

銅含有アミン酸化酵素触媒反応におけるコンホメーション変化の *in crystallo* 熱力学解析

村川 武志¹, 馬場 清喜², 岡島 俊英³

1. はじめに

現在, タンパク質結晶のX線構造解析は, 放射線損傷を低減するため極低温で凍結結晶の回折測定を通じて行われることが多い。その結果得られた構造は, タンパク質が実際に機能する20~30℃付近での立体構造とは, 基本的には大きく変わらないとされている。しかし, 凍結時に室温でとりうる多彩な構造のいくつかが失われており, タンパク質が実際にどのように働くかを説明できないことが懸念されている。さらに, フラッシュクーリングによって凍結された結晶構造は温度情報があいまいなことから, エネルギー的な議論を行うことが困難であることも, 酵素反応論を専門とする研究者などから指摘されていた。タンパク質を含む化学反応の解析は, 一般には正確な温度条件下で行われ, その実験結果をもとに議論される。すなわち, 速度論的な解析や, 分光学的手法を用いた構造変化の測定(CDスペクトルや表面プラズモン共鳴など)などは, 正確な温度情報と組み合わせることでエネルギー的な解釈が可能となるが, これまでのX線結晶構造解析では, その点が考慮されていなかった。

近年, 上記理由により, 非凍結結晶を用いたX線回折

測定が脚光を浴びつつある¹⁾。特に, 本稿の著者の一人, 馬場清喜らが開発したHumid Air and Glue-coating method (HAG法; 以下の3節に詳細を述べる)は, 凍結と非凍結結晶測定のそれぞれの利点をあわせ持ち, かつ実験デザインの自由度が高いことから, 多くのタンパク質研究者の注目を集めている^{2,3)}。本稿では, 最近著者らによって発表された, HAG法を用いた銅含有アミン酸化酵素コンホメーション変化の熱力学的解析⁴⁾について紹介する。

2. 銅含有アミン酸化酵素

銅含有アミン酸化酵素は, 微生物から哺乳動物に至る生物界に広く分布し, 種々の生理活性一級アミン類の酸化脱アミノ反応を触媒する⁵⁾。本酵素はサブユニット分子量70,000~95,000のホモ二量体構造を持ち, 各サブユニットは, 補欠金属の2価銅イオンとペプチド・ビルトイン型キノン補酵素, トパキノン (TPQ) を含有している (図1A)。TPQは酵素遺伝子の中でアミノ酸残基のチロシンとしてコードされており, 銅と酸素の存在下で自己触媒的にチロシン残基から形成される。本酵素の触媒過程は, TPQの酸化還元状態により, 還元的半反応と酸化的半反応の二つに分けられ⁶⁾, 各反応中間体は可視領域に特徴的な吸収スペクトルを持つ。

我々はこれまで土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の銅アミン酸化酵素 (AGAO) を用いて, 反応機構の解析を行ってきた⁶⁻⁹⁾。最近, 嫌気条件下では前半の還元的半反応のみが進行し, 二つの反応中間体, アミノレゾルシノール (TPQ_{amr}) とセミキノン (TPQ_{sq}) の平衡状態となることを明らかにした (図1B)¹⁰⁾。TPQ_{amr} から TPQ_{sq} への過程は吸熱反応であり, 補酵素TPQは銅イオンに配位しない off-Cu 型から銅イオン配位型である on-Cu 型へと大きくコンホメーション変化する (図1A拡大図)。分光学的な解析からは, TPQ_{amr} と TPQ_{sq} の平衡は, 温度および pH に依存することが明らかとなった^{10,11)}。

そのため我々は, 次に pH に依存した構造変化の解析を試みた。具体的には, さまざまな pH で調製した反応中間体結晶を液体窒素で凍結し, 回折測定を行った。ところが同一 pH で調製しても, 結晶ごとのデータのバラツキが非常に大きく, また, 溶液実験のデータとも大きく異なっ

¹大阪医科大学化学教室 (〒569-8686 大阪府高槻市大学町2-7)

²高輝度光科学研究センタータンパク質結晶解析推進室 (〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1-1-1)

³大阪大学産業科学研究所生体分子反応科学研究分野 (〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1)

***In crystallo* thermodynamic analysis of the cofactor conformational change induced during the catalytic reaction of copper amine oxidase**

Takeshi Murakawa¹, Seiki Baba² and Toshihide Okajima³ (¹Department of Biochemistry, Osaka Medical College, 2-7 Daigakumachi, Takatsuki, Osaka 569-8686, Japan, ²Protein Crystal Analysis Division, Structure Analysis Promotion Group, Japan Synchrotron Radiation Research Institute, 1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198, Japan, ³Department of Biomolecular Science and Reaction, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910565

© 2019 公益社団法人日本生化学会

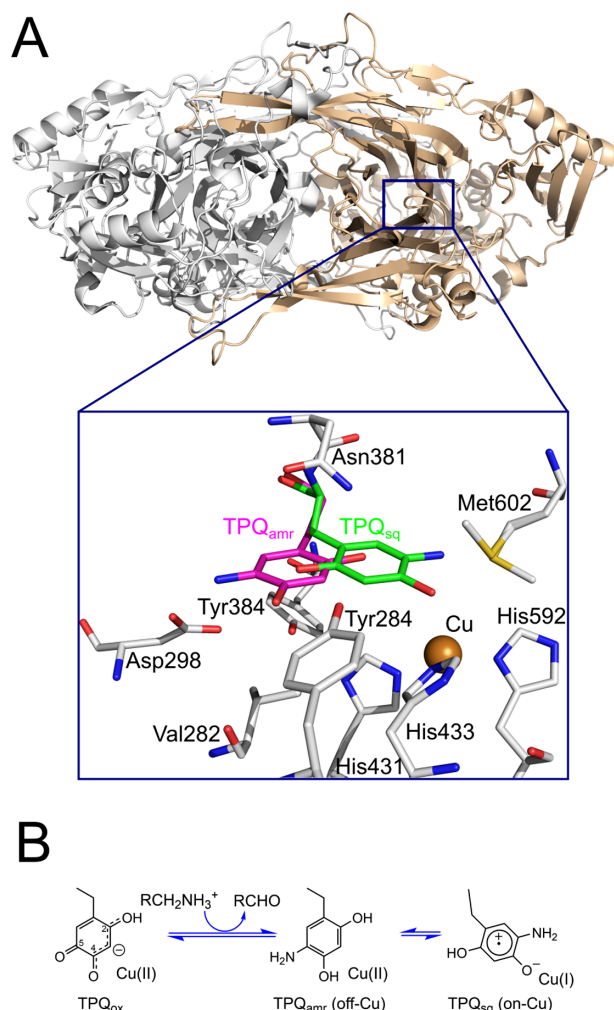


図1 AGAOの構造と触媒メカニズム

(A) AGAOの構造. 拡大図は活性中心. off-Cu (TPQ_{amr}) と on-Cu (TPQ_{sq}) を、それぞれマゼンタと緑で色づけした. (B) 推定される触媒機構. TPQ_{ox}: 酸化型, TPQ_{amr}: アミノレゾルシノール, TPQ_{sq}: セミキノラジカル.

た. これは、TPQ_{amr} と TPQ_{sq} の平衡は pH だけでなく温度にも依存することから、凍結作業時の温度変化により平衡が移動したためと考えられた. ここで疑問となったのが、結晶の温度である. たとえば上記実験では、結晶は以下のようにさまざまな温度を経由している.

- ・ 結晶析出 (16°C)
- ・ 嫌気ボックス内で嫌気化→基質溶液への浸漬 (25~30°C)
- ・ 結晶のピックアップ (室温~嫌気ボックス内の顕微鏡の発熱により 30~40°C ?)
- ・ 液体窒素に浸して凍結 (およそ -200°C)

フラッシュクーリングにより凍結した結晶構造は、どの温度における構造を反映しているのだろうか? そもそも、すばやく液体窒素に浸し、結晶を凍結した場合と、徐々に液体窒素に近づけ凍結した場合では、結晶は同一条件とい

えるのだろうか? 化学平衡は基本的に温度の影響を受けるので、作業時の温度が異なれば、溶液組成が同じでも得られる構造は異なるはずである. すなわち、pH 依存性を正確に測定するには、温度を一定にしなければならない. また、このことは、もし結晶の温度を正確に調節できれば、温度変化による平衡の移動と、それに伴うコンホメーション変化を直接観察することが可能であることを示唆している.

3. HAG法による測定

前節のアイデアを確かめるため、我々はタンパク質結晶の新しいマウント法である HAG 法^{2,3)} を用いた解析を試みた. HAG 法では凍結法と同様なループ上に結晶をすくうが、ポリビニルアルコール (PVA) で結晶を包み、湿度が調節されたガス (調湿ガス) を吹きつけながら回折測定を行う. PVA が結晶と調湿ガス間で水分を緩やかに仲介することによって、結晶の乾燥が防がれる. また、凍結結晶作製の際に添加されるグリセロールなどに比べ、PVA は分子量が大きく結晶内に浸透せず、結晶が損傷しにくい. 上記の利点により、凍結結晶に比べ大幅なデータの改善がみられた例がいくつか報告されている. より詳細な内容については、原著論文および日本語の総説を参照されたい^{2,3)}.

さらに、本研究の実施時期にあわせて、いくつかの改良が既存の HAG 法装置に加えられた. まず湿度調整ガスは、これまで大気ガスを湿潤したものを室温で用いていたが、窒素ガスでの利用が可能になり、そこに温度制御装置が加えられた. さらに温度調整が可能な嫌気ワークベンチが作製され、SPRING-8 のビームライン内に設置された. これらにより、結晶への基質添加から回折測定までを、嫌気状態で、かつ温度が正確に制御された環境下で実施することが可能となった¹²⁾.

実験のアウトラインを以下に示す. まず著者らの研究室で AGAO 結晶の嫌気化を行い、嫌気状態を保ったまま SPRING-8 に輸送した. その後、ビームラインに設置した調湿嫌気ワークベンチ内で結晶温度を調節後、基質アミンを添加した. 結晶の色の变化から反応が平衡に達したことを確認したのち、HAG 法により結晶をマウントし、温度と嫌気環境を保ったまま回折測定を行った. 凍結条件と比べて非凍結条件での回折実験は、X 線照射による損傷が甚大である. そこで、十分な厚みのアルミニウムで X 線量を弱め、かつ比較的大きな結晶を用いて照射位置を少しずつ移動させながら X 線を照射することにより、吸収線量を 1 データあたり 4.8 kGy に抑えて測定を行った¹³⁾.

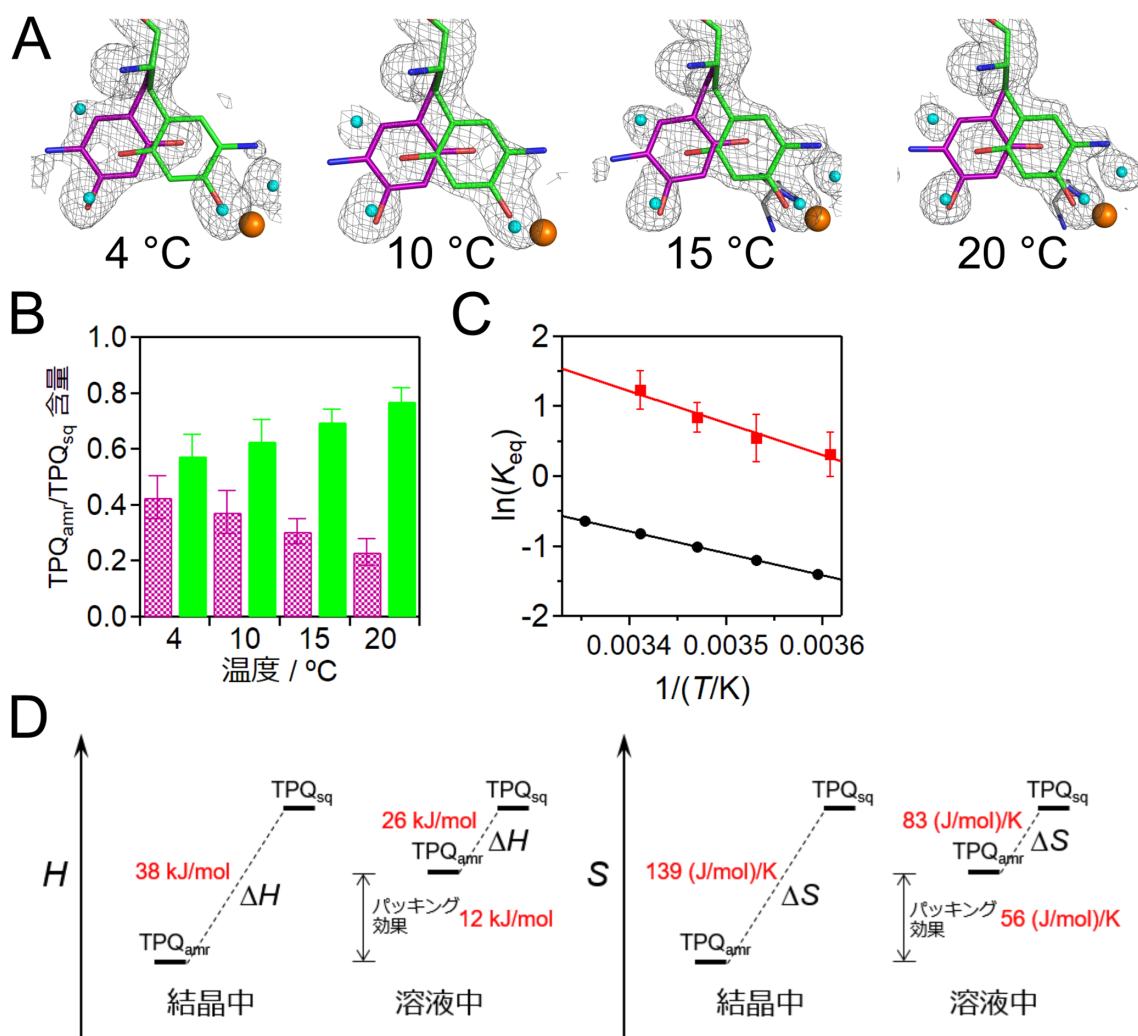


図2 TPQ_{sq}/TPQ_{amr}平衡の温度依存性

基質はエチルアミンを用い、pH 6.0で測定した。(A)4, 10, 15, および20°CにおけるTPQ_{sq} (緑色) およびTPQ_{amr} (マゼンタ) のモデルを、残基382 (TPQ) についての $F_o - F_c$ オミットマップ (3.5 σ , 灰色メッシュ) と重ね合わせた。水分子と銅原子は、それぞれシアンとオレンジの球で表した。(B)各温度でのTPQ_{amr}およびTPQ_{sq}の平均占有率 ($n \geq 6$) をS.E.とともに棒グラフで示した。マゼンタ (棒グラフのパターン, ドット): TPQ_{amr}, 緑 (塗りつぶし): TPQ_{sq}。(C)溶液および結晶中のTPQ_{sq}/TPQ_{amr}平衡のvan't Hoffプロット。溶液中の値は黒(丸), 結晶中の値は赤(四角)で示した。(D)結晶内でのパッキングによる熱力学的なパラメータへの寄与を模式的に示した。

4. 結晶内におけるTPQ_{sq}/TPQ_{amr}平衡の熱力学的解析

各温度における平衡状態の構造を図2Aに示す。基質はエチルアミンとし、pH 6.0で測定を行った。本酵素は2-フェニルエチルアミン (2-PEA) がよい基質になるが、親和性の高い基質を用いると、生成物アルデヒドが活性中心に残り反応に影響することが示唆されている。このため、今回は親和性の低い基質 (すなわち、生成物も活性中心から速やかに排出されると期待される) を用いた。構造解析の結果、溶液での測定と同様に、温度が上昇するに従ってTPQ_{amr}の割合が減少し、それに伴いTPQ_{sq}が増加した (図2B)。また、HAG法を用いた結晶顕微分光測定によって

も、温度に依存したTPQ_{sq}の特徴的な吸収スペクトルの変化が観測され、上記の構造データとよく一致した⁴⁾。

構造解析により得られた中間体の比率 (TPQ_{sq}/TPQ_{amr}) をvan't Hoffプロットし、TPQ_{sq}形成過程の熱力学的パラメータを求めた (図2C)。その結果、溶液中 ($\Delta H^\circ_{\text{solution}} = 26 \text{ kJ/mol}$,

*1 $\Delta H > 0$ である吸熱反応は一般に自発的に起こりにくく、エントロピー変化が負 ($\Delta S < 0$) の値であれば、温度に関わらず反応は自発的に起こらない。しかし、 $\Delta S > 0$ でかつ $|\Delta H| < |T\Delta S|$ であれば、 $\Delta H - T\Delta S = \Delta G < 0$ となり、反応は自発的に起こる。これは、温度が高いときに成り立ち、高温のときに反応は自発的に起こる。このような反応は、エントロピー項の効果で進行し、エントロピー駆動であるという。

$\Delta S^\circ_{\text{solution}} = 83 \text{ J/mol/K}$ と結晶中 ($\Delta H^\circ_{\text{crystal}} = 38 \text{ kJ/mol}$, $\Delta S^\circ_{\text{crystal}} = 139 \text{ J/mol/K}$) の両方とも, ΔH° と ΔS° の両方が正の値であり, 本過程が, エントロピー項に依存して進行 (エントロピー駆動*) することを示した. また, TPQ_{amr} から TPQ_{sq} への構造変化における熱の消費 ($\Delta H^\circ > 0$) は, エントロピーの増加 ($\Delta S^\circ > 0$) によってほとんど相殺され, その結果, 自由エネルギーの変化 (ΔG°) はわずかであった

(溶液中 2.0 kJ/mol , 結晶中 -3.0 kJ/mol). つまり, $\text{TPQ}_{\text{sq}}/\text{TPQ}_{\text{amr}}$ の平衡は, 結晶中と溶液中のいずれにおいても, 両方向に起こりうるエネルギー的にバランスのとれた過程といえる.

得られた熱力学的パラメータについて, 活性中心の構造 (図1A拡大図) に基づき考察する. off-Cu型の TPQ_{amr} の状態では, TPQ環がAsn381およびTyr384/Val282の側鎖に

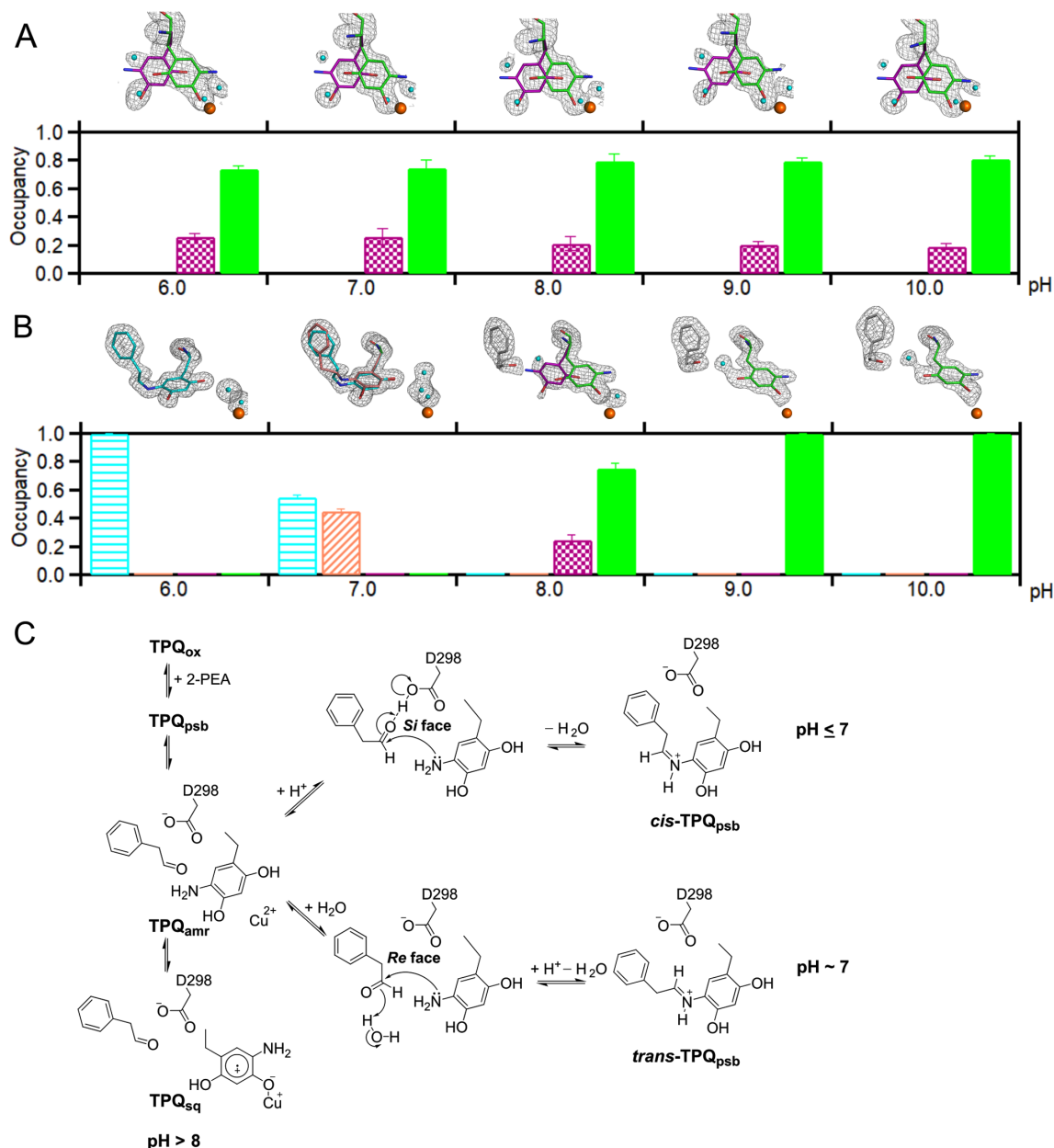


図3 温度一定条件下における平衡構造のpHプロファイル

基質は(A)エチルアミンおよび(B)2-PEAを用い, 温度一定 (15°C) 条件下, 各種pHにおいて測定した. pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, および10.0での活性部位モデルを, 残基382および生成物アルデヒドについての $F_o - F_c$ オミットマップ (3.5σ , 灰色メッシュ) と重ね合わせた. 水分子と銅原子は, それぞれシアンとオレンジの球で表した. 各pHでの中間体構造の中間体の平均占有率 ($n \geq 4$) はS.E.とともに棒グラフで示した. 図中の構造モデルは棒グラフと同色にした. シアン (棒グラフのパターン, 横線): $\text{cis-TPQ}_{\text{psb}}$, 茶 (斜線): $\text{trans-TPQ}_{\text{psb}}$, マゼンタ (ドット): TPQ_{amr} , 緑 (塗りつぶし): TPQ_{sq} . (C)2-PEAを基質とした嫌気条件下における反応スキーム.

は生まれ、さらにTyr284との短い(強い)水素結合(約2.2 Å)があるため、動きが制限されている。一方、on-Cu型のTPQ_{sq}では、Met602との弱い水素結合(約3.0 Å)はあるものの、TPQの芳香環の周囲には、Cβ-Cγ結合で回転するのに十分な空間がある。また、Asn381およびTyr384/Val282の側鎖自体も、TPQをはさんでいる(TPQ_{amr})状態よりも、はさんでいない(TPQ_{sq})方が自由度は増す。以上より、TPQ_{sq}はTPQ_{amr}よりも高いエントロピーを持つといえる。つまり、TPQ_{sq}への構造変化の過程で消費される熱は、主にTPQ_{amr}とTyr284との強い水素結合の切断に使用され、エントロピーの増加は、TPQ環とTPQ_{amr}周辺残基の自由度の増加によるものと考えられる。また、 ΔH° と ΔS° は、溶液中よりも結晶中の方が大きな値を示したが、この理由は以下のように説明できる。結晶中における分子の充填効果(パッキング)は、エネルギー的に有利な非共有相互作用をもたらすと予想されるが、これはTPQ_{sq}よりもTPQ_{amr}の方がより顕著であると考えられる。なぜなら、TPQ_{sq}と銅イオンとの結合は、結晶と溶液の両方で基本的に同様であり、パッキングの影響は低いが、TPQ_{amr}は周辺残基に柔軟に保持されているため、パッキングによる相互作用の増加(最適化)が期待できる。つまり、結晶内では溶液中と比べ、TPQ_{amr}のエントルピーとエントロピーが減少し、 ΔH° と ΔS° が溶液中よりも増加したと考えられる(図2D)。得られたデータより計算した結晶内でのパッキングの寄与は、 $\Delta\Delta H^\circ$ ($\Delta H^\circ_{\text{crystal}} - \Delta H^\circ_{\text{solution}}$) が12 kJ/mol、 $\Delta\Delta S^\circ$ ($\Delta S^\circ_{\text{crystal}} - \Delta S^\circ_{\text{solution}}$) が56 (J/mol)/Kと見積もられた。このように結晶のパッキング効果の熱力学的パラメータを実験的に決定したのは、著者らの知る範囲内では本研究が初めてである。

5. 結晶内における平衡のpHプロファイル

次に我々は、温度一定(15°C)の条件で、結晶内でのTPQ_{sq}/TPQ_{amr}平衡におけるpHの影響を調べた。まずはエチルアミンを基質として測定したが、結晶中のTPQ_{sq}とTPQ_{amr}の占有率は測定されたpH 6.0~10.0でほぼ一定であり(図3A)、また、溶液中でも同様であった¹⁰⁾。この結果は、基質として2-PEAを用いた溶液実験の結果(TPQ_{sq}/TPQ_{amr}平衡がpHに依存し、 $pK_a=5.96$ および7.74を持つ二つの解離基が関与)と対照的であった。そこで、pH依存性の構造的根拠を得るため、2-PEAを用いて結晶内での平衡のpH依存性を調べた。得られた構造は、pHにより大きく異なった(図3B)。pH 6.0では、off-Cu型である生成物シッフ塩基(TPQ_{psb})が認められ、おそらく、基質結合ポケット内に残存した生成物(フェニルアセトアルデヒド:PAA)とTPQ_{amr}との縮合反応により形成されたと考えられた。pH 7.0では2種類のTPQ_{psb}(pH 6でみられたcis型と、

シッフ塩基二重結合に関して配置が異なるtrans型^{*2)}が形成された。さらにpHが上昇すると、pH 8.0ではTPQ_{amr}とTPQ_{sq}の平衡状態が観察され、pH 9.0と10.0ではTPQ_{sq}のみが得られた。また、pH 8.0, 9.0, および10.0では基質結合部位にPAAも結合していた。

得られた構造に基づき、2-PEAを基質とした反応について考察すると、pH>8におけるTPQのoff-Cu型からon-Cu型へのコンホメーション変化の推進力の一つは、おそらく、活性中心内に残存するPAAの芳香環の疎水性によるものと考えられる。Tyr284とTPQ_{amr}との短い水素結合は、プロトンを共有する強い極性相互作用であり、疎水性環境を好まない。プロトン濃度が低下する塩基性条件下では、PAAの疎水性の影響が増大するため、Tyr284は共有しているプロトンを受け取り電氣的に中性となり、プロトンを解離し負電荷を持ったTPQ_{amr}はon-Cuへとコンホメーション変化することでPAAから離れたと考えられる。また、pHに依存したcis型およびtrans型のTPQ_{psb}の形成は、異なる立体配座のPAAカルボニル炭素へのSiまたはRe面への求核攻撃により説明できた(図3C)⁴⁾。

6. おわりに

本稿では、HAG法を用いた銅含有アミン酸化酵素触媒機構の解析を紹介した。やや繰り返しになるが、本研究で目指したのは“非凍結結晶”の構造解析ではなく“温度情報を持った結晶(温度が明らかな結晶)”の構造解析である。非凍結結晶を用いた測定法については、石英チューブの中に結晶を封じ込めるキャピラリー法やX線自由電子レーザーを用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析(SFX)¹⁴⁾などもあるが、温度情報が厳密に明らかな結晶構造を得る手段は、現在のところHAG法のみである。化学反応解析の両輪は速度論と平衡論(熱力学的なエネルギー論)であり、現時点では、前者についてはSFXが、後者についてはHAG法が、今後の有望な解析手段になりうる。したがって、両手法は本質的には競合せず、相補的な関係となる。

また、本研究では、溶液中に比べて結晶中では ΔH , ΔS の値が上昇することが観察されたが、このような変化は、多くのタンパク質が高濃度で存在する細胞内の状態、すなわちmacromolecular crowding¹⁵⁾において起きることが判明している。つまり、結晶内でのタンパク質の動きは、希薄な水溶液中よりも、むしろ生理的な細胞内の状態に近いのかもしれない。これまで結晶構造解析で得られた構造は、溶

*2) ここで観察されたtrans型TPQ_{psb}は、シッフ塩基二重結合に関する異性体であり、基質部分の芳香環への角度がcis型TPQ_{psb}とは異なる。cis型と同様に、こちらもPAAとTPQ_{amr}との間の縮合反応によって形成されたものと考えられる。

液構造と異なり非生理的なのではないかという懸念があったが、もしこの考えが正しく、結晶構造が細胞内のタンパク質の状態を反映しているということになれば、結晶構造解析に新たな意義を与えることができる。今後“*in crystallo*”熱力学解析により、多くのタンパク質の構造あるいはその構造変化が熱力学的パラメータとともに決定され、タンパク質の動的構造の解明に役立つことを期待する。

謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所(旧)生体触媒科学研究分野(谷澤克行名誉教授)、大阪医科大学化学教室(林秀行教授)、同生化学教室(矢野貴人教授)、高輝度光科学研究センタータンパク質結晶解析推進室(熊坂崇室長)、および理化学研究所放射光科学研究センター利用システム開発研究部門(山本雅貴部門長、河野能顕専任技師)との共同研究として行われました。関係の皆様は心より感謝申し上げます。

文 献

- Fraser, J.S., van den Bedem, H., Samelson, A.J., Lang, P.T., Holton, J.M., Echols, N., & Alber, T. (2011) Accessing protein conformational ensembles using room-temperature X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16247–16252.
- Baba, S., Hoshino, T., Ito, L., & Kumasaka, T. (2013) Humidity control and hydrophilic glue coating applied to mounted protein crystals improves X-ray diffraction experiments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 1839–1849.
- 馬場清喜, 熊坂 崇 (2014) 湿度調整と水溶性ポリマーのコーティングを用いたタンパク質結晶マウント法. 日本結晶学会誌, **56**, 194–200.
- Murakawa, T., Baba, S., Kawano, Y., Hayashi, H., Yano, T., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2019) *In crystallo* thermodynamic analysis of conformational change of the topaquinone cofactor in bacterial copper amine oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 135–140.
- MacIntire, W.S. & Hartmann, C. (1993) Copper-containing amine oxidases. in *Principles and Applications of Quinoproteins* (Davidson, V.L. ed.), pp. 97–171, Marcel Dekker, New York.
- Chiu, Y.C., Okajima, T., Murakawa, T., Uchida, M., Taki, M., Hirota, S., Kim, M., Yamaguchi, H., Kawano, Y., Kamiya, N., et al. (2006) Kinetic and structural studies on the catalytic role of the aspartic acid residue conserved in copper amine oxidase. *Biochemistry*, **45**, 4105–4120.
- Murakawa, T., Okajima, T., Kuroda, S., Nakamoto, T., Taki, M., Yamamoto, Y., Hayashi, H., & Tanizawa, K. (2006) Quantum mechanical hydrogen tunneling in bacterial copper amine oxidase reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 414–423.
- Taki, M., Murakawa, T., Nakamoto, T., Uchida, M., Hayashi, H., Tanizawa, K., Yamamoto, Y., & Okajima, T. (2008) Further insight into the mechanism of stereoselective proton abstraction by bacterial copper amine oxidase. *Biochemistry*, **47**, 7726–7733.
- Murakawa, T., Hayashi, H., Taki, M., Yamamoto, Y., Kawano, Y., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2012) Structural insights into the substrate specificity of bacterial copper amine oxidase obtained by using irreversible inhibitors. *J. Biochem.*, **151**, 167–178.
- Murakawa, T., Hamaguchi, A., Nakanishi, S., Kataoka, M., Nakai, T., Kawano, Y., Yamaguchi, H., Hayashi, H., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2015) Probing the catalytic mechanism of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* with halide ions. *J. Biol. Chem.*, **290**, 23094–23109.
- Shepard, E.M. & Dooley, D.M. (2006) Intramolecular electron transfer rate between active-site copper and TPQ in *Arthrobacter globiformis* amine oxidase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11**, 1039–1048.
- Shimada, A., Kubo, M., Baba, S., Yamashita, K., Hirata, K., Ueno, G., Nomura, T., Kimura, T., Shinzawa-Itoh, K., Baba, J., et al. (2017) A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome *c* oxidase. *Sci. Adv.*, **3**, e1603042.
- Zeldin, O.B., Gerstel, M., & Garman, E.F. (2013) RADDOS-3D: time- and space-resolved modeling of dose in macromolecular crystallography. *J. Appl. Cryst.*, **46**, 1225–1230.
- Mizohata, E., Nakane, T., Fukuda, Y., Nango, E., & Iwata, S. (2018) Serial femtosecond crystallography at the SACLA: breakthrough to dynamic structural biology. *Biophys. Rev.*, **10**, 209–218.
- Senske, M., Törk, L., Born, B., Havenith, M., Herrmann, C., & Ebbinghaus, S. (2014) Protein stabilization by macromolecular crowding through enthalpy rather than entropy. *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 9036–9041.

著者寸描

●村川 武志 (むらかわ たけし)

大阪医科大学学生化学教室助教. 博士(理学).

■略歴 1975年茨城県に生まれる. 99年神戸大学農学部卒業. 2001年同大学院自然科学研究科博士前期課程修了. 01～03年雪印乳業株式会社. 06年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了. 06年より現職(06年まで助手, 07年より助教).

■研究テーマと抱負 タンパク質(特に酵素)の構造的および速度論的研究. 酵素の活性中心の中で何が起きているのかを, 原子レベルでエネルギー的に解明し, そのメカニズムを可視化することを目標としている.

■ウェブサイト <https://www.osaka-med.ac.jp/deps/med/>

■趣味 旅行, プロ野球応援.

●馬場 清喜 (ばば せいき)

公益財団法人高輝度光科学研究センタータンパク質結晶解析推進室主幹研究員. 博士(工学).

■略歴 1976年福島県に生まれる. 99年千葉工業大学工学部卒業. 2001年同大学院工学研究科工業化学専攻博士前期課程修了. 04年同大学院工学研究科工業化学専攻博士後期課程修了. 07年より現職(17年まで研究員, 18年より主幹研究員).

■研究テーマと抱負 放射光構造生物学. タンパク質の構造から機能を解明する構造生物学の研究に貢献できるよう, 放射光を用いたX線結晶構造解析について研究開発を行っている.

■ウェブサイト <http://bioxtal.spring8.or.jp/>

■趣味 料理.

●岡島 俊英（おかじま としひで）

大阪大学産業科学研究所准教授。博士（理学）。

■略歴 1992年大阪大学大学院理学研究科修了（生物化学専攻）。同年近畿大学農学部助手。95年同講師。2000年大阪大学産業科学研究所助手。02年同助教授を経て2007年同准教授。現在に至る。この間1998年から1年間米国カリフォルニア大学バークレー校およびスクリプス研究所にて博士研究員。2010年から大阪医科大非常勤講師。

■研究テーマと抱負 キノン補酵素含有酵素の触媒機構と翻訳後修飾機構を、生化学的手法に構造生物学を組み合わせ解明することを研究テーマとしている。

■ウェブサイト <https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/>

■趣味 旅行、町歩き。