

柴田遺伝生化学研究室

Cellular & Molecular Biology Laboratory

主任研究員 柴田 武彦
SHIBATA, Takehiko

相同 DNA 組換えは一对の二本鎖 DNA 分子の間で、切断と再結合によって、互いに塩基配列が極めてよく似ている（相同な）部分を交換または置き換えることで起きる遺伝現象である。これは、遺伝、進化を支配する DNA 生物では普遍的な現象である。農業生物等での伝統的な育種・改良の主要な手段である交配育種の原理でもある。相同組換えの人為的高頻度誘導が可能になれば、安全な遺伝子治療など、ゲノム全体を対象とする新技術実現の核となると期待されている。我々は、相同組換えの遺伝・進化での機能、調節の機構の解明を目指し、そこに働く生体分子群とそれらの相互作用の分子構造と機能を基礎に理解を深める研究を進めてきた。その成果として、確率現象といわれてきた相同 DNA 組換えに働く生体プログラムによる緻密な調節分子機構を明らかにしてきた。さらに、その分子機構の理解から「相同組換えが DNA 固有の機能である」という仮説を導いた他、ミトコンドリア DNA の相同組換え機能の解析から、相同 DNA 組換えの要に働く DNA 反応である相同 DNA 対合の意外な機能を明らかにした。相同 DNA 対合とは、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA との間で塩基配列が似た部分を探し出し、分子間二本鎖組換え中間体を作る反応である。（本年度終結）

1. 組換え反応の分子機構（美川、伊藤（隆）、井川 *1、柴田、吉益 *2、本多 *3、井上 *4、増田 *4、片岡 *4、関山 *4、神保 *4、山田 *4）

相同的 DNA 組換えに働く反応が多くの酵素反応と異なる点は、反応基質も DNA という高分子であるため反応での空間的制約が大きく、酵素論、生化学、分光法など従来の研究手法での解析が困難で研究の進展を阻んできたことである。本分担課題の目的は相同的 DNA 組換え反応をそこに働くタンパク質や DNA の分子間、分子内の相互作用を基に理解することである。

本年度は研究対象として、相同 DNA 対合反応そのものに働く RecA タンパク質と RecA タンパク質に作用して相同 DNA 対合反応の機能調節に働く RecF, RecO, RecR, SSB タンパク質（すべて好熱性細菌 *Thermus thermophilus* 由来）、また RecA タンパク質とは構造が全く異なるが相同 DNA 対合活性を持つ Mhr1 タンパク質（出芽酵母由来）を取り上げた。研究手段として、X 線結晶解析や NMR 分光法による原子分解能での立体構造解析、生化学的手法や各種分光法による分子間相互作用解析、標的変異法による分子改変効果解析を総合的に用い、以下の成果を得た。(1) RecA タンパク質については、コアダメインの NMR 分光法による構造解析を試み、主鎖アミドプロトンシグナルの帰属を終えた。この NMR シグナルを指標にして、補助因子 ATP の非加水分解アナログである ATP γ S の添加の効果を観察した結果、ATP の結合が RecA タンパク質全体に大きく影響を及ぼすことが明らかになった。(2) RecF, RecO, RecR, SSB タンパク質間の相互作用をゲル電気泳動法により解析した結果、RecF \rightleftharpoons RecR \rightleftharpoons RecO \rightleftharpoons SSB という直接相互作用があることが明らかになった。(3) RecR タンパク質についてはこれまでに得られた NMR シグナルを解析することによりその二次構造を決定した。また、主鎖アミドプロトンシグナルの帰属を用いて RecR タンパク質上の RecO

タンパク質との相互作用部位をアミノ酸残基レベルで決定した。(4) RecO タンパク質についても、主鎖アミドプロトンシグナルの帰属を終えた。さらに、蛍光標識した一本鎖 DNA との結合を蛍光強度の変化を指標に測定した結果、SSB よりも強固に一本鎖 DNA と結合することが明らかになった。また、SSB が RecA の一本鎖 DNA 依存性の ATP 加水分解活性を阻害する条件において、RecO は逆にその活性を促進することを見いだした。これらの結果から、一本鎖 DNA への結合力の違いで RecO が SSB を置き換え、RecA タンパク質の一本鎖 DNA へのローディングを促進する機構が示唆された。(5) 酵母ミトコンドリアの Mhr1 タンパク質はアミノ酸配列も立体構造も RecA ファミリーとは異なり、また ATP を必要とせずに相同 DNA 対合反応を促進する。このタンパク質が行う相同的対合が RecA ファミリーによる反応と同じかどうかを検証するために、Mhr1 タンパク質に結合した一本鎖 DNA の立体構造を NMR 分光法で解析した。その結果、Mhr1 タンパク質に結合した一本鎖 DNA は RecA タンパク質と結合したときと同じ特殊構造（DNA のデオキシリボース環の 2CH₂ と隣接したヌクレオチド残基の塩基との間の疎水的相互作用で安定化される伸張構造）をとることを示す結果を得た。このことから、この特殊構造は相同 DNA 対合を行うタンパク質に共通の機構であり、相同的対合は本質的に DNA 自身の性質で起こる反応であるという我々の仮説を裏付けることができた。

2. 生体高分子間相互作用解析のための NMR 分光法（伊藤（隆）、柴田、伊藤（か）*3）

生体高分子間の相互作用の系について NMR 解析を行う場合には、対象となる系の分子量の増大による測定感度の著しい低下、および NMR シグナルのオーバーラップという 2 つの大きな問題が生じる。この問題を解決し、「分子量

の壁」を押し上げる試みとして、重水素化をはじめとした安定同位体標識法の開発と、TROSY法を用いた測定手法の改良が行われており、高分子量タンパク質やタンパク質複合体に対してもNMRによる詳細な解析が可能になってきている。

我々はこれまで、特に高分子量複合体試料の迅速な高次構造解析のための選択的プロトン標識に注目し方法論的な開発研究を行ってきた。また、高分子量タンパク質に最適化したNMR測定法の開発も行ってきた。

本年度はこれまでの方法論的研究を踏まえて、ヒトミトコンドリアに存在するABC輸送体の1つであるABC6タンパク質(93kDa)のC末端可溶性領域(ABC6-C, 285アミノ酸残基, 31.5kDa)について実際に試料調製およびNMR解析を行った。ヒトABC6タンパク質は、当研究室の共同研究において、酵母ATM1ホモログとして同定された。ATM1は鉄の恒常性維持を行うことでミトコンドリア機能の維持に寄与していることが示唆されている。ABC6は現在のところ機能未知であるが、ATM1同様にミトコンドリアの鉄の恒常性維持に寄与していることが想像され、ミトコンドリア病の原因遺伝子の可能性もある。

$^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 均一標識ABC6-C試料を調製し、ヌクレオチド非結合型およびADP結合型の双方について、主鎖NMRシグナルの帰属のためにTROSYタイプの3重共鳴NMR測定を行った。解析の結果、ヌクレオチド非結合型においては、ヌクレオチド結合付近を中心に、局所的な構造多形性に伴う化学交換によると推定されるNMRシグナルの著しいブロードニングが観測された。一方でADP結合型では、前述のヌクレオチド結合領域においてNMRシグナルのブロードニングの解消が見られたのに加え、膜貫通ドメインとの相互作用が示唆されているドメインに新たなシグナルのブロードニングが観測された。この結果はヌクレオチド結合に伴うABC6-Cの構造変化および他ドメインとの情報伝達と密接な関連があると推察される。

3. ミトコンドリアゲノムの維持と遺伝的組換え依存機構(凌, 柴田, 堀^{*4}, 和田^{*4})

パン酵母のMHR1遺伝子の1塩基置換変異であるmhr1-1は、我々が世界に先駆けて分離したミトコンドリアDNAの相同組換え欠損変異である。このmhr1-1は、さらにミトコンドリアでのDNA修復を損なうばかりではなく、ミトコンドリアDNAの子孫細胞への分配にも欠損を示す一方、ホモプラスミー成立過程にも欠損を示すことを見いだした。ホモプラスミーとは、生物界で広く見られる細胞レベル、個体レベルでミトコンドリアDNAなどオルガネラゲノムDNAのコピーを均一にし、それを維持する細胞質遺伝で普遍的現象である。これまでに、Mhr1タンパク質が、相同的DNA対合を行う活性を持つことを見いだし、その活性が、ミトコンドリアDNAの相同的組換え、修復に働くだけでなく、ローリングサークル型DNA複製を誘導に働くこと、ローリングサークル型DNA複製でできる直列多量体(コンカテマー)が、分配の必須な中間体であることを示した。この機構は、1つのDNAを鋳型とする多数のコピーの子孫DNAを選択的に子孫へ分配する結果となるために、ホモプラスミー成立を説明できる。本年度はmtDNAの複製開始点(rep/ori)と呼ばれる塩基配列を持

つmtDNA断片のみを持つ呼吸欠損(HSr⁻)半数体細胞を正常な半数体と接合させると、その子孫がほぼ全てmtDNA断片のみを持つ呼吸欠損となる現象「超抑制現象」に注目してmtDNAを解析した結果、複製開始点特異的なDNA二本鎖切断でローリングサークル型DNA複製が開始することを示す証拠と、そのDNA二本鎖切断に働く遺伝子を明らかにした。その結果、遺伝的な多様性を引き起こす相同DNA組換えと逆に遺伝的均一化であるホモプラスミー化をもたらすローリングサークル型DNA複製とが、DNA二本鎖切断とそれに続く相同DNA対合というDNA反応段階を共有しているという意外な事実が明らかになった。さらに、相同DNA対合後、組換えへ進むかローリングサークル型DNA複製へ進むかは、相同DNA対合を触媒するタンパク質の特性によることが示唆された。

4. アポトーシスの分子生物学(森島, 中西^{*3}, 柴田)

アポトーシス(細胞死)は正常な発生やホメオスタシスの維持などに必要で、その異常はがんをはじめとする数多くの病気の原因となる。この重要な現象の実行において中心的な役割を果たす一群のプロテアーゼ、カスパーゼ族についてその機能と制御機構を明らかにすることを研究目的としている。特に発生におけるアポトーシス、種々のストレスによって起きる病理学的アポトーシスなど生体内での細胞運命決定に関わるカスパーゼの機能と制御に注目している。

異常な立体構造を持つタンパク質が小胞体内に蓄積する状態を小胞体ストレスと呼び、このストレスの強度が強い場合や長時間継続する場合にはカスパーゼファミリーが活性化してアポトーシスを引き起こすことが分かってきた。カスパーゼ12は小胞体ストレスによって特異的に起動するイニシエーターカスパーゼであり、ミトコンドリアの関与無しにアポトーシスを引き起こすことを昨年度までに明らかにした。本年度は小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおけるアポトーシス調節タンパク質の役割について新たな知見を得た。アポトーシス促進タンパク質Bimは増殖中の細胞では細胞質ダイニンに結合して機能を発揮しないことが知られている。ツニカマイシンなどの薬剤を細胞に与えて人為的に小胞体ストレスを発生させたところ、約20時間後に小胞体へのBimの蓄積が見られた。この時間帯はカスパーゼ12が小胞体膜上で活性化し始める時間帯と一致していた。小胞体移行シグナルを付加したBimを過剰発現させるとアポトーシスが引き起こされた。カスパーゼ12の活性化を抑制するタンパク質を合わせて発現させるとアポトーシスは抑制されることから、Bimはカスパーゼ12経路の活性化を通してアポトーシスを誘導していることが示唆された。昨年度までの知見と合わせて、カスパーゼ12の調節機構、機能発現機構の大枠が見えてきた。

^{*1} 嘱託職員, ^{*2} 基礎科学特別研究員, ^{*3} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*4} 研修生

Homologous DNA recombination is the rearrangement of genetic information through the breakage-and-rejoining of homologous DNA molecules. A goal of our research is to

understand the mechanisms and principles working on or governing eukaryotic homologous recombination and their biological consequence. The development of new genome-wide technology is within our long-term scope. Our current studies are focused on the initiation steps of homologous recombination in eukaryotes, and the biological roles of recombination. For this purpose, using various eukaryotic systems from yeasts to human beings and bacterial proteins, we are analyzing molecular structures and interactions of proteins and DNA involved in homologous recombination at the atomic resolution, and biological consequences of the mutations in the genes encoding such proteins. Our results suggest that homologous recombination is an intrinsic molecular feature of DNA and a mechanism to adapt organisms to nutritional stress by increasing genetic variations, and that the early stages of homologous recombination work as a system to segregate mitochondrial homoplasmic cells (all copies of mtDNA in a cell have the same sequence) from heteroplasmic cells during vegetative growth of yeast cells.

1. Molecular biology of the initiation of eukaryotic homologous recombination

In these studies, we analyze the molecular structures and intermolecular interactions involved in homologous recombination at an atomic resolution, with the use of NMR, X-ray crystallography and other spectroscopic means.

RecA protein and its eukaryotic homologue, Rad51 protein, must both cooperatively interact with other proteins to form heteroduplex joints for homologous recombination. In 2004 to 2005, we studied the RecA, RecF, RecO and RecR, SSB proteins of *Thermus thermophilus*. The RecF, RecO and RecR proteins cooperate with the RecA protein in the RecF-pathway of homologous recombination in eubacteria, and we chose this multiprotein system as a general model of the machinery for heteroduplex joint formation in both prokaryotes and eukaryotes. We identified the interactions of RecF, RecR, RecO and SSB proteins as $\text{RecF} \Leftrightarrow \text{RecR} \Leftrightarrow \text{RecO} \Leftrightarrow \text{SSB}$. We finished the assignments of the NMR HSQC signals to the amino acid-sequences of RecA-core domain, RecO and RecR protein, and determined the interaction sites of RecR protein with RecO protein at the amino acid-sequence level. We are analyzing the interaction sites of RecA-core domain, RecO protein in addition to RecR protein with DNA, their partner proteins and nucleotide cofactors.

On the other hand, we previously showed that the binding to the RecA/Rad51 protein induced an extended DNA structure, which is stabilized by the stacking interaction between the methylene moiety at the 2' position of a deoxyribose and the base of the neighboring nucleotide residue on the 3' side. Based on this finding, we proposed that homologous pairing is an intrinsic function of DNA and not a specific function of a protein. Inspired by this assumption, we demonstrated that various structurally unrelated proteins catalyzed homologous pairing in the absence of ATP, and the Mhr1 protein is one such example. We analyzed the structure of oligo-single-stranded DNA bound to Mhr1 protein by TR-NOE, an NMR technique. In this study, we found that the single-stranded DNA bound to the Mhr1 protein induced a unique structure very similar to that of the single-stranded DNA bound to the RecA/Rad51 protein. This indicates that the mechanism of homologous pairing by Mhr1 protein and that by RecA/Rad51 proteins are the same.

2. NMR techniques for the analysis of biomacromolecules

molecules

Recent developments on protein stable isotope labelling and TROSY-based NMR measurements were applied to the C-terminal soluble domain of human mitochondrial ABCB6, ABCB6-C (285 a. a., 31.5 kDa). ABCB6 is a half-type ATP-binding cassette (ABC) transporter protein. Like its *Saccharomyces cervisiae* homologue, Atm1p, ABCB6 is proposed to be responsible for transporting a precursor of the iron-sulfur (Fe/S) cluster from mitochondria to cytosol.

We performed TROSY-based triple-resonance experiments on uniformly $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled ABCB6-C both in the nucleotide-free and ADP-bound states in order to obtain backbone resonance assignments. Results on the nucleotide-free form of ABCB6-C showed that backbone NMR resonances were not detected for around 20% of non-proline residues, which are mainly distributed around the nucleotide binding pocket, suggesting conformational multiplicity of this region. In contrast, for the ADP-bound state, backbone resonances were assignable around the nucleotide-binding pocket, suggesting that ADP-binding immobilised the local conformation. In addition, extra unobservable residues were found to be located around the helical domain, which has been proposed to be responsible for the interaction with the trans-membrane domain. This proposes a signalling mechanism that connects nucleotide-binding events and the conformational changes in the trans-membrane domain.

3. Biological functions of mitochondrial DNA recombination

The functions of DNA recombination in mitochondria were ignored by most scientists, probably because of the absence of observed mitochondrial DNA (mtDNA) recombination in mammals and the absence of isolated mtDNA recombination-defective mutants. Some years ago, we isolated the first example of a mutant defective in mtDNA recombination from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We found that the mutation, *mhr1-1*, is a single base-pair substitution of a nuclear gene, *MHR1*, and simultaneously causes deficiencies in mtDNA-repair, the partitioning of replicated mtDNA into daughter cells and the segregation of homoplasmic cells (in which all copies of mtDNA have the same sequence) from heteroplasmic ones during vegetative growth. The vegetative segregation of homoplasmic cells is a general genetic behavior of organelle genomes, in contrast to meiotic segregation of alleles in Mendelian inheritance. Molecular biological studies on *MHR1* revealed its biochemical function (catalyzing homologous DNA pairing) and previously unknown roles in mtDNA replication and partitioning and in the establishment of homoplasmy; *i.e.*, concatemers formed by Mhr1 protein-initiated rolling circle replication are the essential intermediates for the mtDNA partitioning into daughter cells, and upon the transmission into daughter cells, the concatemers are processed into circular monomers. This mechanism results in the selective transmission of a number of clonal copies of a single template mtDNA, and thus, explains the mechanism of the vegetative segregation of homoplasmic cells. Actually, the defective mutation, *mhr1-1*, and the overexpression of normal Mhr1 protein result in the delay and the acceleration of the vegetative segregation, respectively.

4. Molecular biology of apoptosis

Endoplasmic reticulum (ER) stress activates caspase-12, triggering the ER stress-specific cascade for imple-

mentation of apoptosis. Fractionation of myoblast cells revealed that ER stress led to translocation of Bim, a proapoptotic member of the Bcl-2 family, from a dynein-rich compartment to the ER. Although the toxic effect of Bim had been previously observed only at the mitochondrial outer membrane, overexpression of a Bim derivative, Bim (ER), targeted at the surface of the ER led to apoptosis. A transfectant overexpressing the caspase-12 suppressor protein was resistant to Bim (ER), suggesting that the toxic effect of Bim on the ER is dependent on activation of caspase-12. These results suggest that translocation of Bim to the ER in response to ER stress is an important step towards the activation of caspase-12.

Staff

Head

Dr. Takehiko SHIBATA

Members

Dr. Kunihiro OHTA

Dr. Nobuhiro MORISHIMA

Dr. Feng LING

Dr. Yutaka ITO

Dr. Makoto KIMURA

Dr. Tsutomu MIKAWA

Dr. Masatoshi YOSHIMASU*¹

Dr. Haruhiko YASHIRO*²

Ms. Kyoko TSUCHIYA*³

Dr. Shukuko IKAWA*⁴

*¹Special Postdoctoral Researcher

*²Contract Researcher

*³Contract Technical Assistant

*⁴Temporary Employee

Visiting Members

Mr. Masayoshi HONDA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Kaori ITO (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Dr. Katsumi KAWASAKI (Setsunan Univ.)

Dr. Ryoko KOBAYASHI

Dr. Hitoshi KURUMIZAKA (Waseda Univ.)

Ms. Keiko NAKANISHI (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

Mr. Minoru NAKAYAMA (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

Trainees

Ms. Akiko HORI (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

Mr. Jin INOUE (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Koutaro JINBO (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Yoshitomo KATAOKA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Tokiha MASUDA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kouichi SEKIYAMA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Masanori WADA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kentaro YAMADA (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Ayako YOSHITANI (Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Takahashi-Ando N., Ohsato S., Shibata T., Hamamoto H., Yamaguchi I., and Kimura M.: "Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*", *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3239–3245 (2004). *

Nakayama M., Kawasaki K., Matsumoto K., and Shibata T.: "The possible roles of the DNA helicase and C-terminal domains in RECQ5/QE: complementation study in yeast", *DNA Repair* **3**, 369–378 (2004). *

Yamada T., Mizuno K., Hirota K., Kon N., Wahls W. P., Hartsuiker E., Murofushi H., Shibata T., and Ohta K.: "Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot", *EMBO J.* **23**, 1792–1803 (2004). *

Takizawa Y., Kinebuchi T., Kagawa W., Yokoyama S., Shibata T., and Kurumizaka H.: "Mutational analyses of the human Rad51-Tyr315 residue, a site for phosphorylation in leukaemia cells", *Genes Cells* **9**, 781–790 (2004). *

Enomoto R., Kinebuchi T., Sato M., Yagi H., Shibata T., Kurumizaka H., and Yokoyama S.: "Positive role of the mammalian TBPIP/HOP2 protein in DMC1-mediated homologous pairing", *J. Biol. Chem.* **279**, 35263–35272 (2004). *

Morishima N., Nakanishi K., Tsuchiya K., Shibata T., and Seiwa E.: "Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis", *J. Biol. Chem.* **279**, 50375–50381 (2004). *

Honda M., Rajesh S., Nietlispach D., Mikawa T., Shibata T., and Ito Y.: "Backbone ¹H, ¹³C, and ¹⁵N assignments of a 42kDa RecR homodimer", *J. Biomol. NMR* **28**, 199–200 (2004). *

Kinebuchi T., Kagawa W., Enomoto R., Tanaka K., Miyagawa K., Shibata T., Kurumizaka H., and Yokoyama S.: "Structural basis for octameric ring formation and DNA interaction of the human homologous-pairing protein Dmcl1", *Mol. Cell* **14**, 363–374 (2004). *

Yokoyama H., Sarai N., Kagawa W., Enomoto R., Shibata

T., Kurumizaka H., and Yokoyama S.: “Preferential binding to branched DNA strands and strand-annealing activity of the human Rad51B, Rad51C, Rad51D and Xrcc2 protein complex”, *Nucleic Acids Res.* **32**, 2556–2565 (2004). *

Igawa T., Ochiai-Fukuda T., Takahashi-Ando N., Ohsato S., Shibata T., Yamaguchi I., and Kimura M.: “New TAXI-type xylanase inhibitor genes are inducible by pathogens and wounding in hexaploid wheat”, *Plant Cell Physiol.* **45**, 1347–1360 (2004). *

Tokai T., Fujimura M., Inoue H., Aoki T., Ohta K., Shibata T., Yamaguchi I., and Kimura M.: “Concordant evolution of trichothecene 3-*O*-acetyltransferase and an rDNA species phylogeny of trichothecene-producing and non-producing fusaria and other ascomycetous fungi”, *Microbiology* **151**, 509–519 (2005). *

(総説)

木村真, 安藤直子, 井川智子, 東海武史, 山口勇: “バイオテクノロジーとムギ類赤かび病の制御”, *植物防疫* **58**, 157–161 (2004).

凌楓: “ミトコンドリア DNA 遺伝の基本的分子機構”, *生化学* **76**, 1417–1430 (2004).

(その他)

井藤賀操, 木村真, 山口勇, 古木達郎: “埼玉県で見つかったイワゼニゴケ”, *蘚苔類研究* **8**, 317–319 (2004).

[単行本・Proc.]

(その他)

Kimura M., Yamamoto M., Furuichi M., Kumasaka T., and Yamaguchi I.: “An unexpected gift from fungicide metabolism studies: blasticidin S deaminase (BSD) from *Aspergillus terreus*”, *Molecular Anatomy of Cellular Systems (Progress in Biotechnology, Vol. 22)*, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 55–60 (2002).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Rajesh S., Ito K., Nietlispach D., Shirakawa M., Heddle J., Tame J., and Ito Y.: “NMR studies on the 56kDa *Escherichia coli* nickel-binding protein NikA”, 2nd Trilateral Symp. on Structural Biology, (NMR Association for Structural Biology in Yokohama), Yokohama, Mar. (2004).

Rajesh S., Nietlispach D., Laue E. D., Shibata T., and Ito Y.: “Selective protonation of aromatic rings of Phe, Tyr and Trp using shikimic acid, for the improved global fold determination of larger proteins”, 2nd Trilateral Symp. on Structural Biology, (NMR Association for Structural Biology in Yokohama), Yokohama, Mar. (2004).

Shibata T., Ling F., Mikawa T., Hori A., Masuda T., and Ito Y.: “NMR structure of RecA/Rad51-extended DNA reveals diverse roles of homologous pairing in genetic inheritance”, 2nd Trilateral Symp. on Structural Biology, (NMR Association for Structural Biology in Yokohama), Yokohama, Mar. (2004).

Kagawa W., Kagawa A., Ikawa S., Shibata T., Kurumizaka

H., and Yokoyama S.: “Crystal structure of the homologous-pairing domain of the human Rad52 protein”, 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).

Ito Y., Rajesh S., Heddle J., Ito K., Nietlispach D., Shirakawa M., and Tame J.: “NMR studies on the 56kDa *Escherichia coli* nickel-binding protein NikA”, 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).

Mikawa T., Ito Y., and Shibata T.: “Role of N-terminal domain of RecA for its filament formation on ssDNA”, 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).

Kinebuchi T., Kagawa W., Enomoto R., Shibata T., Kurumizaka H., and Yokoyama S.: “Structural basis for homologous pairing by the human Dmc1 octameric ring”, 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).

Yamada T., Mizuno K., Hirota K., Wahls W. P., Hartsuiker E., Shibata T., and Ohta K.: “Chromatin remodeling in fission yeast meiotic recombination hotspots”, 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop: The Cell Cycle, Nara, Apr. (2004).

Ohsato S., Inaba M., Ochiai-Fukuda T., Fukuda T., Kadokura K., Yamaguchi I., and Kimura M.: “Expression analyses of heavy metal transporter genes in rice”, *Crop Functional Genomics 2004*, Jeju, Korea, Apr. (2004).

Ohta K., Kugou K., Sasanuma H., Shibata T., Shirahige K., Mori S., and Katou Y.: “Dynamic relocation of Spo11 and Mre11 on meiotic yeast chromosomes”, *EMBO Workshop on Recombination Mechanisms*, Seillac, France, May (2004).

Ling F., Hori A., and Shibata T.: “Rep/ori-specific double-stranded breakage for the initiation of mitochondrial DNA replication and recombination”, *EMBO Workshop on Recombination Mechanisms*, Seillac, France, May (2004).

Ling F., Hori A., and Shibata T.: “Double-stranded breakage- and homologous pairing-dependent maintenance and disruption of the integrity of mitochondrial DNA”, 2nd US-Japan DNA Repair Meet., (The National Institute of Environmental Health Sciences and others), Honolulu, USA, June (2004).

Itouga M., Kimura M., Ono Y., and Yamaguchi I.: “Tolerance of the moss *Physcomitrella patens* subsp. *patens* (Funariales) to inorganic arsenate, As (V)”, 7th Ann. Moss Int. Conf. (Moss 2004), Freiburg, Germany, Sept. (2004).

Seo H., Masuoka M., Takeda S., Murofushi H., Shibata T., and Ohta K.: “ADLib system: Rapid and flexible gen-

- eration of specific antibodies by enhancing somatic recombination with a histone deacetylase inhibitor”, 2nd COE 21 Int. Symp. on Human-Friendly Materials Based on Chemistry: Better Living Through Innovative Biomaterials, Tokyo, Nov. (2004).
- Igawa T., Ochiai-Fukuda T., Takahashi-Ando N., Yamaguchi I., and Kimura M.: “Adaptive evolution and pathogen responsive expression of new TAXI-type xylanase inhibitor genes in wheat (*Triticum aestivum* L.)”, 2nd Int. Symp. on Fusarium Head Blight, Orlando, USA, Dec. (2004).
- Igawa T., Takahashi-Ando N., Nishiyama A., Fukuda T., Kadokura K., Yamaguchi I., and Kimura M.: “Detoxification of zearalenone by genetically modified organisms”, 2nd Int. Symp. on Fusarium Head Blight, Orlando, USA, Dec. (2004).
- Mikawa T., Shibata T., and Ito Y.: “Analysis of DNA and ATP binding sites in the central domain of RecA using multidimensional NMR spectroscopy”, 21st Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (21st ICMRBS), Hyderabad, India, Jan. (2005).
- Yoshimasu M., Mikawa T., Hayashi N., Shibata T., and Ito Y.: “In-Cell NMR studies of various proteins expressed in *E. coli*”, 21st Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (21st ICMRBS), Hyderabad, India, Jan. (2005).
- Honda M., Inoue J., Yoshimasu M., Mikawa T., Shibata T., and Ito Y.: “Molecular mechanism of RecR-DNA interactions”, 21st Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (21st ICMRBS), Hyderabad, India, Jan. (2005).
- Inoue J., Honda M., Shibata T., Ito Y., and Mikawa T.: “Structural and functional analyses of *Thermus thermophilus* RecO”, 21st Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (21st ICMRBS), Hyderabad, India, Jan. (2005).
- Masuda T., Mikawa T., Yoshimasu M., Ling F., Shibata T., and Ito Y.: “TRNOE analysis of the single-stranded DNA structure induced by binding of the yeast mitochondrial DNA recombination protein Mhr1p”, 21st Int. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems (21st ICMRBS), Hyderabad, India, Jan. (2005).
- (国内会議)
- 井上仁, 本多賢吉, 伊藤隆, 美川務, 柴田武彦: “NMR を用いた高度好熱菌 RecO の構造・機能解析”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第3回連携研究会, (理研), 播磨, 7-8月 (2004).
- 本多賢吉, 井上仁, 吉益雅俊, 美川務, 伊藤隆, 柴田武彦: “NMR を用いた高度好熱菌 RecR タンパク質の機能解析”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第3回連携研究会, (理研), 播磨, 7-8月 (2004).
- 神保公大郎, 伊藤隆, 美川務, 柴田武彦: “高度好熱菌 RecX の構造機能解析”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第3回連携研究会, (理研), 播磨, 7-8月 (2004).
- 井川智子, 安藤直子, 西山亜里砂, 福田徹子, 門倉香, 山口勇, 木村真: “*zhd101* 遺伝子の導入による穀類のゼアラレノン汚染低減化”, 第22回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 秋田, 8月 (2004).
- 井藤賀操, 木村真, 小野芳朗, 山口勇: “複合処理再生資源化プロジェクトのコケ植物を利用したファイトレメディエーション構想”, 日本蘚苔類学会第33回帯広大会, 帯広, 8月 (2004).
- 笹沼博之, 久郷和人, 柴田武彦, 太田邦史: “減数分裂期 DNA 二本鎖切断形成機構の解析”, 酵母遺伝学フォーラム第37回研究報告会, 松江, 9月 (2004).
- 久郷和人, 森沙織, 柴田武彦, 白髭克彦, 太田邦史: “出芽酵母 Mre11, Spo11 の減数分裂期における染色体上の結合分布の解析”, 酵母遺伝学フォーラム第37回研究報告会, 松江, 9月 (2004).
- 太田邦史, 廣田耕志, 柴田武彦: “Chromatin regulation by CRE-related sequences in transcriptional and recombinational activation during meiosis and stress response”, 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月 (2004).
- 増田ときは, 美川務, 吉益雅俊, 伊藤隆, 凌楓, 柴田武彦: “Functional analysis of Mhr1 protein involved in mitochondrial DNA homologous recombination in yeast”, 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月 (2004).
- 伊藤かおり, 千本木裕, 柴田武彦, 伊藤隆: “NMR analysis of human mitochondrial ABC transporter, ABCB6”, 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月 (2004).
- 井上仁, 本多賢吉, 伊藤隆, 美川務, 柴田武彦: “Structural and functional analyses of *Thermus thermophilus* RecO”, 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月 (2004).
- 本多賢吉, 井上仁, 吉益雅俊, 美川務, 伊藤隆, 柴田武彦: “The NMR studies of RecR-DNA interactions”, 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月 (2004).
- 吉益雅俊, 美川務, 片岡義朝, 林宣宏, 柴田武彦, 伊藤隆: “In-Cell NMR を用いた細胞内蛋白質動態の直接解析法”, 第43回 NMR 討論会, (日本核磁気共鳴学会), 東京, 11月 (2004).
- 井上仁, 本多賢吉, 伊藤隆, 美川務, 柴田武彦: “NMR による高度好熱菌 RecO の構造・機能解析”, 第43回 NMR 討論会, (日本核磁気共鳴学会), 東京, 11月 (2004).
- 本多賢吉, 吉益雅俊, 井上仁, 美川務, 伊藤隆, 柴田武彦: “NMR を用いた RecR と DNA 間の相互作用解析”, 第43回 NMR 討論会, (日本核磁気共鳴学会), 東京, 11月 (2004).
- 伊藤かおり, 千本木裕, 柴田武彦, 伊藤隆: “ヒト・ミトコンドリア ABC トランスポーター ABCB6 の NMR 解析”, 第43回 NMR 討論会, (日本核磁気共鳴学会), 東京, 11月 (2004).
- 増田ときは, 美川務, 吉益雅俊, 凌楓, 柴田武彦, 伊藤隆: “酵母ミトコンドリア DNA 組換え蛋白質 Mhr1 に結合した単鎖オリゴ DNA の立体構造解析”, 第43回 NMR 討論会, (日本核磁気共鳴学会), 東京, 11月 (2004).
- 森島信裕, 中西慶子, 土屋京子, 柴田武彦, 清和恵美子: “Bim の移行による小胞体ストレス誘導性アポトーシスの制御”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2004).
- 川崎勝己, 中山実, 柴田武彦, 伊藤文昭: “DNA 損傷への RECQ5/QE ヘリカーゼの役割”, 第27回日本分子生物学

- 会年会, 神戸, 12月(2004).
- 中山実, 菅田浩司, 川崎勝己, 松本幸次, 伊藤文昭, 柴田武彦: “Dm.RECQ5/QE 強制発現による複眼形成異常”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 井上仁, 本多賢吉, 美川務, 伊藤隆, 柴田武彦: “Functional analyses of *Thermus thermophilus* RecO”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 吉益雅俊, 美川務, 林宜宏, 柴田武彦, 伊藤隆: “In-Cell NMR法を用いた細胞内における蛋白質間相互作用の直接観測”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 美川務, 伊藤隆, 柴田武彦: “RecA/Rad51 ファミリー蛋白質のコア領域の構造機能解析”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 滝沢由政, 柴田武彦, 胡桃坂仁志: “ヒト Rad51N 末端ドメイン結合タンパク質 Sip1 の機能解析”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 凌楓, 堀晶子, 柴田武彦: “ミトコンドリア DNA の複製と相同的組み換えの開始誘導機構”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 中西慶子, 柴田武彦, 森島信裕: “筋分化における生理的小胞体ストレス依存性アポトーシスの意義”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 笹沼博之, 久郷和人, 柴田武彦, 太田邦史: “減数分裂期 DNA 二本鎖切断形成機構の解析”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 升岡美恵子, 瀬尾秀宗, 武田俊一, 室伏擴, 柴田武彦, 太田邦史: “抗体遺伝子座での相同組換え制御におけるクロマチン構造の役割”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 瀬尾秀宗, 升岡美恵子, 武田俊一, 室伏擴, 柴田武彦, 太田邦史: “抗体遺伝子座における相同組換えの活性化とその応用”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 増田ときは, 吉益雅俊, 美川務, 伊藤隆, 凌楓, 柴田武彦: “酵母ミトコンドリア DNA の相同組換え・複製に働く Mhr1 蛋白質の機能解析”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 神保公太郎, 伊藤隆, 美川務, 柴田武彦: “高度好熱菌 RecX の構造機能解析”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 久郷和人, 森沙織, 笹沼博之, 白髭克彦, 柴田武彦, 太田邦史: “出芽酵母 Mre11, Spo11 の減数分裂期染色体上でのダイナミックな再配置とコヒーシオン部位との関係”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 太田邦史, 柴田武彦: “組換えの制御: はじめに”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 堀晶子, 凌楓, 柴田武彦: “相同 DNA 対合活性性によって開始されるミトコンドリア DNA のローリングサイクル複製に働く Din7 蛋白質の同定”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 小林清子, 廣田耕志, 細野美子, 瀬尾秀宗, 柴田武彦, 太田邦史: “耐熱性制限酵素の誘導活性化による体細胞相同組換えの促進”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 和田昌憲, 凌楓, 柴田武彦: “大腸菌を用いた相同 DNA 対合蛋白質群を単離するシステムの開発”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 廣田耕志, Hoffman C. S., 柴田武彦, 太田邦史: “分裂酵母転写抑制因子 Tup11, Tup12 はクロマチン構造変化を制御する”, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月(2004).
- 凌楓, 堀晶子, 柴田武彦: “ミトコンドリアで見つかった相同 DNA 組換えの新しい機能”, 組換えワークショップ, 淡路島, 12月(2004).
- 笹沼博之, 久郷和人, 柴田武彦, 太田邦史: “減数分裂期 DNA 二本鎖切断に関する因子の解析”, 組換えワークショップ, 淡路島, 12月(2004).
- 瀬尾秀宗, 升岡美恵子, 武田俊一, 室伏擴, 柴田武彦, 太田邦史: “抗体遺伝子座における相同組換え活性化による新規抗体作製技術の開発”, 組換えワークショップ, 淡路島, 12月(2004).
- 久郷和人, 森沙織, 笹沼博之, 白髭克彦, 柴田武彦, 太田邦史: “出芽酵母 Mre11, Spo11, Rec8 の減数分裂期染色体上でのダイナミックな結合分布変化の解析”, 組換えワークショップ, 淡路島, 12月(2004).
- 柴田武彦, 増田ときは, 凌楓, 美川務, 伊藤隆: “ミトコンドリア相同 DNA 対合蛋白質の特異な機能”, 第4回日本ミトコンドリア研究会年会, 東京, 12月(2004).
- 凌楓, 堀晶子, 柴田武彦: “複製開始点をもつ欠失変異ミトコンドリア DNA の優性遺伝から見たヘテロプラスミー化機構”, 第4回日本ミトコンドリア研究会年会, 東京, 12月(2004).
- 神保公太郎, 伊藤隆, 美川務, 柴田武彦: “高度好熱菌 RecX の構造機能解析”, Workshop on DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2005, 京都, 1月(2005).
- 井上仁, 本多賢吉, 伊藤隆, 美川務, 柴田武彦: “相同組換えによる損傷 DNA の修復機構”, Workshop on DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2005, 京都, 1月(2005).
- 凌楓, 堀晶子, 柴田武彦: “ミトコンドリア DNA の均一性と不均一性化に働く相同組換え開始機構”, 第22回染色体ワークショップ, (文科省科学研究費補助金特定領域研究「ゲノムホメオスタシスの分子機構」, 「細胞核ダイナミクス」), 仙台, 1月(2005).
- 笹沼博之, 久郷和人, 柴田武彦, 太田邦史: “減数分裂期 DNA 二本鎖切断機構の解析”, 第22回染色体ワークショップ, (文科省科学研究費補助金特定領域研究「ゲノムホメオスタシスの分子機構」, 「細胞核ダイナミクス」), 仙台, 1月(2005).
- 久郷和人, 森沙織, 笹沼博之, 白髭克彦, 柴田武彦, 太田邦史: “減数分裂初期における出芽酵母染色体上の Mre11, Spo11, Rec8 の動態”, 第22回染色体ワークショップ, (文科省科学研究費補助金特定領域研究「ゲノムホメオスタシスの分子機構」, 「細胞核ダイナミクス」), 仙台, 1月(2005).
- 瀬尾秀宗, 升岡美恵子, 武田俊一, 室伏擴, 柴田武彦, 太田邦史: “抗体遺伝子座における相同組換え活性化とその応用”, 第22回染色体ワークショップ, (文科省科学研究費補助金特定領域研究「ゲノムホメオスタシスの分子機構」, 「細胞核ダイナミクス」), 仙台, 1月(2005).
- 佐藤真之, 東海武史, 藤村真, 井上弘一, 工藤俊章, 山口勇, 木村真: “デオキシニバレノールの生合成: トリコテセン骨格への修飾基の導入について”, 日本農芸化学会 2005

年度大会, 札幌, 3月(2005).
東海武史, 佐藤真之, 越野広雪, 川崎常臣, 藤村真, 井上弘一, 渡邊秀典, 北原武, 工藤俊章, 山口勇, 木村真: “ゲノムプロジェクト情報を利用した新規トリコテセン生合成遺伝子の探索と解析”, 日本農芸化学会 2005 年度大会, 札幌, 3月(2005).
稲葉真貴子, 安藤直子, 井川智子, 宇佐美論, 工藤俊章, 山口勇, 木村真: “Xylanase 阻害タンパク (Taxi-III/-IV, XIC) の機能解析”, 日本農芸化学会 2005 年度大会, 札幌, 3月(2005).
木村真: “重要穀類に感染する多犯性病原糸状菌に関する研究”, 日本農芸化学会 2005 年度大会, 札幌, 3月(2005).

塩野あずさ, 橋本千穂, 落合則幸, 坂野真平, 木村真, 山口勇, 藤村真: “アカパンカビの cAMP シグナル伝達系の変異とジカルボキシイミド感受性”, 日本農薬学会第 30 回記念大会, 東京, 3月(2005).
野口莉枝子, 坂野真平, 木村真, 山口勇, 藤村真: “アカパンカビの fludioxonil により誘導される遺伝子の同定と各種ストレスとの関係”, 日本農薬学会第 30 回記念大会, 東京, 3月(2005).
大里修一, 岩村辰則, 井藤賀操, 米山勝美, 小野芳朗, 山口勇, 木村真: “イネの CDF 金属トランスポーターの機能解析”, 日本農薬学会第 30 回記念大会, 東京, 3月(2005).