

三木生物超分子結晶学研究室

Biological Supramolecular Crystallography Laboratory

主任研究員 三 木 邦 夫

MIKI, Kunio

生命現象を理解するためには、生体を構成する個々の分子が、どのようにお互いに協調して高度に統合された超分子システムを作っているかということを明らかにすることが重要である。当研究室ではそのような視点から、生物学的に重要な種々の生命システムを対象として、放射光を利用したX線結晶構造解析の手法を用いて構造生物学的研究を行っている。対象とする生命システムとして現在、ABC トランスポーターが関与する物質輸送、細胞環境応答、細胞分裂制御、バイオポリエステルの生合成と分解、細胞内シグナル伝達制御、芳香族化合物代謝に焦点を当て、研究を進めている。これらの生命システムに含まれる生体高分子の立体構造を、SPring-8 の特性を最大限に利用したX線構造解析によって、迅速かつ高精度に決定し、得られた立体構造情報を基盤とする機能解析を目指している。また、構造ゲノム科学の推進に貢献するために、X線結晶構造解析の迅速化、そのための新規手法についても開発を進めている。

1. 生命システムの構造生物学的研究

(1) ABCトランスポーター関連タンパク質の構造生物学的研究(竹田^{*1}、平野^{*2}、三木)

生体内では様々なABC トランスポーターが、ATP の加水分解エネルギーを利用して、それぞれ固有の物質輸送を行っている。当研究室では大腸菌由来の脂質結合タンパク質輸送因子群(Lol)や高度好熱菌由来の各種ABC トランスポーターを主な研究対象にしてABC トランスポーターの輸送機構の解明に取り組んでいる。Lol 因子はグラム陰性細菌に広く見られる因子で、脂質修飾されたタンパク質をシグナルによって選別し、細胞の内膜から外膜へペリプラズム空間を横切って輸送する。これまでに、ペリプラズム輸送タンパク質LolAと脂質タンパク質受容体LolBの結晶構造を明らかにしている。LolAのR43L変異体は、結合した脂質結合タンパク質を受容体LolBに渡すことができない変異体である。その構造を異なる2つの結晶を用いて決定することで、脂質結合タンパク質の結合・解離の際に必須なフタの動きを解明することができた。また、Lol因子群によって輸送される脂質結合タンパク質の1つであるNlpEの結晶構造を決定することができた。(東京大学分子細胞生物学研究所 徳田教授、京都大学大学院理学研究科との共同研究)

(2) 生物の環境感知・適応システムの研究(宮武、金^{*1}、三木)

原核生物が持つ環境感知・適応システムとして、2成分情報伝達系が最もよく知られている。われわれは、2成分情報伝達系に共通する情報伝達機構を明らかにするために、結晶構造解析による研究を行っている。2成分情報伝達系では、センサーキナーゼが周囲の環境情報を感知し、その情報を転写制御因子に伝達する。最も典型的な転写制御因子は、リン酸基を受容するレシーバードメインと、DNA結合能などを有するエフェクタードメインからなる。われわれは、この2つのドメインからなる転写制御因子の結晶を得たが、分解能が低いために、現在より高分解能の結晶を得るための条件を検討している。

(3) 細胞分裂関連システムの研究(岩崎、三木)

Stationary phase survival protein(SurE)は、真正細菌・

古細菌・植物で保存されているタンパク質で、大腸菌においては、ストレス環境下での生存に必要であることが知られている。SurEは金属要求性のホスファターゼで、ヌクレオチダーゼ活性およびポリリン酸分解活性を持つが、その生理機能や反応機構については不明である。本研究は、SurEの構造機能相関を明らかにすることを目的とする。われわれはこれまでに高度好熱菌由来SurE(TtSurE)の結晶構造を決定した。また、超遠心分析法により、TtSurEは溶液中では2量体・4量体平衡にあることを明らかにしている。TtSurE単量体の構造は、球状のドメインとそこから突出したヘアピンからなる。結晶中では、TtSurEは2量体を作り、さらに2量体同士がヘアピンを介して4量体を形成する。本年度は、新たな結晶系での4量体構造を得た。これまでに得た構造との比較をおこなったところ、TtSurE4量体は、ヘアピン領域の運動性のために対称性の異なる複数の会合様式をとりうるということが分かった。TtSurEが2量体、4量体のいずれで働くのか、そして、四次構造変化がTtSurEの機能発現にどのような役割を果たすのか調べるため、機能解析と並行して、金属イオンおよび基質との共結晶の作成を進めている。

(4) バイオポリエステルの生合成・分解システムの研究(久野、三木；長田(高分子化学研究室))

バイオポリエステルの生合成および分解に関与するタンパク質群について構造解析を行い、立体構造に基づいて機能および相互作用様式を明らかにすることを目的として研究を行っている。バイオポリエステル(ポリ-R-3-ヒドロキシアルカン酸(PHA))の分解には特異的な加水分解酵素が働く。多くのPHA分解酵素は3つのドメインから構成され、ポリエステル固体基質を効率よく分解できるようにそれぞれのドメインが特異的な機能を持っている。一方、カビの一種*Penicillium funiculosum*が産生する菌体外分泌型の分解酵素は触媒ドメインだけからなるシングルドメイン酵素であるが、固体基質に対して十分な分解活性を持っており、単一のドメインに触媒機能と基質吸着機能を有していると考えられる。これまでに本酵素の結晶構造を明らかにし、活性部位および基質吸着部位におけるアミノ酸残基構造を明らかにした。本年度は本酵素と3量

体基質との複合体の構造を明らかにし、活性部位における基質の認識機構および反応機構を明らかにした。基質の疎水的な側鎖（メチル基）は酵素側に形成された疎水的なポケットに対してきっちりとほまりこむように結合していた。親水的な相互作用はほとんどないが、加水分解されるエステル結合の1つ隣のエステル結合のカルボニル酸素が酵素の側鎖（Trp307）と水素結合することでエステルを認識し、またモノマーの主鎖炭素鎖長およびキラリティを規定していることが判った。（群馬大学工学部 粕谷助教授、神奈川大学理学部 齊藤教授との共同研究）

(5) 細胞内シグナル伝達制御機構の研究（吉瀬^{*1}、西谷^{*2}、久野、三木）

細胞内シグナル伝達におけるキナーゼカスケードにはシグナルがクロストークをすることなく効率よく伝わる機構が備わっている。足場タンパク質 JSAP1 は MAP キナーゼカスケードにおいてシグナル伝達の制御を担うタンパク質である。このタンパク質は、一連のシグナル伝達に関わる複数のキナーゼと結合してそれらを統合し、キナーゼ間の効率的な相互作用の場を与える。本研究は足場タンパク質の構造解析を行い、足場タンパク質 キナーゼ間相互作用様式を明らかにすることを目的とする。本タンパク質の様々なトランケート体を設計し、大腸菌発現系でのタンパク質合成を検討したところ、1つのドメインのみからなるものについて大量発現させることに成功した。精製条件を検討し、純度の高い標品を得た。結晶化に向けて条件を検討する。（金沢大学がん研究所 善岡教授、協和発酵工業株式会社との共同研究）

(6) 芳香族化合物代謝システムの研究（金^{*1}、吉瀬^{*1}、宮武、久野、三木）

微生物による芳香族化合物の代謝は、微生物のエネルギー獲得機構として重要であるだけでなく、環境浄化への利用の観点からも興味深い生物学的現象である。4-ヒドロキシフェニル酢酸の微生物分解においては、4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼが初発酵素として働く。この酵素は、フラビンおよび酸素分子を利用して一原子酸素添加反応を触媒するオキシゲナーゼ・コンポーネント（HpaB）と、フラビン：NADH酸化還元酵素であるリダクターゼ・コンポーネント（HpaC）の2つの成分から構成される。HpaCにおいてフラビンがNADHによって還元されると、還元型フラビンはHpaCから解離して溶媒中を拡散してHpaBに受け渡される。本研究はHpaCにおけるフラビンの結合・解離機構、および反応機構を明らかにすることを目的とする。これまでにHpaCとFAD、NAD⁺の複合体の構造を明らかにしている。本年度はHpaCの機能解析を行った。*T. thermophilus*由来のHpaCはNADHについて活性を示したが、NADPHに対しては活性を示さなかった。またFADとFMNのいずれにも活性を示した。速度論パラメータは他の生物種由来酵素のものと同程度の値が得られたことから、フラビンが酵素に強固に結合するのではなく、基質として働いていることが示唆された。

4-ヒドロキシフェニル酢酸の微生物分解では初めにこの化合物が水酸化を受けてそのまま分解されていくのに対し、フェニル酢酸の微生物分解ではまず CoA 体となって活性化されてから水酸化され、分解されていく。フェニル酢酸分解に関与する酵素の1つ、PaaG のホモログの結晶構造を分解能 1.85 Å において明らかにした。PaaG は

アミノ酸配列の相同性からヒドラーゼ/イソメラーゼ・スーパーファミリーに属する。構造解析の結果、モノマーがリング状に会合した3量体を形成し、モノマーは spiral fold と呼ばれる特徴的な構造を持つことが判った。本酵素の機能はまだよくわかっていないが、活性部位の構造から、触媒残基として働くのは Asp136 だけであることが示唆された。

(7) 超分子巨大ヘモグロビンの研究（沼本^{*3}、三木）

硫化水素の豊富な海底に生息する無脊椎動物であるマシコヒゲムシは、口や消化管を持っておらず、外部から有機物を取り込むかわりに自身に共生させた化学合成細菌がつくる有機物に依存して生きている。この共生細菌は硫化水素をエネルギー源としているものと考えられ、マシコヒゲムシの血液中に直接溶解している細胞外巨大ヘモグロビンによって、海中の硫化水素を供給されている。すなわち、この巨大ヘモグロビンは酸素のみならず、通常は猛毒である硫化水素も同時に結合・運搬するという、極めて特徴的な機能を担っている。われわれはこの巨大ヘモグロビンの結晶構造を決定し、ヒトのヘモグロビンサブユニットと構造的に共通な4種のサブユニットがそれぞれ6個ずつ会合した、24量体の球状構造をとっていることを明らかにした。全体の分子量が約40万にもなるこの巨大ヘモグロビン分子は、共通の構造を持った単位ブロックが規則正しく階層的に会合し、さらにサブユニット内、サブユニット間に多くのジスルフィド結合を形成してブロックどうしをしっかりとつなぎ止めていた。また、硫化水素結合部位と考えられるジスルフィド結合に関与していないシステイン残基は、いずれも周囲は疎水性のアミノ酸残基に囲まれており、このような疎水的な環境中に硫化水素を結合して不要な反応を起こすことを防ぎながら、安定に共生細菌まで運搬していることが示唆された。（京都大学大学院理学研究科との共同研究）

(8) フラビン結合型青色光受容体の研究（喜田^{*3}、三木）

BLUF (The sensor proteins for blue-light using the FAD) は、クリプトクロム、フォトロピンに次いで発見された第三のフラビン結合型青色光受容体ドメインである。光合成細菌やラン色細菌などに広く存在する。BLUF は約100個のアミノ酸残基から成り、集光性分子としてFADを保持する。最初のBLUFタンパク質の立体構造として、好熱性ラン色細菌である *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来 Tll0078 の結晶構造を2Å分解能で決定した。Tll0078 は、アミノ酸残基数143の小さなタンパク質であるが、5個の単量体が環状構造をとり、それが2つ重なって大きな10量体を形成している。Tll0078 は、N末端に存在するBLUFドメインと、2本のヘリックスから成るC末端ドメインより構成され、BLUFドメインは5本のβストランドから作られるβシートと、βシートに対して平行に配置された2本のヘリックスから構成されている。FADのイソアロキサジン環はヘリックス間で固定されているが、アデニン環は分子外へ延びており、電子密度を確認することが出来なかった。イソアロキサジン環結合部位は、各種BLUF間で保存された残基により構成されており、この部位は生物種間で保存された構造をとっていると考えられる。これまで、Tyr8 が光受容機構に重要で、イソアロキサジン環と直接相互作用していると考えられてきたが、結晶構造からはその様な相互作用は見いだせなかった。しかし立体構造情報と、

それを基にした部位特異的変異体実験から，FAD と Tyr8 が Gln50 を介して水素結合ネットワークを作っており，このネットワークが青色光受容機構に重要な役割を果たしていることが明らかになった．（京都大学大学院理学研究科との共同研究）

2. 構造ゲノム科学研究

(1) 高度好熱菌タンパク質の構造決定（宮武，久野，岩崎，金^{*1}，吉瀬^{*1}，竹田^{*1}，三木）

2 種の ABC transporter，solute-binding protein，および Phenylacetic acid degradation protein PaaG homolog protein の結晶構造解析を行った．

^{*1} 連携研究員（研究室兼務），^{*2} 研修生，^{*3} 客員研究員

We aim to understand the molecular mechanisms of biological phenomena from the viewpoint of structural biology. We investigate biological molecules to understand how they are integrated to work cooperatively as a supramolecular system. Our current research targets are: ABC transporter-mediated transport system, cellular environmental adaptation, regulatory system of cell division, biopolyester biosynthesis and degradation, cellular signal transduction, and metabolism of aromatic compounds. We determine precise three-dimensional structures of biological macromolecules by means of X-ray crystallography using synchrotron radiation of SPring-8. In addition, we develop several techniques which will facilitate determination of crystal structures in the era of structural genomics

1. Structural biology of biological systems

(1) ABC transporter-mediated transport systems of biomolecules

ABC transporters mediate transport of compounds through membranes using ATP-hydrolysis energy in cells. We study about transport mechanism of lipoprotein transporting factors (Lol proteins) in *Escherichia coli*. LolA is a periplasmic carrier protein of the Lol system. An open-closed conformational transition of LolA was studied using a mutant (R43L) that can bind a lipoprotein, but cannot transfer it to the outer membrane lipoprotein receptor LolB. The structures of the mutant determined in two crystal forms revealed a lid motion indispensable for catching and releasing the lipoprotein. We also determined the crystal structure of a lipoprotein NlpE which is transported by the Lol system.

(2) Cellular environmental adaptation

Two-component regulatory systems are well known as environmental adaptation machineries of prokaryotes. We focus on these systems derived from *Thermus thermophilus* HB8 to elucidate general mechanism of the systems by means of protein crystallography. The sensor-kinases sense environmental signals and then transfer them to corresponding response regulators. The response regulators consist of two domains: receiver domains that accept phosphate group, and effector domains that typically bind to the target DNA. In this year, we obtained novel low-resolution crystals of a response regulator consisting of the receiver and effector domains, and have tried to improve the crystal quality.

(3) Regulatory systems of cell division

Stationary-phase survival protein SurE is distributed

among eubacteria, archaea and plants, and it is required for viability under stressful conditions in *E. coli*. SurE is a metal ion-dependent phosphatase, and has nucleotidase and polyphosphatase activities. However, its physiological role and reaction mechanism are not clear. To elucidate the structure-function relationship of SurE, we have determined the crystal structure of SurE from *T. thermophilus* HB8 (TtSurE). We have reported that TtSurE is in a dimer-tetramer equilibrium in solution from the sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation experiments. The monomeric structure of TtSurE consists of a globular domain and a protruded β -hairpin. In crystals, TtSurE forms a dimer that assembles into a tetramer mediated by β -hairpins. In this year, another tetrameric structures of TtSurE were obtained in different crystal systems. To know whether TtSurE acts as a dimer or a tetramer, and the biological meanings of the changes in quaternary structure, enzymatic assays and cocrystallization with metal ion and substrate are in process

(4) Biopolyester biosynthesis and degradation

Biopolyester poly(*R*-3-hydroxyalkanoate) (PHA) is degraded by a specific enzyme, PHA depolymerase. Crystal structure of a fungal extracellular PHA depolymerase complexed with a methyl ester of a trimer substrate was determined, revealing how the enzyme recognizes a hydrophobic and optically active polymer substrate.

(5) Cellular signal transduction regulation

Scaffold protein is important for regulation of cellular signal transduction. JSAP1 is a scaffold protein involved in the MAP kinase cascade. To obtain sufficient amount of the purified protein for crystallography, various truncated mutants were designed and produced in *E. coli* cells. A mutant consisting of a single domain were overexpressed.

(6) Metabolism of aromatic compounds

Metabolism of aromatic compounds by microorganisms is important for a source of energy. In addition, it is an interesting system concerning degradation of environmental pollutants. In a metabolism of 4-hydroxyphenylacetic acid, it is firstly attacked by a two-component flavin-diffusible monooxygenase composed of HpaB and HpaC. Structures of HpaC complexed with NAD and FAD have been determined. Catalytic properties of HpaC were analyzed. Only NADH, not NADPH, could act as an electron donor, while FAD and FMN could act as electron-acceptors.

Degradation of phenylacetic acid is different from that of 4-hydroxyphenylacetic acid, in that the former compound is firstly activated by being charged with coenzyme A, followed by hydroxylation. Crystal structure of a homolog of phenylacetic acid degradation protein PaaG was determined, revealing a trimeric overall structure with a monomer structure of a spiral fold, a typical fold observed for hydratase/isomerase superfamily.

(7) Giant hemoglobin

An invertebrate beard worm, *Oligobranchia mashikoi* obtains organic compounds mainly from symbiotic chemoautotroph in their body. The symbiont, which is thought to be sulfur-oxidizing bacteria, and this giant hemoglobin can transport oxygen as well as sulfide. We have determined the crystal structure of the 400 kDa giant hemoglobin. It is composed of six copies of each of four individual subunits, and a total of 24 subunits involved in a whole molecule. This giant hemoglobin is constructed from the common units, which assemble hierarchically and are held up by many intra- and inter-subunit disulfide bonds.

(8) Blue-light photoreceptor proteins with a flavin chromophore

The sensor proteins for blue-light using the FAD (BLUF) domain belong to the third family of the photoreceptor proteins using a flavin chromophore, where the other two families are phototropins and cryptochromes. As the first structure of this BLUF domain, we have determined the crystal structure of the Tll0078 protein from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, which contains a BLUF domain bound to FAD, at 2Å resolution. Five Tll0078 monomers are located around the non-crystallographic five-fold axis to form a pentamer, and two pentamers related by two-fold noncrystallographic symmetry form a decameric assembly. The overall structure of the BLUF domain consists of a five-stranded mixed β -sheet with two α -helices running parallel to it. The isoalloxazine ring of FAD is accommodated in a pocket formed by several highly conserved amino acid residues in the BLUF domain.

2. Structural genomics

(1) Structure determination of proteins from *Thermus thermophilus* HB8

Crystal structures of two solute-binding proteins of ABC transporters, and phenylacetic acid degradation protein PaaG homolog were determined as Structurome Project.

Staff

Head

Dr. Kunio MIKI

Members

Dr. Hideyuki MIYATAKE

Dr. Tamao HISANO

Dr. Wakana IWASAKI

Dr. Minoru HAYASHIDA^{*1}

Dr. Kazuki TAKEDA^{*2}

Dr. Seong-Hoon KIM^{*2}

Dr. Tomoyasu KICHISE^{*2}

Dr. Munenori FURUSE^{*3}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Researcher, Structurome Research Group

^{*3} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Hiroyuki OSADA (Polym. Chem. Lab.)

Visiting Members

Dr. Masahiro FUJIIHASHI (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Dr. Noriko FUJII (Res. React. Inst., Kyoto Univ.)

Dr. Dae-Gwin JEONG (Korea Res. Inst. Biosci. Biotech.)

Dr. Seung-Jun KIM (Korea Res. Inst. Biosci. Biotech.)

Dr. Akiko KITA (Res. React. Inst., Kyoto Univ.)

Dr. Koji NAGATA (Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo)

Dr. Tsuyoshi NONAKA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Dr. Nobutaka NUMOTO (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Dr. Zihe RAO (Tsinghua Univ., China)

Dr. Hiraku WADA (Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Dr. Min YAO (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

Dr. Noritake YASUOKA

Trainees

Mr. Yu HIRANO (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Mr. Daisuke MARUYAMA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Mr. Akira NAKAMURA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Mr. Yuichi NISHITANI (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Mr. Satoshi WATANABE (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Kamo M., Kudo N., Lee W., Motoshima H., and Tanokura M.:

"Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of peptide deformylase from *Thermus thermophilus* HB8", Acta Cryst. D 60, 1299--1300 (2004). *

Takeda K., Matsui Y., Kamiya N., Adachi S., Okumura H., and Kohyama T.: "Crystal structure of the *M* intermediate of bacteriorhodopsin: allosteric structural changes mediated by sliding movement of a transmembrane helix", J. Mol. Biol. 341, 1023--1037 (2004). *

Miyatake H., Kim S., Motegi I., Matsuzaki H., Kitahara H., Higuchi A., and Miki K.: "Development of a fully automated macromolecular crystallization/observation robotic system, HTS-80", Acta Cryst. D 61, 658--663 (2005). *

Kim S., Miyatake H., Ueno T., Nagao T., and Miki K.: "Development of a novel ampholyte buffer for isoelectric focusing: electric charge-separation of protein samples for X-ray crystallography using free-flow isoelectric focusing", Acta Cryst. D 61, 799--802 (2005). *

Miura-Ohnuma J., Nonaka T., Katoh S., Murata K., Kita A., Miki K., and Katoh E.: "Improved expression, purification and crystallization of a putative *N*-acetyl- γ -glutamyl phosphate reductase from rice (*Oryza sativa*)", Acta Cryst. F 61, 1058--1061 (2005). *

Numoto N., Nakagawa T., Kita A., Sasayama Y., Fukumori Y., and Miki K.: "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of extracellular giant hemoglobin from pogonophoran *Oligobranchia mashikoi*", Biochim. Biophys. Acta 1750, 173--176 (2005). *

Kita A., Okajima K., Morimoto Y., Ikeuchi M., and Miki K.: "Structure of a cyanobacterial BLUF protein, Tll0078, containing a novel FAD-binding blue light sensor domain", J. Mol. Biol. 349, 1--9 (2005). *

Watanabe S., Kita A., and Miki K.: "Crystal structure of atypical cytoplasmic ABC-ATPase SufC from *Thermus thermophilus* HB8", J. Mol. Biol. 353, 1043--1054 (2005). *

Numoto N., Nakagawa T., Kita A., Sasayama Y., Fukumori Y., and Miki K.: "Structure of an extracellular giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 14521--14526 (2005). *

Kitano K., Kita A., Hakoshima T., Niimura Y., and Miki K.: "Crystal structure of decameric peroxiredoxin (AhpC) from *Amphibacillus xylanus*", Proteins: Struct. Funct. Bioinf. 59, 644--647 (2005). *

Shomura Y., Torayama I., Suh D., Xiang T., Kita A., Sankawa U., and Miki K.: "Crystal structure of stilbene synthase from *Arachis hypogaea*", Proteins: Struct. Funct. Bioinf. 60,

Iwasaki W., Miyatake H., and Miki K.: "Crystal structure of the small form of glucose-inhibited division protein A from *Thermus thermophilus* HB8", *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 61, 1121--1126 (2005). *

Nonaka T., Kita A., Miura-Ohnuma J., Katoh E., Inagaki N., Yamazaki T., and Miki K.: "Crystal structure of putative *N*-Acetyl- γ -glutamyl-phosphate reductase(AK071544) from rice (*Oryza sativa*)", *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 61, 1137--1140 (2005). *

Furutani M., Hata J., Shomura Y., Itami K., Yoshida T., Izumoto Y., Togi A., Ideno A., Yasunaga T., Miki K., and Murayama T.: "An engineered chaperonin caging a guest protein: Structural insights and potential as a protein expression tool", *Protein Sci.* 14, 341--350 (2005). *

Hisano T., Kasuya K., Tezuka Y., Ishii N., Kobayashi T., Shiraki M., Oroudjev E., Hansma H., Iwata T., Doi Y., Saito T., and Miki K.: "The crystal structure of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Penicillium funiculosum* provides insights into the recognition and degradation of biopolyesters", *J. Mol. Biol.* 356, 993--1004 (2006). *

(総説)

Nogi T., Hirano Y., and Miki K.: "Structural and functional studies on the tetraheme cytochrome subunit and its electron donor proteins: the possible docking mechanism during the electron transfer reaction", *Photosynth. Res.* 85, 87--99 (2005). *

森本 幸生, 三木 邦夫: "シンクロトロン放射光によるタンパク質のX線解析", *ぶんせき*, No. 8, pp.439--448 (2005) .

藤橋 雅宏, 三木 邦夫: "タンパク質結晶学の位相決定法における新たな展開", *化学* 60, No. 5, pp.70--71 (2005) .

三木 邦夫: "はやくできること, できないこと", *生物物理* 45, No. 5, pp.233--233 (2005) .

平野 優, 三木 邦夫: "光合成細菌の集光系および光エネルギー変換系蛋白質複合体", *蛋白質 核酸 酵素* 50, 1180--1188 (2005) .

北野 健, 沼本 修孝, 三木 邦夫: "微小重力下でのタンパク質結晶化と放射光による構造解析", *日本マイクログラフィティ応用学会誌* 22, 78--85 (2005) .

沼本 修孝, 福森 義宏, 三木 邦夫: "巨大ヘモグロビンの謎に迫る・X線結晶解析で構造と機能を解き明かせ!", *化学* 61, No. 3, pp.30--34 (2006) .

[単行本]

(総説)

竹田 一旗, 三木 邦夫: "膜タンパク質の結晶化", *タンパク質の結晶化: 回折構造生物学のために*, 京都大学学術出版会, 京都, pp.105--118 (2005) .

久野 玉雄, 三木 邦夫: "X線解析による結晶の評価", *タンパク質の結晶化: 回折構造生物学のために*, 京都大学学術出版会, 京都, pp.372--381 (2005) .

(国際会議等)

Hisano T., Tezuka Y., Kasuya K., Kobayashi T., Shiraki M., Iwata T., Doi Y., Saito T., and Miki K.: "Crystal structure of the type II PHA depolymerase", 229th ACS National Meeting, (American Chemical Society), San Diego, USA, Mar. (2005).

Miki K.: "Structural genomics in Japanese university community (Invited)", 11th Asian Chemical Congress (11ACC 2005), (The Korean Chemical Society), Seoul, Korea, Aug. (2005).

Miyatake H., Yamano A., Hasegawa T., and Miki K.: "A novel method to prepare iodine derivatives for in-house phasing", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Hisano T., Kasuya K., Tezuka Y., Kobayashi T., Shiraki M., Iwata T., Doi Y., Saito T., and Miki K.: "Crystal structure of a biopolyester-hydrolyzing enzyme PHA depolymerase", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Kita A., Okajima K., Morimoto Y., Ikeuchi M., and Miki K.: "Crystal structure of a cyanobacterial BLUF protein, T110078", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Watanabe S., Kita A., and Miki K.: "Crystal structure of atypical cytoplasmic ABC-ATPase SufC", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Kitano K., Kita A., Hakoshima T., Niimura Y., and Miki K.: "Crystal structure of decameric peroxiredoxin (AhpC) from *Amphibacillus xylanus*", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Numoto N., Nakagawa T., Kita A., Sasayama Y., Fukumori Y., and Miki K.: "Structure of a giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi*", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Iwasaki W. and Miki K.: "Structure of stationary phase survival protein SurE from *Thermus thermophilus*", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Saeki K., Ito S., Horikoshi K., and Miki K.: "The crystal structure of a novel subtilisin-like alkaline serine protease, KP-43", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Miki K.: "Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB (Invited)", BMIC 3rd International Symposium on "New Frontiers in Nano-Biotechnology: Protein Structure and Function", (Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University), Seoul, Korea, Aug. (2005).

Masui R., Nakagawa N., Ebihara A., Kanagawa M., Kuroishi C., Miki K., Yokoyama S., and Kuramitsu S.: "A structural and functional whole-cell project for the model organism, *Thermus thermophilus* HB8", *Frontiers of Proteomics: Aims and Perspectives*, (Osaka University), Toyonaka, Nov. (2004).

Nagata K., Tsutsui S., Lee W., Ito K., Kamo M., Inoue Y., and

- Tanokura M.: "Crystal structure of carboxypeptidase 1 from *Thermus thermophilus*", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Ebihara A., Nakagawa N., Kanagawa M., Sato S., Agari Y., Maoka N., Iino H., Kashihara A., Kuroishi C., Masui R., Shirouzu M., Terada T., Miki K., Yokoyama S., and Kuramitsu S.: "Progress in the whole cell project of a model organism, *Thermus thermophilus* HB8", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Kuramitsu S., Ebihara A., Kanagawa M., Nakagawa N., Masui R., Murayama K., Terada T., Shirouzu M., Miki K., and Yokoyama S.: "Whole-cell project of *Thermus thermophilus* HB8 toward atomic-resolution biology", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Kuramitsu S., Ebihara A., Nakagawa N., Fukui K., Kondou N., Masui R., Miki K., and Yokoyama S.: "Structural and functional whole-cell project for an extremely thermophilic model organism, *Thermus thermophilus* HB8", Thermophiles 2005, (Griffith University), Gold Coast, Australia, Sept. (2005).
- (国内会議)
- 福森 義宏, 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 笹山 雄一, 三木 邦夫: "有鬚動物 *Oligobranchia mashikoi* 巨大ヘモグロビンの立体構造と機能", 第32回生体分子科学討論会, 神戸, 6月 (2005) .
- 三木 邦夫: "Hi-Potential Iron-Sulfur Protein(HiPIP)の0.8 Å分解能での結晶構造 ([招待講演]: ワークショップ「蛋白質の結晶構造に観測される水と水の機能」)", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 梅名 泰史, 頼田 和子, 松岡 毅, 阿部 真琴, 喜田 昭子, 福井 清, 三木 邦夫, 森本 幸生: "*Aerococcus vividans* 由来L-乳酸酸化酵素(LOX)のArg-181変異体と野生体のX線結晶構造解析", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 野中 剛, 喜田 昭子, 三浦 純, 加藤 悦子, 稲垣 言要, 山崎 俊正, 三木 邦夫: "イネ由来のN-acetyl- γ -glutamyl-phosphate reductase の結晶構造", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 笹山 雄一, 福森 義宏, 三木 邦夫: "マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの結晶構造", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 久野 玉雄, 金 成勲, 竹田 一旗, 三木 邦夫: "高度好熱菌 *Thermus thermophilus*由来N-Acylamino Acid Racemaseの結晶構造", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 秋山 信彦, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来 amino acid transporterのATP結合ドメインの結晶構造", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 金 成勲, 宮武 秀行, 久野 玉雄, 岩崎 わかな, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来フラビン拡散型NADH: フラビン酸化還元酵素におけるフラビンの結合・解離機構", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 喜田 昭子, 岡島 公司, 森本 幸生, 池内 昌彦, 三木 邦夫: "青色光受容体タンパク質TII0078の結晶学的研究", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 竹田 一旗, 横田 直子, 徳田 元, 三木 邦夫: "大腸菌由来リポタンパク質送体LolAのR43L変異体に見られる構造変化", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 大滝 証, 荒川 孝俊, 三木 邦夫, 尾高 雅文, 養王田 正文: "超好熱性古細菌由来アスパラギン酸ラセマーゼ変異体及び基質複合体のX線結晶解析", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 渡部 聡, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "鉄イオウクラスター生合成関連ABC ATPase SufCの結晶構造解析", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .
- 岡島 公司, 喜田 昭子, 福島 佳優, 落合 有里子, 柴田 穰, 片山 光徳, 森本 幸生, 渡辺 正勝, 伊藤 繁, 三木 邦夫, 池内 昌彦: "好熱性シアノバクテリアの走光性の光受容体PixD (BLUFタンパク質)の光受容機構の変異導入による解析", 第12回日本光生物学協会年会, (日本光生物学協会), 京都, 8月 (2005) .
- 喜田 昭子, 岡島 公司, 森本 幸生, 池内 昌彦, 三木 邦夫: "新規短鎖青色光受容体タンパク質PixDの結晶構造", 第12回日本光生物学協会年会, (日本光生物学協会), 京都, 8月 (2005) .
- 喜田 昭子, 岡島 公司, 森本 幸生, 池内 昌彦, 三木 邦夫: "好熱性シアノバクテリアのフラビン結合光受容体PixD (BLUFタンパク質) の結晶構造解析", 日本植物学会第69回大会, 富山, 9月 (2005) .
- 岡島 公司, 喜田 昭子, 福島 佳優, 落合 有里子, 柴田 穰, 片山 光徳, 森本 幸生, 伊藤 繁, 三木 邦夫, 池内 昌彦: "好熱性シアノバクテリアのフラビン結合光受容体PixD (BLUFタンパク質) の光受容機構の変異導入による解析", 日本植物学会第69回大会, 富山, 9月 (2005) .
- 福森 義宏, 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 笹山 雄一, 三木 邦夫: "*Oligobranchia mashikoi*の400KDaヘモグロビンの結晶構造と機能", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005) .
- 喜田 昭子, 岡島 公司, 森本 幸生, 池内 昌彦, 三木 邦夫: "シアノバクテリア由来BLUFタンパク質PixD (T110078) の結晶構造", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005) .
- 高田 匠, 藤井 紀子, 下岡 正志, 三木 邦夫: "MALDI-TOF-MSによるウサギ水晶体上皮由来培養細胞中での新規D型アミノ酸 (D- β -型アスパラギン酸) 含有タンパク質の同定", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005) .
- 岡島 公司, 喜田 昭子, 福島 佳優, 落合 有里子, 柴田 穰, 片山 光徳, 森本 幸生, 伊藤 繁, 三木 邦夫, 池内 昌彦: "好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP1のPixD (T110078)のBLUFドメインの光受容機構の解析", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005) .

圓山 大介, 西谷 優一, 野中 剛, 喜田 昭子, 深海 隆明, 曾我 部智, 三尾 俊之, 岡部 尚文, 岡部 とし子, 三木 邦夫: "Candida albicans由来 UDP-N-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼにおける構造変化", 第43回日本生物物理学会年会, (日本生物物理学会), 札幌, 11月 (2005) .

岡島 公司, 喜田 昭子, 福島 佳優, 落合 有里子, 柴田 穰, 片山 光徳, 森本 幸生, 伊藤 繁, 三木 邦夫, 池内 昌彦: "シアノバクテリアの新規青色光受容体PixDの構造, 光受容機構の解析", 第43回日本生物物理学会年会, (日本生物物理学会), 札幌, 11月 (2005) .

長尾 秀実, 杉山 歩, 山本 哲徳, 高松 佑一郎, 福森 義宏, 沼本 修孝, 三木 邦夫: "シミュレーションによるマシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの構造研究", 第43回日本生物物理学会年会, (日本生物物理学会), 札幌, 11月 (2005) .

木田 宗志, 飯野 均, 中川 紀子, 久野 玉雄, 藤橋 雅宏, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "フェニル酢酸の異化に関わるPaaタンパク質群の結晶学的研究", 第43回日本生物物理学会年会, (日本生物物理学会), 札幌, 11月 (2005) .

曾佐 顕, 中村 顕, 小森 博文, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来NAD(P)H依存性酸化還元センサーリプレッサーp25の結晶構造", 第43回日本生物物理学会年会, (日本生物物理学会), 札幌, 11月 (2005) .

喜田 昭子, 石田 哲夫, 田中 裕之, 森本 幸生, 堀池 喜八郎, 三木 邦夫: "二原子酸素添加酵素メタピロカテカーゼの阻害剤複合体の結晶構造", 第43回日本生物物理学会年会, (日本生物物理学会), 札幌, 11月 (2005) .

沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 笹山 雄一, 福森 義宏, 三木 邦夫: " (招待講演) 巨大ヘモグロビンの分子会合機構", 第43回日本生物物理学会年会シンポジウム「生体超分子の形態形成と機能発現」, (日本生物物理学会), 札幌, 11月 (2005) .

中川 紀子, 海老原 章郎, 金川 真由美, 増井 良治, 三木 邦夫, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8の構造プロテオミックスの進捗状況", 文部省科研費補助金特定領域研究「統合ゲノム」第7回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, 木更津, 3月 (2005) .

海老原 章郎, 中川 紀子, 金川 真由美, 佐藤 伸哉, 上利 佳弘, 真岡 伸子, 飯野 均, 柏原 愛子, 黒石 千寿, 増井 良治, 白水 美香子, 寺田 貴帆, 三木 邦夫, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8をモデル生物とした「丸ごと一匹プロジェクト」の進捗状況", 第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 6-7月 (2005) .

木田 宗志, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来4-oxalocrotonate tautomeraseの結晶構造", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

渡部 聡, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "鉄イオウクラスター生合成関連ABC ATPase SufC の結晶構造", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

秋山 信彦, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来amino

acid transporterのATP結合ドメインの結晶構造", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

沼本 修孝, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "*Thermus thermophilus* HB8由来シャペロニン10 (Cpn10, co-chaperonin) の結晶構造", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

曾佐 顕, 中村 顕, 小森 博文, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来NAD(H)依存性酸化還元センサーリプレッサーp25の結晶構造", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

永田 宏次, 大塚 淳, 市原 洋祐, 飯野 均, 海老原 章郎, 田之倉 優: "独特の4ヘリックスバンドルトポロジーを有する推定金属依存性加水分解酵素*Bacillus subtilis* YfiTと類似した構造を有するTT2238の結晶構造解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

久野 玉雄, 金 成勲, 竹田 一旗, 上利 佳弘, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来N-アシルアミノ酸ラセマーゼの結晶構造", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

吉瀬 智康, 竹田 一旗, 久野 玉雄, 三木 邦夫: "高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8由来probable enoyl-CoA hydrataseの結晶学的研究", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

竹田 一旗, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来のペリプラズム基質結合タンパク質の結晶構造解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

金 成勲, 宮武 秀行, 久野 玉雄, 岩崎 わかな, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来フラビン拡散型NADH: フラビン酸化還元酵素におけるフラビンの結合・解離機構", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

岩崎 わかな, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来Stationary phase survival protein SurEの結晶構造", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005) .

海老原 章郎, 中川 紀子, 金川 真由美, 佐藤 伸哉, 上利 佳弘, 真岡 伸子, 飯野 均, 柏原 愛子, 黒石 千寿, 増井 良治, 白水 美香子, 寺田 貴帆, 三木 邦夫, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8をモデル生物とした「丸ごと一匹プロジェクト」の進捗状況", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005) .

中川 紀子, 海老原 章郎, 金川 真由美, 増井 良治, 三木 邦夫, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクトの進捗状況", 第6回極限環境微生物学会年会, 東京, 11月 (2005) .

市原 洋祐, 大塚 淳, 井上 由美子, 永田 宏次, 田之倉 優: "高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8由来probable zinc proteaseの構造解析", 第28回日本分子生物学会年会, 福

岡, 12月 (2005).