

年報 タンパク質動態研究所

Annual Reports 2024
Institute for Protein Dynamics
Kyoto Sangyo University

特別企画

Roland Beckmann, Roland Knorr, Francesca Bottanelli . . . 1

構造細胞生物学の研究者に聞く

(聞き手 遠藤斗志也・吉川雅英・稲葉謙次)

レポート「クライオ電子顕微鏡導入にあたって」(横山謙) . . . 17

研究所の活動

生物化学研究室 (遠藤斗志也) . . . 22

分子細胞生物学研究室 (潮田亮) . . . 27

タンパク質バイオジェネシス研究室 (千葉志信) . . . 34

タンパク質構造生物学研究室 (津下英明) . . . 39

膜エネルギー代謝研究室 (横山謙) . . . 44

動物発生学研究室 (武田洋幸) . . . 50

関連セミナー

. . . 55

編集後記 (遠藤斗志也)

. . . 56

2024年度

京都産業大学 タンパク質動態研究所

所員



遠藤 斗志也 (所長)



潮田 亮



千葉 志信



津下 英明



横山 謙



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)

Roland Beckmann, Roland Knorr, Francesca Bottanelli

構造細胞生物学の研究者に聞く

聞き手 遠藤斗志也・吉川雅英・稲葉謙次

2025年9月17日～19日に東京大学の伊藤謝恩ホールでJST-CREST「細胞ダイナミクス」領域（研究総括：遠藤斗志也）、JST-さがけ「細胞の動的高次構造体」（研究総括：野地博行）と学術変革領域研究(A)「クロススケール新生物学」（領域代表：吉川雅英）の共催で国際シンポジウム「International Symposium on Cellular Structural Biology」が開催されました。海外からのスピーカーとして講演いただいたRoland Beckmann, Roland Knorr, Francesca Bottanelliの3人の研究者に、各人の研究歴、研究の視点、そしてヨーロッパ特にドイツの研究環境などについてお話をうかがいました。

遠藤 今日はシンポジウム終了後にお時間をとっていただきありがとうございます。まず最初に、皆さんの経歴について、例えばどこで生まれ、いつサイエンスに興味を持ったかなどをお話いただけますか。

Roland Beckmann の研究ヒストリー

Beckmann 私はスイスで生まれました。両親はドイツ人で、北ドイツで育ちました。高校時代から科学に興味がありましたが、数学も物理も化学も全て好きだったので、進路はなかなか決まりませんでした。結局、医学部と生化学課程に応募しました。記憶力が悪いから医学部は落ちると思っていましたが、両方合格しました。暗記より理解する方が得意だと思って生化学を選び、ベル

リンに行きました。ベルリンを選んだのは、ベルリンという都市がとても好きだったからです。そこで学部から大学院まで学び、神経細胞学の研究室で博士の学位を取得しました。当時は核内キナーゼによるシグナル伝達、つまり基礎的な細胞生物学の研究に取り組んでいました。そしてGünter Blobelの論文に出会ったのです。

遠藤 それはいつ頃の話ですか？

Beckmann 私は92年から95年まで博士課程に在籍しましたが、ちょうどその時期にBlobelらによって核輸送に関する最初の重要な発見がなされました。あの論文の洗練された内容、その明快さに強く惹かれました。そこでBlobel研（Rockefeller大



左から 吉川、遠藤、稲葉、Bottanelli、Knorr、Beckmann



学)のポストドクに応募したのです。

遠藤 Blobel が研究分野を ER から核へ変えた頃のことですね？

Beckmann その通りです。実際、私が Blobel 研に着いた時には、もはや ER の研究をしている人は誰もいませんでした。しかし、Günter は私を説得しようとしたんです。私は MAP キナーゼと核の研究をしたかったんですが、彼は「それはつまらない、ER のタンパク質輸送チャネルの電気生理学をやるべきだ」と。その結果、私は Blobel 研の 30 人ほどのポストドクが皆、核輸送が今やホットな分野であり、ER はもう時代遅れだと思っていた中で唯一人、ER に取り組むことになりました。それで、電気生理学をやるためにパッチクランプ法や黒膜作成の技術を習得し、生物物理学者への転身は目前。準備は万全で、Sec61 や SecY を含む小胞を再構成しました。ところがここで、Sandy Simon が Günter と私に「自分たちも同じ研究をしている」と主張してきたのです。結局、私はプロジェクトから撤退することになり、準備した材料をすべて彼らに引き渡すことになりました。

遠藤 Simon は Blobel 研のメンバーだったのでは？

Beckmann いや、彼は Blobel 研のポストドクでしたが、当時はすでにアシスタントプロフェッサーとして独立していたんです。ただ、私はプロジェクトから撤退することに躊躇はありませんでした。私は自分自身の準備作業に着手していたからです。細胞生物学や生化学の分野から来た者としては、ゲル上のバンドとしてタンパク質を見るのは退屈でした。しかし電気生理学では、実際に機能するチャネルを観察できたわけで、それはとても魅力的でした。さらに電子顕微鏡で分子そのものを見ることができるとは、もっと素晴らしいことではないかと考えました。そこで Blobel 研に在籍したまま、細菌の RNA ポリメラーゼの研究で知られる Kornberg 研出身で当時 Joachim Frank (New York 大学 Albany 校、2017 年ノーベル化学賞受賞) の研究室に所属していた Seth Darst との共同研究を始めました。これでポストドクとしての研究の方向性が変わりました。電子顕微鏡によるトランスロコンの構

造解析です。

遠藤 それは細菌の SEC トランスロコンですか？それとも ER のトランスロコンですか？

Beckmann 当時は主に酵母でした。細菌と酵母の両方のトランスロコンを扱っていましたが、細菌の方は電気生理学のグループに引き継ぎ、私は真核生物の系を継続することにしました。そしてポストドク期間中に、リボソーム-トランスロコン複合体の最初の再構成に成功しました。すばらしい出発点でした。そこから SRP を含めた系などに発展させていきました。Günter と Joachim が同意してくれたので、私はこのプロジェクトを持ち帰って続けていけることになりました。Günter は寛大でした。彼はどのポストドクも、Blobel 研を出ても自由にプロジェクトを続けて良い、それが重要だと言っていました。

ベルリンに戻り、いわゆるフォルクスワーゲン社のグラント、これは独立したグループに 5 年間、研究費を出してくれるのですが、これに予申請しました。テニユアのポジションは取れませんが、この研究費は助かりました。ちょうど Joachim Frank の研究室の Christian Spahn がベルリンに来ていて、一緒に電子顕微鏡を購入するためのお金が欲しかったんです。こうして、私たちは、ベルリンで最初のハイエンドの電子顕微鏡を手に入れたのです。

遠藤 当時の電子顕微鏡の解像度は高くなかったですね。

Beckmann はい、X 線構造解析の人たちは、プロボロジー (blobology)¹ と呼んで笑っていましたね。でも、今では彼らのほとんどが電子顕微鏡による構造解析に転向しています (笑

遠藤 それでもあなたは当時から電子顕微鏡に惹かれていたわけですね。

Beckmann ええ、だって正直言って、側鎖レベルでの議論に留まる生化学って、そんなに面白くなかったんですよ。セリンプロテアーゼの触媒基トリオ (catalytic triad) のこととかは皆が学びましたが、私はむしろ細胞内でのタンパク質の機能に興味があったわけです。その観点では、分解能が 15Å や 10Å の構造であっても極めて示唆に富んでいるのです。当時は新生鎖がリボソームのどこから出てくるのか、大サブユニットと小サブユニットの間なのか、とかも議論になっていました。リボソーム-トランスロコン複合体の構造でも、トランスロコンはリボソームの大サブユニットにくっついていて、ちょうどドーナツ状に見えるトランスロコンとリボソームの位置が一致していました。だからトランスロコンのトンネルが、リボソームから出てくる新生鎖に使われていることが強く示唆されたわけです。

遠藤 当時の分解能でもトランスロコンの孔は見えていたわけですね

Beckmann はい。トランスロコンはドーナツ構造に見えたので、孔の存在は簡単に確認できました。その後、例えば SRP については結晶構造をリボソーム-トランスロコン複合体の電顕構造にドッキングできましたし、tRNA などについても同様です。非常に有益な知見が得られたと言えます。

遠藤 これは再構成系ですか？

Beckmann はい、そうです。

遠藤 これらの複合体はどうやって調製したんですか？

Beckmann リボソームと Sec61 を精製し、無細胞系を使ってリボソームを選択した新生鎖(シグナル配列などを含む)の DNA でプログラムすることでリボソーム新生鎖複合体(RNC)を準備しました。

遠藤 Sec63 とかは使わなかったんですね？ Sec61 と RNC を使った膜透過系ということですね。

Beckmann はい、当初は酵母で研究していたので、Sec61-RNC 複合体です。ご存知のように Sec63² は酵母では翻訳後膜透過にのみ関与しているんですよ。その後数年経って、私たちは Sec61-63 複合体の構造も解明しましたが・・・その後私たちはトランスロコンの構造研究を続け、主に再構成系を用いた調節機構の研究へと進みました。新規合成中のペプチド鎖の調節に関わる因子を可視化し、また、様々な分泌系の補助因子についても調べました。そして、ある時点で電顕分解能の革命が起きたわけですね。

吉川 2012 年からですね。

Beckmann ええ、その通りです。そしてちょっとしたエピソードですが、私はベルリンで 5 年間研究を行った後、当然ながら次のポジションを探していました。最初はベルリンで職を探していましたが全く見つからず、あちこち応募した中で、軽い気持ちで応募したミュンヘン大学(LMU)からテニュアトラック職を提示されたのです。当時良い論文を発表できていたのが幸いでした。ところがオファーを受けたものの、主要な研究費配分機関である DFG は、駆け出しのテニュアトラック教授には必要な設備を資金援助しないことに気づきました。これはまずい。しかし、W3 ポジション(教授職)³の募集も同時にあったのです。そこで大学側は私に W3 の教授職をオファーしてくれました。私は大喜びでした。当時、私はまだ十分に認められていない若手研究者だった

のに、突然 W3 教授職に就くことになったのですから。

遠藤 なるほど

Beckmann そして、電顕も手に入れることができました。しかし一つ問題がありました。手に入れたのは、おそらく世界で最初のクライオ電子顕微鏡 Titan の一つ、Titan 4 号機かそこらだったのですが、これがうまく機能しなかったのです。実際当時、メーカーはこうした開発途上の機器を売りつけるということがよくありました。当時私たちが正式に購入した Titan はヘリウム冷却式でした。当時、Werner Kühlbrandt らが、液体窒素ではなく液体ヘリウム温度で測定する方が良いデータが得られるという主張をし続けていたのです。結局それは間違っており、開発がそれ以上進むことはなかったのですが。

結局その装置は 2 年間全く機能せず、Wolfgang Baumeister (Max Planck 研究所) たちの所の電顕も同じでした。つまり初期のプロトタイプ(おそらく 1 号機か 2 号機)は、後の市販品とは材質やシール構造などが異なり、様々な問題を抱えていたのです。この経験から、最新機種を購入することには慎重になりました。そのため、クライオ電顕の分解能革命に乗り遅れかけました。新しい電子線検出器⁴が登場した頃、私たちはちょうど新しいカメラの購入を検討していたところでした。当時、電子線検出器の放射線耐性や寿命、真の実力は不明だったので、私たちは電子線検出器ではなく、8K CMOS カメラ⁵を購入しました。David Eger も同機種を所有し「素晴らしい」と絶賛していました。ところがこれが最悪だったんです。それは 4 台の 4K カメラを寄せ集めただけの代物で、性能は 4K 単体カメラ以下でした。そのうえ、配置がわずかにずれるなどの問題があったのです。一方で、電子線検出器は驚異的な性能を発揮しました。放射線損傷もなく、性能も抜群でした。こうして 2~3 年間、私たちは電子線検出器に憧れ続け、2015 年か 16 年頃ようやく電子線検出器を手に入れ、真の高分解能を得ることができるようになりました。

それ以来、すべてが楽しいものでした。リボソームアセンブリなどの分野や稲田利文さんとリボソーム品質管理の研究分野にも進出しました。

遠藤 それはいつ頃ですか？



ドーナツ状構造を Cell の表紙に載せていました。

Beckmann 10 年ほど前だと思います。

遠藤 でもそれより前に、トランスロコン-RNC 複合体の高分解能構造を出していませんでしたっけ？

Beckmann ああ、そうです。最初の低解像度の blob 構造は 1997 年でした。

その後 2001 年に活性型リボソーム-Sec61 複合体の構造に関する論文を発表し、さらにその後数報出しました。今ではそれらについてはほとんど研究していません。最後が Sec61 と OST (オリゴ糖転移酵素) の複合体でした。SRP-リボソーム複合体の構造は 2004 年、その後細菌の SRP-リボソーム複合体の構造を 2006 年に発表しました。

遠藤 トランスロコン-RNC 複合体について、Tom Rapoport と異なる見解を持っていた時期もあったのでは？

Beckmann いや、私たちがスクープしただけですよ。

遠藤 では考え方は同じだったということですか？

Beckmann Tom は Chris Akey と組んで 3D 構造を研究していて、私たちと同じ考え方でしたが、Günter Blobel とは意見が合わなかったんです。これはややこしい話で、Günter はそもそも Sec61 や SecY がタンパク質輸送チャンネルだとは信じていなかったのです。彼の研究室のポストドクが、別のタンパク質が真のチャンネルだというデータを持っていたんです⁵。ちなみに、この「別のタンパク質」は後に YidC⁷ であることが後にわかりました。だから彼の考えは完全に間違っていたわけではなかったのです。でも、二人は学会で激しい口論を繰り広げました。

あなたは聞いたことがあるかもしれませんね。

Bottanelli 聞いたことがあります。

Beckmann つまり Rapoport+Görllich (Rapoport 研の学生) 対 Blobel。最前線の研究で激しくバトルを行ったわけです。幸いなことに、私は大腸菌で実験を行い、Sec Y を再構成しました。そうすると Sec Y が膜透過チャンネルの役割を果たしていることが示され、Rapoport のデータと合わせて、Günter も Sec 複合体が正しいと信じるようになったのです。

遠藤 では何をスクープしたんですか？

Beckmann 最初の RNC-Sec61 複合体の構造です。彼らもおなじものをやっていて、結局双方が構造を解明しました。実際、Tom Rapoport は最初の 2D 構造、つまり Sec61 複合体の

吉川 電子顕微鏡への移行を決意した瞬間について教えていただけますか？特定の瞬間があったのか、それとも電子顕微鏡へは徐々にシフトしていったのでしょうか？

Beckmann いくつかのタイミングがあったと言えるでしょう。電気生理学のプロジェクトから追い出された時点で、私たちは何かを探していたわけですが、ちょっと単純に聞こえるかもしれませんが、ドーナツ状のものが見えたのが大きいです。なんてクールなんだろうと思いました。ネガティブ染色像でしたが。

そうすると、次はリボソームとトランスロコンの複合体を見る必要があります、必要な手法が改善可能なことは明白でした。こうして私はこれが進むべき道だと確信したのです。これらの複合体について、それらがどのようにリボソームという機械と相互作用するのか、そうしたことは当時何も分かっていなかった、探求すべき広大な宇宙が広がっていたのです。

吉川 それが電子顕微鏡への転向を決断した瞬間ですね。

Beckmann はい。電顕が設置された地下室の暗闇にいるのが本当に好きでした。でも、ミスも犯しました。私はオペラ音楽を聴くのが好きだったんです。ご存知の通り、顕微鏡が最も嫌うものがあります。振動と騒音です。オペラのラジオが大音量で鳴っていたせいで、いくつかのデータは本当に理想的なものではなくなってしまったんです。当時はまだ顕微鏡を操作するノブを回しながら観察する時代でした

遠藤 あの頃は blob (ぼんやりした塊) しか与えなかった電顕がこんな分解能の革命を起こすとは思わなかったんだと思います。

Beckmann 私は blob で満足でしたよ。

遠藤 ええ、でも多くの人はそれを退屈に思い、より高解像度の構造を得るために X 線構造解析などに移行します。でもあなたは電顕に留まった。

Beckmann ええ、なぜなら私は気づいたんです。つまり解像度の基準から言えば、光学顕微鏡では全く意味をなさないでしょう？解像度がはるかに劣るから。でも当時の電顕なら、細胞内の構造を 10Å 程度の分解能で観察できる。それだけでも極めて示唆に富むのではないのでしょうか。X 線構造情報について言えば、例えば「いくつかのアルギニン残基が RNA と相互作用している」といった部分は確かに構造の一部ですが、個人的にはあまり面白いとは思いません。私は常に細胞内での機能の方が好きなんです。

遠藤 でも Tom Rapoport が細菌 Sec トランスロコンの最初の X 線構造を発表⁸したのはちょうどその頃で、これは大きなインパクトだったですよ。

Beckmann もちろん、あの X 線構造の論文はとても重要だったと思います。あの構造から、膜透過チャンネルがどう動くのかの理解が深まり、砂時計型のチャンネルやラテラルゲート（側方開口部）といった重要な概念が得られたわけです。しかしその後の重要な構造解析の多くはクライオ電顕によるもので、別に私たちのところからだけではなく、Tom Rapoport や Manu Hegde らによる成果もたくさんありました。さらに高分解能である必要もなく、結晶構造が得られていれば、5~6Å 程度の分解能でも、ヘリックスバンドルを同定し、主鎖の流れを追うには十分です。実際、動的性質や柔軟性のために、私たちの多くの複合体構造は高分解能ではありません。しかしそれでも多くの知見が得られます。まず重要なのは「何が存在するのか」を特定することです。どのタンパク質が存在するかを知り、二次構造を認識できれば、AlphaFold の助けを借りて極めて有益な情報が得られます。したがって、高分解能は重要ですが、全てではありません。高分解能で決定された複合体構造には退屈極まりないものが山ほどある一方で、ブロック再構成の手法で得られる構造から重要な示唆に富む知見が得られる例は沢山あります。一例として、Jonathan Weissmann 研からの最初の CAT テイル複合体⁹があります。彼らは突然、60S リボソームと tRNA、Rqc2 を発見し、小サブユニットや RNA なしで 60S リボソーム上で翻訳プロセスがどのように起こるかを説明しました。これは全て 10~15Å の分解能の構造に基づくものでした。

遠藤 リボソームの研究の最大の魅力は何でしょうか？

Beckmann リボソームはスマートフォンのようなものだと思います。スマートフォンは元々電話をかけるために作られたのに、今では通話よりもはるかに重要な追加機能を備えています。リボソームも全く同じで、タンパク質を作れますが、私が本当に興味を持っているのはそこではありません。Christian Spahn のような研究者はリボソーム上での tRNA 移動の最終段階に強く関心を持っていますが、私はそれにはあまり興味がありません。リボソームには分泌タンパク質合成や統合ストレス応答、いま私たちが注力しているリボソーム品質管理 (RQC) といったメタ機能が存在します。間もなく発表予定の論文では、衝突するリボソームによって「ribotoxic」なストレス応答が引き起こされるメカニズムを述べています。私が特に興味深いと思うのは、リボソームのコアの機能の上に、玉ねぎのようにさまざまな機能の層が重なっていることです。力のセンサーとしての調節、ペプチド分解による小分子の放出・・・つまり、私がクールだと思う以上のことをリボソームは行っているのです。もし退屈だったら研究をやめて

いたでしょうけれど、いまだにすべてを理解することはできず、研究を続けているわけです。

遠藤 ありがとうございます。それでは次に行きましょう。Roland Knorr さんお願いします。

Roland Knorr の研究ヒストリー

Knorr 最初から話すと、ベルリンで育ち、学校を卒業後、ドイツのイエーナという街で人間栄養学を学ぶことに決めました。イエーナは Zeiss で有名な街です。当時から大学時代はよく旅行をしていて、大学卒業後は約 2 年間、製薬会社で働き、その後バイオテックのスタートアップ企業に移りました。2005~2006 年頃のことです。その会社は核酸デリバリーに関する研究をしていて、それはまさに RNAi が発見された直後で、誰もがそれを用いて長年克服できないままになっていたあらゆる病気を治そうとしていました。核酸デリバリーは今でも大きな課題ですが、当時は非常に興味深い分野でした。その後、家族の事情でベルリンに戻り、それからポツダムのマックスプランク研究所で、膜の生物物理学の博士課程を始めました。

遠藤 なぜ膜の生物物理学に転向したのですか？

Knorr 私が働いていた小さな会社でのデリバリー法は全て脂質ベースでした。RNA や DNA を封入したリボソームを動物実験に用いていたんです。それで膜の世界に触れました。「これは面白い」と思いましたね。それが私の膜への関心の始まりだったと思います。

デリバリーにおける興味深い点は、リボソームがエンドソーム内の酸性環境下にあると想定されていたことです。そこで中性 pH で取り込み、pH 変化によってリボソームを不安定化させるという発想でした。つまり、層状相から六方相へと膜が相転移を起こし、エンドソーム膜との融合を誘導して核酸を放出させるという発想でした。その実現に必要な構造や組成について、様々な混合物をスクリーニングする大規模な作業を行い、ベシクルを押



し出し、充填し、血清中での安定性などを確認していたのです。RNA デリバリーに関しては、基本的に現在のコロナワクチン注射と同様の技術を当時開発していました。

遠藤 コロナ以前でも、核酸をデリバリーしたいと考えていたんですか？

Knorr はい、COVID 以前でも、大きなテーマでした。実用的には、あらゆる疾患に使える可能性がありました。RNA 干渉を使えば、細胞内の問題を非常に効率的に除去できることが明らかだったからです。細胞培養では特定の遺伝子をノックダウンする用途は確立されていましたが、それを医療応用に移す方法が誰も分からなかったのです。

遠藤 つまりこの場合、DNA じゃなくて RNA？

Knorr DNA も使いました。化学的に安定化された RNA もです。で、私は膜の生物物理学の博士課程から始めたので、主に巨大ベシクルを扱っていました。これは光学顕微鏡で観察できる膜で、ダイナミクスを見るために顕微鏡下で少し準備をすれば、何時間も観察できます。Roland Beckmann と同じように顕微鏡の前に座って blob を見ながら、物事を見て、直感を得て、システムの中で何が起きているのかを探るようなもので、それはなかなか良かったと言わざるを得ません。

研究所で私がいたのは理論部門で、実験科学をやっているのは一グループだけでした。しかし私の生物学的なバックグラウンドには合わず、したがって私はいつも、より生物学的に意味のある構造に興味を持っていました。そしてあるときシート状の膜の形成を観察し、それが何か生物学的な関連性がないだろうかという文献を調べていたら、オートファジーに出会ったんです。オートファゴソームは、その形成の種となる膜シートがサイトゾルで拡張し、閉じるという現象があったのです。「ふむ、面白い」という感じでした。そして、この種となる膜がどのように始まるのか、誰も知らないことに気づいたのです。顕微鏡で似たような形態を見ていくうちに、どんどん魅了されていきました。そこで、大隅良典さんにメールを書き、共同研究などの可能性について尋ねたところ、



彼の元ポスドクだった中戸川さんから返事が来たんです。それで、招待されて、日本に来たんですが、10 日後に大地震が起きました。あわてて帰国して 2 日後、テレビで原発事故の様子が伝えられて・・・

遠藤 地震で日本にいるのが怖くなったわけですね

Knorr いや、私はそれまで日本の文化とあまり接点がなかったので、日本に来てまったく新しい世界が開けたことにすごく魅了されていたんです。ところがいったん帰国したら 2 日後にテレビで発電所が崩壊する様子を目の当たりにしてしまい、現地にいなかったし直接影響も受けていなかったのに、かなり感情的になりました。でも結局、それ以来何度も日本に戻ってきています。

遠藤 帰国してから何年後に戻ってきたんですか？

Knorr JSPS の短期フェローシップに応募しました。それで中戸川さんの研究室に戻ってきて、オートファジー関連タンパク質を精製し、それを巨大な小胞に再構成しました。そんな感じでオートファジー研究が始まったわけです。

遠藤 その間、ポジションは確保できたんですか？ メインの所属はポツダムの研究所のままだったんですね。

Knorr はい、その時点で既に日本との交流プログラムが進行中で、一方で、米国フィラデルフィアの Baumgart 研究室にも長期滞在しました。彼らがチューブ引き伸ばしアッセイを確立しており、彼らの所での測定を希望していたので、そちらにも行ったり来たりしたわけです。

遠藤 なるほど。で、今はケルンでしたっけ？

Knorr はい、昨年ケルンに移りました。その前は、2021 年から 3~4 年ほど、ベルリンのフンボルト大学の生物学研究所で、DFG の独立ジュニアフェローシッププログラムのスタートアップ資金をもらって自身のグループを立ち上げました。

Beckmann 成功したポスドクから PI としてのポジションへの移行は、大きなハードルの一つだと言えますね。ドイツにはテニユアトラックではない、独立ポジションもありますし、ハビリタチオン(大学教授資格)¹⁰という独自のキャリアパスもあります。Walter Neupert 研(ミュンヘン大学)の Hannes Herrmann とかもその制度で独立しました。一方で Neupert 研などではグループリーダーとしての半独立的なポジションを経てから教授になるようなキャリアパスもあります。米国では、ポスドクから独立准教授へ、そしてテニユアを目指すという明快な道がありますが、ドイツのシステムは明確ではなく、いろいろな道があるとい

うことです。

遠藤 オートファジーの研究を進めていて、水島研に移ったのはいつですか？

Knorr 水島先生とは 2015 年から 2016 年にかけての学会で話す機会を得ました。ちょうどその頃、水島先生の ERATO が採択され、いつでもラボに来ていいよ、ということになりました。これはラッキーでした。当時、ポツダムの研究所では契約延長に躊躇があり、契約延長の進め方を話し合うタイミングが延びに延びていたんです。そんな中、水島先生から提案をいただき、私は「長期は無理でも数ヶ月なら可能だ」と考えました。結局、契約が切れた状態だったこともあり来日を決断。結果は大成功で、冬を越す 3 ヶ月間滞りました。うち 2 ヶ月は娘も合流し、横浜のドイツ学校にも通わせました。ほぼ自由に研究を進められ、ポツダムの研究所で独自に実施した先行実験の追跡調査を行いました。半年ほど経った頃、オートファゴソーム形成のメカニズムとして毛細管現象の力を扱った論文を *Nature* 誌に投稿できました。これが順調に受理され、研究資金も確保できました。

遠藤 その後、オートファジーからコンデンセート¹¹の研究へと興味がシフトしていったわけですね。その転換の動機は何だったのですか？

Knorr 転換の理由は単純です。細胞内コンデンセートが大きな話題になる以前は、基本的に細胞内には、膜で囲まれたオルガネラとサイトゾルという、一つの界面しかありませんでした。ところが突然、サイトゾルが相分離することが分かり、コンデンセートとサイトゾルの界面も存在することになったのです。そこで私は「膜とコンデンセートの間では、どんな『つながり』がまだ見えていないのだろうか？」と考えるようになりました。当時すでに、コンデンセートが膜と相互作用するという論文はいくつかありました。しかしそれは、ストレス顆粒が核膜に付着しているとか、核内の他の分離相の一部が膜に接着している、といった「論文をよく読むと見えてくる」程度のもので、その現象自体を正面から詳細に調べた研究はほとんどありませんでした。その後しばらくして、細胞内での「毛細管力」という概念が持つ力の大きさに気がつき始めました。先ほどお話ししたように、私の所属する研究所は理論物理と物理化学の実験が中心で、同僚たちは細胞に関連する現象にはほとんど関心がありませんでした。そこで私は、毛細管力が関与し得る細胞プロセスをリストアップしてみたのですが、それが驚くほど長いリストになったのです。このことがきっかけとなり、研究は大きく広がっていきました。なぜなら、細胞生物学の非常に基本的な領域では、未解決の問題が山積みだったのです。

遠藤 そもそも、あなたの学歴の背景は物理学なのでしょうか？



Knorr いえ、人間栄養学です。医学と生化学、生理学の中間分野です。植物学や食品加工も学びました。

遠藤 しかし、あなたの思考様式は物理学に根ざしているように見えますね。

Knorr いえ、生物学に根ざしていると言いたいです。大学時代の初期は 80%が生物学と重複していました。動物の解剖や植物の切断、図解作成といった必修科目は全員で受講しました。物理学的な視点は、理論研究所での長年の研究活動を通じて身につけたものです。

遠藤 では次に進みましょう。Francesca, お願いします。

Francesca Bottanelli の研究ヒストリー

Bottanelli はい、私はイタリア、ミラノの北の生まれです。ミラノと湖水地方の間の地域ですね。ミラノ大学に通い、植物バイオテクノロジーを専攻しました。実は航空宇宙工学と植物バイオテクノロジーの二択で、宇宙工学には今も強い興味があるのですが、両方合格したので植物バイオテクノロジーを選びました。理由は 2000 年代初頭、当時皆が遺伝子組み換え作物 (GMO) について議論し始めまっていたからです。遺伝子組み換え作物が世界の飢餓を救うと言われていました

遠藤 たけど、確かヨーロッパでは反対派が多かったんですよね？

Bottanelli そう、特にドイツではそうでしたね。でも、私は植物バイオテクノロジーを学ぶことにしました。でも授業が始まると、植物学や昆虫解剖学が多くて、あまり好きではなかったです。作物を畑に植える方法とか、密度や間隔とかを丸暗記する授業は特に。そんなのどうでもいいと思っていました。一方で授業の半分は核酸化学や分子生物学で、そちらは本当に面白かったです。ある細胞生物学の授業では細胞内輸送のメカニズムを扱っていて、教授に「海外で修士の研究ができる知り合いはいませんか？」と尋ねてみました。それでエラスムス交換プログラムによって、

イギリスに行き、リーズ大学で細胞内輸送を研究している研究室（Jurgen Denecke 研）で修士の研究をすることになりました。

遠藤 イングランドの北部ですね。

Bottanelli イタリアではまだ実家暮らしだったのに、突然イギリスに行くことになったわけです。最初は雨が多くて寒くて、イタリア人にとっては…。でも街自体は気に入りました。パーティー三昧の生活から一転、気候にも慣れました。

そこの研究室で修士課程を修了し、植物細胞における液胞へのタンパク質輸送機構を研究しました。このテーマが本当に好きでした。そして博士論文を書いているときに、私が研究していたタンパク質がどのように同定されたか、輸送機構がどのように明らかになってきたかに関する Randy Schekman と Jim Rothman の初期の研究に出会ったんです。そこで当時輸送機構を研究していた有名な研究室を全て把握し、Rothman 研、Suzanne Pfeffer 研、Scott Emr 研に応募しました。

私は博士課程の間、沢山の顕微鏡観察を行いました、実際それが何より好きでした。顕微鏡の前に座って、細胞の中で何が動いているのを見るのが本当に好きだったのです。だから、素晴らしい膜生物学をやっている研究室に行きたかった。そしてイエール大学の Rothman 研に行く機会が巡ってきました。ウェルカム・トラストが支援する英米共同プロジェクトに参加する機会が得られたのです。このプロジェクトは、装置を作る人たち（光学やエンジニアリング）、プローブを開発する研究室、そして細胞生物学の研究室が参加する、本当に多様な人々の集まりでした。知っているかもしれませんが、Alana Shephard、当時はイエールにいて現在はパークレーにいますが、彼女もその一人でした。私はそこで超解像顕微鏡の応用に本気で取り組む初期の生物学者の一人として研究できるということに、本当に魅力を感じたのです。

遠藤 それでスローンケタリングの Rothman 研に移ったんですか？

Bottanelli いえ、イエールに移りました。Jim は既にイエール



大学で、学科長をしていました。

Beckmann それは博士課程ですか、それともポスドクですか？

Bottanelli ポスドクでした。博士号はイギリスで取得し、その後アメリカのイエール大学でポスドクとして、生物学的発見のための超高解像度顕微鏡開発という大規模な共同プロジェクトに携わりました。そこで私は、使いたい超解像顕微鏡を自由に選ぶことができました。4 π 顕微鏡¹²のような、対向する2つの対物レンズを用いてナノメートルスケールの単一分子分解能を実現するタイプなど、あらゆる装置が揃っていて、驚くほど恵まれた環境でした。「ここしかない」という、まさに絶好の場所とタイミングだったと思います。

しかし私は、単一分子局在化顕微鏡（SMLM）¹³にはやや失望しました。だって1枚の画像を得るのに1時間も待ち、その後すべての点滅イベントが検出されるまでさらに5時間待たなければ、1枚の像として再構成できなかったのです。だから私はSTED 顕微鏡¹⁴を使うようになりました。これは純粋に光学的な手法で、顕微鏡を覗いた瞬間に何を撮っているかが見えて、その場で結果が得られます。スループットも高く、すでに市販の顕微鏡が多く利用可能であったことも魅力でした。

遠藤 それで、あなたが超解像顕微鏡で見たいと思っていた対象は何だったのですか？

Bottanelli ゴルジ体における積荷（カーゴ）輸送のモデルです。槽成熟か小胞輸送かという問題¹⁵です。当時は大論争があり、私はその論争の渦中に放り込まれたような感じでした。最終的にはそこからうまく抜け出すことができましたが。

遠藤 当時はどちらのモデルが有利に見えましたか？

Bottanelli 当時の私はとてもナイーブで、純粋に「生きた細胞の中で小胞が出芽して形成される様子を高解像度で世界で初めて追いかけてみたい」という気持ちでした。しかし今では、私はどちらかと言えば槽成熟モデル寄りだと思います。

私たちはゴルジ体の研究は行っていませんが、細胞内輸送には多くの類似性があり、たとえばエンドソーム形成においても、コンパートメント A とコンパートメント B の間を小胞が往き来するのではなく、GTP アーゼによって制御された膜表面の組成変化によってコンパートメントそのものが変化していく、ということが分かってきました。ER でも、ゴルジ体でも、細胞膜でも、エンドソームでも同様の現象が起こっているのなら、ゴルジ体でも同じ仕組みで動いているのではないかと、思うのです。現在私たちは、コンパートメントが内部のカーゴの存在をどのように感知し、「成熟すべきかどうか」を決めているのかを理解しようと

しています。まるでインテリジェントなコンパートメントです。「このカーゴがあるからこちらに進む、このカーゴなら別方向へ」と判断しているかのようです。いまの高解像度で動態を追える顕微鏡技術なら、そうしたプロセスを実際に目で見て理解できるようになってきたと感じています。

遠藤 それでドイツに戻ったんですか。

Bottanelli いや、すぐには戻っていません。イタリア、イギリス、アメリカ・・・。実は私と夫は、同じ場所で二人の教員職を探していたんです。大変でした。2年間、文字通り2週間おきにアメリカとヨーロッパを行き来して面接を受けていました。ここでオファーをもらったり、あそこでオファーをもらったり・・・。そんな中ベルリンで働く機会が出てきて、自分のグループを始めるための資金を少し持っていた夫がこう言ったんです、「実は Christian Spahn の研究室で働くつもりだ」と。さっき Roland Beckman の話に出てきた Spahn です。

それで私たちはベルリンに行くことに決めました。ジュニア教授¹⁶のポジションとしては非常に良かったし、それに付随するポストもありました。かなりのスタートアップ資金も用意されていて、顕微鏡も購入してくれると言われていました。それは明らかに私のやりたい研究に必須の機材でした。だから若手研究者向けのポジションとしては、私にとって非常に魅力的で条件が良かったんです。

遠藤 それは何年ですか？

Bottanelli 2018年の終わりですね。こうして結局ドイツに落ち着きました。ただ、残念ながら、非テニュアトラックのポジションだったのです。非テニュアトラックであるにもかかわらず、成功するためのリソースとサポートが十分に提供されたので、決断を後悔してはいません。

遠藤 でも、なぜスタートアップ支援をこんなに充実させたポジションなのにテニュアへの道がない(非テニュアトラック)のでしょうか？そこまでお金をかけながら、ずっと大学に残ることは望まないという。

Beckmann ドイツのアシスタントプロフェッサー制度についての議論は、そもそも別の意図から始まったのだと思います。政府の主導でより多くのアシスタントプロフェッサーポストを増やす、大学がそれにテニュアトラックを提供するという構想でした。実際、それが実現した大学もある一方で、多くの大学はテニュアトラックを提供するだけのポジションがありませんでした。それでも中央政府から給与が支払われるアシスタントプロフェッサーポストは確保され、人員は補充されました。しかし、当然ながら、彼らはテニュアトラックではありませんでした。つまり、



この制度は正しい方向を向いていたものの、十分に考え抜かれてはいなかったのです。そしてこれは歴史的な経緯によるものでもあります。古いドイツの制度はハビリタシオン(教授資格)を取得し、教授資格レベルに到達した後、いずれ教授職を得る、あるいは得られない、というものでした。そこで「より進歩的な仕組みが必要だ」という考えが生まれ、米国式にポストドク終了後に独立研究者となる道を模索し始めました。そこで独立若手グループ、ジュニア教授職が始まりました。しかし、これらはテニュアポジションの数に比べて遙かに多くの独立PI枠を生み出しました。今でも状況は同じで、独立グループリーダーになること自体は比較的容易でも、そこからテニュアの(終身)ポジションへと移行するのは依然として難しいままです。これは誰かが計画したというよりは、単に「若くして独立を与える」という最初の発想の帰結でしかないわけです。

私たちの大学でも状況は似ています。W2テニュアトラック教授¹⁷がテニュアを得て、正規の教授にはなれますが、長い間、W3(チェア)教授のポジションに昇格するルートが存在しませんでした。つまり、チェアには永遠になれないわけで、その結果、本当に優秀な人材は大学に残らず外へ出て行き、残ったのはそうでない人ばかり、という状況も生まれました。

ミュンヘン大学(LMU)はその点をあらため、今ではW2からチェアに昇格できる可能性があります。しかし、それでもドイツの制度のこの「不透明な時期」は大きな問題です。そして、テニュアトラックではないポジションにいる限り、どれだけ優秀でも最後には職を離れなければならないのです。

これにはドイツの古い伝統も関わっています。「研究者は場所を移るべきだ」という価値観があり、それが自立性や主体性の証しと見なされているのです。ドイツには「in-house course(内部昇進)を避ける慣習」というものがあり、自分の大学から教授を選ぶことは特に慎重に扱われ、抵抗があります。

Knorr 通常、教授は外部から採用すべきとされ、外部からのオファーがある場合のみ、その大学が対抗して教授職を提示することが可能になるのです。外部オファーなしでは、制度上ほぼ不可能です。

Bottanelli こうした問題を補うために、DFG はハイゼンベルク・プログラムを設けました。DFG の研究資金を申請する際に、大学に「テニュアを与えるつもりがあるか」を訪ねることができます。DFG は給与を 5～6 年間負担し、その後大学はテニュアを与えることを約束する仕組みです。

Beckmann しかし、競争が激しく、簡単には取れません。他にもハイゼンベルク・フェローシップという制度もあり、大学が 5～6 年間あなたを受け入れる保証を出すというものもあります。



遠藤 そうすると Francesca、あなたの今はどんな状況なのですか？

Bottanelli 私はいま、いくつかのポジションの面接を受けていて、おそらく近いうちに何かしらの結果が出ると思います。フルプロファイルの教授職、チェアのポジションの面接も受けていますので、なんらかの機会が得られると思います。現在の契約は 2029 年末までありますが、望まない場所には行きたくありません。家族を連れて「ここに住みたい」と思えるところにしか応募していません。

ドイツにおける研究環境

Beckmann ドイツのアカデミアについての厳しい現実を言えば、「この分野で生きるなら、不安定さを受入れ、計画を立てられないことを覚悟し、都市や国を移り続ける覚悟が必要」ということです。子供がいる時期ですら引っ越しが必要になることもあります。私も最初の子供はニューヨークで生まれ、その後夫婦でアカデミアにいてドイツに戻りました。完全にリスクだらけでした。

Bottanelli とはいえ、ドイツのアカデミアには良い点もあります。研究資金は非常に充実しており、インフラも整っています。

Beckmann そうですね、個人的には、「また同じ道を選ぶだろう」と断言できます。私は常に「失敗してもかまわない」と思ってきました。生化学のディプロマ¹⁸を取れたのも驚きでしたし、博士号を取れるとは思っていませんでした。ポストドクでも失敗するだろうと思っていましたが、それでも楽しかったので挑戦しました。研究には「楽器を演奏するような遊びの側面」があり、自分の問題を選び、新しいことを発見するという、自立した意思決定の喜びがあるからです。

Knorr 私も同感です。もし今いる場所や生活スタイルを気に入っているなら、さらに 2 年間ポストドクを続けるのも良いでしょう。でも、状況全体が辛く、不安ばかりで 2 年間すごすなら、それは時間の無駄でしょう。この時期を楽しめる精神状態にあることが重要です。好きでなければ、アカデミアにはお金も安定もありませんから、やっていられません。

Beckmann ミュンヘンでは、多くの学生が最終的に特許法の方分野に進んだり、企業コンサルタントになったりします。給与はずっと高く、ミュンヘンに住み続けることができるからです。私の研究室でも、成功した PhD の多くが特許弁理士になりました。産業界の方が安全だと思われるようです。今それが本当に安全かどうかは別ですが、少なくとも給与はアカデミアよりはるかに良い。そして学生たちは、学問の独立性や研究プロセスをあまり価値としてみていないように感じます。それは私にとって非常に残念な点です。

吉川 産業界での経験はどうでしたか？

Knorr 「産業界では公的資金が使われれば正規のポジションが得られるのに、同じお金が公的な研究機関に入ると、プロジェクト資金と任期付きのポジションにしかならない」という話を聞きました。これはとても興味深い指摘だと思いました。私が産業界で最初に経験したのは製薬企業の品質管理の仕事でしたが、すべてがとても標準化されていて、正直なところ退屈なものでした。最初の数ヶ月は学ぶことが多く急な学習曲線があっただけ良かったのですが、その後は新しいことがほとんどなく、学習曲線は水平、つまり成長も変化もないように感じられました。そういう環境は私の興味を引くものではありませんでした。

次にバイオテック企業、いわゆるスタートアップで働きました。大学を卒業したばかりの若い人たちが集まり、とてもダイナミックなチームで、今でも 20 年前のメンバーと会うくらいです。雰囲気は全く違って、私はそうした環境が好きでしたが、それ

でも自分で決定出来ることは限られていて、「この実験のコストをカバーするために企業との共同研究を取れるかどうか」「会社をもう1年維持できるだけの資金を調達できるか」といった、常にギリギリの状況でした。つまり何が起るかは、自分の手の中にあるとは言えなかったのです。

それでも私はその会社での仕事に満足しており、おそらくあと数年は続けていけたと思います。しかし、産業界とアカデミアの両方を経験した上で元に戻してみると、良い面も悪い面も含めて、私はアカデミアの環境の方が自分には合っていると感じたわけですね。

遠藤 米国では若い人がベンチャー企業を立ち上げようとする動きがありますが、ドイツではどうですか？

Knorr ドイツは資金状況が少し違います。スタートアップ（起業）に関してはアメリカの方が恵まれていますし、文化的にもアメリカの方がリスクを取ることに積極的です。失敗してもドイツほど問題視されず、またすぐに新しいことを始めればよい、という考え方です。その点、ドイツでは様々な理由でスタートアップを支援する仕組みが簡単ではありません。とはいえ、多くのスタートアップが生まれているのは確かです。ただ米国とは若干異なる形で、ということです。

遠藤 これは政府が後押ししているのでしょうか？

Knorr はい、大学や政府からの資金援助があります。スタートアップも生まれていますが、物事の進め方や新しいことの扱い方などの文化は異なります。

Beckmann ドイツにはいくつかのバイオテクノロジーの拠点が、ベルリン、ミュンヘン、そしてある程度はハイデルベルクにもあります。そこでは、多くの補助金や研究基盤が整備されています。しかしスタートアップを立ち上げるのは若者ではなく、すでに確立した教授たちです。彼らは特許やアイデアを持っていて、ある時点でお金にも興味を持つようになるわけです。少なくともミュンヘンでは、そういう印象です。他の分野は分かりませんが、少なくともバイオテクではそうです。

Bottanelli 現在、うちの大学でもスタートアップ推進のための研究費支援スキームが強調されています。例えばトランスレーショナル研究のアイデアがあれば大学から一定額の資金が得られますし、特許や知的財産、スタートアップを後押しする制度が整っています。

ドイツと米国の違いなど

遠藤 ドイツの研究環境は依然として非常に良いですね。一方

で政治的には分断が進んでいるようですが、それが研究環境に影響することはありますか？

Beckmann 現時点では影響は出ていないと言えるでしょう。今後数年の政治状況次第ではどうなるか分かりませんが、歴史的にはドイツはアメリカの後を追うことが多いです。ドイツにも右派ポピュリスト政党がありますし、今後どうなるかは分かりません。しかし過去10年ほどは安定していて、少なくともインフレと同程度には研究費も増えていました。もっと増えるべきだとは思いますが。軍事予算には何十億、何百億も使っているのですから。ただ、他国と比べればまだ恵まれている方だと思います。アメリカの研究費採択率は一桁台、5~7%だと聞きますが、それに比べればドイツははるかに良い状況です。

吉川 ドイツでは市民が科学の重要性を理解しているからでしょうか？アメリカでは一般市民が知性を嫌ったり、科学を軽視する傾向があると思います。

Beckmann ええ、でもアメリカでの研究費の採択率が低いのは昔からで、それ自体は最近の傾向とかではありません。単にシステムが違うというだけで、ドイツでも申請件数が多くなれば採択率は下がります。それでも、まだ他国よりは良いということですね。

このあたりは政治的な判断が大きいと思います。ERC グラントのような非常に価値が高い助成金制度も最近導入されましたが、これは合理的な仕組みです。ドイツの科学への姿勢は複雑です。ご存知の通り、長い間ドイツでは遺伝子組み換え技術への恐れがありました。そのため、40年前に私の研究所（ミュンヘン大学遺伝子センター）はErnst-Ludwig Winnackerによって設立されたのですが、これはいわゆるヘキスト・ショックという事件がきっかけでした。ヘキスト社が組換えインスリンを作ろうとした際、ドイツでは許可されず、アメリカで生産しなければならなかったのです。

化学会社のヘキストは組換えインスリンの開発を望んでいました。長い間、それは豚から精製されていましたが、ドイツでは新技術への恐れから許可が下りませんでした。ドイツ人にはなぜか技術に対する伝統的な恐れがあるように思います。そのため、遺伝子工学を導入するためにいくつかの研究所が設立されました。遺伝子センターもその1つでしたが、現在では別の目的と使命を担っています。しかし今でもドイツでは、たとえば農業分野では遺伝子組み換え作物は完全に禁止されています。これは極端すぎるし、合理的とは言えません。

とはいえ、ヨーロッパでは一般市民の科学リテラシーが極端に低いわけではありません。

遠藤 なるほど、そうするとヨーロッパでは一般市民が、科学的に何が適切で何が不適切かを判断できますか？例えばワクチン、



RNA ワクチンなどについて。

Beckmann パンデミックのときは少し混乱があり、陰謀論が広まりました。そのため疑念を持つ人々も一定数います。しかし、全体としては広く受け入れられていると思います。私の印象では、ヨーロッパ、特にドイツではその点はアメリカより良い状況だと思います。

Bottanelli 私はアメリカとヨーロッパの両方で生活してきました。アメリカでは人々の考え方がより極端で、政治的にも左右の対立がはるかに大きい、分断されていると感じます。ヨーロッパにももちろん極端な人はいますが、基本的には「中心からのずれ」のようなもので、その幅はアメリカほど大きくない、というのが私の印象です。だから、アメリカほど激しい議論にならないことも多いのだと思います。人々の考え方がもっと穏当で、中庸なのです。

Beckmann それに付け加えると、確証はないですが、ヨーロッパでは平均的な教育水準がある程度の科学リテラシーにつながっているのではないかと、とも思います。アメリカでは必ずしもそうではありません。ヨーロッパでは教育が無償で受けられる国が多いですよね。私たちがサバティカルでカリフォルニア州サンディエゴに滞在していたとき、息子は現地の公立高校に通いました。そこは「良い高校」と評判の学校でしたが、それでも教育レベルが本当に低くて驚きました。ですから、もし本人が勉強に興味を持っていなかったり、保守的な家庭環境にあったり、あるいは質の低い高校に通っていたりすると、簡単に「教育をほとんど受けないまま」になってしまいます。

遠藤 宗教の影響はどうか？アメリカでは熱心なキリスト教徒であるためにはダーウィン進化論を信じない人が多いと言われます。ヨーロッパでは宗教は科学に影響しませんよね？

Beckmann ええ、ヨーロッパではほとんど影響しません。宗教が問題になることはありません。アメリカでは正直何が起きているのかよく分かりません。私たちはアカデミアの「情報バブル」の中で暮らしているので、なおさら実感が湧きづらいのです。

Bottanelli 私はちょうどトランプがはじめて大統領に当選した2016年にイェールとニューヨークに住んでいました。完全にその「バブル」の中にいたので、選挙結果を聞いて本当に驚きました。

Beckmann カリフォルニアで初めてトランプ支持者を見ました。カリフォルニアではたいていは民主党支持者ですが、それでも、サンディエゴには巨大な軍事基地があります。だから、地域のフェアなどに行くと、そこで初めて存在を知るような人たちがいるんです。政治的なTシャツを着て政治的主張をしているんです。それまでの私の生活圏では全く見えなかった人々です。トランプの当選は「そんなに多くの人があの方向性を支持しているのか」ということを明らかにした出来事でした。

AI 時代の生命科学研究

吉川 そろそろ科学の話に戻りましょう。これからの細胞生物学や生物物理学、あるいは生命科学全般の未来はどうなるでしょうか？いま AI によって大きな変化が起きていますが・・・

Bottanelli 私たちの研究室が進んでいる方向は、あなたたちの言う「クロススケール」という考え方、階層＝スケールを橋渡しすることです。超解像顕微鏡でタンパク質複合体を細胞内で正確に同定し、それを *in situ* 構造生物学につなげたい。さらに急速な細胞操作を行って、生きた細胞の中でその複合体の構造がどう変わるかまで見たいのです。これはまだ夢ですが、少しずつ近づいていると感じます。たとえばオルガネラを精製して、そこにある膜タンパク質に AlphaFold の構造をドッキングさせる、といったことを試みている段階です。

遠藤 つまり技術駆動のライフサイエンスに大きな期待をしているわけですね

Bottanelli はい、私は非常に技術志向で、新しい標識技術やイメージング技術の最先端に常にしようとしてきました。最近の超解像顕微鏡の進歩は驚異的で、サブナノメートル以下の分解能で生細胞内の構造生物学ができるようになってつつあります。

遠藤 しかし研究はますますお金がかかるようになりますね？

Bottanelli 確かに最先端のMINFLUX顕微鏡¹⁹は2~3百万ユーロします。ただ、数年すればもっと手が届くようになるはずと期待しています。それでもまだ高価なので、色々考えてMINFLUX顕微鏡の初期モデルの一つを導入申請しました。でもまだ技術開発の段階で、生物学の問題に使うには早いと感じました。あと5~10年待つべきかもしれません。

Knorr 私は、技術は重要だと思いますが、「一番重要」とは限らないと思います。今回のコンファレンスでは、新技術に過剰な研究費を投入せずとも、既存技術を相互に連携させることで実現できる可能性が、見事に示されていました。具体的には、ハイエンドの超解像顕微鏡、クライオ電顕、計算科学、生細胞イメージングなど、一人ではカバーできない領域をつなぐ必要があります。本当に必要なのは「技術の統合」です。しかし一方で、データが揃っても、それを元に「正しい問い」を立てるにはとても時間がかかります。多くの研究者は次の論文に急ぐあまり、そうした時間を取らないのです。

遠藤 つまり生命科学はますますビッグサイエンスになって、一般の人々はその最前線を理解できなくなる？

Knorr 私も同じ問題を感じています。発表を聞いても、専門外の話だと全く理解できないことがあります。まして一般の人には難しすぎます。しかしそれでも、技術開発は必要です。電顕の解像度が飛躍的に上がったように、他の分野でもゲームチェンジャーが求められています。ただ、科学者が別々の方向にバラバラに走るのではなく、協力して、統合的に進めるべきです。その意味でも、今回のコンファレンスはとても有意義でした。企画に感謝します。

Beckmann 私は予測が苦手な、明快なビジョンを持つタイプではありません。私のポストドク時代のボス、Günter Blobelは、わずかな実験結果から大きな世界を描ける人でしたが、私はそういう才能を持っていません。だから、私は構造のように「目で見えるもの」が好きなのだと思います。

本質的に2つのレベルがあると思います、細胞のレベルと多細胞のレベルです。細胞レベルでは色々なことについてかなり理解が進みましたが、多細胞性の理解はまだです。今回のコンファレンスになかったトピックは、オミクス系の研究、たとえば質量分析やシーケンスです。これらは仮説なしでも役立つ強力な方法ですが、相関データばかりで因果関係が見えないことも多いです。スクリーニングしても、候補を1つずつ掘り下げ、メカニズムを理解し、構造を明らかにする必要があります。20年前には誰もコンデンサート、相分離だの考えていませんでしたし、今後

何が出てくるか全く分かりません。私が単一遺伝子のクローニングを始めた頃は、それが核膜孔複合体の一部か輸送因子かもしれない、というだけで論文になりました。単一構造の解析も論文になりました。しかし、今では構造は論文の図の1つに過ぎません。大きな物語になりすぎて、誰一人として単独ではとても成しえない。共同研究や幅広いアプローチ、異なる手法の統合が絶対に必要です。

遠藤 これは科学の進歩の必然的な方向性なのでしょうか？

Beckmann そう思います。そしてそれは同時に困難も伴います。

遠藤 データが膨大すぎて、個人の思考能力を超えかねません。

Beckmann その通りです。遺伝学者、構造生物学者、計算科学者では、ものの考え方が違いすぎる。そのため、手法だけでなく、「概念」においても力を合わせる必要があると考えます。

遠藤 AIはその助けになりますか？

Beckmann 非常に便利ですが、限界もあります。顕微鏡を覗いて自分の目で現象を見ることは理解の大きな一部です、AIはそこを代替できません。コンピュータの前に座ってプログラムを実行し、データベースを検索し、統計的に有意なヒットを得たとしても、自分の目で何かが起こるのを見るのと同じくらい魅力的かどうかはわからないのです。

学生が何でもAIに聞き、AIというブラックボックスの答えを鵜呑みにすることで思考力が退化する危険もあります。私の学生がChatGPTに「次の実験として何を提案するか」と尋ねたところ、彼女が元々考えていた計画と同じ答えが返ってきて、「私は不要なのか」と思ったほどです。

ですから、AIは使うべきですが、依存すべきではない。今の若い研究者は数学、プログラミング、AI、ビッグデータ解析、さらにメカニズム解明・・・と、私たちの時代より遙かに多くを学ばねばならず、本当に大変だと思います。

遠藤 でも、それは研究として本当に楽しいのでしょうか？

Beckmann それが楽しいならね。

遠藤 いやいや、違う。AIを使ってビッグデータを処理させるだけなんて、楽しくないです。

Beckmann 同感です。

遠藤 では、私たちには何ができるんでしょう？

Beckmann AI が全てをこなせるわけではないです。つまり、AlphaFold から得られる構造は評価できるし、AlphaFold は方向性すらスクリーニングできます。これは非常に有用です。つまり、AI は本来なら退屈な作業の多くをやってきているわけです。モデル構築もしてくれますが、あれも退屈な作業ですよ。だから AI を適切に使えばよいのです。

Bottanelli AI は、私たちが退屈に感じる作業を引き受けてくれるものだと思うんです。例えば、蛍光顕微鏡をたくさん使って、ひたすら多くの構造を一つ一つクリックして定量するような作業がありますよね。ああしたものは時間を浪費してしまうので、私たちはその時間をアイデアやモデル、仮説について議論することに使えるはず。だから退屈な部分を AI にまかせて、私たちは面白いことに集中できるようにすればいいのです。

Beckmann それに、AI はメタレベルには動けない、現場の物質そのものを動かすことはできません。つまり、自分でピペットマンを使ってサンプルを移し、美しいゲルを流し、きちんとした精製を行える必要があります。これはスキルを身につける問題です。そして、あなたの分野のような顕微鏡技術も、1日で習得できるようなものではありません。経験が必要なんです。

たとえ AI を駆使しても、手作業の技術と状況をコントロールする力が必要です。だから私はそれが楽しいと思いますし、システムに対する直感を身につけることも非常に重要だと思います。私は、研究はまだまだ「楽しい」ものだと思います。

遠藤 研究の楽しさを見つけるには、ハンズオン（手を動かす）経験が重要ということですね。

Beckmann, Knorr, Bottanelli
まったく同感です。

吉川 それが結論かもしれませんね。
本日は、どうも長時間にわたりありがとうございました。

(2025年9月15日 東京大学医学部にて。
写真撮影 Jinyuan Yu)

註

1 プロボロジー

初期のクライオ電顕の画像ではタンパク質やその複合体がぼんやりした塊 (blob) にしか見えなかったことから、blobology (プロボロジー) と揶揄されていた。

2 Sec63

酵母 ER の SEC トランスロコンは、Sec63 を含まないトランスロ

コンと含むトランスロコンに分けられる。前者は Sec61, Sbh1, Sss1 から成り、SRP に依存して (リボソームによる新生鎖延長に駆動されて) co-translational な膜透過を行う。後者は Sec61, Sbh1, Sss1, Sec62, Sec63 から成り、ER 内腔のシャペロン BiP のモーター機能の助けを借りて SRP 非依存の post-translational な膜透過を行う。

3 W3 教授

ドイツには日本の准教授～若手教授に対応する W2 教授と独立講座を主宰する主任クラスの W3 教授に分かれる。どちらも伝統的に大学教授資格 (ハビリタチオン) が必要。

4 電子線検出器

入射した電子を直接シリコンセンサーで検出する装置で、高速の動画撮影が可能。この特性により、電子線照射に伴って生じる粒子の動きをフレームごとに補正することができる。また、旧世代の電子顕微鏡で用いられていた CCD カメラとは異なり、シンチレーターによる電子から光信号への変換を行わないため、電子散乱に起因する像のボケが大幅に低減される。これらの特長により、電子線検出器はクライオ電子顕微鏡単粒子解析に不可欠な要素となり、電子顕微鏡における分解能革命をもたらした主要因の一つである。

5 CMOS カメラ

一般的な CMOS カメラは可視光を直接検出するための装置であり、シンチレーターを必要としない。一方、電子顕微鏡で用いられてきた従来型の CMOS カメラでは、電子線を光信号に変換するためにシンチレーターが用いられてきた。これらのカメラは主として静止画像の取得に用いられ、高速動画撮影は困難であるため、クライオ電子顕微鏡単粒子解析には不向きである。

6 SecY がトランスロコンではないという主張

Watanabe, Nicchita, Blobel (1990) PNAS 87, 1960-1964. 大腸菌の細胞膜反転小胞を可溶化して膜透過できるプロテオリポソームを再構成する際、SecY を含まないにもかかわらず膜透過可能であったことから、SecY は膜透過装置 (トランスロコン) に必須ではないという報告。

7 YidC

原核生物の細胞膜でタンパク質の膜組込を担う装置 (インサターゼ)。SEC トランスロコンと異なるタンパク質が通過するチャネルを作らず、タンパク質-脂質界面を使ってタンパク質を膜に組み込むミトコンドリアや葉緑体、ER にもホモログが存在する。

8 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。

9 Jonathan Weissman らの CAT テイルの論文

Kostova et al. Science 357, 414-417 (2017). リボソームによる翻訳が途中で停止すると、未完の新生鎖がリボソームに取り残され翻訳ができなくなってしまうため、細胞内にはこうしたリボソーム-新生鎖複合体を除去する品質管理システム (RQC) が備わっている。新生鎖に Lys があれば Ltn1 による新生鎖のユビキチン化と分解が行われるが、これがうまく働かない場合は、もう一つの経路として Rqc2 により新生鎖の C 末端にシステイン(C), アラニン(A), スレオニン(T)に富む配列 (CAT テイル) が mRNA 非依存に付加され、分解系に回される。

10 ハビリタチオン (大学教授資格)

ドイツで大学教授になるための資格。独立して研究・教育を行う能力を証明するもので、ハビリタチオン論文の提出、口頭試問、模擬講義などが求められる。通常、ポストドクとして 5~10 年研究した後ハビリタチオン論文を提出することになる。

11 コンデンセート

相分離によって生じる液滴を含む、細胞内で膜を持たずに形成される高濃度の分子集合体。液滴以外にもゲル様構造体なども存在する。生体膜と接触することで、wetting にともないキャピラリー (毛細管) 力を介して膜の形態を変えたと考えられている。

12 4 π 顕微鏡

通常の共焦点顕微鏡や広視野顕微鏡では、対物レンズは 1 本で、光は最大でも半球 ($\approx 2\pi$) からしか集められない。そのため、XY 分解能は高いが、Z 分解能は悪いという非対称性が生じる。この問題を克服するために開発されたのが 4 π 顕微鏡である。4 π 顕微鏡では、試料を上下 2 本の対物レンズで同時に照明・検出し、ほぼ全立体角 ($\approx 4\pi$) から光を集めることで、特に Z 方向 (軸方向) の分解能を飛躍的に高めることができる。

13 単一分子局在化顕微鏡 (SMLM)

単一蛍光分子を時間的に分離して観察し、それぞれの発光位置を高精度に特定することで、回折限界を超えた空間分解能を実現する超解像蛍光顕微鏡。その際、蛍光分子を確率的に ON/OFF 制御し、同時に光る分子を極端に少なくする。これにより、各蛍光分子の中心位置を数ナノメートル~数十ナノメートルの精度で決定できる。

14 STED 顕微鏡

通常の共焦点顕微鏡では、励起された蛍光分子は自然放出によって発光するため、実効的な蛍光発生領域の大きさは回折限界によって制限される。一方、STED 顕微鏡では、蛍光分子を励起した直後にドーナツ状 (中心がゼロ強度) の STED レーザーを照射し、周辺部の蛍光分子を誘導放出により強制的に消光させることで、中心部のごく狭い領域だけが蛍光を発するようにする。その結果、実効的な蛍光発生領域が回折限界以下に縮小され、回折限界を超えた分解能を実現できる。XY 方向の分解能は 20~50 ナノメー

トル程度である。

15 槽成熟 (cisternal maturation) か小胞輸送 (vesicular transport) か

ゴルジ体における異なる槽 (cisternae) のあいだの物質輸送がどのように行われるかについての論争。小胞輸送説では、タンパク質などのカーゴ (積荷) が ER から cis ゴルジへ、cis ゴルジから medial ゴルジへ、medial ゴルジから trans ゴルジへと、順方向に小胞で運ばれると考える。プロコラーゲンなどの巨大カーゴの輸送を説明できない、ゴルジ酵素の分布の維持の説明が難しいなどの問題がある。槽成熟説ではゴルジ槽そのものが時間とともに成熟しつつタンパク質を前方 (trans ゴルジ側) に運ぶと考える。カーゴは槽内に留まり、ゴルジ酵素は COPI 小胞で逆行輸送され、cis 側の槽へと戻る。酵母ゴルジのライブイメージングは槽成熟モデルを支持している。

16 ジュニア教授

註 3 を参照

17 W2 教授

註 3 を参照

18 ディプロマ

ドイツの大学において特定の課程を修了したことを証明する卒業証明書や修了証書。

19 MINIFLUX 顕微鏡

強度最小点 (ゼロ点) をもつ励起光を用い、蛍光分子がどこにあるかを「光らせる」のではなく「光らせない点」から推定することで、極めて高い位置決定精度を実現する超解像蛍光顕微鏡。具体的には、ドーナツ状 (中心ゼロ強度) の励起ビームを、蛍光分子の近傍で、ゼロ点の位置をわずかに変えながら照射し、各位置で得られる蛍光フォトン数の違いを測定する。「どのゼロ点配置で最も光らなかったか」の情報から、分子位置を数ナノメートル以下の精度で推定する。

Roland Beckmann

ドイツ ミュンヘン大学 (LMU) 遺伝子センター・教授

略歴 1995 年 ベルリン自由大学で PhD 取得。1995～2000 年 米国ロックフェラー大学 Blobel 研ポスドク, 2001～2006 年 フンボルト大学ベルリン校フォルクスワーゲン財団グループリーダー, 2006 年～ 現職。リボソーム, トランスロコンおよびそれらの関連複合体のクライオ電子顕微鏡研究の第一人者。

Roland Knorr

ドイツ ケルン大学・教授

略歴 2010 年 ポツダム大学で PhD 取得, 2011～21 年マックスプランク研究所 (ポツダム) ポスドクおよびグループリーダー。この間 2013 年東工大で JSPS PD, 2018～19 年東京大学助手, 2021～24 年 フンボルト大学ベルリン校でグループリーダー, この間 2023～24 年東工大で特任准教授, 2024 年～現職。細胞内コンデンセートと生体膜の相互作用および毛細管力の研究で注目される界面細胞生物学研究の第一人者。

Francesca Bottanelli

ドイツ ベルリン自由大学・ジュニア教授

略歴 2011 年リーズ大学で PhD 取得, 2011～18 年イエール大学 Rothman 研でポスドク, 2018 年～現職。細胞内輸送や膜動態に関する超解像顕微鏡研究の第一人者。

クライオ電子顕微鏡導入にあたって

横山謙

この度、関係各位の多大なる支援と尽力により、ハイエンドクラスのクライオ電子顕微鏡「Glacios2」が本学に導入されることとなった。西日本の私立大学としては初の導入例であり、国内の私立大学においても2025年9月にクライオ電顕が導入された慶應義塾大学医学部とほぼ同時期の希少な事例である。本機は、試料を極低温状態で観察することにより、生体高分子の構造を高分解能で解析可能とする装置であり、構造生物学、分子医学、創薬研究など多岐にわたる分野において革新的な成果をもたらすことが期待されている。こうした最先端機器の導入は、本学が推進する先端研究の基盤強化に資するものであり、研究環境の高度化において極めて重要な意義を持つ。一方で、本機は非常に高額な設備であり、本学がこの分野に対して多大な投資を行ったことに対し、深甚なる敬意と感謝の意を表するものである。我々には、この設備導入に込められた期待に応えるべく、先端的かつ国際的に競争力のある研究成果を創出する責務が課されている。

電子顕微鏡との出会いと初期の研究

私が電子顕微鏡による構造解析に初めて関与したのは、大学院生の頃であり、今から約30数年前にさかのぼる。当時、私はF₁-ATPaseの再構成実験に取り組んでおり、異なる組成を持つ再構成体の構造を比較することで、各サブユニットの分子内配置の同定を試みていた。電子顕微鏡によるタンパク質構造解析において国内で先導的な成果を挙げていた東京大学理学部若林研究室を訪問し、F₁ ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$)、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 、 $\alpha_3\beta_3\delta$ の三種の複合体を電子顕微鏡により観察した。当時の電子顕微鏡観察は負染色法によるものであり、分解能はサブユニットの有無を判別できる程度に限られていたが、それでも γ サブユニットが分子中心に位置し、 δ サブユニットが $\alpha_3\beta_3$ の外側に結合しているという構造的知見を得ることができた¹ (図1)。

当時、マックス・プランク研究所のH. Michelらのグループが光合成活性中心の高分解能X線結晶構造を報告しており、それと比較すると、電子顕微鏡によって得られた構造情報は分解能の面ではるかに見劣りするものであった。

その後、好熱菌由来のV型ATP合成酵素(V/A-ATPase)に関する1分子解析および結晶構造解析に研究の主軸を移し、電子顕微鏡からは一時的に距離を置くこととなった。V/A-ATPase全体の構造決定を目指して結晶化に注力したが、結晶自体は形成されたものの、得られた回折像の分解能が不十分であり、全体構造の決定には至らなかった。

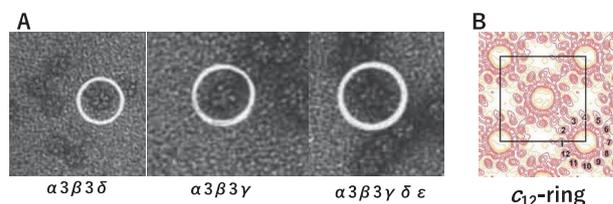


図1. A 好熱菌 F1 由来の再構成体の負染色像。 $\alpha_3\beta_3\delta$ は、中心に穴が見えるが、その他の再構成体は穴に密度があり、穴の密度が γ 由来であることが推察される。B V/A-ATPaseの c_{12} -ringの2D結晶構造

その頃、クライオ電子顕微鏡を用いて2次元結晶から高分解能構造解析を行っていた光岡博士と議論する機会を得た。これを契機に、V/A-ATPaseの膜内在性部分であるVo領域の2次元結晶構造解析を試みることとなった。2次元結晶を用いた電子線構造解析により、原子モデル構築が可能な分解能の構造が得られることが、R. Hendersonらによって示されており、その研究成果は、1997年のノーベル賞受賞にもつながっている。

話を本題に戻すと、Vo領域の2次元結晶作成を試みた結果、結晶シートの形成に成功した。これに電子線を照射して構造解析を行ったところ、残念ながらVoの全構成サブユニットを含む構造は得られなかったが、Vo部分の中核をなすc-ringの構造を明瞭に描出することができた²(図1)。この光岡博士との共同研究は、後にクライオ電子顕微鏡によるV/A-ATPaseの単粒子解析へと発展する重要な契機となった。

この後も引き続き、V/A-ATPase全体の結晶化と構造解析に取り組んでいたが、構造解析に適した回折点を示す結晶を得ることができず研究は停滞した。この状況を一変させたのが、いわゆる「分解能革命」と呼ばれるクライオ電子顕微鏡技術の進展である。

クライオ電子顕微鏡との再接続と技術革新

2013年頃、クライオ電子顕微鏡によってリボゾームの高分解能構造が報告されたという情報を耳にし、その後も巨大なタンパク質複合体の構造解析が次々と発表されたことで、本技術の有用性に強い関心を抱くようになった。ただし、当時「高分解能」とされていた構造は5~8Å程度であり、二次構造の判別は可能であったものの、X線結晶構造解析と比較すると十分とは言えず、発表されたほとんどの構造は、原子モデルの構築には至らないレベルであった。そのような中、大阪大学高圧電子顕微鏡センターにハイエンドなクライオ電子顕微鏡「Titan Krios」が導入されるこ

となり、その管理を任せられたのが、かつて共同研究でお世話になった光岡博士であった。早速光岡博士に連絡を取り、共同研究を依頼することとなった。

まずは精製した V/A-ATPase の溶液を持参し、Vitrobot を用いてクライオグリッドの作成を光岡博士とともにいった。作成されたグリッドを Titan Krios にセットし、PC 上でグリッドの観察を開始したが、当時の操作用 PC は処理速度が非常に遅く、画面が表示されるまでに長時間を要したため、眠気をこらえながら画面を凝視していたことを思い出す。表示された画像には、V/A-ATPase と思われるダンベル型の粒子が確認されたが、この段階では二次構造が判別可能な構造が得られるとは到底思えなかった。とりあえず撮影を進めることとなり、一週間かけて約 1000 枚の画像を取得した。当時のクライオ電子顕微鏡にはマルチショット機能がなく、一晩で 200 枚程度しか撮影できなかったため、撮影には相当な時間を要した。解析には Relion 1.4 を使用したが、GPU 非対応であったため、CPU のコア数を増やす必要があり、ヨドバシカメラで 40 コアの PC を思い切って購入し、解析に臨んだ。Linux 環境への Relion のインストールは初心者向けとは言えず、光岡博士に訪ねいただき、ようやくインストールを完了させることができた。

当時の解析には、今の状況と比較すると考えられないくらい長い時間を要した。マニュアルを見ながら、なんとか 2D 再構成にたどり着いたが、初期に得られた 2D 像は、粒子がぼんやりとした「blob」としてしか見えず、学生からは「雪だるまのようだ」と言われたこともあった。根気強く 2D 分類を繰り返すうちに、V/A-ATPase の外形らしき構造が徐々に明らかとなった。

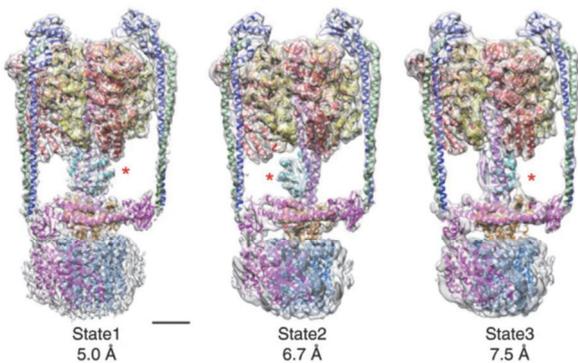


図 2. V/A-ATPase の回転状態に対応した 3 つの構造

粒子画像を整理し、3D 再構成を試みたが、当初は構造が得られず、失敗かと思われた矢先、あるクラスにおいて 8Å 分解能の V 型 ATPase 構造が得られ、ヘリックス構造も確認できた。この瞬間は非常に感動的であった。

その後、撮影枚数を増やし、GPU 対応となった Relion 2.0 を用いることで解析時間が大幅に短縮され、高分解能（といっても 5-8Å）の複数構造を得ることができた（図 2）。手探りで構造解析を進めたため、時間はかかったが、ATP 合成酵素の全体構造に関

しては海外グループに先行されたものの、国内では初となる高分解能の膜タンパク質複合体構造として論文を発表することができた³。

そうこうしているうち、2017 年頃から、原子モデルの構築が可能な分解能を持つクライオ電子顕微鏡構造の報告が急速に増加した。この技術的進展は、カメラ性能の向上、マルチショットによる大量画像取得、解析ソフトウェアの改良、そして解析 PC の演算能力向上によるものである。当時、高圧電子顕微鏡センターの Titan Krios に搭載されていたカメラは、初期型の Falcon 2 であり、高分解能構造の取得には限界があった。一方、Gatan 社製の K3 Summit は、1 電子検出が可能であり、フレーム数の増加、画像サイズの軽量化など多くの利点を有していた。このカメラを用いることで、マルチショットにより一晩で約 5000 枚のクライオ電顕画像を取得することが可能となり、解析に用いる単粒子画像の数が飛躍的に増加した。これにより、繰り返しのクラス分けを通じて複数の構造クラスを分離し、それぞれのクラスの分解能を向上させることが可能となった。さらに、大量の画像データを効率的に解析するためのソフトウェアと PC 環境の進化も、構造解析の分解能向上に大きく寄与した。特に、NVIDIA 社による高性能 GPU の登場により、1 台の PC に最大 4 枚の GPU を搭載することで、複数の構造計算を並列処理することが可能となった。また、Relion の後に登場した解析ソフトである cryoSPARC は、Relion と比べて解析にかかる時間が大幅に短縮でき、ユーザーフレンドリーで使いやすいものであった。これらの技術的要素が重なり、2015 年頃と比較して、莫大な数の画像を迅速に解析し、複数の高分解能構造を得ることが現実のものとなった。

クライオ電子顕微鏡による機能構造解析

このような背景のもと、反応状態に応じた V/A-ATPase の複数構造を決定し、それらを連続的に接続することで、回転運動の様子を再現する試みを行った。V/A-ATPase は、FoF1 ATPase と同様に、回転運動によって機能するモータータンパク質であり、ATP の加水分解過程と回転運動との共役機構の解明は解決すべき課題として残されていた。

クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析は、結晶化を必要としない。この特性は、溶液条件を自由に設定できることを意味し、反応状態にあるタンパク質の構造解析を可能にするという大きな利点を有している。

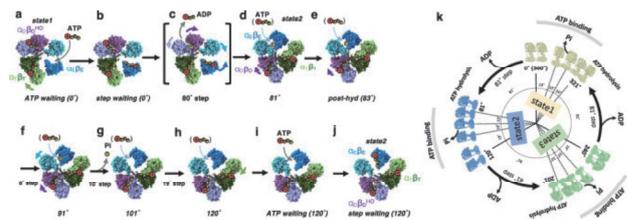


図 3 F₀F₁ ATPase の F₁ 部分の substep 構造。ATP が結合してから複数の構造を経て 120° step が完了する

我々は、ATP 加水分解待機状態、ATP 結合待機状態、ATP 飽和条件下において V/A-ATPase の構造解析を行い、それぞれの条件に対応した構造を取得した。その結果、V/A-ATPase による ATP 加水分解反応が、3 つの ATP がすべての触媒部位に結合している Tri-site モデルに基づいて機能していること、さらに ATP の結合と同時に軸タンパク質が回転するのではなく、3 つの触媒部位での反応が協奏することで軸の回転が生じることが明らかとなった⁴。同様の解析を FoF1 ATPase に対して行ったところ、従来の一分子解析で示唆されていた構造に加え、さらに細かな軸の連続的な動きを経て回転することが判明した⁵ (図 3)。このような機能的構造解析の手法は、他のタンパク質にも応用が広がっており、タンパク質の機能を構造的側面から理解するための有力なアプローチとして確立されつつある。また、Vo 部分の高分解能クライオ EM 構造と分子動力学計算を組み合わせることで、プロトン駆動力による回転力発生機構についての理解を大幅に進めることができた⁶。

クライオ電子顕微鏡による構造解析は、脂質二重膜に埋め込まれた膜タンパク質の構造解析にも応用可能である。輸送を担う多くの膜タンパク質は、膜横断的な膜電位や、プロトン濃度勾配と膜電位によるプロトン駆動力を利用して機能している。そのため、機能状態にある膜タンパク質の構造を捉えるためには、リボソームのような区画構造を持つ人工膜にタンパク質を再構成した状態で解析を行う必要がある。しかしながら、膜に埋め込まれた状態では、単粒子解析に必要な特徴量が減少するため、小型の膜タンパク質に対する単粒子解析は技術的に困難である。一方、V/A-ATPase や FoF1-ATPase は、膜外に突出した V₁/F₁領域が比較的大型であるため、単粒子解析が可能であると予想された。実際に、V/A-ATPase をリボソームに再構成し、クライオ電子顕微鏡による撮影を行ったところ、V/A-ATPase の粒子を明瞭に識別することができた。これらの粒子を対象に単粒子解析を実施した結果、可溶化状態で得られた構造と同等の分解能を持つ構造情報が得られた。

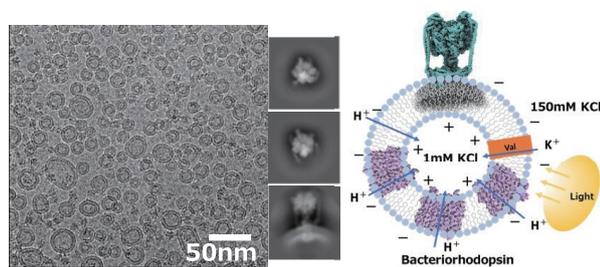


図 4. (左)liposome に再構成した V/A-ATPase のクライオ電顕画像と 2D 平均像。(右) 再構成されたバクテリオロドプシンによる光駆動の ATP 合成反応の模式図

さらに、光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシンと V 型 ATPase を同一リボソーム内に共再構成し、光照射によって

ATP 合成が誘導された状態で構造解析を行った (図 4)。その結果、V₀領域にねじれ構造が認められ、V₁領域には合成された ATP が確認された。これは、ATP 合成状態にある ATP 合成酵素の構造を初めて捉えた例であり、プロトン駆動力による ATP 合成の分子機構を直接可視化した成果である⁷。

本手法は、他のプロトン駆動型膜タンパク質に対する機能的構造解析にも応用可能であり、輸送タンパク質をはじめとする多様な膜タンパク質の分子機構の理解に大きく貢献するものと期待される。

さらなる展開

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析は、in situ におけるタンパク質構造解析にも応用可能である。シナプス小胞 (SV) やミトコンドリア内膜由来のサブミトコンドリア顆粒 (SMP) を電子顕微鏡で観察すると、SV では V-ATPase の V₁領域、SMP では FoF1-ATPase の F₁領域が明瞭に確認される。このことから、SV や SMP 上に存在する特徴量の大きな膜タンパク質に対しては、単粒子解析が可能であると予想された。

実際に SMP をクライオ電子顕微鏡で撮影し、単粒子解析を行った結果、FoF1-ATPase の多量体と推定される 2 次元像に加え、呼吸鎖複合体が集合した超分子複合体と考えられる構造も観察された。構造解析を進めたところ、可溶化状態で得られた超分子複合体と遜色のない分解能の構造を取得することができた (図 5)。これにより、特定の膜タンパク質においては、生体膜中における構造を直接高分解能で決定可能であることが示された。

細胞やオルガネラ内に存在するタンパク質の構造解析には、クライオ電子線トモグラフィー (cryoET) が有効な手法である。しかしながら、cryoET に必要な傾斜撮影は時間的負荷が大きく、高分解能解析に必要な画像情報の取得は容易ではない。現状では、高分解能の膜タンパク質構造を得るには、単粒子解析の方が適していると考えられる。

シナプス小胞に関しては、昨年度に V-ATPase の高分解能 in situ 構造に関する論文が発表されており、我々も同様の分解能での構造再構成に成功している。さらに、構造認識抗体を用いることで、他の膜タンパク質の特徴量を増加させ、in situ での構造決定を可能にする手法の開発も進めている。

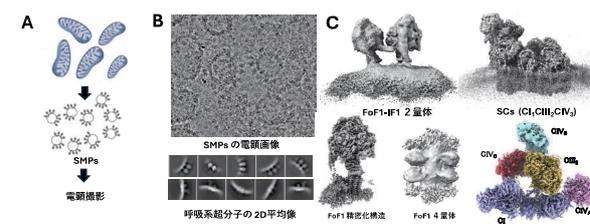


図 5 A. ウシ心筋ミトコンドリアからの SMP の調製, B SMP の電顕画像, C SMP に存在する呼吸系超分子の高分解能構造

このように、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析には未開拓の可能性が多く残されており、今後、リボソームに膜タンパク質を埋め込んだ状態での機能構造解析や in situ 膜タンパク質の単粒子構造解析の事例が増加することが予想される。

おわりに

今回導入される Glacios2 は、加速電圧が 200kV であり、氷厚の大きな試料には不向きであるため、cryoET による高分解能構造の取得には限界がある。しかし、単粒子解析においては、原子モデルの構築が可能な分解能の構造を得ることができる。特に、薬剤設計に必要な分解能で標的タンパク質の構造を明らかにすることが可能であり、製薬企業との共同研究を通じて、創薬に資する構造情報の提供が可能である。

さらに、前述の in situ 膜タンパク質の機能構造解析にも、Glacios2 の性能は十分に活用可能である。分解能の高い構造が得られるかどうかは、装置性能以上に取得されたクライオ電顕画像の品質に依存しており、最終的には良質な測定試料の調製が鍵を握る。

ターゲット設定と試料調製を的確に行うことで、今回導入される Glacios2 のポテンシャルを最大限に引き出し、学術的にも、産学連携の観点からも有用な成果を創出することが可能である。

参考文献

1. Fujiyama, Y., Yokoyama, K., Yoshida, M. & Wakabayashi, T. Electron microscopy of the reconstituted complexes of the F_1 -ATPase with various subunit constitution revealed the location of the gamma subunit in the central cavity of the molecule.

FEBS Lett 271, 111-5 (1990).

2. Toei, M. et al. Dodecamer rotor ring defines H^+ /ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20256-61 (2007).

3. Nakanishi, A., Kishikawa, J.I., Tamakoshi, M., Mitsuoka, K. & Yokoyama, K. Cryo EM structure of intact rotary H^+ -ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. *Nat Commun* 9, 89 (2018).

4. Kishikawa, J. et al. Structural snapshots of V/A-ATPase reveal the rotary catalytic mechanism of rotary ATPases. *Nat Commun* 13, 1213 (2022).

5. Nakano, A., Kishikawa, J.I., Mitsuoka, K., Yokoyama, K. Mechanism of ATP hydrolysis dependent rotation of bacterial ATP synthase. *Nat Commun* 14, 4090 (2023).

6. Kishikawa, J. et al. Rotary mechanism of the prokaryotic V_o motor driven by proton motive force. *Nat Commun* 15, 9883 (2024)

7. Nakano, A et al. Structures of rotary ATP synthase from *Thermus thermophilus* during proton powered ATP synthesis. *Science Advances* 11, 8771(2025)

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.

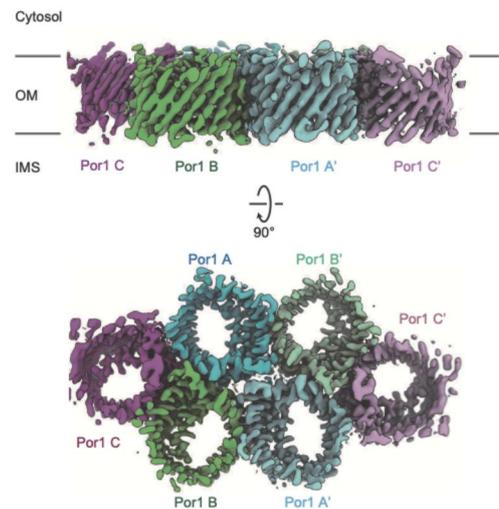
1. 研究概要

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

ミトコンドリア DNA (mtDNA) 維持に関わる因子の同定

ミトコンドリア内のプロテオスタシスは、核ゲノムにコードされたタンパク質とミトコンドリアゲノムにコードされたタンパク質の協調により維持される。当研究室では 2023 年度にミトコンドリア外膜で小分子やイオンの通り道を提供するポリン（酵母では Por1, ヒトでは VDAC）のクライオ電子顕微鏡構造を決定し、Por1 はミトコンドリア上で 6 量体として機能することを見出した（下図、論文 revise 中）。Por1 の 6 量体のプロトマー間の相互作用に関わる残基の変異体を多数作成し、その表現型を解析したところ、急速にミトコンドリア DNA (mtDNA) を欠失する変異体が見つかった。そこでこの変異体を利用して、mtDNA 欠失を抑制する酵母ヌクレアーゼ関連因子欠失変異株のスクリーニングを行ったところ、これら mtDNA の維持に関連することが報告されている Yme2 を含む 7 種類の因子が見つかった。これらの因子はほとんどがミトコンドリアに局在し、4 種はヒトにもホモログが存在する。さらに Por1 変異存在下でこれらの因子を欠失させると mtDNA がミトコンドリア内に蓄積することも明らかになった。ミトコンドリアプロテオスタシス維持に必須の mtDNA 維持と制御機構解明の突破口が開かれることが期待される。



Spf1 による誤配送膜タンパク質の局在校正経路の解明

ミトコンドリアに誤配送されたテイルアンカー (TA) 膜タンパク質はミトコンドリア外膜の ATP アーゼ Msp1 によって引き抜かれて ER に移動し、ER の品質管理システムに供される。一方、ER の ATP アーゼ Spf1 が欠失すると、ミトコンドリア外膜タンパク質のうち多くの TA タンパク質と一部の N アンカータンパク質は ER 膜に誤配送される。誤配送されたタンパク質は Spf1 を発現すると、ミトコンドリアに移行する。プロモーターによる発現スイッチ法を使って、ミトコンドリア外膜の N アンカータンパク質 Msp1 を発現すると、Spf1 の有無にかかわらず、ER にいったん誤局在することが分かった。その後 Spf1 があればミトコンドリアに移行するが、Spf1 がな

ければ誤配送された Msp1 は ER に留まる。ここで Msp1 の ER への誤配送の機構は、通常の新規合成 N アンカータンパク質の ER 移行に必要な SRP 経路を使わない。一方で誤配送 N アンカータンパク質にグリコシル化タグを付加しておくことで糖鎖が付加するので、N アンカータンパク質は単に ER に誤配送されるだけでなく、おそらく SEC61 複合体を使って内腔側に到達し糖鎖付加を受けることが分かった。現在、誤配送 N アンカータンパク質を Spf1 による引き抜きと共役してミトコンドリアに再配送する因子を検討している。

3. Research projects and annual reports

This year's accomplishments

Identification of the factors involved in mitochondrial DNA (mtDNA) maintenance

Mitochondrial proteostasis is maintained through the coordinated function of proteins encoded by both the nuclear and mitochondrial genomes. In 2023, our laboratory determined the cryo-EM structure of yeast porin (Por1 in yeast; VDAC in humans), a transporter of small molecules and ions across the mitochondrial outer membrane. The determined structure showed that Por1 forms a homo-hexameric structure on the mitochondrial membrane (below, manuscript under revision). By generating a series of Por1 mutants with amino-acid substitution at residues involved in the protomer-interfaces, we identified one interesting mutant that rapidly lost mitochondrial DNA (mtDNA). By using this mutant por1 strain, we performed a genetic screen for deletion strains lacking genes for yeast known nuclease-related proteins that could suppress mtDNA loss in the por1 mutant strain. This screen allowed us to identify seven genes, including YME2, which has previously been implicated in mtDNA maintenance. Most of these factors are localized in mitochondria, and four have human homologs. Furthermore, deletion of these factors in the por1 mutant led to the accumulation of mtDNA within mitochondria. These findings may offer a starting point to elucidate the mechanisms underlying mtDNA maintenance and regulation, which are essential for mitochondrial proteostasis.

Re-routing pathway for mislocalized mitochondrial membrane proteins by Spf1

Tail-anchored (TA) membrane proteins mislocalized to mitochondria are extracted by the mitochondrial outer membrane AAA-ATPase Msp1 and redirected to the endoplasmic reticulum (ER), where they are subjected to quality control processes. Conversely, deletion of the ER-resident ATPase Spf1 causes mislocalization of many mitochondrial outer membrane TA proteins, as well as a subset of N-anchored (NA) proteins, to the ER. Upon re-expression of Spf1, these mislocalized proteins are relocated to mitochondria. Using a promoter-switch system, we found that newly synthesized mitochondrial outer membrane NA proteins, such as Msp1, initially mislocalize to the ER regardless of the presence of Spf1. In the presence of Spf1, however, Msp1 is relocated to mitochondria, whereas in its absence, Msp1 stays in the ER. This mislocalization to the ER does not require the signal recognition particle (SRP) pathway, which is typically essential for the ER targeting of nascent NA proteins. When glycosylation tags were attached to the mislocalized NA proteins, they became glycosylated, indicating not only ER targeting but also translocation across the ER membrane into the lumen, presumably via the SEC61 complex. We are currently investigating the factors that mediate the re-routing of mislocalized single-pass membrane proteins to mitochondria in coordination with Spf1-mediated extraction

4. 論文, 著書など

原著論文

- Takeda H, Shinoda S, Goto C, Tsutsumi A, Sakaue H, Zhang C, Hirashima T, Konishi Y, Ono H, Yamamori Y, Tomii K, Shiino H, Tamura Y, Zuttion S, Senger B, Friant S, Becker HD, Araiso Y, Kobayashi N, Koder N, Kikkawa M, Endo T. Oligomer-based functions of mitochondrial porin. Nat Commun in press (2025)
- Matsumoto S, Kogure Y, Ono S, Numata T, Endo T. Msp1 and Pex19-Pex3 cooperate to achieve correct localization of Pex15 to peroxisomes FEBS J in press (2025)

英文総説

Endo T, Wiedemann N Molecular machineries and pathways of mitochondrial protein transport. Nat Rev Mol Cell Biol in press (2025)

Matsumoto S, Ono S, Endo T. Analysis of protein trafficking between mitochondria and the endoplasmic reticulum by fluorescence microscopy. Methods Enzymol 707, 153-171 (2024)

5. 学会発表など

(招待講演)

小野 鈴花, 松本 俊介, 遠藤 斗志也, ATPase を介したオルガネラ間における膜タンパク質の局在制御機構 第 24 回蛋白質科学会年会ワークショップ「多面的視点から捉える蛋白質の世界」, 札幌 2024.6.11-13, 国内, 口頭

Toshiya Endo, Proofreading of organelle protein targeting aided by ATPases in cells. International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics, 福岡, 2024.9.2-5, 国内, 口頭

Toshiya Endo, Regulation of transport pathways for mitochondrial proteins. EMBO Workshop on Advances and challenges in protein translocation across membranes, Sant Feliu de Guixols, Spain, 2024.9.21-25, 国外, 口頭

(一般発表)

Yuta Konishi, Haruka Sakaue, Hironori Takeda, Toshiya Endo, Analysis of the physiological significance and the molecular mechanism of dual localization of Hfd1 in yeast. IUPAB2024, 京都, 2024.6.11-13 国内, ポスター

篠田沙緒里, 坂本智昭, 木村成介, 榎佐和子, 岡田康志, 遠藤斗志也, 出芽酵母のミトコンドリアへ輸送される核コード RNA の探索手法の確立と生理学的意義の解析, 第 76 回細胞生物学会大会, つくば, 2024.7.17-19, 国内, 口頭

小西 雄大, 阪上 春花, 竹田 弘法, 遠藤斗志也, 出芽酵母 Hfd1 の細胞内多重局在の分子機構と生理的意義の解析, 第 76 回細胞生物学会大会, つくば, 2024.7.17-19, 国内, ポスター

Suzuka Ono, Toshiya Endo, The localization control mechanism of single-spanning membrane proteins by ATPases, International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics, 福岡, 2024.9.2-5, 国内, ポスター

Shunsuke Matumoto, Toshiya Endo, Msp1-mediated quality control of peroxisomal tail-anchored proteins, International Symposium on Multifaceted Protein Dynamic, 福岡, 2024.9.2-5, 国内, ポスター

Suzuka Ono, Shunsuke Matsumoto, Toshiya Endo, The localization control mechanism of single-spanning membrane proteins by ATPases, EMBO Workshop on Advances and challenges in protein translocation across membranes, Sant Feliu de Guixols, Spain, 2024.9.21-25, 国外, ポスター

Saori Shinoda, Tomoaki Sakamoto, Seisuke Kimura, Sawako Enoki, Yasushi Okada, Toshiya Endo, A novel mitochondrially-imported RNA (mitoPORT RNA), snR33 is imported into mitochondria in Saccharomyces cerevisiae, EMBO Workshop on Advances and challenges in protein translocation across membranes, Sant Feliu de Guixols, Spain, 2024.9.21-25, 国外, ポスター

Yuta Konishi, Haruka Sakaue, Hironori Takeda, Toshiya Endo, Analysis of the molecular mechanism and physiological significance of multiple localization of Hfd1, EMBO Workshop on Advances and challenges in protein translocation across membranes, Sant Feliu de Guixols, Spain, 2024.9.21-25, 国外, ポスター

赤羽しおり, 遠藤斗志也, 岡敏彦, 「低酸素環境におけるミトコンドリア品質管理の制御」について, 第 97 回日本生化学会大会, 2024.11.6, 国内, ポスター

平嶋孝志, 遠藤斗志也, in vivo ジスルフィド架橋法によるタンパク質複合体予測構造の実験的検証, 第 97 回日本生化学会大会, 横浜, 2024.11.6-8, 国内, ポスター

小野鈴花, 松本俊介, 遠藤斗志也, 異種オルガネラ間における ATPase を介した膜タンパク質の局在制御機構, 第 47 回分子生物学会年会, 福岡, 2024.11.27-29, 国内, 口頭+ポスター

篠田沙緒里, 坂本智昭, 木村成介, 榎佐和子, 岡田康志, 遠藤斗志也, ミトコンドリアへ輸送される RNA (mitoPORT RNA), snR33 の時空間的解析, 第 47 回分子生物学会年会, 福岡, 2024.11.27-29, 国内, ポスター
小暮佳希, 沼田倫征, 遠藤斗志也, 松本俊介, Msp1 を介したペルオキシソーム膜タンパク質の配送やり直し機構の解析, 第 47 回分子生物学会年会, 福岡, 2024.11.27-29, 国内, 口頭+ポスター
稲本大輝, 沼田倫征, 遠藤斗志也, 松本俊介, クライオ電顕解析によって明らかになったミトコンドリア AAA-ATP アーゼ Msp1/ATAD1 による基質膜引き抜きメカニズム, 第 47 回分子生物学会年会, 福岡, 2024.11.27-29, 国内, ポスター
塚原佑飛, 沼田倫征, 遠藤斗志也, 松本俊介, ミトコンドリアタンパク質輸送ストレス条件下における Msp1 の機能解析, 第 47 回分子生物学会年会, 福岡, 2024.11.27-29, 国内, ポスター
小林菜々子, 九笹加菜, Amyot Romain, 川合志朋, 今井湧太, 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 47 回分子生物学会年会, 福岡, 2024.11.27-29, 国内, ポスター
Suzuka Ono, Shunsuke Matsumoto, Toshiya Endo, ATPases control the intracellular distribution of single-spanning membrane proteins, Keystone Symposium on Mitochondrial Biology in Health and Disease, Taipei, Taiwan, 2025.1.13-16, 国外, ポスター+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・基盤研究 (B)

課題名: 生物種を超えたミトコンドリアへ輸送される RNA に関する包括的理解

研究代表者: 篠田沙緒里, 取得年度: 2024-2026 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)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名: ATPase による膜タンパク質輸送機構の解明

研究代表者: 小野鈴花, 取得年度: 2024-2026 年度 (3 年)

科学研究費補助金・若手研究

課題名: 異種オルガネラ間における膜タンパク質の局在制御機構

研究代表者: 小野鈴花, 取得年度: 2024-2026 年度 (3 年)

2) 学外活動

遠藤斗志也: 日本学術会議連携会員

遠藤斗志也: 日本細胞生物学会代議員

遠藤斗志也: 日本細胞生物学会常任編集委員

遠藤斗志也: JST-CREST「細胞内現象の時空間ダイナミクス」研究総括

3) アウトリーチ活動

遠藤斗志也（日本科学未来館サイエンスコミュニケーターが協力）、篠田沙緒里，張春明：【ミトコンドリアクエスト】

実施日時：2024年6月8日

場所：日本科学未来館 3階コスタジオ，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。プロジェクト代表の遠藤よりミトコンドリアの基礎知識から最新研究成果まで発表した(40分×2回)。進行はSCとの対話形式にすることで、聴衆が参加しやすい形式を目指した。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。また，まだ体験ができない未就学児に向けて実験道具を使った知育遊びコーナーを備えたことで，家族での参加を促した。

篠田沙緒里：【私立北鎌倉女子学園高等学校 ラボツアー】

実施日時：2024年4月3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：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った。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、実験道具を実際に触る体験を取り入れた。研究室ツアーは各所で実験を挟みながら，待ち時間に別のエリアを説明するなど、研究員が一日を通して複数の実験を並行して行っている様子をイメージしやすいように工夫した。

4) 受賞等

小西雄大：2024年7月 ミトコンドリアサイエンスワークショップ2024 特別表彰銅メダル，和歌山2024.7.2

研究室紹介写真



R6年10月 研究室(+関連研究者)のリトリート「オルガネラ研究会」(富山県黒部市)

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。言い方を換えれば、電子はどのようにして ERdj5 に伝達されるのか、小胞体はどのようにしてサイトゾルから電子を得ているのか、が避けて通れない大きな問題となる。これは小胞体というオルガネラに残された細胞生物学上の最大の謎の一つでもある。本、従来知られてきたのとはまったく異なる新たな方法によって、小胞体に電子が供給されているメカニズムを明らかにしつつある。また、小胞体内腔のレドックス環境がどのように構築されるのか、その機構解明にも挑戦している。

2. 本年度の研究成果

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

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。小胞体は酸化的フォールディングの場であり、そのレドックス環境はサイトゾルと比較し、酸化的環境に維持されている。また、多くの酸化酵素が存在し、酸化的フォールディングを触媒している。この酸化的環境で、我々は小胞体でジスルフィド還元活性に特化した還元

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、K. Uegaki et al., *Cell Rep.*, 2023)。

さらに ERdj5 が小胞体膜上に存在するカルシウムポンプ SERCA2b およびカルシウムイオンチャネル IP3 受容体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、S. Fujii 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. Yaamashita et al., *Sci. Rep.*, 2021)。

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)。

今回、当グループは、小胞体にグルタチオンを供給する初の輸送体を発見した (*In preparation*)。グルタチオンは小胞体内の酸化還元環境を維持し、ジスルフィド結合の形成やタンパク質の品質管理において中心的な役割を果たす分子であるが、その供給機構は長らく不明であった。本成果により、小胞体恒常性の分子基盤に新たな理解が加わった。現在、この輸送体の機能解析を進めるとともに、大腸菌を用いた高純度精製系の確立に成功しており、Cryo-EM による構造解析にも着手可能な体制を整えた。また、プロテオリポソーム系を用いた輸送活性の定量的評価系の構築にも取り組んでおり、今後の展開が期待される。

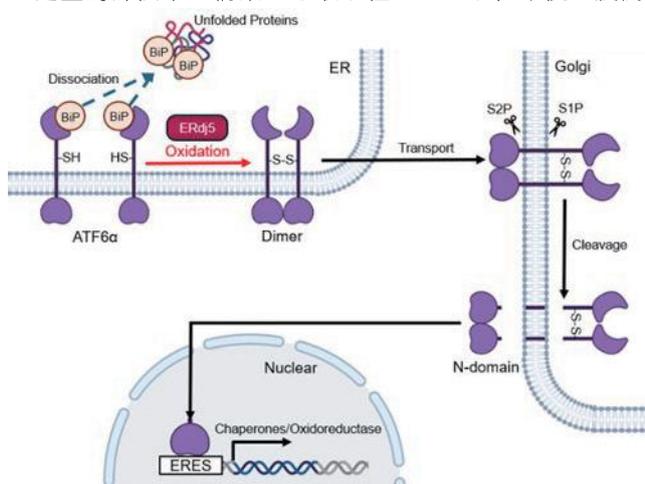


図 1. レドックス制御を介したストレスセンサーATF6の活性化機構

加えて、小胞体ストレス応答における新たな制御機構として、ストレスセンサーATF6の活性化が小胞体内のレドックス状態に依存して制御されていることを明らかにした (図 1, *Under revision*)。これは、小胞体ストレス応答がレドックスという化学的パラメータを介して精緻に制御されていることを示すものであり、小胞体のプロテオスタシスとレドックス環境との密接な関連を示唆する重要な知見である。

さらに、小胞体における新規のタンパク質品質管理構造体を同定し、誤った構造を持つタンパク質の選別と分解における空間的制御機構としての機能が示唆されている (*Under revision*)。これにより、小胞体内の局所構造と機能に関する新たな知見をもたらし、プロテオスタシス研究の進展に資することが期待される。

3. Research projects and annual reports

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

Maintenance of ER homeostasis through the crosstalk among Protein Quality Control, Redox regulation, and Ca²⁺ flux. We identified ERdj5 as a disulfide-reductase in the endoplasmic reticulum (ER). ERdj5 forms the supramolecular complex with EDEM and BiP, and activates the degradation of proteins misfolded in the ER by cleaving the disulfide bonds of misfolded proteins and facilitating the retrograde transport of these proteins

from the ER lumen into the cytosol, where they are degraded by the ubiquitin-proteasome system, which is called as ERAD (R. Ushioda et al., *Science*, 2008; M. Hagiwara et al. *Mol. Cell*, 2011; R. Ushioda et al. *Mol. Biol. Cell*, 2013) .

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

Here, we focused on the control of the Ca²⁺ pump and channel by the redox regulation in the ER. Here, we obtained the structural information of SERCA2b for understanding how ERdj5 promotes the influx of Ca²⁺ by SERCA2b. Then, we found that the reductase ERdj5 affects the Ca²⁺ release activity of the IP3R (S. Fujii et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2023) . Additionally, we found that ERdj5 deficiency causes mitochondrial fragmentation due to Ca²⁺ homeostatic disruption (R. Yamashita et al., *Sci. Rep.*, 2021) . It was clarified that redox regulation by ERdj5 is involved in the uptake and release of calcium ions in the ER.

We have elucidated how ERdj5 obtains the 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 (K. Uegaki et al., *Cell Reports*, 2023).

Moreover, we have discovered that the ER reductase ERp18 binds to zinc ions via sulfur atoms. While the role of zinc ions within the ER lumen has largely remained unclear, our findings reveal that ERp18 acquires hydrogen peroxide decomposition activity upon binding to zinc ions. This 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).

Our group has identified the first transporter responsible for supplying glutathione to the ER, uncovering a previously unknown molecular basis for maintaining the redox environment within the ER (*In preparation*). We have also established a high-purity purification system suitable for structural analysis by cryo-electron microscopy (Cryo-EM) and are developing a proteoliposome-based assay system for quantitative evaluation of its transport activity. In addition, we revealed that the ER stress sensor ATF6 is activated through redox-dependent regulation mediated by ERdj5, PDIR, and ERp18 (Fig.1, *Under revision*), providing new insight into the tight interplay between ER proteostasis and the redox environment. Furthermore, we identified a novel protein quality control structure within the ER, which appears to function as a spatial platform for the selective degradation of misfolded proteins (*Under revision*), offering a new perspective for advancing research in proteostasis.

4. 論文, 著書など

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)

堤智香、潮田亮：小胞体の亜鉛イオンが制御する新たな抗酸化機構の解明、日本亜鉛栄養治療研究会「亜鉛栄養治療」15(1)、19-25(2024)

潮田亮：小胞体環境を評価する、羊土社実験医学増刊号「疾患研究につながるオルガネラ実験必携プロトコール Essential protocols on organelle experiments」67-77(2024)

和田匠太：Opinion-研究の現場から 第174回 細胞生物若手の会発足から10年—未来へとつなぐ伝統と革新、羊土社実験医学「AIで識別してオミクスで理解する 生体イメージング」3073 (2024)

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6年度AMED-CREST「プロテオスタシス」領域会議、東京、2025.3.24-26、口頭

Chika Tsutsumi, Ryo Ushioda : Novel Zn²⁺-dependent antioxidation mechanism in the ER, online, 16th ER & REDOX CLUB MEETING, online, 2025.3.17-20, 口頭

駒井実紅、杉澤亜美、潮田亮 :メラニン合成酵素チロシナーゼの新たなタンパク質品質管理機構の解明、三研究室合同セミナー、滋賀、2024.12.20-22、口頭

奥田結香、杉澤亜美、上田汐莉、潮田亮 :構造異常タンパク質の空間的制御を実現する ERAD body の発見、三研究室合同セミナー、滋賀、2024.12.20-22、口頭

堤智香、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、三研究室合同セミナー、滋賀、2024.12.20-22、口頭

潮田亮 :タンパク質品質管理を支える電子硫黄媒体としての超硫黄分子の役割、学術変革領域研究(A)「硫黄生物学」第4回領域会議、滋賀、2024.12.3-5、口頭

和田匠太、永田和宏、潮田亮 :レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーATF6 活性化機構の解明、学術変革領域研究(A)「硫黄生物学」第4回領域会議、滋賀、2024.12.3-5、口頭・ポスター

河内初穂、堤智香、上垣日育、潮田亮 :超硫黄化修飾を介した新たな小胞体恒常性維持機構の解明、学術変革領域研究(A)「硫黄生物学」第4回領域会議、滋賀、2024.12.3-5、ポスター

杉澤亜美、上田汐莉、奥田結香、潮田亮 :構造異常タンパク質の空間的制御を実現する ERAD body の発見、学術変革領域研究(A)「硫黄生物学」第4回領域会議、滋賀、2024.12.3-5、ポスター

駒井実紅、杉澤亜美、潮田亮 :メラニン合成酵素チロシナーゼの新たなタンパク質品質管理機構の解明、学術変革領域研究(A)「硫黄生物学」第4回領域会議、滋賀、2024.12.3-5、ポスター

坂本龍太、堤智香、潮田亮、小胞体グルタチオン輸送体の再構成、「細胞を創る」研究会 Ver17.0、大阪、2024.11.11-12、ポスター

佐野凌太、堤智香、潮田亮 :小胞体レドックス環境の解明と再構成系の構築酸化的フォールディングにおけるグルタチオン環境の寄与、「細胞を創る」研究会 Ver17.0、大阪、2024.11.11-12、ポスター

堤智香、上垣日育、山下龍志、潮田亮、永田和宏 :亜鉛イオンを介した新たな小胞体における抗酸化機構の解明、第97回日本生化学会大会、横浜市、2024.11.6-8、口頭

駒井実紅、杉澤亜美、潮田亮 :メラニン合成酵素チロシナーゼの新たなタンパク質品質管理機構の解明、第97回日本生化学会大会、横浜市、2024.11.6-8、ポスター

杉山誉人、梅澤啓太郎、佐々木克仁、信田理沙、堤智香、三浦ゆり、潮田亮、乃村俊史 :病原性変異型 SERPINB7 の細胞外分泌不全によるタンパク質恒常性の破綻が表皮セルピノパチーを引き起こす、第97回日本生化学会大会、横浜市、2024.11.6-8、口頭・ポスター

杉澤亜美、上田汐莉、奥田結香、潮田亮 :液-液相分離によって形成される新たなタンパク質品質管理プラットフォーム、第18回日本臨床ストレス応答学会大会、宮崎、2024.11.1-2、ポスター

Ryo Ushioda : Mechanism for maintaining ER calcium ion homeostasis through redox regulation, EMBO Workshop 「The endoplasmic reticulum – guardian of cellular homeostasis」, Italia, 2024.10-20-25, ポスター

Ami Sugisawa, Shiori Ueda, Yuika Okuda, Yasuko Fukuda, Kohei Yokosawa, Keisuke Mochida, Shinya Tahara, Motomasa Tanaka, Takakazu Nakabayashi, Kazuhiro Nagata, Ryo Ushioda : “ERAD body” as a platform facilitating the degradation of misfolded proteins, EMBO Workshop 「The endoplasmic reticulum – guardian of cellular homeostasis」, Italia, 2024.10-20-25, ポスター

潮田亮 :レドックス制御に基づく小胞体恒常性維持機構、第45回日本薬学会九州山口支部コロキウム、長崎、2024.10.19、口頭（招待講演）

和田匠太、永田和宏、潮田亮 :レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーATF6 活性化機構の解明、第2回細胞生物コロキウム、京都、2024.10.19、口頭（「優秀口頭発表賞」受賞）

Ami Sugisawa, Shiori Ueda, Yuika Okuda, Yasuko Fukuda, Ryo Ushioda : Platform for Protein Quality Control Formed through Phase Separation in the Endoplasmic Reticulum、第52回内藤コンファレンス、札幌市、2024.10.1-4、ポスター

Chika Tsutsumi, Kaiku Uegaki, Riyuji Yamashita, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata: Zn²⁺-dependent functional switching of ERp18, an ER-resident thioredoxin-like protein、第 52 回 内藤コンファレンス、札幌市、2024.10.1-4、ポスター

Ayano Kasai, Shinya Ito, Hisato Kondoh, Ryo Ushioda, Kazuhiro Nagata: The collagen-specific molecular chaperon Hsp47 responds to loading changes through mechanotransductor YAP/TEAD、第 52 回 内藤コンファレンス、札幌市、2024.10.1-4、ポスター

潮田亮：化学白斑物質による小胞体ストレス応答の評価、第 6 回日本白斑学会学術大会、山形、2024.9.21-23、口頭

葛西綾乃、山本洋平、滝野友愛、杉原宗親、梅本 哲雄、濱崎 万穂、八田 知久、夏目 徹、Richard I. Morimoto、荒井 律子、和栗 聡、佐藤美由紀、佐藤健、潮田亮、Shoshana Bar-Nun、吉森保、野田健司、永田和宏：小胞体膜タンパク質 ERdj8 によるオートファジー制御機構、第 17 回小胞体ストレス研究会、徳島、2024.9.13-14、口頭

Chika Tsutsumi, Ryo Ushioda : Discovery of a glutathione transporter constructing the redox environment of the ER, International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics, 福岡, 2024.9.2-5, ポスター (「Excellent Poster Presentation Award」受賞)

潮田亮：亜鉛イオンによるユニークな小胞体レドックス環境の制御、第 28 回 日本亜鉛栄養治療研究会学術集会、2024.8.24、大阪、口頭 (招待講演)

潮田亮：小胞体の「質」を担保するレドックス環境の構築機構とその評価、第 76 回日本細胞生物学会大会、つくば市、2024.7.17-19、口頭

布村七海、堤智香、潮田亮：TMX4 を介した小胞体グルタチオン輸送の生理学的意義の解明、第 76 回日本細胞生物学会大会、つくば市、2024.7.17-19、ポスター

和田匠太、永田和宏、潮田亮：レドックス制御を介した小胞体ストレスセンサーATF6 活性化機構の解明、第 76 回日本細胞生物学会大会、つくば市、2024.7.17-19、ポスター

杉澤亜美、上田汐莉、奥田結香、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 76 回日本細胞生物学会大会、つくば市、2024.7.17-19、口頭

和田匠太：「創る」が織りなす未来の細胞生物学と若手研究者へのメッセージ、第 76 回日本細胞生物学会大会、つくば市、2024.7.17-19、口頭 (「細胞生物若手の会功労賞」受賞)

Ryuta Sakamoto, Chika Tsutsumi, Ryosuke Tahara, Kazuhiro Nagata, Ryo Ushioda: Reconstitution of ER glutathione transport system, International Union for Pure and Applied Biophysics, 京都、2024.6.24-28、ポスター

Shota Wada, Kazuhiro Nagata, Ryo Ushioda: Activation mechanism of endoplasmic reticulum stress sensor ATF6a through redox control, EMBO/FEBS Advanced Lecture Course, Greece, 2024.5.26 – 6.1, 口頭・ポスター (「Boehringer Travel Grant」採択)

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

科学研究費補助金・若手研究

課題名：コラーゲンとその品質管理機構に着目した廃用性筋力低下発症メカニズムの解明
研究代表者：葛西綾乃、取得年度 2024-2028 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：2023-2024 年

資生堂株式会社

課題名：チロシナーゼタンパク質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：2024 年

K Hネオケム株式会社

課題名：小胞体でタンパク質品質管理を受ける糖タンパク質の糖鎖構造解析

研究代表者：潮田亮、取得年度：2024 年

2) 学外活動

潮田亮：文部科学省科学技術・学術政策研究所 専門調査委員

潮田亮：小胞体ストレス研究会 世話人

潮田亮：臨床ストレス応答学会 評議員

潮田亮：日本レドックス超分子医学生物学会 理事

潮田亮：細胞小器官用語検討委員会 委員

Ryo Ushioda: Journal of Biochemistry Associate Editor

潮田亮：京都第二赤十字看護専門学校 非常勤講師

3) アウトリーチ活動

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

潮田亮：SOI cafe：特別講義「タンパク質科学から考えるアンチエイジング～なぜヒトは老化するのか～」

4) 受賞歴

和田匠太：第 2 回細胞生物コロキウム「優秀口頭発表賞」受賞

Chika Tsutsumi：International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics「Excellent Poster Presentation Award」受賞

和田匠太：第 76 回日本細胞生物学会大会「細胞生物若手の会功労賞」受賞

Shota Wada: EMBO/FEBS Advanced Lecture Course「Boehringer Travel Grant」採択

潮田研ホームページ

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





写真 1：琵琶湖湖畔にて集合写真



写真 2：2024 年度お花見（京都府亀岡市）

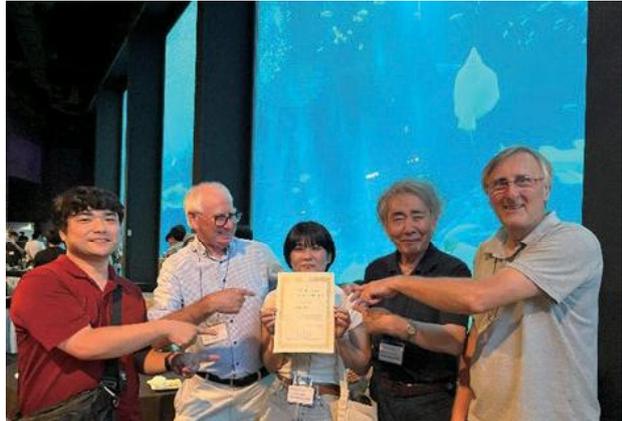


写真 3：Excellent Poster Presentation Award を受賞した堤さん（中央）



京大・井垣研、森研との合同合宿（松の浦セミナーハウス）

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。近年、当研究室では、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い、新規アレスト因子をコードする可能性のある遺伝子を20種近く同定した。この網羅的な探索から、多くのアレストモチーフに共通の配列（RAPP や RGPP といった RAPP 様アミノ酸配列）が見出された。そこで、今度は、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の同定を試みた。この探索からも、すでに10種以上の新規アレスト因子を同定した。既知のアレスト因子の多くがタンパク質局在化装置関連遺伝子の下流にコードされていたが、興味深いことに、モチーフサーチから同定された新規アレスト因子は、下流遺伝子の機能がタンパク質局在化経路に限定されておらず、このことから、新規アレスト因子の生理機能も多岐にわたることが示唆された。

(2) 翻訳品質管理因子 YlmH の同定と機能解析

翻訳の異常によって起こるリボソームの mRNA 上での停滞は、リボソームのリサイクリングを損なうことで翻訳の活性を低下させる。一方、細胞は、mRNA 上で停滞したリボソームを解放する機構（リボソーム品質管理機構：RQC）を介して問題を回避する。我々は、遺伝学的スクリーニング（TnSeq）や情報生物学的なアプローチから、枯草菌の新規翻訳品質管理因子 YlmH を同定した。YlmH と他の翻訳品質管理機構の同時破壊は合成生育阻害を引き起こした。また、翻訳阻害剤存在下で、YlmH は、リボソームの 50S サブユニットと相互作用することも、生化学的に示された。Hauryliuk 研（スウェーデン）、Wilson 研（ドイツ）との国際共同研究による構造解析からも、YlmH が、RQC 経路で機能する RqcH とともに、50S サブユニットに結合することが示された。また、Buskirk 研（米国）の開発したレポーターアッセイからも、YlmH が、RQC 因子のひとつであり YlmH ホモログの RqcP の機能を代替しうることが示された。

(3) ABCF ファミリータンパク質による翻訳促進機構の解明

EF-P は、リボソームが合成を苦手とする配列（難翻訳配列）のひとつとして知られるプロリンの連続配列の合成を促進する trans-acting factor である。今回、我々は、ABCF ファミリーに属するタンパク質も、難翻訳配列の合成を促進する trans-acting factor として働くことを見出した。まず、我々は、*efp* (EF-P をコードする) と、

ABCF ファミリータンパク質のひとつをコードする *yfmR* の二重欠失が、枯草菌において合成生育阻害を引き起こすことを見出した。また、その後の解析から、YfmR は、プロリンとアスパラギン酸が交互に連続する配列の合成を促進することが示された。また、同じく ABCF に属する YkpA が、酸性残基や塩基性残基の連続配列の合成を促進することも示された。以上の結果は、ABCF ファミリータンパク質が、EF-P と同様に、様々な難翻訳配列の翻訳を促進する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 Peptides

Translation arrest peptides (APs) function cotranslationally as nascent polypeptide chains. Recently, we conducted a comprehensive search for APs across over 30,000 bacterial genomes and identified nearly 20 novel APs. This screening revealed that many arrest motifs shared common sequences, such as RAPP or RGPP. Based on this finding, we further searched for proteins containing RAPP-like motifs to identify additional AP candidates and further identified more than 10 novel APs. Notably, whereas most previously known APs are encoded upstream of genes involved in protein localization, many of the newly identified APs were located upstream of a wide variety of genes unrelated to localization pathways, suggesting their broader range of biological functions.

2) Identification and Functional Characterization of the Translation Quality Control Factor YImH

Ribosome stalling on mRNAs due to aberrant translation can impair ribosome recycling and reduce overall translation capacity. To counteract this, cells utilize ribosome quality control (RQC) mechanisms that resolve stalled ribosomes. Using transposon sequencing (TnSeq) and bioinformatics-based approaches, we identified YImH as a novel RQC factor in *Bacillus subtilis*. Simultaneous loss of YImH and *trans*-translation, another translation quality control mechanism, caused synthetic growth defects. Biochemical and structural analyses in collaboration with the Hauryliuk lab (Sweden) and the Wilson lab (Germany) confirmed that YImH binds to the 50S subunit in complex with RqcH, a known RQC component. Furthermore, a reporter assay developed by the Buskirk group (USA) showed that YImH functions as an RQC factor and can substitute for the function of RqcP, a YImH homolog.

3) Translation Facilitation of Translation-impeding sequences by ABCF Family Proteins

EF-P is a well-characterized trans-acting factor that facilitates the translation of polyproline sequences, which are difficult for the ribosome to synthesize. In this study, we found that members of the ABCF protein family also promote the translation of translation-impeding sequences. Specifically, we found that the double deletion of *efp* (encoding EF-P) and *yfmR* (encoding an ABCF protein) results in synthetic growth defects in *Bacillus subtilis*. YfmR promoted the translation of sequences containing alternating proline and aspartic acid residues. In addition, another ABCF protein, YkpA, was found to enhance the translation of sequences composed of consecutive acidic or basic amino acids. These observations revealed the role of ABCF proteins in ensuring efficient translation.

4. 論文, 著書など

原著論文

Fujiwara, K.#*, Tsuji, N.*, Sakiyama, K.*, Niki, H., Chiba, S.#; Evolutionary adaptation of bacterial proteomes to translation-impeding sequences. (2025) **EMBO J.** *in press*. (# corresponding authors, * contributed equally)

Takada, H.#, Fujiwara, K., Atkinson, G. C., Chiba, S., Hauryliuk, V.#; Resolution of ribosomal stalling by EF-P and ABCF ATPases YfmR and YkpA/YbiT. (2024) **Nucleic Acids Res.** 52, 9854-9866. (# corresponding authors.)

Takada, H.#*, Paternoga, H.#*, Fujiwara, K., Nakamoto, J. A., Park, E. N., Dimitrova-Paternoga, L., Beckert, B., Saarma, M., Tenson, T., Buskirk, A. R., Atkinson, G. C., Chiba, S., Wilson, D. N., Hauryliuk, V.; A role for the S4-domain containing protein YlmH in ribosome-associated quality control in *Bacillus subtilis*. (2024) **Nucleic Acids Res.** 52, 8483-8499. (# corresponding authors, * contributed equally)

Fujiwara, K.#, Tsuji, N., Yoshida, M., Takada, H., Chiba, S.#; Patchy and widespread distribution of bacterial translation arrest peptides associated with the protein localization machinery. (2024) **Nat Commun.** 15, 2711. (# corresponding authors)

5. 学会発表など

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「Hybrid-PURE system の構築とそれを利用した新規翻訳アレスト因子の同定」 第 24 回日本蛋白質科学会年, 2024.6.10-13, 札幌コンベンションセンター

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の解析」 第 20 回 21 世紀大腸菌研究会, 2024.6.17-18, 青島サンクマール (宮崎)

高田啓、藤原圭吾、Gemma C. Atkinson、千葉志信、Vasili Hauryliuk: 「多様な ABCF 因子の機能に関して～抗生物質耐性付与から翻訳伸長制御まで～」 第 20 回 21 世紀大腸菌研究会, 2024.6.17-18, 青島サンクマール (宮崎)

藤原圭吾、辻奈緒子、千葉志信: 「翻訳アレストモチーフの細菌界横断的 in silico 解析」 第 20 回 21 世紀大腸菌研究会, 2024.6.17-18, 青島サンクマール (宮崎)

小笠原優大、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「*Brevibacillus* 属由来のアレストペプチドの機能解析」 第 20 回 21 世紀大腸菌研究会, 2024.6.17-18, 青島サンクマール (宮崎)

佐野桃加、藤原圭吾、千葉志信: 「枯草菌アレスト因子 Ywcl の機能解析」 第 20 回 21 世紀大腸菌研究会, 2024.6.17-18, 青島サンクマール (宮崎)

小笠原優大、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「*Brevibacillus* 属由来のアレストペプチドの機能解析」 2024 年度マルチファセットプロテインズ若手ワークショップ, 2024. 8. 1-2, ハートンホテル京都

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 CliM の解明」 2024 年度マルチファセットプロテインズ若手ワークショップ, 2024. 8. 1-2, ハートンホテル京都

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「翻訳アレストによる多様な遺伝子の発現制御」 2024 年度マルチファセットプロテインズ若手ワークショップ, 2024. 8. 1-2, ハートンホテル京都

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「アルテロモナス属細菌における翻訳アレスト因子の解析」 第 97 回日本細菌学会総会, 2024. 8. 7-9, 札幌コンベンションセンター

高田啓: 「Mechanism analysis of multidrug-resistant factor, ARE-ABCF and 23S rRNA modification enzyme」
第 97 回日本細菌学会総会, 2024. 8. 7-9, 札幌コンベンションセンター

吉田真悠、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「クロストリジウム綱から見つかった翻訳アレスト因子 CliM の解明」
2024 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議, 2024. 8. 23-24, 長野市若里市民文化ホール

小笠原優大、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「Brevibacillus 属由来のアレストペプチドの機能解析」 2024 年度
グラム陽性菌ゲノム機能会議, 2024. 8. 23-24, 長野市若里市民文化ホール

佐野桃加、藤原圭吾、千葉志信: 「枯草菌翻訳アレスト因子 Ywcl の機能解析」 2024 年度グラム陽性菌ゲノム機
能会議, 2024. 8. 23-24, 長野市若里市民文化ホール

Shinobu Chiba: 「Universal translation-impeding sequences drive evolution of arrest peptides in bacteria」
International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics, 2024. 9. 2-5, The LUIGANS (福岡)

Keigo Fujiwara, Shinobu Chiba: 「Bacterial domain-wide bioinformatic analysis of RAPP/RGPP as the
universal core motif for the translation arrest」 International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics,
2024. 9. 2-5, The LUIGANS (福岡)

Naoko Tsuji, Shinobu Chiba: 「Diverse translation arrest peptides in the marine bacterium *Alteromonas
macleodii*」 International Symposium on Multifaceted Protein Dynamics, 2024. 9. 2-5, The LUIGANS (福岡)

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「翻訳アレストを利用した遺伝子発現制御機構の解析」 第 16 回ゲノ
ム微生物若手の会研究会, 2024.9.23-24, ホテルシーパレスリゾート 愛知県豊橋市神野新田町ミノ割 1-3

千葉志信: 「万能でない翻訳装置とそれが生み出す生理機能」 京都産業大学 生命科学セミナー, 2024.10.16, 京
都産業大学

辻奈緒子、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「バクテリアの翻訳アレストを利用した遺伝子発現制御」 第二回細胞
生物コロキウム, 2024. 10. 19, 京都産業大学

小笠原優大、藤原圭吾、高田啓、千葉志信: 「Brevibacillus 属由来のアレストペプチドの機能解析」 第 47 回日
本分子生物学会年会, 2024. 11. 27-29, 福岡国際会議場

藤原圭吾、辻奈緒子、千葉志信: 「細菌のアレストペプチドの網羅探索」 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024.
11. 27-29, 福岡国際会議場 (招待講演)

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 CliM の解明」 第 47
回日本分子生物学会年会, 2024. 11. 27-29, 福岡国際会議場

佐野桃加、藤原圭吾、千葉志信: 「枯草菌アレスト因子 Ywcl の機能解析」 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024.
11. 27-29, 福岡国際会議場

高田啓: 「微生物における翻訳品質管理機構の最前線」 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024. 11. 27-29, 福岡国
際会議場 (シンポジウムオーガナイザー)

Hiraku Takada, Caillan Crowe-McAuliffe, Helge Paternoga, Keigo Fujiwara, Esther N Park, Gemma C. Atkinson,
Allen R Buskirk, Shinobu Chiba, Daniel N. Wilson, Vasili Haurlyiuk: 「What we know about bacterial
ribosome-associated quality control」 Ribosome meeting Japan 2024, 2024. 12. 2-4, 東大医科学研究所 (招
待講演)

Keigo Fujiwara, Naoko Tsuji, Karen Sakiyama, Shinobu Chiba: 「Universal Translation-impeding Sequences
Drive Evolution of Bacterial Arrest Peptides」 Ribosome meeting Japan 2024, 2024. 12. 2-4, 東大医科学研
究所 (招待講演)

Naoko Tsuji, Keigo Fujiwara, Hiraku Takada, Shinobu Chiba: 「Common translational arrest mechanism for
diverse genes in *Alteromonas macleodii*」 Ribosome meeting Japan 2024, 2024. 12. 2-4, 東大医科学研究所

高田啓: 「翻訳制御機構の理解から探る応用微生物学」 日本農芸化学会 2025 年度大会, 2025. 3. 3-8, 札幌コン
ベンションセンター

高田啓、藤原圭吾、杉本竜太、大島拓、千葉志信、Vasili Haurlyiuk: 「枯草菌における新規翻訳制御因子の探索
と機能解析」 第 19 回日本ゲノム微生物学会年会, 2025.3. 17-19, かずさアカデミアホール

藤原圭吾、辻奈緒子、千葉志信: 「翻訳を制御する新生鎖の網羅的探索」 第 19 回日本ゲノム微生物学会年会,
2025.3. 17-19, かずさアカデミアホール

藤原圭吾、辻奈緒子、千葉志信：「海洋性細菌 *Alteromonas macleodii* 由来

新規翻訳アレスト因子による 環境センサー機能」 第 19 回日本ゲノム微生物学会年会, 2025.3. 17-19, かずさ
アカデミアホール

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)

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) (2024/11/8)

3) 研究会主催

バイオフィォーラム&タンパク質動態研セミナー (Alexander Mankin 博士、Nora Vázquez-Laslop 博士) , 2024. 9.
6, 京産大

バイオフィォーラム&タンパク質動態研セミナー (Patricia Clark 博士) 2024. 11. 7, 京産大



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、*Deinococcus* 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。これらの二成分毒素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きた。近年、DNA を ADP リボシル化酵素が見つかりその構造と機能研究を進めている。

(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、RIP (リボソーム不活性化タンパク質) と呼ばれる酵素が存在し、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。我々は、白粉花の根由来の MAP および小麦由来のトリチンに注目し、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。具体的にはこれらの結晶構造解析、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 RIP 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おり、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パレルが完全長のもの、膜挿入部がまだ組ま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

での膜透過は 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。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 BEC(CPILE)と命名された。BEC は BEC-a, BEC-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 BEC-b 膜孔調整と構造解析を始めた。面白いのは前述のイオタ毒素 Ib やディフィシル菌毒素 CDTb では最狭窄部位は Phe でできた 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、BEC-b のクランプ最狭窄部位は Ser であり、狭窄部位の大きさも疎水・親水といった違いもあり、どのような影響をしているのか興味深い。ここに焦点を置き、その違いを研究している。

(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、このような複合体の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が明らかにした。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、リボソームのリシンサルシんループのアデニンを特異的に引き抜く酵素が存在することが知られている。白粉花の根由来の MAP および小麦由来のトリチンに注目し研究を進めている。MAP 単体の結晶化に成功し、2.1 Å のデータを高エネ研で測定を行い、高分解能での解析を行なった。また現在、MAP と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 (BECa and BECb) We are studying the difference of the pore in BEC-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, CARP-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 (2024.4~2025.3)

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)

Hideaki Tsuge H, Noriyuki Habuka, Toru Yoshida

General ADP-Ribosylation Mechanism Based on the Structure of ADP-Ribosyltransferase-

Substrate Complexes *Toxins (Basel)*. 16(7):313. (2024) (査読有り)

5. 学会発表など (2024.4~2025.3)

1) 西田菜七実,羽深典之,津下英明

オシロイバナ由来の *Mirabilis Antiviral Protein* のリボソーム不活性化メカニズムの解明

蛋白質科学会 若手の会,札幌,2024年6月

2) Kazuya Nishida, Tomohito Yamada, Hideaki Tsuge

Structure and Function of Egg Mass Proteins in the Apple Snail

(*Pomacea canaliculata*),蛋白質科学会,札幌,2024年6月

3) Noriaki Sakoda, Tomohito Yamada, Hideaki Tsuge

Preparation of *Clostridium perfringens* iota toxin using liposomes

蛋白質科学会,札幌,2024年6月

4) Yuki Mitani, Toru Yoshida, Tomohito Yamada, Hideaki Tsuge

Single-particle structure analysis and activity measurement of *C. perfringens* iota toxin Ib serine-clamp mutant

蛋白質科学会,札幌,2024年6月

5) Yuki Mitani, Sotaro Takiguchi, Ryuji Kawano, Hideaki Tsuge

Analysis of membrane translocation of *Clostridioides difficile* binary toxin
using electrophysiological techniques

生物物理学会,京都,2024年6月

6) 三谷 優季, 滝口 創太郎, 川野 竜司, 津下 英明

二成分毒素の膜透過機構の解明へ向けたナノポア計測

第64回生物物理若手の会 夏の学校, 北海道, 2024年8月

7).西田菜七実,羽深典之,津下英明

オシロイバナ由来の *Mirabilis Antiviral Protein* (MAP) のリボソーム不活性化メカニズムの解明

第70回トキシシンポジウム 滋賀,2024年8月

8).Yuki Mitani, Toru Yoshida, Jun-ichi Kishikaw, Tomohito Yamada, Hideaki Tsuge

Cryo-EM Structure and Activity measurements of Serine clamp mutant of *C. Perfringens* iota toxin Ib
Reveal that Serine clamp Confers Cytotoxicity

2024年度 TARA セミナー・生理学研究会, 筑波, 2024年10月

9)Yuki Mitani, Sotaro Takiguchi, Ryuji Kawano, Hideaki Tsuge

Nanopore Sensing to Reveal the Membrane Translocation Mechanism of a Binary Toxin

分子生物学会, 福岡 2024年11月

10) 西田菜七実,羽深典之,津下英明

Structural and functional analysis of antiviral protein derived from *Mirabilis jalapa*

分子生物学会, 福岡 2024年11月

11) 西田菜七実,羽深典之,津下英明

オシロイバナ由来リボソーム不活性化タンパク質の構造と機能

第478回ビタミンB 研究協議会,滋賀,2025年3月

6. その他特記事項

(1) 外部資金

1) 基盤研究 B

24K01993 リボソーム単粒子解析で迫るトキシシン膜透過システムの理解

研究代表者:津下英明 取得年度:2024-2026(3年)

2) 挑戦的研究(萌芽)

23K18011 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 取得年度:2023-2024(2年)

3) 基盤研究 C

24K08704 セルロース高生産菌に見るエンカプスリンとカーゴタンパク質としての DyP の役割とは
研究代表者:菅野靖史 取得年度 : 2024-2026(3 年)

(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



研究室旅行 小豆島にて 8月

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。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ために、クライオ電顕による動的構造解析を進めている。従来の膜タンパク質は、生体膜から可溶化した状態で構造解析していたが、可溶化および精製過程でサブユニットの脱離や複合体の解離が起こる可能性がある。生体膜上の膜タンパク質を直接構造解析することで、本来の膜タンパク質の姿を捉える。以上の背景から主に次の3つのテーマを進めている。

(1) ATP 合成酵素、V-ATPase の構造解析

V-ATPase は、真核生物の酸性小胞 (リソゾーム、エンドソームなど) に存在する ATP 駆動性のプロトンポンプであり、小胞内の酸性化を通して、タンパク質の品質管理や物質代謝を担っている。ATP 合成酵素 F_0F_1 と同様の回転触媒機構で ATP のエネルギーを回転力に変えてプロトンを輸送する。我々は、真核生物の V-ATPase の先祖と考えられるバクテリア由来の V-ATPase (V/A-ATPase) を研究材料として用い、生化学、生物物理学 (1 分子観察)、構造生物学の手法を組み合わせ、機能・構造の解明を進めてきた。その結果、ATP 駆動の回転機構については、かなり理解が進んだ (昨年度の研究成果)。また、真核生物の V-ATPase の構造を決定することで、V-ATPase を標的とした創薬につながる構造情報を得る。また、ATP 合成酵素 FoF1 についても、構造解析を進めており、ATP の合成・分解と回転という運動間のエネルギー変換機構の解明を目指している。

(2) クライオ電子顕微鏡による ATP 動態に関する膜タンパク質の構造生物学

クライオ電子顕微鏡は、今や構造生物学の主流となり、分子の構造だけでなく、オルガネラや細胞全体の構造を、時には原子分解能近くの精度で見ることが可能にする。我々は、この技術をいち早くとり入れ、世界に先駆けて V 型 ATP 合成酵素の回転に伴う構造変化を明らかにした。この手法をさらに発展させ、細胞内での分子の挙動を高分解能に明らかにし、細胞内で起こっている現象を原子レベルで記述するのが目標である。研究対象を、ATP 動態を司る ATP チャンネルに広げ、ATP 動態を原子レベルで明らかにすることを目的とする。

(3) 生体膜上の膜タンパク質の in situ 構造解析

従来は、可溶化状態の膜タンパク質を精製し、その構造解析を行ってきた。しかしながら、本来膜タンパク質は膜電位を帯びている生体膜上で機能しており、膜タンパク質本来の機能や構造を見るには、生体膜上の膜タンパク質を直接構造解析する必要がある。

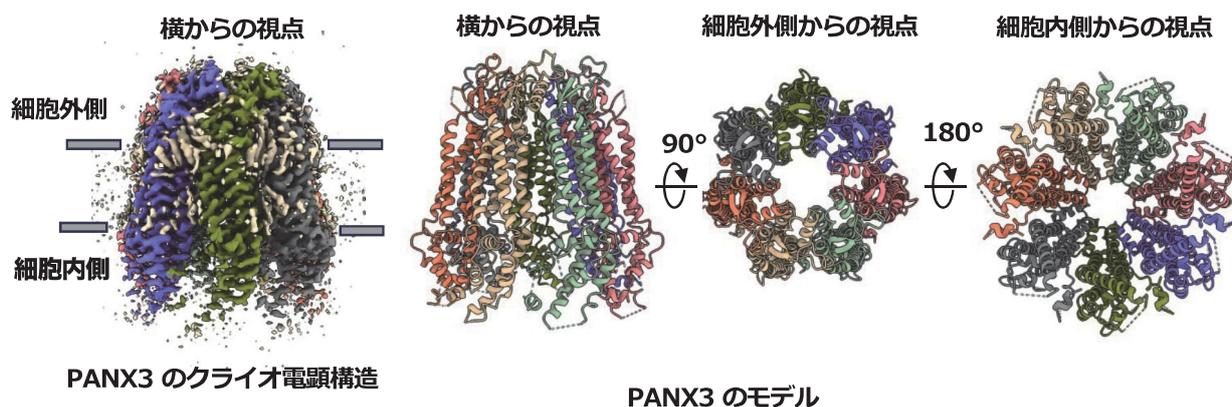
我々は、現在ミトコンドリア内膜上にある ATP 合成酵素 FoF1 と呼吸鎖複合体の構造解析を進めており、これらの機能中の構造を決定することで、酸化的リン酸化の分子機構を原子レベルで記述することを目指している。また、シナプス小胞上にある V-ATPase を標的とした特異的精製法を改良して効率的にシナプス小胞を精製し、シナプス小胞丸ごとの構造解析を行う。

2. 本年度の研究成果

1) ラージポアタンパク質 PANX3 の構造決定

細胞膜には、ATP などの比較的大きな分子を透過させるチャンネルタンパク質が存在している。PANX と呼ばれるラージポアタンパク質は、PANX1-3 の三種類のアイソマーが存在し、ATP や AMP などのヌクレオチドを主に透過させると考えられている。通常は、閉じた構造になっているが、アポトーシスが進行するなどの特殊な条件下で開構造になり、細胞内の ATP を細胞外に漏洩させることで、細胞内の ATP 濃度を現象させ、アポトーシスの進行を促進するといわれている。しかしながら、どのような仕組みで開閉が起こるのか、またヌクレオチド選択の分子基盤などわかってない点が残されている。さらに3つのアイソマーの役割についても不明である。PANX1 および PANX2 の構造は既に報告されているが、PANX3 に関しては、今年になって ATP およびカルシウムイオン存在下での構造が報告された。しかし、その分解能は低く、何も結合していないアポ型の構造は未解明であった。我々は、構造不明であった PANX3 の構造決定を試みた。浮遊細胞を使った発現系を構築し、構造解析に必要な量の PANX3 を精製することができた。精製された PANX3 からクライオグリッドを作成し、大阪大学高圧電顕センターの Titan Krios で撮影した。定法にのっとり、構造解析を行ったところ、3Å を切る分解能の PANX3 のクライオ電顕構造を得ることができた。

決定された PANX3 チャンネルは 7 量体であり、中心対称軸に沿って膜貫通孔を形成する。孔の最も狭い狭窄部は細胞外領域に位置するイソロイシン環で構成され、その大きさは他のパネキシンと同程度であった。構造変異解析 (Structural Variability analysis) の結果、細胞内領域における顕著な構造ダイナミクスが明らかとなり、パネキシンチャンネルの詳細な特性を理解するための構造基盤が解明された。



2) FoF1-ATPase の ADP 阻害構造の解明

FoF1-ATPase は、ATP を加水分解する F1 部分と、膜内在性でプロトンチャンネルとして機能する Fo 部分から構成される。F1 部分には、ATP 加水分解を担う 3 つの触媒部位と、ATP が結合するものの加水分解されないヌクレオチド結合部位である 3 つの非触媒部位が存在する。

F1 の触媒部位に ADP が結合したままになると、F1 の ATP 加水分解活性が阻害される。この阻害様式は ADP 阻害と呼ばれる。一方で、非触媒部位は ATP 加水分解には直接関与しないが、人工的に非触媒部位への ATP の結合をなくすと、F1 が ADP 阻害型となり、ATP 加水分解活性が失われることが報告されていた。F1 が ADP 阻害型となる分子機構は、長年にわたり未解決の課題として残されていた。

今回、非触媒部位の ATP 結合能を失った F1-ATPase (Δ NC-F1-ATPase) を作成し、ADP 阻害状態に陥った Δ NC-FoF1 の構造を、クライオ電子顕微鏡により 2.9Å という高分解能で決定した。ADP 阻害型 F1-ATPase の構造は、野生型の構造とほぼ同様であったが、触媒部位に結合しているヌクレオチドの種類に違いが見られた。ATP が最初に結合する触媒部位である E サイトに関しては、野生型 F1-ATPase では ATP が結合しているのに対し、ADP 阻害型 F1-ATPase では ATP の代わりに ADP が結合していた。また、ATP 分解が行われる D サイトでは、野生型 F1-ATPase では ADP とリン酸が結合しているのに対し、ADP 阻害型 F1-ATPase ではリン酸が存在せず、ADP のみが結合していた。これらの結果から、ADP 阻害型 F1-ATPase では、E サイトに結合している ADP が ATP の新たな結合を妨げるとともに、D サイトからリン酸が失われることで、ADP 阻害構造の安定化が促進されることが明らかとなった (図 2)。

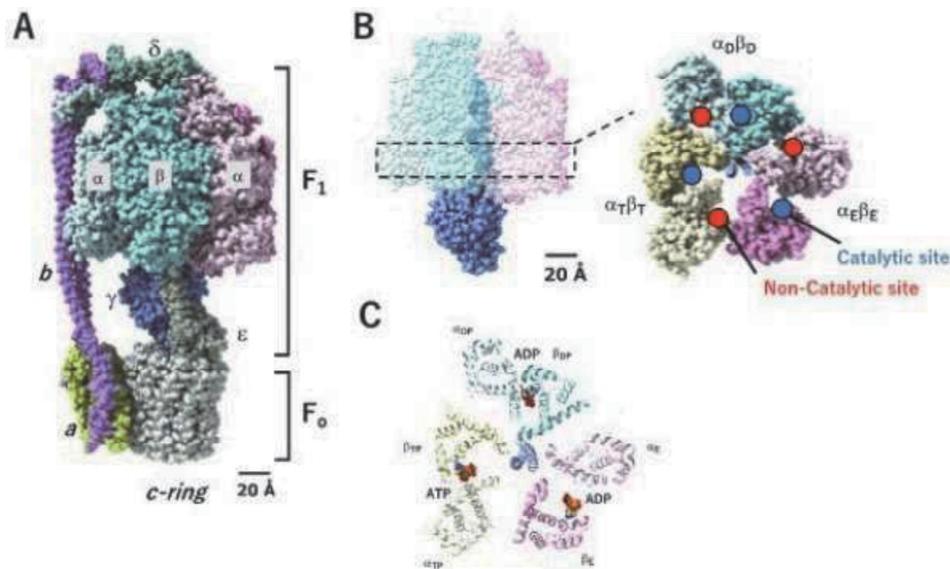


図 2. 今回の研究で解明された ADP 阻害型 FoF1-ATPase の構造。 A. FoF1 の全体構造、 B. F1 部分の構造。 C. F1 部分のヌクレオチド結合状態

3) ミトコンドリア内膜上の FoF1-ATPase の in situ 構造解析

牛心筋ミトコンドリアから調製したサブミトコンドリア顆粒 (SMP) をクライオ電子顕微鏡で撮影した。F1 とと思われる突出部が膜小胞表面に多数観察された。撮影された電顕画像から FoF1 の単粒子を抽出し、クラス分けを行ったところ、阻害タンパク質である IF1 でつながった FoF1 の 2 量体構造が得られた。それぞれのプロトマーに焦点を当てて構造精密化を行ったところ、3Å 前半の分解能の構造を得ることができた。さらに抽出する範囲を広げて単粒子解析を行ったところ、FoF1 の 4 量体構造が得られた。このように、SMP 上の FoF1 は複数の FoF1 からなる超分子構造からなっていた。また、2D 平均像の中には、FoF1 と異なる超分子複合体の像があり、これを元に単粒子を電顕画像から抽出し、単粒子解析を行ったところ、呼吸鎖分子超複合体の構造が得られた。さらにクラス分けを行い、SMP 上に存在する超分子の構造解析を進めている。

3. Research projects and annual reports

The sustenance of life is fundamentally dependent on energy, and the field of bioenergetics investigates how living organisms convert energy into biologically usable forms. Central to this process is adenosine triphosphate (ATP), the universal energy currency of cells, which is predominantly synthesized by ATP synthase within mitochondria. The ATP generated fuels a wide array of cellular activities, including motility, biosynthesis, catabolism, and molecular transport.

Among ATP-dependent transporters, vacuolar-type proton ATPase (V-ATPase) exemplifies a molecular machine that utilizes ATP hydrolysis to translocate ions into intracellular vesicles, thereby inducing acidification essential for numerous physiological functions. Transporters such as V-ATPase play critical roles in cellular homeostasis, and structural studies have greatly contributed to elucidating their functional mechanisms. Nonetheless, key aspects of their dynamic behavior remain elusive.

A central question in molecular life sciences is how protein-based molecular machines convert the chemical energy of ATP into mechanical work, such as substrate transport or conformational movement. To address this, dynamic structural analyses using cryo-electron microscopy (cryo-EM) are being actively pursued. Traditionally, membrane proteins have been studied in solubilized forms following extraction from biological membranes. However, this approach can lead to dissociation of subunits or disassembly of protein complexes, potentially obscuring native conformations.

Recent advances now enable the direct visualization of membrane proteins within their native lipid environments, preserving their authentic structural states. This approach offers a promising avenue for uncovering the true mechanisms of energy conversion and transport in bioenergetic systems.

This year's accomplishments

1. Structural Determination of Large-Pore PANX3

The cell membrane contains channel proteins that facilitate the transport of relatively large molecules such as ATP. Large-pore proteins known as pannexins (PANX1–3) are thought to primarily mediate nucleotide transport, including ATP and AMP. Typically, these channels remain in a closed conformation but open under specific conditions, such as during apoptosis, allowing ATP efflux, which reduces intracellular ATP levels and accelerates apoptosis. However, the molecular mechanisms underlying channel gating and nucleotide selectivity remain unclear, as do the specific roles of the three isoforms.

While the structures of PANX1 and PANX2 have been reported, the structural characteristics of PANX3 remained unresolved. Although a low-resolution structure of PANX3 in the presence of ATP and calcium ions was published earlier this year, its apo-form structure had yet to be determined. To address this gap, we established an expression system using suspension cells and successfully purified PANX3 for structural analysis. Cryo-EM grids were prepared and imaged using a Titan Krios at Osaka University's High-Voltage Electron Microscopy Center.

Subsequent structural analysis yielded a cryo-EM reconstruction of PANX3 at sub-3 Å resolution. The resolved PANX3 channel formed a heptamer, generating a transmembrane pore along a central symmetry axis. The narrowest constriction, located in the extracellular region, was composed of an isoleucine ring, similar in size to that of other pannexins. Structural variability analysis revealed substantial conformational dynamics in the intracellular regions, providing critical insights into the mechanistic properties of pannexin channels.

2. ADP-Inhibited FoF1-ATPase Structure

FoF1-ATPase consists of the F1 domain, which hydrolyzes ATP, and the Fo domain, a membrane-embedded proton channel. The F1 domain has three catalytic sites for ATP hydrolysis and three non-catalytic sites where ATP binds but is not hydrolyzed.

ADP inhibition occurs when ADP remains bound at the catalytic sites, preventing ATP hydrolysis. Although the non-catalytic sites do not directly participate, eliminating ATP binding at these sites induces ADP inhibition, a long-standing unresolved question.

To investigate this mechanism, we generated a variant of FoF1-ATPase (Δ NC-F1-ATPase) lacking ATP-binding at non-catalytic sites and determined its ADP-inhibited structure at 2.9 Å resolution using cryo-electron microscopy. The ADP-inhibited structure closely resembled the wild-type enzyme but showed distinct nucleotide binding differences. In the E site, ATP was replaced by ADP, and in the D site, phosphate was absent, leaving only ADP bound. These findings suggest that ADP at the E site blocks ATP binding, while phosphate loss at the D site stabilizes the ADP-inhibited state.

3. High-Resolution Structural Analysis of Mammalian V-ATPase

V-ATPase was purified from rat brain and analyzed using cryo-electron microscopy. Membrane proteins were solubilized with detergent, followed by the addition of SidK, a Legionella-derived inhibitor that specifically binds V-ATPase. The SidK-V-ATPase complex was isolated using Flag-tagged SidK and Flag resin purification. Further refinement by gel filtration yielded high-purity samples for structural analysis. Cryo-EM imaging achieved sub-2.5 Å resolution, allowing atomic model construction of the Vo domain. These findings provide detailed structural insights into mammalian V-ATPase.

4. 論文, 著書など

原著論文

- 1 ADP-inhibited structure of non-catalytic site-depleted FoF1-ATPase from thermophilic *Bacillus* sp. PS-3. Kobayashi R., Nakano A., Mitsuoka K., and Yokoyama K. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* (2025) DOI: 10.1016/j.bbabi.2025.149536
- 2 Cryo-EM structure of the human Pannexin-3 channel. Tsuyama T., Teramura R., Kishikawa J., Mitsuoka K. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 745 (2025) doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.151227

英文総説

なし

日本語解説記事

なし

5. 学会発表など

1. 哺乳類 V-ATPase の阻害剤結合構造の解明 上田楓華 西田結衣 中野敦樹 中西温子 光岡薫 横山謙 第 24 回日本蛋白質科学会年会 会場 札幌コンベンションセンター 6/2024 ポスター発表
2. V-ATPase の阻害剤結合構造と in situ 構造解析の試み 上田楓華 西田結衣 中野敦樹 中西温子 光岡薫 横山謙 第 47 回日本分子生物学会年会 会場 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡 11/2024 ポスター発表
3. V-ATPase の阻害剤結合構造と in situ 構造解析の試み 上田楓華 西田結衣 中野敦樹 中西温子 光岡薫 横山謙 日本生体エネルギー研究会第 50 回討論会 会場 名古屋大学野依記念学術交流館 12/2024 ポスター発表
4. Cryo-EM structure of mammalian V-ATPase. 西田結衣 中西温子 中野敦樹 上田楓華 光岡薫 横山謙 第 21 回国際生物物理学会 会場 国立京都国際会館 06/2024 ポスター発表
5. Structural analysis of mammalian V-ATPase. 西田結衣 中西温子 中野敦樹 上田楓華 光岡薫 横山謙 第 24 回日本蛋白質科学会年会 会場 札幌コンベンションセンター 06/2024 ポスター発表
6. Purification of Mammalian V-ATPase and Determination of Inhibitor Binding Structure. 西田結衣 中西温子 中野敦樹 上田楓華 光岡薫 横山謙 第 47 回日本分子生物学会年会 会場 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡 11/2024 ポスター発表
7. 創薬につながる哺乳類 V-ATPase の精製と構造解析の試み 西田結衣 中西温子 岡本佳乃 光岡薫 横山謙 日本生体エネルギー研究会第 50 回討論会 会場 名古屋大学野依記念学術交流館 12/2024 ポスター発表
8. Pannexin-3 の構造解析 寺村龍河 津山泰一 横山謙 第 24 回日本蛋白質科学会年会 会場 札幌コンベンションセンター 6/2024 ポスター発表
9. Pannexin-3 の構造解析 寺村龍河 津山泰一 横山謙 第 21 回国際生物物理学会 会場 国立京都国際会館 06/2024 ポスター発表
10. Liposome 上での LRRC8A の高分解構造解析の試み 寺村龍河 津山泰一 中野敦樹 横山謙 日本生体エネルギー研究会第 50 回討論会 会場 名古屋大学野依記念学術交流館 12/2024 ポスター発表
11. 脂質二重膜に組み込まれた機能中膜タンパク質のクライオ電子顕微鏡単粒子解析 中野 敦樹 第 24 回日本蛋白質科学会年会 6/2024 ポスター発表
12. Structural analysis of ATP synthases embedded in a lipid bilayer under proton motive force by cryoEM. 中野敦樹 IUPAB2024 6/2024 ポスター発表udent and Early Career Researcher Poster Award
13. 自作 PC でお手軽単粒子解析 -小胞上の膜タンパク質の構造解析とともに- 中野敦樹 第 47 回日本分子生物学会年会 11/2024 招待講演

14. クライオ電子顕微鏡による ATP 合成酵素の ATP 合成中構造解析 中野 敦樹 日本生体エネルギー研究会第 50 回討論会 12/2024 口頭発表 若手発表賞受賞 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

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究補助金 基盤研究 (B) 「プロトン駆動力による V/A-ATPase の回転触媒機構の解明」 23K27146 研究期間：令和 5-7 年度 研究代表者

2) 学外活動

科学研究費審査委員

3) アウトリーチ活動

滋賀県立水口高校における模擬授業 2024 12 月

京都市立紫野高校生を対象とした模擬実験 2024 月 7 月

研究室紹介写真

2024 12 月に開催された生体エネルギー研究会での一コマ。毎年研究室の学生が発表しています。



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能解析を進めている。現在注目している現象は、左右軸形成、体節の形成・分化、耳石形成などである。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。

現在、池田貴史研究員とともに、以下のテーマで研究を行っている。

- ・シグナル分子の細胞外動態、細胞外基質との相互作用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
- ・体節形成とその由来細胞種の進化的多様性の解明
- ・初期発生のエピジェネティック制御

2. 本年度の研究成果

本年度は上記テーマのうち以下のテーマについての成果発表と進展があった。

初期発生のエピジェネティック制御については、メダカ初期発生におけるヘテロクロマチン修飾である H3K9me3 の動態と制御のメカニズムを解明して論文発表した (Fukushima et al., 2024)。H3K9me3 は、受精後に全体的な消去と再獲得を経て、適切にリプログラミングされることが初期発生に不可欠である。無脊椎動物および非哺乳類脊椎動物において、このようなヘテロクロマチンリプログラミングのダイナミクスは広く保存されているものの、その分子機構は種によって異なる可能性があることがこれまでの研究で示されてきた。本研究では、卵割期における急速な細胞周期が DNA 複製依存的な H3K9me3 の受動的消去を引き起こすこと、また、中期胞胚移行 (mid-blastula transition) に向けて細胞周期が緩やかになることで、H3K9me3 ヒストンメチルトランスフェラーゼである Setdb1 の核内蓄積が増加し、H3K9me3 再蓄積の開始につながることを見出した。さらに、初期発生における細胞周期の長さが、ゼブラフィッシュやアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) においても H3K9me3 リプログラミングを制御していることを示した。これらの知見を無脊椎動物の既報研究と合わせることで、H3K9me3 の全体的な消去と再蓄積は、ショウジョウバエ、線虫、アフリカツメガエル、硬骨魚類といった非哺乳類脊椎動物および無脊椎動物に共通する、細胞周期長依存的な機構によって担われていることを示した。この論文は掲載雑誌 (EMBO report) の表紙に採用された。

体節の 3 次元形態形成について、ゼブラフィッシュ胚の体節伸長を直接的に導く細胞挙動の単一細胞レベルの解析を実施し、その成果を発表した (Kametani et al., 2024)。本研究では、ライトシート顕微鏡を用いて、体節背側半分を構成するすべての細胞の運動と形態を三次元空間で記録した。その結果、個々の細胞内で同時に生じる「水平方向」と「背側方向」の二種類の細胞運動を同定し、これらが体節伸長の過程で複雑にねじれた細胞流を形成することを明らかにした。さらに、三次元計算モデリングにより、水平方向の細胞回転が背腹軸に沿った体節の垂直方向への伸長を加速させることが示された。本研究は、胚の三次元空間において動的に進行する組織形態形成における集団的細胞移動の役割に関する新たな知見を提供するものである。

シグナル分子の細胞外動態に注目した左右軸形成機構については、Dand5 の細胞外分布制御に関わる細胞外基質であるヘパラン硫酸を時期領域特異的に分解するシステムの立ち上げを行った。熱ショックプロモーター下流で膜係留型ヘパラン硫酸分解酵素 tethered-HepIII を発現する遺伝子組換え系統を作製し、熱ショックの条件検討を進めている。池田貴史研究員はこのテーマに関連する学会発表で、第 57 回日本発生生物学会大会にて優秀ポスター賞、学術変革マルチモダル ECM 若手の会 2025 優秀発表賞（ポスドク部門）を受賞した。

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 morphogenesis/differentiation, and otolith formation. We are also collaborating on the Medaka Genome Project to study the genome evolution of vertebrates, and on the epigenetic regulation of vertebrate development using medaka embryos.

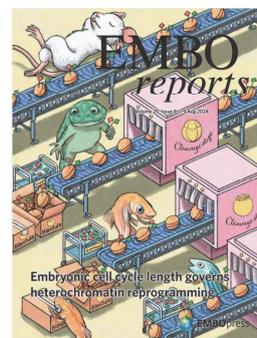
This year, we published two papers on epigenetic reprogramming and somite morphogenesis, which are described in detail below. Furthermore, we established a system to degrade heparan sulfate, an extracellular matrix component involved in regulating the extracellular distribution of Dand5, in a temporally and regionally specific manner. We generated a transgenic medaka line expressing a membrane-anchored heparan sulfate-degrading enzyme, tethered-HepIII, under the control of a heat-shock promoter, and optimized the conditions for heat-shock induction. In addition, we identified motif sequences involved in the interaction between Dand5 and heparan sulfate.

This year's accomplishments

We published the results of two research projects from our ongoing studies on epigenomics in medaka and on somite 3D morphogenesis.

1) Epigenetic reprogramming of H3K9me3 during medaka development (Fukushima et al., EMBO rep., 2024)

This study examines how heterochromatin reprogramming, specifically H3K9me3 dynamics, is controlled during early embryogenesis in non-mammalian vertebrates. Using medaka as the primary model, we show that rapid cleavage cycles after fertilization cause passive, DNA replication-dependent dilution of H3K9me3. As the cell cycle slows toward the mid-blastula transition (MBT), nuclear accumulation of the H3K9me3 methyltransferase Setdb1 enables re-establishment of heterochromatin. Manipulating cell cycle length experimentally confirmed that slowing promotes H3K9me3 re-accumulation, whereas acceleration suppresses it. Similar results were obtained in zebrafish and *Xenopus*, indicating that this mechanism is conserved across non-mammalian vertebrates. The findings support a model where cell cycle length, rather than zygotic genome activation, governs both erasure and re-deposition of H3K9me3. This work provides new insight into the evolutionary conservation of cell cycle-dependent epigenetic reprogramming mechanisms. Notably, this paper was featured on the cover of *EMBO Reports*.



2) 3D single-cell analysis of somite elongation in zebrafish embryos (Kametani et al., Cells Dev., 2024)

This study investigates how tissue elongation is achieved during zebrafish somitogenesis at single-cell resolution. Using lightsheet microscopy, we reconstructed the three-dimensional motion and morphology of all cells in the dorsal half of somites. We identified two concurrent types of movement - horizontal rotation and dorsal displacement - within individual cells, generating a complex twisted flow that drives somite elongation. Inhibition of Sdf1 signaling disrupted both collective movements and blocked elongation, demonstrating its essential role. Computational modeling further showed that horizontal cell rotation accelerates elongation along the dorsoventral axis. Together, these results reveal that coordinated, multidirectional cell migration underlies somite morphogenesis, providing new insights into the dynamic three-dimensional nature of embryonic tissue shaping.

4. 論文, 著書など (*: corresponding authors)

原著論文

Fukushima HS*, Ikeda T, Ikeda S, Takeda H*. Cell cycle length governs heterochromatin reprogramming during early development in non-mammalian vertebrates. *EMBO Rep.* 2024 Aug;25(8):3300-3323. doi: 10.1038/s44319-024-00188-5.

Kametani H, Tong Y, Shimada A, Takeda H*, Sushida* T, Akiyama M*, Kawanishi T*. Twisted cell flow facilitates three-dimensional somite morphogenesis in zebrafish. *Cells Dev.* 2024 Dec;180:203969. doi: 10.1016/j.cdev.2024.203969.

Kei Nagura#, Takafumi Ikeda#, Takashi Hasebe, Yumeko Satou-Kobayashi, Sumio Udagawa, Shuji Shigenobu, Atsuko Ishizuya-Oka, Masanori Taira. Histological and gene-expression analyses of pyloric sphincter formation during stomach metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Developmental biology.* 2025 Jan;517:100-116. (#: equal contribution) doi: 10.1016/j.ydbio.2024.09.010.

英文総説

Kawanishi T*, Takeda H*. Dorsoventral patterning beyond the gastrulation stage: Interpretation of early dorsoventral cues and modular development mediated by *zic1/zic4*. *Cells Dev.* 2025 Feb 24:204012. doi: 10.1016/j.cdev.2025.204012.

日本語解説記事

総説

井上雄介, 武田洋幸, 馬谷千恵. 母親の高脂肪食がメダカ卵に与える影響. *理科通信_サイエンスネット_第81号*, 6-9, 2024

5. 学会発表など

池田貴史. 魚類における頭部鱗の発生と進化—さかなの頭の鱗は進化的新規形質か? 館山湾岸研究所セミナー. 口頭発表. 2025年3月、館山.

Hiroyuki Takeda. Towards understanding the epigenetic regulation of vertebrate early development – fish as a model. Asian Conference on Fish Models for Diseases, 17 - 20 February, 2025. Bangkok, Thailand. Invited talk.

池田貴史. 左右軸形成を駆動する分泌性リガンドと非基底膜 ECM の協働ダイナミクス. マルチモダル ECM 若手の会 2025. 口頭発表. 2025年1月、大阪. 優秀発表賞 (ポストドク部門)・ディスカッション特別賞.

Takafumi Ikeda. Left-right asymmetry formation by secreted ligands from the left-right organizer in zebrafish embryo. Kyoto University International Symposium, 2024. 口頭発表. 2024年12月、京都.

池田貴史. 左右軸形成におけるシグナル分子のはたらきを「見て」理解する. 関西おさかな勉強会. 口頭発表. 2024年11月、京都.

福嶋悠人, 武田洋幸. 魚類初期胚の Zygotic genome activation における活性型ヒストン修飾の機能解析. 第47回日本分子生物学会年会 2024年11月27日、福岡.

Hiroyuki Takeda. Interpretation of the organizer-mediated BMP gradient in late development - Insights from the spontaneous medaka mutant, Da. Spemann-Mangold Centennial Symposium, 16 - 19 September 2024, Freiburg, Germany. Invited talk.

Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda. Extracellular behavior of Nodal and Dand5 proteins secreted from the left-right organizer during left-right pattern formation. Spemann-Mangold Centennial Symposium, 16 - 19 September 2024, Freiburg, Germany. Poster.

Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda. Extracellular interplay of Nodal and Dand5 proteins secreted from the left-right organizer during left-right asymmetry formation. 18th International Zebrafish Conference. 17 - 21 August, 2024, Kyoto. Poster.

哺乳類以外の脊椎動物の初期発生における、細胞周期長調節に依存したヒストン修飾のリプログラミング制御機構、福嶋悠人，池田貴史，池田森羅，武田洋幸．日本動物学会 第 95 回長崎大会 2024 2024 年 9 月 13 日、口頭発表

Takafumi Ikeda, Toru Kawanishi, Hiroyuki Takeda. Visualization and manipulation of Nodal and Dand5 proteins secreted from the left-right organizer in zebrafish embryo. The 57th Annual Meeting of JSDB. ポスター発表. 2024 年 6 月、京都.

福嶋悠人，池田貴史，池田森羅，武田洋幸．哺乳類以外の脊椎動物の初期発生において細胞周期調節機構がヒストン修飾のリプログラミングを制御する、第 17 回日本エピジェネティクス研究会年会 2024 年 6 月 13 日、大阪. ポスター.

Hiroto Fukushima, Takafumi Ikeda, Shinra Ikeda, Hiroyuki Takeda. Cell cycle length regulates both erasure and re-establishment of heterochromatin during early development in non-mammalian vertebrates. Cold Spring Harbor Asia meeting for Chromatin, Epigenetics & Transcription, May 13 -17, 2024, Suzhou, China. Poster (Poser Awards)

6. その他特記事項

1) 外部資金

・ 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)

・ 学術変革領域研究 (A) (公募研究)

研究課題：左右軸形成における分泌性リガンドと非基底膜 ECM の協働ダイナミクス

研究代表者：武田洋幸 取得年度：2024-2025 (2 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： JST-ERATO パネルオフィサー (PO)

武田洋幸： 東京大学 EMP コース (Executive Management Program, 社会人講座) 講師

武田洋幸： 国際生物学賞委員会委員・審査委員会委員

3) 受賞等

- ・2024年7月 池田貴史研究員 第57回日本発生生物学会大会にて優秀ポスター賞。
- ・2025年1月 池田貴史研究員 学術変革マルチモダル ECM 若手の会 2025 優秀発表賞（ポスドク部門）・ディスカッション特別賞。



研究室写真

2024年研究室メンバー（2024年10月）



2024年度卒業式（2025年3月）



2024年度セミナー開催

開催日	演者	演題	世話人
2024. 9. 6	Alexander Mankin (シカゴ大学イリノイ校, USA)	A Fully-Integrated Protein Synthesis Machine	千葉志信
"	Nora Vázquez-Laslop (シカゴ大学イリノイ校, USA)	A Lasso-Peptide Inhibitor of the Bacterial Ribosome	千葉志信
"	Ramanujan Hegde (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK)	Insertion and assembly of multipass membrane proteins	遠藤斗志也
"	Tom A. Rapoport (Harvard Medical School and Howard Hughes Medical Institute, Boston, MA, USA)	Mechanism of protein import into peroxisomes	遠藤斗志也
2024. 11. 7	Patricia L. Clark (Notre Dame大学, USA)	Synonymous codon substitutions modulate transcription and translation of a divergent upstream gene	千葉志信

編集後記

今年も遅くなってしまいましたが、2024年度の年報ができました。年報は、今回から pdf ファイルを主な媒体として制作することにいたしました。紙媒体も並行して制作しますが、pdf 版の方がタブレットその他で読みやすいのではないかと思います。pdf 版をよろしくお願いいたします。

2025年9月に、遠藤が総括を務める JST-CREST「細胞ダイナミクス」領域、野地博行さんが総括を務める JST さきがけ「細胞の動的・高次構造体」、吉川雅英さんが領域代表を務める科研費学術変革領域研究 (A)「クロススケール新生物学」が共催する形で、国際シンポジウム「International Symposium on Cellular Structural Biology」を東大で開催しました。この機会に、海外からの招待講演者である Roland Beckmann さん、Roland Knorr さん、Francesca Bottanelli さんの3人にインタビューを行いました。3人は、クライオ電顕を中心に研究されている Beckmann さん、細胞内コンデンセートを研究されている Knorr さん、超解像顕微鏡を駆使して研究されている Bottanelli さんということで、いま次のフェイズにはいりつつある生命科学の最前線、構造細胞生物学で研究をされています。そこで、どのようにしてこの分野に惹かれるようになったかという、研究者としてのパーソナルヒストリーをお聞きすることができました。また、今回はたまたま3人も現在はドイツの大学に所属する研究者であることから、日本とドイツの研究環境の違いなどについても、興味深いお話しが聞けました。今後の研究における AI の役割など、示唆に富むインタビューになったかと思います。インタビューにご協力いただいた3人の海外からの研究者、そして、主催者側から吉川さん、稲葉さん、ありがとうございました。ちなみに、今回は録音と文字起こしもすべて吉川さんのパソコンのアプリで行ったので、だいぶ省力化できました。

2025年9月に本学に、200kV のクライオ電子顕微鏡 Glacios2 が導入されました（引き渡しは10月末）。11月から稼働開始、2026年4月には外部利用も開始の予定です。わが国はクライオ電顕の整備が遅れたため、構造生物学研究では欧米および中国に大きく遅れをとりました。そうした状況に一矢報いるというわけではありませんが、本学に最新の Glacios2 が設置されたことは大変喜ばしいことであり、本学のみならず京都地区での構造生物学研究の発展に大きく貢献できるものと期待しています。年報では、今回のクライオ電顕導入にあたって、クライオ電顕を用いた先進的研究を行ってきた本学タンパク質動態研の横山さんに、エッセイを書いていただきました。お楽しみいただければと思います。

生命科学研究は、クライオ電子顕微鏡と AI の台頭により、かつての「ゲノム革命」に匹敵する「構造革命」の時代を迎えています。動態研も、そのような時代の変革期にあって、課せられたミッションはますます重くなってきているかと思います。本研究所はそうした内外の要請に応じていく所存ですので、今後とも暖かく見守っていただければと思っています。

遠藤斗志也 (2025.12.26 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

2024 年度号

【非売品】

令和 8 年 2 月 21 日 印刷

令和 8 年 2 月 28 日 発行

発行人 京都産業大学タンパク質動態研究所長
遠藤斗志也

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

