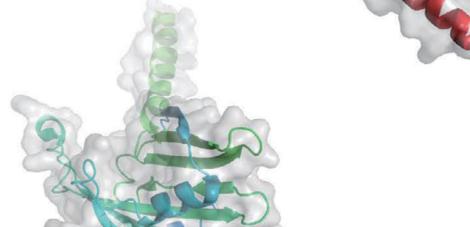


ISSN 2433-3387



# 年報 タンパク質動態研究所

Annual Reports 2016  
Institute for Protein Dynamics  
Kyoto Sangyo University

---

はじめに (永田和宏)	1
開設記念シンポジウム	3
座談会 「タンパク質の魅力、研究の魅力、そして研究所の使命」	5
タンパク質トリビア：タンパク質って？ (伊藤維昭)	21
研究所の活動	
分子細胞生物学研究室 (永田和宏)	26
生物化学研究室 (遠藤斗志也)	34
タンパク質バイオジェネシス研究室 (千葉志信)	39
発生生物学研究室 (近藤寿人)	43
タンパク質構造生物学研究室 (津下英明)	47
セミナー・プレスリリース	51
あとがき	

---

2016年

# 京都産業大学 タンパク質動態研究所

## 所員



永田 和宏 (所長)



遠藤 斗志也



千葉 志信



近藤 寿人



津下 英明

## シニアリサーチフェロー



吉田 賢右



伊藤 維昭

## 招聘教授



大隈 良典  
東京工業大学  
栄誉教授



田中 啓二  
東京都医学総合研究所  
理事長・所長



Dr. Richard I  
Morimoto  
Northwestern U  
(USA)



Dr. Ulrich F Hartl  
Max Planck Institute  
(GER)



Dr. Peter Walter  
UCSF (USA)

# はじめに

京都産業大学 タンパク質動態研究所長

永田 和宏

京都産業大学・タンパク質動態研究所は、平成28年（2016年）4月に発足したが、一年を経過したところで、初めての年報を出すことになった。

京都産業大学に総合生命科学部が創設されたのが、平成22年（2010年）4月であった。学部開設の折り、当時の学長から研究力のある学部にしてほしい旨の依頼があり、そのような陣容を目指して教員の募集を行った。発足時から6年を経て、京都産業大学の総合生命科学部は、学会や研究者のあいだでは、そして文部科学省、日本学術振興会（JSPS）などにおいても、よく認識され、高く評価される存在となった。

そのような評価を基礎として、京都産業大学の特色をさらにアピールできる組織構築が模索され、タンパク質をベースにした研究所設立の依頼が私にもたらされた。一私学が、基礎研究のために研究所を設立する、ありがたい話であり、意味と意義の大きな事業である。残念ながら建物や新たな人員の補充などのない、謂わばバーチャルな研究所ではあるが、それはともあれこのような形でタンパク質研究に従事する研究者が一堂に会して、研究を行なえる場が与えられたことは大きな喜びである。

研究所のホームページなどを見ていただくとよりわかりやすいが、本研究所は、個々のタンパク質の働きや性質を研究するのではなく、どのタンパク質にも共通する性質として、その動態にフォーカスを置いたところに特徴がある。どのタンパク質でも、それが合成され、成熟（フォールディング）して機能を獲得し、本来働くべき場所まで細胞内を輸送され、他のタンパク質との相互作用などを通じて、その機能を発揮する。また、働きを終えたり、構造が壊れたりすれば速やかに分解される。このような謂わば「タンパク質の一生」を動態として理解しようとするのが本研究所設立の目的である。タンパク質動態に焦点を絞った研究所は、国内だけでなく世界にも例がないのではないかと考えている。

もう少し詳しく述べると、本研究所ではタンパク質の動態を3つの角度から研究しようと考えている。第一はタンパク質を誕生から死までの〈時間軸〉で理解しようとするものであり、第二は、タンパク質が細胞内あるいは細胞外へ輸送

される〈空間軸〉に沿った研究である。さらにタンパク質の機能発現には、必ず他の分子との相互作用が必要であり、このような謂わば〈組織化〉の側面を明らかにすることも本研究所の使命である。

本研究所は、あくまで基礎研究を志向する研究所である。しかし、その基礎研究のなかから、社会へ発信したり、産業界へ還元したりすることが可能な研究が出てくれば、それらを応用研究として展開することも、本研究所に課せられた大切なミッションであると考えている。発足したばかりであり、その本当に大きな成果がでるまでには、いま少しの時間が必要であると思われるが、口はばった言い方を許していただければ、「タンパク質と言えば京都産業大学」と言われるような研究所を目指して、所員一同研究を推進していく覚悟なのである。

# タンパク質動態研究所 開設記念シンポジウム

2016年10月26日、タンパク質動態研究所の開設記念シンポジウムが京都産業大学神山ホールで開催された。「タンパク質のゆりかごから墓場まで」と銘打たれたこのシンポジウムでは、学内からは、元京都産業大学総合生命科学部教授であり現シニアリサーチフェローの伊藤維昭、吉田賢右両氏が、また、学外からは、三原勝芳氏（九州大学名誉教授）、藤木幸夫氏（九州大学特任教授）、田中啓二氏（東京都医学総合研究所所長・タンパク質動態研究所招聘教授）、大隅良典氏（東京工業大学栄誉教授・タンパク質動態研究所招聘教授）が招かれ、永田和宏氏（京都産業大学教授・タンパク質動態研究所所長）のコーディネートのもとに講演会が行われた。



本シンポジウムは、計画当初、研究者向けの比較的小規模な講演会として京都産業大学の図書館ホールにて行われる予定であったが、講演予定者の一人、大隅良典氏のノーベル生理学・医学賞の受賞決定という喜ばしいニュースを受け、急遽、収容人数の多い神山ホールに会場が変更され、また、第一部を研究者向け、第二部を一般向けという二段構成での開催となった。シンポジウムの情報発信は、学内で10月6日に開かれた記者会見の場で行われたが、その情報がテレビや新聞などで報道されると、インターネットによる参加申込みが殺到し、記者会見の翌日には一般向けの参加申込みは締め切りとなった。大学広報や研究機構の事



務スタッフは事前準備に大変な思いをされたものと想像するが、迅速かつ柔軟な対応の甲斐もあるうか、シンポジウムの当日には、地元の高校生から京産大生、一般参加者、研究者など合わせて1200名が集まり、多数のマスコミ関係者も加えて会場の神山ホールは大変な賑わいとなった。

研究者向けの第一部では、まず、伊藤維昭氏が登壇した。「タンパク質誕生の真実」という演題で、合成されつつある新生タンパク質がみせる興味深い振る舞いやその生物学的な意義について、最新の研究成果を発表された。次に、吉田賢右氏は、「分子シャペロン・タンパク質の立体構造形成を制御するタンパク質」という演題で、タンパク質のフォールディングにおけるシャペロニンの役割と分子メカニズムについて発表された。三原勝芳氏は、「ミトコンドリア融合・分裂の機



構と生体機能調節」という演題で、ミトコンドリアの動態とそれを制御するタンパク質についての最新の知見を発表された。藤木幸夫氏は、「ペルオキシソームの恒常性と障害の分子基盤」という演題で、ペルオキシソームの機能維持に関わるタンパク質についての最新の知見を紹介された。最後に、田中啓二氏は、「免疫型プロテアソーム～「自己と非自己」識別の根源に迫る！～」という演題で、獲得免疫の形成における免疫型プロテアソームの役割について、大変興味深い知見を報告された。



第二部は研究者以外の一般の方にも公開され、メインイベントとして大隅良典氏の特別講演があった。オートファジー研究を通じて基礎研究にその身を捧げた一人の研究者の姿をひとつのケーススタディーとして示された大変示唆に富んだご講演となった。本シンポジウムは、大隅先生にとっては、ノーベル賞受賞決定後初の一般講演であったこともあり、ご来場いただいた方々にとっても大変貴重な機会になったのではないかと想像する。

実は、この第二部では、大隅先生のご講演に先立って座談会が行われ、大隅氏の研究仲間でもある第一部の演者の先生方や、本シンポジウムのコーディネーターの永田和宏氏らが、大隅先生との交流や個人的なエピソードなどをご披露された。例えば、伊藤維昭氏は、修士課程の時代に生化学若手の会で大隅氏と初めて出会い、一緒に山登りをさ

れた時の写真を披露された。一学年後輩の大隅先生を先導して山登りをする学生時代の自身の写真を指し、



「この頃はまだ私が大隅さんをリードしていました」と言って会場を沸かせていた。本シンポジウムの演者と永田和宏氏を含めた七名は、「七人の侍」という飲み仲間(?) 集団を結成し、定期的に集まって飲みながら語り明かす会を重ねてきた。「七人の侍」のメンバーによる座談会は、研究仲間から見た大隅先生の等身大の姿を垣間見ることのできる大変ユニークな機会でもあったかと思う。

本シンポジウムでの講演や座談会を通じて、大隅先生を始め演者の先生方が、基礎研究の社会的重要性や基礎研究とともに生きることの魅力を伝えようとしていたように思う。基礎研究者の一人として、講演者の思いが少しでも多くの来訪者、特に、高校生や大学生などの若い人たちに響いたことを願い、また、基礎研究が人々の生活の一部としてより親しまれる社会になること願いつつ、「タンパク質動態研究所開設記念シンポジウム」の報告記の結びとしたい。

文責 千葉志信





## 座談会

# タンパク質の魅力、研究の魅力、 そして研究所の使命

平成 29 年 3 月 15 日

### タンパク質動態研究所にもつイメージとは

**永田** 去年の4月にタンパク質動態研究所がスタートしました。今日は第1回の年報をつくるにあたり、この研究所の5つの研究室を主宰されている皆さんにお集まりいただきました。この研究所を皆さんがどんなふうに捉えておられて、どういうところに意義を求めようとしておられるのか。それがご自分の研究活動、そして教育活動にどういう意味を持つのかというあたりをお聞きしながら、この研究所をより良いものにしていくためのヒントをいただきたいと思っています。

まず、この京都産業大学に、私たちが所属する総合生命科学部とは独立した形で、タンパク質動態研究所ができた。この意味というか、この研究所にどのようなイメージを持っ

ておられるかということから、お聞きしたいと思います。

若いところから、千葉さんからどうですか。

**千葉** タンパク質の特に動態という切り口にフォーカスしているというところがいい。それが一つの提案、メッセージになっているんじゃないかと感じました。自分の研究で言えば、タンパク質の機能を理解する上で、タンパク質ができてくるところの動態を理解しないといけないという流れになってきているので、そこで新しい価値観を見出せば、と思っています。

**津下** 私は、動態研究所にさまざまな研究者が集まって、そこで新たな共同研究が生まれ、まだ見たことのないような新しい研究に発展すればいいかなと思っています。それぞれの個が確立した研究者同士が集まって新たな教

育と研究をすることで、今まで1人ではできなかったような新たな分野がまた生まれてくるのではないかと。

僕のところは、これまではX線結晶構造解析でタンパクの静的な形を捉える、そこから機能を解析していくということがポリシーだったんですけれども、いま形の変化が重要になっている。私がターゲットとしているのは、タンパク質のA成分とB成分とがくっついて細胞の中に侵入するという毒素です。そのB成分が実はタンパク質を膜を越えて輸送するトランスロケーターと呼ばれるタンパクで、これが構造を変えてAをどうやって輸送できるようになるかがわかれば、非常に面白いなと思っています。静的なピクチャーを幾つもつなげることで動的なものが生まれてくる。

**遠藤** タンパク質の研究というのは常にライフサイエンスの中心であるわけですが、それが今、すごく変わりつつある、大きな転換点だと思うんです。僕らの研究もそういう世界的な大きな流れの変化の中で変わっていかざるを得ないところがある。どう変わってきているかという、一つはタンパク質の構造決定法の技術革新ですね。もちろん今までX線などでいろいろ構造が決まってきたのですが、クライオ電子顕微鏡<sup>1</sup>を中心とする技術の進展によって今まで決められなかった複雑なタンパク質複合体や膜タンパク質も構造が決まるようになってきた。たぶんこの5年ぐらいの間にもものすごく沢山のタンパク質の構造が出てくるでしょう。それから次は、この10年ぐらいの間にプロテオーム<sup>2</sup>といって細胞の中のタンパク質全体の情報を集めるということができてきたわけだけど、集めるだけではなくて、それを使ってシステムとして理解するというか、コンピュータの中で生

き物をいじるとか、進化させるとか、そういうことができいく感じがあります。もう一方では、タンパク質の構造とか機能を計算機で完全に扱える段階に入りつつある、という計算科学の進歩もあります。

こうした大きな流れの変化に僕らは関わっていきたいとは思いますが、全部にかかわれるわけではない。でも、これだけ大きな変化が起こっていることを何か伝えたい。動態研究所というのは、いま生命科学を牽引し、変化生み出しつつあるような流れについて、この大学の研究者、学生のコミュニティに伝える媒介としての拠点になればいいのかなと思います。

**永田** 今の遠藤さんが言われた大事なことは、個々の研究者がこれまで築いてきたことのほかに、世の中でタンパク質研究が非常な勢いで新しいメソドロジーを導入しながら動いていく。それとどのような関係を持ちながら自分の研究、あるいはこの研究所全体の研究を発展させていくかという目配りが非常に重要になってきていて、それは津下さんのほうに



永田 和宏

も当然かかわってくるわけです。こうしたことは、個人のレベルでは限界があったのを、こういう研究所全体のアクティビティとしてうまく取り込んでいく、これは非常に大事なことだと思いますね。

**近藤** 私はこの研究所に関するストラテジックな面と学術的な面の2つについて、お話ししたいと思います。

コンパクトな私学で何をやるかという、何か特徴を出す戦略が必要で、近畿大学がマグロで行くのだったら、うちはタンパク質動態で行こうかというぐらいの、できればそういう使命を帯びながらこの大学の特徴を出せばいいと思っています。個々の研究活動も、研究所という形にすると見えやすくなるし、この大学の特徴を表現できるかと思っています。だから、この大学自身の幾つかのキャッチフレーズの一つになるような、そういう活動を研究や教育を通してやっていくのがこの研究所の役割でしょうか。たまたま今回は、大隅良典さんがこの研究所に招聘教授として関わられるということで、同じ分野でやっているわれわれが非常に重要なことをやっているという一つのアピールになったのかなと思います。

研究面では、私は世の中では発生生物学者と言われているんですけども、それは正しいような正しくないような。私がやっているのは最終的には生命、具体的にはわれわれの個体ですけども、それをきちっと働かせるためのシステムの研究。いわば個々のタンパク質に対応する非常に強いエンジンとか、すばらしい効きのいいブレーキとか、低速から高速まで全部カバーできるようなすばらしいサスペンションとか、これを全部組み合わせてどうやって一つの車に組み立てるか、そう

いう作業のところの研究です。具体的には、DNA からどの遺伝子をどうやって働かせるかを指示する転写因子というタンパク質、それから細胞は集団で同調的に働く仕事をすることもあるし、隣の細胞同士がむしろ別のことをやったほうがいいこともある、そういったシグナルに関係したシグナルタンパク質、つまりタンパク質機能の出発点と、細胞としてのアウトプットという、両面に位置するタンパク質の研究をしているわけです。こうした個々のタンパク質の研究も、例えば転写因子の安定性ではユビキチン化とか、リン酸化とか、皆さんがなさっていることが全部入ってきますので、1個1個のタンパク質もやりながら、それがどう全体の流れにつながるのか、どうシステム化ができるかというあたりを描ければいいなと思います。

**永田** 私はこの研究所をつくるにあたって、この総合生命科学部には非常に優れた研究者たちが集まっているというのは、学会的にも、文科省的にも皆が認識しているわけですが、それを一つの力に変えるにはどうしたらいいかということを考えました。そうすると、あの人もいるし、あの人もいますという形での認識のされ方よりも、京都産業大学ではこういうところで特徴のある研究者を集めているんです、こういうところにフォーカスした研究を一つの特徴としてやろうとしているんです、という切り口が重要なかなと思いました。そこで何か特徴のあるものを出したいということで、「タンパク質動態」というフレーズが浮かび、それにフィットする先生がたに集まっていたいたわけですね。もちろん、人が先にあって分野が決まったということもあるし、こういう分野だからこういう先生に集まってもらったという両方があるわけです。

が、非常に特徴のある研究所ができたと思っています。

集まっていた方は、もちろんわが国だけじゃなくて世界的にも非常によく知られた人たちばかりで、どこへ出しても恥ずかしくない研究者がそろっている研究所だと思います。ユニット数としては5つでそんなに大きくはないですが、東工大の大隅ユニットも6つぐらいですし、いいサイズだろうと思っています。

**近藤** 昔、阪大に細胞工学センターができたときも、やっぱり5研究室でした。

**永田** 「タンパク質動態」を冠した研究所、というのは僕の知っている限り初めてだと思います。これまでタンパク質の研究というと1個のタンパク質、それに形があって、機能があって、この形と機能がどんなふうに関連しながら一つの生命活動の中で位置づけられているかという、いわば個々のタンパク質オリエンテッドな研究だったと思うんですが、ここはそうじゃない。全てのタンパク質に共通する、ある種の動態がある。生まれてから成熟して、移動して、機能して、劣化して、分解されて、再利用される。1つの研究所がこうした一連のイベントをメインに考えようというのは、多分日本としても初めてだと思うし、世界的にも僕の知っている限りあまりないと思います。

この研究所のもう1つの特徴は、ここに集まっている5人の研究者が近いところにありながら同じことはやっていない。このバランスがなかなか絶妙で、ちょっと話題になっていた、大隅さんも入っている「七人の侍」<sup>3</sup>。あれも同じで、非常に近い分野なんだけど、1人として同じことをやっている人がいない、全部違う分野のことをやっている。そうした

仲間の相乗効果が、すごくいいんです。あの「七人の侍」という仲間がこんなに続いているのは、酒が呑めるということのほかにそういういいことがあるからで、この研究所のメンバーもそれに近いところがある。同じようなことをやっていて競合しているだけだったら研究所としてあまり力にならないけど、少しずつ違うことをやりながら、でもスコープとしては、近藤さんの発生というちょっと見た目には違うような分野も含めて、同じところを志向できるというのが、この研究所として強いところだと思っています。

**千葉** 技術的にも、構造をやる人もいれば、バイオロジーをやる人、分子生物学をやっている人もいる。そういう意味でも非常にバランスがいいですね。

**永田** そうですね。構造生物学、細胞生物学、分子生物学、発生生物学、タンパク質科学、生化学。あまり分けてもしょうがないけど、近いようで重なってはいないという感じですね。

**津下** 一般向けに一言だけ言うと、僕の中のイメージでは、例えば音楽のジャムセッションみたいに、それぞれの個が確立した人がいるんな組み合わせで何かをやると、また新たなものが生まれてくる。そうしたことができるとすごくいいかなと。ジャムセッションの場合は観客がいますが、研究というのは観客をおいてというのはリアルタイムでは無理です。でも、共通しうるのは、やっている人間が共同研究を楽しんでやれること、それがすごく大事だし、それができるんじゃないかなと思います。この研究所のメンバーだけではなくて、総合生命科学部にはいろんな先生がいるので、そういう人たちも巻き込んで、あるいはもっと外部の方も巻き込んで、そ

うことが楽しんでできたら、その核となるような研究所であればいいかなと思います。



津下 英明

#### 私学における新しい研究所設立の意義とは

**永田** わが国のタンパク質科学研究における本研究所の位置づけについては、いろんな意見が出たので、ここでちょっと話題を変えましょう。ここは私学である。早稲田、慶応のように大きな私学でもなくて、まあまあ中堅どころの私学。この私学がこういう一つの研究所を持つことの意味、それは研究面での意味に加えて、大学にどんなふうにコントリビュート、貢献できるかということがあります。一番わかりやすいところは教育ですけど、そういうことについて、この研究所が担っていくべき役割について、何かご意見ありますか。

**遠藤** 国立とか公立の大学は公教育なので、この国の次を担っていく人を育てるというミッションがありますが、私学はそうじゃなくて、それぞれに教育の理念と方針があって、それで人を集めてくる。でも、逆にそれは厳

しくて、学生が集まらないと成り立たない。ここに来て感じたことですが、学部とか組織を、良い学生が集まるよう魅力的にするために、思い切って、かなりのスピード感を持って変えようという姿勢がすごいです。ただ、そういうことだけをやっていると、長期的な視点とか、広い視野とか、最先端での動きとか、そういうことを組織に反映しにくいところがある。研究所のミッションというのは学生がいかに応募してくれるかということだけじゃない視点。長期的、先端性、先進性といった視点でこういうものをつくると、大学にプラスαの魅力ができて、それが間接的に学生を集める魅力にもなるんじゃないかと思います。そういうふうな学部組織と研究所をうまく使い分けていくと、この規模の私学だったらより魅力的になるのかなと思います。

**永田** それは大事な指摘ですね。研究所ができたわけだから、教育といっても学部と同じことを考えていたら研究所のレゾン・デートルはないわけで、それをどう考えるか。1つのアドバルーンというか、見やすい広告塔というか、こんな面白い研究をしているんだ、こんなに先端的な研究をしているんだということを社会なり、あるいは教育現場なりにどう発信できるか。それが間接的に学生集めになるというのは、すごく大事なことです。われわれは研究所の人間として、そういう意味でのアクティビティというのを高めていく必要があるだろうと思います。

**津下** タンパク動態研究所だけでなく、京産大がいいのは、私学なのに理学部を持っていて、かつ天文台がまたいい仕事をしていますね。基礎研究に幅広く力を入れているというのは京産大としてアピールする点じゃないかと思います。タンパク質動態に、天文台

に、理学部を持っているというのは、ちょっとやそっとでは——なかなか短期につくことはできないもので、将来 10 年後、20 年後という長いスパンで見たときにアピールできることじゃないかと思います。

**千葉** 確かに。ちょっと驚いたのは、この研究所はどちらかというと基礎研究に重きを置いているようなところがあって、私大でそれをやるというのは非常に勇気が必要なことだったんじゃないかということです。大学のあり方がいろいろ問われる昨今、やはり大学の一つの重要な役割は、学問とか学術的な価値とか文化を守ること、それをこの大学は真面目にやっているということを示す一つの象徴にも思えました。だから、学生集めという点では、学生さんはかなり偏差値を見るけれども、そういうところではなくて、この京産大の研究とか、純粋に学問を大事にしている姿勢を見て選んでほしいなと思います。

**永田** 大事なことですね。それをアピールするにはどうしたらいいですかね。

**千葉** それがなかなか難しいところですね。

**永田** そうなんですよね。僕が総合生命科学部をつくったときに、総合生命科学部のキャッチフレーズを考えたんです。それは「よりよい教育はよりよい研究から」というもので、それは今も継承されていて、学長も京産大全体をそんなふうに言っていたにいます。僕が今回、大隅さんのノーベル賞受賞に関してあちこちで宣伝しているのは、大隅さんが「科学を文化として捉える、そういう姿勢が日本の中で必要だ」と言われていること、これはとてもいいメッセージだと思っています。千葉さんの口からも期せずしてそういう言葉が出たけど、研究する風土というのが大事だということを、大学としても、学部とし

ても、研究所としても示していく必要があるのではないかと。

ただ、そこまではみんなが同意できるんだけど、これをどう広めていくか。そこが難しいところです。直接に学生集めをするのはこの研究所のミッションじゃないけれども、私学という意味ではそういうことで大きく貢献できるのではないかと。どう考えますか？

**遠藤** 今は入試がある以上、客観的な 1 つの基準として偏差値というものがあって、それで大学のランクづけが決まり、自分がどこに行ったらいいかという学生の動向が予備校の感覚で決まってしまうというのが現状です。本当にそれがあと 10 年続くのかな。今、世の中を見たら、マスメディアが信用されなくなって、ツイッターとかの SNS がどんどん幅をきかせ、情報の出方、入り方、共有のされ方が、大きく変わってきていますよね。そういう中で、大学に入るところだけが偏差値という予備校的なメトリクスで動くというのが本当に続くのかな、という気がします。それが変わってくるというときに慌てて何かしても遅いので、さっきのアドバルーンでもないけれども、何か違う情報の発信の仕方、情報の提供の仕方をつくっていけば何かが変わるのではないかと、と思います。そういう実験は学部レベルでは危なくてできないかもしれないけど、研究所はそういうことが少し許されるマージンがあるのではないかと。だから、思い切って面白いことをやって、何か発信していったらいいのかなと思いますね。

**永田** ここはやはりすごい大事なことです。遠藤さんが言ったのは、この大学だけじゃなくてどこの大学も全部同じ問題で、「大学評価学会」というのがあるのをご存じですか。大学評価はいかにあるべきかをやる学会、ちゃ

んとした学会なんです。僕、実はこの間、その学会に頼まれて特別講演してきたんだけど、やっぱりそこでも同じようなことはみんな問題意識として持っている。これはちょっとドン・キホーテ的だけど、やっぱり誰かに憧れて高校生がこの大学を選ぶというメカニズムが、われわれの時代にはあったと思うんです。僕は個人的には湯川秀樹さんがいたから京都大学理学部、それしか考えなかった。

**近藤** 私は生物物理学科の1期生になるために京大に入ったんです。

**永田** 僕は残念ながら、近藤さんと1年違うだけで生物物理に入れなかった。僕が3年生のときに生物物理学科ができて、近藤さんが1期生なんですね。僕は物理の落ちこぼれだけど、入った動機はすごくはっきりしていて、京都大学に湯川秀樹がいたから。幸いなことに、1年間、湯川先生の物理学通論というのを受けることができたんですが、それが最後の講義だったんです。あの先生がいるからこの大学に行きたいという人が受験生の中に10人でもいれば、また全然意味が違ってくるんじゃないですかね。数的にはわずかなものでも、例えば10人近藤さんに憧れて京都産業大学を受けたいという人が出てくるといのは、この研究所が果たせる一つの意味ではないかと。

**近藤** もちろんこの先生に憧れてというのはあるけど、こういう先生がいる、しかし、それだけじゃないらしいというマス効果というのも大きいかと。そういう意味で働き頭は永田さんだと思いますけれども、それぞれがいるんな機会に存在感を出していただければと思います。

**遠藤** 永田さんの言われた、先生に憧れて来るといのは、確かに今、それだけ魅力を持

った大先生、弟子を何十人も生み出すような人ってどんどんいなくなっていますよね。それは時代の流れる的なこともあって、大学の教育は公平でなければいけないという風潮が強くなっている。きちっとしたカリキュラムやシラバスがあって、教員が変わっても教える内容が同じでなければいけないという。

**近藤** 教育というのは教科書を教えることではなくて、僕らは科学をやっているから、それぞれの一番のプロフェッショナルなところで学生に語りかけて、プロとは何であるか、あなたがプロになるときはどういう気持ちを持ってやるんですか、という問いかけをすることが大学教育だと思うんですね。教科書を教えなさいという教育観が間違いで、われわれとしては、もちろん教科書を離れて教育をしているわけじゃないけれども、研究の最先端から来るような問題提起とか、難しさとか、そうした現場を教えることが大学教育かなと思いますね。

**永田** きょうは教育問題をやる場じゃないのでこのぐらいにしますけど、僕がずっと言い続けていることは、大学ではわかっていることは教科書で見てください。大学の教師がやるべきことは、ここがまだわかってないのだということを学生に気づかせること。それが大学教育の一番の根幹だと僕はずっと言い続けています。

### 意欲をもった大学院生をいかに惹きつけるか

**永田** さっきいい学生という話が出ましたけど、大学院生を増やしていくことがすごく大事なことだと僕は思っていて、研究所にとってもいい大学院生が来てくれないと、続かないです。研究の質を保障するために、大学院

生をどうやって集めるか。これは卵が先か鶏が先かと同じことで、いい研究をしていった学生が来るというのは大事だけれども、いい研究をするためにはいい学生がいないとダメだということです。総合生命科学部をつくる時に、当時の学長に研究のできる学部をつくってください、大学院生を増やしてくださいと言われたので、それは無理ですと言ったんです。「京大でも大学院生が集まらなくなっている時代に、私学で大学院の授業料も高く、しかも出たからといって京大、東大の大学院生と同じように見られるかどうかかわからないところに大学院生を増やせと言っても無理です。だから大学院の授業料をなくしてください」と言った。すると次に（当時の）学長に会ったときに大学院を無料にしますと言われて、後期博士課程から授業料は実質全額無料になりました。これには本当に感心しましたが、この大学のスピード感というのはすごかった。今は、修士課程は成績に応じて7割減免、6割減免、2割減免です。大学としては大学院生を増やすということを全面的にサポートしてくれていると僕は思っているので、これで増やせないというのは、われわれの責任にもなってきます。どうやっていい学生、大学院生を増やしたらいいかについて、何かお考えはありますか。

**近藤** 大学の修士課程というのは、自分の人生、具体的には就職を考えたときに、自分が本当に行きたい職業に就くための具体的な道だと思う。基本的にはそれで納得して行っている人もいます。現在は大学院を出るとするのは必ずしも研究者育成というわけじゃなくて、その大学院で一生懸命研究をしたという経験が次のキャリアにつながるのだと思います。その中で私は研究以外は嫌という人は、

博士課程に行ってプロになるというのが正しいと思います。

就職とは、それぞれの人の人生をいかに豊かにするか、一番得意なところをいかに生かして人生を切り開いていくかというための手段だと思います。その手段を選ぶときに、この大学院は今までのいろいろ経験した大学院の中でも、一番教育がしっかりしていると感じました。まず第1は、最先端の研究の中に大学院生を巻き込んで、自分が後ろからついていくんじゃなくて、一番先端にいるという自信を持たせながら、それなりのいろんな要求、ここは妥協できないとか、そういうことを経験すること。もう一つは、プレゼンテーションがたくさん要求されていますが、すごくいいトレーニングだと思います。大学院



というのは最初の1年だけでもものすごく成長しますから。そのあたりをいかに学部生の方に納得してもらおうかですね。さっき高校と大学は切り離して考えるべきだとおっしゃっていましたが、大学院もまた大学の学部とはまったく別の次のステップなので、だからそこで就職戦線も勝てるし、自分の思っ

た方向に行けることになる。そういうことを学生さんに納得してもらおうということが、ワン・オブ・ザ・ストラテジー、一つの作戦かと思えます。

**永田** 遠藤さんと近藤さんは最近他大学から来られて、この大学院生というものについて何か感じたことはありますか。

**遠藤** 大学院の研究教育が充実していて、学生がちゃんと育っているなと思いました。修士では1年次に2回発表がありますけれども、その発表と質疑応答のレベルの高さにはびっくりしました。

**近藤** すごくうまく働いていると思いますね。

**遠藤** 一つ残念なのは、学生というのは周りの動向を見て自分の行く方向を決めるので、ちょっと前まで求人倍率が低かったから、早く決めないと負けちゃうみたいな、勝ち組になろうと思ったら早く就職を決めたいという雰囲気が強かったのかな、そのせいでここでは国立大と違って優秀な学生が就職に行ってしまうがち、というのがあります。でも、それも今、求人倍率がどんどん上がって行って、変わりつつあるかもしれません。

もう一つは、実は今、国立大学なんかではアカデミアに向かおうという人がどんどん減っています。それはその先にあるものとして、ポスドクを続けても続けても、パーマネントなポジションが足りないとか、暗いものばかりが見えてきたからなわけです。でもそれは逆に、人がアカデミアに行かなくなっていく分、今大学院に行けば結構勝ち組になれるということです。そのあたりがもう少し意識されるといいのかな、と思います。こうした2つの面、求人倍率の上昇とアカデミアに残ることがネガティブからポジティブに変わっていく流れ、ということで新たなフェイズに入

ろうとしているから、そこを見きわめれば、大学院に行くという選択肢は決して悪くはないはずです。それが学生の間で共有されていけば、ここでも成績優秀でモチベーションの高い学生が大学院に行く傾向が強くなるのかなと思っています。

**永田** 大学院に行くということは、これまで大学院に行くと自分の将来の可能性をどんどん狭めていくことにしかない、アカデミアに残るしかない、どんなにしんどくても研究者として残るしかない、ということだったんだけど、今は大学院に残るということがチョイスの可能性を広げていくことになる。それを学生に知ってほしい。大学4年間で卒業したら、せっかく総合生命科学部に来て、研究者という職業にはなかなかつけない、あるいはサイエンスと関係ない職種に行くという形になってしまうんだけど、サイエンスが好きで総合生命科学部に来て、アカデミアに残ることが最終目標じゃないんだけど、その人の人生の選択の幅を広げることになる。これが1点すごく大事なことです。

あともう一つは、本気で1回研究するという経験とそのスタンスを知ってほしい。その上で就職してほしい。

**近藤** それはとても大きいですね。次の段階でどんなところに行くとしても、大学院で本気でやった経験というのはどこでも生きるんですよね。

**永田** それが人生にすごく大きな意味を持ってくるので、僕は今、学生の講義ではそのことを言っているんです。卒業研究だけでは本気で面白いと思えるかどうかと言われると、若干イエスとは言いつらいところがあって、せめて修士まで来てしっかりと研究してほしい。その上でいるんなところに行ったら、そ

の間に没頭した経験というのは、やっぱり人生大きな役に立つと思うんですけどね。

**千葉** 教員の立場から見ても、研究の楽しさを伝えるには、やはり一定の研究活動をして、試行錯誤してという時間が必要なんです。それが大学院まで行ってきて、ある一定の長い期間をやらないと、1 サイクル、2 サイクル経験できない。研究室に来てすぐ出ていってしまうと、こちらとしても伝えたいことが伝えきれないという不満がどうしてもあります。



**永田** 今の学生の多くは失敗経験を持たないまま社会に出ていく。これは恐ろしいことだと思います。卒業研究までは、ちゃんとうまくいくように用意してあるんだけど、本来の研究というのは失敗続きで、失敗したときにどういう態度をとれるかということこそ、学生に一番学んでほしいことです。それを知るためにも大学院まで来てほしいという気がしますね。

**千葉** 生み出すことがいかに大変なことかということを知った上で、日常生活を送ると、多分世界を見る目が変わるんじゃないかということもあると思いますね。

**津下** この学部卒で4期生まで出しているわけですが、大学院の進学率は高いんですが、残念ながら外の大学院に行くんです。せっかく研究の面白さをわかったのだから、この大学院に残って、その研究をさらに続けて発展させてほしいと思います。

**永田** それはちょっと意見が違って、僕は外へ出ていくことは全然かまへんと思っていて、うちで囲い込むという必要はないと思っているんだけど。

**遠藤** 逆方向も欲しいですけどね。

**永田** それは研究所のミッションだと思う。あそこはこういう研究所があるから行ってみたいというので外から来てくれたら、いいですね。

**津下** 学生に一言だけ言いたいのは、人と同じことをやるな。学生は先輩が出たから自分もまたついていだけで同じところを目指すんじゃないし、人と違うことをやってほしいと思っています。

**遠藤** それについては学部教育から変えないとダメかなと思います。今の学部教育は、授業に出て、いい点を取って単位を取る。それを積み重ねていくと卒業できて、就職もうまくいく。これだけであって、単位にならない活動というのはほとんど評価されてないですよ。でも本当は、学部のときにこういうこともやりました、ああいうこともやりました。部活だけじゃなくて、そういう実績をポートフォリオとしてちゃんと見せて、それを武器にしていいところに就職するなり、そういう単位にならないことの重要さをアピールでき

る仕組みを作るべきです。そういう価値観は学部教育からやらないと、「大学院へ行ったら土日も大学に出てきたり、夜遅くまで実験をやって、結果が出なくて苦しんで、そんなの何で面白いの？」となる。本当は、そこにハマれば面白いんだけど、それを面白いと気づかせるような教育が学部でできていない。学部で単位にならないことが、実は幅を広げて面白いんだということをきちんと伝えて、大学院がその先の選択肢としてあることに気づいてもらえるのがいいのかなという気がします。

**永田** 僕が企業の人事で面接をするなら、まず大学でどんな失敗をしたかと聞くな。どんな失敗をして、どう対応したか。それを一人一人に聞けば、その人間がどれくらい企業にとって有益かというのは一発でわかると思うけど、成功体験ばかりで大学から送り出すというのは本当に怖いことだと思うよね。それはさっき千葉さんが言っていたみたいに、そういう体験を積み重ねるのは3年生、4年生だけの卒業研究ではちょっと十分ではないので、大学院まで来られるように学生全体の雰囲気を変えたい。そのためには研究所は面白いことをやっているよとアピールするのは、学部にとっても良いことだという気がするけどね。大学院生を全部研究所で囲い込むということではなくて。

### 大学に研究所から要望したいこと

**永田** いろいろ研究所のことを離れて、教育の本質的な問題とかが出てきましたが、この研究所の中で仕事をしていく面で、こういうところを何とか改善できないだろうかとか、大学にこういうことをお願いしたらどうだろ

うかということを忌憚なく意見をいただきたい、それも含めて年報に載せたいと思います。何を言っても多分クビにはならないので。

**千葉** できるだけ現場にいる時間がほしいというのが切実な問題です。実験系の研究では、とにかくできるだけ長時間学生と教員が接することがエッセンシャル。われわれが伝えたいことは、結局経験を通してしか伝わらないんですよね。学部教育をもっとという意見もあったんですけども、やっぱりダイレクトに伝えるには直接経験してもらおうというのがよくて、そのためにはやっぱり教員が長時間現場にいないといけない。最近PI<sup>4</sup>になって、それがいかに難しいかというのを思い知りました。

**永田** われわれもずっとそうだった。

**千葉** これは本当にまずいことだと思うんです。自分の職務とか使命を果たす環境がやっぱり非常に厳しいものだなと。学生集めに奔走しなければいけない、いろいろなことをしなければいけない。いろいろなことに気を使って、ストレスを教員がためると、それが学生に伝わるとするのは非常にまずい。疲れた顔をしていると、大学院に進んだら将来どういふものなのかと学生が想像するときにもよくないし、われわれ自身のパッションもスポイルされてしまう。

**津下** この研究所の前身と考えていいのかわからないですが、構造生物学研究センターでX線の施設とかを立ち上げる時には、大学には非常にお世話になって感謝しています。さっき遠藤先生の話に出ていたクライオ電顕というのは、多分構造生物学の中ですごく大きな波になってきています。X線構造解析だけじゃなくて、次の時代はクライオ電顕とか、さまざまな新たなテクニックが入って来るわ

けですけれども、クライオ電顕の測定装置を入れろと言うんじゃないで、少なくとも測定データの解析は研究所の中でできるように整備していただけたらうれしい。そういうハードの面のサポートは重要なことなので、できる限りまたよろしくお願ひしたいなと思います。

**近藤** 津下さんはクライオ電顕を具体的に挙げられましたけれども、もう少し広く言うと、新しい方法が出てきて、新しい答えが出る。そういうときに基本的なハードウェアの更新とか新しいスタイルにするということが必要であって、それについてわれわれは外部資金を取ってくる努力をしていますけれども、大きなものは自助努力だけではできないところもあります。要するに新しい汎用性のある、しかし、時代のトップを走るための装置とか、そういうことに対して銀行が投資するようなつもりで大学からサポートをしていただくと、われわれもそれに乗って最大限頑張って成果を生み出し、それがまた巡り回って競争的資金の獲得とかで戻ってくる。企業が最初の投資がうまくいくとどんどん発展するような正のスパイラルを狙いたい。ぜひとも投資のつもりでサポートしていただけると力になるなと思いますね。

**千葉** 設置場所の問題も含めて。

**遠藤** 大学院の学生をいかにふやして、それで研究の質を確保してというときに、大学院生のスペースが確保されていないというのは、ちょっと驚く、というか論外なところがありますね。

**永田** うちなんか廊下に机を置いて座らせているからね。

**遠藤** そこだけは何とかしてほしいと思いますね。

あとわれわれの研究所は、5人なんですよ。5人だから、一番最初に言ったようにカバーできる研究領域自体は狭い。ほんの一部でしかないけれども、できるだけ新しい流れなりをフィードバックして、学生や同僚とシェアしたい。そうすると、国内外からいろいろ研究者が来て、ディスカッションして、場合によったら、ちょっと滞在して実験して出ていく、こういう人の流れの拠点となっていくといい。今でも、この規模でこれだけ著名な世界的な研究者がセミナーをやっているなんて、すごいですよ。それを聞く機会が学生にもちゃんと開かれているというのは素晴らしいと思います。もっとそういう機会を増やしたいし、1日、2日じゃなくて、数カ月滞在してくれるような研究者もいたらどんなにかいいなと思います。ただ、問題はそういうことのサポートの体制が不十分です。人の交流に関しては最優先で手当てしてもらえよう体制をお願ひしたい。昨年海外から研究者が来て2ヶ月滞在したい、というときに、部屋の確保とかが大変でした。

**永田** そう、そういう短期滞在の研究者のための部屋というのは必須です。うちもあるとき研究者が2人海外から来たけど、大学に居室がないので、1つの部屋をシェアしてもらいました。そういうスペースは本当に必要ですよ。

**遠藤** 短期滞在の研究者が帰国後、京産大はすごく良かったよと発信してくれたら、連鎖反応で、ほかの人も来たいと言ってくるわけです。われわれは世界中に知り合いがたくさんいるんだから、そういうところから広げていけば、世界中から実際に研究者が来て、滞在して、ここがすばらしい拠点としてリコグナイズされていくと思うんですね。スペース

の問題と交流に関しては、もっともっと便宜を図ってもらいたいと思います。

**千葉** あと、助教とかポスドクを常に確保できるようにしないと、研究は絶対に進まないですね。今は保障がないですからね。そこは本当に深刻です。

**永田** スペースの問題、人の問題、要求したいのはやまやまだけど、実際の大学の財政の問題にもかかわってくるので、すぐには要求したとおりに行くことはないかもしれないです。

僕はもう一つこの研究所として大事なことは、さっき外部資金の問題も出たんだけど、この研究所はあくまで基礎研究を大事にすることが最大のミッションだと思うんです。ただ、一方で基礎研究から出てきた応用研究の芽をいかに伸ばすかというメカニズムも、大学として構築しておかないいけないことがある。ご存じのように AMED<sup>5</sup> がどんどん膨らんで、基礎研究の予算がどんどん縮小していく中であって、最初から応用研究を目指すのはこの研究所のミッションじゃないけど、基礎から出てきた応用研究の芽を大学として伸ばしていくための方策をとっておかないと、せっかくの知的財産を無駄にすることになってしまう。今、どこの大学でも URA<sup>6</sup> をすごく大事にしている、文科省も URA が無い大学には金を下ろさないといい始めている。ちなみに、この大学では URA はまだない。大学としてそういう取り組みを始めておかないと、外部資金も入ってこなくなる。この研究所も含めて、AMED とかの研究資金の対象になる材料を持っている研究者はここにもおられると思うんだけど、それがうまく AMED の資金獲得に結びつかない。それは例えば企業とタイアップしていることが必要な

のに、それができていないからで、実際企業と話をつけてくれるメディエーターがないと応募すらできないという状況になってきています。大学としては早急にそういう体制をとるということが大事だと思っています。あくまで研究所のミッションとしては基礎研究だけれども、大学にコントリビュートできるものとしては、この研究所が率先して URA を育てていくことじゃないかなと思っています。



### タンパク質の魅力とは何？

**永田** 話し足りないことがまだ沢山あるかと思いますがけれども、最後にタンパク質のどこが面白くて研究をやっているのか、タンパク質の魅力を一言ずつ語っていただけますか？

**遠藤** 僕は、タンパク質ってこんなに素晴らしいものはないと思っています。アミノ酸配列の可能性は無限大（たとえば  $10^{400}$  通

り)でしょう。僕らをつくっている 10 万種類ぐらいのタンパク質はそのたった  $10^{400}$  の 1、ものすごく貴重なものなんですよね。何でそんなものが選ばれたかという、それはアミノ酸をただつないだってほとんどの場合何の形もできないし、何の機能もないんだけど、その中でごくわずかの確率で、ある特定の形をつくれる配列が生まれるわけです。さらにその中で機能を持つものって、さらにごくわずかの確率でしか生まれません。そういうものが選ばれていって、今、10 万種類残った結果が、僕たちを作っているタンパク質なんです。どうやってそれらの分子が選ばれたかと言うと、何十億年という年月をかけて、アボガド口数的に膨大な種類のポリペプチドについての実験を地球上で行って、その進化の中で選ばれたわけです。だから僕らの持っている 10 万種類ぐらいのタンパク質というのは、奇跡の分子のコレクションなんです。こんな奇跡的なものが面白くないはずはないというのが、僕の考えです。

**近藤** 遺伝情報というのは DNA としつつこく言われていますけれども、DNA は分子としては単なるひもで、その配列の中からここからここまでが翻訳される、ここからここまではタンパク質を構成する、それを指令するのは、たとえば転写因子というタンパク質です。遺伝情報というコードから生命を生み出すのはタンパク質であり、そういう意味でタンパク質は遺伝子から由来するものですが、遺伝子を動かすのはタンパク質でないといけない、そのあたりが魅力ではないでしょうか。

**永田** 僕もタンパク質というのはすごく面白いと思っていて、全ての生命現象でタンパク質がかかわらない生命現象は何一つない、これは間違いない。だけど、いま遠藤さんが奇

跡的に残った 10 万種類と言ったけど、この 10 万種類の中に機能のわかっているタンパクは、まだほんのわずかしかない。ほとんどのタンパクはまだ機能がわかっていない。うちのラボの自慢でもあり自負でもあるのは、全部自分たちが見つけたタンパクでだけ研究している、勝負しているということです。だから何にも機能がわからないところからスタートし、これは一体どんな機能を持っているのか？もし機能を持っていないことがあったら面白くないけど、必ず何かの機能があるというのが僕の信念なので、それを自分たちで同定していく。こんな面白いことはないと思っていますね。

**遠藤** 自分たちで名前をつけてね。

**永田** 名前をつけるのが面白いし、好きだし、それは研究者の特権ですね。お二方もし何かあれば。

**千葉** 生物学者が答えようと思って答えられないことの一つに、遺伝情報がどうやって生命に変換されるのかということがあって、当然のことながらタンパク質はその鍵を握る分子なので、生命の謎を解く鍵。遺伝情報の配列がちょっと前まではアミノ酸配列に変換されて、それが構造を持つことによって機能するというような考えがあったけれども、つまり遺伝情報は完成図を設計しているというような考え方でしたけれども、最近はそれに加えて、タンパク質の「でき方」も規定している。アミノ酸配列の中に例えば合成の速度を決めるような情報も入っているということもわかってきて、タンパク質というのは単純に構造だけじゃなくて、でき方も含めての情報が入っている。まだまだ知らないことがあるんだなと実感しています。ちょうどそれが研究テーマでもあるので、またみんなが知らな

いタンパク質の魅力が見つければなというふうに思っています。

**津下** 一番最初の大学の研究室がタンパクのフォールディング<sup>7</sup>の研究室、タンパク質が1本鎖からどうやって折りたたまれるのか。そのころはまだよくわからなかったわけですが、そのあとに結晶構造解析というタンパク質の立体構造を研究するのが僕の仕事になって、今までやってきました。さらに今、タンパク毒素の研究で、最初に言ったようにA成分が一回形をとったものがまたほどけて、B成分のタンパク質を作る穴を通して出ていくわけです。そんなことがどうやって起こるのか。結局一番最初にやったフォールディングのところにもた戻るんです。いかにタンパク質が解きほぐされて、また元に戻るのか。そんなことが起こるといって自体がものすごく不思議で、そこのところをあと10年かけて解き明かしたいなと思っています。非常に魅力的な分野です。

**永田** いい研究所になるような予感がします。

\*\*\*\*\*

(注)

**1 クライオ電子顕微鏡**：生体内の複雑で巨大な生体分子（複合体）を染色することなく、生のまま凍らせて、電子線を使って観察する方法。最近技術革新があり、これまでタンパク質の立体構造決定の王道であったX線結晶構造解析、核磁気共鳴（NMR）に続く第三の方法として急速に普及しつつある。結晶化の必要がない、複数の構造が混じっていても構造決定可能、これまで困難であった膜タンパク質複合体の構造決定にも威力を発揮するなどの長所がある。

**2 プロテオーム**：特定の細胞、組織、個体に存在する数多くのタンパク質の総体。これまでは一つの精製したタンパク質の研究がタンパク質研究の主流であったが、多数のタンパク質を定量的に同時解析する技術が進み、プロテオームそのものを解析対象とする研究（プロテオミクス）が可能となった。

**3 七人の侍**：大隅良典（東京工業大学栄誉教授）、田中啓二（東京都総合医学研究所所長）、三原勝義（九州大学名誉教授）、藤木幸夫（九州大学特任教授）、吉田賢右（京都産業大学シニアリサーチフェロー）、伊藤維昭（京都産業大学シニアリサーチフェロー）、永田和宏（京都産業大学タンパク質動態研究所長）の七人を指して、「七人の侍」と呼ばれることがある。京都産業大学総合生命科学部の開設記念シンポジウムにこの七人が集まってシンポジウムを行い、これがきっかけとなって、このグループで全国の大学で講演を行うことが多くなった。

**4 PI**：Principal Investigator。独立した研究チーム（ラボ）の主宰者。ラボは一人のPIとポスドク（博士研究員）、テクニシャン（研究補助員）、大学院生、学部学生、等から構成されることになる。

**5 AMED**：（国際研究開発法人）日本医療研究開発機構。日本版NIH（米国の医学研究の研究拠点・資金配分機関（Funding Agency））の仮称のもとに設立が準備されて2013年にスタートした、わが国における医療研究開発を支援する資金配分機関。現実には文部科学省が扱っていた生命系基礎研究に関する研究予算の一部がJST等からAMEDに移り、生命科学に投入される国の予算の流れが、基礎研究から応用研究へと変わりつつある。

**6 URA**：リサーチアドミニストレーター。大学などで研究者の研究活動活性化のための環境整備およ

び研究開発マネジメントを担当する職種。具体的には民間も含めた研究資金の調達・管理、知財の管理・活用の業務を担当する。文部科学省が数年前から、URA を育成・確保するシステムの整備を指導・支援している。

**7 フォールディング：**タンパク質はアミノ酸がつながったひも状の高分子(ポリペプチド)であるが、特定の立体構造に折れたたまって、機能を発現する。この高次構造形成プロセスをフォールディングと呼ぶ。タンパク質は、自発的に特定の立体構造に折れたたまると考えられており、その原理解明はタンパク質研究の重要なテーマの1つである。

\*\*\*\*\*

## 研究所員略歴

**永田和宏：**1971 京都大学理学部卒、1971-1976 森永乳業中央研究所 研究員、1976-79 京都大学結核胸部疾患研究所 研修員、1979-86 同 講師、1984-86 米国 National Cancer Institute、Visiting Associate、1986-98 京都大学結核胸部疾患研究所・胸部疾患研究所 教授、1998-2010 京都大学再生医科学研究所 教授、2010より京都産業大学総合生命科学部 教授(2010-2013 学部長)、2016より 京都産業大学タンパク質動態研究所長、京都大学 名誉教授。

**遠藤斗志也：**1977 東京大学理学部卒、1982 東京大学大学院理学系研究科修了(理博)、1982-89 群馬大学 工業短期大学部 助手・助教授/工学部 助教授、1986-88 Basel大学 Biocenter 研究員、1989-91 名古屋大学理学部 助教授、1991-96 同教授、1996-2014 名古屋大学大学院理学研究科 教授、2014より 京都産業大学総合生命科学部 教授。名古屋大学 名誉教授。

**千葉志信：**1997 北海道大学薬学部卒、2002 京都大学大学院理学研究科修了、2002-04 京都大学ウイルス研究所 博士研究員、2004-08 米国 UCSD 研究員、2008-09 京都大学ウイルス研究所 研究員、2009-10 同 助教、2010-14 京都産業大学総合生命科学部 助教、2014年より 同 准教授。

**近藤寿人：**1971 京都大学理学部卒、1976 京都大学大学院理学研究科修了(理博)、1976-78 米国 Wisconsin 大学生化学教室 研究員、1978-88 京都大学理学部 助手・助教授、1988-93 名古屋大学理学部 教授、1993-2002 大阪大学 細胞生体工学センター 教授・センター長(1998-2002)、2002-14 大阪大学大学院生命機能研究科 教授・研究科長(2006-08)、2014より 京都産業大学総合生命科学部 教授。大阪大学 名誉教授。

**津下英明：**1987 北海道大学理学部卒、1989 北海道大学大学院理学研究科修了、1993 理博、1989 日本たばこ産業(JT) 生命科学研究所 研究員、1997-2010 徳島文理大学人間生活学部兼健康科学研究所 助教授・教授、2003-08 徳島大学分子酵素学研究センター 客員教授、2010より 京都産業大学総合生命科学部 教授。

## タンパク質トリビア

# タンパク質って？

伊藤維昭

### 専門用語と日常語

先人から知識や考え方を受け継ぎつつ、新たな何かを加えてあとに続く人につなげる・・・このような繰り返しのどこかに参加することが、科学研究というしごとの中身になります。この知のサイクルは科学者の間で完結するのではなく、その意味するところが、大まかにであっても、広く人々に共有されることは、人々の「幸せ」にとって重要な事だと思えます。しかし、「タンパク質」を考えてみても、実際にはなかなか難しいことだと感じています。タンパク質は科学用語でもあり、日常用語としても使われることが、却ってごく普通の人の理解を妨げているような気がします。このようなことを思うのは、専門分野の学生ですら日常語の「タンパク質」に引きずられることがあるのを一度ならず経験したからです。分子生物学の講義で優秀な成績をとった学生が、「先生、でも大腸菌にはタンパク質なんてないんでしょ？」と質問に来たことがトラウマになりました（解答は以下にあり）。「タンパク質は食品・栄養素の一種でお肉などのことだ」というのがごく普通の人の理解と思えます。これも間違いではないでしょうが、生命科学の研究者が思い浮かべるタンパク質の理解からは、かけ離れています。

### 「タンパク質」などというものは実在しない

「人類」という人は実在しません。存在するのは、貴方であったり私であったり、名前がついた個人です。もう少しタンパク質に近い(?)例えを言えば、「文章」という文章は実在せず、実際に存在するのは、新聞記事、小説、手紙、取説・・・など、特定の内容を表現する文字の並びです。文章（英文）とタンパク質を対比してみます。26文字のアルファベットとスペース、句読点をどのように並べるかで、どんな内容も英文として表現できます。タンパク質は文章と同様、文字に相当する部品の並び方によって決まる個性的な物質です。部品とは、26種類のアルファベットに似て、20種類のアミノ酸です。どのように並べるかで、無限に近い働きをするタンパク質たちができあがるのです。具体的に20種類のアミノ酸を書き出してみます（一文字記号で）： A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y（終わり＝スペースも指定されます）。普通、これらが数十個から1,000個程度（300個～400個くらいの場合が多い）並んで結びつき、鎖となって1種類のタンパク質ができています。アミノ酸の鎖が折り畳まれて各アミノ酸が立体的に配置されると働く状態になります。

## タンパク質は「遺伝子の子供たち」である

文章とは、創造的行為によって創られた文字列であり、「情報」と言ってもよいものです。プリントするにしてもパソコンファイル(情報)による指令が必要です。同様に、アミノ酸の特定の並び方が正確に指定されなければタンパク質を作ることはできません。タンパク質のアミノ酸配列を指定するのは、遺伝子です。遺伝情報発現における「翻訳」というステップで、遺伝暗号を用いてタンパク質が作られるのですが、これ以上立ち入るのは控えます。文章もタンパク質も情報の賜という意味で似ていますね。

### 「遺伝子」も誤解されているかも

遺伝(遺伝子)は、何か変わった性質を受け渡す、と理解している方もいるようです。建物に例えます。奇抜なデザインなどで建築が評価される事があるにせよ、建築設計の基本は、土台、壁、屋根、窓、光熱水設備などの基本をしっかり設計して、建物の存在自体を可能にすることです。遺伝子も同様に、細胞自体が存在できるような基礎的仕組みを指定することが最も基本的な働きです。花の色や種の皺などは、わかりやすい性質ではありますが、一部の些細な事ですね(メンデルさんごめんさい)。生物が生きていること自体が遺伝子の働きのおかげであると理解すると、遺伝子がタンパク質のアミノ酸の並びかたを決めていることも

すんなりと納得できるのではないのでしょうか？

## 食品としてのタンパク質と生命活動の働き手としてのタンパク質

我々は、莫大な種類のタンパク質たちを、細胞一つ一つが持つ遺伝子の指令によってつくり出します。それらが働いてくれるため生きることができます。どんな生き物にとっても同じことです。先ほどの学生の質問への答えは「大腸菌は約 4,000 種類のタンパク質を持つ」です。ヒトのタンパク質の種類は、遺伝子発現の仕方が複雑なためまだ正確にはわかっていないのですが、数万から 20 万種類程度と考えられています。我々は、他の生物のタンパク質を食べます。食品としてのタンパク質は、自分が組み立てるタンパク質の素材(アミノ酸)を得るために食べるのです。食べたタンパク質が働くわけではないので、魚を食べても泳ぎが上手には



なりません・・・魚にとって生命活動の担い手であったタンパク質も、食品になれば他の生物が作るタンパク質の材料の供給源になるだけです。「大事なものは自分で組み立てる」は、生命現象の掟です。この掟は、生物のアイデンティティーの源でもあります。

## 酵素とタンパク質はほぼ同じものと考える方がよい

「酵素」というものも実在しません。酵素サプリはどのような具体的な酵素を含むのかわからず、発酵食品との区別すら曖昧で、バイオの研究者には理解困難な商品です。「酵素」はタンパク質がもつ化学反応を触媒する働きに注目した呼び名です。「消化酵素」は日常会話でも使うかもしれませんが、酵素のごくごく一部に過ぎません。酵素の働きは多彩でアクロバットのような反応をするものもあります。また、狭義の酵素とは呼ばれないタンパク質でも、それらが働くとき化学結合の変化を伴うのは普通です。区別は曖昧になります。タンパク質と酵素はほぼ同義であると考えるとすっきりします。もちろん、構造体として存在するタンパク質(例:髪の毛の主要成分であるケラチン)は酵素とは呼ばないのですが。いずれにしても、遺伝子の産物として生きることを支えていることが重要なことであり、区別しても意味はなさそうです。酵素は「生命の掟」の中心部にあり、重要過ぎて「重要だから食べる」という理屈は成立しないのです。

## タンパク質存在の奇跡と生命の尊さ

永田和宏所長は、「タンパク質の一生一生命活動の舞台裏」(岩波新書)で、細胞の中をミ

クロコスモスと表現し、複雑で精巧な小宇宙からなる生命の尊さを述べています。そのようなマイクロコスモスが存在する可能性・確率は限りなく小さいという事実も生命の尊さを裏付けます。実は、細胞どころか、1つのタンパク質に限っても、その存在は奇跡にも似た希有のことなのです。アミノ酸400個からなるタンパク質には、理論上20の400乗(計算不可能なほどの超天文学的数字です)の種類があり得ます。その中の1つが特定の働きをするタンパク質として、細胞の中に実現しています。さらにそれらが何万~何十万種類コラボする事によって、我々は生きています。悠久の進化の賜である生きものの貴重さは、このように具体的な数字によって示すこともできるのです。情報(遺伝子、ゲノム)と機能(タンパク質)の両輪からなる生命の素晴らしさを、タンパク質を研究することによって極めることは意義深いことではないでしょうか？



## 研究所の活動

分子細胞生物学研究室（永田和宏）

生物化学研究室（遠藤斗志也）

タンパク質バイオジェネシス研究室（千葉志信）

発生生物学研究室（近藤寿人）

タンパク質構造生物学研究室（津下英明）

# 分子細胞生物学研究室 Laboratory of Molecular and Cellular Biology

教授 永田 和宏 Prof. Kazuhiro Nagata, Ph.D

助教 潮田 亮 Assist. Prof. Ryo Ushioda, Ph.D

## 1. 研究概要

分子細胞生物学研究室では、「タンパク質の一生」を大きな研究の枠として設定し、タンパク質の誕生から死までのメカニズムを中心に、中でも、特に「分子シャペロンによるフォールディングと細胞機能制御」および「タンパク質品質管理機構」に焦点をあてて研究を進めている。

タンパク質は正しく合成され、正しい構造をとって初めて本来の機能を発揮するが、それには種々の分子シャペロンが重要な働きをしている。またいったん正しい機能を獲得したタンパク質も、細胞に不断にかかる種々のストレスによって変性したり、遺伝的変異によってどうしても正しい構造をとれないタンパク質も存在する。このようないわゆる不良タンパク質は、単に機能を持たないだけでなく、細胞毒性によって細胞死を誘導し、アルツハイマー病やパーキンソン病のような種々の神経変性疾患の原因ともなっている。従って、タンパク質を正しく合成する productive folding と、ミスフォールドしたタンパク質を適正に処理するための品質管理機構をともどもに研究することは、タンパク質動態の恒常性、細胞レベルでの生命システムの恒常性の維持という観点からは、必須の研究領域である。

本研究室では、上記のコンセプトに従って、以下の4つの主要なプロジェクトについて研究を進めている。いずれも、この一年でこれまで想定していなかった、インパクトの高い興味深い知見が得られ、それぞれ投稿の準備にかかっている。

### 1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

コラーゲン合成においてコラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 は必須の役割を果たしている。Hsp47 はまた肝硬変などの線維化疾患の増悪にも関与しており、この観点からは線維化組織での Hsp47 の阻害が重要である。継続して阻害剤の探索を行っており、その候補化合物を見つけ、特許を取得している。また新たなスクリーニング系の開発も同時に進めており、このプロジェクトは製薬会社との共同研究に発展している。Hsp47 は我々が発見し、長年研究を続けてきたタンパク質であるが、近年の進展も含めこれまでの Hsp47 研究の知見をまとめ、総説として発表した。

### 2) 小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク：小胞体恒常性維持の解明

小胞体でミスフォールドしたタンパク質はサイトゾルへ逆輸送されてからユビキチンプロテアソーム系によって分解される (ERAD)。この過程で ERdj5 という還元酵素が重要な役割を果たしていることをすでに報告したが、新たに、この ERdj5 がカルシウムポンプの活性を制御することによって、小胞体内のカルシウム恒常性維持を担っていることを発見した。レドックス制御を介したタンパク質品質管理とカルシウム恒常性のクロストークに注目している。

### 3) 新規小胞体膜因子によるオートファゴソームの大きさの制御機構の解明

オートファジーは細胞内のタンパク質やオルガネラそのものを分解処理する機構である。近年我々は、新規のオートファジーの制御タンパク質である ERdj8 を発見した。本年一年間でこの ERdj8 の役割に関する研究が著しく進展し、ERdj8 がオートファゴソームの大きさを調節すること、そのことによって大きな分解基質の包み込みに必須であることを明らかにすることができた。本研究によって、研究員の山本洋平は、国際学会で口頭発表に選出された。

### 4) モヤモヤ病感受性遺伝子ミスチリンの機能解析

モヤモヤ病は日本人に多い脳血管疾患であり、一部に家族性の発症が認められるが、我々は初めての確実な遺伝因子として新規の巨大遺伝子ミスチリンをクローニングした (PLOS ONE, 2011)。これまで、ミスチリンが AAA+ ATPアーゼ活性およびユビキチン化活性を示すことや、ゼブラフィッシュの血管・筋肉・神経発生に重要であることなどを明らかにしてきたが (Sci Rep 2014, 2015)、今年度、ミスチリン結合タンパク質探索から見つかった USP15 とミスチリンの機能相関について明らかにした (Sci Rep, in press)。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

近年、コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の変異がヒトやイヌで骨形成不全症を引き起こすことが報告された。我々は OI の原因となる Hsp47 変異体の分子の特性を調べた結果、変異による Hsp47 の量の減少だけではなく、分子シャペロンとしてコラーゲンの合成に必須となるコラーゲンへの結合能の減少もまた骨形成不全症を引き起こす原因の一つであることが考えられた (S.Ito, K.Nagata Biochem Biophys Res Commun. 2016)。

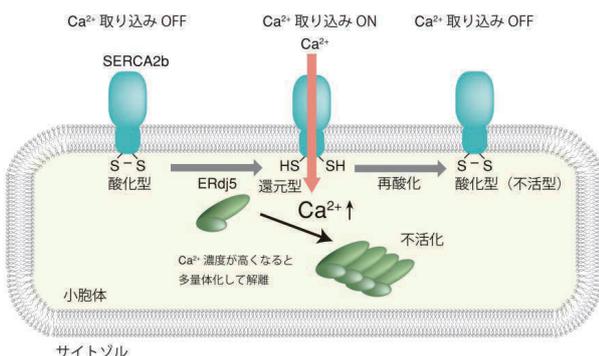
分泌タンパク質は小胞体で合成された後、ER exit site より COPII 輸送小胞に詰め込まれ、積み荷として運ばれていくが、プロコラーゲンの分泌は、その分子サイズが巨大であることから、通常の COPII 小胞には入りきらず、特殊な経路によって運ばれると考えられてきた。最近、ER exit site において TANGO1 というタンパク質が巨大な COPII 小胞形成を助け、コラーゲンの分泌に関与することが明らかになりつつある。我々は共同研究により、Hsp47 が TANGO1 に結合する事で、コラーゲンの輸送にも重要な働きをしている事を示唆するデータを報告した (Y. Ishikawa et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2016)。

また、我々は Hsp47 の機能阻害を目的とし、Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害する化合物の探索から、既に Hsp47 阻害化合物を得ていたが(特許取得済み)、今回、スクリーニング過程の再検討を行い、前回とは異なる構造式で特異性が向上した化合物を得た。このプロジェクトは製薬会社との共同研究に発展し、特許取得、論文投稿準備中である。Hsp47 は我々が発見し、長年研究を続けてきたタンパク質であるが、これまでの Hsp47 研究の知見をまとめ、総説として発表した (S.Ito, K.Nagata Semin Cell Dev Biol. in press)。

### 2) 小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク：小胞体恒常性維持の解明

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。我々は小胞体でジスルフィド還元活性に特化した還元酵素 ERdj5 を発見し、ERdj5 が小胞体のレクチンタンパク質 EDEM および分子シャペロン BiP と複合体を形成することを見出した。ERdj5 は小胞体で末期的にミスフォールドした分解基質のジスルフィド結合を自身の還元活性で切断し、小胞体からサイトゾルへの排出を促進し、タンパク質品質管理において重要な役割を果たしていることを見出した (R. Ushioda et al., Science 2008; M. Hagiwara et al. Mol. Cell 2011; R. Ushioda et al. Mol. Biol. Cell 2013)。

さらに ERdj5 が小胞体膜上に存在するカルシウムポンプ SERCA2 のジスルフィド結合を自身の還元活性で開裂し、複合体を形成することで小胞体へのカルシウム流入を調節し、小胞体のカルシウム動態に影響を与えていることが明らかになった。さらに ERdj5 は小胞体内腔のカルシウム濃度を感じ、SERCA2 との複合体形成を調節していることを明らかにした (R. Ushioda et al., PNAS 2016)。また ERdj5 の還元メカニズムを解明するため ERdj5 の結合タンパク質の同定を行い、候補分子の同定に成功した。その中で、新規の小胞体チオレドキシソム様タンパク質に着目し、in vitro および in vivo 解析を行い、新たな機能と特筆すべき機能調節機構を発見した。



### 3) 新規小胞体膜因子によるオートファゴソームの大きさの制御機構の解明

オートファジーは細胞内の大規模分解系の一つであり、恒常的に細胞内に生じる不良タンパク質や細胞小器官のクリアランスに大きく寄与している。近年、オートファジー分解に必要な膜成分が小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイト (MAM) から生じることが報告され、MAM がオートファジーにおいて重要な役割を持つことが明らかになってきた。これまでに我々は小胞体膜に局在する新規タンパク質である ERdj8 をクローニングし、さらにそれが MAM に局在している結果を得ていた。さらに詳細な解析を行ったところ ERdj8 はオートファゴソームの大きさを制御することが見出された。すなわち初めてのオートファゴソームのサイズを制御する因子である。現在これまでの結果に関して

論文投稿の準備を行っている。今後、この ERdj8 のさらなる機能解析を行うことで、オートファジーの制御における新たな小胞体の概念を提案していきたい。

#### 4) モヤモヤ病感受性遺伝子ミステリンの機能解析

ミステリンの酵素活性、ゼブラフィッシュ初期発生における重要性等は明らかになったが、一方でミステリンが細胞内でどのような機能を持つタンパク質なのか明らかでなかった。このポイントを明らかにするため、ミステリン結合タンパク質の探索を行ってきたが、その1つである脱ユビキチン化酵素 USP15 に着目して研究を行った。その結果、2種類ある USP15 アイソフォームのうち、インタークラスター領域が29アミノ酸長いアイソフォームが主にミステリンを認識し、脱ユビキチン化することによって、ミステリンを安定化し、発現レベルの維持に寄与していることが明らかとなり、誌上発表を行った (Kotani, Morito et al, Sci Rep, in press)。

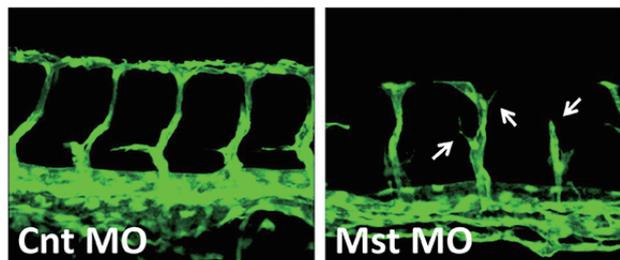


図 ミステリンの発現を抑制すると、ゼブラフィッシュ体幹部血管の形成不全が引き起こされる。

### 3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the productive folding of nascent polypeptides by molecular chaperones and protein quality control mechanism for misfolded proteins within the cells. Particularly, we have been devoted our activity on the following four major research projects:

#### 1) Functional analysis of collagen-specific molecular chaperone Hsp47

Osteogenesis imperfecta (OI) is a genetic disorder characterized by fragile bones. Mutations in collagen specific molecular chaperone Hsp47, specifically L78P and L326P, lead to OI, yet these mutants are not fully characterized. We found that both Hsp47 mutants were structurally unstable and the collagen-binding ability of the mutants was significantly lower than that of the wild type. Thus, the molecular mechanism causing OI might not alone be a decrease in the amount of soluble Hsp47 in the ER but also a loss in the ability of Hsp47 to bind collagen and in chaperoning the procollagen folding (S.Ito, K.Nagata Biochem Biophys Res Commun. 2016).

Secretory proteins are biosynthesized in the ER and transported via the Golgi apparatus. The coat protein complex II (COPII) transport vesicles are about 60 – 90 nm in diameter. However, collagen molecules are much larger, up to several hundreds of nm. Therefore, special COPII vesicles are required to coat and transport these molecules. The transmembrane protein TANGO1 facilitates loading of collagens into special vesicles. Our collaborators and we identify Hsp47 as a guide molecule directing collagens to special vesicles by interacting with TANGO1 (Y. Ishikawa et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2016). And we reviewed the role of Hsp47 in collagen folding in cells, the importance of Hsp47 in mouse development, and the clinical relevance of Hsp47 in various collagen-related diseases such as fibrosis (S.Ito, K.Nagata Semin Cell Dev Biol. in press) .

#### 2) Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation and Ca<sup>2+</sup> flux

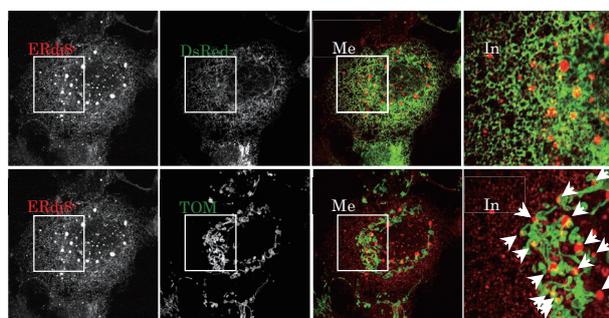
We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in ER. ERdj5 forms the supramolecular complex with EDEM and BiP, and activates the degradation of proteins misfolded in the ER by cleaving the disulfide bonds of misfolded proteins and by facilitating the retrograde transport of these proteins from the ER lumen into

the cytosol, where they are degraded by ubiquitin-proteasome system, which is called as ERAD (R. Ushioda et al., Science 2008; M. Hagiwara et al. Mol. Cell 2011; R. Ushioda et al. Mol. Biol. Cell 2013) .

We found that ERdj5 cleaves the disulfide bond of SERCA2, a  $Ca^{2+}$  pump on ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the  $Ca^{2+}$  concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2. It suggests that redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in  $Ca^{2+}$  homeostasis in the ER (R. Ushioda et al., PNAS 2016). Furthermore, we screened the interaction partner of ERdj5 to declare redox source of ERdj5. We focused on novel ER resident Thioredoxin interacting with ERdj5. We declared its new function and unique regulatory mechanism for ER redox homeostasis.

### 3) ERdj8 regulates the size of auto-phagosomes to degrade large autophagic targets

Non-selective and selective autophagy promote the degradation of several sizes of autophagic targets, and are also closely linked to several human diseases. Isolation membrane, which is a source of autophagosome, promotes the engulfment of autophagic targets of different sizes, from small protein aggregates to large organelles, by regulating the extension of its own membrane. However, the underlying



ERdj8 は小胞体 (DsRed-KDEL) とミトコンドリア (Tomm20) と共局在する新規の DnaJ タンパク質である。矢印はミトコンドリアに局在する ERdj8 を示す。

regulatory mechanisms remain unexplained. Here we show that an ER-localized membrane protein, ERdj8, controls the size of autophagosomes through the regulation of isolation membrane extension as to allow engulfment of large autophagic targets. We show in mammalian cells that downregulation of ERdj8 generates small autophagosomes that fail to engulf the large autophagic targets such as 3  $\mu$ m latex beads (Lysophagy) and damaged mitochondria (Mitophagy), even though small autophagic targets such as 1  $\mu$ m latex beads and p62 were not affected. Consistently, knockdown of dnj-8 (Caenorhabditis elegans ERdj8 homologue) in worm

causes the accumulation of mitochondria in muscle, despite the complete elimination of the small sperm-derived paternal mitochondria. To conclude, the regulation of the autophagosomal size via ERdj8 is essential for the degradation of large autophagic targets and control the intracellular homeostasis.

**4) Functional analysis of a novel protein, mysterin** We demonstrated that mysterin participates in the physiological angiogenesis during zebrafish embryogenesis (Liu, Morito et al., PLOS ONE, 2011; Kotani, Morito et al, Sci Rep, 2015) and that mysterin forms a huge toroidal oligomer and changes its overall structure through ATP-binding and hydrolysis (Morito et al., Sci Rep, 2014). However, mysterin's physiological function in cells remains largely unclear. We explored mysterin binding proteins expecting their functional correlation with mysterin, and found that a deubiquitylating enzyme USP15 deubiquitylates and stabilizes mysterin in an isoform specific manner (Kotani, Morito et al, Sci Rep, 2017).

#### 4. 論文、著書など

R. Ushioda, A. Miyamoto, M. Inoue, S. Watanabe, M. Okumura, K. Maegawa, K. Uegaki, S.i Fujii, Y. Fukuda, M. Umitsu, J. Takagi, K. Inaba, K. Mikoshiba, K. Nagata : Redox-assisted regulation of  $Ca^{2+}$  homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 113(41):E6055E6063 (2016)

- Y.Ishikawa, S.Ito, K.Nagata, L.Y.Sakai,H.Bachinger : Intracellular mechanisms of molecular recognition and sorting for transport of large extracellular matrix molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 113(41): E6036–E6044 (2016)
- S. Ito, K. Nagata Mutants of collagen-specific molecular chaperone Hsp47 causing osteogenesis imperfecta are structurally unstable with weak binding affinity to collagen Biochem Biophys Res Commun. 469(3):437-442 (2016)
- D.J. Klionsky, K.Nagata, R.Ushioda et al : Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring Autophagy(3<sup>rd</sup> edition) Autophagy 2(12):1-222 (2016)
- S. Ito & K. Nagata : Biology of Hsp47 (Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone. Seminars in Cell and Developmental Biology in press.
- K. Araki, R. Ushioda, H. Kusano, R. Tanaka, T. Hatta, K. Fukui, K. Nagata & T. Natsume  
A crosslinker-based identification of redox relay targets. Anal Biochem in press.
- Y. Kotani, D. Morito, K. Sakata, S. Ainuki, M. Sugihara, T. Hatta, SI Iemura, S. Takashima, T. Natsume and K. Nagata : Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor. Scientific Reports in press
- D. Morito and K. Nagata : Physiological Role of Mysterin/RNF213 in Zebrafish. Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Part III in press.
- D. Morito and K. Nagata : Molecular Biology of Mysterin/RNF213 Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Part III in press.
- K. Maegawa, S. Watanabe, K. Noi, M. Okumura, Y. Amagai, M. Inoue, R. Ushioda, K. Nagata, T. Ogura & K. Inaba : The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation. Structure in press.

## 5. 学会発表など

### 招待講演、シンポジウム等

Kazuhiro Nagata : ERdj5 and ERdj8 – Regulation of proteostasis and calcium homeostasis in the ER and negative regulation of autophagy. Cold Spring Harbor Meeting, Protein Homeostasis in Health and Disease, Cold Spring Harbor(USA),2016.4.19

永田和宏、山本洋平、潮田亮 : Proteostasis と Autophagy を制御する2つの新規小胞体レドックスタンパク質  
第68回日本細胞生物学会大会シンポジウム、京都市、2016.6.17

森戸大介 : モヤマヤ病の鍵因子ミステリンの同定と解析  
第63回日本生化学会近畿支部例会、神戸市、2016.5.21  
(平成28年度日本生化学会近畿支部奨励賞受賞記念講演)

潮田亮 : 小胞体恒常性維持のためのレドックス制御 酸化ストレス学会シンポジウム、仙台市、2016.8.30-31

Kazuhiro Nagata : Nascent polypeptide as a source of electrons for the reductive force of ERdj5. Nascent Chain Biology International Symposium, Yamanashi (Japan),2016.9.2

Ryo Ushioda: ERdj5-mediated ER homeostatic mechanism 日本生化学会シンポジウム、仙台、2016.9.26

Denisse Sepulveda, Diego Rojas-Rivera, Andres Kholer, Shinya Ito, Hery Urra, Amado Carreras, Kazuhiro Nagata, Jimena Sierralta and Claudio Hetz : HSP47: a novel regulator of the Unfolded Protein Response 日本生化学会シンポジウム、仙台、2016.9.26

永田和宏 : タンパク質品質管理機能の破綻と病態 脳心血管抗加齢研究会 2016、東京都、2016.12.18

潮田亮 : 還元酵素ERdj5を介した小胞体恒常性維持機構 京都大学第21回BNTセミナー、京都市、2017.12.20

### 学会発表

Yohei Yamamoto, Tomoe Takino, Munechika Sugihara, Kohei Hanafusa, Maho Hamasaki, Miyuki Sato, Ken Sato, Richard

- I. Morimoto, Tamotsu Yoshimori, Shoshana Bar-Nun, Kazuhiro Nagata : A novel ER membrane protein, ERdj8, localizing at ER-mitochondria contact site as a negative regulator for macro-autophagy 第2回4大学1研合同研究会、京都市、2016.1.11-12 (口頭発表)
- Shohei Fujii, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata : ER-resident redox proteins regulate calcium homeostasis. 第2回4大学1研合同研究会、京都市、2016.1.11-12 (口頭発表)
- Kaiku Uegaki, Chika Tsutsumi, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata : Novel ER-resident Thioredoxin, ERp18 scavenges Ero1-generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 第2回4大学1研合同研究会、京都市、2016.1.11-12 (口頭発表)
- Yohei Yamamoto, Tomoe Takino, Munechika Sugihara, Kohei Hanafusa, Maho Hamasaki, Miyuki Sato, Ken Sato, Richard I. Morimoto, Tamotsu Yoshimori, Shoshana Bar-Nun, Kazuhiro Nagata : A novel ER membrane protein, ERdj8, localizing at ER-mitochondria contact sites is a negative regulator for macro-autophagy Cold Spring Harbor Meeting, Protein Homeostasis in Health & Disease, Cold Spring Harbor (USA), 2016.4.18-22 (口頭発表)
- Shohei Fujii, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata : Four cysteines in the ER-luminal loop of IP3R1 are essential both for the channel formation and for the channel activity Cold Spring Harbor Meeting, Protein Homeostasis in Health & Disease, Cold Spring Harbor (USA), 2016.4.18-22
- 堤智香、上垣日育、潮田亮、永田和宏 : 新規小胞体チオレドキシシンERp18による亜鉛結合依存的な活性制御機構の解明 新学術「新生鎖の生物学」第3回若手ワークショップ、淡路市、2016.5.23-25 (口頭発表)
- 伊藤進也、杉原宗親、森戸大介、永田和宏 : 小胞体膜タンパク質TMX1のコラーゲン生合成における役割. 第48回日本結合組織学会大会、長崎市、2016.6.24-25 (口頭発表)
- 堤智香、上垣日育、潮田亮、永田和宏 : 新規小胞体チオレドキシシンERp18による亜鉛結合依存的な活性制御機構の解明 第2回細胞生物若手の会、京都市、2016.6.14
- 上垣日育、潮田亮、永田和宏 : 小胞体内腔還元酵素ERdj5の還元メカニズムの解明. 第2回細胞生物若手の会、京都市、2016.6.14
- Ryo Ushioda, Kaiku Uegaki, Chika Tsutsumi, Kazuhiro Nagata : Electron donor for disulfide reductase ERdj5 in ER Nascent Chain Biology International Symposium, Yamanashi (Japan), 2016.9.1-3
- Daisuke Morito : Potential facilitating effect of N-terminal ribosome arrest on translation process of long polypeptide Nascent Chain Biology International Symposium, Yamanashi (Japan), 2016.9.1-3 (口頭発表)
- Yohei Yamamoto, Ayano Kasai, Tomoe Takino, Munechika Sugihara, Kohei Hanafusa, Tetsuo Umemoto, Maho Hamasaki, Miyuki Sato, Ken Sato, Richard I. Morimoto, Ritsuko Arai, Satoshi Waguri, Tamotsu Yoshimori, Shoshana Bar-Nun and Kazuhiro Nagata : Regulation of autophagosomal size on ER-mitochondria contact site. Nascent Chain Biology International Symposium, Yamanashi (Japan), 2016.9.1-3
- 伊藤進也、杉原宗親、森戸大介、永田和宏 : 小胞体膜タンパク質TMX1のコラーゲン生合成への関与. 第89回日本生化学会大会、仙台市、2016.9.25-9.27 (ポスターと口頭発表)
- 潮田亮 : Maintenance for ER homeostasis through disulfide reductase, ERdj5. 第11回小胞体ストレス研究会、岐阜市、2016.10.10-10.11
- 上垣日育、堤智香、潮田亮、永田和宏 : 新規小胞体酸化還元酵素ERp18の亜鉛イオン依存的な活性制御メカニズムの解明 第11回小胞体ストレス研究会、岐阜市、2016.10.10-10.11
- 森戸大介、永田和宏 : モヤモヤ病AAA+ATPアーゼミステリンの構造と機能. 第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、横浜市、2016.11.30-12.02 (口頭発表)
- 堤智香、上垣日育、山下龍志、潮田亮、永田和宏 : 新規小胞体チオレドキシシン様タンパク質ERp18の亜鉛結合依存的な活性制御 第39回日本分子生物学会年会、横浜市 2016.11.30-12.02
- 堤智香、上垣日育、山下龍志、潮田亮、永田和宏 : 新規チオレドキシシン様タンパク質ER p 18の亜鉛結合依存的な活性制御. 第39回日本分子生物学会年会、横浜市、2016.11.30-12.02 (優秀ポスター賞)
- 大村圭一、奥村正樹、前川憲一、金村進吾、井上道雄、潮田亮、永田和宏、稲葉謙次 : ERdj5とBiPの共役による酸化的フォールディング触媒機構の解明. 第39回日本分子生物学会年会、横浜市、2016.11.30-12.02
- 柳澤孝俊、井上道雄、作田菜奈美、潮田亮、永田和宏、稲葉謙次 : 小胞体カルシウムポンプSERCA2bの活性制御機構の解析. 第39回日本分子生物学会年会、横浜市、2016.11.30-12.02 (優秀ポスター賞)
- 山本洋平、瀧野友愛、葛西綾乃、杉原宗親、花房航平、梅本哲雄、濱崎万穂、佐藤美由紀、佐藤健、Richard I. Morimoto、荒井律

子、和栗聡、Shoshana Bar-Nun、吉森保、永田和宏：A novel ER membrane DnaJ Protein, ERdj8 decides the Size of autophagosome. CREST 平成28年度領域会議、京都市、2016.12.15-16

藤井唱平、潮田亮、永田和宏：小胞体レドックスによるカルシウム恒常性維持機構の解明. CREST 平成 28 年度領域会議、京都市、2016.12.15-16

上垣日育、潮田亮、永田和宏：小胞体レドックスによるカルシウム恒常性維持機構の解明. CREST 平成28年度領域会議、京都市、2016.12.15-16

堤智香、上垣日育、山下龍志、潮田亮、永田和宏：新規小胞体チオレドキシソム様タンパク質ERp18の亜鉛結合依存的な活性制御 CREST 平成28年度領域会議、京都市、2016.12.15-16

## 6. その他特記事項

### 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究S 課題名：レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の研究、研究代表者：永田和宏、取得年度：H24-28年(5年)

科学技術振興機構CREST「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端の基盤技術」 課題名：小胞体恒常性維持機構：Redox,  $Ca^{2+}$ , タンパク質品質管理のクロストーク、研究代表者：永田和宏、取得年度：H25-30年(5年)

武田科学振興財団・特定研究助成[1] 課題名：細胞機能発現制御におけるオルガネラ恒常性とクロストークの重要性、研究代表者：永田和宏、取得年度：H27-30(4年)

日本医療研究開発機構(AMED)産学連携医療イノベーション創出プログラム 課題名：線維化疾患治療薬創出のためのコラーゲン分泌阻害化合物スクリーニングシステムの構築 研究代表者：永田和宏、取得年度：H28-29(2年)

科学研究費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」 課題名：新生鎖による小胞体レドックス制御-新生鎖による還元力の獲得、研究代表者：潮田亮、取得年度：H27-28年(2年)

科学研究費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」 課題名：N末端アレスト配列による巨大新生鎖の翻訳速度調節、研究代表者：森戸大介、取得年度：H27-28年(2年)

科学研究費補助金・基盤研究C 課題名：モヤモヤ病タンパク質ミスチリンの細胞内機能、研究代表者：森戸大介、取得年度：H27-28年(2年)

国立遺伝学研究所「共同研究(B)」 研究課題名：モヤモヤ病関連因子ミスチリンの in vivo 機能解析、研究代表者：森戸大介、取得年度：H28年(1年)

熊本大学発生医学研究所共同研究 研究課題名：モヤモヤ病タンパク質ミスチリンの機能・構造解析 研究代表者：森戸大介、取得年度：H28年(1年)

群馬大学生体調節研究所共同研究 研究課題名：線虫における新規小胞体膜タンパク質 ERdj8 の機能解析および生理的意義の解明 研究代表者：山本洋平、取得年度：H28年(1年)

### 学外活動

永田和宏：九州大学オルガネラホメオスタシス研究センター 客員教授

永田和宏：盛岡大学 客員教授

永田和宏：日本学会会議(細胞生物学) 連携会員

永田和宏：文部科学省 科学研究費助成事業委員会専門委員

永田和宏：文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「新生鎖の生物学」アドバイザー

永田和宏：文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「ユビキチンネオバイオロジー：拡大するタンパク質制御システム」外部評価委員

永田和宏：文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「オートファジー専門委員会」主査、外部評価委員

永田和宏：文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「温度を基軸とした生命現象の統合的理解」外部評価委員

永田和宏：科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業(さきがけ) 研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端の基盤技術」領域アドバイザー

永田和宏：ロレアル-ユネスコ女性科学者日本奨励賞 審査員

永田和宏：安田記念医学財団 理事

永田和宏 : Genes to Cells, Associate Editor

永田和宏 : Cell Structure and Function, Associate Editor

永田和宏 : Scientific Reports, Editor

永田和宏 : Cell Stress Society International, Senior Fellow

永田和宏 : 日本細胞生物学会 幹事、代議員、常任編集委員、名誉会員

永田和宏 : 日本生化学会 評議員

永田和宏 : 日本結合組織学会 評議員

永田和宏 : 京都府立嵯峨野高等学校「スーパーサイエンスハイスクール」学術顧問および運営委員会委員長

永田和宏 : 京都創生百人委員会 委員

永田和宏 : 人間文化研究機構情報発信センター 運営委員会委員

### 受賞等

森戸大介 : 平成28年度日本生化学会近畿支部奨励賞受賞

堤智香、上垣日育、山下龍志、潮田亮、永田和宏 : 第39回日本分子生物学会年会、優秀ポスター賞受賞



# 生物化学研究室 Laboratory of Biochemistry

教授 遠藤 斗志也 Prof. Toshiya Endo, Ph.D.

助教 河野 慎 Assist. Prof. Shin Kawano, Ph. D.

## 1. 研究概要

真核生物の細胞内には高度に発達したオルガネラ（細胞小器官）構造が作られ、それらが細胞に課せられた複雑で膨大な仕事を分散管理している。真核細胞に必須のオルガネラであるミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。近年ミトコンドリア機能と老化や健康、神経変性疾患をはじめとする様々な病態との関係も注目されている。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、細胞の内外からの要請とシグナルに応答し、不要となったミトコンドリアを除去する一方で、必要に応じてミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。ミトコンドリアは de novo には作られず、既存のミトコンドリアを拡大、分裂、分配することで増える。ミトコンドリアを拡大するためには、ミトコンドリアを構成する 1000 種類を越えるタンパク質とカルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生成や構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、オルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（コンタクト）部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心に様々なオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) ノンストップ膜タンパク質の品質管理

真核生物の細胞内で合成されるタンパク質の 2/3 は分泌経路またはオルガネラに向かう。終止コドンの欠失により新生鎖として翻訳が停止したノンストップ (NS) タンパク質の品質管理については、これまでは専らサイトゾルの NS タンパク質が対象であった。われわれは最近、オルガネラ行きの NS タンパク質の品質管理について解析を行い、NS オルガネラタンパク質はリボソームだけでなく、オルガネラ上の膜透過チャネルを占有するため、細胞にとって有害であること、細胞にはこれを回避するために、Dom34: Hbs1 により NS タンパク質をオルガネラ内にリリースする仕組みをもっていることを見出した。そこでオルガネラ行き NS タンパク質の品質管理の研究を NS オルガネラ膜タンパク質の品質管理の研究へと発展させ、ER 膜上の様々な膜

トポロジーの一回膜貫通型膜タンパク質について、NS 化により膜透過チャネルの占有状態がどう変わるのか、サイトゾルにおける NS タンパク質分解の仕組みが関与するかについて検討を行った。

C 末端側に膜貫通 (TM) 配列を持つ C アンカー型膜タンパク質は GET システムにより ER 膜に標的化されるため、Sec61 トランスロコン（膜透過チャネル）を占有することなく、サイトゾルで Ltn1 によるユビキチン化→プロテアソームによる分解という品質管理を受ける。N 端付近に TM 配列をもつ N アンカー型膜タンパク質は、Sec61 トランスロコンから TM 配列がラテラルに ER 膜にリリースされるため、やはり Sec61 トランスロコンを占有することなく、サイトゾルで Ltn1 によるユビキチン化とプロテアソーム分解による品質管理を受ける。N 端にシグナル配列、C 端 TM 配列を

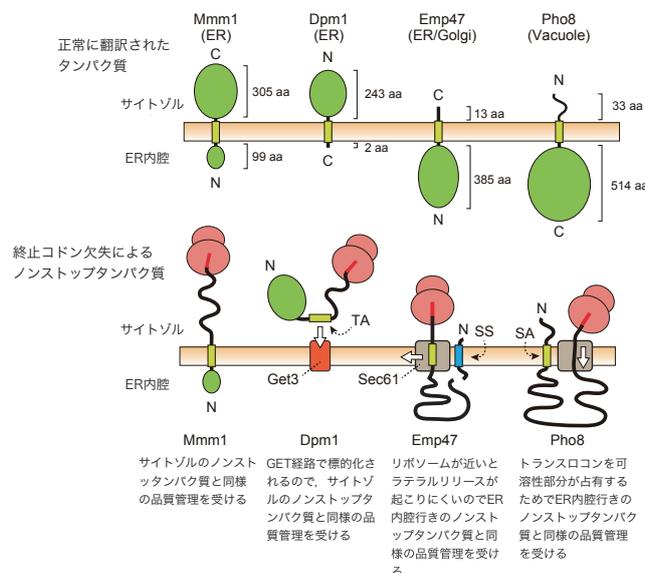


図1 ノンストップ膜タンパク質の品質管理

もつ膜タンパク質は Sec61 トランスロコンからのラテラルリリースが十分でないため、一部トランスロコンのチャンネルを占有する。N 端側にシグナルアンカー (SA) 配列を持つ膜タンパク質は SA 配列に続く大きなドメインが ER 内腔側に膜透過し、C 端側はリボソームがサイトゾル側に残るため、Sec61 トランスロコンを占有する。これらの二つのケースでは、Dom34 による NS タンパク質の内腔側へのリリースが必須の品質管理機構となることが分かった。

## 2) ミトコンドリア外膜-内膜間での脂質輸送の構造生物学的解析

ミトコンドリア機能に必須の脂質ホスファチジルエタノールアミン (PE) の原材料のリン脂質ホスファチジルセリン (PS) は ER で作られ、ER からミトコンドリアの外膜へ、さらに外膜から内膜へと運ばれ、内膜上の Psd1 により PE に変換される。27 年度にホスファチジン酸のミトコンドリア外膜から内膜への輸送に関わる Ups1-Mdm35 の X 線構造を決定し、輸送の分子機構を解明した。今回は PS の輸送に関与する因子の候補として Ups1 のホモログ Ups2 と Mdm35 を考え、ミトコンドリア内膜における Psd1 依存型 PE 合成以外の PE 合成経路を欠失した酵母変異体を用いて、Ups2 欠損の影響を解析した。Ups2 が欠失すると PE が減少すること、この減少は酵母の増殖過程が発酵からミトコンドリアの好気呼吸にスイッチする (ダイオキシシフト) ことで顕著になること、が明らかになった。さらに *in vitro* で精製 Ups2-Mdm35 を用いたリボソーム間脂質輸送アッセイを行い、Ups2-Mdm35 が PS を効率よく輸送することを示した。以上の結果から、Ups2-Mdm35 はミトコンドリアの外膜-内膜間で PS を輸送するタンパク質であることが明らかになった。

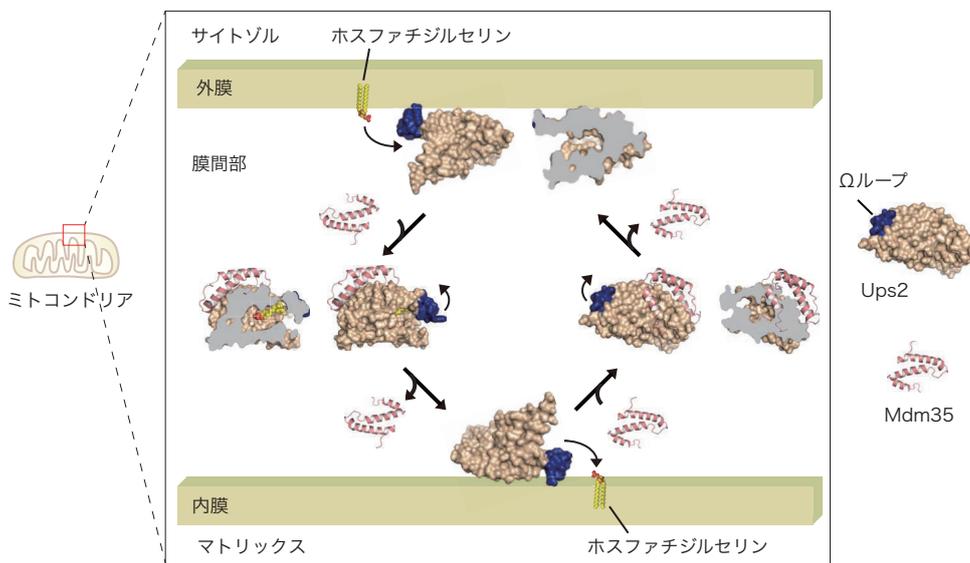


図2 ミトコンドリア内膜外膜間でホスファチジルセリンを輸送する Ups2-Mdm35

### 3. Research projects and annual reports

Eukaryotic cells are highly compartmentalized into membrane- bounded organelles with distinct functions. Mitochondria are essential organelles that fulfill central functions in cellular energetics, metabolism and signaling. We are studying the molecular mechanisms of biogenesis and quality control of mitochondria and other organelles from the viewpoint of protein and lipid trafficking.

Proteins are under the elaborate surveillance to maintain cellular protein homeostasis. mRNA lacking an in-frame stop codon called “nonstop mRNA” would generate aberrant “nonstop (NS) proteins” as well as accumulation of stalled ribosome-nascent chain (RNC) complexes. Although degradation of nonstop cytosolic proteins has been extensively studied, fate of NS proteins targeted to organelles such as the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria was characterized only in a few studies. Among them, we found that, when degradation of NS mRNAs does not work efficiently, NS proteins targeted to the ER or mitochondria occupy not only translating ribosomes but also translocons (translocators) in the organellar

membranes. The Dom34-Hbs1 complex therefore acts on the stalled ribosomes to release stuck nonstop proteins into the organelle lumen, otherwise the protein flux into the organelle is blocked, resulting in defective cell growth.

Here we asked which of the pathways, the cytosolic Ltn1 and proteasome-dependent degradation and the Dom34-Hbs1 dependent release into the ER lumen, NS-ER membrane proteins can be targeted to. We thus followed the fate of NS-membrane proteins at the ER membrane with different membrane topologies, and found that Ltn1-dependent degradation differed for membrane proteins with different topologies and its failure did not affect ER protein import or cell growth. On the other hand, failure in the Dom34-dependent release of the nascent polypeptide from the ribosome led to the block of the Sec61 channel and resultant inhibition of other protein import into the ER caused cell growth defects. Therefore, the nascent membrane protein release from the translation apparatus is more instrumental in clearance of the clogged ER translocon channel and thus maintenance of normal cellular functions.

Organelle functions strictly rely on the organelle-specific lipid compositions. How hydrophobic phospholipid molecules can traverse aqueous compartments to shuttle between different membranes is a critical question concerning the mechanism of membrane biogenesis. We previously determined the X-ray structure of Ups1-Mdm35 and revealed the molecular mechanism of Ups1-Mdm35 mediated phosphatidic acid (PA) transfer between the mitochondrial outer membrane (OM) and inner membrane (IM). Here we asked if Ups2, an Ups1 homolog, can transfer phosphatidylserine (PS) between the OM and IM in cooperation with Mdm35 for phosphatidylethanolamine (PE) synthesis at the IM by Psd1. In the genetic background, where only the mitochondrial PE synthetic pathway is in operation, deletion of the UPS2 gene significantly reduced the level of PE, especially upon diauxic shift. In addition, by using recombinant Ups2 and Mdm35, we could show that Ups2-Mdm35 efficiently transfers PS between liposomes in vitro in a similar manner that Ups1-Mdm35 transfer PA between liposomes. Therefore we concluded that Ups2 transfer PS between the OM and IM for PE synthesis at the IM.

#### 4. 論文、著書など

- T. Suzuki, N. Iida, J. Suzuki, Y. Watanabe, T. Endo, T. Hisabori, M. Yoshida: Expression of mammalian mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase in Escherichia coli depends on two chaperone factors, AF1 and AF2. FEBS Open Bio. 6, 1267-1272 (2016).
- R. Kojima, S. Kajiura, H. Sesaki, T. Endo, and Y. Tamura: Identification of multi-copy suppressors for endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett. 590, 3061-3070 (2016).
- Arakawa, K. Yunoki, T. Izawa, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo: Quality control of nonstop membrane proteins at the ER membrane and in the cytosol. Sci. Rep. 6, Article number: 30795 (2016).
- R. Kojima, T. Endo, and Y. Tamura : A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro. Sci. Rep. 6, Article number 20777 (2016).
- T. Jores, A. Klinger, L. E. GroB, S. Kawano, N. Flinner, E. Duchardt-Ferner, J. Wo "hnert, H. Kalbacher, T. Endo, E. Schleiff, and D. Rapaport: Characterization of the targeting signal in mitochondrial  $\beta$ -barrel proteins . Nature Commun. 7, Article number 12036 (2016).
- N. Miyata, Y. Watanabe, Y. Tamura, T. Endo, and O. Kuge: Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria . J. Cell Biol. 214, 77-88 (2016) (featured by Bruno Mesmin, "Mitochondrial lipid transport and biosynthesis: A complex balance" Spotlight, J. Cell Biol. 214, 9-11 (2016)).

#### 5. 学会発表など

- Toshiya Endo: Transport of Proteins and Lipids to Mitochondria Gordon Research Conference: Mitochondria and Chloroplasts (招待講演) , Mount Snow, West Dover, VT, USA, 2016.6.19-24
- Toshiya Endo: Machineries for mitochondrial protein and lipid transport (招待講演) FASEB Science Research Conference: Molecular Biophysics of Membranes, Snowmass, Colorado, USA, 2016.7.10-15

- Toshiya Endo: Quality control of nonstop proteins at the organelle membranes. Nascent Chain Biology Meeting (招待講演)、富士レークホテル (山梨県富士河口湖町)、2016. 9.1-3
- Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis through protein and lipid transport (基調招待講演)、ICES 2016 Kyoto (The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis)、京都府立大学 (京都府京都市)、2016. 9. 10-14
- 塩田 拓也、今井 賢一郎、深沢 嘉紀、富井 健太郎、Paul Horton、遠藤 斗志也: ミトコンドリアタンパク質搬入口、TOM 複合体の分子形態、および機能、第16回日本蛋白質科学会年会 若手奨励賞シンポジウム、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)、2016. 6. 7-9
- 遠藤 斗志也: タンパク質と脂質を運んでミトコンドリアをつくる仕組み (招待講演)、第54回生物物理学会年会シンポジウム「ミトコンドリアの分子マシナリーと機能管理、合成、構造、機能、適応、そして淘汰」、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)、2016. 11. 25-27
- 田村 康、小島 理恵子、遠藤 斗志也: リン脂質輸送におけるERMES複合体の役割 (招待講演)、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム「ミトコンドリアとオルガネラのコミュニケーション」、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016. 11. 30-12. 2
- 塩田拓也、今井賢一郎、Paul Horton、遠藤 斗志也、Trevor Lithgow: ミトコンドリアタンパク質搬入口の形と機能 (招待講演)、第39回分子生物学会年会シンポジウム「多才なミトコンドリアを支える分子基盤」、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016. 11. 30-12. 2
- 遠藤 斗志也: 新たな視点で考えるミトコンドリア生合成の仕組み (招待講演)、大阪大学蛋白質研究所セミナー「真核細胞のオルガネラ研究最前線」、大阪大学蛋白質研究所 (大阪府吹田市)、2017. 3. 21-22
- Jiyao Song, Yasushi Tamura, Tohru Yoshihisa and Toshiya Endo: Analysis of the outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial proteins, Keystone Symposium on Molecular and Cell Biology: Mitochondrial Dynamics 2016, Sheratone Steamboat Resort, Steamboat Springs, Colorado, USA, 2016. 4. 3-7
- 松本俊介、田村康、江崎雅俊、遠藤 斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットしたタンパク質の分解機構の解析、第16回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場 (福岡県博多市)、2016. 6. 7-9
- 荒磯裕平、柚木芳、河野慎、鈴木純子、包明久、吉川雅英、遠藤 斗志也: 立体構造解析に向けたミトコンドリア外膜トランスロケーター TOM40 複合体の大量調製、第16回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)、2016. 6. 7-9
- 柚木芳、荒川俊輔、井澤俊明、西川周一、田村康、遠藤 斗志也: ミトコンドリアにおけるノンストップタンパク質の品質管理機構の解析、第68回細胞生物学会大会、京都テルサ (京都府京都市)、2016. 6. 15-17
- 松本 俊介、田村 康、江崎 雅俊、遠藤 斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットしたタンパク質の 分解機構の解析、第68回細胞生物学会大会、京都テルサ (京都府京都市)、2016. 6. 15-17
- Yasunori Watanabe, Yasushi Tamura, Shin Kawano, Toshiya Endo: Structural basis of phospholipid transfer between the mitochondrial outer and inner membranes by Ups1-Mdm35, FASEB Science Research Conference: Molecular Biophysics of Membranes, Snowmass, Colorado, USA, 2016.7.10-15
- Kaori Yunoki, Shunsuke Arakawa, Toshiaki Izawa, Shuh-ichi Nishikawa, Yasushi Tamura, and Toshiya Endo: The analysis of quality control systems for nonstop proteins in the ER and mitochondria, Nascent Chain Biology Meeting, 富士レークホテル (山梨県富士河口湖町) , 2016. 9.1-3
- Yuhei Arais, Kaori Yunoki, Shin Kawano, Junko Suzuki, Akihisa Tsutsumi, Masahide Kikkawa, and Toshiya Endo: Large-scale purification of the protein translocator of the outer mitochondrial membrane, Nascent Chain Biology Meeting、富士レークホテル (山梨県富士河口湖町)、2016. 9.1-3
- 古田詩唯奈、小島理恵子、田村康、遠藤 斗志也: 小胞体膜タンパク質 Ilm1 はミトコンドリア小胞体間リン脂質輸送を負に制御する、第89回日本生化学会、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)、2016.9.25-27
- 小島理恵子、遠藤 斗志也、田村康: 新規のin vitro PS輸送実験を用いたERMES複合体のリン脂質輸送機能の解明、第89回日本生化学会、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)、2016.9.25-27
- 植田依里、田村康、遠藤 斗志也: ミトコンドリアクリステジャンクション形成に与するMic19の輸送機構の解析、第89回日本生化学会、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)、2016.9.25-27
- 渡邊康紀、田村康、遠藤 斗志也: 小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送タンパク質CAT-1の構造機能解析、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016. 11. 30-12. 2
- 松本俊介、江崎雅俊、田村康、遠藤 斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットした膜タンパク質の分解機構の解析 第39回日本分

子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2016.11.30-12.2

Jiyao Song, Tohru Yoshihisa, Yasushi Tamura and Toshiya Endo: Analysis of the outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial proteins, American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016, San Francisco, USA, 2016.12.3-7

## 6. その他特記事項

### 外部資金

科学技術振興機構・CREST 課題名：ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワーク 研究代表者：遠藤斗志也、取得年度：H24-29年度（6年）

科学研究費補助金・特別推進研究 課題名：ミトコンドリア生合成を司る細胞内統合的ネットワークの解明 研究代表者：遠藤斗志也、取得年度：H27-31年度（5年）

科学研究費補助金・特別研究奨励費 課題名：ミトコンドリア膜間のリン脂質輸送機構の構造生物学的解明 研究代表者：渡邊康紀、取得年度：H26-28年度（3年）

科学研究費補助金・特別研究奨励費 課題名：ミトコンドリア外膜トランスロケーターによるタンパク質輸送の構造・機能研究 研究代表者：荒磯裕平、取得年度：H27-29年度（3年）

科学研究費補助金・特別研究奨励費 課題名：ミトコンドリア内膜トランスロケータ TIM23 と TIM22 複合体の構造生物学的解析 研究代表者：松本俊介、取得年度：H27-29年度（3年）

科学研究費補助金・基盤研究(C) 課題名：GPCR のアロステリックリガンド：細胞応答測定による親和性解析法とリガンド探索 研究代表者：須賀比奈子、取得年度：H26-28年度（3年）

科学研究費補助金・若手研究(B) 課題名：小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送タンパク質 VAT-1 の構造機能解析 研究代表者：渡邊康紀、取得年度：H28-29年度（2年）

科学研究費補助金・若手研究(B) 課題名：ミトコンドリア外膜の AAA-ATPase Msp1 によるタンパク質品質管理機構 研究代表者：松本俊介、取得年度：H28-29年度（2年）

### 学外活動

遠藤斗志也：九州大学客員教授

遠藤斗志也：名古屋大学招聘教員

遠藤斗志也：日本細胞生物学会評議員

遠藤斗志也：日本細胞生物学会常任編集委員

### 受賞等

遠藤斗志也：平成 28 年度文部科学大臣表彰科学技術賞（研究部門）



H28年9月 研究室（+CREST チーム）のリトリート（山形）

# タンパク質バイオジェネシス研究室 Laboratory of Protein Biogenesis

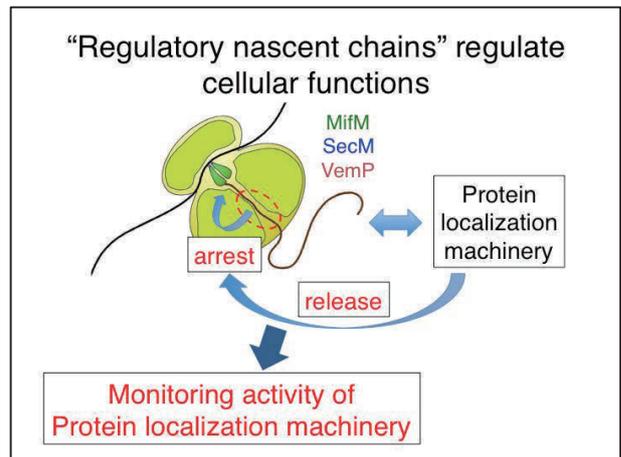
准教授 千葉 志信 Associate Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.

助教 藤原 圭吾 Assist. Prof. Keigo Fujiwara, Ph.D.

## 1. 研究概要

「4文字の羅列からなる遺伝情報がいかにして生命現象に変換されるのか」という問題は、生物学の中心的な問いであり続けている。単純に述べるならば、生命活動は主にタンパク質が駆動する生化学的反応の集合体と見なすことができ、DNAはタンパク質の設計図であるのだから、その設計図に基づいてタンパク質が合成されれば必ずと生命は誕生するということになる。ところが、実際には、タンパク質やその他必要な生体分子やエネルギー源を人為的に混ぜただけでは生命は誕生しない。他にも様々な要素が必要であり、例えば、生命現象の場である細胞や身体という構造体の構築のための生体分子の合成と配置の時空間制御も必要である。

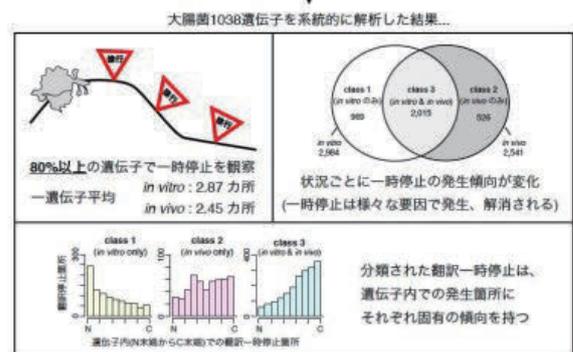
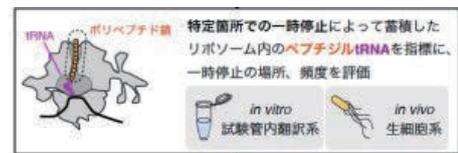
当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置（局在化）の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスと見なすことができ、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がるものと思われる。我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止（アレスト）する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である YidC の活性をモニターし、その機能を維持する役割を担っていることが明らかとなった。MifM の発見に先駆け本学シニアリサーチフェローであり共同研究者でもある伊藤維昭氏らが見出した大腸菌 SecM も、翻訳の途上で機能を発揮する因子のひとつである。それらの「働く翻訳途上鎖」の発見は、遺伝子の機能発現についての我々の理解を拡張するものであり、我々は、「翻訳途上鎖が主役を演じる生命現象」にも着目している。その研究を通じて、「翻訳途上鎖の分子生物学」という新たな学術分野の創成と発展に貢献したいと考えている。なお、千葉研究室は2014年4月に発足以来、シニアリサーチフェローである伊藤維昭氏との協力関係の下、研究を遂行している。本年報では、伊藤維昭シニアリサーチフェローの活動のうち、当研究室の活動に関連するものも併せて報告する。



## 2. 本年度の研究成果

### (1) 大腸菌翻訳途上鎖の網羅的プロファイリング

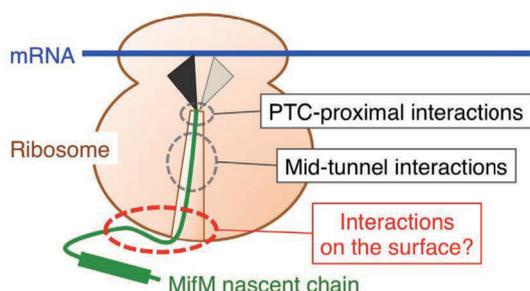
翻訳途上のタンパク質はC末端に tRNA が共有結合したペプチジル tRNA の状態にある。そのため、tRNA の有無を調べることで、翻訳が完了したタンパク質と翻訳途上鎖とを区別することができる。以前、当研究グループは、C末端 tRNA の有無を指標に翻訳途上鎖を合成完了鎖と電気泳動上で区別する方法を開発し、以来、細胞内における翻訳途上鎖の集団（nascentome と命名）を直接的に観察する試みを進めてきた。今回、東京工業大学田口英樹研究室との共同研究で、大腸菌の個々の遺伝子産物から合成される翻訳途上鎖を *in vivo* および *in vitro* で網羅的に解析した。1つの遺伝子から生じる翻訳途上鎖はその伸長の途上では多様



なサイズからなる集団である。翻訳伸長が一定速度で進行するならば、特定のサイズの翻訳途上鎖のみが蓄積することはない。一方、翻訳途上の特定の部位で伸長反応が一時停止する場合には、特定の長さの翻訳途上鎖が特異的に蓄積し、電気泳動で1つのバンドとして検出されることが期待される。今回、大腸菌遺伝子の中から 1,038 遺伝子についてパルスラベル実験を行ったところ、in vivo、in vitro とともに、8割以上のタンパク質で1回以上の翻訳伸長のポーズが起こることを示す結果が得られた。このことは、実際の翻訳が多くの場合速度変化の緩急を伴って進行するものであることを示している。また、ピューロマイシン感受性試験から、翻訳伸長のポーズが多様な機構で起こることを示唆する結果も得られた。

## (2) 枯草菌 MifM-リボソーム間相互作用の全容解明に向けて

枯草菌 MifM は、翻訳の途上で、自身を合成するリボソームと相互作用することで自らの翻訳伸長をアレストする。この MifM の持つユニークな性質は、MifM によるタンパク質膜挿入装置 YidC の活性のモニタリングとそれを介した YidC 経路によるタンパク質膜組込み活性の恒常性維持に必要である。この翻訳アレストは、MifM の C 末端付近に存在する特定の amino 酸配列 (アレストモチーフ) がリボソームの大サブユニットにあるペプチド鎖排出トンネルの内壁やリボソーム活性中心付近の成分と相互作用することで引き起こされる。今回、さらに N 末端側に位置する領域への



変異導入によっても MifM の翻訳アレストが不安定化されることが見出された。精製再構成翻訳系を用いた解析でもこの領域の変異効果が in vivo と同様に観察されたことから、翻訳装置そのものが関わる現象であり、例えばこの領域が直接リボソームと相互作用することで翻訳アレストを安定化させていることが考えられる。この領域は、amino 酸配列上の翻訳停止位置からの位置関係および構造解析の結果から、リボソームの外部に露出していると判断できる。MifM とリボソームとの相互作用は、トンネルの内部にとどまらず、リボソームの表面を含めた非常に広範囲にわたる領域で起こることが示唆された。

## 3. Research projects and annual reports

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM as a regulatory nascent chain that monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying on a class of proteins called 'regulatory nascent chains', which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis. A remarkable property of this class of nascent chains is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those of the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the cellular physiology that is executed by the target gene function, allowing each nascent chain to serve as a unique biological sensor to feedback-regulate the target gene expression. In the MifM regulatory system, its translation arrest is released when the nascent MifM chain, as a monitoring substrate of YidC (the regulatory target), engages in the YidC-mediated insertion into the membrane. The regulated elongation arrest of MifM enables cells to maintain the cellular capacity of membrane protein biogenesis. Our interests are also focused more generally on the mechanisms of protein localization and biogenesis, the biological processes where nascent substrates undergo dynamic interactions with the machineries of translation, targeting and translocation. We envision that our research activities outlined above may ultimately lead to the development of a new research area that might be called "nascent chain biology", which aims at understanding the still hidden principle of the central dogma of gene expression, where nascent chains are likely to play key roles.

## **This year's accomplishments**

### 1) Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling.

Translation is a key biological process where genetic information is converted into functional bio-molecules. Several recent studies have revealed that translation elongation sometimes undergoes transient pausing, which could possibly affect efficiency of cotranslational folding or localization of newly synthesized proteins. To understand whether and how generally the elongation pausing takes place during proteome biogenesis, we carried out systematic profiling of translation elongation of total 1,038 E. coli genes both in vivo and in vitro. Nascent polypeptides were detected based on the existence of the tRNA moiety that is covalently attached to the C-terminal end of nascent peptide chains. Our results revealed that translation elongation of more than 80% of tested genes underwent transient pausing in vitro, in vivo, or both in vivo and in vitro. Our puromycin sensitivity tests suggest that there are several distinct mechanistic modes to induce elongation pause. Our data reveal that elongation pausing is a widespread event during proteome biogenesis.

### 2) Interactions between MifM and the ribosome for the elongation arrest

MifM is a regulatory nascent chain that monitors cellular activity of membrane protein insertase, YidC, by a mechanism involving regulated translation elongation arrest. The elongation arrest requires cotranslational interactions between a specific amino acid motif (arrest motif) near the C-terminus of the MifM nascent polypeptide and the ribosomal components in the region from the peptidyl transferase center through the polypeptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. Our analysis currently under way revealed that mutations in the region N-terminal to the previously determined arrest motif of MifM caused destabilization of the elongation arrest. We reproduced the mutational effects in in vitro translation reactions reconstituted with purified translation components. These results suggest that the region N-terminal to the "arrest motif" also contributes to the stable elongation arrest most likely by directly interacting with the ribosome components. Structural data of the MifM-ribosome complex as well as the primary structure information suggests that such interactions occur probably on the surface of the ribosome rather than within the exit tunnel. Our analyses reveal that the elongation arrest of MifM involves extensive interactions between the nascent chain and the ribosome.

## **4. 論文、著書など**

### **原著論文**

Y. Chadani, T. Niwa, S. Chiba, H. Taguchi, K. Ito: Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2016) 113, E829-838.

## **5. 学会発表など**

Shinobu Chiba: Nascent chain-mediated monitoring of a protein localization machinery. The 18th Tokyo RNA Club 2016.

1. 14 東京 (招待講演)

Shinobu Chiba, Naomi Shimokawa-Chiba, Koreaki Ito: Use of Bacillus subtilis MifM to dissect the YidC functions to facilitate membrane protein insertion. Gordon Research Conference: Protein Transport Across Cell Membranes. 2016.

3. 6-11 Galveston, TX

石井英治、千葉志信、橋本成祐、小嶋誠司、本間道夫、伊藤維昭、秋山芳展、森博幸：ヒブリオ属細菌における新生ポリペプチド鎖を介した発現制御機構 第13回21世紀大腸菌研究会 2016. 6. 2-3. 南阿蘇

Shinobu Chiba: Nascent chain-mediated monitoring of the membrane protein biogenesis factor. Nascent Biology and Ribosome Functions. 2016. 6. 27. 京都 (招待講演)

Shinobu Chiba, Eiji Ishii, Yoshinori Akiyama, Koreaki Ito, Hiroyuki Mori: Nascent chain-mediated monitoring of protein localization machineries. EMBO Ribosome Structure and Function 2016. 2016. 7. 6-10 Strasbourg, France

Keigo Fujiwara, Shinobu Chiba: Role of the PTC-distal interactions between the MifM nascent polypeptide and the ribosome on the ribosome stalling. EMBO Ribosome Structure and Function 2016. 2016. 7. 6-10 Strasbourg, France  
藤原圭吾, 千葉志信: MifM の翻訳アレストを支える新規相互作用の解明 2016 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2016. 8. 29-30. 熱海  
Naomi Shimokawa-Chiba, Shun Minobe, Koreaki Ito, Shinobu Chiba: A nascent chain-based reporter to study the mechanism of membrane protein insertion. Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖  
Keigo Fujiwara, Shinobu Chiba: Involvement of peptidyl transferase center-distal molecular interactions in MifM-instructed translation arrest. Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖  
Koreaki Ito: Dynamic translation entails nascent polypeptides as active players in gene regulation and protein biogenesis. Nascent Chain Biology Meeting 2016. 2016. 9. 1-3. 河口湖 (招待講演)  
千葉志信: 上流 ORF による翻訳アレストを介したタンパク質膜組込装置のモニタリングと発現調節 日本遺伝学会第 88 回大会 2016. 9. 7-9. 三島 (招待講演)  
千葉志信, Daniel Sohmen, Daniel Wilson, 藤原圭吾, 下川 (千葉) 直美, 伊藤維昭: 自身の翻訳伸長を制御する枯草菌 MifM の分子機構と生理機能 第 4 回リボソームミーティング 2016. 9. 17-18 大阪医大  
藤原圭吾, 千葉志信: 枯草菌 MifM の翻訳アレストに関わる新規相互作用の解明 第 4 回リボソームミーティング 2016. 9. 17-18 大阪医大  
千葉志信, 下川 (千葉) 直美, 美濃部隼, 伊藤維昭: チャンネル非依存的タンパク質膜挿入装置 YidC の分子機構解明に向けて 第 89 回日本生化学会大会 2016. 9. 25-27 仙台 (招待講演)  
伊藤維昭: タンパク質誕生の真実 タンパク質動態研究所開設記念シンポジウム 2016. 10. 26 京都産業大学 (招待講演)  
伊藤維昭: 遺伝情報の翻訳に携わる分子の自律性 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「RNA 研究から再考する遺伝情報のセントラルドグマ」 2016. 11.30-12.2. 横浜 (招待講演)  
田口英樹, 茶谷悠平, 丹羽達也, 千葉志信, 伊藤維昭: Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「発現制御装置としてのリボソームの新機能」 2016. 11.30-12.2. 横浜

## 6. その他特記事項

### 外部資金

科研費補助金・新学術領域「新生鎖の生物学」計画研究

課題名: 働く新生鎖の生理機能と分子機構 研究代表者: 千葉志信、研究分担者: 伊藤維昭、取得年度: H26-30 年 (5 年)

科研費補助金・基盤研究 (B)

課題名: 非チャンネル型タンパク質膜挿入マシーナリーの分子機構の解明 研究代表者: 千葉志信、取得年度: H28-31 年 (4 年)

### 学外活動

千葉志信: 第 4 回リボソームミーティング (大阪医大) を共催

伊藤維昭: Member, Faculty of 1000 (論文評価システム)

伊藤維昭: 生物遺伝資源に関する大腸菌小委員会及び NBRP 原核生物運営委員会委員

# 発生生物学研究室 Laboratory of Developmental Biology

教授 近藤 寿人 Prof. Hisato KONDOH, Ph.D

助教 寺元 万智子 Assist. Prof. Machiko TERAMOTO, Ph.D.

## 1. 研究概要

細胞・組織をタンパク質の動態システムとして成立させる転写因子制御を研究している。

細胞が分化・発生というプロセスを経ることによって、一定の構造と機能を持った細胞に成熟し、恒常性を維持するためには、細胞間および細胞内シグナル伝達と、転写因子による遺伝子発現制御が重要である。核における遺伝子発現が特定の細胞状態や機能を規定し、その状態や機能が核にフィードバックされて遺伝子発現を制御する。このようなフィードバック制御を担う、細胞間・細胞内シグナル伝達と、転写因子の作用機構を解明し、それらがタンパク質の動態システムとして細胞・組織を成立させる原理を明らかにする。

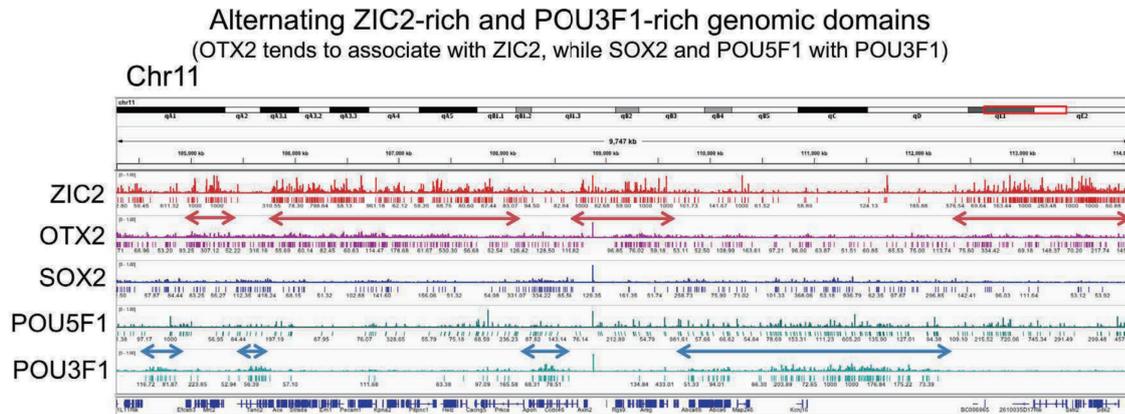
## 2. 本年度の研究成果

- (1) エピプラストの中に様々な領域が成立する過程が、さまざまな体細胞系列を発生させるための第一段階である。エピプラストの中にできる際立った構造は Node と原条である。マウスのエピプラスト幹細胞から、培養条件下で Node 様の組織状態を作り、それから内胚葉前駆体を効率よく作り出すための条件を検討した。それらの組織状態を生み出す、必要かつ最小限の条件として、3次元培養、Nodal 系シグナルの供給、Wnt シグナルの阻害が少なくとも必要であることがわかった。
- (2) エピプラスト状態を特徴づける転写因子に依存した制御を明らかにするために、エピプラスト幹細胞を用いて、そこで制御機能を発揮する主要な5つの転写因子、ZIC2、OTX2、SOX2、POU5F1、POU3F1 のゲノム上の結合部位を、ChIP-seq 法を用いて決定した。その結果、これまでの研究からは予想されなかった次の新しい知見が得られた。(1) ゲノムは、遺伝子密度が高く ZIC2 結合部位が豊富なメガベース(100万塩基対)程度の領域と、遺伝子密度が低く POU3F1 の結合部位が豊富な領域が交互に現れるモザイク状態からなっている。(2) エピプラスト幹細胞で遺伝子の活性化に関わる転写因子は、ZIC2 と OTX2 のペアによって活性化されている。(3) ES 細胞では、SOX2 と POU5F1 の転写因子ペアが主要な制御機能を担っているのに対して、エピプラスト幹細胞では ZIC2-OTX2 ペアが同様な制御機能を担うことを反映して、エピプラスト幹細胞での SOX2 や POU5F1 の結合領域は、ES 細胞における結合領域とは大きく異なる。
- (3) Node からは、脊索と内胚葉が発生するが、内胚葉は転写因子 SOX2 を発現して食道から胃にかけての消化管へと発生する領域、CDX2 を発現して腸へと発生する領域、NKX2.1 を発現して気管ならびに肺に発生する領域に分かれる。この内胚葉で Sox2 遺伝子を失活させると内胚葉の発生がどのように変化するのかを、マウス胚を用いて解析した。SOX2 の発現がなくなっても、内胚葉全体が腸に変わることはないが、発生する食道が気管の性質を持つようになることがわかった。
- (4) エピプラスト幹細胞から効率よく神経幹細胞株を樹立する方法を確立した。神経幹細胞株を樹立する過程での Wnt シグナルの強度を操作すると、胚の中樞神経系の前後の領域に対応したさまざまな領域特性を持った神経幹細胞株を樹立することができた。低 Wnt 条件は、頭部に対応した (Otx2 発現) 細胞株を生み、Wnt が高いと体幹部に対応した (Hox 発現) 細胞株を生み出した。ひとたび領域特性が確立されると、いずれの株も培養条件の Wnt シグナル強度を変化させてもその領域特性は安定に維持され、分化条件に移すと、領域特性を持ったまま、ニューロン、Astrocyte、Oligodendrocyte に分化した。
- (5) 低頻度で水晶体を生む平板培養された網膜細胞に Notch シグナルの阻害剤を加えると、網膜細胞の大半が水晶体に分化することを見出し、その過程を解析した。Notch シグナルの阻害に引き続いて、Prox1、Pitx1 など、水晶体発生の初期過程を司る転写因子が発現された。この研究の結果、網膜自体に水晶体への潜在的な分化能が潜在しており、それが正常網膜発生では Notch シグナルなどの細胞間相互作用によって抑制されていること、その抑制が解除されると水晶体への分化が起きることを示した。つまり、発生過程での特定の細胞系譜は、複数の異なった細胞種への分化能を生むことがあるが、その場合には抑制機構によって見かけ上一義的な分化がもたらされている。

### 3. Research projects and annual reports

We investigate the functions of major transcription factors (TFs), e.g., SOX2 and signaling factors, e.g. Wnts, in epiblast cells and in the derivations of somatic cell lineages from the epiblast. The strategies include: (1) Use of conditional knockout mouse embryos that allow inactivation of specific TFs in defined cell groups and/or developmental stages; (2) Use of epiblast stem cell lines derived directly from mouse embryo epiblasts to analyze the process of regionalization of the epiblast cell sheet in vitro; (3) Derivation of stem cell lines representing an intermediate step of somatic development from the epiblast stem cells, in order to investigate the somatic lineage regulations.

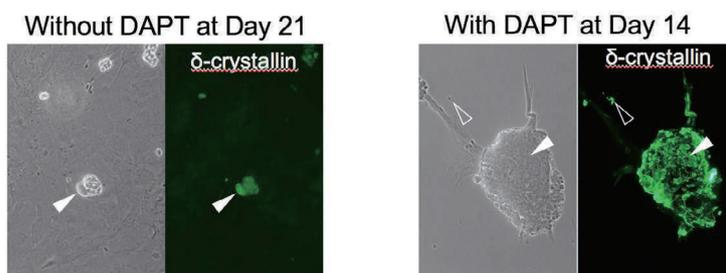
- (1) The first step in the specification of somatic cell lineage is the regionalization of the epiblast cell sheet. The most prominent regional structures are the Node and the primitive streak. Starting from the epiblast stem cells in culture, we investigated the conditions under which cell organization representing Node-streak structures are formed and endoderm tissues are derived. We found that the three-dimensional culture of epiblast stem cells, low Wnt signaling, and high Nodal signaling are the minimal requirement for the formation of such cell organization.
- (2) To obtain an insight into the transcription factor (TF)-dependent regulation of epiblast stem cells (EpiSCs), we performed ChIP-seq analysis of the genomic binding sites in EpiSCs of five major TFs, ZIC2, OTX2, SOX2, POU5F1, and POU3F1, using biotinylated TF. We identified the following new features: (1) The genomic domains of megabase scale rich in ZIC2 peaks and genes, and those rich in POU3F1 but sparse in genes, alternate in EpiSCs, reflecting the clustering of regulatory regions that act in short- and long-ranges, which involve binding of ZIC2 and POU3F1, respectively. (2) The enhancers bound by ZIC2 and OTX2 prominently regulate TF genes in EpiSCs. (3) The binding sites for SOX2 and POU5F1 in mouse ESCs and EpiSCs are divergent, reflecting the alteration of the TF pair of major regulatory functions from SOX2/POU5F1 in ESCs to OTX2/ZIC2 in EpiSCs.



- (3) The endoderm that is derived from the node is regionalized with expression of the transcription factors Sox2 (esophagus and stomach precursor), Cdx2 (gut precursor) and Nkx2.1 (trachea and lung precursor). Conditional knockout of Sox2 in the endoderm resulted in transformation of the esophagus into trachea-like tissue, whereas gut development was not affected.
- (4) We established NSC lines from EpiSCs via passages in a serum-free culture condition. The NSC lines thus established produced neurons, astrocytes, and oligodendrocytes under differentiation conditions. We also established NSC lines with addition of either Wnt antagonist or Wnt agonist to the culture medium. Microarray analyses focusing on transcription factor transcripts indicated that NSC lines

established under low- and high-Wnt conditions had characteristics of anterior and posterior CNS, marked by the expression of *Otx2* and *Hox* genes, respectively. Our results suggest that the manipulation of extracellular signals during the NSC derivation allows the establishment of NSC lines harboring various regional specificities.

### Neural retina-derived lens cells expressing $\delta$ -crystallin



(5) Embryonic neural retinas of avians produce lenses in culture, which is a paradigm of trans-differentiation. Retina-to-lens transdifferentiation occurs in spreading cultures, suggesting it is triggered by altered cell-cell interactions. Addition of Notch signal inhibitors strongly promoted lens development from the neural retina. After Notch

signal inhibition, transcription factor genes that regulate the early stage of eye development, *Prox1* and *Pitx3*, were sequentially activated. These observations indicate that the lens differentiation potential is intrinsic to the neural retina, and this potential is repressed by Notch signaling during normal embryogenesis.

## 4. 論文、著書など

### 原著論文

Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens transdifferentiation. *Dev Biol*. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.11.004. Epub 2016 Nov 11.

Menuchin-Lasowski Y, Oren-Giladi P, Xie Q, Ezra-Elia R, Ofri R, Peled-Hajaj S, Farhy C, Higashi Y, Van de Putte T, Kondoh H, Huylebroeck D, Cvekl A, Ashery-Padan R. Sip1 regulates the generation of the inner nuclear layer retinal cell lineages in mammals. *Development* 143, 2829-2841 (2016).

Teramoto M, Kudome-Takamatsu T, Nishimura O, An Y, Kashima M, Shibata N, Agata K. Molecular markers for X-ray-insensitive differentiated cells in the Inner and outer regions of the mesenchymal space in planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ*. 58, 609-619 (2016).

Kondoh H, Takada S, Takemoto T. Axial level-dependent molecular and cellular mechanisms underlying the genesis of the embryonic neural plate. *Dev Growth Differ*. 58, 427-436 (2016). (総説)

Takemoto T, Abe T, Kiyonari H, Nakao K, Furuta Y, Suzuki H, Takada S, Fujimori T, Kondoh H. R26-WntVis reporter mice showing graded response to Wnt signal levels. *Genes Cells*. 21, 661-669 (2016).

Yasumi T, Inoue M, Maruhashi M, Kamachi Y, Higashi Y, Kondoh H, Uchikawa M. Regulation of trunk neural crest delamination by  $\delta$ EF1 and Sip1 in the chicken embryo. *Dev Growth Differ*. 58, 205-214 (2016).

### 著書

Uchikawa M, Nishimura N, Iwafuchi-Doi M, Kondoh H. Enhancer analyses using chicken embryo electroporation. In "Methods in Molecular Biology – Avian and Reptilian Developmental Biology" (Sheng G, eds) Springer (in press).

## 5. 学会発表など

Kondoh H et al. Functional genomics of peri- and post-implantation stage stem cells. The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Molecular Biology Society Japan. Yokohama, 12.2 (2016).

Iida T, Ishii Y, Kondoh H. Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens

transdifferentiation. The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Molecular Biology Society Japan. Yokohama, 12.1 (2016).

近藤寿人 ヘンゼン結節周辺組織の発生能の再検討. 日本発生生物学会秋季シンポジウム. 三島市 10.20 (2016).

飯田英明 神経性網膜に内在する水晶体分化能を抑制する Notch シグナル: その破綻が水晶体への「分化転換」をもたらす. 日本発生生物学会秋季シンポジウム. 三島市 10.19 (2016)

Kondoh H. Functional genomics of peri- and post-implantation stage stem cells. IRM Distinguished Lecture, University of Pennsylvania Institute for Regenerative Medicine. 6.29 (2016). (招待講演)

Kondoh H., Matsuda K, Mikami T, Oki S, Shigenobu S. Genome-wide functional interactions of five major transcriptional factors in mouse epiblast stem cells. Cell Symposia: Transcriptional Regulation in Development and Disease. Chicago, 6.26-28, 2016

Iida H., Ishii Y., Kondoh H. Simultaneous promotion of neuronal and lens development from chicken embryonic neural retina. 第49回日本発生生物学会年会. 東京都 6.2 (2016).

Yoshihi K., Ishii Y., Kondoh H. Reinvestigation of the developmental potential of grafted Hensen's node. 第49回日本発生生物学会年会. 東京都 6.2 (2016).

Nakamura K., Boitet C., Satake S., Yoshihi K., Ishii Y., Kondoh H. Direct derivation of embryonic neural progenitor cell lines from epiblast stem cells. 第49回日本発生生物学会年会. 東京都 6.2 (2016).

Kondoh H. Molecular and cellular mechanisms underlying lens transdifferentiation from embryonic neural retina. Avian Model Systems 9. Taipei, Taiwan, 2016.3.28-31. (招待講演)

## 6. その他特記事項

### 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(A) 課題名: エピプラストから多様な体細胞系列を生み出す遺伝子制御ネットワークの解析 研究代表者: 近藤寿人、取得年度: H26-28年(3年)

### 学外活動

近藤寿人

日本発生生物学会 Development Growth and Differentiation 副編集長

日本分子生物学会 Genes to Cells Associate Editor

International Society of Differentiation, Board of Directors

日本学術会議 連携会員 発生生物学分科会委員長

日本学術振興会 科学研究費委員会専門委員

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニワトリ・ウズラ」運営委員

理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 運営委委員

大阪大学大学院生命機能研究科 招へい教授



# タンパク質構造生物学研究室 Laboratory of Protein Structural Biology

教授 津下 英明 Prof. Hideaki Tsuge, Ph.D

助教 吉田 徹 Assit. Prof. Toru Yoshida, Ph.D

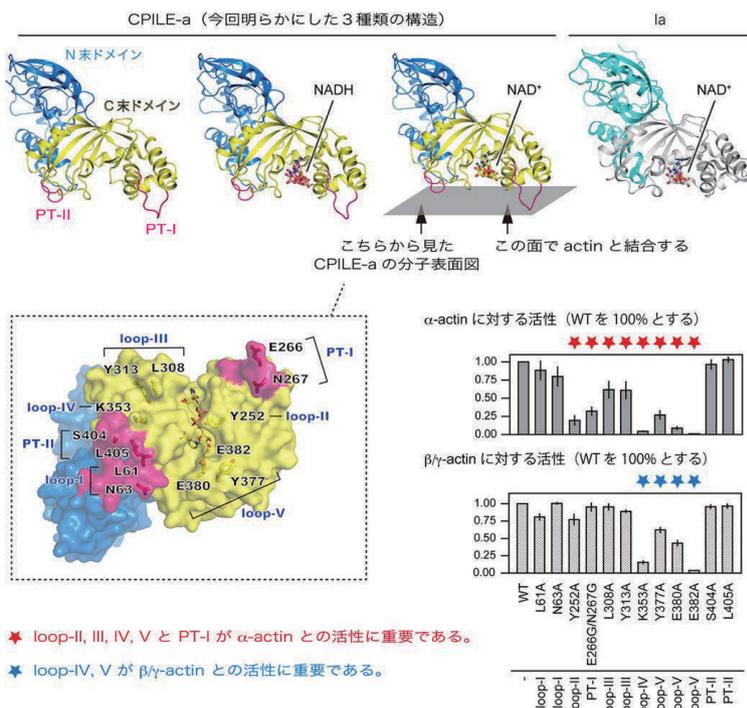
## 1. 研究概要

タンパク質の複合体の構造生物学：すなわちタンパク質とタンパク質がいかに結びつくかに興味を持ち、研究を行っている。特に感染症に関わる因子の構造生物学を進めている。

タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要な不可欠なものとなりつつある。我々はX線結晶構造解析を主要な手段として、タンパク質複合体、特に感染症因子と宿主であるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治癒する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。 ADPリボシル化毒素とそのヒト標的分子複合体の構造生物学：様々な病原微生物はADPリボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。この反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な反応状態での結晶構造解析を進めている。

## 2. 本年度の研究成果

(1) 近年日本で起きた食中毒で、ウェルシュ菌のエンテロトキシン (CPE) 欠損株の関与が疑われ、新規の食中毒毒素が見出された。この毒素はClostridium perfringens iota-like toxin (CPiLE)と命名された。CPiLEはCPiLE-a、CPiLE-bの2つのコンポーネントからなるbinary毒素である。ウェルシュ菌のiota毒素(Ia,Ib)との相同性は50%程度であるが、その毒性に違いがあることが報告された。Iota毒素ではIaはアクチン特異的なADPリボシル化毒素、一方Ibは細胞膜上でオリゴマーを作り、Iaを透過するトランスポーターと考えられている。CPiLEの食中毒原因毒素としてのアッセイすなわち腸管を用いたFluid accumulating 活性は、CPiLE-bのみでもあり、CPiLE-aで増強することが示されている。我々は、食中毒毒素の作用機構解明のためCPiLE-aの構造機能解析を行った (PLoS ONE 2017)。CPiLE-aの結晶はPEGを沈殿剤として得られ、初期位相は水銀を用いたMAD法で得られた。この後、構造精密化し、最終構造を得た。今回得られた構造は、基質なし、NAD<sup>+</sup>複合体 (本来の基質であるNAD<sup>+</sup>が結合したもの)、NADH複合体である。Iaと構造を比較すると、Iaにはない2つのExtra Protruding Loop (PT-Iと PT-II) が存在することがわかった (下図)。すでに我々のグループで研究が進んでいる、Iaと基質タンパクのアクチンとの複合体との結晶構造から、CPiLE-

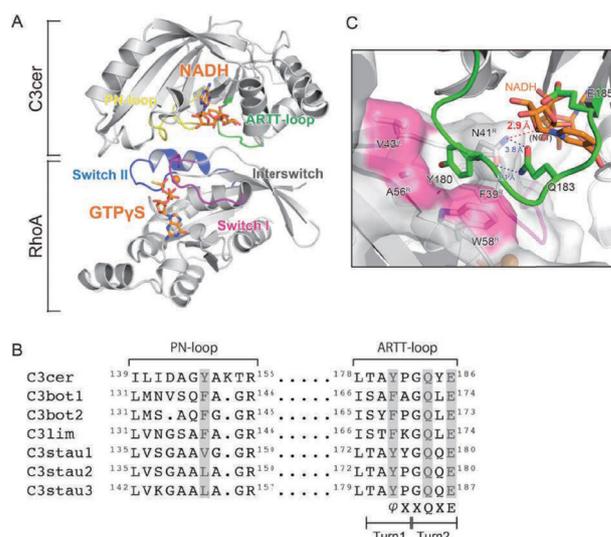


a-actin複合体のモデルを構築し、アクチン結合部位と思われるアミノ酸の変異体を作成して、その役割を検討した。Iaは2つのドメインからなり、C末端ドメインにNAD<sup>+</sup>が結合し、この周りの5つのループ(N末端ドメインのloop-I、C末端ドメインのloop-II-V: loop-Vには基質アミノ酸Arg177の認識に関わるARTT-loopの2つのGluも存在する)がアクチンとの結合に関与していることがわかってきたが、CPiLE-aでは、loop-II-IVと領域外のPT-Iの変異体も $\alpha$ アクチンとの結合すなわち活性に影響することがわかった (左図)。

その一方で $\beta/\gamma$ アクチンに対する活性を見ると、loop-IVとVの変異体では活性が落ちたが、その他の部位の変異体では大きく変化が見られなかった。また、 $\beta/\gamma$ アクチンに対するADP-リボシル化活性は、 $\alpha$ アクチンに対する活性のわずか36%であった。

この結果は、CPILE-a類のボツリヌス菌の酵素C2-IIが $\beta/\gamma$ アクチンしかADPリボシル化しないことは対照的である。現在、構造が未知の膜結合のタンパク質透過装置CPILE-bの構造と機能の研究を進めている。

(2)アクチンをADPリボシル化する毒素は多く知られているが、我々の研究室では、このタイプの毒素とヒト基質タンパク質複合体の構造および其の反応を明らかにしてきた(PNAS 2008, PNAS 2013)。また2015年、全く異なる基質RhoAをADPリボシル化するC3 exoenzymeとその基質(RhoA)複合体の結晶構造解析に成功した(JBC 2015)。RhoA特異的ADPリボシル化酵素C3はRhoAのAsn41を特異的にADPリボシル化する毒素であり、1989年に見出された。代表的なRhoファミリー分子にはRhoA、Rac1、Cdc42があるが、C3はRhoAのみをADPリボシル化する。Rho GTPaseはそのGTP結合型とGDP結合型で、構造が変化し、シグナル伝達スイッチとして働く。C3 exoenzymeとその基質RhoA複合体の結晶構造解析の結果、わかったことは次の点である。(1) RhoAのシグナル伝達スイッチとして機能する可変領域 (switch Iとswitch II) はRhoA(GDP)とRhoA(GTP)で大きく構造が異なることが知られていた。しかしながら、C3が結合した複合体構造ではC3-RhoA(GDP)およびC3-RhoA(GTP)はどちらも同じ可変領域の構造をとる (switch Iは単体のRhoA(GDP)と同じ、switch IIは単体のRhoA(GTP)と同じ)。すなわち、C3の結合により構造変化をおこす。その結果、RhoA(GDP)とRhoA(GTP)はどちらの状態でもADPリボシル化される。(2) C3およびRhoAの認識機構が初めて明らかになった。特に以下の点が興味深い。IaとC3はどちらも似た構造を持つADPリボシル化毒素であるが、その基質はアクチンのArg177とRhoAのAsn41である。毒素には共通したADP-ribosylation turn turn loop (ARTT loop)があり、最初のターンに存在する疎水性側鎖が基質RhoAの認識をし、次のターンに存在するQXEのグルタミンが修飾されるRhoA Asn41の認識に関わると予測されていた。一方IaではEXEであり、最初のグルタミン酸が修飾されるアクチンのArg177の認識に関わる、すなわち、修飾アミノ酸の選別は、このように行われていると予測されていたが、その実験的な証明はされていなかった。C3-RhoAの複合体構造は、Gln(QXE)がRhoA Asn41と水素結合を形成して、特異的な認識をし、さらに、この近傍にNADHのNC1が存在していることが明らかになった。この関係はADPリボシル化にとって理想的な関係であると考えられる(右図)。更に、RhoAシグナルに関わるADPリボシル化の影響を検討するため、ADPリボシル化したRhoAとGDIとの複合体研究を進めている。また、ある種の細菌毒素はRhoA、Rac1、Cdc42のシグナルを脱アミド化修飾することでそのシグナル攪乱を行う。この脱アミド化に関わる毒素とその基質複合体の構造解明を目的に、その解析を進めている。



### 3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our target is macromolecular complex and we would like to reveal the interaction between the infectious factor protein and human protein.

(1) Unusual outbreaks of food poisoning in Japan were reported in which *Clostridium perfringens* was strongly suspected to be the cause based on epidemiological information and fingerprinting of isolates. The isolated strains lack the typical *C. perfringens* enterotoxin (CPE) but secrete a new enterotoxin consisting of two components: *C. perfringens* iota-like enterotoxin-a (CPILE-a), which acts as an enzymatic ADP-ribosyltransferase, and CPILE-b, a membrane binding component. Here we present the crystal structures of apo-CPILE-a, NAD<sup>+</sup>-CPILE-a and NADH-CPILE-a. Though CPILE-a structure has high similarity with known iota toxin-a (Ia) with NAD<sup>+</sup>, it possesses two extra-long protruding loops from G262-S269 and E402-K408 that are distinct from Ia. Based on the Ia-actin complex structure, we focused on actin-binding interface regions (I-V) including two protruding loops (PT) and examined how mutations in these regions affect the ADP-ribosylation activity of CPILE-a. Though some site-directed mutagenesis studies have

already been conducted on the actin binding site of Ia, in the present study, mutagenesis studies were conducted against both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin in CPiLE-a and Ia. Interestingly, CPiLE-a ADP-ribosylates both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin, but its sensitivity towards  $\beta/\gamma$ -actin is 36% compared with  $\alpha$ -actin. Our results contrast to that only C2-I ADP-ribosylates  $\beta/\gamma$ -actin. We also showed that PT-I and two convex-concave interactions in CPiLE-a are important for actin binding. The current study is the first detailed analysis of site-directed mutagenesis in the actin binding region of Ia and CPiLE-a against both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin.

(2) We have been analyzed Ia (actin specific ADP-ribosyltransferase) with actin. Recently we also revealed C3 exoenzyme (RhoA specific ADP- ribosyltransferase) with Rho GTPases (JBC 2015). C3 has long been used to study the diverse regulatory functions of Rho GTPases. How C3 recognizes its substrate and ADP-ribosylation proceeds are still poorly understood. Crystal structures of C3-RhoA complex reveal that C3 recognizes RhoA via switch I, switch II and interswitch regions. In C3-RhoA(GTP) and C3-RhoA(GDP), switch I and II adopt the GDP and GTP conformations, respectively, which explains why C3 can ADP-ribosylate both nucleotide forms. Based on structural information, we successfully changed Cdc42 to active substrate with combined mutations in the C3-Rho GTPase interface. Moreover, the structure reflects the close relationship among Gln183 in the QXE-motif (C3), a modified Asn41 residue (RhoA) and NC1 of NAD(H), which suggests C3 is the prototype ART. The structures show directly for the first time that the ARTT-loop is the key to target protein recognition and also serve to bridge the gaps among independent studies of Rho GTPases and C3. Now we are trying to reveal the complex structure of ADP-ribosylated RhoA with GDI to understand the effect of ADP-ribosylation on Rho signalling. Furthermore, we are trying to reveal the complex structure of Rho family deamidase with Rho GTPase.

#### 4. 論文著書など

Yoshida T, Ogola HJ, Amano Y, Hisabori T, Ashida H, Sawa Y, Tsuge H, Sugano Y. Anabaena sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers.

Proteins. 84(1):31-42. doi: 10.1002/prot.24952 (2016).

Toda A, Tsurumura T, Yoshida T, Tsumori Y, Tsuge H. Structural Basis of Rho GTPase recognition by C3 Exoenzyme. Photon Factory Highlights 2015. 58-59 (2016).

#### 5. 学会発表など

津下英明：ワークショップ「細菌病原性の分子機序研究の最前線」ADP リボシル化毒素 C3 がシグナル伝達阻害を引き起こすしくみ、日本細菌学会、大阪国際交流センター（大阪）、2016.3.25

津下英明：細菌由来 ADP リボシル化毒素の作用機構と基質特異性、大阪府立大学(大阪)、獣医学専攻オープンセミナー、2016.7.22  
Waraphan Toniti, Toru Yoshida, Toshiharu Tsurumura, Daisuke Irikura, Chie Monma, Yoichi Kamata, and Hideaki

Tsuge : Characterization of Actin ADP-ribosyltransferase from Clostridium perfringens iota-like enterotoxin. ICC05-AEM2016 Unazuki(Toyama), 2016.9.8

Toru Yoshida, and Hideaki Tsuge :ADP-ribosylation of RhoA by C3 exoenzyme. ICC05-AEM2016 Unazuki (Toyama), 2016.9.8

村田晴香、ウェルシュ菌産生イオタ毒素Ib成分の構造解析、生化学会、仙台国際センター（仙台）、2016, 9.25

津下英明、戸田暁之、鶴村俊治、吉田徹：シンポジウム「モノ・ポリADPリボシル化によるシグナル伝達系の意義」C3 exoenzymeとRhoA複合体の結晶構造解析に基づく基質特異性、日本分子生物学会、パシフィコ横浜（横浜）、2017.12.2

#### 6. その他特記事項

##### 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究（C）課題名「ADP リボシル化毒素 C3 の RhoGTPase 認識機構の解明」研究代表者：津下英明、取得年度：H27-H29 年（3 年）

## 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

Journal of Crystallography (Hindawi) Editorial board

Advances in Biology (Hindawi) Editorial board

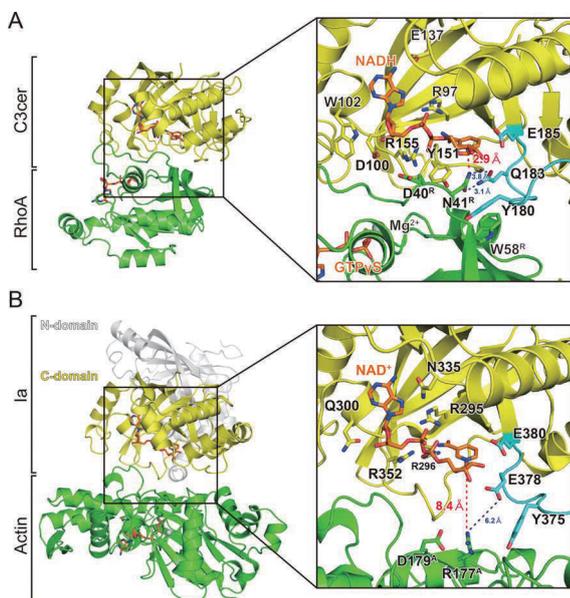
日本学術振興会 回折構造生物第 169 委員会 委員

ビタミン B 研究委員会 委員

日本生化学会 評議員

## 京都産業大学タンパク質動態研究所のメンバーとしての活動

現在までの津下研究室でバイナリー毒素の研究は下記のように進んできた。(1) アクチン特異的 ADP リボシル化毒素 Ia の結晶構造と機能の解析(JMB 2003) (2) Ia と其の標的アクチンの複合体構造解析 (PNAS 2008) (3) Ia-アクチン複合体結晶に NAD をソーキングすることで、ADP リボシル化の前後の構造解析と ADP リボシル化反応機構の解明 (PNAS 2013) (4) 異なる標的である RhoA 特異的 ADP リボシル化毒素 C3 毒素と RhoA の複合体の構造解析 (JBC 2015)。この研究を更に発展させて行く。



Ia-アクチンの複合体構造(A)と C3-Rho の複合体構造 (B)の比較

バイナリー毒素はアクチン特異的な ADP リボシル化毒素とそれを細胞内に透過する膜透過装置：トランスロケータからなる。我々の研究室では細菌のアクチン特異的 ADP リボシル化毒素とヒトアクチン複合体研究など、この分野の構造生物学の最先端研究を推し進めてきたが、特に、膜透過装置：トランスロケータの構造を明らかにしたいと考えている。この研究から、「どのようにしてアクチン特異的 ADP リボシル化毒素がこのトランスロケータを介して細胞内へ通過するのか」という重要な問いに答えていきたいと考えている。

## 高エネルギー加速器研究機構での活動

高エネルギー加速器研究機構、放射光科学研究施設の『Photon Factory (PF) Highlight』は放射光科学研究施設を用いた研究成果のうち、国内外に向けて非常にインパクトがあった成果、さらには新たな測定・解析手法を提唱する非常に重要な成果等が掲載される。2015 年度の生命科学分野における成果として 11 の研究成果が紹介され、其のうちの一つとして以下の我々の研究が紹介された。

Structural Basis of Rho GTPase recognition by C3 Exoenzyme A. Toda, T. Tsurumura, T. Yoshida, Y. Tsumori and H. Tsuge (Kyoto Sangyo Univ)  
<http://www2.kek.jp/imss/pf/science/publ/pfhl/2015/>



## 2016年セミナー開催

開催日	演者	演題	世話人
6月23日	Dr. Janine Kirstein (Leibniz-Institute of Molecular Pharmacology)	Identification of distinct chaperone complexes that can suppress Htt fibril formation and can disaggregate Htt fibrils in vivo and in vitro	永田和宏
6月29日	山田 吉彦 氏 (NIDCR, NIH, Bethesda, MD)	歯原性上皮幹細胞の運命決定と分化誘導の制 御因子の解明	永田和宏
7月11日	竹市 雅俊 氏 (理化学研究所 多細胞システ ム形成研究センター)	細胞間接着分子の多機能性	永田和宏
8月31日	Dr. Agnieszka Chacinska (International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw)	Oxidation of mitochondrial membrane proteins	遠藤斗志也
9月9日	第1部: Dr. Arnold J. M. Driessen (University of Groningen)	Single molecule imaging of the dynamics of the Sec translocase in living cells	遠藤斗志也
	第2部: Dr. Ralf Erdmann (Ruhr-University Bochum)	Protein Import into Peroxisomes	遠藤斗志也
9月12日	Dr. Jürgen Soll (Ludwig-Maximilians University Munich)	Protein translocation in chloroplasts and mitochondria	遠藤斗志也
9月28日	Dr. Claudio A. Hetz (University of Chile, Chile / Harvard School of Public Health)	HSP47: a novel regulator of the Unfolded Protein Response	永田和宏
10月7日	Dr. Filip Wymeersch (MRC Centre for Regenerative Medicine, The University of Edinburgh Scotland)	A transcriptionally Dynamic Population of Neuromesodermal and Lateral Mesoderm Progenitors coexists alongside a Stable Notochord Progenitor Pool	近藤寿人
10月20日	Dr. Doron Rapaport (University of Tübingen)	Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins in evolutionary context	遠藤斗志也
11月28日	Dr. Thomas Langer (University of Cologne)	Mitochondrial phospholipid trafficking	遠藤斗志也

## 2016年 プレスリリース

### 細胞内のカルシウム濃度を一定に保つメカニズムを解明

～ジスルフィド還元酵素が、貯蔵庫へのカルシウムの出入りを制御～

10月1日	新聞	京都新聞 朝刊
10月3日	新聞	産経新聞 朝刊
10月27日	新聞	朝日新聞 朝刊

### 京都産業大学 「タンパク質動態研究所」 開設記念シンポジウム開催に関する記者会見

10月4日	新聞	朝日新聞 朝刊
10月7日	新聞	読売新聞 朝刊

### タンパク質動態研究所の招聘教授に、大隅 良典 東京工業大学栄誉教授をはじめ国内外の著名な研究者が就任

10月6日	テレビ	NHK「ニュース630 京いちにち」、NHK「京都ニュース845」
10月7日	テレビ	関西テレビ「めざましテレビ」
10月7日	新聞	朝日新聞、毎日新聞、読売新聞、産経新聞、日経産業新聞、京都新聞、愛媛新聞 各朝刊
10月12日	Web	大学ジャーナルONLINE

### タンパク質動態研究所開設記念シンポジウム

10月26日	Web	時事通信、共同通信、上毛新聞ニュース
10月26日	テレビ	NHK「ニュース630 京いちにち」、NHK「京都ニュース845」、KBS「newsフェイス」、ABC「キャスト」
10月27日	新聞	朝日新聞、毎日新聞、読売新聞、産経新聞、日経産業新聞、京都新聞 各朝刊

## あとがき

タンパク質動態研究所が発足して1年。これが最初の年報である。研究実績を報告することにとどまらず、私たちがどのような「志」のもとで何を目指しているのかを表現することに力を注いだ。この志が、学内外・国内外の同志にもエールを送ることになればという思いがある。この年報から、京都上賀茂の地で、タンパク質動態の研究が熱いことを感じていただければ幸いである。

(2017.6 近藤寿人)

### 京都産業大学タンパク質動態研究所年報

2016年号

〔非売品〕

平成29年8月25日 印刷

平成29年8月31日 発行

発行人	京都産業大学タンパク質動態研究所長 永田和宏
編集人	京都産業大学タンパク質動態研究所員 近藤寿人
発行所	京都産業大学タンパク質動態研究所 京都市北区上賀茂本山 TEL (075) 705-1468
印刷所	株式会社 北斗プリント社 京都市左京区下鴨高木町 38-2

