

構造生物化学研究室

Structural Biochemistry Laboratory

主任研究員 前田 雄一郎

MAÉDA, Yuichiro

当研究室の研究対象は筋肉および細胞のアクチン・フィラメントである。アクチンフィラメントは細胞中で多くの重要な機能に関与していることが、近年の細胞生物学の発展で明らかとなってきた。多くの機能の中から、我々は「筋収縮」と、筋収縮の「カルシウム調節」の2つを取りあげて、それらメカニズムを深く理解することを目指す。筋収縮は、アクチンフィラメントとミオシンの滑り運動であり、カルシウム調節は、アクチン結合蛋白質（トロポニン・トロポミオシン）とミオシン分子がアクチンフィラメントに引き起こすアロステリック構造変化であろう。筋の生理学が明らかにしてきた現象を分子のレベルの現象として説明することが我々の目標である。その基本的態度は二点である。第一に、メカニズムの解明のためには、まず蛋白質分子の結晶構造を解明することが不可欠であるとの立場。第二に、しかし、得られた構造からメカニズムに到達することは更に重要であるとの立場、である。

昨年度から本年度にかけて、当研究室では三つの重要な蛋白質の結晶構造解明に成功した。第一は、トロポニン（3量体）。これは筋収縮のカルシウム調節メカニズムの鍵を握る蛋白質である。第二は、CapZ（ α -、 β -ヘテロダイマー）。これはアクチンフィラメントB端キャッピング蛋白質である。第三は、トロポモジュリンの部分（C端半分）；P端キャッピング蛋白質である。これらは多くの研究者から待望されていた成果であり、すべて初めての構造であったために、国際学会の場などで多くの議論がすでに交わされている。しかし、メカニズムを深く理解するとの目標にはまだ距離がある。

今後の研究の中心的な課題は、メカニズムを全面的に理解するために、一方ではより大きな複合体、特にアクチンフィラメント全体の結晶構造を解明すること、他方ではアクチンフィラメント上での蛋白質の動き（構造変化）を捉えることである。また、これらの課題をやり遂げるために、独自の研究方法と技術を開発し、蓄積していくことが依然として重要である。例えば、試料調製技術としての蛋白質大量発現系の開発・整備は不可欠であるし、また構造解析技術として、電子顕微鏡を使った単粒子解析法、X線繊維回折強度の解析法、蛍光1分子の立体方位測定法、などを新たに導入・開発して行く。

特に当研究室には藤澤哲郎先任研究員のグループが所属し、SPring-8の蛋白質小角散乱ビームライン（BL45-XU）の運用とそれを使っている研究を担当している。X線小角散乱法（繊維回折法と溶液散乱法）は複合体の構造を知る上で、また筋肉中あるいは溶液中での分子の構造変化を知る上で重要な方法である。特にビームラインの光源特性が優れていること、解析法が進歩したこと、個々の分子の結晶構造が解明されたこと、などの要因が重なりその重要性は増している。X線小角散乱法の有効性をより高めるため、当研究室では高圧下でのX線溶液散乱測定システムを独自に開発している。

1. トロポニン・トロポミオシンの構造とカルシウム調節のメカニズム

（1）トロポニン・トロポミオシン複合体の構造解析（武田^{*1}，山下，前田（雄）；前田（佳）^{*2}（細胞情報伝達研））

骨格筋および心筋の収縮制御の要となるトロポニン（Tn）・トロポミオシン（Tm）複合体の構造・機能解析を進めている。トロポニンはTnC（カルシウムイオン受容部）、TnT、TnIの3サブユニットから成る複合体、他方トロポミオシンは全長がほぼ α ヘリカル・コイルドコイルから成る細長い分子である。筋の「細い繊維」はアクチンフィラメントにトロポミオシンとトロポニンが結合した複合体である。筋収縮のカルシウム調節はTnCへのカルシウムイオン結合によって細いフィラメントの状態が変化し、ミオシン（モーター分子）との相互作用が調節される。この状態変化の実体を知るためには、トロポニンおよびトロポミオシンの立

体構造およびカルシウム濃度に依存した構造の変化を知ることが不可欠となる。

昨年度までに、調節に必須の部分を含むトロポニン複合体（Tn46k）より2.8 Å分解能のデータを得ていたが、本年度は理研ビームラインBL44B2およびBL45PXで得た2つのMAD（多波長異常分散）データセットより結晶構造を得ることに成功し、2.6 Å分解能で精密化を行っている。これはトロポニン3量体としての初めての結晶構造であり、これによりサブユニット間の相互作用の詳細が明らかになった。さらにこの構造を基により大きな複合体（Tn52k）の結晶を分子置換法により解くことに成功し、3.3 Å分解能で精密化を行った。これらのトロポニンの結晶構造より、トロポニンは複数のサブドメインに分かれ、サブドメイン間の連結は柔軟であることが明らかになった。この柔軟な連結に注目して収縮調節機構の仮説を構築している。

収縮調節機構をさらに詳しく知るためには、Tn/Tm 複合体の結晶構造が必要である。Tn と (Tn 結合領域を含む) 短い Tm 断片との共結晶化が得られ、4.5 Å 分解能程度までのデータ収集に成功している。今後位相決定を行い、モデル構築へと進みたい。

(2) 細いフィラメント上でのトロポニンの形態変化

筋収縮のカルシウム調節メカニズムを知るために、細いフィラメント上でのそれぞれの蛋白質分子の形態と形態変化を解明しようとしている。

(i) トロポニンの位置変化 (佐野, 前田 (雄); 前田 (佳) ^{*2} (細胞情報伝達研))

トロポミオシンの領域 2-4 を削除した変異トロポミオシン D234Tm で再構成した細いフィラメントはカルシウムの有無にかかわらず常に阻害状態をとる。TnI とアクチンの間の蛍光エネルギー移動を D234Tm と正常 Tm とを比較検討して、どのような構造変化が筋収縮制御に必須であるかを調べ、細いフィラメントがカルシウムおよび S1 結合によるトロポニンの位置変化に対応している 3 状態をとることを明らかにした。(福井大学工学部生物工学科, 海氏, 三木氏との共同研究)

(ii) トロポニン C の構造変化 (松本 ^{*2}, 牧野 ^{*3}, 前田 (雄); 前田 (佳) ^{*2} (細胞情報伝達研))

細いフィラメント上での TnC の構造や構造変化を中性子散乱法を用いて調べている。この方法では、蛋白質分子の選択的重水素化とコントラスト変調法を組み合わせることにより、蛋白質複合体中のうち重水素化した特定成分のみからの構造情報を抽出することができる。すでに高重水素化率 (94%以上) の TnC を調製し細いフィラメント中の TnC と交換する方法を確立した。中性子散乱強度を解析した結果、細いフィラメント中の TnC はカルシウムの存在により慣性半径が小さくなり、またフィラメント軸からの距離も小さくなる方向に移動していることが示唆された。現在モデルの精密化を行っている。(原子力研究所先端基礎研究センター, 藤原氏との共同研究)

(3) トロポミオシンの構造と機能

(i) 熱安定性 (佐野, 前田 (雄); 前田 (佳) ^{*2} (細胞情報伝達研))

筋収縮のカルシウム調節機構の中でトロポミオシンはトロポニンと協同して重要な役割を担っている。トロポミオシンがあって始めてアクチンフィラメントの (ミオシン分子との相互作用に見る) 状態変化が協同的となる。この協同性の原因は、トロポミオシンが列車のように head-to-tail に連結してアクチンフィラメントに沿って縦走すること、トロポミオシン分子は全長にわたって平行な 2 本鎖の α -helical coiled-coil 構造であること、そして長さ方向に coiled-coil 構造が安定な部分と不安定な部分があり、しかも分子全体として適当に不安定なこと、に求められよう、構造の不安定さが機能発現 (アクチンの状態変化を協同的にする) に重要であると考えられるが、それを実証したい。そのために、普通のトロポミオシンに比して分子全体がより安定である、あるいは不安定である変異分子を調製することを試みている。安定な部分を切除すれば分子の安定度が低下すると予想したが、実際には反対に安定度は上昇して、この方向での試みは失敗であった。(福井大学工学部生物工学科, 志鷹氏, 海氏, 三木氏との共同研究)

(ii) 結晶化へ (前田 (雄); 前田 (佳) (細胞情報伝達研))

構造の不安定さを理解するには分子の全長にわたる結晶構造が必要であると思われる。すでに N 端付近の断片の結晶構造は既知であるが、現在、分子全体の構造解析に適した結晶は得られていない。そこで蛋白質の立体構造を認識する抗体を得て、この抗体 (Fv) との共結晶を作る目的で、ロブスタートロポミオシンに対する立体特異的なモノクローナル抗体の調製を進めている。(ドイツ・マックスプランク生物物理研究所, Dr. C. Hunte, Prof. H. Michel の協力を得た)

2. アクチンフィラメントおよび細いフィラメント配向ゾルの X 線繊維回折

筋肉の「細いフィラメント」は生体中でフィラメント構造として存在し機能する。機能研究のためにはこれらフィラメント状態の構造を知る必要がある。この目的のために、我々はフィラメントをガラスキャピラリー中に高度に配向させた配向ゾルのシステムをすでに確立し、X 線繊維回折強度から構造情報の抽出を目指してきた。

(1) アクチンフィラメントモデルの精密化 (小田, 前田 (雄))

これまでのアクチンフィラメントの構造研究は、X 線繊維回折と電子顕微鏡を用いて行われてきた。X 線繊維回折は、高分解まで情報を記録することができるが、三次元再構成に必要な構造因子のうち強度しか得られず、モデルのユニークネスに問題がある。また、電子顕微鏡による解析は、フィラメントの回折能が低いため、分解能 30 Å に相当する反射点でさえ著しい強度の減衰が観察され、この分解能を超えることはできていない。そこで、X 線繊維回折からの強度と電子顕微鏡からの位相を使い、分解能 20 Å にて三次元再構成を行った。得られた電子密度図から、フィラメント中では、アクチンのサブドメイン 2 が伸びていること、C 末端の位置がアクチン単量体の結晶構造とは異なり、真下のアクチンサブユニットのサブドメイン 2 の近接に移動していることが示唆された。この研究で、アクチンのみからなるフィラメントの構造については、現在の技術で到達可能な最良のモデルを得たと考えている。(ドイツ・マックスプランク医科学研究所, Mr. H. Stegmann, Dr. R. R. Schröder, Prof. K. C. Holmes; ERATO 難波プロジェクト, 難波氏, 長谷川氏との共同研究)

(2) ファロイジンやドラスタチン 11 の結合部位 (小田, 前田 (雄))

アクチンは細胞骨格を形成する主な蛋白質であり、アクチンの重合・脱重合を伴う細胞骨格の消滅・構築、そして、その制御が細胞の恒常性にとって重要である。ガンなどの疾病ではこの細胞骨格の暴走が起こっている。ファロイジンやドラスタチン 11 など、アクチンフィラメントに結合するペプチドは、脱重合を抑制するので、強制的にこの暴走を抑える対処薬として期待されている。この研究では、これらのペプチドとアクチンとの相互作用を分子レベルで理解するために、アクチン上の結合部位を決定した。

まず結合部位を決定する方法を開発した (詳細は省略)。ファロイジンとドラスタチン 11 は、アクチンフィラメントの別の位置に結合するが、ともに、フィラメント形成に重要な 2 本のストランド間に結合し、この 2 本のストランド

の解離を抑制することによって、フィラメント構造を安定化すると結論された。(米国・アリゾナ大学化学科, Prof. R. B. Bates, Prof. Z. D. Crane, Prof. C. W. Dicus, Prof. B. A. Sufi との共同研究)

(3) 筋肉「細いフィラメント」のカルシウム結合による構造変化(小田, 牧野^{*3}, 西川^{*4}, 藤沢, 前田(雄))

配向ゾルを調製し X 線繊維回折強度から構造情報を得る方法を筋肉の「細いフィラメント」に適用している。近年フィラメントを構成する蛋白質単体の結晶構造が明らかにされているので、この原子構造と X 線繊維回折強度を結合することによって信頼性の高い構造モデルを構築できると考えている。これまで配向ゾル調製法に改良を加えてきた結果, SPing-8 の高輝度 X 線を用いることで高分解能領域まで回折強度を得ることができるようになった。本年度は特に解析に必要なプログラムの改良を行った。予備的な解析の結果では、トロポニンのカルシウム調節に重要な部分の構造はフィラメント軸方向に細長く伸びた構造をしていることが示唆された。これは本年明らかになったトロポニンの結晶構造とよく符号する。現在これらのデータを用いてアクチンフィラメント上でのトロポニンの構造変化のより詳細なモデルを検討中である。(ERATO 難波プロジェクト, 長谷川氏, 難波氏との共同研究)

3. 短く長さの揃ったアクチンフィラメントの調製法の確立をめざして

(1) 計画の全体と発現系の確立(山下, 瀧^{*2}, 似内^{*2}, 岩佐^{*2}, 佐野, 前田(佳)^{*2}, 前田(雄))

筋肉の「細いフィラメント」は複合体として機能を担うので、筋収縮のメカニズムとカルシウム調節のメカニズムを知るには、どうしても複合体全体の立体構造を知ることが必要である。特に蛋白質間の相互作用を理解するためには、X 線結晶構造解析法によってフィラメント全体の原子座標を得る必要がある。ところが「細いフィラメント」の核をなすアクチンは長いフィラメントになり易く、フィラメントの結晶はこれまで不可能とされてきた。そこで、我々は、以下の 4 つの方法をすべて検討して、長さの揃った短いフィラメントを調製して結晶化する課題に挑戦している。

(i) 両端での伸長を抑えるキャッピング蛋白質と、長さを決める「物差し」蛋白質を活用して人工的に作る。

まず、B 端をキャップする CapZ, P 端をキャップするトロポモジュリンの 2 つの蛋白質の結晶構造を解明した。(後述)

(ii) 化学架橋したアクチン・オリゴマーとキャッピング蛋白質との結晶化を試みる。

(iii) アクチンフィラメントをつくりにくいアクチンの変異体をつくり、キャッピング蛋白質との結晶化を試みる。

(iv) 自然界に存在する短いアクチンフィラメントを単離する。この目的でダイナクチン複合体の単離法の改良を試みている。(後述)

この一連の研究の基礎として、以下の蛋白質の発現系をこれまでに確立した。

(a) トロポモジュリンの各種アイソフォームをクローニングし昆虫細胞(Sf9)での発現系を確立した。

(b) 「物差し」蛋白質として使うためトロポミオシンの昆虫細胞(Sf9)での発現系を確立した。

(c) B 端キャッピング蛋白質としては CapZ を使うが、こ

れは既に昆虫細胞での発現系を確立してある。

(d) アクチンの昆虫細胞での発現系を確立しつつある。

(4. 参照)

(2) トロポモジュリンの結晶構造の解明(Krieger^{*3}, 山下, 似内^{*2}, 前田(雄))

トロポモジュリンはアクチン・トロポミオシン・フィラメントの P 端に結合しフィラメントの長さや安定性を制御する蛋白質である。アクチンの重合・脱重合を基にした細胞内オルガネラ輸送において重要な役割を果たしており、また筋肉においてはアクチンフィラメントの長さを一定に保つ仕組みをも担っているらしい。

昨年度に、この蛋白質の C 端半分の結晶構造を解明した。この C 端半分は Leucine-Rich Repeat (LRR) という繰返し構造からなるコンパクトなドメインを形成しており、この構造はアクチンとの結合に使われているらしい。本年度は、得られた結晶構造を詳細に検討して、アクチンとの結合様式と P 端キャッピングのメカニズムについての仮説を提唱した。P 端あたりトロポモジュリン 1 分子が結合し、この分子はフィラメントの伸長点に結合して、そこへのアクチン単量体結合を競合的に阻害するのであろう(米国・ニュージャージー医科歯科大学, Dr. Kostyukova との共同研究)。

(3) トロポミオシン・トロポモジュリンの結合(佐野, 前田(雄); 前田(佳)^{*2}(細胞情報伝達研))

トロポモジュリンは、一方でアクチンと、他方でトロポミオシンと結合しアクチンフィラメントをキャッピングする。現在、トロポモジュリンとトロポミオシンの結合比を確定することを試みている。

(4) CapZ の結晶構造の解明(山下, 前田(雄); 前田(佳)^{*2}(細胞情報伝達研))

CapZ は、アクチンフィラメントの B 端をキャッピングする蛋白質で、筋肉や一般の細胞内でアクチンフィラメントの安定化、フィラメントの配向やネットワークの形成、フィラメントのダイナミクスの制御に重要な役割を担っている。またそのアクチンキャッピング活性は細胞骨格運動の調節物質であるリン脂質によって阻害されることが報告されており、CapZ は細胞情報伝達系からの情報を受けアクチンの重合・脱重合を制御することによって、細胞運動を制御する一役を担っていると考えられる。本研究では、これら CapZ の機能発現のメカニズムを解明するために CapZ の結晶構造を解明した。この蛋白質の構造はこれまでまったく未知であった。

本年度良質の CapZ 結晶を得ることができ、SPinrg-8 の理研ビームライン I (BL45XU) および II (BL44B2) にてその回折強度データ収集を行い、金誘導体および白金誘導体結晶を用いた MAD 法によって 2.2 Å 分解能での立体構造を解明することに成功した。CapZ は α (33 kDa) および β (31 kDa) の異なる 2 つのサブユニットからなるヘテロ二量体蛋白質で、両者のアミノ酸配列に相同性はないが、今回の構造は、両サブユニットが非常に類似した立体構造を取っており、それらが擬似 2 回対称の関係で会合して 1 つの分子を形成していることを示す。さらに、これまでの知見と照合すると CapZ にはアクチン結合部位が 2 箇所存在し、それらがやはり 2 回対称で関係づけられる位置にあると結論された。これはいささか意外である。というのも、

フィラメント端でのアクチン分子の配置は 2/1 らせん対称であるのに、そこに 2 回対称の CapZ が結合している。この対称性の違いを補正して結合を適合させるために、CapZ はホモ二量体ではなくヘテロ二量体構造を取っているものと推測される。

(5) 生体内に存在するフィラメント複合体の結晶化をめざして(瀧^{*2}, 前田(雄); 前田(佳)^{*2}(細胞情報伝達研))

自然界に存在するアクチン・ミニフィラメントとしてダイナクチン複合体を対象に選び、その結晶構造解析を進めるために分離・大量精製に取り組んでいる。ダイナクチンは、ダイニンとダイニンが輸送する積み荷(膜、小胞体、染色体など)の間のリンカーとして働いている分子量約 1.03 MD, 11 種の蛋白質からなる巨大複合体であり、複合体中にアクチンとアクチン様蛋白質(Actin related protein, Arp1)から形成されるミニフィラメントを含む。本年度は、牛脳からこの複合体全体の大量精製に成功した。しかしその直後、国内で狂牛病(BSE)が発見され牛脳の供給が途絶えたため、ブタ脳に切換え、ブタ脳からも複合体を得ることができた。現在、結晶化条件の検索を行っている。(米国、ジョーン・ホブキンス大学, Prof. T. Schroer との共同研究)

4. 昆虫細胞を用いた高効率蛋白質発現系の構築

(1) 発現増強因子(佐野, 前田(雄); 前田(佳)^{*2}(細胞情報伝達研))

大腸菌発現系を用いて得られた蛋白質試料に問題がある場合、従来バキュロウイルス・昆虫培養細胞を用いた発現系が利用されてきた。しかし収量が不足であることも多い。我々は、21 残基からなるロプスター由来のリーダー配列(L21)により、バキュロウイルス発現系において、細胞骨格蛋白質の発現量の大幅な上昇が見られることを見いだした。そこで、L21 の効果の一般性を検討するためにホタル・ルシフェラーゼを発現した。L21 を 5' 非翻訳領域に挿入した場合、その発現量は L21 がいないときに比べ約 7 倍上昇した。さらに L21 の内部配列の検討を行い、L21 に存在する 2 つの sequence element の両方が L21 による発現量の上昇に必須であることを明らかにした。

(2) アクチンの大量発現(岩佐^{*2}, 佐野, 前田(雄); 前田(佳)^{*2}(細胞情報伝達研))

上述の発現促進因子を用いてアクチン発現量も飛躍的に向上することを見いだした。アクチンフィラメントの構造変化と機能発現の関係を深く理解するためには、アクチンを組換え蛋白質として大量に得ることが不可欠であるが、これまで世界のどこでも成功していなかった。現在、精製法の検討を行っている。

5. 大型放射光施設を利用した生体高分子溶液中および筋肉中での構造生物研究

(1) 理研ビームライン I (BL45-SAXS) の高度化(藤澤, 西川^{*4}, 高橋^{*5})

BL45XU において小角散乱ブランチと結晶構造解析ブランチの共同運用を円滑にするために、現在小角散乱で使用している波長を 1.0 Å から 0.9 Å に変更した。それに伴い 0.9 Å 使用時に結晶側の GAP 変更に伴うビーム位置の変動、強度の変化、検出器の応答などを評価した。

(2) 高圧下での蛋白質相互作用研究システムの構築

(i) 電気泳動装置の開発(藤澤, Shtykova^{*3}, 桑本^{*2}, 西川^{*4})

2,000 気圧の高圧下での蛋白質の振る舞いを調べるために native ポリアクリルアミド電気泳動を高圧下で行う高圧電気泳動装置を開発した。標準蛋白質として牛血清アルブミンとアポフェリチンを用いて最適条件を決定し、2,000 気圧下でも電気泳動が正常に行われることを立証した。

(ii) 高圧ストップフロー装置の開発(藤澤, 桑本^{*2}, 西川^{*4})

2,000 気圧下での 2 液混合を行い、蛋白質の構造変化を X 線小角散乱によりモニターする事が可能な装置を開発している。本年度は 2 液混合のミキサー部を改造し、様々な方式の流路を持つミキサーを製作し、その評価を行った。

(iii) 筋蛋白質への応用(桑本^{*2}, 藤澤, 西川^{*4})

X 線小角散乱用高圧ジャンプ装置を用いて平滑筋ミオシン S1, 骨格筋ミオシン S1, 骨格筋ミオシン HMM の分子形態の圧応答を調べる予備実験を行った。実験には単分散系のサンプルが必要とされるため、papain, chymotrypsin そして V8 protease で調製した S1 についての会合特性を調べた。その結果、chymotrypsin 処理による骨格筋 S1 は安定性も高く、ATP 結合に伴って回転半径が 5% 変化した。この系について高圧条件での最適化を行った。(室蘭工科大学大学院工学研究科, 岡本氏との共同研究)

(3) 筋蛋白質と筋肉の構造変化

筋肉中には蛋白質分子が極めて良く秩序だって集合しているので、生きて動いている筋肉からの X 線回折強度には蛋白質分子の形態変化の情報が含まれている。筋肉からの X 線回折強度はそのままでは解釈できないが、主要な構成蛋白質の結晶構造の情報と、また電子顕微鏡で解明された筋細胞中でのこれらの蛋白質の配置についての情報を結合することで、構造変化を解釈することが可能になってきた。

(i) ホタテ貝ミオシンの構造変化(Popp^{*2}, Shtykova^{*3}, 桑本^{*2}, 藤澤, 前田(雄))

筋収縮の張力発生はミオシン分子の“頭振り”に因るとの説のひとつの根拠は、ミオシン分子の ATP 結合部位の状態に対応して結晶中でのミオシン頭部の形態が異なるとの実験結果である。しかし、この対応関係が筋肉中でも成り立つとの証拠はない。ここでは結晶中での形態変化の根拠に使われているホタテ貝柱ミオシンを取上げ、溶液中での構造変化、筋肉中での構造変化を解明する。本年度はホタテ貝ミオシンから均一で X 線溶液散乱法に適したミオシン頭部を単離精製する方法を確立した。

(ii) 甲殻類筋肉の X 線回折(Popp^{*2}, 藤澤, 前田(雄))

従来、カエル筋からの X 線回折強度が解析されてきたが、本研究では甲殻類(ロプスター)筋肉を用いる。この筋肉はアクチンフィラメントが長く、また筋の単位断面積あたり本数が多いので特にアクチンフィラメントの構造変化の測定には有利である。本年度は、本研究に必要な温度制御付きの測定系を構築し、ビームライン BL45 で使用を開始した。

(iii) 架橋処理 X 線回折像による筋肉の細いフィラメント蛋白質の状態研究(藤澤; 鈴木^{*6}(光物性研究チーム, FRS))

骨格筋細いフィラメントの制御システムには、“off”(Ca²⁺ 非結合), “on”(Ca²⁺ 結合), “potentiated”(ミオシン頭

部と強い結合をもつ³の3つの状態がある。生化学的な研究は、“on”状態だけがミオシンと弱い相互作用を与えることを示した。これらの状態間の平衡は、実験条件により容易にシフトするためそれぞれの状態の特徴づけは非常に困難である。この問題を克服するために、我々は3つの状態の骨格筋細いフィラメントをEDCで架橋した。制御蛋白質の状態は、X線回折強度で確認した。“on”状態で架橋した細いフィラメントは第2層線強度を“potentiated”状態のレベルに上昇させることなしに、ミオシン頭部と強く相互作用し、しかもATP分解反応はアクチンにより加速された。これは、生化学的研究からの予想と反対し、EDC架橋してもカルシウム制御系は正常に機能しており、構造の研究に適していることを示している。アクチン第2層線強度と機能の間の非対応は、細いフィラメント制御機構に新たな見識を提供した。(高輝度光科学財団、岩本氏;通信総合研究所、大岩氏との共同研究)

(iv) 微小ビームを用いた単一筋原繊維からの小角X線回折(西川^{*4}, 藤澤)

ピンホールスリットにより0.9 μm に整形したビームを単一筋原繊維に照射したところ、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントで形成される6方格子に対応する回折点を得られた。これにより生体内での秩序構造がサルコメア周期を超えて1mm程度の長さに維持されていることが初めて示された。このマイクロビームを使えば、光学顕微鏡観察に適したサイズの組織から、分子の配置についての情報を得られる。他の生体内秩序構造への応用が期待される。(高輝度光科学財団、岩本氏、若山氏との共同研究)

(4) X線溶液散乱法によるクラミドモナス鞭毛内腕ダイニン亜種cの分子構造(藤澤)

クラミドモナス鞭毛内腕ダイニンは、電子顕微鏡の負染色法観察ではカーボン支持膜上でドーナツ状の頭部から微小管結合部位とされる柄(stalk)と幹(stem)が突出していることが知られている。溶液中での形態を確認するためにダイニンの希薄溶液(0.1mg/ml以下)からのX線溶液散乱を*ab initio*法を用いて三次元形状を推定した。その結果ドーナツ状の頭部と幹は確認されたが柄の部分は頭部の裏側に巻き込んでいような形となった。(通信総合研究所、大岩氏;高輝度光科学財団、岩本氏との共同研究)

(5) CAGリピート病の配列を持つ変異ミオグロビンのフィラメント形成初期課程の研究(田中^{*4}(CAGリピート病研究チーム, BSI) 藤澤, 西川^{*4})

CAGリピート病はCAGリピート配列(ポリグルタミン)が挿入された蛋白質がアミロイドを形成する病気であることが知られている。50個のCAGリピート配列を挿入した変異ミオグロビンのアミロイド繊維形成過程をX線溶液散乱で調べ、繊維を形成する前に回転半径110 Å程度の中間体を経ることが判明した。

(6) 人工設計蛋白質の構造評価(藤澤, 新井^{*7}, 西川^{*4})

2つの緑色蛍光蛋白質EBFPとEGFPからなるキメラ蛋白質のリンカー部分を設計し、その全体構造を溶液散乱により得られた散乱曲線を使って電子密度像を計算した。さらにその低分解能電子密度像に対し高分解能構造をモデリングする事によりリンカー部分の構造を推定した。(米国Scripps研究所, Dr. W. Willyとの共同研究)

(7) 時分割溶液散乱による蛋白質refoldingの研究(鶴澤

^{*8}, 高橋^{*6}, 木村^{*8}, 西川^{*4}, 藤澤)

高速混合型フローセルを用いてチトクロームCの2次構造形成と3次構造形成の相関について初めて実験的に明らかにした。また、アポミオグロビンの構造形成を調べるために様々な状態のアポミオグロビンの溶液構造に対しX線小角散乱測定を行い、サブミリ秒の時分割溶液散乱測定の予備実験を行った。(京都大学大学院工学研究科、秋山氏との共同研究)

^{*1} 科学技術振興事業団さきがけ研究 21 研究員兼務, ^{*2} 研究協力員, ^{*3} 協力研究員, ^{*4} 基礎科学特別研究員, ^{*5} 委託研究生, ^{*6} 共同研究員, ^{*7} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*8} 研修生

Research Subjects and Members of Structural Biochemistry Laboratory

1. Mechanism of Calcium Regulation of Muscle Contraction
2. Mechanism of Muscle Contraction
3. Mechanism of Actin Filament-Dynamics Driven Movement of Cell Organelle
4. Mechanism of Capping and the Stabilization of Actin Filament
5. Establishing New Methods for Structural Analysis of Large Protein Complexes as well as for Studying Movements of Protein Molecules within Complexes
6. Structural Studies on Protein Solutions Using Synchrotron Small-Angle X-ray Scattering

Head

Dr. Yuichiro MAÉDA

Members

Dr. Tetsuro FUJISAWA
Dr. Toshiro ODA
Dr. Soichi TAKEDA
Dr. Atsuko YAMASHITA
Dr. Ken-Ichi SANO
Mr. Akihiro YAMAMOTO
Dr. Yukihiro NISHIKAWA^{*1}
Ms. Inna KRIEGER^{*2}
Mr. Kouji MAKINO^{*2}
Ms. Evgenia SHTYKOVA^{*2}
Mr. Mitsusada IWASA^{*2}
Mr. Shigeo KUWAMOTO^{*2}
Ms. Fumiko MATSUMOTO^{*2}
Dr. Yasushi NITANAI^{*2}
Dr. David POPP^{*2}
Dr. Keiko TAKI^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Kayo MAEDA (Cellular Signaling Lab.)

Dr. Motomasa TANAKA (Lab. for CAG Repeat Diseases, BSI)

Dr. Takuya SUZUKI (Lab. for Tera-Photonics, PRC)

Dr. Hiroyuki IWAMOTO (JASRI)

Visiting Members

Dr. Satoshi TAKAHASHI (Sch. Technol. Kyoto Univ.)

Dr. Yojiro TAMURA (Suzuka Natl. Coll. Technol.)

Trainees

Mr. Yoshikazu TAKAHASHI, (Toray Res. Cen.)

Mr. Takanori UZAWA (Fac. Eng., Kyoto Univ.)

Mr. Tetsunari KIMURA (Fac. Eng., Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Nakasako M., Fujisawa T., Adachi S., Kudo T., and Higuchi S.: "Large-scale domain movements and hydration structure changes in the active-site cleft of unligated glutamate dehydrogenase from *thermococcus profundus* studied by cryogenic X-ray crystal structure analysis and small-angle X-ray scattering", *Biochemistry* **40**, 3069–3079 (2001). *

Kostyukova A. S., Tiktopulo E. I., and Maeda Y.: "Folding properties of functional domains of tropomodulin", *Biophys. J.* **81**, 345–351 (2001). *

Toyokawa H., Fujisawa T., Inoko Y., Nagayoshi T., Nishii Y., Nishikawa Y., Ochi A., Suzuki M., and Tanimori T.: "Performance of a micro-strip gas chamber in solution X-ray scattering", *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **467**, 1144–1147 (2001). *

Nishikawa Y., Fujisawa T., Inoko Y., and Moritoki M.: "Improvement of a high pressure cell with diamond windows for solution X-ray scattering of proteins", *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **467/468**, 1384–1387 (2001). *

Hai H., Sano K., Maeda K., Maeda Y., and Miki M.: "Ca²⁺- and S1-induced conformational changes of reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence energy transfer spectroscopy: Structural evidence for three states of thin filament", *J. Biochem.* **131**, 407–418 (2002). *

Akiyama S., Takahashi S., Kimura T., Ishimori K., Morishima I., Nishikawa Y., and Fujisawa T.: "Conformational landscape of cytochrome *c* folding studied by microsecond-resolved small-angle x-ray scattering", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1329–1334 (2002). *

(総 説)

岩本裕之, 大岩和弘, 鈴木拓, 藤澤哲郎: "活性化された筋収縮蛋白の X 線繊維回折", *SPring-8 利用者情報* **6**, 223–226 (2001).

[単行本・Proc.]

(総 説)

Fujisawa T., Nishikawa Y., and Inoko Y.: "The use of a small-angle X-ray scattering technique with a third-generation synchrotron X-ray source in high-pressure biochemistry", *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, edited by Hayashi R., Elsevier Science, Amsterdam, pp. 615–620 (2002).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Krieger I., Kostyukova A., Yamashita A., Tiktopulo E. I., Fujisawa T., and Maeda Y.: "Crystal structure of the C-terminal half of tropomodulin and the mechanism of P-end capping", *Alpbach Workshop on Molecular Motors*, 2001, (Max Planck Institute for Medical Research), Alpbach, Austria, Apr. (2001).

Oda T. and Holmes K. C.: "Determination of phalloidin position in f-actin using the fibre diffraction data", *10th Ann. Fibre Diffraction and Non-Crystalline Diffraction Workshop*, (Collaborative Computational Project for Fibre Diffraction (CCP13)), Stirling, UK, June (2001).

Takahashi S., Akiyama S., Kimura T., Ishimori K., Morishima I., Nishikawa Y., and Fujisawa T.: "The timing of secondary and tertiary structure formations observed in fast folding processes of globular proteins", *8th CGGH Symp. on New Paradigms of Molecular Chaperones in the Postgenome Era*, (The Biochemical Society of Japan), Sapporo, Aug. (2001).

Oda T.: "Structural analysis of F-actin using X-ray fibre diffraction from filament sols", *Alpbach Workshop on Coiled-coins, Collagen & Co-proteins III*, Alpbach, Austria, Sept. (2001).

Oda T.: "Comparison of F-actin models using X-ray fibre diffraction", *RIKEN Symp. on Int. Workshop on Actin Filament from Structure to Mechanism*, Harima, Nov. (2001).

Yamashita A., Maeda K., and Maeda Y.: "Crystal structure of actin capping protein CapZ", *RIKEN Symp. on Int. Workshop on Actin Filament from Structure to Mechanism*, Harima, Nov. (2001).

Krieger I., Kostyukova A., Yamashita A., Nitanai Y., and Maeda Y.: "Crystal structure of the C-terminal half of tropomodulin: A leucine-rich repeat domain caps actin filament", *RIKEN Symp. on Int. Workshop on Actin Filament from Structure to Mechanism*, Harima, Nov. (2001).

Sano K., Maeda K., Oki M., and Maeda Y.: "Enhancement of protein expression in insect cells: using a leader sequence of lobster tropomyosin cDNA", *RIKEN Symp. on Int. Workshop on Actin Filament from Structure to Mechanism*, Harima, Nov. (2001).

Kimura C., Hai H., Maeda K., Maeda Y., and Miki M.: "The behavior of N-terminal and C-terminal region of TnI on the reconstituted thin filament observed by flu-

- oresence measurements”, RIKEN Symp. on Int. Workshop on Actin Filament from Structure to Mechanism, Harima, Nov. (2001).
- Shitaka Y., Sano K., Hai H., Maeda K., Maeda Y., and Miki M.: “Thermal stability of tropomyosin”, RIKEN Symp. on Int. Workshop on Actin Filament from Structure to Mechanism, Harima, Nov. (2001).
- Hai H., Sano K., Maeda K., Maeda Y., and Miki M.: “Ca²⁺ -and S1-induced conformational changes of reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence energy transfer spectroscopy: Structural evidence for three-states of thin filament”, RIKEN Symp. on Int. Workshop on Actin Filament from Structure to Mechanism, Harima, Nov. (2001).
- Matsumoto F., Makino K., Maeda K., Patzelt H., Maeda Y., and Fujiwara S.: “*In situ* structural information of troponin C on the thin filament obtained by neutron scattering”, RIKEN Symp. on Int. Workshop on Actin Filament from Structure to Mechanism, Harima, Nov. (2001).
- Yamashita A., Maeda K., and Maeda Y.: “Crystal structure of actin capping protein CapZ”, 46th Ann. Meet. of Biophysical Soc., San Francisco, USA, Feb. (2002).
- Krieger I., Kostyukova A., Yamashita A., Nitani Y., and Maeda Y.: “Crystal structure of the C-terminal half of tropomodulin: A leucine-rich repeat domain caps actin filament”, 46th Ann. Meet. of Biophysical Soc., San Francisco, USA, Feb. (2002).
- Takeda S., Yamashita A., Maeda K., and Maeda Y.: “Crystal structure of troponin ternary complex”, 46th Ann. Meet. of Biophysical Soc., San Francisco, USA, Feb. (2002).
- Shtykova E., Fujisawa T., Kuwamoto S., Nishikawa Y., and Maeda Y.: “High-pressure electrophoresis: A tool for investigating protein aggregation state and protein-protein interaction”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- (国内会議)
- 藤澤哲郎: “第3世代放射光 X 線小角散乱の高圧生物化学への応用”, 日本材料学会 149 回高圧部門委員会, 草津, 4 月 (2001).
- 秋山修志, 高橋聡, 原田治幸, 石森浩一郎, 森島績, 西川幸宏, 藤澤哲郎: “マイクロ秒分別の X 線小角散乱とパルスラベル NMR 法で観測したシトロクロム C の折れ畳みランドスケープ”, 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6 月 (2001).
- 松本富美子, 前田佳代, Patzelt H., 大木進野, 前田雄一郎, 藤原悟: “中性子溶液散乱による細いフィラメント上でのトロポニン C 形態の解明”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 海宏, 佐野健一, 前田佳代, 前田雄一郎, 三木正雄: “D234 変異トロポミオシンを使った再構成細いフィラメントの蛍光エネルギー移動測定”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 大岩和弘, Burgess S. A., Walker M., Trinick J., 藤澤哲郎, 岩本裕之, 榎原斉: “X 線回折電子顕微鏡単粒子解析法および X 線溶液散乱法によるクラミドモナス鞭毛内腕ダイニン亜種 c の分子構造の解析”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 山下敦子, 前田佳代, 前田雄一郎: “アクチンキャッピングタンパク質 CapZ の結晶構造解析”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 若山純一, 藤澤哲郎, 岩本裕之: “コントラスト変調法による骨格筋繊維の X 線回折像の解析”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 鶴澤尊規, 秋山修志, 木村哲就, 高橋聡, 石森浩一郎, 森島績, 西川幸宏, 藤澤哲郎: “サブミリ秒 X 線小角散乱測定を用いたアポミオグロビンの折れ畳み過程の研究”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 武田壮一, 山下敦子, 前田雄一郎: “トロポニントロポミオン複合体の結晶化と構造解析の戦略”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 志鷹祐司, 佐野健一, 海宏, 前田佳代, 前田雄一郎, 三木正雄: “トロポミオシンの熱安定性”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- Krieger I., Kostyukova A. S., 山下敦子, 前田雄一郎: “トロポモジュリン C 端半分の結晶構造: LRR ドメインがアクチンフィラメントの P 端をキャップする”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 高橋義和, 西川幸宏, 前田雄一郎, 藤澤哲郎: “一次元溶液散乱曲線から低分解能三次元蛋白質形状の計算-2-”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 田中元雅, 西川幸宏, 町田陽子, 森島績, 藤澤哲郎, 貫名信行: “凝集性アミノ酸配列を有するミオグロビンの性質と構造的特徴”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 木邑智恵子, 海宏, 前田佳代, 前田雄一郎, 三木正雄: “蛍光偏光解消法による TnI の N 端/C 端側と thin filament 構成タンパク質との相互作用の比較”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 岩本裕之, 大岩和弘, 若山純一, 藤澤哲郎: “軽鎖を除去または交換したアクト-S1 複合体の ADP による構造変化の X 線回折”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 田嶋佳子, 牧野浩司, 若林克三: “軟体動物平滑筋のキャッチ状態の構造”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 田中元雅, 町田陽子, 西川幸宏, 赤木巧, 森島績, 端川勉, 藤澤哲郎, 貫名信行: “神経変性における病因遺伝子産物構造変化の解析”, 文科省科研費特定領域研究 C 「先端脳」平成 13 年度班会議, 東京, 12 月 (2001).
- 山下敦子, 前田佳代, 前田雄一郎: “アクチンキャッピングタンパク質 CapZ の結晶構造”, 2002 年生体運動研究合同班会議, 千葉, 1 月 (2002).
- 武田壮一, 山下敦子, 前田佳代, 前田雄一郎: “トロポニンの結晶構造とカルシウム調節のメカニズム”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VII)」, 播磨, 3 月 (2002).