

5-8 タンパク3000プロジェクト 中核機関成果報告

グループ名 個別的分析プログラム名 (脳・神経系)
中核機関名 大阪大学蛋白質研究所
代表者名 中川 敦史

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

構造解析に関しては、現在、脳・神経系に密接に関連した、452 のターゲットに関してクローニングを終了し、発現・精製系の構築の終わったものから構造解析を進めている。プロジェクト開始から現在までにグループ全体で、58(内、べん毛関連 6)の構造解析が終了し、そのうちの 38 構造(内、べん毛関連 5)を PDB に登録した。グループ全体としては、これ以外に 208 の構造解析が終了し、そのうち 127 を PDB に登録した。未登録の構造については、論文投稿時までに座標(およびX線に関しては構造因子も)を登録する。

構造解析された主なタンパク質

- 神経伝達物質の分解を行う膜結合型モノアミン酸化酵素 MAOA(ラット由来およびヒト由来)と特異的阻害剤との複合体の構造を決定した。これらの構造に基づいてうつ病等の治療薬開発を進めている。
- 脳のレイヤー形成因子リーリンについて、そのリピート構造の一つの構造を決定した。解かれた構造は既知の fold ドメイン 3 つが全く新しい形でアレンジされたものであった。このリピート 4 つを含むフラグメントについては電子顕微鏡による単粒子トモグラフィーにより、4 つのリピートが連なった形の全体構造を得た。
- 脳に特異的に発現し、免疫系と同様に遺伝子クラスターを通して、多様化、組織化、獲得的形質の記憶の機能をもつことが示唆されている多様化膜分子 CNR(Cadherin-related Neuronal Receptor)の EC1 ドメインの構造を決定した。その他のドメインについての構造解析も NMR と X 線の両方から平行して進めている。
- 摂食行動を制御する神経ペプチドで、睡眠覚醒の制御における役割にも注目が集まっているオレキシンAの構造を決定し、それに基づく受容体特異性の解明を行った。
- カルノシン分解酵素が中枢神経系において、エネルギー代謝調節や睡眠・覚醒のリズムなどに関与する神経伝達物質であるヒスタミンの生合成過程で重要な役割を担うことを明らかにし、さらにその構造を決定した。
- 細胞死のシグナル伝達において機能し、中枢神経細胞死などの疾病に関連する DAP キナーゼのキナーゼドメインおよび2種類の阻害剤複合体の構造を決定し、その構造を基に薬物候補としての阻害剤の特許を強化した。
- 増殖分化に関連した Wnt シグナル伝達系の負の抑制因子 Axin の DIX ドメインの構造決定に成功した。さらに Axin-DIX 変異体の構造を決定し、構造から機能解析を進めている。
- 生体内で特異的な局所ホルモンとして機能し、様々な生理作用を有しているプロスタグランジン(PG)化合物のうち、脳中枢神経系では睡眠誘発物質として抹消神経系ではアレルギーや炎症作用の媒介物質として機能している PGD と、子宮平滑筋の収縮作用を有し陣痛促進剤として既に臨床応用されている PGF_{2a}、アフリカ睡眠病原虫など寄生虫由来の PGF、それぞれの合成酵素(PG 合成酵素)と種々の阻害剤との複合体の構造を X 線および NMR 法を用いて決定した。現在、その詳細な複合体構造に基づいて医薬開発を目指している。
- 脳に特異的に発現し、小胞体関連分解システムにおいて細胞質に逆行輸送された糖タンパク質にユビキチンを付加する役割を担っているユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs1} の SBD ドメインとその糖複合体の構造を決定した。
- 神経突起形成時に重要な細胞内 pH 依存的な細胞骨格形成過程において中心的な役割を果たすナトリウム水素交換体 NHE1 の細胞内領域とその活性化因子 CHP1 との複合体(26kDa)の構造を決定した。これは国内で新規に構造決定された NMR 構造としては最大のものであるだけでなく、CHP1 の属する CNS ファミリー蛋白質において最初の複合体構造であり、活性化メカニズムの解明などに極めて重要な意義を持っている。
- ほ乳類の体内時計関連タンパク質群の構造に基づくネットワーク解明を目指して、関連するタンパク質群の構造解析に向けて発現・精製系の確立と結晶化を進めている。このうち、膜タンパク質 BIT/SHPS-1 の細胞外ドメインの構造を決定し、その情報伝達にかかわる重要な知見を得た。また、Importin-β/SREBP2 複合体の構造決定に成功

し、体内時計の自発的発信機構の中心的な働きである転写因子の核移行に関する重要な知見を得た。

- 好熱藍藻由来の時計タンパク質、KaiA, KaiB, KaiCのうち、KaiA, KaiBの構造を決定した。これらの立体構造と、電子顕微鏡を用いた低分解能のKaiCの構造から、生体時計の24時間周期の自発的発生機構に関する基本的かつ重要な知見を得た。
- べん毛構成タンパク質のうち、FlgE 31Kフラグメントの構造を決定し、細菌べん毛のユニバーサルジョイント機能発現機構を明らかにした。FlgL 26Kフラグメント、FlgK49Kフラグメントの構造を決定し、FliC41Kフラグメントの構造と組み合わせて、フックからフィラメントに至るべん毛繊維部全体の原子構造を明らかにした。さらに、べん毛タンパク輸送装置蛋白質FlhAC 43Kフラグメントの構造を決定し、輸送機構の一端を明らかにした。III型輸送装置蛋白質で初めての解析例である。また、細菌の環境認識に関連した、セリンレセプターTsr可溶性ドメインの構造を決定し、レセプターの認識機構を明らかにした。

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}	48	117
(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}	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 ^{*1}	74	197

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	126	520

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） 特許出願数（海外）	6 件 6 件	27 件 14 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： 7 件 （〔参考〕平成14年4月～平成17年3月末： 12 件） <ul style="list-style-type: none"> • モノアミン酸化酵素Aをターゲットとしたうつ病治療薬の開発を進めている • APP細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を多数作製し、機能ドメインのマッピングと臨床試料中の定量キット作製を進めている • 肥満症は、糖尿病や動脈硬化をはじめとする多くのメタボリックシンドロームの原因となる。摂食調節作用を持つオレキシンAの構造解析から受容体との結合部位を推定した。この結果に基づき、肥満症の新規治療薬の開発を始めた 	
(3) 成果の産業移転に関する具体的な例	モノアミン酸化酵素Aの立体構造をターゲットとしたうつ病治療薬の開発をインターサイトにおいて進めている	
(4) 出願した特許の具体的な例	「プロトカドヘリンの新規機能ドメイン」、「薬剤スクリーニング方法、組換えベクター、形質転換体およびアピコンプレキサン類原虫により引き起こされる疾病に対する治療用組成物」、「球状粒子を形成する新規タンパク質、およびそのタンパク質をコードする新規遺伝子」、「血糖低下用組成物」、「標的指向性運搬体」、「新規イミダゾール化合物及びその用途」、「鉄硫黄タンパク質、タンパク質-FAD複合体、電子伝達剤、およびフェレドキシン活性阻害の測定方法」	

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

タンパク質の発現

- 昆虫細胞や動物細胞などを用いた、膜タンパク質 (CD151、インテグリン、コネキシン、リーリンおよびその受容体等) や糖鎖修飾を制御したタンパク質の大量発現システムを構築した (蛋白研)
- 小麦胚芽抽出物を用いた無細胞タンパク質合成系による (膜タンパク質、金属結合タンパク質を含む) タンパク質大量発現技術の確立と、NMR 測定のためのアミノ酸選択的標識技術の確立を行った (愛媛大)

X線結晶構造解析法

- SPring-8 蛋白研ビームライン (BL44XU) の高度化を行い、微小結晶や生体超分子複合体など、高分解能データの得ることが難しいタンパク質の結晶構造解析のためのビームラインとして、輝度・平行性・安定性・データの精度の面で世界トップレベルのビームラインとした (蛋白研)
- 1 個の結晶から 1 枚のイメージしか得られない結晶の回折データを処理できるプログラムを開発し、膜タンパク質等の脆弱な結晶による回折強度データ収集を可能にした (蛋白研)
- 攪拌による対流制御による新しい結晶化法を開発した。従来の静置法で 10 Å 分解能の回折像しか得られなかったタンパク質について攪拌法により 2 Å 分解能の回折像を与える結晶が得られた (阪大・工) *
- 紫外線レーザーを使ったタンパク質の加工技術を開発した。この方法は、結晶に損傷を与えることなく加工できるため、複数の結晶からなるクラスター結晶から単結晶を切り出したり、ガラス壁面から成長した結晶をダメージを与えることなく取り出したりすることができる (阪大・工) *
- 実験室レベルの規模での結晶の自動化を可能とする、溶液調製・分注システムを開発した。 (阪大・工、蛋白研) *
- 結晶化条件の最適化のための温度スクリーニングを行うための装置を開発した (阪大・工) *
- マキシマムエントロピー法を用いた高精度な電子密度分布解析と低分解能回折強度データ収集法の開発を行った。従来の精密化法に比べてより精度が高く、結合電子に関する議論ができる結果が得られた (JASRI、蛋白研)
- ヒト由来末梢神経系 PGD 合成酵素などをターゲットに、阪大工学部を中心として構造に基づくインシリコ創薬のプロジェクトを立ち上げ、薬剤の創出を進めている (阪大・工)

* 阪大・工学部のグループを中心に、創晶プロジェクトとして、新しい結晶化法に開発や結晶化のための様々な装置の開発を行い、産業移転を図っている。

NMR 法

- NMR を用いた双極子相互作用による複合体の構造解析法を開発した。この方法は、複合体の大きさには依存しないため、複合体の構造解析のための非常に強力なツールとなる (蛋白研)
- シグナルの幅広化などによりこれまで測定が難しいとされてきた NMR 法による常磁性金属を持つタンパク質の構造解析法の開発を行い、完全酸化型チトクロム c_3 の構造解析に成功した (蛋白研)
- 分子量の大きなタンパク質の構造解析のためのインテンインを使った部位特異的同位体標識法を開発した (蛋白研)
- 高濃度のサンプル溶液を調製する必要がなく、また分子量の制限がないため、膜タンパク質などの構造解析に今後さらに発展が期待される、固体 NMR 法による構造解析のための方法論の開発し、構造決定を行った (蛋白研)
- 樹脂担体固定化 NMR 法を開発し (特許出願)、その展開を行った。この方法は、非特異的な相互作用を生じるタンパク質や、安定性の乏しいタンパク質の構造解析に有効である (奈良先端大)
- 国内で最大となる 26kDa の蛋白質複合体の NMR 構造決定に成功した (奈良先端大)

6. タンパク質の機能解析に関する成果概要

カルノシンの機能解析 (蛋白研) カルノシンを脳内に投与することにより血糖上昇の抑制が起こり、それに交感神経系活性の低下とヒスタミン H3 受容体の活性化が関与することを明らかにし、さらに、脳に局在するカルノシンを分解する酵素の一つを見出してクローニングし、構造解析に成功した。

ニューロンガイダンス因子リーリンの機能解析 (蛋白研) ニューロンガイダンス因子リーリンのドメイン構造とその受容体結合部位を同定するために多数のフラグメントを作成し、現在その機能部位の特定に近づいている。糖鎖などの翻訳後修飾を受けたリーリンの組み換え発現のため、動物細胞を用いた糖鎖修飾を制御した発現系を構築した。現在一部のドメインについての結晶化を進めている。また、リーリンの受容体は ApoE receptor2 とよばれる LDL 受容体と近縁の膜蛋白質で神経系組織に特異的に発現するが、この蛋白質には RAP と呼ばれるプライベートシャペロン

が存在する。このシャペロンと受容体の複合体を細胞外に発現させることに成功しており、その結晶化を進めている。
中枢神経系における可塑性を制御するタンパク質群の同定と機能解析(医科研、蛋白研) Lin-7 がその PDZ ドメインを介して ErbB-4 チロシンキナーゼの C 末端に結合することを示した。Cbl-c の標的として Src を、また神経系における Cbl 及び Cbl-b の標的として ErbB-4, TrkB, Dab1 などを同定した。さらに、これらのタンパク質の発現系を構築し、現在、大量発現と精製を進めている。

神経シナプスの伝達とその調節に関連したタンパク質の機能解析(岡大、蛋白研) Amphiphysin1, dynamin1 によって小胞形成能やその機構が増強されることを明らかにした。さらにこの機構を詳細に調べ、Amphiphysin1 が膜脂質存在下で dynamin の GTPase 活性を著しく上昇させることを明らかにした。Amphiphysin1 と dynamin1 は cyclin dependent kinase5 によるリン酸化を受け、これによりエンドサイトーシス活性が変化することを明らかにした。さらにリン酸化部位を決定した。現在、amphiphysin1 単体および amphiphysin1 と dynamin の複合体の結晶化を進めている。

脳・神経系特異的な新規タンパク質の機能解析(産研) 独自に発見した脳・神経系特異的な新規タンパク質 ENH1, DISC1, FEZ1, FEZ2, NELL1, NELL2 などの機能解析により、その機能を明らかにした。現在結晶化を進めている。

細菌べん毛モーターとそのモーター回転制御シグナル伝達系機能解析(名大・理、阪大・生命機能) Na⁺駆動型モーターのエネルギー変換ユニット、あるいはイオンチャネルに対応すると考えられる遺伝子の構造機能解析を行い、その局在位置を明らかにした。また、走行レセプターのリガンド結合ドメインに関して、構造解析を進めている。

バイオインフォマティクスを利用した機能解析 (蛋白研、東京医科歯科大、東大・医科研) バイオインフォマティクスに関しては、PDBj と協力しながらプロジェクトを進めている。具体的には、PDBj の Sequence navigator を使って、ターゲットとするタンパク質の構造が未知であるかどうかの検索を行う一方、PDBj Structure navigator を用い、構造決定が行われたタンパク質の構造に対して、既知の構造とフォールドとの類似性を評価している。さらに、eF-site データベースを使って、分子表面のかたちと物理化学的特徴の類似性から生化学機能とその機能部位の推定を行っている。また、PDBj における eProtS(タンパク質構造百科事典)の作成への協力も行っている。

グループ内のプロジェクトの進捗状況について、独自に開発したデータベースと web インターフェイスにより外部に向かって発信するシステムを構築した。

7. 平成 16 年度の評価に対する反映状況について

平成 16 年度の評価では、特に研究成果の内容が散漫でグループとしての方向性がはっきりしていないという指摘があった。複雑なネットワークを形成する脳・神経系の機能を明らかにするためには、幅広いターゲットを扱う必要があるが、その中でも、脳や神経の回路・形態形成に関連するタンパク質群、体内環境統合タンパク質群、神経変性疾患やがんにも密接に関連した神経系の発生・分化および機能の制御に関わるタンパク質群、脳・神経系の疾病に深く関連したタンパク質を中心として研究を進めていくようにした。一方、高等生物の脳・神経系に関連したタンパク質は、画一的な手法では研究が進まないことが多いため、発現に関して、大腸菌、昆虫細胞、酵母、小麦胚芽無細胞系等様々な系を用意し、グループ間の連携をとりながら平行して異なる発現系を試すようにしている。精製に関しては、互いに連携を取りながらグループ全体として最大限に能力を発揮して研究を進めていく体制をとっている。また、本来の研究に合致しない研究が数多く見られるとの指摘に関しては、現在までに脳・神経系に直接関連するタンパク質の構造解析に関して、当初の目標数 40 に対して 52 のタンパク質の構造解析を終了(33 を PDB に登録)しており、プロジェクトとしては当初計画通り以上に進んでいると考えている。それ以外のタンパク質の構造解析の数が多いのは、これまでの研究の継続によるものであり、本プロジェクトを軽視しているのではないことを付け加えたい。

グループの編成にあたっては、蛋白質研究所全体でネットワークを組んでプロジェクトの遂行にあたり、それを補完する構造解析グループをサブ機関とし、また、ターゲットの選択および機能解析を担当するサブ機関を加えて中川グループ他と協力して構造・機能解析を進めることとした。構造解析グループは、大阪地区を中心に十分な構造解析の実績のあるメンバーで構成し、「脳・神経系」のテーマに沿ったターゲットを設定してプロジェクトを推進している。

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。

構造解析に関して 当初から、解析が困難な脳・神経系の機能に密接に関連したタンパク質をターゲットとして、長期的な展望の下、しかしプロジェクト期間内にすぐれた成果が上がるように目標を立て、プロジェクトを進めてきた。現在は、神経の回路・形態形成に関連するタンパク質、体内環境統合タンパク質、神経変性疾患やがんにも密接に関連した神経系の発生・分化および機能の制御に関わるタンパク質、脳・神経系の疾病に深く関連したタンパク質を解析テーマとして、膜タンパク質や超分子複合体をメインターゲットに移行しながら研究を展開している。

特許出願に関して 特許出願に関しては数としての目標は定めていないが、グループ全体としてプロジェクトの成果を積極的に特許化するための体制作りを行った。特許出願に関して、大阪産業振興機構（大阪 TLO）に依頼して、「プロジェクト成果に特許化に関するアンケート」を実施し、その回答に基づいて、研究内容・状況に関するヒアリングを行い、特許化、実用化の可能性のあるものについて特許文献調査を実施し、その結果、実用化が見込めると考えたターゲットに関して、特許化を進めた。出願は、企業に技術移転できる可能性が高く有用度の高い発明に絞って行い、国際特許の取得を前提とすることとした。研究成果の特許化にあたっては、特に疾患との関係で新しい機能が発見されたり、複合体となり始めて機能することが確認されたりするタンパク質について、積極的に特許化を行った。実際の特許化は、企業に技術移転できる有用度の高い発明に絞っているため、あまり数は多くないが、年1回開催される班会議において、大阪TLOより特許化・知財化についての講演をお願いし、啓蒙活動につとめている。また、本年度は、各研究グループに対してのヒアリングを予定している。

定期的な見直し体制について プロジェクトを進める上でさらに強化すべきであると考えた領域に関して、年度途中からでもプロジェクトへの参加を依頼した。平成15年度から再委託を行ったグループは、東大医科研・御子柴克彦教授（IP₃受容体関連タンパク質の構造と機能）、東京医科歯科大・伊藤暢聡教授（疾病に関するタンパク質の構造、バイオインフォマティクス）、阪大・産研・村上聡助手（膜タンパク質の調製・結晶化と構造）である。平成16年度から再委託を行ったグループは、信州大・医・鈴木龍雄教授（シナプス関連タンパク質のプロテオーム解析とクローニング）、東大・院総合文化・栗栖源嗣助教授（脳・神経系関連タンパク質の構造）である。また、平成16年度途中から、バイオインフォマティクスを利用した機能解析研究をさらに推進するために東大医科研・木下賢吾助教授をメンバーに加えた。来年度に向けて費用対効果をさらに高めるために、グループの再編成を行うことを予定している。

表1 再委託先一覧

16年度	17年度	機関名	業務担当者	業務題目
協力	協力	阪大・微研	岡田雅人	神経細胞間情報伝達に関わるタンパク質の構造と機能の解析
再委託	再委託	阪大・院工	井上豪	マウス由来PGD合成酵素と各種阻害剤との複合体のX線構造解析
再委託	再委託	阪大・院工	金谷茂則	脳・神経系に関連するタンパク質とそのホモログの構造機能解析、タンパク質の菌体外分泌システムの構築に関する研究
再委託	再委託	阪大・院工	大政健史	マウス由来脳型 PGD 合成酵素と各種阻害剤との複合体の X 線構造解析
再委託	再委託	阪大・産研	黒田俊一	脳神経系特異的プロテインキナーゼ C (PKC) 結合タンパク質の構造解析
再委託	再委託	阪大・産研	村上聡	膜タンパク質の構造解析
再委託	再委託	阪大・院生命機能	今田勝巳	細胞骨格と膜蛋白質の相互作用の理解に重要な分子群および体内時計蛋白質の構造
再委託	再委託	阪大・院薬	大久保忠恭	睡眠・脳内疎水性物質輸送に関わるタンパク質の立体構造決定
再委託	再委託	兵庫県立大・院生命理学	樋口芳樹	脳・神経系およびその周辺のタンパク質の結晶構造解析
再委託	再委託	関西学院大・理工	山口宏、木下勉	神経幹細胞分化制御タンパク質の構造解析、脳神経系ペプチドホルモン前駆体タンパク質の構造解析

再委託	再委託	名大・院理	本間道夫	モータータンパク質およびエネルギー変換蛋白質の構造解析
再委託	再委託	名大・遺伝子	石浦正寛	好熱性藍色細菌時計タンパク質の構造解析
再委託 (木下氏 を追加)	再委託	東大・医科研	竹縄忠臣、山本雅、御子柴克彦、木下賢吾	神経細胞情報伝達に関わる新たな発見と構造・機能解析
再委託	再委託	東大・院総合文化	栗栖源嗣	脳・神経系で機能しているタンパク質の構造研究
再委託	再委託	徳島大・薬	山内卓	カルモデュリン依存性プロテインキナーゼの結晶構造解析
再委託	再委託	岡山大・院医学総合	竹居孝二、西堀正洋、松井秀樹、阿部康二、筒井公子	神経細胞特異的タンパクの機能構造解析
再委託	再委託	広島大・院理	片柳克夫	神経系をはじめとする生命維持に主要な蛋白質に関する構造機能相関の基盤確立
再委託	再委託	奈良先端大	児嶋長次郎	神経細胞の情報伝達に関わる蛋白質の構造と機能の解明
再委託	再委託	愛媛大学・総合支援セ	森田勇人	翻訳後修飾を受けたタンパク質の小麦胚芽無細胞合成系による効率的な大量発現法の開発
再委託	再委託	JASRI/SPring-8	高田昌樹	マキシマムエントロピー法を用いた新しいタンパク質の精密構造解析法の開発
再委託	再委託	東京医科歯科大学	伊藤暢聡	疾患に関するタンパク質の構造機能に関する研究
協力	再委託	信州大・院医	鈴木龍雄	新規シナプスタンパク質をコードする遺伝子クローニングと生理機能の解明
協力	協力	就実大・薬	中西徹	CT 蛋白質の動物細胞による大量発現
協力	協力	京都府立医科大学	赤路健一	HLTV 関連タンパク質の構造解析

注. 機関の種別―「中核」中核機関。「再委託」サブ機関のうち再委託先機関。「協力」サブ機関のうち協力機関。「班友」サブ機関のうち研究費が配分されない機関。「―」該当なし。

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}

蛋白質研究所内では、グループ間の情報交換と推進に向けての議論を行うために、「プロジェクト連絡会」を年数回開催している。この「連絡会」では、重点的に進めるべきであるとするプロジェクトを選択し、業務分担の調整を行うとともに、技術的な意見交換や成果に関しての更なる発展のための意見交換を行っている。また、発現を中心とした具体的な技術交換を行うための「発現に関する研究会」を開催している。ここでは、成功例の紹介だけでなく、直面している問題点を話題として取り上げ、プロジェクトの遂行上の技術的な問題点に関しての解決策を見つけることを主な目的としている。サブ機関を含めたグループ全体では、年1回程度グループ内のメンバーに限定した「脳・神経系ワークショップ」を開催し、各プロジェクトの進行状況の報告とともに、技術的な問題点を解決するための意見交換や新しい共同研究体制作りを行った。また、常時、メーリングリスト等により情報交換を行っている。

「脳・神経系」グループ全体としての連携の下に効率的にプロジェクトが進む体制作りを進めた。グループ間の連携による成果の拡大の一例としては、御子柴教授が構造・機能解析を進めている IP₃ 受容体に関連した CARP について、森田助教授が小麦胚芽無細胞系を用いた発現系を構築し、得られた 40 μg の精製タンパク質 (4 μl) を用いて、中川教授により微量結晶化システムを使って 196 条件の結晶化条件を検討し微結晶を得ることに成功した。また、森田助教授と阿久津教授との共同研究で、小麦胚芽無細胞系を用いた膜貫通タンパク質の発現を進めており、構造解析に利用できるサンプル作りの目処が立っている。同様の連携は他でも進められている。また、CNR の構造解析においては、池上助教授による NMR を用いた安定化条件の情報に基づいて、樋口教授により結晶化が成功した。

また、外部への広報・啓蒙活動として、プロジェクトに関連した蛋白研セミナー「脳・神経系の総合プロテオミクス」、「構造解析に向けてのタンパク質の発現」などを開催している。

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
	250	387.6	191	190	1,018.6

(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. Akama H, Kanemaki M, Yoshimura M, Tsukihara T, Kashiwagi T, Yoneyama H, Narita S, Nakagawa A, Nakae T, Crystal structure of the drug-discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: Dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end, *J. Biol. Chem.* 279, 52816-52819 (2004). PDB ID: 1WP1
2. Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiha K, Subtype-specific and ER-luminal-environment-dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44, *Cell* 120, 85-98 (2005).
3. Inoue T, Irikura D, Okazaki N, Kinugasa S, Matsumura H, Okano Y, Shishitani H, Uodome N, Yamamoto M, Kumasaka T, Kai Y, Urade Y, Metal Activation Mechanism of Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthase, *Nature Struct. Biol* 10, 291-296 (2003). PDB ID: 1IYI, 1IYH
4. Kim M, Okajima T, Kishishita S, Yoshimura M, Kawamori A, Tanizawa K, Yamaguchi H, X-ray snapshots of quinone cofactor biogenesis in bacterial copper amine oxidase, *Nature Struct Biol.* 9, 591-596 (2002). PDB ID: 1IVU, 1IVV, 1VW, 1IVX
5. Kishishita S, Okajima T, Kim M, Yamaguchi H, Hirota S, Suzuki S, Kuroda S, Tanizawa K, Mure M, Role of copper ion in bacterial copper amine oxidase: spectroscopic and crystallographic studies of metal-substituted enzymes, *J. Am. Chem. Soc* 125, 1041-1055 (2003). PDB ID: 1IQX, 1IQY, 1IU7
6. Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, Nagoshi E, Nakagawa A, Imamoto N, Yoshimura M, Sakai H, Chong KT, Tsukihara T, Yoneda Y, The Structure of Importin- β Bound to SREBP-2: Nuclear Import of a Transcription Factor, *Science* 302, 1571-1575 (2003). PDB ID: 1UKL
7. Maeno-Hikichi Y, Chang S, Matsumura K, Lai M, Lin H, Nakagawa N, Kuroda S, Zhang JF, A PKC ϵ -ENH-channel Complex Modulates N-type Ca²⁺ Channels, *Nature Neurosci.* 6, 468-475 (2003).
8. Mizushima T, Hirao T, Yoshida Y, S. J L, Chiba T, Iwai K, Yamaguchi Y, Kato K, Tsukihara T, Tanaka K, Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase, *Nature Struct. Molec. Biol.* 11, 365-370 (2004). PDB ID: 1UMH, 1UMI
9. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A, Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB, *Nature* 419, 587-593 (2002). PDB ID: 1IWG
10. Nakatani K, Hagihara S, Goto Y, Kobori A, Hagihara M, Hayashi G, Kyo M, Nomura M, Mishima M, Kojima C, Small molecule ligand induces nucleotide flipping in (CAG)_n trinucleotide repeats, *Nature Chem. Biol.* 1, 39-43 (2005). PDB ID: 1X26
11. Oikawa T, Yamaguchi H, Itoh T, Kato M, Ijuin T, Yamazaki D, Suetsugu S, Takenawa T, PtdIns(3,4,5)P₃ binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia, *Nature Cell Biology* 6, 420-426 (2004).
12. Park SJ, Suetsugu S, Takenawa T, Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation, *EMBO J.* on-line

(2005).

13. Samatey FA, Matsunami H, Imada K, Nagashima S, Shailh TR, Thomas DR, Chen JZ, DeRosier DJ, Kitao A, Namba K, Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism, *Nature* 431, 1062-1068 (2004). PDB ID: 1WLG
14. Takagi J, Yang Y, Liu J, Wang J, Springer TA, Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic β -propeller interface, *Nature* (2003).
15. Tseng Y, Butte A, Kokkotou E, Yechoor V, Taniguchi C, Kriauciunas K, Cypess A, Niinobe M, Yoshikawa K, Patti M, Kahn C, Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and neclin, *Nat. Cell. Biol.* 7, 601-611 (2005).
16. Uzumaki T, Fujita M, Nakatsu T, Hayashi F, Shibata H, Itoh N, Kato H, Ishiura M, Crystal structure of the C-terminal clock-oscillator domain of the cyanobacterial KaiA protein, *Nature Struct. Mol. Biol.* 11, 623-631 (2004). PDB ID: 1V2Z
17. Wei F, Nagashima K, Ohshima T, Saheki Y, Lu Y, Matsushita M, Yamada Y, Mikoshiha K, Seino Y, Matsui H, Tomizawa K, Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion, *Nature Medicine* 10, 1104-1108 (2005).
18. Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah MKL, Vanden Driessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Nanoparticles for the Delivery of Genes and Drugs to Human Hepatocytes, *Nature Biotechnology* 21, 885-890 (2003).
19. Yamazaki D, Suetsugu S, Miki H, Kataoka Y, Nishikawa S, Fujiwara T, Yoshida N, Takenawa T, WAVE2, involved in directed cell migration, is required for cardiovascular development, *Nature* 424, 452-456 (2003).
20. Yoshida Y, Kinuta M, Abe T, Liang S, Araki K, Cremona O, Paolo GD, Moriyama Y, Yasuda T, Camilli PD, Takei K, The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature, *EMBO J.* 23, 3483-3491 (2004).