

# 城生体金属科学研究室

## Biometal Science 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) 二原子酸素添加酵素の結晶構造ならびに機能解析 (杉本, 大槻<sup>\*1</sup>, 福村<sup>\*1</sup>, 城)

ヘム結合型二原子酸素添加酵素は、ヘム (ポルフィリン鉄錯体) を活性中心とし、酸素分子 ( $O_2$ ) の2つの酸素原子を基質に添加させ、Trp代謝の第一および律速段階であるインドール環開裂反応を触媒する。この反応におけるヘム鉄を介した酸素原子添加反応の分子機構を詳細に解析することを目的として研究を行った。昨年決定したヒト由来インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ (IDO) の基質非結合型の結晶構造を基に、活性部位周辺のアミノ酸残基の部位特異変異体を調製し、それらの酵素活性、基質親和性、リガンド結合速度を測定した。その結果、いくつかの変異体では基質を結合はするが反応が進行しないことが明らかとなった。活性部位における各アミノ酸残基の役割を推定し、詳細な酸素添加反応機構を提唱した。この反応機構に構造情報を加えるために、基質との複合体の結晶構造解析に取り組んだ。基質であるL-Trp, D-Trpや阻害剤の存在下で針状結晶が得られた。一方、もう1つの二原子酸素添加酵素であるトリプトファン2,3ジオキシゲナーゼ (TDO) の大量発現系の構築にも成功した。

(2) 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<sup>\*2</sup>, 牧野<sup>\*1</sup>, 杉本, 城)

サイトグロビン (Cgb) とニューログロビン (Ng) は、近年新たに発見されたヘム結合型グロビンタンパク質であり、ミオグロビン (Mb) やヘモグロビン (Hb) とおなじファミリーに属する。NgbとCgbは、Mb, Hbと異なり、ヘム鉄はその酸化状態に関わらず2つのヒスチジン (近位 His と遠位 His) を軸配位子とする六配位構造をしている。本年度は、Cgb, Ngbのピコ秒時間分解能共鳴ラマン分光測定により、近位 His とヘム鉄との伸縮振動を初めて観測した。一酸化炭素 (CO) 結合型の振動分光測定からは、鉄に結合したCOと遠位 His との相互作用の有無により、COの配位結合状態が3種類存在することを明らかにした。以上の結果を基に、外部配位子との結合に際して起こるヘム周辺構造の変化、特に外部配位子と遠位 His の置換について考察した。Cgbの高分解能結晶構造解析より、これまで不明であったN末の20残基部分が、ヘリックス構造を

形成していることを明らかにした。このような構造は今まで Mb などには見られない。

(3) 脱窒菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の膜結合型一酸化窒素還元酵素の反応機構解析と結晶化 (汲田<sup>\*3</sup>, 日野<sup>\*4</sup>, 城)

バクテリア由来の一酸化窒素 (NO) 還元酵素 (NOR) は、脱窒過程においてNOから亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) への還元反応を触媒するチトクロム bc 型の膜内在性タンパク質である。その触媒活性部位はヘムと非ヘム鉄からなる複核構造をしており、この部位でN-O結合の開裂とN-N結合の生成が行われる。そのアミノ酸配列は好気呼吸系の末端酸化酵素であるチトクロム c 酸化酵素と高い相同性を示し、生物の呼吸過程の進化を探る上でも注目されている。本研究では、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来 NOR によるNO還元触媒反応を、独自の急速凍結装置を用いた時分割電子スピン共鳴 (EPR) スペクトルによって追跡した。その結果、反応開始後0.5ミリ秒においてヘムと非ヘム鉄のそれぞれにNO分子が配位した短寿命反応中間体の存在を発見した。シングルターンオーバー (0.5~10ミリ秒) での反応追跡、低温において反応中間体をアニリングすることによる反応追跡の結果、“trans-機構”と呼ばれる  $N_2O$  生成の反応機構を証明した。提唱した反応機構を立体構造を基盤に理解する目的で、NORの結晶化に取り組み、大きさ  $0.8\text{ mm} \times 0.6\text{ mm} \times 0.3\text{ mm}$  の単結晶を得た。現在  $6\text{ \AA}$  分解能の回折データが得られており、今後さらに結晶化条件を検討し、高分解能での構造解析を目指す。

(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<sup>\*5</sup>)

ウシ心筋チトクロム酸化酵素は、ミトコンドリア内膜に位置し、分子状酸素を水にまで還元するとともに、この反応に共役して水素イオンを内膜の内側から外側に能動輸送する膜タンパク質複合体である。この酵素の反応機構を真に理解するためには、水素原子の位置決定が可能な精度の良いデータに基づく詳細な立体構造情報が不可欠である。新規界面活性剤3-オキサトリデシル- $\alpha$ -D-マンノシド (3OM) を用いて得られた結晶においては、これまでの結晶とは異なり、酵素分子は結晶中ではモノマーで存在していた。しかし、酵素のサブユニット組成や活性に大きな違いは認め

られなかった。そこでさらに 3OM を用いた標品の精製、結晶化条件の検討を行った。硫安分画を 3 回行った標品を、タンパク質濃度 100 mg/ml, 50 mM リン酸ナトリウム pH 6.2, 2~3% PEG4000 の条件で結晶化を行ったところ、再現性よく高分解能を示す結晶が得られた。結晶を凍結させる際に用いる凍結防止剤について 14 種類、そのときの緩衝液について 15 種類検討を行った結果、50 mM Mes/Tris pH 6.2, 4% PEG4000, 35% プロピレングリコールの条件が最も適していた。SPring-8 (BL44XU) で X 線回折実験を行ったところ、1 個の結晶では 1.9~2.1 Å 分解能が限界であったが、結晶の質と凍結方法が優れていたため、異なる結晶間でも同型性は保持されていた。複数の結晶からの回折データを足し合わせた結果、1.65 Å 分解能のデータ収集に成功した。

(5) 脂肪酸水酸化酵素チトクロム P450<sub>BSβ</sub> の構造解析 (金<sup>\*4</sup>, 杉本, 城)

*Bacillus subtilis* 由来のチトクロム P450 (P450<sub>BSβ</sub>) は過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を利用して、基質である長鎖脂肪酸 (パルミチン酸) の水酸化反応を触媒するヘム酵素である。本研究では、その触媒反応機構を分子レベルで解明するために、反応中間体の結晶構造を最終目標に研究を進めている。本酵素の基質結合型の構造はすでに決定されている。そこで、過酸化水素により触媒反応を進行させた酵素を用いて結晶を作製、構造解析を行い、水酸化された基質が酵素に結合した生成物結合型の構造を得た。また、酸素のアナログである一酸化炭素 (CO) が鉄に結合した CO 型結晶構造も得た。CO 結合前の構造と比較してみると、活性部位近傍に存在する Phe79 が移動し、それに伴う水の位置の変化、ヘム周辺の水素結合のネットワーク構造の変化が観測された。酸素結合型とその還元型 (反応中間体) の構造解析の準備段階として、本酵素と酸素の反応をストップフロー法を用いて -15°C で行った結果、溶液状態において酸素化型をとらえることに成功した。低温度条件において、酸素化型結晶を作成できることが示唆され、来年度にその解析を目指す。

## 2. 気体センサーとして働く金属タンパク質の構造機能研究

細菌や菌類、植物の環境 (光, 酸素, 栄養など) 感知・細胞内情報伝達は、環境センサーとして働くヒスチジinkinナーゼ (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 依存性のリン酸基転移反応を介して行われ、「二成分情報伝達系」と呼ばれる。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。現在、数百種もの二成分情報伝達系遺伝子が明らかになっているものの、HK の環境因子 (リガンド) 結合に共役した自己リン酸化反応の制御やリン酸基受容による RR の活性化といったタンパク質レベルでのスイッチングのメカニズムは依然不明のままである。我々はリガンド結合の研究に有利なセンサードメインに金属を持つ気体センサータンパク質を二成分情報伝達系研究のパラダイムとしている。

(1) 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 (寛), 籾本<sup>\*1</sup>, 田中<sup>\*2</sup>, 城)

根粒菌の FixL はセンサードメインにヘムを持ち、ヘムで

の酸素着脱がその初発感知機構である。酸素存在下 (酸素結合型) ではキナーゼ活性が抑制され、低酸素下 (酸素分離型) ではキナーゼ活性が上昇する。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、マメ科植物に共生して窒素固定関連遺伝子 (*nifA*, *fixK*) を発現させる。FixL・FixJ 二成分情報伝達系において新たに発見された第三のタンパク質成分 FixT は、低酸素条件下で発現され、酸素濃度に関わらず FixL の自己リン酸化活性を阻害する負のフィードバックの働きをしているが、その阻害機構は不明である。ClustalX ソフトを用いて、FixJ を含む既知の RR との相同性検索を行った結果、FixT は全長にわたり類似性が認められた。中でも、リン酸基を受容しうるアスパラギン酸や保存性の高いリジン残基が 54, 96 番目に存在していた。FixL の様々なドメイン欠失変異タンパク質を用いたプルダウン実験の結果、予想通り FixT は FixL のリン酸基受容部位である H285 を含む二量体化リン酸基転移サブドメインに結合することが判明した。以上の結果より、FixT は RR の一種であると結論した。ただし、FixT は FixL によってリン酸化されることはなく、他の HK によるリン酸化も不明であることから、いわゆる「孤児」の RR といえる。FixT はリン酸化を阻害する RR として初めて明らかにされたものである。

(2) 好熱菌由来ヒスチジinkinナーゼおよびそのレスポンスレギュレーター複合体の結晶化 (山田<sup>\*4</sup>, 中村 (寛), 城)

二成分情報伝達系の HK はマルチドメインタンパク質であり、その構造はリガンドを感知する「センサードメイン (SD)」, リン酸化基質であ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 (DD)」と ATP の結合およびリン酸の転移を行う「触媒ドメイン (CD)」に細分化される。現在までに、各々のドメイン構造は報告されているものの、全長構造の情報がないうえに機能発現時のドメイン間の構造変化や相互作用変化は議論されていない。本研究は、高度好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の HK, RR を用い、HK の全長構造およびその RR 複合体の構造を決定し、二成分情報伝達系における、「SD-DD-CD 間の分子内情報伝達機構」, 「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。X 線小角散乱 (SAXS) により全長 HK, RR およびその複合体の溶液構造を得ることに成功し、さらに HK/RR 複合体の X 線結晶構造回折から得られた 4.8 Å 電子密度と重原子位置から、各ドメインと RR の相対配置を帰属した。その結果、HK 二量体は楕円筒状をしており、その長径方向ではないところに RR 二分子が結合するという複合体形成様式を明らかにした。また、HK 単量体間で直接接触しているのは DD だけであり、複合体における RR 間相互作用はないことを明らかにした。

(3) エチレンセンサータンパク質 ETR1 の立体構造解析に向けた大量発現系構築 (菊地, 中村 (寛), 兼本<sup>\*1</sup>, 城)

植物ホルモンであるエチレンは、植物の発生から枯死に至るまでの様々な過程において重要な役割を果たしている。エチレンを利用した農作物の鮮度コントロールなどは既に一部で実用化されているものの、植物のエチレン濃度感知機構や、その情報伝達機構に関しては不明な点が多く残されている。我々は、エチレン濃度の情報伝達機構をタンパク質レベルで明らかにすることを目的として、二成分情報

伝達系に属するシロイヌナズナ由来のエチレンセンサータンパク質 ETR1 の大量発現系構築に取り組んでいる。大腸菌を利用した発現系からは、植物細胞内と同様の配向性（3 回膜貫通構造）を持つ SD を得ることができないことは昨年度までの研究により分かっている。本年度は、大腸菌およびシロイヌナズナの培養細胞（T87）を利用し、キナーゼドメインも含む ETR1 全長の発現系構築を行った。ウェスタンブロット法により、いずれの場合でも ETR1 全長の発現を確認することができた。大腸菌の系においては人工的に膜貫通性リード配列を付加することで、3 回膜貫通構造の“正しい配向性”を持つ ETR1 が得られる系であることも明らかとなった。一方、培養細胞では、その発現量は僅かであった。

### 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 \*<sup>1</sup>）

マッコウクジラミオグロビンのアミノ酸配列を改変して *in vitro* でプロトヘムと反応させることにより、本来 *b* 型のヘムをもつ野生型を *c* 型のヘムタンパク質へ変換した。*c* 型のヘムは *a* 型や *b* 型と異なり、ヘムのビニル基がポリペプチドの Cys 残基と共有結合している。変異体は 2 つ作製し、1 つは、天然シトクローム *c* の配列モチーフを適用し、ミオグロビンの軸配位子 His93 に隣接する Leu89 を Cys に置換した。もう 1 つの変異体は、ミオグロビンの立体構造中で結合ヘムのビニル基のひとつに近接する Lys42 を Cys に置換した。野生型ミオグロビン遺伝子から PCR 法により変異体遺伝子を作製し、ベクターを用いて大腸菌に導入した。変異体は封入体として効率良く発現し、細胞破碎後、塩酸グアニジン溶液で可溶化、逆相 HPLC により精製された。得られた変異体はヘムを結合していなかったが、精製タンパク質にプロトヘムを加えることにより、野生型ミオグロビンと同様なプロトヘム結合型のホロ体が得られた。そこでこれらの変異型ミオグロビンを還元/嫌気条件下で 2 晩インキュベートし、逆相 HPLC を用いてヘムを共有結合しているタンパク質を精製した。ピリジンヘモクローム法により、得られた 2 種類のヘム結合変異体グロビンは、タンパク質の Cys 残基にヘムがチオエーテル結合していることが判明した。

#### (2) 人工 DNA 結合タンパク質（磯貝，伊藤）

分子設計用に開発した経験的ポテンシャル関数を用いて、 $\lambda$  ファージ由来 Cro タンパク質 ( $\lambda$ Cro) の立体構造に折り畳まれるアミノ酸配列をデノボ設計した。 $\lambda$ Cro は、全長 67 残基のサブユニットからなるホモダイマーを形成し、二次構造として  $\alpha$  ヘリックスと  $\beta$  シートを持つ古典的な転写因子の 1 つである。設計されたダイマータンパク質のモノマー変異体を合成し、多次元 NMR 解析により、その溶液構造を決定した。得られた平均構造は、天然  $\lambda$ Cro モノマー変異体の X 線構造と比較して、主鎖の RMSD が 2.1 Å の精度で一致した。

### 4. タンパク質構造解析測定法の開発と応用

(1) 分子構造を基盤にした蛍光タンパク質の発光機構の解明（福村 \*<sup>1</sup>，菊地，高 \*<sup>3</sup>，Jeyaraman \*<sup>3</sup>，城）

オワンクラゲ由来の green fluorescent protein (GFP)、さらに DsRed に代表される GFP-like proteins は、細胞生

物学や分子生物学の分野で欠かすことができない道具になっている。近年、それらの利用が増加するのに伴い、「特定の条件で蛍光色が変わる」、「あるイオンが存在するときのみ光る」などの新しい機能を持つ蛍光タンパク質が要求されるようになってきた。我々は、様々な新規色素/蛍光タンパク質の立体構造を明らかにし、立体構造と蛍光特性の関連を明らかにすることを目的とした研究を行っている。本年度までに 30 種の新規色素/蛍光タンパク質の結晶化を試み、13 種の X 線結晶構造解析に成功した。いずれの構造も全体構造は GFP や DsRed と同様の  $\beta$ -can 構造であったが、それぞれの発色団周辺構造は独特のものであった。それらを比較することで、蛍光を発するためにはタンパク質内部の発色団に平面性（広がった  $\pi$  電子系）があることが重要であり、平面性のある発色団とその周辺に位置するアミノ酸残基との水素結合や  $\pi$ - $\pi$  stacking などにより蛍光色が決定されることを明らかにすることができた。今後、より多くの立体構造を、より高分解能で明らかにすることで、分子構造を基盤にした蛍光タンパク質の発光機構の解明が期待できる。

(2) 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，城）

生体試料を対象とした X 線吸収スペクトル (bioXAS) は、標的要素の特異性が高く必ずしも高純度な試料を要求しないこと、生理的条件下（溶液状態）で測定を行うことができるために、海外では金属タンパク質の活性部位微細構造解析の網羅的研究 (metalloproteome) などにも積極的に利用されている。我々は既に、SPring-8 ビームラインにおいて、bioXAS に最適化した測定システムを構築し、鉄-硫黄クラスターを持つ金属タンパク質などの測定で成果を挙げている。本年度は、従来よりも容易にセンタリングを行うことができるように本システムの改良を行った。また、より希薄な系にも対応できるように、アンジュレータビームラインを利用するシステムの構築に着手した。しかし、放射線損傷が大きいため、損傷を評価するための顕微分光装置を導入することなどの検討も始めた。

### 5. 構造生物学研究の支援業務（瀧尾，大嶋 \*<sup>3</sup>，中村（光）\*<sup>3</sup>，高橋 \*<sup>6</sup>）

旧 HTPF 発現精製チーム機能解析グループは、年度前半においては、旧 HTPF の業務として精製タンパク質の品質評価、機能解析ならびに播磨研究所の共通施設である昆虫細胞培養室の維持管理を行った。10 月初めの旧 HTPF 改組に伴い当研究室に移籍し、精製タンパク質の品質評価と昆虫細胞培養室の維持管理の業務は継続するとともに、機能解析は終了、新たにタンパク質の解析に関する支援業務を開始した。年度を通じて行った精製タンパク質の品質評価に関しては 2 月末現在でプロテインシークエンサーによる解析 693 件、質量分析による解析 553 件、精製タンパク質の SDS-PAGE および Native-PAGE 539 件となっている。機能解析は 9 種の酵素タンパク質の活性測定などを行った。昆虫細胞培養室の利用研究室は現在 3 研究室・グループ（4 名）であるが、現在 JASRI に実験計画を申請中のグループもあり来年度以降増加が見込まれている。タンパク質の解析に関する支援業務に関してはこれまで 3 研究室・グループ（5 名）からの相談を受け、種々の測定や解析を行った。

また、先端タンパク質結晶学研究グループの多量体タンパク質構造解析研究チームとの共同研究で、結晶の改質に役立つ情報を集めるため重水素置換による方法の検討に着手した。

\*<sup>1</sup> 研修生, \*<sup>2</sup> ジュニア・リサーチ・アソシエイト, \*<sup>3</sup> 協力研究員, \*<sup>4</sup> 基礎科学特別研究員, \*<sup>5</sup> 客員主管研究員, \*<sup>6</sup> 協力技術員

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. Research in Biometal Science Laboratory focuses on understanding the functions of such metalloproteins and metalloenzymes at molecular and atomic levels 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 heme-containing dioxygenases, cytoglobin, bacterial nitric oxide reductase, cytochrome *c* oxidase and peroxxygenase P450.

(1) The heme-containing dioxygenases catalyze the first and rate-limiting step in Trp metabolism, kynurenine pathway, in which two oxygen atoms of the molecular oxygen ( $O_2$ ) is incorporated into the indole ring of the substrate. On the basis of the crystal structure of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and the kinetic measurements of the IDO mutants, we proposed a possible mechanism of the catalytic reaction; the proton abstraction by  $O_2$  leads to the electrophilic addition of  $O_2$  into indole ring. We also started to construct the expression system of the recombinant protein of another dioxygenase, tryptophan 2,3-dioxygenase.

(2) Cytoglobin (Cgb) and Neuroglobin (Ngb) are newly discovered members of the vertebrate globin family and reversibly bind  $O_2$  by virtue of the heme iron. The static and time-resolved vibration spectroscopies revealed the Fe-His stretching and presence of three conformers in the CO complex for Cgb and Ngb. The high resolution crystallographic analysis of ferric Cgb in orthorhombic crystal lattice revealed the additional helix, composed of twenty residues in the N-terminal extra region.

(3) 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 cytochrome *c* oxidase (CcO). In this study, the structures of the reaction intermediates in the single turnover of the NO reduction by NOR from *Pseudomonas aeruginosa* were characterized by the time-resolved EPR spectroscopy combined with the original freeze-quench device. Based on its structure, we propose a newly developed mechanism for the NO reduction reaction conducted by NOR. In addition, we have obtained single crystals of NOR, which diffracted X-ray at 6 Å resolution.

(4) Knowledge of the position of hydrogen atom is essential to understand the mechanism of CcO. To obtain CcO crystals diffracting X-rays at higher resolution, various crystallization conditions were inspected. When 3-oxatridecyl- $\alpha$ -D-mannoside as a detergent was used, the

data set was successfully processed at 1.65 Å resolution.

(5) Cytochrome P450 from *Bacillus subtilis* (P450BS $\beta$ ) is peroxxygenase, which catalyzes the hydroxylation reaction of fatty acid using hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) as an oxidant. For elucidation of the catalytic mechanism, it is imperative to have intermediate structural information on the catalytic cycle. To deduce some features of the  $O_2$ -bound or activated oxygen intermediate, we determined structure of the ferrous-CO-bound form as an analog of oxygenated intermediate.

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

The two-component regulatory system is widely distributed in bacteria, fungi and plants. It is well known that sensory histidine kinases (HK) sense individual environmental stimuli, and the cognate response regulators (RR) transduce their signals downstream upon receiving the phosphoryl group. However, it has been still unknown how HKs are autophosphorylated upon ligand-binding, and how RRs are activated upon phosphorylation.

(1) The rhizobial FixL-FixJ two-component system is a paradigm of oxygen sensing signal transducing systems. We have discovered that FixT is a novel type of RRs, which binds to the dimerization domain in FixL to inhibit its autophosphorylation activity.

(2) For elucidation of the mechanisms of “intramolecular signal transduction of HK”, “ATP-dependent autophosphorelaytion of HK” and “phosphotransfer between HK and RR”, we have tried determination of the solution and the crystal structures of the HK and its RR complex using proteins from hyperthermophile, *Thermotoga maritima*. Using small angle X-ray scattering technique, we obtained the solution structures of HK, RR, and HK/RR complex. These structures revealed that two RR molecules bind two-fold symmetrically to the dent region in HK dimer. We also obtained the crystal structure of HK/RR complex at 4.8 Å resolution. Each domain of HK and RR were assigned into the electron density map. The complex formation, binding manner of RR, on the crystal structure was identical to the results of SAXS.

(3) ETR1 protein, which belongs to two-component system, mediates responses to the plant hormone ethylene. The details of ethylene signal transduction mechanism in plants, however, has still remained unclear. To study the ethylene-binding site ( $Cu^{1+}$ ), we have constructed large-scale expression systems of the full-length ETR1 cloned from *Arabidopsis* using *E.coli* and culture cell (T87) as host. Western-blot analysis indicated the expression of the full-length ETR1 in *E.coli* and T87 system. It has revealed that the recombinant ETR1 using *E.coli* system has the same topology as the *in vivo* protein.

### 3. De novo protein design

(1) Sperm whale myoglobin was transformed from *b*-type to *c*-type hemoprotein by site-specific residue replacements with Cys and *in vitro* formation of covalent bond between the Cys residue and a heme vinyl side chain.

(2) Solution structure of an artificial protein computationally designed to fold into the bacteriophage  $\lambda$ Cro structure was determined by NMR spectroscopy. The solved structure was similar to a X-ray structure of natural  $\lambda$ Cro with RMSD of the polypeptide backbones at 2.1 Å.

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

(1) Green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea* and

GFP-like proteins become ubiquitously used as tools in the field of molecular and cellular biology. Structural information should be imperative to perform rational mutagenesis for generating fluorescent proteins with more useful performance. We have succeeded in purification of new chromo/fluoro-proteins cloned from anthozoa species and subsequently determined the 13 crystal structures. The structures indicate important interactions between the chromophore and amino acid residues, which are effective in determination of fluorescent colors.

(2) X-ray absorption spectroscopy of bio-related samples (bioXAS) has recently recognized as the comprehensive tool for 3D- and electronic structural characterization of the active site in metalloproteins. We have developed a XAS measurement system suitable for bioXAS study at SPring-8 beamline. The following improvements on the system are now progress; (i) adaptation for undulator beamline for the data with higher S/N ratio, especially intending to measurement of ultra-diluted samples such as membrane proteins. (ii) introduction of spectrometer for detection of radiation damage.

### 5. Supporting system for structural biology research in Harima Institute

The Functional Analysis Group of the Large Scale Protein Production Team in the High-throughput Factory was reorganized to assist researchers of the Harima Institute in protein characterization, and now belongs to this laboratory. This year, more than 700 protein samples have been characterized by protein sequencer, mass spectrometer, PAGE, HPLC, fluorescence spectrometer and others.

### Staff

#### Head

Dr. Yoshitsugu SHIRO

#### Members

Dr. Hiroshi AOYAMA

Dr. Yasuhiro ISOGAI

Dr. Yutaka ITO

Dr. Yoshiaki KAWANO

Dr. Akihiro KIKUCHI

Dr. Tsutomu MIKAWA

Dr. Shingo NAGANO

Dr. Hiro NAKAMURA

Dr. Hiroshi SUGIMOTO

Dr. Koji TAKIO

Dr. Tomoya HINO<sup>\*1</sup>

Dr. Misa KIM<sup>\*1</sup>

Dr. Seiji YAMADA<sup>\*1</sup>

Dr. Jeyakanthan JEYARAMAN<sup>\*2</sup>

Dr. Hideyuki KUMITA<sup>\*2</sup>

Dr. Mitsuhiro NAKAMURA<sup>\*2</sup>

Dr. Noriyasu OHSHIMA<sup>\*2</sup>

Mr. Jun-ichiro TAKA<sup>\*2</sup>

Ms. Naoko TAKAHASHI<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup>Special Postdoctoral Researcher

<sup>\*2</sup>Contract Researcher

<sup>\*3</sup>Contract Technical Scientist

### Visiting Members

Dr. Shin-ichi ADACHI (PF, KEK)

Prof. Yoshiki HIGUCHI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Prof. Masao IKEDA-SAITO (IMRAM, Tohoku Univ.)

Prof. Tsutomu KOYAMA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

Prof. Yukio MORIMOTO (Res. React. Inst., Kyoto Univ.)

Prof. Takumi NOGUCHI (Inst. Mater. Sci., Univ. Tsukuba)

Ms. Hitomi SAWAI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Dr. Naoki SHIBATA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Mr. Atsunari TANAKA (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)

Prof. Chikashi TOYOSHIMA (IMCB, Univ. Tokyo)

Dr. Masaki UNNO (IMRAM, Tohoku Univ.)

Prof. Shin-ya YOSHIKAWA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

### Trainees

Mr. Satoru AKIMOTO (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Eiko FUKUMURA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Mr. Manabu ISHIDA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Ms. Mayuko KANEMOTO (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Masatomo MAKINO (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Mr. Takashi OHTSUKI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

### 誌 上 発 表 Publications

#### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

Tsukihara T., Shimokata K., Katayama Y., Shimada H., Muramoto K., Aoyama H., Mochizuki M., Shinzawa-Itoh K., Yamashita E., Yao M., Ishimura Y., and Yoshikawa S.: "The low-spin heme of cytochrome *c* oxidase as the driving element of the proton-pumping process", Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 15304–15309 (2003). \*

Adachi S., Inoue K., Oka T., Yagi N., Tanaka Y., Ishikawa T., and Shiro Y.: "Subnanosecond-resolved X-ray diffraction at the SPring-8 high flux beamline BL40XU", AIP Conf. Proc. **705**, 1383–1386 (2004). \*

Ishida M., Dohmae N., Shiro Y., Oku T., Iizuka T., and Isogai Y.: "Design and synthesis of *de novo* cytochromes *c*", Biochemistry **43**, 9823–9833 (2004). \*

Matsunaga I. and Shiro Y.: "Peroxide-utilizing biocatalysts: structural and functional diversity of heme-

- containing enzymes”, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 127–132 (2004). \*
- Umemura M., Su F., Takaya N., Shiro Y., and Shoun H.: “D88A mutant of cytochrome P450nor provides kinetic evidence for direct complex formation with electron donor NADH”, *Eur. J. Biochem.* **271**, 2887–2894 (2004). \*
- Uchida T., Mogi T., Nakamura H., and Kitagawa T.: “Role of Tyr-288 at the dioxygen reduction site of cytochrome *bo* studied by stable isotope labeling and resonance raman spectroscopy”, *J. Biol. Chem.* **279**, 53613–53620 (2004). \*
- Kumita H., Matsuura K., Hino T., Takahashi S., Hori H., Fukumori Y., Morishima I., and Shiro Y.: “NO reduction by nitric-oxide reductase from denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa*”, *J. Biol. Chem.* **279**, 55247–55254 (2004). \*
- Sugimoto H., Makino M., Sawai H., Kawada N., Yoshizato K., and Shiro Y.: “Structural basis of human cytoglobin for ligand binding”, *J. Mol. Biol.* **339**, 873–885 (2004). \*
- Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: “ADP reduces the oxygen-binding affinity of a sensory histidine kinase, FixL: The possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2742–2746 (2004). \*
- Oinuma K., Kumita H., Ohta T., Konishi K., Hashimoto Y., Higashibata H., Kitagawa T., Shiro Y., and Kobayashi M.: “Stopped-flow spectrophotometric and resonance Raman analyses of aldoxime dehydratase involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis”, *FEBS Lett.* **579**, 1394–1398 (2005). \*
- Kiyoshi T., Maeda H., Kikuchi J., Ito Y., Hirota H., Yokoyama S., Ito S., Miki T., Hamada M., Ozaki O., Hayashi S., Kurihara N., Suematsu H., Yoshikawa M., Matsumoto S., Sato A., and Wada H.: “Present status of 920 MHz high-resolution NMR spectrometers”, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **14**, 1608–1612 (2005). \*
- 汲田英之: “SPRING-8 放射光を用いた蛋白質の折れ畳み過程の観測”, *化学と工業* **57**, 1308 (2004). \*
- (総説)
- 城宜嗣, 渡辺芳人: “金属酵素による小分子活性化の化学”, *生化学* **76**, 429–439 (2004).
- 汲田英之, 城宜嗣: “一酸化窒素から亜酸化窒素への変換: 一酸化窒素還元酵素の構造と機能”, *生物物理* **44**, 155–160 (2004).
- reduction by fungal and bacterial NORs”, *RIKEN-CCLRC Daresbury Symp.: Structural Biology*, (RIKEN and others), Daresbury, UK, May (2004).
- Kikuchi A.: “Structural study on colour variation of fluorescent proteins”, *RIKEN-CCLRC Daresbury Symp.: Structural Biology*, (RIKEN and others), Daresbury, UK, May (2004).
- Shiro Y., Kumita H., Hino T., Matsuura K., Takahashi S., Hori H., and Fukumori Y.: “NO reduction by fungal and bacterial nitric oxide reductases”, 3rd Int. Conf. on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-3), New Orleans, USA, July (2004).
- Nakamura H.: “The heme-based oxygen sensor, FixL/FixJ system, a paradigm of the two-component signal transducing systems”, 13th European Bioenergetics Conf. (EBEC 2004), Pisa, Italy, Aug. (2004).
- Sugimoto H., Oda S., Otsuki T., Hino T., Yoshida T., and Shiro Y.: “Structure and mechanism of heme-containing oxygenase”, 7th Int. Symp. Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, Awaji, Aug. (2004).
- Kim M., Sugimoto H., Matsunaga I., and Shiro Y.: “Analysis of catalytic mechanism of fatty-acid hydroxylase cytochrome P450 based on intermediate crystal structures”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Makino M., Sugimoto H., Sawai H., Kawada N., Yoshizato K., and Shiro Y.: “Crystal structure of human cytoglobin”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Oda S., Sugimoto H., Yoshida T., and Shiro Y.: “Crystallization and preliminary crystallographic studies of human indoleamine 2,3-dioxygenase”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Yamada S., Sugimoto H., Kumita H., Nakamura H., and Shiro Y.: “Crystallization of the histidine kinase/response regulator complex of the two-component signal transduction system”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Kohyama T., Nishikawa T., Tokuhisa T., Okumura H., Matsui Y., Sakai K., Murakami M., Adachi S., Kamiya N., and Takeda K.: “Crystallographic studies of the photoreaction intermediates of bacteriorhodopsin: Water translocation during the proton pumping cycle”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Shinzawa-Itoh K., Terada H., Yamazaki A., Tadehara Y., Aoyama H., Sugimura T., Yamashita E., Tsukihara T., and Yoshikawa S.: “Intrinsic lipids in bovine heart cytochrome *c* oxidase”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN,

## □ 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Shiro Y. and Nakamura H.: “Sensing Mechanism by heme-based oxygen sensor FixL/FixJ system”, 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).
- Shiro Y.: “Structural studies of metalloproteins: NO

- and others), Himeji, Sept. (2004).
- Yoshikawa S., Muramoto K., Aoyama H., Mochizuki M., Shinzawa-Itoh K., Yamashita E., Yao M., and Tsukihara T.: “The low spin heme of cytochrome *c* oxidase as the driving element of the proton pumping process”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Kikuchi A., Tanida H., and Shiro Y.: “X-ray absorption spectroscopy for metalloproteins at SPring-8”, 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Nakamura H.: “Rhizobial FixL/FixJ system exhibits a paradigm of the two-component signal transducing systems: a two-cylinder reciprocating engine model of phosphorylation reactions”, 14th Int. Congr. on Nitrogen Fixation, Beijing, China, Oct.–Nov. (2004).
- Inagaki E., Ohshima N., Kuroishi C., and Tahirov T.: “Crystal Structure of *Thermus thermophilus*  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase”, 3rd Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2004), (International Structural Genomics Organization and others), Washington DC, USA, Nov. (2004).
- Nakamura H.: “A novel regulatory mechanism of the kinase reaction of a heme-based oxygen sensor proteins: two-cylinder reciprocating engine model of FixL/FixJ”, 3rd Symp. on Advances in Bioinorganic Chemistry (SABIC-2004)/ 2nd Asian Biological Inorganic Chemistry Conf. (AsBIC-II), (Tata Institute of Fundamental Research (TIFR) and others), Goa, India, Dec. (2004).
- Shiro Y.: “Reaction mechanism of NO reduction by nitric oxide reductases”, 3rd Symp. on Advances in Bioinorganic Chemistry (SABIC-2004)/ 2nd Asian Biological Inorganic Chemistry Conf. (AsBIC-II), (Tata Institute of Fundamental Research (TIFR) and others), Goa, India, Dec. (2004).
- Sawai H., Mizutani Y., Ohta T., Sugimoto H., Makino M., Kawada N., Yoshizato K., Uno T., Kitagawa T., and Shiro Y.: “Structural characterization of distal and proximal histidine environment of neuroglobin and cytoglobin”, 3rd Symp. on Advances in Bioinorganic Chemistry (SABIC-2004)/ 2nd Asian Biological Inorganic Chemistry Conf. (AsBIC-II), (Tata Institute of Fundamental Research (TIFR) and others), Goa, India, Dec. (2004).
- (国内会議)
- 内藤久志, 高潤一郎, 宮崎直幸, 小川輝, 中川敦史, 月原富武, 藤本瑞, 水野洋, 萩原恭二, 東貴彦, 渡邊康雄, 大村敏博: “イネ萎縮ウイルスの主要キャプシド蛋白質の構造”, 平成 16 年度日本植物病理学会大会, 福岡, 3 月 (2004).
- 宮崎直幸, 内藤久志, 高潤一郎, 中川敦史, 月原富武, 藤本瑞, 水野洋, 萩原恭二, 東貴彦, 渡邊康雄, 大村敏博: “イネ萎縮ウイルスの主要構成蛋白質の自己組織化機構”, 平成 16 年度日本植物病理学会大会, 福岡, 3 月 (2004).
- 磯貝泰弘, 伊藤隆, 池谷鉄兵, 太田元規: “De novo design and synthesis of  $\lambda$  cro fold”, 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 (2004).
- 牧野正知, 杉本宏, 澤井仁美, 河田則文, 吉里勝利, 城宜嗣: “ヒト由来サイトクロビンの配位子結合機構”, 第 14 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM 2004), (日本薬学会), 静岡, 6 月 (2004).
- 杉本宏: “ヘム含有二原子酸素添加酵素インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼの構造と反応メカニズム”, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「化学と生物の融合: 生体金属科学の構築にむけて」, 吹田, 6 月 (2004).
- 澤井仁美, 杉本宏, 牧野正知, 水谷泰久, 河田則文, 吉里勝利, 宇野公之, 城宜嗣: “Neuroglobin と Cytoglobin のヘム軸配位子周辺の構造”, 第 31 回生体分子科学討論会, 水戸, 7 月 (2004).
- 汲田英之, 松浦宏治, 日野智也, 高橋聡, 堀洋, 福森義宏, 森島績, 城宜嗣: “急速凍結 EPR 分光法による膜結合型 NO 還元酵素の反応機構解析”, 第 31 回生体分子科学討論会, 水戸, 7 月 (2004).
- 城宜嗣: “分子構造を基盤に金属酵素の機能を理解する”, 第 17 回生物無機化学夏季セミナー, 岐阜県丹生川村, 8 月 (2004).
- 汲田英之, 松浦宏治, 日野智也, 高橋聡, 堀洋, 福森義宏, 森島績, 城宜嗣: “緑膿菌由来 NO 還元酵素の短寿命中間体の構造及び反応機構解析”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
- 穂本智, 城宜嗣, 中村寛夫: “The inhibitory mechanism of the FixT for the FixL kinase activity in *Sinorhizobium meliloti*”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
- 中村寛夫: “Two-cylinder reciprocating engine model of the oxygen sensor kinase system, FixL/FixJ”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
- 汲田英之, 松浦宏治, 日野智也, 高橋聡, 堀洋, 福森義宏, 森島績, 城宜嗣: “膜結合型 NO 還元酵素の反応機構解析”, 第 19 回生体機能関連化学シンポジウム, (日本化学会生体機能関連学部会), 東京, 10 月 (2004).
- 城宜嗣: “ヘム型酸素添加酵素の構造と機能”, 分子科学研究所研究会「生体金属分子科学の展望」, 岡崎, 10 月 (2004).
- 山下栄樹, 青山浩, 村本和優, 伊藤-新沢恭子, 吉川信也, 月原富武: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素のヘム A のフェーネシルエチル基の絶対構造決定”, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 青山浩: “膜蛋白質複合体の構造-機能研究の新展開: チトクロム酸化酵素”, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 菊地晶裕: “構造を基盤にした蛍光タンパク質の発光の分子機構”, 理研シンポジウム「モレキュラー・アンサンブル 2004」, 和光, 11 月 (2004).
- 山田斉爾: “二成分情報伝達系タンパク質複合体の結晶・溶液構造解析”, 理研シンポジウム「モレキュラー・アンサンブル 2004」, 和光, 11 月 (2004).
- 磯貝泰弘: “人工タンパク質のデザインとフォールディング”, 第 61 回武蔵野地区高分子懇話会, 八王子, 11 月 (2004).
- 花田真, 福本雅子, 山本尚吾, 杉村高志, 青山浩, 伊藤-新沢

- 恭子, 月原富武, 吉川信也: “3 - オキサトリデシルマンノシドを用いたチトクロム酸化酵素の結晶化”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 村本和優, 青山浩, 山下栄樹, 伊藤-新沢恭子, 月原富武, 吉川信也: “チトクロム酸化酵素の高分解能構造”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 寺田浩人, 山崎明子, 杉村高志, 伊藤-新沢恭子, 蓼原よしき, 花田真, 青山浩, 月原富武, 吉川信也: “ウシ心筋ミトコンドリア呼吸鎖複合体に特異的に結合する脂質”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 村本和優, 青山浩, 石田訓康, 倉内毅, 青波里実, 山下栄樹, 伊藤-新沢恭子, 月原富武, 吉川信也: “還元型チトクロム酸化酵素の NO 結合型構造と CO 結合型構造の精密化”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 青山浩, 村本和優, 菅倫寛, 平田邦夫, 山下栄樹, 伊藤-新沢恭子, 吉川信也, 月原富武: “酸化型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の活性中心の構造”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 兼本真友子, 中村寛夫, 城宜嗣: “エチレンセンサータンパク質 ETR1 の大腸菌における発現系構築に向けた膜内配向性解析”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 牧野正知, 杉本宏, 澤井仁美, 河田則文, 吉里勝利, 城宜嗣: “結晶構造に基づいたヒト由来サイトグロビンのリガンド結合機構”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 田中敦成, 中村寛夫, 城宜嗣: “酸素センサータンパク質 FixL の自己リン酸化反応と二量体化の関連”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 磯貝泰弘, 伊藤隆, 池谷鉄兵, 太田元規: “人工  $\lambda$ Cro の溶液構造”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 城宜嗣, 汲田英之, 日野智也: “脱窒生物の一酸化窒素還元酵素の触媒反応機構”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 奈良麻利子, 佐藤雅俊, 城宜嗣, 中村寛夫: “動物細胞におけるヘムの輸送について”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 竹田直弘, 竹清貴浩, 奥野明, 清水昭夫, 磯貝泰弘, 加藤稔, 谷口吉弘: “デノボデザインペプチドおよびタンパク質の  $\alpha$ -ヘリックスに及ぼす圧力効果”, 第 42 回日本生物物理学会年会, 京都, 12 月 (2004).
- 城宜嗣: “金属酵素による酸化還元反応の機構を分子レベルでさぐる”, 分子科学研究所研究会「物理化学から生命科学を展望する: 分子組織体から細胞へ」, 岡崎, 12 月 (2004).
- 磯貝泰弘: “人工タンパク質のデザインとフォールディング”, 分子科学研究所研究会「物理化学から生命科学を展望する: 分子組織体から細胞へ」, 岡崎, 12 月 (2004).
- 青山浩: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶化”, 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複合体の溶液・結晶構造解析”, 理研マンスリーフォーラム第 6 回ポスターセッション, 播磨, 1 月 (2005).
- 城宜嗣: “金属蛋白質・金属酵素による物質変換と情報変換の化学”, 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「配位空間の化学」第 1 回公開講演会・平成 16 年度成果報告会, 東京, 2 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).