

# 年報 タンパク質動態研究所

Annual Reports 2022  
Institute for Protein Dynamics  
Kyoto Sangyo University

特別企画	．．．	1
座談会「これからのタンパク質科学を語る」 (田口英樹・濡木理・野地博行・遠藤斗志也)		
これまでの歩みとこれから (武田洋幸)	．．．	17
研究会レポート「第69回トキシシンポジウム」 (津下英明)	．．．	24
研究所の活動		
生物化学研究室 (遠藤斗志也)	．．．	29
分子細胞生物学研究室 (潮田亮)	．．．	36
タンパク質バイオジェネシス研究室 (千葉志信)	．．．	42
タンパク質構造生物学研究室 (津下英明)	．．．	47
膜エネルギー代謝研究室 (横山謙)	．．．	52
プレスリリース	．．．	57
編集後記 (遠藤斗志也)	．．．	58

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

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)

## これからのタンパク質科学を語る

田口英樹・濡木 理・野地博行・遠藤斗志也

遠藤 2年前、ちょうどコロナ禍が起こったときでしたが、年報企画で、私と永田和宏さん、嶋田一夫さんで、わが国のタンパク質科学の動向について、放談会をやりました。そのときはメンバーが年齢的にややロートルだったので、今回はまさしく最前線で活躍されて、今のタンパク質科学を牽引している方々に、好き放題話していただくということで、企画をしました。

そこで早速ですが、皆さんの研究経歴、これまでこんな感じでやってきて、いまはこういうことをやっています、ということをご自己紹介的にお話しいただけますか？

田口 それでは私から行きます。私は東工大の修士からタンパク質科学の研究を始めました。当時助教授だった吉田賢右さんのところでテーマを選びました。吉田さんはF<sub>1</sub>-ATPアーゼの大家でライフワークとして研究をしているわけですが、F<sub>1</sub>はin vitroでの再構成が難しかったのです。1980年代後半当時、タンパク質のフォールディングは自発的に起こるというアンフィンセンのドグマがすべてを説明すると思われていた時代だったわけですが、その頃、タンパク質のフォールディングを助ける因子があるんじゃないか、アンフィンセンのドグマは本当だろうか？ということが出てきたのがHsp60、いまでいうシャペロン GroELでした。当時日本では、熱ショックタンパク質についてはよく知られていましたが、John Ellisが言い出したシャペロンという概念は、まだ広がっていませんでした。そこでHsp60の研究をやってみよう、ということで私の修士の研究がスタートしました。まずは、好熱菌 *Thermus thermophilus* からHsp60を精製して、今で言うシャペロン活性を測ることから始めてみようということになりました。

始めた頃は、世界の誰もシャペロンがフォールディングを助けることを試験管内で示しておらず、最初はまったく手探りでした。そのような状況で1989年にGeorge Lorimerが、それに続いて、今シャペロン研究を世界的に牽引しているUlrich HartlやArthur Horwichが、シャペロンがフォールディングを助けることを試験管の中で証明し、うちのグループでもそういうアッセイができるようになりました。そこでシャペロンが働くメカニズムを調べるといって学位を取り、助手になってもそういう研究を続けていました。

アンフィンセンのドグマは本当か、というのがその後、そして今でもずっと私の研究のバックボーンになっています。その後、酵母にもプリオンがあるという話が出てきました。プリオンのように同じアミノ酸配列なのに、タンパク質としての構造が、元々ある構造ともう一つ違う構造の2つあるというのは、フォールデ

ィングをやっている者にとってはすごく興味深かったのです。そこで酵母プリオンの研究も、自分の興味として始めました。

シャペロンの研究をやっていると、翻訳時、タンパクができてくるときに、ど

のようにフォールディングが進むか、ということが関わってきます。そこで翻訳と共役したフォールディングの研究というのも始めました。ちょうど東大の新領域の上田卓也さんの研究室の助教授になることができて、大腸菌の精製因子から再構成した翻訳システム、PUREシステムを存分に使う機会に恵まれました。PUREシステムはシャペロンが入っていない翻訳系ですから、シャペロン研究者にとっては最高のツールです。PUREシステムで凝集しやすいタンパク質を作らせる際に好きなシャペロンを入れて効果を見る、といった研究をしていきました。そういうことで翻訳が面白くなって、新生ポリペプチド鎖の研究、「新生鎖の生物学」というテーマで新学術領域研究を始めました。そこから、翻訳の一時停止など標準的じゃない翻訳も面白いということになってきて、さらに終止コドンもないのに翻訳が終わる現象なども見つかってきました。それらも含めて、翻訳レベルでタンパク質の多様性は大きく広がる、ひいては、タンパク質全体のプロテオームという概念そのものがどんどん広がっていくということにも興味を拡がり、現在走っている学術変革領域研究(A)「マルチファセットプロテインズ」につながりました。

遠藤 なるほど。当時はシャペロンとシャペロニンという用語が混同されて使われていたりした、そんな時代でしたよね。シャペロンのことは後でもっと詳しく聞きたいのですが、濡木さん、お願いします。

濡木 はい、僕は中学2年くらいのときに、学校の自由レポートのテーマに「匂いの嗅覚受容」を取り上げたのですが、そのときの先生に、嗅覚のメカニズムを解明したらノーベル賞だって言われました。その頃から膜タンパク質に興味があったのですが、高



田口 英樹 (東工大)

校では人生についていろいろと悩みました。結局人の役に立ったら自分の生きがいを見出されるんじゃないか、という気持ちで大学に入りました。(東大では) 理科二類だったので、点数的には医学部に行けたのですが、父からおまえは職人になりたいのかってすごく怒られました、自分でも病気が怖かったので、理学部の生物化学科に行くことにしました。横山茂之先生の研究室で tRNA のアミノアシル化とか修飾、あるいはプロセッシングといったことをずっとやってきました。2003 年に 37 歳で東工大の教授になって独立したときに、念願の膜タンパク質を始めました。本当は嗅覚受容体だから GPCR (G タンパク質共役受容体) をやりたかったんですけど、当時すでに Linda Buck 博士らが嗅覚受容体を見つけてノーベル賞をとっていたんですが、僕は別にそういう遺伝子を見つけないわけではなくて、それがどうやって働いているかと嗅覚受容機構のメカニズムが知りたかったんですね。しかしなかなかうまく発現しなかったので、膜輸送体、チャンネルとかトランスポーターとかの研究を 8 年間くらい続けました。

東工大に 5 年いて、その次に東大の医科研に移って 2 年、そして結局本郷に教授で戻ってきました。そして翻訳系も続けていたんですが、非翻訳 RNA も始めました。これは後に RNA 干渉とかゲノム編集とか、そういったものにつながっていきました。膜タンパク質としては、チャンネル、トランスポーターといった輸送体から、光、温度、触覚といった物理刺激で開くチャンネルに興味を持ちましてそういうものをやったり、感覚受容体として GPCR も続けています。それ以外に、昔、医学を一時志したと言うこともあって、創薬ターゲットというか、疾患タンパク質にも非常に興味を持っています。ですから非翻訳 RNA、膜タンパク質、そして疾患ターゲット、とほぼライフサイエンスのすべてを網羅するような感じでやってきました。当初は偉い先生方から、君の研究は発散しすぎだ、などとも言われてきたのですが、最近になって、可溶性タンパク質もサイトゾルでは休止状態であって、LLPS (液液相分離) も含めて考えれば膜に行けばはじめて活性化するんじゃないか、という気がしてきました。そうするとすべてがつながってきた、収束してきたという感じで、やはり自分は色々なものに手を出してやってきたけど、それは結局正しかったのではないかと、思っている次第です。

遠藤 濡木さんは最初から宮沢 (辰雄) 研ではなくて、横山研だったんですか？

濡木 いえ、卒研が宮沢研で、その後が横山研になります。D2 のときに蛋白工学研究所 (PERI) の森川耿右さんのところに行って、構造研究の手法を習いました。それまでは遺伝子のクローニングとかミュータジェネシスとかで機能解析とかをやっていたんですが、X 線をはじめ横山研に持ち込みました。当時横山研では NMR をやっていたので、僕も河合剛太さんから NMR を習ったんですが、シム合わせ (シムコイルの調整)、8 つくらいのつまみを色々動かして磁場の均一度を上げることがなかなかできなく

て、河合さんに、これダメだよ、と言われていました。

遠藤 たくさんのコイルのつまみを同時に動かして、シムを合わせていく、最適解を見つけていくのが楽しいですよ (笑)

濡木 なるほど、僕にはちょっとパラメータが多すぎてダメでした (笑)。

遠藤 せっかくの機会なので田口さんにお聞きしたいのですが、シャペロンの作動機構は、結局



濡木 理 (東大)

Hartl のケージモデルが支配していて、教科書にも載っていて、吉田賢右さんがそれに異議を唱えても、なかなかそれが受け入れられずに来ている印象があるんですが、シャペロンの研究者としての田口さんの見方はどうですか？ Hartl は GroEL14 量体の半分の 7 量体と GroES がつくるケージの中でタンパク質のフォールディングが進む、吉田さんはそうじゃなくて基質はケージ内にいきなりは閉じ込められず、GroES が GroEL に結合した後も一部は外に出ていて、徐々に閉じ込められる、ということで、かなり対立するモデルだったと思うのですが。

田口 僕の認識としては、結局色々あるっていう、基質となるタンパク質、クライアントと呼ばれたりしますが、クライアントの性質とか、実験条件によって色々ある。どれか 1 つのモデルが正しいというのは、どうも違うんじゃないか、と今は思っています。

遠藤 そういう考え方が多いんですかね？

田口 多いかどうかは分かりませんが、もし GroEL-ES の研究者が一堂に集まってコンセンサスを取ろうとしたとして、皆違うことを言う可能性がある。それぞれに正しいところも確かにある。そうすると 1 つのパスウェイだけで話を決めるのは無理なんじゃないかと。

遠藤 それを聞いて思うのは、シャペロン研究でも、僕らの分野のタンパク質輸送の分野でも、モデルタンパク質を使って、一気にメカニズム解明が進むところはありますね。じゃあ、そのモデルタンパク質が全体を代表しているのか、っていうところは、問題があったと思うんです。

田口 そうです。

遠藤 だから、田口さんはいま、逆にプロテオーム的に全体を見渡してシャペロンの機能を理解しようという方向に向かっているように見えますが、その辺はどうですか？やはりそうしていくべきなんですか？

田口 シャペロニンの研究でずっと不満があったのは、たとえば大腸菌の GroEL の研究で一番よく使われてきたのは Rubisco だと。Rubisco って葉緑体の中のタンパクですよね。あとは、ロダネーゼ (Rhodanese) というミトコンドリアの中のタンパクです。それって結局、皆、使いやすいから使ってたけど、それで研究が進んでも、細胞の中で GroEL は何をやっているかということが実はよく分からなくて — そういう研究は遅れていたわけです。たとえばバクテリアの大腸菌ですら、GroEL がどのタンパク質のフォールディングを助けるか、というのはまだ終わっていません。まあ研究としては、ずいぶん後になってプロテオミクス研究の進展、質量分析技術の発展がないとできなかったわけですが。

そうするとやはりクライアントによって、いろんなケースがある。どのメカニズムを使うかっていうのは、それぞれだと。もしくは究極的には、GroEL-ES のケージの中では、バルクでのフォールディングとは違うフォールディングをするようなタンパク質だってあるんじゃないかと。これは昔から Hartl ともディスカッションをしているんですが、シャペロン研究の究極の問いはそれじゃないかと。つまり、溶液の中で自発的にフォールディングして A という構造になるとします。一方 GroEL-ES のケージの中でフォールディングすると B という構造になると。そういうことが細胞の中でももし起こっていたら、それはタンパク質のフォールディング研究において最も重要なアンフィセンのドグマに大きな修正を加えなければいけない、ということになると思うんです。

遠藤 タンパク質が独立に進化してきたわけではなくて、シャペロンなんかと一緒に進化してきた可能性があるというわけですね。実際タンパク質って単独で動くものはけっこう少なくて、オリゴマーをつくるわけだから、パートナータンパク質と一緒に進化してきたということはあるわけで、そうするとパートナーじゃないけれど、一時的なパートナーとしてシャペロンもタンパク質の進化に加わってきた、といのはありうるような気がしますね。実際膜タンパク質だと膜とともに進化してきたわけで、膜貫通ヘリックスの配向が2通りあったり、膜への組み込みとともに配向が反転したり、さらに脂質組成を変えると配向が変わったり、といったことがあります<sup>1</sup>。

田口 複雑なタンパク質だと専用のシャペロンっていっぱいありますよね。リボソームにしてもプロテアソームにしてもそうです。それはシャペロンが特化していったわけですが、僕が興味を持ってやってるシャペロニンだとか、Hsp70 とか、そういうジェネラルなシャペロンですら、相手によってはフォールディングの

経路を変えてしまうようなことをやってもいいんじゃないか、そう思います。

遠藤 タンパク質は相互作用相手の核酸と一緒に進化してきたという面もあるわけでしょう？ 濡木さんの研究分野なんかだと。



遠藤 斗志也 (京産大)

濡木 そうですね。もちろん最初

は RNA だけしかなかった RNA ワールドがあったので、RNA がだんだんタンパク質に置き換わってきた、っていうのはありますね。CRISPR-Cas9 なんかも、起源が古いものは、タンパク質の部分は RNA が補完して同じような役割をしているという例があります。だから RNA とかの核酸からだんだんタンパク質になっていったという例は色々あると思います。

遠藤 他のタンパク質がタンパク質のフォールディングやアセンブリーにどのくらい関わるか、っていうところが、アンフィセンのドグマへの挑戦になると思うんですが、でも、田口さん、そういうアンフィセンのドグマを破るものは、結局まだ見つかってないんですね？

田口 定義によるんですけどね。プリオンだって、1つの配列でも全然違う構造になる、そういうのがあるわけです。

遠藤 田口さんはいまそういうものを取ろうとしてるじゃないですか。2種類のフォールディングをするタンパク質を取ってこようという。それにシャペロンを絡めれば、シャペロンに依存してフォールディングが変わるタンパク質が取れそうですね。

田口 仰るとおりです。細胞の中で、シャペロンの外では A、シャペロンの中では B という構造をとるものを取ってくればいいわけですが、どう見つければいいのかということが難しいわけです。なので、そういうタンパク質をデザインしようっていうのが、最近やっていることとかいうか、できるんじゃないかと思うんですけどね。たとえば、シャペロンの外では自由に拡散できてフォールディングするけど、シャペロンの中のような狭い空間では体積的にも制約があるから、そのときだけ起こる相互作用が安定になって考えれば、いちおうデザイン的にはありうると思います。

遠藤 なるほど。いま田口さんがやっている2つの構造をとりう

るタンパク質の話は？

田口 あれは A という構造を取るドメインの C 末端と B という構造をとるタンパク質のドメインの N 末端をオーバーラップさせて 1 つのタンパク質をつくと、そのタンパク質がどちらの構造に転びうる、つまり、シーソーみたいになるという発想です。In vitro でも細菌のなかでも、どちらにでも転びうるタンパク質ができたという話です。

遠藤 なるほど。そうすると外部条件によって 2 つの安定な状態をとれるタンパク質がデザインできる、ということですね。

田口 そうですね。実際、片方のドメインに結合するリガンドを加えると、シーソーがそっちに傾いたり、そういうことができることまでは分かっていますが、シャペロンをいれたときにどちらかに偏るか、ってところはまだできていません。

遠藤 なるほど。それでは次に濡木さんに聞きますが、結局、濡木さんは、構造生物学は X 線をやってきて、膜タンパク質には Lipidic Cubic Phase (LCP) 法を使って、いまはもう全面的にクライオ電子顕微鏡に移行ですか？

濡木 いや、そんなことはないです。小さいものとかは結晶化をやっていきますので、5% くらいのエフォートは X 線ということを日頃から心がけてやっています。

遠藤 だけどクライオ電顕のインパクトってすごくて、構造生物学を変えましたよね。これってクライオ電子線トモグラフィ (ET) の方向はあるでしょうけれど、今後さらに進化していく可能性はあるんですか？電子線はいま最高が 300kV ですがこれをどんどん強くしていっても、こんどは試料が壊れてしまいますよね。

濡木 そうですね、電子線があまり強いとダメージも大きくなるので、液体ヘリウムで凍らせないとダメだとか、そういう問題になってくるかと思えます。でも、分解能はもう 1.2 Å とかかいてますので、1.0 Å を切るかもしれないですし、X 線と違って基本的に制限はないので、X 線をもう超えていると思えます。だから今後はどんどん大きなものが対象になってくるかと思えます。超分子複合体はもちろんですが、どのくらい過渡的な複合体を扱えるかとか、本当にミトコンドリア全部を見れるのかとか、そういうレベルになってくのかなと思えます。

遠藤 いまはグリッドの作成とか、あるいは単粒子解析の方法とか、ああいうのはまだ発展途上ですよ。

濡木 そうですね、いろんな技術がちょこちょこあって。そういうのは体系だっではないんですが、人によっていろいろ「技

があって、それらを組み合わせると、小さいものでも分子量 5 万くらいの構造が解けてしまうというのがあります。だからだんだん体系立って、何でも構造が解けるようになっていくと思います。

遠藤 クライオ ET の方は、見通しはどのような風にお考えですか？

濡木 僕はつい最近始めたんですが、試料調製がすごく難しいです。リボソームとか F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP アーゼとかだったら、普通にクライオ電顕で見ても、粒子として一つ一つ見えるんですよ。でも他の 1 タンパク質って細胞内のどこにあるか分からないんで、クライオ CLEM ですかね、クライオケイ光顕微鏡で見る。それで場所を特定して、クライオ電顕にもって行って、そこにあるとして画像を集めるのか、角度を変えてたくさん画像をとるのかいろいろあると思うんですが、そういうところがまだうまくいけません。

遠藤 FIB で切片をつくる場所は、いろいろノウハウがあるみたいですけど。

濡木 そこは技術的に何とか乗り越えられると思うんですが、やはりいかにタンパク質を帰属するか。クライオ ET は、精子の鞭毛の構造とか、規則的なもの、やれるものはやられているので、今後はインセル NMR じゃないですがインセルクライオ単粒子解析みたいな方向でしょうか。そういう試みはされていますが、試料調製が難しいとか、座標の特定が難しいとかで、まだ本当に見たいものを見る段階にはなっていません。いま、うちでもクライオ CLEM ができるようになってきたので、それを使って測定に入ろうとしてはいます。

遠藤 単粒子解析って結局粒子数が数万とか、そういうので分解能が上がってるわけですが、クライオ ET ってそこまで粒子数が集められないじゃないですか。それで分解能が十分に上がるんですか？

濡木 だから角度を変えて何枚も撮って、それを補うということになるんですが、ある程度集めないと分解能が上がらないです。まあ 3 Å 台に行けばいいかなと思うんですが、3 Å 台に行けば、側鎖も見えるんで。

遠藤 たしかに特徴的な形をもった粒子以外は帰属がしにくいということで、CLEM でやるのも 1 つの手だけど、今後なにが革新的な帰属の技術って出てくる可能性はないんですか？

濡木 標識ですね。金コロイドみたいなものはクライオ電顕で見えますので、クライオ電顕で見えるようなマーカーみたいなものができてくれば、CLEM をやらなくてもできるようになるかと。

蛍光だどうしても像が発散しちゃうんで、位置が特定しにくくなるんです。だから金じゃないけど、色々標識ができるようになってくると、直にクライオ電顕で見たときに、場所が特定できて、粒子数を集められるっていうことはあるかと思います。

遠藤 なるほど。構造生物学の方向としては、ET で細胞の中を見るって方向ですか。

濡木 そうですね。ただ僕がもうちょっと興味があるのは、高解像度の光学顕微鏡、岡田康志さんと一緒にやってますけど、あと中野明彦さんもやってましたけど、ライブイメージングで生きている状態で原子分解能まで見るっていうのが究極的な願いです。生きている状態で、原子分解能で、どういう原子が動いて機能が発揮できるのかっていうのをリアルタイムで見たい、リアルスペースで見たいってことです。光学顕微鏡も分解能が上がってきて、クライオ電顕もより複雑な生体に近いところまで来ているので、両方が合致したところすごいことが起きるかな、と思っています。

遠藤 高速 AFM なんかは、1 分子で見ている時間分解能も高いですね。あれで分解能がもう少し上がれば。細胞の中も高速 AFM で見れたらいいんだけど、オルガネラとかは高速 AFM で見れるんですか？

田口 細胞レベルでの高速 AFM は、まだ、なぜってわかる形態変化にとどまるようですね。

遠藤 濡木さんの予測では、構造生物学とともに生命科学は今後どういうふうに進んでいくんですか。

濡木 僕は最近、合成生物学に興味があるんです。合成生物学と構造生物学って非常にコンプリメンタリな技術なんで、両方やると何か新しいものができるのではって思っているんです。僕らが最近つくったのは、一番強い SpCas9 の 1/3 以下の大きさで、同じくらいのゲノム編集活性を持つもの、それができました。それも合成生物学と構造生物学の両方を組み合わせることで初めてできたんです。そういう網羅的にやるっていう技術と、構造を見て理論的にファインチューニングするっていう技術を両方使うと新しいツールができる、そのツールを使うと新しいサイエンスがまた見えてくるんじゃないか、って思ってます。

遠藤 ここでいう合成生物学っていうのは、デザインするっていう意味ですか？

濡木 網羅的なスクリーニングという意味での合成生物学です。

田口 狙ってつくるといって、David Baker らがブレイクスルーを

起こしたタンパク質をデザインするというような、そういうゲノムデザインではなくてということですか。

濡木 どこかでつながるとは思うんですが、いま僕がやっているのは、とりあえず今あるものを人工進化していくってところからです。

遠藤 いま出てきましたけど、Baker たちがプロテインデザインで使っている Rosetta とか、AlphaFold2 みたいな、そういう計算科学の進歩の問題がありますね。ある意味構造も、構造屋さんなしに、誰でも構造を使えるようになってきてるんですが、この辺の動向については、お二人はどうお考えですか？

濡木 うちでも AlphaFold2 とかを便利に使わせていただいているんですが、クライオ電顕で密度がでたときに、AlphaFold2 のモデルがあるとそれをあてはめて、それと一致しないところを直すというのはけっこう簡単にできるので、いいツールだと思います。ただタンパク質って大事なところは、固くなくて、柔らかいところが機能を持っているので、そういうところは AlphaFold2 では予測できないんですね。機械学習ですから、学習しないと予測ができないので、柔らかいところって学習しづらいというか、データがないのでそういう所は見えないんです。だから大まかな場としての構造は AlphaFold2 で済むんですけど、機能で大事なところはクライオ電顕とかでちゃんと確かめないと何も言えないと僕は思っています。

遠藤 でもクライオ電顕ではいろんな構造が出てくるでしょう。それに意味があるのかとか、どういう順番で働くのか、そういうところはけっこう難しいですよ。

濡木 そうですね。クラス分けして、ある程度恣意的に並べるといってもありますけど、最近時分割のクライオ電顕も出てきて、ある反応を始めてから何秒とか、何ミリ秒ごとに凍らせて測定するというような感じで。それでやっていくと完全に 1 つの構造にならなくて、ある程度のポピュレーションが少しずつ変わっていくわけですが、それを見ると順番が分かるんです。CRISPR-Cas でも、Cas9 でも Cas12a でもやられていますし、ちょっと今、トレンドになっています。

遠藤 なるほど、それは強いですね。

濡木 XFEL (X 線自由電子レーザー) はちょっと難しいので、それ以外のものは時分割のクライオ電顕はできると思っています。XFEL では光を当ててから何マイクロ秒、何ミリ秒って追跡するので、僕らもチャンネルロッドシンでやったんですが、それ以外では二液混合で基質と混合して、そこからスタートして何ミリ秒毎とかっていうのはトライしているみたいですけど、やはり技術的

な問題があるみたいです。

遠藤 なるほど、田口さんはどうお考えですか？そういう AI 時代に入ってきた構造生物学というか、生命科学というか。

田口 いろんな意味ですごい革命ですよ。立体構造をきちっとつくるタンパク質に関しては、実験的にクライオ電顕の革新があるし、そして一方で AlphaFold2 みたいなものがあるって相当に進んできている。僕は専門じゃないけど、この 5 年、10 年でかなりのところまで行っちゃうんじゃないかな、と思います。そう言ったときに、形をつくらない非構造生物学って言うか、そっちの重要性がますます高まる、濡木さんの話とも対応すると思うんですけど、最初の頃は天然変性タンパク質、天然変性領域っていうような形で始まったものが、いまは液液相分離のような違った側面から変性領域の重要性が分かってきたりしています。

そうやってきたときは、そういう AI ももちろん発展するかもしれないけど、どう研究していけばいいかっていうことすら変わってくる。究極的には、液液相分離では、配列じゃなくてアミノ酸組成でいいなんて話もあるじゃないですか。静電相互作用のプラスとマイナス、それに疎水性残基を適当に散らばらせることで、機能のある程度、たとえば RNA との結合なんかを実現できるっていう。そういうことになると、アミノ酸配列の重要性すら、また変わってくるのかなと。

遠藤 液滴ばいものってクライオ ET でも見えますよね。そういう方向性ってどうですか、濡木さん。

濡木 液滴内のタンパクの構造をきめるのは難しいと思うんですけど、CLEM なのかどういいう標識が分かりませんが、どういいうタンパク質がどういいう局在をしていっているのが見えてくる可能性はあると思います。それぞれのタンパク質の構造がある程度あって、そういう局在とか相互作用がある程度見えてくれば、けっこういろんなことが言えるようになるのかな、と思います。

遠藤 いま、液滴っていったって、均一じゃなくて、けっこう中に領域があったり、そういう話にもなってますよね。

濡木 マクロの構造っていうか、そういうのが分かってくると、個々のタンパク質の構造と合わせていろんなことができるかと。

遠藤 あと、田口さん、既知のタンパク質って配列空間の多様性を考えると、あらゆる可能性があるポリペプチドのほんの一部だけでしょう。それ以外のポリペプチドの空間があるわけじゃないですか。その空間って、つまり新規に de novo にタンパク質をデザインするっていうのは、そういうところにも踏み出していくっていう方向性ですよ。AlphaFold2 って共進化の情報をかなり使っているみたいですが、そういう新しいタンパク質のデザイ

ンには通用できるんですか？

田口 通用できるんじゃないですか、最終的には。

遠藤 できるかな。

田口 いままで実験で見つかっていないフォールドがどんどん見つかってきたりして、AlphaFold2 もどんどん進化しているみたいだし。

遠藤 それってどうやって見つかるわけですか？予測で見つかるんですか？

田口 たとえば、いままであり得ないトポロジーみたいなのを勝手に空想して、あるかなって探すとあったりする、そういう話が出てきているみたいです<sup>2</sup>。AlphaFold2 は配列から構造の予測ですが、いまこんな構造にしたいならどんな配列がそれを実現するか、っていうそっちのツールも出てきてます。RFdiffusion<sup>3</sup>とか、ProteinMPNN<sup>4</sup> なんていうツールでどちらも Baker らのグループが作ったものです。要するに、この 1 年でアミノ酸配列から立体構造と、立体構造からアミノ酸配列、と両方できるからデザインがすごくやりやすくなってるんです。

遠藤 AlphaFold2 の構造予測の精度が増したのは、共進化の情報を使ったのが大きいわけでしょう。それがなくなるわけですよ。

田口 ないです。だから、今までの生物が進化の過程で獲得してきたものだけがある意味ベースになっているからと思うんですけど、そのときのルールを逆手に取れば、生物が捨ててきたかもしれないけど、こういうことはありうるって言う構造は、もう今でもつくれるみたいです。

遠藤 そうですか。

田口 だから昔、濡木さんが knot (結び目) のタンパク質の構造を解いたときに、皆がそんなのあり得ないってことで随分反対されて、論文もなかなかアクセプトされなかったって話を聞いたことがありますけど。ああいうことが今では当たり前になってきていると思うんです。今までは無理でしょうっていうようなトポロジーとか、すごくアクロバチックなフォールドが、実は可能だった、今まで見つからなかっただけ、見ようとしなかっただけ、という例はどんどん出てくると思います。そうするとやはり

AlphaFold2 と de novo の合理デザインによるタンパク質研究のこの数年くらいの革新は、まだまだ先が見えないくらい面白くなっていくと思います。

遠藤 なるほど。配列から構造っていう AlphaFold2 みたいな AI と、構造から配列っていう AI の両方が発展すると、それこそいままでのタンパク質の空間だけでなく、その外の配列、まだ生物が試していない膨大なポリペプチド鎖の配列の空間に踏み出してって、そこでまた両方がチェックし合いながら、それぞれ囲碁や将棋の AI みたいに、経験したことのないものをどんどん検証していくってことが可能になるんですかね。

田口 そうなってきたと思います。だから、本当に市民のタンパク質デザイナーっていうのがもう十分にあり得ます。こんな構造はどうかなって勝手に Illustrator で作ったタンパク質構造の骨格を Protein MPNN でアミノ酸配列に変換して、それを今度は AlphaFold2 で予測してっていう、そういうプロセスが、今もうできてみたいですから。しかも今は DNA 合成もすごく安くなってから、ある意味誰でも、ひょっとしたら家でも DIY みたいにタンパク質をつくって、そこで構造が解けるみたいになったら、いままでのタンパク質科学研究がすごく一般にひろがるんじゃないかと思います。

遠藤 そうですね。AI の強みって、僕らが知らない世界をどんどん AI が勝手に開拓してって賢くなるってことなんで、それがタンパク質の構造とか、そういう所に使えるようになったら、勝手にどんどん発展してってしまいそうですね。

田口 そう、それは本当に囲碁とかと同じで、今まで踏み込めなかった空間、タンパク質で言えば配列空間にどんどんコンピュータで網羅的に攻めてって、これはこんな形とり得ますっていうのをどんどん提示する、そういう時代になりつつある、なるんじゃないですか。

遠藤 あ、いま遅れて野地さんが入ってこられたので、最初に野地さんも今までどういう研究をされてきて、今どういう研究をやってます、って言うことを自己紹介的に話していただけますか？

野地 はい。もともとご存じの通り、私は田口さんと同じラボの出身で、ATP 合成酵素をずっと研究してきました。ATP 合成酵素のエネルギー変換メカニズムの解明が博士課程のときのテーマでした。具体的には、ATP 合成酵素が回転を介してエネルギー伝達するという仮説を 1 分子観察技術で検証したのが私の学位です。正直に言うと、最初は回転ではないという仮説をトライしたのですが、これが失敗したため回転仮説に転向しました。この経緯やその後の展開の研究でずいぶん沢山のことを学びました。それ以降、もうほとんどライフワークのように ATP 合成酵素の研

究をやっています。その中で、1 分子計測・マイクロデバイス・高速 AFM・クライオ電験などを経験することで、タンパク質科学のいろんなイノベーションを見てきたあって思っています。既に議論になってる



野地 博行 (東大)

と思いますけど、クライオ電験のインパクトは私の分野でも目覚ましいものがあります。かつては、絶対に見ることができないと思っていた ATP 合成酵素全体の立体構造を見ることができ、そのメカニズムが明らかになりつつあります。

2 つ目の研究の軸として、マイクロデバイス、つまり小さなりアクターを使ったデジタルバイオ分析法というのを開発しています。この研究の発端は、ATP 合成酵素を閉じ込めて逆回転させ、その時合成される ATP の数を計測しようというものです。この実験が成功した後、視点を変えてみるとこれは 1 分子単位の酵素アッセイという新しいバイオ分析技術になるのでは？と着想し開発しました。最初の論文は確か 2005 年だったと思います。この技術を用いた酵素や酵素標識された生体分子の定量技術を「デジタルバイオ分析法」と名づけ、いろんなアッセイを発表してきました。デジタル ELISA とか、デジタルインフルエンザ計測、デジタル核酸計測技術などが含まれます。

この研究でも、ATP 合成酵素の研究とは別の知見がいろいろ得られました。たとえば、分子モーター研究においても言われていたことではあるんですが、分子には個性があることがはっきりしました。ATP 合成酵素の 1 分子計測では、分子を基板の上に固定することに加え、回転を可視化するためのプローブを接続します。そのため、仮に分子毎に活性が異なってもそれを本当に分子個性だとは断言しにくいところがありました。しかしデジタル計測ではタンパク質を固定する必要がありません。すると、リアクタの体積のばらつきや測定装置のノイズでは説明できない酵素分子間の活性の違いがあるのです。興味深いことに、最近の研究では、活性から見える分子間個性の広がりプロミスキューティ、つまり非天然の基質に対する反応性と正の相関があることを見出しました。この分子間個性の広がり自体が、触媒反応の機能を獲得する進化的能力のパロメーターになるかもしれないと考えています<sup>5</sup>。

三つ目の軸としては、デジタルバイオ分析で用いているデバイスを利用した酵素スクリーニングです。ここでは、デバイスの中で 1 分子 DNA から無細胞の転写・翻訳反応を行い、合成された酵素を評価して DNA を回収する技術を開発しました。これもテ

クノロジー寄りの研究です。さきほど少し議論にあがっていたと思いますが、いま、インシリコの構造予測だったり、機械学習で限られたデータ数から実験的に探索されていない空間、条件、もしくは配列の機能を推定するというのが進んでいます。しかし、これらが教師有りの機械学習という観点で考えると、やはり物理的なシミュレーションというのは必要だと思っています。そういった意味でも、微量かつ多種類のタンパク質をプロトタイピングする技術の開発を目指しています。将来的にはインシリコの設計技術との合流まで繋げたいと思っています

遠藤 教師あり、なしという？

野地 「教師あり」とは実験データを用いて機械学習するという事です。たとえばアミノ酸配列の配列空間をXY平面に展開し、Z軸に機能、たとえば酵素活性をプロットした適応度地形を考えます。実験的には、無数にある配列座標に対する活性値はほとんど決定されておらず、実測点はポツポツとしかないわけです。その間の形状を機械学習で内挿していく、配列空間の点の間を補っていくというのが通常の機械学習を用いた方法だと思っています。変異体を実験的に可能な範囲でサンプリングしてその活性を計測し、得られた実測点の間を各アミノ酸の物理化学的なパラメーターなどを考慮して補完するということがなされています。

遠藤 わかりました。

野地 実際にはいろいろな手法があるのだと思いますが、私の理解している範囲では、まずは実際データが必要です。このとき、測定点が増えるほど予測精度も向上するのです。しかし、実際にはデータ点が極めて少ないのが現状です。なので、私たちがつくっているような無細胞タンパク質合成系を利用して多種類のタンパク質を一度に合成して評価する系を作ることができれば、これに貢献できるかな、と思って研究しています。これが3番目の軸です。

4番目は、これまでの自分の研究を外挿したものです。これまで1分子の計測から少しずつ分子システムの構築へと階層を登ってきました。これを外装すると「細胞をつくる」ことだと考え、思い切って人工細胞を始めています。とりあえずの目標は、天然の分子でも合成分子でもいいので、ある定義された環境において、自律的に進化する分子システムを作ることです。これはタンパク質科学とは強い接点はないかもしれないですが、とはいえシステムを作る上で基本は分子なので、分子の特性をよく理解した上で、組上げていく研究になります。

遠藤 タンパク質1分子ごとに個性があるって、それは何に基づく個性なんですか、可能性としては。

野地 構造多型に起因すると考えるのが自然だと思います。無細

胞タンパク質合成系の転写や翻訳のエラーも考えましたが、それでも説明がつかないくらい個性が頻発というか、大きいんです。1000分の1とか、そんなレアな確率ではなく、平均値を中心として、変動係数が低い場合でも10%くらい、高いときには20%、30%くらいになります。しかも、比較的長寿命なんです。昔言われていた、ダイナミックディスオーダーみたいな、時間に対する活性のトラジェクトリ（時間変化）をとると、高かったり低かったり揺らぎがあるけど、時間平均すると分子間平均と一致するという話ではないのです。ものすごく長時間、hourのオーダーで見ても速いものは速い、遅いものは遅い、という個性があります。おそらく僕らが考えている以上に、非常に安定な準安定構造が多数あるんだろうと思っています。モデルとしてやっているのはアルカリホスファターゼ（ALP）っていう非常に古典的な酵素を中心にやっていますが、それ以外の酵素においても、われわれが調べた範囲ではほぼ計測したすべての酵素について、分子間個性があるようです。もちろんこれは測定の実差とかをかなり厳密に引き算したうえで、それでもどうしても残ってくる分散、という形で言っています。

通常は正規分布なんですけど、ALPの場合は二峰性があって、低い活性の分布と高い活性の分布があります。これは分子内のジスルフィド結合が未熟であることや、コファクターである亜鉛イオンを取り込み損ねたものっていう形で説明はつけました<sup>6</sup>。一方で、各分布の中で見られる活性の違いに関しては、構造を見ないとちょっと説明がつかないと思っています。ただ、分子集団の中でそれぞれマイナー分子の構造をどうやって解くのかっていうのは技術的な問題があると思いますが。

遠藤 そうすると一分子観察で見たいいろいろな個性みたいなのは、時間平均すればアンサンブル平均と一致すると思っていたんですが、そう単純じゃなくて、ものすごい長寿命のものがある、っていうことですか。

野地 そうです。かつて、熱をかけて一回変性させてリフォールディングさせたらどうなるんだろうってことをトライはしたんですが、実験が難しくて頓挫しています。個々の分子を捕捉してその活性を追跡できるので、例えば処理前には高活性だった分子がリフォールディングすると真ん中に来たり、低活性側に来たりとかするのは、と思ってトライしました。ただ、これがあまりにも難しすぎて中断しています。

遠藤 そうすると、それは別にリン酸化だの、そういう修飾とかの問題ではなくて、全く同じアミノ酸配列、化学的には同じ一次構造であっても、高次構造を取る段階で個性、長寿命の個性が出てくる、っていう理解ですね。

野地 正確に言うと解釈です。いちおう精製された構成要素からなるPUREシステムなので、リン酸化酵素は入っていないです

し、翻訳後修飾っていうのがほぼあり得ない状態でタンパク質は調製しています。なので、あり得るエラーとしては翻訳エラーなんですけど、文献で報告されている翻訳エラー率では、見ている分布は説明できないのです。今後は化学的分析が必要だと思いますが、生化学的分析の範囲では均一な試料を使っているつもりです。

遠藤 なるほど。せっかくだから、ちょっと1分子のことでおうかがいたいんですが、1分子観察ではアンサンブル平均と時間平均でいたい話が合うような、そういう中でちょっと特異なものが見つかってくると、こういう感じなんですか？

野地 はい。これまではエルゴード仮説を信じて、時間平均をしたらアンサンブル平均と一致するという前提で、いろんな実験系をつくってきました。ただ、すごく精密にやると測定している時間スケールではアンサンブル平均に合致しない例っていうのが見えてきます。他のグループからも同様の報告はあります。おそらくフォールディングって相当に特異な反応なのではないでしょうか？これは私も田口さんに意見を聞きたいんです。フォールディングって、平均の描像っていうのが書ける一方で、実態はものすごく多様な反応で、かなり個性の大きいプロセスなのではないかと。それによって準安定構造にポツポツと落ちて、その準安定構造の間をジャンプする。この遷移する時間スケールっていうのが、時としては非常に長い場合もある。昔の構造理論ではミリ秒以上も準安定構造が存在するはずがないなんて言われていたように記憶しています。しかし、われわれの手元で見ると、hourのオーダーで変化しない、非常にエネルギーバリアの高い準安定構造にそれぞれトラップされているようなのです。

遠藤 なるほど。

田口 いまの話、とても面白く聞かせてもらって、さっき野地さんが来る前に僕が話してた内容とも関係すると思うんです。繰り返しますと、バルクなフォールディングは例えばAだと、僕の専門のシャペロニンのケージの中ではBになると、そういうことがあってもいいんじゃないかというのは、シャペロン研究者の問いの1つの究極なんですけど、今の話も大雑把に言えばそういうことにつながると思うんです。それってあってもいいんじゃないかなと。今までは見る技術もなかったし、あと片方がメジャーだったら、そっちがわかったら話は終わってしまうというか、見ようとしな。要するに他の構造があっても、見ようとしなければ分からないっていうことがある。

多型っていうか、2つの準安定な構造があって、行き来しうる。しかもそれが思ったよりバリアがあるから、行き来が一見、見えない。長時間、片方ずついるっていうあたりが、ちょっとつながると思うんですけど。いま、自分の関係している分野のひとつのトピックは、翻訳の速度によってフォールディングが影響を受けるんじゃないか、という話です。特に真核生物のマルチドメイン

タンパク質なんかだと、翻訳の初期にフォールディングしたものと、後の方でフォールディングしたものがお互い影響し合ったりすると。そうすると、あまり速く翻訳が進みすぎると良くないとか、そういうこともあるし、その逆もあるわけです。そうすると、一次構造だけでは最終構造を規定できないという1つの例になります。

野地 これって、原核生物のタンパクとかでは起きえないんでしょうか。どこかで聞いた記憶がうっすらあるのですが、たとえばマルチドメイン構造のタンパク質で、そのリンカー部分にレアカドンがあったりすると、最初に翻訳された部分がゆっくりとフォールディングして、速度論的には不利なんだけど、エネルギー的には安定な構造にちゃんと終結というかおちついて、そのあと後ろが続いてくれればきれいにマルチドメイン構造が形成される。しかし、あまり速く翻訳が進むと前側の部分が速度論的には速くてエネルギー的にちょっと不安定な変な構造をとってしまっ、そこにトラップされると全体の構造がちゃんとできないみたいな話がありうるんじゃないかと。

田口 それって、天然のバクテリアでは見つかっていないと思うんですけど、大腸菌ではそういうタンパク、いま野地さんが言った正しくそのコンセプトのタンパクをデザインした人がいるんです。

野地 デザインする？

田口 GFPとかBFP、色違いの蛍光タンパクを2つ繋いで、その間にどっちにも行くような配列をリンカーとして入れる。そのリンカーの部分の翻訳を最適化するかレアカドンにするかで、FRETが変化したっていう、そういう研究が10年ほど前にあって、それをやったClarkさんは、「Expanding Anfinsen's principle」ってタイトルを付けてるんです<sup>7</sup>。

野地 皆、そういうタイトル好き。

田口 それは僕もすごく感銘を受けて、その方を国際会議に呼んだことがあるんですけど、やはりそういうことを考える人はいて、この話はデザインだけど、天然にもそういうのはあるけれども見つけることが難しいって、そういうことになるんじゃないかと思えます。

野地 なるほど。

遠藤 1分子だと結局、それぞれの分子を見ているので、時間スケールも含めて、ヘテロかどうかが分かるのが面白いところですね。最終的に長時間の平均を見たらアンサンブル平均と同じになるっていう単純な話じゃなくて、その時間変化を見ると、ヘテロの

差が面白いものが見つかってくる、ってそういうことですよね。たとえば翻訳ってというのは、全部均一なんですか？同じタンパク質でも何か知らないけど速く行っちゃう分子とそうでない分子があるとか。同じタンパクはすべて同じスピードで翻訳が進むんですか？

田口 それはかなり確率的に変化する部分があります。

遠藤 だから、そこが本当にガウス分布的で、けっこう裾野があると。それが、その次の立体構造にも影響を与えるかもしれないね。

田口 そうですね。

遠藤 タンパク質が成熟化してアセンブリーするところまでにいろんなプロセスが時間的に見てヘテロに起こるとすると、それぞれが次々に玉突き的にヘテロな結果を生むかもしれない。そういうのは1分子だと見えてくるんですかね。

野地 そうですね。翻訳の途中のプロセスの測定はなかなか難しいと思うんですが、もしそういうのが可能になれば、翻訳のスピードというか、同じポリペプチドでも速いところと遅いところとか、そういう確率論のプロセスが見えると思います。それとフォールディングした後の活性との対応づけってというのは、原理的には見れる時代が近いんじゃないかと思います。

遠藤 1分子で翻訳、見られますよね。翻訳の過程を蛍光ラベルとかを使って。

野地 そうですね。いろんな方法でやられてきたと思うんですが、タンパク質全体をきっちり見尽くした、っていうのはなかなかないんじゃないでしょうか。局所的に1個、2個、3個くらいのプロセスを見るみたいなことは記憶にあります。でも、たとえば100アミノ酸とか300アミノ酸全部の取り込みを見て、その後の結果としての酵素の活性を見るみたいな・・・そういうことに成功したっていうのは僕の記憶にはないです。

田口 ないと思います、たしかに。

野地 ただ、原理的には手の届くところにあると思います。

遠藤 1分子観察がそういう1分子プロセスのモニタリングみたいな方に行けて、構造はクライオ電顕で・・・でもクライオ電顕ではある程度たくさんの粒子がないと分解能が上がらないから、1分子レベルでプロセスと最終構造をひも付けするのは難しいですかね。構造は蛍光なんか使えば、1分子レベルでできるのかな？

野地 それは濡木さんに質問したいです。クライオ電顕の単粒子解析って言うても、けっこうタンパク質濃度が低いと解析できないじゃないですか。お聞きしたいのは、側鎖の向きとかまでは見れなくても良いのですが、主鎖構造くらいを知りたかったら、粒子数はそんなに要らないのではないのでしょうか？

濡木 そうですね、粒子数で分解能は決まってくるんで、やはり4Åは切りたいところですが。ただクライオ電顕の場合は、結晶と違って、分子同士がお互いに相互作用はしていないので、1個1個の分子は別々にふるまうと思います。その中でクラス分けして、いろいろ個性っていうか、多型っていうか、揺らぎっていうか、そういうのは出てきます。

野地 いま、活性で分子ソーティング（分別）っていうのは現実的にできると思っていて、活性の高い分子と活性の低い分子を分けて、それぞれを集めてからクライオ電顕で構造の特徴を抽出することは、原理的には可能じゃないかと思っているんです。

濡木 それはできると思います。多分そういうフラクションをそれぞれ取ったときに、クラス分けできるんだけど、活性の高いフラクションではこっちのクラスの方が優勢で、活性の低いフラクションではこっちのクラスの方が優勢で、みたいな感じで2つの構造がたぶん分かれると思います。

遠藤 1分子観察みたいなので、速く翻訳が進んだものと、遅いものをフラクション分けできれば、その先の構造解析はできますね。

野地 そうですね！完全にファンシーなアイデアですが、ナノポア技術っていうのはけっこう今進んでいるので、ナノポアからポリペプチド鎖が出てきたときに、高い電圧でスポッと引き抜いたとき、つまりリフォールディングしなくてはいけない状態で取ったフラクションと、ゆっくり引っ張り出したポリペプチド鎖のフラクションを分けて構造解析するなんてことも可能なんじゃないかなと思ったりして。実際のリボソームを用いるのは難しいかもしれないですが・・・

濡木 いやむしろリボソームはいいターゲットじゃないですか、逆に。いろんな状態とれるっていうか、つくれるし、構造の解析としては非常にやりやすいです。状態を分けてそれぞれを構造解析して、機能とどうつながっているとか、そういうのを見るには非常にやりやすいサンプルだと思いますけど。

遠藤 さっきAIがいろんなタンパク質のデザインに使えるとか、そういう可能性の話をしたんですけども、いまAIができてることっていうのは20種類のアミノ酸で作られてるタンパク質ですが、一方でPeter G. Schultzなんかがやってるのはコドンを変えちゃって、もう全然違うアミノ酸を使ったタンパク質をどん

どん作るっていう。とにかく細胞のコドン表を完全に書き換えちゃう、っていうのを Schultz およびその周辺の人たちがやっていますよね。そうすると、アミノ酸 20 種類じゃないタンパク質。昔宮沢研では超タンパク質って言ってましたけど、ああいうものが出てきたら予測はまた困難になっちゃうんですか？ AI は 20 種類のアミノ酸の世界なら、天然のタンパク質以外の領域にも踏み出していけるということなんですけれども、20 種類のアミノ酸を超えてしまう、そういう世界になったら、AI とはいえ学習できないから踏み出せないんですかね。

濡木 もうかしたら外挿するって言うか、そういうことできるのでは？

野地 たぶん全体的には精度は落ちるとは思いますけど、非天然のアミノ酸といえども、おそらく他の天然のアミノ酸と比べて大きさがったり、極性がたり、いろんな物理化学的パラメーターという形で記述すると同じように取り扱えるので、そういうデータを使いながら学習させる。単なる配列記号としての 20 文字じゃなくて、ちゃんと物理化学的パラメーターも入れ込んだ形での学習のアルゴリズムができれば、ある程度拡張できるんじゃないでしょうか。

遠藤 なるほど。あと細胞をつくる、っていう話。それはある意味自分の手で生命を作り出すっていうのは夢ですけど、それに足りない技術って言うと、再構成の技術が全然進んでないと思うんですよ。ある順番でいいにいろんな物を加えて作るっていう、ロボットでもいいんですが、そういう技術って進歩しないんですか？ 大きなものを作る技術が全然ないような気がするんですが。

野地 そうですね。私はマイクロデバイス分野の中では嚙ってる程度の立場ですが、通常スケールの溶液操作技術を単純に微小化するという発想の研究は 10 年以上前に限界に到達しています。今は、音響を使って液滴を飛ばす技術などが実用化までされていますが、まだまだスケールが大きい。今後やらなくてはいけないのは、マイクロメートル単位で順番に分子を添加したり、分子の向きを制御したりする技術の開発が必要だと思います。たとえばマイクロメートルサイズのリアクターに順番に溶液を交換させていくって言うことは、うちの研究室でも既にできます。あと、そこに光制御できるような要素を入れてあげると、限定的な範囲ですが、ある程度のことはできるようになります。ただ、まだまだ適応範囲に制限があるので、もっと使い勝手の良いものを作りたいですね。

遠藤 そうすると 1 分子観察だけでなく、1 分子マニピュレーションみたいなものもまだまだ進歩していく、という感じですか？

野地 そう思います。ナノポア技術もこれほどすごい勢いで発展

するとは思ってませんでした。もちろんすごく適応範囲に制限のある技術ですが、うまく適合するとパワフルな方法ですね。DNA シーケンスのみならず、タンパク質の相互作用だったりとか、いろんな計測が今までできていますが、これもある意味分子操作だと思っています。光を用いた技術に関しても、いまはイメージングへの展開が目立っていますが、今後は分子マニピュレーションへの展開というのは十分にあり得るのではないのでしょうか？ 超解像顕微鏡みたいな発想で。今まではサブマイクロメートルスケールぐらいの空間分解能しかなかった光ピンセットなどを改良して、ものすごく局所的に力をくわえるみたいなことも、将来的には可能になるんじゃないかと期待しているところです。

遠藤 なるほど。だいたいお聞きしたいことは聞いてきましたが、今後のタンパク質科学の方向性、20 年後にどうなっているかっていう大胆予想をしていただきたいんですが、どうですか？ 50 年後はさすがに無理だと思うので、20 年後。この数年ですごく変わったけど、10 年後じゃなくて 20 年後。好き勝手にお願いします。

田口 僕はいまの野地さんの話にかぶせてって言うわけじゃないですけど、細胞をつくるっていうのは、例えば天然の生物が準備したタンパク質を使っただけのものではできないんじゃないかな、と思うんですが、さらにはゲノムデザインとか、要するに生物が今まで準備してこなかった、進化上作ってこなかったタンパク質で色々代替する、置き換えていくと、最終的にはデザインしたタンパク質だけで、場合によっては 20 種類のアミノ酸以外のものを使って、生物的なものができるんじゃないかなと。20 年くらいたったら完全に de novo デザインした生物っていうのができる。そのとき定義としての生命をどう考えるかによるかもしれないけど。

遠藤 面白いですね。今でも、ゲノムサイズをどんどん縮小して、どこまで小さな細菌がつくれるかっていう研究もありますしね。de novo デザインした生物というのは、やはり自律的に複製して、場合によっては進化していくってことですか。

田口 そうです。あと、テクニカルな面で最近思ってるのは、いまはプロテオミクスって質量分析に頼ってるけど、やはりさっきのナノポア技術みたいなものが一気に進展して、シーケンシングができたりするっていうような。いままでの質量分析ではどうしてもイオン化の問題で飛ばなかったものが読めるとか、タンパク質もいまのプロテオーム解析ではプロテアーゼで断片化してるじゃないですか、そういうものもロングリードで読めるようになる。

遠藤 それは 20 年後じゃなくて、5 年後、10 年後でできるでしょうね。濡木さんはどうですか？ 20 年後の構造生物学はどうなってますかね。

濡木 教科書では細胞の中ってタンパク質どうしの間が水2,3分子しか空いてないくらいに、ぎちぎちに最密充填になっていて、普通に取り出した状態とは全然違う世界になってるって言われてますけど、そういうのが本当に原子分解能で明らかになって、どういう風に細胞の中場で活性制御が行われて、っていうところも原子分解能で明らかになって、生命のメカニズムって言うのが、本当に原子の動きで分かるようになってくるんじゃないかなと思います。それは20年いかなくても分かるかもしれないですけど。それができると、それが実際に医学とか、そういう役に立つ方向に行くんじゃないかと思ってます。

遠藤 なるほど。野地さんはどうお考えですか。

野地 生物物理ってもともと生物の世界に新しい物理の法則を見出そうという、そういうスタンスで発足した分野で非平衡の物理の面白い展開というのはあったけど、根本的にはわれわれが見てきたものは何かというと、結局物理と化学で説明できますよね、っていう話なんです。むしろ「生命は工学」という見方が強化されつつあるのでは？と思ってます。Life Is Technology, つまり生命を分子工学として見ることで面白い展開があるんじゃないかなって思っています。

今までは分析したり、観察したり、要は知ることによって「生命に驚く」時代がずっと続いてきたんですけど、これからは人間が積極的にこの分子工学の世界に入っていったって「分子や生命を創る」時代になるのではと。分子を作るといのはまさに濡木さんもやられてることだと思いますけど、それがもっと大規模に起きてくるんじゃないかなと。実際のタンパク質とかを見ると、非常にモジュール化されてる印象があります。もちろんそのモジュールをどう組み合わせればいいのかっていう方法論は、われわれはまだ理解していないんですけど。DNAの合成技術だけ見ても昔に比べればはるかに安い値段で合成できるようになりました。そのおかげで、de novo設計したタンパク質を実際に物理シミュレーションするっていうことが普通にできるようになってます。そういう方向がより加速すると思っています。加えて、それをシステムとして組み上げていく方向に行けば、田口さんがおっしゃるようなde novo設計した生命、あり得た生命みたいなものを設計することがどんどん起きてくるんじゃないかなと思ってます。

濡木 僕も、それはすごく同意するところです。ちょっと古い話になりますが、20世紀までって、分子生物学って放射線だったり化学物質で偶発的にできたミュータントを取ってきて、遺伝子を見つけて、これが生命のメカニズムの遺伝子だっていう学問だったんですけど、それは今、CRISPR-Cas9を使ってゲノムワイドにスクリーニングするような時代になってきています。

遠藤 逆遺伝学によるスクリーニングですね。

濡木 神経生物学も昔はイメージングして、この神経細胞が活性化してるねって、受動的に観察する時代から、今は、光遺伝学みたいなのニューロンってターゲティング(標的化)して、それを活性化して挙動を見るって時代になってます。だから、やはりテクノロジーがサイエンスを牽引していくってことになってると思います。それが20世紀までのサイエンスと21世紀からサイエンスの違いだと思います。テクノロジーが牽引して行って、その先には確かに生命をつくるっていう方向になっていくんだと思うんです。だから、そこでそういう方向性についていける人、ついていけない人っていうのが勝ち組、負け組っていうのが出てくるんだと僕は思っています。

遠藤 私は今までの皆さんのお話を聞いてて思うのは、AIの進歩がすごいということ。タンパクのデザイン、機能のデザイン、こういうのはAIがもうできてしまうでしょう。相互作用のデザインもできてくるでしょう。そうするとAIがインシリコで、自分のコンピューターの中で、細胞の中でこれをこやったらこうなるっていうのがどんどんできるようになってきて、そうすると、こういう変化を入れたらこういうことが起こるって、インプットとアウトプットはもうAIが示してくれる。それで実際に実験で試してみるとそのとおりだと。そういう時代が20年後か30年後にはもう来るんじゃないかという気がします。また、創薬だって、こうすればこうなるというのが分かっちゃう。ただ、それはAIは分かるんだけど、もう僕らはとても分からない。AIがAIの中では分かっているんだけど、僕らはもうついていけなくなっちゃう。だから、AIの中で細胞をつくって、それを進化させることができて、下手すれば多細胞生物もAIの中でつくって進化させてっちゃうかもしれない。そして結果は予測したとおりになるかもしれない。でも、僕らは理解できなくなって、じゃあ僕らは何を楽しんだらいいんだっていうふうになってしまうのかなっていう。生命科学者は何を楽しいと感じたらいいんだろうって世界になっちゃうのかなって気がしました。

田口 もう今、既にそれは始まっているところはあるんじゃないですか。要するに研究自体が非常に複雑になって、時間もかかるようになっていて。そうすると、われわれの世代だと、一つのタンパク質の機能を調べるだけっていうのでも十分な仕事になってたけど、今では、単独の酵素の活性を測るだけとかだとなかなかいい研究として成り立たないことが普通じゃないですか。もう既に十分複雑化していて、その外挿が人知を超えたところがあれば、結果は得られても、それで「分かった!」とか「そういうことだったのか!」というような満足感は得にくい時代になっていくかもしれない。

遠藤 AIは結果を予測できるけど、僕らはその予測ができないし、

どうやって予測したのか理解できないってそういう世界ですね。

野地 いや、それはおっしゃるとおりだと思っていて。機械学習の専門家の知り合いの話を聞くと、そこは彼らもすごく気にしているみたいです。機械学習によって色々できるけど、でも、それと理解したこととはイコールではないです。かつて、「できること」と「分かること」というのは、互いに連動して発展してきたと思うんですけど、今は、「できること」ばかり突出している。そして「分かる」っていうのは随分後まわしにされているというか、ないがしろにされている。結局、僕らは知りたい、理解したいんです。エンジニアとしてはできるっていうのが突出していてもいいんですが、サイエンティストとしてはやっぱり理解したい。

今の機械学習っていうか、ディープラーニングのやり方って、ものすごくたくさん例を取ってきて、言語化できないぐらい複雑なものをそのまま丸のみして予想するっていう話で、それは、人間にとっての理解とは全然違う理解の仕方ですよ。一部の機械学習の専門家の人、今後は何か予想できるアルゴリズムができたとしたら、そこから人間の理解に繋げることを可能とする研究が必要と言っていました。

ディストピアとしては機械だけが突出して先に進むんですけど、ユートピアとしては、機械に働かせてわれわれは理解を楽しめる世界が来るかもしれない。僕はユートピアを想像したいので、ディストピアの機械だけが突出して何でも実現する側で人間がアホのようにそれに追随するのではなく、人間が理解できる形で特徴を抽出して理解したい。僕らは、結局物事を抽象化しないと理解できないと思うんです。全ての特徴を全部頭に入れた上で理解・予想するというのではなく、重要な数少ない特徴だけで大雑把に特徴を説明できますって言いたい。それが100パラメーターの組み合わせで云々って言われるとちょっと・・・もう少し単純化して頭で理解したいのです。

遠藤 だから、AIが進歩したら、AIはそうやって予測どんどんできるようになってきちゃうわけでしょう。でもそれを人が楽しみたかってことも、AI、分かってくれてね、人が楽しめるように説明してくれるAIがちゃんとできますよ。

野地 そういう意味ね。それはユートピアとしてもいいですね。

遠藤 そういうことじゃないかな。

野地 なるほど。

遠藤 そういう意味でも、やっぱりAIの進歩って数年後も分からないところがあるんで、そこが鍵を握るような気がします。

本当はベンチャーのこととかファンディングのこととか、そういうことも聞こうかと思ったんですが、そういうのを聞くと長くなっちゃうんで、今日はちょうどいいところにオチができたみた

いなので、この辺にしたいと思いますが。最後に、これからの世代の人に言いたいこと、最後に一言あればお願いします。何かありますか？

田口 さっきのAIのことだけ考えると少し憂鬱になるとかあるのかもしれないけど、逆に今まで見えなかった分見える時代になってきていると思います。今の人間の知性のちょっと先で、われわれがまだ分かるレベルで、まだ分からないことがいっぱいあると思うんです。それは、アイデア次第だとか、数十年前だと絶対できなかったことが、今できるようになってきているから、古きをたずねて新しいを知るっていうのは本当にあり得るのかなと。こういうビッグデータがたまってきたりとか、次世代シーケンサーを自在に使えとか、そういうことだからできる、昔捨てられたアイデアとか、分からなかったクエスチョンっていっぱいあると思うんです。それを掘り起こすっていうのは、まだいくらでもできるんじゃないかと僕は思います。

遠藤 なるほどそう考えると、いまは一番生命科学を楽しめる時かもしれませんね。濡木さん、どうですか。若い人たちに向けて。

濡木 僕らぐらいの年になるとやっぱりいろいろ病気だとか、寿命だとかっていうのを考えちゃうんですが、そういう意味で、本当にメカニズムが分かる、理解できるっていう喜びと、本当に原子分解能で理解できれば、それが医療応用できて病気を治せたり、あるいは寿命が延びたりとか、そういうことにもつながられるっていうことで、僕はベンチャー、今日はベンチャーの話はなかったですけど、やっているわけです。そういう意味で、いわゆるビジネス界とつながって分かったことは、これは本当にフィロソフィーの話なんですけど、研究者がお金のお話をしちゃいけないっていうのが、昔からずっとあったと思うんです。先日吉森保さんとも合意したんですが、清貧って言葉があるんですけど、僕、清貧ってのではないと思うんです、あつてはいけないと思うし。だから、研究者がお金の話すると卑しいとかっていうこと考えること自体が卑しいと僕は思っています。研究者はこれからの世界をつくっていくんだから、いくら恵まれた環境にあってもいいし、若い人にはそういうのはすごく響くと思うんですけど、研究者がお金持ちになってもいい。お金持ちになると、また新しい世界見えてくるし。だから、そういう意味でメカニズムを楽しみ、しかも病気を治して、寿命を延ばして楽しみ、自分の生活も楽しむっていうのもあると思うんで、研究者ってこうでなければいけないっていうのはないし、非常に楽しい世界だと思うので、若い人がそういうところに入って来て、ぜひ、それが駆動力になって国を動かし、世界を動かすというふうになってほしいと思っています。

遠藤 なるほど。もうちょっと研究者はリッチになってもいいよね。付け加えること、野地さんはどうですか。



野地 まず一つ、ここにありますが来年、IUPAB、国際生物物理学連合と日本生物物理学会の合同会議がありますので、ぜひご参加下さい。テーマはこの後ろにあるように、遠藤さんの大好きな rock, rocking out biophysics です。rocking out っていうのはご存じのように、要はロックしようぜっていう意味で、ここで言うと、既存概念プチ壊せです。学問っていうのは、既存の概念を破壊したり、更新したりするってことが本質的な活動目的だと思っていて、今までこうだと思われてた世界の見方を拡張したりすることだと思います。なので、ここは生命やタンパク質に関する概念っていうのを革新しましょう、そういう意味を込めて rocking out っ付けています。

あと、僕の若い方に対するメッセージにも通じるころではあるんですけども、空気読まず、忖度せず、突き抜けてくださいと。僕らがつくり上げてきたものをプチ壊すぐらいの勢いで突き抜けてほしいと思っています。

遠藤 なるほど。僕は別にそんなに付け加えることないんですけど、最近びっくりしたのは科博、国立自然科学博物館のクラウドファンディングです。今、もう電気代が払えなくなって大ピンチだったっていうところを、クラウドファンディングでやりますと。目標1億円って言ってたんだけど、とてもそんな集まらないよって言われてたのが、やってみたらその日のうちに1億円突破したんです。数日前の話ですけど、もう今、5億円です。今日はもっと行ってるかもしれない、つまり、科学博物館って愛されてるんですよ。

今、最先端の生命科学とかそういうのは、イノベーションとかでお金がある程度、重点的に付くけど、ああいう博物学的なものってなかなか付かないです。電気代も、大学とか研究機関には補正予算で電気代の値上がり分の補填が来たけど、科学博物館は付かなかったんですって。それで自分たちの研究費の残額を全部返納して電気代に充てたんですって。科学博物館って、そこまでピンチだったのが、クラウドファンディングであつという間にお金が集まって。それを聞いて、やっぱり朝ドラの「らんまん」じゃないけど、自然を眺めて、それでいいな、面白いな、きれいだなって思う、生物のそういう多様性とかに惹かれるのって、人間の本质みたいなもので、それが生命科学の原点かなって気も、ちょっとしました。生命科学も進み過ぎると、あわてて市民への還元とか、市民との対話とかって言うんだけど、そんなところじゃな

くてもっと身近なところで、科学と市民との距離はもっと狭まるっていうか、一緒になるっていうか、そういうのがあるんだなっていうのは意外な気がしたんです、びっくりしました。

濡木 結構、国民は普通の人でもサイエンスっていうか、科学にナイーブにすごく期待してる場所がありますよね。今、血友病のゲノム編集による治療っていうのを自治医大の大森司先生とやっていて、血友病の患者さんたちに対して講師っていう形で講演しています。僕なんか本当に基礎研究なのであんまり興味ないだろうと思って、去年は動画を上げるだけだったんですが、動画を出すのが遅れたら、普通の患者さんから、濡木先生の講演がまだ上がってませんかかって、いろいろ言われて。それを上げたら、すごい視聴されてたみたいで、やはりそういうゲノム編集、遺伝子治療っていうのを夢見ながら病気と闘ってる人がいるんだと分かって、そういう意味で、とてもやりがいが出ました。

遠藤 僕ら研究が先端に行きすぎてて、市民との間の距離がものすごく開いちゃってると思ってるけど、案外、近いとかってあるかもしれませんね。濡木さんの後ろにチョウの標本が見えてますが、そういうのって原点ですよ。



濡木 そうですね。やっぱり自然を愛するって、原点です。自然を愛するっていうのが、サイエンスだと思っんで。

遠藤 一方ではどんどん進んでいくけど、そういう普通の人目線で科学を楽しむっていうのもまだまだあるし、科学は愛されてるところあるし、ちょっと救われた気がして。そういうのもいい話だっっていうことを感じました。

はい、そういうことで、今日は長時間にわたってありがとうございました。

(2023年8月10日 zoom 会談)

## 参考文献

1. White, von Heijne, Engelman. “Cell Boundaries: How Membranes and Their Proteins Work”, CRC Press (2022).
2. Sakuma, Koike, Ota. Dual-wield NTPases: a novel protein family mined from AlphaFold DB. *bioRxiv* doi: 10.1101/2023.02.19.529160v2
3. Watson et al. De novo design of protein structure and function with RF diffusion. *Nature* 620, 1089-1100. doi: 10.1038/s41586-023-06415-8.
4. Dauparas et al. Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN. *Science* 378, 49-56 (2022). doi: 10.1126/science.add2187.
5. Sakuma, Honda, Ueno, Tabata, Miyazaki, Tokuriki, Noji. Genetic perturbation alters functional substrates in alkaline phosphatase. *J. Am. Chem. Soc.* 145, 2806-2814 (2023) doi/10.1021/jacs.2c06693
6. Ueno, Kato, Minagawa, Hirose, Noji. Elucidation and control of low and high active populations of alkaline phosphatase molecules for quantitative digital bioassay. *Prot. Sci.* 30, 1628-1639 (2021) doi: full/10.1002/pro.4102
7. Sander, Chaney, Clark. Expanding Anfinsen's principle: contributions of synonymous codon selection to rational protein design. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 858-861 (2014) doi: 10.1021/ja411302m.

## 用語

**アンフィンセンのドグマ** タンパク質のネイティブな立体構造は熱力学的に最も安定な状態であり、タンパク質の立体構造はそのタンパク質のアミノ酸配列によって決まる、という仮説。その根拠となった実験により、Christian B. Anfinsen は 1972 年にノーベル化学賞を受賞した。

**シャペロニン** シャペロンのうち、原核生物では GroEL と補助因子の GroES、真核生物ではミトコンドリアや葉緑体の Hsp60 と補助因子 Hsp10 を指す。GroEL や Hsp60 はドーナツ状のリング構造で、変性している基質となるタンパク質を ATP 依存でリング内に閉じ込めてフォールディングを助けることができる。真核生物のサイトゾルにあるシャペロニンは CCT/TriC と呼ばれる。

**プリオン** タンパク質性の感染因子（核酸を含まない）で、タンパク質が正常な構造から別の異常構造に変換し、その構造が同じタンパク質の正常な他の分子に伝搬する。典型的には異常構造はアミロイドと呼ばれる線維状集合体である。クロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病は異常プリオンが脳に沈着して起こると考えられている。発見者の Stanley B. Prusiner は 1997 年

にノーベル生理学・医学賞を受賞した。

**PURE システム** 上田卓也（現・早稲田大）のグループによって開発された、再構成型の無細胞タンパク質合成系。大腸菌で翻訳反応に関与する因子（リボソームを含む）をすべて精製し、アミノ酸、NTP、tRNA などと混合して再構成したもの。よく用いられる大腸菌、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽などの細胞抽出液を使用せず、精製した因子のみを混合した反応液を使用するため、組成を自由に調節して、シャペロンなどの機能を研究できる。真核生物の PURE システムも開発されている。

**GPCR (G タンパク質共役受容体)** 細胞膜に発現し、細胞外からの刺激を受容して、細胞内の三量体 G タンパク質を活性化することで細胞応答を引き起こす一群のタンパク質。多くの疾患に関与しており、市販薬の数が GPCR を標的としている。GPCR の立体構造を決定した Brian Kobilka は 2012 年にノーベル化学賞を受賞した。

**蛋白質工学研究所 (PERI)** 1986 年に政府と民間が共同出資して設立した蛋白質工学専門の研究開発会社。1995 年に生物分子工学研究所 (BERI) に転換した。

**シムコイル** NMR (核磁気共鳴法) の観測領域の静磁場の不均一性を補正して均一にするために補正磁場を発生させる調整用コイル。このコイルに流す電流値の調整により「シム合わせ」を行う。シムコイルは複数あり、手で調整するときは  $^2\text{H}$  のロックシグナルを見ながら、その強度が上がるように調整していく。

**Hartl のケージモデル** 大腸菌のシャペロニン GroEL-ES では 7 量体リングが 2 つ背中合わせに結合した GroEL と、リングの蓋として働く 7 量体の GroES から構成されるが、基質タンパク質は GroEL と GroES がつくる狭い空間 (ケージ) に閉じ込められ、その中で凝集することなく 1 分子のフォールディングが進行するというモデル。多くの教科書に記載されている。

**CRISPR-Cas9** ゲノム編集ツール。ガイド RNA とヌクレアーゼの Cas9 から構成される。

**Lipidic Cubic Phase (LCP) 法** 膜タンパク質をキュービック相と呼ばれる相になった脂質に再構成して、結晶化を行う方法。

**クライオ電子線トモグラフィ (ET)** クライオ電子顕微鏡の応用技術で、試料を傾けながら一連の二次元画像データを取得し、それらを組み合わせて三次元画像の再構成を行う。

**クライオ CLEM** 光電子相関顕微鏡法 (correlative light electron microscopy) 試料をケイ光顕微鏡とクライオ電子顕微鏡

を用いて同時観察し、それぞれの像を比較して細胞内における分子の局在を解析する方法。

**FIB** クライオ電子線トモグラフィの測定に必要な薄膜試料を作成するための集束イオンビーム (FIB) 加工装置。

**ゲノムデザイン** ここでは、合成生物学やゲノム編集技術を使って、新たな生物機能を作り上げる、大規模なゲノム設計

**Rosetta, AlphaFold2** AI を用いたタンパク質のアミノ酸配列からその安定な立体構造を予測するソフトウェア。Rosetta は David Baker (米ワシントン大学) らのグループが、AlphaFold2 は DeepMind 社が開発した。タンパク質の既知の立体構造に近い構造をテンプレート構造として用いるだけでなく、タンパク質中で共進化したと考えられる配列の情報を使うことで、予測の精度を上げている。

**XFEL (X 線自由電子レーザー)** 自由電子のビームがつくるコヒーレント (レーザー) 光のうち X 線領域の光を用いた X 線計測法。原子や分子の瞬間的な動きを観察することが可能となる。日本では播磨の放射光施設の SACRA が利用可能。

**液液相分離 (LLPC)** 2 つの液体が混ざり合わずに互いに排除し合うことで二相に分離する現象、細胞内でタンパク質や核酸が液液相分離を起こして周囲とは異なる液相を形成することが分かってきた。形成された液相は液滴 (droplet) あるいは膜のないオルガネラ (membrane-less organelle) と呼ばれることもある。

**エルゴード仮説** 統計力学において、時間平均を位相空間平均で置き換えるための仮説。十分長い時間の間に系はあらゆる状態を同じように経験するという仮説。

**ナノポア技術** 超微細なナノメートルサイズの孔 (ナノポア) を使った技術。応用例として、ひも状に延ばした 1 本の DNA をナノポア内を通すと、ポア内に置かれたナノサイズの電極対の間に流れる電流が一つ一つの塩基で異なるので、その違いを測ることで DNA の塩基配列が計測できる。

**次世代シーケンサー** DNA の塩基配列を解読するシーケンサーはサンガーが 1977 年に開発した方法が長らく標準だったが、2000 年代前半頃にサンガー法とは別の原理の「次世代」型シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS) が登場した。NGS

は圧倒的なスピードと解読量で DNA 塩基配列解読に革命をもたらした。次世代シーケンサーもさらに進化を続けており、本会談にも出てくるナノポアシーケンサーは最新のシーケンサーの一つである。

**田口 英樹 (たぐち ひでき)**

東京工業大学科学技術創成研究院細胞制御工学研究センター・教授

**略歴** 1967 年兵庫県に生まれる。89 年 東京工業大学工学部卒業。93 年 同大学院総合理工学研究科博士課程修了。93 年 日本学術振興会特別研究員。95 年 東京工業大学資源化学研究所助手。2003 年 東京大学新領域創成科学研究科助教授 (2007 年より准教授)。2010 年 東京工業大学生命理工学研究科教授。2015 年より現職。途中 2002~06 年 JST さきがけ研究者を兼任。一貫して、細胞内での「タンパク質の一生」に絡んでタンパク質科学が広がっていく領域に興味を持ち続けて研究している。特に、シャペロンの作用機構、プリオンやアミロイドを含むタンパク質凝集体の形成機構、細胞内タンパク質動態、新生鎖の生物学。

**濡木 理 (ぬれき おさむ)**

東京大学理学部理学系研究科生物化学専攻 教授

**略歴** 1965 年 生まれる。88 年東京大学理学部卒業 93 年同大学院理学系研究科博士課程修了。この間 90-91 年 仏ルイ・パスツール大学 HFSP 研究員、91-93 年 蛋白質工学研究所研究員。94 年 理化学研究所基礎科学特別研究員。95 年東京大学大学院理学研究科助手。2002 年 同助教授。2003 年 東京工業大学大学院生命理工学研究科教授。2008 年 東京大学医科学研究所基礎医科学部門教授。2010 年より東京大学大学院理学系研究科教授。研究の興味は、五感のメカニズムを原子分解能で明らかにすることと基礎研究を医療応用して、難病の治療につなげること。

**野地 博行 (のじ ひろゆき)**

東京大学工学系研究科応用化学専攻・教授

**略歴** 1969 年北海道生。93 年 東京工業大学理学部卒業。97 年同大学院総合理工学研究科博士課程修了。97 年 JST 博士研究員、2000 年 JST さきがけ研究員、2001 年 東京大学生産技術研究所助教授、2005 年 大阪大学産業科学研究所 教授。2010 年より現職。この間、2016~19 年 JST ImpACT プログラムマネージャー、2020-25 年 JST さきがけ「高次構造体」領域総括を兼任。ATP 合成酵素の 1 分子生物物理学研究、デジタルバイオ分析法、人工細胞リアクタ工学を研究している。

# これまでの歩みとこれから

武田洋幸

今年（2023年）4月に京都産業大学に着任し、新たにタンパク質動態研究所のメンバーの一員となりました。これからよろしくお願ひします。歳をとっていますが、新任の教員・研究者として自己紹介を兼ねて、研究者としての私のバックグラウンドと今後の研究について簡単に紹介します。

私は新潟県新潟市生まれ。小学校の頃は週末や長期の休みになると、田舎の母方の実家に連れていかれ、水田、川、山に囲まれた自然の中でさまざまな生き物と遊んだ記憶が今でも鮮明に残る。これが私と生き物の長い付き合いのスタートライン。高校時代はラグビーに明け暮れたが、週末は自転車で近くの川（信濃川）や海岸で釣りを楽しんだ。やがて釣った魚を飼育するようになり、気づいてみれば、人生の多く時間を（家庭でも職場でも）、魚と過ごすようになっていた。進路選択の時には、ムツゴロウこと畑正憲の生き方に刺激をうけ、理学部で動物学を専攻。思い返すとあまり悩まずに自然にこの道に入り込んだように感じている。

## 私の原点

私と発生学との出会いは、動物学教室での学部3年の実習。当時の教育カリキュラムはかなり牧歌的で、3-4年の2年間（卒研は無し）で生理学、内分泌学、組織学・発生学、放射線生物学、生化学の実習と2回の臨海実習（加えて自主臨海実習を夏季に1-2週間）をうけ、各分野のコアな考え方と手法の手解きを受ける。各実習は3-4か月間も続く。発生学実習では、ウズラまたはニワトリ胚の正常発生を、各発生段階の胚のパラフィン連続切片をひたすら作成し、立体的に、かつ時系列的に脊椎動物の発生を肌感覚をもって理解させられた。といっても、実習は時間に追われることもなく、いたって自由。各自が教員から種卵（有精卵）をもらって、好きな時にそれを孵卵器に入れ、興味ある発生段階を自分で選んで観察するだけ。中には孵化（孵卵21日）させた「ひよこ」をそのまま自宅に持ち帰って「にわとり」まで育てる人とか、大きくしてから骨格標本を作る人など、かなり自主性に任せられていた。今時こんな実習をやったら、学生、父兄そして教務担当の先生からお目玉をくらいそうすが、私にとってはこの実習が発生学への入り口、始まりであった。実習が始まってすぐに、刻々と姿、かたちを変えて発生・成長するニワトリ胚の虜となった。特に非常に早い時期（原腸形成期）の胚が1時間、2時間という時間の単位でダイナミックに変化することに興奮を覚えた。高校生物学で学んだシュペーマンとマンゴルドのオーガナイザーの実験（1920年代の有名なイモリの二次軸誘導の実験）が、目の前で発生するニワトリ胚の姿と重なっていた。以来、実験材料、研究対象そして研究環境が変わることがあっても、一貫して脊椎動物の発生に関わることができたのは、恩師（水野丈夫先生）を

はじめ多くの先輩、同僚、ラボメンバーのおかげと思っている。今回京都産業大へ異動するにあたって、旧職場の書棚を整理している際に、上述の組織学・発生学実習のレポートを発見した。40年以上前に自分でスケッチした図の数々に、思わず見入ってしまい、何度も作業が中断した。私の研究者としての原点ここにあると改めて認識した。

## ゼブラフィッシュとメダカ

哺乳類（マウス・ラット）やニワトリを主な実験動物としていた私が研究対象として魚に出会ったのは、理化学研究所研究員だった1991年（当時33歳）。ポス（天沼宏主任研究員）の許可を得て、近くのペットショップで購入したゼブラフィッシュを実験室に持ち込み、魚を用いた発生学の研究を開始した。当時世界的に広がりを見せていたゼブラフィッシュの実験系だが、日本ではまだ誰も使っておらず、何もかも手探り状態。ただ、魚好きの私にとっては願ってもないチャンスを手にしたわけで、「一人で、そして自分の責任でやる」と宣言したことばの重みを感じる暇もなく、日々実験（最初は魚のお世話だけ）に取り組んだ。今思えば、一研究員の私には確たる勝算があるはずもなく、透明で綺麗なゼブラフィッシュ胚を見て、おもしろいことができそうだという直感につき動かされていた気がする。以来30年以上の月日が流れたが、ゼブラフィッシュとの付き合いは変わっていない。1999年に国立遺伝学研究所（遺伝研）でPIとなった時には、ゼブラフィッシュに加えて、メダカも研究に導入した。メダカはゲノムサイズがゼブラフィッシュの半分、日本での研究蓄積のおかげで複数の近交系統が利用可能など、遺伝学やゲノム科学の研究ではゼブラフィッシュより優れている。メダカを導入するに当たり、まず考えたのはゲノムの解読。2000年当時、ヒト、マウス、ラットなど高等脊椎動物のゲノム配列が次々に決定され、瞬く間に「ゲノム配列なくしてはモデル動物たり得ない」という時代に突入していた。当時所長であった小原雄治先生を必死に説得し、メダカゲノムプロジェクトを遺伝研（小原、武田）と生物情報の森下真一先生（東京大学・新領域）でキックオフできた。メダカの利点が生かされ、先行していたゼブラフィッシュよりも早く高精度の概要配列を発表でき（Kasahara et al., 2007; ゼブラフィッシュは2012年に概要完成）、脊椎動物のゲノム進化の研究に貢献するとともに、メダカの遺伝学を後押しすることができた。このプロジェクトを通して、発生「屋」の私がゲノムの世界と初めて関わりを持ち、一次情報の産生、解析に立ち会うという貴重な経験をさせてもらった。現在私の研究テーマの一つであるエビジェネティクス、エビゲノム研究のルーツはここにある。

ゼブラフィッシュを用いた実験発生学

実験発生学とは、発生中の胚に種々の実験操作を加えて、その影響を調べることで、発生の原理を明らかにする学問である。代表的な例が前述のスーパーマンとマンゴルドによるオーガナイザーの研究である。そしてゼブラフィッシュは胚操作が容易なので、実験発生学に適したモデルでもある。1993年に理研から名古屋大学理学部の黒岩厚研究室に助教(のちに准教授)として異動した頃には、ゼブラフィッシュの実験系に慣れ、私の興味である初期胚のパターン形成の実験発生学が展開できる状況になっていた。私が今でも気に入っている、中胚葉誘導(Mizuno et al., 1996)と体節形成(分節時計)(Horikawa et al., 2006)研究はこれにあたる。いずれも正常、または遺伝的に改変した細胞を宿主胚に移植することで、正常発生に外部より摂動を与えてその結果を解析するアプローチをとっている。解析には数理モデルを用いることもあった。ここでは分節時計の研究をまとめた図を載せたので見ていただきたい(図1)。

実は来年2024年はスーパーマンとマンゴルドが一連のオーガナイザー研究をまとめて出版してから100年目にあたる。”Spemann-Mangold Centennial Symposium Self-Organization in Biology 2024 in Freiburg”が企画され、私もオーガナイザーの一人として参加する予定である。この分野の海外の友人たちと旧交を温める良い機会となりそうである。ちなみに最近の若い研究者は、ES細胞などの幹細胞、iPS細胞に触発されて発生学に入る人が多いと思うが、私の年代の発生学者は、オーガナイザーによる二次軸形成と答える人が断然多い。

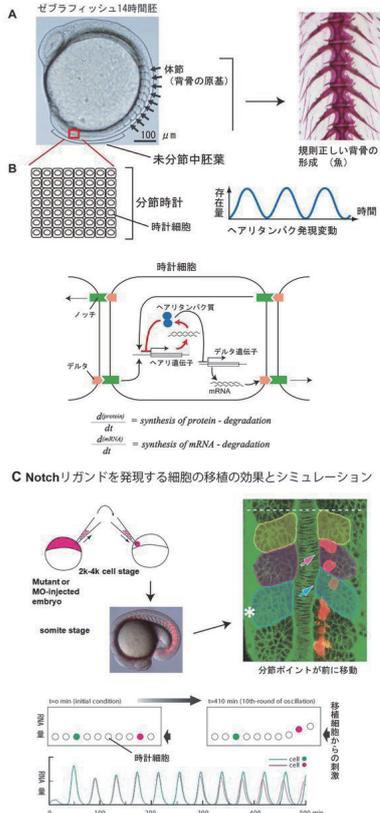


図1

突然変異体 --- 予期せぬ出会いが魅力

小型魚類は世代交代の時間が3ヶ月と短く、次の世代への影響を調べる遺伝学が脊椎動物の中ではマウスと共に容易である。遺伝学をやっているとその時々に出会う突然変異体によって研究の方向がガラリと変わることがよく起こる。ノックアウトマウスの表現型によって人生が変わってしまった研究者はたくさんいるはずである。ここでは私が影響を受けたメダカ変異体の3つを簡単に紹介したい。いずれも今の仕事につながっているものである。

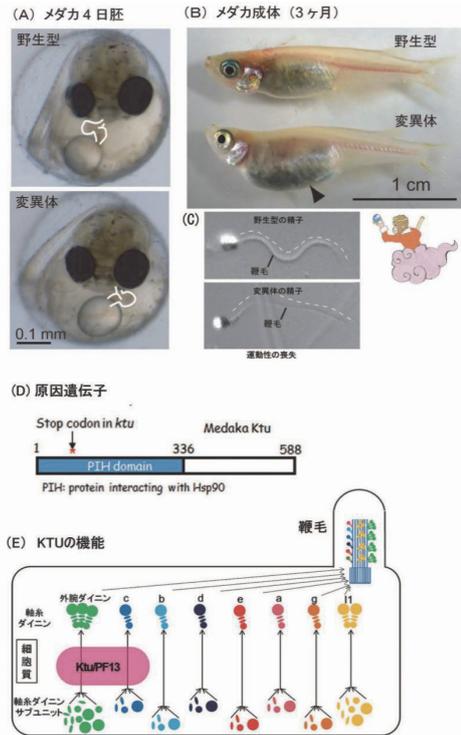


図2

(1) 左右軸形成異常の ktu 変異体 (図2)

国立遺伝学研究所に在職していた時に、メダカの中規模(小型水槽3000個程度を用いて)な突然変異体のスクリーニングを実施した。強力な発癌剤ENUを成体雄に投与し、精子ゲノムに変異を入れ、その子孫の影響を調べる古典的な三世スクリーニングである。ポストドク数名とともにひたすら交配を繰り返し、発生異常を示す系統単離を2年間にわたって行った。なかなかハードな実験であった。そのスクリーニングで目に留まった一つが、メダカ突然変異体 *ktu* である。*ktu* は、左右非対称に配置される内臓(左側に心臓、右側に肝臓など)の位置がランダムとなる典型的な左右軸喪失変異体で(図2A)、興味深いことに、このメダカ変異体は成長の過程で必ず腎臓肥大を発症し、腹部がふくれる(図2B)。腎臓肥大のため背筋が曲がった成魚の姿(泳ぎもふらつく)が、孫悟空が空を飛ぶために乗る筋斗雲(きんとうん)に似ているとして、この変異体は *kintoun (ktu)* と命名された。内臓配置の異常と腎臓病は一見無関係と思われがちだが、当時すでに両者共に細胞に生えている繊毛の異常が原因であることが知られていた。詳しい解析の結果、*ktu* 変異体では、繊毛・鞭毛の運動に不可欠なモータータンパク質の複合体であるダイニン

ームが欠損して、運動性を失っていることが判明した (図 1C)。さらに解読されたばかりのゲノム情報を利用して原因遺伝子を同定したところ、変異を起こしていた遺伝子はヒトを含めた脊椎動物、昆虫、そして単細胞生物まで、繊毛・鞭毛を持つ生物に広く存在する普遍的な遺伝子であった。しかも、これまで全く知られていない新規のタンパク質をコードしていた (図 1D)。

生物種間で保存されている遺伝子は、ヒトの遺伝病の原因となる場合が多い。繊毛が原因で起こる病気は腎臓肥大だけでなく、いわゆる繊毛病 (Kartagener 症候群ともよび、気管支炎、男性不妊や内臓逆位などの症状を示す遺伝病) も有名である。そこで、この繊毛病の研究で実績のある Heymut Omran 先生 (当時 Freiburg University、ドイツ) に連絡をとり共同で、繊毛病の患者のゲノム DNA を 100 家系以上調査した。その結果 2 つ家系で、今回発見した *KTU* 遺伝子の変異が原因となって繊毛病を発症していた。この病気では、気道に面した細胞に生えている繊毛の運動性が低下して、気管支内に進入した細かい異物を排除することができず炎症が起きる。また男性不妊は精子鞭毛の運動異常が原因である。さらに、David R. Mitchell 先生 (SUNY Upstate Medical University、米国)、神谷律先生 (当時東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻) と共同で、単細胞生物であるクラミドモナスでもこの遺伝子が破壊されると鞭毛の運動が完全に停止すること、そしてその原因がダイニンアーム前駆体の形成阻害にあることも突き止めた。これらの研究を通して、細胞・器官の機能に重要な繊毛・鞭毛がもつダイニン複合体の新たな形成過程が明らかとなった (図 2E)。この論文執筆はドイツ、米国、日本の PI が共同作業する形となり、時差の関係でいつも私は深夜の対応であったことを覚えている。しかも当時はネット環境が今とは比べものにならないくらい貧弱で、ネットよりも 3 点を結ぶ電話会議 (teleconference) を多用し、論文が accept された時も電話でお互いの労をねぎらった (Omran et al., 2008)。分子生物学、ゲノム科学の研究が進む脊椎動物モデルから、変異体スクリーニングの最初の段階で、新規の、しかも普遍的に重要な遺伝子に出会えたことは幸運であった。また共同研究の過程で異分野の PI と深く交流できたことは有意義であった。

実は *KTU* のストーリーはこれで終わらなかった。論文発表後しばらくして、この *KTU* タンパク質はファミリー (PIH ドメインを有している) を構成していることが判明したからである。早速、それぞれの機能解析を今度はゼブラフィッシュを用いて行った。ゼブラフィッシュは *ktu* を含む 4 つの遺伝子がこのファミリーを構成しており、逆遺伝学であるゲノム編集で、全ての遺伝子の機能を破壊した。そして全ての遺伝子破壊系統が、鞭毛、繊毛の運動の異常を示した。精子鞭毛の CryoEM の観察なども導入して (吉川雅英先生 (東京大学医学系研究科) との共同研究)、それぞれが別のダイニンアームの構成要素の形成に寄与していることを突き止めた (Yamaguchi et al., 2018)。この変異体をきっかけに左右時形成はこの後も武田研究室の主要な研究テーマとなり、今でも続いている。

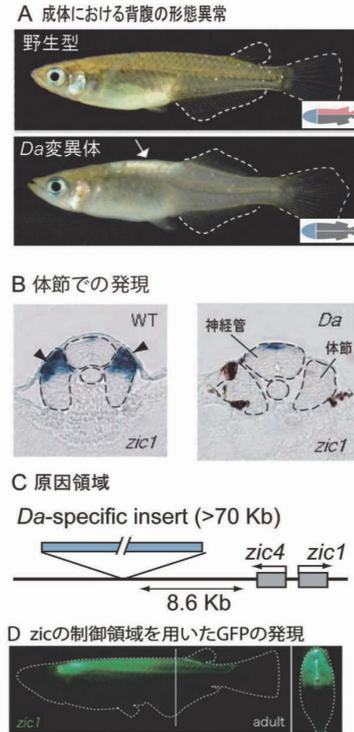


図 3

## (2) Double anal fin (*Da*)変異体 (図 3)

メダカのモデル生物としての魅力は、豊富な自然突然変異体のコレクションである。1960 年代にデビューしたゼブラフィッシュに比べ、日本でのメダカ研究の歴史は古い。さらに小中学校や家庭で飼育されることが多い。その過程で自然に出現する突然変異体 (自然突然変異体) が収集されて、ナショナルパオリソースの一環として基礎生物学研究所で維持されている。その中で奇妙な外形を示す *Double anal fin (Da)* 変異体が私の目に留まった。*Da* は初期発生は正常だが、発生後期、成長期になると、体幹部の背中半分の外形 (背鰭 (ひれ) のかたち、色素のパターン、体型全体) が腹側のそれと同じなる。メダカは表層を泳ぐ魚で、それに適応して、背鰭は小さく、体型も背中が平坦 (直線的) な形をしている。さらに魚は一般に銀色の色素は腹側のみに分布し、背中側は黒っぽい色をしている場合が多い (保護色)。*Da* 変異体は、この背中の中層が腹側化している (大きな背鰭、tear-drop 型の体型、銀色の色素細胞が背中にも分布) (図 3A)。一見すると、中層を遊泳する鯉、鮪の体型に似ている。この表現型はメンデルの法則 (semi-dominant) で遺伝するので、この劇的な外形の変化は一つの遺伝子座の変異によって引き起こされることがわかってきた。「背に腹は変えられない」という諺はあるが、背が腹に変わってしまった変異体なのだ。早速ポジショナルクローニングを実施したところ、Zinc-finger 型転写因子 *Zic1*、*Zic2* をコードする遺伝子の近傍に巨大な DNA 断片が挿入されていることが判明した (図 3C)。この二つの遺伝子は進化の過程で duplication が起きて独立したが、今も共有の enhancer で発現制御が行われている。*zic1, 2* 遺伝子は神経発生に重要な転写因子であることが知られていたが、DNA 断片の挿入は神経組織での *zic* 遺伝子の発現

はほとんど影響がない。そのおかげで神経発生は正常で致死とならない。一方、*zic* 遺伝子は体節（筋節）でも発現するが、*Da* 変異体では体節の *zic* 遺伝子の発現が特異的に喪失していた。他の解析も併せて、*Da* 変異体は巨大な DNA 断片の挿入によって誘発された、*zic* 遺伝子の体節エンハンサー変異体であると結論づけた。*Zic* は神経分化の文脈で主に研究されていたが、発生初期で致死とならない *Da* 変異体が手に入ったことで、*Zic* の体節での役割を明らかにすることができた。

興味深いことに、野生型胚では *zic* 遺伝子は体節の背中側半分に限局して発現している。つまり、からだの内部に存在する筋肉組織の背腹のパターンが、からだの形（体型）だけでなく、外側の色素の分布パターン、鱗の大きさまでも制御していたのである。そして *Zic* はこれらの形質の上位に位置する重要な転写因子（selector gene）として機能している。*zic* 遺伝子は魚類から哺乳類まで全ての脊椎動物で保存され、発現パターンも共通であることから、脊椎動物のかたちの進化と多様化に重要な役割を担っていることが示唆された（Moriyama et al., 2012; Kawanishi et al., 2013）。

原因遺伝子が特定された *Da* 変異体からは、多くの研究が派生し、発展した。例えば、体節内での *zic* の発現境界の成立メカニズム（Abe et al., 2019）、体節が体幹部の外骨格（ウロコや鱗条）を産生するという発見（Shimada et al., 2013; 外骨格は全て神経堤細胞から由来すると思われる）、*zic* の下流因子 *Wnt11* の機能（Heiling et al., 2022）など。さらに *zic* 遺伝子の体節背側での発現は、体節に由来する組織（筋肉、脊椎骨、外骨格など）で一生涯発現が維持され（図 3D）、それがエピジェネティック修飾によることが判明した（Nakamura et al., 2014）。これをきっかけに、メダカを用いた発生重要遺伝子のエピジェネティック制御、エピゲノムの初期胚での成立機構の研究に発展した（Nakamura et al., 2021; Fukushima et al., 2023）。また、*Da* 変異体で *zic* 遺伝子近傍に挿入された DNA 断片は全長 180kb の最大級のトランスポゾンであることも判明した（図 3C）。しかもその中身は、*piggyBac* 型トランスポゾンとヘルペスウイルスがそれぞれ完全な形を残して合体した新規の転移因子（mobile element）であることも驚きであった（Inoue et al., 2017; Inoue & Takeda, 2023）。このように武田研の過去 15 年間の研究の多くが *Da* 変異体から生まれた現象を追求しており、今もそのいくつかが進行中である。*Da* 変異体は 1960 年代に名古屋大学の富田英夫教授が名古屋近郊で採取したメダカ集団（富田コレクション）から見つかったものである。我々にとってメダカ *Da* 変異体は、まさに自然からの貴重な贈り物であった。

### （3）耳石欠損の *ha* 変異体（図 4）

最後に紹介する変異体も富田コレクションの一つで、これも自然からの贈り物。*ha* 変異体は遊泳中に姿勢維持が困難になるという表現型によって同定された。ある頻度で銀色の腹を上に向けるので、遊泳中の集団を上から眺めていると、きらりとひかる個体

が時々目にはいる（図 4A）。魚類の姿勢は、光に向かって背を向ける反応（背向反射）と内耳からの情報（耳石のずれ）の二つで維持される。この *ha* 変異体は耳石が形成されず、重力感知ができないことは知られていた（図 4A）。学生のテーマ（練習問題？）の一つとして、バイオリソースからこの変異体を提供してもらって、武田研でポジショナルクローニングを実施した。その結果原因遺伝子は、脊椎動物では初めてとなるポリケタイド合成酵素をコードする遺伝子（medaka (*Olyzias latipes*) Polyketide synthase, *OIPKS* と命名）であった。*ktu* 変異体と同様に、「クローニングしてみたものの、これ何?」、という事態が再来した。今回原因遺伝子として同定した *OIPKS* は複数の酵素ドメインを持つ type I PKS で、動物に普遍的に存在する脂肪酸合成酵素 FAS と構造上の類似性がある（図 4B）。表現型の詳細な解析より、*ha* 変異体では胚の耳胞内で炭酸カルシウムの結晶化の最初のステップである核形成（図 4C）が起こっていない。実は、棘皮動物のウニには PKS の遺伝子が 2 つ（SpPKS1, SpPKS2）ゲノム内に存在することはすでに報告されていたので、アンチセンス法を用いて機能阻害実験を試みた。その結果、SpPKS2 をノックダウンしたウニ幼生では、炭酸カルシウムの骨格（骨片）の形成が完全に阻害された。これらの結果は、生物の炭酸カルシウムのバイオミネラルゼーションには、PKS の合成産物が普遍的に必要なことを示唆している。ここまですべて論文として発表した（Hojo et al., 2015）。しかし、その後様々な努力にもかかわらず、*OIPKS* の産物は今も未同定のままとっている。

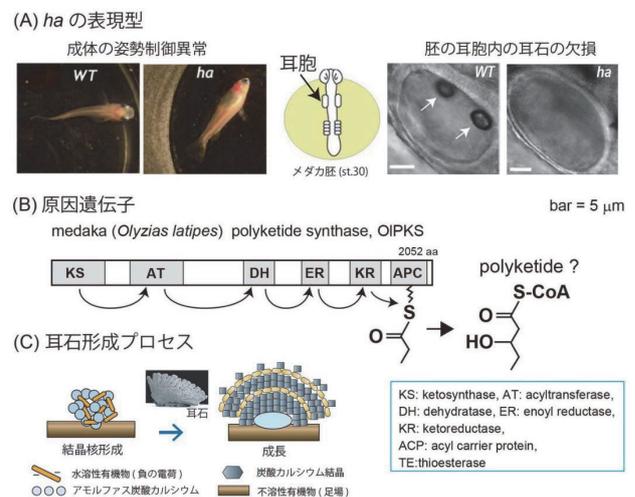


図 4

多様な PKS 遺伝子は微生物、植物を中心に研究されてきた。ポリケタイドは植物、糸状菌、昆虫など広範囲の生物種が合成する脂質様の低分子化合物であり、様々な生理活性を有し、食品、医薬品としても活用されている。一方、我々は PKS がバイオミネラルゼーションの核形成に必須な産物を産生している可能性を初めて報告した。ヒトを含む脊椎動物の骨格や歯はリン酸カルシウムを主成分とするが、地球生態系を構成する多くの生物は炭酸カルシウムからなる骨格や殻を作る（サンゴ、貝類、円石藻な

どのプランクトンなどの石灰化生物)。海洋石灰化生物はそのバイオマスの多さから地球規模の炭素循環の鍵を握る生物である。近年海洋の酸性化がこれら生物の石灰化能を低下させていることが報告されており、石灰化のメカニズムの解明が急がれる。メダカ PKS の産物同定が進めば、地球化学、環境生物学の分野にも貢献できると思われる。

#### これからの研究

前述の3つの変異体の研究の延長として、今後は是非ともやり遂げたい課題がある。(1) 左右軸形成のシグナル因子の可視化とその動態、(2) 体節組織の分化能の進化、(3) OIPKS の産物の同定と炭酸カルシウムの普遍的な結晶化メカニズム、である。

(1) について。左右時形成は、マウス、ゼブラフィッシュを用いた研究でかなりのことがわかっている。つまり、胚の尾部にある小さな左右軸オーガナイザーとよばれる組織が重要で、その上皮にはえている運動性繊毛が左向き水流を作り出し、水流を感知した左側の組織で Nodal (Tgf- $\beta$  スーパーファミリー) が分泌される。Nodal は胚の左側全体に拡散、伝搬し、左側特異的な遺伝子発現ネットワークを ON にする。このストーリーは、主に遺伝学の結果に基づいたもので、私も納得している。しかし発生学者としては、シグナル因子がどのように胚の左側全体に拡散するか、そして右側ではどのようなメカニズムで拡散が抑制されているかを、シグナル因子の可視化を通して解明したい。胚発生の過程で、細胞外に分泌されたシグナル因子が可視化された例はほとんどない。濃度が低いこと、細胞間隙を動き回っていることが光学的に補足できない理由と考えられている。直接見ないと納得しない性分から、私は最新の技術(抗体トラップ法、FCS など)を駆使して可視化にチャレンジしたい。ゼブラフィッシュ胚はこのチャレンジには最適である (Ikeda et al., 2023)。

(2) について。体節組織は、脊椎骨(内骨格)、外骨格(からだの外側を覆う鱗など)、骨格筋、真皮など脊椎動物のからだの主要な構成要素を生み出す。体節由来のこれら組織の種類と比率は脊椎動物ごとに多様で、進化に伴って変化している。脊椎動物の多様な体制が作られるメカニズムを探るためにも、体節組織の分化能が動物種ごとにどのように変化しているのかを理解することが重要と考えている。遺伝子発現(シングルセルレベル)、移植による細胞系譜の追跡を様々な実験動物で行い、理解を深めたい。

(3) について。OIPKS の産物がわからない状況を少しでも早く打開し、炭酸カルシウムのバイオミネラリゼーションの核形成の普遍的なメカニズムに迫りたい。具体的アプローチについては検討中である。

以上3つが当面の課題と考えている。特に(1)と(3)については、タンパク質動態研究所の皆様からの助言と協力を得ながら進めて行ければと思っている。また、私がこれまで培ってきた個体、組織レベルの知識と経験が所内の研究に少しでも役立つこと

も願っている。

最後に、私は、「生物の正常な発生は美しい」、「発生学はアート」、「胚は芸術作品」、といった言葉をよく口にする。PKS のストーリーで出てきた海洋プランクトンの円石藻も美しい幾何学的な殻(炭酸カルシウム結晶)を作ることで知られており、魅かれる所以である。このような生き物へのこだわりを持ちつつ、研究者人生を全うできれば幸せと思っている。

#### 文献

Abe K., Shimada S., Tayama S., Nishikawa S., Kaneko T., Tsuda S., Karaiwa A., Matsui T., Ishitani T., & Takeda, H. Horizontal boundary cells, a special group of dermomyotomal cells, play crucial roles in the formation of dorsoventral compartments in teleost somite. *Cell Reports*, 27, 928–939. (2019).

Fukushima HS, Takeda H, & Nakamura R. Incomplete erasure of histone marks during epigenetic reprogramming in medaka early development. *Genome Res.* 2023 Apr;33(4):572-586, (2023).

Heilig AK, Nakamura R, Shimada A, Hashimoto Y, Nakamura Y, Wittbrodt J, Takeda H, & Kawanishi T. Wnt11 acts on dermomyotome cells to guide epaxial myotome morphogenesis. *Elife* 6;11:e71845, (2022).

Horikawa, K., Ishimatsu, K., Yoshimoto, E., Kondo, S. & Takeda, H. Noise-resistant and synchronized oscillation of the segmentation clock. *Nature* 441, 719-23, (2006).

Ikeda T, Inamori K, Kawanishi T & Takeda H. Reemployment of Kupffer's vesicle cells into axial and paraxial mesoderm via transdifferentiation. *Dev Growth Differ* 64(3):163-177, (2022).

Inoue Y, Takeda H. Teratorn and its relatives - a cross-point of distinct mobile elements, transposons and viruses. *Front Vet Sci.* 10:1158023 eCollection 2023.

Inoue, Y., Saga, T., Aikawa, T., Kumagai, M., Shimada, A., Kawaguchi, Y., Naruse, K., S. Morishita., Koga, A. & Takeda., H. Complete fusion of a transposon and herpesvirus created the Teratorn mobile element in medaka fish. *Nature Commun.* 8, 551. (2017).

Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W.,

Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin, I. T., Takeda, H., Morishita, S. & Kohara, Y. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 447, 714-9, (2007).

Kawanishi, T., Kaneko, T., Moriyama, Y., Kinoshita, M., Yokoi, H., Suzuki, T., Shimada, A. & Takeda, H. Modular development of the teleost trunk along the dorsoventral axis and *zic1/zic4* as selector genes in the dorsal module. *Development*, 140, 1486-96, (2013).

Mizuno, T., Yamaha, E., Wakahara, M., Kuroiwa, A. & Takeda, H. Mesoderm induction in zebrafish. *Nature* 383, 131-132, (1996).

Moriyama, Y., Kawanishi, T., Nakamura, R., Tsukahara, T., Sumiyama, K., Suster, M.L., Kawakami, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Yasuoka, Y., Nagao, Y., Sawatari, E., Shimizu, A., Wakamatsu, Y., Hibi, M., Taira, M., Okabe, M., Naruse, K., Hashimoto, H., Shimada, A. & Takeda, H. The medaka *zic1/zic4* mutant provides molecular insights into teleost caudal fin evolution. *Curr Biol* 22, 601-7, (2012).

Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C., Mizuno, H., Kawano, H., Fliegau, M., Yagi, T., Koshida, S., Miyawaki, A., Zentgraf, H., Seithe, H., Reinhardt, R., Watanabe, Y., Kamiya, R., Mitchell, D. R. & Takeda, H. *Ktu/PF13* is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins. *Nature* 456, 611-6. (2008).

Shimada, A., Kawanishi, T., Kaneko, T., Yoshihara, H., Yano, T., Inohaya, K., Kinoshita, M., Kamei, Y., Tamura, K., Takeda, H. Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nat Commun* 4, 1639, (2013).

Nakamura, R., Tsukahara, T., Qu, W., Ichikawa, K., Otsuka, T., Ogoshi, K., Saito, T.L., Matsushima, K., Sugano, S., Hashimoto, S., Suzuki, Y., Morishita, S. & Takeda, H. Large hypomethylated domains serve as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates. *Development* 141, 2568-2580, (2014).

Nakamura, R., Motai, Y., Kumagai, M., Wike, C.L., Nishiyama, H., Nakatani, Y., Durand, N.C., Kondo, K., Kondo, T., Tsukahara, T., Shimada, A., Cairns, B.R., Aiden, E.L., Morishita, S. & Takeda, H. CTCF looping is established during gastrulation in medaka embryos. *Genome Res.* 31(6):968-980. (2021).

Yamaguchi H., Oda T., Kikkawa M., & Takeda H. Systematic studies of all PIH proteins in zebrafish reveal their distinct roles in axonemal dynein assembly. *ELife* 9(7), (2018).

## 図の説明

### 図1. 体節形成を制御する分節時計の作動原理の研究

A.ゼブラフィッシュ体節形成期胚（受精後 14 時間）での体節形成（分節）。ゼブラフィッシュでは体節は 30 分に一回前方から順番に、一対ずつ等間隔に中胚葉組織からくびれ切れて形成される。体節の分節は規則的な椎骨の形成に必須である。

B.分節前の中胚葉組織（未分節中胚葉）では、細胞ごとに転写因子ヘアリの ON/OFF が周期的に起こっている。ヘアリは分解されやすく、かつ一定量以上蓄積すると自身の転写を阻害する。すなわち、以下のサイクルが 30 分周期で起こっている。

(i)ヘアリの転写→(ii)ヘアリ mRNA からの翻訳→(iii)蓄積したヘアリによるヘアリ遺伝子の転写抑制→(iv)ヘアリの分解→(i)ヘアリの転写……

個々の細胞でのヘアリの周期的変動は、細胞間のシグナル伝達系であるノッチ（まつ結合型受容体）-デルタ（膜結合型リガンド）を介して個々の細胞のヘアリの周期が同期され、結果として未分節中胚葉組織全体で 30 分周期のヘアリ転写因子の発現変動が繰り返される。ヘアリの周期が一回まわるとに組織の前方で分節が起こる。

C.ノッチリガンドを恒常的に発現した細胞の移植実験。移植された細胞により、組織全体の分節時計の進みが加速されて、分節間隔が短縮し、結果的にコントロール側に比べて分節ポイントが前方へ移動した（矢印）。この結果は数学的シミュレーションの予測と一致した。すなわち、B で示された遺伝子ネットワークとノッチによる細胞間の同調が実際の胚の組織で起こっていることが証明された。

### 図2. メダカ左右軸変異体 ha

A.メダカ左右軸変異体 ha の表現型。心臓など内臓の左右非対称の配置がランダムとなる。

B.腎臓の肥大（多発性嚢胞腎）も発症する。

C.鞭毛・繊毛の運動性の喪失も起こる。

D.原因遺伝子 *ktu* は PIH ドメインを有する機能未知のタンパク質をコードする新規遺伝子であった。

E.KTU は細胞質で、ダイニン複合体（ダイニンアーム）形成に関与している。ダイニン複合体は細胞質でアセンブルされたのち、

繊毛基部へ運ばれる。

### 図3. メダカ自然突然変異体 *Da* 変異体

A.成体の表現型。変異体では、からだの背側の形質（鱗のかたち、銀色素（矢印））が腹側の形質に置き換わっている。また変異体は全体として teardrop 型の形になり、背中が丸くなる。

B.原因遺伝子 *zic1* の発現。野生型の胚では、*zic* 遺伝子は体節（筋節）の背側に限局して発現するが、*Da* 変異体では発現が消失している。これにより背側の体節が腹側の性質に変化していると予想される。

C.変異体の *zic* 領域には 70kb 以上（実際は全長 180kb）の巨大な DNA 断片が挿入されている。これにより *zic* 遺伝子の体節組織での発現を制御する体節エンハンサーが機能しない。

D.*zic* 遺伝子の制御領域を GFP につないだコンストラクトで作成したトランスジェニック (Tg) 系統の成体。GFP の発現は内在の *zic* 遺伝子の発現を反映している。この Tg 系統の観察により、*zic*

遺伝子の体節背側での発現は胚期だけではなく、成体になっても一生涯維持されていることが判明した。

### 図4. メダカ自然突然変異体 *ha* 変異体

A.*ha* 変異体は姿勢制御に異常がある。変異体では、胎児期の耳胞内に形成される耳石が欠損している。

B.原因遺伝子は複数の酵素ドメインを持つ type I Polyketide synthase (OIPKS) であった。このタイプの酵素は一般に malonyl-CoA または acetyl-CoA を基質として、polyketide 様の低分子化合物を産生することが知られている。OIPKS の合成産物は未同定である。

C.炭酸カルシウムを含むバイオミネラリゼーションのプロセス。最初にアモルファス炭酸カルシウムが集合する核形成が起こる（プロセスの詳細は不明）。この核を中心に、炭酸カルシウム結晶（微量のタンパク質成分を含む）が急成長する。

## 研究会レポート「第 69 回トキシシンポジウム」

開催日時：2023 年 9 月 7 日～8 日、場所：むすびわざ館

第 69 回トキシシンポジウム世話人  
津下英明

2023 年 9 月 7 日（木）～8 日（金）、京都壬生にある京都産業大学 むすびわざ館で、京都産業大学タンパク質動態研究所との共催で第 69 回トキシシンポジウムを開催いたしました。トキシシンポジウムの第 1 回は昭和 30 年に東京で黒屋雅彦先生により開催され 70 年近く開催され続けている歴史あるシンポジウムです。毎年夏に開催されてきましたが、新型コロナウイルス感染症のため、対面の開催が難しくなり、過去 2 年の第 67 回の名古屋、第 68 回の広島は zoom での開催となっていました。今年開催のお話をいただいた時から、とにかく対面では開催したいと考えてきました。9 月に入り、気を揉んだのは、台風です。9 月に入ってから次から次へと台風が生まれ、12 号は大丈夫かと思いきや、13 号が発生、最後まで zoom との共催の覚悟も必要な状況でした。8 日には関東に近づいたものの、大きな台風になることはなく、2 日間のトキシシンポジウムを無事に終えられたことに感謝しています。参加者は毒素シンポジウムの会員だけでなく、その他の参加もあり約 70 名の参加でした。

また、今年の招待公演は、お二人の先生にお願いをいたしました。1 人目のご講演は京都大学・生物学研究所・生命科学研究所・白眉センターの杉田征彦准教授で「電子顕微鏡でウイルスを見る」でした。ウイルスの語源はラテン語で病毒因子とのこと、そこから始まり、いくつかの RNA ウイルスとタンパク質の関係をクライオ電子顕微鏡で明らかにし、これを分かりやすく紹介していただきました。また、もう 1 人のご講演は岐阜大・医学研究科・病原体制御学分野の永井宏樹先生にお願いいたしました。タイトルは「レジオネラの多様なエフェクター」で、レジオネラは約 300 種の多様なエフェクターを持つこと、これらのエフェクターの中には今まで見つけてこなかった新たな機能を持つものが多く見つけていることを紹介されました。特に永井先生はエフェクターを制御するエフェクター「メタエフェクター」の概念を出されて、その同定の話をしていただきました。また、ミトコンドリア ATP-ADP 交換輸送体を標的とする ADP-リボシル化する酵素と、それを制御して脱 ADP-リボシル化する酵素のお話を、構造も含めてご紹介されました。我々も、長らく ADP-リボシル化する酵素の構造生物学を続けており、興味深く伺いました。

5 題の若手奨励演題がありましたが、2 題の演題を若手奨励賞（投票で決定）とさせていただきます。1 つは、岩本英紀さん（京都大学・農学研究科）もう 1 つは田口黎武さん（慶應大学・理工学部）で、それぞれサソリ毒素の話とシアノバクテリア由来の環状ペプチドのお話でした。どちらも研究の面白さが伝わり、

これからの発展も楽しみな研究でした。この奨励賞には会の最後で賞状と盾が贈られ、関矢加智子先生から励ましのお言葉をいただきました。この他、一般講演が 12 題、ポスターが 11 題と 2 日間の会でしたが、活発な討論が行われ、対面ならではの良い会だったと思います。

来年は京都薬科大学の八尋錦之介先生が実行委員長をなされて琵琶湖畔で開催予定です。また 1 泊 2 日ですが、合宿形式が戻ってくる予定です。また来年も皆様とお会いできること楽しみにしています。最後に、この学会に参加していただいた多くの皆様、また開催にあたり協力いただいた皆様（運営事務局の大阪公立大学の山崎伸二先生、畑中律敏先生や京都産業大学のスタッフの方々）に感謝をしたいと思います。



京都大学大学院 農学研究科  
応用生命科学専攻 岩本英紀(大学院生)

2023 年 9 月 7 日～9 月 8 日に京都産業大学むすびわざ館で開催された第 69 回トキシシンポジウムに参加し、口頭発表若手奨励演題にて、「ヤエヤマサソリ毒腺トランスクリプトーム解析をもとにした機能未知ペプチドからの殺虫性成分の探索」というタイトルで発表し、若手奨励賞をいただきました。このような素直な賞を頂き大変光栄に感じています。ありがとうございます。

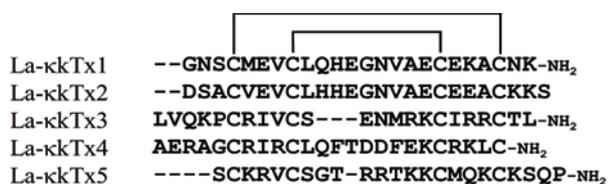
サソリは毒液を天敵から身を守ったり、餌となる昆虫を捕獲したりするために使用します。毒液の主成分はペプチドで、中には殺虫活性や抗菌活性など、さまざまな生理活性を高い選択性で示すペプチドがあるため、農薬や医薬への応用が期待されてい

ます。ヤエヤマサソリは日本にも生息する小型のサソリで、当研究室ではこれまでにヤエヤマサソリ毒液由来の生理活性ペプチドの研究が進められてきました。これまでに複数の殺虫性ペプチドや抗菌ペプチドを同定しており、今後もユニークな生理活性の発見が期待できます。

毒液に含まれる生理活性ペプチドの探索では、一般的に活性を指標とした手法が用いられてきました。毒液をクロマトグラフィーにより分画し、それらの活性評価をおこなう操作を単一成分になるまで繰り返します。この手法によってこれまでに当研究室では3種類の殺虫性ペプチドを同定してきました。しかし、この手法では含量の少ない活性成分の発見は難しく、検出できずに見逃されてしまう成分が存在すると考えられます。そこで毒腺のトランスクリプトーム解析をおこない、毒液に存在するペプチドの配列を予測し、既知ペプチドとの相同性をもとにして活性がありそうなペプチドを絞り込むという手法をもちいた新規生理活性ペプチドの探索を試みました。

ヤエヤマサソリの毒腺トランスクリプトーム解析によって推定したペプチドの中から、毒液中に最も多く含まれていたペプチドファミリーである KTx (K+チャネルへ作用するペプチドとの相同性から分類) に着目しました。KTx ファミリーを構造によってさらに7つに分類したうち、本研究では k-KTx に焦点を当てました。このペプチドはこれまでに研究があまり進んでおらず、その機能もまだわかっていないことから、このペプチドファミリーの中に殺虫活性を示すものがあると仮説を立て、推定されたペプチドの化学合成、殺虫活性評価をおこなうことで、新たな殺虫性ペプチドの発見を目指しました。この結果、ヤエヤマサソリ毒液のトランスクリプトーム解析の結果から同定された La-kKTx1 から La-kKTx5 までの5種類の新規ペプチドのうち、La-kKTx2 に殺虫活性があることを確認しました。

続いて、La-kKTx2 の殺虫活性に重要なアミノ酸の特定を目指しました。La-kKTx1 が La-kKTx2 と約 70%の高い相同性を持っているのにも関わらず殺虫活性を示さなかったことから、これらの2つのペプチドのアミノ酸配列が異なる部分に活性の違いが起因していると推測しました。そして、活性に重要だと予測したアミノ酸を La-kKTx1 を La-kKTx2 で入れ替えた1アミノ酸置換ペプチドをデザインし、殺虫活性を測定することで重要性の確認を行いました。この結果、La-kKTx2 の N 末端側から 10 番目のヒスチジンが活性に重要な働きをしており、このアミノ酸を La-kKTx1 の N 末端側から 10 番のアミノ酸であるグルタミンに置換することで活性が失われることを特定しました。



私はこの研究において、アミノ酸を1つ置き換えるだけで活性が大きく変化するという、生物の受容体とペプチドの結合の緻密さと、サソリの毒液という自然界にもともと存在する化合物が、殺虫剤や農薬の応用への高いポテンシャルを秘めているという点に魅力を感じています。今後はさらにこのペプチドについて、さらに構造活性相関研究をベースに知見を深め、有用なペプチドのデザインへとつなげていくことを目標とし研究に取り組みたいと考えています。

学会に参加して発表するという経験が初めてだったため、当日はもちろん、事前の準備の段階でも大変緊張していましたが、発表時の質疑応答では多くのご質問を頂き、さらに、口頭発表が終わった後にも個別で感想、疑問を伝えてくださる方がいらっしやり、自分の発表に興味を持って聞いて貰えたことを実感し、非常に嬉しく感じました。また、私自身の研究とは関わりのない分野の研究をされている方のご発表やご意見は新鮮に感じました。今回トキシシンポジウムに参加したことで、他の方のご発表を通して学びを得ただけでなく、自身の研究に対して反応を頂けたことで研究への意欲を高めることができ、実りのある時間になることができました。

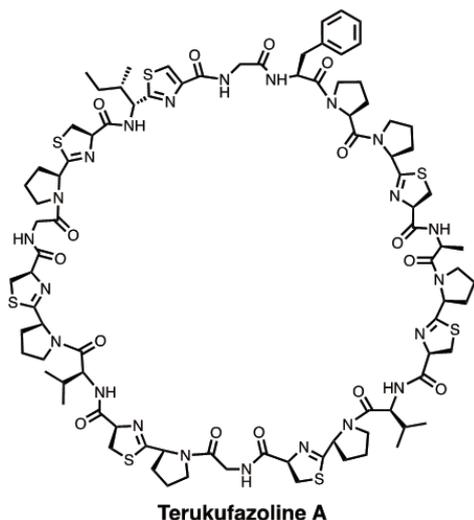
慶應義塾大学理工学部化学科

末永研究室 田口黎武 (大学院生)

新規天然物 terukufazoline A の単離・構造決定・生物活性・全合成を題材に、第 69 回毒素シンポジウムで発表し、若手奨励賞を頂戴した。本稿では、その研究内容を紹介する。

当研究室 (慶應義塾大学理工学部化学科 天然物化学研究室) では、南西諸島で採集した海洋シアノバクテリアから新規天然物の探索研究を行っている。近年我々は、離島で採集した見目の珍しい海洋シアノバクテリアから新規天然物を発見してきた。今回もまた、離島の珍しいシアノバクテリアを狙うべく、採集地を粟国島 (那覇から北西へ約 60 km の離島) とした。大浜にて採集した赤い小豆のような海洋シアノバクテリアは見目が珍しく、期待できるサンプルであった。

Terukufazoline A は分液操作や逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて安定であり、難なく単離することができた。当初、terukufazoline A の 1H NMR は多数のロータマーにより複雑化していたため、精製が不十分な可能性を疑った。しかし、再度 HPLC で精製しても 1H NMR が変わらず、マススペクトルを測定すると分子量が 1972 と巨大な化合物であると判明した。いよいよ大変な化合物を相手にするのだとわかり、心が躍った。



二次元 NMR スペクトルの解析により、terukufazoline A のすべての構成アミノ酸を明らかにすることができたのだが、アミノ酸配列の決定には多大な時間を要した。タンデムマスペクトルでは、同一のアミノ酸を多数含む環状ペプチドであるために解釈が困難であった。もちろんできる限りの解釈を行ったのだが、内容があまりにも複雑であり、筆者の説明が拙いことも相俟って、報告会で先生方に納得していただかず、涙したことを覚えている。また、分解反応ではチアゾリンが曲者のため反応系が複雑化してしまい、分解物の単離・解析が困難であった。結局、化学的なアプローチによるアミノ酸配列の決定は難航したため、生合成遺伝子情報を用いたアプローチへと転じた。

ペプチド化合物の生合成経路には、NRP (非リボソームペプチド) 経路と RiPP (リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド) 経路の二種類がある。構成アミノ酸の構造から terukufazoline A の生合成経路を RiPP 経路と推定した。この経路では、生合成遺伝子から転写・翻訳により合成されたペプチド鎖が、酵素修飾を受けることで RiPP が生合成される。そのため、採集した海洋シアノバクテリアから生合成遺伝子を見つけ出すことができれば、アミノ酸配列を決定することができると推定した。実は、採集したサンプルにエタノールを注ぐ (抽出操作を行う) 直前に、何かに使えるかもしれないと思いとどまって、なげなしの量のサンプルを冷凍庫に保管しておいた。この判断が功を奏し、メタゲノム解析を行うことができた。解析結果から生合成遺伝子の探索を進めていくと、シアノバクテリアが生産する RiPP と相溶性の高い配列が

一つだけヒットした。固唾を吞んで塩基配列をアミノ酸配列に変換すると、terukufazoline A に相当する配列があるではないか！ 快刀乱麻を断ち、絶対立体配置決定・全合成に向かって賽は投げられたのである。

続いて、首尾よく絶対立体配置を決定することができた。最後の難関は、エピ化しやすいチアゾリンの立体配置決定であった。重塩酸で天然物を加水分解し、エピ化したアミノ酸を重水素標識する条件としたことで、結論を出すことができた。すべての立体配置が決まった瞬間には、岩崎有紘先生 (当時は当研究室専任講師、現在は中央大理工学部准教授) と抱き合い、感動を分かち合った。構造を明らかにした terukufazoline A は、HeLa 細胞に対して細胞毒性を示さなかったのに対し、アフリカ睡眠病の病原原虫である *Trypanosoma brucei rhodesiense* に対して中程度の増殖阻害活性を示したことから、選択的な抗トリパノソーマ活性を示すことがわかった。

構造を決定したのは今年の三月であり、この時点で論文化してもよい成果であったのだが、私は元来、全合成を熱望して斯界へ飛び込んだ人間である。そのためどうしても terukufazoline A を作りたい、作らなければならないという使命感に駆られた。やると決めたからには、九月初めの本学会に間に合わなければ腹を切る覚悟で臨んだ。他大学院の博士後期課程進学を決めていたため、新しい研究テーマで DC1 を執筆したり、本学会を含む三つの学会の要旨を執筆したりとハードなスケジュールであったが、本学会の四日前になんとか全合成を達成した。合成品の <sup>1</sup>H NMR を測定すると、天然物とまったく同じ複雑怪奇なスペクトルが目の前に現れた。感慨もひとしおであり、肩の荷が下りた。以上が本研究の成果であるが、私には解き明かしたい問いが一つある。それは「どのような理由をもって海洋シアノバクテリアがこの毒素を生産したのか」である。採集で観察した海洋シアノバクテリアは多様な生態をとり、それら試料に含まれる代謝産物の内訳が大きく異なることから、生物は環境に合わせて独特の代謝産物を作る理由があると考えてきた。しかし、その理由を解明する術を、今の私は持ち合わせていない。博士後期課程では、恒松雄太先生 (名古屋大学大学院生命農学研究科准教授、本研究のゲノム解析にて御協力を賜った) のもとの、ゲノム編集や種々のオミクス解析を通じて超炭素鎖有機分子の生合成機構解明研究を行う予定である。これまでに得た知見に、新天地で得られる知見を組み合わせ、未知なる問いに立ち向かいたい。



## 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）

# 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 種類を超えるタンパク質とカルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生成や構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、オルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（コンタクト）部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心に様々なオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

## 2. 本年度の研究成果

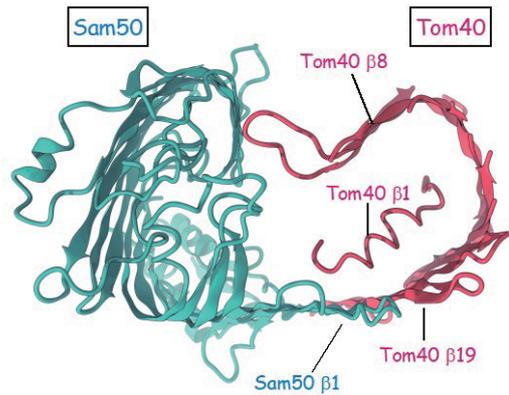
### (1) ミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体による $\beta$ -バレル構造形成の分子機構

ミトコンドリア外膜には小分子やタンパク質の通り道を提供するポリンや Tom40 などバレル型構造の膜タンパク質（ $\beta$  バレル型膜タンパク質）が存在し、ミトコンドリアの機能に必須である。SAM 複合体はこれらのタンパク質の  $\beta$  バレル構造形成と外膜へ私たちは、SAM 複合体の構成サブユニットが異なる二つの複合体について、高分解能立体構造を決定し、SAM 複合体がそのサブユニットと基質の  $\beta$  バレルタンパク質を入れ替えながら、基質のバレル構造形成を促し、外膜に組み込む新規の仕組み（ $\beta$  バレルスイッチモデル）を明らかにした (Takeda *et al.*, *Nature* 2021)。しかし、基質がどのように  $\beta$  シートを折り曲げて正確にバレル構造に組み上げるのかについては不明であった。今回、SAM 複合体と構造形成途上にある基質 Tom40 の複合体のクライオ電子顕微鏡構造を 2.8 Å の空間分解能で決定した (Takeda *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2023)。さらに *in vivo* で  $\beta$  バレル構造形成時の基質の  $\beta$  シート形成と Sam50-基質間および基質内の一過的相互作用を、ジスルフィド結合形成を指標としてモニターする実験系を確立し、バレル構造形成の解析を行った。SAM 複合体の Sam50 の  $\beta 1$  ストランドと基質 Tom40 の  $\beta 19$  ストランドが  $\beta$  シートを作り、N 端側に向かって  $\beta 8$  ストランドまで  $\beta$  シートが形成されていた。 $\beta 1$ - $\beta 7$  ストランドは構造が十分には見えなかったが、 $\beta 1$  は以外にも途中まで形成された  $\beta$  バレルの内部に入り込みヘリックス構造を作っていた。この後  $\beta$  バレル形成が進むと  $\beta 1$  よりも前にある 80 残基程度の N 端セグメントが  $\beta 1$  を追い出し、 $\beta 1$  は  $\beta 19$  と  $\beta$  シートを形成して  $\beta$  バレル構造が完成すると考えられる。すなわち、基質の  $\beta$  バレルが構造正しく形成されるためには、C 端側からの  $\beta$  シートの成長、バレル形成の途中でシートを大きく曲げることで、最終的に C 端側  $\beta$  ストランドと  $\beta$  シートを形成してバレルを閉じるために N 端側の  $\beta$  セグメントとなる部分を形成途上のバレル内にいったん呼び込むことが必要であることがわかった。これは、細菌の BAM 複合体による  $\beta$  バレルタンパク質の構造形成とは全く異なるメカニズムであり、進化的にどのように獲得されたか、など興味深い。

### (2) オルガネラに誤配送された膜タンパク質の配送やり直しの分子機構

真核細胞のオルガネラが正しく機能するためには、各オルガネラの機能を担うタンパク質が正しくオルガネラに配送されることが必要である。これまでオルガネラタンパク質はその局在化シグナルにしたがって正確に目的地に輸送される、そして万一輸送に失敗した誤配送タンパク質は速やかに分解されると考えられてきた。しかし

私たちは最近、タンパク質の細胞内輸送は必ずしも正確ではなく、確率的に誤局在が起こりうる、しかしそうした誤局在タンパク質を見出し、単に分解するだけでなく配送のやり直し、いわば「配送の校正」を行うことで、最終的に正しいタンパク質の局在化を実現するシステムが存在することを見出した (Matsumoto and Endo, *J. Biochem.* 2023)。すなわちミトコンドリア外膜の AAA-ATP アーゼの Msp1 が、ミトコンドリア外膜に誤配送された膜タンパク質を検出して引き抜き、ER 膜に送り込んで分解するか配送をやり直すかが決まることを見出した (Matsumoto, Ono *et al.*, *JCB*, 2022)。それではこうしたタンパク質の配送の校正は他のオルガネラでも起こるのか？本研究では、ER に誤配送されたミトコンドリア外膜タンパク質の ER 膜からの引き抜きと品質管理に ER 膜の P-type ATP アーゼ Spf1 が関わる可能性について検討した。まず、Spf1 欠損酵母細胞ではミトコンドリア外膜の TA タンパク質や一部の N アンカータンパク質が ER に誤局在することを見出した。さらに誤配送基質の発現をオフにしてから Spf1 の発現を誘導すると、誤配送されたミトコンドリア外膜タンパク質が ER から減少し、ミトコンドリアへの局在が回復することを見出した。これらの局在の変化は Spf1 欠損に伴う ER ストレス誘導やエルゴステロールのオルガネラ間分布の変化による二次的影響に由来するものではないことを確認した。これらの結果は Spf1 がミトコンドリアと ER 間での膜タンパク質の正しい局在化の実現に関わることを強く示唆するものと考えられる。



SAM 複合体と Tom40 のフォールディング中間体との複合体のクライオ電顕構造

### 3. Research projects and annual reports

#### This year's accomplishments

#### 1) Molecular mechanism of $\beta$ -barrel protein folding by a mitochondrial outer membrane translocator, the SAM complex.

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.

The mitochondrial outer membrane houses membrane proteins characterized by barrel-like structures, known as  $\beta$ -barrel membrane proteins. These proteins, such as porins and Tom40, play a crucial role in facilitating the passage of small molecules and proteins, thereby contributing to mitochondrial function. The SAM complex in the mitochondrial outer membrane is a translocator responsible for the formation of the  $\beta$ -barrel structure of these proteins and their incorporation into the outer membrane. We have previously determined the high-resolution structures of the two forms of the SAM complex, each of which contains different subunit proteins, and revealed a novel mechanism ( $\beta$ -barrel switch model) in which the SAM complex switches its subunits with the  $\beta$ -barrel protein substrate to promote its formation of the  $\beta$ -barrel structure and its insertion into the outer membrane. (Takeda *et al.*, *Nature* 2021). Nonetheless, it still remained unclear how the substrate folds the  $\beta$ -sheet and assembles it into a precise barrel structure, closing the sheet. In this study, we determined the cryo-EM structure of the SAM complex with a folding intermediate of the substrate Tom40 at a spatial resolution of 2.8 Å (Takeda *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2023). Furthermore, we established an experimental system to monitor  $\beta$ -sheet formation of the substrate and its transient interaction with Sam50 as well as within Tom40 during  $\beta$ -barrel formation *in vivo*, using disulfide bond formation as an indicator for analysis of barrel structure formation. In summary, the structurally correct formation of the substrate's  $\beta$ -barrel

requires the growth of the  $\beta$ -sheet from the C-terminal side, significant bending of the sheet during barrel formation, and the involvement of the N-terminal  $\beta$ -segment inside the forming barrel, ultimately leading to the closure of the barrel. This mechanism differs entirely from the process by which bacterial BAM complexes form  $\beta$ -barrel proteins. The evolutionary acquisition of this mechanism is an intriguing aspect worth exploring further.

## **2) Molecular mechanism of re-transport of mislocalized organelle proteins.**

For eukaryotic cell organelles to function properly, the proteins responsible for the function of each organelle must be correctly delivered to the organelle. It has been believed that organelle proteins are precisely transported, and that mislocalized proteins are quickly degraded. However, we have recently found that intracellular transport of proteins is not always precise and that mislocalization can occur stochastically, but that there exists a system that detects such mislocalized proteins and not only degrades them but also re-transport them, so to speak, by "proofreading of protein transport" to finally achieve correct protein localization (Matsumoto and Endo, *J. Biochem.* 2023). Msp1, an AAA-ATPase in the mitochondrial outer membrane, detects and extracts mislocalized membrane proteins from the mitochondrial outer membrane, which are then transported to the ER membrane for degradation or re-transport (Matsumoto, Ono et al., *JCB*, 2022). Then, an important question is if such proofreading of protein transport could operate in other organelles. In this study, we investigated the possibility that the ER P-type ATPase Spf1 is involved in the quality control and extraction of mitochondrial outer membrane proteins mislocalized to the ER from the ER membrane. First, we found that mitochondrial outer membrane tail-anchored (TA) proteins and some N-anchored proteins are mislocalized to the ER in Spf1-deficient yeast cells. We also found that when Spf1 expression was induced after the expression of the mislocalized substrates was turned off, the mislocalized mitochondrial outer membrane proteins decreased from the ER and their localization to mitochondria was restored. We confirmed that these changes in localization were not due to secondary effects of Spf1 deficiency-induced ER stress or changes in the inter-organelle ergosterol distribution. These results strongly suggest that Spf1 is involved in achieving correct localization of membrane proteins between mitochondria and the ER.

## 4. 論文, 著書など

### 原著論文

Matsumoto S, Ono S, Shinoda S, Kakuta C, Okada S, Ito T, Numata T, Endo T, GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER. *J. Cell Biol.* 221, e202104076 (2022).

Kakimoto-Takeda Y, Kojima R, Shiino H, Shinmyo M, Korokawa K, Nakano A, Endo T, Tamura Y, Dissociation of ERMES clusters plays a key role in attenuating the endoplasmic reticulum stress. *iScience* 25(11):105362 (2022).

Takeda H, Busto JV, Lindau C, Tsutsumi A, Tomii K, Imai K, Yamamori Y, Hirokawa T, Motono C, Ganesan I, Wenz, L-S, Becker T, Kikkawa M, Pfanner N, Wiedemann N, Endo T, A multipoint guidance mechanism for  $\beta$ -barrel folding on the SAM complex. *Nat Struct Mol Biol* 30, 176-187 (2023).

Akabane S, Watanabe K, Kosako H, Yamashita S-I, Nishino K, Kato M, Sekine S, Kanki T, Matsuda N, Endo T, Oka T, TIM23 facilitates PINK1 activation by safeguarding against OMA1-mediated degradation in damaged mitochondria. *Cell Rep.* 42, 11254 (2023).

## 英文総説

Hirashima T and Endo T (News and Views), A protein entry path into chloroplasts. **Nature** 615, 222-224 (2023).

Araiso Y and Endo T (Review), Structural overview of the translocase of the mitochondrial outer membrane complex. **Biophys. Physiol.** e190022 (2022).

Araiso Y, Imai K, Endo T (Review), Role of the TOM complex in protein import into mitochondria: structural views. **Ann. Rev. Biochem.** 91, 679-703 (2022).

Matsumoto S and Endo T (Review), Proofreading of protein localization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1. **J. Biochem.** 173, 265-271 (2023).

## 日本語解説記事

遠藤斗志也, 荒磯裕平, 竹田弘法, ミトコンドリアタンパク質の膜透過と膜組込機構. **医学のあゆみ** 281 (12), 1151-1156 (2022).

遠藤斗志也, 竹田弘法, 荒磯裕平, ミトコンドリアタンパク質の輸送機構. **実験医学** 41 増刊「ミトコンドリア: 疾患治療の新時代」, 664-675 (2023).

## 5. 学会発表など

(招待講演)

松本峻介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, ミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー型タンパク質の配送校正機構, 第22回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ「細胞内タンパク質世界の新視点」, つくば2022.6.7-9, 国内, 口頭

Toshiya Endo, Protein machineries that make and maintain mitochondria, Mitochondria and Friends 2.0: Scientific Symposium Dedicated to the Memory of Walter Neupert, Munich, 2022.6.27, 海外, 口頭

Toshiya Endo, Protein machineries in transport and re-transport of mitochondrial proteins (Invited lecture -Closing talk), EMBO Workshop on New Challenges in Protein Translocation across Membranes Sant Feliu de Guizols, Spain, 2022.9.17-21, 海外, 口頭

松本俊介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, 膜タンパク質局在化における配送校正機構の解明 (2022年度日本生化学会奨励賞受賞講演), 第95回日本生化学会大会, 名古屋, 2022.11.9-11, 国内, 口頭

Toshiya Endo, Pathways and machineries that mediate and regulate mitochondrial protein trafficking (Invited), ISF Workshop: Mitochondria Past and Present - Evolution, Proteostasis, Dynamics and Disease, Kibbutz Ein Gedi, Dead Sea, Israel 2022.11.13-16, 海外, 口頭

遠藤斗志也, 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解明, タンパク質研究シンポジウム, 東京, 2022.12.12-13, 国内, 口頭

(一般発表)

川上航平, 後藤美稀, 遠藤斗志也, 田村康, ミトコンドリアの存在量を調節する分子機構の解明, 日本生化学会東北支部第88回例会, 鶴岡, 2022. 5. 27, 国内, ポスター発表

椎野浩也, 橋本美智子, 細谷孝充, 遠藤斗志也, 田村康, リン脂質合成輸送阻害剤を用いたミトコンドリア-小胞体間におけるリン脂質輸送機構の解析, 日本生化学会東北支部第88回例会, 鶴岡, 2022. 5. 27, 国内, ポスター発表

小西雄大, 阪上春花, 竹田弘法, 遠藤斗志也, 酵母アルデヒドデヒドロゲナーゼHfd1の細胞内局在の分子機構, 第68回日本生化学会近畿支部例会 大津 (ハイブリッド) 2022.5.28, 国内, 口頭

九笹加菜, 小林菜々子, 今井大達, 榎野愛実, 稲津明広, 古寺哲幸, 遠藤斗志也, 荒磯裕平, 高速原子間力顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリアタンパク質搬入ゲート TOM 複合体の構造とダイナミクス, 第22回日本蛋白質科学会年会, つくば, 2022. 6.7-9, 国内, 口頭

小西 雄大、阪上春花、竹田弘法、遠藤斗志也，コエンザイムQ合成経路におけるER局在型の酵母アルデヒドデヒドロゲナーゼHfd1の関与，第74回日本細胞生物学会大会，東京都江戸川区，2022.6.28-30，国内，口頭

篠田沙緒里、坂本智昭、木村成介、遠藤斗志也，ミトコンドリアに輸送される新規核コードRNAの網羅的探索，第74回日本細胞生物学会大会，東京都江戸川区，2022.6.28-30，国内，口頭

Saori Shinoda, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Toshiya Endo, Identification of nuclear-encoded RNAs in mitochondria, 第23回日本RNA学会年会，京都，2022.7.20-22，国内，口頭

Haruka Sakaue, Toshiya Endo, Analysis of the import regulatory mechanism of mitochondrial IMS protein, EMBO Workshop on New Challenges in Protein Translocation across Membranes, Sant Feliu de Guizols, Spain 2022.9.17-21，海外，ポスター発表

Suzuka Ono, Shunsuke Matsumoto, Toshiya Endo, Membrane protein quality control in mitochondria and the ER by Msp1 and Spf1, EMBO Workshop on New Challenges in Protein Translocation across Membranes, Sant Feliu de Guizols, Spain, 2022.9.17-21，海外，ポスター発表

Saori Shinoda, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Toshiya Endo, Identification of nuclear-encoded RNAs in mitochondria, EMBO Workshop on New Challenges in Protein Translocation across Membranes, Sant Feliu de Guizols, Spain, 2022.9.17-21，海外，ポスター発表

平嶋孝志，齊藤知加，河野 慎，遠藤斗志也，小胞体-ミトコンドリア間接触部位を形成する酵母ERMES複合体の最小機能単位，第95回日本生化学会大会，名古屋，2022.11.9-11，国内，口頭+ポスター発表

阪上春花，遠藤斗志也，出芽酵母におけるミトコンドリア膜間部タンパク質のインポート調節機構，第95回日本生化学会大会，名古屋，2022.11.9-11，国内，口頭+ポスター発表

椎野浩也，橋本美智子，細谷 孝充，遠藤斗志也，田村 康，リン脂質合成輸送阻害剤を用いたミトコンドリア・小胞体間における新規リン脂質輸送因子の探索，第95回日本生化学会大会，名古屋，2022.11.9-11，国内，ポスター発表

小野鈴花，遠藤斗志也，Spf1が調節するミトコンドリア-ER間における膜タンパク質の再配達機構，第45回日本分子生物学会年会，幕張，千葉，2022.11.30-12.2，国内，ポスター発表

小西雄大，阪上春花，竹田弘法，遠藤斗志也，細胞内多重局在タンパク質Hfd1とTOM複合体の相互作用形態の探索，第45回日本分子生物学会年会，幕張，千葉，2022.11.30-12.2，国内，ポスター発表

赤羽しおり，渡邊聖菜，小迫英尊，松田憲之，遠藤斗志也，岡敏彦，ミトコンドリア膜透過装置TIM23はPINK1複合体のメンバーとして、脱分極で誘導されるPINK1分解を抑制する，第45回日本分子生物学会年会，幕張，千葉，2022.11.30-12.2，国内，ポスター発表

小林菜々子，九笹加菜，今井大達，川合志朋，槇野愛実，稲津明広，古寺哲幸，遠藤斗志也，荒磯裕平，ミトコンドリア膜透過装置TOM複合体の高速原子間力顕微鏡解析，第45回日本分子生物学会年会 幕張，千葉 2022.11.30-12.2，国内，ポスター発表

篠田沙緒里，坂本智昭，木村成介，遠藤斗志也，ミトコンドリアへ輸送される核コードRNAの探索技術の開発と生理学的意義の解析，第21回日本ミトコンドリア学会年会，東京，2023.3.16-18，国内，口頭

## 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 (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・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：2020-2025 年度（6 年）

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名：ミトコンドリア外膜上で起こる分解経路の生理的意義の解明

研究代表者：篠田沙緒里，取得年度：2019-2022 年度（3 年）

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名：ミトコンドリア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）

私立学校振興共済事業団 女性研究者奨励金

ATPase を介したタンパク質配送校正機構の解明

研究者：小野鈴花，取得年度：2022 年度（1 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

篠田沙緒里，張春明：【宮城県仙台第一高校 ラボツアー】

実施日時：2022 年 7 月 7 日

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：研究内容の紹介および研究室ツアーを行った。研究員立ち会いのもと，実際に顕微鏡操作を体験しながらヒト培養細胞のミトコンドリアの観察を行った。またタンパク質構造解析に関する一連の過程についても説明を行った。

篠田沙緒里：【井出庸生文部科学副大臣への研究室紹介】

実施日時：2022 年 9 月 28 日

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：井出庸生文部科学副大臣に対し，研究室の紹介および研究室の案内を行った。若手研究者の現状についても説明を行った。見学後に副大臣の SNS でも当研究室を見学されたことが報告されていた。

張春明，草野清輔：【鹿児島県立甲南高等学校 ラボツアー】

実施日時：2022 年 12 月 7 日

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：来館した鹿児島県立甲南高等学校の生徒に対し，研究内容の紹介および研究室ツアーを研究員より行った。ラボツアーについては，研究対象であるミトコンドリアをマクロ（細胞）とミクロ（分子）という 2 つの視点で捉え，理解を深めてもらうことを目的とした。

篠田沙緒里：【私立北鎌倉女子学園高等学校出張授業】

実施日時：2023 年 1 月 20 日

場所：神奈川県 私立北鎌倉女子学園高等学校

内容：理系クラス高校 2 年生に向けて研究者という職業および，自身の研究を紹介する授業(60 分)を行った。その後パネルディスカッションを行い生徒と対談した。2021 年度から行なっている出張授業のため，去年の経験を活かして授業を行った。



2023年9月 遠藤研リトリート（山形県天童市）

# 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**」をと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、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。本、従来知られてきたとはまったく異なる新たな方法によって、小胞体に電子が供給されているメカニズムを明らかにしつつある。また、小胞体内腔のレドックス環境がどのように構築されるのか、その機構解明にも挑戦している。

## 2. 本年度の研究成果

### 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。この酸化環境で、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 (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 (R. Ushioda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2016)。また、ERdj5 の欠損はサイトゾルのカルシウムイオン恒常性破綻を招き、ミトコンドリアの異常断裂を引き起こすことを明らかにした (R. Yamashita et al., *Sci. Rep.* 2021)。

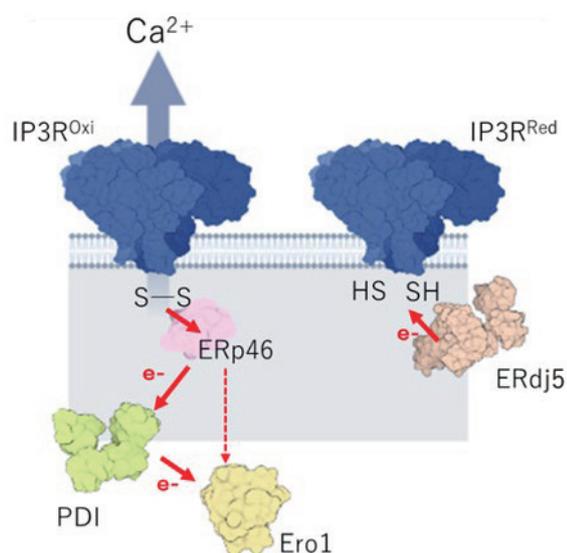


図1. 小胞体カルシウムイオンチャンネル IP3 受容体のレドックス制御

今回、小胞体カルシウムイオンチャンネル IP3 受容体の制御因子の探索のため、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 を用いて小胞体内腔の酸化還元酵素群の遺伝子欠損細胞株を複製し、IP3 受容体を介した  $Ca^{2+}$  放出活性や細胞内環境の変化を解析した。多くの酸化還元酵素の遺伝子欠損細胞で  $Ca^{2+}$  放出活性の変化が観察されましたが、直接的な制御因子として酸化酵素 ERp46 と還元酵素 ERdj5 を同定した。ERp46 は IP3 受容体を酸化することによって  $Ca^{2+}$  放出活性を正に制御し、逆に ERdj5 は IP3 受容体を還元することによって負に制御することを明らかにした (図1, S. Fujii et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* in press)。また、この制御は、IP3 受容体の小胞体内腔の酸化還元状態に依存しており、まったく新しい  $Ca^{2+}$  放出活性制御であることがわかった。これらの研究成果から、小胞体内腔のレドックス環境の変化がこれらの酵素を介して IP3 受容体を介した  $Ca^{2+}$  シグナルに異常を引き起こす可能性が示唆された。このことは、疾患や老化など小胞体内腔のレドックス環境の変化と  $Ca^{2+}$  シグナルとの関係を結びつける重要な知見となるだろう。

これまで我々は、ERdj5 が小胞体の  $Ca^{2+}$  ポンプ SERCA2b の活性化にも寄与することを明らかにし、ERdj5 の細胞内での  $Ca^{2+}$  恒常性における重要性を示してきました。本研究の成果とあわせて、ERdj5 は  $Ca^{2+}$  を取り込むポンプを正に制御し、 $Ca^{2+}$  を放出するチャンネルを負に制御するという合理的な  $Ca^{2+}$  制御機構を見出した。小胞体内腔の  $Ca^{2+}$  濃度が低下した時に、効率よく  $Ca^{2+}$  濃度を回復させる合目的な  $Ca^{2+}$  恒常性維持機構モデルを提唱出来た。

### 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 mechanisms for misfolded proteins within the cells. Particularly, we have devoted our activity to 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., **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2016). Furthermore, the 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 the 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 (S. Fujii et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** in press) . Additionally, we found that ERdj5 deficiency causes mitochondrial fragmentation due to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostatic disruption (R. Yaamashita et al., **Sci. Rep.** 2021) . 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

##### 原著論文

Shohei Fujii, Ryo Ushioda\* and Kazuhiro Nagata\*. Redox states in the endoplasmic reticulum directly regulate the activity of calcium channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. **Proc Natl Acad Sci USA.** in press

Hiroki Tanemura, Kenji Masuda, Takeshi Okumura, Eri Takagi, Daisuke Kajihara, Hirofumi Kakihara, Koichi Nonaka, Ryo Ushioda\*: Development of a stable antibody production system utilizing an Hspa5 promoter in CHO cells, **Scientific Reports.** 12, Article number: 7239 (2022)

##### 著書

潮田亮：小胞体局在還元酵素ERdj5の欠損が引き起こすミトコンドリア断裂、総合学術研究所所報第17号、115-120 (2023)

上垣日育、永田和宏、潮田亮：小胞体プロテオスタシスの新常識—酸化反応の場としての小胞体から還元反応の場へ、実験医学増刊40(12)、250-258(2022)

#### 5. 学会発表など

Ryo Ushioda: A new platform formed by JDP-Hsp70 for protein quality control in the ER, J-domain proteins from molecular mechanisms to diseases International Workshop (CSSI), Poland, 2023.3.29-2023.4.1 (招待講演)

潮田亮：レドックス制御に基づく小胞体ホメオスタシスの理解、第2回日本医学会連合 Rising Star リトリート、淡路市、2023.3.5-2023.3.6 (招待講演)

和田匠太、永田和宏、潮田亮：レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサー制御機構の解明、第45回日本分子生物学会年会、千葉県、2022.11.30-2022.12.2 (口頭)

堤智香、田原諒佑、坂本龍太、渡邊弘樹、永田和宏、潮田亮：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45回日本分子生物学会年会、千葉県、2022.11.30-2022.12.2 (口頭)

杉澤亜美、潮田亮：液-液相分離によって形成される新たなタンパク質品質管理プラットフォーム、第 45 回日本分子生物学会年会、千葉県、2022.11.30-2022.12.2（口頭）

潮田亮：小胞体における新たなタンパク質品質管理プラットフォームの形成、第 95 回日本生化学会大会 シンポジウム、名古屋市、2022.11.9-2022.11.11（口頭）

杉澤亜美、潮田亮：液-液相分離によって形成される新たなタンパク質品質管理プラットフォーム、第 95 回日本生化学会大会、名古屋市、2022.11.9-2022.11.10（口頭）

Ryo Ushioda：ER Redox shift through the ribosome translation、第 60 回日本生物物理学会年会、函館市、2022.9.28-2022.9.30（口頭）

潮田亮：タンパク質品質管理を支える電子移動媒体としての超硫黄分子の役割、学術変革領域(A)「硫黄生物学」第 2 回領域会議、福岡市、2022.8.6-2022.8.8（口頭）

和田匠太、永田和宏、潮田亮：レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーの新たな活性化機構、学術変革領域(A)「硫黄生物学」第 2 回領域会議、福岡市、2022.8.6-2022.8.8（ポスター）

渡邊弘樹、堤智香、永田和宏、潮田亮：小胞体に形成される局所的な還元環境の同定、学術変革領域(A)「硫黄生物学」第 2 回領域会議、福岡市、2022.8.6-2022.8.8（ポスター）

杉澤亜美、潮田亮：近接依存性標識を用いた小胞体タンパク質品質管理機構の評価、第 15 回小胞体ストレス研究会、京都市、2022.7.30-2022.7.31（ポスター）

和田匠太、永田和宏、潮田亮：レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーATF6 制御機構の解明、第 15 回小胞体ストレス研究会、京都市、2022.7.30-2022.7.31（ポスター）

藤井唱平、潮田亮：小胞体の機能を支えるオルガネラ環境の探求、第 15 回小胞体ストレス研究会、京都市、2022.7.30-2022.7.31（ポスター）

潮田亮：レドックス制御を介した小胞体恒常性維持機構、第 15 回小胞体ストレス研究会、京都市、2022.7.30-2022.7.31（口頭）

葛西綾乃、潮田亮：カラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の負荷に応答した転写調節機構 の解明、第 15 回小胞体ストレス研究会 若手の会、京都市、2022.7.29（口頭）

和田匠太、永田和宏、潮田亮：レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーATF6 制御機構の解明、第 15 回小胞体ストレス研究会 若手の会、京都市、2022.7.29（優秀発表賞 受賞）

杉澤亜美、岸本哲弘、潮田亮：近接依存性標識を用いた小胞体タンパク質品質管理機構の評価、第 74 回日本細胞生物学会大会、東京都、2022.6.28-2022.6.30(2022.6.30)（ポスター）

潮田亮：レドックス制御を介した小胞体タンパク質品質管理、第 3 回 日本結合組織学会若手セミナー、オンライン、2022.6.24（招待講演）

Ryo Ushioda: Maintenance of Endoplasmic Reticulum Homeostasis through Redox Regulation, Cellular and Protein Homeostasis webinar, Online, 2022.6.14（招待講演）

潮田亮：酸化反応の場としての小胞体から、還元反応の場としての小胞体へ、微研セミナー、吹田市、2022.6.10（特別講演）

杉澤亜美、岸本哲弘、潮田亮：近接依存性標識を用いた小胞体タンパク質品質管理機構の評価、第 68 回日本生化学会近畿支部例会、滋賀県、2022.5.28（口頭）

和田匠太、永田和宏、潮田亮：ドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーATF6 制御機構の解明、第 68 回日本生化学会近畿支部例会、滋賀県、2022.5.28（優秀発表賞 受賞）

## 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：一過的・局所的に出現する小胞体還元環境の解明

研究代表者：潮田亮、取得年度 2022-2026 年

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)

課題名：タンパク質品質管理を支える電子移動媒体としての超硫黄分子の役割

研究代表者：潮田亮、取得年度：2021-2025 年

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)

課題名：硫黄生物学研究推進のための国際連携とインフラ整備

研究分担者：潮田亮、取得年度 2021-2025 年

AMED-CREST

課題名：プロテオスタシスにおけるタンパク質構造形成機構の包括的解明

研究分担者：潮田亮、取得年度：2021-2026 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：2021-2022 年

資生堂株式会社

課題名：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：2022 年

## 2) 学外活動

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

潮田亮：小胞体ストレス研究会 世話人

潮田亮：第 15 回小胞体ストレス研究会大会長

Ryo Ushioda: 4th International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine, the 12th International NO Conference & The 22nd NOSJ, Organizing committee member

Ryo Ushioda: Journal of Biochemistry Associate Editor

潮田亮：京都第二赤十字看護専門学校 非常勤講師

## 3) アウトリーチ活動

潮田亮：京都市立紫野高等学校：高大接続授業「タンパク質が光る！？病気の原因になる！？タンパク質が織りなす不思議な世界」

潮田亮：追手門学院大手前高等学校 模擬授業「生命を「カタチ」作るもの」

## 4) 受賞歴

(1) 和田匠太：第 68 回日本生化学会近畿支部例会 優秀発表賞

(2) 和田匠太：第 15 回小胞体ストレス研究会 若手の会 優秀発表賞

潮田研ホームページ

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





写真1: 京都大学生命科学研究科 井垣研究室との交流会



写真2 第15回小胞体ストレス研究会スタッフ記念撮影

# 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

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

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

## 2. 本年度の研究成果

### (1) タンパク質膜組込装置 YidC の枯草菌における基質の探索

真正細菌におけるタンパク質の膜組込は、主に、Sec 経路と YidC 経路を介して行われる。Sec 経路は、SecYEG 複合体が形成するタンパク質膜透過チャンネルを介し、新生ポリペプチド鎖が膜を超えて輸送される。一方、YidC は、膜内に半分埋まった溝構造を含む特徴的な構造をしており、チャンネルに依存しない膜組込装置として Sec トランスロコンとは異なる機構で膜挿入を行うことが示唆されている。しかしながら、その詳細な分子機構については、まだあまり明らかにされてはいない。YidC と基質膜タンパク質の相互作用を理解する上で、多くの基質を同定することは重要であるが、特にグラム陽性菌においては、限られた数の基質しか同定されていない。そこで、本研究では、枯草菌 MifM の翻訳アレストを利用したユニークな膜挿入アッセイ系を構築し、枯草菌由来の様々な膜タンパク質の膜挿入の YidC 依存性を検討した。その結果、全部で 8 種類の、新規 YidC 基質と思われる膜タンパク質を同定した。それらを用いた解析から、YidC の膜内のアルギニンの普遍的な重要性が示された。

### (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の upstream にコードされている。これらに共通の特徴を手がかりとし、昨年度までに、30,000 種以上のバクテリアゲノムを対象にアレスト因子の探索を行った。その結果、新規アレスト因子をコードする可能性のある遺伝子が 10 種以上同定された。今年度は、それらがアレストを引き起こすか否かを、大腸菌、枯草菌の系を用いて検討し、多くのものが、大腸菌、枯草菌の片方もしくは両方で翻訳アレストを起こすことが示された。また、保存性の高い残基のうち、少なくとも一部はアレストに重要であることも示された。さらに、toeprinting 解析などから、それらのアレスト因子のアレスト部位を決定した。これらの因子の中には、RAPP 様の配列を含むものが多く含まれていた。一方で、新規アレスト配列を持つものもいくつか見出された。この一連の解析から、非常に多くのバクテリアが、*sec/yidC* 遺伝子の upstream にアレストペプチドをコードしていることが示唆され、タンパク質局在化装置のアレストペプチドを介した制御の普遍性が示唆された。

### 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) Systematic search for *B. subtilis* YidC substrates

In bacteria, protein membrane insertion is mediated mainly by two pathways: the Sec and YidC pathways. The Sec pathway utilizes the SecYEG membrane protein complex as a protein-conducting channel to translocate polypeptides across the membrane. In contrast, YidC has a functionally crucial membrane-embedded hydrophilic groove instead of a channel. However, the molecular mechanism of how YidC mediates membrane protein insertion remains to be largely unknown. To understand the interaction between YidC and substrate membrane proteins, it is important to identify many substrates. However, particularly in Gram-positive bacteria, only a limited number of substrates have been currently identified. Therefore, to identify novel *B. subtilis* YidC substrates, we now constructed a unique membrane insertion assay system using MifM an arrest peptide and examined the YidC-dependence of membrane insertion for various membrane proteins derived from *Bacillus subtilis*. We then identified a total of eight novel membrane proteins that are likely to be novel YidC substrates. Subsequent analysis using these proteins demonstrated the universal importance of arginine in the membrane-embedded groove of YidC.

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

Three of the translation arrest peptides previously found in eubacteria (SecM, MifM, and VemP) are encoded upstream of genes encoding components of the protein localization machinery. Based on common features shared by these arrest peptides, we have previously investigated more than 30,000 eubacterial genomes and then identified more than 10 putative novel arrest peptides. Using *E. coli* and *B. subtilis* systems, we currently demonstrated that they indeed induce translation arrest in either one or both of these bacteria. We also demonstrated that at least some of the highly conserved

residues are crucial for the arrest. Our toeprinting analysis determined the arrest sites of these arrest peptides. Interestingly, many arrest peptides contained RAPP-like sequences, while some were found to possess novel arrest-inducing sequences. Our analyses suggests that a wide variety of bacteria encode arrest peptides upstream of the *sec/yidC* genes, highlighting the universality of regulation of protein localization machinery by an essentially shared mechanism involving regulated translation arrest of the upstream gene.

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

Takada H., Mandell Z., Yakhnin H., Glazyrina A., Chiba S., Kurata T., Wu K., Tresco B., Myers A., Atkinson G., Babitzke P., Hauryliuk V.; Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor VmlR is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp. (2022) *Nucleic Acids Res.* 50, 6174-6189.

Obana, N., Takada, H., Crowe-McAuliffe, C., Iwamoto, M., Egorov, A.A., Wu, K.J.Y., Chiba, S., Murina, V., Paternoga, H., Tresco, B.I.C., Nomura, N., Myers, A.G., Atkinson, G.C., Wilson, D.N., Hauryliuk, V.; Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: VmlR2, Ard1 and CplR. (2023) *Nucleic Acids Res.* **in press**

Shiota N., Shimokawa-Chiba, N., Fujiwara, K. Chiba S.: Identification of *Bacillus subtilis* YidC substrates using a MifM-instructed translation arrest-based reporter. (2023) *J. Mol. Biol.* **in press**

##### 英語総説

Chiba, S., Fujiwara, K., Chadani, Y., Taguchi, H.; Nascent chain-mediated translation regulation in bacteria: translation arrest and intrinsic ribosome destabilization. (2023) *J. Biochem.* 173, 227-236.

##### 日本語総説

千葉志信、藤原圭吾 (2022) 新生ポリペプチド鎖が制御する翻訳動態. 実験医学増刊 Vol.40 No.12 セントラルドグマの新常識〜転写・翻訳の驚きの新機構と再定義されるDNA・RNA・タンパク質の世界

#### 5. 学会発表など

千葉志信、吉田真悠、辻奈緒子、藤原圭吾：タンパク質局在化装置に関連した翻訳アレスト因子の探索と解析：第 68 回日本生化学会近畿支部例会：2022. 5. 28

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：放線菌由来の新規アレスト因子の探索と解析：第 68 回日本生化学会近畿支部例会：2022. 5. 28

藤原圭吾、千葉志信：TnDR 法による新生鎖の動的挙動のプロテオームワイドな検出：第 68 回日本生化学会近畿支部例会：2022. 5. 28

千葉志信、崎山歌恋、吉田真悠、下川-千葉直美、藤原圭吾：タンパク質局在化装置と翻訳アレスト因子の進化的な繋がり：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

藤原圭吾、赤岡大暉、千葉志信：TnDR-seq による新生鎖の動的挙動の網羅的検出：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

高田啓、藤原圭吾、Gemma C. Atkinson、Vasili Hauryliuk、千葉志信：微生物における新規翻訳品質管理機構 RQC の分子メカニズムの解明：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

赤岡大暉、高田啓、藤原圭吾、千葉志信：枯草菌における翻訳途上鎖依存的な翻訳終了現象の解析：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：放線菌の新規翻訳アレスト因子の探索と解析：第 18 回 21 世紀大腸菌研究会：2022. 6. 27-28

藤原圭吾：モデル細菌における新生鎖ダイナミクスの網羅的検出：第 15 回 小胞体ストレス研究会・若手の会：2022.07.29

千葉志信：真正細菌の翻訳アレスト因子の網羅的探索：第 15 回 小胞体ストレス研究会：2022. 7. 30-31

藤原圭吾、千葉志信：モデル細菌における新生鎖ダイナミクスの網羅的検出：第 15 回 小胞体ストレス研究会：2022. 7. 30-31

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：放線菌由来の翻訳アレスト因子の探索と in vitro での解析：2022 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議：2022. 8. 25-26

赤岡大暉、高田啓、藤原圭吾、千葉志信：枯草菌における新生鎖依存的な翻訳終了現象：2022 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議：2022. 8. 25-26

藤原圭吾、千葉志信：TnDR-seq による新生鎖挙動の検出：2022 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議：2022. 8. 25-26

高田啓：温故知新、翻訳装置に内在する微生物環境応答機構の理解：ACT-X「環境とバイオテクノロジー」第 3 回領域会議：2022. 9. 29

藤原圭吾、千葉志信：TnDR-seq による新生鎖挙動の網羅的検出：第 4 5 回日本分子生物学会年会：2022.12.1

高田啓、藤原圭吾、千葉志信：微生物翻訳研究のこれから：第 1 回マルチファセットプロテインズ・若手ワークショップ：2022. 12. 6

藤原圭吾、千葉志信：真正細菌における翻訳アレストの解析と応用：第 1 回マルチファセットプロテインズ・若手ワークショップ：2022. 12. 6

千葉志信：機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構：第 3 回マルチファセットプロテインズ領域会議：2022.12. 7-8

藤原圭吾、千葉志信：TnDR-seq による新生鎖挙動の検出：第 3 回マルチファセットプロテインズ領域会議：2022.12. 7-8

千葉志信：翻訳アレストを応用したタンパク質動態解析：マルチファセットプロテインズ・ランチオンセミナー：2022. 12. 20

高田啓：温故知新、翻訳装置に内在する微生物環境応答機構の理解：ACT-X「環境とバイオテクノロジー」第 4 回領域会議：2023. 1. 22

千葉志信：非チャンネル型タンパク質膜挿入装置 YidC の解析：サントリー生命科学財団セミナー：2023. 3. 10（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・基盤研究 (C)

課題名：非チャンネル型タンパク質膜組込装置 YidC の分子機構

研究代表者：千葉志信、取得年度：R3-R5 年（3 年）

発酵研究所一般研究助成

課題名：グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明

研究代表者：千葉志信、取得年度：R3-R4 年（2 年）

科研費補助金・若手研究

課題名：次世代型 TnDR 法による新生鎖動的挙動の網羅的解析

研究代表者：藤原圭吾、取得年度：R3-R4 年（2 年）

戦略的創造研究推進事業・ACT-X（環境とバイオテクノロジー）

課題名：温故知新、翻訳装置に内在する微生物環境応答機構の理解

研究代表者：高田啓、取得年度：R3-R5（3年）

2) 学外活動

日本生化学会「生化学」誌・企画協力委員

3) アウトリーチ活動

模擬授業（学部学科説明会）「生命科学の魅力」（大谷中学・高校）（2022/2/14）

4) 学会主催

2022 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（摂南大学・福山大学と共催）：2022/8/25-26 大阪工業大学梅田キャンパス OIT 梅田タワー

5) 受賞

優秀発表賞（辻奈緒子）：第 68 回日本生化学会近畿支部例会

# 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。Ib 膜孔と Ia-Ib 膜孔複合体の構造を明らかにしている。これに続き、抗生物質耐性菌が問題となり、その強毒化が懸念されているディフィシル菌の二成分毒素 CDT のクライオ電子顕微鏡により明らかにした。このタンパク質膜透過機構の解明が大きな目標である。

(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) トキシン膜透過システムの構造基盤

*C.perfringens* が持つ 2 成分毒素イオタ毒素はアクチンを特異的に 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。2020 年、Ib 膜孔の解析をクライオ電子顕微鏡で進め、その構造を、C7 対称性を用いて 2.9 Å 分解能で得た。Ib 膜孔は 7 量体からなる。さらに Ia の結合する様子を捉えたいと考え、調整した Ib 膜孔に Ia を加えて、データを収集、C1 対称性を用いた解析を行った。クラス分けの段階でベータバレルが完全長のもので、膜挿入部がまだ組み立てられていない短いものを分けることができ、それぞれ解析を行い、2.9 Å と 2.8 Å 分解能での解析に成功した。Ia は N 末端のドメインで、7 量体の Ib 膜孔に一つ結合する。最も重要なのは、この結合により、Ia の N 末端の  $\alpha$  ヘリックスが一部解ける点である。さらに Ia の N 末端の先は、Ib 膜孔の狭窄部位 (直径 6 Å) である  $\phi$  クランプへと続いていた。このことから Ia の Ib 膜孔を介した膜透過は N 末端から解けて行われると考えられる。また明らかになっている異なるグループに属する 2 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 (*Nature Structural & Molecular Biology*, 2020)。

続いて、抗生物質耐性菌の感染が問題となっているディフィシル菌が持つ二成分毒素 CDT の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて明らかにした (*Nature Communications*, 2022)。イオタ毒素は 7 量体であるが、CDTb はこれが、2 つ合わさったダイヘプタマーの 14 量体構造をとることが報告されてきたが、この構造だと、膜に孔を開けることができない、また CDTa の膜透過にも支障があると考えられる。CDT でも生理的な 7 量体の構造があるのではないと考え、その構造決定を進めてきた。界面活性剤 LMNG の存在下で、CDTa 結合した CDTb 膜孔を調製、電子顕微鏡でのデータ測定と解析を進めた。その結果、ダイヘプタマーの 14 量体とともにイオタ毒素と同様の 7 量体の CDTb 膜孔構造が存在していることがわかった。これに CDTa を加えて、クライオ電子顕微鏡での構造決定を行った。其の結果 CDTa 1 分子が CDTb 膜孔に結合した構造を明らかにした (写真 1 枚目参照)。この分解能は 2.6 Å である。さらに漏斗型の狭窄部位のひとつである NSS-loop に二状態があることを見出し、これが CDTa との結合とタンパク質透過に重要であることを検証した。さらに、CDTa が CDTb 膜孔に結合した状態での構造解析から、結合したばかりの CDTa と CDTb 膜孔複合体と、CDTa の N 末端の  $\alpha$  ヘリックスが一部解けた状態と CDTb 膜孔複合体の 2 つの構造をそれぞれ精密化して明らかにした。これは N 末

端の $\alpha$ ヘリックスのアンフォールディングの動的な様子を捉えた初めての報告である。これらの二成分毒素のタンパク質膜透過の仕組みはまだよくわかっていない。これらのタンパク質膜透過システムをトキシン膜透過システムと名づけ、さらに研究を進めている。

我々は、2成分毒素の構造だけでなく、細胞を対象にした in vivo アッセイおよび電気生理による膜孔測定すなわち in vitro アッセイの系を立ち上げて、機能を確認していこうとしている。さらに Ib を用いた膜孔タンパク質のデザインを目指している。nanopore を用いた DNA シーケンスはすでに実用化されている。同様に nanopore を用いたアミノ酸シーケンスは 20 種のアミノ酸を見分けることができるかどうか今後の課題であるが、それに適した膜孔タンパク質を用いることは重要であろう。これに向けて、Ib 膜孔は天然のタンパク質膜透過システムであり、これを用いた基礎と応用研究は重要であろう。

#### (2) 新規二成分毒素 CPILE (BEC)の構造と機能

近年日本で起きた食中毒で、ウェルシュ菌のエンテロトキシン (CPE)欠損株の関与が疑われ、新規の食中毒毒素が見出された。この毒素は *Clostridium perfringens* iota-like toxin (CPILE)と命名された。CPILE は CPILE-a, CPILE-b の 2 つのコンポーネントからなる 2 成分毒素である。前述のイオタ毒素と比較しながら CPILE-b 膜孔調整と構造解析を始めた。面白いのは前述のイオタ毒素 Ib やディフィシル菌毒素 CDTb では最狭窄部位は Phe でできた  $\phi$  クランプできており、これがタンパク質膜透過に最も中であることはわかっている。一方、CPILE-b のクランプ最狭窄部位は Ser であり、狭窄部位の大きさも疎水・親水といった違いもあり、どのような影響をしているのか興味深い。ここに焦点を置きながら、これらクロストリジウム属の 2 成分毒素の、タンパク質の輸送機構、毒性発現機構の全体を明らかにする。また、これらの透過阻害剤にも注目して研究をすすめている。

#### (3) ADP リボシル化の特異性

我々は ADP リボシル化毒素 (酵素) とその基質タンパク質の複合体の丸ごとの構造解析を進めてきた。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が、このような研究は世界でもほとんどない。これらの研究により、ADP リボシル化はタンパク質のアミノ酸であれ、あるいは DNA の塩基であれ同じ基質認識機構で、ADP リボシル化するということを明らかにした。これら ADP リボシル化毒素の研究から、その分子機構はわかってきたが、まだヒト PARP などの分子機構は不明な点が多く面白い。

#### (4) スクミリンゴガイ二成分毒素の研究

スクミリンゴガイはアルゼンチン原産のリンゴガイ科の大型巻貝で、通称、ジャンボタニシと呼ばれる。日本では食用を目的として、持ち込まれたが、野生化した外来種で、稲を食害することから、防除対象となっている。田んぼで赤い卵塊を目にするが、この卵に 2 成分毒素が含まれており、1 つはレクチン、もう一つは膜孔毒素であることがわかっている。この卵塊から毒素を精製し、構造決定できないか検討を始めた。卵塊から毒素を精製した。98KDa のバンドは還元剤存在下で、67KDa と 31KDa の 2 成分に分かれる。質量分析 MALDI-TOF を用いた mascot 解析から、スクミリンゴガイ由来の毒素であることを確認した。現在、クライオ電子顕微鏡を用いて、この膜孔毒素の構造を明らかにしようとしている。

### 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 have reported the cryo-EM structures of the translocation channel Ib-pore and its complex with Ia (**Nat Struct & Mol Biol.**, 2020) Furthermore, this year, we reported binary CDT (CDTa and CDTb) toxin complex from the most clinically important bacterium *Clostridioides difficile* (formerly *Clostridium*) (**Nature communications**, 2022). CDTb has been proposed to be a di-heptamer, but its physiological heptameric structure has not yet been reported. Here, we report the cryo-EM structure of CDTa bound to the CDTb-pore, which reveals that CDTa binding induces partial unfolding and tilting of the first CDTa  $\alpha$ -helix. In the CDTb-pore, an NSS-loop exists in 'in' and 'out' conformations, suggesting its involvement in substrate translocation. Finally, 3D variability analysis revealed CDTa movements from a folded to an unfolded state. These dynamic structural information provide insights into drug design against hypervirulent *C. difficile* strains.

(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 (CPILe-a), which acts as an actin ADP-ribosyltransferase, and CPILe-b, a membrane-binding and protein-translocation component. We are studying the difference of the pore in CPILe-b compared with Ib-pore and CDTb-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) We are studying the two component toxin from *Pomacea canaliculata*. We purified the binary toxin from red egg of *Pomacea canaliculata* and ought to reveal the pore forming mechanism and function.

### 4. 論文, 著書など (2022.4~2023.3)

Kawamoto A., Yamada T., Yoshida T., Sato Y., Kato T., and Tsuge H. (2022) Cryo-EM structures of the translocational binary toxin complex CDTa-bound CDTb-pore from *Clostridioides difficile*. **Nature communications**, 13(1):6119. doi: 10.1038/s41467-022-33888-4. (査読あり)

### 5. 学会発表など (2021.4~2022.3)

- 1) 山田等仁、川本晃大、吉田徹、加藤貴之、津下英明  
クライオ電子顕微鏡によるディフィシル菌二成分毒素 CDTa CDTb 複合体の構造解析  
第 22 回日本蛋白質科学会 2022.6.7-9 [D3 山田：学生口頭発表賞受賞]
- 2) 西田和哉、山田等仁、津下英明

スクミリンゴガイ膜孔形成毒素 PcPV-2 の構造と機能の解析

第 68 回トキシシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6

3) 吉田徹、内田悠斗、山田等仁、津下英明

*C. perfringens* 由来に成分毒素 CPiLEb の貫通膜孔は、セリンで形成された最狭窄部位をもつ

第 68 回トキシシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6

4) 山田等仁、川本晃大、吉田徹、加藤貴之、津下英明

ディフィシル菌が産生する二成分毒素の構造解析

第 68 回トキシシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6

5) 友田駿、山田等仁、津下英明

イオタ毒素 Ia-GFP キメラのタンパク質膜透過の確認と構造解析

第 60 回生物物理学会 函館 2022.9.28-30

6) 内田悠斗、吉田徹、山田等仁、津下英明

Effect of narrowest clamp of binary toxin on cell toxicity

第 60 回生物物理学会 函館 2022.9.28-30

7) 山田等仁、杉田征彦、野田岳志、津下英明

クライオ電子顕微鏡による高分解能構造解析で明らかになってきた二成分毒素の膜透過機構

第 60 回生物物理学会 函館 2022.9.28-30 [D3 山田：口頭発表および学生発表賞受賞 (ポスター)]

8) 山田等仁、吉田徹、津下英明

ディフィシル菌の二成分毒素のタンパク質膜透過の動的な様子

第 469 回ビタミン B 研究委員会 京都 2022.11.19

## 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タンパク質膜透過の動的構造解析 研究代表者：津下英明

取得年:2021~2023

「ウイルス・幹細胞システム医生物学共同研究拠点」共同研究課題 京都大学医生物学研究所

課題名：リボソームに再構成した Ib 膜孔のクライオ電子顕微鏡による構造解析 研究代表者：津下英明

取得年:2022

(2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

Toxins, Editorial boards

ビタミン B 研究委員会 委員

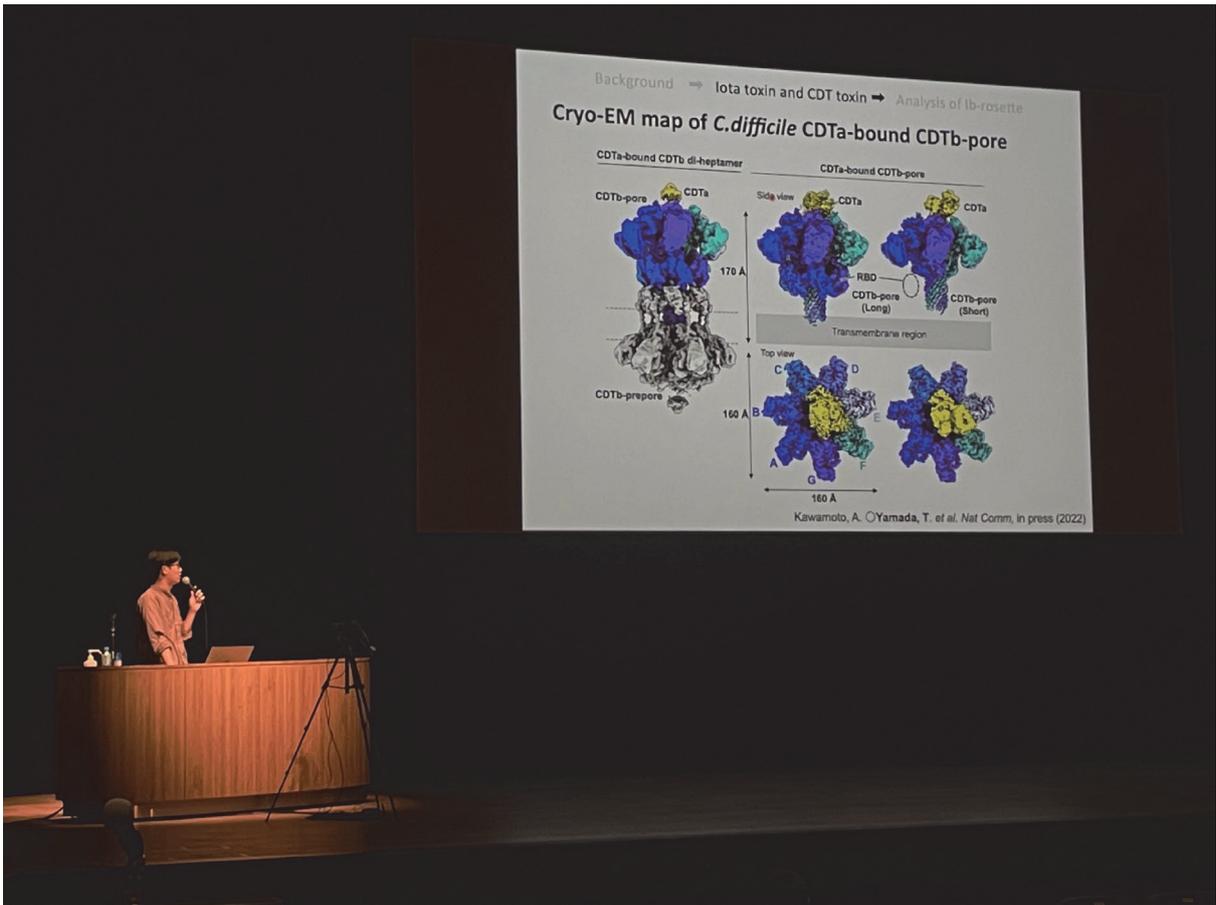
日本生化学会 評議員

(3) 受賞等

D3 の山田等仁さんが、下記の 2 つの学会で受賞しました！

第 21 回日本タンパク質科学会 学生口頭発表賞受賞

第 60 回生物物理学会 学生発表賞受賞 (ポスター)



第 60 回生物物理学会 函館年会で



琵琶湖畔で



# 膜エネルギー代謝研究室 Laboratory of membrane bioenergetics and metabolism

教授 横山 謙 Prof. Ken 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。ちっぽけなタンパク質からなる分子機械がどうやって ATP のエネルギーを輸送や運動に変換するのかは、とても興味深い問題であり、解決すべき生命科学の課題の一つである。この分子機械の仕組みを解明するには、その動きと形を見る必要があり、そのための手法として我々は、1分子回転観察とクライオ電顕による構造生物学を行ってきた。

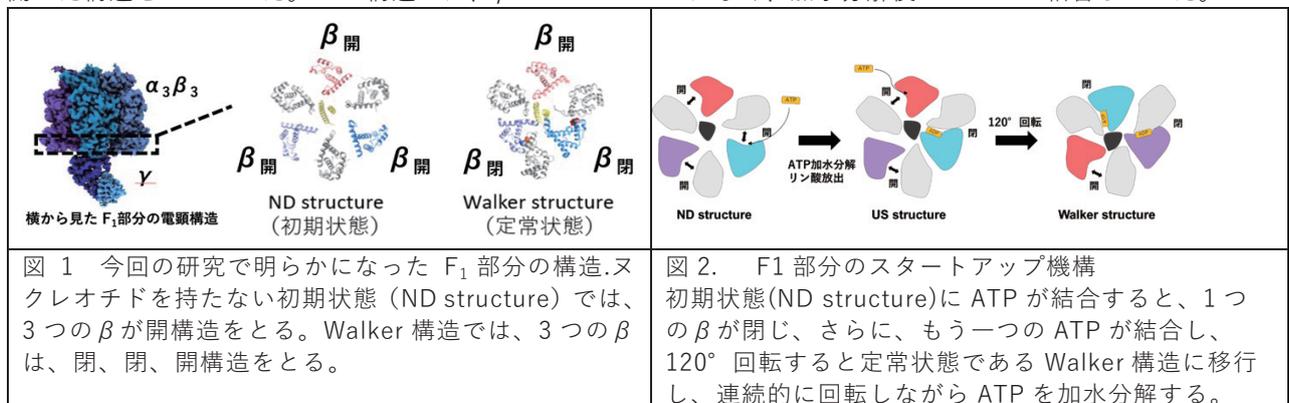
一方で、生命がエネルギーを利用する過程は、老化や老化に伴う疾病と深い関係がある。寿命を変化させる遺伝子の中には、エネルギー代謝関係の酵素が沢山あり、エネルギー摂取量そのものが寿命を決めることも報告されている。我々は、エネルギー通貨である ATP の細胞内濃度と寿命との関係を、分子イメージングという手法で解明する研究に着手し、生体エネルギー学の視点から老化・寿命・疾病の問題に取り組んでいる。

## 2. 本年度の研究成果

### 1) FoF1ATP 合成酵素の初期反応 (ユニサイト触媒) の解明

FoF1 には ATP が結合する 3 つの触媒部位があり (図 1)、すべての結合部位に ATP が結合した時に回転が連続的に起こる (定常状態)。しかし、最初の ATP が 1 つ目の触媒部位に結合したときに起こる触媒反応 (ユニサイト触媒) では、ATP に対する親和性が高く、かつその分解速度が遅いなど、特異な性質を示すことがわかってきた。多くの研究者が ユニサイト触媒機構の解明に取り組んできたが、未だユニサイト触媒と定常状態での触媒機構との関連はわかっていない。

今回の研究では、クライオ電子顕微鏡を用いることにより、ユニサイト触媒が起こる前後の構造を捉えることに成功した。クライオ電子顕微鏡による構造解析は、X 線結晶構造解析で得ることのできなかつた一過性の中間体構造を決定することができる。透析処理によって内在性のヌクレオチドを取り除いた FoF1 を使い、FoF1 の量に対して約 1/3 量の ATP を加え、反応中に急速凍結した。得られた凍結グリッドをクライオ電子顕微鏡で撮影し、その画像を解析することで、すべての触媒サブユニットにヌクレオチドが結合していない ND 構造と 1 つの触媒サブユニットに ADP が結合した US 構造 (ユニサイト構造) が得られた。ND 構造は、3 つの  $\beta$  がすべて開いた構造をとっていた。US 構造では、 $\beta$  TP に ATP ではなく、加水分解後の ADP が結合していた。



この結果から、ユニサイト触媒では、ATPは $\beta$ DPではなく、 $\beta$ TPに結合し、 $\beta$ TPで加水分解が起こることが明らかになった。以上のことから、FoF1にヌクレオチドが結合していない初期状態から定常状態までのモデル(図2)を提案し、長年の議論に終止符を打つことができたと考えている。

## 2) 時間分解能スナップショット解析による V/A-ATPase の活性化機構の解明

昨年度は、クライオ電子顕微鏡により、V/A-ATPase が ATP の加水分解で回転する様子を再現することに成功した (Nature Communications, 2022)。この研究成果から、3つある触媒部位で ATP の加水分解過程の1部が別々かつ同時に起こることで中心回転軸が回転し、効率よく ATP の加水分解エネルギーを回転力に変換することを明らかにした。言い換えると、3つの触媒部位に ATP が結合した状態になることが回転に必要である。しかしながら、ATP がない状態の V/A-ATPase に ATP が結合した場合、1分子の ATP だけで回転が起こる必要があり、このような1触媒部位による回転の報告はない。今回、初期状態の V/A-ATPase が連続的に回転できる状態に至るスターター機構を解明するために、時間分解能スナップショット解析を行った(図3)。ATP を完全に取除いた V/A-ATPase に対して、ATP 濃度が低い状態で反応させ 60 秒放置した後の溶液からクライオグリッドを作成した。この時、反応液には ATP の結合を遅くする硫酸イオンをわずかに加え、反応開始後すぐに ATP が V/A-ATPase に結合しないようにした。このグリッドからは、ATP が1分子結合した構造が得られたが、ATP が最初に結合する部位ではなく、閉じた部位に ATP が確認されたことから、最初に ATP が結合した後、 $120^\circ$ 回転した構造であることが示唆された。次に、高 ATP 濃度条件で V/A-ATPase を 5 秒反応させたもの、および 30 秒反応させた反応液からそれぞれクライオグリッドを作成した。5 秒反応させた反応液から得られた構造には、ATP が1分子結合した構造と2分子結合した構造が得られた。先程の構造と異なり、最初に ATP が結合する開いた部位に ATP が確認されたことから、 $120^\circ$ 回転する前の構造であることがわかった。ATP が2分子結合した構造でも開いた部位に ATP が結合していたことから、 $120^\circ$ 回転する前の構造である。30 秒反応させた反応液からは、1分子の ATP が開いた部位に結合した構造と、3つすべての部位に ATP が結合した構造が得られた。このことから、開いた部位に1分子の ATP が結合した構造の寿命が長く、2分子結合した構造の寿命が短いことが示唆された。

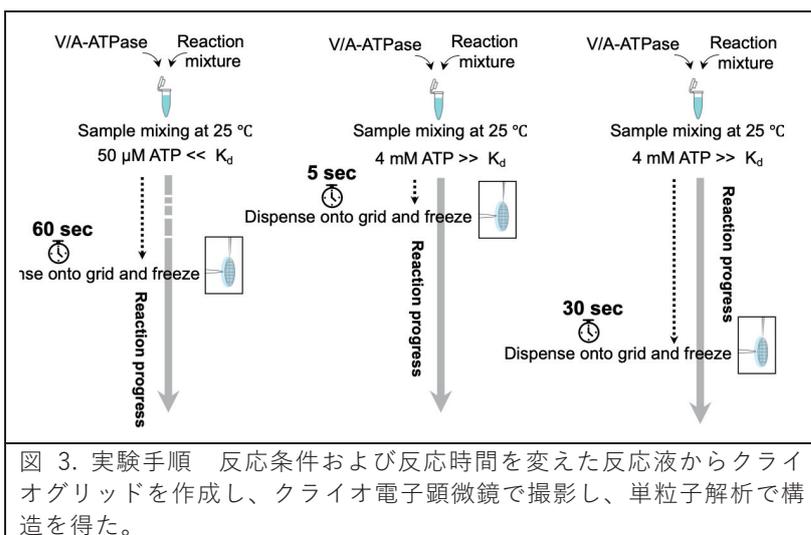


図 3. 実験手順 反応条件および反応時間を変えた反応液からクライオグリッドを作成し、クライオ電子顕微鏡で撮影し、単粒子解析で構造を得た。

以上の結果から、

1. 開いた部位に結合した ATP のみで  $120^\circ$ 回転するが、回転前構造の滞留時間が長い。
2. 開いた部位に加え、閉じた部位に ATP が結合した構造は、30 秒後には消失していることから、この構造の滞留時間が短く、すなわち、回転前構造の滞留時間が短い。
3. V/A-ATPase の全体構造は強固で、ATP が結合して  $120^\circ$ 回転が起こることで、次の部位に ATP が結合し、3分子の ATP が結合した定常状態になる。
4. V/A-ATPase の構造変化は離散的に起こり、FoF1 で見られた遷移的な開いた構造 (PNAS Nexus, 2022) を経ずに、基底状態から定常状態へ変化することが明らかになった(図4 参照)。

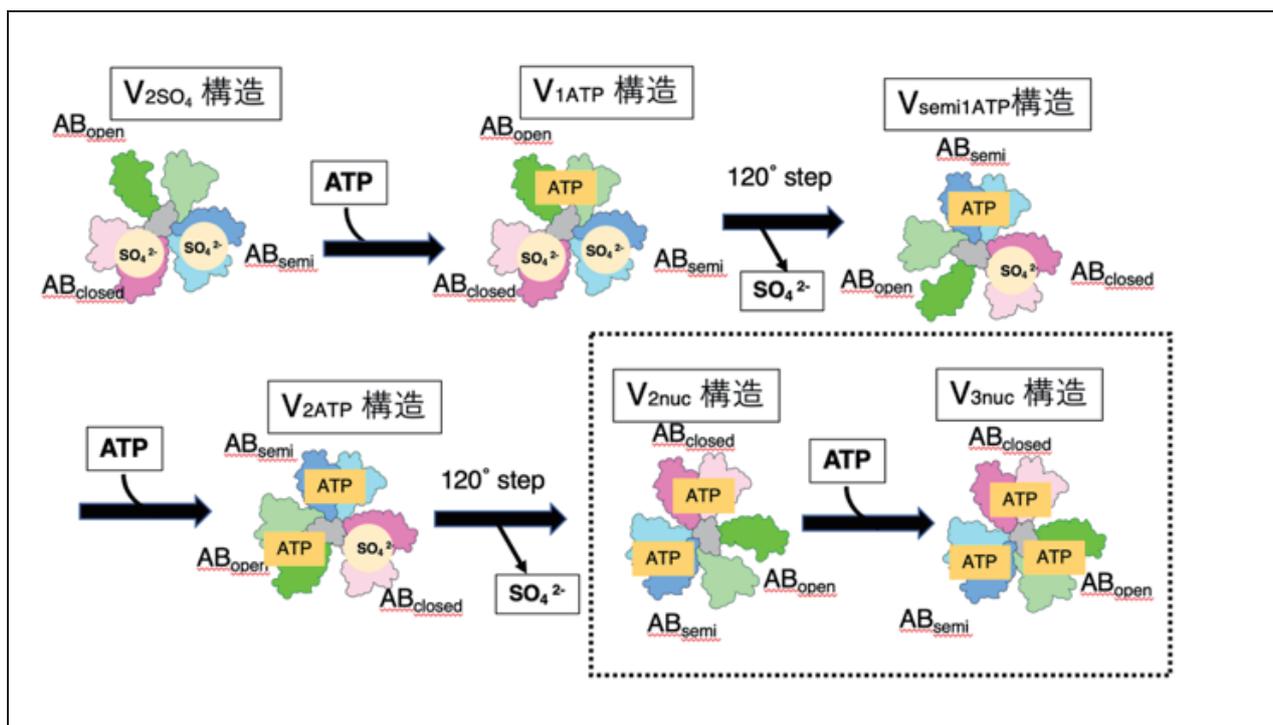


図 4. 基底状態にある V/A-ATPase の定常状態への遷移機構 最初の ATP が結合すると、一つの ATP だけで 120°回転が起こる ( $V_{1\text{semi1ATP}}$ )。120°回転することで、次の ATP の結合が可能になり、ATP が結合して 2 分子の ATP が結合した状態になる ( $V_{2\text{ATP}}$ )。さらに 120°回転することで、三番目の部位に ATP が結合できるようになり、ATP が結合することで、3 分子の ATP が結合した定常状態 ( $V_{3\text{ATP}}$ ) になる。

### 3. Research projects and annual reports

Energy is essential for the sustenance of life, and bioenergetics is a crucial scientific field that aims to understand how living organisms convert energy into usable forms and how it is utilized. ATP, the energy currency of life, is synthesized by ATP synthase, present in the mitochondria or bacterial plasma membranes. This produced ATP is used in various biological processes, including muscle contraction, and biomolecule synthesis and degradation. The vacuolar proton ATPase (V-ATPase) uses ATP to transport ions into vesicles, which is responsible for different physiological phenomena by acidification. The mechanism of how tiny protein-based molecular machines convert ATP energy into transport and motion is a fascinating and important question that needs to be answered in the life sciences. To comprehend this mechanism, it is crucial to study the movement and shape of these molecular machines. To achieve this goal, we have utilized single-molecule rotation observation and structural biology with cryo-electron microscopy.

Our ultimate aim is to understand and explain how living organisms transform and utilize energy to sustain life. 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.

Based on these points, we have carried out three themes;

1. Molecular mechanism of rotary ATPase/synthases, V-ATPase and  $F_0F_1$ .
2. ATP homeostasis in living cells
3. Structural biology of membrane proteins involved in ATP homeostasis using Cryo-electron microscopy

Achievements in 2022

#### 1) Structural basis of unisite catalysis of bacterial $F_0F_1$ -ATPase

ATP synthases ( $F_0F_1$ -ATPase) are crucial for all aerobic organisms.  $F_1$ , a water-soluble domain, can catalyze both the synthesis and hydrolysis of ATP with the rotation of the central  $\gamma\epsilon$  rotor inside a cylinder made of  $\alpha_3\beta_3$  in three different conformations (referred to as  $\beta_E$ ,  $\beta_{TP}$ , and  $\beta_{DP}$ ). In this study, we determined multiple cryo-electron microscopy structures of bacterial  $F_0F_1$  exposed to different reaction conditions. The structures of nucleotide-depleted  $F_0F_1$  indicate that the  $\epsilon$  subunit directly forces  $\beta_{TP}$  to adopt a closed form independent of the nucleotide binding to  $\beta_{TP}$ . The structure of  $F_0F_1$  under conditions that permit only a single catalytic  $\beta$  subunit per enzyme to bind ATP is referred to as unisite catalysis and reveals that ATP hydrolysis unexpectedly occurs on  $\beta_{TP}$  instead of  $\beta_{DP}$ , where ATP hydrolysis proceeds in the steady-state catalysis of  $F_0F_1$ . This indicates that the unisite catalysis of bacterial  $F_0F_1$  significantly differs from the kinetics of steady-state turnover with continuous rotation of the shaft.

#### 2) Structural transition of the ground-state structure to steady-state structures by sequential binding of ATP to V/A-ATPase

Vacuolar/archaeal-type ATPase (V/A-ATPase) is a rotary ATPase that shares a common rotary catalytic mechanism with  $F_0F_1$  ATP synthase. Structural images of V/A-ATPase obtained by single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) during ATP hydrolysis identified several intermediates, revealing the rotary mechanism under steady-state conditions. Here, we identified the cryo-EM structures of V/A-ATPase corresponding to short-lived initial intermediates during the activation of the ground state structure by time-resolving snapshot analysis. These intermediate structures provide insights into how the ground-state structure changes to the active, steady state through the sequential binding of ATP to its three catalytic sites. All the intermediate structures of V/A-ATPase adopt the same asymmetric structure, whereas the three catalytic dimers adopt different conformations. This is significantly different from the initial activation process of  $F_0F_1$ , where the overall structure of the  $F_1$  domain changes during the transition from a pseudo-symmetric to a canonical asymmetric structure (PNAS NEXUS, pgac116, 2022).

#### 4. 論文, 著書など

##### 原著論文

1. Cryo-EM analysis of V/A-ATPase intermediates reveals the transition of the ground-state structure to steady-state structures by sequential ATP binding. Nakanishi, A., Kishikawa, J.I., Mitsuoka, K., Yokoyama, K. *J Biol Chem* 299: 102884-102884 (2023)
2. Structural basis of unisite catalysis of bacterial  $F_0F_1$ -ATPase. Nakano A, Kishikawa J, Nakanishi A, Mitsuoka K, and \*Yokoyama K. *PNAS Nexus* volume 1, pgac116 (2022)

##### 5. 学会発表など

1.  $F_1$ -ATPase の substep の正体 中野敦樹, \*横山謙 2023 年 生体運動研究合同班会議 東京大学 小柴ホール 2023/1/6 口頭発表

2. クライオ電子顕微鏡によるATP合成酵素FoF1の回転機構の解明 中野敦樹、岸川淳一、横山謙 日本生体エネルギー研究会 第48回討論会 会場 京都大学 益川ホール 2022/12/15 口頭発表
3. 横山謙 クライオスナップショットによるV/A-ATPaseの回転機構の解明 日本顕微鏡学会 倉敷 川崎祐宣記念講堂, 第65 回シンポジウム 招待講演 11/2022
4. Vo 部分での回転によるプロトン輸送機構の分子基盤 西田結衣、岸川淳一、中西温子、中野敦樹、横山謙 第 60 回日本生物物理学会年会 会場 函館アリーナ・函館市民会館 2022/9/30 ポスター発表 2.
5. クライオ電子顕微鏡による ATP 合成酵素 FoF1 の化学力学共役機構の解明 中野敦樹、岸川淳一、中西温子、横山謙 第 60 回日本生物物理学会年会 会場 函館アリーナ 2022/9/30 ポスター発表
6. 好熱菌 FoF<sub>1</sub>-ATPase のユニサイト触媒作用の構造的基盤 中野敦樹、青山桃子、岸川淳一、横山謙 第 60 回生物物理学会年会 2022/9/29 函館アリーナ ポスター発表
7. FoF1-ATPase の非触媒部位の機能解明 Functional elucidation of the non-catalytic site of FoF1-ATPase 小林廉、中野敦樹、横山謙 日本生物物理学会第 60 回年会 2022/9/29 函館アリーナ ポスター発表
8. ATP 合成酵素 FoF1 の ATP 駆動性回転における化学・力学共役機構の分子基盤 中野敦樹、岸川淳一、中西温子、横山謙 第 22 回日本蛋白質科学会年会 会場 つくば国際会議場 2022/6/8 口頭発表

## 6. その他特記事項

### 1) 外部資金

#### 1. 科学研究補助金 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)

### 2) 学外貢献

#### 1. 科学研究費審査委員

#### 2. 論文査読 4 件 Nature, Structure, iScience, EMBO Journal

### 3) アウトリーチ活動

#### 1. オープンキャンパスでの研究紹介



## 2022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）型膜タンパク質をつくる仕組みを解明！将来的な病気の治療法開発、老化を防ぐなどの可能性に期待  
「A multipoint guidance mechanism for b-barrel folding on the SAM complex」  
(Nature Structural and Molecular Biology :  $\beta$  バレル構造はSAM複合体上で多点ガイド機構で作られる)

2023. 1月

インターネット 記事

北海道新聞、沖縄タイムス、CNET japan ほか

## 編集後記

1970年に解散したビートルズの新曲「Now And Then」が今日（11月3日）、世界同時配信リリース/発売された（<https://www.youtube.com/watch?v=Opxhh9Oh3rg&t=1s>）。この新曲は、ジョン・レノン（1980年没）が1977年頃に自宅のダコタハウスで残っていたデモ録音4曲のうち1曲がベースになっている。90年代前半にオノ・ヨーコからポール・マッカートニーに渡されたこのデモ録音は、家庭用のカセットレコーダーにより、ピアノとボーカルがモノラル1トラックで録音されたもの。当然ノイズが多く、かつジョンのボーカルに比べてピアノの音が大きすぎてボーカルをバランス良く抽出できないという問題があった。それでも4曲のうち2曲はポールがジョンの声にボーカルを重ね、さらには他のメンバーが大幅に演奏を重ねるなどして、だいぶ前に新曲として発表されたものの、「Now And Then」は、当時の技術的限界からビートルズ・バージョンの制作は見送られていた。それから27年。ジョージ・ハリソンも亡くなって元ビートルズのメンバーは2人だけになってしまったが、今回AI技術によってノイズとピアノの音を削除してジョンのボーカルのみ抽出が可能となり、ジョージの演奏はアーカイブから抽出するなどして、ビートルズ・バージョンの制作に成功したというわけだ。なるほど、この手の生成AIの技術はすごくて、実際インターネットにも、ジョンが唄う「Yesterday」はもとより、トランプ前大統領とバイデン現大統領がデュエットするダイア・ストレイツのナンバーなどがあがっていて、実によくできていることに感心する。フェイクニュースや情報操作の脅威が増しているのも当然だろう。

さて、できあがった曲はあまりビートルズらしくなかったが、それでも4人がAI技術の力を借りて、時代を超えて共同作業して作り上げた曲という意味は大きいかもしれない（数年後に、「いや、あれは僕たちが作ったんじゃないくて、ジョンのデモテープを元にビートルズらしい曲にしてくれてAIに頼んだら出てきた曲だったんだよ」ってポールが種明かししたら面白いが）。事ほど左様に、AI技術の進展は驚くべきスピードで、AlphaFold2に驚いたのが2022年7月（公開は2021年7月）、ChatGPTの登場が2022年11月。もはや今後の世界のあり方を考えるとき、AIの存在を無視することは不可能だ。今回のオンライン座談会では、タンパク質科学を先導する3人の方々に、タンパク質の現在と未来を語ってもらったわけだが、当然AIの話も出てきた。いかがだったでしょうか？加えて今回は、動態研の新メンバーとなった武田さんにも自己紹介の文章を書いていただきました。今回は私の巻頭言が間に合わなくて失礼しましたが、後半部分はともかく、前半部分の読み物をお楽しみいただければと思います。

遠藤斗志也（2023.11.3 タンパク質動態研所長）

# 京都産業大学タンパク質動態研究所年報

2022年度号

【非売品】

令和5年12月14日 印刷

令和5年12月25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

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

©京都産業大学タンパク質動態研究所

