

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		YOKOYAMA SHIGEYUKI					
①研究代表者氏名		横山 茂之		②所属研究機関・部局・職 東京大学・大学院理学系研究科・教授			
③研究課題名	和文	遺伝情報系と細胞シグナル系における超分子複合体の立体構造と機能					
	英文	Structural and functional studies on biological macromolecules involved in the flow of genetic information and the cellular signal transduction.					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		26,900	18,400	16,300	12,700	11,400	85,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
横山 茂之	東京大学・大学院理学系研究科・教授	構造生物学		研究全体の進行、超分子複合体の調製、構造・機能相関の解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>近年の構造生物学の進歩は目覚ましく、生命現象を支える巨大な超分子複合体の構造解析も報告されるようになった。例えば、核酸を含む超分子複合体のリボソーム、RNAポリメラーゼ、ヌクレオソームなど、膜タンパク質複合体のポンプ、チャネル、トランスポーター、レセプターなどである。これらの比較的強固な超分子複合体に加えて、多くのマルチドメインタンパク質の様々な組み合わせによる動的な超分子複合体にも研究が展開している。本研究では、まずタンパク質・タンパク質およびタンパク質・核酸の相互作用解析に基づいて、より高次の超分子複合体の形成を明らかにする。個々の複合体の立体構造を主にX線結晶構造解析を用いて解明し、それらのタンパク質および核酸の分子機能を可視化する。さらにそれらの複合体間の相互作用から、それらの生体高分子が実際に機能している動的な姿を明らかにして、複雑な生物システムの機構に原子分解能で迫る。研究対象としては、多くのタンパク質（および核酸）が次々と相互作用のカスケードを展開することによって機能発現する典型的なシステムとして、セントラルドグマに沿った遺伝情報の複製・発現の過程および高等真核細胞のシグナル伝達経路を選択する。本研究は、タンパク質単独の構造を片端から決定することに止まらず、機能に重点を置いた構造生物学を展開することが特徴で、生命の本質的なメカニズムの原子レベルでの解明が期待できる。</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

アミノアシル tRNA 合成酵素については、これまでに基質や阻害剤との相互作用が十分に解明されていないものについて、tRNA やアミノ酸、ないしは特異的阻害剤との複合体の結晶構造解析に着手している。このうちロイシル tRNA 合成酵素(LeuRS)について、tRNA との複合体の結晶構造解析に成功し、LeuRS による長いバリアブルアームをもった tRNA の特異的認識機構およびアミノ酸の校正機構について重要な知見を得ることができた。

また、非天然アミノ酸であるヨードチロシンを結合した変異体チロシル tRNA 合成酵素(TyrRS)の構造解析により、人工アミノ酸の取り込みのメカニズムを明らかにした。さらに、22 番目のアミノ酸として知られるピロリジンを tRNA に付加するピロリジル tRNA 合成酵素(PylRS)の活性ドメインの構造を決定し、特殊なアミノ酸であるピロリジンの認識に関する重要な知見を得た。さらに、PylRS が非天然のアミノ酸を tRNA に付加する特性があることが明らかになり、バイオテクノロジーへの応用が期待できる。

tRNA のアンチコドン 1 文字目の修飾ヌクレオチドの 1 つであるイノシンの生成を触媒する tRNA アデノシンデアミナーゼ(TadA)の結晶構造を決定し、tRNA との結合モデルからその反応機構を推定した。また、アンチコドンループのメチル化をつかさどる酵素である TrmD と tRNA との複合体の結晶化を行い、十分な反射を与える結晶を得ている。さらに、tRNA の L 字型コアへの修飾の導入において、tRNA、ArcTGT、TruB から構成されると考えられる超分子複合体「モディフィコソーム」の X 線構造解析を行うための準備として、TruB の発現・精製を行い、これらの三重複合体の形成をゲルシフトアッセイによって検証した。また、ArcTGT が tRNA の L 字コア領域に修飾を導入するさいに誘導する tRNA の λ 型構造の普遍性を検証するために、バリン tRNA 以外にもロイシン tRNA との複合体の結晶も行っている。

前駆体 tRNA の 3'末端のプロセッシングを行う酵素である tRNaseZ の結晶構造解析に成功し、反応機構や tRNA との結合様式について重要な知見を得た。また、前駆体 tRNA のスプライシングに関与するエンドヌクレアーゼなどの酵素について結晶解析に成功している。引き続きこれらの酵素と前駆体 tRNA との複合体の結晶化・構造解析を行っている。

ショウジョウバエにおいて生殖細胞の形成に働く RNA ヘリカーゼである Vasa と RNA、ATP との三重複合体の X 線結晶構造解析に成功した。この構造をもとに、RNA ヘリカーゼが RNA 二重鎖をほどく分子機構を推定することができた（インチワーム機構）。遺伝子発現制御など多様な現象に働いている RNA ヘリカーゼの今後の研究に大きく寄与する成果である。

以上の研究成果は、いずれも、大学院生が主に実験を担当したものであり、本研究費（科学研究費補助金、基盤研究 S）を用いて、東京大学の研究室で行ったものである。ただし、X 線回折データの測定は、大型放射光（播磨 SPring-8、筑波 PF）で行っている。

次に、理化学研究所播磨研究所、オハイオ州立大学、食品総合研究所との共同研究で行った成果を述べる。ここで、ppGpp の大量調製は振興調整費で食品総合研究所にて行われた。横山および関根俊一（東京大学講師）がタンパク質試料の調製、結晶化条件検索等で寄与している。高度好熱菌由来 RNA ポリメラーゼ(RNAP)と、緊縮調節で働くアラーマンの一種である ppGpp との複合体の結晶構造を決定することに成功した。ppGpp は RNA ポリメラーゼの活性中心のすぐ近傍に結合することが明らかになった。さらに緊縮調節における重要なタンパク質因子である DksA の結晶構造を解明し、生化学的解析に基づいて緊縮調節における作用機作のモデルを提唱した。

最後に、大学院生 2 名が参加して、理化学研究所（ゲノム科学総合研究センター、横浜市）との共同研究で得られた成果を述べる。主たる実施場所は、理化学研究所である。減数分裂において染色体の相同組換え反応をつかさどるタンパク質 Dmc1 の結晶構造を解明した。Dmc1 は 8 量体のリングが二重に重なり合ったダブルリング構造をとっており、これに基づいて、リングの中心の穴に二重鎖 DNA が、リング-リング間の隙間に出来た穴に単鎖 DNA がそれぞれ結合する相同組み換え中間体の新たなモデルを提唱した。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

チロシルtRNA合成酵素(TyrRS)は、チロシンtRNA (tRNA^{Tyr})にチロシンを結合させる反応を触媒する酵素で、遺伝暗号の翻訳(タンパク質合成)において重要な役割を果たしている。我々は、遺伝子工学的手法を用いてアミノ酸やtRNAに対する基質特異性を変化させた変異体TyrRSを作成し、非天然のアミノ酸を部位特異的にタンパク質に取り込ませ、様々な用途に応用する技術を開発している。まず我々は、TyrRSのアミノ酸結合部位を改変し、ヨウ素を含むヨードチロシンをタンパク質に取り込ませることに成功した。ヨードチロシンは重原子を含むアミノ酸であり、タンパク質の結晶構造解析などへの応用が期待されている。このTyrRS変異体とヨードチロシンとの複合体の結晶構造解析を行い、この酵素が変異によってどのようにヨードチロシンを認識する能力を獲得し、チロシンを認識しないように変化しているかを明らかにした(PNAS, 2004)。この立体構造の情報は、今後酵素のアミノ酸特異性を幅広く他の人工アミノ酸に適合するように改変するのに有用である。

さらに我々は別のTyrRS変異体を用い、人工的なアミノ酸であるパラベンゾイルフェニルアラニン(pBpa)を細胞内で標的タンパク質に導入する技術を開発した(Nature Methods, 2005)。タンパク質の特定の部位に取り込まれたpBpaは光照射によって近くにある別のタンパク質と架橋を形成する。この技術を用いて細胞の癌化に関わるタンパク質であるGrb2にpBpaを取り込ませて反応させたところ、Grb2と相互作用することが知られているEGF受容体と架橋を形成することが実際に確認された。この技術は、目的タンパク質と相互作用するタンパク質を架橋によって安定に回収することを可能にするので、未知の標的タンパク質の同定に役立つと期待されている。

配偶子形成では、減数分裂によって半数体の精子や卵子が作られるが、その際に相同組み換え反応によって遺伝子のシャッフリングがなされ、ゲノムの多様性がもたらされる。我々は、減数分裂時のDNAの相同組み換えにおいて中心的な役割を果たすタンパク質であるDmc1の結晶構造を決定することに成功した(Mol. Cell, 2004)。Dmc1は、8個のサブユニットが規則的に環状に並んでリング構造を形成し、さらに同じリングが重なりあった、合わせて16個のサブユニットからなるダブルリング構造をとっていることが明らかになった。立体構造に基づく生化学的解析により、リング構造の中心の穴に二重鎖DNAが、リング-リング間の隙間にできた穴に一本鎖DNAが結合する相同DNA組み換え反応の中間体の新たなモデルを提示することができた。この結果は、相同組み換えを応用した染色体上での遺伝子治療や、農作物や家畜の品種改良において重要な基礎を与えるものと考えられる。

RNAポリメラーゼ(RNAP)は、DNAに記された遺伝情報を正確に読み取り、RNAを合成する反応をつかさどる。我々はこれまでに細菌由来のマルチサブユニットのRNAPやファージ由来の単サブユニットのポリメラーゼの結晶構造を明らかにし、転写開始や伸長反応のメカニズムを明らかにしてきた。細菌では緊縮調節と呼ばれる現象が知られており、細胞がアミノ酸の飢餓状態にさらされると、グアノシン4リン酸(ppGpp)と呼ばれる化学物質がつけられ、RNAポリメラーゼの活性を制御することによって、特定の遺伝子の発現が抑制されたり、促進されたりする。我々はppGppとRNAPとの複合体の結晶構造を決定することに成功した(Cell, 2004)。ppGppはRNAポリメラーゼの活性中心のすぐ近傍に結合することが明らかになり、結晶構造に基づく分子モデリングや生化学的解析から、ppGppがRNAPの活性中心の立体配置に影響を及ぼしたり、DNAと直接相互作用したりすることによって、ポリメラーゼの活性を制御していることが明らかになった。我々はさらに緊縮調節における重要なタンパク質因子であるDksAの結晶構造を解明し、生化学的解析に基づいて緊縮調節における作用機作のモデルを提唱した(Cell, 2004)。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

1. 本研究費で行った研究の成果

Kaminishi, T., Sakai, H., Takemoto-Hori, C., Terada, T., Nakagawa, N., Maoka, N., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of ribosomal protein L11 methyltransferase from *Thermus thermophilus* HB8, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 59(5), 930-932, (2003).

Ishii, R., Nureki, O., and Yokoyama, S., Crystal structure of the tRNA processing enzyme RNase PH from *Aquifex aeolicus*, J. Biol. Chem., 278(34), 32397-32404, (2003).

Burgess, A. W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P. J., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., and Yokoyama, S., An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors, Mol. Cell, 12(3), 541-552, (2003).

Okabe, M., Tomita, K., Ishitani, R., Ishii, R., Takeuchi, N., Arisaka, F., Nureki, O., and Yokoyama, S., Divergent evolutions of trinucleotide polymerization revealed by an archaeal CCA-adding enzyme structure, EMBO J., 22(21), 5918-5927, (2003).

Takai, K. and Yokoyama, S., Roles of 5-substituents of tRNA wobble uridines in the recognition of purine-ending codons, Nucleic Acids Res., 31(22), 6383-6391, (2003).

Ito, N., Nureki, O., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Hanaoka, F., Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* DNA primase-UTP complex: implications for the mechanism of primer synthesis, Genes Cells, 8(12), 913-923, (2003).

Sengoku, T., Nureki, O., Dohmae, N., Nakamura, A., and Yokoyama, S., Crystallization and preliminary X-ray analysis of the helicase domains of Vasa complexed with RNA and an ATP analogue, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 60(2), 320-322, (2004).

Fukunaga, R., Fukai, S., Ishitani, R., Nureki, O., and Yokoyama, S., Crystal structures of the CP1 domain from *Thermus thermophilus* isoleucyl-tRNA synthetase and its complex with L-valine, J. Biol. Chem., 279(9), 8396-8402, (2004).

Kise, Y., Lee, S.W., Park, S.G., Fukai, S., Sengoku, T., Ishii, R., Yokoyama, S., Kim, S., and Nureki, O., A short peptide insertion crucial for angiostatic activity of human tryptophanyl-tRNA synthetase, Nat. Struct. Mol. Biol., 11(2), 149-156, (2004).

Nureki, O., Watanabe, K., Fukai, S., Ishii, R., Endo, Y., Hori, H., and Yokoyama, S., Deep knot structure for construction of active site and cofactor binding site of tRNA modification enzyme, Structure, 12(4), 593-602, (2004).

Randau, L., Schauer, S., Ambrogelly, A., Salazar J. C., Moser J., Sekine S.I., Yokoyama S., Söll D., and Jahn D., tRNA recognition by glutamyl-tRNA reductase, J. Biol. Chem., 279(33), 34931-34937, (2004).

Sakamoto, K., Ishimaru, S., Kobayashi, T., Walker, J. R., and Yokoyama, S., The *Escherichia coli argU10(Ts)* phenotype is caused by a reduction in the cellular level of the *argU* tRNA for the rare codons AGA and AGG, J. Bacteriol., 186(17), 5899-5905, (2004).

Fukunaga, R. and Yokoyama, S., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the editing domain of *Thermus thermophilus* isoleucyl-tRNA synthetase complexed with pre- and post-transfer editing-substrate analogues, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 60(10), 1900-1902, (2004).

Fukunaga, R. and Yokoyama, S., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of leucyl-tRNA synthetase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 60(10), 1916-1918, (2004).

Fukunaga, R., Ishitani, R., Nureki, O., and Yokoyama, S., Crystallization of Leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Leu} from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*, Acta Crystallogr. F Biol. Crystallogr., 61(1), 30-32, (2005).

- Kobayashi, T., Sakamoto, K., Takimura, T., Sekine, R., Vincent, K., Kamata, K., Nishimura, S., and Yokoyama, S., Structural basis of non-natural amino acid recognition by an engineered aminoacyl-tRNA synthetase for genetic code expansion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(5), 1366-1371, (2005).

Kobayashi, T., Takimura, T., Sekine, R., Vincent, K., Kamata, K., Sakamoto, K., Nishimura, S., and Yokoyama, S., Structural snapshots of the KMSKS loop rearrangement for amino-acid activation by bacterial tyrosyl-tRNA synthetase, *J. Mol. Biol.*, 346(1), 105-117, (2005).

Fukunaga, R. and Yokoyama, S., Crystal structure of leucyl-tRNA synthetase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel editing domain orientation, *J. Mol. Biol.*, 346(1), 57-71, (2005).

- Hino, N., Okazaki, Y., Hayashi, A., Sakamoto, K., and Yokoyama, S., Photocrosslinking between cell signaling proteins in mammalian cells with an expanded genetic code, *Nature Methods*, 2(3), 201-206, (2005).

Watanabe, K., Nureki, O., Fukai, S., Ishii, R., Okamoto, H., Yokoyama, S., Endo, Y., and Hori, H., Roles of conserved amino acid sequence motifs in the SpoU (TrmH) RNA methyltransferase family, *J. Biol. Chem.*, 280(11), 10368-10377, (2005).

Kurimoto, K., Muto, Y., Obayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Kigawa, T., Okumura, H., Tanaka, A., Shibata, N., Kashikawa, M., Kiyokazu, A., and Yokoyama, S., Crystal structure of the N-terminal RecA-like domain of a DEAD-box RNA helicase, the *Dugesia japonica* vasa-like gene B (DjVLGB) protein, *J. Struct. Biol.*, 150(1), 58-68, (2005).

Ishii, R., Minagawa, A., Takaku, H., Takagi, M., Nashimoto, M., and Yokoyama, S., Crystal structure of the tRNA 3' processing endoribonuclease tRNase Z from *Thermotoga maritima*, *J. Biol. Chem.*, 280(14), 14138-14144, (2005).

Kuratani, M., Ishii, R., Bessho, Y., Fukunaga, R., Sengoku, T., Sekine, SI., and Yokoyama, S., Crystal structure of tRNA adenosine deaminase TadA from *Aquifex aeolicus*, *J. Biol. Chem.*, 280(16), 16002-16008, (2005).

2. 本研究費の成果とその他の研究の成果をあわせて論文にしたもの

Fujikawa, N., Kurumizaka, H., Nureki, O., Terada, T., Shirouzu, M., Katayama, T., and Yokoyama, S., Structural basis of replication origin recognition by the DnaA protein, *Nucleic Acids Res.*, 31(8), 2077-2086, (2003).

Kato, M., Shirouzu, M., Terada, T., Yamaguchi, H., Murayama, K., Sakai, H., Kuramitsu, S., and Yokoyama, S., Crystal structure of the 2'-5' RNA ligase from *Thermus thermophilus* HB8, *J. Mol. Biol.*, 329(5), 903-911, (2003).

Tawaramoto, M. S., Park, SY., Tanaka, Y., Nureki, O., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S., Crystal structure of the human centromere protein B (CENP-B) dimerization domain at 1.65-Å resolution, *J. Biol. Chem.*, 278(51), 51454-51461, (2003).

Fujikawa, N., Kurumizaka, H., Nureki, O., Tanaka, Y., Yamazoe, M., Hiraga, S., and Yokoyama, S., Structural and biochemical analyses of hemimethylated DNA binding by the SeqA protein, *Nucleic Acids Res.*, 32(1), 82-92, (2004).

Kimoto, M., Endo, M., Mitsui, T., Okuni, T., Hirao, I., and Yokoyama, S., Site-specific incorporation of a photo-crosslinking component into RNA by T7 transcription mediated by unnatural base pairs, *Chem. Biol.*, 11(1), 47-55, (2004).

Temiaikov, D., Patlan, V., Anikin, M., McAllister, W. T., Yokoyama, S., and Vassylyev, D. G., Structural basis for substrate selection by T7 RNA polymerase, *Cell*, 116(3), 381-391, (2004).

Kasai, T., Inoue, M., Koshihara, S., Yabuki, T., Aoki, M., Nunokawa, E., Seki, E., Matsuda, T., Matsuda, N., Tomo, Y., Shirouzu, M., Terada, T., Obayashi, N., Hamana, H., Shinya, N., Tatsuguchi, A., Yasuda, S., Yoshida, M., Hirota, H., Matsuo, Y., Tani, K., Suzuki, H., Arakawa, T., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Kigawa, T., and Yokoyama, S., Solution structure of a BolA-like protein from *Mus musculus*, *Protein Sci.*, 13(2), 545-548, (2004).

Hirao, I., Harada, Y., Nojima, T., Osawa, Y., Masaki, H., and Yokoyama, S., *In vitro* selection of RNA aptamers that bind to colicin E3 and structurally resemble the decoding site of 16S ribosomal RNA, *Biochemistry*, 43(11), 3214-3221, (2004).

Maeda, T., Inoue, M., Koshiba, S., Yabuki, T., Aoki, M., Nunokawa, E., Seki, E., Matsuda, T., Motoda, Y., Kobayashi, A., Hiroyasu, F., Shirouzu, M., Terada, T., Hayami, N., Ishizuka, Y., Shinya, N., Tatsuguchi, A., Yoshida, M., Hirota, H., Matsuo, Y., Tani, K., Arakawa, T., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Kigawa, T., and Yokoyama, S., Solution structure of the SEA domain from the murine homologue of ovarian cancer antigen CA125 (MUC16), *J. Biol. Chem.*, 279(13), 13174-13182, (2004).

- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, SI., Vassilyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., and Vassilyev, D. G., Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp, *Cell*, 117(3), 299-310, (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 Dmc1, *Mol. Cell*, 14(3), 363-374, (2004).

Tanaka, Y., Tawaramoto-Sasanuma, M., Kawaguchi, S., Ohta, T., Yoda, K., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S., Expression and purification of recombinant human histones, *Methods*, 33(1), 3-11, (2004).

Hanawa-Suetsugu, K., Sekine, SI., Sakai, H., Hori-Takemoto, C., Terada, T., Unzai, S., Tame, J. R. H., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(26), 9595-9600, (2004).

Perederina, A., Svetlov, V., Vassilyeva, M. N., Tahirov, T. H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., and Vassilyev, D. G., Regulation through the secondary channel—structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription, *Cell*, 118(3), 297-309, (2004).

Vassilyeva, M. N., Perederina, A. A., Svetlov, V., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., and Vassilyev, D. G., Cloning, expression, purification, crystallization and initial crystallographic analysis of transcription factor DksA from *Escherichia coli*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60(9), 1611-1613, (2004).

Murayama, K., Kato-Murayama, M., Katsura, K., Uchikubo-Kamo, T., Yamaguchi-Hirafuji, M., Kawazoe, M., Akasaka, R., Hanawa-Suetsugu, K., Hori-Takemoto, C., Terada, T., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., Structure of a putative *trans*-editing enzyme for prolyl-tRNA from *Aeropyrum pernix* K1 at 1.7Å resolution, *Acta Crystallogr. F Biol. Crystallogr.*, 61(1), 26-29, (2005).

Tanaka, Y., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S., CpG methylation of the CENP-B box reduces human CENP-B binding, *FEBS J.*, 272(1), 282-289, (2005).

3. その他の共同研究

Polycarpo, C., Ambrogelly, A., Ruan, B., Tumbula-Hansen, D., Ataide, S. F., Ishitani, R., Yokoyama, S., Nureki, O., Ibba, M., and Söll, D., Activation of the pyrrolysine suppressor tRNA requires formation of a ternary complex with class I and class II lysyl-tRNA synthetases, *Mol. Cell*, 12(2), 287-294, (2003).

Sato, K., Tokmakov, A. A., He, CL., Kurokawa, M., Iwasaki, T., Shirouzu, M., Fissore, R. A., Yokoyama, S., and Fukami, Y., Reconstitution of Src-dependent phospholipase C γ phosphorylation and transient calcium release by using membrane rafts and cell-free extracts from *Xenopus* eggs, *J. Biol. Chem.*, 278(40), 38413-38420, (2003).

Takemoto, A., Kimura, K., Yokoyama, S., and Hanaoka, F., Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin, *J. Biol. Chem.*, 279(6), 4551-4559, (2004).

4. 参考 (本研究費ではなく、理化学研究所において文部科学省依託費「タンパク3000」で行った成果)

Mitsui, T., Kitamura, A., Kimoto, M., To, T., Sato, A., Hirao, I., and Yokoyama, S., An unnatural hydrophobic base pair with shape complementarity between pyrrole-2-carbaldehyde and 9-methylimidazo[(4,5)-b]pyridine, *J. Am. Chem. Soc.*, 125(18), 5298-5307, (2003).

Suenaga, A., Hatakeyama, M., Ichikawa, M., Yu, X., Futatsugi, N., Narumi, T., Fukui, K., Terada, T., Taiji, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Konagaya, A., Molecular dynamics, free energy, and SPR analyses of the interactions between the SH2 domain of Grb2 and ErbB phosphotyrosyl peptides, *Biochemistry*, 42(18), 5195-5200, (2003).

Hatakeyama, M., Kimura, S., Naka, T., Kawasaki, T., Yumoto, N., Ichikawa, M., Kim, JH., Saito, K., Saeki, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Konagaya, A., A computational model on the modulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt pathways in heregulin-induced ErbB signalling, *Biochem. J.*, 373(2), 451-463, (2003).

Kurumizaka, H., Enomoto, R., Nakada, M., Eda, K., Yokoyama, S., and Shibata, T., Region and amino acid residues required for Rad51C binding in the human Xrcc3 protein, *Nucleic Acids Res.*, 31(14), 4041-4050, (2003).

Kobayashi, A., Kokubo, T., Ota, Y., and Yokoyama, S., Promoter-specific function of the TATA element in undifferentiated P19 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310(2), 458-463, (2003).

Mitsui, T., Kimoto, M., Sato, A., Yokoyama, S., and Hirao, I., An unnatural hydrophobic base, 4-propynylpyrrole-2-carbaldehyde, as an efficient pairing partner of 9-methylimidazo[4,5-*b*]pyridine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13(24), 4515-4518, (2003).

Hirao, I., Mitsui, T., Kimoto, M., Harada, Y., and Yokoyama, S., An unnatural base pair for efficient incorporation of nucleotide analogs into RNAs, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, (3), 215-216, (2003).

Moriyama, K., Kimoto, M., Mitsui, T., Yokoyama, S., and Hirao, I., Simple preparation of biotinylated RNA by transcription via an unnatural base pair, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, (3), 277-278, (2003).

Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Nunokawa, E., Ishizuka, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S., A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors, *J. Mol. Biol.*, 337(1), 49-63, (2004).

Kukimoto-Niino, M., Murayama, K., Inoue, M., Terada, T., Tame, J. R. H., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., Crystal structure of the GTP-binding protein Obg from *Thermus thermophilus* HB8, *J. Mol. Biol.*, 337(3), 761-770, (2004).

Chumpolkulwong, N., Hori-Takemoto, C., Hosaka, T., Inaoka, T., Kigawa, T., Shirouzu, M., Ochi, K., and Yokoyama, S., Effects of *Escherichia coli* ribosomal protein S12 mutations on cell-free protein synthesis, *Eur. J. Biochem.*, 271(6), 1127-1134, (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(8), 2556-2565, (2004).

Endo, M., Mitsui, T., Okuni, T., Kimoto, M., Hirao, I., and Yokoyama, S., Unnatural base pairs mediate the site-specific incorporation of an unnatural hydrophobic component into RNA transcripts, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14(10), 2593-2596, (2004).

Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., and Yokoyama, S., Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression, *J. Struct. Funct. Genomics*, 5(1-2), 63-68, (2004).

Kimoto, M., Yokoyama, S., and Hirao, I., A quantitative, non-radioactive single-nucleotide insertion assay for analysis of DNA replication fidelity by using an automated DNA sequencer, *Biotechnol. Lett.*, 26(12), 999-1005, (2004).

López-Méndez, B., Pantoja-Uceda, D., Tomizawa T., Koshiba S., Kigawa T., Shirouzu M., Terada T., Inoue M., Yabuki T., Aoki M., Seki E., Matsuda T., Hirota H., Yoshida M., Tanaka A., Osanai T., Seki M., Shinozaki K., Yokoyama S., and Güntert P., NMR assignment of the hypothetical ENTH-VHS domain At3g16270 from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biomol. NMR*, 29(2), 205-206, (2004).

Pantoja-Uceda, D., López-Méndez, B., Koshiba S., Kigawa T., Shirouzu M., Terada T., Inoue M., Yabuki T., Aoki M., Seki E., Matsuda T., Hirota H., Yoshida M., Tanaka A., Osanai T., Seki M., Shinozaki K., Yokoyama S., and Güntert P., NMR assignment of the hypothetical rhodanese domain At4g01050 from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biomol. NMR*, 29(2), 207-208, (2004).

Reay, P., Yamasaki, K., Terada, T., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., Structural and sequence comparisons arising from the solution structure of the transcription elongation factor NusG from *Thermus thermophilus*, *Proteins*, 56(1), 40-51, (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(34), 35263-35272, (2004).

Saito, K., Kigawa, T., Koshihara, S., Sato, K., Matsuo, Y., Sakamoto, A., Takagi, T., Shirouzu, M., Yabuki, T., Nunokawa, E., Seki, E., Matsuda, T., Aoki, M., Miyata, Y., Hirakawa, N., Inoue, M., Terada, T., Nagase, T., Kikuno, R., Nakayama, M., Ohara, O., Tanaka, A., and Yokoyama, S., The CAP-Gly domain of CYLD associates with the proline-rich sequence in NEMO/IKK γ , *Structure*, 12(9), 1719-1728, (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(9), 781-790, (2004).

Hirao, I., Fujiwara, T., Kimoto, M., and Yokoyama, S., Unnatural base pairs between 2- and 6-substituted purines and 2-oxo(1H)pyridine for expansion of the genetic alphabet, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14(19), 4887-4890, (2004).

Hirao, I., Harada, Y., Kimoto, M., Mitsui, T., Fujiwara, T., and Yokoyama, S., A two-unnatural-base-pair system toward the expansion of the genetic code, *J. Am. Chem. Soc.*, 126(41), 13298-13305, (2004).

Wang, H., Hori-Takemoto, C., Murayama, K., Sakai, H., Tatsuguchi, A., Terada, T., Shirouzu, M., Kuramitsu, S., and Yokoyama, S., Crystal structure of ribosomal protein L27 from *Thermus thermophilus* HB8, *Protein Sci.*, 13(10), 2806-2810, (2004).

Arai, R., Ito, K., Wakiyama, M., Matsumoto, E., Sakamoto, A., Etou, Y., Otsuki, M., Inoue, M., Hayashizaki, Y., Miyagishi, M., Taira, K., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., Establishment of stable hFis1 knockdown cells with an siRNA expression vector, *J. Biochem. (Tokyo)*, 136(4), 421-425, (2004).

Ogiso, H., Kagi, N., Matsumoto, E., Nishimoto, M., Arai, R., Shirouzu, M., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., and Yokoyama, S., Phosphorylation analysis of 90kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex, *Biochemistry*, 43(49), 15510-15519, (2004).

Scott, A., Pantoja-Uceda, D., Koshihara S., Inoue M., Kigawa T., Terada T., Shirouzu M., Tanaka A., Sugano S., Yokoyama S., and Güntert P., NMR Assignment of the SH2 Domain from the Human Feline Sarcoma Oncogene FES, *J. Biomol. NMR*, 30(4), 463-464, (2004).

Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S., Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1, *Plant Cell*, 16(12), 3448-3459, (2004).

Padmanabhan, B., Scharlock, M., Tong, K. I., Nakamura, Y., Kang, M.I., Kobayashi, A., Matsumoto, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., and Yokoyama, S., Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of Kelch-like motif region of mouse Keap1, *Acta Crystallogr. F Biol. Crystallogr.*, 61(1), 153-155, (2005).

Sakai, H., Wang, H., Takemoto-Hori, C., Kaminishi, T., Kamewari, Y., Terada, T., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., Crystal structures of the signal transducing protein GlnK from *Thermus thermophilus* HB8, *J. Struct. Biol.*, 149(1), 99-110, (2005).

Tokmakov, A., Iwasaki, T., Itakura, S., Sato, K., Shirouzu, M., Fukami, Y., and Yokoyama, S., Regulation of Src kinase activity during *Xenopus* oocyte maturation., *Dev. Biol.*, 278(2), 289-300, (2005).

Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Yamasaki, T., Tateno, M., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S., Solution structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA-binding domain, *Plant Cell*, 17(3), 944-956, (2005).

Nameki, N., Tochio, N., Koshihara S., Inoue M., Yabuki T., Aoki M., Seki E., Matsuda T., Fuji kura Y., Saito M., Ikari M., Watanabe M., Terada T., Shirouzu M., Yoshida M., Hirota H., Tanaka A., Hayashizaki Y., Güntert P., Kigawa T., and Yokoyama S., Solution structure of the H DGF PWWP domain, *Protein Sci.*, 14(3), 756-764, (2005).

<国際会議、学会等における発表状況>

Yokoyama, S., "EGF/EGFR 621 complex", EGFR Meeting (Ludwig Institute for Cancer Research), Lorne, Australia, Mar. (2003).

Yokoyama, S., "Genetic code systems with Unnatural amino acids and base pairs: a structure based approach", 103rd General Meetings of American Society of Microbiology, Washington Convention Center, Washington, DC., USA

Yokoyama, S.: "Deep knot structure for cofactor binding and active-site formation in tRNA modification enzyme", The 20th tRNA Workshop 2003, Banz, Gemany, Oct. (2003).

Yokoyama, S.: "Structural biology of RNA modification enzymes and helicase", RNA 2003 Kyoto on the New Frontier of RNA Science (The RNA Society of Japan), Kyoto, Japan, Nov. (2003).

Yokoyama, S.: "Structural proteomics of thermophiles and higher eukaryotes", 10th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM10), Beijing, China., Jun. (2004).

Yokoyama, S.: "National project on protein structural and functional analyses in Japan", Spine Congress, London, UK., Oct. (2004).

Yokoyama, S.: "Current status of structural proteomics", Frontiers of Proteomics -Aims and Perspectives-, Toyonaka, Japan, Nov. (2004).

Yokoyama, S.: "Structural proteomics projects in Asia and the Pacific", ISGO International Conference on Structural Genomics 2004, Washington DC, USA., Nov. (2004).

Yokoyama S.: "Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8", 2004 International Conference on Polyamines: Functions and Clinical Application, Kisarazu, Japan, Nov. (2004).