

年報 タンパク質動態研究所

Annual Reports 2023
Institute for Protein Dynamics
Kyoto Sangyo University

特別企画 Tom Rapoport と Ramanujan Hegde	1
タンパク質輸送の研究者に聞く (聞き手 遠藤斗志也)	
ミーティングレポートMFP国際会議	20
「International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics」 & 京都産業大学バイオフィォラム (千葉志信・小野鈴花)	
研究所の活動	
生物化学研究室 (遠藤斗志也)	27
分子細胞生物学研究室 (潮田亮)	35
タンパク質バイオジェネシス研究室 (千葉志信)	41
タンパク質構造生物学研究室 (津下英明)	46
膜エネルギー代謝研究室 (横山謙)	50
動物発生学研究室 (武田洋幸)	55
編集後記 (遠藤斗志也)	59

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



武田 洋幸

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)

Tom Rapoport と Ramanujan Hegde

タンパク質輸送の研究者に聞く

聞き手 遠藤斗志也

遠藤 今日は、福岡で行われた京都産業大学と学術変革研究「マルチファセットプロテインズ」が共催する国際会議で講演いただいた Tom Rapoport さんと Manu Hegde さんに京産大でのセミナーをお願いしました。お二人ともタンパク質輸送の分野では最先端の研究をされており、しかも最高レベルの生化学と最新のクライオ電顕などの構造生物学を組み合わせ、インパクトの大きな成果を次々にだしてこられました。良い機会ですので、お二人にこれまでの経歴とか、海外での研究環境、そしてサイエンスについての哲学などをお聞きしたいと思い、このインタビューを企画しました。よろしくお願いいたします。

Tom Rapoport の研究ヒストリー

遠藤 それでは最初に簡単にお二人の略歴を話していただけますか？ Tom は東ドイツにおられたんですよね。

Rapoport そうです。私のファミリーヒストリーは複雑なのですが、まずは父のことから話しましょう。私の父は現在のウクライナで、ユダヤ人の家庭に生まれました。父のお父さんは商人でした。しかしロシア革命が起こると、資本家と見なされて危険を感じ、オデッサからウィーンに逃れました。父はウィーンで子供時代を過ごすこととなりました。奨学金を得た父は米国のシンシナチに行くこととなりました。ところがやがてオーストリアはナチに占領されてしまい、左翼系の青年組織で活動し、後に共産党に入ることとなる父はオーストリアに戻るができなくなりました。母はドイツの植民地だったアフリカのカメルーンに生ま



左からお父さんの Samuel Rapoport, 共同研究者の Reinhart Heinrich (フンボルト大学), 奥さんの Iris, そして Tom Rapoport

れましたが、両親が離婚、ユダヤ人のお母さんと一緒にドイツに戻り、ドイツ北部のハンブルグで育ちました。そこで医学を専攻しましたが、当時の人種差別のせいで、ユダヤ人は学位を取ることが許されていませんでした。そこで母は米国に渡り、シンシナチで父と出会ったわけです。そして長男の私を含めて3人の子供が生まれました。

遠藤 お父さんは大学の先生だったんですよね？

Rapoport そう、著名な生化学者でした。血液の抗凝固剤の発明で有名になったと言ってました。酸性クエン酸デキストロース (ACD) で、これを使うと血液を3週間保存することができるようになったのです。輸血が大量に必要な第二次世界大戦時には非常に重要な発明でした。

遠藤 なるほど。

Rapoport それで父はトルーマン大統領から功労賞を授与されました。しかしその数週間後には、共産主義者に対する赤狩りで、要注意人物となってしまいました。そして下院の非米活動委員会への出頭を求められたため、私たち一家は米国を出てヨーロッパに戻ることにしました。父は、最初は家族全員で戻ろうと考えたのですが、オーストリアはまだ米国とソ連に占領されていたため、すぐにブラックリストに載ってしまいました。そういうわけで、1951年にオーストリアに戻ったのですが、仕事に就くことができませんでした。そんな折、東ドイツから仕事のオファーがあり、ドイツ語ができたこともあって、皆で東ドイツに行くことになりました。そういうわけで私は東ドイツで育ちました。

遠藤 たしかお父さんは戦後日本に来て、子供たちの命を救ったんですよね。

Rapoport そうです。ポリオのワクチンの発明で有名になる Sabin 博士がシンシナチで働いていたんですが、彼は占領下の日本を訪れ、戻ってきてから父にこう言ったんです。「日本には疫病という謎の病気があるんだ」と。それを聞いて父は、カルシウム不足ではないかと言いました。Sabin は大いに興奮して国務省に連絡し、少人数の代表団が派遣されました。父はその代表団の



若き日の Tom とお母さん

一員だったのです。代表団の団長は Kathy Dodd という小児科医の草分けの人物でした。彼らは日本に行き、数週間後には日本では牛乳不足が病気の原因であることが確認されました。褒賞は日本アルプスへの旅行でした。しかしすぐに米国に連れ戻され、委員会への出頭を求められたわけです。

そういうわけで私は米国で生まれ、東ドイツで育ちました。そして化学と生化学を学び、博士号を取得し、最終的には東ドイツ科学アカデミーの教授になりました。両ドイツの統一後も5年間そこに留まりましたが、95年に米国に戻りました。そして2年後に幸運にもハワードヒューズのグラントを得ることができました。

遠藤 Sec 複合体の再構成¹に成功したのは、米国に行く前だったのでしょうか？

Rapoport それはまだ東ドイツにいるときでした。想像できると思いますが、東ドイツではすべてが非常に困難でした。薬品も何もありませんでした。連絡をとるのも用意ではありませんでした。私たちはエッペンチューブもピベットマンのチップも洗って再使用していました。簡単ではありませんでした。それでも私たちはなんとかそれなりの研究を行い、Nature に何報かの論文を発表しました。

遠藤 すごいです。

Rapoport ええ、いつも言ってるのですが、困難な状況の中でも研究はできるのです。トップレベルの研究者になるのは難しいかもしれませんが、研究を楽しもうと思えば、出来ると思います。それにはワクワクするような雰囲気をつくり、人々とディスカッションすればいいんです。そうすれば可能になります。ドイツの統一後、私たちは突然、非常に裕福になりました。西ドイツが東ドイツに資金を投入したからです。そして彼らは、東ドイツの体制下でそれなりにうまくやっていた人を探していました。私はそ

の一人だったのです。ですから私が米国に発つときには私は7つのグラントをすべて希望レベルの金額で獲得できていました。突然お金に困らなくなったわけです。世界中に流通しているジギトニンのほとんどを買い占めることすらできました。

遠藤 たしかにそこが再構成成功のポイントですよ

Rapoport そう、ジギトニンは高価だったけど、私たちはそれを欲しいだけ手に入れられたわけです。

遠藤 しかもジギトニンはロットによって品質が変わるのが難点ですよ。

Rapoport それについては面白い話がありますが、以前話しましたっけ？

遠藤 以前に聞きましたが、もう一度お願いします。

Rapoport Sec 複合体の再構成の論文¹を発表したときの話です。方法のところに私たちは BigCHAP という界面活性剤を使ったが、ロットによって不純物が異なり、われわれと同じロットが手に入らなくても、他のロットが使える、と書きました。数ヶ月後、私たちはジギトニンの供給元のカルビオケム社からレターヘッド入りの手紙を受け取りました。

「Rapoport 博士、弊社は自社製品に大きな誇りを持っており、貴殿が弊社の製品に不純物が含まれていると指摘されたことに、弊社は落胆しました。現在 BigCHAP に含まれる不純物の特定を試みております。つきましては、入手不可能となったロットの 100g から精製した物質の少量のサンプルを同封いたします。」そして折りたたまれた小さな紙にバーコードとともに白い粉末が入っていました。ちょうどそのとき、研究室 OB で再構成実験の論文のファーストオーサーの Dirk Görlich が訪ねてきていました。彼はその粉末を取りましたが、重さを量るにはあまりにも少



Tom と奥さんの Iris (カンボジアにて)

量だったので、エッペンドルフチューブに入れて溶かしました。それは少し泡立ちました。今思えばそれはただのセッケンか SDS だったと思います。で、それをタンパク質の小胞体への in vitro インポートアッセイに使ってみたら、インポートに対する阻害効果が出てしまいました。このことには戸惑いました。以前カルピオケム社に不純物が何か問い合わせたことがあったのですが、回答は得られなかったからです。それでどういう返事を書こうかと悩んでいるうちに 2 通目の手紙が来ました。今度は不純物の特定について大きな進展があったと書かれていました。不純物は 180kD のタンパク質だったというのです。背景として、実は当時、David Meyer が 180kD のタンパク質が ER 膜上のリボソーム受容体だという論文を Nature に出していました²。その考えを、私たちは私たちの再構成の論文で否定していたのです。ところがもし私たちが使った界面活性剤に 180kD タンパクが混入していたら、それが重要だという考えを否定できないことになってしまいます。Dirk は激怒しました「この人たちは自分たちが界面活性剤をどうやって作っているかを全く分かってない。タンパクが界面活性剤に混入するなんてありえない！」と。そのとき別の学生が手紙を取り上げて、照明にかざしてみたんです。「ハハ、この手紙の便箋にはカルピオケム社の透かしがはいってない、偽物だ」と。それでやっと私たちは、こんなことをやる人間は世界中に一人しかいない、と言うことに気づいたわけです。Peter Walter です。

Hegde そして、その Sec 複合体の再構成実験に再現性はあった。

Rapoport ええ、そうです。Manu がそれを確かめた唯一の研究者です。

Hegde そう、別のロットの界面活性剤を使ってもちゃんと再現できました。180kD タンパクが入ってなくてもね (笑)

Rapoport そう、精製タンパク質を使った Sec 複合体の再構成実験は、他のラボはどこも追試しようとしなかったんですよ。実験結果にはとても説得力があったので、どこのラボもわざわざ手間暇かけて追試実験をしようとはしなかった。ところが Manu とかれのボスの Lingappa は別でした。彼らはボストンの私たちのラボをわざわざ訪ねてきて・・・ここでまた面白い話があるんですが、それについては別の機会に。そういうわけで、私は Manu をうちのラボ出身の学生かボストンの一人のように感じるわけです。

Hegde そのとき、私はまだ学生でしたからね。

Rapoport うちのラボに滞在したのはたった 2 週間でしたが。



Manu と弟 (上)

Hegde しかも 1 年の間隔をあけての 2 週間ですね。

Manu Hegde の研究ヒストリー

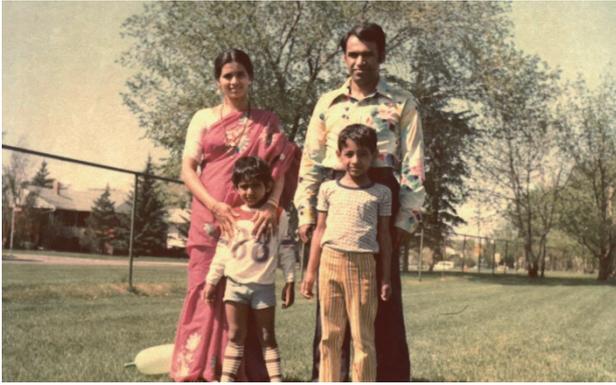
遠藤 それでは Manu、あなたのことを話してください。

Hegde はい、私はインドの南西部にあるカルナータカ州で生まれました。父もカルナータカ州の農家が 7 つあるくらいの小さな村で生まれました。ですから父は将来農家を継ぐだろうと思われていました。しかし父がまだ 9~10 ヶ月の幼い頃、火傷で片足を失ってしまいました。当時はまだ屋外で食事をつくっていたので、赤ちゃんだった父はそうした食事用の火に巻き込まれて、ひどい火傷を負ってしまったんです。それで、成長するにつれて兄弟たちと一緒に農作業できなくなり、残された唯一の選択肢は地元の学校に通うことしかありませんでした。父は数学に非常に興味を持ち、地元の学校で学べる限りの数学を独学で学び、奨学金を得て、地元の大学に進学しました。それが事実上村から出る唯一の道筋でした。

そして、父は母と結婚し、私が生まれたわけですが、その時点で父の大きな野望は、インドの大学で教師になることだったと思います。一方、母は多くの点で非常に野心的だったと思いますが、父にはもっとできることがあると感じていたのでしょう、博士課程への進学を勧めました。そこで父は米国とカナダの PhD コースを受験し、最終的にはもっとも給与の高いカナダのサスカトゥーン州のサスカチュワン大学を選びました

遠藤 寒いところですね

Hegde すごく寒い所です。確か 1973 年か 74 年だったと思います。でもそのときは家族全員が行くにはお金が足りなかったもので、父はまず一人で行きました。そして私たち家族全員で行ける



カナダに移住した Hegde 一家（両親と弟と、1976 年頃）

だけの十分なお金を貯めた後、1975 年にサスカトゥーン行きの航空券を送ってくれました。12 月だったと思います。私たちはそれまで雪を見たことも聞いたこともありませんでした。こうして私たちはカナダに行き、2 年間を過ごしました。その後父は北イリノイ大学に教授職を得たので、私はそこで育ちました。両親は私が医者になることを望んでいたと思います。それで両親は私がサイエンスを学び、最終的には医学の道に進むことを勧めてくれました。医学部への入学のチャンスを高めるために、私はラボで働くことになったのですが、そこで研究という物に非常に興味を持つことになりました。問題を解決することがとにかく好きだったので。それで大学院に進学して、両親を失望させないために MD（医学博士）-PhD プログラムに入るという戦略を立てました。MD-PhD プログラム在学中に、私の研究への興味は確固たるものとなりました。それで医学部を卒業しましたが、研究を続ける決心をし、実際にその通りになりました。

Rapoport それは UCSF（カリフォルニア大学サンフランシスコ校）の話ですね。

Hegde そうです。私の場合、大学はシカゴ大学で、医学部大学院が UCSF です。ところで、父が数学者だったことを考えれば、私の名前が Ramanujan である理由も分かります。Ramanujan は南インド出身の有名な数学者の名前なんです。インドには多くの著名な数学者がいますが、インド国内だけで教育を受け、学んだのは彼が唯一の人物でしょう。多くの場合、海外に出て、オックスフォード大学やケンブリッジ大学で学びますから。そういう意味で、彼は本当にインド生まれの生粋の数学者なのです。

Rapoport でも彼は誰かに指導してもらおうと言えなかった。彼はその後英国に渡り、飢え死にしてしまった・・・

Hegde そうです。残念ながら、彼は若くして亡くなりました。彼は独学で多くの数学を学びましたが、証明のやり方を学ぶことができませんでした。

Rapoport だから、人々は彼が何をやってたかを理解できなかったと思います。

Hegde そうです。彼の専門は数論の分野でしたが、色々な関係性を書き出しただけでした。そして自分の考えを世界中の科学者数学者に手紙で送ったのですが、返事をくれたのはケンブリッジ大学の数学者 G. H. Hardy ただ一人でした。Hardy はそれらの関係性がこれまで考えられたことがないものであることを認識し、ここに天才がいると気づいたので。それで彼をケンブリッジに来れるよう手配したのです。1900 年台初頭のことだったと思います。彼はベジタリアンだったので、基本的に食事を摂るのに非常に苦労したと思います。日照時間が短いのでビタミン D 不足になっていたことも確かでしょう。Tom が言うように最終的には栄養失調に陥ったのだと思います。おそらく結核も患っていたと思われ、したがって感染症にもかかりやすくなっていたのでしょう。それらが彼の状態をさらに悪化させました。

話がそれましたが、UCSD では Vishu Lingappa のところで研究を続けました。Lingappa は Günter Blobel の最初の大学院生で、そういう系譜から私もタンパク質の輸送と膜透過に興味を持つようになったわけです。

遠藤 Lingappa は Peter Walter よりも年齢が上でしたか？

Hegde 同じくらいの年齢だと思います。彼らは同時期に Blobel 研で研究をしていました。そうそう、Peter も UCSF にいたので、彼が私の学位論文の審査会の座長をしてくれました。それ以来 Peter とはずっとコンタクトをとっています。長年にわたる知り合いです。

Rapoport 私も Vishu Lingappa のことはよく知っています。最



大学院時代の Manu（1998 年の新聞記事より）

初に会ったのは Blobel 研を訪問したときかな。その後彼が UCSF に移ってから 1 週間ほどしたときに、また会いました。彼の教授室には簡易ベッドが置いてあり、「私にはアパートが必要だと思う？」って聞かれましたよ、彼は変わってましたが、すごく面白い人物でした。

Hegde そう、信じられないほどクリエイティブな人でした。彼もまた MD-PhD でした。彼は生理学の深い知識を活かして、タンパク質の輸送や成熟について医学的に関連性の高い側面から研究をしていました。彼はプリオンタンパクやアポリポタンパク B のような一見異常なタンパク質を研究し、そのおかげでグラントの獲得や、タンパク質輸送におけるニッチは位置を確保することができました。彼は夢想家だったと言えると思います。素晴らしいアイデアを色々持っており、クリエイティブでした。一方私は、より現実的で色々なことに、より慎重でした。だから私たちは良いチームだったし、多くを学ぶことができました。

今でも覚えているのは Tom が UCSF を訪問してセミナーを行ったときのことで。Vishu に会いに来たんじゃなかったですかね。Vishu はいつも親切で、訪問した研究者と会うときには、学生も訪問者に会うようにアレンジしてくれました。Tom は覚えていないかもしれませんが、私は鮮明に覚えています。再構成論文がちょうど出たときだったので、「このアプローチは素晴らしい、やり方をぜひ習いたい」と言ったのです。すると Tom は「ぜひうちのラボに来てみなさいよ」と言ってくれたのです。Tom がどのくらい本気だったかどうかはわかりませんが、その後連絡をとり続け、ほどなく Tom のラボを訪ねることができました。それで Tom と知り合いになったというわけです。

Rapoport Vishu は本当に変わった人間でね、彼は UCSF にポジションがあったんだけど、ある日すべてを放り出して家族とともに 1 年間世界中を回る旅に出ってしまったんですよ。私はあるとき、モンゴルにいる彼から電話をもらいましたよ。

遠藤 それってサバティカルだったんですか？

Rapoport サバティカルではなくて、ただ、仕事を辞めて旅にでってしまったんですよ。

Hegde 私がラボを出て 5 年か 6 年後のことだと思います。しかし彼はまだとてもエネルギーにあふれていましたよ。

Rapoport 彼は理想主義者だったので、年に 1 ヶ月は貧しい人々のために病院で働いていました。彼はもともと UCSF 病院で働く義務があったのですが、それに加えて年に 1 ヶ月働いたというわけです。一度彼は看護師たちのストライキを組織したことでクビになりかけたこともありましたが、とても面白い人物でした。

Hegde 突出した理想主義者でしたね。

Rapoport 彼はその後会社を立ち上げましたが、結局は倒産してしまいました。

Hegde さて、私は医学部を修了しましたが、次に何をしようか、わかりませんでした。そうしたら当時の婚約者が、NIH（米国国立衛生研究所）で研究員として働きたいと言ったんです。彼女は外科医としてトレーニングを受けており、私も NIH で何か仕事を見つけられるだろうと考えました。当時 NIH には大学院を出てすぐに研究グループを立ち上げることができるフェローシップのプログラムがありました。それでそのプログラムに応募したのです。そういうわけで UCSF を離れてすぐに NIH で自分のグループを立ち上げることができました。それから 11 年ほど NIH に所属することになりました。最初の 2 年間は研究員として、その後は Juan Bonifacino が率いる細胞生物学部門に移りましたが、そこは本当に素晴らしい研究環境で、細胞生物学の最高水準の研究が行われていました。そこで 9 年ほど過ごしました。ある日、私の隣の Jennifer Lippincott Schwartz のラボのポスドクから、「突拍子もない話かもしれないが、イギリスへの移籍を考えたことはないか？」と訪ねられました。彼はたまたま MRC 分子生物学研究所 (LMB) にいたので、私はそこを訪問したのですが、そこを訪ねてみて、まさに私にピッタリの環境であると感じました。つまり、基礎研究に重点を置いた、正に理想的な研究環境だったのです。そこにいる人々は、私が本当に好きな人たちばかりで、比較的小規模の研究グループを持っていました。私にはそれが理想的に思えたので、そこに移る決心をしました。

遠藤 そうすると英国 MRC のほうが NIH よりも研究環境としては優れていると思ったわけですか？

Hegde いや、単に私に合っていたと言うことだと思います。NIH には多くの利点があります。まず、NIH では何をやりたいかに関わらず、必要な物はすべてそろっています。臨床医もいますし、患者のサンプルにも簡単にアクセスできます。あらゆること



Tom Rapoport (左) と Manu Hegde (右)

をやる人たちが揃っています。しかし、NIH は巨大な施設です。何エーカーもある敷地に1万人以上の職員がいます。ですから必要な物はすべて揃っているとはいえ、思うほど簡単にアクセスできるわけではないのです。一方、MRC は1つの建物にすべてが収められています。グループの数も50しかありません。そして当時の各グループの平均的なサイズは高々6人程度でした。そして分子レベルでの生命の理解に、より重点が置かれていました。それこそが私が惹かれたことだったのです。回りの誰もが同じことに興味をもっている、それが私にフィットしました。

パンデミックが与えた影響

遠藤 つまり大きなグループは好きではないということですか？

Hegde ええ、私はいまでも日常的に研究に携わっているのが好きです。パンデミックが始まる前では、実際にラボで実験もしていました。MRC ではそれが可能なのだと思います。MRC では、ほとんどのグループリーダーは今でも自分で実験をしています、これは非常に珍しいことです。

Rapoport 私の場合は逆でした。パンデミックの時は実験をしていましたが、その前も後も実験はできませんでした。

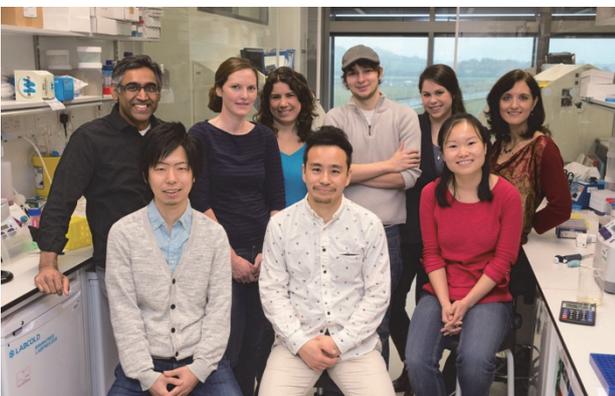
遠藤 電気泳動のゲルを流したりしてたんですか？

Rapoport もちろん！

遠藤 でも手元が見えにくいのが問題かと

Rapoport 確かに、そうですね

遠藤 今のラボはどのくらいのサイズですか？



LMBのManuグループ（2014年頃、板倉英祐さん（前列左）、柳谷耕太さん（前列中央））

Hegde 私のラボは常に8人くらいの規模でした。最初は2人くらいでスタートしましたが、最終的には6年ほどの間に8人くらいにまで増えました。学生とポスドク合わせてです。

Rapoport 私のラボは13~15人ですかね。Manuのラボよりも大きいですね。

遠藤 多くの人があなただのラボで研究したいと思ってるからですね

Rapoport この点では、Manuとの競争にはいつも負けるんですよね。パンデミックの最中とその後に何が起きたかということ、私を含め、多くの研究者にとってポスドクを見つけるのが難しくなった。パンデミック以前は中国やアジアから来る人をすぐに雇うことはなかった。でも結局はもっと多くの人員が必要だと考えて雇うことにしました。そう、そのうちの一人は永田研から来た上垣君で、とても優秀なので満足しています。でも突然、今年の4月だったか4人の非常に優秀な人たちが応募してきました。全員米国からの応募ですが、ポーランド系が1人、イタリア系アメリカ人が1人、中国系が1人、もう一人は生粋のアメリカ人でした。私は4人にオファーを出しました。全員が来るとは思わなかったので賭けに出してみたんです。そうしたら4人のうち3人が承諾しました。というわけで財政的にピンチです。

遠藤 実際のところ、パンデミックは研究にどんな影響を与えたでしょう？

Rapoport それほど大きな影響はありませんでした。2ヶ月間ラボに行けなかっただけです。ただ、その期間は最悪でした。私は3人の教授のうちの1人として、実験を行うと主張して、実際に実験を行いました。全体としては、それほど問題はなかったと思います。最も問題になったのは、インターンシップなどを行うラボを見つけられなかった学部生たちだったと思います。しかし、われわれにとってはそれほど悪くありませんでした。

遠藤 なるほど

Hegde 私も同じような感じですね。建物が閉鎖されていた期間は2ヶ月以下でした。そして一部のラボはCOVIDの研究に着手する選択をしました。私は詳細が分からないので何の貢献もできないと感じ、そのような研究は行いませんでした。私がやったとしても、皮相的なことしかできなかったでしょう。そこで、私は長期的には何をしたいのか、かなり真剣に考えることにしました。ですから私は休業期間を、プロジェクトテーマの優先順位づけに充てました。そして一部の研究を中止することにしました。すなわち、リボソームの品質管理に関する研究についてすべてを

書き出し、最終的にそれを中止することに決めました。そういう意味では、パンデミックは非常に有益でした。なぜなら研究をしていると、なぜこういうことをしてるのだろうということを知り時間をかけて考えることは困難だからです。

遠藤 つまり新しいことを始めたのではなく、切り捨てたわけですね

Hegde その通りです。ですから、私たちは取り組んでいたテーマの中の1つを中止し、最も重要なこと2つにもう少し時間を割こうと考えました。考える時間があるということは有益ですね。ただ、Tom が言うように、研究経験のない学生にとっては本当に大変だったと思います。大学院への出願書類に説得力が出ません。そして大学院に入学しても、はっきりと違いがわかります。研究経験がないと、ラボのことを一から学ばねばならないからです。そして大学院の大部分を新型コロナウイルスの感染期間として過ごした学生は研究の重要な側面を見逃してしまうことになったと思います。ラボの仲間意識、アイデアの共有、自由なディスカッションなどです。それはうちでも Tom のところでも極めて重要な経験の一部です。これは問題だったと思います。

遠藤 オンライン会議は可能でしたが、対面での交流の代わりにはなりませんでしたね。

Rapoport 私たちは Zoom 会議にかなり切り替えましたが、私は嫌いでした。今でも好きでないと思います。自分の経験から、Zoom 会議が始まると、内職を始めてしまうんですね。

遠藤 事務的な会議ならそれでもいいけど、研究の打ち合わせではそれはダメですね。

Rapoport 遠くにいる人たち、カリフォルニアの人や中国の人と話すには便利ですけれどね。

生化学と構造生物学

遠藤 お二人とも、生化学が好きですね。ある意味で生化学は時代遅れに見えますが、非常に重要です。生化学的な精製、再構成といったもの、そして構造生物学がある。構造生物学の急速な進歩には、どのように対応してますか？

Rapoport 私が米国に移り、タンパク質の膜透過系の再構成に取り組んでいたとき、真の進歩には構造情報が不可欠であることに気づきました。当時私たちは皆、Blobel が考えたように、異なるサブユニットが生体膜内で集合して、リング構造に組み立てられると考えていたと思います。私はよく財布からコインを取り出

して、チャンネルがどのように組み立てられるかを考えるために、それをリング状にならべていました。そんなとき、ポストン大学の電顕の専門家 Chris Akey がアプローチしてきたので、それを試してみました。しかし当時のクライオ電顕は「blobology」(blob (ぼんやりした形)しか分からないという意味の造語)の段階で、明らかにうまくいきませんでした。そこで当時 X 線結晶学者であり同僚だった Stephen Harrison と話し合いました。夕食の席で私は、SecY 複合体の構造が決められるんじゃないか、と話しました。すると彼は「もちろん手伝うよ」と乗り気になりました。しかしもちろん、すべての仕事はこちらでやらねばならないのは明らかでした。X 線構造解析には結晶が必要であり、結晶を作るためには大量の精製タンパク質が必要でした。幸い私のラボには、Ian Collinson、次に Bert van den Berg と Bill Clements という優秀な人たちが次々に参加してくれました。そして私も結晶をすくい上げる作業に参加しました。

遠藤 でも当時はこうした結晶化のプロジェクトはリスクが大きかったですよ。ポスドクの人たちがこうしたリスクの高いプロジェクトをやったというのは驚きです。

Rapoport ええ、だから皆私は狂ってると思ったわけです。誰もそんなことを達成できるとは信じていなかったと思います。そして実際、私自身もかなり懐疑的でした。それでも実際に希望が見えたのは、タンパク質をかなり大量に精製できたときでした。それから結晶化装置をセットアップし、良さそうな結晶ができました。しかし、6Å 程度の分解能の回折像しか得られませんでした。そして1年以上もこの分解のレベルで行き詰まっていた。それでも Bill Clement は興味を持ち、ラボに参加してくれました。しかし、結晶を改善することはできませんでした。そんなとき、学生の Enno Hartmann が複合体にはβサブユニットが必要なんじゃないかと注意を促したんです³。この時点では私たちは必須サブユニットから成る SecYE 複合体を結晶化しようとしていました。彼はもう一つβサブユニットがあるんじゃないかと考え、配列を指摘したんです。そこで私たちはβサブユニット候補遺伝子をクローニングし、結晶化を試みたところ、三者複合体はすぐに分解能が向上しました。さらに Bert van den Berg が粘り強く多くの変異体を作り、少しずつ分解能が改善していきました。分解能が 3.4Å から 3.2 Å にあがると、大きな改善となりました。

遠藤 当時あなたは生データの解析に関わっていたのですか？

Rapoport ええ、実際私も関わっていました。分解能が低かったため、モデルの構築には非常に時間がかかったことを覚えています。Bill Clements が解析をするにあたり、Steve Harrison が重要な役割を果たしました。当時、私たちは小さな部屋で毎週ミーティングをしていたことを覚えています。そして私は進捗が遅か

ったので苛立っていました。そこで私はまずいくらかの構造精密化を試み、R 因子を 40 かそれ以下に下げました。次のミーティングで、「手早く、雑な精密化をやってみたんだけど」と言ったところ、Stephen は「そんな雑なことをやるべきではない」と怒りました。「でも R 因子は 40 なんだけど」と私。彼は「なんだって?」と言いました (笑)。私も X 線構造解析のことを少し学んだわけです。今でも私は自分が構造生物学者だとは思っていないけれど、質問するくらいはできるようになった。それは PI として重要なことだと思っています。PI はラボの中を歩き回り、質問をする。正しい質問をね。基本的には一日中ずっとそれだけなんです。

(ここで遠藤が一時退席)

Hegde Enno が指摘したβサブユニットのことは知りませんでした。

Rapoport モデルの構築には3~4年かかったと思います。だから非常にゆっくり進んだというかんじでした。

Hegde でも初期の段階で Sec 複合体は単量体であることに気づいていたんですね。

Rapoport そうです。(当時は、チャンネルはサブユニットが複数集まってできると考えられていた 図1) だからがっかりしました。膜透過できない不活性構造が得られるだけで、実際の膜透過のメカニズムは分からないと思い込んでいました。

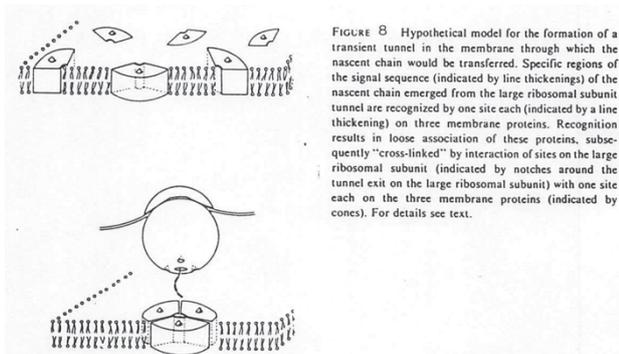
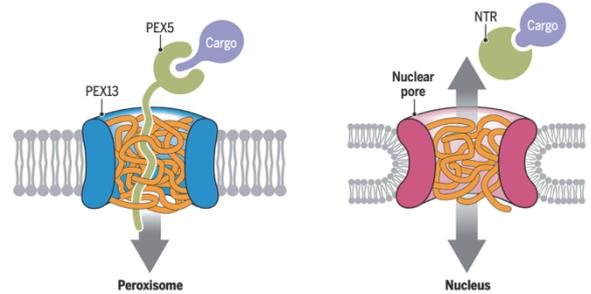


図1 タンパク質の膜透過チャンネルの初期モデル

Hegde しかし皮肉なことに最新の PEX チャンネルは複数のサブユニットが集まってチャンネルをつくる⁴(図2)わけですよね。昔のモデルみたいに。

Rapoport そうです。

Hegde 正確には当時のモデルとはちがうけれど、高次のオリゴマー構造をつくるというわけですね。



Peroxisomal protein import resembles nuclear transport. A dense meshwork is formed in the peroxisome's membrane by the YG domain of multiple copies of the peroxisomal protein PEX13. This meshwork functions as a conduit through which the import receptor PEX5 can selectively diffuse and deliver bound cargo into the peroxisome. The process is similar to how a nuclear transport receptor (NTR) moves through the FG meshwork inside a nuclear pore.

図2 ペルオキシソームの PEX13 が作る膜透過チャンネル (文献4)

Rapoport ただ両親媒性ヘリックスが膜に挿入されてチャンネルを作るというのは普通じゃないので、まだ推測の域にあるとは思っています。

Hegde たとえば膜でポアを形成する細菌毒素のような場合はそういう例があるわけで、だからどうやって膜挿入が起こるのかが知りたいところです。

Rapoport その通りですね。どうやってそういうことが起こるのか。

Hegde 最初に PEX のサブユニット間で FG 相互作用ができる仕組みがあって、その相互作用が協調して膜挿入が起こるのだとすれば、文字通りクールだと思います。その逆はあり得ない、つまりそうでなければ膜透過の障壁を作る前に孔ができてしまうことになりますからね。

Rapoport その通りです。いま正にそのことを確かめようとしているところです。このモデルでは PEX13 が自発的に膜挿入される可能性がある。それを確かめようとしています。

Hegde それがどうなるかを見ているのは本当に興味深いです。

Rapoport そうですね、膜タンパク質の膜挿入についても同様の問題があります。いまやっていますが、まだ初期段階です。

(遠藤 戻る)

遠藤 続きですが、Manu も構造生物学研究をたくさんやってますよね

Hegde ええ、しかし私が構造生物学に参入したのはそれほど計画的なものではありませんでした。私が NIH から MRC に移ったとき、素晴らしい構造生物学者に囲まれ、構造というものが環境

の一部になっている所に身を置いたことになりました。そこでは X 線結晶構造解析の様々な方法が開発され、クライオ電顕についても様々な面で開発が行われてきていました。ちょうどその頃、偶然試験管内でリボソームの品質管理経路の初期段階を再構成できることが分かったのです。当時、Venki Ramakrishnan⁵のラボの大学院生だった Rebecca Voorhees がポストドクをやれるラボを探していました。ちょうど私が MRC に移ったときで、ラボを構える MRC 分子生物学研究所 (LMB) は彼女がいる研究所だったわけです。彼女はこの分野に興味をもっているようでした。自転車の駐輪場で Venki と私はばったり出会い、彼は彼のラボの学生が私のラボに応募しようと考えていることを私に伝え、私も「そうなら、真剣に考えますよ」と答えました。そういうわけで彼女は私のラボに入りました。彼女は Venki のラボでリボソームの結晶解析をやっていたのですが、当時はちょうどクライオ電顕がそれまでの blobology から大きく発展し始めた時期でもありました。しかも MRC はそれが世界中に普及する前にそれが使える数少ない拠点の 1 つでした。そこで Rebecca と Venki は私が素晴らしい生化学者で、こういった試料を準備できるんだから、クライオ電顕を使うべきだ、と言ってきたわけです。つまりこうした回りの人々の後押しで、私はクライオ電顕を使うことになったということです。これは多くの場所の研究環境とは大きく異なります。普通だったらグラントを申請する際に、新しいことを始めようと言ったら、「それはできない、あなたにはその分野の経験と実績がない」と言われるでしょう。ところが LMB では、必ずしも経験がない分野であってもそこに足を踏み入れることを奨励されるのです。Tom が Steve Harrison のことについて言ったように、必要なときは手を貸すから、と声をかけてくれる。だから自分の専門外の分野に踏み込む自身が生まれ、何か間違ったことをしてしまうんじゃないだろうか、という不安をいただくことなく、新しい分野に挑戦できるのです。

遠藤 Tom, あなたもいいタイミングで X 線からクライオ電顕に移りましたよね

Tom そうそう、クライオ電顕はその後、この分野の一般的な手法になりましたね。

遠藤 でもあなたの場合、少し早かった。

Tom そうですね。早くにシフトできたのは幸運でした。そしてクライオ電顕の経験がある人を雇用できたことも幸運でした。そういう人がいないと難しいですからね。PI としてその分野に精通していれば別ですが、われわれだけでは何もできなかった。経験のある人が必要でした。

Hegde 私たちの場合も、たとえば試料の調製の仕方は分かって

いました。ですから当時でも、リボソーム新生鎖複合体に関する物であれば、RQC (リボソーム品質管理) 因子やトランスロコンやその他のものに結合しているかどうかにかかわらず、試料調製は可能でした。界面活性剤の種類やすべての条件がわかっていました。Rebecca は構造解析に力はすごくありましたが、クライオ電顕の経験はありませんでした。しかし彼女はこの分野の専門家 Israel Fernandez と親しく、われわれ 3 人が異なる方向からこの研究に関わることになりました。その結果、非常に早く仕事が進みました。

Rapoport X 線結晶構造解析のトレーニングを積んだ人にとってはクライオ電顕への転向は問題ないと思います。Rebecca は一人でもきつとうまくやれたでしょう。

Hegde そうですね。

Rapoport 私たちのようにそうした経験がない、あるいは少ない人たちにとっては、より難しくなります。しかし、すべてにおいて専門家である必要はないと思います。実際 1 つのことについて専門家であることは必ずしも利点とはならないです。むしろ問題に答えるために必要なことを幅広く考えた方が、より生産的だと感じます。

Hegde 私が特に嫌うことの 1 つに、学生やポストドクのセミナーに参加していて、彼らが「私は NMR のラボ出身です」とか「私は〇〇のラボ出身です」とか言うことがあります。私がそれを不快に思うのは、Tom が言ったのと同じ理由からです。つまり彼らは自分がある特定の分野や話題に閉じ込めてしまう、そうすると他の問題の可能性について考えなくなってしまい、創造性が妨げられてしまうのです。そして自分が慣れている手法を、ときには間違った問題に適用してしまうことすらあります。なぜなら、それが唯一自分が慣れている手法だからですね。それよりも、Tom が言ったように、問題の個々の部分に対して最善のアプローチは何かを考える方が良い戦略だと思います。そして助けが必要なら助けを求めればいいし、そうでなければ求めなければいい。

Rapoport それは若い人のトレーニングにおいて重要なことでもあります。学生にはどうなってほしいのか？ラボに来て、構造生物学をやりたいと言った人がいました。でも、いまの状況を見てごらんください。AlphaFold の例を見ても、おそらく 10 年か 15 年後には、現在のような構造生物学は存在しなくなっていることは明らかです。だから構造生物学者になろうとしている人は、15 年後には困ることになるでしょう。若い人たちは、先を見据えて、より多才になる必要があると思います。

Hegde 重要なのは、良い質問の仕方、あるいは質問が得意で

ない場合は、良い質問を見分けるスキルだと思います。どちらも非常に役に立つでしょう。

遠藤 あなたたちお二人のラボの素晴らしい点は、構造生物学と生化学の組み合わせですが、今の人たち、学生たちはあまり生化学をやりたがらない。しかし生化学は重要であり、同時に難しい。たとえば再構成実験には長い時間がかかり、2年、3年どころではない。でもお二人は生化学の研究で成功を収めていますよね。では、生化学の研究で重要なのは何でしょうか？Manuの場合は、米国から大量のウサギ網状赤血球ライセートを取り寄せましたよね。私はこのことを知って素晴らしいと思いました。普通はこんなことは考えません。Tom、いま良い生化学を行うための重要なポイントは何なのでしょう？

Rapoport それは難しい質問ですね。生化学があまり人気がないというのは、その通りだと思います。メカニズムの生物学は、以前のような人気はありません。私たちの分野は以前ほど人気がないとさえ言えるでしょう。だからこの種の研究をする人を集めるのは難しいのです。一方で私のラボを去った人たちは、就職に困ることはありません。だから最終的には人々はこのような困難な仕事をやり遂げた人を評価する、そうした人たちは十分に訓練を受け、生化学と構造生物学に精通していると。ですから大変な仕事でありリスクも高いですが、やはりやる価値がある仕事だと信じています。リスク要因が、人々がそれを敬遠する最大の理由だと思います。実際私のラボでは、結果が保証されているようなプロジェクトはひとつもありません、だから若い学生やポストドクがそれを受け入れるには勇気がいるのです。

Hegde 私が生化学的アプローチについて楽観的なのは、歴史的にあらゆるプロセスは最終的には実際に機能する個々の構成要素に分解できるという事実です。そうすると、おそらく1つの反応をすべて一緒にというわけにはいかないでしょうが、経路の各ステップは確実に理解できます。細胞レベルで機能していることがわかっているので、あとは混入物やその他の物をすべて取り除いたとしても、タンパク質やタンパク質複合体等、その本質的な特徴を保持できる物を見つけることが鍵となります。私は、これは確実にできると信じています。完全に再構成できない物はほとんどありません。次に遺伝学的アプローチでは見えない物があるということです。たとえば冗長性はしばしば問題となります。欠失してしまう構成要素もある、たとえば遺伝学的アプローチでは、必須因子は見つけられない。ですから、最終的にはすべての鍵となる構成要素が揃っているか、欠けているかを知る唯一の方法は・・・

Rapoport メカニズムを理解することです。

Hegde はい。

Rapoport それ以外に方法はないと思います。それしか私たちが満足を得るものはないでしょう。私たちが分子レベルで物事の仕組みを理解すること、それこそが私にとっては最大の満足が得られるものです。

遠藤 そうすると、遺伝学者の立場とは異なるということですね。遺伝学的スクリーニングからは、多くの鍵となる構成要素を見つけることができます、Randy Schekman, Yoshinori Ohsumi, Koreaki Ito・・・でもそれだけでは十分でない。メカニズムを理解するには、補完的な、異なるアプローチが必要というわけですね。

Rapoport ええ、だから私はいつも遺伝学者たちをうらやましく思います。

Hegde わかります。

Rapoport 最終的には、彼らは「私がSec61を発見した」と主張できるわけです。それらが何をやっているかが分からなくてもです。それでも彼らは重要なタンパク質の発見者としてすべての名誉を手にできます。率直に言って、うらやましい話です。

Hegde もう少し踏み込んだ話をすると、栄光の大部分は研究の最初と最後にあります。まず、最初のスクリーニングとかです。そして研究の最終段階には、たとえばリボソームの結晶構造などがあります。そしてその間の部分、たとえばリボソームを例にとると、翻訳が行われるための一連の出来事を理解するために膨大な仕事が行われました。大変な仕事です。また鍵となるステップなど、すべてのものを明らかにすることも必要でした。でも、おわかりのように、最初と最後の部分こそが、ある程度の栄光を得られる部分なわけです。最初の段階では、Paladiが、顕微鏡画像の中の粒子（リボソーム）を見て、それが翻訳と何か関係するので



Tom Rapoport (左) と Manu Hegde (右)

はないかと推測したわけですが。そして最後には結晶構造解析があった。でもその間には生化学があった。困難な作業であり、本当に腕まくりをして全力で取り組まねばなりません。何年も何年も混乱が続きます。しかしそれが重要なのです。だからそういった作業の中に、満足を見出さねばならないのです。

Rapoport あなたのさっきの質問はよい生化学を行う上で大事なことは何か？でしたね。誰が言ったか忘れてしまいましたが精製が不十分なタンパク質に時間を費やすのはやめましょう、と。

Hegde はい、「Don't waste clean thoughts on dirty enzymes」ですね。Kornbergの本ではじめて知りました。彼の言葉は覚えてないですが。

Rapoport それは真実だと思います。まず最初にすべきことはタンパク質を十分に精製することです。こうした実験では、不純物の混入（コンタミネーション）を見ているわけではないことを確信することが重要です。やはり、研究における適切なレベルを見つけないことが「アート」だと思いますね。最初はプロセスを十分に理解できていないので、粗い（crudeな）系を使うことが重要です。たとえば小胞体（ミクロソーム）を用いた膜透過系はこの分野にとって非常に重要でしたし、アフリカツメガエルの卵母細胞抽出物も、われわれのペルオキシソーム研究の初期段階において有用でした。しかし、ある段階で、完全に再構成された系に進まなければプロセスを深く理解することはできません。これは、ある意味で大きな飛躍です。良いレシピなどありません。ですから私たちは基本的には、「すべての必要な構成要素が揃っている」と仮定して試してみます。しかし、それが正しいとは限りません。粗い系から精製した要素を使った系に体系的に進むことは、現実的には難しいことがよくあります。時には運も必要です。Jim RothmanがNEMを発見できたのは非常に幸運でした。なぜならN-エチルマレイミドで1つの因子を阻害できたからです。私たちはこのアプローチを復活させました、同じやり方でERの形態制御に関わるレティキュロンを発見、同じように幸運でした。

Hegde 私たちの分野でも同じです。たとえば、SRP受容体の限定分解で受容体ドメインを膜貫通配列から切り離したとき、機能を保ちながら可溶性ドメインとして動作することが明らかになったケース（図3）など、信じられないことが起こります。

Rapoport 私が講義をする時は「これは真似してはダメ、もう一度成功することはないだろう」と言っています。（遠藤註：この結果が間違っているというのではなく、再構成実験は実験者の腕に依存するため、時には再現がきわめて困難な実験もある）

Hegde その通りです。二度目は決してうまくいきません。それ

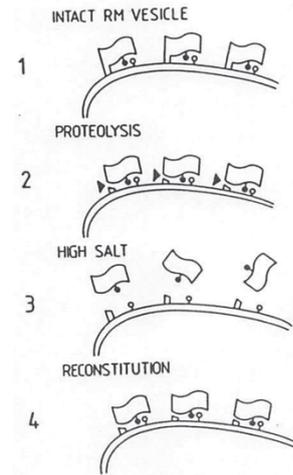


図3 SRP受容体の機能ドメイン同定の手順

なのに不思議と、このような場合では可溶性フラグメントとして機能を保っています。理論的には、これはリボソームを正しくERに誘導する受容体のはずですが、それが切り離されても機能するのです。ですから、やはり運が必要です。ただ、重要なのは、このような珍しい結果を活かそうとする意欲があることです。「運」が関与する結果が1つある一方で、成功すべきだったのがうまくいかなかった合理的な試みが数多くあるのも事実です。

生化学が難しい理由は、明確な公式が存在しないことです。しかし、それが楽しいと私は思います。少なくとも私のラボのやり方では、データを解釈する過程に関わるのが好きです。解釈自体が一種のアートだからです。特に初期段階では、システムが複雑で、結果があまり意味をなさないことが多いです。粗い系では信号も弱いので、そういった点も難しいですね。私はタンパク質の完全な精製にこだわるTomほど厳密ではありません。むしろ粗い系の中で何が起きているかを理解することに強みを感じています。そして、システムがある程度見えてきたら、変異導入を用いてさらに理解を深められると信じています。ただ、各段階で異なるスキルセットが必要です。たとえば、美しい遺伝学的スクリーニングを設計する能力は非常に重要なスキルです。

Rapoport しかし最も難しいこと、そして挑戦的なことは、良いプロジェクトを見つけることだと感じます。それが最も難しいことです。長期的なプロジェクトができるように、ニッチなテーマを見つけようと多くの人が目を光らせています。そうしたニッチな分野で実際にリーダーになるのはとても難しいことです。私にはそうなれるかどうかわからない。Manuは腰を落ち着ければ考えることができると言いましたよね。そのためにはもう1回バンデミックが必要かもしれませんね（笑）。

Hegde その通りですね

Rapoport でも私の場合はちょっとちがいます。何かに引っかかって偶然みつける（セレンディビティ）ということが良くあり

ます。時には実際に座って論文を読み、ちょっと待てよ、これは面白いかもしれない、とひらめくこともあります。しかし、これが一番難しいと感じます。特にラボを出て、これからキャリアを築こうという若い科学者にとってはもっとも難しいことだと思います。ラボでやっていたことをそのまま続けても、有名な科学者になることは決してできません。ですからかれらもまたそれを見つければなりません。同じようなことを探そうとする人々がたくさんいる、指数関数的な世界なのです。

遠藤 正しい方向を見つけるには、Tom, あなたの場合は机に向かって座って考えると・・・

Rapoport そして運ですね

Hegde はっきりさせておきたいのは、初期のパンデミックの時のポイントは、プロジェクトを選ぶのではなく、限られたエフォートをどこに集中させるかを明確にすることでした。私が知っておきたかったのは、一見単純な問題を解決するのにどれだけ時間がかかるかということでした。ですから2000年代はじめに着手した研究の1つ、テイルアンカータンパク質が膜に挿入される仕組みを解明しようとする研究を例にとると、これは非常に単純な問題に見えます。しかし、遺伝学、生化学、再構成、構造といった分野がすべて統合され、それらをまとめるモデルができるにはおそらく10年から15年はかかったでしょう。それも多くのグループが、様々な部分で協力し合って取り組んだ成果です。現在でもToshiたちが行っている研究の中にも、タンパク質の誤配送がどう処理されるのか、についてまだ理解できていないことがありますよね。パンデミックが役立ったのは、まさにそうした部分です。解決にそれほど時間がかかったり、比較的単純な問題に妥当な答えをだすのにそんなに時間がかかるなら、キャリアの中でそのレベルの満足度で解決できる問題は、ごく少数になる。そうすると、私はあまりにも多くの問題に取り組みすぎていると感じました。

Rapoport 「Annual Review of Biochemistry」に一種の自伝を書いたのですが、私の場合、タンパク質の膜透過、小胞体ストレス応答、小胞体の形態学、ATPアーゼ、ペルオキシソームという5つの分野の研究をしてきたと思います。タンパク質の膜透過には35年以上、小胞体ストレスあるいはERADには25年、小胞体の携帯には25年ATPアーゼもおなじくらい、そしてペルオキシソームのタンパク質輸送は最も新しいテーマで10年ほどを費やしました。Manuが言ったように、粘り強さと本当に夢中になる気持ちがあれば、その分野で真にインパクトを与える研究は出来ないと思います。Toshi, あなたはミトコンドリアの研究をどのくらい続けてるのですか？



Tom Rapoport (左) と Manu Hegde (右)

遠藤 35年くらいですね

Rapoport そうでしょうね。

Hegde それもそうですね、最初は遺伝学で、変異体の解析、生化学、そして構造。プロジェクトとともに手法も進化する必要がありますね。

米英の研究環境事情

遠藤 なるほど。それでは話題を変えましょう。わが国では米国、ヨーロッパ、中国と比較して日本の研究レベルが低下してきていることに、人々は懸念を抱き、不安を感じています。政府はその理由を見つけようとしています。政府の研究シンクタンクが国際共同研究の数とインパクトの高い論文の数の間に相関をみいだしたのです。そこで政府は、国際共同研究を増やせば、科学力が向上するだろうと考えたのです。相関と因果関係はちがうんですけどね。ですからこのごろはグラントの申請とかでも国際共同研究の数などを示すよう求められています。米国や英国ではどうですか？

Rapoport まず最初に言っておきたいのは、私は個人の思考こそが重要だと強く信じています。ですから個人に与えられるグラントが重要だと信じています。比較的小規模なグループが最も生産的だとも信じています。一定の人数を超えると、たいていは機能しなくなります。私は東ドイツで育ち、グラント制度がなかったので、個人へのグラント制度というものを信じています。しかし、プログラムグラント制度は信じていませんし、反対です。人々にコラボレーションを強制することは決して良い考えではありません。コラボレーションは内側から生まれるものでなければなりません。そしてコラボレーションが必要でない場合もよくあります、それでいいのです。

Hegde 研究者どうしに関わる必要はあるけれど、必ずしもコラボレーションをする必要はないですね。

Rapoport その通りです。

Hegde 質的に新しい洞察はすべて個人から生まれるという考えには全面的に賛成です。もちろんどんなことにも例外はありますが、ほとんどの場合、それまでは混乱していたデータが突然意味を成すようになったときに閃く洞察です。単にデータを集めるだけの作業ではそのようなことは滅多に起こりません。もう一つは、コラボレーションには、良いコラボレーションを円滑に、ある程度の相乗効果が出るように行うには、それなりの労力が必要だということがあります。コラボレーションから得られる利益が費やした時間を上回るようなコラボレーションは、そう簡単にはできないと思います。ですから、厳選された少数のコラボレーションがより効果的である傾向があると思います。私が考える「厳選された」とは、補完的な視点や、特定の分野における価値あると思われる専門的知識をもつ人物、その問題に真剣に取り組んでいる人との共同研究です。真剣に取り組んでいなければ、結局は二番手の努力しか得られません。

Rapoport そうですね。もう一つはこうした強制的なコラボレーションは、お金が絡んでいて、誰もがそれを追い求めるという意味で強制的なわけですが、大勢の人々集めてグループを編成する、トップダウン方式の研究が多いですね。つまり病気とか何かの問題があり、その解決を上の人々が考えるわけです。私の考えではそれはうまくいきません。お金の無駄遣いにしか思えません。

Hegde そうですね、少し明確にしたいと思います。科学を概念的に前進させるには、問題について懸命に考え、しばしば長期間にわたって投資を行う小規模のグループが、ほとんどの場合、有効だと思います。しかしある種のブレイクスルーがいったん達成されれば、特定の分野では何を達成すべきかが分かっており、それを実行する人員さえいればよいという、チームサイエンスの余地が生まれることがあります。

Rapoport たとえば？

Hegde そうですね、ヒトゲノムプロジェクトがその典型的な例でしょう。私がヒトゲノムというとき、それだけを意味しているわけではありません。非常に多くの生物のゲノム配列を決定したことによる恩恵は、当時予想されていたものをはるかに超えるものでした。ホモログを見れるようになったことで、事実上、ほとんどの初期構造予測アルゴリズムでそれを利用できるようになりました。つまり、その情報があるだけで役に立つという類いのものなのです。配列決定はサンガー法であり、それらの2つの主要な方法のうち1つはMRCで開発されましたが、MRCはそ

れ以降の研究には一切関与していません。ですからこれが1つの例になります、それほど多くの例があるわけではありません。

Rapoport なるほどそうかもしれません。ただ一般的に言えば、ゲノムの配列決定は一種自己修正的な面がありますよね。

Hegde その通りです。

Rapoport 配列には最初は間違いが多かったですが、何度も何度も、また異なる生物でも配列を決定したので、最終的にはほぼすべてのエラーが取り除かれました。しかし、タンパク質の相互作用研究や局在化などの大規模な研究を見ると、私は全く役に立たないと思います。なぜなら調べても分からないからです。おそらく20%くらいは誤りがあるのでしょうか。しかしどれが正しいとかはどうしたらわかるのでしょうか？もう一度やり直さないとダメです。ですからエラー率が本当に小さい場合を除いては、こうした大規模な情報が本当に役に立つとはあまり思えません。

Hegde システムに十分な冗長性がくみこまれている場合、たとえばがんの依存関係マップは驚くほど有用だと思います。

Rapoport 確かに、いくつかありますね。

Hegde そう、いくつかあるんですよ。

Rapoport OK、わかりました。

Hegde それからもう一つは、コネクトームです。ショウジョウバエのコネクトームですが、私も最初Tomと同じような反応でした。こんなことにこれほど努力を費やしていたのか、という感じでした。しかし、現在では特定の神経回路をリンクし、光遺伝学とコネクトーム情報をつかって特定の回路に動作をマップすることが可能になっています。今できることはきわめてインプレッシブです。

Rapoport でもあまりに記述的なような

Hegde そうではありますが・・・

Rapoport とにかく、あなたの質問に戻しましょう。話がそれてしまいました。米国の現状はというと、あまり良くはないと思います。若い人の一般的な感覚としては、NIHのグラントを得るのは非常に難しいです。キャリアの途中でNIHのグラントを失う人もいます。50歳くらいでグラントを失うと、再びグラントを得るのは非常に難しいです。グラントが一度途絶えると、成果を出すための資金がなくなるので、基本的に悪循環に陥り、サイエ

ンスの世界から離脱することになります。恵まれた場所もあるし、そうでない場所もある。ハーバード大学は成功するチャンスがまだあると思います。中西部のどこかにいるとしたら成功は難しくなる。ラボを出た若い人たちが、こうした名高い場所に職を見つけられず、中西部かどこかに行くことになってしまうのはつらいことです。サイエンスの世界でキャリアを築くのは、非常に難しいことです。私は東ドイツで育ちましたが、それよりもずっと厳しい状況です。東ドイツはあまり良い場所ではありませんでしたが、それでも中西部の方がもっと厳しいと思います。私たちはまだ研究を続けることができますが、彼らはどうでしょうか。NIHの予算はしばらくの間停滞しています。一方で給与は上げざるを得ません。ポストクの給与はインフレやその他の要因でかなり上昇しました。その結果、予算は変わらないのに給与は上がるので、雇用できる人数が減ることになります。

遠藤 日本でも為替レートの問題があります。多くの機器や薬品は輸入品ですが、予算は同じままです。

Rapoport その通りです。だから私は少し懐疑的で悲観的です。つまり裕福なラボと非常に貧しいラボがあるという、ほぼ2つの階級制度のような状況です。ただ、これは修正できると思います。なぜなら NIH は実際に支援すべきでないものに対して膨大なお金を無駄にしているからです。たとえば臨床試験。これは NIH がやるべきことではないと思います。はっきりさせておきますが、製薬会社が参入しないような稀少疾患については、NIH がやるべきだと思います。しかし、がんのような大企業が関与するような疾患については、NIH ではなく製薬会社がやるべきだと思います。NIH が得る資金の多くは医療研究に費やされていますが、本当に優れているとは言えないものが多いです。

Hegde いま NIH の所長は誰ですか？

Rapoport これは所長の責任ではありません。すべてがきわめて政治的なものなのです。議会が決定を下すわけであり、彼らは基礎研究に価値を見出してないのです。

Hegde 私は米国の政治家よりも英国の政治家の方が基礎研究を重視していると思います。その意味では悪くないですね。Crick 研究所と LMB は、英国で最も注目されている研究機関でしょう。政治家が定期的に訪問していると思います。彼らは基礎研究が英国経済にどのような恩恵をもたらしたかについて定期的に聞いており、結局は彼らが本当に気にかけているのはその点なのです。そして英国は、歴史的に科学分野で非常に強みを発揮してきました。ですから、彼らは自国の実力以上の成果を上げようとしているのだと思います。そういう意味で、私は概ね政治家たちに満足しています。

Rapoport 私は政治家たちを全く知らないのですが、あまり多くは言えません。しかし確かにあると思います。ご存じのように米国にはロビー活動のシステムがあります。だからそれを専門としている人々もいるわけです。

Hegde まあ、私は LMB というかなり特殊な所にいるので、外の情報はあまりわからないわけですが。

Rapoport 私は HHMI⁶のおかげで恵まれた研究環境にいます。われわれ二人は非常に恵まれた状況にあるといえるでしょう。だから会議とかに行くと、予算のことが気になってそれについては触れないようにしてしまいます。私の年間予算は 120 万~130 万ドルです。NIH のグラントの場合は通常 30 万ドルです。

Hegde そうですね。

Rapoport そして彼らはポストクたちの給与の 75%、ときには 100%を払わなくてはならないんです。そうするとわずかしが残りません。

Hegde LMB が世界標準から見るとかなり低予算で機能できる理由は、私たちの給与が極めて低いからです。

Rapoport 聞いてもいいですか？ 給与はいくらですか？

(以下、遠藤が電話に出ている間に、二人の間で両国での研究者の給与の話になったので、削除)

Hegde たとえば MRC が人材の定着に苦労している理由がおわかりいただけだと思います。MRC にいる彼らが他の場所に移れば、米国と同等のポジションで 2 倍から 3 倍の給与を簡単に得ることができます。Max Planck 研究所の給与がどのくらいかはわかりませんが・・・

遠藤 そうすると、米国では大きなラボはまだ大丈夫だけど、小さなラボは衰退しつつあるということですか？

Rapoport 場所によると思います。小さな機関で大きなラボをもつのは難しいでしょうね。MD の人たちは大きなラボを持つことが多いですが。

遠藤 なるほど

Rapoport 彼らは階層性のシステムを持つことが多いですね。大物が上に立って、その下に・・・日本でも同じような物でしょう？

遠藤 はい、似てますね。こうした研究環境は大統領選の結果に左右されますかね？これからの方向性はどうなるんでしょう？

Rapoport そうですね。通常 NIH の予算は議会によって決定されます。過去には、これは数少ない超党派の合意が得られた分野の 1 つでした、共和党も民主党も、つまりあの人たちは高齢化しているわけですから、高齢化や病気について何か手を打つことに賛成してきたわけです。ですから通常はこの点に合意があるわけです。ところがいまケネディ（ロバート・F・ケネディ・ジュニア）という男がいて、彼は無所属候補として大統領選に出馬しました。結局退きましたが、いまはトランプを支持しています。そして彼は保健省担当を望んでおり、NIH の予算もその中に含まれます。彼は予防接種に反対する人物です。つまり彼は科学者を嫌っているのです。ですからもしトランプが当選し、彼が保健省長官になれば、われわれは大きな問題に直面する可能性が高いでしょう（遠藤註：11月にロバート・F・ケネディ・ジュニアはトランプ政権の保険福祉省のトップに指名された。NIH は保険福祉省の傘下）。

遠藤 なるほど。英国やヨーロッパはもう少しうまくやっているようですが。

Hegde 英国についてはいくつか言えることがあります。ヨーロッパ全体について語ることはできませんが、英国では、米国で目にするようなラボの規模や相対的な貧富の劇的な差はないと思います。ですから英国には巨大な研究所はあまり多くありません。それは特に一般的というわけでもなく、また特に評価されているようにも見えませんが、基礎科学は依然として国の繁栄の原動力であるということは、政治的にもかなりコンセンサスが得られていると思います。そういう意味では、英国の姿勢には概ね前向きなものを感じています。課題はグラントの割合が全体的に依然としてかなり少ないことです。大学内の小さなグループでも、MRC に申請して競争的な研究費を獲得することはできると思います。さらに資金を得ることも可能です。たとえば Wellcome Trust⁷ は非常に手厚い支援を提供しています。それにより、より充実したグループをつくることができます。Wellcome Trust は基礎科学や基礎科学とより応用に近い研究の組み合わせに対して、歴史的に資金提供を積極的に行ってきました。しかし最近では、戦略的に重要と考えるいくつかの分野に重点を置いています。私はこれがシステムを歪めると考えています。トップダウン方式は、進歩を促すには効率が悪い方法であることが多いのです。何が重要で、何が面白く、何が個々の科学者にとって取り組みやすいかという重要な決定は、科学者に委ねる方が、長期的にはうまくいく傾向があると思います。それでも Wellcome Trust は幅広い分野を支援し続けていると思いますので、今後どうなるか見てみたいと思っ

ています。

遠藤 Wellcome Trust は独自の資金源を持っているのですか？

Hegde 寄付で成り立つ団体です。そして大きな基金を持っています。

Rapoport 彼らは世界最大の非政府スポンサーだと思います。HHMI よりも規模が大きいと思います。

遠藤 HHMI も寄付金ベースですか？

Rapoport いえ、基金です。Howard Hughes が医学研究のために莫大な財産を残したわけです。

Hegde 英国では、幸いにも ERC（欧州研究会議）のグラントに関して、その前には EMBO のグラントに関して、EU との間で合意が成立しました。少なくとも主な資金源の 1 つ、たとえば EMBO のポストドクのフェローシップや ERC のグラントなどは、現在ではよりシームレスなものとなっています。

ERC は英国の科学の歴史においてかなりの資金を提供してきました。ERC の素晴らしい点の 1 つは、研究を始めたばかりの人向けの資金が別にプールされていることです。ERC には、いわゆる「ERC スタートアップグラント」があり、中堅研究者を対象とした「ERC consolidator グラント」、そして実績のある研究者を対象とした「ERC シニアグラント」があります。このように明確な道筋が用意されているのです。また、資金提供も非常に手厚い。報告義務については、Wellcome Trust よりやや負担が大きいかもしれませんが、Wellcome Trust は基本的に、申請書は短く、資金提供は手厚く、研究者による研究推進を信頼しています。

遠藤 なるほど。

Rapoport グラント制度に関する米国の変化の 1 つは、ほぼ完全とは言うわけではないですが、大部分が、いわゆる MIRA（Maximizing Investigator's Research Award）システムに変更されたことです。このシステムは、プロジェクトよりも研究者のキャリアを支援するものです。これは原則的に、非常に良いアイデアだと思います。

遠藤 つまり人物を選んでお金をつけるわけですね

Rapoport その通りです。そうすれば、資金をより自由に分配することができます。そうでないと膨大な量の官僚主義的作業が生まれてしまいます。これまでだと、あるプロジェクトについて得た資金を他のプロジェクトに使うことはできませんが、MIRA シ



LMBのオフィスでのManu（2019年頃）

システムでは、他の用途にも簡単に資金を活用することができます。

遠藤 これは興味深いですね

Rapoport 唯一の問題は、「移行」の際に基本的に支給額が減額されることです。たとえば NIH から 2 つのグラントを得ていたとします。それを 1 つの MIRA グラントに統合しなければなりません。そして MIRA グラントは基本的にその水準に留まり、それ以上増額することはできません。だから切り替えに不満を持つ人もいます。しかし全体的には良いアイデアだと思います。

遠藤 HHMI も同じですね

Rapoport 同じですね。基本的にプロジェクトではなく個人に対する支援です。

遠藤 ある段階では評価は必要でしょうけれど、良い考えだと思います。研究には自由な裁量が必要ですからね。

Rapoport もう一つちょっと言いたいことは、われわれの専門分野ではないですが、米国は、橋渡し研究（translational research）、すなわち何かを発見し、それを産業に移行していくことに優れています。研究者が会社を設立したり、特許から製品化までを一貫して行える仕組みが数多く整備されています。必ずしもわれわれの仕事ではありませんが、米国のサイエンスは、そういった橋渡し研究において他国のサイエンスよりもはるかに強力なものになっていると思います。

遠藤 なるほど

Rapoport 他の国は米国ほどうまくやっているとは思えません。

Hegde おそらくそうですね。米国の特定の地域ではそれを奨励しています。特にボストン・ケンブリッジ・エリアやスタンフォード・ベイ・エリアでは、特定の分野におけるどんな発見でも、それが企業へと転換される文化があります。

Rapoport ここでもう一つ指摘しておきたいことがあります。近年、Altos 社⁸のような企業が数多く登場しています。こうした企業は、大学から研究者を引き抜いています。私はこれに賛成ではありません。彼らは研究者に高額報酬を支払っています。しかし、私はこうした研究者の多くは非常に優秀であり、本来は大学のシステムの中にいるべきだと感じています。彼らは教えるべきであり、学生を指導すべきです。また、UCSF が Altos 社に大学院生の受入れを許可したことも好ましくないとします。つまり彼らは独占していた地位を事実上手放したのです。それは良い考えとは思えません。

遠藤 そうですね

Rapoport これからどうなるか見ていきましょう。私たちは、Altos 社以外にもそういう企業にいる友人を色々しています。どこがありましたっけ？

Hegde Ark Institute とか、いくつかありますね。

Rapoport こういうものは沢山あります。サウジアラビアの新しい会社もあります。大金を持っている人なら誰でも、基本的には科学者を「買う」ことができます。それは私たちのシステムを大きく歪めていると思います。

Hegde そもそも、スケジュール通りにサイエンスを進めるのは非常に難しいことです、この種の試みについて私が最も懸念しているのは、多額の資金を持つ投資家が最終的に求めるのは、進展を見たいということです。研究の進展がいつ来るのか、どこから来るのかを予測するのは、多くの場合極めて難しいです。ですからこうしたことがどんどん始まることは不安です。政府がこの種の試みにおいて優位に立てる点があるとすれば、政府の場合は非常に長期的な視点に立てるということです。そして、幅広いポートフォリオに広く投資し、長期的な視点を持つことで、少なくとも投資のいくつかは、病気の治療や経済的な利益を生み出すことに成功するでしょう。つまり、政府が関心を寄せるようなことです。もちろん、投資の多くは知識を生み出すと言う点、これは非常に長い目で見たときにはじめてインパクトが出てくるわけですが、そこで非常に成功を収めるでしょう。私は昨今の新興投資企業の中に、10年以上存続し、その間に発見を主導していくものが、どれほど資金を提供したとしても、あるとは思えないのです。

Rapoport あなたの大学ではどうか分かりませんが、同様の問題はわれわれの大学にもあります。うちの大学は、より多くの応用研究を行いたいと考えています。そこでگران制度を設けるだけでなく、たとえば現在では1階にインキュベーターラボと呼ぶ巨大なラボを設け、そこで企業の人たちが研究者の知識を活用できるようになっています。私は大学と企業の間には、より明確な区別が必要だと感じています。私たちは基礎知識を生み出すために大学にいます。そして、その先に大規模なスクリーニングや薬剤開発などを行うよう後押ししてくれます。しかしそういうことは、私たち素人より、企業の方が遙かにうまくできるでしょう。だから、私はそういうことは企業にまかせるほうがよいと考えています。

Hegde この点で、うまくいっている例を1つあげると、LMBはアストラゼネカ社の研究本部のすぐ向かいに位置しています。それで、LMBとアストラゼネカ社はMRCが500万ポンド、アストラゼネカ社が1000万ポンド位を拠出して、「Blue Sky Fund」を設立しました。その狙いは、アストラゼネカの研究者とLMBの研究者が共同でプロジェクトを立ち上げることです。必ずしもトランスレーショナル（橋渡し）である必要はないですが、両者にとって興味深いものといえると思います。知財の問題は少し複雑ですが、私のようなスクリーニングは行わないけれど、何かをしたいと思っている研究者と、生物学の特定の分野についてもっと知りたいと思っているアストラゼネカの研究者と一緒にプロジェクトを立ち上げ、それぞれの専門技術ややり方にアクセスできる機会を提供しています。これは実際かなりうまくいっています。

Rapoport 私はウィーンの分子薬理学研究所（IMP）のアドバイザーボードの一人ですが、この研究所はベーリンガーエンゲルハイム社がスポンサーとなっています。ですから両者のつながりは非常に緊密で、実際、IMPの科学者の中にはベーリンガーエンゲルハイム社に多大な貢献をしている人もいます。企業からの人材を育てるといっても、非常にうまくいっていると思います。薬物スクリーニングも企業側が行ってくれています。

Hegde アカデミアと企業、それぞれのコミュニティが、それぞれのコミュニティで何が起きているのか、考え方やアプローチについて、より認識を深めることに価値があると思います。私は、創薬がいかに難しいのか、また何をやっているのかについて、より理解が深まり、敬意を抱くようになりました。Tomが言うように、私のような人間が創薬を行い、成果を出すには、どれほど準備不足であるかと言うことについても、です。興味深い創薬の標的を見つけたからと行って、実際に薬を開発できると考える研究者は、非常に甘いと思います。創薬は信じられないほど複雑です。



ラボでのManu（2021年頃）

ですから、そのことを知っておくことは実際にはとても役に立ちます。そういうわけで、私はこのアストラゼネカとの共同プロジェクトである「Blue Sky」プロジェクトをととても気に入っており、支援しています。

若い人たちに向けて

遠藤 わかりました。それでは最後に、お二人から若い人たちにエンカレッジするメッセージをいただけますか？

Rapoport 少し悲観的なコメントもしましたが、それでも若い研究者にとってサイエンスは素晴らしいものだと思います。私たちは世界で最高の仕事をしていると断言できます、つまり私たちの職業以上に良い職業はないと思います。その理由の1つは、自分の好奇心に従うことができることです。さらに私たちは国際的な家族の一員であり、世界中で色々な人々に出会えます。自分の働く時間も基本的に自由に選べます。好きなときに出勤し、好きなときに退勤できる。私の所属する部局では、実際にどれだけ休暇をとっているか誰も気にしないですし、知りません。常に若い人たちと働けることも大きな特権です。彼らの年齢はだいたいいつも同じですが、私だけが年をとっていく（笑）。サイエンスは最高の仕事であり、覚悟を決めた人は必ず成功できると確信しています。もちろんある程度のインテリジェンスと運も必要ですが、一番大事なのは自分の仕事に情熱を持ち、覚悟することです。それさえあれば、きっと成功できると思います。

遠藤 なるほど。

Rapoport それともう一つ感じたことがあります。今回の福岡での国際会議で、女性科学者の数が本当に少ないことに気づきました。これは、ここ日本では米国よりも深刻な問題だと思います。米国でも家庭とサイエンスのキャリアを両立させるのは大きな



Tom Rapoport 近影

課題です。でも女性科学者に伝えたいのは、あまり早くにあきらめてしまうのはやめてほしい、ということです。可能だと信じて欲しい。正しいパートナーを見つけて責任を分担すれば、実現できると思います。

遠藤 そうですね、ありがとうございます。

Hegde いくつかあります。1つは、成功への道筋が1つだけだという印象を持つ人がいるかもしれませんが、実際にはそうではないということです。たとえばいまインタビューを受けている私たち二人も、それぞれ全く異なる道を歩んできましたし、他の多くの人々に話を聞けば、成功への道筋は本当に多種多様だと言うことがわかるはずです。人生の途中で一度サイエンスから離れて戻ってきた人もいれば、キャリアの初期に運良く大きな成果を出した人もいます。本当に色々なケースがあります。そして、決意や粘り強さ、インテリジェンスが重要なのはもちろんですが、早い段階で自分の可能性を見てくれる良い指導者（メンター）に出会い、その人から建設的なフィードバックを得ることが非常に大事です。

Rapoport その通りですね。

Hegde 人はしばしば気づかないのですが、キャリアの初期段階で、どのラボに入るかを決めるような判断をするとき、そのラボで、ちゃんとスキルを学べるか、良い指導を受けられるかを基準にすることが重要です。テーマに惹かれることがよくありますが、それに惑わされるのは避けるべきです。

遠藤 そうかもしれません。

Hegde サイエンスというのは、他の多くの職業とは少しちがいます。会計士になるためのように、多くのコースを受講してある日突然「科学者」になれるわけではありません。それはむしろ、鍛冶屋になるようなものです。サイエンスの成功は、徒弟制度、師弟関係に大きく依存しています。

Rapoport さらに言うと、若い研究者たちを見ていると、サイエンスのキャリアを築くのはどれだけ難しいかを実感し、落ち込んだり、自分には無理だと思う人が多いです。人はあまりにも遠くを見すぎ、考えすぎます。自分は成功しないと思ってしまい、そして落ち込んでしまうんです。でも私はこう言いたいです。「いまこの瞬間を楽しんでほしい」。毎日の実験や、説得力ある素晴らしい結果がえられたとき、それがその日を素晴らしいものにしてくれますよね。その瞬間を楽しむことが大事です。そして、そういった瞬間が十分に積み重なれば、それが成功につながります。

遠藤 そうですね。今日はどうもありがとうございました。

(2024年9月6日 京都産業大学にて)

註

1 Sec 複合体の再構成実験の報告論文

Görllich, D. and Rapoport, T.A. (1993) Cell 75, 615-630. ER でタンパク質の膜透過を担う Sec61 複合体 (Sec61 α , β , γ) と SRP 受容体を人工脂質膜にはじめて再構成し、これらが膜透過機能を担う最小の構成単位であることを示した論文

2 リボソーム受容体を報告した論文

Savitz, A. J., and Meyer, D. I. (1990). Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum. Nature 346, 540-544.

ER の 180kD タンパク質が分泌タンパク質の ER への co-translational な膜透過に必要なリボソーム受容体であるという報告の論文。

3 タンパク質の膜透過装置 (SecY 複合体) の最初の精密構造の報告論文

van den Berg, L. et al. Nature 427, 36-44 (2004). アーキア *Methanococcus jannaschii* の SecY 複合体 (ER の Sec61 複合体に対応) の分解能 3.2Å の X 線構造を報告した論文。大腸菌の SecY 複合体 (SecY, E がコア複合体) については詳しい研究が成されていたが、アーキアの SecY 複合体についてはサブユニット構成が確立していなかった。アーキアの SecY α は大腸菌の SecY, 哺乳動物の Sec61 α , 酵母の Sec61 に対応し, SecY γ は大腸菌の SecE, 哺乳動物の Sec61 γ , 酵母の Sss1 に対応する。アーキアの SecY β は哺乳動物の Sec61 γ , 酵母の Sbh1 に対応するが, 大腸菌にはホモロ

グが存在しない。

4 ペルオキシソームのタンパク質膜透過機構の論文

Gao, Y. et al. (2022) Science 378, eadf3971 ペルオキシソーム膜のインポートでは PEX13 がオリゴマーをつくることで形成される巨大な孔（ポア）をタンパク質がアンフォールドせずに通過できることを示した論文。孔にはフェニルアラニン（F）とチロシン（Y）の並んだ配列がゲル様構造を作り、核膜孔と良く似た仕組みで物質の出入りを制限しているというモデル。

5 Venki Ramakrishnan

インド出身で MRC 分子生物学研究所の構造生物学者。リボソームの構造と機能に関する研究の功績で 2009 年ノーベル化学賞を受賞

6 HHMI

ハワードヒューズ医学研究所。米国の実業家ハワード・ヒューズによって 1953 年に設立された非営利の医学研究機関。最低 5 年間で、300 人以上の科学者に大きな資金を提供する HHMI Investigator Program がある。資金提供は研究助成金（グラント）の授与ではなく、大学等に所属する研究者を在籍のまま同研究所の研究員として雇用するかたちで行われる。（Wikipedia より）

7 ウェルカム・トラスト

イギリスロンドンに本拠地を置く、世界屈指の資産規模の医療研究財団。トラストの使命は、人および動物の健康増進を目的とする研究を助成することにある。（Wikipedia より）

8 Altos 社

著名な企業家や投資家から 30 億ドルの出資を受けて 2022 年に設立された米国のバイオテック研究企業。ヒトの老化を防ぎ、細胞を若返らせ、寿命を延ばすことをめざす。山中伸弥教授が同社の上

級科学アドバイザー、京大 iPS 細胞研究所は同社と受託研究契約を結んでいる。

Tom A. Rapoport

米国ハーバード大学医学部・教授

略歴 1972 年 東ドイツフンボルト大学ベルリン校で PhD 取得。1972 年 東ドイツ科学アカデミー分子生物学中央研究所助手、1985 年 同教授（細胞生物学）、1991 年ドイツマックスデルブリュックセンター グループリーダー、1995 年 ハーバード大学医学部教授、1997 年 HHMI 教授を兼任。タンパク質の膜透過研究、ER の形態形成、ER でのタンパク質品質管理、ペルオキシソームタンパク質の膜透過、膜組込機構などの研究の第一人者。特にタンパク質の膜透過装置の構造決定は細胞内のタンパク質輸送の研究最大のブレイクスルーとなった。

Ramanujan Hegde

英国 MRC 分子生物学研究所・教授

略歴 1997 年 UCSF で PhD 取得、1999 年同大学で MD 取得。1999 年 NIH 研究員、2008 年同シニアインヴェスティゲーター、2011 年 英国 MRC 分子生物学研究所プログラムリーダーおよび研究部長。細胞内のタンパク質輸送、タンパク質の膜透過と膜挿入、リボソーム品質管理等の研究の第一人者。最近 ER における膜タンパク質の膜挿入に関わる新規装置と機構を発見し、教科書を書き換えることとなった。



ミーティングレポート

MFP 国際会議「International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics」 & 京都産業大学バイオフィォーラム



写真 1：集合写真

千葉志信

2024年9月2日から5日にかけて、福岡のザ・ルイガンスにて、学術変革領域研究(A)・マルチファセットプロテインズと、京都産業大学動態研究所の共催の国際シンポジウム、「International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics」が開催された。今回の国際会議は、マルチファセットプロテインズの最終年度にあたる2024年度に、領域の集大成として開催されることが、領域設立当初から計画されていた。京産大からは遠藤斗志也先生と千葉（筆者）が、本領域の計画班として参画していた。その関係もあり、京産大タンパク質動態研が、今回の国際会議の共催団体として名乗りを上げた。本国際会議は、マルチファセットプロテインズ代表者の東京科学大・田口英樹さんを中心とし、また、名古屋大の松本有樹修さんが世話人となり、上記の日程で4日間にわたり開催された。海外の著名な研究者8名に加え、山中伸弥先生、大隅良典先生を含む国内の著名な研究者も多く招待され、大御所から若手新鋭の研究者まで、タンパク質研究の様々な分野において最前線で活躍している研究者が福岡の地に集結した。大隅良典先生、水島昇先生がそれぞれ体調不良のため、当日不参加となったのは大変残念であったが、それでも、4日間にわたり、レベルの高い発表や議論がなされ、大いに盛り上がった会議となった。未発表データも発表された関係で、発表内容には触れないが、

以下、ミーティングの全体的な流れを報告する。

DAY1

まず、初日の午後3時に、マルチファセットプロテインズ代表の田口さんにより、開会が宣言された。また、この7月に逝去された田中啓二先生を悼み、黙祷が捧げられた。田中先生は、過去にはタンパク質動態研の招聘教授をしておられ、また、マルチファセットプロテインズの評価委員もご担当されていた。

Session 1は、本学の遠藤斗志也先生が座長として登場した。演者として、稲田利文先生（東大）、富田野乃さん（東大）、親泊政一先生（徳島大）、Judith Frydman（スタンフォード大）が登壇された。稲田さんは、リボソームの停滞を解消する様々な分子機構に関する緻密で包括的な仕事の一端を発表された。富田さんは、ミトコンドリアの翻訳系の精製再構成系を用いた翻訳終結の分子認識に関する結果を発表された。親泊さんは、腎臓がんに関与する特殊リボソームによる翻訳動態と、それが腫瘍に与える影響についての網羅的な解析について発表された。Judith Frydmanは、翻訳のポーズが加齢によって増加する現象を線虫や酵母の系で示された。

Session 2では、まず、遠藤先生は、酵母の Msp1 や Spf1 が、誤

局在した膜タンパク質を膜から引き抜くことで正しいオルガネラへと再局在させるという発見と、そこから導き出された、タンパク質局在化における校正機構という新たな概念について発表された。Manu Hegde (MRC) は、小胞体への分泌タンパク質のターゲティング経路において、小胞体膜で SRP と相互作用することでリボソーム-新生鎖複合体を受け取る新たな因子を同定し、その解析結果を発表された。Tom Rapoport (Harvard Medical School) は、これまであまり具体的な理解が進んでいなかったペルオキシソームへのタンパク質輸送の分子機構について、基質タンパク質が核膜孔のようなメッシュからなる孔を通してレセプタータンパク質とともに輸送されること、そのキャリアタンパク質が、ユビキチン化され、AAA ATPase により引っ張られて再びサイトゾルへと戻ることなど、斬新な結果を示された。藤木幸夫先生 (九大) は、カタラーゼの細胞質-ペルオキシソーム間のダイナミックな局在変化とそれを介した新たな酸化ストレス応答機構について話された。いずれも、新たなコンセプトを提唱するスケールの大きな仕事であった。セッション終了後、夕食と懇親会で初日の幕を閉じた。



写真 2：田口先生の冒頭挨拶



写真 3：初日の夕食の様子

DAY2

2 日目には、口頭発表の 4 つのセッションとポスター発表が行われた。Session 3 では、まず筆者 (千葉) が、バクテリアの翻訳アレスト因子を網羅的に同定する中で見えてきたアレスト機

構の普遍性と機能の多様性について発表した。次に、Alexander Mankin (University of Illinois, Chicago) が、バクテリアのリボソームトンネルに侵入して翻訳終結反応を停止する驚くべき抗菌ペプチドについての発表を行った。3 番目に、領域代表の田口さんが、大腸菌新規アレストペプチドの話や、翻訳中にリボソームのサブユニット間相互作用が不安定化する現象 (IRD)、さらには、IRD とリボソームスキッピングの関連などについて話された。新生鎖には「translation dynamics code」が内包されており、それを読み解くことが重要であるとのメッセージが印象的であった。

Session 4 では、まず、今回の国際会議の世話人である松本有樹修さんが登壇され、non-coding RNA として定義されるなどの理由でこれまで見過ごされてきた coding sequence (hidden CDS) の生理機能について発表された。個体レベルでの生理機能解析から、分子レベルでのメカニズム解析 (例えば、Non-AUG コドンからも翻訳が開始されることなど) にいたるまで、包括的な研究の一端を話された。次に、花田耕介先生 (九州工業大) は、シロイヌナズナのゲノムにコードされた de novo gene の網羅的探索とその機能解析について話された。3 番手として、山中伸弥先生 (京大) が登壇された。iPS 細胞の印象が強い山中さんであったが、翻訳開始に関与する因子の研究を中心に、ベーシックな翻訳研究についての最近の成果を発表された。研究室の多くの人が翻訳関連の仕事をしているとのことであった。技術的な限界により行き詰まっていた研究が、CRISPR-Cas システムの開発によって進展した話など、現場レベルでの話にも臨場感があり、親近感の湧く発表であった。

集合写真撮影とランチタイム終了後、ポスター発表が行われた。若手からシニアの研究者まで、全 62 題のポスターが発表され、活発な議論がなされた。ポスター発表は、3 日目の午後にも行われた。ポスター発表終了後の Session 5 では、まず、浅川和秀先生 (遺伝研) が、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関わる凝集性タンパク質である TDP-43 について、凝集に関与するドメインを光遺伝学という独自の手法を用いて決定される仕事を発表された。次に、田中元雅さん (理研) は、アミロイドの脱凝集における各シャペロンの役割についての最近の研究成果を発表された。3 番手の森戸大介さん (昭和大) は、もやもや病に関与する巨大タンパク質ミスチリンの生理機能と病態との関連について、最近の展開を踏まえて発表された。ミスチリンの本来の生理機能とその破綻による発症のメカニズムの理解が、ここに来て急激に進んできたようだ。

この日最後のセッションである Session 6 は、RAN 翻訳がテーマであり、筆者が座長を務めた。トップバッターの Laura Ranum (University of Florida) は、二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼが RAN 翻訳を制御すること、その酵素を阻害することで、

病態を改善出来ることを示された。また、RAN 翻訳産物に対する抗体も、症状を改善することを示した。2 番手の石黒亮先生（法政大）は、ALS の原因遺伝子の多くが RNA 結合タンパク質をコードしていること、それらが mRNA のグアニン四重鎖構造に結合することに着目し、自然界に存在するリチウムの 2 種類の安定同位体のグアニン四重鎖構造に与える影響の違いとその病態リスクに関する研究を発表された。3 番手の Peter Todd (University of Michigan School of Medicine) は、CGG リピートが原因となる RAN 翻訳の分子機構についての解析結果を報告された。このセッション最後の演者は永井義隆先生（近畿大）で、RAN 翻訳が引き起こす病態に影響を与える内因性因子を、疾患モデルショウジョウバエを用いて複数同定し、それぞれに異なるメカニズムで RAN 翻訳を抑制し症状を改善することを示す結果を発表された。本セッションからは、ノンコーディングリピート病の発症機構の理解とその治療に向けた基礎研究がリンクしながら急速に進んでいるという印象を受けた。

2 日目のディナーは屋外でのバーベキューであった。天気にも恵まれ、爽やかな気候の中、親睦を深めつつ、みなバーベキューを楽しんでいた。



写真 4：バーベキューの一幕。若い院生にとっては、他の大学の院生と交流する貴重な機会にもなった。

DAY3

3 日目は、午前中に口頭発表、午後からポスターセッション、その後、エクスカージョンという流れであった。密度の濃い国際会議で余裕のあるスケジュールは大変ありがたいと感じた。まず、この日最初のセッション (Session 7) では、元京産大タンパク質動態研所長の永田和宏先生（現 JST 生命誌館）が、ER のタンパク質やカルシウムの恒常性維持機構について話された。特に、最近発見された小胞体タンパク質 ERp18 が、亜鉛イオン依存的な機能変換によってカタラーゼ活性を獲得し、過酸化水素の除去を行うことで小胞体や細胞内環境の維持を行っていることなどを話された。2 番手の奥村正樹さん（東北大）は、カルシウムイオン依存的な液胞形成と、その小胞体プロテオスタシスにおける役割について話された。3 番手の稲葉謙次さん（九州大）は、小胞体とゴルジ体における亜鉛イオンの恒常性維持機構と、それぞれのオルガネラでの亜鉛イオン濃度の違いがタンパク質の局在

を制御するという斬新な研究成果を発表された。このセッションの最後の演者は、タンパク質動態研の招聘教授でもある Richard Morimoto (Northwestern University) で、加齢にしたがって熱ショックストレス応答が低下し、そのことが、プロテオスタシスの破綻を引き起こすとの研究成果を発表された。

コーヒープレイクを挟んで Session 8 が行われた。このセッションでは、独創的な技術開発を伴う研究が発表された。まず、小林穂高さん（徳島大）が、翻訳中のリボソームの一分子ライブイメージングと、それを利用した解析結果を紹介された。合成直後の mRNA よりも少し時間が経った後の mRNA のほうが翻訳が盛んに起こるとの予想外の結果を示された。2 番手の七野悠一さん（理研）は、近接分子特異的なピオチン化とリボソームプロファイリングを組み合わせた手法を開発し、細胞周期における局所翻訳の動的な挙動について最新の成果を発表された。松本雅記さん（新潟大）は、質量分析を駆使し、非典型的な翻訳により生み出されたタンパク質群の直接的な検出を試みた。その結果、アラニンの連続配列をコードした部位から非典型的な翻訳開始が起こることなど、新規の非典型翻訳現象を発見された。産物を直接見ることに強みを感じられる発表であった。このセッションの最後の演者、渡邊力也さん（理研）は、ナノポアデバイスを用いた一分子計測系を用い、高感度での酵素アッセイや短時間での診断を可能にする技術について紹介された。セッション全体として、クリエイティブな技術開発を伴う独創性の高い発表の連続であった。午前のセッション終了後、ランチタイム、2 回目のポスターセッションと続いた。ポスターセッションは、1 回目に劣らず盛り上がっていた。午後 3 時からはエクスカージョン（自由時間）であった。私は近くの水族館（マリンワールド）に遊びに行った（写真）。ホテルのプールで楽しんだ人達もいたようである。この日のディナーは、マリンワールドを貸し切って行われた。大きな水槽の前での立食パーティーは、ほとんどの参加者にとって経験がなく、海外からのゲストにも大変好評であった。学生・院生を対象とした優秀ポスター賞の受賞者の発表も行われた。このような場所での表彰ということも相まって、受賞者にとっては、特別な夜となったことだろう。本学博士過程の院生である堤智香さん（潮田研）も受賞者に選ばれたことを追記しておく。



写真 5：優秀発表賞を受賞した堤智香さんを囲んで

また、受賞しなかった学生・院生の皆さんも含め、ここに至るまでの努力とその成果に対し、心から祝福したい。

DAY4

さて、最終日である。午前中に2つのセッションが行われた。一つ目のセッション (Session 9) のトップバッターは三輪つくみさん (東京科学大) で、大腸菌の small heat shock protein である IbpA が熱ショックシグマ因子である $\sigma 32$ を翻訳レベルで制御するという、新たな熱ショックストレス応答の制御機構について話された。次に、齊尾智英さん (徳島大) が、大腸菌のシャペロンと基質タンパク質との局所的な親和性が基質分子全体のフォールディングにどのように貢献するのかを調べた結果を発表された。局所的な holding が分子全体の folding を促進するとの概念を提唱された。Johannes Buchner (Technical University Munich) は、ヒトのがん抑制遺伝子産物である p53 タンパク質の凝集を防ぐ機構として、small heat shock protein であるクラスタリンに着目し、クラスタリンが p53 に結合し、多様な non-native state に維持することで、Hsp70 による再生を促しているという話をされた。Session 9 最後の演者、塩田拓也さん (宮崎大) は、大腸菌外膜タンパク質のアセンブリにおいて、普段は必須でないと言われる BamC コンポーネントが、L-form (大腸菌がペプチドグリカン層を失った状態) になる条件下において必須となることを示した。

最後のセッションである Session 10 では、まず、太田元規先生 (名古屋大) が、複数の天然変性領域予測プログラムの比較解析の結果を発表された。特に、ホモログが多いものの予測は各プログラム間でより合致する傾向にあるが、ホモログの少ないものについてはバラツキが多く、このことが問題であるとのことであった。一方で、異なるプログラム間で予測が合致することが、必ずしも予測の正確さを保証していないとの議論もあり、印象的であった。このセッション2番目の演者である平山尚志郎さん (東大) は、ユビキチン化されたタンパク質の核外への輸送 (核内へのインポートを防ぐ) 機構について話された。特に、新規に合成されたタンパク質がユビキチン化を受けた場合にそれらを認識する C6orf106 の働きについて話された。最後に、体調不良でご欠席となった水島昇先生の代理で、助教の江口智也さん (東大) が登壇された。江口さんは、ATG101 の発現をリバーシブルに ON/OFF できるマウスを開発し、神経の機能維持におけるオートファジーの重要性について検討した結果を報告された。オートファジーをブロックしてしばらくすると神経系の破綻に伴う運動障害が現れるが、オートファジーを回復させることで運動障害が消失することを示された。一度発症した神経性の運動障害が回復するという結果は驚きであった。

田口さんの閉会の挨拶の前に、ゲストスピーカー数名からコメントをいただいた。中でも、Richard Morimoto は、このような国際会議が過去のタンパク質・シャペロン関連の特定領域や新学術

領域時代から日本において脈々と受け継がれ、発展してきているものであることをリマインドした上で、日本のタンパク質研究のコミュニティが達成してきた成果を賞賛された。また、Manu Hegde は、若手とシニア世代の研究者間で“phase separation”が見られたとの指摘をした上で、世代を超えた交流をより促進することが重要であるとコメントされた。

直前の台風の影響もあり、海外からのゲストスピーカーも含め、多くの方が、福岡にたどり着けるのかどうかヤキモキしたのと思われる。蓋を開けてみれば、海外からのゲストも無事福岡に到着し、また、会期中は天気にも恵まれ、素晴らしい国際会議となった。京産大・タンパク質動態研が、共催団体として、微力ながらもこの国際会議をサポートできたことは、所員として誇らしく思われたが、なによりも、この会議を大変素晴らしいものにしてくれた松本有樹修さんとその研究室のメンバーに、改めて感謝したい。

サテライトミーティング (バイオフィォラム・タンパク質動態研セミナー)

さて、大成功に終わったマルチファセットプロテインズの国際会議であったが、その終了翌日の9月6日 (金)、上記の国際会議に参加された海外の研究者のうち4名を京産大に招き、サテライトミーティングとして、バイオフィォラム兼タンパク質動態研セミナーを開催した。筆者が招待した Alexander Mankin、Nora Vázquez-Laslop (シカゴ大学イリノイ校)、遠藤先生が招待された Manu Hegde、Tom Rapoport の豪華な4名が、それぞれ講演された。Nora Vázquez-Laslop は、抗菌作用を持つ Lasso peptide の中では初となる、リボソームに作用する抗菌性 Lasso peptide についての話をされた。また、Alexander Mankin は、リボソーム工学の最新の研究内容について話された。Manu Hegde は、膜タンパク質の小胞体へのターゲティングに関与する新規因子についての発表をされ、Tom Rapoport は、ベルオキシソームへのタンパク質の局在化の分子機構について、マルチファセットプロテインズの国際会議で触れなかったデータも含め発表された。学内外から学生、研究者が約50名参加し、エキサイティングな最先端のサイエンスを堪能し、また、熱心な質疑応答がなされた。京産大の学生や若い研究者にとっても大きな刺激になったものと思われる。



写真6：Nora Vázquez-Laslop 博士の講演



写真 7 : Alexander Mankin 博士の講演

研究員 小野鈴花

台風一過の晴天のなか、学術変革領域研究 (A)「マルチファセット・プロテインズ」が主催する国際会議が九州・福岡で 2024 年 9 月 2 日から 5 日の 4 日間にかけて開催されました。予想外な台風の停滞と進路変更直前まで現地開催が危ぶまれましたが、大きなスケジュール変更もなく無事に顔を合わせて開会することが出来ました。海外からお越しいただいたゲストのみなさまも日本の台風シーズンの洗礼を受けて、口々に「無事に着けるか心配だった」「飛行機がすごく揺れて怖かった」と仰っていて、遠路はるばるお越しいただいたのに余計な心配をお掛けしてしまって申し訳なかったな…と思いました。学術変革領域研究 (A)「マルチファセット・プロテインズ」はタンパク質の謎を多面的な観点から解こうというモチベーションで集った研究者のグループで、みなさま独自の技術を以ってして「転写」から「翻訳」はもちろん、合成されたタンパク質の「分子動態」またそれらの「制御機構」について研究を繰り広げているため普段から幅の広い内容の会議が行われます（個人的な感想です）が、それに加えて今回の国際会議には Tom Rapoport 博士やノーベル賞を受賞された山中伸弥先生など海外と国内のトップランナーがゲストとして参加されるという国内外の権威が集結したとてもゴージャスな会議でした。私は日本で開催される国際会議に参加するのはこれが初めてでしたので、海外の先生に会いたいなら時間とお金をかけて海外に出向かないとお会い出来ないというなかで、日本に居ながらこれほどの先生方のお話を聞けるということはとても有難く喜ばしい機会でした。時差ボケを伴う遠距離移動もないため、とても良いコンディションでお話を拝聴することができました。日本の学会でも海外ゲストの先生のお話を伺う機会がありますが、こんなにたくさんのタンパク質研究に関わる先生方が一堂に集まることは極稀で、これもマルチファセット・プロテインズに集う先生方の国内にとどまらないコネクションの賜物と感謝しております。

今回の国際会議には口頭発表とポスター発表の演題があるなか

で、発表や質疑応答はすべて英語で行われました。私はポスター発表での参加でしたが、もう少し詳しく説明がしたかったな…いま何て言ってた…? など手こずりながら無事にプレゼンテーションとディスカッションを終えることが出来たように思います。



写真 8 : 会議の様子

現状、短く 3 文くらいに分けてでも言いたいことをちゃんと伝えるのが目標ですね。ただ、日本人に対しては日本語で話すという事態に陥っておりましたので、もっと厳しく日本人に対しても英語で発表を行うべきでしたし、質問も英語でするべきだったと反省しております。いま思うと、現地の言葉が飛び交う国際会議はあまりないのではないかとも思うのですが、いかがでしょうか？ポスター発表には学生限定で優秀賞が設けられていました。受賞者は、東京大学の元起寧那さん、京都産業大学の堤智香さん、名古屋大学の平田実奈さんの 3 名で全員が私のお知り合いという快挙にとてもうれしかったです。みなさん聡明で、言語の壁に動じることのないタフでチャーミングな研究者なので、今後の活躍がとても期待されます。基本的に口頭発表はゲストのみなさまとマルチファセット・プロテインズに所属する先生方がされていましたが、全体を通して世界的に求められている研究のクオリティとして、得られたデータや知見の「一般化（全体像）」と「メカニズムの解明（詳細）」が必要であることを痛感しました。まだ若輩者の駆け出しの研究者ではありますが、日本では獲得した研究費の成果としてどちらかという小さくコンスタントな結果が求められるように感じていて時間の制約が厳しいと思うのですが、でも海外のトップランナーはその一歩先まで踏み込んだ完成形に近い Nature・Cell・Science クラスの研究を行うんです。それは確かに計画力の違いかもしれませんが、研究費の問題かもしれませんが、食事を囲んで世間話をすれば学生指導の問題やスタッフの采配など抱えていることは私達とほぼ同じで、この埋まらない差は何だろうと考えさせられました。もちろん生化学や分子細胞生物学、構造生物学などそれぞれに得意なフィールドがあるなかで、必要なポイントをしっかりおさえた解像度の高い研究をいかに展開してゆくか、技術的にも経済的にも様々な点でまだまだやることは沢山あると身が引き締まる思いでした。また、研究の内容だけでなく、プレゼンテーションの仕様なども若手研究者

には良い勉強になりました。連日の会議に参加して、国内開催であるにも関わらず海外の国際学会に参加した時のような良い刺激を受けることが出来ましたので、今回の国際会議は大変盛況だったのではないかと思います。自身の研究についても、行き詰まっていたところに新たな観点からのコメントやアドバイスをいただいて収穫もありつつ、これから埋めていかなければいけない穴と自身の英語運用能力不足に猛省しながら学会特有の高揚感のなか閉会となりました。

翌日の9月6日にはTom Rapoport 博士とRamanujan Hegde 博士、また Alexander Mankin 博士と Nora Vázquez-Laslop 博士に京都産業大学までお越しいただき、バイオフィォーラムが開催されました。英語で行われる参加自由の講演会でしたが教室が埋まるほどの参加者に恵まれ、学生から教員まで活発なディスカッションが行われた良いセミナーでした。その後すぐに海外で開催された国際学会に参加する予定があったため気づいたことですが、ゲストのみなさまが比較的ゆっくりとプレゼンテーションされていて、日本の大学で開催されるセミナーに対するホスピタリティを感じました。学生の中に海外の国際学会に参加できるチャンスは限られていて、連れて行ってもらえるかどうかは所属する研究室や大学のシステムに依存すると思います。そのなかで、先日の国際会議もそうですが、海外からゲストを招待して国内にいなから国際学会と同様の経験をすることが出来るこのような機会を学生は是非もっと活用するべきではないかと思いました。聞いても分からないから参加しないではなくて、世界中で繰り広げられている学術研究の一端を知る機会を、研究室に配属された学生に限らず1回生でも2回生でも上手く活用してほしいなと思います。折角ならもっと広い会場で行った方が良かったでしょうか。国際会議も大人ばかりでしたが、バイオフィォーラムについても、もう少し学生の参加者がいると良かったです。所属する大学や組織、研究室によって出来る経験に差が出てきてしまうことも、今後の大きな課題だと思いました。ホスピタリティといえば、海外の学会では参加登録の際に必ず宗教的な理由や主義の観点から食事の種類についてのアンケートが実施されますが、今回は無かったねという指摘を海外ゲストの方からいただきました。その話から日本における宗教や食の多様性についての話に展開して、日本では食の選択がまだあまりメジャーではないというところに収まりましたが、確かに国際会議というからには意識していなければいけなかったポイントで、盲点でした。こんなところで国際性の低さが垣間見えてしまいましたが、もっと五輪開催くらいに気を遣ってゆかないといけませんね。このような国際性も、学生の頃から身につけられると良いのではないのでしょうか。今回の国際会議に参加して、個人的にはとてもグローバルな視点が刺激されたように思います。日本の学会と海外の学会でそれぞれに出会える人・聞ける話があるなかで、良いとこ取りの一週間でした。ひとまず英語をどうにかしないとダメですが…トップ

ランナーの研究者が備えている審美眼を目指して、頑張って磨いてゆきたいですね。国内開催での国際会議、大変身になる良い経験をさせていただきました。駆け出しの研究者として、世界的に及第点がいただける研究を展開してゆけるように精進してまい



りたいと思います。

写真9：バイオフィォーラム後の記念撮影

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）

動物発生学研究室（武田洋幸）

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

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ミトコンドリア外膜小分子輸送体ポリンの構造とアセンブリー構造形成の意義

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（ β バレル型膜タンパク質）が存在する。ポリン（酵母では Por1, ヒトでは VDAC）は小分子やイオンの輸送体であり、膜環境に再構成した単量体の精密構造は報告されているが、実際のミトコンドリア上の多量体の精密構造については不明であった。今回、酵母ミトコンドリアから精製した Por1 について、その精密構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析で決定した（分解能 3.2Å）。Por1 は 3 量体が二量体化した 6 量体構造をとっていた。このアセンブリー構造形成には Por1 単量体の小分子/イオン輸送以外の機能があるかどうかを検討するために、サブユニット間相互作用に関与する残基を置換した変異体について、機能解析を行った。その結果、(1) TOM 複合体のサブユニット Tom22 との相互作用ができなくなった Por1 変異体は TOM 複合体の 2 量体-3 量体平衡を 3 量体側に固定するため、2 量体特異的な基質のミトコンドリア内への取り込みに欠陥がでた。これまでは Por1 欠失株を用いて解析していたため、2 量体-3 量体平衡だけでなく小分子/イオン輸送への影響を排除できなかったが、今回の結果から、Por1 は Tom22 との結合を介して TOM 複合体の 2 量体-3 量体平衡を制御していることが明らかになった。(2) ERMES（ミトコンドリア-ER コンタクト）を介して ER からミトコンドリア外膜に入ってきたリン脂質は外膜の外層から内層に反転移動しなければならない。その経路として、外膜のポリンなどの 2 量体界面がはたらきうるという報告が最近出たので、6 量体構造についてサブユニット界面を脂質が反転移動するかどうか分子ダイナミクス計算で検討した。その結果、ポリンのサブユニット界面で効率よく脂質が反転移動しうることが分かった。(3) ポリンのサブユニット界面の残基の 1 つではミトコンドリア DNA (mtDNA) が失われて $\times 0$ 株になりやすいことが分かった。mtDNA を失う速度は細胞が増殖する速度よりも速いので、単に mtDNA の複製が阻害されて、増殖にともなって mtDNA が希釈されるのではない。さらに、この Por1 変異株において酵母のヌクレアーゼの欠失の影響を調べたところ、mtDNA の欠失を阻害するヌクレアーゼが 7 種類見つかった。これらのヌクレアーゼは Por1 変異体による mtDNA 喪失に関与すると考えられ、これまで全く不明であった mtDNA 喪失のメカニズム解明の突破口になるものと考えられる。

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。私たちの研究から、こうしたタンパク質の正しい細胞内局在には、オルガネラタンパク質に書き込まれた局在化シグナルに従う正確な輸送だけでなく、一定確率で起こりうる輸送のエラーを校正する「配送やり直し」機構が重要であることが分かってきた。ミトコンドリアに誤配送されたタンパク質は、酵母ミトコンドリア外膜の AAA-ATP アーゼの Msp1 が膜から引き抜き、これがサイトゾルの GET システムの助けにより ER に移行、ER で分解されるか配送をやり直すかが決まる (Matsumoto, Ono et al., JCB, 2022)。一方、酵母 ER 上の P-type ATP アーゼ Spf1 が欠損すると、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。様々なミトコンドリア外膜タンパク質について Spf1 欠損に伴う ER への誤局在の有無を調べたところ、ミトコンドリア上で複合体をつくるタンパク質は ER に誤局在しにくかったことから、複合体をつくらずにミトコンドリア外膜からサイトゾルに抜けやすいタンパク質が確率的に ER に誤局在することが考えられた。

一方で、新規合成された N アンカーミトコンドリア外膜タンパク質も、過剰発現すると Spf1 欠損株ではいったん ER に蓄積すること、蓄積した N アンカータンパク質は Spf1 を発現すると本来の目的地であるミトコンドリアに移行することが分かった。さらに Spf1 が存在する野生型株でも、新規合成直後に N アンカーミトコンドリア外膜タンパク質の一部は ER に移行し、それが次にミトコンドリアに移行することがわかった。このことからミトコンドリア外膜へのタンパク質局在経路の流量には制限があり、経路をオーバーフローしたタンパク質は ER にいったん移行してからミトコンドリアに移行することが考えられた。いったんミトコンドリアに移行した外膜タンパク質と新規合成直後の外膜タンパク質では、ER への誤局在の機構が異なるのかどうか、誤局在に関する因子は何か、については検討中である。また Spf1 によって引き抜かれた ER 上の誤局在ミトコンドリアタンパク質はどのような因子の助けでミトコンドリアに移行するのかなども検討中の課題である。

3. Research projects and annual reports

This year's accomplishments

Structure and functions of the assembled porin in the mitochondrial outer membrane. 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 (OM) houses membrane proteins characterized by barrel-like structures, known as β -barrel membrane proteins. These proteins, such as porins and Tom40, play crucial roles in facilitating the passage of small molecules and proteins, respectively, across the OM, thereby contributing to mitochondrial functions. Porins (Por1 in yeast and VDAC in humans) are most abundant OM transporters for small molecules and ions across the mitochondrial OM. While the high-resolution structures of monomeric VDAC reconstituted in membrane environments have been reported, that of assembled porin in intact mitochondria remained unknown. This time, we determined the high-resolution structure of Por1 purified from yeast mitochondria using cryo-electron microscopy (EM) single-particle analysis (at a resolution of 3.2Å). Por1 formed a homo-hexamers composed of trimeric dimers. To ask if assembled Por1 has functions other than small molecule/ion transport through its β -barrel pore, we made mutants with substitution of the residues involved in inter-subunit interactions and analyzed their functional consequences.

The results showed: (1) A Por1 mutant defective in its interaction with the TOM subunit Tom22, stabilized the TOM trimer in its dimer-trimer conversion, thereby leading to defects in the import of dimer-specific substrate proteins into mitochondria. Although our previous analyses using the Por1

deletion mutant could not exclude the secondary effect arising from the defects in small molecule/ion transport (Sakaue et al., Mol. Cell 2019), the present results revealed that Por1 regulates the dimer-trimer conversion through its binding to free Tom22 transiently dissociated from the TOM. (2) Phospholipids transported to the OM should move from the outer leaflet to the inner leaflet of the OM by flip-flop diffusion. Since a recent report suggested that the dimer interface of porin could serve as this pathway, we performed molecular dynamics simulations to examine whether lipids could flip at the subunit interfaces of the Por1 hexamer. The results indicated that lipids could efficiently flip at the subunit interfaces of Por1. (3) Mutation of a residue at the subunit interface of Por1 made cells prone to losing mitochondrial DNA (mtDNA), resulting in a $\square 0$ strain. Since the mutant strain loses mtDNA faster than the rate of cell growth, this mtDNA loss is not merely due to the inhibition of mtDNA replication and its subsequent dilution through cell division. In addition, examining the impact of nuclease deletions in this Por1 mutant strain allowed us to identify seven nucleases on yeast that inhibited the mtDNA loss. These nucleases could be involved in the mtDNA loss caused by the Por1 mutant, providing a breakthrough in uncovering the long-sought mechanism behind the mtDNA loss. Molecular mechanism of re-transport of mislocalized organelle proteins. For organelles in eukaryotic cells to function properly, proteins responsible for their functions must be correctly delivered to the correct organelles. We have revealed that, in addition to the precise targeting of organelle proteins directed by their encrypted targeting signals, re-transport or proofreading of the transport errors, which could occur with a certain probability, is crucial for proper intracellular protein distribution among different organelles.

When tail-anchor (TA) proteins are mislocalized to mitochondria, the AAA-ATPase Msp1 in the OM extracts them. The extracted proteins are then transferred to the ER with the aid of the cytosolic GET system, where they are subjected to the decision of whether they will be degraded or re-transported (Matsumoto, Ono et al., JCB, 2022). In turn, we found that defects in the P-type ATPase Spf1 in the ER membrane leads to mislocalization of TA proteins and some N-anchor proteins of mitochondrial OM to the ER. Furthermore, when the expression of mislocalized proteins is turned off and the expression of Spf1 is induced, the mislocalized OM proteins decrease in the ER, restoring their localization to mitochondria. Besides, analyses of various mitochondrial OM proteins revealed that proteins forming complexes on mitochondria are less likely to be mislocalized to the ER. This suggests that proteins not forming complexes can be more efficiently extracted from the OM to the cytosol, resulting in more efficient mislocalization to the ER. In addition, newly synthesized N-anchor mitochondrial OM proteins also accumulate in the ER when overexpressed in Spf1-deficient strains. However again, when Spf1 is expressed, these accumulated N-anchor proteins relocate to their intended destination, mitochondria. Even in wild-type strains with Spf1, some newly synthesized N-anchor OM proteins initially move to the ER before shifting to mitochondria. This indicates the limitation of the flux to the mitochondrial OM, causing overflowed proteins to transiently move to the ER before relocating to mitochondria.

We are currently investigating whether the mechanism of ER mislocalization differs between proteins initially transported to the mitochondrial OM and newly synthesized OM proteins, and identifying the factors involved in this mislocalization. Additionally, we are exploring which factors assist the Spf1-extracted mislocalized mitochondrial proteins on the ER to mitochondria.

4. 論文, 著書など 原著論文

Shiino H, Tashiro S, Hashimoto M, Sakata Y, Hosoya T, Endo T, Kojima H, Tamura Y, Chemical inhibition of phosphatidylcholine biogenesis reveals its role in mitochondrial division. *iScience* 27(3) 109189-109189 (2023).

Genge MG, Roy Chowdhury S, Dohnálek V, Yunoki K, Hirashima T, Endo T, Doležal P, Mokranjac D, Two domains of Tim50 coordinate translocation of proteins across the two mitochondrial membranes. *Sci Alliance*. 6(12):e202302122 (2023).

Akabane S, Watanabe K, Kosako H, Yamashita SI, 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).

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

5. 学会発表など

(招待講演)

松本竣介, 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送機構、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

(招待講演)

Toshiya Endo, Machineries that mediate and regulate mitochondrial protein trafficking. SFD International Conference, Waikiki, Hawaii, USA, 2023.9.26-29、国外、口頭

Toshiya Endo, Making of mitochondria from proteins and lipids. Walter Neupert Lecture, Munich, Germany, 2023.10.10、国外、口頭

Toshiya Endo, Machineries and pathways of mitochondrial protein and lipid trafficking, Seminar at University of Freiburg, Freiburg, Germany, 2023.10.13、国外、口頭

Toshiya Endo, Machineries and pathways of mitochondrial protein and lipid trafficking. Seminar at University of Tuebingen, Tuebingen, Germany, 2023.10.16、国外、口頭

遠藤斗志也、オルガネラ膜タンパク質局在化の新原理 (シンポジウム「オルガネラ・ライフ・サイクル」) 第 96 回日本生化学会大会、2023.10.31-11.2、国内、口頭

赤羽しおり, 遠藤斗志也, 岡敏彦, 障害ミトコンドリアにおける TIM23 を介した新たな PINK1 活性化機構 (シンポジウム「ミトコンドリア機能の強靱化」~そのメカニズムと介入操作), 第 96 回日本生化学会大会, 2023.10.31-11.2, 国内, 口頭

小野鈴花, 松本俊介, 遠藤斗志也, オルガネラ膜における ATPase を介した膜タンパク質の局在制御機構 (シンポジウム「ミトコンドリア研究の新たな視点 -1 分子動態から多細胞相互作用まで」), 第 46 回日本分子生物学会年会, 2023.12.6-12.8, 国内, 口頭

(一般発表)

小野鈴花, 松本俊介, 遠藤斗志也, ATPase を介したミトコンドリア-ER における膜タンパク質の再配送機構, 第 69 回生化学会近畿支部例会, 京都, 2023.5.17, 国内, 口頭

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 の細胞内局在における C 末端疎水性領域の役割 (ポスター発表) 第 75 回細胞生物学会大会, 奈良, 2023.6.28-30, 国内, ポスター

稲本大輝, 沼田倫征, 遠藤斗志也, 松本俊介, ミトコンドリア外膜上の品質管理に関わる AAA-ATPアーゼ Msp1 の機能構造解析, 第 96 回日本生化学会大会, 福岡, 2023.10.31-11.2, 国内, 口頭+ポスター

小暮佳希, 小野鈴花, 岡田悟, 沼田倫征, 遠藤斗志也, 松本俊介, オーキシングロン法を用いた出芽酵母におけるペルオキシソーム膜タンパク質の局在解析, 第 96 回日本生化学会大会, 福岡, 2023.10.31-11.2, 国内, ポスター

平嶋孝志, 齊藤知加, 河野 慎, 遠藤斗志也, 人工テザリングタンパク質による酵母小胞体-ミトコンドリア間コンタクトサイトの機能的相補, 第 96 回日本生化学会大会, 福岡, 2023.10.31-11.2, 国内, ポスター

後藤千穂, 篠田沙緒里, 阪上春花, 張春明, 遠藤斗志也, ミトコンドリアの外膜タンパク質ポリンを介した mtDNA 維持機構の解析, 第 96 回日本生化学会大会, 福岡, 2023.10.31-11.2, 国内, ポスター

小林菜々子, 九笹加菜, Romain Amyot, 今井大達, 川合志朋, 今井湧太, 稲津明広, 今井賢一郎, 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 複合体の一分子動態解析, 第 46 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2023.12.6-12.8, 国内, ポスター

椎野浩也, 橋本美智子, 細谷孝充, 遠藤斗志也, 小島宏達, 田村康, ホスファチジルコリン合成阻害剤 PCiB の単離とミトコンドリア分裂への影響, 第 31 回山形分子生物学セミナー, 山形, 2023.11.11, 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・若手研究

課題名: ミトコンドリアに輸送される新奇核コード RNA の網羅的検索

研究代表者: 篠田沙緒里, 取得年度: 2022-2023 年度 (2 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名：小胞体-ミトコンドリア間コンタクト部位を介した脂質輸送の生理的意義

研究代表者：平嶋 孝志，取得年度：2023-2025 年度（3 年）

2) 知財権等 なし

3) 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

篠田沙緒里：【北鎌倉女子学園高等学校 高校 1, 2 年生向けラボツアー】

実施日時：2023 年 4 月 2 日 10:30~15:00

場所：日本科学未来館 遠藤プロジェクト研究室，3 階ハブスペース

内容：北鎌倉女子学園高等学校 高校 1, 2 年生 10 名に対し，研究内容の紹介，研究室ツアー，事前に受け付けた質問の回答を合わせた対談を行う予定。研究室ツアーではミトコンドリアを染色した生きた状態のヒト培養細胞を蛍光顕微鏡を使って実際に観察してもらった。

篠田沙緒里，張春明，技術補佐員 2 名，学生 2 名：【ミトコンドリアクエスト】

実施日時：2023 年 9 月 9 日

場所：日本科学未来館 遠藤プロジェクト研究室，3 階ハブスペース

内容：一般来館者向けに当研究室の研究対象であるミトコンドリアをテーマに，生物学を身近に感じてもらうためのイベントを開催した。3 階ハブスペースでは酵母の顕微鏡観察や知育エリア，書籍の展示などの体験企画を中心として，クイズワークを行った。事前申込者はラボツアーに参加し，研究室内の機器等を見学した。

張春明，草野清輔：【鹿児島県立甲南高等学校向けラボツアー】

実施日時：2022 年 12 月 6 日 13:30-14:30

場所：日本科学未来館 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。それぞれの研究材料および成果について実体験をしてもらうべく，2 つのツアーを実施した。

篠田沙緒里：【防府市青少年科学館（山口県）中学生，教育委員会のラボツアー】

場所：日本科学未来館 遠藤プロジェクト研究室

内容：防府市青少年科学館が主催する中学生向け科学コンテストの最優秀者 ※副賞として、東京都内の科学系博物館を 2 泊 3 日で巡る「科学の旅」の一環で日本科学未来館来館。研究内容の紹介，研究室ツアー，事前に受け付けた質問の回答を合わせた対談を行う予定。研究室ツアーではミトコンドリアを染色した生きた状態のヒト培養細胞を蛍光顕微鏡を使って実際に観察してもらった。

篠田沙緒里，張春明，技術補佐員 2 名，学生 2 名：【ミトコンドリアクエスト】

実施日時：2024 年 2 月 24 日

場所：日本科学未来館 遠藤プロジェクト研究室，3 階ハブスペース

内容：一般来館者向けに当研究室の研究対象であるミトコンドリアをテーマに，生物学を身近に感じてもらうためのイベントを開催した。3 階ハブスペースでは酵母の顕微鏡観察や知育エリア，書籍の展示などの体験企画を中心として，クイズワークを行った。事前申込者はラボツアーに参加し，研究室内の機器等を見学した。今回新たに 3 階のハブスペースではアガロースゲルにサンプルを打ち込む体験コーナーを作った。

4) 受賞等

遠藤斗志也：2023 年 10 月 Walter Neupert Lecturer (Neupert Stiftung)

受賞事由 Molecular mechanisms of mitochondria biogenesis

遠藤斗志也：2023年7月 日本蛋白質科学会名誉会員

後藤千穂（M2）：2023年11月12日 第1回細胞生物コロキウム（東大） 優秀ポスター賞

5) その他 なし



R5年9月 研究室(+関連研究者)のリトリート「オルガネラ研究会」(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 (プロテオスタシス)**」、「**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) プロテオスタシス破綻に伴う老化・疾患メカニズムの解明

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

2. 本年度の研究成果

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

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。小胞体は酸化的フォールディングの場であり、

そのレドックス環境はサイトゾルと比較し、酸化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)。

今回、小胞体カルシウムイオンチャネル IP3 受容体の制御因子の探索のため、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9

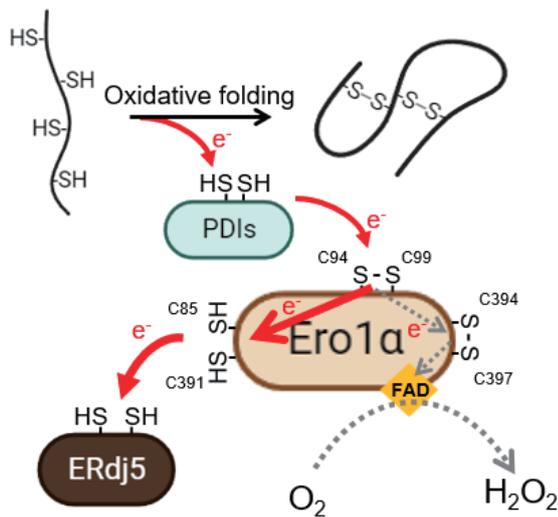


図 1. 酸化酵素 Ero1 を介した還元酵素 ERdj5 への電子伝達

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作製し、IP3 受容体を介した Ca²⁺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 Ca²⁺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 Ca²⁺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 (S. Fujii et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2023)。また、ERdj5 が酸化的な環境とされる小胞体でどのようにその還元力を得るのかを明らかにした。ERdj5 は酸化酵素 Ero1 と結合し、酸化的フォールディングによって Ero1 が受け取った電子を ERdj5 の還元力として供給していることを証明した (図 1. K. Uegaki et al., *Cell Rep.*, 2023)。

さらに我々は、硫黄原子を介して小胞体還元酵素 ERp18 が亜鉛イオンと結合することを見出した。小胞体内腔の亜鉛イオンの役割は不明な点が多いのが現状であったが、ERp18 は亜鉛イオンと結合することで過酸化水素の分解活性を持つことを明らかにした。ERp18 による小胞体の過酸化水素分解活性は、小胞体からサイトゾルへの過酸化水素の漏洩を防ぎ、酸化ストレスを低減することで細胞および個体の老化に影響を与えることがわかった (C. Tsutsumi et al., *Cell Rep.*, 2024)。

3. Research projects and annual reports

We focused our research on productive folding of nascent polypeptides by molecular chaperones and protein quality control mechanisms for misfolded proteins within cells. Specifically, we have devoted our activity to the following two major research projects:

Maintenance of ER homeostasis through crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and Ca²⁺ flux. We identified ERdj5 as a disulfide reductase in the endoplasmic reticulum (ER). ERdj5 forms a supramolecular complex with EDEM and BiP and activates the degradation of misfolded proteins 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 ERAD(R. Ushioda et al., **Science** 2008; M. Hagiwara et al. **Mol. Cell** 2011; R.Ushioda et al. **Mol. Biol. Cell** 2013).

We found that ERdj5 cleaves the disulfide bond of SERCA2b, a Ca²⁺ pump in the ER membrane, and regulates its function. Additionally, ERdj5 senses the Ca²⁺ concentration in the ER and regulates its interaction with SERCA2b. This suggests that the redox activity of ERdj5 is involved not only in protein quality control but also in Ca²⁺ homeostasis in the ER (R. Ushioda et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2016).

Here, we focused on controlling the Ca²⁺ pump and channel via redox regulation in the ER. Here, we obtained structural information on SERCA2b to understand how ERdj5 promotes the influx of Ca²⁺ by SERCA2b. We found that ERdj5 affects the Ca²⁺ release activity of IP3R (S. Fujii et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2023) . Additionally, we found that ERdj5 deficiency caused mitochondrial fragmentation due to Ca²⁺ homeostatic disruption (R. Yaamashita et al., **Sci. Rep.** 2021) . Redox regulation by ERdj5 is involved in the uptake and release of calcium ions in the ER.

We elucidated how ERdj5 obtains electrons for its reductase activity in the oxidative environment of the endoplasmic reticulum (ER). It has been demonstrated that ERdj5 binds to the oxidative enzyme Ero1 and utilizes the electrons transferred to Ero1 through oxidative folding to supply the electrons (**Figure 1**, K. Uegaki et al., **Cell Reports**, 2023).

Moreover, we discovered that ER reductase ERp18 binds to zinc ions via sulfur atoms. While the role of zinc ions within the ER lumen remains largely unclear, our findings reveal that ERp18 acquires hydrogen peroxide decomposition activity upon binding to zinc ions. The hydrogen peroxide decomposition activity of ERp18 in the ER prevents the leakage of hydrogen peroxide into the cytosol, thereby reducing oxidative stress and influencing cellular and organismal aging (C. Tsutsumi et al., **Cell Reports**, 2024).

4. 論文, 著書など

原著論文

Chika Tsutsumi, Kaiku Uegaki, Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda*, Kazuhiro Nagata*: Zn²⁺-dependent functional switching of ERp18, an ER-resident thioredoxin-like protein, **Cell Reports**, 43(2), 113682 (2024)

Jaroslawn Marszalek, Ryo Ushioda, Harm H. Kampinga* et al.: J-domain proteins: From molecular mechanisms to diseases, **Cell Stress and Chaperones**, 29(1), 21-33 (2024)

S. Iwamoto, T. Kobayashi, H. Hanamatsu, I. Yokota, Y. Teranishi, A. Iwamoto, M. Kitagawa, S. Ashida, A. Sakurai, S. Matsuo, Y. Myokan, A. Sugimoto, R. Ushioda, K. Nagata, N. Gotoh, K. Nakajima, T. Nishikaze, J. Furukawa, N. Itano*: Tolerable glycometabolic stress boosts cancer cell resilience through altered N-glycosylation and Notch signaling activation, **Cell Death & Disease**, 15, 53 (2024)

Xiaohan Cai, Shogo Ito, Kentaro Noi, Michio Inoue, Ryo Ushioda, Yukinari Kato, Kazuhiro Nagata, Kenji Inaba*: Mechanistic characterization of disulfide bond reduction of an ERAD substrate mediated by cooperation between ERdj5 and BiP. **The Journal of biological chemistry**, 299(11), 105274 (2023)

Kaiku Uegaki, Yuji Tokunaga, Michio Inoue, Seiji Takashima, Kenji Inaba, Koh Takeuchi, Ryo Ushioda*, Kazuhiro Nagata*: The oxidative folding of nascent polypeptides provides electrons for reductive reactions in the ER, **Cell Reports**, 42(7), 112742 (2023)

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**. 120(22), e2216857120 (2023)

5. 学会発表など

- 潮田亮：オルガネラ環境に応じたタンパク質フォールディング、令和5年度AMED-CREST/PRIME「プロテオスタシス」領域会議、東京都、2024.2.7-9（口頭）
- 杉澤亜美、上田汐莉、潮田亮：液-液相分離によって形成される新たな小胞体タンパク質品質管理プラットフォーム、第46回日本分子生物学会年会、兵庫県、2023.12.6-8（ポスター）
- 潮田亮、上垣日育、永田和宏：硫黄修飾が織りなす新たな電子伝達とオルガネラ恒常性維持、第46回日本分子生物学会年会、兵庫県、2023.12.6-8（ポスター・口頭）
- 堤智香、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46回日本分子生物学会年会、兵庫県、2023.12.6-8（口頭）
- 潮田亮：レドックス制御に基づく小胞体恒常性維持機構～還元反応の場としての小胞体～、第4回皮膚科基礎研究セミナー、茨城県、2023.12.5（招待講演）
- 杉山誉人、佐々木克仁、信田理沙、梅澤啓太郎、三浦ゆり、潮田亮、乃村俊史：病原性変異型SERPINB7の細胞外分泌不全が長島型掌蹠角化症を引き起こす、第96回日本生化学会大会、福岡県、2023.10.31-11.2（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活性化機構の解明、第96回日本生化学会大会、福岡県、2023.10.31-11.2（ポスター）
- 潮田亮：小胞体プロテオスタシスを支える環境基盤、第96回日本生化学会大会、福岡県、2023.10.31-11.2（口頭）
- 葛西綾乃、伊藤進也、潮田亮、永田和宏：YAP/TEADを介した負荷依存的なコラーゲン特異的分子シャペロンHsp47の発現調節機構の解明、第96回日本生化学会大会、福岡県、2023.10.31-11.2（ポスター）
- 堤智香、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16回小胞体ストレス研究会、石川県、2023.9.29-30（口頭）
- 坂本龍太、堤智香、田原諒佑、永田和宏、潮田亮：酸化的フォールディング環境を創る、細胞を創る会Ver16、東京都、2023.9.25-26（ポスター）
- 坂本龍太、堤智香、田原諒佑、永田和宏、潮田亮：Reconstitution of ER glutathione transport system、第3回学術変革領域(A)「硫黄生物学」領域班会議、熊本県、2023.9.16-18（ポスター）
- 杉澤亜美、上田汐莉、潮田亮：Novel platform of Protein Quality Control formed by liquid-liquid phase separation in the ER、第3回学術変革領域(A)「硫黄生物学」領域班会議、熊本県、2023.9.16-18（ポスター）
- 潮田亮：Super-sulfur as electron media for Protein Quality Control、第3回学術変革領域(A)「硫黄生物学」領域班会議、熊本県、2023.9.16-18（口頭）
- 潮田亮：レドックス制御に基づく小胞体恒常性維持機構～還元反応の場としての小胞体～、Diabetes Forum 2023、石川県、2023.8.30（招待講演）
- 潮田亮：レドックス制御を介した小胞体恒常性維持機構～そしてその破綻～、金沢大学医学部 大学院セミナー、石川県、2023.8.30（招待講演）
- 葛西綾乃、伊藤進也、潮田亮、永田和宏：YAP/TEADを介した負荷依存的なコラーゲン特異的分子シャペロンHsp47の発現調節機構の解明、第30回次世代医工学研究会、兵庫県、2023.7.6-7（口頭）
- 潮田亮：小胞体というオルガネラ環境は、どのように維持されるのか、第30回次世代医工学研究会、兵庫県、2023.7.6-7（口頭）
- 葛西綾乃、伊藤進也、潮田亮、永田和宏：YAP/TEADを介した負荷依存的なコラーゲン特異的分子シャペロンHsp47の発現調節機構の解明、第75回日本細胞生物学会大会、奈良県、2023.6.28-30（ポスター）
- 藤井唱平、潮田亮、永田和宏：カルシウムイオンチャネルIP3Rは小胞体レドックスによって自律的に制御される、第75回日本細胞生物学会大会、奈良県、2023.6.28-30（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(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：2022-2023 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：2023 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

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：神戸市立葺合高等学校：模擬授業「生命を「カタチ」づくるもの」

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」

4) 受賞歴

和田 匠太：2023 博士キャリアメッセ KYOTO 第二部 Murata Manufacturing Award 受賞

潮田研ホームページ

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





写真 1: JDP ミーティング@Gdansk, Poland



写真 2 : 京都大学大学院理学研究科 森研究室と合宿



写真 3 : 京大大学生命科学研究科 井垣研究室とスポーツ大会



写真 4: 三大学合同セミナー（北村研（北大）、加藤研（阪大））@北海道大学



写真 5 集合写真 2023

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) 新規翻訳アレスト因子の同定と解析

翻訳アレスト因子は、翻訳途上鎖の状態では生理機能を発揮するユニークなタンパク質である。近年、当研究室では、真正細菌において過去に見出された翻訳アレスト因子に共通の特徴を手がかりとし、3万種以上のバクテリアゲノムを対象に、アレスト因子の網羅的探索を行った。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。その中には、RAPP や RGPP といったアミノ酸配列（RAPP 様モチーフ）を持つものが少なからず含まれていた。一方で、既知のアレスト因子と配列の類似性の全く見られないモチーフを含むものも見出された。今年度は、これらの因子の翻訳アレストの分子機構を解明するための手がかりを得るために、変異解析や生化学的解析を進め、アレスト位置の決定や重要な配列の同定などを行った。また、RAPP 様配列を含むタンパク質をモチーフ検索することで、新たなアレスト因子を同定した。これらの解析から、バクテリアは、翻訳アレストという共通の機構を利用しつつ、多様な細胞制御機構を実現している可能性が示唆されつつある。

(2) RAPP モチーフを含むアレスト因子 ApdA/ApdP のアレスト機構の解明

前述したとおり、近年当研究室で行われた網羅的スクリーニングから、多数のアレスト因子が同定されたが、その多くに共通のアミノ酸配列（RAPP 様モチーフ）が見出された。放線菌由来の ApdA、根粒菌由来の ApdP も、我々の初期のスクリーニングから同定されたアレストペプチドであり、アレストに必須の RAPP 配列を含む。これらのアレスト機構を理解するために、ハンブルク大学の Daniel Wilson 教授らと国際共同研究を行い、クライオ電子顕微鏡を用いた ApdA、ApdP のリボソーム複合体の構造決定並びに変異解析を行った。ApdA、ApdP は、それぞれ、枯草菌、大腸菌のリボソームとの複合体を解析したが、この両者の RAPP モチーフは、それぞれのリボソーム内で同一の立体構造を取ることが示唆された。さらに、この構造は、かつて伊藤維昭博士らが発見した SecM のものとも共通であることが明らかとなった。この一連の発見は、異なる細菌種が、共通の分子機構を介してアレストを起こす因子を進化の過程で独立に獲得したことを示唆しており、アレストモチーフの収斂進化が起こったことを示唆している。

3. Research projects and annual reports

Since our discovery of *Bacillus subtilis* MifM, which monitors the activity of the YidC-mediated membrane insertion pathway, we have been interested in and studying this class of proteins called 'regulatory nascent chains', which function while they are still in the midst of the process of biosynthesis on the ribosome. A remarkable property of this class of gene products is that they interact cotranslationally with components of the ribosome including those comprising the polypeptide exit tunnel, and thereby arrest their own translation elongation. The arrested state of translation elongation affects translation of the downstream target gene either positively (in the case of MifM) or negatively. Importantly, these regulatory nascent chains serve as a co-translational substrate of the protein localization pathway to be monitored, such that the arrest can be stabilized or canceled in response to changes in the effectiveness of the localization machinery under given conditions of the cell. Thus, these nascent chains represent unique biological sensors that enable real-time feedback regulation of the target machinery. In the MifM regulatory system, its translation arrest is released when the nascent MifM chain, as a monitoring substrate of YidC (the regulatory target), engages in the YidC-mediated insertion into the membrane. The regulated elongation arrest of MifM enables cells to maintain the capacity of membrane protein biogenesis. As introduced above, our interests are also focused more generally on the mechanisms of protein localization and biogenesis, the biological processes where nascent substrates undergo dynamic interactions with the machineries of translation, targeting and translocation. We envision that our research activities should ultimately lead to the development of a new research area that might be called "nascent chain biology", which aims at understanding the still hidden principle of the central dogma of gene expression, where nascent chains are likely to play key roles.

This year's accomplishments

1) Identification and Analysis of Novel Translation Arrest Factors

Translation arrest peptides are unique proteins that exert their physiological functions while in the state of a nascent polypeptide chain. In recent years, our laboratory has conducted a comprehensive search for arrest peptides across more than 30,000 bacterial genomes, using common features shared by previously identified translation arrest peptides in bacteria as clues. We then identified more than 10 genes that code for novel arrest peptides. Among these, several contained amino acid sequences with motifs similar to RAPP and RGPP (the RAPP-like motif). Meanwhile, we also identified those having motifs with no sequence similarity to known arrest peptides. Currently, to gain insights into the molecular mechanisms of translation arrest by these arrest peptides, we conducted mutational and biochemical analyses, determining arrest sites on mRNA and identifying critical sequences. Additionally, by searching for proteins containing RAPP-like sequences, we further identified novel arrest peptides. These studies suggest that bacteria might utilize a common mechanism of translation arrest to achieve diverse cellular regulation.

2) Analysis of the Arrest Mechanism of the RAPP Motif-Containing Arrest Peptides ApdA/ApdP

As mentioned above, recent comprehensive screenings conducted in our laboratory identified numerous arrest peptides, many of which shared a common amino acid sequence (RAPP-like motif). ApdA, derived from actinomycetes, and ApdP, derived from alphaproteobacteria, were also those identified in our initial screenings and contained the arrest-essential RAPP sequence. To understand the arrest mechanisms of these arrest peptides, we engaged in international collaboration with Prof. Daniel Wilson at the University of Hamburg. We determined the structure of the ribosome complexes with ApdA and ApdP using cryo-electron microscopy and conducted mutational analyses. The analyses

of ApdA and ApdP complexes with the ribosomes of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, respectively, suggested that the RAPP motifs in both arrest peptides adopt the same conformation within their respective ribosomes. Furthermore, it was revealed that this structure is also common with that of SecM, discovered previously by Koreaki Ito and colleagues. These studies suggest that different bacterial species have independently acquired arrest peptides that induce arrest through a common molecular mechanism during evolution, indicating the occurrence of convergent evolution of arrest motifs.

4. 論文, 著書など

原著論文

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.** 51, 4536–4554.

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.** 435, 168172.

Ugajin, N., Imami, K., Takada, H., Ishihama, Y., Chiba, S., Mishima, Y.: Znf598-mediated Rps10/eS10 ubiquitination contributes to the ribosome ubiquitination dynamics during zebrafish development. (2023) **RNA.** 29, 1910-1927.

Morici, M., Gabrielli, S., Fujiwara, K., Paternoga, H., Beckert, B., Bock, L. V., Chiba, S.#, Wilson, D. N.#: RAPP-containing arrest peptides induce translational stalling by short circuiting the ribosomal peptidyltransferase activity. (2024) **Nat Commun.** 15, 2432. (# corresponding authors)

Gersteuer, F.*, Morici, M.*, Gabrielli, S., Fujiwara, K., Safdari, H. A., Paternoga, H., Bock, L. V., Chiba, S., Wilson, D. N.: The SecM arrest peptide traps a pre-peptide bond formation state of the ribosome. (2024) **Nat Commun.** 15, 2431. (* contributed equally)

Fujiwara, K.#, Tsuji, N., Yoshida, M., Takada, H., Chiba, S.# (2024) Patchy and widespread distribution of bacterial translation arrest peptides associated with the protein localization machinery. **Nat Commun.** in press. (# corresponding authors)

5. 学会発表など

高田啓: 「微生物における翻訳研究の魅力と将来展望」 ノボザイムズジャパンセミナー, 2023.5.18, ノボザイムズジャパン株式会社 (招待講演)

千葉志信: 「グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明」 第17回発酵研究所助成研究報告会, 2023. 6. 9, 千里ライフサイエンスセンター (大阪)

千葉志信: 「機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構」 第4回マルチファセットプロテインズ領域会議, 2023. 6. 16, 東工大すずかけ台キャンパス

高田啓: 「微生物における翻訳研究の魅力と将来展望」 IAB セミナー, 2023.6.28, 慶応義塾大学生命先端研究所 (山形) (招待講演)

藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信: 「新規翻訳アレスト因子のバクテリアワイドな探索」 第19回21世紀大腸菌研究会, 2023. 6. 29-30, 湯野浜温泉 亀や

辻奈緒子、藤原圭吾、千葉志信: 「アルテロモナス属由来新規翻訳アレスト因子の下流遺伝子発現制御機構の解析」 第19回21世紀大腸菌研究会, 2023. 6. 29-30, 湯野浜温泉 亀や

吉田真悠、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「クロストリジウム綱に由来する新規翻訳アレスト因子の分子機構の解明」 第19回21世紀大腸菌研究会, 2023. 6. 29-30, 湯野浜温泉 亀や

千葉志信: 「翻訳アレストを利用した細胞の機能制御の分子機構 Mechanism of cellular regulation by translation arrest」 第23回日本蛋白質科学会年会, 2023. 7. 5-7, 名古屋国際会議場

藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信：「Bacteria-wide search for translational arrest peptides」 第 24 回日本 RNA 学会年会, 2023. 7. 5-7, 那覇文化芸術劇場なはーと

Tsuji Naoko, Fujiwara Keigo, Takada Hiraku, Chiba Shinobu: 「Identification of Novel Translation Arrest Peptides with RAPP and RGPP sequence Motifs」 第 24 回 日本 RNA 学会 年会, 2023. 7. 5-7, 那覇文化芸術劇場 なはーと

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・分野融合セミナー, 2023.7.11, 京都産業大学（京都）

高田啓, Helge Paternoga, 藤原圭吾, Esther Park, Jose Nakamoto, Allen R Buskirk, Gemma C Atkinson, Daniel N Wilson, Vasili Haurlyliuk, 千葉志信：「枯草菌における新規 RQC 関連因子の解析」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

藤原圭吾、辻奈緒子、吉田真悠、千葉志信：「タンパク質局在化装置に関連する翻訳アレスト因子のバクテリアワイドサーチ」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

赤岡大暉、高田啓、丹羽達也、田口英樹、千葉志信：「枯草菌における翻訳途上鎖依存的な翻訳途中終了現象の解析」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

吉田真悠、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：「クロストリジウム綱由来の新規アレスト因子の分子機構と下流遺伝子制御の解明」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：「配列モチーフの探索による新規アレスト因子の同定」 マルチファセットプロテインズ領域会議・第 2 回若手の会, 2023. 10. 23-24, 定山溪（札幌）

千葉志信：「機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構」 第 5 回マルチファセットプロテインズ領域会議, 2023. 10. 24-26, 定山溪（札幌）

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：「RAPP 様配列を含む新規翻訳アレスト因子の同定」 第 96 会日本生化学会大会, 2023. 10. 31-11.2, 福岡

Shinobu Chiba: 「Regulated translation arrest: a regulation mechanism of genes for bacterial protein localization machinery」 BACELL2023, 2023/11/20-23, 神戸商工会議所

千葉志信：「新生ポリペプチド鎖によるタンパク質バイオジェネシスのモニタリング」 新資源生物変換研究会, 45271, オンライン（招待講演）

千葉志信：「翻訳アレストを介した細胞の機能制御」 第 2 回タンパク質関連シンポジウム, 2024. 1. 24-25, 日本科学未来館（お台場）（招待講演）

Keigo Fujiwara: 「Bacterial domain-wide search for translation arrest peptides, and potential application in the research of protein biogenesis」 The 2166th NIG Biological Symposium, 2024. 1. 26, 国立遺伝学研究所（招待講演）

高田啓：「翻訳研究の魅力と将来展望：微生物はリボソームをどのようにハンドリングしているのか？」 第 18 回日本ゲノム微生物学会年会, 2024. 3. 12-14, かずさアカデミーホール

赤岡大暉、高田啓、藤原圭吾、千葉志信：「新規 uORF による枯草菌 Mg²⁺ transporter MgtE の発現制御機構の解析」 第 18 回日本ゲノム微生物学会年会, 2024. 3. 12-14, かずさアカデミーホール

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信：「海洋性バクテリア *Alteromonas macreodii* の多様な翻訳アレスト因子」 第 18 回日本ゲノム微生物学会年会, 2024. 3. 12-14, かずさアカデミーホール

高田啓：「微生物を対象とした翻訳研究の魅力と将来展望」 日本農芸化学会 2024 年度東京大会, 2024. 3. 26, 東京農業大学世田谷キャンパス

藤原圭吾：「細菌界横断的ゲノム解析から見る翻訳一時停止因子の共通性と多様性」 遺伝研研究会「微生物の細胞複製システムから紐解く生命のデザイン」, 2024. 3. 28-29, 国立遺伝学研究所（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）

科研費補助金・基盤研究（C）

課題名：ABC-F タンパク質ファミリーの機能から読み解く翻訳制御機構の新展開

研究代表者：高田啓、取得年度：R5-R7年（3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) アウトリーチ活動

高大接続授業（京都産業大学附属高等学校）（2023/11/10）

3) シンポジウム・セッションオーガナイザー

第23回日本蛋白質科学会年会, 2023. 7. 5-7, 名古屋国際会議場

4) 受賞

優秀発表賞（吉田真悠）：マルチファセットプロテインズ領域会議・第2回若手の会

優秀発表賞（赤岡大暉）：第18回日本ゲノム微生物学会年会

優秀発表賞（辻奈緒子）：第18回日本ゲノム微生物学会年会

研究奨励賞（高田啓）：第18回日本ゲノム微生物学会年会



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。

(3) リボソーム不活性化タンパク質の構造生物学: さまざまな植物にはリシン類似の蛋白質毒素が存在し、リボソームのリシンサルシループのアデニンを引き抜くことが知られている。当研究室の羽深は、白粉花の根由来の MAP が大腸菌のリボソームを不活性化することを見出している (Habuka et al, JMB 1991)。この構造を明らかにするため、最先端の構造生物学的方法で研究を進めている。具体的には MAP 単体の結晶構造解析、及びリボソームとの複合体のクライオ電子顕微鏡の構造解析を進めていく。また MAP はウイルスに対する抗ウイルス活性を持つことが知られている。この現象の解明を目指す。

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 膜孔の一つに結合する。最も重要なのは、この結合により、Ia の N 末端の α 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 ϕ クランプへと続いていた。このことから Ia の Ib 膜孔を介しての膜透過は N 末端から解けて行われると考えられる。また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)。近年日本で起きた食中毒で、ウェルシュ菌のエンテロトキシン (CPE) 欠損株の関与が疑われ、新規の食中毒毒素が見出された。この毒素は *Clostridium perfringens* iota-like toxin (CPIL) と命名された。CPIL は CPIL-a, CPIL-b の 2 つのコンポーネントからなる 2 成分毒素である。前述のイオタ毒素と比較しながら CPIL-b 膜孔調整と構造解析を始めた。面白いのは前述のイオタ毒素 Ib やデフィシル菌毒素 CDTb では最狭窄部位は Phe でできた ϕ クランプでできており、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、CPIL-b のクランプ最狭部位は 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。

(2) 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。我々の以外の研究でも、最近の研究では DNA の ADP リボシル化は脚光を浴びている。さらに蛤由来の DNA ADP リボシル化酵素 CAPR-1 の活性特異性と構造を明らかにするための研究を進めている。

(3) リボソーム不活性化タンパク質の構造生物学：さまざまな植物にはリシン類似の蛋白質毒素が存在し、リボソームのリシンサルシループのアデニンを特異的に引き抜くことが知られている。MAP 単体の結晶化に成功し、2.2 Å のデータを測定、解析を行った。さらにシンクロトロンでの測定を行い、高分解能での解析を目指す。また現在、大腸菌リボソームとの複合体のクライオ電子顕微鏡の構造解析を進めている。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our focus is macromolecular complexes, and we would like to reveal the interaction between the infectious factor protein and human protein. These basic researches are 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, last year, we reported binary CDT (CDTa and CDTb) toxin complex from the most clinically important bacterium *Clostridioides difficile* (formerly *Clostridium*) (*Nature communications*, 2022).

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.

(2) 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.

Recently, DNA ADP-ribosyltransferase including ScARP and pierisin are in the spot light. Now we are trying to reveal the function and structure of DNA ADP-ribosyltransferase, CAPR-1 from *Meretrix lamarckii*.

(3) We are studying the function and structure of *Mirabilis jalapa* antiviral protein (MAP). MAP is ribosome inactivating protein, which deactivate *E. coli* ribosome. We try to solve the structure of MAP by

crystallography and also reveal the complex structure with E.coli ribosome by cryo-EM. Furthermore, MAP has anti-viral activity., but the molecular mechanism is open question. We are also interested in the anti-viral activity of MAP.

4. 論文, 著書など

Sven Falke, Julia Lieske, Alexander Herrmann, Jure Loboda, Katarina Karničar, Sebastian Günther, Patrick Y.A. Reinke, Wiebke Ewert, Aleksandra Usenik, Nataša Lindič, Andreja Sekirnik, Klemen Dretnik, Hideaki Tsuge, Vito Turk, Henry N. Chapman, Winfried Hinrichs, Gregor Ebert, Dušan Turk, Alke Meents (2024) Structural elucidation and antiviral activity of covalent cathepsin L inhibitors
Journal of Medicinal Chemistry
2024, 67, 9, 7048–7067 (査読あり)

津下英明

細菌ADPリボシル化酵素の基質認識機構とその細胞膜透過に関する研究
ビタミン 2023 Vol9,12,540-551

5. 学会発表など

- 1) 津下英明 “二成分毒素：ADP リボシル化酵素成分の基質認識機構と細胞膜透過機構について”
日本環境変異原ゲノム学会 シンポジウム「有毒生物と遺伝子変異」、東京、2023.6.3 (招待講演)
- 2) 津下英明 “細菌 ADP リボシル化酵素の基質認識機構とその細胞膜透過に関する研究”
第 75 回日本ビタミン学会、仙台、2023.6.17-18 (招待講演)
- 3) 三谷優季、津下英明 “ウェルシュ菌イオタ毒素 Ib serine-clamp 変異体の単粒子構造解析及び活性測定”
蛋白質科学会 名古屋、2023.7.5-8 ポスター発表
- 4) 吉田徹、門間千枝、滝口創太郎、藤田祥子、内田悠斗、山田等仁、川野竜司、津下英明 “二成分毒素 CPILeB のセリンで形成された膜貫通孔” 第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 口頭発表
- 5) 迫田憲亮、山田等仁、津下英明 “ウェルシュ菌イオタ毒素の膜透過機構の研究” ポスター発表
第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8
- 6) 西田和哉、山田等仁、津下英明 “スクミリングガイの膜孔形成毒素、PcPv-2 オリゴマー構造の撮影の試み”
第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 ポスター発表
- 7) 羽深典之、津下英明 “Ribosome -Inactivating Protein のリボソーム特異性と抗ウイルス活性に関する研究”
第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 ポスター発表
- 8) 三谷優季、川野竜司、滝口創太郎、津下英明 “電気生理による二成分毒素のポアシグナル測定”
第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 ポスター発表
- 9) 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から見えてきたウェルシュ菌イオタ毒素の膜孔形成機構” 第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 口頭発表
- 10) 津下英明 “スクミリングガイ (Pomacea canaliculata) 卵塊のタンパク質の物性”
第 473 回ビタミン B 研究協議会、京都 楽友会館、2023.11.10 口頭発表
- 11) Yuki Mitani, Sotaro Takiguchi, Ryuji Kawano, Hideaki Tsuge “Construction of a membrane translocation assay system for C. difficile binary toxin by electrophysiological technique” 日本生物物理学会、名古屋、2023.11.14-16 ポスター発表

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究（B） 21H02452

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

科学研究費補助金・挑戦的研究（萌芽） 23K18011

課題名：リボソーム不活性化タンパクとリボソームのクライオ電子顕微鏡による丸ごと複合体解析

研究代表者：津下英明 取得年:2023~2024

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

第 75 回日本ビタミン学会 学会賞

「細菌 ADP リボシル化酵素の基質認識機構とその細胞膜透過に関する研究」

津下英明



2023 年度 卒業式で



第 69 回トキシシンポジウム
京都産業大学むすびわざ館で開催

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) FoF1-ATPase の ATP 駆動性回転のスナップショット解析

クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析によって、ATP 合成酵素 FoF1 の 18 個の回転中の中間体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単粒子解析は、反応中で複数の構造が混在したサンプルであってもクラス分けによって同時に構造決定することが可能である。低い ATP 濃度で反応させることで、ATP 結合前構造を、高い ATP 濃度で反応させることで、ATP の加水分解、分解物の ADP と P_i の放出に関する対応する構造の分離を試みた。クラス分けを工夫することで、従来明らかにされていなかった γ サブユニットのより細かい回転角度を示す F1 部分の構造を複数分離することに成功した。その結果、 360° 回転中の 18 種類の構造を得ることができた(図 1)。ATP の加水分解サイクルに対応した構造だけでなく、反応過程とは対応しない複数の構造も明らかになった。得られた構造から以下のことが示唆された。ATP 濃度が高い条件では、すべての構造において E site に ATP が結合しており、このことは、ATP の濃度が高い条件では、どの回転角度に対応した F1 部分の E site に対しても ATP が結合できることを示す(図 2)。また高 ATP 濃度条件では、すべての触媒サイトに ATP もしくは ADP が結合していることから、新たに ATP が結合することができず、そのため結合した ATP により 80° 回転が起こることがわかった。 80° 回転待ち構造 (これを 0° 構造と呼ぶ) に対して、 γ サブユニットの回転角度が 81° の構造が得られたが、D site には ATP が結合しており、一方 γ の回転角度が 83° の構造の D site では、ADP と P_i が結合していた。このことから、 $81^\circ \rightarrow 83^\circ$ の構造変化の過程で D site の ATP が加水分解されることがわかる。 γ サブユニットの回転角度が 91° の構造では、E site にリン酸と ATP が結合していたが、 γ サブユニットの回転角度が 101° の構造の E site にはリン酸が結合していなかった。このことは $91^\circ \rightarrow 101^\circ$ の過程でリン酸が放出されることをしめす。さらに γ サブユニットが 19° 動いた 120° 構造が分離されたが、ATP の

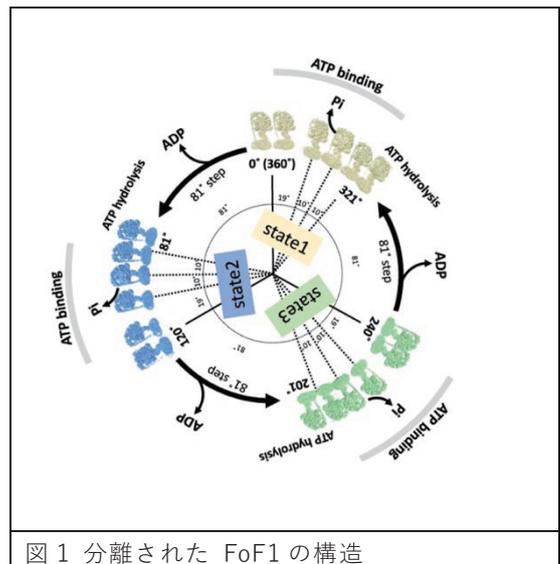


図 1 分離された FoF1 の構造

触媒過程とは関係なく γ サブユニットが動いている。このことは、この 19° の動きが分子内に蓄積された捻じれによって駆動された可能性を示す。

ATP の結合により引き起こされた 80° 回転後に蓄積された捻じれではないかと考えているが、分子動力学計算などのさらなる検証が必要である。低 ATP 濃度条件下では、すべての構造の E site には ATP が結合していなかった。 120° 構造のうち、T site がより閉じて反応が進行したように見える構造の E site にも ATP が結合しておらず、この E site に ATP が結合することで 80° 回転待ち構造になる。つまり、この構造が ATP 結合待ち構造に対応すると考えられる。ATP 濃度が低い時は、ATP 待ち構造の E site に ATP が結合したと同時に 80° 回転が起こることになり、従来の 1 分子観察実験の解析結果とも合致する。一方、ATP 濃度が高い時は、E site は常に ATP に占有されており、そのために結合した ATP が 80° 回転を引き起こすことになる。

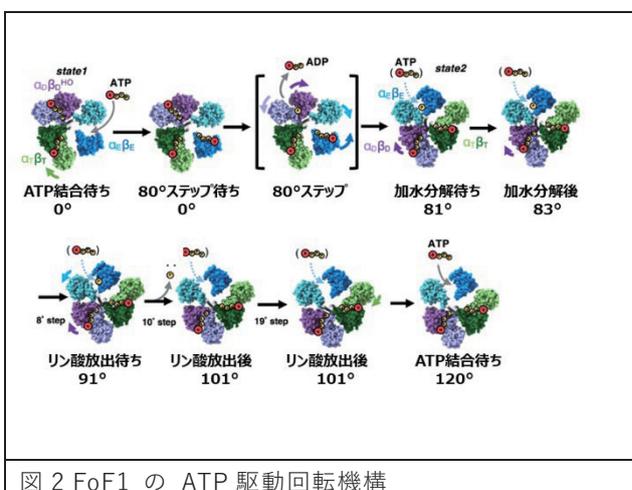


図 2 F₁F₀F₁ の ATP 駆動回転機構

2) プロトン駆動力による回転機構の解明

ATP 合成酵素は、生体膜を横断するプロトン駆動力により膜内在性部分のローターリングを回転させ、その回転力により、親水性部分で ADP をリン酸化して ATP を合成する。V/A-ATPase の V_o 部分の構造をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析により、側鎖の向きが判別可能な分解能の構造を得ることができた。この構造を使って、全原子分子動力学計算を行い、プロトン駆動力による回転機構に関する重要な知見を得ることができた。V/A-ATPase の V_o 部分は、12 の c-subunit からなる c_{12} -ring が d-subunit と回転子複合体を形成し、プロトン駆動力により固定子である a-subunit に対して回転する。得られた V_o 部分の高分解能構造では、ペリプラズム側と細胞質側にそれぞれ親水的なチャンネルがあり、複数の水分子も同定できた。2 つのチャンネルは、a-subunit のアルギニン残基により区切られていた。

c-subunit に存在するプロトン輸送に参与する グルタミン酸残基 (Glu) のうち、一つが a-subunit の Arg と塩橋形成距離にあった。さらにその両隣の c-subunit のある Glu は、それぞれ親水的なチャンネルに面しており、伸びた構造をとっていた (extended)。他の c-subunit の Glu は、疎水的な領域に存在し、隣の c-subunit のスレオニン残基 (Thr) と水素結合を形成することで、曲がった構造をとっていた (proton-locked)。この構造を基に、Glu のプロトン化状態の組み合わせを変えた全原子動力学計算によるシミュレーション (MD) を行った。塩橋形成している Glu をプロトン化し塩橋形成をなくし、かつペリプラズム側の Glu をプロトン化 (ペリプラズム側のプロトン濃度が高いとする設定) すると自発的な回転が観察された。一方、塩橋形成している Glu を脱プロトン化した場合は回転せず、プロトン駆動力による塩橋の切断が回転に必要なことが示唆された。c-ring を強制回転させる設定の MD では、やはり塩橋形成した Glu をプロトン化することで、スムーズに c-ring が回転し、回転中の中間体構造も同定できた。以上の結果をまとめると、プロトン駆動力により、ペリプラズム側の pH が下がりペリプラズム側および塩橋形成する Glu が両方ともプロトン化することで c-ring の一方向回転が達成されることが示唆された。この一方向性には、細胞質側の脱プロトン化された Glu と a-subunit の Arg 間に生じるクーロン力と、ペリプラズム側のプロトン化された Glu による膜領域との疎水性相互作用が関与していると考えられる。この研究成果を論文として投稿した。

3) 哺乳類 V-ATPase の高分解能構造解析

ラット脳から V-ATPase を精製し、クライオ電子顕微鏡で高分解能構造を得た。ラット脳のホモジネートに界面活性剤を加え、膜タンパク質を可溶化した。そこに V-ATPase 特異的に結合するレジオネラ菌由来の阻害タンパク質である SidK を加えた。SidK には Flag-tag が導入されており、Flag resin に混合液を通すことで、SidK-V-

ATPase 複合体を Flag-resin に結合させた。つぎに Flag ペプチドにより SidK と結合した V-ATPase を溶出した。ゲルろ過により精製度を高めた標品をクライオ電子顕微鏡による構造解析に供した。解析をすすめた結果、全体で 2Å 前半の分解能の構造を得ることができた。さらに精密化をすすめ、Vo 部分でも原子モデル構築可能な構造を得ることができた。

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 2023

1) Mechanism of ATP hydrolysis dependent rotation of bacterial ATP synthase

F1 domain of ATP synthase is a rotary ATPase complex in which rotation of central γ -subunit proceeds in 120° steps against a surrounding $\alpha_3\beta_3$ fueled by ATP hydrolysis. How the ATP hydrolysis reactions occurring in three catalytic $\alpha\beta$ dimers are coupled to mechanical rotation is a key outstanding question. Here we describe catalytic intermediates of the F1 domain in F_0F_1 synthase from *Bacillus PS3* sp. during ATP mediated rotation captured using cryo-EM. The structures reveal that three catalytic events and the first 80° rotation occur simultaneously in F1 domain when nucleotides are bound at all the three catalytic $\alpha\beta$ dimers. The remaining 40° rotation of the complete 120° step is driven by completion of ATP hydrolysis at $\alpha\delta\beta D$, and proceeds through three sub-steps (83°, 91°, 101°, and 120°) with three associated conformational intermediates. All sub-steps except for one between 91° and 101° associated with phosphate release, occur independently of the chemical cycle, suggesting that the 40° rotation is

largely driven by release of intramolecular strain accumulated by the 80° rotation. Together with our previous results, these findings provide the molecular basis of ATP driven rotation of ATP synthases.

2) Structural analysis of rat brain V-ATPase

V-ATPase was purified from rat brain, and its high-resolution structure was obtained using cryo-electron microscopy. Detergent was added to a homogenate of rat brain to solubilize membrane proteins. The Legionella-derived inhibitory protein SidK, which specifically binds to V-ATPase, was then added. SidK had a Flag-tag introduced, and the mixture was passed through Flag resin, allowing the SidK-V-ATPase complex to bind to the Flag resin. Next, V-ATPase bound to SidK was eluted using Flag peptide. The purified sample, further refined through gel filtration, was subjected to structural analysis by cryo-electron microscopy. As a result, an overall resolution in the low 2 Å range was achieved. Further refinement allowed for the construction of an atomic model even in the Vo region.

3) Rotary mechanism of the Vo motor driven by proton motive force.

ATP synthases play a crucial role in energy production by utilizing the proton flow (proton motive force, pmf) across the membrane to rotate the membrane-embedded rotor c-ring, driving ATP synthesis in the hydrophilic catalytic hexamer. Although this process is very well-established, the molecular mechanism by which the pmf is converted into the c-ring rotation has remained elusive. Here, we describe the cryoEM structure of the Vo domain of the V-type ATP synthase (V/A-ATPase) at a resolution of 2.8 Å, allowing precise identification of glutamate residue (Glu) side chain orientations within the c12-ring. Our analysis revealed that of the 12 c-ring Glu, the three facing the water channel were in an extended conformation. The central Glu formed a salt bridge with the Arginine residue of the stator a-subunit (a/Arg). Molecular dynamics (MD) simulations, utilizing this structure and considering structurally relevant water molecules, revealed the water channel in the vicinity of this salt bridge. Further MD simulations demonstrated unidirectional Brownian motion of the c12-ring towards the direction of ATP synthesis when both the periplasmic and salt bridge forming Glu residues were protonated. When the salt bridge forming Glu residue remained unprotonated, the salt bridge persisted even after a forced 30° rotation of the c-ring, with no new salt bridge formation between the adjacent Glu and the a/Arg. The combination of high resolution cryo-EM structure of Vo and MD simulations strongly indicates that asymmetry in the protonation states of the three c/Glu facing the water channel induces a bias in the Brownian motion of the c12-ring, resulting in a rotation of the c12-ring towards the direction of ATP synthesis.

4. 論文, 著書など

原著論文

1. Mechanism of ATP hydrolysis dependent rotation of bacterial ATP synthase. Nakano A, Kishikawa J, Mitsuoka K, *Yokoyama K. Nat. Communi, 14 Article number: 4090 (2023)
2. Rotary mechanism of V/A-ATPases-how is ATP hydrolysis converted into a mechanical step rotation in rotary ATPases? Yokoyama K. Frontiers in Molecular Biosciences-Structural Biology Vol .10 (2023)
3. クライオ電子顕微鏡用の試料作製とその構造解析 横山 謙、岸川淳一 タンパク質の構造解析手法と In silico スクリーニングへの応用事例 第2節 p95-106 (2023) (株)技術情報協会

5. 学会発表など

1. FoF1-ATPase の非触媒部位の機能解明 小林廉 第49回日本生体エネルギー研究会討論会 会場 山口大学 吉田キャンパス 大学会館 12/2023 ポスター発表

2. クライオ電子顕微鏡によるプロトン駆動力下での ATP 合成酵素の構造解析 中野敦樹 第 49 回日本生体エネルギー研究会討論会 会場 山口大学 吉田キャンパス 大学会館 12/2023 ポスター発表
3. リポソームに包埋された多剤排出タンパク質 AcrB の構造解析 武藤優斗 第 49 回日本生体エネルギー研究会討論会 会場 山口大学 吉田キャンパス 大学会館 12/2023 ポスター発表
4. 哺乳類 V-ATPase の構造解明 西田結衣 第 49 回日本生体エネルギー研究会討論会 会場 山口大学 吉田キャンパス 大学会館 12/20
5. 23 口頭発表 学生優秀発表賞
6. プロトン駆動力下でのクライオ電子顕微鏡単粒子解析によって明らかにする ATP 合成酵素の回転機構 中野敦樹、岸川淳一、光岡薫、横山謙 第 61 回日本生物物理学会年会 会場 名古屋国際会議場 11/2023 ポスター発表
7. 哺乳類 V-ATPase の構造機能解明 西田結衣、中西温子、中野敦樹、佐伯詩織、光岡薫、横山謙 第 61 回日本生物物理学会年会 会場 名古屋国際会議場 11/2023 ポスター発表
8. リソソーム周辺の局所的な細胞質 ATP 濃度イメージング 青山桃子、津山泰一、今村博臣、横山謙 第 61 回日本生物物理学会年会 会場 名古屋国際会議場 11/2023 ポスター発表
9. FoF1-ATPase の非触媒部位の機能 小林廉、中野敦樹、横山謙 第 61 回日本生物物理学会年会 会場 名古屋国際会議場 11/2023 ポスター発表
10. Vo 部分でのプロトン駆動力による回転機構の分子基盤 西田結衣、岸川淳一、岡崎圭一、中野敦樹、横山謙 第 23 回日本蛋白質科学学会 会場 名古屋国際会議場 07/2023 ポスター発表
11. リポソームに再構成した膜タンパク質の高分解能構造解析の試み 中野敦樹、河内貴哉、小林廉、谷口佳奈、武藤優斗、津山泰一、横山謙 第 23 回日本蛋白質科学学会 会場 名古屋国際会議場 07/2023 ポスター発表

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 R3-R5 (3 年)

2. 住友ファーマとの共同研究

課題名：クライオ電子顕微鏡を用いた化合物とタンパク質の複合体の立体構造解析 研究代表者：横山 謙 取得年度 R3-R5 (2 年)

2) 学外貢献

1. 科学研究費審査委員

2. 論文査読 2 件

3. 日本生体エネルギー研究会 常任幹事

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

2. 模擬講義・模擬実験 2 件

動物発生学研究室 Laboratory of Embryology

教授 武田 洋幸

Prof. Hiroyuki Takeda, Ph. D.

1. 研究概要

動物発生学研究室では、小型魚類(ゼブラフィッシュ *Danio rerio* と メダカ *Oryzias latipes*)を用いて脊椎動物の初期発生過程における体軸形成および器官形成の機構を研究している。小型魚類は多数の突然変異体が存在し、遺伝子導入や胚操作が容易であるなど、発生遺伝学、実験発生学に適したモデル脊椎動物である。我々はゼブラフィッシュ胚、メダカ胚を用いて、初期発生過程で重要な働きを持つ遺伝子群の機構解析を進めている。現在注目している現象は、左右軸形成、耳石の形成、体節の分化などです。並行して、我々は、メダカゲノムプロジェクトおよびエピゲノム解析(発生と環境応答)を他の研究室と共同で推進している。

2023年4月に着任し、以下の3つの新規研究を開始した。

- ・シグナル分子の細胞外動態に注目した左右軸形成機構の解明
- ・*ha* 変異体を用いた耳石形成機構の解明
- ・体節由来細胞の種の進化的多様性の解明

2. 本年度の研究成果

上記の新規研究の成果はまだ得られていない。一方、これまでのゲノム、エピゲノム関係の研究をまとめて、成果を公表した。概略は以下である。

- ・初期胚リプログラミングにおけるヒストン修飾の動態の全貌解明:メダカ初期胚リプログラミング中で各種ヒストンの消長を定量的 ChIP-seq で解明した。特に、リプログラミング中でテロメアに残存し続ける H3K9me3 は、卵割中の細胞で染色体分離に必須であると報告した。
- ・栄養刺激の記憶候補の特定:メダカ初期成長期(ふ化直後)で高脂肪食投与による脂肪肝の誘発とコントロール食移行による脂肪肝解消過程で、肝臓での遺伝子発現、エピゲノムの変化を追跡した。その結果、栄養刺激によるクロマチン開閉状態やヒストン修飾の変化が長期間維持されているゲノム領域を複数見出した。
- ・母親の栄養環境の次世代へ影響を実験系の確立:高脂肪食で飼育された母親から生まれる子孫の発生率が著しく低下することを見出し、その原因が卵黄成分や母体のホルモン環境の変化(卵巣を含む母体の機能低下)であることを突き止めた。

3. Research projects and annual reports

We have been studying the mechanisms of body axis formation and organogenesis using small fish, zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*). Small fish are model vertebrates suitable for developmental genetics and experimental embryology because of the large number of mutants, and the ease of genetic and embryonic manipulation. Currently, we are focusing on left-right axis formation, somite differentiation, and otolith formation. We are also collaborating on the Medaka Genome Project to study the genome evolution of vertebrates, and on the epigenetic changes during development and in response to environmental stimuli.

I was appointed in April 2023 and began the following new research projects.

- ・Left-right asymmetry formation by secreted signaling proteins
- ・Mechanism of otolith formation using *ha* mutants
- ・Evolutionary diversity of somite-derived cell types

This year's accomplishments

The results of the above new projects have not yet been obtained. Instead, we have published the following results of our previous genomics and epigenomics-related studies in medaka fish.

1) A Complete picture of the dynamics of histone modifications during epigenetic reprogramming in medaka embryos

Epigenetic modifications undergo drastic erasure and reestablishment after fertilization. This reprogramming is required for proper embryonic development and cell differentiation. In mammals, some histone modifications are not completely reprogrammed and play critical roles in later development. In contrast, in nonmammalian vertebrates, most histone modifications are thought to be more intensively erased and reestablished by the stage of zygotic genome activation (ZGA). Our data revealed that H3K27ac, H3K27me3, and H3K9me3 escape complete reprogramming, whereas H3K4 methylation is completely erased during cleavage stage. Furthermore, we experimentally showed the functional roles of such retained modifications at early stages. For example, H3K9me3 is globally erased but specifically retained at telomeric regions, which is required for maintenance of genomic stability during the cleavage stage. These results expand the understanding of diversity and conservation of reprogramming in vertebrates, and unveil previously uncharacterized functions of histone modifications retained during epigenetic reprogramming.

2) Identifying candidate epigenetic memories for nutritional stimuli

The nutritional status during early life can have enduring effects on an animal's metabolism, although the mechanisms underlying these long-term effects are still unclear. Epigenetic modifications are considered a prime candidate mechanism for encoding early-life nutritional memories during this critical developmental period. However, the extent to which these epigenetic changes occur and persist over time remains uncertain, in part due to challenges associated with directly stimulating the fetus with specific nutrients in viviparous mammalian systems. Our data show that early-life HFD feeding triggers both reversible and persistent epigenetic changes in medaka hepatocytes. Our data provide novel insights into the epigenetic mechanism of nutritional programming and a comprehensive atlas of the long-term epigenetic state in an early-life HFD model of non-mammalian vertebrates.

3) Establishment of an experimental system to study the effects of maternal nutritional environment on the next generation

Maternal nutritional status can affect development and metabolic phenotypes of progeny in animals. The effects of maternal diet are thought to be mediated mainly by changes inside oocytes such as organelles, maternal RNAs, and metabolites. However, to what extent each factor contributes to offspring phenotypes remains uncertain, especially in viviparous mammalian systems, where factors other than oocytes, such as placenta and milk, need to be considered. Here, using the medaka fish as an oviparous vertebrate model, we examined whether maternal high-fat diet (mHFD) feeding affects offspring development and what kind of changes occur in the contents of mature eggs. We found that mHFD caused the high frequency of embryonic deformities of offspring, accompanied by downregulation of transcription- and translation-related genes and zygotic transcripts at the blastula stage. Our study presents a comprehensive data on the changes inside eggs in a mHFD model of nonmammalian vertebrates and provides insights into the mechanisms of parental nutritional effects on offspring.

4. 論文, 著書など

原著論文

(*: corresponding authors)

Inoue Y*, Fukushima M, Hirasawa G, Furukawa F, Takeda H*, Umatani C*. Maternal High-Fat Diet Affects the Contents of Eggs and Causes Abnormal Development in the Medaka Fish. *Endocrinology*. 2024 Jan 16;165(3):bqae006.

- Inoue Y., Suzuki Y., Kunishima Y., Washio T., Morishita S.*, Takeda H*. (2023). High-fat diet in early life triggers both reversible and persistent epigenetic changes in the medaka fish (*Oryzias latipes*). BMC Genomics, 24(1):472
- Liu S, Kawanishi T, Shimada A, Ikeda N, Yamane M, Takeda H*, Tasaki J*. Identification of an adverse outcome pathway (AOP) for chemical-induced craniofacial anomalies using the transgenic zebrafish model. Toxicol Sci. 2023 Oct 30;196(1):38-51.
- Fukushima HS, Takeda H*, Nakamura R* (2023). Incomplete erasure of histone marks during epigenetic reprogramming in medaka early development. Genome Research, 33(4): 572–586. (selected as the cover picture)

英文総説

- Fukushima HS, Takeda H, Nakamura R. Targeted Manipulation of Histone Modification in Medaka Embryos. Methods Mol Biol. 2023;2577:279-293.
- Inoue Y, Takeda H*. (2023). Teratorn and Its Related Elements – a Novel Group of Herpesviruses Widespread in Teleost Genomes. Zoological Science, 40(2):83-90.
- Inoue Y., Takeda H*. (2023). Teratorn and its relatives – a cross-point of distinct mobile elements, transposons and viruses. Frontiers in Veterinary Science, 10:1158023.

日本語解説記事

なし

5. 学会発表など

- 武田洋幸 “魚類(メダカ)を用いたエピジェネティック記憶の研究. シンポジウム「エピジェネティクス研究の新機軸～モデル動物からヒトまで～」、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 (口頭発表)
- 福嶋悠人, 中村遼平, 武田洋幸 “魚類初期発生においてリプログラミングを免れるヒストン修飾は正常発生に重要な役割を持つ”、第 16 回日本エピジェネティクス研究会年会 19–20 June 2023, Tokyo, Japan (ポスター発表)
- Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda “Extracellular interplay of Nodal and Dand5 proteins during the left-right asymmetric pattern formation in the lateral plate mesoderm”, The 56th Annual Meeting of JSDB.2023 年 7 月. (口頭・ポスター発表) Young Investigator Paper Award (DGD 奨励賞)
- Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda “Extracellular interplay of Nodal and Dand5 proteins during the left-right asymmetric pattern formation in the lateral plate mesoderm”, The 4th GfE-JSDB Young Scientist Exchange Meeting. 仙台、2023 年 7 月.(口頭発表)
- Ryohei Nakamura, Shinra Ikeda, Hiroto Fukushima and Hiroyuki Takeda Regulation and functional role of 3D chromatin structure during medaka embryogenesis.第29回小型魚類研究会 2023年 9月21日 埼玉大学(口頭発表)
- 福嶋悠人, 池田貴史, 池田森羅, 武田洋幸 “非哺乳類脊椎動物のエピジェネティックリプログラミングにおいて細胞周期の長さがヘテロクロマチンの消去・再構成を制御する”、第 46 回日本分子生物学会年会 2023 年 12 月 神戸(ポスター発表)
- 福嶋悠人, 武田洋幸:ヒストンアセチル化酵素 CBP/P300 による Zygotic genome activation 制御機構” 第 46 回日本分子生物学会年会 2023 年 12 月 神戸(ポスター発表)
- 池田森羅, 中村遼平, 武田洋幸 “メダカ初期胚におけるクロマチンループ構造の転写制御への寄与の解析”、第 46 回日本分子生物学会年会 2023 年 12 月 神戸(ポスター発表)
- 井上雄介, 福島真夏, 平澤郷, 古川史也, 武田洋幸, 馬谷千恵“メダカ母体への高脂肪食投与が卵成熟および次世代個体の発生に与える影響の解析”、第 46 回日本分子生物学会年会 2023 年 12 月 神戸(ポスター発表)

6. その他特記事項

1) 外部資金

1) 外部資金

・AMED_CREST「全ライフコースを対象とした個体の機能低下機構の解明」領域

研究課題:全ライフコースおよび次世代におよぶエピジェネティック記憶の研究

研究代表者:武田洋幸 取得年度:2018-2023(6年)

・科研費・基盤研究(B)

研究課題:魚類脂肪組織を対象とした栄養適応の発生生物学的解析

研究代表者:武田洋幸 取得年度:2023-2025(3年)

・共同研究(理化学研究所)

脊椎動物の胚発生における体節組織の分化能の進化的変遷

研究代表者:武田洋幸 取得年度:2023年

2) 学外活動

武田洋幸:日本発生生物学会理事

武田洋幸:AMED-CREST「早期ライフステージにおける分子生命現象の解明」研究開発副総括(PO)

武田洋幸:日本学術会議・会員、第二部部長(2023年9月まで)

武田洋幸:東京大学 エグゼクティブ・マネジメント・プログラム(EMP、社会人講座)講師

3) アウトリーチ活動

なし

編集後記

2023年度の年報がやっとできました。2024年9月には動態研が、科研費学術変革領域研究「マルチファセットプロテインズ」(領域代表・田口英樹さん)との共催で、福岡で国際会議を開催しました。本来なら2024年度の年報に取り上げるべき内容ですが、タイミングを逸するのは良くないので、今回の年報に開催報告を掲載しました。さらにこの会議の招待講演者であるTom RapoportさんとManu Hegdeさんには京都に来てセミナーをしていただいたのですが、その機会を利用してお二人にインタビューを行いました。実は過去に私が関わった新学術領域研や特定領域研究でも、著名な海外の研究者の方にインタビューをしていて(ノーベル賞受賞者も含めて)、それがけっこう貴重なバイオグラフィ集となっています。今回のお二人のインタビューも、お二人の研究歴から研究やサイエンスについての哲学、米英の研究環境など、多岐にわたっており、とても含蓄のあるものとなっています。特に、Manu Hegdeさんがパンデミックの時に、自分のラボのプロジェクトを見直して、プロジェクト数を減らしたと言う話には、考えさせられました。研究成果だけ追い求めると、どんどんプロジェクトが広がって行って、身の丈を超えしまう危険がありますが、そこをあえて抑える勇気には感心しました。研究がどんどん高度化、ビッグサイエンス化するなかで、身体感覚を尊重した研究姿勢の重要性に気づかされました。またお二人の姿勢にも、たとえばTom Rapoportさんは精製タンパク質を使った再構成系や構造解析を目指すのに対して、Manu Hegdeさんはcrudeな系で現象を見つけ、変異体解析でメカニズムに迫るといふ、違いがあるのも興味深かったです。

さて、2024年のノーベル物理学賞は人工ニューラルネットワークの機械学習への応用、そして化学賞はAIによるタンパク質の立体構造予測と設計、に対して授与ということで、この年報でもしばしば取り上げてきたAI関連の成果が早々とノーベル賞を獲得しました。ノーベル物理学賞を受賞したジェフリー・ヒントン氏は、人類はまもなく、はじめて自分たちを超える知性の出現に立ち会うことになる、とその脅威について語っていますが、このことが示唆するところの重要性は計りしれません。AIが暴走して、人類が絶滅危惧種に追い込まれないことを祈ります。

遠藤斗志也 (2024.12.10 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

2023 年度号

【非売品】

令和 7 年 1 月 21日 印刷

令和 7 年 1 月 29日 発行

発行人 京都産業大学タンパク質動態研究所長
遠藤斗志也

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

