

ISSN 2433-3387

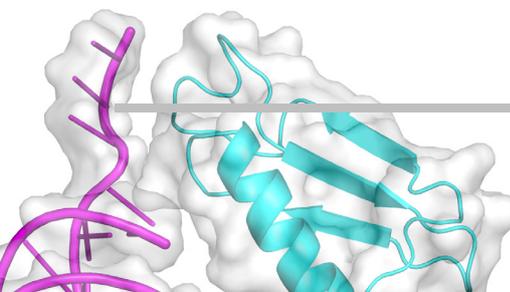
年報

タンパク質動態研究所



Annual Reports 2019
Institute for Protein Dynamics
Kyoto Sangyo University

はじめに (永田和宏)	1
所長あいさつ (遠藤斗志也)	2
オンライン鼎談 「タンパク質動態研究所とタンパク質科学研究」	3
Meeting Reports タンパク質動態研究所講演会シリーズ 「ようこそタンパク質の不思議な世界へ」	30
研究所の活動	
分子細胞生物学研究室 (永田和宏)	34
生物化学研究室 (遠藤斗志也)	42
タンパク質バイオジェネシス研究室 (千葉志信)	49
タンパク質構造生物学研究室 (津下英明)	53
膜エネルギー代謝研究室 (横山謙)	58
発生生物学研究室 (近藤寿人)	61
セミナー・プレスリリース	67



2019年度

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



津下 英明



横山 謙



近藤 寿人

シニアリサーチフェロー



吉田 賢右



伊藤 維昭

招聘教授



大隈 良典
東京工業大学
栄誉教授



田中 啓二
東京都医学総合研究所
理事長・所長



Dr. Richard I
Morimoto
Northwestern U
(USA)



Dr. Ulrich F Hartl
Max Planck Institute
(GER)



Dr. Peter Walter
UCSF (USA)

最後の「はじめに」 ～退職にあたって～

永田 和宏

2016年に設立されたタンパク質動態研究所も、4年の活動期間を経て、国内外の多くの研究者に知られる存在となってきた。

特に、2018年8月26日～29日の4日間にわたって、比叡山で開催された国際会議「Proteins; from the Cradle to the Grave」（日本学術振興会、新学術領域研究「新生鎖の生物学」との共催）は、国内外からの多くの聴衆を集め、活発な議論が交わされた。その報告が、*Nature Structural and Molecular Biology* 誌 (Vol.25, 996-999, 2018) に写真入りで大きく報じられたことは記憶に新しい。国内の多くの若手研究者に大きな刺激を与えただけでなく、京都産業大学生命科学部の学生、大学院生にも、世界の研究のトップランナーたちと直接話をする機会が持てたことは、大きな収穫であったろうと考えている。

私は、創設時から所長ということで、この研究所とともに歩んできたことになるが、2020年4月をもって退職することになった。京都産業大学に創設された総合生命科学部の学部長として赴任して、ちょうど10年となる。タンパク質動態研究所とはわずか4年のご縁となり、心残りもあるが、今後の発展に期待したいと思う。

最後の年ということも考え、2019年には、アウトリーチ活動の新しい試みとして、「ようこそ、タンパク質の不思議な世界へ」と題した連続講演会を開催した。私自身は、京都産業大学の創設50周年事業として大学から依頼され、2016、2017年の二年にわたって、特別対談シリーズ「マイ・チャレンジ 一步を踏み出せば、何かが始まる！」を主催したことがあった。これは『僕たちが何者でもなかった頃の話をしよう』（文春新書）として、正・続の二冊が刊行され好評であった。

そこで今回も外部から講師をお招きし、その講演のあと、インタビューという形で鼎談を行なうという形をとった。仲野徹（大阪大学）、竹市雅俊（理研）、吉森保（大阪大学）の三先生方の示唆とユーモアに富んだ話を伺うことができ、毎回、多くの聴衆に恵まれて有意義な講演会シリーズとなった。

私がこの欄に「はじめに」を書くのはこれが最後となる。私自身は、この4月からJT生命誌研究館に館長として移動したが、研究に関しては、潮田准教授と共同研究をさせていただいており、まだしばらくサイエンスの世界を楽しみたいと願っているところである。タンパク質動態研究所が、遠藤斗志也新所長のもと、これからもいっそうの研究の発展を内外にアピールしていただくとを祈念している。

最初の「はじめに」 ～研究所長就任にあたって～ 遠藤 斗志也

2020年4月から、永田和宏前所長に代わり、私こと遠藤が京都産業大学のタンパク質動態研究所の所長を務めることになりました。また2020年4月から、潮田亮准教授が研究所のメンバーになるとともに、本研究所の評価助言をいただく招聘教授に新たに Nikolaus Pfanner 教授（独フライブルグ大学）、森和俊教授（京都大学）、嶋田一夫教授（理化学研究所）をお迎えしました。この新体制は2020年度からですが、今回お届けするのは昨年度、2019年度の本研究所の活動をまとめた年報となります。

本学の研究所は3年で1期ですので、2016年に発足した当研究所にとって2019年度は2期目の最初の年でした。発足時に掲げた本研究所の研究方針に鍵となる三つの軸、すなわちタンパク質の一生という時間軸、タンパク質が細胞内で働く場という空間軸、そして組織化（分子間相互作用）、これらの重要性が現在ますます高まり、認識されつつあります。背景としてはこの数年で飛躍的に進展したクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析技術があり、2019年度も本研究所からクライオ電子顕微鏡を用いたインパクトのある研究成果がいくつも論文発表されました。一方で顕微技術の発展や網羅的な解析手法の発展により、タンパク質が働く場である細胞の中で、タンパク質が生まれて、移動して、様々な分子と相互作用し、そして分解されというタンパク質の機能を俯瞰する視点からの理解も進みつつあります。これについても、インパクトのある成果が本研究所から続々と出ています。本研究所がまさしく現在のタンパク質科学の最前線を先導する研究拠点として活動できていることの証左かと言えます。

今回、永田前所長、招聘教授の嶋田一夫先生、そして私で、オンライン鼎談というか放談を行い、タンパク質科学研究の最新の動向も含めて、自身と研究との関わり、研究所をとりまく様々な問題、そして若い人たちへのメッセージなど、多岐にわたる話題をとりあげてディスカッションしました。その内容を本年報に収録いたしました。3人の個性が出て、読み応えのあるものになったかと思います。お楽しみください。

本研究所のもう一つの重要な使命は、本学の学生を、研究を通じてインスパイアし、一般市民の方々との交流を通じて本研究所のファンになっていただくことです。そのために、2019年度は「ようこそタンパク質の不思議な世界へ」と題して、3回の一般市民向け講演会シリーズを行いました。これについては永田前所長が巻頭言で書かれているとおりです。ちょうどこのシリーズの3回目が終わったところで COVID-19 の広がりが無視できなくなり、大学を取り囲む環境も含めて社会が大きく変容せざるを得なくなりました。そのため、2020年度も何らかの形でこうした一般社会へのアウトリーチを考えていた本研究所も、軌道修正を余儀なくされたところ です。

最後になりましたが、本研究所では急速に変容する大学を取り囲む環境を見ながら、研究に留まらず、本研究所として新たな活動を模索していきたいと考えています。皆さまのご支援とご協力を賜りたい幸いです。

(2020年11月)

オンライン鼎談 『タンパク質動態研究所とタンパク質科学研究』

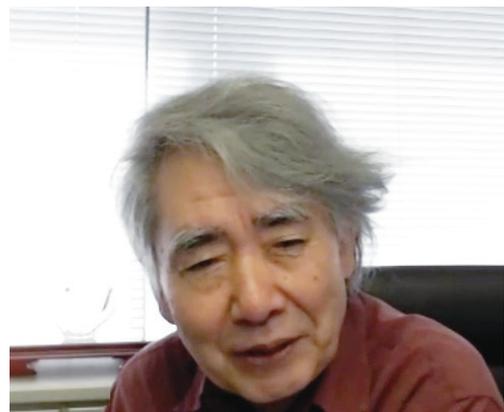
嶋田一夫, 永田和宏, 遠藤斗志也

遠藤 本日は zoom 鼎談に参加いただき、ありがとうございます。早速ですが、本学にバーチャルですがタンパク質動態研究所というものがあります。今回は 2020 年度から研究所の招聘教授になっていただいた嶋田先生をお招きしまして、前所長の永田先生、そして所長を引き継ぎました私の 3 人で、タンパク質研究の動向および将来、その周辺のことを語っていききたいと思います。

まず自己紹介を兼ねて、皆さんのタンパク質研究との関わりを簡単にお話いただきたいと思います。それでは前所長の永田先生からお願いします。

「自分たちのラボで見つけたタンパク質だけで仕事をしてきた、新しいもん好きです」

永田 昨年度まで所長をしておりました永田です、よろしく申し上げます。これまでのことを紹介せえということですが、私はきちんと一本道を歩いて来た人間じゃなくて、あちこち寄り道ばかりしているんです。もともと物理の出身なんです、そこから落ちこぼれて、企業に一回就職したりしています。今に続くタンパク質研究ということになると、1984 年から 1986 年にアメリカの NIH に留学をしました。そのときに Ken Yamada¹ と一緒に仕事をしたんですが、コラーゲンのレセプターを見つけようとしていました。



一本道を歩いてきた人間ではなく、あちこち寄り道ばかりしてきました

ところがレセプターを見つけようとしていたら、レセプターじゃなくて、別のものがとれて、実はそれがコラーゲン特異的な分子シャペロンだったんです。Hsp47 といいますけれども、それがこの分野に入ってきたきっかけということになります。

Hsp47 はコラーゲンの生合成に必須で、遺伝子ノックアウトするとマウスは生きられなくなる。シャペロンというのは基質選択性についてはジェネラルだというふうに思われていたんですが、Hsp47 は基質に特異的なシャペロンということだった。そういう例は、世界的に初めてだったわけで、それを 20 年近くやっています。機能はだいたい分かってきて、それを抑えてやると線維化疾患が抑えられるということが分かってきたので、今、その阻害剤を見つけようという仕事を続けています。

Hsp47 から派生して小胞体というオルガネラに興味が出てきて、その中でのシャペロンとかの仕事もしました。2000 年ぐらいからは、小胞体の中のミスフォールドしたタンパクの分解、いわゆる小胞体関連分解 (ERAD) ですね、そこでタンパク質品質管理に関わるもの

として新しく EDEM というタンパクを見つけました。EDEM は、ミスフォールドしたタンパク質を合成系から分解系へリクルートしてくるんですが、その後、EDEM に結合して基質のジスルフィド結合を切って 1 本のポリペプチドとしてディスロコンチャネルからサイトゾルに逆輸送して分解する、ERdj5 というタンパク質も見つけました。

最初はコラーゲンの生合成というところから始まって、分解というところについて、基本的には小胞体におけるタンパク質の品質管理機構ということで仕事をしてきています。新しいものが好きで、あまり人のやっていたタンパク質で仕事をしたくないので、何となくうちのラボは、自分たちで見つけたタンパク質でだけ仕事をしてきたという経緯があります。これがどこまで続くかということは別として、そういう、新しいもん好きです。

遠藤 永田さんは企業の研究所にもいらっしゃったんですね。

永田 はい、森永乳業の中央研究所にいました。私は物理で落ちこぼれていて、量子力学とかそんなんしかやったことなかったんです。当時、日本全国バイオをやったら儲かる的な空気があって、どこの企業もバイオを始めていたんですね。それで研究所の上層部が、森永に入って図書室で遊んでいた僕に目を付けて、おまえやれということになりました。細胞培養から始めたんですが、当時動物細胞の培養は誰もできなくて、いくら培養しても顕微鏡で見ると増えてないんです。それで東大の吉倉廣さんの所に見せに行ったら、「おまえ、これはシャーレの裏を見てるやないか」と。顕微鏡のフォーカスの合わせ方も知らなかったんです。そんなんでやっていたので、まあひどいものでしたけれども、森永にいたときに 2 報、英文論文を書くことができました。それで京大のウイルス研におられた市川康夫²先生に拾ってもらって、そうですね、3 年ぐらい無給で働いていました。1 歳と 3 歳の子どもがいて、無給になって、これからどうなるか分からんという生活をしていましたね、僕は。

遠藤 ありがとうございます。

嶋田 永田先生、一つ質問、よろしいでしょうか。森永乳業と量子化学の関係というのはどのようにになっているんですか。

永田 本当ですね。実はなんでそんなのを採用したのかよく分からない。でも、僕の数年前に、やはり僕と同じ研究室から森永に入った人がいるんです。その人は辞めちゃったんだけど、辞めた所からどうしてもう一回採るんや？とも思うんだけど、たまたまその頃は非常に景気がいい時期で、求人があった。だから僕らも物理の理論だけど、就職するんだったらどこでも採ってもらえるということで、たかをくくってたんだと思う。ほとんど就職試験はなかったみたいなので、面接に来た専務に、「ちょっと研究所も見ておきたいから連れて行ってくれ」と言って、専務の専用車で研究所に連れて行ってもらいました。

嶋田 さすが大物ですね。

永田 いや、要は世間ってものがよくわかってなかっただけですよ（笑）。

嶋田 だけど、生物から物理へ行くのは難しいけれども、物理から生物というのはシフトしやすいかなとも思うんです。いかがでしょう。

永田 いや、僕は生物嫌いだったんでね、あの頃（笑）。まだ分子生物学は本当には浸透していなかったし、ひたすら覚え込む分野だった。それで嫌いになったんですね。

「NMR で得られる情報は、X線やクライオEM で得られる情報とはちょっと違うんです」

遠藤 それでは次は、嶋田さん、お願いします。

嶋田 実は私も修士を出て、東レリサーチセンターで7年ほどサラリーマンをして、それから臨床医学総合研究所（当時）に移ったということがあって、私も会社の経験はございます。私、駒場（東大教養学部）のときに何をしたかったかというと、人間を理解したいという気持ちが非常に強くて、それで考えた道が三つあって、一つは心理学ですよ。心理学的に人間を理解する。もう一つはロボット。要するに、ロボットを作ってみれば人間を理解できるんじゃないか。3番目が生化学的に人間を理解するという事で、いろいろ迷ったんですけども、結局理学部の生物化学科に進んだという事情がございます。



人間を理解したいという気持ちが強くて、考えた道が3つありました

理学部の生物化学に行って、本当は分子生物学を学ぼうと思っていましたが、宮澤辰雄³先生の生物物理化学の授業が非常にスマートで面白かったので、それで宮澤研に入って、NMR（核磁気共鳴）を始めました。宮澤研にはすごい先輩方、偉い先輩方がいて、その中に一人、遠藤さんって、名前だけは知っていましたが、あまり研究室の中では話してなかったんです。ところが遠藤先輩と実はあるコンサート（Ry Cooderの初来日公演：遠藤注）で一緒になって、「遠藤さん、こんなコンサート来てるんですか？」ということになりました（笑）。後で分かったんですけども、遠藤さんはご存じのようにその道でも大家でして、それから遠藤さんとは色々お付き合いをさせていただくことになりました。

話がそれましたが、その後、東レリサーチセンターに入りました。そこではやはり NMR

をベースにした研究を行っていたんですが、東レだからポリマーが対象なんです。私、大学のときはタンパク質の溶液 NMR が専門だったんですが、ポリマーの解析は、やはり機能しているポリマーの状態で解析しないと駄目だということで、溶液ではなくて、ちょうど固体の高分解能 NMR というのが出てきたところでしたので、固体 NMR でポリマーを解析、分析、評価していました。

そもそも東レに行きなさいと言われたのは宮澤先生で、宮澤先生から「骨をうずめるつもりでやって来なさい」と言われてましたので、それでは骨をうずめるつもりでやろうと思っていたら、ちょうど7年ぐらいたったときに宮澤先生から電話があつて、稲垣冬彦先生と一緒にやる気はないかと。稲垣先生は、実は私が修士のときに実質的にご指導してくださった先生で、その先生が今、臨床研にいるから、稲垣先生のところで研究をしてはどうだということでした。それで東レを退社して、稲垣先生のラボに行つて、糖鎖、それから再びタンパク質の NMR を始めたということになります。

その後、1年ちょっとしたら今度、宮澤先生からまた電話があつて、「そろそろ動く気はありませんか」と。「いや、先生、まだ1年しかたっていないんですけど」と申し上げたところ、「ちょっと話をしたいので家に来てください」と言われました。ちょうど時は平成が変わるときで、宮澤先生のお宅のテレビがついていて、小淵さんが『平成』と出した、あれを見ていました。そのときにいらっしゃったのが東大薬学部の荒田洋治先生でして、それで荒田先生の研究室で研究を始めたということになります。

そういうことで、私は一貫してNMRを使って研究をしてきたわけですが、やはりNMRならではの仕事をしなくちゃいかんなど昔から強く思っていて、例えば東レのときにはNMRで実際の機能しているポリマーだから固体でやらなくちゃいけないとか。それから、いま扱っている膜タンパク質も、実際に機能しているような状態でその機能を解明しないといけないということで、ナノディスクに入れたりとか。そういう具合に実際に働いている状態でそれがどういう具合に機能しているのかをNMRを使って明らかにしていく、ということをやつてきたということになります。扱ったタンパク質は球状タンパク質もありますし、膜タンパク質もチャンネルタンパク質とかGPCRとかあるんですけども、なかなか他の方法では見えないような方法、切り口で機能を解明していくということをやつてきたように思います。

遠藤 嶋田さんはNMR一筋って言いますが、それはそう簡単じゃなくて、誘惑がものすごくあつたと思うんです。NMR やっていた人ってほとんどがX線構造解析に手を出していますね。X線の人、今やクライオ電子顕微鏡(EM)に手を出しているわけですよ。その中で、誘惑に負けなかった。どうしてそうなのかというのがちゃんと聞きたかった。

嶋田 それはですね、確かに誘惑はあつたんですけども、やはりNMRで得られる情報というのは、X線で得られる情報やクライオEMで得られる情報とはちょっと違うんですよ。

ですから NMR の情報をうまく使えば、X 線やクライオ EM のデータをさらに深く解析、理解することができる、だから NMR を捨ててしまっただけは駄目だと。NMR は NMR で十分情報は出るし、X 線と NMR、クライオ EM と NMR といった組み合わせを使って合わせ技での研究。特に今、クライオ EM と NMR の相性は非常に良いと思っているので、新しいバイオロジーというか、生命現象の理解が進むのではないかなと、実は期待しているところです。だけど、そこはもうこういうルートがやっている場合ではなくて、若い人に NMR をどんどんやっていただきたいと思っています。

遠藤 なるほど。

永田 今の嶋田さんの話を聞いていてうらやましいのは、先生がちゃんとおまえここに行け、ここに行ったらどうやって言ってくれるのね。僕、そういうことなかったんだな、全然。

嶋田 自分でこういう所に決めて、この道を歩んだっていうのがかっこいいんですけども、僕の場合はそうではなくて、やはり昔の先生って強かったのかもしれないけど・・・

遠藤 いや、いろいろなタイミングで稲垣さんにしろ、荒田先生にしろ、嶋田さんのことがまず一番に思い浮かんだ、あの人来て欲しいと。その仲介を宮澤先生がされた、ということでしょう。

嶋田 だから、そこは何を思い浮かべたのか。宴会のときに頑張っているなどかね（笑）。

「電気泳動の装置とかプリミティブだけど新鮮で面白いと思って、自分の分野を変えてミトコンドリア研究を始めたというわけです。」

遠藤 それでは私の順番ですね。私も嶋田さんと同じ東大の理学部の生物化学科の宮澤研の出身で、構造というか NMR に浸っていたんですけども、確かに宮澤先生からここに行っただろうかという話がありました。最初は断ろうと思ったんですけども、結局決断して行ったところが群馬大学の併設短大の3年制夜間短大です。そこへ行って、NMR もないですから、考えたときに、やはりタンパク質は好きだったんですけども、それこそ嶋田さんの話にもありましたけれども、タンパク質が働く場所ね。細胞の中で作られるときのことを考えると、当時シグナ



夜間短大で NMR もないから何をやろうかを考えたときに、やはりタンパク質は好きだった

ル配列が付いたものがいろいろ見つかってきていたわけです。われわれが構造研究の対象にしていたのは精製してきたタンパクなので、シグナル配列はもう取れているんですね。だから、シグナル配列が付いていたものはもしかしたら構造が全然、違うんじゃないかと。そういうことを当時は誰もやっていなかったのだから、そういうことができるラボを一生懸命、図書館で文献で探して、スイスのバーゼル大学の Jeff Schatz⁴ の研究室を見つけて、そこに行くことになったわけです。Schatz 研ではミトコンドリアのことを知って、そして構造じゃなくて生化学的手法、そういうやり方があるんだということを知りました。ミトコンドリアを取ってきて、ものをぱっぱと混ぜて、その後、電気泳動をして……。宮澤研で使っていた NMR はあの当時でもすごい値段で 1 億ぐらいしたんじゃないかと思えますけれども、Schatz 研では、使っているのは大学の工作室で作って各ラボに配っている電気泳動の装置とかなんですが、できることはものすごく奥が深かったんです。そういうやり方がプリミティブだけど、自分にはとても新鮮で面白いと思って、分野を大きく変えて、生化学とか細胞生物学、ミトコンドリアの研究を始めることになったというわけです。

それまでの構造研究の場合には target oriented というか、タンパク質をまず測定してみて、構造情報が得られたら、それを機能と結び付けるためにはどうしたらいいかなとかって考えるスタイルだったんですけれども、今度はそうじゃなくて疑問ばかりですから、question oriented な世界に入って、その面白さに取りつかれ、その後、名古屋に行って自分のラボを立ち上げて、ずっとミトコンドリアをはじめとするオルガネラのことをやってきました。

オルガネラ研究の分野に構造研究の手法を使うことは長い間難しかったんですけど、今やっと膜タンパク質複合体の構造解析がクライオ EM とかでできるようになってきて、再び原点というか、構造からあらためてたくさんあったクエスチョンを見直せる時代になってきました。研究生活の最後にそういう原点に戻るようなことができ、それで楽しくやっている、そういう感じです。

永田 遠藤さんの話を聞いてやはり立派だと思えるのは、留学するときにちゃんと調べて行くんですね、自分で。僕の場合は、留学先ではファイブロネクチンをやったんだけど、そもそもファイブロネクチンって何か分からないで行ったという感じなんです(笑)。たまたま知人を介して来ないかという話があって一回断ったんだけど、もう一度、市川康夫先生に「こんな話があって断ったんです」と言ったら、「君、行くんやったら俺の目の黒いうちに行ってくれ」と言われて、それで急遽行くことにしました。それまでは僕は、白血病細胞の分化誘導についての研究をしていた。がん学会で発表するような仕事、白血病細胞が分化誘導因子によってマクロファージに分化する、そういう分化発生というところで研究していたのに、NIH のファイブロネクチンの研究室に行ったわけです。実際行ってみたら、みんなファイブロネクチンレセプターをやっていて、その頃、ファイブロネクチンレセプターというのが分かっていなくて、ボスの Ken Yamada から「おまえ、ファイブロネクチンレセプター取ってくれ」って言われました。でもみんなと同じことをやるのも嫌だから、「ファイブ

ロネクチンレセプターじゃなくてコラーゲンレセプターを取りたい」って言ったら、Ken から「ほんならやってみ」と言われて、こんな関西弁じゃないけれど(笑)、やり始めたわけです。ただし、結局見つかったのはコラーゲンレセプターではなく、Hsp47 というコラーゲン特異的なシャペロンだったことになります。Ken Yamada はがっかりしたと思うんですけど、あのときファイブロネクチンレセプターをやっていたらインテグリンの研究者になっていて、one of them になっていたと思うので、一応、あそこで頑張っただけ違うことを主張してよかったと思います。

成り行き任せなんですよ、僕は。森永に行ったのも成り行き任せだし。僕が唯一自分で決心したというのは、企業を辞めて無給の研究员になるために京大に戻ったときですね。あれが一番大きかったと思います。

遠藤 進路とか、そういうことを考えるときに、いろいろ調べて探して行くという行き方と、巡り合わせとか、誰かに請われてとか、そういう人と人のつながりで行くというのも、在り方。それはそれで一つのチャンスのような気がしますね。たまたまどちらかということでしょうね。

嶋田 そうですね。だけど、遠藤さんの話を聞いているとて、やっぱりよく考えられていて、構造からバイオロジーのほうにシフトしたというところがすごく見事で、ミトコンドリアのほうに移られたというのはすごいなと思います。私、ずっと NMR をやっていたんですけども、さっき言われたように、NMR の方が X 線のほうにシフトするじゃないですか。それが多くなってくると、逆にこれは絶対嫌だなと。こうなったら、人がそういう方向なんだったら、自分はここでオリジナリティを出そうというような、ちょっとへそ曲がりなところもあったなと思って、聞いていました。

遠藤 そういう、何ていうか意地とか、反骨的なところとか、こだわりとか、そういうのも大事ですよ、そう思います。

タンパク質動態研究所のこれまでにについて

次に研究所のことを紹介したいんですけども、この研究所は永田さんが 2016 年 4 月に立ち上げたわけですよ。一応、そのいきさつみたいなことと、永田さんが所長のときにやってきたことを、簡単に紹介いただければと思います。

永田 私は 2010 年にこの京都産業大学に移ってきたんですけども、そのときに当時の学長から言われたのは、とにかく研究のできる大学にしてほしいということでした。私学というところと教育中心で研究はどうでもいいところが多いんですけども、研究できる大学

にしてほしい、そういう学部をつくってほしいということで、教授の人選も、僕は基本的に研究のいい人というのを軸に選びました。それでやってきて、ありがたいことに伊藤維昭さんとか、吉田賢右さんとか、八杉貞雄さんとか、いい人が集まってくれて、学界的にも文科省にも割と注目される学部ができた。その続きで、5年ほどたって辞めていかれた先生の後任に遠藤さん、それから近藤寿人さんに来てもらって、より充実したことになって、そのうちにせっかくできた機運でということで、ちょっと僕の定年が近いということもあったのかもしれないんだけど、2016年に研究所をつくれということになりました。

これはもう大変ありがたいことで、当時タンパク質を中心にやっている人の業績が目立って良かったというか、いい研究者が集まっていたので、タンパク質を中心にやりましょうということになりました。タンパク質については、構造的な視点はもちろんあったんですが、人員の分野や配置も考えると、動態にフォーカスしてやりましょう、と考えました。タンパク質ができて働く三つのポイントを考えて、一つは、時間軸に沿ったタンパク質の一生。つまり、合成されてからフォールディングして分解されるまでの一生というのが一つ。次に、僕は小胞体、遠藤さんはミトコンドリアというように、細胞内の様々な場におけるタンパク質の役割。つまり場がないとタンパク質は働けないということがあって、場を中心に考える空間軸。それから、タンパク質は単独では働けず、様々な基質や他のタンパク質との相互作用で働くということで、タンパク質の相互作用というのをもう一つの軸。この三つを軸に置いた研究所をつくらうということで、タンパク質動態研究所ということになりました。

個々の研究についてはいろんな成果を上げていただいているわけですが、研究所のアウトリーチ的な活動としては、まず最初に開設シンポジウムをやりました。これは個人的なことで申し訳ないんだけど、「7人の侍」と自称している盟友の田中啓二さん、



研究所をつくるにあたって三つのポイントを考えました

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 Kaikan, 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.

Exciting science, traditional Japanese vegetarian food and vibrant discussions on tatami mats
A meeting site where the perpetuity of ancient traditions was felt everywhere provided a stimulating environment for discussions of the top-notch science that was presented by the ~180 participants. The conference was organized by Kazuhiko Nagata (Kyoto Sangyo University), a director of the Institute for Protein Dynamics at Kyoto Sangyo University, and Hidetoshi Taguchi (Tokyo Institute of Technology), a chairperson of the Japanese MEXT team-based grant consortium on 'Nascent-Chain Biology' together with Toshiya Endo (Kyoto Sangyo University) and Shinobu Chiba (Kyoto Sangyo University).

The conference was opened by three Japanese scientific giants: Yoshimori 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. Masasuke Yoshida (Kyoto Sangyo University) talked about the molecular structures and dynamics of two of the most amazing cellular machines: the F₁F₀ ATP synthase and the GroEL.

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

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

大隅良典さん、三原勝芳さん、藤木幸夫さんらを呼んで、それからこちらにいた吉田賢右さん、伊藤維昭さんにも加わっていただいて開設シンポジウムをやりました。ところが何というタイミングか、開設シンポジウムの1週間前に大隅さんがノーベル賞を取っちゃったので、開設シンポジウムという以上にノーベル賞のお披露目のパーティーみたいになってしまって、一般の人を含めて1000人以上の人が集まったという驚きの出発になりました。それから大きなものとしては、翌々年の2018年に比叡山で、田口英樹（東工大）さんが領域代表を務めていた新学術領域研究と、われわれのタンパク質動態研究所が一緒になって、「Life of Proteins: from the Cradle to the Grave」という国際会議をやって、これも200人ほどの参加者になって、海外からも非常にたくさんの方が来てくれました。Natureの姉妹誌『Nature Structure & Molecular Biology』に写真付きで大きなレポートが載って国際的にもインパクトがある会になりました。もう一つは、去年やったんですが、少しアウトリーチにも力を入れようということで、『ようこそ、タンパク質の不思議な世界へ』という講演会シリーズをやって、研究所の人間が1人と外部から呼んだ人が1人、市民向けに研究の話をする。そして最後に私が加わって鼎談をするという形の講演会を3回やりました。これもけっこう評判がよかったと思います。

遠藤 そうですね。特に去年から今年にかけて3回やった『タンパク質ってこんなに面白い』っていう一般向けの講演会は、そんなに大きな規模じゃないけど良かったですね。熱心な人たち、お年寄りが結構多かったけど、高校生とかも含めて色々な人が来てくれました。そういう市民とのやり取りというか、アウトリーチというのはやっぱり大事だなと思いました。

そんなふうにしてやってきて、第1期が終わった感じですね。その間に文科省の私学向けのブランディング事業という予算に採択されて、この研究所を中心に本学をPRするというのもいろいろやりました。この4月から永田さんが所長を辞められて、私が所長ということになりました。私以外の現在のメンバーを簡単に紹介します。横山謙さんは、V-ATPアーゼの専門家ですが、クライオEMを駆使してV-ATPアーゼが働く様子を構造から調べています。さらにATPがシグナル分子として働くという、そういうことも含めて研究を展開されています。津下英明さんは毒素タンパク質が、細胞膜に自分自身で穴をつくって入っていくということ。これもクライオEMで自分自身が入っていく様子もう見えているんですね。千葉志信さんは、リボソームからタンパク質ができる途中の、いわゆるできかけの新生鎖が機能するという、SecMとかで知られている現象。これもやはりクライオEMで、詳細に見れるようになっていて、どんどん面白い展開になっています。あと潮田亮さんは永田研の助教だったんですけど、今もう独立してラボを構えて、小胞体の中



一般向けの講演会は大きな規模じゃないけど良かったですね

でのレドックスとタンパク質の機能化とかを中心に、いろいろやっておられます。そして私。こんな感じでやっているのです、どうなんでしょうね。結構、昨今の研究分野の流れで構造に軸足が来ているような、そういうところがあります。

あとご意見番というか、アドバイスをいただいてより研究所を良いものにしていくために、招聘教授をお願いしているのが、海外では米国ノースウェスタン大学の Rick Morimoto さん、ストレス応答の大家です。それから独マックスプランク研究所の Ulrich Hartl, シャペロニンを見つけた人ですね。それからミトコンドリアの輸送で、フライブルグ大学の Nikolaus Pfanner さん。あと日本からは京大の森和俊さんと理研の嶋田さんをお願いしています。

嶋田 最初の京都産業大学を研究オリエンテッドな大学にしてくださいということから始まって、ここまで研究が進んだということですね。しかも、タンパク質というキーワードで結び付けられた研究所が1期、2期と続いているのは素晴らしいことだと思います。今、京都産業大学にクライオEMはあるんですか。

遠藤 残念ながら、ないですね。

嶋田 クライオEMの導入もいいかもしれないけど、クライオネットワークという形の共同利用で使うということでもいいと思います。こんどは構造生物学専門の人がいらっしやると、さらに所内でも共同研究が進みそうな感じですね。こんなに皆さん構造的なものも取り入れて研究をされているんだったら、中での構造生物学研究者との共同研究というものもあかなと思えました。

NMR, X線, クライオEMをどう使っていくか

遠藤 次に、タンパク質の研究を、皆さん、30年、40年とやってこられて、これから先どうなっていくのかという「タンパク質研究の動向」について考えてみたいと思います。そのなかで、うちの研究所が今後どうあるべきかということも見えてくるかと思っています。タンパク質科学というか、タンパク質研究は、今後、どういうふうになっていくんですかね。嶋田さん、どうですか。

嶋田 まず私の研究領域の展開ということだと、やはりX線、クライオEM、NMRといった手法について、さっき言った合わせ技というのがより強く出てくるのかなと思います。X線はスナップショットで構造を出して、機能を理解しようとするわけですが、X線が強いのは、そこからいろいろアイデアが出てくるということなんですね。例えば、創薬の場合でもキャビティ（空隙）があると、キャビティに入るような化合物は、こういうものがあるので

はないかと。そうすると、そうした化合物を使って機能をモジュレーションできるのではないかというようなアイデアが出てくるわけです。そういう意味では、やはり原子レベルの分解能の構造、座標というのは非常に強いと思います。

しかしスナップショットだけでは駄目だということもあります。例えば、私どもが研究している GPCR の機能について言えば、GPCR は基本的にいくつかのコンホメーションを膜中で取っていて、それがいろいろ移り変わる、構造平衡になっているということが分かってきています。それで、GPCR の特徴である (ligand) efficacy, すなわちいろいろなシグナル伝達の強さを示すリガンドが存在するという事は、リガンドが付くことによって構造平衡が活性な方向に動くか、不活性な方向に動くかという、その平衡を制御しているんだということになるわけです。そうすると、X 線で例えばキャビティを埋めると薬になるという概念はもうそこでは使えなくなって、キャビティを埋めるだけではなくて、GPCR 分子の運動性、構造平衡をコントロールするということまでやらないと薬ができなくなる、ということが分かりつつあります。その辺のところをちゃんと詰めるということが、やはり機能を明らかにするという意味でも、創薬においても重要ではないかなと思います。

薬の開発を見ると、例えば年間 20 種類くらいの新薬が出ているわけですが、このペースはこの 20 年間ずっと変わっていないんですね。ところがタンパク質構造のデータベースである Protein Data Bank (PDB) に登録されている構造数はこの 20 年で 100 倍増えているわけです。だから、静的な構造が薬の開発に必要なかという、必要だけど十分ではないということなんです。要するに構造が分かれば薬ができるんだしたら、PDB のデータがこんなに増えているのなら、もっと薬が出てもいいんじゃないのという話になるわけ



静的な構造が薬の開発に必要なかという、必要だけど十分ではない

で、そこにはもうひとひねり必要なのではないかと。確かに、X 線があるといろいろなアイデアが出てくる。じゃあ NMR でダイナミクスが分かったときに、どういうアイデアが出てくるのか。タンパク質の動的構造=ダイナミクスをコントロールするというようなことができればいいのではないかと考えていて、これをこれからさらに解明していくべきだろうと考えています。静的構造オンリーでいろいろ考えるのではなくて、ダイナミクスを踏まえた上で機能を考える、さらにそれが細胞の中とか、そういうことも踏まえて色々考えることができるようになってくると、よりリアルな、実際に働く場での機能の解析や展開があるのではないかと思います。特に細胞の中は molecular crowding な状況にあるわけですから、試験管の中で調べられることとは違うわけで、そうしたことを統合したような形でタンパク質を理解するということができるかと素晴らしいかなと思います。実際、クライオ EM でも、クライオ電子線トモグラフィーのような技術展開もできてきているわけです。

プロテオスタシス，細胞生化学，細胞内ダイナミクス

遠藤 永田さんはAMED-CRESTで新しい研究開発領域立ち上げて、それを総括としてやられているんですが、そういうことも含めてタンパク質科学。AMEDですから、病気とか健康とか、そういうのをある程度、見据えての研究の動向というのはどうなんでしょう。

永田 今年から僕がAMED-CREST, PRIMEの研究開発総括になって、その後、遠藤さんがJSTのCRESTの研究開発総括をすることになった。たまたま僕が本学を出ることになったからこの2人になったわけで、僕が出ていなかったらさすがに二つのCRESTの代表が同じ大学の同じ研究所からというのはあり得なかったと思いますが、それぐらいうちの研究所のレベルを認識していただいたことは、研究所としてありがたかったかなと思っています。

研究の動向ということからいうと、AMED-CRESTの領域タイトルは「プロテオスタシス」なんですね。タンパク質の恒常性というところに着目をして創薬につなげようという研究開発領域なんですけれども、そこをちょっと離れていうと、今の嶋田さんの話も含めて、分子生物学が大事だ。これは、もう誰もが認識してやってきたんだけど、一方で生化学がいったん下火になっちゃったんですよ。だけど本当に大事なものは細胞生化学だということが、いまあらためて認識されてきていると思うんです。つまり、これまでの生化学は、生体物質を取り出して*in vitro*でやってきた。そうじゃなくて、細胞の中で、細胞という場の中でいかに生化学をやっていくか。そうしたものが、分子生物学以降もっとも大事な分野として、意識せざるを得なくなってきたんじゃないか、ということが徐々認識されつつある。そしてそれをやるだけのメソッドロジーが揃いつつあるというのが現在ではないでしょうか。

構造という面からいうと、嶋田さんがおっしゃったように、X線、クライオEM、それからNMR。この三つがお互いに補完しながらやっていくということかな。X線は、どちらかというとなかなかハードな構造。ハード面での構造をきちんと見ている。クライオEMは、存在形態というか、場の中でのタンパク質の構造をきちんと見ている。それからNMRは、ダイナミックな構造が解析可能というか、構造的なベースで時間的な解析が可能だという。素人なのでこういう総括の仕方は間違っているかも知れないけど、これら3つの手法のそれぞれが相まっていくと、細胞生化学へのアプローチというのが可能になってくるんじゃないかと、僕は思っています。

先ほど言ったこのタンパク質動態研究所の創設するときの理念であった時間軸，空間軸，それから相互作用というのを考えようと思うと、この「細胞生化学」しか道がないんじゃないか。分子 (molecule) そのものを外すことはできないけど、molecule そのものでもないし、その molecule がどういう場で、ど



構造生物学の3つの手法が相まっていくと、細胞生化学というのが可能になるんじゃないか

ういものとの関係性の中で、どういタイミングで反応が起こっていくのかという、その辺のダイナミクスを生化学的に構造的な視点で見ていくというのが、これから一番重要なベースになっていくような気がしています。

遠藤 ちょっとお伺いしたいんですけども、プロテオスタシスという言葉ですが、あらためて考えてみると、タンパク質って機能できるかできないかですよ。そこにホメオスタシス（恒常性）をくっ付けるというのは、どうい発想の造語なんですかね。

永田 これはもともとプロテイン・ホメオスタシスと言っていたんですよ。ところがあるときヨーロッパでわれわれの分野の学会があって、Rick Morimoto とか Bill Balch とかがこれからはプロテオスタシスって呼ぼうって声高に言って、その場にいた連中がみんな賛同して、あちこちでプロテオスタシスって言い出したんです。それで世界的に広まったわけで、完全な造語ですね。

この造語の中には、今、言ったような三つの概念が僕は入っていると思っています。つまり、時間軸に沿ったタンパクの一生。それから、どうい場で働いて、それから、いかに他のものとの相互作用の中で自らの運命（fate）を決めていくかという、その辺の概念が全部入った概念で、本来の意味のプロテオスタシスというのはタンパクの一生だと思うんですけども、もうちょっと広い概念で使っていると思います。

遠藤 ホメオスタシスというのは、生き物というか、細胞というか、そっちの言葉ですね。タンパク質というのはもう分子ですよ。だから、それを結び付けたということでは、タンパク質が細胞の中でどう働き、どう生命に貢献するかというか、そういう文脈を考えさせる言葉ですね。

永田 まさにそうで、個々のタンパク質についてはプロテオスタシスというのではないわけです。だから、どうい場の中でタンパク質が働くか、というところでこういう言葉が出てきたんだと思うんですね。

遠藤 そうですね。その「場」というところですね。私のほうが今担当している JST の CREST の領域は「細胞内ダイナミクス」ということで、嶋田先生にもサイエンスアドバイザーということで大変お世話になっていますけれども、こちらはどうぞですね。横軸に時間を取って、どう構造生物学が発展していくかという、一つはターゲットがどんどん大きなものになっていって、今までできなかったような膜タンパク質複合体なんかの構造も分かるようになってきて、しかもそれが今度、細胞の中でのタンパク質の構造にだんだん迫っていける。クライオ電子線トモグラフィーなんかを使って、もう既に細胞の中で、どこでこういうタンパク質が集まって何かしているよとか、そういうのがちゃんと見れるようになってきてい

ますからね。

一方で顕微技術の解像度が上がって、超解像顕微鏡なんかでマクロのほうからスケールがどんどん下がってきてどんどん小さなものが見えるようになっていきます。この二つの方向性がマージする辺りでは、さっき永田先生が細胞の中での生化学と言われましたけれども、細胞の中での生化学でも生物物理でも構造でもいいですが、とにかく細胞という場で番地付きの情報の精度が上がってきている。これはやはり、革命的だと思うんですね。ただし、もちろん情報量がものすごく多いですから、それを理解するためには一体どうやっていったらいいのかというのはありますけれども、そういう時代になっているかなと。そういう方向を見据えて、今、研究課題を募集しているような段階です。だから、永田先生の話でもそうですけれども、やっぱり働く場の中でより研究できるようになっていっている、そういう方向なんでしょうね。

生命は要素還元主義的に理解可能か？

嶋田 永田先生は細胞生化学、それから遠藤先生は細胞内ダイナミクスというような言葉を使われているけど、同じようなイメージ、同じような学問の方向性だなと思ったんですが、そうやってきたときに、ちょっと教えていただきたいのは、われわれ基本的に要素還元主義者じゃないですか。複雑系になってきたときに、要素還元がどこまでできるのか。どうすればできるようになるのかというのがやはり次の問題になってきて、そこをあいまいにやる手はあるかもしれないけれども、やっぱりそこは残したいと思うんですけれども、その辺に関するコメントはおありでしょうか。

遠藤 永田先生、いかがですか。

永田 僕は基本的に物理から出てきたということもあって、冗長性にはついてゆけなくて、基本的に要素還元主義者なんです。嶋本伸雄君は総合生命科学部で教授にもなったのですが、実は同級生なんですけど、彼とよくしゃべっていたのは、もうわれわれは三つ以上になったら理解できない(笑)。網羅的に全部が集まって何かやっているという形からものを考えていくのが苦手な人間。ただタンパク質は1個では作用できないとことははっきりしている。たとえ基質であっても、何かとの相互作用の中でしかタンパク質本来の機能はあり得ないわけで、構造をつくるにしても、構造をつくる場との相互作用とか、他のタンパク質との相互作用をするというのがある。だから僕の場合は、基本的にはインタラクトームという考え方からいくにしても、まずは最も強く結合するものから、その結合の意味は何か、機能的な意味を構造的に見るということを進めていって、そこで本来の細胞の中での機能が再現できない場合にはあと何が必要なのかという、個々から広げていって、必要最小限の要素で説明しきりたいという形でしか考えられない。

嶋田 なるほど。

遠藤 私も、自分が理解できる範囲というのはタンパク質複合体、せいぜい超複合体程度で、それがどうダイナミックに変わっていくか、その辺が理解できる限界ですよ。ただ生命科学って、生命とは何かというのがある意味、究極のクエスチョンだとすると、その理解に要素還元的、あるいは僕らが理解できる範囲の要素だけの組み合わせで到達できるかというのは、ちょっと分からないところがありますね。つまり、構成要素が何万にもなってはじめてシステムとして協働的に何かが起こるとしたら、僕らはそれを理解できるんだろうかっていう。それはある意味で宇宙の銀河がどうなってというような話とか、ものすごく複雑な気象の現象とか、ああいうのと同じでね。つまりコンピューター、AI を使わないと予測もできないし、われわれが分かるような形で生命が本当に記述されるのか。そういう原理があるのかというのはちょっとオープンですよ。だから分からない、僕は。

嶋田 今、遠藤さんが言われたこと、すごくよく分かって、われわれが何か証明しようとした場合、必要十分をやるわけで、その場合、強いのは再構成なんです。再構成系をつくることで、これは完全に理解できたよねって言えると思っっているんですが、生命の場合、再構成系はあるのか、ないのかというところで、それがすでにわれわれが持っている技術でできるかどうかというのは、全く分かりません。違った学問のスタイルとか、違った攻める道具とか、そういうのが必要なのかなと思いました。



生命の場合、再構成系はあるのか、ないのかというところが分からないですよ

時間軸という視点の重要性

永田 生命ということでいうと、もう一つ大きいのは、時間だと思います。これまでの生物学の中で最も欠けてきたもの。この反応が起こって、次にこの反応が起こるという生化学的な順序は分かっているんだけど、この反応が起こって、次の反応が起こるまでにどれくらいの時間がかかって、何が必要なのかという時間軸ということが生物学の中でこれまでほとんど解明されてこなかった。つまり、酵素反応の順序は理解されてるんだけど、それが実際の細胞の中でどれくらいの時間で起こるのか。遺伝子がタンパク質になった後のタンパク質間相互作用、出会いの確率も含めて、時間的な要素がほとんど埋められてこなかった。これはこれからの生物学の中ですごく大きな分野になっていくと思うんですけど。お二方

はどんなふうにお考えか、ちょっと聞いてみたいですね。

嶋田 今おっしゃられたことは、一つ一つの要素があっても、それがどういう具合に sequence されるのか。その sequence というのは、場に依存して sequence されるわけですから、こういう条件のときにこう sequence されるんだというようなことを明らかにしていくことが非常に重要な課題ですね。今、抽象的な言い方になっているんですけども、一つ一つのバイオロジーの中でそういう局面というのはありますから、そういう見方で整理して、クエスチョンをつくっていくというのは非常に重要なことだと思いました。

永田 究極の複雑系ですからね。すぐにアプローチできるわけじゃない。

遠藤 時間軸ということでいえば、何が原因で何が結果かという因果関係を集めていくというのは必要でしょうね。とはいっても複雑系で、1, 2 時間後の天気だったら、僕らも最近のアプリで雲の動きとかを見たら予想できるんですけど、ひと月先の天気とか、来年の天候なんていうのはあまりにも複雑で、いまだに AI だってできないわけですよ。いずれできるようになるでしょうけれど、そのときはもうわれわれの理解を超えていて・・・、人が知っている将棋の局面はごくわずかで、AI はその何万倍もの対局を既にやっているという、そういうのと同じで、われわれが理解できる範囲のはるか外側に答えがあるのかもしれないですね。ただ生命が気象現象とか株価の変動とかと違うのは、破綻しないでちゃんと integrity が保たれているということです。これ、単なる複雑系を超えた原理が何かあってほしいなというか、それがなかったら破綻したり、何が起こるか分からない。生命は、長い時間をかけて、破綻しないように進化をしてきたわけで、何か神様の方程式みたいなのが生命にあってもいいような気がするんだけど、希望としては、



希望的には、生命にも何か「神様の方程式」みたいなのがあってもいい気がするんだけど

永田 僕はずっとタンパク質の品質管理をやってきた人間なんですけど、タンパク質の変性というのはどういうタイミングで起こるかって、全然、分からないんです。つくられた後のどのタイミングでどういうストレスを受けてタンパク質が変性するかとかは偶然性の産物で、全然、予測がつかない。でも、その予測もつかないそれぞれのステップで、ここで変性したらこういうメカニズムで分解あるいは再生しよう、そうした仕組みが既に用意されているということは、これはとんでもないすごいことで、そこまで含めて生物、生命現象って成り立っているんだっていうこと、よく感じますね。

遠藤 昨今の液々相分離 (LLPS) みたいな話というのは、今までと全然、違う視点で出てきた、でも多分、生命にとっても大事な現象なんですね。LLPS では、分子がいっぱいあって、でもそれがあるとき突然ぱつと変わっちゃうわけですね。そういうのって私たち、理解しにくいですね、私たちの頭の中ではね。だけど、そういうのが生命のけっこう根本のところに出てきちゃったので、ああいうのをどう理解していいのかっていうのは、何か考え方を大きく変えないと行けないんですかね。時間変化も一様じゃなくて、非線形的にぽんといくわけでしょう、さっきの変性なんかも。アミロイド形成なんかもそうですね。そういうのって理解できるような手だてがあるんですかね。

永田 個々の反応って絶対 reversible なんですよ、個々の反応を素過程に分けるとね。だけど、生命というのは素過程の reversible が、どこか時間がたったところで完全に irreversible になるということを保証しないと、生命自体が成り立たないということがあって、そのところを、僕は従来の単純な生化学だけではいかないところがあると思っています。LLPS にしても、個々の分子の集合という reversible な素過程から、突然どこかで層分離して irreversible な状態に入っちゃうのでしょ。やっぱり生命現象の中でそういう、LLPS も含めて、時間的な観点をどこかに入れておくというのはすごく大事なことだと思うんですね。

遠藤 この辺は非常に奥が深い、面白い話だと思うんですけども、次に行きましょう。

コロナと研究, 研究者

遠藤 ちょっと昨今の状況を考えると、コロナ。コロナで世の中、大きく変わっちゃったんですね。お二人ともちょうど大学を離れたタイミングでコロナなんですが、今、大学にいる人間はものすごく大変なんですよ。もちろんこっちも授業の準備とか大変だし、学生も大変。しかも、大学そのものも変わっていくわけで、もう変わらざるを得ないというか、大きな変化の中に突入しちゃったんですね。だから、研究の在り方でも、大学の在り方でも、あるいはもっと広いものでも、コロナのインパクトというのを今どうお感じですか。大学を出た人から見えるものもあると思うので、ちょっとそういうことを今回、いい機会だから聞こうかなと思っていますが、いかがでしょうか。

嶋田 コロナに関しては、wait and see というところもあると思うんですよ。コロナで大きく変わるという意見をお持ちの方がある一方、やっぱり変わらないんじゃないかという意見の方もいらっしゃいますよね。今まで克服できなかった感染症はなかった、だから、絶対克服はする。そのときに、変わっている部分もあるけど、変わっていない部分も絶対あるはずで、全部、変わるという論調が今、けっこう強いかもしれないけど、実は変わらないとこ

ろに着目する考え方もあるんじゃないかなと思っています。大学の大変さから離れた身からすると、興味深くこの推移を見守っていきたいと思っています。

永田 二つあって、大学と直接というんではないんですけども、一つは科学研究予算ということも含めて、役に立つ、役に立たないということがこれからかなりシビアに考えられていこうと思っています。今回のコロナで政府から出た金の額ってすごいですよね。しかもあれは、実はほとんど役に立つところに行っていないんじゃないか、なし崩し、ドタバタで配ってしまって。つまり、今回のコロナで PCR を日本でできなかったということ、これがどこから由来しているか



無駄になったから良かったね、という国民のコンセンサスが必要

という、PCR の装置自体の問題よりも、保健所がパンクしちゃう。保健行政がどんどん縮小してきて、20 年前に比べたら保健所の数は半分になっているんですね。こういう、将来ひょっとしたら起こるかもしれないものに対する予算というのが出せない状況に今なっていて、逆に目の前の役に立つものにどんどん金を出すという形で科学行政が動いてきている。特に、僕は防災予算、防疫予算というのは、役に立たなかったという結果にこそ意味があると思っています、役に立ったら困るんです。無駄になったから、ああ良かったねという国民のコンセンサスをどこかで得る必要があって、それは結局、基礎研究に出す予算の考え方にもつながってくるとしています。ここはこれから科学者コミュニティの中では真剣に議論していくべきことだと思っています。

もう一つは、今回研究者にとってすごく表に出てきたのは、プレプリントジャーナルの問題、これがすごく大きくなっています。いま中国からどんどんコロナ関係の論文、情報が出て、1 日に 1000 報ぐらい出ているんですかね。その多くがプレプリントに近いジャーナルで、だから撤回されるものどんどん増えていっているという現状です。今回のコロナ渦で明らかになったのは、論文やデータをいかに速やかに研究者コミュニティに、一般社会に還元するかという問題と、その質をどこで保証するかという問題なんです。査読の是非も含めたプレプリントジャーナルの問題というのは、これからわれわれのコミュニティではすごく大きな問題になってくると思います。

遠藤 今回のコロナの状況を見ていると、そのうちに日本の科学者何やってるのって。何にもできてないじゃないって、そういうことを言われちゃわないかなってのがちょっと心配です。ワクチンもどこの国から輸入します、何千万人分確保しますってそういう話で、じゃあ日本の科学者は何やってるの、大学にもいっぱいいるのって。それは僕らから

言わせれば、僕らの研究費って全部、目的が決まっています、それ以外のことに使っちゃいけないことになっているのでできないんだけど。でもそれはやっぱり言い訳で、文科省がどこかの時点で、今年、当分は科研費の30パーセントは自由に使っていていいと、コロナ関係に自由に使っていていいと。そしてそれは、業績成果としてカウントできるとかっていう宣言を出せばいい。あるいは大学は大変だけど、国立研究所ね、理研みたいな所。そういうところは、effortの30パーセントはコロナに割けと、そういう命令を出してもいい。つまり、僕ら研究者がこうやってただ見ていて、なんにもできないよねってやっていていいのか。実際は手足が縛られているんだけど、本当に長い目で見ると、それでいいのかなっていう気がちょっとするんだけど、どうなんでしょう。

嶋田 産総研にしても理研にしても、コロナに対してちゃんと有効な研究をするような仕掛けというのは内部にあって、研究者がそこに参入して、自分の得意な領域で治療薬とかそういう開発を進めるといった動きはあります。そこから成果が出てくるか、出てこないかというのは、今までやっていたこと、経験やリソースからは少しシフトしてやるわけですから、どれほどうまくできるかというのは分からないですけども、そういう動きはあります。

遠藤 なるほど、やっているわけですね。

嶋田 ただ、普段から versatile な研究を推奨しておくことは重要で、コロナウイルスの研究をやっている方がいま活躍されるというようなことになると思います。

遠藤 その versatile というのはすごく大事で、僕らはミトコンドリア一筋みたいな、そういうのが偉いねって割と言われがちなんですけど、常に何かあちこちにも手を出すという姿勢を持っていて、こんなような、これがどのぐらいの国難か知らないけど、そういうときには、ちょっと発想を変えてできるぐらいの柔軟さを本当は養っておかなきゃいけないのかなと。いつもディテールのところでこう近視眼的に過ぎているなという反省はありますね。



個々の研究者が versatile であるというのと、 versatile な個々があることを担保しておくことが重要

嶋田 それもありますし、個々の研究者が versatile であるというのと、 versatile な個々の研究があると思います。それを担保しておく、いろんな研究を認めるというような。これしか駄目ですか、こういう具合の目的志向で、トップダウンでこういう研究をなささいじゃな

くて、自由な発想でもってやっていけば、そこには versatile な土壌ができて、なにかのときに対応しやすいんじゃないかというような。

遠藤 そうですね。感染症なんて、日本にもう要らないんじゃないかって、そういう見方も一部にあったもんね。

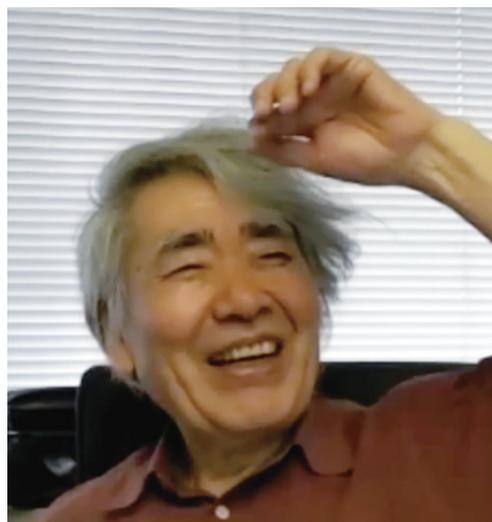
永田 僕は、遠藤さんが言ったのには反対で、こういうときにこそ何でもコロナ、コロナって流れていかない研究というのが大事だと思っています。一つしかやらないんじゃないくて、いろんな好奇心を持ってもいいんだけど、それぞれの分野で出している成果を、必要になったときに出してくる。感染症をどうかせんといかんというときには、感染症をやっている人が、今やったらこれを使えばいいんじゃないかというふうに引き出してくる、その引き出しになるということが大事だと思うんですね。今、遠藤さんがちょっと言ったように、感染症はもう日本は要らないんじゃないかというので、感染症、微生物の研究者に対する研究費はすごく少なくなってきたと思うんです。そういうところに、急にこういうところが大事だからといってトップダウンで大きな研究費を出すんじゃないくて、これは大隅さんなんかもずっと言っていることなんだけど、いろんな分野の研究に研究費が回るような体制をつくっておくことが、こういう予期せぬことが起こったときに引き出してくる知識の総量ということから言えば、すごく大事なことなんですね。ちょっとこれ、ある種、浮世離れした言い方で、なかなか認めてもらえないんだけど、僕はそういうふうに思っています。

嶋田 要するに、ある程度お金を出しているいろんな研究が育っていないと駄目だということですね。あと、こういうときに必要なのはヘッドクォーターの役割ですね。各省庁からお金が出ていて、トータルとしてはいいんだけど、結構オーバーラップしたりとかということがあります。もうちょっと整理をするというか、統制が取れたファンディングというのも重要なんじゃないかと、はたから見ていて思います。

コロナと人間関係、社会の変容

遠藤 ところで大学にいますと、いま話題になっていますよね。対面授業がなくなって、もうオンラインで授業をやっていこうという流れ。これは僕、ものすごい世の中を変えちゃっているなって。もう後戻りできないというか、10年ぐらい先には来るようなことが一気に来ちゃっている。いいんですか、こんなことで。僕らの人間の進化って、社会性の中で文化なりそういうものが生まれてきたわけでしょう。でも、その社会性がバーチャルに、しかも中途半端なバーチャルですよ、まだまだレベルが低くて。そういうものに置き換わっていったら、僕らの何かものすごく大事なものが触まれていくような気がするんですけど、どうですか。だって、オンライン飲み会なんてやる気になる？

永田 いやあ、われわれ、やってるんだよね、3週間に1回(笑)。ただ、本当に人間関係がすごく変わってきて、僕、一方で一般投稿歌の選歌をやっていると、やっぱり人に関する興味というか、対人関係という歌がすごく増えている感じがします。こうして会うことが禁じられてしまうと、無意味に会っていた人たちがこんなに多かったのかということが非常によく分かる。それから、僕ら、遠藤さんもそうだと思うけど、1週間に1回か2回、東京にずっと行っていたわけじゃないですか。6カ月、全く東京に行かなくてもあまり問題ない、一体これまで何やったんだと思うわけ



われわれ、やってるんだよね、オンライン飲み会を3週間に1回

ね。飲みに行くのも、会社の上司だからとか、誘われて断れなかったからという形で飲みに行ったりしたことが多いんだけど、行かなくなって気持ちよくなった。でも、会えなくなったら、どうしてもこういうときだから会いたい人ができてきて、そういう人とオンライン飲み会をやる。これもまた新しい形で、つまり、人と無意識に会っていた中で、自分たちにとって大切な人間関係はどれだったんだということを、この期間、無意識にみんな考得ざるを得なくなった。この人は会わないといかんかった人、この人は全然、会う必要はなかったということを考えてくる時期だったと思う。

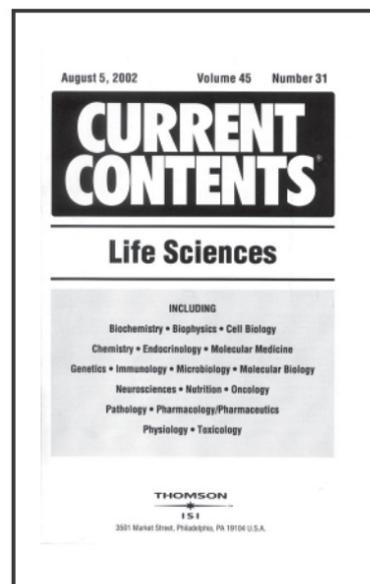
これからの社会を考えると、これがずっと続いて、じゃあ、会いたい人だけ会ってたらいいのかというと、これまた社会が非常にいびつになり、分断を生むことになってくる。

遠藤 そこですよ、そこ。

嶋田 会いたくない人と会わなくても本当にいいのか。そこから得るものは何かなかったのかっていうことが、ちょっと。

遠藤 つまり、今やもうネットの世界にいることがデフォルトになっちゃって。それって僕らになんか、ものすごく深遠な生理的影響を与えるんじゃないかと思っていて、バーチャルだけの接触だけやっていると、オキシトシンとかセロトニンの分泌とか変わるんじゃないかな。5年、10年とこんなことが続いたら、人間みんなおかしくなっちゃうんじゃないかって。会いたくない人とも会うこと、あるいは意味がないような人との接触ももしかしたら意味がある、みたいだね。それが社会性の何か根本じゃないですか。人間が100人単位の狩猟生活から数百人、数千人の農耕生活にいったのと同じぐらいのインパクトのあるシフトを今、しているんじゃないかという気がして、その影響はとて計り知れない。

永田 ちょっととつぴな連想かも分からないけど、昔の Current Contents⁵のことを思いました。お二人は、知ってるよね、Current Contents って。世界中で出版されている科学ジャーナルの目次だけを載せていて、週に一回送ってくる。そのジャーナルの目次を見て、自分の専門に関係する論文を調べるのだけれど、たまたま自分の分野とは関係ないけどその論文を見つけて読んでみて、すごく面白いヒントを得たっていうような論文の接し方があった。今はインターネットでキーワードを入れておけば自動的に向こうから送られてくる。そういう情報で若い人たちはみんな自分の分野の情報を得る。そうすると、情報の漏れはないけれども、関係のないところに対する視野が欠落してしまうという状況になってきてしまう。これからのネット社会というのは、さっき言った人との付き合い方も含めて、意味のない出会いとか、嫌な出会いというのを全部排除していくと、結局、自分の興味のあるものとしか付き合わないという、社会の分断化が進んでいく予感がすごくある。



嶋田 昔、図書館に行って、ジャーナルを見て、この論文をコピーしたいっていったときにページをめくるじゃないですか。そのとき前後のページを見て、あれ、何これって。そういう論文に結構、巡り合ってたんですよね。それでついでにこれちょっとコピーしておこうとやってことがけっこう役に立つこともあったわけで、そういうのって重要だと思うんです。必要なものだけ、キーワード検索。それも重要だけど、あれ？こういうのもあるんだ、っていうような出会いがないですよ。

永田 犬も歩けば棒に当たるだよね。それが大事なんだよ。

遠藤 効率的じゃないもの、アナログ的なもの。そういうものに固執するのは大事だと思いますね。僕ら昭和世代としてはね。

もう一つ、コロナで変わったのは、感染症だからね、監視というものが正当化されちゃうんですよね。今まで個人の健康って結局、自分が好きで酒飲んでるんだからいいじゃないとかって言っていたことが、こればかりは、コロナになっちゃって自分が良ければいいじゃないって言えないんですね。そういう人は社会として許容できないので。そうすると、人の健康にまで監視が入ってきちゃうんですよ。やっぱりこれは付き合っていくしかないんですかね。テロに対する対策として監視カメラが増えているのと同じように、今度は感染症対策として個人の健康に監視が介入してくるといふ。これは僕、怖いとは思いますが、ど

うですかね。

嶋田 そうですね。コロナにかかったら、どういう人と会っていましたかって、全部、芋づる式に濃厚接触者探しが行われるわけで、これはすごいなと思って。誰と会っていたかというのはプライベートな情報なんだけど、感染症対策に対してそういう物言いは無力で、それを全部明かさないと駄目だという、そういうことですよね。

永田 日本は不思議がられているね。ジャパニーズ・ミラクルといって、死亡者が少ない、感染者が少ない。結局、日本人の体質というものが非常に大きくて、自粛が意味を持つ国ってあまりないんですよ、世界に。日本は自粛というのがすごく大きくて、自粛警察という言葉も今、出ている。結局、監視カメラがあって、権力がそれを監視しているから控えるというのではなくて、日本人というのは隣組同士で監視し合うという文化なんです。これ、戦前からの国民性なんですけど、戦前、戦中は隣組が一番怖かった、司法の官憲よりも。つまり、隣から見られている、人から見られているという、この視線が日本人の行動を律してきたということがあって、今回は、それがコロナで非常にうまく働いて、マスクをしていない人間にマスクをしろという。飲みに行ったら非難される。住民同士が非常に強い surveillance と control をしている。これが日本の、ジャパニーズ・ミラクルの一つの大きな要因なんですよ。ただ、これはネガティブな面がすごく大きくて、こういうことでどんどん監視が進んできたら、非常に怖いことですよ。

遠藤 でも、これも長い目で見ればそういう流れだったと思うんです。10年先とか考えれば。でも、それが1年で来ちゃったという感じで、いろんなことが一気に進んで。こっちがそれに対して、いいんだか、悪いんだか、議論する間もなくどんどん変わっているという気がして、嶋田さんのように眺めていると楽しいという見方もありますが(笑)。

嶋田 いや、本当に10年かけて変化した社会と、わずか1年で変化した社会は、内容が随分違うと思うんですよ。1年の急激な変化に関しては、絶対その反動というのがあると思うんですよ。だから、本当は変わるべきところも変わらないことも考えられるので、一体、どういう具合に落ち着くかという意味で興味深いと思っています。

若い人たちへのメッセージ

遠藤 最後に、大学というのは人を育てる、教育するというミッションがある。一方で研究所というのはちょっとそれから外れて、研究というものでプレゼンスを上げるとか、直接市民と何かやり取りするとか、教育と離れた部分もできる、そういう点がいい点だと思います。研究者と社会との関係とか、あるいは若い人に対して、こういう困難な時期、何か思ってお

られること、言いたいことがあればちょっとお願いしたいんですけど。

僕らは古き良き時代の人間ですが、若い人に言うことないですか？嶋田さんは。

永田 嶋田さん、幾つ？ まだ若いよね。

嶋田 いや、もう 65 ですから。

永田 65、まだ若いな。

嶋田 すみません、まだ鼻たれ小僧で。確かに今の人は時間の配分がわれわれのときより随分、違うような気がするんですよ。だけど、やっぱり何か芯というか、そういうのは同じだから、そういうのを大切にしてやっていただけるといいかなと思います。でもまあ、われわれの時代のほうがやりやすかったかもしれないかな。



まあ、われわれの時代のほうがやりやすかったかもしれないかなあ

遠藤 お金はなかったけどね。

嶋田 お金はなかったけれども、そういう反面で、けっこう時間的にはやりやすかった。今は皆さん、せちがらくなって、非常に効率化されて追われるような環境で、自分のやりたいことをやらなきゃいけないというようなことで、大変かもしれない。でも、そこは絶対できると信じて、工夫して、新しいこと、価値のあることをやっていただければいいかと思うんですけど。

永田 僕は、こういうコロナも含めて、サイエンスの非常にベーシックなことを一般社会に共有してもらおうということはすごく大事なんだと、今回、特に思いました。一般の人にとっては、ウイルスもバクテリアも見分けがつかなくて、ウイルスは生き物だと思って怖がる。石鹸で手を洗うことを奨励されているけれど、その理由がわかって石鹸を使うのと、わからないでただ言われるからやるのとはずいぶん違うと思うんです。コロナウイルスは油でできた膜を持っているんですよ。石鹸は油を溶かす。それでウイルスが死活化する。こういうちょっとした基礎知識をどういうふうに社会と共有していくか。これは科学者の責任でもあると思っています。そういう意味で、われわれが果たしていく役割は大きい。われわれは本当に、嶋田さんも遠藤さんも僕も、サイエンスに閉じこもって一般社会に向けた発信ってほとんどしてこなかった世代。若い人がみんなそういう説明責任みたいなことで社会に対してアウトリーチすることが必要だというふうに押しつけられていくと、これはまずい、

若い人はとにかくそんなこと関係なしに研究に専念してほしいと思っています。一方、年を取ってわれわれの世代になると、そういう役割をいや応なく担っていかざるを得ないと思っています。

特に、こういうときにサイエンスというのは取っつきがたいもので、どこか本棚にしかないものだと思ってもらうと困るんで、サイエンスというのは日常の中でこそ生きるものだというのを一般の人に分かりやすく話をしていくというのはわれわれとしての責任だろうと、この頃、そう真剣に思っています。そういう意味で、われわれ自身のこれからを規定する研究費の問題も含めて、一般社会にファンをつくらないとやっていけなくなる。つまり、例えば大隅財団⁶でもみんな寄付を募るわけだけど、僕は寄付にはすごく大きな意味があると思っています。寄付をしたら、寄付をした相手が何をしているのか知りたくなる、人情で。阪神のファンだったら、わざわざ金払って甲子園まで行って、金払って見て、喜んで帰ってくる。何の意味もないんだけど、ファンになるというのはそういうことで、お金を払ってでもそこに行ってみたい。こういうサイエンスのファンを徐々に形作っていくというのが、われわれこれからサイエンティストが自分のやりたい研究をやっていくためにも必要になってくると、真剣に思っています。

タンパク質動態研究所がその先頭に立ってくれというふうには全然、思っていないし、むしろいい研究してほしいと思っていますけれども、遠藤さんみたいな年になっている人は、そういうことが必要にもなってくるだろうな、そんなふうに思っています。

遠藤 僕は、昭和の世代の人間としては、サイエンスはあの時代は良かったって思っていますけれども、それが今、通用しないということももちろん十分、分かっています。あの時代は、僕の尊敬する田宮信雄⁷先生は、自分でヘビをちゃんと棲んでいる所まで、南太平洋に全部行って、捕まえて、毒を取って、タンパク質精製してってことをされていた。その構造を私はお手伝いしたみたいな、そういう研究が楽しくあったんですよ。だけど今はそういう楽しみ方はしにくい。でも今の時代にまた全然、違うところから面白いと思って入ってくる人はいるはずで、それは科学オタクみたいな人なのかもしれないし。そういう面白さは全然、違うところから生まれて、僕らがもうとてもああだこうだ説教できない楽しみ方はあるはずなんですよ。

だから、せめて入ってきて野垂れ死にするようなことがないような仕組みというか、インフラというか、食っていけるといふか、そういうのがあれば、あとは今の人なりの、また全然違う楽しみ方で面白いと思って入ってくる人、いると思います。科学をやっていたら食えなくなるとか、結婚できないとか、そんなふうになっちゃったら困るんで、せめてそういうことはちゃんとしてあげる。だから、大隅財団なんかもそういう試みなのもかもしれないですよ。そのためには、市民への発信、市民と一緒に考えるという姿勢は大事で、共有できるものがなかったら支持してもらえないので、そういうのは大事だなと思います。タンパク質動態研も、せっかくいい3回の市民向け講演会を、やったんですけど、いまはそれをちょっ

とできない状況です。だからなにか今できる、ああいうものを考えていかなきゃ駄目ですね。永田さんは生命誌研究館でいろいろなことをやれているんですか、それともコロナでできないんですか？

永田 僕はこの4月に京産大から生命誌研究館に移ってすぐ、一番最初にやったことは、館長として休館を決めることと、館員に自宅待機を要請することでした(笑)。今は大体、元に戻ってきましたけど。さっき、一般へのサイエンティフィックな知識の共有といったのですが、社会への情報発信を積極的にやっていくというのが一つ大きなことで、遠藤さんにやれと言ったけれども、僕自身もやらざるを得ない。そんな感じです。

遠藤 今日はお忙しい中、お二人には貴重はお話をいただきありがとうございます。今後も当研究所を応援していただければと、思っています。

(2020年9月28日 zoom 会議にて)

略歴

嶋田一夫

理化学研究所・生命機能科学研究センター・生体分子動的構造研究チーム・チームリーダー。

1954年東京都出身。東京大学理学部生物化学科卒業、同大学院修士課程修了。(株)東レリサーチセンター・構造化学研究部 入社。(財)東京都臨床医学総合研究所 入所。東京大学薬学部、助手、講師、助教授、教授を経て現職。この間、産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・センター長、同研究顧問併任。

永田和宏

JT 生命誌研究館館長・京都産業大学名誉教授・京都大学名誉教授。1947年滋賀県出身。京都大学理学部物理学科卒業。理学博士(京都大学)。京都大学再生医科学研究所教授、京都産業大学総合生命科学部初代学部長、同タンパク質動態研究所初代所長を経て現職。朝日歌壇選者、宮中歌会始詠進歌選者を務めるなど、歌人としての活動も知られる。

遠藤斗志也

京都産業大学生命科学部教授・タンパク質動態研究所所長。1953年東京都出身。東京大学理学部生物化学科卒業、同大学院理学系研究科博士課程修了。群馬大学工業短期大学部、群馬大学工学部、名古屋大学理学部化学科、同大学院理学研究科物質理学専攻を経て現職。

註)

¹ Kenneth (Ken) Yamada

1944- 医学博士(スタンフォード大学)。NIH Distinguished Investigator and Chief。
フィブロネクチンの発見者。ダイナミックな細胞-細胞外マトリックス相互作用の研究など細胞生物学分野を牽引した。長年、Journal of Cell Biology 誌の編集者を務めている。1984-86 年まで客員准教授として永田が留学した。

² 市川康夫

1927-2000 医学博士(京都大学)。京都大学ウイルス研究所助教授の時イスラエルへ留学。同結核胸部疾患研究所教授。ノートルダム女子大学教授。白血病細胞の分化誘導療法の確立によって、高松宮妃癌研究基金学術賞受賞。

³ 宮澤辰雄

1927-1993 東京大学理学部化学科水島三一郎教授の研究室出身。元大阪大学蛋白質研究所教授、東京大学理学部生物化学科教授。赤外スペクトルのアミド吸収帯と二次構造の関係を発見。その後 NMR を用いたタンパク質の構造解析、蛋白質工学でわが国のタンパク質研究を牽引した。

⁴ Gottfried (Jeff) Schatz

1936-2015 オーストリア・グラーツ大学出身。米国 Efraim Racker 研究室を経て、スイスバーゼル大学バイオセンター教授 (1974-2000)。1964 年にミトコンドリア DNA を発見、その後ミトコンドリアへのタンパク質輸送機構の研究で、ミュンヘン大学の Walter Neupert 教授とともに分野を牽引した。

⁵ Current Contents

トムソンロイター社が自然科学，社会科学の分野別に主要学術雑誌の最新号の目次を集めて発刊していた週刊小冊子。著者とキーワードでの索引が便利だった。

⁶ 大隅財団

ノーベル生理学・医学賞受賞者 (2016) の大隅良典教授が 2018 年に設立した公益財団法人で正式名称は大隅基礎科学創成財団。基礎研究の助成，研究者と社会の連携を構築するために様々な集会などを主催。

⁷ 田宮信雄

1922-2011 東京帝国大学理学部化学科卒業。東京医科歯科大学教授を経て東北大学理学部化学第二学科教授 (1966-1988)。エラブウミヘビの神経毒タンパク質エラプトキシンの発見と研究で世界的に知られる。

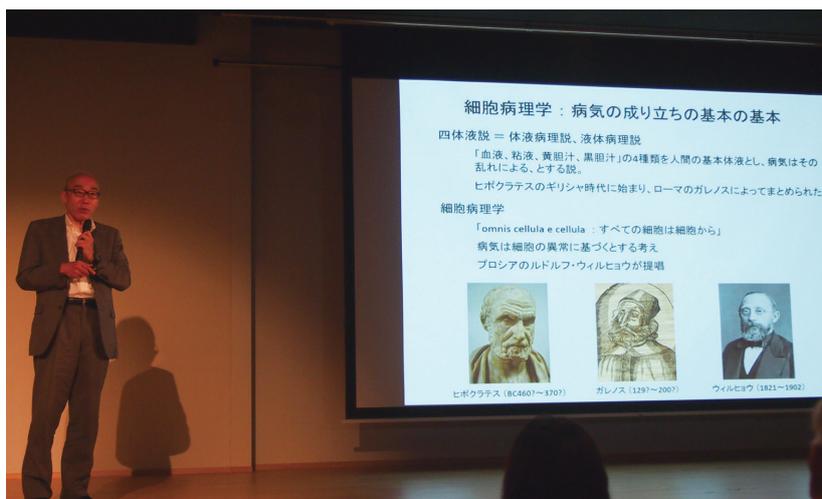
タンパク質動態研究所講演会シリーズ 「ようこそタンパク質の不思議な世界へ」



2019年度に、タンパク質動態研究所のアウトリーチ活動として、「ようこそタンパク質の不思議な世界へ」と題して、3回の一般市民向け講演会シリーズを行いました。サブタイトルには「理系の嫌いな人歓迎！」と銘打って、最新のサイエンスのおもしろさ、研究者にとってのサイエンスの楽しみ方などをわかりやすく一般の人に伝えることをめざし

ました。

毎回各分野のトップの研究者1名をゲストスピーカーとして、外からお招きし、研究所のメンバーとゲストスピーカーの先生が講演を行い、その後、永田所長を含めて3名が登壇し、ゲストスピーカーの先生にインタビューするという形で行いました。第1回は2019年9月14日に大阪大学大学院医学系研究科の仲野徹先生をお招きし、「(あまり)病気をしない暮らし」というタイトルでご講演いただきました。研究所からは永田和宏所長が「細胞って、こんなにおもしろい」というタイトルで細胞から見た生命科学を話されました。仲野先生は書籍やインターネットなど様々な形で発信をつづけられているだけあって、先生ならではのユーモア満点、軽妙な語り口で、がんの発生機構という固い内容を分かりやすく説明いただきました。タイトルが「病気をしない暮らし」ではなく、「(あまり)病気をしない暮らし」となっているあたりは、お見事でした。



仲野先生のご講演、まずはイントロから

第2回は2019年12月7日に理化学研究所生命機能科学研究センターの竹市雅俊先生をお招きし、「生命は謎だらけ：好奇心こそ科学のはじまり」というタイトルでご講演いただきました。

研究所からは近藤寿人教授が「発生って、こんなにおもしろい」というタイトルで発生の研究の魅力を話されました。竹市先生は細胞どうしを結びつけるタンパク質カドヘリンの発見者ですが、講演ではご自身の研究だけでなく、生物の本能に関わる複雑な行動（オトシブミの巣の作り方など）を例に、正しく謎だらけの生命科学の本質をわかりやすく話されました。た



第2部の鼎談/インタビュー，左から近藤，竹市，永田の各先生

しかに小鳥のさえずりのプログラムなどについては少しずつ解明されてきていますが、葉に切れ目を入れて折りたたんで、トポロジー的にも複雑な巣をつくりあげる方法がDNAのどこに書き込まれているのか、まったく不思議です。カメラがご趣味とのことで、生き物のきれいな写真も印象的でした。

第3回は2020年2月22日に大阪大学大学院生命機能研究科・医学系研究科の吉森保先生をお招きし、「細胞が自分を食べる：オートファジーの不思議」というタイトルでご講演いただきました。研究所からは遠藤斗志也が「ミトコンドリアって、こんなにおもしろい」というタイトルで自身とオルガネラ研究の関わりのことを話しました。吉森先生はノーベル賞受賞者の大隅良典先生のラボと一緒にオートファジーを研究されていたこともあり、酵母で見つかったオートファジーがわれわれヒトでも、発生から病気や老化まで、さまざまな局面で重要な役割を果たしていることを分かりやすく話していただきました。吉森先生は多趣味でいろいろなことにウンチクの深い方なのですが、時間が足りずにそうしたことまでは話を広げられなかったのはちょっと心残りでした。



控え室で，左から近藤，吉森，永田，遠藤の各先生

講演会場は京都産業大学附属中学高校のある下京区のむすびわざ館で行われました。交通の便ということでは少し不便なところですが、また中学校や高校の行事と重なる日程もあったに

もかかわらず、高校生からご高齢の方まで多くの方に来ていただき、なかにはまた毎回来ていただいた方も少なからずいらっしゃったことは心強く感じました。アンケートの回答の中では、「サイエンスにあまりつながりのない人でも非常に楽しめた内容」「漠然と感じたり、思ったりしていたことが興味深い表現で語っていただけた」「失礼ながら今まで貴大学の研究活動について全く関心を持っていなかった。しかし本日の講演会に参加しこの認識が誤りであることを知った」「このシリーズが3回で終わるのは残念です」などの声は、心強く感じました。一方で「レジュメが欲しかった」「もっとタンパク質に話が聞きたかった」「講演内容の密度に比べ、時間が短い」「研究活動の広報が不十分ではないか」などの厳しい注文もありました。今後の参考にしていきたいと思えます。

本研究所のファン(?)ができてつあるところで3回の講演シリーズは終了しました。現在はコロナ禍のため第二弾を行えない状況ですが、ウィズコロナの時代のなかでの発信を考えたいと思っています。

(文責：遠藤斗志也)

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）

タンパク質構造生物学研究室（津下英明）

膜エネルギー代謝研究室（横山謙）

発生生物学研究室（近藤寿人）

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.

准教授 潮田 亮 Associate 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。このようにいわゆる<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推進してきた。

すなわち、

- 1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析
- 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
- 3) 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
- 4) Moyamoya 病原因遺伝子 mysteriin の機能解析

の4つであった。

プロジェクト4)の責任者であった森戸大介が昭和大学医学部に講師として赴任し、プロジェクト3)の責任者であった山本洋平が大阪大学歯学部助教として採用されたことから、これら2つの研究は、現在もそれぞれ昭和大学、大阪大学で継続されている。

以下、プロジェクト1)とプロジェクト2)について、この1年3か月で得られた知見について紹介する。

1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

コラーゲン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、この観点からは各種線維化組織において、Hsp47 は治療に関する有望なターゲットタンパク質となり得る。Hsp47 の機能阻害によって、コラーゲンの異常合成を主因とする線維化疾患の治療法を確立しようとするものである。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(J Biol Chem 2017, 2019)。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ら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。本研究は、研究助教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)。さらに 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)。そのような経過から、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るように酸化的环境下にあるが、この酸化的环境下において 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准教授を中心としたチームによって、従来知られてきた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。また、小胞体内腔のレドックス環境がどのように構築されるのか、その機構解明にも挑戦している。

2. 本年度の研究成果

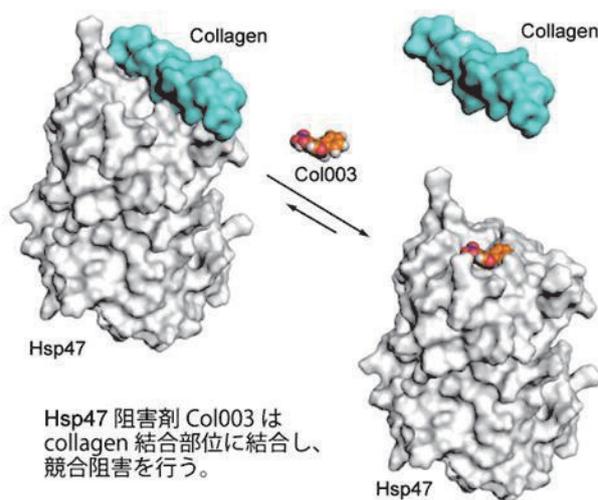
1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

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。Hsp47 はヒートショックタンパク質(HSP)に属し、温度に依存して転写レベルで発現が変動する。通常 37°Cで培養している細胞を、33°Cで培養するとコラーゲン合成に対する Hsp47 の依存度が低くなることを共同研究で、明らかにした(Fujii K et al, Sci Rep, 2019)。このことは、37°Cがコラーゲンにとって熱的に不安定なヒートショック条件であり、Hsp47 がコラーゲンにとって HSP として働いていることを示唆している。

近年、Hsp47 がコラーゲン以外のタンパク質にも結合し、コラーゲンの品質管理に関与することが示唆されている(Ishikawa Y et al, PNAS, 2016)。さらに、Hsp47 は細胞外のコラーゲンの合成を制御することで、がん細胞の転移に関与することが分かってきた (Xiong G et al. PNAS . 2020)。新規結合パートナーや疾患との関連を含む 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. 2019)。

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-コラーゲン間相互作用の検出に成功し、阻害剤の効果を評価した(Ito S et al, J Biol Chem. 2019)。この方法により、より有望な化合物の探索を共同で行い、その一部を発表した(Yoshida M et al, Chem Pharm Bull. 2020)

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。



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じ、SERCA2 との複合体形成を調節していることを明らかにした (R. Ushioda et al., PNAS 2016)。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. 2019)、今後、詳細なポンプ活性化メカニズム解明が期待される。さらにカルシウム制御として、小胞体局在のレドックス因子がカルシウムチャンネル 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、ポンプとチャンネルを 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、極めて巧み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。また、これらレドックス依存的な小胞体恒常性維持機構について総説にまとめ、広くコンセプトを伝えることが出来た (R.Ushioda & K.Nagata, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2019)。

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 two 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. Lowering the culture temperature corrected collagen abnormalities in Hsp47 knockout cell (Fujii KK, et al, Sci Rep. 2019). This collaborated study suggested that Hsp47 stabilizes procollagen as heat shock protein and body temperature would be a heat shock condition to procollagen folding. Recently, we also collaboratively found Hsp47 promotes cancer metastasis by enhancing collagen-dependent cancer cell-platelet interaction. (Xiong G et al, PNAS 2020) and a cell-specific ablation of Hsp47 defines the collagen-producing cells in the injured heart (Khalil H, et al, JCI Insight. 2019). To date, 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 review (Ito S and Nagata K J Biol Chem. 2019). 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 (Ito S et al, J Biol Chem. 2019). We are searching for more promising compounds by this method. As a part of the hit compounds, We reported the structure-activity relationship study on a compound inhibiting between collagen and Hsp47 (Yoshida M, et al, Chem Pharm Bull 2020).

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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca²⁺ concentration in the ER and regulates the interaction with SERCA2b. It suggests that the 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, 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. Furthermore, we summarized our previous works as a review of the redox-dependent endoplasmic reticulum homeostatic mechanism (R.Ushioda & K.Nagata, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2019).

4. 論文、著書など

- Y. Yamamoto, A. Kasai, H. Omori, T. Takino, M. Sugihara, T. Umemoto, M. Hamasaki, T. Hatta, T. Natsume, R. I. Morimoto, R. Arai, S. Waguri, M. Sato, K. Sato, S. Bar-Nun, T. Yoshimori, T. Noda & **K. Nagata** : ERdj8 governs the size of autophagosomes during the formation process *J. Cell. Biol.* in press
- Y. Zhanga, M. Inoue, A. Tsutsumi, S. Watanabe, T. Nishizawac, **K. Nagata**, M. Kikkawa & K. Inaba : Cryo-EM structures of SERCA2b reveal the mechanism of regulation by the luminal extension tail. *Science Advance* in press
- A. Kohler, M. Morgelin, J.M. Gebauer, S. Ocal, T. Imhof, M. Koch, **K. Nagata**, M. Paulsson, M. Aumailley, U. Baumann, F. Zacke & G. Sengle: New specific Hsp47 functions in collagen subfamily chaperoning. *FASEB J.* 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.* 68(3):220-226 (2020)

- G. Xiong, J. Chen, G. Zhang, S. Wang, K. Kawasaki, J. Zhu, Y. Zhang, **K. Nagata**, Z. Li, BP. Zhou, R. Xu : Hsp47 promotes cancer metastasis by enhancing collagen-dependent cancer cell-platelet interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117 (7) :3748-3758 (2020)
- 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*. 294(44):15962-15972 (2019)
- S. Ito & **K. Nagata** : Roles of the endoplasmic reticulum-resident, collagen-specific molecular chaperone Hsp47 in vertebrate cells and human disease. *J Biol. Chem*. F294(6):2133-2141 (2019)
- 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* 1;11(5), (2019)
- M. Inoue, N. Sakuta, S. Watanabe, Y. Zhang, K. Yoshikaie, **R. Ushioda**, Y. Kato, J. Takeda, T. Tsukazaki, **K. Nagata** & K. Inaba : Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay. *Cell Rep*. 27(4)1221-1230 (2019)
- 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*. 218(3):949-960 (2019)
- KK. Fujii, Y. Taga, T. Sakai, S. Ito, S. Hattori, **K. Nagata** & T. Koide : Lowering the culture temperature corrects collagen abnormalities caused by HSP47 gene knockout. *Sci Rep*. 9(1):17433. (2019)
- H. Khalil, O. Kanisicak, RJ. Vagnozzi, AK. Johansen, BD. Maliken, V. Prasad, JG. Boyer, MJ. Brody, T. Schips, KK. Kilian, RN. Correll, K. Kawasaki, **K. Nagata** & JD. Molkenin: Cell-specific ablation of Hsp47 defines the collagen-producing cells in the injured heart. *JCI Insight* 4(15):e128722 (2019)
- H.H. Kampinga, C. Andreasson, A. Barducci, M.E.Cheetham, D. Cyr, C. Emanuelsson, P. Genevaux, J.E. Gestwicki, P. Goloubinoff, J. Huerta-Cepas, J. Kirstein, K. Liberek, M.P. Mayer, **K. Nagata**, N.B. Nillegoda, P. Pulido, C. Ramos, P. De Los Rios, S. Rospert, R. Rosenzweig, C. Sahi, M. Taipale, B. Tomiczek, **R.Ushioda**, J.C. Young, R. Zimmermann, A. Zylicz, M. Zylicz, E.A. Craig & J. Marszalek : Function, evolution, and structure of J-domain proteins. *Cell Stress and Chaperones* 24(1):7-15 (2019)

5. 学会発表など

招待講演

Kazuhiro Nagata : Protein folding and misfolding in the Endoplasmic Reticulum. EMBO workshop “Protein quality control: From mechanisms to disease”, Mallorca (Spain) 2019.04.30

永田和宏 : 線維化疾患治療薬ターゲットとしての Hsp47. 第 105 回日本消火器病学会総会 (ワークショップ基調講演)、金沢市、2019.5.11

永田和宏 : 生物物理若手の会夏の学校、神戸市、2019.08.29

Kazuhiro Nagata : Organizing and Closing remarks 日独米 AMED ワークショップ”Dynamic Codes of Proteins and Glycans in Stress Resilience and Diseases”、東京都、2019.9.6-7

永田和宏 : 小胞体恒常性の維持機構. 老化メカニズムの解明・制御プロジェクト「加齢依存性タンパク質変性と老化」研究会、神戸市、2019.11.08

学会発表

堤智香、**潮田亮**、**永田和宏** : 小胞体における亜鉛依存的なレドックスゾーンの構築. 新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」平成 30 年度若手の会、徳島市、2019.01.25

Kaiku Uegaki, **Ryo Ushioda** and **Kazuhiro Nagata** : Nascent polypeptide can be an electron donor for ER-resident disulfide reductase ERdj5. EMBO workshop “Protein quality control: From mechanisms to disease”,Mallorca (Spain)2019.04.28-05.03(Poster award)

Ryo Ushioda, Kaiku Uegaki and Kazuhiro Nagata :

Maintenance of ER homeostasis through disulfide reductase. Gordon Research Conference "2019 Stress Proteins in Growth, Development and Disease", Lucca (Italy), 2019.06.23-28(Flash Talk)(口頭発表)

上垣日育、潮田亮、高島成二、稲葉謙次、永田和宏 :

Electron donor for disulfide reductase ERdj5 in the ER. 第 19 回日本蛋白質科学会年会 第 71 回日本細胞生物学会大会 合同年次大会、神戸市、2019.06.24-26

藤井唱平、潮田亮、山浦大地、平野愛弓、永田和宏 :

レドックスによる小胞体カルシウム恒常性維持機構の解明. 第 19 回日本蛋白質科学会年会 第 71 回日本細胞生物学会大会 合同年次大会、神戸市、2019.06.24-26

潮田亮 : レドックス制御に基づく小胞体恒常性維持機構. 第 92 回日本生化学会大会、横浜市、2019.09.20 (奨励賞受賞講演)

潮田亮 : レドックスを介した小胞体恒常性維持機構, 第 92 回日本生化学会大会シンポジウム、横浜市、2019.09.18-20(口頭)

藤井唱平、永田和宏 : 小胞体の酸化還元酵素によるカルシウムイオンチャネルの制御機構の解明. 第 92 回日本生化学会大会、横浜市、2019.09.18-20 (若手優秀発表賞)

Ryo Ushioda: Maintenance of ER homeostasis through disulfide reductase. The 1st International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine, Sendai, 2019.09(口頭)

潮田亮 : ストレス応答としての小胞体レドックスシフト. 第 14 回小胞体ストレス研究会、岡山市、2019.09.26-27(口頭)

藤井唱平、潮田亮、永田和宏 : IP3 受容体のレドックス依存的なチャネル活性制御機構の解明. 第 14 回小胞体ストレス研究会、岡山市、2019.09.26-27(口頭)

山下龍志、潮田亮、永田和宏 : 小胞体ゴルジ体間におけるレドックス環境のクロストーク. 第 2 回オルガネラゾーン若手の会、2019.11.25 (若手優秀発表賞)

伊藤進也、永田和宏 : 細胞におけるコラーゲンとその特異的分子シャペロン Hsp47 の相互作用の解析. 第 42 回日本分子生物学会年会、福岡市、2019.12.03-06

葛西綾乃、伊藤進也、永田和宏 : コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の新規発現調節領域の探索. 第 42 回日本分子生物学会年会、福岡市、2019.12.03-06

Riyuji Yamashita、Ryo Ushioda、Kazuhiro Nagata :

Redox-crosstalk between ER and Golgi apparatus. 第 42 回日本分子生物学会年会、福岡市、2019.12.03-06 (口頭)

亀井亮太、伊藤進也、永田和宏 : 脂肪組織における分子シャペロン Hsp47 の役割. 第 42 回日本分子生物学会年会、福岡市、2019.12.03-06

6. その他特記事項

外部資金

科学研究費補助金・基盤研究 A

課題名：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 [I]

課題名：膜輸送を介したオルガネラ恒常性維持と細胞機能制御、共同研究者：永田和宏 (研究代表者：遠藤斗志也)、取得年度：2019-2021 年

資生堂、研究代表者：永田和宏、取得年度：2017-2020 年

大塚製薬、研究代表者：永田和宏、取得年度：2017-2019 年

バイエル薬品、研究代表者：永田和宏、取得年度：2018-2019 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：2019 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

学外活動

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「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：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「マルチモードオートファジー：多彩な経路が織り成す
自己分解系の理解」外部評価委員

永田和宏：リアル・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 : 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」運営委員会委員長

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

永田和宏 : 日本医療研究開発機構(A M E D) プロテオスタシス、プログラムスーパーバイザー

受賞等

永田和宏 : 瑞宝中綬章

潮田亮 : 2019 年度日本生化学会 奨励賞受賞

Kaiku Uegaki : EMBO workshop “Protein quality control: From mechanisms to disease” Poster award、
2019.04.28.05.03

藤井唱平 : 第 92 回日本生化学会大会 若手優秀発表賞受賞、2019.09.18-20

山下龍志 : 第 2 回オルガネラゾーン若手の会 優秀発表賞受賞、2019.11.25



潮田研ホームページ

<https://ushioda-lab.com/>



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 種類を超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 複合体のクライオ電子顕微鏡(EM)構造の決定

ミトコンドリア外膜トランスロケータの TOM 複合体は 1000 種におよぶほとんどのミトコンドリアタンパク質のミトコンドリア内への移行の搬入口として機能する。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、3 量体と (Tom22 を含まない) 2 量体は各々通過させる基質タンパク質の種類が異なることを見出していた (Sakaue et al., *Mol. Cell* 2019)。今回、われわれは酵母細胞から TOM 複合体 (Tom40, Tom22, Tom5, Tom6, Tom7 の 5 種類のサブユニットから構成される膜タンパク質複合体) を精製し、東京大学のクライオ電子顕微鏡を用いてその構造を 3.8Å の分解能で決定することに成功した (Araiso et al. *Nature* 2019)。全体構造は各サブユニット 2 個ずつから成る 2 量体で、タンパク質の通り道 (膜透過チャネル) となるβ-バレル構造の Tom40 同士の界面に、Tom22 二分子と脂質一分子が入り込んでいた。これは上述の Tom22 を含む 2 量体とは異なり、ミトコンドリアにメジャーに存在する 3 量体のコア部分に対応すると考えられた。一方、Tom40 のポリペプチド鎖の N 末端部分はチャネル構造形成には関わらないが、Tom40 チャネルの孔を外 (サイトゾル) 側から内 (膜間部) 側に向かって貫き、膜間部側に出てきた N 端部分を Tom5 がつなぎ止めていた。

TOM 複合体を通過した前駆体は、次の因子に引き渡されて、最終目的地に運ばれる。N 端にミトコンドリア行きシグナルとして「プレ配列」を持つものは、内膜の TIM23 複合体と呼ばれるトランスロケーターに引き渡されて、内膜を通過してマトリクスに運ばれる。今回、TIM23 複合体のサブユニット Tim50 が、TOM 複合体のサブユニット Tom40 の C 端側や Tom22 の膜間部側のドメインと相互作用していることが分かった。これらのドメインは 2 量体の内側、2 つの Tom40 同士の界面の近くにあり、Tim50 を含む TIM23 複合体は TOM 複合体の 2 量体の「内側」で、通過してくるプレ配列を持つ前駆体を待ち構えていることになる。一方、多様な前駆体タンパク質のうち、プレ配列を持たない膜間部の可溶性タンパク質は、TOM 複合体から膜間部の Mia40 に引き渡される。今回、Mia40 は Tom40 のチャネル内を貫いて膜間部側に出てくる Tom40 の N 端側と相互作用していることが分かった。すなわち、膜間部の可溶性タンパク質が Tom40 チャネル内を通過して Tim40 に引き渡される出口は、TOM 複合体の 2 量体の「外側」にあることになる。このようにタンパク質の膜透過チャネル内に、プレ配列を持つ前駆体タンパク質と持たない前駆体タンパク質専用の通り道と出口を別々に用意し、出口で待ち構える各輸送経路

の下流の因子に前駆体タンパク質を別々に受け渡すことで、性質も機能も異なる 1000 種に及ぶ前駆体タンパク質の外膜透過を効率良く行っていることが明らかになった。

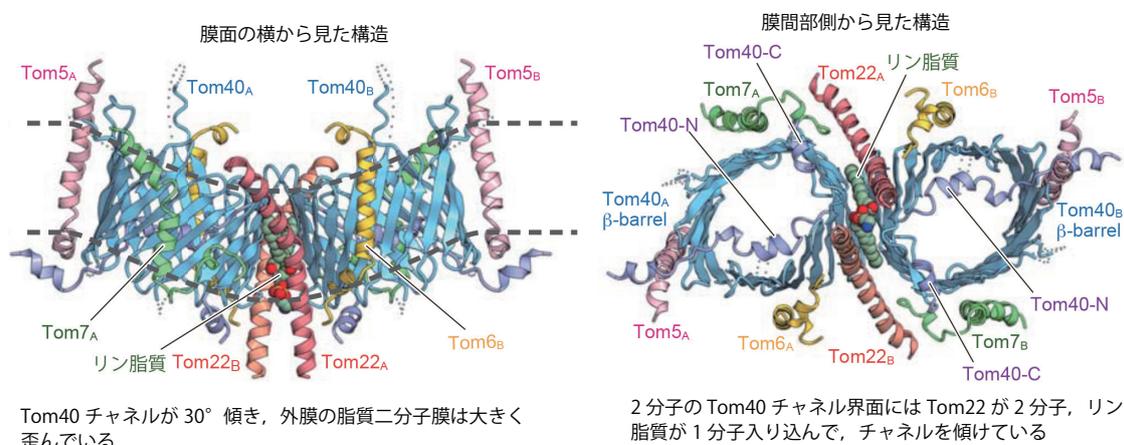


図 1 TOM 複合体のクライオ EM 構造 (分解能 3.8 Å) (Araiso et al. (2019) Nature) βバレル型膜タンパク質 Tom40 の膜透過チャンネル間界面に Tom22 が 2 分子、リン脂質が 1 分子入り込むことで、チャンネルが傾き、二分子膜が曲がっている。Tom40 の N 端はチャンネルを外から中に貫き、Tom5 により安定化されている。

(2) Msp1 によるタンパク質配送のやり直し機構の発見

タンパク質自身には働くべき場所が宛名として書き込まれ、細胞にはそれを読み取って目的地への配送を行うシステムが備わっている。タンパク質の目的地への配送はきわめて正確に行われ、その配送が狂うと細胞機能は損なわれ、様々な病気につながるものと考えられてきた。しかし、今回われわれは、タンパク質の細胞内配送には間違いが起こりうること、しかしいったん配送先を間違っても、配送をやり直す、すなわち校正を行うシステムが存在することをはじめて見出した。

われわれは、ミトコンドリアに誤配送されたタンパク質の分解に Msp1 というタンパク質が関わるという、最近の報告に注目した。ペルオキシソームに行くべき Pex15 というタンパク質の変異体 Pex15Δ30 (ミトコンドリアに誤配送される) を使って、Msp1 がどんなタンパク質と協力して Pex15Δ30 の分解を促すのかを調べた。そして、Pex15Δ30 はプロテアソームによってサイトゾルで分解されること、意外にもプロテアソーム分解の目印となるユビキチン付加はミトコンドリアではなく ER に存在する Doa10 というユビキチン化酵素によって行われることが分かった。ER には、内部に異常タンパク質が生じると、これを見出してユビキチン化し、サイトゾルに送り出してプロテアソームで分解する強力な「品質管理」システムが存在する。Doa10 はこの品質管理システムの一員であり、通常は Doa10 が ER 膜上の異常タンパク質をユビキチン化すると、サイトゾルから Cdc48 というタンパク質がやってきて異常タンパク質を ER 膜からサイトゾルに引き出し、プロテアソームに受け渡す。実際、Cdc48 が Pex15Δ30 の分解に必要であることも分かった。Pex15Δ30 は ER では本来のパートナータンパク質と複合体を作れないので異常タンパク質として認識されてしまうことが考えられる。そうであれば、異常タンパク質として認識されない Pex15Δ30 以外のタンパク質がミトコンドリアに誤配送された場合はどうなるであろうか。本来 ER 膜に組み込まれてからゴルジ体に配送されてゴルジ体膜上で働く Gos1 をミトコンドリア外膜に誤配送させてみると、Gos1 もミトコンドリア外膜から Msp1 によって引き抜かれ、一部は ER 膜に移行することがわかった。興味深いことに Gos1 は ER 膜上で Doa10 によるユビキチン化を受けるのではなく、本来の目的地であるゴルジ体まで小胞体から正しく配送された。Gos1 は ER の品質管理システムによって異常とはみなされず、いったん ER にさえ戻れば、ゴルジ体まで正しく運ばれることとなった。

Msp1 はミトコンドリア外膜に誤配送された Pex15Δ30 や Gos1 などのタンパク質を何らかの仕組みで見出し、ATP のエネルギーを使ってそれらを外膜から引き抜く。引き抜かれた Pex15Δ30 や Gos1 は膜タンパク質なので、おそらく多くは再びミトコンドリア外膜に組み込まれるが、一部は近くに存在する ER 膜にも組み込まれる。すなわちミトコンドリアに誤配送された Pex15Δ30 や Gos1 は配送をやり直す機会を Msp1 によって与えられたと考えられる。こうして、Msp1 はミトコンドリア外膜に誤配送されたタンパク質を ATP のエネルギーを使って引き抜き、

近くにある ER などの膜に配送をやり直させる機会を与えている。これまでタンパク質の配送は正確に行われるべきであり、そのやり直しを行うタンパク質やシステムが存在するとは考えられていなかった。しかし Msp1 の新しい機能の発見は、細胞内ではタンパク質の配送は間違いが起こりうること、しかし間違いが起こっても Msp1 などによってそれをやり直すことで、タンパク質の正しい配送や、誤配送されたタンパク質の除去ができること、そのことで細胞の正常機能の維持を実現していることがわかった。

3. Research projects and annual reports

This year's accomplishments

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. We determined here the cryo-electron microscope (EM) structure of the yeast TOM complex at 3.8Å resolution.

The cryo-EM structure of the TOM complex revealed two separate preprotein exits sites toward the IMS. That is, presequence-containing preproteins that constitute about 60% of mitochondrial proteins were suggested to leave the Tom40 pore at the *trans* site, which is formed by Tom22/Tom7/Tom40 in vicinity of the middle of the Tom40 dimer, and are then transferred to Tim50 of the TIM23 complex via the IMS domains of Tom22 and Tom40. Presequence-less preproteins, which include three different classes (MIA substrates and β -barrel and carrier precursors), were suggested to leave the Tom40 channel in proximity of Tom5 and the N-extension of Tom40 at the periphery of the Tom40 dimer. The IMS-exposed portion of the N-extension of Tom40 recruits small TIM chaperones and Mia40 close to the exit site to ensure an efficient transfer of precursor proteins. In this way, the TOM complex functions as the hub for the intramitochondrial sorting of mitochondrial precursor proteins.

Previous studies reported that a subset of tail-anchored (TA) proteins targeted to the ER were mislocalized to mitochondria by, for example, disruption of the GET pathway. The mitochondrial outer membrane AAA-ATPase Msp1 was reported to clear such mistargeted TA proteins as well as a model mistargeted TA protein Pex15 Δ 30. We found that mislocalized Pex15 Δ 30 was first recognized by Msp1 in the OM, then ubiquitinated by Doa10 and its co-factors in the ER membrane, and subsequently extracted from the ER membrane by Cdc48 for proteasomal degradation in the cytosol. Our results suggest that Msp1 constantly extracts substrate TA proteins like Pex15 Δ 30 from the mitochondrial OM at the expense of ATP hydrolysis, which are primarily reinserted into the OM, but the extracted TA proteins have a small chance of reinserting in the ER membrane. The substrate TA proteins transferred to the ER are, if aberrant, ubiquitinated by the ERAD system, Doa10 and its co-factors in the ER. If TA proteins transferred to the ER by Msp1 escaped recognition by the ERAD machinery like the case of Gos1 in the absence of Get3, they may follow their inherent secretory pathways to reach their destinations. In this sense, Msp1 functions as an “extractase” that facilitates “proofreading” of the mistargeted TA proteins by promoting their transfer to the ER for further degradation or retrieval of sorting via the secretory pathway.

4. 論文, 著書など

原著論文

- S. Nakamura, A. Matsu, S. Akabane, Y. Tamura, A. Hatano, Y. Miyano, H. Omote, M. Kajikawa, K. Maenaka, Y. Moriyama, T. Endo, and T. Oka, The mitochondrial inner membrane protein LETM1 modulates cristae organization through its LETM domain. *Commun. Biol.* 3, 99 (published online, March 5, 2020).
- Y. Watanabe, Y. Tamura, C. Kakuta, S. Watanabe, and T. Endo, Structural basis for inter-organelle phospholipid transport mediated by VAT-1. *J. Biol. Chem.* 295, 3257-3268 (2020) (Online published, Jan 31, 2020).
- M. Yamamoto, S. Uji, T. Sugiyama, T. Sakamoto S. Kimura, T. Endo, and S. Nishikawa, ERdj3B-mediated quality control maintains anther development at high temperatures. *Plant Physiol.* 182, 1979-1990 (2020) .
- Y. Arais, A. Tsutsumi, J. Qiu, K. Imai, T. Shiota, J. Song, C. Lindau, L.-S. Wenz, H. Sakaue, K. Yunoki, S. Kawano, J. Suzuki, M. Wischniewski, C. Schütze, H. Ariyama, T. Ando, T. Becker, T. Lithgow, N. Wiedemann, N. Pfanner, M. Kikkawa, and T. Endo, Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. *Nature* 575, 395-401 (published online, Oct 10, 2019).
- S. Matsumoto, K. Nakatsukasa, C. Kakuta, Y. Tamura, M. Esaki, and T. Endo, Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER. *Mol. Cell* 76, 191-205 (online published, 2019 August 22).
- T.K. Sato, S. Kawano, and T. Endo, Role of the membrane potential in mitochondrial protein unfolding and import. *Sci Rep.* 9(1):7637 (2019)
- H. Sakaue, T. Shiota, N. Ishizaka, S. Kawano, Y. Tamura, K.S. Tan, K. Imai, C. Motonon, 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.* 73, 1044-1055 (2019).
- 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.* 9(1):1185 (2019)
- 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.* 26(3):518-528.e6 (2019)
- K. Sawasato, R. Sato, H. Nishikawa, N. Iimura, 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 MPIase essential for membrane protein integration *in vivo*. *Sci. Rep.* 9(1):1372 (2019)

英文総説

- T. Endo and H. Sakaue, Multifaceted roles of porin in mitochondrial protein and lipid transport. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 1269-1277 (2019)
- H. Sakaue and T. Endo, Regulation of the protein entry gate assembly by mitochondrial porin. *Curr. Genet.* 65, 1161-1163 (2019).
- 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.* 1949:57-67. (2019).
- Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo, Organelle contact zones as sites for lipid transfer. *J. Biochem.* 65(2):115-123 (2019)

日本語解説記事

- 荒磯裕平, 遠藤斗志也, ミトコンドリアタンパク質搬入ゲート TOM 複合体〜クライオ電子顕微鏡による立体構造の解明, *実験医学* 38 増刊「イメージング時代の構造生命科学」 697-700 (2020).
- 阪上春花, 遠藤斗志也, ミトコンドリアタンパク質の膜透過装置, *実験医学* 37 増刊「ミトコンドリアと疾患・老化」 1903-1908 (2019).
- 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也, オルガネラコンタクトサイトを介した脂質輸送と代謝, *実験医学* 37 増刊「ミトコンドリアと疾患・老化」 1909-1916 (2019) .

5. 学会発表など

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

Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis and maintenance: pathways and machineries, Seminar at BMC, University of Munich, University of Munich, Germany, 2019.11.23.

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.

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 は新規ダイニンタイプ AAA+である (招待講演+ポスター), 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 (招待講演), 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 (ポスター), 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.

西川周一, 鈴木千晴, 河野慎, 渡邊信久, 遠藤斗志也: 極核融合因子シロイヌナズナ Gex1 タンパク質のシステインリッチドメインの構造と機能の解析, 第 60 回日本植物生理学会年会, 名古屋, 名古屋大学, 2019.3.13-15.

Toshiya Endo: Pathways and machineries of mitochondrial protein import (招待講演), EMBO Workshop "Current Advances in Protein Translocation across Membranes", Sant Feliu de Guixols, Spain, 2019.3.23-27.

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り明らかとなったミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体の構造 (口頭+ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 ワークショップ「ミトコンドリアの機能理解におけるタンパク質科学からのアプローチ」, 神戸, 2019.6.24-6.26.

阪上春花, 塩田拓也, 石坂直也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアのポリンは外膜透過装置 TOM 複合体のアーセンブリーを制御する (口頭+ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア局在型 CDP-DAG 合成酵素 Tam41 の結晶化 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

新名真夏, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア形態維持における核膜・液胞間連携ゾーンの役割 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

後藤美稀, 遠藤斗志也, 田村康: 出芽酵母におけるミトコンドリア量を制御する因子の同定 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

松本俊介, 中務邦雄, 角田千香, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: Msp1 は, 小胞体-ミトコンドリアコンタクト部位でミスターゲットタンパク質を除去する AAA-ATPase である (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

柿元百合子, 小島理恵子, 新名真夏, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体コンタクトサイトの数を制御する分子メカニズムの解明 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

荒磯裕平, 包明久, 鈴木純子, 吉川雅英, 遠藤斗志也: Structural study of the protein translocator of the outer mitochondrial membrane complex (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: リン脂質合成・輸送阻害剤のハイスループットスクリーニング (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

植田依里, 田村康, 遠藤斗志也: Mic19 のミリストイル化モチーフによるミトコンドリア局在化機構の解析 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

田代晋也, 名黒功, 遠藤斗志也, 田村康: 哺乳類ミトコンドリア・ER 膜間コンタクト形成に関与する因子の探索 (ポスター), 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 神戸, 2019.6.24-6.26.

田代晋也, 名黒功, 遠藤斗志也, 田村康: ヒトミトコンドリア・ER 膜間コンタクト形成に関与する因子の探索 (口頭+ポスター), 第 92 回日本生化学会大会, 横浜 (パシフィコ横浜), 2019.9.18-20.

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: リン脂質合成及び輸送阻害剤の探索 (ポスター), 第 92 回日本生化学会大会, 横浜 (パシフィコ横浜), 2019.9.18-20.

荒磯裕平, 包明久, 今井賢一郎, 阪上春花, 塩田拓也, 柚木芳, 鈴木純子, 河野慎, 吉川雅英, 遠藤斗志也: クライオ電子顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリア膜透過装置の構造と機能, 第 57 回生物物理学会年会 シンポジウム「クライオ電子顕微鏡でできること, できないこと〜構造生命科学の最先端」(招待講演), 宮崎 (シーガイアコンベンションセンター), 2019.9.24-26.

Haruka Sakaue, Takuya Shiota, Naoya Ishizuka, Yasushi Tamura, Toshiya Endo: Regulation of the protein entry gate assembly by mitochondrial porin (招待講演), 第 42 回分子生物学会年会 ワークショップ「The Biology of Mitochondria-Cytosol Communications」, 福岡, 2019.12.3-6.

6. その他特記事項

1) 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-R1 年度 (5 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名: ミトコンドリアトランスロケータ 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-R1 年度 (3 年)

科学研究費補助金・若手研究

課題名: X 線結晶構造解析によるミトコンドリアトランスロケータ SAM 複合体の構造基盤

研究代表者: 竹田弘法, 取得年度: H30-R2 年度 (4 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上で起こる分解経路の生理的意義の解明

研究代表者: 篠田沙緒里, 取得年度: H31-R2 年度 (3 年)

2) 学外活動

遠藤斗志也: 日本学術会議連携会員

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

遠藤斗志也: 第 19 回日本蛋白質学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同大会 大会長

3) アウトリーチ活動

2019 年 8 月 23, 24 日 日本科学未来館サイエンストーク&オープンラボ

サイエンストーク「タンパク質とミトコンドリアの不思議な世界」(遠藤斗志也) およびラボ見学

2020 年 1 月 14 日 日本科学未来館サイエンストーク&オープンラボ

サイエンストーク「タンパク質の研究者にきいてみよう!」(竹田弘法) およびラボ見学

2020 年 2 月 2 日 日本科学未来館サイエンストーク&オープンラボ

サイエンストーク「細胞の世界を冒険しよう」(篠田沙緒里) およびラボ見学

2020 年 2 月 22 日

遠藤斗志也: ミトコンドリアって、こんなにおもしろい，京都産業大学タンパク質動態研究所講演会シリーズ「ようこそ、タンパク質の不思議な世界へ」第3回，京都（京都産業大学むすびわざ館）



R1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」(金沢)

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

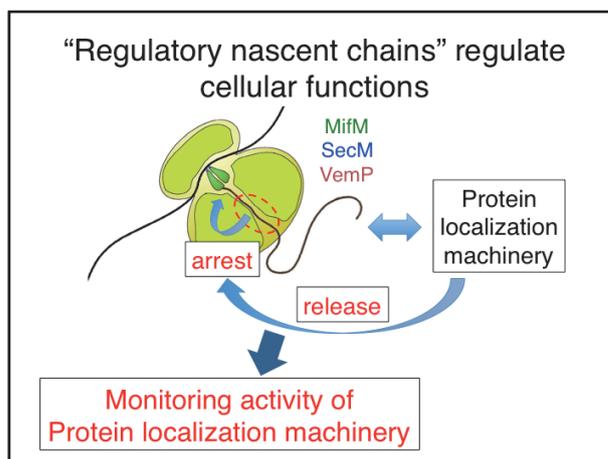
准教授 千葉 志信 Associate Prof. Shinobu Chiba, Ph.D.

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

1. 研究概要

生命活動は主にタンパク質が触媒する生化学的反応の集合体と見なすことができるが、タンパク質をはじめとする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。細胞内では、これらの因子の個々の働きが高次に連携することでひとつの生命体として組織化されている。このような生体分子の組織化を支える要素のひとつが、生体分子の合成と配置の時空間制御である。

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。また、最近、翻訳の品質管理に関する新たな研究プロジェクトも始動し、成果が得られつつある。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) フォースレポーターを用いた新生タンパク質の動的挙動の網羅的検出

枯草菌 MifM は、C 末端付近に存在するアレストモチーフを介してリボソーム成分と相互作用することで自身の翻訳伸長をアレストする。この翻訳アレストは、アレスト配列が N 末端側から引っ張られることで解除される。このアレストモチーフを、「引っ張り力レポーター」として使い、トランスポゾンを利用して様々なタンパク質の N 末端断片と融合したライブラリを作成した。その中から、アレストが解除されるものを選択することで、翻訳の途上で引っ張り力を伴う新生鎖を網羅的に探索することを試みた。その結果、膜局在や、co-translational なフォールディング、複合体形成などが引っ張り力を伴って進行すること、また、そのような動的な過程を経て多くのタンパク質が合成されることが示唆された（論文投稿中）。同様の解析を大腸菌でも進めている。

(2) 枯草菌新規リボソームレスキュー因子の同定と解析

終止コドンに欠いた異常 mRNA (non-stop mRNA) をリボソームが翻訳すると、翻訳終結が行われずに mRNA 上でリボソームが停滞する。この停滞リボソームをレスキューする主要な因子として tmRNA-SmpB 複合体が知られているが、今回我々は、枯草菌における第 2 のリボソームレスキュー因子として、BrfA を同定した。遺伝学、生化学および、Wilson 博士らとの共同研究による構造生物学的な解析から、BrfA は、翻訳終結因子 RF2 依

存的に、終止コドン非依存的な翻訳終結を促進することが示された。BrfA は、グラム陽性菌の RF 依存的リボソームレスキュー因子としての初めての報告例となった (Shimokawa-Chiba et al., Nat. Commun. 2019)。

(3) 枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC の阻害剤の探索

以前我々は、YidC 活性の阻害に呼応して LacZ 活性を上昇させる枯草菌レポーター株を作製した。この株を用い、東大創薬機構から提供された化合物ライブラリを対象に、YidC 依存的なタンパク質膜組込を阻害する低分子化合物のスクリーニングを進めてきた。YidC の活性が阻害されれば、このレポーター株の LacZ 活性が上昇することが期待されたが、今回のスクリーニングで、濃度依存的にレポーター活性を上昇させる化合物を複数得た。今後、これらの化合物が本当に YidC の活性を阻害しているのかどうかについて、他のアッセイ系を用いて検証を進める予定である。

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) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics using a transposable force reporter (*TrFR*)

The elongation arrest of MifM is force-sensitive and is canceled when the MifM nascent chain is pulled from the N-terminus. We took advantage of such a force-sensitivity to capture co-translational pulling force on nascent chains in a proteome-wide fashion. Using transposon, we constructed a gene-fusion library, in which the N-terminal regions of proteins were fused N-terminally to the arrest sequence of MifM and then screened proteins that canceled elongation arrest. We indeed identified hundreds of proteins that canceled the elongation arrest of the force reporter, most probably reflecting their abilities to initiate the maturation and/or localization process co-translationally.

2) Identification and characterization of a novel ribosome rescue factor in *B. subtilis*

Ribosome stalls on mRNA when it translate mRNA that lacks an in-frame stop codon (non-stop mRNA). Ribosome rescue factors mediate rescue of the ribosomes on the non-stop mRNA. In addition to previously-identified primary ribosome rescue factor, tmRNA-SmpB complex, we here identified BrfA as a secondary ribosome rescue factor in *B. subtilis*. We demonstrated that BrfA recruits RF2 to the stalled ribosome to facilitate a stop codon-independent translation termination on the non-stop mRNA. BrfA is the first reported example of RF-dependent ribosome rescue factor in Gram-positive bacteria.

3) Screening of chemical compound that inhibits YidC

We have previously constructed a reporter strain of *B. subtilis* that exhibits an elevated level of LacZ activity in response to dysfunction of YidC. By screening chemical compounds that elevate the reporter activity, we are searching for those that inhibit the YidC pathway of membrane protein insertion. We now identified several compounds that elevate the reporter activity in a dose-dependent manner.

4. 論文, 著書など

原著論文

Shimokawa-Chiba, N.*, Müller, C.*, Fujiwara, K., Beckert, B., Ito, K., Wilson, D. N.#, Chiba, S.# Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nat. Commun.** (2019) 10, 5397. (*: equally contributed, #: corresponding authors)

Fujiwara, K., Katagi, Y., Ito, K., Chiba, S. Proteome-wide Capture of Co-translational Protein Dynamics in *Bacillus subtilis* Using TnDR, a Transposable Protein-Dynamics Reporter. **Cell Rep.** in press

英文総説

Ito K., Shimokawa-Chiba N, Chiba S. Sec translocon has an insertase-like function in addition to polypeptide conduction through the channel. *F1000Res.* (2019) ;8:F1000 Faculty Rev-2126.

日本語解説記事

千葉志信、田口英樹 (2019) 翻訳途上で機能する新生ポリペプチド鎖. *実験医学* Vol.37, No.18 (11月号), 3048-3054.

5. 学会発表など

Keigo Fujiwara, Yutaro Katagi, Koreaki Ito, Shinobu Chiba: Studying co-translational protein dynamics using force-sensing arrest peptides, RIBOSOME 2019 meeting, 2019. 1/6-1/10, Mérida, Mexico

藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: MifM および SecM の翻訳アレストの解除を指標とした新生鎖の動的過程の系統的調査. 第 16 回 21 世紀大腸菌研究会. 2019. 5/29-5/30. 琵琶湖ホテル

Naomi Shimokawa-Chiba, Claudia Müller, Keigo Fujiwara, Bertrand Beckert, Koreaki Ito, Daniel N. Wilson, Shinobu Chiba: A release factor-dependent ribosome rescue mechanism in Gram-positive bacteria, EMBO Conference (Protein synthesis and translational control), 2019. 9/4-9/7, Heidelberg, Germany

藤原圭吾、櫻祐太郎、伊藤維昭、千葉志信: アレストペプチドによる新生鎖の動態過程の系統的調査. 令和元年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議. 2019. 9/6-9/7. 筑波

崎山歌恋、下川(千葉)直美、千葉志信: 新規翻訳アレストペプチドの変異解析. 第 92 回日本生化学会大会. 2019. 9/18-9/20, パシフィコ横浜

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信：翻訳アレストの解除を指標とした新生鎖の動的過程の系統的調査。第 92 回日本生化学会大会。2019. 9/18-9/20. パシフィコ横浜

Shinobu Chiba: A novel ribosome rescue mechanism in *Bacillus subtilis*. ウイルス・再生医科学研究所セミナー。2019. 11/ 8. 京大・ウイルス再生研

塩田成未、千葉志信：枯草菌タンパク質膜組込装置 YidC を阻害する化合物の探索。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

下川（千葉）直美、Claudia Müller、藤原圭吾、Bertrand Beckert、伊藤維昭、Daniel N. Wilson、千葉志信：枯草菌における新規リボソームレスキュー因子の同定と解析。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

崎山歌恋、下川（千葉）直美、千葉志信：細菌由来の新規翻訳アレスト因子の同定と解析。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

藤原圭吾、榎祐太郎、伊藤維昭、千葉志信：アレストペプチドをフォースセンサーとして利用した新生鎖の動的挙動の網羅的調査。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

榎祐太郎、藤原圭吾、千葉志信：翻訳アレスト因子を利用した大腸菌新生タンパク質の動的挙動の網羅的解析。第 42 回日本分子生物学会年会。2019. 12/3-12/6. 福岡国際会議場

Shinobu Chiba: Nascent polypeptide chain-mediated translation elongation arrest in bacteria. BPS2020 (64th Annual Meeting of the Biophysical Society). 2020. 2/15-2/19. San Diego, USA

6. その他特記事項

1) 外部資金

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）

科研費補助金・若手研究

課題名：翻訳と共役して起こる新生タンパク質の動的過程の系統的調査

研究代表者：藤原圭吾、取得年度：H31-R2 年（2 年）

2) 学外活動

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 2019 年 7 月 30 日-8 月 5 日



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、特に感染症因子と宿主であるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治癒する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。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。

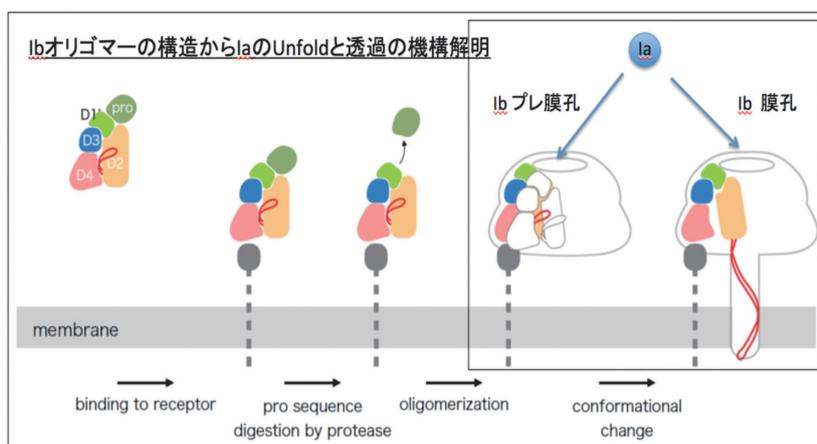
(1) 細菌タンパク質輸送装置の構造と機構の解明：*C.perfringens* が持つ二成分毒素はアクチンを ADP リボシル化する Ia とこれをエンドサイトーシスを経て細胞内へ輸送する装置 Ib からなる。この数年、クライオ電子顕微鏡により Ib の構造と機能に焦点を当てた研究を進めてきた。今年度初めて Ib 膜孔と Ia-Ib 膜孔複合体の構造を明らかにした。

(2) 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

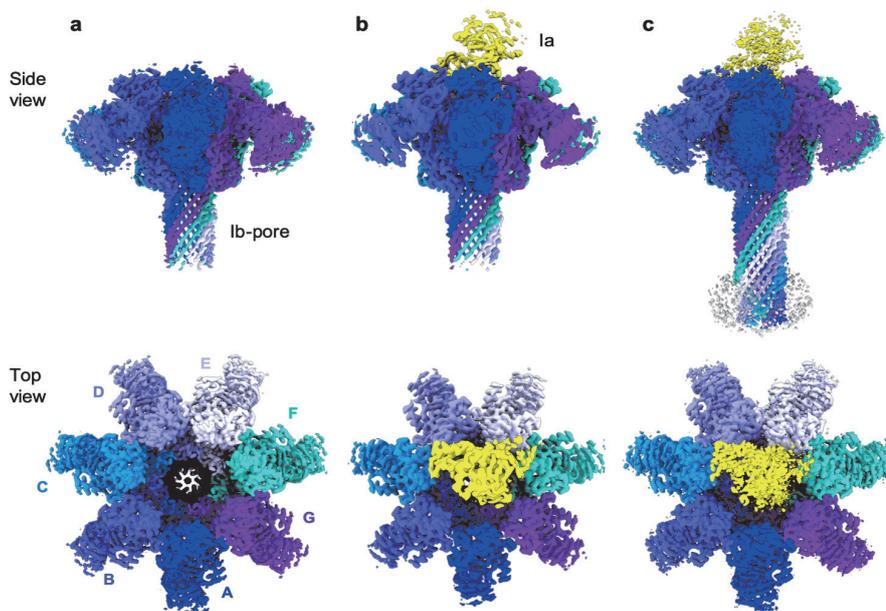
(1) 二成分毒素：Ib 膜孔と Ia 結合 Ib 膜孔のクライオ電子顕微鏡による構造決定

C.perfringens が持つ 二成分毒素はアクチンを特異的 ADP リボシル化する毒素 Ia とこれを細胞内へ輸送する装置 Ib からなる。我々は以前より二成分毒素の研究を進めており、Ia 単体および基質アクチンとの複合体の構造を X 線結晶構造解析で明らかにし、構造と機能の解析を進めてきた。二成分毒素の毒性発現機構を理解するには、Ib の研究が欠かせない。しかし、膜タンパクであることから、サンプル調整と結晶化が難しかった。このためクライオ電子顕微鏡による解析を進めてきた。サンプル精製方法の改良およびグリッドのスクリーニングを進めて、高分解能のデータ収集に成功し、その解析から Ib 膜孔の高分解能解析に成功した。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。以前の解析から、分解能は悪いが、Ib はプロ配列 (pro) を切

断すると、プレ膜孔を経由して、膜孔になることは、わかってきた。プレ膜孔から膜孔への変化は、長いベータバレルを注射針のように突き出し膜に孔をあける。この領域は疎水性のため、サンプル調整の段階で、アグリゲーションを抑える何かしらの手段が必要であった。このため我々は LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol)



(左) Ib膜孔 (中) Ia結合-Ib膜孔 (short stem) (右) Ia結合-Ib膜孔 (long stem)

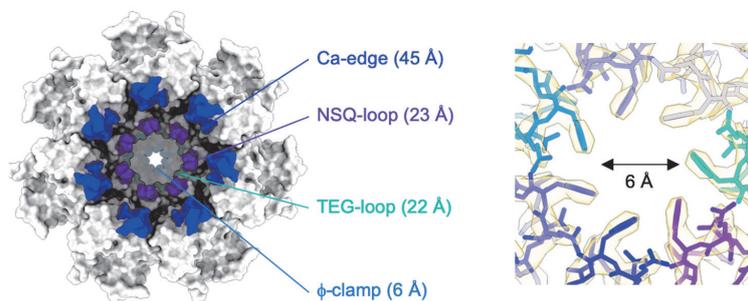
Ia 1 分子が Ib 7 量体からなる Ib 膜孔に結合する。

完全長の long stem だけでなく、膜結合への過渡的な中間体である

Ib 膜孔 (short stem) の存在が明らかになった。

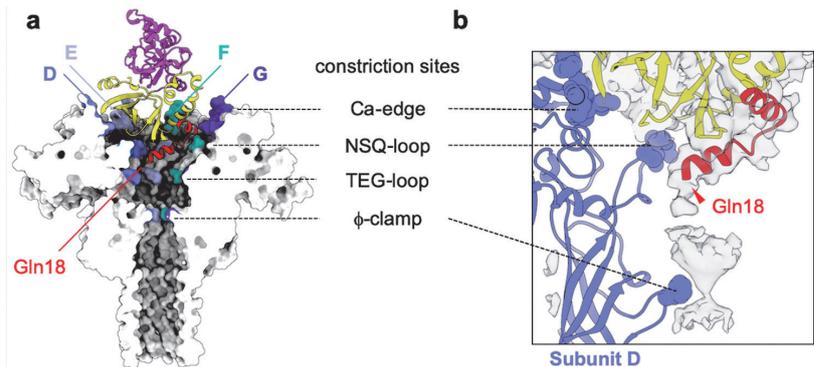
の濃度と精製の過程でいつ加えるかを詳細に検討した。さらにクライオ電子顕微鏡にのせるグリッド作成でも、この LMNG の濃度が高いとノイズとなることから、アグリゲーションを抑えつつ、ノイズとならない最適な濃度を探った。こうして見つかった、最適な条件を用いてサンプル調整とグリッド作成を行い、大阪大学・蛋白質研究所の Titan Krios を用いて撮影を行い、C7 対称性を用いて 2.9 Å 分解能での構造を得た。Ib 膜孔は 7 量体からなる。さらに Ia を通過させるために、これが結合する様子を捉えたいと考え、調整した Ib 膜孔に Ia を加えて、データを収集、C1 対称性を用いた解析を行った。クラス分けの段階でベータバレルが完全長のものと、膜挿入部がまだ組み立てられていない短いものを分けることができ、それぞれ解析を行い、2.9 Å と 2.8 Å 分解能での解析に成功した。この結果から、以下のことがわかってきた

(1) Ia は 7 量体の Ib 膜孔の一つに結合する。(2) Ia は N 末端のドメインで結合し、アクチン ADP リボシル化活性を持つ C 末端ドメインは、その上に位置する。(3) Ia の N 末端はこの結合により末端の α ヘリックスが一部解ける。(4) この Ia の N 末端の先は、Ib 膜孔の狭窄部位 (直径 6 Å) である ϕ クランプへと



Ib 膜孔は 6 Å の狭窄部位を持つ。また Ib モノマーの N 末端にあるカルシウム結合が安定な構造を作り (Ca-edge)、7 量体を形成し、ここに Ia が上から載るように結合する。

続いていた。このことから Ia の Ib 膜孔を介しての膜透過は N 末端から解けて行われると考えられる。また (5) プレ膜孔から膜孔へは、ベータバレルが完全でない、短い short stem 型が中間体として存在し、おそらく、これから完全長 (long stem 型) になることで膜への完全挿入がなされる。明らかになっている異なるグループに属する二成分毒素、炭素菌毒素との比較から Ib 膜孔の新規の特徴



Ia は Ib 膜孔に N 末端ドメインを使って結合する。この結合で N 末端の α ヘリックスが解ける。Ib 膜孔は蛋白質のアンフォールドと膜透過を担う装置であることが明らかになった。

的な、タンパク質膜輸送機構を提唱した。これらの結果を、今年 3 月、*Nature Structural & Molecular Biology* 誌へ掲載した (京都産業大学、山田 (M2)、吉田、津下と大阪大学、筑波大学の共同研究)。

(2) クロストリジウム二成分毒素の比較研究

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 (CPIL) と命名された。CPIL は CPIL-a、CPIL-b の 2 つのコンポーネントからなる binary 毒素である。前述のイオタ毒素と比較しながら CPIL-b 膜孔調整と構造解析を始めた。また人で腸炎を起こすディフィシル菌の CDT は二成分毒素であり、この比較研究も始めている。これらクロストリジウム属の二成分毒素の、タンパク質の輸送機構を明らかにする。この研究は阻害剤開発の基礎研究となる。

(3) ADP リボシル化の特異性

我々は ADP リボシル化毒素 (酵素) とその基質タンパク質の複合体の丸ごとの構造解析を進めてきた。特に Ia-アクチン複合体、C3-RhoA 複合体、ScARP-グアニン複合体の研究により、ADP リボシル化はタンパク質のアミノ酸であれ、あるいは DNA の塩基であれ同じような認識機構で、基質を認識して ADP リボシル化するという事を明らかにした。しかしながら、人 PARP (ポリ ADP リボシル化あるいはモノ ADP リボシル化) の認識機構はまだよくわかっていない。この解明のため、構造解析を進めている。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our target is macromolecular complexes, 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.

This year's accomplishments

(1) The iota toxin produced by *Clostridium perfringens* type E, is a binary toxin comprising two independent polypeptides: Ia, an ADP-ribosyltransferase, and Ib, which is involved in binding to the cell and translocation of Ia across the cell membrane. We reported the cryo-EM structures of the

translocation channel I_b-pore and its complex with I_a. The high-resolution I_b-pore structure demonstrates a similar structural framework as observed for the catalytic ϕ -clamp of the anthrax protective antigen pore. However, the I_a-bound I_b-pore structure showed a unique binding mode of I_a. One I_a binds to the I_b-pore, and the I_a N-terminal domain interacts with I_b via two other I_b-pore constriction sites via multiple weak interactions. Furthermore, I_b-binding induces I_a N-terminal α -helix tilting and partial unfolding, whereupon the unfolded N-terminus continues to the ϕ -clamp gate. This study reveals a novel mechanism of N-terminal unfolding that is crucial for protein translocation. The study was reported in *Nat Struct & Mol Biol*.

(2) Recently, 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 binary toxin consisting of two components: *C. perfringens* iota-like enterotoxin-a (CPIL_E-a), which acts as an actin ADP-ribosyltransferase, and CPIL_E-b, a membrane-binding and protein-translocation component. We are trying to reveal the structure and functions of CPIL_E-b compared with I_b-pore.

(3) We are interested in the specificity of ADP-ribosyltransferase (ART). We have revealed the complex structures of I_a-actin, C3-RhoA and ScARP-guanine for the last ten years. From these structures, we understood they all use the ARTT-loop in common. Furthermore, we consider that this is a common substrate recognition mechanism for all ARTs, all protein/amino acid-target and DNA/base-target ARTs. However, it is still an open question of the specificity of human PARPs, which belongs to a different group of ART. Thus, we are trying to reveal the structures of PARP in order to understand the specificity.

4. 論文, 著書など (2019.1~2020.3)

原著論文

Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, Tsuge H.
Translocational unfolding in clostridial binary iota toxin complex.

BioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/721969> (2020)

Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, Tsuge H.

Cryo-EM structures reveal translocational unfolding in the clostridial binary iota toxin complex.

Nat Struct & Mol Biol. 27(3):288-296. doi:10.1038/s41594-020-0388-6. (2020) (査読有り)

5. 学会発表など (2019.1~2020.3)

Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, and Tsuge H : Cryo-EM structure of clostridial binary toxin translocon I_b-pore, European Workshops on Bacterial Protein Toxins - ETOX19, Davos (Switzerland), 2019.6.22-26 (口頭発表:山田)

Monma C, Saiki D, Shimojima Y, Suzuki J, Sadamasu K, Yamada T, Tsuge H, Kamata Y: Diarrheagenic activity of each component of CPIL_E as a new enterotoxin produced by *Clostridium perfringens* isolated from foodborne outbreaks, CLOSPATH 11, Leiden (Netherlands) 2019.8.19-22

山田等仁、津下英明: ウェルシュ菌 2 成分毒素 膜孔複合体の単粒子解析、生理研研究会 クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析～みんなのクライオ電顕～、岡崎コンファレンスセンター (愛知)、2019.11.6-26-27 (口頭発表:山田)

吉田徹、津下英明: DNA を基質とする ADP リボシル基転移酵素の基質認識機構、酵素補酵素研究会、ホテルアウィーナ大阪 (大阪) , 2019.7.4-5

半田達也、津下英明: 病原菌由来モノ ADP リボシル基転移酵素の基質認識機構に関する研究, 酵素補酵素研究会、ホテルアウィーナ大阪 (大阪), 2019.7.4-5

津下英明: タンパク質膜透過チャンネルの単粒子構造解析, 第453回ビタミンB 研究協議会、パレスサイドホテル (京都) 2019.8.30-31

山田等仁、吉田徹、川本暁大、光岡薫、岩崎憲司、津下英明: Cryo-EM structure of clostridial binary toxin translocation channel Ib-pore, 第 57 回日本生物物理学会、シーガイアコンベンションセンター (宮崎)、2019.9.24-26

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ランスロコンの構造機能解析 A」研究代表者: 津下英明, 取得年度: H30-H31 年 (2 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 代議員

3) 記事掲載

Nature Research Microbiology Community

Posing just before protein translocation in bacterial binary toxin

Hideaki Tsuge

<https://naturemicrobiologycommunity.nature.com/posts/61288-posing-just-before-protein-translocation-in-bacterial-binary-toxin>



膜エネルギー代謝研究室 Laboratory of Membrane Bioenergetics

教授 横山 謙 Prof. K. Yokoyama, Ph.D.

助教 岸川淳一 Assist. Prof. J.Kishikawa, Ph.D.

1. 研究概要

生命の維持にはエネルギーが必要であり、生命がエネルギーを使いやすい形に変え、それを使う仕組みを研究するのが、生体エネルギー学 (Bioenergetics) である。生命のエネルギー通貨である ATP は、主にミトコンドリアに存在する ATP 合成酵素により作られる。作られた ATP は、生物が運動することや、生体分子の合成、分解、輸送などに使われる。たとえば、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) は、ATP を使って小胞内にイオンを輸送し、その酸性化を通して様々な生理現象を担う。V-ATPase のように、ATP を使って基質を運ぶタンパク質は輸送体と呼ばれ、その仕組みは、それぞれの輸送体の構造を明らかにすることでだいぶわかってきたが、不明な点も残っている。ちっぽけなタンパク質からなる分子機械がどうやって ATP のエネルギーを輸送や運動に変換するのかは、とても興味深い問題であり、解決すべき生命科学の課題の一つである。我々は、1 分子回転観察とクライオ電顕による構造生物学により、V-ATPase および ATP 合成酵素 FoF1 の構造機能の解明に取り組んできた。一方で、生命がエネルギーを利用する過程は、老化や老化に伴う疾病と深い関係がある。寿命を変化させる遺伝子の中には、エネルギー代謝関係の酵素が沢山あり、エネルギー摂取量そのものが寿命を決めることも報告されている。以上の背景のもと、生体エネルギー学の視点から老化・寿命・疾病の問題に取り組んでいる。

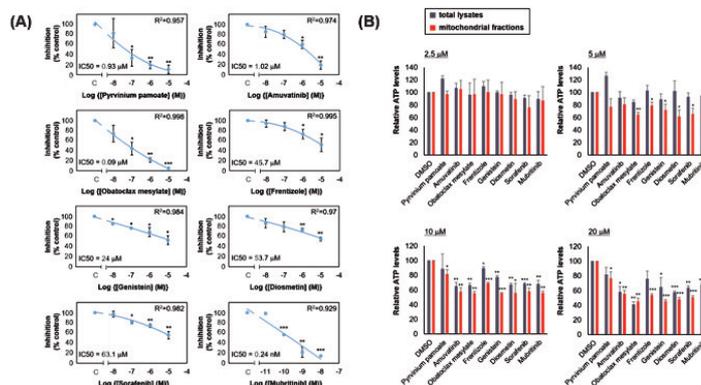
2. 本年度の研究成果

(1) V_o 部分の構造の決定

低温電子顕微鏡 (クライオ EM) による単粒子解析は、タンパク質の構造を決定する有力な方法の一つである。電子直接検出器の登場および解析手法の発展により、タンパク質分子を時には原子分解能で構造決定することが可能になった。今回、我々は、大阪大学にある自動撮影装置を備えた Titan Krios (FEI) により、V-ATPase の V_o 部分の構造を原子分解能で決定することができた。親水性である V_i 部分が脱離し、残された V_o 部分でのプロトンの漏洩がなんらかの機構で妨げられていることが予想されていた。今回の研究成果により、プロトンの漏洩阻害が、親水的な腕部分の大きな構造変化による回転阻害によって起こることが明らかになった。このような機械的な活性調節機構をタンパク質が備えているのは驚きであり、いかに精緻で精巧な仕組みでタンパク質が生命を支えているかを改めて認識できた。この成果は、2020 8月に eLife に発刊された。

(2) 麻酔作用と ATP 濃度変化の関係

ミトコンドリア呼吸鎖複合体は様々な生命活動に必要とされるアデノシン三リン酸 (ATP) を合成する重要な機能を担っているが、一方で薬理的、遺伝学的に呼吸鎖複合体の活性を下げると線虫の寿命が延びるという報告がある。そこで私達は、MASC アッセイという方法を用いて 2500 種類の既存薬の中からミトコンドリアの ATP 合成に対する阻害薬の探索を行い、それらが線虫の寿命に影響を与えるかどうか調べた。その結果、哺乳細胞において 2500 種類の既存薬の中から 8 個の ATP 合成阻害剤を見つけた (図 1A)。さらに、これら 8 個の薬剤が線虫でも ATP 量を減らすことを明らかにした (図 1B) この成果は、2020 の 8月に BBA に発刊された。



3. Research projects and annual reports

Energy is necessary to sustain life. Bioenergetics is an important scientific field, whose aim is how life changes energy into a form that is easy to use and how it is used. ATP, the energy currency of life, is synthesized by ATP synthase, which exists in mitochondria or in bacterial plasma membranes. The produced ATP is used in variety of biological processes, such as muscle contraction, the synthesis and degradation of biomolecules. For example, the vacuolar proton ATPase (V-ATPase) uses ATP to transport ions into vesicles which are responsible for various physiological phenomena through its acidification. How molecular machines made up of tiny proteins converts the energy of ATP into transport and motion is a very interesting question and one that needs to be solved in the life sciences. To understand the mechanism of these molecular machines, we need to see its movement and shape. For this purpose, we have used single-molecule rotation observation and structural biology with cryo-electron microscopy. Our final goal is to clarify and describe how living organism transform and use energy to live.

On the other hand, the process by which life utilizes energy is likely related to aging and age-related diseases. Several enzymes involved in energy metabolism are reported to be involved in life-span altering genes, and the amount of energy intake itself determines lifespan. We have started to study the relationship between the intracellular concentration of ATP, the energy currency, and lifespan using molecular imaging techniques. The results revealed a close relationship between aging, anesthetic effects, and metabolic control and ATP levels in the individual. Thus, we are addressing the issues of aging, lifespan and disease from the perspective of bioenergetics.

This year's accomplishments

1) Structure of the Vo domain of V/A-ATPase

Single particle analysis using cryo-EM is one of the most powerful methods for protein structure determination. With the advent of direct electron detectors and the development of analytical techniques, we can easily determine the structure of protein molecules, sometimes with near atomic resolution. In this study, we have determined the structure of the Vo part of V-ATPase at atomic resolution using Titan Krios (FEI), which is equipped with an automated imaging system at Osaka University. The hydrophilic V₁ part of V-ATPase has been desorbed, and the leakage of protons from the remaining Vo part of V-ATPase was expected to be somehow prevented. The results of the present study reveal that the inhibition of proton leakage is caused by a large structural change in the hydrophilic arm, which inhibits rotation. These results will be published in the next year. CryoEM structure of V type ATP synthase.

2) Relationship between anesthetic action and ATP concentration change

The mitochondrial respiratory chain complex plays an important role in the synthesis of adenosine triphosphate (ATP), which is required for various biological activities, but it has been reported that pharmacologically and genetically decreasing the activity of the mitochondrial respiratory chain complex prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Therefore, we used the MASC assay to search for inhibitors of mitochondrial ATP synthesis among 2,500 existing drugs to determine whether they affect the lifespan of *C. elegans*. As a result, we found 8 inhibitors of ATP synthesis among 2500 existing drugs in mammalian cells (Figure 1A). Furthermore, we found that these eight drugs also reduced ATP levels in *C. elegans*.

4. 論文, 著書など

原著論文

なし

英文総説

1. Nakanishi Atsuko, Kishikawa Jun-ichi, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken Cryo-EM studies of the rotary H⁺-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. (2019) Biophysics and Physicobiology 140-146

日本語解説記事

なし

5. 学会発表など

1. 古田綾、岸川淳一、中西温子、光岡薫、横山謙 “好熱菌 V/A-ATPase のヌクレオチドフリー構造の解析” 第45回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 口頭発表
2. 岸川淳一、中西温子、古田綾、加藤貴之、光岡薫、横山謙 “好熱菌 V型 ATP 合成酵素の膜内在性ドメイン Vo の構造解析” 第45回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 口頭発表
3. 三谷奈穂、中野敦樹、岸川淳一、横山謙 “キメラ軸を持つ V1-ATPase の 1 分子解析” 第45回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 ポスター発表
4. 中西温子、岸川淳一、玉腰雅忠、光岡薫、横山謙 “Single-particle analysis of lipid nanodisc-reconstituted V-ATPase from *Thermus thermophilus*” 第57回日本生物物理学会 宮崎市 9/2019
5. 岸川淳一、加藤 貴之、古田 綾、中西 温子、光岡 薫、横山 謙 V型 ATP 合成酵素の膜内在性ドメイン Vo の単粒子解析 Single particle analysis of membrane Vo domain of V type ATP synthase 蛋白質科学会年会 6/2019 神戸ポートアイランド

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究補助金 基盤研究 B

課題名：液胞型 ATPase の全体構造解明を突破口としたプロトン輸送機構の解明 研究代表者：横山 謙
取得年度 H29-31 (3年)

武田科学振興財団 特定研究助成

課題名：オルガネラと細胞間をつなぐ膜輸送を介した細胞恒常性維持機構の解明
共同研究者：横山 謙 取得年度 H30-34 (5年)

2) 学外活動

日本生物物理学会

日本生体エネルギー研究会 常任幹事

日本生化学会

日本分子生物学会

日本タンパク質科学会

3) アウトリーチ活動

なし

4) その他

1. 古田綾（修士2年生）さんが2019年12月開催の日本生体エネルギー研究会討論会で優秀発表賞を受賞
2. 科学研究補助金費審査委員として50件以上の申請書を査読
3. 論文査読2件（Science Advanced, Nature Communications）
4. 岸川淳一研究助教が大阪大学蛋白質研究所に助教として赴任した。

発生生物学研究室 Laboratory of Developmental Biology

研究員 (PI) Hisato Kondoh, Ph.D.

研究員 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。研究室としては、研究のまとめの段階にあり、研究成果の刊行に努めている。

2. 本年度の研究成果

(1) Sox2 遺伝子を、前腸の上皮に限定して欠損させると、消化器から呼吸器への転換がおきる

FoxA2-Cre を用いて、内胚葉由来の前腸上皮に限定して、マウス胚の *Sox2* 遺伝子を欠失させた。その胚では、転写因子 NKX2.1 を発現する気管・気管支の上皮の管が咽頭と胃をつなぎ、その中点から一対の気管支を生じていた。その中点と胃を繋ぐ部分の管は、第3の気管支としての性質を持っていた。上皮が作る管組織を取り囲む間充織 (SOX2 を発現しない) が、間接的に変化するかどうかを調べた。その結果、食道の間充織に特徴的な *Wnt4* の発現が失われ、呼吸器系に特徴的な *Tbx4* や *Hoxb6* が発現されていた。この結果から、食道の前駆体である前腸の上皮で転写因子 SOX2 の発現を失わせると、食道が、SOX2 の発現のない間充織を含めて、気管と気管支からなる呼吸器系の組織に変わることが明らかになった。多くの組織の発生において、間充織からのシグナルの効果によって上皮の性質が変化する例が多数知られている。しかし、本研究は、上皮の性質が間充織の性質を決定する具体例を示し、相互作用は双方向であることを明らかにした。

(2) エンハンサーD1 による、神経管と神経堤での Sox2 遺伝子の発現制御は、転写因子 SOX2 と ZIC2 の協同作用に依存している

転写因子 SOX2 は、さまざまな前駆体細胞の状態を制御しており、それらの発生段階に応じて異なったエンハンサーが *Sox2* 遺伝子を制御している。エピプラストから神経系が発生する初期段階では、頭部では N2 エンハンサーが、また体幹部から尾部にかけては N1 エンハンサーが、神経系への発生能を付与する第1段階での SOX2 発現をもたらしている。第2段階の、神経系前駆体に対応した SOX2 の発現を担うエンハンサーの1つが、D1 エンハンサーであると考えられている。D1 エンハンサーは神経堤でも活性をもち、最近注目されている神経堤での SOX2 の制御機能にも関わると予想される。そこで、D1 エンハンサーを活性化する転写因子を解析した。エンハンサーの配列への変異の導入の効果、エンハンサー配列への転写因子の結合の解析を組み合わせ、D1 エンハンサーが、SOX2 自身と ZIC2 という2つの転写因子の組み合わせで活性化されることを明らかにした。つまり、中枢神経系を特徴付ける転写制御には、SOX2 の自己活性化と、これまでも神経系の制御の中核をなすと考えられていた ZIC2 の協同作用が関わっている。

(3) エピプラスト幹細胞の集塊培養に細胞外基質を付加することによって、内胚葉を生み出す原腸陥入を模倣できる

消化管上皮等の前駆体は、転写因子 FOXA2 と SOX17 の共発現によって特徴付けられる。ES 細胞等から内胚葉の性質を持った細胞集団を生み出すことは、人為的なプロトコルによって実現可能であったが、胚発生のプロセスを再現したものではなかった。FOXA2 と共に EGFP を発現するエピプラスト幹細胞を用いて、次の培養操作を行った。エピプラスト幹細胞を浮遊集塊培養して、体細胞への発生の準備段階にシフトした上で、それを細胞外基質 (特に Laminin) に富んだ Matrigel の中で培養した。その条件下で、エピプラスト幹細胞は原腸陥入

と類似の変化を示した。まず、SOX17 を発現するが E-cadherin の発現を失った細胞が、Matrigel が占める空間に移動した。原腸陥入の模倣である。次いで、その集団は SOX17 と E-cadherin を共発現する、私塾した内胚葉の管に発生した。エピプラスト幹細胞から出発するこの培養操作を用いて、内胚葉の発生過程を、in vitro で研究できる。以上の過程で、SOX17 発現細胞は GATA4 発現細胞（心筋前駆体）の一部から派生した。これらの細胞系列の発生過程での関係が示唆された。

(4) ヘッジホッグシグナルが欠損した鳥類胚では、口腔外胚葉から異所的な下垂体原基を発生し、それらが更に異所的な水晶体を生む

SOX2 と PAX6 の転写因子ペアは、水晶体発生第 1 段階で作用する。これらの転写因子の発現があれば、水晶体以外の組織であっても、条件が整えば水晶体に発生する可能性がある。口腔外胚葉の最後端に発生する下垂体原基（ラトケ嚢）は、SOX2 と PAX6 のペアを発現する胚組織の例である。ヘッジホッグシグナルが欠損した変異体 (*Talpid*) ウズラの胚の頭部を調べると、口腔外胚葉近辺で小さな水晶体が発生することがわかったので、その詳細を検討した。*Talpid* 変異体では、ラトケ嚢以外の場所で、口腔外胚葉由来の異所的な下垂体原基（転写因子 LHX3 を発現）を生じていた。*Talpid* 変異体では、しかし、それらの下垂体原基での LHX3 の発現は維持されず、その代わりに水晶体発生第 2 段階で作用する転写因子 PROX1 が発現されて水晶体に変化することが明らかになった。したがって、ヘッジホッグシグナルは、下垂体原基の発生において、2 つの制御機能を持つ。まず、異所的な原基の発生を抑制すること、第 2 に、原基の LHX3 の発現を維持することである。

3. Research projects and annual reports

We have investigated how transcription factors (TFs) regulate developmental processes under the influence of the inflow of various external signals involving cell-cell or cell-substrate interactions. Our group is in the concluding phase, and publications of our achievements are underway.

This year's accomplishments

1) The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components. (doi:10.1242/bio.048728).

In the anterior foregut (AFG) of mouse embryos, the transcription factor SOX2 is expressed in the epithelia of the esophagus and proximal branches of respiratory organs comprising the trachea and bronchi, whereas NKX2.1 is expressed only in the epithelia of respiratory organs. We produced mouse embryos with AFG-specific SOX2 deficiency. In the absence of SOX2 expression, a single NKX2.1-expressing epithelial tube connected the pharynx and the stomach, and a pair of bronchi developed in the middle of the tube. Expression patterns of NKX2.1 and SOX9 revealed that the anterior and posterior halves of SOX2-deficient AFG epithelial tubes assumed the characteristics of the trachea and bronchus, respectively. In addition, we found that mesenchymal tissues surrounding the SOX2-deficient NKX2.1-expressing epithelial tube changed to those surrounding the trachea and bronchi in the anterior and posterior halves, as indicated by the arrangement of smooth muscle cells and SOX9-expressing cells and by the expression of *Wnt4* (esophagus specific), *Tbx4*

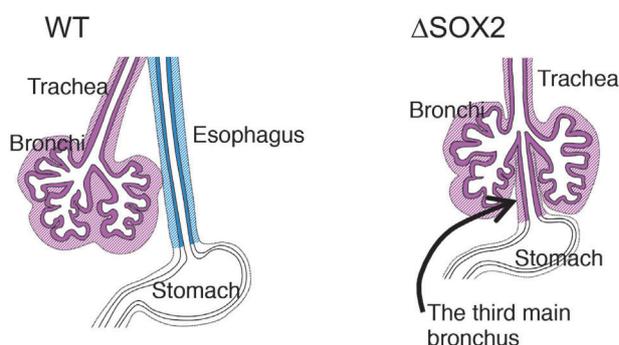


Figure 1. The loss of SOX2 in the epithelial tissues alters the esophageal characters of the anterior foregut into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components.

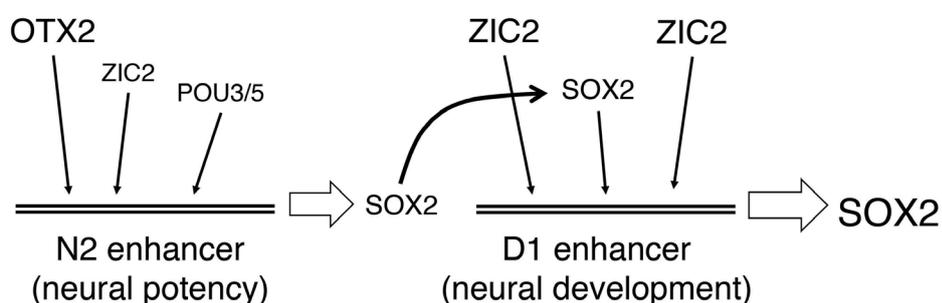
(respiratory organ specific), and *Hoxb6* (distal bronchus specific). The impact of mesenchyme-derived signaling on the early stage of AFG epithelial specification has been indicated. Our study demonstrated an opposite trend where epithelial tissue specification causes concordant changes in mesenchymal tissues, indicating a reciprocity of epithelial-mesenchymal interactions.

2) *Sox2* gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2. (doi: 10.1111/gtc.12753).

The transcription factor (TF) SOX2 regulates various stem cells and tissue progenitors via functional interactions with cell type-specific partner TFs that co-bind to enhancer sequences. In order to characterize the partner TFs of SOX2 in neural progenitors, we investigated the regulation of the D1 enhancer of the *Sox2* gene, which is activated in the embryonic neural tube (NT) and neural crest (NC), using chicken embryo electroporation. We determined SOX2 and ZIC2 as the major D1 enhancer-activating TFs. Binding of these TFs to the D1 enhancer sequence was confirmed by chromatin immunoprecipitation analysis. The combination of SOX2 and ZIC2 TFs activated the enhancer in both the NT and NC. These results indicate that SOX2 and ZIC2, which have been known to play major regulatory roles in neural progenitors, do functionally cooperate. In addition, the recently demonstrated SOX2 expression during the NC development is accounted for at least partly by the D1 enhancer activity.

Figure 2

Sox2 gene enhancers regulating different stages of neural development

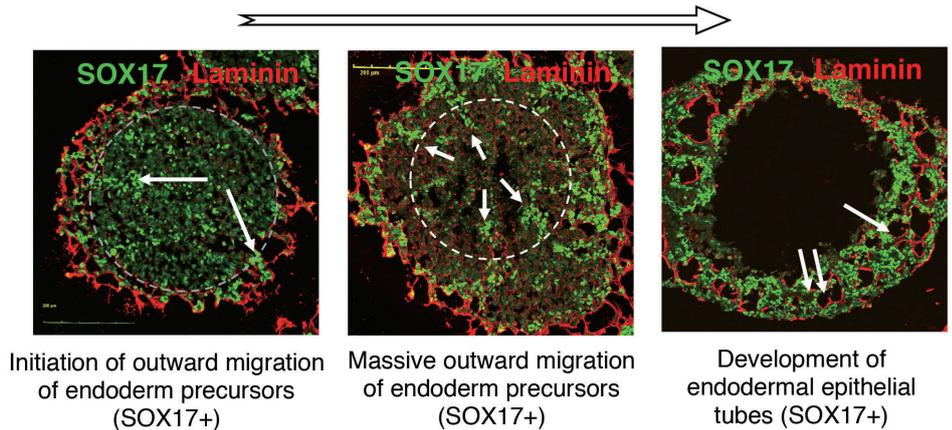


3) Modeling early stages of endoderm development in epiblast stem cell aggregates with supply of extracellular matrices. (doi: 10.1111/dgd.12663).

Endoderm precursors expressing *FoxA2* and *Sox17* develop from the epiblast through the gastrulation process. To investigate this process, we established an EpiSC line i22, in which enhanced green fluorescent protein is coexpressed with *Foxa2*. Culturing i22 EpiSCs as aggregates for a few days was sufficient to initiate *Foxa2* expression, and further culturing of the aggregates in Matrigel promoted the sequential activation of transcription factor genes involved in endoderm precursor development, e.g., *Eomes*, *Gsc*, and *Sox17*. In aggregation culture of i22 cells for 3 days, all cells expressed POU5F1, SOX2, and E-cadherin, whereas expression of GATA4 and SOX17 was also activated moderately in dispersed cells, suggesting priming of these cells to endodermal development. Embedding the aggregates in Matrigel for further 3 days elicited migration of the cells into the lumen of laminin-rich matrices, in which FOXA2 and SOX17 were expressed at a high level with the concomitant loss of E-cadherin. Prolonged culturing of the aggregates generated three segregating cell populations found in post-gastrulation stage embryos: (1) definitive endoderm co-expressing high

SOX17, GATA4, and E-cadherin, (2) mesodermal cells expressing a low level of GATA4 and lacking E-cadherin, and (3) primed epiblast cells expressing POU5F1, SOX2 without E-cadherin. Thus, aggregation of EpiSCs followed by embedding of aggregates in the laminin-rich matrix models the gastrulation-dependent endoderm precursor development.

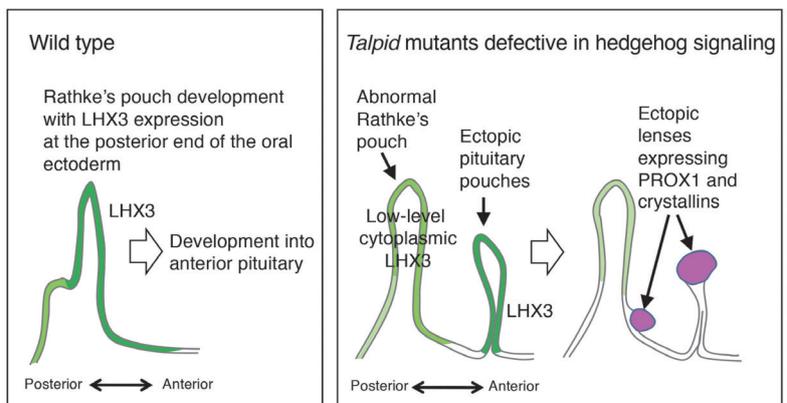
Figure 3
In vitro model of endoderm-producing gastrulation



4) The formation of multiple pituitary pouches from the oral ectoderm causes ectopic lens development in hedgehog signaling-defective avian embryos (doi: 10.1002/dvdy.222)

Hedgehog signaling has various regulatory functions in tissue morphogenesis and differentiation. To investigate its involvement in anterior pituitary precursor development and the lens precursor potential for anterior pituitary precursors, we investigated *Talpid* mutant Japanese quail embryos, in which hedgehog signaling is defective. *Talpid* mutants develop multiple pituitary precursor-like pouches from the oral ectoderm (OE). The ectopic pituitary pouches initially expressed the pituitary-associated transcription factor (TF) LHX3 similarly to Rathke's pouch, the genuine pituitary precursor. The pouches coexpressed the TFs SOX2 and PAX6, a signature of lens developmental potential. Most *Talpid* mutant pituitary pouches downregulated LHX3 expression and activated the lens-essential TF PROX1, leading to the development of small lens tissues. We concluded that hedgehog signaling in normal embryos regulates the development of Rathke's pouch in two steps. First, by confining Rathke's pouch development in a low hedgehog signaling region of the OE. Second, by sustaining LHX3 activity to promote anterior pituitary development, while inhibiting ectopic lens development.

Figure 4



development of small lens tissues. We concluded that hedgehog signaling in normal embryos regulates the development of Rathke's pouch in two steps. First, by confining Rathke's pouch development in a low hedgehog signaling region of the OE. Second, by sustaining LHX3 activity to promote anterior pituitary development, while inhibiting ectopic lens development.

4. 論文, 著書など

原著論文

Teramoto M, Sugawara R, Minegishi K, et al. The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components. *Biol Open*. 2020;9(2):bio048728. doi:10.1242/bio.048728

Iida H, Furukawa Y, Teramoto M, et al. Sox2 gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2. *Genes Cells*. 2020;25(4):242-256. doi:10.1111/gtc.12753

Inamori S, Fujii M, Satake S, et al. Modeling early stages of endoderm development in epiblast stem cell aggregates with supply of extracellular matrices. *Dev Growth Differ*. 2020;62(4):243-259. doi:10.1111/dgd.12663

5. 学会発表など

Hideaki Iida, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh. "Possible Sox2 autoregulation involving POU partner factors in the establishment of embryonic neural primordia." 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists in conjunction with Asia-Pacific Developmental Biology Network. May 2019, Osaka.

Machiko Teramoto, Ryo Sugawara, Atsushi Kuroiwa, Yasuo Ishii, Hisato Kondoh. Endodermal SOX2 expression determines the esophagus character of the anterior foregut in both epithelial and mesenchymal components." 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists in conjunction with Asia-Pacific Developmental Biology Network. May 2019, Osaka.

Hisato Kondoh, Koya Yoshihi, Hideaki Iida, Machiko Teramoto, Kagayaki Kato. "A new fate map and anterior mesendoderm-dependent regulation of brain precursor development determined via live imaging of avian embryos." 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists in conjunction with Asia-Pacific Developmental Biology Network. May 2019, Osaka.

Hisato Kondoh. "Changing SOX partners during the developmental progression of stem cells." Vth International SOX Research Conference. Sept-Oct, 2019, L'Isle-sur-la-Sorgue, France.

渡邊優作, 中村香絵, 三上智之, 近藤寿人 「光褪色後蛍光回復法 (FRAP) による神経幹細胞内の SOX2 のパートナー転写因子との相互作用の解析」 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

飯田 英明, 内川 昌則, 近藤 寿人 「単一エンハンサー内での SOX2-ZIC2、SOX2-PAX3 の 2 つの転写因子相互作用によって、Sox2 遺伝子が神経系と神経堤で活性化される」 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

Mai Fujii, Sachiko Inamori, Machiko Teramoto, Hideaki Iida, Hisato Kondoh "Modeling node-proximal gastrulation in epiblast stem cells." 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

寺元 万智子, 菅原 諒, 黒岩 厚, 石井 泰雄, 近藤 寿人 「食道上皮での SOX2 発現が失われると、上皮だけでなく間充織までも気管と気管支に変わる」 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

Hisato Kondoh, Koya Yoshihi, Machiko Teramoto, Hideaki Iida, Kagayaki Kato. "A new live imaging technique of avian embryos determining a revised fate map and mesendoderm-dependent gathering of brain precursors." 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

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(B) 課題名：体細胞系列の選択的な発生をもたらすエピブ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：2017-2020 年度（4 年）

科学研究費補助金 若手研究者 課題名：内胚葉から食道領域が間充織とともに作り出される機構 研究代表者：寺元万智子、取得年度：2019-2020 年度（2 年）

2) 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

JST さきがけ「多細胞」領域 アドバイザー

JT 生命誌研究館顧問

International SOX Research Conference Steering Board

2019年度セミナー開催

開催日	演者	演題	世話人
2019.3.13	平田 普三 (青山学院大学 理工学部)	動物の行動変化のメカニズム	永田和宏
2019.05.08	中野 沙緒里 (京都産業大学 生命科学部)	オートファゴソームの静電的成熟	遠藤斗志也
2019.06.21	Michael P. Rout (Rockefeller University, USA)	A Hole New View : Structure-Function Mapping of the Nuclear Pore Complex	遠藤斗志也
2019.06.27	Jodi Nunnari (University of California, Davis, USA)	Mitochondrial Behavior	遠藤斗志也
2019.08.07	Niwa Rosen, Maho (University of California, USA)	Novel Activation of ATF6, a Major Arm of the Unfolded Protein Response pathway by Specific Sphingolipids	永田和宏
2019.11.29	高田 啓 (Umea University, Sweden)	翻訳装置をターゲットとする抗生物質からいかにしてバクテリアは生き残るのか？	千葉志信
2020.03.02	Richard I Morimoto (Northwestern University, USA)	Cell Stress Responses, Proteome Health and Cell Stress Responses, Proteome Health and Organismal Proteostasis	永田和宏

2019年度プレスリリース

田村康准教授 (山形大学), 瀬崎博美教授 (米国ジョーンズホプキンス大学), 遠藤斗志也教授 (京都産業大学) ミトコンドリアのクリステを作る仕組みの一端を解明〜クリステ形成におけるリン脂質輸送の重要性を発見〜		
2019.01.31	インターネット記事	Sankei Biz、ZDNet Japan ほか

タンパク質動態研究所の永田和宏所長、森戸大介主任研究員 (現・昭和大学医学部講師) もやもや病の責任遺伝子が脂肪代謝の制御因子であることを発見		
2019.02.01	新聞	京都新聞 朝刊
2019.02.07	新聞	毎日新聞 朝刊
2019.02.09	新聞	朝日新聞 朝刊
2019.02.15	新聞	科学新聞 朝刊
2019.03.15	新聞	読売新聞 朝刊

阪上春花 研究員, 遠藤斗志也教授 (京都産業大学) ミトコンドリアのポリンがミトコンドリアタンパク質搬入装置の集合を制御することを発見		
2019.2.22	新聞	科学新聞

植田依里 大学院生 (名古屋大学), 遠藤斗志也教授 (京都産業大学) 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を発見		
2019.03.15	インターネット記事	毎日新聞、exciteニュース、ZDNet Japan ほか

津下英明 (京都産業大学) クライオ電子顕微鏡により細菌毒素タンパク質の膜透過機構の一端を解明		
2019.03.19	新聞	日経産業新聞

河野慎 助教, 遠藤斗志也教授 (京都産業大学) ミトコンドリアにおける膜電位の定説を覆す役割を解明		
2019.07.02	インターネット記事	exciteニュース、ZDNet Japan ほか

松本俊介 研究員, 遠藤斗志也教授 (京都産業大学) タンパク質の細胞内輸送の校正システムを発見		
2019.08.22	新聞	京都新聞 朝刊

荒磯裕平 研究員, 遠藤斗志也教授 (京都産業大学) ミトコンドリアへのタンパク質搬入口TOM複合体の精密構造と働く仕組みを解明		
2019.10.12	新聞	京都新聞 朝刊
2019.11.05	新聞	日経産業新聞

生命科学者・歌人の功績が評価、タンパク質動態研究所所長・生命科学部 永田 和宏 教授が瑞宝中綬章を受章		
2019.11.03	新聞	朝日新聞 朝刊
2019.11.03	新聞	読売新聞 朝刊
2019.11.03	新聞	毎日新聞 朝刊
2019.11.03	新聞	産経新聞 朝刊
2019.11.03	新聞	京都新聞 朝刊

千葉志信 (京都産業大学) タンパク質合成の異常から細胞を救う新たなタンパク質を発見		
2019.12.02	インターネット記事	沖縄タイムズ、SankeiBiz、exciteニュースほか

遠藤斗志也教授 (京都産業大学) オルガネラ (細胞内器官) 間のリン脂質輸送に係るヒトのタンパク質「VAT-1」の構造を決定し、その働きを解明		
2020.03.09	インターネット記事	exciteニュース、CNET Japan、沖縄タイムズほか

京都産業大学タンパク質動態研究所年報

2019 年号

〔非売品〕

令和3年 1月 19日 印刷

令和3年 1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

遠藤斗志也

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

