

領域略称名：天然変性蛋白質
領域番号：3102

平成23年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る研究経過等の報告書

「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」

(領域設定期間)
平成21年度～平成25年度

平成23年6月

領域代表者 横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学研究科・
教授・佐藤衛

目次

研究領域の目的及び概要	2
研究の進展状況	3
研究を推進する上での問題点と今後の対応策	4
主な研究成果	5
研究成果の公表の状況	15
研究組織と各研究項目の連携状況	27
研究費の使用状況	29
今後の研究領域の推進方策	30
総括班評価者による評価の状況	31

研究領域の目的及び概要

研究領域名 : 天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現
研究期間 : 平成21年度～平成25年度
領域代表者 : 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科・教授 佐藤 衛

補助金交付額 : 平成21年度 : 222, 300千円
平成22年度 : 251, 400千円
平成23年度 : 249, 000千円

天然変性タンパク質は単独ではポリペプチド鎖が大きく揺らいだ変性状態として存在するが、ターゲット分子を認識して結合すると規則正しく折れ畳まれて特定の立体構造が形成される(結合と連結した折れ畳まり)。このような分子認識機構は従来のタンパク質の分子認識モデルである「鍵と鍵穴」や「誘導適合」とは異なり、タンパク質の構造・機能研究にパラダイムシフトをもたらす新しいターゲットとして注目される。天然変性タンパク質は真核細胞(特に核内)に数多く見られるのが特徴で、DNAの複製・転写・修復・組換えやヒストン修飾などに関与する様々な細胞内ネットワークにおけるハブタンパク質として、非常に重要な役割を担っている。本研究領域ではこのように真核細胞の遺伝情報の発現調節や恒常性の維持機構に関わる重要な天然変性タンパク質に焦点を当て、その分子認識機構を解明しながら新しい学術領域を構築していく。一般に、大きく揺らいだポリペプチド鎖がターゲット分子と遭遇して規則正しく折れ畳まれた立体構造が誘起される反応は、ターゲット分子と出会ったときの遭遇複合体(非特異的複合体)から特異的な認識に必要な特異的複合体への構造変化と考えることが出来る。天然変性領域をもたない通常のタンパク質による分子認識でもこのような過程は生じているが、遭遇複合体から特異的複合体形成までが非常に速いので実験的には区別が困難である。しかし、天然変性タンパク質ではターゲット分子との結合に伴って高次構造が形成されるので、遭遇複合体から特異的複合体への構造変化の過程を実験的に捉えることが可能になると考えられる。本研究領域ではこのような考え方を共有しながら、構造生物学、情報生物学、分子生物学の研究者が有機的に連携し、天然変性タンパク質の分子認識と機能発現機構を解明することによって、次世代の生命科学の礎となる構造生物学、分子生物学、情報生物学の融合した新領域を構築していくことを目的とする。

この目的を達成するために、本領域研究では以下のような流れで構造生物学、分子生物学、情報生物学の3研究グループ間の協力体制を構築し、有機的かつ密接な連携関係を強化していく。まず、選定された天然変性状態を有するタンパク質に対して、情報生物学グループが天然変性領域の精密な予測を行い、その結果に基づいてアミノ酸置換体のライブラリーを構築する。次に、これらの変異タンパク質群を発現・精製し、ターゲットとなるタンパク質との複合体系で分子生物学的な解析を行い、タンパク質機能への影響を解析する。同時に、構造生物学グループがそれぞれの天然変性タンパク質(領域)を発現・精製し、質量分析でターゲットタンパク質への結合を確認しながら、遭遇複合体や中間体の動的構造をX線小角散乱や高速AFM、NMR等で解析する。さらに、特異的複合体の立体構造をX線結晶構造解析やNMRで決定する。これらの研究を通して相互作用に影響することが明らかになったアミノ酸変異体の影響を解析することで、天然変性タンパク質の構造・機能相関を明らかにしていきたいと考えている。

研究の進展状況

研究項目：A01（構造生物学グループ）

構造生物学グループでは、新たに開発したX線小角散乱法と分子動力学シミュレーションを組み合わせた手法により天然変性タンパク質の動的構造を解析する研究が順調に進展している。また、新規に開発した1分子蛍光法により、天然変性状態に過渡的な特定の構造を持った分子種が存在し、これが折り畳みの核として働くことを示唆するデータが得られている。また、高速AFM法による天然変性タンパク質の動態解析では、世界最高性能の高速AFMの開発に成功し、領域内研究者が対象にしているタンパク質の動態解析に利用されている。また、ヒストン多量体の構造解析を質量分析およびNMRで行い、ヒストンH2A/H2B二量体のN末端とC末端の各々30残基が天然変性状態であることを明らかにした。さらに、核内天然変性タンパク質PQBP-1およびiPS細胞作成に利用される転写因子Sox2とOct3/4、テロメアタンパク質TRF2の塩基性ドメイン、ヘテロクロマチン形成因子HP1 α のクロモドメインのリン酸化修飾体等のNMR解析を行い、ターゲット認識で引き起こされる天然変性領域の構造変化を解析している。

研究項目：A02（分子生物学グループ）

組換え酵素の天然変性領域の機能解析を行っている分子生物学グループでは、アミノ酸置換変異導入により、Rad51とRad52の共同作用によるATP依存型のDループ形成が生体での組換え修復に重要であることを明らかにし、Rad52の新機能を見出した。Rad52はC末端側に種間で保存されていない天然変性領域を持ち、この領域でRad51等と相互作用することが知られているが、この結果はクロマチン構造に関わる基本的な問題解決の手掛かりを与えるものと期待される。また、核内ネットワークを制御する天然変性タンパク質の機能発現を研究しているグループでは、DNA複製フォークの進行停止を修復する過程で重要な働きをするHef、減数分裂初期遺伝子の発現を制御するクロマチン関連転写因子Ume6、核小体ヒストンシャペロンNPMの天然変性領域の機能解析を行い、Hefの天然変性領域にPCNAはじめ複数のタンパク質が結合すること、Ume6の2つの天然変性領域が転写の活性化と抑制に別々に関与すること、NPM1の核小体クロマチンの構造変換活性に天然変性領域へのRNA結合が重要なことなど新規の天然変性領域の機能を明らかにした。

研究項目：A03（情報生物学グループ）

情報生物学グループでは、シミュレーションとデータベース解析による天然変性タンパク質の基礎および応用研究を行っている。シミュレーション解析では、天然変性タンパク質の物理化学的に妥当なシミュレーションを実施するために、効率的な構造空間のサンプリング手法を新規に開発した。この方法を用いて天然変性タンパク質NRSFとそのターゲットタンパク質mSin3との結合シミュレーションを行い、正しい結合モデルの再現に成功した。さらに、結合過程を詳細に解析し、「結合と連結した折れ畳まり」の機構が「誘導適合」と「構造分布移動」の二面性を持つことを明らかにした。データベース解析では、天然変性タンパク質のデータベース：IDEALを開発した（8月15日に公開予定）。このデータベースにはヒト核内タンパク質を中心に文献調査に基づくアノテーションが集積されている。天然変性タンパク質の分子認識モチーフや翻訳後修飾を受ける部位の閲覧も可能である。さらに、タンパク質配列を構造ドメイン領域と天然変性領域に分離する新しい予測法DICHOTを開発し、結果を公開している。また、アクチンの重合過程を制御する天然変性タンパク質CARMILの機能発現機構を弾性ネットワークモデルを適用することで明らかにした。

研究を推進する上での問題点と今後の対応策

研究項目：A01（構造生物学グループ）

X線小角散乱法と分子動力学シミュレーションを組み合わせた手法による天然変性タンパク質の動的構造解析では、X線を照射する体積中に存在する多数のタンパク質分子(約 10^{12} 個)の溶液散乱から個々の分子の揺らぎを解析する。しかし、究極的にこのように大きく揺らいだ天然変性タンパク質や長大な天然変性領域をもつマルチドメインタンパク質の動的構造解析には20フェムト秒以内での1分子解析が有効である。このようなことから、次世代放射光光源を用いた少数タンパク質分子の溶液散乱解析、さらにはフェムト秒パルスレーザー（X線自由電子レーザー：X-FEL）を使った原子分解能での1分子解析から高分解能の構造情報が抽出できるかどうかシミュレーション解析を行っている。また、天然変性タンパク質研究で最も重要な「結合と連結した折れ畳まり」機構の解明では、コントラスト変調法を利用した中性子小角散乱法が効果的である。しかし、3月11日の東日本大震災の影響で国内唯一の研究用原子炉JRR3Mが使用できなくなり、かつパルス中性子源であるJ-PARCプロジェクトも甚大な被害を受け、その復旧にはかなりの日数がかかる見通しとなった。そこで、本年4月から杉山正明教授(京大原子炉実験所)に班友として当該領域研究に加わっていただき、海外の中性子散乱施設での実験を計画している。

研究項目：A02（分子生物学グループ）

タンパク質の構造を専門にしていない分子生物学者の間では、天然変性タンパク質の概念について、各人の理解の間にかかなりの違いがあることが領域会議などで明らかになってきた。そのような状況下で、「コンピュータによる天然変性タンパク質（領域）の探索」と題する第1回若手育成講習会が2010年9月10日に横浜市立大学鶴見キャンパスで開催された。若手研究者だけでなく中堅以上の研究者の参加も見られたが、分子生物学グループの研究者にとって天然変性タンパク質の概念を共有することに大いに役立った。今後も、折に触れて天然変性タンパク質の概念について議論することが肝要とあると考える。天然変性タンパク質の分子認識機構として「結合と連結した折れ畳まり」がよく取り上げられるが、天然変性タンパク質の全容はまだ未知数で、「結合と連結した折れ畳まり」以外の新規な分子認識機構がこれから発見されることも十分考えられる。新しい描像や特性についても過去の常識にとらわれずに柔軟に対応し、天然変性タンパク質の概念を刷新し、共有していくことが肝要である。

研究項目：A03（情報生物学グループ）

タンパク質の結合と折れ畳まりの問題はそれぞれが難しく、通常のシミュレーションでは個別に研究される。しかし、結合と連結して折れ畳まれる天然変性タンパク質（図1）の構造と機能を明らかにするためには、この2つの問題を同時に解決しなくてはならない。そこで、本研究グループではTTP-McMD法を開発し、構造探索アルゴリズムを飛躍的に発展させることで、天然変性タンパク質（NRSF）とそのターゲットタンパク質（mSin3）の自由エネルギー算出に対応した。また、天然変性タンパク質のアノテーションの作業では、様々な実験結果から状態を判断しなくてはならず、解釈が難しい場面に多々遭遇している。そこで、アノテーション作業を標準化するために、毎週2-3回のスカイプ会議、月1回のFace to Faceの会議を実施し、新事例についてはXMLタグの増設などで対応してきた。

主な研究成果

●研究項目：A01（構造生物学グループ）

研究項目A01では天然変性状態や遭遇複合体の構造解析を目的に、2つの計画研究（計画研究1と2）と7つの公募研究を設けて研究を推進している。

計画研究 1:天然変性タンパク質の新規構造解析法の開発

図1はポリペプチド鎖が大きく揺らいだ変性状態として存在する天然変性タンパク質（IDP）（State 1）が、ターゲットタンパク質分子（OP）を認識して特定の立体構造が形成される（State 2）「結合と連結した折れ畳まり」機構を示している。計画研究1の目標は、State 1の動的構造及びState 2の「結合と連結した折れ畳まり」機構を解析する手法・方法論の開発である。計画研究1では、X線小角散乱法（SAXS）と分子動力学（MD）シミュレーションを組み合わせたMD-SAXS法および高速原子間力顕微鏡（高速AFM）によりState 1の動的構造を解析する手法・方法論を開発している。

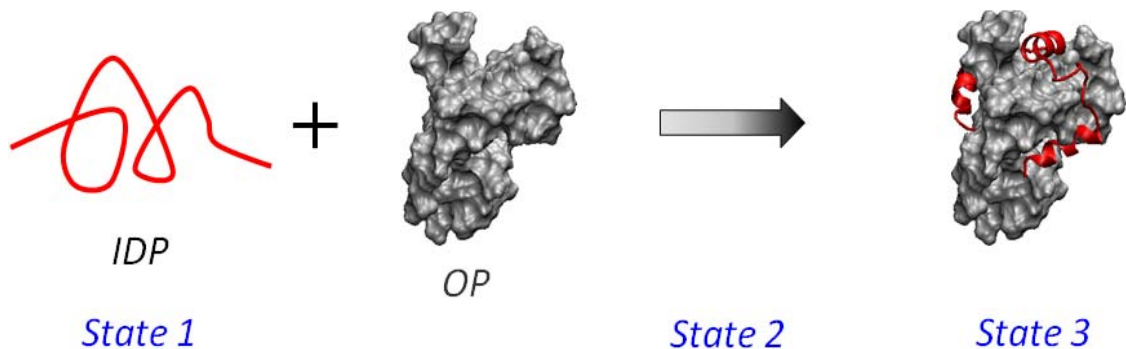


図1. 結合と連結した折れ畳まり機構。IDP: 天然変性タンパク質、OP: ターゲットタンパク質分子

MD-SAXS法による天然変性タンパク質の動的構造解析では、H21年度に購入した2次元複合型ピクセルアレー検出器（PILATUS 100K）を組み込んだX線小角散乱装置のセットアップ・データ収集及び解析システムの開発を行った。また、X線結晶構造解析やNMRで得られた原子モデルから水和構造を正しく考慮して理論SAXS強度を計算する手法を開発した。この手法については世界的に幾つかの方法が提案されているが、実験で得られたSAXS強度との一致度は必ずしもよくないのが現状である。しかし、本研究では、タンパク質溶液と緩衝溶液それぞれに対して、MDシミュレーションによってSAXS強度を計算して両者を差し引く方法を開発した。この方法は、これまでに提案されている方法とはまったく異なる発想に基づいてタンパク質分子表面の水和水からの散乱を取り扱っており、モデルタンパク質を用いての動的構造解析で良好な結果が得られている。MD-SAXS法は、実験のSAXSデータに含まれる動的構造の情報を数百nsオーダーの長時間MDシミュレーションを用いて解析する方法である。しかし、非常に揺らぎの大きい天然変性タンパク質の構造をMDでサンプリングすることは現在の計算機では困難である。そこで、本研究では、アミノ酸の2面角データベースを用いた天然変性領域の高速構造構築法とMDを組み合わせる方法を開発した。さらに、作成した動的構造モデルに実験情報を加味するために、モデルからMD-SAXS法を用いて理論的にSAXS強度を計算し、それが実験SAXSデータと一致するように動的構造モデルを精密化する方法を開発した。実験のSAXSデータは古細菌由来Hefタンパク質（ヘリカーゼドメインとヌクレアーゼドメインから構成され、その間に約100残基の天然変性領域が存在するタンパク質）の

SAXSデータを用いた。現在、この実験データを使って、Hefタンパク質の動的構造解析を行っている。また、State 2の解析では、コントラスト変調法を利用した中性子小角散乱（SANS）法が有効で、現在、Hefの重水素化タンパク質の調製およびSANS実験を計画している。なお、SANS実験は3月11日の東日本大震災の影響で国内の中性子源が使えなくなったので、海外の中性子散乱施設、例えば、フランス・グルノーブルのILL研究所の原子炉での実験を計画している。

高速AFMによる天然変性タンパク質の動態解析の研究では、新しい振幅計測法を導入して装置のノイズ低減化を図るとともに、天然変性タンパク質を含む種々のタンパク質の観察に適した基板や溶液条件を検討した。その結果、世界最高性能の高速AFMの開発に成功した。この高速AFM装置を利用して、天然変性タンパク質FACTについては、天然変性タンパク質領域のリン酸化に伴うフォールディングを見出し、この領域とDNAの結合がこのフォールディングを通して調節されていることが示された。また、天然変性タンパク質領域を多く含むと予測されているPQBP-1の高速AFM撮影を行い、WWドメインと推定される球状ドメインに天然変性領域と思われる長いひも状の構造が続き、その先に小さい球状のドメインがあることが示された。天然変性タンパク質領域の存在が確認されていない種々のタンパク質のダイナミクスについても高速AFM撮影を行った。さらに、理論予測との比較および天然変性領域に共通する性質や個々のタンパク質の天然変性領域に特有な性質を調べたところ、理論予測と一致する場合が一般的であるが、天然変性と予測されている領域が秩序構造をもつ場合や、それと逆の場合もあった。理論的に導かれる中間的な秩序-非秩序指数に対応する構造は実際には存在せず、完全秩序-完全非秩序状態の間をダイナミックに転移している可能性が示唆された。実際、メチル化DNA結合タンパク質MeCP2において転移現象が見出された。天然変性領域がほとんどを占めるタンパク質については、高速AFM観察を容易にするためにGFPなどを末端に導入した試料の調製を進めている。なお、当該高速AFMの開発にともなう特許は次のとおりである。

- ▶ 安藤敏夫、岡崎康孝、内橋貴之：原子間力顕微鏡及びカンチレバー支持具、特願2010-126027、2010年6月1日（国内）
- ▶ 安藤敏夫、斎藤 究、戸田明敏：走査型プローブ顕微鏡、特許第4646049号、2010年12月17日（国内）
- ▶ 安藤敏夫、内橋貴之、古寺哲幸、高橋直尚：原子間力顕微鏡、特許第4496350号、2010年4月23日（国内）

計画研究 2:天然変性タンパク質の動的構造解析

NMR および質量分析法（MS）を主な解析手法として以下のような研究を行った。

(1) ヒストン多量体の解析

ヒストンH2A/H2B二量体、H3/H4四量体の構造はこれまでに解かれておらず、ヌクレオソームコアの形成／組み換えのメカニズムは構造的に裏付けられていない。またヒストンの天然変性領域の修飾がもたらす構造変化も明らかになっていない。そこで、組み換え体として調製したヒストン多量体の構造解析をMS や NMR を用いて以下のように行った。H2A/H2B二量体、H3/H4四量体、H2A/H2B/H3/H4八量体は、2 M 以上の酢酸アンモニウム水溶液で調製することで安定な多量体のイオンをMSで観測できること、そして、H2A/H2B二量体はArg残基のシトルリン化により安定化されることをMSで明らかにした（図2）。また、H2A/H2B二量体、H3/H4四量体の分子イオンの衝突断面積をイオンモビリティMS（IM-MS）で求めたところ、いずれもヌクレオ

ソームコアの結晶構造から抜き出したこれらの構造を元にした理論的な衝突断面積よりわずかに大きいことが示された。さらに、H2A/H2B二量体中のH2Aの二次構造をNMRで同定し、ヌクレオソームコア中のH2Aの構造と比較したところ、H2AH2B二量体中では、N末端とC末端の α ヘリックスが壊れ、N末端およびC末端の各々30残基が天然変性状態であることが示された。また、3種類のヒストンシャペロンNAP1、NAP2、FACTのSPT16の各酸性ドメイン（いずれも天然変性領域）とH2Aとの相互作用をNMRで解析し、H2Aの結合領域の同定に初めて成功した。

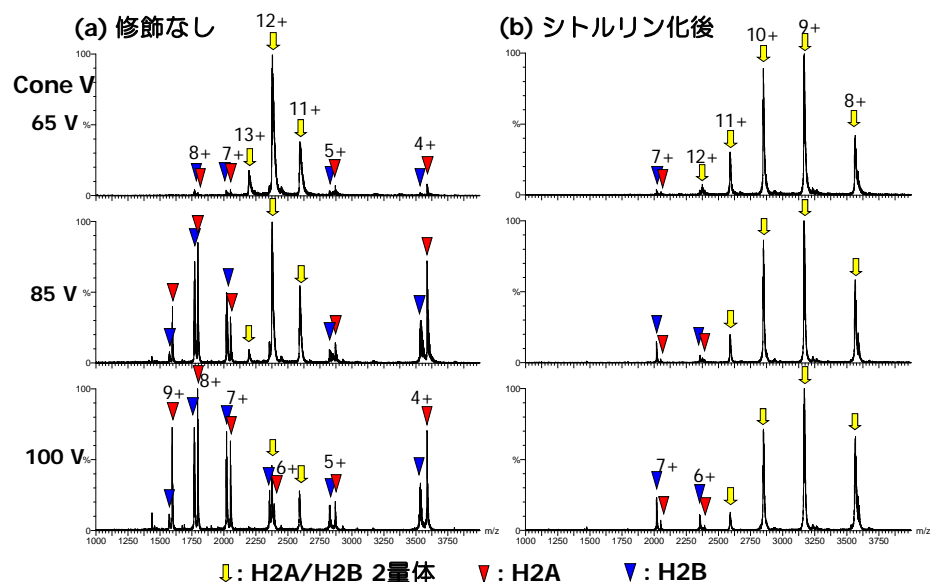


図2: ヒストンH2A/H2B二量体のESI-MS

(2) 核内天然変性蛋白質polyglutamine tract binding protein-1 (PQBP-1) のNMR解析

NMRによる解析で、PQBP-1は長大な天然変性タンパク質領域と小さなフォールドしたコアから構成されること、PQBP-1の長大な変性領域が極性ドメインとC末端ドメインから構成されること、フォールドしたコアがWWドメインから構成されることを明らかにした。変性領域の極性ドメインはポリグルタミン鎖と相互作用し、C末端ドメインはスプライソソームのU5-15kDと相互作用することから、PQBP-1の機能ドメインは天然変性状態であることが明らかとなった。また、PQBP-1とU5-15kDとの相互作用解析から、C末端ドメインの天然変性領域に存在するTyr245, Val251, Leu252, Asn255が結合に重要であることが示された。

(3) iPS細胞作成に用いられる転写因子Sox2とOct3/4のNMR解析

Sox2とOct3/4の天然変性領域は核移行に関わるタンパク質とDNAの両者ともに結合する特異な天然変性領域である。これまでに、Oct3/4の天然変性領域ではDNA結合型において複数のNMRシグナルが観測されることから構造多型であることがわかった。また、Sox2では構造多型は認められず、緩和分散実験から遊離状態において2%程度の存在比で α ヘリックスが解けていることが明らかとなった。

公募研究

公募研究では、新規に開発した1分子蛍光法によって、天然変性状態に過渡的な特定の構造を

持った分子種が存在し、これが折り畳みの核として働くことを示唆するデータが得られ、分子認識モチーフとの関連で今後の研究に興味を持たれる。また、2チャンネルタイムスタンプ法による天然変性状態にある分子認識ドメインの構造分布と構造状態遷移ダイナミクスの解析も進められている。さらに、大きく揺らいだ天然変性タンパク質の構造集団に対する各アミノ酸残基のRDCを推定する計算方法を新規に開発し、この方法と解鎖構造生成法、X線小角散乱法を使った尿素変性状態と酸変性状態のアポミオグロビンの構造特性評価の研究が進展している。一方、タンパク質の異常凝集に関しては、天然変性蛋白質 α シヌクレインのアミロイド線維形成や変性させたGroES蛋白質の構造とアミロイド線維形成に関して、凝集のコアペプチドの同定やその応用、アミロイド線維形成機構の原子レベルでの解析が行われている。

●**研究項目：A02（分子生物学グループ）**

研究項目A02では核内タンパク質の天然変性タンパク質の機能解析を目指し、2つの計画研究（計画研究3と4）と13の公募研究を設けて研究を推進している。

計画研究 3:組換え酵素における天然変性領域の機能

相同DNA組換えの開始制御の主要な標的は、組換え初期過程である（図3 (1)-(5)）。そこに働く代表的なタンパク質についてアミノ酸配列を解析したところ、それらの多くが天然変性領域をもつと予測された。これらの天然変性領域の相同組換えでの分子機能と遺伝的機能を明らかにすることを通して、天然変性タンパク質の普遍的な機能と原理への理解を深めることが本研究の目的である。研究対象は、組換え開始部位とタイミングを支配するDNA二重鎖切断（DSB; 図3 (1)）を入れる組換え開始酵素Spo11（減数分裂期）とNtg1（栄養増殖期）、組換え相手の選択と組換え中間体形成（図3 (3)）に働くRecA/Rad51型組換え酵素と組換えメディエーター（RPAで被われた単鎖DNAにRecA/Rad51を載せる機能を担う）、SDSA経路かホリデー中間体経由かの選択（図3 (4)-(5s,d)）である。

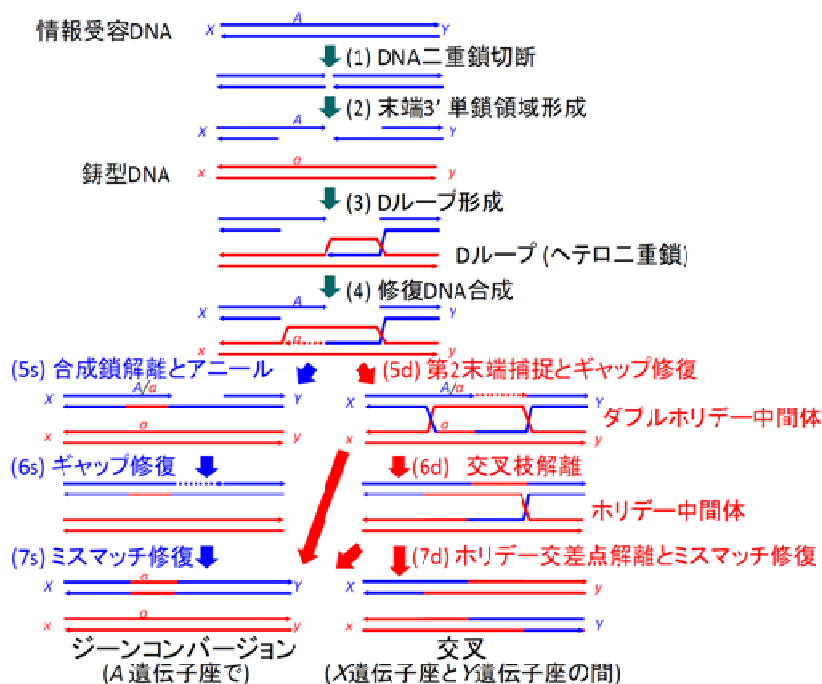


図3. 相同組換え経路。(1)-(5s)-(7s) がSDSA経路

相互作用の分子機能の研究は、正常型と突然変異型タンパク質について、また、天然変性領域をもたないが同じ働きをする真正細菌のタンパク質については、生化学と構造解析手法により比較解析して研究を進めた。また、多様な遺伝学的解析ができるショウジョウバエと酵母を用いて、天然変性領域の突然変異の表現型解析により相互作用に遺伝機能解明を行った。組換え開始段階のタンパク質がもつ天然変性領域の機能を理解することで天然変性領域の酵素反応やその活性制御での未知の機能が明らかにできると考えている。

(1) Rad52の機能解析

Rad52は酵母からヒトまで見つかる代表的な組換えメディエーターである。種間で保存されたN末端側のDNA結合ドメインと保存されていないC末端ドメインからなり、C末端ドメイン全体が天然変性と予測された。組換えメディエーター機能（図3 (3)）と相補配列をもつ単鎖DNAのアニーリング活性（図3 (5s), (5d)）でRad52が相同組換えに働くことは知られていた。我々は、既にRad52が単独でATP不要のDループ形成活性をもつこと、また、RPAが無くてもRad51によるDループ形成をRad52が促進することを明らかにしていたが、これらの組換えでの機能は不明であった。そこで、Rad52のC末端ドメインが予測通り天然変性タンパク質であることをNMRで確認した。さらに、Rad52のN末端DNA結合ドメインにアミノ酸置換変異を導入して、Rad52が二重鎖DNAを捕まえてRad51に渡すことがRad51とRad52の共同作用によるATP依存型のDループ形成（図3 (3)）に働くこと、および、それが生体でのDSBの相同組換え修復でも重要なことを示し、これまで知られていなかったRad52の新機能を明らかにした。

(2) Dループ形成反応の解析

Rad52と細菌の組換えメディエーターRecOは、単独でATPを必要としないDループ形成反応を行うことが知られている。我々は、Rad52, RecOおよびATP不要型組換え酵素RecT（細菌）とMhr1（酵母ミトコンドリア）によるDループ形成反応中間体中の単鎖DNAがRecA/Rad51と同様の特異な伸長構造を持つことをNMRで明らかにした。この結果は、反応を触媒するタンパク質が何であってもDループ形成はDNAレベルでは共通の分子機構で行われていること、および、真核・原核生物いずれでも2種の組換え酵素が相同組換えでのDループ形成で共同作用していることを示している。今後はその意義と天然変性領域の役割を明らかにしていく予定である。

(3) 酵母SDSA相同組換えアッセイ系の開発と解析

体細胞でのDNA切断修復には相同組換え経路と非相同性末端結合が働く。体細胞増殖期では、相同組換え修復では姉妹染色体が鋳型に選ばれるが、ホリデー中間体を経由する組換え経路や非相同性末端結合では交差、LOH（ヘテロ接合性喪失）、欠失変異などゲノムの不安定性を招く。天然変性タンパク質を含む組換え関連因子における変異のDNA切断修復への効果を解析するに当たり、ゲノム不安定性を引き起こさないSDSA相同組換え経路（図3）への変異の影響を特異的に検定する系が存在しなかった。そこで、新たに酵母を用いたSDSAアッセイ系を開発して変異体解析を行った結果、Dループ形成に関わるRad51, Rad52, Rad54に加えて、従来組換え抑制因子として知られていたものを含む天然変性領域をもつ複数のDNAヘリカーゼがSDSA経路を促進することがわかった。その組換え抑制機能は交差に働き（図3 (4)-(5d)）、ゲノム安定性に寄与することもわかった。また、Rad52の天然変性領域だけを除いた*rad52DC*変異株作製して解析した結果、SDSA経路と非相同性末端結合の両方に対する阻害効果を見出した。今後、本アッセイ系をRad52とDNAヘリカーゼの天然変性領域の組換え機能の精密解析に利用していく

予定である。

計画研究 4:核内ネットワークを制御する天然変性タンパク質の機能発現

(1) DNA 複製・修復関連タンパク質の天然変性領域の機能と構造の解析

Hef/FancM は DNA 複製フォーク停止の修復に非常に重要なタンパク質因子である。本研究では、まず Hef/FancM の N 末端ヘリカーゼドメインと C 末端ヌクレアーゼドメインの間に存在する長大なリンカー領域が天然変性状態であることを NMR, CD, 高速 AFM で明らかにした。次に、この天然変性領域に結合するタンパク質因子を探索したところ、PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) がこの領域に結合することを明らかにした。同時に天然変性領域中の結合部位を同定した (図 4)。PCNA は DNA 鎖に結合し、DNA 鎖上で働く多くのタンパク質因子を結合する足場となるクランプ分子として知られている。現在、Hef-PCNA 間の相互作用様式を詳細に解析するとともに、PCNA 結合の生理的な意義を解析している。さらに、この天然変性領域と相互作用する他のタンパク質因子を同定するために、酵母 Two-Hybrid 法を用いて、ヒトとアーキアの Hef 遺伝子をそれぞれ Bait として、それぞれの cDNA ライブラリーを網羅的にスクリーニングしている。現在までに、RecJ ヌクレアーゼや Rev1-Rev3 タンパク質因子が候補として上がり、現在それらの相互作用を確認中である。これらの相互作用因子から Hef が関与する修復経路の解明に新たな糸口が見つかるものと期待している。天然変性領域を有する Hef タンパク質以外の DNA 複製、修復関連タンパク質として、DNA ポリメラーゼ D, DNA Ligase, Gins タンパク質 についても研究が進展している。特に *Thermoplasma* 由来の Gins タンパク質に存在する 100 アミノ酸からなる天然変性領域は、このタンパク質がホモ 4 量体として安定に存在するために重要なことを突き止めた。

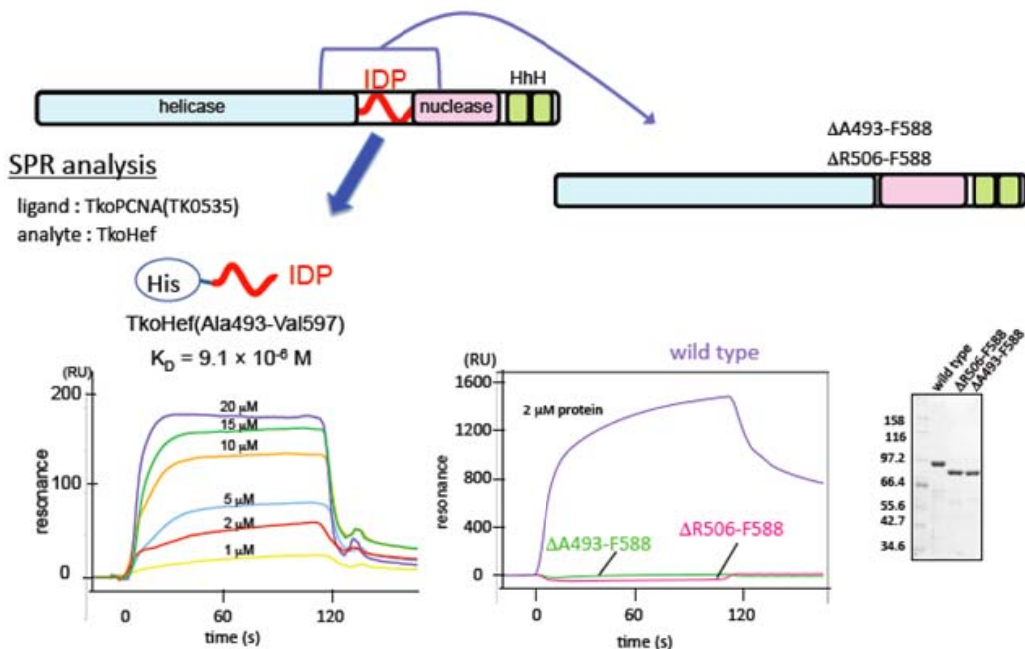


図4. Hef-PCNAの相互作用解析

Hefの天然変性領域はそれ自身でPCNAに結合する (左)

Hefの天然変性領域を欠失させるとPCNAと結合しなくなる (右)

(2) 出芽酵母の転写活性化/抑制因子Ume6の天然変性領域の機能解析

出芽酵母における減数分裂初期遺伝子群の発現制御において、Ume6は、饑餓条件ではIme1と相互作用して転写を活性化するが、栄養増殖条件ではクロマチンリモデリング因子 Isw2 複合体とヒストン脱アセチル化酵素Rpd3をリクルートして転写を抑制する。本研究では、Ume6による転写抑制において、Isw2がヌクレオソームポジショニングして、activatorの結合を阻害することが重要であることを*in vivo*で明らかにした。また、Ume6は分子全体にわたって長大な天然変性領域を有することが構造予測プログラムから予想された。そこで、Ume6変異株を作製して解析した結果、2つの天然変性領域（ID1とID4と命名）が、それぞれ転写の活性化と抑制に関与していることが明らかとなった。Ume6のN末端側がリン酸化されるという報告を踏まえ、ID1が天然変性領域としてリン酸化を受け、Ime1との相互作用に関与していることが推察される。一方、ID4はSin3-Rpd3との相互作用に関与していることが考えられ、現在その確認作業を行っている。また、ID1とID4の大量発現系を作製し、これらの天然変性領域の動的解析とタンパク質間相互作用の解析を進めている。

(3) 核小体ヒストンシャペロンNPMの構造と細胞内機能の解析

NPM1はN末端の多量体形成領域を介して5量体を形成する。中央の領域には120アミノ酸程度の天然変性領域があり、この領域にはヒストンシャペロン活性に必要な酸性領域が含まれる。C末端には3本のアルファヘリックスを形成するRNA結合領域があり、この領域に急性骨髄性白血病の多くの患者で変異がみられる。本研究ではNPM1はヒストンシャペロンとして核小体クロマチンの構造変換にかかわること、この活性にはRNA結合が重要であることを明らかにしてきた。さらに、NPM1の天然変性領域の中に新規のRNA結合領域を同定し、この領域はリン酸化による制御を受けることを明らかにした。また、計画研究2の明石との連携研究によって、NPM1がNPMファミリータンパク質NPM3と多量体を形成することによって、その機能が制御されることを見出した。また、細胞質に局在して核と細胞質の間をシャトルするヒストンシャペロンNucleosome Assembly Protein 1 (NAP1) の機能解析も進めている。NAP1のC末端には50アミノ酸からなる酸性領域が存在し、この領域がヒストンシャペロンとしての機能重要であることがわかっている。NAP1にはいくつかのファミリータンパク質が存在し、これまでにユビキタスに発現する2つのNAP1ファミリータンパク質について生化学的な機能を明らかにした。現在、酸性領域とヒストンとの相互作用様式の解析、酸性領域の構造の解析を計画研究2の西村と共同で進めている。

(4) クロマチンを介するネットワークの解析

ヒストンとDNAとの相互作用によるヌクレオソーム形成と転写活性との関係を、出芽酵母を用いて*in vivo*で解析する系を構築した。この系を用いて超らせん構造の湾曲DNAはヒストンと高い親和性を有し、プロモーター上でヌクレオソームの配置をダイナミックに変化させて転写活性を高めることを明らかにした。さらに、様々なリピート配列を解析し、ヌクレオソームの形成または排除と転写活性との相関性を実証した。また、 α -細胞特異的遺伝子ではヌクレオソームポジショニングが転写抑制に必須であることを示し、細胞分化や老化を誘導する5-ブロモデオキシウリジンがプロモーター上のヌクレオソームポジショニングを破壊して、転写活性を増大することを見出した。

公募研究

公募研究では、分子生物学、生化学、分子遺伝学的手法を用いて天然変性タンパク質の多様な新規機能が明らかとなってきた。例えば、全長に渡ってドメイン構造をもたない天然変性タンパク質（NEDタンパク質）には主要な細胞内シグナル伝達を制御する機能を有するものと新規の細胞質内小胞輸送経路に働くものが存在することを明らかにし、後者については新規小胞輸送経路に働くペプチドモチーフも同時に同定した。また、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因遺伝子として同定されたTDP-43には新しい多数のスプライシングバリエントが存在し、このスプライシングバリエントの多くが天然変性領域に局在していることを見いだした。このことからTDP-43の天然変性領域がその安定性に影響してALSの発症に関与していることを明らかにした。さらに、エピジェネティクスな生体内現象の制御に重要な働きをしているUHRF1について、ヒストン修飾と片鎖メチル化DNAの認識に重要なリンカー領域（天然変性状態と考えられている）のリン酸化がヒストンとDNAの双方への結合を抑制することが明らかにされた。また、異常タンパク質を感知するセンサーである小胞体膜タンパク質IRE1について、機能ドメインとしての天然変性領域の機能解析を行い、IRE1には2つのパラログ（IRE1 α とIRE1 β ）があり、IRE1 β はIRE1 α とは異なり直接ターゲットと結合することで異常タンパク質を感知することが明らかにされた。また、染色体分配に重要な働きをするセントロメアについて、個々のセントロメアタンパク質は単独では変性状態にありながら、染色体分配の際には複数のタンパク質が集合して機能的な高次の複合体を形成することを明らかにした。

●研究項目：A03（情報生物学グループ）

研究項目A03では天然変性タンパク質の構造と機能的性質を情報生物学的に解明することを目指し、2つの計画研究（計画研究5と6）と4つの公募研究を設けて研究を推進している。

計画研究 5: 計算科学による核内タンパク質天然変性状態の構造多型解析

天然変性タンパク質の機能は「結合と連結した折れ畳まり」と呼ばれる機構（図1）で発現する。この性質は遊離の状態では立体構造を形成しているタンパク質にはない独特なもので、この機構によって天然変性タンパク質のハブ性（多様なターゲット分子と相互作用する性質）を可能にしていると推測される。最近、アメリカを中心としたいくつかのグループが結合と連結した折れ畳まりの物理化学的な理由付けのために理論計算を行い、相反する二つのメカニズム（「誘導適合」や「構造分布移動」）が提案されている。しかし、これらの研究は、正しい複合体構造を形成するようにバイアスをかけてシミュレーションしており、得られた結果にはバイアスの影響が大きい。また、アミノ酸を1個のビーズに置き換えてタンパク質分子を表現する粗視化モデルや、周囲の溶媒分子をあらわに扱わない手法が採用されている。実験的に結合過程を詳細に追跡できない現状では、「誘導適合」と「構造分布移動」のどちらが正しいかはわからない。

結合と連結した折れ畳まりのメカニズムを物理化学的に明らかにするためには、バイアスがからなく、粗視化も溶媒の近似も使わない厳密なシミュレーションを実施する必要がある。そこで、平成21年10月より全原子モデルでの分子動力学（MD）計算を開始した。対象は計画研究2の西村らがNMRで構造決定した天然変性タンパク質NRSFとターゲットタンパク質mSin3の複合体である。天然の複合体構造では、NRSFはmSin3のクレフトにはまり込みヘリックス構造を

とる。シミュレーションの初期構造ではNRSFを変性させ、かつ、mSin3から遠く離して配置した。計算は、新規に開発したマルチカノニカル分子動力学法を使った。この方法により効率的構造探索が実現され、その結果、単体のNRSFは多様な立体構造の間を揺らいでおり、そのどれもmSin3に結合することが明らかとなった（構造分布移動を支持する結果）。そして、いったん非天然複合体構造が形成されると、NRSFは構造を変化させながら最終的にはヘリックスを形成し（誘導適合を支持する結果）、複合体構造を再現することができた（*J. Am. Chem. Soc.* in press）。このメカニズムは誘導適合と構造分布移動の二面性を有するもので（図5 (A)）、さらに結合過程の自由エネルギー地形を求めてみると、NRSFがmSin3上で向きを変えるときやNRSFの鎖の伸びが変化するとき自由エネルギーの障壁を乗り越えることが明らかとなった（図5 (B), (c)）。計算手法の理論構造から考えて、前述した他の研究グループからはこの研究と同等の結果は絶対に得られない。また、この研究を進める過程で開発した計算のアルゴリズムを用いて57残基からなるタンパク質のfolding自由エネルギー地形を算出した。

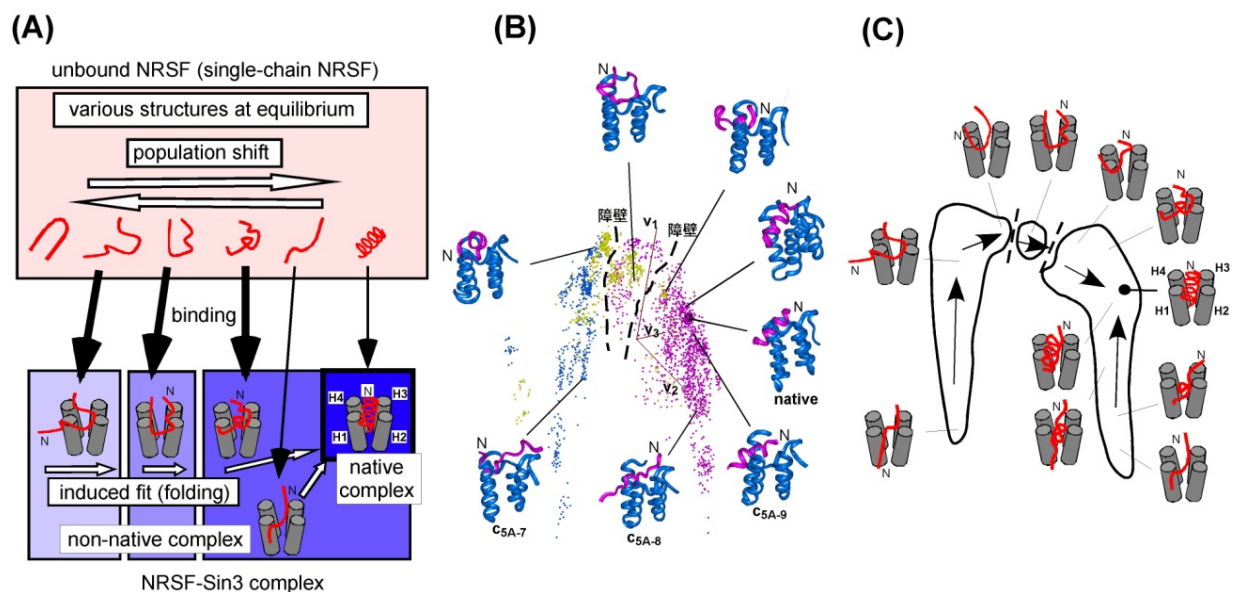


図5. (A) 結合と連結した折れたたまりの全体像。NRSFは赤いヒモ、mSin3は四つのシリンダー（H1-H4）で表示。上パネルはNRSF単体の運動、下パネルは複合体中でのNRSFの構造変化。矢印は構造変化の向き。"N"はNRSFのN末端。(B) 得られた自由エネルギー地形。個々の小さな点はシミュレーションから得られた構造で、ある抽象的な空間にマッピングした。立体構造の図では、マゼンタがNRSF、シアンがmSin3。自由エネルギー障壁は点線で表わされている。(C) は(B) を模式化したもの。

計画研究 6:タンパク質天然変性状態の情報基盤の確立と展開

平成21年10月より博士研究員1-2名、アノテータ2-3名、システムエンジニア1名を雇用し、天然変性タンパク質のデータベース開発を行っている。天然変性タンパク質は遊離の状態ではポリペプチド鎖が大きく揺らいだ変性状態として存在するが、ターゲット分子を認識して相互作用すると特定の立体構造が形成される（結合と連結した折れ畳まり）。このような相互作用部位は分子認識モチーフ（Molecular Recognition Features: MORF）と呼ばれている。また、天然変性タ

ンパク質はリン酸化やメチル化などの翻訳後修飾を受け、相互作用の形態を変化させるものもある。このような天然変性タンパク質の独特の機能を解析していくためには、MORFや翻訳後修飾される部位を明示的に登録していく必要がある。開発しているデータベース (Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literatures: IDEAL, <http://www.ideal.force.cs.is.nagoya-u.ac.jp/IDEAL/>) では、核内タンパク質を中心に分子認識モチーフや翻訳後修飾部位について文献調査などに基づく注釈付けを行い、既に100エントリほどを登録した。データは全てXML化されており、計算機上で細かな処理が可能である。現在、インターフェース (図6) の実装などを行っており、平成23年8月15日に公開を予定している。

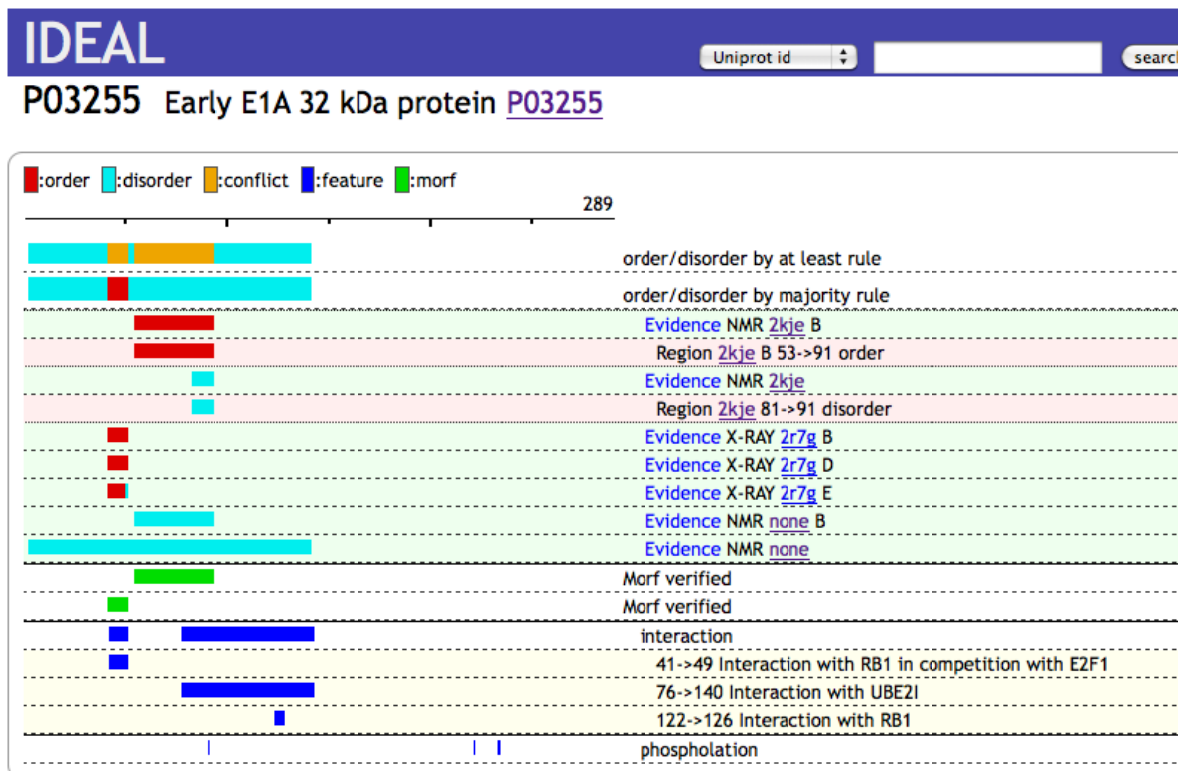


図6. ヒトアデノウイルスのタンパク質のIDEALでの表示画面。天然変性領域 (水色)、立体構造のある領域 (赤) などが一目瞭然で理解できる。分子認識モチーフ (MORF) は他のタンパク質との相互作用部位。リン酸化部位についても記載があり、天然変性領域のデータと照らし合わせて閲覧することが可能である。

天然変性領域を予測するプログラムはこれまでも多く開発されているが、それらは全て天然変性している可能性を「1残基ごとに」示すものであった。しかし、天然変性領域と対立する概念である構造ドメインは、少なくともある程度の連続した残基領域にわたり定義されるものである。したがって「構造ドメインでない天然変性領域」もそれに倣うのが自然である。そこで、ドメインサイズ程度の領域が構造をとるのかとらないのかを判別するプログラム DICHOTを新たに開発し、解析結果をhttp://spock.genes.nig.ac.jp/~genome/human_tf/で公開した。DICHOTでは「天然変性領域の配列保存性は低い」という性質を利用して、構造ドメインか天然変性領域かを判定している。DICHOTを利用した研究からリン酸化部位は天然変性領域に多いことが確認された。また、ある種の糖鎖修飾を受ける部位も天然変性領域に多いことが新たに明

らかとなった。

その他、アクチンの重合制御に関わる天然変性タンパク質CARMILの弾性ネットワークモデルを用いたコンピュータ解析を実施し、機能発現メカニズムを解明した。また、NMRで構造決定されたモデルから天然変性領域を同定する方法も開発した。また、タンパク質の発現を高速に行うPRESAT-VECTORを利用した天然変性領域同定システムを開発し、計画研究1で構造解析し計画研究4で機能解析しているHefタンパク質に適用した。

公募研究

公募研究では、天然変性タンパク質の安定性データベースの開発、二次元ゲル電気泳動を利用して天然変性領域を判定する方法、天然変性タンパク質のペプチドライブラリ開発、MutSの天然変性ループの計算機シミュレーションなどを実施した

研究成果の公表の状況

(1) 主な論文等一覧について

当該領域研究（計画研究代表・分担者：17名、公募研究代表者：24名）の総論文数は169報。

以下の一覧は、27, 28ページに記載されている研究組織の研究項目（A01 → A02 → A03）の順にリストされている。

1. H. Tachiwana, W. Kagawa, T. Shiga, A. Osakabe, Y. Miya, K. Saito, Y. Hayashi-Takanaka, T. Oda, M. Sato, S-Y. Park, H. Kimura, *H. Kurumizaka, Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A, *Nature* in press
2. T. Yoshizawa, T. Shimizu, M. Yamabe, M. Taichi, Y. Nishiuchi, N. Shichijo, S. Unzai, H. Hirano, M. Sato, *H. Hashimoto, Crystal structure of basic 7S globulin, a xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase inhibitor protein-like protein from soybean lacking inhibitory activity against endo- β -glucanase, *FEBS, J.* **278**, 1944-1954 (2011)
3. N. Horikoshi, H. Tachiwana, K. Saito, A. Osakabe, M. Sato, M. Yamada, S. Akashi, Y. Nishimura, W. Kagawa, *H. Kurumizaka, Structural and biochemical analyses of the human PAD4 variant encoded by a functional haplotype gene, *Acta Cryst.* **D67**, 112-118 (2011)
4. T. Oroguchi, M. Ikeguchi, *M. Sato, Towards the Structural Characterization of Intrinsically Disordered Proteins by SAXS and MD Simulation, *J. Physics: Conference Series* **272**, 012005 (2011)
5. A. Kawai, H. Hashimoto, S. Higuchi, M. Tsunoda, M. Sato, K. T. Nakamura, *S. Miyamoto, A novel heterotetrameric structure of the crenarchaeal PCNA2-PCNA3 complex, *J. Struct. Biol.* **174**, 443-450 (2011)
6. 荳口友隆、池口満徳、*佐藤 衛, 天然変性タンパク質：タンパク質の構造・機能研究の新しいターゲットーX線小角散乱と分子動力学シミュレーションによる動的構造解析ー, *実験医学*, **29**, 475-480 (2011)
7. T. Oda, H. Hashimoto, N. Kuwabara, S. Akashi, K. Hayashi, C. Kojima, T. Kawasaki, K. Shimamoto, M. Sato, *T. Shimizu, Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications, *J. Biol. Chem.* **285**, 1435-1445 (2010)
8. K. Hara, H. Hashimoto, Y. Murakumo, S. Kobayashi, T. Kogame, S. Unzai, S. Akashi, S. Takeda, T. Shimizu, *M. Sato, Crystal structure of human REV7 in complex with human REV3 fragment and structural implication of the interaction between DNA polymerase ζ and REV1, *J. Biol. Chem.* **285**, 12299-12307 (2010)
9. Yanagihara, K. Nakahira, T. Yamane, S. Kaieda, K. Mayanagi, D. Hamada, T. Fukui, K. Ohnishi, S. Kajiyama, T. Shimizu, M. Sato, T. Ikegami, M. Ikeguchi, T. Honda, *H. Hashimoto, Structure and Functional Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin, *J. Biol. Chem.* **285**, 16267-16274 (2010)

10. H. Hashimoto, K. Hara, A. Hishiki, S. Kawaguchi, N. Shichijo, K. Nakamura, S. Unzai, Y. Tamaru, T. Shimizu, *M. Sato, Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. *EMBO Rep.* **11**, 848-853 (2010).
11. N. Kuwabara, H. Hashimoto, N. Yamada, S. Unzai, M. Ikeguchi, M. Sato, Y. Murayama, H. Iwasaki and *T. Shimizu, Expression, purification and crystallization of Swi5 and the Swi5-Sfr1 complex from fission yeast, *Acta Cryst.* **F66**, 1124-1126 (2010)
12. *佐藤 衛, 中性子溶液散乱法による生体高分子の構造解析, *RADIOISOTOPES*, **59**, 367-378 (2010)
13. K. Hara, T. Shimizu, S. Unzai, S. Akashi, M. Sato, *H. Hashimoto, Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of human REV7 in complex with REV3 fragment, *Acta Crystallogr.* **F65**, 1302-1305 (2009)
14. T. Oda, H. Hashimoto, N. Kuwabara, S. Akashi, K. Hayashi, C. Kojima, W. H. Ling, T. Kawasaki, K. Shimamoto, M. Sato, *T. Shimizu, Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications, *J. Biol. Chem.* **285**, 1435-1445 (2009)
15. H. Hashimoto, S. Kawaguchi, K. Hara, K. Nakamura, T. Shimizu, Y. Tamaru, *M. Sato, Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of the zinc-finger domain of zebrafish Nanos, *Acta Crystallogr.* **F65**, 959-961 (2009)
16. N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, *T. Ando, Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy, *Nature*, **468**, 72-76 (2011)
17. P.-E. Milhiet, D. Yamamoto, O. Berthoumieu, P. Dosset, Ch. Le Grimellec, J.-M. Verdier, S. Marchal, *T. Ando, Deciphering the structure, growth and assembly of amyloid-like fibrils using high-speed atomic force microscopy, *PLoS One*, **5**, e13240 (8 pp) (2010)
18. D. Yamamoto, T. Uchihashi, N. Kodera, H. Yamashita, S. Nishikori, T. Ogura, M. Shibata, *T. Ando, High-speed atomic force microscopy techniques for observing dynamic biomolecular processes, *Methods Enzymol.* **475** (B) 541-564 (2010)
19. D. Yamamoto, A. Taoka, T. Uchihashi, H. Sasaki, H. Watanabe, T. Ando, *Y. Fukumori, Visualization and structural analysis of the bacterial magnetic organelle magnetosome using atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9382-9387 (2010)
20. *安藤敏夫, 歩くタンパク質 "ミオシンV" を捉えた!, 化学, **66**, 55-59 (2010)
21. *安藤敏夫, 古寺哲幸, 高速原子間力顕微鏡によるタンパク質の動態撮影, 生物物理, **51**, 22-25 (2010)
22. *安藤敏夫, Visual Review 「高速原子間力顕微鏡によるタンパク質の高解像・動画観察」, 感染・炎症・免疫, **40**, 31-37 (2010)
23. *安藤敏夫, 生体分子の動態を捉える高速原子間力顕微鏡, 表面科学, **31**, 405-410 (2010)
24. S. Sugimoto, K. Yamanaka, S. Nishikori, A. Miyagi, T. Ando, *T. Ogura, AAA+ chaperone ClpX regulates dynamics of prokaryotic cytoskeletal protein FtsZ, *J. Biol. Chem.* **285**, 6648-6657 (2010)
25. M.-C. Giocondi, D. Yamamoto, E. Lesniewska, P.-E. Milhiet, T. Ando, *C. Le Grimellec, Surface topography of membrane domains, *Biochim. Biophys. Acta.-Biomembranes*, 1978, 703-718 (2010)
26. M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, *T. Ando, High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photo-activated bacteriorhodopsin, *Nature Nanotechnology*, **5**, 208-212 (2010)
27. *安藤敏夫, 生体分子の動的プロセスを直接可視化する高速AFM, 顕微鏡, **45**, 22-30 (2010)
28. Casuso, N. Kodera, C. Le Grimellec, T. Ando, *S. Scheuring, High-resolution high-speed contact mode atomic force microscopy movies of purple membrane, *Biophys J*, **97**, 1354-1361 (2009)
29. D. Yamamoto, N. Nagura, S. Omote, M. Taniguchi, *T. Ando, Streptavidin 2D crystal substrates for visualizing biomolecular processes by atomic force microscopy, *Biophys. J.* **97**, 2358-2367 (2009)
30. H. Yamashita, K. Voitchovsky, T. Uchihashi, S. Antoranz Contera, J. F. Ryan, *T. Ando, Dynamics of bacteriorhodopsin 2D crystal observed by high-speed atomic force microscopy, *J. Struct. Biol.* **167**, 153-158 (2009)
31. Shinohara, N. Kodera, *T. Ando, Single-molecule imaging of a micro-Brownian motion of a chiral helical π -conjugated polymer as a molecular spring driven by thermal fluctuations, *Chem Lett.* **38**, 690-691 (2009)
32. *安藤敏夫, ビデオレート高速バイオ原子間力顕微鏡, 真空, **51**, 783-788 (2009)
33. *安藤敏夫, 生命科学に資する高速原子間力顕微鏡, バイオインダストリー, **26**, 21-30 (2009)
34. Shimoyama S, Nagadoi A, Tachiwana H, Yamada M, Sato M, Kurumizaka H, *Nishimura Y, *Akashi S. Deimination stabilizes histone H2A/H2B dimers as revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **45**, 900-908 (2010).
35. Domann PJ, Akashi S, Barbas C, Huang L, Lau W, Legido-Quigley C, McClean S, Neusüss C, Perrett D, Quaglia M, Rapp E, Smallshaw L, Smith NW, Smyth WF, *Taylor CF. Minimum

- Information About a Proteomics Experiment (MIAPE). Guidelines for reporting the use of capillary electrophoresis in proteomics. *Nat Biotechnol.* **28**, 654-655 (2010).
36. Miranda FF, Iwasaki K, Akashi S, Sumitomo K, Kobayashi M, Yamashita I, *Tame JR, *Heddle JG. A Self-Assembled Protein Nanotube with High Aspect Ratio. *Small* **5**, 2077-2084 (2009).
 37. 明石知子、巨大タンパク質の質量分析、ぶんせき、**8月号**、422-427 (2009).
 38. Takahashi M, *Mizuguchi M, Shinoda H, Aizawa T, Demura M, Okazawa H, Kawano K. Polyglutamine tract-binding protein-1 binds to U5-15kD via a continuous 23-residue segment of the C-terminal domain. *Biochim Biophys Acta.* **1804**, 1500-1507 (2010).
 39. Takahashi M, *Mizuguchi M, Shinoda H, Aizawa T, Demura M, Okazawa H, Kawano K. Polyglutamine tract binding protein-1 is an intrinsically unstructured protein.. *Biochim Biophys Acta.* **1794**, 936-943 (2009).
 40. Kouno T, *Mizuguchi M, Aizawa T, Shinoda H, Demura M, Kawabata S, Kawano, K. A novel β -defensin structure: big defensin changes its N-terminal structure to associate with the target membrane. *Biochemistry* **48**, 7629-7635 (2009).
 41. *Sugase K. Elucidating slow binding kinetics of a protein without observable bound resonances by longitudinal relaxation NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR*, in press
 42. Nomura K, Maeda M, Sugase K, *Kusumoto S. Lipopolysaccharide induces raft domain expansion in membrane composed of a phospholipid-cholesterol-sphingomyelin ternary system. *Innate Immun.* **17**, 256-268 (2011).
 43. Sekiguchi T, Suzuki N, Fujiwara N, Aoyama M, Kawada T, Sugase K, Murata Y, Sasayama Y, Ogasawara M, *Satake H. Calcitonin in a protochordate, *Ciona intestinalis*--the prototype of the vertebrate calcitonin/calcitonin gene-related peptide superfamily. *FEBS J.* **276**, 4437-4447 (2009).
 44. Shimoyama S, Nagadoi A, Tachiwana H, Yamada M, Sato M, Kurumizaka H, *Nishimura Y, *Akashi S. Deimination stabilizes histone H2A/H2B dimers as revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **45**, 900-908 (2010).
 45. Yamane T, Okamura H, Nishimura Y, Kidera A, *Ikeguchi M. Side-chain conformational changes of transcription factor PhoB upon DNA binding: a population-shift mechanism. *J Am Chem Soc.* **132**, 12653-12659 (2010).
 46. Yagi H, Takeuchi H, Ogawa S, Ito N, Sakane I, Hongo K, Mizobata T, Goto Y, *Kawata Y. Isolation of short peptide fragments from alpha-synuclein fibril core identifies a residue important for fibril nucleation: a possible implication for diagnostic applications. *Biochim Biophys Acta.* **1804**, 2077-2087 (2010).
 47. Tanaka S, Kawata Y, Otting G, Dixon NE, Matsuzaki K, *Hoshino M. Chaperonin-encapsulation of proteins for NMR. *Biochim Biophys Acta.* **1804**, 866-8671 (2010).
 48. 鎌形清人、高橋聡、新しいタンパク質科学の可能性-新時代を切り拓くマルチタレント David Baker-、化学（化学同人） **1**, 68-69 (2011).
 49. Nakamura S, Seki Y, Katoh E, *Kidokoro S, Thermodynamic and structural properties of the acid molten globule state of horse cytochrome C. *Biochemistry*, **50**, 3116-3126 (2011).
 50. *Soda K, Shimbo Y, Seki Y, Taiji M. Structural characteristics of hydration sites in lysozyme. *Biophys Chem.* **156**, 31-42 (2011).
 51. Kurahashi H, Pack CG, Shibata S, Oishi K, Sako Y, Nakamura Y. [PSI(+)] aggregate enlargement in rnl1 nonprion domain mutants, leading to a loss of prion in yeast. *Genes Cells.* **16**, 576-589 (2011).
 52. 日比野佳代、白 燦基、佐甲靖志、細胞内1分子計測とシステムズバイオロジー、細胞工学 **29**, 344-348(2010).
 53. Nakagawa H, *Kataoka M. Percolation of Hydration Water as a Control of Protein Dynamics, *J. Phys. Soc. Jpn* **79**, 083801 (2010).
 54. 中川 洋、片岡 幹雄、中性子非弾性散乱による生体高分子ダイナミックスの研究、高分子 **60**, 195-196 (2011).
 55. Ikeda K, Kameda T, Harada E, Akutsu H, *Fujiwara T. Combined Use of Replica-Exchange Molecular Dynamics and Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR Spectral Simulations for Determining the Structure and Orientation of Membrane-Bound Peptide. *J Phys Chem B.* in press.
 56. Todokoro Y, Kobayashi M, Sato T, Kawakami T, Yumen I, Aimoto S, Fujiwara T, *Akutsu H. Structure analysis of membrane-reconstituted subunit c-ring of E. coli H⁺-ATP synthase by solid-state NMR. *J Biomol NMR.* **48**, 1-11 (2010).
 57. *Arai, N., Kagawa, W., Saito, K., Shingu, Y., Mikawa, T., Kurumizaka, H. and *Shibata, T. Vital roles of the second DNA binding site of Rad52 in yeast homologous recombination. *J. Biol. Chem.*, **286**, 17607-17617 (2011).
 58. Inoue, J., Nagae, T., Mishima, M., Ito, Y., Shibata, T. and *Mikawa, T. A mechanism for SSB displacement from single-stranded DNA upon SSB-RecO interaction. *J. Biol. Chem.*, **286**,

- 6720-6732 (2011).
59. Ling, F., Mikawa, T. and *Shibata, T. Enlightenment of yeast mitochondrial homoplasmy: diversified roles of gene conversion. *Genes*, **2**, 169-190 (2011).
 60. Shingu, Y., Mikawa, T., Onuma, M., Hirayama, T. and *Shibata, T. A DNA-binding surface of SPO11-1, an Arabidopsis SPO11 orthologue required for normal meiosis. *FEBS J.*, **277**, 2360-2374 (2010).
 61. Masuda, T., Ling, F., Shibata, T. and *Mikawa, T. Analysis of DNA-binding sites on Mhr1, a yeast mitochondrial ATP-independent homologous pairing protein. *FEBS J.*, **277**, 1440-1452 (2010).
 62. Masuda, T., Ito, Y., Terada, T., Shibata, T. and *Mikawa, T. A non-canonical DNA structure enables homologous recombination in various genetic systems. *J. Biol. Chem.*, **284**, 30230-30239 (2009).
 63. *Ling, F., Yoshida, M. and *Shibata, T. Heteroduplex joint formation free of net topological change by Mhr1, a mitochondrial recombinase. *J. Biol. Chem.*, **284**, 9341-9353 (2009).
 64. Yamana, Y., Sonezaki, S., Ogawa, H. I. and *Kusano, K. Mismatch-induced lethality due to a defect in Escherichia coli RecQ helicase in exonuclease-deficient background: Dependence on MutS and UvrD functions. *Plasmid*, **63**, 119-127 (2010).
 65. Ogino, H., Ishino, S., Mayanagi, K., Haugland, G. H., Birkeland, N-K., Yamagishi, A., and *Ishino, Y. The GINS complex from the thermoacidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum* may function as a homotetramer in DNA replication. *Extremophiles* **15**, in press
 66. Oyama, T., Ishino, S., Fujino, S., Ogino, H., Shirai, T., Mayanagi, K., Saito, M., Nagasawa, N., Ishino, Y., and Morikawa, K. Architectures of archaeal GINS complexes, essential DNA replication initiation factors. *BMC Biol.* **9**, 28 (2011).
 67. Liu, C., McKinney, M. C., Chen, Y. H., Earnest, T. M., Shi, X., Lin, L. J., Ishino, Y., Dahmen, K., Cann, I. K., Ha, T. Reverse-Chaperoning Activity of an AAA+ Protein. *Biophys. J.* **100**, 1344-1352 (2011).
 68. Mayanagi, K., Kiyonari, S., Nishida, H., Saito, M., Kohda, D., Ishino, Y., Shirai, T., and Morikawa, K. Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 1845-1849 (2010)
 69. Akita, M., Adachi, A., Takemura, K., Yamagami, T., Matsunaga, F., and *Ishino, Y. Cdc6/Orc1 from *Pyrococcus furiosus* may act as the origin recognition protein and Mcm helicase recruiter. *Genes Cells* **15**, 537-552 (2010)
 70. Lin, L-J., Yoshinaga, A., Lin, Y., Guzman, C., Chen, Y-H., Mei, S., Lagunas, A. M., Koike, S., Iwai, S., Spies, M. A., Nair, S. K., Mackie, R. I., *Ishino, Y., and Cann, I. K. O. Molecular analyses of an unusual translesion DNA polymerase from *Methanosarcina acetivorans* C2A. *J. Mol. Biol.* **397**, 13-30 (2010)
 71. Fujikane, R., Ishino, S., *Ishino, Y., and Forterre, P. Genetic analysis of DNA repair in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *Genes Genet. Syst.* **85**, 243-257 (2010).
 72. Nishida, H., Mayanagi, K., Kiyonari, S., Sato, Y., Oyama, T., Ishino, Y., and Morikawa, K. Structural determinant for switching between the polymerase and exonuclease modes in the PCNA-replicative DNA polymerase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 20693-20698 (2009).
 73. Kato K., Okuwaki M., *Nagata K.: Involvement of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J. Cell Sci.*, in press (2011)
 74. Hisaoka M., Ueshima S., Murano K., Nagata K., *Okuwaki M. Regulation of nucleolar chromatin by B23/nucleophosmin jointly depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. *Mol Cell Biol.*, **30**, 4952-64 (2010)
 75. *Okuwaki M., Kato K., and Nagata K. Functional characterization of human Nucleosome Assembly Protein 1-like proteins in human cells. *Genes to Cells*, **15**, 13-27 (2010)
 76. Miki, K., Shimizu, M., Fujii, M., Takayama, S., Hossain, M.N. and *Ayusawa, D. 5-bromodeoxyuridine induces transcription of repressed genes with disruption of nucleosome positioning. *FEBS J.*, **277**, 4539-4548 (2010).
 77. Tanase, J., Morohashi, N., Fujita, M., Nishikawa, J., *Shimizu, M. and *Ohyama, T. Highly efficient chromatin transcription induced by superhelically curved DNA segments: the underlying mechanism revealed by a yeast system. *Biochemistry*, **49**, 2351-2358 (2010).
 78. Akai, Y., Adachi, N., Hayashi, Y., Eitoku, M., Sano, N., Natsume, R., Kudo, N., Tanokura, M., Senda, T.* and Horikoshi, M.* Structure of the histone chaperone CIA/ASF1-double bromodomain complex connecting histone modifications and site-specific histone eviction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 8153-8158 (2010).
 79. Sato, L., Noguchi, S., Hayashi, Y., Sakamoto, M. and Horikoshi, M.* “Global analysis of functional relationships between histone point mutations and the effects of histone deacetylase inhibitors. *Genes Cells*, **15**, 553-594 (2010).

80. Endo, H., Kawashima, S., Sato, L., Lai, M.S., Enomoto, T., Seki, M.* and Horikoshi, M.* Chromatin dynamics mediated by histone modifiers and histone chaperones in postreplicative recombination. *Genes Cells*, **15**, 945-958 (2010).
81. Kawano, A., Hayashi, Y., Noguchi, S., Handa, H., Horikoshi, M.* and Yamaguchi, Y.* Global analysis for functional residues of histone variant Htz1 using the comprehensive point mutant library. *Genes Cells*, **16**, 590-607 (2011).
82. Kundu, L.R., Seki, M., Murofushi, H., Furukohri, A., Waga, S., Score, A.J., Blow, J.J., Horikoshi, M., Enomoto, T. and Tada, S.* Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 1129-36 (2011).
83. Kawashima, S., Nakabayashi, Y., Matsubara, K., Sano, N., Enomoto, T., Tanaka, K.* , Seki, M.* and Horikoshi, M.* Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation. *EMBO J.*, in press.
84. Inaba, Y., Nakabayashi, M., Itoh, T., Yoshimoto, N., Ikura, T., Ito, N., Shimizu, M., *Yamamoto, K. 22S-Butyl-1alpha, 24R-dihydroxyvitamin D(3): Recovery of vitamin D receptor agonistic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **121**, 146-150 (2010).
85. Ogawa, Y., Nonaka, Y., Goto, T., Ohnishi, E., Hiramatsu, T., Kii, I., Yoshida, M., Ikura, T., Onogi, H., Shibuya, H., Hosoya, T., Ito, N., *Hagiwara, M. Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.*, **1**, 1-9 (2010).
86. Nomura, W., Ohashi, N., Okuda, Y., Narumi, T., Ikura, T., Ito, N., *Tamamura, H. Fluorescence-quenching screening of protein kinase C ligands with an environmentally sensitive fluorophore. *Bioconjugate Chem.*, **22**, 923-930 (2011).
87. Ito, T., Tsuruta, S., Tomita, K., Kikuchi, K., Yokoi, T., Aizawa, Y.* Genes that integrated multiple adipogenic signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
88. Sekiyama, N., Arita, K., Ikeda, Y., Hashiguchi, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Saitoh, H., Shirakawa, M.* Structural basis for regulation of poly-SUMO chain by a SUMO-like domain of Nip45. *Proteins*. **78**, 1491-1502 (2010).
89. *Kosako, H. and Imamoto, N. Phosphorylation of nucleoporins: signal transduction-mediated regulation of their interaction with nuclear transport receptors. *Nucleus*, **1**, 309-313 (2010).
90. *Kosako, H. and Nagano, K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Exp. Rev. Proteomics*, **8**, 81-94 (2011).
91. Maehara, Y., Miyano, K., Yuzawa, S., Akimoto, R., Takeya, R., Sumimoto, H.* A conserved region between the TPR and activation domains of p67^{phox} participates in activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, **285**, 31435-31445 (2010).
92. Kato, Y., Kawasaki, H.* , Ohyama, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Kokubo, T. and Hirano, H. Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. *Genetics.*, 2011 May 30. [Epub ahead of print]
93. Kasahara, K.* , Ohyama, Y. and Kokubo, T. Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 4136-4150 (2011).
94. Ohyama, Y., Kasahara, K. and Kokubo, T.* *Saccharomyces cerevisiae* Ssd1p promotes *CLN2* expression by binding to the 5'-untranslated region of *CLN2* mRNA. *Genes Cells.*, **15**, 1169-1188 (2010).
95. Sugihara, F., Kasahara, K. and Kokubo, T.* Highly redundant function of multiple AT-rich sequences as core promoter elements in the TATA-less *RPS5* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 59-75 (2011).
96. Ohtsuki, K., Kasahara, K., Shirahige, K. and Kokubo, T.* Genome-wide localization analysis of a complete set of Tafs reveals a specific effect of the *taf1* mutation on Taf2 occupancy and provides indirect evidence for different TFIID conformations at different promoters. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1805-1820 (2010).
97. Torigoe, H.* , Rahman, S. M. A., Takuma, H., Sato, N., Imanishi, T., Obika, S., and Sasaki, K. 2'-O,4'-C-Aminomethylene bridged nucleic acid modification with enhancement of nuclease resistance promotes pyrimidine motif triplex nucleic acid formation at physiological pH. *Chemistry Eur. J.*, **17**, 2742-2751 (2011).
98. Torigoe, H.* , Rahman, S. M. A., Takuma, H., Sato, N., Imanishi, T., Obika, S., and Sasaki, K. Interrupted 2'-O,4'-C-aminomethylene bridged nucleic acid modification enhances pyrimidine motif triplex-forming ability and nuclease resistance under physiological condition. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, **30**, 63-81 (2011).
99. Tohmonda, T., Miyauchi, Y., Ghosh, R., Yoda, M., Uchikawa, S., Takito, J., Morioka, H., Nakamura, M., Iwawaki, T., Chiba, K., Toyama, Y., Urano, F., and Horiuchi, K.* The IRE1 α -XBP1

- pathway is essential for osteoblast differentiation through promoting transcription of Osterix. *EMBO Rep.*, **12**, 451-457 (2011).
100. Thorp, E., Iwawaki, T., Miura, M., and Tabas, I. * A reporter for tracking the UPR in vivo reveals patterns of temporal and cellular stress during atherosclerotic progression. *J Lipid Res.*, **52**, 1033-1038 (2011).
 101. Miyazaki, Y., Kaikita, K. *, Endo, M., Horio, E., Miura, M., Tsujita, K., Hokimoto, S., Yamamuro, M., Iwawaki, T., Gotoh, T., Ogawa, H., and Oike, Y. * C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **31**, 1124-1132 (2011).
 102. Hosoda, A., Maruyama, A., Oikawa, D., Oshima, Y., Komachi, Y., Kanai, G., Sato, H., and Iwawaki, T. * Detection of ER stress in vivo by Raman spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun.*, **405**, 37-41 (2011).
 103. Iwawaki, T. *, Akai, R., and Kohno, K. IRE1 α disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level. *PLoS One.*, **5**, e13052 (2010).
 104. Tsukano, H., Gotoh, T. *, Endo, M., Miyata, K., Tazume, H., Kadomatsu, T., Yano, M., Iwawaki, T., Kohno, K., Araki, K., Mizuta, H., and Oike, Y. * The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **30**, 1925-1932 (2010).
 105. Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., and Iwawaki, T. * Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 α . *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6265-6273 (2010).
 106. Oikawa, D., Akai, R., and Iwawaki, T. * Positive contribution of the IRE1 α -XBP1 pathway to placental expression of CEA family genes. *FEBS Lett.*, **584**, 1066-1070 (2010).
 107. K. E. Gascoigne, K. Takeuchi, A. Suzuki, T. Hori, T. Fukagawa, and *I. M. Cheeseman. Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell*, **145**, 410-422 (2011).
 108. A. Suzuki, T. Hori, T. Nishino, J. Usukura, A. Miyagi, K. Morikawa, and *T. Fukagawa. Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins. *J. Cell Biol.* **193**, 125-140 (2011).
 109. A. Suzuki and *T. Fukagawa. Cell Biological Analysis of DT40 Knockout Cell Lines for Cell-Cycle Genes. *Current Protocols in Cell Biology* **50**, 8.7.1-8.7.17 (2011).
 110. J. C. Schmidt, T. Kiyomitsu, T. Hori, C. B. Backer, T. Fukagawa, *I. M. Cheeseman. Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin/SKAP complex to bi-oriented kinetochores. *J. Cell Biol.* **191**, 269-280 (2010).
 111. S. Ohta, J-C. Bukowski-Wills, L. Sanchez-Pulido, F. L. Alves, L. Wood, Z. Chen, M. Platani, L. Fischer, D. F. Hudson, C. P. Ponting, T. Fukagawa, W. C. Earnshaw and *J. Rappsilber. The protein composition of mitotic chromosomes determined using multi-classifier combinatorial proteomics. *Cell* **142**, 810-821 (2010).
 112. W-H. Shang, T. Hori, A. Toyoda, J. Kato, K. Pendorf, Y. Sakakibara, A. Fujiyama and *T. Fukagawa. Chickens possess centromeres with both extended tandem repeats and short non-tandem-repetitive sequences. *Genome Research* **20**, 1219-1228 (2010).
 113. S. A. Ribeiro, P. Vagnarell, Y. Dong, T. Hori, B. F. McEwen, T. Fukagawa, C. Flors and *W. C. Earnshaw. A super-resolution map of the vertebrate kinetochore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 10484-10489 (2010).
 114. K. Johnston, A. Joglekar, T. Hori, A. Suzuki, T. Fukagawa and *E. D. Salmon. Vertebrate Kinetochore Protein Architecture: Protein Copy Number. *J. Cell Biol.* **189**, 937-943. (2010).
 115. Y. Cheng, H. Geng, S. H. Cheng, P. Liang, Y. Bai, J. Li, G. Srivastava, M. Ng, T. Fukagawa, X. Wu, A. TC Chan and *Q. Tao. The KRAB zinc finger protein ZNF382 is a general, proapoptotic tumor suppressor repressing multiple oncogenes and frequently silenced in multiple carcinomas. *Cancer Research* **70**, 6516-6526 (2010).
 116. J. P. I. Welburn, M. Vleugel, D. Liu, J. R. Yates III, M. A. Lampson, T. Fukagawa and *I. M. Cheeseman. Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol. Cell* **38**, 383-392 (2010).
 117. R. Matsuda, T. Hori, H. Kitamura, K. Takeuchi, T. Fukagawa and *M. Harata. Identification and characterization of two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. *Nucleic Acids Research* **38**, 4263-4273 (2010).
 118. D. Liu, M. Vleugel, C. B. Backer, T. Hori, T. Fukagawa, I. M. Cheeseman and *M. A. Lampson. Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J. Cell Biol.* **188**, 809-820 (2010).
 119. Z. Xu, H. Ogawa, P. Vagnarelli, J. H. Bergmann, D. F. Hudson, T. Fukagawa, W. C. Earnshaw and

- *K. Samejima. INCENP -aurora B interactions modulate kinase activity and chromosomal passenger complex localization. *J. Cell Biol.* **187**, 637-653 (2009).
120. K. Nishimura, T. Fukagawa, H. Takisawa, T. Kakimoto and *M. Kanemaki. An auxin-based degron system for the rapid deletion of proteins in nonplant cells. *Nature Methods* **6**, 917-922 (2009).
121. M. Okada, K. Okawa, T. Isobe and *T. Fukagawa. CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3986-3995 (2009).
122. M. Amano, A. Suzuki, T. Hori, C. Backer, K. Okawa, I. M. Cheeseman and *T. Fukagawa. The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure. *J. Cell Biol.* **186**, 173-182 (2009).
123. M. Iwamoto, C. Mori, T. Kojidani, F. Bunai, T. Hori, T. Fukagawa, Y. Hiraoka and *T. Haraguchi. Two Distinct Repeat Sequences of Nup98 Nucleoporins Characterize Dual Nuclei in the Binucleated Ciliate Tetrahymena. *Current Biology* **19**, 843-847 (2009)
124. T. Kawashima, Y. C. Bao, Y. Minoshima, Y. Nomura, T. Hatori, T. Hori, T. Fukagawa, T. Fukada, N. Takahashi, T. Nosaka, M. Inoue, T. Sato, M. Kukimoto-Niino, M. Shirouzu, S. Yokoyama and *T. Kitamura. A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 1796-1813 (2009)
125. X. Kong, A. R. Ball, Jr., E. Sonoda, J. Feng, S. Takeda, T. Fukagawa, T. J. Yen and *K. Yokomori. Cohesin associates with spindle poles in a mitosis-specific manner and functions in spindle assemble in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1289-1301 (2009)
126. 竹内康造, *深川竜郎, 動原体の分子構築, 細胞工学 **29**, 849-855 (2010).
127. *深川竜郎, 染色体分配に必要な動原体の分子構築, 実験医学 **27**, 2732-2739 (2009).
128. *深川竜郎, 染色体分配に必須なキネトコア構造の分子構築, 遺伝 **63**, 71-78 (2009).
129. 堀哲也, *深川竜郎, セントロメアでのクロマチン構造の形成に必要なヒストンバリエーションとDNA結合, 蛋白質・核酸・酵素, **54**, 1276-1283 (2009).
130. *Higo, J., Nishimura Y., Nakamura, H. A Free-energy Landscape for Coupled Folding and Binding of an Intrinsically Disordered Protein in Explicit Solvent from Detailed All-atom Computations. *J. Am. Chem. Soc.* in press (2011).
131. Ikebe, J., Standley, D. M., Nakamura, H., *Higo, J. Ab initio simulation of a 57-residue protein in explicit solvent reproduces the native conformation in the lowest free-energy cluster. *Protein Sci.* **20**, 187-196 (2011).
132. Ikebe, J., Umezawa, K., Kamiya, N., Sugihara, T., Yonezawa, Y., Takano, Y., Nakamura, H., *Higo, J. Theory for Trivial Trajectory Parallelization of Multicanonical Molecular Dynamics and Application to a Polypeptide in Water. *J. Comput. Chem.* **32**, 1286-1297 (2011).
133. Umezawa, K., Morikawa, R., Nakamura, H., *Higo, J. Solvent flow patterns fluctuating largely around a protein and correlation with solvent density fluctuations: a molecular dynamics study. *J. Chem. Phys.* **132**, 155103 (2010).
134. Umezawa, K., Morikawa, R., Nakamura, H., *Higo, J. Solvent flow patterns fluctuating largely around a protein and correlation with solvent density fluctuations: a molecular dynamics study. *Vir. J. Bio. Phys. Res.* (<http://www.vjbio.org>) **19**, Issue 9 (May 1) (2010).
135. *肥後順一 「単軌跡和マルチカノニカル分子動力学法」. アンサンブル (分子シミュレーション研究会会誌) **12**, 8-10 (2010).
136. Ito, J., Sonobe, Y., Ikeda, K., Tomii, K., *Higo, J. Universal partitioning of the hierarchical fold network of 50-residue segments in proteins. *BMC Struct. Biol.* **9**, 34 (2009).
137. *Sugihara, T., Higo, J., Nakamura, H. Parallelization of Markov chain generation and its application to the multicanonical method. *J. Phys. Soc. Jpn.* **78**, 074003 (2009).
138. *Higo, J., Kamiya, N., Sugihara, T., Yonezawa, Y., Nakamura, H. Verifying trivial parallelization of multicanonical molecular dynamics for conformational sampling of a polypeptide in explicit water. *Chem. Phys. Lett.* **473**, 326-329 (2009).
139. Umezawa, K., Ikebe, J., Nomizu, M., Nakamura, H., *Higo, J. Conformational requirement on peptides to exert laminin's activities and search for protein segments with laminin's activities. *Biopolymers: Peptide Science*, **92**, 124-131 (2009).
140. *Takano, M., Terada, T., Sasai, M. Unidirectional Brownian motion observed in an in silico single molecule experiment of an actomyosin motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 7769-7774 (2010).
141. 神谷成敏, 肥後順一, 福西快文, *中村春木「タンパク質計算科学—基礎と創薬への応用—」 共立出版 (2009).
142. 高松敦子, 高野光則, 山崎義弘, 宮口智成, 柳谷 晃「コンプレックス・ダイナミクスの挑戦」 (共立出版) in press
143. Morita, H., *Takano M. Residue network in protein native structure belongs to the universality class

- of a three-dimensional critical percolation cluster. *Phys. Rev. E* **79**, 020901(R) (2009).
144. Y. Matsuura, M. Ota, T. Tanaka, M. Takehira, K. Ogasahara, B. Bagautdinov, N. Kunishima, *K. Yutani, Remarkable improvement in the heat stability of CutA1 from *Escherichia coli* by rational protein design, *J. Biochem.* **148**, 449-458 (2010)
 145. S. Takeda, S. Minakata, R. Koike, I. Kawahata, A. Narita, M. Kitazawa, M. Ota, T. Yamakuni, *Y. Maéda, Y. Nitani, Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation—steric and allosteric inhibition, *PLoS Biol.* **8**, e1000416 (2010)
 146. H. Nishi, *M. Ota, Amino acid substitutions at protein-protein interfaces that modulate the oligomeric state, *Proteins* **78**, 1563-1574 (2010)
 147. S. Takeda, R. Koike, Y. Nitani, S. Minakata, Y. Maéda, *M. Ota, Actin capping protein and its inhibitor CARMIL: how intrinsically disordered regions function, *Phys. Biol.* **8**, 035005 (2011)
 148. H. Nishi, R. Koike, *M. Ota, Cover and spacer insertions: Small nonhydrophobic accessories that assist protein oligomerization, *Proteins*, in press (2011)
 149. Nonomura*, M. Eiguchi, M. Nakano, K. Takashima, N. Komeda, S. Fukuchi, S. Miyazaki, A. Miyano, H. Hirochika, N. Kurata. A novel RNA-recognition-motif protein is required for premeiotic G1/S-phase transition in Rice. *PLoS Genet.*, **7**, e1001265 (2011)
 150. S. Fukuchi*, K. Hosoda, K. Homma, T. Gojobori, K. Nishikawa. Binary classification of protein molecules into intrinsically disordered and ordered segments. *BMC Structural Biol.*, in press.
 151. Nishikawa*, Y. Nakajima, M. Ito, S. Fukuchi, K. Homma, K. Nishikawa. Computational prediction of O-linked glycosylation sites that preferentially map on intrinsically disordered regions of extracellular proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 4991-5008 (2010)
 152. S. Fukuchi*, K. Homma, Y. Minezaki, T. Gojobori, K. Nishikawa. Development of an Accurate Classification system of Proteins into Structured and Unstructured Regions that Uncovers Novel Structural Domains: Its Application to Human Transcription Factors. *BMC Structural Biol.*, **9**, 26 (2009)
 153. S. Fukuchi*, K. Homma, S. Sakamoto, H. Sugawara, Y. Tateno, T. Gojobori, K. Nishikawa. The GTOP database in 2009: updated content and novel features to expand and deepen insights into protein structures and functions. *Nucleic Acids Res.*, **37**, D333-D337 (2009)
 154. H. Sugawara, K. Ikeo, S. Fukuchi, T. Gojobori, Y. Tateno, Y*. DDBJ dealing with mass data produced by the second generation sequencer. *Nucleic Acids Res.*, **37**, D16-D18 (2009)
 155. T. Tsuruta, N. Goda, Y. Umetsu, N. Iwaya, Y. Kuwahara, *H. Hiroaki, ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the SPFH domain of human stomatin, *Biomol NMR Assign.* in press
 156. Y. Umetsu, N. Goda, R. Taniguchi, K. Satomura, T. Ikegami, M. Furuse, *H. Hiroaki, ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the first PDZ domain of mouse ZO-1, *Biomol NMR Assign.* in press
 157. Y. Umetsu, T. Tenno, N. Goda, M. Shirakawa, T. Ikegami, *H. Hiroaki, Structural difference of vasoactive intestinal peptide in two distinct membrane-mimicking environments, *Biochim Biophys Acta*, **1814**, 724-730 (2011)
 158. Hasegawa, E. Tokuda, T. Tenno, K. Tsujita, H. Sawai, *H. Hiroaki, T. Takenawa, T. Itoh, SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain, *J Cell Biol.* **193**, 901-916 (2011)
 159. Y. Fujiwara, K. Fujiwara, N. Goda, N. Iwaya, T. Tenno, M. Shirakawa, *H. Hiroaki, Structure and Function of the N-terminal Nucleolin Binding Domain of Nuclear Valosin-containing Protein-like 2 (NVL2) Harboring a Nucleolar Localization Signal, *J Biol Chem.* **286**, 21732-21741 (2011)
 160. Iwaya, Y. Kuwahara, Y. Fujiwara, N. Goda, T. Tenno, K. Akiyama, S. Mase, H. Tochio, T. Ikegami, M. Shirakawa, *H. Hiroaki, A common substrate recognition mode conserved between katanin p60 and VPS4 governs microtubule severing and membrane skeleton reorganization, *J Biol Chem.* **285**, 16822-16829 (2010)
 161. *J. Jee, T. Mizuno, K. Kamada, H. Tochio, Y. Chiba, K. Yanagi, G. Yasuda, H. Hiroaki, F. Hanaoka, M. Shirakawa, Structure and mutagenesis studies of the C-terminal region of licensing factor Cdt1 enable the identification of key residues for binding to replicative helicase Mcm proteins, *J Biol Chem.* **285**, 15931-15940 (2010)
 162. H. Ohnishi, *H. Tochio, Z. Kato, T. Kimura, H. Hiroaki, N. Kondo, *M. Shirakawa, ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88, *Biomol NMR Assign.* **4**, 123-125 (2010)
 163. R. Nishimasu, H. Komori, Y. Higuchi, H. Nishimasu, *H. Hiroaki, Crystal structure of a PFU-PUL domain pair of *Saccharomyces cerevisiae* Doa1/Ufd3, *Kobe J Med Sci.* **56**, E125-E139 (2010)
 164. H. Ohnishi, H. Tochio, Z. Kato, K. E. Orii, A. Li, T. Kimura, *H. Hiroaki, N. Kondo, M. Shirakawa, Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling, *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**, 10260-10265 (2009)
 165. Inomata, A. Ohno, H. Tochio, S. Isogai, T. Tenno, I. Nakase, T. Takeuchi, S. Futaki, Y. Ito, H. Hiroaki, *M. Shirakawa, High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in

- human cells, *Nature*. **458**, 106-109 (2009)
166. Y. Kuwahara, S. Unzai, T. Nagata, Y. Hiroaki, H. Yokoyama, I. Matsui, T. Ikegami, Y. Fujiyoshi, *H. Hiroaki, Unusual thermal disassembly of the SPFH domain oligomer from *Pyrococcus horikoshii*, *Biophys J*. **97**, 2034-2043 (2009)
167. M. Gromiha and *A. Sarai, Thermodynamic Database for Proteins: Features and Applications, *Methods Mol. Biol.* **609**, 97-112 (2010)
168. A. Hayashi, N. Hino, T. Kobayashi, R. Arai, M. Shirouzu, S. Yokoyama, *K. Sakamoto, Dissecting Cell Signaling Pathways with Genetically Encoded 3-Iodo-L-tyrosine, *ChemBioChem*. **12**, 387-389 (2010)
169. 果然、平野隆、川上隆雄、龔雲波、野村将春、山口学、佐治久、垣花昌俊、大平達夫、*池田徳彦、肺腺癌細胞の分泌蛋白質群：外科的切除組織の培養上清に含まれる診断バイオマーカー候補の同定、*肺癌*, **50**, 141-150 (2010)

(2) ホームページについて

平成21年9月よりホームページ (<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/IDP/index.html>) を立ち上げた。主な公開内容は次の通りである。

1. メンバーの業績（「成果」欄）：原著論文、総説等の論文を掲載
2. 領域主催／共催の学術的企画（「シンポジウム&領域会議」および「ニュース」欄）：
シンポジウム／ワークショップ：7回（国際シンポジウム7回）
若手育成企画（夏の学校や講習会）：7回
あわせて、企画後にその報告も行う。
3. プレス発表（「ニュース」欄）：8紙への掲載を公表。
4. メンバーの受賞や表彰：2件
中川 洋氏（日本原子力研究開発機構・研究員）：Journal of the Physical Society of Japan (JPSJ) に掲載された論文がJPSJ編集委員会の推薦する注目論文としてEditor's Choiceを受ける。
安藤敏夫氏（金沢大学数物科学系・教授）：山崎貞一賞を受賞。
5. メールマガジン：当該領域研究の活動を知らせるとともに、天然変性タンパク質に関する記事を掲載する。現在4号まで配信。
6. 英語版のホームページ：外国からのアクセスに備えて、英語版を作成した。
7. 公募情報：公募要項を掲載した。
8. 領域班会議等（「シンポジウム & 領域会議」欄）：メンバーだけが関係する会議等の企画をニュースに掲載することで、本領域の活動状況を一般の研究者が閲覧できるようにした。なお、アクセス数はカウントしていないので不明であるが、検索サイトで「天然変性」または「天然変性タンパク質」と入力して検索をかけると、当該領域研究のホームページがリストのトップに表示される。

(3) 公開発表について

第1回公開シンポジウム（2010年1月19日、理化学研究所横浜研究所 交流棟ホール）

「天然変性タンパク質研究が目指すサイエンス」と題して、第1回公開シンポジウムを開催した。一般参加者は約100名。本領域研究のキックオフミーティングという位置づけで、計画研究代表者を中心に今後進めていく領域研究について講演し、天然変性タンパク質をテーマにした新学術領域研究が立ち上がった旨を全国に発信した。講演者および講演タイトルは以下のとおりである。

佐藤 衛 (横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科)

天然変性タンパク質の動的構造解析への挑戦

安藤 敏夫 (金沢大学数物科学系)

タンパク質の天然変性領域の高速AFM観察と今後の展望

明石 知子 (横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科)

天然変性タンパク質の構造解析—質量分析によるアプローチ—

西村 善文 (横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科)

天然変性タンパク質の認識機構と合理的創薬

柴田 武彦 (理化学研究所)

組換えメディエーターの新機能探索と天然変性領域

石野 良純 (九州大学大学院農学研究院)

DNA複製フォーク進行に関与するタンパク質の天然変性領域の役割解明を目指して

太田 元規 (名古屋大学大学院情報科学研究科)

天然変性タンパク質のデータベース構築と解析

肥後 順一 (大阪大学臨床医工学融合研究教育センター)

天然変性蛋白質NRSFはパートナー蛋白質Sin3の存在下のみでヘリックス構造をとる—
全原子マルチカノニカル計算—

第1回国際シンポジウム (2011年1月27日-28日、横浜市、浜銀ホール・ヴィアマーレ)

当該シンポジウムでは、新学術領域研究の発足にふさわしく天然変性タンパク質研究で著名な研究者を広く海外から招待し、日本における第1回国際シンポジウムとして名実ともに充実したシンポジウムとすることを試みた。また、班員以外にも広く公開することを主眼点にして、横浜の桜木町駅前の会場で開催することにした。実際、主催者の意気込みに呼応して天然変性タンパク質研究の分野で著名な海外の研究者が大勢参加した。なお、一般参加者は104名で、その内75%は40代以下の若手研究者であった。今回のシンポジウムを通じてタンパク質の構造・機能研究に大きなパラダイムシフトが起きていることを参加者の多くの方が実感したものである。講演者および講演タイトルは次のとおり (アンダーラインは海外からの招待講演者)。

Mamoru Sato (Yokohama City Univ.)

Towards the structural characterization of IDPs by SAXS and MD simulation

Dmitri Svergun (EMBL Hamburg, Germany)

Small-angle X-ray scattering to study protein flexibility in solution

Hiroshi Nakagawa (Japan Atomic Energy Agency)

Dynamics and hydration of intrinsically disordered protein studied by inelastic neutron scattering

Satoko Akashi (Yokohama City Univ.)

Mass spectrometry for characterization of IDPs

Kyohei Arita (Kyoto Univ.,)

Structural basis for recognition of epigenetic modifications by UHRF1

Yoshifumi Nishimura (Yokohama City Univ.)

IDPs in eukaryotic transcription-related factors

Peter Wright (Scripps, USA)

Promiscuous liaisons: functional interactions of intrinsically disordered proteins in signaling networks

Richrad Kriwacki (St. Jude Children's Research Hospital, USA)

Protein flexibility in cell cycle regulation

Takehiko Shibata (Riken)

Roles of intrinsically unstructured proteins in homologous genetic recombination

Yoshizumi Ishino (Kyusyu Univ.)

Structural and functional analyses of a DNA repair protein Hef containing a ID region between the helicase and endonuclease domains

Tatuso Fukagawa (NIG)

Spindle microtubules generate tension-dependent structural deformation of inner kinetochore

Norman Davey (EMBL Heidelberg, Germany)

How viruses hijack cell regulation ?

Peter Tompa (Hungarian Academy of Sciences)

Structural disordered and chaperone activity of plant dehydrins *in vitro* and *in vivo*

Yasushi Kawata (Tottori Univ.)

Role of natively unstructured polypeptide: Molecular chaperone GroEL and alpha-synuclein

Satoshi Fukuchi (NIG)

A database of intrinsically disordered protein

Motonori Ota (Nagoya Univ.)

Assignment of intrinsically disordered regions based on NMR structural data

Junichi Higo (Osaka Univ.)

A free-energy landscape of coupled folding and binding by atomically detailed computer simulations

Keith Dunker (Indiana Univ., USA)

Protein intrinsic disorder and cell signaling

なお、当該領域研究では、次世代の生命科学の礎となる物理学・化学・生物学が融合した新しい学際的な研究領域の創造を目指し、様々な角度から若手人材育成のためのプログラムを企画してきた。そのための具体的な活動が若手講習会で、これまでに以下の2つの講習会を開催した。

第1回若手育成講習会 (2010年9月10日、横浜市立大学鶴見キャンパス)

第1回は「コンピュータによる天然変性タンパク質（領域）の探索」と題する講習会を開催した（参加者は33名）。講習会では領域代表による基調講演の後、福地佐斗志博士（国立遺伝研）の講義および指導のもとに実際に天然変性タンパク質（領域）の検索実習を行った。天然変性タンパク質（領域）を予測するプログラムの原理の説明から、実際に現在どのようなプログラムが公開されていて、それぞれにどのような特徴があるのかなど、情報生物学が専門でない研究者にも理解できる内容で、天然変性タンパク質の概念を共有できる講習会となった。

第2回若手育成講習会 (2011年4月26日、大阪大学蛋白質研究所)

第2回は、「NMRによるタンパク質解析法の基礎的理解（概論と実習）」と題する講習会を開催した。「NMR実験から何がわかるか?」「NMRから得られたデータの解釈は?」など、NMRを専門としない研究者が天然変性タンパク質の研究においてNMRのデータを利用、理解するための基礎的かつ実践的な講習会となった（参加者は48名）。

(4) 「国民との科学・技術の対話」について

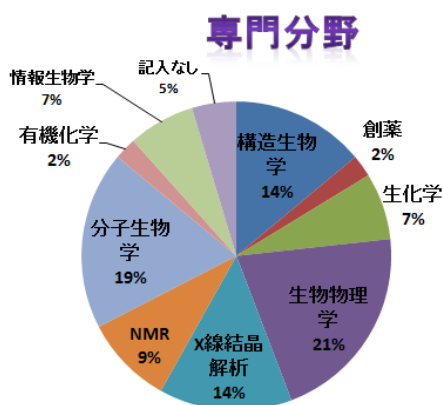
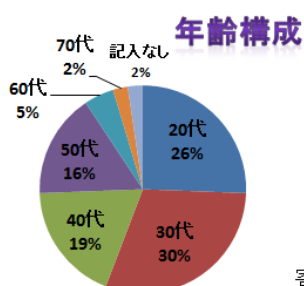
2010年11月の「国民との科学・技術対話」の推進についての通達に伴い、それ以後に行われた下記シンポジウムについてアンケート調査を行った。その結果を以下に記す。

第1回国際シンポジウム (2011年1月27日-28日、横浜市、浜銀ホール・ヴィアマーレ)

文科省新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」 第1回国際シンポジウム(平成23年1月27-28日開催)

アンケート集計結果

アンケート対象者数: 104名
アンケート回答者数: 43名
アンケート回収率: 41%



寄せられた感想

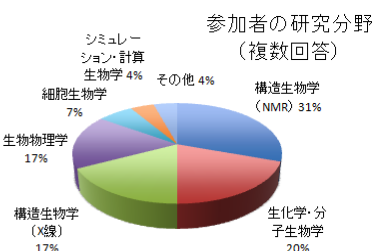
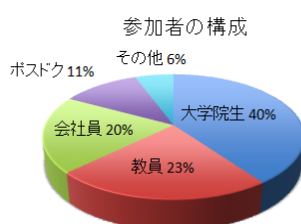
- ・世界的に著名な海外研究者の話を聴くことができ非常に有益であった。
- ・今後もこのような機会を設けてほしい。
- ・抄録(要旨集)がほしい。
- ・構造生物学が新しい局面に入ったことを感じさせるレベルの高いシンポジウムであった。
- ・今回の外国からの招待講演者の中から、将来のノーベル賞受賞者が出るのではないかと感じた。
- ・わが国の天然変性分野の研究は端緒を開いたところなのでオールジャパンでの推進が求められていると思う。

第2回若手育成講習会 (2011年4月26日、大阪大学蛋白質研究所)

文科省新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」 第2回若手育成講習会「NMRによるタンパク質解析法の基礎的理解(概論と実習)」 (平成23年4月26日開催)

アンケート集計結果

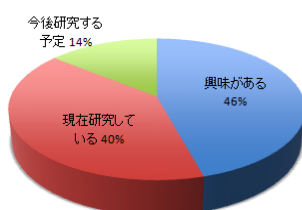
参加者: 48名
回答者: 35名
回収率: 73%



寄せられた感想

- ・あまりNMRだけのセミナーというものがないので、とても有意義な時間でした。また、機会があれば参加したいです。
- ・スライドを印刷して配布して頂きたかった。メモをとるのに忙しく、話を集中して聞けなかった。
- ・NMRを普段から研究しているが、講義は基礎から測定の実用例まであって、ためになった。
- ・NMRの実習に参加させて頂きましたが、大変参考になりました。また、パネルディスカッションでは、公開質問ということで、諸先生方からコメントを頂け、これからの研究の参考にさせて頂きたいと思っております。
- ・セミナーの内容は分かりやすかったです。実習に参加させて頂きましたが、NMR実験をやったことがないので、実習の内容は個人的に少し難しかったですが、したがって、実際の測定における基礎の基礎のような内容がもう一段階あると嬉しいです。

天然変性タンパク質について



なお、2010年11月以前に開催された以下の講習会についても独自にアンケート調査を行ったのでその結果を記す。

第1回若手育成講習会（2010年9月10日、横浜市立大学鶴見キャンパス）

第1回若手講習会「コンピュータによる天然変性タンパク質（領域）の探索」を開催した（参加者は33名）。講習会では領域代表による基調講演の後、福地佐斗志博士（国立遺伝研）の講義および指導のもとに実際に天然変性タンパク質（領域）の検索実習を行った。天然変性タンパク質（領域）を予測するプログラムの原理の説明から、実際に現在どのようなプログラムが公開されていて、それぞれにどのような特徴があるのかなど、情報生物学が専門でない研究者にも理解できる内容の講習会となった。アンケート回答率は42%、その86%が45歳以下の若手研究者。また、64%が分子生物学、36%が構造生物学を専門とする研究者。ほとんどの参加者は、天然変性タンパク質（領域）の検索について、全く知識がなかったか、検索プログラムの存在を知っていても、使ったことがないか、または、独学で少々触った程度の経験を有する程度でした。参加者の感想としては、「実習を混ぜながらの講義は非常にわかりやすかった」「今回の講習会の範疇を超えて天然変性タンパク質の議論にまで盛り上がったことがよかった」「実習形式のため講習内容を理解しながら進めることができた」「実際にプログラムを使いながら講義を聴いたのでわかりやすかった」「講義と実習が一緒に進めていてよかった」「初心者にもわかりやすくゆっくり進んだのでよかった」「演習があったので、検索プログラムの使い方を理解できた」「質問しやすい雰囲気があり非常によかった」と好評であった。

研究組織と各研究項目の連携状況

（1）研究組織

研究項目：A01（構造生物学グループ）天然変性状態や遭遇複合体の構造解析

計画研究 1:天然変性タンパク質の新規構造解析法の開発

研究代表者:佐藤 衛(横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科・教授)

研究分担者:安藤敏夫(金沢大学数物科学系・教授)

計画研究 2:天然変性タンパク質の動的構造解析

研究代表者:明石知子(横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学・准教授)

研究分担者:水口峰之(富山大学大学院医学薬学研究部・教授)

研究分担者:菅瀬謙治(公益財団法人サントリー生物有機科学研究所・主席研究員)

研究分担者:西村善文(横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学・教授)

公募研究(代表者)

鎌形清人(東北大学多元物質科学研究所・助教)

関 安孝(岩手医科大学薬学部構造生物 薬学講座・講師)

桑田一夫(岐阜大学・人獣感染防御研究センター・教授)

藤原敏道(大阪大学蛋白質研究所・教授)

河田康志(鳥取大学大学院工学研究科・教授)

中川 洋(日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門・研究員)

佐甲靖志 (理化学研究所細胞情報研究室・主任研究員)

研究項目：A02 (分子生物学グループ) 核内タンパク質の天然変性状態の機能解析

計画研究 3: 組換え酵素における天然変性領域の機能

研究代表者: 柴田武彦 (理化学研究所柴田遺伝制御学研究室・上席研究員)

研究分担者: 草野好司 (京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センター・特任教授)

計画研究 4: 核内ネットワークを制御する天然変性タンパク質の機能発現

研究代表者: 石野良純 (九州大学大学院農学研究院・教授)

研究分担者: 清水光弘 (明星大学理工学部化学科・教授)

研究分担者: 奥脇 暢 (筑波大学大学院人間総合科学研究科・准教授)

公募研究 (代表者)

堀越正美 (東京大学分子細胞生物学研究所・教授)

半田直史 (東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任助教)

伊倉貞吉 (東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所・准教授)

相澤康則 (東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター・講師)

小野寺理 (新潟大学脳研究所・准教授)

松浦能行 (名古屋大学大学院理学研究科・准教授)

有田恭平 (京都大学大学院工学研究科・助教)

小迫英尊 (徳島大学疾患酵素学研究センター・准教授)

湯浅 聡 (九州大学大学院医学研究院生化学分野・特任准教授)

古久保哲朗 (横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科・教授)

鳥越秀峰 (東京理科大学理学部第一応用化学・准教授)

岩脇隆夫 (群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット・講師)

深川竜郎 (国立遺伝学研究所・教授)

研究項目：A03 (情報生物学グループ) 天然変性タンパク質のバイオインフォマティクス

計画研究 5: 計算科学による核内タンパク質天然変性状態の構造多型解析

研究代表者: 肥後順一 (大阪大学蛋白質研究所・特任研究員／客員教授)

研究分担者: 菊池 誠 (大阪大学サイバーメディアセンター・教授)

研究分担者: 高野光則 (早稲田大学大学院先進理工学研究科・准教授)

計画研究 6: タンパク質天然変性状態の情報基盤の確立と展開

研究代表者: 太田元規 (名古屋大学大学院情報科学研究科・教授)

研究分担者: 福地佐斗志 (前橋工科大学工学部・准教授)

研究分担者: 廣明秀一 (名古屋大学大学院理学研究科・教授)

公募研究 (代表者)

新井亮一 (信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・助教)

皿井明倫 (九州工業大学情報工学研究院・教授)

川上隆雄 (東京医科大学医学部外科学第一講座・客員准教授)

石田 恒 (日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門・研究員)

(2) 各研究項目の連携状況

当該領域研究では、新学術領域研究が目指す異なる学問分野の研究者が有機的に連携して行う研究体制を構造生物学グループ(A01)、分子生物学グループ(A02)、情報生物学グループ(A03)の間で構築している。以下に研究項目間の連携研究の現状等を概説する。

1. **研究項目A01とA02との連携研究**：計画研究1において新たに開発したX線小角散乱法と分子動力学シミュレーションを組み合わせた手法および高速原子間力顕微鏡法を使って計画研究4が対象にしている天然変性タンパク質の動的構造解析や天然変性領域の同定・構造転移の解析がなされ、両手法が天然変性タンパク質の動態解析に極めて有効であることが証明された。また、計画研究2と計画研究4の間では、NMRによる天然変性領域の同定や相互作用解析が精力的に行われ、ヒストンシャペロンNAP1およびNAP2とヒストンの複合体の構造・機能解析、テロメア配列のヌクレオソーム解析とUme6の天然変性領域の解析などが両研究グループ間で本格化している。また、NPMタンパク質の複合体解析も質量分析によって行われている。さらに、計画研究1とA02の公募研究との連携研究では、公募研究の有田班が解析しているUHRF1について、計画研究1が新たに開発したX線小角散乱法でドメインの構造解析を行い、ドメイン間の天然変性領域と考えられているリンカー領域の構造と機能の関連を明らかにした。同様に、公募研究の半田班が解析しているRecBCD酵素のRecBサブユニットについて、ドメイン間の天然変性領域と考えられているリンカー領域の構造・機能解析を行った。
2. **研究項目A01とA03との連携研究**：計画研究2のグループがNMRで決定した天然変性タンパク質NRSFとそのターゲットタンパク質Sin3との結合過程を、計画研究5のグループが全原子マルチカノニカル分子動力学法で解析し、NRSFとSin3が結合した初期では複合体は非天然複合体構造をとり、それがさまざまな構造変化を重ねつつ天然複合体構造へと移行していく天然変性タンパク質の結合と連結した折れ畳まりの重要なステップを初めて明らかにした。
3. **研究項目A02とA03との連携研究**：組換えに働く真核生物のタンパク質を研究している計画研究3のグループは、データベース解析を行っている計画研究6のグループと共同して、Rad51等と相互作用する組換えメディエーターRad52のC末端側の保存されていない領域の構造機能解析を行っている。また、天然変性領域をもつマルチドメインタンパク質の機能解析を行っている分子生物学グループ(計画研究4)もデータベース解析を行っている計画研究6のグループと共同して天然変性領域の予測および実験的検証を行ない、マルチドメインタンパク質の機能予測・機能解析を行っている。

研究費の使用状況

本領域研究で購入した主な設備の使用状況は次の通りである。

1. 二次元複合型ピクセルアレー検出器(PILATUS100K/R)(平成21年度設置、横浜市立大学)平成21年度に購入した当該検出器をこれまで開発してきたX線小角散乱装置に組み込んで測定システムの効率化を図った。同時に、X線結晶構造解析やNMRによって得られたタンパク質の原子モデルから水和構造を正しく考慮して散乱強度を計算する方法を新たに開

発し、モデルタンパク質を用いての揺らぎの解析で良好な結果が得られている。現在、この測定システムを使ってX線小角散乱法と分子動力学シミュレーションを組み合わせた手法（MD-SAXS法）による天然変性タンパク質の動的構造解析を行うとともに、当該領域研究内での連携研究に積極的に利用し、効率的な運用を行っている。

2. 四重極飛行時間型質量分析装置 Waters Synapt G2 HDMS（平成21年度設置、横浜市立大学）
平成21年度にイオンモビリティ質量分析装置（IM-MS）を導入して天然変性タンパク質およびその複合体の構造研究を精力的に実施している。本IM-MSは、ヌクレオソームコアのように 100 kDa を超えるタンパク質複合体でも質量測定を行うことができる上、タンパク質をコンフォメーションの違いで分離し分子イオンの衝突断面積を求めることができる。そこで、本装置を用いてタンパク質複合体の質量や衝突断面積を求めるとともに、多量体形成や修飾に伴うタンパク質複合体の構造変化（コンフォメーション）などの解析を行うことができるようになり、天然変性タンパク質の構造研究において活用している。
3. 500MHz NMR用クライオプローブ（平成21年度設置、横浜市立大学）
500 MHz NMR 用のクライオプローブを導入することで、水溶液中タンパク質のNMR測定におけるS/N（シグナルとノイズの比）が向上し、天然変性タンパク質由来のピークを効率よく同定することができるようになった。その結果、天然変性タンパク質の構造解析の研究を加速することができた。

その他、本領域研究で購入した設備等についても全て有効に活用されている。これらが自由に使えることは、天然変性領域を有する不安定なタンパク質を調製するうえで、極めて有効な使途であった。また、研究費は学術研究員、技術補佐員などの人権費としても有効に活用されている。

今後の研究領域の推進方策

天然変性タンパク質研究は、変性状態にある転写因子CREBのKIXドメインが転写のコアクチベータCBPのKIXドメインと相互作用し、高次構造が形成されることを示したP. Wrightらの研究（*Cell* **91**, 741-752, 1997）から本格的に始まった。この研究を契機に天然変性タンパク質に関する論文が指数関数的に増加し、データが集まり始めた。こうして天然変性タンパク質は、タンパク質の構造・機能研究の新しいターゲットとして注目され、様々な性質が明らかになってきた。しかし、これまで蓄積されてきたデータはごく一部で、天然変性タンパク質の特性を明らかにするためにはさらなるデータの蓄積が必要である。たとえば、今回、天然変性タンパク質NRSFとその相互作用ターゲットmSin3との結合過程をシミュレーションし、天然変性タンパク質の特徴の一つと考えられている「結合と連結した折れ畳まり」機構（図1）が「誘導適合」と「構造分布移動」の二面性を持つことを世界に先駆けて明らかにしたが、この二面性が天然変性タンパク質全般に当てはまるのかなど、これから明らかにしていかなければならない問題が山積している。

当該領域研究も折り返し点を迎え、前半期のデータの蓄積を踏まえ、より一層研究を加速させていくことが期待される。しかし、天然変性タンパク質研究は既存の学問領域を単に集めるだけでは進展しない難易度の高い研究領域である。したがって、新学術領域研究一般に求め

られているように、異なる学問分野の研究者が有機的に連携して行う研究の推進により、新たなブレークスルーを成し遂げていく必要がある。現段階においても連携研究は活発に行われているが、それらはまだ2つの研究項目間でしか行われていない。したがって、後半期では、2ページに記載された「研究領域の目的及び概要」で具体的に述べているように、2つの研究項目間の連携研究をさらに発展させ、公募研究を含む全研究項目間で連携研究が取り組めるようにしていくことが肝要である。天然変性タンパク質は真核生物に多く見られるため、「天然変性タンパク質の理解なくして、真核生物の機能解明なし」と言うことができる。創薬研究においても、天然変性タンパク質の理解がなければ疾患関連タンパク質に対する薬剤候補化合物は設計できない。国内の大手製薬会社もこのことを認識し始めており、当該領域研究の成果に注目している。

これまでのタンパク質研究の歴史を振り返ると、Anfinsenのドグマを契機にしてタンパク質の立体構造の構築原理が解明されてきた。当該領域研究では、天然変性タンパク質の発見を契機に再度タンパク質の立体構造形成の原点に立ち返り、研究を推進していく必要があると考えている。そのためには、次世代の生命科学を担う若手人材の育成が重要であることは言うまでもない。当該領域研究では、これまでに2回若手育成講習会を開催してきた。3回目は「天然変性タンパク質の動的構造情報に基づく創薬」と題して来年度開催を予定している。天然変性タンパク質研究は5年という短い研究期間では到底まなならぬ新学術領域である。しかし、この5年の短い研究期間に若手研究者を中心とした天然変性タンパク質の研究グループが形成されれば、自発的に天然変性タンパク質研究は大きく成長していくものと確信している。このようなことから、当該領域研究では今後2年半の研究活動を通じて、若手研究者を中心とした生命科学の新学術領域を構築していきたいと考えている。

総括班評価者による評価の状況

国際高等研究所・チーフリサーチフェロー：森川 耿右

近年、通常の酵素蛋白質のような特定の堅い立体構造をもたない蛋白質が数多く見いだされ、「天然変性蛋白質」と呼ばれている。こうした蛋白質の生物学的機能と物性的性質の関連性の解明は分子生物学の重要な研究課題となりつつある。この観点から、筆者はこの新学術領域の進捗状況と発展に強い関心をもっている。特に、高等真核生物の核内において、遺伝子発現とその調節に関与する蛋白質の多くが広範な天然変成領域を有し、多くの蛋白質において全長の70-80%が天然変性状態にあることが共通の認識となりつつある。比較的短い天然変性の領域がターゲット蛋白質と結合して、特定の構造をとることは「coupled folding」と呼ばれ、その認識機構は各論的ではあるが、徐々に明らかになりつつある。しかし、100残基を超える長さの天然変成領域の機能的意義は未だに不明で、未開拓の研究分野である。筆者は、こうした領域がリン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化等の翻訳後修飾を通じて、巨大で遷移的な複合体形成の鍵を握っていると推測している。即ち、エピジェネティクスとの深い関係が予感され、応用的観点からはips細胞等再生医学にも関連してくる。この観点から、当該新領域がエピゲノム研究会国際シンポジウムをサポートし、構造エピゲノム研究会と親密な関係を維持していることは高く評価されるべきである。

研究成果については、構造生物学グループと分子生物学グループからの論文報告数もかな

り多く、順調な進捗状況と認識している。公募研究においては、新しい技術を指向したグループや細胞骨格、細胞分裂、プリオン等に関連した研究グループも参加しており、バランスのよい組織構成が実感される。

大阪大学蛋白質研究所・教授：中村 春木

平成22年度第1回領域会議と平成23年度第1回天然変性タンパク質国際シンポジウムに参加する機会を得た。天然変性タンパク質が稀なものでなく、広く生命における様々な機能発現に関わっていることが、今や明らかにされつつある。この新規の分野に対して、分子生物学、構造生物学、生物物理学、バイオインフォマティクスなどの様々な分野の研究者が、異なるアプローチで天然変性タンパク質に関わる種々の現象を解明しようとしており、常に熱気にあふれた会合であった。また、ISIDP国際シンポジウムでは、一般に公開されたため、計画研究、公募研究以外の研究者も多数参加しており、本領域の学問の広がりや印象的であった。本領域では、新たな学問分野としての現象が極めて明確であるため、異なるアプローチの融合は、わざわざ強制するまでもなく自然と実施されており、既に融合の結果産まれたと思われる研究の発表もあり、本領域の研究の進捗は極めて順調だと思われる。特に、日本ではあまり得意でないと言われるwet（実験研究）とdry（計算機を用いた情報科学・計算科学）の連携研究が積極的に行われ、国際的に優れた成果も出ている点は、高く評価できる。

東京医科歯科大学難治疾患研究所・客員教授：藤井 義明

タンパク3000などの従来の構造生物学のプロジェクトが目指していたものは酵素タンパクのような特定のしっかりした堅い立体構造を持ったタンパク質の構造を解明する事が中心であった。しかし、P300/CBP, P19, アデノウイルスE1Aなどのタンパク質は、天然変性タンパク質と呼ばれる単独では一定のしっかりした構造を持たない構造（揺らぎの大きな、言わば無構造な構造）を持つタンパク質であり、相手タンパク質が存在すると、一定の高次構造が誘起され、相互作用して、機能を発揮する事が明らかになって来た。シグナルタンパク質、転写因子、転写共役因子などの生理的に重要なタンパク質は、ほとんどがタンパク質間相互作用によって機能を発揮する事が知られているので、本研究課題は生命現象を深く理解するには重要な課題として認識されつつある。従って、研究班は従来のX線結晶解析やNMRによる研究の他に、X線小角散乱、高速AFMなどのタンパク質の動きを探る物理化学的方法の研究者などを糾合して研究を進めている。班会議、国際、国内シンポジウムなども、適宜開かれて、研究者間の意見の交換もよく行われているので、協同研究も行われるようになって来ている。また、若手の育成にも配慮して、講習会等を計画的に開いており、アンケートをとってその効果をフィードバックしている。研究成果については、既に、論文報告も可成り多く、特筆すべきものも見られるが、新しいコンセプトの研究分野から後半の研究に向けて、飛躍的な研究成果が産み出されることを期待したい。