

理論構造生物学研究室

Theoretical Structural Biology Laboratory

主任研究員 三木邦夫
MIKI, Kunio

生命現象を理解するためには、生体を構成する個別の分子がどのように協調し統合されて、より高度なシステムとして働くのかということを知ることが重要である。当研究室では、いくつかの生命現象のモデルシステムを取り上げ、生物学的に重要な種々の生命システムの分子機構を構造生物学的に解明するための研究を行っている。それらの生命システムとは、例えば、脂質タンパク質輸送システム、細胞分裂開始システム、細胞環境感知・適応システム、エネルギー貯蓄システム、ストレス応答システムなどである。こうした生命システムに含まれる生体高分子の立体構造を、SPRing-8 を利用した X 線結晶構造解析によって、迅速かつ高精度に決定する。加えて、その他の物理化学的手法、分子生物学的手法、および計算機科学的手法も駆使して、生体分子のシステムレベルでの総括的な理解を目指している。また、構造ゲノム科学の推進に貢献すべく、X 線結晶構造解析迅速化のための方法論についても開発を進めている。

1. 生命システムの構造生物学的研究

(1) 脂質タンパク質膜間輸送システムの研究 (竹田^{*1}, 宮武, 三木)

リポタンパク質は脂質が共有結合したタンパク質である。このリポタンパク質は原核生物から真核生物にいたるまで幅広く見られ、その機能も形態維持や物質輸送、薬剤排出など多岐にわたっている。リポタンパク質は脂質を共有結合しているため不溶性であり、リポタンパク質が脂質膜から他の脂質膜へ輸送されるためには、タンパク質による触媒作用が必要である。最近、グラム陰性菌の持つ細胞質膜 (内膜) と外膜の間のペリプラズム空間でのリポタンパク質輸送をつかさどるタンパク質群が、相次いで発見された。ペリプラズム空間のシャペロンタンパク質 LolA, 外膜でのリポタンパク質受容体 LolB, 細胞質膜の ABC トランスポーターである LolCDE 複合体である。これまでの生化学的な知見によると、これら Lol システムは次のような輸送機構でリポタンパク質を外膜へ輸送する。LolCDE 複合体が ATP のエネルギーを利用してリポタンパク質を細胞質膜から遊離する。遊離したリポタンパク質は LolA と複合体を形成することによって、ペリプラズム空間に可溶化される。外膜で LolB がリポタンパク質を受け取り、外膜に組み込む。我々はこれらの Lol システム群による外膜リポタンパク質輸送の分子レベルでの機構解明を目指し、Lol システムのタンパク質群の X 線結晶構造解析を進めている。これまでにペリプラズム空間のシャペロンタンパク質 LolA (1.65 Å 分解能) と外膜でのリポタンパク質受容体 LolB (1.90 Å 分解能) の構造を決定することに成功した。これら 2 つのタンパク質はアミノ酸配列の類似性はほとんどない (8%以下) にもかかわらず、三次元構造は驚くほど良く似ていた。その基本構造はタンパク質の中心部に疎水性のキャビティーを持つ袋状であり、多様な構造を持つリポタンパク質の脂質部分を会合するために都合の良い構造であることが分かった。また、袋のフタを形成する α ヘリックスの配置と疎水性のキャビティーでの芳香性残基の分布が LolA と LolB では異なっていたが、この構造上のわずかな違いが ATP エ

ネルギーを使用することなく LolA から LolB へリポタンパク質を受け渡すために重要であることが解明された。ATP transporter である, LolCDE 複合体の構造解析も開始した。(京都大学大学院理学研究科 三木研究室; 東京大学分子細胞生物学研究所 徳田教授との共同研究)

(2) 生物の環境感知・適応システムの研究 (宮武, 金^{*2}, 三木)

原核生物には、様々な種類の環境感知・適応システムが備わっている。その中で、二成分系と呼ばれるシステムは最も詳細に研究されてきたものの 1 つである。これは、環境情報を感じ取るセンサーキナーゼと、遺伝子転写を制御する転写制御因子の 2 種類のタンパク質群から構成され、原核生物だけではなく一部の真核生物にも見られる汎用性の高いシステムである。本研究では、高度好熱菌 *T.thermophilus* HB8 をモデル生物として、その二成分系タンパク質群を分子レベルで解析する。現在までに、数種類の二成分系タンパク質の発現系構築に成功し、精製・結晶化を試みている。また、二成分系が更に高度に発展した系であるラン藻由来アデニル酸シクラーゼの触媒ドメインの発現も試みており、可溶化剤を用いて不溶性の封入体沈澱からのリフォールディングに成功し、活性を持つ試料が調製できた。この試料を用いて現在結晶化を試みている。また、他の好熱性宿主から、類似のアデニル酸シクラーゼ遺伝子を探索し、発現系の構築を試みている。(東京大学大学院総合文化研究科 大森教授との共同研究)

(3) 細胞分裂開始面決定システムの研究 (岩崎^{*3}, 宮武, 三木)

細胞分裂の際、分裂面の位置を正しく決定するという事は、最も重要なプロセスの 1 つである。近年、原核生物において MinC, MinD などの一連のタンパク質群が、互いに協調して細胞分裂面を決定していることが明らかにされつつある。これらのタンパク質の立体構造を決定し、分裂面位置決定の分子機構を明らかにすることを目的としている。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 MinC, MinD の発現系を作成し、両者の複合体の作成を試みたが、

安定な複合体を得ることはできなかった。しかし、MinD2 量体の結晶を得ることに成功した。現在までに報告されている MinD の立体構造はいずれも単量体であるが、最近、MinD は自己会合する性質があり、重合・脱重合が機能上重要であることが報告された。MinD2 量体構造の決定は、ATP 依存的に MinD が重合・脱重合し、細胞内を振動する機構についての知見を与えると期待される。得られた MinD2 量体結晶は完全双晶であったが、結晶性の改善を試みると同時に、分子置換法での解析を進めている。また、Min 以外にも細胞分裂に関与するタンパク質群の結晶解析を試み、glucose-inhibited division protein A の結晶構造を得ている。

(4) バイオポリエステル生合成・分解システムの研究(久野, 三木; 土肥 (高分子化学研究室))

バイオポリエステルの生合成と分解において重要な働きをするタンパク質群について、立体構造に基づく機能および相互作用様式の研究を行っている。微生物によるバイオポリエステルの生合成には多くのタンパク質が関与している。*Aeromonas caviae* は R 体特異的エノイル CoA ヒドラーゼを持っており、脂肪酸代謝中間体からモノマーを供給する経路を持つ。本酵素の結晶構造を 1.5 Å 分解能で明らかにし、基質特異性改変の鍵となる残基を見出すことができた。これらの残基を変異させた酵素を作成し、様々な鎖長の基質に対する活性を調べ、また組み換え大腸菌を用いて実際のポリマー生産への応用を検討した。一方、バイオポリエステルの分解には特異的な加水分解酵素が関与している。分解酵素はポリエステル表面に吸着することにより効率的に固体基質を加水分解する。多くの分解酵素が 3 つのドメインから構成されるタンパク質であるのに対し、カビの一種 *Penicillium funiculosum* が産生する酵素は触媒機能を持つドメイン 1 つのみから成る。このカビ由来のバイオポリエステル分解酵素の結晶化に成功し、分解能 1.8 Å 以上の反射を与える結晶を得ることができた。(東京工業大学大学院総合理工学研究科 土肥教授; 神奈川大学理学部 齊藤教授; 群馬大学工学部 粕谷博士との共同研究)

(5) 細胞内シグナル伝達制御機構の研究(吉瀬^{*2}, 久野, 三木)

細胞内シグナル伝達におけるキナーゼカスケードにはシグナルが効率よく伝わるような機構を持っている。足場タンパク JSAP-1 は MAP キナーゼカスケードにおいて効率的なシグナル伝達を行わせる。このタンパクは、一連のシグナル伝達に関わる複数のキナーゼと結合してそれらを集積させ、効率的なキナーゼ間相互作用の場を与えることにより、シグナル伝達制御における重要な働きをしている。足場タンパクの結晶構造解析を目指して、本タンパクの大腸菌および昆虫細胞を用いた大量発現系の構築を進めている。(金沢大学がん研究所 善岡教授; 協和発酵工業(株)との共同研究)

(6) ストレス応答システムの研究(庄村^{*4}, 三木)

シャペロニンは細胞の生育に必須な超分子複合体であり、ATP 依存的に変性タンパク質のリフォールディング反応を触媒する。内部に大きな空洞を持つ二重リング構造をとり、空洞内部は親水的な環境で基質タンパク質が正しい折れ畳み反応を行うのに適している。これまでに超好熱菌 *Thermococcus strain* KS-1 由来グループ II 型シャペロニンの結晶構造を 2.4 Å 分解能で決定した。得られた結晶構造

は、空洞への入り口が完全に閉じた closed 型であり、その親水的な内部の環境は、シャペロニンの基質である高次構造が不完全なタンパク質が正しい折れ畳み反応を行うのに適していることが示唆された。しかし、その詳細な分子機構の解明には open 型の構造情報が不可欠である。そこで、このシャペロニンの open 型の構造決定を目指して、異なる結晶型の立体構造を 3.0 Å 分解能で決定した。グループ II シャペロニンは、高濃度の硫酸イオン存在下では closed 型を形成しやすいことが知られているため、今回の結晶化は低濃度の硫酸イオン存在下で行ったが、得られた結晶構造は closed 型であった。硫酸イオンを完全に除いた状態での結晶は、分解能が低すぎるために構造決定には至っていない。しかし、結晶の格子定数や空間群、シャペロニン自身の対称性から、この硫酸イオン非存在下の結晶でシャペロニンは open 型を取っていることが示唆された。(京都大学大学院理学研究科 三木研究室; 海洋バイオテクノロジー研究所 丸山博士; 東京農工大学工学部 養王田助教との共同研究)

(7) 芳香族化合物代謝システムの研究(金^{*2}, 宮武, 久野, 三木)

細菌の中には芳香族化合物を炭素源・エネルギー源として取り込むことができるものが多く存在する。水酸化酵素はその代謝の初発酵素として働く。大腸菌 W 株における 4-ヒドロキシフェニル酢酸 (4-HPA) の代謝では、4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼが初発酵素として働き、4-HPA のベンゼン環の *ortho* 位に水酸基を導入する。この酵素は 2 つのコンポーネント (HpaB, HpaC) からなり、HpaB は基質に水酸基を導入する FADH₂ 依存性酸化酵素、HpaC は FAD を還元して HpaB に供給するフラビン:NADH 酸化還元酵素である。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のゲノム解析の結果、HpaB および HpaC と相同性がある ORF が存在することが分かった。我々はこれらの酵素の反応機構を立体構造に基づいて明らかにすることを目的として、好熱菌由来の酵素の構造解析を行った。HpaB の分子モデルを構築し、精密化した結果、HpaB は 23 本の α -helix と 14 本の β -strand からなるホモテトラマーを形成していた。HpaB と FAD の複合体結晶の解析から 1 つのモノマー当たり 1 分子の FAD を含んでいることが分かった。FAD が結合するクレフトは、極性残基の領域と疎水性残基の領域からなっている。また、隣接するモノマーの 15 番目の α -helix もクレフトの一部を形成していることから、HpaB はホモテトラマーを形成することが FAD の結合に必須であると考えられる。一方、HpaC については、多波長異常分散法による結晶構造の解析の結果、HpaC はホモダイマーを形成し、1 つのモノマー当たり 1 分子の FAD を含んでいた。現在の分子モデルは 114 個の水分子と 2 分子の FAD を含む。HpaC の全体構造は 3 本の α -helix と 9 本の β -strand からなる非 Rossmann fold 型の構造であり、FAD は 3 番目の β -strand に沿って結合していることが分かった。現在、このシステムの生化学的実験も進めている。

2. 構造ゲノム科学

(1) 高度好熱菌タンパク質の構造決定(宮武, 久野, 金^{*2}, 吉瀬^{*2}, 竹田^{*1}, 岩崎^{*3}, 三木)

葉酸代謝系酵素ジヒドロネオプテリンアルドラーゼ, チロシン代謝系酵素 4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼ, glucose-inhibited division protein Gid A, 2 種類の転写制御因子の結晶構造を決定し, 構造に基盤を置いた機能解析を進めている。特に, 転写制御因子については分子シミュレーションによる機能解析も併せて行っている。

(2) 結晶構造解析の迅速化手法の開発 (竹田^{*2}, 宮武, 三木; 朴, 神谷 (研究技術開発室))

タンパク質結晶学において構造解析の迅速化を目指すためには, 結晶化とならんで位相決定が重要な問題である。最近, 位相決定に使用されはじめた I, Xe および Cs などの重原子は, いずれも通常タンパク質の構造解析で使用されるエネルギー (E ~ 12.4 keV) よりも非常に高いエネルギー領域 (E ~ 35 keV 付近) に, それらの K 吸収端を持っている。そのため, これまでにはこれらの重原子に多波長異常分散 (MAD) 法が適用されることがなかった。SPring-8 ではこのエネルギー領域の X 線を利用することができるため, 高エネルギー X 線を用いた MAD 法は, 新規タンパク質の構造決定を迅速に行う方法として, 非常に期待がもたれる。これまでに構造既知のタンパク質を用いて, Xe を異常分散原子として用いた MAD 法による位相決定を行った。その結果, 残基の種類を特定することができるモデリング可能な良好な電子密度が得られた。同様な結果は異常分散原子として I を用いることによっても得られ, 新規な構造を持つタンパク質を効率的に決定するための位相決定方法として, 非常に有効であることを示すことができた。現在, 更に効率的な試料結晶調製方法について研究を進めている。(JASRI 河本博士との共同研究)

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

The goal of our laboratory is to understand the molecular mechanism of biological phenomena from the viewpoint of structural biology. We investigate biological molecules in living organisms to understand how they are integrated to work cooperatively as a whole system. Our research targets are, for example, transmembrane transport, regulatory process of cell deviation, cellular environmental sensing/adaptation, energy storage/metabolism, and stress response. We determine precise three-dimensional structures of biological macromolecules by means of X-ray crystallography using synchrotron radiation of SPring-8. In addition, we employ the physicochemical method including *in situ* measurements with the atomic force microscope, molecular biological methods, and computational methods such as molecular simulation to understand the time course behavior of the biological molecular systems.

1. Structural biology of biological systems

(1) Studies on outer-membrane trafficking system of lipoproteins in Gram-negative bacteria

In *Escherichia coli*, there are more than 90 species of lipoproteins that have covalently bound lipids. The Lol system mediates the translocation of the insoluble outer membrane lipoproteins. The Lol system is composed of a periplasmic chaperone LolA, an outer membrane receptor LolB, and the LolCDE complex that belongs to an ATP-binding cassette (ABC) transporter family. The Lol-

CDE complex recognizes the sorting signal and releases the outer-membrane lipoprotein from the outside of the inner membrane by using the ATP hydrolysis energy. The released outer membrane lipoprotein forms a 1:1 complex with LolA. The outer membrane lipoprotein is accepted by LolB, and is subsequently incorporated into the periplasmic side of the outer membrane. We determined the crystal structures of LolA and LolB at 1.65 Å and 1.90 Å resolution, respectively. Despite their dissimilar amino acid sequences (identity ~8%), the structures of LolA and LolB are strikingly similar to each other. Both have a hydrophobic pouch made of an unclosed β-barrel and α-helical lid, and these pouches are expected to accommodate the lipid moiety of lipoproteins. However, the structural differences in size and shape of hydrophobic inner spaces between LolA and LolB are highly connected to the functional differences between two proteins, and are essential for the vectorial translocation of lipoproteins from LolA to LolB.

(2) Studies on environmental sensing/adaptation systems

Two-component regulatory systems are ubiquitous signal transduction devices and respond environmental stimuli in prokaryotic cells and even in some eukaryotic cells. The systems basically consist of two molecules: sensor-kinases and response regulators. Sensor-kinases sense environmental stimuli to regulate the kinase activity. Response regulators control transcription of the corresponding genes. In the present study, we intend to elucidate molecular mechanism of the systems derived from *T. thermophilus* HB8. Until now, we succeeded in preparing one sensor-kinase sample and solving crystal structures of two response regulators. In addition, we also focus on the more evolved form of the two-component regulatory system: adenylatecyclase from *Spirulina platensis*.

(3) Studies on cell division determination system

Bacterial cell division requires accurate selection of the middle of the cell. This selection is mediated by MinC, MinD, and MinE proteins. In order to elucidate the mechanism of division site selection, we started to determine the crystal structures of Min proteins. MinC and MinD from *Thermus thermophilus* HB8 were expressed and purified from *E. coli*. The screening of the complex between MinC and MinD from *Thermus thermophilus* HB8 is not yet successful. The crystals of the MinD dimer were obtained, although all the structures of MinD are hitherto reported as monomeric. Structure determination by the molecular replacement is in progress.

(4) Studies on biopolymer biosynthesis/degradation system

R-Specific enoyl-CoA hydratase is an enzyme which supplies monomers for the biosynthesis of biopolyester in *Aeromonas caviae*. We have solved the crystal structure of the enzyme at 1.5 Å resolution and revealed some key residues that could define the specificity for chain-length of substrates. A polymer-degrading enzyme from *Penicillium funiculosum* has been successfully crystallized which diffracts X-rays beyond 1.8 Å resolution.

(5) Studies on regulation system of cellular signal transduction

Scaffold proteins are important for the regulation of cellular signal transduction. JSAP-1 is a scaffold protein involved in the MAP kinase cascade. Construction of an overproduction system of the protein is under way.

(6) Studies on stress response system of group II chaperonin from hyperthermophilic archaea

Chaperonins, specified as a class of molecular chaperones, function as a folding chamber in an ATP depend-

ing manner. Its back-to-back stacked toroidal assembly is common among most of chaperonins. Crystal structures of group II chaperonins have been determined only in closed states. In order to elucidate the molecular mechanism of the group II chaperonin, it is important to know the atomic structure at the open state. It is known that the concentration of sulfate ion critically affects on the conformational state of group II chaperonins. Namely, a high concentration of sulfate ions stabilizes the closed state of chaperonins. The first crystals of the group II chaperonin were obtained under the high concentration of ammonium sulfate, and their structures were completely in the closed state. At a low concentration of sulfate ion, the second crystal structure was determined, which also showed the closed state structure. The third crystals of the group II chaperonin are produced under sulfate ion free condition. However, their diffraction power is poor. The improvement of the crystallization condition and mutational studies for the stabilization of the open state are now in progress.

(7) Studies on aromatic compound catabolic system

A catabolic pathway of aromatic compounds is one of the most important processes as a source of carbon and energy of bacteria. In the case of *Escherichia coli*. W, the first intermediate of the catabolic pathway consists of two components, HpaB and HpaC, encoded by the *hpaB* and *hpaC* genes, respectively. We have performed crystal structure analyses of HpaB and HpaC from *T. thermophilus* HB8 to elucidate reaction mechanisms of the enzymes based on their 3D structures. The overall HpaB structure is a homotetramer consisting of 23 α helices and 14 β strands, each monomer contains one FAD molecule. Formation of the tetramer is found to be essential for enzymatic activity because the FAD binding clefts are located in the interfaces of each monomer. On the other hand, the HpaC forms homodimer and each monomer contains one FAD molecule. The overall structure of the monomer is non-Rossmann fold type, consisting of 3 α helices and 9 α strands. Biochemical measurements of the system are now in progress.

2. Structural Genomics

(1) Structure determination of proteins from thermophilic bacteria

We have determined crystal structures of proteins from *T. thermophilus* HB8; 7,8-Dihydroneopterin aldolase, 4-Hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase, glucose-inhibited division protein Gid A, and 2 kinds of response regulators. We also carry out functional analysis based on the structures.

(2) Studies on rapid determination of crystal structures

Xenon (Xe) is a rare gas atom that can be introduced into many protein crystals by pressurization. Multi-wavelength anomalous dispersion (MAD) phasing method using Xe atoms is expected as a method for high-throughput protein crystallography. However, the *K*-absorption edge of Xe (34.56 keV) is in the ultra-high energy region that are difficult to use even at synchrotron facilities. At the bio-crystallography beamline BL41XU of SPring-8, a wide range of energy from 6.5 keV to 38 keV can be available to general users. The ultra-high energy X-rays from 21 keV to 38 keV are generated as third harmonics emissions of the in-vacuum undulator. Beam properties at the region are good enough to collect reflection data from macromolecular crystals. In order to investigate the practicality of the Xe-MAD method using ultra-high energy X-rays, we tested on a hen egg-white lysozyme at the beamline BL41XU. The electron density map was sufficient enough to build a molecular model. Iodine is also

found to be useful for MAD phasing as an anomalous scatterer.

Research Subjects and Members of Theoretical Structural Biology Laboratory

1. Structural biology of biological systems
2. Structural genomics

Head

Dr. Kunio MIKI

Members

Dr. Hideyuki MIYATAKE

Dr. Tamao HISANO

Dr. Wakana IWASAKI^{*1}

Dr. Kazuki TAKEDA^{*2}

Dr. Seong-Hoon KIM^{*2}

Dr. Tomoyasu KICHISE^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Nobuo KAMIYA (Div. Bio-Crystallography Tech.)

Dr. Sam-Yong PARK (Div. Bio-Crystallography Tech.)

Dr. Yoshiharu DOI (Polymer Chemistry Lab.)

Visiting Members

Dr. Noritake YASUOKA

Dr. Masaru TANOKURA (Univ. Tokyo)

Dr. Akiko KITA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Dr. Kumiko KOBAYASHI (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Dr. Zihe RAO (Tsiughua Univ., Beijing)

Dr. Hai DANG (Tsiughua Univ., Beijing)

Mr. Yasuhito SHOMURA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Trainees

Mr. Tsuyoshi NONAKA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Mr. Nobutaka NUMOTO (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Mr. Akira NAKAMURA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Mr. Satoshi WATANABE (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑 誌]

(原 著 論 文) * 印 は 査 読 制 度 が ある 論 文

Liu L., Nogi T., Kobayashi M., Nozawa T., and Miki K.:

“Ultra-high-resolution structure of high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*”, *Acta Cryst. D* **58**, 1085–1091 (2002). *

Shomura Y., Yoshida T., Maruyama T., Yohda M., and Miki K.: “Crystallization and preliminary X-ray char-

acterization of archaeal group II chaperonin α -subunit from *Thermococcus* strain KS-1”, *Acta Cryst. D* **58**, 1830–1832 (2002). *

Liu L., Iwata K., Yohda M., and Miki K.: “Structural insight into gene duplication, gene fusion and domain swapping in the evolution of PLP-independent amino acid racemases”, *FEBS Lett.* **528**, 114–118 (2002). *

Ogata H., Mizoguchi Y., Mizuno N., Miki K., Adachi S., Yasuoka N., Yagi T., Yamauchi O., Hirota S., and Higuchi Y.: “Structural studies of the carbon monoxide complex of [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: Suggestion for the initial activation site for dihydrogen”, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11628–11635 (2002). *

Liu L., Iwata K., Kita A., Kawarabayashi Y., Yohda M., and Miki K.: “Crystal structure of aspartate racemase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its implications for molecular mechanism of PLP-independent racemization”, *J. Mol. Biol.* **319**, 479–489 (2002). *

Kita A., Matsunaga S., Takai A., Kataiwa H., Wakimoto T., Fusetani N., Isobe M., and Miki K.: “Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1”, *Structure* **10**, 715–724 (2002). *

Fujihashi M., Peapus D. H., Nakajima E., Yamada T., Saito J., Kita A., Higuchi Y., Sugawara Y., Ando A., Kamiya N., Nagata Y., and Miki K.: “X-ray crystallographic characterization and phasing of a fucose-specific lectin from *Aleuria aurantia*”, *Acta Cryst. D* **59**, 378–380 (2003). *

Hisano T., Tsuge T., Fukui T., Iwata T., Miki K., and Doi Y.: “Crystal structure of the (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase from *Aeromonas caviae* involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis”, *J. Biol. Chem.* **278**, 617–624 (2003). *

(総説)

大谷直人, 中川紀子, 竇関淳, 海老原章郎, 佐藤伸哉, 上利佳弘, 小林慎一郎, 上利和子, 真岡伸子, 増井良治, 三木邦夫, 横山茂之, 倉光成紀: “バクテリア蛋白質の網羅的発現”, *蛋白質 核酸 酵素* **47**, 1009–1013 (2002).

庄村康人, 三木邦夫: “タンパク質高次構造形成にかかわる生物マシーナリ”, *日本結晶学会誌* **45**, 54–59 (2003).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Hisano T., Tsuge T., Fukui T., Iwata T., Doi Y., and Miki K.: “Structural analysis of (*R*)-hydratase complexed with its substrate”, *Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era*, Yokohama, Feb. (2002).

Shomura Y., Yoshida T., Iizuka R., Maruyama T., Yohda M., and Miki K.: “Crystal structural analysis of archaeal group II chaperonin having the defect of refolding activities”, *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting*, Cold Spring Harbor, USA, May (2002).

Miki K.: “Structural basis of lipoprotein transport by LolA and LolB in the Lol system”, *2nd Tsinghua Int. Conf. of Protein Science (2nd TICPS)*, Beijing, China, June (2002).

Takeda K.: “Structural basis of lipoprotein traffic across the periplasm”, *Gordon Research Conf. on Bacterial Cell Surfaces*, New London, USA, June (2002).

Takeda K., Miyatake H., Yokota N., Matsuyama S., Tokuda H., and Miki K.: “Structural basis of lipoprotein traffic across the periplasm (II)”, *Gordon Research Conf. on Bacterial Cell Surfaces*, New London, USA, June (2002).

Hisano T., Tsuge T., Doi Y., and Miki K.: “Crystal structure of (*R*)-hydratase and its mutant complexed with crotonyl-CoA”, *19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX)*, Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Kim S., Miyatake H., Hisano T., and Miki K.: “Crystal structure of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase large chain (HpaA) from *Thermus thermophilus* HB8”, *19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX)*, Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Ito S., and Miki K.: “Crystal structure of a calcium-free α -amylase AmyK38”, *19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX)*, Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Kita A., Matsunaga S., Takai A., Kataiwa H., Wakimoto T., Fusetani N., Isobe M., and Miki K.: “Crystal structure of the complex between calyculin A and protein phosphatase 1 catalytic subunit”, *19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX)*, Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Iwasaki W., Miyatake H., and Miki K.: “Crystal structure of the small form of glucose-inhibited division protein A from *Thermus thermophilus* HB8”, *19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX)*, Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Takeda K., Miyatake H., Yokota N., Matsuyama S., Tokuda H., and Miki K.: “Crystallographic studies of the lipoprotein localization factors LolA and LolB from *E. coli*”, *19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX)*, Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Miki K.: “Structural basis of bacterial lipoprotein localization system”, *8th Harima Int. Forum on Structural Biology of Biological Machinery*, Harima, Mar. (2003).

(国内会議)

岩田忠久, 久野玉雄, 平石知裕: “直鎖状脂肪族ポリエステル単結晶の結晶構造解析”, *文科省科研費補助金特定領域研究 (B) 環境低負荷型高分子第 5 回公開シンポジウム*, 名古屋, 6 月 (2001).

久野玉雄: “(*R*) 体特異的エノイル-CoA ヒドラーゼの基質認識機構”, *理研シンポジウム「構造生物学 (VII)」*, 播

- 磨, 3月(2002).
- 吉田允, 岩田耕育, 劉利軍, 三木邦夫, 養王田正文: “超好熱性古細菌由来アスパラギン酸ラセマーゼの部位特異的変異による反応機構解析”, 第6回マリンバイオテクノロジー学会大会, 小金井, 5月(2002).
- 飯塚怜, 駒田俊裕, 久堀徹, 吉田尊雄, 丸山正, 庄村康人, 三木邦夫, 養王田正文: “超好熱性古細菌由来グループII型シャペロニンの反応サイクルにおけるヌクレオチドの役割”, 第6回マリンバイオテクノロジー学会大会, 小金井, 5月(2002).
- 野中剛, 藤橋雅宏, 喜田昭子, 萩原浩, 尾崎克也, 伊藤進, 三木邦夫: “カルシウムを含まない α -アミラーゼ AmyK38 のX線結晶構造”, 第2回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6月(2002).
- 喜田昭子, 松永茂樹, 高井章, 片岩裕貴, 脇本敏幸, 伏谷伸宏, 磯部稔, 三木邦夫: “プロテインフォスファターゼ1-カリクリンAの複合体のX線結晶構造解析”, 第2回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6月(2002).
- 庄村康人, 虎山一郎, 喜田昭子, Sah D.-Y., 三川潮, 三木邦夫: “結晶構造に基づく Stilbene Synthase (STS) の閉環反応機構の解明”, 第2回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6月(2002).
- 飯塚怜, 駒田俊裕, 久堀徹, 吉田尊雄, 丸山正, 庄村康人, 三木邦夫, 養王田正文: “古細菌型シャペロニンの機能発現を支える構造変化”, 第2回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6月(2002).
- 海老原章郎, 寛閑淳, 中川紀子, 佐藤伸哉, 上利佳弘, 真岡伸子, 上利和子, 増井良治, 三木邦夫, 横山茂之, 倉光成紀: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 蛋白質の網羅的発現と精製の進行状況”, 第2回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6月(2002).
- 前河友紀, 渡邊信久, 姚閑, 喜田昭子, 三木邦夫, 石田哲夫, 堀池喜八郎, 田中勲: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来メタピロカテラーゼの結晶構造解析”, 第2回日本蛋白質科学会年会, 名古屋, 6月(2002).
- 世古丈裕, 劉利軍, 三木邦夫, 養王田正文: “*Pyrococcus horikoshii* OT3 AspR の酸素活性部位の挙動の分子力学的シミュレーション”, CBI学会第3回大会(2002年大会), 東京, 9月(2002).
- Kharel Y., Zhang Y., 藤橋雅宏, 三木邦夫, 古山種俊: “The role of highly conserved aromatic residues in *Micrococcus luteus* B-P 26 undecaprenyl diphosphate synthase”, 第75回日本生化学会大会, 京都, 10月(2002).
- 駒田俊裕, 飯塚怜, 久堀徹, 吉田尊雄, 丸山正, 庄村康人, 三木邦夫, 養王田正文: “グループII型シャペロニンへのヌクレオチド結合の協同性”, 第75回日本生化学会大会, 京都, 10月(2002).
- 吉田拓允, 岩田耕育, 劉利軍, 三木邦夫, 養王田正文: “部位特異的変異による超好熱性古細菌由来アスパラギン酸ラセマーゼ反応機構の解析”, 第75回日本生化学会大会, 京都, 10月(2002).
- 三木邦夫: “大学における構造ゲノム科学: プログラムへの取り組みと今後の推進”, 第75回日本生化学会大会シンポジウム「生物マシーナリーの構造生物学と構造ゲノム科学」, 京都, 10月(2002).
- 柘植丈治, 田口精一, 久野玉雄, 土肥義治: “モノマー供給酵素 PhaJ の基質特異性改変とバイオポリエステル生産への応用”, 日本生物工学会平成14年度大会, 大阪, 10月(2002).
- 久野玉雄, 手塚陽子, 粕谷健一, 白木麻里, 岩田忠久, 土肥義治, 三木邦夫, 斎藤光實: “カビ由来ポリヒドロキシアルカン酸分解酵素の結晶学的研究”, 日本結晶学会平成14年度年会, 東京, 12月(2002).
- 金成勲, 宮武秀行, 久野玉雄, 三木邦夫: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase large chain (HpaB) および small chain (HpaC) 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).
- 天野仰, 藤橋雅宏, 安藤昭一, 三木邦夫, 長田嘉穂: “ヒイロチャワンタケ, レクチン AAL の立体構造と部位特異的変異体の解析”, 第25回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2002).
- 三木邦夫: “大学におけるターゲット指向型構造ゲノム科学: タンパク3000プロジェクト”, 第25回日本分子生物学会年会シンポジウム「ターゲット指向型構造ゲノム科学の展望」, 横浜, 12月(2002).
- 岩崎わかな, 宮武秀行, 三木邦夫: “Glucose-inhibited division protein A (GidA) の結晶構造”, 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).
- 竹田一旗, 宮武秀行, 朴三用, 河本正秀, 神谷信夫, 三木邦夫: “I, Xe, Cs を用いた MAD 法による蛋白質 X 線結晶構造解析”, 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).
- 久野玉雄, 宮武秀行, 三木邦夫: “*Thermus thermophilus* HB8 由来 7,8-dihydroneopterin aldolase の結晶構造”, 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).
- 庄村康人, 吉田尊雄, 丸山正, 養王田正文, 三木邦夫: “グループII型シャペロニンの結晶構造解析”, 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).
- 三木邦夫: “企画講演「蛋白質結晶学と構造プロテオミクス」: タンパク質の個別的解析プログラムによる構造・機能研究”, 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).
- 金成勲, 宮武秀行, 久野玉雄, 三木邦夫: “高度好熱菌由来 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase large chain (HpaB) および small chain (HpaC) の結晶構造”, 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).
- 三木邦夫: “構造ゲノム科学と構造生物学の接点”, 第227回CBI学会研究講演会「タンパク質研究の最前線」, 東京, 1月(2003).