

生体物理化学研究室

Biophysical Chemistry 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ことも知られている。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) 耐熱性一原子酸素添加酵素 CYP119 の各種配位子結合型の結晶構造解析 (足立, 山根^{*1}, 城)

昨年度結晶構造解析に成功した好熱性古細菌 (*Sulfolobus solfataricus*) 由来の耐熱性一原子酸素添加酵素 (CYP119) について、酵素反応機構をより詳細に検討するために種々の配位子 (CO, NO, n-butyl-isocyanide) 結合型結晶を調製し、結晶構造解析を進めた。配位子非結合型構造において、基質結合に関わると考えられる FG ループ周辺部分は熱揺らぎにより電子密度が観測されなかった。この状態に酸素化型モデルとして一酸化炭素 (CO) または一酸化窒素 (NO) を結合させると、FG ループ部分の一部の電子密度が観測されるようになった。さらに立体的にかさ高い n-ブチルイソシアニドを配位子として結合させると、FG ループの主鎖部分の電子密度がほぼすべて観測されるようになった。n-ブチルイソシアニドの n-ブチル基部分は反応基質 (おそらく長鎖脂肪酸) と同様な位置を占めていると考えられ、この結果から基質結合における FG ループ部分の構造変化とその役割について議論した。

(2) 脂肪酸水酸化酵素チトクロム P450Bsβ の結晶構造解析ならびに共鳴ラマン分光法による構造解析 (李^{*2}, 山田 (朱)^{*1}, 尾林^{*3}, 城)

チトクロム P450BSβ は *Bacillus subtilis* 由来のヘムタンパク質で、過酸化水素を利用して長鎖脂肪酸の α 位および β 位の水酸化反応を触媒する。このような水酸化位置の特異性を構造生物学的な面から理解するために、P450BSβ の基質非結合ならびに基質 (ミスチン酸, ラウリン酸) 結合型酵素の X 線結晶構造解析を行った。P450BSβ 単結晶の回折データの収集を SPring-8 BL44B2 にて行い、空間群 $p3_221$, 非対称単位内に 3 分子が入っていることが分かった。Fe 原子を利用した MAD 法で位相を決めた。本酵素の基質結合部位は疎水性アミノ酸残基でできたチャンネルになっており、脂肪酸のカルボキシル基は活性部位であるヘムに近接する I helix に位置する Arg242 残基に結合していた。活性部位周辺は親水的な環境であった。以上の構造情報を基にして、Arg242 を含むいくつかの残基の変異体を作成し、その活性測定ならびに共鳴ラマン分光測定から P450BSβ の反応部位特異性を示すのに重要な酵素-基質相互作用の様

式を分子レベルで決定した。

(3) 二原子酸素添加酵素インドールアミン 2, 3 ジオキシゲナーゼの構造解析 (小田^{*1}, 尾林^{*3}, 城)

インドールアミン 2, 3 ジオキシゲナーゼ (IDO) は、哺乳類の生体内トリプトファン代謝に係わる重要な酵素であり、酸素分子 (O₂) を用いてインドール環に酸素 2 原子を添加する反応を触媒する。この触媒反応の分子機構と構造との関連を理解することを目的に研究を開始した。本年度は、X 線結晶構造解析を目指し、本酵素の大腸菌発現系を構築し、その単離精製・結晶化を試みた。結晶化と平行して、共鳴ラマン分光法を用いた活性部位周辺の構造解析を行った。鉄への配位子結合の特徴ならびに鉄結合配位子と基質 (トリプトファン) との相互作用も検討した。

(4) 肝硬変細胞にのみ発現するヘムタンパク質の構造機能解析 (澤井^{*1}, 城)

星状細胞は肝臓を形成する細胞の 1 つである。肝硬変などの病気で肝臓が繊維化した際にのみ、この星状細胞中にヘムを含むタンパク質 (STAP) が発現することが近年発見された。ヘモグロビン, ミオグロビン, ニューログロビンに続く人間における 4 番目のグロビタンパク質である。この STAP の構造機能を解析するために、本年度は大腸菌中で組換え体が発現する系を構築し、さらにこの発現系を用いて多量の精製タンパク質を得ることに成功した。6 種類のヒスチジン変異体を作製し、分光 (可視光吸収, 赤外吸収および共鳴ラマン) 測定を行った結果、鉄の軸配位子は His81 と His113 と決定した。酸化還元電位測定 ($E_{1/2} = +20$ mV) の結果と合わせて、これら軸配位子の特徴を検討した。また、結晶構造解析を目指して、結晶作製も開始した。

(5) 赤外分光法による光合成水分解反応の解析 (野口, 杉浦^{*4})

光合成水分解反応 (酸素発生反応) の反応メカニズムに関しては、S 状態と呼ばれる 5 つの中間状態 (S₀-S₄) の光駆動サイクルによって反応が進むということ以外、未だほとんど解明されていない。特に、基質である水分子がどのステップで反応系に入るのか、また、プロトンがどの段階で解離するのかという基本的な問題にすら、確かな結論が得られていない。そこで、水和の量 (= 基質の量) を変化させた光化学系 II タンパク質における水分解反応を、フー

リ工変換赤外分光法を用いてモニターし、水和量と反応効率の関係性を調べた。まず、ラン藻より調製した光化学系 II コア標品を用いて乾燥フィルムを作り、密閉セル中で湿度を変えることによって、水和量の異なる試料を作成した。そして、それぞれの試料で、閃光誘起 FTIR 差スペクトルで測定し、 $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$, $S_3 \rightarrow S_0$ の各中間状態遷移の反応効率をシミュレーションにより計算した。その結果、 $S_2 \rightarrow S_3$ および $S_3 \rightarrow S_0$ 遷移が $S_0 \rightarrow S_1$ および $S_1 \rightarrow S_2$ 遷移よりも水和量に対する感受性が強く、より乾燥した試料での反応効率が低くなった。このことから、基質水分子、もしくはプロトンの反応系での出入りは、 $S_2 \rightarrow S_3$ および $S_3 \rightarrow S_0$ 遷移において起こることが強く示唆された。

(6) ウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶構造解析 (青山, 吉川^{*5})

チトクロム酸化酵素は哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖の末端に位置し、チトクロム c から電子を受け取り、酸素を水にまで還元するとともに水素イオンを膜の内側から外側へと能動輸送する分子量約 20 万の膜タンパク質複合体である。この酵素の酸素還元メカニズムを明らかにするためには、種々の酸化状態や反応中間体の詳細な構造が不可欠である。そこで結晶用の顕微吸収分光計を作製し、X 線照射前後の吸収スペクトルを測定したところ、酸化型結晶はわずか 2 秒の露光で、水和電子による還元反応が起こっていることが明らかとなった。そこで、できるだけ X 線による還元の影響を少なくするため、1 個の結晶への露光時間を 1 秒だけとして、約 500 個の結晶を用いて、X 線回折データを収集し、これを酸化型結晶のデータセットとした。また水素イオン能動輸送機構の解明のために、さらに高分解能の反射を示す結晶の作製を試みた。本酵素のような膜タンパク質の結晶化では、可溶化させる界面活性剤の種類の選択は非常に重要であり、市販品ではデシルマルトシドが最も良い結晶が得られた。そこでこのデシルマルトシドをリード化合物として、全く新しい界面活性剤の合成を行ったところ、3-オキサトリデシルマルトシドを用いると結晶が得られた。現在さらに結晶化条件のスクリーニングを行っている。

(7) *Pseudomonas aeruginosa* 由来の一酸化窒素還元酵素の構造と機能に関する研究 (汲田^{*3}, 城)

一酸化窒素還元酵素 (NOR) はバクテリアの脱窒過程において一酸化窒素 (NO) を亜酸化窒素 (N_2O) に還元するチトクロム bc 型の膜貫通タンパク質である。脱窒反応に関わる他の酵素における研究が進む中で、NOR はその熱安定性の低さのため最近になるまで単離・精製は成功していなかった。また、NOR はアミノ酸の一次構造の解析から、哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖の末端酸化酵素であるチトクロム酸化酵素との類似性が見いだされ、生物の呼吸過程の進化を探る上で特に注目されている。本年度は *Pseudomonas aeruginosa* 由来の NOR について精製法を検討し、純粋なサンプルを多量に得ることに成功した。結晶化を開始した。次年度においては、各種分光学的、生化学的手法を用い、構造と機能の相関について解析を行う予定である。

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

(1) 酸素センサータンパク質 FixL/FixJ 系の情報伝達機

構の解析 (中村, 斉藤^{*6}, 穂本^{*7}, 細野^{*6}, 田中^{*6}, 城)

根粒菌のヘム結合型酸素センサー FixL/FixJ タンパク質はそれぞれ二成分情報伝達系のヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターであり、FixL は酸素存在下 (酸素結合型) ではキナーゼ活性が抑制され、低酸素下 (酸素解離型) では ATP 依存性キナーゼ活性が上昇し、自身のヒスチジンをリン酸化する。FixL からリン酸基を受け取った FixJ は転写因子として活性化され、*nifA*, *fixK* 遺伝子を発現させることにより窒素固定酵素を誘導合成する。酸素の認識機構、リン酸化反応などへの情報変換機構、遺伝子発現機構などの一連の情報の流れを分子または原子レベルで解明すること目的として研究を行っている。本年度は、酸素 (O_2) 同様二原子分子である一酸化炭素 (CO), 一酸化窒素 (NO) では FixL の自己リン酸化活性を抑制できないことを見いだした。UV ラマン共鳴スペクトル測定ならびに種々の変異体の活性測定によって、ヘム遠位側アミノ酸が酸素分子の特異的な認識に関与していることが示唆された。今回の結果から、FixL は酸素のみが生理的リガンドとなる、文字どおり酸素センサーであることが明らかとなった。

ところで、二成分情報伝達系のヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターはそれぞれヒスチジンとアスパラギン酸がリン酸化されるが、リン酸化されたヒスチジンならびにアスパラギン酸は、酸あるいはアルカリに対して不安定であるため、通常のゲル電気泳動後の酸/アルコール固定、乾燥では定量的な解析が不可能であった。そこで、これらの処理を行わず、放射性標準 ATP を用いてゲル中のリン酸基を定量する方法を確立した。この方法は反応液中の複数のタンパク質のリン酸化レベルを簡便かつ正確に定量できる利点を持つ。

(2) 好熱菌由来のヒスチジンキナーゼを含む二成分系キメラタンパク質の設計 (汲田^{*3}, 山田 (齊)^{*2}, 中村, 城)

二成分情報伝達系では、シグナル受容ドメインの構造が多種多様であるのに対し、ヒスチジンキナーゼドメインにおけるアミノ酸配列の保存度は高い。そこで二成分情報伝達系における分子機構の一般性を理解することを目的として、FixL のヘム含有ドメインに好熱菌由来のヒスチジンキナーゼを融合したキメラタンパク質の設計を行った。用いた好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来のヒスチジンキナーゼドメインは、FixL との一次構造における相同性は 30% であった。熱安定性が高く結晶化しやすいとされる好熱菌由来タンパク質の特徴を活かし、FixL のセンサードメインによるキナーゼ活性の制御機構に関して、分光学的、構造生物学的見地から検討を行った。このキメラタンパク質の遺伝子は、PCR 法により FixL のセンサードメインの下流に結合位置を変化させて 5 種類を作製し、大腸菌による大量発現を行った。精製された 5 種類のキメラタンパク質はいずれもヘムを取り込んだ状態で安定に存在し、分光学的性質は酸素結合・非結合型共に野生型 FixL と類似していた。しかし、これらのキメラタンパク質ではセンサードメインにおける酸素の結合/解離によってヒスチジンキナーゼの活性は制御されなかった。これは野生型のセンサーキナーゼにおいて各ドメインが単に化学結合により連結されたのではなく、情報伝達を達成するためにドメイン間の配向およびそれにより決定される相互作用が厳密に制御されていることを示唆する結果である。

(3) エチレン受容体タンパク質 ETR1 の活性部位構造解析 (菊地^{*3}, 中村, 足立, 藤嶋^{*1}, 城)

エチレンガスは、植物ホルモンとして植物の発生から枯死にいたる成長や分化の各過程を制御するだけでなく、環境ストレスの伝達など様々な細胞応答にも関与している。エチレンの受容体タンパク質である ETR1 は二成分系に属するセンサータンパク質であり、センサードメインには銅イオンが含まれているとの報告がなされている。昨年度までに、ETR1 のセンサードメインの大量発現の構築に成功しており、結晶化条件の検索を進めてきた。現在までに、結晶性の固体が得られるような条件のいくつかを見出すことに成功した。今後、さらに良質な単結晶を目指し、結晶化条件の検索を続けていく。また、エチレン処理の有無で Cu K-edge の X 線吸収スペクトル (XANES) が変化することを既に明らかにしているが、その理論的な解析を行った。その結果、1 つのシステインと 2 つ (ないしは 3 つ) のヒスチジンが銅イオンに配位した構造を考えると、実測のデータと矛盾しないことを示すことができた。

3. 新規人工タンパク質の分子設計 (磯貝, 石田^{*7})

既存の天然タンパク質とは独立に新しい機能を持った人工タンパク質が設計できるようになれば、タンパク質の構築原理研究のみならず、その応用範囲は甚大である。本研究では、計算と実験室進化実験を組み合わせることによって、天然タンパク質のアミノ酸配列情報に依存しない人工タンパク質の設計を行っている。本年度は、新しく開発した分子設計用ポテンシャル関数を用いて、天然の DNA 結合タンパク質 λ Cro の立体構造を安定化するアミノ酸配列の設計を行った。この配列をコードする人工タンパク質を合成し、生化学的な解析を行ったところ、ターゲットとしたダイマー構造をとっていなかった。そこで、疎水性コアの中に部位特異的ランダム変異を導入し、native PAGE 解析により、重合状態に関してセレクションを行った。選択された人工タンパク質は、全長 60 残基中 4 残基の置換が導入されており、ターゲットとしたダイマー構造と天然様の立体構造特性を示した。また、タンパク質立体構造中での残基間接触によるアミノ酸側鎖構造のエントロピー変化を計算した。この結果を参照して人工グロビンの再設計・再合成を行ったところ、NMR によって検出される構造特異性が改善された。

4. タンパク質構造解析測定法の開発と応用

(1) タンパク質結晶の超高分解能結晶構造解析 (足立, 李, 野中^{*4}, 森本^{*4}, 栗栖^{*4}, 城)

理研ビームライン II (BL44B2) を利用して、1 Å 分解能を超える超高分解能結晶構造解析を更に推進した。一酸化窒素還元酵素 P450nor について 1.0 Å 分解能の構造精密化を進め、水素原子を含めた構造モデルを得た。結晶学的 R 値は 10.2% であった。1.0 Å 分解能結晶構造では、低分解能解析では明らかでなかったアミノ酸主鎖、側鎖、配位子の構造多型が数多く観測され、また活性中心であるヘム鉄近傍の配位構造をより精密に決定することができた。精密化した構造を基に、分子内の全てのペプチド結合および側鎖の二面角の分布を調べたところ、通常構造精密化の際に用いられる制限値とは有意に異なる分布が得られ、構造精

密化パラメータの一部見直しが必要であることが明らかとなった。

(2) タンパク質結晶の反応中間体結晶構造解析 (足立, 李, 神山^{*4}, 山口^{*4}, 城; 小森, 三木 (理論構造生物学研))

昨年度から理研ビームライン II に設置された顕微分光装置を利用して、タンパク質結晶中に生成する反応中間体の構造解析を進めている。一酸化窒素還元酵素 P450nor では鉄 3 価 NO 結合型結晶に X 線照射すると結晶の可視吸収スペクトル変化が観測され、鉄 2 価への還元反応が進行していることが示唆された。この反応にともなって、ヘム鉄周辺の配位構造が変化し、また NO に近接した 1 個の水分子の電子密度が消失することが明らかとなった。DNA 光修復酵素では、酵素中の補欠分子である酸化型 FAD が X 線照射により還元をうけて、還元型 FAD に変化することが近紫外部の吸収スペクトル変化から明らかとなった。還元反応にともなって FAD 分子の平面性がくずれ、FAD 近傍のアミノ酸側鎖と水素結合を形成することにより還元型 FAD を安定化していることが示唆され、この結果に基づいて DNA 光修復酵素における光活性化の機構を提案した。

(3) 血管新生メカニズムに関する研究 (杉本)

血管新生とは胎仔期において原始的な血管が枝別れあるいは発芽によって再構築され、最終的に平滑筋などの壁細胞が血管周辺に動員されて血管構造の安定化にいたるまでをいう。本研究では、血管形成後期において血管内皮細胞とその周辺細胞との連携に関与する成長因子であるアンジオポエチンの関係するシグナル伝達機構を構造生物学的な見地から明らかにしていくことを目的とし、X 線結晶学によりアンジオポエチンおよびその受容体 Tie2 の立体構造の解析を進めている。これまでに、アンジオポエチン 1 の遺伝子クローニングおよび受容体のいくつかの機能ドメインの調製を行った。そのうちドメイン 5 の結晶構造の決定に成功した。アンジオポエチンおよびアンジオポエチン 2 の受容体との分子間相互作用について生化学的も実験を行い、最終的にはアンジオポエチンと受容体 Tie2 の細胞外ドメインとの複合体の解析を目指す。

(4) 金属タンパク質の測定に最適化した X 線吸収微細構造 (XAFS) 測定法の開発と応用 (菊地^{*3}, 足立, 城)

XAFS 法により、金属イオンの配位環境に関する詳細な情報を得ることができる。非結晶試料や溶液試料でも測定できるという大きな利点があることから、金属タンパク質中の金属イオン局所構造の解析には有用な手法の 1 つである。従来、金属タンパク質の XAFS 測定を行うには、数十~数百 μ L の試料が必要であったが、1 μ L 程度でも十分に解析可能な XAFS データを得ることができる測定法の開発に成功した。この測定法を使い、現在、エチレンセンサータンパク質 ETR1 や鉄-硫黄クラスターを含んだタンパク質の局所構造解析を進めている。また、吸収端近傍のスペクトル (XANES) から金属イオン周辺の電子状態に関する情報を引き出すことがどこまで可能であるのか理論計算を用いて検討している。

^{*1} 研修生 (姫工大大学院), ^{*2} 協力研究員, ^{*3} 基礎科学特別研究員, ^{*4} 共同研究員, ^{*5} 客員主管研究員, ^{*6} 研修生, ^{*7} ジュニア・リサーチ・アソシエイト

Research Subjects and Members of Biophysical Chemistry Laboratory

1. Molecular Structures and Functions of Metalloenzymes
2. Structural and Functional Analyses of Signal Transducing Metalloproteins
3. *De Novo* Protein Design
4. Development and Application of New Techniques of Protein Crystallography

Head

Dr. Yoshitsugu SHIRO

Members

Dr. Yasuhiro ISOGAI
Dr. Hiro NAKAMURA
Dr. Takumi NOGUCHI
Dr. Shin-ichi ADACHI
Dr. Hiroshi AOYAMA
Dr. Hiroshi SUGIMOTO
Dr. Akihiro KIKUCHI^{*1}
Dr. Hideyuki KUMITA^{*1}
Dr. Eiji OBAYASHI^{*1}
Dr. Dong-Sun Lee^{*2}
Dr. Seiji YAMADA^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Kunio MIKI (Theoretical Structural Biology Lab.)
Mr. Hirofumi KOMORI (Theoretical Structural Biology Lab.)

Visiting Members

Mr. Satoru AKIMOTO (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Manabu ISHIDA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Prof. Tsutomu KOYAMA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)
Dr. Genzi KURISU (Protein Res. Inst., Osaka Univ.)
Dr. Yukio MORIMOTO (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Dr. Takamasa NONAKA (Dept. Biol. Eng., Nagaoka Univ. Technol.)
Dr. Hiroshi YAMAGUCHI (Sch. Sci., Kwansei Gakuin Univ.)
Prof. Shin-ya YOSHIKAWA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Trainees

Ms. Kei FUJISHIMA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Kaito HOSONO (Fac. Eng., Hosei Univ.)
Mr. Syun-ichiro ODA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

Mr. Ken SAITO (Fac. Sci., Saitama Univ.)
Ms. Hitomi SAWAI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Atsunari TANAKA (Fac. Sci., Yokohama City Univ.)
Ms. Akari YAMADA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Kazuhide YAMANE (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

誌 上 発 表 Publications

[雑 誌]

(原 著 論 文) * 印 は 査 読 制 度 が ある 論 文 誌

- Nakamura H., Saito K., and Shiro Y.: "Quantitative measurement of radioactive phosphorylated proteins in wet polyacrylamide gels", *Anal. Biochem.* **294**, 187–188 (2001). *
- 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). *
- Lee D., Kim N., and Lee S.: "2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate, a stable free radical, is an α -glucosidase inhibitor", *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 727–728 (2001). *
- Lee D. and Lee S.: "Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor", *FEBS Lett.* **501**, 84–86 (2001). *
- Odoko M., Yao M., Yamashita E., Nakashima R., Hirata K., Aoyama H., Muramoto K., Shinzawa-Itoh K., Yoshikawa S., and Tsukihara T.: "Optimization of the energy constant of the methionine S ^{δ} -C ^{ϵ} bond for X-*PLOR* refinement of protein structure", *J. Appl. Crystallogr.* **34**, 80–81 (2001). *
- Adachi S., Oguchi T., Tanida H., Park S., Shimizu H., Miyatake H., Kamiya N., Shiro Y., Inoue Y., Ueki T., and Iizuka T.: "The RIKEN structural biology beamline II (BL44B2) at the SPring-8", *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **467/468**, 711–714 (2001). *
- Sasaki Y. C., Okumura Y., Adachi S., Suda H., Taniguchi Y., and Yagi N.: "Picometer-scale dynamical X-ray imaging of single DNA molecules", *Phys. Rev. Lett.* **87**, 248102-1–248102-4 (2001). *
- Ota M., Isogai Y., and Nishikawa K.: "Knowledge-based potential defined for a rotamer library to design protein sequences", *Protein Eng.* **14**, 557–564 (2001). *
- Shimizu H., Park S., Shiro Y., and Adachi S.: "X-ray structure of nitric oxide reductase (cytochrome P450nor) at atomic resolution", *Acta Cryst. D: Biol.* **58**, 81–89 (2002). *
- Matsunaga I., Yamada A., Lee D., Obayashi E., Fujiwara N., Kobayashi K., Ogura H., and Shiro Y.: "Enzymatic reaction of hydrogen peroxide-dependent peroxygenase cytochrome P450s: Kinetic deuterium isotope effects

and analyses by resonance Raman spectroscopy”, *Biochemistry* **41**, 1886–1892 (2002). *

Noguchi T. and Sugiura M.: “Flash-induced FTIR difference spectra of the water oxidizing complex in moderately hydrated photosystem II core films: Effect of hydration extent on S-state transitions”, *Biochemistry* **41**, 2322–2330 (2002). *

(総説)

中村寛夫, 城宜嗣: “シグナル変換 2 成分系タンパク質”, *生物物理* **41**, 295–298 (2001).

宮武秀行, 城宜嗣: “酸素センサー蛋白質 FixL の酸素濃度感知機構”, *日本結晶学会誌* **43**, 158–163 (2001).

[単行本・Proc.]

(総説)

磯貝泰弘, 太田元規: “人工タンパク質の合理的設計”, シリーズ・ニューバイオフィジックス II 「生体ナノマシンの分子設計」, 城所俊一 (編), 共立出版, 東京, pp. 102–121 (2001).

(その他)

Komatsuzaki Y., Kusunoki M., Hasegawa K., Ono T., and Noguchi T.: “Highly structure-sensitive EXAFS spectra from multinuclear Mn model compounds. Ab initio refinement of a diamond-structure of the S₁-state Mn₄CaCl cluster in photosystem II”, *Proc. of 12th Int. Congr. on Photosynthesis (PS2001)*, Brisbane, Australia, 2001–8, CSIRO, Collingwood, pp. S13-012-1–S13-012-4 (2001).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Noguchi T. and Sugiura M.: “Flash-induced reactions of the oxygen-evolving complex of photosystem II as studied by Fourier transform infrared spectroscopy”, 4th Int. Conf. on Biological Physics (ICBP 2001), Kyoto, July–Aug. (2001).

Komatsuzaki Y., Kusunoki M., Hasegawa K., Ono T., and Noguchi T.: “Highly structural-sensitive EXAFS spectra from multinuclear Mn model compounds: Ab initio refinement of a diamond-structure of the S₁-state Mn₄-Ca-Cl cluster in photosystem II”, 12th Int. Congr. on Photosynthesis (PS 2001), Brisbane, Australia, Aug. (2001).

Higuchi M., Noguchi T., and Sonoike K.: “Reduction of the Mn cluster in oxygen evolving complex under dark-chilling condition”, 12th Int. Congr. on Photosynthesis (PS 2001), Brisbane, Australia, Aug. (2001).

Noguchi T. and Sugiura M.: “FTIR detection of the molecular reactions during the oxygen-evolving S-state cycle”, 12th Int. Congr. on Photosynthesis (PS 2001), Brisbane, Australia, Aug. (2001).

Shiro Y.: “Insight from high resolution structures of cytochrome P450: Multi-conformation and ligand coordination geometry”, 12th Int. Conf. on Cytochrome P450, La Grande Motte, France, Sept. (2001).

Noguchi T.: “FTIR studies on the reactions of cofactors

in photosystem II”, *Int. Symp. on Protein-Cofactor Interactions*, Berlin, Germany, Nov. (2001).

Shiro Y.: “Structural and functional divergency of cytochrome P450: NO reductase and fatty acid peroxidase”, 4th National Symp. in Chemistry, (National Chemical Laboratory and University of Pune), Pune, India, Feb. (2002).

Shiro Y.: “Functional genomics of metalloenzymes”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).

(国内会議)

水島恒裕, 中島良介, 山下栄樹, 平田邦生, Yao M., 月原富武, 青山浩, 伊藤 - 新澤恭子, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素では 14 分子のリン脂質が補欠分子として働いている”, 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6 月 (2001). 青山浩, 山下栄樹, 平田邦夫, 月原富武, 村本和優, 伊藤恭子, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素の 1.8 Å 分解能の X 線構造解析”, 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6 月 (2001).

大床真美子, Yao M., 山下栄樹, 中島良介, 平田邦生, 青山浩, 村本和優, 伊藤-新澤恭子, 吉川信也, 月原富武: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素の 2.0 Å 分解能でのアミノ酸側鎖構造精密化”, 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6 月 (2001).

磯貝泰弘, 太田元規, 石井杏奈, 石田学, 西川建: “タンパク質の構造単一性に寄与するアミノ酸残基の同定 分子設計用特異性関数の開発”, 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6 月 (2001).

磯貝泰弘, 太田元規, 田中敦成, 飯塚哲太郎, 西川建: “計算とランダム変異実験を組み合わせたデノボタンパク質設計”, 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6 月 (2001).

小倉尚志, 青山浩, 伊藤 - 新澤恭子, 吉川信也: “結晶チトクロム c 酸化酵素の偏光共鳴ラマンスペクトル”, 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6 月 (2001).

小倉尚志, 青山浩, 伊藤 - 新澤恭子, 吉川信也: “チトクロム a と a₃ の振動スペクトルの分離: 結晶酵素の偏光共鳴ラマンスペクトル”, 第 28 回生体分子科学討論会, 金沢, 7 月 (2001).

城宜嗣: “ヘム蛋白質の新しい機能: 気体分子センシング”, 第 28 回生体分子科学討論会, 金沢, 7 月 (2001).

菊地晶裕, 足立伸一, 谷田肇, 城宜嗣: “金属イオンを含む超薄な生体試料溶液での XAFS 測定”, 第 4 回 XAFS 討論会, つくば, 8 月 (2001).

平田邦生, 山下栄樹, 月原富武, 村本和優, 青波果実, 青山浩, 伊藤-新澤恭子, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素の Zn²⁺, Cd²⁺ 金属イオンの結合サイト”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).

野口巧, 杉浦美羽: “赤外分光法による光合成酸素発生系における S 状態反応サイクルの解析”, 第 39 回日本生物物理学会年会, 吹田, 10 月 (2001).

汲田英之, 中村寛夫, 足立伸一, 城宜嗣: “好熱菌由来のヒスチジンキナーゼを含む二成分系キメラタンパク質の設計”, 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2001).

青山浩, 平田邦生, 山下栄樹, 月原富武, 岡田英理, 村本和優, 伊藤 - 新澤恭子, 吉川信也: “ウシ心筋チトクロム酸化酵素

- の高分解能構造解析の現状”, 日本生物物理学会第 39 回年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 村本和優, 青波果実, 青山浩, 伊藤-新澤恭子, 小倉尚志, 平田邦生, 山下栄樹, 秋津貴城, 月原富武, 吉川信也: “還元型ウシ心筋チトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析によるヘム a 側鎖の構造変化”, 日本生物物理学会第 39 回年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 小倉尚志, 青山浩, 伊藤-新澤恭子, 吉川信也: “結晶チトクロム酸化酵素の酸化還元反応: 共鳴ラマン分光法”, 日本生物物理学会第 39 回年会, 吹田, 10 月 (2001).
- 磯貝泰弘, 太田元規, 石井杏奈, 石田学, 西川建: “人工設計によるミオグロビン”, 日本生物物理学会第 39 回年会, 大阪, 10 月 (2001).
- 菊地晶裕: “エチレンセンサータンパク質植物が作り出す銅オレフィン錯体”, 第 30 回錯体化学若手の会近畿地区勉強会, 大阪, 12 月 (2001).
- 菊地晶裕: “エチレンセンサータンパク質 ETR1 その機能・構造と電子状態”, 理研シンポジウム「MRサイエンス'01」, 和光, 12 月 (2001).
- 城宜嗣: 文科省科研費補助金特定領域研究 A「生物マシーナリー」第 3 回公開シンポジウム, 京都, 1 月 (2002).
- 李東善: “脂肪酸水酸化酵素の構造機能解析: 基質認識と触媒作用”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VII)」, 播磨, 3 月 (2002).
- 野口巧: “光合成蛋白質の構造と反応に関する分光学的研究”, 日本植物生理学会年会, 岡山, 3 月 (2002).
- 樋口美栄子, 野口巧, 園池公毅: “低温・暗黒処理による酸素発生系の構築過程の解析”, 日本植物生理学会年会, 岡山, 3 月 (2002).