

5 - 7 細胞内シグナル伝達

グループ名 個別的解析プログラム名(細胞内シグナル伝達)

中核機関名 北海道大学大学院薬学研究院

代表者名 稲垣 冬彦

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

構造研究、機能研究、基盤技術開発を含め、当グループの事業は順調に遂行された。当初、5年間で60個のタンパク質の構造決定を予定していたが、平成19年4月末現在で、116個のタンパク質の構造を決定し、80個のタンパク質についてPDB登録を行った。当グループの研究の第1の特長は、細胞内シグナル伝達の中でも生物学的に重要なシステムに焦点を絞り、関与する蛋白質群について立体構造を決定するとともに、サブ機関と連携して機能解析を行い、調和のとれた構造生物学的研究を遂行した点である。研究項目として(1)自然免疫の構造生物学(好中球活性酸素発生系とインターフェロン産生系の構造生物学)、(2)細胞接着の構造生物学、(3)細胞極性の構造生物学、(4)細胞増殖の構造生物学、(5)細胞分化の構造生物学、(6)飢餓シグナルの構造生物学の6項目について研究を行った。また、平成17年度より、(7)疾患関連タンパク質を対象とした創薬ストリームラインの構築を開始した。当プロジェクトでは、真核生物由来のタンパク質、特に哺乳動物由来のタンパク質が対象となるため、当初よりタンパク質発現、構造解析の困難は予期されたが、班員の努力により予定以上の数のタンパク質について構造解析がおこなわれ、構造を基盤とした機能研究が進展した。第2の特長はタンパク質の構造解析に必要な基盤技術の開発を並行して進めた点である。中核機関ではNMR構造解析の自動化を目的とし、自動帰属プログラムOliviaの開発を行なった。構造解析エンジンとしてCYANAをドッキングし、甲斐荘グループにより開発されたSAILアミ酸を用いて作製したSAILカルモジュリンを対象として解析をおこなった結果、短時間で高精度のNMR構造を得ることができた。SAIL、Oliviaともに我国発のオリジナル技術であり、国際的なdefacto standard技術として今後展開する予定である。タンパク質発現はヒト由来タンパク質を対象とした構造研究のボトルネックとなっている。この問題については、カイコ蛹による発現系を検討した。カイコ蛹を培養槽として用いるため、大量調製も可能である。大腸菌では発現ができなかったヒト由来タンパク質10種類について検討し、可溶性タンパク質としての発現を確認した。ヒト由来タンパク質の大量調製法の確立は次期プロジェクト「ターゲットタンパク質」でも必須である。第3の特長は当グループでは、細胞生物研究者、機能解析研究者と中核機関を中心とする構造生物研究者との間で密接な共同研究体制が構築され、国際的にも評価の高い構造研究がグループ内で推進された点である。第4の特長は平成17年度より、北大生物系研究者、医学系研究者、創薬研究者を加えて、疾患関連タンパク質を対象とした創薬ストリームラインの構築を始めた点である。中核機関では以前より北大医学系研究者からの依頼を受け、疾患関連タンパク質の構造研究を進め、北大の構造生物学センターとしての役割を果たしてきたが、平成17年度より、本プロジェクトに項目(7)を新たに加え、北大より10名の研究者が当プロジェクトに参加した。原ガンタンパク質Crk、自然免疫におけるアダプタータンパク質TRIF/TICAM-1、胃ガンの原因とされているピロリ菌由来CagAタンパク質の構造機能研究が推進された。

(1) 自然免疫の構造生物学的解明(好中球活性酸素発生系とインターフェロン産生系)

好中球活性酸素発生系 - 好中球活性酸素発生系は侵入した病原性微生物を食胞内に取り込み、活性酸素を発生し、殺菌するシステムであり、自然免疫の最前線において、重要な役割を果たしている。活性酸素は生体にとっても危険なため、その発生は厳密に制御されている必要がある。活性酸素の発生には、NADPH酸化酵素の細胞質因子複合体が膜タンパク質Cyt b₅₅₈(gp91^{phox}およびp22^{phox}複合体)と結合すること、その結合には、細胞質因子p47^{phox}とp22^{phox}の細胞質領域のプロリンに富む領域との結合、およびp40^{phox}のPXドメインとファゴソーム膜上のPI(3)Pとの結合が必須といわれている。我々は、p47^{phox}

タンデム SH3 ドメイン (自己阻害領域を含む) の結晶構造 (Genes Cells, 2004b) と溶液構造 (J. Biol. Chem., 2004c)、およびタンデム SH3 ドメインと p22^{phox} 細胞質ドメインのプロリンに富む領域との複合体の構造を解明し (J. Biol. Chem., 2006g)、休止時に p47^{phox} は閉構造をとること、活性時には、自己阻害領域がリン酸化を受け、p47^{phox} は閉構造から開構造へと構造変化を行う機構を解明した。ついで、p40^{phox} (PX-SH3-PB1) 全長の構造を X 線結晶構造解析により決定した。PX ドメインは PB1 ドメインとの分子内相互作用により、PI(3)P と結合できないようにマスクされていた。相互作用を破壊した変異体では、p40^{phox} のファゴソームへの局在および顕著な活性酸素の発生がみられた (EMBO J., 2007b)。P40^{phox} には、活性化を検知して開構造をとらせる機構が内在することを示している。以上、好中球活性酸素発生の厳密な制御に必要な p47^{phox}、p40^{phox} の協調的な構造変化を明らかにした。

インターフェロン産生系 - IRF-3 (Interferon regulatory factor 3) はウイルス感染に応答し、I 型インターフェロン誘導を行う転写因子である。ウイルスに対する自然免疫応答として生体防御に重要な役割を果たしている。我々は IRF-3 の C 末端側転写調節ドメインの構造を決定した。この構造に基づき、リン酸化による二量体形成、核移行、CBP/p300 との複合体形成にいたる一連の IRF-3 活性化機構について構造的な観点より考察を加えた。興味深い点は、IRF-3 転写調節ドメインは構造的に SMAD と類似している点である。リン酸化による活性化機構も共通しており、脊椎動物において、IRF-3 は SMAD より進化し、自然免疫のシグナル伝達分子としての役割を果たすようになったと考えられる (Nature. Struc. Biol., 2003e)。

IRF-3 の活性化には、細胞内ウイルスレセプター RIG-I による RNA の認識が必要である。限定分解により RIG-I の RNA 認識ドメインを同定し、構造を決定するとともに、ウイルス由来の RNA のみが RIG-I により認識される機構を明らかにした。また、TLR3 下流においてインターフェロン産生および炎症反応に関わる TRIF/TICAM-1 の N 末端領域を限定分解により同定するとともに、その構造を解明した。

(2) 細胞接着の構造生物学的解明

ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) タンパク質は、その N-末端の FERM ドメインで様々な接着分子などの膜タンパク質の細胞内ドメインに特異的に結合して、これらと細胞骨格を連結する代表的な足場タンパク質であり、細胞内から細胞接着を支えるとともに、細胞内シグナル伝達の起点となる重要なタンパク質である。

これまでに、ラデキシン FERM ドメインと免疫グロビュリン (Ig) スーパーファミリーの代表的接着分子である ICAM-2 (intercellular adhesion molecules-2) (EMBO J., 2003a) やシアロムチンファミリーの接着分子 PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) 更に、イオンチャネルのアダプタータンパク質である NHERF-1 (N⁺/H⁺ exchanger (NHE) regulatory factor) ならびに E3KARP (NHE3 kinase-A regulatory protein) (Structure, 2006c) との複合体の結晶構造を決定して、分子認識の詳細と結合による機能制御を世界に先駆けて明らかにした。

(3) 細胞極性の構造生物学的解明

PB1 ドメインの構造と機能 - PB1 ドメインは aPKC、Par6、Cdc24、Bem1 等細胞極性を制御するタンパク質に共通してみられるドメインであり、極性発現、維持に必須な役割を果たしている。構造解析の結果、PB1 ドメインはユビキチンフォールドをとること、挿入部位に結合領域を提示することにより、新たな相互作用機能を付加している事を見出した。酸性領域を結合部位とするタイプ 1 およびタイプ 1 の結合領域と反対側の面に存在する塩基性領域を結合部位とするタイプ 2 の PB1 ドメイン間でヘテロ複合体を形成すること (EMBO J., 2003, J. Biol. Chem., 2004)、さらに PB1 ドメイン相互の特異的な分子認識を可能とする分子機構について、構造面より明らかにした (J. Biol. Chem., 2005)。PB1 ドメインの発見、構造解析、機能解析まで一貫して、当グループ内での共同研究を通して行われたものであり、国際的にも我が国発のドメインとしての評価をうけている。

CAP-Gly ドメインの構造と機能 - 細胞骨格からみた細胞極性では、微小管制御タンパク質の分子認識と機能制御が最重要課題となる。微小管制御タンパク質の代表である CLIP-170 (cytoplasmic linker

protein-170kDa) の微小管認識を明らかにするために、微小管認識ドメインである N-末端領域に存在する 2 つの CAP-Gly ドメイン (CAP-Gly 1 と CAP-Gly 2) の構造を決定した。ドメイン表面の電荷分布の特徴と、変異実験から微小管との相互作用部位を特定した。また、微小管との強い相互作用は CAP-Gly 1 ではなく、CAP-Gly 2 が担うことを明らかにした。さらに、CAP-Gly 2 とチューブリン C 末端配列との複合体の構造を NMR により決定し、特異的な認識機構を明らかにした。

(4) 細胞増殖の構造生物学的解明

Grb2 SH2 ドメインと特異的阻害剤の複合体の構造 - Grb2 SH2 ドメインは、標的ペプチドがターン構造を作って結合する点で他の SH2 と標的ペプチドとの認識とは異なる。Grb2 を介するシグナルは、乳ガン等で亢進していることが報告されており、Grb2 SH2 の特異的阻害剤は抗ガン剤として有望である。Grb2 SH2 と標的ペプチドの複合体の構造に基づいて設計された阻害剤 (NIH T. Burk 博士との共同研究) と SH2 との特異的認識について明らかにした。SH2 と阻害剤はイオン相互作用、疎水性相互作用を介して安定な複合体を形成していた。現在この薬剤はフェーズ 2 の臨床試験まで進んでいる。全重水素化 SH2 を用いることにより、従来困難であった阻害剤のシグナル帰属を確実に行うことができ、高分解能の複合体の構造を決定する事ができた。阻害剤との複合体について、高精度の構造解析を行う方法論を提出した。なお、今回の構造結果に基づき、より高親和性の阻害剤の設計が NIH グループにより進められている。

Crk タンパク質の構造と制御機構 - CrkI(SH2-SH3)、CrkII(SH2-nSH3-cSH3)はスプライシングアイソフォームである。CrkII は細胞骨格の調節に関わっているが、CrkI は細胞のガン化に働くことが報告されている。また、CrkII がリン酸化を受けると (pCrkII) CrkII を介するシグナルは遮断される。シグナル伝達における Crk タンパク質の機能の差異を構造を基盤として明らかにするために、我々は NMR 法を用いて、CrkI、CrkII、pCrkII の構造を決定した。CrkI はフレキシブルな分子であり、SH2、SH3 の標的ペプチドの結合部位は露出している。一方、CrkII では、SH3 間のリンカー部位が糊として、3 つのドメインをまとめ、nSH3 の結合部位は SH2 により覆われていた。pCrkII ではリン酸化部位に CrkII の SH2 が結合していた。このような構造の差異は X 線小角散乱や CrkI、CrkII、pCrkII と標的タンパク質との結合実験の結果とも対応する。CrkI、CrkII の発ガン性に対する顕著な違いは nSH3 ドメインの露出度の差異として説明できる。この結果を実証するために、CrkII のリンカー部分に変異を加え、開構造をとらせると、CrkI 同様、細胞の形態変化を誘起することが確かめられた (Nat. Struc. & Mol. Biol., 2007d)。以上の結果は、Crk タンパク質の永年の謎を明らかにした点で評価できる。

(5) 細胞分化の構造生物学的解明

細胞周期を G1/S チェックポイントで止め、細胞分化に導く抗増殖タンパク質が近年注目されている。この中でも BTG1/Tob ファミリータンパク質は SMAD、CAF-1、ERK と結合し転写や翻訳を抑制する。我々は Tob と CAF-1 複合体の構造を明らかにした。BTG/Tob ファミリーに保存された配列は CAF-1 との結合面を形成していた。Tob は poly-A 結合タンパク質(PABP)と結合すること、CAF-1 はデアデニラーゼ活性(RNA)を有する事を考慮すると、Tob は足場蛋白として PABP と CAF-1 を結びつけ、mRNA の poly-A テールを分解することにより、細胞増殖を抑制している可能性が示唆された。

(6) 飢餓シグナルの構造生物学的解明

オートファジーは大隅グループにより初めて見出された現象である。飢餓に伴いオルガネラや細胞質成分を取り囲むようにオートファゴソームが形成され、リソソーム/液胞と融合する。リソソーム/液胞内に放出されたオルガネラや細胞質成分は加水分解酵素により分解され、再利用される。しかし、最近の研究により、飢餓応答だけではなく、神経変性、細菌感染、免疫提示等にも重要な役割を果たしていることが報告されている。オートファゴソームの形成には Atg タンパク質群が関与し、特に Atg8 の脂質化 (PE 化) が必須である。オートファジーの構造生物学的解明を目的とし、コンジュゲート系に関与する蛋白質の発現、精製、結晶化を行ない、7 種類のタンパク質について良好な結晶を得た。コンジュゲート系として、LC3 (Atg8 ヒトホモログ) (Genes Cells, 2004e)、Atg12 (Autophagy, 2005b)、Atg3 (J. Biol.

Chem., 2007c)、Atg4 (J. Biol. Chem., 2005d)、Atg5-Atg16 複合体 (J. Biol. Chem., 2007a)の構造を明らかにした。興味深いことに、Atg8、Atg12 ともにユビキチンフォールドをとっていた。Atg8 のプロセス酵素である Atg4 の構造を決定した。Atg8 の結合により活性部位が開構造をとり、C 末端テールが活性部位により認識される機構を明らかにした。中核機関で決定した Atg タンパク質の構造に基づき、大規模な機能解析が大隅グループと中核機関の共同でおこなわれた。また、調製した蛋白質を用いて抗体の作成が行われた。これらの抗体はオートファジーの機能研究にとって重要な役割を果たしている。

膜新生の起点となる PAS (pre-autophagosomal structure) には、多くのタンパク質の集積がみられること、時間的、空間的なタンパク質の集積が膜新生を誘起することが大隅グループにより明らかにされ、中核機関において、PAS 形成の構造生物学的解明を目的として、大規模なタンパク質発現が行われている。オートファジー研究は、日本発の細胞生物学研究として国際的評価に高い評価を受けており、PAS の構造生物学的解明は膜新生の機構解明に不可欠である。

(7) 疾患関連タンパク質を対象とした創薬ストリームラインの構築

平成17年度より当グループに北大生物系、医学系研究者、創薬研究者10名を加え、疾患関連タンパク質を対象とした構造生物学研究の展開と創薬ストリームラインの構築を目指した。自然免疫に関わるタンパク質群、原ガン遺伝子産物 CrkII、胃ガンの原因となるピロリ菌 CagA 等の構造解析を行い、RNA アプタマー等を用いた創薬研究へと結びつけることを目的としている。Crk タンパク質の研究はこのプロジェクトの一環として行われた成果である。

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	80	16
(2)構造解析を終了したがPDB未登録のタンパク質の数	36	10
(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	0	

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	201	22

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)	4件(内1件は5月に)	1件(5月出願)
特許出願数(海外)	2件	1件
(2)特許登録数(国内)	1件	0件
特許登録数(海外)	0件	0件

<p>(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>	<p>平成 14 年 4 月～平成 19 年 3 月：7 件</p> <p>NMR 解析プラットフォーム Olivia をホームページで公開している。国内外の 150 以上の大学、研究機関からのアクセスがあり、支援を行っている。ソフトウェアハウス STS と共同で Olivia の仕様マニュアル、ユーザーマニュアルを作成した。Web 上での公開を検討中である。</p> <p>Olivia をバリアン社製 NMR システムのバンドルソフトとして提供する可能性についてバリアン社 (Palo Alto, USA) より打診され、バリアン本社で開催されたユーザーズミーティングにおいて Olivia のデモを行ない、高い評価を得た。今後、世界展開を行い、Olivia を国際標準ソフトとして展開したい。</p> <p>片倉工業とカイコ蛹を用いたヒト由来タンパク質発現について共同研究を行った。大腸菌での発現が確認されなかったか、不溶性にしか発現されなかった 10 種類以上のヒト由来タンパク質の発現をカイコ蛹を用いて行い、良好な結果を得た。虫体由来のタンパク質と目的タンパク質を分離するための精製系を構築することが急務となっている。</p> <p>大手食品会社より提供されたタンパク質 3 種(150 - 200 残基)の構造解析を共同研究として行った。Olivia を用いてスペクトル解析をおこない、良好な結果を得た。Olivia の産業応用を計るとともに、NMR 構造決定のハイスループット化への道筋を付けた。</p> <p>大手製薬会社より依頼を受け、研究員の受け入れを行った。NMR 測定、解析、構造決定までの一連の過程について教育を始めた。</p> <p>効率的なタンパク質リン酸化手法を用いて、リン酸化タンパク質の作製を島津製作所との共同研究として開始した。</p>
<p>(4)成果の産業移転に関する具体的な例</p>	<p>Olivia の評価が高まり、産業界から使用したいとの要望が増えている。そのため、チュートリアルやマニュアルを充実し、NMR 教育を含めた産業界への支援体制を強化した。また、バリアン社製 NMR 装置へのバンドルソフト化が実現すれば、本邦発の defacto standard なソフトとなる。今後も努力を続けていきたい。</p>
<p>(5)出願した特許の具体的な例</p>	<p>NMR シグナル帰属支援システム - 帰属過程とスペクトルを結びつける言語を開発した。これにより帰属過程を追えるようになり、初心者でも熟練者と同等の正確な帰属が可能となった。(国内 / 特許第 3697948 号)</p> <p>シグナル伝達活性を有する細胞質蛋白質の活性制御(北大) - 好中球活性酸素発生系の細胞質因子 p47 と p67 を融合し、活性酸素発生能を持つ新規タンパク質を作った。このタンパク質のリンカーに Grb2 結合ペプチド配列を組み込み、Grb2 の有無により活性酸素発生能を人為的にオン・オフするシステムを作った。(国内 / 特願 2003-409281)</p> <p>NADPH オキシダーゼ活性を阻害するポリペプチド(北大) - 活性酸素発生は組織に重大な損傷を与える。炎症反応では直ちに活性酸素の発生をとめる必要がある。我々は活性酸素発生を抑えるペプチドを見出した。(国内 / 特願 2003-409282)</p> <p>抗炎症作用を示す薬剤およびその製造方法(九大) - システインを介した 2 量体 HLA-G が LIR1 と LIR2 に対して単量体よりも強く結合し、シグナルを 100 倍以上効率よく伝達することを見いだした。高機能活性を有する HLA-G の 2 量体分子を用いて、臓器、骨髄移植における免疫抑制効果を増</p>

	<p>進することが期待できる。また、不妊症治療への応用も考えられる。(米国仮出願 No.60/699,783)</p> <p>修飾蛋白質の製造方法(北大) - 基質とリン酸化酵素に結合モジュールを導入し、効率的にリン酸化を行うシステムを構築した。リン酸化効率を 10 - 50 倍程度に向上することができた。(国内 / 特願 2006-043310)</p> <p>同上の内容について PCT 出願を行った (PCT/JP2006/324761)。</p> <p>効率的なタンパク質の連結法 - 結合モジュールを導入することにより、効率的にインティン反応をおこなう系を構築した。(国内 / 特願 2007-121925)</p>
<p>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>	
<p>本プロジェクトにおいて、X 線結晶構造解析システム、800MHz および 500 MHz NMR 低温プローブ各一式、全自動タンパク質結晶化観察解析システム一式を購入した。</p> <p>のべ 15 名のポスドクを雇用した。そのうち、エール大学博士研究員 (1 名)、オックスフォード大学博士研究員(2 名)として留学し、1 名は帰国後、熊本大学助手として採用され、1 名は国内の他大学の博士研究員として採用された。また、1 名のポスドクは、北海道大学助手として採用された。その他の研究員は蛋白 3000 終了後は、他の研究機関のポスドクおよび中核機関あるいはサブ機関において、他の研究費により雇用されている。</p>	
<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</p>	
<p>(1) Olivia による NMR 構造解析の自動化(北大)</p> <p>NMR による構造解析の HTP 化をはかることを目的として、自動帰属機能を備えた Olivia の開発を行っている。自動帰属の流れをプログラム化し、評価をおこなった。また CYANA とのインターフェースを作成し、実際の構造解析を行った。Olivia を SAIL 蛋白質対応に修正し、SAIL カルモジュリンスペクトルについて解析を行った結果、自動帰属、マニュアル帰属を含めて短時間 (2 日間) で 95% 以上の主鎖、側鎖の帰属が終了した。ついで、CYANA を用いて SAIL カルモジュリンの構造決定を行った。1 日程度の構造計算で高精度のカルモジュリンの構造を得た。</p> <p>(2) プロジェクション-リコンストラクション法(北大)</p> <p>プロジェクション-リコンストラクション法によるデータ解析を Olivia 上で行えるようにするとともに、最適の測定条件を探索するために、Olivia から NMR 測定を制御できるようにした。これにより、従来の測定時間を 1/5 程度に短縮することが可能となった。測定と主鎖帰属をリアルタイムで行うことが可能となった。</p> <p>(3) SAIL 法を用いた高分子量タンパク質の高精度構造決定 (SAIL テクノロジーズ社)</p> <p>SAIL タンパク質ではプロトン密度が低くなるため、高分子量タンパク質でも実効分子量半分程度のタンパク質と同程度の線幅を与えるメリットがある。今回、分子量 43 kDa のマンノース結合タンパク質について SAIL 法を用いて構造を決定した。43 kDa タンパク質でも NMR 法により高精度で構造を決定できることを実証した。この結果は NMR 法の従来の分子量の壁を破るものであり、SAIL 法の評価を決定的にする業績である。</p> <p>(4) カイコサナギを用いたタンパク質発現(北大)</p> <p>カイコサナギを用いたタンパク質発現系をたちあげた。大腸菌では発現できないか不溶性タンパク質としてしか発現しない哺乳動物由来の蛋白質 10 種類についてカイコサナギによる発現を行った。発現検討を行った結果、10 種類すべてについてタンパク質の発現を確認した。カイコ由来のタンパク質との分離、精製系の確立、大量調製法の確立を進めている。次期プロジェクトの課題であるヒト疾患関連タンパク質の調製法としてカイコサナギによるタンパク質調製は有望である。</p> <p>(5) 相互作用モジュール導入による効率的なリン酸化手法の開発(北大)</p> <p>基質の局所濃度を高めることは酵素反応を効率的に行うために必要である。リン酸化酵素として、Abl</p>	

を用い、基質には Abl SH3 の結合配列であるプロリンに富むペプチドを組み込んだ。相互作用モジュールを組み込むことにより、Abl 周りの基質の局所濃度は増加し、10 - 50 倍程度、リン酸化反応が亢進した。相互作用モジュールとして、いくつかの組み合わせが可能であるが、いずれの場合も数十倍の効率化を図ることができた。実際、CrkII のリン酸化体をこの方法により大量調製し、構造解析を行う事ができた。

(6) 相互作用モジュールの導入によるインティン反応の効率化(北大)

インティン反応は領域特異的にラベルを行うことができる点で、高分子量 NMR 解析に必要である。インティン反応を効率的に行わせるため、強固な複合体を形成する PB1 ドメインを相互作用モジュールとして用いた結果、従来法ではインティン反応を確認できなかった場合でも、効率的にインティン反応が進んでいることを確認した。相互作用モジュールを組み込むことにより、局所濃度を高め、酵素反応を効率的に行えることを実証した。

7. タンパク質の機能解析に関する成果の概要について

オートファジーは我国発の細胞生物学分野の重要な発見である。大隅博士はオートファジーに關与するタンパク質として 30 個のタンパク質を同定した。これらのうち、8 個のタンパク質はユビキチン結合系に類似した二つのシステムに属し、それぞれの再構成系を確立した。再構成系を利用して *in vitro* での Atg8 の PE 化および Atg-12-Atg5 の結合体の作成が可能となった。中核機関と大隅グループの間では密接な共同研究が展開されており、中核機関で決定された構造に基づき、大規模な変異体解析、機能解析が進行している。オートファジーの分子機構およびオートファゴソーム膜新生の機構を共同のもとに解明する。現在、オートファゴソーム膜形成の PAS(preautophagosomal structure)に集積するタンパク質群の解析が精力的に行われ、中核機関で大量発現系の検討が行われている。今後、構造生物学的研究に展開する。住本博士は好中球活性酸素発生系における p40^{phox} の役割を明らかにした。また、好中球以外にも活性酸素発生系は存在し、活性酸素がシグナル分子としての機能を果たしていることを示した。これらのタンパク質についても中核機関と共同で構造研究へ展開している。武内博士は p40^{phox} に結合するタンパク質として細胞接着に関するタンパク質を見出した。また、カイコ細胞系を用いた機能解析法を提案している。伊藤博士は酵母に含まれる PX、SH3 の網羅的な機能解析を進め、神田グループの構造研究とドッキングした。また、出芽酵母の極性発現について中核機関との共同研究が進展している。田中博士は CrkII および変異体の機能解析を行い、中核機関の構造研究と連携した。藤博士は、生物情報学の立場から、プロジェクト内で構造解析が行われているタンパク質についてドメインの切り出し、機能推定をおこない、本プロジェクトを支援した。

8. これまでの評価に対する反映状況について

細胞内シグナル伝達グループは構造解析と機能解析が調和の取れた研究展開をしていること、対象となる蛋白質も生物学的に重要であるとの評価をいただき、これまでの路線に沿って、研究を展開してきた。オートファジーの構造解析、好中球活性酸素発生系、インターフェロン産生系の構造生物学は、高い評価を受けており、研究は順調に推移した。大きな成果を出せるように結果を取りまとめている。カイコ発現系、Olivia の開発は研究基盤開発であり、その独自性を評価いただいた。16 年度評価として、重要なタンパク質について逆プロテオミクスによるリガンド探索を進めるように勧められた。これについては平成 17 年度より項目 疾患関連タンパク質を対象とした創薬ストリームラインの構築を立ち上げ、北大医学系研究者、創薬研究者を加えた研究組織を作った。これにより創薬研究への方向性を明確にした。また、平成 16 年度の評価委員会の指摘を受け、研究組織の再編を行なった。

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)

構造解析の数値目標 60 に対し、80 個のタンパク質の構造を決定し、PDB に登録した。真核生物、特にヒト由来のタンパク質かつ重要な機能を果たしているタンパク質を構造解析の対象としているため、構造解析数としては満足いくものと考えている。論文についても、構造論文、機能論文の多くが一流国際誌へ掲載されていることも、当グループの研究能力の高さを示すものと考えているが、さらなる研究面での質を向上するように努めたい。特許や産学連携について、グループ内での啓蒙活動をおこなった結果、5 件の特許申請が行われた。グループの特許に対する意識を高め、特許化できる研究を掘り起こすことが重要と考えている。5 年間のプロジェクトにおいて、中核機関が半数のタンパク質の構造を解析し、技術開発の点でも 4 点の特許申請を行った。中核機関としての責任を果たしたと考えている。

再委託先一覧

14 - 16 年度	機関名 (課題名)	業務担当者	17 - 18 年度	機関名 (課題名)	業務担当者
中核	北海道大学大学院薬学研究科 (細胞内シグナル伝達)	稲垣冬彦	中核	北海道大学大学院薬学研究科 (細胞内シグナル伝達)	稲垣冬彦
				北海道大学大学院薬学研究科 (核酸を基盤とした創薬)	松田 彰
				北海道大学大学院薬学研究科 (18年度 先端生命科学研究院) (膜動態と疾患研究)	五十嵐靖之
				北海道大学大学院医学研究科 (18年度 先端生命科学研究院) (自然免疫の機構解明)	瀬谷 司
				北海道大学大学院医学研究科 (ユビキチン修飾系と疾患)	畠山鎮次
				北海道大学大学院医学研究科 (Crk の機能解析)	田中伸哉
				北海道大学遺伝子病制御研究所 (T 細胞、NK-T 細胞の分化の機構解明)	小野江和則
				北海道大学遺伝子病制御研究所 (平成 18 年 3 月に退官) (癌および免疫におけるプロテインホスファターゼの機能解明)	菊池九二三
				北海道大学遺伝子病制御研究所 (T リンパ球活性化における接着機構の解明)	上出利光
	北海道大学遺伝子病制御研究所 (ピロリ菌による発ガン機構の解析)	畠山昌則			
	北海道大学遺伝子病制御研究所 (細胞極性の機構解明)	田中一馬			
再委託	奈良先端科学技術大学院大学 (X 線結晶構造解析によるシグナル伝達タンパク質の構造決定)	箱嶋敏雄	再委託	奈良先端科学技術大学院大学 (X 線結晶構造解析によるシグナル伝達タンパク質の構造決定)	箱嶋敏雄
再委託	東京都立大学大学院理学研究科 (新規同位体標識技術を用いる蛋白質構造決定)	甲斐荘正恒	再委託	Sail テクノロジーズ(株) (18年4月より名大理特任教授) (新規同位体標識技術を用いる蛋白質構造決定)	甲斐荘正恒
再委託	九州大学生体防御医学研究所 (膜近傍のシグナル伝達系、レセプター下流のシグナル伝達の構造ゲノム研究)	神田大輔	再委託	九州大学生体防御医学研究所 (膜近傍のシグナル伝達系、レセプター下流のシグナル伝達の構造ゲノム研究)	神田大輔
再委託	筑波大学応用生物化学系 (分子認識を介するシグナル伝達の構造解析研究)	田中俊之	再委託	九州大学生体防御医学研究所 (好中球活性化酸素発生系の機能研究)	住本英樹

再委託	九州大学生体防御医学研究所 (好中球活性酸素発生系の機能研究)	住本英樹	再委託	東京大学大学院新領域創成科学研究科 (相互作用構造基盤解明への分子遺伝学的アプローチ)	伊藤隆司
再委託	東京大学大学院新領域創成科学研究所 (相互作用構造基盤解明への分子遺伝学的アプローチ)	伊藤隆司	再委託	大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (オートファジーに必須な Apg タンパク質群の網羅的機能解析)	大隅良典
再委託	自然科学研究機構・基礎生物学研究所 (オートファジーに必須な Apg タンパク質群の網羅的機能解析)	大隅良典	再委託	九州大学生体防御医学研究所 (細胞内シグナル伝達の構造ゲノム)	藤 博幸
再委託	名古屋大学大学院理学研究科 (蛋白質大量産生系の確立と細胞接着分子群の構造解析)	武内恒成	班友	㈱エーザイ カン研究所 (18年度より京都府立医大) (蛋白質大量産生系の確立と細胞接着分子群の構造解析)	武内恒成
再委託	京都大学化学研究所 (細胞内シグナル伝達の構造ゲノム)	藤 博幸			
再委託	プロテオーム研究所 (サイトカイン類と受容体細胞外部位の効率的発現)	三浦謹一郎			

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

ホームページを立ち上げ、各研究機関の研究内容、研究進捗状況、業績リストを作成し、ホームページに掲載し、グループ内外に広く情報を発信した。またグループ内では班会議を開催し、密度の高い議論を行い、班員相互の理解と新しい共同研究体制を作り上げた。中核機関は個々のサブ機関と共同研究を密に行っており、年に3 - 4回、個別に会合を持つ等、研究連絡につとめた。特許化等についても専門家からの講義を受け、班員の啓蒙につとめた。産業移転は具体的に進められていないが、某大手食品会社と Olivia を中心とした産業連携を始めた。また、バリアン社からも、バンドルソフトとしてユーザーへ提供したいとの話も進んでいる。わが国初の本格的なソフトとして国際的にも評価されるよい機会なので、積極的に対応していきたい。また、評価委員会の指摘を受け、大野茂男教授(横市大)らグループ外の細胞内シグナル伝達グループとの研究連携も進めた。

プロジェクト遂行については、中核機関が大部分の責任を持って行った。中核機関のリーダーシップのもとに機能研究グループとの連携はきわめて良好である。今後、構造解析を行っているサブ機関に対し、生物学的に意義のある蛋白質の構造決定を行ない、更なる創薬への展開を図る。また、特許申請についても強力に進めていくつもりである。その意味で中核機関のリーダーシップを発揮するように努めている。課題 創薬ストリームラインの構築については、今後、産業界とも連携をとることが必要である。第1回産学連携フォーラムを札幌で開催し、300人近い参加者があり、蛋白3000の広報活動に役立った。

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

科学技術の発展および産業応用に与えた効果については、直接的な成果は本プロジェクトより生まれていない。しかし、Olivia は NMR 構造解析のプラットフォームとして将来、産業界に重要な貢献を果たすものと考えられる。我が国の製薬メーカーの NMR 研究者の支援体制を構築することにより、産業応用に与える効果は将来計り知れない。また、バリアン社製 NMR 装置のバンドルソフトとなれば、世界標準として多くの研究者に使用されることになる。カイコ蛹を用いたヒト由来タンパク質発現系についても、種々の工夫により、着実に使える系となってきた。より困難なタンパク質を対象とした研究を行う必要があるが、種々の発現系の中で、カイコ蛹は十分特徴を持った発現系である。オートファジを含め、本プロジェクトで対象としたタンパク質は基礎生命現象を担うものが多く、学術的評価の高いものであり、将来、はかりしれない応用が出てくる可能性は高い。対費用効果を考えれば、本プロジェクトの成果の評価は高いものと考えている。

12. 各年度の委託費 (千円)	14年度	15年度	16年度	17年度	18年度	計
	257,000	417,600	216,000	238,000	230,000	1,358,600
設備費(千円)	110,916	167,268	4,749	36,561	9,061	328,555
人件費(千円)	9,180	68,759	65,490	55,977	71,133	270,539
運営費(千円)	122,976	160,102	129,004	124,674	130,545	667,301
管理費(千円)	13,928	21,471	16,757	20,788	19,261	92,205

(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)
1	GCN2p の GI (RWD) ドメイン	2YZ0	Released	2007.05.08	GI ドメインは進化的に保存されたドメインであり、GCN2 の N 末端側に存在する。飢餓時を検出し、eIF2 をリン酸化することにより、アミノ酸合成関連蛋白質の発現を促進する。GI ドメインは GCN1 と結合し、GCN2 の局在を制御している。	
2	Atg4B - LC3(1-120) complex	2Z0D	Released	2007.05.08	Atg4 はオートファジに必須な Atg8 のプロセシング酵素と同時に脱 PE 化反応も行う。オートファジーを開始するために必須な酵素である。反応物との複合体の構造を明らかにすることにより、プロセシングの反応機構を明らかにした。	オートファジーの選択的阻害剤の開発により、細胞生物学的現象を解明する試薬となる。
3	Atg4B - LC3(1-124) complex	2Z0E	Released	2007.05.08	基質との複合体の構造を明らかにすることにより、基質結合により活性部位の構造が開き、酵素反応が起きることを明らかにした。	オートファジーの選択的阻害剤の開発により、細胞生物学的現象を解明する試薬となる。
4	NIPP1 FHA domain	2JPE	Released	2007.05.08	核内 1 型 Ser/Thr 残基特異的プロテインホスファターゼ (PP1) の主要な結合分子である NIPP1 は、PP1 の阻害ペプチドとして精製された分子であり、その	

					ノックアウトマウスが胎生致死となることが報告されている。NIPP1 の C 末端領域 (NIPP1-dC) を欠損する変異体は細胞周期の停止と細胞死誘導が確認され、pre-mRNA の splicing を抑制し、成熟 mRNA レベルを減少させる事が明らかになった。また、NIPP1 には、Thr リン酸化タンパク質との相互作用に関わると推測される FHA ドメイン (M1T132) が存在し、NIPP1-dC の pre-mRNA splicing の抑制にこのドメインが必須であった。				
5	OsNifU1A domain I	2JNV	Released	2007.05.08	葉緑体局在型の NifU 様タンパク質である OsNifU1A は、光合成において重要な役割を果たすフェレドキシンに転移される鉄硫黄クラスターを形成するための足場を提供する。domain I は、高度に保存された CXXC もチーフで鉄硫黄クラスター形成に必須であることが予想されるが、そのモチーフはフレキシブルなループ状に存在することがわかった。				
6	phosphorylated Crk-11	2DVJ	Released	2007.05.08	ヒトのがんに関わるタンパク質である CRK-11 のリン酸化体の立体構造を解析した。リン酸化により CRK-11 の活性が完全にストップすることが構造的に示された。				島津製作所と共同でリン酸化タンパク質の標品としての製造することを検討している。
7	Autophagy-related protein 3	2DYT	Released	2007.01.23	本構造解析研究により、タンパク質脂質化修飾を行う酵素 Atg3 の三次元構造が明らかとなった。立体構造が明らかとなっているタンパク質脂質化酵素はフアルネシルトランスフェラーゼなど数少なく、またグリセロリン脂質化修飾を行う酵素は Atg3 以外に報告がないことから極めて重要な知見であると言え				

8	p40(全長)	2DYB	Released	2007.01.23	<p>る。</p> <p>p40 は好中球 NADPH oxydase の活性制御に関わる因子の一つである。p40 は活性酸素の産生そのものには寄与しないが、生理学的な条件下では活性酸素発生活性を亢進することが知られている。p40 タンパク質全長の構造解析により、PX ドメインと脂質二重膜上に存在するホスファチジルイノシトール3リン酸との相互作用が、自身の PB1 ドメインにより自己阻害されていることが明らかとなった。</p>
9	Atg5/16(1-46)	2DYM	Released	2006.12.26	<p>オートファジー（細胞内分解機構）においてオートファゴソーム形成に関わるタンパク質 Atg5 と Atg16 とは複合体を形成する。Atg5/Atg16 複合体がオートファゴソーム前駆体に局在化するためには Atg5 と Atg16 の両者が必要であることがこれまでにわかっている。本解析では、立体構造を基にオートファゴソーム形成メカニズムの理解を進めることを狙い Atg5 と Atg16 の N 末端側領域 (Atg5 結合領域) との複合体立体構造解析を行った。</p>
10	Atg5/16(1-57) crystal 1	2DY0	Released	2006.12.26	<p>オートファジー（細胞内分解機構）においてオートファゴソーム形成に関わるタンパク質 Atg5 と Atg16 とは複合体を形成する。Atg5/Atg16 複合体がオートファゴソーム前駆体に局在化するためには Atg5 と Atg16 の両者が必要であることがこれまでにわかっている。本解析では、立体構造を基にオートファゴソーム形成メカニズムの理解を進めることを狙い Atg5 と Atg16 の N 末端側領域 (Atg5 結合領域) との複合体立体構造解析を行った。</p>
11	Bem1p PX domain	2CZ0	Released	2006.10.03	<p>PX domain は細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質との結合能を持つことが知られているが、</p>

					その細胞内における機能に関しては未解明な点が多い。 Bem1p-PX domain の構造解析はイノシトールリン脂質との結合様式を明らかにし、細胞内でのシグナル伝達系における PX domain の役割を説明することを可能にするものである。	
12	Crk-II SH2	2EYV	Release	2006.11.10	Crk-II は細胞内の様々なシグナル伝達に関わるタンパク質であり、また、様々な癌において発現の亢進が見られるタンパク質である。 その SH2 ドメインは Crk-II によるシグナル伝達において主要な役割を果たすドメインであり、創薬ターゲットとしても期待される分子である。	
13	Crk-II nSH3	2EYW	Release	2006.11.10	Crk-II の N 末端側 SH3 ドメイン (nSH3) は Crk-II によるシグナル伝達において主要な役割を果たすドメインであり、創薬ターゲットとしても期待される分子である。	
14	Crk-II cSH3	2EYX	Release	2006.11.10	Crk-II の C 末端側 SH3 (cSH3) ドメインは標的分子は未知であり、そのシグナル伝達における役割の詳細はわかっていない。 当該ドメインの構造解析の結果より Crk-II cSH3 が通常の SH3 とは異なり PxxP を含む配列を認識できないことが示された。	
15	Crk-II	2EYZ	Release	2006.11.10	Crk-II の全長の立体構造を決定した。 これにより、Crk-II がリン酸化による制御以外にも非リン酸化状態においても制御が存在していることが示された。 Crk-II は分子量が 35000 程度であり、NMR で構造が解かれたものとしてはかなり大きく、当中核機関が保有する 800MHz の NMR 装置があつて初めて成し得た。	抗がん剤の開発
16	Crk-I	2EYY	Release	2006.11.10	Crk-I は Crk-II のスプライシングが異なるアイソフォームであり、Crk-II との構造的な違いは cSH3 お	抗がん剤の開発

						よびリン酸化部位である Y221 を持たない点である。活性については Crk-II よりもかなり強い癌化能を有する。Crk-II の構造解析結果と合わせることでその強い癌化能の分子機構に関する構造生物学的な知見が得られた。		
17	Tob-hCaf1 複合体	2D5R	Release	2006.12.12		G1 期における細胞増殖抑制因子である Tob 蛋白質とそのパートナーである Poly(A) デアデニラーゼ hCaf1 との複合体の立体構造を解明することにより、Tob ファミリー蛋白質による細胞増殖抑制シグナルの認識特異性を原子レベルで理解できることが期待される。細胞増殖抑制機構を原子レベルで解明することは、癌などの細胞増殖異常を強制的に停止させるための治療薬の開発に貢献する。また Poly(A) デアデニラーゼの構造解析は、細胞内における多種多様な RNA の分解制御の研究に重要な知見を与える。	抗がん剤の開発	
18	p40(phox)の SH3 ドメイン(NMR 構造)	1Z9Q	Release	2006.03.21		結晶構造しか出ていなかった p40(phox)SH3 ドメインの水溶液中の構造を NMR によって決定した。		
19	RF-3 175C	1J2F	Released	2003.11.25		IRF-3 (Interferon regulatory factor 3)はウイルス感染に反応し、初期の I 型インターフェロン誘導を行う転写因子である。当該構造は IRF-3 の C 末端側転写調節ドメインであり、類似構造が既知である DNA 結合ドメインは含まれていない。IRF-3 活性化時のリン酸化、複合体化についての知見を得るために構造解析を行い、初期の I 型インターフェロン誘導のメカニズムに対して、モデルを構築する事ができた。	抗ウイルス薬の開発	
20	OsNifU1A domain II	1TH5	Released	2005.09.27		葉緑体同型型の NifU 様タンパク質である OsNifU1A は、光合成において重要な役割を果たすフェレドキ		

					<p>シンに転移される鉄硫黄クラスタを形成するための足場を提供する。domain I は、鉄硫黄クラスタ形成に必須であることが予想されるが、domain II の機能については不明であった。本構造解析により domain II の存在がフェレドキシンとの結合を促進することが示唆された。</p>	
21	OstrXh	1WMJ	Released	2005.10.25	<p>タンパク質は植物体内における重要な物質輸送経路である原形質連絡の細胞間通過能力を上昇させる事が知られている。他の生物種由来タンパク質との立体構造比較から特異な N 末端構造を見いだした。また、NMR 測定を含め 3 週間で立体構造決定した事は、当研究室における NMR 立体構造解析 HTP 化が順調であることを示している。</p>	
22	aPKC PB1	1VD2	Released	2004.09.12	<p>OPCA モチーフは$\beta\alpha$のコンパクトな二次構造を有し、保存された酸性残基により酸性表面が形成されている。一方、Type で保存されている Lys 残基が立体構造上適切に配置されており、PKCζ PB1 は Type 、 の両方として機能できる構造的な特徴を備えているといえることを明らかにした。</p>	
23	aPKC/Par6 PB1 complex	1WMH	Released	2004.12.07	<p>今回 PKCζ/Par6α PB1 ドメイン複合体の結晶構造を決定し、PB1 ドメインの相互作用様式を分子レベルで明らかにした。PKCζ PB1 と Par6α PB1 は互いに三次構造の相同性は高いものそれぞれ異なる領域で相互作用していること、Type で保存されている Lys 残基と Type の保存された酸性残基が塩橋を形成し、静電相互作用が複合体形成の原動力となっていることを明らかにした。</p>	
24	DJ-1	1UCF	Released	2003.08.19	<p>DJ-1 は癌化や男性不妊、酸化ストレス応答といった多様な機能に関わるタンパク質である。また、家族</p>	<p>パーキンソン病の治療薬の</p>

					性パーキンソン病 PARK7 の変異の原因遺伝子産物として同定され、DJ-1 の変異がパーキンソン病を引き起こすことが明らかにされた。DJ-1 はこのように多様な機能を持つにもかかわらず、その機能がどのような分子的基盤に基づいて発揮されるのかについては未知である。本構造解析により、DJ-1 は超好熱古細菌の細胞内プロテアーゼと極めて高い構造類似性を有していることが明らかとなった。	開発
25	DJBP	1WLZ	Released	2005.08.23	DJBP は DJ-1 に結合する新規タンパク質である。DJBP は精巢特異的に発現しており、C 末端領域を用いてアンドロゲンレセプターと結合し、ヒストンデアセチラーゼをリクルートすることで転写活性を抑制する。この転写活性の抑制は DJ-1 により部分的に解除される。	パーキンソン病の治療薬の開発
26	UCK2 CTP complex	1UDW	Released	2004.05.04	Uridine-cytidine kinase (UCK) の CTP 複合体である。UCK はピリミジンヌクレオチドサルベージ経路の律速酵素である。ピリミジンヌクレオシドのリン酸化をおこなう。エテニル誘導体はリン酸化されると RNA 合成酵素を阻害する。固形ガンに対する抗ガン剤として有効である。	抗がん剤の開発
27	UCK2 UTP c omplex	1UEI	Released	2004.05.04	UCK と UTP 複合体の結晶構造である。反応物の構造と考えられる。	抗がん剤の開発
28	UCK2 Cytidine complex	1UEJ	Released	2004.05.04	UCK と Cytidine 複合体の結晶構造である。	抗がん剤の開発
29	UCK2 free	1UFQ	Released	2004.05.04	UCK フリーの結晶構造	抗がん剤の開発
30	UCK2 CMP ADP complex	1UJ2	Released	2004.05.04	UCK 反応中間体の結晶構造	抗がん剤の開発
31	LC3	1UGM	Released	2004.07.06	酵母 Atg8 のヒトホモログ。Atg8 同様 PE 化をうけオ	オートファジ

						ートファゴソームを形成する。ユビキチン骨格のN端側に二つのヘリックスを持つ点がユニークである。	ーのマーかターンパク質として診断に利用
32	TPR (1-203) of p67phox	1WM5	Released	2005.10.25		P67phox のN末端領域に存在する TPR モチーフの構造決定。TPR モチーフは Rac に結合し、好中球活性化酸素発生のスイッチとして働く	
33	Plant ATG12	1WZ3	Released	2005.06.21		植物の Atg12。初めての Atg の構造であり、ユビキチンフォールドをとる。	
34	Human Atg4B	2CY7	Released	2005.09.13		ヒト Atg 8 ホモログである LC3 のプロセシング酵素。C 末端を切断し、Gly を露出させる。活性中心には LC3 が結合しないと C 末端部分は入れない。	オートファジー選択的阻害剤の開発
35	p47phox tandem SH3 domains complexed with p22phox-peptide	1WLP	Released	2005.10.04		NADPH酸化酵素の活性制御を担う p47phox と p22phox の結合時の溶液中での立体構造を NMR により決定した。他グループにより発表されていた結晶構造では構造未知の p22phox 領域が ヘリックス構造を形成していることを新たに発見した。この領域は p47-p22 両者間の結合親和性向上に重要な役割を果たしていることが変異実験により明らかになった。	抗炎症剤の開発
36	Grb2 SH2 domain complexed with the inhibitor	1XON	Released	2005.04.19		Grb2 の SH2 ドメインの阻害剤複合体の溶液中における立体構造を NMR により明らかにした。この inhibitor は NIH の Burke 博士により SBDD 法を用いて合成されたものである。本立体構造により SBDD 法の確かさが実証できた。また、本 inhibitor は乳がん抗がん剤として開発中のものである。	抗がん剤として臨床実験中
37	Der F2	1WRF	Released	2005.04.19		ダニアレルギーの原因タンパク質 Der F2 の溶液中での立体構造を NMR により明らかにした。本タンパク質は IgG フォールド立体構造を形成していることがわかった。	抗アレルギー薬の開発
38	Solution Structure Of The Pb1	1Q10	Released	2003.10.14		Bem1 と Cdc24PB1 ドメインの相互作用は出芽位置を	

	Domain Of Cdc24P (Long Form)					決定しているタンパク質相互作用である。Cdc24 の PB1 ドメインの構造を決定した。ゴビキチンフォルドの上に新たに相互作用部位が提示されている。	
39	Solution Structure Of The Pb1 Domain Of Cdc24P (Short Form)	1TZ1	Released	2005.09.06		Cdc24 の短鎖形について構造を決定した。ゴビキチンフォルドのうち、N端のシートが欠如していたが、安定な構造をとることがわかった。タンパク質物性として興味深い	
40	Crystal Structure Of Autoinhibited Form Of Tandem Sh3 Domain Of P47Phox	1UEC	Released	2003.05.27		好中球活性酸素発生に関わる NADPH 酸化酵素の細胞質サブユニット p47phox のタンデム SH3 ドメインと阻害領域を含む構造を明らかにした。二つの SH3 を阻害領域が包み込む構造をとっていた。	抗炎症薬の開発
41	radixin FERM ドメインと ICAM-2 の二者複合体	1J19	Released	2003.03.11		免疫グロブリンスーパーファミリー接着分子の細胞質内での足場タンパク質による分子認識の最初の機構解明	
42	Rho-キナーゼ RhoA 結合ドメイン	1UIX	Released	2003.10.21		Rho-キナーゼの平行二重コイル化による二量体化の証明	
43	GTPCHI -GFRP-BH2-GTP の四者複合体	1WPL	Released	2004.09.08		GTPCHI の GFRP と負のアロステリックエフェクター BH2 による不活性機構の解明	
44	SixA 遊離型	1UJB	Released	2005.01.25		原核生物のヒスチジン・フォスファターゼの世界初の構造	
45	SixA-V04 複合体	1UJC	Released	2005.01.25		活性部位と触媒機構の解明	
46	ヒト FEN1 と PCNA の二者複合体	1UL1	Released	2005.03.01		全長の酵素を結合した PCNA 複合体の最初の構造、2 状態の発見	
47	Peroxi redoxin AhpC	1WE0	Released	2005.03.29		バクテリアの 2Cys-peroxi redoxin	
48	radixin の FERM ドメインと NHERF の二者複合体	2D10	Released	2006.07.18		イオンチャネル制御因子 NHERF (NHERF-1) の足場タンパク質 radixin による分子認識機構の解明	
49	radixin の FERM ドメインと E3KARP の二者複合体	2D11	Released	2006.07.18		イオンチャネル制御因子 E3KARP の足場タンパク質 radixin による分子認識機構の解明	
50	radixin の二量体 FERM ドメイン	2D2Q	Released	2006.04.19		足場タンパク質 radixin の FERM ドメインによる自己	

						会合による分子機能制御の解明	
51	Rho-キナーゼ-fasudil の複合体	2F2U	Released	2006.04.25		Rho-キナーゼと臨床応用が進むくも膜下出血治療薬であるキナーゼ阻害剤ファスジルとの複合体の構造を解明して薬剤特異性の構造的基礎を確立	
52	新規低分子量 G タンパク質 Rad	2DPX	Released	2006.08.08		低分子量 GTPase の新規ファミリー (GRK ファミリー) の GTPase の一つである Rad の構造	
53	Rho-kinase と阻害剤 Y27632 との複合体	2H9V	Released	2006.12.05		Rho-キナーゼとキナーゼ阻害剤 Y27632 との複合体の構造を解明して薬剤特異性の構造的基礎を確立	
54	ウエルナー症候群タンパク質 HRDC ドメイン結晶 1	2E1E	Released	2006.12.12		ウエルナー症候群の原因遺伝子産物 WRN の HRDC ドメインの世界初の構造	
55	ウエルナー症候群タンパク質 HRDC ドメイン結晶 2	2E1F	Released	2006.12.12		ウエルナー症候群の原因遺伝子産物 WRN の HRDC ドメインの世界第 2 番目の構造	
56	sialoadhesin, Nap compound	10D7	Released	2004.05.16		シアル酸を結合する細胞表面レセプターと糖鎖化合物との複合体。 (Naphthyl-2-Carbonyl)-Amino-9-Deoxy-Neu5ac (Nap Compound)	
57	sialoadhesin, Benz compound	10D9	Released	2004.05.16		シアル酸を結合する細胞表面レセプターと糖鎖化合物との複合体。 Me-A-9-N-Benzoyl-Amino-9-Deoxy-Neu5ac (Benz Compound)	
58	sialoadhesin, Bip compound	10DA	Released	2004.08.14		シアル酸を結合する細胞表面レセプターと糖鎖化合物との複合体。 (Biphenyl-4-Carbonyl)-Amino-9-Deoxy-Neu5ac (Bip Compound)	
59	LIR1 type1.03	1UFU	Released	2004.08.10		免疫細胞上の MHC 受容体の 1 つ。SNP type 1.01 が関節リウマチに関係	
60	LIR1 type 1.02	1UGN	Released	2004.08.10		同上	
61	LIR1 type 1.01	1VDG	Released	2005.08.02		同上	
62	Tom20-SS-ALDH(A-linker)	1WT4	Released	2005.11.22		ミトコンドリアへのタンパク質輸送においてブレ配	

						列を認識する受容体。分子間SS結合でプレ配列を固定した。リンカーは SAAAGC。プレ配列は ヘリックスで結合している	
63	Tom20-SS-ALDH(Y-linker)	2CUV	Released	2006.05.23		同上。リンカーは SYAGC。	
64	SeIB-M・SECIS RNA	1WSU	Released	2005.01.25		細菌におけるセレノシステインのタンパク質への取り込みに関係するポリペプチド鎖伸長因子のドメインとそれが結合するmRNAのヘアピン構造との複合体。winged helix motif がRNAを認識する初めての例である	
65	SeIB-C・SECIS RNA	2UWM	on hold			同上	
66	LIR9	2D3V	Released	2006.06.06		LIR9 は LIR1 と似たドメイン構造を持つ免疫細胞上の受容体であるが、そのリガンドは未知である。LIR1と同じくイムノグロブリン様ドメインがタンデムに2つつながった形をとっていた。未知のリガンドを探索において有用な情報となる。	
67	HLA-G dimer	2D31	Released	2006.03.14		胎盤での免疫抑制を担うHLA-G分子の特殊なダイマー型の構造解析。ダイマー型がいかにシグナルを効率よく伝達することができるかを明らかにした。この構造から炎症剤等の蛋白質製剤としての改良が期待できる。	高機能活性を有するHLA-G2量体分子を用いて、臓器、骨髄移植における免疫抑制効果を増進することが期待できる。また、不妊症治療への応用も考えられる。
68	PriAのN末端ドメイン、フリー	2D7E	Released	2006.11.07		PriA蛋白質は細菌のDNA複製が何らかの理由でストップしたときに、複製再開をするために働く。	

						そのN末端ドメインはストップした複製フォークにおける露出したDNAの3末端を認識する。新規フォールド	
69	PriAのN末端ドメイン、ジヌクレオチド複合体	2D7G	Released	2006.11.07	Released	同上、d(ApA)との複合体	
70	PriAのN末端ドメイン、ジヌクレオチド複合体	2DWL	Released	2006.11.07	Released	同上、d(ApC)との複合体	
71	PriAのN末端ドメイン、ジヌクレオチド複合体	2DWM	Released	2006.11.07	Released	同上、d(ApT)との複合体	
72	PriAのN末端ドメイン、ジヌクレオチド複合体	2DWN	Released	2006.11.07	Released	同上、d(ApG)との複合体	
73	PriAのN末端ドメイン、トリヌクレオチド複合体	2D7H	Released	2006.11.07	Released	同上、d(CpCpC)との複合体	
74	HLA-G/LIR2 complex	2DYP	Released	2006.11.07	Released	LIR ファミリーのうち白血球に広く発現する抑制型レセプターLIRB2 と HLA-G との複合体。 HLA-G は他のMHCクラスI分子に比べLIRB2強く結合する理由を説明できた。	
75	NiKA	2BA3	Released	2006.10.03	Released	バクテリア接合伝達のDNA伝達開始に関与するタンパク質ではじめて立体構造が決定されたRibbon-Helix-Helix(RHH)タンパク質であり、特にPタイプの伝達開始点を持つ接合伝達プラスミドのDNA伝達にRHHフォールドを持ったタンパク質が関与することを今回はじめに明らかにした。	現在は考えられないが、院内感染に関わるタンパク質であるために、産業利用の可能性はあるかもしれない。
76	Calmodulin(CaM)	1X02	Released	2006.03.07	Released	SAIL-CYANA法を用いて精密構造解析に初めて成功した17kDaのカルシウム結合タンパク質である。全てのアミノ酸残基をSAILアミノ酸に置換したfull SAILタンパク質はNMR解析の自動化の開	SAIL技術自体の産業利用は限りなく広がるであろう。

77	MBP	2D21	Released	2006.03.07	発モデルとして利用可能であり、事実稲垣垣研において Olivia を利用し、ほぼ完全な自動スベクトル解析に成功した。 MBP は分子 41kDa の高分子量タンパク質であり、従来の二重標識試料を用いる NMR 解析によっては構造決定が不可能な分子範囲にある。我々は CaM に続き、full SAIL 試料を調製しその立体構造を精密に決定した。SAIL 法は NMR 解析技術の革新的新技術であることが明瞭に実証された。 細胞分化を停止させる。	CaM の構造は既に結晶状態で解かれている。 CaM のケースと全く同様である。
78	Solution Structure Of Cpi-17(22-120)	1J2M	Released	2003.06.17		
79	Solution Structure Of Cpi-17(22-120) T38D	1J2N	Released	2003.06.17	リン酸化ミメティック体の構造決定	
80	NMR Structure of Ubiquitin-Like Domain In Murine Parkin	1MG8	Released	2003.08.08	パーキンソン病の原因タンパク質パーキンのコピキチン様ドメイン構造	パーキンソン病治療薬の開発

2. 主要な論文リスト

- 1) Hamada K., Shimizu T., Yonemura S., Tsukita Sh., Tsukita Sa., Hakoshima T.: Structural basis of adhesion protein recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. **EMBO J.** 22(3), 502-514, 2003a. [**PDB: 1J19**]
- 2) Shimizu T., Ihara K., Maesaki R., Amano M., Kaibuchi K., Hakoshima T.: Parallel coiled-coil association of the RhoA-binding domain in Rho-kinase. **J. Biol. Chem.**, 278(46), 46046-46051, 2003b. [**PDB: 1UIX**]
- 3) Honbou K., Suzuki N.N., Horiuchi M., Niki T., Taira T., Ariga H., Inagaki F.: The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. **J. Biol. Chem.** 278, 31380-31384, 2003c Aug. [**PDB: 1UCF**]
- 4) Yoshinaga S., Kohjima M., Ogura K., Yokochi M., Takeya R., Ito T., Sumimoto H., Inagaki F.: The PB1 domain and the PC motif-containing region are structurally similar protein binding modules. **EMBO J.** 22, 4888-4897, 2003d Oct. [**PDB: 1Q10**]
- 5) Takahashi K., Suzuki N.N., Horiuchi M., Mori M., Suhara W., Okabe Y., Fukuhara Y., Terasawa H., Akira S., Fujita T., Inagaki F.: X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. **Nat. Struct. Biol.** 10 (11), 922-927, 2003e Nov. [**PDB: 1J2F**]
- 6) Suzuki N.N., Koizumi K., Fukushima M., Matsuda A., Inagaki F.: Structural basis for the specificity, catalysis, and regulation of human uridine-cytidine kinase. **Structure**, 12, 751-64, 2004a May. [**PDB: 1UFQ, 1UDW, 1UE1, 1UEJ, 1UJ2**]
- 7) Yuzawa S., Suzuki N.N., Fujioka Y., Ogura K., Kamikubo H., Kataoka M., Sumimoto H., Inagaki F.: A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47^{phox}, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. **Genes Cells**, 9, 443-456, 2004b May. [**PDB: 1UEC**]
- 8) Yuzawa S., Ogura K., Horiuchi M., Suzuki N.N., Fujioka Y., Kataoka M., Sumimoto H., Inagaki F.: Solution structure of the tandem SH3 domains of p47^{phox} in an autoinhibited form. **J. Biol. Chem.**, 279(28), 29752-29760, 2004c Jul.
- 9) Hirano Y., Yoshinaga S., Ogura K., Yokochi M., Noda Y., Sumimoto H., Inagaki F.: Solution structure of atypical PKC PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. **J. Biol. Chem.**, 279(30):31883-90, 2004d Jul. [**PDB: 1VD2**]
- 10) Sugawara K., Suzuki N.N., Fujioka Y., Mizushima N., Ohsumi Y., Inagaki F.: The crystal structure of microtubule-associated protein light chain3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. **Genes Cells**, 9, 611-8, 2004e. [**PDB: 1UGM**]
- 11) Yoshizawa S., Rasubala L., Ose T., Kohda D., Fourmy D., Maenaka K.: Structural basis for mRNA recognition by elongation factor SelB. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 12, 198-203, 2005a. [**PDB: 1WSU**]
- 12) Suzuki N. N., Yoshimoto K., Fujioka Y., Ohsumi Y., Inagaki F.: The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. **Autophagy** 1: 119-126, 2005b. [**PDB: 1WZ3**]
- 13) Hirano Y., Yoshinaga S., Takeya R., Suzuki N.N., Horiuchi M., Kohjima M., Sumimoto H., Inagaki F.: Structure of a cell polarity regulator, a complex between atypical PKC and Par6 PB1 domains. **J. Biol. Chem.**, 280(10):9653-61, 2005c Mar. [**PDB: 1WMH**]
- 14) Sugawara K., Suzuki N.N., Fujioka Y., Mizushima N., Ohsumi Y., Inagaki F.: Structural basis for the specificity and catalysis of human Atg4B responsible for

- mammalian autophagy. **J. Biol. Chem.** 280, 48, 40058-40065, 2005d Dec. [**PDB: 2CY7**]
- 15) Kainosho M., Torizawa T., Iwashita Y., Terauchi T., Ono A. M., Guentert P.: Optimal Isotope Labelling for NMR Protein Structure Determinations. **Nature**, 440, 52-57, 2006a. [**PDB: 1X02, 2D21**]
 - 16) Yanuar A., Sakurai S., Kitano K., Hakoshima T.: Crystal structure of human Rad GTPase of the R GK-family. **Genes to Cells**, 11(8), 961-968, 2006b. [**PDB: 2DPX**]
 - 17) Terawaki S., Maesaki R., Hakoshima T.: Structural Basis for NHERF Recognition by ERM Proteins. **Structure**, 14(4), 777-789, 2006c. [**PDB: 2D10, 2D11**]
 - 18) Yamaguchi H., Kasa M., Amano M., Kaibuchi K., Hakoshima T.: Molecular mechanism for the regulation of Rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil. **Structure**, 14(3), 589-600, 2006d. [**PDB: 2F2U**]
 - 19) Shiroishi M., Kuroki K., Ose T., Rasubala L., Shiratori I., Arase H., Tsumoto K., Kumagai I., Kohda D., Maenaka K.: Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. **J. Biol. Chem.**, 281, 10439-10447, 2006e. [**PDB: 2D31**]
 - 20) Shiroishi M., Kuroki K., Rasubala L., Tsumoto K., Kumagai I., Kumagai E., Kato K., Kohda D., Maenaka K.: Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 103, 16412-16417, 2006f. [**PDB: 2DYP**]
 - 21) Ogura K., Nobuhisa I., Yuzawa S., Takeya R., Torikai S., Saikawa K., Sumimoto H., Inagaki F.: NMR Solution Structure of the Tandem Src Homology 3 Domains of p 47 phox Complexed with a p22phox-derived Proline-rich Peptide. **J. Biol. Chem.** 281 (6), 3660-3668, 2006g Feb. [**PDB: 1WLP**]
 - 22) Matsushita M., Suzuki N.N., Obara K., Fujioka Y., Ohsumi Y., Inagaki F.: Structure of Atg5-Atg16, a complex essential for autophagy. **J. Biol. Chem.**, 282(9), 6763-72, 2007a Mar 2. [**PDB: 2DYM, 2DYO**]
 - 23) Honbou K., Minakami R., Yuzawa S., Takeya R., Suzuki N.N., Kamakura S., Sumimoto H., Inagaki F.: Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. **EMBO J.**, 26(4), 1176-86, 2007b Feb 21. [**PDB: 2DYB**]
 - 24) Yamada Y., Suzuki N.N., Hanada T., Ichimura Y., Kumeta H., Fujioka Y., Ohsumi Y., Inagaki F.: The crystal structure of ATG3, an autophagy-related E2 enzyme that mediates ATG8 lipidation. **J. Biol. Chem.**, 282(11), 8036-43, 2007c Mar 16. [**PDB: 2DYT**]
 - 25) Kobashigawa Y., Sakai M., Naito N., Yokoichi M., Kumeta H., Makino Y., Ogura K., Tanaka S., Inagaki F.: Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, in press, 2007d. [**PDB: 2EYV, 2EYW, 2EYX, 2EYZ, 2EYY, 2DVJ**]
 - 26) Ose T., Soler N., Rasubala L., Kuroki K., Kohda D., Fourmy D., Yoshizawa S., Maenaka K.: Structural basis for dynamical interdomain movement and RNA recognition of the selenocysteine specific elongation factor SelB. **Structure**, in press, 2007e. [**PDB: 2UWM**]
 - 27) Sasaki K., Ose T., Okamoto N., Maenaka K., Tanaka T., Masai H., Saito M., Shirai T., Kohda D.: Structural basis of the 3'-end recognition of a leading strand in stalled replication forks by PriA. **EMBO J.**, in press, 2007f. [**PDB: 2D7E, 2D7G, 2D7H, 2DWL, 2DWM, 2DWN**]