

ストラクチュローム研究 (蛋白質集団の系統的構造解析研究)

Structurome Research

グループリーダー 倉 光 成 紀
KURAMITSU, Seiki

遺伝情報系蛋白質研究チーム

チームリーダー 倉 光 成 紀
KURAMITSU, Seiki

物質・エネルギー代謝系蛋白質研究チーム

チームリーダー 三 木 邦 夫
MIKI, Kunio

機能未知蛋白質研究チーム

チームリーダー 横 山 茂 之
YOKOYAMA, Shigeyuki

近年の分子生物学、生化学およびシンクロトロン放射光利用技術の進展により、基本的生命システムを構成する多種類の生体分子群(タンパク質、核酸、脂質、糖質等)を、個別ではなく一括して研究対象とし、分子認識や酵素反応の分子機構を、系統的に、かつ原子分解能で解明・理解する新しい構造生物学研究が可能になりつつある。本研究では高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 をモデル生物として取り上げ、セントラルドグマなどの基本的生命現象にかかわるタンパク質群を初めとして、可能な限り多数のタンパク質を、SPring-8の理研のビームラインを用いてX線結晶解析するとともに、比較的低分子量(分子量30000以下)のタンパク質については、NMRによる立体構造解析も並行して行っている。それによって、細胞内環境下におけるタンパク質-リガンド、タンパク質-タンパク質間の相互作用の立体構造に基づいた解析、並びにタンパク質の立体構造と分子機能との間の相関関係を、タンパク質の三次元立体構造に基づいて原子レベル分解能で系統的に解明・理解することを試みる。

ゲノム解析、タンパク質の大量発現・精製は、3チーム(遺伝情報系蛋白質研究チーム、物質・エネルギー代謝系蛋白質研究チーム、機能未知蛋白質研究チーム)が協同で取り組んでおり、その後のタンパク質結晶化、X線結晶構造解析も3チームが緊密に連携をとりながら進めている。

4. ゲノム解析研究

研究担当者: 倉光成紀, 増井良治, 柴田武彦, 横山茂之
高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8(*T. th.*)のゲノム解析の結果をもとにして、さらに詳細に解析したところ、*T. th.*には大きな環状ゲノムの他、3つのプラスミドが存在することが明らかになった。遺伝子の総数は約2000個であり、機能既知のタンパク質は約1500種類であった。そのうち70%以上のタンパク質が、高等生物のタンパク質と共通な機能をもつ相同タンパク質であった。

5. タンパク質の大量発現、精製、および結晶化

研究担当者: 倉光成紀, 増井良治, 三木邦夫, 横山茂之, 和田 崇, 濡木 理, Vassilyev D., 白水美香子, Trakhanov S., 寺田貴帆, 野嶽勇一, 本島浩之, 石嶋 潤, 安田潤平, 佐藤伸哉, 都築千鶴, 小林慎一郎, 真岡伸子, 松本香代子, 松田智恵子, 渡部ゆき

各タンパク質をコードする *T. th.* 遺伝子をPCRで増幅し、TAクローニングでpT7Blueへクローニングした後、塩基配列を確認し、タンパク質量産化用ベクターpET-11a(Novagen Co.)へクローニングしている。必要に応じて、pET-15b, 16b, 19bベクターを用いてHis-tagをN末端に付加させたタンパク質の作製や、Se-Met化タンパク質の調製も行っている。

従来、pETベクターを用いたタンパク質量産化は、大腸菌の対数増殖期に誘導剤で誘導する方法がとられてきたが、そのような誘導を行わずに定常期まで大腸菌を培養しても、*T. th.* タンパク質量産化が約75%の成功率で達成されることが明らかになった。この発見により、煩雑なタンパク質の大量発現が非常に簡便になった。

大腸菌で量産化した *T. th.* タンパク質は、大腸菌体を超音波破碎後、熱処理を行うのみで、好熱菌タンパク質の純度をかなり上げることができた。その後、室温におけるイ

オン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの並列クロマトシステムを用いて、タンパク質を精製した。*T. th.* は 85°C でも生育することから予想されるように、そのタンパク質は安定であるので、4°C の冷房室やクロマトチャンバーの中で精製を行う必要はなく、室温での精製が可能であった。

タンパク質の結晶化はおもに hanging drop 蒸気拡散法で行ったが、その結晶化成功率は、80~90%であった。さらに、3 Å 以下の X 線回折データ収集の成功率は約 80%である。これまでに約 22 個のタンパク質の立体構造決定を行ったが、他のグループの結果と併せると、これまでに *T. th.* で立体構造が決定されたタンパク質総数は約 50 種類以上になる。各タンパク質の構造解析結果の一部を以下に記す。

6. 遺伝情報系タンパク質の構造解析研究

研究担当者：倉光成紀，増井良治，三木邦夫，横山茂之，福山恵一，角田佳充，山本雅貴，熊坂 崇

DNA 修復酵素群は原核生物から真核生物まで広く保存されている場合が多く、ヒトでは DNA 修復酵素の欠損が様々な遺伝性疾患の原因となることが知られている。このため、DNA 修復酵素群の構造機能解析は、基本的生命現象を理解する上で重要な役割を果たすだけでなく、病気と直結した応用的な側面をも担っている。*T. th.* には少なくとも 30 種類の DNA 修復酵素の存在が確認されており、それらには塩基除去修復系、ヌクレオチド除去修復系、ミスマッチ修復系、組換え修復系その他の酵素群が含まれる。これらの *T. th.* DNA 修復酵素群の遺伝子をクローニングし、順次、タンパク質の量産・精製・立体構造解析を行っている。

その中の 1 つ、*T. th.* DNA 光回復酵素は、触媒基近傍に結合した補酵素 FAD と可視光のエネルギーとを利用して、紫外線によって生成した DNA 損傷（シクロブタン型ピリミジンダイマー）を修復する。重原子同型置換法によって位相を決定し、補酵素 FAD を含む全アミノ酸 420 残基の構造を決定したところ、可視光のエネルギーを吸収して触媒基近傍の FAD に伝達するための集光性 8-hydroxy-5-deazaflavin (8-HDF) が、光回復酵素の比較的表面上に結合していることが分かった。耐熱性光回復酵素の立体構造が明らかになったことによって、分子内エネルギー移動について詳細な解析を進めることが可能となった。

酸素呼吸の代謝の過程で生じる酸素ラジカル種は、DNA に様々な障害を引き起こす。特に、グアニンの酸化によって生じる 8-オキシグアニン (GO) は量的にも多く、シトシン (C) とともアデニン (A) ととも塩基対を形成できるので、C:G → A:T への突然変異を誘発し、細胞死やがんの原因となる。MutM は GO:C 塩基対から GO を除去し、G:C → T:A への変異を防ぐ DNA 塩基除去修復酵素である。この MutM タンパク質の酵素反応機構を解明するために、まず、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の MutM タンパク質の X 線結晶構造解析を行い、その結果をもとにして、活性部位に存在する Glu2 と Glu5 をアミノ酸置換したところ、Glu2 が触媒基として重要な役割を果たしていることが明らかになった。

7. 物質・エネルギー代謝系タンパク質の構造解析研究

研究担当者：三木邦夫，喜田昭子，宮武秀行，金 成熟，広津 建，宮原郁子，神谷信夫，城 宜嗣，久野玉雄，濱田賢作，須藤恭子，西尾和也，三浦圭子，河本正秀

T. th. アスパラギン酸アミノ基転位酵素の基質認識機構を、基質との反応速度論的解析および X 線結晶解析で調べた。その結果、アミノ基転位酵素は一般に、性質の全く異なる 2 種類の基質を認識し得る、非常に特異な「1 酵素-2 基質」酵素であることが明らかになった。さらに、このような「1 酵素-2 基質」酵素は、転位酵素群だけではなく、他の酵素群にも存在することが示唆された。

様々な酵素で、基質結合時にドメインが動くことが知られているが、このドメインの動きを、種々の常温生物と耐熱性生物のアミノ基転移酵素について比較したところ、「耐熱性が高い酵素ほど、基質結合時のドメインの動きが小さい」という法則が見いだされた。これはアミノ基転移酵素のみならず、これまでに報告されている他の 2 種類の酵素についても同様であった。

ヘム、クロロフィル、ビタミン B12、F430 など、金属イオンを配位したポルフィリン誘導体は、生体内で重要な役割を果たしている。フェロキラーゼはプロトポルフィリン IX に Fe²⁺ を挿入しプロトヘムを合成する酵素であり、ヒトではフェロキラーゼを欠損すると、プロトポルフィリン症を発症することが知られている。高度好熱菌のフェロキラーゼは Rossmann fold 様のほぼ相同な 2 つのドメインからなり、他の生物種には見られないプロリンに富んだループを持つことが分かった。基質となる金属イオンと結合するヒスチジン残基など、活性部位は 2 つのドメインの間の溝に位置していた。種間で保存されている多くの残基もこの溝に位置することから、これらの残基が活性に関わっていることが示唆された。

炭素 5 つからなるイソプレノイド単位を含む化合物は、23000 以上もの種類が同定されており、原核・真核を問わず全生物に広く分布している。それらの合成は、ジメチルアリルピリン酸 (C5) に基本単位であるイソペンテニルピリン酸を次々と付加することによって進行する。ゲラニルゲラニルピリン酸シンセターゼ (GGPS) は、ゲラニルゲラニルピリン酸 (C20) までの多段階の付加反応を行う酵素である。今回決定された立体構造では、GGPS は二量体であり、α ヘリックスバンドルを構成している。活性中心となる保存された残基は、α ヘリックスによって作られた空孔の底に位置する。その空孔の内壁は主に疎水性の残基によって構成されており、疎水性のイソプレノイド鎖の結合を可能にしている。また、この好熱菌酵素が実際にどれくらいの長さのものまで基質にするかについてのデータはないため、本当にこのタンパク質が GGPS であるという実験的証拠はないが、基質が結合する空孔の深さから見て、少なくとも C20 のイソプレノイド鎖を持つゲラニルゲラニルピリン酸は結合しうることが分かった。

ピログルタミン酸ペプチダーゼ I (ピロリドンカルボキシルペプチダーゼ: PCP) は、ペプチドやタンパク質の N 末端に位置するピログルタミン酸を分解・除去する酵素である。PCP はシステインプロテアーゼファミリーに属し、バクテリアに見られるクラス I と哺乳類にあるクラス II 型がある。哺乳類の酵素は神経ペプチドの活性制御に働いているとも言われているが、バクテリアにおける機能はよく分かって

いない。今回決定された好熱菌の PCP は四量体を形成しており、プロトマーはコンマのような形をした α/β フォールドをとっている。興味深いことに、活性中心の Cys-His-Asn の空間配置は他のシステインプロテアーゼよりもセリンプロテアーゼの活性中心と似ていた。立体構造そのものも哺乳類のクラス II 型のものとは似ておらず、カルボキシペプチダーゼなどの別のファミリーの加水分解酵素と類似性が見られた。このことは、本酵素の基質特異性や反応機構を考える上で有益な情報を与えてくれる。

ヒボキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) は、プリンサルベージ経路の中心となる酵素で、ホスホリボシル-1-ピロリン酸からヒボキサンチンあるいはグアニンにホスホリボシル基を転移して、イノシン酸あるいはグアニル酸を作る。ヒトでは、HGPRT 遺伝子の異常は、神経系の疾病などを引き起こす。決定された立体構造では、HGPRT はダイマーを形成しており、大小 2 つのドメインからなる。両ドメインの間の溝が活性部位を形成しているが、その溝の一方はループが覆っていることから、このループが基質結合において重要な役割を果たしていると考えられる。

イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) は、ロイシンの生合成経路で働く酵素であり、高度好熱菌由来の酵素の立体構造が決定されている。一方、イソクエン酸脱水素酵素は、クエン酸サイクルを構成する酵素の 1 つであり、古くから研究されている。両酵素の遺伝子とも高度好熱菌のゲノム解析によって同定されているが、それとは別に両酵素とホモロジーを示す遺伝子がゲノム解析によって新たに見つかった。今回その立体構造を決定したところ、IPMDH と非常に良く似ており、同じような酸化還元反応を行う脱水素酵素であることが立体構造からも支持された。IPMDH と同じタンパク質ファミリーに属しながら機能が分かっている新しい新規なタンパク質の構造を決めたのは、これが初めてである。基質特異性など今後の機能解析を行う上で、この構造情報が大いに役に立つものと期待される。

8. 機能未知タンパク質の構造解析研究

研究担当者：横山茂之、和田 崇、濡木 理、Vassilyev D.、白水美香子、Trakhanov S.、寺田貴帆

近年各所で展開されているゲノム解析プロジェクトの進展により、生物ゲノムの情報は急速に蓄積されつつある。しかしながら、ゲノム解析によって明らかになった遺伝子の大半は、その機能が分かっておらず、それら機能未知遺伝子産物 (タンパク質ないしは核酸) の細胞における役割を解明することがポストゲノムの一大研究課題である。そこで、構造解析によって明らかになった立体構造をもとにして系統的な分子機能解析 (Functional Genomics) を行い、ヒトを含めたすべての生物に共通で未知の基本的生命現象を明らかにしていく。

まず、*T. th.* CsaA タンパク質は、最近になって初めてシャペロニンとしての機能が同定されたタンパク質である。本年度我々は、*T. th.* 由来 CsaA タンパク質の結晶構造を 2.0 Å 分解能で明らかにした。結晶構造によれば、CsaA はホモ二量体分子であり、これが機能単位であると考えられる。CsaA モノマーは既知のオリゴヌクレオチド結合フォールドに類似した構造をとっており、その N 末端および C 末

端側に付随したモチーフがダイマーインターフェイスをたち作っている。2 つのサブユニット間には、大きい疎水性の溝が形成されており、ここで基質を結合すると考えられる。一方、CsaA はある種の tRNA 結合ドメイン (Trbp 等) と配列の類似性を持っている。構造に基づいた一次構造の比較を行ったところ、CsaA の基質結合部位の構造は Trbp の tRNA 結合部位の構造に類似していることが予測された。このことは、CsaA タンパク質のもう 1 つの機能、すなわち tRNA 結合の可能性を示唆している。

T. th. 機能未知タンパク質 YabJ の結晶構造を、SIRAS 法を用いて 1.5 Å 分解能で決定した。結晶構造によれば、YabJ はホモ三量体タンパク質であり、3 つのサブユニットの間には小さく深いくぼみが形成されている。このタンパク質表面のくぼみは、小さいリガンド (ないしは基質) を受容する結合部位 (ないしは活性部位) である可能性が考えられる。最近、枯草菌の同タンパク質ホモログがプリン生合成の調節に関与していることが報告され、YabJ の PurR の co-repressor としての機能が示唆された。現在、YabJ の機能の詳細な解析と基質の検索が進行中である。

T. th. のリボソーム大サブユニットの構成要素である L17 タンパク質の結晶構造を 2.2 Å 分解能で決定した。L17 分子は 2 つのドメインからなっており、そのうちの 1 つは典型的な DNA/RNA 結合モチーフであるヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフ (HTH) を含んでいる。結晶の非対称単位には 9 つの L17 分子が含まれており、組合わせによって 2 タイプの二量体を考えることができる。一方のタイプの二量体では、2 つの HTH モチーフの認識ヘリックスが互いに 26 Å 離れており、逆平行の位置関係にある。これは、いくつかの転写因子の構造に類似している。最近になって、L17 が湾曲 DNA や複数のリボソームタンパク質をコードしている (L17 遺伝子を含む) オペロンとみられる領域の末端に結合することが見いだされ、*T. th.* L17 タンパク質の転写制御への関与が示唆された。L17 タンパク質のリボソーム外機能の研究を現在行っている。

T. th. の 2'-O-リボースメチル基転移酵素 (Rrmh: 274 アミノ酸残基) の結晶構造を 2.4 Å 分解能で決定した。リボースの 2'-O-メチル化は、シュドウリジル化とならんで、真核生物、原核生物を通じてもっとも広範に存在する転写後修飾であり、RNA の機能構造の維持とリガンドとの相互作用を保証していると考えられている。2'-O-リボースメチル基転移酵素は、トランスファー RNA (tRNA) の 18 番目のグアニンをメチル化する SpoU にちなんで、「SpoU ファミリー」と呼ばれ、触媒ドメインにはモチーフ I, II, III といった極めて保存された配列を持つ。X 線結晶構造解析の結果、Rrmh は、RNA 結合ドメインと考えられる N 末端ドメインと触媒ドメインと考えられる C 末端ドメインを持っていた。驚くべきことに、C 末端の触媒ドメインの前半は他のファミリーのメチル基転移酵素と同様の dinucleotide-binding fold であったのに対し、後半に明瞭な「結び目 ("knot")」を持っていた。この "knot" は、わずか 41 アミノ酸残基からなる短いループを分子量 4861 相当のペプチド鎖が貫通しており、先の *Nature* に掲載された "knot" に比べ際立っている。さらに興味深いことに、この "knot" 上には SpoU ファミリーに保存されているモチーフ III がのっており、SpoU ファミリーでは "knot" が活性部位を形成していると考えら

れた。これは、酵素フォールド中に新規の“knot”構造を見だし、その機能発現への役割を示唆した国際的にも最初の例である。

T. th. 由来の ribosomal protein L28 は、分子量 10.97 k で 98 残基のアミノ酸からなる。¹⁵N-labeled L28 を用いて HSQC を測定し、NMR の条件を検討した後、2D HX-NOE (heteronuclear NOE) の測定を行った。その結果、約 40 残基は構造をとっていないことが分かった。次に、¹³C, ¹⁵N labeled L28 (phosphate buffer, pH 6.5, 5 mM DTT-d, 200 mM KCl) の主鎖 (NH, CO, C α , C β) の帰属を行った。約 75 残基の主鎖については帰属を完了したが、残りについては、構造をとっていないため帰属はできなかった。結果的に、N 末端側 (aa1-40) までは構造をとっておらず、中央から C 末端については構造をとっていることが分かった。ケミカルシフト値より、中央部分 (aa40-60) は、 β -sheet 構造、C 末側 (aa60-98) は α -helix 構造をとっていることが推測された。光散乱測定や超速心法では、L28 は 2-3 量体をとっているというデータが得られており、溶液中では単体で存在していないと考えられ、生体内では RNA あるいは他のタンパク質と結合して存在していると考えられる。

T. th. 機能未知タンパク質 258 (Tth258) は、*T. th.* ゲノム配列より見いだされた機能未知遺伝子がコードするタンパク質の 1 つである。Tth258 およびそのホモログは真正細菌ゲノムに広く見いだされることから、生物学的に重要な機能を果たすと予想されるが、機能既知のタンパク質とは一次配列上のホモロジーがないため、これまでその機能は全く未知であった。そこで Tth258 の立体構造を NMR 法により解析したところ、そのフォールディングは、 $\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ をコアとする“RNaseH-like fold”をとることが明らかとなった。これを受けて DNA 結合活性を測ったところ、2 重鎖 DNA との顕著な結合能が確認された。したがって、Tth258 は核酸の代謝系に関わる新規ヌクレアーゼである可能性が高い。

機能未知タンパク質の機能解析を行うためには、遺伝子破壊株の系統的作製が有効な手段である。そこで、約 85°C で利用可能な耐熱化力ナマイシン耐性マーカー (HTK) を作製し、相同組換えを利用して簡便かつ効率の良い *T. th.* 遺伝子破壊株作製法を確立した。欠損株は予想通りの表現型と遺伝子型を示した。この HTK はゲノムにシングルコピー存在するだけで、選択マーカーとして十分機能することも明らかとなった。

遺伝情報系蛋白質研究チーム

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Sugahara M., Mikawa T., Kumasaka T., Yamamoto M., Kato R., Fukuyama K., Inoue Y., and Kuramitsu S.: “Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively damaged DNA, MutM (Fpg), from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8”, EMBO J. **19**, 3857-3869 (2000). *

Kawaguchi S., Müller J., Linde D., Kuramitsu S., Shibata T., Inoue Y., Vassilyev D. G., and Yokoyama S.: “The crystal structure of the ttCsaA protein: An export-

related chaperone from *Thermus thermophilus*”, EMBO J. **20**, 562-569 (2001). *

(総説)

Yokoyama S., Hirota H., Kigawa T., Yabuki T., Shirouzu M., Terada T., Ito Y., Matsuo Y., Kuroda Y., Nishimura Y., Kyogoku Y., Miki K., Masui R., and Kuramitsu S.: “Structural genomics projects in Japan”, Nat. Struct. Biol. **7** Suppl., 943-945 (2000).

Yokoyama S., Matsuo Y., Hirota H., Kigawa T., Shirouzu M., Kuroda Y., Kurumizaka H., Kawaguchi S., Ito Y., Shibata T., Kainosho M., Nishimura Y., Inoue Y., and Kuramitsu S.: “Structural genomics projects in Japan”, Prog. Biophys. Mol. Biol. **73**, 363-376 (2000).

倉光成紀, 三木邦夫, 宮野雅司, 神谷信夫, 横山茂之: “構造ゲノム科学”, 日本結晶学会誌 **43**, 45-54 (2001).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Okumura A., Kuroda Y., Kuramitsu S., Shibata T., Inoue Y., and Yokoyama S.: “Identification of folded protein domains candidate to high-throughput structure determination: A pilot experiment using the *Thermus thermophilus* genome”, Int. Conf. on Structural Genomics 2000 (ICSG2000), Yokohama, Nov. (2000).

Tajima K., Shirouzu M., Inoue M., Yabuki T., Kigawa T., Shibata T., Inoue Y., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Production of *Thermus thermophilus* HB8 proteins by cell-free system”, Int. Conf. on Structural Genomics 2000 (ICSG2000), Yokohama, Nov. (2000).

Terada T., Shirouzu M., Kawaguchi S., Masui R., Nureki O., Vassilyev D. G., Wada T., Inoue M., Ishii R., Katsura Y., Kukimoto M., Nakano N., Trakhanov S., Inoue M., Tachida Y., Hashimoto K., Goto M., Tajima K., Kigawa T., Yabuki T., Asanuma M., Hirota H., Inoue Y., Shibata T., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Structural studies on new functional proteins and proteins involved in transcription and translation of *Thermus thermophilus* HB8”, Int. Conf. on Structural Genomics 2000 (ICSG2000), Yokohama, Nov. (2000).

(国内会議)

小森博文, 辻内宏, 増井良治, 倉光成紀, 横山茂之, 柴田武彦, 井上頼直, 三木邦夫: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来, 光回復酵素の結晶構造解析”, 第 38 回日本生物物理学会年会, 仙台, 9 月 (2000).

田島夏織, 白水美香子, 井上みお, 矢吹孝, 木川隆則, 柴田武彦, 井上頼直, 倉光成紀, 横山茂之: “無細胞系による高度好熱菌 *T. th.* HB8 タンパク質の発現”, 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

小林慎一郎, 野嶽勇一, 本島浩之, 石嶋潤, 増井良治, 中川紀子, 柴田武彦, 井上頼直, 横山茂之, 倉光成紀: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 量産化タンパク質の効率的精製系の構築”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VI)」, 和光, 1 月 (2001).

倉光成紀, 増井良治, 黒川顕, 安永照雄, 横山茂之: “高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト”のためのゲノム解析”,

第3回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, (統合ゲノム), 木更津, 2月(2001).

胡桃坂仁志, 白水美香子, 榎本りま, 木川隆則, Vassilyev D. G., 井上頼直, 柴田武彦, 倉光成紀, 横山茂之: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の網羅的タンパク質間相互作用解析系の構築”, 第3回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, (文部省科研費補助金特定領域研究(C)「統合ゲノム」), 木更津, 2月(2001).
白水美香子, 田島夏織, 井上みお, 矢吹孝, 寺田貴帆, 木川隆則, 井上頼直, 倉光成紀, 横山茂之: “無細胞系による高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 タンパク質の発現”, 第3回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, (統合ゲノム), 木更津, 2月(2001).

物質・エネルギー代謝系蛋白質研究チーム

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Kitano K., Sasaki R., Nogi T., Fukami T. A., Nakagawa A., Miki K., and Tanaka I.: “Utilization of microgravity to improve the crystal quality of biologically important proteins: Chaperonin-60, GrpE, B-subunit of V-type ATPase, and MIF”, *J. Cryst. Growth* **210**, 819–823 (2000).

*

(総説)

Yokoyama S., Hirota H., Kigawa T., Yabuki T., Shirouzu M., Terada T., Ito Y., Matsuo Y., Kuroda Y., Nishimura Y., Kyogoku Y., Miki K., Masui R., and Kuramitsu S.: “Structural genomics projects in Japan”, *Nat. Struct. Biol.* **7** Suppl., 943–945 (2000).

北野健, 三木邦夫: “蛋白質結晶化における微小重力利用”, *日本マイクログラビティ応用学会誌* **17**, 114–120 (2000).
倉光成紀, 三木邦夫, 宮野雅司, 神谷信夫, 横山茂之: “構造ゲノム科学”, *日本結晶学会誌* **43**, 45–54 (2001).

口頭発表 Oral Presentations

(国内会議)

森本幸生, 田中勲, 三木邦夫: “SPRING-8における微小結晶対応・高エネルギー分解能アンジュレータ構造生物学ビームラインの提案”, *日本結晶学会平成11年度年会*, 京都, 11月(1999).

小森博文, 辻内宏, 増井良治, 倉光成紀, 横山茂之, 柴田武彦, 井上頼直, 三木邦夫: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来, 光回復酵素の結晶構造解析”, 第38回日本生物物理学会年会, 仙台, 9月(2000).

沼本修孝, 禾晃和, 横山謙, 吉田賢右, 三木邦夫: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 V-type H⁺ ATP 合成酵素の結晶化”, 第14回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 広島, 1月(2001).

機能未知蛋白質研究チーム

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Vassilyev D. G., Shirouzu M., Wada T., and Yokoyama

S.: “2.3 Å resolution crystal structure of L17 ribosomal protein from *Thermus thermophilus*”, *Int. Conf. on Structural Genomics 2000 (ICSG2000)*, Yokohama, Nov. (2000).

Tajima K., Shirouzu M., Inoue M., Yabuki T., Kigawa T., Shibata T., Inoue Y., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Production of *Thermus thermophilus* HB8 proteins by cell-free system”, *Int. Conf. on Structural Genomics 2000 (ICSG2000)*, Yokohama, Nov. (2000).

Terada T., Shirouzu M., Kawaguchi S., Masui R., Nureki O., Vassilyev D. G., Wada T., Inoue M., Ishii R., Katsura Y., Kukimoto M., Nakano N., Trakhanov S., Inoue M., Tachida Y., Hashimoto K., Goto M., Tajima K., Kigawa T., Yabuki T., Asanuma M., Hirota H., Inoue Y., Shibata T., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Structural studies on new functional proteins and proteins involved in transcription and translation of *Thermus thermophilus* HB8”, *Int. Conf. on Structural Genomics 2000 (ICSG2000)*, Yokohama, Nov. (2000).

Vassilyev D. G.: “The crystal structure of a bifunctional protein with export-related chaperone and tRNA-binding activities”, *UK-Japan (DL/RIKEN/JASRI) Joint Symp.*, Harima, Nov. (2000).

(国内会議)

小森博文, 辻内宏, 増井良治, 倉光成紀, 横山茂之, 柴田武彦, 井上頼直, 三木邦夫: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来, 光回復酵素の結晶構造解析”, 第38回日本生物物理学会年会, 仙台, 9月(2000).

田島夏織, 白水美香子, 井上みお, 矢吹孝, 木川隆則, 柴田武彦, 井上頼直, 倉光成紀, 横山茂之: “無細胞系による高度好熱菌 *T.th* HB8 タンパク質の発現”, 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2000).

小林慎一郎, 野嶽勇一, 本島浩之, 石嶋潤, 増井良治, 中川紀子, 柴田武彦, 井上頼直, 横山茂之, 倉光成紀: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 量産化タンパク質の効率的精製系の構築”, *理研シンポジウム「構造生物学(VI)」*, 和光, 1月(2001).

倉光成紀, 増井良治, 黒川顕, 安永照雄, 横山茂之: “高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクトのためのゲノム解析”, 第3回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, (統合ゲノム), 木更津, 2月(2001).

胡桃坂仁志, 白水美香子, 榎本りま, 木川隆則, Vassilyev D. G., 井上頼直, 柴田武彦, 倉光成紀, 横山茂之: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の網羅的タンパク質間相互作用解析系の構築”, 第3回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」(文部省科研費補助金特定領域研究(C)「統合ゲノム」), 木更津, 2月(2001).
白水美香子, 田島夏織, 井上みお, 矢吹孝, 寺田貴帆, 木川隆則, 井上頼直, 倉光成紀, 横山茂之: “無細胞系による高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 タンパク質の発現”, 第3回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, (統合ゲノム), 木更津, 2月(2001).

Research Subjects and Members of Structure Research Group

1. Genome Research
2. Overexpression, Purification and Crystallization of Proteins
3. Structural Studies of Genetic Proteins
4. Structural Studies of Metabolic Proteins
5. Structural Studies of New Functional Proteins

Group Leader

Dr. Seiki KURAMITSU

Genetic Proteins Research Team

Head

Dr. Seiki KURAMITSU

Members

Dr. Jun ISHIJIMA
Dr. Yoshimitsu KAKUTA (Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)
Dr. Ryuichi KATO (Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)
Dr. Gota KAWAI (Fac. Tech., Chiba Inst. Technol.)
Dr. Masahide KAWAMOTO (JASRI)
Mr. Shin-ichiro KOBAYASHI
Mr. Shinya SATO
Dr. Genichi SANPEI (Fac. Electro-Commun., Univ. Electro-Commun.)
Ms. Kyoko SUDO
Mr. Kazuya NISHIO
Dr. Yuichi NODAKE
Dr. Kensaku HAMADA (Interdiscip. Fac. Sci. Eng., Shimane Univ.)
Dr. Keiichi FUKUYAMA (Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)
Dr. Ryoji MASUI (Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)
Ms. Keiko MIURA (JASRI)
Dr. Hiroyuki MOTOSHIMA

in collaboration with

Dr. Takashi KUMASAKA (Structural Biophysics Lab.)
Dr. Takehiko SHIBATA (Cellular & Molecular Biology Lab.)
Dr. Masaki YAMAMOTO (Structural Biophysics Lab.)

Technical Staffs

Ms. Chizuru TSUDUKI
Ms. Nobuko MAOKA
Ms. Chieko MATSUDA
Ms. Kayoko MATSUMOTO
Ms. Yuki WATABU

Metabolic Proteins Research Team

Head

Dr. Kunio MIKI

Members

Dr. Akiko KITA (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)
Dr. Seong-Hoon KIM

in collaboration with

Dr. Nobuo KAMIYA (Div. Bio-Crystallography Technology)
Dr. Yoshitsugu SHIRO (Biophysical Chemistry Lab.)
Dr. Tamao HISANO (Theoretical Structural Biology Lab.)
Dr. Hideyuki MIYATAKE (Theoretical Structural Biology Lab.)

New Functional Proteins Research Team

Head

Dr. Shigeyuki YOKOYAMA

Members

Dr. Osamu NUREKI (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
Dr. Takashi WADA

in collaboration with

Dr. Mikako SHIROUZU (Cellular Signaling Lab.)
Dr. Takaho TERADA (Protein Research Group, GSC)
Dr. Sergei TRAKHANOV (Protein Research Group, GSC)
Dr. Dmitry VASSYLYEV (Cellular Signaling Lab.)

Technical Staffs

Ms. Marina VASILIEVA