

三木生物超分子結晶学研究室

Biological Supramolecular Crystallography 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、生体を構成する個々の分子が、どのようにお互いに協調して高度に統合された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。当研究室ではそのような視点から、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して現在、ABC トランスポーターが関与する物質輸送、細胞分裂制御、バイオポリエステルの生合成と分解、細胞内シグナル伝達制御、芳香族化合物代謝に焦点を当て、研究を進めている。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、得られた立体構造情報を基盤とする機能解析を目指している。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) リボタンパク質膜間輸送システムの研究(竹田^{*1}, 平野^{*2}, 三木)

リボタンパク質は原核生物から真核生物まで幅広く存在し、その機能は形態維持、物質輸送、薬剤排出など多岐にわたる。グラム陰性細菌のリボタンパク質はN末端の残基が脂質修飾されており、その疎水的な修飾末端で細胞内膜あるいは外膜に埋め込まれる。内膜で脂質修飾されたタンパク質のうち、特定のシグナル配列を持つものは外膜へ運ばれる。リボタンパク質の膜間輸送をつかさどるタンパク質群のなかで、LolA はリボタンパク質を内膜から外膜に移動させ、外膜上のリボタンパク質受容体である LolB にリボタンパク質を渡す。LolB はリボタンパク質を受け取ると、外膜上へ脂質タンパク質を移す。すでに LolA および LolB の結晶構造を決定し、リボタンパク質運搬の分子機構を明らかにしている。今年度は、Lol 因子群によって輸送されるリボタンパク質群の1つである NlpE の構造を明らかにした。この NlpE はグラム陰性細菌の細胞表層ストレスに応答する Cpx シグナル伝達経路の活性化に関与するタンパク質である。2.6 Å 分解能での結晶構造解析の結果から、このタンパク質は、周囲の酸化還元電位やイオン濃度の変化によって容易に3次、4次構造を変化させることができることが推測され、この性質と Cpx 経路活性化との関連を議論した。(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との共同研究)

(2) ストレス応答関連システムの研究(岩崎, 三木)

Stationary phase survival protein (SurE) は、原核生物・植物・酵母で保存されているタンパク質で、大腸菌においてはストレス環境下での生存に必要であることが知られている。SurE は金属要求性のホスファターゼで、ヌクレオチダーゼ活性およびポリリン酸分解活性を持つが、生理機能の詳細や反応機構については不明である。本研究は、SurE の構造機能相関を明らかにすることを目的とする。これまでに高度好熱菌由来 SurE の結晶解析を行い、SurE 4量体は、ヘアピン領域の運動性のために2量体同士の相対配置の異なる複数の会合状態をとりうることを明らかにしている。本年度は、SurE と金属・基質 (AMP) との複合体の構造を決定した。複合体において2つのプロトマーでは活性残基を含むループが基質に対して開いた構造を

とり、AMP を結合していたのに対し、残り2つのプロトマーではこのループが閉じた構造をとり、AMP は結合していなかった。さらに、AMP を結合した2つのプロトマー間では、開構造をとったループ同士がスワップされていた。これらは、今回の複合体の構造解析によって初めて見られた特徴である。スワップされているループ上の残基の変異体を作成し、活性測定および構造解析をしたところ、SurE は4量体を作ってループスワップ構造をとることが機能発現に必要であることが示唆された。さらに構造上の特徴から、4つのプロトマー全てが同時に触媒活性を示すことはなく、非対称な4量体構造をとりながら2分子ずつが酵素としてはたらくと考えられた。

(3) 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; 前田(前田バイオ工学研究室))

バイオポリエステルの生合成および分解に関与するタンパク質群について構造解析を行い、立体構造に基づいて機能および相互作用様式を明らかにすることを目的として研究を行っている。バイオポリエステルの一つ、ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)はR-3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットに持つ水に不溶性ポリマーである。その分解には特異的な加水分解酵素が働く。多くのPHA分解酵素は3つのドメイン(触媒ドメイン、リンカードメイン、PHA吸着ドメイン)から成るマルチドメイン酵素で、ポリエステル固体基質を効率よく分解するようにそれぞれのドメインが特異的な機能を持っている。中には単一のドメインで構成される分解酵素も存在する。これまでにカビ由来のシングルドメイン分解酵素の結晶構造を明らかにし、3量体基質との相互作用様式を明らかにしている。しかし、4量体以上の大きさの基質の場合にはそれがどのように結合するのかは現在のモデルでは予想することが難しい。今年度は、シングルドメイン分解酵素について、4量体以上の大きさの基質アナログとの複合体の結晶化の検討を行った。基質アナログとして、β-アラニンや3-メルカプトプロピオン酸のオリゴマーを用いた。さらに、リンカードメインおよびPHA吸着ドメインの構造と機能を明らかにするため、マルチドメイン酵素について結晶化の検討を行った。(群馬大学大学院工学研究科 粕谷助教授、神奈川大学理学部 齊藤教授との共同研究)

(4) 細胞内シグナル伝達制御機構の研究 (西谷^{*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クロストークをすることなく効率よく伝わる機構が備わっている。足場タンパク質 JSAP1 は MAP キナーゼカスケードにおいてシグナル伝達の制御を担うタンパク質である。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統合し、キナーゼ間の効率的な相互作用の場を与える。本研究は足場タンパク質の構造解析を行い、足場タンパク質 キナーゼ間相互作用様式を明らかにすることを目的とする。本タンパク質の様々なトランケート体を設計し、大腸菌発現系でのタンパク質合成を検討したところ、1つのドメインのみからなるものについて大量発現させることに成功した。このトランケート体と JNK との複合体形成が安定になる条件を検討し、結晶化条件を検討した。(京都大学大学院理学研究科、金沢大学がん研究所 善岡教授、協発酵工業株式会社との共同研究)

(5) 芳香族化合物代謝システムの研究 (金^{*3}, 久野, 岩崎, 三木)

微生物による芳香族化合物の代謝は、微生物のエネルギー獲得機構として重要であるだけでなく、環境浄化技術への利用の観点からも興味深いテーマである。4-ヒドロキシフェニル酢酸の微生物分解においては、4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼが初めに働く。この酵素は NADH と酸素を用いて 4-ヒドロキシフェニル酢酸の水酸化を触媒する。この酵素は2つのコンポーネントからなる。オキシゲナーゼ・コンポーネント (HpaB) は還元型フラビンと酸素を用いて 4-ヒドロキシフェニル酢酸の水酸化を触媒する。リダクターゼ・コンポーネント (HpaC) は NADH を用いて酸化型フラビンを還元し、HpaB に供給する。HpaB と HpaC の間のフラビンの受け渡しはフラビンの自由拡散によって行われ、タンパク質間相互作用は起こらない。このような、フラビンの自由拡散による受け渡しは他のモノオキシゲナーゼにも見られ、Two-component flavin-diffusible monooxygenase (TC-FDM) ファミリーと呼ばれる。HpaB, HpaC の反応機構、および TC-FDM ファミリーにおけるフラビンの受け渡しのメカニズムを明らかにするため、これらの構造解析を行った。HpaC については、リガンドフリー型、FAD 結合型、FAD-NAD⁺ 結合型の結晶構造を明らかにした。HpaC を含むフラビン・リダクターゼにおいてリガンドフリー型の構造は初めての報告である。FAD や NADH の結合によって若干の構造変化 (induced fit) が起こるが、大きな構造変化が起こらないことが判った。構造が判っている他のフラビン・リダクターゼはフラビンを強固に結合するタイプの酵素であり、フラビンとの結合様式に違いがあるのではないかと考えられたが、結合様式の比較の結果、フラビン・リダクターゼで保存性が低いループ領域のコンフォメーションに多様性が見られ、FAD との相互作用に違いが見られた。このことから、FAD に対する親和性の違いはこの保存性の低いループ領域との相互作用に依存するのではないかと考えられた。一方、HpaB については、リガンドフリー型、FAD 結合型、FAD-基質結合型の結晶構造を明らかにした。これらの構造は TC-FDM ファミリーにおいて初めての報告である。リガンドフリー型では基質の結合部位が形成されてい

ない。FAD の結合により、一部 disorder していたループ領域 (loop $\beta 5$ - $\beta 6$) が構造変化を起こして FAD と相互作用する。FAD の結合・解離にはこのループ領域の運動性が関与しているのであろう。この構造変化に伴い、基質と結合する残基 (Ser197, Thr198) を含む領域にも構造変化が起こり、基質結合部位が preform される。基質が結合すると、基質結合部位を含むループ領域 (loop $\beta 8$ - $\beta 9$) にさらなる構造変化が起こる。反応過程において HpaB に結合した還元型フラビンは酸素分子と結合して不安定な C4a-ヒドロペルオキシフラビンを形成するが、HpaB 内では比較的長い時間安定に存在する。ヒドロペルオキシ部分の近傍に位置する Arg100 が C4a-ヒドロペルオキシフラビンの安定化に寄与すると考えられる。

(6) 光回復酵素の構造解析 (藤橋^{*1}, 三木)

DNA 修復酵素群は原核生物から真核生物まで広く保存されている場合が多く、ヒトでは DNA 修復酵素の欠損が様々な遺伝性疾患の原因となることが知られている。このため、DNA 修復酵素群の構造機能解析は、基本的生命現象を理解する上で重要な役割を果たすだけでなく、病気と直結した応用的な側面をも担っている。DNA 修復酵素群の中の1つ、光回復酵素 (Photolyase) は、触媒基近傍に結合した補酵素 FAD と可視光のエネルギーとを利用して、紫外線によって生成した DNA 損傷 (シクロブタン型ピリミジンダイマー, CPD) を修復する。また、光回復酵素には2つの補欠因子が存在し、それぞれ、光のエネルギーを補足する集光補欠因子、CPD を形成している共有結合を切断する触媒補欠因子として機能することが知られている。これまでに、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の DNA 光回復酵素の結晶構造を明らかにしている。今年度は、好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の光回復酵素の結晶構造解析を行った。その立体構造は、これまでに知られている大腸菌由来、シアノバクテリア由来、高度好熱菌由来の光回復酵素の構造と基本的には相同であることが分かった。二つの補欠因子のうち触媒補欠因子は他の光回復酵素と同じく、FAD であった。これに対して集光補欠因子は、それまでに知られていた MTHF や 8-HDF ではなく、FAD であることが明らかになった。(京都大学大学院理学研究科、産業技術総合研究所 辻村博士との共同研究)

(7) 複製開始タンパク質の構造解析 (中村^{*2}, 三木)

F プラスミドは大腸菌を宿主として複製し、大腸菌染色体あたり 1~2 コピーで安定に保持され、細胞周期の特定の時期に複製する。F プラスミドでは、DNA 複製開始タンパク質 RepE (分子量 29,000) が DNA の複製開始を制御し、複製周期を厳密に調節する役割を担っている。このタンパク質は通常二量体として存在して、*repE* 遺伝子のリプレッサーとして機能するが、DnaK 分子シャペロン群の働きで単量体へと変換されイニシエーターとしての機能を発揮する。すでに RepE の単量体と DNA オリゴマーの複合体の結晶構造を解析することに成功している。今年度は、リプレッサーとして機能する 2 量体状態の RepE と結合する DNA との複合体の結晶構造を明らかにした。その結果、2 量体形成に重要な分子間相互作用について詳細な知見が得られ、多くの変異体解析の結果を立体構造から説明づけることができた。また、単量体の構造と比較検討することにより、N 末端領域および C 末端領域のドメイン構造は保持されたまま、これらを繋ぐリンカー領域の 2 次構造を変

化させることで、効率的な 2 量体・単量体変換が行われていることが分かった。(京都大学大学院理学研究科, 京都大学ウイルス研究所 和田博士との共同研究)

*¹ 客員研究員, *² 研修生, *³ 協力研究員

We aim to understand the molecular mechanisms of biological phenomena from the viewpoint of structural biology. We investigate biological molecules to understand how they are integrated to work cooperatively as a supramolecular system. Our current research targets are: ABC transporter-mediated transport system, cellular environmental adaptation, regulatory system of cell division, biopolyester biosynthesis and degradation, cellular signal transduction, and metabolism of aromatic compounds. 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 techniques which will facilitate determination of crystal structures in the era of structural genomics.

(1) Intermembrane transport systems of biomolecules

NlpE is an outer membrane lipoprotein transported by the Lol system, and involved in envelope stress response. Adhesion of bacterial cells to abiotic surfaces activates the NlpE-dependent Cpx signal transduction pathway, which regulates expression of genes involved in maintenance of the envelope. The crystal structure of NlpE from *Escherichia coli* was determined at 2.6 Å resolution. The structure showed that NlpE consists of two β-barrel domains. Two monomers in the asymmetric unit form an unusual 3D domain-swapped dimer. The tertiary and/or quaternary structural instability may be responsible for Cpx pathway activation.

(2) Stress response system

Stationary-phase survival protein SurE is distributed among prokaryotes, plants and yeast, and it is required for viability under stressful conditions in *E. coli*. SurE has metal ion-dependent nucleotidase and polyphosphatase activities. The tetrameric structure of SurE from *T. thermophilus* in complex with metal ion and substrate AMP was determined. In the complex, AMP-bound active sites with the loops in an open conformation were found in the two protomers, and AMP-free active sites with the loops in a closed conformation were found in the other two protomers. The former two AMP-bound loops are swapped between the protomers. Structural and functional analysis of the mutant of the residues involved in the loop swapping suggest that SurE acts as a tetramer and that the loop swapping is required for the functioning of SurE. Furthermore, structural features suggest that the tetramer acts with half-of-the-sites reactivity behavior adopting asymmetric structure.

(3) Biopolyester biosynthesis and degradation

Biopolyester poly(*R*-3-hydroxyalkanoate) (PHA) is degraded by a specific enzyme, PHA depolymerase. Crystal structure of a fungal extracellular PHA depolymerase complexed with a methyl ester of a trimer substrate has been determined, revealing how the enzyme recognizes a hydrophobic and optically active polymer substrate. Crystallization trials were conducted to prepare crystals of complex of the enzyme with substrate analogs with more than three monomer units.

(4) Cellular signal transduction regulation

Scaffold protein is important for regulation of cellular signal transduction. JSAP1 is a scaffold protein involved in the MAP kinase cascade. To obtain sufficient amount of the purified protein for crystallography, various truncated mutants were designed and produced in *E. coli* cells. Truncated forms of JSAP1 containing a single domain were prepared, and conditions for the complex formation with a kinase were studied.

(5) Metabolism of aromatic compounds

Metabolism of aromatic compounds by microorganisms is important for a source of energy. In addition, it is an interesting system concerning degradation of environmental pollutants. In a metabolism of 4-hydroxyphenylacetic acid, it is firstly attacked by a two-component flavin-diffusible monooxygenase composed of HpaB and HpaC. Structures of HpaB complexed with FAD and 4-hydroxyphenylacetic acid have been determined. These structural data showed a dynamic behavior of the enzyme with a preformation of the substrate-binding site. These data also suggest a mechanism in which C4a-hydroperoxyflavin is formed and stabilized.

(6) Photolyase

DNA repair enzymes are conserved among prokaryotes and eukaryotes. One of the DNA repair enzymes, photolyase, repairs cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) by using FAD and the energy of visible light. Photolyases have two chromophores; one works as an antenna pigment that harvests photon energy, and the other catalyzes the CPD repair reaction. The crystal structure of the photolyase from *S. tokodaii* (St-photolyase) was determined. The structure of the St-photolyase is superimposed very well on the three known photolyases from *E. coli*, *A. nidulans*, and *T. thermophilus* including the catalytic cofactor FAD. Surprisingly, the light-harvesting cofactor of St-photolyase is FAD whereas 5,10-methenyltetrahydrofolate (MTHF) and 8-hydroxy-5-deaza-riboflavin (8-HDF) are the known light-harvesting cofactors.

(7) Replication initiator protein

F plasmid is maintained at 1-2 copies per host chromosome. DNA replication initiator protein RepE stringently regulates F plasmid replication. RepE exists mostly as a dimer which functions as an autogenous repressor. Conversion to the RepE monomer which acts as a replication initiator requires the action of chaperones such as DnaK. The crystal structure of the RepE dimer in complex with the *repE* operator DNA was determined. The structure revealed the details of the interaction that is important for dimerization. The conformations of the internal N- and C-terminal domains are conserved between the dimer and monomer, whereas the relative domain orientations are strikingly different, accompanying secondary structural changes in the linker connecting the two domains. The structural changes in the linker allow an efficient oligomeric transition of dual-functional RepE.

Staff

Head

Dr. Kunio MIKI

Members

Dr. Tamao HISANO
Dr. Wakana IWASAKI
Dr. Minoru HAYASHIDA*¹
Dr. Seong-Hoon KIM*²

*¹ Special Postdoctoral Researcher

*² Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Mizuo MAEDA (Bioeng. Lab.)

Visiting Members

Dr. Masahiro FUJIIHASHI (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Dr. Noriko FUJII (Res. React. Inst., Kyoto Univ.)
Dr. Akiko KITA (Res. React. Inst., Kyoto Univ.)
Dr. Koji NAGATA (Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo)
Dr. Akira NAKAMURA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Dr. Tsuyoshi NONAKA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Dr. Nobutaka NUMOTO (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Dr. Zihe RAO (Tsinghua Univ., China)
Dr. Kazuki TAKEDA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Dr. Hiraku WADA (Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)
Dr. Satoshi WATANABE (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Dr. Min YAO (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)
Dr. Noritake YASUOKA

Trainees

Mr. Nobuhiko AKIYAMA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Mr. Yu HIRANO (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Mr. Hiroshi KIDA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Mr. Daisuke MARUYAMA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Mr. Yuichi NISHITANI (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誌

Nishitani Y., Maruyama D., Nonaka T., Kita A., Fukami T. A.,
Mio T., Yamada-Okabe H., Yamada-Okabe T., and Miki K.:
"Purification, crystallization and preliminary X-ray
diffraction studies of *N*-acetylglucosamine-phosphate mutase
from *Candida albicans*", Acta Cryst. F **62**, 419-421 (2006). *

Maruyama D., Nishitani Y., Nonaka T., Kita A., Fukami T. A.,
Mio T., Yamada-Okabe H., Yamada-Okabe T., and Miki K.:
"Purification, crystallization and preliminary X-ray
diffraction studies of UDP-*N*-acetylglucosamine
pyrophosphorylase from *Candida albicans*", Acta Cryst. F
62, 1206-1208 (2006). *

Hirano Y., Hossain M. M., Takeda K. Tokuda H., and Miki K.:
"Purification, crystallization and preliminary X-ray
crystallographic analysis of the outer membrane lipoprotein
NlpE from *Escherichia coli*", Acta Cryst. F **62**, 1227-1230
(2006). *

Watanabe S., Kita A., Kobayashi K., Takahashi Y., and Miki K.:
"Crystallization and preliminary X-ray crystallographic
studies of the oxidative-stress sensor SoxR and its complex
with DNA", Acta Cryst. F **62**, 1275-1277 (2006). *

Nishitani Y., Maruyama D., Nonaka T., Kita A., Fukami T. A.,
Mio T., Yamada-Okabe H., Yamada-Okabe T., and Miki K.:
"Crystal structures of *N*-acetylglucosamine-phosphate
mutase, a member of the -D-phosphohexomutase
superfamily, and its substrate and product complexes", J.

Biol. Chem. **281**, 19740-19747 (2006). *

Okajima K., Fukushima Y., Suzuki H., Kita A., Ochiai Y.,
Katayama M., Shibata Y., Miki K., Noguchi T., Itoh S., and
Ikeuchi M.: "Fate determination of the flavin photoreceptions
in the cyanobacterial blue light receptor TePixD (TII0078)",
J. Mol. Biol. **363**, 10-18 (2006). *

Fujihashi M., Numoto N., Kobayashi Y., Mizushima A.,
Tsujimura M., Nakamura A., Kawarabayashi Y., and Miki K.:
"Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus*
tokodaii with two FAD molecules: implication of a novel
light-harvesting cofactor", J. Mol. Biol. **365**, 903-910 (2007).
*

Nakamura A., Sosa A., Komori H., Kita A., and Miki K.:
"Crystal structure of TTHA1657 (AT-rich DNA-binding
protein; p25) from *Thermus thermophilus* HB8 at 2.16
resolution", Proteins: Struct. Funct. Bioinf. **66**, 755-759
(2007). *

Nakamura A., Wada C., and Miki K.: "Expression and
purification of F-plasmid RepE and preliminary X-ray
crystallographic study of its complex with operator DNA",
Acta Cryst., F **63**, 346-349 (2007). *

Watanabe S., Matsumi R., Atomi H., Imanaka T., and Miki K.:
"Crystallization and preliminary X-ray crystallographic
studies of [NiFe] hydrogenase maturation proteins, HypC
and HypD", Acta Cryst., 538-541 (2007). *

Maruyama D., Nishitani Y., Nonaka T., Kita A., Fukami T. A.,
Mio T., Yamada-Okabe H., Yamada-Okabe T., and Miki K.:
"Crystal structures of uridine-diphospho-*N*-acetyl-
glucosamine pyrophosphorylase from *Candida albicans* and
catalytic reaction mechanism", J. Biol. Chem., 282,
17221-17230 (2007). *

(総説)

Numoto N. and Miki K.: "Crystal structure of giant hemoglobin
from beard worm *Oligobranchia mashikoi*", SPring-8 Res.
Frontiers **2005**, 12-13 (2006).

沼本 修孝, 三木 邦夫: "マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの
結晶構造", 京都大学低温物質科学研究センター誌,
pp.20-25 (2006).

海老原 章郎, 新海 暁男, 中川 紀子, 増井 良治, 三木 邦
夫, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌丸ごと一匹プロ
ジェクト: 構造ゲノム科学からシステム生物学へ", 日
本結晶学会誌 **48**, No. 6, pp.403-410 (2006).

[単行本]

(総説)

三木 邦夫, 喜田 昭子, 宮武 秀行, 久野 玉雄, 田中 勲, 渡
邊 信行, 姚 閔: "生体高分子の結晶構造", "第5版実験化
学講座" 第11巻「物質の構造 III 回折」, 2006- 5, 日
本化学会編, 丸善, 日本, pp.231-278 (2006).

三木 邦夫, 岩崎 わかな: "バイオインフォマティクス: タン
パク質の解析", "第5版実験化学講座"第29巻「バイオテ
クノロジーの基本技術」, 2006- 5, 日本化学会編, 丸善,
東京, pp.339-356 (2006).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kort R., Komori H., Adachi S., Miki K., Eker A., Hellingwerf K., and Ravelli R.: "Biological implications of radiation damage in the active site: Cryocrystallographic studies on DNA photolyase and photoactive yellow protein[invited]", 4th International Workshop on X-ray Damage to Biological Crystalline Samples, (JASRI, RIKEN/SPRING-8), Harima, Mar. (2006).

Orita I., Kita A., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y., and Miki K.: "Crystallographic study of 3-hexulose-6-phosphate synthase, a member of orotidine monophosphate decarboxylase superfamily", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (IUBMB 2006), Kyoto, June (2006).

Ebihara A., Kanagawa M., Kuroishi C., Nakagawa N., Masui R., Terada T., Shirouzu M., Miki K., Yokoyama S., and Kuramitsu S.: "Progress in the Whole Cell Project of a Model Organism, *Thermus thermophilus* HB8", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Nakagawa T., Numoto N., Kita A., Sasayama Y., Miki K., and Fukumori Y.: "Structure of the sulfide-binding hemoglobin from the marine tube worm *Oligobranchia mashikoi*", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, (IUBMB2006), Kyoto, June (2006).

Hisano T., Kasuya K., Tezuka Y., Ishii N., Kobayashi T., Shiraki M., Oroudjev E., Hansma H., Iwata T., Doi Y., Saito T., and Miki K.: "The crystal structure of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Penicillium funiculosum*", International Symposium on Biological Polyesters (ISBP 2006), (University of Minnesota Humphrey Center), Minneapolis, USA, Aug. (2006).

Miki K.: "Crystal structure of an extracellular giant haemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi* (invited)", 14th International Conference on Dioxygen Binding and Sensing Proteins, (Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli), Napoli, Italy, Sept. (2006).

Miki K., Numoto N., Nakagawa T., Kita A., Sasayama Y., and Fukumori Y.: "Crystal structure of 400kDa giant hemoglobin of gutless beard worm (invited)", 8th R.O.C.-Japan Joint Seminar on Crystallography, (The Crystallographic committee, National Tsing Hua University and National Synchrotron Radiation Research Center), I-Lan, Taiwan, Sept. (2006).

Numoto N., Nakagawa T., Kita A., Sasayama Y., Fukumori Y., and Miki K.: "Molecular assembly of extracellular giant hemoglobin (invited)", 4th ISGO International Conference on Structural Genomics (ICSG2006), (ISGO), Beijing, China, Oct. (2006).

Nakagawa N., Ebihara A., Kanagawa M., Kuroishi C., Masui R., Terada T., Shirouzu M., Miki K., Yokoyama S., and Kuramitsu S.: "Progress in the Whole Cell Project of a Model Organism, *Thermus thermophilus* HB8", 4th ISGO International Conference on Structural Genomics (ICSG2006), Beijing, China, Oct. (2006).

Sugiyama A., Yamamoto T., Nagao H., Nishikawa K., Numoto N., and Miki K.: "Molecular dynamics study of dynamical structure stability of giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th

Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), (The Organizing Committee of EABS & BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).

Nishikawa K., Sugiyama A., Yamamoto T., Nagao H., Numoto N., Miki K., and Fukumori Y.: "Molecular dynamics study of solvent water behavior in giant hemoglobin of *Oligobranchia mashikoi*", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), (The Organizing Committee of EABS & BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).

Miki K.: "Structural basis of bacterial lipoprotein transport by Lol system (invited)", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), (The Organizing Committee of EABS & BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).

Yamamoto T., Sugiyama A., Nishikawa K., Nagao H., Sugimori K., Numoto N., Miki K., and Fukumori Y.: "The theoretical study of sulfide-binding mechanism of the giant hemoglobin of *Oligobranchia mashikoi*", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), (The Organizing Committee of EABS & BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).

Fujihashi M., Numoto N., Kobayashi Y., Mizushima A., Tsujimura M., Nakamura A., Kawarabayashi Y., and Miki K.: "Crystal structure of archaeal photolyase with two FAD molecules", Joint conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (AsCA'06/CrSJ), Tsukuba, Nov. (2006).

Numoto N., Nakagawa T., Kita A., Sasayama Y., Fukumori Y., and Miki K.: "Crystal structure of extracellular giant hemoglobin of pogonophoran *Oligobranchia mashikoi*", Joint conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (AsCA'06/CrSJ), (AsCA'06/CrSJ), Tsukuba, Nov. (2006).

Watanabe Y., Kita A., Ohnishi K., Suzuki K., Miki K., and Morimoto Y.: "Crystallographic studies of FAD bound form of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* S-1", Joint conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (AsCA'06/CrSJ), (AsCA'06/CrSJ), Tsukuba, Nov. (2006).

Ebihara A., Kanagawa M., Kuroishi C., Nakagawa N., Masui R., Terada T., Shirouzu M., Miki K., Yokoyama S., and Kuramitsu S.: "Progress in the Whole Cell Project of a Model Organism, *Thermus thermophilus* HB8", Joint conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (AsCA'06/CrSJ), Tsukuba, Nov. (2006).

(国内会議)

中川 紀子, 海老原 章郎, 黒石 千寿, 金川 真由美, 増井 良治, 三木 邦夫, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクトの進捗状況", 文部省科研費補助金特定領域研究「統合ゲノム」第8回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, 木更津, 3月 (2006).

渡部 聡, 松見 理恵, 喜田 昭子, 跡見 晴幸, 今中 忠行, 三木 邦夫: "[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関するHypC・HypDの結晶構造解析", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).

喜田 昭子, 石田 哲夫, 田中 裕之, 森本 幸生, 堀池 喜八

- 郎, 三木 邦夫: "カテコール2,3-ジオキシゲナーゼ(メタピロカテラーゼ)の阻害剤複合体の結晶構造解析", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 久野 玉雄, 粕谷 健一, 手塚 陽子, 石井 成昭, 小林 輝幸, 白木 真理, 岩田 忠久, Emin O., Hansma H., 土肥 義治, 齋藤 光實, 三木 邦夫: "カビ由来バイオポリエステル分解酵素の結晶構造", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 阿部 真琴, 梅名 泰史, 喜田 昭子, 三木 邦夫, 徳永 文穂, 岩井 一宏, 森本 幸生: "ヒト由来コピキチン接合酵素E2の結晶構造解析", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 木田 宗志, 飯野 均, 中川 紀子, 久野 玉雄, 藤橋 雅宏, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "フェニル酢酸の異化に関わるPaaタンパク質群の結晶学的研究", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 笹山 雄一, 福森 義宏, 三木 邦夫: "マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの一部酸素結合型結晶構造", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 福森 義宏, 沼本 修孝, 中川 太郎, 喜田 昭子, 笹山 雄一, 三木 邦夫: "巨大ヘモグロビンの構造的組織化と機能【招待講演】", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 鈴木 宏昭, 道 日娜, 平野 優, 三木 邦夫, 大友 征宇: "光合成色素膜タンパク質超分子複合体の構造安定性にCa²⁺が強く関与する", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 海老原 章郎, 金川 真由美, 黒石 千寿, 中川 紀子, 増井 良治, 寺田 貴帆, 白水 美香子, 三木 邦夫, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8をモデル生物とした「丸ごと一匹プロジェクト」の進捗状況", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 内匠 浩平, 中村 顕, 三木 邦夫: "高度好熱菌*T. thermophilus* HB8由来GrpEの結晶学的研究", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 岩崎 わかな, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来Stationary phase survival protein SurEの結晶構造", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 高田 匠, 下岡 正志, 藤井 紀子, 小島 正美, 三木 邦夫: "赤外線照射後の水晶体蛋白質中のD- -アスパラギン酸含有蛋白質の網羅的検索", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 平野 優, Md. H. M., 竹田 一旗, 徳田 元, 三木 邦夫: "大腸菌由来外膜リポ蛋白質mNlpEの結晶構造解析", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 藤橋 雅宏, 沼本 修孝, 小林 由紀子, 水嶋 陽, 辻村 昌也, 中村 顕, 河原林 裕, 三木 邦夫: "超好熱古細菌*Sulfolobus tokodaii* 由来 Photolyase の結晶構造解析", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 新井 崇之, 渡部 聡, 松見 理恵, 跡見 晴幸, 今中 忠行, 三木 邦夫: "超好熱始原菌由来ヒドロゲナーゼ成熟化に関与するHypAのX線結晶構造解析", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 永田 宏次, 大塚 淳, 飯野 均, 海老原 章郎, 田之倉 優: "独特の4ヘリックスバンドル構造を有する推定金属依存性加水分解酵素TT2238の結晶構造解析", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 久野 玉雄: "ポリヒドロキシブタン酸分解酵素の結晶構造", エコマテリアル研究会, (高分子学会), 和光, 7月 (2006).
- 久野 玉雄, 中村 光裕, 瀧尾 擴士, 佐藤 伸哉, 三木 邦夫: "ジヒドロネオプテリン・アルドラーゼの結晶構造", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 金 成勲, 久野 玉雄, 竹田 一旗, 岩崎 わかな, 海老原 章郎, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来 4-ヒドロキシフェニル酢酸 3-モノオキシゲナーゼのオキシゲナーゼ・コンポーネント (HpaB) の構造解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 木田 宗志, 飯野 均, 中川 紀子, 久野 玉雄, 藤橋 雅宏, 喜田 昭子, 三木 邦夫: "フェニル酢酸の好氣的代謝に関わるPaaタンパク質の結晶学的研究", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 永田 宏次, 大塚 淳, 飯野 均, 海老原 章郎, 田之倉 優: "4ヘリックスバンドルタンパク質TT2238の2つの α ヘリックス ($\alpha 2$ と $\alpha 3$) 間の長いループのプロテアーゼ活性による除去", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 内匠 浩平, 中村 顕, 三木 邦夫: "*Thermus thermophilus* HB8由来コシャペロンGrpEの結晶構造解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 岩崎 わかな, 三木 邦夫: "高度好熱菌由来Stationary phase survival protein SurEの4量体構造における対称性の崩れ", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 鈴木 道彦, 齋藤 純一, 木元 久, 藤井 豊, 安藤 昭一, 草桶 秀夫, 三木 邦夫: "*Paenibacillus fukuinensis* D-2由来キトサナーゼの立体構造と機能解析", 第20回キチン・キトサン・シンポジウム, (第20回キチン・キトサンシンポジウム運営委員会), 福井, 8月 (2006).
- 久野 玉雄: "PHB分解酵素の結晶構造", 第58回日本生物工学会大会, (社団法人 日本生物工学会), 大阪, 9月 (2006).
- 岩田 忠久, 田中 稔久, 久野 玉雄: "バイオベースポリエステルの生分解性制御技術の開発", 第55回高分子討論会, (高分子学会), 富山, 9月 (2006).
- 沼本 修孝, Nakagawa T., 喜田 昭子, Sasayama Y., Fukumori Y., 三木 邦夫: "巨大ヘモグロビン (400kDa) の結晶構造と超分子会合機構", 第10回SPRING-8シンポジウム, (SPRING-8), 播磨, 11月 (2006).