

構造生物物理研究室

Structural Biophysics Laboratory

主任研究員 宮野 雅 司
MIYANO, Masashi

構造生物物理研究室の主たる研究分野は、脂質様物質を介した生体内のエネルギーや情報の流れをタンパク質の構造依存的に解釈することであり、この研究姿勢は生物学上の基礎科学を推進するだけでなく、医学や薬学分野への応用も視野に入れたものである。現在は脂質代謝と脂質メディエータ関連の酵素を対象としている。応用上重要性が高い脂質メディエータ受容体を含む膜タンパク質の構造研究を視野に入れているため、膜タンパク質について広く重要視しており、可能なものについては発現精製を含めた構造決定に取り組んでいる。もう1つの研究分野は、タンパク質の結晶化と回折強度測定効率化に関する技術開発である。これは文部科学省の研究委託事業である“タンパク 3000 プロジェクト”に寄与するもので、理研内外の組織と共同で行っている。

1. 結晶化を指向したタンパク質の発現精製法の研究

(1) 無細胞タンパク質合成系を用いた M₂ ムスカリン性アセチルコリン受容体の合成、精製、および巻き戻しに関する研究(堀^{*1}、宮野;石原、佐伯、五島、白水、木川(タンパク質構造・機能研究グループ);横山(細胞情報伝達研究室))

膜タンパク質は医薬品開発などの応用面の重要性が高いにもかかわらず、ヘテロホストを用いた場合、発現タンパク質がホスト細胞の生存へ直接影響すること、また膜画分への移行とフォールディングの問題から、活性体を直接大量に発現させることが極めて困難である。本研究では、Gタンパク質共役型受容体である M₂ ムスカリン性アセチルコリン受容体を対象とし、大腸菌抽出液を用いた無細胞合成系での発現、精製および巻き戻しによる活性体の生産法について検討し 900 μl の反応系から 800 μg の精製サンプルが得られた。2種類のアンタゴニストを使った結合試験の結果、精製受容体タンパク質は結合活性を持っていた。無細胞合成反応系を用いて膜タンパク質の大量発現を行い、活性タンパクの調製が可能であることが示された。

(2) ヒト脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼの発現精製に関する研究(有井^{*2}、菅原、宮野;服部、辻本(細胞生化学研究室))

ヒト脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ(A-LAP)は Zn²⁺ 結合型金属メタロプロテアーゼであり、M1 ファミリーに共通で活性発現に不可欠な HEXXH(X)₁₈E モチーフを有している。A-LAP は生体内において小胞体内腔に局在し、その生理学的機能は MHC-I におけるペプチド抗原提示時のトリミングであると報告があった。本タンパク質の結晶構造解析を行い反応機構を明らかにするために、現在 Sf 9 細胞を用いた発現系からの A-LAP の精製および大腸菌を用いた大量発現系の構築に取り組んでいる。自動結晶化装置“TERA”を用いて Sf 9 細胞から得られた発現タンパク質の結晶化条件検討を行い、また精製純度を高めるための精製条件検討を行っている。一方、大腸菌発現系では活性型 A-LAP は発現されなかったが、活性に関係するアミノ酸残基に変異を導入した変異体 A-LAP は発現が認め

られ、発現精製法の確立を行っている。

(3) ヒト由来カルシニューリンホモログスプロテイン(CHP)の精製結晶化に関する研究(菅原、若林^{*3}、盛^{*3}、宮野)

CHP は、細胞に普遍的に含まれ細胞内部の pH を調節する膜タンパク質である Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) に結合し、何らかの制御因子として働くことが示唆されているが詳細な機構は全く未知である。CHP と NHE1 の結合配列部分のペプチド断片を大腸菌で大量発現させて得られた複合体試料について結晶化を行っている。

2. 膜タンパク質の結晶構造の解明

(1) 好熱性らん藻 *Thermosynechococcus vulcanus* 由来光化学系 II 膜タンパク質複合体の結晶構造解析(沈、吾郷、浜田^{*1}、宮野;神谷(研究技術開発室))

光化学系 II 複合体は 14 種の膜タンパク質と 3 種の膜表面タンパク質を含む分子量 320 kDa の超分子複合体である。好熱性らん藻 *Thermosynechococcus vulcanus* から光化学系 II 複合体を単離・精製・結晶化し、結晶構造解析を行っているが、本年度その構造を 3.7 Å 分解能で解析した。その結果、これまで未知であった表在性 12 kDa タンパク質の構造が明らかにされ、また、膜の内側(ルーメン側)に露出している D1、D2、CP47、CP43 サブユニットのループ領域の多くが明らかにされた。これにより、ルーメン側において各サブユニット間の可能な相互作用が示唆された。このほか、反応中心に近い領域でカロチノイドの存在が明らかにされ、光化学系 II のエネルギー・電子伝達におけるカロチノイドの役割が示唆された。さらに水分解・酸素発生反応の直接的な触媒中心であるマンガクラスターについて、その配位構造・可能な配位残基を明らかにした。

(2) 常温性ラン藻 *Cyanobacterium Synechocystis* CPP sp. 6803 由来光化学系 II 複合体の X 線結晶構造解析(網中^{*4}、菅原、菓子野^{*3}、沈、宮野)

常温性ラン藻 *Cyanobacterium Synechocystis* CPP sp. 6803 由来の光化学系 II 複合体は分子量約 400 kDa で 21 種以上のポリペプチド鎖からなる膜タンパク質超分子複合体

である。複合体中で最も大きな分子量を持つ CP47 ポリペプチドの C 末にヒスチジンタグをつけて高活性、高純度に単離精製された試料を用いて X 線結晶構造解析に向けた結晶化を試みた。試料は波長 530~600 nm の範囲外の光には不安定であるため、遮光結晶化トレイ、自動結晶化分注装置、自動観察装置を用いて結晶化条件のスクリーニングと観察作業における試料の変性を防ぎ、作業の効率化を図った。いくつかの条件で得られた結晶について条件の最適化を行っている。

3. 脂質メディエータ、脂肪酸代謝をはじめとする酵素類の結晶構造の解明

(1) ロイコトリエン B₄ 12-デヒドロゲナーゼ/15-ケトプロスタグランジン 13-レダクターゼの結晶構造解析 (堀^{*1}, 吾郷, 宮野, 横溝^{*3}, 清水^{*3})

ロイコトリエン B₄ (LTB₄) は、炎症反応において白血球や好酸球などを活性化する走化性因子である。白血球以外の組織で、LTB₄ の不活性化経路の初発酵素としてロイコトリエン B₄ 12-デヒドロゲナーゼが同定され、LTB₄ の 15 位の水酸基の酸化反応を触媒する。また、本酵素は 15-ケトプロスタグランジンやリポキシン A の 12 位の二重結合の還元反応を触媒することにより、これらの不活性化に寄与していることも最近明らかになった。つまり本酵素は脂質メディエータの不活性化において、異なる部位の酸化と還元を担う多機能酵素として働いている。この分子機構を理解するために、本酵素の結晶構造解析を行った。現在、構造精密化を進めており、基質や補因子との複合体の解析が今後の課題である。

(2) プロスタグランジン D₂ 合成酵素の構造機能相関の研究 (入倉^{*3}, 吾郷, 井上 (豪)^{*3}, 宮野, 裏出^{*3}; 山本, 熊坂 (X 線干渉光学研究室))

プロスタグランジン (PG) D₂ は炎症反応や高等動物の睡眠誘発に関わる。この PGD₂ の合成酵素 (PGDS) には、進化的に異なるリポカリン型 (L-PGDS) とグルタチオン転移酵素型と呼ばれる 2 種類の型がある。昨年度まで解析を行っていた結晶とは異なる、新たな結晶系に属する L-PGDS 結晶について構造解析を行い、L-PGDS の生物学的機能に深くかかわると推定される、反応産物である PGD₂ と L-PGDS の相互作用において興味ある知見を得た。

(3) *Thermus thermophilus* HB8 由来アシル CoenzymeA リガーゼの結晶構造解析 (久永^{*5}, 吾郷, 宮野)

脂質は膜構造の形成、エネルギーの蓄積と供給、細胞間情報伝達等に関わる生体の主要な構成要素の 1 つで、その代謝に関わる酵素は疾病治療薬や抗菌剤開発の重要なターゲットとなりうる。本年度は β 酸化によるエネルギー産生やトリグリセリド、リン脂質などの脂質合成などに利用される脂肪酸アシル Coenzyme A (CoA) を、脂肪酸、ATP、CoA から二段階反応で合成するアシル CoA リガーゼのアポ酵素、ATP アナログ複合体、脂肪酸-AMP 複合体のそれぞれについて結晶構造を決定した。触媒反応の進行の過程で現れる反応段階に対応するこれらの構造を決定したことで、酵素の構造変化を伴った触媒反応機構の詳細を明らかにすることができた。

(4) *Thermus thermophilus* HB8 由来 ribose 5-phosphate isomerase A (RpiA) の結晶構造解析 (浜田^{*1}, 吾郷, 菅

原, 宮野; 野嶽 (発現精製チーム))

RpiA (227 アミノ酸残基) は ribose 5-phosphate から ribulose 5-phosphate への異性化反応を触媒する酵素である。RpiA は酸化的ペントースリン酸回路および植物のカルビンサイクルで機能し、配列は生物種を超えて高度に保存される。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 RpiA の構造解析を MAD 法により行い RpiA の全体構造を決定した。RpiA は α/β フォールドを持つ 2 つのドメインから構成され、二量体を形成している。さらに基質結合部位および触媒基の同定、さらに触媒機構を調べることを目的に、基質および阻害剤との複合体結晶の構造解析を行った。複合体構造解析の結果から、酵素とリガンドとの相互作用を明らかにでき、異性化酵素としての触媒反応に関わる触媒基と基質または阻害剤との相互作用に基づき詳細な反応機構を提唱することができた。

4. タンパク質構造決定の効率化に関する技術に関する研究

構造ゲノミクスは、ゲノム解析による膨大な遺伝子情報の蓄積を受け、遺伝子産物であるタンパク質の立体構造情報を網羅的に集積することを目指している。タンパク質構造決定の 1 つの柱は X 線結晶構造解析であり、タンパク質の生産、結晶化、X 線回折データ収集、構造解析という過程を経て構造情報解析によって立体構造情報が整理、集積される。さまざまな生物種の多様なタンパク質を扱う構造ゲノミクスでは、多数の試料を効率よく処理していくため、各段階での技術開発が必要となる。当研究室では、横浜研究所ゲノム科学総合研究センターとともにタンパク 3000 プロジェクトの網羅的構造解析中核機関である理研播磨研究所ハイスループットファクトリー、ならびに X 線干渉光学研究室と共同で必要な技術開発を行っている。

(1) 全自動タンパク質結晶化・観察システムの開発研究 (菅原, 宮野; 濱田 (賢), 小林, 西尾, 桑井, Babayeba (結晶化チーム); 瀧尾 (発現精製チーム); 国島 (構造解析第 1 チーム); Tahirov (構造解析第 2 チーム))

構造ゲノミクスにおいて結晶化はボトルネックの 1 つである。商用結晶化ロボットや結晶化スクリーンキットなどのタンパク質結晶化技術の進歩を生かして、より多くのサンプルをより早く結晶化スクリーニングするため、結晶化から観察のデータ管理まで含めたハイスループット全自動結晶化・観察システムの開発を進めている。本年度は昨年度までに企業と開発した全自動結晶化観察ロボット“TERA”の本格的な運用を開始し、現在約 250 試料について約 16 万条件の結晶化、約 130 万枚の結晶化ドロップ画像の撮影を行い、50 もの試料から構造解析に適した結晶が得られている。

(2) タンパク質構造解析の研究支援ツールの開発研究 (高^{*3}, 金森^{*3}, 宮野, 菅原 (光); 国島 (構造解析第 1 チーム); 黒石, 菅原 (眞) (発現精製チーム))

タンパク質構造の大量解析事業によって作り出されるデータは、網羅的な実験の結果、有益な情報を含んでいる一方で、その量が非常に膨大であるため、そこに含まれる情報を取り出し有効に管理、使用していくためにはデータベースが必要である。高い拡張性をデータベースに付加するため、デンドリカル構造の動的モデルを持つハイスループットファ

クトリーデータベース (HTPF-DB) を構築し運用を開始した。HTPF-DB は基礎 DB, プラスミッド DB, 培養 DB, 精製 DB, サンプル DB, 結晶 DB, 回折 DB, 解析 DB から構成されている。

(3) 構造ゲノムビームラインの研究開発 (井田^{*5}, 神田^{*4}, 宮野; 山本, 上野, 熊坂, 石川 (X 線干渉光学研究室))

SPring-8 構造ゲノムビームライン BL26B1&B2 では, 迅速タンパク質構造解析を実現するための研究開発を進めている。構造ゲノムビームラインでは, 膨大な凍結結晶サンプルを効率よく取り扱うため, サンプルチェンジャーを中心とした大量サンプル管理システムの開発を進めている。大量サンプル管理システムでは, サンプルは保存用ラックに複数個収納された状態で保存・運搬され, さらに自動マウントすることで大量サンプルの管理・測定を可能にする。また, HTPF データベースと連携して, あらかじめ測定された評価用回折イメージの検討結果に従って自動データ収集を可能とする。平成 14 年秋からユーザーによるテスト運転を開始しており, 平成 15 年春からサンプルチェンジャーと HTPF データベースによる自動運転のテストを行っている。

^{*1} 基礎科学特別研究員, ^{*2} 協力研究員, ^{*3} 共同研究員, ^{*4} 研修生, ^{*5} ジュニア・リサーチ・アソシエイト

The structural biophysics laboratory is focused on the structure-based functional analysis of the enzymes and receptors related to lipid metabolism and lipid mediators, since they are not only biological importance but potential targets to develop therapeutics. On the structural studies for trans membrane receptors for the lipid mediators, the laboratory started from over-production of a trans-membrane type receptor, M2-receptor as well as the crystallization and structural analysis of oxygen-evolving photosystem II complex as an important case study of membrane protein structural studies. The other focus is to develop high-throughput technologies for SR protein crystallography including automated crystal diffraction data collection and integrated automated protein crystallization system as an effort for National Project on Protein Structural and Functional Analysis, Protein 3000.

1. Expression and purification of proteins

(1) M2 muscarinic acetylcholine receptor on cell-free system

Expression of membrane-integrated protein is thought to be very difficult, because of an influence of the expressed protein to host cells and its folding process into membrane fraction. In this study, we have attempted the expression of M2-muscarinic receptor in the *E. coli* Cell-free system. The expressed receptor was purified and refolded into liposome, and the ligand binding activity was measured.

(2) Human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)

Human adipocyte-derived leucine aminopeptidase, which localizes in endoplasmic reticulum, belongs to the M1 family of zinc-metalloproteases and is involved in the generation of the major histocompatibility complex (MHC) class I-binding peptides. To elucidate the structure based for the reaction mechanism of A-LAP, we perform refinement of the experimental condition for purification

of A-LAP from Sf 9 cell expression system and construct over-expression systems using *E. coli*.

(3) Human calcineurin homologous protein (CHP)

CHP binds $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger (NHE1) and regulate pH inside the cell. We are trying crystallization experiments for X-ray crystallographic analysis of the complex of CHP and NHE1 fragment.

2. Structure-based functional study of membrane proteins

(1) Photosystem II from a thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*

We determined the crystal structure of photosystem II from a thermophilic cyanobacterium *T. vulcanus* at 3.7 Å resolution. The crystal structure revealed the molecular interactions among a number of subunits in the large membrane-protein complex. The arrangements of chlorophylls and other cofactors, and the possible residues surrounding the Mn-cluster were also determined, which provided new and important insights into the mechanism of PSII reactions.

(2) Photosystem II from a Cyanobacterium *Synechocystis* CPP sp. 6803

Cyanobacterium *Synechocystis* CPP sp. 6803 has 400 kDa molecular weight and more than 21 polypeptides. We are trying crystallization experiments using a robotic system for X-ray crystallographic analysis of this super macromolecular complex.

3. Structure based functional study of proteins related to lipids and other

(1) Leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-ketoprostaglandin 13-reductase

The enzyme plays an important role in inactivating Leukotriene B₄ (LTB₄), prostaglandin (PG) and lipoxin A₄ (LXA₄). It is a bifunctional enzyme that acts as a dehydrogenase with LTB₄ and acts as a reductase with PG and LXA₄. The crystal structure has been solved and the crystallization of complex with substrates or co-factors is now in progress.

(2) Prostaglandin D Synthase

Prostaglandin (PG) D₂ is converted from PGH₂ by two types of prostaglandin D synthases (PGDS). One is a lipocalin type and the other is a glutathione S-transferase type. The analysis of the crystal of the lipocalin type PGDS belonging to the new space group gives insights into the structure bases for the biological activity of the lipocalin type PGDS.

(3) Acyl Coenzyme A ligase from *Thermos thermophilus* HB8

Acyl Coenzyme (CoA) ligase forms a fatty acyl CoA molecule by two reaction steps. In this study, the crystal structure of acyl CoA ligase and ligand complexes are determined. The structural comparison between the apo and complex crystal structures gives a clear understanding for the reaction mechanisms of the enzymatic catalysis.

(4) Ribose 5-phosphate isomerase A (RpiA) from *Thermus thermophilus* HB8

Ribose 5-phosphate isomerase A (RpiA) catalyzes the interconversion of ribose 5-phosphate between ribulose 5-phosphate. RpiA plays role in the oxidative pentose phosphate pathway and in the Calvin cycle of plants. We have determined the crystal structure of RpiA by MAD phasing at 1.8 Å resolution. RpiA exhibits α/β fold and the two subunits forming a dimer include chloride ions at their interface. Based on the structures complexed with ligands, the active site residues are identified and a catalytic mech-

anism in detail is proposed.

4. Development of technologies for structure determination of protein with high throughput

(1) Technologies for protein crystallization

Protein crystallization is one of the major bottlenecks in protein X-ray crystallography. We have designed and developed full-automatic crystallization and observation robot, "TERA". Up to date, the number of trials of crystallization and observed images for more than 250 proteins is about 160 thousand and 1.3 million, respectively. Fifty proteins crystallized with X-ray crystallographic quality.

(2) Tools for information integration

The fully-integrated laboratory information management to determine a number of protein structures in high throughput manner is crucial due to huge and various information production to be recorded, shared and utilized. Hightthroughput Factory Database (HTPF-DB) is the database to manage and share the experimental information. The dynamic model with dendritic structure is adopted as a basic frame to endue the database with high flexibility and expansibility.

(3) Technologies for automated diffraction data collection

RIKEN Structural Genomics Beam lines I & II (BL26B1/B2) at SPring-8 have been developed for high throughput protein crystallography (HTPX). The beam lines are equipped with sample auto-changing system and the beam line operating system. Both systems make possible to automatic data collection in cooperation with the sample database system. The beam lines were started user operation from October 2002, and will ready for automatic data collection in 2003.

Research Subjects and Members of Structural Biophysics Laboratory

1. Expression and purification of proteins
2. Structure based functional study of membrane proteins
3. Structure based functional study of proteins related to lipids and other
4. Development of technologies for structure determination of protein with high throughput

Head

Dr. Masashi MIYANO

Members

Dr. Jian-Ren SHEN
Dr. Hideo AGO
Dr. Mitsuaki SUGAHARA
Dr. Keisuke HAMADA^{*1}
Dr. Tetsuya HORI^{*1}
Dr. Yasuhiro ARII^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Nigar BABAYEBA (Large Scale Protein Crystallization Team)

Dr. Kensaku HAMADA (Large Scale Protein Crystallization Team)

Dr. Akira HATTORI (Cellular Biochemistry Lab.)

Dr. Tetsuya ISHIKAWA (Coherent X-Ray Optics Lab.)

Dr. Nobuo KAMIYA (Div. of Bio-Crystallography Technology)

Dr. Masanori KOBAYASHI (Large Scale Protein Crystallization Team)

Dr. Takashi KUMASAKA (Coherent X-Ray Optics Lab.)

Dr. Maki KUMEI (Large Scale Protein Crystallization Team)

Dr. Naoki KUNISHIMA (Protein Crystal Structure Team 1)

Dr. Chizu KUROIISHI (Large Scale Protein Production Team)

Dr. Kazuya NISHIO (Large Scale Protein Crystallization Team)

Dr. Yuichi NODAKE (Large Scale Protein Production Team)

Dr. Mayumi SUGAHARA (Large Scale Protein Production Team)

Dr. Tahir TAHIROV (Protein Crystal Structure Team 2)

Dr. Koji TAKIO (Large Scale Protein Production Team)

Dr. Masafumi TSUJIMOTO (Cellular Biochemistry Lab.)

Dr. Gou UENO (Coherent X-Ray Optics Lab.)

Dr. Masaki YAMAMOTO (Coherent X-Ray Optics Lab.)

Dr. Shigeyuki YOKOYAMA (Cellular Signaling Lab.)

Ms. Mie GOTO (Protein Res. Group, GSC)

Dr. Takenori KIGAWA (Protein Res. Group, GSC)

Dr. Goshi ISHIHARA (Protein Res. Group, GSC)

Ms. Mihoro SAEKI (Protein Res. Group, GSC)

Dr. Mikako SHIROUZU (Protein Res. Group, GSC)

Visiting Members

Dr. Shuichiro GODA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

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

Ms. Yuko HIRANAGA (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

Mr. Koh IDA (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)

Dr. Katsuaki INOUE (JASRI)

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

Mr. Daisuke IRIKURA (Osaka Biosci. Inst.)

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

Prof. So IWATA (Imperial Coll., UK)

Mr. Eiji KANAMORI (Hitachi Software Eng. Co., Ltd.)

Dr. Yasuhiro KASHINO (Grad. Sch. Sci., Himeji Inst. Tech.)

Dr. Naoki MOCHIZUKI (Natl. Cardiovascular Cen.)

Prof. Hidezo MORI (Natl. Cardiovascular Cen.)
 Dr. Kazuto OKURA (Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)
 Prof. Toshihisa OSHIMA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)
 Dr. Haruhiko SAKURABA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)
 Prof. Mamoru SATO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Prof. Takao SHIMIZU (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)
 Dr. Toshiyuki SHIMIZU (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Hideyuki TAKA (Hitachi Software Eng. Co. Ltd.)
 Dr. Hideaki TSUGE (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)
 Dr. Yoshihiro URADE (Osaka Biosci. Inst.)
 Dr. Shigeo WAKABAYASHI (Natl. Cardiovascular Cen.)
 Prof. Yasushi YAMAMOTO (Fac. Sci., Okayama Univ.)
 Dr. Takehiko YOKOMIZO (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Trainees

Mr. Ryota AMINAKA (Grad. Sch. Sci., Himeji Inst. Technol.)
 Mr. Kyouhei ARITA (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Ms. Chie ENDO (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Ms. Akiko HIRATA (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Takahito IMAGAWA (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)
 Mr. Tsuyoshi IMASAKI (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Hiroyuki KANDA (Interdiscip. Fac. Sci. Eng., Shimane Univ.)
 Mr. Masamichi NAGAE (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Hitoshi NAKAYAMA (Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ.)
 Mr. Shigefumi OMATSU (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Shinsuke SAKUMA (Grad. Sch. Natl. Sci. Tech., Okayama Univ.)
 Ms. Ayaka WATANABE (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Ms. Noriyo YAMADA (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Kazunari YONEDA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Tahirov T. H., Sasaki M., Inoue-Bungo T., Fujikawa A.,

Sato K., Kumasaka T., Yamamoto M., and Ogata K.: "Crystals of ternary protein-DNA complexes composed of DNA-binding domains of c-Myb or v-Myb, C/EBP α or C/EBP β and *tom-1A* promoter fragment", *Acta Cryst. D* **57**, 1655–1658 (2001). *

Katoh H., Itoh S., Shen J., and Ikeuchi M.: "Functional analysis of *psbV* and a novel *c*-type cytochrome gene *psbV2* of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1", *Plant Cell Physiol.* **42**, 599–607 (2001). *

Irikura D., Kumasaka T., Yamamoto M., Hayashi O., and Urade Y.: "Crystal structure of lipocalin-type prostaglandin D synthase", *Int. Congr. Ser.* **1233**, 453–459 (2002). *

Tohri A., Suzuki T., Okuyama S., Kamino K., Motoki A., Hirano M., Ohta H., Shen J., Yamamoto Y., and Enami I.: "Comparison of the structure of the extrinsic 33 kDa protein from different organisms", *Plant Cell Physiol.* **43**, 429–439 (2002). *

Koulougliotis D., Shen J., Ioannidis N., and Petrouleas V.: "Near-IR irradiation of the S₂ state of the water oxidizing complex of photosystem II at liquid helium temperatures produces the metalloradical intermediate attributed to S₁Y_Z", *Biochemistry* **42**, 3045–3053 (2003). *

Hamada K., Shimizu T., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S., and Hakoshima T.: "Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex", *EMBO J.* **22**, 502–514 (2003). *

Hayashi F., Suzuki H., Iwase R., Uzumaki T., Miyake A., Shen J., Imada K., Furukawa Y., Yonekura K., Namba K., and Ishiura M.: "ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC", *Genes Cells* **8**, 287–296 (2003). *

Irikura D., Kumasaka T., Yamamoto M., Ago H., Miyano M., Kubata K. B., Sakai H., Hayaishi O., and Urade Y.: "Cloning, expression, crystallization, and preliminary X-ray analysis of recombinant mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase, a somnogen-producing enzyme", *J. Biochem.* **133**, 29–32 (2003). *

Kamiya N. and Shen J.: "Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus valcanus* at 3.7-Å resolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 98–103 (2003). *

菅原光明, 宮野雅司: "ハイスループット自動結晶化・観察システムの開発", *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 1026–1032 (2002). *

(総 説)

吾郷日出夫, 宮野雅司: "創薬からみた構造プロテオミクス", *ゲノム医学* **3**, 109–118 (2003).

(その他)

吾郷日出夫: "構造ゲノムのツールとしてのタンパク質の無細胞合成の迅速化", *ファルマシア* **38**, 547–548 (2002).

菅原光明, 宮野雅司: "全自動タンパク質結晶化観察ロボッ

トシステム「TERA」の開発”, 現代化学, No. 383, p. 41 (2003).

宮野雅司, 高秀幸: “タンパク質構造解析の研究支援ツールの共同開発”, 現代化学, No. 384, p. 43 (2003).

[単行本・Proc.]

(総説)

Arao S., Yamada S., Kawamori A., Shen J., Ionnidis N., and Petrouleas V.: “EPR studies of manganese spin centers in the even-number oxidation states of water oxidizing complex in photosystem II”, EPR in the 21st Century: Basics and Applications to Material, Life and Earth Sciences (Proc. 3rd Asia Pacific EPR/ESR Symposium), Kobe, 2001–10~11, edited by Kawamori A., Yamauchi J., and Ohta H., Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 466–470 (2002).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Ida K., Yamamoto M., Kumasaka T., Ueno G., Kanda H., Miyano M., and Ishikawa T.: “Beamline automation of RIKEN structural genomics beamlines”, 1st Asian Conf. on Photobiology, (The Photobiology Association of Japan and Korean Society of Photoscience), Awaji, June (2002).

Shen J.: “PS II structure overview”, Gordon Research Conf. on Biochemical Aspects of Photosynthesis, Bristol, USA, June (2002).

Watanabe Y., Inoue K., Miura K., Fujisawa T., and Inoko Y.: “A solution X-ray scattering study on the renatured dimer of a membrane protein Porin”, 12th Int. Conf. of Small-Angle Scattering, (International Union of Crystallography), Venice, Italy, Aug. (2002).

Fujisawa T., Inoue K., and Yagi N.: “Time-resolved visualization of the tertiary structural changes of during unfolding reactions using third-generation synchrotron X-ray scattering”, 12th Int. Conf. of Small-Angle Scattering, (International Union of Crystallography), Venice, Italy, Aug. (2002).

Hamada K., Ago H., Sugahara M., Nishio K., Nodake Y., and Miyano M.: “Crystal structure of Acyl-CoA dehydrogenase of *Thermus thermophilus* HB8”, 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Sugahara M., Nishio K., Kawamura K., Nagashima M., Yamai S., Nonomura K., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Miyano M.: “Development of full automatic protein crystallization and observation system at SPring-8”, 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Ueno G., Yamamoto M., Kumasaka T., Ida K., Kanda H., Yasukawa S., Sasaki K., and Ishikawa T.: “RIKEN structural genomics beamline at SPring-8/operation system for high throughput data collection”, 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallog-

raphy (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Yamamoto M., Kumasaka T., Ueno G., Ida K., Kanda H., Miyano M., and Ishikawa T.: “RIKEN structural genomics beamlines at SPring-8”, 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Ida K., Yamamoto M., Kumasaka T., Ueno G., Kanda H., Yokozawa Y., Sasaki K., and Ishikawa T.: “RIKEN structural genomics beamlines at SPring-8/development of sample auto-changing system”, 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Miyano M., Yamamoto M., and Kumasaka T.: “Toward activation mechanism of GPCRs”, 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Sugahara M., Nishio K., Kobayashi M., Hamada K., and Miyano M.: “Development of the full-automatic protein crystallization and observation robot, TERA system”, Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2002), Berlin, Germany, Oct. (2002).

Nishio K., Kobayashi M., Sugahara M., Hamada K., and Miyano M.: “Highthroughput screening for protein crystals using an automated robotics at Highthroughput Factory”, Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2002), Berlin, Germany, Oct. (2002).

Yamamoto M., Kumasaka T., Ueno G., Ida K., Kanda H., Miyano M., and Ishikawa T.: “RIKEN structural genomics beamline at SPring-8”, Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2002), Berlin, Germany, Oct. (2002).

Miyano M.: “Database support for high throughput structural genomics/proteomics initiative”, Workshop on Data Management Aspects of High Throughput Structure Determination, (European Bioinformatics Institute), Cambridge, UK, Mar. (2003).

(国内会議)

河本正秀, 三浦圭子, 引間孝明, 沈建仁, 神谷信夫: “SPring-8におけるビームライン操作環境の整備, He クライオ装置, 結晶化ロボット, 光化学系 II 研究”, 文科省科研費補助金特定領域研究「生物マシーナリー」第5回ワークショップ, 熱海, 7月 (2002).

宮野雅司: “タンパク質と糖鎖の X 線結晶構造解析”, 第23回日本糖質学会年会, 横浜, 8月 (2002).

沈建仁: “Functional analysis of photosystem II based on its three-dimensional structure”, 日本植物学会第66回大会, 京都, 9月 (2002).

日野智也, 沈建仁, 神山勉: “光捕集クロロフィル a/b 蛋白質複合体が形成する正二十面体の X 線結晶構造解析”, 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月 (2002).

有田恭平, 橋本博, 清水敏之, 佐藤衛, 山田道之, 宮野雅司: “Peptidylarginine Deiminase の X 線結晶構造解析”, 日本結晶学会平成14年度年会, 東京, 12月 (2002).

神谷信夫, 沈建仁: “SPring-8のBL41XUを利用した *Synechococcus Vulcanus* 由来光化学系 II 膜蛋白質複合体の結晶構造解析”, 日本結晶学会平成14年度年会, 東京, 12月

(2002).

井田孝, 山本雅貴, 上野剛, 神田浩幸, 熊坂崇, 村上博則, 横沢裕, 佐々木勝成, 石川哲也: “構造ゲノムビームライン・サンプルチェンジャーの開発”, 日本結晶学会平成 14 年度年会, 東京, 12 月 (2002).

神田浩幸, 山本雅貴, 上野剛, 井田孝, 熊坂崇, 宮野雅司, 石川哲也: “構造ゲノムビームラインの自動化”, 日本結晶学会平成 14 年度年会, 東京, 12 月 (2002).

今崎剛, 橋本博, 清水敏之, 加藤祭, 佐藤衛, 幸多恵子, 宮野雅司: “制限酵素 EcoO1091 および DNA 複合体の結晶構造”, 日本結晶学会平成 14 年度年会, 東京, 12 月 (2002).

堀哲哉, 石原豪史, 佐伯美帆, 五島美絵, 白水美香子, 木川隆則, 宮野雅司, 芳賀達也, 横山茂之: “無細胞タンパク質合成系を用いた M2 ムスカリン性アセチルコリン受容体の合成, 精製, および巻き戻し”, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2002).

山本雅貴, 上野剛, 神田浩幸, 井田孝, 熊坂崇, 宮野雅司, 石川

哲也: “SPring-8 理研構造ゲノムビームライン”, 第 16 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 姫路, 1 月 (2003).

井田孝, 山本雅貴, 熊坂崇, 上野剛, 神田浩幸, 村上博則, 横沢裕, 佐々木勝成, 石川哲也: “構造ゲノムビームライン・サンプルチェンジャーの開発”, 第 16 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 姫路, 1 月 (2003).

沈建仁, 神谷信夫: “結晶構造に基づく光化学系 II 複合体の分子機構”, 日本植物生理学会 2003 年度年会および第 43 回シンポジウム, 東大阪, 3 月 (2003).

山成敏広, 赤堀興造, 沈建仁: “光合成光化学系 II 中のシトクロム b-559 量について”, 日本植物生理学会 2003 年度年会および第 43 回シンポジウム, 東大阪, 3 月 (2003).

作間真介, 沈建仁, 森宏樹, 菅原光明, 宮野雅司, 山本泰: “光合成酸素発生系膜表在性タンパク質の結晶化”, 日本植物生理学会 2003 年度年会および第 43 回シンポジウム, 東大阪, 3 月 (2003).