

5 - 2 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(発生・分化とDNAの複製・修復)
中核機関名 東京大学
代表者名 田之倉 優

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

発生・分化に関わるタンパク質の構造解析・機能解析の成果

真核生物の発生過程に必須なRNAi関連タンパク質DicerのRNA分解酵素ドメインの構造解析

東大・田之倉は、真核生物の遺伝子発現制御機構の一つ、RNA干渉(RNAi)に関するDicerタンパク質のRNA分解酵素ドメインの立体構造決定に成功した。RNA分解活性を有するDicerは発生過程に必須な分子であり、分解物のRNA断片(siRNA)がRNAiを引き起こす。Dicerの構造は、RNAiの分子機構の解明に大いに役立つだけでなく、RNAiを利用した遺伝子治療技術開発のために必須な知見を提供する。

脊椎動物の初期発生・器官形成に重要なタンパク質30種の機能解析・構造解析

東大・福井(年度途中から北大)と田之倉は、両生類胚期の予定外胚葉をアクチビンで処理するアニマルキャップアッセイから、初期発生や器官形成に重要であると特定されたタンパク質30種類について、小麦胚芽無細胞発現系と大腸菌コールドショック発現系とを用いて発現量・可溶性発現の検討を行った。中胚葉誘導因子activinやその阻害因子antivin、脊索への分化を誘導するBtg2、神経管の初期分化に必須なdullardの活性化発現に成功し、結晶化を進めている。

ハエの脚分化を規定する転写因子とDNAの3者複合体の機能解析・構造解析

東大・小嶋と田之倉は、ショウジョウバエの肢の発生過程に働く転写因子間の相互の発現制御機構を解析し、Aristaless(AI)とClawless(Cll)が発現している最先端部でBarが発現しないのは、AIとCllが強制的に働いてBarの発現を抑制しているためであることを明らかにした。AIとCllが共存すると複合体を形成し、それぞれが単独で結合する配列とは異なるDNA配列を認識する。この転写因子間相互作用の分子認識機構を明らかにするために、AI-CII-DNAの3者複合体の構造解析を行っており、3.1Åの回折データが得られている。

分化や疾患に関連する膜タンパク質の発現・機能解析・構造解析

東大・田之倉、永田、佐藤、東薬大・山岸、生物有機化学研・石塚は、ヒトadrenaline受容体(7回膜貫通型Gタンパク質共役受容体)、ヒト抗糖尿病ホルモンadiponectinの受容体膜タンパク質AdipoR1(7回膜貫通型)の酵母での発現に成功した。また、破骨細胞の分化に関与する膜タンパク質V-ATPaseの膜貫通ドメインの結晶化に成功し、4.0Å分解能の回折データを得た。さらに、腸球菌の悪性化に関わる受容体膜タンパク質FsrC(7回膜貫通型)の大腸菌での発現と結晶化に成功した。結晶化条件の最適化が進行中である。

心臓の発生と機能に重要なトロポニンの機能解析・構造解析・創薬基盤研究

東大・田之倉は、拘束型心筋症の原因となるtroponin(Tn、TnT-TnI-TnCの3者複合体)タンパク質変異体の構造・機能を正常型と比較解析し、この異常Tnの機能を正常化する薬剤を探索し、茶カテキン(EGCG)がシード化合物となりうることを発見した。NMR機能解析から、EGCGはTnCのCエンドープに結合し、TnCのCエンドープとTnIとの相互作用を強めることにより、TnのCa²⁺感受性を減弱させることを明らかにした。現在、EGCGを安全性の高い心筋症治療薬のシード化合物として医療応用にむけた基盤研究を展開している。

神経細胞の分化およびアルツハイマー病関連タンパク質の機能解析・構造解析・創薬基盤研究

三菱化学生命研・河野は、神経細胞の発生・分化およびアルツハイマー病の発症に関わるTPK Iの構造を決定し、その立体構造を元に、アルツハイマー病治療薬のリード化合物の設計を進めている。

加齢性難聴や老化に関わるタンパク質群の特定・機能解析・構造解析・食品開発基盤研究

東大・田之倉はWisconsin大・Dr. Prollaとの共同研究で、加齢性難聴モデルマウスを用いたDNAマイクロアレイ解析により、加齢性難聴の発症や老化全般に関わるタンパク質を28個特定した。この中には、聴覚関連タンパク質のほか、寿命制御因子、ミトコンドリアDNA修復酵素、ミトコンドリア機能調節因子が含まれていた。これらのタンパク質の構造解析・機能解析を、抗老化機能性食品の開発に結びつける予定である。

DNAの複製・修復に関わるタンパク質の構造解析・機能解析の成果

DNAの複製に関わるタンパク質の機能解析・構造解析

九大・植田、石野は、DNA複製関連タンパク質の構造解析・機能解析を進めている。原核型の複製開始因子DnaA、その制御因子HspQの構造を決定し、ヘリカーゼDnaB、その補助因子DnaC、プライマーゼDnaGの結晶化を進めている。また、真核型のDNAリガーゼ、複製フォーク修復タンパク質Hef、Hjmの構造を決定し、複製ヘリカーゼMcm、複製ポリメラーゼ第2サブユニットDP1の構造解析を進めている。また、DNA鎖の連続合成に重要なクランプローディング複合体(PCNA-RFC-DNA)の立体構造モデルを構築した。

老化に関するミトコンドリアDNA合成酵素POLGの機能解析・構造解析

東大・田之倉は、変異体マウスを使った実験から、ミトコンドリア DNA を複製する DNA polymerase γ (POLG) の校正機能を低下させると、早老症になることを示し、POLG 機能の抗老化への寄与を明らかにした。現在、POLG の構造解析を進めている。

DNA複製時の変異導入を防ぐMutTタンパク質の機能解析・構造解析

東大・田之倉は、DNA 複製時の変異導入を防ぐ MutT (ヒトから微生物まで広く分布している) の立体構造を決定した。複数の基質アナログ存在下での結晶構造から基質認識について新たな知見が得られた。

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	25	85
(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	72
(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	20	157

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	56	320

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)	1 件	34 件
特許出願数(海外)	2 件	17 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： 27 件 ([参考]平成 14 年 4 月～平成 17 年 3 月末： 36 件) 産業移転および産学連携を目的とした共同研究の主要例を示す。</p> <ol style="list-style-type: none"> 小麦胚芽無細胞発現系を利用した発生・分化関連タンパク質の多検体発現量・可溶性検定(東大・田之倉、永田、(株)三菱化学学生命研・河野、ゾイジーン(株)) 食品タンパク質の物性改変による新規機能性食品の開発(田之倉、味の素(株)) 老化関連タンパク質の発現や活性を制御する抗老化化合物の探索と新規機能性食品への応用(東大・田之倉、マリーンバイオ(株)) 擬似無重力下での結晶化のための磁石および観察装置の開発(東大・田之倉、ジャパンスーパーコンダクタテクノロジー(株)) アルツハイマー病関連タンパク質の立体構造に基づいた阻害剤設計(株)三菱化学学生命研・河野) 小麦胚芽無細胞合成系を利用した NMR 用安定同位体標識試料調製法の開発(株)三菱化学学生命研・河野、群馬大・若松) 医薬品原料の非天然型アミノ酸合成酵素 TpMsAT の構造機能解析(東薬大・山岸、東大・田之倉) 痛風の原因酵素キサンチン酸化還元酵素と阻害剤 4 種との複合体の構造解析。構造情報に基づくさらに強力な抗痛風剤・抗活性酸素剤の開発、臨床応用(日医大・西野、帝人(株)、三菱ウェルファーマ(株)、(株)富士薬品、日本ケミファ(株)) 新型タンパク質チップ開発(愛媛大・遠藤、(株)パーキンエルマー・ジャパン) タンパク質の凝集を防止する新規化合物の開発と利用(群馬大・若松)
-----------------------------------	---

(3)成果の産業移転に関する具体的な例	<ol style="list-style-type: none"> 麹カビ由来酵素 P450nor を利用した一酸化窒素(NO)検査薬を、月桂冠(株)との共同研究で商品化した。NO は情報伝達や免疫において重要である(祥雲) 本プロジェクトで得られたキサンチン酸化還元酵素の構造情報を利用し、帝人(株)、三菱ウェルファーマ(株)、(株)富士薬品、日本ケミファ(株)の 4 社が開発した阻害剤のうち 3 種が痛風治療薬として臨床利用へ向けて開発中。そのうち
---------------------	--

	<p>帝人(株)が開発した薬剤はアメリカで臨床薬として承認済、日本でも近日中に承認される見込。三菱ウェルファーマ(株)、(株)富士薬品が開発したものはフェイズ 2 臨床試験の途中。日本ケミファ(株)と共同でタンパク質構造に基づく薬剤設計を試みている(日医大・西野)</p> <p>3. 小麦胚芽無細胞タンパク質発現系を利用するウイルスポテアーゼ阻害剤やプロテインキナーゼ阻害剤のハイスループット・スクリーニング技術の産業移転(愛媛大・遠藤)</p>
--	--

(4)出願した特許の具体的な例	平成 14 年 4 月～平成 17 年 10 月末に出願した特許の一覧を下表(表 1)に示す。国内: 35 件、国際: 19 件である。
-----------------	--

表 1. 特許出願一覧(平成 14 年 4 月～平成 17 年 10 月末)

発明の名称	発明人(代表者・分担者のみ示す)	特許公開番号 ()内は出願番号
平滑筋弛緩剤とその有効成分の抽出方法	小濱(群馬大) 田之倉 永田(東大)	2005-289898
IL-10 を高産生する細胞およびその製造方法	八村(東大)	2005-080528
新規制限酵素 PabI	小林(東大)	2004-226136
無細胞タンパク質合成法を用いる新規ヌクレアーゼのスクリーニング方法	小林(東大)	2004-226138
トランスリンの 3 次元構造座標, 及び該 3 次元構造座標の使用	河野(三菱化学)	(2002-236139)
NMR 測定方法および該方法に用いるための構造物	河野(三菱化学)	2004-138545
蛋白質の NMR 測定方法	河野(三菱化学) 遠藤(愛媛大)	(2003-032381) W02004/070371A1
アミノ酸選択的標識化蛋白質合成方法	河野(三菱化学) 遠藤(愛媛大)	(2003-202926) W02005/010195A1
NMR シグナルの帰属方法	河野(三菱化学)	(2004-025592) W02005/073747A1
標的分子とリガンドあるいはリガンド候補化合物との結合検出方法	河野(三菱化学)	(2005-030898) (2005-067783)
脳移行活性を有するポリペプチド、およびその利用	澤田(藤田保衛大)	(2003-289890) (PCT/JP04/11668)
脳移行性骨髄前駆細胞	澤田(藤田保衛大)	(2004-298170)
非ワトソン-クリック塩基対-金属錯体	小野(都立大)	(2003-201500)
核酸固相合成用担体及びそれを用いた核酸合成	小野(都立大)	2005-229894
ゲラニルゲラニルグリセロールリン酸合成酵素の結晶	山岸(東薬大)	2005-046057
Method for improving the thermostability of proteins	山岸(東薬大)	EP1182253A2
キサントニン酸化還元酵素変異体	西野(日医大)	2005-287414
無細胞タンパク質合成用胚芽の選別方法、及び無細胞タンパク質合成用胚芽抽出物の製造方法	遠藤(愛媛大)	2004-000188
ハイスループット合成システム	遠藤(愛媛大)	(2003-281500)
一分子レベルでタンパク質の動態を確認できる方法	遠藤(愛媛大)	(2004-121886)
翻訳効率制御活性を有する核酸塩基配列及びその利用	遠藤(愛媛大)	W02003/056009A1
無細胞タンパク質合成用胚芽抽出物の製造方法及び無細胞タンパク質合成方法並びに無細胞タンパク質合成用溶液	遠藤(愛媛大)	W02003/064671A1
無細胞タンパク質合成用細胞抽出液及びその製造方法	遠藤(愛媛大)	W02003/064672A1
タンパク質合成方法	遠藤(愛媛大)	W02003/072796A1
無細胞タンパク質合成用凍結乾燥製剤	遠藤(愛媛大)	(2002-138828) W02003/095661A1
標識化単鎖抗体およびその利用	遠藤(愛媛大)	(2002-210067) W02004/009639A1
無細胞タンパク質合成用胚芽の選別方法および無細胞タンパク質合成用胚芽抽出物の製造方法	遠藤(愛媛大)	2004-159588
自動蛋白質合成方法及びそれを行うための装置	遠藤(愛媛大)	(2003-033009) W02004/070047A1
無細胞系合成システム	遠藤(愛媛大)	(2003-122930) W02004/097014A1
タンパク質チップ作製用試薬	遠藤(愛媛大)	(2003-028859) W02005/015212A1

生理活性タンパク質に対する薬剤の新規ハイスループットスクリーニング法	遠藤（愛媛大）	(2003-316081) WO2005/024428A1
抗原物質の製造方法	遠藤（愛媛大）	(2003-333659) WO2005/030954A1
指標物質の新規スクリーニング方法	遠藤（愛媛大）	(2003-353949) WO2005/035780A1
高機能化無細胞合成用細胞抽出物及び該抽出物の調製	遠藤（愛媛大）	(2003 434080) WO2005/063979A1
組替えミオシン	小濱（群馬大）	2004-57152 WO2004/011649A1
DNA 断片の再クローニング方法	小濱（群馬大）	2005-289898
新規 DNA ヘリカーゼ	石野（九大）	2004-121069
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	石野（九大）	2004-229612
臓器スライス方法及びその装置	中野（千葉大）	2004-177128

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

技術開発の成果

高等動物由来タンパク質の活性型発現のための小麦胚芽無細胞発現系の検討

愛媛大・遠藤、三菱化学生命研・河野が開発・改良を進めた小麦胚芽無細胞発現系を利用し、東大・田之倉、永田、福井（年度途中から北大）は、ヒト・マウス・カエル等の発生・分化に関わるタンパク質で、大腸菌発現系では活性型が得られない 47 種類について発現検定を行った。その結果、35 種類のタンパク質の発現が確認され、うち 11 種類（全体の 24%）の可溶性発現に成功し、高等動物由来のタンパク質発現における小麦胚芽無細胞発現系の優位性が再確認された。無細胞系は、ハイスループットで多検体の扱いが容易なため、小スケール機能解析やタンパク質発現の最適化（タグの種類や位置の選択、ドメイン境界の特定等）に有効である。

愛媛大・遠藤と東大・小林、田之倉は、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系で、細胞死に関連する DNA 分解酵素とそのセレノメチオニン標識体とを大量調製し、結晶化に成功し、2.8Å 分解能の結晶構造を決定した。無細胞系を利用した結晶構造決定は、今までほとんど報告されておらず、DNA 分解酵素のような細胞毒性が強いタンパク質の立体構造決定への道を開くことになると期待される。

三菱化学生命研・河野と群馬大・若松は、小麦胚芽無細胞発現系で安定同位体 (¹³C, ¹⁵N) 標識を可能にし、無細胞系で発現したタンパク質を精製せずにそのまま NMR 測定する系を確立した。この技術は、高効率 NMR 構造解析に大きく寄与している。

東大・中井と愛媛大・遠藤は、小麦胚芽無細胞発現系での発現量とアミノ酸配列や高次構造との関係をバイオインフォマティクス手法を用いて解析し、N 末端近傍にランダムコイルやコイルドコイルが存在すると発現量が低下する傾向を見出した。さらに、発現量の増大に関連する構造的特徴の解析が進行中である。

高等動物由来タンパク質の活性型発現のための大腸菌コールドショック発現系の検討

東大・田之倉、永田、千葉大・中野は、タカラバイオが開発したコールドショック発現系を利用し、高等動物の発生・分化関連タンパク質の発現検定を行った。コールドショックプロモーター制御下に、大腸菌由来のタンパク質高次構造形成を助けるタンパク質 trigger factor と目的タンパク質とを融合させて発現すると、50%以上の確率で可溶性発現に成功し、そのうち活性検定したタンパク質はすべて活性を有していた。この発現系は、多検定の取扱いには向かないが、スケールアップが容易にできるので、構造解析用の試料調製に適している。実際この系を利用して可溶性発現したタンパク質 12 種類のうち、3 種類で結晶化に成功している。

分化や疾患に関連する膜タンパク質発現系の検討

東大・永田、田之倉、佐藤は、真核生物由来の膜タンパク質の発現のために酵母 *Pichia pastoris* を宿主として利用し、ヒトの 7 回膜貫通型受容体 AdipoR1 の発現に成功した。また、原核生物由来の膜タンパク質の発現のために大腸菌を宿主とする系では pET と pBAD の 2 種類のベクターでの発現量比較を行い、pBAD を利用して腸球菌の 7 回膜貫通型受容体の高発現に成功し、結晶化に成功している。試料調製のロットが違って再現性良く結晶が得られる安定した膜タンパク質発現系を確立することに成功した。

東薬大・山岸は、構造解析用の膜タンパク質大量調製のために、大型ジャーファーマンターで好熱菌の培養を行い、可溶性タンパク質に比べて発現量が少ない膜タンパク質の試料調製に大きく貢献した。

磁気力を利用した擬似無重力環境下での結晶化による結晶の質の向上

東大・田之倉は、超伝導磁石を用いて、宇宙空間の無重力環境に似た環境を地上で実現する装置をジャパンスーパーコンダクタテクノロジ(株)と共同で開発し、擬似無重力環境下での可溶性タンパク質の結晶化で、分解能が向上することを実証した。今後、膜タンパク質の結晶化への応用を計画している。

タンパク質の立体構造に基づく創薬技術の開発

日医大・西野は、キサントニン酸化還元酵素の立体構造をもとに、この酵素の働きを阻害する抗痛風剤や抗活

性酸素剤の開発を国内の製薬会社4社と共同で進めており、1つの化合物については、痛風治療薬としてアメリカで承認された。タンパク3000プロジェクトで得られた多数のタンパク質構造情報を創薬等の産業移転に活かすために、キサンチン酸化還元酵素における成功例が他のタンパク質の場合にも応用可能と期待される。

6. タンパク質の機能解析に関する成果概要

タンパク質の機能解析に関する成果は、項目1に記載したので、そちらを参照されたい。

7. 平成16年度の評価に対する反映状況について

「発生・分化とDNAの複製・修復」に直接関係するタンパク質の研究に集中するために「発生・分化とDNAの複製・修復」に直接関係するタンパク質の研究に集中するように研究テーマを方向付けし、その方向に合致しない分担者については、再委託を見直した。

「発生・分化」関連タンパク質の解析を強化するために東京大学・浅島 誠 教授の協力を得て、福井彰雅、小嶋徹也の2人の若手発生生物学者を分担者に加え、カエルの初期発生やハエの器官形成に重要なタンパク質群の調製、構造解析、機能解析を推進している。

「DNAの複製・修復」関連タンパク質の解析を強化するために植田(九大)、山岸(東薬大)に再委託しているDNAの複製・修復関連タンパク質の調製について田之倉(東大)を中心に情報交換を行った。その後、試料調製の効率が向上している。

グループ内で共通のテーマへの関心と方向性を再確認し、グループ内での連携を強化するために中核機関代表者の東大・田之倉が分担者と頻りに連絡をとり、研究の方向性や進捗状況の確認を行った。また、中核機関と再委託機関の共同研究だけでなく、再委託機関どうしの情報交換、共同研究も推奨し、グループ内の連携強化を図った。

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。

構造解析数 中核機関の東大において、平成14年4月以降、89個のタンパク質立体構造を決定し、そのうち53個の構造をPDBに登録した。領域の目標数(14年度5個、15年度10個、16年度12個、17年度14個)の半分以上の構造決定を中核機関で行うことを目標にしているが、実際にはこの目標の2倍以上の成果を挙げた。東大は、当領域領域内での中心的な役割を担っており、達成度は十分と考えている。

特許出願数 平成14年4月以降の特許出願は、中核機関の東大において次の4件であった。「平滑筋弛緩剤とその有効成分の抽出法」(東大・田之倉、永田)、「IL-10を高産生する細胞およびその製造方法」(東大・八村)、「新規制限酵素PabI」(東大・小林)、「無細胞タンパク質合成法を用いる新規ヌクレアーゼのスクリーニング方法」(東大・小林)。

見直し体制 領域代表者の田之倉(東大)が、年度ごとに全分担者の研究成果を評価し、次年度の研究費の配分に反映させてきた。また、分担者の入れ替えも行った。

再委託先の見直し 年度毎の内部評価により、各個別機関の業績を評価し、再委託先の見直しを行っている。16年度、海洋バイオテクノロジー研究所への再委託を打ち切ったが、17年度は、さらに藤田保健衛生大学、東京都立大学への再委託を打ち切った。17年度から新たに、発生・分化関連タンパク質の試料調製を(株)生物有機化学研究所に再委託先した。表2に再委託先一覧を示す。

表2. 再委託先一覧

16年度	17年度	機関名	業務担当者	業務題目
中核	中核	東京大学	田之倉 優 祥雲 弘文 永田 宏次 佐藤 能雅 小林 一三 中井 謙太	発生・分化とDNAの複製・修復に関わるタンパク質の立体構造解析 糖代謝経路(糖質分解酵素)、窒素代謝酵素群の結晶化と構造解析 発生・細胞分化に関わる蛋白質のNMRによる構造解析 ヒト疾患に関わる蛋白質の構造生物学研究 細胞死ヌクレアーゼの発現 バイオインフォマティクスによる研究支援
			[16年度まで] 八村 敏志 西郷 薫	免疫細胞の機能の分化に関与する遺伝子のクローニングと発現タンパク質の構造解析 ショウジョウバエの発生分化関連タンパク質の大量発現

			[17年度から] 福井 彰雅 (途中から北大) 小嶋 徹也	初期発生に関わるタンパク質の同定及び機能解析 発生分化関連タンパク質の機能及び構造解析
再委託	再委託	(株)三菱化学 生命科学研究所	河野 俊之	発生・分化と DNA の複製・修復に関わるタンパク質の 立体構造決定
再委託	契約せず	藤田保健衛生大学	澤田 誠	骨髄細胞・好中球の分化調節因子の機能解析と構造解析 のための試料の大量調製
再委託	契約せず	東京都立大学	小野 晶	同位体標識 DNA を用いる複製・修復関連蛋白質の構造 決定
再委託	再委託	東京薬科大学	山岸 明彦	好熱性古細菌の細胞分裂・細胞骨格関連遺伝子の網羅的 探索とそのタンパク質の大量発現
再委託	再委託	日本医科大学	西野 武士	ヒト培養細胞を用いた発生・分化に伴い変動する蛋白質 の結晶化と構造解析
再委託	再委託	タカラバイオ(株)	佐川 裕章	タンパク立体構造解析用新規発現系を用いた幹細胞の 分化に関与する蛋白質の構造解析と機能解明
再委託	再委託	愛媛大学	遠藤 弥重太	無細胞タンパク質合成法を用いる構造ゲノム科学基盤 技術の確立
再委託	再委託	群馬大学	若松 馨 [16年度まで] 小濱 一弘	膜蛋白質の NMR による構造決定
再委託	再委託	九州大学	石野 良純 植田 正	複製、組換え修復関連のタンパク質の構造、機能解析 大腸菌 DNA の複製開始及び制御機構の構造生物学的ア プローチ
再委託	再委託	千葉大学	中野 實	哺乳類の生殖、発生及び分化に関わるタンパク質の高次 構造解析
再委託	再委託	東京工業大学	[16年度まで] 田中 信夫 有坂 文雄 [17年度から] 熊坂 崇	枯草菌の分化に関する蛋白質と極限微生物の細胞分裂 に関与する蛋白質の構造解析 バクテリア細胞分裂関連遺伝子群の構造ゲノム科学 細胞分裂関連蛋白質の構造研究
再委託	再委託	(独)農業生物資源 研究所	山崎 俊正	フジツボの分化に関する接着タンパク質の研究
	再委託	(株)生物有機化学 研究所	石塚 朋弘	発生・分化と DNA の複製・修復に関わるタンパク質の 発現系構築とタンパク質の調製

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

外部への広報

当領域のホームページ (URL: <http://fesb.ch.a.u-tokyo.ac.jp/p3k/index.html>) に、当領域の研究目的や研究成果の公開に加え、一般の方にも分かりやすいよう用語解説も掲載して、情報発信を行っている。

サブ機関を含むグループ全体での連携性の確保への取り組み

平成 17 年 3 月にタンパク 3000 評価委員会によってなされた当領域への評価結果を、4 月に分担者全員に Eメールの添付ファイルとして送り、より一層「発生・分化と DNA の複製・修復」に焦点を絞った研究を進めるようにと指示を出した。また 4 月から、「発生・分化」タンパク質の解析を強化するために新加入した東大・福井 (年度途中から北大) 小嶋と計 5 回の会合を開き、標的タンパク質の選択や構造解析・機能解析の方針について話し合った。一方、「DNA の複製・修復」を強化するために、関連の試料調製を再委託している九大・植田、東薬大・山岸と進捗状況の確認や技術情報の交換を進めた。また、10 月に開催した領域内の成果報告会でも、全分担者に「発生・分化と DNA の複製・修復」に忠実な研究を推進するように力説するとともに、当領域全体および各分担者の成果を数値化した一覧表を提示し、分担者のより一層の努力を促した。また今年度は、当グループで開発された小麦胚芽無細胞タンパク質発現系 (愛媛大・遠藤、(株)三菱化学学生命研・河野) や大腸菌コールドショック発現系 ((株)タカラバイオ・佐川) を利用して高等動物由来のタンパク質の活性型取得に成功した例がグループ内の複数の研究機関から報告され、先端技術の共有も進展しつつある。

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
	580	446	267	310	1,603

(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. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth S, Hofer T, Hacker T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Saupe KW, Weindruch RH, Leeuwenburgh C and Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481-484 (2005).
2. Hishida T, Han YW, Shibata T, Kubota Y, Ishino Y, Iwasaki H, Shinagawa H. Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes Dev.* 18, 1886-1897 (2004)
3. Miyata T, Oyama T, Mayanagi K, Ishino S, Ishino Y and Morikawa K. The clamp loading complex for processive DNA replication. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 632-636 (2004)
4. Inoue T, Irikura D, Okazaki N, Kinugasa S, Matsumura H, Uodome N, Yamamoto M, Kumasaka T, Miyano M, Kai Y, Urade Y. Mechanism of metal activation of human hematopoietic prostaglandin D synthase. *Nat. Struct. Biol.* 10, 291-296 (2003)
5. Kostyuchenko VA, Leiman PG, Chipman PR, Kanamaru S, van Raaij MJ, Arisaka F, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG. Three-dimensional structure of bacteriophage T4 baseplate. *Nat. Struct. Biol.* 10(9), 688-693 (2003)
6. Okabe M, Tomita K, Ishitani R, Ishii R, Takeuchi N, Arisaka F, Nureki O and Yokoyama S. Divergent evolutions of trinucleotide polymerization revealed by an archaeal CCA-adding enzyme structure. *EMBO J.* 22, 5918-5927 (2003)
7. Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, and Sumimoto H: The adaptor protein p40^{phox} as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* 21, 6312-6320 (2002).
8. Miyata T, Suzuki H, Oyama T, Mayanagi K, Ishino Y, and Morikawa K, Open clamp structure in the clamp-loading complex visualized by electron microscopic image analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13795-13800 (2005).
9. Iwata M, Imamura H, Stambouli E, Ikeda C, Tamakoshi M, Nagata K, Makyio H, Hankamer B, Barber J, Yoshida M, Yokoyama K and Iwata S. Crystal structure of a

- central stalk subunit C and reversible association/dissociation of V-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 59-64 (2004)
10. Okamoto K, Matsumoto K, Hille R, Eger BT, Pai EF, Nishino T. The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101,7931-7936 (2004). PDB ID: 1V97
 11. Sawasaki T, Ogasawara T, Morishita R, Endo Y. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14652-14657 (2002)
 12. Rossmann MG, Mesyanzhinov VV, Arisaka F and Leiman PG. Phage T4 injection complex and baseplate structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 171-180 (2004)
 13. Adachi-Yamada T, Harumoto T, Sakurai K, Ueda R, Saigo K, O'Connor MB, Nakato H. Wing-to-Leg homeosis by spineless causes apoptosis regulated by Fish-lips, a novel leucine-rich repeat transmembrane protein. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3140-3150 (2005)
 14. Nakao M, Barrero RA, Mukai Y, Motono C, Suwa M, and Nakai K. Large-scale analysis of human alternative protein isoforms: pattern classification and correlation with subcellular localization signals. *Nucleic Acids Res.* 33, 2355-2363 (2005)
 15. Ishikawa K, Watanabe M, Kuroita T, Uchiyama I, Bujnicki JM, Kosinski J, Gajda MJ, Kawakami B, Tanokura M and Kobayashi I. Discovery of a novel restriction endonuclease through genome comparison and wheat-germ-based cell-free translation assay: PabI (5'GTA/C) from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Nucl. Acid Res.* 33, e112 (2005).
 16. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 32, 936-948 (2004)
 17. Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 32, W124-W129 (2004)
 18. Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SKh, Dryden DT, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumport RI,

Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Kruger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw PC, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JM, Wilson GG, Xu SY. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* 31, 1805-1812. (2003)

19. Takahashi M, Takahashi F, Ui-Tei K, Kojima T, Saigo K. Requirements of genetic interactions between *Src42A*, *armadillo* and *shotgun*, a gene encoding E-cadherin, for normal development in *Drosophila*. *Development* 132, 2547-2559 (2005)
20. Hosono C, Takaira K, Matsuda R, and Saigo K. Functional subdivision of trunk visceral mesoderm parasegments in *Drosophila* is required for gut and trachea development. *Development* 130, 439-449 (2003).

その他、*J. Biol. Chem.* 34 報、*J. Mol. Biol.* 15 報、*Structure* 8 報をはじめとして全 432 報。