

タンパク質発現・解析高度化施設

Protein Preparation/NMR Facilities

施設長 横山 茂之
YOKOYAMA, Shigeyuki

発現施設では、PCR 増幅した DNA 断片を鋳型に用いる無細胞タンパク質合成法によって、1 年に数万コンストラクトの cDNA や遺伝子断片 DNA に対して、タンパク質合成量と可溶性をチェックする発現スクリーニング・ロボットシステムを構築した。これまでに、GSC 遺伝子構造・機能研究グループによって調製、シーケンシング、アノテーションが行われたマウス完全長 cDNA (FANTOM 等) の約 2 万クローンから、ORF を特定可能な約 7,500 クローンを選択し、無細胞タンパク質合成による発現スクリーニングを完了している。(約 15,000 コンストラクト) 引き続き、基本構造 (ドメイン) に対応する部分タンパク質 (1 万コンストラクト以上) の発現スクリーニングも実施した。次に、それらのタンパク質について、1 mg スケールでタンパク質を合成し、精製して、可溶性、NMR スペクトルの性質など、立体構造解析の適性を調べ好適なものを選び出した。これらを、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 二重標識または非標識試料として大量に調製し精製して、NMR 構造解析・機能解析用のタンパク質試料とした。

解析高度化施設としては、NMR による構造解析の自動化手法の研究を進めるとともに、新たな構造・機能解析手法の開拓を目指して、非天然型アミノ酸 (ヨウ素など重原子を含むものなど) をタンパク質に部位特異的に導入する基本技術の開発を進めた。また、タンパク質の可溶性を上げるような化学修飾方法の検討を進めた。

なお、当施設は平成 13 年 4 月に発足し、平成 14 年 4 月 1 日よりタンパク質構造・機能研究グループと一体化して研究を実施する運びである。

1. タンパク質合成技術の高度化 (平尾, 三井, 木賀, 原田, 佐藤, 横山)

タンパク質合成技術高度化チームの研究目的の 1 つは、人工塩基対を用いて遺伝暗号を拡張し、非天然型アミノ酸を含むタンパク質の合成系を確立することである。本年度においては、既に開発済みの人工塩基対である 2-アミノ-6-(2-チエニル) プリン (s) とピリドン-2-オン (y) を用いた転写-翻訳カップル系によりタンパク質中へ非天然型アミノ酸を導入する系の簡便化に取り組んだ。特に、非天然型塩基 (s) をアンチコドンに含む tRNA の転写による簡便な調製法と tRNA に非天然型アミノ酸を結合させるアミノアシル合成酵素についてそれぞれ検討し、新たな可能性を見いだした。また、さらに新たな人工塩基対の開発も行い、塩基対のデザインに今まで試みられていなかった概念を導入した塩基とそのヌクレオチド誘導体の化学合成に成功した。

2. タンパク質の多種発現・精製

(1) タンパク質の多種発現・精製 (木川, 田仲, 青木, 矢吹, 沈, 布川, 関, 松田 (貴), 松田 (夏), 元田, 宮田, 小林 (敦), 斎藤 (み), 山崎, 犀川, 井上 (み), 中島 (理), 藤倉, 平川, 廣安, 立木, 鞆, 曾和, 碓, 渡辺, 津金沢, 葛西^{*1}, 前田 (健)^{*1}, 北村^{*1}, 児玉^{*1}, 横山; 野田, 田代 (工学基盤研究部))

タンパク質多種発現・精製チームでは、遺伝子資源が確保できた多数のタンパク質ないしはタンパク質ドメインから、ハイスループットな構造・機能解析に適したクローンを、実験的な手法を用いて選択するシステムを構築し、調製タンパク質の発現量・可溶性情報の網羅的な解析パネル

を作成している。本情報は、今後のタンパク質構造・機能研究グループのプロテオーム研究の基盤情報となる。

さらに、発現量・可溶性の高かった試料を選択し、中量スケールで発現して部分的に精製した試料を調製して、NMR の HSQC スペクトルの測定や、結晶化のスクリーニングを行い、構造解析試料としての適性を調べる。この二段階の選択により、多数の試料候補から、効率良く、構造解析適性の高い試料を解析対象として選択する。各発現過程では、多数試料を同時に迅速に発現調製することが必要となるため、発現系としては無細胞タンパク質合成系を利用する。

本年度は、まず、マウス PhaseI クローンおよび FANTOM クローンのうち、発現用プライマーが合成されていた約 7,500 クローンにコードされているタンパク質に関して、His-tag および GST-tag 融合型での発現解析を行った。現在は、ヒト、マウス、アラビドプシスの cDNA 約 50,000 クローンにコードされた 150 以上のタンパク質ドメイン (10,000 コンストラクト以上) に関して発現解析を進めており、すでに、30 以上のドメイン試料が NMR を用いた構造解析適性の高い試料として選択されている。

また、無細胞タンパク質合成系の効率化や適応範囲の拡大を目指した技術の開発・改良を進めるとともに、スループットの向上を目指した自動化技術の開発にも着手した。

(2) 小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたハイスループット NMR 構造解析候補タンパク質のスクリーニング法の開発 (長谷川, 金, 松原, 濱田 (白水), 堀 (弘)^{*2}, 澤崎^{*2}, 遠藤^{*3}, 木川, 矢吹, 元田, 横山)

小麦胚芽 (真核型) 無細胞系を用いたハイスループットな発現スクリーニング法の開発を行った。今回は、コムギ

もシロイヌナズナも同じ植物であるという点から、植物ゲノム機能情報研究グループ（プロジェクトディレクター：篠崎一雄）により単離されたシロイヌナズナ完全長 cDNA クローン（RAFL clone）から NMR 構造解析しやすい 578 クローンを候補とし、その中からランダムに 288 クローンを選定した。スクリーニングをハイスループットに進めるため、全クローンについて PCR 法で Authentic protein と GST fusion protein の 2 種類の発現形の鋳型 DNA を作製した。小麦胚芽無細胞タンパク質合成法の常法（透析法、反応時間 2 日間）によりタンパク質を合成後、CBB 染色で目的タンパク質のバンドが確認できたクローンは、それぞれ約 70%、85%であった。また、合成タンパク質の 50%以上が可溶化したクローンは 50%、85%であり、特に GST を融合したタンパク質はほとんどが可溶性を示した。

同一の 288 クローンについて、GST fusion protein として、現行の大腸菌由来無細胞タンパク質合成法を用いて、簡便法であるパッチ法（反応時間 1 時間）でのタンパク質発現率を検討したところ 76%であった。50%以上が可溶化していたクローンは 60%であった。

これらのことから、小麦胚芽無細胞系は大腸菌由来無細胞系と同じように解析候補タンパク質の発現状態のハイスループットスクリーニングに有用であることが示された。

3. タンパク質の大量発現・精製

（1）タンパク質の大量発現・精製（濱田（白水）、寺田、石塚、野村、シータ山口、牛越、龍口、宇田、亀割、濱名、速水、平藤（山口）、大林、亀山、津金沢、遠藤^{*1}、石井^{*1}、石谷^{*1}、上西^{*1}、勝木^{*1}、桂^{*1}、岸田^{*1}、栗本^{*1}、岡部^{*1}、仙石^{*1}、進藤（秀）^{*1}、横山（史）^{*1}、木川、横山）

タンパク質大量発現・精製チームでは NMR 解析用のサンプルについては、¹³C、¹⁵N ラベルのタンパク質を大量スケールの無細胞タンパク質合成系にて合成し、Ni アフィニティカラムおよびイオン交換カラムクロマトグラフィー等により精製を行っている。

X 線結晶解析用のサンプルとしては、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のタンパク質を中心に、発現・精製を行っている。大腸菌で発現させた高度好熱菌タンパク質は、菌体を超音波破碎後、熱処理を行い、その後、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、ゲル濾過クロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーを用いて、タンパク質を精製している。また、SeMet ラベル化した高度好熱菌タンパク質を調製する場合は、主に無細胞タンパク質合成系を用いて合成している。精製方法は、大腸菌内での発現の場合とほぼ同様で、合成後の反応液を熱処理してからカラムクロマトグラフィーで精製している。すでに幾つかのタンパク質については、無細胞タンパク質合成系により合成した SeMet タンパク質を使用して、立体構造解析に供した。

（2）膜タンパク質の発現方法の確立（濱田（白水）、石原、安田、田島、五島、佐伯、木川、横山）

無細胞タンパク質合成系において、疎水性の高い領域を有するタンパク質は不溶性の沈殿となる傾向がみられる。そこで、膜タンパク質を不溶化させることなく合成することを目的とし、数種類の界面活性剤を用いて、膜タンパクの合成量や可溶性に与える影響について検討した。その結

果、反応液に特定の界面活性剤を添加した場合にのみ、合成されたタンパク質は遠心上清画分に検出された。また、合成阻害が認められる界面活性剤も決定した。したがって、いくつかの界面活性剤を添加した無細胞タンパク質合成系により、膜タンパク質を系統的に、不溶化させることなく、合成することが可能であることが示された。

4. NMR 解析技術の高度化（山崎、吉川）

NMR を用いてより多くのタンパク質試料のハイスループットな構造解析が可能であるようにするために、タンパク質の溶解度を上げ、NMR での測定を容易にする必要がある。そのために NMR 解析技術高度化チームではタンパク質の修飾による可溶化の研究を行った。以前の研究で、タンパク質の表面のリシンのアミノ基へ還元的アルキル化の化学反応を利用して、親水基や電荷を付加することによって溶解度を大きく変化させられることを明らかにした。多くの場合数倍の溶解度が得られることが分かった。本年度は、更なる溶解度の改善のために、多電荷を付加することを検討した。その 1 つは付加する多電荷分子を設計合成すること、もう 1 つは酵素によってペプチドなどの多電荷分子を付加することである。両方とも現時点では成功していないが、成功の可能性は高いと期待している。

NMR 解析の自動化のためのソフト開発を行った。主鎖信号の帰属は推論の問題に一般化される。優先順序付けされた全検索のアルゴリズムを使うことによって、人間が行えるより場合の数の多い場合の推論を可能にしようとしたものである。特にデータが不完全な場合、場合の数が増えるが、多数解を示すことができるようにしたもののである。どのくらい長い配列のどのくらい不完全なデータから正解を探し出せるかという性能評価を行っているところである。

^{*1} 研修生、^{*2} 共同研究員、^{*3} 客員主管研究員

Research Subjects and Members of Protein Preparation/NMR Facilities

1. Protein Synthesis Technology
2. Protein Preparation Screening
3. Large-scale Protein Preparation
4. NMR Spectroscopy

Head

Dr. Shigeyuki YOKOYAMA

Team Leaders

Dr. Ichiro HIRAO (Protein Synthesis Technology Team)
Dr. Takanori KIGAWA (Protein Preparation Screening Team)
Dr. Mikako SHIROZU-HAMADA (Large-scale Protein Preparation Team)
Dr. Toshio YAMAZAKI (NMR Spectroscopy Team)

Members

Dr. Masaaki AOKI

Dr. Ryoichi ARAI
 Dr. Goshi ISHIHARA
 Dr. Daisuke KIGA
 Dr. Masao MITSUI
 Dr. Xinchun SHEN
 Dr. Takaho TERADA
 Dr. Alexander TOKMAKOV
 Dr. Takashi YABUKI
 Ms. Mie GOTO
 Ms. Yoko HARADA
 Ms. Mio INOUE
 Ms. Yoshiko ISHIZUKA
 Mr. Atsuo KOBAYASHI
 Ms. Natsuko MATSUDA
 Mr. Takayoshi MATSUDA
 Ms. Eiko MATSUMOTO
 Ms. Yukako MIYATA
 Ms. Yoko MOTODA
 Ms. Naoko NOMURA
 Ms. Miyuki SAITO
 Ms. Mihoro SAEKI
 Ms. Ayako SAKAMOTO
 Mr. Akira SATO
 Ms. Eiko SEKI
 Ms. Kaori TAJIMA
 Ms. Ayako TATSUGUCHI
 Ms. Yumiko TERAZAWA
 Ms. Hiroko UDA
 Ms. Ryoko USHIKOSHI
 Ms. Emi YAMAGUCHI-NUNOKAWA
 Ms. Emi YAMAGUCHI-SIHTA
 Ms. Chikako YOSHIKAWA
 Ms. Yukiko FUJIKURA
 Mr. Hiroaki HAMANA
 Mr. Nobuhiro HAYAMI
 Ms. Noriko HIRAKAWA
 Ms. Fumiko HIROYASU
 Mr. Masaomi IKARI
 Ms. Yuki KAMEWARI
 Ms. Noriko KAMEYAMA
 Ms. Naomi OBAYASHI
 Ms. Noriko SOWA
 Ms. Mitsue SUNADA
 Ms. Rina TATSUKI
 Ms. Yasuko TOMO
 Ms. Keiko TSUGANEZAWA
 Ms. Megumi WATANABE
 Ms. Machiko YAMAGUCHI-HIRAFUJI
 Mr. Jun-pei YASUDA

in collaboration with

Dr. Hideo TASHIRO (Advanced Engineering Cen.)
 Dr. Koki NODA (Advanced Engineering Cen.)

Trainees

Mr. Makoto ENDO (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Ryohei ISHI (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Ryuichiro ISHITANI (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Tatsuya KAMINISHI (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Takuma KASAI (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Takeo KATSUKI (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Yasuhiro KATSURA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Hiroyuki KISHIDA (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Ms. Aya KITAMURA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Kouichirou KODAMA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Kazuki KURIMOTO (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Takeshi MAEDA (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Ms. Mayuko OKABE (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Toru SENGOKU (Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)
 Mr. Hideyasu SHINDO (Fac. Sci., Univ. Tokyo)
 Ms. Fumika YOKOYAMA (Fac. Sci., Jpn. Women's Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Ito N., Nureki O., Shirouzu M., Yokoyama S., and Hanaoka F.: "Crystallization and preliminary X-ray analysis of a DNA primase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*", J. Biochem. **130**, 727–730 (2001). *

Kigawa T., Yamaguchi-Nunokawa E., Kodama K., Matsuda T., Yabuki T., Matsuda N., Ishitani R., Nureki O., and Yokoyama S.: "Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis", J. Struct. Funct. Genom. **2**, L87–L104 (2001). *

Kimoto M., Shirouzu M., Mizutani S., Koide H., Kaziro Y., Hirao I., and Yokoyama S.: "Anti-(Raf-1) RNA aptamers that inhibit Ras-induced Raf-1 activation", Eur. J. Biochem. **269**, 697–704 (2002). *

Kitanaka C., Kato K., Ijiri R., Sakurada K., Tomiyama A., Noguchi K., Nagashima Y., Nakagawara A., Momoi T., Toyoda Y., Kigasawa H., Nishi T., Shirouzu M., Yokoyama S., Tanaka Y., and Kuchino Y.: "Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: Possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression", J. Natl. Cancer Inst. **94**, 358–368 (2002). *

Hirao I., Ohtsuki T., Fujiwara T., Mitsui T., Yokogawa T., Okuni T., Nakayama H., Takio K., Yabuki T., Kigawa T., Kodama K., Yokogawa T., Nishikawa K., and Yokoyama S.: "An unnatural base pair for incorporating amino acid analogs into proteins", Nat. Biotechnol. **20**, 177–182 (2002). *

(総 説)

木川隆則, 白水美香子, 胡桃坂仁志, 倉光成紀, 横山茂之: "構造ゲノム科学研究の流れと成果: RIKEN Structural Genomics Initiative (RSGI)", 実験医学 **19**, 945–949

(2001).

[単行本・Proc.]

(総 説)

Trakhanov S.: 白水美香子:(訳) “タンパク質結晶解析と強力シンクロトロン放射光”, 大規模ゲノム解析技術とポストシーケンス時代の遺伝子機能解析, 品川朗, 鈴木治和 (編), 中山書店, 東京, pp. 189–195 (2001).

木川隆則, 横山茂之: “タンパク質の高次構造決定 (NMR 法)”, 大規模ゲノム解析技術とポストシーケンス時代の遺伝子機能解析, 品川朗, 鈴木治和 (編), 中山書店, 東京, pp. 196–202 (2001).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Fukai S., Sekine S., Nureki O., Shimada A., Terada T., Shirouzu M., Vassilyev D., and Yokoyama S.: “Structural basis for the amino acid and tRNA recognition by class-I aminoacyl-tRNA synthetases”, 66th Cold Spring Harbor Symp. on Quantitative Biology: The Ribosome, New York, USA, May–June (2001).

Kigawa T., Yabuki T., Terada T., Shirouzu M., Hayashizaki Y., and Yokoyama S.: “Structure and function analyses of proteins using the cell-free synthesis”, 15th Symp. of the Protein Soc., Philadelphia, USA, July–Aug. (2001).

Shirouzu M., Terazawa Y., Enomoto R., Kurumizaka H., Inoue Y., Shibata T., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Comprehensive analysis of the interactions among *Thermus thermophilus* HB8 proteins”, 4th ORCS Int. Symp. Ribosome Engineering, Tsukuba, Oct. (2001).

Wang H., Yamaguchi H., Hori C., Kaminishi T., Terazawa Y., Enomoto R., Shirouzu M., Terada T., Kurumizaka H., Inoue Y., Shibata T., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Crystallization and X-ray diffraction determination of the structure of *Thermus thermophilus* nitrogen regulatory protein P-II”, 4th ORCS Int. Symp. Ribosome Engineering, Tsukuba, Oct. (2001).

Kigawa T., Matsuda T., Nunokawa E., Yabuki T., Matsuda N., and Yokoyama S.: “Development and application of the protein production system using the cell-free synthesis”, 4th ORCS Int. Symp. Ribosome Engineering, Tsukuba, Oct. (2001).

Yabuki T., Motoda Y., Matsuda N., Hayashizaki Y., Kigawa T., and Yokoyama S.: “High-throughput and high-yield production of protein fragments using PCR and cell-free synthesis”, 4th ORCS Int. Symp. Ribosome Engineering, Tsukuba, Oct. (2001).

Terada T., Shirouzu M., Kigawa T., Inoue M., Goto M., Ishizuka Y., Kubota K., Ushikoshi R., Tatsuguchi A., Kamewari Y., Hamana H., Hayami N., Kuramitsu S., Shibata T., Inoue Y., and Yokoyama S.: “Large-scale preparation system of ribosome-binding proteins for structural analysis of *Thermus thermophilus* HB8 ribosome-protein complexes”, 4th ORCS Int. Symp. Ribosome Engineering, Tsukuba, Oct. (2001).

Hori C., Nakayama H., Kaminishi T., Shirouzu M., Shibata T., Inoue Y., Kuramitsu S., Hirota H., Takio K., and Yokoyama S.: “Proteomic analysis of the ribosomal and its associated proteins of *Thermus thermophilus* HB8”, 4th ORCS Int. Symp. Ribosome Engineering, Tsukuba, Oct. (2001).

Kaminishi T., Hori C., Wang H., Kato M., Nureki O., Terada T., Shirouzu M., Sekine S., Vassilyev D., Shibata T., Inoue Y., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “X-ray crystallographic study of *Thermus thermophilus* HB8 70S ribosome and its complex with protein Y”, 4th ORCS Int. Symp. Ribosome Engineering, Tsukuba, Oct. (2001).

Yokoyama S.: “Structural genomics and proteomics”, 3rd Korea-Japan Science and Technology Forum, (Ministry of Science and Technology, Korea and others), Seoul, Korea, Oct.–Nov. (2001).

Nureki O., Kiga D., and Yokoyama S.: “Crystal structure of “class-I” lysyl-tRNA synthetase: divergence from class I or class II?”, Asilomar Conf. on Aminoacyl-tRNA Synthetases in Biology, Medicine, and Evolution (aaRS2001), Pacific Grove, USA, Jan. (2002).

Fukai S., Shimada A., Nakama T., Nureki O., Sekine S., Vassilyev D., Kiga D., Sakamoto K., Hirao I., and Yokoyama S.: “Structures and substrate recognition mechanisms of class I aminoacyl-tRNA synthetases”, Asilomar Conf. on Aminoacyl-tRNA Synthetases in Biology, Medicine, and Evolution (aaRS2001), Pacific Grove, USA, Jan. (2002).

Saito K., Saeki M., Kim J., Shirouzu M., and Yokoyama S.: “Adaptation of the Grb2-SH2 domain for specific binding to a phosphorylated unnatural amino acid: Rational protein engineering in combination with the biacore biosensor”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).

Kiga D., Sakamoto K., Kodama K., Kigawa T., Matsuda T., Yabuki T., Shirouzu M., Harada Y., Nakayama H., Takio K., Hasegawa Y., Endo Y., Hirao I., and Yokoyama S.: “An engineered *Escherichia coli* tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in an eukaryotic translation system and its application in cell-free translation”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).

Hirao I., Ohtsuki T., Fujihara T., Mitsui T., Yokogawa T., Okuni T., Nakayama H., Takio K., Yabuki T., Kigawa T., Kodama K., Yokogawa T., Nishikawa K., and Yokoyama S.: “An unnatural base pair for coupled transcription-translation in a cell-free system”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).

Mitsui T., Kimoto M., Kitamura A., To T., Satoh A., Hirao I., and Yokoyama S.: “An unnatural, hydrophobic base pair with the shape complementarity between pyrrole-2-carbaldehyde and 9-

- methylimidazo[(4,5)-b]pyridine”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Kimoto M., Shirouzu M., Mizutani S., Koide H., Kaziro Y., Hirao I., and Yokoyama S.: “Anti-(Raf-1) RNA aptamers that inhibit Ras-induced Raf-1 activation”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Shen X., Kigawa T., Yabuki T., Motoda Y., Matsuda N., Asanuma M., Hirota H., Hayashizaki Y., and Yokoyama S.: “Combinatory use of cell-free protein expression, limited proteolysis, and mass spectrometry for the high-throughput domain boundary identification”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Masui R., Kurokawa K., Matsuo Y., Nakagawa N., Terada T., Shirouzu M., Yasunaga T., Shibata T., Inoue Y., Miki K., Yokoyama S., and Kuramitsu S.: “Comparative analysis of *Thermus thermophilus* HB8 proteins”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Arai R., Takagi T., Matsumoto E., Sakamoto A., Terazawa Y., Yokoyama F., Shirouzu M., and Yokoyama S.: “Comprehensive functional analysis for unknown function proteins”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Hamada T., Hirota H., Furukawa H., Muto Y., Yokoyama S., and Haga T.: “Conformational analysis of ligands bound to the muscarinic acetylcholine receptor by TR-NOE”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Kato M., Shirouzu M., Terada T., Yamaguchi H., Murayama K., Sakai H., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Crystal structure of TT0787 of *Thermus thermophilus* HB8”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Tajima K., Shirouzu M., Ishihara G., Hori T., Saeki M., Goto M., Miyano M., Kigawa T., Haga T., and Yokoyama S.: “Effects of detergents on the membrane protein synthesis by cell-free system”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Yabuki T., Motoda Y., Matsuda N., Saito M., Hayashizaki Y., Kigawa T., and Yokoyama S.: “High-throughput and high-yield production of protein using PCR and cell-free protein synthesis”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Matsuda T., Kigawa T., Matsuda N., and Yokoyama S.: “High-yield cell-free protein synthesis system with dialysis”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Kigawa T.: “Highthroughput protein expression using the cell-free synthesis”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Terada T., Shirouzu M., Kigawa T., Nureki O., Inoue M., Goto M., Ishizuka Y., Kubota K., Ushikoshi R., Tatsuguchi A., Kamewari Y., Hamana H., Hayami N., Masui R., Shibata T., Inoue Y., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Large-scale preparation system for structural analysis of proteins derived from *Thermus thermophilus* HB8”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Wada T., Shirouzu M., Terada T., Ishizuka Y., Tajima K., Matsuda T., Kigawa T., Kuramitsu S., Park S., Tame J. R., and Yokoyama S.: “Original structure determination of an unknown function protein synthesized by a cell-free system”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Seki E., Kigawa T., Matsuda N., Hayashizaki Y., and Yokoyama S.: “Protein domain screening system for structural genomics”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Shirouzu M.: “Protein expression and purification at RSGI”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Yokoyama S.: “RIKEN structural genomics/proteomics initiative”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Harada Y., Nojima T., Osawa Y., Masaki H., Hirao I., and Yokoyama S.: “RNA aptamers that bind to colicin E3 structurally resembling the decoding site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Kikuchi J., Iwahara J., Kigawa T., Murakami Y., Okazaki T., and Yokoyama S.: “Solution structure determination of the two DNA-binding domains in the *Shizosaccharomyces pombe* Abp1 protein by a combination of dipolar coupling and diffusion anisotropy restraints”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Fukushima K., Kikuchi J., Koshiha S., Kigawa T., Kuroda Y., and Yokoyama S.: “Solution structure of the DFF-C domain of DFF45. A structural basis for the regulation of apoptotic fragmentation of chromosomal DNA”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Inoue M., Kigawa T., Shirouzu M., Shibata T., Inoue Y., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: “Solution structure of the hypothetical protein 258 from *Thermus thermophilus*”, Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Hatanaka M., Ikeya T., Ito Y., Nanakamura S., Itakura T., Ohno M., Yokoyama S., Shimizu K., and Masaki

- H.: "Solution structure of the RNase active domain of colicin E6 in the complex with its inhibitor protein", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Hori C., Nakayama H., Kaminishi T., Kawazoe M., Shirouzu M., Kuramitsu S., Hirota H., Takio K., and Yokoyama S.: "Structural and functional studies for *Thermus thermophilus* HB8 ribosome", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Koshiba S., Kigawa T., Itoh T., Takenawa T., Kikuchi A., and Yokoyama S.: "Structure and function of the epsin N-terminal homology (ENTH) domain of epsin", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Katsura Y., Shirouzu M., Yamaguchi H., Hayashi H., Ishitani R., Nureki O., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: "The crystal structure of aspartate aminotransferase which belongs to subgroup IV from *Thermus thermophilus* HB8", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Endo M., Shirouzu M., and Yokoyama S.: "The fission yeast adaptor protein Scd2 mediates the complex formation containing Scd1, Cdc42Sp, and Shk1 involved in the Cdc42 signaling cascade", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Wang H., Hori C., Sakai H., Yamaguchi H., Kaminishi T., Terada T., Shirouzu M., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: "X-ray crystallographic studies of PII from *Thermus thermophilus* HB8", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- (国内会議)
- 沈新春, 木川隆則, 矢吹孝, 元田容子, 松田夏子, 淺沼三和子, 廣田洋, 林崎良英, 横山茂之: "限定分解による蛋白質のドメイン領域同定のための多検体調製系の開発", 第1回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6月(2001).
- 菊地淳, 伊藤隆, 木川隆則, 横山茂之: "遠位の構造情報が開拓するタンパク質のNMR解析", 第1回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6月(2001).
- 小柴生造, 木川隆則, 伊藤俊樹, 竹縄忠臣, 菊池章, 横山茂之: "epsinのENTHドメインのNMRによる構造機能解析", 第1回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6月(2001).
- 矢吹孝, 松田貴意, 元田容子, 松田夏子, 木川隆則, 横山茂之: "迅速, 高収量なタンパク質発現法: 無細胞タンパク質合成系", 第1回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6月(2001).
- 木川隆則, 白水美香子, 廣田洋, 横山茂之: "理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター(GSC)における構造ゲノム科学研究への取り組み", 第1回日本蛋白質科学会年会構造生物学ワークショップ, 吹田, 6月(2001).
- 上西達也, 堀千重, 加藤美幸, 濡木理, 寺田貴帆, 白水美香子, 柴田武彦, 井上頼直, 倉光成紀, 横山茂之: "高度好熱菌 protein Yの機能解析および構造解析", 日本 tRNA 学会年会第3回RNAミーティング, 神戸, 8月(2001).
- 沈新春, 木川隆則, 矢吹孝, 元田容子, 松田夏子, 淺沼三和子, 廣田洋, 林崎良英, 横山茂之: "限定分解による蛋白質のドメイン領域同定のための多検体調製系の開発", 第74回日本生化学会大会, 京都, 10月(2001).
- 松田貴意, 矢吹孝, 松田夏子, 木川隆則, 横山茂之: "透析法を用いた無細胞タンパク質合成系によるタンパク質試料の大量調製", 第74回日本生化学会大会, 京都, 10月(2001).
- 菊地淳, 伊藤隆, 木川隆則, 横山茂之: "主鎖シグナルからのタンパク質グローバルフォールドの決定", 第40回NMR討論会, つくば, 11月(2001).
- 横山茂之, 廣田洋, 木川隆則, 白水美香子: "構造ゲノム科学プロジェクトにおけるNMR", 第40回NMR討論会, 京都, 11月(2001).
- 横山茂之: "ゲノムとタンパク質", 播磨科学公園都市・放射光産業利用セミナー第4回シンポジウム: 放射光が拓くナノサイエンスの世界への誘い, (兵庫県他), 東京, 11月(2001).
- 野村守, 堀千重, 川添将仁, 上西達也, 内海利男, 柴田武彦, 井上頼直, 倉光成紀, 横山茂之: "高度好熱菌リボソームタンパク質L10およびL7/L12複合体の過剰発現系によるL8複合体 *in vitro* 再構成の試み", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 石谷隆一郎, 濡木理, 深井周也, 雫本禎哉, 行木信一, 渡邊正勝, 近藤久雄, 関根光雄, 岡田典弘, 西村邁, 横山茂之: "Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 矢吹孝, 元田容子, 齋藤みゆき, 松田夏子, 布川絵未, 木川隆則, 林崎良英, 横山茂之: "PCRと無細胞合成を用いた, 迅速, 高収量なタンパク質発現法", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 松田貴意, 松田夏子, 木川隆則, 横山茂之: "透析法を用いた高収量な無細胞タンパク質合成系", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 行木信一, 染谷龍彦, 木本路子, 寺田貴帆, 白水美香子, 塙(末次)京子, 平尾一郎, 高久洋, 姫野依太, 武藤昱, 井上頼直, 柴田武彦, 倉光成紀, 横山茂之, 河合剛太: "Interaction of tmRNA with a tmRNA-specific binding protein, SmpB, from *Thermus thermophilus*", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 木川隆則: "日本における構造ゲノム科学", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 小森博文, 増井良治, 倉光成紀, 横山茂之, 柴田武彦, 井上頼直, 三木邦夫: "*Thermus thermophilus* 由来 DNA 光回復酵素の結晶構造: Pyrimidine-dimer 認識機構", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 倉光成紀, 三木邦夫, 横山茂之: "モデル生物としての高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8の構造・機能ゲノム科学", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 栗本一基, 深井周也, 濡木理, 武藤裕, 横山茂之: "一本鎖RNAに結合する, エノイル CoA ヒドラターゼのホモログ, ヒト AUHの機能・構造解析", 第24回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月(2001).
- 増井良治, 黒川顕, 松尾洋, 中川紀子, 寺田貴帆, 白水美香子,

- 柴田武彦, 井上頼直, 安永照雄, 三木邦夫, 横山茂之, 倉光成紀: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 蛋白質の比較解析”, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2001).
- 西岡輔, 中川紀子, 増井良治, 井上頼直, 柴田武彦, 横山茂之, 倉光成紀: “高度好熱菌 RecF, RecR タンパク質の機能解析”, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2001).
- 伊藤晋敏, 濡木理, 白水美香子, 横山茂之, 花岡文雄: “真核型 DNA プライマーゼ-基質複合体の X 線結晶構造解析”, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2001).
- 田島夏織, 白水美香子, 石原豪史, 木川隆則, 芳賀達也, 横山茂之: “無細胞タンパク質発現系を用いた膜タンパク質の合成”, 第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 (2001).
- 横山茂之: “Structural genomics of genetic information transfer systems”, 文科省科研費補助金基盤研究 (C) 公開シンポジウム「蛋白質フォールディング研究の現状と将来」, 東京, 12 月 (2001).
- 横山茂之: “核酸結合タンパク質とシグナル伝達タンパク質の構造生物学”, 第 20 回高峰カンファレンス, (三共生命科学振興財団), 東京, 2 月 (2002).
- 増井良治, 黒川顕, 松尾洋, 中川紀子, 寺田貴帆, 白水美香子, 柴田武彦, 井上頼直, 安永照雄, 三木邦夫, 横山茂之, 倉光成紀: “高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 蛋白質の比較解析”, 文科省科研費補助金・特定領域研究「統合ゲノム」第 4 回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, 木更津, 2 月 (2002).
- 横山茂之: “ポストゲノムシーケンスの構造生物学”, 文科省総合がん総括班がん特定領域 (C) 合同公開シンポジウム, 東京, 2 月 (2002).