

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、生命を構成する個々の分子が、どのように互いに協調して、高度に統合されたような超分子システムを作っているかということを明らかにすることが重要である。当研究室ではこのような視点に鑑み、生物学的に重要な種々の生命システムを対象として、放射光を利用した X 線結晶構造解析の手法を用いて構造生物学的研究を行っている。対象とする生命システムとは、例えば、脂質タンパク質膜間輸送、細胞環境感知・応答、細胞分裂制御、バイオポリエステル合成、細胞内シグナル伝達制御、芳香族化合物代謝などに関するものである。これらの生命システムに含まれる生体高分子の立体構造を、SPRING-8 の特性を最大限に利用した X 線結晶構造解析によって、迅速かつ高精度に決定し、得られた立体構造を基盤とする機能解析を目指している。加えて、その他の物理化学的手法も駆使して、生体分子の分子機構を統括的に理解しようとしている。また、構造ゲノム科学の推進に貢献するために、X 線結晶構造解析の迅速化、そのための新規手法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) 脂質タンパク質輸送に関する構造生物学的研究 (竹田^{*1}, 宮武, 三木)

細菌のリポタンパク質は N 末端の残基が脂質修飾されていて、その疎水的な脂質部分が内膜あるいは外膜に組み込まれている。内膜で脂質修飾されたリポタンパク質は特定の配列によって選別され、内膜あるいは外膜に局在化される。グラム陰性細菌に広くみられる Lol タンパク質群は、リポタンパク質を内膜から外膜へ親水的环境であるペリプラズム空間を横切って輸送する。グラム陰性細菌のリポタンパク質輸送を構造生物学的に解明するため、大腸菌由来のペリプラズム空間のシャペロンタンパク質 LolA とリポタンパク質受容体 LolB の結晶構造をそれぞれ 1.65 Å と 1.90 Å 分解能で決定した。その結果、2つのタンパク質間にはアミノ酸配列上の類似性がほとんどないにもかかわらず、どちらの構造も U 字型の β シートと三本の α ヘリックスから構成されているなど、驚くほどよく似ていることが判明した。 β シートと α ヘリックスが形成する空洞の表面は疎水性の残基で構成されていて、これらの空洞がリポタンパク質の脂質部分の結合部位であると推定することができた。しかしながら、三本のヘリックスの位置や相対配置などが LolA と LolB の間で異なっていた。これらの構造上の異差はリポタンパク質との親和性の違いに影響し、その親和性の差を利用して ATP を使えないペリプラズム空間でのリポタンパク質輸送を実現していることが示された (東京大学分子細胞生物学研究所 徳田教授, 京都大学大学院理学研究科 三木研究室との共同研究)。

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

生物にとって周囲の環境情報を感知し、適応することは生存上必須であり、様々な環境感知・適応システムが知られている。その中で、2成分情報伝達系と呼ばれるシステムは、その汎用性の高さから、原核生物界で広く採用されて

いる。2成分情報伝達系は、環境情報を感知するセンサーキナーゼタンパク質と、それから情報を受け取って転写を制御する転写制御タンパク質の2種類から構成されている。本研究では、*T. thermophilus* HB8 の2成分情報伝達系を構造生物学的に研究し、このシステムに共通する情報伝達機構を解明することを目的とする。現在までに、native の形では精製が困難であった数種類のセンサーキナーゼタンパク質を his-tag 付きの形で発現し、精製した。現在これらの結晶化条件を検討している。また、3種類の転写制御因子タンパク質結晶化・構造解析も行った。さらに、2成分系が進化してきた際の祖先と考えられる、ラン藻由来アデニル酸シクラーゼの触媒ドメインおよび全長の発現・精製も試みており、精製時に試料を変性させることなく、native 条件下で効率的に目的タンパク質を得るプロトコルを確立できた。現在こうした試料の結晶化条件の検討を行っている (東京大学大学院総合文化研究科 大森教授との共同研究)。一方、ラン藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 由来の酸素センサータンパク質として、ヘム PAS ドメインを含む Alr2428 タンパク質を見だし、COS (Cyanobacterial oxygen sensor) と名付け、そのドメインが酸化還元状態を感知しうることを生化学的実験により明らかにした。さらに、共鳴ラマン測定などの分光学的測定を COS の各リガンド結合型に対して行うことにより、このタンパク質の酸素感知機構が解明されつつある (東京大学大学院総合文化研究科 池内助教授との共同研究)。

(3) 細胞分裂関連システムの研究 (岩崎^{*1}, 宮武, 三木)

Glucose-inhibited division protein A (GidA) は、tRNA の修飾に関与するタンパク質である。5-methylaminomethyl-2-thiourigine の生成反応経路で働き、この修飾には、コドン-アンチコドン相互作用を安定化する役割がある。*gidA* 遺伝子を失活させると、2塩基のフレームシフトが起きてしまう。*gidA* 遺伝子は原核・真核生物に広く存在する。生物種によっては、分子量の小さい2つ目の GidA (GidA_{small}) を

持つものもある。本研究では、*Thermus thermophilus* HB8 由来の GidA_{small} の結晶構造を、多波長異常分散法により、1.65 Å 分解能で決定した。得られた構造は、Rossmann fold を持っており、結晶化溶液に FAD を加えていないにもかかわらず、FAD を高い占有率で結合していた。GidA_{small} のフォールディングは、フラビンタンパク質の構造上の特徴を備えていたことから、FAD は GidA の補酵素であることが明らかになった。GidA が酸化還元反応を触媒するかはまだ不明であるが、GidA_{small} の構造から、FAD が機能に必要であることが強く示唆された。GidA の一次配列は、GidA_{small} と比べると 2 カ所の挿入配列を持つ。得られた GidA_{small} の構造を元に、GidA のモデルを作成したところ、2 つの挿入配列は、それぞれ触媒部位と tRNA 認識部位を構成すると考えられた。

(4) バイオポリエステルの生合成・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、構造解析を行い、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。バイオポリエステル (ポリ (R-3-ヒドロキシアリカン酸)) 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の表面に結合・吸着することにより効率的に固体基質を加水分解する。多くの分解酵素は 3 つのドメインから構成され、各ドメインはそれぞれ特異的な機能を持っている。これらのうち 2 つは加水分解反応の触媒およびポリエステル固体への吸着において中心的な働きをするドメインである。触媒ドメインはポリエステルのエステル結合を加水分解することによりモノマー単位まで分解する。ポリエステル固体への吸着能はほとんどなく、固体基質の効率的な分解には吸着ドメインの働きが必須である。このようなマルチドメイン構造の酵素に対し、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 つのみからなる。この酵素はマルチドメイン酵素と同等な分解活性を持っており、単一のドメインに触媒機能および吸着機能を有していると考えられる。本酵素の結晶化を行い、PEG8000 を沈殿剤に用いることにより良質な結晶を得ることに成功した。この結晶は放射光 X 線に対し、分解能 1.8 Å 以上の回折点を与えた。白金誘導体の調製を行い、SIRAS 法により構造解析を行った。その結果、 α/β 加水分解酵素構造を持っていることが分かった。これはアミノ酸配列の特徴からは予想することができず、加水分解酵素構造ファミリーの分子進化の観点から見ても興味深い (神奈川大学理学部 斉藤教授、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。足場タンパク質 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。このタンパク質は、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。足場タンパクの構造解析を行い、足場タンパク質-キナーゼ間、足場タンパク上におけるキナーゼ-キナーゼ間相互作用

を明らかにする。本タンパク質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。昆虫細胞内での発現を確認し、精製を試みた。さらなる高発現のための条件を検討する。(金沢大学がん研究所 善岡教授、協和発酵工業との共同研究)

(6) 芳香族化合物代謝システムの研究 (金^{*2}、宮武、久野、三木)

4-ヒドロキシフェニル酢酸の微生物分解において、その代謝経路の初段階には 4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼが働く。これはオキシゲナーゼコンポーネント (HpaB) およびリダクターゼコンポーネント (HpaC) の 2 つの酵素から構成される。HpaB は 4-ヒドロキシフェニル酢酸の *ortho* 位に水酸基を導入する反応を触媒する FAD 依存性酸化酵素であり、HpaC は NADH を用いて FAD を還元し HpaB に供給するフラビン:NADH 酸化還元酵素である。両コンポーネント間における電子のやりとりは FAD/FADH₂ の受け渡しによってなされ、その時コンポーネント間で相互作用があると考えられる。しかし、4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼの場合、直接的な相互作用がなくても、FAD/FADH₂ が溶媒中を拡散することによって、HpaB と HpaC との間での受け渡しが可能であることが知られている。このような酵素 2 成分系は、ほかの芳香族化合物を酸化する酵素系にも見られ、Two-Component Flavin-Diffusible Monooxygenase (TC-FDM) Family と呼ばれるスーパーファミリーを形成している。FAD の両コンポーネントに対する結合・解離のしくみはこのスーパーファミリー酵素による芳香族化合物分解のメカニズムにおいて大きな特徴といえる。このメカニズムを明らかにするため、*Thermus thermophilus* HB8 由来の HpaB、HpaC およびそれらの補酵素複合体の結晶構造解析を行った。HpaB の全体構造は medium-chain acyl-CoA dehydrogenase と類似していることが分かった。しかし、FAD 結合部位近傍のループ構造が大きく異なっており、この構造的な特徴が HpaB から FAD 分子が着脱される機構と関連があると考えられる。一方、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。HpaC の全体構造は *Archaeoglobus fulgidus* 由来 ferric reductase (FeR) と類似していたが、FAD が結合するクレフトの形状は、HpaC の方が FeR の場合よりも、FAD を容易に着脱する構造であることが比較の結果示唆された。

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^{*1}、三木)

Glucose-inhibited division protein (GidA)、葉酸代謝系酵素ジヒドロネオプテリナルドラーゼ、芳香族化合物代謝系酵素 4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼ、転写制御因子の結晶構造解析を行い、構造と機能の関係を解析している。特に、4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼについては、FAD、NAD および基質複合体の解析に重点を置いている。

(2) 結晶構造解析の迅速化手法の開発 (竹田^{*1}、宮武、金^{*2}、三木；朴、神谷 (研究技術開発室))

(i) 結晶構造解析の迅速化手法の開発

多波長異常散乱 (MAD) 法による X 線結晶構造解析は、

もっとも汎用的なタンパク質立体構造決定法の1つである。本研究では、大型放射光施設 SPring-8 で得られる 35 keV の超高エネルギー X 線を使用して、このエネルギー領域に吸収端を持つヨウ素原子あるいはキセノン原子を異常散乱原子として導入したタンパク質結晶の MAD データをそれぞれ収集した。MAD データを解析した結果、どちらの場合にもタンパク質構造のモデリングに適した電子密度マップが得られた。この研究により、SPring-8 の超高エネルギー X 線を利用した I-MAD 法と Xe-MAD 法は生体高分子の構造決定の簡素化に非常に有効であることを示すことができた (JASRI 河本博士との共同研究)。

(ii) 全自動結晶化・観察ロボットの開発

実験室レベルにおける生体高分子結晶化のための完全自動化装置の開発を行った。装置は分注部、観察部およびストレージ部の3つから構成されており、それぞれが1つの制御コンピュータによって有機的に連結されている。分注部は、シッティングドロップ法による結晶化を行うために、SBS 規格に準じる 96 穴あるいは 24 穴の市販の結晶化用プレートに対応している。高粘性の結晶化溶液も精度よく分注するために、母液用分注ノズル、ドロップ用分注ノズルおよびタンパク質溶液用分注ノズルの3本の専用ノズルが実装されている。実験再現性の障害になる分注時の不要な蒸発は、分注毎にシーリングする機構によって防いでいる。分注後の結晶化プレートは自動的に 500 枚までストック可能なストレージ部に送られる。結晶化プレートは自動的にバーコード管理され、結晶化の時間経過がすべてコンピュータ上で管理される。ストレージ部内に観察装置が実装されており、温度変動を与えることなく結晶化の観察が行えるように設計されている。ストックされたプレートはあらかじめ決められた任意のスケジュールによって自動的に順次観察され、タンパク質結晶の特徴を自動的に認識するソフトによって、ドロップ中の結晶を自動抽出するように設計されている (パナソニックファクトリーソリューションズとの共同開発)。

(iii) フリーフロー等電点電気泳動法を用いた X 線結晶解析向けのタンパク質の電荷的分離

X 線結晶解析におけるタンパク質の結晶化の成否は、タンパク質試料の電荷の均一性に大きく左右される。等電点電気泳動法は、pH 勾配下で両性電解質の等電点差を利用して各成分を分離する方法であり、分離だけではなく濃縮もできる特徴がある。Tecan 社製のフリーフロー電気泳動システムは、変性または非変性のいずれの条件下でも 96 分画までの高速連続分画が可能であり、ポリアクリルアミドゲルなどのマトリクスを使わず溶液中で分離・分取を行うため高収率で目的物質を回収することができる特徴がある。しかし、このシステムで pH 勾配を作るために用いられる両性電解質溶液は Prolyte という付属のバッファーを用いているが、その組成は公開されておらず、目的タンパク質の活性を失う恐れがある有害物質が混入している可能性がある。そこで、タンパク質精製・結晶化に適した泳動バッファーの開発を行った。天然および合成の低分子量両性電解質を用いて様々な混合比を検討し、pH 勾配が適切になるように調製した。その結果、市販の Prolyte に比べて遜色のない pH 勾配を形成できた (テカンジャパンとの共同開発)。

*1 協力研究員, *2 連携研究員

Research of our laboratory aims to understand the molecular mechanism of biological phenomena from viewpoint of structural biology. We investigate biological molecules in living organisms to understand how they are integrated to work cooperatively as a whole supramolecular system. Our research targets are, for example, transmembrane transport, cellular environmental sensing/adaptation, regulatory process of cell division, biopolymer biosynthesis, cellular signal transduction and aromatic compound metabolism. We determine precise three-dimensional structures of biological macromolecules by means of X-ray crystallography using synchrotron radiation of SPring-8. In addition, we develop several methodologies concerning protein crystallography to contribute the progress of structural genomics.

1. Structural biology of biological systems

(1) Structural studies on lipoprotein transport

The Lol proteins, widely found in Gram-negative bacteria, mediate the transport of insoluble bacterial lipoproteins from the inner membrane to the outer membrane through the periplasmic space. The crystal structures of a periplasmic lipoprotein carrier, LolA, and a lipoprotein receptor, LolB, from *Escherichia coli* were determined at 1.65 and 1.90 Å, respectively. The structures of LolA and LolB are surprisingly similar to each other and characterized by a U-shaped β -barrel and three α -helices plugging the sheet. For both proteins, the inner surfaces of the β -sheet and α -helices consisted by hydrophobic residues form cavities, which are possible binding sites of the lipid moiety of the lipoprotein. However, some structural differences, such as the position and orientation of three α -helices, are found between LolA and LolB. These structural differences may cause the different binding affinities for lipoproteins, which may make it possible to transfer lipoproteins from LolA to LolB in the periplasmic space without hydrolysis energy of ATP.

(2) Environmental signal sensing systems

Two component signal transduction systems, consisting of sensor histidine kinases and response regulators, are ubiquitous in prokaryotic organisms. *T. thermophilus* HB8 also equips the systems. We have been carried out structural biological studies of the systems from *T. thermophilus* HB8 as a model system, to find out the general mechanism of signal transduction in the systems. We reconstructed the overexpression systems of the sensor histidine kinases with His-tags. Purification and crystallization of the proteins are now in progress. In addition, we also focus on the other two-component regulatory systems of adenylate cyclase from *Spirulina platensis* and a putative oxygen sensor domain from *Anabaena* 7120.

(3) Cell division related proteins

Glucose-inhibited division protein A (GidA) plays a role in tRNA modification. It is involved in the biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in the tRNAs, which stabilize codon-anticodon interactions. The *gidA* gene is widely distributed in both prokaryotes and eukaryotes. A subset of organisms has a second smaller GidA (GidA_{small}). We determined the crystal structure of GidA_{small} from *T. thermophilus* HB8 at 1.65 Å resolution by the MAD method. The structure of GidA_{small} has a Rossmann fold, which is characteristic of a dinucleotide

binding fold. Although FAD was not added to the crystallization media, it was bound to GidA_{small} at full occupancy. The topology of GidA_{small} satisfies the features of flavoproteins, revealing FAD as a genuine cofactor of GidA.

(4) Structural biology of the systems of biosynthesis and degradation of biopolyesters

Degradation of biopolyester (poly (R-3-hydroxyalkanoate)) is conducted by a specific enzyme, PHA depolymerase. Most of known PHA depolymerases are composed of three distinct domains with specific functions. In contrast, a fungal enzyme from *Penicillium funiculosum* has only a single domain with multi-functions. The crystal structure represented an unexpected α/β hydrolase fold.

(5) Studies on the regulation of cellular signal transduction

Scaffold protein is important for regulation of cellular signal transduction. JSAP-1 is a scaffold protein involved in the MAP kinase cascade. A protocol for production of the protein in insect cells was established.

(6) Studies on aromatic compound metabolism system

4-Hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase is composed of two polypeptide chains (large and small components). The large component is a flavin-dependent monooxygenase which introduces a hydroxyl group to the aromatic ring of 4-hydroxyphenylacetate. The small component is a flavin:NADH oxidoreductase, which provides a reduced flavin to the large component. Structural analysis has revealed that HpaB forms homo-tetramer, and resemble medium-chain acyl-CoA dehydrogenase in terms of the main chain conformation. The conformation of a loop near the cavity for binding of FAD in HpaB largely differs from the corresponding loop of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, that may explain the easy binding/releasing of FAD to/from the molecular surface of HpaB. On the other hand, HpaC forms homodimer and is structurally similar with ferric reductase (FeR) from *Arhaeoglobus fulgidus*. The shape of the FAD-binding site in HpaC is found to be more suitable for easier FAD binding/releasing than that of FeR.

2. Structural Genomics

(1) Structure determination of proteins from *Thermus thermophilus* HB8

Crystal structures of proteins from *T. thermophilus* HB8; glucose-inhibited division proteins (GidA), dihydro-neopterin aldolase, 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase and response regulators were determined as a part of structural genomics project. The analysis of FAD or NAD complexes of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase were performed to elucidate the reaction mechanism.

(2) Development of full-automated macromolecular crystallization/observation robot system

A macromolecular crystallization/observation robot system was developed. The system is able to dispense protein and crystallization solutions to each well of 24- or 96-well plates. After the dispensation, the prepared crystallization plates are transferred to an incubator, which is equipped with digital microscope for observation. Appeared crystals in the droplets are automatically detected by the image recognition software.

(3) Development of buffer system for isoelectric focusing separation

Isoelectric focusing (IEF) involves generating a pH gradient and allowing ampholytes such as proteins to migrate to the position where the pH equals to its isoelectric point (pI). Each ampholyte focuses at a different pH position

owing to the property of different pIs. We developed novel separation buffer for IEF, called as "Crystalite", suitable for next crystallization steps.

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^{*1}

Dr. Seong-Hoon KIM^{*2}

Dr. Tomoyasu KICHISE^{*2}

^{*1} Contract Researcher

^{*2} Researcher, Structurome Research Group Project

in collaboration with

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

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

Dr. Yoshiharu DOI (Polymer Chemistry Lab.)

Visiting Members

Dr. Noritake YASUOKA

Dr. Masaru TANOKURA (Univ. Tokyo)

Dr. Noriko FUJII (Res. React. Inst., Kyoto Univ.)

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

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

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

Dr. Koji NAGATA (Univ. Tokyo)

Dr. Zihe RAO (Tsinghua Univ., China)

Dr. Hai PANG (Tsinghua Univ., China)

Trainees

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

Takeda K., Miyatake H., Yokota N., Matsuyama S., Tokuda H., and Miki K.: "Crystallization and pre-

- liminary crystallographic study of the outer-membrane lipoprotein receptor LolB, a member of the lipoprotein localization factors", *Acta Cryst. D* **59**, 1224–1226 (2003). *
- Takeda K., Miyatake H., Yokota N., Matsuyama S., Tokuda H., and Miki K.: "A practical phasing procedure using the MAD method without the aid of XAFS measurements: successful solution in the structure determination of the outer-membrane lipoprotein carrier LolA", *Acta Cryst. D* **59**, 1440–1446 (2003). *
- Kim S.-H., Miyatake H., Hisano T., Ohtani N., and Miki K.: "Crystallization and preliminary X-ray analysis of a small component of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase (HpaC) and its cofactor complex from *Thermus thermophilus* HB8", *Acta Cryst. D* **59**, 2275–2278 (2003). *
- Tsuge T., Hisano T., Taguchi S., and Doi Y.: "Alteration of chain length substrate specificity of *Aeromonas caviae* R-enantiomer-specific enoyl-coenzyme A hydratase through site-directed mutagenesis", *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4830–4836 (2003). *
- Fujikura K., Zhang Y.-W., Fujihashi M., Miki K., and Koyama T.: "Mutational analysis of allylic substrate binding site of *Micrococcus luteus* B-P26 undecaprenyl diphosphate synthase", *Biochemistry* **42**, 4035–4041 (2003). *
- Fujihashi M., Peapus D.-H., Kamiya N., Nagata K., and Miki K.: "Crystal structure of fucose specific lectin from *Aleuria aurantia* binding ligands at three of its five sugar recognition sites", *Biochemistry* **42**, 11093–11099 (2003). *
- Suzuki Y., Taguchi S., Hisano T., Toshima K., Matsumura S., and Doi Y.: "Correlation between structure of the lactones and substrate specificity in enzyme-catalyzed polymerization for the synthesis of polyesters", *Biomacromolecules* **4**, 537–543 (2003). *
- Takeda K., Miyatake H., Yokota N., Matsuyama S., Tokuda H., and Miki K.: "Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB", *EMBO J.* **22**, 3199–3209 (2003). *
- Kharel Y., Zhang Y.-W., Fujihashi M., Miki K., and Koyama T.: "Significance of highly conserved aromatic residues in *Micrococcus luteus* B-P26 undecaprenyl diphosphate synthase", *J. Biochem.* **134**, 819–826 (2003). *
- Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Ito S., and Miki K.: "Crystal structure of calcium-free α -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-K38(AmyK38) and its sodium ion binding sites", *J. Biol. Chem.* **278**, 24818–24824 (2003). *
- Iizuka R., Yoshida T., Shomura Y., Miki K., Maruyama T., Odaka M., and Yohda M.: "ATP binding is critical for the conformational change from an open to closed state in archaeal group II chaperonin", *J. Biol. Chem.* **278**, 44959–44965 (2003). *
- Shomura Y., Yoshida T., Iizuka R., Maruyama T., Yohda M., and Miki K.: "Crystal structures of the group II chaperonin from *Thermococcus* strain KS-1: Steric hindrance by the substituted amino acid, and inter-subunit rearrangement between two crystal forms", *J. Mol. Biol.* **335**, 1265–1278 (2003). *
- Mizuno N., Voordouw G., Miki K., Sarai A., and Higuchi Y.: "Crystal structure of dissimilatory sulfite reductase D(DsrD) protein - Possible interaction with B- and Z-DNA by its winged-helix motif", *Structure* **11**, 1133–1140 (2003). *
- (総説)
- Kita A. and Miki K.: "A novel interacting mechanism between mammalian protein phosphatase 1 and its inhibitor calyculin A", *Photon Factory Act. Rep.* **20**, Pt.A, 32–33 (2003).
- 喜田昭子, 三木邦夫: "セリン/トレオニンホスファターゼ1: カリクリン A 複合体の結晶構造", *生物物理* **43**, 248–251 (2003).
- 竹田一旗, 三木邦夫: "脂質結合タンパク質を輸送するタンパク質, LolA と LolB の結晶構造", *SPring-8 利用者情報* **9**, 30–35 (2004).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Hisano T., Tsuge T., Fukui T., Iwata T., Doi Y., and Miki K.: "Crystal structure of (*R*)-hydratase from *Aeromonas caviae*", *Int. Symp. on Diffraction Structural Biology (ISDSB2003)*, (JSPS), Tsukuba, May (2003).
- Kita A., Matsunaga S., Takai A., Kataiwa H., Wakimoto T., Fusetani N., Isobe M., and Miki K.: "Crystal structure of the complex between protein phosphatase 1 catalytic subunit and calyculin A", *Int. Symp. on Diffraction Structural Biology (ISDSB2003)*, (JSPS), Tsukuba, May (2003).
- Kim S.-H., Miyatake H., Hisano T., and Miki K.: "Crystallization and preliminary X-ray analysis of small component of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase (HpaC) from *Thermus thermophilus* HB8 and cofactor complexes", *Int. Symp. on Diffraction Structural Biology (ISDSB2003)*, (JSPS), Tsukuba, May (2003).
- Takeda K., Miyatake H., Park S.-Y., Kawamoto M., Kamiya N., and Miki K.: "Xe-MAD phasing at the beamline BL41XU of SPring-8", *Int. Symp. on Diffraction Structural Biology (ISDSB2003)*, (JSPS), Tsukuba, May (2003).
- Nonaka T., Fujihashi M., Kita A., Hagihara H., Ozaki K., Itoh S., and Miki K.: "Crystal structures of alkaline α -amylase, AmyK38 and its complexes with oligosaccharides", *Japanese-German Biochemistry Meet.*, Marburg, Germany, Sept. (2003).
- Miki K.: "Structural basis of energy-independent transfer of lipoproteins", *Japanese-German Biochemistry Meet.*, Marburg, Germany, Sept. (2003).
- Miki K.: "Structural basis of bacterial lipoprotein local-

- ization system”, 2003 POSTECH Symp. of Structure and Folding in Protein Science, (Biotechnology Research Center and others), Pohang, Korea, Oct. (2003).
- Miki K.: “Structural genomics in Japanese university community”, 3rd Tsinghua Int. Conf. of Protein Sciences (3rd TICPS), (Tsinghua University), Beijing, China, Oct. (2003).
- Suzuki Y., Taguchi S., Hisano T., Matumura S., and Doi Y.: “Correlation between structure of the lactones and substrate specificity in enzyme-catalyzed polymerization for the synthesis of polyesters”, 1st IUPAC Int. Conf. on Bio-based Polymers (ICBP 2003), (International Union of Pure and Applied Chemistry, RIKEN, and others), Wako, Nov. (2003).
- Miki K.: “Structural genomics in the field of formation of protein higher-order structures and expression of protein functions”, Workshop France-Japan on Structural Genomics, Tokyo, Nov. (2003).
- (国内会議)
- 竹田一旗, 宮武秀行, 久野玉雄, 三木邦夫: “ABC トランスポーターの ATP 結合サブユニットの結晶構造解析”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト:第 1 回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 7 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”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト:第 1 回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 7 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 の部位特異的変異体の解析”, 日本農芸化学会 2003 年度大会, 横浜, 藤沢, 3-4 月 (2003).
- 飯塚怜, 吉田尊雄, 庄村康人, 三木邦夫, 丸山正, 伊野部智由, 桑島邦博, 養王田正文: “ATP 結合に伴う古細菌型シャペロニンの構造変化”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 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 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 金成勲, 宮武秀行, 久野玉雄, 三木邦夫: “*Thermus thermophilus* HB8 由来 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase small component(HpaC) の結晶構造解析”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 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: “アルカリ α -アミラーゼ AmyK38 とマルトペンタオースの複合体の結晶構造”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 久野玉雄, 手塚陽子, 粕谷健一, 白木麻里, 岩田忠久, 土肥義治, 齊藤光實, 三木邦夫: “カビ由来ポリヒドロキシアルカン酸分解酵素の結晶構造解析”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 藤橋雅宏, Peapus D.-H., 神谷信夫, 長田嘉穂, 三木邦夫: “ヒイロチャワンタケ由来レクチンの結晶構造とフコース認識機構”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 福森義宏, 三木邦夫: “マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの結晶学的研究”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 宮武秀行, 金成勲, 久野玉雄, 三木邦夫: “高度好熱菌由来 2 成分情報伝達系の構造生物学的研究”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 平野優, 沼本修孝, 鈴木宏昭, 喜田昭子, 王征宇, 野澤庸則, 三木邦夫: “集光性アンテナタンパク質 I(LHI) と光合成反応中心 (RC) との複合体の結晶化”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 中村顕, 小森博文, 小林元悟, 喜田昭子, 和田千恵子, 三木邦夫: “複製開始タンパク質 RepE N 末ドメイン二量体の結晶化”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 世古丈裕, 劉利軍, 吉田拓允, 三木邦夫, 養王田正文: “分子動力学シミュレーションによる超好熱性アスパラギン酸ラセマーゼの活性部位の挙動解析”, 第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6 月 (2003).
- 庄村康人, 虎山一郎, 喜田昭子, 三木邦夫, 相亭, 三川潮, Suh D. -Y., 大利徹, 西岡瑞枝, 渋谷雅明, 海老塚豊: “マメ科植物由来スチルベン合成酵素 (STS) 蛋白の三次元構造解析と変異導入によるカルコン合成酵素への変換の試み”, 第 21 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 高松, 8 月 (2003).
- 金成勲, 宮武秀行, 久野玉雄, 三木邦夫: “Crystal structures of the two components of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase from *Thermus thermophilus*”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 2 回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8 月 (2003).
- 吉瀬智康, 久野玉雄, 竹田一旗, 三木邦夫: “Crystallization and preliminary crystallographic analysis of short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family proteins”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 2 回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8 月 (2003).
- 久野玉雄, 宮武秀行, 三木邦夫: “Crystallization and preliminary X-ray analysis of chloromuconate cycloisomerase”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 2 回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8 月 (2003).
- 金成勲, 宮武秀行, 久野玉雄, 三木邦夫: “Crystallization and preliminary X-ray analysis of small component of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase (HpaC) from *Thermus thermophilus* HB8 and cofactor complexes”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 2 回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8 月 (2003).
- 竹田一旗, 宮武秀行, 三木邦夫: “Crystallographic studies of ATP-binding subunits of ABC transporters from *Thermus thermophilus* HB8”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 2 回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8 月 (2003).
- 宮武秀行, 金成勲, 三木邦夫: “Development of full-automated macromolecular crystallization/observation robot system”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 2 回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8 月 (2003).
- 宮武秀行, 金成勲, 三木邦夫: “Structural biological study on environmental sensing/adaptation proteins of *Thermus thermophilus* HB8”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェ

- クト第2回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8月(2003).
- 庄村康人, 虎山一郎, 喜田昭子, 三木邦夫, 相亭, 三川潮, Suh D.-Y., 大利徹, 西岡瑞枝, 渋谷雅明, 海老塚豊: “マメ科植物由来スチルベン合成酵素(STS)蛋白の三次元構造解析と変異導入によるカルコン合成酵素への変換の試み”, 日本生薬学会第50回年会, 東京, 9月(2003).
- 三木邦夫: “タンパク質結晶解析の迅速化, 高精度化”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9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: “高エネルギー領域での多波長異分散法による位相決定”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).
- 野中剛, 藤橋雅宏, 喜田昭子, 佐伯勝久, 堀越弘毅, 伊藤進, 三木邦夫: “酸化剤耐性アルカリセリンプロテアーゼ(KP-43プロテアーゼ)の結晶構造と酸化によるズブチリシンの失活機構”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).
- 宮武秀行, 金成勲, 茂木逸郎, 松崎浩文, 北原秀吉, 三木邦夫: “生体高分子結晶化用全自動結晶化・観察装置の開発”, 第46回日本神経化学学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月(2003).
- 飯塚怜, 吉田尊雄, 庄村康人, 三木邦夫, 丸山正, 伊野部智由, 桑島邦博, 養王田正文: “Analysis of ATP-dependent conformational change in archaeal group II chaperonin”, 第76回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2003).
- 吉田尊雄, 劉利軍, 荒川孝俊, 三木邦夫, 養王田正文: “Analysis of reaction mechanism of aspartate recemase from hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3”, 第76回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2003).
- 養王田正文, 大河内美奈, 碓井啓資, 飯塚怜, 吉田尊雄, 庄村康人, 三木邦夫, 丸山正: “Molecular chaperon system of archaea”, 第76回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2003).
- 三木邦夫: “タンパク 3000 プロジェクト個別的分析プログラムの研究成果”, 第7回 SPring-8 シンポジウム, 播磨, 11月(2003).
- 三木邦夫: “タンパク質結晶学による構造生物学と構造ゲノム科学”, Takeda Genome Urology 2003 (TGU), (武田薬品工業), 京都, 11月(2003).
- 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, 斉藤光實: “カビ由来ポリヒドロキシアルカン酸分解酵素の結晶構造”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 竹田一旗, 宮武秀行, 横田直子, 松山伸一, 徳田元, 三木邦夫: “グラム陰性細菌におけるリポ蛋白質輸送機構の結晶学的研究”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 喜田昭子, 岡島公司, 池内昌彦, 三木邦夫: “シアノバクテリア由来新規フラビンタンパク質の結晶学的研究”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 沼本修孝, 喜田昭子, 三木邦夫: “シャペロニン 10(Cpn10, co-chaperonin) の X 線結晶構造解析”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 福澤盛二, 馬野且元, 喜田昭子, 三木邦夫: “タンパク質結晶化観察支援システムの開発”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 藤橋雅宏, Peapus D.-H., 神谷信夫, 長田嘉穂, 三木邦夫: “フコース特異的レクチンの立体構造と基質認識機構”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 金成勲, 上野朋行, 長尾卓也, 宮武秀行, 三木邦夫: “フリーフロー等電点電気泳動法を用いた X 線結晶解析向けのタンパク質の電荷的分離”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 吉瀬智康, 久野玉雄, 竹田一旗, 三木邦夫: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 short-chain dehydrogenase/reductase(SDR) の結晶学的研究”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 渡部聡, 喜田昭子, 三木邦夫: “高度好熱菌由来 ABC-ATPase SufC の結晶構造解析”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 宮武秀行, 金成勲, 茂木逸郎, 松崎浩文, 北原秀吉, 樋口朗, 三木邦夫: “全自動生体高分子結晶化・観察装置の開発”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月(2003).
- 竹田一旗, 宮武秀行, 横田直子, 松山伸一, 徳田元, 三木邦夫: “大腸菌の外膜リポ蛋白質局在化因子 LolA と LolB の結晶構造”, 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2003).
- 三木邦夫: “光を化学エネルギーに変えるタンパク質”, 第18回「大学と科学」公開シンポジウム「タンパク質のかたちから生命のなぞを解く: 生物マシーナリー構造生物学の最前線」, 豊中, 12月(2003).
- 金成勲, 三木邦夫: “Crystal structures of 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase large chain and small chain from *Thermus thermophilus* HB8”, 理研シンポジウム「理研構造生物 IX シンポジウム Part1. 脂質メディエーター関連タンパク質の生物学からその応用発展 Part2. 放射光構造生物の進展とさらなる飛躍を目指して」, 播磨, 1月(2004).
- 三木邦夫: “「タンパク質高次構造形成と機能発現」に関する構造生物学・構造ゲノム科学”, 九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト「九大における構造生物学の教育・研究環境の整備確立」公開セミナー, 福岡, 1月(2004).
- 三木邦夫: “「タンパク質高次構造形成と機能発現」の構造ゲノム科学”, タンパク質最前線セミナー4「タンパク質の構造解析と創薬—タンパク 3000 プロジェクト, タンパク質の個別的分析プログラムの成果」, 大阪, 2月(2004).