

## 5 - 7 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(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科  
代表者名 稲垣 冬彦

### 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

#### 進捗状況の概観

構造研究、機能研究、基盤技術開発を含め、当グループの事業の進捗状況は順調である。構造解析数では、平成14年 - 17年の4年間で45個の構造決定を予定していたが、平成17年11月末現在で、99個のタンパク質の構造を決定し、論文投稿時に随時PDB登録を行っている(PDB登録数60)。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網羅的に立体構造を決定する点である。平成17年度には、研究項目として好中球活性酸素発生系の構造生物学、細胞接着の構造生物学、細胞極性の構造生物学、細胞増殖の構造生物学、細胞分化の構造生物学、飢餓シグナルの構造生物学、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取り上げた。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、機能解析が著しく進展した。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ている点である。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タンパク質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ともに我国発の独自技術であり、国際的なdefacto standardとして今後展開していきたい。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。今後、結晶構造解析に向けたタンパク質の大量調製法の確立を目指す。第3の特長は当グループでは、細胞生物学研究者、機能解析研究者、バイオインフォマティクス研究者と中核機関を中心とする構造生物学研究者との間で密接な共同研究体制が構築されている点である。当グループからの研究は一流国際誌に掲載され、国際的にも高い評価を受けている。第4の特長は平成17年度より、北大医学系研究者、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を新たに加えた。北大より10名の研究者が当プロジェクトに参加している。

#### 研究課題の進捗状況

##### (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、自然免疫で重要な役割を果たしている。活性酸素は生体にとって危険なため、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成分Cyt b<sub>558</sub>と結合すること、その結合には細胞質因子p47<sup>phox</sup>が開構造より閉構造へ構造を変化することが必須といわれている。我々はp47<sup>phox</sup>に焦点を当てて研究を行い、閉構造に対応するp47<sup>phox</sup>タンデムSH3ドメインの構造および開構造に対応するタンデムSH3ドメインとp22<sup>phox</sup>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明らかにした。閉構造と開構造を比較することにより活性酸素発生系の活性化機構を明らかにした。

**インターフェロン産生系** - IRF-3 (Interferon regulatory factor 3)はウイルス感染に应答し、I型インターフ

エ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。

## (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ブリン (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) 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) regulatory factor) ならびに E3KARP (NHE3 kinase-A regulatory protein) 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、さらに結合面を傾けて結合の特異性を出していることを明らかにした。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。

## (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薬剤 (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。

**Crk-I, Crk-II の構造と制御機構** - CrkI (SH2-SH3), CrkII (SH2-SH3-SH3) はアイソフォームであり、CrkI の蓄積により細胞がガン化することが報告されている。このような差異を明らかにするために、我々は CrkI, CrkII の構造を NMR 法により明らかにした。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、

SH3 の結合部位はともに SH2 により覆われていた。このような構造の差異は X 線小角散乱や CrkI, CrkII と標的タンパク質との結合実験の結果とも対応する。以上、CrkI, CrkII の発ガン性の違いは SH3 ドメインの露出度の差異として説明できる。

#### (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。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、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。また、調製した蛋白質を用いて抗体の作成もおこなった。これらの抗体は今後のオートファジー研究にとって重要な役割を果たすものである。現在、Atg8, Atg12, Atg3, Atg4 の構造を明らかにした。興味深いことに、Atg8, Atg12 とともにユビキチンフォールドをとっていた。Atg8 のプロセッサー酵素である 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ている。

#### (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、当グループに北大医学系研究者、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、創薬研究へと結びつけることを目的としている。北大の特長のある医学研究と構造研究を結びつけ、創薬への手がかりを見つけることを目的としている。

### 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 <sup>1</sup>	29	31
(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>	0	0
(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>	33	66

### 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	49	121

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) 特許出願数(海外)	0 件 0 件	3 件 1 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: 2 件 ([参考]平成 14 年 4 月～平成 17 年 3 月末: 3 件) 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、公開予定。Olivia をバリアン NMR システムのバンドルソフトとして提供することを日本バリアンと検討。 (某民間会社より提供されたタンパク質 3 種について、Olivia によりスペクトル解析をおこない、良好な結果を得た。)	
(3)成果の産業移転に関する具体的な例	なし	
(4)出願した特許の具体的な例	Olivia に関する特許 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様の正確な帰属が可能となった。(国内) シグナル伝達の人為的制御 - 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 の結合ペプチドを組み込み、Grb2 の添加により活性酸素発生能を抑えた。人為的にシグナルをオン・オフするシステムを作った。(国内) シグナル制御をおこなうペプチド - 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) HLA-G のジスルフィド結合型 2 量体化による免疫抑制効果の増進 - 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。(海外)	
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 <sup>4</sup>		
(1) Olivia による NMR 構造解析の自動化 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。NMR 構造解析の HTP 化はほぼ完成に近づいたといえる。		
(2) SAIL 法を用いた高分子量タンパク質の高精度構造決定 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。

### (3) カイコサナギを用いたタンパク質発現

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、或いは活性を持た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不可欠である。

## 6. タンパク質の機能解析に関する成果概要

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関与するタンパク質として 16 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コンジュゲートシステム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 のコンジュゲート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予定である。住本博士は好中球活性酸素発生系における p40<sup>phox</sup> 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<sup>phox</sup> 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する。藤博士は、Bioinformatics 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、バイオインフォマティクスの立場より本プロジェクトを支援している。

## 7. 平成 16 年度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いた。今後もこの路線に沿った研究を行う。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、高い評価を受けたが、研究は順調に推移しており、大きな成果を出す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進められた。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い。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い、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、新たな研究の展開に対応できるようにした。

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。

構造解析の数値目標については達成した。また、論文についても、一流国際誌への掲載がおこなわれている。さらに研究面での質を向上するように努める。特許や産学連携についても、グループ内での啓蒙活動を引き続きおこなう。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。

再委託先一覧

16 年度	機関名	業務担当者	17 年度	機関名	業務担当者
中核	北海道大学大学院薬学研究科	稲垣冬彦	中核	北海道大学大学院薬学研究科	稲垣冬彦
				薬学研究科	松田 彰
				薬学研究科	五十嵐靖之
				医学研究科	瀬谷 司
				医学研究科	畠山鎮次
				医学研究科	田中伸哉
				遺伝子病制御研究所	小野江和則
				遺伝子病制御研究所	菊池九二三
				遺伝子病制御研究所	上出利光
				遺伝子病制御研究所	畠山昌則
再委託	奈良先端科学技術大学院大学	箱嶋敏雄	再委託	奈良先端科学技術大学院大学	箱嶋敏雄
再委託	東京都立大学大学院理学研究科	甲斐荘正恒	再委託	Sail テクノロジーズ(株)	甲斐荘正恒
再委託	九州大学生体防御医学研究所	神田大輔	再委託	九州大学生体防御医学研究所	神田大輔
再委託	筑波大学応用生物化学系	田中俊之	再委託	九州大学生体防御医学研究所	住本英樹
再委託	九州大学生体防御医学研究所	住本英樹	再委託	東京大学大学院新領域創成科学研究科	伊藤隆司
再委託	東京大学大学院新領域創成科学研究科	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	大隅良典
再委託	自然科学研究機構・基礎生物学研究所	大隅良典	再委託	九州大学生体防御医学研究所	藤 博幸
再委託	名古屋大学大学院理学研究科	武内恒成	班友	(株)エーザイ カン研究所	武内恒成
再委託	京都大学化学研究所	藤 博幸			
再委託	プロテオーム研究所	三浦謹一郎			

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>

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ている。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ている。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、研究連絡をおこなっている。特許化等についても専門家からの講義を受け、班員の啓蒙に勤めている。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、パリアン社からも、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(横浜市大)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ている。

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ている。中核機関のリーダーシップの元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。

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と思う。

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
	257	417.6	216	238	1128.6

(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. Sugawara K, Suzuki NN, 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.* 2005 Sep 23; [Epub ahead of print] PDB ID: 2CY7
2. 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, 2005. PDB ID: 1WZ3
3. “NMR Assignment Methods for the Aromatic Ring Resonances of Phenylalanine and Tyrosine Residues in Proteins”, Torizawa T., Ono A.M., Terauchi T., and Kainosho M., *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 12620-12626 (2005).
4. 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, 2005 Mar. PDB ID: 1WMH
5. Yoshizawa, S., Rasubala, L., Ose, T., Kohda, D., Fourmy, D., and Maenaka, K. (2005). Structural basis for mRNA recognition by elongation factor SelB. *Nat Struct Mol Biol* 12, 198-203. PDB ID: 1WSU
6. 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, 2004 Jul. PDB ID: 1VD2
7. Sugawara, K., Suzuki, N.N., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Inagaki, F.: The Crystal Structure of Microtubule-Associated Protein Light Chain 3, a Mammalian Homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells.*, 9, 611-8, 2004 Jul. PDB ID: 1UGM
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<sup>phox</sup> in an autoinhibited form. *J. Biol. Chem.*, 279(28), 29752-29760, 2004 Jul.
9. 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<sup>phox</sup>, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells.*, 9, 443-456, 2004 May. PDB ID: 1UEC
10. 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, 2004 May. PDB ID: 1UFQ, 1UDW, 1UE1, 1UEJ, 1UJ2
11. Kojima, C., Hashimoto, A., Yabuta, I., Hirose, M., Hashimoto, S., Kanaho, Y., Sumimoto, H., Ikegami, T., and Sabe, H. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* 23, 4413-4422 (2004).
12. Kuma A., Hatano M, Matsui M., Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y., Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432, 1032-1036. (2004)
13. Ichimura Y., Imamura Y., Emoto K, Umeda M, Noda T., Ohsumi Y. In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *J. Biol.*

*Chem.*, 279, 40584-92. (2004)

14. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell*, 15,1101-1111. (2004)
15. Takahasi, 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, 2003 Nov. PDB ID: 1J2F
16. 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, 2003 Oct. PDB ID: 1Q10
17. Honbou, K., Suzuki, NN., 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, 2003 Aug. PDB ID: 1UCF
18. 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 (2003). PDB ID: 1J19
19. 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 (2003). PDB ID: 1UIX
20. Obita, T., Muto, T., Endo, T., and Kohda, D. (2003). Peptide library approach with a disulfide tether to refine the Tom20 recognition motif in mitochondrial presequences. *J Mol Biol* 328, 495-504. PDB ID: 1WT4, 2CUV
21. Maita, N., Okada, K., Hatakeyama, K., and Hakoshima, T. Crystal structure of the stimulatory complex of GTP cyclohydrolase I and its feedback regulatory protein GFRP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(3), 1212-1217, (2002). PDB ID: 1IS7, 1IS8
22. Shimizu, T., Seto, A., Maita, N., Hamada, K., Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., and Hakoshima, T. Structural basis for neurofibromatosis Type 2: Crystal structure of the Merlin FERM domain. *J. Biol. Chem.* 277(12), 10332-10336, (2002). PDB ID: 1ISN
23. Kami, K., Takeya, R., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2002). Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *Embo J* 21, 4268-4276.
24. Kuribayashi, F., Nunoi, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T., and Sumimoto, H. The adaptor protein p40<sup>phox</sup> as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* 21, 6312–6320 (2002).