

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

タンパク質動態研究所が発足して3年、ここに年報として、この一年の成果を報告できるのはうれしいことである。個々の研究員の皆さんの大きな努力により、この一年も世界に誇りうる成果を生み出し、国内的にも、国際的にも本研究所が広く認知される場所となっている。

研究のための外部資金という面から見ても、引き続き「私立大学研究ブランディング事業」が継続していることのほかに、研究所の複数のメンバーによる武田医学研究財団からのグラントをはじめとして、個人研究費のほかにも研究所としての研究資金を得ていることも特筆しておきたい点である。私学における基礎研究推進のための基盤として、このような外部資金の導入は今後とも積極的に取り組まなければならない課題であろう。

本年の事業として特に強調しておかなければならないものは、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）の共催による国際会議「Proteins from the Cradle to the Grave」が開催されたことであろう。比叡山延暦寺を会場として、2018年8月26日～29日の4日間にわたって開かれた。海外からの招聘演者14名を含め、参加者177名という大きな、かつ活発なシンポジウムになったのはうれしいことだった。Nature および Nature Structural and Molecular Biology (NSMB) の国際学術誌の編集者2名も海外から参加し、特に NSMB 誌においては、大きな写真（本年報 ページに再録）とともに、“Life of proteins: from nascent chain to degradation” と題して詳細な報告がなされ、この会議の国際的なインパクトを示すものとなった (Vol. 25, 996-999, 2018)。

数名の国内外の研究者による報告であったが、気の利いた章題からなっているもので、順に拾ってみると “Exciting science, traditional Japanese vegetarian food and vibrant discussions on tatami mats” “Protein synthesis at high resolution” “Origami: how proteins are folded” “Translocation of newly synthesized proteins across membrane” “Poka-yoke: surveillance of protein biogenesis” “Hara-kiri: proteasomal degradation and autophagy” “Prospects for the protein community” となっている。世界遺産延暦寺の特殊な環境での国際会議で、多くの外国人が日本という国に対して持っている興味と、サイエンスをいかに楽しもうとしているかが如実にわかるような遊び心満点の章題である。

この会議には、本研究所からも多くの若い研究者、大学院生が参加して、積極的に個人的な **discussion** に参加していたのも印象的なことであった。ここから世界を常に意識した若い研究者が多く育って行ってくれることを願うばかりである。

Report

# International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave”

2018年8月26日(日)~29日(火)

比叡山延暦寺 延暦寺会館

オーガナイザー:永田 和宏(京都産業大学)、田口 英樹(東京工業大学)



## International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” 若手レポート

2018年8月の26日から29日にかけて、国際シンポジウムがタンパク質動態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）の共催で開かれた。比叡山の延暦寺会館において開催された本シンポジウムには、本研究所からも多くの大学院生が参加した。研究発表や研究者との交流、そして学会運営を通してたくさんの刺激を受けたことだろう。その経験を、参加した学生たちにレポートしてもらったことにした。

永田研究室： 葛西 綾乃（博士課程）  
山下 龍志（博士課程）  
千葉研究室： 榎 祐太朗（修士2年）  
塩田 成未（修士2年）  
向川 結紀子（修士2年）

### シンポジウム概要

千葉研究室：藤原 圭吾（研究助教）

「一隅を照らす、これ則ち国宝なり」。これは天台宗の開祖、最澄のことばである。自分自身が置かれたその場所で、精一杯努力し、明るく光り輝くことのできる人こそ、何物にも代えがたい貴い国の宝だという。細胞レベルで考えると、さまざまな持ち場でそれぞれの役割をはたしているのがタンパク質たちであり、それらこそが細胞にとって「宝」であると言える。その光は、生まれ、輝き、消えていく。その動態に魅了された研究者たちが天台宗の総本山に集まり、International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave”が開催された。俗世から隔離された比叡山の宿坊“延暦寺会館”で、仏教文化に囲まれた中、3泊4日。参加総勢約180名で、国内外の存在感溢れる研究者が多く参加した本シンポジウ

ムもまた、サイエンス界の一隅を照らすものだったのではないだろうか。まずは千葉研の藤原が、会の概略をレポートする。

本シンポジウムはタンパク質動態研究所（以下、動態研）が、新学術領域研究「新生鎖の生物学」との共催で開催した。口頭で36講演、そのうち14題が海外からの招待講演者によるものであった。ポスター発表も104題あり、非常に活気あふれるものとなった。さらにNature誌とNature Structural & Molecular Biology誌のエディターまで参加していたことに、本会の注目度が表れていたように思う。

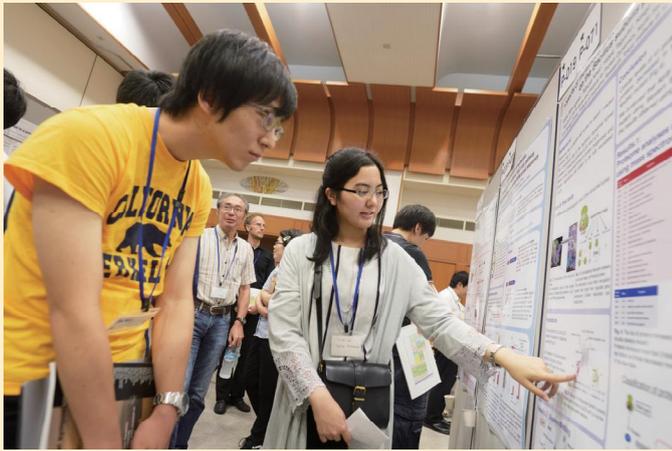
静かな山中、厳かな雰囲気のある大ホール“比叡”で、大隅良典先生、吉田賢右先生、伊藤維昭先生といった日本のタンパク質研究を代表してきた3名の先生方の



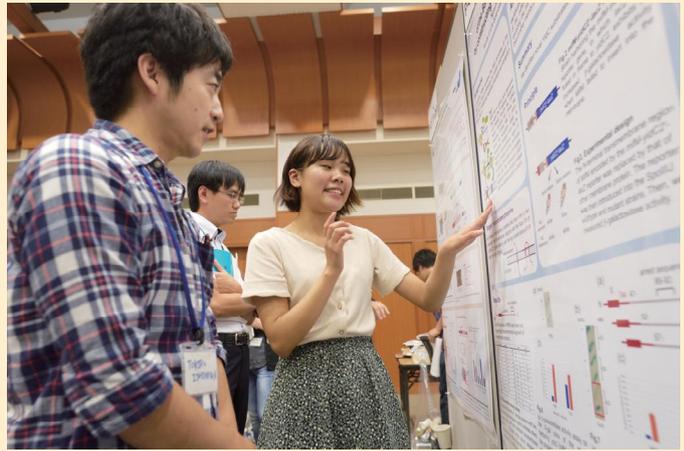
(榎) 琵琶湖の眺めがすごくきれいだった。  
(塩田) トロッコに乗っていったよね。  
(榎) ケーブルカーやで。  
(塩田) 降りてからの坂がしんどかった。



(向川) 私は藤原さんの車で行ったから楽だったよ。  
(塩田) トロッコにはトロッコのよさがあったし。  
(榎) いやケーブルカーやって。



(向川)緊張する。。。のにたくさんの人が来てくれました。藤田さん、そんなに見ないでください。。。



(塩田)説明してもつかしい！でも思った以上にたのしい！

plenary lecture から口頭発表がはじまった。二日目には田中啓二先生と永田和宏先生のご講演からセッションがスタートし、4日目まで講演と討論が繰り広げられた。海外からのスピーカーとしては動態研の招聘教授でもある Peter Walter 氏、Richard Morimoto 氏、Ulrich Hartl 氏をはじめ、著名な方々が講演をされた。名前だけみると重厚な雰囲気が出そうに思えるが、トークの方はそうでもない。各所で笑いを誘ったり、伊藤先生が発した“Stick-to-the Basic-ism (or Ito-ism)”という言葉がバズったり、みなさんが発表を楽しんでいる様子が垣間見え、基礎研究に魅了された研究者たちが変わらず自由にエンジョイしているように見えた(いつものことだが)。そういったタンパク質研究の著名な先生方が変わらず発表される姿には分野の歴史を感じることができる。その一方で、若い先生の発表からは分野のバイタリティや将来性を感じることができる。齋尾智英さん、岩崎信太郎さん、三嶋雄一郎さん(発表順)といった勢いのある若手の方々のご発表があった。これからも若手が台頭していけるように、努力したいと思う。

シンポジウムの内容はタイトル通りである。タンパク質のゆりかご(あるいはその前)から墓場まで、つまり合成から分解まで、である。「新生鎖の生物学」との共催であったこともあり、タンパク質の合成段階の研究が多く発表された。タンパク質を合成するリボソームの動態についてはまだまだネタが尽きない。新生鎖による翻訳の一時停止や強制終了、ユビキチン化による真核生物リ

ボソームの制御機構など、新しいことがわかってきている。翻訳系を阻害する薬剤の話題は複数演題あった。またクライオ電顕の発達によりリボソームの構造解析がホットな時代である。今回もアレスト状態にあるリボソームの構造やリボソーム品質管理に関わる構造など、新しいデータが数多く発表された。タンパク質のフォールディングは長く研究が続けられている分野だが、高速 AFM や Ribosome profiling、FRET、NMR、X 線結晶構造解析など、新旧多様な技術で研究がなされているようだ。真核生物におけるオルガネラへの新生タンパク質のターゲティングも ER ミトコンドリアやペロキシソームと幅広く発表があった。タンパク質の分解過程もプロテアソームやオートファジー、ERAD とカバーされていた。このように本シンポジウムでは、タンパク質の合成から分解まで、本当に幅広く網羅されていた。千葉志信先生、津下英明先生、遠藤斗志也先生、近藤寿人先生(発表順)と、動態研所属の先生方の発表をその中で聞くと、各研究がこれまた幅広い分野にまたがりつつ要所を抑えた位置にあることがわかる。うまく連携し補い合ったチーム仕事が今後ふえてくるのだろうか。

ポスター発表は 52 題ずつ 2 日に分けて行われた。会場は密度が高く、PI レベルから学生まで多数の発表があり、飲み物片手に議論を交わす活気あふれる場となった。初めて英語で発表する学生も多かったのではないだろうか。それでも海外の著名人相手にプレゼンする姿が各所で見られた。千葉研の学生も二人発表した。私は学生時



食事は精進料理。大豆タンパク質 Glycinin と  $\beta$ -conglycinin が普通の料理より多く含まれていそうだ。

(塩田) この中にいくつ、大豆料理があるでしょう。

(向川) ご飯とお揚げしか食べられなかった。(超野菜嫌い)

(樫) あれ、最後にはがんばって野菜食べてなかったっけ??

(向川) あまりに食べられるものがなくて、最終的には流し込んでいた。

(樫) 涙なしに語れない、成長物語!

(塩田) ドラマがあったんだね。(私のクイズは無視??)

代にそのような経験をできなかったので、正直うらやましく思う。

ところで、全編英語の講演を集中して聞き続けるのは非常に疲れる。エネルギー補給が必要だ。しかし食事は比叡山らしく精進料理のみ。肉はない。これは多くの参加者に大きなインパクトを与えたであろう。やはり修行の地だった。4 日間も耐えられるか不安な人が多かったはずだ (特に筆者が所属する千葉研は偏食家が多い)。タンパク質は栄養素としても重要である。動物性タンパク質のかわりに畑の肉、大豆の加工食品 (湯葉や豆腐) がメインのタンパク質摂取源だった。味はとても美味しかったし、意外にも量はあったのでお腹は充分満たされた。肉を求めて俗世 (京都市内) へ降りる人は出なくてすんだ。それでもなにか、満たされない感覚が参加者の中にあっただ。その欲をサイエンスへの欲に昇華するのが主催者側の思惑だったのだろう。

夜には 3・4 時間の (あるいはそれ以上の) 討論会が每晚開かれ、老若男女・国籍問わずの交流を畳の上で楽しんだ。海外からの招待客は少し離れた「ロテルド比叡」に泊まられていたので (羨ましい)、22 時くらいに送迎バスで帰っていかれたのだが、それまでの時間はみな宴

会場で交流を楽しんでいたようだった。学生のみなさんも積極的に交流しているようだった。1 日目の深夜には MBS テレビで永田先生のドキュメントが放送されていたので、部屋で鑑賞した。永田研の潮田助教 (当時) は序盤で眠りに落ちていたが、お疲れだったのだろう。2 日目の討論会でも白熱したのか、遅くまで会場にいた潮田さんは部屋に帰るも鍵がかかっており (犯人は同室の筆者、遠藤研の河野さん、津下研の吉田さん)、しかたなく学生たちの部屋で寝たそうだ (ごめんなさい)。

3 日目の午後には、延暦寺ならではのエクスカージョンが行われた。2 グループに分かれ、写経と延暦寺ツアーを交互に行った。写経は下に見本を敷き、上に半紙を重ねて文字を書く。日本人は般若心経を、海外の人用には簡略化されたもので漢字を 16 文字ほど書いた。お坊さんの説明を受ける前に見本の用紙へ直接書き始める海外の人が数名おり、「そうじゃないですよ」と言っても「いいじゃないのよ」という感じで、その自由さに圧倒された。楽しそうだったので、まあいいかと思っていたが、後でお坊さんに注意されていた。写経している内容の意味についてはお坊さんから説明があり、それを九州大学の藤木先生が英訳してくださった。生命科学とかけ離れた宗教的・哲学的概念をうまく伝えるのはとても困難なところ、それでも藤木先生はなんとか伝わるよう努力されていた。集中し始めるとみな一心に写経をし、終わったら自然と各所で peer review が行われる。2 作目にまで手をつけるツワモノ先生もいた。こういった姿に、日々の研究者としてのスタイルが垣間見えるようで面白かった。延暦寺ツアーでは、お坊さんの説明を聞きながら東塔と呼ばれる延暦寺のメインエリアをまわった。会場の延暦寺会館はそのメインエリア内にあるため、観光を兼ねるのには便利だった (坂や階段はきついが)。たまった疲れや時差ボケもあるであろう海外の人たちにとっても、近くで観光できるのはよかったのでは。本堂にあたる根本中堂はちょうど約 10 年かかる大改修の最中であり、残念ながら外観を眺めることができなかったが、中に入るとその仏教の空気と歴史の凄みを強く感じ取ることができた。

その日の夜にはバンケットが開催され、NSMB ポスター賞の表彰が行われた。優秀な発表が多かったことから票が割れ、5名を予定していたポスター賞に7名が選ばれた。副賞としてNSMBのアクセス権1年分が送られた。動態研のメンバーが選ばれなかったのは残念なところだが、そこは「のびしろ」として捉えて今後の研究活動を頑張っていきたいところである。

動態研は主催の一員であったし、開催地に近かったこともあり、準備の大半を動態研のメンバーが担った。動態研の先生方、そして誰より永田研秘書の石田さんがとても良く事前準備をしてくださっていた。当日は動態研所属の各研究室の若手、特に学生が動いたが、大きなトラブルなく進められたのは事前準備の段階で詳細まで気を配っていただいていたからだと思う。その上で、学生たちは良く気を利かせ、自主的に動くことができていた。会の終了後に Peter Walter 氏や Richard Morimoto 氏がスタッフのところへきて、学生たちにねぎらいの言葉をかけてくれたのはありがたいことだった。無事終わったことを実感し、ホッとした。

「一隅を照らす、これ則ち国宝なり」。最澄は天台宗を開くにあたり、人々を幸せへ導くために「一隅を照らす国宝の人材」を養成したいという熱い想いを抱いていたそう。自分もサイエンス界の一隅で光をはなてる研究を志したいと、多くの（特に若い）参加者が思えるような会だったのではないだろうか。現に私はそう思われた、比叡山での輝く貴い国際会議だった。

以降は参加した学生たちに、国際会議の感想を思い思いに書いてもらった。

### 葛西 綾乃 (永田研、博士課程)

昨年8月、国際シンポジウム「Proteins: From the Cradle to the Grave」が京都の比叡山延暦寺で開かれ、私も参加者兼スタッフとして参加させていただきました。私は世界中の著名なサイエンティストが一堂に会するその場の雰囲気完全に飲まれてしまって、最初から最後まで緊張しっぱなしでした。それに私は英語があまり得意ではないので、講演を聞いていても、正直、わかるよ



(上) 写経のようす。みなさん真剣です。  
(左下) Richard Morimoto 氏と遠藤先生が楽しそうですね。近藤先生も。伊藤先生は黙々と。  
(右下) レビューア(Alexander Mankin 氏 & Peter Walter 氏)

の指摘をうける Rolland Beckmann 氏。Nature 誌のエディターがその様子をうかがっている。この作品はまだアクセプトされていないようだ (2019年6月現在)。



3日目の Banquet の様子。Peter Walter 氏による乾杯の音頭  
 (樫) 最初は料理がすくなくめだったね。  
 (向川) お腹が空いて、みんないっぱい取っていたからじゃない？  
 (塩田) 学生たちみんな、先生たちに配慮せずにご先にとりにい  
 った。



(向川) 私たちだけかな。3日ぶりの洋食がうれしすぎて。  
 (樫) しみた。  
 (塩田) 千葉先生は豆腐ハンバーグをとって「これは本当の肉なの  
 か」と聞いてきたよ。  
 (向川) 疲れてたんだね、総合司会おつかれさまでした！

うな、わからないような、そんな情けない気持ちでしたし、話す方はもっと自信がなくて、夜の討論会の時に、ロテルド比叡に宿泊される先生方全員にロテルド比叡に帰るためのバスに乗っていただくように英語で声をかける、という任務は本当に気が滅入りました。これだけでもヘトヘトなのに、一日三食全てが精進料理だったり、急な階段を登って延暦寺を見学したり、写経したりと、本当に修行をさせられているみたいだなと思っていました。だから正直に言えば、国際シンポジウムが終わった直後の感想は「はあ、、、つかれた、、、」だったと思います。

それからしばらく経って、先日この文章の執筆を依頼され、改めて当時は振り返る機会をいただき、写真をいくつか見せてもらいながら当時は思い出すうちに、それまで心身ともにクタクタだったという記憶しかなかったのですが、この国際シンポジウムに参加した経験は、今の私にとっても大きな影響を与えた出来事だったということに気付かされました。

比叡山の国際シンポジウムを経験する前の私は、世界のトップサイエンティストは自分とは全く違う世界にいて、話す話題も、面白いと感ずることも全く違うのだと考えていました。でも、それは誤解でした。学会初日は会場設営と受付、照明係の仕事をしているうちにあっという間に過ぎ、すぐに夜の討論会になりました。それぞれ大御所の研究者たちを囲んで話す状況になったのですが、普段から英語に自信のない私は、大御所の皆さんを目の前にして余計に緊張してしまい、何も話すことがで

きず、ひたすら話を聞いて笑顔で頷くことしかできませんでした。英語が話せないことにも、雰囲気にも馴染めないことにもやるせなさを感じつつその場をやり過ごしていたのですが、そんな中、ふと冷静になり、討論会会場を見渡してみると、それまで自分とは別格の、雲の上の存在のように感じていた世界のトップサイエンティストの皆さんが、普段の私たちと同じように、飲み物を飲んでわたいもない世間話に花を咲かせ、私たちと同じタイミングで笑っていることに気が付きました。その時、永田先生がよく言うとおられる「何か特別な人たちがサイエンスをしているのではなく、自分たちとなんら変わらない普通の人間が、純粋に楽しんでサイエンスをやっているのだ」という言葉を思い出し、「まさにこのことだ！」と思いました。

次の日からのセッションでは、初めにも述べたように、分かるところもあれば聞き逃したり、理解できなかったりするところもありつつ、、、といった感じでしたが、大御所のみなさんほど、発表する時も、質問する時も、「研究が面白くてたまらない！」という思いがにじみ出ている感じがして、若い人たちよりもはるかに活気と好奇心に満ち溢れている姿がとても印象的でした。普段の私は、実験や授業、論文紹介やプログレスレポートの準備などに気を取られて、いつも焦って余裕がなく、好きで始めたはずの研究なのに、心から楽しんでやることを忘れがちになっています。そんな私に「もっと気楽に、思いのままに研究を楽しめばいいのだ」と励ましていただい

いるように感じました。

シンポジウムの最後には、Rick Morimoto 先生がサプライズで秘書の石田さんに花束を渡す場面がありました。4日間の中で最も感動的な場面でしたし、私も少し胸が熱くなりました。研究するにしても、発表するにしても、一人でやることではありません。もっと身近なことで言えば、毎日実験ができることも、もっと言えば、握れるピペットマンがあることだけでも、たくさんの支えがあってこそです。そんな見えないところで支えてくれる人たちへの感謝を忘れないということを実践している姿は、本当に素敵だなと思いました。

研究の世界に飛び込んで間もない私たちにとって、こんなに早い時期に世界のトップレベルの研究者たちと交流し、海外を肌で感じられたことは本当に素晴らしい経験になったと思います。個人としては、ロテルド比叡に宿泊されるみなさんを無事に送り届けられたことで、案外私の英語って通じるんだなと少し自信を持てるようになった学会でもありましたし、これまで全く手が届かないところにあると思い込んでいた「海外」や「世界のトップサイエンティスト」が、案外手が届くところにあるのかもしれないと思えるきっかけにもなりました。研究に対する角な緊張も解けて、研究を楽しむことを大切にしようと思えるようになりましたし、自分と世界とのギャップを埋めるために何をしたらいいかと思いを巡らせる機会も増えたように思います。このシンポジウムで感じたことの全てを日々に活かし、これからも成長し続けられればと思います。

山下 龍志 (永田研、博士課程)

昨年の「International Symposium on “Proteins;from the Cradle to the Grave”」には、M2の学生ながらも参加させていただき非常に多くの経験をさせていただきました。

この度は京都産業大学の千葉先生から、本学会の感想についての寄稿依頼をいただきましたので、未熟な文章ではありますが、僕が感じたことや自身の成長につながった点について綴らせていただきたいと思います。

本学会は平成30年8月26日から29日と4日間かけて行われました。8月の終盤ではありましたが、残暑が厳しく会場へのバスを待つ間にもガラガラと汗をかいたことを覚えております。会場は滋賀の延暦寺会館という延暦寺の敷地内にある非常に立派な建物でした。集会所の京都駅とは異なり、車や街の雑音は一切せず落ち着いた雰囲気の会場でありました。

会場へ到着後は精進料理をいただき（生まれて初めての精進料理！！美味しかったです！！）、和やかな雰囲気のまま Plenary lecture が始まりました。初めは英語での講義ということで緊張しておりましたが、吉田先生、伊藤先生たちが研究へ向けられる熱意や若い研究者を応援する言葉から、「自分のような学生であっても大きな発見ができる」「何か1つでも新たなことを発見したい」と勇気づけられ、今回の学会では精一杯頑張ろうと決心しました。

その後は懇親会ということで、この機会に Bernd Bukau 先生や Ulrich Hartl 先生とお話をして、ありがた



みなさん、若々しい！



石田さん、お疲れ様でした！



延暦寺ツアーの様子



いお言葉を頂戴しようと考えていたのですが、この日は先生方のホテルへの終バスが近いということで早々に帰られてしまい、残念に思いつつもこの学会で何か掴んで帰ろうと静かに闘志を燃やす形で初日は終了いたしました。

翌日から学会も本格的に始まり、耳が英語になれたのか前日より内容は聞き取れるようになりました。Nature, Cell, Science でいつも名前を拝見している先生方が次々と、発表をしている様子には圧倒されました。先生方の発表をなんとかノートに書き記し、疑問点などもメモを取りながら聞いていたのですが、ディスカッションとなるとなかなか手を挙げる事ができず、自分の情けなさに腹が立ったことを覚えております。その日の夜にはポスター発表があり、なんとかこの不甲斐なさを挽回しようと、持てる力を絞り出して発表させていただきました。結果として僕の力及ばず、賞こそ得ることはできませんでしたが、多くの人に自分の研究を聞いていただきながら、熱くディスカッションを交わすことができ非常に良い経験をさせていただくことができたと思っております。自身の研究の面白さをもっと伝えたい、頑張りたいと思うきっかけとなりました。

その後は、懇親会が開かれ、二次会が僕の部屋で行われるというヘビーな内容ではありましたが、この間に多くの先輩方にかわいがっていただき、自身の進路の相談や研究に対する姿勢など多くのことを学ばせていただきました。睡眠時間が大幅になくなったという点を除き非常に有意義なものでありました (笑)。

この経験を通じ、三日目は非常にやる気に満ちた状態

で学会に臨ませていただきました。この日に最も成長できたと感じたことは、Johannes M. Herrmann 先生の発表で質問をすることができたことです。初めは内容がうまく伝わらず、冷や汗をかきながらの質問となりました。

しかし、僕の拙い英語であっても Johannes M. Herrmann 先生は真摯に僕の質問を理解しようとして下さり、自分のような学生の質問であっても真剣に耳を傾けてくれる様子に非常に感動いたしました。僕もこのような姿勢でサイエンスに臨み、多くの方とディスカッションができるようになりたいと思うことができました。この経験を通じ、自分の中でも英会話に対するハードルが下がり、最後の懇親会では Hartl 夫妻ともお話をすることができました。お話すると非常に明るく気さくな方たちで、初めはサイエンスに関するありがたいお話を聞こうと息巻いていたのですが、話は徐々に恋愛話へ・・・最終的には二人の馴れ初めから惚気話へと発展してしまい「恋愛は素晴らしい」という教訓を学んでその日は終了いたしました。

この日の経験は、自分が一皮むけることのできた非常に良い一日であり、自身もこのような場で自らの研究を伝えたい、皆を感心させるような面白い研究をしたいと思ひ、博士課程への進学を決意するきっかけとなりました。

一度質問をする勇気が出せばあとは楽なもので、最終日にも質問をすることができ、有意義な時間を過ごすことができたと感じながら終了する形となりました。

今回の国際会議は、多くの先生方から直接お話を伺うことができ、その内容を若く熱いガッツを持った同年代

の人たちと議論することができるというまさに、仏様から教えを受けそれを学ぶような場所でありました。この経験を通じ一皮むけ、煩惱の一つでもなくすことができたのではないかと考えております。今後はなくした煩惱の分知識をたくさん詰め込んで、これからの博士生活を豊かなものにしようと決意し、筆を置かせていただきます。

## 櫻 祐太郎（千葉研、修士2年）

### ・セッション

四日間を通して様々なタンパク質研究の第一線をゆく何人もの重鎮らによるセッションが行われた。フォーリングやシャペロンなど、タンパク質の合成に関わる研究や、膜輸送などの合成後に関わる研究について発表され、まさしくタイトル通り「タンパク質の一生」を様々な視点から見るができるセッションであった。発表は全て英語であったため、内容を理解することがとても困難だったが、発表者と質問者の英語を介した議論が繰り広げられ、各々の研究に対する熱意がひしひしと伝わってきた。今回はお手伝いも兼ねて参加しており、質疑応答用のマイク担当に当たっていたため、会場内をマイク片手にあちらこちらと走り回る心構えでセッションに臨んだのだが、実際はスタンドマイクのスイッチのON・OFFをするだけの単純作業で終わってしまった。数週間前から走り込んで体力作りやマイクの受け渡しのイメージトレーニングまでしてきたのだが、その努力も虚しく体力を持て余す結果となってしまった。が、そのおかげもありセッションは集中して聞くことができたと思う。

### ・精進料理

会場が比叡山延暦寺の敷地内にあるホテルであったため、全ての食事が精進料理であった。一見肉や刺身のように見える料理も、実は全てこんにゃく。他にも豆腐や野菜料理が多く盛り込まれており、思っていたよりも彩り豊かな豪華な食事だった。最初はもの珍しさのせいか写真を撮ったりして楽しんでいたが、回数を重ねるごとに新鮮さが薄れ、三日目あたりからは「肉が食いたい」

としか考えられなくなっていた。こうなることを予想して、あらかじめ非常食を大量に持ち込んでいた学生もいた。（どこの食いしん坊と野菜嫌いとは言わないが。）たった数日で飽きてしまっているのだから、お肉大好きな僕には僧侶の道は到底無理だと悟った四日間であった。

### ・エクスカージョン

三日目の午後からエクスカージョンがあり、延暦寺の境内を見て回った。しゃべりの上手なおっさん（京都弁でお坊さん）に案内してもらい、薬師如来を祭った根元中堂の話や延暦寺の経歴などの話を聞いた。暗闇の中に建つ薬師如来像は、どこか神秘的な魅力を放っていて得も言えない感情を植え付けられた。そのほか比叡山の自然を感じながらいくつか別の施設を巡った。僕は自前の一眼レフを持ってきていたため、お堂の外観や自然の写真を撮ったりして少しは楽しかったのだが、照りつける暑さの中アップダウンの激しい道や階段を歩き回された同期の女子学生の顔は満身創痍そのもの。もはやおっさんの声が届くかどうかの最後列で死んだ魚の目をしながら話を聞いていた彼女らの顔を、気づかれないようにパシャリ。無意識のうちにシャッターを切っていた。反省はしているが、後悔はしていない（本人らの強い希望により、残念ながら写真の掲載は断念）。



ケーブルカーで下山。比叡山でいい経験ができました！

## 塩田 成末・向川 結紀子（千葉研、修士2年）

この国際会議は、国内だけでなく海外の著名な先生方の講演も聞けるととても貴重な機会でした。タンパク質の“ゆりかごから墓場まで”の様々な領域で活躍しておられる先生方が広い会場いっぱいにおられ、有名な研究者の方たちがこの分野にたくさんおられることを実感することができました。論文でお見かけする先生方の講演を聞くことができ、大変記憶に残る4日間となりました。

ポスターセッションでは、初めてのポスター発表というに加えてさらに英語での発表だったため、とても緊張していましたが、会場は思った以上に和んでおり緊張がほぐれました。海外の先生が一人、発表を聞きに来てくださりました。上手な英語で説明をすることはできませんでしたが、理解しようとしてくださいました。説明を終えたあと、「君にポスター賞の投票をするよ」と言ってもらえたことがとても嬉しかったです。つたない英語でも自分の研究について少しでも伝えることができ、人に面白いと思ってもらえる研究ができているんだとちょっと自信ができました。

同じ院生のポスター発表をみると、実験データがたくさん載っており、自分も日々の実験を頑張らないと、と焦りました。また、研究室によって実験手法に特徴があることもおもしろいなと思いました。様々な分野の方たちのポスターを見て、自分の知らないことが多くあり、もっと勉強が必要であると感じました。

講演、セッションの他にとても思い出に残っていることは、食事です。今回の食事はすべて精進料理でした。精進料理は質素なものだと思っていましたが、見た目は色とりどりで食べる前から楽しめたことが意外でした。湯葉で肉、こんにゃくで刺身を例えており、肉や魚がなくても、美味しい食事を楽しむことができました。最終日になると、最後の精進料理に少し名残惜しくなりましたが、お肉を食べたいという気持ちの方が少しだけ強くなりました。

エクスカージョンでは、比叡山ならではの体験をすることができました。写経は初めての経験でしたが思った以上に無心になることができました。デジタルが発達し、文字を書くという作業が減っている今、実際に筆を用い

て紙に漢字を書くことは、久々のことで新鮮でした。ツアーは境内を散策し、当時のお坊さんたちの修行の様子を聞きました。お坊さんたちも煩惱に苦しんでいたのだなと親近感を感じました。

この国際会議では運営にも関わり、受付の手伝いや、発表中にはタイムキーパーやマイク係をしました。微力ながら会場のお手伝いに携わり、学会運営に貢献することができたことはいい経験でした。比叡山の夏は暑かった！

**meeting report**

### Life of proteins: from nascent chain to degradation

Cells rely on the synthesis, translocation, folding and turnover of proteins. Owing to complexity, spatiotemporal regulation and surveillance of these processes are vital. Advances in the field were discussed at the international symposium 'Proteins: From the Cradle to the Grave' that took place in the wonderful setting of a Buddhist temple located close to Kyoto, Japan. The emerging theme was the interdependence among cellular processes and organelle compartments.

One delightful aspect of being a scientist is the opportunity to attend conferences all around the world and sometimes in extraordinary places. This was certainly true for the meeting that took place 26-29 August 2018 at Enryakuji Kofukuji, a Tendai monastery located on Mount Hiei, overlooking Kyoto. This amazing temple complex, a UNESCO World Heritage site, was founded in 788 and is one of the most significant monasteries in Japanese history.

The conference was organized by Kazuhiko Nagata (Kyoto Sangyo University), a director of the Institute for Protein Dynamics at Kyoto Sangyo University and Hiroko Taguchi (Tokyo Institute of Technology), a chairperson of the Japanese NEMT (Nascent Chain Biology) together with Toshiyuki Izido (Kyoto Sangyo University) and Shirobu Chiba (Kyoto Sangyo University).

The conference was opened by three Japanese scientific giants: Yoshinori Ohsumi (Tokyo Institute of Technology, honored with the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine), commenced the meeting with an exciting lecture about yeast autophagy, starting from his historical discovery of the first autophagy mutant, *atg1*, and connecting it by animated movies with all 18 critical Atg proteins, many known in structural detail, that orchestrate autophagosome formation. Ohsumi concluded with recent data suggesting that autophagy degrades many cytosolic proteins with unexpected specificity or preference, the underlying mechanism of which is still elusive. Masahiko Yoshida (Kyoto Sangyo University) talked about the molecular structures and dynamics of two of the most amazing cellular machines: the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase and the GroEL.

**Exciting science, traditional Japanese vegetarian food and vibrant discussions on tatami mats**  
A meeting site where the perpetuity of ancient traditions was felt everywhere



Participants of the nascent-chain biology research meeting at Enryakuji Kofukuji, a Tendai monastery close to Kyoto.

996 NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY | VOL 25 | NOVEMBER 1 2018 | 996-999 | www.nature.com/nature

後日、NSMB 誌にミーティングレポートが掲載された (Herrmann JM et al, NSMB 2018)。

# 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、従来4つの主要なプロジェクトについて研究を進めてきた。そのうち、博士研究員であった山本洋平をヘッドとして進めてきた、新規遺伝子 ERdj8 によるオートファゴソームのサイズの調節機構の研究は、山本が大阪大学歯学部助教として採用されたことから、現在も共同研究を進め、これまでの成果は論文の revise 中であるが、本研究テーマからは外している。以下の3つのテーマについては、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

コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 は 1986 年、永田らによって発見された新規タンパク質であり、コラーゲン合成において必須の役割を果たしている。その後の研究から、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た(*JBC* 2017)。現在、より阻害効果の高い阻害化合物を探索し臨床応用を目指している。このプロジェクトは製薬会社と産業技術総合研究所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-M) に採択され、精力的に研究が進められている。またドイツの製薬会社とのあいだのライセンス契約の締結に向けて準備が進んでいる。本研究は、博士研究員の伊藤進也をヘッドとした研究チームによってなされている。

### 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

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)。この過程で潮田らにより、2008 年に ERdj5 という還元酵素が発見され、ミスフォールドタンパク質の品質管理機構において重要な役割を果たしていることをすでに報告してきた (*Science* 2008, *Mol. Cell* 2011 など)。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 (*PNAS* 2016)。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。小胞体はよく知られたように酸化環境下にあるが、この酸化環境において ERdj5 が還元活性を発揮するためには、何らかの方法によって還元力を得なければならない。言い方を変えれば、電子はどのようにして ERdj5 に伝達されるのか、小胞体はどのようにしてサイトゾルから電子を得ているのか、が避けて通れない大きな問

題となる。これは小胞体というオルガネラに残された細胞生物学上の最大の謎の一つでもある。本研究室では潮田亮助教を中心としたチームによって、従来知られてきたのとはまったく異なる新たな方法によって、小胞体に電子が供給されているメカニズムを明らかにしつつある。

### 3) もやもや病責任遺伝子ミスチリンの機能解析

もやもや病は東アジア地域に多い重篤な脳血管疾患であり、一部に家族性の発症を認める。我々はもやもや病の責任遺伝子ミスチリンをクローニングし (*PLOS ONE*, 2011)、生理・病態機能の解明を目指して、解析を続けてきた。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 (*Sci Rep* 2014, 2015, 2017)。さらに最近、ミスチリンが脂肪貯蔵の制御因子であり、もやもや病責任変異によりこの機能が障害されることをつきとめた (*J Cell Biol*, in press)。これまでもやもや病と脂質代謝の関連についてほとんど議論されたことがなく、ミスチリンが脂肪滴蓄積の制御因子であったことは驚くべき新展開であると言える。本研究は森戸大介主任研究員のチームによって行われてきた。森戸研究員は、平成 30 年度より、昭和大学医学部講師として新たな活動の場を得、本研究室との共同研究を進めている。

## 2. 本年度の研究成果

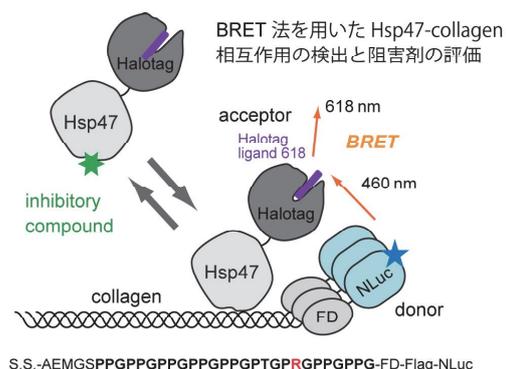
### 1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

Hsp47 は小胞体に局在し、コラーゲン生合成に必須の分子シャペロンとして、我々が発見してから長年研究を続けてきたタンパク質であるが、近年コラーゲン以外のタンパク質にも結合し、コラーゲンの分泌に関与することが示唆されている (Ishikawa et al, *PNAS*, 2016)。新規結合パートナーを含む Hsp47 の最新のトピックを総説として報告した (Ito S and Nagata K *J Biol Chem*, in press)。

Hsp47 はコラーゲンの異常蓄積を特徴とする線維化疾患の増悪因子ともなり、Hsp47 の発現を抑制すると線維化が抑制されることから、有望な分子標的とされてきた。我々は Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害する低分子化合物の探索を行い、詳細な解析の後、得られた Hsp47 阻害化合物の一部について特許を取得し、既に論文として発表している (Ito S et al, *J Biol Chem*, 2017)。今年度は、生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) 法を用いて、この阻害剤が確かに小胞体内で Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害していることを示した。これまで、Hsp47 とコラーゲンの相互作用を細胞内で検出するには、その結合解離定数からクロスリンカーを用いて結合を固定する必要があり、結合解離が不可逆になることから、相互作用阻害剤の評価が難しかった。BRET 法は近接するタンパク質間相互作用をエネルギー転移で見積もるため、正しい結合解離を捕らえることができる。BRET 法による Hsp47-コラーゲン間小胞体内相互作用の検出に成功し、阻害剤の効果を評価した (論文投稿中)。この方法により、より有望な化合物の探索を行っている (右図)。

Hsp47 阻害剤プロジェクトは製薬企業及び産業技術総合研究所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-M) に採択され、臨床応用に向け、*in vitro* での構造活性相関、*in cell* での阻害能評価及び *in vivo* での薬効評価を総合しながら、研究が進められている。

(文責：伊藤)

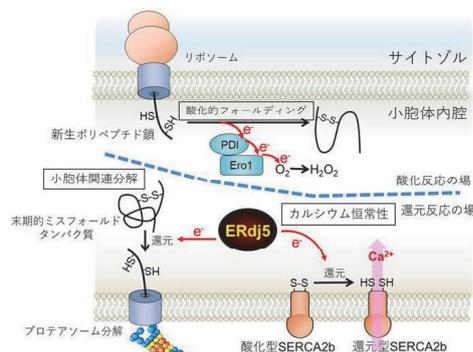


### 2) 小胞体におけるタンパク質品質管理、レドックス制御、カルシウム恒常性のクロストーク：小胞体恒常性維持の解明

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)。東北大学の稲葉教授らとの共同研究において SERCA2b の結晶構造が解明に成功しており (Inoue *et al.* *Cell Rep.* in press)、今後、詳細なポンプ活性化メカニズム解明が期待される。現在進行中のカルシウム制御として、ERdj5 がカルシウムチャネル IP3 受容体の活性をレドックス依存的に制御することも見出し、ポンプとチャネルを ERdj5 の還元活性を介して、reciprocal にかつ合目的的に制御するという、極めて巧妙な制御機構を明らかにしつつある。また、ERdj5 の還元メカニズムに関して、新生鎖を電子ドナーとする全く新しいメカニズムを明らかにし、現在、論文投稿準備中である (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) もやもや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 (ATP アーゼ/ユビキチンリガーゼ)、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 (Sugihara *et al.*, *J. Cell Biol.* 2019)。ミスチリンの局在・機能はユビキチンリガーゼドメイン内のもやもや病原因変異により顕著に障害されていた。

(文責：森戸)

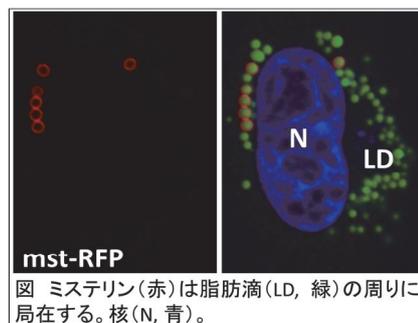


図 ミスチリン(赤)は脂肪滴(LD, 緑)の周りに局在する。核(N, 青)。

### 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 three major research projects:

**1.: Functional analysis of collagen-specific molecular chaperone Hsp47.** A collagen-specific molecular chaperone Hsp47 localizes in the endoplasmic reticulum (ER) and has essential role for collagen synthesis in vertebrate. Recently, several new binding partners of Hsp47 were

identified, they may co-work with Hsp47 in collagen synthesis in the ER. We summarized such recent topics of Hsp47 as a mini-review in J Biol Chem (Ito S and Nagata K *J Biol Chem.* in press).

Hsp47 could be a promising target for the management of fibrosis. We screened small-molecule compounds that inhibit the interaction of Hsp47 with collagen from chemical libraries and found that a molecule Col003 competitively inhibited the interaction and caused the inhibition of collagen secretion (Ito S et al, *J Biol Chem.* 2017).

We are developing new screening systems and are searching for more effective Hsp47 inhibitor. Herein, we established a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system for assessing Hsp47-collagen interaction dynamics within the ER. After optimization and validation of the method, inhibition of the interaction between Hsp47 and collagen by a small molecule (Col003) was demonstrated for the first time in the ER. Using the BRET system, we found that Hsp47 interacts not only with (Gly-Pro-Arg) but also weakly with (Gly-Pro-Hyp) motifs of triple helical collagen in cells. This method can provide valuable information on PPIs between Hsp47 and collagen, and the effects of PPI inhibitors important for the treatment of fibrotic disorders (*under submission*). We are searching for more promising compounds by this method.

The project of Hsp47 inhibitor has developed into collaborating research with pharmaceutical companies and the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), and was adopted by ACceleration Transformative research for Medical Innovation (ACT-M) of Japan Agency for Medical Research and Development (AMED). Aiming for clinical application, our research on Hsp47-collagen interaction also integrates *in vitro* structure- activity relationship, in-cell inhibitory activity evaluation and *in vivo* efficacy evaluation.

**2: Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and Ca<sup>2+</sup> flux.** We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in the 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 facilitating the retrograde transport of these proteins from the ER lumen into the cytosol, where they are degraded by the 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 SERCA2b, a Ca<sup>2+</sup> pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca<sup>2+</sup> concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2b. It suggests that redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the ER (R. Ushioda *et al.*, *PNAS* 2016). Furthermore, Inaba group (Tohoku Univ.) and we elucidated the structure of SERCA2b (Inoue et al. *Cell Rep.* 2019). This information may help to understand the activation mechanism of SERCA2b pump through ERdj5. On the other hand, we have revealed the mechanism of the electron transfer to ERdj5 from the nascent chain.

**3. 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 and pathological functions in cells remain 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. This function is largely impaired by moyamoya disease mutations (Sugihara, \*Morito et al., *J Cell Biol*, in press).

#### 4. 論文、著書など

S.Ito, M.Saito, M.Yoshida, K.Takeuchi, T.Doi & K.Nagata : A BRET - based assay reveals collagen - Hsp47 interaction dynamics in the endoplasmic reticulum and small-molecule inhibition of this interaction. *J Biol. Chem.* in press

M.Yoshida, M.Saito, S.Ito, K.Ogawa,N.Goshima, K.Nagata&T.Doi : Structure-Activity Relationship Study on Col-003,a Protein-Protein Interaction Inhibitor between Collagen and Hsp47. *Chem.Pharm.Bull.* in press

S.Ito & K.Nagata : Roles of the endoplasmic reticulum-resident, collagen-specific molecular chaperone Hsp47 in vertebrate cells and human disease. *J Biol. Chem.* In press

R.Ushioda & K.Nagata : Redox-Mediated Regulatory Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology "Protein Homeostasis SECOND EDITION"* Cold Spring Harbor Laboratory press in press

M. Inoue, N. Sakuta, S. Watanabe, Y. Zhang, K. Yoshikae, R. Ushioda, Y. Kato, J. Takeda, T. Tsukazaki, K. Nagata & K. Inaba : Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay. *Cell Rep.* in press

M. Sugihara, D. Morito, S. Ainuki, Y. Hirano, K. Ogino, A. Kitamura, H. Hirata & K. Nagata : The AAA+ ATPase/ ubiquitin ligase mysterin cytoplasmic lipid droplets *J. Cell. Biol.* in press

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* 115(18):E4199-4208 (2018)

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* 16: 1–14 (2018)

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* 10.3389 (2018)

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.* 497:279-284 (2018)

D. Sepulveda, D. Rojas-Rivera, DA. Rodríguez ,J. Groenendyk, A. Köhler,C. Lebeau-pin,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  $\alpha$ . *Mol Cell.* , 69:238-252 (2018)

伊藤進也、永田和宏 : Hsp47 (コラーゲン特異的分子シャペロン) - 線維化治療の標的因子として. 医学のあゆみ「蛋白質代謝医学- 構造・機能の研究から臨床応用まで」(医歯薬出版) Vol.267, No13, p.941-947 (2018)

潮田亮 : 蛋白質品質管理のための小胞体関連分解. 医学のあゆみ「蛋白質代謝医学 - 構造・機能の研究から臨床応用まで」(医歯薬出版) Vol.267, No13, p.1034-1040

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. 実験医学増刊号 (羊土社) p79-86 (2018)

森戸大介：ミステリン - もやもや病の責任遺伝子産物. 医学のあゆみ「蛋白質代謝医学 - 構造・機能の研究から臨床応用まで」(医歯薬出版) Vol.267, No13, p1105-1110 (2018)

永田和宏、椛島健治：鍛えよ、知の体力を. 週刊医学界新聞 (医学書院) 第 3297 号 (2018)

永田和宏：cell Stress and Proteostasis Dysfunction in Aging and Disease. ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム 30th ニュースレター (日本医療研究開発機構) p13-15 (2018)

## 5. 学会発表など

### 招待講演

永田和宏：細胞内ストレス防御の分子機構. 新学術領域研究「予防を科学する炎症細胞社会学」公開シンポジウム (特別講演)、東京都、2018.02.09

Kazuhiro Nagata：Role of ER J protein for the maintenance of ER homeostasis. International workshop of CSSI, Gdansk (Poland), 2018.4.6

Kazuhiro Nagata：Redox-mediated regulation of ER homeostasis. Cold Spring Harbor Meeting "Protein Homeostasis in Health and Disease", Cold Spring Harbor(USA), 2018.4.20

永田和宏：タンパク質品質管理機構の破綻：加齢と病態. 第 60 回日本老年医学会学術集会 (特別講演)、京都市、2018.06.14

Kazuhiro Nagata：ERdj5 as a master regulator of the ER homeostasis: crosstalk of Ca<sup>2+</sup> and redox homeostasis. FASEB Meeting "Protein Research Conferences", Bonaventure(USA), 2018.07.28

Kazuhiro Nagata：Nascent polypeptide as a source of reductive power in the ER. International Symposium "Proteins: from the Cradle to the Grave", Hieizan, 2018.08.27

### 学会発表

森戸大介：Physiological and pathological functions of moyamoya disease-associated gene mysterin. 第327回熊本大学発生医学研究所セミナー、熊本市、2018.1.31 (口頭発表)

潮田亮：ジスルフィド還元酵素による小胞体恒常性維持機構の解明. 第1回ユビキチン研究会、東京、2018.01.19 (口頭発表)

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. 第 1 回ユビキチン研究会、東京、2018.01.18 (口頭発表)

Ryo Ushioda：Maintenance of ER Homeostasis through Disulfide Reductase Erdj5. 東京工業大学化学生命科学研究国際フォーラム、東京都、2018.03.5 (口頭発表)

Ryo Ushioda：Maintenance of ER homeostasis through disulfide reductase ERdj5. International workshop of CSSI, Gdansk (Poland), 2018.4.6 (口頭発表)

Daisuke Morito：Structure and Function of AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Kyoto, 2018.04.22-26

潮田亮：小胞体ジスルフィド還元酵素 ERdj5 の還元ドナーの探索. 平成 30 年度生理学研究所研究会、岡崎市、2018.04.26 (口頭発表)

山下龍志、潮田亮、永田和宏：小胞体還元酵素 ERdj5 の欠損はミトコンドリアの断裂を引き起こす. 平成 30 年度生理学研究所研究会、岡崎市、2018.04.26 (ポスター優秀発表賞)

藤井唱平、潮田亮、永田和宏：レドックス依存的な小胞体カルシウムチャネルの動態解析. 新学術研究「新生鎖の生物学」第 5 回若手ワークショップ、蔵王市、2018.05.14-15

上垣日育、潮田亮、永田和宏：新生鎖による小胞体還元力導入機構の解明. 新学術研究「新生鎖の生物学」第 5 回若手ワークショップ、蔵王市、2018.05.14-15

葛西綾乃、永田和宏：小胞体ミスフォールドタンパク質の選択的オートファジー分解. 第70回日本細胞生物学会、第51回日本発生物学会合同大会、東京都、2018.06.05-08

伊藤進也：コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析. 京都バイオ計測センター研究交流発表会、京都市、2018.06.21（口頭発表）

伊藤進也、永田和宏：小胞体内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. 第18回日本蛋白質科学会年会、新潟市、2018.06.26-28

Ayano Kasai, Yo-hei Yamamoto, Tomoe Takino, Richard I. Morimoto, Mlyuki Sato, Ken Sato and Kazuhiro Nagata : Physiological role of a novel ER membrane protein, ERdj8, which determines the size of autophagy. FASEB Meeting "Protein Research Conferences", Bonaventure(USA), 2018.07.22-27

Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata : Deficiency of ER-resident reductase ERdj5 causes disruption of Mitochondrial morphology. FASEB Meeting "Protein Research Conferences", Bonaventure (USA), 2018.07.22-27

Ryo Ushioda, Kaiku Uegaki, Kazuhiro Nagata : Nascent chain as Electron donor for disulfide reductase in the ER. International Symposium "Proteins:from the Cradle to the Grave", Hieizan, 2018.08.27-29

Daisuke Morito, Shiori Ainuki, Munechika Sugihara and Kazuhiro Nagata : The unique AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin is involved in the cellular fat metabolism. International Symposium "Proteins:from the Cradle to the Grave", Hieizan, 2018.08.27-29

Shinya Ito, Koji Ogawa, Koh Takeuchi, Masahito Yoshida, Takatsugu Hirakawa, Takayuki Doi, Naoki Goshima, Tohru Natsume and Kazuhiro Nagata : A small-molecule compound inhibits a collagen-specific molecular chaperone Hsp47 and could represent a potential remedy for fibrosis. International Symposium "Proteins:from the Cradle to the Grave", Hieizan, 2018.08.27-29

Shohei Fujii, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Distinct cysteine pairs contribute to assembly and regulation of ins(1,4,5)P3 receptors. International Symposium "Proteins:from the Cradle to the Grave", Hieizan, 2018.08.27-29

Chika Tsutsumi, Kaiku Uegaki, Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Zinc-dependent functional switching of ERp18, a novel ER thioredoxin. International Symposium "Proteins:from the Cradle to the Grave", Hieizan, 2018.08.27-29

Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Deficiency of ER-resident reductase ERdj5 causes disruption of Mitochondrial morphology. International Symposium "Proteins:from the Cradle to the Grave", Hieizan, 2018.08.27-29

Shiori Ainuki, Daisuke Morito, Munechika Sugihara and Kazuhiro Nagata : Regulation of lipid metabolism by 591 kDa AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, and its impairment by moyamoya disease mutations. International Symposium "Proteins:from the Cradle to the Grave", Hieizan, 2018.08.27-29

Shohei Fujii, Ryo Ushioda and Kazuhiro Nagata : Distinct cysteine pairs contribute to assembly and regulation of ins(1,4,5)P3 receptors. The 15<sup>th</sup> International Meeting of the European Calcium Society, Hamburg, 2019.9.10-13

Shinya Ito, Kazuhiro Nagata : Collagen-specific molecular chaperone Hsp47 would be a therapeutic target for fibrotic diseases. 19<sup>th</sup> Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism, Kyoto, 2018.09.11

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

Mitochondrial morphology. 線虫研究の未来を考える会、三島市、2018.09.14-15

伊藤進也、永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能制御. 第 13 回小胞体ストレス研究会、宮崎市、2018.11.16-17 (口頭発表)

潮田亮、上垣日育、永田和宏：酸化的環境で還元反応の場を提供する新生鎖の役割. 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜市、2018.11.28-30

## 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：2013-2018 年

科学研究費補助金・基盤研究 A

課題名：小胞体における活性酸素除去に関わる新たな分子機構の解明、研究代表者：永田和宏、取得年度：2018-2021 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・基本スキーム (ACT-M)

課題名：コラーゲン分泌阻害低分子による抗線維化薬、研究代表者：永田和宏、取得年度：2018-2020 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：2015-2018 年

資生堂

研究代表者：永田和宏、取得年度：2017-2019 年

大塚製薬

研究代表者：永田和宏、取得年度：2017-2018 年

バイエル薬品

研究代表者：永田和宏、取得年度：2018 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：2017-2018 年

科学研究費補助金・新学術領域「細胞機能を司るオルガネラ・ゾーンの解読」

課題名：レドックスゾーンで切り拓く小胞体恒常性維持、

研究代表者：潮田亮、取得年度：2018-2019 年

科学研究費補助金・基盤研究 C

課題名：レドックス制御によるカルシウム恒常性維持機構、研究代表者：潮田亮、取得年度：2018-2020 年

加藤記念バイオサイエンス振興財団

課題名：小胞体における還元ネットワークの構築とその制御、研究代表者：潮田亮、取得年度：2018-2019年

東北大学 CORE ラボ共同研究

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：2018年

科学研究費補助金・若手研究

課題名：タンパク質間相互作用の新規 in vivo 検出法、研究代表者：伊藤進也、取得年度：2018-2019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：2017-2019年

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：TMX4 を中心とする小胞体膜近傍での還元ネットワークの解明、研究代表者：堤智香、取得年度：2018-2020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「ケモテクノロジーが拓くユビキチンフロンティア」外部評価委員

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

永田和宏：文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「予防を科学する炎症細胞社会学」外部評価委員

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 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

Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata :  
Deficiency of ER-resident reductase ERdj5 causes disruption of Mitochondrial morphology.  
FASEB Meeting "Protein Research Conferences", Bonaventure(USA), 2018.07.22-27 (優秀ポスター  
一賞受賞)



# 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

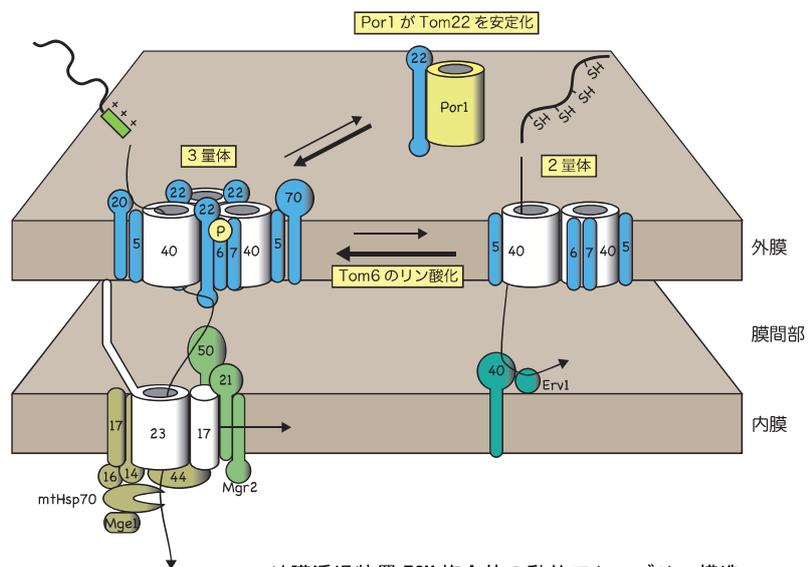
真核生物の細胞内には高度に発達したオルガネラ（細胞小器官）構造が作られ、それらが細胞に課せられた複雑で膨大な仕事を分散管理している。真核細胞に必須のオルガネラであるミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。近年ミトコンドリア機能と老化や健康、神経変性疾患をはじめとする様々な病態との関係も注目されている。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、細胞の内外からの要請とシグナルに応答し、不要となったミトコンドリアを除去する一方で、必要に応じてミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。ミトコンドリアは *de novo* には作られず、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の意義の解明

ミトコンドリア外膜トランスロケータの TOM 複合体は 1000 種におよぶミトコンドリアタンパク質のほとんどのミトコンドリア内への移行の搬入口として機能する。一方ミトコンドリア外膜のポリンは小分子の代謝物質やイオンのミトコンドリア内外の出入りを担う。われわれは、TOM 複合体は「孔」として機能する Tom40 3 分子が Tom22 によって糊付けされた 3 量体をつくるが、その一部は Tom22 がはずれて Tom40 が 2 分子の 2 量体に変換することを見出していた。今回、3 量体からはずれた Tom22 にミトコンドリアのポリンが結合すること、すなわちポリンは TOM 複合体 3 量体から一時的にはずれた Tom22

に結合することで、TOM 複合体 3 量体 (Tom22 を含む) から TOM 複合体 2 量体 (Tom22 を含まない) への変換を促進する働きがあることが分かった。それでは TOM 複合体の 3 量体と 2 量体の存在意義は何なのか？今回われわれは、ミトコンドリアタンパク質の多くは 3 量体の TOM 複合体を使ってミトコンドリア内に入るが、膜間部の可溶性タンパク質 (TIM40/MIA 経路により輸送される基質) は 2 量体の TOM 複合体を使ってミトコンドリア内に入ることを新たに見出した。すなわち、ミトコンドリア

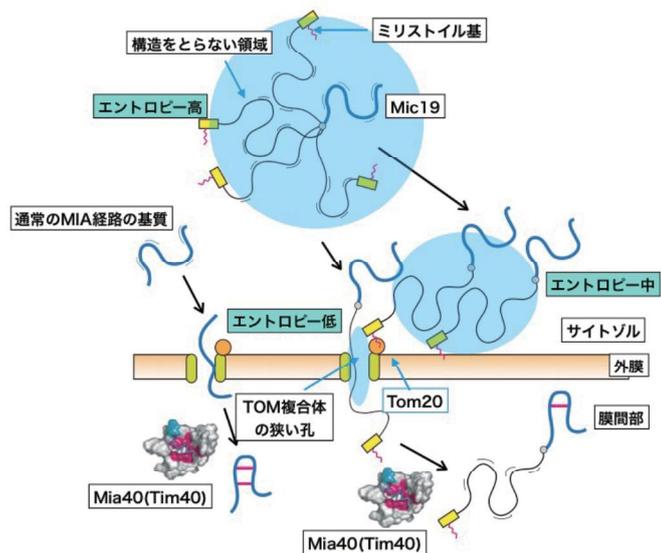


アタンパク質の搬入口 TOM 複合体は、その組成を 3 量体と 2 量体で変えることで、1000 種類に及ぶさまざまなミトコンドリアタンパク質を、効率よく取り込めるようになっていていると考えられる。

ポリリンとは逆に、TOM 複合体のサブユニットの 1 つである Tom6 は 2 量体から 3 量体への変換を促進するが、この変換が細胞周期に依存することも明らかになった。すなわち、Tom6 は細胞周期依存的にリン酸化されるが、このリン酸化が 2 量体と 3 量体の安定性を変えていることがわかった。細胞周期に依存して、ミトコンドリアが必要とするタンパク質の種類が異なり、そうしたタンパク質の種類の変化にうまく対応できるよう、2 量体と 3 量体の量比が微調整されているのかもしれない。

## 2) エントロピーが駆動する新たなミトコンドリアタンパク質輸送機構の発見

正常機能のミトコンドリアを維持するためには、ミトコンドリア内膜のクリステ構造の形成と維持が重要である。クリステ構造の特にジャンクションと呼ばれる部分を作るのに必要な MICOS 複合体の構成因子はサイトゾルで合成され、ミトコンドリア内に移行する。われわれは、酵母の MICOS 複合体を構成する 6 種の因子のうち、Mic19 に、しっかりした立体構造をとらない長い領域があると、MIA 経路による膜間部への輸送が阻害され、その解除には Mic19 のミリスチル化が必要であることを見いだした。また Mic19 がミリスチル化されると、ミトコンドリアの外膜や、外膜の膜透過装置 TOM 複合体の受容体 Tom20 への結合が促進されることもわかった。立体構造をとらない長い領域があると、Mic19 はミトコンドリアの外でのエントロピーが特に高く、そのままでは、TOM 複合体の狭い孔には入りにくくなる（孔に入るとエントロピーが大きく減少する）。しかし、Mic19 をミトコンドリアの外膜や Tom20 に結合させると、ミトコンドリアの外で自由に動き回れる空間が小さくなる、つまりはエントロピーが下がることで、孔に入るときのエントロピー減少が少なくなり、TOM 複合体への輸送がスムーズに行われるようになる。こうしたエントロピーにより駆動される輸送はこれまで想定されていなかったが、N-ミリスチル化は哺乳動物のミトコンドリアタンパク質などで見いだされており、こうしたメカニズムが単に Mic19 のみに見られるのではなく、一般的な輸送の仕組みとして働くことが考えられる。



エントロピーの調節によって駆動されるタンパク質の膜透過

## 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  $\beta$ -barrel protein Tom40, and six  $\alpha$ -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 and ions across the OM. 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. What is the role of the minor population of the dimeric TOM complex lacking Tom22? We observed that minimizing the proportion of the dimeric TOM complex by Por1 depletion selectively slowed the import of soluble intermembrane-space proteins that use the TIM40/MIA pathway. This suggests that the dimeric TOM complex facilitates import of soluble proteins into the intermembrane space.

The MICOS complex mediates formation of the crista junctions in mitochondria, which is essential for mitochondrial respiration. Here we analyzed the mitochondrial import pathways for the six yeast MICOS subunits as a step toward understanding of the assembly mechanisms of the MICOS complex. Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, and Mic60 used the presequence pathway to reach the intermembrane space (IMS). In contrast, Mic19 took the TIM40/MIA pathway, through its CHCH domain, to reach the IMS. Unlike canonical TIM40/MIA substrates, presence of the N-terminal unfolded DUF domain impaired the import efficiency of Mic19, yet N-terminal myristoylation of Mic19 circumvented this effect. The myristoyl group of Mic19 binds to Tom20 of the TOM complex as well as the outer membrane, which may lead to “entropy pushing” of the DUF domain followed by the CHCH domain of Mic19 into the import channel, thereby achieving efficient import.

#### 4. 論文, 著書など (2018.1~2018.12)

H. Sakaue and T. Endo, Regulation of the protein entry gate assembly by mitochondrial porin. *Curr Genet.* in press.

T.K. Sato, S. Kawano, and T. Endo, Role of the membrane potential in mitochondrial protein unfolding and import. *Sci Rep.* in press.

Y. Tamura, R. Kojima, and T. Endo, Advanced *in vitro* assay system to measure phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine transport at ER/mitochondria interface. *Methods Mol Biol.* in press.

H. Sakaue, T. Shiota, N. Ishizaka, S. Kawano, Y. Tamura, K.S. Tan, K. Imai, C. Motono, T. Hirokawa, K. Taki, N. Miyata, O. Kuge, T. Lithgow, and T. Endo, Porin associates with Tom22 to regulate the mitochondrial protein gate assembly. *Mol Cell.* in press.

E. Ueda, Y. Tamura, H. Sakaue, S. Kawano, C. Kakuta, S. Matsumoto, and T. Endo, Myristoyl group-aided protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Sci Rep.* in press.

R. Kojima, Y. Kakimoto, S. Furuta, K. Itoh, H. Sesaki, T. Endo, and Y. Tamura, Maintenance of cardiolipin and crista structure requires cooperative functions of mitochondrial dynamics and phospholipid transport. *Cell Rep.* in press.

Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo, Organelle contact zones as sites for lipid transfer. *J.*

*Biochem.* in press.

K. Sawasato, R. Sato, H. Nishikawa, N. Imura, Y. Kamemoto, K. Fujikawa, T. Yamaguchi, Y. Kuruma, Y. Tamura, T. Endo, T. Ueda, K. Shimamoto, and K.I. Nishiyama, CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPLase essential for membrane protein integration *in vivo*. **Sci Rep.** in press.

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  $\beta$ -barrel proteins. **J Cell Biol.** 217, 3091-3109 (2018).

T. Endo, Y. Tamura, and S. Kawano, Phospholipid transfer by ERMES components (Editorial). **Aging**, 10, 528-529 (2018).

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.** 8, 6175 (2018).

T. Endo, Y. Tamura, Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space. **EMBO J.** 37, 98993 (2018).

田村康, 河野慎, 遠藤斗志也, ミトコンドリアと小胞体間のオルガネラコンタクト, 生体の科学 69, 577-580 (2018)

河野慎, 遠藤斗志也, (最新のトピックス) 膜間コンタクトサイトで働く脂質輸送タンパク質: SMP ドメインと START(-like)ドメイン, 化学 73, 66-67 (2018)

田村康, 河野慎, 遠藤斗志也, ミトコンドリアと小胞体のクロストーク, 月刊細胞 50, No.8, 412-415 (2018)

八木達彦, 遠藤斗志也, 神田大輔, 「化学の要点シリーズ 25: 生化学の論理, 物理化学の視点」 共立出版 (2018)

## 5. 学会発表など (2018.1~2018.12)

Toshiya Endo: Mitochondrial Protein and Lipid Transport (招待講演), Gordon Research Conference on Protein Transport across Cell Membranes, Galveston, TX, USA, 2018.3.11-16

Toshiya Endo: Mitochondrial Protein and Lipid Trafficking (招待講演), Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26

遠藤斗志也: Cellular mechanisms to make mitochondria: pathways and machineries (招待講演), 第70回細胞生物学会大会・第51回発生生物学会合同大会シンポジウム「Current Frontiers in Cell and Developmental Biology」東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8

河野慎, 遠藤斗志也: ERMES 複合体再構成によるリン脂質輸送 (招待講演) 第18回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「蛋白質の分子内情報伝達機構の新展開」, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28

Toshiya Endo: Mitochondrial protein trafficking across the outer membrane: pathways and machineries (招待講演), International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29

Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis: machineries and pathways (基調講演) International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis, 倉敷, 倉敷国際ホテル, 倉敷市民会館, 2018.11.7-10

Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis and maintenance: pathways and machineries (招待講演), Protein Biogenesis and Mitochondrial Dynamics, Baiersbronn, Germany, 2019.11.19-21

松本俊介, 角田千香, 中務邦雄, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: 2つのAAA-ATPaseによるミトコンドリア外膜に誤局在したテイルアンカータンパク質の分解機構 (招待講演) 第41回日本分子生物

- 学会年会 ワークショップ「AAA-ATPase リングが織りなす多彩な細胞機能とそのしくみ」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30
- Haruka Sakaue, Takuya Shiota, Naoya Ishizaka, Yasushi Tamura, Toshiya Endo: Mitochondrial porin modulates the assembly of Tom22 into the TOM complex, Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26
- Shin Kawano, Toshiya Endo: Partial reconstitution analyses indicate the phospholipids transfer functions of the ERMES complex between membranes, Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26
- Shunsuke Matsumoto, Kunio Nakatsukasa, Yasushi Tamura, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo: Degradation pathway mediated by the two AAA-ATPase Msp1 and Cdc48 for the mistargeted tail-anchored proteins on the mitochondrial outer membrane, 第 70 回細胞生物学会大会・第 51 回発生生物学会合同大会, 東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8
- Yuriko Kakimoto, Shinya Tashiro, Rieko Kojima, Toshiya Endo, Yasushi Tamura: Visualizing multiple inter-organelle contact sites using split-GFP system, 第 70 回細胞生物学会大会・第 51 回発生生物学会合同大会, 東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8
- 鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地 博行: 生体分子モーターはどのようにして力を発生させているのか? 静的・動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F1-ATPase の回転力発生機構の分析, 第 46 回生体分子科学討論会, 大阪, 大阪市立大学, 2018.6.22-23
- 木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア型 CDP-DAG 合成酵素 Tam41 の結晶化, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28
- 荒磯裕平, 包明久, 松本俊介, 柚木芳, 吉川雅英, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜トランスロケータ TOM 複合体の構造・機能研究, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28
- 阪上春花, 塩田拓也, 石坂直也, 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制御因子として機能する, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28
- Yuhei Arais, Akihisa Tsutsumi, Shunsuke Matsumoto, Kaori Yunoki, Masahide Kikkawa, Toshiya Endo: Structural and functional study of the protein translocator of the outer mitochondrial membrane, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29
- Haruka Sakaue, Takuya Shiota, Naoya Ishizaka, Yasushi Tamura, Toshiya Endo: The regulation of the assembly of the mitochondrial translocator TOM complex by mitochondrial porin, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29
- Shunsuke Matsumoto, Chika Kakuta, Kunio Nakatsukasa, Yasushi Tamura, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo: Two AAA-ATPase-mediated degradation pathways of mislocalized tail-anchored proteins on the outer mitochondrial membrane, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29
- 鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地 博行: 静的・動的 X 線結晶構造解析による生体分子モーター F1-ATPase の反応過程構造の決定と力発生分子機構, 第 12 回分子科学討論会, 福岡, 福岡国際会議場, 2018.9.10-13
- 西川周一, 宇治周平, 坂本智昭, 山本雅也, 杉山智之, 木村成介, 遠藤斗志也: シロイヌナズナ小胞体品質管理変異株が高温ストレス下で示す花粉成熟異常の解析, 日本植物学会第 82 回大会, 広島国際会議場, 広島, 2018.9.14-16

鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地 博  
行: X線結晶構造解析により明らかになった回転分子モーターF1-ATPaseの力発生の仕組み, 第56回日本生物物理学会年会, 岡山, 岡山大学, 2018.9.15-17

丹羽 一, 遠藤斗志也: ミトコンドリア内膜トランスロケータTIM23複合体の構造機能解析, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

田代晋也, 遠藤斗志也, 田村康: 遺伝学的スクリーニングに向けた哺乳類動物細胞内ミトコンドリア-ER膜間コンタクト検出系の構築, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア型CDP-DAG合成酵素Tam41の結晶化, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

柿元百合子, 田代晋也, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFPを用いた新規オルガネラ間近接評価実験系の確立, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

阪上春花, 塩田拓也, 石坂直也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアポリンタンパク質Por1による外膜透過装置TOM複合体のアセンブリー制御, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

工藤真之祐, 古田詩唯奈, 遠藤斗志也, 田村康: リン脂質代謝におけるPah1の機能解析, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

新名真夏, 柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFPを用いたNVJ連携ゾーンの機能の解析, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

藤木幸夫, 丹羽一, 宮内(南里)康弘, 奥本寛治, 向井悟, 野井健太郎, 小椋光, 遠藤斗志也: 新しく単離したPex7結合PTS2タンパク質P7BP2は新規ダイインタイプAAA+である, 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ「AAA-ATPaseリングが織りなす多彩な細胞機能とそのしくみ」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

Takuya Shiota, Haruka Sakaue, Toshiya Endo, Kher Shing Tan, Trevor Lithgow: Cell cycle-dependent dynamic association of the mitochondrial protein entry gate, TOM complex, 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ「Mitochondria-governed evolution and higher-order functions in life」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也: クライオ電子顕微鏡によるミトコンドリア外膜トランスロケータSAM複合体の構造解析, 第41回日本分子生物学会年会, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

## 6. その他特記事項

### 外部資金

#### 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: ミトコンドリアトランスロケータSAM複合体の構造・機能研究

研究代表者: 竹田弘法, 取得年度: H30-32年度(3年)

### 学外活動

遠藤斗志也: 日本学術会議連携会員

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：日本蛋白質科学会役員  
遠藤斗志也：日本細胞生物学会代議員  
遠藤斗志也：日本細胞生物学会常任編集委員

受賞等

阪上春花：第91回日本生化学会大会 若手優秀発表賞（日本生化学会）



30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」（鶴岡）

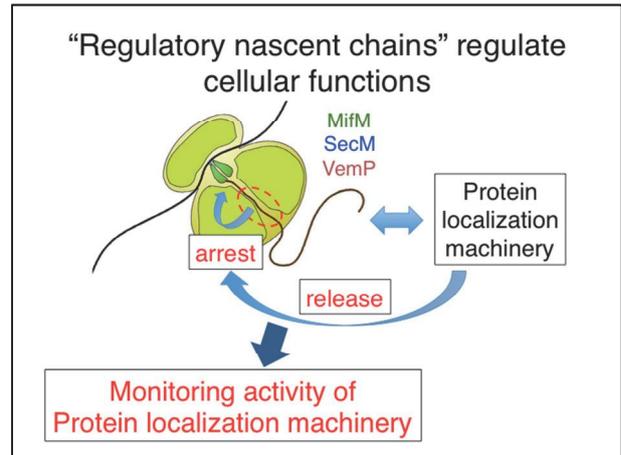
# タンパク質バイオジェネシス研究室 Laboratory of Protein Biogenesis

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。

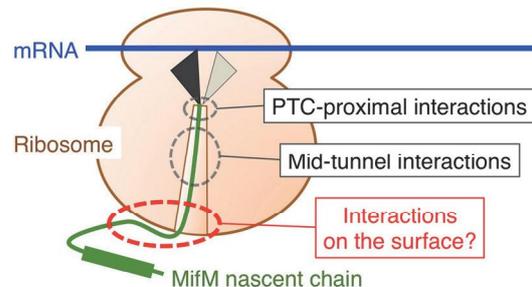


当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置（局在化）の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスであり、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がる。加えて、我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止（アレスト）する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である YidC の活性をモニターし、その合成量をリアルタイムに調整する役割を担っている。MifM の発見に先駆け共同研究者で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。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、伊藤維昭氏の活動のうち、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 による翻訳アレスト機構の解明

枯草菌の調節性新生鎖である MifM は、翻訳の途上で、自身の翻訳伸長をアレストする。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以前示されていた。今回、遺伝学的、生化学的解析から、MifM とリボソームとの相互作用が、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 (Fujiwara 2018 Sci. Rep.)。



## (2) 新規翻訳アレスト因子の同定

真正細菌において過去に見出された翻訳アレスト因子のうち3つ (SecM、MifM、VemP) は、タンパク質局在化装置に関連する遺伝子上流にコードされている。今回、400種類以上の真正細菌のゲノム情報を網羅的に探索し、タンパク質局在化装置遺伝子上流にコードされている翻訳アレスト因子を、新たに3つ見出した。大腸菌、枯草菌の翻訳系を用いた遺伝学、生化学的な解析から、これらはいずれも翻訳アレストを引き起こすことが示された。いずれも、ある特定のコドンで1回のみ翻訳停止を引き起こすことも示された。また、変異解析から、翻訳アレストに重要な配列も同定した。興味深いことに、細菌の進化の過程でそれぞれ独立に生じたと思われるこれらのアレスト因子には、共通のアミノ酸配列が見出された。この意味合いについて、現在解析を進めている。

## (3) 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の新規基質の探索

枯草菌には、それぞれ SpoIIIJ、YidC2 と呼ばれる2つの YidC ホモログが存在する。枯草菌の YidC 経路で膜挿入されることが明確に示されている基質は、MifM のみである。枯草菌における YidC 依存的タンパク質膜組込経路の重要性や生理的意義、分子機構を理解するために、枯草菌 YidC の新規基質を探索している。MifM の翻訳アレストモチーフを C 末端側に付加する事により、膜挿入を感知できる系を構築し、様々な枯草菌膜タンパク質の膜挿入における YidC 依存性を検証した。その結果、SpoIIIJ 依存性を示す膜タンパク質を複数見出した。現在、さらに基質の探索を進めるとともに、これらの膜タンパク質が YidC のどのような機能に依存して膜挿入されるのかを解析している。

## **3. Research projects and annual reports**

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM, which monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying this class of proteins called 'regulatory nascent chains', which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis on the ribosome. A remarkable property of this class of gene products is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those comprising the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the downstream target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, these regulatory nascent chains serve as a co-translational substrate of the protein localization pathway to be monitored, such that the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the effectiveness of the localization machinery under given conditions of the cell. Thus, these nascent chains represent unique biological sensors that enable real-time feedback regulation of the target machinery. 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. As introduced above, 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 should 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 contribute to the elongation arrest

MifM is a regulatory nascent chain that monitors cellular activity of membrane protein insertase, YidC, by a mechanism involving regulated translation elongation arrest. Our current

analysis revealed that elongation arrest of MifM involves extensive interactions between the MifM nascent polypeptide chain and the ribosomal components including those on the ribosomal external surface (Fujiwara 2018 Sci. Rep.).

## 2) Identification of novel translation arrest peptides in eubacteria

Three regulatory arrest peptides previously found in eubacteria (SecM, MifM and VemP) function as a cis-regulator of the protein translocation machinery. They are encoded by a gene that resides upstream of the gene that encodes possible target component of the protein translocation machinery. We searched for novel regulatory arrest peptides from more than 400 bacterial genome sequences, resulting in the establishment of three novel arrest peptides. We confirmed that they were able to stall *B. subtilis* or *E. coli* ribosomes at a single specific site of the coding sequence. Systematic mutagenesis allowed us to identify amino acid residues that are required for the arrest-provoking function of the nascent peptides. Interestingly, they seem to illuminate some common amino acid sequence features.

## 3) Identification of YidC substrates in *B. subtilis*

*B. subtilis* has two YidC homologs, SpolIJ and YidC2, but their substrates have not been identified, except for MifM, which is known to engage in insertase function. To further understand the physiological roles and molecular mechanisms of the YidC pathways of membrane protein insertion in this bacterium, we are attempting at identifying novel YidC substrates. We use the translation arrest element of MifM followed by LacZ as a *cis* sensor of membrane insertion of membrane proteins predicted to span the membrane once or twice. So far, we have identified several putative YidC substrates.

## 4. 論文, 著書など

### 原著論文

Yura, T., Miyazaki, R., [Fujiwara, K.](#), [Ito, K.](#), [Chiba, S.](#), Mori, H. and Akiyama, Y. Heat shock transcription factor  $\sigma(32)$  defective in membrane transport can be suppressed by transposon insertion into genes encoding a restriction enzyme subunit or a putative autotransporter in *Escherichia coli*. ***Genes Genet Syst.*** (2018) **93**, 229-235.

[Fujiwara, K.](#), [Ito, K.](#) and [Chiba, S.](#) MifM-instructed translation arrest involves nascent chain interactions with the exterior as well as the interior of the ribosome. ***Sci Rep.*** (2018) **8**, 10311.

### 英文総説

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

### 日本語解説記事

田口英樹、茶谷悠平、[千葉志信](#)、[伊藤維昭](#) (2018) 終止コドンに依らず翻訳を途中終了させる酸性アミノ酸の連続配列. *バイオサイエンスとインダストリー (B&I)* 76, 239-241.

[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.

伊藤維昭 (2018) タンパク質を配置する細胞の仕組み. *日本の科学者* 53, 12-17.

伊藤維昭 (2018) 蛋白質の居場所決定における生体膜への組込み. *医学のあゆみ* 267, 959-965.

## 5. 学会発表など

樫祐太郎、千葉志信: 枯草菌 EF-P 修飾酵素の同定とその重要性の解明. 新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王

向川結紀子、丹羽達也、田口英樹、藤原圭吾、千葉志信: 新生鎖-リボソームトンネル相互作用が枯草菌プロテオーム構成に果たす役割. 新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王

塩田成未、千葉志信: 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の新規基質の探索. 新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王

藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: MifM の翻訳アレストを解除できるシス因子の探索と解除機構の解析. 新生鎖の生物学・若手ワークショップ 2018. 2018. 5/14-5/16 蔵王

Koreaki Ito: Dynamic translation entails nascent polypeptides as active players in gene regulation and protein biogenesis. Seminar at Academia Sinica. 2018.6.8 Taipei, Taiwan

Karen Sakiyama, Naomi Shimokawa-Chiba, Shinobu Chiba: Identification and characterization of novel translation-arrest peptides in bacteria. International symposium Proteins; from the cradle to the grave 2018. 8/26-8/29 滋賀県比叡山延暦寺会館

Koreaki Ito: Things that I am proud of, ...or rather trivial? International symposium Proteins; from the cradle to the grave 2018. 8/26-8/29 滋賀県比叡山延暦寺会館

千葉志信、崎山歌恋: 新規翻訳アレスト因子の探索. 2018 年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議 2018. 8/31-9/1 KKR ホテル熱海

藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: 枯草菌 MifM を利用したタンパク質動態の解析. 2018 年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議. 2018. 8/31-9/1 KKR ホテル熱海

Karen Sakiyama, Naomi Shimokawa-Chiba, Shinobu Chiba: Characterization of novel translation-arrest peptides encoded upstream of genes for protein localization machinery. CSHL meeting: Translational control 2018. 9/4-9/8 CSHL, NY, USA

藤原圭吾、樫祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: 翻訳アレスト配列を用いた新生ポリペプチド鎖の動的挙動の解析. 第5回リボソームミーティング 2018. 9/13-9/14 新潟大学中央図書館ライブラリーホール

Koreaki Ito, Hiroyuki Mori, Shinobu Chiba: Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. BACTERIAL PROTEIN EXPORT 2018. 2018. 9/30-10/3 Leuven, Belgium

Shinobu Chiba: Translation arrest as a universal mechanism of gene regulation of bacterial protein localization machineries. Seminar in University of Hamburg. 2018. 10/5 Hamburg, Germany.

Koreaki Ito: Real-time regulation by monitoring substrates and nascent chain handling of the ribosome. Seminar in University of Hamburg. 2018. 10/5 Hamburg, Germany

千葉志信: 新規調節性アレストペプチドの探索. Identification and characterization of novel regulatory arrest peptides. 第41回日本分子生物学会年会. 2018. 11/28-11/30 パシフィコ横浜

## 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：タンパク質動態研究所・新学術領域「新生鎖の生物学」合同国際シンポジウム「Proteins; from the Cradle to the Grave」世話人

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、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 2018年7月24日-8月1日

千葉志信：模擬授業（常翔学園） 2018年7月9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) 胚の神経系原基の成立における転写因子 SOX2 と ZIC2 の機能的な協同作用

転写因子 SOX2 は、神経系原基の成立と維持において中心的な役割を果たすが、SOX2 の機能は協同して働くパートナー因子に依存していることから、神経系原基において SOX2 がどの因子をパートナーとするのかは重要な課題である。これを明らかにするために、Sox2 遺伝子の発現を、胚発生の早期から、そして神経系全体で制御する D1 エンハンサーが受ける転写制御を研究した。

440 塩基対の長さを持つ D1 エンハンサーを A から E までの 5 領域に分けて、それぞれ単独、あるいは組み合わせてエンハンサー活性を検討した。それらの領域を tkEGFP レポーターにつなげてニワトリ胚に electroporation によって導入し、それらの領域領域の組み合わせが持つエンハンサー活性を評価した。その結果、中心に位置する CD 領域の組み合わせが、神経系原基における D1 エンハンサーの活性を担っていることがわかった。

CD 領域に様々な変異を導入してエンハンサー活性への影響を調べた結果、2 箇所の SOX 因子結合配列と 1 箇所の ZIC 因子結合配列の変異が、エンハンサー活性を著しく低下させた。また、D1 エンハンサー活性は、SOX2 と ZIC2 の組み合わせによって活性化された。これらの結果から、神経系原基の制御においては、SOX2 のパートナー因子のひとつが ZIC2 であることが示唆された。またこれらの因子の組み合わせが Sox2 遺伝子の自己制御にも関わっていると考えられる。

### (2) 前部中内胚葉に依存した脳の前駆体の発生の制御を、鳥類胚のライブイメージングで解析

平坦な円板状のエピブラストから発する鳥類胚の脳は、脳の初期発生の解析に最適のモデルであるが、個々の細胞の振る舞いに関するライブイメージングデータがなかったために、その解析は進んでいなかった。本研究ではまず、ステージ 4 のニワトリ胚のエピブラスト細胞をランダムに選んで分散した輝点として蛍光標識して、脳の発生運命地図を作成した。それぞれの脳領域に、どの範囲に分布するエピブラスト細胞が収束するのかを解析した。その結果、脳の前駆体はこれまで考えられていたよりもはるかに広い領域のエピブラストに分布していた。前脳、中脳、後脳の前駆体は、エピブラストの前部の中央よりから中部の側部にかけて、その順番で配置されていた。

他の胚からとったノードを宿主胚の前半部に移植すると、第 2 の不完全な脳組織が形成される。この過程を解析するために、mCherry を発現するウズラ胚のノードを、分散して EGFP で標識されたニワトリ胚のエピブラストの前半の様々な場所に移植した。移植されたノードは、前部中内胚葉 (AME) に発生するとともに、その周囲にある宿主のエピブラスト (脳の前駆体) を集合させた。その結果、集合した脳の前駆体自体が持っていた脳領域特異性を反映した、部分的な脳組織がその場で発生した。AME が持つ周囲の脳前駆体を集合させる活性は、BMP アンタゴニストである Noggin を分泌する COS 細胞の移植で模倣することができた。

### (3) 内胚葉での SOX2 の発現が、前部前腸から食道への発生を、上皮と間充織の双方にもたらす

転写因子 SOX2 は内胚葉の前側で発現され、その領域は前部前腸をへて食道と呼吸器系の上皮に発生する。SOX2 の制御機能が前部前腸の発生にどのように関わるのかを明らかにするために、内胚葉特異的に *Sox2* 遺伝子を破壊した。その結果、食道と呼吸器系の分離が起こらず、前部前腸から咽頭と胃をつなぐ1本の管が発生し、その中間部から1対の気管支が分岐した。SOX2 の発現がない前部前腸由来の管の上皮は、すべてが呼吸器に特異的な NKX2.1 を発現した。さらに SOX9 の発現パターンからは、咽頭と胃をつなぐ管の上皮の前側は気管の性質を持ち、そして後側（胃側）は気管支の性質を持つことがわかった。

食道を取り囲む間充織は *Wnt4* を発現する一方、気管/気管支を取り囲む間充織は SOX9 と *Tbx5* を発現するので明確に区別できる。SOX2 の発現を失った前部前腸を取り囲む間充織は、全長にわたって気管/気管支の性質を示した。したがって、SOX2 の発現の有無によって変化する上皮に同調して、間充織も食道タイプか気管/気管支タイプかを選んで発生することが明らかになった。

(4) ヘッジホッグシグナル伝達に欠損を持つ鳥類胚では、口腔外胚葉から複数の下垂体原基の嚢組織が発生し、それらから異所的な水晶体が発生する。

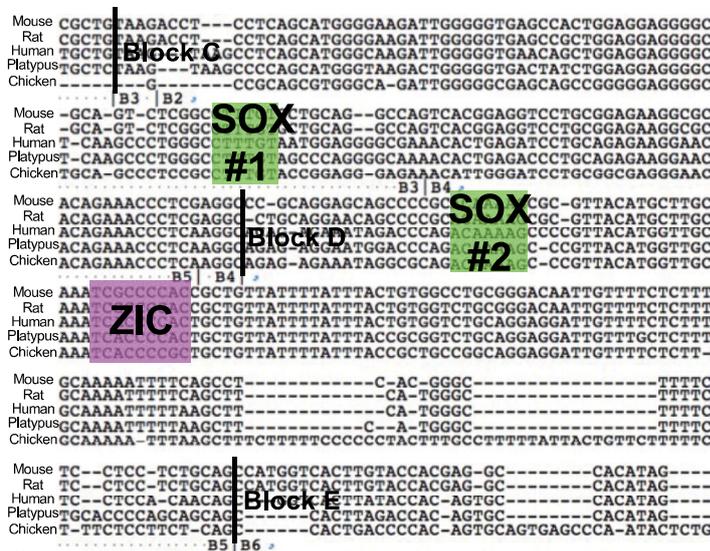
ヘッジホッグシグナルは、組織の形態形成や分化に関わる多様な制御機能を発揮する。ヘッジホッグシグナルが下垂体原基の発生にどのように関わり、そして下垂体原基が潜在的に持つ水晶体発生能にどのように関わるのかを明らかにするために、ヘッジホッグシグナル伝達に欠損を持つウズラ変異体 (*Talpid* 変異体) のホモ接合体胚における下垂体原基の発生を解析した。*Talpid* 変異体では、通常の下垂体原基（ラトケ嚢）に加えて、下垂体原基に固有の LHX3 を発現する嚢構造を複数、口腔上皮から発生していた。これらの LHX3 を発現する嚢構造（ラトケ嚢を含む）の一部が SOX2 と PAX6 を共発現し始める（水晶体前駆体状態）のに続いて、LHX3 の発現低下と PROX1 の活性化がおり、クリスタリンのセットを発現する小さな水晶体組織の発生が開始された。したがって、ヘッジホッグシグナルは下垂体原基の発生の2つの段階に関わっている。第1に、ラトケ嚢の発生を、通常ではヘッジホッグシグナルが低い1カ所に限定すること。第2に、LHX3 の発現を維持することによって下垂体原基から水晶体への発生を抑制することである。

### 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 2018.

(1) Possible functional cooperation between SOX2 and ZIC2 in the establishment of embryonic neural primordia

The TF SOX2 plays a central role in the development and maintenance of neural primordia. Because the function of SOX2 relies on interacting partner TFs, it is important to determine which TFs cooperate with



SOX2 as the partner factor in neural primordia. To address this problem, we investigated the *Sox2* D1 enhancer, because D1 enhancer is activated at an early stage of neural development, and its activity uniquely covers the entire neural primordium, in contrast to other CNS region-specific enhancers of *Sox2*.

We divided the D1 enhancer sequence of ~440 bp, which is conserved across the amniotes, into the blocks A to E, and assessed the enhancer activity of the blocks using ptkEGFP reporter, which was electroporated into chicken embryos or transfected in neural stem cell lines. We found that the centrally located blocks C and D in combination bear the major regulatory function of the D1 enhancer.

Mutational analysis of the block C + D sequence indicated that two SOX binding sequences and a ZIC binding sequence are involved in the D1 enhancer activation. In addition, the D1 enhancer was activated by the combination of SOX2 and ZIC2, suggesting that the novel pair of TFs, SOX2 and ZIC2 plays important roles in the regulation of neural stem cells, including *Sox2* autoregulation.

### (2) Anterior mesendoderm-dependent regulation of brain precursor development determined via live imaging of avian embryos

The early regulatory processes of brain development in avian embryos remain poorly understood, because of the lack of live-cell imaging data. To establish a fate map for each embryonic brain portion, EGFP was expressed in a randomly selected cells of stage 4 chicken embryo epiblast. The resulting EGFP-expressing cells were followed to trace the origin of the cells contributing to different brain portions. The results indicated that brain precursors were more widely distributed in the epiblast than previously believed and the precursors of the forebrain, midbrain, and hindbrain were regionally arranged from the antero-central to the medio-lateral portions of the epiblast in order.

Grafting an exogenous node into an anterior position of the host embryo led to the development of a secondary and imperfect brain structure. To investigate this process, mCherry-expressing quail nodes were transplanted at various anterior positions of chicken embryos, where the epiblast cells were randomly labeled with EGFP. The grafted node developed into the anterior mesendoderm (AME), followed by local gathering of host head precursors surrounding the graft-derived AME, which in turn led to the development of a secondary brain portion that reflected the regional specificity of the gathered head precursors. The AME's head precursor-gathering activity was mimicked by grafting COS cells secreting BMP antagonist Noggin.

Our results indicate that node-derived AME provides a center for the gathering of brain precursors in the epiblast by inhibiting BMP signaling, which comprises the initial step of head morphogenesis.

### (3) Endodermal SOX2 expression determines the esophagus character of the anterior foregut in both epithelial and mesenchymal components

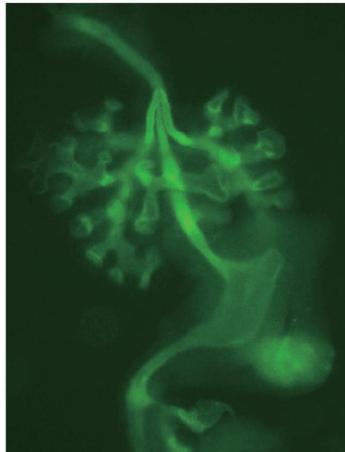
The TF SOX2 is expressed in the anterior endoderm and its derivative anterior foregut (AFG) epithelium, which further develops into the epithelia of esophagus and respiratory system. We investigated the consequence of endoderm-specific *Sox2* inactivation to clarify how SOX2 function is involved in the AFG development. The SOX2-less AFG epithelium developed into a single epithelial tube connecting the pharynx and stomach, from the middle of which a pair of bronchi branched out, as examined at E11~12.5. The SOX2-less AFG epithelium expressed trachea/bronchi-characteristic NKX2.1, indicating the change of esophagus to trachea/bronchus. SOX9 expression level in the epithelia varies depending on the region of the respiratory system: low from the trachea to proximal bronchi, and high in the distal bronchi. SOX2-less AFG epithelial tube from the pharynx to the middle was low in SOX9 expression, while its expression level increased toward the stomach, indicating that anterior and posterior halves of SOX2-less AFG epithelium developed as those of trachea and bronchi, respectively.

E12~13

Wild type



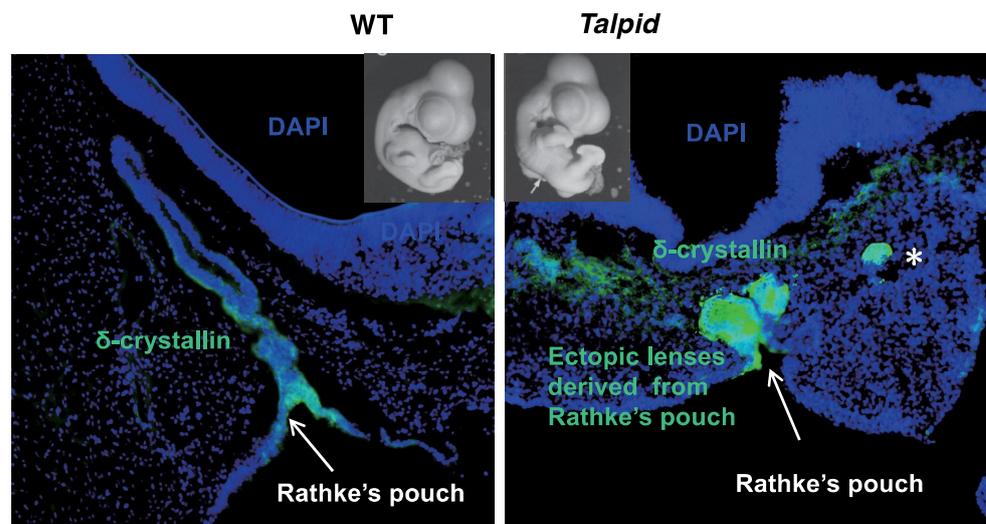
SOX2-less alimentary tract lacking esophagus



The mesenchymal tissues surrounding the esophagus and trachea/bronchi are clearly distinguished, e.g., the former expresses *Wnt4*, whereas the latter expresses *SOX9* and *Tbx5*. The mesenchyme associated with *SOX2*-less AGF showed all characteristic of trachea/bronchi, indicating that the absence of *SOX2* in the developing AFG epithelium also caused an overt change in the surrounding mesenchyme. Thus, endodermal *SOX2* expression determines the esophagus character of the AFG in both epithelial and mesenchymal components.

(4) Development of multiple pituitary pouches from the oral ectoderm in hedgehog signaling-defective avian embryos causing ectopic lens development

Hedgehog signaling has versatile regulatory functions in tissue morphogenesis and differentiation. For the interest in its involvement in the pituitary precursor development and in the lens precursor potential of pituitary precursors, we investigated *Talpid* mutant Japanese quail embryos, which are defective in Hedgehog signaling. *Talpid* mutants developed multiple pituitary precursor-like pouches of variable sizes expressing the TF LHX3 from the oral ectoderm, in addition to normally positioned Rathke's pouch, which are collectively called pituitary pouches. Some parts of the pituitary pouches co-expressed TFs *SOX2* and *PAX6* in the nuclei, presumably primed for lens development, bulged out and activated TF *PROX1* with concomitant loss of *LHX3* expression. This was followed by the development of small lens tissues consisting of lens epithelium and lens fiber compartments and expressing all  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\delta$ -crystallins. Thus, hedgehog signaling acts on Rathke's pouch development in two different steps, first to confine Rathke's pouch development in the hedgehog signal-low area of oral ectoderm, and second to sustain *LHX3* and to inhibit lens development from the pouch.



E4.5 quail embryos

4. 論文, 著書など

## 原著論文

Sugahara S, Fujimoto T, Kondoh H, Uchikawa M. (2018) Nasal and otic placode specific regulation of Sox2 involves both activation by Sox-Sall4 synergism and multiple repression mechanisms. *Dev Biol.* 433(1):61-74. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.11.005.

Kondoh H. (2018) Roles of ZIC2 in Regulation of Pluripotent Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 1046:339-351. doi: 10.1007/978-981-10-7311-3\_17.

Okamoto Y, Nishimura N, Matsuda K, Ranawakage DC, Kamachi Y, Kondoh H, Uchikawa M. (2018) Cooperation of Sall4 and Sox8 transcription factors in the regulation of the chicken Sox3 gene during otic placode development. *Dev Growth Differ.* 60(3):133-145. doi: 10.1111/dgd.12427.

## 5. 学会発表など

Hisato Kondoh. Mechanisms underlying lens transdifferentiation from neural retina and pituitary. Gordon Research Conference on Visual System Development. Il Ciocco, Italy, May 20-24 (2018). (Invited)

Koya Yoshihi, Kagayaki Kato, Hisato Kondoh. Live imaging of node graft and host cells to establish its role in head development. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Hideaki Iida, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh. Regulation of a pan-neural Sox2 enhancer D1. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Machiko Teramoto, Ryo Sugawara, Atsushi Kuroiwa, Yasuo Ishii, Hisato Kondoh. SOX2-dependent determination of tissue identities in the foregut. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Hisato Kondoh. The pairing interaction dynamics of the transcription factor SOX2 with partner factors. International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave." Otsu, Japan, August 26-29 (2018). (Invited)

Hisato Kondoh. Mechanisms underlying lens transdifferentiation in neural retina cells and pituitary precursors. The 23rd Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, Belfast, UK, September 9-13 (2018). (Invited)

Hisato Kondoh. A drastic change in the major regulatory TFs from SOX2- POU5F1 to ZIC2-OTX2 in the pluripotent stem cells representing preimplantation and post-implantation stages. EMBO WORKSHOP 2018 "Molecular Mechanisms of Regenerative and Developmental Biology." Singapore, November 11-13 (2018). (Invited)

飯田 英明、内川 昌則、近藤 寿人. D1エンハンサーによる、胚の中枢神経系と頭部神経堤におけるSox2発現の制御. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).

寺元 万智子、菅原 諒、黒岩 厚、石井 泰雄、近藤 寿人. 内胚葉で発現されるSOX2が前腸の上皮と間充織の双方を食道に発生させる. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).

近藤 寿人、中村 香絵、渡邊 優作、藤井 麻衣、稲森 祥子、飯田 英明. エピプラスト幹細胞を用いて、着床後に体細胞系列が生み出される機構を研究する. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).

## 6. その他特記事項

### 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）

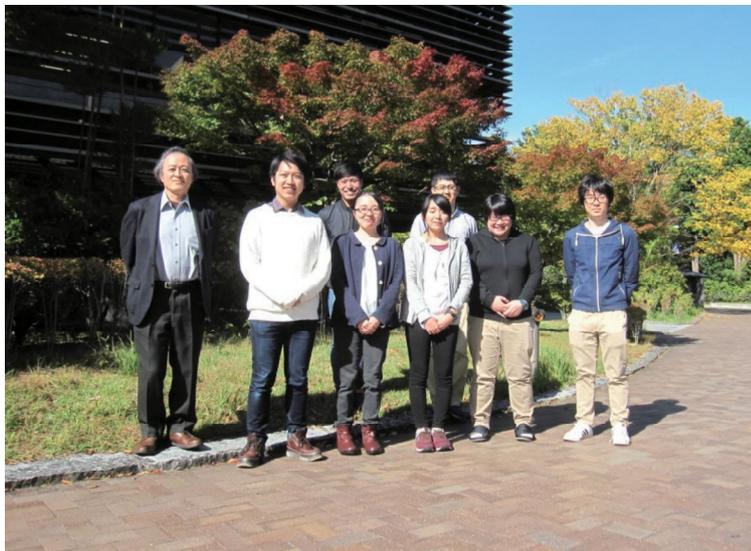
### 学外活動

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

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



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

教授 津下 英明 Prof. Hideaki Tsuge, Ph.D

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

## 1. 研究概要

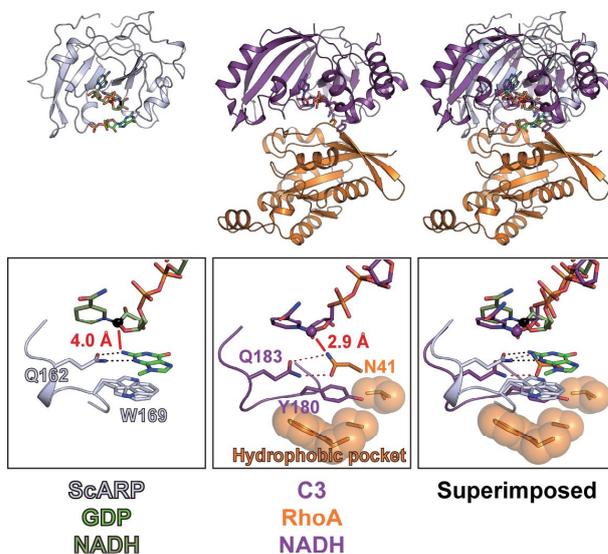
タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要な不可欠なものとなりつつある。タンパク質複合体、特に感染症因子とホストであるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治療する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を主要な手段として用いる。

(1) 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) 細菌トランスロコンの構造と輸送機構の解明：*C.perfringens* が持つバイナリー毒素は上述したアクチンを ADP リボシル化する Ia とこれを膜内へ輸送するトランスロコン Ib からなる。トランスロコン Ib の構造と機能に焦点を当てた研究を進めている。

## 2. 本年度の研究成果

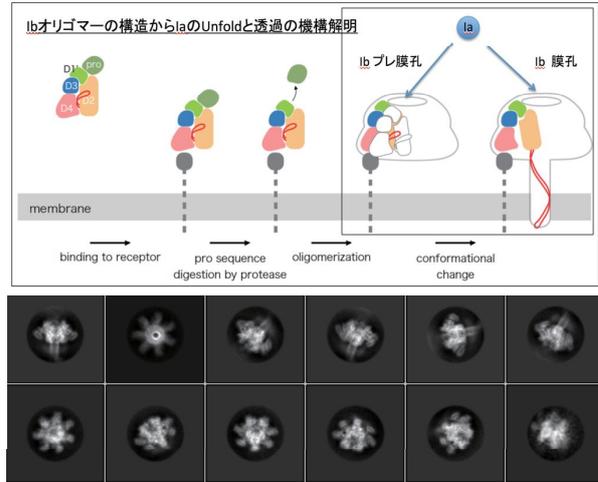
(1) モンシロチョウに存在する酵素ピエリシンは DNA を ADP リボシル化する酵素として、国立がんセンター杉村らによって見出された。ピエリシンは、種々のがん細胞に対して細胞傷害活性を示すことから研究が進められてきた。我々のグループでは、タンパク質を標的とした細菌由来の ADP リボシル化毒素の構造と機能を、特に基質タンパク質との複合体から明らかにする研究を長年行っている。その基質認識についてさらなる理解を進めるために、DNA を ADP リボシル化する酵素の構造と機能に興味をもち研究を行った。放線菌にもこれに似た酵素 ScARP が存在する。ピエリシンと ScARP の違いは、ピエリシンは二重らせんの DNA を好んで認識し、ScARP は低分子のグアニンに対して特異性を示すことであった。このグアニン特異性について知りたいため、ScARP と GDP の共結晶化を行いその構造を明らかにした。得られた構造を、既に我々が構造を明らかにしている、RhoA の Asn を ADP リボシル化する C3 毒素と対比した。どちらも酵素の ARTT ループ上の Gln(Q) が ScARP ではグアニンを、もう一方の C3 では Asn の認識を行っていた。その基質認識機構は、ARTT と NAD<sup>+</sup> と基質の相対配置は、基質が塩基とアミノ酸と別のものでありながら、驚くほど似ている（図参照）。普遍的な ADP リボシル化の基質の認識機構を明らかにした。



(2) *C.perfringens* が持つ binary 毒素である、膜孔形成毒素 Ib の構造と機能解析を進めている。膜孔形成毒素 Ib はアクチン特異的 ADP リボシル化する酵素 Ia を膜透過させるトランスロコンである。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。

(3) 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typell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。その単体の構造が得られ、その結果を、生化学にフィードバックして研究を進めている。



Ib-oligomer 単粒子解析 2D クラス画像

### 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) ScARP is a member of the pierisin family of DNA-targeting ADP-ribosyltransferases (ARTs). Pierisin group enzymes ADP-ribosylate the N<sup>2</sup> amino groups of guanine residues in DNA to yield N<sup>2</sup>-(ADP-ribos-1-yl)-2'-deoxyguanosine. Though the structures of pierisin-1 and Scabin were revealed recently, the mechanism of specific substrate recognition was poorly understood because of a lack of substrate-binding structure. We revealed the structure of ScARP bound to NADH and GDP (substrate). The structure showed that guanine of GDP was trapped between N-ribose of NADH and Trp159. Interestingly, N<sup>2</sup> and N<sup>3</sup> of guanine form hydrogen bonds with OE1 and NE2 of Gln162, respectively. We present the first direct observation that the ADP-ribosylating toxin turn-turn (ARTT)-loop including Trp159 and Gln162 plays a key role in the specificity of DNA-targeting guanine specific ART as well as protein-targeting ART such as C3 exoenzyme. We propose that the ARTT-loop recognition is a common substrate recognition mechanism in the pierisin family. Furthermore, this complex structure with minimum elements of ADP-ribosylation sheds light on similarities and differences among two major subclasses that are distinguished by conserved structural motifs: H-Y-E in the ARTD subfamily and R-S-E in the ARTC subfamily. The spatial arrangements of electrophile and nucleophile are same, providing the first clear insight of the common reaction mechanism in both ARTs. ARTC (ScARP) uses the ARTT-loop to recognize substrate whereas ARTD (Arr) uses the C-terminal helix instead of the ARTT-loop. These characterizations would facilitate to make better inhibitors of ARTs.

(2) 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 pore-forming translocon.

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 translocation via Ib.

### (3) 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.

## 4. 論文著書など

Yoshida T, and Tsuge H. Substrate N<sup>2</sup> atom recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting, guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP.

**Journal of Biological Chemistry**,293(36):13768-13774(2018)

Suzuki Y., Tsuge H., Hondoh H., Kato Y., Uehara Y., Maita N., Hosokawa K., and Ueta S. Precipitant-Free Lysozyme Crystals Grown by Centrifugal Concentration Reveal Structural Changes.

**Crystal Growth and Design**,18 (8):4226-4229(2018)

## 5. 学会発表など

Yoshida T, Yamada T, and Tsuge H Membrane transport and ADP-ribosylation mechanism of binary toxin *C. perfringens* iota toxin , International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” , 比叡山延暦寺会館 (京都),2018.8.26-29. (口頭発表)

Yoshida T, and Tsuge H Substrate recognition and reaction mechanism of DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase, International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” , 比叡山延暦寺会館 (京都),2018.8.26-29.

Yamada T, Yoshida T, and Tsuge H Cryo-EM single particle analysis of *C. perfringens* binary toxin, International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” , 比叡山延暦寺会館 (京都),2018.8.26-29.

津下英明: DNAを標的としたADPリボシル化酵素の基質認識機構,第453回ビタミンB 研究協議会、オークラホテル高松 (香川),2018.8.31

津下英明 : From Protein to DNA Modification: Substrate recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP, 日本分子生物学会 ワークショップ ADP-ribosylation in intra- & extracellular communication and diseases,パシフィコ横浜,2018.12.3-6 (口頭発表)

津下英明: Clostridium Binary Toxin : 膜孔形成タンパク質トロンソロコンの作用機構について,京都薬科大学,2018.2.25

## 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「クライオ電子顕微鏡と X 線結晶構造解析による二成分毒素トロンソロコンの構造機能解析」研究代表者：津下英明, 取得年度：H30-H32 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

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



## 2018年セミナー開催

開催日	演者	演題	世話人
2018. 3/20	Dr. Jeffrey L. Brodsky (University of Pittsburgh)	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation, Substrate Selection, and Protein Conformational Disorders	永田和宏
	Dr.Gerardo Z. Lederkremer (Tel Aviv University, Israel)	Timing of glycoprotein folding quality control: too slow or too fast ?	
2018. 5/18	Dr.Catherine Goodman (The journal of Biological Chemistry Scientific editor)	Publishing at JBC	津下英明
2018. 7/5	矢原 一郎 先生 (東京都医学総合研究所)	適応応答と進化	永田和宏
2018. 8/24	Dr. Alexander Mankin (University of Illinois at Chicago)	Unconventional translation strategies that diversify the bacterial proteome	千葉志信
2018. 11/6	Dr. Kenneth M. Yamada (National Institutes of Health)	Dynamic Cell-Matrix Interactions in Cell Migration, Invasion, and Organ Formation	永田和宏
2018. 12/3	加藤 治郎 先生 (National Institutes of Health)	翻訳後修飾ADP リボレーションと疾病 ーアメリカ生活18年間とともにー	津下英明

## 2018年プレスリリース

核内の分解標的タンパク質を核外に運び出すメカニズムを解明 ～UBIN-POSTシステムが核内ユビキチン化タンパク質の異常蓄積を解消し、遺伝情報保存の場である核を保護する～		
2018. 4/17	新聞	毎日新聞 朝刊
2018. 4/17	新聞	京都新聞 朝刊

## あとがき

今号がタンパク質動態研究所の第3号目の年報となる。タンパク質動態研発足3年目となった2018年度の特筆すべきイベントとしては、新学術領域「新生鎖の生物学」と合同で開催した国際会議“Proteins; from the Cradle to the Grave”が挙げられる。今号では、国際会議に参加した大学院生がその体験を綴ったものをレポート記事として掲載した。このようなタンパク質動態研究所の活動が、これからのサイエンスを担う若い世代の育成にも貢献するものであればと願っている。

(2019.7 千葉志信)

### 京都産業大学タンパク質動態研究所年報

2018年号

〔非売品〕

令和元年10月17日 印刷

令和元年10月30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

株式会社プレスハウス

京都市東山区新宮川町通松原下ル