

北海道大学大学院薬学研究科 教授

稲垣 冬彦

「構造生物学に基づくシグナル伝達系の解明とその制御」

1. 研究実施の概要

1. 1 はじめに

我々は、シグナル伝達タンパク質の機能ドメインの標的認識機構について、その特異性を明らかにするとともに多機能ドメインより構成されるシグナル伝達タンパク質の特徴を構造生物学に基づいて明らかにすることを目的として研究を行った。CRESTの支援を受けて行った研究の概要を記す。

1. 2 SH2、SH3の標的認識の特異性

SH2、SH3はシグナル伝達タンパク質に含まれる機能ドメインの代表であり、それぞれリン酸化チロシンを含む配列やプロリンに富む配列を認識する構造ドメインである。シグナル伝達経路はSH2、SH3による標的配列の認識に依存しており、その点でSH2、SH3ドメインによる標的配列認識の特異性を明らかにすることは重要な意義を持つ。われわれはSH2、SH3のみよりなるアダプタータンパク質 Grb2 (SH3-SH2-SH3) を取り上げ構造と標的認識を明らかにした。

1. 2. 1 Grb2SH2の新規な標的認識： Grb2SH2はpYVNVを標的配列とする。pYより2番目の残基としてAsnを要求する点で、3番目の残基として疎水性残基を要求する従来型のSH2による認識とは異なる。立体構造解析の結果、コア配列であるpYVNVはSH2上でターン構造を取っていた。このターン構造はSH2側のTrp残基による立体障害とペプチド側のAsn側鎖とSH2主鎖との間の水素結合により安定化されていた。Grb2SH2は他のSH2と比較して特異な認識を行っていることを明らかにした。

1. 2. 2 Grb2SH3の正則な標的認識： Grb2のN端側およびC端側のSH3ドメインと標的配列との複合体の構造について検討した。プロリンに富む標的は(+)と(-)の二つの配向をとってSH3に結合する事が報告されているが、Grb2の二つのSH3はそれぞれ(+)、(-)の異なる配向で標的配列を認識していた。ペプチドの配向は、ペプチドに含まれる塩基性残基とSH3のRT-ループ上の酸性残基との相互作用並びに ϕ PX ϕ Pのコンセンサス配列に含まれる疎水性残基 ϕ とSH3との相互作用により規定されている。ポリプロリンタイプIIヘリックス構造形成という構造的な制約下で標的ペプチドは双方向で結合することにより結合ペプチドのレパートリーを増している事がわかる。

1. 2. 3 SH3ドメイン相互の新規な分子認識： VavのN端SH3 (VavnSH3)とGrb2のC端SH3 (Grb2cSH3)相互の分子認識について検討した。Vavは血球細胞にのみ発現しており、血球細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている。Grb2cSH3とVavnSH3との結合はラフトに局在したLATとGrb2SH2の結合を介してVavをラフトに繋ぎとめ、ZAP-70によるVavのリン酸化を可能とするためである。Vavはリン酸化によりRacに対するGEF

活性を亢進させる事により、細胞増殖や分化のスイッチの役割を果たす。当初、Vav と Grb2 の結合は VavnSH3 に含まれるプロリンに富む配列と Grb2cSH3 との正則な結合と考えられていたが、本研究の結果、VavnSH3 および Grb2cSH3 ドメイン全体の構造を必要とする新規な結合様式であることを明らかにした。

1. 3 Grb2 の柔軟な構造と生理的意義

Grb2 の結晶構造によると、二つの SH3 は接触し、コンパクトな形状を取る事が報告されている。しかし、このような固定した構造を取るとすると、多様な Grb2 の生理機能を理解することは困難である。我々は Grb2 の機能を理解するため、NMR の緩和解析と X 線小角散乱の測定を行ない、溶液における構造を解明した。NMR の結果によれば各ドメインは切り出されたドメインと同程度に溶媒に露出していること、リンカー部分はフレキシブルな構造を取ることがわかった。そこで、二つの SH3 がリンカー周りに柔軟な構造を取り、二つの SH3 相互の相対配置を変えうるというモデルをたてた。このモデルよりもとめた距離分布は X 線小角散乱より実験的に求めた距離分布とよく対応した。Grb2 はリンカー周りに柔軟な構造を取り、標的認識を行っている。このような Grb2 の動的な挙動はアダプター分子として多様な標的分子を繋ぎとめるために有利と考えられる。

1. 4 新規機能ドメイン PB1 ドメインと PC モチーフの構造と機能

新規ドメインの機能を構造に基づいて理解することは、シグナル伝達ネットワークの理解には欠かせない。Cdc24p に含まれる PC モチーフは酸性残基と疎水性残基よりなる 28 残基の特徴的な配列で、Bem1p の PB1 ドメインと相互作用する事が知られている。これらのドメインは多くの極性維持に関与するタンパク質にも共通して見出されていることより、細胞極性の決定と維持に重要な役割を果たしている事が期待される。PB1 ドメインと PC モチーフを含む領域について構造決定を行った結果、興味深いことに、これらはユビキチン様の構造を取ることがわかり、二つのドメインをまとめて PB1 ドメインと総称した。相互作用面を検討した結果、PC モチーフに含まれる酸性残基を含む領域と PB1 ドメイン上の塩基性残基が相互作用していることを明らかにした。他のユビキチンファミリーでは見られなかった新しい相互作用様式であった。

1. 5 好中球活性酸素発生系の構造生物学

好中球 NADPH オキシダーゼは活性酸素発生の本体である膜タンパク質 Cyt b₅₅₈ (gp91^{phox} と p22^{phox} 複合体) と細胞質因子である p47^{phox}、p67^{phox}、p40^{phox} から構成される。細菌食食に従い、細胞質因子は膜へ移行し、Cyt b₅₅₈ を活性化し、活性酸素を発生し殺菌する。我々は活性化の過程を構造生物学的に明らかにすることを目的とした。休止状態では、p47^{phox} はタンデム SH3 がマスクされた状態にいるが、活性化に伴い、アンマスク状態になり p22^{phox} のプロリンに富む領域に結合する。これを契機として Cyt b₅₅₈ が活性化される。我々は p47^{phox}

のマスク状態のモデルとしてタンデム SH3 を含む 151-340、アンマスク状態のモデルとして 151-286 の領域と p22^{phox} の PRR 領域の複合体の構造を解析した。この二つの状態で大きな構造変化が起きることを実証するとともに、アンマスク状態の構造を明らかにした。

1. 6 シグナル伝達の人為的制御を目的としたドメイン工学の検討

ドメインはシグナル伝達の制御ドメインとして使われる。したがって適当な機能ドメインを組み合わせるにより新しい機能を持ったシグナル伝達タンパク質をデザインすることができる。我々は好中球活性酸素発生系に注目し、構成的に活性酸素発生能を持つタンパク質を設計した。活性酸素発生には p67^{phox} の TPR ドメインとタンデム SH3 が不可欠である。そこで、これらのドメインをリンカーの長さを変えて結合させた種々の融合蛋白質を作製し活性酸素発生能を検討した。さらに、TPR とタンデム SH3 を Grb2 の標的配列である VPP ペプチドを介してリンクさせ、活性酸素の発生が Grb2 により抑えられることを明らかにした。この結果は、人為的にシグナルを制御できる可能性を示している。

1. 7 X線結晶構造解析の導入とシグナル伝達タンパク質の構造解析

シグナル伝達タンパク質の理解にはドメインを対象とする構造解析のみでは不十分であり、より大きな構造フレームにおける構造研究が不可欠である。この点で X線結晶構造解析の導入は必然であった。我々は X線結晶構造解析法を導入するとともに、シグナル伝達に関与するタンパク質の構造解析をおこなった。

1. 7. 1 IRF-3 の制御ドメインの構造解析： IRF-3 はインターフェロン産生のトリガーであり、抗ウイルス作用発現のために必須なタンパク質である。我々はトリプシンによる限定分解に基づき制御ドメインを切り出し、制御ドメインの X線結晶構造解析を行った。驚くべきことに IRF-3 の制御ドメインは SMAD の MH2 ドメインと類似した構造を持っていた。リン酸化による二量体形成、二量体形成による広範な酸性ポケットの形成および酸性ポケットと CBP/p300 との結合の可能性を明らかにした。構造のみならず、SMAD と類似した活性化機構を持つことから、IRF-3 は SMAD ファミリーから分かれ、TOLR の下流のシグナルとしてインターフェロンシグナル系を発達させたと考えた。

1. 7. 2 増殖抑制タンパク質 Tob の立体構造と Caf1 複合体の構造解析： BTG ファミリーは細胞増殖抑制タンパク質である。BTG ファミリーのタンパク質は Caf1、Erk、Hox および SMAD1 と特異的な相互作用を行う事が報告されている。我々は BTG ファミリーとして Tob をとりあげ、Caf1 との複合体について結晶構造解析を行った。Tob と Caf1 の結合面には Tob で保存された残基が存在していること、さらに Caf1 と Tob 複合体の構造は大腸菌由来のヌクレアーゼと類似した構造を取っていた。単鎖 DNA を基質としてヌクレアーゼ活性を測定したところ Mn²⁺存在下でエキソヌクレアーゼ活性を示した。

1. 8 N-WASP を介したシグナルによる細胞骨格制御（東京大学医科学研究所竹縄忠臣グループ）

細胞の遊走には、情報伝達系で制御された非常に早いダイナミックな細胞骨格の再編成が起こることが、必須である。細胞が運動し、遊走する時、まず進行方向の先端部（leading edge）で Cdc42 が活性化され、糸状仮足を形成し、進行方向へ長い突起を伸ばす、それに続いて、Rac が活性化され、葉状突起を形成してアクチン線維のメッシュを作り、運動の駆動力を発生する。さらに細胞の後方部で Rho が活性化され、退縮を起こし、ストレスファイバーを発達させナメクジが進むように動く。

我々は細胞の遊走先端に局在し、長い糸状仮足形成にかかわる N-WASP や膜ラップリングにかかわる WAVE (WAVE1-3) を発見した。我々は WASP ファミリー蛋白質の活性化機序を明らかにし、WASP ファミリー蛋白質がいかんして外界からの遊走シグナルを受けて、活性化され、遊走先端部でダイナミックなアクチン線維の再構築を引き起こし、細胞を直接移動させるキイの蛋白質であることを明らかにした。

1. 9 細胞増殖抑制因子 Tob の構造解析（東京大学医科学研究所山本雅グループ）

Tob ファミリーは過去 10 年ぐらいの間に細胞増殖抑制活性をもつ蛋白質群として見出されてきたものである。ファミリーを構成する個々の分子の生理機能は十分には明らかでないが、遺伝子欠損マウスの解析等から、Tob が癌抑制遺伝子として機能していることを示す結果を得てきた。更にその作用機構を探り、Tob が Erk1/2 の良い基質となること、非リン酸化 Tob が G0/G1 遷移を抑制すること、Erk1/2 によるリン酸化がこの抑制を解除することを見出した。さらに、この G0/G1 遷移抑制は、Tob が cyclin D1 遺伝子の発現を負に制御するためであることを示した。

1. 10 好中球活性酸素発生系の機能解析（九州大学生体防御医学研究所住本英樹グループ）

好中球 NADPH 酸化酵素は細胞質因子である制御因子と膜タンパク質である Cyt b558 よりなる複合酵素である。食食シグナルにより細胞質因子は活性化され、Cyt b558 と結合する事により活性酸素が発生する。細胞質因子は p47、p67、p40 および Rac から構成される。p47、p67、p40 は SH3 を含むマルチな機能ドメインより構成され、機能ドメイン間の相互作用を通して活性制御を行っている。これらの機能ドメインが活性酸素発生に及ぼす効果を生化学的に明らかにした。

2. 研究構想

2. 1 研究構想

シグナル伝達系は真核生物になって発展したシステムであり、細胞外からのシグナルを細胞内でタンパク質ーリガンド、タンパク質ータンパク質相互作用に変換して核へと伝え、最終的に細胞の増殖、分化を誘起する。原核生物の場合と異なり、真核生物のシグナル伝達系の特徴は、細胞内でシグナルは枝分かれし、相互にクロストークを行い、あるいは統合されるといったダイナミックな制御を受け、シグナル伝達ネットワークを形成している点である。これは細胞外環境や刺激の複雑な変化に対応し、より柔軟なシグナル伝達制御を行う必要があるからである。生物はこのような複雑なシステムを短期間で作り上げる必要があった。このために、既存の機能ドメインと標的の組み合わせを少しずつ変えながら多様な認識機構を作り上げていったと考えられている。この様にして作られたドメインの代表例が Src ホモロジー 2 (SH2)、Src ホモロジー 3 (SH3) である。それぞれ、リン酸化チロシンを含む配列やプロリンに富む配列を認識するドメインである。その後、シグナル伝達タンパク質に含まれるドメインとして、PH ドメイン、WW ドメイン、PDZ ドメイン等が次から次へと同定された。そして、これらの機能ドメインを複数組み合わせ、多彩なタンパク質間相互作用を可能とするシグナル伝達タンパク質を作り上げていった。一連のシグナル伝達研究を通して、自分自身は酵素機能は持たないが、タンパク質同士の相互作用を介してシグナル伝達の仲介を行うアダプタータンパク質および足場タンパク質と呼ばれる一群のタンパク質が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。シグナルはこれらのタンパク質の周りに集められたタンパク質の相互作用を介して効率よく伝達されていくと考えられる。したがって、シグナル伝達の実態を明らかにするためには、個々の機能ドメインの構造および標的との認識機構を明らかにするとともに、アダプタータンパク質や足場タンパク質の周りに形成されたシグナル伝達複合体の構造を解明することが必要となる。ドメイン単位ばかりでなくより大きな構造フレームを対象とした構造解析を進める必要がある。このために X 線結晶構造解析を当研究室で立ちあげることを目標とした。また、シグナル伝達タンパク質の構造と機能研究は人為的なシグナル制御を目的とする新規タンパク質の設計を可能とする。われわれはこの技術をドメイン工学と名づけ、好中球活性酸素発生系を対象として新しい機能タンパク質を作製することを目的とした。

2. 2 研究計画・進め方の概要およびその後の展開から生まれた目標と役割分担

2. 2. 1 SH2、SH3 の標的認識の特異性

2. 2. 1. 1 Grb2SH2 の新規な標的認識： アダプタータンパク質として Grb2 を取り上げ、SH2 と Shc のリン酸化ペプチドの標的認識機構を NMR により明らかにした。Grb2 の SH2 は他の SH2 に比べて特異的な標的認識を行っている事を明らかにした。Grb2 の発現はガン細胞で亢進していることから、Grb2 の特異的な阻害剤は抗ガン剤として有効なこ

とが期待される。そこで、効果的な抗ガン剤の開発を目的として、薬剤との複合体の構造決定を行った。構造研究については稲垣グループ、Grb2 と N-WASP の標的認識および細胞骨格制御における Grb2 の機能的役割については竹縄グループが研究を行った。

2. 2. 1. 2 Grb2SH3 の正則な標的認識： Grb2nSH3 と Sos ペプチド複合体、Grb2cSH3 と RHY ペプチド複合体の立体構造を NMR 法により決定した。それぞれ(-)、および(+)方向で標的配列を認識していた。SH3 の正則な標的配列認識について詳細に明らかにする事が出来た。又、立体構造解析の結果、親和性の高いペプチドの設計が可能となり、SH3 を対象とする薬剤設計研究が可能となった。構造研究は稲垣グループが、N-WASP と関連した Grb2 の機能解析は竹縄グループが行った。

2. 2. 1. 3 SH3 ドメイン相互の新規な分子認識： SH3 の認識にはプロリンに富むペプチを介さない認識がいくつか知られている。稲垣グループでは X 線結晶構造解析法を用い、非正則な認識の一例として VavnSH3 と Grb2cSH3 の認識を明らかにした。非正則な認識はきわめて特異性が高く、この特異性を利用した薬剤設計は今後の課題といえる。

2. 2. 2 Grb2 の柔軟な構造と生理的意義

Grb2 は SH3-SH2-SH3 のドメイン構成を持つ。稲垣グループは NMR と X 線小角散乱を用いて解析を行った結果、Grb2 はリンカー周りに柔軟な構造をとり、二つの SH3 の相対位置を自由に変えることが出来ることを示した。Grb2 は標的蛋白質に含まれるプロリンに富むペプチド配列を二価で認識する事により、高い親和性を持って結合する事が可能となる。又、三つの結合サイトを提示する事により、効率的に Grb2 の周りに結合たんぱく質を集め、効率的なシグナル伝達を行うことを可能となる。アダプターたんぱく質の動的挙動と機能との関連を初めて明らかにした。このようなアダプター蛋白質の動的挙動は今後シグナル伝達を考えていく上で重要な概念を与えた。

2. 2. 3 新規機能ドメイン PB1 ドメインと PC モチーフの構造と機能

細胞極性の決定と維持に関与する新規ドメイン PB1 と PC モチーフの構造と機能を明らかにした。驚くべき事に、これらのドメインはともにユビキチンときわめてよく似た立体構造をとるが、相互作用部位はユビキチンとは異なる事を見出した。ユビキチンフォールドという安定な骨格の上にさまざまな相互作用部位を提示し、多様な蛋白質相互作用部位を作り上げる戦略を見て取る事が出来る。PB1 と PC モチーフは 70 以上のシグナル伝達蛋白質に見出されている新規ドメインであるが、特異性は高く、特定の PB1、PC モチーフのみが結合する。今後は相互作用認識を明らかにする。また、細胞極性維持の分子機構の解明を行う。

PB1 ドメイン、PC モチーフの同定は住本グループにより行われ、変異体解析を含む機能解析は住本グループが行った。構造解析は稲垣グループにより行われた。同定、構造解析、機能解析とわが国ですべての解析が行われた点で特筆される。

2. 2. 4 好中球活性酸素発生系の構造生物学

好中球 NADPH 酸化酵素は貪食した最近を活性酸素を発生して殺菌を行うシステムである。膜蛋白質である Cyt b558 と細胞質因子である p47、p67、p40 からなる。細胞質因子は SH3 を含むシグナル伝達蛋白質特有の多機能ドメインより構成されている。稲垣グループは住本グループとの共同の元に、細胞質因子に含まれる機能ドメインの高発現系を作成し、活性酸素発生に必要な機能ドメイン間の相互作用を明らかにする事を目的として研究を展開した。p47 のタンデム SH3 ドメインは休止状態ではマスクされているが、活性化に伴い、開いた構造をとり、p22 のプロリンに富む領域と相互作用を行う。このような構造変換を X 線小角散乱を用いて明らかにするとともに、p22 のプロリンに富む領域との複合体の構造を明らかにし、アンマスク機構を解明した。現在、活性酸素発生に必要なドメイン間相互作用をすべて明らかにするため、研究を展開している。CREST 研究期間内では終了しなかったが、今後、大きな研究展開が期待される。

2. 2. 5 シグナル伝達の人為的制御を目的としたドメイン工学の検討

シグナル伝達蛋白質の特徴は多機能ドメインより構成されている点である。ドメイン間の相互作用を組み合わせる事によりシグナル制御を行っている。われわれは、これらのドメインを組み合わせてシグナル伝達蛋白質を設計し、人為的にシグナル制御を行うことを目的とするドメイン工学の検討を行った。好中球活性酸素発生系では、p67 の TPR モチーフと p47 のタンデム SH3 の二つが Cyt b558 と相互作用を行うことが必要である。そこで、活性酸素発生の最小単位として、p67 の TPR モチーフと p47 タンデム SH3 を融合した蛋白質を設計し、活性酸素発生能を検討した。この融合蛋白質はフルの活性酸素発生能を持つ事を明らかにした。さらにこの融合蛋白質に Grb2SH3 の標的配列を組み込み、Grb2 添加による活性酸素発生能の低下、さらに RHY ペプチドの添加による活性酸素発生能の復活を検討した所、Grb2 添加により 40%程度にまで活性酸素の発生が低下した事、ペプチドの添加により、80%以上の活性酸素の発生能の復活が観測された。この結果は、ドメイン工学の手法を用い、人為的にシグナルを制御できる事を示している。この研究は稲垣グループと住本グループの共同研究として行われた。

2. 2. 6 X 線結晶構造解析の導入とシグナル伝達蛋白質の構造解析

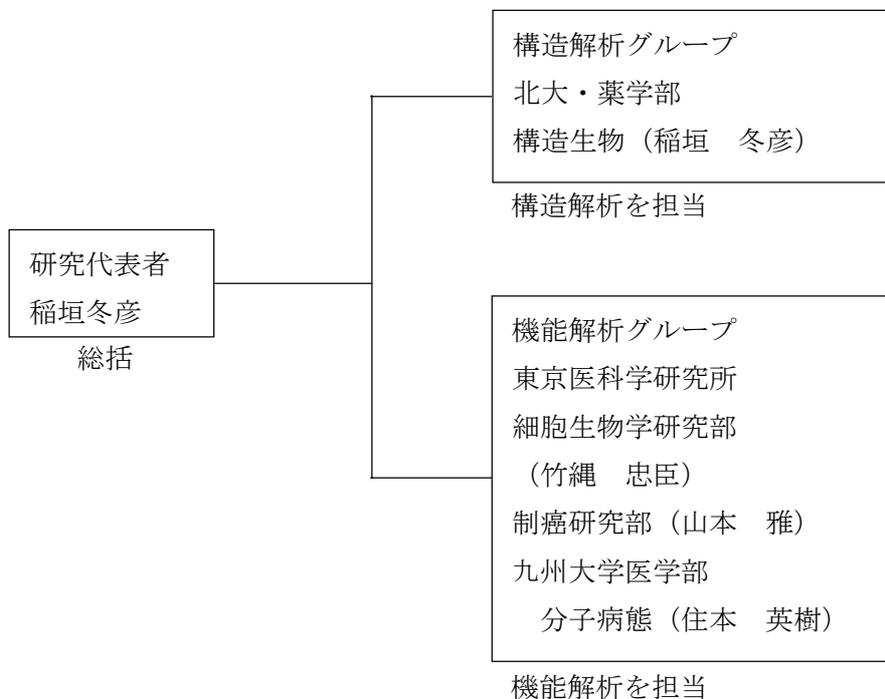
シグナル伝達蛋白質は多機能ドメインより構成され、ドメイン間の相互作用を介してシグナル制御を行っている。したがって、シグナル伝達を理解するためには、より大きな構造フレームを対象とした構造解析を行う必要がある。CREST 研究を始めるにあたり、X 線結晶構造解析を稲垣グループに導入した。その結果、構造研究の対象が広がり、研究対象を選ばない研究体制を作る事が出来た。現在 X 線結晶構造解析の研究は順調に展開しており、ほぼ 1/3 のメンバーが X 線結晶構造解析研究を進めている。又、NMR を研究手段としているグループも、研究対象により X 線結晶構造解析を行う体制が整った。

2. 2. 6. 1 IRF-3 の制御ドメインの構造解析： IRF-3 はインターフェロン産生のトリガーであり、抗ウイルス作用発現で重要な役割を果たしている。稲垣グループは IRF-3 の制御ドメインの構造を X 線結晶構造解析で明らかにした。興味深い事に IRF-3 は SMAD の MH2 と極めてよく似た構造をとる事、さらにオリゴマを形成し、核移行、CBP/p300 と結合する事により産生遺伝子の転写を促進する点で、SMAD シグナリングと類似している。SMAD は線虫から見出されるのに対し、IRF は脊椎動物になって初めて見出されたものである。最近、IRF-3 は TOLR の下流で働いている事が示されており、SMAD から発生し、TOLR 下流のシグナルとして IRF-3 は発展したものと考えられる。この研究は稲垣グループにより行われたものであり、IRF-3 の構造解析と活性化過程の解析より、抗ウイルス作用発現の機構が明らかにされた。今後、本研究で得られた知見に基づいて、抗ウイルス状態を構成的に作り出す変異体の作成を試み、もって医薬品開発を行う。

2. 2. 6. 2 細胞増殖抑制因子 Tob の立体構造解析と Caf1 複合体の構造解析： Tob は Erk、Hox、SMAD1、Caf1 等の多くの蛋白質と相互作用を行い、細胞増殖を抑制する新規な因子であるが、その分子機構についてはほとんど解明されていない。Tob 単独では発現は少ないため、Caf1 との共発現系を作成し、複合体として蛋白質を精製した。結晶構造解析を行った結果、Tob は新規のフォールドを持つ事、Caf1 との複合体の構造は大腸菌のエキソヌクレアーゼ 1 と類似している事を見出した。実際エキソヌクレアーゼ活性を持つ事を確かめるとともに、変異体を作成し、活性に必要な残基を同定した。構造に基づいた Tob の機能解析の進展が望まれている。機能解析は山本グループが、構造解析は稲垣グループにより行われた。細胞周期の調節蛋白質として位置付けられるため、今後抗ガン剤の開発を進めていくべきと考えている。

3. 研究実施体制

(1) 体制



4. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
1998. 8. 28-31	CREST、RRR 合同ワークショップ	静岡県三島市、東レ総合研修センター	50 人	NMR の基礎的理論と最新技術の理解を目的としたワークショップ
1999. 8. 3-6	CREST Workshop	北大・学術交流会館	50 人	NMR の基礎的理論と最新技術の理解を目的としたワークショップ

5. 主な研究成果

(“1章に記載の通り、6章についても別冊としての公開を予定しています。”)

(1) 論文発表 (国内 13 件、海外 50 件)

—海外

- 1) Okochi, K., Matsuda, S., Suzuki, T., Inoue, J., Yamamoto, T.: Interaction of antiproliferative protein Tob with inducible poly(A)-binding protein: Implication of Tob in translational control, **submitted** for publication.
- 2) Shiose, A., Kuribayashi, F., Takeya, R., Sumimoto, H.: Nox4, a novel homologue of the phagocyte NADPH oxidase catalytic subunit gp91^{phox}. **Int. Congress Ser. 1233, in press**, 2002.
- 3) Kuribayashi, F., Nunoi, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T., Sumimoto, H.: The adaptor protein p40^{phox} as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. **EMBO J. 21**, 6312-6320, 2002.
- 4) Kami, K., Takeya, R., Sumimoto, H., Kohda, D.: Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67^{phox}, Grb2 and Pex13p. **EMBO J. 21**, 4268-4276, 2002.
- 5) Ponting, C., Ito, T., Moscat, J., Diaz-Meco, M. T., Inagaki, F., Sumimoto, H.: OPR, PC and AID: all in the PB1 domain. **Trends Biochem. Sci. 27**, 10, 2002.
- 6) Yamamori, T., Inanami, O., Sumimoto, H., Akasaki, T., Nagahata, H., Kuwabara, M.: Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 293**, 1571-1578, 2002.
- 7) Kubo, T., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Sumimoto, H., Hosokawa, K., Tohyama, M.: A novel FERM domain including guanine nucleotide exchange factor is involved in Rac signaling and regulates neurite remodeling. **J. Neurosci. 22**, 8504-8513, 2002.
- 8) Kohjima, M., Noda, Y., Takeya, R., Saito, N., Takeuchi, K., Sumimoto, H.: PAR3 β , a novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions. **Biochem. Biophys. Res. Commun. 299**, 641-646, 2002.
- 9) Suzuki, T., K.-Tsuzuku, J., Ajima, R., Nakamura, T., Yoshida, Y., Yamamoto, T.: Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation. **Genes & Dev. 16**, 1357-1370, 2002.
- 10) Ogura, K., Nagata, K., Horiuchi, M., Ebisui, E., Hasuda, T., Yuzawa, S., Nishida, M., Hatanaka, H., Inagaki, F.: Solution structure of N-terminal SH3 domain of Vav and the recognition site for Grb2 C-terminal SH3 domain. **J. Biomol. NMR, 22**, 37-46, 2002.
- 11) Yuzawa, S., Yokochi, M., Hatanaka, H., Ogura, K., Kataoka, M., Miura, K., Mandiyan, K.V., Schlessinger, J., Inagaki, F.: Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for recognition. **J. Mol. Biol., 306**, 527-537, 2001.
- 12) Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., Sumimoto, H.: A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. **J. Biol. Chem. 276**, 1417-1423, 2001.
- 13) Noda, Y., Takeya, R., Ohno, S., Naito, S., Ito, T., and Sumimoto, H.: Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C. **Genes Cells 6**, 107-119, 2001.

- 14) Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., Kohda, D. : Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. **Nature Struct. Biol.** **8**, 526-530, 2001.
- 15) Nosaka, Y., Arai, A., Kanda, E., Akasaki, T., Sumimoto, H., Miyasaka, N., Miura, O.: Rac is activated by tumor necrosis factor α and is involved in activation of Erk. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **285**, 675-679, 2001.
- 16) Ito, T., Matsui, Y., Ago, T., Ohta, K., Sumimoto, H.: Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. **EMBO J.** **20**, 3938-3946, 2001.
- 17) Yoshida, Y., Hosoda, E., Nakamura, T., Yamamoto, T.: Association of ANA, a member of the anti-proliferative Tob family proteins, with a Caf1 component of the CCR4 transcriptional regulatory complex. **Jpn. J. Cancer Res.** **92**, 592-596 2001.
- 18) Terasawa, H., Noda, Y., Ito, T., Hatanaka, H., Ichikawa, S., Ogura, K., Sumimoto, H., Inagaki, E.: Structure and ligand recognition of the PB1 domain: A novel protein module binding to the PC motif. **EMBO J.**, **20**, 15, 3947-3956, 2001.
- 19) Ago, T., Takeya, R., Hiroaki, H., Kuribayashi, F., Ito, T., Kohda, D., Sumimoto, H.: The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **287**, 733-738, 2001.
- 20) Takai, T., Hatanaka, H., Ichikawa, S., Yokota, T., Inagaki, E., Okumura, Y.: Effects of Double Mutation at Two Distant IgE-binding Sites in the Three-dimensional Structure of the Major House Dust Mite Allergen Der f 2 on IgE-binding and Histamine-releasing Activity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **65**, 7, 1601-1609, 2001.
- 21) Nishida, M., Nagata, K., Hachimori, Y., Horiuchi, M., Ogura, Mandiyan, K.V., Schlessinger, J., Inagaki, E.: Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. **EMBO J.** **20**, 12, 2995-3007, 2001.
- 22) Suzuki, T., Matsuda, S., Kawamura-Tsuzuku, J., Yoshida, Y., Yamamoto, T.: A serine/threonine kinase p90rsk1 phosphorylates the antiproliferative protein Tob, **Genes Cells** **6**, 131-138, 2001
- 23) Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Takenawa, T.: A novel N-WASP binding protein, WISH induced Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. **J. Cell Biol.** **152**, 471-482, 2001.
- 24) Kawasaki, M., Inagaki, E.: Random PCR-Based screening for soluble domains using green fluorescent protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **280**, 3, 842-4, 2001.
- 25) Rascan, I, M., Yamamoto, T.: B cell receptor signaling involves physical and functional association of FAK with Lyn and IgM, **FEBS Letters** **498**: 26-31, 2001
- 26) Yamaguchi, H., Miki, H., Suetsugu, S., Ma, L., Kirschner, M.W., Takenawa, T.: Two tandem verprolin homology domains are necessary for strong activation of Arp2/3 complex induced actin polymerization and induction of microspike formation by N-WASP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**, 12631-12636, 2000.
- 27) Takeya, R., Takeshige, K., Sumimoto, H.: Interaction of the PDZ domain of human PICK1 with class I ADP-ribosylation factors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **267**, 149-155, 2000.
- 28) Shiose, A., Sumimoto, H.: Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47^{phox} to activate the phagocyte NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.** **275**, 13793-13801, 2000.
- 29) Tanaka, H., Takeya, R., Sumimoto, H.: A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A₂. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **272**, 320-326,

- 2000.
- 30) Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T., Yamamoto, T.: Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts, **Cell** **103**, 1085-1097, 2000.
 - 31) Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., Takenawa, T.: IRSp53 is an essential intermediate in the regulation of membrane ruffling by Rac and WAVE. **Nature**, **408**, 732-735, 2000.
 - 32) Kawakami, T., Hasegawa, K., Teruya, K., Akaji, K., Horiuchi, M., Inagaki, F., Kurihara, Y., Uesugi, S., Aimoto, S.: Polypeptide Synthesis Using an Expressed Peptide as a Building Block via the Thioester Method. **Tetrahedron Letters**, **41**, 15, 2625-2628, 2000.
 - 33) Ogura, K., Tsuchiya, S., Terasawa, H., Yuzawa, S., Hatanaka, H., Mandiyan, V., Schlessinger, J., Inagaki, F.: Solution Structure of the SH2 Domai of Grb2 Complexed with the Shc-derived Phosphotyrosine-containing Peptide. **J. Mol. Biol.**, **289**, 439-445, 1999.
 - 34) Akasaki, T., Koga, H., Sumimoto, H.: Phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent activation of the small GTPase Rac2 in human neutrophils. **J. Biol. Chem.** **274**, 18055-18059, 1999.
 - 35) Ago, T., Nunoi, H., Ito, T., and Sumimoto, H.: Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47^{phox}: triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts intramolecular interaction in p47^{phox}, thereby activating the oxidase. **J. Biol. Chem.** **274**, 33644-33653, 1999.
 - 36) Izuhara, K., Arinobu, Y., Sumimoto, H., Nunoi, H., Takeya, R., Higuchi, K., Takeshige, K., Hamasaki, N., and Harada, N.: Association of the interleukin-4 receptor α chain with p47^{phox}, an activator of the phagocyte NADPH oxidase in B cells. **Mol. Immunol.** **36**, 45-52, 1999.
 - 37) Ogura, K., Nagata, K., Hatanaka, H., Habuchi, H., Kimata, K., Tate, S., Ravera, M. W., Jaye, M., Schlessinger, J., Inagaki, F.: Solution structure of human acidic fibroblast growth factor and interaction with heparin-derived hexasaccharide. **J. Biomol. NMR**, **13**, 11-24, 1999.
 - 38) Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., Kirschner M. W.: The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. **Cell**, **97**, 221-231, 1999.
 - 39) Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F., Sumimoto, H.: Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67 (phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.**, **274**, 35, 25051-60, 1999.
 - 40) Ikematsu, N., Yoshida, Y., K.-Tsuzuku, J., Ohsugi, M., Onda, M., Hirai, M., Fujimoto, J., Yamamoto, T.: Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases. **Oncogene**, **18**, 7432-7441, 1999.
 - 41) Tsuchiya, S., Ogura, K., Hatanaka, H., Nagata, K., Terasawa, H., Mandiyan, V., Schlessinger, J., Aimoto, S., Ohta, H., Inagaki, F.: Solution Structure of the SH2 Domain of Grb2/Ash Complexed with EGF Receptor-Derived Phosphotyrosine-Containing Peptide. **J. Biochem.**, **125**, 1151-1159, 1999.
 - 42) Kim, M., Tezuka, T., Suzuki, Y., Sumio Sugano, S., Momoki Hirai Tadashi Yamamoto. Molecular cloning and characterization of a novel *cbl*-family gene, *cbl-c*. **Gene** **239**, 145-154, 1999.
 - 43) Umemori, H., Hayashi, T., Inoue, T., Nakanishi, S., Mikoshiba, K., Yamamoto, T.:

- Involvement of protein tyrosine phosphatase in activation of the trimeric G protein G_{q/11}. **Oncogene** **18**, 7399-7402, 1999.
- 44) Ichikawa, S., Hatanaka, H., Yuuki, T., Iwamoto, N., Kojima, S., Nishiyama, C., Ogura, K., Okumura, Y., Inagaki, F.: Solution Structure of Der f 2, the Major Mite Allergen for Atopic Disease. **J. Biol. Chem.**, **273**, 1, 356-360, 1998.
- 45) Akhter, S., Ichihara-Tanaka, K., Kojima, S., Muramatsu, H., Inui, T., Kimura, T., Kaneda, N., Talukder, A.H., Kadomatsu, K., Inagaki, F., Muramatsu, T.: Clusters of Basic Amino Acids in Midkine: Roles in Neurite-Promoting Activity and Plasminogen Activator-Enhancing Activity. **J. Biochem.**, **123**, 1127-1136, 1998.
- 46) Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T.: The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. **EMBO J.** **17**, 6516-6526, 1998.
- 47) Abe, Y., Odaka, M., Inagaki, F., Lax, I., Schlessinger, J., Kohda, D.: Disulfide Bond Structure of Human Epidermal Growth Factor Receptor. **J. Biol. Chem.**, **273**, 18, 11150-11157, 1998.
- 48) Yutaka Yoshida, Satoru Matsuda, Junko K-Tsuzuku, Naoko Ikematsu, Johji Inzawa, Hisashi Umemori and Tadashi Yamamoto. ANA, a novel member of Tob/BTG1 family, is expressed in the ventricular zone of the developing central nervous system. **Oncogene** **16**, 2687-2693, 1998.
- 49) Kohno, T., Kawanishi, M., Matsuda, S., Ichikawa, H., Takada, M., Ohki, M., Yamamoto, T., Yokota, J.: Homozygous Deletion and Frequent Allelic loss of the 21q11.1-q21.1 region including the ANA gene in human lung carcinoma. **Gene, Chromosomes & Cancer** **21**, 236-243, 1998.
- 50) Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T.: WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin-polymerization induced by Rac. **EMBO J.** **17**, 6932-6941, 1998.

—国内

- 1) 稲垣冬彦：SH3 相互の新規認識、「Medical Science Digest」、29、2、30-33、2003
- 2) 吉永壮佐、稲垣冬彦：新規ドメイン PB1 の構造と機能—シグナル伝達における役割—、「蛋白質 核酸 酵素」、47、8、941-947、2002
- 3) 稲垣冬彦、湯澤聰：Grb2 を介するシグナル伝達の構造生物学、「生化学」、74、1229-1236、2002
- 4) 岩崎わかな、稲垣冬彦：へパリン/へパラン硫酸を介した増殖因子のシグナル伝達、「蛋白質 核酸 酵素」、46、13、1922-1928、2001
- 5) 稲垣冬彦：SH2 ドメイン・SH3 ドメイン、「生体の科学」、52、5、445-449、2001
- 6) 神田大輔、住本英樹、稲垣冬彦：複数の蛋白質ドメインの強調に基づく昨日調節—活性酸素生成を例として—、「蛋白質 核酸 酵素」、46、11、1726-1731、2001
- 7) 稲垣冬彦：SH2 ドメイン・SH3 ドメイン、「生体の科学」、52、5、444-449、2001
- 8) 寺沢宏明、稲垣冬彦：PB1 ドメインと PC モチーフ含有領域—タンパク質間相互作用を担う新しい構造ドメイン—、「細胞工学」、20、10、2001
- 9) 稲垣冬彦：SH2, SH3 によるシグナル認識、「道楽誌」、17、4、2-8、2000
- 10) 稲垣冬彦：SH2, SH3 によるシグナルの認識機構、「遺伝子産物（タンパク質）の形を観る—構造生物学とは何か?—」、122-131、1999
- 11) 湯澤聰、稲垣冬彦：特集 構造生物学が解明するシグナル伝達 Grb2 の柔軟な構造に見る巧みな結合様式、「細胞工学」、18、10、1487-1494、1999
- 12) 柳田充弘、伊倉光彦、森川耿右、難波啓一、稲垣冬彦、西村善文：座談会 構造生物

- 学はなにを目指すのか?、「蛋白質 核酸 酵素」、44、4、614-629、1999
- 13) 稲垣冬彦: II. 細胞内シグナル伝達 SH2、SH3 の構造生物学、「蛋白質 核酸 酵素」、44、4、355-367、1999

(2) 特許出願 (国内 1 件、海外 0 件)

①国内

- 1) 発明者 稲垣冬彦、横地政志
- 2) 発明の名称 帰属プロセスの共有化を可能とした NMR スペクトル解析法
- 3) 出願人 北海道大学
- 4) 出願日 平成 13 年 10 月 31 日

(3) 新聞報道等

①新聞報道

-北海道新聞 平成 14 年度 4 月 10 日 (月)

「バイオと IT で新薬づくり」北大と民間 2 社、病気と抑制するタンパク質特定

-北海道新聞 平成 14 年 6 月 10 日 (水)

IT とバイオ未来産業の胎動