フェレドキシンの動的構造および フェレドキシン:NADP⁺還元酵素との電子伝達複合体形成

広島大学総合科学部 手島圭三

大阪大学蛋白質研究所 楠木正巳, 長谷俊治

We have investigated the conformational and dynamical changes of plant-type ferredoxin (Fd) depending upon the redox state by 2D NMR spectroscopy and the three-dimensional structures of Fd, Fd:NADP⁺ reductase (FNR) and their complex by X-ray crystallography. These combined data allow us to discuss a molecular mechanism for the redox dependent change in the affinity of Fd with FNR, which is important in modulating redox metabolism in the cells, and also discuss the molecular property of Fd as an electron carrier in living cells.

ferredoxin / ferredoxin:NADP⁺ reductase / electron transfer / dynamics / NMR / X-ray crystallography

1. はじめに

フェレドキシン (Fd) は、葉緑体チラコイド膜の光合成電子伝達系の光化学系Iから電子を受けとり、ストロマに存在するFd依存性酵素と総称されるさまざまな酸化還元酵素に電子を与える。Fdは1電子キャリアーであり、特異的な分子間相互作用により酸化還元酵素と電子伝達複合体を形成し電子の授受を行う。電子の授受に伴ってその相互作用力が変化し、複合体の形成と解離がくり返し起こることが、種々の酸化還元代謝を円滑に進める上で重要であると考えられているが、この構造的な基盤は明確になっていない。本稿では、我々の得た最近の知見を中心に、酸化還元状態によってFdの構造および動的揺らぎに差異があることを示し、Fdの代表的なパートナータンパク質であるFd:NADP⁺還元酵素 (FNR) との相互作用の詳細について述べる。

2. 植物型Fdの構造

植物型 Fd は、低電位 (−400 mV 前後) の [2Fe-2S] クラスターを酸化還元中心にもつ分子サイズが約 12 kDa の酸性タンパク質である。その一次構造は 70 種あまりの植物で明らかにされているが¹⁾、そのうちで今回述べるスギナ (*E. arvense*) FdI, トウモロコシ FdI と他の代表的な植物型 Fd の一次構造アラインメントを

Fig. 1 に示す。また、高等植物では同一種内に数種類の Fd アイソフォームが存在するので、その一例としてスギナ FdII の一次構造を Fig. 1 に含めた。

スギナ FdI²⁾, Fd II³⁾, クロレラ⁴⁾, 4 種のシアノバク

<i>E. arvense</i>	FdI	A-YKTVLKT-PSGEF-TLDVPEGTTILDAAEEA	30
maize	FdI	ATYNVKLIT-PEGEV-ELQVPDDVYILDQAEED	31
spinach	FdI	AAKVTLVLT-PTGNV-EFQCPDDVYILDAAEEE	31
<i>Anabaena</i>	Fd	ATEKVTLINEAEGTKHEIEVPPDDEYILDAAEEQ	33
<i>E. arvense</i>	FdII	A-YKVTLKT-PDGD I-TFDVEFGERLIDIGSEK	30
<i>E. arvense</i>	FdI	GYDL[PSCRAGACSSCI]SKVVS GSVDSQSEG	60
maize	FdI	GIDL[PYSCRAGSCSSCA]GKVVSGSVDSQSDQ	61
spinach	FdI	GIDL[PYSCRAGSCSSCA]GKLKTGSLNQDDQ	61
<i>Anabaena</i>	Fd	GYDL[PSCRAGACSTCA]SKLVSGTVDQSDQ	63
<i>E. arvense</i>	FdII	A-DL[PLSCQAGACSTCI]GKIVSGTVDQSEG	59
<i>E. arvense</i>	FdI	SFLDDGQMEEGFVLTCIAIPESDLVVIETHK	90
maize	FdI	SYLDDGQIADGWVLTCHAYPTSDVVIETHK	91
spinach	FdI	SFLDDGQIDEQVLTCAAYPVSDVTIETHK	91
<i>Anabaena</i>	Fd	SFLDDGQIEAGVLTCAVAYPTSDVVIETHK	93
<i>E. arvense</i>	FdII	SFLDDGQIEQGYVLTCAIAPESDVVIETHK	89
<i>E. arvense</i>	FdI	EEELF	95
maize	FdI	EEELTGA	98
spinach	FdI	EEELTA	97
<i>Anabaena</i>	Fd	EEDLY	98
<i>E. arvense</i>	FdII	EDEL	93

Fig. 1 Sequence alignment of major plant-type Fds. Residues conserved among the five Fds are shown in black and the [2Fe-2S] cluster binding loop is boxed. Residues with filled circles are involved in intermolecular salt bridges between maize Fd I and FNR.

Dynamics of Redox State-Dependent Ferredoxin Structure and Electron-Transfer Complex Formation with Ferredoxin:NADP⁺ Reductase

Keizo TESHIMA¹, Masami KUSUNOKI² and Toshiharu HASE²¹Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University²Institute for Protein Research, Osaka University

テリア (*S. platensis*⁵), *A. sacrum*⁶), *Anabaena*⁷), *Anabaena heterocyst* 細胞由来⁸⁾) の計7種類のFdの三次元構造がX線結晶解析から明らかにされている。また、スギナ Fd I⁹), Fd II¹⁰) と好熱シアノバクテリア (*S. elongatus*)¹¹) においては、NMR 情報 (NOE による距離制限等) にもとづく構造計算によって溶液中の三次元構造が明らかにされている。NMR の場合、Fe 原子の常磁性効果でクラスター周りの約18残基のNMRシグナルは観察できないので、その部分については同一あるいは同種Fdの結晶構造座標の情報を得て構造計算が行われている。ただし、結晶座標にもとづく部分を含めても含めなくてもNMRの構造計算は同様に収束することがわかっている。これまでに三次元構造が明らかにされたいずれのFdも全体構造は類似しており、 $\alpha + \beta$ タンパク質に属する。

3. FdとFNRとの相互作用におよぼす酸化還元状態の影響

FdとFNRとの電子伝達反応において、光化学系I→Fd→FNR→NADP⁺の方向へ電子移動する場合と、逆方向のNADPH→FNR→Fd(この後シクロクロム*c*へ電子を流して測定する)の場合について、FdとFNRの速度論パラメーターを測定し K_m 値の比較を行った。Fd→FNRの場合の K_m 値は還元型Fdと酸化型FNRの複合体の解離定数に相当し、逆方向の場合は酸化型Fdと還元型FNRの複合体の解離定数に相当する。典型的なFdであるスギナFdIの K_m (Fd→FNR)は $0.62 \pm 0.08 \mu\text{M}$ であるのに対して、逆方向の K_m (FNR→Fd)は $11.4 \pm 0.98 \mu\text{M}$ であり、両者の値は約20倍異なっていた^{3), 12)}。この場合、FNRとの親和性はFdからFNRへの電子伝達経路の方が強いので、スギナFdIはもっぱら光化学系IからFNRへ電子を伝達する生理的役割をもっているであろう。電子授受の方向性の違いによってこのような大きな親和性の変化がどうして起こるのであるのか、大変興味ある現象である。酸化還元状態に応じてFdまたはFNR分子自身のコンホメーションが変化し、さらには両分子の誘導適合的な相互作用様式も変化することによって起こるのではないかと推察される。

4. Fdのコンホメーションにおよぼす酸化還元の影響

2D-NMRを用いて、スギナFdIの酸化還元による主鎖アミドプロトンと α プロトンの化学シフト変化($\Delta\delta = |\delta_{\text{reduced}} - \delta_{\text{oxidized}}|$)を調べたところ(図2), NMRが観測されないクラスター周りを除く76残基中、23残基において0.05 ppm以上の化学シフト変化が観測された。そのうち9残基は、70種以上の植物型Fdのほとん

Fig. 2 Chemical shift perturbations of NH (A) and H α (B) protons of *E. arvense* Fd I on the redox state change. The absolute values (ppm) of $\Delta\delta$ (reduced-oxidized) are plotted as a function of residue number. The plus and minus values of $\Delta\delta$ are distinguished in black and dark gray, respectively. The four prolines and the residues whose chemical shift are not observed due to paramagnetic effects of the [2Fe-2S] cluster, are shown in light gray. The residues with filled circles and open circles exhibit a chemical shift only in the oxidized and reduced states, respectively.

どで保存されている。特に0.15 ppm以上の大きな化学シフト変化を示したのは、Asp25, Gly60とHis89-Glu91のアミドプロトン、Leu24とGlu91の α プロトンである。化学シフト変化の大きかったLeu24-Asp25とHis89-Glu91の2つの領域は、動物のFd類似タンパク質であるアドレノキシンの酸化還元に伴う化学シフト変化の大きかった領域¹³⁾と一次構造アライメント上よく対応していた。[2Fe-2S]クラスターの還元によって化学シフトが特に大きく変化する領域は、植物型および動物型Fdともに変わらないようである。

前述したように、約18残基のNMRシグナルは鉄の常磁性効果で見えないが、この領域内でもクラスターの酸化還元状態に応じて微妙に変化しているようである。Ile23とLeu24のアミドプロトン、およびIle23の α プロトンのNMRシグナルは酸化状態では観測され、還元状態では観測されない。対照的に、Ser61-Leu63のアミドプロトンとPhe62の α プロトンのNMRシグナルは酸化状態では観測されず、還元状態で観測される。この正反対のパターンを示す2つの領域はクラスターをはさんでちょうど真向かいの位置に存在する。クラスターのFe1およびFe2原子から8-9 Å以内の領域にあるプロトンのNMRシグナルは観測されないが、酸化状態の結晶座標から判断すると、Ile23-Leu24の部分はぎりぎりこの領域の外側にあり、Ser61-Leu63の部分はぎり

Fig. 3 Comparison of the three-dimensional structures of *E. arvense* Fd I between oxidized and reduced states. The best-fit superpositions of the backbone (N, C α , C') atoms of the final 20 structures of Fd I in the oxidized (a) and reduced states (b). (c) The energy-minimized average structures of the oxidized and reduced Fds, which are superimposed by the least square fitting of the four-stranded β -sheet, are shown in gray and white with shadows, respectively. The C-terminal region of Lys90-Phe95 is boxed. Black and gray circles represent Fe and S atoms, respectively, of the [2Fe-2S] cluster in the oxidized Fd I.

ざりこの領域の内側にある。以上のことから、還元によって [2Fe-2S] クラスターは Ser61-Leu63 の側から Ile23-Leu24 の側へ向かってわずかに動く可能性が考えられる。この問題は今後さらに検証されなければならないが、大変おもしろい現象である。

NMR の情報 (NOE, 重水素交換およびカップリング定数) から求められる原子間の距離制限と二面角の角度制限を用いて、酸化および還元状態におけるスギナ FdI の構造計算を行った。その結果を Fig. 3a, b に示す。骨格構造 (N, C α , C') の RMSD^{*} は酸化状態で 0.53 ± 0.12 Å であり、還元状態で 0.77 ± 0.16 Å である。両者の構造を、酸化還元によって NMR シグナルがほとんど変化しなかった β シート構造中の残基 2-8, 11-17, 47-52 および 83-87 で重ねあわせた図を Fig. 3c に示す。Lys90-Phe95 の C 末端領域を除いて全体の二次構造中に明白な変化は見られなかった。この 6 残基からなる C 末端領域のヘリックス様のコンホメーションは、酸化状態から還元状態へ移行すると少し伸長した状態からより

巻いた状態へ変化することは明らかである。

5. Fd の動的揺らぎと酸化還元による変化

X 線結晶解析や NMR 測定から、Fd の C 末端領域 Lys90-Phe95 はもともとフレキシブルな領域であるといわれている^{2), 11)}。したがって、C 末端領域は酸化還元で構造を変えるだけでなく、構造の揺らぎ、すなわちダイナミクスも変化させるのではないだろうか。そこで、¹H-¹⁵N 相関 2D-NMR^{14), 15)} を用いて、¹⁵N ラベルしたスギナ FdI の酸化状態と還元状態におけるアミド ¹⁵N 核の緩和測定を行った。N 末端、プロリン残基とクラスター結合ループを除くすべての主鎖アミド ¹⁵N 核の縦緩和時間^{*} T_1 、横緩和時間 T_2 を測定した。結果を Table 1 に示す。

酸化状態の場合、C 末端領域を除く残基の T_1 はほぼ等しく平均値は 341.3 ± 29.3 msec であり、 T_2 は His89 と C 末端領域を除く残基の値はほぼ同じで平均値は 167.9 ± 12.8 msec であった。C 末端の Phe95 の T_1 , T_2 は、酸化

Table 1 Comparison of T_1 , T_2 values of the backbone amide ¹⁵N for His89-Phe95 of *E. arvense* FdI in the oxidation and reduction states. The values are means $\pm$ S.D. of three independent determinations.

	Oxidation state		Reduction state	
	T_1 (msec)	T_2 (msec)	T_1 (msec)	T_2 (msec)
His89	337.8 ± 17.3	92.3 ± 5.1	304.8 ± 15.3	139.7 ± 9.9
Lys90	343.0 ± 13.4	148.8 ± 4.0	294.5 ± 13.0	128.9 ± 6.6
Glu91	338.7 ± 13.0	170.6 ± 4.5	290.0 ± 10.2	136.2 ± 4.6
Glu92	367.5 ± 9.1	156.7 ± 8.0	282.0 ± 8.6	128.5 ± 5.5
Glu93	363.8 ± 13.2	170.0 ± 4.6	290.6 ± 15.6	130.2 ± 4.2
Leu94	382.0 ± 8.7	209.9 ± 9.6	290.2 ± 17.3	130.0 ± 4.4
Phe95	441.3 ± 13.0	239.6 ± 7.7	299.0 ± 15.1	141.0 ± 9.0
Average value for the other observed residues	341.3 ± 29.3	167.9 ± 12.8	291.7 ± 27.1	132.2 ± 17.9

状態では他の部分に比べてそれぞれ1.3倍、1.4倍と共に大きいことから、Phe95の内部運動(ピコ秒オーダー)は他の部分より大きいと考えられる。さらに、Leu94も同様の傾向を示しているためC末端領域の先端部分はフレキシブルな状態にあると思われる。¹H-¹N定常状態NOEの値はピコ秒からナノ秒の速い時間スケールでの揺らぎを反映して小さくなるが、Phe95のその値は他の部分の約1/2でやはり小さかった。また、His89、Lys90の T_1 はC末端領域以外の部分と変わらないのに対して T_2 は小さく、His89の T_2 は他の部分の約1/2であった。これから、この部分にミリ秒前後の時間スケールの化学交換を伴う構造平衡の存在が示唆される。まとめると、酸化状態ではC末端領域Lys90-Phe95の根元ではミリ秒前後の遅い揺らぎがあり、先端部分は内部運動が大きく激しく揺らいでいると思われる。

対照的に、還元状態では、His89およびC末端領域Lys90-Phe95の T_1 、 T_2 は他の部分の値とほとんど同じであった。これは、これらの領域が還元状態では他の部分と同程度に固くなっていることを示しており、また、His89付近でのミリ秒前後の時間スケールの構造平衡が還元状態では消失することを示している。

以上のことから、スギナFd IのC末端領域は、酸化状態ではフレキシブルで比較的伸長したコンホメーションをとり、還元状態では逆に比較的固いヘリックス構造をとるということがはじめて示された⁹⁾。では、[2Fe-2S]クラスターの酸化還元とC末端領域の静的および動的構造変化はどのような仕組みで連動しているのだろうか。

6. [2Fe-2S] クラスターの還元がC末端領域の構造変化を引き起こす仕組み

酸化還元状態で構造や揺らぎが変化するC末端領域の根元にあたるHis89-Glu91の部分は、X線結晶解析によるとクラスター結合ループのSer44-Leu47の部分と水分子を介した水素結合網で結ばれている²⁾。

Fig. 4からわかるように、His89-Glu91の主鎖アミド基は、6分子の水分子を含む複雑な水素結合網を通して、Ser44とSer45のO^γ原子、Ser45-Leu47の主鎖カルボニル基およびSer44の主鎖アミド基と結ばれている。ラン藻Fd (*Anabaena*) においてもX線結晶解析から同様の水素結合網の存在が報告されている¹⁶⁾。この水素結合網はFd分子の表面ないしは表面近くに存在するので、溶液中ではあまり強く結ばれていないと思われる。実際、上述したように、酸化状態ではHis89あたりにミリ秒前後の化学交換を伴う遅い揺らぎが存在していると思われる。さて、唯一、還元型Fdの結晶解析がなされたラン藻Fd (*Anabaena*) では、酸化状態ではCys43

Fig. 4 Schematic representation of the hydrogen bonding network involving Ser44-Leu47, His89-Glu91 and the six ordered water molecules in *E. arvense* Fd I. The N and O atoms are shown in light gray and black, respectively. The large black circles represent O atoms of water molecules. The atomic coordinates were downloaded from PDB (accession number: 1FRR).

のカルボニル基は[2Fe-2S]クラスターへ向かって配向し、Ser44のアミド基は逆方向に配向している(対応するスギナFd Iの残基番号で述べる)が、還元状態になるとそれぞれの配向は反転すると報告されている¹⁷⁾(Fig. 4挿入図)。スギナFd Iとラン藻Fdとはクラスター結合ループが高い相同性をもつこと(Fig. 1)から、スギナFd Iでも同じことが起こると考えられる。したがって、Ser44のアミド基とGlu91側鎖O^γ原子およびSer45のO^γ原子との2分子の水分子を介した静電的相互作用は還元によって破壊され、Ser44-Leu47、His89-Glu91および複数の水分子からなる水素結合網は新しく再編されたと考えられる。この酸化還元に依存した水素結合網の再構築はHis89-Glu91の主鎖アミドおよびαプロトンの化学シフトに大きな変化をもたらすであろう。

まとめると、[2Fe-2S]クラスターの還元はCys43-Ser44ペプチド結合の配向の反転を導き、それが契機となって、His89-Glu91がかかわる水素結合網の再構築が起こる。この水素結合網の再構築によって、C末端領域Lys90-Phe95のダイナミクスおよびコンホメーションの変化が引き起こされるのではないかとと思われる。今後は、この水素結合網の形成に重要と思われるアミノ酸側鎖を改変することによってC末端領域の構造や揺らぎがどのような影響を受けるのか実証したい。

7. FdとFd:NADP⁺還元酵素(FNR)の複合体形成と酸化還元状態の影響

FdとFd依存性還元酵素群の間の複合体構造のうち、FdとFNR(酸化型トウモロコシFd Iと酸化型トウモロコシ葉FNR)の複合体構造のみが明らかになっている¹⁸⁾(Fig. 5)。図に示されるように、2つの補欠分子族が6.0 Å

Fig. 5 Three-dimensional structure of the maize Fd I-FNR complex.

の距離で向かい合う状態になるように両タンパク質分子は結合している。補欠分子族近傍の接触面は疎水性残基で占められ、その外側の接触面では5つの塩橋が形成されている。それをクローズアップしたのがFig. 6である。Fd側の残基-FNR側の残基で表すと、Glu29-Lys304, Arg40-Glu154, Asp60-Lys33, Asp65-Lys91, Asp66-Lys88であり、この5つの塩橋が両分子の配向に重要な働きをしていると思われる。また、複合体状態と遊離状態のFNR構造の比較から¹⁸⁾、Fdとの結合によってFNRのGly82-Lys91を含むループ部分が変化してはじめてAsp65-Lys91とAsp66-Lys88の2つの塩橋が形成されるようになり、誘導適合のような構造変化が結合時にFNRで起こることがわかった。また、複合体中のFdのC末端領域の温度因子は高く、これはこの部分がかなりフレキシブルであることを示している。しかし、おもしろいことに、FdのC末端カルボキシル基とFNRのLys85の側鎖は距離的には塩橋を結べる範囲内にあることが明らかにされた。

3. で述べたように、還元型Fdと酸化型FNRとの親和性は酸化型Fdと還元型FNRとの親和性より高い。この要因は何であろうか。これまでの研究結果から次のようなことが考えられる。酸化型FNRではFdとの結合によりGly82-Lys91のループ部分が移動する局所的なコンホメーション変化が起き、Fd側との2本の塩橋(Asp65-Lys91とAsp66-Lys88)形成が可能となる¹⁸⁾。もし、還元型FNRでその局所的コンホメーション変化が起きなければ、酸化型Fdと還元型FNRは5本の塩橋を正しく結べなくなるであろう。複合体のX線結晶解析がなされたときと同じ酸化還元条件で、酸化型スギナFdIと酸化型FNRとの複合体の解離定数を蛍光測定法から直接的に求めたところ、 $28.6 \pm 2.4 \mu\text{M}$ であっ

Fig. 6 Close-up of the five intermolecular salt bridges between maize Fd I and FNR. The intermolecular salt bridges consist of Glu29 (on the Fd side)-Lys304 (on the FNR side), Arg40-Glu154, Asp60-Lys33, Asp65-Lys91 and Asp66-Lys88.

た¹²⁾。この値は酸化型Fdと還元型FNRの組合せの場合の K_m 値($11.4 \pm 0.98 \mu\text{M}$)より小さいことはなくほぼ同じであるので、還元型FNRでは局所的コンホメーション変化は起こらないとする上述の仮説には無理がある。

一方、還元型Fdと酸化型Fdの違いは、我々のわかっている範囲では、6残基からなるC末端領域が酸化型ではフレキシブルで少し伸長したコンホメーションをとっているのに対して、還元型では固いヘリックス構造をとるということである。複合体のX線結晶解析からFdのC末端カルボキシル基とFNRのLys85のε-アミノ基が塩橋を結べる距離内にあることを考えあわせると、還元型Fdと酸化型FNRとの結合ではFdのC末端カルボキシル基とFNRのLys85の側鎖がしっかりしたもう1本の塩橋を形成し、この場合の親和性増大の重要な要因になっている可能性が考えられる。今後、タンパク質工学とX線結晶解析およびNMRによる構造解析を組みあわせることによって、親和性増大の構造的仕組みが厳密に明らかにされると思われる。

FdとFNRとの相互作用が酸化還元状態によって変化することは、金属錯体のような小分子の電子伝達体では起こりがたいことであって、生物が採用する高分子のタンパク質電子伝達体の重要な特性である。我々は、今回、そのしくみの可能性の1つを示した。

8. おわりに

Fdは種々の還元酵素(FNR、亜硝酸還元酵素、亜硫酸還元酵素(SiR)、Fd-チオレドキシン還元酵素(FTR)等)に電子を供与して、炭酸、窒素および硫黄同化等

への還元力の分配を決定する重要な役割を果たしている。FdのFNRに対する相互作用部位とSiRおよびFTRに対する相互作用部位では部分的に異なることがわかっているので^{19),20)}, 電子の流れを決定する重要な要因の1つは、Fdと各還元酵素間の非共有結合的相互作用の相違にあると思われる。

また、高等植物では、2つ以上のFdアイソフォームが存在する。スギナのFdIとFdIIでは、光化学系IからNADP⁺への電子伝達活性はFdIの方が高く、逆方向のNADPHからFNRを介してFdへの活性はFdIIの方が高い^{3),12)}。この場合、FdIが各種還元酵素に電子を分配するネットワークとFdIIが電子を分配するネットワークが相補的に機能しあうことによってさまざまなレドックス代謝が制御されていると考えられる。FdIIでは、FNRとの結合時に塩橋を形成するFd側の5つの残基(Fig. 1)のうち、Glu28とArg38は電荷のないSer28とGln38に置換しており、Glu58はFdIには見られないArg22と新たなユニークな分子内塩橋を形成している³⁾。したがって、FdIIとFNRとの結合様式はFdIの場合とかなり異なることが推察される。ここで述べた酸化還元による動的構造変化も含めた非共有結合的相互作用のどのような相違にもとづいて、複数のFdアイソフォームはパートナーである種々の還元酵素に対するユニークな電子伝達ネットワークを構築しているのであろうか。今後の研究の大変興味深いところである。

謝 辞

最後に、ここで述べた研究成果は、Guy Thomas Hanke 博士(阪大蛋白研)、山崎俊正主任研究官、加藤悦子主任研究官(農水省生物資源研)、廣瀬修一君(ファルマデザイン)、藤田しのぶさん(ダイナコム)、西山大介君(阪大蛋白研)、栗栖源嗣助教授(東大総合文化研究科)との共同研究によるものであります。また、赤堀興造教授(広大総合科学部)、楯真一主席研究員(生物分子工学研)からは有益な御助言を賜りました。これらの方々にこの場を借りて厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Matsubara, H. and Saeki, K. (1992) *Adv. Inorg. Chem.* **38**, 223-280.
- 2) Ikemizu, S., Bando, M., Sato, T., Morimoto, Y., Tsukihara, T. and Fukuyama, K. (1994) *Acta Crystallogr.* **D50**, 167-

- 174.
- 3) Kurisu, G., Nishiyama, D., Kusunoki, M., Fujikawa, S., Katoh, M., Hanke, G. T., Hase, T. and Teshima, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 2275-2281.
- 4) Bes, M. T., Parisini, E., India, L. A., Saraiva, L. M., Peleato, M. L. and Sheldrick, G. M. (1999) *Structure* **7**, 1201-1211.
- 5) Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, S., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K. and Matsubara, H. (1980) *Nature* **286**, 522-524.
- 6) Tsukihara, T., Fukuyama, K., Mizushima, M., Harioka, T., Kusunoki, M., Katsube, Y., Hase, T. and Matsubara, H. (1990) *J. Mol. Biol.* **216**, 399-410.
- 7) Rypniewski, W. R., Breiter, D. R., Benning, M. M., Wesenberg, G., Oh, B.-H., Markley, J. L., Rayment, I. and Holden, H. M. (1991) *Biochemistry* **30**, 4126-4131.
- 8) Jacobson, B. L., Chae, Y. K., Markley, J. L., Rayment, I. and Holden, H. M. (1993) *Biochemistry* **32**, 6788-6793.
- 9) Teshima, K., Hirose, S., Yamazaki, T., Katoh, E., Wada, K., Ikegami, T. and Hase, T.: 投稿準備中
- 10) Kitada, Y., Ikegami, T., Nishiyama, D., Kurisu, G., Kusunoki, M., Hase, T. and Teshima, K. (2004) *生化学* **76**, 790.
- 11) Hatanaka, H., Tanimura, R., Katoh, S. and Inagaki, F. (1997) *J. Mol. Biol.* **268**, 922-933.
- 12) Teshima, K., Fujita, S., Hirose, S., Nishiyama, D., Kurisu, G., Kusunoki, M., Kimata-Ariga, Y. and Hase, T. (2003) *FEBS Lett.* **546**, 189-194.
- 13) Xia, B., Volkman, B. F. and Markley, J. L. (1998) *Biochemistry* **37**, 3965-3973.
- 14) Kay, L. E., Torchia, D. A. and Bax, A. (1989) *Biochemistry* **28**, 8972-8979.
- 15) Kay, L. E., Keifer, P. and Saarinen, T. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663-10665.
- 16) Holden, H. M., Jacobson, B. L., Hurley, J. K., Tollin, G., Oh, B.-H., Skjeldal, L., Chae, Y. K., Cheng, H., Xia, B. and Markley, J. L. (1994) *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 67-88.
- 17) Morales, R., Chron, M.-H., Hudry-Clergeon, G., Petillot, Y., Norager, S., Medina, M. and Fray, M. (1999) *Biochemistry* **38**, 15764-15773.
- 18) Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Ariga, Y. and Hase, T. (2001) *Nature Struct. Biol.* **8**, 117-121.
- 19) De Pascalis, A. R., Schürmann, P. and Bosshard, H. R. (1994) *FEBS Lett.* **337**, 217-220.
- 20) Akashi, T., Matsumura, T., Ideguchi, T., Iwakiri, K., Kawakatsu, T., Taniguchi, I. and Hase, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 29399-29405.

手島圭三

手島圭三（てしま けいぞう）

広島大学総合科学部助教授

1982 年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了。理学博士。82-89 年星薬科大学助手、89-92 年大阪大学理学部助手、92 年より現職。

研究内容：タンパク質の構造-機能相関

連絡先：〒739-8521 広島県東広島市鏡山 1-7-1

E-mail: teshi@hiroshima-u.ac.jp

楠木正巳（くすのき まさみ）

大阪大学蛋白質研究所助教授

1980 年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了。理学博士。80-95 年大阪大学蛋白質研究所助手、95 年より現職。

研究内容：X 線構造生物学

連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

E-mail: kusunoki@protein.osaka-u.ac.jp

長谷俊治（はせ としはる）

大阪大学蛋白質研究所教授

1977 年大阪大学大学院理学研究科博士課程中退。77 年大阪大学理学部教務職員。79 年大阪大学理学部助手。

87 年名古屋大学農学部助教授。92 年より現職。

研究内容：植物のエネルギー・代謝にかかわる分子マシナリーの研究

連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

E-mail: enzyme@protein.osaka-u.ac.jp