

[0025]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2010

<https://doi.org/10.15017/26853>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 25, 2011. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :



生 体 多 階 層 シ ス テ ム 研 究 セ ン タ ー
Multi-scale Research Center for Medical Science

プロテオミクス分野

Division of Proteomics

プロテオミクス分野では、タンパク質の総体であるプロテオームを解析するための技術開発とその応用を目指すと共に、多くの研究者に対して最先端技術の提供を行っている。基本技術としては精密質量分析によるショットガン・プロテオミクス、ターゲット・プロテオミクス、ペプチドマスフィンガープリンティング等を用い、さらに ICAT, iTRAQ, SILAC, mTRAQ 等の安定同位体標識を用いた定量情報付加による高度のプロテオミクス技術を擁している。さらに従来個別解析であった MRM 技術を改変して大規模データ取得を目指す次世代プロテオミクス技術の開発を行っている。現在、13 台の質量分析計を有し、幅広いプロテオミクス技術への要請に対応が可能となっている。

プロテオミクス分野は、分野所属の松本雅記准教授とテクニカルスタッフ 1 名（吉村祐子）に加え、技術室所属の技官 1 名（木庭絵美子）とテクニカルスタッフ 1 名（小田瑞穂）、および研究所所属のテクニカルスタッフ 1 名（高見知代）で実際の研究開発及びサービス業務を進めている（2011 年 3 月 31 日現在）。

人事異動について、退職者として、2011 年 3 月にテクニカルスタッフの吉村祐子が退職した。

A. 酵素-基質関係解明に向けた総合的なアプローチ

「酵素-基質関係の全体像の解明」というテーマは、現代の生物学が抱える大問題である。細胞内における多くの事象のコントロールには、多くの酵素によるタンパク質の翻訳後修飾が重要な役割を果たしている。しかし、実際にこれらの酵素が生体内で何を標的としているかは、実はあまり明らかになっていないのが現状である。

われわれはこの大問題に立ち向かうため、10 年の歳月を費やして定量プロテオミクス技術を用いた翻訳後修飾の網羅的解析に取り組んできた。具体的には、1) リン酸化やユビキチン化されたタンパク質の全体像（プロテオーム）を取得し、2) 酵素変異（ノックアウトやノックダウン）による発現抑制および過剰発現によるプロテオームの変動を解析する、という 2 段階のプロセスによって基質候補分子を LC-MS/MS によって網羅的に同定することを目標として研究を進めてきた。

その結果、リン酸化においては固相化金属親和性カラム（IMAC）法によるリン酸化ペプチドの徹底的な条件検討によって、高い網羅性を持って全体像（リン酸化プロテオーム）を取得することにはほぼ成功し、安定化同位体標識を用いた定量的プロテオミクスによる変動解析を行った。例えば細胞周期におけるリン酸化タンパク質の網羅的同定と変動解析を行い、多くの新知見を得た。またリン酸化酵素阻害剤を用いることによって、リン酸化カスケード全体像のうち、どこが変化しているのかを可視化することに成功した。またある刺激（インプット）がどのように異なった反応（アウトプット）を引き起こすかを知るために、EGF と Insulin に対する反応性の違いを例にとって詳細に検討することによって、そのキー分子を同定した。さらにキナーゼノックアウトマウスを用いて、そのリン酸化状態を網羅的に検索することにより、その違いを明らかにする試

みも紹介したい。

一方でユビキチン化においては全体像（ユビキチン化プロテオーム）を取得すると共に、結合や酵素活性に基づく新規の方法論も考案し、実用化へのバリデーションを行っている。特に以前は困難であった酵素-基質結合に基づく方法において、定量的プロテオミクスを用いて新規基質を発見する方法を考案し、新たな基質を数多く見つけることに成功している。

また第4世代のプロテオミクスと言われるMRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を用いて、抗体を使用せずに数万種類のタンパク質を超高感度で絶対定量する新方法 (Information-based MRM) を開発した。この方法で得られる情報量は、ウェスタンブロッティング 25,000 レーンに匹敵し、従来の 100 倍以上の高感度、高精度であり、抗体も不要なので全てのタンパク質、部位、修飾に対応できる夢の技術である。全体的なパフォーマンスは現行のウェスタンブロッティング法の約 100 万倍以上であり、今後ウェスタンブロッティング法は不要になると思われる。これによって研究を革新的に進歩させると同時に、臨床検査への応用やバイオマーカー探索など、医学生物学に長足の進歩をもたらすことが期待される。

B. 神経機能に關与する小胞輸送タンパク質の網羅的解析

神経細胞は非常に長い神経突起を有しているが、その特殊な構造によって細胞間情報伝達や神経回路形成が可能となり、神経機能が発揮される。神経突起の形成・維持には、神経細胞に特異的な細胞内輸送システムが必要だと考えられているが、われわれは、細胞内輸送の制御により神経突起形成を誘導する膜タンパク Protrudin を発見し、その突起形成機序を明らかにしてきた。近年、ヒト Protrudin の遺伝子変異が遺伝性痙性対麻痺という神経軸索変性を伴う神経疾患の患者家系で報告されたことから、Protrudin 依存的な輸送システムが、神経突起の形成だけでなく、その機能維持にも重要であることが示唆された。

Protrudin 依存的な輸送システムの全体像を明らかにする目的で、Protrudin と結合するタンパク質を網羅的に探索した結果、細胞内輸送や神経変性に関係する分子として KIF5 が同定された。マウス脳における Protrudin と KIF5 の生理的な結合が確認できたため、それらの機能的関連性を検証した。Protrudin の HeLa 細胞における過剰発現は突起形成を誘導するが、KIF5 を HeLa 細胞に過剰発現させると、同様に突起構造が形成された。さらに、Protrudin と KIF5 を共発現させると相乗的に突起形成が誘導されたことより、Protrudin と KIF5 の機能的関連性が示唆された。次に、これらの機能発揮メカニズムを探索した。Protrudin を過剰発現させたところ、Protrudin の結合タンパク質である Rab11 等の KIF5 への結合が増加した。KIF5 は様々な積荷タンパク質の順行輸送を担うモータータンパク質であることから、Protrudin はその結合タンパク質を KIF5 に繋ぐアダプタータンパク質として機能し、それらの輸送を制御しているのではないかと考えられた。

ヒトにおける KIF5 の変異は Protrudin と同じく遺伝性痙性対麻痺の原因として報告されていることから、Protrudin と KIF5 による輸送システムが神経機能に生理的に重要であると考えられる。Protrudin-KIF5 依存的な輸送メカニズムのさらなる解析により、将来的には神経疾患の発症機構解明に繋がることも期待される。

業績目録

原著論文

1. Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T., Nakayama, K. I. 2010.
Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 397, 93-99.
2. Ohzono, C., Etoh, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hirota, Y., Tanaka, Y., Fujita, H. 2010.
Nedd4-interacting protein 2, a short half-life membrane protein degraded in lysosomes, negatively controls down-regulation of connexin43.
Biol. Pharm. Bull., 33, 951-957.
3. Takeda, H., Kawamura, Y., Miura, A., Mori, M., Wakamatsu, A., Yamamoto, J., Isogai, T., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Natsume, T., Nomura, N., Goshima, N. 2010.
Comparative analysis of human SRC-family kinase substrate specificity in vitro.
J. Proteome Res., 9, 5982-5993.
4. Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Yoshimori, T., Yokota, S., Himeno, M., Tanaka, Y., Fujita, H. 2011.
Proteome of ubiquitin/MVB-Pathway: Possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation.
Genes Cells, in press.

著書

1. 松本雅記, 中山敬一. 2010.
in vitro 安定同位体標識法によるリン酸化の定量解析.
実験医学別冊「創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析」(小田吉哉・長野光司 編, 羊土社, 東京) 31-37.
2. 松本雅記, 中山敬一. 2010.
プロテオミクスが拓く細胞周期研究.
細胞周期フロンティア (佐方功幸・稲垣昌樹・岸本健雄 編, 共立出版, 東京) 23-28.

学会発表

1. Nakayama, K. I., Yumimoto, K., Matsumoto, M. (2010, 8/19).
Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by proteomics: Say good-bye to western blotting.
(Invited speaker)
6th Global-COE International Symposium: New Horizons for Modern Science - Biology and Medicine at the Crossroads, Fukuoka.
2. Hayakawa, H., Ito, R., Sekiguchi, M., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2010, 12/7).
Human Proteins Specifically Bound to 8-Oxoguanine-containing RNA and their Responses to Oxidative Stress. (ワ

ークショップ)

第33回日本分子生物学会年会, 神戸.

3. 松崎美美子, 白根道子, 松本雅記, 中山敬一. (2010, 12/8).
Protrudin は KIF5 のアダプタータンパク質として働き、神経機能を制御する.
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
4. 押川清孝, 松本雅記, 中山敬一. (2010, 12/8).
ユビキチン化修飾部位を網羅的に同定する方法の開発と応用. (ワークショップ)
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
5. Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Sata, T., Fujimoto, K., Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Tanaka, Y. (2010, 12/8).
The endosomal vesicles carrying ubiquitylated cargos selectively localizes to the cleavage furrow during cytokinesis.
(一般口頭発表)
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
6. 足立淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水崇, 松本雅記, 中山敬一, 茂木章, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅 (2010, 12/9).
DNA 損傷応答ネットワークにおけるリン酸化・ユビキチン化修飾ダイナミクスのプロテオーム解析.
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
7. 松本雅記, 中山敬一, 五島直樹, 夏目徹 (2010, 12/9).
次世代プロテオミクスを用いたヒト総プロテオームの絶対定量. (ワークショップ)
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
8. Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T., Nakayama, K. I. (2010, 12/9).
Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3.
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
9. 鳴海良平, 久家貴寿, 松本雅記, 中山敬一, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長毅. (2010, 12/10).
定量的リン酸化プロテオミクスによる乳癌組織の予後不良群と予後良好群の比較.
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
10. 弓本佳苗, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一. (2010, 12/10).
DiPIUS 法を用いたユビキチンリガーゼ基質の網羅的同定. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
11. 久家貴寿, 鳴海良平, 村岡賢, 足立淳, 松本雅記, 中山敬一, 松原久裕, 松下一之, 野村文夫, 長野一也, 角田慎一, 朝長毅. (2010, 12/10).
大規模リン酸化プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカー探索. (一般口頭発表)
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
12. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. (2010, 12/10).
リン酸化プロテオミクスを用いた新規 mTOR 下流分子の網羅的探索と機能解析. (一般口頭発表)
第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
13. Matsuzaki, F., Shirane, M., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2011, 2/12).
Protrudin is a novel adaptor protein of KIF5 and regulates neuronal function. (Oral)
7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity, Singapore.

14. Moroishi, T., Nishiyama, M., Yumimoto, K., Matsumoto, M., Iwai, K., Nakayama, K. I. (2011, 2/12).
Loss of SCFFbx15 results in deregulation of iron metabolism in mice. (Oral)
7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity, Singapore.

構造生物学分野

Division of Structural Biology

タンパク質の立体構造を決定し、他の分子との相互作用を詳細に解析することで、分子認識の問題や酵素活性発現メカニズムを構造生物学の手法を駆使することで明らかにしていく。ターゲット選択にあたっては、単に生物学的機能の重要性だけでなく、分子機能が構造生物学的に興味ある課題を含んでいるかどうかを重要視する。研究手法として、X線結晶解析、核磁気共鳴解析、電子顕微鏡（単粒子解析と電子線トモグラフィ解析）を組み合わせ用いることを特徴とする。

九州大学共同利用施設である核磁気共鳴装置（3台）と、生体防御医学研究所技術室のX線結晶回折装置およびクライオ電子顕微鏡(FEI Polara)のユーザー管理を行って、九州大学における構造生物学の拠点形成を目指している。また、九州大学グローバルCOEのポストゲノム研究センター構造生物学部門として、講習会・講演会の開催や研究支援を行っている。

A. Tom20タンパク質のプレ配列認識機構

ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は細胞質のリボソームで合成された後に、ミトコンドリアへと輸送される。ミトコンドリアのマトリクスおよび内膜へ輸送されるタンパク質はN末端に余分な配列（プレ配列）が付加された前駆体として合成される。我々は分子間ジスルフィド結合を用いた手法を適用することで、プレ配列が本来持つ大きな運動性を保持したままの状態でのTom20-プレ配列複合体を安定化し、原子レベルの構造情報や動的情報を得ることに成功した。その結果に基づいて、Tom20によるプレ配列認識は「動的平衡認識メカニズム」であることを提唱している。そのキーワードは、複数の結合状態、それぞれの結合状態における部分的な特徴の認識、そして、複数の状態間の速い交換である。この“ゆるい”分子認識機構により、Tom20タンパク質は適度な親和性で多様なアミノ酸配列と相互作用することができる。

現在は第2世代の複合体の安定化デザインを行っている。結合状態の運動において不動点となっている位置は、プレ配列中に存在するTom20結合モチーフLxxLL（L:Leu残基）の中央のロイシン残基である。ここにスルフヒドリル基をもつアミノ酸を導入し、Tom20側のVal109の位置に導入したシステイン残基のスルフヒドリル基との間に分子間ジスルフィド結合を形成させる。昨年度は、プレ配列にホモシステイン（システインよりメチレン基1個分側鎖が長い）を導入して、結晶構造解析とNMR緩和時間解析を行ったが、プレ配列の運動が過度に束縛されていることが判明した。今年度は、ホモシステインよりさらにメチレン基が長い非天然アミノ酸を用いることにした。メチレン基が1個分長くなったアミノ酸（L-2-Amino-5-mercaptopentanoic acid, 略称はAmp）とメチレン基が2個分長くなったアミノ酸（L-2-Amino-6-mercaptohexanoic acid, 略称はAmh）である。これらは市販品がないので、それぞれLオルニチンとLリジンを原料として数百mgスケールで合成し、保護基としてFmoc基とMob基を導入した*。ペプチ

ド合成でプレ配列に導入し、Tom20 C100S/V109C と分子間ジスルフィド結合複合体を調製し、結晶化を行った。その結果、Amp 体において結晶が得られ、放射光施設での実験で十分な分解能の回折データが得られた。現在、構造解析を進めている。Amh 体では、今のところ結晶が得られていない。このことは、Amh 体では分子間テザーが長すぎるために、プレ配列の自由度が大きく、結晶化を妨げている可能性がある。

*九州大学・稲盛フロンティア研究センター 山東信介教授との共同研究

B. オリゴ糖転移酵素の比較構造生物学の展開

タンパク質のアスパラギン残基への糖鎖付加（N型糖鎖付加）は翻訳後修飾の代表である。コンセンサス配列 Asn-X-Thr/Ser 中の Asn 残基への糖鎖の転移反応はオリゴ糖転移酵素 (OST) と呼ばれる膜タンパク質酵素が触媒している。N型糖鎖修飾は真核生物だけではなく、古細菌にも広く存在する。また、真正細菌の一部にも存在する。OST 酵素の触媒サブユニットは STT3/Ag1B/Pg1B と呼ばれるタンパク質である。STT3 タンパク質は真核細胞では動物から植物、菌類、原生動物に至るまでそのアミノ酸配列は非常に良く保存されている。これに対し、古細菌由来の STT3 や真正細菌の STT3 のアミノ酸配列は多様である。WWDYG という 5 残基の保存モチーフを除くと、3 つの生物界由来の STT3 のアミノ酸配列相同性は低い。しかし、立体構造に基づいた共通構造の考察を行えば、アミノ酸配列比較だけでは得られない新しい知見が得られると期待される。

我々は過去に古細菌 *Pyrococcus furiosus* の STT3 タンパク質の可溶性ドメインと真正細菌 *Campylobacter jejuni* 由来の STT3 タンパク質の可溶性ドメインの結晶構造を決定した。構

造比較をすると、WWDYG 部分のコンホメーションが全く異なっていた。本年度は、新たに古細菌 *Pyrococcus horikoshii* と *Pyrococcus abyssi* 由来の STT3 タンパク質の可溶性ドメインの結晶構造決定と、古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来の STT3（3 つのホモログがある）の可溶性ドメインの結晶構造決定（3 種のうち 2 種）を行った。この結果、アミノ酸配列の相同性が 30 % から 70 % にわたって分布する計 6 種の可溶性ドメインの結晶構造が得られたことになる。WWDYG モチーフ部分のコンホメーションを比較すると、アミノ酸配列相同性が 30 % 程度しかないにもかかわらず、*C. jejuni* と *A. fulgidus* 由来の STT3-c の WWDYG 部分のコンホメーションが同一であった（図 1）。したがって、このコンホメーションが結晶コンタクトがないときの正しいコンホメーションであることを示唆している。また、WWDYG モチーフが結晶コンタクトで容易に変形する柔軟さをもつことから、酵素反応サイクルの間に大きなコンホメーション変化を起

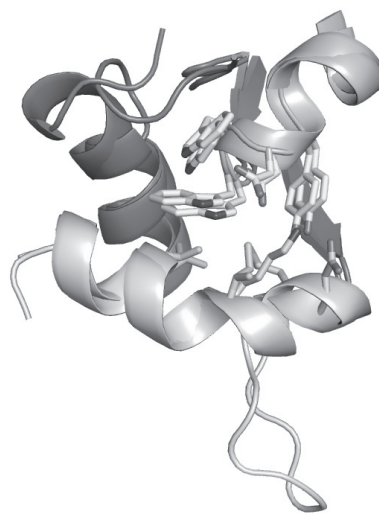


図 1 真正細菌 *Campylobacter jejuni* の STT3 の可溶性ドメインの結晶構造と新たに決定した古細菌 *Archaeoglobus fulgidus* の STT3（ホモログ c）の結晶構造の WWDYG モチーフ部分の比較。

こすことも同時に示唆される．以上の結果は，単独の結晶構造決定だけでは結論することは困難であり，比較構造生物学アプローチの有効性を示している．

C. DNA 関連超分子複合体の電子顕微鏡による単粒子解析

電子顕微鏡による単粒子解析法では，試料の結晶化等を必要とせず，X 線や NMR では解析困難な超分子複合体を，生理的条件下で立体構造を解析できる．我々は機能構造である DNA との共結晶が得難い DNA の複製，修復，組換え等に働く超分子複合体を中心に解析を進めている．本年度は *P. furiosus* 由来の PolB-PCNA-DNA, Fen1-Lig-PCNA-DNA, GINS 等の複合体の他，DARS-DnaA-DNA, MCM, RNaseP, Rhp51-DNA 等，様々な複合体の解析に着手した．

DNA polymerase PolB には DNA の複製とともに，誤って複製した場合にはこれを校正する exonuclease 活性を有する．昨年度までに，PolB-PCNA-DNA の校正モードにおける構造を得ていたが，本年は更に詳細に解析を進めることで，新規にみつかった polymerase と PCNA 間に相互作用部位に polymerase のアルギニンクラスターが配置されていて，さらに，塩基性アミノ酸からなるクラスターが他の PolB でも保存されていることを示した．更にこのクラスターのアルギニンを置換した変異体からなる複合体の機能解析及び，単粒子解析を行った結果，この塩基性クラスターが複製と校正の両モード間の切り換えに重要な役割を担っていることを示した．以上の結果をもとに，複合体のダイナミックな構造変化を伴ったモード切り換えの機構を提唱した．

D. 葉緑体局在化に関わる因子の結晶構造解析

植物の葉緑体は，植物体に光が当たると，その刺激に応答して葉緑体の局在が変化することが知られている．葉緑体は，弱い光を受けた場合，光への集積反応が見られ，逆に強い光を受けた場合，その光ダメージを避けるための回避反応が起こる．*Arabidopsis thaliana* において，JAC1 タンパク質は，弱い光に反応する葉緑体集積反応に関与していて，C 末端に Auxilin 様 J-domain を持つ．この J ドメインの活性が，葉緑体の集積反応に重要であることを，構造解析と変異体解析を用いて明らかにした．また，同じく葉緑体の動態に関与する CHUP1 タンパク質の C 末端部分の結晶構造解析を行っている．

*九州大学・理学院 和田正三特任教授との共同研究

E. DOCK2/DHR2 の G E F 活性阻害剤の開発

自己免疫疾患の治療や予防に期待される DOCK2/DHR2 のシグナル伝達阻害剤候補となる低分子量化合物について，STD (saturation transfer difference) NMR スペクトル法を利用した相互作用解析を行った．DOCK2/DHR2 へのラジオ波照射存在下で低分子化合物の ¹H NMR スペクトルを測定した結果，ラジオ波照射非存在下のスペクトルにくらべ，シグナル強度の減少が見られた．この結果は，低分子量化合物が DOCK2/DHR2 タンパク質に相互作用していることを示している．

*九州大学・生体防御医学研究所 福井宣規教授との共同研究

F. クライオ電子顕微鏡の導入とセットアップ

昨年度の汎用型透過電顕 FEI T20 のセットアップに引き続き、今年度は極低温クライオ電子顕微鏡 FEI Polara のセットアップを行った。この装置は急速凍結した試料を極低温で観察可能であるが、実際に凍結タンパク質試料を用い、液体窒素や液体ヘリウムで試料ステージを冷却して、到達温度及びステージの安定性を確認することができた。またこの装置のもう一つの特徴であるトモグラフィー機能についても、タンパク質複合体及び組織切片試料を用いて操作を行い、正常動作することを確認した。また、電子分光装置をつかったフィルター像の撮影、厚い試料への有効性が期待される STEM 機能についてもセットアップを完了した。トモグラフィーデータから立体構造再構築を行う計算機の環境を、標準的なソフトウェアである IMOD を中心に構築した。周辺機器については、超薄切片を作成するクライオミクロトームの更新をはじめ、凍結試料作成装置 Vitrobot の導入を行い、多様な電子顕微鏡試料の作成に対応可能な環境が整いつつある。

業績目録

原著論文

1. Masai H, Tanaka T, Kohda D. 2010.
Stalled replication forks: making ends meet for recognition and stabilization.
Bioessays, 32, 687-697.
2. Takano A, Suetsugu N, Wada M, Kohda D. 2010.
Crystallographic and functional analyses of J-domain of JAC1 essential for chloroplast photorelocation movement in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Cell Physiol, 51, 1372-1376.
3. Yanagihara I, Nakahira K, Yamane T, Kaieda S, Mayanagi K, Hamada D, Fukui T, Ohnishi K, Kajiyama S, Shimizu T, Sato M, Ikegami T, Ikeguchi M, Honda T, Hashimoto H. 2010.
Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin (TDH).
J Biol Chem. 285,16267-16274.
4. Yamamoto H, Itoh N, Kawano S, Yatsukawa Y, Momose T, Makio T, Matsunaga M, Yokota M, Esaki M, Shodai T, Kohda D, Hobbs AE, Jensen RE, Endo T. 2011.
Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria.
Proc Natl Acad Sci U S A, 108, 91-96.
5. Mayanagi K, Kiyonari S, Nishida H, Saito M, Kohda D, Ishino Y, Shirai T, Morikawa K. 2011.
Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex.
Proc Natl Acad Sci U S A, 108, 1845-1849.
6. Igura M, Kohda D. 2011.

- Quantitative assessment of the preferences for the amino acid residues flanking archaeal N-linked glycosylation sites. *Glycobiology*, *in press*
7. Suetsugu N, Takano A, Kohda D, Wada M. 2011.
Structure and activity of JAC1 J-domain implicate the involvement of the cochaperone activity with HSC70 in chloroplast photorelocation movement.
Plant Signal Behav, *in press*
8. Ohnishi K, Nakahira K, Unzai S, Mayanagi K, Hashimoto H, Shiraki K, Honda T, Yanagihara I, 2011.
Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*
FEMS MicroBiol Lett. *in press*
9. Igura M, Kohda D. 2011.
Selective control of oligosaccharide transfer efficiency for the N-glycosylation sequon by a point mutation in oligosaccharyltransferase
J Biol Chem, *in press*

総説

1. 神田大輔, 2010.
連載「いきなり始める構造生物学」第6回 目指せ! タンパク質調製名人
細胞工学 第29巻 第5号, 494-499.
2. 神田大輔, 2010.
連載「いきなり始める構造生物学」第7回 立体構造決定法総論
細胞工学 第29巻 第7号, 718-722.
3. 神田大輔, 2010.
連載「いきなり始める構造生物学」第8回 結晶を作る技術
細胞工学 第29巻 第9号, 936-943.
4. 神田大輔, 2010.
連載「いきなり始める構造生物学」第9回 X線結晶学は王道です
細胞工学 第29巻 第11号, 1152-1165.
5. 神田大輔, 2011.
連載「いきなり始める構造生物学」第10回 NMRはスペクトロスコーピーです
細胞工学 第30巻 第1号, 78-79.
6. 神田大輔, 2011.
連載「いきなり始める構造生物学」第11回 電子顕微鏡はフロンティア
細胞工学 第30巻 第3号, 304-313.
7. 西田洋一, 真柳浩太, 石野良純, 森川耿右, 2010.
DNA クランプ/複製 DNA ポリメラーゼ複合体における DNA 合成・修正スイッチング機構
日本結晶学会誌 第52巻, 201-207.

著書

1. 真柳浩太, 廣明秀一, 白井 剛, 2010

学会発表

1. 泉桂星, 斉藤貴士, 寺沢宏明, 神田大輔 (2010, 6/16-18)
ミトコンドリア Tom20 とプレ配列ペプチドの相互作用における新規安定複合体の作製
第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌
2. 真柳浩太, 西田洋一, 清成信一, 神田大輔, 白井剛, 石野良純, 森川耿右 (2010, 6/16-18)
DNA Pol-PCNA-DNA 複合体の電子顕微鏡単粒子解析
第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌
3. 井倉真由美, 真柳浩太, 神田大輔 (2010, 6/16-18)
大腸菌膜に発現させた Asn 結合型糖鎖修飾を決定するオリゴ糖転移酵素の精製と結晶化
第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌
4. 松本俊介, 井倉真由美, 神田大輔 (2010, 6/16-18)
第三のタイプの活性部位を持つオリゴ糖転移酵素の結晶化
第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌
5. James Nyirenda, 神田大輔, 井倉真由美, 松本俊介 (2010, 6/16-18)
Functional and crystallization studies on Oligosaccharyltransferase (PglB and AglB) from *Campylobacter jejuni* and *Pyrococcus furiosus*
第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌
6. 斉藤貴士, 神田大輔 (2010, 6/16-18)
ミトコンドリア Tom20 とプレ配列ペプチドの複合体の安定化と結晶化
第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌
7. 高野晃, 住本秀樹, 神田大輔 (2010, 6/16-18)
NADPH オキシダーゼ Nox1 関連因子 Noxa1-Noxo1 複合体解析
第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌
8. 神田大輔 (2010, 6/16-18)
準安定な分子複合体から構造情報を得るための新戦略
第 10 回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ「過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」, 札幌
9. Daisuke Kohda (2010, 6/25)
Comparative structural biology of oligosaccharyltransferase: an enzyme that catalyzes the glycosylation of the Asn-X-Ser/Thr sequon – (oral)
The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institutes Network and the International Symposium Commemorating Inauguration of Kanazawa University Cancer Research Institute (第 5 回研究所ネットワーク国際シンポジウム), Kanazawa
10. M. Igura, N. Maita, J. Nyirenda, S. Matsumoto, D. Kohda (2010, 8/1-6)
Comparative structural biology of oligosaccharyltransferase: an enzyme that catalyzes the glycosylation of the Asn-X-Ser/Thr sequon (oral)
The 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo

11. J. Nyirenda, S. Matsumoto, M. Igura, D. Kohda (2010, 8/1-6)
Functional and crystallization studies on bacterial and archaeal oligosaccharyltransferases (PglB and AglB) from *Campylobacter jejuni* and *Archeoglobus fulgidus*
The 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo
12. M. Igura, N. Maita, J. Nyirenda, S. Matsumoto, D. Kohda (2010, 8/1-6)
Successful expression of archaeal STT3/AglB protein in E.coli cell membrane
The 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo
13. Y. J. Lee, A. Ishiwata, A. Kubota, T. Watanabe, D. Kohda, Y. Ito (2010, 8/1-6)
Synthesis of Glycans as Donor Substrates for Bacterial Protein Glycosylations
The 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo
14. 末次憲之, 高野晃, 神田大輔, 和田正三 (2010, 9/9-11)
葉緑体光定位運動を制御する JAC1 の J-ドメインの構造と機能の解析
第 74 回日本植物学会年会, 名古屋
15. 中尾祐士, 服部淳子, 原唯史, 山口浩輝, 郷田秀一郎, 真柳浩太, 神田大輔, 角田佳充, 木村誠 (2010, 9/17-18)
超好熱古細菌リボヌクレアーゼ P の高次構造解析を目指した再構成酵素の精製
日本農芸化学会西日本平成 22 年度支部大会, 熊本
16. Mayanagi K, Saito M, Oyama T, Ishino Y, Shirai T (2010, 9/20-22)
Modeling of 3R complexes from structure database
日本生物物理学会 第 48 回年会, 仙台
17. 神田大輔 (2010, 10/7)
準安定な分子複合体から構造情報を得るための戦略とその応用
蛋白研セミナー:「蛋白質の機能-構造相関解明のための精密構造解析とその方法 ~水素原子から細胞まで~」, 大阪
18. 高野晃, 住本秀樹, 神田大輔 (2010, 12/7-10)
NADPH オキシダーゼ Nox1 関連因子 Noxa1-Noxo1 複合体解析
第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 神戸
19. 松本俊介, 井倉真由美, ニレンダジェイムス, 神田大輔 (2010, 12/7-10)
第三のタイプの活性部位を持つオリゴ糖転移酵素の結晶化
第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 神戸
20. 真柳浩太, 西田洋一, 清成信一, 斉藤美保子, 神田大輔, 石野良純, 白井剛, 森川耿右 (2010, 12/7-10)
電子顕微鏡単粒子解析による複製関連複合体の反応制御機構の研究
第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 神戸
21. 中尾祐士, 服部淳子, 原唯史, 山口浩輝, 郷田秀一郎, 真柳浩太, 神田大輔, 角田佳充, 木村誠 (2010, 12/7-10)
超好熱古細菌リボヌクレアーゼ P の高次構造解析を目指した再構成酵素の精製
第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 神戸
22. 桑原直之, 橋本博, 小甲裕一, 池口満徳, 佐藤衛, 真柳浩太, 村山泰斗, 岩崎博史, 清水

- 敏之 (2010, 12/7-10)
相同組換えに関わる Swi5-Sfr1 複合体の構造機能解析
第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 神戸
23. 尾木野弘実, 石野園子, 真柳浩太, Nils-Kare Birkeland, 山岸明彦, 石野良純 (2010, 12/7-10)
Homotetrameric GINS from the thermoacidophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*
第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 神戸
24. 藤野誠司, 石野園子, 井田梨沙, 尾木野弘実, 富田宏矢, 金井保, 跡見晴幸, 真柳浩太, 大山拓次, 森川耿右, 石野良純 (2010, 12/7-10)
超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* の複製フォーク複合体解明に向けての MCM, GINS 複合体解析
第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会, 神戸
25. 神田大輔 (2011, 1/21)
Asn 残基に糖鎖を転移するオリゴ糖転移酵素の比較構造生物学
理研シンポジウム第 14 回「生体分子の化学」, 和光, 埼玉
26. 松本俊介 (2011, 2/2)
第三のタイプの活性部位を持つオリゴ糖転移酵素の X 線結晶構造解析
革新的研究開発リーダー養成事業高度化のためのワークショップ, 福岡
27. S Matsumoto (2011, 2/12)
Crystal structure of oligosaccharyltransferase bearing the third type of the catalytic center (oral)
The 7th Global COE International Symposium, the 6th Young Investigators Forum, Bintan Island, Indonesia
28. T Saitoh, K Izumi, Y Miyazaki, D Kohda (2011, 2/11)
Stabilization and Structure Analysis of Mitochondrial Tom20-Presequence Complexes
The 7th Global COE International Symposium, the 6th Young Investigators Forum, Bintan Island, Indonesia
29. K Mayanagi, S Kiyonari, H Nishida, M Saito, D Kohda, Y Ishino, T Shirai, and K Morikawa (2011, 2/11)
Molecular architecture of the PolB-PCNA-DNA complex as revealed by the electron microscopic single particle analysis
The 7th Global COE International Symposium, the 6th Young Investigators Forum, Bintan Island, Indonesia
30. 神田大輔 (2011, 3/18)
タンパク質の動的側面を積極的に捉える-Tom20 と OST 酵素を例にして-
構造生物シンポジウム～構造科学・計算科学からの生命科学研究ならびに創薬科学への展開～, 大阪
31. 神田大輔 (2011, 3/26)
準安定なタンパク質複合体から構造情報を得るための戦略
日本化学会第 91 春季年会特別企画講演, 横浜

防御分子構築学分野

Division of Molecular Design

当部門は、昨年まで微生物ゲノム情報学分野と名称であったが、研究内容は生命情報科学であり、現在もバイオインフォマティクスについての研究を行なっている。研究対象は、主にタンパク質であり、その配列や立体構造などを用いて、それからの機能情報の抽出のための方法の開発と、その応用研究を行なっている。いずれのタイプの研究においても、進化的視点からの情報解析を実施している。

A. スコア関数の比較解析と新規スコア関数の開発

アラインメントの各サイトの保存度/変異度を定量的に評価するため、多くのスコア関数が開発されてきた。それらの関係を体系的に比較した研究は、これまでなかった。そこで、これらのスコア関数を実装し、その関係をクラスタ分析で調査した。収集したスコア関数の一部については、SEALA という名称で計算サービスとプログラムのダウンロードサービスを行なっている。また、酵素の触媒部位予測に適用し、その精度を調査した。さらに、その成果に基づいて新たなスコア関数を開発した。

a. スコア関数の比較解析

表A. 1に今回解析に使用したスコアの内訳を示す。Sは我々のウェブサイト SEALA でスコアの計算サービスとプログラムのダウンロードサービスを行なっているもの、Iは今回の解析のために我々でコードして導入したもの、Dは開発者のウェブサイトからダウンロードできるものである。表A. 2は、表A. 1の式中のノーテーションの説明である。

Symbol frequency	S	Wu70	$d_k/p_k(\alpha_0(k))$
	I	Lockess99	$\sqrt{\sum_{\alpha}^{20} \left(\ln \frac{\text{Bin}(X-n_k(a))}{\text{Bin}(X-n(a))} \right)^2}$
	S	Pei01var(w)	$\sqrt{\sum_{\alpha}^{20} (p_k(\alpha) - p(\alpha))^2}$
Stereochemical properties	I	Taylor86	$\min \{ \{ T_j : A_k \subseteq T_j \} : j = 1, \dots, 61 \}$
	I	Zvelebil87	$0.9 - 0.1n_{\text{eff}}$
Symbol entropy	S	Sander91	$S_{21}(p_k)$
	S	Shenkin91	$6 \times 2^{S_2(p_k)}$
	S	Gerstein95	$S_2(p_k) - S_2(p)$
	I	Wang06w	$R(p_k, q)$
	I	Caspra07w	$(R(p_k, r) + R(q, r))/2, r = (p_k + q)/2$
Stereochemically sensitive entropy	S	Mirny99	$S_c(p_k), AA = \{\text{AVLIMC,FWYH,STNQ,KR,DE,GP}\}$
	S	Williamson95	$R(p_k, p), AA = \{\text{VLIM,FWY,STNQ,HKR,DE,AG,P,C}\}$
	S	Caffrey04w	$V(p_k)$
Mutation data	S	Sander91sp	$(\sum_{i,j} w_{ij})^{-1} \sum_i^N \sum_{j>i}^N w_{ij} M_K(A_{ik}, A_{jk}), w_{ij} = d(A_i, A_j)$
	I	Karlin96	$\frac{2}{N(N-1)} \sum_i^N \sum_{j>i}^N M_E(A_{ik}, A_{jk})$
	S	Valdar01	$(\sum_{i,j} w_i w_j)^{-1} \sum_i^N \sum_{j>i}^N w_i w_j M_V(A_{ik}, A_{jk})$ $w_i = \frac{1}{N-1} \sum_j d(A_i, A_j)$
	S	Pei01sp(w)	$\sum_{\alpha}^{20} \sum_{\beta}^{20} p_k(\alpha) p_k(\beta) M_K(\alpha, \beta)$
	I	Thompson97	$\frac{1}{N} \sum_i^N \bar{X} - X_i , X_{ij} = M(\alpha_j, A_{ik})$
	I	Mihalek07	$-\sum_{\alpha=1}^{20} \sum_{\beta>\alpha}^{20} p_k(\alpha, \beta) \ln \frac{p_k(\alpha, \beta)}{M_K(\alpha, \beta)}$ $p_k(\alpha, \beta) = 2n_k(\alpha, \beta)/N(N-1)$
	I	Lin08w	$\sum_{\alpha}^{20} p_k(\alpha) M_L(\alpha_0(k), \alpha)$
Phylogeny	S	Mihalek04	$1 + \sum_{n=1}^{N-1} \frac{1}{n} \sum_{g=1}^n S(p_k^{(g)})$
	I	Zhang08	$1 + \sum_{n=1}^{N-1} \frac{1}{n} \sum_{g=1}^n V(p_k^{(g)})$
	D	Mayrose04	RatedSite

表 A. 1 使用したスコア関数一覧

N	No. of sequences in alignment.
A_{ik}	The amino acid in sequence i at alignment site k .
$d(A_i, A_j)$	Sequence distance in percent.
p_k	Probability estimated from site k .
p	Probability estimated from alignment.
q	Probability estimated from database.
$S_b(k)$	$-\sum_{\alpha \in AA} p_k(\alpha) \log_b p_k(\alpha)$
$R(p_v, p)$	$\sum_{\alpha \in AA} p_v(\alpha) \log \frac{p_k(\alpha)}{p(\alpha)}$
$V(p_k)$	$-Tr(\omega \log_{20} \omega), Tr(\omega) = 1$ $\omega = diag(p_k(\alpha_1), \dots, p_k(\alpha_{20})) \times M_f$
n_k	No. of occurrences in site k .
n	No. of average occurrences in a site.
$\alpha_O(k)$	Most common amino acid at k .
d_k	No. of different amino acids at k .
M	The BLOSUM62 matrix, containing log-odds ratios (<i>blosum62.bla</i>).
M_f	The BLOSUM62 matrix of frequencies (<i>blosum62.qij</i>).
M_V	$M_V(\alpha, \beta) = \frac{M(\alpha, \beta) - \min(M)}{\max(M) - \min(M)}$
M_K	$M_K(\alpha, \beta) = \frac{M(\alpha, \beta)}{\sqrt{M(\alpha, \alpha)M(\beta, \beta)}}$
M_M	M_f normalized such that each row and column approx. sums to 1.
M_L	M normalized such that $M_L(\alpha, \alpha) = 10; 2 \leq M_L(\alpha, \beta) \leq 10$

表 A. 2 表記法一覧

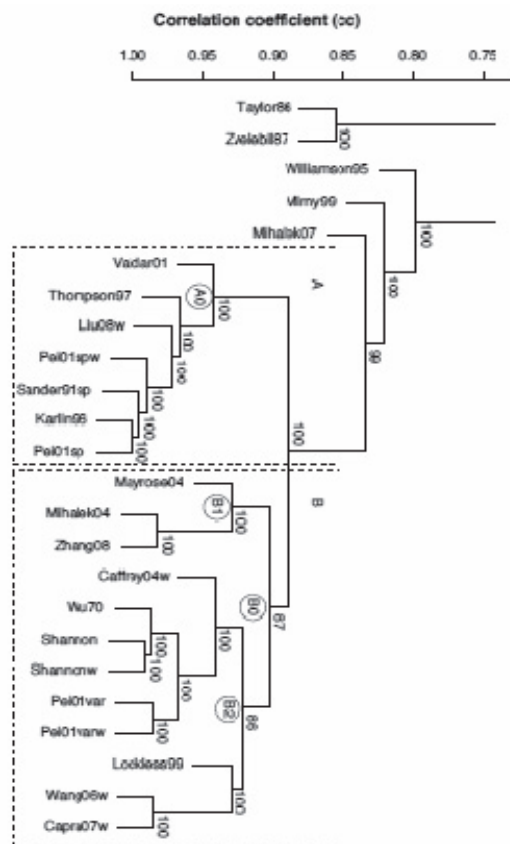
これらのスコア関数は、Valdar によってその定式化に基づく分類がなされていた。表 1 では、Valdar の分類に基づいて、今回使用したスコア関数を分類してある。しかし、それらが実際の動作において、どのように類似するかのか、あるいは異なるのかは不明であった。そこで、Catalytic Site Atlas に登録されているタンパク質のアラインメントに、これらのスコア関数を適用し、各サイトのスコアを計算した。計 455 アラインメント、155,694 アラインメントサイトを使用した。その中には触媒残基が 1414 サイト含まれていた。まず、各方法の間の平均相関係数を以下のように計算した。

$$\hat{C} = \sum_{i=1}^m C^{(i)}$$

ここで、 $C^{(i)}$ は、 i 番目のアラインメントについての相関係数を意味し、 m はアラインメントの総数である 455 である。アラインメントごとにそれに含まれる配列の本数が異なるが、スコア関数の中には配列の本数に対する依存性が観察されるものがあり、その点を考慮するため上記のような平均相関係数を計算した。また、はずれ値の効果を考慮し、今回は Spearman の順位相関を使用した。この平均相関係数を用いて、スコア関数の間の距離 D は次のように定義した。

$$D = 1 - \hat{C}$$

このようにして定義された距離を用いて、average linking 法で階層的クラスタリングを行なった（図A. 1）。



図A. 1 スコア関数のクラスタ分析の結果

他のアラインメントセットも使用してみたが、樹形の詳細は異なるものの、全体のクラスタリングパターンは類似するデンドログラムが得られた。また、図中各ノードに割り振られているのは 1000 回のリサンプリングに基づくブートストラップ確率であるが、基本的にはいずれも高い値を示していた。これらのことから、このデンドログラム中のクラスタリング・パターンの信頼性は高いことが示唆される。この樹形から、スコアリング関数は、大きく二つのグループに分類されることがわかる。一つは、置換行列に基づく方法（図 1 中のクラスタ A）とアラインメントの各サイトにおけるアミノ酸頻度に基づく方法（図 1 中のクラスタ B）である。クラスタ B はさらに、系統樹を考慮したもの (B1) と、考慮しないもの (B2) の 2 つに分類された。Sander91, Shenkin91, Gerstein95 は、全て 20 種類のアミノ酸についての Shannon entropy の variation であり、図 1 のデンドログラムの上では同じ位置を占めたので、まとめて Shannon と記述してある。

Shannonw は、Shanon と同じ計算方法であるが、アミノ酸頻度の計算に Henikoff-Henikoff の方法によるウェイトを掛けて推定したものを利用している。各スコア関数の名称の最後の小文字の w は、この taxonomic bias の考慮がなされていることを表している。この 2 つの大きなクラスに属さないものが、5 つ見出されている。この 5 つの関数は、どの関数とも遠い関係にある。次に、これらスコア関数のパフォーマンスの比較を行なった。Catalytic Site Atlas に記述されている残基を true positive として AUC を計算した。いくつかのスコアには配列の本数への依存性があるので、アラインメントセットに含まれる本数の上限を変えながら、AUC を計算した (図 A. 2)。

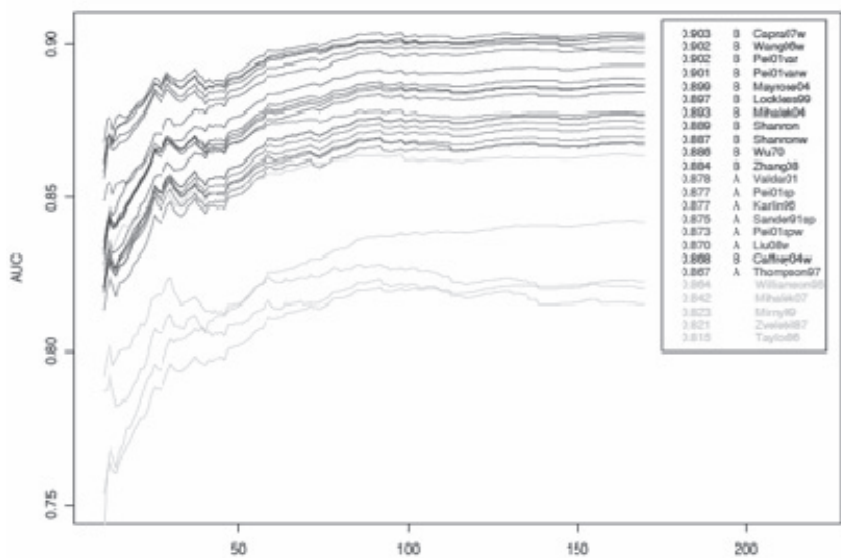


図 A. 2 スコア関数のパフォーマンス。横軸が、使用しているアラインメントセットの中のアライメントに含まれる配列の上限、縦軸が AUC を表す。青は頻度ベースのスコア関数、赤が置換行列に基づくスコア関数、緑色がその他のスコア関数である。

頻度ベースのスコア関数が、他のスコア関数よりも高いパフォーマンスを示している。特に、Wang06w と Capra07w が高いパフォーマンスを示しているが、これらはどちらも相対エントロピーの形で、バックグラウンドのアミノ酸組成の補正を行なっている方法である。また、名前に w がついているので、アミノ酸組成の推定にあたっては taxonomic bias の補正がなされている。von Neumann entropy を使用し、エントロピーの計算に置換行列を導入した Caffery04w は、デンドログラムでは他の頻度ベースのスコア関数同様にクラス B2 に属しているものの、他の頻度ベースのスコアよりもパフォーマンスが悪く、置換行列に基づくスコア関数のパフォーマンスと同程度であった。本比較解析

の結果は、BMC bioinformatics に掲載されたが、掲載後のアクセス数が多く、掲載誌より” highly accessed paper” に認定されたことを特記しておく。

b. 新規スコア関数の開発

上記の解析結果から、相対エントロピーをさらに修飾することで、パフォーマンスの改善が期待される。Von Neumann entropy (VNE)に見られたように、置換行列の考慮は必ずしもパフォーマンス向上につながるわけではないが、今回は VNE を相対エントロピーに拡張することを試みた。Relative von Neumann entropy (RVNE)は既に使用されているが、アラインメントスコアに拡張するにあたって、Caffery によるスコア関数としての VNE の定義を修正した。

Von Neumann entropy は、密度行列 ρ に対して計算される。密度行列は、半正定値行列で、そのトレースが 1 になるという条件を持つ。半正定値という条件は、複素行列の場合、密度行列はエルミート行列であることを意味するが、タンパク質の解析のような実行列を扱う場合、密度行列は対称行列となる。密度行列 ρ に対する VNE の定義は

$$VNE(\rho) = -tr(\rho \log \rho)$$

と与えられる。実際には、 ρ の固有値が $\{\lambda_1, \dots, \lambda_i, \dots, \lambda_n\}$ と与えられた場合、

$$VNE(\rho) = -\sum_{i=1}^n \lambda_i \log \lambda_i$$

となる。

Caffery らは、VNE をアラインメントサイトのスコアとして利用するにあたり、密度行列を次のように定義した。

$$\rho_{caffery} = diag(p_1, \dots, p_{20}) \times M$$

ここで、 $p_1, \dots, p_{20}$ は、そのサイトのアミノ酸組成であり、 M は BLOSUM の置換行列である。この密度行列は、対称性を満たしておらず、形式的に固有値から VNE に類するものは求まるが VNE とは言えない。また、今回、我々はスコア関数としての VNE を RVNE に拡張したいわけだが、その際、この対称性が満たされていないと計算ができなくなる。そこで、操作的ではあるが密度行列を次のように定義しなおした。

$$\rho = PAP$$

ここで、 $P = \text{diag}(\sqrt{p_1}, \dots, \sqrt{p_i}, \dots, \sqrt{p_{20}})$ であり、 $A = [A_{ij}(s)] = \left(\frac{M_{ij}}{M_{ii}M_{jj}} \right)^{\frac{1-s}{s}}$ である。 s は

スコアを最適化するために制御されるパラメータの一つであり、0 から 1 までの値をとる。これにより対称行列として密度行列が得られる。

RVNE を計算するため、バックグラウンドのアミノ酸組成 $\{q_1, \dots, q_i, \dots, q_{20}\}$ を用いて、バックグラウンドのアミノ酸成についての密度行列 σ を次のように定義する。

$$\sigma = Q A Q$$

ここで、 $Q = \text{diag}(\sqrt{q_1}, \dots, \sqrt{q_i}, \dots, \sqrt{q_{20}})$ で、 A は ρ と同じものであるが、 s は ρ に対するものとは独立に扱われる。以降では、 ρ に対するものを s_1 、 σ に対するものを s_2 とよぶ。バックグラウンドのアミノ酸組成は、次のように推定した。

$$q_i = \frac{1}{n} + r \left(\hat{q}_i - \frac{1}{n} \right)$$

r は、0 から 1 までの値をとり、 q の推定値を観測値と一様分布の間に制御するパラメータで、RVNE のパフォーマンスを最適化するように決定される。

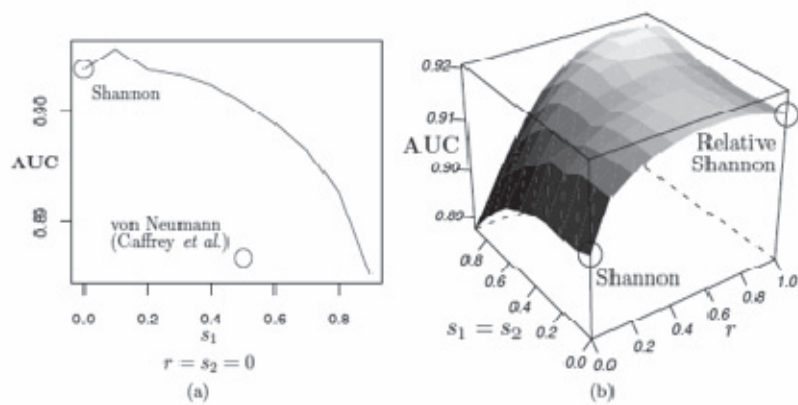
この時、RVNE は次のように定義される。

$$RVNE(\rho, \sigma) = \text{tr}(\rho \log \rho) - \text{tr}(\rho \log \sigma)$$

実際には ρ と σ の固有値と固有ベクトルを利用して次のように計算される。

$$RVNE(\rho, \sigma) = \sum_{i=1}^{20} \lambda_i \left(\log \lambda_i - \sum_{j=1}^{20} (\mathbf{v}_i^T \mathbf{w}_j)^2 \log \mu_j \right)$$

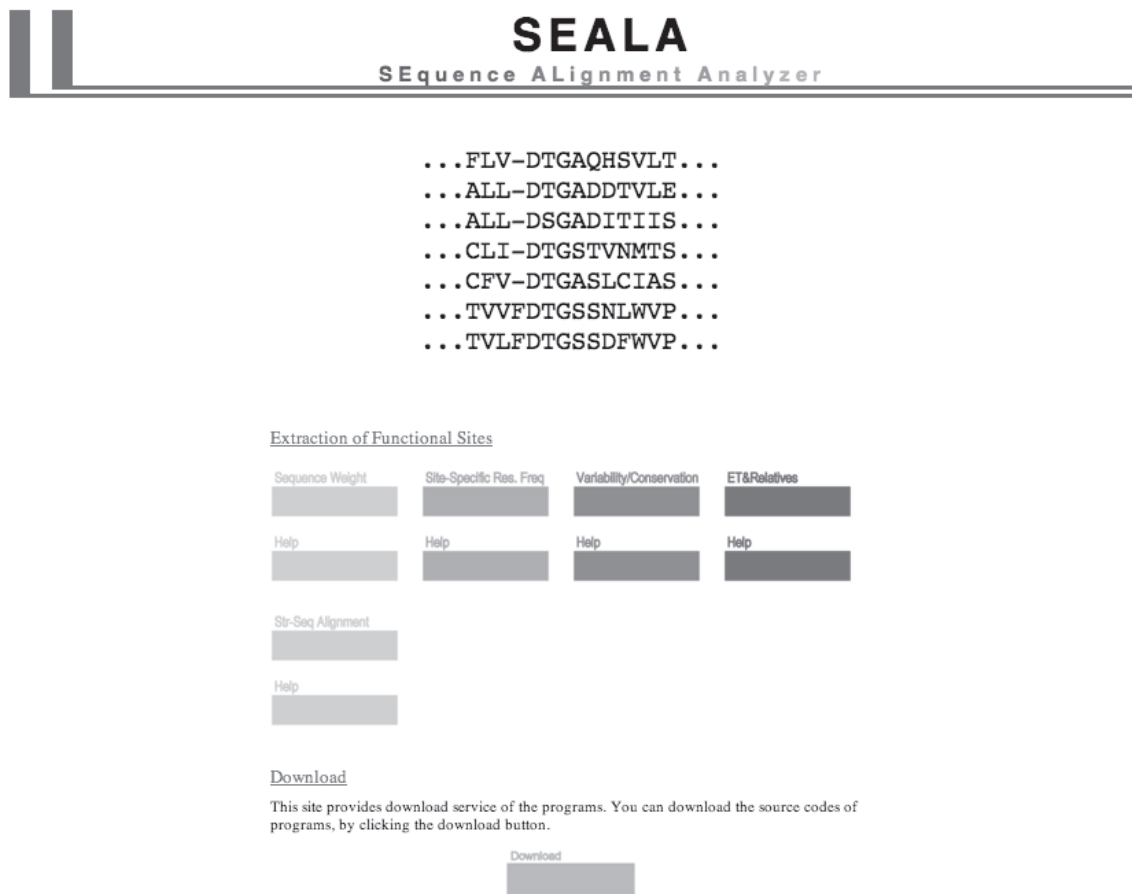
ここで、 λ 、 μ は、 ρ 、 σ の固有値、 $\mathbf{v}$ 、 $\mathbf{w}$ は ρ 、 σ の固有ベクトルを表している。3 つのパラメータ (r, s_1, s_2) についての全探索を行ない、Catalytic Site Atlas について AUC を計算した。図 3 はその結果の一部を示したものである。(a) は、 $r = s_2 = 0$ の場合、(b) は $s_1 = s_2$ の場合を表す、図に示すように、RVNE は、relative Shanon entropy や Shanon entropy をその特殊なケース（パラメータの特定の値のセット）として含んでいる。また、(a) には Caffery et al. の VNE との比較も示されている。この探索の結果、 $s_1 = s_2 = 0$ で、 r が 0.5 から 0.8 の範囲の値をとった時に、最も高い AUC が得られ、それは他のエントロピースコアよりも大きな値であった。



図A. 3 RVNEのパラメータ最適化

c. 計算サービス及びダウンロードサービス

上記の計算のサービス及びプログラムのダウンロードサービスのため、SEALA という名前のウェブサイト(<http://seala.cbrc.jp/~SEALA/>)を2010年7月より生命情報工学研究センターで立ち上げた。以下がサイトのトップページのイメージである。



図A. 4 SEALA のトップ画面

7 月から 12 月までのアクセス状況は以下の通りである。

	Visists	Hiits	Visists (Daily Avg)	Hits (Daily Avg)
7 月	24	1536	2	153
8 月	49	778	1	25
9 月	82	762	2	25
10 月	327	2425	10	78
11 月	243	1070	10	44
12 月	354	2209	11	71

業績目録

原著論文

1. Iwatsuki, M., Mimori, K., Ishii, H., Yokobori, T., Takatsuno, Y., Sato, T., Toh, H., Onoyama, I., Nakayama, K., Baba, H., Mori, M. 2010
Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance.
International Journal of Cancer, 126, 1828-1837.
2. Osawa, H., Iwatsuki, M., Mimori, K., Sato, T., Johansson, F., Toh, H., Watanabe, M., Mori, M. 2010
FANC2D mRNA over-expression is a bona-fide indicator of lymph node metastasis in human colorectal cancer.
Ann. Surg. Oncol. 17, 2341-2348.
3. Katoh, H., Toh, H. 2010
Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program.
Bioinformatics 26, 1899-1900.
4. Standley DM, Yamashita R, Kinjo AR, Toh H, Nakamura H. 2010
SeSAW: balancing sequence and structural information in protein functional mapping.
Bioinformatics. 26, 1258-1259.
5. Johansson, F., Toh, H. 2010
Relative von Neumann entropy for evaluating amino acid conservation
J Bioinform Comput Biol. 8, 809-823.
6. Iizuka, Y., Okuno, T., Saeki, K., Uozaki, H., Okada, S., Misaka, T., Sato, T., Toh, H., Fukayama, M., Takeda, N., Kita, Y., Shimizu, T., Nakamura, M., Yokomizo, T. 2010
Protective roles of second leukotriene B₄ receptor BLT2 in murine model of inflammatory colitis
FASEB J. 24, 4678-4690.
7. Johansson, F., Toh, H. 2010
A comparative study of conservation and variation scores.
BMC Bioinformatics 11, 388.
8. Ebina, T., Toh, H., Kuroda, Y.
DROP: An SVM domain linker predictor trained with optimal features selected by random forest.
Bioinformatics (in press)

著書

1. Sato, T., Yamanishi, Y., Kanehisa, M., Horimoto, K., Toh, H.
Improvement of the mirrortree method by extracting evolutionary information. (review)
In: Sequence and Genome Analysis (ed. Zhao, Z.) iConcept Press (in press) .
2. 藤 博幸
第3章 分子進化のパターン (分担)
第17章 遺伝子発現調節の分子進化
In: 新しい分子進化学入門 (宮田隆 編) pp.30 – 40, pp. 175-184 (2010), 講談社

学会発表

1. 太安裕美、神谷成敏、藤博幸 (2010, 6/16-6/18)
プロスタノイド受容体群の機能分化に関する情報科学的解析
第 10 回日本蛋白質科学会年会 (札幌)
2. 清水 佳奈、藤 博幸 (2010, 6/16-6/18)
天然変性タンパク質の相互作用の網羅的解析
ワークショップ 蛋白質間相互作用の計算・情報科学
(オーガナイザー 中村春木、藤博幸)
第 10 回日本蛋白質科学会年会 (札幌)
3. 根本航、福井一彦、藤博幸 (2010, 6/16-6/18)
G タンパク質共役型受容体間相互作用の制御に向けたバイオインフォマティクスによるアプローチ
第 10 回日本蛋白質科学会年会 (札幌)
4. Daiyasu, H., Nemoto, W., Kang, Y., Toh, H. (2010, 12/7 – 12/10)
Ccomputational Analysis of Functional Differentiation of Chemokine Receptors
第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)
5. 岩部直之、隈啓一、加藤和貴、藤博幸、佐々木剛、廣瀬希、管裕、宮田隆、岡田雅人、鈴木穰、笠原雅弘、新井理、大石加寿子、鹿児島浩、豊田敦。黒木陽子、菅野純夫、森下真一、小原雄治、藤山秋佐夫 (2010, 12/7 – 12/10)
動物の多細胞化と遺伝子族多様化の関連性: I. シグナル伝達系
第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)
6. 隈啓一、岩部直之、加藤和貴、藤博幸、佐々木剛、廣瀬希、管裕、宮田隆、鈴木穰、笠原雅弘、新井理、大石加寿子、鹿児島浩、豊田敦。黒木陽子、菅野純夫、森下真一、小原雄

治、藤山秋佐夫 (2010, 12/7 – 12/10)

動物の多細胞化と遺伝子族多様化の関連性: II. 細胞接着因子と転写因子

第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)

7. Ichihara, H., Toh, H. (2010, 12/7 – 12/10)

Computational Analysis of Ubiquitin-like Proteins as Hubs

第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)

8. Oda, H., Ota, M., Sato, T., Toh, H. (2010, 12/7 – 12/10)

Application of 3D-profile to Comparative Studies of Profiles

第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)

防御システム再生学分野

Division of Regeneration Biology

防御システム再生学分野では、(A) 癌幹細胞制御の研究、(B) 再生医学と癌研究の連携、(C) 発癌の早期病変の研究、を研究の3つの柱と位置づけ研究を推進している。外科学の基盤の上にたち、癌の診断と治療をより良くするための研究を行っている。遺伝子、蛋白質、細胞、組織、個体、集団レベルでの医科学叡智を総動員して癌の制圧を目指している。このような先端医科学を臨床外科学に展開することにより、質が高くコストに見合った医療を提供することに社会貢献できる。

A. 癌幹細胞制御の研究

癌幹細胞は1994年に造血器幹細胞で最初に報告されてから我々の研究室では消化器癌幹細胞を世界に先駆けて報告した。本年度は、肝臓癌の癌幹細胞に特化させた研究を実施し、造血器とは異なる固形癌特有の分子病態を明らかにした。この知見は新たな治療法の開発に貢献できる。この目的に沿って消化器癌の癌幹細胞の分子生物学的特徴を明らかにした。

a. 2つのタイプの癌幹細胞

治療抵抗性の観点から、静止期にある癌幹細胞と増殖期にある癌幹細胞を峻別できる細胞表面分子を同定した。この細胞表面分子を駆使することにより、これら2つのタイプの癌幹細胞を明らかにすることが可能となり、特に静止期にある癌幹細胞が従来には知られていなかった薬剤耐性機構に関わることが明らかとなった。この静止期にある癌幹細胞は、癌幹細胞が低酸素領域に存在して治療後に残存することを分子レベルから解明できる突破口となった。細胞内の活性酸素と解糖系の偏倚の解明に着手し、本年度は新しい情報伝達経路の解明を実施した。情報伝達経路に特異的な阻害剤の開発に着手した。

b. 癌細胞のリプログラミング

高度で簡便なiPS技術を駆使することにより、消化器癌細胞のリプログラミングを実施した。本事業の成果の1部として、消化器癌細胞は正常分化細胞に於けると同様に多分化能を再獲得して、分化誘導療法と抗癌剤への感受性を獲得できることを明らかとして、新時代を切り拓く新しい癌治療の先鞭をつけることに成功した(iPC技術)。今年度の後半から、消化器癌細胞の中でも特に癌幹細胞に焦点を当ててリプログラミングを誘導する新技術の開発に着手した。

B. 再生医学と癌研究の連携に向けて

再生医学から癌研究へと研究を展開するとともに、癌細胞から誘導する我々独自の iPC 技術を正常細胞に応用することを試みた。現在開発中の複数の低分子化合物を使用することにより、癌化の可能性を高度に排除できる新しいリプログラミング技術の開発に向けて基盤を構築した。この研究のインパクトとして、従来の iPS 技術の弱点であった癌化問題の克服、正常と癌の相違の解明に向けて応用が可能と考えられる。細胞の起源の研究を開始した。

C. 発癌の超早期病変の究明

発癌の超早期病変において、正常細胞が如何に生理的機能の作動原理から逸脱して癌化形質を獲得するかに関して、基盤研究を実施した。超早期段階には未分化関連遺伝子の発現が時空間的に異常を来していることを明らかにしたので、化学発癌実験において再現することで新しい創薬のための技術開発に向けて基盤を構築した。本年度は試験管内で培養した消化器組織に遺伝子発現トレーシングでの高感度イメージング分析を実施し、発癌過程の早期病変を可視化した。発癌早期病態の分子生物学的特徴を検討した。

業績目録

原著論文

1. Miyoshi N., Ishii H., Nagai K., Hoshino H., Mimori K., Tanaka F., Nagano H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Defined factors induced reprogramming of gastrointestinal cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA. 107(1), 40-45, 2010.
2. Miyoshi N., Ishii H., Mimori K., Takatsuno Y., Kim H., Hirose H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. Br J Cancer. 101, 1664-1670, 2010.
3. Miyoshi N., Ishii H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. RGS16 is a marker for prognosis in colorectal cancer. Ann Surg Oncol. 16, 3507-3514, 2010.
4. Takeno A., Takemasa I., Seno S., Yamasaki M., Motoori M., Miyata H., Nakajima K., Takiguchi S., Fujiwara Y., Nishida T., Okayama T., Matsubara K., Takenaka Y., Matsuda H., Monden M., Mori M., Doki Y. Gene expression profile prospectively predicts peritoneal relapse after curative surgery of gastric cancer. Ann Surg Oncol. 17(4), 1033-1042, 17(4), 2010.
5. Adachi S., Takiguchi S., Okada K., Yamamoto K., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Fujiwara Y., Hosoda H., Kangawa K., Mori M., Doki Y. Effects of ghrelin administration after total gastrectomy: a prospective,

- randomized, placebo-controlled phase II study. *Gastroenterology*. 138(4), 1312-1320, 2010.
6. Miyata H., Yamasaki M., Takiguchi S., Nakajima K., Fujiwara Y., Mori M., Doki Y. Pre- and post-therapy nodal status equally affects survival of patients with oesophageal squamous cell carcinoma receiving preoperative chemoradiation. *Oncol Rep*. 23(5), 1331-1337, 2010.
 7. Makino T., Yamasaki M., Miyata H., Yoshioka S., Takiguchi S., Fujiwara Y., Nakajima K., Nishida T., Mori M., Doki Y. p53 Mutation status predicts pathological response to chemoradiotherapy in locally advanced esophageal cancer. *Ann Surg Oncol*. 17(3), 804-811, 2010.
 8. Yamasaki M., Miyata H., Fujiwara Y., Takiguchi S., Nakajima K., Nishida T., Yasuda T., Matsumiya J., Mori M., Doki Y. p53 Genotype Predicts Response to Chemotherapy in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Ann Surg Oncol*. 17, 634-642, 2010.
 9. Deguchi T., Tanemura M., Miyoshi E., Nagano H., Machida T., Ohmura Y., Kobayashi S., Marubashi S., Eguchi H., Takeda Y., Ito T., Mori M., Doki Y., Sawa Y. Increased immunogenicity of tumor-associated antigen, mucin 1, engineered to express alpha-gal epitopes: a novel approach to immunotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 70(13), 5259-5269, 2010.
 10. Yamamoto K., Takiguchi S., Miyata H., Adachi S., Hiura Y., Yamasaki M., Nakajima K., Fujiwara Y., Mori M., Kangawa K., Doki Y. Randomized phase II study of clinical effects of ghrelin after esophagectomy with gastric tube reconstruction. *Surgery*. 148(1), 31-38, 2010.
 11. Fujiwara Y., Nishida T., Takiguchi S., Nakajima K., Miyata H., Yamasaki M., Yamamoto K., Moon JH., Mori M., Doki Y. Feasibility study of S-1 and intraperitoneal docetaxel combination chemotherapy for gastric cancer with peritoneal dissemination. *Anticancer Research*. 30, 1335-1340, 2010.
 12. Rahadiani N., Ikeda J., Makino T., Tian T., Qiu Y., Mamat S., Wang Y., Doki Y., Aozasa K., Morii E. Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 17(5), 1311-1323, 2010.
 13. Makino T., Fujiwara Y., Takiguchi S., Miyata H., Yamasaki M., Nakajima K., Nishida T., Mori M., Doki Y. The utility of pre-operative peritoneal lavage examination in serosa-invading gastric cancer patients. *Surgery* 148(1), 96-102, 2010.
 14. Kobayashi S., Nagano H., Marubashi S., Takeda Y., Tanemura M., Konishi K., Yoshioka Y., Inoue T., Doki Y., Mori M. Impact of postoperative irradiation after non-curative resection of hilar biliary cancer. *J Surg Oncol*. 100, 657-662, 2010.
 15. Miyoshi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Kim H., Nagai K., Uemura M., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. ATP11A is a novel predictive marker for metachronous metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep*. 23, 505-510, 2010.
 16. Miyoshi N., Ishii H., Mimori K., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. TDGF1 is a novel predictive marker for

metachronous metastasis of colorectal cancer. *Int J Oncol.* 36, 563-568, 2010.

17. Motoyama K., Inoue H., Mimori K., Tanaka F., Kojima K., Uetake H., Sugihara K., Mori M. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer. *Int J Oncol.* 36, 1089-1095, 2010.
18. Iwatsuki M., Mimori K., Sato T., Toh H., Yokobori T., Tanaka F., Ishikawa K., Baba H., Mori M. Overexpression of SUGT1 in human colorectal cancer and its clinicopathological significance. *Int J Oncol.* 36, 569-575, 2010.
19. Nagahama Y., Ueno M., Haraguchi N., Mori M., Takakura N. PSF3 marks malignant colon cancer and has a role in cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 392, 150-154, 2010.
20. Iwatsuki M., Mimori K., Yokobori T., Takatsuno Y., Sato T., Toh H., Onoyama I., Nakayama K., Baba H., Mori M. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int J Cancer.* 126, 1828-1837, 2010.
21. Yamamoto H., Hemmi H., Gu JY., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Minute liver metastases from a rectal carcinoid: A case report and review. *WJGS.* 2(3), 89-94, 2010.
22. Marubashi S., Nagano H., Kobayashi S., Eguchi H., Takeda Y., Tanemura M., Umeshita K., Monden M., Doki Y., Mori M. Evaluation of a new immunoassay for therapeutic drug monitoring of tacrolimus in adult liver transplant recipients. *J Clin Pharmacol.* 50, 705-709, 2010.
23. Miyoshi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Hitora T., Tei M., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. TGM2 is a novel marker for prognosis and therapeutic target in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 17, 967-972, 2010.
24. Kobayashi S., Nagano H., Marubashi S., Wada H., Eguchi H., Takeda Y., Tanemura M., Kim T., Doki Y., Mori M. Multidetector computed tomography for preoperative prediction of postsurgical prognosis of patients with extrahepatic biliary cancer. *J Surg Oncol.* 101, 376-383, 2010.
25. Murakami M., Nagano H., Kobayashi S., Wada H., Nakamura M., Marubashi S., Eguchi H., Takeda Y., Tanemura M., Umeshita K., Doki Y., Mori M. Effects of pre-operative transcatheter arterial chemoembolization for respectable hepatocellular carcinoma: implication of circulating cancer cells by detection of α -fetoprotein mRNA. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 1, 485-491, 2010.
26. Sekimoto M., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Doki Y., Mori M. Laparoscopic reoperation of anastomotic leakage after a laparoscopic low anterior resection of the rectum. *Int J Colorectal Dis.* 25, 665-666, 2010.
27. Nagai K., Ishii H., Miyoshi N., Hoshino H., Saito T., Sato T., Tomimaru Y., Kobayashi S., Nagano H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Long-term culture following ES-like gene-induced reprogramming elicits an aggressive phenotype in mutated cholangiocellular carcinoma cells. *BBRC.* 395, 258-263, 2010.
28. Ishii H., Doki Y., Mori M., Perspective beyond cancer genomics: bioenergetics of cancer stem cells. *YMJ.* 51(5),

617-621, 2010.

29. Haraguchi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Ohkuma M., Kim MH., Akita H., Takiuchi D., Hatano H., Nagano H., Bamard GF., Doki Y., Mori M. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest.* 120(9), 3326-3329, 2010.
30. Taniguchi K., Nishikawa A., Sugino T., Aoyagi S., Sekimoto M., Takiguchi S., Okada K., Monden M., Miyazaki F. Method for objectively evaluating psychological stress resulting when humans interact with robots
Advances in Human-Robot Interaction 141-164, 2010.
31. Shimizu S., Takehara T., Hikita H., Kodama T., Miyagi T., Hosui A., Tatsumi T., Ishida H., Noda T., Nagano H., Doki Y., Mori M., Hayashi N. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology.* 52, 698-704, 2010.
32. Tokuoka M., Miyoshi N., Hirota T., Mimori K., Tanaka F., Shibata K., Ishii H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Clinical significance of ASB9 in human colorectal cancer. *Int J Oncol.* 37, 1105-1111, 2010.
33. Motoori M., Takemasa I., Yamasaki M., Komori Y., Takeno A., Miyata H., Takiguchi S., Fujiwara Y., Yasuda T., Yano M., Matuura M., Matsubara K., Monden M., Mori M., Doki Y. Prediction of the response to chemotherapy in advanced esophageal cancer by gene expression profiling of biopsy samples. *Int J Oncol.* 37, 1113-1120, 2010.
34. Nakajima K., Nezu R., Ito T., Nishida T. Hand-Assisted Laparoscopic Restorative Proctocolectomy for Ulcerative Colitis: The Optimization of Instrumentation Toward Standardization. *Surg Today.* 40, 840-844, 2010.
35. Tanaka K., Yano M., Motoori M., Kishi K., Miyashiro I., Shingai T., Gotoh K., Nomura S., Takahashi H., Ohue M., Yamada T., Ohigashi H., Yamamoto T., Yamasaki T., Doki Y., Ishikawa O. CEA-Antigen and SCC-Antigen mRNA Expression in Peripheral Blood Predict Hematogenous Recurrence After Resection in Patients with Esophageal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 17, 2779-2786, 2010.
36. Nishida N., Mimori K., Yokobori T., Sudo T., Tanaka F., Shibata K., Ishii H., Doki Y., Mori M. FOXC2 is a Novel Prognostic Factor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2010. (in press)
37. Yokobori T., Mimori K., Ishii H., Iwatsuki M., Tanaka F., Kamohara Y., Ieta K., Kita Y., Doki Y., Kawano H., Mori M. Clinical Significance of Stanniocalcin 2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 17, 2601-2607, 2010.
38. Nagahara M., Mimori K., Kataoka A., Ishii H., Tanaka F., Nagahara T., Sato T., Ono S., Sugihara K., Mori M. Correlated Expression of CD47 and SIRPA in Bone Marrow and in Peripheral Blood Predicts Recurrence in Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 16(18), 4625-4635, 2010.
39. Yoshimoto K., Namori H., Mori T., Ohba Y., Shibata H., Tashiro K., Shiraishi S., Kobayashi T. A Segmentectomy of the Right Upper Lobe Has an Advantage over a Right Upper Lobectomy Regarding the Preservation of the Functional Volume of the Right Middle Lobe: Analysis by Perfusion Single-Photon Emission Computed

- Tomography/Computed Tomography. *Surgery Today*. 40, 614-619, 2010.
40. Ozawa K., Iwatsuki M., Mimori K., Sato T., Johansson F., Toh H., Watanabe M., Mori M.
FANCD2 mRNA Overexpression is a Bona Fide Indicator of Lymph Node Metastasis in Human Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 17, 2341-2348, 2010.
 41. Yamamoto H., Sekimoto M., Uemura M., Miyoshi N., Haraguchi N., Takemasa I., Nomura M., Mizugima T., Ikeda M., Doki Y., Mori M. Feasibility of end-to-anterior wall anastomosis in conversion of the double-stapling technique during laparoscopically assisted surgery. *Surg Endosc*. 24, 2178-2181, 2010.
 42. Nakajima K., Nishida T., Jeffrey W. M., Takahashi T., Souma Y., Miyazaki Y., Iijima H., Mori M., Doki Y.
Current Limitations in endoscopic CO2 insufflation for NOTES: flow and pressure study. *Gastroenterol Endosc*. 72(5), 1036-1042, 2010.
 43. Tanaka F., Yamamoto K., Suzuki S., Inoue H., Tsurumaru M., Kajiyama Y., Kato H., Igaki H., Furuta K., Fujita H., Tanaka T., Tanaka Y., Kawashima Y., Natsugoe S., Setoyama T., Tokudome S., Mimori K., Haraguchi N., Ishii H., Mori M. Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on gut squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ADLH2 risk alleles. *Oesophagus* 59, 1457-1464, 2010.
 44. Tanaka F., Mimori K., Tahara K., Inoue H., Mori M. Saline replacement after local resection of breast: a simple technique with good control and improved patient satisfaction. *Breast Cancer* 17, 261-264, 2010.
 45. Ikai I. Kudo M., Arii S., Omata M., Kojiro M., Sakamoto M., Takayasu K., Hayashi N., Makuuchi M., Matsuyama Y., Monden M. Report of the 18th follow-up survey of primary liver cancer in Japan. *Hepatology* 40, 1043-1059, 2010.
 46. Sekimoto M., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Doki Y., Mori M. Laparoscopic lymph node dissection around the inferior mesenteric artery with preservation of the left colic artery. *Surg Endosc* 2010. (in press)
 47. Taniguchi K., Nishikawa A., Sugino T., Aoyagi S., Sekimoto M., Takiguchi S., Okada K., Monden M., Miyazaki F.
Method for objectively evaluating psychological stress resulting when humans interact with robots. *Advances in Human-Robot Interaction*. 141-164, 2010
 48. Sekimoto M., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Doki Y., Mori M. Laparoscopic reoperation of anastomotic leakage after a laparoscopic low anterior resection of the rectum. *Int J Colorectal Dis*. 25(5), 665-666, 2010.
 49. Mizushima T., Ohno Y., Nakajima K., Kai Y., Iijima H., Sekimoto M., Nishida T., Nexu R., Ito T., Doki Y., Mori M. Malignancy in Crohn's disease: incidence and clinical characteristics in Japan. *Digestion* 81(4), 265-270, 2010.
 50. Tomimaru Y., Eguchi H., Wada H., Noda T., Murakami M., Kobayashi S., Marubashi S., Takeda Y., Tanemura M., Umeshita K., Doki Y., Mori M., Nagano H. Insulin-like growth factor-binding protein 7 alters the sensitivity to interferon-based anticancer therapy in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer*. 102(10), 1483-1490, 2010.

51. Tomimaru Y, Nagano H, Eguchi H, Kobayashi S, Marubashi S, Wada H, Tanemura M, Umeshita K, Hiramatsu N, Takehara T, Doki Y, Mori M. Effects of preceding interferon therapy on outcome after surgery for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 102(4), 308-314, 2010.
52. Tomimaru Y, Takeda Y, Tatsumi M, Kim T, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Tanemura M, Kitagawa T, Nagano H, Umeshita K, Wakasa K, Doki Y, Mori M. Utility of 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in differential diagnosis of benign and malignant intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. *Oncol Rep.* 24(3), 613-620, 2010.
53. Tomimaru Y, Wada H, Marubashi S, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Noda T, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Fresh frozen plasma transfusion does not affect outcomes following hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 16(44), 5603-5610, 2010.
54. Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Tomokuni A, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. MicroRNA-21 induces resistance to the anti-tumor effect of interferon- α /5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 103(10), 1617-1626, 2010.
55. Tomimaru Y, Eguchi H, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Effect of autologous blood transfusion on avoidance of homologous blood transfusion and long-term prognosis in surgery for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010. (in press)
56. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Takeda Y, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Successful adult ABO incompatible living donor liver transplantation: Experience with double infusion through the hepatic artery and portal vein. *Hepato-Gastroenterology* 2010. (in press)
57. Kobayashi S, Nagano H, Hoshino H, Wada H, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Kim T, Shimosegawa E, Hatazawa J, Doki Y, Mori M. Diagnostic value of FDG-PET for lymph node metastasis and outcome of surgery for biliary cancer. *J Surg Oncol*, 2010. (in press)
58. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Single incision laparoscopic(SILS) hepatectomy for hepatocellular carcinoma: Initial experience in a Japanese patient. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2010. (in press)
59. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Doki Y, Mori M. Fibrin sealant with PGA felt for prevention of bile leakage after liver resection. *Hepato-gastroenterology* 2010. (in press)
60. Nishimura J, Morii E, Takahashi T, Souma Y, Nakajima K, Doki Y, Nishida T. Abdominal soft tissue sarcoma: a multicenter retrospective study. *Int J Clin Oncol.* 15(4), 399-405, 2010.
61. Kurokawa Y, Sasako M, Sano T, Shibata T, Ito S, Nashimoto A, Kurita A, Kinoshita T. Randomized controlled trials comparing postoperative changes in body weight, symptoms and respiratory function after extended surgery in gastric cancer patients. *Brit J Surg.* 2010. (in press)

62. Miki Y, Kurokawa Y, Hirao M, Fujitani K, Iwasa Y, Mano M, Nakamori S, Tsujinaka T. Survival analysis of patients with duodenal gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Gastroenterol* 44, 97-101, 2010.
63. Omura Y, Tanemura M, Kawaguchi N, Machida T, Tanida T, Deguchi T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Matsuura N, Ito T, Nagano H, Doki Y, Mori M. Combined Transplantation of Pancreatic Islets and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Enhances the Survival and Insulin Function of Islet Grafts in Diabetic Mice. *Transplantation* 2010. (in press)
64. Eguchi H, Nagano H, Tanemura M, Takeda Y, Marubashi S, Kobayashi S, Wada H, Umeshita K, Mori M, Doki Y. A thick pancreas is a risk factor for pancreatic fistula after a distal pancreatectomy: Selection of the closure technique according to the thickness. *Dig Surg*. 2010. (in press)
65. Shimizu J, Ikeda K, Fukunaga M, Murata K, Miyamoto A, Umeshita K, Kobayashi T, Monden M. Multicenter prospective randomized phase II trial of antimicrobial prophylaxis in low-risk patients undergoing colon surgery. *Surgery Today*. 40, 954-957, 2010.
66. Utsumi M, Shimizu U, Miyamoto A, Umeshita K, Kobayashi T, Monden M, Makimoto K. Age as an independent risk factor for surgical site infections in a large gastrointestinal surgery cohort in Japan. *J Hosp Infect*. 75, 183-187, 2010.
67. Suzuki Y, Takahashi K, Yamaguchi T, Matsumoto H, Nakano D, Koizumi K. Stoma-Closure-Induced Fulminant Pseudomembranous Colitis Recovered by Adjunctive Intracolonic Vancomycin with Postural Change. *Case Rep Gastroenterol*. 4(2), 133-137, 2010.
68. Mizote Y, Taniguchi T, Tanaka K, Isobe M, Wada H, Saika T, Kita S, Koide Y, Uenaka A, Nakayama E. Three novel NY-ESO-1 epitopes bound to DRB1*0803, DQB1*0401 and DRB1*0901 recognized by CD4 T cells from CHP-NY-ESO-1-vaccinated patients. *Vaccine* 19(28), 5338-5346, 2010.
69. Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Nishida N, Tokuoka M, Akita H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Abnormal expression of PFDN4 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. *Ann Surg Oncol*. 17(11), 3030-3036, 2010.
70. Nishida N, Mimori K, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. FOXC2 is a Novel Prognostic Factor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010. (in press)
71. Miyata H, Yamasaki M, Takiguchi S, Nakajima K, Fujiwara Y, Konishi K, Morii E, Mori M, Doki Y. Prognostic value of endoscopic biopsy findings after induction chemoradiotherapy with and without surgery for esophageal cancer. *Ann Surg* 2010. (in press)
72. Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Takiguchi S, Nakajima K, Fujiwara Y, Konishi K, Mori M, Doki Y. Survival factors in patients with recurrence after curative resection of esophageal squamous cell carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2010. (in press)
73. Koyama S, Tomimatsu T, Kanagawa T, Daimon E, Kimura T, Kuroda A, Tanemura M, Doki Y, Ito T.

- Successful pregnancy after simultaneous pancreas-kidney transplantation from a brain-dead donor: the first case report in Japan. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010. (in press)
74. Miyoshi N., Ishii H., Mimori K., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. SCRN1 is a novel marker for prognosis in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 101, 156-159, 2010.
 75. Miyoshi N., Ishii H., Sekimoto M., Haraguchi N., Mori M. The properties and identification of cancer stem cells. *Surgery Today*, 2010. (in press)
 76. Yamamoto H., Sekimoto M., Oya M., Yamamoto N., Konishi F., Sasaki J., Yamada S., Taniyama K., Tominaga H., Tsujimoto M., Akamatsu H., Yanagisawa S., Sakakura C., Kato Y., Matsuura N. OSNA-based Novel Molecular Testing for Lymph Node Metastases in Colorectal Cancer Patients: Results from a Multicenter Clinical Performance Study in Japan. *Ann Surg Oncol*, 2010. (in press)
 77. Konishi K., Yamamoto H., Mimori K., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Sekimoto M., Matsuura N., Takao T., Doki Y., Mori M. Expression of C4.4A at the invasive front is a novel prognostic marker for disease recurrence of colorectal cancer. *Cancer Sci*. 101(10), 2269-2277, 2010.
 78. Uemura M., Yamamoto H., Takemasa I., Mimori K., Hemmi H., Mizushima T., Ikeda M., Sekimoto M., Matsuura N., Doki Y., Mori M. Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic marker for colorectal cancer: in vivo identification from hypoxic tumor cells. *Clin Cancer Res*. 16(18), 4636-4646, 2010.
 79. Uemura M., Ikeda M., Yamamoto H., Kitani K., Tokuoka M., Matsuda K., Hata Y., Mizushima T., Takemasa I., Sekimoto M., Hosokawa K., Matsuura N., Doki Y., Mori M. Clinicopathological Assessment of Locally Recurrent Rectal Cancer and Relation to Local Re-Recurrence. *Ann Surg Oncol* 2010. (in press)
 80. Tanida T., Ohue M., Noura S., Seki Y., Gotoh K., Motoori M., Kishi K., Yamada T., Miyashiro I., Ohigashi H., Yano M., Ishikawa O. Long-term complete response of unresectable liver metastases from colorectal cancer. *Hepato-Gastroenterology* 57, 1-6, 2010.
 81. Makino T., Miyata H., Yamasaki M., Fujiwara Y., Takiguchi S., Nakajima K., Higuchi I., Hatazawa J., Mori M., Doki Y. Utility of response evaluation to neo-adjuvant chemotherapy by (18)F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery* 148(5), 908-918, 2010.
 82. Rahadiani N., Ikeda J., Makino T., Tian T., Qiu Y., Mamat S., Wang Y., Doki Y., Aozasa K., Morii E. Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 17(5), 1311-1323, 2010.
 83. Qiu Y., Song B., Zhao G., Deng B., Makino T., Tomita Y., Wang J., Luo W., Doki Y., Aozasa K., Morii E. Expression level of Pre B cell leukemia homeobox 2 correlates with poor prognosis of gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 36(3), 651-663, 2010.
 84. Makino T., Fujiwara Y., Takiguchi S., Tsuboyama T., Kim T., Nishijima Y., Yamasaki M., Miyata H., Nakajima K., Mori M., Doki Y. Preoperative T staging of gastric cancer by Multi-Detector Row Computed Tomography. *Surgery*,

2010. (in press)

85. Yamasaki M., Makino T., Masuzawa T., Kurokawa Y., Miyata H., Takiguchi S., Nakajima K., Fujiwara Y., Matsuura N., Mori M., Doki Y. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2010. (in press)
86. Nishida N., Mimori K., Fabbri M., Yokobori T., Sudo T., Tanaka F., Shibata K., Ishii H., Doki Y., Mori M. MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer, and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin Cancer Res*. 2010. (in press)
87. Tomimaru Y., Eguchi H., Wada H., Tomokuni A., Kobayashi S., Marubashi S., Takeda Y., Tanemura M., Umeshita K., Mori M., Doki Y., Nagano H. Synergistic antitumor effect of interferon- β with gemcitabine in interferon- α -non-responsive pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2010. (in press)