

## 5-6 タンパク3000プロジェクト 中核機関成果報告

グループ名 個別的解析プログラム名 (タンパク質高次構造形成と機能発現)  
中核機関名 京都大学大学院理学研究科  
代表者名 三木 邦夫

### 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

本課題では、タンパク質が細胞内で合成された後の折れたたみ構造の変化と機能の発現（立体構造形成、トランスロケーション、ストレス応答、品質管理と分解など）に関与する一連のタンパク質群の構造を網羅的に決定する。得られた構造に基づいて、その働きを分子レベルで解明することで、タンパク質の高次構造形成と機能発現の分子機構を系統的に理解する。これに関連して、対象とするタンパク質の調製や結晶構造解析法の高度化に関する基盤的技術の開発を行う。研究計画にしたがって、この分野に直接関わるタンパク質を中心的な対象とし、また、その周辺のタンパク質も含めて、幅広く構造/機能解析を推進したところ、当初の構造解析の目標を達成することができた。

構造解析の主な成果としては、次のようなものをあげることができる。

【タンパク質輸送・局在化】細菌におけるリポタンパク質の内膜から外膜への輸送に関わるタンパク質 LolA（外膜特異的リポタンパク質の分子シャペロン）、LolB（LolA が運んできたリポタンパク質を受け取る外膜特異的リポタンパク質受容体）の4種の結晶構造、2種の変異体の結晶構造を決定した。LolA と LolB は予想外によく似た構造をとり、それぞれの分子内に存在する疎水性の窪みがリポタンパク質の脂質部分を結合する部位であることがわかった（徳田, 三木, *EMBO J.*, 2003）。加えて、ペリプラズムのストレス応答に関与するリポタンパク質 NlpE の結晶構造を決定した（徳田, 三木, 2005）。

【分子シャペロン】グループ I 型シャペロニンでは、GroEL, GroES, ATP からなる三重複合体を形成して、そのリング内に変性タンパク質を取り込む。基質タンパク質を含んだ初めての例として好熱菌由来の GroEL-GroES 複合体の結晶構造を決定した。基質タンパク質を取り込んだことによって、7 量体リングが 7 回回転対称から大きく歪んでいることが明らかになった。（吉田, *Structure*, 2004）。一方、グループ II 型シャペロニンは、 $\alpha$ -サブユニット変異体だけからなる 16 量体の結晶構造を決定し、結晶構造で得られた close 型（基質を取り込んだときのかたち）の構造から、open 型（基質を取り入れるために開いたときのかたち）の構造を推測することができた（養王田, 三木, *J. Mol. Biol.*, 2004）。また、グループ II シャペロニンについては、タンパク質工学的にゲストタンパク質と融合させた会合体を作成し、その構造および機能を解析して、これを用いた効率的な発現システムについても検討した（三木, *Prot. Sci.*, 2004）。

【タンパク質分解とシャペロン】プリオン様タンパク質 Sup35 によるアミロイドファイバーを分断する Hsp104（酵母）のホモログである ClpB（好熱菌）モノマーの結晶構造を明らかにし、そのドメイン間の動きが脱凝集の機能を発揮するために重要であることを、構造と変異体解析から示した（吉田, *Cell*, 2003）。C 末端に分子内シャペロン様  $\beta$ -バレルドメインを有する酸化剤耐性アルカリプロテアーゼ KP-43 の結晶構造を決定した（三木, *J. Biol. Chem.*, 2004）。膜結合性の金属プロテアーゼ FtsH の結晶構造解析・機能解析も行った（吉田, *Structure*, 2002）。

【金属取り込みによるタンパク質成熟化】鉄イオウクラスター形成に関わる種々のタンパク質が、本グループ内で次々と決定された。クラスター合成系で機能する SufD は、 $\alpha$ -ヘリックス構造モチーフを持ち、このモチーフで二量化する新規な四次構造であった（福山, 2005）。クラスター中間体を保持する機能がある SufA は二量体で、C 末端側にある Cys 残基が近接しており、二量体の間で Fe-S クラスター中間体を配位することが示唆された（福山, 2005）。ABC-ATPase である SufC は、他の

ABC-ATPase には見られない新規の部分構造を有しており, SufD と複合体を形成する機構を考察した (三木, *J. Mol. Biol.*, 2005). 一方, ヒドロゲナーゼに金属を取り込み活性発現するヒドロゲナーゼ成熟化因子 Hyp タンパク質群の機能を明らかにするため, HypA, HypC, HypD の結晶化に成功し, HypC については構造が得られた. HypC は N 末端側の OB fold ドメインと, C 末端側の $\alpha$ -ヘリックスより構成され, 特に OB fold 領域の一次構造がよく保存されていることから, HypC の構造は細菌から古細菌まで広く保たれていることが推定された (今中, 三木, 2005).

【高次会合状態と機能発現】ダイズ種子中の貯蔵タンパク質であり, 食糧タンパク質として重要なグリシニンの 3 量体 (プログリシニン) ならびに 6 量体会合状態の構造を決定し, 会合状態が変化する機能を明らかにした. それぞれ, プログリシニン分子中に存在する 4 箇所のディスオーダー領域が, 大きく移動することでグリシニンでは 6 量体が形成されることがわかった. この結果から 6 量体形成を阻害しないグリシニン変異体の設計が可能になり, 血圧低下やコレステロール低下などの作用を有する生理活性ペプチド内在グリシニンの設計などに応用できる. (三上, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, *J. Agric Food. Chem.* 2003). また, ダイズ以外で緑豆, アズキ, カボチャの種子グロブリンについて結晶構造を決定した. 構造を比較の結果, ループ部分の構造の多様性を明らかになった (三上, 2005).

オートファジーにおいて物質輸送の機能を担うオートファゴソームの形成に関与しているタンパク質 MAP-LC3 (ヒト由来) の溶液構造を決定したところ, MAP-LC3 は microtubule とオートファゴソームの間のアダプタータンパク質として機能することが示唆された. (河野, 水口, *J. Biol. Chem.*, 2005).

複雑な超分子複合体を形成するタンパク質として, 有鬚動物由来の細胞外巨大ヘモグロビン (分子量 38 万) の結晶構造を決定し, ヒトのヘモグロビンとはまったく異なる様式で 4 種類のサブユニットが会合し, 全体で 24 量体を形成していることを明らかにした. この巨大ヘモグロビンは酸素を運搬すると同時に, 硫化水素も同時に運搬する. 得られた結晶構造から, 硫化水素結合部位を推定し, その周辺環境から結合のメカニズムを議論した (三木, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005). 回虫成虫ミトコンドリア膜中に存在する膜タンパク質複合体 II (native 構造と阻害剤構造) の立体構造を明らかにした (原田, 2005).

## 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 <sup>*1</sup>	22	101
(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 <sup>*1</sup>	12	4
(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 <sup>*1</sup>	54	135

## 3. 論文掲載数<sup>\*2</sup>

	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	62	255

## 4. 成果の産業連携について<sup>\*3</sup>

	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)	1 件	13 件
特許出願数 (海外)	0 件	0 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	<p>平成 17 年 4 月～10 月末： 10 件          ([参考] 平成 14 年 4 月～平成 17 年 3 月末： 13 件)</p> <p>1) 結晶化自動観察システムの開発, 2) 有用ペプチド配列導入ダイズタンパク質の分子設計, 3) 結晶化装置開発と調製結晶の質的評価, 4) タンパク質結晶用 Grid Screening 溶液の調整, 5) 耐熱性 hydrogenase, 6) 超好熱菌を利用したタンパク質の耐熱化, 7) LolA と LolB をターゲットにした薬剤の開発, 8) 抗体認識部位 (エピトープ) アミノ酸配列の決定, 抗体による受容体活性化機構の解明, 高活性抗体の設計, 9) 蛋白質構造解析コンソーシアムとの産学連携</p>
(3) 成果の産業移転に関する具体的な例	<p>1) 結晶化自動観察システムの製品化, 2) 抗体複合体の構造から抗体の抗原への親和性の向上, 類似の受容体に作用する抗体の開発</p>
(4) 出願した特許の具体的な例	<p>1) グリシニン, <math>\beta</math>-コングリシニンおよびプログリシニンの結晶, 三次元座標, 三次元構造およびそのモデル, 並びにそれらの使用, 2) 耐熱性アスパルターゼの結晶, 3) レクチンの結晶, 4) 結晶化スクリーニング用溶液の作成方法, 5) アルツハイマー病の原因となるアミロイド <math>\beta</math> ペプチドとトランスサイレチンの相互作用部位, 6) 水素の製造法および製造装置, 7) 耐熱化酵素を利用した光学活性化化合物の合成, 8) 耐熱・耐アルカリ性プロテアーゼの開発, 9) 細菌リポ蛋白質局在化因子 LolA および LolB の結晶構造解析.</p>

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

タンパク質構造解析技術の開発に関して、黒木グループ（日本原子力研究開発機構）は、新規タンパク質に対するモノクローナル抗体の調製、抗体を用いた結晶化・構造決定を推進した。抗体との複合体の結晶化にはポリエチレングリコールが有効であることをつきとめ、市販のスクリーニング系を基準にして抗体複合体の結晶化に特化した結晶化スクリーニング試薬の開発が進んでいる。本課題では、現在すでに共同研究による新しいターゲットへの適用が進められており（黒木、三木の連携）、今後、本グループ内のみならず本プロジェクト全体に、抗体を用いた結晶化技術を広く提供し実用化することを目指す。結晶化の技術開発に関して、通常の実験室スケールに適した自動結晶化観察装置の開発（三木、三谷商事（株）との共同）を行った。自動結晶化観察装置についてはすでに商品化され市販されている。結晶化の困難な試料について、そのドメイン単位での結晶化を支援するための計算による二次構造ブレイカー予測プログラムが開発された（美宅, *Biophysics*, 2005）。

大型放射光施設 SPring-8 における多波長異常分散法の汎用的実験法の開発（XAFS 測定を行わずに行う実用的実験法の開発、高エネルギー（短波長）X線による Xe や I 原子の多波長異常分散法の開発など）に取り組んで、それぞれに成果を得た（三木, *J. Appl. Crystallogr.*, 2004）。

6. タンパク質の機能解析に関する成果概要

機能解析のグループでは、それぞれのターゲットの機能解析を進めている。

**[タンパク質輸送・局在化]** タンパク質分泌装置の駆動 ATPase である SecA は、分泌モニタータンパク質 SecM によって巧みな制御を受けていることを発見した（伊藤）。RseP（旧称 YaeL）はアンチ

シグマ E 因子である膜タンパク質 RseA の DegS に引き続く 2 段階目の切断を司り、表層ストレス応答を可能にすることを発見したが、さらに RseP の PDZ ドメインと RseA のグルタミンに富むペリプラズム領域が DegS による一段階目の切断がない時に RseP の切断を抑制していることを見出した (伊藤). RseP について、プロテアーゼ活性を示し、RseA 以外の TM 配列を切断し得ること、効率の良い切断には TM 配列中の helix-breaking 残基が重要であることを示した (伊藤). 大腸菌に存在する 90 種以上のリポ蛋白質それぞれの遺伝子を破壊することにより、必須リポ蛋白質 2 種 (LolB, YfiO), 生育を高温感受性にするもの 7 種 (DcrB, YcfM など), 溶菌を引き起こすもの 1 種 (YfgL), 薬剤に対し高感受性にするもの 5 種 (YcfM など) を明らかにした (徳田). ミトコンドリア膜タンパク質の輸送システムおよび内膜の 6 回膜貫通型蛋白質 ABCme についての輸送シグナル配列などの研究を進めた (三原). 疎水性の高いマルチスパン膜タンパク質 (ABC 輸送体) のミトコンドリア輸送シグナル配列 (N135) の機能解析を行い、この配列が ABC 輸送体のタンパク質合成に共役した小胞体への標的化を抑制し、かわってミトコンドリアへの合成後の輸入を実現する特異な機能を持っていることを明らかにした (三原, 阪口).

【分子シャペロン】 オリゴマー構造が安定な ClpC を発見した. 一方, sHsp の構造はオリゴマーとして存在するが、オリゴマー構造は変性タンパク質結合部位が隠された不活性な状態であり、オリゴマー解離によってシャペロン機能が発現することを明らかにした (養王田).

【タンパク質分解とシャペロン】 コラーゲンに特異的な小胞体分子シャペロン HSP47 は 3 本鎖コラーゲンに結合することによって、その安定化に寄与し、また小胞体内でのコラーゲンの凝集阻止に働いていることを明らかにした (永田). 哺乳動物の小胞体ストレス応答の 3 つの経路 (ATF6 経路, IRE1-XBP1 経路, PERK-ATF4 経路) のうち、IRE1-XBP1 経路で機能する転写因子 XBP1 が、小胞体膜の主要な成分であるリン脂質の合成を誘導して小胞体の発達を促すことを見いだした. また PERK の下流で働く分子である GADD34 の大量調整が可能になった (森).

【金属取り込みによるタンパク質成熟化】 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株で、ヒドロゲナーゼ成熟化に関与する Hyp タンパク質群 (ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypA-HypF) の相同遺伝子や、Signal peptide peptidase と相同性を示す遺伝子を同定し、タンパク質も調製した (今中).

## 7. 平成 16 年度の評価に対する反映状況について

「分散的なテーマによる問題の掘り下げ方が浅い、拠点としてテーマに鋭く迫っているとは言えない、というそれまでの指摘があまり改善されているようには感じられない」、というご指摘があった。テーマが分散的であるのはこの領域での構造ゲノム科学として立案しているため、当初から対象タンパク質を狭い範囲に絞ってはいないことによると思われるが、平成 16 年度以降には、たとえば、本領域での中心的テーマの一つであるシャペロニンについて、グループ I, グループ II の両タイプでの新たな構造解析が完了し、それぞれ、基質を取り込んだ状態における構造変化、変異体導入による基質取り込みに連動したシャペロニン分子の「蓋」部分の開閉についての議論が深まった。この基質取り込みに関する「蓋」部分の動きは、協同して働くコシャペロニンの構造などからも議論が深まっている。また別の注目すべきシャペロンの機能である凝集体の解きほぐしに関して、この機能を持つ分子シャペロン ClpB についても構造が決定され、ドメイン間の動きの重要性を明らかにするとともに、DnaJ, DnaK との関係に関わる機能的な解析が進んだ。これらのシャペロン分子に関しては構造研究からの十分な掘り下げが行われたと考える。他の重要なテーマとして取り組んでいるタンパク質の成熟化、特に、金属原子 (クラスター) の取り込みに関しても同様で、一連の Fe-S タンパク質成熟化 SUF マシーナリの SufA, SufC, SufD の構造がそれぞれ決定され、さらにそれらの機能複合体 (例えば SufC+SufD 複合

体)の構造解析も進んでいる。同じく金属取り込みによるタンパク質の成熟化として、NiFe型ヒドロゲナーゼの金属取り込みによる成熟化に関わるHypタンパク質群のうち、HypCの構造が決定され、HypA、HypDおよび機能的複合体HypC+HypD複合体の構造解析が進んでいる。これらは、異なる金属取り込み系のタンパク質群の構造が網羅的に解明しようとしているもので、構造生物学的研究例がほとんどないこの分野を深く掘り下げる研究になると確信している。構造ゲノム科学プロジェクトである以上、対象は分散的に設定されているが、その中の重要なテーマに関しては深い議論が可能であり、新しい重要な知見を生み出していると考えている。

「標的の多彩さを利用して機能発現に重要だが見過ごされている問題(例えば”protein non-folding problem”。機能発現に必須または密接に関与するペプチド鎖部分がしばしば規則的なフォールド構造をとらない理由を問う)に挑戦するのも一案」とのご指摘があるが、その取り組みの一例として、グループIシャペロニンの補因子Cpn10(Gro-ES)のループ領域に着目した。この領域はCpn60(Gro-EL)との結合部位が存在するが、非常に長いフレキシブルなループ領域となっており、Cpn10単独では結晶構造中ではほとんど電子密度が確認できず、溶液中では大きく揺らいでいると思われる。しかしながら、Cpn60と複合体を形成するとしっかりと固定されることが、複合体の結晶構造から明らかになっている。また、基質を分子内部に取り込んだ状態での“ゆがんだ”シャペロニン複合体結晶構造とも比較して、大きく揺らいでいることの意味を考えることができた。また、リポタンパク質受容体であるLolBの構造中には特定の二次構造をとらない箇所があり、これはリポタンパク質を外膜に移行させる役目のために、揺らいでいることが重要であることが示唆された。

「Misfold病の予防と治療に対する社会的要請は強いがゆえに、本グループの主題への期待も大きい」とのご指摘で、Misfold病への取り組みとして、アルツハイマー病発症に関わるFe65タンパク質のWWドメインの溶液構造を決定し、他の関連タンパク質とともに構造と機能の解析を進めている。また、 $\alpha$ A、 $\alpha$ B-crystallinの異常凝集が白内障を引き起こすことに関して、アミノ酸の反転とmisfold病の関係が指摘されている。さらに、misfold病は $\alpha$ ヘリックス構造の中心部分がブレイクし2本の $\beta$ シートに成るという構造変化が素過程であることから、構造予測の対場から、二次構造ブレーカーの予測システムを発展させてmisfold病の原因タンパク質のアミノ酸配列解析を行っている。

「・・・先鋭的な研究ができる仕組みが必要・・・。そのためにはメンバーの整理も含む部分交替も必要であろう」とのご指摘に対して、平成17年度から2グループを中止して1グループ加入した。さらに平成18年度からは2グループを中止する計画である。

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。

当初に目標としたタンパク質の構造解析数は5年間で50個を目標とした。構造解析においては、平成17年10月現在で、構造解析を終了したタンパク質数は188個であり、PDBへの登録数(123個)においても、当初の計画を大きく上まわることができた。また、この間10件を超える国内特許を出願した。また、この課題における研究論文発表としては、原著論文で300報以上となり、Nature, Science, Cell, Mol. Cell, Nature Cell Biol., EMBO J., Proc. Natl. Acad., Sci. USA, などをはじめとする、主要なジャーナルに掲載されている。今後、重要でインパクトの高いタンパク質群が構造解析を成功させるために、編成グループ(再委託先)の進捗状況を定期的に分析して見直し、平成16年度からは新たに3グループに参画いただいた(京都大学原子炉実験所、藤井; 兵庫県立大学: 阪口、富山医科薬科大学、水口)。また、平成17年度開始時にも同様に見直し、2グループへの再委託を取りやめ、新たに1グループに参画いただいた。さらに、平成18年度にも2グ

ループへの再委託を取りやめる計画にしている。

16年度	17年度	機関名	業務担当者
中核	中核	京都大学大学院理学研究科	三木 邦夫
再委託	再委託	大阪大学大学院理学研究科	福山 恵一
再委託	再委託	京都大学大学院農学研究科	三上 文三
再委託	再委託	京都大学化学研究所	畑 安雄
再委託	—	京都大学原子炉実験所	森本 幸生
再委託	再委託	北海道大学大学院理学研究科	河野 敬一
再委託	再委託	富山医科薬科大学薬学部	水口 峰之
再委託	再委託	京都大学大学院工学研究科	今中 忠行
再委託	再委託	東京農工大学大学院	養玉田正文
再委託	再委託	名古屋大学大学院工学研究科	美宅 成樹
再委託	再委託	東京工業大学資源化学研究所	吉田 賢右
再委託	再委託	京都大学再生医科学研究所	永田 和宏
再委託	—	京都大学大学院理学研究科	森 和俊
再委託	再委託	京都大学ウイルス研究所	伊藤 維昭
再委託	再委託	東京大学分子細胞生物学研究所	徳田 元
再委託	再委託	九州大学大学院医学研究院	三原 勝芳
再委託	再委託	九州大学大学院理学研究院	藤木 幸夫
再委託	再委託	京都大学原子炉実験所	藤井 紀子
再委託	再委託	兵庫県立大学大学院生命理学研究科	阪口 雅郎
再委託	再委託	日本原子力研究所（日本原子力研究開発機	黒木 良太
—	再委託	京都工芸繊維大学繊維学部	原田 繁春

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<sup>※5</sup>

これまで年1回の連絡会議を行い、各サブ機関でのプロジェクトの進捗状況を的確に把握し、議論を行い、グループ全体での連携性の確保に重要な役目を果たしてきた。加えて、メール等による情報の発信と返信、また、グループ内のワーキンググループ委員との協議、また、委員のワーキンググループからのフィードバックなど、頻繁な意思疎通が行われている。また、ホームページによって進捗状況を公開し、グループ内での情報の共有に努めている。

グループ内には、タンパク質調製が困難なターゲット（膜タンパク質を含む）に取り組んでいる機能解析グループが複数あり、これらのグループでは、結果のインパクトは極めて高いが、タンパク質の発現、精製には大きな困難が伴うものを扱っている。プロジェクトも中盤を越えて、そのターゲットの今後の見極めが重要な時期になるが、これに関しては中核機関としての役目を果たしたい。実質的な推進策として、膜タンパク質や発現の難しいタンパク質を対象とするグループでの進捗を再検討して、本プロジェクト内でのグループの入れ替えも実施した。機能解析は分子生物学的、生化学的に十分行われているが、構造生物学的視点への方向性が見極められないターゲットを、構造研究の方向に向けて推進させることは重要であり、今後、そのようなターゲットを一つでも多く成果に結びつけるよう、中核機関としての努力を払いたい。

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
	280	360	227	204	1,071

(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)

1. Kida Y, Mihara K, and Sakaguchi M, Translocation of a long amino-terminal domain through ER membrane mediated by following signal-anchor sequence, *EMBO J.* **24**, 3202-3213 (2005).
2. Oka T, Mihara K, A Railroad Switch in Mitochondrial Protein Import, *Mol. Cell* **18**, 145-146 (2005).
3. Numoto N, Nakagawa T, Kita A, Sasayama Y, Fukumori Y, Miki K, Structure of an extracellular giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14521-14526 (2005). PDB ID: 2D2M, 2D2M
4. Shimamura T, Koike-Takeshita A, Yokoyama K, Masui R, Murai N, Yoshida M, Taguchi H, Iwata S, Crystal Structure of the Native Chaperonin Complex from *Thermus Thermophilus* Revealed Unexpected Asymmetry at the *cis*-Cavity, *Structure* **12**, 1471-1480 (2004). PDB ID: 1WE3,1WF4
5. Zeng L, Lu M, Mori K, Luo S, Lee A S, Zhu Y, Shyy J Y J, ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis, *EMBO J.* **23**, 950-958 (2004).
6. Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer J W, XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis and biogenesis of the endoplasmic reticulum, *J. Cell Biol.* **167**, 35-41 (2004).
7. Akiyama Y, Kanehara K, Ito K, RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences, *EMBO J.* **23**, 4434-4442 (2004).
8. Murakami A, Nakatogawa H Ito K, Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12330-12335 (2004).
9. Feese MD, Tamada T, Kato Y, Maeda Y, Hirose M, Matsukura Y, Shigematsu H, Muto T, Matsumoto A, Watarai H, Ogami K, Tahara T, Kato T, Miyazaki H, Kuroki R, Structure of the receptor-binding domain of human thrombopoietin determined by complexation with a neutralizing antibody fragment, *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 1816-1821 (2004). PDB ID: 1V7M, 1V7N
10. Zhu Y, Swanson B, Wang M, Hildeman D, Schaefer B, Liu X, Suzuki H, Mihara K, Kappler J, Marrack P, Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2 related proteins on mitochondria in T cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7681-7686 (2004).
11. Lee S, Watanabe YH, Sigler PB, Chiu W, Yoshida M, Tsai FT, The Structure of ClpB: A Molecular Chaperone that Rescues Proteins from an Aggregated State, *Cell* **115**, 229-240 (2003). PDB ID: 1QVR
12. Mihara K, Moving inside membranes, *Nature* **424**, 505-506 (2003).
13. Ishii D, Kinbara K, Ishida Y, Ishii N, Okochi M, Yohda M, Aida T, Chaperonin-mediated stabilization and ATP-triggered release of semiconductor nanoparticles, *Nature* **423**, 628-632 (2003).
14. Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K, EDEM As an Acceptor of Terminally Misfolded Glycoproteins Released from Calnexin, *Science* **299**, 1394-1397

- (2003).
15. Takeda K, Miyatake H, Yokota N, Matsuyama S, Tokuda H, Miki K, Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB, *EMBO J.* **22**, 3199-3209 (2003). PDB ID: 1IWL, 1UA8, 1IWM, 1IWN
  16. Kanehara K, Ito, K, Akiyama Y, YaeL proteolysis of RseA is controlled by the PDZ domain of YaeL and a Gln-rich region of RseA, *EMBO J.* **22**, 6389-6398 (2003).
  17. Matsumoto N, Tamura S, Fujiki Y, The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes, *Nat. Cell Biol.* **5**, 454-460 (2003).
  18. Matsumoto N, Tamura S, Furuki S, Miyata N, Moser A, Shimosawa N, Moser H.W, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y, Mutations in Novel Peroxin Gene *PEX26* that Cause Peroxisome-Biogenesis Disorders of Complementation Group 8 Provide a Genotype-Phenotype Correlation, *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 233-246 (2003).
  19. Adachi M, Kanamori J, Masuda T, Yagasaki K, Kitamura K, Mikami B, Utsumi S, Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homohexamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7395-7400 (2003). PDB ID: 1OD5
  20. Masuda K, Matsuyama S, Tokuda H, Elucidation of the function of lipoprotein-sorting signals that determine membrane localization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7390-7395 (2002).