

構造生物化学研究室

Structural Biochemistry Laboratory

主任研究員 前田 雄一郎

MAÉDA, Yuichiro

当研究室の研究対象は筋肉および細胞のアクチン・フィラメントである。アクチンフィラメントがどこにでも顔を出す重要な「役者」であることは、近年の細胞生物学の発展で明らかとなってきた。細胞の多くの機能は、アクチン・フィラメントのさまざまな「運動形態」によって担われる。「運動形態」とは、例えば、筋収縮ではアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの「滑り運動」である。筋収縮のカルシウム調節では、トロポニン・トロポミオシンというアクチン結合蛋白質がアクチンフィラメントに引き起こす何らかの形態変化であることも確実である。さらに、例えば神経軸索の伸展はアクチン単量体の重合・脱重合の動的平衡によって担われることが最近の研究で分かってきた。我々の研究は、これらさまざまな「運動形態」のメカニズムを深く理解することをめざす。そのための基本的態度は2点である。第一に、メカニズムの解明のためには、まず各構成蛋白質と複合体の原子構造を解明することが不可欠であるとの立場。第二に、原子構造を基にして、さまざまな生物物理的な研究方法を動員して、新しいメカニズムの研究に取り組むとの考え方。

本年度は、構成蛋白質の結晶構造解析で大きな成果が出始めた。まず、アクチンフィラメント P 端キャッピング蛋白質であるトロポモジュリンの部分 (C 端半分) の構造を解明し、P 端キャッピングのメカニズム、ひいてはアクチンフィラメント安定化のメカニズム理解へ途を開いた。さらに、トロポニン分子の結晶構造も解明され、カルシウム調節のメカニズムを理解するための本格的な研究を開始した。トロポミオシン (部分) と B 端キャッピング蛋白質である CapZ の結晶構造解明も射程内に入った。これらの他にも、独自の研究方法と技術を蓄積してきた。アクチンフィラメントの高度配向ゾルの調製方法、それを使ってのアクチンフィラメント構造モデルの精密化、バキュロウィルスを使っての蛋白質発現の発現促進因子の発見、それを使ってのトロポミオシンとアクチン等の発現系の確立をした。

本年度はまた、藤澤哲郎前任研究員他、SPring-8 の蛋白質小角散乱ビームライン (BL45-XU) の運用とそれを使っての研究を担当するグループが当研究室に合流した。

今後の課題は、より大きな複合体、特にアクチンフィラメントの短く長さの揃ったセグメントの結晶化と構造解析、アクチンフィラメント理解の鍵を握るトロポミオシン分子のフィラメント上での動態の解析、アクチン自体の変異蛋白質の調製と動態の観測技術の確立などである。また、ビームラインを使って高圧下での蛋白質分子と蛋白質相互作用の熱力学的性質の研究をいっそう発展させる。

1. トロポニン・トロポミオシンの構造とカルシウム調節のメカニズム

(1) トロポニン・トロポミオシン複合体の構造解析 (武田^{*1}, 山下, 前田 (雄); 前田 (佳) (細胞情報伝達研))

骨格筋および心筋の収縮制御の要となるトロポニン・トロポミオシン複合体の構造・機能解析を進めている。トロポニンは4つの EF-Hand 型カルシウム結合モチーフを持つ TnC と、トロポミオシン結合領域を持つ TnT, 単独でアクチン相互作用を抑制する活性のある TnI の3本のポリペプチド鎖から成る分子量約7万ダルトンの複合体で、全長がほぼ α ヘリカル・コイルドコイルから成るトロポミオシンと結合し、アクチン繊維上に存在して筋の「細い繊維」を構成している。カルシウム調節は TnC へのカルシウム結合をトリガーとしてモーター分子ミオシンから成る「太い繊維」と「細い繊維」の相互作用の様式を変化させ筋の収縮・弛緩の調節を行うことであるが、その本質の理解のためにはまずトロポニンおよびトロポミオシンの立体構造と、カルシウム濃度に依存した構造の変化を知ることが

不可欠となる。X線結晶構造解析を主たる手法とした本研究の戦略として、我々は (i) 機能ドメインの解析・結晶化に適した試料デザイン・発現系を用いた効率的な試料調製、(ii) 効率的な結晶化条件のスクリーニング (iii) SPing-8 のビームラインを利用した迅速な結晶のスクリーニング・データ収集・構造解析、の3点に力を入れてこの問題に取り組んでいる。(i) については平成11年度にほぼ終了し、平成12年度は (ii) および (iii) に取り組んできた。

トロポニンについて、本年度始めに機能ドメインを含む複合体から 3 Å 分解能以上の回折を示す良質の結晶を得ることに成功し、重原子置換体の検索、多波長データの収集、MAD による解析を進めてきた。最近、理研ビームライン BL45XU-PX で測定したオスmium置換体の MAD データから解釈のできる電子密度図を得ることに成功し、現在分子モデルの作成を進めている。また、トロポミオシンについてトロポニン結合領域を含むフラグメントを用い 2 Å 以上の分解能の回折を示す結晶を得ることに成功し、現在構造解析を進めている。さらに、トロポニン・トロポミオシ

ン複合体についても新規の結晶を得ることに成功し、解析を進めている。トロポニン・トロポミオシン複合体を側鎖構造の議論できる分解能で構造解析し、他の手法で得られる結果を踏まえて細い繊維の分子モデルを提案し、カルシウム調節のメカニズムを分子構造の面から明らかにすることを目指す。

(2) 細いフィラメント中でのトロポニン C の形態(松本^{*2}, 武田^{*1}, 牧野^{*3}, 前田(雄); 前田(佳)(細胞情報伝達研); 沈(光合成科学研))

細いフィラメント中におけるトロポニン C の構造を調べるために、フィラメント中のトロポニン C のみを選択的に重水素化し、中性子溶液散乱を測定する研究を行っている。その第一段階として、フィラメント中にあるトロポニン C を、ラベルしたトロポニン C へ交換する方法を確立することは必須であるが、この条件検討を昨年度に引き続き行った。その結果、構造や活性を保ったまま、ほとんど全てのトロポニン C を交換できるような条件を見いだすことができた。しかし、当研究室で発現系を持っているヒト・トロポニン C を用いて置き換えた場合には、交換後のフィラメントは活性を完全に保つことはできず、ウシ心筋由来のトロポニン C で置き換えたときのみ活性を完全に保つことができた。実際に蛋白質を重水素化するためには大腸菌での発現系を利用しなければならないため、現在、ウシ・トロポニン C を大腸菌で発現させる系の構築を検討している。

さらにこれらの実験と平行して、重水素化トロポニン C を発現させるシステム(Patzelt, H. et al., *Phytochemistry* 50, 215-217 (1999))を導入した。重水素化蛋白質の調製は、重水中で培養した緑藻から重水素化ペプトンを調製する作業と、そのペプトンを用いて培養した大腸菌で目的の蛋白質を発現、精製するという二段階から成る。本年度は、導入したシステムを用いて軽水中でトロポニン C を発現させることに成功した。トロポニン C の発現量は、LB 培地を用いての培養と比べて遜色はなかった。緑藻の重水への adaptation にも成功し、現在は重水中における緑藻の大量培養を行っている。(原子力研究所の藤原氏との共同研究, Max-Planck-Inst. für Biochemie の Prof. Oesterheld, Dr. Patzelt の指導を得た。)

(3) アクチン・トロポミオシン複合体は 3 つの異なる状態が存在するか?(佐野^{*4}, 前田(雄); 前田(佳)^{*2}(細胞情報伝達研))

アクチン・トロポミオシン複合体とミオシン頭部との相互作用については、アクチン・トロポミオシン複合体が 2 状態を取るモデルが提唱されている。しかし近年我々自身のデータも含めて、この 2 状態モデルでは説明がつかない報告が相次いで発表されている。Tobacman は、新たなモデルを提唱した。このモデルに従うと、今まで 2 状態モデルで説明がつかない報告を矛盾なく説明することができるが、一方では熱力学的な取り扱いができないという欠点を持つ。我々は、上述の問題点をクリアするモデルを既に提唱しているが、本年度はこのモデルに若干の修正を加えた。また、この 3 状態のモデルのさらなる検討のための実験を行ったところ、過剰量のトロポミオシンをアクチンフィラメントに結合させたとき、アクチン 7 分子当たりトロポミオシンが 2 分子結合することが明らかになった。現在、アクチンフィラメント上に 2 分子のトロポミオシン

が結合できることと、アクチン・トロポミオシン複合体とミオシン頭部との相互作用について検討を加えている。

(4) ウサギ・トロポミオシンの熱安定性(佐野^{*4}, 前田(雄); 前田(佳)^{*2}(細胞情報伝達研))

トロポミオシンは分子の全長にわたって 2 本鎖で平行な α -helical coiled-coil 構造を取っている。この構造の安定化には、イオン性相互作用と疎水性相互作用の両方が寄与している。ウサギ骨格筋由来のトロポミオシンは、熱に比較的安定な N 端領域と不安定な C 端領域に分けることができる。我々は、熱に安定とされている N 端領域の 2/3 (a.a.49-167) を欠失した変異体の熱安定性について検討を加えた。

円二色偏光を用いて、温度変化に対しての α -helix 含量の測定から、この欠失変異体は低イオン強度下では N 端の安定領域の 1/3 だけで、分子の熱安定性は野生型と同じに保つことができたが、高イオン強度下での分子の熱安定性は不安定な C 端領域と同程度であった。このことは、従来考えられていた、 α -helical coiled-coil 構造の安定化に寄与するイオン性相互作用について、N 端領域全体が安定化に寄与しているのではなく、その約 1/3 だけでも充分 C 端の不安定な領域の安定性を高めることができることを意味する。また、疎水性相互作用については、C 端領域の不安定さが優勢になる。現在、DSC による熱測定や疎水プローブを用いた蛍光測定により、これらの性質にさらに検討を加えている。トロポミオシンは semi-flexible な rod であり、この柔軟さが分子の機能に重要な役割を果たしていると考えられている。今後は、トロポミオシンの柔軟さと α -helical coiled-coil 構造の安定性の相関、さらには機能との関係についても考察していきたいと考えている。(福井大学工学部生物工学科, 志鷹氏, 三木氏との共同研究)

(5) トロポミオシンの立体特異的モノクローン抗体の調製とトロポミオシンの結晶化(前田(雄); 前田(佳)(細胞情報伝達研))

トロポミオシンの結晶化には多くの試みがなされているが、今のところ、高分解能のデータをとるのに充分良い結晶は得られていない。そこで今回は蛋白質の立体構造を認識する抗体を得て、この抗体(Fv)との共結晶を作ろうと試みようとし、先ずロブスタートロポミオシンに対する構造特異的なモノクローナル抗体の調製を始めた。マウスに抗原となるロブスタートロポミオシンを注射し抗体反応のよかったマウスを選び脾臓を取り出しミエローマ細胞と 50% PEG で融合させた。ハイブリドーマ細胞は hypoxanthine と azaserine で選択し、3036 のハイブリドーマ colony が得られた。最初の抗体発現細胞の screening では、standard の ELISA とトロポミオシンに結合するトロポニンを紹介した sandwich ELISA を行った。この結果 33 個のロブスタートロポミオシンに対するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞を得ることができた。standard の ELISA による screening ではトロポミオシンが直接 ELISA プレートの表面に付き、立体構造の保持は保証されないで、トロポニンを先ずプレートの表面に付けそれにトロポミオシンを結合させた ELISA による screening を行った。しかし、後者の場合トロポニンと直接反応する抗体があることが分かり新たな screening の方法を考えなくてはならなかった。計画はトロポミオシンの N 端に His-tag を付けた recombinant 蛋白質を作製して、Ni²⁺-nitrilotriacetic acid がコートされた

プレートに His-tag を吸着させトロポミオシンの立体構造を保持して screening を行うことを考えている。現在この recombinant が作製できたので、蛋白を大腸菌で培養して screening を行うところである。(Max-Planck-Inst. の Dr. Carola Hunte と Prof. Hartmut Michel の協力による)

2. アクチンフィラメントおよび細いフィラメント配向ゾルからの構造情報(小田, 牧野^{*2}, 西川^{*2}, 藤沢, 前田(雄))

アクチンフィラメントや筋肉の細いフィラメントは生体中で蛋白質が重合したフィラメントとして存在し機能する。機能研究のためにはこれらを生体中に近いフィラメント状態の構造, 特に単量体間の相互作用部位の構造を知ることが重要である。この目的のために, これらフィラメントをガラスキャピラリー中に高度に配向させた配向ゾルのシステムを確立し, X 線繊維回折の方法で繊維構造のモデル化に取り組んでいる。X 線繊維回折法では直接高分解能の電子密度図を得ることは困難である。しかし近年フィラメントを構成する蛋白サブユニットの結晶構造が明らかにされているので, この原子構造と SPring-8 の高輝度 X 線をもちいた高分解能領域の強度回折データを基にすることで, 信頼性の高い構造モデル構築が可能と思われる。

細いフィラメント配向ゾルからの X 線繊維回折像には, 主に 1/2.7 nm 分解能より内側にトロポニンの構造情報を与える層線が現れる。これらの層線は細いフィラメント上でのトロポニンのらせん周期 77 nm に由来するため回折像では非常に近接する。精密な構造情報を得るためにはこれらの層線を完全に分離しなければならない。このために昨年度に引き続き(1)高配向度試料の調整条件の再検討, および(2)SPring-8 の小角ビームライン BL45XU, BL40B2 での測定に必要なインフラの整備を進め, 長距離カメラでの測定を行った。まず(1)の結果から高配向度の試料の作成には Cl⁻ の濃度の重要性が示唆された。さらに高カルシウム濃度と低カルシウム濃度の試料調製における最適条件の違いはこの Cl⁻ が関与していると思われ, フィラメント表面の正電荷の違いを反映しているものと思われる。これはカルシウム濃度の変化によりトロポミオシンがアクチン上の位置を変えろという説を間接的に支持すると思われ, さらに系統的な測定を計画中である。またこの結果から大きなドメインの均一なゾルを容易に作成できるようになり, これを応用して高カルシウム濃度と低カルシウム濃度の2つのドメインを融合させることでカルシウム濃度の勾配をゾルに導入することができた。この試料からの X 線回折像は濃度の上昇に伴い段階的に変化するように見られ, 筋収縮制御の構造変化の時分割的研究への応用が期待できる。(2)の結果より実験室系の測定環境では得られない高い解像度かつ低バックグラウンドの小中角領域の回折像が再現性よく得られた。現在これらのデータを用いてトロポニンの構造変化のモデルを検討中である。

F-アクチンに結合するペプチドを通して, F-アクチンフィラメントの安定性をコントロールするメカニズムについて検討している。ファロイジンによって引き起こされる脱重合の阻害の分子メカニズムについて知見を得るため, これまで, 20 Å 分解能でパターン図をつくり, F-アクチン上のファロイジン結合部位を同定してきたが, 回折像の質の

向上や解析方法の進歩により, 8 Å 分解能のデータを用い結合部位を決定することができた。一般に, この 8 Å 分解能の電子密度図で, ヘリックス等の硬い二次構造が同定できる。ファロイジンの結合部位は, 低分解能で考えていたより軸に近く, 9.0~10.0 Å 付近で, 2本のアクチンストランドのほぼ中央にあることが分かった。大局的に見れば, 1993年に Lorenz らがモデリングにより示した結合部位とほぼ一致するものの, 最大 2~3 Å 程度のずれが見られた。8 Å 分解能では, ファロイジンの向きは Lorenz モデルより生化学データを説明できると思われる。Lorenz らが提案した, フィラメント安定化メカニズムの大枠と矛盾するところはない。ファロイジンの解析に用いた方法を, F-アクチン結合物質である, ドラスタリン 11 の結合部位の同定に応用している。ドラスタリン 11-F-アクチンゾルからの回折像は, 分子量はファロイジンとほぼ同じにも関わらず, ファロイジンほど劇的な変化を示さず, まだ, 同定できていない。これは, この結合部位がフィラメントの軸からかなり離れていることを示唆する。また, コフィリンの結合部位も検討している。

また, これまで, モデリングされ報告されてきた F-actin モデルの信憑性を, 8 Å の強度データを基に検討している。ヘリックス等の硬い二次構造の配置に関しては, ほぼモデルを支持する結果を得ているが, ループ等に関しては検討中である。オミット図を用いた解析では, read の方法(1986)を用いたとしても, モデルに引きずられる傾向があるので, 解析に限界がある。そこで, 低温電子顕微鏡を用いた位相データを得, X 線の強度データと組み合わせ, 電子密度図を作成することも行っているが, 分解能は 20 Å を超えていない。(松下電器産業中央研究所の山下氏; ERATO の長谷川氏, 難波氏との共同研究)

3. 短く長さの揃ったアクチンフィラメントの調整法の確立をめざして

(1)計画の全体と発現系の確立(佐野^{*4}, 前田(雄); 前田(佳)(細胞情報伝達研))

細いフィラメントは複合体として機能を担うので, 複合体全体の立体構造を知ることがメカニズムの研究に不可欠である。特に蛋白質間の相互作用を理解するには, 蛋白質の原子座標が必要である。細いフィラメントを構成するアクチンは長いフィラメントになり易く, 細いフィラメントの結晶はこれまで報告がない。そこで, 我々は, 短く長さの揃ったフィラメントを調製して結晶化することにより原子座標を得ようとしている。短く長さの揃ったフィラメントの調製は(i)アクチンキャッピング蛋白質と, アクチンフィラメントの長さを決定する「物差し」蛋白質を活用して人工的に作る(ii)自然界に存在する短いアクチンフィラメントを単離する, という2方針を立てている。(i)については筋肉中で細いフィラメントの P 端に実際存在するアクチンキャッピング蛋白質であるトロポモジュリンの各種アイソフォームをクローニングし昆虫細胞での発現系の確立を行った。「物差し」蛋白質としては, 自然界に存在する短いアクチンフィラメントでも「物差し」として使われていると考えられているトロポミオシンを昆虫細胞で発現する系を確立した。B 端のキャッピング蛋白質としては,

CapZ に注目し、これは既に昆虫細胞での発現系を確立してある。(ii)については、アクチン様蛋白質からなるダイナクチンが複合体として単離できることから、先ず脳からダイナクチン・ミニフィラメントを単離精製することを試みている。

(2)トロポモジュリンの構造の研究(Krieger^{*3}, Kostyukova^{*3}, 山下, 藤澤, 前田(雄))

トロポモジュリンはアクチン・トロポミオシン・フィラメントの P 端をキャップすることによってフィラメントを安定化させる。アクチンの重合・脱重合を基にした細胞内オルガネラ運動において重要な役割を果たしていると考えられており、また筋肉においてはアクチンフィラメントの長さを一定に保つ仕組みをも担っているらしい。

この蛋白質の N 端半分はトロポミオシンとの結合に、C 端半分はアクチンとの相互作用を担っているらしいとの知見があったが、構造も未知で、どのように機能するかも理解されていなかった。我々は大量発現系を確立し、大きな断片を調製した。(Kostyukova et al., 2000)これらの材料を使つての X 線溶液散乱と熱測定の結果から、N 端半分は棒状分子で二次構造を持つが三次構造を持たないこと、C 端半分はより球状で 1 つの単位に折り畳まれた構造をしていることを明らかにした。(Fujisawa et al., 2001; Kostyukova et al., 2001)この結果から、C 端半分が結晶化可能と予測し、また熱測定時の経験から pH3, 亜鉛存在化での結晶化に成功し(Krieger et al., 2001), 理研ビームライン II (BL44B2)において亜鉛による MAD 法で 1.45 Å 分解能での構造を決定した。この部分は Leucine-Rich Repeat (LRR)という繰り返し構造からなるドメインであり、アクチン結合蛋白質でこのモチーフが見つかったのは最初である。LRR は多くの他の蛋白質で蛋白質相互作用に使われている。この蛋白質の C 端半分について調べたところ、アクチンとネブリンが相互作用することが明らかになった。これらの結果を基にして、アクチンフィラメントの P 端キャッピングのメカニズムについて仮説を提唱した。(Fujisawa et al., 2001)

(3)「物差し」ユニット~トロポモジュリン・トロポミオシン複合体形成(佐野^{*4}, 前田(雄); 前田(佳)(細胞情報伝達研))

赤血球膜の裏打ち構造中に存在するアクチンフィラメントの長さがそろっていることは知られている。その理由として、赤血球で発現しているトロポモジュリン・トロポミオシン複合体が、「物差し」ユニットとして働くことによるという説が提唱されている。我々は、短く長さのそろったアクチンフィラメントの *in vitro* 再構成にこの「物差し」ユニットを用いることを考えた。そこで、赤血球で発現しているトロポモジュリンとトロポミオシンのアイソフォームの cDNA クローニングを行い、パキキュロウイルスによるこれらの発現系を構築した。トロポモジュリンとトロポミオシンが相互作用することは既に知られているが、溶液中での直接の結合や結合比はまだ調べられていない。アクチンフィラメントの再構成の第一段階として、トロポモジュリンとトロポミオシンの溶液中での相互作用を調べた。その結果、溶液中のトロポモジュリンとトロポミオシンの結合・解離を直接見ることができた。また予備実験から、結合比は従来提唱されていた、2:1 もしくは 4:1 ではなく 1:1 の結合であると示唆される結果が得られた。

(4) CapZ の立体構造解析(山下, 前田(雄); 前田(佳)(細胞情報伝達研))

CapZ は、アクチンフィラメントの反矢じり端と呼ばれる側の末端をキャッピングする蛋白質で、筋原線維やその他の細胞内でアクチンフィラメントの長さの調節やフィラメント・ネットワークの形成に大きな役割を果たしている。またそのアクチンキャッピング活性は細胞骨格運動の調節物質であるリン脂質によって阻害されることが報告されており、CapZ は細胞情報伝達系からの情報の“受け手”としてアクチンの重合・脱重合を制御していると考えられる。この CapZ についてはこれまでに構造学的な情報が全く得られていない。そこで、本研究では CapZ の立体構造解析を行って、CapZ のアクチン結合部位や結合様式、さらにはアクチンフィラメントの調節機構を構造の面から明らかにすることを旨とする。

まず CapZ の原子レベルでの立体構造情報を得るため、X 線結晶構造解析に取り組んでいる。結晶化条件の探索を行った結果、構造解析に供しうる結晶を得ることに成功した。現在結晶化条件およびデータ収集条件の改良を行い、解析を進めている。また、プロテアーゼによる限定加水分解や CD 測定などの生化学実験を行い、リン脂質によって CapZ が立体構造変化を起こし、その構造が不安定化することを示す結果を得た。このことから、リン脂質による CapZ のアクチンキャッピング活性の変化は CapZ の構造変化と結び付いているものと推測された。今後この機構を立体構造の面から明らかにしていきたい。

(5) 生体内に存在するフィラメント複合体の調製法の確立をめざして(瀧景子^{*2}, 前田(雄); 前田(佳)(細胞情報伝達研))

生体内ではもともとそれぞれの場所(筋肉や細胞骨格など)でその機能に適したサイズのアクチンフィラメントが作られている。この、生体内で構築される“長さの揃ったアクチン”をキャッピング蛋白質を含む複合体として大量に分離する方法を確立し結晶化する。遺伝性貧血の研究の蓄積から、赤血球膜には“長さの揃った短いアクチンフィラメント”が細胞骨格構造体として含まれていることが知られているので、まず、赤血球からアクチンフィラメントを含む細胞骨格構造体の分離を行い、電子顕微鏡にて複合体の同定を行った。現在は、さらにこの構造体からのアクチンミニフィラメントの分離を試みている。

また一方で、細胞生物学的観点から近年研究が進み、DNA 複製時の染色体分配や、ゴルジ・小胞体輸送に関するダイナクチン複合体中でも、短いフィラメント構造体が機能していることが明らかになってきた。これは、アクチン関連蛋白質(Actin related protein, Arp1)と名付けられたアクチンと非常に相同性の高い蛋白質で、このフィラメントの分離も試みた。今後、それぞれのフィラメントの結晶化に取り組み、ミニフィラメント複合体の X 線結晶構造解析から単体がフィラメントに重合する際の構造変化について考察する。

4. ロブスター・トロポミオシン遺伝子由来の発現促進因子(佐野^{*4}, 大木^{*2}, 前田(雄); 前田(佳)(細胞情報伝達研))

複数の生物種由来のトロポミオシン蛋白質を昆虫細胞

(Sf9) で発現させたところ、ロブスター由来のトロポミオシンの発現量は著しく多く、ウサギ由来のものと比較して、30~100 倍にもものぼることに気が付いた。発現量の差がどうい理由によるものかを検討するために、これらのトランスファーベクターの構成を比較した。ロブスター由来のトロポミオシンのトランスファーベクターは、市販されている pVL1392 のマルチクローニングサイトの XbaI サイトにその cDNA を挿入したもので、その cDNA には翻訳開始点の上流に 21bp の非翻訳領域 (L21) を含んでいた。この L21 が発現量を増加させるシス因子ではないかと考え、pVL1392 の XbaI サイトの下流に L21 (pVL-L21) とウサギ由来のトロポミオシン cDNA をつないだところ、予想通り発現量の大幅な増加が認められた。さらに他の細胞骨格系蛋白質においても、同様に pVL-L21 に cDNA をつないで発現を行ったところ、CapZ・トロポモジュリンでは高い発現効率を示した。今までその発現を確認することができなかったアクチンも、この pVL-L21 を用いた場合、発現量は低かったものの、その発現を SDS-PAGE/CBB 染色により確認することができた。また、昆虫培養細胞を用いた発現系では、複数のポリペプチドの共発現が容易にできるという長所があるが、この点も CapZ α サブユニット/ β サブユニット・トロポミオシン/トロポモジュリンのいずれにおいても共発現が良好に行われ、複合体を形成していることを確認した。これらのことから、pVL-L21 は細胞骨格を構成する蛋白質発現に有効である。

L21 の効果の一般性を示すため、L21 の下流に luciferase 遺伝子をつなぎ、その遺伝子産物の発現量を調べている。予備実験の結果ではあるが pVL-L21 による luciferase の発現量の増加が認められた。現在、さらに詳細な解析を行っている。

5. 大型放射光施設を利用する生体高分子溶液中での構造生物研究

(1) 理研ビームライン I (BL45-SAXS) の高度化 (西川^{*2}、藤澤、高橋 (義)^{*5})

前年度より引き続きマイクロストリップガスチェンバーの筋肉ファイバーへの応用実験を行い、ガス型検出器の持つ広いダイナミックレンジを生かした良好な X 線回折像を得ることができた。(谷森、越智、永吉、小石) また、イメージングプレート (IP、理学・R-RAXIS・IV⁺⁺) の評価を行い、放射光小角実験では露光から読み取りまでの IP の減衰が問題となることが判明し、従来の BAS-III という素材から BAS-MS という素材に IP を変更し、露光を厳密に制御するために R-RAXIS・IV⁺⁺ コントロールソフトを改変した。また、X 線イメージンシファイアー + CCD 検出器の CCD 部を高速外部コントロール可能な CCD と置き換えた。BL45XU のデータを使用して三次元低分解能構造が計算できることを、トロポニン C とミオシン S1 断片により確認をした。

(2) 高圧 X 線小角散乱測定装置の開発 (藤澤、西川^{*2})

X 線小角散乱用高圧ジャンプ装置のシール部分を改良し、5000 気圧まで安定に圧力が保持でき、高圧下での蛋白質構造の測定がサンプル容量 0.4ml でできるようになった。チトクローム C、アポフェリチン、カルモジュリン等において圧力を変えることによる構造変化を調べた。(大阪大学大

学院・基礎工学研科の猪子氏、札幌医科大学の熊野氏との共同研究)

(3) トロポニン CI 複合体の溶液構造およびその熱力学的評価 (藤澤、武田^{*1}；鳥越 (細胞材料室))

トロポニン C とトロポニン I (1-47) の複合体は結晶中では非常にコンパクトな形を形成している。沈殿剤を除いて結晶成長させたのと全く同じ溶液条件でトロポニン CI 複合体構造とその Ca²⁺ 応答を、X 線溶液散乱を用いて測定した。トロポニン C・N-ドメインとの結合が弱いトロポニン I (1-47) では伸びた形であり、Ca²⁺ による構造変化は小さいが、トロポニン I (1-132) と結合させると形が大きく変化し、Ca²⁺ 結合、あるいは熱による形態変化の影響を調べ、形態変化と熱力学量の相関を取るために DSC 測定を行った。

(4) EDC で架橋されたアクトミオシン複合体の構造変化の X 線回折による研究 (藤澤；鈴木 (光物性研究チーム、FRS))

硬直化されたウサギアクチンフィラメントにミオシン S1 を加え EDC 架橋処理を行うと、S1 が結合することによりアクチン由来の層線は強調される。しかし、ATP 存在下ではアクチン由来の層線は変化しなかった。立体構造特異的な結合サイトが、以前はアクトミオシンサイクルには重要であると考えられていたが、この架橋されたアクトミオシン複合体ではほとんどの時間結合していない状態にあることが分かった。(Iwamoto et al., 2001) (高輝度光科学財団の岩本氏；通信総研の大岩氏との共同研究)

(5) CAG リpeat 病の配列を持つ変異ミオグロビンのフィラメント形成初期課程の研究 (藤澤、西川^{*2}；田中 (CAG リpeat 病研究チーム、BSI))

CAG リpeat 病は CAG リpeat 配列を持つ蛋白質がアミロイドを形成する病気であることが知られている。様々な長さの CAG リpeat 配列を持つ変異ミオグロビンの繊維形成と構造のコンパクトさについて、X 線溶液散乱を用いて調べた。

(6) 人工設計蛋白質の構造評価 (藤澤；新井^{*6}、西川^{*2}、磯貝 (生体物理化学研))

BL45XU を使用することにより測定された 4 種類の人工グロビンに対し特に、ヘムを結合した状態の構造に対し溶液中構造を計算した。また、蛋白質相互作用研究のために、2 つの緑色蛍光蛋白質 EBFP と EGFP からなるキメラ蛋白質のリンカー部分を設計し、その全体構造を溶液散乱により評価した。

(7) 時分割溶液散乱による蛋白質 refolding の研究 (藤澤、高橋^{*5}、西川^{*2}；磯貝 (生体物理化学研))

BL45XU で得られた放射光時分割溶液散乱のデータに基づき、アポミオグロビンの折れ畳み反応の可視化を行った。また、高速混合型フローセルを用いてチトクローム C のサブミリ秒の時分割溶液散乱測定を行い反応開始後 150 マイクロ秒の時間より測定が可能となり、サブミリ秒領域での全体構造の構造形成が始めて明らかになった。(京都大学大学院工学研究科の秋山氏との共同研究)

6. トロポニン還元酵素-II の時分割 X 線結晶構造解析 (山下；加藤、中津 (メンブレンダイナミクス研究グループ))
トロポニン還元酵素-II (TR-II) は NADPH を補酵素と

してトロピノンのカルボニル基を β -水酸基に還元しシュードトロピンを生成する反応を触媒する酵素である。これまでにこの酵素の X 線結晶構造解析を行い、基質の結合していない状態の構造、および酵素反応終了後の状態である生成物複合体の構造 (TR-II: シュードトロピン: NADP⁺ 複合体) を明らかにしてきた。しかし、TR-II の酵素反応をになう構造基盤をさらに詳しく解明するためには、反応が始まる直前の状態である基質複合体の構造、すなわち TR-II: トロピノン: NADPH 複合体の構造を解析することが必要である。昨年までに、反応の直前の構造を捉えるため、フローセル法とラウエ法を組み合わせた X 線回折データ収集を行った。本年度は得られたデータの処理および構造解析を行った。その結果、活性部位に基質の電子密度を確認することができ、確かに TR-II: NADPH: トロピノン複合体、すなわち反応が起こる直前の構造を捉えられたことが確認できた。また解析した結晶中の大部分の酵素が基質複合体の状態であることは、顕微分光分析を行うことによっても確認した。さらに、明らかになった酵素反応直前の構造をすでに解析した反応終了後の構造と比較した結果、反応の前後で基質トロピノンの結合方向が少し変化しており、活性部位内のアミノ酸残基もそれに伴って若干構造変化をしていることを明らかにした。この結果は、この酵素の活性部位内の基質および残基が、反応の前後で位置を変えることにより、酵素反応の進行に適した配置を取る、ということを示すものである。今回行った実験から、反応に伴った酵素の「動き」を示す結果を得ることができた。

*¹ 科学技術振興事業団さきがけ研究 21 研究員兼務, *² 研究協力員, *³ 協力研究員, *⁴ 基礎科学特別研究員, *⁵ 委託研究生, *⁶ 研修生

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

- Krieger I., Kostyukova A., and Maeda Y.: “Crystallization and preliminary characterization of crystals of the C-terminal half fragment of tropomodulin”, *Acta Cryst. D* **57**, 743–744 (2001). *
- Isogai Y., Ishii A., Fujisawa T., Ota M., and Nishikawa K.: “Redesign of artificial globins: Effects of residue replacements at hydrophobic sites on the structural properties”, *Biochemistry* **39**, 5683–5690 (2000). *
- Oda T., Makino K., Yamashita I., Namba K., and Maeda Y.: “Distinct structural changes detected by X-ray fiber diffraction in stabilization of F-actin by lowering pH and increasing ionic strength”, *Biophys. J.* **80**, 841–851 (2001). *
- Bolze J., Fujisawa T., Nagao T., Norisada K., Saito H., and Naito A.: “Small angle X-ray scattering and ³¹P NMR studies on the phase behavior of phospholipid bilayered mixed micelles”, *Chem. Phys. Lett.* **329**, 215–220 (2000). *
- Sano K., Maeda K., Taniguchi H., and Maeda Y.: “Amino acid replacements in an internal region of tropomyosin alter the properties of the entire molecule”, *Eur. J. Biochem.* **267**, 4870–4877 (2000). *

- Kostyukova A., Maeda K., Yamauchi E., Krieger I., and Maeda Y.: “Domain structure of tropomodulin: Distinct properties of the N-terminal and C-terminal halves”, *Eur. J. Biochem.* **267**, 6470–6475 (2000). *
- Fujisawa T., Inoue K., Oka T., Iwamoto H., Uruga T., Kumasaka T., Inoko Y., Yagi N., Yamamoto M., and Ueki T.: “Small-angle X-ray scattering station at the SPring-8 RIKEN beamline”, *J. Appl. Crystallogr.* **33**, 797–800 (2000). *
- Sano K., Maeda K., Oda T., and Maeda Y.: “The effect of single residue substitutions of serine-283 on the strength of head-to-tail interaction and actin binding properties of rabbit skeletal muscle α -tropomyosin”, *J. Biochem.* **127**, 1095–1102 (2000). *
- Hai H., Miura T., Kobayashi T., Maeda Y., and Miki M.: “Conformational changes of the troponin-tropomyosin complex on F-actin observed by fluorescence resonance energy transfer measurements”, *J. Fluoresc.* **10**, 193–201 (2000). *
- Iwamoto H., Oiwa K., Suzuki T., and Fujisawa T.: “X-ray diffraction evidence for the lack of stereospecific protein interactions in highly activated actomyosin complex”, *J. Mol. Biol.* **305**, 863–874 (2001). *
- Oka T., Yagi N., Fujisawa T., Kamikubo H., Tokunaga F., and Kataoka M.: “Time-resolved X-ray diffraction reveals multiple conformations in the M-N transition of the bacteriorhodopsin photocycle”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14278–14282 (2000). *
- Oda T., Makino K., Yamashita I., Namba K., and Maeda Y.: “The helical parameters of F-actin precisely determined from X-ray fiber diffraction of well-oriented sols”, *Results and Problems in Cell Differentiation*, edited by C. dos Remedios, Springer-Verlag, Berlin, **32**, 43–58 (2001).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Fujisawa T., Takeda S., and Maeda Y.: “If TnC takes the compact conformation?”, *Muscle Contractile Proteins Gordon Conf.*, New London, USA, June (1999).
- Oda T., Makino K., Hasegawa K., Namba K., and Maeda Y.: “X-ray fibre diffraction from F-actin at SPring-8”, *9th Ann. Fibre Diffraction and Non-Crystalline Diffraction Workshop*, (CCP13), Sheffield, UK, June (2000).
- Nihsikawa Y., Fujisawa T., Inoko Y., and Moritoki M.: “Improvement of high-pressure cell with diamond windows for solution X-ray scattering of protein”, *7th Int. Conf. on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2000)*, (Technische Universität Berlin and BESSY), Berlin, Germany, Aug. (2000).
- Toyokawa H., Fujisawa T., Inoko Y., Nagayoshi T., Nishi Y., Nihsikawa Y., Ochi A., Tanimori T., and Suzuki M.: “Performance of a micro-strip gas chamber in solution X-ray scattering”, *7th Int. Conf. on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2000)*, (Technische Univer-

- sität Berlin and BESSY), Berlin, Germany, Aug. (2000).
- Fujisawa T., Nihsikawa Y., and Inoko Y.: “The use of small-angle X-ray scattering technique with third-generation synchrotron X-ray source on high-pressure biochemistry”, 1st Int. Conf. on High Pressure Biochemistry and Biotechnology, Kyoto, Nov. (2000).
- Yamashita A.: “Laue structure of tropinone reductase-II complexed with NADPH and tropinone: Capturing an enzyme structure just before the reaction initiates”, UK-Japan (DL/RIKEN/JASRI) Joint Symp., Mikazukicho, Nov. (2000).
- Takahashi S., Akiyama S., Ishimori K., Morishima I., Nihsikawa Y., and Fujisawa T.: “Submillisecond folding dynamics of cytochrome-c studied using rapid mixing technique”, JSPS-CNRS Japan-France Joint Seminar, (Japan Society for the Promotion of Science, Centre National de la Recherche Scientifique), Kyoto, Dec. (2000).
- Kostyukova A., Fujisawa T., Krieger I., Tiktopulo E., Yamashita A., Maeda K., and Maeda Y.: “Tropomodulin: Distinct properties of N- and C-terminal halves”, 45th Ann. Meet. of Biophysical Soc., Boston, USA, Feb. (2001).
- Yamamoto M., Adachi S., Kumasaka T., Kawano Y., Park S.-Y., Kamiya N., Shiro Y., Inoue Y., Yokoyama S., Miyano M., and Ishikawa T.: “SPRING-8 RIKEN beamlines for structural biology and structural genomics”, High Throughput Structural Biology, (ESRF, EMBL), Grenoble, France, Feb. (2001).
- (国内会議)
- 海宏, 三浦智雄, 小林智芳, 前田雄一郎, 三木正雄: “細いフィラメント上 Tm-Tn 複合体構造変化の蛍光エネルギー移動法による観察”, 日本生物物理学会第 37 回年会, 和光, 10 月 (1999).
- 藤澤哲郎, Kostyukova A., 前田雄一郎: “X 線溶液散乱から見てきたトロポモジュリンのかたち”, 2000 年生体運動研究合同班会議, 大阪, 1 月 (2000).
- 海宏, 三浦智雄, 小林智芳, 前田雄一郎, 三木正雄: “トロポニン-トロポミオシン構造変化の蛍光エネルギー移動測定”, 2000 年生体運動研究合同班会議, 大阪, 1 月 (2000).
- 前田雄一郎: “筋肉の細いフィラメントの構造と機能”, 理研シンポジウム「構造生物学 (V): SPRING-8 と構造生物学研究」, 佐用郡三木町, 1 月 (2000).
- 宮島達也, 竹中幹人, 曾田憲弘, 三田一樹, 橋本竹治, 藤澤哲郎: “圧力ジャンプによるジブロックコポリマーの秩序化過程のダイナミクスに関する研究”, 第 49 回高分子学会年次大会, 名古屋, 5 月 (2000).
- 竹中幹人, 宮島達也, 曾田憲弘, 三田一樹, 橋本竹治, 藤澤哲郎: “圧力ジャンプによるジブロックコポリマーの濃度揺らぎのダイナミクスに関する研究”, 第 49 回高分子学会年次大会, 名古屋, 5 月 (2000).
- 松本富美子, 藤原悟, 前田雄一郎: “結晶構造解析と溶液散乱の対話: アクチンフィラメントの研究の現場から”, 理研シンポジウム「中性子光学素子の開発と応用 (NOP)」, 和光, 5 月 (2000).
- 秋山修志, 高橋聡, 石森浩一郎, 森島績, 西川幸宏, 藤澤哲郎: “円二色性及び X 線小角散乱分光法によるシトクロム c の折れ畳み初期過程の観察”, 蛋白合同年会東京 2000: 第 51 回タンパク質構造討論会, 第 12 回日本蛋白工学会, 第 7 回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ, 東京, 6 月 (2000).
- 磯貝泰弘, 太田元規, 石井杏奈, 藤澤哲郎, 西川建: “球状タンパク質のデノデザイン”, 蛋白合同年会東京 2000: 第 51 回タンパク質構造討論会, 第 12 回日本蛋白工学会, 第 7 回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ, 東京, 6 月 (2000).
- 石井杏奈, 石田学, 磯貝泰弘, 藤澤哲郎, 太田元規, 飯塚哲太郎, 西川建: “全配列設計された人工グロビンの構造特性と機能”, 蛋白合同年会東京 2000: 第 51 回タンパク質構造討論会, 第 12 回日本蛋白工学会, 第 7 回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ, 東京, 6 月 (2000).
- 岩本裕之, 大岩和弘, 鈴木拓, 藤澤哲郎: “X 線回折法によるアクチン-平滑筋ミオシン S1 複合体中ヌクレオチド結合部位の位置決定”, 第 38 回日本生物物理学会年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 西川幸宏, 藤澤哲郎, 守時正人: “X 線小角散乱による圧力効果 (I): 高圧セルの開発と Cytochrome-C への応用”, 第 38 回日本生物物理学会年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 藤澤哲郎, 西川幸宏, 猪子洋二: “X 線小角散乱による圧力効果 (II): タンパク質複合体アポフェリチンの圧縮率直接測定”, 第 38 回日本生物物理学会年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 藤澤哲郎, 西川幸宏, 能野秀典: “X 線小角散乱による圧力効果 (III): カルモジュリン Ca²⁺ 結合構造変化の圧力による模倣”, 第 38 回日本生物物理学会年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 藤澤哲郎, Kostyukova A., 前田雄一郎: “X 線溶液散乱で見るトロポモジュリンの形とトロポミオシンとの相互作用”, 第 38 回日本生物物理学会年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 藤澤哲郎, 鳥越秀峰, 武田壮一, 前田雄一郎: “トロポニン CI 複合体の Ca²⁺ 応答の溶液構造及び熱力学的評価”, 第 38 回日本生物物理学会年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 高橋義和, 西川幸宏, 前田雄一郎, 藤澤哲郎: “一次元溶液散乱曲線から低分解能三次元タンパク質像の計算”, 第 38 回日本生物物理学会年会, 仙台, 9 月 (2000).
- Krieger I., Kostyukova A., 前田雄一郎: “Crystallization and preliminary X-ray crystallographic data of tropomodulin C-terminal fragment”, 第 38 回日本生物物理学会回年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 海宏, 佐野健一, 前田佳代, 前田雄一郎, 三木正雄: “D234 変異トロポミオシンを使った再構成細いフィラメントの蛍光エネルギー移動測定”, 第 38 回日本生物物理学会回年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 溝口智恵子, 海宏, 前田佳代, 前田雄一郎, 三木正雄: “TnI の C 末端と阻害領域との挙動の比較”, 第 38 回日本生物物理学会回年会, 仙台, 9 月 (2000).
- Kostyukova A., Tiktopulo E., Krieger I., 前田佳代, 前田雄一郎: “Tropomodulin domain structure”, 第 38 回日本生物物理学会回年会, 仙台, 9 月 (2000).
- 佐野健一, 前田佳代, 前田雄一郎: “アクチン-トロポミオシン複合体の 3 状態モデル”, 第 38 回日本生物物理学会回

- 年会, 仙台, 9月(2000).
- 武田壮一, 山下敦子, 前田佳代, Krieger I., 前田雄一郎: “トロポニンの結晶化と構造解析”, 第38日本生物物理学学会回年会, 仙台, 9月(2000).
- 田嶋佳子, 三島久典, 牧野浩司, 若林克三: “軟体動物平滑筋の活性化過程における 59 Å X線反射強度の時分割測定”, 第38日本生物物理学学会回年会, 仙台, 9月(2000).
- 紺田佳孝, 溝口智恵子, 前田佳代, 前田雄一郎, 三木正雄: “変異トロポニン T を使った再構成細いフィラメントの蛍光エネルギー移動測定”, 第38日本生物物理学学会回年会, 仙台, 9月(2000).
- 川口昭夫, 鶴谷直樹, 深尾浩次, 宮路英紀, 藤澤哲郎, 西川幸宏: “ナイロン 6 試料へのイオン・低分子の拡散と配向挙動: 放射光を用いたコンプレックス形成初期過程の観察”, 第49回高分子討論会, 仙台, 9月(2000).
- 岩本裕之, 鈴木拓, 大岩和弘, 藤澤哲郎: “骨格筋収縮制御蛋白に対する化学架橋剤 EDC の作用: X線回折法による研究”, 第71回日本動物学会年次大会, 東京, 9月(2000).
- 高橋聡, 秋山修志, 石森浩一郎, 森島績, 西川幸宏, 藤澤哲郎: “Early Folding Dynamics of Cytochrome C studied using rapid mixing device”, 第12回名古屋コンファレンス「タンパク質フォールディングの諸問題」, (日本化学会東海支部), 岡崎, 10月(2000).
- 西川幸宏, 藤澤哲郎: “BL45XU-小角ステーションの最近の進展”, 第4回 SPring-8 シンポジウム, (高輝度光科学財団), 三日月町, 10月(2000).
- 前田雄一郎: “トロポニンの構造変化と筋のカルシウム調節をどのように結びつけるか?”, 第8回理研-岡山ジョイントフォーラム「循環ホメオダイナミクス-フィジオームへの挑戦」, (岡山県, 岡山県新技術振興財団), 岡山, 10月(2000).
- 山下敦子, 遠藤真治, 東常行, 中津亨, 小田順一, 加藤博章: “トロポニン還元酵素-II: 補酵素: 基質複合体のラウエ法による立体構造解析”, 日本結晶学会 2000 年度年会, 仙台, 11月(2000).
- 藤澤哲郎: “蛋白質結晶構造と放射光 X線小角散乱からみた溶液構造”, 日本結晶学会創設 50 周年記念大会, 仙台, 11月(2000).
- 秋山修志, 高橋聡, 木村哲哉, 石黒浩一郎, 森島績, 西川幸宏, 藤澤哲郎: “高速混合・X線小角散乱技術を利用したシトクロム C 折れ畳み初期過程の観察”, 動的側面からみたタンパク質の分子科学, (分子科学研究所), 岡崎, 12月(2000).
- 岩本裕之, 大岩和弘, 鈴木拓, 藤澤哲郎: “EDC は細いフィラメントの収縮制御系を 3 状態に固定する”, 2001 生体運動研究合同班会議, 東京, 1月(2001).
- Krieger I., Kostyukova A., 山下敦子, 前田雄一郎: “トロポモジュリン C 端半分の結晶構造”, 2001 生体運動研究合同班会議, 東京, 1月(2001).
- 渡邊康, 井上勝晶, 三浦圭子, 藤澤哲郎, 猪子洋二: “大腸菌外膜蛋白質 OmpF ポーリンの構造形成中間体の特性”, 第14回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 東広島, 1月(2001).
- 藤澤哲郎, 西川幸宏, 猪子洋二: “X線小角散乱高圧ジャンプ装置の評価”, 第14回放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 東広島, 1月(2001).
- 西川幸宏, 藤澤哲郎, 猪子洋二: “小角 X線散乱におけるイメージングプレート (R-AxisIV++) の強度値の定量性評価”, 第14回放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 東広島, 1月(2001).
- Kostyukova A., Krieger I., 藤澤哲郎, Tiktopulo E., 前田佳代, 前田雄一郎: “Structure of tropomodulin, the unique capping protein for the P-end of actin filament”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VI)」, 和光, 1月(2001).
- 牧野浩司, 小田俊郎, 難波啓一, 前田雄一郎: “X-ray fiber diffraction studies of well oriented sols of muscular Native Thin Filament and F-actin”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VI)」, 和光, 1月(2001).
- 前田雄一郎: “トロポモジュリンの構造とアクチンフィラメント P 端キャッピングのメカニズム”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VI)」, 和光, 1月(2001).
- 武田壮一: “筋収縮調節タンパク質複合体の構造解析に向けた戦略”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VI)」, 和光, 1月(2001).
- 石田学, 石井杏奈, 磯貝泰弘, 太田元規, 藤澤哲郎, 西川建, 飯塚哲太郎: “全配列設計された人工グロビンの構造特性”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VI)」, 和光, 1月(2001).
- 藤澤哲郎, 西川幸宏: “理研構造生物学ビームライン X線小角散乱測定施設”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VI)」, 和光, 1月(2001).

Research Subjects and Members of Structural Biochemistry Laboratory

1. Mechanism of Calcium Regulation of Muscle Contraction
2. Mechanism of Sliding between Actin Filament and Myosin
3. Mechanism of Actin Filament-Dynamics Driven Movement of Cell Organelle
4. Mechanism of Capping and the Stabilization of Actin Filament
5. Establishing New Methods in Recombinant Protein Expression, X-ray Fibre Diffraction, X-ray Solution Scattering, Protein Crystallography
6. Structural Studies on Protein Solutions using Synchrotron Small-angle X-ray Scattering

Head

Dr. Yuichiro MAÉDA

Members

Dr. Tetsuro FUJISAWA

Dr. Toshiro ODA

Dr. Soichi TAKEDA

Dr. Atsuko YAMASHITA

Dr. Ken-Ichi SANO^{*1}

Dr. Alla KOSTYUKOVA^{*2}
Ms. Inna KRIEGER^{*2}
Mr. Kouji MAKINO^{*2}
Ms. Fumiko MATSUMOTO^{*2}
Dr. Yukihiro NISHIKAWA^{*2}
Dr. Keiko TAKI^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Hisaaki TANIGUCHI (Membrane Dynamics Research Group)

Dr. Hiroaki KATO (Membrane Dynamics Research

Group)

Dr. Hidetaka TORIGOE (Gene Bank)

Visiting Members

Atsuhiko OCHI (Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Inst. Tech.)

Ms. Manami OKI

Tadasu TANIMORI (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Trainees

Ryoichi ARAI (Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ.)

Satoshi KOISHI (Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Inst. Tech.)

Tsutomu NAGAYOSHI (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Yoshikazu TAKAHASHI (Toray Res. Cen.)