

# 宮野構造生物物理研究室

## Structural Biophysics Laboratory

主任研究員 宮野 雅司

MIYANO, Masashi

脂質は生体の高密度エネルギー源であり、主要な細胞膜構成成分であり、様々な化学修飾を受け多彩な生理活性信号伝達物質としても働く。多様な構造・機能を持つ脂質は多くの疾患・病態と関連しているため、脂質関連タンパク質研究は医学薬学分野の応用への基盤情報となる。例えば、ロイコトリエン  $C_4$  ( $LTC_4$ ) はアラキドン酸を出発物質として生合成されるエイコサノイドの一つで、強力な平滑筋収縮物質として知られ、喘息増悪時に  $LTC_4$  産出が増大するので、 $LTC_4$  合成酵素の特異的阻害剤は抗喘息抗アレルギー薬候補となる。そこで、未解明の本酵素の立体構造は、特異的薬剤設計の貴重な情報となる。また、脂質は取り扱いの難しさから、その関連タンパク質、特に膜タンパク質の研究は他のタンパク質に比べて構造・機能研究は遅れている。我々は、基礎生物学としての脂質生物学の発展と医学薬学の基盤、創薬展開を視野に入れ、脂質関連タンパク質の構造・機能研究を中心に行っている。また、応用展開支援として、タンパク質結晶構造解析基盤技術向上のために、結晶イメージの自動判別法開発と、新規分子置換アルゴリズムと高精密度アルゴリズムの検証を共同で進めている。

### (A) 脂質関連蛋白質の構造・機能解析

(1) ヒト由来ロイコトリエン  $C_4$  合成酵素の構造研究 (吾郷、入倉<sup>\*3</sup>、金岡<sup>\*2</sup>、島村<sup>\*3</sup>、宮野)

膜貫通型タンパク質であるロイコトリエン  $C_4$  合成酵素 ( $LTC_4S$ ) は、ロイコトリエン  $A_4$  ( $LTA_4$ ) に還元型グルタチオンを付加しロイコトリエン  $C_4$  ( $LTC_4$ ) を生合成する酵素である。総称してシステニルロイコトリエン ( $Cys-LT$ ) と呼ばれる  $LTC_4$  とその代謝物  $LTD_4$ 、 $LTE_4$  は、強い平滑筋収縮を伴うアナフィラキシーショック症状の原因物質 SRS-A (Slow Reacting Substance of Anaphylaxis) の構成成分で、 $Cys-LT$  の平滑筋収縮活性の強さは、よく知られた炎症性物質であるヒスタミンのおよそ 1000 倍もある。気管支平滑筋収縮による喘息発作や、血管平滑筋収縮による毛細血管からの血漿漏出など、急性炎症の諸症状に連関している。また最近の遺伝子欠損動物を用いた肺の慢性炎症モデル実験は、急性炎症だけでなく、慢性炎症とそれに伴う組織の繊維化にも関わることを示している。 $LTC_4S$  は  $Cys-LT$  による生体反応において鍵となる酵素で喘息ばかりでなく新たな慢性炎症の創薬ターゲットとして重要であると考えられている。本研究では、 $LTC_4S$  の構造を X 線結晶構造解析によって明らかにし、さらに基質認識や触媒反応の構造的基礎を明らかにする。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて発現した天然型  $LTC_4S$  とセレノメチオニン置換  $LTC_4S$  の精製・結晶化条件を最適化し、3.3 Å 分解能の回折能を持つ結晶を得た。この結晶を用いて初めてヒト由来膜貫通型蛋白質  $LTC_4S$  の X 線結晶構造解析に成功した。構造解析では、セレノメチオニン置換  $LTC_4S$  の結晶の回折データを多波長異常分散法で解析し初期モデルを構築した。このモデルを天然型  $LTC_4S$  の結晶の回折データに対し精密化し、グルタチオンを結合した  $LTC_4S$  の結晶構造を決定した。さらに  $LTC_4S$ /グルタチオン/ $LTA_4$  複合体構造をモデリングし、酵素反応触媒機構を検討した。二つのアルギニン残基のグアニジノ基が、それぞれ酸と塩基として機能する位置・立体特異的酸塩基触媒反応機構を提案した。現在、提案した構造モデルに基づき、阻害剤開発も視野に入れて基質認識や触媒反応を検討している。

(2) ロイコトリエン  $B_4$  受容体 ( $BLT1$ )、血小板活性化因子受容体 ( $PAFR$ ) の結晶化に向けた、酵母による大量発現と精製 (堀、佐藤<sup>\*3</sup>、宮野、清水<sup>\*1</sup>、石井 (聡)<sup>\*2</sup>)

ロイコトリエン  $B_4$  ( $LTB_4$ ) は、炎症反応初期に、炎症細胞である白血球や好酸球などを活性化する走化性因子である。 $LTB_4$  は産生細胞において生合成され、炎症細胞表面の  $BLT1$  に作用して炎症細胞を活性化する。血小板活性化因子 ( $PAF$ ) は、炎症初期に白血球や血小板などで産生され、細胞遊走や平滑筋収縮、サイトカインの放出など多様な生体反応を伝達する。 $BLT1$  や  $PAFR$  は G タンパク質共役型受容体であり、リウマチや喘息などの創薬ターゲットとなっている。これら受容体の結晶構造解明を目指して、メタノール資化酵母を使用した大量発現系構築を行った。

$BLT1$  (マウス、ヒト、ラット、モルモット)、 $PAFR$  (マウス、ヒト、ラット) に対して、N 末に発現タグを融合させたコンストラクトを作成して発現チェックを行った。N 末タグは、 $\alpha$ PrePro-FLAG, HA, FLAG, His-FLAG, StrepII-FLAG の 5 種類で、合計 35 種。 $^3H$ - $LTB_4$  と  $PAFR$  アゴニストである  $^3H$ -WEB2086 の結合活性測定の結果、 $\alpha$ PrePro-FLAG を融合したヒト及びモルモット由来  $BLT1$  のみ活性があることが明らかになった。さらに、Scatchard plot 測定の結果、モルモット由来  $BLT1$  のみ生体組織と同様な  $^3H$ - $LTB_4$  親和性があった。モルモット由来  $BLT1$  に対し、様々な変異体の発現系を構築して Western blot による発現  $BLT1$  の評価や活性測定を行った結果、C 末に His タグを付加した糖鎖結合部位変異体 (N4A) が結晶化のための大量発現系に適していた ( $K_d = 4.3 nM$ ,  $B_{max} = 40.0 pmol/mg$ )。さらに、ロドプシンの結晶構造から予想された、フレキシビリティの高い C 末側を欠損させた変異体 5 種、G-タンパク質  $\alpha$  サブユニットとの共発現系の検討を行った。

(3) 昆虫細胞を用いたGPCR大量発現系の構築 (佐藤<sup>\*3</sup>、堀、宮野、清水<sup>\*1</sup>、石井 (聡)<sup>\*2</sup>)

ヒトゲノム中には 800 を超える G 蛋白共役型受容体 (GPCR) がコードされているが、これらの多くが創薬ター

ゲットとなる可能性を持つ。脂質メディエーター受容体は GPCR に分類され、最も構造解析が困難な膜蛋白として知られている。構造解析を困難にしている理由としては、まず安定した大量発現が困難であることが挙げられる。本研究では、昆虫細胞にヒト脂質メディエーター受容体を発現させ生理活性の解析を行うと同時に、構造解析を目的とした受容体の大量発現系について基礎的な検討を行っている。

今年度は、高純度精製を念頭においた新たな高発現株の樹立を行った。その結果、これまで使用していた C 末端タグ(His x6)に対し新たに N 末端タグ(Streptag II)を導入した h-BLT1 受容体高発現株 ST45 の樹立に成功した。特に、ST45 クローン細胞株 D3 はリガンド結合実験から 10pmol/mg protein を超える発現量を達成した。昨年度に確立した大量培養系を用いることで、1 mg 程度の受容体を見込む膜画分が得られることが期待された。

N および C タグに対する特異抗体を用いて、ST45D3 細胞中の hBLT1 の分布を観察した。Anti-ST tag および anti-V5 tag 抗体により見いだされたシグナルはエピトープの共在を示しており、ST45D3 で発現している hBLT1 がそれぞれのタグを保持していることが確認された。また、アンタゴニストを添加した場合、シグナルの相対的な増強が観察され、ウエスタンブロットの結果と一致した。この状況で観察されるシグナルは細胞膜上に凝集する傾向を示しており、hBLT1 はアンタゴニスト依存的に膜上で安定すると結論した。

ST45D3 細胞の膜粗抽出画分を調製し、1%DDM による可溶化と Histidine tag および Streptag II tag に対するアフィニティ精製を行った。膜画分を 1%DDM で 16 時間可溶化し、上澄を TARON (Co-affinity resin)、さらに Streptactin resin を用いて BLT1 の抽出と精製を行った。溶出画分に受容体タンパクと思われるバンドが確認できたので、質量分析を行い目的タンパクであることを確認した。さらに、ESI-MS による質量分析を行った結果、特定残基にリン酸化が検出された。

#### (4) イカロドプシンの構造解析 (島村<sup>\*3</sup>、宮野)

タンパク質全体の約 30%を占めている膜タンパク質は、細胞の中と外の間の情報、エネルギー、物質の輸送や伝達等で重要な働きを担っている。さらに、創薬ターゲットの約 50%が膜タンパク質である。このようなことから、膜タンパク質の立体構造を明らかにすることは、意義がある。しかし膜タンパク質は大量に発現/精製することが難しいため、構造が解明された例は、可溶性タンパク質に比べて少ない。我々は、サントリー生物有機研究所の石黒部長、平木博士等との共同研究で網膜に大量に発現しているロドプシンを、イカの網膜から直接精製する系を確立し、その立体構造の解析を目指した。現在、4 程度のデータを取得可能な結晶を得ることに成功している。

#### (5) プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 認識マウスモノクローナル IgG1 の構造解析 (菅原、倉橋<sup>\*2</sup>、青山<sup>\*5</sup>、山本<sup>\*2</sup>、宮野)

PGE<sub>2</sub> は、炎症反応、抗炎症反応、血管拡張、血圧降下および胃液分泌抑制など様々な生理作用を引き起こす脂

質メディエーターである。PGE<sub>2</sub> のこれらの作用は種々の標的細胞に存在する情報伝達系を異にする PGE<sub>2</sub> 特異的な受容体との結合により引き起こされる。これまでタンパク質と PGE<sub>2</sub> 複合体の構造解析は報告されておらず、基質認識機構についてはあまり良く知られていない。我々は PGE<sub>2</sub> と特異抗体の Fab フラグメントとの複合体を目指して、タンパク質の脂質メディエーター分子の認識機構の解明を目指している。今年度は、抗体全長のパイン消化により Fab フラグメントを高収率で得て、ゲル濾過により PGE<sub>2</sub>-Fab 複合体を単離した。

#### (B) その他のタンパク質の結晶学的研究

(1) ヒト M1 ファミリー亜鉛アミノペプチダーゼの結晶構造解析 (菅原、服部 (辻本細胞生化学研究室)、辻本 (辻本細胞生化学研究室)、宮野)

哺乳動物において重要な生理機能を担っている糖タンパク質である M1 亜鉛アミノペプチダーゼのうちヒト由来の脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ (A-LAP) およびアミノペプチダーゼ A (APA) について、天然糖鎖修飾型および糖鎖のない変異体を昆虫細胞 Sf9 より大量発現および精製を行った。本年度、APA は Ca<sup>2+</sup> イオンの存在下で 0.1 mm 角の結晶が得られたが、構造解析に十分な分解能の回折データは得られていない。

(2) カンピロバクター由来シアル酸転移酵素の大量調製と X 線結晶解析 (菅原、梶原<sup>\*2</sup>、宮野)

シアル酸は細胞膜表面のオリゴ糖の末端に存在して、リガンド-受容体および細胞-細胞間相互作用に重要な生物学的機能を担っている。シアル酸転移酵素は糖タンパク質のムチン型糖鎖やアスパラギン結合型糖鎖およびスフィンゴ糖脂質の非還元末端糖残基 (ガラクトース, N-アセチルガラクトサミン, N-アセチルグルコサミン, シアル酸) に CMP-シアル酸を糖供与体として転移する酵素群である。基質とする糖鎖や形成される結合様式の違いにより異なる酵素が関与する。これらの酵素とその変異体を作成し、結晶化および酵素学的な反応メカニズムの検討をおこなっている。

(3) ヒト由来カルシニューリンホモログスプロテイン (CHP) の結晶化および構造解析 (菅原、若林<sup>\*2</sup>、宮野)

CHP は、細胞に普遍的に含まれ細胞内部の pH を調節する膜タンパク質である Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) に結合し、何らかの制御因子として働くことが示唆されている。NHE1 の CHP 結合配列部分のペプチド断片と CHP を大腸菌で共発現させて得られた複合体試料の高純度精製に成功し、添加剤としてイットリウムなどを含む条件から結晶が得られ、2.7 Å 分解能で構造解析を行い、NHE1 の細胞内 pH 調整機構についてのモデルを提唱した。

(4) -ラクタマーゼ, Toho-1 の高分解能 X 線結晶構造解析 (内山<sup>\*4</sup>、島村<sup>\*3</sup>、吾郷、宮野)

β-ラクタマーゼ Toho-1 は、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼであり、近年の薬剤耐性菌に対して開発された第三世代セフェム系抗生物質に対しても高い加水分解活性を持つ。既に Toho-1 の立体構造は、酵素-基質複合体のものが高分解能で解明されている。我々は、β-ラクタマーゼを阻害し、重大な感染症の治療に使われる阻害剤の一種イミペネムと Toho-1 との複合体構造の解明を目指

した。1.5 までの分解能で Toho-1 / イミペナム複合体構造のデータが得られ、現在、精密化を行っている。

(5) 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<sup>\*2</sup>、中村<sup>\*2</sup>、岡本 (河田ナノフォニクス研究室)、前田 (雄)<sup>\*1</sup>)

蛍光顕微鏡による一分子観察は、X線結晶構造解析法やNMR法などでは解析不可能な蛋白質分子ひとつひとつの動きを可視化する事が可能である。この方法では、蛋白質分子の動的な情報を得られるため、構造と機能を理解する上で、結晶構造解析のような多数の分子の統計的な情報に基づく方法に対して相補的な役割を担っている。

我々は蛋白質の構造変化を観察するために ヘリックスの方向変化を直接観測する蛍光単分子方位計測顕微法を開発している。本手法では、二価性ローダミンで蛋白質の特定の ヘリックスをラベルして、その3次元方位を直接観察するための技術開発を行なった (京都大学、山本行男研との共同研究)。

二価性ローダミンをラベルするためにトロポニン C (TnC) セントラルヘリックス(95-102)に変異を導入し、ラベルし、アクチンフィラメント上でトロポミオシン (Tm)およびTnT、TnIの観察をin vitroで行なった。ブラウン運動によるアクチン-Tm-Tn複合体の揺らぎの抑制が重要であり、分子の構造変化を妨げずに分子の揺らぎを抑制する方法について検討している。

(6) Tm フラグメントの結晶構造解析 (似内、南方<sup>\*2</sup>、前田 (佳) (X線構造解析研究チーム)、小田<sup>\*2</sup>、前田 (雄)<sup>\*1</sup>)

昨年度までに、N 末端側に GCN4 配列を付加した Tm の 176-284 残基目を含む断片 (ZrsTm(176-284))について 2.6 Å 分解能で、また、N 末端側と C 末端側に GCN4 配列を付加した 176-273 残基目を含む断片 (NZrsTm(176-273)NZ)について 2.0 Å 分解能で成功していた。今年度に入り、二種類目の NZrsTm(162-273)NZ 結晶の調整、および、結晶構造解析を行うことに成功した。これら三種類の結晶構造の比較を詳細に行うことにより、Tm 分子の持つ柔軟性についてより深い議論が行うことが可能になった。

(7) Tm と Tn の複合体の結晶構造解析 (似内、南方<sup>\*2</sup>、前田 (佳) (X線構造解析研究チーム)、小田<sup>\*2</sup>、前田 (雄)<sup>\*1</sup>)

回折能ある Tm/Tn 複合体結晶が得られおり、この結晶が本当に Tm と Tn を含む複合体結晶であることについては SDS-PAGE により確認している。しかしながら、この複合体結晶の回折能は 20 Å に過ぎず、現在では到底構造解析可能とは言えない。各種結晶化改善方法を試みたが現在のところ改善された例は無い。

(8) Tm と TnT1 複合体の結晶構造解析 (似内、南方<sup>\*2</sup>、前田 (佳) (X線構造解析研究チーム)、小田<sup>\*2</sup>、前田 (雄)<sup>\*1</sup>)

His-hcTnT1/ZrsTm(162-284)、および、hcTnT1/ZrsTm(162-284)の組み合わせに関して、結晶が再現性良く得られ、かつ、SDS-PAGE での分析によりこれらの結晶が複合体であることを確認した。しかしながら、ほとんどの

結晶は 7 Å 程度の回折斑点しか与えないことがわかった。各種結晶化改善方法を試みたが、残念ながら改善は見られなかった。

### (C) タンパク質構造解析技術の高度化

(1) タンパク質結晶化の効率化 (菅原、国島 (多量体タンパク質構造解析研究チーム)、川端 (分散適応ロボティクス研究ユニット)、宮野)

タンパク質の X 線結晶構造解析で、結晶化は最大のボトルネックである。そこで結晶化のための全自動結晶化観察ロボット (TERA) の開発により、多数の試料の標準条件での結晶化に成功した。ロボットによる実際の稼働によるこれまでの経験と蓄積された膨大な数の結晶化イメージを使って、結晶化写真の自動判別ソフトウェア開発をロボティクス研究グループと共同でおこなっている。結晶化ドロップの形状と画像の撮影条件の均一化により、90%を超える判別が可能となった。

(2) より正確なタンパク質理解を目指したタンパク質構造解析技術の高度化を目指した研究 (吾郷、西堀<sup>\*2</sup>、坂田<sup>\*1</sup>、戎崎 (戎崎計算宇宙物理研究室)、宮野)

超精密構造解析・タンパク質の構造や機能の源泉となって生体機能発現の中心的役割を果たしている、水の構造を含む水素結合など非共有結合相互作用を検討する上で、タンパク質の超高分解能精密解析は必須である。しかし、有機小分子、材料結晶などと違い、実在のタンパク質結晶の不完全性、タンパク質結晶の損傷、さらに回折データ収集システムの限界など多くの実験的制約の中で、水を含む非共有結合相互作用を再検討する基礎データとなりうる、超高分解能解析が出来るタンパク質結晶の数は少ない。またさらに、現在の結晶解析計算がフーリエ解析に基づいていることによる原理的限界が存在する。これまでに C60、シリコン結晶などの超高分解能解析に実績があり、フーリエ解析の原理的限界を超えうる電子密度改良法であるマキシマムエントロピー法 (MEM) を準原子分解能のタンパク質結晶の回折強度データに対して適応するための手順について検討を行った。その結果、これまでほとんど顧みられなかった、結合水以外の第 2 層、3 層を含む結晶中の水分子を、座標を特定した構造モデルとして、構造解析計算へ取り込むことが MEM を準原子分解能のタンパク質結晶の回折強度データに対して適応する上で重要である事を見いだした。1.3Å という準原子分解能回折強度データを使った従来の精密化では、十分確認できなかったマルチコンフォーマー残基の特定が、同じ回折強度データを用いた徹底的な MEM による電子密度改良による構造モデル改良をすることで可能になった。さらに、多くの水素原子を付加することも出来た。これらの結果は、これまでの原子分解能解析での構造に照らして妥当であると結論した。

分子置換法・分子置換法はタンパク質の X 線結晶構造解析の主要な構造決定法であるが、構造の相同性が十分高いタンパク質の立体構造モデルがあらかじめ必要であるという制約がある。このためアミノ酸配列の相同性と立体構造の相同性の間の相関が低いタンパク質の構造を決定する場合には、解析出来ない。この限界の緩和・解決を目指して、遺伝的アルゴリズムを取り入れた分子置換法 GA - MR 法の開発に参画した。

\*<sup>1</sup> 客員主幹研究員、\*<sup>2</sup> 客員研究員、\*<sup>3</sup> 協力研究員、\*<sup>4</sup> ジュニア・リサーチ・アソシエイト、\*<sup>5</sup> 研修生

We have been focusing on the structural-based functional analyses for enzymes and receptors related to lipids. These proteins are biologically important and the major targets for the therapeutics for inflammation and immuno-modulation. We also develop new technologies for SR protein crystallography in collaboration.

**(A) Structural based functional study of lipid-related proteins**

**(1) Crystal structure analysis of leukotriene C<sub>4</sub> synthase (LTC<sub>4</sub>S)**

LTC<sub>4</sub>S is the membrane integrated enzyme responsible for biosynthesis of cysteinyl leukotrienes and a potent target for the development of therapeutic agents for inflammatory diseases including asthma. The crystal structure of human LTC<sub>4</sub>S was determined by the MAD method at 3.3Å resolution. We proposed the novel acid-base reaction mechanism to conjugate glutathione to leukotriene A<sub>4</sub> in highly regio- and stereo-specific manner catalyzed by the two arginine residues, of which one plays as a base to activate thiol group of glutathione as the reactive species and the other works as an acid to supply hydrogen for the hydroxyl anion growing in the catalysis. The structure based molecular function analysis of LTC<sub>4</sub>S is going on.

**(2) Expression studies of G-protein coupled receptors (BLT1 and PAFR) using *Pichia pastoris***

Expression system of BLT1 and PAFR with yeast *Pichia pastoris* have been constructed. The factors to be examined were the source of receptors (mouse, human, rat and guinea pig), the N-terminal expression tags ( $\alpha$ PrePro-FLAG, HA, FLAG, His-FLAG, StrepII-FLAG) and the sugar chain deficient mutants (N-terminal and IV-V loop). The <sup>3</sup>H-LTB<sub>4</sub> binding affinity of guinea pig BLT1 mutant (N4A) was comparable to that of native guinea pig tissues (K<sub>d</sub> = 4.3nM, B<sub>max</sub> = 40.0pmol/mg) and suitable for the overexpression for crystallographic studies.

**(3) Expression studies of G-protein coupled receptor using insect cell**

Structural information of GPCRs has significant availabilities for pharmaceutical studies, and most of them are recognized as potential therapeutic targets. In some cases, since GPCRs are extremely low expression *in vivo*, and have difficulties with their over-expression and purification *in vitro*, the development of efficient heterologous expression systems are indispensable for structural studies.

BLT1 is a major receptor for Leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), a potent chemoattractant involved in inflammation and immunoresponse, expressed in some myeloid cells and regulates their activities. Although many pharmacological studies have been reported on BLT1, the structural studies of BLT1 are not advanced, because of insufficiently amount of physiological active receptor. Heterologously expressed human BLT1 using *Drosophila* Schneider 2 (S2) cells has physiological activities compared with its native character. On this point, the systems that we use may combine the two requisites of efficacy for expression of active GPCRs and of simplicity for manipulation.

**(4) Crystallographic studies of squid rhodopsin**

Membrane proteins play a crucial role in many cellular functions. Despite the growing need for the structural information, it is still very difficult to get crystals of membrane proteins. We succeeded in establishing the purification system for a membrane protein, squid rhodopsin, and obtaining crystals suitable for X-ray diffraction.

**(5) Crystallographic analysis of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) specific mouse monoclonal IgG1**

PGE<sub>2</sub> has both inflammation and anti-inflammation actions, and exerts various physiological functions. We have purified the Fab fragment of a highly specific anti-PGE<sub>2</sub> mouse monoclonal IgG from hybridoma cell. PGE<sub>2</sub>-Fab complex were obtained by gel filtration chromatography.

**(B) Structural and functional analysis of other proteins.**

**(1) Structural analysis of the two types of human M1 zinc amino peptidases**

We have tried to purify and crystallize adipocyte-derived leucin aminopeptidase (A-LAP) and aminopeptidase A (APA) including their natives and mutants without modified-sugar chains expressed by insect cells, *Sf9*. The crystal with the 0.1mm corner appeared in the presence of a Ca<sup>2+</sup> ion about APA, but the resolution of the diffraction data was not enough for structure analysis.

**(2) Crystallographic analysis of sialyltransferase from campylobacter.**

Sialic acid on the end of oligosaccharide of the cell membrane surface takes an important biological function on a ligand-acceptor and cell-cell interactions. Sialyltransferases transaminate CMP-sialic acid as a sugar donor to a mucin-type sugar chain of glyco-protein, an asparagine bound carbohydrate chain and a non-reduction end sugar residue of sphingoglycolipid (galactose, N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine and sialic acid). We have been trying to purify the recombinant native and inactive mutant proteins expressed in *E. coli*.

**(3) Purification and crystallization of human calcineurin homologous protein (CHP).**

CHP binds to Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-exchanger (NHE1) and regulates intracellular pH. We have obtained crystals of CHP complex with NHE1 fragment, which diffracted beyond 3 Å resolution.

**(4) High resolution crystal structure of a  $\beta$ -lactamase, Toho-1.**

$\beta$ -Lactamases hydrolytically inactivate  $\beta$ -lactam antibiotics and thus the expression of  $\beta$ -lactamases is a prevalent resistance mechanism of pathogenic bacteria to  $\beta$ -lactam antibiotics. Toho-1 is an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. We succeeded in collecting a data set for the Toho-1/Imipenem complex. Refinements are currently in progress.

**(5) Three-dimensional orientational imaging of single molecule on actin filaments**

Single molecule fluorescence microscopy can visualize the dynamics of a molecule. This method is complementary to the methods based on the static structure of molecules obtained by X-ray crystallography and NMR method.

We are developing the three-dimensional orientation imaging method to determine the conformational change of a protein detected as a change of direction of  $\alpha$ -helices. We used bifunctional rhodamine (BR) to label a specific helix of protein.

We used troponin C (TnC) mutant to attach BR-label, and reconstruct thin filament with F-actin, tropomyosin, TnT and TnI. We have been investigating the method to suppress fluctuation of complex by Brownian motion without interference of conformational change.

(6-8) Structural studies of tropomyosin fragments.

We have solved the crystal structures of tropomyosin fragments past years. In this year, new crystal structure of the same fragment was solved and this structure included novel conformation of the molecules. Then, we can make further discussion about the molecular properties of tropomyosin.

### **(C) Development of novel methodology in protein crystallography.**

#### **(1) Protein crystal evaluation.**

Development of an automatic crystallization observation robot (TERA) contributed to structure determination of a lot of proteins. We have been developing of automatic crystal evaluation system for an enormous number of crystallization images in cooperation with a robotics research group of RIKEN. By uniformity of crystallization plate and photographic condition, the correct rate in the evaluation of crystals reached more than 90%.

#### **(2) Development of novel methodology in protein crystallography.**

High accurate refinement of protein crystal structures – The accurate protein structure determination at the resolution where hydrogen atoms are able to be observed in the electron density map is essential to elucidate details of the non-bonded interactions maintaining protein structure, but it is rare to get a protein crystal diffracting beyond 1 Å resolution at where the hydrogen atoms appear in the map. The MEM (maximum entropy method) is a potential method to overcome the resolution problem, and is popular among the material science but not for protein crystallography. We are developing the protocol, especially in modeling of water structure, to apply the method on the protein crystallographic structural refinement.

Molecular replacement method – The structural similarity between the target and the reference proteins is crucial to the molecular replacement method, because of the fewer searching parameters of the current MR programs in reciprocal space. We start the development of a new molecular replacement system based on the genetic algorithm to extend the searching parameters in real space.

---

## *Staff*

### *Head*

Dr. Masashi MIYANO

### *Members*

Dr. Hideo AGO

Dr. Yasushi NITANAI

Mr. Akihiro YAMAMOTO

Dr. Tetsuya HORI

Dr. Mitsuaki SUGAHARA

Mr. Daisuke IRIKURA<sup>\*1</sup>

Dr. Yo SATOW<sup>\*1</sup>

Dr. Tatsuro SHIMAMURA<sup>\*1</sup>

---

<sup>\*1</sup> Contract Researcher

### *in collaboration with*

Dr. Toshikazu EBISUZAKI (Computational Astrophysics Lab.)

Dr. Akira HATTORI (Cellular Biochemistry Lab.)

Dr. Kuniaki KAWABATA (Distributed Adaptive Robotics Research Unit)

Dr. Naoki KUNISHIMA (Oligomeric Protein Crystallography Team)

Dr. Kayo MAEDA (X-ray Structural Analysis Research Team)

Dr. Takayuki OKAMOTO (Nanophotonics Lab.)

Dr. Masafumi TSUJIMOTO (Cellular Biochemistry Lab.)

### *Visiting Members*

Dr. Shuji AKIYAMA (ERATO, JST)

Dr. Kosuke ARITAKE (Osaka Biosci. Inst.)

Dr. Shuichiro GODA (Grad. Sch. Sci. and Tech., Univ. Nagasaki)

Dr. Hiroshi HASHIMOTO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Hidemi HIRANO (ERATO, JST)

Dr. Hiroshi IMAI (ERATO, JST)

Dr. Katsuaki INOUE (JASRI)

Prof. Tsuyoshi INOUE (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Dr. Satoshi ISHII (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Mr. Mitsusada IWASA (ERATO, JST)

Prof. Yasuhiro KAJIWARA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Dr. Yoshihide KANAOKA (Harvard Med. Sch., USA)

Dr. Chieko KIMURA (ERATO, JST)

Dr. Yuko KURAHASHI (Fac. Human Life Sci., Doshisha Women's College of Liberal Arts)

Dr. Michael LASSALLE (ERATO, JST)

Prof. Yuichiro MAEDA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

Prof. Masayoshi MAEJIMA (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

Dr. Michtaka MASUDA (Nat. Cardiovascular Center)

Dr. Fumiko MATSUMOTO (Neutron Science Research Center, JAERI)

Dr. Yoshiyuki MATSUURA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

Dr. Vladimir MESHCHERYAKOV (ERATO, JST)

Ms. Shiho MINAKATA (ERATO, JST)

Dr. Naoki MOCHIZUKI (Nat. Cardiovascular Center)

Dr. Nanae NAGATA (Osaka Biosci. Inst.)

Dr. Motoyoshi NAKAMURA (ERATO, JST)

Dr. Akihiro NARITA (ERATO, JST)

Dr. Eiji NISHIBORI (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Ms. Naoko ODA (ERATO, JST)

Dr. Hirofumi ONISHI (ERATO, JST)

Dr. David POPP (ERATO, JST)

Prof. Makoto SAKATA (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Prof. Mamoru SATO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Prof. Takao SHIMIZU (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Dr. Toshiyuki SHIMIZU (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Shuichi TAKEDA (ERATO, JST)

Dr. Soichi TAKEDA (Nat. Cardiovascular Center)

Dr. Yojiro TAMURA (General Education, Suzuka Natl. Coll. Technol.)

Prof. Hideaki TSUGE (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)

Mr. Takuro UCHIYAMA (Grad. Sch. Biosci. Biotech., Tokyo Inst. Tech.)  
 Dr. Yoshihiro URADE (Osaka Biosci. Inst.)  
 Ms. Hiroko UTSUNOMIYA (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)  
 Dr. Shigeo WAKABAYASHI (Nat. Cardiovascular Center)  
 Prof. Shozo YAMAMOTO (Grad. Sch. Home Econ., Kyoto Women's Univ.)

#### Trainees

Ms. Mayuko AKABOSHI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Ms. Sae AOYAMA (Grad. Sch. Home Econ., Kyoto Women's Univ.)  
 Mr. Shuheng DAI (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

Mr. Kodai HARA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Hirokazu HIRABAYASHI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Tasuku HIRAYAMA (Grad. Sch. Human and Environmental Studies, Kyoto Univ.)  
 Ms. Asami HISHIKI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Tsuyoshi IMAZAKI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Toshiyasu INUZUKA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)  
 Ms. Saki IRIE (Grad. Sch. Home Econ., Kyoto Women's Univ.)  
 Mr. Toyokazu KOMATSUBARA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Tsuyoshi KONUMA (Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)  
 Mr. Taro KUROSAKI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Ms. Nahoko NAGASAKI (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)  
 Mr. Yoichi NAOE (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Atsushi NOHARA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)  
 Mr. Takashi ODA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Minhao QIAN (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)  
 Mr. Yasuaki TAGAWA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Hironobu TANIMOTO (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)  
 Mr. Mayuki YAMABE (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)  
 Mr. Kazunari YONEDA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

2315--2325 (2006). \*

Takeda S., Igarashi T., Mori H., and Araki S. : "Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold", EMBO J. 25, 2388--2396 (2006). \*

Masuda M., Takeda S., Sone M., Ohki T., Mori H., Kamioka Y., and Mochizuki N. : "Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms", EMBO J. 25, 2889--2897 (2006). \*

Narita A., Takeda S., Yamashita A., and Maeda Y. : "Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study", EMBO J. 25, 5626--5633 (2006). \*

Hori T., Ishijima J., Yokomizo T., Ago H., Shimizu T., and Miyano M. : "Crystal structure of *anti*-configuration of indomethacin and leukotriene B<sub>4</sub> 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase complex reveals the structural basis of broad spectrum indomethacin efficacy", J. Biochem. 140, 457--466 (2006). \*

Aritake K., Kado Y., Inoue T., Miyano M., and Urade Y. : "Structural and functional characterization of HQL-79, an orally selective inhibitor of human hematopoietic prostaglandin D synthase", J. Biol. Chem. 281, 15277--15286 (2006). \*

Ago H., Oda M., Takahashi M., Tsuge H., Ochi S., Katunuma N., Miyano M., and Sakurai J. : "Structural basis of the sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*", J. Biol. Chem. 281, 16157--16167 (2006). \*

Imai H., Narita A., Schroer T. A., and Maeda Y. : "Two-dimensional averaged images of the Dynactin complex revealed by single particle analysis", J. Mol. Biol. 359, 833--839 (2006). \*

Onishi H., Mikhailenko S. V., and Morales M. F. : "Toward understanding actin activation of myosin ATPase: The role of myosin surface loops", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 6136--6141 (2006). \*

Bagautdinov B., Sugahara M., and Kunishima N. : "Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of archaeal 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase homologue PH0634 from *Pyrococcus horikoshii* OT3", Acta Cryst. F 63, 15--17 (2007). \*

Sugahara M., Murai S., Sugahara M., and Kunishima N. : "Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the putative thiamine-biosynthesis protein PH1313 from *Pyrococcus horikoshii* OT3", Acta Cryst. F 63,

#### 誌 上 発 表 Publications

[ 雑誌 ]

( 原著論文 ) \* 印は査読制度がある論文誌

Popp D., Yamamoto A., Iwasa M., and Maeda Y. : "Direct visualization of actin nematic network formation and dynamics", Biochem. Biophys. Res. Commun. 351, 348--353 (2006). \*

Ammar Y. B., Takeda S., Hisamitsu T., Mori H., and Wakabayashi S. : "Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for pH regulation", EMBO J. 25,

56--58 (2007). \*

Popp D., Yamamoto A., Iwasa M., Narita A., Maeda K., and Maeda Y. : "Concerning the dynamic instability of actin homolog ParM", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 109--114 (2007). \*

Nakayama H., Shimamura T., Imagawa T., Shirai N., Itoh T., Sako Y., Miyano M., Sakuraba H., Ohshima T., Nomura N., and Tsuge H. : "Structure of a hyperthermophilic archaeal homing endonuclease, I-Tsp061I: contribution of cross-domain polar networks to thermostability", *J. Mol. Biol.* 365, 362--378 (2007). \*

Narita A. and Maeda Y. : "Molecular determination by electron microscopy of the actin filament end structure", *J. Mol. Biol.* 365, 480--501 (2007). \*

(総説)

山本 雅貴, 宮野 雅司 : "創薬に役立つタンパク質のX線結晶構造解析", *放射線と産業*, No. 110, pp.10-16 (2006).

[ 単行本 ]

(原著論文) \* 印は査読制度がある論文誌

Saito K., Kawabata K., Asama H., Mishima T., and Sugahara M. : "Design of classifier to automate the evaluation of protein crystallization states", *Proceedings of the 2006 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2006)*, Orlando, USA, 2006--5, IEEE Robotics and Automation Society, Orlando, pp.1800--1805 (2006). \*

(総説)

Ago H. and Miyano M. : "Structure basis of the unidirectional catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase. - Toward the vectorial movement across the membrane", *Functional and Structural Biology on the Lipo-network*, edited by Morikawa K. and Tate S., Transworld Research Network, Keala, pp.95--115 (2006).

Maeda Y., Nitanaï Y., and Oda T. : "From the crystal structure of troponin to the mechanism of calcium regulation of muscle contraction", *Regulatory Mechanisms of Striated Muscle Contraction*, Springer, Tokyo, pp.37--46 (2007).

Nitanaï Y., Minakata S., Maeda K., Oda N., and Maeda Y. : "Crystal structures of tropomyosin: flexible coiled-coil", *Regulatory Mechanisms of Striated Muscle Contraction*, Springer, Tokyo, pp.137--151 (2007).

□ 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Saito K., Kawabata K., Asama H., Mishima T., and Sugahara M. : "Design of classifier to automate the evaluation of protein crystallization states", *2006 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2006)*, (IEEE Robotics and Automation Society), Orlando, USA, May (2006).

Imai H., Narita A., Schroer T. A., and Maeda Y. : "The dynactin complex structure revealed by single particle analysis", *2006 Gordon Research Conference on Three Dimensional Electron Microscopy*, Barga, Italy, June (2006).

Ueda K., Kimura C., Aihara T., Ueki S., Miki M., and Arata T. : "Conformational states of tropomyosin molecule on muscle thin filament as studied by site-directed spin labeling ESR", *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*, (Japanese Biochemical Society Molecular Biology Society of Japan), Kyoto, June (2006).

Akiyama S., Yamada S., Sugimoto H., Kumita H., Ito K., Fujisawa T., Nakamura H., and Shiro Y. : "Signal transduction pathway in Histidine Kinase and Response Regulator Complex revealed by joint usage of Crystallography and small-angle X-ray scattering", *13th International Conference on Small-angle Scattering (SAS2006)*, Kyoto, July (2006).

Fujisawa T., Kuwamoto S., Maeda Y., and Okamoto Y. : "The mechanism of pressure-induced oligomerization of heavy meromyosin molecules probed by synchrotron small-angle X-ray scattering", *13th International Conference on Small-angle Scattering (SAS2006)*, Kyoto, July (2006).

Lokanath N. K., Kuroishi C., Sugahara M., and Kunishima N. : "Crystal structure of modular stator subunit E of archaeal H<sup>+</sup>-ATPase from *Pyrococcus horikoshii* OT3", *2006 Meeting of the American Crystallographic Association (ACA 2006)*, Honolulu, USA, July (2006).

Popp D., Yamamoto A., and Maeda Y. : "Crowded hydrophilic surfaces change annealing dynamics of actin filaments", *16th International Microscopy Congress (IMC16)*, (International Federation of Societies for Microscopy), Sapporo, Sept. (2006).

Maeda Y. : "Flexibility and flexibility changes in troponin-tropomyosin complex and the mechanism of regulation of muscle contraction", *Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006*, (National Center of Competence in Research), Brunnen, Switzerland, Sept. (2006).

Maeda Y. : "A mechanism for how the capping protein (CP) caps the actin filament barbed-end, proposed based on the single particle analysis of cryo-EM

- images", 21st European Cytoskeleton Forum, Biopolis, Singapore, Oct.-Nov. (2006).
- Iwasa M., Sano K., Maeda K., Oda T., and Maeda Y. : "An establishment and analysis of recombinant wild-type and mutant human cardiac actins", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Ueda K., Kimura C., Aihara T., Ueki S., Miki M., and Arata T. : "Conformational states of tropomyosin molecule on muscle thin filament", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Yamada S., Sugimoto H., Kobayashi M., Akiyama S., Nakamura H., and Shiro Y. : "Crystal structure of histidine kinase and response regulator complex", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov.(2006).
- Takiguchi K., Nomura F., Inaba T., Takeda S., Saito A. H., and Hotani H. : "Direct observation of process of various transformations that induced into giant liposome", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Uzawa T., Kimura T., Ishimori K., Morishima I., Matsui T., Ikeda-Saito M., Takahashi S., Akiyama S., and Fujisawa T. : "Generality of initial collapse demonstrated by scaling relationship for submillisecond intermediates of protein folding", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Oda T. and Maeda Y. : "Modeling of F-actin", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Japan, Nov. (2006).
- Narita A., Oda T., and Maeda Y. : "Pointed end structure of Actin-Filament", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Nohara A., Ito K., Maeda Y., Kondo T., and Akiyama S. : "Real-Time SAXS observation of assembling-disassembling cycles of cyanobacterial circadian clock proteins", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Akiyama S., Nohara A., Ito K., Maeda Y., and Kondo T. : "Small-angle X-ray scattering studies on assembling-disassembling complexes of cyanobacterial circadian clock proteins", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Bagautdinov B., Sugahara M., and Kunishima N. : "Structure of 6-Pyruvoyl Tetrahydrobiopterin Synthase from *Pyrococcus horikoshii* OT3: Novel Oligomerisation and Substrate Binding Modes", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Aihara T., Nakamura M., Ueki S., Miki M., and Arata T. : "Switch action of troponin I on the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated thin filament as revealed by spin-labeling distance measurement using PELDOR", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Japan, Nov. (2006).
- Takeda S., Narita A., Morii H., and Maeda Y. : "The binding mechanism of capping protein(CP) to barbed and of actin filament", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Ago H., Oda M., Takahashi M., Tsuge H., Ochi S., Katunuma N., Miyano M., and Sakurai J. : "Structural basis of the sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*", Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (AsCA'06/CrSJ), Tsukuba, Nov. (2006).
- Narita A., Mizuno N., Kikkawa M., and Maeda Y. : "A new image analysis to determine the dynein-microtubule complex structure", 51st Annual Meeting of Biophysical Society, Baltimore, USA, Mar. (2007).
- Iwasa M., Maeda K., Narita A., Maeda Y., and Oda T. : "Dual roles of Q137 of actin revealed by use of recombinant human cardiac  $\alpha$ -actin", 51st Annual Meeting of Biophysical Society, Baltimore, USA, Mar. (2007).
- (国内会議)  
Popp D., 山本 明弘, 前田 雄一郎 : "Crowded hydrophilic surfaces change annealing dynamics of actin filaments", 理研シンポジウム「理研・分子研合同シンポジウム：第3回エクストリームフォトニクス研究」, 和光, 4月(2006).
- 山本 明弘, 岡本 隆之, 成田 哲博, Popp D., 前田 雄一郎 : "Imaging of three-dimensional directions of



single fluorophore for determination of  $\alpha$ -helices orientations", 理研シンポジウム「理研・分子研合同シンポジウム：第3回エクストリームフォトンクス研究」, 和光, 4月(2006).

正雄, 荒田 敏昭: "骨格筋の各種再構成フィラメントにおけるトロポミオシンのESR動的解析", 2007年生体運動研究合同班会議, 金沢, 1月(2007).

Popp D., 山本 明弘, 岩佐 充貞, 前田 雄一郎: "Molecular trapping of SipA induced actin filaments near crowded hydrophilic surfaces", 理研シンポジウム「理研・分子研合同シンポジウム：第3回エクストリームフォトンクス研究」, 和光, 4月(2006).

平山 祐, 山本 行男, 中村 志芳, 前田 雄一郎: "蛍光1分子方位計測法に使用する2価蛍光色素の合成と蛋白質への結合", 理研シンポジウム「理研・分子研合同シンポジウム：第3回エクストリームフォトンクス研究」, 和光, 4月(2006).

中村 志芳, 平山 祐, 銭 旻浩, Popp D., 山本 明弘, 前田 雄一郎: "蛍光1分子方位計測法の筋のカルシウム調節機構解明への応用", 理研シンポジウム「理研・分子研合同シンポジウム：第3回エクストリームフォトンクス研究」, 和光, 4月(2006).

前田 雄一郎: "蛋白質分子の動態と機能発現のメカニズムの関係を理解するにはどうしたらよいか", 第2回生物物理学のアプローチによるゲノム情報解析研究会, (名古屋大学), 名古屋, 9月(2006).

山田 齊爾, 秋山 修志, 杉本 宏, 城 宜嗣: "X線結晶回折とX線小角散乱の併用によるセンサーヒスチジンキナーゼ/レスポンスレギュレーター複合体の構造機能解析", 理研シンポジウム「第2回生体分子の分離・解析法の進展: 構造生物学の新技术開発とその応用」, 和光, 10月(2006).

成田 哲博, 武田 修一, 山下 敦子, 前田 雄一郎: "Determination of actin filament end structure by cryo electron microscopy", 日本分子生物学会2006フォーラム「分子生物学の未来」, 名古屋, 12月(2006).

前田 雄一郎: "Newly emerging possibilities in structural biology", 日本分子生物学会2006フォーラム「分子生物学の未来」, 名古屋, 12月(2006).

前田 雄一郎: "タンパク質分子の動態と機能の関係: 動きがおかしいタンパク質は病気を起こす?", 第12回名古屋大学理学懇話会「生命の『核』を衝く: X線でみるタンパク質の動的構造」, (名古屋大学), 名古屋, 12月(2006).

南方 志帆, 似内 靖, 前田 佳代, 小田 直子, 若林 克三, 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と結晶構造から見るトロポミオシンの柔軟性", 2007年生体運動研究合同班会議, 金沢, 1月(2007).

植田 啓介, 木邑 智恵子, 相原 朋樹, 植木 正二, 三木