

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。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。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。今年度はトロポミオシン分子のトロポニン結合部を含む断片の結晶を得てトロポミオシンの構造と柔らかさの関係を理解する重要な手がかりを得た。また、アクチンフィラメントB端にCapZが結合した構造を電子顕微鏡画像解析の方法で解明した。電子顕微鏡を使ってダイナクチン複合体の分子配列も解明した。アクチン重合体自体の原子モデルの改良、アクチン大量発現系の開発での見るべき進展があった。

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。まずガラス細管中にF-アクチンを高濃度、高配向させる方法を確立し、その配向ゾルからのX線繊維回折強度から振幅情報を得た。その振幅情報とクライオ電子顕微鏡写真からの位相情報を統合し、最良の電子密度分布を得た。その電子密度分布に、基準振動モードを基にした方法と分子動力学シミュレーション法を使ってG-アクチンの結晶構造を変形させながら当てはめていった。こうして8Å分解能を持つ原子モデルを得た。

このモデルで、いくつか重要な点が明確になった。第一、F-アクチンの(対角方向ではなく)縦方向のサブユニット間の連結の特徴的な構造が明確になった。第二、G-F変換に伴うscissors-likeとpropeller-likeのサブユニットの形態変化が明確になった。第三、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かかわり重要な結節点となっている。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のDr. R.Schröderらとの共同研究)

- (2) 昆虫細胞を用いた高効率ヒトアクチン発現系の構築と変異アクチンの機能解析(岩佐*1、前田(佳)*1(生体マルチソーム研究チーム)、小田(俊))

アクチンは筋肉蛋白質や細胞骨格蛋白質の主要成分で、

筋収縮や食胞形成などの細胞運動に重要な役割を担っている。その際のアクチンの重合・解離といったアクチンフィラメント動態は、アクチン結合蛋白質のみならずアクチン分子自身の構造変化により制御されていることが知られている。このようなアクチンフィラメント動態に伴うアクチン分子の構造変化についてより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系を確立し、動態に関与する部位に変異を導入した組換えアクチンを解析することが不可欠である。そこで我々は、昆虫細胞を用いた系で、ヒト由来の高等生物アクチンを大量かつ高効率に得るための発現系の構築および変異アクチンの機能解析を試みている。トランスファーベクターには、我々が開発した発現促進配列であるL21を導入したベクターと、Joelらが用いたベクター(*)を使用した。これらのベクターを用いて、ヒト骨格筋型アクチンと、ヒト心筋型アクチンの可溶性組換えアクチン発現量を比較した。その結果、どちらのベクターを用いた場合でも発現量は同程度であった。また、骨格筋型よりも心筋型の方が高い発現量が確認された。このことから、心筋型アクチンを今後の解析に用いることにした。同様にヒト非筋型アクチンも良好な発現が確認された。さらに、組換えアクチンと昆虫細胞由来アクチンを容易に分離するために、アクチンのN末側にアフィニティタグと発現後切除する配列を導入した。

現在は、組換えアクチンの精製方法の最適化と、機能解析方法の検討を行っている。精製方法はほぼ確立されており、1L培養あたり約1mgの収量で高純度の精製発現アクチンが得られている。機能解析については、アクチンの重合散乱曲線、臨界重合濃度および重合時の無機リン濃度の定量を行っているが、再現性の良い解析方法が確立されつつある。これらの手法を用いて、組換えアクチンと組織から得たアクチンの比較を行っている。また、アクチンフィラメント動態に関与する部位である、ATPaseやアクチン重合に重要と考えられている部位に変異を導入した種々の変異体の作製も行っている。今後はそれらの精製方法を確立し、上記機能解析を行う予定である。

(*) Joel *et al. Biochemistry* 2004, **43**, 11554-11559

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2003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)トロポミオシンの結晶構造の解明 (似内、南方*1、小田(直)*1、前田(佳)代*1 (生体マルチソーム研究室))

トロポミオシン(Tm)は、284残基400 Åの長さのcoiled-coil蛋白質であり、骨格筋、および、心筋において、トロポニンとともにカルシウム濃度による筋肉の張力調節に関わっている。

Tmが結晶化し得ることは1940年代には知られていたが、多くの試みにも関わらず7 Å分解能の結晶解析結果が登録されているのみである。これは、Tm分子特有の柔軟性が良質の結晶成長の妨げになっているためであると考えられるが、他方、この柔軟性自体がTmの本質的な機能、および、カルシウム調節に関与しているとも考えられる。

近年、N末端側81残基フラグメントの結晶構造が2.0 Åで解かれ、また、Leu-Zipper融合蛋白質として254 - 284までの結晶構造が2.7 Åで解かれた。これにより、Tmの原子分解能結晶構造解析の糸口が見つかったものの、Tmがトロポニンコアと相互作用すると言われている機能的に重要な部位、すなわち、TmのCys190周辺はこの中に含まれておらず、依然として詳細は不明であった。

本研究室では、N末端側にGCN4配列を付加したトロポミオシンのC末端側断片を6種類作り、そのうち、176 - 284残基を含む断片について2.6 Å分解能で結晶構造解析に成功した。さらに、N末端側とC末端側にGCN4配列を付加した176-273残基を含む断片を調製し、これを2.0 Å分解能で結晶構造解析に成功した。前者の結晶構造では、heptad repeatが保たれているcoiled-coil構造がGlu218周辺で明確に曲がっていることが明らかとなった。また、両構造とも、coiled-coilの局所的な構造パラメータが、coiled-coilの軸に沿って様々に変化しており、さらに、前者と後者はまったく同じ共通配列を含む一方で、構造パラメータがお互いに異なる部分が存在していることが判明した。これらの事実は、トロポミオシンが柔軟な分子であることを明確に示している。結晶構造の詳細な解析から、coiled-coil構造を不安定化するdestabilizing cluster、特に、疎水コアに近接する酸性残基Asp137とGlu218の重要性と、これらの残基がトロポミオシン分子の昨日に直接結びついている可能性を我々は指摘した。

ごく最近、LehrerらのグループがAsp137をLeuに置換した

変異体では、カルシウム依存的なトロポニン - トロポミオシンによるミオシンS1のATPase阻害活性が異常となること、すなわち、カルシウム濃度による制御がかからなくなり、常にカルシウムonの状態になることを報告している(2006年米国生物物理学会923-Pos)。このように、我々の提案はトロポニン - トロポミオシンの分子機能理解において、一石を投じたものとなった。

(3)トロポニン T1-トロポミオシン複合体の結晶化(南方*1、似内)

昨年度までに、N末端側にヒスチジンタグをつけたトロポニン T1 (His-TnT1)の発現系を構築し、これまでのTnT25Kの臭化シアンを用いた化学的切断法では精製が困難だったヒト心筋トロポニン T1 (hcTnT1)の結晶化を行った。今年度、引き続きhcTnT1の結晶化およびTnT1とトロポミオシン(Tm)複合体の調整、結晶化を行った。

hcTnT1については、X線結晶構造解析に適した結晶が得られなかった。そこで、先にTmとの複合体を作ることにした。フラグメントの長さが異なるなどのいろいろな種類のTmと複合体を作るには、大量のTnT1が必要になるが、今までの発現系ではhcTnT1の発現量が少ないという問題点があった。そこで、発現条件を検討し、コンピテントセルを変えることによって、発現量を増やすことに成功した。

N末端側にヒスチジンタグがついたHis-hcTnT1またはヒスチジンタグをTEV proteaseを用いて切断したhcTnT1と、N末端側にロイシンジッパーをつけた2種類のトロポミオシン(ZTm162(162-284)、ZTm176(176-284))または両端にロイシンジッパーをつけた2種類のトロポミオシン(ZTm162Z、ZTm176Z)とを組み合わせて複合体を調製した。つまり、別々に精製したTnT1とTmを1:1の割合になるように混ぜた後、ゲル過クロマトグラフィーにより全てのTmと複合体を作っていることを確認し、結晶化のスクリーニングを行った。

His-hcTnT1 / ZTm162、hcTnT1 / ZTm162の結晶は再現よく得られ、SDS-PAGEで結晶中にTnT1とTmが含まれていることを確認した。His-hcTnT1 / ZTm162、hcTnT1 / ZTm162はそれぞれ同じ結晶化条件で、同じ結晶系の結晶が得られるため、結晶中でのヒスチジンタグによる影響はないと思われる。しかし、結晶により分解能にばらつきが見られ、あまり分解能はよくない。結晶とドロップ両方をSDS-PAGEで確認し、比較したところ、ドロップ中ではTnT1が少なくなっていた。従って、結晶中ではTnT1:Tm=1:1と2:1でできた複合体が混ざっていて、それが分解能を悪くしている可能性があると考え、先程と同様にTnT1:Tm=2:1の複合体を調製し、結晶化のスクリーニングを行った。1:1の時と同じ結晶化条件で結晶が得られたが、分解能は同程度で改善されなかった。次に、X線回折実験を行う時の結晶を凍らせる段階でのダメージを減らすため、glutaraldehydeによるcross-linking、cryo protectantを変えるなどのクライオ条件の検討を行ったが、現在のところ改善は見られない。今後、Tmの種類を変えて複合体を調製し、結晶化を行う予定である。

(3)酵母トロポミオシン2の結晶構造 (Meshcheryakov*1)

酵母のTmには2つのアイソマーyTm1(199残基=アクチン5分子分)とyTm2(161残基=アクチン4分子分)があり、特に後者はこれまで報告のあるTmのなかでは最短である。アミノ酸配

列は哺乳類の Tm とは大きく異なっているため、原子構造を解明することによって立体構造的ないしは予測される動的性質が判明すれば、Tm とはそもそもどのような分子であるのかを理解することが可能となると期待される。

我々は γ Tm2 の全長分子から結晶を得た。この結晶から 3 Å までの反射を観察でき、3.4-3.5 Å の範囲のデータを記録することができた。位相を得るために SeMet を持つ分子も発現し結晶化できた。しかし結晶は力学的に脆弱であるため回折強度の測定はできていない。

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。

(4) NMR によるトロポニン 3 量体の構造解析 (Lassalle*1)

当研究グループが解明したヒト心筋のトロポニンの結晶構造ではいくつかのループ部分の電子密度が同定できなかった。例えば、TnI のヘリックス 4 を形成する残基 164-188 とか、TnT2 の残基 183-202 などである。本研究ではこれら揺動していると考えられるループ部分を中心に NMR で構造を決定し、動態も理解することを当面の目標とする。

本年度は、標識を導入した TnC を使って、その単体 ($^2\text{D}^{15}\text{N}$ TnC)、TnI との複合体 ($^2\text{D}^{15}\text{N}$ TnC complexed with TnI)、および TnI-TnT との複合体 ($^2\text{D}^{15}\text{N}$ TnC complexed with TnI and TnT2) から HSQC spectra を得ることに成功した。また、標識した TnI を含んだ複合体、 $^2\text{D}^{15}\text{N}$ TnI/TnC/TnT2、標識した TnT2 を含んだ複合体 $^2\text{D}^{15}\text{N}$ TnT2/TnC/TnI のそれぞれより HSQC spectra を得た。これまでヒト心筋のトロポニンは溶解度が低く蛋白質濃度を高くできず NMR 測定ができていなかった。我々がこれを可能にしたのは可溶化条件を発見したためである。

共同研究者

近畿大学赤坂研究室、首都大学東京甲斐研究室

(5) 遺伝性心筋症を引き起こす TnT 変異と機能変調との因果関係について (松本*1、前田 (佳)*1 (生体マルチゾーム研究室)、似内、小田 (俊)、前田 (雄))

心筋症の一部はトロポニン中の遺伝的変異に起因する。これまで知られているアミノ酸変異をヒト心筋トロポニンコアドメイン結晶構造上に配置すると、構造が固いと考えられている IT アーム中には TnT の E244D と K247R の 2 つの変異が存在していた。IT アームのようなコイルドコイルは一般的に疎水性コアが形成され安定化しているが、この部位では極性アミノ酸残基の存在によりコイルドコイルは不安定化している。また静電的反発力のために側鎖が外側を向くと同時に近傍のアミノ酸側鎖と水素結合を介して安定化していた。そのためコイルドコイル中には空隙が生じている。さらに結晶構造を基準振動により解析した結果、この部位は分子の屈曲の中心となっており、非常に特異な構造を有している領域であることが明らかとなった。これらのことから、心筋症の機能変調の原因は、この領域の特異な構造の変化によって運動様式が正常に保たれなくなったためであるとの仮説をたてた。本研究では、この仮説を検証して心筋症機能変調の原因を構造の面から解明し、さらに筋収縮機能発現機構を明らかにすることを目指した。

そのために、全長ヒト心筋型 TnT の 244 あるいは 247 に系統的に変異を導入し、これらの変異による機能変調を調べようと試みた。本年度は、ウシ心臓から精製した筋原繊維に心筋症の原因変異を導入した TnT (E244D あるいは K247R) を大概らの方法に従って交換導入し、それらの機能 (ATPase) を測定した。E244D 変異を導入した筋原繊維は、これまで報告されているのと同様にカルシウム感受性に変化を与えず最大張力を増大させた。K247R の生化学的実験はこれまで報告がないが、本研究によりカルシウム感受性、張力ともにほとんど影響を与えないことが示唆された。今後はこれまでに調製した種々の変異 TnT を用いて系統的に機能を調べ、アミノ酸変異と機能変調との因果関係を明らかにしていくつもりである。この研究は分子レベルで変異と機能異常の関係を説明しようとするものであり、遺伝性疾患の疾病機序を分子レベルの変異から直接説明する大きな一歩となるものである。

参考文献

Yanaga, Morimoto, Ohtsuki. *J.Biol.Chem.* 1999 **274**:8806-12.

(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*1)

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り組みを始めている。

筋収縮のカルシウム調節機構を理解するためには細いフィラメント全体の構造変化を原子レベルで知ることが必要である。本研究の目的は thin filament の結晶化を目指して長さの揃った短いフィラメントを構築することである。その方針は、フィラメントの端を止めるキャップと長さを決める物差しを結合させフィラメントの長さを固定するものである。物差しとしてトロポミオシンを、キャップとしてアクチンフィラメントの B 端をキャップする CapZ を用いる。また両者を結合させるために CapZ とトロポニン T の融合タンパク質 (CapZ-TnT) を構築し、トロポミオシンとトロポニン T の親和性を利用する。本年度は昨年に引き続き融合タンパク質の構築とアクチンを除く他の成分の大腸菌での発現系の構築を行った。その結果、CapZ-TnT は低塩濃度 (0.2M 以下) で沈殿することがわかった。これは低塩濃度に不安定である TnT の性質の影響と考えられる。トロポミオシンと TnT の十分な親和性を得るには低塩濃度に対して安定な融合タンパク質の構築を必要とする。そこでトロポニン複合体の他の成分である TnI、TnC を CapZ-TnT と共発現させた CapZ-Tn 融合タンパク質の発現・精製を試みた。CapZ(β) の N 末にタグを導入し、CapZ-Tn を大腸菌で発現させたところ融合タンパク質の成分である CapZ(\square)、CapZ(β)-TnT、TnI、TnC が可溶性画分に発現し、タグ精製を行ったところそれぞれの成分がタグをつけた CapZ(β) と共に溶出されることがわかった。今後この融合タンパク質の性質を検討した上で他の成分の精製を行いミニフィラメント作成に取り掛かる予定である。

3. ダイナクチンの複合体の構造研究

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かかわる重要な機能

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*1)

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。今年度は、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2次元投影像を得た。

(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 (古田*2、谷本*2、今井*1、前田(佳)*1(生体マルチソーム研究室))

Dynactin複合体のサイドアームであるp150^{Glued}の、ショルダー複合体結合領域を決定するため、p150^{Glued}欠失変異体とショルダー複合体との結合解析を行った。まずショルダー複合体を構成するp50 とp24 の大腸菌での共発現系を構築し、ショルダー複合体を得る事に成功した。次に5種類のp150^{Glued}欠失変異体を作製しショルダー複合体との結合の有無を調べた。その結果、p150^{Glued}のC末端側にあるcoiled-coil領域付近がショルダー複合体との結合に必要な事がわかった。今後p150^{Glued}のショルダー複合体結合領域を絞り込み、p150^{Glued}断片とショルダー複合体が結合した状態での結晶化、立体構造解析を行う予定である。またp150^{Glued}欠失変異体とCapZとの結合解析を行ったところ、p150^{Glued}中央領域とCapZとの直接の相互作用が示唆される結果が得られた。この相互作用についても今後さらに詳しく解析する予定である。

(3)ダイナクチン複合体の P-end capping 蛋白複合体の発現 (前田(佳)*1(生体マルチソーム研究室))

P-end capping 蛋白複合体はp25、p27、p62 そしてArp11 から構成されている。これら4成分を同時に大腸菌内で発現させようとした。結果はp25、p27 は発現したが、不溶性であった。p62、Arp11 については、発現はみられなかった。p25、p27 は共に LβH fold をしていると予想されているので、urea 等変性剤を用いて可溶化し後再生する事が可能かも知れないのでこれを試みる。またP-end capping 蛋白複合体はp25、p27のグループとp62、Arp11のグループに分離する事ができる。この事とArp11が昆虫培養細胞内で発現出来た(Dr.Schroer 私信)ことから、p62、Arp11については昆虫培養細胞で発現を試みたほうが良いかもしれないので、こちらを試みる。

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。本年は以下の2課題を追求した。

(1)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*1、山下)

我々は2003年CP全分子(α-, β-ヘテロダイマー)の結晶構造を解明した。今年度は、アクチンの先(B端側)に結合するキャッピングタンパクであるCapZとアクチンフィラメントの複合体の三次元構造をクライオ電子顕微鏡写真と独自に開発した画像処理法を用いて23.3 Å分解能で決定した。これにより、CapZのアクチンへの結合様式が解明されたとともに、世界で始めてアクチンフィラメントの端の構造を直接決定することができた。当研究室の武田修一氏のミュータントの結果をあわせ、現在論文執筆中である。

同じ方法を用いて、結合蛋白質無しのアクチンフィラメントのP端の構造も約24 Å分解能で決定した。現在この構造が何を意味するかを解釈しているところである。

(2) キャッピングタンパク質(CapZ)のアクチンフィラメント結合機構の解析(武田(修)*1)

アクチン細胞骨格は細胞の形態、生理機能、運動の制御をつかさどる重要な構造体である。細胞内においてアクチンフィラメントは伸長及び収縮を繰り返しており、その制御は多くの調節タンパク質が関与する複雑な過程である。キャッピングタンパク質はα, βサブユニットからなるヘテロダイマーで、アクチンフィラメントB端に非常に高い親和性(Kd~1nM)で結合することによってフィラメントの重合、及び脱重合を阻害する重要な調節因子である。以前に我々のグループによってキャッピングタンパク質CapZ(chickenα1β1)の結晶構造が明らかになった。その構造から両サブユニットのC末端部位の両親媒性ヘリックスがCapZ本体から“触覚”のように離れ、アクチンフィラメントB端と疎水性相互作用によって結合するというモデルが提唱された。その後の生化学的実験からそのモデルが検証されているが、詳細な複合体の結合様式は明らかとはなっていない。最近、我々はクライオ電子顕微鏡像の単粒子解析法を用いてアクチンフィラメントとCapZ複合体の三次元構造解析を試みた。得られた構造情報は、αサブユニットのC末端部位がアクチンフィラメントとの結合において最も重要であることを示唆した。この付近のアミノ酸配列を比較すると、正電荷を持つアミノ酸残基が生物種間で非常によく保存されている。本研究ではこれらの保存性の高い残基に突然変異を導入した変異体CapZのアクチンフィラメント結合活性を調べることによって、複合体形成の機構を調べることを目的とした。CapZのフィラメントキャッピング活性はピレン標識アクチンを用いたアクチンフィラメント重合測定により評価した。その結果、いくつかのαサブユニットC末端部位の正電荷残基の変異体CapZについて野生型に比べ低いキャッピング活性(フィラメントB端への親和性の減少)が計測された。特に負電荷残基への置換、及び複数の正電荷残基の変異体においてはキャッピング活性が著しく減少した。これらの結果はCapZαサブユニットC末端付近の正電荷残基クラスターと、アクチンフィラメントB端特異的部位との静電相互作用による結合という、新たな結合機構を支持するものである。今後はさらなる変異体のキャッピング活性を測定することによってより詳細な結合機構を調べる予定である。また他のアクチ

ン調節タンパク質を含めたフィラメントB端ダイナミクスの制御機構を明らかにしたい。

(3) 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*1、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めざしている。特に FH1FH2 領域を含む結晶構造の解明をめざして発現系を準備している。アクチン重合因子 mDia1 による細胞内アクチン動態の解明を研究課題とし、非筋細胞では、アクチンは常に重合・脱重合を繰り返しており、多くの細胞機能に寄与している。アクチン繊維重合端(B-end)では、大別すると、重合因子とキャッピング因子の2種が働いている。この2種の因子のバランスが重合にとって重要となる。重合因子は、VASP ファミリーと Formin ファミリーの2種が同定されているが、その中でも Dia ファミリーは、アクチン骨格調節機構の上位シグナルである低分子 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリーによって活性化することが知られており、重要なタンパク質と考えられる。そこで、この機能を探索するために(1)構造解析(2)生化学的機能解析(3)細胞での機能解析を行っている。

Dia ファミリー分子は、N 末から GBD (GTPase binding domain)、DID (Diaphanous Inhibitory Domain)、DD (Dimerization Domain)、CC (Coiled coil domain)、FH1 (Formin homologous Domain 1)、FH2 (Formin homologous Domain 1)、DAD (Diaphanous Autoregulatory Domain) の少なくとも合計7個の領域で構成されている。構造解析研究は、既に種々の領域 (FH2、FH2-actin complex、RhoC-(GBD-DID-DD domain) complex、DAD-DID complex) で結晶が作製され、構造が明らかになっており、アクチン結合様式や、Rho 結合による活性化様式、DAD による阻害様式などが解明されつつある。しかしながら、次の重要な2点においては未解決のままである。(1)どのように Rho 結合や DID-DAD の解離による活性化でアクチン重合が活性化されるのか。(2)アクチン重合において FH1 はどのような寄与をしているのか。これらの問題には、全長タンパク質での研究が不可欠である。

Dia 分子はホモダイマーを機能単位として、多くの分子間あるいは分子内の相互作用部位を持つ。FH2 同士、DIDとDAD、DD 同士、さらに CC 同士も分子間相互作用を行っていると思われている。また、FH2とDIDとの間にも相互作用があるのではないかと提案されており、合計6カ所もの相互作用部位を持つ複雑な形をしていると考えられ、ドメインだけでの研究では全体像が把握しにくい。ところが、全長タンパク質を用いた研究は、現在まで、皆無である。そこで、まず、組換え全長タンパク質の精製を試みている。

昨年度はトリ由来の Dia を用いて、大腸菌あるいは昆虫細胞を用いて発現させ、精製を試みた。高い発現レベルをもつ系を確立することはできたが、分解物と思われるものが多く含まれ、構造解析には適さないものであった。また、トリ由来の Dia は、ほ乳動物の3種の Dia のどのタイプに相当するかが不明である。アミノ酸配列からは、mDia3 に最も近いが、ほ乳動物由来の Dia での生化学的特徴の違いが不明であるため、タイプ付けすることは現在のところ不可能である。さらに、最終目

標となる細胞での機能解析ではほ乳動物細胞を用いる予定のため、マウス由来の mDia1 に変更した。加えて、予想される全長蛋白質の複雑な構造のため、大腸菌よりもほ乳動物細胞により近い昆虫細胞のほうが蛋白質の折りたたみ構造がより正しくなるのではないかと考えた。mDia1 でも昆虫細胞での発現は良好であった。しかしながら、cDiaと異なり、mDia1 は不溶性画分に多くみられた。種々の界面活性剤(TX-100、C12E9、DOC、EmphigenBB など)を試したが顕著な効果は認められず、軽い超音波処理によりほとんど可溶性画分に移行した。この後、可溶性画分をグルタチオン・カラムに通し、精製した。まだ、マイナーバンドが残っており精製度は80-90%位と想像される。

これと平行して、 β -actin 発現系の構築も試みている。通常、生化学的解析には骨格筋 α -actin が用いられている。しかしながら、いくつかの actin 結合タンパク質で、解離定数の違いが報告されており、重合機構に重要なタンパク質である profilin も α -actin よりも β -actin に強く結合すると報告されている。mDia1 は非筋細胞に発現するタンパク質であり、生理的な基質は β -actin であると考えられる。しかしながら、組織からは少量しか精製できず、しかも β 、 γ -actin 混合物である。そこで、 β -actin 発現系の構築を試みた。タグとして、GST と His を持つ2種の発現系を作製した。GST 系では、GST がダイマーを形成するためと思われるが、完全にモノマーすることは困難であった。これに対して、His 系の場合は、約 50%が可溶性画分に回収され、90%以上の精製度のものが得られた。しかしながら、抽出効率が悪く、透析中に生成する不溶物に大量の actin が含まれることなどの問題点が残されている。この問題は、少なくとも含まれるアクチン結合タンパク質による影響と考えられる。透析後の試料は、透析溶液中の KCl 濃度を 150mM から 0mM にすることにより、生成する不溶物の量には変化がなかったが、次の段階である Ni-NTA カラムへの吸着量が顕著に向上した。現時点においては、回収率は10%以下と推定され、回収量は1リットル培養から、10 mg 程度であった。そこで、現在、actin モノマー結合タンパク質である profilin を共発現させ、抽出効率をあげることを計画している。また、profilin-actin complex は強固な複合体を形成するため、精製過程でも安定な複合体を形成し、回収率などの劇的な改善が期待される。

α -actin 発現・精製法を確立させ、細胞内と同様な因子を用いて、mDia1 全長タンパク質の生化学的機能解析をおこなう。Rho ならびに profilin-actin の結合やアクチン重合測定をおこなう。アクチン重合測定は、pyrene 標識アクチンを用いた測定を計画しているが、pyrene 法では蛍光強度の増加は、溶液全体でのアクチン繊維の長さの合計の増加に対応する。つまり、1本あたりの繊維が長く繊維数が少ない場合と、1本あたりの繊維が短く繊維数が多い場合とでは区別できないという欠点がある。Dia の場合は、この差を無視することはできないとの認識が研究者間で広まっている。そこで、将来的には、顕微鏡下で個々の繊維を測定することも視野に入れている。このような研究により、mDia1 の構造解析にむけた複合体作りを検討していく。細胞での機能解析は、現在、固定した細胞での蛍光染色を行っており、細胞運動における mDia の機能に注目して、最適な実験系を探索する。

5. アクトミオシン相互作用

ミオシン ATP 加水分解反応のアクチンによる活性化機構の研究ミオシンは ATP 加水分解のエネルギーをアクチンの滑り運動に変換するモーター蛋白質であり、その反応はアクチンによって活性化される。しかしながら、活性化がどのような機構で起こるかは未だ明らかになっていない。本研究では、遺伝子工学的手法を駆使してこの問題を解明する。(尾西*1)

バキュロウイルス-昆虫培養細胞発現系を利用して、人工変異ミオシンを作成することに成功している。アクチン結合部位と推定されているミオシン表面ループの3つに人工変異を導入して、機能に与える影響を調べた。その結果、これらのループはアクチン結合の後に起こるアクチン結合クレフトの閉鎖に深く関与することがわかった。疎水性トリプレットと呼ぶ部位はこれらの表面ループの中でも最も強くクレフト閉鎖を起こすことがわかった。人工変異ミオシンで観察された ATP 加水分解反応やモーター活性の低下はこの機能異常が原因であることが分かった。これらの結果に基づいて、ミオシンのモーター機能のアクチンによる活性化に新しい機構を提案した。これらの研究成果をまとめて、PNAS に投稿中である。

アクトミオシンは ATP 結合によって解離する。今後は3つのミオシン表面ループの人工変異がアクトミオシン解離反応に与える役割を研究し、ミオシン ATP 加水分解反応の全貌を明らかにする。また、アクチン発現系を確立して、人工変異アクチンを作成する。ミオシン側の人工変異の結果から今回提唱した活性化機構がアクチン側の人工変異でも正しいと言えるかどうかを検討する。

6. 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*1、中村*1、岡本(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2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。(京都大学、山本行男研との共同研究)。

二価性ローダミン BR ラベル部位の決定と遺伝子組み換えによる変異導入とそれらの発現については、トロポニン C センtralヘリックス(95-102)並びにトロポニン I の IT-arm 部位(87-94, 88-95, 91-98)に BR ラベルを行うためにシステイン残基を導入した。トロポニン I 変異体に関してはトロポニン C と比べ発現量が低かった。BR ラベルタンパクの検定と分離精製法の確立と実施についてはイオン交換カラム、逆相カラムによって目的の状態のラベルタンパクを取得することができ、その確認は質量分析によって行うことができた。そのほか BR トロポニン C のトロポニン複合体への導入、BR トロポニン複合体のアクチンフィラメントへの導入 BR ラベルによるトロポニン機能障害の検定法の確立と実施のため、アクトミオシン ATPase アッセイを行うことにより BR トロポニンの機能検定を行った。センtralヘリックスに関してはラベルによる大きな機能への影響はなかった。アクチンフィラメント場での BR1分子観察については、Popp*1 博士によって偏光顕微鏡を用いた1分子観察が行われ、現在解析が行われている。今後はトロポニン I 変異体の発

現量の改良を行う。

共同研究者

京都大学大学院人間環境 山本行男教授、平山祐

(2) Crowding な状態でのアクチンフィラメントの振る舞い (Popp*1)

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わかった。

(3) ダイニン-微小管複合体の構造解析 (成田*1)

アメリカの Texas Southwestern Medical Center の吉川助教の研究室との共同研究で、ダイニン-微小管複合体の構造解析を進めている。今年度はシミュレーション を用いて画像解析システムを完成させた。現在、そのシステムを用いて吉川研究室の水野博士が様々な条件のクライオ電子顕微鏡写真データを解析している。

共同研究者

Dr. Naoko Mizuno, Dr. Masahide Kikkawa;
University of Texas, Southwestern Medical Center

7. 概日時計蛋白質: X線小角散乱測定に向けた藍藻由来・時計蛋白質の発現系改良(秋山修志*3、野原淳志*2)

SPring-8 に代表される第3世代放射光施設であっても、安定した X 線小角散乱測定を行うためには数 mg/ml 程度の試料濃度が求められる。よって、大腸菌で大量発現させた時計蛋白質(KaiA, KaiB, KaiC)を高純度かつ高収量で回収することが必要となる。従来の方法では、時計蛋白質を GST との融合蛋白質として大量発現し、プロテアーゼで GST を切り離して単離・精製する。このプロトコルは確立されたものであるが、X 線小角散乱測定を行うには不完全な点が2つ残されていた。第1に、プロテアーゼを完全に除去できるかという点である。数サイクルの概日周期にわたる長時間測定では、僅かな量の残存プロテアーゼも蛋白質に相当のダメージを与える可能性がある。第2の問題は、プロテアーゼ処理を行っても N 末端に5つの余分なアミノ酸(GPLGS)が残ることである。余分アミノ酸からの散乱寄与を無視した状態で高精度の構造解析を行うことは困難であるし、それらが時計蛋白質の分子間相互作用に悪影響を及ぼしかねない。

我々は、GST 融合に伴う諸問題を回避するために単独発

現・精製法の確立を試みた。発現ベクターや宿主の種類を検討し、更に時計蛋白質の抽出・精製条件を最適化した。その結果、動的光散乱法で単分散と判定される純度の試料を、KaiA で 18 mg/L of culture、KaiB で 8 mg/L of culture、KaiC で 3 mg/L of culture 得ることが可能となった。これらの精製試料を用いて単体での X 線小角散乱測定を行ったところ、散乱パターンは既報にある X 線結晶構造でよく説明することができ、我々の試料調整が良好であることが示された。今後、時計蛋白質の X 線小角散乱測定を精力的に行い、その分子間相互作用の解析に挑む計画である。

共同研究者

名古屋大学理学研究科 近藤孝男教授

8. 大型放射光施設を利用した生体高分子溶液および筋肉中の蛋白質の構造研究

(1) 理研構造生物学ビームライン□・小角散乱ステーション (BL45XU-SAXS) の運用及び高度化 (伊藤*4、芝田*5、藤澤)

本ビームラインは 1997 年の建設より 8 年以上の歳月が経ち、真空排気系を中心に老朽化による不具合が顕著になっている。本年度の高度化作業は、1) 低エミッタンスモード運転及びトップアップモード運転の光学素子への影響の調査、2) ダイヤモンド分光結晶に対するオゾン洗浄法の適用、3) エアコン、除湿機導入による実験ハッチ内温度湿度管理の強化を行った。特に、新たなリング運転モードの影響はギャップ変更に伴うビーム位置変動から見たところ、以前と比較して 6 割の変動幅に減少した。利用においては、和光高分子化学研究室、小林脂質生化学研究室、今本細胞核機能研究室、播磨城生体金属科学研究室等理研内及び理研外との共同研究で非結晶構造解析が活発に行われている。

(2) 高圧 X 線小角散乱による骨格筋 HMM の構造空間の探索 (藤澤、桑本*1)

蛋白質は溶液中で様々な構造を取っているが、常圧では存在比率の小さい構造に関して情報を得るのが特に困難である。温度-圧力摂動による平衡移動により骨格筋 HMM の取りうる構造を高圧 X 線小角散乱によって研究している。昨年度の研究で骨格筋 HMM はサブゼロ温度高圧で常温常圧とは違う構造を取り、しかも常圧構造と平衡状態にある事がわかった。本年度は部分的に判明している結晶構造を用いて rigid body refinement 法による HMM 分子構造の詳細な散乱シミュレーションを行った。その結果、低温高圧下での骨格筋 HMM 頭部配置が生物学的には意味のある折れ曲がり構造であるが、平滑筋、非脊椎筋とは違う構造配置を取っている事が判明した。

共同研究者

室蘭工業大学 岡本洋教授

(3) 時分割測定が可能な小角・広角同時測定検出器の開発 (沢柳*2、(高分子化学研究室) 藤田(高分子化学研究室、田中*4(高分子化学研究室) 伊藤*4、藤澤、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 BL454XU-SAXS で使用する、二次元 X 線小角・広角同時測定装置を開発している。本装置は、生分解性高分子構造の持つ長周期と短周期の 2 つの構造スケールを同時に観察する事により、延伸、昇温時における高分子構造の変化を統合的に観測する事を目的としている。本年度は、ハードウェアおよびデータ処理系が完成し、性能評価実験を通して画像補正ソフトの開発を行った。

(4) 蛋白質折り畳み初期過程の構造スケール則の研究 (鶴沢*2、木村*2、高橋*1、秋山*3、藤澤)

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、蛋白質の折り畳み運動を研究してきた。本年度は、収縮状態における回転半径 (R_g) とアミノ酸残基数 (N) の関係を調べた。 N の大きいタンパク質では、初期収縮状態の R_g 値測定が困難であったが、今回、 N が 263 と大きい「ヘムオキシゲナーゼ」というタンパク質の R_g 値を測定することができた。得られた値を、これまでに観測されてきた他のタンパク質の R_g 値と合わせて調べたところ、 R_g 値と N との間にスケール則が成立することを発見し、タンパク質の折り畳み運動初期に観察される収縮運動が高分子で一般的に見られるコイル・グロビュール転移に基づくことを明らかにした。

(5) リン脂質の構造物性相関に関する研究 (早川*3 (小林脂質生物化学研究室)、小林(小林脂質生物化学研究室)、高橋*1、伊藤*4、藤澤)

リソピスフォスファチジン酸 (LBPA) が形成する膜構造とその物性を X 線測定によって調べた。天然型親水性頭部を持つ LBPA とその構造異性体である非天然型 LBPA の膜構造の温度依存性を測定した。その結果、両 LBPA とも温度相転移が、スタックしたラメラ構造から、膜間が広く膨潤した構造へと転移する "Unbinding transition" である事を示した。また相転移温度は天然型 LBPA の方が 3 □ ほど低いものの、両 LBPA の相転移温度は非常に高く (40 前後)、分子間水素結合の形成を強く示唆した。また X 線測定による膜電子密度分布を分子動力学シミュレーションの結果と比較することにより、両 LBPA における転移温度及び膜構造の差は、親水性頭部における水酸基の向きに起因する分子間水素結合能の差によるものであることが考えられた。

(6) 放射光を用いた昇温過程における生分解性高分子単結晶の小角および広角回折像の時分割測定 (沢柳*2、田中*4、藤田、岩田(高分子化学研究室)、伊藤*4、藤澤)

生分解性を有する高分子材料 Poly[(R)-hydroxybutyrate] (P(3HB)) 単結晶を溶液状態から異なる温度で等温結晶化させ、得られた単結晶マットの昇温過程における構造変化を時分割 X 線小角散乱および広角回折法により観察した。時分割 X 線小角散乱測定により、結晶化温度に依存した不連続なラメラ層厚の増加が見いだされた。一方、広角回折測定では、結晶化度が最初増加し、その後減少することが観測された。これらの実験事実は昇温時に生分解性高分子の融解と再結晶化が部分的に起こっていることが原因であると示唆された。

*1 客員研究員、*2 研修生、*3 訪問研究員、

*4 協力研究員、*5 業務協力員

Summary

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. 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, 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 the 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.

Tropomyosin is extremely asymmetric (20Å 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. This year, we have obtained crystal structure of the Tm fragment 176-284 fused with GCN4 at the N-terminus, which contains the Tn binding region. The crystal structure indicates that at a acidic residue E218 in the hydrophobic core makes the

molecule bendable there. By comparing the crystal structure with the other crystal structure, the fragment 176-273 fused with GCN4 at either end, we are able to distinguish the geometrical parameters which are intrinsic to the amino-acid sequence from those which resulted from the lattice packing within crystals. We now start understanding the structural bases for the flexibility of Tm.

3. Structural studies of dynactin complex

The dynactin complex consists of 12 kinds of proteins, weighing about 1.5MDa, 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), that 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 dynain and kinesin, the overall shape and the molecular arrangement of the complex has been obtained by the single particle analysis of EM photographs.

4. Proteins interacting with the ends of actin filament

In the cell, actin exerts force by fast polymerization and depolymerization. The ends of actin filament in association with various end-interacting proteins play crucial roles for this molecular motion: CapZ (also known as CP) blocks the B-end of the actin filament. This year, using the single particle analysis of EM, the structure of CP-actin B-end complex emerges. By combining our previously obtained CP crystal structure as well as mutational experiments, we now know residues of CP which are involved in the interface with actin filament B-end, how the end capping is performed.

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 physical properties of lipids, and studying 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 conformations under high hydrostatic pressure.

Staff

Head

Dr. Yuichiro MAEDA

Members

Dr. Tetsuro FUJISAWA

Dr. Toshiro ODA

Dr. Atsuko YAMASHITA

Dr. Yasushi NITANAI
Mr. Akihiro YAMAMOTO
Dr. Kazuki ITO^{*1}

^{*1} Contract researcher

Technical Staff

Mr. Koji SHIBATA

Assistants

Mr. Hiromi TANAKA
Ms. Sachiko YUKI
Ms. Junko ITO
Ms. Junko NAKAMURA

in collaboration with

Mr. Yoshihiro AOYAGI (Polymer Chemistry Laboratory)
Dr. Masahiro FUJITA (Polymer Chemistry Laboratory)
Dr. Tadahisa IWATA (Polymer Chemistry Laboratory)
Dr. Seiji YAMADA (Biometal Science Laboratory)
Dr. Kayo MAEDA (Bio-multisome Research Team)
Dr. Takayuki OKAMOTO (Nanophotonics Laboratory)

Visiting Members

Dr. Hirofumi ONISHI (JST)
Dr. Hiroshi MORII (JST)
Dr. Michael LASSALLE (JST)
Dr. David POPP (JST)
Dr. Chieko KIMURA (JST)
Dr. Motoyoshi NAKAMURA (JST)
Dr. Yoshiyuki MATSUURA (JST)
Dr. Akihiro NARITA (JST)
Dr. Hiroshi IMAI (JST)
Dr. Vladimir A. MESHCHERYAKOV (JST)
Dr. Fumiko MATSUMOTO (JST)
Mr. Shuichi TAKEDA (JST)
Mr. Mitsusada IWASA (JST)
Ms. Hidemi HIRANO (JST)
Ms. Shiho MINAKATA (JST)
Ms. Naoko ODA (JST)
Dr. Shuji AKIYAMA (JST)
Dr. Satoru FUJIWARA (JAERI)
Dr. Soichi TAKEDA (Natl. Inst. Card. Vasc. Res.)
Dr. Satoshi Takahashi (Inst. for Protein Res. Osaka Univ.)
Dr. Yojiro TAMURA (Suzuka Natl. Coll. Technol.)
Dr. Hirokazu ARIMOTO (Nagoya Univ.)
Dr. Hiroshi TAKAHASHI (Gunma Univ.)
Dr. Hideki TAKAHASHI (Kobe Univ.)
Dr. Hirokazu ARIMOTO (Tohoku Univ.)
Mr. Shigeo KUWAMOTO (Hyogo Science and Technology Association)

Trainees

Ms. Mayumi FURUTA (Nagoya Univ.)
Mr. Hironobu TANIMOTO (Nagoya Univ.)
Mr. Atsushi NOHARA (Nagoya Univ.)
Mr. Shuheng DAI (Nagoya Univ.)
Mr. Minhao QIAN (Nagoya Univ.)
Mr. Tasuku HIRAYAMA (Kyoto Univ.)
Mr. Takanori UZAWA (Sch. of Technol., Kyoto Univ.)
Mr. Toshiyasu INUZUKA (Nagoya Univ.)

Mr. Tsuyoshi KONUMA (Nagoya Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Tamura T., Wakayama J., Fujisawa T., Yagi N., and Iwamoto H.: "Intensity of X-ray reflections from skeletal muscle thin filaments partially occupied with myosin heads: Effect of cooperative binding", J. Muscle Res. Cell Motil. 25, 329--335 (2004). *

Iwata T., Fujita M., Aoyagi Y., Doi Y., and Fujisawa T.: "Time-resolved x-ray diffraction study on poly [(R)-3-hydroxybutyrate] films during two-step-drawing: generation mechanism of planar zigzag structure", Biomacromolecules 6, No. 3, pp.1803--1809 (2005). *

Oda T., Namba K., and Maeda Y.: "Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis", Biophys. J. 88, No. 4, pp.2727--2736 (2005). *

Kimura T., Akiyama S., Uzawa T., Ishimori K., Morishima I., Fujisawa T., and Takahashi S.: "Specifically Collapsed Intermediate in the Early Stage of the Folding of Ribonuclease A", J. Mol. Biol. 350, 349--362 (2005). *

Iwamoto H., Inoue K., Fujisawa T., and Yagi N.: "X-ray microdiffraction and conventional diffraction from frozen-hydrated biological specimens", J. Synchrotron Rad. 12, 479--483 (2005). *

Fujita M., Sawayanagi T., Tanaka T., Iwata T., Abe H., Doi Y., Ito K., and Fujisawa T.: "Synchrotron SAXS and WAXS studeies on changes in structural and thermal properties of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystals during heating", Macromol. Rapid Commun. 26, 678--683 (2005). *

Yamashita A., Singh S. K., Kawate T., Jin Y., and Gouaux E.: "Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters", Nature 437, 215--223 (2005). *

(総説)

Takahashi S., Uzawa T., and Fujisawa T.: "Collapse and search dynamics of Apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of α -helical content and compactness", SPring-8 Res. Frontiers 2004, 24--25 (2005).

山下 敦子: "ラウエ回折法によるトロピノン還元酵素- の時分割X線結晶構造解析", 生化学 77, No. 7, pp.649--655 (2005).

前田 雄一郎: "結晶構造を解明してから始まる生理学の新しい展開: トロポニン・トロポミオシン・アクチンによるカルシウム調節メカニズムの研究", 生体の科学 56, No. 6, pp.556--563 (2005).

松浦 能行: "蛋白質複合体結晶構造が明らかにした蛋白質相互作用の多様性, 巧妙性: 核外輸送複合体の場合", 生体の科学 56, No. 6, pp.564--570 (2005).

山下 敦子: "X線結晶学は膜タンパク質の構造解明にどのように立ち向かっているか", 生体の科学 56, No. 6, pp.571--580 (2005).

小田 俊郎: "フィラメント構造体の構造をどのように解明するか: アクチンフィラメントの場合", 生体の科学 56, No. 6, pp.581--585 (2005).

藤澤 哲郎: "放射光X線小角散乱を用いた高圧下における蛋白質溶液構造", 日本中性子科学会誌「波紋」16, No. 1, pp.60--63 (2006).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Oda T.: "Fiber diffraction patterns from native thin filament sols: Interpretation of thin filament structure", Alpbach Workshop on Molecular Motors 2004, Alpbach, Austria, Mar.--Apr. (2004).

Tamura T., Wakayama J., Yagi N., and Iwamoto H.: "High-speed time resolved X-ray studies on the thin filament structural changes during force development", 8th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).

Fujisawa T.: "SAXS in Structural Biology", 10th Users' Meeting & Workshops, (National Synchrotron Radiation Research Center), Hsinchu, Taiwan, Oct.--Jan. (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", RIKEN Symposium on Pressure and Protein Dynamics, Harima, Mar. (2005).

Yamada S., Akiyama S., Sugimoto H., Kumita H., Ito K., Fujisawa T., Nakamura H., and Shiro Y.: "Solution- and Crystal-Structure Analyses of the Two-Component-System Complex between Histidine Kinase and Response Regulator", RIKEN Symposium on Pressure and Protein Dynamics, Harima, Mar. (2005).

Maeda Y.: "Structure of actin-tropomyosin-troponin complex and the mechanism of calcium regulation of muscle contractions", Experimental Biology 2005/ 35th International Congress of Physiological Sciences (EB/IUPS 2005), (International Union of Physiological Sciences), San Diego, USA, Mar.--Apr. (2005).

Fujisawa T.: "Dynamic View of Protein Solution Structure by Synchrotron X-ray Small-Angle Scattering", 3rd International Symposium of X-ray and Neutron Scattering on Integrated Molecular Systems, (Korean Synchrotron Radiation Users Association), Pohang, Korea, June (2005).

Narita A., Yamashita A., and Maeda Y.: "A new image analysis to reconstruct structures of ends of actin filaments", Gordon Research Conference on Three Dimensional Electron Microscopy, (Gordon Research Conference), New London, USA, June (2005).

Ito K., Fujisawa T., and Iwata T.: "The Design of Two-Dimensional SAXS/WAXS Simultaneous Measurement Apparatus for Time-Resolved Experiment", 3rd International Symposium of X-ray and Neutron Scattering on Integrated Molecular Systems, (Korean Synchrotron Radiation Users Association), Pohang, Korea, June--June (2005).

Oda T., Makino K., Takeda S., Matsumoto F., and Maeda Y.: "Ca-induced conformational change of troponin-tropomyosin in the cardiac muscle thin filament", 2005 Gordon Research Conference on Muscle: Contractile Proteins, New London, USA, July (2005).

Onishi H., Mikhailenko V.S., and Morales F.M.: "Myosin surface loops involved in motility and actin activation", 2005 Gordon Research Conference on Muscle: Contractile Proteins, New London, USA, July (2005).

Nitanai Y., Maeda K., Oda N., Minakata S., and Maeda Y.: "The crystal structure of C-terminal fragment of rabbit skeletal -Tropomyosin; crystallographic evidence of Tropomyosin bending", 2005 Gordon Research Conference on Muscle: Contractile Proteins, New London, USA, July (2005).

Maeda Y., Oda T., and Nitana Y.: "Tropomyosin crystal structure and structural changes of the regulatory proteins upon Ca²⁺-binding", 2005 Gordon Research Conference on Muscle: Contractile Proteins, New London, USA, July (2005).

Narita A., Yamashita A., and Maeda Y.: "Determining structures of ends of actin filaments", Gordon Research Conference on Motile and Contractile Systems, New London, USA, July (2005).

Imai H., Narita A., Schroer T.A., and Maeda Y.: "Molecular arrangement of dynactin complex elucidated by single particle analysis of EM pictures", Gordon Research Conference on Motile and Contractile Systems, New London, USA, July (2005).

Fujisawa T., Kuwamoto S., Maeda Y., and Okamoto Y.: "Probing two heads configuration of heavy meromyosin by High pressure SAXS technique", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Maeda Y., Nitana Y., and Oda T.: "Aiming at elucidating atomic structures of muscle thin filament complex", 4th Alpbach Workshop on: Coiled-coils, Collagen and Co-proteins: IV, Alpbach, Austria, Sept. (2005).

Fujisawa T., Kuwamoto S., Maeda Y., and Okamoto Y.: "Switching to an alternative posture of two heads of skeletal muscle heavy meromyosin induced under high pressure: a synchrotron small-angle X-ray Scattering study", Trends in High Pressure Protein Sciences (THPPS 2005), Montpellier, France, Sept. (2005).

Tanaka T., Fujita M., Takeuchi A., Suzuki Y., Uesugi K., Ito K., Fujisawa T., Doi Y., and Iwata T.: "Structural analysis of biodegradable high-strength fibers prepared by drawing after isothermal crystallization in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate]", 1st International Symposium of Research Center for Environment Friendly Polymers (IS-RCEFP-I), (Kwansei

- Gakuin University), Nishinomiya, Oct. (2005).
- Nitanai Y., Maeda K., Oda N., Minakata S., and Maeda Y.: "Crystal structure of tropomyosin: a flexible coiled-coil", International Symposium Celebrating 40th Anniversary of Troponin Discovery, The 33rd NIPS Conference "Regulatory Proteins of Striated Muscle: Structure, Function and Disorders", (National Institute for Physiological Sciences), Okazaki, Oct. (2005).
- Oda T., Stegmann H., Makino K., Hasegawa K., Schroder R. R., Keiichi N., and Maeda Y.: "Modeling of F-actin structure using electron microscopy and X-ray fiber diffraction", International Symposium Celebrating 40th Anniversary of Troponin Discovery, The 33rd NIPS Conference "Regulatory Proteins of Striated Muscle: Structure, Function and Disorders", (National Institute for Physiological Sciences), Okazaki, Oct. (2005).
- Kimura C., Ueno Y., Uesawa K., Wakabayashi K., and Miki M.: "Placing Troponin on Tropomyosin by using FRET Data", International Symposium Celebrating 40th Anniversary of Troponin Discovery, The 33rd NIPS Conference "Regulatory Proteins of Striated Muscle: Structure, Function and Disorders", (National Institute for Physiological Sciences), Okazaki, Oct. (2005).
- Maeda Y.: "Structural basis of troponin-tropomyosin mediated calcium regulation", International Symposium Celebrating 40th Anniversary of Troponin Discovery, The 33rd NIPS Conference "Regulatory Proteins of Striated Muscle: Structure, Function and Disorders", (National Institute for Physiological Sciences), Okazaki, Oct. (2005).
- Imai H., Narita A., Schroer T. A., and Maeda Y.: "Two-Dimensional averaged images of the Dynactin complex revealed by single particle analysis", International Workshop Dynein 2005: Molecular Mechanisms of Axonemal and Cytoplasmic Dyneins, Kobe, Oct.--Nov. (2005).
- Iwamoto H., Tamura T., Wakayama J., Noda N., Sugiyama T., Fujisawa T., and Kamimura S.: "X-ray diffraction analysis of the axonemal structure and dynein motor functions of sea-urchin sperm flagella", International Workshop Dynein 2005: Molecular Mechanisms of Axonemal and Cytoplasmic Dyneins, Kobe, Oct.--Nov. (2005).
- Yamada S., Akiyama S., Sugimoto H., Kumita H., Ito K., Fujisawa T., Nakamura H., and Shiro Y.: "Molecular mechanisms of signal transduction in His-Asp relay two-component system", 1st International Symposium on Chemistry of Coordination Space (ISCCS 2005), Okazaki, Nov. (2005).
- Yamashita A., Singh S. K., Kawate T., Jin Y., and Gouaux E.: "Crystal structure of bacterial homolog of NA+/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters", 4th 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium, (ISIR Osaka University), Toba, Nov. (2005).
- Yamashita A.: "Crystal structure of a homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters", Assembly and Reconstitution of Membrane Proteins and Cellular Molecular Machineries, (21st Century COE of Biol.Sci./IPR, Osaka University), Osaka, Nov. (2005).
- Tanaka T., Fujita M., Takeuchi A., Suzuki Y., Uesugi K., Ito K., Fujisawa T., Doi Y., and Iwata T.: "Processing and structural analysis of biodegradable high-strength fibers in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate]", International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005), (Chemical Society of Japan, USA, Canada, Korea, New Zealand and Australia), Honolulu, USA, Dec. (2005).
- Sawayanagi T., Fujita M., Tanaka T., Iwata T., Abe H., Doi Y., Ito K., and Fujisawa T.: "Real-time synchrotron SAXS and WAXS studies on annealing behavior of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]", International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005), (Chemical Society of Japan, USA, Canada, Korea, New Zealand and Australia), Honolulu, USA, Dec. (2005).
- Fujisawa T.: "Hydration and isothermal compressibility estimated by high-pressure synchrotron X-ray small-angle scattering", JSPS Core-to-Core Program (Integrated Action Initiative, Project No. 17009) International Seminar 2006 "Pressure, Hydration and Dynamics :toward a new dynamic view of proteins", Okinawa, Jan. (2006).
- Fujisawa T., Kuwamoto S., Maeda Y., and Okamoto Y.: "Synchrotron X-ray small-angle scattering from protein solutions under high pressure", JSPS Core-to-Core Program (Integrated Action Initiative, Project No. 17009) International Seminar 2006 "Pressure, Hydration and Dynamics :toward a new dynamic view of proteins", Okinawa, Jan. (2006).
- Oda T., Makino K., Matsumoto F., Takeda S., and Maeda Y.: "Calcium-induced shift of troponin and tropomyosin on the cardiac muscle thin filament", Biophysical Society 50th Annual Meeting, Salt Lake City, USA, Feb. (2006).
- Onishi H., Mikhailenko v. S., and Morales F. M.: "Roles of myosin surface loops in binding actin, and in "actin activation" of myosin ATPase", Biophysical Society 50th Annual Meeting, Salt Lake City, USA, Feb. (2006).
- Nitanai Y., Maeda K., Oda N., Minakata S., and Maeda Y.: "The crystal structure of C-terminal fragment of rabbit skeletal α -tropomyosin; Crystallographic evidence of tropomyosin bending", Biophysical Society 50th Annual Meeting, Salt Lake City, USA, Feb. (2006).
- Narita A., Yamashita A., and Maeda Y.: "The structure of F-actin and CapZ complex", Biophysical Society 50th Annual Meeting, Salt Lake City, USA, Feb.--Feb. (2006).
- (国内会議)
前田 雄一郎: "アクチンやトロポニン(遺伝性心臓疾患の原因遺伝子)などの生体材料解析", 小型シンクロトロン光源とその医療・産業応用に関する研究会(第4回), (科学技術交流財団), 名古屋, 12月(2004).
- 前田 雄一郎: "これからの構造生物学とは何か?どのように研究を組織すべきか?", 科学技術の未来を展望する戦略ワークショップ, (財団法人科学技術広報財団), 浜松, 3月(2005).
- 藤澤 哲郎: "理研構造生物学ビームライン BL45XU-SAXS", 第1回小角散乱研究会, 京都, 3

- 月 (2005).
- 沢柳 知治, 藤田 雅弘, 田中 稔久, 岩田 忠久, 阿部 英喜, 土肥 義治, 伊藤 和輝, 藤澤 哲郎: "大型放射光を用いたP(3HB-co-3HV)単結晶の昇温過程における構造変化の解析", 第6回グリーン・サステイナブルケミストリーシンポジウム (GSCシンポジウム), (Green ¥& Sustainable Chemistry Network, 日本産業技術振興協会), 東京, 3月 (2005).
- 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, 土肥 義治, 岩田 忠久: "ポリ(L-乳酸)繊維の大型放射光による結晶化と熱融解挙動の高次構造解析", 第54回高分子学会年次大会, 横浜, 5月 (2005).
- 藤田 雅弘, 沢柳 知治, 田中 稔久, 岩田 忠久, 阿部 英喜, 土肥 義治, 伊藤 和輝, 藤澤 哲郎: "昇温過程におけるP(3HB)単結晶の構造変化の大型放射光による解析", 第54回高分子学会年次大会, 横浜, 5月 (2005).
- 沢柳 知治, 藤田 雅弘, 田中 稔久, 岩田 忠久, 阿部 英喜, 土肥 義治, 伊藤 和輝, 藤澤 哲郎: "昇温過程におけるP(3HB-co-3HV)単結晶の構造変化の大型放射光による解析", 第54回高分子学会年次大会, 横浜, 5月 (2005).
- 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, 土肥 義治, 岩田 忠久: "ポリヒドロキシアルカン酸の高強度繊維の作製と放射光による高次構造解析", 平成17年度繊維学会年次大会, 岐阜, 6月 (2005).
- 松浦 能行: "核外輸送複合体の結晶構造", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005).
- 前田 雄一郎: "筋収縮のカルシウム調節のメカニズム: 構造を見てわかること、わからないこと", 第43回茅コンファレンス, (日本学術振興会), 北杜, 8月 (2005).
- 藤澤 哲郎, 桑本 滋生, 前田 雄一郎, 岡本 洋: "骨格筋HMM溶液構造の温度・圧力依存性", 第14回生物関連高压研究会シンポジウム, 徳島, 9月 (2005).
- 沢柳 知治, 藤田 雅弘, 田中 稔久, 岩田 忠久, 阿部 英喜, 土肥 義治, 伊藤 和輝, 藤澤 哲郎: "大型放射光によるポリヒドロキシアルカン酸単結晶の熱的挙動のリアルタイム測定", 第54回高分子討論会, (高分子学会), 山形, 9月 (2005).
- 田中 稔久, 藤田 雅弘, 竹内 晃久, 鈴木 芳夫, 上杉 健太郎, 伊藤 和輝, 藤澤 哲郎, 土肥 義治, 岩田 忠久: "大型放射光を用いたポリ(3-ヒドロキシブタン酸)とその共重合体の高強度繊維の構造解析", 第54回高分子討論会, (高分子学会), 山形, 9月 (2005).
- 山田 斉爾, 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の情報伝達メカニズム", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 日下部 貴久, 木邑 智恵子, 佐久間 紹子, 尾上 敦洋, 三木 正雄: "146-174の間の7残基ごとにシングルステインを導入した変異Tmの性質", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 谷本 博信, 前田 佳代, 今井 洋, 前田 雄一郎: "Dynactin 複合体の構成部分dynamitin(p50)のドメイン構造", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 植田 啓介, 相原 朋樹, 植木 正二, 木邑 智恵子, 三木 正雄, 荒田 敏昭: "ESRによる細いフィラメント上のトロポミオシンの動的解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 岩本 裕之, 大岩 和弘, 上田 太郎, 若山 純一, 田村 巧, 藤澤 哲郎, 八木 直人: "X線繊維回折法によるアクトーミオシンサブフラグメント複合体の低分解能構造の復元", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 小田 俊郎, 前田 雄一郎: "アクチンの重合阻害のメカニズム", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 似内 靖, 前田 佳代, 小田 直子, 南方 志帆, 前田 雄一郎: "ウサギ骨格筋トロポミオシンC末端フラグメントの結晶構造解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 武田 修一, 成田 哲博, 森井 博史, 前田 雄一郎: "キャッピングタンパク質 (CapZ) のアクチンフィラメント結合機構の解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 成田 哲博, 山下 敦子, 前田 雄一郎: "クライオ電子顕微鏡写真からアクチンフィラメント端の三次元構造を決定するための新しい画像処理方法", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 鶴澤 尊規, 西村 千秋, 秋山 修志, 石森 浩一郎, 高橋 聡, Dyson J., Wright P.: "サブミリ秒分割H/D交換とNMRを用いたアボミオグロビンの折り畳みにおけるヘリックス形成機構", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 古田 真弓, 前田 佳代, 今井 洋, 前田 雄一郎: "ダイナクチンのショルダー複合体の物理化学的性質の解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 相原 朋樹, 植田 啓介, 植木 正二, 中村 志芳, 原 英之, 三木 正雄, 荒田 敏昭: "トロポニンIの制御ドメインとトロポニンCのN-lobe間のELDOR距離測定", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 尾西 裕文: "ミオシンモーターにおける力発生機構の解明: ATP加水分解からレバー・アーム回転に至る情報の流れ", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 木邑 智恵子, 上野 豊, 上早稲 敬子, 若林 克三, 三木 正雄: "蛍光エネルギー移動 (FRET) 法により求められたデータに基づくトロポミオシン上のトロポニンの分子配置", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 岩佐 充貞, 佐野 健一, 前田 佳代, 前田 雄一郎: "昆虫細胞を用いた高効率ヒトアクチン発現系の構築と変異アクチンの機能解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).

- 幌, 11月 (2005).
- 中村 志芳, 茶谷 俊介, 山本 行男, 荒田 敏昭: "新規2価性キラルスピンラベルを用いたESRによるトロポニンCの分子回転動態と配向角度の解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 今井 洋, 成田 哲博, Schroer T. A., 前田 雄一郎: "単粒子解析法によるダイナクチン複合体の2次元平均像", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 藤原 悟, 松本 富美子, 高橋 伸明: "中性子繊維回折法による細いフィラメント中のトロポニンサブユニット配置の解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 前田 雄一郎: "筋収縮のカルシウム調節のメカニズム: 原子構造を見てわかること、わからないこと", 玉城嘉十郎教授記念公開学術講演会(第44回), (京都大学理学部), 京都, 11月 (2005).
- 山下 敦子: "「正常な」タンパク質からの膜輸送体の機能を知る-Na+/Cl-依存性神経伝達物質トランスポーター細菌由来ホモログの結晶構造解析", ミニシンポジウム「タンパク質立体構造の正常と異常」, (熊本大学拠点形成研究「“Made in Kumamoto University”の画期的新薬創生研究」), 熊本, 12月 (2005).
- 伊藤 和輝: "CCD型X線検出器", ワークショップ「放射線検出器と電子回路の課題と展望」(Spring-8), (JASRI), 播磨, 12月 (2005).
- 山下 敦子: "神経伝達物質輸送の構造基盤: Na+/Cl-依存性神経伝達物質トランスポーターの細菌由来ホモログの結晶構造", 第10回慶應医学賞受賞記念シンポジウム, (慶應義塾医学振興基金事務局), 東京, 12月 (2005).
- 似内 靖, 前田 佳代, 小田 直子, 南方 志帆, 前田 雄一郎: "ウサギ骨格筋トロポミオシンC末端フラグメントの結晶構造解析", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- 伊藤 和輝, 藤澤 哲郎, 岩田 忠久: "時分割2D-SAXS/2D-WAXS同時測定装置の開発", 第19回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 名古屋, 1月 (2006).
- 高橋 聡, 鶴澤 尊規, 藤澤 哲郎: "時分割X線小角散乱法による蛋白質の折れ畳みダイナミクス: 「収縮と探索」機構の提案", 第19回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 名古屋, 1月 (2006).
- 上村 慎治, 野田 直紀, 杉山 貴紹, 若山 純一, 田村 巧, 藤澤 哲郎, 岩本 裕之: "ウニ精子ペン毛軸系のX線回折", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1月 (2006).
- 植田 啓介, 木邑 智恵子, 植木 正二, 三木 正雄, 荒田 敏昭: "部位特異的スピンラベルESRを用いたトロポミオシンの動的解析", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1月 (2006).
- 岩本 裕之, 大岩 和弘, 上田 太郎, 若山 純一, 田村 巧, 藤澤 哲郎, 八木 直人: "アクトS1複合体のクリスタルパッキング", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1-1月 (2006).
- 似内 靖, 前田 佳代, 小田 直子, 南方 志帆, 前田 雄一郎: "ウサギ骨格筋 -トロポミオシンの結晶構造", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1-1月 (2006).
- 相原 朋樹, 中村 志芳, 植木 正二, 原 英之, 荒田 敏昭: "カルシウムに依存したトロポニンCとI制御ドメインの電子間パルス二重共鳴距離測定", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1-1月 (2006).
- 佐久間 紹子, 木邑 智恵子, 尾上 淳洋, 日下部 貴久, 志鷹 裕司, 三木 正雄: "トロポミオシンのトロポニン球状領域結合領域置換の影響", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1-1月 (2006).
- 今井 洋, 成田 哲博, Schroer T. A., 前田 雄一郎: "単粒子解析法によるダイナクチン複合体の2次元平均像", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1-1月 (2006).
- 藤原 悟, 松本 富美子, 高橋 伸明, 中川 洋: "中性子繊維回折法による細いフィラメント中のトロポニンサブユニット配列の解析", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1-1月 (2006).
- 成田 哲博, 武田 修一, 山下 敦子, 前田 雄一郎: "電子顕微鏡写真からアクチンフィラメントの端の構造を決定する新しい画像処理法", 2006年生体運動研究合同班会議, 東京, 1-1月 (2006).
- 山下 敦子, Singh S. K., 川手 敏充, Jin Y., Gouaux E.: "Na+/Cl-依存性神経伝達物質トランスポーター細菌由来ホモログの結晶構造", 第11回放射光医学研究会講演会, 大阪, 1-1月 (2006).
- 犬塚 俊康, 藤澤 哲郎, 有本 博一, 上村 大輔: "超炭素鎖化合物の立体配座及び機能解析研究", 日本化学会第86春季年会, 船橋, 3月 (2006).