maximum-entropy method for the further-refinement of the refined protein crystal structure

The Maximum Entropy Method (MEM) is rapidly gaining ground to reduce model bias in X-ray Crystallography. To evaluate the advantage of MEM based refinement, first, we designed and installed for evaluation of the MEM calculation.

4. Structural and functional analysis of other proteins

(1) X-ray crystal structural study of ribose-5-phosphate isomerase

The ubiquitous ribose-5-phosphate isomerase (Rpi) catalyzes the reversible isomerization between ribulose-5-phosphate (Ru5P) and ribose-5-phosphate (R5P) in the oxidative pentose-phosphate cycle. In this year, to clarify the sugar-ring-open mechanism of the enzyme, we are determining the high resolution crystal structures of Rpi mutants from *Thermus thermophilus* HB8.

(2) Characterization of DNA recognition mechanisms by structural and mutational studies using homing endonuclease I-Tsp061I

Homing endonuclease (HEase) is a key enzyme for intron/intein's lateral transfer. HEase is a site-specific DNA endonuclease, which recognizes and cleaves a relatively long sequence (14-40 bp). We attempted to create a novel HEase with optional recognition sequences from the known HEase, since we determined the x-ray structure of the 16S rDNA intron-encoded HEase I-Tsp061I as a LAGLIDADG family member from hyper-thermophilic archaeon *Thermoproteus sp.* IC-061 at 2.0 Å resolution to be elucidated the DNA binding residues. Based on the modeled DNA-enzyme complex, the residues, which may interact with the substrate DNA, were mutated and the resultant mutants were applied to the cleavage assay against the various substrates.

(3) Structural and functional analysis of RVCaB

In the plant cell, the vacuole can occupy more than 80% of a cell's volume and the concentration of Ca²⁺ in the vacuole is higher than in the ER or in the cell-wall compartment. To clarify the calcium dependency of a novel plant calcium binding protein RVCaB in the vacuole, the structural and functional differences were analyzed with or without Ca²⁺ ion.

Staff

Head

Dr. Masashi MIYANO

Members

Dr. Hideo AGO

Dr. Tetsuya HORI

Dr. Mitsuaki SUGAHARA

Dr. Jun ISHIJIMA *

Dr. Tatsuro SHIMAMURA *

*Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Masafumi TSUJIMOTO (Cell. Biochem. Lab.)

Dr. Akira HATTORI (Cell. Biochem. Lab.)

Dr. Yo SATO (Mamm. Protein Crystallogr. Team, Adv. Protein Crystallogr. Res. Group)

Visiting Members

Dr. Hiroshi HASHIMOTO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Dr. Yuko HISANAGA (Natl. Cardiovasc. Cen.)

Dr. Koh IDA (Sch. Sci., Kitazato Univ.)

Dr. Katsuaki INOUE (JASRI)

Dr. Tsuyoshi INOUE (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Mr. Daisuke IRIKURA (Harvard med. Sch., USA)

Dr. Satoshi ISHII (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Prof. So IWATA (Imp. Coll., UK)

Dr. Yoshihide KANAOKA (Harvard med. Sch., USA)

Dr. Yasuhiro KASHINO (Grad. Sch. Sci., Himeji Inst. Tech.)

Dr. Yuko KURAHASHI (Fac. Hum. Life Sci., Doshisha Women's Coll. Liberal Arts)

Prof. Masayoshi MAEJIMA (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

Dr. Michitaka MASUDA (Natl. Cardiovasc. Cen.)

Dr. Naoki MOCHIZUKI (Natl. Cardiovasc. Cen.)

Mr. Hitoshi NAKAYAMA (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Dr. Eiji NISHIBORI (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Prof. Makoto SAKATA (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Prof. Mamoru SATO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Prof. Takao SHIMIZU (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Dr. Toshiyuki SHIMIZU (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Hideyuki TAKA (Hitachi Software Eng. Co. Ltd.)

Prof. Hideaki TSUGE (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)

Dr. Yoshihiro URADE (Osaka Biosci. Inst.)

Ms. Hiroko UTSUNOMIYA (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)

Dr. Shigeo WAKABAYASHI (Natl. Cardiovasc. Cen.)

Prof. Shozo YAMAMOTO (Grad. Sch. Home Econ., Kyoto Women's Univ.)

Trainees

Mr. Hiroki ADEGAWA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kyouhei ARITA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama

City Univ.)
 Mr. Takuya HIRATA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Ms. Asami HISHIKI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Ms. Yuki IDE (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
 Ms. Kumiko IGARI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Tsuyoshi IMAZAKI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Makoto IWAMOTO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Ms. Michiko KATSUKAWA (Grad. Sch. Home Econ., Kyoto Women's Univ.)
 Mr. Shigeta KAWAGUCHI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Shigeyuki MOMOZAWA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)
 Ms. Nanako NAGASAKI (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)
 Mr. Yoichi NAOE (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Takashi ODA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Takashi SHIMADA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Yasuhiro SHIMIZU (Fac. Eng., Univ. Tokushima)
 Mr. Yasushi SUGIMOTO (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)
 Mr. Toshiharu TSURUMURA (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)
 Mr. Kazunari YONEDA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

- Lokanath N. K., Shiromizu I., Ohshima N., Nodake Y., Sugahara M., Yokoyama S., Kuramitsu S., Miyano M., and Kunishima N.: "Structure of aldolase from *Thermus thermophilus* HB8 showing the contribution of oligomeric state to thermostability", *Acta Cryst. D* **60**, 1816–1823 (2004). *
- Ueno G., Yamamoto M., Hirose R., Ida K., Kanda H., Miyano M., Kumasaka T., and Ishikawa T.: "High throughput protein crystallography at RIKEN structural genomic beamlines", *AIP Conf. Proc.* **705**, 1209–1212 (2004). *
- Ueno G., Hirose R., Ida K., Kumasaka T., and Yamamoto M.: "Sample management system for a vast amount of frozen crystals at SPring-8", *J. Appl. Cryst.* **37**, 867–873 (2004). *
- Hori T., Yokomizo T., Ago H., Sugahara M., Ueno G., Yamamoto M., Kumasaka T., Shimizu T., and Miyano M.: "Structural basis of leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase catalytic mechanism and a possible Src homology 3 domain binding loop", *J. Biol. Chem.* **279**, 22615–22623 (2004). *
- Hisanaga Y., Ago H., Nakagawa N., Hamada K., Ida K., Yamamoto M., Hori T., Arie Y., Sugahara M., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Miyano M.: "Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-coa synthetase dimer", *J. Biol. Chem.* **279**, 31717–31726 (2004). *
- Lokanath N. K., Ukita Y., Sugahara M., and Kunishima N.: "Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the vacuole-type ATPase subunit E from *Pyrococcus horikoshii* OT3", *Acta Cryst. F* **61**, 56–58 (2005). *
- Sugahara M., Nodake Y., Sugahara M., and Kunishima N.: "Crystal structure of dehydroquinase synthase from *Thermus thermophilus* HB8 showing functional importance of the dimeric state", *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **58**, 249–252 (2005). *
- (総説)
 宮野雅司, 菅原光明: "ハイスループット自動結晶化観察システム", *Med. Sci. Dig.* **30**, 161–162 (2004).
 河本正秀, 酒井久伸, 井田孝, 上野剛, 山本雅貴: "高輝度放射光によるタンパク質結晶構造解析の現状と問題点", *放射光* **17**, 330–337 (2004).
 宮野雅司, 堀哲哉: "7回膜貫通型受容体の構造と機能: ロドプシンを中心に", *医学のあゆみ* **212**, 9–15 (2005).
 (その他)
 菅原光明, 岡崎伸生, 宮野雅司: "全自動タンパク質結晶化観察ロボット (TERA)", *化学* **59**, No. 10, pp. 52–53 (2004).
 [単行本・Proc.]
 (その他)
 Kimura M., Yamamoto M., Furuichi M., Kumasaka T., and Yamaguchi I.: "An unexpected gift from fungicide metabolism studies: blasticidin S deaminase (BSD) from *Aspergillus terreus*", *Molecular Anatomy of Cellular Systems (Progress in Biotechnology, Vol. 22)*, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 55–60 (2002).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Miyano M., Ago H., Hori T., Kumasaka T., Inoue T., Hisanaga Y., Irikura D., Yokomizo T., Urade Y., Shimizu T., and Hayaishi O.: "Structural biology on lipid related proteins: toward the medical and medicinal applications", 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).
 Miyano M.: "Structures on lipid related proteins at structural biophysics laboratory", RIKEN-CCLRC Daresbury Symp.: Structural Biology, Daresbury, UK, May (2004).
 Sugahara M., Okazaki N., Nakamura Y., Kumei M., Tanaka T., Miyano M., and Yokoyama S.: "High

- throughput protein crystallization in Highthroughput Factory, SPring-8/RIKEN”, 10th Int. Conf. on the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM10), Beijing, China, June (2004).
- Hori T., Yokomizo T., Ago H., Sugahara M., Ueno G., Yamamoto M., Kumasaka T., Shimizu T., and Miyano M.: “Structural basis of leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase catalytic mechanism and a possible SH3-binding loop”, ASBMB Ann. Meet. and 8th IUBMB Conf., (American Society for Biochemistry and Molecular Biology and International Union of Biochemistry and Molecular Biology), Boston, USA, June (2004).
- Hisanaga Y., Ago H., Nakagawa N., Hamada K., Ida K., Yamamoto M., Hori T., Arai Y., Sugahara M., Mori H., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Miyano M.: “Structural basis of the substrate specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-coa synthetase dimer”, 5th Int. Conf. on Lipid Binding Proteins, Zao, Sept. (2004).
- Nishibori E., Koishi T., Narumi T., Tahirov T., Ago H., Taiji M., Miyano M., Ebisuzaki T., Makino J., and Sakata M.: “An x-ray structure determination by genetic algorithm with a special-purpose computer; MDM”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Shimamura T., Koike-Takeshita A., Yokoyama K., Masui R., Murai N., Yoshida M., Taguchi H., and Iwata S.: “Crystal structure of the native chaperonin complex from *Thermus thermophilus* revealed unexpected asymmetry at the *cis*-cavity”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Okazaki N., Tanaka T., Nakamura Y., Kumei M., Miyano M., and Sugahara M.: “Development of data processing for High-throughput crystallization with TERA”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Ueno G., Hirose R., Ida K., Kumasaka T., and Yamamoto M.: “Sample management system of frozen crystals at the SPring-8 RIKEN Structural Genomics Beamlines”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Hori T., Yokomizo T., Ago H., Sugahara M., Ueno G., Yamamoto M., Kumasaka T., Shimizu T., and Miyano M.: “Structural basis of leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase catalytic mechanism and a possible SH3 binding loop”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Hisanaga Y., Ago H., Nakagawa N., Hamada K., Ida K., Yamamoto M., Hori T., Arai Y., Sugahara M., Mori H., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Miyano M.: “Structural basis of the substrate specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Kawabata K., Saitoh K., Asama H., Sugahara M., Kunimitsu S., Mishima T., and Miyano M.: “Protein crystallizing state discrimination based on image processing”, 1st IEEE Tech. Exhibition Based Conf. on Robotics and Automation (TEXCRA 2004), (IEEE Robotics and Automation Society), Tokyo, Nov. (2004).
- Bagautdinov B., Takio K., Sugahara M., and Kunishima N.: “Crystallographic analysis of the biotin (acetyl-CoA-carboxylase)ligase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its complexes”, 3rd Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2004), (International Structural Genomics Organization and others), Washinton DC, USA, Nov. (2004). (国内会議)
- 佐藤陽, 有竹浩介, 毛利育子, 谷池雅子, 裏出良博: “Prevention of muscular necrosis by inhibition of hematopoietic prostaglandin D synthase”, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).
- 仲村勇樹, 田中智之, 岡崎伸生, 糸井麻希, 菅原光明: “Evaluation and optimization of full automated crystallization and observation robot system “TERA””, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 上野剛, 廣瀬雷太, 井田孝, 熊坂崇, 山本雅貴: “理研構造ゲノムビームラインの自動運転”, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 若山純一, 田村巧, 井上勝晶, 八木直人, 岩本裕之: “ADP 光遊離にともなうアクト-平滑筋 S1 複合体の構造変化の超高速時分割 X 線回折”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 菅原光明, 岡崎伸生, 仲村勇樹, 糸井麻希, 田中智之, 永島正嗣, 川村清和, 山井滋雄, 野々村健司, 佐藤貴久, 宮野雅司: “ポストゲノム時代の大規模処理システムの必要性と現状”, 第 5 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI2004), つくば, 12 月 (2004).
- 齊藤佳奈子, 川端邦明, 浅間一, 三島健稔, 菅原光明: “テクスチャ特徴量を用いたタンパク質結晶化状態判定手法: Support vector machine による識別実験”, 第 5 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI2004), つくば, 12 月 (2004).
- 宮野雅司, 菅原光明, 山本雅貴, 石川哲也, 吾郷日出夫: “SPring-8 における生命科学分野への応用”, 東京大学物性研究所短期研究会「高輝度放射光を用いた先端科学研究と新たな展開」, 東京, 12 月 (2004).
- 上野剛, 廣瀬雷太, 井田孝, 熊坂崇, 山本雅貴: “理研構造ゲノムビームライン自動運転の現状”, 第 18 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 鳥栖, 1 月 (2005).
- 吾郷日出夫, 久永裕子, 宮野雅司: “長鎖脂肪酸アシルコエンザイム A 合成酵素の構造と機能”, 第 10 回放射光医学研究会講演会, (萌芽的先端医療技術推進事業), 吹田, 1 月

(2005).

宮野雅司: “遺伝的アルゴリズムとマキシマムエントロピー法によるタンパク質結晶構造解析”, 理研シンポジウム「ナショナルセンター・理研播磨研究所合同シンポジウム

2005」, 播磨, 1月(2005).

堀哲哉: “生理活性脂質不活性酵素の結晶学的研究”, 理研シンポジウム「第2回ケミカルバイオロジーシンポジウム」, 東京, 2月(2005).