

# 年報 タンパク質動態研究所

Annual Reports 2020  
Institute for Protein Dynamics  
Kyoto Sangyo University

巻頭言（遠藤斗志也） . . . 1

## 特別企画

- 「転写因子が複合体となって初めて見せる、  
DNA結合特異性と転写制御活性」（近藤寿人） . . . 3
- 「新型コロナウイルスが照らし出すことを学ぶ」（伊藤維昭） . . . 8
- 「その後」（吉田賢右） . . . 11
- 「新型コロナウイルスのスパイク蛋白質と  
感染増強に関わる抗体の複合体構造解析」（岸川淳一） . . . 17

## 研究所の活動

- 生物化学研究室（遠藤斗志也） . . . 20
- 分子細胞生物学研究室（潮田亮） . . . 25
- タンパク質バイオジェネシス研究室（千葉志信） . . . 29
- タンパク質構造生物学研究室（津下英明） . . . 32
- 膜エネルギー代謝研究室（横山謙） . . . 36
- 発生生物学研究室（近藤寿人） . . . 39

プレスリリース . . . 43

2020年度

# 京都産業大学 タンパク質動態研究所

## 所員



遠藤 斗志也 (所長)



潮田 亮



千葉 志信



津下 英明



横山 謙



近藤 寿人

## 招聘教授



森 和俊  
京都大学



嶋田 一夫  
理化学研究所



Dr. Richard I.  
Morimoto  
Northwestern  
University (USA)



Dr. F. Ulrich Hartl  
Max Planck Institute  
(GER)



Dr. Nikolaus  
Pfanner  
University of Freiburg  
(GER)

## 巻頭言「幼年期の終わり」

タンパク質動態研究所所長 遠藤斗志也

アーサー・C・クラークの「(地球) 幼年期の終わり」は、人類を圧倒的に凌駕する知的生命との出会いを描いた SF の古典的名作だ。「上主 (Overlord)」と呼ばれる彼らの出現により、地球上から無智、疾病、貧困、恐怖は事実上姿を消し、人類ははじめてほぼ完全な状態で安全と平和と繁栄を手に入れる。圧倒的な力を持つ彼らの前では国家間の戦争は無意味であり、困っている人間がなくなれば、物を盗む意味もなくなる。潜在的に犯罪者の素質を持っている人間も上主の監視から逃れることができないことを皆が知っている。誰もが好きな職業に就き、労働時間は短くなり、あまった余暇では好きなだけ教育を受けられる。

ただ、この与えられた微温的な至福の世界は、ある種の喪失感を伴っている。あらゆる葛藤、闘争が消滅したことで、優れた創作芸術は途絶えてしまう。さらに科学も斜陽を迎える。「好奇心は残っている。好奇心にふける余暇もある。だが基礎科学の研究に捧げる情熱がなくなったのである。上主たちが何時代も前に発見してしまった秘密をさぐるために一生をついやすなど、むなしく思えるだけだった。」

そう、これはもはや遠い未来の話ではない。既に現実が起こりつつあることなのかもしれない。ただし「上主」は遠い宇宙から来た知的生命ではなく、AI である。

ご存じのように 7 月に生命科学分野に激震が走った。かつて AI を使った囲碁プログラム AlphaGo をつくって囲碁の世界チャンピオンを打ち負かしてしまった Google 傘下の英国 DeepMind 社が、今度は AI を使ってきわめて精度の高いタンパク質の立体構造予測プログラム「AlphaFold2」を作ってしまったのである。ほぼ同時期に米国の David Baker らのグループも同様のプログラムを発表した。DeepMind 社はソースコードを公開して誰でも「AlphaFold2」を利用できるようにしただけでなく、簡易版を web 上に公開し、アミノ酸配列を投げれば 20 分とかで立体構造の原子座標が返ってくるようになった。すでにデータベース上にはヒト、酵母、ショウジョウバエ、シロイヌナズナ、大腸菌などモデル生物の予測構造が 7 月末の時点で 35 万種類も登録され、誰でも閲覧することができる。このあたりのことは、本年報でもすでに吉田さんと岸川さんが書かれている。

それにしても、AI がこんな短期間で生命科学最大の難問といってもいい、タンパク質の立体構造予測問題を解決してしまうとは思わなかった。プロテインデータバンクには X 線、NMR、クライオ電顕等で決定された 18 万を越えるタンパク質の立体構造が登録されているが、それでもそれが AI のトレーニングデータとして十分だとは思いつかなかった。そこで思い出されるのは、かつてこの国で動いていた「タンパク 3000」なる総額 500 億円以上が費やされた大型プロジェクトのことである (2002~2006)。タンパク質の折れたたみパターン (フォールド) 数は限られている (Cyrus Chothia により 1000 種類程度と予想された) ので、1 万~1 万 2 千種類のファミリーを代表するタンパク

質の構造を決定すればすべてのタンパク質の立体構造を推定できるということで、わが国はその 1/3 にあたる 3000 種類のタンパク質の立体構造決定をめざすという触れ込みであった (米国でも同様のプロジェクトが走っていた)。そして実際に 2700 種類以上のタンパク質の立体構造が決定され、そのうち 900 以上は新規構造 (既知の構造と 30% 以下の相同性) であった。一方でプロジェクト自体が立体構造決定の数値目標を設定していたことから、構造決定されたタンパク質には機能不明のタンパク質が数多く含まれていたし、各国のプロジェクトが終了しても結局新規にタンパク質の立体構造を高い精度で予測することはできなかった。しかし、このとき決定された数多くの新規構造が今回の AlphaFold2 のトレーニングデータに役立ったことは、疑う余地がない。タンパク 3000 の成果は、終了後 15 年を経てプロジェクト自体が皆の記憶の彼方に遠のいたころ、AlphaFold2 という形で実を結んだということだろうか。

短期的には、AlphaFold2 は構造生物学の研究者に恩恵をもたらすだろう。少なくとも正解に近い構造があるわけだから、クライオ電顕の単粒子解析における粒子画像の分類、X 線構造解析における位相決定のための分子置換法、結晶化しやすいコンストラクト作成などを助け、構造決定の効率をあげるだろう。それ以上にメリットがあるのは、一般の生命科学研究者だ。これまでのように構造を手にした一部の研究者のみが、機能研究の美味しいところを独占してしまうということはなくなる。精度の高い予測構造に基づいて、ただちに変異体解析や機能解析ができるようになる。貴重なタンパク質の構造情報を一般の生命学者に広く開放することにより、真の意味で構造情報入手の格差がなくなる。

一方、中長期的な展望は、問題をはらむ。現時点での AlphaFold2 の構造予測には苦手なものがいろいろあるようだが、そうした問題は早晚解決できそうな気がする。タンパク質複合体、タンパク質と核酸や小分子との複合体の予測やサーチも時間の問題だろう。吉田さんが書かれている、立体構造からのアミノ酸配列の予測 (真の意味でのプロテインデザイン) も、AI が予測と逆予測を繰り返していけば、正しい答えに到達してしまいそう。そうなったときに、構造生物学はどこに向かうのだろうか。現在の構造生物学研究は時間も労力もコストもかかりすぎる。AI があつという間に立体構造をかなりの精度で予測できるようになったら、膨大な時間と労力とコストをかけて精密な立体構造を決める意義があるタンパク質のターゲットはかなり限られてくるはずだ。囲碁や将棋の世界では、AI が人間に勝ったところでリーグ戦には参加できないわけで、むしろ人間が AI を使ってトレーニングすれば良いという棲み分けができたが、生命科学の世界ではそうはいかない。Science 誌も「In the short term, it will boost structure determination efforts, . . . And over time it will also slowly replace experimental structural determination efforts」と書いている。

「地球幼年期の終わり」には続きがある。上主の目的は単に人類にユートピアを与えることではなかった。上主のさらに上の存在である「主上心 (Overmind)」は、人類の子供たちを自分たちと一体化させた存在に進化させる、「トータルブレイクスルー」を目指していた。進化する人類=子供たちの世代は、これまでの人類=親たちの世代とは全く異質の存在であり、両者は希望や求

めるものを分かち合うことはできない。これまでの人類=親たちの世代は、そして地球という存在そのものが終焉を迎えていく。AIとともに歩いていくことが具体的に見えてきた生命科学の、そして私たちの未来には、そのような終焉が来ないことを望むのだが・・・。

\* \* \* \* \*

2020 年度はコロナの影響で、本研究所としてのアウトリーチ活動はできず、学生の入構制限により、研究に少なからず遅れも生じました。そんな中で、今回は研究所の活動報告に加えて、2020 年度でオフィシャルに本研究所を去られた近藤寿人さん、本研究所 OB の伊藤維昭さん、吉田賢右さん、そして本研究所から大阪大学に転出された若手の岸川淳一さんに、ご自身の研究のこと、あるいはサイエンスに関連して思うこと、などの文章をお寄せいただきました（ご寄稿ありがとうございました）。コロナからプラズモン共鳴、クライオ電顕、AlphaFold2 まで興味深いトピック満載で、インスパイアされるところの多い研究紹介やエッセイかと思います。お楽しみいただければと思います。

(2021.8.13)

# 転写因子が複合体となって初めて見せる、DNA 結合特異性と転写制御活性

近藤寿人

私が京都産業大学に赴任してからの7年間は、発生の多様な制御プロセスを研究テーマとして掲げており、タンパク質動態研究所でのテーマもそれに沿ったものであった。これらの研究の基盤は、タンパク質としての転写因子による転写制御にあったが、それをあまり表立ずに研究を進めてきたので、この機会に、ハードコアの転写因子研究の一例を紹介したい。盟友である蒲池雄介氏（現 高知工業大学教授）との二人三脚の研究の歩みである。これから述べる、エンハンサーの制御から転写制御の実体を明らかにしてゆくという研究の歩みは、世界の同時代の研究の発展にも貢献したと思う。

$\delta$ -クリスタリン遺伝子は、眼の水晶体の発現が始まる早い時期から発現される、鳥類にはあるが哺乳類にはない遺伝子である。この遺伝子を活性化（転写させる）機構が明らかになれば、水晶体を発生させる最初のステップの制御が明らかになるだろうという期待を持って研究を始めた。私が1983年に発表した研究[1]では、このニワトリの遺伝子をマウスの細胞に導入（マイクロインジェクションによる）すると、水晶体特異的に発現されることを報告した。この遺伝子を導入されたマウスの様々な培養細胞の中で、水晶体細胞だけが  $\delta$ -クリスタリンを強く発現した。その後、 $\delta$ -クリスタリン遺伝子の第3イントロンに水晶体特異性を決めるエンハンサーがあることを同定し[2]（用語解説 1）、そのエンハンサーの DNA 配列が、水晶体特異性を規定する領域と、非特異的にエンハンサー活性を上げる領域とに分別されること[3]、水晶体特異性を規定する領域は、DC5 と名付けた 50 塩基の配列にまで狭められ、DC5 の塩基配列に2つの転写因子が結合して初めてエンハンサーが活性化されること[4]を示した。ここまでは、紆余曲折は常につきものとは言え比較的堅実に研究を進めることができた。[惜しむらくは、論文[3]で、 $\delta$ -クリスタリンのエンハンサーの活性が、非特異的な SV40 エンハンサーの共導入(co-microinjection)によって競合されることから、エンハンサーの作用の共通因子（今でいう coactivators）の存在を予見し主張したのだが、時期尚早で、世には受け入れられなかった]。しかしいずれにせよ、これらは準備段階の作業である。目指していたのはその2つの転写因子は何であって、それらの結合によってどのようにして転写の活性化が起きるのかという課題である。

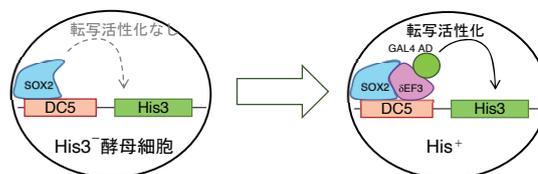
DC5 配列の5'側に結合する転写因子は、Southwestern 法（用語解説 2）でクローニングすることができた。その頃、哺乳類の雄の性決定をする SRY という転写因子と似た DNA 結合ドメインを持つ転写因子が遺伝子ファミリーを作ることが明らかになり、それらを SOX 因子群と呼ぶことになった。Mouse Molecular Genetics 学術集会で知り合った MRC の Robin Lovell-Badge がマウスの SOX 転写因子群（SOX ファミリー）の配列を分類していたので、それと比較すると、私たちが見つけた DC5 結合タンパク質がニワトリの SOX2 であることはすぐに

判った。彼と共著で発表した論文[5]は、SOX 転写因子が制御する遺伝子を具体的に、水晶体を例として初めて示したものであった。

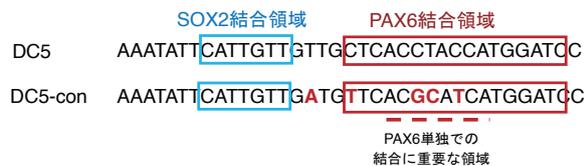
しかし、SOX2 の下流側に結合する転写因子（仮称  $\delta$ EF3: これは SOX2 を持つ水晶体核抽出液を用いた EMSA では確認できていた；用語解説 3）が何であるのかは、なかなか分からなかった。Southwestern 法の条件を変えるなど手を替え品を変えてみたが、なかなか捕まらない。この状況から、 $\delta$ EF3 は隣に SOX2 が結合しなければ DNA に結合しないのかもしれないと考え、酵母細胞に DC5 を制御配列として持つ His3 遺伝子を準備するとともに、その酵母細胞でニワトリ SOX2 を発現しておき、C-末端側に酵母で活性を持つ GAL4 の活性化ドメインが付加されるように仕組んだ cDNA ライブラリーをタンパク質として発現させる方法を使った（図 A）。これは当時、タンパク質複合体の構成成分をクローニングするために広く用いられていた two-hybrid 法（用語解説 4）に似ていたので、1.5 hybrid と研究室では呼んでいた。

この 1.5 hybrid 法は成功で、21 世紀を迎えた頃に  $\delta$ EF3 が PAX6 であることが明らかになった[6]。つまり、SOX2 と PAX6 が複合体を作ってエンハンサーとしての DC5 を活性化し、その結果として  $\delta$ -クリスタリン遺伝子を発現させるのである。ES 細胞やそのプロトタイプであるテラトカルシノーマ細胞で発現される Fgf4 遺伝子も、SOX2 単独ではなく SOX2 と POU5F1(OCT3, OCT4 とも呼ばれる)とが作る複合体によって活性化されることが明らかになっていた。さらに、当時発表されていた SOX 因子が関わる制御の data を分析して次の結論に至った。SOX ファミリーの転写因子単独ではエンハンサーや遺伝

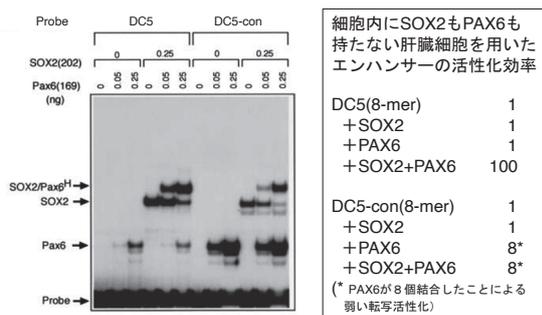
## A 1.5 hybrid screeningによる、 $\delta$ EF3 = PAX6の同定



**B DC5 と DC5-con (PAX6結合配列をconsensusに変更)の塩基配列の比較**



**C PAX6のDC5 への結合が SOX2との共結合に依存することを示すEMSAの結果。DC5-conの場合と比較した。**



子を活性化することはなく、もう一つのパートナー因子との複合体を作って (パートナーが自己である場合は homodimer を形成して) 初めて、転写制御能を発揮できる。また、組み合わせられるパートナー因子によって制御標的遺伝子が決まる (パートナー因子が PAX6 であれば、クリスタリン遺伝子など視覚系の遺伝子; パートナーが POU5F1 であれば Fgf4 遺伝子など ES 細胞の特性に関与する遺伝子)。この制御標的遺伝子を選別する機構を、"SOX-partner code" と呼んで 2000 年に Trends in Genetics 誌に発表した[7]。このモデルは支持者を増やしてゆき、20 年を経た今でもよく引用されている。

δEF3 が PAX6 であるという結果は、2 重の驚きであった。第一に、PAX6 は眼の発生に不可欠な転写因子としてすでに知られており、しかも私たちは 1998 年の論文[8]で、「SOX2 と PAX6 が同時に発現される細胞では、水晶体には発生しないまでも δ-クリスタリン遺伝子が弱く発現される」と述べていたのである。その状況でも、δEF3 が PAX6 であるとは考えられなかった。第二の驚きは、δEF3 が PAX6 である気づかなかった原因でもあるのだが、DC5 配列の中の PAX6 (δEF3) 結合配列は、PAX6 単独での DNA 結合コンセンサス配列とは、PAX6 の DNA 結合に重要とされる塩基配列の部分で大きく異なっていたことである (図 B)。

そこで私たちは次の実験を行った。もとの DC5 配列と、DC5 の中の PAX6 結合領域を、PAX6 単独での DNA 結合コンセンサス (consensus) 配列に置き換えたもの (DC5-con) とを用意して、(1)転写因子の in vitro での結合(EMSA で解析)と、(2)DC5 エンハンサーの活性化 (下流につなげた 蛍光 luciferase 遺伝子発現の活性化) の両面から検討した (図 C)。

DC5 配列にも DC5-con 配列にも、SOX2 は単独で強く結合する。PAX6 単独では、DC5 にはほとんど結合しないのに対し

て、DC5-con に対しては良く結合する。さて、PAX6 を SOX2 と同時に DC5 DNA に加えると、今度は PAX6 が低濃度であっても SOX2 とともに協同的に強く結合した。一方、DC5-con 配列に対しては、SOX2, PAX6 の結合配列への結合の和が見られるだけで、両者の DNA 結合に関する協同的な効果は見られなかった。

では、エンハンサーの活性化はどうか? PAX6, SOX2 が同時に複合体を作りながら DC5 配列に結合する場合に限って、エンハンサーの強い活性化が起きた。DC5-con 配列に PAX6, SOX2 が (上記のように) 同時に結合しても、エンハンサーの活性化はほとんど起きなかった。この結果は次のことを示していた。

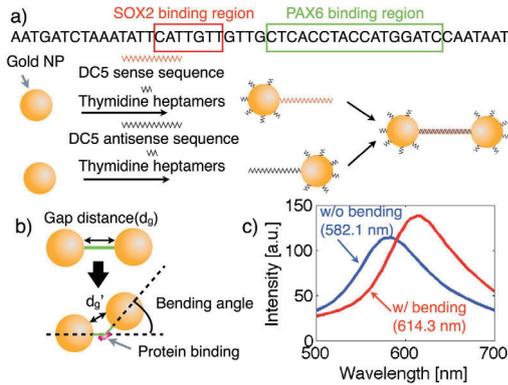
SOX2 と PAX6 が転写活性化のための複合体を作って DNA に複合体として結合する配列は、それら単独の結合配列の和ではなく、新しい配列である。SOX2-PAX6 複合体の DNA 結合配列のうち PAX6 と相互作用する部分の塩基配列は、PAX6 単独の結合コンセンサス配列とは大きく異なっている。

SOX2 と PAX6 が転写活性化のための複合体を作っていることは、EMSA での移動度が DC5 を使うと DC5-con よりも若干早い(DNA との 3 分子複合体がより compact な構造をとっている)ことからもうかがわれたが、より明確な証拠を得たい。このように考えつつ、いくつかの試行錯誤を続けるうちに数年を経てしまったが、その時は訪れた。

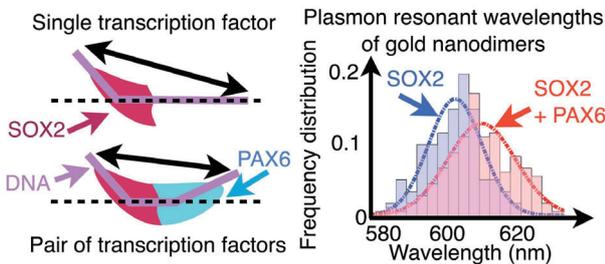
当時の大阪大学・生命機能研究科の同僚で photonics を専門とする井上康志教授から次のことを学んだ。2つの金ナノ粒子が数 10 nm の距離で接近していると、金粒子表面の電子の間でプラズモン共鳴が起きる結果、散乱光が長波長側にシフトする。そのシフトの度合いで金ナノ粒子間の距離が測れる。このことを利用すれば、転写因子複合体そのものではなくても、複合体が結合した DNA の変型は計測できるはずで、それをもとにして転写因子複合体の構造的な特性を知ることができるだろう。このことから、井上康志教授、また実際に測定実験を担当した大学院生の森村皓之君 (現 堀場製作所) などとの共同研究を始めた。

実験のデザインは直裁である。50 nm 径の金ナノ粒子に、SH 基を介して 50 塩基からなる DC5 配列の 1 本鎖 forward 配列を 5'側でつなぎとめたものと、同様に DC5 配列の 1 本鎖 reverse 配列を同じく 5'側でつなぎとめたものを用意する。これらを混合すると、DC5 配列は 2 本鎖となり、両端に金ナノ粒子を持つ DC5 配列が出来上がる。同様に、両端に金ナノ粒子を持つ DC5-con 配列も作製する。これらに、SOX2 や PAX6 単独、あるいは SOX2 と PAX6 の等モル混合を加えたときに、(1)散乱光スペクトルの極大がどれだけ長波長側にシフトするのか? したがって、(2)金ナノ粒子の間隔が何 nm まで接近するのか? さらに従って、(3)DC5 DNA が転写因子の結合によってどのように屈曲するのか? を計測するのである (図 D)。実際には、一対の金ナノ粒子 (その間に DC5 DNA が位置する) ごとに顕微鏡下で次の計測を繰り返すという、根気勝負の実験である。偏光

### D 金ナノ粒子に挟まれたDC5 DNAの屈曲を、散乱光のプラズモン共鳴波長のシフトによって検出する作戦



### E 金ナノ粒子対による散乱光のプラズモン共鳴波長のシフトから推定されたDC5 DNAの屈曲



フィルターでナノ粒子ペアの方向に振動する散乱光（この極大波長が変化）を取り出したのちに、散乱光をスペクトル分析してゆくのである。森村君は、打てば響く素晴らしいセンスの持ち主で、周到な予備実験ののちに本実験を実行して、図 E に示す素晴らしい結果を生み出した[9]。

転写因子を加えない状態では、DC5 配列を挟んだ金ナノ粒子のプラズモン共鳴は 587 nm にピークを持つが、それに SOX2 を加えるとピークは、604 nm にシフトし、SOX2 と PAX6 を同時に加えると、612 nm にまでシフトした。この結果から、SOX2 が DC5 DNA に結合すると 60° の大きな屈曲が DNA にもたらされる（これは、SOX2 の DNA 結合が、minor groove をこじ開けるような作用を持つため、他の測定からも既知であった）。SOX2 と PAX6 が同時に作用すると、（おそらく PAX6 が結合する場所で）DNA がさらに 6° 屈曲する。この PAX6 の存在に依存した変化は、DC5-con 配列を使った場合は起きない。

このことから、DNA の変型から導かれた間接的な証拠によるものではあるが、次のことが示された。SOX2 と PAX6 と DC5 配列は 3 分子複合体を作り、その結果、単に SOX2 と PAX6 が DNA に結合した場合（DC5-con への 2 因子の独立した結合）よりも大きな DNA の屈曲をもたらす。

この実験は、in vitro の反応を使った実験であったために、SOX2 や PAX6 分子としては C 末端側の転写活性化に関わる長い領域を欠いた、大腸菌の中で合成したものをを用いた。しかし、DC5-con に SOX2、PAX6 が結合しても転写活性化は起きない

ことなどから、SOX2 と PAX6 と DC5 配列の 3 分子複合体が形成されて初めて、SOX2 の C 末端側と PAX6 の C 末端側も複合体を形成して、近傍の遺伝子に対する転写活性化能を発揮することを結論していた[6]。それを合わせて一般化すると「転写因子は複合体となって初めて、DNA 結合特異性と転写制御活性を見せる」ということになる。

以上に述べてきた、SOX2 とパートナー転写因子が作る複合体に固有の結合配列は、パートナー因子が PAX6 である場合に限ったものではない。ES 細胞などで顕著な転写制御活性を示す SOX2 と POU5F1 (OCT3/4) の組み合わせの場合でも同様な現象は確認できる。SOX2 の結合配列 ACAA[T/A] に隣接する POU 因子の結合配列として、POU 因子単独での結合コンセンサス配列 ATGCA[A/T]AT がそのまま来るとはまず無い。1-3 塩基のコンセンサスからのズレが、SOX2 と複合体を作りうる POU 因子の種類を決めており[10][11]、またおそらく転写 2 因子の結合にもとづく転写活性化のレベルにも影響を与えている。

さらに、2 つの転写因子が同一の細胞内で発現されていても、それらが常に複合体を形成して転写制御をおこなうわけではないという、より高次の制御もある。SOX2、POU5F1 を共発現する ES 細胞内では、ほとんどの場合 SOX2-POU5F1 の複合体としてこれらの転写因子が作用している。しかし、ES 細胞の次の発生段階に対応するエピプラスト幹細胞では、SOX2 も POU5F1 もふんだんに発現されているにもかかわらず、両者が複合体として転写制御に関わっている割合は極めて低いのである[12]。

年を追うごとに、様々なゲノムデータ、トランスクリプトームデータが溢れんばかりの勢いで充実している現状である。それらをもとにした in silico での転写制御ネットワーク予測も盛んである。その作業には本来、転写因子の in vivo でのゲノム中での結合配列に関するデータ（ChIP-seq などによる）が必要なのだが、ChIP-seq の対象となった転写因子の種類も調べられた細胞の種類も限定的である。そのこともあって、例えば open chromatin 領域の中に見出される、転写因子単独での DNA 結合配列（コンセンサス配列）が、転写因子の結合配列であると仮定して作られたモデルが少なくない。しかし、そのアプローチでは、本稿で述べた転写因子複合体に固有の、機能的な転写因子結合部位は見逃される危険性が高い。森のみを見て木は見ずといった in silico studies にならぬよう、いささかの警鐘を鳴らしたい。

図の中のパネル A, B, C は、文献[6] Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R., & Kondoh, H. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev.*, 15(10), 1272–1286. Doi: 10.1101/gad.887101 の図を改変して用いた。パネル D, E は、文献[9] Morimura, H., Tanaka, S., Ishitobi, H., Mikami, T., Kamachi, Y., Kondoh, H., & Inouye,

Y. (2013). Nano-analysis of DNA conformation changes induced by transcription factor complex binding using plasmonic nanodimers. *ACS Nano*, 7(12), 10733–10740. Doi: 10.1021/nn403625s Copyright 2013, American Chemical Society の図の一部を、American Chemical Society の許可を得て転載した。

### 【用語の解説】

#### (1) エンハンサー(Enhancer)

真核生物の遺伝子発現の活性化に関わる制御 DNA 配列。遺伝子の転写領域との位置関係は様々であり、上流にあったり、転写配列の中 (intron にあることが多い) にあったり、下流にあったりする。また、1つの遺伝子の発現制御に、複数のエンハンサーが関与するのが通常である。Sox2 遺伝子の制御には、30以上の異なるエンハンサーが関与している [13][14]。エンハンサーには、次のような共通した性質がある。(1)近傍の遺伝子を活性化するが、遺伝子に対する特異性はないので、あるエンハンサーを任意の遺伝子の近傍に位置させた人工的な制御システム (エンハンサー・レポーター) を解析に用いることができる [13]。(2)その際に、エンハンサーの向きや位置や遺伝子との距離を変えても、遺伝子 (転写) 活性化には大きな影響がない。エンハンサーの作用機構としては、次のモデルが広まっている。ゲノムの中でエンハンサーは転写因子を多数結合し、それらの転写因子が coactivator と総称される、転写活性化をひきおこすためのタンパク質複合体と結合する。その状態のエンハンサー上のタンパク質因子がプロモーター上の基本転写因子と相互作用して転写を活性化する。その際には、DNA が loop 構造をとって、エンハンサー配列は転写開始のためのプロモーターと至近距離にあるというモデルである。しかし、遺伝子の転写状態ではエンハンサーは遺伝子とは遠位にあることを示すライブイメージングのデータもあって、エンハンサーの作用機構の全てが解明されているわけではない。タンパク質動態研究所の活動として行ったエンハンサーの解析の例に文献[15]がある。

#### (2) Southwestern 法

バクテリオファージ ベクター中に cDNA をランダムに挿入して、その cDNA がコードするタンパク質を発現するようにしておく、バクテリオファージが作るプラーク=溶菌斑の中にそのタンパク質が蓄積する。溶菌斑の中のタンパク質を溶菌斑の位置を保った状態でフィルター膜に移しとり、その膜に P<sup>32</sup>でアイソトープ標識した (例えば) DC5 配列を含む溶液の中でインキュベートすると、DC5 結合タンパク質を持つ溶菌斑の位置が β 線を出す

### 引用文献

[1] Kondoh, H., Yasuda, K., & Okada, T. S. (1983). Tissue-specific expression of a cloned chick delta-crystallin gene in mouse cells. *Nature*, 301(5899), 440–442. Doi: 10.1038/301440a0

ので、その元の溶菌斑にいるバクテリオファージを単離・増殖させる。そのバクテリオファージ ベクターの中に挿入されていた cDNA の配列を決定して、コードされていた結合タンパク質のアミノ酸配列を知る。タンパク質をフィルター膜に写しとる Western blot と、P<sup>32</sup>標識 DNA probe を用いる Southern blot をもじった表現。

#### (3) EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

DNA 断片を電気泳動すると、短い断片ほど速く泳動される。その DNA に転写因子等が結合すると、その泳動速度 (移動度) が下がる。このことを利用して、特定の DNA 配列 (Probe と呼ぶ) への転写因子の結合を定量的に計測するのが、EMSA 法である。転写因子の結合による移動度の変化は、DNA 配列が短い方が顕著である。移動度の変化の検出のためには、電気泳動の担体としてポリアクリルアミドのように網目が細かいものを採用してするのが良い。また、特異的な DNA 配列への結合のみを検出するためには、probe 濃度も、加える転写因子等も、可能な限り濃度を下げたほうが良いが、低濃度の probe の移動度の変化を敏感に検出する方法が伴っていなければならない。このために、P<sup>32</sup>の放射活性等で標識した DNA 断片が probe として用いられた。現在では放射活性を用いない方法が普及しているが、精度は劣る。

#### (4) Two-hybrid 法

酵母細胞の中に、例えば、転写 (活性化) 因子 GAL4 の結合配列を promoter に持つ His3 遺伝子を用意する。これに GAL4 が結合すると His3 が活性化されるので、その酵母が His3 欠損株であればヒスチジン要求性がなくなる。GAL4 タンパク質は DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインに分かれる。上記の細胞に、GAL4 の DNA 結合ドメインと転写活性化ドメインを切り離した状態で発現しても、His3 の転写活性化は起きない。このことを利用して、タンパク質 A と相互作用するタンパク質を cDNA ライブラリーから探し出す。タンパク質 A を GAL4 の DNA 結合ドメインに融合し、また cDNA ライブラリーのコード配列に GAL4 転写活性化ドメインが融合されるようにライブラリーを設計しておく。このライブラリーの配列 X が A と相互作用すると、「GAL4 DNA 結合ドメイン → タンパク質 A → タンパク質 X → 転写活性化ドメイン」という連鎖によって、His3 が活性化される (His3 欠損株のヒスチジン要求性がなくなる)。このようなタイプの、2つの hybrid タンパク質を用いて相互作用するタンパク質を screening する方法を、two-hybrid 法という。

- [2] Hayashi, S., Goto, K., Okada, T. S., & Kondoh, H. (1987). Lens-specific enhancer in the third intron regulates expression of the chicken delta 1-crystallin gene. *Genes Dev.*, 1(8), 818–828. Doi:10.1101/gad.1.8.818
- [3] Goto, K., Okada, T. S., & Kondoh, H. (1990). Functional cooperation of lens-specific and nonspecific elements in the delta 1-crystallin enhancer. *Mol Cell Biol.*, 10(3), 958–964. Doi:10.1128/mcb.10.3.958-964.1990
- [4] Kamachi, Y., & Kondoh, H. (1993). Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens-specific activity of the delta 1-crystallin enhancer. *Mol Cell Biol.*, 13(9), 5206–5215. Doi: 10.1128/mcb.13.9.5206-5215.1993
- [5] Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R., & Kondoh, H. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J.*, 14(14), 3510–3519.
- [6] Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R., & Kondoh, H. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev.*, 15(10), 1272–1286. Doi: 10.1101/gad.887101
- [7] Kamachi, Y., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genetics*, 16(4), 182–187. Doi: 10.1016/s0168-9525(99)01955-1
- [8] Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., & Kondoh, H. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development*, 125(13), 2521–2532.
- [9] Morimura, H., Tanaka, S., Ishitobi, H., Mikami, T., Kamachi, Y., Kondoh, H., & Inouye, Y. (2013). Nano-analysis of DNA conformation changes induced by transcription factor complex binding using plasmonic nanodimers. *ACS Nano*, 7(12), 10733–10740. Doi: 10.1021/nn403625s
- [10] Kondoh, H., & Kamachi, Y. (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.*, 42(3), 391–399. Doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.003
- [11] Kamachi, Y., & Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 140(20), 4129–4144. Doi:10.1242/dev.091793
- [12] Matsuda, K., Mikami, T., Oki, S., Iida, H., Andrabi, M., Boss, J. M., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., & Kondoh, H. (2017). ChIP-seq analysis of genomic binding regions of five major transcription factors highlights a central role for ZIC2 in the mouse epiblast stem cell gene regulatory network. *Development*, 144(11), 1948–1958. Doi: 10.1242/dev.143479
- [13] Uchikawa, M., Ishida, Y., Takemoto, T., Kamachi, Y., & Kondoh, H. (2003). Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell*, 4(4), 509–519. Doi: 10.1016/s1534-5807(03)00088-1
- [14] Okamoto, R., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2015). Sixteen additional enhancers associated with the chicken Sox2 locus outside the central 50-kb region. *Dev Growth Differ.*, 57(1), 24–39. Doi: 10.1111/dgd.12185
- [15] Iida, H., Furukawa, Y., Teramoto, M., Suzuki, H., Takemoto, T., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2020). Sox2 gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2. *Genes Cells*, 25(4), 242–256. Doi: 10.1111/gtc.12753



著者：近藤寿人

JT 生命誌研究館顧問 表現ディレクター・大阪大学名誉教授。1949 年福岡県出身。京都大学理学部卒業、京都大学理学研究科博士課程修了、ウイスコンシン大学生化学部、京都大学理学部生物物理学、名古屋大学理学部分子生物学科、大阪大学細胞生体工学センター、同大学院生命機能研究科、京都産業大学総合生命科学部、同タンパク質動態研究所（併任）を経て現職。

# 新型コロナウイルスが照らし出すことを学ぶ

伊藤維昭

京都産業大学からいただいていた「シニアリサーチフェロー」の立場も2020年4月で終了となりました。ちょうど新型コロナウイルスの世界的流行が差し迫った状況と重なり、料理と散歩を日常としつつ、時にオンライン飲み会のお誘いを受けたり、セミナーをオンライン聴講するのが「社会との接点」という生活を続けています。とは言っても、自宅でも自由に論文を検索して読むことができる時代の恩恵を受けて、科学との接点も最小限持ち続けようとはしています。いわゆるSNSという交流の道具もあり、適度に利用すると、思わぬ情報に接したり、人々の考えがわかり助かります。時には自分からも、たわいもない日常の情景を発信したり、時には世の中の動きに対する意見を述べたり、自分の理解できる科学の話を紹介したりすることも責務かと思ひ、時々実行しています。

新型コロナウイルス(以下、コロナウイルスと省略します)は、科学を身近なものにしてくれています。細胞に備った仕組みを巧みに利用して自分の遺伝子を増やすウイルスは、遺伝子、タンパク質、そして細胞の働きの中から「例題」をハイライトして突きつけてきます。ウイルスを巡る報道や出版物を介して、一般の方も学術用語に触れる機会が増えました。このような時、分子生物学の起源はウイルス(バクテリオファージ)の研究にあったことを思い出します。そして、科学者ではない一般の方にも、できるだけ基本となる考え方を提示してしまう方がよいと思う今日この頃です。科学者は呪文の様な難しい事を言っていると思われる、逆に神秘思想に繋がりがかねないように思います。・・実は科学の内容も結構簡単だったりするという事実をわかってもらう努力も必要と思ひ時々文章を投稿しています。動態研年報に寄稿の機会をいただきましたので、いくつかコロナウイルスを巡る、一般向けにはあまり議論されていない周辺的なことを抜き書きしてみました。

## 膜融合

コロナウイルスも、細胞と同様、生体膜で包まれています。感染には「膜の融合」を使います。「生体膜」には細胞を取り囲んで外部と区別する細胞膜、細胞内を区切って細胞内小器官を形づくるオルガネラ膜などがあります。生体膜の基本的な構造は脂質二重層です(図1)。脂質は水と混じり合わないため水溶液を仕切るのは得意です。生体膜はシート状に二次元に広がりますが、端がない・・シャボン玉をイメージするとよいかもかもしれません。生物が生きていくため、時には異なる膜が融合するという、ダイナミックなイベントも必要になります(図2)。この時二つのシャ

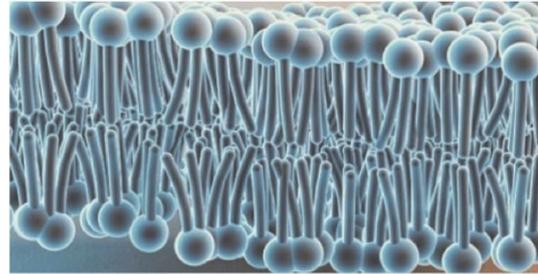


図1 脂質二重層の模式図。Rizo, J., Jaczynska, K., and Stepien, K. P. (2021) Elife. 10.7554 / eLife. 70298 より

ボン玉が融合して一つになります。その結果、仕切りとしての脂質部分が繋がります。大きな「細胞シャボン玉」と遙かに小さな「ウイルスシャボン玉」が融合するのが、コロナウイルス感染の始まりです。ウイルスと細胞の膜がどのような仕組で融合するのかが重要な点です。膜融合を阻害することで感染を起りにくくする治療薬も開発中らしいです。

生体膜にはタンパク質(膜タンパク質)が組み込まれています。膜タンパク質は膜を越えた物質や情報のやりとりを媒介します。コロナウイルスの膜にはスパイクタンパク質が組み込まれています。このスパイクは、感染の標的となる細胞の細胞膜に存在するアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)と言う膜タンパク質に結合します。すると、ウイルスと細胞膜が近づき、「膜融合」が起こり、感染が成立します。コロナウイルスがACE2を受容体として利用するようになったのは、偶然かもしれませんが、ACE2をよく発現している細胞に感染する性質が定着したのは、結果としてウイルスが増殖しやすいためと考えられます。その結果、病原性が発揮されるのでしょう。

「膜融合」を持ち出したのは、師であり友人である William Wickner 博士の論文を目にしたからです。この「ビルさんの論文」は、ウイルスとは直接の関係は無く、細胞の内部でおこる膜の融合を実行する「マシン」について述べています(図2)。

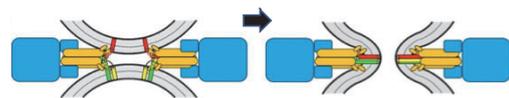


図2 膜融合の模式図。Rizo, J., Jaczynska, K., and Stepien, K. P. (2021) Elife. 10.7554/eLife.70298 より

## ワクチンを巡って

リアルタイムで経験している科学の歴史上の画期的出来事

今回の伝令RNA(messenger RNA, mRNA)を用いるワクチンの開発は、これまでの科学研究の蓄積が急激に花開いたもので、

我々は科学の進歩が突然の人類の危機に対応する歴史的な場面にリアルタイムに臨場しているのだという感慨を持ちます。日本人の基礎研究(古くは、三浦、古市博士による mRNA の末端にある CAP 構造発見)も大いに貢献しています。ただ、強靱なストラテジーをもって総合し、実行する事は全面的に外国に任せてしまいました。科学に国境はないとは言え、複雑な気持ちにはなりません。

### タンパク質動態とワクチン

mRNA ワクチンの RNA は、抗原として設定した特定のタンパク質(今回の場合、ウイルスのスパイクタンパク質)の合成を細胞の中で直接指令します。スパイクタンパク質は二つの立体構造を取ります。一つは、閉じた構造で、そのままでは細胞の受容体(ACE2)に結合できません。もう一つは受容体に結合し易いオープン構造です。感染にはオープン構造への構造変化が必要になります。抗体はオープン構造を認識するものが感染阻止効果が高いだろうと言われています。タンパク質の立体構造はアミノ酸の配列順序により決まりますが、閉構造を取りやすいか開構造を取りやすいかもアミノ酸配列により影響されます。そこで、mRNA ワクチンでは、開構造を取りやすいアミノ酸配列を指令する様に一部 RNA の塩基配列が改変されています。現在世界的に問題になっているウイルスの変異株はスパイクタンパク質のアミノ酸が一部置換しているため受容体に結合し易くなっていたりするわけですが、ワクチン自体、オープン構造に対する抗体ができやすいように工夫されていることも、もっと知られてもよいのではないかと思います。タンパク質動態研究の重要性を多くの人に知っていただくためにも。なお、最初に述べた膜融合を起こすためには、スパイクタンパク質は受容体に結合してから、特定の場所に切れ目が入って膜に突き刺さるような振る舞いをする様です。スパイクに切れ目を入れるのは細胞に存在する少なくとも2種類のプロテアーゼ(タンパク質分解酵素)です。こんなところでもウイルスはちゃんと細胞の道具を利用してスパイクタンパク質に曲芸を演じさせています。

### ワクチン RNA とウイルス RNA: 無意識的「認知の偏り」について

mRNA ワクチンは、「遺伝子組み換え」とは無関係で、我々の遺伝子に作用するわけではありません。それでも、RNA を注射することは、これまで人類が体験しなかったことであり、不安を感じる人がいるようです。ワクチンの RNA が細胞の核に取り込まれてゲノム(遺伝子の集合である染色体)に組み込まれる可能性に対する心配です。もちろん、RNA がそのまま DNA ゲノムに組み込まれる事はあり得ませんが、なんらかのやり方で、DNA に「逆転写」された配列が組み込まれる可能性です。様々な理由から、そのようなことは非常に起こりにくいと考えられています。しかし、可能性がゼロかと問われれば、ゼロという断定は科学的にはできません。長期的に予測不能な悪影響が絶対にないと断言

もできないでしょう。

純粹にこのことだけを考えた場合、ワクチン接種をしないことが安全です。しかし、そんな純粹思考をしている状況ではありません。以下、(1)と(2)の比較になります。

(1) ワクチンを打つと、ワクチンの RNA がその人のゲノムに組み込まれる可能性がゼロとは言えず、長期的に何らかの悪影響があることを全否定はできない。

(2) ワクチンを打たないで、新型コロナウイルスに感染した場合は何が起るだろうか? 細胞の中にウイルス RNA が入ってどんどん複製し、1個の細胞あたり何千コピーも存在することになる。このウイルスの全長 RNA には、25種類ほどの遺伝子が乗っていて、ワクチン RNA (遺伝子1個のみ)に比べて長さが10倍ほどある(図3)。



図3 新型コロナウイルスのRNAの模式図。長方形は5'末端から3'末端まで、約3,000個の塩基が連続したRNAの鎖を表す。

希に起こるかも知れないゲノムへの組込みを心配するのなら、ワクチン接種(1)よりウイルス感染(2)の方が遙かに心配です。大量のウイルスRNAを抱え込むことになるからです。上記は、RNAの挙動のみに特化した議論です。本来、ワクチンの目的はウイルスのRNAが細胞の中・身体の中に蔓延することを防ぎ、感染・発病・重症化の可能性を減らすことです。一般的な意味でのワクチンの副反応の議論も他に譲りますが、RNA由来配列がゲノムに組み込まれるかもしれないというわずかな心配を考える場合でも、感染と比べればワクチン接種の方が心配が少ないはずだということを書いたかったのです。

ここで話を混ぜ返すようですが、良きにつけ、悪きにつけ、生きものはウイルスと付き合いってきました。哺乳動物の胎盤は、源を質せばウイルス由来であるという話は有名です。ウイルス由来の配列の一部が宿主の染色体に入り込むという出来事は、生物進化の悠久のタイムスケールでは、むしろ当たり前だったのではないのでしょうか? そのようなスケール観で見た場合でも、ワクチンRNAの薄片を特別視する根拠はないのではないのでしょうか? 「RNAを注射する」という言葉から発する「認知の偏り」に気づくべきだと思います。

加えて、mRNA ワクチンを注射した場合、リンパ節などに優先的に取り込まれて、主として免疫担当細胞に入ってスパイクタンパク質を合成する(従って効率よい免疫反応が誘起される)と言われています。従って、普通の細胞にワクチンのRNAが入る

こと自体、余り起こらないと理解するのが妥当です。このことも、ウイルスに感染した場合との比較では、考慮に入れるのがよいと思います。ワクチンの mRNA が注射後に辿る経路については、科学者でも免疫学分野でない人にはあまり理解されていないようなので、以下で取りあげます。

### mRNA ワクチンが浮き彫りにする、科学分野間の分断

mRNA ワクチンでは、脂質ナノ粒子に包み込んだ mRNA を注射します。その後何が起こるのでしょうか？

【考え方 1】まず、mRNA が注射部位近くの細胞（筋肉注射なら筋肉細胞）に取り込まれる（脂質ナノ粒子はその取り込みを促進する）、そして、スパイクタンパク質の合成を指令する。次に、免疫システムが細胞外に放出されたスパイクタンパク質断片、あるいはスパイクの一部を表面に持つ細胞を非自己と認識し、抗体産生や細胞性免疫のステップを発動する。

分子生物学・生化学分野で仕事をしてきた私にとって「mRNA」は馴染み深いため、mRNA ワクチンも分かったつもりになって、この【考え方 1】しか考えていませんでした。この単純な理解は私だけではなく、例えば日本 RNA 学会の記事でも、「mRNA を脂質ナノ粒子 (LNP) で包み、筋肉注射を行う。すると mRNA は筋肉細胞内に入り、細胞質で直ちにタンパク質が作られる」との説明になっています。

(<https://www.rnaj.org/component/k2/item/855-iizasa-2>)

しかし、おそらく、実際の免疫反応の起こり難さや、安全性の問題などから、細胞一般に mRNA を無差別に入れるという戦略はもともと採られていなかったようなのです。

【考え方 2】ワクチンはまず免疫系細胞に配送され、捕捉されて、免疫系の細胞に mRNA が取り込まれる。免疫担当細胞自体の内部でスパイクタンパク質の合成が起こる。そのことによって、効率よい免疫応答が誘導される。脂質ナノ粒子が如何に免疫担当細胞を標的とし、免疫系によって処理されるのかが問題の本質の一つである。

実際に、10 年以上前から mRNA ワクチンの基礎研究がなされ、膨大な論文が存在します。mRNA を免疫担当細胞に配送して、抗原提示細胞自体の内部で抗原タンパク質を発現させ、効率よい免疫応答を誘起するという戦略が取られてきたのです。リン

パ節・樹状細胞・食細胞へ優先的に送り込むのに最適なナノ粒子が開発されてきたようです。【考え方 2】は免疫の専門家の先生に思い切って質問したことがきっかけになって知りました。

「mRNA ワクチンが驚異的な有効性を発揮している一番の理由は、この剤型がリンパ管に入ってリンパ節に運ばれやすく、しかも食細胞に入って抗原提示をするため」というのが免疫学者から得た説明です。

【考え方 1】と【考え方 2】は、お互いに交叉していないようで、【考え方 1】による解説記事も多くみられます。科学の世界にあって珍しい状況かも知れませんが、分子生物学者の多くは、mRNA という分子生物学の「セントラルドグマ」の中心に存在する分かりやすい分子に目を奪われて、免疫学の知識と研究の歴史を学ぼうとせず、自分なりの理解の範囲（【考え方 1】）で済ませてしまっているのではないかと思います（自分自身がそうでした）。一方で、免疫学者の想定【考え方 2】がどこまで当たっているのかという事もあるのかも知れませんが？ いずれにせよ、二つの考え方が併存して交わらないのは、大げさに言えば、科学史における一大問題なのかも知れませんが。新型コロナウイルスに対する mRNA ワクチンと言う社会的に重要な問題の出現によって、学問の「division」が露わになったのでしょうか？ 最後に、新型コロナウイルスに対する mRNA ワクチンを詳しく説明した総説を一つ挙げておきます。

Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C., and Dewitte, H. (2021) The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *J. Control. Release.* **333**, 511-520.

以上とりとめもなく記しました。私たちが感じることは往々にして、何らかの先入観によって無意識的に先導されていることがあります。なにかのきっかけで、あれっ、それでいいの？と思うことがあります、あれこれ調べたり考えたりすると、何らかの「新しい」（自分にとって）ことに辿り着くことがあります。このような喜びは研究室に行かなくても経験できることを、コロナウイルスが教えてくれました。しかし、オンライン交流や文章の投稿というかたちであっても、人との交流がなければそのような時も訪れないでしょう。今後とも、タンパク質動態研究の仲間の片隅に置いてくださいますようお願いいたします。



著者：伊藤維昭

京都大学名誉教授。元京都産業大学タンパク質動態研究所シニアリサーチフェロー・生命科学部教授。1943 年静岡県出身。京都大学理学部化学科卒業、同大学院理学系研究科博士課程修了。京都大学助手、同教授を歴任。

# その後

吉田賢右

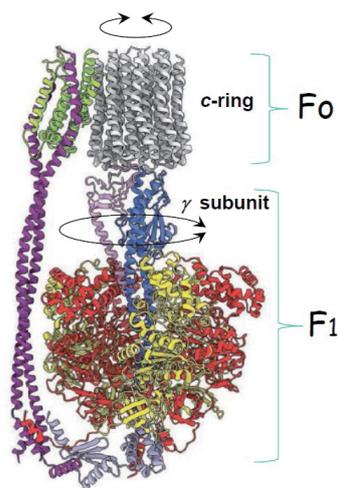
7年前の2014年、私は京都産業大学（タンパク質動態研究所）の研究室を閉じ、私の実験科学による研究は終わった。その後、自分の狭い研究分野から多少自由になって、気の向くままにジャーナル（の abstract と figures）を読みながらあれこれの知的探索を楽しんでいる。以下、そのいくつかをまとめてみる。

## 1. 我が亡き後に・・・

7年前、私たちの研究はどこまで到達していたか、残された課題は何か、そしてその後なにが解明されたのか（されなかったか）、メモしてみた。（👉）会心の発見、（😞）あれっという期待と違う発見、（?!）重要かどうか未知数の発見、（☆）他グループの発見。

### 1-a ATP合成酵素・・・酵素学の完成

この巨大な膜酵素は、地球のあらゆる生物に存在し、呼吸・光合成によって形成された膜内外のH<sup>+</sup>勾配を利用してATPを合成し細胞に供給している（逆反応ではATPを加水分解してH<sup>+</sup>輸送する）。膜に埋まったH<sup>+</sup>流駆動のFoモーターにF1が結合している。F1はそれ自身で、120°/ATPごとの回転をくりかえすATP駆動の回転モーターである（👉）。120°は、ATP



c-ringとγ subunitが回転する

Guo et al. Elife 2019; 8: e43128

結合/解離で駆動する80°+ Pi解離/結合で駆動する40°のサブステップ回転からなる（👉）。また、この酵素の構成サブユニットの一つが状況によって腕を伸ばすように大きく構造変化し、反応（回転）にブレーキをかけ制御する（👉）。

ところが、京産大時代の研究により、上記のサブステップ回転も、ブレーキも、生物によりさまざまであることがわかってきた（😞 Suzuki 2014, ☆ Zarco-Zavala 2020, ☆ Varghese 2018）。進化する中で、もっとも基本的な構造と機構は維持されているが、生物種ごとに各々の生理的必要性に応じて改訂できる部分の多い酵素だった。すると、制御は生物種ごとに個別に研究

する必要があり、我々が去ったあと、あまり進んでいない。それでも、結核菌のATP合成酵素の研究からは、これに特異的に強く結合し回転を止める化合物（Bedaquilin）が発見され、多剤耐性結核菌の最後の切り札の薬となっている（☆Guo 2021）。

### IF1-KO mouse; apparently normal

Nakamura, et al. Biosci Rep 2013, 33(5). pii: e00067



WT KO

### However,

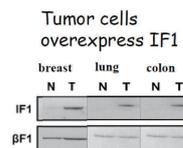
Transformed fibroblast cells from IF1-KO mouse did not develop cancer in nude mice.



Facenda, Nakamura, Yoshida et al. Cell Rep 2017;18,1869-83

### normal

- breeding
- growth
- body weight
- starvation
- motion ability
- tissue anatomy
- mitochondria
- ATP synthase
- ATP synthesis



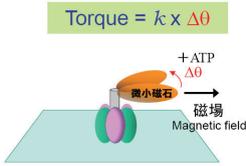
Sanchez-Cenizo et al. JBC. 2010; 285, 25308-13

動物ミトコンドリアのタンパク質 IF1 は、飢餓や酸素不足でATP合成のためのエネルギー（H<sup>+</sup>勾配）が乏しくなるとATP合成酵素に結合し、逆回転（ATP分解）を抑えて（👉）、ATPをむだに消費することを防ぐ。それなら、IF1がないと飢餓に弱いだろうとKOマウスを作ったが、KOマウスにはなんの障害も現れなかった（😞）。ただ最後に、KOマウスはガンになりにくいという可能性を見つけた（?!）。ガン細胞は、IF1を多量に合成している（☆）。ガン細胞は血管造成/酸素が間に合わずもっぱら解糖系でATPを作っているが、そのATPをATP合成酵素が逆反応で分解しないようにIF1で阻害していると考えられる。そこで、IF1に結合して機能を喪失させる化合物を見つければ、それは抗がん剤になるとの期待を抱いた。が、後継研究者は現れず、追究はできなかった（ちょっと残念）。

モーターたんぱく質の機構について、ランダムな熱ゆらぎ運動の一方向選択説（Brownian ratchet）と、ぐいぐい動かす説（power stroke）があった。ATP合成酵素は、ATPで回転を駆動する場合、約40°ごとに回転力がジャンプするpower strokeモーターであることを、自慢したくなるような巧妙な実験で発見した（👉）。かたや、Foについては、原子構造解明（☆Guo 2017）によって、Brownian ratchet motorであることはほぼ確実となった。ATP合成酵素は、原理のちがう2種のモーターが回転軸を共有して接合したものだったのだ。

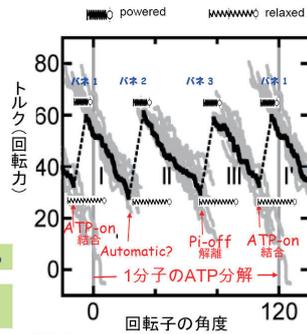
## F<sub>1</sub> is a power stroke motor

Saita et al. PNAS, 2015; 112, 9626-31

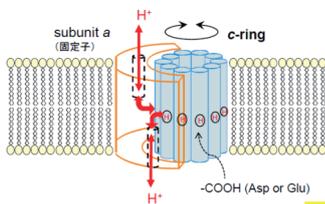


1. どの角度でもトルクが正、働いている
2. 約40度ごとにバネがあってトルクがジャンプする

Good! ~ 40° ≈ Fo-motor step (~ 36°)



## F<sub>0</sub> is a Brownian ratchet motor



c-ring は熱揺らぎでぶらぶらと左右に回っている

H<sup>+</sup> は2つの出入り口があり、回転ドア方式で自由に出入りする

膜内外にH<sup>+</sup>濃度差があると、一方方向に回転するmotorとなる

ギアチェンジのできるモーターだった!

c-ring を構成するサブユニットの数 (= 1回転で運ぶH<sup>+</sup>の数) が生物種ごとに違う

ウシ(ヒト)	3 ATP : 8 H <sup>+</sup>
酵母	3 ATP : 10 H <sup>+</sup>
細菌	3 ATP : 10 ~ 15 H <sup>+</sup>
葉緑体	3 ATP : 14 H <sup>+</sup>

ATP 合成酵素の初めての単離からスタートして40年、私が研究現場を離れるころにこの酵素の酵素学はほぼ完成した。全体構造の解明も、20年間の結晶化の骨折り損の末に、クライオ電子顕微鏡のグループに試料を送ったらあっさり決まった (☆Guo 2019)。

もう、個別の酵素学の時代は終わったのだ・・・

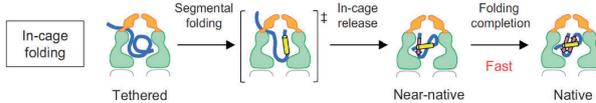
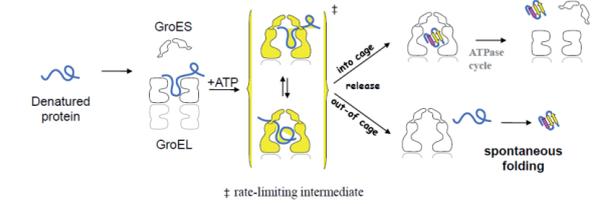
### 1-b 分子シャペロン・・・不本意な終わり

内部空洞 (カゴ) に変性タンパク質のポリペプチドのヒモをとりこんで立体構造への折りたたみ (folding) を補助するシャペロン (細菌の GroEL-ES) の研究は、苦い終わり方だった。カゴには外部に通じる隙間がいくつかあり、ヒモは隙間に可動的に繋留された状態 (dynamic tethering) で部分的 folding が進み、最後に繋留できる自由なヒモ部分がなくなりカゴの中に放出されて全体の folding が完成するという結果を得た (👏)。繋留されたヒモの一部は隙間から外に顔をだすし、全長が外に逃げ出す場合もある (👏)。

変性タンパク質は生理的な溶液条件では自分で folding する (spontaneous folding)。その時に、まずヒモは小さく不規則に丸まって揺らぎの多い毛玉ようになる。毛玉の中でたまに出現する動きの自由な部分から folding する。しかし、ヒモが繋留されると全体が毛玉になることはできず、自由な部分が多いので、そこから部分的な folding をする、それを繰り返す、というのが繋留の意味だろう (👏)。

## シャペロニン (GroEL/ES) の folding 援助

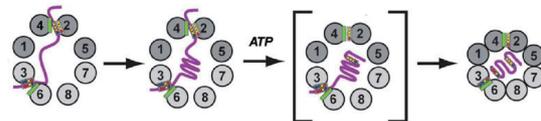
Motojima et al. EMBO J 2010, BBRC 2015, JB 2018



細菌のシャペロニン GroEL/ES: tether, segmental folding, in-cage release

Motojima et al. J Biochem. 2018; 164: 369-79.

これは、「変性タンパク質は完全にカゴの中に閉じ込められて自由な分子として folding している」という学界の大御所たち (米国の A. Horwich、ドイツの U. Hartl) の教科書モデルと違って、彼らがどこでまちがったか (実験は正しいが解釈が間違っているのである)、そこもやんわり指摘した。しかし、大御所とその門下はどうしても私たちの実験を認めなかった。誰がやっても簡単に再現できるのに・・・ (たとえばカゴのフタは閉まっているのに中のヒモが外に逃げ出すことは、ゲルろ過すればすぐわかる)。学会で私が発表しても反論も質問もないから論争にもならない。しかし、私たちの major journal 投稿は rejection の連続だった。そのうちに、大御所門下の一人 (J. Frydman) が、動物のシャペロニン (TRiC) では、ヒモはカゴのふちに結合しながら folding が進む、ということを見出した (下図、リングを上から見た図) (☆Joachimciak 2014)。私たちの結果とほぼ相同ではないか。それでも私たちの繋留モデルは無視されたままで、教科書のシャペロニンの作用機構モデルは今でも問題のあるままである。



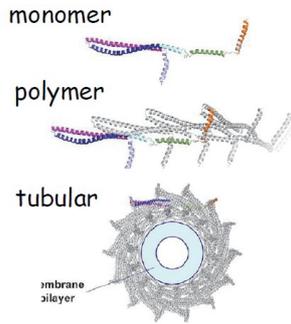
動物のシャペロニン TRiC: tether, segmental folding, in-cage release

Joachimciak et al. Cell 2014; 159, 1042

もう一つ、最近号の Cell 誌 (July 8, 2021) になんと3報続けて載った論文が、昔、私たちが論文1つで通り過ぎたあるタンパク質が実は流離異種だったことを報告していて、「うーん」と感銘したので、記しておきたい。好熱菌の ATP 合成酵素を大腸菌で大量発現すると、分子量 2.5 万のタンパク質も大量に合成誘導される。調べてみると、PspA というタンパク質で、ATP 合成酵素の大量発現で障害をうけた膜を直していた。さらに、PspA

は水可溶性タンパク質であるが、多量体ポリマーとして精製され、膜脂質に直接結合し、エタノールなどに触れた脂質2重膜のイオンの漏れを抑える能力を持つことがわかった (👍 Kobayashi 2007)。膜にべたべた結合して膜を修復するタンパク質など聞いたことがなく、興味はあったが、それ以上の追及はしなかった。Cell 誌の論文では、

### PspA, membrane chaperone



Liu et al. Cell 2021; 184, 3660-73

PspA ポリマーは曲率の違うさまざまな大きさのリングをつくることができ、膜の表面に結合することが低温顕微鏡などで示されている。PspA は膜の融合や分離や修復などの機能をもつ、いわば生体膜の形態変化の producer であり (膜シャペロン) であり、あらゆる生物に分布する重要タンパク質 (ESCRT-III family) の細菌バージョンだった。論文を見ると、PspA は ATP 加水分解活性があり、それによってモノマーからポリマーになる、とある。そういえば、我々の実験でも、精製ポリマーを尿素変性してからまた folding させると、モノマーのまま度々2度とポリマーにならなかった。あの時、ATP を加えてみればよかった。

## 2. 新型コロナの感染防御・・・evidence-based policy

パンデミックが発生し無数の論文と情報があふれた。私は、我知らずのうちに科学者の目 (論文の査読者の目) で感染とその防御の方法について学術論文を読んでいた。

まず気がついたのは、「専門家」の単純な間違いである。例をあげると、始めのころ、マスクの有効性を疑う発言をする専門家もいた (WHO まで!)。マスクの網目が大きすぎる、とか、呼吸には有効だが吸気にはどうか、とか。しかし、マスクを通る空気は乱流だし揺らぎもあり、ウイルスを含む唾飛沫はマスクの繊維に衝突して吸着されるだろう。実際、有効性は実験で示された。

世界と日本のクラスター感染の分析論文から、「集まって歌う、食べながら喋る、飲みながら喋る」(それと、くしゃみ、せき) ときに感染が起きていることがわかる。要するに、唾の飛沫 (半乾きになった飛沫核) を吸い込むことで感染が起きている。静かに呼吸しているだけなら唾は飛ばないから、三蜜でも感染はおきないだろう。 $\mu\text{m}$  単位のエアロゾルの体積ではウイルスはほとんど含まれていないから、いわゆる空気感染はおきていないだろう。また、確実に接触感染だと言える報告を私は知らない。スチール表面に付着したウイルスが何時間生き延びた、などの論文はよく

読めばまったく日常には起こらない感染条件であることがわかる。手洗いをせよ、という。やらないよりいいだろう。しかし、手洗いでは感染は防げない。こういう evidence に基づいて考えれば (evidence-based policy)、現行の防御政策は、ずっと焦点をしぼることができ、みんなが順守できるものとなるはずである。このあたり詳しくは講演したので YouTube で見られる ([https://www.brh.co.jp/event\\_lecture/detail/777](https://www.brh.co.jp/event_lecture/detail/777))

うまくいけば、現在の蔓延防御策を一変させるかも、という以下の思いつきがある。

唾が感染源である。新型コロナウイルスは脂質膜で包まれているので 50%エタノール中で 1 分で全滅する (複数の実験報告がある)。泡盛で 50%エタノールのものがある。これでまず全員うがい (口の中を洗浄) してから (飲み込んでもいい、消化管からの感染は報告がない)、会食を始めたなら感染は起こらないのではないかな。

### 誰かにやってほしい簡単な実験

唾液のウイルスを、50%エタノールで絶滅できるか？  
絶滅した場合、唾液中に再出現するまでの時間は？

1. 唾液にウイルスを多く含む感染者  
10 ml の 50%エタノール or 水で1分間うがい  
回収したうがい液のウイルスの数をかぞえる\*
2. 水のうがいを10分ごとにくりかえす  
回収したうがい液のウイルスの数をかぞえる\*

\* 培養細胞への感染でもいいが、ヒトACE2を上気道に発現するマウスで感染性ウイルスの定量ができる。PCRもやればもっといい。

## 3. 人類進化・・・投石によってその類猿人は草原に立った

有史以前のヒトの進化・移動・地域集団の成り立ちについての理解はこの20年で大変な進歩があった。古代ゲノムの解析ができるようになったからである。ヒトが、単線的な純粋系統ではなく、未知の古代人、ネアンデルタール人、デニソワ人と交雑してきたこと、いかなる民族も出アフリカの後たかだか5~6万年前に分岐した地域集団であること、先に移動した集団の後に次の集団が移動してくるなど複雑な過程を経て現在の地域集団が形成されたこと、などがはっきりとわかってきた。次々に発表される論文に感激し、一般向けに日本語で紹介することを考えたが、この分野で活躍している David Reich が「交雑する人類」(NHK出版) という研究の臨場感まで感じられるすばらしい本を書いたので (第一線の研究指揮をしながらよくこの大部の本を書けたと感心)、その気は失せてしまった。今でも新着論文は目を通しているが、最近は、もっと最初期のヒトの進化について考えている。そして、今まで主張する人がいなかった (と思う) 「投石こそ最初期の祖先の生存を可能にした」という説を考えている。

## 直立二足歩行がヒトの始まり



準備: 森林中をぶら下がり移動  
肩と腕の回転、手指で握り、まっすぐな背骨と首

- ～400万年前 直立二足歩行
- ～300万年前 石器
- ～140万年前 火の使用
- ～80万年前 脳の急速増大

330万年前、  
タンザニアの湿った火山灰の上を、  
連れだって歩いた親子がいる・

現代人なみ、ほぼ完全な二足歩行

のちにヒトへとつながる進化の道を進み始めたのは、森林から疎林あるいはサバンナに下り立った二足で直立歩行する類人猿である。直立二足歩行こそ、ヒトにつながる進化を特徴づける最初期の最重要な、他のいかなる生物にもみられない形質だった。では、なぜ直立二足歩行はサバンナに下り立ったばかりの類人猿の生存・繁殖を支えたのか。これには諸説ある。両手が使えるので石器など道具を作れる、重たい脳を支えられる、と言う。しかし、石器製作も脳の重量化も直立歩行開始の何百万年もあとのことである。二足歩行はエネルギー効率的であり、長距離の追跡で疲れた草食動物をしとめることができる、とも言う。しかし、そういう積極的な狩りができるようになったのもだいぶ後のことと思われる。私の思いつきでは、昼に直射日光は主に肩と頭に当たる（4足動物は背も首も）ので肩まで伸びる頭髪だけで日焼けを防げる、両手が使えるので身体のどこでも蚊やアブなど吸血虫（これはアフリカの動物にとっては大問題、ましてや暑さ対策として汗腺を発達する代わりに体毛を失った類人猿にとっては）を追い払うことができる、というのはある程度の利点だったかもしれない。

しかし思うのだが、裸でサバンナに下り立った直立二足歩行動物は、ただちに、何をおいてもまず、猛獣の餌食にならないように、そして、食料を確保しなければならない。それには飛び道具

## 投石による防衛、獲物横取り、狩り

直立二足歩行で  
肩を回転させる 投擲(石、棒)  
が可能になった

獣を追い払う(食われぬため)  
獲物を横取りする(食うため)

だれかにやってほしい ちょっと危険な 実験

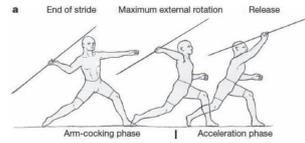
獲物を食うライオン、ハイエナなどに遠くから投石する  
肉食獣は、逃げる? or こちらに向かって攻撃してくる?

だ、と私は考えた。つまり投石(投擲)である。彼らの祖先は、木の枝にぶら下がりながら移動する懸垂移動によって、回転する腕と肩、他の4指に向かい合う親指、まっすぐな背と首、を備えていた。これは、そのまま、石などを高速で投げる動作に使える。

## Supporting facts (1)

### 解剖学: ヒトの投げる動作は、独特で強力

Roach et al. Nature 2013; 498. 483.



腕の回転速度=40 m/秒=時速130 km

筋肉による投げる力は、  
全体の半分

肩の靭帯と腱が伸びて  
弾性バネエネルギーをためて、一気に放出

ウエストが長く柔軟で、  
腕を大きく回転

200万年前のホモ・エレクトスは、現代人のように投げる事ができた

進化の中で、投石という飛び道具を武器に使う初めての大型生物が、サバンナに出現したのである。彼らは、投石で襲ってくる猛獣を撃退し、獲物をしとめた獣を投石で追い払い獲物を横取りすることができて、良質の食料を得ることができただろう。

他の説と同じく投石説もまだ決定的な証拠といえるものはないが、支持的なことはある。ヒトの投擲動作はまったく独特であり、現代の普通の男性でも時速60キロくらいのスピードで投石できるだろう(プロ野球投手は150キロ!)。200万年前の古代人の骨格から、かれらも同様に投石できただろう、という。

また、投石をくりかえせば右か左か、利き腕が生じると思う。

## Supporting facts (2)

### 「利き腕」: 投げれば、利き腕が生じる

チンパンジーには利き腕がない

160万年前、前歯の線状痕から右利き

200万年前の石器、右利きの者が作った

石の貯蔵: 投石に手頃な石置き場らしき遺跡

期待: 投石によって陥没した頭蓋骨の発見 等

検討: サバンナに石はある(あった)のか?

女性は石を投げたのか?

チンパンジーを観察するとかれらに利き腕はないそうだ。発掘された古代人の骨格から利き腕のありなしがわかるかと思っただ、それはわからないという。それでも、歯で皮をなめした時についた歯の線状痕から、160万年前の古代人は右利きとわかった。石器を作るときに削られた石の非対称な形で、作製者が右利きか左利きかわかるそうで、それによると200万年前の石器の製作者は右利きだった。

いくつか疑問がある。サバンナに投げやすい石はあったのだろうか。オーストラルピテクスの洞窟に石の集積所らしきものがあった、とどこかの記事で読んだが、投石用かどうかはわからない。投石は集団で行ったほうが安全で効果的だろう。そうすると、女性も? しかし、女性の投擲能力は男性よりもずっと低い(そうでもない? 水滸伝では、女性のつづて名人が敵将を次々と倒す)。なぜ女性に発達しなかったか? サバンナには乾季に耐える根菜があるが、それまでこれを食料とする生き物は少なかった。そこで根菜を採取して両手で運搬する(これも直立二足歩行の利点)

のが女性の役割だったのだろうか。

古代人は初めのうちは自然石を投げていたが、そのうちに尖った石の方が効果があることに気がつき石を加工し始める。石器の製作である。尖った石は肉を削いだり切ったりすることにも使われた。石でなく棒も投げただろう。やがて、棒の先を鋭くして槍を作る、石器を棒に固定して手斧にする、石の矢じりを棒の先端に着ける、と飛び道具は高度化してゆく。そのころになると、獲物の横取りだけではなく、積極的に攻撃して獲物を得るようになる。この時、直立2足歩行の高いエネルギー効率が草食動物の長距離追跡に役立った。さらに弓が発明されて、直立2足歩行の類人猿は地球史上で最強のハンターとなってゆく。

こういう分野ではどうやって論文にまとめるのか、わからないが、もし、将来、「投石によって初期人類は立った」説が認められた時には吉田もそう言っていたと思い出してください。

### 「投石」から発展

尖った石が効果的 → 石器作製

サルが遊びで「石器」を作る

Proffitt et al. Nature 2016; 539, 85



石と木の組み合わせ → 手斧、槍

手斧は投げやすく命中すれば非常に破壊的

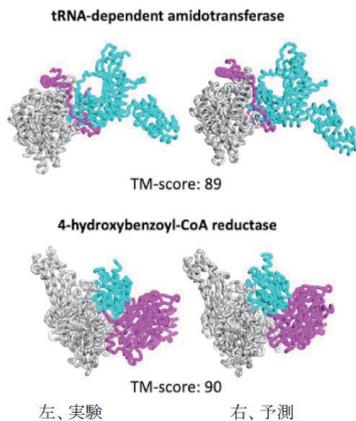
有史時代の投石; 最近まで有効な武器だった

投石機、石打ち刑、ダビデ、つぶて合戦(印地) …

## 4. 構造予測のその後・・・AIの勝利

3年前のこの年報に私は、アミノ酸配列からのタンパク質の立体構造予測について、molecular dynamics に特化した Anton 計算機 (D. Shaw) と統計力学による安定構造計算 (F. Hirata) に期待すると書いた。しかし、その後、どちらもそれほど展開していないようだ。早断できないが、問題があるのかもしれない。

### RoseTTAfold の驚くべき予測力



アミノ酸配列だけから3種のタンパク質の複合体の構造を予測

Baek et al., Science 10.1126/science.abj8754 (2021).

かわりに、この2年でAI (artificial intelligence, 人工知能) による構造予測が飛び出した。この場合、AIとは、要するに膨大な構造データベースからの類推である。Google 傘下の英国の DeepMind 社の開発した AlphaFold2 が2020年の国際コンテストで完全に近い構造でみんなを驚かした。水や脂質との相互作用など考えなくてもいいので、膜タンパク質の構造も予測できる。そして、ごく最近、今度は米国のワシントン大学のグループから AlphaFold2 に匹敵する性能の RoseTTAFold が発表された。驚いたことに、これは2つ (or 3つ) のタンパク質のアミノ酸配列だけから両者 (or 3者) の結合した複合体の構造を、ほぼ正確に予測した (上図、Science, July 15, 2021 から引用)。AI法のいいところは、だれでもアミノ酸配列を入力すれば数十分のうちに予測結果が得られることである。

### 追記

上記で脱稿して送ったら、すぐに年報発行人の遠藤さんが、さらに最近、Nature on-line (出版前の論文の速報、<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>) に AlphaFold2 の新しい論文が公開された、と知らせてくれた。この論文を読んで仰天、DNA と言えば F. Sanger の塩基配列決定がゲノムの新しい世界を開いたように、タンパク質の関わる研究の全分野を革新する内容だった。2020年のコンクール優勝以来、AlphaFold2 はなりを潜めていたが、その間に、彼らはヒトのタンパク質 5万種のほとんど全て (!!) を AlphaFold2 で構造予測していたのだ。そうしたら、5万のうち、予測構造に確信のもてるものが約3万、さらにそのうち約2万はもう間違いないと言えるレベルだということ (<http://alphafold.ebi.ac.uk>)。そして、構造がはっきり予測できないもののうち相当部分は本当に構造のない天然変性部分だろうという。アミノ酸側鎖の位置までわかるので、構造未知のいくつかのタンパク質を取り上げて構造を予測し、その活性中心の側鎖の配置から触媒作用機構を推定している。計算方法が詳述され、だれでも自由に使えるサイトまで公開された (下記)。

(<https://colab.research.google.com/drive/1LVPSOf4L502F21RWBmYJJYYLDIOU2NTL>) 試しに自分の扱うタンパク質のアミノ酸配列を入力してみたら、ほとんど正しい構造が予測されたという話があちこちから聞こえてきた。

## だれかにすぐに始めてほしい研究

1年以内にできたらひよっとすると来年の3人目のノーベル賞かも

$y = f(x)$  は解けた、ならば

逆関数  $x = g(y)$  を解いて欲しい

$Y$  (立体構造) を与えて  $x$  (アミノ酸配列) を求める

$y$ : 立体構造  
 $f$ : folding 関数  
 $x$ : アミノ酸配列  
 $g$ : 逆folding 関数

つまり、デザインした立体構造にfoldingするアミノ酸配列を見出すこと

あるタンパク質によく結合する別のタンパク質の3D構造をデザインし、そのアミノ酸配列を見出すこと

本当の「タンパク質工学」の始まり となる

これだけ信頼できる構造予測が簡単にできるとなると、研究者がやることは、ごく簡単な実験で（例えば予測 3D 構造で近接している 2 つアミノ酸をシステインに変えて酸化すれば S-S 架橋ができるとか）予測を正当化することですむ。予測構造を初期構造として分子動力学計算を実施すれば構造の変化もわかる。さらに特殊な情報の必要がないかぎり、結晶も電子顕微鏡もスキップできるのではなからうか・・・

とにかく、アミノ酸配列が 3 D 構造を決定するという Anfinsen の提案以来 50 年にわたり幾多の俊英たちの挑戦を退けてきた超難問がここにほぼ解かれた・・・来年のノーベル賞は英国と米国の 2 つのグループで決まりか。

## 文献

- Gestaut D, Limatola A, Joachimiak L, Frydman J (2019) The ATP-powered gymnastics of TRiC/CCT: an asymmetric protein folding machine with a symmetric origin story. *Curr Opin Struct Biol.* Apr; 55: 50–58 DOI: 10.1016/j.sbi.2019.03.002
- Guo H, Bueler SA, Rubinstein JL (2017) Atomic model for the dimeric FO region of mitochondrial ATP synthase. *Science* 358, 936–940 DOI: 10.1126/science.aao4815
- Guo H, Courbon GM, Bueler SA, Mai M, Liu J, Rubinstein JL (2021) Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline *Nature* 589 143-147-DOI: 10.1038/s41586-020-3004-3
- Guo H, Suzuki T, Rubinstein JL (2019) Structure of a bacterial ATP synthase. *Elife.* 8:e43128 DOI: 10.7554/eLife.43128
- Joachimiak LA, T. Walzthoeni T, Liu CW, Aebersold R, Frydman J (2014) The structural basis of substrate recognition by the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Cell* 159, 1042 DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.042
- Kobayashi R, Suzuki T, Yoshida M.(2007) Escherichia coli phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol Microbiol* 66(1):100-9. DOI:org/10.1111/j.1365-2958.2007.05893.x
- Suzuki T, Tanaka K, Wakabayashi C, Saita E, Yoshida M (2014) Chemomechanical coupling of human mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase motor. *Nature Chem Biol.* 10, 930-936 DOI: 10.1038/nchembio.1635
- Varghese F, Blaza JN, Jones AJY, Jarman OD, Hirst J. (2018) Deleting the IF1-like z subunit from Paracoccus denitrificans ATP synthase is not sufficient to activate ATP hydrolysis. *Open Biol.* 8: 170206 DOI: org/10.1098/rsob.170206
- Zarco-Zavala M, Watanabe R, McMillan DGG, Suzuki T, Ueno H, Mendoza-Hoffmann F, García-Trejo JJ, Noji H. (2020) The 3 × 120° rotary mechanism of Paracoccus denitrificans F<sub>1</sub>-ATPase is different from that of the bacterial and mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 117(47):29647-29657 DOI: 10.1073/pnas.2003163117



著者：吉田賢右

JT 生命誌研究館顧問・研究ディレクター、東京工業大学名誉教授。

1944 年群馬県出身。東京大学理学部生物化学科卒業。理学博士(東京大学)。自治医科大学第一生化学、東京工業大学理学部、同生命理工学部、同資源化学研究所所長、京都産業大学総合生命科学部教授、同タンパク質動態研究所シニアリサーチフェローを経て現職。

# 新型コロナウイルスのスパイク蛋白質と感染増強に関わる抗体の複合体構造解析

岸川 淳一

大阪大学 蛋白質研究所

## はじめに

2013年頃の直接電子検出器 (Direct Electron Detector; DED) の出現により、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-Electron Microscopy; Cryo-EM)<sup>\*1</sup> による蛋白質構造解析の分解能は飛躍的に向上し、X線結晶構造解析にならぶ蛋白質構造解析の主要な方法の1つとなった。実際に、Cryo-EMによる構造解析の登録件数は、年々増加しており、数年後にはX線結晶構造解析の登録件数を超えると予想されている。また、Cryo-EMによる構造解析は、100 kDaを下回る分子量の蛋白質の構造解析には向かない、という分子量の壁が存在したが、DEDの出現以降の装置および解析手法の開発・進歩により、その壁も取り払われつつある<sup>\*2</sup>。Cryo-EMによる構造解析では、対象の蛋白質に複数の状態があった場合でも、EM画像上で分類する<sup>\*3</sup>ことで、それぞれの状態の構造を同時に明らかにできることが大きなメリットである。本稿では著者が行った新型コロナウイルスのスパイク蛋白質と新型コロナウイルスの感染を増強する抗体との複合体の構造解析を紹介する。その構造解析でも、大いに上記のメリットが発揮された。

## 新型コロナウイルスと感染増強抗体

2019年12月、中国武漢を発端とした新型コロナウイルス (Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2; SARS CoV-2) は、またたく間に世界に拡がり、パンデミックの様相を呈している。これまでに、全世界で約2億人が感染し、約420万人の人命が失われた (2021年7月時点)。日本でも、約90万人が感染し、1万5千人が亡くなっている。現在でも収束の目処は立っていない。コロナウイルスは、RNAウイルスの1種で、柔らかな脂質2重膜の殻 (エンベロープ) の中にその遺伝情報であるゲノムRNAが収まっている。ゲノムRNAには、ウイルスを構成する29種類の蛋白質がコードされている<sup>1)</sup>。コロナウイルスの蛋白質の構造を知ることは薬を作ることに繋がるため、世界中多くの研究者がコロナウイルスの蛋白質の構造解析に取り組んでおり、その結果、ほとんどの蛋白質の構造が明らかになった<sup>1)</sup>。その中で、とりわけ注力されているのが、ウイルスの感染に重要な役割を持つスパイク蛋白質の構造解析である。これまでに報告されている約1,400のコロナウイルス関連蛋白質のうち、実に460以上がスパイク蛋白質関連であることから注目度合いがよく分かる (2021年7月時点)。スパイク蛋白質は1回膜貫通領域を持つ蛋白質で、N末ドメイン (NTD)、レセプター結合ドメイン (RBD)、S2ドメインを持ち、ホモ3量体でエンベロープの表面から突き出るような形で存在する<sup>\*4</sup>。RBDが、宿主細胞 (ここではヒト細胞) のACE2受容体に結合することがウイルス感染の最初の重要なステップとなるため、RBDを含むスパイク蛋白質の構造解析が盛んに行われている。ニュースを賑わせている変異株 (アルファ株、デルタ株など) の多くは、RBDに変異が入ることでACE2受容体との結合性が変化したもので、変異の結果、感染力がより強くなっていると考えられている。

RBDやその周辺に結合し、ACE2受容体との結合を阻害するような抗体は感染を抑制する中和抗体となるが、その一方で、重篤な症状を示したコロナウイルス患者から単離した抗体を調べたところ、スパイク蛋白質とACE2受容体の結合を促進する抗体 (増強抗体) があることがわかった<sup>2)</sup>。増強抗体がスパイク蛋

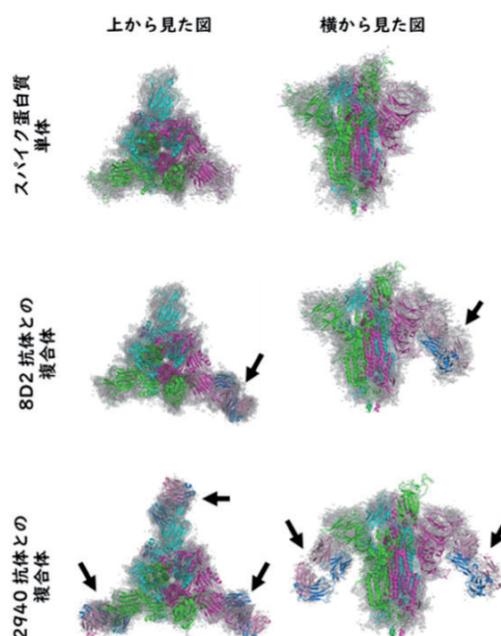


図1. 構造解析で得られた新型コロナウイルスのスパイク蛋白質と増強抗体との複合体構造。矢印で抗体 (Fab) の位置を示す。8D2抗体は1ヶ所、2940抗体は3ヶ所のNTDに結合しているのがわかる。

白質のどの部分に結合するかを生化学的に調べたところ、RBDとは直接関係しないNTDに結合することが示唆された。そこで私達は、感染を増強する抗体がNTDのどこに結合するかを調べるために、単粒子解析によるスパイク蛋白質と抗体複合体の構造解析に取り組んだ。

## 新型コロナウイルスのスパイク蛋白質構造解析

精製したコロナウイルスのスパイク蛋白質そのもの、スパイク蛋白質と感染増強を起こす2種類の抗体 (8D2抗体、2940抗体) をそれぞれ混ぜ合わせた溶液を使い、クライオ電子顕微鏡の観察用基板を調製した。調製した基板は、ハイエンドクライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて撮影を行った。撮影したそれぞ

れ約 6,000 枚程度の電顕画像から解析を行い、スパイク蛋白質-増強抗体複合体の構造解析を行った。その結果、スパイク蛋白質単体は 3.6Å、8D2 抗体との複合体は 3.5-3.7Å、2940 抗体との複合体は 3.2-4.0Å の分解能で構造を得ることができた<sup>2)</sup>。どちらの抗体も NTD の下側に結合していることがわかった (図 1)。

これは、抗体の抗原 (エピトープ) 解析やそれを元にした結合シミュレーションの結果とよく一致していた。また、8D2 抗体は 3 つの NTD のうちいずれか 1 つに結合しているのに対し、2940 抗体は 2 つ、または 3 つの NTD に結合しており、それぞれの抗体の NTD に対する親和性を反映していることがわかった。このように複数の状態 (結合している抗体の数など) を含む蛋白質の構造解析を行えることは、前述の Cryo-EM を使った構造解析のメリットである。一方で、NTD への増強抗体の結合が RBD の構造に影響を与えることが期待されたが、抗体結合による明確な違いは見いだされなかった。別の実験から抗体の感染増強効果は、Y 字型の抗体の形が重要であるという結果が得られた。増強抗体は、エンベロープ上に存在する隣り合った 2 つのスパイク蛋白質の NTD を繋げ、下側に引き下げることで、RBD の構造変化を誘起するのではないかと考えられる (図 2)。今後、このモデルが正しいか、構造学・生化学の両面からさらに検証していく必要がある。

抗体に依存する感染増強自体は、以前から知られており、抗体依存性感染増強 (Antibody-Dependent Enhancement: ADE) と呼ばれる<sup>3)</sup>。この現象は、コロナウイルスやインフルエンザウイルス、HIV ウイルスなど様々なウイルスで観察される。そのメカニズムは、対象のウイルスに別のウイルスに対する抗体が結合することで、副次的に感染が増強されるものと考えられている。今回、我々が報告した増強抗体は、ADE とは全く異なる新たなメカニズムで感染増強を引き起こす。このメカニズムについて、さらに研究をすすめることで、コロナウイルスなどによる重篤化リスクの低減につながる可能性がある。

## 著者注

<sup>※1</sup> 低温電子顕微鏡。電子線損傷を防ぐために液体窒素温度下で対象を観察する電子顕微鏡。

<sup>※2</sup> 現在では、数 10 kDa の蛋白質の構造解析も可能となった。しかし、小さい分子量の蛋白質の場合、サンプルへの要求が大きいため、一般には数 100 kDa 以上の蛋白質が好ましい。

<sup>※3</sup> EM 画像上で単一の状態を取り出すので、in silico purification とも呼ばれる。

<sup>※4</sup> エンベロープからスパイク蛋白質が突き出ている様子が、太陽のコロナのように見えるため、コロナウイルスと呼ばれる。

<sup>※5</sup> AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk>)

<sup>※6</sup> AlphaFold2 は、折りたたまった構造予測を与えるが、なぜそのように折りたたまるかなどの情報は与えない。

## 引用文献

<sup>1)</sup> Evolution of the SARS-CoV-2 proteome in three dimensions (3D) during the first six months of the COVID-19 pandemic. Lubin et al. bioRxiv 406637 (2020)

<sup>2)</sup> An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies. Liu et al. Cell S0092-8674(21)00662-0 (2021)

<sup>3)</sup> Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. Lee et al. Nat. Microbiol. 5, 1185-1191 (2020)

<sup>4)</sup> Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Jumper et al. Nature (2021)

<sup>5)</sup> Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. Tunyasuvunakool et al. Nature (2021)

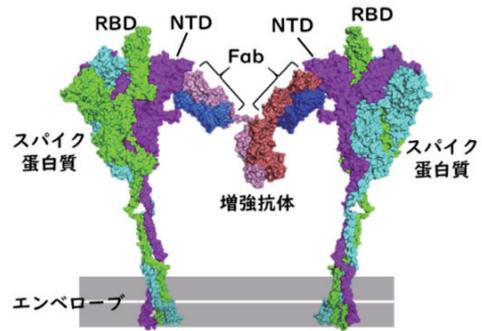


図 2. 増強抗体の感染増強モデル。増強抗体がエンベロープ上に存在する 2 つのスパイク蛋白質の NTD に結合し、下方に引き下げることで RBD の構造変化を誘起する。その結果、宿主細胞の ACE2 受容体との結合が促進され、感染が増強される。

## これからの蛋白質の構造解析

構造生物学は転換期にある。2021 年 7 月、深層学習による蛋白質構造予測ツールである AlphaFold2 が公開された<sup>4)</sup>。AlphaFold2 は、タンパク質構造予測コンペ「CASP」で 2 位に圧倒的なスコアの差をつけ優勝したツールである。さらに、AlphaFold2 でヒトのほとんどすべての蛋白質構造を予測したデータベースも公開された<sup>5),\*5</sup>。高精度の蛋白質の予測構造への容易なアクセスは、これからの蛋白質科学を変えていくだろう。配列比較と同じ感覚での構造比較や、予測構造を元にした実験のデザインが行われるだろうし、さらには反応機構の議論ができるかもしれない。「正確な構造予測」は、それだけインパクトがある技術である。では、蛋白質の構造解析が不要になったかという、そういうわけではない。AlphaFold2 でも、巨大な蛋白質や複合体蛋白質、膜蛋白質の構造予測は、まだ十分ではないし、蛋白質折りたたみの過程<sup>6)</sup>や反応に伴う構造変化など、動的な構造情報を予測することも出来ていない。このような動的な構造情報を得るためにも、Cryo-EM を使った構造解析のような手法はまだまだ現役である。構造解析が進めば、構造予測も進む。もうしばらく構造生物学にとってエキサイティングな時代が続きそうだ



著者：岸川淳一

大阪大学蛋白質研究所助教。1981 年長崎県出身。九州工業大学情報工学部生命システム工学科中途退学、同大学大学院情報工学研究科博士課程修了。博士 (情報工学)。理化学研究所、金沢大学、京都産業大学を経て現職。

## 研究所の活動

生物化学研究室（遠藤斗志也）

分子細胞生物学研究室（潮田亮）

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）

# 生物化学研究室 Laboratory of Biochemistry

教授 遠藤斗志也 Prof. Toshiya Endo, Ph.D.

## 1. 研究概要

真核生物の細胞内には高度に発達したオルガネラ（細胞小器官）構造が作られ、それらが細胞に課せられた複雑で膨大な仕事を分散管理している。真核細胞に必須のオルガネラであるミトコンドリアは、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。近年ミトコンドリア機能と老化や健康、神経変性疾患をはじめとする様々な病態との関係も注目されている。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、細胞の内外からの要請とシグナルに応答し、不要となったミトコンドリアを除去する一方で、必要に応じてミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。ミトコンドリアは de novo には作られず、既存のミトコンドリアを拡大、分裂、分配することで増える。ミトコンドリアを拡大するためには、ミトコンドリアを構成する 1000 種類を越えるタンパク質とカルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生合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

### ミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体のクライオ電子顕微鏡 (EM) 構造の決定

1000 種におよぶほとんどのミトコンドリアタンパク質はミトコンドリア外膜トランスロケータの TOM 複合体によりミトコンドリア内に取り込まれ、その後外膜、膜間部、内膜、マトリクスといったミトコンドリア内の区画に仕分けられる。外膜には小分子の輸送を担うポリンをはじめとするいくつかの  $\beta$  バレル型膜タンパク質が存在する。 $\beta$  バレル型膜タンパク質は TOM 複合体を介して外膜を通過した後、膜間部側から外膜のトランスロケータ SAM 複合体により、 $\beta$  バレル構造をつくりつつ外膜に挿入される。SAM 複合体は Sam35, Sam37, そして  $\beta$  バレル型膜タンパク質の Sam50 と Mdm10 から構成されるが、Mdm10 は常に SAM 複合体に組み込まれているのではなく、SAM 複合体と ERMES 複合体 (ER とミトコンドリアのコンタクトをつくる複合体) との間をダイナミックに往き来することが示唆されていた。私たちは、SAM 複合体が  $\beta$  バレル型膜タンパク質を外膜に組み込む仕組みを解明するために、出芽酵母由来の Mdm10 を含む SAM 複合体と含まない SAM 複合体のクライオ EM 構造を分解能 2.8-3.2Å で決定した (Takeda et al. Nature 2021)。

Mdm10 を含まない SAM 複合体構造では、Sam50 が 2 量体を形成しており ((Sam50)<sub>2</sub>-Sam35-Sam37)、各 Sam50 は  $\beta$  バレルが完全に閉じない「ラテラル開口型」であった (この複合体を SAM<sup>dimer</sup> 複合体と呼ぶ)。Sam50 どうしの相互作用はほとんどなく (界面には脂質がはさままれていた)、Sam35 と Sam37 が互いに相互作用しつつ、Sam50 の 2 量体にサイトゾル側から結合することで、Sam50 を SAM 複合体に固定していた。一方、これまでの生化学的解析と低分解能の EM 解析からは、SAM 複合体の構造として Sam50 : Sam35 : Sam37 = 1 : 1 : 1 の化学量論で構成されるヘテロ 3 量体構造 (SAM<sup>core</sup> 複合体と呼ぶ) が示唆されており、ミセル中のヘテロ 3 量体のクライオ EM 構造も最近報告された。そこで、His タグおよび HA タグをそれぞれ付加した 2 種類の Sam50 を、内在性 Sam50 を欠失した酵母株に導入し、His タグによるアフィニティ精製を行った。その結果、His-Sam50 とともに HA-Sam50 が精製されたことから、SAM<sup>dimer</sup> 複合体がミトコンドリア上に確かに存在していることが示された。さらにネイティブ PAGE による複合体サイズの解析や架橋実験により、出芽酵母のミトコンドリア上には SAM<sup>core</sup> 複合体と SAM<sup>dimer</sup> 複合体がともに存在することが明らかとなった。それではなぜミトコンドリア上に SAM<sup>core</sup> 複合体と SAM<sup>dimer</sup> 複合体が存在するのか。基質の  $\beta$  バレル型膜タンパク質前駆体は、 $\beta$  バレル構造を形成する  $\beta$  ストランドのうち最も C 端側のストランド中の「 $\beta$  シグナル」が SAM 複合体に認識されることが知られている。そこで His タグを付加した基質 Tom40 の  $\beta$  シグナルを樹脂に固定

化し、どちらの SAM 複合体が結合するかを調べた。その結果、基質 Tom40 の  $\beta$  シグナルは SAM<sup>dimer</sup> 複合体に結合することがわかった。すなわち、SAM<sup>dimer</sup> 複合体は基質の Tom40 を受け入れる前段階の分子種であることがわかった。

現在の私たちのモデルでは、基質 Tom40 の  $\beta$  シグナルが SAM<sup>dimer</sup> 複合体に認識されると、Tom40 は一方の Sam50 分子と入れ替わる形で SAM 複合体に結合し、一過的に Sam50-Tom40-Sam35-Sam37 という中間体複合体をつくる。この複合体中で、Tom40 の  $\beta$  バレル構造が形成されると考えられる。 $\beta$  バレル構造が完成すると Tom40 は SAM 複合体から解離する必要があるが、私たちの以前の生化学的解析から、もう一つの  $\beta$  バレル型膜タンパク質の Mdm10 が Tom40 と入れ替わることで、完成型 Tom40 を SAM 複合体から追い出すことが示唆されていた。実際、今回決定された Mdm10 を含む SAM 複合体 (SAM<sup>Mdm10</sup> 複合体) では、SAM<sup>dimer</sup> 複合体中の一方の Sam50 分子が Mdm10 に入れ替わっており、Mdm10 のバレル構造内に Sam37 の長いヘリックス構造が入り込むことで、Mdm10 が SAM 複合体につき止められていた。この後、Mdm10 がもう一つの Sam50 分子と入れ替わることで SAM<sup>dimer</sup> 複合体が再生成され、反応サイクルが完結すると考えられる。

### 3. Research projects and annual reports

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

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and are transported to mitochondria by dedicated import systems. The outer membrane contains several b-barrel membrane proteins, including porins, which are responsible for the transport of small molecules. b-barrel membrane proteins move through the outer membrane via the TOM complex and are inserted into the outer membrane from the intermembrane-space side by the translocator SAM complex, forming a b-barrel structure. The SAM complex is composed of Sam35, Sam37, and the b-barrel membrane proteins Sam50 and Mdm10, yet Mdm10 is not always incorporated into the SAM complex, but it dynamically moves back and forth between the SAM complex and the ERMES complex (an inter-organelle tethering complex between the ER and mitochondria). To elucidate the mechanism by which the SAM complex incorporates b-barrel membrane proteins into the outer membrane, we determined the cryo-EM structures of the yeast SAM complexes with and without Mdm10 at a resolution of 2.8-3.2Å.

In the structure of the SAM complex without Mdm10, Sam50 formed a dimer ((Sam50)<sub>2</sub>-Sam35-Sam37), and each Sam50 was "laterally open" with the b-barrel not completely closed (this complex is called the SAM<sup>dimer</sup> complex). Sam35 and Sam37 interacted with each other and bound to the dimer of Sam50 from the cytosolic side, thereby anchoring Sam50 to the SAM complex. On the other hand, biochemical and low-resolution EM analyses have suggested a heterotrimeric structure (called the SAM<sup>core</sup> complex) consisting of Sam50 : Sam35 : Sam37 = 1 : 1 : 1 stoichiometry as the structure of the SAM complex, and the cryo-EM structure of the heterotrimer in micelles was also recently reported. We thus introduced two types of Sam50, one with a His-tag and the other with an HA-tag, into a yeast strain lacking endogenous Sam50, and performed affinity purification using the His-tag resin. The results showed that HA-Sam50 was purified together with His-Sam50, indicating that the SAM<sup>dimer</sup> complex does indeed exist on mitochondria. Furthermore, analysis of the apparent complex size by native PAGE and cross-linking experiments showed that both the SAM<sup>core</sup> and SAM<sup>dimer</sup> complexes are present on yeast mitochondria. Then, an arising question is why the SAM<sup>core</sup> and SAM<sup>dimer</sup> complexes exist on mitochondria. It is known that the SAM complex recognizes the "b-signal" in the C-terminal b-strand of the b-barrel part of the substrate precursor. Therefore, we immobilized the b-signal of the His-tagged substrate Tom40 on the resin and examined which SAM complex binds to it. We found that the b-signal of substrate Tom40 binds to the SAM<sup>dimer</sup> complex. In other words, the SAM<sup>dimer</sup> complex was a species that accommodates the substrate Tom40.

In our current model, when the b-signal of the substrate Tom40 is recognized by the SAM<sup>dimer</sup> complex, Tom40 binds to the SAM complex in a manner that replaces one of the Sam50 molecules, transiently forming the Sam50-

Tom40-Sam35-Sam37 intermediate complex. Once formation of the b-barrel structure becomes complete, Tom40 needs to dissociate from the SAM complex, but our previous biochemical analyses suggested that Mdm10, another b-barrel membrane protein, could replace Tom40 and drive the mature Tom40 out of the SAM complex. Indeed, in the cryo-EM structure of the SAM complex containing Mdm10 determined in the present study (the SAM<sup>Mdm10</sup> complex), one of the Sam50 molecules in the SAM<sup>dimer</sup> complex was replaced by Mdm10, and the long helical structure of Sam37 was inserted into the barrel structure of Mdm10, thereby tethering Mdm10 to the SAM complex. After this, Mdm10 was replaced by another Sam50 molecule, and the SAM<sup>dimer</sup> complex was re-generated to complete the reaction cycle.

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

- H. Takeda, A. Tsutsumi, T. Nishizawa, C. Lindau, J.V. Busto, L.-S. Wenz, L. Ellenrieder, K. Imai, S.P. Straub, W. Mossmann, J. Qiu, Y. Yamamori, K. Tomii, J. Suzuki, T. Murata, S. Ogasawara, O. Nureki, T. Becker, N. Pfanner, N. Wiedemann, M. Kikkawa, and T. Endo, Mitochondrial sorting and assembly machinery operates by b-barrel switching. *Nature* 590 (7844), 163-169 (2021)
- H. Shiino, S. Furuta, R. Kojima, K. Kimura, T. Endo, and Y. Tamura, Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted Escherichia coli phosphatidylserine synthase PssA. *FEBS J.* 288, 3285-3299 (2021) (Online published on Dec 7, 2020)
- T. Tamura, A. Fujisawa, M. Tsuchiya, Y. Shen, K. Nagao, S. Kawano, Y. Tamura, and T. Endo, Umeda M, Hamachi I, Organelle membrane-specific chemical labeling and dynamic imaging in living cells. *Nat Chem Biol.* 16 (12), 1361-1367 (2020) (online published on Sep 21, 2020).

##### 英文総説

- Y. Arais, K. Imai, and T. Endo (Review), Structural snapshot of the mitochondrial protein import gate. *FEBS J.* online published on Dec 10, 2020
- Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo (Review), Lipid homeostasis in mitochondria. *Biol. Chem.* 401, 821-833 (online published on April 22, 2020)

#### 5. 学会発表など

Toshiya Endo: Pathways, machineries and mechanisms of mitochondrial protein and lipid transport (招待講演) DBB Zoom Seminar (hosted by Stockholm University), Online 2020.6.1

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア・小胞体間におけるリン脂質合成輸送阻害剤の単離 (ポスター発表) 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

柿元百合子, 小島理恵子, 新名真夏, 黒川量雄, 中野明彦, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間結合因子ERMES複合体クラスターの解離がERストレス軽減に寄与する (ポスター発表) 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

松崎淳平, 田代晋也, 新田莉彩子, 尾野雅哉, 吉丸哲郎, 片桐豊雅, 遠藤斗志也, 田村康: Split-APEX2-GFP を用いたヒトミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイト局在タンパク質の同定 (ポスター発表), 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

Haruka Sakaue, Jiyao Song, Toshiya Endo: Requirement of the TOM complex for mitochondrial outer membrane protein biogenesis in vivo (ポスター発表) 第20回日本蛋白質科学会年会, オンライン, 2020.7.7-9

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間におけるリン脂質合成酵素及び輸送因子阻害剤の探索 (口頭発表), 第93回日本生化学会大会, オンライン, 2020.9.14-16

木村啓介, 河合文啓, 平田邦生, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康: Firmicutes bacterium 由来のCDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明 (ポスター発表), 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020.12.2-4

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間リン脂質輸送阻害剤の (ポスター発表), 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020.12.2-4

木村啓介, 河合文啓, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康: Firmicutes bacterium 由来の CDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明 (口頭発表), 第28回山形分子生物学セミナー, オンライン, 2020.12.3

## 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 (A)

課題名: ミトコンドリアの生合成と機能維持を担うタンパク質交通システムの解明

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2022 年度 (3 年) → 中止

科学研究費補助金・基盤研究 (S)

課題名: ミトコンドリアの生合成と機能維持を担うタンパク質交通システムの分子基盤

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2024 年度 (5 年)

科学研究費補助金・新学術領域研究

課題名: Msp1 によるオルガネラ間コンタクトを介したタンパク質交通の校正

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2021 年度 (3 年) → 中止

科学研究費補助金・学術変革領域研究 (A)

課題名: 細胞内タンパク質の多重局在とその制御機構の解明

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2024 年度 (5 年)

AMED・CREST

課題名: タンパク質の交通が制御するミトコンドリアプロテオスタシスの構造生物学研究

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2024 年度 (5 年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

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: 2018-2020 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: 2018-2021 年度 (4 年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

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: 2019-2021 年度 (3 年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名: ミトコンドリア膜間部タンパク質の外膜透過における分子機構の解明

研究代表者: 阪上春花, 取得年度: 2020-2022 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: JST/CREST 「細胞内ダイナミクス」細胞内現象の時空間ダイナミクス 研究総括

### 3) アウトリーチ活動

竹田弘法: 【YouTube ライブ配信 「おうちでラボツアー ミトコンドリアの仕組みを探れ」】

<https://www.miraikan.jst.go.jp/events/202010241602.html>

実施日時： 2020.10.24

場所： 日本科学未来館遠藤プロジェクト研究室よりライブ配信

遠藤斗志也：【YouTube ライブ配信「トークセッション：研究者に聞く、そんなに化学は面白いの？」】

<https://www.miraikan.jst.go.jp/events/202010251603.html>

実施日時： 2020.10.25

篠田沙緒里：【YouTube ライブ配信：第1回 細胞生物若手の会オンライン交流会～すべてはここから始まった】

<https://www.youtube.com/watch?v=TKG7HX6aJFQ&feature=youtu.be>

実施日時： 2020.9.25



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)

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

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。このようないわゆる不良タンパク質は、単に機能を持たないだけでなく、細胞毒性によって細胞死を誘導し、アルツハイマー病やパーキンソン病のような種々の神経変性疾患の原因ともなっている。従って、「タンパク質を正しく合成する productive folding」と、「ミスフォールドしたタンパク質を適正に処理するための品質管理機構」ともども研究することは、「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、3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) 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
- 2) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析
- 3) タンパク質品質管理に関わる新規システイン修飾

以下、プロジェクト 1)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。

### 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環境下にあるが、この酸化的環境において ERdj5 が還元活性を発揮するためには、何らかの方法によって還元力を得なければならない。言い方を変えれば、電子はどのようにして ERdj5 に伝達されるのか、小胞体はどのようにしてサイトゾルから電子を得ているのか、が避けて通れない大きな問題となる。これは小胞体というオルガネラに残された細胞生物学上の最大の謎の一つでもある。従来知られてきたのとはまったく異なる新たな方法によって、小胞体に電子が供給されているメカニズムを明らかにしつつある。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

### 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。小胞体は酸化的フォールディングの場であり、そのレドックス環境はサイトゾルと比較し、酸化的環境に維持されている。また、多くの酸化酵素が存在し、酸化的フォールディングを触媒している (図 1-①)。

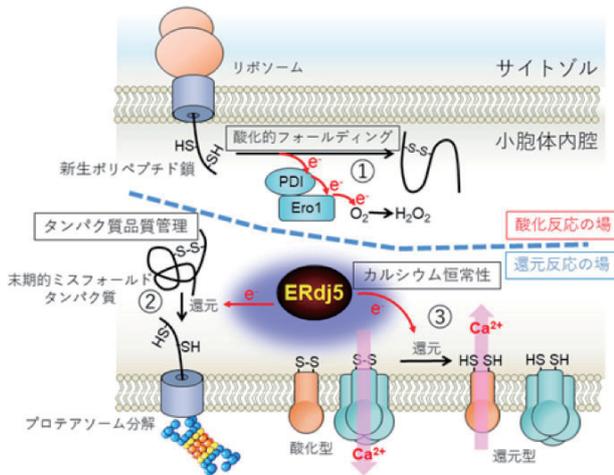


図 1. これまで小胞体は酸化的フォールディングを中心とした酸化反応の場として考えられてきた。一方、潮田らは小胞体内腔の還元反応の重要性を明らかにしてきた。

この酸化的環境で、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 (図 1-②、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い出しており、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、極めて巧妙な制御機構を明らかにしつつある (図 1-③)。

今回、さらに ERdj5 の重要性を明らかにするため、ERdj5 ノックダウン/ノックアウトをした線虫、CRISPR/Cas9 を用いて樹立した ERdj5 欠損 HeLa 細胞、または MEF 細胞を用いて、ERdj5 欠損による細胞内異常を観察した。線虫では、これまで知られていた筋肉以外の腸などの細胞でミトコンドリアの断裂が観察された。このミトコンドリアの断裂は、哺乳類細胞 HeLa 細胞、MEF 細胞でも再現された。小胞体局在タンパク質 ERdj5 の欠損が、なぜミトコンドリアの形態に影響を及ぼすのかを調べた。今回、ERdj5 機能不全がサイトゾルのカルシウムイオン濃度が恒常的に上昇することを突き止めた。ERdj5 欠損細胞では、カルシウムイオン濃度依存的に活性化する Drp1 が活性化しており、Drp1 の GTPase 活性依存的にミトコンドリアのくびり切りが起こることを見出した。ERdj5 欠損によるミトコンドリア異常断裂はミトコンドリア機能の低下を引き起こし、細胞内での ROS を上昇させた。このことにより、細胞のアポトーシスを惹起させ、この細胞死は神経変性疾患などの疾患を悪化させる可能性も示唆される。また、線虫の ERdj5 欠損は線虫の寿命を低下させることも明らかにした。これらの知見は ERdj5 の制御に関し、その重要性を再認識する結果となった (Submitted)。さらに、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。

### 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:

**Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and  $Ca^{2+}$  flux.** We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in the endoplasmic reticulum (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  $\text{Ca}^{2+}$  pump on the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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.

Here, we focused on the control of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump and channel by the redox regulation in the ER. Here, we obtained the structural information of SERCA2b for understanding how ERdj5 promotes the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  by SERCA2b. Then, we found that the reductase ERdj5 affects the  $\text{Ca}^{2+}$  release activity of the IP3R. Additionally, we found that ERdj5 deficiency causes mitochondrial fragmentation due to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostatic disruption. It was clarified that redox regulation by ERdj5 is involved in the uptake and release of calcium ions in the ER.

#### 4. 論文, 著書など

潮田亮: レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の解明～還元反応の場としての小胞体～, 生化学 192(4), 536-546(2020)

#### 5. 学会発表など

潮田亮: 還元反応の場としての小胞体, 第 1 回レドックス R&D 委員会サテライトシンポジウム, オンライン, 2021.03.04-05 (招待講演)

堤智香, 潮田亮, 永田和宏: 小胞体レドックス環境を構築するグルタチオン輸送機構の解明, 第 72 回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.06.09-11

Ryo Ushioda: Redox signal for maintenance of ER homeostasis. 第 93 回日本生化学会大会シンポジウム, オンライン, 2020.09.14-16

和田匠太, 永田和宏, 潮田亮: ERdj5 を介した小胞体ストレスセンサー制御機構の解明, 第 27 回次世代医工学研究会, オンライン, 2020.12.07

堤智香, 潮田亮, 永田和宏: 小胞体レドックスはどのように構築されるのか, 第 3 回オルガネラゾーン若手の会, オンライン, 2020.12.2

#### 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 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

研究分担者: 潮田亮, 取得年度: 2020-2021 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: 潮田亮 (研究代表者: 遠藤斗志也)

取得年度: 2020-2021 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

研究開発分担機関代表者: 潮田亮, 取得年度: 2020 年

資生堂

課題名：ジメチルピラゾリルジメチルピリミジン塩酸塩によるチロシナーゼタンパク分解のメカニズム解明に関する研究

研究代表者：潮田亮, 取得年度：2020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：2020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

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名：TMX4 を中心とする小胞体膜近傍での還元ネットワークの解明

研究代表者：堤智香, 取得年度：2018-2020年

## 2) 学外活動

(1) 潮田亮：文部科学省 科学技術・学術政策研究所 専門調査委員

(2) 潮田亮：小胞体ストレス研究会 世話人

(3) 潮田亮：京都第二赤十字看護専門学校 非常勤講師

(4) 潮田亮：新学術領域「オルガネラゾーン」班友

## 3) アウトリーチ活動

(1) 潮田亮：日本・青少年サイエンス交流事業「さくらサイエンスプラン」に参加

(2) 潮田亮：日本学術振興会「ひらめき★ときめきサイエンス」採択

(3) 潮田亮：兵庫県立鳴尾高等学校 模擬授業「生命を「カタチ」作るもの」



2021年春 集合写真

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

教授 千葉 志信 Prof. Shinobu Chiba, Ph.D

## 1. 研究概要

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

当研究室では、タンパク質の合成と成熟、さらには、その空間配置（局在化）の分子機構を明らかにすることを目指し研究を進めている。生命活動の実働部隊であるタンパク質が合成され機能を獲得するこの過程は、情報が生命へと変換される最初の重要なプロセスであり、このメカニズムを理解することは、遺伝情報が生命活動へと変換される機構を理解することに繋がる。加えて、我々は、合成の途上で生理機能を発揮するユニークなタンパク質を見出した。例えば、枯草菌 MifM は、翻訳の途上で自身を合成するリボソームに働きかけ、自らの翻訳伸長を一時停止（アレスト）する性質を持つ。この性質を利用し、タンパク質膜組込装置である YidC の活性をモニターし、その合成量をリアルタイムに調整する役割を担っている。MifM の発見に先駆け共同研究者である伊藤維昭氏らが見出した大腸菌 SecM も、翻訳の途上で機能を発揮する因子のひとつである。それらの「働く翻訳途上鎖」の発見は、遺伝子の機能発現についての我々の理解を拡張するものであり、我々は、「翻訳途上鎖が主役を演じる生命現象」にも着目している。その研究を通じて、「翻訳途上鎖の分子生物学」という新たな学術分野の創成と発展に貢献したい。

## 2. 本年度の研究成果

### (1) タンパク質ダイナミク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。この引っ張り力感受性に基づいた「タンパク質ダイナミクスレポーター」を構築した。さらに、それをトランスポゾンに導入した Transposable protein-dynamics reporter (TnDR) を構築し、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製した。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 (Fujiwara et al., Cell Rep. 2020)。この TnDR と次世代 DNA シーケンス技術を組み合わせることで網羅性を大きく向上させた、第二世代の TnDR (TnDR-seq) の開発も進めている。

### (2) 新規翻訳アレスト因子の同定と解析

真正細菌において過去に見出された翻訳アレスト因子のうち 3 つ (SecM, MifM, VemP) は、タンパク質局在化装置をコードする遺伝子上流にコードされている。今回、400 種類以上の真正細菌ゲノムを網羅的に探索し、タンパク質局在化装置遺伝子上流にコードされている翻訳アレスト因子を、さらに 3 つ見出し、それぞれ、ApcA, ApdA, ApdP と命名した。ApcA, ApdA は放線菌に由来し、ApdP は根粒菌に由来する。大腸菌、枯草菌の翻訳系を用いた遺伝学、生化学的な解析から、これらはいずれも翻訳アレストを引き起こすこと、また、その翻訳アレストは、ある特定のコドン 1 カ所で行われることもそれぞれ示された。網羅的な変異解析を行い、それぞれのアレスト因子による翻訳アレストに重要な配列を同定した。興味深いことに、細菌の進化の過程でそれぞれ独立に生じたと思われるこれらのアレスト因子が、互いに類似のアミノ酸配列 (RAPG もしくは RAPP) に依存するかたちで翻訳アレストを起こすことも見出された (Sakiyama et al., Nucleic Acids Res. 2021)。

### 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 protein-dynamics reporter (TnDR)

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 protein-dynamics reporter, most probably reflecting their abilities to initiate the maturation and/or localization process co-translationally (Fujiwara et al., 2020. Cell Rep.). We are also developing a second generation of TnDR or TnDR-seq, which greatly improves coverage by combining the current version of TnDR with the next-generation DNA sequencing technology.

##### 2) Identification and characterization of novel translation arrest factors

Three of the translation arrest factors previously found in eubacteria (SecM, MifM, and VemP) are encoded upstream of genes encoding components of the protein localization machinery. Using this and other information, we comprehensively searched more than 400 eubacterial genomes and found three more translation arrest factors encoded upstream of genes for the protein localization machinery, and named ApcA, ApdA, and ApdP, respectively. ApcA and ApdA are encoded by actinobacteria genome, whereas ApdP is encoded by a-proteobacterial genome. Genetic and biochemical analyses using the *E. coli* and *B. subtilis* translation systems showed that they all arrest translation elongation at a specific codon. Comprehensive mutational analysis allowed us to identify the sequences that are crucial for translational arrest. Interestingly, these arrest factors, which likely have occurred independently during bacterial evolution, were also found to cause translational arrest in a manner depending on amino acid sequences (RAPG or RAPP) that are similar to each other (Sakiyama et al., *Nucleic Acids Res.* 2021).

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

Fujiwara, K., Katagi, Y., Ito, K. and Chiba, S. (2020) Proteome-wide capture of co-translational protein dynamics in *Bacillus subtilis* using TnDR, a transposable protein-dynamics reporter. *Cell Rep.* 33, 108250.

doi: 10.1016/j.celrep.2020.108250.

Sakiyama K, Shimokawa-Chiba N, Fujiwara K, Chiba S. (2021) Search for translation arrest peptides encoded upstream of genes for components of protein localization pathways. *Nucleic Acids Res.* 49, 1550-1566.

doi: 10.1093/nar/gkab024.

#### 5. 学会発表など

Shinobu Chiba: Proteome-wide detection of nascent chain dynamics. Nascent Chains 2020 (4th Annual Conference on Protein Folding on the Ribosome). 2021/ 12/11-12. Zoom Webinar (国際会議・招待講演)

#### 6. その他特記事項

##### 1) 外部資金

科研費補助金・学術変革領域研究 (A) 計画研究

課題名: 機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構

研究代表者: 千葉志信、取得年度: R2-R6 年 (5 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) アウトリーチ活動

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・京産大生命科学部教授) に協力 2020 年 2 月 18 日-20 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.

## 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療する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を主要な手段として用いる。

(1) 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。我々は2020年度にIb膜孔とIa-Ib膜孔複合体の構造を明らかにした。これにより、二成分毒素のタンパク質透過の機構の理解が進んだ。

(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、宿主のタンパク質を修飾し、宿主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。

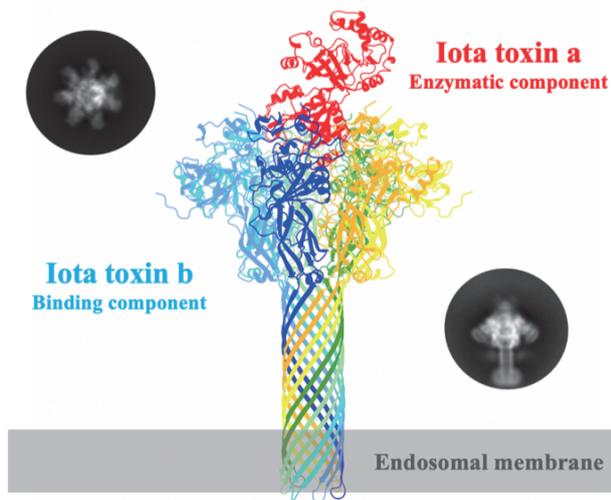
## 2. 本年度の研究成果

### (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。

2020年3月、我々はIb膜孔と、Iaが結合したIb膜孔の構造をクライオ電子顕微鏡を用いた解析で明らかにした。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 $\alpha$ 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6Å)である $\phi$ クランプへと続いていた。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膜孔の新規の特徴的な、タンパク質膜輸送機構を提唱した。これらの結果を、2020年3月および2021年に報告した(Nat Struct & Mol Biol. 27(3):288-296. : 京都産業大学、山田(D1)、吉田、津下と大阪大学、筑波大学の共同研究および *Methods Enzymol.* 2021;649:125-148. 山田&津下)。

### Iota toxin complex from E type *Clostridium perfringens*



ディフィシル菌は、抗菌薬の投与の後の腸炎の最も一般的な原因として知られる。いくつかの毒素を持ち、TcdA, TcdB のアクチンのグリコシル化に関わる主要な毒素の他、強毒性株では第3の毒素である、二成分毒素の関与が疑われている。最近、米国の2つのグループがディフィシル菌の二成分毒素の膜孔の構造 (CDTb) を明らかにしている。どちらも CDTb の7量体が上下に2つ重なった14量体構造である。この14量体は膜孔形成、また CDTa 透過にも不適なアーティファクトと考えられる。このため、我々は生理的な状態の CDTb 膜孔および CDTa 結合した CDTb 膜孔の構造を明らかにすべく実験を進めている。将来の二成分毒素の阻害剤の開発も考えて研究を進めている。

### (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 リボシル化の基質特異性

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-グアニン複合体を明らかにしてきた。これらの研究から、ADP リボシル化の一般的な基質認識機構を明らかにした。すなわち、タンパク質のアミノ酸も、あるいは DNA の塩基も同じ基質を認識機構で認識と ADP リボシル化するというを明らかにした。研究に携わった、吉田 (現在、日本女子大学) がこの総説を書き、論文採択された (*Toxins*, 2020)。

## 3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our focus 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 Ib-pore and its complex with Ia. The high-resolution Ib-pore structure demonstrates a similar structural framework as observed for the catalytic  $\phi$ -clamp of the anthrax protective antigen pore. However, the Ia-bound Ib-pore structure showed a unique binding mode of Ia. One Ia binds to the Ib-pore, and the Ia N-terminal domain interacts with Ib via two other Ib-pore constriction sites via multiple weak interactions. Furthermore, Ib-binding induces Ia N-terminal  $\alpha$ -helix tilting and partial unfolding, whereupon the unfolded N-terminus continues to the  $\phi$ -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*. Furthermore, we are currently trying to reveal the structure of *C. difficile* binary toxin (CDT<sub>a</sub> and CDT<sub>b</sub>) complex.

(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<sub>E</sub>-a), which acts as an actin ADP-ribosyltransferase, and CPIL<sub>E</sub>-b, a membrane-binding and protein-translocation component. We are trying to reveal the structure and functions of CPIL<sub>E</sub>-b compared with Ib-pore.

(3) We are interested in the specificity of ADP-ribosyltransferase (ART). We have revealed the complex structures of Ia-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 (2020.4~2021.3)

##### 原著論文

Tsuge H. A myelin sheath protein forming its lattice.

*J. Biol. Chem.* 295(26):8706-8707.

doi: 10.1074/jbc.H120.014273. (2020) (査読有り)

Yoshida T, Tsuge H. Common Mechanism for Target Specificity of Protein- and DNA-Targeting ADP-Ribosyltransferases

*Toxins (Basel)*. 2021 13(1):40. doi: 10.3390 (査読有り)

Yamada T, Tsuge H.

Preparation of *Clostridium perfringens* binary iota-toxin pore complex for structural analysis using cryo-EM

*Methods Enzymol.* 2021;649:125-148. doi:10.1016/bs.mie.2021.01.032. (査読有り)

#### 5. 学会発表など (2020.4~2021.3)

津下英明“二成分毒素膜孔複合体の単粒子解析”日本顕微鏡学会 第 76 回学術講演会紙上開催、2020.5.25-27 (招待講演)

津下英明“二成分毒素複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析：ADP リボシル化毒素の細胞内輸送機構の解明”第 460 回ビタミン B 研究協議会（愛知）、2020.8.29

津下英明“見えてきたタンパク質膜透過機構、クロストリジウム二成分毒素複合体の単粒子解析から”第 46 回生体エネルギー研究会、長土堀青少年交流センター（金沢）、2020.12.10(招待講演)

#### 6. その他特記事項

1) 外部資金

なし

2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

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  
なし



# 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.

## 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。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/A-ATPase のクライオ電顕を用いた構造解析

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。前年度、我々は、大阪大学にある自動撮影装置を備えた Titan Krios により、V/A-ATPase (V-ATPase, VoV1) の Vo 部分の構造を原子分解能で決定し、Vo 部分で見られる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を明らかにした。この成果は、2020 年 8 月に eLife に発刊された。

さらに、いまだ議論が別れている V1 部分での ATP 駆動による回転力発生機構を解明するために、反応条件を変えて凍結グリッドを作成し、ATP 結合待ち、ATP 加水分解待ち、ADP およびリン酸解離待ち、等の構造を決定し、触媒サイクルと構造変化の対応付けをすることで、ATP 加水分解反応と中心回転軸の回転、すなわち化学・力学エネルギー変換機構を明らかにすることを目的に構造解析を進めている。本年度では、ATP 飽和条件での原子分解能構造を決定し、3 つある触媒部位がすべて ATP と思われるヌクレオチドで占められていることを明らかにした。この結果は、3 つある触媒部位に結合しているヌクレオチド数が 2 ないし 3 で推移して機能していること (tri-site 仮説) を支持する結果である。

### (2) 呼吸鎖複合体を阻害する化合物の探索

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) 合成に必要な駆動力を供給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。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、8 種類の ATP 合成阻害剤を見つけた。さらに、これらのいくつかは呼吸鎖複合体 I を阻害することを明らかにした。この成果は、2020 年の 8 月に BBA に発刊された。本年度は、阻害剤が精製された呼吸鎖複合体を阻害することを明らかにした。これらの阻害剤は、抗がん剤として使用されているものもあり、呼吸鎖複合体 I が抗がん剤の標的分子である可能性が示唆された。呼吸鎖複合体 I を標的としたドラッグデザインに資する構造情報を得るために、阻害剤が結合した複合体の構造解析をクライオ電顕を用いて進めている。

### 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) Structural analysis of V/A-ATPase using CryoEM

Single particle analysis by cryo-electron microscopy (cryo-EM) is one of the most powerful methods to determine the structure of proteins. With the advent of direct electron detectors and the development of analysis methods, it has become possible to determine the structure of protein molecules at atomic resolution. Last year, we determined the structure of the Vo domain of V-ATPase at atomic resolution using Titan Krios (FEI) equipped with an automated imaging system at Osaka University, and indicated that the inhibition of proton leakage observed in the Vo portion is owing to the rotational inhibition by a large conformational change in the hydrophilic arm of a subunit. This result was published in eLife in August 2020.

In addition, to elucidate the mechanism of ATP-driven rotation of V1, which is still controversial, we prepared a frozen grid with different reaction conditions. Last year's project, we determined the atomic resolution structure under ATP-saturated conditions and found that all three catalytic sites was occupied by nucleotides that appear to be ATP. This result supports the tri-site hypothesis, which states that the number of nucleotides bound to the three catalytic sites remains between two and three.

#### 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 pharmacological and genetic studies have shown that reducing the activity of the respiratory chain complex extends the lifespan of *C. elegans*. We conducted a search for inhibitors of mitochondrial ATP synthesis among 2500 existing drugs using a method called MASC assay, and found 8 ATP synthesis inhibitors. Furthermore, they found that some of them inhibit respiratory chain complex I. These results were published in BBA in August 2020.

In this year, we found that the inhibitors inhibit the purified respiratory chain complexes. Some of these inhibitors have been used as anticancer drugs, suggesting that respiratory chain complex I may be a target molecule for anticancer drugs. In order to obtain structural information for drug design targeting respiratory chain complex I, we are now analyzing the structure of the complex bound with inhibitors.

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

1. Mechanical inhibition of isolated  $V_o$  from  $V/A$ -ATPase for proton conductance. Kishikawa J, Nakanishi A, Furuta A, Tamakoshi M, Mitsuoka K, and \*Yokoyama K. (2020) *Elife* e5686
2. Identification of chemical compounds as an inhibitor of mitochondrial ATP synthesis, leading to an increased stress resistance and an extended lifespan in *C. elegans*. Ikeda T, Kishikawa J, Hayashida Y, Fujikawa M, Yokoyama K. (2020) *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2020 Nov 1;1861(11):148281.

##### 英文総説

なし

##### 日本語解説記事

なし

#### 5. 学会発表など

1. 佐伯詩織、中西温子、横山謙 “結核菌 FoF1 の発現・精製系の構築” 第 46 回日本生体エネルギー研究会 討論会 金沢市 12/2020 ポスター発表
2. 中野敦樹、佐伯詩織、中西温子、岸川淳一、横山謙 “好熱菌 V 型 ATP 合成酵素の ATP 加水分解待ち構造の解析” 第 46 回日本生体エネルギー研究会討論会 金沢市 12/2020 口頭発表

#### 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：クライオ電子顕微鏡による V 型 ATPase の回転機構の解明 研究代表者: 横山 謙

取得年度 R2-R4 (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-R4 (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

日本蛋白質科学会

##### 3) アウトリーチ活動

なし

##### 4) その他

1. 科学研究補助金費審査委員として 30 件以上の申請書を査読

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

研究員 (PI) Hisato Kondoh, 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。初期胚の細胞が発生過程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、またその状態を維持する。それを実現しているのは、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。本研究では、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。本年度は、以下の2課題の研究を行った。

## 2. 本年度の研究成果

### (1) エピプラスト幹細胞株からの領域性をもった神経幹細胞株の樹立

エピプラスト幹細胞という体細胞全体の前駆体に対応する細胞株から、無血清培養の条件下で直接的に神経幹細胞株を樹立するという、独自の培養操作法を確立していた。胚の中で進行する神経系の領域化の過程を、エピプラスト幹細胞の培養操作技術を駆使して、以下のように単純化した。(1) 無血清合成培地の中でエピプラスト幹細胞の培養操作を行うことによって、胚の中でエピプラストと相互作用する周囲の組織からの影響を除外して神経系の成立と領域化の過程を解析できる。(2) 神経幹細胞株を樹立することによって、胚発生では神経組織(ニューロン、グリア)を生成し続ける神経幹細胞を、分化を停止させた状態で均質な細胞集団として集積して、詳細に解析することができる。

本研究では特に、胚で神経幹細胞が生まれる時期に、胚の尾側(後側)に向かってシグナルのレベルが上昇する Wnt シグナルに的を絞って、その神経幹細胞樹立過程における効果を分析した。

エピプラスト幹細胞を神経幹細胞樹立の培養条件下に置いてから5日までは、細胞は集塊状態で増殖し、神経幹細胞としての性質はまだ顕著ではないが、その時期に既に、エピプラストに特徴的な Pou5f1 遺伝子の発現は失われており、神経系に特徴的な Sox1 の発現が上昇していた。また、神経幹細胞株が樹立される約3週間よりも前に、神経系としての細胞の性質と、神経系の中での大まかな領域特性が獲得されることがわかった。

前・中脳で発現される Otx2, 菱脳・脊髄で領域ごとに異なった組み合わせで発現される Hoxa 遺伝子群の発現解析から、Low Wnt の条件下では前・中脳、Medium Wnt では菱脳、そして High Wnt では、頸部・胸部の脊髄に対応する神経幹細胞株が樹立されたことが明らかになった(図1)。

さらに、一度確立された神経幹細胞株の領域特性は Wnt シグナル強度を変化させても安定して維持されることを示した。実際の胚発生過程と対応させてみると、頭尾方向での Wnt シグナル強度の違いは、神経幹細胞が成立する時期を過ぎると胚の中では失われる。このことから、神経幹細胞が生み出される時期での胚の頭尾方向での Wnt シグナル強度の違いが、まず神経幹細胞の領域特性の確立に反映され、次いで、その領域特性が安定に維持されることによって、その後の機能領域に分かれた神経系の発生が実現すると考えられる。

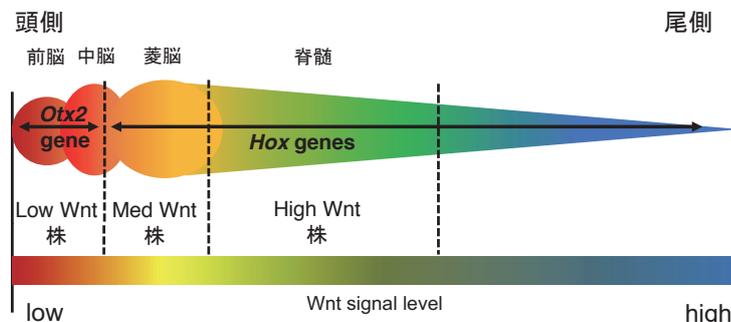


図1 Wnt シグナルの強度の違いによって規定される、エピプラスト幹細胞から樹立される神経幹細胞株の領域特性(渡邊優作修士論文より)。

## (2) エピブラストから内胚葉への発生過程の ZIC 転写因子による制御

エピブラスト幹細胞を、Wnt シグナルを抑制した状態で浮遊細胞塊として培養したのちに、laminin を豊富に含む Matrigel 中に移すと、原腸陥入に類似した細胞集団の再編成がおきて内胚葉の発生をもたらすことを発表していた (Inamori, Fujii, et al., 2020)。このエピブラスト幹細胞の培養操作条件において、内胚葉の発生を特徴付ける Sox17 遺伝子の発現上昇と、転写因子遺伝子 Zic2 の発現上昇のタイミングが一致することを見出した。その制御関係を明らかにするために、マウス胚での Zic2 のノックアウトの効果を調べた。

エピブラストの内胚葉前駆体で特に強く発現する Foxa2 の特異性を用いて、Foxa2 発現細胞で Zic2 遺伝子をノックアウトする (塩基配列を欠失させる) と胚発生、特に内胚葉の発生がどのように影響されるのかを調べた。Foxa2 遺伝子座に Tamoxifen 依存的な組換え酵素 CreER の遺伝子を組み込むとともに、Zic2 遺伝子エクソンの両側に LoxP 配列を持つマウス系統を交配によって作成した。

この系統の妊娠マウスに Tamoxifen を投与すると、胚の中で Foxa2 を発現する細胞に限定して Zic2 遺伝子をノックアウトでき、そのノックアウトのタイミングも選択できる (図2)。このマウス系統を使用して、着床直後に Zic2 をノックアウトした E6.5 マウス胚を集めて、免疫染色によって SOX17 発現を調べた。その結果、Foxa2 発現細胞で Zic2 遺伝子を不活化すると、SOX17 発現が著しく低下し、原腸陥入がおきなくなるとともに、内胚葉が作られなくなった。この結果から、ZIC2 が内胚葉発生への制御に関わること、Sox17 は Zic2 の下流に位置することが示された。

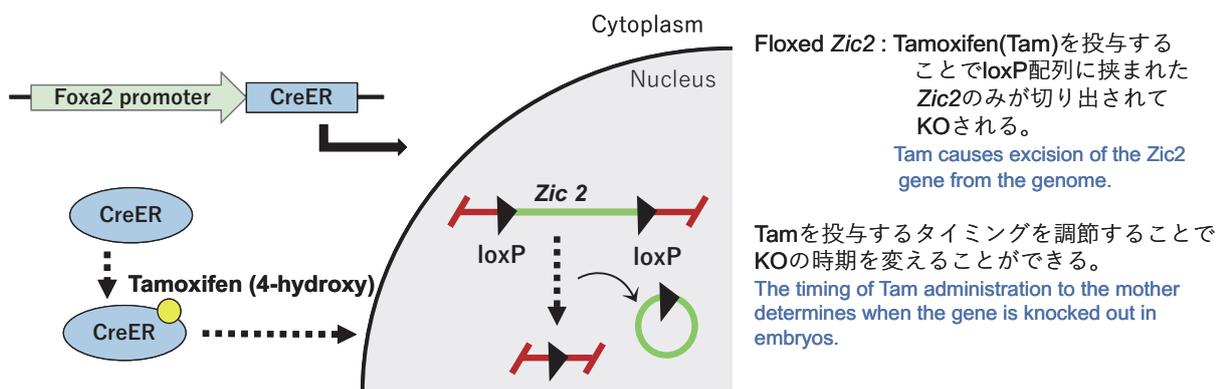


図2 Tamoxifen 投与によってひきおこされる Zic2 遺伝子ノックアウトの過程 (藤井麻衣修士論文より)。

### 3. Research projects and annual reports

We have investigated how transcription factors regulate developmental processes under the inflow of various external signals involving cell-cell or cell-substrate interactions. This year, we focused on the following research projects to conclude issues that we previously raised.

#### This year's accomplishments

##### 1) Deriving neural stem cell lines with specific anteroposterior CNS regionalities from epiblast stem cells

We have previously developed a procedure to directly establish the neural stem cell lines from epiblast stem cells under a serum-free culture condition. This procedure simplifies the neural stem cell-deriving processes during embryogenesis by starting from the epiblast stem cells. (1) The employment of the serum-free culture condition allowed the analysis of the processes of neural stem cell derivation and regional specificity endowment, being freed from complex interactions with the surrounding tissues that occur during embryogenesis. (2) Establishing neural stem cell lines in culture is equivalent to arresting the neural developmental process at the stem cell stage and accumulating the stem cells. In contrast, the stem cells in embryos proceed to neurogenesis differentiating neurons and glial cells.

This study highlighted the anteroposterior variations in the Wnt signal strength imposed on the embryonic CNS, which occur confined to the developmental stages of establishing the neural stem cell regional identities.

When the epiblast stem cells were placed in the neural stem cell-deriving culture condition, the cells developed as clumps in the first five days, without assuming a neural stem cell-like morphology. However, during this period, the epiblast-characteristic *Pou5f1* was already downregulated, and the neural-characteristic *Sox1* was activated. The above and other observations indicated that the neural characteristics and anteroposterior regional specificities were established earlier than the neural stem cell stabilization into cell lines, which occurred after three weeks.

The expression of the *Otx2* gene in the fore/midbrain and the *Hoxa* genes in the hindbrain and the spinal cord was investigated to identify the regional specificities associated with the individual neural stem cell lines. The analysis indicated that the neural stem cell lines established under the low, medium, and high Wnt condition bear the regional identities of fore/midbrain, hindbrain, and trunk spinal cord, respectively, of the ~E10.5 CNS (Fig. 1).

Moreover, the established anteroposterior regional specificity of the neural stem lines was stably maintained without relying on the subsequent Wnt signal levels. In embryos, the anteroposterior differences of Wnt signal inputs to the neural tissues occur before E10, but are then lost. Thus, both in vivo and in vitro, the differences in the Wnt signal inputs during the neural stem cell derivation provide the regional identity to the neural stem cells; once the stem cells are established, the regional identities are stably maintained regardless of the Wnt signal inputs at later stages.

## 2) Involvement of the transcription factor ZIC2 in the regulation of endoderm derivation from the epiblast

We have previously shown that epiblast stem cell aggregates cultured under a low-Wnt signal condition undergo cell rearrangements analogous to the node-proximal gastrulation upon transferring in the laminin-rich Matrigel matrix (Inamori, Fujii, et al., 2010). We also found that the endoderm-characteristic transcription factor gene *Sox17* was activated synchronously with the *Zic2* gene activation. We examined the consequence of *Zic2* knockout in the mouse embryos at the gastrulation stage to investigate the relationships between *Zic2* and *Sox17* gene functions.

We set up genetically engineered mouse lines where the *Zic2* gene is knocked out (ablated) in the *Foxa2*-expressing cells, the precursors for the endoderm development in the epiblast, to see the consequence of *Zic2* gene knockout in these cells. The mouse lines produced by genetic crossing harbored the tamoxifen-activatable recombinase gene *CreER* in the *Foxa2* locus and a *LoxP* sequence-flanked *Zic2* exon. Administration of tamoxifen to the pregnant mice allows inactivation of the *Zic2* gene in the *Foxa2*-expressing cells in developing embryos, the timing of which can be manipulated (Fig. 2).

Taking advantage of these mouse lines, we collected E6.5 embryos with *Zic2* knockout and immunostained for *SOX17* expression. The data showed that *Zic2* ablation in the *Foxa2*-expressing cells caused the *Sox17* downregulation, the gastrulation inhibition, and the endoderm loss in the embryos. These observations indicated that the transcription factor ZIC2 is involved in the endoderm genesis, and *Sox17* is downstream of *Zic2*.

## 4. 論文, 著書など

### 原著論文

Taira Y, Ikuta Y, Inamori S, Nunome M, Nakano M, Suzuki T, Matsuda Y, Tsudzuki M, Teramoto M, Iida H, Kondoh H.

The formation of multiple pituitary pouches from the oral ectoderm causes ectopic lens development in hedgehog signaling-defective avian embryos. *Dev Dyn*. 2020 Dec;249(12):1425-1439. doi: 10.1002/dvdy.222.

Iwanami N, Takeshita K, Lawir DF, Suetake I, Tajima S, Sikora K, Trancoso I, ÓMeara C, Siamishi I, Takahama Y, Furutani-Seiki M, Kondoh H, Yonezawa Y, Schorpp M, Boehm T. Epigenetic Protection of Vertebrate Lymphoid Progenitor Cells by Dnmt1. *iScience*. 2020 Jul 24;23(7):101260. doi: 10.1016/j.isci.2020.101260.

Inamori S, Fujii M, Satake S, Iida H, Teramoto M, Sumi T, Meno C, Ishii Y, Kondoh H. Modeling early stages of endoderm development in epiblast stem cell aggregates with supply of extracellular matrices. *Dev Growth Differ*. 2020 May;62(4):243-259. doi: 10.1111/dgd.12663.

Iida H, Furukawa Y, Teramoto M, Suzuki H, Takemoto T, Uchikawa M, Kondoh H. 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 Apr;25(4):242-256. doi: 10.1111/gtc.12753.

## 5. 学会発表など

Yuki Taira, Yuya Ikuta, Machiko Teramoto, Mitsuo Nunome, Mikiharu Nakano, Takayuki Suzuki, Yoichi Matsuda, Masaaki Tsudzuki, Hisato Kondoh "The formation of multiple pituitary pouches from the oral ectoderm in hedgehog signaling-defective avian embryos causing ectopic lens development." 53rd Annual Meeting of JSDB, May, 2020, Kumamoto.

Hisato Kondoh, Hideaki Iida, Koya Yoshihi, Kagayaki Kato. "Live imaging of avian epiblast development using randomly or selectively marked cell populations." 53rd Annual Meeting of JSDB, May, 2020, Kumamoto.

## 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プラストの領域化と転写制御ネットワーク

研究代表者：近藤寿人、取得年度：2017-2020年度（4年）

### 2) 学外活動

近藤寿人

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」運営委員長

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



近藤寿人、藤井麻衣（白鳥研究室）、渡邊優作（板野研究室）

## 2020年度プレスリリース

遠藤斗志也 ミトコンドリアにバレル(円筒)型膜タンパク質を組み込む仕組みを解明 英国科学誌「Nature」(オンライン版)に掲載		
2021.1	インターネット記事	毎日新聞、沖縄タイムス、AFP通信、QNET Japanほか

千葉志信 合成途上の新生タンパク質が見せる動的な挙動を網羅的に検出する手法を開発と解析 米国科学雑誌「Cell Reports」(オンライン版)に掲載		
2020.11	インターネット記事	読売新聞、北海道新聞、沖縄タイムス、AFP通信、Sankei Bizほか

# 京都産業大学タンパク質動態研究所年報

2020年度号

【非売品】

令和3年11月19日 印刷  
令和3年11月29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

