

年報 タンパク質動態研究所

Annual Reports 2017
Institute for Protein Dynamics
Kyoto Sangyo University

はじめに (永田和宏)	1
命の誕生を紡ぎ出す、 遺伝子調節タンパク質を求めて (近藤寿人)	2
若手座談会 「タンパク質研究の魅力」	15
タンパク質の構造の理解に向けて (吉田賢右)	30
研究所の活動	
分子細胞生物学的研究室 (永田和宏)	38
生物化学研究室 (遠藤斗志也)	48
タンパク質バイオジェネシス研究室 (千葉志信)	54
発生生物学的研究室 (近藤寿人)	59
タンパク質構造生物学的研究室 (津下英明)	64
セミナー・プレスリリース あとがき	68

2017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
荣誉教授



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

京都産業大学にタンパク質動態研究所が発足してから二年が経過した。この間、個々の研究室における研究は順調な進展を見せ、ここに年報としてその成果報告をできることは大きな喜びである。

生命活動の根幹を担うタンパク質研究に特化し、タンパク質の動態を「時間軸」「空間軸」そして「組織化」という3つの視点から総合的に研究するとする、本学タンパク質動態研究所の創設は、わが国のみならず、国際的にも大きな注目を集めた。海外から3名、国内から2名のきわめて著名な招聘客員教授を迎えることができたことは言うまでもなく、本年からは、吉田賢右、伊藤維昭リサーチフェローを研究所のフェローとして迎えることができたこともありがたいことであった。吉田、伊藤両先生が、長くわが国のタンパク質研究を牽引して来られたことは、あらためて言うまでもないが、5つの研究室だけでなく、一私学として、これだけの陣容を揃えた研究所は、ほとんど例がないだろうと自負している。

このような背景を含め、本年度は、タンパク質動態研究所が中心になって応募していた「私立大学研究ブランディング事業」に採択されたことも、本研究所の歩みに弾みをつけてくれることになった。学長の口からは、折りに触れ「本学の研究の中でも強みであるタンパク質研究」という言葉をよく聞くことがあるが、その意味でも、タンパク質研究がブランディング事業として認められたことは、この方向性の妥当性を示唆しているものと受け止めている。

また来年度(2018年8月26～29日)には、本研究所と新学術領域研究「新生鎖の生物学」(日本学術振興会)の共催事業として、国際会議「Proteins: From the Cradle to the Grave」が、比叡山延暦寺において開催されることになっている。すでに海外からの招聘演者、参加者を含め、国内からの多くの参加者が集まりつつあり、その成功を心待ちにしているところである。

本年報においては、昨年は5人のPIによる座談会を行った。年報にこのような座談会記事を掲載するのは、比較的珍しいことと思われるが、研究の中心になるPIが、どのような思いで研究に取り組んでいるかを示すことができたと考えている。それに続いて、本年の年報においては、本研究所で研究を続けている若手研究者たち、博士研究員や大学院学生たちによる座談会が持たれ、その記録が載ることになっている。これも年報としては異例の記事だと考えているが、まさに最前線で日々研究にいそんでいる若手研究者の本音が聞けるものと楽しみにしている。

また本年報においては、長年発生生物学領域において、世界的な研究を展開してこられた近藤寿人先生による、自伝とも言うべき研究の歴史を執筆いただいた。一人の研究者が、時に迷いながらも、長年の研究をどのような思いで続け、そして大きな成功を収められたのか、そこにはどのような信念と、冒険と、そして喜びがあったのか、それらを若手の研究者にぜひ知っていただきたいという思いからである。

研究の最前線で活躍する若手の研究者、大学院生が、研究に本当の喜びを見いだせる場であり続けられるよう、努力を傾注することが、本研究所の成功につながるものであると確信している。本年報は、単なる報告書ではなく、これら二つの記事からも明らかのように、若い研究者に自信と希望と野望を持ってもらうための冊子であって欲しいと願っている。

命の誕生を紡ぎ出す、遺伝子調節タンパク質を求めて

近藤寿人

1. 志を立てる

振り返れば、私が現在の研究を志したのは、高校2年の頃である。発生生物学に現代的な発想と潮流をもたらした Conrad H Waddington が1961年に著した *The Nature of Life*¹⁾ が翻訳されて、「生命の本質」²⁾ というタイトルで1964年に岩波書店から出版されたのを読んだのが大きなきっかけとなった。

1964年当時は分子生物学の興隆の真っただ中で、遺伝子暗号を解明する研究がデッドヒートを繰り広げており、そのワクワクする状況は、刊行が始まったばかりのブルーバックスなどでほとんどリアルタイムで私たちにも伝えられていた。もし研究者という職業を選択できるならば、分子生物学という分野で戦いたいという淡い願望を私は抱いていた。

Waddington は、ようやくメッセンジャーRNAが姿をあらわしはじめた1961年にすでに次のことを予言していたのである。『DNAという物質で構成されるたくさんの「遺伝子」にコードされるタンパク質の中には、遺伝子を調節するタンパク質があって、その作用の連鎖によって、胚の中の細胞が次々と状態を変えていって多様な組織化された細胞群を生み出す。これが命の誕生を紡ぎ出す発生のプロセスである』(近藤による現代用語での意識)。私は、これだ！と感じ、動物の胚の発生を舞台とした遺伝子調節を極めたいと願った。しかし、動物の遺伝子などおおよそ霧の彼方で、その見えぬ峰を目指しての歩みをはじめることになる。まず、その峰へのルートを見つけられるような大学で学ばなければ——丁度私が大学進学の際に京都大学理学部に新設されることになった生物物理学教室を目指した。

京都大学理学部では、数学や物理の志望者として入り混じって教育を受けていて、数学や物理学の世界の美しさに感動する一方、分子生物学や発生生物学については教科書には目を背けて、独学で原著論文を読み漁った³⁾。

2. 時を待つ

しかし、大学院進学を間近にした頃になっても、動物の遺伝子は深い霧の中に閉ざされていた。当

時の生物物理学教室には、岡田節人という個性的でもあり、最先端レベルの発生生物学の研究をしている教授がいたが、当時の発生生物学の最先端は洗練された細胞培養技術にあり、一方私は、あくまでも遺伝子調節タンパク質を目指していた。

そこで、大学院では、大腸菌の分子遺伝学の先駆者の一人である小関治男教授の門を叩いた。サルモネラの鞭毛タンパク質フラジェリンと鞭毛のラセン構造との関連について朝倉昌教授(名古屋大学)が行った、この上もなく美しい研究に感動していたので、不遜にも「大腸菌の分子遺伝学を用いて鞭毛形成を研究したい」と小関教授に申し出た。この研究を行えば、変異体の解析を通じて複雑なシステムの構築に関わる遺伝子調節タンパク質にも肉薄できるのではないかと——発生に関わる遺伝子制御にも通じるかもしれないという思いがあった。

当時の小関研究室の主要なテーマは tRNA の分子遺伝学であったから、それからは大きく外れたテーマを提案したのである。小関教授は大変寛大であっただけでなく、教授自身が、鞭毛に関する研究も行っていた Bruce A.D. Stocker の研究室でイギリス時代を過ごした経験から鞭毛にも造詣が深く、私の願いを受け入れていただいた。もちろん研究の計画・実施と論文発表はすべて自己責任で行わなければならない。

幸いにも、朝倉昌教授の一番弟子であった宝谷紘一博士が助手として隣の研究室に着任され、大腸菌のフラジェリンの精製・分析、それからの鞭毛の再構成の研究については直接の指導を受けた。また、私が見つけた大腸菌変異体が持つ直線状鞭毛の構造を、電子顕微鏡像の光回折(フーリエ変換)像を基にして解析する研究⁴⁾では、その研究室の助教であった柳田充弘博士の指導を受けることができた。(当時、柳田博士は T4 ファージの頭部の構造を、その手法を用いて研究していた。) 修士課程の2年間を、タンパク質を中心とした研究に注いだ後に、分子遺伝学の世界に深く入り、鞭毛形成のための遺伝子の調節の研究に没頭した⁵⁾。しかし、大学院の時代が終わろうとする頃になっても、動物の遺伝子はまだ霧の中にあった——とはいえ、制限酵素が精製され、ウイルスの DNA がそれによって解析され始め、霧はようやく晴れつつあった。

私は、鞭毛を持った細菌が糖やアミノ酸の濃度勾配を検出して遊走する「走化性」の機構について斬新な研究を発表していた Julius Adler (米国、Wisconsin 大学、生化学教室) の個性的な研究に心が動かされて、「大腸菌を用いてシグナル伝達の機構を研究できれば！」との思いで、Postdoctoral fellow として研究チームに加わりたくて手紙を書いた。「自分で fellowship を獲得すること」という条件で受け入れるという返事もあり、何とか Damon Runyon Cancer Fund から fellowship を得て、大学のある Madison 市に向かった。(学術振興会の fellowship はなかった時代である)

Adler 研では、糖類への走化性を調節するシグナル伝達タンパク質の研究を行った⁶⁾。研究成果以上に重要な体験は、ポストドク間での、「誰がより優れた発想を持ってより魅力的な研究テーマで研究をするか」という熾烈なポジション争いで、国際舞台での戦い方の一つを学んだと思う。日本のサッカー選手がヨーロッパのチームに参加した場合と似た体験だったのかもしれない。

3. 時代の到来

Madison に来てみると、新しい時代がすでに到来していた。Adler 研の2階上では新しい制限酵素 PstI が部分精製されていた。向かいの建物にある遺伝学(Genetics)教室では、遺伝子クローニングに用いるファージベクターの試作品が作られ、グロビン遺伝子がクローニングされていた。私が待

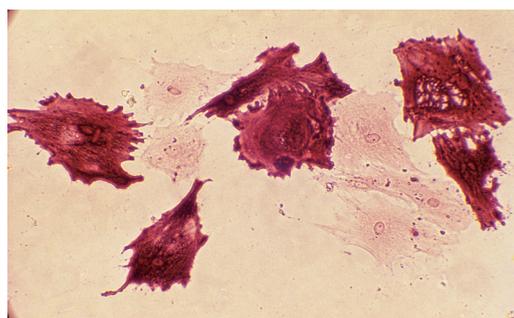
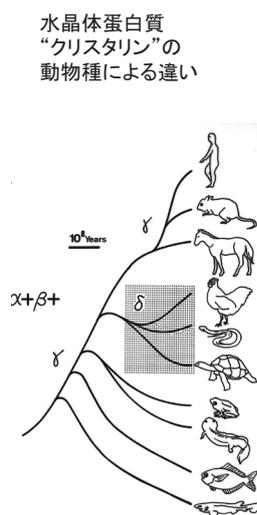
ち望んでいた時代が到来したのを悟った。走化性に関連する遺伝子をクローニングするという正当な理由でボスを説得して、遺伝学教室で遺伝子クローニングの基礎を学んだ。

動物の遺伝子の発現を直接的に解析し、遺伝子調節タンパク質の働きを明らかにするための長い道のりの入り口が開けた。ちょうどその頃、この時代の流れを察知した京都大学の岡田節人教授が、「遺伝子を扱える」助手の公募を始めたので応募し、1978 年末に岡田教授のグループ(竹市雅俊助教授、安田國男助手)に助手として参加することが出来た。

岡田教授が私に求めたのは、2つのキーワード「水晶体、遺伝子」を使った挑戦的な研究を自由に行うことであった⁷⁾。安田國男氏とともに、ニワトリの水晶体の主要タンパク質である δ (デルタ)-クリスタリンをコードする遺伝子のクローニングに成功したあと、私は、「なぜ δ -クリスタリンの遺伝子は水晶体だけで働くのか？」という問題設定のもとで研究を進めた。遺伝子調節タンパク質とその働きに関する研究を、水晶体を舞台として開始したのである。

4. 水晶体を舞台にして、一步を踏み出す

当時は、動物の遺伝子の発現調節(転写調節)の基本的な機構自体が全く不明な状況であったが、それでも胚発生の遺伝子調節にかかわる重要な課題を問うことができた。クリスタリン遺伝子は確



440 NATURE VOL. 301 3 FEBRUARY 1983 LETTERSTONATURE

Tissue-specific expression of a cloned chick δ -crystallin gene in mouse cells

Hisato Kondoh, Kunio Yasuda & T. S. Okada

Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606, Japan

図1 培養されたマウスの水晶体細胞の核に、ニワトリの δ -クリスタリン遺伝子を注入すると、 δ -クリスタリンが大量に合成され、赤く免疫染色された。他の細胞種の核に注入した場合には、このような大量合成は起きない。

かに水晶体だけで働く（発現される、転写される）が、それは（モデル1）遺伝子ごとに個別の調節がなされている結果なのか、それとも（モデル2）「水晶体」という状態に対応した遺伝子調節の仕組みがあって、クリスタリン遺伝子は、その仕組みに従って調節される結果として水晶体だけで発現されるのか？という問いである。実は、 δ -クリスタリンは鳥類にはあるがマウスなどの哺乳類にはなく、哺乳類では δ -クリスタリンとは全く異なった γ -クリスタリン（鳥類にはない）が、水晶体の主要タンパク質として合成されている。マウスの様々な組織から採った細胞を培養して、その核の中にニワトリの δ -クリスタリンの遺伝子を導入した場合に、モデル1が正しいければ、 δ -クリスタリンの遺伝子は、その遺伝子を持たないマウスの水晶体では働かないだろう。しかしモデル2が正しいければ、マウスの細胞であっても、 δ -クリスタリンの遺伝子はやはり水晶体で効率よく働くに違いない。

直径約 5 μm の細胞核の一つ一つに、1 fL (10⁻¹⁴ L) ほどの δ -クリスタリン遺伝子の DNA 溶液を微量注入してゆく方法で行った実験は明快な結論をもたらした。モデル2——つまり水晶体という細胞の状態（分化状態）に対応した遺伝子調節の仕組み

がある——というのが正しい。さらに踏み込んで考えれば、クリスタリン遺伝子を調節する仕組みを明らかにできれば、その仕組みは水晶体という細胞状態を作る仕組みそのものであるだろう。この結論は、1983年当時としては画期的なもので、Nature 誌に掲載された⁹⁾。(図1)

この研究結果はまた、クリスタリン遺伝子の DNA 配列のどこかに、水晶体という細胞状態を検知してその遺伝子の働き（転写）を活性化する調節領域があるに違いないことを示していた。当時大学院生であった林茂生氏（現理研 CDB チームリーダー）と共に行った研究によって、 δ -クリスタリン遺伝子の調節領域は、遺伝子内の第3イントロンにあり、転写活性化エンハンサーの性質を持ち、水晶体の状態を検知するコア領域と、コア領域の作用を増幅する DNA 領域とから構成されることを示した。

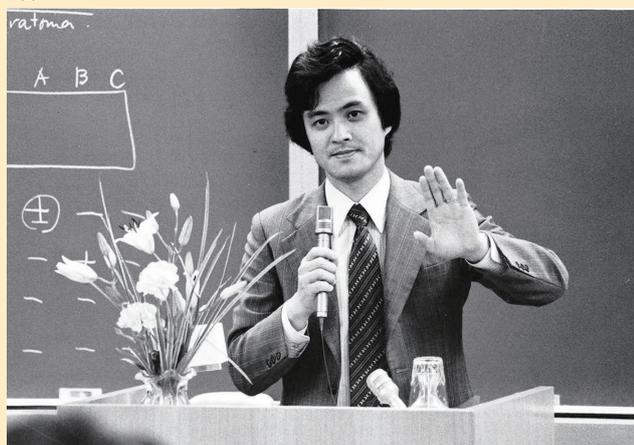
このようにして、岡田節人教授（1985年に基礎生物学研究所長として転出）、竹市雅俊教授のもとで、助手・助教授として働いた1988年までの京都大学時代に、命の誕生を紡ぎ出す転写調節タンパク質（転写因子）を探索する道を切り開くことができた⁹⁾。

挿話1：その次を考えて研究しよう

δ -クリスタリン遺伝子をマウス細胞の核に注入して δ -クリスタリンの合成を見る実験が成功するまでには、ほぼ1年間の足踏みがあった。 δ -クリスタリン遺伝子の全長約14 kb (14,000塩基対)が一つのファージベクターにすっぽりと収まっていることがわかったが、ベクターを含めた線状DNAの全長は50kbもあって溶液はネバネバと粘度を示して、とてもマイクロインジェクションには使えない。DNAがコンパクトな構造を持つプラスミドベクターに遺伝子全長を再クローニングする（移し換える）必要があった。当時の汎用ベクターpBR322では、PstIかEcoRIで切り出したDNA断片しかクローニングできなかったが、 δ -クリスタリン遺伝子には、それらによる切断部位がたくさんあって移し替え作業は難航した。しびれを切らして、精製したファージ粒子を直接核に注入すると、1~2%という低い確率ではあったがマウスの水晶体細胞でニワトリの δ -クリスタリンが合成されていた。しかしその低い頻度では強い結論を導くことはできない。そうしているうちに1981年の暮れに新しい制限酵素XbaIが発売され、制限酵素地図を作ってみると、遺伝子全長がEcoRI-XbaI、XbaI-KpnIの2つのDNA断片として切りだせることが分かったので、pBR322をベースにEcoRI、KpnI切断部位を端を持つDNAをクローニングするベクターを自作し、上記の2つのDNA断片を挿入した。このようにして準備した δ -クリスタリン遺伝子のプラスミドを核に注入する実験を行った時は、すでに1982年5月の連休に差し掛かっていた。DNAを注入

した翌日に固定し、翌々日までかけて免疫染色した細胞が赤々と染め出されているのを顕微鏡の視野で確認した（図1）時には、興奮した。一年間の苦勞が報われた！というのではなく、「これで次のステップに進める！」という胸の高まりであった。もちろん、研究には小さなゴールがたくさんあるが、一つのゴールに達してから次を考えるのではなく、その先を読みきってそれらのゴールを通過していくのが良いと思っている。プロの棋士が先を十分に読んで一手を打つように。

この研究は幸いにも注目されることとなり、1983年にはいろいろの場所で話をする機会が与えられた。挿入写真は、シオノギ製薬の研究所で講演をした時のものである。ヘアスタイルは今とはそんなには変わっていないつもりだが、



5. ES細胞を新しい tool に

この京都大学時代に、もう一つ重要な研究を開始した。1981年にMartin J Evansがマウスの着床前胚の細胞からES細胞株を樹立したことを発表した。この細胞を着床前の胚に戻すと、正常な体細胞として発生し、できたキメラマウスの様々な組織に分布する。このES細胞をうまく活用すれば、培養皿の中で遺伝子操作を行ったのちにその細胞をマウス個体に戻して、遺伝子操作の効果を分析できるに違いない。

その思いから、1984年にCambridge大学に

Evansを訪ねて第1世代のES細胞の分与をうけ、ES細胞を植え付けたばかりの培養フラスコを肌で温めながら空路帰国した。同時期にES細胞研究を始めた相沢慎一氏（前理研CDB副センター長）と共に、日本でのES細胞研究の先鞭を切った。

このES細胞を用いて、大学院生であった高橋淑子さん（現京都大学理学研究科教授）が、ニワトリの δ -クリスタリン遺伝子がマウス胚のすべての組織で、ニワトリ胚と同一の調節を受けることを証明した¹⁰⁾。

挿話2：超一流の胸を借りよう

岡田節人教授は、研究に挑戦を求め、自由を与えるとともに、その豊かな国際人脈（友人関係）をもとに、超一流の研究者を招いて（当時の）若手の成長を助けた。カエルの核移植の研究で発生生物学に革命をもたらしたJohn B Gurdon（ガードン：2012年に山中伸弥教授とともにノーベル賞受賞、英国）、ウズラとニワトリのキメラを駆使して先駆的な研究を展開したNicole M Le Douarin（ルドワラン：1986年京都賞受賞、フランス）、ホメオドメインを発見したショウジョウバエ毛の研究者Walter J Gehring（ゲーリング：2000年京都賞受賞、スイス）などは、ほとんど毎年京都を訪れる常連であった⁷⁾。これらの超一流の研究者たちは、私や大学院生たちに威圧感で接することはなく、胸を開いて議論に応じてくれたが、彼らの発想は研ぎ澄まされているだけでなく広い視野と奥深さがあった。より突っ込んだ議論を仕向けるとそれに応じてより鋭い議論が返ってきて、本気での議論のラリーからは学ぶことも多く、また超一流の研究者のレベルを確かめ流ことができて、私たちの目標となった。挿入写真は、Le Douarinと議論している1987年の私である。

私が学位論文を指導した加藤和人氏は、John Gurdonの奥行きのある発想に魅かれて、彼のもとでポストドク時代を送った。英国は、最初の「試験管ベビー」を生んだ国でもあり、人に関わる生命の諸問題についての議論が偏見を排した形



で深化している。英国の生命科学の深い思想に触れた彼は、その後生命倫理の専門へと転身し、現在は大阪大学医学部教授として活躍している。この話は「転身のすすめ」に続く。

6. 新天地での遺伝子調節研究への邁進

1988年に名古屋大学理学部に出来て間もない分子生物学科（それ以前の分子生物研究施設の改組）の教授に着任した。助教授には、胚発生に重要な働きを持つHox属の遺伝子調節タンパク質を研究していた高橋直樹氏（現東京大学農学研究科教授）を、そして助手にはショウジョウバエでの遺伝子調節研究の経験をもつ東雄二郎氏（前愛知県発達障害研究所部長）を招いて、発生のプロセスでの遺伝子調節に照準を定めた研究を進めた。名古屋大学の研究環境も学生も素晴らしく、良いスタートを切ることができた。

同じ1988年にMario R Capecchiが発表した

ノックアウトマウス作成の論文に刺激を受けて、第2世代のES細胞（遺伝子操作の結果が、生殖細胞を介して子孫に伝わる）をEdinburghのグループから入手するとともに、当時まだ既知のものが少なかった遺伝子調節タンパク質の中からN-mycを選んで、ノックアウトマウスを作製し、その第1報は1991年に発表した¹¹⁾。相賀裕美子さん（現国立遺伝学研究所教授）と相沢慎一氏によるTenascinノックアウトマウスの成功と同時期で、相沢—近藤の2グループが、日本のES細胞とノックアウトマウス研究の初期10年間を支えていた。

ノックアウトマウスを用いた研究が勢いを増すと共に飼育マウス数が増えて、研究室を改造して

作ったマウス飼育室に収まりきれなくなった頃、幸いにも、大阪大学細胞生体工学センターに招かれ（1993年）、余裕ある飼育環境のもとでマウスを用いた研究を進展させることができた。このマウス研究の発展には、抜群の技術力を持っていたスーパー大学院生、下野明彦氏の貢献が大きい。

1993年には、Principal investigatorとして申請していた Human Frontier Science Program の国際チームが採用され、様々な国際共同研究を展開した大阪大学時代の幕が開かれた。

本命の δ -クリスタリン遺伝子の調節タンパク質の全貌を明らかにするまでには、以下に述べるように10年近い歳月を要したが、その間にも(1) N-mycが調節する遺伝子群 Ndrgl-4の発見と Ndrgr タンパク質による細胞内シグナルの調節の研究、(2) DNAのCACCT配列に結合して、細胞分化・細胞遊走・がんの薬剤耐性などに関わる転写調節

タンパク質群 δ EF1 (Zeb1)・Sip1 (Zeb2)の発見と解析などの研究を実施した。今日特にがんの制御の観点から注目されている Ndrgr、Zeb タンパク質の研究の基礎をつくった。

δ -クリスタリン遺伝子からその調節タンパク質を明らかにするのと逆のアプローチも採用した。Hox 調節タンパク質群は、何らかの遺伝子の調節領域に結合して頭から尾の方に向かっての極性をもつ体の形成を調節しているはずだが、実際にはどの遺伝子を調節しているのかは明らかでなかった。HoxC8が結合しているゲノムDNAを濃縮してきて、その中からHoxC8が本当に結合して調節する領域を見つけ出した。高橋助教に協力して完成したこの研究は、遺伝子調節タンパク質の働きを知る新しい方法として、Nature 誌に掲載された¹²⁾。

挿話3：熟す前の超一流をつかもう

2007年のノーベル医学・生理学賞は、ES細胞とノックアウトマウス作製の開拓者3人、Martin Evans、Mario Capecchi、Oliver Smithiesに与えられた。私は3人ともそれ以前から知っており、特にEvansとCapecchiについては、彼らが「熟す」前の時期に身近に交わる機会を得て大いに刺激を受けた。Martin Evansとは、ES細胞を受け取るためにCambridgeを訪れた1984年に初めて会ったが、その時にはすでに、マウス以外の動物種からのES細胞株を樹立することを目指して悪戦苦闘していた。1987年に北京で開かれたAMBO（アジア分子生物学連合）実験コースの講師を務めた際に、彼も講師に招聘した（挿入写真）。実験コースのあと講師一同が京劇に招かれ、中国語は全く理解できないながらもレベルの高い演技と音楽を楽しんだあと、「あれはきっと回想の場面に違いない、その前の急転回の方が良かった！」と、彼と同感したことが懐かしい。

Mario Capecchiについては、1990年頃、彼が名古屋での医学系

の学会に招かれていることを知り、当時すでに私たち自作のノックアウトマウスができていたこともあって名古屋大学に招待して講演をしてもらった。それが初対面ではあったが、私は彼の主要な論文のほとんどすべてを読んでおり、また幼少の頃はナチスに追われて渡米したイタリア難民として大変苦労したことも聞いていた。そのこともあって、長時間にわたって歓談した。その時の会話の一つ：“What did you learn from Jim Watson?” “Nothing.” CapecchiはWatson研時代に、大腸菌での蛋白合成がf-Metで始まることや、ナンセンスコドンで新生ポリペプチドがリボソーム



から解離するのが releasefactor の作用であることを最初に示して名をあげた。その後、酵母、動物細胞と研究材料を変えていったが、培養細胞の核に線状 DNA を注入するとはほぼ 100% が染色体に組み込まれるが、端のない環状 DNA では組み込まれないことを示し、その研究が ES 細胞における相同組換え（ノックアウトマウス作製の第一段階）の研究へと発展していった。

Oliver Smithies は、私の Wisconsin 大学時代には向かいの遺伝学教室の教授であった。グロビン遺伝子をクローニン

グするプロジェクトの推進者の一人であったが、ゲノムの組換えに関する発言が多く、後日の相同組換えのデザインを予期させるものであった。

これらの研究者に見るような、（すでに大家であったとはいえ）超一流になるべき発展途上にある研究者との対話は、お互いに露骨には出さないものの、それぞれの生々しい研究上の苦しみや壁についての実体験がおのずから反映されて、私自らを鼓舞する源となった。また、研究分野の流れやその中の自らの立ち位置を正確に把握する機会でもあった。

7. 遺伝子調節タンパク質 Sox2 との出会い

δ -クリスタリン遺伝子のエンハンサーの塩基配列の中で、「この部分が水晶体の細胞状態に応答する」というコア領域は最終的には 30 塩基対の DC5 配列に絞られ、DC5 領域に 2 種類の異なった遺伝子調節タンパク質が結合すると、このエンハンサーが活性を持ち、そして δ -クリスタリン遺伝子の転写を引き起こす——というところまでは名古屋大学時代に到達していた。

では、それらの遺伝子調節タンパク質はどのようなものだろうか？ 第 1 のタンパク質は、「DC5 配列に結合するタンパク質をコードする、ニワトリの水晶体の cDNA をクローニングする」という直裁な方法によって、当時研究員であった蒲池雄介氏（現高知工科大学教授）が明らかにした。1994 年のことである。蒲池雄介氏はその後、助教・准教授として、大阪大学時代の私の研究の相棒であった。

そのタンパク質の中の DNA に結合する部分は HMG ドメインという特徴的な性質をもち、Sry という哺乳類の性を決定する遺伝子調節タンパク質のものとは非常によく似ていた。その少し前の国際学会で Robin Lovell-Badge（英国、現 Crick 研究所）が 1 枚のスライドの中で示していた、あるマウスの遺伝子調節タンパク質に対応するものであることを直感し、彼に連絡を取ってそのことを確認した。彼は、そのタンパク質に Sox2 (Sry-related HMG box-2) と命名していたので、私たちのタンパク質はニワトリ版の Sox2 であったことになる。この論文は、1995 年に EMBO Journal 誌に Lovell-Badge を共著者として発表した¹³⁾。遺伝子調節タンパク質がどのように発生過程にかかわるのかを具体的に示した初期の例である。その後 Lovell-Badge と私は、遺伝子調節タンパク質 Sox2 について少し異なった観点から研究を深め、2016 年には 2 人で、Sox2 に関するモノグラフを Academic

Press 社から刊行した¹⁴⁾。（図 2）

また、オーストラリア Brisbane 大学の Peter Koopman と、Sox 調節タンパク質の研究者を集めた国際研究集会で分野をもりあげようと意気投合し、International Sox Research Conference を始めた。2005 年に第 1 回を Brisbane で、第 1 回を 2008 年に私の主催で淡路島の夢舞台国際会議場で開催した。その後、ドイツ、米国、フランスでと毎回開催の場所を変えて、Sox 研究者の結束と情報交換の場となっている。

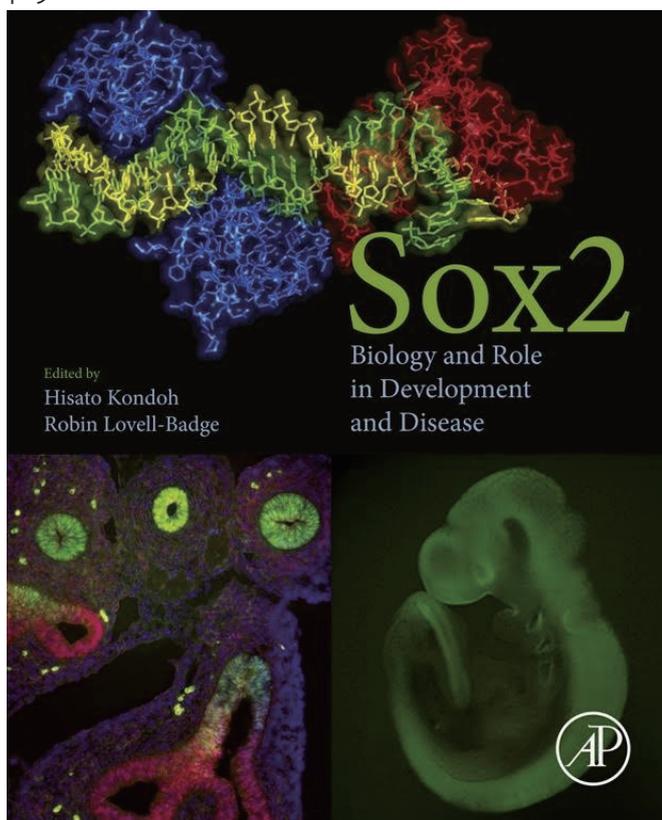


図 2 Academic Press 社から 2016 年に刊行した、遺伝子調節因子 Sox2 に関する多面的な研究を集大成したモノグラフ。

8. 2つの遺伝子調節タンパク質がペアを作って複合体として働く

DC5 配列に結合するもう一つの遺伝子調節タンパク質が Pax6 であることを明らかにするまでに、さらに 5 年の歳月を要した。1998 年にすでに、2 つの遺伝子調節タンパク質 Sox2 と Pax6 が共存する状態で水晶体が発生するという論文を自ら発表していたにもかかわらず、である。それは DC5 配列の中の Pax6 結合配列が、Pax6 単独で結合する塩基配列とはかけ離れていたからである。DC5 配列は、2 つの遺伝子調節タンパク質 Sox2 と Pax6 が複合体を作った時に結合する配列であっ

て、その複合体が結合して初めて δ -クリスタリン遺伝子のエンハンサーは活性を持つ。Sox2 と Pax6 がバラバラに隣接した DNA 配列に結合するだけではその効果はない。また、Sox2 と Pax6 を強制発現すると、通常は水晶体にはならない組織が水晶体になることから、Sox2 と Pax6 が複合体を作って作用することが、水晶体を発生させる基本機構であることも示した。2001 年に Genes & Development 誌に発表したこの新しい研究結果は、胚発生に関わる遺伝子調節の研究者の間で大きな反響を呼んだ¹⁵⁾。(図 3)

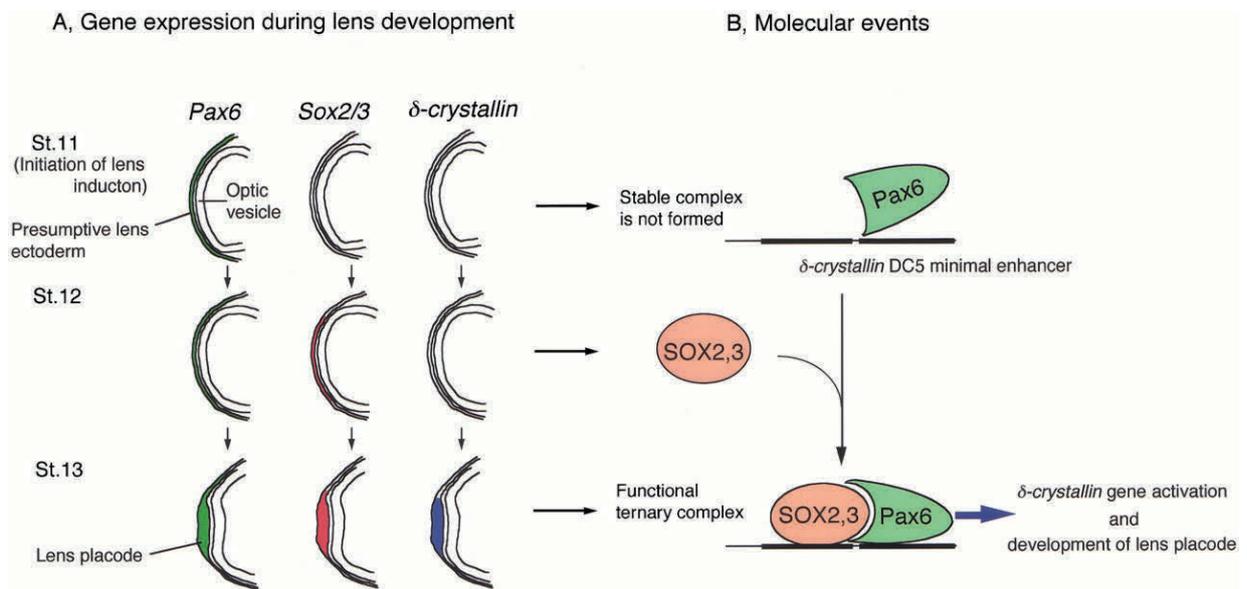


図3 遺伝子調節タンパク質 Pax6 と Sox2 (あるいはそれに近縁の Sox3) が複合体を作ってエンハンサーの DNA 配列に結合して、水晶体の発生を開始 (頭部の外胚葉から分化) させることを説明した図。Kamachi et al. (2001) Genes Dev., 15:1272-1286. より転載。

Sox という名前を持つ、類縁の遺伝子調節タンパク質は 20 種類以上ある。Sox2-Pax6 複合体の作用についての研究をもとにして、当時散発的に発表されていた Sox タンパク質の働きに関する研究結果を再解釈して、(1) Sox 調節タンパク質は単独で働くのではなく、Pax6 のようなパートナータンパク質と複合体を作って作用する。(2) Sox とパ

ートナータンパク質の組み合わせの多様性が、発生のプロセスで多様な細胞種を生み出すための基盤となる機構である——という新しいモデルを提唱した (Sox-partner code model)^{16,17)}。このモデルはその後の様々な研究によって支持され、実証されることになった¹⁸⁾。(図 4)

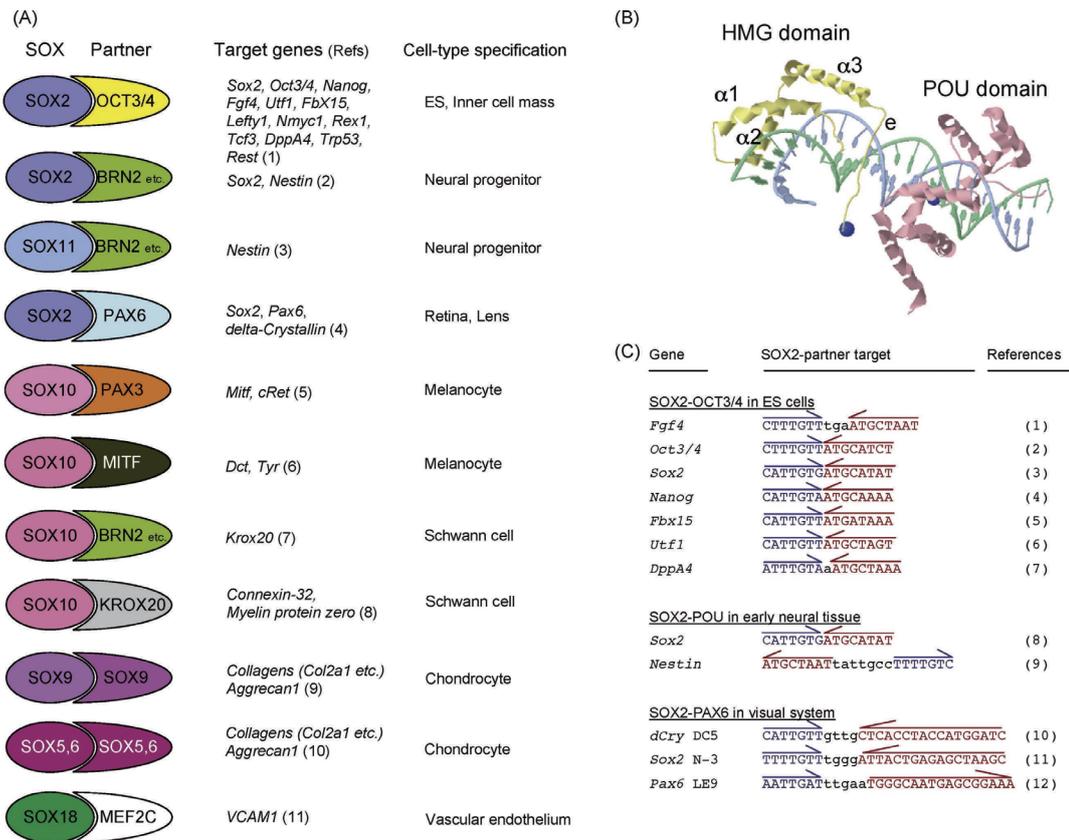


図4 Sox-partner code と細胞の分化状態の関係。(B)は、Sox2 と Oct3/4 が複合体を作る contact 部位の、3次元構造の模式図。Kondoh and Kamachi, (2010) SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(3):391-399より転載。

挿話4：原理の普遍性を目指そう

2001年に、会長が竹市雅俊氏、プログラム委員長が私という主催チームで、国際発生生物学会を京都で開催した。挿入写真は、その Banquet で、Walter Gehring を囲んでいるところである。ショウジョウバエの研究者である Gehring はその前年に「生物の発生機構における種間共通性の発見」によって京都賞を受賞していた。そしてショウジョウバエの Pax6 が当時の彼の研究テーマでもあった。この時の Gehring と私の間の議論で、Sox2 と Pax6 のペアはショウジョウバエと同様に働いているに違いないからそれを試してみようということになり、その共同研究は数年後に実を結んだ。Sox2 と Pax6 の相互作用は、ショウジョウバエの目の発生にも基礎機構として働いていることが証明された。それをさらに敷衍すると、原始的な動物から高等動物に至るまで、Sox2 と Pax6 の相互作用が視覚機能の発生を支配しており、私が手掛かりとしたニワトリδ-クリスタリンの発見は Sox2-Pax6 による数多の視覚系の発生の制御の一端に過ぎない——それ自体私が最初

から想定していた結論である。個々の研究は、ある特定の小さな現象を対象とせざるをえないし、その小さな現象を深く解析しなければなぜその現象が起きるのかを明らかにすることもできない。しかし、その解析を各論で終わらせるのか、その解析結果からある一般性を持った原理を引き出そうとするのかで、研究の方向も価値も大きく違ってくる。



9. 遺伝子調節タンパク質の遺伝子の調節が、発生プロセスの核心に迫る

Sox-partner model によって、発生過程で様々な組織が生み出される原理が示されたとしても、それだけでは胚発生を説明したり理解したりすることにはならない。様々な組織が混じった塊ができて、それは命を持った胚や個体ではない。遺伝子調節タンパク質が胚の細胞の空間配置のなかで、特定のタイミングで、そして胚の中の特定の領域だけでつくられることによって初めて、様々な組織や臓器が機能的なつながりを持った個体が生まれる。その仕組みを明らかにしなければならない。

この考えから、Sox2 遺伝子を調節する DNA 領域 (エンハンサー) を、ゲノム上の広い領域にわたって探した。まず、内川昌則助教とともに多数のエンハンサーを迅速に検出するとともに、その特異性 (どのタイミングで、どの細胞種・組織で働くか)

を明らかにする新しい方法を開発したうえでのことである。Sox2 調節タンパク質を持つ (つまり Sox2 遺伝子を働かせている) 組織の最も主要なものは中枢神経系 (脳、脊髄) であり、それに水晶体、内耳、嗅覚上皮などの感覚器官の組織が続く。Sox2 という一つの遺伝子だけでも、その働き ON/OFF を調節する異なったエンハンサーが数 10 もあり、神経系での ON/OFF を調節するエンハンサーの中にも、脳全体、脳の一部、脊髄の一部、という風に、沢山の守備範囲が異なるエンハンサーあることがわかった¹⁹⁾。2003 年のことである。

このようにして見出されたそれぞれのエンハンサーに、どのような調節タンパク質が働くのかを解析するだけでなく、次の新しいアプローチを採った。Sox2 遺伝子のエンハンサーの DNA 配列を一つずつ欠損させた、エンハンサーのノックアウトマウスを作製した。

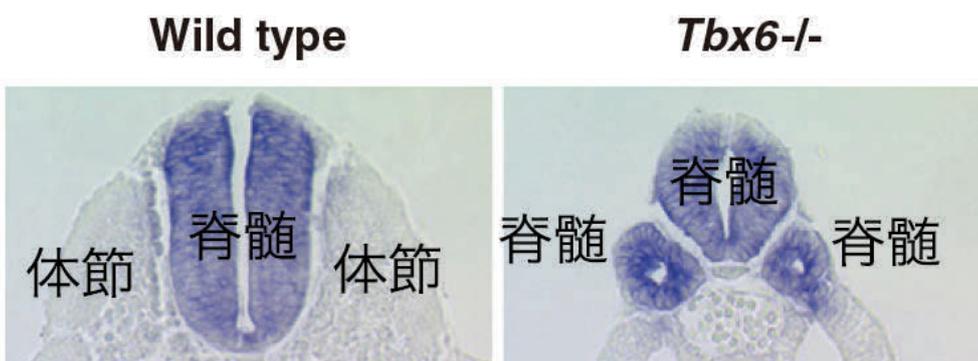


図5 Sox2 遺伝子の調節がうまくいかないと、ある場合(Tbx6 調節タンパク質を持たないマウス)では、筋肉や骨をつくる「体節」ができずに、代わりに余分な一对の脊髄ができる。神経系と筋肉や骨が、共通の前駆体から発生することの反映である。Takemoto et al. (2011). Nature. 470:394-398より。

遺伝子の発現調節から発生プロセスを解明しようとして始めた私の研究は、この頃から、古典的な発生生物学の教科書的な枠組みを大きく修正せざるを得ない状況になっていった。研究が胚発生プロセスの核心に至ったということである。例をあげると、古典的なモデルでは「中枢神経系全体が生まれたのちに脳と脊髄にわかれる」とされていたのに対して、実際には脳と脊髄は最初から異なったプロセスで発生する²⁰⁾。古典的なモデルでは「胚組織はまず 3 胚葉に分かれたのちに外胚葉から表皮と神経組織ができ、中胚葉から骨や筋肉が生まれる」とされていたのに対して、脊髄は、実は骨や筋肉と共通の前駆体細胞 (Neuro-mesodermal progenitor) から発生するのであり、

3 胚葉説を否定している。2 番目の結論を発表した竹本龍也助教 (現徳島大学教授) を筆頭著者とする論文は、2011 年に Nature 誌に掲載された²¹⁾。(図 5)

4 年前に京都産業大学総合生命科学部に着任したのを機に、遺伝子調節タンパク質の働きの研究の延長上にある、生々しい胚発生の問題に直接関わる研究を進展させている。卒業研究の学生たちや大学院生たちとの日々の研究は活気にあふれている。

挿話5：転身のすすめ

大学院まではトレーニングの期間である。特に大学院では研究に没頭する体験をしなければならない。しかし、たまたま出会った大学院までの研究テーマを一生引きずる必要はないし、ましてや大学院で研究をしたからと言って、いわゆる研究者になる必要も必然性もない。人生の道はもっと広く考えて、自己の能力を最大限に活用する道を見出すのが良い。このことは「科学者になる方法」という本の中で語った。John Gurdon の許で研究し、現在は研究倫理の分野で活躍している加藤和人氏についてはすでに紹介したが、好例である。私

が動物の発生の研究を指導した学生の幾人には、「君は植物を使った研究の方が向いているからその方向に変わった方が良い」と積極的に転身を勧めた。その方々は皆、第一線の植物の研究者として名をあげている。大学院で優秀な研究をして、現在は企業マンとして世界を飛び回っている人もいる。

大切なことは、「科学——それはなぜ起きるのかという深い問いかけ」を経験したことがあるかどうかである。科学の経験は目に見えない武器である。その経験はどの業界に入っても底力になる。

10. 奥深い遺伝子調節の問題：相互依存する2つの機構の絡み合い

Sox-partner code model を支持する有力な証拠の一つは、マウス ES 細胞を成立させる機構であった。着床前胚に相当する多能性細胞であるマウスの ES 細胞の中には、Sox2、Oct3/4 という2つの遺伝子調節タンパク質がふんだんに作られているだけでなく、これらの調節タンパク質が複合体を作って、ゲノム中の数万箇所に散在するエンハンサーに結合して、ES 細胞の成立に必要な沢山の遺伝子を働かせている。山中伸弥教授たちは、マウス ES 細胞に似た iPS 細胞を成立させるためには Sox2、Oct3/4、Klf4、Myc の4種の遺伝子を強制発現させる必要があることを示したが、その中に Sox2、Oct3/4 が含まれていたのは必然だといえる。

着床後胚に相当する多能性細胞である、ヒトの ES 細胞やマウスのエピプラスト幹細胞でも、Sox2、Oct3/4 がふんだんに作られているので、これらの細胞でも、Sox2 と Oct3/4 は、ES 細胞におけるのと同様に複合体を作り、同様の遺伝子群を働かせていると（実証することなく）考えられてきた。

私は、マウスのエピプラスト幹細胞で働く遺伝子調節タンパク質がどのようにして、そしてどのような遺伝子を調節しているのかを明らかにする目的で、ChIP-seq 法（クロマチン免疫沈降—配列決定法）という、次世代シーケンサーを用いた方法で、Sox2、Oct3/4 を含む5種類の遺伝子調節タンパク質が、ゲノム上のどの位置に結合しているのかを網羅的に調べた。2つの調節タンパク質が複合体を作っていれば、それらがゲノム上のほとんど同じ位置に結合しているという結果が出る。昨年（2017年）に発表したこの研究は、予想外の結論をもたらした。Sox2 と Oct3/4 が複合体を作り、主要な遺伝子調節機能を果たしているのは、マウスの ES 細胞（つまり着床前胚に相当）に固有のことであって、着床後胚に相当するヒトの ES 細胞やマウスのエピプラスト幹細胞では、Zic2-Otx2 調節タンパク質ペアが作る複合体が主導権を握り、Sox2-Oct3/4 ペアはほとんど複合体を作っていない²¹⁾。この研究結果は、ヒトの ES 細胞に近いヒトの iPS 細胞を樹立するためには、マウス iPS 細胞用の4つの遺伝子の組み合わせは最善ではないだろうといった問題提起をもしている。

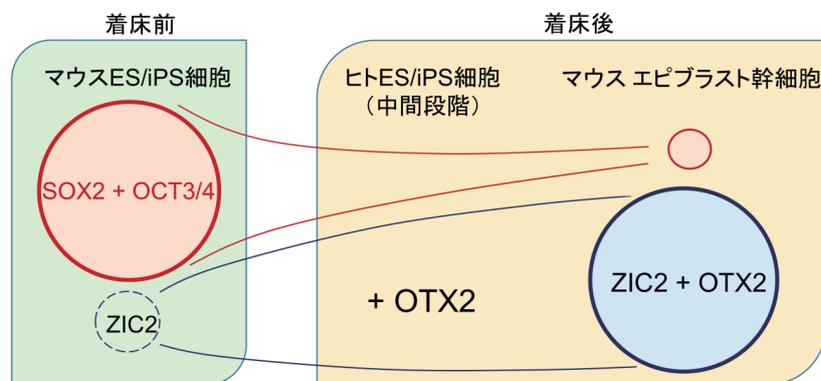


図6 着床前の状態を反映した多能性幹細胞(ES細胞)では、遺伝子調節タンパク質 Sox2 と Oct3/4 が複合体を作って主要な調節機能を果たしているが、着床後胚の状態を反映した多能性幹細胞では、Zic2 と Otx2 の複合体が取って代わる。

一般的な、そしてより重要な問題は、「遺伝子調節タンパク質が発現されているからといって、それらが直ちに複合体ペアをつくるわけではない——それはなぜか？」といである。この研究からはすでにその答えとして、遺伝子調節タンパク質と、ヒストンのメチル化・アセチル化や、DNAのC塩基のメチル化によるエピジェネティックな効果（塩基配列情報以外の効果）との相互作用が示唆されている。遺伝子調節タンパク質のゲノムDNAへの結合とエピジェネティック効果をもたらすさまざまな修飾反応は、相互依存的な関係にあり、特にZic2調節タンパク質にはその相互依存の仲立ちをする機能が期待されている。

この発見によって、私は発生のプロセスを進め

る遺伝子調節という研究の出発点に舞い戻った気がしている。この研究を始めた1979年に私は、最初に付いた大学院生であった阿形清和氏（現学習院大学教授）と、細胞の分化状態とDNAのC塩基のメチル化のパターンとの関連を調べていた。

「遺伝子調節タンパク質の作用だけではなく、エピジェネティックな効果もまた遺伝子調節の主役である」という可能性を、あわせて検討していたのである。40年前の研究ツールでは明快な解答を得ることができなかったが、今日に至って2つの機構の相互依存が姿を現した。私が京都産業大学の研究活動のなかで、その相互依存のプロセスを具体的に示すことができれば、私が若い頃に志した峰に到達したことになるのかもしれない。

挿話6：学会発表は国際「交易」の場

私の国際的な人脈は、ほとんどが学会の場で作られていった。Robin Lovell-Badge, Peter KoopmanなどSoxタンパク質に関わる多くの研究者との交流は、Mouse Molecular Geneticsなどの国際学会での出会いから始まった。もう一つの例をあげよう。1997年に米国Salt Lake City郊外で開かれた国際発生活物学会では、遺伝子調節タンパク質 δ EF1に関するポスターを出していたが、同じ会場の随分離れた場所に、ベルギーのグループが、非常によく似た遺伝子調節タンパク質にSip1という名前をつけてポスター発表をしていた。すぐにそのグループのbossであるLeuven大学のDanny Huylebroeckを見つけ出して、昼食をとりながら3時間ほど議論をたたかわせた。その結果、この2つの遺伝子調節タンパク質は近縁であるが——従って同様な機能を持つことが期待されるが——異なったものであり、したがってセットとして解析することに意味があるので、共同研究をしようということになった。（現在、 δ EF1とSip1はZeb1, Zeb2と呼ばれることが多い）。Huylebroeckの研究室から

研究員が大阪大学の私の研究室に2年ほど滞在してSip1遺伝子のノックアウトマウスを作製し、Sip1タンパク質が細胞運動に関わる遺伝子を調節していることを示す最初の美しいdataを示し、そして日本女性を妻として帰国した。一方私は、Leuven大学で2日間の連続講義をするなど、かなり頻繁に相互訪問して強い連携をもった。20年を経た今もHuylebroeckとの親交は続いている。挿入写真は2017年にSingaporeで開催された国際発生活物学会でも

のである。

国内学会も同じ役割を果たす。2009年のことだが、それまで面識のなかったEdinburgh大のVal Wilsonからmailと論文の未発表原稿が届いた。その少し前の日本発生活物学会（発表は英語が原則）で私たちがポスターを出していた「体幹部では神経系と筋肉や骨が同じ起源を持つ」という発表を英国からの来訪者が見て、Val Wilsonに「君の研究と同じ結論に別のアプローチで到達した発表があった」と伝えたとするのである。彼女の論文は間もなくDevelopmental Cellに、そして私たちの論文は2011年にNatureに発表されたが、私たちには「同志」としての思いがあり、交流はつづいている。

学会は、いわば国際見本市のようなものである。自社製品の最新モデルを展示しながら積極的にbuyersを探す、あるいは連携先を探して共同で新製品を開発する契機をつかむ——そのような場である。展示するだけでは価値に乏しい。取引先を探すのに似た積極的な姿勢で、学会を活用すると良いというのが私の経験である。



11. 研究者の社会的な使命

私は研究者という職業に就く力があるのかどうか、最初は全く自信がなかった。何とか研究者としてやっていけるかもしれないと感じたのは大学院で研究を始めて以降のことである。このことは「科学者になる方法」という本の中でも述べている²²⁾。

研究を職とするという幸いに恵まれた以上は、研究者としての社会的な使命を果たさなければならない。私にとっての社会的な使命とは、あえて市井に出て行くということではなく、研究をするものにしかできない活動によって、私が属する社会の文化力を底上げすることである。研究の現場を通しての人材育成や、研究者コミュニティの活性化に日々つとめたい。Peter Koopman と私が立ち上げた International Sox Research Conference もその一環である。最初の世界の研究者への呼びかけでは“Grass-rooted meeting”という表現を使った。

私は、大阪大学細胞生体工学センターのセンター長を4年間務めたが、その期間のうち3年間は、研究組織としての同センターを廃止して、独立研究科「生命機能研究科」を立ち上げることに精力を注いだ。6研究室からなる細胞生体工学センターの研究レベルは十分に突出していたが、次の時代を俯瞰すれば、もっと多様な学流が入り混じった研究組織を作るべきであるし、何よりもその研究の活力の中に多くの大学院生を招き入れて、次世代の人材を育成すべきである。岸本忠三大阪大学総長の同意と後押しを得て、また柳田敏雄教授という分野融合の旗頭を得て、理系全部局と定員捻出の交渉をし、また文部科学省には10回近く足を運んで、そして新しい作業にはつきものの逆風に抗いながら、24研究室からなる生命機能研究科を2002年に発足させた。大阪大学というコミュニティを通じての社会貢献が出来たと思っている。

1998年から、9年間にわたって、JST(科学技術振興機構)によるERATO(戦略的創造研究推進事業)と後継の発展事業のプロジェクトリーダーを務めた。自身の研究室のプロジェクトを拡大して事業を実施されるリーダーが多い中であって、私は別の道を選んだ。私の守備範囲の中で、日本の研究には大きく欠けている研究活動に、私のERATOプロジェクトを投資したいと考えたのである。1つのモデル動物の、発生過程に関わる突然変異体を徹底的に集めて解析することによって、未知であった遺伝子やタンパク質の機能、さらには多様な調節機構を一挙に明らかにすることができる。日本の生物学研究には、大規模の変異体をスクリーニングする研究を実施するという経験が欠けていた。

当時始まろうとしていたメダカ全ゲノム配列決定計画も、多数の変異体が存在して初めて、その価値が生まれる。そこで日本産の優れた実験動物であるメダカを使って大規模変異体スクリーニングを実施した。大阪大学を離れて、鴨川沿いの川端一条下ルにある「近畿地方発明センター」の地下室を改造して6000個の水槽を擁する研究室をつくった。この研究で、多くの新規な変異体が単離され解析されて、多方面の研究に活用された。この研究は日本のメダカ研究を活性化し、そして国際的な注目を集めた。私自身の研究と深く関わるころでは、Yap 遺伝子調節タンパク質のメダカ変異体の研究が、2015年にNatureに掲載された²³⁾。

私が京都産業大学に着任して、この大学の学生が持つ潜在的な能力に感動したことを『実験医学』への寄稿文の中で語ったことがある³⁾。かつて合唱指揮者 吉村信良氏は、京産大グリークラブを率いて、全日本合唱コンクールで9年連続金賞一位となった。学生たちの素晴らしい潜在力を引き出したの偉業であり、私にとっての模範である。私も、本学での研究活動の現場で、学生の潜在力を引き出せるようなコーチでありたいと願っている。

引用文献

- 1) C.H.Waddington (1961) “The nature of life” George Allen & Unwin Limited.
- 2) C.H. ウォディントン (白上謙一、碓井益雄訳) (1964) 「生命の本質」岩波書店
- 3) 近藤寿人 (2015) 「科学の原典をひも解き、知の体系を築く」『実験医学』33 (18):2976-2983.
- 4) Kondoh H, Yanagida M. (1975) Structure of straight flagellar filaments from a mutant of *Escherichia coli*. **J Mol Biol.** 96(4):641-652.
- 5) Kondoh H, Ozeki H. (1976) Deletion and amber mutants of *fla* loci in *Escherichia coli* K-12. **Genetics** 84(3):403-421.
- 6) Kondoh H, Ball CB, Adler J. (1979) Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein for the ribose and galactose chemoreceptors of *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 76(1):260-264.
- 7) Kondoh H, Nakamura H. (2017) Obituary: Tokindo S. Okada (1927-2017). **Development** 144(10):1737-1739. doi: 10.1242/dev.153270.
- 8) Kondoh H, Yasuda K, Okada TS. (1983) Tissue-specific expression of a cloned chick δ -crystallin gene in mouse cells. **Nature** 301(5899):440-442.

- 9) Hayashi S, Goto K, Kondoh H, et al. (1987) Lens-specific enhancer in the third intron regulates expression of the chicken δ 1-crystallin gene. **Genes Dev.** 1(8):818-828.
- 10) Takahashi Y, Okada TS, Kondoh H, et al. (1988) Embryonic stem cell-mediated transfer and correct regulation of the chicken δ -crystallin gene in developing mouse embryos. **Development** 102(2):259-269.
- 11) Sawai S, Shimono A, Kondoh H, et al. (1991) Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes. **New Biol.** 3(9):861-869.
- 12) Tomotsune D, Kondoh H, Takahashi N, et al. (1993) A mouse homologue of the Drosophila tumour-suppressor gene *l(2)gl* controlled by Hox-C8 in vivo. **Nature** 365(6441):69-72.
- 13) Kamachi Y, Lovell-Badge R, Kondoh H et al. (1995) Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. **EMBO J.** 14(14):3510-3519.
- 14) Kondoh H, Lovell-Badge R (eds) (2016) **"Sox2: Biology and role in development and disease."** Academic Press/Elsevier.
- 15) Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H et al. (2001) Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. **Genes Dev.** 15(10):1272-1286.
- 16) Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. (2000) Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. **Trends Genet.** 16(4):182-187.
- 17) Kamachi Y, Kondoh H. (2013) Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. **Development** 140(20):4129-4144. doi: 10.1242/dev.091793.
- 18) Uchikawa M, Ishida Y, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. (2003) Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. **Dev Cell.** 4(4):509-519.
- 19) Iwafuchi-Doi M, Tesar PJ, Kondoh H., et al. (2012) Transcriptional regulatory networks in epiblast cells and during anterior neural plate development as modeled in epiblast stem cells. **Development** 139(21):3926-3937. doi: 10.1242/dev.085936.
- 20) Takemoto T, Papaioannou VE, Kondoh H, et al. (2011) Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. **Nature** 470(7334):394-398. doi: 10.1038/nature09729.
- 21) Matsuda K, Shigenobu S, Kondoh H, et al. (2017) ChIP-seq analysis of genomic binding regions of five major transcription factors highlights a central role for ZIC2 in the mouse epiblast stem cell gene regulatory network. **Development** 144(11):1948-1958. doi: 10.1242/dev.143479.
- 22) 科学技術振興機構プレスルーム編 (2005) 「**科学者になる方法**」 東京書籍
- 23) Porazinski S, Kondoh H, Furutani-Seiki M, et al. (2015) YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. **Nature** 521(7551):217-221. doi: 10.1038/nature14215.

若手座談会「タンパク質研究の魅力」

平成30年5月8日(火)

16号館2階 会議室

永田研：森戸大介（主任研究員）
 上垣日育（D2、学振特別研究員）
 堤智香（D1、学振特別研究員）
 遠藤研：河野慎（研究助教）
 阪上春花（研究員）

千葉研：藤原圭吾（研究助教）
 近藤研：寺元万智子（研究助教）
 飯田英明（研究員）
 津下研：吉田徹（研究助教）
 （平成30年5月8日現在）

森戸 去年、教授たちが座談会をされました。「タンパク質の魅力、研究の魅力、そして研究所の使命」というタイトルでやっておられます。今年は若手でやってくださいということで、我々にお鉢が回ってきました。タイトルを「タンパク質研究の魅力」ということにしています。このコンセプトに一応沿って話してください。



まず、自己紹介から。永田研究室の森戸大介です。よろしくお願ひします。僕は10年前にミスチリンという遺伝子をクローニングして、これはモヤモヤ病という病気の原因遺伝子なんですけども、このミスチリンの生理機能が何で、この機能にどういう異常が起こるとモヤモヤ病という血管の病気になるのかを10年間研究しています。

河野 遠藤研の河野慎です。お願ひします。

遠藤研に移ったのが10年前です。ミトコンドリアのタンパク質の構造解析を今までやってきています。

阪上 同じく遠藤研究室の阪上春花です。よろしくお願ひします。遠藤研に研究員として入って3年目で、学生時代は兵庫県立大学の理学部で細胞内のタンパク質の局在を解析していました。遠藤研究室に入ってから、ミトコンドリア外膜にあるトランスロケーターである TOM 複合体によるミトコンドリアタンパク質輸送の解析をしています。

寺元 私は近藤研の寺元万智子と申します。よろしくお願ひします。私は、学部生のときは水産学部でウナギの研究をしていました。その後、ラボを移動して、プラナリアの研究をしていました。そこで学位を取って、今いる近藤先生の研究室に来たという感じです。今、2年たって、ことしの4月で3年目になります。

近藤研では、気管と食道の発生がSOX2という転写因子のタ

ンパク質によって、どのように制御されているのかという事を、マウスを使って調べています。

飯田 近藤研究室の飯田英明です。今、研究員の2年目になるんですけども、学部からずっと京都産業大学にいます。学部的时候は鳥インフルエンザ研究センター、大学院では発生生物学の八杉貞雄先生のもとで、八杉先生が退職されたあとは、ドクターで近藤先生のもとで研究してきました。今はSOX2のエンハンサーの研究をやっております。よろしくお願ひします。

森戸 今、近藤研はマウスとチキンを扱っているということですか。

飯田 そうですね。

森戸 これって併用できるものなんですか。随分違うように思えるけど、初期発生は一緒なのかな。

飯田 そうですね。初期発生はすごい近くて。

森戸 とにかくSOX2が絡めば何でもやる。

飯田 そういう感じですね。

上垣 きょうのオーガナイザーの森戸さんと同じく、永田研究室の上垣日育と申します。よろしくお願ひします。僕は、永田研の潮田亮先生が発見した小胞体内唯一の還元酵素ERdj5の還元力の源を今、研究しています。これまで小胞体については、ずっと酸化的フォールディングを中心に研究されてきたんですけど、潮田先生の発見以来、還元酵素を中心におもしろみが増えてきて、それがどうやって還元されるのかということをはたすらやっているという感じです。

永田研究室には学部生の3回生のときからずっと所属していて、飯田さんと同じく京産大でひたすら研究をし続けているという感じです。それはすごいいいことなんですけど、研究室自体が楽しくて、それはかなりよかったです。

堤 同じく永田研究室のD1の堤智香です。よろしくお願ひします。私は京都産業大学の3回生の夏ぐらいに永田研に入らせてもらって、修士を去年取らせていただいて、そのままドクターも永田研究室で研究をしようという感じです。小胞体内腔でのレドックスについて研究しています。最近、還元ネットワークというのに注目が集まってきていて、その還元力がどこからどのように導入されてくるのかという経路を探しているところです。

吉田 津下研究室の吉田徹といひます。よろしくお願ひします。僕は東京工業大学で学部生からドクターまで研究を行って

て、今は津下研究室で酵素が基質タンパク質をどうやって認識するのかということを中心に研究しています。今はプロテインデータバンクにすごく多くの構造が登録されていますけど、僕が知っている限り、酵素と基質タンパク質の複合体は指で数えるぐらいしか実は登録されていない、ちょっとニッチな分野かなと思っているので、だからこそおもしろいなとは思っています。今後どうやって捉まえて、どういうふうに反応するのかという、やや化学寄りなことをやれたらいいなと思って研究しています。

藤原 千葉研究室の藤原圭吾です。よろしくお願いします。私は、学部からドクターまで京大の農学部にいました。学位を取ったあと、2014年の秋からずっと千葉研で研究をやっています。今、やっているのは、千葉先生が見つけた枯草菌で翻訳アレストを起こすような MifM というタンパク質です。翻訳途上で自身の合成をとめるようなペプチドの研究をしています。最近では翻訳アレストを通して新生ポリペプチド差が合成途上でどのようなダイナミクスを見せるのかというのを調べようとしています。

森戸 テーマで言うと、構造の人が2人ぐらいと、それから大きく言って酵素反応と細胞ぐらいがこの5人ぐらいですか、それからタンパク質と個体までいっている人たちが2人という感じ。材料で言うと、河野さんは酵母、阪上さんも酵母、マウスでニワトリ、我々は哺乳類で、それから吉田さんは生物種ということではないかもしれないですけど。

吉田 生物種はあってもバクテリアが多いですね。

森戸 そして枯草菌。かなりバリエーションに富んだメンバーになりましたね。どうもありがとうございました。

□ 研究の世界に入った「きっかけ」は？ □

森戸 これでお互いを認識できたと思うので、早速この座談会の内容に入っていきたいと思います。それで、最初のトピックは、実験、それから研究のおもしろさ。それぞれ研究を選んで、学生の人たちはまだこれから選択があるんですけども、研究を選んだというモチベーションがあると思うので、それについて話してみたいと思います。

話の口切りは河野さんからお願いしようと思うんですけど、河野さんが実験研究の何がおもしろいと思っていて、どうしてこの道を選んだかということから聞かせていただけますか。

河野 最初、X線の仕事は余りやっていなくて、X線をやっているラボにはいたけど、違うことをやっていたんです。たまたま精製したタンパクで、おまえ構造をやってみたらどうやと言われて始めたときに、今まで精製したタンパクというのは SDS-PAGE でしか見たことなく、何やこれと思っていたけど、実際構造を見てみるとこういうものなんだというのがすごい頭の中にひらめくというか、実態がわかった瞬間に、何かタ

ンパク質というのがおもしろいというふうに。生物ってあんまり捉えどころがないなと思っていたんです。柔らかくて実態がないような。

森戸 ファジーな感じ。

河野 けど、実際構造解析してみると、やっぱりタンパク質も原子できていて、物理的な法則に従う非常にソリッドなものなんだというのがわかって、それだったらきっと理屈みたいなのが通るのじゃないか。温めたら分解するとか、そういう単純な原理の積み重ねによって生き物もできているんだというのがそのときに瞬間的にひらめいたものがあったって、それからそういうのをどんどん追求していきたいと思って、今までやってきています。

森戸 それはご自身で取られた構造を見たときに。

河野 そうですね。自分でやってみた瞬間に、今までよくわからなかったものというのが実はこういうものだったというのを自分の手で明らかにできたというのが大きかったんでしょね。

森戸 教科書に載っている構造ではなくて。

河野 はい。

森戸 それはタイミングで言うと、いつぐらいのことなんですか。

河野 M1 ぐらいのときですね。

森戸 結構早いんですね。M1で構造が取れて、これやと思った。それは幸運な滑り出しですね、なかなかそんなにうまくはいかないと思うんですけど。そのときにそのまま研究を仕事にしてしまおうかと思ったわけですか。

河野 その辺はちょっと正直悩んだんですけど、あのとき就職が激しかったというのもありました。

森戸 我々氷河期の時代ですからね。

河野 やっぱりちょうどそのタンパク質と基質複合体とかうまく取れるようになってきて、こういうのをやっていったほうがおもしろいんじゃないかなと思うようになっていたんですね。M2の春ぐらいに、この研究の世界に飛び込んでみてもいいかなと思って、ドクターコースに進学しようと思った。

森戸 何か生物が非常にどろどろとしたファジーなものであって、それがきちっと分子とか原子の言葉で原理原則があって切り分けられるというところに惹かれるなというのは、僕も割と同じところがあって。ただ、僕はそれを自分のデータとしてではなくて、最初、本で読んだときに、分子生物学の世界ってこうなのだと思って、僕の場合は自分のデータというものはなかなか出なくて、自分で実感するのは非常に遅くなったんですけども、でも根っこのところでは割とこういうどろどろとしたものを原理原則で切り分けられるなというところに惹かれて始めたみたいなのところがありますね。

ほかの皆さんはどうでしょうね。自分のモチベーションを語ってみようという方は。

寺元 私は、高校生のときに理科の実験で、多分皆さんもやっているんじゃないかと思うんですが、タマネギの皮で細胞の形



をのぞいたことがあって、そのときにこんなにきれいに並んでいるんだというのがすごい衝撃で、資料集なんかでは見たことはあったんですけど、なかなか自分でサンプルをつくって、実際、顕微鏡で好きなところに動いて見るというのは楽しいなと思って、そういうのもあって、生物系のほうに行こうかなと思ってやっていました。さっき河野さんがおっしゃったように、自分で見れるというのは感動が違うなと思いました。教科書なんかではニワトリとかだと、例えば普通にこれですよというのが載っているんですけども、実際にそれを自分で卵の殻をあけてのぞいてみると、感動が段違いにあって、そういうのもあって、自分で見れるというのが楽しくて、それで修士に行きました。修士から博士に行くときも、もうちょっとやり足りないかなみたいな、大して深く悩まず進学してしまって、ちょっと失敗したなと思っているんです。(笑)

今でも自分で見れるというのはすごく楽しくて、染色すると、例えば長ければ4日とか5日とかかかっちゃうんですけど、きょうは楽しい発色の日だなと思って、週末ラボに来れる、いいなと楽しんでやっています。染まったら楽しいんです。真っ黒だったらハアとなるという感じですかね。

森戸 今、タマネギの細胞がちゃんと並んでいると言われていて、最初に細胞が並んでいるのを見て感動した人は、その後も要するに細胞の並びをずっとやっているわけですね。

寺元 細胞が動いていっているんじゃないかと期待してやっていたりとか、そうですね。普通の生活だと、そういうところまで見れなくて、世界で一番最初に私が見れるんだと思うと、すごく楽しいと思います。

森戸 一番最初というのは喜びですよ。

藤原 自分で何か具体的に見るというのは僕もかなり共通しているところなんです。僕ももともと農学部だったんですけども、本当に農学らしい農学、例えば作物学とか、育種学とか、そういうのが集まっている学部でした。そういう世界ではかなり応用的なので、どういう遺伝子があれば作物がどういふふうになるとか、そういうのが話として教えられるんですけど、僕はそこで遺伝子だけで話が進むのが、もっと遺伝子の産物であるタンパク質について知りたいと思ったのが最初のき

かけで、そこから実際に自分で、河野さんぐらいのレベルじゃないですけど、僕はSDS-PAGEだけでちょっと感動しました。実際に自分でタンパク質を見る。それでこういう研究の世界とか、そういうのがおもしろいなと思ってというのはあります。

森戸 農学部は全体として遺伝学が優勢なんですかね。

藤原 そうだと思います。

河野 農学部ってすごい学科が多くて、九大もそうだったんですけど、10個ぐらいあるのかな、いろんなことをやっている人がいて、これっばいみたいなのがなかなか言いにくいところでもあるんですよ。

森戸 確かに農業経済もあれば、水産もあればみたいな。

河野 ユンボを動かすところもありますしね。

藤原 僕がいた学科もそうですね。植物もあれば、動物もあれば、水産もありますし、すごい巨大な学部で、いろんなことをやっている人がいるんですけど、やっぱり遺伝学というのは、

森戸 強いでしょうね。その中でタンパク質に来た、そのままタンパク質をやっている。

藤原 そうですね。タンパク質のバイオジェネシスというところずっとやっています。

森戸 どうですか、上垣君。

上垣 結構恥ずかしいんですけど、実家が林業をやっていて、おじいちゃんと一緒に山に上ったりすると、自然とかを知りたいなというのが強いのが昔からあって、できればそういう研究者になりたいなというふうな思いで生きていて……。何でかという、たまに行くときどき森林の環境というのは変わっていくというのがわかるんですね。それで環境を保全したいなというのがもともとのきっかけだったんですよ。ところが、転がり込んだのはタンパク質動態研なんですけど。もともと中学・高校とスポーツをずっとやっていて、スポーツのほうが好きになってしまって、そっちのほうをやっていたんですけど、大学で京産大に入ってから、当時はタンパク質動態研究所はまだできてなかったんですけど、永田先生とか、今の七人の侍の伊藤先生だったりとか、吉田先生とかがいてくれて、この人たちの講義を聞いて、タンパク質の分子メカニズムというのがすごいおもしろくて、これはやるべきだなと思って、ちょっと研究の道に入りたいというのがきっかけです。

森戸 上垣君はちょっとおもしろいエピソードがあって、確かに最初は林業をやりたいと思ってたんですね。ここでも最初は生命資源科学科に……。

上垣 「資源」に入ろうとしたんです。総合生命科学部は、生命システム学科、生命資源学科、動物生命医科学科と3つに分かれているんですけど、指定校推薦でどれでも選べるとはじめは言われていました。僕は環境を保全したいから資源をやろうと思ってそこに行ったんですけど、急に、面接の2日前ぐらいに連絡が来て、夕方6時ぐらいに親と一緒に呼び出しをくらって、「実は資源は推薦が来ていない、動物も来ていない、システムしか来ていない。あと2時間で決めてくれ。」と。それで、行くしかないやろうと。運がよくて、システムには永田先生と

かおもしろい先生がいたんですが、僕は全然そのときは知らなかったんです。全然考えていなかったの。それは本当に幸運でした。

森戸 たまたま入ってきた人もいるということですね。でも、実験は楽しんでやっていますよね。

上垣 実験は楽しいですね。さっき言っていたとおり、染色する日とかはすごい楽しいですね。ウエスタンプロットティングで検出する日とかは楽しくて、早く見たいなという気持ちは尽きないですね。

河野 きっかけとしては、先生の講義がおもしろかったということですか。

上垣 そうですね。あともう一つは、何でこんなおもしろそうにしゃべっているのやろうという疑問ですね。

河野 やっている人が楽しそう。

上垣 永田先生とかは、(タンパク質が)トランスロコンに入るのがおもしろいと言っているんですけど、何がおもしろいのかなと。それがすごい印象的でしたね。

森戸 ほかの人はどうですか。

阪上 私はそもそもこういう理系の世界に興味を持ったのが高校生のときで、高校で出会った化学の先生が楽しそうに授業をされていたんですね。何がそんなに楽しいんだろうなと思って、理系の世界に興味を持って、理学部に入学しました。大学3年生のときにオープンラボで各研究室を見て回るというのをやっていて、一通り見ていったんですけど、結局何をやっているのかよくわからなくて、唯一楽しそうにやっているというか、先生自身が楽しそうに研究をやっているラボが1つありました。そこで聞いた説明で、細胞の中のタンパク質が新しくできたときに、どうやって目的地に運ばれていくかという話をされていて、実はそのタンパク質自身に情報が書き込まれていて、その情報をもとに、ミトコンドリアや小胞体に行くという話を聞いて、それはおもしろそうだなと思って、それでその研究室に入ることを決めました。配属された研究室で私は小胞体に行かないというタンパク質を解析していました。何で小胞体に行かないのかというメカニズムがよくわかっていなくて、私が入ったときには、何かタンパク質が作用してそうだとするところまで

はわかっていたんですけど、その正体がわかっていなかったんです。それだったらそのタンパク質を見つけてやろうという気概で入って、学部4年生からD3までずっとそのテーマをやっていたんですけど、どうやってタンパク質を見つけるかというその方法もわからないし、誰も教えてくれなかったんです。なので、自分で論文をいろいろあさって、いろいろトライ・アンド・エラーを繰り返して、失敗ばかりだったんですけど、運よくD3のときにそのタンパク質を見つけることができました。一つの研究を続けて結果を出してまとめるという一連のプロセスを研究できたということがすごくおもしろかったので、もうちょっと続けてみようかなと思ってポストクになりました。

森戸 研究の楽しさとしては、今、皆さんおっしゃったように、直接見ることができる、それから自分が世界で初めて見ることができる、そういう楽しさがありますよね。それから今、阪上さんが言ったように、研究って割に難しい問題を解いていくので、それを最初から最後までやっていくプロセスの楽しさがあるということもある。それから研究に入っていく道の入りとしては、割に教授が楽しそうにやっているところに引き寄せられる傾向があって、ここにいる人たちのポストに当たる人たちはみんな割に楽しそうにやっている人たちだと思うんですね。それが一つこの研究所のいいところかなと思います。

□ タンパク質動態研にきた「きっかけ」は？ □

森戸 次の話題にいきましょうか。それで研究の楽しさみたいなことが一通り出たと思うんですけども、さらにもうちょっと踏み込んで、実際に数ある研究機関の中でもこの研究機関、タンパク質動態研に何かの魅力があってここに入ってきた、皆さんそれぞれそういう選択があって入ってきていると思うんですね。この大学は8年前に総合生命科学部ができて、それが母体となって2年前にタンパク質動態研というのができた。そこへ言わば途中から入ってきた人たちがいて、そういう人たちがどういうモチベーションを持って、タンパク質動態研のどういう部分を評価して入ってきたのかということ聞いてみたいと思います。

これは、まだ話していなかった吉田さんから聞いてもいいですか。

吉田 僕が来たのは5年前なので、そのときにはまだタンパク質動態研はできていなかったんですね。ただ、もともと学位を取るまでの間に津下先生とはちょっとだけつながりがあって、もう少し結晶構造解析を深いところまでやりたいなという思いがあってここに来たという感じなんですけど、一応そのときに津下先生といろいろ話して、研究しやすい環境かどうかとか、あと学生の数がどれぐらいとか、そういう話も聞いた上で、ここなら研究もしやすそうだし、割と楽しくやれるんじゃない



かなと思って決めました。

森戸 研究環境がよかったと。

吉田 そうですね。研究環境というのは、例えば予算的なものもありますし、あとは部屋の広さだったりとか、あと総合生命の中に結構有名な先生方もいっぱいいらっしゃるの、そういう意味ではいろんな刺激をすぐにもらえるという言い方は変かもしれないですけど、いい意味で刺激がある環境だなと思っていたので、それも決め手にはなりました。

森戸 我々の永田研も、8年前にここに総合生命科学部ができるときに京都大学から京都産業大学に移ってきて、思ったことは、全然研究ができるということで、設備もいいし、集まっている人たちもいいし、ラボで変わらないアクティビティで研究ができるということと、結構定期的に皆さんセミナーをやりますよね。あのセミナーのレベルが非常に高く、いい人がしゃべりに来るし、京都大学時代と全然変わらないレベルの研究が維持できているなというのはすごく僕なんか感じますね。

藤原さんはどうですか。

藤原 僕はもうすぐ4年近くになるんですけど、僕が来たのもタンパク質動態研がまだなかった時代なんですけど、そのころはこの京産大に総合生命学部があるというのは知らなかったんです。千葉先生ともつながりはなく、実際にはJREC-INの公募を見てやってきました。そこで研究内容を見てもうすごくおもしろそうだと思うって来たわけなんです。実際には先生たちの研究内容もおもしろそうだからそういう研究をしたいというのがありますし、論文を読むと緻密な実験をされておられたので、もっと自分自身学ばないといけないことがたくさんあると思ったので、研究者としても学べるのがすごく多いだろうと思ってここに来たいというふうに最初思いました。



実際に入ってみて、環境には驚きました。さっきおっしゃったように、セミナーがかなり頻度高く行われていますし、レベルも高いですし、実験もやりやすいですし、横のつながりもいいなと思ったので、すごくいい環境だなというふうには思いますね。僕がいたラボは全然横のつながりとかがなくて、セミナーも全然なかったですし、いいなと思いました。

森戸 研究の緻密さで言うと、伊藤先生、千葉先生は特に緻密

なタイプで、すごい美しい。我々はちょっと粗っぽいよね。抜けがよくあるよね。

寺元さんはどういう経緯で。

寺元 私の場合は一応学位を取ってきたという話をしていたんですけど、学位が間に合っていなかったんです。京大だったんですけど、そのときの先生が東京のほうに行かれたんです。

森戸 阿形先生ですよね。

寺元 阿形先生の研究室でプラナリアの研究をしていたときに、研究室が異動しますと言われたのでついていこうかなと思ってたんですけど、3月になって、組織学的な手法というか、切片をつくってたんぱく質やmRNAを染色したりなど、近藤先生がそういうことをやっていた人を探して、置いてもらえるかもしれないからちょっと面接に行ってみようと言われて、それで来ました。たくさん複数の選択肢があったうちから何か理由があって来たというわけではなくて、行くしかないという感じで押しかけました。

森戸 近藤先生は阿形先生の師匠ということですか。

寺元 阿形先生が学生だったときの助手の先生だったと聞いています。

森戸 寺元さんも割と流れのままに来たという感じですね。

寺元 そうですね。渡りに船的な感じで、やったあとという感じでした。(笑)

森戸 阪上さんは？

阪上 D3の冬にぎりぎり論文がアクセプトになって、その年に卒業できるということが確定していました。それまでに企業の就職活動とかもしていたんですけど、D3の夏になっても決まらなくて、そのときちょうど遠藤先生が機能解析できる人を募集していたんですよ。ある学会で遠藤先生にお会いして面接させていただいて、現在、遠藤研でやられていることを聞いて、ちょっと悩んだんですけど、やってみようと思って、そのまま遠藤研に入りました。遠藤研って名古屋大のときはタンパク質輸送をメインにやっていた研究室だったんですけど、今は脂質の輸送解析とタンパクの構造を解くことがメインで、入ったときはどちらかというとアウェイな環境だったんです。ですが構造生物学者とディスカッションするのも新鮮で、今は結構楽しんでやっています。

あとタンパク質動態研の魅力ですけど、私が学生のときにいた研究室が「タンパク質の社会」という特定領域研究の班に属してまして、「タンパク質の社会」は、京産大にいらっしゃる大御所の先生方がほとんど所属していた班だったので、京産大はそういう有名な先生がいることが魅力でした。なので、全く知らない大学に行くという感覚じゃなくて、ちょっと安心して行けるかなというくらいの気持ちで入りました。

森戸 一時日本のタンパク質研究の総本山みたいな雰囲気がありましたね。

阪上 何でこんな1カ所に集まっているのかなと思うぐらい集まっていたですね。

森戸 吉田、伊藤、遠藤、永田とね。そんなところは確かにあ

りますね。

寺元 誰もそういう先生たちが集まった理由をご存じないんですか。

森戸 最初にこの総合生命科学部の立ち上げの準備委員会みたいなのがあって、永田先生がそこに入っていて、永田先生が割と自分の知っているいい人たちに声をかけて、その人たちが入ってきたみたいな経緯があって、伊藤先生、吉田先生……。遠藤先生はちょっと後から入ってこられたんですよね。遠藤先生はまだ60歳前で入ってこられましたよね。58-59の人が国立の名古屋大学から京産大に移ってきて、結構これは驚きの人事で、よく遠藤先生来たなという感じがしましたけど。

河野 お友達もいっぱいいて、ディスカッションが同じフロアとかでできるので、すごく贅沢な状況ですね、そういうところを魅力に感じたんじゃないですかね。

あと、ご存じの方があつたら逆にお伺いしたいんですけど、何でこの京産大はこんなに研究をやる、いわば学部生の教育にあんまり寄与しないシステムをこんなに気前よくやっていいよと押しつけているんですかね。

森戸 それは僕も知らないですね。

河野 すごく不思議だと思う。すごいいいシステムだと思うんですけど。

吉田 結構多くの先生方が「いい教育はいい研究から」という標語を打ち出しておられますよね。多分その標語をメインにいろいろ交渉されて、結果的に大学側としても賛同していただいているという感じなのかなぐらいには思っていました。

河野 この動態研究所のシステムに大学がすごく協力的なのがいいなと思っていて、お金ばっかり食ってお荷物みたいな感じではなくて、大学の中で大事にされているシステムなんだなと思うんですよね。参画している先生方もそれに応えようと頑張るといふのもありますね。

森戸 どうなんですかね、研究で活躍すると、学生に対するアピールにはなるのかな。

上垣 学部生から見るとちょっとわからないかもしれないですね。修士ぐらいからは意識するとは思いますが。

藤原 入学時点ではどうなんですか。

上垣 僕らのときは設立されてなかったのだからなくて。

森戸 ただ、確かに君がさっき言っていたけど、授業している先生が異常におもしろそうにしゃべっていると、何かおもしろいかなと思うところはあるよね。

上垣 それは本当にいいことです。

河野 先生たちのアクティビティを上げることで学生たちの期待みたいなものをどんどん上げることができる。

森戸 確かに全国的に大学院進学率が比較的低い中で、ここはドクターまで行って研究しようという人がちょいちょいいるので、これは結構世の中の水準と比べてもすごくいいことかもしれないですね。大学がそれを意識しているのかどうかまではわからないですけども、ぜひこのような支援は今後も続けていただきたいなと思いますね。

河野 ありがたい話ですね。

□ ラボ選び〜研究テーマのすすめかた □

森戸 それとも関係するんですけど、学生の人たちに主に聞いてみたいんですけども、内側から見て、総合生命に入ってきた人たちがどこの研究室に所属するか、どこの学科に行くかということはある程度選択肢があるわけですけども、その中で皆さんはタンパク質動態研の研究室を選んで入ってこられたところはどういうモチベーションがあったのかということ聞いてみたいんですけど、これは飯田君から聞いていきましようか。

飯田 一応今、研究員になっていて、学生のころとはまたちょっと違うものがある見えてきたりしているんですけど、学生のころに、今おっしゃったみたいな、世界のトップクラスの先生がちょうど（京産大に）入って来た時期でした。僕は勝手に「天下り先」と呼んでいたんですが、それは逆にすごくありがたくて、勉強しているうちに、いる先生がすごいなというのを実感してきて……。あとこの大学、総合生命科学部自体の特徴なんですけど、他大学と比べたときに、各ラボに分属する人数がすごく少ない。それは国公立と近いものがあるって、例えば正確な情報じゃないかもしれないんですけど、他の私大とかになると数十人分属してきて、遠心機を並んで待つみたいなことを聞いたことがあって、研究どころじゃないというのと、あと卒検は数十人が分属してきたら先生は手に負えないのでというので、その点、ここはすごくいいなと……。それから、場所がないのも理由なんですけど、うちはかなり共通機器が多い。それはすごくありがたい。本来ラボにないものが使えるというのと、あとそれを使う人たちが平和なんです。譲り合い精神をみんなすごく持っていて、あんまりバトルにならない。他大学とかの話をしていると結構バトルが多いみたいなんです。

森戸 君は一体どこからその情報を……。？（笑）

飯田 それはすごくありがたいかなと思っています。

森戸 他人の遠心機を止めて回すという人もいるらしい。

飯田 そうですね。シークエンスの予約時間がオーバーしていたら、止めて入れ替えちゃうみたいな。

森戸 殺伐としていますね。

飯田 そうですね。そういうのはないので、すごいうれしいです。

森戸 もともと先生たちの仲がよくて、ラボ間が割に風通しがいいということがあるかもしれないですね。

飯田 ラボ同士の部屋自体の壁もないので、それはときどきうとうしがられているかもしれないんですけど、僕が結構ちょっかいを出しているの。 （笑）

森戸 今、非常にいい話が出ましたね。そんな魅力があったの

かと再認識しましたね。

では、上垣君はどうやってここに。

上垣 ほとんど飯田さんが言ったとおりなんですけど、永田研を選んだ理由というのは、学部生のときからおもしろいと思っていたということなんですけど、本当は吉田研に入ろうとしていたんです。吉田先生の所に行こうと思ったら、ここはもうなくなるからだめだと言われて・・・。そのときに吉田先生が、それだったら一番おもしろいのは永田研だから永田研に行けと言われて、それで永田先生のところに行こうと思いました。

森戸 今のところは削ったほうがいいかもしれないね。(笑)

上垣 本当に永田先生はおもしろいですし、吉田先生もおもしろくて、今ずっとタンパク質動態研にいる上の重鎮の人たちはひたすら研究をおもしろそうにやっているというのが一番大きいところですね。その中で僕が選べたのは永田研だったので永田研にしたということです。

入ってからもひたすらおもしろいことばかりで、研究室自体も飲み会とかもありますし、それで研究の話が盛り上がったりとか、それ以外にも一般的な普段の生活の話もできますし、そういう気軽に研究室に行って気軽に楽しめる、第二の家みたいな感じでいられるというのは本当にいいところだなと思いがら、今、この研究室に入ってよかったと思っています。それぐらいですかね。

ほかの大学をあんまり見たことないのでわからないんですけど、ほかの大学に比べたらいい施設なんやろうなと思いがら、感謝しています。

森戸 確かによその大学の人たちに聞くと、4月になると15人とか20人入ってきて、しかも一人一人卒業論文を書かせないといけないから、全員にテーマを割り振る必要がある。そんなこと現実的には不可能で、それを無理くりやって、しかも実験させるということで、それに比べると、我々のところは1学年4、5人入ってくるのかな。いい規模ですよ。その中から2、3人修士に進んだりして、うまく重要なテーマだけ、本当に必要性のあるテーマだけをやって回っていると思いますね。

上垣 自分の好きな研究を比較的自由にやらせてくれるというのが大きいですね。ほかの研究室だと結構決まって、これしかやっちゃだめと言われて、どんどん閉じ込められていく感じがする。それに対して永田研はそうではなくて、自由にやってくれ。そのかわり失敗しても知らんぞみたいなところがあるんですけど。

森戸 どっちがいいのか迷うところもあるけど。本当にそのラボ全体の方向性を見て必要なテーマをかちと割り振っていくと、システムチックに仕事が進められるんだけど、学生のやりたいようにやると、ぱっと発散していくときがあるからね。このラボの軸は何だということになることもあるのですね。

上垣 その辺はうまく取りまとめてほしいなと思います。

森戸 そう、うまく上の人がね。

上垣 鎖をどこかで、ここ行っちゃだめよとか。

吉田 今のテーマはご自分で考えてやれている感じですか。

上垣 そうですね。一応これをやってみると言うんですけど、これをやってみるしか言わないです。そこからどう動くかが動くまいが、何をターゲットにするかしないかは自分次第やという感じで。その辺が楽しいかなという感じはします。

森戸 さっき阪上さんも言っていたけど、テーマを与えてほっとくらボというのがありますよね。それはいい意味でとおきますけど、いい意味でほっとくらボがありますよね。その中で自分で調べものをして、自分で構築してって仕事を完成していくという道筋があって、でもどっちがいいんでしょうね。僕もそういう感じで放置された。テーマを与えられて自分で工夫しておやりなさいという感じで放置された。でも、僕の場合はそれで非常に苦労したんです。なかなか仕事がうまく進まなくて、最後にはゴールにたどり着きましたけど、学生のころはこういうことはやめてほしいなと思っていました。もっとしっかりトラブルシューティングを上の人がして、どうやっていかを導いてほしいなと思いがら、これは永田研と阪上さんのもとの阪口研はそうである。ほかのラボはどうやっていますか。千葉研は？

藤原 うちはそのままで放し飼いな感じではないですね。どういうテーマをやりたいかというのだけは最初スタッフでテーマの案をざらっと20個ぐらい並べて、この中からやりたいというので選んだテーマを、ある程度千葉先生とか僕がうまく誘導しながら進めていくというような感じですね。そこまで放置ではないですね。

森戸 みんなお互いに学生同士とかでディスカッションもするし、もうちょっと上の人たちとのディスカッションも頻繁にやって、1人でやっているという感じではないね。

藤原 1人でやっているという感じではないですね。ディスカッションはかなりしてくれますし、その中でどう取捨選択していくかということが大事という感じですね。

森戸 津下研はどんな感じでやっておられますか。

吉田 一応テーマは最初に幾つかの数を示して、その中で学生さんにちょっと興味があるものを選んでくださいと選んでもらって、その後、放置するかどうかは学生の雰囲気を見ながら決めています。やっぱり主体的に自分で考えて行動できる学生さんだったらあえて余り言わずにできるだけ放置して、そのかわりディスカッションの場を多く設けるようにして、今、何やっているのとか、うっとうしがられているかもしれないけどちょっとかい出すような感じで・・・。逆にそうじゃなくて、おんぶに抱っこじゃないと無理という学生さんの場合はやっぱり逐一教えながら、ある程度からガチガチまでしっかり道筋をつけてあげて教えていく感じにはしています。

さっき森戸さんがおっしゃっていましたが、僕自身も学生のときは、テーマもあやふやだし、何がやりたいのかもあやふやなままだったんですね。それでひたすら論文を読んで決めていくという感じでかなり苦労したので、僕も学生さんにはもうちょっとちゃんと教えてあげたいなという思いがあります。

森戸 この放置方式でやると、確かにゴールまでたどり着いた

学生はすごく強いんですね。ゴールにたどり着かない学生が出てくるところが問題で。

上垣 僕もちょっとそこは不安ですね。

森戸 放置でいける人は、今、吉田さんがおっしゃったように、いけそうな人はいかしておいて、フォローが必要な人はフォローしていくみたいなのがいいんですかね。

近藤研はどんな感じですか。

寺元 近藤研の場合は、学生さんたちがラボに配属されたときに、ラボ内のスタッフや院生の先輩たちがそれぞれメインでやっている研究手法について、トレーニングコースを受けます。それが一通り終わる頃に、近藤先生から、じゃ君にはこのテーマをやってもらおうかという形です。

森戸 一応適性を見きわめるといいな。

寺元 そのようです。私は余り学生さんのテーマを決めることには関係してないので、見ていて近藤先生がここがいいかなというので決めていかなと私は思っているんですけども、多分飯田君のほうにつきあいが長いので、からくりも知っていると思います。

飯田 多分テーマの選び方は寺元先生がおっしゃっていたような感じで、近藤先生はタンパク質動態研のほかの先生たちとは違って、いい意味で過保護です。すごい面倒を見てくださって、ご自身でいまだに手を動かして研究されているというのもあるんですが、直接ご指導くださるのがすごいありがたくて……。実はこの会議では近藤先生のことをボロカスに言えと言われていたんですが、正直言えないぐらい僕は尊敬してまして、頭が上がらないんです。自分でやると道がそれちゃうんです。もちろん厳しいんですけど、それをパシッと戻してくださるので、そこはすごいいい意味で過保護です。でも、分属生の中では正直過保護過ぎると言っている学生もいました。ちょっとサボっちゃう子に対して、自分でやるのに、それを先生がある程度無理やりサポートしてしまうので、その子自身でやる力がつかないというのはちょっと言っている学生もいました。多分それぞれの学生さんを見て、この人にはしっかりと、吉田先生がおっしゃったみたいな指導が一番いいんじゃないかなと思います。

森戸 そうやって密着して教えてもらえると、この人がどういう考え方を、どういうサイエンスの考え方でしているかというのはよくわかるよね。

飯田 テーマを与えられて、最初は何のことかよくわからないんですけど、先生と密着していたら嫌でもそのテーマの魅力に気づくというか、どんどん好きになっていくというのはあるので、僕は「洗脳」と言っているんですけど。

森戸 天下りで、次は洗脳。(笑)

飯田 それはいいなと思います。

森戸 近藤先生は言うまでもなく超一流の先生なので、その先生の組み立て方をバーツとシャワーしてもらえるとというのは非常にいいかな。

飯田 歴史からずっと教えてくださるので、すごくありがたい

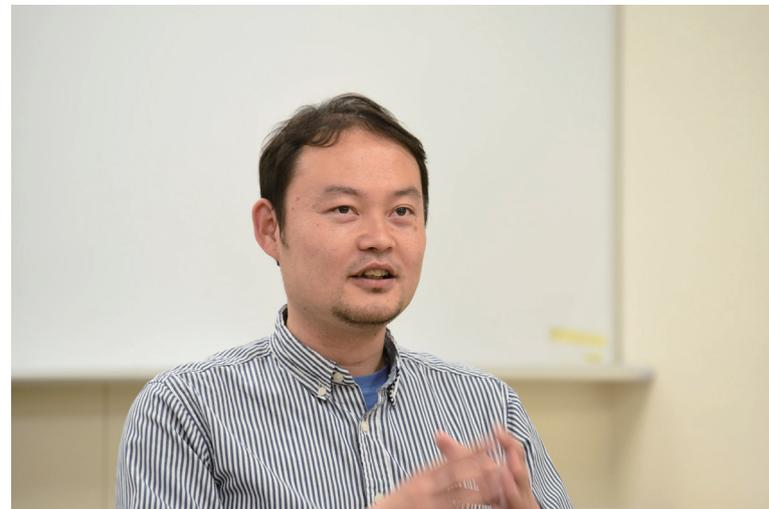
ですね。

森戸 いい意味で細かいよね。

飯田 そうですね。

森戸 最後は、ちょっと遠藤研も聞いておきましょうか。

河野 遠藤研はそういうスタイルみたいなのが余りなくて、テーマを決めるときはキャンディデートが幾つかある中で、一応予備的なトレーニングをやった後に、この子にはこういうのが向いてそうだとか、これは向いてなさそうだなみたいな感じで決めるんですけど、中長期的なテーマというより、短期的なところを積み重ねてやろうみたいなところはありましたね。短期目標をつくって、ここからここまでやろうね、みたいなのをみんなに配って、ここまでいったら、じゃあ次はこれかこれかこれに進めるからみたいな感じで……。みんな進み方はバラバラなので、教えるときに完全に重複することはあんまりないんですけども、そんな感じで適性に応じているかどうかかわからないけど、テーマを割り振って、短距離走をみんなにやらせているような感じですかね。



森戸 短距離走を積み重ねていって、気がつくと42.195キロを走っていたみたいなの。

河野 いけるようにできたらいいんですけど、やっぱり難しいときもあるんですけどね。

森戸 河野さんとか阪上さんはあらかじめゴールをある程度見据えて、多分中長期でやりますよね。学生はボトムアップで小さいものを積み重ねていって、気がつくとひとかたまりの仕事になっているという感じですか。

河野 ですね。別に意識したわけでもないですが、そういうふうになっていると今、皆さんの話を聞いて思ったところです。

森戸 ちょっと珍しいやり方ですね。いろんなやり方がありますね。若干話がそれましたが、それぞれのラボの特色が伺えたかと思います。

□ 研究か生活か □

森戸 ここまで研究のおもしろさとか楽しさについて語ってき

たんですけれども、もう一つ実は我々にはシビアな問題として、生活か研究かという問題があります。研究は結構厳しい道なので。これは座談会なので一応説明してみると、研究者が大学、アカデミアの世界に残っていくということが非常に難しく、今、大学のポジションがすごく少ないので、研究を続けていてもそのまま一生やっていけるかどうかかわからないわけですね。そういうプレッシャーにもさらされますし、かつ大学院に進むと、修士の2年と博士の3年で計5年間、これは普通の人であれば学校を卒業して企業に入って給料をもらうところが、我々は5年間学費を払ってさらにやる。しかも厳しい道に進んでいくということがあります。さらに大学でのポジションというのいろんなポジションがあって、今はかなり若手のポジションは任期付きのポジションが増えていて、非常に不安定です。こういういわば研究生の負の面みたいなものがあるわけなんですけど、にもかかわらず、我々それぞれ何らかの理由があって研究を選んでいるわけなんですけど、ここのところを皆さんどう考えているかということをちょっと話してみたいと思います。

多分僕と河野さんが一番年上になると思うんですけど、河野さんはちなみにお幾つなんでしょうか。

河野 39です。

森戸 僕42なんです。ちょっと近いところですね。(笑) 河野さんとか僕なんかは結構シビアな問題だと思うんですけども、どう思われますか。河野さんはまだまだこれからずっと研究でいく。

河野 どうでしょうね、それはやっぱりタイミングというか、僕はどちらかという人生の中で楽しいということと生活することというのは切り分けないといけないと思うので、どちらかにウエートが重過ぎたらどっちも破綻してしまいますよね。研究がおもしろいからといって生活を適当にやってもだめだし、生活したいから余りおもしろくないことをやるとしてもだめだし、それはやっぱりバランスですね。状況によっては企業に行っても全然いいかなとは思っていますね。

森戸 そこでもやっぱり研究を続ける職ということですかね。

河野 できればですね。

森戸 僕はどちらかという楽しさと生活していくことのバランスは、圧倒的に楽しさのほうが大きくて、若干生活を軽視しながらここまでやってきたところがあるんですけど。

河野 研究は境目が曖昧なんですよ。研究は楽しくて生活の糧になるものというところにどこでズバッと切るかというのは、ずっと研究してきた人たちにとっては難しいところなんです。

森戸 確かに。今、企業の話がありましたけど、企業に行くにしても、いつその決断をすべきかみたいなことがあって、僕なんかちょっとその決断が難しい年齢に達しつつありますが、しがみついてもやっていけないといけないと思っていますが。

年齢順に下ろしていくと、次は誰になるのでしょうかね。吉田さんですか。

吉田 僕も任期があと2年なので、企業に行くのであればそろそろ動き出さないといけないなとは考えているんですけど、どうしても現実問題としては腰が重くなってしまいます。今の状況がそれなりに楽しいしというのはあるので、自分がどうするかというわけではないんですけど。



少し話がそれてしまってもいいですか。僕自身が大学に入ってからずっと思っているのは、大学のポジションってかなり少ないと思うんですけども、大学のポジションで研究をやる先生と大学の1、2年生の大学生の初等教育を専門にやる先生の2つのポジションがあればすごくいいのにな、とは思っています。ちょっと僕は特殊で、もともと先生になりたくてこの業界に入っていて、もちろん研究は好きなんですけど、大学生に入ったときのいろんな研究をする上での武器みたいなものですか、一般基礎的な知識とかをもっとサクッとみんなにわかりやすく教えられたら、みんな研究をスイスイ進められるのという思いがあって。先生によりますけど、僕が大学生のときはいわゆる成書と言ったらいいですか、物理化学ならアトキンスとかをポンと渡されて、やっといきたいな。それをポンと教えてくれればすぐわかるのに、すさまじい時間をかけてやっと理解してきた経緯があるので、時間の無駄だなという思いがあるので。多分、研究者の中でも教えるのがすごい得意な方もいれば、研究でバリバリやっていく方もいるので、そういうポジションがもしあれば、研究者でアカデミアに残る人たちにとっては割といい道になるんじゃないかな。また学生さんにとっても、そういう先生がいてくれると多分すごく頼りになるんじゃないかなとは思っています。

森戸 昔は大学に教養部があって、わりにそういう部分を分担していましたよね。あとは今で言うと、どちらかという教育重視の大学とかそういうのが相当するかもしれないですね。

吉田 そうですね。先生方も皆さんすごくお忙しいので、そういった業務を分けられたらみんなハッピーになるかもしれないなと思っています。

森戸 研究をする人は教育の領域をなくしてくれと。

河野 普段研究している時間というのを、その半分でもどうやってわかりやすい授業をしようかとかに費やすことができ

ば、例えばうちに入ってきて今まで生物をやったことなかったんですけどみたいな学生に対してもすごいフォローになりそうですものね。どうしても、適当と言ったら言い方は悪いですけど、研究ほどは一生懸命教育をやれないのが現状ですよ、評価体制を考えても。教育がきちんとできて評価される環境というポジションがあれば、本当に学部生、特に1、2年生の勉強の質はぐっと上がりそうですよね。

吉田 そう思っています。

森戸 次は年齢順では誰になるのかな、藤原さんですか。

藤原 僕は若いほうではありませんが。この業界は将来設計って難しいですよ。なかなか考え切れないんですけど、僕はかなり森戸さんに近いのかもしれないですが、楽しいというのがあって、生活はちょっと。

森戸 それはやばいですよ。(笑)

藤原 そうですね。だから、その辺はこれからどう判断していくかというのは難しくなってくるのだと思います。ただ、まだ今、楽しいことをやりたいというのが強いかもしれないですね。

森戸 我々ぐらいのときに比べると、研究者がアカデミアに残っていくというのは徐々に下のほうに行くにつれ、また若干緩和されているような感じはしますよね。

河野 ですかね。任期付きというポジションが増えているということですか。

森戸 ポジションも増えていますし、研究の道に残ろうという人が我々のときよりは少なくなっていると思うんですね。いまどきは助教を募集しても集まらないときもあるみたいな話を聞くので、昔はすごく厳しかったんですけどね。

上垣 何で森戸さんらの時代に研究者が増えたんですか。

森戸 それは悪名高いポスト1万人計画というのがあって、大学院をドーンと大きくして、大学院進学者を増やして、ポスト、博士号を持っている人を1万人つくる、ドーンと増やそうと、文科省が主導してそれをやった。ここは削りましょうね。でも、大学のポストを全く増やさなかったために、博士は取ったけど、行き場のない人たちがすごくたくさんできた。だから、その人たちが30歳ぐらいからポロポロと抜け落ち始めて、今でも我々の先輩とか前後の年代とかでも、ぎりぎり研究業界

に残っているけど、やっぱり行き先がなくて、そこのボリュームが圧倒的に大きいですよ。それに対する救済策みたいなものが結局講じられず、自己責任で来ちゃっていますけどね。その揺り戻しが、そういう姿を見て大学院に学生が進学しないという現象になって出てきていて、これからすごく極端に学生が少なくなっちゃうので、これで研究業界を支えていけるのかどうか、難しくなっていると思います。そういうことがあって我々のときは非常に苦しいんですけども。

阪上 楽しさと生活を天秤にかけたら、私はまだ独身なので楽しさを優先しますが、ただ、もしこの先、結婚して家族ができてとなったら、生活のほうに傾いていくとは思うんですね。楽しい優先というのをどこまで続けていくかということなんですけども、本当に流れに乗るしかないということしか言えなくて、何か具体的にこのあとポストを何年か続けて、助教になって、准教授になって、教授になるみたいな、そんな華々しい計画は特になくて、何か無理やりPIになる必要もないかなと今、考えています。もしアカデミア以外に、研究職じゃなくてもいいんですけど、ある企業で自分が楽しく働ける場所があるのだったら、迷わずそこに行く覚悟はあります。

森戸 確かにPIになるしかみたいな選択肢でなくて、PIにならなくても研究を続けていける道というのが幅広くあると思うんですけどね。

阪上 吉田さんの話じゃないんですけど、PIになる人っているんなことができる人じゃないと多分なれないと思うんですよ。実験もできるし、論文も書けるし、授業もできるし、学生の指導もできるし、予算も取れるしみたいな、そういうマルチな人じゃないと残れないと思うので、その中の一つ、例えば実験できるとか、教育できるみたいな、そういうのに特化した人を雇ってくれるようなポジションがあればすごく将来設計が立てやすいんですけど、ないですよ。

森戸 大部分の人はマルチじゃないからね。

阪上 ここの大学の御所の先生を見ていると、本当にマルチな人が多いですね。

森戸 そうか。(笑) 欠落している人はいるよね。何か欠落している人はいると思いますよ。

阪上 永田先生は結構マルチな方じゃないですか。

森戸 どうか、知らない。それは言われてみると、確かに今、日本でPIになろうと思うとマルチじゃないといけないうね。だから、そういう意味では非常に難しいですね。

阪上 一般人には無理ですよ。

森戸 忙しいしね。

阪上 全ての技能を伸ばすことなんて絶対無理なので、どこかに特化したところで受け皿になってくるところを探すしかない。

河野 そうすると、研究者が持つべき、研究業界が持つべきダイバーシティというのがどんどん縮小して行って、一部のスーパースターの非常に固定された考え方が支配するようになってっちゃうとね。



阪上 そこに予算が集まっていて、そこだけ力がついていくみたいな。

河野 おもしろくない業界になっちゃうよね。

吉田 実際に割とそういうふうになっていませんか。

阪上 なっていると思います。

吉田 やっぱり先生方を見ていると、もとをたどるとこの先生みたいな感じで。

河野 確かに。

吉田 それはもちろんいい面もあると思うんですけど。

森戸 ありますね。

じゃあ進めましょうか。寺元さん。

寺元 生活か研究か、どっちかを優先するかということですよ。

森戸 これは生活と研究のコンフリクトをどのように解決していくか。つまり研究という道に行くと、将来設計が難しかったり、任期付きだったり、どこかで生活を選ぶために研究をやめざるを得ない場面とかも出てくるかもしれないとか、そういう研究に伴う生活面での不安定さどう対峙するかということですね。

寺元 確かに周りの普通に学部を卒業して企業に行った人たちと比べると、自分の場合は任期があって、3年後どこに住んでいるか、給料があるかもわからないというような状況だと、やっぱりちょっと不安だなとは思っています。ただ、ほかの仕事に鞍替えできるかという、ついていけないでしょうし、雇ってもらえないというもあるんだろうなという気がします。近藤先生に座談会があるんですと言ったら、若手の座談会ということはきっと彼らの大きな、大いなる野望を語る会だと、いっぱい野望について語っててくださいと言われてます。

森戸 それいいな。この後、最後に野望について語ってもらおうか。

寺元 自分の好きなことだけをして教授になれたらいいなとは思いますが、自分のところと教授まではなかなか簡単には埋まらなくて、どうやって教授になっているのかなというのは疑問です。子どももいないし、結婚もしていないわけではなく、働ける場所があるんだったら、地球上のどこかであれば行こうかなと思っています。働く場所がみつかるかはわからないので、不安ですが、だからといって対処のしようがないという感じなので、行けるところまで行こうかなと思っています。

森戸 わかりました。何となく若い人の方があまり不安に思っていないという感じがする。俺はめっちゃ不安なんやけどな。

(笑)

それで、研究業界はさっき言ったポスドク1万人計画みたいなことがあって、非常に研究業界で若手に厳しい環境が続いていて、僕の印象からすると、それでもなお大学院によく入ってきたなという気がするんですけど、飯田君なんかはそれをどう思って入ってきたんですか。

飯田 ドクターに進んだのは、僕は正直将来のことは一切考えずに、テーマをある程度まで完結したいなと思ったので行った



んですけども、ちょっとさっきのテーマと被ってしまうんですが、僕も森戸先生と同じで、正直不安しかないと状況でして。今年、もしくは長くて来年で僕も任期が終わりなので、今年探さないといけなんですけど、そもそもほとんどのポストは任期付きで。僕は29なんですけど、僕の年齢になると同級生は働き始めて、ある程度年がたって安定しているんですね。それで、アカデミアに行くならですけど、僕らには任期付きしかないという状況と、その状況が何で生まれているかというのは僕の持論なので無視していただければいいんですが、楽しい研究と生活のメリハリがこの業界は全然ついていないんじゃないかなと思っています。残業は当たり前、休日出勤当たり前みたいなのが横行している状況がすごい悪いと思ってまして、普通の企業ではそもそもあり得ないことですし、あとメリハリがないのでドラドラ続けてしまっているということはすごく悪くて、それが学部生はみんなこの分野に進まないでおこうという原因なんじゃないかと思っています。やっぱり好きなことといってもある程度メリハリ、好きなこともやり過ぎたらしんどいので、ある程度メリハリがあって、普通の企業とかの労働と一緒にまでは無理ですけど、似たような状況をつくったほうが進みやすいですし、そうでなければ、任期という縛りがあるので、なおさらアカデミックに行こうとは思わないですよ。

森戸 きょうは飯田君、いいこと言うな。ここは太字にしよう。(笑)

飯田 正直僕はアカデミアは厳しいかなと思っていて、なるべく研究はやりたいですけど、企業でも行けたらいいなと思っています。就活とかもやってこなかったのが、本当に学部生とかはすごいなといつも尊敬して見えています。できる気がしないというのはありますね。しかも、まさにメリハリなんですけど、正直休日まで行って、夜もおそくまで研究している状況で、果たして就活ができるのかというのはちょっと疑問点です。

森戸 それでもしないと就職できないからね。

飯田 そうですね。

森戸 それは近藤先生と交渉してください。

上垣君は何か不安に思っていますか。何かあんまり……。

上垣 確かに、本当に不安に思っているのかといったら思って

いないというのが現実です。永田先生にだまされて入ってきたというのが答えなんですけど、別に今、嫌やなと思っていることはないですし、研究に関してもおもしろいと思ってやっていますし、生活も何とか自分の体が動くまで動き続けられればいいんだという精神がどこかあります。それはスポーツをやっていたよかったなというところがあって、ちぎれるまで走れというふうに指導されて。

森戸 それか飯田君の言う研究業界の悪いところかな。

飯田 そんな人はあんまりおらんからね。ちぎれたら嫌やし、痛いもん。(笑)

上垣 だからといって、それを強制してほしいとは思ってないんです。それは自分で選択することなのかと思っていて、自分が楽しいから走り続けられればいいと思っていて、それ以上楽しくないのやったら走らなればいとは思っているほうです。だから、無理に自分の後輩たちに走れとは思ってなくて、俺は走るけど、おまえは休んでいてもいいよみたいな感じです。それでいいんじゃないかなとは思っています。

森戸 研究は自主性の上に基づく営みであるよね。

上垣 それは何か別なと違うかなと思っていて、どっちかという生活を保てるのかどうかということが不安です。結局お金の問題とかのほうが一番不安で、これはありがたいことに学振をいただいているので今は大丈夫ですけど、2年後にはなくなるので、その次にちゃんと取らないといけないので。

森戸 今、うちは上垣君と堤さんと両方学振もらっているよね。学振が今ちょっと拡充していて、わりに大学院に進む人に比較的近いやすくなっているというのはすごくいいというか、この業界にとってはいいことですね。

上垣 それは本当にうれしいことです。ただ、任期付きなものの上の人たちは多いというので、ちょっとそれが心配です。

あとは将来、海外に行きたいなというのがあります。これはちょっと不安な要素ではないんですけど、行ったところでうまくいかどうかかわからないというのはちょっと不安ですけど、やるしかない。

森戸 一昔前までみんなドクターを取ると必ず海外に行っていましたけど、この中で海外に留学された方はおられますか……？

すごい、誰もいない。(笑)

これが今のあり方ですよ。海外留学しなくなりましたよね。僕らの上ぐらいはみんな海外に行っていましたよね。海外へ行くと、日本に帰ってきにくいというのがあって、つまり日本でのポジションが得にくいというのもあるね。でも、ぜひ海外へ行ってください。帰ってこなくていいから。(笑)

上垣 ぜひ空けといてください。広げてください。

森戸 一畳ぐらいな。(笑)

堤さんはどうしていますか。研究って結構厳しいですが、それでも大学院に入ってきましたが。

堤 永田研に入るという時点でそうだったんですけど、研究に携わることをしていきたいというのが昔から夢だったので、研



究室に入って研究をしよう。

森戸 いつぐらいからの夢。

堤 割と小さいときから、家族にそういうことをしている人がいたりとか、高校生のときに主体的に理系の実験をやらしてもらえ環境にあったので、そういうことをしたいなというのは昔から思っていました。大学での研究とか企業の研究にはこだわらずにやりたいなという思いは持っています。森戸さんとか河野さんがいろいろ話されたように、ポストがないとか、日本の研究力が落ちてきているのじゃないかみたいなのがすごく耳に入ってくるし、それでも私はやりたいという思いがあるから、そうなると日本にこだわらなくてもいいんじゃないかという思いになるので、日本でも外でも何らかの研究ができるように、せめてドクターを取ればと思って大学院に入って、今、やっています。

森戸 これは夢のある話やね。ドクターを取ったら世界で勝負していけるという。

堤 そういう思いですね。もうちょっと研究をやり足りないなという思いとドクターがあれば、海外、外にも出られるんじゃないかという思いで進学しました。

森戸 最後いい話になりましたね。結局のところ、我々だってそういう生活上の不安があるということは認識しつつも、こうやって研究に残っているので、研究のおもしろさに魅せられてやっているというところはありますし、それぞれ思いがあると思いますけど。

□ 将来の野望 □

森戸 さっきいい話が出たので、せっかく若手の座談会なので、それぞれ野望がもしあれば語ってみましょうか。

これは非常に個人的な話ですけども、この2、3年ぐらい独立して研究室を主宰したいと思ってそういう職を探してみました。結局それはうまくいかず、もう一度別のラボのスタッフとして転出することになったんですけども、僕が思うに、このP

PIという職業、教授という職業は非常に自由度が高くて、サラリーマンでこんなに自由度高く仕事をしている人たちは少ないと思うんですね。自分で予算を取ってきて、好きなふうに割り振って、出勤しているのかしてないのかわからないような、どこにいてもあんまり怒られないし、相当自由に仕事をしてもいいし、かなり自由度の高い職業とされていて、世の中で最も魅力的な職業の中の一つじゃないかと思っています。ぜひPIになりたいと思っています、PIになったら当然今の研究は進めていくわけですけども、そこから派生してくるいろんなことがあって、自由に研究を進めるというのもあるし、また今、我々の持っている知識を使うと例えば創薬とかに行けるわけですよね。PIになったら会社をつくってみたいと思っています、これはすぐにつくってみたいと思っています、創薬をやりたい。創薬ってやり始めはそんなに金がかからないので、半分ぐらい科研費を使いながらやってみればいいので、そういうことをやってみて。我々の職業ってそういう自由な勝手なことをやっても別に誰からも怒られない職業なので、せっかくだからそういうことをやってみて。会社もつくってみたいし、本も書いてみたいし、いろんなところに行ってみて、そういうふうに自由にやってみて。それで一生動けなくなるまで仕事ができれば最高と思っています。

特に僕のはやっているのはモヤモヤ病の原因遺伝子とミステリン、モヤモヤ病は全然発病の機序がわからなくて、ミステリンをやっている中でこうかなというのは徐々に見えてきたので、それをどうすれば治せるかということについても、ひょっとしてこうかなという予想があり、それは今後10年ぐらいかけてやっていくわけですけども、その中でもひょっとしたらこうやったら治療薬をつくれるんじゃないかという方向性もあって、そういうのに今、独立できればすぐ取りかかりたかったんですけども、それはちょっとしばらくお預けになるのであれですけども、近い将来にはそういうことをやってみて。会社もやり、大学で研究もやりというふうにやってみてというふうに思っています。

皆さんどうですか。

寺元 自分で会社を興すとお給料の心配はしなくてよくなる。

森戸 いやいや、その母体となる金はどこから取ってこないといけないからね。

寺元 先ほどPIとか教授の先生ってマルチな人が多いんじゃないかとおっしゃったんですけど、私の印象的には、当然マルチな先生もいらっしゃると思うんですけど、それと同じぐらいちょっと狂気をはらんだような、よくわからないけど何か集中しているとか・・・。

森戸 とりつかれたように偏った人もいますよね。

寺元 そういう先生も結構いるんじゃないかなという気はするんです。ずっとやっていきたいと思うのだったら、ステップアップしていくしかない。ただ、そこまではすんなり行けそうにはないので、周りの先生を参考にしつつ、自分でマルチにできるように頑張るか、もしくは狂気を育てるか、どちらかなんだ

ろうなと思っているんですけど、自分の中で育てられる狂気を探したいなと思っています。

森戸 狂気の方向か。

寺元 マルチはちょっと難しいので。

森戸 ちなみに寺元さんはテーマ的には、今後、どういうふうにやっていきたいと思っているんですか。SOX2 でいきたいと思っているんですか。

寺元 今すぐということですか。

森戸 これから次の5年、次の10年と考えたときに。

寺元 さっきニワトリの話をしていたんですけど、きれいに形ができていく過程はとても感動するので、そういった方面で職を得られればいいかなと思います。

森戸 何か形づくりの解析を続けていくと。

寺元 ただ、この生き物のこの現象、と決め打ちするほどの決意はまだないので、そういうのを探しながら頑張らないといけないと思います。

森戸 逆に言うと、モデル生物間の移動というのはそんなに難しくはない。マウスからをニワトリに移動するということはそんなに難しくはないんですか。

寺元 私の場合は、ニワトリは言うほどは使っていませんが、やっぱりいろいろ違っていることも多いと思います。ただ、今のラボでは、ニワトリをやっている人がすぐ近くにいるので、教えてとすぐ言えるので、そういう意味では動物間で移動することに抵抗はないです。学部ときはウナギだったし、修士・博士ときはプラナリアで、今、使っているのはマウスなのですが、遺伝子を完全にノックアウトすることができるか、いわゆるメジャーな生き物を使っている場合はそういう研究するためのツールがたくさんあるのですが、プラナリアやウナギとかを使っている場合はできなかったノックアウトが、マウスではできて、すごく感動しました。メジャーな生き物の場合は、研究ツールをみずからつくり出さなくても良いことも多いのかもしれない。自分が本当に知りたいことがあって、すでにツールが揃っている生き物がいるなら、プラナリアやウナギを使うよりはやりやすいのかなという気がします。ウナギだったりプラナリアだったり、その生き物自体がおもしろい、ということも捨てがたいなあと思います。いろんな生き物を研究対象にしてみて、どれもそれぞれにおもしろいので、どれがいいのか悩むところではあります。

森戸 今、選んでいるところですね。

誰か野望がある人はいますか。

河野 さっきおっしゃった会社を興したいというので、研究者の地位をある面でお金とかそういう面で高めるというにはすごくよくて、みんなが何らかの形で持っておきたいようなものですよ。世間が研究者っておもしろそうとか、研究をしている人はすごいんだみたいなのを思ってもらえるような。赤貧というのが今の研究者のイメージですよ。じゃなくて、研究を一生懸命やると、うまくやるとお金ももうけられるし、世界的にも名前が知られるようになるという可能性をはらんだ魅力的な



職業だというのは広く知ってもらえるというのはいいなと思いますね。

森戸 そういういい面はありますね。そういうことを広めたいと思っているわけじゃないですけども。それはすごくいい面ですよ。

河野 研究者の野望といえばそんなものかな。

森戸 今の時代、まさに日本でもそういうことを許される空気になってきていますよね。昔は身を削って、研究者たるものは飯食わずに研究するみたいな雰囲気がありましたけど、今は割とゆるい許される感じになってきましたね。

ほか野望はありますか。

飯田 先生方みたいな雲の上のような野望じゃないんですけど、大丈夫ですか。

森戸 いいよ、小さな野望から。

飯田 そもそも今回、文句ばかり言ってしまって申しわけないなと思っていて、でもまた言おうとしているんですけど。そもそも研究の仕事は厳しいという考え自体は、僕はちょっと違うんじゃないかなと思ってます。それは何でかという、明らかにほかの企業とかで働いている人を見ても、どう見ても企業で営業している人とか事務の人とかのほうが仕事としては厳しいと思っていて、こんなに自由にやれているのに、そんな

甘いこと言うなということはあるんです。

森戸 文句を言うなと。

飯田 それは何で厳しいかというのは、研究が厳しいんじゃないって、いわゆる任期とか、残業しても一銭も出ないという、ほんまに好きな人じゃないとやれないというのがこの分野の悪いところじゃないかなと思っていて、もっとちゃんと労働時間とかを決めて、メリハリをつけて、そこまで好きじゃないけど一般の人もっとやれるようにしたら、もっとポストとか広がっていいんじゃないかなと思います。厳しいという方向性が間違っているんじゃないかというのもあるって、不安しかないといながら、でも気づいたら結局ここまで続けてしまったわけです。それは何でかという、その不安を超えるぐらいの魅力があるからで、大げさに言うと世界で自分しかやってない、世界初、独自性と新規性みたいなところとか、あと結構みんなとフレンドリーに話し合っ、ディスカッションしながらやれるという、ほかの職業みたいに上司絶対とかいう厳しさが無いというのが続けてしまう魅力かなと。苦勞して研究するんですけど、ずっと失敗して、ときどきキラッと光るものが見えるときがあって、それにとりつかれちゃうというのがいいかなと思っています。

森戸 非常に真つ当なこと言ってますね。で、野望は。

飯田 野望が、全然アカデミックとかにこだわりはないんです

が、何かウェットな手を動かしたりするのが結局自分は好きなのじゃないかなと思っていて、企業に行ったとしても、なるべくそういうのができたらいいかなというのが小さな野望です。

森戸 普通の幸せみたいな野望やな。

飯田 そうですね。

森戸 あとちょっとだけ時間がありますけど。

藤原 僕の場合は、野望、何か研究を続けているモチベーションとも被るんですけども、おもしろい細胞内の現象に出会いたいというのがあるので、そういうのに出会いたいというのが野望なんでしょうね。そういう意味では、PIになるというのは、PIになったらもちろん一番自由に研究ができると思うので、どちらかというとPIになるのが目標というよりは手段になるのかもしれないですね。基本的には基礎研究をやりたい。一方で、若干応用研究にも興味がある。

森戸 研究者として非常に真っ当なご意見ですね。研究の楽しさそのものを追いかけていく。

ほかに野望はいいですか。

吉田 研究の座談会なのに話がずれてしまいますけど、ずっと思っているのは教科書を書きたいです。大学に入って、内容がすごく難しく、もっとわかりやすい教科書があったらなと学生のころから思っていたし、みんな何だかんだ言ってわかりやすいのって好きじゃないですか。池上彰がテレビでもてはやさ

れるのはわかりやすいからで、それは裏を返せば、わかりやすく説明できる人が余りにも少ないということなので、自分がどれだけわかりやすく説明できる能力に長けているかは周りが評価することなのでわからないですけど、できるだけわかりやすい教科書を世に出して、みんながこれいいねと思ってくれるような仕事をしたいなと思っています。

森戸さんがおっしゃったように、PIになると自由度が高いので、自分の時間を研究にどれだけ注ぐのか、教育にどれだけ注ぐのかという割合をある程度変えることができると思っています。PIになれば研究ももちろん楽しいからしますが、少し教科書づくりとか教育のほうにウエートをかけられたら一番いいなと思っています。

森戸 テレビに出てきそうですね。

藤原 話し方が上手ですね。

森戸 何とか先生とかで出てきそう。

吉田 ありがとうございます。

森戸 とりとめのない座談会になったかもしれないですけど、本音とかキラッと光る意見が出たような気がします。いい座談会になったのではないのでしょうか。

こんなところにしましょうか、どうもお疲れ様でした。ありがとうございました。

タンパク質の構造の理解に向けて

京都産業大学 吉田賢右

宇宙の生命は・・・つまり地球の生命および地球外生命すべては・・・炭素と水の独特の化学的な性質に依存して存在しています。炭素は混成軌道により、シグマ（一重）結合、2重結合、3重結合、共鳴結合、環形成、などさまざまな化学結合が可能で、膨大な種類の化合物を作ることができます。液体の水は、遷移的な分子間水素結合による独特な物性（高い沸点など）および水素イオンの平衡的な解離によって、生命の分子にかけがえのない環境を提供します。炭素の代わりにケイ素を使い、水の代わりに液体アンモニアや液体硫化水素の中で生きる生命は存在するのでしょうか。現代の化学はそのわずかな可能性も示すことができません。

どんな宇宙生命でも、個体が活動し、子供を作る（遺伝）ことが必要でしょう。地球の生命は、遺伝にはリン酸ジエステル結合でつながれた核酸ポリマーである DNA（まれに RNA）を採用し、個体の活動にはアミノ酸がペプチド結合でつながれたタンパク質を採用しています。遺伝子の機能としては必要なのはコピー可能な1次元の文字列であり、それはDNAに限らずいろいろな高分子が採用可能でしょう。しかし、活動分子としてのタンパク質の機能は3次元的な立体構造に依存しており、そうすると、どんな宇宙生命もタンパク質を採用せざるを得ないと思われ（もちろん、20種のL型アミノ酸を使用しているのは地球生命に独特のものでしょうが）。それは、ペプチド結合の半2重結合性、-CO:HN-の主鎖間の水素結合、そして側鎖の多様性による広大な物性と多様な立体構造の可能性、などがタンパク質以外的高分子では不可能のように思えるからです。核酸でもきちんとした立体構造を持つものが知られています。しかし、その構造の多様性はごく限定されています。タンパク質は宇宙において生命を可能とした奇跡の化合物である、と言ってもいいでしょう。ですから、タンパク質の理解、とりわけタンパク質にとって命とも言える立体構造の研究は、予言的に言えば、宇宙生命的な重要性がある、と私は思っています。この分野において最近、革新的な開拓が進んでいるので、簡単に紹介します。

タンパク質は20種のアミノ酸がいろいろな順番で重合したヒモ状の高分子で、ヒモは折りたたまれて（folding）さまざまな立体構造を形成します。

「天然のタンパク質の立体構造はそのアミノ酸配列を持つタンパク質が水溶液中で取りうる構造の中で熱力学的に最も安定な構造である」というのがタンパク質の基本原則です。それなら、立体構造を計算できそうなものですが、ダメです。少なくともごく最近まではダメでした。

アミノ酸配列は、立体構造の暗号である Anfinsen の原理

天然に存在するタンパク質の立体構造形成 (folding) には、外から情報やエネルギーを与える必要はない。アミノ酸配列だけで立体構造は決まる

天然タンパク質の基本方程式

$$y = f(x)$$

y : 立体構造
F : folding 関数
x : アミノ酸配列

問題 (x) と答 (y) は12万セット知られているが、関数 (f) は未知である

この暗号解読は、難攻不落 (だった)

それなら、立体構造は実験で決めるしかありません。そのため、この60年間、X線結晶解析が主要な方法として使われてきました。この方法では、結晶を作ることが今も昔も最大の難関ですが、解析手段・方法は長足の進歩をしています。例えば、時間を追って構造変化を見ることが出来ます。呼吸鎖酵素では酸素分子が銅に立ち寄りてからヘムに結合する過程がわかりました。また、膜脂質の原子の位置までわかる革新的な方法が開発され、膜タンパク質とリン脂質の相互作用が見えるようになりました。

ごく最近、低温電子顕微鏡+1電子検出像で多数の1分子(単粒子)画像解析を行う強力な方法が登場しました。結晶解析とは逆に、大きな分子を得意とし、結晶化は不要です。時間分解、複数の構造異性の解析も可能です。これにより、今までどうしても結晶化ができなかったタンパク質(およびタンパク質複合体)の構造が次々と解明されています。

タンパク質の立体構造を計算によって予測しよう、という試みも何十年と続けられてきました。既知の立体構造を持つタンパク質に似たアミノ酸配列を持つタンパク質はやっぱり似た立体構造を持つだろう、ということで、この作業を計算機にやらせる、というのが今まで、一番当たりそうな方法でした。計算だけに頼るアプローチは2つあります。1分子の構造変化の時間追跡(MD, molecular dynamics)、多分子の統計力学的解析です。

MDはニュートン力学の計算です。1つ1つの原子に化学結合の拘束と原子間力と電荷を与えて全原子の運動をフェムト秒刻みで追跡するのです。多くの星がお互いに重力を及ぼしながら運動する天文学の多体問題と似ています。そして、計算の出発点となる初期構造が必要です。

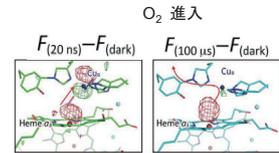
タンパク質の立体構造は、1つ1つ実験で決める

X線による結晶解析

X線自由電子レーザーで動画

シトクロームオキシダーゼにCO (O₂ analog)を結合させておいて、閃光でCOを追い出す(O₂結合の逆)。nano secの間に起きる構造変化とO₂の進入経路を解明

Shimada, ..., Yoshikawa, Tsukihara
Sci Adv. 2017

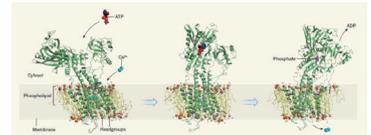


rocking motion

結晶解析で膜も見える

Ca pumpのほぼ全中間体の構造を、周囲の膜(~50分子のリン脂質)とともに解明

Norimatsu, ..., Toyoshima
Nature 2017

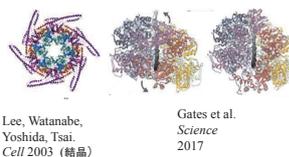


低温電子顕微鏡による単粒子解析

結晶困難なタンパク質の構造決定。
大きい分子ほど有利。早い。

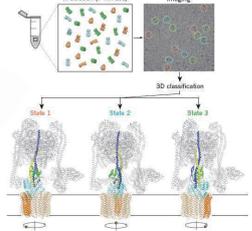
複数の構造の混合物でも
分類できれば、構造がわかる

Hsp104; プリオン凝集体やアミロイドを溶かす



Lee, Watanabe,
Yoshida, Tsai
Cell 2003 (結晶)

Gates et al.
Science
2017



さらに

時間分解の構造(~msec)
連続的な構造変化

ATP synthase
Meier et al. Mol
Cell 2016

V-ATPaseのモータ回転
Rubinstein et al. Nature 2016

立体構造を計算で予測する

分子動力学 MD : 時間

運動力学:

1分子の構造の動きの時間変化を追ってゆく

自由エネルギー計算 : 空間

統計力学:

ある一瞬の多数の分子の構造の分布

タンパク質の分子動力学(MD)シミュレーション

■ 力場の方程式 (古典力学)

$F =$ 化学結合力 + ファンデルワール力 + 静電的力

$$F_i = m_i \frac{d^2 x_i}{dt^2} \quad i: \text{each atom}$$

■ 初期構造が必要

■ 計算: タンパク質全原子(1万-1000万)と水原子

1 femto (10⁻¹⁵) sec の時間刻み

MDにはいくつか問題点があります。まず、計算の基礎となる力場の方程式ですが、量子論は含まれず、あくまで近似です。タンパク質の構造と言ったら誰でも知っている水素結合も疎水相互作用も含まれていません。中性のはずの炭素原子にもマイナス電荷を割り振ったりしています。小さい分子の計算結果が実際の分子の構造に合うように数値を割り振っているのです。はたしてこれが大きなタンパク質分子に有効なのか、予断できません。

初期構造も問題です。ふつう結晶解析などで決まった構造を初期構造として採用します。構造未知のタンパク質には使えません。水素の位置などはわからないのがふつうなので、推定です。また、実際のタンパク質の構造は揺らいでいます。知りたい構造が大きく揺らいだときの構造である場合、計算してもそこにたどりつけない可能性が大きい。多数の異なる初期構造から計算を繰り返すためには、多数の既知の（あるいは仮定の）構造が必要ですし、また計算量が膨大になります。

一番の問題は、計算量です。10 フェムト秒以上の時間刻みだとうまくいきません。1 フェムト秒後の（最低でも）数万の原子の位置を数値的に計算し、その計算結果の構造を元にまた 1 フェムト秒後の原子の位置を計算する、という繰り返しです。タンパク質の folding や生物的に意味のある構造変化は大抵の場合、ミリ秒以上のオーダーですから、繰り返しは膨大になります。世界最速の計算機でもマイクロ秒の計算がせいぜいです。

しかたがないので、この分野の研究者は「粗視化」をやります。大胆な単純化によって計算量を減らして、ミリ秒くらいの長時間の構造変化を見ようというのです。しかし、都合のいい粗視化の方法は未だ見つからず、計算結果はあまり信頼性がありません。薬の候補となる低分子とタンパク質の結合のスクリーニング計算でも当たるのは数パーセント以下だそうです。さらに問題なのは、これでは力場の方程式が有効なのかどうか、それもわからないことです。

「力場の方程式」の問題

正しいのか？

この方程式は、水素結合も疎水結合も含まない！

物理学的な根拠が不明確

小さい分子にはOK、しかし、タンパク質に使えるのか？



中性の原子にまで適当に(実験結果に合うように)電荷を割りふっている

「初期構造」の問題

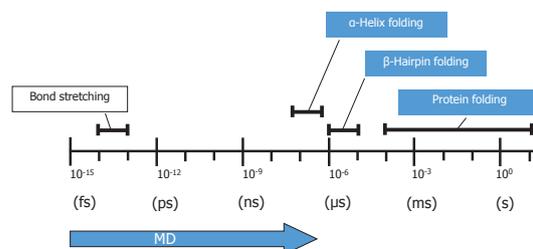
結晶構造、単粒子低温電顕、NMR

初期構造を設定

実際には揺らぎがある。多くの初期構造で計算する必要

「計算」の問題

タンパク質の機能的な構造変化は 1 msec (10^{-3}) 以上 1兆回の計算



「計算」の問題

今まで

計算力不足で、1μs の計算もたいへん

さまざまな「粗視化」(乱暴な単純化)で計算量を 1000分の1 以下に

1. 計算結果が頼りにならない
2. 力場方程式が正しいのか、不明

ところが最近大きな進歩がありました。米国の計算科学者 David E. Shaw は、計算技術を使って株式で大富豪になり、その資金で私立研究所を設立し MD 専用計算機 (Anton と称す) を作り上げたのです。今までの巨大な汎用計算機は膨大な数の計算コアを並列させたものですが、コア間の通信にますます時間がかかるようになっていきます。そこで Shaw たちは CPU チップから専用のものを開発し無駄な計算をはぶき、今までよりも数桁速い計算速度を実現したのです。

MD専用計算機の開発

David E. Shaw

元コロンビア大学・計算機科学教授。
モルガンスタンレー入社後、個人の投資会社を設立。資産2000億円以上。



富士通 90nm テクノロジー

普通のCPUだと無駄な計算が多いので、専用CPUにすれば速い。

並列計算機(「京」60万のユニット)は、並列が多くなるとユニット間の通信が速度制限



MD専用計算機 Anton

2010年 個人の研究所
D.E. Shaw Research (DESRES) を設立
MD 専用計算機 ANTON-1、-2 を開発

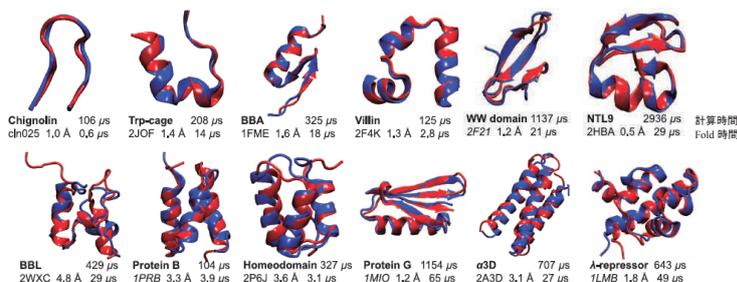
■ 2万原子の系で1日に10 μ sを計算。
日本のスパコン「京」の100倍以上

開発は大きな賭けでした。というのは、力場の方程式が大きなタンパク質にも有効かどうか誰も知らなかったわけで、もし無効なら何の役にも立たない計算機を何百億円もかけて作ったことになりまから。しかし、まず、ごく小さなタンパク質の構造を、アミノ酸配列だけの情報を与えて計算したところ、百発百中でかつてない正確さで予測できました。

小さなタンパク質の fast folding 計算の成功

赤(実験)、青(計算)

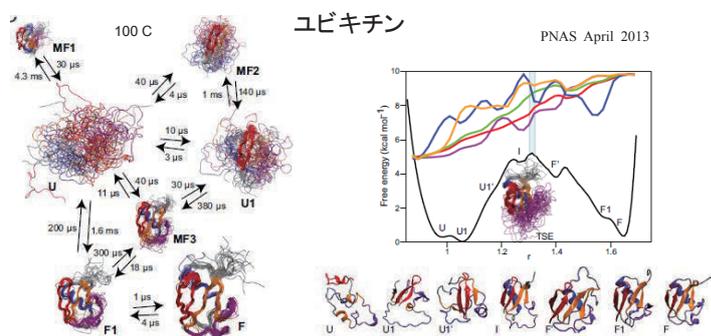
Science 2011, 334, 517



1. 計算した構造は、実際の構造とよく一致している。
2. Folding の経路は、1つ、あるいは2つ(β -sheet のできる順番が違う)
3. Unfold でも、native-like の部分構造(α -helix が多い)が出現消滅している。
native-like topology で folding が始まる。sequential stabilization 起きている
4. 律速の過程はない(大きなenergy barrier はない)

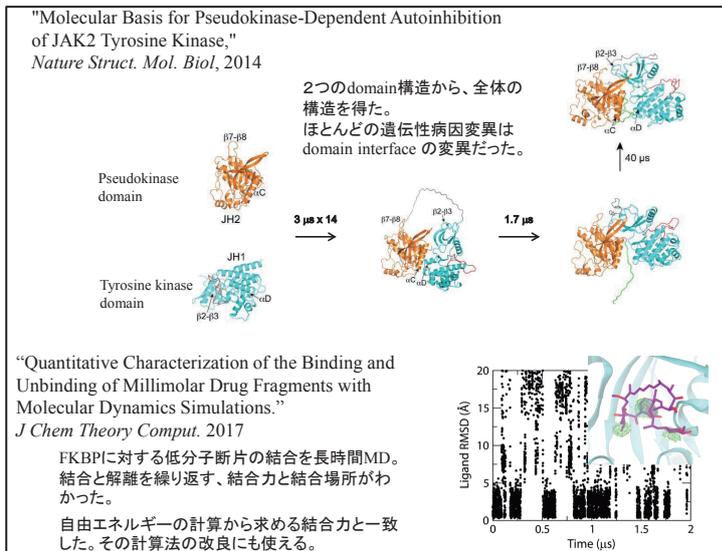
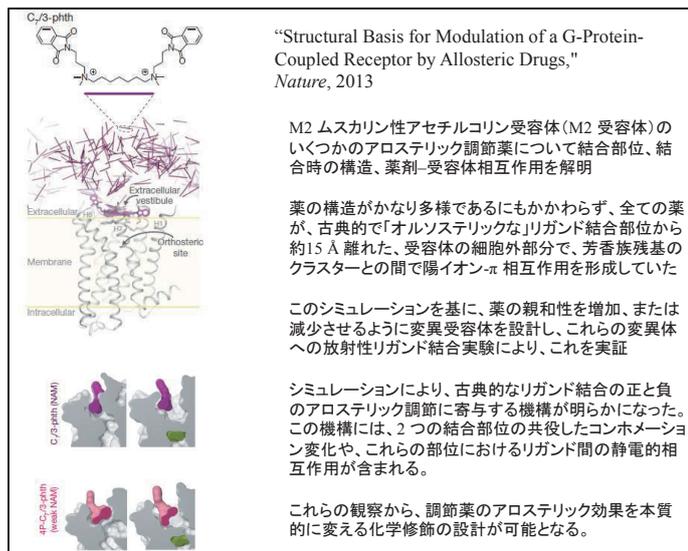
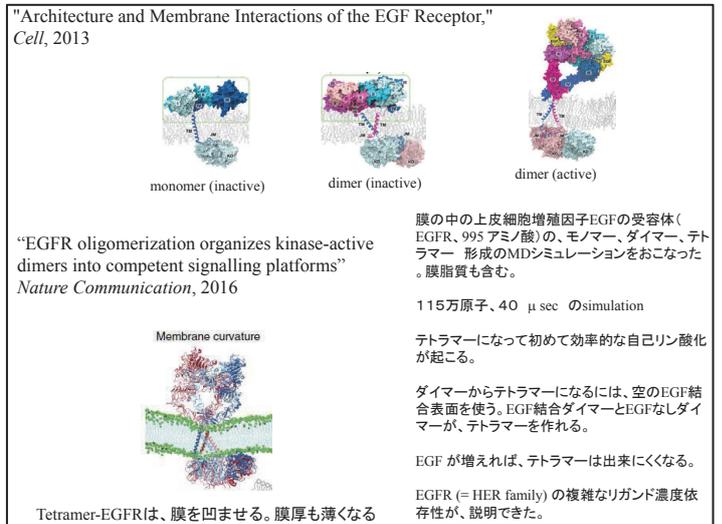
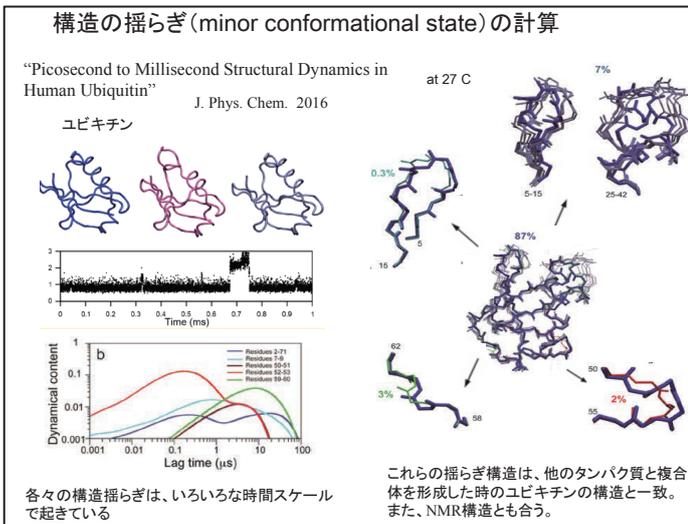
次に Shaw たちは本格的なタンパク質としてユビキチン (アミノ酸 76 個) の folding を計算しました。すると、自由に動くヒモ状の unfold の状態から天然の(native)立体構造まですべての過程が計算で出現しました。変性温度 (100 度) で計算すると、ユビキチンは unfold と native の間を行き来します。また、これで力場の方程式がタンパク質にも適用可能であることが証明されました。ついにアミノ酸配列から立体構造を計算できる時代が来たのです。

普通のタンパク質の slow folding 計算の成功



興味のある方のために以下の4枚の図で Anton の計算の威力をいくつか示します。

- native-like の部分構造が早くから出現
- Energy barrier (~5 kcal/mol)がある (= folding 中間体がある)
- **力場の仮定が正当化された**
- folding は過去の履歴に依らない



MD専用機で切り開かれたタンパク質の計算化学は今後どのような発展をするだろうか。まず、力場の方程式の改良が格段に進むでしょう。計算結果の良し悪しの評価が正確に出来れば、計算方法の改良は計算機自体にやらせることができます。例えば最近の計算将棋の進歩は、棋面の評価の改良によるところが大きいです。さらなる方法の改良と計算機の開発により、タンパク質すべてのうち30%くらいは計算で立体構造がわかるようになる、とShawは述べています。

分子動力学(MD)によるタンパク質研究の今後

ANTONで力場の方程式の改良

例：計算ではfolding 初期のポリペプチド鎖の凝集が過度に進む

$$F = \text{化学結合力} + \text{ファンデルワール力} + \text{静電的力}$$

引力ばかりで斥力がないから？(吉田)

評価関数があれば、改良は限界まで進む

計算力

Shaw said; 今でもPDB(protein data bank)の10%は、計算可能。10年以内にはこれは30%になるだろう。

1000万原子の長時間(msec)シミュレーションをめざして最高の研究者を集めている

Anton-1 → Anton-2 (x2 速度) → Anton-3 (x4 速度)

しかし、大きな問題があります。Anton の開発はすべて Shaw の私費によって行われました。得られた情報や計算機の使用は、外部に対して閉ざされています。科学の公開性はここにはありません。この分野は大きな実用的な需要があります。独占的な新薬の開発です。外部のアクセスを遮断する理由があるのです。科学界が今まで経験しなかった資本主義的な科学知識の独占です。私は、日本でも Anton 級の MD 専用機の開発が急務だと思います。

最後に、MD とまったく異なる「統計力学」的なアプローチについて紹介します。ここからは、元分子研で現豊田理化学研究所の平田文男さんの理論の紹介です。私も議論に加わって最近、一つの定式に表現されました。タンパク質の構造は水溶液中で水分子と相互作用しながらその時の平衡構造の付近でゆらいでいます。天然構造が非常にまれに極端にゆらいで完全変性してもまたもとの天然構造にもどることができます。すなわち、タンパク質の構造変化は弾性変形です。

弾性変形ならば線形代数が使える、そして平衡構造からのずれの大きさに比例した復元力が働く、その結果、タンパク質の構造ゆらぎはガウス分布を含む関数で表現できます。その関数に大きな摂動を与えれば大きなゆらぎの構造を知ることができます。さらに、溶液の条件が大きく変るときにはタンパク質の構造も大きく変わりますが、解析接続という方法で途中の構造を知ることができます。原理的には、アミノ酸配列から立体構造が計算できるといいます。しかも少ない計算量で。まだ開発中ですが、期待しています。

問題

ANTON 24台。外部に使わせない。売らない。

ビル・ゲイツ, ジェフ・ベゾス (Amazon) などの協力

米国の薬会社と 1.2 billion dollar (1000億円超) の契約

日本 理研で Shaw の 100分の1(?) の予算で開発中

2014年に完成予定だったが……

新たに組織と予算を集中して日本でも ANTON 級の MD 専用機を

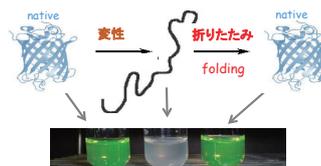
タンパク質の自由エネルギー計算

変形 (ものの形が変わる)

塑性変形: 非可逆的 (破壊現象), 非線形, 地震

弾性変形: 可逆的 (もとに戻る), 線形の数学的記述, 力学的エネルギー 弾性; バネ, ボール
エントロピー 弾性; ゴム

タンパク質の構造は? 自由エネルギー 弾性変形



クラゲの蛍光タンパク質(GFP)

$y = f(x)$ は解明できる可能性

水中のタンパク質の構造ゆらぎは弾性変形であり、線形応答理論が使える

F. Hirata, M. Sugita, M. Yoshida, K. Akasaka.
J. Chem. Phys. 145, 234106 (2016)

タンパク質の構造のゆらぎ (変位 \propto 力、ばねのフックの法則と同じ)

溶媒の水分子も考慮したタンパク質の自由エネルギー曲面上での基準振動解析

$$\mathbf{R}_\alpha(t) = \mathbf{R}_\alpha(t = \infty) - \frac{1}{k_B T} \sum_\gamma \langle \Delta \mathbf{R}_\alpha(t) \Delta \mathbf{R}_\gamma \rangle_{eq}^{(0)} \cdot \mathbf{f}_\gamma(0)$$

平衡構造に摂動を与えてゆらぎ構造を計算

大きなゆらぎの構造を取り出すためには、大きな摂動をかける

数秒に 1 回出現する構造も、短い計算時間でわかる

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」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た。

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。Hsp47 阻害剤の探索を行い、得られた Hsp47 阻害化合物の一部について論文を発表し、新たなスクリーニング系の開発も同時に進め、より阻害効果の高い阻害化合物を探索している。このプロジェクトは製薬会社との共同研究に発展し、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 (ACT-MS) に採択された。

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。本プロジェクトを推進してきた博士研究員山本洋平は、大阪大学歯学部助教として赴任することになった。

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、一部に民族性・家族性の発症を認める。我々はモヤモヤ病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、ミスチリンタンパク質が 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、USP15による正の制御を受けることなどを明らかにしてきたが (*Sci Rep* 2014, 2015, 2017)、最近ついに、ミスチリンの細胞内機能の同定に成功し、さらに解析を進めている (submitted)。

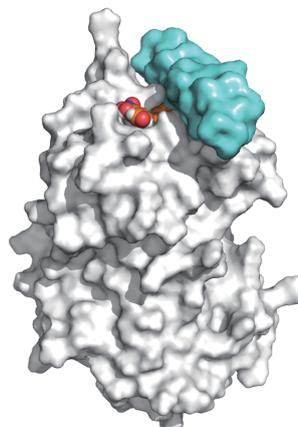
2. 本年度の研究成果

1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

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 の研究を総説として発表した (S.Ito, K.Nagata *Semin Cell Dev Biol.* 2017)。Hsp47 は線維化疾患の増悪因子ともなり、有望な分子標的とされてきた。Hsp47 阻害剤の探索を行い、得られた Hsp47 阻害化合物の一部について論文を発表した (S.Ito et al, *J Biol Chem.* 2017)。新たなスクリーニング系の開発も同時に進め、より阻害効果の高い阻害化合物を探索している。このプロジェクトは製薬会社との共同研究に発展し、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に採択され、臨床応用に向け精力的に研究が進められている。

蛍光相関分光法 (FCS) を用いてコラーゲン添加時の蛍光ラベルした Hsp47 の拡散速度の変化から相互作用を解析でき、その相互作用は pH6.6 から 6.3 にかけて徐々に失われ、再度 pH7.3 に戻ると回復することが分かった。同一分子の pH 依存的なコラーゲンとの相互作用の回復を観察できたのは始めてである (Kitamura A et al, *BBRC* 2018)。

Unfold protein response (UPR) は小胞体に正しくフォールディングできていないタンパク質が存在する際の小胞体の恒常性を維持する応答である。小胞体膜タンパク質 IRE1 は UPR 時に活性化し、転写因子 XBP1 のスプライシングを通して、応答シグナルをサイトゾルへと伝達している。今回、分子シャペロン Hsp47 が Bip と競合し、IRE1 の活性化を調整していることが共同研究により明らかになった (Sepulveda D et al, *Mol Cell.* 2018)。この論文は雑誌の表紙を飾った (文責：伊藤)。

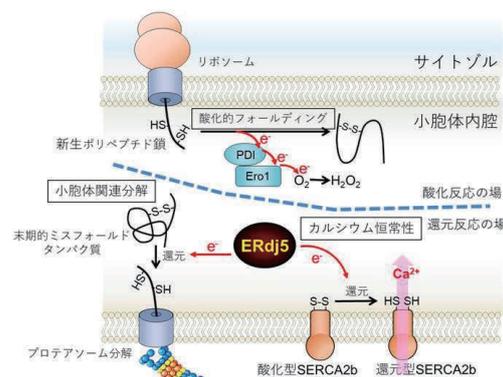


Hsp47(白)とコラーゲン(青)の相互作用を低分子化合物(黄)が阻害する。

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受し、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。新たな因子を介し、これまで明らかにされてこなかった小胞体内腔の還元力導入機構について解明を進めている (文責：潮田)。



これまで、小胞体はEro1-PDIを中心とした酸化反応の場として捉えられていたが、還元酵素ERdj5の発見により、ジスルフィド還元反応が「タンパク質品質管理」、「カルシウム制御」を含む小胞体恒常性にとって非常に重要であるということが明らかになった。

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をまとめ論文投稿中である。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 (文責: 山本)。

4) モヤモヤ病感受性遺伝子ミスチリンの機能解析

ミスチリンの酵素活性、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、一方でミスチ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、ミスチリンの細胞内局在について詳細な解析を行い、ミスチリンが中性脂肪の貯蔵サイトである脂肪滴に局在し、脂肪分解を負に制御する因子であることを明らかにした。現在、これらの結果について論文投稿すると共に、さらに詳しい解析を進めている (submitted)。

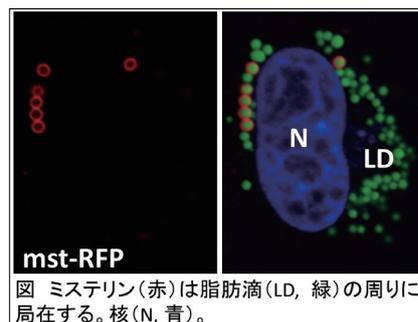


図 ミスチリン(赤)は脂肪滴(LD, 緑)の周りに局在する。核(N, 青)。

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. Hsp47 is an endoplasmic reticulum (ER)-resident collagen-specific molecular chaperone essential for correct folding of procollagen in the ER (S.Ito, K.Nagata *Semin Cell Dev Biol.* 2017). Hsp47 could be a promising target for the management of fibrosis. We screened small-molecule compounds Col003 that inhibit the interaction of Hsp47 with collagen from chemical libraries and we found a molecule Col003 competitively inhibited the interaction and caused the inhibition of collagen secretion (S.Ito et al, *J Biol Chem.* 2017). We are developing a new screening system and are searching for more effective Hsp47 inhibitor. Collaborated with a pharmaceutical company this project was adopted by ACceleration Transformative research for Medical Innovation Setup scheme (ACT-MS) of Japan Agency for Medical Research and Development (AMED). We established a method for rapidly and quantitatively measuring the interaction between HSP47 and collagen in solution using fluorescence correlation spectroscopy. The diffusion rate of HSP47 labeled with Alexa Fluor 488 decreased upon addition of type I or III collagen. We observed dissociation of collagen from HSP47 at low pH and re-association after recovery to neutral pH (Kitamura A et al, *BBRC* 2018). Maintenance of ER proteostasis is controlled by a dynamic signaling network known as the unfolded protein response (UPR). IRE1 α is a key UPR transducer, determining cell fate under ER stress. Using cellular and biochemical analysis we found Hsp47 directly binds to IRE1 α , displacing the negative regulator BiP from the complex to facilitate IRE1 α oligomerization. We conclude that Hsp47 adjusts IRE1 α signaling by fine-tuning the threshold to engage an adaptive UPR (Sepulveda D et al, *Mol Cell.* 2018) .

2: Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation and Ca²⁺ 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 Ca²⁺ pump on ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca²⁺ 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 Ca²⁺ homeostasis in the ER (R. Ushioda *et al.*, **PNAS** 2016). Furthermore, we screened the interaction partner of ERdj5 to declare redox source of ERdj5. From MS analysis, we have identified the candidate of electron donor for ERdj5. We are trying to reveal the unknown mechanism of electron transfer into ER resident proteins.

3: ERdj8 regulates the size of autophagosomes to degrade large autophagic targets

Non-selective and selective-autophagy promote the degradation of several size 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 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 μ m latex beads (Lysophagy) and damaged mitochondria (Mitophagy), even though small autophagic targets such as 1 μ 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). Moreover, we recently identified its significant involvement in lipid metabolism in cells (submitted).

4. 論文、著書など

S. Hirayama, M. Sugihara, D. Morito, S. Iemura, T. Natsume, K. Nagata : Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** in press

P. Sasikumar, KS. AlOuda, W.J. Kaiser, LM. Holbrook, N.Kriek, AJ. Unsworth, AP. Bye, T. Sage, R. Ushioda, K. Nagata, RW. Farndale, JM. Gibbins : The chaperone protein HSP47: a platelet collagen binding protein that contributes to thrombosis and hemostasis **Journal of Thrombosis and Haemostasis** in press

C. Caba, Hyder A. Khan, J. Auld, R. Ushioda, K. Araki, K. Nagata, B. Mutus : Conserved Residues Lys57 and Lys401 of Protein Disulfide Isomerase Maintain an Active Site Conformation for Optimal Activity: Implications for Post-translational Regulation **Frontiers in Molecular Biosciences** in press

A. Kitamura, Y. Ishida, H. Kubota, CG. Pack, T. Homma, S. Ito, K. Araki, M. Kinjo, K. Nagata : Detection of substrate binding of a collagen-specific molecular chaperone HSP47 in solution using fluorescence correlation spectroscopy.

Biochem Biophys Res Commun. in press

D. Sepulveda, D. Rojas-Rivera, DA. Rodríguez, J. Groenendyk, A. Köhler, C. Lebeaupin, S. Ito, H. Urra, A. Carreras-Sureda, Y. Hazari, M. Vasseur-Cognet, MMU. Ali, E. Chevet, G. Campos, P. Godoy, T. Vaisar, B. Bailly-Maitre, K. Nagata, M. Michalak, J. Sierralta, C. Hetz. : Interactome Screening Identifies the ER Luminal Chaperone Hsp47 as a Regulator of the Unfolded Protein Response Transducer IRE1 α . **Mol Cell.**, in press

S. Ito, K. Ogawa, K. Takeuchi, M. Takagi, M. Yoshida, T. Hirokawa, S. Hirayama, K. Shin-Ya, I. Shimada, T. Doi, N. Goshima, T. Natsume, K. Nagata : A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone and could represent a potential remedy for fibrosis

J. Biol. Chem. 292:20076-20085 (2017)

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** 25:846-857 (2017)

Y. Kotani, D. Morito, K. Sakata, S. Ainuki, M. Sugihara, T. Hatta, S. 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** 7:44293 (2017)

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** 1(520):22-26 (2017)

S. Ito & K. Nagata : Biology of Hsp47 (Serpine H1), a collagen-specific molecular chaperone **Seminars in Cell and Developmental Biology** 62:142-151 (2017)

D. Morito and K. Nagata : Molecular Biology of Mysterin/RNF213 **Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Part III**, pp45-57 (2017)

D. Morito and K. Nagata : Physiological Role of Mysterin/RNF213 in Zebrafish **Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Part III**, pp59-67 (2017)

5. 学会発表など

招待講演、シンポジウム等

Kazuhiro Nagata : Regulation of Proteostasis and Calcium Homeostasis in the ER and of Autophagy. The 2017 Japan -NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease, Sendai (Japan), 2017.2.17

永田和宏 : ミステリンの生物学 第13回福岡脳神経血管内治療シナプス、福岡市、2017.04.14

Kazuhiro Nagata : Cross-talk of protein, redox and calcium homeostasis in the ER Proteostasis Mini-symposium at Northwestern, Evanston (USA), 2017.04.20

Kazuhiro Nagata : Protein quality control in the ER: ERAD and autophagy CNIO Frontiers Meeting "Molecular Chaperones in Cancer", Madrid (Spain), 2017.05.02

永田和宏 : 小胞体恒常性の維持機構 日本生化学会中部支部例会、名古屋市、2017.05.20

永田和宏 : 膜であるヒトの内と外 ラボカフェスペシャル featuring サーチプロジェクト、大阪市、2017.05.24

Kazuhiro Nagata : Redox cascade protein folding in the ER International Symposium on Protein Quality Control, Nara (Japan), 2017.06.04

永田和宏 : Maintenance of ER homeostasis by redox cascade 第5回新学術領域研究「酸素生物学」全体班会議特別講演、吹田市、2017.06.17

Kazuhiro Nagata : Regulation of ER Homeostasis by Redox Signaling Gordon Research Conference "Stress Proteins in Growth, Development & Disease", Sundry River (USA), 2017.07.12

Kazuhiro Nagata : Cross-talk of protein, redox and calcium homeostasis in the ER Seminar to the National Institutes of Health (NIH), Bethesda (USA), 2017.07.21

Kazuhiro Nagata : Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum (Presentation of the Hans Neurath Award) Protein Society Annual Symposium, Montreal (Canada), 2017.07.24

Kazuhiro Nagata : Redox-mediated regulatory mechanism of ER homeostasis Seminar in McGill University, Montreal (Canada), 2017.07.26

Kazuhiro Nagata : Maintenance of ER homeostasis by ER redox network INM Institute Seminar, Saarbrucken (Germany), 2017.08.11

Kazuhiro Nagata : Redox-mediated regulatory mechanism of ER homeostasis The 8th CSSI International Congress on Stress Proteins in Biology and Medicine, Turku (Finland), 2017.08.16

永田和宏 : Redox-mediated regulation of ER homeostasis 2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸市、2017.12.09

学会発表

森戸大介 : モヤマヤ病タンパク質ミスチリンの同定と機能解析 第3回4大学1研合同研究会、京都市、2017.1.7-8 (口頭発表)

瀧野友愛、山本洋平、永田和宏 : ERdj8 regulates the size of autophagosomes to degrade large autophagic targets

第3回4大学1研合同研究会、京都市、2017.1.7-8(口頭発表)

堤智香、上垣日育、山下龍志、潮田亮、永田和宏 :

Zinc-dependent functional switching of ERp18, a novel thioredoxin homolog in the ER

第3回4大学1研合同研究会、京都市、2017.1.7-8(口頭発表)

山本洋平 : ERdj8 regulates the size of autophagosomes to degrade large autophagic targets

群馬大学生体調節研究所セミナー、前橋市、2017.2.2

(口頭発表)

森戸大介 : Mysterin, a unique enzyme associated with moyamoya disease 第307回熊本大学発生医学研究所セミナー、熊本市、2017.3.27 (口頭発表)

大村圭一、奥村正樹、前川憲一、金村進吾、井上道雄、天貝佑太、潮田亮、永田和宏、稲葉謙次 : ERdj5とBiPの共役による基質ジスルフィド結合の還元機構の解明

Disulfide reducing mechanism by which BiP facilitates catalysis of ERdj5 第17回日本蛋白質科学会年会、仙台市、2017.6.20-22

Michio Inoue, Nanami Sakuta, Satoshi Watanabe, Kunihito Yoshikaie, Masataka Umitsu, Yoshiki Tanaka, Ryo Ushioda, Yukinari Kato, Junichi Takagi, Tomoya Tsukazaki, Kazuhiro Nagata, Kenji Inaba Crystal structures of SERCA2b reveal the mechanism of its redox-dependent activity regulation.

第17回日本蛋白質科学会年会、仙台市、2017.6.20-22

潮田亮 : レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の解明 生理学研究所研究会「オルガネラダイナミクスの新規制御機構とその病態生理」、岡崎市、2017.05.31 (口頭発表)

Ryo Ushioda : Electron donor for disulfide reductase ERdj5 in ER International Symposium on Protein Quality Control, Nara (Japan), 2017.06.04

潮田亮：Redox-assisted regulation of ER homeostasis
第69回日本細胞生物学会大会、仙台市、2017.06.13-15（ポスターと口頭発表）

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への関与
第 69 回日本細胞生物学会大会、仙台市、2017.06.13-15（ポスターと口頭発表）

藤井唱平、潮田亮、永田和宏：レドックスによる小胞体カルシウム放出チャンネルの活性制御機構の解明
細胞生物学会大会、仙台市、2017.06.13-15（ポスターと口頭発表）

山下龍志、潮田亮、永田和宏：小胞体還元酵素ERdj5欠損が引き起こすミトコンドリア断裂メカニズムの解明
細胞生物学会大会、仙台市、2017.06.13-15

潮田亮、上垣日育、藤井唱平、永田和宏：
新生鎖による還元酵素 ERdj5 の還元メカニズム
第 17 回日本蛋白質科学会年会、仙台市、2017.06.21（口頭発表）

Chika Tsutsumi, Kaiku Uegaki, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata：Zinc-dependent functional switching of ERp18, a novel thioredoxin homolog in the ER
Gordon Research Conference “Stress Proteins in Growth, Development & Disease”, Sundry River(USA), 2017.07.09-13

Shinya Ito, Koji Ogawa, Koh Takeuchi, Masahito Yoshida, Takatsugu Hirokawa, Takayuki Doi, Naoki Goshima, Tohru Natsume, Kazuhiro Nagata：Inhibition of collagen-specific molecular chaperone Hsp47 with small molecules.
The 8th International Congress on Stress Proteins in Biology and Medicine, Turku (Finland), 2017.08.13-17

會退詩央莉、森戸大介、杉原宗親、永田和宏：
モヤモヤ病感受性遺伝子mysterinの細胞内機能の同定
新学術「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ、京都市、2017.08.29-31

葛西綾乃、山本洋平、瀧野友愛、杉原宗親、上田洋行、梅本哲雄、濱崎万穂、佐藤美由紀、佐藤健、八田知久、Richard I.Morimoto、夏目徹、荒井律子、和栗聡、吉森保、Shoshana Bar-Nun、永田和宏：Turnover of ERdj8 through the endoplasmic reticulum associated degradation regulates the size of autophagosomes
新学術「新生鎖の生物学」第 4 回若手ワークショップ、京都市、2017.08.29-31

山下龍志、潮田亮、永田和宏：小胞体ジスルフィド還元酵素ERdj5欠損が引き起こすミトコンドリア断裂メカニズムの解明
新学術「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ、京都市、2017.08.29-31

潮田亮：Electron donor for disulfide reductase ERdj5 in ER
第12回小胞体ストレス研究会、生駒市、2017.10.9-10

山本洋平、葛西彩乃、瀧野友愛、杉原宗親、上田洋行、梅本哲雄、濱崎万穂、佐藤美由紀、佐藤健、八田知久、夏目徹、Richard I.Morimoto、荒井律子、和栗聡、Shoshana Bar-Nun、吉森保、永田和宏：小胞体関連分解（ERAD）によるオートファゴソームのサイズ調節機構
第12回小胞体ストレス研究会、生駒市、2017.10.9-10（ポスター大賞受賞）

上垣日育、潮田亮、永田和宏：小胞体ジスルフィド還元酵素ERdj5の還元メカニズムの解明
第12回小胞体ストレス研究会、生駒市、2017.10.9-10（ポスター賞受賞）

藤井唱平、潮田亮、永田和宏：レドックスによる小胞体カルシウム放出チャンネルの活性制御機構
新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成29年度第1回班会議、大分県速見郡、2017.11.08-10（ポスターとフラッシュトーク）

上垣日育、潮田亮、高島成二、稲葉謙次、永田和宏：
新生鎖による小胞体ジスルフィド還元酵素ERdj5の還元メカニズムの解明。新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成29年度第1回班会議、大分県速見郡、2017.11.08-10

潮田亮：Redox regulation for Hormesis in ER
Conbio2017生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017.12.06-09(口頭発表)

伊藤進也、永田 和宏：小胞体におけるコラーゲンとその特異的分子シャペロン間の相互作用の検出と阻害

Conbio2017 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017.12.06-09 (ポスターと口頭発表)

杉原宗親、森戸大介、會退詩央莉、永田和宏:

A New Mechanism for Fat Regulation

Conbio2017 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017.12.06-09

瀧野友愛、山本洋平、Richard I.Morimoto、佐藤美由紀、佐藤健、永田和宏: Physiological analysis of a novel ER membrane protein, ERdj8

Conbio2017 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017.12.06-09 (ポスターと口頭発表)

會退詩央莉、森戸大介、杉原宗親、永田和宏:

Enzymatic activities and biological function of moyamoya disease-associated factor mysterin

Conbio2017 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017.12.06-09 (ポスターと口頭発表)

山下龍志、潮田亮、永田和宏: Deficient of ER-resident reductase ERdj5 causes disruption of Mitochondrial morphology

Conbio2017 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017.12.06-09

葛西綾乃、山本洋平、瀧野友愛、杉原宗親、上田洋行、梅本哲雄、濱崎万穂、佐藤美由紀、佐藤健、八田知久、Richard I.Morimoto、夏目徹、荒井律子、和栗聡、吉森保、Shoshana Bar-Nun、永田和宏:

A novel ER membrane protein, ERdj8 regulates the size of autophagosomes

Conbio2017 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017.12.06-09 (ポスターと口頭発表)

作田菜奈美、井上道雄、渡部聡、潮田亮、永田和宏、稲葉謙次: Structural and functional analysis of human Sarco/Endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a

Conbio2017 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017.12.06-09 (ポスターと口頭発表)

藤井唱平、潮田亮、永田和宏: レドックスによる小胞体カルシウム放出チャネルの活性制御機構の解明

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的基盤技術」領域 H29 年度領域会議、東京都、2017.12.21-22

6. その他特記事項

1) 外部資金

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的基盤技術」

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

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年

資生堂

研究代表者: 永田和宏、取得年度: H29-30年

大塚製薬

研究代表者: 永田和宏、取得年度: H29-30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：H29-30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：H27-29年(3年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の還元メカニズムの還元、研究代表者：上垣日育、取得年度：H29-31年(3年)

東北大学 CORE ラボ共同研究

研究課題名：レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の解明

研究代表者：潮田亮、取得年度：H29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：H29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：H29年(1年)

2) 知財権等

該当なし

3) 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：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「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：日本学術振興会 科学研究費助成事業「特別推進研究」選定委員

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的基盤技術」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：大隅基礎科学創成財団 理事、評議員

永田和宏：生命誌研究館 顧問

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：DNA and Cell Biology, 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

4) 受賞等

永田和宏：The Protein Society (USA), “Hans Neurath Award” 受賞 (Montreal)

山本洋平、葛西彩乃、瀧野友愛、杉原宗親、上田洋行、梅本哲雄、濱崎万穂、佐藤美由紀、佐藤健、八田知久、夏目徹、Richard I. Morimoto、荒井律子、和栗聡、Shoshana Bar-Nun、吉森保、永田和宏：第12回小胞体ストレス研究会、ポスター大賞受賞

上垣日育、潮田亮、永田和宏：第12回小胞体ストレス研究会、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。

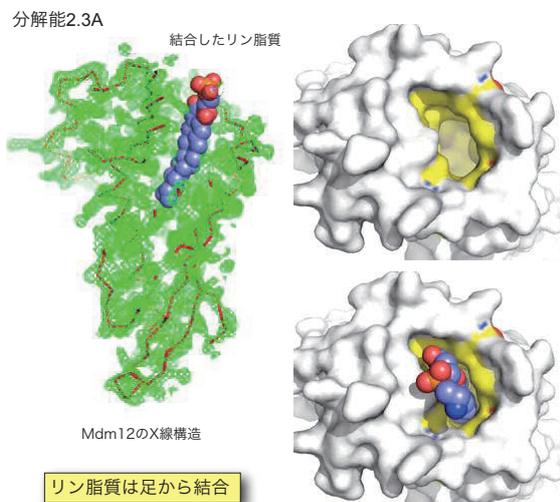
2. 本年度の研究成果

1) ミトコンドリア外膜トランスロケータ TOM 複合体の動的アセンブリーの解析

外膜トランスロケータ TOM 複合体の Tom22 を過剰発現して部位特異的光架橋実験をおこなうと、サイトゾルの Hsp70 (Ssa1) との架橋、外膜の Por1 (ヒト VDAC ホモログ) との架橋が見出される。Ssa1 には、TOM 複合体に組み込まれる前の Tom22 を組み込み可能な状態に保つアセンブリー因子の働きがあると考えられる。Por1 にも同様の働きがある可能性があるため、Por1 欠損株で Tom22 の TOM 複合体へのアセンブリーを調べたところ、Tom22 が欠損するとアセンブリー速度が上昇した。野生型酵母株でも、Tom22 はアセンブリー途上で Por1 と一過的に相互作用することが架橋により確認された。したがって、Por1 は複合体に組み込まれないフリーの Tom22 を安定化する働きがあるものと考えられる。さらに、TOM 複合体のサブユニット Tom6 欠損株は 3 量体 TOM 複合体から Tom22 を欠く 2 量体 TOM 複合体に動的平衡をシフトさせるが、Tom6 欠損に加えて Por1 を欠損させると 2 量体 TOM 複合体から 3 量体 TOM 複合体に戻ることが分かった。しかしこの 3 量体 TOM 複合体はインポート能に欠損があり、その理由を検討中である。

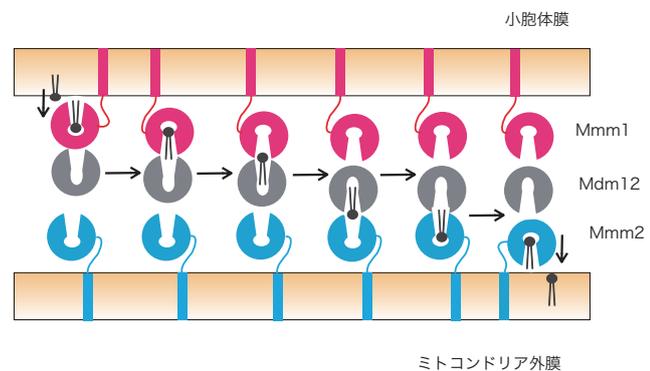
2) ERMES 複合体によるミトコンドリア-ER 間脂質輸送機構の解明

酵母細胞内でミトコンドリアと ER の物理的なコンタクト（テザリング部位）をつくる ERMES が脂質輸送に関わるかどうかを検証すべく、酵母 *K. lactis* の Mdm12 の X 線構造を 2.3 Å の分解能で決定した（右図）。Mdm12 には疎水性の深いポケットが外に向かって開いており、ここにリン脂質が結合していた。このリン脂質は大腸菌細胞膜の主要脂質のホスファチジルエタノールアミン (PE) であった。したがって Mdm12 が脂質結合タンパク質である



こと、脂質の脂肪酸部分を認識して結合すること（頭部を認識しないので脂質の種類に対する特異性は低い）が明らかになった。

以上の構造情報は Mdm12 が脂質結合タンパク質であることを示すが、このことは必ずしも単独で脂質輸送能を示すことを意味しない。Mdm12 は Mmm1 と複合体を形成するので、Mdm12, Mmm1 (MBP との融合タンパク質), Mdm12-Mmm1 複合体の各々について、in vitro でリポソームを用いた脂質輸送アッセイ系を使って、Mdm12 と Mmm1 が脂質輸送に関わる可能性を検討した。大腸菌の発現系から精製した Mdm12, Mmm1 (MBP との融合タンパク質), Mdm12-Mmm1 複合体の、in vitro リポソーム間の脂質輸送能は Mdm12 < Mmm1 << Mdm12-Mmm1 の順番であった。Mdm12 の構造に基づいて Mmm1 の構造をホモロジーモデリングで予想し、それに基づいて Mmm1 の予想脂質結合ポケットの変異体を作成、Mmm1, Mdm12-Mmm1 複合体の in vitro でのリポソーム間の脂質輸送能を調べたところ、変異体ではともに輸送能が低下しており、Mdm12-Mmm1 複合体の脂質輸送能は Mmm1 の脂質結合が重要な役割を担うことがわかった。そこで、新規に開発した酵母細胞から単離した ER・ミトコンドリア膜画分を用いた ER-ミトコンドリア間ホスファチジルセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE) 輸送アッセイ系を用いて、ERMES による脂質輸送能を調べたところ、やはり Mmm1 の変異株では PS の輸送が遅れた。したがって ERMES において、Mdm12-Mmm1 は脂質輸送の最小機能ユニットであり、Mmm1 が重要な役割を果たすことが分かった。ERMES による ER-ミトコンドリア間脂質輸送のメカニズムモデルを右図に示す。



Mmm2もMmm1やMdm12と同様、脂質結合 (SMP) ドメインを持っているので、同じような動きを想定できる。

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.

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and are transported to mitochondria by dedicated import systems. The TOM complex in the outer membrane (OM) functions as a protein entry gate through which over 90% of the mitochondrial proteome is imported. The TOM complex consists of the channel-forming β -barrel protein Tom40, and six α -helical membrane proteins. Structural analyses of the TOM complex by site-specific photocrosslinking revealed that the TOM complex exists in two distinct forms, a three-channel form (the “trimer”) and two-channel form (the “dimer”).

Here we discovered that Por1 sequesters the Tom22 molecule that is dissociated from the trimeric TOM complex upon its conversion to the dimeric complex. Por1 is a yeast voltage-dependent anion channel (VDAC) and mediates transport of small molecules across the OM. The absence of Por1 shifts the equilibrium of the TOM complex towards the trimeric form and accelerates the assembly of newly imported

Tom22 into the mature trimeric TOM complex. Tom6 is known to stabilize the trimeric TOM complex; the absence of Tom6 shifts the equilibrium of the TOM complex towards the dimeric form. Intriguingly, simultaneous depletion of Tom6 and Por1 leads to formation of the pseudo-trimeric form of the TOM complex, which was shown to be defective in protein import both in vivo and in vitro. This suggests that Tom6 is critical for guiding the proper assembly of Tom22 into the TOM complex in the absence of Por1, and preventing premature integration of Tom22 into the trimeric TOM complex.

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. ERMES (ER-mitochondrial encounter structure) physically links the membranes of the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria in yeast. Although the ER and mitochondria cooperate to synthesize glycerophospholipids, whether ERMES directly facilitates the lipid exchange between the two organelles remains controversial. Here, we compared the X-ray structures of an ERMES subunit Mdm12 from *Kluyveromyces lactis* with that of Mdm12 from *Saccharomyces cerevisiae*, and found that both Mdm12 proteins possess a hydrophobic pocket for phospholipid binding. However in vitro lipid transfer assays showed that Mdm12 alone or an Mmm1 (another ERMES subunit) fusion protein exhibited only a weak lipid transfer activity between liposomes. In contrast, Mdm12 in a complex with Mmm1 mediated efficient lipid transfer between liposomes. Mutations in Mmm1 or Mdm12 impaired the lipid transfer activities of the Mdm12-Mmm1 complex, and furthermore, caused defective phosphatidylserine transport from the ER to mitochondrial membranes via ERMES in vitro. Therefore the Mmm1-Mdm12 complex functions as a minimal unit that mediates lipid transfer between the membranes.

4. 論文, 著書など

- T. Jores, J. Lawatscheck, V. Beke, M. Franz-Wachtel, K. Yunoki, J.C. Fitzgerald, B. Macek, T. Endo, H. Kalbacher, J. Buchner, D. Rapaport, Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins. *J Cell Biol.* in press.
- T. Endo, Y. Tamura, and S. Kawano, Phospholipid transfer by ERMES components (Editorial). *Aging*, in press.
- Y. Kakimoto, S. Tashiro, R. Kojima, Y. Morozumi, T. Endo, and Y. Tamura, Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Sci. Rep.* in press.
- T. Endo, Y. Tamura, Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J.* in press.
- Matsumura, A., Higuchi, J., Watanabe, Y., Kato, M., Aoki, K., Akabane, S., Endo, T. and Oka, T. Inactivation of cardiolipin synthase triggers changes in mitochondrial morphology. *FEBS Lett.* 592, 209-218 (Online published Dec 29, 2017).
- S. Kawano, Y. Tamura, R. Kojima, S. Bala, E. Asai, EA. Michel, B. Kornmann, I. Riezman, H. Riezman, Y. Sakae, Y. Okamoto, and T. Endo, Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1-Mdm12 of ERMES. *J. Cell. Biol.* 217, 959-974 (online published Dec.26, 2017).
- Y. Tamura and T. Endo, Role of intra- and inter-mitochondrial membrane contact sites in yeast phospholipid biogenesis, *Adv. Exp. Med. Biol.* 995, 121-133 (2017)

遠藤斗志也, ミトコンドリア蛋白質の配送機構, (週刊) 医学のあゆみ 260, 37-41 (2017)

5. 学会発表など

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」吹田市, 大阪, 2017.3.21-22

Toshiya Endo: Biogenesis and maintenance of mitochondria through protein and lipid transport (招待講演) 42nd FEBS Congress, Jerusalem, Israel, 2017.9.10-14

遠藤斗志也: 奇跡の分子, タンパク質が拓く細胞の不思議な世界 (特別講演) 名古屋市立大学総合生命理学部新設記念シンポジウム「未来を拓くサイエンス」名古屋市立大学, 2017.10.15

遠藤斗志也: タンパク質と脂質からミトコンドリアをつくる (招待講演) ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会) シンポジウム「拡大する蛋白質科学のフロンティア」神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

柿本百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFP を用いたオルガネラ膜間テザリング因子の探索, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

沢里克宏, 佐藤諒, 西川華子, 飯村直樹, 藤川鉦樹, 山口敏幸, 車ゆうてつ, 田村康, 遠藤斗志也, 上田卓也, 島本啓子, 西山賢一: タンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質酵素 MPlase は生育に必須である, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

荒磯裕平, 包明久, Andr Heuer, Roland Beckmann, 吉川 雅英, 遠藤斗志也: ミトコンドリア膜透過中に翻訳停止したリボソーム・新生鎖複合体の構造・機能研究, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

鈴木俊治, 平田邦生, 山下栄樹, 飯田直也, 遠藤斗志也, 久堀徹, 吉田賢右, 野地博行: 1 分子モーターが動いている瞬間を見る: 時分割動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F1 の回転力発生機構の分析, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split GFP を用いたオルガネラ膜間近接評価実験系の確立, 第69回日本細胞生物学会, 仙台国際センター 2017.6.14

鈴木俊治, 平田邦生, 山下栄樹, 遠藤斗志也, 久堀徹, 吉田賢, 野地博行: 角度分割・時分割 X 線結晶構造解析による, ほ乳類 F1-ATPase のリン酸解離駆動の回転力発生機構の分析, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 2017.6.20-22

渡邊康紀, 田村康, 遠藤斗志也: VAT-1 による ER-ミトコンドリア間のリン脂質輸送の構造基盤, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 2017.6.20-22

阪上春花, 石坂直也, 塩田拓也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリーにおける Por1 の役割, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 2017.6.20-22

鈴木俊治, 平田邦生, 山下栄樹, 飯田直也, 遠藤斗志也, 久堀徹, 吉田賢右, 野地 博行: 角度分割・時分割 X 線結晶構造解析による, 哺乳類 F1-ATPase のリン酸解離駆動の回転力発生機構の分析, 第55回生物物理学会年会, 熊本大学, 2017.9.19-21-22

松本俊介, 中務邦雄, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜へのミスターゲットした膜タンパク質の分解機構の解析, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

小島理恵子, 伊藤喜重, 瀬崎博美, 遠藤斗志也, 田村康: カルジオリピンの維持には正常なクリステ構造が必要である, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

古田詩唯奈, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: 小胞体膜タンパク質 Ilm1 の欠損はリン脂質輸送とスフィンゴ脂質異常を引き起こす, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

阪上春花, 石坂直也, 塩田拓也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアポリンタンパク質 Por1 は外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリー調節因子として機能する, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFP を用いたオルガネラ膜間テザリング因子の探索, ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

沢里克宏, 佐藤諒, 西川華, 飯村直, 藤川鉦樹, 山口敏幸, 車ゆうてつ, 田村康, 遠藤斗志也, 上田卓也, 島本啓子, 西山賢一: タンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質酵素 MPLase は生育に必須である, ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

荒磯裕平, 包明久, Andr Heuer, Roland Beckmann, 吉川雅英, 遠藤斗志也: ミトコンドリア膜透過中に翻訳停止したリボソーム・新生鎖複合体の構造・機能研究, ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

鈴木俊治, 平田邦生, 山下栄樹, 飯田直也, 遠藤斗志也, 久堀 徹, 吉田 賢右, 野地 博行: 1 分子モーターが動いている瞬間を見る: 時分割動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F1 の回転力発生機構の分析, ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

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・若手研究(B)

課題名: 再構成系により明らかにする膜間リン脂質輸送分子メカニズム

研究代表者: 河野慎, 取得年度: H29-30 年度 (2 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・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 29 年度科学研究費助成事業審査委員表彰 (日本学術振興会)



29年9月 研究室（+関連研究者）のリトリート「オルガネラ研究会」（愛媛）

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

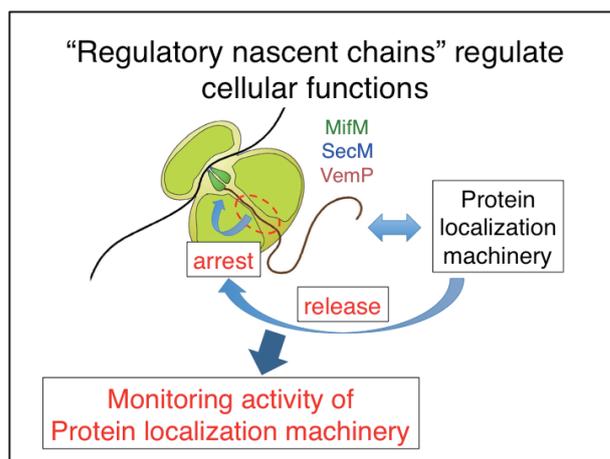
准教授 千葉 志信 Associate Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.

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を生み出すのか」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自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。

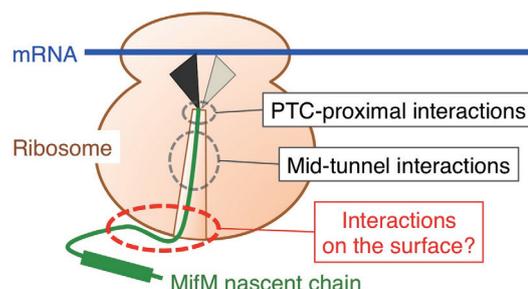
当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置（局在化）の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスと見なすことができ、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がるものと思われる。また、我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止（アレスト）する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である 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) 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、自身の翻訳伸長をアレストするユニークな性質を持つ。この翻訳アレストは、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アミノ酸配列（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ことが示されていたが、最近になって、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。昨年に引き続き、この N 末端領域の網羅的な変異解析を行った結果、この領域の欠失が MifM の翻訳アレストを不安定化させることが示された。また、リボソームの表面に存在するリボソームタンパク質の変異も翻訳アレストを不安定化させることが示され、これらの結果から、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ものであることが示唆された（論文投稿中）。

(2) 翻訳途上鎖によるリボソームサブユニット構造の不安定化

翻訳途上鎖が自身を翻訳するリボソームに働きかけてその活性を制御する例がいくつも見出されてきたが、今回、東京工業大学・田口英樹教授らとの共同研究で、新生鎖が自身を翻訳するリボソームの大小サブユニット間相互作用を不安定化し、終止コドンに依存せずに翻訳伸長を強制終了する現象（Intrinsic ribosome destabilization; IRD）を大腸菌において見出した。IRD は、新生鎖の特定の配列に依存し、例えば、塩基性アミノ酸残基に富んだ領域の後に酸性残基が連続したような配列や、酸性残基とプロリン残基が交互に現れるような配列などをリボソームが合成した時に起こる。たった一本のポリペプチド鎖を合成するために、リボソームの二つのサブユニットは、翻訳伸長の間、歯車のような回転運動を数百回、数千回と繰り返す。今回見出された IRD は、そのような動的な過程が潜在的に翻訳装置そのものを不安定化のリスクを内包していることを実証するものであるが、一方で我々は、大腸菌がこの現象を利用し、細胞内 Mg^{2+} イオン濃度の低下時に IRD を起こすことでマグネシウムトランスポーターの発現を亢進する仕組みを持つことも見出した。

(3) 大腸菌 SecM における翻訳アレストの制御機構

我々は、枯草菌 MifM や大腸菌 SecM を「モニター基質」と呼んでいる。基質自身が発現制御因子でもあると言うユニークな仕組みによって、装置の活性変動を直接監視してタンパク質局在化因子の発現をリアルタイムに制御する。モニター基質の翻訳途上鎖が局在化装置の働きを受けると、その翻訳アレストが解除されることがこの制御の基盤になっている。最近の研究から、翻訳途上鎖に対する「引っ張り力」がアレスト解除のきっかけになることが考えられるが、細胞内での実際の機構は不明である。我々は、リボソームトンネル出口のさらに外側に近接した“Arrest Release Mediator”と名付けた SecM 内の領域が Sec 反応に呼応したアレスト解除に必要とされることを見出した。部位特異的クロスリンク実験により、この領域が特定のリボソームタンパク質に近接していることが明らかになりつつある。

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 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 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) Extensive interactions between MifM and the ribosome are involved in 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 current analysis revealed that amino acid substitution or deletion of the region N-terminal to the previously determined arrest motif of MifM caused destabilization of the elongation arrest in vivo as well as in vitro translation reactions reconstituted from 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. Such an interaction seems to involve ribosomal surface components as mutations of them also compromised elongation arrest. Our analyses reveal that the elongation arrest of MifM involves extensive interactions between the nascent chain and the ribosome (Manuscript submitted).

2) Intrinsic ribosome destabilization (IRD) by nascent polypeptide

Nascent polypeptide chain can participate in the regulation of the rate of translational elongation by cotranslationally interacting with the ribosomal components. Our current collaboration with Prof. Hideki Taguchi's group (Tokyo Inst. of Tech.) now led to a discovery of a specific amino acid sequence of nascent polypeptides that could cotranslationally destabilize intersubunit interaction between the large and small subunits of the ribosome, thereby leading to a premature termination of translation elongation even before the ribosome reaches the stop codon. This phenomenon, which is termed intrinsic ribosome destabilization (IRD), typically occurs when the ribosome is synthesizing a consecutive array of acidic residues and those intermitted by alternating prolines. The IRD may represent an intrinsic risk underlying a dynamic biological process such as translation elongation, during which two ribosomal subunits have to repeat ratchet-like dynamic movement hundreds of thousands of times to synthesize just a single polypeptide chain. However, we also found that *E. coli* takes advantage of IRD to upregulate expression of a Mg²⁺ transporter in response to decreased intracellular Mg²⁺ concentration, thereby maintaining Mg²⁺ homeostasis.

3) Mechanisms of arrest regulation in SecM

We call a class of regulatory nascent polypeptides, such as MifM and SecM, "monitoring substrates" as they sense the activity of protein localization machinery directly and thereby enable real-time feedback regulation. Elongation arrest in SecM is subject to cancellation ("arrest-release") when its nascent chain, having an export signal sequence, engages in the Sec-mediated translocation across the membrane. Recent studies have shown that the Sec machinery's attempt to export the nascent SecM polypeptide generates a pulling-force that triggers arrest-release, presumably by disrupting the interactions between the amino acid residues of the arrest sequence and the ribosome, thus abolishing the prerequisite for the ribosomal dysfunction. Although this scheme of export-coupled arrest release is likely to underlie the regulated translation arrest of SecM, molecular mechanisms of physiological arrest release are still left for further studies. We identified a SecM segment, termed "arrest-release mediator," that is required for the export-coupled arrest release. This

segment is located outside of the ribosome but close to the tunnel exit of the ribosome. Crosslinking experiments suggest that this region interacts with some ribosomal protein components.

4. 論文, 著書など

原著論文

- K. Fujiwara, K. Ito, S. Chiba: MifM-instructed translation arrest involves nascent chain interactions with the exterior as well as the interior of the ribosome. *Sci. Rep.* (2018) in press
- Y. Chadani, T. Niwa, T. Izumi, N. Sugata, A. Nagao, T. Suzuki, S. Chiba, K. Ito, H. Taguchi: Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. *Mol. Cell.* (2017) **68**, 528-539.e5.

英文総説

- K. Ito, H. Mori, S. Chiba: Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. *FEMS Microbiol Lett.* (2018) 365. 11

日本語解説記事

- 茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭、田口英樹：翻訳の途上の新生ポリペプチド鎖がひき起こすリボソームの不安定化および環境のセンサーとしての利用 ライフサイエンス新着レビュー 2017年11月20日 DOI: 10.7875/first.author.2017.130
- 千葉志信 (2018) 調節性翻訳アレストペプチドによる細胞機能の制御. 生化学 第90巻第2号, 147-157.
- 茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭、田口英樹 (2018) 翻訳途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化とその生理的意義. 実験医学 Vol. 36, No. 8 (5月号) 1364-1367.

5. 学会発表など

- 伊藤維昭: Nascent polypeptide handling of the translating ribosome Microbial Genetics and Genomics VII. 2017年5月4-7日 Asilomar, California (招待講演)
- 藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: Screening of translation arrest-releasable elements 新学術領域「新生鎖の生物学」主催・国際シンポジウム「Protein Quality Control」2017年6月4日 奈良・東大寺総合文化センター
- 由良隆、宮崎亮次、藤原圭吾、千葉志信、森博幸、秋山芳展: 大腸菌の熱ショック応答：研究の経過と現状 第14回21世紀大腸菌研究会 2017年6月8-9日 熱海 (招待講演)
- 伊藤維昭: トランスロコンから翻訳に立ち返って (Revisiting translation after the translocon) 第17回日本蛋白質科学会年会 2017年6月20-22日 仙台国際センター (招待講演)
- 伊藤維昭: 細胞機能を支える動的翻訳 多元物質科学研究所セミナー 2017年6月23日 東北大学 (招待講演)
- 藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: MifMの翻訳アレストを解除できる因子のスクリーニング 2017年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2017年8月25-26日 熱海
- 伊藤維昭: 生命を支える動的翻訳とタンパク質の一生 アイエム翻訳サービス株式会社主催 第3回医薬翻訳セミナー 2017年8月26日 大阪市 (招待講演)
- 藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: Screening of Translation Arrest-Releasable Elements 新学術領域「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ 2017年8月29-31日 京都・関西セミナーハウス
- 伊藤維昭: Nascent polypeptide handling of the translating ribosome THE INs-and-OUTs OF MEMBRANE BIOLOGY 2017年9月1-3日 Hemavan, Sweden (招待講演)
- 伊藤維昭: タンパク質誕生の秘密 大隅良典氏ノーベル賞受賞記念「七人の侍」講演会 2017年9月14日 福岡 (招待講演)
- 千葉志信: 働く新生鎖の生理機能と分子機構 新学術領域「新生鎖の生物学」班会議 2017年11月8-10日 別府

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: アレスト配列にシスに付加したときに翻訳アレストを解除できるタンパク質エレメントの探索 新学術領域「新生鎖の生物学」班会議 2017年11月8-10日 別府

6. その他特記事項

1) 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）

2) 学外活動

千葉志信、藤原圭吾：新学術領域「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ主催 2017年8月29-31日、京都

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

3) アウトリーチ活動

千葉志信：「ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～」“生命活動の担い手「タンパク質」の世界”主催 2017年8月19日、京都産業大学

千葉志信、藤原圭吾：日本・アジア青少年サイエンス交流事業「さくらサイエンスプラン」（代表者：加藤啓子・京産大総合生命科学部教授）に協力 2017年7月25日-8月2日

千葉志信：高大接続授業（洛西高校） 2017年7月27日



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。

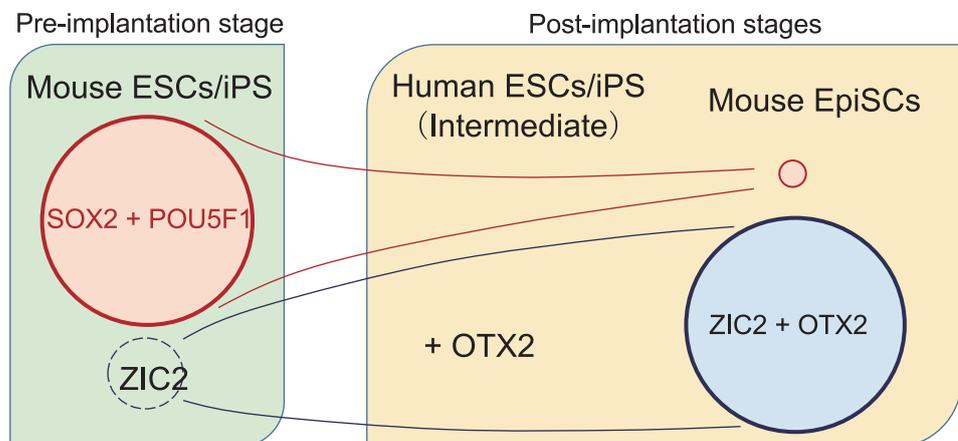
2. 本年度の研究成果

(1) エピプラスト幹細胞の遺伝子制御ネットワークが明らかにした、着床前と着床後に対応する多能性幹細胞の間で見られる制御機構の大きな変化

マウスのエピプラストから直接に樹立されたエピプラスト幹細胞(EpiSC)は、エピプラストの状態をよく反映している。私たちは以前の研究で、エピプラスト幹細胞では、5つの転写因子が主要な遺伝子制御機能を果たしていることを示した(引用文献③)。ZIC2, OTX2, SOX2, POU5F1, そしてPOU3F1である。これらの転写因子は、エピプラスト状態を決定しているだけでなく、エピプラストに始まる多様な体細胞系列の発生をも制御していると考えられた。そこで、これらの転写因子がエピプラスト幹細胞のゲノム配列の数万箇所に結合する際に、それらの結合部位が実際にはどの位置にあるのか、またこれらの転写因子が、どのような遺伝子群を調節しているのか、そしてどのような転写因子の組み合わせが、エピプラスト状態を決定するのに主要な役割を果たしているのかを調べた。着床前胚に対応する多能性幹細胞であるマウスの胚性幹細胞(ESC)ではSOX2-POU5F1の転写因子ペアが中心的な制御機能を果たしている。このSOX2-POU5F1ペアが、エピプラスト幹細胞でどのような機能を果たしているかという点にも注目した。これらの研究目的のために、転写因子と結合したDNA配列を、転写因子との複合体として抽出してそのDNA配列群を決定した(ChIP-seq法: chromatin immunoprecipitation-sequencing)。通常の抗体による免疫沈降に代えて、ビオチン化転写因子と結合DNAの複合体をストレプトアビジンとの結合によって抽出する方法を採用して、シグナル/ノイズ比の高い解析を実施することができた。2つの転写因子が隣接したDNA配列に結合して協同的に作用する場合には、これらの転写因子の結合部位がゲノム上の多くの箇所で重なる。

この研究によって、エピプラスト幹細胞の状態を決定する転写因子ペアが、SOX2-POU5F1ではなく、ZIC2-OTX2であることが明らかになった。幾つかの初期胚に由来する多能性幹細胞での転写因子結合部位を詳細にわたって比較した結果、SOX2-POU5F1が主要な制御機能を発揮するのは、着床前胚

The SOX2-POU5F1 (OCT3/4) TF pair exerts its major regulatory functions only during pre-implantation stages but is replaced by the ZIC2-OTX2 TF pair in the epiblast of post-implantation stages.



の状態（マウス胚性幹細胞）に限られており、着床後胚の状態に対応するヒトの胚性幹細胞やマウスのエピブラスト幹細胞では、SOX2-POU5F1 の転写因子ペア自体が形成されなくなり、制御機能が ZIC2-OTX2 ペアに取って代わられることがわかった。転写因子ペアによる遺伝子制御は、このように着床の前後で劇的に変化する。この転写因子ペアの交替は、着床前にすでに、ZIC2 の結合によって準備されており、着床後に OTX2 の発現が上昇するのに伴って ZIC2-OTX2 のペアが形成されて遺伝子発現制御を主導するようになると考えられる。

(2) 内胚葉の領域化への転写因子 SOX2 の関与

内胚葉が成立すると、転写因子 SOX2 を発現する前側の領域が前腸に発生する。SOX2 が内胚葉の領域化にどのように関わっているのかを調べるために、内胚葉で Tamoxifen 依存的に Cre 組み換え酵素を発現する *FoxA2-CreER* と、*floxed Sox2* を併せ持つマウス系統を作成し、前腸から食道と気管が分岐する前の発生段階で Tamoxifen を作用させることによって、内胚葉組織の *Sox2* 遺伝子を欠落させた。その結果、咽頭から胃までをつなぐ 1 本の管が発生し、その中間点から一対の気管支が伸び出していた。この管の内面は、食道が重層上皮であるのに対して、気管に特徴的な円柱上皮を持ち、また、気管に固有の転写因子 NKX2.1 を発現していた。この結果から、前腸上皮において、食道を決定する SOX2 と気管を決定する NKX2.1 が拮抗しており、SOX2 の発現がなくなると食道に相当する上皮が全て NKX2.1 を発現して気管化したものと結論された。

この遺伝子操作では、前腸組織の中で、SOX2 を発現する上皮に限定して *Sox2* 遺伝子を不活性化したのであったが、食道上皮が気管上皮に変化するに合わせて、その周囲の間充織組織も気管のものに変化した。例えば、食道から気管に変化した上皮の管を取り巻く間充織組織が、気管系の間充織に特異的な転写因子 TBX4 を発現していた。これまで、間充織の特性がそれに隣接する上皮の特異性を決定するプロセスが強調されてきたが、前腸の発生においては逆に、転写因子による上皮の特異化が間充織の特性をもたらしていた。

3. Research projects and annual reports

We investigated how transcription factors (TFs) regulate developmental processes via binding to regulatory sequences of their target genes at the genome-wide scale and via intercellular signaling pathways. We achieved the following major results during 2017.

(1) Distinct regulations among pluripotent stem cells

The epiblast formed after embryonic implantation represents the founding tissue for all somatic lineage derivations and is modeled in mouse pluripotent epiblast stem cell (EpiSC) lines adapted in serum-free culture conditions. In a previous study, we identified five major TFs that regulate the epiblast cell state and their somatic cell derivation, i.e., ZIC2, OTX2, SOX2, POU5F1, and POU3F1, including the SOX2-POU5F1 pair, considered to be involved in the regulation of pluripotency states. To elucidate the regulatory function of the TFs, we performed chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) over the entire genome sequence. This enabled us to determine the binding sites of the TFs and to identify the group of genes regulated by these TFs as well as the TF combination that plays a major role in the regulation of EpiSC-specific genes. The central regulatory function of the SOX2-POU5F1 pair in mouse embryonic stem cells (ESCs) is well established. Therefore, we compared the action of this TF pair in EpiSCs with that in mouse ESCs. We used biotinylated TFs to pull down TF-DNA complexes using streptavidine instead of conventional antibody-dependent pulldown, allowing analysis with a high signal-to-noise ratio. If two TFs cooperate by binding to adjacent DNA sequences, an overlap of ChIP-seq peaks of these TFs is detected.

We identified ZIC2-OTX2 as the major TF pair that regulates the EpiSC state and not SOX2-POU5F1 despite a high expression level of SOX2 and POU5F1 in these cells. Comparison of the TF-binding sites in EpiSCs with those in mouse and human ESCs indicated the following. Pluripotent stem cells differ in the major acting TF pairs. The SOX2-POU5F1 pair exerts its major regulatory function only during preimplantation stages, represented by mouse ESCs. The SOX2-POU5F1 pairing is largely lost in

pluripotent stem cells of human ESCs and mouse EpiSCs and is superseded by the ZIC2–OTX2 pair in EpiSCs. This transition is primed by the binding of ZIC2 at the preimplantation stage and is manifested by the activation of OTX2 expression.

We also found that when the ZIC2–OTX2 pair gains major regulatory function, their binding regions are subjected to histone modifications H3K4me1 plus H3K27Ac, a signature for active enhancers, or H3K4me1 plus H3K27me3, a signature for poised enhancers. These histone markings may involve the interaction of ZIC2 with chromatin remodeling factors.

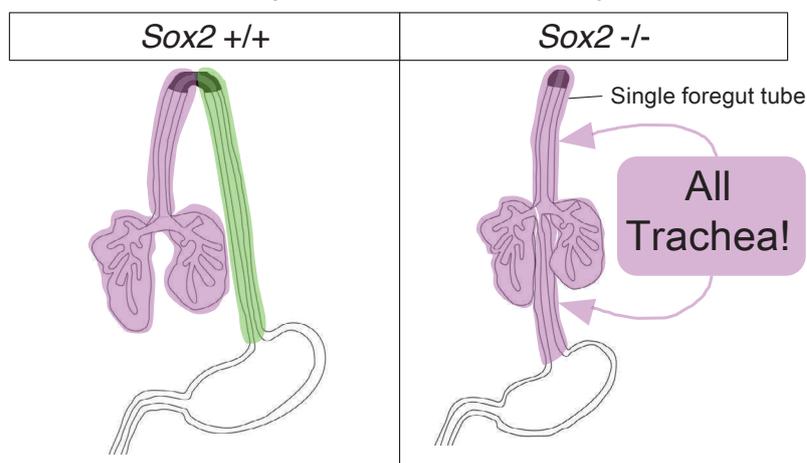
(2) Endodermal regionalization via counteraction of TFs

The TF SOX2 is expressed in the anterior endoderm and its embryonic derivative, the foregut. We investigated how SOX2 regulates foregut development using conditional *Sox2*-KO mouse embryos in which *Sox2* is inactivated in the endoderm by *FoxA2*-CreER, which was activated by tamoxifen administration. *Sox2* inactivation in the endoderm resulted in the formation of a single foregut duct connecting the pharynx and stomach, in the middle of which a pair of bronchial tubes developed.

The foregut duct that developed from SOX2-less endoderm was made of columnar epithelium and expressed the trachea-characteristic TF NKX2.1, indicating the development of a trachea-like esophagus. Our results combined with a previous report stating that *Nkx2.1*-KO results in the development of a single foregut but with esophagus characteristics and expressing high SOX2 indicate that SOX2 and NKX2.1 counteract each other in the endoderm to support the development of the esophagus and trachea, respectively.

Although SOX2 was inactivated only in the epithelial component of the foregut tube, the

Single foregut tube formed in the absence of SOX2 displayed trachea characteristics in both epithelium and mesenchyme



surrounding mesenchymal tissues also changed their characteristics to match those of the trachea. The mesenchyme surrounding the trachea-like esophagus expressed TF TBX4 at all axial levels, which is characteristic of the trachea and lung mesenchyme. This observation indicates that the tissue identity of the epithelial component impacts the surrounding mesenchyme to warrant the development of a functional organ.

4. 論文, 著書など

Kondoh H. Roles of ZIC2 in regulation of pluripotent stem cells. *Adv Exp Med Biol.* in press

Sugahara S, Fujimoto T, Kondoh H, Uchikawa M. Nasal and otic placode specific regulation of *Sox2* involves both activation by *Sox*-*Sall4* synergism and multiple repression mechanisms. *Dev Biol.* 433, 61-74. (2017). doi: 10.1016/j.ydbio.2017.11.005.

Uchikawa M, Nishimura N, Iwafuchi-Doi M, [Kondoh H](#). Enhancer analyses using chicken embryo electroporation. *Methods Mol Biol.* 1650, 191-202 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-7216-6_12.

Matsuda K, Mikami T, Oki S, Iida H, Andrabi M, Boss JM, Yamaguchi K, Shigenobu S, [Kondoh H](#). ChIP-seq analysis of genomic binding regions of five major transcription factors highlights a central role for ZIC2 in the mouse epiblast stem cell gene regulatory network. *Development* 144, 1948-1958 (2017). doi: 10.1242/dev.143479.

Sasado T, [Kondoh H](#), Furutani-Seiki M, Naruse K. Mutation in cpsf6/CFIm68 (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor Subunit 6) causes short 3'UTRs and disturbs gene expression in developing embryos, as revealed by an analysis of primordial germ cell migration using the medaka mutant naruto. *PLoS One.* 12, e0172467 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0172467.

Iida H, Ishii Y, [Kondoh H](#). Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens transdifferentiation. *Dev Biol.* 421, 118-125 (2017). doi: 10.1016/j.ydbio.2016.11.004.

5. 学会発表など

Teramoto M, Sugawara R, Ishii Y, Kuroiwa A, Kondoh H. SOX2-dependent determination of tissue identity in the foregut. *ConBio2017, Kobe, 12.9* (2017)

Kondoh H, Matsuda K, Oki S, Shigenobu S. A drastic change in the major regulatory TFs from SOX2-POU5F1 to ZIC2-OTX2 in the pluripotent stem cells representing pre-implantation and post-implantation stages. *ConBio2017, Kobe, 12.8* (2017)

中村香絵, Boitet C, 吉水康矢, 飯田英明, 近藤寿人 エピプラスト幹細胞株から樹立された領域特性をもつ神経幹細胞株の解析 *ConBio2017 神戸 12.8* (2017)

稲森祥子, 石井泰雄, 近藤寿人 Foxa2 とともに nEGFP を発現するエピプラスト幹細胞を用いた、初期発生過程の研究 *ConBio2017 神戸 12.8* (2017)

吉水康矢, 近藤寿人 ヘンゼン結節は脊索前板の発生を介して、Otx2 を発現するエピプラストに頭部を形成させる *ConBio2017 神戸 12.8* (2017)

飯田英明, 内川昌則, 近藤寿人 Sox2 の神経系での発現を制御する D1 エンハンサーの解析 *ConBio2017 神戸 12.6* (2017)

Teramoto M, Sugawara R, Ishii Y, Kuroiwa A, Kondoh H. SOX2-dependent determination of tissue identity in the foregut. *ISDB 2017, Singapore, 6.20* (2017)

Kondoh H, Matsuda K, Oki S, Shigenobu S. Roles for ZIC2 in the regulation of epiblast stem cells and embryonic stem cells. *ISDB 2017, Singapore, 6.20* (2017)

Kondoh H, Yoshihi K. Embryonic region-dependent development and interactions of grafted Hensen's node with host tissues: reconsideration of organizer model. *50th Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. Tokyo, 5.10* (2017)

Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of "lens transdifferentiation". *50th Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. Tokyo, 5.10* (2017)

Nakamura K, Boitet C, Satake S, Yoshihi K, Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Establishment of neural progenitor cells lines with defined regional specificities from EpiSCs. *50th Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. Tokyo, 5.10* (2017).

Inamori S, Ishii Y, Kondoh H. Establishment and use of a new epiblast stem cell line marking Foxa2 expression with GFP. *50th Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. Tokyo, 5.10* (2017)

Teramoto M, Sugawara R, Ishii Y, Kuroiwa A, Kondoh H. SOX2-dependent determination of tissue identity in the foregut. *50th Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. Tokyo, 5.10* (2017)

6. その他特記事項

研究の外部発信

Development 誌に発表した、多能性幹細胞の制御に関する新しい発見については、2017年5月31日にプレスリリースした。
<https://kyodonewsprwire.jp/release/201705312273>、http://www.kyoto-su.ac.jp/news/20170531_345_news.html

動物細胞内で特定のタンパク質をビオチン化するためのベクターpCAGGS-BLRP-BirA を米国 Emory 大学の Jeremy Boss と共同開発し、それを理研バイオリソースセンターDNA Bank に寄託した。(＃RDB15774)

外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(B) 課題名：体細胞系列の選択的な発生をもたらすエピプラストの領域化と転写制御ネットワーク
研究代表者：近藤寿人、取得年度：H29-32年（4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

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 Assist. Prof. Toru Yoshida, Ph.D

1. 研究概要

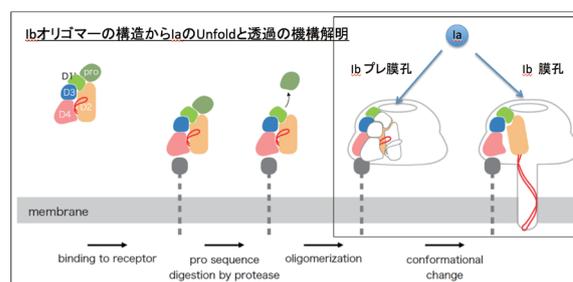
タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要不可欠なものとなりつつある。我々は X 線結晶構造解析を主要な手段として、タンパク質複合体、特に感染症因子とホストであるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治療する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。ADP リボシル化毒素とその標的分子複合体の構造生物学：様々な病原微生物は ADP リボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。この反応特異性とその反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な ADP リボシ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

2. 本年度の研究成果

(1) *C.perfringens* が持つ binary 毒素を研究の対象に、(A) binary 毒素の A サブユニット Ia の基質アクチンの認識機構と部位特異的 Arg の ADP リボシル化機構の解明 (Tsuge et al.PNAS 2008,Tsurumura et al.PNAS 2013) と (B) 膜孔形成毒素 Ib を介した Ia の膜透過の仕組みの解明を目的として研究を進めている。

(A) 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。昨年、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い、本年論文として報告した (PLoS ONE 2017)。さらに現在、構造が未知の膜孔形成のCPiLE-aの透過装置CPiLE-bの構造と機能の研究を進めており、その発現精製を行い、オリゴマーの形成を見ている (1-Bも参照)。

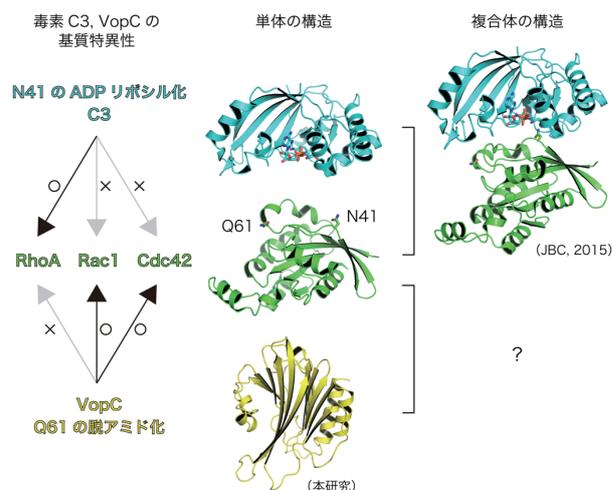
(B) Ia がアクチンの ADP リボシル化毒性を発揮するためには Ib が①水溶性プレ膜孔オリゴマーを形成、次に細胞膜上で構造変化をおこし②Ib オリゴマーからなる膜孔を形成、③これに Ia が結合し、Ia の立体構造がほどけて、④Ia が Ib オリゴマー膜孔を通過する、この4つのステップが必要となる (下図)。最初の構造解析の目的は、500KDaのオリゴマーを作るプレ膜孔および膜孔の構造を明らかにすることである。Ib は 20KDa のプロ配列(pro)と 75KDa の4つのドメインからなるボディ(Ib)からなる。大腸菌で発現させた GST-pro-Ib をトリプシン、キモトリプシンで処理し、GST と pro を切断、ゲルろ過でオリゴマーフラクションを取り、負染色電子顕微鏡画像およびクライオ電子顕微鏡データを取得した。さらに cryo EM を用いた単粒子解析をおこなった。現在その解析の継続と、サンプル調整を変えることで、より良い分解能のデータを取得できないかを検討を加えている。



(2) 腸炎ビブリオは主に海水中に生息する細菌であり、本菌で汚染された魚介類を生食することで、ヒトに感染して腸炎ビブリオ食中毒を発症させる。エフェクターVopC は typeIII の分泌装置を介して分泌され、Rho GTPase である Cdc42 の Gln を脱アミド化することで、宿主細胞に影響し、感染しやすくする場を作っていると考えられる。食中毒原因菌の毒素の作用機作を明らかにするため VopC の結晶構造解析を行った。既に VopC と似た毒素である大腸菌の Cnf1 の構造は明らかになっているが、その基質特異性は異なり、Cnf1 では RhoA 特異的である。これらの脱アミド化毒素の Rho GTPase の認識機構と反応機構は、基質タンパク質との複合体の構造が明らかでないためによくわ

かっていない。我々は単体の結晶構造だけでなく、Cdc42複合体での構造解析と、認識機構を知るための基質変異体を用いた機能解析を進めている。本年度の研究により、その単体の構造が明らかになった。現在、その機能解析を進めている。

(3) 細菌による monoADP リボシル化は様々なタンパク質を標的に修飾を行うことが知られていた。しかしながら、近年 DNA を標的とした ADP リボシル化も起こることが知られ、脚光を浴びている。特にヒトの DNA 修復に関わる PARP (ポリ ADP リボシル化酵素) もそのタンパク質を標的とした基質と基質認識機構はわからないことが多かった。しかし、本年 PARP が DNA を基質とすることが複数のグループから報告された。最初に見つけられた DNA を標的とした ADP リボシル化はモンシロチョウに存在するピエリシンである。国立がん研究所の杉村等によって見つかったが、そのホモログが細菌にも存在し、DNA、特にそのグアニンを特異的に ADP リボシル化することがわかってきた。我々のグループでは DNA を標的として ADP リボシル化する酵素の構造と機能解析を進めており、その構造から重要なデータを得ており、論文での発表を進めている。



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. These basic researches were expected to find a novel drug in infectious disease.

(1) Binary Toxin

(A) 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⁺-CPILE-a and NADH-CPILE-a. Though CPILE-a structure has high similarity with known iota toxin-a (Ia) with NAD⁺, it possesses two extra-long protruding loops from G262-S269 and E402-K408 that are distinct from Ia. These results were published in this year with functional studies (PLoS ONE, 2017). We also try to reveal the structure of CPILE-b.

(B) Iota-toxin from *C. perfringens* type E is a binary toxin composed of an enzymatic component (Ia) and a pore-forming protein translocon (Ib). Ia is an ADP-ribosylating toxin that ADP-ribosylates actin. ADP-ribosylation of G-actin at arginine 177 causes the depolymerization of the actin cytoskeleton and finally leads lethal and dermonecrotic in mammal cells. On the other hand, Ib of binary toxin is important machinery for protein translocation: Ia translates over the membrane to the cytosol via Ib as pore-forming translocon. First we would like to reveal the structure of pre-pore and pore of Ib using cryoEM and crystallography. Our final purpose is to understand the mechanism of Ia translation via Ib.

(2) Effector of *V. parahaemolyticus*

Vivrio parahaemolyticus is a Gram-negative marine bacterium that causes acute gastroenteritis in humans. The virulence is dependent of a type III secretion system and VopC is one effector which is homologue of

the catalytic domain of cytotoxic necrotizing factor (CNF). VopC was reported to deamidate Rac1 and Cdc42 but not RhoA. To understand the mechanism of recognition of Rho GTPase and ADP-ribosylation, we are going to solve the structure of VopC together with biochemical studies.

(3) DNA-targeting ADP-ribosyltransferase

Traditionally, ADP-ribosylation has been considered a protein modification. However, emerging evidence suggests that DNA ADP-ribosylation is also common. The first DNA-targeting ART was found in Pierid butterflies and was thus named as pierisin. To date, six pierisins (pierisin-1, -1b, and -2~5), ScARP, and Scabin are considered to belong to the pierisin family. We try to unravel the structure of ScARP to know the mechanism of DNA recognition and guanine ADP-ribosylation.

4. 論文著書など

Suzuki Y., [Tsuge H.](#), Hondoh H., Kato Y., Uehara Y., Maita N., Hosokawa K., Ueta S. Precipitant-free lysozyme crystals grown by centrifugal concentration reveal structural changes. *Crystal Growth and Design* (2018) *in press*

Kobayashi H, Otsubo T, Teraoka F, Ikeda K, Seike S, Takahashi E, Okamoto K, [Yoshida T](#), [Tsuge H](#), Yamanaka H. Involvement of the Arg566 residue of *Aeromonas sobria* serine protease in substrate specificity. *PLoS One*. 12(10): e0186392. (2017)

Toniti W, [Yoshida T](#), Tsurumura T, Irikura D, Monma C, Kamata Y, [Tsuge H](#). Crystal structure and structure-based mutagenesis of actin-specific ADP-ribosylating toxin CPILe-a as novel enterotoxin. *PLoS One*. 12(2): e0171278. (2017)

5. 学会発表など

津下英明: ウェルシュ菌の食中毒に関わる新規 ADP リボシル化毒素 CPILe : Iota 毒素との比較、第 447 回ビタミン B 研究協議会、大阪大学中之島センター (大阪)、2017.3.4

[Toru Yoshida](#), Hidetomo Kobayashi, Hiroyasu Yamanaka, [Hideaki Tsuge](#): Structure determination of *Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin by X-ray crystallography. ETOX18, Institut Pasteur (Paris), 2017.06.27

Waraphan Toniti, [Toru Yoshida](#), Toshiharu Tsurumura, Daisuke Irikura, Chie Monma, Youichi Kamata, [Hideaki Tsuge](#): Crystal structure and structure-based mutagenesis of actin-specific ADP-ribosylating toxin CPILe-a as novel enterotoxin ETOX18, Institut Pasteur (Paris), 2017.06.27

津下英明: ヒト ADP リボシル化酵素 (PARP) と細菌モノ ADP リボシル化毒素との構造と機能の比較、第 450 回ビタミン B 研究協議会、京都大学友会館 (京都)、2017.10.28

6. その他特記事項

(1) 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)

科学研究費補助金・若手研究 (B)

課題名「モノ ADP リボシル化毒素に不可欠な 2 種類の特異性を理解する」研究代表者: [吉田徹](#), 取得年度: H29-H31 年 (3 年)

(2) 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



2017年セミナー開催

開催日	演者	演題	世話人
2017. 3/6	角田 佳充 教授 (九州大学大学院 農学研究院)	硫酸転移酵素の構造生物学	津下英明
2017. 6/5	Dr. Ramanujan S. Hegde (MRC Laboratory of Molecular Biology)	Mechanisms of protein quality control in the cytosol	遠藤斗志也
2017. 6/5	Dr. Peter Walter (University of California、本 学タンパク質動態研究所 招 聘教授)	From Protein Folding to Cognition : a Serendipitous Path of Discovery	永田和宏
2017. 6/7	佐藤 久夫氏 (京都産業大学 日本科学未 来館 遠藤プロジェクト)	-楕円な社会とサイエンス- 焦点は二つ！	遠藤斗志也
2017. 9/1	Prof. Klaus Aktories (University of Freiburg)	Targeting of the Cytoskeleton by Bacterial Protein Toxins	津下英明
2017. 9/4	Dr. William E. Balch (The Scripps Research Institute)	Understanding Genetic Variation in the Complex Landscapes of Protein Misfolding and Trafficking Disease	永田和宏
2017. 9/4	Dr. Sandra Schmid (UT Southwestern Medical Center)	Adaptive clathrin-mediated endocytosis and signaling in cancer cells	永田和宏
2017. 9/12	岩淵-土井 真木子 博士 (University of Pennsylvania)	細胞運命を司るパイオニア転写因子FoxAのク ロマチン制御機構	近藤寿人
2017. 9/12	竹本 龍也 教授 (徳島大学先端酵素学研究 所)	神経板と体節中胚葉を産み出す体軸幹細胞の 制御	近藤寿人
2017. 12/11	井澤 俊明 博士 (ドイツ ミュンヘン大学)	The mitoRQC pathway～新生ミトコンドリアタン パク質の品質管理機構～	遠藤斗志也



Hegde 博士 (左) と Walter 博士 (右) のセミナーの様子

2017年 プレスリリース

日本人初の快挙！京都産業大学タンパク質動態研究所 永田和宏所長が The Protein Society “Hans Neurath Award”を受賞		
4月28日	新聞	読売新聞 朝刊
9月3日	新聞	朝日新聞 朝刊
9月9日	新聞	朝日新聞 朝刊(淡路版)

細胞内の不良品たんぱく質の分解メカニズムを解明 ～アルツハイマー病など神経性疾患の成因解明が可能に～ (永田和宏ら)		
5月5日	Web	日経速報アーカイブ
5月10日	Web	医療NEWS

多能性幹細胞について、転写因子ZIC2を中心とした、定説を覆す新しい制御機構を発見 ～iPS細胞をはじめとした多能性幹細胞の研究の新展開を期待～ (近藤寿人ら)		
5月31日	新聞	京都新聞、産経新聞
5月31日	Web	共同ニュース、AFPBBニュース、Dmenu ニュース、goo ニュース、Yahoo ニュース、朝日新聞、毎日新聞(Web)、SankeiBizほか

ミトコンドリアと小胞体間のコンタクト部位ERMES複合体におけるMdm12の立体構造および脂質配 送メカニズムの解明 (遠藤斗志也ら)		
12月30日	新聞	京都新聞 朝刊

2017年 トピック

8月19日	「ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI」 “生命活動の担い手「タンパク質」の世界”を開催(千葉志信)	
11月9日	文部科学省「私立大学研究ブランディング事業」に タンパク質動態研究所の事業が採択	

あとがき

今号がタンパク質動態研究所の第2号目の年報となる。第1号目から、単なる報告書ではなく、読み物として楽しんでいただける年報作りを意識してきた。今回も、研究活動の報告に加えて、エッセイや座談会など、読み物記事も充実している。研究者のキャリアの各ステージにおいて、それぞれの研究者が様々な思いを抱きながら研究と向き合っている、その姿が図らずも浮かび上がるような、深みのある年報になったように思われる。

(2018.7 千葉志信)

京都産業大学タンパク質動態研究所年報

2017年号

〔非売品〕

平成30年9月18日 印刷

平成30年9月28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 千葉志信
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

