

生命情報と生体機能のナノバイオロジー

著者	今井 清博, 大河内 正一, 片岡 洋右, 高藤 昭, 平松 豊一, 飯塚 哲太郎, 中村 寛夫, 磯貝 泰弘, 原田 慶恵, 堀 洋
出版者	法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究センター
雑誌名	法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究センター年報
巻	2003
ページ	53-67
発行年	2004-12-24
URL	http://hdl.handle.net/10114/916

生命情報と生体機能のナノバイオロジー

目 的

今世紀は、前世紀から得られつつあるヒトや他の生物種のゲノム情報（DNA 塩基配列）という知的財産を人類の福祉や発展のために利用する時代であるといわれている。そのためには、数万個の遺伝子から成る膨大なゲノム情報の迅速処理・探索技術などの数理工学的解析技術の飛躍的發展に加えて、遺伝子発現（蛋白質生合成）と蛋白質機能の研究を通しての遺伝子の同定が緊急の課題となっている。本プロジェクトでは、1分子計測や1分子操作などのバイオナノテクノロジーを取り入れながら、生命情報解析技術の高度化と有効利用、遺伝子の同定、生命情報の発現・伝達・攪乱メカニズムの解明、細胞機能を基盤にした個体丸ごと生体機能の理解を目指す。

2003年度は、以下の課題を中心にして研究を進めた。

- 1．アロステリック蛋白質の規範としてのヘモグロビンの機能解析と環境応答性の研究
- 2．生体と水、生体水の概念
- 3．分子シミュレーションのための拡張アンサンブルモンテカルロ法の開発
- 4．遺伝子発現産物の翻訳後プロセスの解析
- 5．遺伝子解析と情報理論による特定残基の機能
- 6．分子生物学へのトポロジー代数の応用
- 7．遺伝子組み換えによる生体内情報伝達系の解析
- 8．新規蛋白質分子の設計
- 9．ナノテクノロジーによる生体内情報伝達系の解析
- 10．磁気共鳴分光学による蛋白質物性

成 果

【今井グループ】 蛋白質の構造・機能相関と生体機能の分子論

DNA 情報の変異に起因して生ずる変異ヘモグロビン（異常ヘモグロビンや人工変異ヘモグロビン）の構造や機能特性の研究を通じて、ヘモグロビンの分子進化や環境適応の仕組みを明らかにすることを目指している。

今年度は、北海道教育大学と大阪大学大学院基礎工学研究科と共同で、進化上、単量体ヘモグロビンと四量体ヘモグロビンをつなぐ位置にある円口類ヘモグロビン、およびそのミオグロビンの構造と機能を明らかにするため、新潟産と北海道産のカワヤツメウナギの血液から溶血液とヘモグロビンを、筋肉からミオグロビンをそれぞれ調製して下記の実験結果を得た。

1．ヘモグロビン、ミオグロビンの成分と構造の解析

(1) 溶血液には5つのアイソフォーム（Hb₁ ~ Hb₅）が存在し、初めの2つがメジャー成分であった。

(2) 精製した Hb₁ のアミノ酸配列はウミヤツメの Hb₁ のそれと 97% の相同性を示した。ヒトの Hb の α 鎖、 β 鎖に比べると相同性は低く、N 末端が 8 残基長く、C 末端付近に 9 残基分の欠

損がみられた。

(3) Hb のアミノ酸配列は Hb のそれと同一であった。

(4) ミオグロビンは単一成分で、しかも、そのアミノ酸配列は Hb のそれと同一であった。

2. 酸素結合特性

(1) Hb の機能は、種々の点において脊椎動物 Hb のそれに比べて原始的である(弱い協同作用、Bohr 効果、CO₂ の効果の存在と有機リン酸塩効果の欠如)。

(2) Hb と Hb の間には若干の機能的差異がみられた。

(3) ミオグロビンの機能は Hb のそれに類似していた。

3. 電子常磁性共鳴 (EPR)、フーリエ変換赤外線吸収 (FT-IR)

(1) 酸化型と還元 NO 型の EPR、CO 型の FT-IR のデータは、ヤツメウナギ Hb のヘム鉄配位構造が、近位、遠位残基が His である脊椎動物 Hb のそれに類似していることを示しているが、若干の相違もみられる。

4. まとめ

(1) Hb は Hb が何らかの人工的あるいは翻訳後修飾によって生成した可能性がある。

(2) ヤツメウナギでは、Mb は Hb と同一蛋白である可能性がある。そうだとすると、この動物、あるいは円口類一般では、Hb のポリペプチド鎖をそのまま Mb として“流用”していることになり、進化論的に興味深い。

【大河内グループ】 生体水 の概念

生命現象の場としての水(細胞内液、組織間液、血液などの体液)の役割を明らかにすることを目指している。今年度は、活性酸素による生体の酸化を防ぎ、人工体液などに応用可能な、抗酸化力を有する還元系の“生体水”の概念を提案した。

ここ 10 年以上に亘って水の分子クラスターの大小により、健康やおいしい水の評価が可能とした 170-NMR 法について、当研究室ではその評価は不可能なことを明らかにした。そこで、新たな水評価法として、電子と水素イオン濃度(活量)に基づいた ORP(酸化還元電位)-pH による方法を提案した。悪性腫瘍や老化の原因物質と考えられている活性酸素を消去する抗酸化能を、水が有しているなら、健康にとって有意義な水となる。すなわち、活性酸素は相手を酸化することから、その反対の還元は酸化抑制作用を有する。そこで、これまで pH 7 を基準に、水が酸性とアルカリ性に分類されてきたが、さらに pH 7 に対応する平衡電子濃度(活量)として、平衡 ORP 式を提案し、これにより水が酸化系、還元系に分類できることを明らかにした。このことにより、ORP-pH を測定により、活性酸素消去能の、必ずしもイコールではないが、簡便な評価法が可能となり、さらに各種水を測定した結果、温泉源泉、その浴用に一番影響する皮膚、さらに皮膚の内側の体液、我々生体を維持、成長するために日常的に摂取している畜産肉類、魚介類、野菜・果物類すべてが還元系であることが明らかとなり、生体に近い水としての“生体水”の概念を提案した。

【片岡グループ】 分子シミュレーションによる蛋白質の立体構造

本年度テーマ:「レプリカ交換法による長鎖状分子のモンテカルロシミュレーション」

モンテカルロシミュレーションから長鎖状分子の相転移に伴う構造・エネルギー・エントロピー変化を調べる方法を研究した。

具体的モデルは、30個のモノマーが長鎖状に連なり、隣り合うモノマー間にはバネ相互作用が働くものである。より離れたモノマー間にはベキ乗の反発ポテンシャルと静電的相互作用が作用する。電荷は1-15番目のモノマーと16-30番目のモノマーで符号が異なる。モンテカルロシミュレーションによって十分高温からシミュレーションを始め、徐々に温度を下げると、ランダムな構造から代表的には2種の規則構造のどちらかへ相転移することが分かった。エネルギーがより低い規則構造として螺旋型構造が得られ、もう一つの規則構造は卵型の密度の高い構造である。

サンプリングの効率はレプリカ交換法の方が通常メトロポリス法より高いことも明らかになった。

【高月グループ】 遺伝子発現産物の翻訳後プロセスの解析

本年度テーマ：「ゴルジ膜構造体のダイナミクス制御・構造維持と再構築の機構」

複合糖質糖鎖合成や細胞内輸送において重要な機能を担っているゴルジ装置は中心体近傍に係留された特異な構造を維持しており、また、細胞分裂時に断片化して娘細胞に等分に分配された後に速やかに再構築されるダイナミックな膜構造体である。ゴルジ装置の中心体近傍への係留は微小管に依存すると考えられてきたが、細胞分裂阻害剤などの存在下で微小管を破壊しても中心体近傍に係留されることから、微小管以外の細胞内構造体の関与が示された。次いで、ゴルジ装置や中心体に存在する蛋白に特異な抗体を用いて蛍光抗体法で解析し、ゴルジ装置と中心体は繊維状構造体で結ばれていることを見いだした。この繊維状構造体にはcAMP依存性プロテイン・キナーゼ(PKA)が存在することから、PKA阻害剤のゴルジ装置構造維持に及ぼす作用を検討し、ゴルジ装置 nucleation という中心体の新規な機能を提唱した。

【平松・関田グループ】 遺伝子解析と情報理論による特定残基の機能

情報理論を蛋白質一次構造でのアミノ酸残基の生起確立に応用することによって、特定残基の構造・機能上の重要性を推定する研究を行っている。今年度は、エイズウイルス HIV の V3 ループでのウイルス存続に重要なアミノ酸群の推定を行った。

【浦谷・田辺グループ】 分子生物学へのトポロジー代数の応用

RNA および蛋白質の三次元構造へのトポロジー代数の応用と機能解析、とくに、ゲノム・モチーフ検索の新しいアルゴリズムの提案を目指している。今年度は、検索アルゴリズムのボトルネックであったソート法で、従来法に比べ圧倒的に高速な新解析法の開発に成功した。

【中村グループ】 遺伝子組み換えによる生体内情報伝達系の解析

細菌は光、酸素、栄養などの環境の変化を感知するために「二成分情報伝達系」¹というタンパク質ファミリーを多数発達させてきた。この「二成分情報伝達系」では、環境因子(リガンド)を感知したセンサータンパク質がATPを使ってペアのタンパク質をリン酸化することで細胞内に情報を伝える。今回の研究では根粒菌中に存在するヘム(鉄・ポルフィリン錯体)を含む酸素センサータンパク質 FixL を試料にして、リン酸化反応の産物であるADPによってヘム

鉄と酸素の結合の強さが変化することを世界で初めて発見し、センサー機能とリン酸化反応を結び付けたメカニズムを明らかにした。「二成分情報伝達系」は、ほ乳類などの動物には存在しないので、このようなリン酸化反応の基本的なメカニズムを解明することで病原性細菌などに対する抗生物質の開発につながるものと期待される。

【磯貝・飯塚グループ】 新規蛋白質分子の設計

天然のヘムタンパク質が持つ高いヘム親和性や機能は、ヘム結合部位近傍のアミノ酸の種類と配置が重要であると考えられる。しかし、天然並みのヘム結合親和性を持つ人工ヘムタンパク質はまだ作られておらず、どのようなアミノ酸をどう配置すれば良いかということは明らかでない。そこで、人工設計されたヘムタンパク質の実験室内進化系を試作した。すなわち、ランダム変異を導入した人工ヘムタンパク質をファージの外殻タンパク質との融合体としてファージ表面に呈示させ、ヘムとの親和性を利用して活性のあるクローンを選択する。そのために、プロトヘムをビオチン化した新規分子（ビオチンヘム）を合成した。合成は、ビオチンのヒドラジド誘導体をジシクロヘキシルカルボジイミド存在下でヘムのプロピオン酸基とカップリングすることで行った。ビオチンヘムは単独で天然ヘム蛋白質のアポ体と結合し、その機能を再構成することができた。また、ストレプトアビジンとビオチンの強く特異的な相互作用を利用して、ビオチンヘムに結合した蛋白質を迅速に回収できることを確認した。さらに、実験室進化の初期分子として、昨年度までに設計した人工グロビンの他に、ヘムを結合する4ヘリックスバンドルを設計した。この人工タンパク質を大腸菌のタンパク質発現系を用いて合成したところ、設計した通りの2次構造を保持し、ヘムを特異的に結合した。

【原田グループ】 ナノテクノロジーによる生体内情報伝達系の解析

神経成長因子（Nerve Growth Factor、以下NGFと略す）が 10^{-10} M程度の極めて低い濃度で、脊髄後根節神経細胞の発生分化や神経軸索の伸長を誘導するメカニズムを明らかにするために、蛍光色素(Cy3)で標識した個々のNGF分子が成長円錐膜上の受容体に結合していく様子や、受容体に結合した後、成長円錐内でどのような振る舞いをするのかを、蛍光1分子イメージング顕微鏡を用いて観察し解析を行った。その結果、受容体結合後のNGF分子のふるまいには2種類あることが明らかとなった。ひとつは運動方向に偏りのない、2次元拡散運動で、もうひとつは成長円錐の進行方向と逆の方向に向かう、一方向性の運動である。Cy3 NGFの投与直後には、受容体に結合したCy3 NGFのほとんどが2次元拡散運動をおこなっているが、投与10分後にはそれらの多くが一方向性の運動によって成長円錐基部に集積され、集合体を形成していることが観察された。Cy3 NGF分子ひとつひとつの軌跡を追跡した結果、受容体と結合したNGFは、初めに2次元拡散運動をおこなった後に、一方向性運動に移行して、成長円錐と神経軸索との結合部に集められ、ここで細胞内に取り込まれることが示唆された。

【堀グループ】 磁気共鳴分光学による蛋白質物性

本年度テーマ：「S=2 スピン系ヘムタンパク質の電子常磁性共鳴（EPR）による解析 Mⁿ³⁺・置換ミオグロビンの場合」

Fe²⁺ヘム鉄と同じS=2を持つMn³⁺-ポルフィリン置換ミオグロビン（Mn³⁺Mb）の電子状態の解析を行った。

Mn³⁺-錯体の高スピン状態 (S=2) のゼーマンエネルギー準位はスピンハミルトニアン $H = D[S_z^2 - S(S+1)/3] + E(S_x^2 - S_y^2) + S \cdot g \cdot B$ より求められる。

外部磁場をへム面に垂直方向(z軸)かつz軸に平行にマイクロ波磁界をかけると、S=2のEPR遷移が可能性になる。

この条件を満たす二重モードEPR空洞共振器を作製した。

Mn³⁺Mb溶液のXバンドEPRは75mT付近に特異な信号を示した。

信号強度の温度依存性の解析、平行モードでの信号強度から $S_z = \pm 2$ 近接準位間の遷移で、 $D < 0$ である事が明らかとなった。単結晶Mn³⁺Mb中のへム面垂直(z軸)方向のEPR信号解析の結果から、 $g_z = 1.93$ 、 $E^2/D = 0.032 \text{ cm}^{-1}$ が得られた。

2003年度業績リスト（生命情報と生体機能のナノバイオロジー）

今井清博

論文

- 1) Zhang, Y., Miki, M., Sasagawa, K., Kobayashi, M., Imai, K. & Kobayashi, M.: "The cooperativity of human fetal and adult hemoglobins is optimized: a consideration based on the effectiveness of the Bohr shift", *Zool. Sci.* 20, 23-28 (2003).
- 2) Kamimura, S., Matsuoka, A., Imai, K. & Shikama, K.: "The swinging movement of the distal histidine residue and the autoxidation reaction for midge larval hemoglobins", *Eur. J. Biochem.* 270, 1424-1433 (2003).
- 3) S.Neya, K.Imai, H.Hori, H.Ishikawa, K.Ishimori, D.Okuno, S.Nagatomo, T.Hoshino, M.Hata, & N.Funasaki: "Iron hemiporphycene as a prosthetic Group for myoglobin", *Inorg. Chem.* 42, 1456-1461 (2003).
- 4) Zhang, Y., Kobayashi, K., Sasagawa, K., Imai, K. & Kobayashi, M.: "Significance of affinity and cooperativity in oxygen binding to hemoglobin of horse fetal and maternal blood", *Zool. Sci.* 20, 1087-1093 (2003).
- 5) Miyazaki, A., Nakanishi, T., Shimizu, A., Ninomiya, K., Nishimura, S. & Imai, K.: "Hb Buzen [β 138(H16)Ala Thr (g.1395 G A)]: A new β chain variant", *Hemoglobin* 27, 243-247 (2003).
- 6) Saito, K., Ito, E., Hosono, K., Nakamura, K., Imai, K., Iizuka, T., Shiro, Y., and Nakamura, H.: "The Uncoupling of Oxygen Sensing, Phosphorylation Signaling and Transcriptional Activation in Oxygen Sensor FixL and FixJ Mutants", *Mol. Microbiol.* 48(2), 373-383 (2003).
- 7) Nakamura, H., Kumita, H., Imai, K., Iizuka, T., and Shiro, Y.: "ADP reduces the oxygen-binding affinity of a sensory histidine kinase, FixL: The Possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2742-2746 (2004).

口頭発表

- 1) 今井清博、堀洋、矢沢洋一、大河内正一：「ヤツメウナギのヘモグロビン、ミオグロビンの構造と機能」、第41回日本生物物理学会年会、2003年、新潟市
- 2) Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: "ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL: The possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction", *Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function The 3rd Symposium, Kyoto, Oct.* (2003)
- 3) Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: "ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL: the possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction", *Gordon Research Conferences : Sensory Transduction in Microorganisms*, Ventura, USA, Jan. (2004)

大河内正一

論文

1) H. Ohnami, K. Koumura, S. Ikeda, and S. Okouchi: "ORP(Oxidation-Reduction Potential) – pH Relationship between Hot Spring Waters and Human Body Fluids", Proceedings of The 38th Conference of Societe Internationale des Techniques Hydrothermales, 320-325 (2003).

口頭発表

1) 大河内正一、吉田史志、土田和志、阿部寛史、石原義正、上平恒、“糖アルコール水溶液中における水の動的状態”、日本化学会第 83 春季年会、2PA-028(2003 年 3 月)。

2) 平岡英泰、大河内正一、大野慶晃、阿岸祐幸、“レーザー血流画像化装置による食品がおよぼす血流量変化の測定()”、日本食品工学会第 4 回年次大会講演要旨集、94(2003)。

3) 大河内正一、吉田史志、土田和志、阿部寛史、石原義正、上平恒、“プロトン交換速度に及ぼすアルキル基の影響”、第 26 回溶液化学シンポジウム & OHTAKI SYMPOSIUM 講演要旨集、126-127(2003 年 10 月)

4) 大河内正一、阿部寛史、石原義正、上平恒、“誘電緩和法によるカルボキシル基を有する溶質水溶液中の水の動的状態”、第 26 回溶液化学シンポジウム & OHTAKI SYMPOSIUM 講演要旨集、134-135(2003 年 10 月)

5) 大波英幸、阿部寛史、平岡英泰、乾祐哉、御影佳孝、森雅年、和賀俊明、大河内正一、“還元水の Aging 抑制”、第 2 回日本機能水学会学術大会講演要旨集、42(2003)。

6) 今井清博、堀洋、矢沢洋一、大河内正一：“ヤツメウナギのヘモグロビン、ミオグロビンの構造と機能”、第 41 回日本生物物理学会年会、2003 年、新潟市

片岡洋右

論文

1) Yamada, Y. and Kataoka, Y.: "Equation of State for Free Energy of Homogeneous Nucleation in Supersaturated Lennard-Jones Vapor Phase Derived by Monte Carlo Simulations", Bull Chem. Soc. Japan 76 (7), 329-1339 (2003).

概要：レナードジョーンズ粒子系での過飽和蒸気相における均質核生成の自由エネルギーをモンテカルロ法で求めそれを密度・温度・粒子数に関する状態方程式にまとめた。計算方法はそれぞれの密度・粒子数について低温から十分高温までのモンテカルロシミュレーションを行い、低温での同一基準から計ったクラスター相とモノマー相のエントロピーを熱力学的積分法によったものである。ヘルムホルツ自由エネルギーだけでなくギブスの自由エネルギーについても議論した。

紀要

1) 蟹江了充、片岡洋右：“分子動力学法を用いた水のマイクロクラスターの相転移計算”、法政大学計算科学研究センター報告、17, 65-68 (2004)

概要：水分子の個数が 8 個の場合と 30 個の場合についてマイクロクラスターを低温で作成し、温度上昇に伴う総転移を分子動力学法で調べた。水分子の間には水素結合が形成される SPCE モデルポテンシャルを仮定した。キャリアガスとしてアルゴン分子を導入して

シミュレーションを行い、水分子系の値はアルゴン系の熱力学量を差し引くことで得た。系の温度を上昇させてクラスターが崩壊しモノマーへ転移する様子が観測され、そのときの熱力学量の変化を計算できた。

2) 老沼宏益, 片岡洋右: "荷電粒子系モデルに関する分子動力学シミュレーション", 法政大学計算科学研究センター報告, 17, 69-72 (2004)

概要: 荷電粒子気体のモデル計算を NVT アンサンブル分子動力学シミュレーションによって行った。代表的な温度を指定して、圧力が体積にどのように依存するかを調べた。具体的な分子系のイメージとしては気体状態での KCl である。モデルの一つは正負の電荷を持つ粒子を独立に扱う場合であり、他は正負の電荷を持つ粒子が分子を形成しているものである。この系では強い静電的な相互作用があるため気液臨界温度近傍では特徴ある pVT 関係が得られた。

口頭発表

1) 老沼宏益, 片岡洋右: "分子動力学法による荷電粒子系の圧力等温線"、日本コンピュータ化学会 2003 春季年会講演予講集, 1P02 (2003)

2) 蟹江了充, 片岡洋右: "分子動力学法による水のマイクロクラスターの相転移"、日本コンピュータ化学会 2003 春季年会講演予講集, 1P03 (2003)

3) 上田洋輔, 山田祐理, 片岡洋右: "レプリカ交換法による長鎖状分子のモンテカルロシミュレーション"、日本コンピュータ化学会 2003 春季年会講演予講集, 2P10 (2003)

4) 山田祐理, 片岡洋右: "剛体壁から離れた場所にある井戸型ポテンシャル系の液・液および気・液相転移の統計理論"、第 26 回溶液化学シンポジウム 1A06 (2003)

5) YKATAOKA, Y. and YAMADA, Y.: "Fluid-fluid Transition and Negative Expansion in 2 Step-function Molecules System by Statistical Mechanics", Joint Meeting: "International Conference on Molecular Simulation" and "Computational Science Workshop 2004", Jan 13-15, 2004, Tsukuba.

高月 昭

論文

1) 高月 昭: 「糖タンパク質の合成および細胞内輸送の阻害剤の発見と作用機構の研究」, 日本農芸化学会誌 78 (1), 14-18 (2004).

口頭発表

1) 高月 昭: 「バイオプローブを用いたゴルジ装置ダイナミクス機構の研究」, 第 1 回ケミカルバイオロジーシンポジウム発表要旨集, p.34, (2004)

平松豊一

論文

1) Hiramatsu, T., S.Nishimura and S.Matsuda: "A generalization of the Lee distance and error correcting codes", Proceedings 2003 IEEE, Inter. Sym. on IT, p186, 2003.

著書

1) Hiramatsu, T. & G.Kohler : "Coding Theory and Number Theory", Kluwer Academic Publishers, 2003.(with G.Kohler).

紀要

1) 平松豊一,知念宏司 : 「自己双対符号のゼータ関数とリーマン予想の類似」, 法政大学工学部研究集報, 第40巻, 21-26,2004.

口頭発表

1) 平松豊一、知念宏司 : 「線形符号のゼータ関数とリーマン予想の類似」, 京大数理研究集会「符号と暗号の代数的数理」,(2003年11月).

2) 平松豊一、松井聖 滋その他 : 「Duadic 符号と冪剰余」, 第26回情報理論とその応用シンポジウム(SITA2003), (2003年12月)

飯塚哲太郎

論文

1) Saito, K., Ito, E., Hosono, K., Nakamura, K., Imai, K., Iizuka, T., Shiro, Y., and Nakamura, H.: "The Uncoupling of Oxygen Sensing, Phosphorylation Signaling and Transcriptional Activation in Oxygen Sensor FixL and FixJ Mutants", Mol. Microbiol. 48(2), 373-383 (2003).

2) Nagamine, T., Kawasaki, Y., Iizuka, T., Okano, K., Matsumoto, S., and Choudary, P.V.: "Functional Characterization of Bacterial Signal Peptide OmpA in a Baculovirus-Mediated Expression System", Cell Str. Func. 28, 131-142 (2003).

3) Nakamura, H., Kumita, H., Imai, K., Iizuka, T., and Shiro, Y.: "ADP reduces the oxygen-binding affinity of a sensory histidine kinase, FixL: The Possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2742-2746 (2004).

著書

1) 飯塚哲太郎 : 「ポストシーケンスタンパク質実験法4 ---構造・機能解析の実際」(大島泰郎、鈴木絃一、藤井義明、村松喬編) 東京化学同人、東京、「金属蛋白質の解析---ESR法とEXAFS法」,pp.103-111 (2003)

口頭発表

1) Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: "ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL: The possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction", Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function The 3rd Symposium, Kyoto, Oct. (2003)

2) Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: "ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL: the possibility of an enhanced

reciprocating kinase reaction”, Gordon Research Conferences : Sensory Transduction in Microorganisms , Ventura, USA, Jan. (2004)

中村寛夫

論文

- 1) Saito, K., Ito, E., Hosono, K., Nakamura, K., Imai, K., Iizuka, T., Shiro, Y., and Nakamura, H.: “The Uncoupling of Oxygen Sensing, Phosphorylation Signaling and Transcriptional Activation in Oxygen Sensor FixL and FixJ Mutants”, *Mol. Microbiol.* 48(2), 373-383 (2003).
- 2) Nakamura, H., Kumita, H., Imai, K., Iizuka, T., and Shiro, Y.: “ADP reduces the oxygen-binding affinity of a sensory histidine kinase, FixL: The Possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2742-2746 (2004).
- 3) Akimoto S., Tanaka A., Nakamura K., Shiro Y., and Nakamura H.: “O₂-specific regulation of the ferrous heme-based sensor kinase FixL from *Sinorhizobium meliloti* and its aberrant inactivation in the ferric form”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 136-142 (2003)
- 4) Kumita H., Yamada S., Nakamura H., and Shiro Y.: “Chimeric sensory kinases containing O₂ sensor domain of FixL and histidine kinase domain from thermophile”, *Biochim. Biophys. Acta* 1646, 136-144 (2003)
- 5) Saito K., Ito E., Hosono K., Nakamura K., Imai K., Iizuka T., Shiro Y., and Nakamura H.: “The uncoupling of oxygen sensing, phosphorylation signalling and transcriptional activation in oxygen sensor FixL and FixJ mutants”, *Molecular Microbiology* 48, 2, 373-383 (2003)
- 6) Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: “ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL : the possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2742-2746 (2004)

口頭発表

- 1) Kumita H., Yamada S., Nakamura H., and Shiro Y.: “Interaction between sensor domain and histidine kinase domain of sensory histidine kinase in the two-component signaling system”, 11th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Cairns, Australia, Jul. (2003)
- 2) 穂本 智、城 宜嗣、中村 寛夫: “FixLによる O₂, CO, NO の弁別 sensing と生理機能発現に関して”, 第8回酸素ダイナミクス研究会, 神戸, Sep. (2003)
- 3) Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: “ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL: The possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction”, *Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function The 3rd Symposium*, Kyoto, Oct. (2003)
- 4) 穂本 智、田中 敦成、中村 花野子、城 宜嗣、中村 寛夫: “O₂ specific regulation of

the ferrous heme-based sensor kinase FixL from *Sinorhizobium meliloti* and its aberrant inactivation in the ferric form”, 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, Oct. (2003)

5) 田中 敦成、中村 寛夫、城 宜嗣: “酸素センサータンパク質 FixL の自己リン酸化制御機構における二重体化の意義”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, Oct. (2003)

6) Kasai Y., Kanemoto M., Shiro Y., and Nakamura H.: “Two-component signal transferring systems: from bacteria to plants”, Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function The 3rd Symposium, Kyoto, Oct. (2003)

7) 伊藤 かわり、葛西 佑一、伊藤 隆、柴田 武彦、田村 浩二、中村 寛夫、城 宜嗣: “根粒菌 FixJ 蛋白質 C 末端ドメインの DNA との相互作用の解析”, 第 42 回 NMR 討論会, 吹田, Nov. (2003)

8) 葛西 佑一、倉島 かわり、伊藤 隆、中村 寛夫、柴田 武彦、城 宜嗣: “二成分情報伝達系レスポンスレギュレーター-FixJ の構造・機能解析”, 第 42 回 NMR 討論会, 吹田, Nov. (2003)

9) 中村 寛夫: “細胞内情報伝達系: 生物が用いるやわらかい相互作用”, 理研シンポジウム「モレキュラー・アンサンブル 2003」, 和光, Dec. (2003)

10) 穂本 智、城 宜嗣、中村 寛夫: “Arginine in distal side of oxygen-sensing domain acts as the switch for the initial reaction of autokinase activity to FixL”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, Dec. (2003)

11) Nakamura H., Kumita H., Imai K., Iizuka T., and Shiro Y.: “ADP reduces the oxygen binding affinity of a sensory histidine kinase FixL: the possibility of an enhanced reciprocating kinase reaction”, Gordon Research Conferences: Sensory Transduction in Microorganisms, Ventura, USA, Jan. (2004)

磯貝泰弘

論文

1) Ishida, M., Dohmae, N., Shiro, Y. and Isogai, Y.: "Synthesis of biotinylated heme and its application to panning heme-binding proteins", Analytical Biochemistry 321, 138-141 (2003).

概要: 鉄-プロトポルフィリン (ヘム) とビオチンをスペイサーを介して結合し、新規のヘム誘導体分子ビオチンヘムを合成した。ビオチンヘムはアポミオグロビンおよび複数の人工ヘムタンパク質に特異的に結合し、タンパク質の活性を再構成できた。したがってこの分子は、新規の受容体タンパク質の探索やランダム変異を導入した人工ヘムタンパク質ライブラリーから機能性クローンをスクリーニングするのに有効である

口頭発表

1) 石田学、堂前直、城宜嗣、磯貝泰弘: "Synthesis of biotinylated heme and its application to panning heme-binding proteins", 第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月、横浜

2) Ishida, M., Dohmae, N., Shiro, Y., Isogai, Y.: "Design and synthesis of de novo

cytochrome c", The 3rd Symposium on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function, Oct. 2003, Kyoto

3) 武蔵映、杉本宏、城宜嗣、磯貝泰弘：「揺らいでいる C 末断片を除去した Cro の機能・構造解析」、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、2003 年 9 月、新潟

4) 西山 善喬、磯貝 泰弘、荒川 秀雄、猪飼 篤：「ミオグロビンとその人工類似体の構造安定性と力学応答特性の関係」、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、2003 年 9 月、新潟

5) 磯貝泰弘：「人工タンパク質のデザイン」、立命館大学理工学研究所プロジェクト研究シンポジウム「蛋白質を主とする生態系の化学：生物科学と溶液化学の融合」、2004 年 1 月、滋賀県草津

6) 磯貝泰弘：「人工タンパク質のデザイン」、バイオデザインの活用による新機能物質の開発研究会第 8 回研究会、2004 年 1 月、名古屋

7) 磯貝泰弘：「デザインとフォールディング研究の接点」、理研シンポジウム（タンパク質のデザイン，実験室進化，フォールディング）、2004 年 3 月、埼玉県和光

原田慶恵

論文

1) 原田慶恵：“RNA ポリメラーゼによる DNA の回転をみる (イメージングで解き明かす生命機能 第 3 回)”。実験医学, 21, 1800-1801, 2003

2) 原田慶恵：“生物学実験法講座「1 分子生理学」DNA モーターの 1 分子機能解析”。日誌, 65(7・8), 225-231, 2003

3) 原田慶恵：“熱ゆらぎを利用して動く？ モータータンパク質の新しい運動モデル”。化学, 58(11), 48-49, 2003

著書

1) 原田慶恵：“生体分子の 1 分子イメージング。生命科学への招待”(太田博道・柳川弘志 編著), 151-163, 三共出版, 2003

2) 原田慶恵：“DNA モーターを測る。ナノテクノロジーハンドブック IV 編 バイオ・化学へ使う”(ナノテクノロジーハンドブック編集委員会編), 108-112, オーム社, 2003

3) 原田慶恵：“DNA, RNA ポリメラーゼ”。生物物理学ハンドブック, 朝倉書店, 印刷中

口頭発表

1) 原田慶恵：“個々の生体分子の動きを見て細胞や分子モーターの機能を探る”。第 27 回バイオインフォマティクス研究会, 2003.4.23, 東京

2) 原田慶恵：“1 分子の動きを見て細胞や分子モーターの機能を探る”。2003.6.5, 横浜市立大学大学院総合理学研究科計測科学研究室講演会, 横浜

3) 原田慶恵：“1 分子ナノバイオサイエンス 分子 1 個の動きを光学顕微鏡で見る”。臨床研カレッジ 2003, 2003.6.26, 東京

4) 谷知己, 宮本善一, 藤森一浩, 田口隆久, 柳田敏雄, 佐甲靖志, 原田慶恵：“後根節成長円

- 錐における神経成長因子受容の1分子解析”. 第26回日本神経科学大会, 2003.7.23-25, 名古屋
- 5) Harada, Y.: “Single-molecule approach to the function of cell and DNA motor. XXIST International Conference on Photochemistry”, 2003.7.28, 奈良 (招待講演)
- 6) 谷知己, 原田慶恵: 成長円錐における神経成長因子の輸送と集積: “1分子単位の観察”, 日本生物物理学会 第41回年会, 2003.9.23-25, 新潟
- 7) 鞍馬秀輝, 貴家康尋, 多田隈尚史, 永川豊広, 船津高志, 原田慶恵: “ α -actin mRNAの細胞内輸送と局在のイメージング”. 日本生物物理学会 第41回年会, 2003.9.23-25, 新潟
- 8) Harada, Y.: “Observation of DNA rotation during transcription by RNA polymerase”. Forth East Asian Biophysics Symposium, 2003.11.3-6, Taipei, Taiwan
- 9) Tani, T., Miyamoto, Y., Fujimori, K., Taguchi, T., Yanagida, T., Sako, Y., Harada, Y.: “Transport of nerve growth factor in the growth cones of dorsal root ganglion neurons”. COE International Conference 2003 “Molecular Mechanism of Intracellular Transports: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily Proteins”, 2003.11.4-8, 箱根
- 910) Sasuga, Y., Ohara, O., Harada, Y.: “High-throughput analysis of the biomolecular interactions by the using microbeads array”. The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network, 2003.11.12-13, 東京
- 11) Tani, T., Miyamoto, Y., Fujimori, K., Taguchi, T., Yanagida, T., Sako, Y., Harada, Y.: “Single molecule tracking of nerve growth factor on the growth cones of dorsal root ganglion”. First COE International Symposium Gunma University “Molecular Mechanisms for Vesicle Trafficking and Membrane Fusion”, 2003.11.21-22, 前橋
- 12) 谷知己, 宮本善一, 藤森一浩, 田口隆久, 柳田敏雄, 佐甲靖志, 原田慶恵: “成長円錐における神経成長因子の受容機構: 1分子の振る舞いから”. 日本顕微鏡学会第48回シンポジウム 材料科学と生命科学のクロストーク 顕微鏡解析の最前線, 2003.12.6-7, 東京 (招待講演)
- 13) Harada, Y.: “Studies on Biomolecules Using Single Molecule Imaging and Manipulation Techniques”. RLNR/Tokyo-Tech 2003 International Symposium Nanoscience and Nanotechnology on Quantum Particles 2003, 東京
- 14) Sasuga, Y., Ohara, O., Harada, Y.: “Analysis of the biomolecular interactions by the using microbeads array”. RLNR/Tokyo-Tech 2003 International Symposium Nanoscience and Nanotechnology on Quantum Particles 2003, 2003.12.15-17, 東京
- 15) 原田慶恵: “1分子の動きを観てタンパク質の機能を探る”. 名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー, 2003.12.19, 名古屋
- 16) Harada, Y.: “Single-Molecule Approach to the Function of Cell and DNA Motor”. Mini-conference “Nano-machines: Frontiers and opportunities”, 2003.12.26, Taichung, Taiwan (招待講演)
- 17) 原田慶恵: “分子イメージングによる生体分子間相互作用解析システムの開発”. 特定領域研究(B)公開シンポジウム, 2004.3.5, 東京

18) Harada, Y.: "Biomolecule Imaging". ナノ電気計測グループ研究会, 2004. 3. 20, 日光 (招待講演)

堀 洋

論文

1) Y.Miyajima, H.Yashiro, T.Kashiwagi, M.Hagiwara and H.Hori: "High Field and Multi-Frequency EPR in Single Crystals of Sperm Whale Met-Myoglobin: Determination of the Axial Zero-Field Splitting Constant and Frequency Dependence of the Linewidth",

J. Phys. Soc. Jpn., 73, 280-286 (2004)

2) T.Egawa, S.Yoshioka, S.Takahashi, H.Hori, S.Nagano, H.Shimada, K.Ishimori, I.Morishima, M.Suematsu, and Y.Ishimura: "Kinetic and Spectroscopic Characterization of Hydroperoxy Compound in the Reaction of Native Myoglobin with Hydrogen Peroxide", J. Biol. Chem., 278, 41597-41606 (2003)

3) T.Mikuma, T.Ohyama, N.Terui, Y.Yamamoto, and H.Hori: "Coordination complex between haemin and parallel-quadruplexed d(TTAGGG)", Chem. Commun. (2003) 1708-1709

4) R.Makino, E.Obayashi, N.Homma, Y.Shiro, and H.Hori: "YC-1 Facilitates the Release of the Proximal His Residue in the NO and CO complexes of Soluble Guanylate Cyclase", J.Biol.Chem. (2003) 278, 11130-11137

5) M.Tanaka, K.Matsuura, S.Yoshioka, S.Takahashi, K.Ishimori, H.Hori, and I.Morishima: "Activation of Hydrogen Peroxide in Horseradish Peroxidase Occurs within ~300ms Observed by a New Freeze-Quench Device", Biophysical J. (2003) 84, 1998-2004

紀要

1) 堀 洋: "EPR でヘムタンパク質の何をみるか? 活性部位の電子状態と構造・機能との相関", 大阪大学低温センターだより, 2003年, No.121, pp. 7-11.

口頭発表

1) 宮嶋良治、八代晴彦、柏木隆成、萩原政幸、堀洋: "マッコウクジラメトミオグロビン単結晶の高磁場、多周波 EPR による研究", 第 41 回日本生物物理学会年会、2003 年、新潟市

2) 畠中逸平、堀洋、宮崎源太郎: "Hb の R T 転移による C-O 伸縮振動変化". 第 41 回日本生物物理学会年会、2003 年、新潟市

3) 汲田英之、松浦宏治、高橋聡、堀洋、福森義宏、森島績、城宜嗣: "急速凍結 EPR 分光法による緑膿菌由来 NO 還元酵素の短寿命中間体の観測と反応機構解析", 第 41 回日本生物物理学会年会、2003 年、新潟市

4) Ryu Makino, Shinsuke Yazawa, and Hiroshi Hori: "Interaction between nucleotide binding site and heme-sensor site in guanylate cyclase", 第 76 回日本生化学会大会、

2003 年、横浜市

5) Yuji Matsuda, Takeshi Uchida, Hiroshi Hori, Teizo Kitagawa, and Hiroyuki Arata: "Roseobacter denitrificans has a nitric oxide reductase homologue with unique binuclear center composed of heme b3 and a copper atom", 第 76 回日本生化学会大会、2003 年、横浜市

6) 八代晴彦、宮嶋良治、柏木隆成、萩原政幸、堀洋: "高磁場、多周波 EPR 装置の金属タンパク質への適用: マッコウクジラメトミオグロビンの単結晶 EPR", 第 42 回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2003)、2003 年、東広島市

7) 萩原政幸、宮嶋良治、八代晴彦、柏木隆成、堀洋: "鯨メトミオグロビン単結晶の多周波 EPR", 日本物理学会 2003 年秋季大会、2003 年、岡山市