

# 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事も知られている。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解析と機能解析(杉本、佐藤<sup>\*1</sup>、大槻<sup>\*2</sup>、福村<sup>\*2</sup>、四ッ谷<sup>\*2</sup>、城)

インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ(IDO)はヘム(ポルフィリン-鉄錯体)を活性中心として、トリプトファン代謝における第一段階かつ律速段階の反応を触媒する。基質のインドール環への二原子酸素添加の過程を原子レベルで理解することを目的として解析をおこなった。本年度は分子表面の残基に変異をいれた IDO を利用することで、CN 結合型の結晶化に成功し、その立体構造を決定した。すでに得られているフェニルイミダゾール結合型の構造と比較すると基質結合ポケットを形成する長いループの位置が 6Å 以上移動していた。この基質結合部位の柔軟性が酵素の基質特異性に関与していることが示唆された。ストッブドフロー装置を用いて IDO に対する酸素の結合速度を求めた。その結果、基質非結合型の方が基質結合型よりも酸素を速く安定に結合することが明らかとなった。もうひと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)については、4量体に会合した状態を保ちつつ、さらに精製中にフラグメント化することなく純度の高い標品を調整する方法を確立した。

(2) 哺乳動物のグロビンタンパク質の構造機能解析(澤井<sup>\*3</sup>、牧野<sup>\*2</sup>、杉本、城)

近年は乳類から発見されたサイトグロビン(Cgb)とニューログロビン(Ngb)は、ミオグロビン(Mb)やヘモグロビン(Hb)と同じファミリーに属するヘム結合型グロビンタンパク質である。Mb と Hb の軸配位子が 1 つのヒスチジン残基であるのに対し、Cgb と Ngb は酸化状態に関わらず 2 つのヒスチジン残基を軸配位子とする六配位構造をとることが知られている。以前に Cgb と Ngb の CO 結合型のピコ秒時間分解能共鳴ラマン分光測定を行ったが、本年度は野生型および変異体を用いたシアン結合型の共鳴ラマン分光測定により、Ngb では鉄に配位した CN に対する遠位ヒスチジンの影響が他のグロビンと比較して非常に強いことが明らかとなった。ヒトの野生型 Ngb の分解能 2.8Å での結晶構造解析により、酸素結合能を制御しているといわれているシステイン残基側鎖の構造を明らかにし、その役割について考察した。また、これまでに観測されてい

ない Ngb の 2 量体形成様式を明らかにした。

(3) 脱窒菌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(永野、日野<sup>\*4</sup>、山本<sup>\*2</sup>)

硝酸イオンから窒素分子を生成する脱窒は、自然界の窒素サイクルのプロセスのひとつであると共に、嫌氣的なエネルギー代謝である硝酸呼吸として機能する重要な物質変換である。一酸化窒素還元酵素(NOR)は、この硝酸呼吸、脱窒の過程で一酸化窒素(NO)から亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)を合成する膜結合型のヘム酵素である。NORの作動機構を解明する上で最も重要な中間体は、活性部位にNOが結合した複合体であるが、半減期が1ミリ秒と極めて短寿命であるため反応機構には不明な点が多く残されている。そこでこの中間体を捕捉するために低温下、凍結NORを高圧一酸化窒素ガスに暴露し、一酸化窒素複合体を調製するクライオガスサイターの作製を行った。この装置では-130℃まで試料を冷却した状態で、20気圧の気体に曝露することが可能である。一方、立体構造を基盤として反応機構を理解することを目的とし、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来のNORの三次元結晶化に取り組んでいる。これまでに、いくつかの界面活性剤を用いて結晶を得ているが、結晶性が悪く、分解能 6Å であり構造決定には至っていない。本年度は、結晶性を向上させるため、NORに特異的に結合するモノクローナル抗体の作成に取り組んだ。その際、天然に存在する膜蛋白質を抗原とするモノクローナル抗体の効率的なスクリーニング法を開発した。その結果 10 種類の抗体を得ることができた。現在、これらの抗体のFab部分を調製しNOR-Fab複体の結晶化を行っている。

(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>)

蛋白質の機能を理解するためには、全ての構成成分を明らかにすることが不可欠である。生体膜に存在する膜蛋白質に、特異的に脂質が結合し機能に関与していると提唱されているが、未だその完全な構造情報は得られていない。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、水素イオンを内膜の内側から外側に能動輸送する膜蛋白質複合体であるウシ心筋チトクロム酸化酵素に存在する脂質の構造決定を行った。質量分析により、脂質の極頭部と脂肪酸の結合位置、炭素数及び二重結合の位

置を決定した結果、7種類のリン脂質と7種類のトリアシルグリセロールの存在が明らかとなった。1.8 分解能 X線解析により各脂質の電子密度を確認し、酵素1分子に13個の脂質が存在することが明らかとなった。

(5) 脂肪酸水酸化酵素チトクロムP450BS の触媒機構解析(永野、金<sup>4</sup>、城)

*Bacillus subtilis* 由来のチトクロムP450 (P450BS) 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、この触媒反応の分子機構を解明することを目的とし、反応中間体の結晶構造解析を試みている。酵素と過酸化水素の反応によって得られる中間体は不安定だったので、酸素化型を二電子還元して中間体を得ることを試みた。還元型酵素と酸素の反応をストップフロー用いて、15で行った。自動酸化速度を小さくする事が可能になり、溶液状態において酸素化型をとらえる事に成功した。この結果を基に、酸素化型の結晶作製を試みた。

## 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ンキナーゼ(HK)と、レスポンスレギュレーター(RR)のふた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。現在、数千種もの二成分情報伝達系遺伝子があきらかにされているものの、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。

(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)、田中<sup>3</sup>、菊地、城)

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。FixLはセンサードメインにヘムをもち、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(酸素解離型)ではキナーゼ活性が上昇する。転写因子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のヘムには酸素以外の一酸化炭素なども結合する。しかし、FixLは酸素とそれ以外の気体状小分子を正確に見極めて、酸素分子が結合/解離した場合にのみ、その情報をキナーゼドメインに伝達する。この認識メカニズムの詳細を解明する目的で、picosec~millisecの時間スケールで時分割共鳴ラマンスペクトル測定を行った。その結果、0.2~2microsecondの時間範囲で、ヘムに配位した小分子の種類に依存してヘム周辺の構造が変わること、さらに、その変化はキナーゼドメインの構造変化とも連動していることを明らかにすることができた。FixLのヘムでの酸素結合が自己リン酸化を抑制する初発機構はヘム遠位側アミノ酸によって支えられていると考えられるため、多数の変異体を用いてリガンド結合型タンパク質のリン酸化活性などの生化学的、およびNMRやラマン分光などの分光学的解析を行った。その結果、遠位アミノ酸群は結合酸素の安定化に寄与していること、また酸素結合による周囲の構造の均一化がリン酸化抑制に連関していることが示唆された。

(2) 好熱菌二成分情報伝達系の構造機能解析(山田<sup>4</sup>、大野<sup>4</sup>、小林<sup>2</sup>、杉本、中村(寛)、城)

二成分系のHKにおけるセンサー部位とキナーゼ活性制御の相関を明らかにする事を目的に、好熱菌由来のHK(ThkA)とRR(TrrA)を選び出し、X線小角散乱、結晶回折によりその複合体構造を4.2分解能で決定した。その結果、ThkA二量体の中心に二つのTrrA分子が結合していた。また、ThkAのセンサー部位のみの高分解能構造を決定し、複合体構造に当てはめたところ、リガンド結合により構造変化の起きると推定される部位と、触媒ドメインとの接触が見られ、この相互作用がキナーゼ活性制御に重要である事を明らかにした。一方、ThkA特異的な制御因子を探索したが、候補化合物は見つからなかった。TrrAにおいては、NMR測定によりThkAとの接触残基を特定する事ができた。

(3) エチレンセンサータンパク質ETR1の立体構造解析にむけた大量発現系構築(菊池、小原<sup>1</sup>、城)

エチレンは植物における様々な生理作用に関与する植物ホルモンの一種である。エチレンの情報伝達機構に関する研究は、主に遺伝学的解析による研究が1980年代から盛んに行われ、その後の分子生物学的解析の結果、ETR1やERS1がエチレン受容体として機能していることが明らかになった。しかし、情報伝達機構に関しては不明な点が多く残されている。そこで、我々はエチレン受容体の性質を分子レベルで解明することを目的とし、ETR1の大量発現系構築に取り組んでいる。現在までに、大腸菌、シロイヌナズナの組換え体や植物培養細胞を利用した発現系構築に取り組んできたが、いずれの場合にもタンパク質レベルで構造機能解析を行える量のタンパク質を得ることはできなかった。本年度は酵母を利用し、エチレン受容体の大量発現系を構築することを目的に、酵母の培養を行える環境を整えた。

## 3. 新規人工タンパク質の分子設計(磯貝、石田<sup>6</sup>)

天然蛋白質のアミノ酸配列とフォールディング特性の関係を調べるために、ミオグロビンの疎水性コア変異体を作成し、変性実験を行った。その結果、ミオグロビンのアミノ酸配列は、フォールディングの反応中間体を不安定化するように厳しく選ばれており、それによって協同的な折りたたみ反応を実現していることが明らかになった。中間体の形成は、大きな球状蛋白質が正しく折りたたまれるのに不可欠なステップであるが、過度に安定な中間体は、細胞内でミスフォールドした分子重合体の形成を促進する。従って、中間体の不安定化は、蛋白質分子進化の淘汰圧となっていると考えられる。

## 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(菊池、福村<sup>2</sup>、高<sup>1</sup>、Jeyakanthan<sup>1</sup>、城)

オワンクラゲ由来のGFPやサンゴ由来のGFP様タンパク質を基盤にした*in vivo*イメージングの技術に目覚しい進展が見られている。それに伴い、外部刺激で蛍光色に変化するものなど、従来にはない機能を持つGFP様タンパク質の作製が求められるようになってきた。機能性を持つタンパク質の構築にはランダムミュレーションによる方法に依存している部分が多いが、立体構造をベースとする

合理的な設計も一部で行われるようになった。そこで我々は、様々な色の GFP 様色素・蛍光タンパク質の結晶構造解析を進めている。本年度は新たに3種の色素タンパク質の構造解析に成功した。また、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) イメージングでの利用に大きな期待が持てる、ドナーとアクセプターの2つのドメインから成る蛍光タンパク質の結晶化にも成功した。

(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)

X線吸収スペクトル (XAS) の高エネルギー側に広がる微細構造は EXAFS と呼ばれ、測定対象の状態を問わずに金属イオン周辺の構造を明らかにすることができる。そのため、金属タンパク質をはじめとする生体関連試料溶液に対しても、その金属イオン周辺構造情報を得るために極めて有用な手法の一つである。既に我々は、生体試料を測定対象とした X線吸収スペクトル (bioXAS) に最適化させた測定システムを構築しているが、本年度はこの測定システムを利用して金属タンパク質の活性部位のモデルとなる得る金属錯体の測定を行うなど、さらに測定の対象を広げた。

(3) DNA 相同組換えを調節する蛋白質群の機能解析 (美川) DNA 傷害等の結果生じた ssDNA 領域は ssDNA 結合蛋白質 (SSB) によって保護され、実際に組換え修復を行う RecA は結合できない。RecF、RecO、RecR はこの ssDNA 領域を SSB から RecA に受け渡すことが知られているが、その詳細は不明である。そこで我々はこの系に参加するすべての蛋白質を調製し、まずその傷害認識機構を調べることにした。その結果、RecF は RecFR 複合体を形成して dsDNA に強く結合すること、また、RecO は ssDNA 上の SSB と結合すること、RecR は RecO とともに結合することが明らかになった。これらの結果をもとに、これら蛋白質群による傷害領域の認識機構に対する新しいモデルを提唱した。

(4) DNA 相同組換えを行う RecA 蛋白質を用いたマルチプレックス PCR 法の確立 (美川)

PCR 法は特異的な DNA 断片を効率よく増幅する方法として、医療分野やライフサイエンス分野において広く受け入れられている。しかしながら、目的とする DNA 断片以外の増幅が生じるという問題があり、このバックグラウンドが PCR 法を用いた検査試薬などへの応用の障害になっていた。我々はこの問題を解決することを試みて、PCR の反応系に DNA の対合反応を触媒する耐熱性の RecA を加えることにした。その結果、正確なプライマーの対合により非特異的な増幅は大きく抑えられ、1本のチューブ内で10以上の PCR 反応を同時に効率よく起すことに成功した。このマルチプレックス PCR 法により PCR 法の応用範囲が大きく広がった。

(5) 四次元結晶構造解析法による酵素反応の構造生物化学 (河野)

本研究では結晶構造解析を用いて酵素反応を動的に追跡することを目的とした研究開発を行っている。現在は、ニトリルヒドラーゼ (NHase) の酵素反応過程の追跡を行っている。NHase はニトリル化合物に水を付加して対応するアミド化合物を生成する酵素である。活性中心に3価の非ヘム鉄または非コリノイド・コバルトを含み、鉄型 NHase は一酸化窒素 (NO) の光脱離によって活性化される。本年度は、通常の方法を用いた時間分割結晶構造解析を行い、

試料温度 140K 下で基質の鉄への配位過程を捕らえることに成功した。

(6) マウス由来グリセロホスホジエステラゼの酵素学的解析 (大嶋<sup>\*4</sup>)

グリセロホスホジエステラゼ (GDE) は、リン脂質の分解産物であるグリセロホスホジエステルを加水分解しグリセロール3-リン酸と各種リン脂質に対応する極性基を生じさせる酵素である。ほ乳類の GDE は、1種類について酵素活性が報告されているのみである。一次配列からマウスの GDE と予測される6種のタンパク質の発現系を構築した。それらは一次配列から膜タンパク質であると推定される。大腸菌を用いた発現系を試みたが、ほとんど発現が見られなかった。しかしながら、HEK293細胞で GDE を発現させることに成功した。抗体を用いて GDE を精製し N 末端のアミノ酸配列を解析しシグナル配列の有無を検討した。

## 5. 構造生物学研究の支援業務 (瀧尾、中村(光)<sup>\*1</sup>、高橋<sup>\*7</sup>)

精製タンパク質の品質評価及び播磨磨研共通施設である昆虫細胞培養室の維持管理、タンパク質の解析に関する支援業務を行った。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プロテインシークエンサーによる解析 800件、質量分析による解析 1100件、精製タンパク質の SDS-PAGE および Native-PAGE 650件となっている。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。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5研究室・グループ (13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国島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を検討した。

<sup>\*1</sup>協力研究員、<sup>\*2</sup>研修生 (兵庫県立大学大学院) <sup>\*3</sup>ジュニア・リサーチ・アソシエイト、<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>客員研究員、<sup>\*7</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. 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 lines.

### 1. Structural and Functional Analyses of Several Metalloenzymes:

(1) IDO is a heme-containing dioxygenase and catalyzes the incorporation of dioxygen (O<sub>2</sub>) into indole rings, that is the first and rate-limiting step in the main pathway of human tryptophan catabolism. We determined the cyanide-bound form of IDO which suggest the role of loop in the active site for the wide substrate specificity. We also purified and crystallized the tetrameric human tryptophan 2,3-dioxygenase.

(2) Neuroglobin and cytoglobin are two recently discovered members of the vertebrate globin family. Both are intracellular proteins with hexacoordinated heme-Fe atoms in

the ferrous and ferric forms. We measured the resonance Raman spectroscopy of cyanide-bound form of Ngb. The steric effect of distal His on the cyanide ligand is stronger than those of other globin proteins. The structure of native form of human Ngb was determined at 2.8 Å resolution which implicates the role of Cys residues for the regulation of the oxygen binding ability.

(3) Bacterial nitric oxide reductase (NOR) is a membrane-bound cytochrome  $cbb_3$  type respiratory enzyme, which contains the heme  $b_3$  and non-heme iron binuclear center. NOR produces nitrous oxide ( $N_2O$ ) from nitric oxide (NO) by two-electron reduction. Although NO-complex of NOR is a key catalytic intermediate, it is very difficult to characterize due to its very short half life at room temperature. To overcome the difficulty, we have developed a cryo-gas-citer, which forces gas molecules to penetrate into NOR at cryo-condition. We also have been trying to solve the crystal structure of NOR to clarify its molecular mechanism. So far, many single crystals were obtained but, unfortunately, their diffraction quality was poor. In this year, we developed a new hybridoma screening technique and generated 10 monoclonal anti-NOR antibodies which is expected to improve crystal quality.

(4) The chemical structures of lipids of bovine heart cytochrome c oxidase including the head group structures, the chain lengths and unsaturated bond positions of the hydrocarbon tails were determined by MS analysis. All 13 lipids were identified in the X-ray structure at 1.8 Å resolution.

(5) Cytochrome P450 from *Bacillus subtilis* (P450BS $\beta$ ) is a peroxxygenase that catalyzes the hydroxylation reaction of fatty acid using hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) as an oxidant. Oxygen complex of P450BS $\beta$  which can be transformed into a catalytic intermediate by X-ray reduction, was observed with stopped-flow rapid scan at  $-15^\circ C$ . To elucidate the catalytic mechanism, we are trying to prepare oxygen-bound P450BS $\beta$  single crystals.

## 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) FixL is a paradigm of heme-based oxygen-sensing proteins. Spectroscopic and mutagenesis studies have suggested that amino acid residues of the heme distal side stabilize the bound  $O_2$ , and that a single convergent structure of the sensor domain of the ligand-bound form is relevant to the downregulation of kinase activity. FixL uses a heme moiety as an oxygen molecule sensing. We succeeded in the measurements of time-resolved resonance Raman spectra of the protein spanning of time-orders from ps to ms. The spectra suggested that the structural change around heme associating with the dissociation of the oxygen molecule are coupled to those of the kinase domain of FixL.

(2) We determined the low resolution structure of the two-component system (ThkA•TrrA complex) of the thermophilic bacterium with small angle X-ray scattering and crystallographic techniques. Two TrrA molecules bind to the center of ThkA dimer in the complex structure. The fitting of the high resolution structure of ThkA sensor domain into the

complex structure revealed a conformational change of the sensor domain induced upon the ligand binding should be directly transmitted to the ThkA catalytic domain through the special region. On the other hand, we could not find the candidate compound for the specific inhibitor of ThkA. An NMR titration study revealed the specific residues of TrrA for ThkA binding.

(3) A gaseous ethylene acts as a hormone in plants. In *Arabidopsis*, ethylene is perceived by receptor proteins such as ETR1 and ERS1 that are membrane-bounded proteins with three transmembrane helices. Although we have tried to establish overexpression systems of ETR1 by using *E. coli*, transgenic *Arabidopsis* and plant culture cells, the expressed protein were insufficient in quantities. Then, we have started to establish overexpression systems of ETR1 and/or ERS1 by using yeast as a host.

## 3. De novo protein design

Hydrophobic core mutants of sperm whale apomyoglobin were constructed to investigate the amino acid sequence features that determine folding properties. The denaturation experiments of these mutant myoglobins suggest that the two-state transition of protein folding or the transient formation of the unstable intermediate, which seem to be required for effective production of the functional proteins, have been a major driving force of molecular evolution of natural globular proteins.

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

(1) Green fluorescence protein (GFP)-based techniques hold great promise for *in vivo* imaging. The three-dimensional structural information is imperative to construct new fluorescence proteins with some desirable functions. We have succeeded in crystallization and determination of three new GFP-like proteins. The structures help us to construct new fluorescent proteins as *in vivo* markers.

(2) Biological application of X-ray absorption spectra (XAS) have been recognized as a tool for characterization of environment around metal ions in metalloproteins. We have established bioXAS measurement system that enables us to obtain XAS data from 1  $\mu L$  sample. In this year, the targets have been extended to model complexes that were inspired by metalloproteins.

(3) ssDNA regions that result from DNA damage are immediately coated by SSB. RecF, RecO, and RecR proteins recognize the dsDNA-ssDNA junction and mediate the loading of RecA protein onto the SSB-coated ssDNA. We demonstrated that RecFR complex binds to dsDNA preferentially, that RecO binds to SSB on the ssDNA and that RecR interacts with not only RecF but also RecO. These results proposed a new model for RecFOR assembly at dsDNA-ssDNA junctions.

(4) Although PCR method is widely accepted, the non-specific products often complicate the analysis. To reduce the non-specific amplification, we employed a heat-stable RecA protein that catalyzes the pairing of homologous DNA strands. We demonstrated that the RecA protein could minimize non-specific amplification and enable more than one dozen simultaneous PCRs in a single test tube.

(5) To understand reaction mechanism of enzymes, we are developing novel techniques of time-resolved crystallography. Nitrile Hydratase (NHase) from *Rhodococcus* is an enzyme capable of catalyzing hydration of nitriles, and it contains a mononuclear non-heme iron as its reaction center.

This year, we obtained diffraction data in the process of the substrate molecule binding to NHase at 140K.

(6) Glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDE) catalyzes the hydrolysis of glycerophosphodiesters, degradation products of phospholipids, producing glycerol 3-phosphate and corresponding alcohols. Among mammalian GDEs, only GDE1 is reported to have GDE activity. We have constructed an expression system for 6 kinds of mouse GDEs. GDEs are expressed in HEK293 cells and the protein was purified. We have analyzed the existence of signal sequences by determining the N-terminal sequences of the purified GDEs

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

We supported researchers of the Harima Institute in protein characterization. This year, more than 1500 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. Yoshiaki KAWANO  
Dr. Akihiro KIKUCHI  
Dr. Tsutomu MIKAWA  
Dr. Shingo NAGANO  
Dr. Hiro NAKAMURA  
Dr. Hiroshi SUGIMOTO  
Dr. Tomoya HINO<sup>\*1</sup>  
Dr. Misa KIM<sup>\*1</sup>  
Dr. Ayako OHNO<sup>\*1</sup>  
Dr. Noriyasu OHSHIMA<sup>\*1</sup>  
Dr. Seiji YAMADA<sup>\*1</sup>  
Dr. Jeyaraman JEYAKANTHAN<sup>\*2</sup>  
Dr. Atsuko KOHARA<sup>\*2</sup>  
Dr. Mitsuhiro NAKAMURA<sup>\*2</sup>  
Dr. Hideaki SATO<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 (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Prof. Masao IKEDA-SAITO (IMRAM, Tohoku Univ.)  
Mr. Manabu ISHIDA (Res. Center for Micro-Nano Technol., Hosei Univ.)

Prof. Yutaka ITOH (Tokyo Metropolitan Univ.)  
Dr. Takashi IYANAGI  
Dr. Hirofumi KOMORI (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Prof. Tsutomu KOYAMA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)  
Prof. Yukio MORIMOTO (Res. Reactor Inst., Kyoto Univ.)  
Prof. Takumi NOGUCHI (Inst. Mater. Sci., Univ. Tsukuba)  
Ms. Hitomi SAWAI (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Dr. Naoki SHIBATA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Dr. Yasuhiro SHOMURA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Mr. Atsunari TANAKA (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)  
Prof. Chikashi TOYOSHIMA (IMCB, Univ. Tokyo)  
Dr. Masaki UNNO (IMRAM, Tohoku Univ.)  
Mr. Mamoru YAMANISHI (Okayama Univ.)  
Prof. Shin-ya YOSHIKAWA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

#### Trainees

Ms. Eiko FUKUMURA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Mr. Hiroshi IMAMURA (Ritsumeikan Univ. Grad. Sch.)  
Ms. Miki KOBAYASHI (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Mr. Masatomo MAKINO (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Mr. Masaharu NISHIHARA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Mr. Takashi OHTSUKI (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Ms. Yukiko TAKAI (Tokyo Inst. of Technol. Grad. Sch. of Biosci. and Biotechnol.)  
Mr. Keita YAMAMOTO (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Mr. Norihiko YOKOI (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)  
Ms. Keiko YOTSUYA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)  
Mr. Eduardo VOTTERO (Univ. of British Columbia)

---

### 誌上発表 Publications

[ 雑誌 ]

( 原著論文 ) \*印は査読制度がある論文誌

Hirata K., Yamashita E., Aoyama H., Muramoto K., Yoshikawa S., and Tsukihara T.: "Scaling of one-shot oscillation images with a reference data set", *J. Synchrotron Rad.* 11, 60 - 63 (2004). \*

Yamashita E., Aoyama H., Yao M., Muramoto K., Itoh-Shinzawa K., Yoshikawa S., and Tsukihara T.: "Absolute configuration of the hydroxyfarnesylethyl group of haem A, determined by X-ray structural analysis of bovine heart cytochrome *c* oxidase using methods applicable at 2.8 resolution", *Acta Cryst. D61*, 1373 - 1377 (2005). \*

Sugahara M., Ohshima N., Ukita Y., Sugahara M., and Kunishima N.: "Structure of ATP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Thermus thermophilus* HB8 showing the structural basis of induced fit and thermostability", *Acta Cryst. D61*, 1500 - 1507 (2005). \*

Nakabayashi M., Shibata N., Komori H., Ueda Y., Iino H., Ebihara A., Kuramitsu S., and Higuchi Y.: "Structure of a conserved hypothetical protein, TTHA0849 from *Thermus thermophilus* HB8, at 2.4 resolution: a putative member

- of the StAR-related lipid-transfer (START) domain superfamily", *Acta Cryst. F* 61, 1027 - 1031 (2005). \*
- Jeyaraman J., Taka J., Kikuchi A., Kuroishi C., Yutani K., and Shiro Y.: "Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the L-fucose-1-phosphate aldolase (FucA) from *Thermus thermophilus* HB8", *Acta Cryst. F* 61, 1075 - 1077 (2005). \*
- Jeyaraman J., Inagaki E., Kuroishi C., and Tahirov T.: "Structure of PIN-domain protein PH0500 from *Pyrococcus horikoshii*", *Acta Cryst. F* 6, 463 - 468 (2005). \*
- Yamamoto K., Kimura S., Shiro Y., and Iyanagi T.: "Interflavin one-electron transfer in the inducible nitric oxide synthase reductase domain and NADPH-cytochrome P450 reductase", *Arch. Biochem. Biophys.* 440, 65 - 78 (2005). \*
- Takasu H., Jee J., Ohno A., Goda N., Fujiwara K., Tochio H., Shirakawa M., and Hiroaki H.: "Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 460 - 465 (2005). \*
- Sawai H., Makino M., Mizutani Y., Ohta T., Sugimoto H., Uno T., Kawada N., Yoshizato K., Kitagawa T., and Shiro Y.: "Structural characterization of the proximal and distal histidine environment of cytoglobin and neuroglobin", *Biochemistry* 44, 13257 - 13265 (2005). \*
- Kurashima-Itoh K., Kasai Y., Hosono K., Tamura K., Oue S., Isogai M., Ito Y., Nakamura H., and Shiro Y.: "Solution structure of the C-terminal transcriptional activator domain of FixJ from *Sinorhizobium meliloti* and its recognition of the *fixK* promoter", *Biochemistry* 44, 14835 - 14844 (2005). \*
- Taka J., Ogasahara K., Jeyaraman J., Kunishima N., Kuroishi C., Sugahara M., Yokoyama S., and Yutani K.: "Stabilization due to dimer formation of phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermus thermophilus* HB8: X-ray analysis and DSC experiments", *J. Biochem.* 137, 569 - 578 (2005). \*
- Kandori H., Nakamura H., Yamazaki Y., and Mogi T.: "Redox-induced protein structural changes in cytochrome *bo* revealed by fourier transform infrared spectroscopy and [<sup>13</sup>C]Tyr labeling", *J. Biol. Chem.* 280, 32821 - 32826 (2005). \*
- Lokanath N. K., Ohshima N., Takio K., Shiromizu I., Kuroishi C., Okazaki N., Kuramitsu S., Yokoyama S., Miyano M., and Kunishima N.: "Crystal structure of novel NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8", *J. Mol. Biol.* 352, 905 - 917 (2005). \*
- Isogai Y., Ito Y., Ikeya T., Shiro Y., and Ota M.: "Design of  $\lambda$  cro fold: Solution structure of a monomeric variant of the *De Novo* protein", *J. Mol. Biol.* 354, 801 - 814 (2005). \*
- Shigemori Y., Mikawa T., Shibata T., and Oishi M.: "Multiplex PCR: use of heat-stable *Thermus thermophilus* RecA protein to minimize non-specific PCR products", *Nucleic Acids Research Online Issues* (web) (<http://nar.oxfordjournals.org/>) 33, No. 14, (2005). \*
- Oda S., Sugimoto H., Yoshida T., and Shiro Y.: "Crystallization and preliminary crystallographic studies of human indoleamine 2,3-dioxygenase", *Acta Cryst. F* 62, 221 - 223 (2006). \*
- Sugimoto H., Oda S., Otsuki T., Hino T., Yoshida T., and Shiro Y.: "Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 2611 - 2616 (2006). \*
- Ishijima J., Uchida Y., Kuroishi C., Tsuzuki C., Takahashi N., Okazaki N., Yutani K., and Miyano M.: "Crystal structure of alanyl-tRNA synthetase editing-domain homolog (PH0574) from a hyperthermophile, *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 1.45 resolution", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 62, 1133 - 1137 (2006). \*
- (総説)
- 山本 雅貴, 城 宜嗣: "SPRING-8の発信するバイオ研究", *バイオサイエンスとインダストリー* 63, No. 4, pp.255 - 260 (2005).
- 磯貝 泰弘: "望みの立体構造をもった人工タンパク質をデザインする", *バイオニクス* 3, No. 2, pp.66 - 67 (2006).
- 村中 俊哉, 小原 淳子: "植物ステロイドの糖転移酵素 配糖化に関わる遺伝子の解明により毒と薬の生産制御に期待", *化学と生物* 44, No. 1, pp.6 - 7 (2006).
- [ 単行本 ]
- (総説)
- 磯貝 泰弘, 太田 元規: "人工タンパク質設計", *タンパク質科学: 構造・物性・機能*, 化学同人, 東京, pp.363 - 370 (2005).
- 磯貝 泰弘, 太田 元規: "タンパク質の分子設計", *生物工学ハンドブック*, コロナ社, 東京, pp.188 - 190 (2005).
- 口 頭 発 表 Oral Presentations
- (国際会議等)
- Jeyaraman J., Taka J., Kitaguchi Y., Kuroishi C., Takada K., Yokoyama S., Shiro Y., and Yutani K.: "Crystal Structure of Putative Dipeptidase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus horikoshii* OT3", 3rd International Conference on Structural Genomics (ICSG 2004), Washington, USA, Nov. (2004).
- Sugimoto H., Oda S., Otsuki T., Hino T., Yoshida T., and Shiro Y.: "Structural basis of O<sub>2</sub> incorporation into indole ring catalyzed by heme-containing dioxygenase", 14th International Conference on Cytochromes P450: Biochemistry, Biophysics, and Bioinformatics, Dallas, USA, May - June (2005).
- Oinuma K., Kumita H., Ohta T., Konishi K., Ishida K., Hashimoto Y., Higashibata H., Kitagawa T., Shiro Y., and Kobayashi M.: "Analysis of the reaction mechanism of aldolase dehydratase containing heme as the active center", 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary, July (2005).
- Yoshimasu M., Mikawa T., Hayashi N., Shibata T., and Ito Y.: "In-Cell NMR studies of calmodulin protein expressed in *E. coli*", EUROMAR/ EENC 2005, Veldhoven, The Netherlands, July (2005).
- Sugimoto H., Oda S., Otsuki T., Yoshida T., and Shiro Y.: "Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Jeyaraman J., Kikuchi A., Taka J., Karasawa S., Miyawaki A., and Shiro Y.: "Crystal structure of novel cyan-emitting fluorescent protein from *Acropora* stony coral", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Fukumura E., Kikuchi A., Karasawa S., Miyawaki A., and Shiro Y.: "Crystal structure of novel orange-emitting fluorescent protein from stony coral", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Lokanath N. K., Ohshima N., Takio K., Shiromizu I., Kuroishi C., Okazaki N., Kuramitsu S., Yokoyama S., Miyano M., and Kunishima N.: "Crystal structure of the NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Makino M., Sugimoto H., Sawai H., Kawada N., Yoshizato K., and Shiro Y.: "High resolution structure of cytoglobin reveals the extra helix in N-terminus", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Kikuchi A., Fukumura E., Karasawa S., Miyawaki A. and Shiro

- Y.: "Structural basis for cyan-emitting mechanism in a cyan fluorescent protein", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Aoyama H., Shinzawa-Itoh K., Terada H., Tadehara Y., Yamashita E., Sugimura T., Tsukihara T., and Yoshikawa S.: "X-ray structures of phospholipids in bovine heart cytochrome *c* oxidase", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).
- Nagano S., and Poulos T. L.: "Crystallographic study on the dioxygen complex of wild-type and mutant cytochromes P450cam", 1st International Symposium on Chemistry of Coordination Space (ISCCS 2005), Okazaki, 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).
- Hino T., Kumita H., Yamamoto K., and Shiro Y.: "Spectroscopic and crystallographic studies of bacterial nitric oxide reductase", 1st International Symposium on Chemistry of Coordination Space (ISCCS 2005), Okazaki, Nov. (2005).
- Sugimoto H., Oda S., Otsuki T., Hino T., Yoshida T., and Shiro Y.: "Structure and catalytic mechanism of human indoleamine 2,3-dioxygenase", 1st International Symposium on Chemistry of Coordination Space (ISCCS 2005), Okazaki, Nov. (2005).
- Kurashima-Ito K., Ikeya T., Senbongi H., Mikawa T., Shibata T., and Ito Y.: "Characterisation of the nucleotide-binding domain of the human mitochondrial ABC transporter ABCB6 by heteronuclear multidimensional NMR and homology modelling", 44th Annual Meeting of Japanese NMR Society and The 1st Asia-Pacific NMR Symposium, Yokohama, Nov. (2005).
- Hatanaka M., Honda M., Murakami S. I., Mikawa T., Ito Y., Shibata T., and Yamazaki T.: "Structural changes induced by ATP hydrolysis in microcrystallized protein-DNA filaments detected by solid state NMR", 44th Annual Meeting of Japanese NMR Society and The 1st Asia-Pacific NMR Symposium, Yokohama, Nov. (2005).
- Mizuno H., Mal T. K., Kikuchi A., Markus W., Fukano T., Ando R., Taka J., Jeyaraman J., Shiro Y., Ikura M., and Miyawaki A.: "A photochromic GFP-like protein and molecular/structural basis of the photochromism", 44th Annual Meeting of the NMR Society of Japan and 1st Asia-Pacific NMR Symposium, Yokohama, Nov. (2005).
- Harada Y., Tokushima T., Miyajima Y., Shiro Y., Takeuchi T., Fukushima A., Kino H., Fukuyama H., Takakura K., Hieda K., and Shin S.: "Soft x-ray emission spectroscopy of biomaterials", International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005), Honolulu, USA, Dec. (2005).
- (国内会議)
- 城 宜嗣: "二成分情報伝達系における分子内情報伝達機構解明にむけて", 大阪大学蛋白質研究所セミナー「Metals in Chemical Biology: 金属イオンを軸とした化学と生物学の融合に向けて」, 吹田, 6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」平成17年度第1回全体会議, 名古屋, 6月 (2005).
- 荒川 孝俊, 片岡 慎吾, 河野 能顕, 神谷 信夫, 片山 葉子, 養王田 正文, 尾高 雅文: "Thiobacillus thioautotrophicus由来チオンアネート加水分解酵素のX線結晶構造解析", 第5回日本蛋白質科学学会年会, 福岡, 6-7月 (2005).
- 杉本 宏: "インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼの結晶構造", 第9回P450勉強会, (P450勉強会), 神戸, 7月 (2005).
- 金 美沙: "ペルオキシゲナーゼ活性をもつP450BSS $\beta$ の結晶構造を基盤とした触媒反応機構解析", 第9回P450勉強会, (P450勉強会), 神戸, 7月 (2005).
- 大槻 宗史: "Kinetic and Spectroscopic Studies of Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)", 第9回P450勉強会, (P450勉強会), 神戸, 7月 (2005).
- 日野 智也: "緑膿菌由来膜貫通型一酸化窒素還元酵素の精製と結晶化", 第9回P450勉強会, (P450勉強会), 神戸, 7月 (2005).
- 永野 真吾: "P450結晶構造", 第9回P450勉強会, (P450勉強会), 神戸, 7月 (2005).
- 福村 栄維子: "Tryptophan 2,3-dioxygenase の発現系構築", 第9回P450勉強会, (P450勉強会), 神戸, 7月 (2005).
- 山本 啓太: "緑膿菌由来膜貫通型一酸化窒素還元酵素の反応機構解析", 第9回P450勉強会, (P450勉強会), 神戸, 7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).
- 中林 誠, 柴田 直樹, 飯野 均, 海老原 章郎, 樋口 芳樹: "STARTドメインスーパーファミリーに属する新規タンパク質: TT1201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).
- 中林 誠, 柴田 直樹, 金川 真由美, 中川 紀子, 樋口 芳樹: "アセトイン脱水素酵素類似タンパク質: TT1271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).
- 井上 仁, 本多 賢吉, 伊藤 隆, 柴田 武彦, 美川 務: "高度好熱菌RecOの機能解析", 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).
- 本多 賢吉, 井上 仁, 伊藤 隆, 柴田 武彦, 美川 務: "高度好熱菌RecR蛋白質の構造機能解析", 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).
- 矢追 克郎, 近藤 英昌, 野呂 奈津子, 杉本 宏, 津田 栄, 日吉 あや子, 三石 安: "GH74キシログルカン分解酵素の機能と構造の比較", 日本応用糖質科学会平成17年度大会(第54回)・第13回糖質関連酵素化学シンポジウム, 津, 9月 (2005).
- 永野 真吾, Cupp-Vickery J. R., Poulos T. L.: "Comparison of dioxygen-bound cytochrome P450 crystal structures", 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第1回ワークショップ, 淡路, 9月 (2005).
- 青山 浩: "ウシ心筋チトクロム酸化酵素の脂質のX線構造解析", 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第1回ワークショップ, 淡路, 9月 (2005).
- 中川 祥子, 山口 由夏, 城 宜嗣, 斎藤 正男, 中村 寛夫: "ジフテリア菌の細胞膜にあるヘムセンサーキナーゼChrSタンパク質", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005).
- 重森 康司, 大石 道夫, 柴田 武彦, 美川 務: "マルチプレックスPCR法: 高度好熱菌TthRecAタンパクを用いたPCR精度向上法", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005).
- 老沼 研一, 汲田 英之, 太田 雄大, 小西 一誠, 石田 京子,

- 橋本 義輝, 東端 啓貴, 北川 禎三, 城 宜嗣, 小林 達彦: "ストップフローを用いた、アルドキシムデヒドラターゼの反応機構解析", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005).
- 永野 真吾, Cupp-Vickery J. R., Poulos T. L.: "IヘリックスThrを持たないシトクロムP450eryFの酸素結合型の結晶構造解析", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005).
- 菊地 晶裕, 千田 俊哉, 福田 雅夫, 城 宜嗣, 木村 成伸: "Pseudomonas sp. KKS102株由来低電位Rieske型フェレドキシニンBphA3のHis配位子置換", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005).
- 小原 淳子, 中嶋 千晴, 吉田 茂男, 村中 俊哉: "ステロイドサボニン合成に関わるナス科植物由来配糖化酵素の機能改変", 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月 (2005).
- 神田 勝正, 村本 和優, 伊藤-新沢 恭子, 山下 栄樹, 青山 浩, 月原 富武, 吉川 信也: "チトクロム酸化酵素の一酸化炭素結合型構造の解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 太田 和宏, 村本 和優, 伊藤-新沢 恭子, 山下 栄樹, 青山 浩, 月原 富武, 吉川 信也: "還元型チトクロム酸化酵素のシアニ化物イオン結合構造の解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 近藤 英昌, 矢追 克郎, 野呂 奈津子, 日吉 あや子, 杉本 宏, 鈴木 守, 津田 栄, 三石 安: "糖質加水分解酵素ファミリー74に属するexo-型及びendo-型キシログルカン分解酵素のX線結晶構造解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11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).
- 山田 斉爾, 中村 寛夫, 城 宜嗣: "二成分制御系のPASドメイン", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 青山 浩, 山下 栄樹, 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精密構造決定の戦略", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 井戸 亘, 村本 和優, 伊藤-新沢 恭子, 山下 栄樹, 青山 浩, 月原 富武, 吉川 信也: "チトクロム酸化酵素のX線による還元効果の構造解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 西宮 佳志, 杉本 宏, 佐藤 涼子, 野呂 奈津子, 近藤 英昌, 高道 学, 三浦 愛, 津田 栄: "シチロウオ由来II型不凍タンパク質のX線結晶構造解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 今村 比呂志, 磯貝 泰弘, 竹清 貴浩, 谷口 吉弘, 加藤 稔: "コイルドコイル構造をもつペプチド(GCN4-p1)の温度・圧力に対する二次構造安定性", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 晝間 祐介, 菊地 晶裕, 城 宜嗣, 水谷 泰久: "リガンド脱離に伴う酸素センサータンパク質(FixL)の構造ダイナミクス", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 石田 学, 安田 温, 山崎 伊織, 太田 元規, 磯貝 泰弘, 今井 清博: "最尤法により推測した祖先型ミオグロビンのアミノ酸配列", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 永野 真吾, Poulos T. L.: "水酸化活性を失った変異型シトクロムP450cam酸素複合体の結晶構造解析", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 磯貝 泰弘: "天然蛋白質のアミノ酸配列に見るフォールディング中間体の不安定化機構", 第43回日本生物物理学会年会, 札幌, 11月 (2005).
- 城 宜嗣: "環境応答型センサー蛋白質におけるドメイン相互作用", 理研シンポジウム「モレキュラー・アンサンブル2005」, 和光, 11月 (2005).
- 永野 真吾, Poulos T. L.: "変異型シトクロムP450cam D251NとT252A酸素複合体の結晶構造解析", 第38回酸化反応討論会, 札幌, 11月 (2005).
- 山口 由夏, 中川 祥子, 城 宜嗣, 斎藤 正男, 中村 寛夫: "ジフテリア菌二成分情報伝達系ヘムセンサータンパク質ChrS自己リン酸化活性について", 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月 (2005).
- 田中 敦成, 藤井 浩, 城 宜嗣, 中村 寛夫: "酸素センサータンパク質FixLの自己リン酸化制御におけるヘム遠位側にあるアミノ酸の役割", 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月 (2005).
- 重森 康司, 美川 務: "大腸菌の相互組換えを利用したDNA cloningに対する高度好熱菌RecX蛋白質の効果", 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月 (2005).
- 佐藤 雅俊, 城 宜嗣, 中村 寛夫: "動物細胞におけるヘム輸送", 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月 (2005).
- 青山 浩, 山下 栄樹, 村本 和優, 伊藤-新沢 恭子, 吉川 信也, 月原 富武: "2.8 分解能でのウシ心筋チトクロム酸化酵素のヘムAのフェルニルエチル基の絶対構造決定法", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- Jeyaraman J., 高 潤一郎, 菊地 晶裕, 黒石 千寿, 油谷 克英, 城 宜嗣: "Crystal Structure of L-fucose-1-phosphate aldolase from *Thermus thermophilus* HB8", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- 菅 倫寛, 伊藤-新沢 恭子, 青山 浩, 山下 栄樹, 吉川 信也, 月原 富武: "アニーリング法を用いたチトクロム酸化酵素の分解能の改善", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- 杉本 宏, 四ツ谷 景子, 小田 俊一朗, 日野 智也, 大槻 崇史, 吉田 匡, 城 宜嗣: "ヘム依存型ジオキシゲナーゼの構造解析", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- 近藤 英昌, 西宮 佳志, 安井 雅範, 野呂 奈津子, 佐藤 涼子, 杉本 宏, 鈴木 守, 三浦 愛, 津田 栄: "魚類由来II型不凍タンパク質のX線結晶構造解析", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- 高 潤一郎: "ab initio位相決定による球状ウイルス結晶の構造解析法", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- 平田 邦夫, 城 宜嗣, 月原 富武, 中川 敦史, 福山 恵一, 和田 啓, 山本 雅貴, 田中 宏志, 高田 昌樹: "マキシマムエントロピー法によるタンパク質結晶構造解析 できること、できないこと", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- 中林 誠, 柴田 直樹, 小森 博文, 上田 康史, 飯野 均, 海老原 章郎, 倉光 成紀, 樋口 芳樹: "高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来機能未知タンパク質 TTHA0849 の結晶構造", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).
- 永野 真吾, Poulos T. L.: "水酸化活性を失った変異型シトクロムP450camの酸素複合体の結晶構造解析", 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生体超分子構造」第2回公開シンポジウム, 金沢, 12月 (2005).
- 磯貝 泰弘: "Native protein sequences are designed to destabilize the folding intermediates", 第3回「水と生体分子」公開ワ



- ークシヨップ, (文科省科研費特定領域研究), 岡崎, 1月 (2006).
- 今村 比呂志, 磯貝 泰弘, 竹清 貴浩, 谷口 吉弘, 加藤 稔: "Pressure and temperature induced conformational change of coiled coil peptide", 第3回「水と生体分子」公開ワークショップ, (文科省科研費特定領域研究), 岡崎, 1月 (2006).
- 城 宜嗣: "金属蛋白質・金属酵素による物質交換と情報交換の化学", 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2回公開講演会・成果報告会, 京都, 1月 (2006).
- 山田 齊爾, 杉本 宏, 中村 寛夫, 城 宜嗣: "センサーヒスチジンキナーゼの活性制御メカニズム", 日本農芸化学会2006年度大会, 京都, 3月 (2006).