

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）構造解析用核内タンパク質等の生産と評価
（英語）Production and characterization of nuclear proteins

補助事業担当者 （日本語）横浜市立大学生命医科学研究科 特任教授 西村善文
所属 役職 氏名：（英語）Yoshifumi Nishimura, Professor, Yokohama City University

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

支援

- ① 結晶化用タンパク質の生産：酵酵母発現系とバキュロウイルス（昆虫細胞）発現系の培養設備の補充などを行って支援の体制を整え、課題番号 1169-1（東邦大・伊関）新規青色光センサー「光活性化アデニルサンシクラーゼ 0aPAC の大量発現調製、および結晶化、構造解析に成功した。また、マウスの海馬の神経細胞に 0aPAC を供発現させ、青色光センサーにより神経細胞の軸索伸長能をコントロールする事に成功した。

Production of Protein for Crystallization:

By supplementing the protein production facilities with yeast and baculovirus (insect cell) expression systems, assignment number 1169-1 (Toho Univ., Prof. Iseki), we succeeded in preparing a novel blue-light sensor protein, photoactivated adenylyl cyclase 0aPAC. The protein was crystallized and the high-resolution crystal structure was solved. 0aPAC was also expressed in the hippocampal neurons of mice, allowing the axonal elongation of these neurons to be controlled by blue light.

- ② NMR 用タンパク質の生産：安定同位体でラベルした NMR 用タンパク質の調製と NMR の測定を行った。
- 課題番号 1121（名市大・中山）クロモドメインによるクロマチン結合様式の解明：Chp1 のクロモドメインの NMR 用試料を調製しヒストン H3 の 9 番目のリシンのメチル化(H3K9me)との複合体構造と noncoding RNA との相互作用を解析し、また Swi6 のクロモドメインの NMR 試料を調整しフリーの構造を解析し Chp1 と比較した(Mol. Cell 47, 228, 2012)。HP1 α のクロモドメインのリン酸化体と非リン酸化体を生産しリン酸化体と非リン酸化体の各フリーの構造とリン酸化体とヒストン H3K9me との複合体構造を NMR で解析した(Sci. Rep. 6, 22527, 2016)。課題番号 1122：新規クロマチン関連タンパク質 HiTAP1 とヒストン H3-H4 相互作用解析（名市大・田上）酵母 HiTAP1 の C 末ドメインの構造を NMR で解析し球状ドメイン構造を決定した。課題番号 2079：分裂期特異的な染色体パセンジャー複合体の動的構造解析（がん研・広田）がんで発現が高い Hec1(Highly expressed protein in cancer)のリン酸化ドメインの NMR 用安定同位体ラベルタンパク質を調整し、NMR を測定し天然変性タンパク質である事を確認し、AuroraB によるリン酸化反応をリアルタイムに追跡した。

Production of nuclear proteins for NMR analyses: Several nuclear proteins labeled with stable isotopes were produced and measured by NMR. For # 1121 (Nakayama, NCU), the chromodomain of Chp1 was produced and then subjected to NMR analysis. We have obtained the complex structure of the Chp1 chromodomain bound to the methylated histone H3 at lysine 9 and examined the interaction surface of the complex with a non-coding RNA. In addition, we have determined the NMR structure of the Siw6 chromodomain and compared it with the Chp1 chromodomain structure (Mol. Cell 47, 228, 2012). The phosphorylated and un-phosphorylated chromodomains of HP1 α labeled with stable-isotopes were produced and examined the NMR structures in their un-bound and bound states to the methylated histone H3 at lysine 9 (Sci. Rep. 6, 22527, 2016). For #1122, the interaction mode of a new chromatin-related protein, HiTAP1 with histone H3 was examined by NMR (Tagami, NCU). We have prepared the C-terminal domain of yeast HiTAP1 and determined its NMR structure. For # 2079, the chromatin passenger complex specific in mitosis has been examined by NMR (Hirota, Cancer Res.).

- ③ 質量分析 (MS) による性状解析：100 kDa を超える複合体のネイティブ質量分析を行う技術基盤を構築した。課題番号 1164-2（シミック HD・菅谷）について、バイオインフォ領域・池口に協力し、L-FABP の質量分析による性状解析を行った。課題番号 2021（理化学研究所・山口芳樹）について、生産領域・禾に協力し、筋ジストロフィー関連糖リン酸化酵素 SGK196 の質量分析による性状解析を行い、論文にまとめて報告した (Genes Cells, 2017)。課題番号 2149（東工大・岩崎博史）について、相同組換えに関連するタンパク質の質量分析による性状解析を行った。

Structural characterization by mass spectrometry: Techniques for observation of intact ions of large protein complexes (>100 kDa) was established by native mass spectrometry. For #1164-2 (Sugaya, CMIC HD), L-FABP was characterized by mass spectrometry in cooperation with Prof. M. Ikeguchi, PI of a project in the Bioinformatics area. For #2021 (Y. Yamaguchi, RIKEN), muscular dystrophy related glucose phosphorylating enzyme SGK 196 was characterized by mass

spectrometry in collaboration with Prof. T. Nogi, sub-PI of a project in the Production area. The results of #2021 were reported in a paper (Genes Cells, 2017). For #2149 (Prof. H. Iwasaki, Tokyo Institute of Technology), proteins related to homologous recombination were characterized by mass spectrometry.

- ④ X線溶液散乱 (SAXS) による性状解析：理研・松井（課題番号：1054）及び横浜市大・医・中村（課題番号：1109）の支援依頼に協力して各々のタンパク質の性状解析を行った。具体的には、結晶化スクリーニングを行い、結晶の得られなかったタンパク質試料に対し、会合状態、分子形状の解析、および推定される分子構造と実際の溶液中での分子構造の比較を SAXS 法により行った。その他の支援としては、東大・濡木、東大・清水、阪大・栗栖、京大・白川、早大・胡桃坂、広島大・小田、東工大・村上、東工大・岩崎、島根大・尾林、金沢大・安藤、横浜市大・緒方、横浜市大・朴、横浜市大・西村から依頼・提供されたタンパク質に対して、SAXS 法による性状評価を行うとともに、天然変性タンパク質および天然変性領域を含むマルチドメインタンパク質については、アンサンブル最適化法による揺らぎの解析（動的構造解析）も行った。なお、東大・濡木、京大・白川、島根大・尾林、金沢大・安藤、横浜市大・朴、横浜市大・西村との共同研究では成果の一部を論文発表した。

Assessment of protein solution by small-angle X-ray scattering (SAXS): We have assessed protein solutions prepared by Dr. Matsui's group of RIKEN and Dr. Nakamura's group of Faculty of Medicine, Yokohama City University by SAXS in terms of aggregation states, capability of low resolution structure analysis, comparison between predicted and real structures, and so on. In addition to these assessments, we carried out SAXS analyses of proteins, including intrinsically disordered proteins, prepared by Prof. Nureki's group (Univ. Tokyo), Prof. Shimizu's group (Univ. Tokyo), Prof. Kurisu's group (Osaka Univ.), Prof. Shirakawa's group (Kyoto Univ.), Prof. Kurumizaka's group (Waseda Univ.), Prof. Oda's group (Hiroshima Univ.), Prof. Murakami's group (Titech.), Prof. Iwasaki's group (Titech.), Dr. Obayashi's group (Shimane Univ.), Prof. Ando's group (Kanazawa Univ.), Prof. Park's group (Yokohama City Univ.), Prof. Nishimura's group (Yokohama City Univ.), and so on. Several results of these SAXS analyses have been published in Scientific journals.

- ⑤ 超遠心分析法による性状解析：複雑なタンパク質自己会合系や、タンパク質間相互作用解析のためのソフトウェアの整備を行った。課題番号 1223:Human NBR1-UBA domain の構造解析（京都大・栃尾）について超遠心分析を用いて自己会合状態の解析支援を行い、タンパク質挙動の濃度依存性から解離定数を計算した。課題番号 2016:AL アミロイドーシス関連免疫グロブリン軽鎖の可変ドメイン二量体の解離会合平衡に関する超遠心分析解析を行い、疾病関連タンパク質の濃度依存性から解離定数を計算した。また、超遠心分析を用いて人工設計タンパク質の性状解析を行った。

We have developed software for analyzing simple interactions and higher order self-association between proteins. Structural analysis of the human NBR1-UBA domain (Kyoto Univ., Prof. Tochio)

was carried out, and the dissociation constant was calculated from the concentration dependence of the protein behavior. We performed AUC analysis of dimerization of the AL-amyloid-associated immunoglobulin light chain, and determined the dissociation constant from the concentration dependence of the disease-related protein and an artificial variant.

・高度化

- ⑥ NMR 用タンパク質生産の高度化：安定同位体ラベルした基本転写因子 TFIIH の p62 の PH ドメインとがん抑制遺伝子産物 p53 のリン酸化転写活性化ドメインとの複合体の NMR による構造解析を行った (JACS, 136, 14143, 2014)。p53 の転写活性化ドメインの複合体構造は今まで数多く報告されているが全て標的タンパク質の表面上でヘリックスを形成していたが、今回初めてリン酸化転写活性化ドメインの複合体構造を解析し、標的の PH ドメイン上で伸びた紐様構造で結合していることを明らかにした。安定同位体ラベルした p53 の転写活性化ドメイン中に存在する 9 個のセリンやトレオニンの特異的なリン酸化反応を種々の酵素を用いて追跡し、さらにリン酸化に伴う PH ドメインの結合反応をリアルタイムに NMR で追跡した。またヌクレオチド除去修復因子 XPC の酸性ドメインの特異的なリン酸化反応を引き起こす酵素を同定し、更に p62 との複合体形成反応も NMR によりリアルタイムに追跡した (Oncogenesis, 4, e150, 2015)。各々安定同位体ラベルした XPC の酸性ドメインと p62 の複合体構造を NMR で解析した (Structure 23, 1827, 2015)。また細胞周期特異的転写因子 DP1 の酸性度メインと p62 の複合体構造も NMR で解析した (J. Mol. Biol. 428, 4993, 2016)。安定同位体ラベルしたヒストン H2A と H2B 複合体の各々の安定同位体ラベルタンパク質を生産し複合体を再構築し NMR により主鎖の帰属を行った。主鎖の化学シフトを用いてバイオインフォマティクス領域の池口との共同研究で CS-Rosetta を用いて初めて H2A-H2B 単独の構造を決定した (Sci. Rep. 6, 24999, 2016)。さらにヒストン H2A-H2B との相互作用を検討するためにヒストンシャペロン NAP1 の全長、N 末欠損体、C 末欠損体、C 末酸性ドメインなどの試料調製を行い NAP1 の C 末酸性ドメインはヒストン H2A-H2B との結合に必要ながヒストン H3-H4 との結合には必要ないことを確認した (Genes Cells 21, 571, 2016)。線維筋痛症の標的タンパク質と考えられる Sin3 と NRSF の相互作用を阻害する化合物の新規デザインを NMR スクリーニングの結果に基づいてインシリコで行いこれらの化合物について新たに NMR で解析を行った。

Advanced NMR research: We determined the tertiary structure of the transactivation domain from p53 bound to the PH domain of p62 subunit in TFIIH (JACS, 136, 14143, 2014). So far, several tertiary structures of the p53 transactivation domain bound to target proteins have been reported to hold a helix on the target proteins, however, we have revealed that the phosphorylated p53 transactivation domain holds an extended string-like conformation on the p62 PH domain. In addition, we have revealed specific kinases, which phosphorylate each of 9 serine or threonine residues in the p53 transactivation domain and monitored the serine or threonine phosphorylation by each kinase with NMR (Oncogenesis, 4, e150, 2015). In addition, we determined the tertiary structures of the p62 PH domain bound to the acidic domains of a repair factor, XPC (Structure 23, 1827, 2015) and a cell cycle transcription factor, DP1 (J. Mol. Biol. 428, 4993, 2016). We have determined the tertiary structure of histone H2AH2B labeled

with stable isotopes in a collaboration with Ikeguchi (YCU) (Sci. Rep. 6, 24999, 2016). In addition, we have examined the interaction of a histone chaperone, human NAP1 with histone H2A/H2B and revealed the C-terminal acidic domain of human NAP1 (Genes Cells 21, 571, 2016). And interaction inhibitors between a corepressor, mSin3B and a neural repressor, NRSF/REST have been developed in order to rescue several neurological diseases.

- ⑦ 質量分析 (MS) によるタンパク質性状解析の高度化: ヒストン H2A/H2B 二量体および H3/H4 四量体についてイオンモビリティ質量分析で観測される気相での構造の二峰性について、分子動力学シミュレーションにより、取りうる気相での構造モデルを算出し、実験結果と照らし合わせて解析して論文発表した (Anal Chem 2013)。テイル部分にアセチル化および脱イミノ化を行ったヒストン H2A/H2B 二量体、およびテイル欠損させたヒストン H2A/H2B 二量体の MS による性状解析を行い、脱イミノ化により高塩濃度に対する安定性が高くなるがアセチル化では変化がないこと、気相での二量体の構造の二峰性はテイル部の荷電状態とは無関係なテイル部の構造多様性に由来すること、テイル欠損させることにより水溶液中での構造が緩むこと等を発見し論文発表した (Anal Chem 2015, Protein Sci. 2015)。再構成したヌクレオソームコア (NCP) をエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) で観測することに成功し、再構成の過程においてヘキサソーム NCP がオクタソーム NCP とともに生成されることを見出し、論文で発表した (Biochemistry 2013)。テイル欠損させたヒストン H2A/H2B 二量体を含むオクタソーム NCP も再構成できることを電気泳動や ESI-MS により確認した。ヒストンシャペロン NAP1 とヒストン多量体の複合体のネイティブ質量分析に成功し、NAP1 の C 末端の酸性領域がヒストンの認識において重要であることを確認した (Genes Cells 2016)。修飾および変異に伴う動的な構造変化を解析する目的で、修飾されたヌクレオソームコアの調製およびネイティブ質量分析を行った。早大・胡桃坂との共同研究で、オーバーラッピングダイヌクレオソームの質量分析を行い、ヒストンと DNA のストイキオメトリの決定に成功し、原子レベルの構造解析のデータとともに論文発表した (Science 2017)。

Methodology advancement of mass spectrometry (MS) in protein characterization: The bimodality for the histone H2A/H2B dimers and H3/H4 tetramers in ion mobility mass spectrometry (IM-MS) was investigated using molecular dynamics (MD) simulation. Possible structural models of the dimers and tetramers were successfully suggested by MD simulation, and were evaluated by comparing with the experimental collision cross-section values observed by IM-MS (Anal. Chem. 2013). Acetylated and/or deiminated histone H2A/H2B dimers and tail-truncated H2A/H2B dimers were characterized by mass spectrometry (Anal. Chem. 2015, Protein Sci. 2015). We found that 1) The dimer got stabilized by deimination at high-salt concentrations, but acetylation did not affect on the dimer stability. 2) The bimodality of the gas phase structure of the dimer was derived from the structural diversity of the histone N-tail regions. 3) The bimodality of the gas phase structure is irrelevant to the charge states of the tail regions. 4) The structure of the dimer was relaxed in the aqueous solution if the tail regions were depleted. Intact ions of the reconstituted nucleosome core particle (NCP) was successfully observed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). It was found that hexasome NCP was

generated together with octasomal NCP in the process of reconstruction (Biochemistry 2013). It was also identified that tail-depleted histone H2A/H2B dimer can form an octasomal NCP; this was verified by electrophoresis and ESI-MS under native conditions. The stoichiometry of the histone chaperone NAP1 and histone multimer complex was definitely determined by native mass spectrometry (Genes Cells 2016). It was demonstrated that the C-terminal acidic region of NAP1 is important for histone recognition. In collaboration with Prof. Kurumizaka, Waseda University, native mass spectrometry of overlapping dinucleosomes was carried out and stoichiometry of histones and DNA was successfully determined (Science 2017).

- ⑧ X線溶液散乱 (SAXS) の高度化：試料自動交換装置を設置するとともに、既存の SAXS 装置の光学系および検出系の一部を改良した。さらに、光学系および検出系を改良した X線溶液散乱装置に試料自動交換装置を組み込み、両者が連動して作動する制御系を開発するとともに、長時間安定的に作動することを確認した。高度化においては、既存の SAXS 装置の光学系および検出系の一部の改良により、放射光 (PF および SPring-8) と同程度の SAXS データを放射線損傷なく測定できるようになった。また、自動試料交換装置により利便性が大きく増し、より多数のサンプルを連続して測定可能となった。このように高度化した X線溶液散乱装置を活用して、DNA メチル化維持とヒストン修飾の認識に関わるタンパク質 UHRF1 のリン酸化及び変異導入による溶液構造の変化を解析し、ヒストン修飾の認識機構を明らかにし論文発表した。また、早大・胡桃坂と様々なヒストンバリエントを有するヌクレオソームやヘキサソームの性状解析に関して共同研究を行い、その成果の一部を論文発表した。同様に、早大・胡桃坂と様々なヒストンバリエントを有するトリ・ヌクレオソームの性状解析を行い、その動態を X線溶液散乱法と計算科学シミュレーションで明らかにした。さらに、金沢大・安藤とは、SAXS 法と高速 AFM 法を用いて天然変性タンパク質の動態解析を行い、高速 AFM 観察から見積もられた分子の End-to-end distance が SAXS 法で計測される分子の慣性半径 R_g と強い相関関係にあることを証明し、Nature Nanotech. に投稿した (現在リバイス中)。

Improvement of small-angle X-ray scattering (SAXS) measurement: We have improved an automatic sample changer as well as X-ray optics and detecting components installed for SAXS measurement using laboratory X-ray source. As results of these improvements, these sample changers and SAXS components have been established to work very stably for longer measurement and facilitate automatic data collection of a lot of protein solutions. Furthermore, the SAXS system improved here has been shown to be able to collect high quality SAXS data corresponding to those collected in synchrotron radiation facilities, such as PF and SPring-8, without radiation damage. Using the SAXS data collection system improved here, we have analyzed the structural change of UHRF, which concerns DNA methylation maintenance and histone recognition, by specific phosphorylation and mutations. We have also analyzed the dynamical structures of nucleosomes and hexasomes including various histone variants, and some of these results have been published in Scientific journals (Collaboration with Prof. Kurumizaka of Waseda Univ.). We have also analyzed the dynamical structures of tri-nucleosome with various histone variants (Collaboration with Prof. Kurumizaka of Waseda Univ.). Furthermore, we have elucidated that

the end-to-end distances estimated from high-speed atomic force microscopy (AFM) and the radius of gyration R_g derived from SAXS data are highly involved with each other (Collaboration with Prof. Ando of Kanazawa Univ.), and the results were published in Nature Nanotech. (now in revision).

- ⑨ 抗体を用いたタンパク質生産の高度化: インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ断片を抗原としてモノクローナル抗体を作成した。RNA ポリメラーゼの断片 (PA, PB1, PB2) の RNA 結合部位の発現系の構築・大量生産・精製を行い、タンパク質をマウスに免疫し、合計 28 種類のハイブリドーマを得る事ができた。マウスから、腹水を採集して単離精製を行い、抗原タンパク質との結合確認を行った。その結果、PA に特異的に結合し、ウイルス増殖を阻害する抗体 PA11.9 を開発する事ができた。また、抗体 PA11.9 の可変領域のアミノ酸配列を決定し、抗体の構造解析にも成功した。また、PB2 の RNA 結合部位からの 2 個の抗体が抗原タンパク質と結合確認が認められ、合計 3 個の抗体作製に成功した。その中から、PB2 3-1.6 抗体は分子生物学的研究ツールでの診断試薬の使用可能として特許出願 (特願 2014-068824) をしており、民間社へのライセンス契約を進めている。

Advancement of protein production using antibodies: Monoclonal antibodies were prepared against fragments of influenza virus RNA polymerase. By expressing pieces of the RNA-binding regions of the polymerase subunits (PA, PB1, PB2) and then immunizing mice with the purified proteins, we were able to obtain a total of 28 different hybridomas. Ascites fluid was collected and antibody binding to the antigen protein was confirmed. As a result, it was possible to develop antibody PA11.9, which specifically binds to the PA subunit and inhibits virus propagation. We also determined the amino acid sequence of the variable region of PA11.9, and succeeded in structural analysis of this antibody. In addition, two antibodies were confirmed to bind to the RNA binding site of PB2 protein. One of these, PB2 3-1.6 antibody, is the subject of a patent application (Japanese Patent Application No. 2014-068824) for a diagnostic reagent that can be used as a molecular biological research tool, and has been successfully licensed to a private company.

⑩ 課題の総合的推進

課題全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、機関内や機関間で定期的に会合を持った。西村、佐藤、朴、明石はお互いの実験で密接な議論を行ってきた。また西村や分担機関の胡桃坂が調製した試料での明石による MS 実験での議論、西村と胡桃坂による試料調製の共同実験での議論、分担機関セルフリースサイエンスが調製した試料の西村による NMR 実験での議論など機関内や機関間で密接な議論を行い本課題の支援や高度化が総合的に推進できる体制を構築している。

Promotion of activities. Many times, the project members in YCU, Drs. Nishimura, Sato, Park and Akashi have gathered and discussed on their research activities, together with Dr. Kurumizaka from Waseda Univ.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 35件）

1. Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, Saotome-Nakamura A, Akashi S, Nishimura Y, Nagata K. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasmin/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling. *Nucleic Acids Res.* 2012, Jun;40(11):4861-78.
2. Ishida M, Shimojo H, Hayashi A, Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K, Nishimura Y, Nakayama J. Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. *Mol Cell.* 2012, Jul 27;47(2):228-41.
3. Arita K, Isogai S, Oda T, Unoki M, Sugita K, Sekiyama N, Kuwata K, Hamamoto R, Tochio H, Sato M, Ariyoshi M, Shirakawa M. Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012, Aug 7;109(32):12950-5.
4. Yoshida H, Kawai F, Obayashi E, Akashi S, Roper DI, Tame JR, Park SY. Crystal structures of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the apo and cefotaxime-bound forms. *J Mol Biol.* 2012, Oct 26;423(3):351-64.
5. Nishiyama T, Noguchi H, Yoshida H, Park SY, Tame JR. The structure of the deacetylase domain of *Escherichia coli* PgaB, an enzyme required for biofilm formation: a circularly permuted member of the carbohydrate esterase 4 family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2013, Jan;69(Pt 1):44-51.
6. Saikusa K, Kuwabara N, Kokabu Y, Inoue Y, Sato M, Iwasaki H, Shimizu T, Ikeguchi M, Akashi S. Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering. *Analyst.* 2013, Mar 7;138(5):1441-9.
7. Saikusa K, Fuchigami S, Takahashi K, Asano Y, Nagadoi A, Tachiwana H, Kurumizaka H, Ikeguchi M, Nishimura Y, Akashi S. Gas-phase structure of the histone multimers characterized by ion mobility mass spectrometry and molecular dynamics simulation. *Anal Chem.* 2013, Apr 16;85(8):4165-71.
8. Nozawa K, Ishitani R, Yoshihisa T, Sato M, Arisaka F, Kanamaru S, Dohmae N, Mangroo D, Senger B, Becker HD, Nureki O. Crystal structure of Cex1p reveals the mechanism of tRNA trafficking between nucleus and cytoplasm. *Nucleic Acids Res.* 2013, Apr 1;41(6):3901-14.
9. Kikuchi J, Shibayama N, Yamada S, Wada T, Nobuyoshi M, Izumi T, Akutsu M, Kano Y, Sugiyama K, Ohki M, Park SY, Furukawa Y. Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. *PLoS One.* 2013, Apr 11;8(4):e60649.
10. Trewhella J, Hendrickson WA, Kleywegt GJ, Sali A, Sato M, Schwede T, Svergun DI, Tainer JA, Westbrook J, Berman HM. Report of the wwPDB Small-Angle Scattering Task Force: data requirements for biomolecular modeling and the PDB. *Structure.* 2013, Jun 4;21(6):875-81.

11. Cho KJ, Lee JH, Hong KW, Kim SH, Park Y, Lee JY, Kang S, Kim S, Yang JH, Kim EK, Seok JH, Unzai S, Park SY, Saelens X, Kim CJ, Lee JY, Kang C, Oh HB, Chung MS, Kim KH. Insight into structural diversity of influenza virus haemagglutinin. *J Gen Virol.* 2013, Aug;94(Pt 8):1712-22.
12. Azegami N, Saikusa K, Todokoro Y, Nagadoi A, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S. Conclusive evidence of the reconstituted hexasome proven by native mass spectrometry. *Biochemistry.* 2013, 52(31), 5155-5157.
13. Ichikawa Y, Morohashi N, Nishimura Y, Kurumizaka H, Shimizu M. Telomeric repeats act as nucleosome-disfavouring sequences in vivo. *Nucleic Acids Res.* 2014, Feb;42(3):1541-52.
14. Sugiyama M, Arimura Y, Shirayama K, Fujita R, Oba Y, Sato N, Inoue R, Oda T, Sato M, Heenan RK, Kurumizaka H. Distinct features of the histone core structure in nucleosomes containing the histone H2A.B variant. *Biophys J.* 2014, May 20;106(10):2206-13.
15. Okuda M, Nishimura Y. Extended string binding mode of the phosphorylated transactivation domain of tumor suppressor p53. *J Am Chem Soc.* 2014 Oct 8;136(40):14143-52.
16. Voet AR, Noguchi H, Addy C, Simoncini D, Terada D, Unzai S, Park SY, Zhang KY, Tame JR. Computational design of a self-assembling symmetrical β -propeller protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, Oct 21;111(42):15102-7.
17. Nishibuchi G, Machida S, Osakabe A, Murakoshi H, Hiragami-Hamada K, Nakagawa R, Fischle W, Nishimura Y, Kurumizaka H, Tagami H, Nakayama J. N-terminal phosphorylation of HP1 α increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 2014, Nov 10;42(20):12498-511.
18. Soh YM, Bürmann F, Shin HC1, Oda T, Jin KS, Toseland CP, Kim C, Lee H, Kim SJ, Kong MS, Durand-Diebold ML, Kim YG, Kim HM, Lee NK, Sato M, Oh BH, Gruber S8. Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding. *Mol Cell.* 2015, Jan 22;57(2):290-303.
19. Saikusa K, Nagadoi A, Hara K, Fuchigami S, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S. Mass spectrometric approach for characterizing the disordered tail regions of the histone H2A/H2B dimer. *Anal Chem.* 2015, Feb 17;87(4):2220-7.
20. Ichikawa Y, Nishimura Y, Kurumizaka H, Shimizu M. Nucleosome organization and chromatin dynamics in telomeres. *Biomol Concepts.* 2015, Mar;6(1):67-75.
21. Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, Fukumura H, Sato I, Kim JH, Hoshino Y, Lee J, Amemiya N, Sato M, Hirata K, Singh DJ, Masuda T, Yamamoto M, Urano T, Yoshida K, Tanigaki K, Yamamoto M, Sato M, Inoue S, Aoki I, Ishikawa Y. A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging. *Sci Rep.* 2015, Mar 17;5:9194.
22. Okuda M, Nishimura Y. Real-time and simultaneous monitoring of the phosphorylation and enhanced interaction of p53 and XPC acidic domains with the TFIIH p62 subunit. *Oncogenesis.* 2015, Jun 1;4:e150.
23. Saikusa K, Shimoyama S, Asano Y, Nagadoi A, Sato M, Kurumizaka H, Nishimura Y, Akashi S. Charge-neutralization effect of the tail regions on the histone H2A/H2B dimer structure. *Protein Sci.* 2015, Aug;24(8):1224-31.

24. Okuda M, Kinoshita M, Kakumu E, Sugasawa K, Nishimura Y. Structural Insight into the Mechanism of TFIIH Recognition by the Acidic String of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC. *Structure*. 2015, Oct 6;23(10):1827–37.
25. Hishiki A, Hara K, Ikegaya Y, Yokoyama H, Shimizu T, Sato M, Hashimoto H, Structure of a novel DNA-binding domain of helicase-like transcription factor (HLTF) and its functional implication in DNA damage, *J. Biol. Chem.* 290. 2015, 13215–13223.
26. Okuda M, Nishimura Y. Dataset for the NMR structure of the intrinsically disordered acidic region of XPC bound to the PH domain of TFIIH p62. *Data Brief*. 2016, Jan 2;6:571–7.
27. Ohtomo H, Akashi S, Moriwaki Y, Okuwaki M, Osakabe A, Nagata K, Kurumizaka H, Nishimura Y. C-terminal acidic domain of histone chaperone human NAP1 is an efficient binding assistant for histone H2A–H2B, but not H3–H4. *Genes Cells*. 2016, Mar;21(3):252–63.
28. Shimojo H, Kawaguchi A, Oda T, Hashiguchi N, Omori S, Moritsugu K, Kidera A, Hiragami-Hamada K, Nakayama J, Sato M, Nishimura Y. Extended string-like binding of the phosphorylated HP1 α N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail. *Sci Rep*. 2016, Mar 3;6:22527.
29. Moriwaki Y, Yamane T, Ohtomo H, Ikeguchi M, Kurita J, Sato M, Nagadoi A, Shimojo H, Nishimura Y. Solution structure of the isolated histone H2A–H2B heterodimer. *Sci Rep*. 2016, May 16;6:24999.
30. Ohki M, Sugiyama K, Kawai F, Tanaka H, Nihei Y, Unzai S, Takebe M, Matsunaga S, Adachi S, Shibayama N, Zhou Z, Koyama R, Ikegaya Y, Takahashi T, Tame JR, Iseki M, Park SY. Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016, Jun 14;113(24):6659–64.
31. Okuda M, Higo J, Komatsu T, Konuma T, Sugase K, Nishimura Y. Dynamics of the Extended String-Like Interaction of TFIIIE with the p62 Subunit of TFIIH. *Biophys J*. 2016, Sep 6;111(5):950–62.
32. Okuda M, Araki K, Ohtani K, Nishimura Y. The Interaction Mode of the Acidic Region of the Cell Cycle Transcription Factor DP1 with TFIIH. *J Mol Biol*. 2016, Dec 4;428(24 Pt B):4993–5006.
33. Kobayashi T, Obana Y, Kuboi N, Kitayama Y, Hayashi S, Oka M, Wada N, Arita K, Shimizu T, Sato M, Kanaly RA, Kutsuna S. Analysis of the Fine-Tuning of Cyanobacterial Circadian Phase by Monochromatic Light and Long-Day Conditions. *Plant Cell Physiol*. 2016, 57, 105–114
34. Nagae M, Mishra SK, Neyazaki M, Oi R, Ikeda A, Matsugaki N, Akashi S, Manya H, Mizuno M, Yagi H, Kato K, Senda T, Endo T, Nogi T, Yamaguchi Y. 3D structural analysis of Protein O-Mannosyl Kinase POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy. *Genes Cells*. 2017, 22(4), 348–359.
35. Kato D, Osakabe A, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park SY, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science*. 2017, 356(6334), 205–208.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Behavior of intrinsically disordered regions within a protein complex of Swi5-Sfr1 characterized by IM-MS and SAXS, 口頭, Saikusa K, Kuwabara N, Kokabu Y, Sato M, Iwasaki H, Ikeguchi M, Shimizu T, Akashi S, 19th International Conference on Mass Spectrometry, 2012/9/16-21, 国内.
2. What happens on the histone multimers in the gas phase?, 口頭, Saikusa K, Fuchigami S, Takahashi K, Asano Y, Nagadoi A, Tachiwana H, Kurumizaka H, Ikeguchi M, Nishimura Y, Akashi S, 19th International Conference on Mass Spectrometry, 2012/9/16-21, 国内.
3. Characterization of histone multimers in the gas phase by ion mobility mass spectrometry and molecular dynamics simulation, ポスター, Saikusa K, Fuchigami S, Takahashi K, Asano Y, Nagadoi A, Tachiwana H, Kurumizaka H, Ikeguchi M, Nishimura Y, Akashi S, 第50回日本生物物理学会年会, 2012/9/22-24, 国内.
4. SAXS & MD Simulation to Investigate Protein Flexibility in Solution, 口頭, Sato M, Ikeguchi M, Oroguchi T, The 2st Annual Meeting for Whole-Organism Science Society. Joint Meeting with The 11th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project, 2012/9/28-29, 国内.
5. Protein Dynamics Investigated by Small-Angle X-ray Solution scattering and Molecular Dynamics Simulations, 口頭, Oroguchi T, Hashimoto H, Oda T, Sato M, and Ikeguchi M, 15th International Small-Angle Scattering Conference 2012/ 11/18-23, 国外.
6. 溶液散乱と分子動力学計算で明らかにされるタンパク質の構造揺らぎと水和構造, 口頭, 佐藤衛, 日本中性子科学会第12回年会, 2012/12/10-11, 国内.
7. 質量分析を用いたスクレオソームのアセチル化に伴う構造変化の解析, ポスター, 畔上奈々子, 七種和美, 神蔵祐典, 戸所泰人, 立和名博昭, 長土居有隆, 胡桃坂仁志, 西村善文, 明石知子, 第85回日本生化学会大会, 2012/12/14-16, 国内.
8. 高分子としてのタンパク質構造解析: 様々の手法のシンクロナイゼーション質量分析の立場から, 口頭, 明石知子, 第6回ソフトマター中性子散乱研究会(依頼講演), 2012/12/21, 国内.
9. Characterization of IDPs by Mass Spectrometry and MD simulation, 口頭, Akashi S, 2nd International Symposium on Intrinsically Disordered Proteins, 2013/1/23-24, 国内.
10. 質量分析による構造生物学, 口頭, 明石知子, 中性子連携研究会(第4回中性子小角散乱解析法研究会)(依頼講演), 2013/3/14, 国内.
11. 高分子としてのタンパク質構造解析: 小角X線, 中性子散乱の立場から, 口頭, 佐藤衛, 平成24年度第1回生物構造学研究会, 2013/3/21, 国内.
12. SAXS & MD Simulation to Investigate Protein Flexibility in Solution, 口頭, Sato M, International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB2013), 2013/3/26-29, 国内.
13. Structure of histone H2A/H2B dimer analyzed by ion mobility mass spectrometry and molecular dynamics simulation, ポスター, Saikusa K, Fuchigami S, Asano Y, Nagadoi A, Tachiwana H, Kurumizaka H, Ikeguchi M, Nishimura Y, Akashi S, The 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2013/6/9-13, 国外.

14. Protein Dynamics Investigated by SAXS and MD Simulation, 口頭, Sato M, International Conference on Structural Genomics-Structural Life Science-(ICSG2013-SLS), 2013/7/29-8/1, 国内.
15. 将来光源を用いた新しいタンパク質の構造・機能研究, 口頭, 佐藤衛, 第31回関西界面科学セミナー(光が拓く表面・界面主役の世界), 2013/8/2-3, 国内.
16. イオンモビリティ質量分析と分子動力学シミュレーションを用いたヒストン多量体の構造解析, 口頭, 七種和美, 湊上壮太郎, 浅野裕輝, 高橋恭平, 長土居有隆, 立和名博昭, 胡桃坂仁志, 池口満徳, 西村善文, 明石知子, 第61回質量分析総合討論会, 2013/9/10-12, 国内.
17. スクレオソームコアの再構成生成物の質量分析, ポスター 第61回質量分析総合討論会, ポスター, 畔上奈々子, 七種和美, 戸所泰人, 長土居有隆, 胡桃坂仁志, 西村善文, 明石知子, 2013/9/10-12, 国内.
18. 低エミッタンス高輝度光源を用いたタンパク質の新しい構造解析法の提案, 口頭, 佐藤衛, 第3世代中型高輝度放射光源(SLiT-J)の実現に向けて—先端学術研究と産業技術支援—, 2013/12/9-10, 国内.
19. MSとSAXSを組み合わせたタンパク質の解析, 口頭, 明石知子, SPRUC 拡大研究会・SPring-8 利用ワークショップ-SPring-8とユーザーのさらなる連携を目指して(依頼講演), 2014/2/1-2, 国内.
20. ヒストン H2A/H2B 二量体の気相中における構造多様性の要因, 口頭, 七種和美, 長土居有隆, 原佳那, 湊上壮太郎, 胡桃坂仁志, 西村善文, 明石知子, 第62回質量分析総合討論会, 2014/5/14-16, 国内.
21. Protein Flexibility Investigated by SAXS & MD Simulation, 口頭, Sato M, The 4th Asia Pacific Protein Association (APPA) Conference, 2014/5/17-20, 国外.
22. ネイティブ質量分析—タンパク質複合体のストイキオメトリーの確実な決定手法, 口頭, 明石知子, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014/6/25-27, 国内.
23. DNA 架橋損傷修復に関わる天然変性タンパク質 Hef の構造研究, ポスター, 小田隆, 小林裕也, 舘岡太郎, 宮城泰城, 石黒あかり 有田恭平, 禾晃和, 石野良純, 杉山正明, 佐藤衛, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014/6/25-27, 国内.
24. Native Mass Spectrometry of Reconstituted Human Nucleosome Core Particle, ポスター, Akashi S, Azegami N, Saikusa K, Todokoro Y, Nagadoi A, Kurumizaka H, Nishimura Y, 20th International Conference on Mass Spectrometry, 2014/8/24-28, 国外.
25. Behavior of the disordered tail regions of the histone H2A/H2B dimer, ポスター, Saikusa K, Nagadoi A, Hara K, Fuchigami S, Kurumizaka H, Nishimura Y and Akashi S, 20th International Conference on Mass Spectrometry, 2014/8/24-28, 国外.
26. Structural dynamics of tri-nucleosome studied by combination of coarse grained molecular simulation and SAXS, ポスター, Takagi Y, Kokabu Y, Oda T, Tachiwana H, Kenzaki H, Kurumizaka H, Sato M, Ikeguchi M, Takada S, 日本生物物理学会第52回年会, 2014/9/25-27, 国内.
27. X線溶液散乱—創薬研究への応用, 口頭, 佐藤衛, 創薬コンソ分野別研究会, 2014/10/7, 国内.

28. X線溶液散乱を中心にした相関構造解析—揺らぎの大きい軟らかなタンパク質の構造解析を目指して, 口頭, 佐藤衛, 第 87 回日本生化学会大会(シンポジウム), 2014/10/15-18, 国内.
29. テイル欠損したヌクレオソームの調製と修飾による構造変化の解析, ポスター, 前澤拓也, 七種和美, 長土居有隆, 胡桃坂仁志, 西村善文, 明石知子, 第 87 回日本生化学会大会, 2014/10/15-18, 国内.
30. X線溶液散乱法を中心にした軟らかなタンパク質の相関構造解析, 口頭, 佐藤衛, 大阪大学蛋白質研究所セミナー・包括脳ネットワーク研究会・第 5 回神経科学と構造生物学の融合研究会, 2014/12/4-5, 国内.
31. タンパク質の天然変性領域を標的にした創薬, 口頭, 佐藤衛, 翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成・平成 26 年度諮問委員会, 2015/3/10, 国内.
32. タンパク質複合体中の天然変性領域の振る舞い, 口頭, 七種和美, 足立風水也, 越阪部晃永, 前澤拓也, 西村善文, 胡桃坂仁志, 明石知子, 第 63 回質量分析総合討論会, 2015/6/17-19, 国内.
33. Behavior of histone H2A/H2B dimers in the gas phase, The 3rd Global Mass Spectrometry Trends and Ion Chemistry, 口頭(招待), Akashi S, ASM POSTECH, 2015/8/17-18, 国外.
34. Native Mass Spectrometry of Protein Complexes with Intrinsically Disordered Regions, 口頭(招待), Akashi S, 2015 Korean Society for Mass Spectrometry Annual Meeting, 2015/8/19-21, 国外.
35. MD-SAXS によるタンパク質のゆらぎ解析, 口頭, 池口満徳, 小甲裕一, 佐藤衛, 日本結晶学会平成 27 年度年会, 2015/10/18-19, 国内.
36. DNA 架橋損傷修復に関わる天然変性タンパク質 Hef の構造研究, ポスター, 小田隆, 関野絢子, 中筋航, 石黒あかり, 石野良純, 佐藤衛, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/7-9, 国内.
37. 微小管親和性の異なるダイニンストーク領域の構造変化, ポスター, 西河洋祐, 岩崎遥華, 松本 崇, 西田紀貴, 小田隆, 佐藤衛, 嶋田一夫, 田中秀明, 栗栖源嗣, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/7-9, 国内.
38. タンパク質複合体の天然変性領域の構造への影響, 口頭, 明石知子, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/7-9, 国内.
39. Behavior of Intrinsically Disordered Regions in Protein Complexes, 口頭(招待講演), Saikusa K, Osakabe A, Kawata Y, Kurumizaka H, and Akashi S, 21st International Conference on Mass Spectrometry, 2016/8/21-26, 国外.
40. NMR Study of the Isolated Histone H2A-H2B Heterodimer, ポスター, Ohtomo H, Moriwaki Y, Yamane T, Ikeguchi M, Kurita J, Sato M, Nagadoi A, Shimojo H, Nishimura Y, The XXVIIth International Conference on on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
41. NMR Study on the Interaction between the Tumor Suppressor p53 and the General Transcription Factor TFIIH, ポスター, Okuda M, Nishimura Y, The XXVIIth International Conference on on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
42. Structural basis for photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase from the photosynthetic cyanobacterium *Oscillatoria acuminata*, ポスター, Ohki M, Sugiyama K, Kawai F, Matsunaga S, Iseki M, Park SY, ポスター, The 30th European crystallographic

- meeting. Congress center Basel, Switzerland, 2016/8/28, 国外.
43. Structural study on interaction between PCNA and intrinsically disordered protein Hef in DNA interstrand crosslink repair, ポスター, Oda T, Ishiguro A, Miyagi T, Sekino A, Nakasuji W, Kobayashi Y, Tateoka T, Sugiyama M, Ishino Y, Sato M, 第42回内藤コンファレンス, 2016/10/4-7, 国内.
 44. センダイウイルスCタンパク質によるI型インターフェロン不応答機構の分子基盤解明, 口頭, 小田康祐, 小田隆, 的場康幸, 入江崇, 佐藤衛, 坂口剛正, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23-25, 国内.
 45. 蛋白質選択的飽和によるタンパク質-リガンド相互作用観測の試み, ポスター, 栗田順一, 平尾優佳, 西村善文, 第55回NMR討論会, 2016/11/16-18, 国内.
 46. Structural analysis of Calredoxin from Chlamydomonas reinhardtii, ポスター, Mutoh R, Tanaka H, Matsumoto T, Oda T, Sato M, Hipper M, Kurisu G, 第54回日本生物物理学会年会, 2016/11/25-27, 国内.
 47. アセチル化に伴うヌクレオソームの構造変化の解析, 口頭, 七種和美, 新屋大貴, 加藤大貴, 畔上奈々子, 長土居有隆, 泉俊輔, 西村善文, 胡桃坂仁志, 明石知子, 日本化学会第97春季年会(2017), 2017/3/16-19, 国内.
 48. Structural basis of a sliding mechanism of DNA clamp regulated by the intrinsically disordered region of Hef, ポスター, Oda T, Sekino A, Ishiguro A, Miyagi T, Nakasuji W, Kobayashi W, Tateoka T, Sugiyama M, Ishino Y, Sato M, "The 78th Okazaki Conference" Grand Challenges in Small-angle Scattering", 2017/3/18-21, 国内.
 49. X線溶液散乱と分子動力学計算でみるタンパク質の動的構造と水和構造, 口頭, 佐藤衛, 新世代研究所水和ナノ構造・バイオ単分子合同研究会, 2017/3/27, 国内.

(3)「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

1. インフルエンザウイルス由来のRNAポリメラーゼ発現系構築と結晶化及び抗インフルエンザ薬のスクリーニング方法、朴三用、尾林栄治、永田恭介、川口敦史、技術、2009/7/2、(PCT 日本移行)特願 2010-519109 号、(PCT 米国移行)13/001091、(PCT 欧州移行)09773545.0、W02010/001967、(PCT 日本移行) 特許第 5548955 号、(PCT 米国移行) 8,455,229、有 PCT/JP2009/062140
2. インフルエンザウイルス由来のRNAポリメラーゼ PB1-PB2 タンパク質の発現系構築と結晶化、朴三用、尾林栄治、永田恭介、川口敦史、2009/10/16、(国内優先権出願) 特願 2009-121376 号、(PCT 日本移行) 特願 2010-533938、(PCT 米国移行) 13/124581、(PCT 欧州移行) 09820646.9、W02010/044468 (PCT 日本移行) 特許第 5655198 号、(PCT 米国移行) 8,569,016、有 PCT/JP2009/67926

3. 線維筋痛症の予防または治療薬、神経疾患に関連する神経特異的転写抑制因子（NRSF）のコリプレッサーmSin3 への結合を阻害する化合物の NMR による同定とモデルマウスでの実証. 西村善文、植田弘師、PRISM BioLab 株式会社、2012/12/6、特願 2012-267599 号
4. インフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの PB2 サブユニットに対するモノクローナル抗体、朴三用、浦野健、杉山佳奈子、タンパク質、2014/3/28、特願 2014-068824 号
5. 神経選択的転写抑制因子 NRSF に特異的に結合する mSin3B に結合する化合物の利用. 西村善文、長土居有隆、平尾優佳、五嶋良郎、山下直也（宮田直樹、鈴木龍大（名古屋市立大学）、植田弘師（名古屋大学））。2015/12/11, 特許 2015-5850321 号. 2015/12/9, US 9/206, 125 B2
6. 新規抗 PAD4 抗体、佐藤衛、山田道之、金澤智、豊浦雅義、庄屋雄二、斉藤憲二、山崎ちひろ、2016/3/7、PCT/JP2016/057030