

# 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、福村<sup>\*1</sup>、四ッ谷<sup>\*2</sup>、米谷<sup>\*2</sup>、城)

ヒトのインドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ(IDO)は必須アミノ酸であるトリプトファンをキヌレニンへ代謝する経路の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。IDOの活性部位付近に存在するアミノ酸残基のうち触媒反応あるいは基質特異性に関与すると考えられる残基の変異体を新たに合計 19 種類デザインし、大腸菌を用いて発現および精製をおこなった。それらの基質(L-およびD-トリプトファン)の代謝活性を測定した。これにより各残基の役割の詳細な議論が可能となり、特にArg231が持つ荷電性および側鎖構造が活性を発揮するには不可欠であることが明らかとなった。ヒトのもう一つの二原子酸素添加酵素であるトリプトファン 2,3 ジオキシゲナーゼの結晶化に初めて成功した。現在 8 Å 分解能の回折データが得られており、今後さらに精製方法および結晶化条件を検討して高分解能構造解析を目指す。

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

マウスのニューログロビン(Ngb)の還元型およびCO結合型の結晶を作成し、結晶構造解析をおこなった。差フーリエ図を計算すると、ヘム鉄へのCO結合によってヘム面が大きく傾きつつ近位側に移動することで遠位ヒスチジンとヘム鉄の間にスペースが生じている様子を示した。これは既に報告されている構造と一致している。

(3) 脂肪酸水酸化酵素チトクロム P450<sub>BS</sub> の触媒機構解析 (永野、金<sup>\*3</sup>、城)

*Bacillus subtilis* 由来のチトクロム P450 (P450<sub>BS</sub>) は過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を利用して、基質である長鎖脂肪酸(パルミチン酸)の水酸化反応を触媒するペルオキシゲナーゼ活性をもつヘム酵素である。本酵素の酸化型の結晶構造はすでに決定されている。本研究では、過酸化水素を利用した水酸化反応の触媒反応機構を解明するために、反応中間体の結晶構造解析を試みた。嫌気条件下で酸化

型酵素の結晶をジチオナイトで還元し、自作のCryo-O<sub>2</sub>-Siterを用いて-40℃、2MPaで酸素分子を導入し、酸素化型(Fe<sup>2+</sup>+O<sub>2</sub>型)の結晶を得た。今後、長波長X線照射による還元法を用いて、結晶中で反応中間体を生成する事を試みる。

(4) ビタミンD代謝酵素の立体構造解析 (杉本、城)

*Streptomyces griseolus* 由来 CYP105A1 はビタミンD<sub>3</sub>を活性型ビタミンD<sub>3</sub>である1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>(1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)に変換する。X線結晶構造解析によりCYP105A1の立体構造を決定した。活性部位の構造に基づき変異体を作成し、活性上昇を試みた。変異体の多くは活性が低下したが、R84AはビタミンD<sub>3</sub>に対する25位水酸化活性および25(OH)D<sub>3</sub>に対する1 $\alpha$ 位水酸化活性において著しい活性上昇がみられた。これらの結果とドッキング解析により基質認識様式に関する考察を得た。

(5) 新規抗がん剤スタウロスポリンの基本骨格を形成するStaPの結晶構造解析 (牧野<sup>\*2</sup>、平野<sup>\*4</sup>、永野)

スタウロスポリンはプロテインキナーゼの強力な阻害剤であり、抗がん作用を示す抗生物質である。スタウロスポリン生合成系の中で、主要な分子骨格を構築する酵素であるStaPとStaDの結晶構造解析を行なった。その結果、StaPは基質非結合型で1.9Å、基質結合型で2.4Å分解能の反射を与える結晶を得ることに成功した。現在、構造解析中である。一方、StaDは、当初精製酵素に非特異的な分解を受けた蛋白質が混入していたが、発現法・精製法を最適化することにより、さらに高く純度の高い試料を得ることが可能になった。またStaDのホモログであるVioBについても平行して精製系の検討を行っている。

(6) 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>\*3</sup>、山本<sup>\*5</sup>、松本<sup>\*4</sup>、城)

一酸化窒素還元酵素(NOR)は嫌気呼吸系の中で一酸化窒素を亜酸化窒素に還元するヘム酵素であり、酸素呼吸の鍵酵素であるシトクロムc酸化酵素の祖先分子と考えられている。NORの反応機構理解の上で鍵となる短寿命なNO複合体を安定に捕捉するため、凍結NORを高圧NOガスに曝露する手法(Cryo-gas-siter)の開発を前

年度に引き続き行った。緩衝溶液の組成を系統的に検討したところ、塩化リチウム、グリセロールなどの抗凍結剤が低温（ $<-70$ ）で凍結試料に気体を浸透させるために必須であることを見出した。さらに、NOR による NO 還元触媒反応を、立体構造を基盤として理解することを目的とし、その三次元結晶化に取り組んでいる。昨年度までに、緑膿菌由来の cNOR に対する特異的なモノクローナル抗体を 10 種類作成した。今年度は、これらの抗体の抗原結合部位 Fab の切り出し及び精製を行い、cNOR との複合体を作成し共結晶化を行った。その結果、いくつかの抗体において、結晶性は良くないものの、単結晶を作成するまでに至った。現在、結晶化に用いる界面活性剤や結晶化条件の検討を行っている。一方、好熱菌の qNOR についても結晶化を開始した。qNOR はメナキノールから電子を受け取り、NO 還元反応を行なう。*Bacillus stearothermophilus* 由来 qNOR の大腸菌での発現系を構築したところ、湿菌体量 75g から 1mg の qNOR を得ることができた。さらに得られた qNOR の結晶化を行ったところ、大きさ  $0.1 \times 0.1 \times 0.04$  の単結晶から分解能  $\sim 3.0$  の回折データを得ることができた。

(7) 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>\*6</sup>）

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し、水素イオンを内膜の内側から外側に能動輸送するウシ心筋チトクロム酸化酵素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。特に酵素に特異的に結合する脂質の構造決定は、最も困難であるが、1.8 Å 分解能で各脂質の X 線構造を決定した。リン脂質極頭部のリン酸基及びコリンのトリメチルアミンは静電的相互作用で、トリアシルグリセロールは 3 つの連続したくぼみで蛋白質内に固定されており、固有の成分である可能性を強く示唆していた。各脂質はサブユニットの配置及びダイマーの安定化、サブユニット III に存在する 3 つのリン脂質は、酸素還元中心への酸素供給の機能を有することを X 線構造は示していた。

## 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なっているものの、HK の環境因子（リガンド）結合に共役した自己リン酸化反応の制御やリン酸基受容による RR の活性化といったタンパク質レベルでのスイッチングのメカニズムは依然不明のままである。

(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)、菊地、城）

ヘムドメインの立体構造から得られる情報では、現在までに分光学的・生化学的研究から得られた情報伝達メカニズムを十分にサポートすることができない。また、分子レベルでより詳細なメカニズムを解明するためには、キナーゼドメインを含んだ全長 FixL の立体構造情報が不可欠である。そこで、全長 FixL の結晶構造解析

を行うことを目指し、結晶化条件の検索に取り組んだ。精製方法の改善等を行いながら結晶化条件の検討を進めたところ、微結晶が得られた。今後、結晶化条件の最適化をさらに進め、立体構造を基盤とした FixL における情報伝達メカニズムの解明を目指す。

(2) ジフテリア菌ヘムセンサータンパク質 ChrS/ChrA の情報伝達機構の解析（中村、城）

ジフテリア菌はヒト上気道粘膜に感染する。細菌増殖に必要な鉄源は主に血液ヘモグロビンのヘムであり、ABC 型輸送タンパク質によって取り込まれる。取り込まれたヘムはヘムオキシゲナーゼ（HmuO）による分解を受け、遊離した鉄が利用される。hmuO 遺伝子は環境中のヘムによって誘導されるが、トランスに作用する遺伝子 chrSA が発見され、ヘムセンサーであることが示唆された。本研究では大腸菌細胞膜に発現させた ChrS がヘム依存的に自己リン酸化されることを初めて示した。この自己リン酸化はヘム依存性であり、ポルフィリンや亜鉛、コバルトポルフィリン錯体では効果がないことが判明した。また、ヘムによる活性化にはセンサードメインの His21 が必須の機能を果たしていることがわかった。

(3) 好熱菌二成分情報伝達系の構造機能解析（山田<sup>\*3</sup>、小林<sup>\*2</sup>、杉本、中村(寛)、城）

好熱菌の ThkA・TrrA 複合体の低分解能構造に、ThkA のセンサー、二量化、触媒ドメイン、および TrrA の高分解能構造を当てはめ、ThkA・TrrA 複合体の原子モデルを構築する事に成功し、以下の新しい知見を得た。(1) センサー・触媒ドメイン間 シート形成がキナーゼ活性を制御している事が示唆された。(2) 触媒ドメインは、リン酸化反応前後で ATP 結合サイトの構造を変化させる事が示唆された。(3) TrrA・センサードメインのヘリックス同士の接触によりリガンド親和性の制御が行われる事が示唆された。一方、自己リン酸化 HK の検出・定量法はこれまで放射性同位元素を用いた方法しかなかった。広島大学の小池グループが開発したマンガンフォスタグは、リン酸モノエステルジアニオン ( $O-PO_3^{2-}$ ) と特異的かつ可逆的に結合する。これを共重合させたアクリルアミドゲル電気泳動とクマジー染色により、自己リン酸化反応後と未反応の HK を分離・可視化することができた。また、画像処理ソフト Image J を使ったこれらタンパクの定量結果は、これまでの RI 法の結果と一致していた。また、本データはフォスタグによるホスホラミデートジアニオン ( $N-PO_3^{2-}$ ) の結合を初めて示したものである。

(4) 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（菊地、小原<sup>\*4</sup>、城）

エチレンは植物ホルモンとして作用し、輸入バナナを追熟させる際など、既に実用化もされている。エチレンの生合成に関する研究は古くから行われているが、エチレン濃度の感知機構に関する詳細は未知な部分が多い。そこで我々はシロイヌナズナ由来のエチレン受容体である ETR1 や ERS1 を大量に発現させ、結晶構造解析も含め、分子レベルでエチレン濃度感知のメカニズムを解明することを目指している。本年度は、昨年に引き続き、酵母 (*Pichia pastoris*) を用いた発現系構築に取り組んだ。

### 3. 新規人工タンパク質の分子設計 (磯貝)

前年度までに設計・合成した人工 Cro 蛋白質は、非協同的な熱変性反応を示した。そこで、協同的なフォールディング反応をデザインするため、人工 Cro 蛋白質の NMR 構造に基づいて、疎水性コアを形成するアミノ酸部位の内 4 つを選んで残基置換し、一連の変異蛋白質を作成した。これらの変異体について熱変性実験を行い、協同的なフォールディング反応を示す人工蛋白質を得た。本結果は、NMR 構造が決定できる様な単一の立体構造の形成は、協同的なフォールディング反応実現のための十分条件とは成り得ず、天然様の協同的なフォールディング特性を実現するためには、さらにアミノ酸配列の絞り込みが必要であることを示す。

### 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 (菊地、福村<sup>\*1</sup>、高<sup>\*4</sup>、Jeyakanthan<sup>\*4</sup>、城)

ポストゲノム時代となり、オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質 (GFP) を用いた *in vivo* イメージングに対する期待が高まっている。近年では、蛍光を発する状態と無蛍光な状態を可逆的に行き来する蛍光タンパク質を用いることで、*in vivo* でのタンパク質-タンパク質相互作用などがより詳細にイメージングもできるようになってきた。Dronpa はそのような可逆的な異性化の特性を持つ GFP 様タンパク質であるが、その異性化のメカニズムは詳細には分かっていない。本年度は理研ビームライン BL44B2 を利用して on-line 異性化システムを構築し、Dronpa における異性化メカニズムを立体構造ベースで解明することに成功した。

(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 (X-ray Absorption Spectrum, XAS) は放射光を利用することで簡単に測定が行え、測定対象の状態を問わずに試料中の金属イオン周辺構造情報を得ることができる。そのため、室温では不安定であり低温を保つことが不可欠な中間体などの構造を知る際には強力なツールとなる。我々は既に SPring-8 のビームラインを利用して金属タンパク質などの生体関連試料を測定することに特化した測定システムを構築し、その有用性を明らかにしてきた。また、このシステムは金属タンパク質における活性部位のモデルと考えられる金属錯体を対象にした XAS 測定にも適していることを確認している。本年度は、不安定種であり、低温かつ溶液状態でのみ存在し得るマンガン金属錯体の反応生成物を quick-scan 法で測定し、生成物のマンガンイオンの配位構造解析を行うことに成功した。

(3) DNA 相同組換えを負に調節する蛋白質 RecX の機能解析 (美川)

RecA は DNA の鎖交換反応を触媒することにより、DNA 相同組換え反応において中心的な役割を果たす。近年、その活性が RecX によって負に調節されることが示されたが、その詳細な機構は明らかにされていない。我々は、この阻害機構を明らかにすることを目的として、高度好熱菌 recX 遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の大量調製を行い、その性質を調べた。その結果、RecX は単量体で存在するアルファヘリックス含量 54% の蛋

白質であり、80 度まで安定であった。さらに、RecX は RecA に直接相互作用し、RecA の単鎖 DNA 依存性 ATP 加水分解活性や DNA 鎖交換反応を阻害することが明らかになった。

(4) 高圧 NMR 法による広い構造空間における蛋白質ダイナミクスの研究 (北原<sup>\*8</sup>)

高圧 NMR 法を用いて、高圧下で安定な蛋白質の準安定状態を捕捉する事により、蛋白質の構造揺らぎ、準安定状態や変性状態への構造転移と蛋白質の機能発現や異常構造転移との関係を議論した。ユビキチンフォルド (UBL) を持つホモログ蛋白質及びドメインを対象に配列、構造、安定性、ダイナミクスの総合的な研究をスタートさせた。翻訳後修飾を行なうユビキチンと、NEDD8 について共通に保存された準安定構造を発見した。翻訳後修飾を行なうその他複数の UBL について高圧 NMR 測定を行なった結果、共通に保存された準安定構造が存在し、蛋白質により中間体の安定性は大きく異なることが分かった。また加圧により水の凝固点を下げ、ユビキチンを用いて蛋白質の低温変性の研究を行なった。圧力と同様に、低温下では準安定構造が安定化するがその割合は圧力のそれに比べ十分小さいものであった。この結果は、圧力が温度に比べ選択的に中間体を安定化する物理量であることを明確に示した。更に、ユビキチンについては高温変性と低温変性が同じ変性状態、すなわち統一した熱容量によって十分説明できることが分かった。蛋白質凝集の観点から、SS 結合を除いた二ワトリリゾチームについて、アミロイドプロトフィブリル形成とモノマーへの圧力解離過程を圧力ジャンプ蛍光分光法により詳しく研究、熱力学量の算出に成功した。

(5) 改変 ssDNA 結合蛋白質を用いた DNA 増幅法の開発 (美川)

RCA とは鎖置換ポリメラーゼとランダムヘキサマーを利用して、その系に存在するプラスミド DNA やゲノム DNA を増幅する反応である。この反応は少量しか存在しない DNA の増幅方法として近年急速に普及しつつある。しかしながら、現在の RCA には増幅効率の悪さや非特異的な増幅を抑えられないなどの問題点がある。我々はこの問題を解決することを目的として、ssDNA の二次構造を緩和してポリメラーゼ反応を助けることが知られる SSB 蛋白質を利用することにした。その結果、我々の作成した変異 SSB 蛋白質を RCA 反応に加えることにより、非特異的な増幅を抑えたより増幅効率の高い RCA を実現することに成功した。

(6) 四次元結晶構造解析法による酵素反応の構造生物学 (河野)

本研究では結晶構造解析を用いてあらゆる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、昨年度得られた構造の精密化と得られた結果の検定ならびに UV/Vis 顕微分光装置によるデータ収集を行った。また、新しい NHase ファミリー蛋白質である Thiocyanate Hydrolase の構造解析

を行った。

(7) マウス由来グリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼの酵素学的解析 (大嶋<sup>\*3</sup>)

グリセロホスホジエステルホスホジエステラーゼ (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。昆虫細胞にて GDE を大量発現させ、単一に精製することに成功した。精製タンパク質のグリセロホスホジエステルに対する酵素活性を確認し、基質特異性を解析した。さらに結晶構造解析を目指して結晶化を行い、複数の条件においてタンパク質の結晶が得られている。

## 5. 大型放射光施設を利用した生体高分子溶液および筋肉中での蛋白質構造の研究 (藤澤、松尾<sup>\*7</sup>)

(1) 高圧 X 線小角散乱法によるフィラメント蛋白質の構造安定性

アクチン、チューブリンなど生体内中で繊維を形成する蛋白質は、ヌクレオチド結合の状態を変えながら、かい離会合をダイナミックに行うことにより発生、分化に大きく関わっている。非常に硬いフィラメントを作る actin、非常に不安定なフィラメントを作る ParM、超高次構造を作る tubulin、リング状と直線状の繊維構造を作る FtsZ に対して、疎水結合とイオン結合による蛋白質間相互作用を微調できる高静水圧力の特性を生かして、各フィラメントの構造安定性を、高圧 X 線小角散乱法を用いて調べた。X 線高圧ジャンプ小角散乱実験によるかい離反応の時定数の違いから、ヌクレオチドの違いと結合蛋白質の違いによる安定性への影響を定量した。

(2) マウス水晶体の白濁化の静水圧力による研究

水晶体の「透明」かつ「高屈折率」という性質は、水晶体中の高濃度クリスタリンにより実現されている。このような、高濃度の蛋白質であるにも関わらず何故透明なのかという疑問には未だ説明されていない。水晶体中のクリスタリン粒子間相互作用の違いにより、透明性の違いが出ているのではないかという仮説に基づき高静水圧力を生後 10 日の白濁した水晶体にかけてみた。圧力をかけると 60MPa 近傍で透明になり減圧すると元に白濁した。さらに、高圧 X 線小角散乱によるその場観察で粒子間相互作用を調べると透明な場合、より粒子間相互作用が弱まり空間的な均一性が高まることが確認された。より定量的な解釈に向けて再現性と散乱データ解析を行う。

(3) PDC (ピルビン酸脱水素複合体) E2 (リポアミド還元酵素 - アセチル基転移酵素)複合体、sHSP の圧力による構築原理

ピルビン酸脱水素酵素複合体の核部分を形成する E2 (リポアミド還元酵素 - アセチル基転移酵素)複合体は正 12 面体構造をしている。E2 は電子顕微鏡トモグラフィによると大きさに分布があり、その揺らぎを、高圧 X 線小角散乱を用いて定量化を試みた。散乱曲線から判

断すると E2 は 360MPa 下でもかい離することは無く、正 12 面体構造を維持し圧力と共に収縮していた。また、small heat shock protein (sHSP)の高圧によるかい離実験も行った。SHSP は円筒形の複合体を形成していることが判明した。

(4) 蛋白質折れ畳み反応の時分割 X 線小角散乱測定

昨年度から引き続いてバルナーゼの折れ畳み中間体を小角散乱実験を用いて研究している。バルナーゼの尿素、及び塩酸グアニジンによる変性の平衡状態による X 線小角散乱測定を行った。バルナーゼはおおよそ 2.1M 塩酸グアニジンで変性した。尿素により変性したバルナーゼの回転半径は 33 であり、塩酸グアニジンにより変性した値とほとんど同じであり、MD シミュレーションの 16.5 と比較して大きく違っていた。外部の研究者の協力を得て MD シミュレーションの比較を行う予定である。さらに、ラクトグロブリンの尿素変性から native 状態への折れ畳み反応を測定した。回転半径の変化はおおよそ 2 ミリ秒の時定数で終了した。今後、X 線小角散乱高速フロー装置を用いてサブミリ秒時分割測定を行う予定である。

(5) X 線小角散乱測定によるリゾチウム変異体アミロイド形成の構造変化

SS 結合を全欠損したリゾチウム変異体 (0SS)、1 本含む変異体 (1SS) 4 種、2 本含む変異体 (2SS) 2 種、ならびに天然型リゾチウム (WT) のそれぞれが形成するアミロイド様フィブリルやプロトフィブリルについて X 線小角散乱測定を行い、以下の知見を得た。0SS フィブリルの直径は 7.8 nm であり、1SS-1 と 2SS 1+2 は細い線維 (それぞれ、6.7-7.2 nm、3.3-4.9 nm 直径) を形成するが、他の変異体線維は 0SS 線維と同程度か、わずかに太い。WT リゾチウムプロトフィブリルならびに成熟フィブリルは、それぞれ 4.4 nm ならびに 9 nm の太さである。これらの知見により、線維の構成および形成機構ならびにそれらの SS 結合との関わりを解明する基盤が確立した。

(6) アクチンとアクチン結合蛋白質ゲルゾリンスーパーファミリー類との複合体の研究

Gelsolin スーパーファミリーと呼ばれる蛋白質群はアクチンと結合し、フィラメントをキャップしたり、繊維束を形成したりしている。Villin, adseverin, cap G, advillin, supervillin, flightless I, protovillin, EhABPH の 8 つの蛋白質に対し、X 線溶液散乱測定を行い溶液中での構造を計測した。また、gelsolin の N 端、C 端、頭部ドメインとそれぞれアクチンとの結合、さらには Ca<sup>2+</sup>に対する構造変化の有無なども調べ、現在解析中である。

(7) X 線小角散乱による RecF, RecR 及び RecF/RecR 複合体の低分解能構造解析

DNA 損傷の結果生じた二本鎖 DNA と一本鎖 DNA のジャンクション領域は相同組換え開始に関わる RecF, RecR 蛋白質複合体に認識され、それにより相同組換え修復が誘導される。近年 RecF 及び RecR 蛋白質の構造が相次いで明らかになったが、RecF/RecR 複合体の構造は明らかになっていない。そこで我々は RecF, RecR 単体、RecF/RecR 複合体の X 線小角散乱測定を行った。まず RecF, RecR 単体の低分解能構造モデルは予想された RecF, RecR の結晶構造とよく一致した。次に RecF/RecR

複合体の測定を行った結果、動的分布関数の形からこの複合体が中空構造を保持していることが明らかになった。これまでの生化学的解析の結果を満たすよう RecF/RecR 複合体モデルの構築を行っている。

## 6. 構造生物学研究の支援業務 (瀧尾、中村(光)<sup>\*4</sup>、高橋<sup>\*7</sup>)

精製タンパク質の品質評価、に播磨理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2月末現在でプロテインシーケンサーによる解析1264件、質量分析による解析1594件、精製タンパク質の SDS-PAGE および Native-PAGE 1250 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(5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(10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の検討に着手した。

<sup>\*1</sup> 研修生 (大阪大学大学院) <sup>\*2</sup> 研修生 (兵庫県立大学大学院) <sup>\*3</sup> 基礎科学特別研究員、<sup>\*4</sup> 協力研究員、<sup>\*5</sup> ジュニア・リサーチ・アソシエイト、<sup>\*6</sup> 客員主管研究員、<sup>\*7</sup> 協力技術員、<sup>\*8</sup> 訪問研究員

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 Bio-metal 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) Human indoleamine 2,3-dioxygenase (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 prepared the 19-type of mutants by site-directed mutagenesis and measured their activities of the dioxygenase reaction. The results suggest the important amino acid residues for the catalysis, which helps to understand the mechanism of the substrate specificity and the catalytic reaction of IDO.

(2) The X-ray diffraction data of CO-bound form of mouse neuroglobin was measured. The difference Fourier maps suggest that upon CO binding the heme group slides into a crevice in the proximal side, which is consistent with the published structure.

(3) Peroxygenase P450 is a unique cytochrome P450 type enzyme which catalyzes the hydroxylation reaction of fatty acid using hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as an oxidant. For elucidation of the catalytic mechanism, the crystal structure of the intermediate was determined using x-ray analysis.

(4) Cytochrome P450SU-1 (CYP105A1) from *Streptomyces griseolus* has an hydroxylation activity for vitamin D<sub>3</sub> to produce the active form of vitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25(OH)D<sub>3</sub>. Substrate specificity for vitamin D<sub>3</sub> by P450s is often crucial to their application for analytical and pharmaceutical purposes. The crystal structure of P450SU1 in the substrate-free form and the analysis of various mutants and the docking calculation of the CYP105A1-vitamin D<sub>3</sub> provided significant information on the substrate recognition within the catalytic pocket.

(5) Staurosporine has attracted much attention due to its powerful anti-tumor activity. StaP and StaD play key roles in staurosporine biosynthesis since main frame of staurosporine is constructed by these enzymes. We have expressed StaP in *E. coli* and purified by conventional methods. Single crystals of substrate-free and -bound forms which diffract at 1.9- and 2.4-Å resolution were obtained. Crystallographic and biochemical analyses of this enzyme are in progress. It was difficult to purify StaD because of its low-heme-content and non-specific degradation, but we managed to obtain high heme-content and pure samples by optimizing expression and purification conditions. We have also started to optimize the conditions of VioB which is a homologue of StaD.

(6) Nitric oxide reductase (NOR) is presumed to be an ancestral enzyme of cytochrome c oxidase which is a central enzyme of aerobic respiratory system. In order to obtain short-lived obligatory catalytic intermediate, NOR-NO complex, we have developed cryo-gas-citer which diffuses gas molecules into frozen protein solution. Screening buffer condition for cryo-gas-citer experiments reveals lithium chloride, glycerol, or ethylene glycol accelerates diffusion of gas molecules into frozen protein solution. We have been also trying to solve the crystal structure of NOR. We have generated 10 monoclonal antibodies specifically bound to *Pseudomonas aeruginosa* cNOR to enhance crystal formation. Using some antibody fragments, crystals of cNOR-Fab complex were obtained. Optimization of the crystallization conditions is in progress. In addition, the crystallization of *Bacillus stearothermophilus* qNOR, which couples the oxidation of menaquinol with the reduction of NO to N<sub>2</sub>O, was also started. We constructed the expression system of the qNOR in *E. coli*, and have obtained the single crystals of the purified enzyme which diffracted X-ray at ~3.0Å resolutions.

(7) Xray structures of all lipids contained in bovine heart cytochrome c oxidase were determined at 1.8 resolution. The head group of each phospholipid(PL) and the fatty acids of triacylglycerol contributed to the specific bindings. 4PLs stabilized dimmer state and 3PLs in subunit III provided pathway and storage for O<sub>2</sub>.

## 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) To elucidate the more details of transduction mechanism in FixL, the three-dimensional structural information of the full-length FixL is imperative. We have started to try

the crystallization of the full-length FixL. As far, we obtained micro crystals which was still insufficient for X-ray diffraction experiments. We will continue the screening of the crystallization conditions to obtain crystals with suitable shapes.

(2) *Corynebacterium diphtheriae* is a causative agent of diphtheria. Heme oxygenase (HmuO) is involved in iron acquisition from the host heme that has been transported thorough an ABC-type heme transporter. We indicated that the chrS protein which was produced in the E. coli membrane catalyzed heme-dependent autophosphorylation reaction. Protoporphyrin and its Co and Zn complexes failed in the kinase activation, suggesting that ChrS is a specific sensor for the heme.

(3) We constructed the atomic model of ThkA•TrrA complex by the fitting of the domain structures (sensor, dimerization, and catalytic domain of ThkA and TrrA) into the complex structure at the resolution of 4.2 Å. The structure revealed new insights as follows: [1] the inter-domain beta sheet between sensor and catalytic domain regulates the kinase activity of ThkA, [2] the ATP binding site of catalytic domain changes the conformation after the kinase reaction, and [3] the inter-domain helical interaction between sensor and TrrA regulates the ligand affinity in the sensor domain. We also develop a new detection method for phosphorylated histidine kinase protein using a polyacrylamide gel co-polymerized with the Phos-tag molecule that binds specifically a phosphoester dianion ( $O-PO_3^{2-}$ ). The quantitative analysis of the phosphorylated histidine kinase with using of the processing software, Image J, corresponds to the result of a current radioisotope method. Moreover, this is the first data that Phos-tag binds a phosphoramidate dianion ( $N-PO_3^{2-}$ ).

(4) ETR1 and ERS1 are believed to be ethylene receptor proteins containing a copper ion. However, the transduction mechanism of ethylene concentration remains still unclear. We have tried to construct their overexpression system using yeast (*Pichia pastoris*) as host. Although western-blot analysis have not yet indicated the expression of the proteins, use of some variant of *Pichia pastoris* will be hold promise to establish the construction system of the recombinant proteins.

### 3. De novo protein design

We had computationally designed a de novo protein that folds into a unique tertiary structure similar to that of a monomeric variant of bacteriophage λ Cro. In the present study, this protein was redesigned to fold cooperatively, based on the solution structure. The present result indicates that amino acid sequences that realize the folding cooperativity are further selected from those that realize a unique tertiary structure.

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

(1) Dronpa is one of switchable fluorescent proteins, which enable us to detect fast movement and tracking of individual proteins in vivo. We introduced lasers and spectrometer into “on-line” by which we can control the isomerization state of the crystals and subsequently collect X-ray diffraction patterns. Based on the structures, we propose a possible mechanism of the reversible photochromism occurred in Dronpa

(2) We have established the measurement system that

suitable for X-ray absorption spectroscopy of metalloproteins and bio-inspired metal complexes in SPring-8 beamlines. A couple of the spectra of structural unknown products of manganese complexes that are stable only in solution at low-temperature were collected by using the system with quick-scan method. The structural information around manganese ion was successfully determined by EXAFS analysis.

(3) In previous year term, we found evolutionally conserved intermediates between homolog proteins, ubiquitin and NEDD8, which have same topology of ubiquitin-fold (UBL) and are post translational modifiers. This study has been extended to other UBL. Similar intermediates are observed in some other post translational modifiers but not in the non-modifiers such as ubiquitin like domains in large proteins. This result suggested the functional relevance of the intermediates to the protein modification systems. Our interests are also focused on the mechanism of amyloid fibril formation in proteins. The disulfide-deficient variant of hen lysozyme was used as a model amyloid protein. The kinetic mechanism of dissociation of the protofibril was studied in detail by pressure-jump Trp fluorescence spectroscopy.

(4) RecA protein plays a central role in homologous recombination by promoting DNA strand exchange. Although RecX protein downregulates the RecA function, the mechanism is not clear. Therefore, we prepared *T. thermophilus* RecX protein and examined its properties. RecX protein existed as a monomer, showed 54%  $\alpha$ -helical content and was stable up to 80 °C. In addition, RecX protein interacted with *T. thermophilus* RecA protein directly and inhibited the ssDNA-dependent ATPase and strand exchange activities *in vitro*.

(5) Rolling circle amplification (RCA) of plasmid or genomic DNA using random hexamers and bacteriophage phi29 DNA polymerase has become popular in the amplification of template DNA. We constructed some mutant SSB proteins from *T. thermophilus* to increase the efficiency of DNA synthesis and the accuracy of RCA. As a result, we succeeded to get one of the SSB mutant protein, which halved the elongation time required to synthesize DNA and eliminated nonspecific DNA products in RCA reactions.

(6) To gain a deeper understanding of the reaction mechanism, we are developing 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. The iron center is activated by photo-driven NO release. This year we refined structures obtained last year, and verification and obtained supporting data by UV/Vis micro-spectro photometer. And, determination of Thiocyanate Hydrolase, that is a new nitrile hydratase family protein, structure by X-ray crystallography.

(7) 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 insect cells and the purified protein was obtained. We have analyzed the enzyme activity of a mouse GDE. Screening of crystallization was successful in several conditions.

### 5. Structural studies on protein solutions using synchro-

### tron small-angle X-ray scattering

RIKEN structural beamline I, BL45XU-SAXS is actively used by Fujisawa and his collaborators including inside and outside RIKEN. The main focus of his studies is the kinetic studies of protein in solution that include submillisecond fast-flow measurements and high pressure experiments. The high pressure apparatus developed by his group has a very small sample volume and can record time-resolved data with transient change of pressures. The pressure perturbation was used for studying weak interaction between proteins, subunits and domains. The physical properties of filamentous proteins, high molecular protein complex, and intact crystalline were studied.

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

We supported researchers of the Harima Institute in protein characterization. This year, more than 1200 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. Tetsuro FUJISAWA  
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\*2</sup>  
Dr. Misa KIM<sup>\*1</sup>  
Dr. Noriyasu OHSHIMA<sup>\*1</sup>  
Dr. Seiji YAMADA<sup>\*1</sup>  
Dr. Satoshi HIRANO<sup>\*2</sup>  
Dr. Jeyaraman JEYAKANTHAN<sup>\*2</sup>  
Dr. Atsuko KOHARA<sup>\*2</sup>  
Dr. Yushi MATSUMOTO<sup>\*2</sup>  
Dr. Mitsuhiro NAKAMURA<sup>\*2</sup>  
Mr. Jun-ichiro TAKA<sup>\*2</sup>  
Dr. Eduardo VOTTERO<sup>\*2</sup>  
Mr. Hiroshi MATSUO<sup>\*3</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. Kazuyuki AKASAKA (Sch. of Biol.-Oriented Sci. and Technol., Kinki Univ.)

Dr. Yoshio GOTO (Sony Corporation)

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)

Dr. Hitomi SAWAI (Okazaki Inst. for Integrative Bioscience, National Inst. of Natural Sci.)

Dr. Naoki SHIBATA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

Dr. Yasuhito SHOMURA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

Prof. Chikashi TOYOSHIMA (IMCB, Univ. of Tokyo)

Dr. Masaki UNNO (IMRAM, Tohoku Univ.)

Mr. Mamoru YAMANISHI (Okayama Univ.)

Prof. Shigeyuki YOKOYAMA (Sch. of Sci., Univ. of Tokyo)

Prof. Shin-ya YOSHIKAWA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

### Trainees

Ms. Eiko FUKUMURA (Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ.)

Mr. Kazumi HATA (Grad. Sch. of Biol.-Oriented Sci. and Technol., Kinki Univ.)

Mr. Hiroshi IMAMURA (Ritsumeikan Univ. Grad. Sch.)

Ms. Miki KOBAYASHI (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

Ms. Erisa KOMETANI (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

Mr. Shusuke KUSAMA (IMRAM, Tohoku Univ.)

Mr. Akihiro MAENO (Grad. Sch. of Biol.-Oriented Sci. and Technol., Kinki Univ.)

Mr. Masatomo MAKINO (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

Mr. Masakazu MORIYAMA (Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo)

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)

---

### 誌 上 発 表 Publications

#### [ 雑誌 ]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文誌

Hirotzu S., Chu G. C., Unno M., Lee D.-S., Yoshida T., Park S.-Y., Shiro Y., and Ikeda-Saito M. : "The Crystal Structures of the Ferric and Ferrous Forms of the Heme Complex of HmuO, a Heme Oxygenase of *Corynebacterium diphtheriae*", J. Biol. Chem. **279**, 11937-11947 (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). \*
- Makino M., Sugimoto H., Sawai H., Kawada N., Yoshizato K., and Shiro Y. : "High-resolution structure of human cytoglobin: identification of extra N- and C-termini and a new dimerization mode", *Acta Cryst. D* **62**, 671-677 (2006). \*
- Nakano N., Okazaki N., Sato S., Takio K., Kuramitsu S., Shinkai A., and Yokoyama S. : "Structure of the stand-alone RAM-domain protein from *Thermus thermophilus* HB8", *Acta Cryst. F* **62**, 855-860 (2006). \*
- Nishimiya Y., Kondo H., Yasui M., Sugimoto H., Noro N., Sato R., Suzuki M., Miura A., and Tsuda S. : "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of  $\text{Ca}^{2+}$ -independent and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent species of the type II antifreeze protein", *Acta Cryst. F* **62**, 538-541 (2006). \*
- Isogai Y. : "Native protein sequences are designed to destabilize folding intermediates", *Biochemistry* **45**, 2488-2492 (2006). \*
- Tanaka A., Nakamura H., Shiro Y., and Fujii H. : "Roles of the heme distal residues of FixL in  $\text{O}_2$  sensing: A single convergent structure of the heme moiety is relevant to the downregulation of kinase activity", *Biochemistry* **45**, 2515-2523 (2006). \*
- Makino A., Ishii K., Murate M., Hayakawa T., Suzuki Y., Suzuki M., Ito K., Fujisawa T., Matsuo H., Ishitsuka R., and Kobayashi T. : "D-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol alters cellular cholesterol homeostasis by modulating the endosome lipid domains", *Biochemistry* **45**, 4530-4541 (2006). \*
- Hayakawa T., Hirano Y., Makino A., Michaud S., Lagarde M., Pageaux J. F., Doutheau A., Ito K., Fujisawa T., Takahashi H., and Kobayashi T. : "Differential Membrane Packing of Stereoisomers of Bis(monoacylglycerol)phosphate", *Biochemistry* **45**, 9198-9209 (2006). \*
- Yoshikawa S., Muramoto K., Shinzawa-Itoh K., Aoyama H., Tsukihara T., Ogura T., Shimokata K., Katayama Y., and Shimada H. : "Reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase", *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 395-400 (2006). \*
- Yoshikawa S., Muramoto K., Shinzawa-Itoh K., Aoyama H., Tsukihara T., Shimokata K., Katayama Y., and Shimada H. : "Proton pumping mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase", *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1110-1116 (2006). \*
- Takarada H., Kawano Y., Hashimoto K., Nakayama H., Ueda S., Yohda M., Kamiya N., Dohmae N., Maeda M., and Odaka M. : "Mutational study on  $\alpha\text{Gln90}$  of Fe-type nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N771", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 881-889 (2006). \*
- Kumar P. K., Thirumananeri K., and Mizuno H. : "Structural basis of HutP-mediated transcription anti-termination", *Curr. Opin. Structural Biol.* **16**, 18-26 (2006). \*
- Hayashi T., Murata D., Makino M., Sugimoto H., Matsuo T., Sato H., Shiro Y., and Hiseada Y. : "Crystal Structure and peroxidase activity of Myoglobin reconstituted with iron porphycene", *Inorg. Chem.* **45**, 10530-10536 (2006). \*
- Uzawa T., Kimura T., Ishimori K., Morishima I., Matsui T., Saito M. I., Takahashi S., Akiyama S., and Fujisawa T. : "Time-resolved Small-Angle X-ray Scattering Investigation on the Folding Dynamics of Heme Oxygenase: Implication of the Scaling Relationship for the Submillisecond Intermediates of Protein Folding", *J. Mol. Biol.* **357**, 997-1008 (2006). \*
- Park S.-Y., Yokoyama T., Shibayama N., Shiro Y., and Tame J. : "1.25 Å resolution crystal structures of human Haemoglobin in the Oxy, Deoxy and Carbonmonoxy Forms", *J. Mol. Biol.* **360**, 690-701 (2006). \*
- Inagaki E., Ohshima N., Takahashi H., Kuroishi C., Yokoyama S., and Tahirov T. : "Crystal structure of *Thermus thermophilus*  $\delta$ 1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase", *J. Mol. Biol.* **362**, 490-501 (2006). \*
- Yamada S., Akiyama S., Sugimoto H., Kumita H., Ito K., Fujisawa T., Nakamura H., and Shiro Y. : "The signaling pathway in histidine kinase and the response regulator complex revealed by X-ray crystallography and solution scattering", *J. Mol. Biol.* **362**, 123-139 (2006). \*
- Kitahara R., Yamaguchi Y., Sakata E., Kasuya T., Tanaka K., Kato K., Yokoyama S., and Akasaka K. : "Evolutionally conserved intermediates between ubiquitin and NEDD8", *J. Mol. Biol.* **363**, 395-404 (2006). \*
- Eleonora S. V., Vladimir V. V., Huajie W., Fujisawa T., and Jin W. Y. : "Autoxidized Phospholipids in Hexane: Nano-self-assemblies Studied by Synchrotron Small-Angle X-ray Scattering", *Langmuir* **22**, 7994-8000 (2006).
- Kitahara R., Okuno A., Kato M., Taniguchi Y., Yokoyama S., and Akasaka K. : "Cold denaturation of ubiquitin at high pressure", *Magn. Reson. Chem.* **44**, S108-S113 (2006). \*
- Kashiwagi K., Isogai Y., Nishiguchi K., and Shiba K. : "Frame shuffling: a novel method for in vitro protein evolution", *Protein Eng.* **19**, 135-140 (2006). \*
- Okazaki N., Kumei M., Manzoku M., Kuramitsu S., Shirouzu M., Shinkai A., and Yokoyama S. : "Structure of a UPF0150-family protein from *Thermus thermophilus* HB8", *Acta Cryst. F* **63**, 173-177 (2007). \*
- Kanaujia S. P., Ranjani C. V., Jeyaraman J., Baba S., Chen L., Liu Z., Wang B., Nishida M., Ebihara A., Shinkai A., Kuramitsu S., Shiro Y., Sekar K., and Yokoyama S. : "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of molybdenum-cofactor biosynthesis protein C from *Thermus thermophilus*", *Acta Cryst. F* **63**, 27-29 (2007). \*
- Kanaujia S. P., Ranjani C. V., Jeyaraman J., Baba S., Kuroishi C., Ebihara A., Shinkai A., Kuramitsu S., Shiro Y., Sekar K., and Yokoyama S. : "Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of DHNA synthetase from *Geobacillus kaustophilus*", *Acta Cryst. F* **63**, 103-105 (2007). \*
- Yamada S., Nakamura H., Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., and Shiro Y. : "Separation of a phosphorylated histidine protein using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis", *Anal. Biochem.* **360**, 160-162 (2007). \*
- Shibata R., Bessho Y., Shinkai A., Nishimoto M., Fusatomi E., Terada T., Shirouzu M., and Yokoyama S. : "Crystal structure and RNA-binding analysis of the archaeal transcription factor NusA", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*



355, 122-128 (2007). \*

Lokanath N. K., Matsuura Y., Kuroishi C., Takahashi N., and Kunishima N. : "Dimeric core structure of modular stator subunit E of archaeal H<sup>+</sup>-ATPase", J. Mol. Biol. **366**, 933-944 (2007). \*

Kohara A., Nakajima C., Yoshida S., and Muranaka T. : "Characterization and engineering of glycosyltransferases responsible for steroid saponin biosynthesis in Solanaceous plants", Phytochemistry **68**, 478-486 (2007). \*

(総説)

城 宜嗣: "日本発の生体機能関連化学の新分野を創ろう", 日本化学会生体機能関連化学部会News Letter **21**, 11 (2006).

水野 洋, Thirumananseri K., クマール ペンメツチャ : "転写制御タンパク質HutPの立体構造とアンチターミネーション機構", 日本結晶学会誌 **48**, 153-159 (2006).

杉本 宏, 永野 真吾, 城 宜嗣: "酸素添加酵素の分子メカニズム", 日本結晶学会誌 **48**, 418-423 (2006).

北原 亮, 横山 茂之, 赤坂 一之: "可変圧力NMR法による新しい蛋白質構造パラダイムの構築", 分光研究 **55**, 10-20 (2006).

藤澤 哲郎: "タンパク質溶液散乱法: 高分解能構造と低分解能構造の橋渡し", 放射光 **19**, 429-436 (2006).

北原 亮, 赤坂 一之: "揺らぐ蛋白質構造の解析: 可変圧力NMRからのアプローチ", 高圧力の科学と技術 **17**, 32-41 (2007).

## 口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Fujisawa T. : "The use of the third generation synchrotron small-angle scattering on protein dynamics in solution: present and future", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2004).

Nagano S. and Poulos T. L. : "Crystal structures of ferrous oxygen-complex of wild-type cytochrome P450cam and its mutants, D251N and T252A: implication for oxygen activation by P450", 14th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience: The 50th Anniversary of Oxygenases Advances and Reflections, Kyoto, Apr. (2006).

Shiro Y. : "Structural basis of O<sub>2</sub> incorporation into Indole Ring Catalyzed by Indoleamine 2,3-Dioxygenase", 14th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience: The 50th Anniversary of Oxygenases Advances and Reflections, Kyoto, Apr. (2006).

Fujisawa T. : "Interpretation of SAXS Data", Innovation in Nanoscale Modeling and Imaging of Biological System (Innovations 2006), Huston, USA, Apr. (2006).

Shiro Y. : "Redox chemistry of NO and O<sub>2</sub> in hemoproteins", Post Hayaishi Symposium at SPring-8 "Chemical Biology of Redox Metalloenzymes", Harima, Apr. (2006).

Fujita M., Sawayanagi T., Tanaka T., Iwata T., Abe H., Doi Y., Ito K., and Fujisawa T. : "Cynchrotron SAXS and WAXD studies on structural change of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystals on heating", 13th Int. Conf. on Small-angle Scattering (SAS2006),

Kyoto, June (2006).

Iyanagi T., Yamamoto K., and Shiro Y. : "CaM activates one-electron reduction of quinones by neuronal nitric oxide synthase", 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Sugimoto H., Shinkyo R., Yoneda S., Kamakura M., Ikushiro S., Shiro Y., and Sakaki T. : "Crystal structure of cytochrome P450SU-1 (CYP105A1) from *Streptomyces griseolus* and molecular docking with its substrate vitamin D<sub>3</sub>", 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Hino T., Kumita H., Fukumori Y., and Shiro Y. : "Crystallographic study of bacterial nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*", 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Fukumura E., Sugimoto H., Nagano S., Takio K., Iyanagi T., and Shiro Y. : "L-Tryptophan 2,3-dioxygenase: expression, purification of recombinant enzyme and characterization of its enzymatic properties", 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Shiro Y. and Sugimoto H. : "Reaction mechanism of heme-containing oxygenases based on their molecular structures", 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Yamada S., Akiyama S., Sugimoto H., Kumita H., Ito K., Fujisawa T., Nakamura H., and Shiro Y. : "Signaling pathway and regulatory mechanism of sensor histidine kinase in two-component system", 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Shinkyo R., Sugimoto H., Kamakura M., Ikushiro S., Shiro Y., and Sakaki T. : "Structure-function analysis of *Streptomyces griseolus* CYP105A1 catalyzing hydroxylation of vitamin D<sub>3</sub>", 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Takahashi S. and Fujisawa T. : "Collapse and Search" Dynamics of Protein Folding Detected by Time-resolved Small Angle X-ray Scattering", 2nd Int. Sympo. on the Frontier of Applied Mathematics, (Tsinghua University), Beijing, China, June (2006).

Aoyama H. : "Towards X-ray structural determination of hydrogen atoms in bovine heart cytochrome c oxidase", Int. Workshop on Reaction Mechanisms of Energy-Transducing Metalloenzymes, Harima, June (2006).

Sugimoto H. : "X-ray structural studies on Indoleamine Dioxygenase", Int. Workshop on Reaction Mechanisms of Energy-Transducing Metalloenzymes, Harima, June (2006).

Yamada S., Nakamura H., and Shiro Y. : "Inter-domain and inter-molecular signaling pathway in two component system: Histidine kinase and response regulator", Satellite Meeting of the 20th IUBMB Int. Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Sendai, June (2006).

Sugimoto H. : "Structural biology of a Tryptophan-Ring cleavage Enzyme: X-ray structure and reaction mechanism of human indoleamine 2,3-dioxygenase", 11th Meet-

- ing of Int. Study Group for Tryptophan Research (IS-TRY-2006 Tokyo), Tokyo, July (2006).
- Matsufuji T., Jinbo Y., Izumi Y., Kumano H., and Fujisawa T. : "Characterization of transient intermediates in the dissociation kinetics of calcium-calmodulin-peptide complex", 13th Int. Conf. on Small-angle Scattering (SAS2006), Kyoto, July (2006).
- Iwamoto H., Inoue K., Fujisawa T., and Yagi N. : "Evolution of insect flight muscle structure as viewed from x-ray fiber diffraction", 13th Int. Conf. on Small-angle Scattering (SAS2006), Kyoto, July (2006).
- Toba S., Iwamoto H., Fujisawa T., Sakakibara H., and Oiwa K. : "Fiber diffraction study on flagellar axonemes of chlamydomonas and the small angle x-ray scattering analysis on the inner-arm dynein c", 13th Int. Conf. on Small-angle Scattering (SAS2006) , , Kyoto, July (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 Int. Conf. on Small-angle Scattering (SAS2006), Kyoto, July (2006).
- Takahashi H., Hayakawa T., Kawasaki Y., Ito K., Fujisawa T., Kodama M., and Kobayashi T. : "Structural characterization of N-Lignoceroyl(C24:0) Sphingomyelin bilayer membranes by SAXS and XRD : a reevaluation", 13th Int. Conf. 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 Int. Conf. on Small-angle Scattering (SAS2006), Kyoto, July (2006).
- Kamimura S., Tamura T., Wakayama J., Noda N., Sugiyama T., Fujisawa T., and Iwamoto H. : "X-ray diffraction analysis of the axonemal structure of sea-urchin sperm flagella", 13th Int. Conf. on Small-angle Scattering (SAS2006), Kyoto, July (2006).
- Takahashi S. and Fujisawa T. : "Collapse and search" dynamics of protein folding detected by time-resolved small angle X-ray scattering", 13th Int. Conf. on Small-angle Scattering (SAS2006), Kyoto, July (2006).
- Jeyaraman J., Kuroishi C., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Shiro Y. : "Crystal Structure of Carbonic anhydrase Complexed with Bicarbonate from *Pyrococcus horikoshii* OT3", 2006 Meeting of the American Crystallographic Association (ACA 2006), Honolulu, USA, July (2006).
- Kitahara R., Yokoyama S., and Akasaka K. : "A new paradigm of protein structures by variable pressure NMR", IMS Symposium on New Frontiers of NMR Molecular Science, Okazaki, July (2006).
- Hatanaka M., Honda M., Ishibe S., Mikawa T., Ito Y., Shibata T., and Yamazaki T. : "Observation of structural changes induced by ATP hydrolysis in a microcrystalline sample of protein-DNA filaments by Solid-State NMR", 22nd Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2006), Gottingen, Germany, Aug. (2006).
- Maeno A., Kitahara R., Dahlquist F., Yokoyama S., Mulder F., and Akasaka K. : "Variable pressure NMR reveals conformational fluctuation around cavities in a protein", 22nd Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2006), Gottingen, Germany, Aug. (2006).
- Kitahara R., Hata K., Yokoyama S., Akasaka K., and Cheng J. : "Variable pressure NMR reveals the energy landscape of BTK SH3 domain", 22nd Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2006), Gottingen, Germany, Aug. (2006).
- Simorellis A., Kitahara R., Yokoyama S., Akasaka K., and Koide S. : "Variable pressure NMR study on multiple conformational states of OspA, a vaccine candidate for Lyme disease", 22nd Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2006), Gottingen, Germany, Aug. (2006).
- Kitahara R., Yokoyama S., Akasaka K., and Kato K. : "Variable pressure NMR reveals similarities and differences in structure and dynamics of ubiquitin-like proteins/domains", Discussions on Protein Hydration and Structural Dynamic: High Pressure and other approaches, Montpellier, France, Aug. (2006).
- Kitahara R., Simorellis A., Maeno A., Yokoyama S., Koide S., and Akasaka K. : "Variable pressure NMR and fluorescence studies on multiple conformational states of OspA, a vaccine candidate for Lyme disease", 4th Int. Conf. on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2006), Tsukuba, Sept. (2006).
- Aoyama H. : "Structures and functions of lipids in bovine heart cytochrome c oxidase", SLS Seminar, Zurich, Switzerland, Sept. (2006).
- Kitahara R., Yokoyama S., Akasaka K., and Kato K. : "Similarities and differences in structure and dynamics of ubiquitin-like proteins/domains", Switzerland-Japan Sympo. on Structural Biology 2006, Brunnen, Switzerland, Sept. (2006).
- Fujisawa T. : "Overview of biological small-angle scattering at SPring-8", 1st EMBL Beamline Workshop 'BIOSAXS @ PETRA-III', (European Molecular Biology Laboratory), Hamburg, Germany, Oct. (2006).
- Fujisawa T. : "Time-resolved X-ray scattering", EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecule , (European Molecular Biology Laboratory), Hamburg, Germany, Oct. (2006).
- Takai Y., Ota M., and Isogai Y. : "A method to evaluate heme-binding affinity on the protein theoretical model", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Ishida M., Yasuda A., Murakami Y., Ota M., Isogai Y., and Imai K. : "Ancestral myoglobins: amino acid sequences, syntheses and oxygen-binding properties", 5th East Asian Biophysics Sympo. 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 Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Hino T., Kumita H., Fukumori Y., and Shiro Y. : "Crystallization of bacterial nitric oxide reductase using monoclonal antibody fragment", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Imamura H., Isogai Y., and Kato M. : "Difference of folding

- properties between natural and de novo cro proteins", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Toba S., Iwamoto H., Fujisawa T., Sakakibara H., and Oiwa K. : "Fiber diffraction study on flagellar axonemes from a wild type and mutant strains of chlamydomonas", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Lokanath N. K., Nakamura M., Ohshima N., Takio K., and Kunishima N. : "First crystal structure of the 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 5-dehydrogenase", 5th East Asian Biophysics Sympo. 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 Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Aoyama H., Shinzawa-Itoh K., Maeda T., Tsukihara T., and Yoshikawa S. : "Lipid movements in bovine heart cytochrome c oxidase depending on crystal packing", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Iwamoto H., Inoue K., Fujisawa T., and Yagi N. : "Molecular mechanism of stretch activation in insect flight muscle as examined by X-ray diffraction", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Kitahara R., Yokoyama S., Akasaka K., and Kato K. : "Probing energy landscape of ubiquitin-like proteins with variable pressure NMR", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Sugimoto H. and Shiro Y. : "Structural basis of O<sub>2</sub> incorporation into indole-ring catalyzed by human indoleamine 2,3-dioxygenase", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Takahashi H., Hayakawa T., Kawasaki Y., Ito K., Fujisawa T., Kodama M., and Kobayashi T. : "Structural investigation on highly asymmetric sphingomyelin (C24:0 SM) bilayers", 5th East Asian Biophysics Sympo and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Isogai Y. : "Structure-based design of folding cooperativity of a de novo cro protein", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Kamimura S., Iwamoto H., and Fujisawa T. : "X-ray diffraction from dynein motors and microtubules in sea-urchin sperm flagellar axonemes", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Aoyama H., Shinzawa-Itoh K., Tsukihara T., and Yoshikawa S. : "X-ray structural determination of hydrogen atoms in bovine heart cytochrome c oxidase", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Takahashi S. and Fujisawa T. : "Collapse and search" dynamics of protein folding detected by time-resolved small-angle x-ray scattering", 5th East Asian Biophysics Sympo. and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).
- Shibata R., Bessho Y., Shinkai A., Nishimoto M., Fusatomi E., Terada T., Shirouzu M., and Yokoyama S. : "Crystal structure of the archaeal transcription termination factor NusA", Joint Conf. of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (ASCA'06/CrSJ), Tsukuba, Nov. (2006).
- Shiro Y. : "Redox Chemistry of Hemoproteins", Kyoto Conf. on Solid State Chemistry Transition Metal Oxides: Past, Present and Future, Kyoto, Nov. (2006).
- Fujisawa T. and Takahashi S. : "Protein folding dynamics detected by time-resolved synchrotron x-ray small-angle scattering technique", 2nd Int. Sympo. on Portable Synchrotron Light Sources and Advanced Applications, (Ritsumeikan University), Kusatsu, Shiga Pref. Jan. (2007).
- Kitahara R. : "Pressure and Protein Dynamics", 3rd Japanese-french Seminar on Structural Dynamics of Proteins, Grenoble, France, Jan. (2007).
- Kitahara R., Gallop M., Yokoyama S., Guittet E., Roumestand C., Heijenoort C.V., and Akasaka K. : "Pressure NMR for protein dynamics", 20eme congres du GERM 2007, Perpignan, France, Mar. (2007).
- Toba S., Iwamoto H., Fujisawa T., Sakakibara H., and Oiwa K. : "Conformational changes of flagellar axonemes revealed by fiber diffraction study of flagella from chlamydomonas strains", 51st Annual Meeting of Biophysical Society, (Biophysical Society), Baltimore, USA, Mar. (2007).
- Shiro Y. : "Intra-and Intermolecular signal transduction of Two-Component regulatory system", Int. Sympo. on Biological Application of Vibrational Spectroscopy, Harima, Mar. (2007).

#### (国内会議)

- 新京 楽, 杉本 宏, 米田 幸世, 澤田 夏美, 鎌倉 昌樹, 生城 真一, 井上 國世, 城 宜嗣, 榊 利之 : "*Streptomyces griseolus*由来CYP105A1の構造と機能の解析", 日本農芸化学会2006年度大会, 京都, 3月(2006).
- 高井 悠紀子, 太田 元規, 磯貝 泰弘 : "ミオグロビンの立体構造を利用したヘム結合フィコシアニンのデザインと合成", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月(2006).
- 新京 楽, 杉本 宏, 米田 幸世, 澤田 夏美, 鎌倉 昌樹, 生城 真一, 井上 國世, 城 宜嗣, 榊 利之 : "ビタミンD水酸化活性を有する放射菌由来CYP105A1の構造と機能の解析", 日本ビタミン学会第58回大会, 徳島, 5月(2006).
- 磯貝 泰弘 : "人工蛋白質のデザインとフォールディング", 関西学院大学理工学部講演会, 三田, 7月(2006).

中林 誠, 柴田 直樹, 中井 恵美, 金川 真由美, 中川 紀子, 倉光 成紀, 樋口 芳樹: "CBSドメインを有するタンパク質TTHA0829:結晶構造とトランスクリプトーム解析に基づいた機能の推定", 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5回連携研究会, 播磨, 8月(2006).

新海 暁男: "Thermus thermophilus HB8株由来の転写因子、cAMPレセプタータンパク質の機能", 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5回連携研究会, 播磨, 8月(2006).

房富 絵美子, 柴田 理恵, 新海 暁男, 西本 まどか, 寺田 貴帆, 白水 美香子, 別所 義隆, 横山 茂之: "古細菌型転写終結因子NusAの結晶構造解析及びRNA結合解析", 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5回連携研究会, 播磨, 8月(2006).

美川 務, 本多 賢吉, 井上 仁, 増田 ときは, 伊藤 隆, 柴田 武彦: "高度好熱菌のDNA相同組換え: 組換え修復を中心に", 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5回連携研究会, 播磨, 8月(2006).

永野 真吾: "緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の一酸化窒素複合体の赤外分光解析を目指して", 文部科学省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2回ワークショップ, 葉山, 8月(2006).

伊藤 和輝, 藤澤 哲郎, 岩田 忠久: "時分割2次元SAXS/WAXS同時測定装置と生分解性高分子研究への応用", 第55回高分子討論会, (高分子学会), 富山, 9月(2006).

犬塚 俊康, 上村 大輔, 藤澤 哲郎, 有本 博一: "パリトキシ分子形状の直接観察: 放射光X線小角散乱測定による水溶液中配座の研究", 第48回天然有機化合物討論会, 仙台, 10月(2006).

山田 斉爾, 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).

菊地 晶裕: "NMR 及び結晶構造に基づくDronpaのPhotoconversionのメカニズム", ボトムアップ若手の会第1回研究会: 物理・化学・生物の融合を目指して, 和光, 11月(2006).

城 宜嗣: "蛋白質分子内および分子間の情報伝達: 二成分情報伝達系", 局所電子構造の理解に基づく物質科学の新展開, 和光, 11月(2006).

藤澤 哲郎: "放射光X線小角散乱を用いたタンパク質溶液構造のダイナミクス", 関西学院大学 環境調和型高分子研究センター/ナノ界面創生研究センター合同シンポジウム: 第1回関学SPring-8シンポジウム, 大阪, 11月(2006).

井上 勝晶, 藤澤 哲郎: "SPring-8における蛋白質溶液散乱の現状と今後の展望", 第10回SPring-8シンポジウム, (SPring-8), 播磨, 11月(2006).

北原 亮, Gallopin M., Roumestand C., 横山 茂之, Guittet E., 赤坂 一之, Heijenoort V.C.: "The combinatory use of relaxation dispersion and

variable pressure NMR for protein dynamics analysis: D<sup>1</sup> domain of annexin I", 第45回NMR討論会, 京都, 11月(2006).

北原 亮, 横山 茂之, 加藤 晃一, 赤坂 一之: "可変圧力NMR法による蛋白質の構造と熱力学デザインについて", 第47回高圧討論会, 熊本, 11月(2006).

小林 美紀, 山田 斉爾, 杉本 宏, 中村 寛夫, 城 宜嗣: "ヒスチジキナーゼThkA触媒ドメインの結晶構造解析", 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).

本多 賢吉, 井上 仁, 伊藤 隆, 柴田 武彦, 美川 務: "DNA組換え修復に関与する蛋白質群の構造と機能", 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).

前島 一博, 伊藤 和輝, 早川 智広, 今本 尚子, 藤澤 哲郎: "X線でヒトゲノムを「見る」: 分裂期染色体と細胞核のクロマチン高次構造", 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).

古角 友宏, 山口 由夏, 大柳 明日香, 斉藤 正男, 城 宜嗣, 中村 寛夫: "ジフテリア菌ヘムセンサーキナーゼChrSのヘム結合部位の検討", 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).

増田 ときは, 吉益 雅俊, 伊藤 隆, 凌 楓, 柴田 武彦, 美川 務: "酵母ミトコンドリアDNAの相同組換え・複製に働くMhr1蛋白質の活性中心残基の解析", 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).

小林 立文, 佐藤 雅俊, 城 宜嗣, 中村 寛夫: "動物細胞におけるヘムの取り込みについて", 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).

吉川 信也, 伊藤-新澤 恭子, 青山 浩, 村本 和優, 杉村 高志, 月原 富武: "チトクロム酸化酵素の脂質の構造と生理機能", 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3回公開シンポジウム, つくば, 12月(2006).

矢野 直峰, 月原 富武, 村本 和優, 伊藤-新澤 恭子, 吉川 信也, 青山 浩: "温度因子を用いたHis, Asn, Gln 側鎖の配向決定法の確立に向けて", 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3回公開シンポジウム, つくば, 12月(2006).

永野 真吾, 山本 啓太, 日野 智也, 松本 悠史, 城 宜嗣: "緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の一酸化窒素複合体の振動分光学的解析", 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3回公開シンポジウム, つくば, 12月(2006).

上村 慎治, 杉山 貴昭, 岩本 裕之, 藤澤 哲郎, 杉本 泰伸, 若林 克三: "ウニ精子ペン毛軸系のX線回折", 2007年生体運動研究合同班会議, (金沢大学), 金沢, 1月(2007).

鳥羽 栞, 岩本 裕之, 藤澤 哲郎, 榊原 斉, 大岩 和弘: "クラミドモナス鞭毛のX線回折: ダイニン腕の構造変化の検出", 2007年生体運動研究合同班会議, (金沢大学), 金沢, 1月(2007).

青山 浩: "ウシ心筋チトクロム酸化酵素の高精度構造解析の現状", 大阪大学蛋白研セミナー「高精度・高

分解能構造解析」, 吹田, 1月(2007).

林 恵子, 杉本 宏, 新京 栄, 山田 雅人, 中林 佐知栄, 鎌倉 昌樹, 生城 真一, 城 宜嗣, 榊 利之: "*Streptomyces griseolus* 由来CYP105A1変異体のビタミンD<sub>3</sub>水酸化活性", 日本農芸化学会2007年度大会, 東京, 3月(2007).

磯貝 泰弘: "人工タンパク質の完全設計と構造決定", 理研シンポジウム「第2回バイオ医工学シンポジウム」, 和光, 3月(2007).