

5 - 3 タンパク3000プロジェクト 中核機関成果報告シート

グループ名 個別的分析プログラム名(転写・翻訳)

中核機関名 北海道大学大学院理学研究科

代表者名 田中 勲

1. 平成17年10月末におけるグループ全体の事業計画に対する事業の進捗状況の概要について

蛋白質構造解析の主要なすべてのステップにおいて独自の技術開発を行い、一部は実用化されプロジェクトの推進に役立っている。プロジェクト開始時以来の PDB 登録総数は 148 個にのぼり、計画の 100 個を既に大きく上回っている。以下、構造解析を行った蛋白質から、生物学的に特に重要な解析成果と産業応用につながる可能性のある解析成果に絞って記述する。

1. 遺伝暗号の翻訳に関わる因子の特筆すべき構造解析成果

古細菌リボヌクレアーゼ P 蛋白質の構造解析 最初に発見されたりボザイムの構造研究

Biochemistry 44, 12086-12093 (2005)など

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は、前駆体 tRNA の 5' leader 配列のプロセシングに関与するリボザイムである。歴史上、最初に発見されたりボザイムであり、全生物種に存在しているが、その構成成分や酵素化学的性質は生物種によって異なっている。最近、真正細菌の RNase P の構造が *Nature* に発表されたが、真正細菌の RNase P が、約 400 ヌクレオチドからなる 1 分子の RNA と 1 分子のタンパク質(約 10kDa)から構成されるのに対し、真核生物や古細菌の RNase P は 1 分子の RNA と複数のタンパク質サブユニットから構成されている。本研究では、超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* RNase P が 5 種のタンパク質と RNA とから構成されていることを再構成実験で証明し、さらにすべての蛋白質成分の構造を ~2.0 Å の分解能で決定した。

CCA 付加酵素と tRNA プライマー複合体の構造解析 —鋳型非依存性 RNA 合成機構—

Nature 430, 700-704, (2004)

tRNA の 3' 末端の CCA 配列は、全生物で、蛋白質合成過程におけるアミノ酸との結合やリボソームとの結合に必須である。この CCA 配列は CCA 付加酵素と呼ばれる鋳型非依存性 RNA ポリメラーゼによって、CTP および ATP を基質として、新規に合成される。今回、CCA 付加酵素と tRNA の複合体の結晶構造を 2.8Å 分解能で決定し、本酵素は、鋳型 DNA の代わりに酵素のアミノ酸残基で構成された「タンパク質性の鋳型」によって、基質となる CTP や ATP を固定し、鋳型なしでも CCA 配列を結合させることができることが明らかになった。

リジン合成酵素の構造解析 複雑な RNA 修飾機構の最初の解明

PNAS, 102, 7487-7492 (2005)

リジン合成酵素 (TilS) は、tRNA^{Ile} のアンチコドン 1 字目の C34 にリジンを結合させてリジンにすることで、tRNA のコドン特異性とアミノ酸特異性を同時に Met から Ile に変換する重要な酵素である。今回 TilS の結晶構造を 2.4Å 分解能で決定し、それに基づく変異体解析を行うことで、TilS が C34 をアデニル化し、アミノ基が活性化されたリジンに求核置換攻撃させることでリジンが生成することを初めて明らかにした。本酵素は細菌に特異的なため、本構造は有効な抗生物質の設計・開発に応用できる。

メチオニル tRNA 合成酵素と tRNA^{Met} の複合体の構造解析 —四半世紀の謎の解明—

Nat. Struct. Mol. Biol., 12, 931-932 (2005)

メチオニル tRNA 合成酵素 (MetRS) は、結晶構造が最初に解明されたアミノアシル tRNA 合成酵素であり、膨大な生化学的データも集積していながら、四半世紀に渡って結晶構造が決定されなかった。今回 MetRS と tRNA^{Met} との複合体の結晶構造を 2.4Å 分解能で決定した結果、tRNA^{Met} のアンチコドンループは大きく歪み、C34、A35、A38 からなる 3 塩基スタック構造を取り、MetRS の Trp 残基と Arg 残基が核酸の 2 重らせん構造を模倣してアンチコドンを認識していることが明らかになった。

哺乳動物ミトコンドリア Ser-tRNA 合成酵素の構造解析及び tRNA^{Ser} 識別の分子機構

EMBO J., 24, 3369-3379 (2005)

SerRS は tRNA^{Ser} の特徴である長く伸びたバリアブルアームを認識していることが知られているが、動物ミトコンドリアの二つの tRNA^{Ser} (mt tRNA^{Ser}) にはこのバリアブルアームが存在しない。詳細な認識分子メカニズムを

解明するために、我々は初めてとなる哺乳動物（ウシ）ミトコンドリアSerRSのX線結晶構造を 1.65Åの高分解能で決定することに成功した。これによって、mt SerRSには両末端にそれぞれ延長ペプチドが付加されており、これらが特異的にmt tRNA^{Ser}を認識していることを発見した。ミトコンドリアの翻訳系では、tRNA^{Ser}が進化の段階で消失したバリエーションを補うために、mt SerRSは両末端に延長ペプチドを獲得し、新たなtRNA^{Ser}上の識別部位をみつけ出したと考えられる。

トランス校正酵素 AlaX と Ser 複合体の構造解析 —アラニン類似アミノ酸から識別する機構— *PNAS*, 102, 11669-11674 (2005)

遺伝暗号の翻訳はコドンとアミノ酸を直接的に結び付けているアダプター分子、アミノアシル tRNA(aa-tRNA)によって媒介されるため、aa-tRNA 合成の精度は正確なタンパク質合成にとって非常に重要である。しかし、一部のアミノ酸同士は側鎖のサイズや性質が非常に似通っているため、間違った組み合わせの aa-tRNA が合成されることがある。AlaX は tRNA(Ala)に対してセリン、あるいはグリシンが間違っ て付加された Ser-tRNA(Ala) や Gly-tRNA(Ala)に対して校正活性を示す酵素であり、校正サイトにおいてセリンとグリシンをアラニンから識別して、これを加水分解する。今回得られた AlaX-セリン複合体構造より、20 年以上謎であったこれらのアミノ酸の識別機構が解明された。

血管新生抑制活性に働くヒト由来トリプトファン tRNA 合成酵素の構造解析 —がん治療の可能性— *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 149-156 (2004)

ヒト由来トリプトファン tRNA 合成酵素(hTrpRS)は、スプライスパリアント型(mini TrpRS)が細胞外へ分泌され、血管内皮細胞のアポトーシスを促し、血管新生の抑制に働く。今回 mini TrpRS の結晶構造を 2.3Å 分解能で決定し、mini TrpRS の tRNA を認識するドメインに挿入された 8 ペプチドが血管内皮細胞のアポトーシスに必須であることを解明した。本構造に基づき、血管新生によって引き起こされる失明や癌細胞の増殖を抑制する薬剤の設計が可能になると考えられる。

翻訳開始因子 a/eIF2 , 複合体の構造解析 真核生物,古細菌の翻訳開始複合体 論文準備中

a/eIF2 は , の 3 つのサブユニットからなり、真核生物、古細菌の翻訳開始反応において、リボソームへのGTP依存的な開始Met-tRNA_iの運搬、および開始コドンの認識に伴うGTP加水分解によるMet-tRNA_iの解離という 2 つの中心的な役割を担っている。今回、古細菌由来aIF2 -GDP複合体の構造解析を行うことに成功し、サブユニットがGTP結合サイトの近傍に結合することを初めて明らかにした。また、サブユニット単体との構造比較から、分子の可動性が機能に深く関わっていることを見出した。本解析の結果とこれまでの知見を総合することで、翻訳開始反応において最も重要なステップである開始コドン認識からMet-tRNA_i解離に至る詳細な分子機構のモデルを提唱している。

古細菌由来翻訳調節因子複合体・RelB/RelE の構造解析 —リボソーム上の mRNA を切断する酵素— *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12, 327-331 (2005)

大腸菌に代表される真正細菌は翻訳調節因子(RelBとRelE)を持っている。RelEは翻訳過程のmRNAを特異的に切断するリボヌクレアーゼで、通常 RelB と複合体を形成して酵素活性が阻害されている。しかし、アミノ酸欠乏条件下では細胞内プロテアーゼによりRelBが分解され、その結果RelEがタンパク質合成を阻害する。本研究では、超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii*のRelB/RelE相同タンパク質複合体の構造を 2.3 Å の分解能で決定した。RelBは伸びた構造を持つのに対して、RelEは球状タンパク質で、その形と大きさから、RelEがtRNAの分子擬態としてリボソームに結合することが示唆された。

真核生物ペプチド鎖解離因子 eRF3c の構造解析 —翻訳終結制御を担うハブ酵素— *Mol. Cell*, 14, 233-245 (2004)

真核生物ペプチド鎖解離因子 eRF3c は、tRNA 擬態性タンパク質であるペプチド鎖解離因子 eRF1 と結合することで協調的に翻訳終結反応を遂行する GTP 結合性タンパク質である。また、eRF3 は翻訳終結マシナリーと様々な高次生命機能に働く因子群とを結びつけるハブの中心でもある。その機能構造の解明は、疾患治療のための創薬ターゲット検索という観点からも有望視される。本研究では、eRF3 の 3 つ異なる機能モードの構造を決定し、高次生命機能において様々な因子により翻訳終結効率を制御すると考えられるスイッチ構造を明らかにした。

リボソーム再生因子とリボソーム複合体の立体構造 —翻訳装置のリサイクル機構—

EMBO J., 24, 251-260 (2005)

リボソーム再生因子 RRF は真性細菌の生存に必須である翻訳終結後リボソーム複合体の再生を司り、細菌感染症の創薬ターゲットとして有望である。本研究では RRF リボソーム結合ドメイン/リボソーム 50S サブユニット複合体の X 線結晶構造を解析し、両者の相互作用部位を初めて原子レベルで明らかにした。また、これまで詳細が不明であったリボソーム再生機構において決定的な役割を果たすと考えられる 30S/50S サブユニット界面の構造変化を見出した。これらの結果に基づいて設計した分子のリボソーム再生阻害能を現在検討中であり、新規抗菌剤創出への展開が期待される。

2. 創薬など産業利用につながる可能性のある構造解析ディールス・アルダー反応触媒酵素の構造解析 —ディールス・アルダー反応触媒酵素のはじめての解析—

Nature 422, 185-189 (2003)

ディールス・アルダー反応は、有機合成化学上極めて重要な反応の一つであり、制癌剤や抗生物質、免疫抑制剤など、芳香族化合物の合成現場で盛んに使用されている。この反応を触媒する酵素の存在は、数十年前より予測されていたが、触媒反応を説明することは容易ではなかったため、酵素の存在を証明した例は無かった。我々はマクロフォン酸合成酵素の構造解析を行い、ディールス・アルダー反応が組み込まれた酵素反応を具体的に説明した。

tRNA 依存アミド基転移酵素 GatCAB の構造解析および反応機構の解明 —論文準備中

真核生物以外の生物には GlnRS が存在せず、代わりに GluRS が tRNA^{Gln} に Glu を結合させ、tRNA 依存性アミド基転移酵素 (バクテリアでは GatCAB, 古細菌では GatDE) が tRNA に結合した Glu を Gln に変換する。多剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 由来 GatCAB 複合体の結晶構造を 2.4 Å 分解能で決定し、様々な基質複合体の構造解析と変異体を用いた活性測定を行い、GatCAB の反応機構を解明した。GatCAB はバクテリアでは必須の酵素であるが、ヒトを含む真核生物では利用されていない。このことから、本構造を元に GatCAB の機能を阻害する薬剤を設計することにより、広範囲の病原性バクテリアに対する有効な抗生物質になると期待される。

ヒト MTH1 と基質複合体の構造解析 —突然変異と異常 RNA 合成を防ぐ酵素— 論文準備中

ヒト MTH1 は DNA や RNA 合成の基質となる様々な変異原酸化プリンヌクレオシド 3 リン酸を分解することによって突然変異と異常 RNA 合成を防ぐ酵素である。今回、化学構造の異なる 2 つの基質と MTH1 の複合体の結晶構造を 2.3 Å 分解能で決定したところ、活性部位にある隣り合う 2 つの Asp 残基のプロトネーション部位を交換することによって異なる基質を認識するという極めてユニークな方法で幅広い基質特異性が発現していることが分かった。また MTH1 は脳腫瘍などのがん細胞に高発現し、その欠損細胞は酸化ストレスで細胞死を起こすため、MTH1 の阻害剤は新規のがん治療薬になる可能性がある。現在、その阻害剤の設計を行っている。

多剤排出ポンプ調節因子の構造解析と機能同定 構造解析から機能解析へ

J. Biol. Chem., 280, 38711-38719 (2005)

C. glutamicum 由来 CGL2612 蛋白質は、立体構造解析の結果 *S. aureus* (ブドウ球菌) 由来多剤耐性調節転写因子 QacR と非常に類似した立体構造を持つ事が明らかとなった新規因子である (一次構造の相同性は 7%)。SELEX 法による結合 DNA 配列同定実験を行ったところ、本タンパク質は *cgl2611* 遺伝子のプロモーター領域に結合する事が明らかとなった。*cgl2611* は膜蛋白質をコードしており、多剤排出ポンプである *S. aureus* 由来 QacA (QacR によって発現が制御) とも一次構造上高い相同性を示す (29%)。CGL2612 欠損株では CGL2611 の発現量増加がみられ、それに伴って薬剤への耐性が増大した。これらの結果より、CGL2612 が *C. glutamicum* の持つ多剤耐性オペロンのレギュレーターである事が明らかとなった。

肝臓特異的転写因子 HNF-6α と認識 DNA 複合体の構造解析

—新規ホメオドメイン蛋白質の DNA 認識機構の解明— 論文準備中

HNF-6 蛋白質は肝臓特異的転写因子群のひとつであり、肝細胞の発生や分化、増殖などの調節のほか、代謝に関連する多様な遺伝子の転写調節機能を有している。この蛋白質は CUT ドメインとホメオドメインという二つの DNA 結合ドメインを持ち、ターゲットとなる DNA の塩基配列によって転写調節機構を変化させている。

ターゲット遺伝子のひとつであるトランスサイレチンのプロモーター領域との複合体の構造解析により、二つのドメインによる協調的な DNA 認識機構を解明し、転写調節メカニズムの多様性を説明した。

黄色ブドウ球菌の病原性発現因子の構造解析 病原微生物の構造生物学 論文準備中

黄色ブドウ球菌バンコマイシン耐性株の病原性発現因子群を対象とした構造生物学研究を展開した。研究対象としたのは、薬剤耐性関連蛋白質、細胞接着因子蛋白質、細胞外酵素、莢膜合成関連蛋白質など 160 種類の蛋白質で、そのうち 23 種類の蛋白質については結晶化に成功した。これまでに、薬剤耐性関連蛋白質 Drp35, Fe 貯蔵蛋白質 Dps 細胞分裂関連蛋白質 SAV0287 の立体構造解析が完了しているほか、細胞接着因子 EhbA, 莢膜合成蛋白質 CapF についてはデータ収集が完了し、現在構造解析中である。

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 17 年 4 月～平成 17 年 10 月末	(参考) 平成 14 年 4 月～平成 17 年 3 月末
(1)PDB登録数 ¹	25	123
(2)構造解析を終了したがPDB登録を保留しているタンパク質の数 ¹	23	7
(3)PDB登録の有無に関わらず構造解析を終了したタンパク質の数 ¹	48	130

3. 論文掲載数²

	平成 17 年 4 月～平成 17 年 10 月末	(参考) 平成 14 年 4 月～平成 17 年 3 月末
・件数	67	344

4. 成果の産業連携について³

	平成 17 年 4 月～平成 17 年 10 月末	(参考) 平成 14 年 4 月～平成 17 年 3 月末
(1)特許出願数(国内)	3 件	22 件
特許出願数(海外)	0 件	9 件

(2)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	平成 17 年 4 月～10 月末: 11 件 ([参考]平成 14 年 4 月～平成 17 年 3 月末: 19 件) ナリットルオーダーの微量蛋白質試料で結晶化条件のスクリーニングを実施出来る結晶化チップの開発(三菱レイヨン(株)). 結晶のフリーマウント法の製品化を目指した開発((株)プロテインウェーブ). 放線菌由来チトクロム P450 を用いたバイオプロセスへの応用と研究用試薬の開発(メルシャン(株)). バクテリアの遺伝子発現解析に関する研究および応用調査((株)アイシン・コスモ研究所). 新規転写合成 siRNA の開発(北海道システムサイエンス(株))
-----------------------------------	---

(3)成果の産業移転に関する具体的な例	結晶性直接評価が可能な結晶化プレートの製品化((株)ラボ). 微生物変換技術開発のためのロドコッカス・エリスロポリス細胞を宿主とする組換え蛋白質生産技術の提供(メルシャン(株)). 高感度質量分析用メタルスプレーヤ S((株)坂口技研). プロテオミクス研究用データベース Human-RERFECT((株)メイズ)
---------------------	--

(4)出願した特許の具体的な例	ナリットルオーダーの微量蛋白質溶液を用いて結晶化を実施するための結晶化チップの構造, およびそれを用いて結晶化する方法. 蛋白質結晶化剤をゲルポリマーに保持させ, 蛋白質溶液を接触させ結晶化させる方法. 結晶を凍結状態で溶媒完全フリーにマウントし, 長波長X線を利用した回折強度測定の高精度化を容易に実現する方法. 放線菌の一種であるロドコッカス属を用いて既存の発現系とは異なる温度, 環境で使用できる発現系. 蛋白質多量体化を促進するペプチドとそれを利用した促進方法. RNA 中のイノシン化部位を特定する方法. 往復循環クロマトグラフィー. 高い耐熱性を有する糖ヌクレオチド合成酵素および糖リン酸転移酵素. インフルエンザウィルス RNA ポリメラーゼの大量精製法. ヒト由来上皮成長因子とその受容体の結晶構造解析に基づいた, がん化を抑制する新規薬剤・抗体の設計.
-----------------	---

5. 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 4

蛋白質調製技術: 組換え蛋白質生産支援技術の開発において、放線菌を宿主とする発現系の開発を行った。細胞外へ蛋白質を分泌させる発現ベクターも開発し、多様な発現系構築が可能になった。またメルシャン(株)との間で同宿主細胞の高機能化の共同開発も実施した。更に 2 種の蛋白質が生産可能なベクターの開発、宿主細胞の機能改変を促進するためにトランスポゾンを利用した新規ベクターの開発を行った。このベクターを利用する事で変異が導入された位置を容易に同定する事が可能になる。発現条件や機能解析検討に有用な多検体試料からの組換え蛋白質を同時精製する磁性粒子攪拌装置も商品化に向けた技術的改良が進行中である。また、大腸菌についても、変異株を利用することでヒト等真核生物の蛋白質を活性型として得ることが出来る発現系の技術開発に成功している。

蛋白質可溶化技術: これまでは立体構造を有していないと考えられてきた封入体中でも、蛋白質は天然と類似した 2 次構造を維持していることを見出した。この知見に基づき、封入体となった蛋白質を、2 次構造を維持したまま可溶化し、天然構造へと再生する手法を構築した。また、固定化したシャペロニン、酸化還元酵素の利用が可溶化に有効であることを見出した。

蛋白質結晶化技術: 中核拠点において開発した結晶の回折能を迅速に評価できる結晶化装置(直接評価用結晶化プレート)は、ハイスループット構造解析に対し大変有効であることから製品化を行っている。次世代の結晶化デバイスである結晶化マイクロアレイの開発も継続されており、今年度も 1 件の特許を申請した。また初期結晶化条件をさらに最適化し、良質かつ大型の結晶を迅速に得るために、蛋白質濃度と結晶化剤濃度を主要なパラメータとし、シーディング法と組み合わせた条件展開法を新たに開発中である。

結晶自動観察技術: ナノ分注機利用結晶化装置による大量の結晶化プレートを観察し、結晶化条件を検討するため、恒温で保管した 400 枚の結晶化プレートを定期的に自動顕微鏡観察する装置を開発した。これを元に、観察部のみの製品化も実施している。

結晶構造解析技術: クロムの特性 X 線(2.29 Å)を利用し、S-SAD 法で蛋白質構造解析を行うための新規結晶マウント法を開発した。大量生産可能な製品化を目指した開発を開始した。構造解析自動精密化プログラムについては、既に実用化の段階に入りつつあり、当拠点グループ内だけでなく、創薬コンソーシアムや蛋白 3000 プロジェクトの他の拠点ユーザーにも利用され、プロジェクトの推進に貢献している。

6. タンパク質の機能解析に関する成果概要

酸化ストレスによる突然変異の抑制に働くヒト hMTH1 と NUDT5 が異常 mRNA 生成抑制にも働くことを解明。カイク由来新規転写制御関連蛋白質 FMBP1 の DNA 認識機構を解明。動物細胞リボソーム蛋白質複合体 P0-P1-P2 が翻訳反応の駆動部(GTPase センター)として翻訳のスピードを決定していることを証明。真核生物ペプチド鎖解離因子 eRF3 の eRF1 との結合部位の解明および作用モデルの検証。原核生物ペプチド鎖解離因子の機能発現に関わる有力な因子、リボソーム蛋白質 L11 を同定し、その機能部位を決定。ミトコンドリアセリル tRNA 合成酵素 SerRS の tRNA 識別機構の解明。古細菌アミノアシル tRNA 合成酵素 ArgRS の tRNA 識別機構の解明。古細菌の tRNA 修飾酵素 RNaseP が 5 種の蛋白質と RNA との複合体で機能することを証明し再構成実験に成功。酵母ツーハイブリッドシステムによるエキソソーム関連蛋白質の蛋白質間相互作用の解明。mRNA 分解酵素の高次複合体形成の解明。翻訳開始因子 aIF2B のリン酸化部位の特定。大腸菌 RNA ポリメラーゼの第一次機能変換因子群(プロモーターを認識するシグマ因子群)全 7 種類について、支配下遺伝子(プロモーター)の同定と転写制御機構の解析を行い、また第二次転写因子群全 300 種の発現精製を行った。糖代謝関連酵素群の至適温度、金属イオン要求性の違いの解明。機能未知転写調節因子 CGL2612 が多剤排出ポンプ CGL2611 の転写制御を行っていることを解明。リボソーム再生因子 RRF の構造ゆらぎと機能の関係の解明。CCA 付加酵素の RNA 重合メカニズムの解明。リジン合成酵素のコードンおよびアミノ酸特異性の解明。メチオニル tRNA 合成酵素 MetRS の tRNA 認識メカニズムの解明。

7. 平成 16 年度の評価に対する反映状況について

平成 16 年度の評価委員会の指摘を受けて、翻訳因子を中心に、より困難で重要なターゲットに焦点を絞り、また成果の産業利用を視野に入れた解析を行うべく重点化を図った。重点化の効果として、1. に記載した重要な解析成果があがっている。RNA 干渉についても同様に重点項目としてサブ拠点に研究を促している。

8. 中核機関としての独自の目標（解析数、特許出願数等）に対する達成度、定期的な見直し体制等について。平成 16 年度及び平成 17 年度の再委託先一覧を含めること。

目標に対する達成度： 5 年間 100 個の構造解析という目標に対し、平成 14 年度から現時点までの PDB 登録数は 148 と、既に計画を大幅に上回っている。特許については、これまでに 34 件（国内 25 国外 9）を申請した。
定期的な見直し体制： 4 名の運営委員からなる運営委員会において、班員、予算、研究方針について逐次見直しを行っている。16 年度からは重点項目に集中的に予算を配分することで拠点全体の成果を向上させることを決定した。研究方針では、産学連携を視野に入れて、新しく病原菌ゲノムを拠点のターゲットとすることを決定し、MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)を対象に病原性因子等の構造機能解析を開始した。

表 1 再委託先一覧（平成 16 年度，平成 17 年度同一）

機関名	業務担当者	業務題目
北海道大学大学院理学研究科	出村 誠	転写制御関連タンパク質の構造・機能に関する NMR 解析
(独)産業技術総合研究所	田村具博	遺伝子発現制御に関する研究
東京大学大学院新領域創成科学研究科	津本浩平	蛋白質合成に関わる各種プロセッシング・修飾酵素と因子の構造ゲノム科学
新潟大学理学部	内海利男	リボソームの構造機能解析
東京大学医科学研究所	伊藤耕一	翻訳終結機能研究を基軸とした、翻訳装置の普遍機能構造の解明
東京大学大学院工学系研究科	鈴木 勉	ミトコンドリア翻訳関連因子の構造解析
お茶の水女子大学理学部	今野美智子	核酸とタンパク質の結合機構に関する研究
(独)産業技術総合研究所	河原林 裕	遺伝子情報解析に関する研究
国立遺伝学研究所	白木原康雄	原核真核転写因子の構造解析
国立遺伝学研究所	西川 健	コンピュータ解析によるターゲット選択
(財)日本生物科学研究所	石浜 明	大腸菌転写因子の構造 - 機能相関の網羅的解析
大阪大学大学院薬学研究科	吉田卓也	クロマチン構造関連因子・核内受容体の立体構造解析
九州大学大学院農学研究院	木村 誠	tRNA 修飾酵素および翻訳開始因子の構造生物学的研究
熊本大学大学院医学薬学研究部	山縣ゆり子	mRNA の生成(転写), 制御, 成熟化と輸送, 並びに遺伝情報維持に関わるタンパク質の構造生物学
東京工業大学大学院生命理工学研究科	濡木 理	遺伝暗号の翻訳に働くタンパク質の構造解析に関する研究

9. 中核機関として、外部への広報、サブ機関を含むグループ内部での連携体制の確保をどのように実現しているか⁵

北大中核拠点に、プロジェクト内外で開発された技術を集約したハイスループット構造解析拠点を設置し、サブ拠点に対して解析支援サービスを実施している。主に機能解析を行っているサブ機関より、構造解析用試料の調製、蛋白質結晶化、構造解析に関しての依頼を受けてきた。このシステムにより、各サブ機関における機能解析と HT パイプラインにおける構造解析が並行して進行する体制を確立した。中核拠点では、また、蛋白質解析の各工程におけるハイスループット化の技術開発を行い、技術情報は、研究交流会あるいはニュースレターによってサブ拠点に伝えている（平成 17 年度の研究交流会は 11 月 21 日～22 日に予定。ニュースレター No.6 を 12 月に刊行予定）。北海道産総研(田村グループ)は、蛋白質の発現や可溶化について、北大の技術支援サービスをサポートしている。インフォマティクスの支援として、遺伝研(西川グループ)では、転写翻訳データベース TTDB を公開しており、班員のターゲットセレクションに役立てられている。

10. 各年度の委託費 (百万円)	平成 14 年度	平成 15 年度	平成 16 年度	平成 17 年度	計
	468.925	476.6	287	265	1497.525

(別紙)論文のリスト(グループとしての成果を表す代表的な論文 10~20 編程度)

Structural basis for template-independent RNA polymerization

K. Tomita, S. Fukai, R. Ishitani, T. Ueda, N. Takeuchi, D. G. Vassilyev, and O. Nureki

Nature **430**, 700-704 (2004)

PDB ID: 1VFG

Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase

Toyoyuki Ose, Kenji Watanabe, Takashi Mie, Mamoru Honma, Hiromi Watanabe, Min Yao, Hideaki Oikawa, and Isao Tanaka

Nature **422**, 185-189 (2003)

PDB ID: 1IZC

Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*

Kong C, Ito K, Walsh MA, Wada M, Liu Y, Kumar S, Barford D, Nakamura Y, Song H

Mol Cell. **14**, 233-45 (2004)

PDB ID: 1R5B, 1R5N, 1R5O

Structural basis for anticodon recognition by methionyl-tRNA synthetase

K. Nakanishi, Y. Ogiso, S. Fukai and O. Nureki

Nat. Struct. Mol. Biol., **12**, 931-932 (2005)

PDB ID: 2CSX, 2CT8

Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects

Hisanori Takagi, Yoshimitsu Kakuta, Takahiro Okada, Min Yao, Isao Tanaka and Makoto Kimura

Nat. Struct. Mol. Biol. **12**, 327-331 (2005)

PDB ID: 1WMI

A short peptide insertion crucial for angiostatic activity of human tryptophanyl-tRNA synthetase

Y. Kise, S. W. Lee, S. G. Park, S. Fukai, T. Sengoku, R. Ishii, S. Yokoyama, S. Kim and O. Nureki

Nat. Struct. Mol. Biol. **11**, 149-156 (2004)

PDB ID: 1ULH

Dual Mode Recognition of Noncanonical tRNAs^{Ser} by Seryl-tRNA Synthetase in Mammalian Mitochondria

Chimnaronk, S., Jeppesen, M.G., Suzuki, T., Nyborg, J. and Watanabe, K.

EMBO J. **24**, 3369-3379 (2005)

PDB ID: 1WLE

X-ray crystallography study on ribosome recycling: the mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit.

Wilson D. N., Schlutzenzen F., Harms J. M., Yoshida T., Ohkubo T., Albrecht R., Buerger J., Kobayashi Y., Fucini P.

EMBO J. **24**, 251-260 (2005)

PDBID: 1Y69

Wobble modification differences and subcellular localization of tRNAs in *Leishmania tarentolae*: implication for tRNA sorting mechanism

Kaneko, T., Suzuki, T., Kapushoc, S.T., Rubio, M.A., Ghazvini, J., Watanabe, K., Simpson, L. and Suzuki, T

EMBO J. **22**, 657-667 (2003)

Molecular basis of alanine discrimination in editing site

Masaaki Sokabe, Ayuko Okada, Min Yao, Takashi Nakashima, Isao Tanaka

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **102**, 11669-11674 (2005)

PDB ID: 1WNU, 1WXO, 1V7O

Structural basis for lysidine formation by ATP pyrophosphatase accompanied with a lysine-specific loop and a tRNA-recognition domain

Nakanishi, K., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Soma, A., Sekine, Y., Suzuki, T. and Nureki, O.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **102**, 7487-7492 (2005)

PDB ID: 1WY5

Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease

Kirino, Y., Yasukawa, T., Ohta, S., Akira, S., Ishihara, K., Watanabe, K. and Suzuki, T

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **101**, 15070-15075 (2004)

The CGL2612 Protein from *Corynebacterium glutamicum* Is a Drug Resistance-Related Transcriptional Repressor: Structural and Functional Analysis of a Newly Identified Transcription Factor from Genomic DNA Analysis

Hiroshi Itou, Ui Okada, Hiroaki Suzuki, Min Yao, Masaaki Wachi, Nobuhisa Watanabe and Isao Tanaka

J. Biol. Chem., **280**, 38711-38719 (2005)

PDB ID: 1V7B

How oligomerization contributes to the thermostability of an archaeon protein: Protein L-Isoaspartyl-O-methyltransferase from *Sulfolobus tokodai*

Yoshikazu Tanaka, Kouhei Tsumoto, Yoshiaki Yasutake, Mitsuo Umetsu, Min Yao, Harumi Fukada, Isao Tanaka, and Izumi Kumagai

J. Biol. Chem. **279**, 32957-32967 (2004)

PDB ID: 1VBF

Crystal structure of archaeal ribonuclease P protein Ph1771p from *Pyrococcus horikoshii* OT3: An archaeal homolog of eukaryotic ribonuclease P protein Rpp29

Tomoyuki Numata, Ikuko Ishimatsu, Yoshimitsu Kakuta, Isao Tanaka, and Makoto Kimura

RNA **10**, 1423-1432 (2004)

PDB ID: 1V76

Structural basis for sulfur relay to RNA mediated by heterohexameric TusBCD complex

T. Numata, S. Fukai, Y. Ikeuchi, T. Suzuki, and O. Nureki

Structure, in press

PDB ID: 2D1P

Crystal Structure of a Ribonuclease P Protein Ph1601p from *Pyrococcus horikoshii* OT3: An Archaeal Homologue of Human Nuclear Ribonuclease P Protein Rpp21

Yoshimitsu Kakuta, Ikuko Ishimatsu, Tomoyuki Numata, Kazumi Kimura, Min Yao, Isao Tanaka, and Makoto Kimura

Biochemistry **44**, 12086-12093 (2005)

PDB ID: 1XOT