

5 - 4 転写・翻訳

グループ名 個別的解析プログラム名(転写・翻訳)
中核機関名 横浜市立大学
代表者名 西村 善文

1. 平成19年3月末におけるグループ全体の事業計画に対する成果の概要について

1. 基本転写因子

ヒトの基本転写因子TFII Eの既に決定していたサブユニットのコアドメインの構造に引き続きサブユニットのコアドメインであるZn結合ドメインの構造を世界で初めてNMR法で決定した。アミノ酸配列からはシート構造からなるZnリボン構造だと予測されていたが構造解析の結果更にヘリックスを含む新規構造だった。解析の結果タンパク質表面に特徴的な酸性アミノ酸パッチがあることが判明しそれらの変異体を作成したところ転写活性化能が上昇した変異体を得る事が出来た。またZnに配位している4個のシステイン残基をアラニンに変異したミュータントを作成したところ転写の活性化能にミュータント間で非対称性がありその原因をNMRによる構造解析で議論した。

TFII Eの質量をMSで正確に測定した結果TFII Eは溶液中ではこれまで言われてきたようなヘテロテトラマーではなくのヘテロダイマーであることを実証した。さらに超遠心実験やX線小角散乱で確認した。その後この結果を支持する電子顕微鏡実験が別のグループから報告された。

酵母の基本転写因子TFII Eb中のメディエーターサブユニットGal11結合部位の立体構造をNMRで解析した。過渡的に構造形成を行う非常に不安定な構造体であったが、TFII Ebのこの構造がメディエーターとの相互作用に必須であることを、アミノ酸の変異実験により確認した。

ヒトの基本転写因子TFII Fの質量をMSで正確に測定した結果TFII FもTFII Eと同様に溶液中ではこれまで言われてきたヘテロテトラマーではなくのヘテロダイマーであることを確定した。

2. 転写因子

神経特異的な遺伝子の発現を神経前駆細胞や非神経細胞で抑制する転写抑制因子NRSF/RESTとコリプレッサーmSin3の複合体構造を決定した。NRSFのN末領域の中の約10アミノ酸からなる疎水性領域がSin3のPAH1ドメインと結合することを初めて同定し、両者の複合体構造を初めてNMR法で決定した。NRSFは疎水性ヘリックスを形成しSin3のPAH1ドメインの疎水性溝に深く埋もれていた。NRSFは約1000個の神経特異的な遺伝子の発現に関与し、またハンチントン病やダウン症や髄芽腫などの疾患に関与しているためSin3とNRSFの結合を阻害する化合物が発見できると神経疾患の治療薬の候補化合物になる。

転写因子であるC/EBPの変異が白血病発症において重要である。野生型C/EBPと各種の天然プロモーター上に存在する非対称性配列および人工的な対称性配列High Affinity Siteを持つDNAフラグメントとの複合体、さらに、様々な変異型C/EBPとDNAとの複合体のX線結晶構造解析を行った。

急性白血病において、造血幹細胞の分化に必須の転写因子であるRunx1とCBFタンパク質の変異が、約30%の頻度で見ついている。Runx1のDNA結合活性とRunx1の活性調節因子CBFによるRunx1-DNA相互作用のアロステリック制御作用をX線結晶構造により解析した。またNMRによりRunx1-DNA複合体およびRunx1-CBF-DNA複合体におけるRunx1分子全体の揺らぎのパターンの概要を明らかにした。

植物の転写因子として世界で始めて植物の形態形成に関与する転写因子HY5及びそのDNAとの複合体のX線結晶構造解析に成功し植物の光形態形成に関与する構造生物学的研究の第一歩を築いた。

GT-1 は植物遺伝子の光に応答した発現の制御に関与している転写活性化因子である。GT-1 の DNA 結合ドメインの構造を NMR 法で決定した。さらに GT-1 のリン酸化をミミックする Thr 残基を Asp に置換した変異体の構造も決定した。また両タンパク質について、標的 DNA との相互作用様式を明らかにした。

概日リズムを制御する時計タンパク質関連の遺伝子の転写を制御するタンパク質 PEX の X 線結晶構造解析に成功し、PEX が新規の Winged Helix モチーフで DNA に結合することを示した。

転写因子 PhoB の DNA 結合転写活性化ドメインのフリーと DNA 結合型の動的構造を NMR で詳細に解析した。DNA 結合転写活性化ドメインには固い疎水性コアと柔らかい疎水性コアの 2 種類のコアが存在した。柔らかい疎水性コアは DNA 結合表面と RNA ポリメラーゼ結合表面を支えていて固い疎水性コアはこれらの機能性表面の逆側を支えていた。DNA 結合とともに柔らかいコアの揺らぎは押さえられたが、それでも RNA ポリメラーゼ相互作用部位は揺らいだままであった。

転写因子 PhoB の全体構造を NMR で解析した。PhoB は N 末にリン酸化転写調節ドメインを C 末に DNA 結合転写活性化ドメインを含んでいる。全長の構造を NMR で解析したところ DNA 結合転写活性化ドメインの構造はドメイン単独、非リン酸化の全長、リン酸化の全長中で変化せず、さらに特異的な DNA に結合しても DNA 結合転写活性化ドメインの構造は 3 者間で基本的に同じであった。

PhoB の DNA 結合ドメインの DNA の認識様式を、新しく開発した水中でのディスタンスジオメトリ計算法を用いて詳細に検討した。その結果、いくつかの水分子を介した水素結合が同定され、うち二つは結晶構造にも存在するものであった。また、複合体形成に伴う、PhoB ドメインのダイナミクスの変化についての NMR の結果を再現するシミュレーションを行い、その変化の機構について詳細に検討した。

3. クロマチン関連因子

転写制御クロマチン構造変化に関連するクロマチンリモデリング因子である酵母 Chd1 のタンデムに並んだ 2 個のクロモドメインの立体構造を NMR で決定した。ヒトホモログの CHD1 のクロモドメインはヒストン H3 の 4 番目のメチル化リシンを認識して遺伝子の活性化に関与することが報告されていたが、今回の構造解析のヒト CHD1 の構造と異なり酵母 Chd1 のクロモドメインはメチル化ヒストンとは相互作用できないことが判明し全く新規な機能を持つクロモドメインであることが判った。

ヒストンシトルリン化酵素で転写関連因子の PAD4 とその基質複合体の X 線結晶構造解析に世界で初めて成功しヒストン修飾の触媒機構を明らかにし、Ca²⁺による新規の酵素活性化機構を発見した。

ヒストン修飾酵素 PAD4 とヒストン N 末端ペプチド (基質) との複合体の X 線結晶構造解析に成功し、PAD4 によるヒストン尾部の認識及び修飾機構を明らかにした。

ヒストン修飾酵素 PAD4 は、ゲノムワイドの解析によって関節リウマチの原因タンパク質であることが示されている。PAD4 - 基質 (ヒストン) 複合体の構造解析結果に基づいて PAD4 の活性を阻害する化合物を設計し合成し PAD4 の活性阻害剤の創製に成功し、関節リウマチの創薬候補化合物を得た。

クロマチンの基本構成単位のヒトヌクレオソームの再構成系を構築しヒトヌクレオソームの立体構造を明らかにした。Xenopus では既に報告があるが、ヒトのヌクレオソームの立体構造としては初めての例であり、ヌクレオソーム上の DNA の構造柔軟性が示唆できた。

ヌクレオソームシャペロンとして働くと考えられる HMG 2 蛋白質を対象として 2 つの HMG ドメインの構造機能解析をおこない、立体構造から 2 つのドメインの機能の相違について解析した。

クロマチン末端テロメア保護因子 TRF2 とテロメア DNA との複合体構造を NMR 法で決定した。既に決定していた TRF1 とテロメア DNA 複合体構造と比較して DNA 結合能が強くなった TRF2 変異体の作成に成功した。結合活性を BIACORE で調べ結合能強化に関与するアミノ酸を同定した。

ヒトテロメア構成因子の TRF1 と TRF2 およびそれらの変異体 8 種類を作成し二重鎖 DNA チップを用いて様々な配列を持つ DNA との結合活性を網羅的に調べることが出来た。

ヒトテロメア保護因子 TRF2 とテロメア DNA の 1 本鎖 3 突出末端が作る平行グアニン 4 重らせん構造と相互作用することを見出した。また TRF1 は逆平行 4 重らせん構造を壊すことを見出した。

テロメア関連因子 hnRNP A1 タンパク質は 2 つの核酸結合ドメインを持ち、片方がテロメア DNA にそして他方がテロメラーゼ RNA に結合して 3 者複合体が形成される事を示唆する結果を NMR より得た。

テロメア DNA が生理的なイオン環境下で形成する特異な 4 重鎖構造の決定に成功した。結晶構造とは異なる特異な構造を溶液中では形成する事が分かった。

mRNA のプロセッシングやテロメア DNA の維持等への関与が実証ないしは示唆されている hnRNP D タンパク質に関し、テロメア DNA との複合体の NMR による構造を決定した。hnRNP D が、テロメア DNA の 4 重鎖構造を破壊して 1 本鎖構造に構造遷移させる事を見出した。そしてこの事によりテロメラーゼがテロメア DNA に作用できるようになりテロメア DNA の伸長反応が順調に進行できる。

4. DNA 関連因子

DNA ミスマッチ修復においては、チミン DNA グリコシラーゼ TDG がチミンを修復した後、脱塩基された DNA に結合しつづける。その後、TDG は SUMO (small ubiquitin-like modifier) 修飾され、DNA から脱離する。SUMO1 が結合した TDG の大量調製ならびに結晶構造解析に成功した。TDG はその C 末端に SUMO 修飾により新規 ヘリックスの形成が誘導され、そのヘリックスが TDG の DNA からの脱離を促進している。またこのヘリックスによる TDG と SUMO1 の間の非共有結合の接触部位のアミノ酸が DNA からの脱離に重要であることが、変異体作成実験より明らかになった。

DNA の損傷修復および複製過程に係わる蛋白質 XPF/ERCC 1 はヌクレオチド除去修復に係わり損傷部位の 5 端の切断を行う蛋白質である。立体構造解析の結果、XPF/ERCC1 の DNA 結合ドメインはすでに解析していた古細菌由来の蛋白質の DNA 結合ドメインと類似の構造を持つが、配列相同性が低い ERCC1 サブユニットには extra-helix 領域が存在することが明らかになった。

アポトーシス関連タンパク質 CAD/DFF44 の構造解析から、アポトーシスの際に染色体 DNA が切断されるメカニズムを解明することができた。カスパーゼによって限定分解された 2 つの CAD/DFF40 がお互い結合して「ハサミ」のような構造を形成して染色体 DNA をはさみ込んで切断することが明らかになった。

M2 フェージ由来 DNA ポリメラーゼの X 線結晶構造解析に成功し、得られた高次構造情報に基づいて DNA の認識・複製機構を解析した。

大腸菌由来の DNA メチルトランスフェラーゼと S-アデノシルホモシステインとの複合体の X 線結晶構造解析に成功し、DNA のメチル化機構を構造生物学的解析した。

大腸菌由来 型制限酵素 Eco0109I 及びその特異的 DNA との複合体の X 線結晶構造解析に成功し、構造と機能との関連を明らかにした。

5. 核関連因子

核 - 細胞質間輸送レセプター (トランスポートイン 1) と輸送分子 (基質: 転写因子などの核内因子や mRNA など) との複合体の X 線結晶構造解析に成功し、新規の核 - 細胞質間輸送の基質認識及び基質解離機構を構造科学的に明らかにした。

細胞分裂制御においては、細胞分裂促進因子 (MPF) が重要な役割を担っている。MPF は、細胞分裂開始の準備が整うまで Wee1 によって不活性化されている。リン酸化酵素である MPF による Wee1 分子中の 1 力所のリン酸化が、3 つの独立の作用で Wee1 の分解を引き起こすことを明らかにした。

核膜の再構成や ER 依存的蛋白質分解に重要な蛋白質として VCP(CDC48)が知られている。ペルオキシソーム病に関連する遺伝子 PEX1 のこれまでアノテーションがされていなかった N 末端配列を詳細に解析して、VCP の N 末端ドメイン類似のフォールドを有する新規ドメインを単離することに成功し、X 線結晶解析で構造決定した。PEX1-NTD は VCP およびそのアダプター因子 Ufd1、膜融合装置 N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) の N 末端ドメインに類似しておいた。

6. 翻訳関連因子

転写後修飾の一つである RNA のシュドウリジン化を行うタンパク質 RluC と RluD の立体構造を解明した。RluC と RluD は、23S リボソーム RNA の特定のウリジンをシュドウリジン化するタンパク質で、今回の構造からこれらのタンパク質の RNA 結合部位を特定することができた。

翻訳の終結反応を制御する因子 eRF3-N が結合する PABP の領域として PABC ドメインを同定した。eRF3-N の 64-94 の領域には、2 つの重複した PABC 結合モチーフ (モチーフ 1 と 2) が存在していることを見出し、eRF3 の PABC 結合モチーフ 1 と 2 それぞれについて PABC との複合体の立体構造を NMR で解析し化学交換している 2 つの状態の立体構造をそれぞれ明らかにした。

Musashi タンパク質は、標的遺伝子の mRNA に結合して翻訳を阻害する事で、分化における神経細胞の非対称分裂を制御している。2 つの RNA 結合ドメインの立体構造及び RNA との相互作用様式を決定した。また 2 つの RNA 結合ドメインを連結したものに関して標的 RNA との相互作用部位の同定を行い複合体中における 2 つの RNA 結合ドメインの構造を決定した。さらに 2 つのドメインが標的 RNA に順次相互作用する事を見出した。以上より、標的 RNA を動的・静的に認識するメカニズムが明らかになった。

HIV の病因性タンパク質である Tat に対する RNA アプタマーに関し、Tat のアナログとの複合体の構造を決定した。またよりリアリスティックなアナログとの複合体の構造決定も行なった。これにより抗 HIV 薬の開発に向けた基盤が確立された。

7. その他薬物標的タンパク質など

抗生物質であるペニシリンを含む β -ラクタム剤は、細胞壁合成における細胞壁の架橋ステップを阻害する。この架橋を生成するペニシリン結合性タンパク質 (Penicillin-binding Protein: PBPs) の PBP4 の立体構造を初めて解析し、PBP4 酵素と抗生物質の複合体 (アンピシリン、ペニシリン G、ペニシリン V) 構造も解明した。また、国内で最も多く使用されている β -ラクタム系の抗生物質ファロムとフロモックス複合体構造決定にも成功した。その構造を基に β -ラクタム系 (セフェム系とペネム系) の抗生物質とタンパク質への結合部位、構造変化などの情報を明らかにすることが出来た。

ダイオキシン分解に重要である初期分解酵素群 (DfdA、DfdB、DfdC) の立体構造解析に成功した。また、ダイオキシン分解の初発酸化酵素である DfdA の構造情報をもとに基質特異性に関わるサブユニットについて、部位特異的アミノ酸置換の導入を行い、分解基質特異性解析を行った結果、野生型とは異なる分解基質特異性を有する酵素の創製に成功した。

2. グループにおけるタンパク質の構造解析について

	平成 14 年 4 月～平成 19 年 3 月末	(参考) 平成 18 年 4 月～平成 19 年 3 月末
(1)PDB 登録数	111	19
(2)構造解析を終了したが PDB 未登録のタンパク質の数	16	16
(3)平成 19 年 4 月末までに構造解析が終了したタンパク質の数	1	

3. 論文掲載数		
	平成 14 年 4 月～平成 19 年 3 月末	(参考) 平成 18 年 4 月～平成 19 年 3 月末
・ 件数	272	65
4. 成果の産業連携について		
	平成 14 年 4 月～平成 19 年 3 月末	(参考) 平成 18 年 4 月～平成 19 年 3 月末
(1)特許出願数 (国内)	17 件	0 件
特許出願数 (海外)	8 件	1 件
(2)特許登録数 (国内)	2 件	0 件
特許登録数 (海外)	1 件	0 件
(3)成果の産業移転及び産学連携を目的とした共同研究の件数及び内容	<p>平成 14 年 4 月～平成 19 年 3 月： 12 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 関節リウマチ原因タンパク質 PAD4 の選択的低分子阻害剤のリード化合物探索 2. 病原菌由来のペニシリン結合タンパク質の構造から新たな抗生剤の開発を目的として産学連携の共同研究 3. HIV の Tat タンパク質を捕捉するアプタマーに関して複合体に関する分子動力学シミュレーションを、NEC ソフトと共同研究 4. 小麦胚芽を用いたタンパク質の無細胞合成システムを利用した核内タンパク質の合成 ((株) セルフリーサイエンス) 5. 二重鎖 DNA チップを用いた DNA 結合タンパク質の配列特異性の網羅的同定 (DNA チップ研) 6. タンパク質結合低分子化合物のハイスループットスクリーニング技術 (製薬協蛋白質コンソーシアム) 7. マイクロチップ電気泳動質量分析装置の開発 (島津製作所) 8. タンパク質回収フロー型 NMR 測定装置の開発 (資生堂) 9. PACAP および PACAP 受容体の構造解析を通じた医薬品開発にむけた共同研究 10. ヒトリウマチの原因遺伝子産物の PAD4 と基質(阻害剤)との相互作用の In silico 解析 11. ダイヤモンド様炭素皮膜処理した基板にプロテインチップを作製し、チップ上で相互作用するタンパク質を検出する研究 (東洋鋼鈹) 12. アレルギー反応に重要な役割を果たすインターロイキン 18 について、抗アレルギー薬開発、新規臨床検査方法の開発などの臨床応用に密接に結びついた共同研究 (岐阜大学医学部) 	
(4)成果の産業移転に関する具体的な例	<ol style="list-style-type: none"> 1. 協和発酵工業 (株式会社): 関節リウマチ原因タンパク質 PAD4 の大量発現・高純度精製技術の供与、関節リウマチ原因タンパク質 PAD4 の活性阻害の制御機構のコンサルティング、ハイスループットスクリーニングの技術提供 2. 丸和栄養食品 (株式会社): 大腸菌由来のペニシリン結合タンパク 	

	<p>質の構造解析の技術移転と共にインフルエンザ菌のペニシリン結合タンパク質の共同研究</p> <p>3. コンフォーカルサイエンス(有限会社): 大腸菌由来のペニシリン結合タンパク質の構造解析の結晶化のノウハウを行かして、インフルエンザ菌由来のペニシリン結合タンパク質を国際宇宙ステーションでの結晶化の共同研究</p> <p>4. 大陽日酸(株式会社): 15N と 13C の安定同位体でラベルしたモノヌクレオチドを用いて DNA ポリメラーゼにより同位体ラベルした DNA オリゴマーを NMR 測定用に大量に取得する方法</p> <p>5. 日立ソフトウェア(株式会社): テロメア結合タンパク質 TRF1 や TRF2 とそれらの変異体 8 種類のテロメア DNA 結合能を迅速かつ網羅的に同定するための二重鎖 DNA チップの開発</p>
(5)出願した特許の具体的な例	<ul style="list-style-type: none"> • 特願 2003-32233, PCT/JP2004/001220: テロメアタンパク質とグアニン-四重らせん DNA との複合体 • 特願 2004-267770, PCT/JP2005/016704: 神経特異的遺伝子発現に必要なアミノ酸配列 • 薬剤結合でヘモグロビンの R 状態の酸素親和性を変えることが出来る • 病原性大腸菌由来のヘム結合タンパク質(Hbp)の構造 • PCT/JP2005/001574 名称: ペプチジルアルギニンデイミナーゼ 4 阻害剤 • 生理的なカリウムイオン濃度によって活性がオフからオンにスイッチングされる核酸酵素複合体 • 特願 2003-206609 「インターロイキン 18 変異体蛋白質」 • 特願 2004-231652 「酵母 DSK2 のユビキチン結合ドメインとモノユビキチンとの複合体の構造的特徴および酵母 DSK2 のユビキチン結合ドメインによるモノユビキチン認識機構」 • 特願 2004-350635 「ヒト Vps4b の MIT ドメインと二価または三価の金属イオン複合体の構造的特徴およびヒト Vps4b の MIT ドメインによるホスファチジルイノシトールリン酸認識機構」 • 蛋白質新規フォールディング法(国内・PCT 出願) • 酸化 LDL 受容体の立体構造(国内・PCT 出願) • アゴニスト化合物スクリーニングのための新規 NMR 技術(国内・PCT 出願)
5. 本プロジェクトにおいて整備された研究設備及び育成された人材について	
<p>整備した研究設備:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 800MHzNMR 用クライオプローブ等付属装置(クライオプローブ、冷却装置、ヘリウムコンプレッサー) 2. 600MHzNMR 用クライオプローブ等付属装置(クライオプローブ、冷却装置、ヘリウムコンプレッサー) 3. 500MHzNMR 用クライオプローブ等付属装置(クライオプローブ、冷却装置、ヘリウムコンプレッサー) 4. 600MHzNMR 用高感度検出器等付属装置(CP TXI 600S3) 5. 質量分析装置 autoflex-YS (MALDI-TOFMS) <p>育成した人材: ポスドク 6 名(現在、1 名は他予算によるポスドクとして研究室に滞在中、1 名は学振の特別研究員、1 名はバイオ系の会社に就職、1 名は研究室のポスドク、1 名は横浜市大医学部助教、1 名は京都大学助教に就任)</p>	

6. 本プロジェクトの推進に係る技術開発に関する成果について

1. 基本転写因子 TFIIIE の試験管内での転写活性化能が高くなった変異体を作成した。
2. テロメアタンパク質 TRF2 の二重鎖テロメア DNA の結合能が高くなった変異体を作成した。
3. 二重鎖 DNA チップを開発し TRF1 や TRF2 を例にして配列特異的 DNA 結合能を網羅的に検出することが出来た。
4. タンパク質回収フロー型 NMR 装置を開発しタンパク質とリガンドの結合をスクリーニング出来た。
5. マイクロチップ型電気泳動質量分析装置を開発し微量タンパク質で質量分析が可能になった。
6. 可視領域の吸収を持つタンパク質の結晶に連続的に可視レーザー光を照射し、結晶中のタンパク質に構造変化を引き起こし、機能解析をする顕微分光装置を開発した。
7. ファージライブラリーを用いた迅速なペプチドの安定同位体標識法を開発した。
8. 分子間相互作用残基を同定する新手法、アミノ酸選択的交差飽和法およびメチル基を選択標識した試料を用いる交差飽和法を開発を行った。
9. NMR から得られたタンパク質 - DNA 複合体の構造を分子動力学シミュレーションの方法を用いることによってさらに精密化することができた。
10. ホモ多量体中において、分子内水素結合と分子間水素結合を明確に区別する事はこれまで不可能であった。
11. NH_2 基が関与した水素結合の検出には、カバーすべきケミカルシフトの範囲が広い為に複雑なパルス系列が用いられるが、アーティファクトがよく生じる。今回励起帯域の広い整形パルスを適切に用いる事で、単純でアーティファクトが生じないパルス系列を開発した。
12. ^{13}C クライオ NMR プローブを利用した ^{13}C NMR シグナルの高感度検出を生かして、アルギニン残基の相関ピークの観測を行う事で、水素結合に関する知見を得る事に成功した。
13. NEC ソフトとの産学連携で、HIV の Tat タンパク質の部分ペプチドとアプタマーの相互作用に関し、水を含んだ分子動力学計算を、NEC ソフトが有する高速計算機を活用して行った。
14. 情報生物学的手法と生化学的手法を組合わせてドメイン境界を決定し、ドメインごとに発現系を複製する、いわゆるドメイン解剖学の一手法を開発した。
15. 新規の ^{13}C 観測型 2D-NMR パルスをを用いて 1~30Hz という非常に速いアミドプロトン交換速度を簡単な測定法で定量的に見積もる新手法を開発した。
16. 表面プラズモン共鳴測定装置をナノアフィニティークロマトグラフィー装置として用いて、結合の過程をモニターし、装置のチップから結合したタンパク質を溶出して、同定できるシステムを構築した。

7. タンパク質の機能解析に関する成果の概要について

1. NMR から得られたタンパク質 - DNA 複合体の構造をあらわに考慮した水環境下で精密化することで、水を介したタンパク質による DNA の認識がより多くあり得ることを示すことができた。
2. Aurora-A が、悪性腫瘍細胞の増殖・進展に直接関わっていることを明らかにした。また、Aurora-A ががん分子標的治療の新たなターゲット分子となりうることを明らかにした。
3. HeLa 細胞において RNAi の手法によって hnRNP D/hnRNP A1 タンパク質をノックダウンしたところ、テロメア長の短小化が示唆された。これにより両タンパク質がテロメア長の制御に関与している事が示唆された。
4. ヒトの TFIIIE を構成する 2 つのサブユニットのうち、TFIIIE 中央コア領域の亜鉛フィンガーモチーフの構造とその点変異を用いた機能解析を行った。
5. ヒト TFIIIE サブユニットの C 末端の 2 つの塩基性領域を含む bHLH と bHL 領域に点変異を導入す

ることで機能解析を行い、RNA ポリメラーゼ II (Pol II)、TFIIE、TFIIB、TFIIF、一本鎖 DNA の各々に結合するアミノ酸残基を同定した。

6. TFIIE の機能解析の一環で、TFIIE が酵母の生存のために必須であることを示し、転写の際に関与していることを示した。TFIIE の C 末端領域を点変異を用いて遺伝学的に解析したところ、低温感受性が見られた。

7. これまで明らかでなかった Pol II との相互作用の際における 12 個の Pol II サブユニットの TFIIE 結合サブユニットの同定を行い、TFIIE では Rpb2 と Rpb12、TFIIE には Rpb5 サブユニットが結合することを明らかにした。

8. ヒトメディエーター複合体の 3 サブユニット (MED6、MED7、CDK8) に HA と FLAG タグを付け発現する HeLa 細胞株を樹立して、抗体カラムを用いてメディエーター複合体を精製した。

9. ヒトメディエーター複合体の解析を進め、MED18 という出芽酵母での Srb5 に相当するサブユニットをヒトで初めて同定し、この機能を解明するため siRNA を作成して細胞内に導入して、MED18 をノックダウンすると細胞内で起こる転写活性化がさらに増強される結果が得られた。

10. Aurora-A タンパク質および Aurora-A の活性化に必要である TPX-2(1-43) タンパク質を GST あるいは His-タグとの融合タンパク質として大腸菌で発現させ、それらを精製した。

11. SUMO-1 化による TDG (Thimine DNA glycosylase) の DNA 結合能の抑制機構を詳細に解明するために、SUMO-1 と TDG の複合体 (イソペプチド結合を持たないもの) の決定を行なった。

8. これまでの評価に対する反映状況について

1. 平成 15 年度：拠点内で取り上げているテーマが分散しているという指摘があった。また生物情報科学グループとの連携強化も指摘された。

本拠点ではタンパク質の構造解析に実績のあるグループでしかも構造生物学や分子生物学、生化学、生物情報科学からなるグループで構成されていたが、最初は各グループの過去の研究から直接転写・翻訳に関連しない構造も解析され、内容が明確でないという指摘もあったが、全員が集まって研究内容と今後の予定を発表しその場であらためて転写・翻訳という明確な目標を確認した。また転写の観点から藤井義明 (筑波大)、タンパク質構造の観点から阿久津秀雄 (阪大)、企業化の観点から鈴木榮一郎 (味の素) 各外部委員が評価を行った。この会をその後毎年開催した。質疑応答の後でメンバーの研究内容や目標に関しては特に問題がなく継続して研究を行うこと及び真核生物でのタンパク質修飾の転写制御における重要性があらためて強調された。また薬物標的タンパク質の構造解析の重要性も指摘された。なお生物情報科学的研究を本格化しヒト cDNA から新規核内タンパク質の同定及び水分子をあらわに考慮したディスタンスジオメトリ計算法を開発した。

2. 平成 16 年度：創薬との関連を十分に考慮して行う必要があるとの指摘があった。

外部評価委員からは薬物標的タンパク質の構造解析の重要性も指摘され、また創薬との関連を十分に意識して取り組むために、製薬協の蛋白質構造解析コンソーシアムと中核機関の横浜市大との間に基本協定を結び NMR を利用したタンパク質の構造解析技術の普及・向上と創薬を目的とした共同研究事業の創出及び新薬の開発を行うこととした。また本拠点の研究成果の未公開成果の一部を「蛋白質構造解析コンソーシアム」に開示し意見交換を行った。

3. 平成 17 年度：具体的なテーマの集中と選択が望ましいという指摘と産業応用への取り組みの必要性が指摘された。

中核機関としてグループの構成を見直した。転写翻訳関連タンパク質の構造解析と創薬を指向したテ

ーマに集中するために、中核機関内の2つの研究グループを除き集中化した。更に疾病関連タンパク質の構造機能解析の連携を深めるために、東京大学医学部病院、名古屋大学医、熊本大学医、愛媛大学医を分担研究機関に加え共同研究を開始した。さらに環境関連タンパク質でダイオキシン分解酵素の研究を遂行するために、横浜市大客員教授との共同研究を開始した。さらに一部企業との共同研究を行った。また「蛋白質構造解析コンソーシアム」加盟4社との受託研究を開始した。

9. 中核機関としての目標（解析数、特許出願数等）に対する達成度について（これまでの分担機関及びその課題の一覧を含めること）

タンパク質の構造解析の目標数は、平成14年度14個、平成15年度14個、平成16年度16個、平成17年度16個で、平成18年度20個以上であり、の平成14～18年度の5年間におけるプロジェクトの合計目標数は80個以上であった。平成18年度末までのPDB登録総数は111個なので、当初目標を十分に達成したといえる。

また有用なタンパク質においては適宜特許化を図る予定で既にタンパク3000プロジェクト内だけで国内外を含めて20個以上の特許を出願した。なお研究体制については外部評価委員の意見を参考にしている。

表1 再委託先一覧

機関名	業務担当者	業務題目
横浜市立大学 (14-18年度：中核)	西村善文	転写・翻訳関連因子の構造機能解析研究
横浜国立大学 (14-16年度：分担)	片平正人 (17年度から 中核)	NMRと分子生物学による転写・翻訳系のRNA/DNA結合タンパク質の構造生物学
東京大学 (14-18年度：分担)	嶋田一夫	翻訳制御因子の生化学とNMRによる構造解析
大阪大学/富山大学 (14-18年度：分担)	大熊芳明	基本転写因子と転写メディエーターによるRNAポリメラーゼの修飾、転写機能調節の解明
生物分子工学研究所 (14-17年度：分担)	楯 真一	NMRによる転写制御関連複合体の機能構造解析
京都大学 (17-18年度：分担)	白川 昌宏 (16年度まで 中核)	NMRによる遺伝子の転写・修復およびクロマチン・核膜の制御因子の構造ゲノム科学
熊本大学 (18年度：分担)	佐谷秀行	Aurora-Aキナーゼの中心体における活性化機構
愛媛大学 (18年度：分担)	安川正貴	TPX-2/Aurora-Aを標的としたがん免疫療法の開発
名古屋大学 (18年度：分担)	浦野 健	TPX-2/Aurora-Aとその複合体の機能解析
東京大学・医学部病院 (18年度：分担)	山本一彦	自己免疫疾患関連遺伝子FCRL3のタンパク構造に基づいた機能解析

10. 中核機関として、外部への広報、分担機関を含むグループ内部での連携体制の確保への取り組みについて

外部への広報としてPDBに登録したタンパク質の構造と本研究結果の論文リストをホームページ上で公開している (<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/protein3000/top0512.html>)

雑誌「蛋白質核酸酵素」の2005年6月号特集号「構造ゲノムプロジェクトの進展」の中で「NMRによ

る蛋白質構造解析」で構造ゲノム科学の現況報告の中で広報している。また製薬協の「蛋白質構造解析コンソーシアム」の総会で「タンパク 3000 中核拠点・横浜市大の蛋白質構造解析・機能解析への取り組み、現況と今後の展開」として成果の概要を講演報告した。さらにまた第2回日英シンポジウムでの講演報告と第3回日本ヒトプロテオーム機構大会に参加し講演報告を行った。2005年日本生化学会のランチョンセミナーでも「ヒト核内タンパク質の構造プロテオミクス」で講演報告した。

製薬協の「蛋白質構造解析コンソーシアム」の会員に中核機関の横浜市大に来てもらって秘密保持契約のもとに成果を一部開示し持ち帰り検討してもらっている。さらに「蛋白質構造解析コンソーシアム」のメンバーに横浜市大所有のNMR装置を一部解放して創薬に向けて有効に利用する取り組みを18年度から開始した。実際に「蛋白質構造解析コンソーシアム」の4社がNMRを利用した受託研究を開始し、また1社がNMRによる創薬を担当する人材育成プログラムのために共同研究を開始した。

「よこはまNMR構造生物学研究会」で構造生物学関連のワークショップ等を年4回程度開催し、横浜市大や理研GSCや製薬企業を中心とする多くのメンバーが参加し意見交換を行った。

サブ機関との連携では西村と富山大学の大熊との間の共同研究、横浜市大の廣明と京大の白川との共同研究、横浜市大内の片平、廣明、古久保と京大の白川の間のイメージングNMRの共同研究、横浜市大内の西村、平野、大野の間のヒト疾患関連タンパク質の共同研究などが行われ意見交換を行っている。

サブ機関を含むグループ内の班会議を、外部運営委員の藤井義明(筑波大学)、鈴木榮一郎(味の素)等が参加するとともに、研究メンバー、弁理士、文部科学省、横浜市大研究推進課が出席し班会議を毎年開催した。研究メンバー全員が集まり非公開の研究発表会を行い、お互いの研究内容と予定に関して質疑応答を行いお互いの研究現況を把握し共同研究に関して意見交換を行ってきた。

11. 本プロジェクトにおける成果が我が国の科学技術発展及び産業応用に与えた効果について

以下のように本研究拠点の転写因子を中心に疾病関連タンパク質の構造機能解析を行うことが可能になった。また一部製薬会社とも受託研究や共同研究を開始した。

1. 関節リウマチの原因タンパク質であるPAD4-基質(ヒストン)複合体の構造解析結果に基づいてPAD4の活性を阻害する化合物を設計し合成しPAD4の活性阻害剤の創製に成功している。
2. ハンチントン病やダウン症や髄芽腫などの疾患に関与している転写抑制因子NRSF/RESTによるSin3との複合体構造に基づいて結合阻害化合物が設計できると神経疾患の治療薬の候補化合物になりうる。
3. 白血病発症において重要であるC/EBPと各種DNAとの複合体や様々な白血病関連変異型C/EBPとDNAとの複合体のX線結晶構造解析と急性白血病において非常に重要な造血幹細胞の分化に必須の転写因子であるRunx1のDNA結合活性とCBFによる制御作用をX線結晶構造により解析した。
4. 製薬協の「蛋白質構造解析コンソーシアム」の4社がNMRを利用した受託研究を開始した。また1社がNMRによる創薬を行うための人材育成プログラムの共同研究を開始した。

12. 各年度の委託費	14年度	15年度	16年度	17年度	18年度	計
(千円)	310,000	550,000	230,000	229,000	172,000	1,491,000
設備費(千円)	145,693	245,117	25,279	50,856	20,550	487,495
人件費(千円)	9,908	28,642	28,592	11,045	9,764	87,951
運営費(千円)	127,839	225,990	154,928	145,142	124,486	778,385
管理費(千円)	26,560	50,251	21,201	21,957	17,200	137,169

(別紙)

1. 構造解析を行ったタンパク質について

タンパク質名	PDB ID	状況	リリース日	当該解析のメリット及び重要性の概要	成果の産業移転先 (予定を含む)
ヒトリゾチーム 低温構造	1IWT	Released	2002/9/4	低温(113K-170K)構造。低温における立体構造の温度変化を見たもので、低温結晶解析における技術的観点における貴重な情報を与えた。	
ヒトリゾチーム 低温構造	1IWU	Released	2002/9/4	同上	
ヒトリゾチーム 低温構造	1I WV	Released	2002/9/4	同上	
ヒトリゾチーム 低温構造	1I WW	Released	2002/9/4	同上	
ヒトリゾチーム 低温構造	1I WX	Released	2002/9/4	同上	
ヒトリゾチーム 低温構造	1I WY	Released	2002/9/4	同上	
ヒトリゾチーム 低温構造	1I WZ	Released	2002/9/4	同上	
薬剤(ベザフィブ レート)結合ヘモ グロビン	1IWH	Released	2002/10	細胞内に高濃度の酸素があると、ガン細胞の放射線に対する感受性が高まる。ヘモグロビンの酸素親和性を低下させる試薬は、ガン細胞への酸素運搬量を増やすため放射線治療の役に立つ。抗高脂血症薬ベザフィブレートはデオキシ T 構造ヘモグロビンの中心空洞に結合し酸素親	

					和性を下げることが知られている。今回の研究はヘモグロビンの R 状態の酸素親和性に与える薬剤結合の影響を、タンパク質の構造変化で示した初めての報告である。	
新規 4 重鎖構造 (DNA R-mer)	1MYQ	Released	2002/10/23		新規 4 重鎖 DNA 構造(分子内平行型 5 重鎖構造)を決定した。この新規構造に類似した構造が、テロミア DNA においても形成されている可能性を指摘した。	
HPSP(Human Phosphoserine Phosphatase)の構造	1L8L	Released	2003/4/1		HPSP タンパク質は、神経情報伝達物質である NMDA (N-methyl-D-aspartate) の活性を調節するタンパク質である。NMDA は記憶に関わるタンパク質で、アルツハイマー型痴呆の治療薬として研究が進められている。全体の構造は、コアドメインとサブドメインからできており、32x37x55Å の大きさである。HPSP タンパク質は、二量体として機能しており、阻害剤 AP3 の結合部位は二量体の結合界面付近のくぼみに結合していた。また、二量体中の 2 つの HPSP は、それぞれ異なる構造変化をして機能している事が証明された。	
HPSP(Human Phosphoserine Phosphatase)の構造	1L8O	Released	2003/4/1		同上	
レグインシユリン	1JU8	Released	2003/6/17		マメ科植物のホルモン様ペプチド(レグインスリン)の構造を NMR 法によって決定した。このペプチドは受容体様タンパク質に結合し、そのリン酸化活性を亢進することにより、植物の成長分化の制御に係わっていると推定された。受容体様タンパク質への結合に不可欠なレグインスリンドメインも特定することができた。	

C/EBP (Residues 259-336)-DNA (16mer, High affinitysite) 複合体	1GU4	Released	2003/6/26	C/EBP と人工的な対称性配列 High Affinity Site を持つ DNA フラグメントとの複合体の結晶構造解析を行い、両者の相互作用を明らかにした。	
C-Myb DNA-Binding Domain R1 sub domain(Residues 38-89)	1GUU	Released	2003/6/26	造血系の転写調節因子 c-Myb は C/EBP と協調して、血球分化に関わる遺伝子の転写制御を行う。c-Myb のアミノ末端近傍には、互いに相同性の高い 3 つの配列リピート(R1, R2, R3)が存在し、DNA 結合ドメインを形成する。トリ白血病ウイルス由来の v-Myb では、これらの配列リピートに変異が導入されていることにより、細胞が癌化を起こすとされる。R1 (1GUU), R2 (1GV5), R2-R3 (1GV2)の各フラグメントの結晶構造解析を行い、DNA 結合能や転写活性に重要な役割と構造との関係について明らかにした。また、分子内空隙に由来する構造的ゆらぎにより DNA 結合能をもつ R2 について、分子内空隙を埋める変異体(1GVD)の構造解析を行った。	
架橋剤結合へモ グロビン (Fe) (Ni)	1J3Y	Released	2003/7/22	血液中酸素運搬タンパク質へモグロビンに配位子が結合する過程を直接観測することに初めて成功した。へモグロビン(鎖)結晶中に光(可視レーザー)を照射することにより構造変化を引き起こし、また結晶を液体へリウム温度まで冷却することで、配位子結合過程の構造解析を行った。このような構造解析法は、機能発現に連携した動的構造解析として初めての成功例である。	
架橋剤結合へモ グロビン (1J3Z	Released	2003/7/22	血液中酸素運搬タンパク質へモグロビンに配位子が結合する過程を直接観測するため、タンパク質結晶にレーザーなしの	

(Fe-CO) (Ni) 架橋剤結合ヘモ グロビン((Ni) (Fe))	1J41	Released	2003/7/22	状態での構造解析を行った。 血液中酸素運搬タンパク質ヘモグロビンに配位子が結合する過程を直接観測することに初めて成功した。ヘモグロビン(鎖)結晶中に光(可視レーザー)を照射することにより構造変化を引き起こし、また結晶を液体ヘリウム温度まで冷却することで、配位子結合過程の構造解析を行った。このような構造解析法は、機能発現に連携した動的構造解析として初めての成 功例である。
架橋剤結合ヘモ グロビン((Ni) (Fe))	1J40	Released	2003/7/22	血液中酸素運搬タンパク質ヘモグロビンに配位子が結合する過程を直接観測するため、たんぱく質結晶にレーザーなしの状態での構造解析を行った。
RNA アプタマーと Tat タンパク質ア ナログ複合体	1NBK	Released	2003/12/3	HIV の悪性タンパク質である Tat に対する新規 RNA アプタマーが、いかにして Tat を非常に高い親和性で捕捉できるのかを明らかにできた。タンパク質 - RNA 相互作用様式は、これまでに見えない新しいタイプのものであった。構造に基づきさらに高性能のアプタマーを合理的にデザインする事が可能となり、抗 HIV 剤の創製への土台が得られた。
C/EBP (Residues 259-336)-DNA (16mer, Tom-1A Promotoer) 複合 体	1GTW	Released	2004/2/6	C/EBP と、その標的遺伝子 tom-1A の塩基配列との複合体の結晶構造から C/EBP と tom-1A の相互作用を明らかにした。
Musashi タンパク 質 RNA 結合ドメイ	1UAW	Released	2004/3/24	神経分化は、神経細胞の非対称分裂によって引き起こされるが、Musashi はこれを制御する RNA 結合タンパク質で、その

ン					<p>欠損は重大な神経系の異常をもたらす。標的遺伝子の RNA との高い親和性の獲得の為に、適切な立体構造に加えて、表面電荷と主鎖のダイナミクス(ゆらぎ)も大きく寄与している事を今回明らかにした。これにより、標的 RNA の翻訳を制御する仕組みが分かり、神経系の異常の理解に向けた足掛かりが得られた。</p>	
HMGB2 蛋白質の C 末端側 DNA 結合ドメイン	1J3C	Released	2004/5/25		<p>ヒストン形成の補助因子として知られる HMGB2 の DNA 結合ドメインに DNA 異常構造に対する親和性を導入する変異体の構造。以上構造にたいする HMG の親和性発現機構の解明に寄与した。</p>	
HMGB2 蛋白質の DNA 結合活性変異体	1J3D	Released	2004/5/25		<p>ヒストン形成の補助因子として知られる HMGB2 の DNA 結合ドメインの立体構造。DNA 認識の中心となるドメインの立体構造の結果からヒストン形成時における HMGB 蛋白質の寄与を解明した。</p>	
C171A/V236A Mutant of N-carbamyl-D-amino acid aminohydrolase	1UF4	Released	2004/6/8		<p>ペニシリン等の抗生物質の工業的生産をより効率的に行なうことができる酵素の創製に利用できる。</p>	鐘淵化学工業(株)
Crystal Structure Of C171A/V236A Mutant Of N-Carbamyl-D-Amino Acid Amidohydrolase Complexed With	1UF5	Released	2004/6/8		<p>ペニシリン等の抗生物質の工業的生産をより効率的に行なうことができる酵素の創製に利用できる。</p>	鐘淵化学工業(株)

N-Carbamyl-D-Methionine							
Crystal Structure Of C171A/V236A Mutant Of N-Carbamyl-D-Amino Acid Amidohydrolase Complexed With N-Carbamyl-D-Valine	1UF7	Released	2004/6/8			ペニシリン等の抗生物質の工業的生産をより効率的に行なうことができる酵素の創製に利用できる。	鐘淵化学工業(株)
Crystal Structure Of C171A/V236A Mutant Of N-Carbamyl-D-Amino Acid Amidohydrolase Complexed With N-Carbamyl-D-Phenylalanine	1UF8	Released	2004/6/8			ペニシリン等の抗生物質の工業的生産をより効率的に行なうことができる酵素の創製に利用できる。	鐘淵化学工業(株)
HMGB2 蛋白質の N 末端側 DNA 結合ドメイン	1J3X	Released	2004/6/29			ヒストン形成の補助因子として知られる HMGB2 の異常 DNA 構造親和性を示すドメインの立体構造。B ドメインとの構造比較から DNA 異常構造に対する親和性発現機構を解明した。	
C/EBP bZIP	1GU5	Released	2003/6/21			様々な非対称性配列認識を可能にする白血球関連タンパク	

Homodimer Bound To A DNA Fragment From TheMim-1 Promoter				質 C/EBP ファミリーの結合メカニズムの解析に必須である	
Ni 金属混成ヘモ グロビン	1UIW	Released	2003/8/3	胎児が生まれる際低酸素状態を引き起こしているが、そのメカニズムは特定されていない。ここでは (Ni) (Fe-CO)ヘモグロビンの構造解析から、そのメカニズムの解明を行った。	
アブラナ Sp11-S8	1UGL	Released	2003/9/30	<ul style="list-style-type: none"> ・アブラナ属植物の自家受粉阻害因子 ・アブラナ属植物の自家受粉阻害機構に関する最初の立体構造的知見である。 ・アブラナにおける自己・非自己認識に関わる遺伝的に多様性を持っている領域が立体構造上能動性の高いループに相当することが判明したため、工学的に興味深い。 ・構造がヒトなどの生態防御タンパク質 defensin と同一のフォールドであり、自己認識と生体防御の間の機能的な遠い類縁関係を示唆する。 ・植物の育種・交雑への応用や、遺伝子組換え作物の花粉の飛散防止などへの利用が考えられる。 	
新規 4 重鎖構造 (RNA 14-mer)	1MY9	Released	2003/10/7	新規 4 重鎖 RNA 構造(分子内平行型 4 重鎖構造)を決定した。この新規構造に類似した構造が、テロミア DNA や HIV ゲノムの 2 量化部位にも存在する可能性を指摘した。	
CBL2	1UHN	Released	2003/11/4	<ul style="list-style-type: none"> ・カルシウムセンサーとして最近見つけられたものであり、ストレス応答に深く関与している ・常時活性型型蛋白質、及び、異なる標的認識を行うタンパク質の開発 	

					<ul style="list-style-type: none"> ・アミノ酸配列上は2から3割程度の一致度をもつタンパク質が既に解析されているが、二次構造の配向などはかなり異なっている。 ・塩耐性の植物の開発に関わる可能性がある 	
ヒトインターロイキン18	1J0S	Released	2003/11/11		<ul style="list-style-type: none"> ・ヒトの免疫、アレルギーに関与するサイトカインの一種である。 ・立体構造を基に表面残基の点変異体が多数作成され、IL18受容体との結合の in vitro アッセイ、及び細胞に対する活性アッセイなど、詳細な機能解析が行われた。 ・IL18受容体に結合するが、細胞活性が変化した変異体に関して特許申請を行った。 	
ヒトMTH1	1IRY	Released	2003/12/23		<ul style="list-style-type: none"> ・細胞内の酸化を受けたグアニン、アデニンヌクレオチドを分解する事で、DNAの変異の抑制に関与すると考えられている。 ・NMRによるヌクレオチドとの結合実験から、ヌクレオチド結合ポケットが推定された。 ・安定同位体で標識された基質ヌクレオチドを使った実験から、触媒機構に関する知見が得られた。 	
ニッケル(Ni)金属結合タンパク質	1UIU	Released	2004/2/3		<ul style="list-style-type: none"> ニッケルイオン(Ni)運搬タンパク質(NiKA)は、ABCトランスポーターファミリーで、Niは生理的条件下では溶解せず、NiKAタンパク質により細胞内での運搬が可能になる。NiKAタンパク質の構造(新規構造)を解明し、ニッケルイオンの細胞内での運搬機構解明を行った。 	
ニッケル(Ni)金属結合タンパク質(ニッケル金属結	1UIV	Released	2004/2/3		<ul style="list-style-type: none"> NiKAタンパク質の構造と、Niイオンとの複合体のX線構造を解明し、ニッケルイオンの細胞内での運搬機構解明を行った。 	

台型)							
ヒトHR23b/S5a 複合体	1UEL	Released	2004/2/10	<ul style="list-style-type: none"> ・XPC などの核内の遺伝子修復因子の寿命と安定性に関するHR23b とプロテオソームサブユニット S4a の複合体 ・ユビキチン相互作用モチーフ UIM と Ubl の最初の高分解能の複合体立体構造である。 ・His67 の側鎖プロトン化と結合解離定数の相関を発見し、pH に依存せずに常に強く結合する Ub 変異体を作製できた。 ・UIM の立体構造は新規であり、構造を元に配列モチーフの再定義が可能となった。 			
新規 4 重鎖構造 (DNA 24-mer)	1OZ8	Released	2004/4/8	新規 4 重鎖 DNA 構造(分子内平行型 4 重鎖構造)を決定した。この新規構造に類似した構造が、テロメア DNA においても形成されている可能性を指摘した。			
黒マグロヘモグロビン (一酸化炭素型)	1V4U	Released	2004/7/6	クロマグロ Hb の配位子(一酸化炭素化型)結合型の構造決定を行い、ルレート効果のメカニズム解明を行った。			
ホスホジエステラーゼ 5 (バイアグラ結合型)	1UDT	Released	2004/7/9	生体内の情報伝達物質であるサイクリック AMP とサイクリック GMP を選択的に結合するタンパク質(PDE5)は、心臓疾患、うつ病、喘息、炎症、勃起不全などの多様な病気に関連している。PDE5 タンパク質阻害剤として、クエン酸シルデニフィリン(バイアグラ)が結合した構造を解明した。	PDE5 タンパク質の阻害剤として、クエン酸シルデニフィリン(バイアグラ)が現在、勃起不全治療薬として市販されている。今回初めての、PDE5 との複合体の構造から、副作用が起きない優れた新薬設計が可能になると考えられており、ファイザー製薬と共同研究を考えている。		

ホスホジエステラ ーゼ5 (タダラフィ ル結合型)	1UDU	Released	2004/7/9	生体内の情報伝達物質であるサイクリック AMP とサイクリック GMP を選択的に結合するタンパク質(PDE5)は、心臓疾患、うつ病、喘息、炎症、勃起不全などの多様な病気に関連している。PDE5 タンパク質阻害剤として、タダラフィル(tadalafil)が結合した構造を解明した。この構造は新規の構造であり、選択的なタンパク質阻害剤の新薬設計が可能となると考えられる。	
ホスホジエステラ ーゼ5 (バデナフィ ル結合型)	1UHO	Released	2004/7/9	生体内の情報伝達物質であるサイクリック AMP とサイクリック GMP を選択的に結合するタンパク質(PDE5)は、心臓疾患、うつ病、喘息、炎症、勃起不全などの多様な病気に関連している。PDE5 タンパク質阻害剤として、バデナフィル(vardenafil)が結合した構造を解明した。	
ヒト PAD4(Ca2+- 非結合型)	1WD8	Released	2004/7/13	<ul style="list-style-type: none"> ・ヒト PAD4の活性阻害剤は、ヒト関節リウマチの治療薬になる可能性が大(成果の産業移転に大きな期待)。 ・まったく新しい Ca2+イオン結合による酵素の活性化機構を有している。 ・Ca2+イオンが酵素の活性化と蛋白質間相互作用の両方に関与している。 	三共、協和醗酵、JT、味の素
ヒト PAD4(Ca2+結 合型)	1WD9	Released	2004/7/13	<ul style="list-style-type: none"> ・ヒト PAD4の活性阻害剤は、ヒト関節リウマチの治療薬になる可能性が大(成果の産業移転に大きな期待)。 ・まったく新しい Ca2+イオン結合による酵素の活性化機構を有している。 ・Ca2+イオンが酵素の活性化と蛋白質間相互作用の両方に関与している。 	三共、協和醗酵、JT、味の素
ヒト PAD4(Ca2+結 合型)と基質 BA と の複合体	1WDA	Released	2004/7/13	<ul style="list-style-type: none"> ・ヒト PAD4 の活性阻害剤は、ヒト関節リウマチの治療薬になる可能性が大(成果の産業移転に大きな期待)。 ・全く新しい Ca2+イオン結合による酵素の活性化を有してい 	三共、協和醗酵、JT、味の素

					る。 ・Ca ²⁺ イオンが酵素の活性化とタンパク質間相互作用の両方 に 関与している。	
ヒト TRF2 の DNA 結合ドメインのフリーの構造	1VF9	Released	2005/5/17		・TRF2 の DNA 結合ドメインのフリーの構造を解析し基本的には DNA との複合体と同じであるが N 末のアームがフレキシブルであることが確認された。	
ヒト TRF2 の DNA 結合ドメインの DNA との複合体	1VFC	Released	2005/5/17		・TRF2 の DNA 結合ドメインとテロメア DNA との複合体の構造を解析したが構造に基づいていくつかの変異体を作成し野生型の TRF2 よりもテロメア DNA への結合能が強い変異体をいくつか作成することができた。	
C/EBP (変異体 V285A) - DNA(High Affinity Site)	2E42	on hold			CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)は血球系細胞の分化、増殖を制御する転写調節因子である。本解析は C/EBP の DNA に対する認識機構、特に C/EBP ファミリーに特徴的である非対称的塩基配列認識メカニズムの一端を明らかにすることを目指した構造解析である。本構造からバリン 285 番が C/EBP の非対称性 DNA 配列を認識するため重要であることが示唆された。	
C/EBP (変異体 K269A) - DNA(High Affinity Site)	2E43	on hold			血球系細胞の分化、増殖を制御する転写調節因子 C/EBP の非対称塩基配列に対する結合機構の一端を明らかにすることを目指した構造解析である。本構造から K269 が対称・非対称の区別なく DNA 認識に重要であることが示唆された。	
RNA 修飾タンパク質 RluC	1V9K	Released	2004/5/18		シュードウリジンは RNA 中のウリジンが異性化されたものである。この修飾塩基はメチル化塩基と並んで、RNA 中に最も多く存在し、全ての生物種の RNA に見られる。RluC タンパク質は、23S リボソーム RNA 上(955,2504,2580 番目)のウリジンからシユ	

					ードウリジンへの異性化するタンパク質である。RluC は新規構造で、シュードウリジン化のメカニズムを解明した。	
RNA 修飾タンパク質 RluD	1V9F	Released	2004/5/18		シュードウリジンは RNA 中のウリジンが異性化されたものである。この修飾塩基はメチル化塩基と並んで、RNA 中に最も多く存在し、全ての生物種の RNA に見られる。RluD タンパク質は、23S リボソーム RNA 上(1911,1915,1917 番目)のウリジンからシュードウリジンへの異性化するタンパク質である。RluD は新規構造で、シュードウリジン化のメカニズムを解明した。	
アポトーシス関連タンパク質 CAD(caspase-activated Dnase)	1V0D	Released	2004/5/21		アポトーシス(プログラムされた細胞死)は、生物の発生・免疫システムの維持・感染に対する細胞の反応等で起こる、生物にとって重要な現象である。アポトーシスは厳密にプログラムされており、アポトーシスに関連したタンパク質群は、不活性化状態で細胞内に待機している。ここでは、アポトーシス関連タンパク質の活性化型 CAD/DFF40 の立体構造を決定し、染色体 DNA を挟み込んで切断されるメカニズムを解明した。	
黒マグロヘモグロビン (脱酸素型 pH=7.5)	1V4W	Released	2004/7/6		ヘモグロビン(Hb)は体内の各組織に効率よく酸素を供給するタンパク質である。クロマグロの Hb はルート効果というヒト Hb には見られない特殊な機能を持つ。ルート効果とは、pH 低下によって酸素親和性が激減し、Hb に酸素が結合しない現象を言う。クロマグロ Hb 脱酸素化型 pH=7.5 の状態で構造決定を行い、ルート効果のメカニズムを解明した。	
黒マグロヘモグロビン (脱酸素型 pH=5.0)	1V4X	Released	2004/7/6		クロマグロ Hb は溶液中の環境変化によって、様々な構造変化を引き起こしている。脱酸素化型 pH=5.0 の状態で構造決定を行い、ルート効果のメカニズムを解明した。	
JNK(c-jun	1UKH	Released	2004/8/23		JNK(c-jun N-terminal kinase)酵素は情報伝達系のタンパク質	

N-terminal kinase)タンパク質 (JNK1 複合体)				で、生物の細胞がストレスにさらされた際に活性化される。近年、この経路の異常活性化が様々な病気(リュウマチ関節炎、軟骨・骨格の腐食)に関わっていることが明らかになってきた。ここでは JNK1 と相互作用するタンパク質(JIP1)との複合体の構造を決定し、そのメカニズムを解明した。	
JNK1-JIP1-SP600125の複合体	1UKI	Released	2004/8/23	JNK1 と JNK1 の活性を抑える薬剤(名称 SP600125、分子量 220、ATP のアナログ)との複合体の立体構造を決定した。これらの立体構造情報は、さらに効果的な JNK1 活性抑制物質の発見・デザインに将来利用されることが期待される。	
マウス PEX1	1WLF	Released	2004/9/7	・AAA-ATPase であり、ペルオキシソームの膜融合・ペルオキシソーム酵素の輸送に不可欠の役割を有する。N 末端ドメインは、基質およびアダプター認識ドメインであると考え。 ・遺伝性ペルオキシソーム欠損症 PBD(副腎白質ジストロフィー)やツェルウェーガー症候群の原因遺伝子産物であるが、PEX0 そのものの分子機能は不明な点が多かった。 ・配列相同性が 29%以下の新規のドメインであるにもかかわらず VCP の N ドメインと構造は酷似しており、分子進化学的に興味深い。 ・配列相同性が 29%以下の新規のドメインである。 ・本ドメイン発見には国産の新規バイオインフォマティクスサーバーFORTE(産総研)が貢献しており、国産技術の先進性のアピールに重要。	
TF E	1VD4	Released	2004/10/5	・ TFIIIE サブユニットの Zn 結合ドメインの構造を解析し全く新規の亜鉛リボン構造であることを解析した。 ・構造に基づいて変異体を作成した結果転写活性化能が上昇した変異体を作成した。	

ヒト Vps4B MIT ド メイン	1WR0	Released	2004/10/7	<ul style="list-style-type: none"> ・AAA-ATPase であり、後期エンドソームの膜構造制御・多胞体の形成、ウイルスの宿主細胞からの出芽に不可欠の役割を担う。N 末端ドメインは、基質およびアダプター認識ドメインであると考えられる。 ・膜タンパク質の運命決定と選別輸送に関する ESCRT-III の解離・会合を制御すると考えられ、その分子メカニズム解明に貢献できる。 ・コイルドコイルを利用したタンパク質 タンパク質相互作用ドメインとして興味深い構造モチーフであった。 ・MIT ドメインとして最初の構造であり、また新規のフォールドであった。 ・全く新しい作用機序の抗ウイルス薬のドラッグデザインに利用可能。
型制限酵素 EcoO109I	1WTD	Released	2004/12/14	<ul style="list-style-type: none"> ・天然には存在しない新しい認識配列を認識・切断する新規の制限酵素のデザインが期待される ・こうしてデザインされた新規の制限酵素は、ミトコンドリアにおける遺伝子治療に利用できる
型制限酵素 EcoO109I と DNA との複合体	1WTE	Released	2004/12/14	<ul style="list-style-type: none"> ・天然には存在しない新しい認識配列を認識・切断する新規の制限酵素のデザインが期待される ・こうしてデザインされた新規の制限酵素は、ミトコンドリアにおける遺伝子治療に利用できる
ヘム結合タンパク 質	1WXR	Released	2005/3/1	<ul style="list-style-type: none"> 鉄は病原性細菌の生存に必須である。「ヘム結合タンパク質」とは、病原性大腸菌が宿主からヘム鉄を奪い取るための道具で、「オートトランスポーターファミリー」に属している。このタンパクの一部分が病原性大腸菌から分泌され、宿主のヘモグロビンを分解し、ヘム鉄を大腸菌まで運んでくる。我々はこの巨

					大分泌ドメイン(112 kDa)の結晶構造を解明に成功した。これは、このセリンプロテアーゼグループで得られた最初の構造であり、非常に大きな平行ヘリックス構造を持つことがわかった。	
hnRNP D-テロメア DNA 複合体	1X0F	Released	2005/4/5	2005/4/5	老化・癌化に関与するテロメラーゼの活性を調節する事が示唆されている hnRNP D タンパク質のテロメア DNA への作用メカニズムが解明できた。hnRNP D の働きをブロックする分子を設計してテロメラーゼの働きを制御する事で、抗癌剤が開発できる可能性が提示された。	製薬会社
酵母 Dsk2-UBA: ユビキチン複合体	1WR1	Released	2005/4/19	2005/4/19	・p53などの核内の転写因子の寿命と安定性に関するシャトルファクター-Dsk1 とユビキチンの複合体 ・ユビキチン結合ドメイン UBA と Ub の最初の高分解能の複合体立体構造解析である。 ・ユビキチン認識機構の解明は科学的に重要である。例えば、ユビキチンシステムの発見を称え、2003 年ノーベル化学賞がローズ博士らに授与された。フォールドが異なるにもかかわらず UIM と同じ Ub のインタフェースを認識しており、分子認識機構の点から興味深い。 ・化学シフト摂動法と単独構造から作られたモデルを除けば、UBA-Ub の原子レベルでの複合体立体構造は新規である。 ・ヒトホモログ hPLIC-0 は肝炎ウイルス由来 RNA ポリメラーゼの分解を促進しているため、肝炎の治療や診断薬への応用可能性がある。	
Lectin-like oxidized low density	1YXK	Released	2005/6/14	2005/6/14	血管内皮細胞の機能不全を誘導する核内シグナルとなる酸化 LDL を刺激として受ける受容体の立体構造。細胞表面にあるのと同じ状態の二量体構造として立体構造を得ることに	

lipoprotein receptor disulfide-linked dimer				成功し、酸化LDLの認識機構の解明につながった。	
Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor (CTLD monomer)	1YXJ	Released	2005/6/14	上記受容体の単量体としての立体構造であるが、結晶化条件が酸性であるため、エンドソーム中での当該受容体の構造変化を議論するうえで重要となる。細胞内での酸化LDLをいかにして手放すかなど議論するうえで上記の構造との比較は生物学的な意味を持つ。	
Solution structure of the HMG-box domain in the SSRP1 Subunit of FACT	1WXL	Released	2005/8/5	ヌクレオソーム上での転写伸張反応を促進する蛋白性複合体因子であるFACTのHMGドメインの立体構造。全体構造はHMGB タイプの典型的な立体構造を保持しているが、3本のヘリックス構造のうち、第2、第3ヘリックス結合部において遅い構造変化があり、ヌクレオソーム上のDNA構造に対するアダプテーションに関与していることが示唆された。	
CBM31	2COV	Released	2005/9/13	タンパク質と糖鎖の相互作用メカニズムを明らかにすることで、糖鎖分析への応用化が期待できる。	
C-Myb DNA-Binding Domain R2-R3 sub domain (Residues 89-193)	1GV2	Released	2003/7/3	造血系の転写調節因子c-MybはC/EBP・と協調して、血球分化に関わる遺伝子の転写制御を行う。c-Mybのアミノ末端近傍には、互いに相同性の高い3つの配列リピート(R1, R2, R3)が存在し、DNA結合ドメインを形成する。トリ白血ウイルス由来のv-Mybでは、これらの配列リピートに変異が導入されていることにより、細胞が癌化を起こすとされる。R1 (1GUU), R2 (1GV5), R2-R3 (1GV2)の各フラグメントの結晶構造解析を行い、DNA結合能や転写活性に重要な役割と構造との関係	

									について明らかにした。また、分子内空隙に由来する構造的ゆらぎにより DNA 結合能をもつ R2 について、分子内空隙を埋める変異体(1GVD)の構造解析を行った。	
C-Myb DNA-Binding Domain R2 sub domain (Residues 90-141)	1GV5	Released	2003/7/3						同上	
C-Myb DNA-Binding Domain R2 sub domain 変異体 V103L (Residues 90-141)	1GVD	Released	2003/7/3						同上	
Ets-1 DNA Binding and Autoinhibitory Domains (Residues 297-441)	1GVJ	Released	2004/2/6						Ets-1は転写因子Etsファミリーの1種であり、カルボキシル末端に DNA 結合ドメイン(Ets-1 ドメイン)が存在し、そのアミノ末端側には DNA 結合を抑制する autoinhibitory 領域が存在する。Ets-1 ドメインと autoinhibitory 領域を含むフラグメントの結晶構造から、autoinhibitory 領域を介したホモダイマーを形成することを明らかにした。	
GSPT/eRF3(motif 1) P A B C複合体	2DHW	on hold							翻訳終結因子 eRF3 の PABP 結合モチーフ 1 と PABP 中の PABC ドメインとの複合体の NMR 構造。下記モチーフ 2 と結合した状態との間で化学交換しているという、新たな相互作用様式を明らかにした。	
GSPT/eRF3(motif	2DI1	on hold							翻訳終結因子 eRF3 の PABP 結合モチーフ 2 と PABP 中の	

2) PABC複合体					PABC ドメインとの複合体の NMR 構造。上記モチーフ 1 と結合した状態との間で化学交換しているという、新たな相互作用様式を明らかにした。	
ディスコイデインドメインレセプター2 (DDR2) DS ドメイン	2DJE	on hold			癌浸潤などに関わる蛋白質として、細胞膜上のコラーゲン受容体 DDR2 の DS domain の立体構造解析を NMR により行うとともに、コラーゲン結合部位を同定した。	
古細菌由来タンパク質 PH0471-NfeDC	2EXD	Released	2006/12/12		<ul style="list-style-type: none"> ・NfeDC ドメインは、計測科学研究室で新規に同定されたドメインであり、構造既知の類縁タンパク質を持たない。このドメインをもつ蛋白質はすべて膜蛋白質であり、またそのほぼ半数は N 末端に ClpX 様の protease ドメインを有しているため膜シグナリングに関連する protease の原型であると考えられている。 ・真性細菌および古細菌にのみ存在する。また古細菌の stomatin homolog と相互作用する。 ・我々は Pyrococcus horikoshii PH0471 より同ドメインを単離し、世界で始めてこの新規ドメインの構造決定に成功したところ RNA 結合たんぱく質によく見られる OB-fold であることが判明した。 ・stomatin は赤血球のラフト局在タンパク質であり、細胞膜の重要な膜構成成分のひとつであるが機能未知である。ラフトなどの真核細胞の重要な膜機能解明に貢献することができると。 	
ヒト thimine DNA glycosylase-SUMO1 複合体	1WYW	Released	2005/6/21		<ul style="list-style-type: none"> ・ユビキチン様蛋白質翻訳後修飾因子 SUMO により、共有結合で修飾された遺伝子修復酵素 TDG の結晶構造解析である。 	

				<p>・ユビキチンによる蛋白質翻訳後修飾は、単に他の因子が相互作用することが可能となるインタフェースを付与するだけであつた。SUMO は、修飾した TDG の C 末端に新規のヘリックス構造を誘起し、TDG が基質 DNA から解離するのを促すと示唆された。この発見は蛋白質修飾による蛋白質の機能変換の分子メカニズムを提案するものである。</p> <p>・蛋白質の翻訳後修飾が TDG の DNA 結合能を変化させる原子的レベルでのメカニズムを示唆するデータである。</p>	
CHP1	2CT9	Released	2005/7/5	<p>細胞内 pH や細胞容積維持に中心的な役割を果たす Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (NHE) の必須制御因子として働く。NHE の異常が様々な疾病に関わることが知られており、その制御をするための基礎知見を与える。</p>	
Crystal structure of human nucleosome	2CV5	Released	2005/7/5	<p>ヒトのヌクレオソームコアパーティクルの立体構造。ヒト由来のヒストン蛋白質を含む初めての結晶構造。ヒストンオクターマー構造の保存性に比較して、DNA 構造に Xenopus 由来のヒストンを含む場合とで明らかでない違いが確認された。ヌクレオソーム上での DNA の柔軟性を示唆するものと考える。</p>	
神経特異的転写抑制因子 NRSF /RST とコリプレッサー Sin3 の複合体構造	2CZY	Released	2005/12/20	<p>野生型のハンチンチンは細胞質中で NRSF/REST と結合し、NRSF/REST の NRSE/RE0 への結合を制御している。一方、ハンチントン病では、このコントロールが失われ、神経の遺伝子の発現が十分に起こらない。NRSF/REST に拮抗し、NRSF/REST の標的遺伝子を活性化する化合物は、治療薬になる可能性がある。</p>	
クリップドメイン-セリンプロテアーゼ (serine proteases, SPs) とリンプロテアーゼの構造	2B9L	Released	2006/1/3	<p>クリップドメイン-セリンプロテアーゼ (serine proteases, SPs) とリンプロテアーゼの構造は、様々な生理作用の細胞外シグナル伝達経路を構成する非常に重要な成分である。特に、無脊椎動物の胚発生の転</p>	

				<p>写翻訳過程や、免疫反応で重要な役割を果たしている。プロフェノキシダーゼ活性化因子 (Prophonoloxidase-activating factor (PPAF)-II) は、昆虫が持つ重要なタンパク質であり、クリップドメインスーパーファミリーに属している。このタンパク質は、昆虫の主な防御機構・メラニン化を引き起こすフェノキシダーゼを活性化するために必要不可欠である。今回、PPAF-II の詳細な立体構造を解明し、クリップドメインは新規構造を持つことがわかった</p>	
ヒト thimine DNA glycosylase-SUM O1 複合体	2D07	Released	2006/6/6	<p>・ユビキチン様蛋白質翻訳後修飾因子 SUMO-3 により、共有結合で修飾された遺伝子修復酵素 TDG の結晶構造解析である。SUMO-3 が付加した標的蛋白質の結晶構造解析例はいまだ報告が無い。</p> <p>・SUMO1 と SUMO2/3 は配列相同性が 60%程度であり、細胞内では標的基質により使い分けられているが、その差異のメカニズムは明らかでない。TDG は双方により修飾を受け、それによりもたらされる機能変換 (DNA 結合能の低下) も等しい。</p> <p>・本研究により、SUMO1 と SUMO2/3 の双方に共通の残基が TDG とのインタフェースを形成しており、TDG に SUMO1 のときと同様な新規ヘリックスを誘起していることが、その DNA 結合能低下に関与していることが示唆された。</p> <p>・SUMO1 と SUMO2/3 の細胞内の機能の相同性を示すなど、分子生物学的研究に貢献する。</p>	現在、国内の製薬社に共同研究及び技術移転を含めて研究を進めている。
ペニシリン結合タンパク質 PBP4	2EX2	Released	2006/6/13	<p>新抗生剤の開発研究: 抗生物質であるペニシリンを含む -ラクタム剤は、細胞壁合成における最終段階となるペプチドグリカン (細胞壁) の架橋</p>	

				<p>ステップを障害する。この架橋を生成する酵素をペニシリン結合性タンパク質 (Penicillin-binding Protein: PBPs) と呼ばれる。我々は、大腸菌由来の PBP4 酵素の立体構造決定を行い、ペニシリンの結合部位を特定することが出来た。また、PBP4 酵素と抗生物質の複合体 (アンピシリン、ペニシリン G、ペニシリン V) 構造も解明した。また、国内で一番良く使用されている -ラクタム系 (セフェム系とペネム系) の抗生物質ファロム (商品名: 第一サントリーファーマ社)、フロモックス (商品名: 塩野義製薬社) 複合体構造決定にも成功した。その構造を基に -ラクタム系 (セフェム系とペネム系) の抗生物質とタンパク質への結合部位、構造変化などの情報を明らかにすることが出来た。これらの構造情報を基に、国内の -ラクタム系抗生物質の製薬会社への技術移転も含めて、次世代の新たな抗生剤開発を行う予定である。</p>	
ペニシリン結合タンパク質 PBP4(複合体: ペニシリン V 結合型)	2EX9	Released	2006/6/13	同上	同上
ペニシリン結合タンパク質 PBP4(複合体: ペニシリン G 結合型)	2EX8	Released	2006/6/13	同上	同上
ペニシリン結合タンパク質 PBP4(複合体: アンピシリン 結合型)	2EX6	Released	2006/6/13	同上	同上

ペニシリン結合タンパク質 PBP4(複合体:パロム結合型)	2EXA	Released	2006/6/13	同上	同上
ペニシリン結合タンパク質 PBP4(複合体:フロモックス結合型)	2EXB	Released	2006/6/13	同上	同上
Trap3 タンパク質	2EXS	Released	2006/8/1	バイオセンサータンパク質の開発: TRAP (Trp RNA-binding Attenuation Protein)は、細胞内の Trp の制御因子として機能しているタンパク質である。近年、バイオテクノロジーとエレクトロニクスを融合させたバイオエレクトロニクスの研究が活発に行われ、酵素などの蛋白質を用いたバイオセンサーなど、すでに実用化されている。TRAP という蛋白質を人工的に改造して、12 個の TRAP で構成された極小ドーナツ状構造蛋白質の製造する方法を X 線結晶構造解析から明らかにした。また、その中心の穴に金属微粒子を固定する方法を発明して、現在特許を申請中である。	現在、松下電氣社に共同研究及び技術移転を含めて研究を進めている。
Trap4 タンパク質	2EXT	Released	2006/8/1	同上	同上
pituitary adenylate cyclase activating peptide 38 (PACAP38)	2D2P	Released	2006/9/26	・神経ペプチドである脳下垂体由来アデニル酸シクラーゼ活性化因子(PACAP38)の、DPC ミセル結合状態での NMR 構造である。 ・これまで短いアナログ PACAP27 について同様の構造が出されてきたが、PACAP38 のほうが生理活性が約 100 倍強く、それは C 末端側の脂質膜との相互作用による寄与であると考え	

					<p>られてきた。本構造解析により、PACAP38 がミセル相互作用時に C 末端で両親媒性ヘリックスを形成することを示したと同様にミセルと相互作用している残基を推定した。</p> <p>・PACAP に限らず多くの神経ペプチドの活性を増強し血中安定性を増す方法論の開発などに役立つ。</p>
human peptidylarginine deiminase 4 complexed with 10-mer peptide from histone H3 (peptide H3-1)	2DEW	Released	2006/2/18	<p>新規のヒストン修飾として注目されているアルギニン残基のシトルリン化を触媒する peptidylarginine deiminase 4 (PAD4)とヒストン H3 の N 末端ペプチド 1(H3-1)との複合体の X 線結晶構造解析で、本解析によってヒストン認識の新事実が明らかに、ヒストンのメチル化とシトルリン化による転写調節機構の解明が大きく進展するものと期待される。</p>	
human peptidylarginine deiminase 4 complexed with 10-mer peptide from histone H3 (peptide H3-2)	2DEX	Released	2006/2/18	<p>新規のヒストン修飾として注目されているアルギニン残基のシトルリン化を触媒する peptidylarginine deiminase 4 (PAD4)とヒストン H3 の N 末端ペプチド 2(H3-2)との複合体の X 線結晶構造解析で、本解析によってヒストン認識の新事実が明らかに、ヒストンのメチル化とシトルリン化による転写調節機構の解明が大きく進展するものと期待される。</p>	
human peptidylarginine deiminase 4 complexed with 10-mer peptide from histone H4	2DEY	Released	2006/2/18	<p>新規のヒストン修飾として注目されているアルギニン残基のシトルリン化を触媒する peptidylarginine deiminase 4 (PAD4)とヒストン H4 の N 末端ペプチド(H4)との複合体の X 線結晶構造解析で、本解析によってヒストン認識の新事実が明らかに、ヒストンのメチル化とシトルリン化による転写調節機構の解明が大きく進展するものと期待される。</p>	
シロイヌナズナ由来	2DGE	Released	2006/7/4	<p>高等植物のサイトクローム c6A は、藻類やシアロバクテリアの</p>	

<p>来のサイトクローム c6A</p>				<p>サイトクローム c6 に比べると、12 残基のアミノ酸配列からなるループ構造の挿入を持つ。我々は、このループ構造の機能を明らかにするために、<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)由来のサイトクローム c6A の立体構造を 1.5 Å の高分解能で決定した。サイトクローム c6A の全体構造は、クラス I c タイプのサイトクロームと共通であった。補欠分子であるヘムは、Cys16 と Cys19 の 2 つのシステイン残基と共有結合していた。ヘム中央の鉄原子は、His20 と Met60 を軸配位子として結合し、全体では正八面体構造を持っていた。サイトクローム c6A に特徴的なループ構造の中にある Cys67、Cys73 の 2 つのシステインはジスフィリド結合を形成しており、サイトクローム c6A の構造安定性に寄与している。</p> <p>サイトクローム c6A の特徴的な性質の 1 つに「低い酸化還元電位」がある。これ故にサイトクローム c6A は、サイトクローム b6f と PSI (Photosystem I、光合成システム I) の間の電子伝達の役割を果たしておらず、別の役割を持っていると考えられる。我々は、決定した立体構造を基にして、サイトクローム c6A が「低い酸化還元電位」を持つ理由について、立体化学的なモデルを提唱する。</p>
<p>human peptidylarginine deiminase 4 complexed with N-alpha-benzoyl- N5-(2-fluoro-1- minoethyl)-L-orni</p>	<p>2DW5</p>	<p>Released</p>	<p>2006/8/4</p>	<p>関節リウマチ原因タンパク質 peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) と阻害剤との複合体の X 線結晶構造解析で、本解析によって関節リウマチの根本的な治療薬の開発が期待される。</p>

thine amide						
pex	2E1N	Released	2006/10/26		シアバクテリア <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 由来 Pex の X 線結晶構造解析で、本解析によって生物時計の制御メカニズムの解明研究が加速されることが期待できる。	
CD44 HABD (HA-bound form)	2I83	Released	2006/11/21		白血球や癌細胞の浸潤などに関わる蛋白質 CD44 のヒアルロン酸結合ドメインのヒアルロン酸結合構造の NMR 構造。	
Solution structure of the first chromodomain of yeast Chd1	2DY7	Released	2006/11/28		クロマチンリモデリング因子、出芽酵母 Chd1 のタンデムに並んだ 2 つのクロモドメインの 1 番目のクロモドメインの立体構造。機能解明、特にヒストン H3 の 4 番目のトリメチル化リジンへの結合能を明らかにすることに主眼を置き解析した。	
Solution structure of the second chromodomain of yeast Chd1	2DY8	Released	2006/11/28		クロマチンリモデリング因子、出芽酵母 Chd1 のタンデムに並んだ 2 つのクロモドメインの 2 番目のクロモドメインの立体構造。機能解明、特にヒストン H3 の 4 番目のトリメチル化リジンへの結合能を明らかにすることに主眼を置き解析した。	
B30.2/SPRY	2IHS	Released	2007/1/16		B30.2/SPRY ドメインと呼ばれるものは、非常にたくさんのタンパク質に見つかっている。そのタンパク質の役割は、サイトカイン情報伝達や、レトロウィルス制限など、生物学的に非常に多岐にわたる。今回、我々は SPRY ドメイン中の B30.2/SPRY の結晶構造を報告する。今回の SPRY ドメインと呼ばれるものは、SOCS box プロテイン(GUSTAVUS)を含み、RNA ヘリカーゼ VASA 由来の 20 アミノ酸残基のペプチドと複合体を形成している。今回の結晶構造により、ドメイン群がターゲットタンパク質をどのように認識しているのかが明らかになった。 ペプチド結合サイトは非常に堅いポケット構造であった。 ポケット内側とペプチドの Asp-Ile-Asn-Asn-Asn 配列の相互	

	NikA	2NOO	Released	2007/1/23	<p>作用は、GUSTAVUS と VASA の非常に強い結合を説明していた。この発見から、アポトーシス誘導タンパク質である Par-4 の一部分、Glu-Leu-Asn-Asn-Leu というアミノ酸配列が、GUSTAVUS ホモログの SSB-1 との相互作用の認識部位として使われていることが容易に導かれる。さらに解析を進めた結果、非常にたくさんさんの B30.2/SPRY ドメインが今回発見したポケット状構造と同様のものを持っていた。このドメインはマルチターゲット結合ドメインと考えられる。</p>
	NikA	2NOO	Released	2007/1/23	<p>大腸菌は、生きていくために細胞内に少量のニッケルイオンが必要である。ニッケルイオンは、大腸菌内で様々な酵素の補因子として使われたり、嫌気性呼吸反応に使われたりしている。しかし、高濃度のニッケルイオンは大腸菌にとって有毒なため、大腸菌ではニッケルイオンくみ出し機構、取り込み機構の両方が発達している。この機構が働いて、大腸菌内のニッケルイオンの濃度が維持されている。nikA のニッケルイオン結合部位付近のアミノ酸残基を置換するミュータント実験を行った。等温滴定量測定的手法を利用して、ミュータント nikA のニッケルイオン結合親和性を調べてみた所、ニッケル結合部位付近のアミノ酸残基をたくさんアラニン等に置換しても、ニッケルイオン結合親和性にはあまり影響を及ぼさなかった。このミュータント nikA の結晶構造解析を行った所、今まで知られていたニッケル結合部位とはまったく異なる場所にある2つのヒスジン残基の間にニッケルイオンが結合していることがわかった。これにより、今までの物理化学的測定結果との矛盾が解決した。nikA の2つのニッケルイオン結合部位の生理学的な関連性について議論する。</p>

蛍光タンパク質 Dronpa 構造	2GX0	Released	2007/5/8	オワンクラゲやサンゴ・イソギンチャクに由来する蛍光タンパク質を使って、生体分子をラベルして可視化する技術は広く普及しています。しかし、一般的な蛍光イメージングは、蛍光シグナルの分布の定常状態を観察できますが、その動きに関してはほとんど情報をもちません。我々は、タンパク質を改変することにより、異なる2つの波長の光でラベルと脱ラベルを自在に制御できるフォトクロミック蛍光メカニズムを構造から明らかにした。	
蛍光タンパク質 Dronpa 構造	2GX2	Released	2007/5/8	同上	
環境汚染化合物 の分解酵素 HpcG 構造	2EB4	on hold		環境中において、微生物は植物由来または人工的に合成された芳香族化合物 (AHs) を分解し、炭素循環を維持しており、この能力を利用した応用技術 (バイオレメディエーション) に興味を持たれている。AHs の分解には単環の AHs の分解経路を含む事が多く、その代謝経路、分解産物が特に <i>Escherichia coli</i> で解析され、関連遺伝子群が単離されている。我々は、アポ体の構造を 1.6 分解能で、HpcG の補因子である Mg ²⁺ と阻害剤である oxalate との複合体構造を 1.7 分解能で決定し、メカニズムを解明した。	
環境汚染化合物 の分解酵素 HpcG 構造	2EB5	on hold		同上	
環境汚染化合物 の分解酵素 HpcG 構造	2EB6	on hold		同上	

GT-1	2JMW	on hold	GT-1 は、植物遺伝子の光制御に関与している転写因子である。光信号によってカルシウム/カルモジュリンキナーゼIIが活性化されるとGT-1はリン酸化され、これによってDNA結合能が上昇し、転写の活性化が生じる。得られた構造から、DNAへの結合様式が明らかとなり、リン酸化によるDNA結合能上昇機構に関する手掛かりが得られた。		
GT-1 変異体	2EBI	on hold	GT-1 は、植物遺伝子の光制御に関与している転写因子である。光信号によってカルシウム/カルモジュリンキナーゼIIが活性化されるとGT-1はリン酸化され、これによってDNA結合能が上昇し、転写の活性化が生じる。リン酸化されるトレオニン残基をアスパラギン酸に置換するとDNAへの親和性が高まる。即ちこの変異体はリン酸化状態をミミックできる。変異体の構造・運動性を天然型の構造・運動性と比較する事によって、リン酸化によるDNAへの親和性の上昇機構を示唆できた。		
テロミアDNA	2E4I	on hold	多型性を示す為に構造決定が困難な系であっても、適切な化学修飾を施して平衡を片寄せする事で、構造決定が可能となる事を示した。また得られたテロミアDNAの構造は、癌化と密接に結びついているテロメララーゼの阻害剤の開発に利用できる。		

2. 主要な論文リスト

1. Okuda, M., Horikoshi, M., Nishimura Y. Structural Polymorphism of Chromodomains in Chd1. *J.Mol.Biol.***365**,1047-1062(2007). PDB ID: 2DY7,2DY8
2. Okamura, H., Makino, K., Nishimura, Y. NMR dynamics distinguish between hard and soft hydrophobic cores in the DNA-Binding domain of PhoB and demonstrate different roles of the core in binding to DNA. *J.Mol.Biol.***367**,1093-1117(2007)
3. Kyouhei Arita, Hiroshi Hashimoto, Kumiko Igari, Mayuko Akaboshi, Shinsuke Kutsuna, Mamoru Sato and Toshiyuki Shimizu. Structural and biochemical characterization of a cyanobacterium circadian clock-modifier protein. *J. Biol. Chem.***282**,1128-1135(2007)
4. Baba, D., Maita; N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., Shirakawa, M. Crystal structure of SUMO-3-modified thymine-DNA glycosylase. *J.Mol.Biol.***359**,137-147(2006)
5. Ki, S., Sugihara, F., Kasahara, K., Tochio, H., Okada-Marubayashi, A., Tomita, S., Morita, M., Ikeguchi, M., Shirakawa, M. and Kokubo, T. A novel magnetic resonance-based method to measure gene expression in living cells. *Nucleic Acid Research*,**34**,e51(2006)
6. Yuan Luo, Kyouhei Arita, Monica Bhatia, Bryan Knuckley, Young-Ho Lee, Michael R. Stallcup, Mamoru Sato, and Paul R. Thompson. Inhibitors and Inactivators of Protein Arginine Deiminase 4: In Vitro, In Vivo, and structural characterization. *Biochemistry*,**45**,11727-11736(2006)
7. J.S. Woo, H.Y. Suh, S.-Y. Park, B.H. Oh. Structural basis for protein recognition by B30.2/SPRY domains. *Mol Cell*,**24**,967-976(2006)
PDB ID: 2IHS
8. N. Haruta, Y. Kurokawa, Y. Murayama, Y. Akamatsu, S. Unzai, Y. Tsutsui, H. Iwasaki. The Swi5-Sfr1 complex stimulates Rhp51/Rad51- and Dmc1-mediated DNA strand exchange in vitro. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 823-830 (2006)
9. Hirayama A., Shirota O., Nomura M., Nagadoi A., Nishimura, Y., A protein recycling system for nuclear magnetic resonance-based screening of drug candidates, *Analytical Biochemistry*, **353**, 99-107 (2006)
10. Arita, K., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Yamada, M., Sato, M. Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 5291-5296 (2006) .PDB ID: 2DEY, 2DEW, 2DEX
11. H. Kishida, S. Unzai, David I. Roper, S.-Y. Park and J. R.H. Tame. Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics” *Biochemistry* **45**, 783-792 (2006).
PDB ID: 2EX2,2EX6,2EX8,2EX9,2EXA,2EXB
12. Baba, D., Maita, N., Jee, J. G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. Structure of

- SUMO1-conjugated thymine DNA glycosidase provides mechanistic insight into DNA product release and functional protein transfer. *Nature* **435** 979-82.(2005) PDB ID: 1WYW
13. Nomura M., Uda-Tochio H., Murai K., Mori N. And Nishimura Y., The Neural Repressor NRSF/REST Binds the PAH1 Domain of the Sin3 Corepressor by Using its Distinct Short Hydrophobic Helix, *J. Mol. Biol.*, **354**, 903-915 (2005). PDB ID: 2CZY
 14. Hanaoka S., Nagadoi A. and Nishimura Y., Comparison between TRF2 and TRF1 on their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities, *Protein Sci.* **14**, 119-130 (2005). PDB ID: 1VF9,1VFC
 15. Enokizono Y., Konishi Y., Nagata K., Ouhashi K., Uesugi S., Ishikawa F. and Katahira M., Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D, *J. Biol. Chem.*, **280**, 18862-18870 (2005). PDB ID: 1X0F
 16. Watanabe N, Arai H, Iwasaki J, Shiina M, Ogata K, Hunter T, Osada H Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005 Aug 16**;102(33):11663-8.
 17. Naoe Y, Arita K, Hashimoto H, Kanazawa H, Sato M, Shimizu T Structural characterization of calcineurin B homologous protein 1. *J Biol Chem.* **280**, 32372-32378 (2005) .PDB ID: 2CT9
 18. Hashimoto H., Shimizu T., Imasaki T., Kato M., Shichijo N., Kita K., Sato M. Crystal structures of type II restriction endonuclease EcoO109I and its complex with cognate DNA. *J Biol Chem.* **280(7)**:5605-5610. (2005). PDB ID: 1WTD,1WTE
 19. Akashi, S., Osawa, R., and Nishimura, Y. Evaluation of protein-DNA binding affinity by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 116-125 (2005).
 20. Itoh Y., Unzai S., Sato M., Nagadoi A., Okuda M., Nishimura Y., Akashi S. Investigation of molecular size of Transcription Factor TFIIE in solution Proteins : *Structure, Function, and Bioinformatics*, **61**, 633-641 (2005).
 21. Arita K., Hashimoto H., Shimizu T., Nakashima K., Yamada M and Sato M. Structural basis for Ca²⁺-induced activation of human PAD4 .*Nature Struc. and Mol. Biol.*, **11**, 777-783 (2004). PDB ID: 1WD8,1WD9,1WDA
 22. Okuda M., Tanaka A., Arai Y., Satoh M., Okamura H., Nagadoi A., Hanaoka F., Ohkuma Y. and Nishimura Y., A Novel Zinc Finger Structure in the Large Subunit of Human General Transcription Factor TFIIE, *J. Biol.Chem.*, **279**, 51395-51403 (2004) .PDB ID: 1VD4
 23. E-J Woo., Y-G. Kim., M-S. Kim., W-D. Han., S. Shin., H. Robinson., S.-Y. Park., B-H. Oh. Structural Mechanism for Inactivation and Activation of CAD/DFP40 in the Apoptotic Pathway, *Mol. Cell*, **14**, 531-539 (2004). PDB ID: 1V0D
 24. Y-S. Heo., S-K. Kim., C.I. Seo., Y.K. Kim., B-J. Sung., H.S. Lee., S.-Y. Park., J.H. Kim., K.Y. Hwang., Y-L. Hyun., Y.H. Jeon., S. Ro., J.M. Cho., T. G. Lee.

- C-H, Yang, Sturctural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125, *EMBO J.*, **23**, 2185-2195 (2004). PDB ID: 1UKH,1UKI
25. Nagae M, Nozawa A, Koizumi N, Sano H, Hashimoto H, Sato M, and Shimizu T. The crystal structure of the novel calcium binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 42240-42246 (2003). PDB ID: 1UHN
26. Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Tochio, H., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase: characterization of a putative adaptor-binding domain. *J Biol Chem.* **279** 50060-50068 (2004). PDB ID: 1WLF
27. B-J. Sung, K.Y. Hwang, Y.H. Jeon, J.I. Lee, Y-S. Heo, J.H. Kim, J.M. Yoon, Y-L. Hyun, E. Kim, S.J. Eum, S.-Y. Park, J-O. Lee, T.G. Lee, S. Ro, J.M. Cho. Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. *Nature* **425**, 98-102. (2003). PDB ID: 1UDT,1UDU,1UHO
28. Miyanoiri, Y., Kobayashi, H., Imai, T., Watanabe, M., Nagata, T., Uesugi, S., Okano, H. and Katahira, M. Origin of higher affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than that of the C-terminal one of a mouse neural protein, Musashi1, as revealed by comparison of their structures, modes of interaction, surface electrostatic potentials and backbone dynamics. *J. Biol. Chem.*, **278**, 41309-41315. (2003) . PDB ID: 1UAW