

前田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種々のアクチン結合蛋白質と相互作用をして様々な重要な機能を担う。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のではないか。特定のアクチン結合蛋白質は特定の準安定状態を“選択”し、それが特定のメカニズム発現に関与しているのではないか。我々は原子構造に基づいて“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つに迫りたい。昨年度はトロポニンの結晶構造を解明したが、本年度はアクチンフィラメント上でのトロポニンの位置と構造の変化について新しい知見を得た。またアクチン重合体自体の原子モデルを得て、アクチンフィラメントの動態研究を始める基礎を得た。

また藤澤哲郎らは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、蛋白質複合体形成や蛋白質のたたみ込みについて多くの貴重な成果を得ている。

1. 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

アクチンは単量体が重合しフィラメントを形成する。単量体の結晶構造は既知であるが重合体の原子構造は未解明である。また高等生物のアクチンの大量発現、それゆえ変異体の調製にも成功していない。

(1) アクチン重合体の最良の原子モデルを得た (小田 (俊))

我々は以下の独自の方法を開発して重合体の原子モデルを構築した。(i) 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確立した。(ii) 次にそのゾルの X 線繊維回折より得た振幅と氷包埋した重合体の電顕写真からの位相を総合して、アクチン重合体の三次元電子密度マップ (20 Å 分解能) を得た。(iii) このマップ中にアクチン単量体の結晶構造を置き、初期モデルとした。(iv) 最後に回折強度とステレオ化学の縛りを満たす範囲内で Xplor の焼きなまし法を適用してサブユニット-サブユニット接触部位の局部形態を決めた。この最終アクチン重合体モデルは以前のモデルに比して、① 2本のストランド間隔が狭く、② “DNase-I 結合ループ” がストランド間に向かって伸展しており、③ “疎水性プラグ” が丸い形状であり、④ サブドメイン 4 はフィラメントの縦の結合と横の結合ともに関わり重要な結節点となっている。特徴④はアクチン近縁の蛋白質の結晶内相互作用に酷似している。これらの特徴はアクチン変異体を調製することによって実験的に検証することができる。(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 らとの共同研究)。

(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 (横山構造分子生物学研究室))

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。本研究では、昆虫細胞を用いた系を用いて、ヒト由来のアクチンを構造生物学研究に十

分な量を得ることを目標にしている。昨年度までの研究で、我々が独自に開発したロブスター由来の DNA 配列である L21 を付けたベクターを使用して、ヒト骨格筋型組換えアクチンの発現量を飛躍的に増加できることを示した。また、C 端にタグを付けての発現を試みたが、N 端側の翻訳後修飾の異常がタグ自体の影響のため、発現アクチンはうまく重合しなかった。それゆえ本年度は、N 端にタグを付けて発現後切除する系を作製した。この組換えアクチンは、C 端にタグを付けたものと比べて重合能が改善された。また、ヒト心筋型アクチンやヒト細胞質型アクチンの発現系も構築した。現在は、ヒト心筋型組換えアクチンの機能解析と、変異体の作製を試みている。

2. 筋 (骨格筋・心筋) のカルシウム調節のメカニズムの研究

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”に担われている。“細いフィラメント”はアクチン重合体の上にトロポミオシン (Tm)・トロポニン (Tn) が結合した複合体である。我々は昨年度にトロポニンの中核部分の結晶構造を発表した。この結晶構造によって、カルシウム結合によって引き起こされるトロポニン分子内の構造変化について多くを知ることができたが、カルシウム結合のシグナルがアクチンフィラメントにどのように伝達されるかは不明である。これを知るには、アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体全体の構造を知ること、またトロポミオシン単体およびトロポミオシン・トロポニン複合体の結晶構造を知る必要がある。本年度はそのための多くの試みがなされた。

(1) アクチンフィラメント上でのトロポニン C の構造変化 (松本 *1, 藤原 *2; 前田 (佳) *1 (横山構造分子生物学研究室))

細いフィラメント複合体中でのトロポニン C (TnC) の構造とその変化を知るために、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こと、またフィラメントの軸方向に 10 Å 程度移動すること、を初めて解明した。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) に適用した。この研究では、(i) ウシ心臓から天然アクチンフィラメントを大量かつ簡便に調製する方法を改良し (ii) 重水素化蛋白質を大腸菌で大量 (80 mg/L culture) かつ高い重水素化率 (96%) で発現する方法を導入、確立し、(iii) 細いフィラメント上のトロポニン成分だけを重水素化蛋白質に交換する方法を確立し、(iv) 中性子繊維回折に使用できる細いフィラメント配向系の調製法を確立した。これらの方法は中性子回折実験のみならず蛍光標識やスピン標識を使つての研究などに広く応用できる汎用性を持つ。

(2) 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 (俊))

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 (SPRING-8 BL45XU-SAXS ビームライン使用)。その強度のパターン関数 (質量の自己相関) の解析から Ca^{2+} 結合による細いフィラメント複合体の構造変化について以下の結論を得た。(i) トロポニンの位置はフィラメント軸に約 5 Å 近く。(ii) トロポニン中核部分は形態変化を起こし、フィラメント軸に直角の成分が減少しフィラメント軸に沿った成分が増加する。(iii) トロポミオシンの位置については、フィラメント軸からの距離を変えずに方位角を約 15 度変化させる。これらの結果を総合すると、トロポニンは低 Ca^{2+} 濃度ではトロポミオシンからフィラメントの外側に向かって伸展するが、 Ca^{2+} 結合により内側に傾くモデルを提出した。

(3) 筋肉の細いフィラメント複合体の構造：電子顕微鏡像の単粒子解析法 (成田 *3)

ここ数年、成田ら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 Å 前後の分解能で解明することを目標としている。本年度はシミュレーションシステムを用いて、信頼できる手法をほぼ確立した。現在十分と思われる量の電子顕微鏡写真を撮影も終え、その解析を進めている。

(4) トロポミオシン単体およびトロポミオシン・トロポニン複合体の結晶化 (似内, 南方 *2, Meshcheryakov *1, 中村 *2, 小田 (直) *4; 前田 (佳) *1 (横山構造分子生物学研究室))

トロポニン・トロポミオシン複合体の結晶構造を得ることを目標として研究を続けている。現在までのところ、複合体結晶は再現性良く得られているが、回折しない。また、トロポミオシン断片を単独で結晶化した場合も、種々の結晶形が得られるものの、ほとんどの結晶形が回折しない。

このような現象は、トロポミオシン分子の柔軟性に起因すると考えられ、さらに、この柔軟性こそがトロポニン・トロポミオシン系のカルシウム調節の機能に関与しているとも考えられる。結晶化のためにはトロポミオシンに適切な変異を導入することが必要であると考えられるが、特にトロポニン・トロポミオシンの機能に重要であると考えられるトロポミオシン全長の 1/2~2/3 の部分を含む結晶構造解析の例が無いため、変異を加えようとしても明確な戦略が立てられないのが現在までの一番の問題であった。しかしながら、最近、唯一反射を出すトロポミオシン断片の結晶形に関して構造解析が進行しているので、この解析結果がトロポミオシン分子の性質解明の糸口になるとともに、上記の設計戦略の指針となることを期待している。

その他トロポニン T1 単体およびトロポニン T1・トロポミオシン複合体の結晶の改良、分子長がより短い酵母のトロポミオシンの結晶化、トロポミオシンの立体構造を認識する抗体 (Fv 断片) とトロポミオシンの共結晶化を試みている。

(5) NMR によるトロポニン 3 量体の構造解析：特に複数の形態の検出 (Lassalle *2)

トロポニン・トロポミオシンによる筋収縮のカルシウム調節のメカニズムを理解するには、これら蛋白質の原子座標を得るだけでは不十分で、その動態を理解する必要がある。分子全体の構造の“揺れ”が機能発現に本質的に重要でないかと考えている。そのためには NMR が最適な方法であるが、トロポニン 3 量体は分子量 5 万を超えるので、解釈できる NMR のデータを得るには多くの工夫が必要である。本年度は、改良した同位体標識法を用い 3 量体中のトロポニン C のみを標識し、まずヒト心筋トロポニン C 単体の NMR スペクトルを得た。(近畿大学 赤坂研究室、東京都立大学 甲斐荘研究室との共同研究)

(6) 長さの揃ったアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体ミニフィラメントの調製 (木邑 *2)

筋収縮のカルシウム調節機構を知る上で、アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の原子構造を得ることが必要である。しかしこの複合体の結晶化のためには長さの均一なミニフィラメントの調製が必要となる。様々な融合蛋白質を調製してこの課題を解決しようと取組みを始めている。

3. ダイナクチン複合体の構造研究

ダイナクチン複合体は 12 種類の蛋白質から成る分子量約 1.5 MDa の複合体で、細胞内で微小管の配置を支配し、核膜の輸送、細胞分裂時の紡錘体の輸送などに関わる重要な機能を担う。その構造の中核をなしているのが、Arp1 (アクチン様蛋白質) ミニフィラメント、すなわち自然界に存在する、長さがそろったミニフィラメントである。本研究では、ミニフィラメント構築原理および細胞内輸送の調節装置としての機能を解明するために、ダイナクチン複合体の構造研究を行っている。

(1) 電子顕微鏡像単粒子解析法による複合体全体の構造解析 (今井 *1, 成田 *3)

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きた。本年度は、非常に均一な試料を調製する方法を確立し、その試料の負染色電顕写真よりダイナ

クチン複合体の二次元投影像を得た。その像から、shoulder部、Arp1 ミニ・フィラメント部、およびミニ・フィラメントの両端部の分子配置が解明された(米国 ジョンズ・ホプキンス大学 T. A. Schroer 研究室との共同研究)。

(2) ダイナクチン複合体ショルダー部分の蛋白質の構造解析(谷本 *4, 古田 *4, 今井 *1; 前田(佳) *1(横山構造分子生物学研究室))

複合体中でアーム(p150^{Glued})の付け根に結合すると考えられている p50, p24 の結晶化へ向けてこれら蛋白質の会合特性とドメイン構造の解明に取り組んだ。P50 は 3 量体ないしは 4 量体を形成し、会合体中で分子の N 端側約 1/4 は一定の構造を取らないことが判明した。

4. アクチンフィラメントの端に結合する蛋白質

アクチンは細胞内で急速に重合・脱重合を繰り返し、その分子運動は細胞移動、原形質流動、細胞内顆粒輸送、神経軸索伸長、細胞分裂など多くの機能で中心的な役割を担っている。このアクチンの分子運動においてフィラメントの端と、端に結合する蛋白質が重要である: フィラメントを枝分かれさせフィラメントの端を増やすもの、端に結合して自由端を減らすキャッピング蛋白質(CapZ = CP)、“古くなった”フィラメントの脱重合を促進する蛋白質、さらに膜近傍でアクチンフィラメントを“紡ぐ”蛋白質などである。本年度は以下の 2 課題を追求した。

(1) フォルミン蛋白質の FH1FH2 を含む結晶構造解析を目指して(森井 *2, 武田(修) *1)

フォルミン蛋白質群はアクチンフィラメント成長端に結合し伴走しながらアクチンを紡ぎ、力を発生する。このメカニズムを理解するために、フォルミン蛋白質単体および成長端複合体の結晶構造の解明を目指している。特に FH1FH2 領域を含む結晶構造の解明を目指して発現系を準備している。

(2) CapZ が結合したアクチンフィラメント端の構造: 電子顕微鏡像の単粒子解析(成田 *3, 山下)

我々は昨年度、CP 全分子(α -、 β -ヘテロダイマー)の結晶構造を解明した。本年度は電子顕微鏡像の単粒子解析法を用いて、アクチン重合体の B 端に CP が結合した複合体の構造解析を進めほぼ解析を終えた。

5. 新しい方法の開発, その他

(1) アクチンフィラメント上の蛋白質分子の蛍光 1 分子方位決定法の開発(山本, Popp *2, 中村 *2; 岡本(河田ナノフォトニクス研究室))

アクチンフィラメント上にあるトロポニン²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法を開発している。(京都大学 山本行男研究室との共同研究)。

(2) 中性子溶液散乱法による平滑筋ミオシンの構造変化の研究(弟子丸 *1, 藤原 *2)

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。ミオシンには 2 つの頭部があり、それぞれは制御軽鎖 1 を結合する。制御軽鎖のリン酸化によ

って頭部間相互作用が変化し、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変化し、その結果平滑筋の収縮が起こる。このリン酸化—形態変化—収縮の連関を理解するため、形態変化を中性子溶液散乱法で計測する研究を行ってきた。本年度はリン酸化を制限された変異制御軽鎖を作成し、それを含むミオシンを調製した。この結果、リン酸化程度の異なる双頭を持つミオシンを調製することができた。これにより、人為的に双頭間相互作用の強さを制御する手段を手に入れた。(創価大学 丸田晋策, 大阪大学大学院基礎工学研究科 若林克三, 大阪大学大学院理学研究科 荒田敏昭との共同研究)。

(3) 天然“細いフィラメント”の特性(武田(修) *1, 小田(俊))

筋の“細いフィラメント”はアクチン・トロポミオシン・トロポニンの複合体であり、筋収縮とそのカルシウム調製を担う。細いフィラメントの研究には、それぞれ精製して得た構成蛋白質から複合体を再構成して使うのが一般的であるが、我々は均一性への配慮からウシ心筋より直接分離した“細いフィラメント”を使用してきた。本年度はこの試料の特性をいくつかの点にわたって解明した。第一、他の蛋白質の存在について。抗体を用いての解析から、ネブリンは含まれず、CapZ (CP) を結合することを確認した。第二、複合体のミオシン S1-activated ATPase 活性のカルシウム濃度依存性を確認した(北海道大学大学院水産科学研究科の尾島孝夫, および田中啓之の指導による)。第三、複合体溶液の超高精度誘電分散測定を実行した。アクチン重合体に特徴的な hyper mobile な水によるとされる 10 GHz 以上の高周波領域は、 $[Ca^{2+}]$ に依存しない。それに対し 10 GHz 以下では低 $[Ca^{2+}]$ で誘電排除体積が大きいすなわち水和量が多いと示唆された(東北大学大学院工学研究科 鈴木誠との共同研究)。

(4) Crowding な状態でのアクチンフィラメントの振舞い(Popp *2)

細胞内の体積の 30% までは蛋白質, DNA, リボソーム, 膜などで占められている。この体積から溶質分子は排除され、その熱力学的効果のために、細胞内では蛋白質相互作用、酵素反応の速度などが大きな影響を受け細胞外と比べて 1 桁程度異なる。ここではメチルセルロース等高分子 crowding agent のアクチンフィラメントへの影響を調べるために、エバネッセント照明蛍光顕微鏡を用い、親水性にしたガラス板表面上約 180 nm の液層を照明して、アクチンフィラメント 1 本を観察した。高分子 crowding agent はアクチンフィラメントの重合速度を亢進させフィラメント同士の再結合(アニーリング)を促進させるために、平均長が長くなる。また束化が促進される。そしてその程度は、アクチン結合蛋白質の種類およびアクチン単量体の状態(結合 Nd および可視化のために結合した蛍光色素の種類等)によっても異なる。crowding agent 存在下では、アクチンの状態の微妙な差異を検出できることが分かった。

(5) ダイニン-微小管複合体の構造解析(成田 *3)

モーター蛋白質である細胞質ダイニンは微小管の上を動き、細胞内でのオルガネラの配置と移動に大きな役割を担っている。ダイニンは巨大分子であるためダイニンの原子構造も解明されていない。また、微小管上でのチューブリン・ダイニンの複合構造の解析も、チューブリン・ダイニンの結

合比が1:1ではないため困難があった。微小管・ダイニンの複合体の構造解析を電子顕微鏡写真の単粒子解析法を用いて開始した。(University of Texas, Southwestern Medical Center, Dr. N. Mizuno らとの共同研究)。

6. 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 I (BL45-XU) の高度化 (伊藤 *¹, 飯塚 *⁵, 芝田 *⁵, 秋山 *³, 藤澤 (哲))

本ビームラインは1997年の建設より7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。本年度は、(1) ダイヤモンド結晶を用いた分光器の第1結晶の振動対策、(2) 分光器真空容器の真空改善対策、(3) 実験ハッチ内 X 線シャッターの交換を行った。分光器に対する作業の結果、ダイヤモンド分光結晶へのダメージと熱負荷によるドリフトを低減することができた。また、立ち上がり0.3ミリ秒、繰り返し150 Hz の X 線シャッターを導入することにより試料への放射線損傷を低減することに成功した。

(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, 藤澤 (哲))

高圧下での蛋白質の構造転移を X 線小角散乱によって調べている。本年度は圧縮比1:1の改良型高圧セルを作成した。その結果、試料体積(50 μ L)が大幅に減少し、また微妙な圧力制御が可能となった結果、作業効率が大幅に改善され、小角散乱分解能も1100 \AA^{-1} まで向上した。本年度は骨格筋 HMM の温度-圧力構造相図と相転移近傍の時間変化を X 線小角散乱によって調べた。平行して高圧蛍光測定、高圧光散乱測定調べる事により、骨格筋 HMM の構造変化が圧力による変性ではなく、構造を保持したままの形態変化であることを明らかにした。(室蘭工業大学 岡本洋との共同研究)

(3) 蛋白質溶液散乱の放射線損傷の定量的研究 (桑本 *¹, 秋山 *³, 藤澤 (哲))

第3世代放射光や次世代 X 線レーザーなど高輝度 X 線を生体試料に照射する際の、単色 X 線吸収量と放射線損傷の関係を知ることは非常に重要であるが未だ系統的かつ定性的な測定が無い。我々は lysozyme の蛋白質溶液の X 線照射による凝集(放射線誘発凝集)を X 線小角散乱によって調べた。Lysozyme の凝集には臨界線量率(400 Gy)が存在し、それ以上で凝集は指数関数的に増加した。放射線(医学)において知られる「希釈効果」も観察された。この放射線誘発凝集には、ポリペプチド鎖の切断は伴わず(質量分析)、折り畳み構造の実質的な変化も伴わない(X 線小角散乱)ため、正常な lysozyme の非特異的会合であることが示唆された。また、放射線損傷を抑制するには、glycerol, ethylene glycol や sucrose 等の抗凍結剤の少量添加が有効であること、これら抑制は主に蛋白質-蛋白質相互作用の変化によるものであって、“活性化”蛋白質の拡散速度の減少ではないと示唆された。

(4) X 線小角散乱によるヒスチジンキナーゼの低分解能構造解析 (秋山 *³; 山田 (城生体金属科学研究室))

ヒスチジンキナーゼは ATP を結合し、その γ リン酸基を自身のヒスチジン残基に転移させ、更にレギュレーター蛋白質へと転移させる。我々はヒスチジンキナーゼの X 線小角散乱測定を行い、得られた低分解能全体構造に高分解

能サブドメイン構造をフィットさせ、ヒスチジンキナーゼのドメイン構造を推定した。更に、ヒスチジンキナーゼとレギュレーター蛋白質の複合体について現在検討している。ヒスチジンキナーゼをレギュレーター蛋白質で滴定しながら X 線小角散乱測定を行ったところ、化学量論的な複合体が安定に形成されることが明らかとなった。ヒスチジンキナーゼとレギュレーター蛋白質の会合部位を推定するべく、複合体の低分解能構造解析を進めている。

(5) 高速混合・時分割 X 線小角散乱による一本鎖モネリンの折畳み過程の研究 (木村 *⁴, 鶴沢 *⁴, 高橋 *², 秋山 *³, 藤澤 (哲))

我々は高速混合型フローセルを用いた X 線小角散乱法を確立し、これまでにシトクロム c やアポミオグロビンの折畳み運動を研究してきた。その結果、 α ヘリックス含量の高いシトクロム c やアポミオグロビンの折畳み初期で分子の回転半径が20~50%減少し、特異的な主鎖収縮が限定的に起こることを明らかにしてきた。我々は折畳み初期の収縮運動が蛋白質の構造トポロジーと何らかの相関を持つという仮説を立て、今回、 β シート含量の高い一本鎖モネリンの折畳み運動をサブミリ秒の時間分解能で研究した。一本鎖モネリンは折畳みの最初の段階で大規模な収縮を示し(70%)、 β シートを含まない蛋白質が α ヘリックスを多く含む蛋白質より収縮しやすい傾向にあることが示唆された。このような高速かつ大規模な収縮はターン構造の形成を核とした折畳み運動によるものと推測される。

(6) X 線小角散乱による脂質集合体の高次構造、熱物性同時測定装置の開発 (伊藤 *¹, 藤澤 (哲); 早川, 小林 (小林脂質生物学研究室))

リゾビスフォスファチジン酸(LBPA)は、細胞の後期エンドソームに多量に存在する酸性リン脂質であり、後期エンドソームの特徴的な構造(マルチラメラボディ)の形成に必須であると考えられている。しかし、この脂質の存在量は細胞における全脂質の1%程度に過ぎず、この脂質によって形成される膜構造やその物性は明らかではない。そこで新規開発した高精度温度制御器による熱測定と X 線小角散乱測定を同時に行い、構造と物性を調べた。高精度温度制御器はペルチェ素子を組み合わせた温度制御セルである。温度範囲は+5 $^{\circ}$ Cから+85 $^{\circ}$ C、行過ぎ量が0.1 $^{\circ}$ C以下、平衡化に10 $^{\circ}$ C/分という性能を有し、脂質系の相図作成などに応用した。この経験に基づき、行過ぎ量が0.01 $^{\circ}$ C以下の装置を現在開発中である。

(7) 時分割測定が可能な小角・広角同時測定検出器の開発 (伊藤 *¹, 藤澤 (哲); 岩田 (高分子化学研究室))

第II期環境分子科学研究に基づき、生分解性高分子、ポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート]単結晶の昇温過程におけるラメラ膜厚の増大現象を分子鎖と高次構造の秩序形成過程から知るために X 線小角散乱および広角回折実験を理研構造生物学ビームライン I (BL45XU)で行っている。本年度からは小角・広角の反射の時間変化を同時測定できる検出器の開発を進めている。小角用には現在使用している検出器を用い、広角用に新たに縮小型光ファイバーとインターライン読出し CCD を接合したものをタイル状に並べた検出器を想定している。この装置の特徴は、(1) 20 フレーム/秒で小角・広角の二次元像を記録することが可能なこと、(2) 外部 X 線シャッターとの同期が不要なことである。現

在, 検出器要素の予備実験および設計・製作を行っている。

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

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 strategies for understanding the mechanisms from the atomic structures, which is one of the central questions modern biology is addressing.

1. Atomic structure and dynamic properties of the actin filament

We have completed our modeling for the atomic structure of polymerized actin (F-actin). First, well oriented F-actin sols were prepared in glass capillaries. Combining the X-ray diffraction amplitudes obtained from the sols with the phase information from the cryo-EM picture of isolated F-actin filaments, 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 our F-actin model. Compared with the previous models, our model indicates that (1) the spacing between two long-pitch helices is narrower (2) the DNaseI binding loop is extended into the space, (3) the hydrophilic plug is in a more round form, and (4) sub-domain 4 lies at the cross-road between the vertical inter-subunit interactions and the diagonal interactions. The manner of interactions between vertically related subunits along the long-pitch helices is like in the actin-related bacterial protein. Based on our atomic model of F-actin, the dynamic properties of F-actin have been proposed, which can be tested by employing variants of actin. Actin variants shall be prepared by use of our Sf9 based expression systems which are almost completed.

2. 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. However, how Ca^{2+} binding to troponin is propagated into the tropomyosin-actin filament remains obscure. On one hand, the structure of the thin filament complex (troponin-tropomyosin-actin) should be elucidated even at low spatial resolutions. On the other, we have been trying to obtain atomic structures of tropomyosin as well as the complexes between tropomyosin and troponin.

By use of highly oriented cardiac muscle thin filaments, in combination with Patterson analyses of X-ray diffraction intensities, conformational changes of the thin filament complex induced by Ca^{2+} -binding have been elucidated. (1) Upon Ca^{2+} -binding, troponin shifts towards the filament axis by 5 Å. (2) The core-domain of troponin changes the overall shape into a more elongated form along

the filament axis. (3) The position of tropomyosin strands shift only slightly by 15 deg around the filament axis. Another approach to the conformational change of the thin filaments complex is underway by use of the single particle analysis of cryo-EM pictures.

In our crystal structure of the core-domain of troponin, troponin C was in a folded conformation, whereas the crystal structure of troponin C alone indicated an extended conformation. To address the question, if troponin C is folded or extended on the muscle thin filament, we combined the neutron solution scattering and the contrast variation techniques, which makes only deuterated troponin C “visible”. The results indicate that troponin C is in an extended conformation on the thin filament and that, upon Ca^{2+} -binding, troponin C shifts towards the filament axis.

Tropomyosin is extremely asymmetric (20 Å thick and 400 Å long) and flexible. Although, these properties must be tightly associated with the functions, these properties must have hindered tropomyosin forming well-diffracting crystals. Only recently, we have obtained reasonable crystals, whose structures are now emerging. We hope that, based on the crystal structure, we may design variant tropomyosins to be used for better crystals, both of tropomyosin alone and of the tropomyosin-troponin complex.

3. Structural studies of the dynactin complex

The dynactin complex consists of 12 kinds of proteins, weighing about 1.5 MDa, and plays major roles as a regulator of microtubule-associated motor molecules. The core of the complex is the mini-filament of Arp1 (actin-related protein 1), which is a naturally occurring mini-filament. In order to understand the design concept of the mini-filament of homogeneous length distribution as well as the mechanism how the complex regulates dynein and kinesin, the overall shape of the complex has been obtained by single particle analysis of EM photographs.

4. Proteins interacting with the ends of the actin filament

In the cell, actin exerts force by fast polymerization and depolymerization. The ends of an actin filament in association with various end-interacting proteins play crucial roles for this molecular motion: The Arp2/3 complex branches the filament to create new ends, cofilin promotes depolymerization, CapZ blocks the ends, and proteins like formin promote fast and processive polymerization at the end. We are studying the structures of these proteins to know how these proteins perturb the dynamic properties of the actin filament. This year, using single particle analysis of EM, the structure of CapZ-actin B-end complex emerged.

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. The beam-line has been used for studying early volume compression processes in a protein folding pathway, studying the physical properties of lipids, and studying the domain structures of proteins as well as oligomer formation from proteins. As an in-house project, we have been constructing an experimental apparatus for measuring protein con-

formations under high hydrostatic pressure.

Staff

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. Kazuki ITO^{*2}
Dr. Vladimir A. MESHCHERYAKOV^{*2}
Dr. Shungo DESHIMARU^{*2}
Dr. Junichi WAKAYAMA^{*2}
Dr. Takumi TAMURA^{*2}
Dr. Fumiko MATSUMOTO^{*2}
Mr. Mitsusada IWASA^{*2}
Mr. Shigeo KUWAMOTO^{*2}
Mr. Shuichi TAKEDA^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

Technical Staff

Mr. Takashi IIZUKA
Mr. Koji SHIBATA

Assistants

Mr. Hiromi TANAKA
Mr. Syogo TAKEUCHI
Ms. Sachiko YUKI
Ms. Junko ITO
Ms. Junko NAKAMURA
Ms. Satoko FUJISAWA
Ms. Mitsue OKAMOTO

in collaboration with

Mr. Yoshihiro AOYAGI (Polym. Chem. Lab.)
Dr. Masahiro FUJITA (Polym. Chem. Lab.)
Dr. Tadahisa IWATA (Polym. Chem. Lab.)
Dr. Seiji YAMADA (Biometal Sci. Lab.)
Dr. Kayo MAEDA (Struct. Mol. Lab.)
Dr. Takayuki OKAMOTO (Nanophotonics Lab.)

Visiting Members

Dr. Hirokazu ARIMOTO (Sch. Sci., Nagoya Univ.)
Dr. Sugie FUJIME (JST)

Dr. Satoru FUJIWARA (JAERI)
Dr. Hiroyuki IWAMOTO (JASRI)
Dr. Chieko KIMURA (JST)
Dr. Michael LASSALLE (JST)
Ms. Shiho MINAKATA (Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)
Dr. Hiroshi MORII (JST)
Dr. Motoyoshi NAKAMURA (JST)
Dr. Kazuo ONUMA (AIST)
Dr. David POPP (JST)
Dr. Satoshi TAKAHASHI (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)
Dr. Soichi TAKEDA (Natl. Inst. Card. Vasc. Res.)
Dr. Yojiro TAMURA (Suzuka Natl. Coll. Technol.)

Trainees

Ms. Mayumi FURUTA (Sch. Sci., Nagoya Univ.)
Mr. Toshiyasu INUZUKA (Sch. Sci., Nagoya Univ.)
Mr. Tetsunari KIMURA (Sch. Technol., Kyoto Univ.)
Ms. Naoko ODA (Sch. Biol.-Oriented Sci. Technol., Kinki Univ.)
Mr. Hironobu TANIMOTO (Sch. Sci., Nagoya 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

- Iwamoto H., Wakayama J., Fujisawa T., and Yagi N.: "Static and dynamic x-ray diffraction recordings from living mammalian and amphibian skeletal muscles", *Biophys. J.* **85**, 2492–2506 (2003). *
- Tamura T. and Iwamoto H.: "Thymol: a classical small-molecule compound that has a dual effect (potentiating and inhibitory) on myosin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 786–791 (2004). *
- Wakayama J., Tamura T., Yagi N., and Iwamoto H.: "Structural transients of contractile proteins upon sudden ATP liberation in skeletal muscle fibers", *Biophys. J.* **87**, 430–441 (2004). *
- Miki M., Hai H., Saeki K., Shitaka Y., Sano K., Maéda Y., and Wakabayashi T.: "Fluorescence resonance energy transfer between points on actin and the C-terminal region of tropomyosin in skeletal muscle thin filaments", *J. Biochem.* **136**, 39–47 (2004). *
- Hiromasa Y., Fujisawa T., Aso Y., and Roche T. E.: "Organization of the cores of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex formed by *E2* and *E2* plus the *E3*-binding protein and their capacities to bind the *E1* and *E3* components", *J. Biol. Chem.* **279**, 6921–6933 (2004). *
- Kim K., Yamashita A., Wear M. A., Maéda Y., and Cooper J. A.: "Capping protein binding to actin in yeast: Biochemical mechanism and physiological relevance", *J. Cell Biol.* **164**, 567–580 (2004). *
- Akiyama S., Fujisawa T., Ishimori K., Morishima I., and

- Aono S.: “Activation mechanisms of transcriptional regulator CooA revealed by small-angle X-ray scattering”, *J. Mol. Biol.* **341**, 651–668 (2004). *
- Matsumoto F., Makino K., Maeda K., Maéda Y., and Fujiwara S.: “Conformational changes of troponin C within the thin filaments detected by neutron scattering”, *J. Mol. Biol.* **342**, 1209–1221 (2004). *
- Kuwamoto S., Akiyama S., and Fujisawa T.: “Radiation damage to a protein solution, detected by synchrotron X-ray small-angle scattering: dose-related considerations and suppression by cryoprotectants”, *J. Synchrotron Rad.* **11**, 462–468 (2004). *
- Uzawa T., Akiyama S., Kimura T., Takahashi S., Ishimori K., Morishima I., and Fujisawa T.: “Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of alpha-helical content and compactness”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1171–1176 (2004). *
- Arai R., Wriggers W., Nishikawa Y., Nagamune T., and Fujisawa T.: “Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering”, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **57**, 829–838 (2004). *
- Kimura T., Uzawa T., Ishimori K., Morishima I., Takahashi S., Konno T., Akiyama S., and Fujisawa T.: “Specific collapse followed by slow hydrogen-bond formation of β -sheet in the folding of single-chain monellin”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2748–2753 (2005). *
- 高橋聡, 鶴澤尊規, 秋山修志, 藤澤哲郎: “サブミリ秒分割 X 線小角散乱法の開発と蛋白質の折り畳み過程の研究”, *放射光* **17**, 127–134 (2004). *
- (総説)
- 高橋聡, 鶴澤尊規, 藤澤哲郎: “時分割 X 線小角散乱が明らかにする蛋白質の収縮と構造形成”, *SPring-8 利用者情報* **9**, 265–268 (2004).
- 高橋聡, 鶴澤尊規, 藤澤哲郎: “X 線小角散乱を使った蛋白質の折り畳み運動のリアルタイム観察”, *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 135–140 (2004).
- 藤澤哲郎: “放射光 X 線小角散乱測定法”, *蛋白質 核酸 酵素* **49**, 1687–1692 (2004).
- 口頭発表 Oral Presentations**
(国際会議等)
- Oda T., Stegmann H., Makino K., Hasegawa K., Schroder R. R., Namba K., and Maéda Y.: “Modeling of F-Actin: X-ray fiber diffraction and cryoelectron microscopy”, *Alpbach Workshop on Molecular Motors*, (Max Plank Institute for Medical Research), Alpbach, Austria, Mar.–Apr. (2004).
- Uzawa T., Akiyama S., Kimura T., Takahashi S., Ishimori K., Morishima I., and Fujisawa T.: “Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of α -helical content and compactness”, *1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science* (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).
- Nukina N., Tanaka M., Machida Y., Nishikawa Y., Akagi T., Hashikawa T., and Fujisawa T.: “Structural basis for polyglutamine disease pathogenesis: Therapeutic strategy”, *Cold Spring Harbor Laboratory 2004 Meet. on Molecular Chaperones & the Heat Shock Response*, Cold Spring Harbor, USA, May (2004).
- Maéda Y.: “Structure of troponin and the mechanism how it works”, *Research Conf. on Structural Mechanisms in Muscle; Jean Hanson’s Legacy*, (The Randall Division of Cell and Molecular Biophysics), London, UK, May (2004).
- Oda T., Stegmann H., Makino K., Hasegawa K., Schroder R. R., Namba K., and Maéda Y.: “Modeling of F-actin: X-ray fiber diffraction and cryoelectron microscopy”, *Wenner-Gren Int. Symp. on Force Generation in Biological Systems*, (Wenner-Gren Foundations), Stockholm, Sweden, Aug. (2004).
- Watanabe Y., Inoue K., Fujisawa T., and Inoko Y.: “Characterization of the reassembled dimer of an oligomeric membrane protein OmpF porin using small-angle x-ray scattering”, *8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004)*, (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Uzawa T., Akiyama S., Kimura T., Takahashi S., Ishimori K., Morishima I., and Fujisawa T.: “Collapse and search dynamics of apomyoglobin Folding revealed by submillisecond observations of α -helical content and compactness”, *8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004)*, (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Oiwa K., Nakamori R., Iwamoto H., Sakakibara H., and Fujisawa T.: “Conformational changes of chlamydomonas inner-arm dynein c coupled with ATP hydrolysis studied with tryptic digestion and SAXS analysis”, *8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004)*, (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Fujiwara S., Deshimaru S., Fujisawa T., Matsumoto F., Wakabayashi K., and Yonezawa Y.: “Formation of the amyloid protofilaments of hen egg white lysozyme studied by small-angle x-ray scattering”, *8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004)*, (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Hiromasa Y., Fujisawa T., Aso Y., and Roche T. E.: “Organization of the cores of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex formed by E2 and E2 plus the E3-binding protein and their capacities to bind the E1 and E3 components”, *8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004)*, (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Kuwamoto S., Fujisawa T., Akiyama S., Maéda Y., and Okamoto Y.: “Pressure transition of heavy meromyosin by solution x-ray scattering”, *8th Int. Conf. on Biology*

- and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Kuwamoto S., Akiyama S., and Fujisawa T.: “Radiation-induced aggregation detected by synchrotron x-ray small-angle scattering”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Kimura T., Uzawa T., Akiyama S., Takahashi S., Konno T., Ishimori K., Morishima I., and Fujisawa T.: “Rapid collapse without stable secondary structures in the early folding dynamics of single-chain monellin”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Akiyama S., Fujisawa T., Ishimori K., Morishima I., and Aono S.: “Small-angle X-ray scattering reveals a bent-conformation of the transcriptional activator CooA in solution conditions: New insights into activation mechanisms of CooA”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Matsufuji T., Jinbo Y., Izumi Y., Yoshino H., and Fujisawa T.: “Structural characterization of transient intermediates in calcium dissociation from complexes of calmodulin and target peptide with stopped-flow small-angle x-ray scattering”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Arai R., Wriggers W., Nishikawa Y., Nagamune T., and Fujisawa T.: “The use of synchrotron small-angle x-ray scattering for designing the variably linked chimeric proteins”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Fujisawa T.: “BL45XU at SPring-8”, RIKEN Symp. and Satellite Workshop of BSR2004: SAXS in the 21st Century, Harima, Sept. (2004).
- Fujisawa T.: “Examples of analysis based on crystal structure: what we can say by SAXS”, RIKEN Symp. and Satellite Workshop of BSR2004: SAXS in the 21st Century, Harima, Sept. (2004).
- Iwamoto H., Wakayama J., Tamura T., and Yagi N.: “Phylogeny of winged insects viewed from flight muscle myofibrillar lattice structure: An X-ray cryomicrodiffraction study”, Biophysical Soc. 49th Ann. Meet., Long Beach, USA, Feb. (2005).
- Iwamoto H.: “Thin filament cooperativity is an important factor for determining skeletal and cardiac muscle performance even at saturating calcium levels”, Biophysical Soc. 49th Ann. Meet., Long Beach, USA, Feb. (2005).
- Matsumoto F., Makino K., Maeda K., Patzelt H., Maéda Y., and Fujiwara S.: “Conformational changes of tropomyosin C within the thin filaments detected by neutron scattering”, Biophysical Soc. 49th Ann. Meet., Long Beach, USA, Feb. (2005).
- (国内会議)
- 松藤智洋, 神保雄次, 和泉義信, 能野秀典, 林宣宏, 藤澤哲郎: “ストップフロー小角散乱によるカルモデュリンの標的分子認識機構解明 3”, 第 17 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, つくば, 1 月 (2004).
- 伊藤和輝: “最近の小角散乱実験技術の動向”, 高分子科学研究会第 1 回講演会, 播磨, 6 月 (2004).
- 藤澤哲郎: “理研 BL45 における小角散乱の生物科学への応用”, 高分子科学研究会第 1 回講演会, 播磨, 6 月 (2004).
- 秋山修志, 藤澤哲郎, 石森浩一郎, 森島績, 青野重利: “X 線小角散乱法で見た CooA の溶液構造と転写調節メカニズム”, 第 31 回生体分子科学討論会, (日本化学会他), 水戸, 7 月 (2004).
- 藤澤哲郎: “小角散乱の立場から見た 30 年後の科学像”, 日本放射光学会若手を中心としたワークショップ「今後 30 年の科学の未来像: 放射光の役割」, 東京, 7 月 (2004).
- 藤田雅弘, 岩田忠久, 田中稔久, 土肥義治, 藤澤哲郎: “大型放射光によるポリ (L-乳酸) 単結晶の熱処理・融解挙動の解析”, 第 53 回高分子討論会, (高分子学会), 札幌, 9 月 (2004).
- 岩田忠久, 田中稔久, 藤田雅弘, 土肥義治, 藤澤哲郎, 竹内晃久, 鈴木芳夫, 上杉健太郎, 内海英二: “大型放射光によるポリ [(R)-3-ヒドロキシブチレート] フィルムおよび繊維の熱融解挙動の解析”, 第 53 回高分子討論会, (高分子学会), 札幌, 9 月 (2004).
- 田中稔久, 藤田雅弘, 竹内晃久, 鈴木芳夫, 上杉健太郎, 藤澤哲郎, 岩田忠久, 土肥義治: “大型放射光を用いたポリ (L-乳酸) 繊維の熱融解挙動の解析”, 第 53 回高分子討論会, (高分子学会), 札幌, 9 月 (2004).
- 伊藤和輝: “CCD 型 X 線検出器”, 第 8 回 SPring-8 シンポジウム「利用技術に関するワークショップ: 最新の検出器とその応用」, (JASRI, SPring-8 利用者懇談会), 播磨, 10 月 (2004).
- 河野能顕, 藤澤哲郎, 内藤久志, 引間孝明, 伊藤和輝, 秋山修志, 中島寛樹, 飯塚崇, 松泰司, 神谷信夫: “理研構造生物学ビームライン (BL44B2, BL45XU) の現状”, 第 8 回 SPring-8 シンポジウム「利用技術に関するワークショップ: 最新の検出器とその応用」, (JASRI, SPring-8 利用者懇談会), 播磨, 10 月 (2004).
- 河野能顕, 中島寛樹, 藤澤哲郎, 伊藤和輝, 秋山修志, 飯塚崇: “理研構造生物学ビームライン I (BL45XU) の現状”, 第 8 回 SPring-8 シンポジウム「利用技術に関するワークショップ: 最新の検出器とその応用」, (高輝度光科学研究センター), 播磨, 10 月 (2004).
- 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 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 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チン-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).
- 上村慎治, 若山純一, 田村巧, 藤澤哲郎, 岩本裕之: “X 線回折によるウニ精子ペン毛軸糸構造の解析”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 秋山修志, 藤澤哲郎, 石森浩一郎, 森島績, 青野重利: “X 線

- 溶液散乱法で見た CooA の転写調節メカニズム”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 鶴澤尊規, 木村哲就, 高橋聡, 石森浩一郎, 秋山修志, 藤澤哲郎, 松井敏高, 齋藤正男: “ヘムオキシゲナーゼの折れ畳みにみるオリゴマー形成と初期収縮の意義”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 桑本滋生, 藤澤哲郎, 前田雄一郎, 岡本洋: “高圧 X 線小角散乱から見た骨格筋 HMM の head-tail junction の柔らかさ”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 藤原悟, 松本富美子, 弟子丸俊吾: “細いフィラメントの中性子繊維回折”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 成田哲博, 安永卓生, 若林健之: “電子分光的クライオ電子顕微鏡像の単粒子解析に陽アクチン・フィラメントの α ヘリックスの可視化”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 田村巧, 若山純一, 八木直人, 藤澤哲郎, 岩本裕之: “力発生を阻害した骨格筋活性化時の細いフィラメント構造変化”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 秋山修志, 藤澤哲郎, 石森浩一郎, 森島績, 青野重利: “X 線小角散乱法による CooA の転写調節メカニズムの研究”, 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).
- 伊藤和輝, 藤澤哲郎, 岩田忠久: “二次元 SAXS/WAXS 同時測定装置の設計”, 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).
- 桑本滋生, 秋山修志, 藤澤哲郎: “放射線 X 線小角散乱により観察された蛋白質溶液の放射線損傷: 線量依存性の考察と凍結防止剤の効果”, 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).
- 小田俊郎, 牧野浩司, 武田修一, 松本富美子, 前田雄一郎: “Ca²⁺によりひき起こされる筋肉細いフィラメントの構造変化”, 2005 年生体運動研究合同班会議, 豊中, 1 月 (2005).
- 田村巧, 若山純一, 八木直人, 前田佳代, 前田雄一郎, 岩本裕之: “骨格筋収縮特性に与える心筋トロポニン変異体の影響”, 2005 年生体運動研究合同班会議, 豊中, 1 月 (2005).
- 松本富美子, 弟子丸俊吾, 前田佳代, 前田雄一郎, 藤原悟: “中性子小角散乱による細いフィラメント中の TnI の構造解析にむけて”, 2005 年生体運動研究合同班会議, 豊中, 1 月 (2005).
- 桑本滋生, 藤澤哲郎, 前田雄一郎, 岡本洋: “放射光 X 線小角散乱から見た骨格筋 HMM の高静水圧下における形態変化”, 2005 年生体運動研究合同班会議, 豊中, 1 月 (2005).
- 岩本裕之: “小角散乱法による筋収縮の分子メカニズム”, 第 10 回放射光医学研究会講演会, (放射光医学研究会), 大阪, 1 月 (2005).
- 伊藤和輝, 藤澤哲郎, 早川智広, 小林俊秀: “BL45XU でのマイクロセル開発と脂質系の構造: 研究への応用”, 理研シンポジウム「構造生物学 (X): これからの構造生物学における新ツール」, 播磨, 1 月 (2005).
- 伊藤和輝, 藤澤哲郎, 岩田忠久: “BL45XU における 2 次元 SAXS/WAXS 同時測定装置の開発”, 理研シンポジウム「構造生物学 (X): これからの構造生物学における新ツール」, 播磨, 1 月 (2005).
- 藤澤哲郎: “BL45XU における高圧 X 線小角散乱装置の開発”, 理研シンポジウム「構造生物学 (X): これからの構造生物学における新ツール」, 播磨, 1 月 (2005).
- 山田齊爾, 秋山修志, 杉本宏, 汲田英之, 伊藤和輝, 藤澤哲郎, 中村寛夫, 城宜嗣: “二成分情報伝達系タンパク質ヒスチジンキナーゼ/レスポンスレギュレーター複合体の溶液・結晶構造解析”, 日本農芸化学会 2005 年度大会, 札幌, 3 月 (2005).
- 鶴澤尊規, 木村哲就, 高橋聡, 石森浩一郎, 秋山修志, 藤澤哲郎, 松井敏高, 池田-斎藤正男: “Significance of rapid collapse in hemeoxygenase folding”, 文科省科学研究費補助金特定領域研究「水と生体分子が織り成す生命現象の化学」第 2 回公開ワークショップ, 東京, 3 月 (2005).