

# バイオ解析チーム

## Biomolecular Characterization Team

チームリーダー 堂前直

DOHMAE, Naoshi

バイオ解析チームは生命現象を解明するために、生体成分に関する解析法の開発やその応用を行っている。生体成分の中でも特にタンパク質は生命現象の源であり、その構造を調べることで遺伝子との対応を付けるばかりでなく生物学的活性のメカニズムや活性の制御機構について重要な知見が得られる。これら生体分子の解析のための新しい手法や装置の開発および導入を行い、装置ならびに設備の設置や管理、解析方法に関する情報を整備することで研究支援を行う。ゲノムプロジェクトの進展に伴い発現の可能性のある未成熟タンパク質のアミノ酸配列情報が多量に蓄積し、生体高分子解析の目的や手法も大きく変化している。このため古典的な化学的手法に加え発展著しい質量分析による構造解析に力を入れ詳細な構造解析、定量解析、網羅的解析の手法の開発と応用に取り組んでいる。さらに、600 MHz NMR や分析用超遠心分析装置を管理し、三次元構造解析や複合体解析の充実も図っている。

なお、当室のチームリーダーは9月30日までは岩木正哉が兼務し、10月1日付けで堂前直が就任した。

### 1. 生体分子の詳細な構造解析（堂前，中山，中村，西村\*）

ポストゲノムシーケンス時代のタンパク質構造解析への要求の1つが翻訳後修飾に関する知見の蓄積であろう。また、バイオプローブを用いたケミカルバイオロジー研究を始め、低分子薬剤のタンパク質結合位置の解析に大きな要求がある。これらの修飾部位解析を含めた詳細精密構造解析は今後の最も重要な課題の1つと考えられる。

ゲノムデータベースに対する一致性を見ることで、タンパク質と遺伝子に対応することについては、現在相当のレベルで微量化自動化がなされているが、翻訳後修飾を始めとする修飾基および修飾部位の決定はかなり立ち遅れている。原因として現在の主な手法である液体クロマトグラフィー質量分析法では得られたペプチドは元のタンパク質のほんの数パーセントであることが多く、また修飾が入ったことでクロマトグラフィーの回収率が低下しさらにイオン化効率が下がった断片はほとんど見逃されていることが考えられる。これを改善するために、タンパク質全体を見ながら修飾および修飾部位を絞り込んでいくナローダウン型修飾部位の決定法を開発した。またこの方法を潜在的細胞障害性マクロライド抗生物質 Amphidinolide H がアクチンへと結合する部位の決定に応用した。

また、当チームで確立したアミノ酸配列分析や質量分析を用いた構造決定法を用いることでいくつかの翻訳後修飾の修飾部位やプローブの結合位置を決定した。一例としてユビキ

チン様タンパク質の SUMO (small ubiquitin-like modifier) がチミジン DNA グリコシラーゼにイソペプチド結合で結合する部位を決定した。また、ほうれん草光合成系 II 複合体の解明のために外因性の 23 kDa タンパク質を化学修飾した解析にも応用した。23 kDa タンパク質のアミノ基またはカルボキシル基に修飾を施し、外因性 33 kDa タンパク質への結合を調べた。この結果は正電荷を持つアミノ基を修飾した場合に有為に結合能が低下した。この際の修飾部位を MALDI-TOFMS でどのリジン残基が修飾を受けたか調べた。これにより決定された 23 kDa タンパク質のリジン残基は高等植物 12 種で保存されているものであった。

当チームは現在までに多くの構造解析方法を開発し、多種多様な応用研究にそれを適用しており、タンパク質の修飾や消化を始めとするプロセッシング方法に独自のノウハウを築いてきた。今回これをウシ血清アルブミンの消化に応用しプロテオームスタンダードを作成した。このスタンダードを解析したところ、ほとんどのシステインが完全にカルボキシメチル化されており、ほぼ完全にトリプシンにより消化されていることを確認した。このスタンダード作成のノウハウを民間企業に移植して作成された商品が市販されるに至った。

### 2. 生体分子の定量的解析法の開発と応用（中村，堂前，中山）

質量分析法によるタンパク質解析では、ごく微量の成分の同定も可能である反面、定量性の欠如がしばしば問題となる。そこで、我々は、これまでに構築してきた交互スキャン nano-LC/FT-ICR MS 測定システムを応用し、定量的見地を考慮したタンパク質複合体消化物の解析のための新しい手法を開発、その有用性を検証した。本法は、精密質量タグを用いたタンパク質同定法、交互スキャン nano-LC/FT-ICR 質量分析結果に基づく精密質量タグの検証、および各タンパク質成分に起因する複数の精密質量タグに対する質量クロマトグラム面積の標準化を含む。複合体消化物中のトリプシンペプチドの精密質量を nano-LC/FT-ICR MS により測定するのと並行して、エレクトロスプレイイオン源の条件を交互に変えることによりフラグメントイオン強調スペクトルを取得する。本法ではデータ依存 MS/MS 測定を用いないためにマスクロマトグラムの完全性が保たれ、MS と MS/MS の切り替えによるペプチド信号の取得漏れも回避できる。ペプチド精密質量に基づく暫定的な帰属をフラグメントイオン強調スペクトルから得られる情報を用いて検証することにより複合体中のタンパク質成分を同定し、それぞれのタンパク質成分について検証済みのペプチド精密

質量に対応する複数のマスクロマトグラムを抽出してピーク面積を標準化する方法を確立した。モデル混合物を用いた検討の結果、各タンパク質成分に対応する標準化された質量クロマトグラムピーク面積は期待どおり成分間のモル比を反映することが確認された。次に、藍藻 photosystem II 複合体試料に対して、本解析方法の応用を試みた。複合体を直接トリプシン消化した試料の解析により同定されたタンパク質成分の内、photosystem II の化学両論的構成成分である 8 種のタンパク質と、それらと共に精製されてきたマイナー成分である phycobiliproteins の間では、標準化されたマスクロマトグラムピーク面積に明確な差が認められ、各タンパク質成分に対応する標準化質量クロマトグラムピーク面積が成分間のモル比を反映することに基づく非化学量論的不純物の判別が可能であることが示された。また、試料調整の条件はトリプシンペプチドの回収率に影響を及ぼすが、タンパク質毎に観測されるペプチド数が増えるにつれ、平均化の効果により、標準化ピーク面積は量的指標として妥当な値となり得ることが示された。各種質量分析法の中で最も高い分解能および質量精度を与える LC/FT-ICR MS は、多数のペプチドを観測するための手法として大変優れた方法である。本研究においては 7 テスラの市販 FT-ICR 質量分析装置により 5 ppm の質量精度が達成され、藍藻由来の比較的小さなタンパク質複合体の解析が可能であった。より高磁場の FT-ICR 装置と最新の質量較正技術を用いれば 1 ppm を上回る質量精度が得られることも報告されており、今後、超高磁場装置の利用が可能になれば、ゲノムサイズの大きな生物由来の巨大複合体解析への応用も可能となることが期待される。

生理活性物質等の低分子量微量生体分子の精密な同定、構造解析、生体内動態の定量的解析は、基礎生物学のみならず、分子探索およびケミカルバイオロジー研究等の重要な基盤となる。最新の質量分析法を駆使してそれらの解析を推進するため、FT-ICR MS を中心とした精密 MS を用いた解析システムの構築とバイオプローブおよび関連化合物の高感度同定や生体内動態解析への応用について検討した。低分子量化合物の高感度精密質量分析へと nano-LC/FT-ICR MS 測定系を応用し、さらに、バイオプローブおよび関連化合物等の同定、構造解析機能強化のため、赤外多光子吸収解離法を含む精密 MS/MS 測定系を導入した。本測定系で得られる超高分解能と質量精度を活用し、安定同位体標識を利用したバイオプローブ等の未知誘導体、代謝産物の包括的探索のための新しい測定原理を考案した。究極の目標は各種生体分子および関連物質等の動態を包括的かつ定量的に解析し理解していくことにあり、並行して、より定量的に優れた三連四重極型質量分析装置の導入を行った。

### 3. 生体高分子の網羅的解析 (中山, 中村, 堂前)

細胞内外のタンパク質を網羅的に解析するためには、二次元電気泳動法などでタンパク質を分離・検出したタンパク質を質量分析法などで同定する方法が一般に用いられる。しかし、タンパク質は多様な性質を持つため網羅的、系統的に分離・分析することは難しい。そこで細胞抽出液などの複雑な混合物のままタンパク質を化学的、酵素的な方法でペプチドに断片化して生じたペプチド混合物を質量分析する方法が開発されてきた。この方法ではタンパク質からペ

プチドに変換する過程が本質的に重要であるにも関わらず、効率的に変換することは困難だった。我々はタンパク質消化条件を検討し、強力な変性剤であるグアニジン中でのトリプシン消化条件を確立した。一方、複雑な混合物を分離するためには荷電の差で分離するイオン交換クロマトグラフィーと疎水性の差で分離する逆相クロマトグラフィーなど独立した分離モードを組み合わせた多次元分離法が有効である。しかし、グアニジンなどの塩濃度が高い試料をイオン交換クロマトグラフィーで分離するためにはあらかじめ脱塩が必要だった。従来この脱塩過程はしばしば回収率が低く、これを回避するために試料調製法は制限を受けていた。本年度は固相抽出カラムを試料注入ポートに組み込みバルブ切り換えを使用することでオンラインで脱塩濃縮と緩衝液交換を行うシステムを構築した。この改良によりグアニジンを含む消化物試料を直接陽イオン交換クロマトグラフィーで分離することが可能となった。この強陽イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを組み合わせた二次元クロマトグラフィーにさらにエレクトロスプレーイオン化あるいはマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計を組み合わせた分離検出システムを構築した。これにより約 50,000 ペプチドを分離した状態で質量分析できるようになった。ゲノムの小さなバクテリアなどであれば発現タンパク質から生じる全てのペプチドを分離・検出することが可能である (例えば大腸菌全 ORFs をトリプシン消化して生じるペプチドは約 5 万種類である)。この方法を *M. mobile* のプロテオーム解析に適用したところ、予想 ORFs の約 7 割のタンパク質を同定可能だった。

\* 協力技術員

This team is engaged in structural characterization of biological molecules to support biological science. Our activities include mass spectrometry, protein chemical analyses, ultracentrifugal analysis and nuclear magnetic resonance. We are interested in developing new characterization methods for biological molecules.

### 1. Development and application of analysis methods for structural detail on biological molecules

We have been developing a novel analytical method for post-translational modifications or a bio-probe binding site of proteins, called a narrow down method. We have applied this method to an Amphidinolide H, a potent cytotoxic macrolide, covalently bind to actin molecules and stabilizes actin filament. The binding site of Amphidinolide H was determined to be a specific region in actin subdomain 4, which was found to be a good example of a bio-probe interaction with an active protein.

We have determined some post-translational modification sites or artificial probe binding sites using chemical protein sequence and mass spectrometric analyses, e.g. sumoylation (SUMO:small ubiquitin-like modifier conjugation) and NSP (N-succinimidyl propionate) modification. Modification of proteins by SUMO is essential for many cell processes in eukaryotes. Sumoylation regulates DNA repair, transcriptional control, cell signaling, sister chromatid cohesion, cell cycle progression and apoptosis. We have determined to sumoylation site of thymine-DNA gly-

cosylase. On the other hand, to elucidate electrostatic interaction of spinach photosystem II related proteins, the extrinsic 23 kDa protein and 33 kDa proteins, we modified amino or carboxyl group of the 23 kDa protein. Mapping of the modification sites of the 23 kDa protein was performed with MALDI-TOF MS. The modification lysine residues of 23 kDa protein with NSP were wholly conserved in the 23 kDa protein from 12 species of higher plants.

## 2. Development and application of quantitative methods for characterization of biomolecules

We have developed a novel mass spectrometry-based approach for protein complex characterization with quantitative aspects. The new approach enabled discrimination of stoichiometric and non-stoichiometric components in a digested protein complex. Accurate masses of tryptic peptides in the digested complex were acquired by nano-LC Fourier transform-ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometry (MS). The conditions of the electrospray ion source were alternated to acquire normal and fragment-ion-rich mass spectra concurrently. This method of acquisition, which includes no tandem mass spectrometry (MS/MS), allowed us to retain the integrity of the mass chromatograms and averted missed peptides due to MS and MS/MS switching. Tentative assignments of accurate peptide masses were verified with the concurrently acquired fragment-ion-rich spectra, and the identities of the protein components were established. For each identified protein component, mass chromatograms attributable to the validated accurate peptide masses were extracted, and the peak areas of multiple mass chromatograms were standardized. The standardized peak areas appeared to reasonably reflect the molar ratio of the protein components in standard mixtures. This new approach was successfully applied to the characterization of a cyanobacterial photosystem II complex preparation; a clear difference in the standardized peak areas was observed between the two groups of identified components, namely, eight stoichiometric photosystem II proteins and two minor co-purified phycobiliproteins.

Microscale precision characterization of small biomolecules and related compounds is an essential part of the chemical biology research. To facilitate such characterization by taking advantage of advanced mass spectrometry including FT-ICR MS, the on-line nano-LC/FT-ICR MS system was adapted for accurate mass measurement of bioprobes and related compounds. Advanced MS/MS capabilities including infrared multiphoton dissociation were integrated into the FT-ICR MS system to enhance the system's ability to characterize those compounds in detail. An ultimate goal is comprehensive and quantitative analysis of those biomolecules to understand their dynamics. A triple quadrupole mass spectrometer was implemented for future quantitative analysis.

## 3. Development of proteomic analysis

Direct LC-MS analysis of complex peptide mixture, derived from protein complex, organelle, and crude cell lysate, is a powerful means for comprehensive analysis of cellular proteins. For the analysis, conversion from proteins to peptides is a key step because partially cleaved peptides can cause miss identification and system trouble. We have improved a procedure for proteolysis in guanidium hydrochloride. To separate the resultant peptide mixture containing guanidium salt, on-line desalting multi-dimensional liquid chromatography system has been developed. The system can be separated over 30,000 pep-

tides. The purified peptides are analyzed and identified by ESI/MS or MALDI/MS. Using the method, about 70% of ORFs of *M. mobile* have been identified. The method may prove to be a general method to analyze proteome

## Research Subjects and Members of Biomolecular Characterization Team

1. Development and application of analysis methods for structural detail on biological molecules
2. Development and application of quantitative methods for characterization of biomolecules
3. Development and application of proteomic analysis

### Head

Dr. Naoshi DOHMAE

### Members

Dr. Takemichi NAKAMURA

Dr. Hiroshi NAKAYAMA

Dr. Yasuhiro ISOGAI

Dr. Yutaka ITO

Ms. Tomoe NISHIMURA \*

---

\* Contract Researcher

### in collaboration with

Dr. Hiroyuki OSADA (Antibiotics Lab.)

Dr. Takeo USUI (Antibiotics Lab.)

Dr. Fumio HANAOKA (Cellular Physiology Lab.)

Dr. Kaoru SUGASAWA (Cellular Physiology Lab.)

Dr. Makoto KAIBARA (Computer & Information Div.)

Dr. Masafumi ODAKA (Bioengineering Lab.)

Dr. Mizuo MAEDA (Bioengineering Lab.)

Dr. Masafumi TSUJIMOTO (Cellular Biochemistry Lab.)

Dr. Shigeyuki YOKOYAMA (Cellular Signaling Lab.)

Dr. Yasuhiro HASHIMOTO (Glyco-Chain Functions Lab, FRS)

Dr. Shinobu Kitazume-KAWAGUCHI (Glyco-Chain Functions Lab, FRS)

Dr. Koji TAKIO (Highthroughput Factory)

Dr. Nobuyuki NUKINA (Lab. for Structural Neuropathology, BSI)

Dr. Isamu YAMAGUCHI (Lab. for Remediation Research, PSC)

Dr. Makoto KIMURA (Lab. for Remediation Research, PSC)

---

## 誌 上 発 表 Publications

[ 雑誌 ]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

Woo S., Kimura M., Nishiyama A., Dohmae N.,

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Hamamoto H., Seung-Keun J., and Yamaguchi I.: "Proteome analysis of wheat lemma", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2486–2491 (2003). \*
- Korekane H., Taguchi T., Sakamoto Y., Honke K., Dohmae N., Salminen H., Toivonen S., Helin J., Takio K., Renkonen O., and Taniguchi N.: "Purification and cDNA cloning of UDP-GlcNAc:GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc(NAc)-R [GlcNAc to Gal] $\beta$ 1,6N-acetylglucosaminyltransferase from rat small intestine: a major carrier of dIGnT activity in rat small intestine", *Glycobiology* **13**, 387–400 (2003). \*
- Tsujimura M., Odaka M., Nakayama H., Dohmae N., Koshino H., Asami T., Hoshino M., Takio K., Yoshida S., Maeda M., and Endo I.: "A novel inhibitor for Fe-type nitrile hydratase: 2-cyano-2-propyl hydroperoxide", *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11532–11538 (2003). \*
- Seko A., Dohmae N., Takio K., and Yamashita K.: " $\beta$ 1,4-galactosyltransferase ( $\beta$ 4GalT)-IV is specific for GlcNAc 6-O-sulfate:  $\beta$ 4GalT-IV acts on keratan sulfate-related glycans and a precursor glycan of 6-sulfosialyl-Lewis X", *J. Biol. Chem.* **278**, 9150–9158 (2003). \*
- Sato T., Dohmae N., Qi Y., Kakuda N., Misonou H., Mitsumori R., Maruyama H., Koo E. H., Haass C., Takio K., Morishima-Kawashima M., Ishiura S., and Ihara Y.: "Potential link between amyloid  $\beta$ -protein 42 and C-terminal fragment  $\gamma$  49-99 of  $\beta$ -amyloid precursor protein", *J. Biol. Chem.* **278**, 24294–24301 (2003). \*
- Tanioka T., Hattori A., Masuda S., Nomura Y., Nakayama H., Mizutani S., and Tsujimoto M.: "Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase: The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases", *J. Biol. Chem.* **278**, 32275–32283 (2003). \*
- Rajesh S., Nietlispach D., Nakayama H., Takio K., Laue E. D., Shibata T., and Ito Y.: "A novel method for the biosynthesis of deuterated proteins with selective protonation at the aromatic rings of Phe, Tyr and Trp", *J. Biomol. NMR* **27**, 81–86 (2003). \*
- Sengoku T., Nureki O., Dohmae N., Nakamura A., and Yokoyama S.: "Crystallization and preliminary X-ray analysis of the helicase domains of Vasa complexed with RNA and an ATP analogue", *Acta Cryst. D* **60**, 320–322 (2004). \*
- (その他)
- 中村健道: "タンデムマスマスペクトロメトリー: ハイフェネーテッド質量分析 II", *ぶんせき*, No. 6, pp. 286–293 (2003). [単行本・Proc.]
- (その他)
- Nakamura T., Dohmae N., and Takio K.: "Quantitative aspects in direct characterization of digested protein complex: an approach based on high-accuracy mass chromatographic analysis with FT ICR MS", *Proc. 51st ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Montreal, Canada, 2003–6, The American Society for Mass Spectrometry, Montreal, p. A030648 (2003).
- Nakamura T., Dohmae N., and Takio K.: "Quantitative aspects in direct characterization of digested protein complex: An approach based on high-accuracy mass chromatographic analysis with FT ICR MS", *51st ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics*, (American Society for Mass Spectrometry), Montreal, Canada, June (2003).
- Kitazume-Kawaguchi S., Tachida Y., Oka R., Kotani N., Ogawa K., Suzuki M., Dohmae N., Takio K., Saido T. C., and Hashimoto Y.: "*In vivo* cleavage and secretion of  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase, ST6Gal I", *4th Japan-Korea Collaboration Program on Glycobiology*, (RIKEN FRS and KSF), Wako, July (2003).
- Iwata H., Kaibara M., Dohmae N., and Takio K.: "Purification and identification of coagulation factor IX-activating enzyme on the erythrocyte membranes", *19th Congr. of the Int. Soc. on Thrombosis and Haemostasis*, Birmingham, UK, July (2003).
- Ishida M., Dohmae N., Shiro Y., and Isogai Y.: "Design and synthesis of *de novo* cytochrome *c*", *3rd Symp. on Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Function*, Kyoto, Oct. (2003).
- Kitazume-Kawaguchi S., Tachida Y., Oka R., Kotani N., Ogawa K., Suzuki M., Dohmae N., Takio K., Saido T. C., and Hashimoto Y.: "Characterization of alpha2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta-secretase (BACE1) and following processing", *3rd General Meet. of the Int. Proteolysis Soc.*, Nagoya, Nov. (2003).
- Kondo W., Dohmae N., Imajoh-Ohmi S., Kawasaki Y., Saio M., Okuno M., and Kojima S.: "Detection of tissue- and isoform-specific proteolytic activation of latent TGF-beta associated with pathogenesis of hepatic diseases", *3rd General Meet. of the Int. Proteolysis Soc.*, Nagoya, Nov. (2003).
- Manya H., Inomata M., Fujimori T., Dohmae N., Sato Y., Takio K., Nabeshima Y., and Endo T.: "Klotho protein deficiency leads to overactivation of  $\mu$ -calpain", *7th Asia/Oceania Regional Congr. of Gerontology*, Tokyo, Nov. (2003).
- (国内会議)
- 白水美香子, 新井亮一, 堀-竹本千重, 寺澤ゆみこ, 西本まどか, 寺田貴帆, 中山洋, 瀧尾擴士, 柴田武彦, 倉光成紀, 横山茂之: "高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 機能未知タンパク質の機能解析", 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト: 第1回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 7月 (2002).
- 中村健道: "フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析法の生体分子解析への応用", 理研シンポジウム「第3回分析・解析技術と化学の最先端」, 和光, 12月 (2002).
- 藤林明美, 大谷将, 顧建国, 堂前直, 瀧尾擴士, 関口清俊: "線虫 RME-8 のヒトホモログはペリプラキリンに結合する", 第56回日本細胞生物学会大会, 大津, 5月 (2003).
- 中村健道, 堂前直, 瀧尾擴士: "タンパク質複合体消化物直

- 接解析の定量的側面：FT ICR MS を用いた精密質量クロマトグラム解析に基づくアプローチ”，第 51 回質量分析総合討論会，つくば，5 月 (2003).
- 立田由里子，北爪-川口しのぶ，岡律子，小谷典弘，小川加寿子，鈴木實，堂前直，瀧尾擴士，西道隆臣，橋本康弘：“BACE1 によって切断された ST6Gal I のプロセッシングと分泌”，第 24 回日本糖質学会年会，横浜，7 月 (2003).
- 佐藤明美，由比賢蔵，鈴木健裕，藤利彰彦，田中寛康，堂前直，沈建仁，太田尚孝，榎並勲：“紅藻の表在性 33kDa 蛋白の PSII への結合部位の化学修飾による同定”，日本植物学会第 67 回大会，札幌，9 月 (2003).
- 藤利彰彦，堂前直，太田尚孝，井上康則，榎並勲：“表在性 23kDa 蛋白の PSII 複合体への結合部位の化学修飾による同定”，日本植物学会第 67 回大会，札幌，9 月 (2003).
- 橋本康弘，立田由里子，岡律子，小谷典弘，小川加寿子，鈴木實，堂前直，瀧尾擴士，西道隆臣，北爪-川口しのぶ：“Alzheimer’s beta-secretase (BACE1) cleaves alpha2, 6sialyltransferase as a physiological substrate”，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，新潟，9 月 (2003).
- 北爪-川口しのぶ，立田由里子，岡律子，小谷典弘，小川加寿子，鈴木實，堂前直，瀧尾擴士，三善英知，西道隆臣，橋本康弘：“Characterization of sialyltransferase cleavage-secretion”，第 76 回日本生化学会大会，横浜，10 月 (2003).
- 堂前直，西村友枝，中山洋：“Digestion of proteins by trypsin in guanidine chloride”，第 76 回日本生化学会大会，横浜，10 月 (2003).
- 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，横浜，10 月 (2003).
- 林もゆる，櫻井智成，西澤詠子，鈴木康弘，堂前直，下仲基之，小嶋聡一：“肺腺癌細胞由来プロテアーゼによるプラスミノーゲン分解産物の生成機構”，第 26 回日本血栓止血学会学術集会，東京，11 月 (2003).
- 頼永優，堂前直，松崎英樹，黒石千寿，宮野雅司，瀧尾擴士：“Pyrococcus horikoshii OT3 ゲノムのタンパク質翻訳領域の検討”，超好熱古細菌の構造ゲノミクスのためのワークショップ，(RIKEN HTPF)，播磨，11 月 (2003).
- 堂前直，川口健太郎，松葉修一，佐藤裕，小松節子，船附秀行：“低温ストレスで蓄積阻害されるイネ薬小孢子期特異的糖タンパク質の解析”，NIAS シンポジウム「植物プロテオーム研究の最前線」，(農業生物資源研究所)，つくば，2 月 (2004).