

領域略称名：多面的蛋白質世界
領域番号：20A304

令和5年度
科学研究費助成事業「学術変革領域研究（A）」
に係る中間評価報告書

「マルチファセット・プロテインズ：拡大し変容する
タンパク質の世界」

領域設定期間

令和2年度～令和6年度

令和5年6月

領域代表者 東京工業大学・科学技術創成研究院・教授・田口 英樹

目 次

研究組織

1	総括班・総括班以外の計画研究	2
2	総括班・総括班以外の計画研究の研究代表者・研究分担者	3
3	公募研究	6

研究領域全体に係る事項

4	研究領域の目的及び概要	8
5	審査結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況	10
6	研究の進展状況及び主な成果	12
7	研究発表の状況	26
8	研究組織の連携体制	31
9	若手研究者の育成に係る取組状況	32
10	アウトリーチ活動に係る取組状況	33
11	研究費の使用状況・計画	34
12	今後の研究領域の推進方策	35
13	総括班評価者による評価	37

研究組織 (令和5年6月末現在。ただし完了又は廃止した研究課題は完了・廃止時現在。)

1 総括班及び総括班以外の計画研究

研究項目[1]	課題番号 研究課題名	研究代表者 氏名	所属研究機関・部局・職	人数[2]
X00 総	20H05924 拡大し変容するタンパク質の世界（総括班）	田口英樹	東京工業大学・科学技術創成 研究院・教授	2
A01 計	20H05925 非典型的な翻訳動態の多様性・普遍性と分子機構	田口英樹	東京工業大学・科学技術創成 研究院・教授	1
A01 計	20H05926 機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構	千葉志信	京都産業大学・生命科学部・ 教授	2
A01 計	20H05927 新規 AUG 非依存性 RAN 翻訳の分子機構とその神経変性病態における役割	永井義隆	近畿大学・医学部・教授	2
A01 計	20H05928 ノンコーディング RNA から産生されるタンパク質の生理機能	松本有樹修	名古屋大学・理学研究科・教 授	1
A01 計	20H05929 細胞内タンパク質の多重局在とその制御機構の解明	遠藤斗志也	京都産業大学・生命科学部・ 教授	2
A01 計	20H05930 未開拓プロテオームの同定・定量技術の開発	松本雅記	新潟大学・医歯学系・教授	1
A01 計	20H05931 未開拓タンパク質の1分子計測技術・デバイス開発	渡邊力也	理化学研究所・開拓研究本 部・主任研究員	1
A01 計	20H05932 未開拓タンパク質データの収集・特徴抽出・予測	太田元規	名古屋大学・情報学研究科・ 教授	2
総括班及び総括班以外の計画研究 計 9 件（廃止を含む）				

[1] 総：総括班、計：総括班以外の計画研究

[2] 研究代表者及び研究分担者の人数（辞退又は削除した者を除く。）

2 総括班及び総括班以外の計画研究の研究代表者・研究分担者

研究項目：X00

研究課題名：拡大し変容するタンパク質の世界（総括班）

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	田口英樹	東京工業大学・科学技術創 成研究院・教授	研究総括
分担	千葉志信	京都産業大学・生命科学部・ 教授	広報
合計 2 名			

研究項目：A01-1

研究課題名：非典型的な翻訳動態の多様性・普遍性と分子機構

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	田口英樹	東京工業大学・科学技術創 成研究院・教授	研究総括
合計 1 名			

研究項目：A01-2

研究課題名：機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	千葉志信	京都産業大学・生命科学部・ 教授	原核生物の機能性翻訳途上鎖の解析の研究総括と遂行
分担	内藤 哲	北海道大学・農学研究院・農 学研究員	真核生物の機能性翻訳途上鎖の解析の研究総括と遂行
合計 2 名			

研究項目：A01-3

研究課題名：新規 AUG 非依存性 RAN 翻訳の分子機構とその神経変性病態における役割

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	永井義隆	近畿大学・医学部・教授	研究全般の実施と統括
分担	森 康治	大阪大学・大学院医学系研 究科・講師	培養細胞を用いた解析

合計 2 名

研究項目 : A01-4

研究課題名 : ノンコーディング RNA から産生されるタンパク質の生理機能

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	松本有樹修	名古屋大学・理学研究科・教授	研究総括
合計 1 名			

研究項目 : A01-5

研究課題名 : 細胞内タンパク質の多重局在とその制御機構の解明

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	遠藤斗志也	京都産業大学・生命科学部・教授	研究全般, タンパク質の細胞内局在制御
分担	松本俊介	九州大学・農学研究院・助教	Msp1 によるタンパク質の細胞内局在制御
合計 2 名			

研究項目 : A01-6

研究課題名 : 未開拓プロテオームの同定・定量技術の開発

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	松本雅記	新潟大学・医歯学系・教授	研究総括
合計 1 名			

研究項目 : A01-7

研究課題名 : 未開拓タンパク質の 1 分子計測技術・デバイス開発

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	渡邊力也	理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員	総括
合計 1 名			

研究項目：A01-8

研究課題名：未開拓タンパク質データの収集・特徴抽出・予測

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	太田元規	名古屋大学・情報学研究科・ 教授	研究統括, 情報解析
分担	福地佐斗志	前橋工科大学・工学部・教授	情報解析
合計 2 名			

3 公募研究

研究項目[1]	課題番号 研究課題名	研究期間	研究代表者 氏名	所属研究機関・部局・職	人数 [2]
A01 公	21H05708 メダカノンコーディング RNA から翻訳されるペプチドによる行動制御機構解析	令和3年度 ～ 令和4年度	横井佐織	北海道大学・大学院薬学研究院・助教	1
A01 公	21H05710 分泌系タンパク質の配送における非典型的な翻訳終結反応の分子機構と生理機能の解明	令和3年度 ～ 令和4年度	松尾芳隆	東京大学・医科学研究所・准教授	1
A01 公	21H05711 翻訳途上の新生鎖に隠された新しい仕組みによって促進されるタンパク質の折り畳み機構	令和3年度 ～ 令和4年度	門倉 広	東北大学・多元物質科学研究所・准教授	1
A01 公	21H05712 クライオ電顕単粒子解析による終止コドンのリードスルーの活写	令和3年度 ～ 令和4年度	田中良和	東北大学・大学院生命科学研究所・教授	1
A01 公	21H05713 生体内ストップコドンリードスルー	令和3年度 ～ 令和4年度	市之瀬敏晴	東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教	1
A01 公	21H05717 小分子 RNA 依存的リボソーム停滞機構の統合的理解	令和3年度 ～ 令和4年度	岩川弘宙	立教大学・理学部・生命理学科・准教授	1
A01 公	21H05720 タンパク質 N 末端コードの系統的解析	令和3年度 ～ 令和4年度	今見考志	理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員	1
A01 公	21H05724 病害菌の感染防御に関与する非 AUG を開始コドンを持つ短い遺伝子の探索	令和3年度 ～ 令和4年度	花田耕介	九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授	1
A01 公	21H05726 tRNA レポートリーの変化が与えるタンパク質の多面性	令和3年度 ～ 令和4年度	吉久 徹	兵庫県立大学・大学院理学研究科・教授	1
A01 公	21H05727 非典型翻訳の試験管内再構成とそのメカニズムの解明	令和3年度 ～ 令和4年度	町田幸大	兵庫県立大学工学部・大学院工学研究科・准教授	1
A01 公	21H05728 非膜性構造体における蛋白質の機能性構造ドメインと天然変性領域の協同的役割	令和3年度 ～ 令和4年度	山本詠士	慶應義塾大学・理工学部・専任講師	1
A01 公	21H05731 液-液相分離によるメンブレンコンタクトの構築基盤の解明	令和3年度 ～ 令和4年度	藤岡優子	北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教	1

A01 公	21H05733 神経変性疾患に関わる凝集体の形成・抑制の in situ 構造生物学	令和3年度 ～ 令和4年度	山形敦史	理研・生命機能科学研究センター・研究員	1
A01 公	21H05734 APEX-Ribo-Seq: 近傍標識による非典型局所翻訳の網羅解析	令和3年度 ～ 令和4年度	七野悠一	理化学研究所・開拓研究本部・研究員	1
A01 公	21H05736 刺激依存的に非典型読み枠で合成されるタンパク質の同定及びその合成機構、機能の解析	令和3年度 ～ 令和4年度	足達俊吾	産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門・主任研究員	1
公募研究 計 15 件 (廃止を含む)					

[1] 公：公募研究

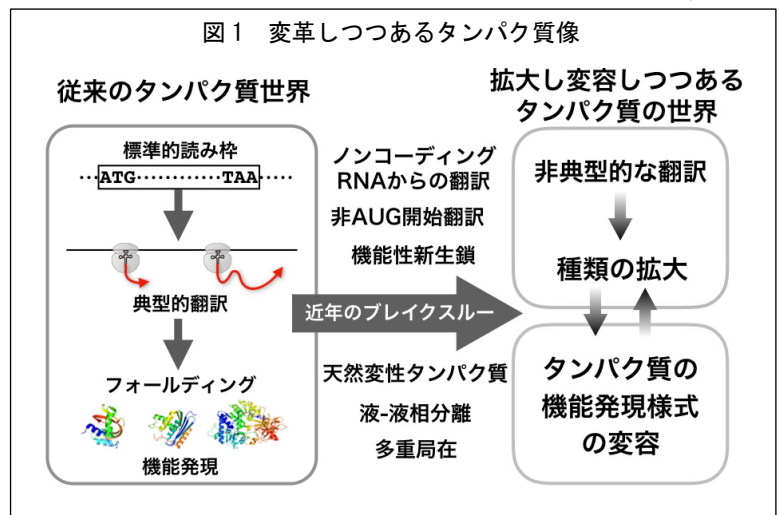
[2] 公募研究は研究代表者が1名で実施

研究領域全体に係る事項

4 研究領域の目的及び概要

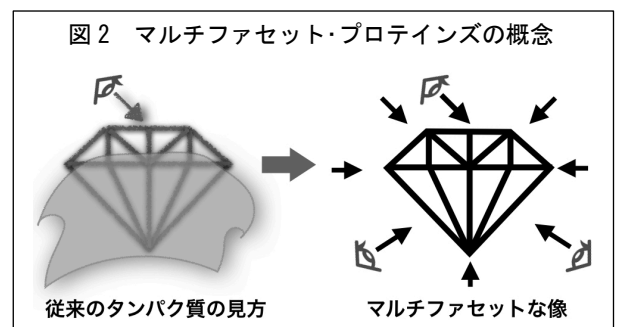
研究領域全体を通じ、本研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時の領域計画書を基に、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、どのような点が「これまでの学術の体系や方向を大きく変革・転換させる」ものであるか、研究の学術的背景や領域設定期間終了後に期待される成果等を明確にすること。

【背景・目的】 この数年の間に従来のタンパク質像が大きく変革しつつある。これまでのタンパク質研究は、リボソームが mRNA 内の遺伝子読み枠（ORF）の開始コドンから終止コドンまでを翻訳し、完成したポリペプチド鎖が立体構造を形成して機能するという過程を前提としている。しかし、近年のさまざまな発見や技術革新によるブレイクスルーから、従来のタンパク質科学の常識が大きく揺らいでいる。例えば、翻訳は、想定されている遺伝子読み枠の開始コドン AUG から始まって淡々とアミノ酸を紡いで終止コドンで終わるだけではない。翻訳はしばしば AUG 以外から始まったり、翻訳伸長途中で止まったりする。タンパク質をコードしないという定義で命名されたノンコーディング RNA が生理的に意味のあるタンパク質に翻訳される例が続々と見つかってきている。質量分析に基づくプロテオミクス解析の技術革新などによってプロテオームを構成するタンパク質のレパートリーは増加の一途をたどっている。また、タンパク質はいつもフォールディングして機能するわけではないこと、特定の場所・特定の構造状態で機能を発揮するだけではないこともわかってきた。さらに、こうした従来見過ごされていたタンパク質の世界が神経変性疾患など多くの病気に密接に関わる例が見出されてきた。このように、不変と考えられていた「タンパク質の世界」にはこれまで見えていなかった多くの面があり（**multifaceted**）、我々の認識する世界は拡大し変容しつつある（図 1）。



すなわち、細胞内でのタンパク質の世界を真に理解するには、タンパク質の合成過程、種類、機能発現様式における従来の常識を疑い、これまで欠けていた新たな視点にてタンパク質の世界を見直す必要がある。

ここでタンパク質世界の真の姿を宝石に例えてみよう（図 2）。従来は宝石にヴェールがかかり、ごく一部のカット面（ファセット: facet）をぼんやりと見ていただけであったが、最近のブレイクスルーによってヴェールがはがされ、これまで見えていなかった多くの面（マルチファセット）が見えるようになってきた。さらに、ORF の定義の変更、翻訳過程の詳細な理解、タンパク質フォールディングや局在の常識の変更、相分離などさまざまな「メガネ」が手に入り、各ファセットをより解像度高く見ることでタンパク質世界の真の姿に迫れるようになってきたと言える。



そこで本領域では、**拡大し変容するタンパク質の世界をマルチファセットな視点で開拓しながら、その実体、分子機構、生理的な意義と制御を明らかにし、タンパク質に基盤を置く生命科学に新たなパラダイムを構築することを目的とする。**

【全体構想】

本領域は、多面的な視点でタンパク質を捉え直すことで、その分子機構や細胞内機能を明らかにし、*in vivo* タンパク質科学のパラダイムシフトに貢献することを目指す。この目的達成のために、領域代表のビジ

ョンの下、有機的な連携が可能な実績のある研究者を多様な学問分野、幅広い世代から結集し、8つの計画研究体制を組織した(図3)。これらの計画研究は、各々が独立した研究を行いつつ、学術変革領域の枠組みの中で個別の研究室では実現できない連携研究を実現する。

【各研究計画の達成目標】

【1. 非典型的な翻訳動態の分子機構】

従来の ORF の枠を超えた非典型的な翻訳がどの程度普遍的に起こるのか、その全貌を明らかにする。また、その生理機能、分子機構、細胞内での動態を明らかにする。

【2. 未開拓プロテオームの探索と生理機能】

iMPAQT など定量プロテオミクス、リボソームプロファイリング、バイオインフォマティクスを駆使することで、これまで未開拓だったタンパク質を多数同定する。これにより、ノンコーディング RNA から産生されるタンパク質の種類、量、生理機能を明らかにする。

【3. 神経変性疾患に関与する非典型的な翻訳とその病態との関連】

RAN 翻訳の分子機構、病態との関連を明らかにする。RAN 翻訳から産まれる低複雑性 LC ドメインタンパク質による液-液相分離の性質、神経変性機構について明らかにする。

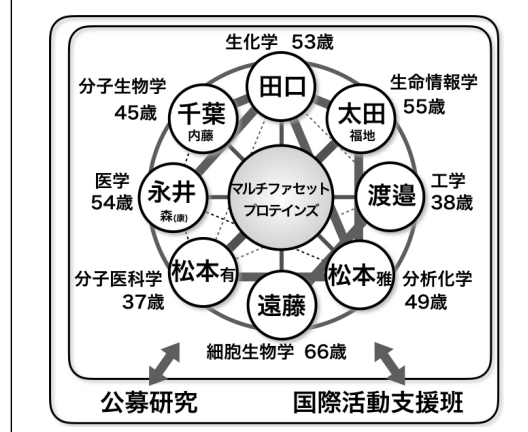
【4. 細胞内タンパク質の機能発現様式】

翻訳が途中で停止した新生鎖の生理機能、細胞内での翻訳に共役したフォールディング、オルガネラ間での多重局在と制御の分子機構を明らかにする。

【5. 新たな方法論の開発と応用】

未開拓タンパク質の世界を探究する際に必要な 1 分子レベルでのデバイス開発、バイオインフォマティクスによる新規 ORF 由来タンパク質や液-液相分離するタンパク質のデータ収集、予測などを実施する。

図3 本領域の組織構成(年齢は2020 当時)



公募研究は、計画研究では網羅できない研究分野や課題、新発想の連携研究を募集する。

総括班は領域研究のとりまとめに必須の体制であり、領域代表のリーダーシップの下に、未開拓タンパク質世界の研究に邁進する。特に、以下の点に留意して本領域を運営する。

1. 領域内の連携強化

本領域の組織は各計画班員それぞれが得意分野を持ちつつも、その研究内容は緩くオーバーラップした集団である。この特長を最大限活かすため設備共用化や研究員、学生の交流などを行いながら、分野の垣根を越えた連携を促進するとともに、常に新たな研究展開の方向性、新たなタンパク質世界の存在と機能の原理発見を模索する。

2. 新しい技術開発の促進

科学の革新的な進歩には新たな方法論、新しい技術の開発が不可欠である。タンパク質世界の研究の変革にも、新たな視点を支える技術的ブレイクスルーが必要である。定量プロテオミクス、1 分子レベルでの研究を支えるマイクロデバイスなど、新しい技術開発に注力する。

3. 次世代の研究者の育成

次世代を担う若手研究者こそが、拡大し変容するタンパク質の世界を切り拓き、学術を変革する担い手になってほしい。そこで、活気と緊張感に満ちたコミュニティーに大学院生まで含めた若手を招き入れ、エンカレッジすることで、一人でも多くの後進が未踏の分野に挑戦できる環境を構築する。

以上により、タンパク質科学のパラダイムシフト、ひいては生命科学の発展に大きく貢献する。本領域で実現するタンパク質研究のパラダイムシフトは基礎的な研究として大きなインパクトをもたらすが、それだけではない。あらゆる生命現象にタンパク質が関わることを考えれば、本領域によって新たな視点を導入されたタンパク質の世界はあらゆる生命科学全般へ大きな波及効果をもたらす。さらには、神経変性疾患の病態解明、疾患バイオマーカー、天然に存在しないタンパク質を合理的にデザインする人工タンパク質研究など医療・産業分野にもシームレスにつながり、飛躍的な発展をもたらす領域である。

5 審査結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況

研究領域全体を通じ、審査結果の所見において指摘を受けた事項があった場合には、当該指摘及びその対応状況等について、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。

審査結果の所見

本研究領域は、これまでのタンパク質像からは想定できなかった多面的なタンパク質機能を見だし、拡大し変貌するタンパク質世界の理解を深めることで、タンパク質科学における新しい常識を確立して、新たな学問領域を開拓しようとする提案である。若手を含めた、様々な手法を持った研究遂行能力が高い研究者が参画しており、それぞれに斬新な問題意識を持った研究課題がバランスよく集約されている。従来のタンパク質の常識が覆されるような知見を基に、その実体や分子機構、生理的な意義を明らかにしようとする点で、従来の学問分野に新たな変革をもたらすという要素は十分に含まれている。一方で、計画研究には広範な対象が含まれているので、計画研究間での円滑な連携促進への工夫が望まれる。また、生化学的・細胞生物学的解析に比べて、研究領域内での構造生物学的解析の役割は限定的であり、例えば、RNA シャペロン仮説の構造生物学的解明などの重要性から、公募研究などを含めた検討が期待される。

【コメント1】計画研究間での円滑な連携促進への工夫が望まれる。

対応策: 所見を受けて、計画班内でより一層の連携を深めることとした。具体的には、以下のような対応をした。

1. 計画班員内での情報交換を迅速、かつ、密に行うために、通常のメールより密に連絡を取りやすい Slack（オンラインチームコミュニケーションツール）を、領域発足後、比較的早い段階の2020年12月に導入した。さらに、翌年度に公募班員が決まったあとは全班員へも拡げている。これにより、随時交換を取ることが可能となり、交流が深まった。
2. コロナ禍での領域運営の中でも、領域内のコミュニケーションを深めるために隔月でランチ時にオンラインでセミナーを開催している（マルチファセットプロテインズランチセミナー）。まずは計画班員の中で技術・方法論に特化した班員による技術セミナーを実施しており、活発な質疑応答がなされている。

以上のように連携を深めた結果、計画班内での共同研究による論文が領域発足後に8報公開されている（永井-森-田口の3つのラボの共同研究の成果である **Fujino et al., eLife 2023** など）。

【コメント2】・・・研究領域内での構造生物学的解析の役割は限定的であり、例えば、RNA シャペロン仮説の構造生物学的解明などの重要性から、公募研究などを含めた検討が期待される。

対応策: 所見を受け止めて、公募研究の募集文章に「構造生物学的アプローチによる多面的なタンパク質世界の理解」を明記して、構造生物学的な観点からの公募研究を広く募った。その結果、前期の公募研究15件のうち2件が構造生物学関連として採択された。

- ・田中良和（東北大）「クライオ電顕単粒子解析による終止コドンのリードスルーの活写」
- ・山形敦史（理研）「神経変性疾患に関わる凝集体の形成・抑制の *in situ* 構造生物学」

単粒子クライオ電顕でのリボソーム関連構造、細胞内クライオ電子線トモグラフィー法という多様な構造解析手法が領域に加わり、領域研究に厚みが増した。

公募班発足後に行った領域会議（2020年10月29日 Zoom）にて、公募研究の紹介を実施したところ、すぐに共同研究が開始し、既に成果が得られ始めている。

なお、RNA シャペロン仮説に関して、永井義隆計画班員によって現状は主に生化学的な手法にて RAN 翻訳(神経変性疾患に関与する AUG 非依存性翻訳)における RNA シャペロンの研究が進められている。RAN 翻訳においては、塩基リピートが形成するグアニン 4 重鎖と呼ばれる特殊な高次構造が重要な役割を担っており、円二色性スペクトルなどでの解析は既に実施済みである。永井らによる解析の進展後にはより高分解能の構造生物学的な解析が必要となるが、領域内の連携で進めていく予定である。

6 研究の進展状況及び主な成果

(1) 及び (2) について、計画研究及びそれと連携している公募研究ごとに、具体的かつ簡潔に記述すること。
(一つの計画研究及び連携する公募研究で2頁以内)

(1) 領域設定期間内及び中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価実施時までにはどこまで研究が進展しているのか

(2) 各計画研究で得られた成果、及びそれぞれの計画研究と連携している公募研究で得られた成果について、(計画研究・連携する公募研究の順で記載すること。なお、本研究領域内の共同研究等による成果の場合はその旨を明確にすること。)

A01-1 研究課題：非典型的な翻訳動態の多様性・普遍性と分子機構

計画研究代表者：田口英樹（東京工業大学 科学技術創成研究院 教授）

(1) 中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価までにはどこまで進展したのか

生命は数千から数万種におよぶタンパク質の機能に依存している。細胞内のタンパク質はリボソームを中心とした翻訳系で合成され、合成されたポリペプチド鎖はアミノ酸配列に規定された立体構造にフォールディングして機能を発現する、というドグマが基本である。しかし、本学術変革(A)で標榜しているように、タンパク質の世界にはさまざまなこれまで私たちが知らない一面（ファセット）があることがわかってきた。本研究では、その中でも翻訳レベルでの遺伝情報発現について近年わかってきた非典型的な現象についてその多様性、普遍性、分子機構を調べることを目的としている。具体的には、非典型的な翻訳の中でも、新生ポリペプチド鎖（新生鎖）による翻訳一時停止（翻訳アレスト）(Chadani *et al.* *PNAS* 2016 など) や翻訳途中終了 (Chadani *et al.* *Mol Cell* 2017)、翻訳バイパス（ホッピング）、疾患に関与するリピート関連非 AUG 翻訳（RAN 翻訳）など（図 1）を軸として調べる。

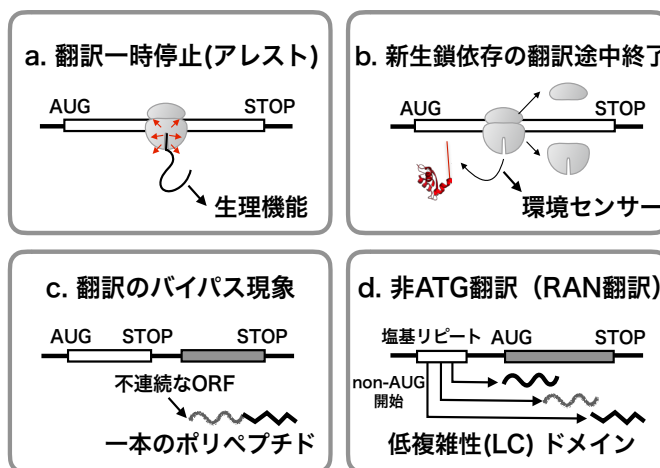


図 1 非典型的な翻訳動態の例

研究 1. 新生鎖に依存したリボソーム不安定化の

普遍性と分子機構：新生鎖に依存して翻訳が途中終了する現象（IRD）が大腸菌で明らかとなった。そこで、この IRD に関して、その普遍性や分子機構の詳細を大腸菌で引き続き解析するとともに、大腸菌以外の生物、特に真核生物でどのくらい普遍的に起こるのか、また、その分子機構や付随する生理機能についても探求する。

研究 2. 非典型的な翻訳から産まれるタンパク質の多様性：非典型的な翻訳動態を考慮に入れると、細胞内で産み出されるタンパク質のレパートリーは増大する。非典型的な翻訳に由来するタンパク質がどのくらい存在するのか分析手法の開発も含めて探索する。

研究 3. 疾患に関与する非典型的な翻訳（RAN 翻訳）の分子機構・細胞内動態：非典型的な翻訳がどのような分子機構で起こっているのかを *in vitro*（再構成型無細胞翻訳系）、*in vivo*（生細胞内翻訳可視化系）で明らかにする。

(2) これまでに得られた成果

研究 1. 新生鎖に依存したリボソーム不安定化の普遍性と分子機構：1-1) 大腸菌での IRD の分子機構解析（図 2）：IRD は負電荷に富んだアミノ酸配列の翻訳伸長が起こりにくくなるという点で翻訳の不備であると捉えることもできる。特に翻訳開始直後に IRD が起こりやすいことがわかったので、IRD を抑制するための分子機構について詳細に調べ、以下の知見が得られた。a. リボソームに備わった新生鎖が通過するトンネルを新生鎖が占めるほど IRD は起こりにくくなる。b. 翻訳直後できるだけ高いアミノ酸から構成される新生鎖が翻訳されると IRD が抑制される。この知見はリボソームになぜ 30

アミノ酸長にも及ぶトンネルがあるのかについても重要な洞察を与えるものである (図 2, Chadani *et al. EMBO J* 2021)。

1-2) 真核生物の IRD : 大腸菌で見つかった IRD が出芽酵母やヒトの培養細胞でも翻訳の初期段階で起こりうることを証明し、IRD が原核生物のみならず真核生物にも保存されている普遍的な現象であることを見出した。また、IRD 現象に関して、リボソームは負電荷に富んだ新生鎖の翻訳を「苦手」とするという

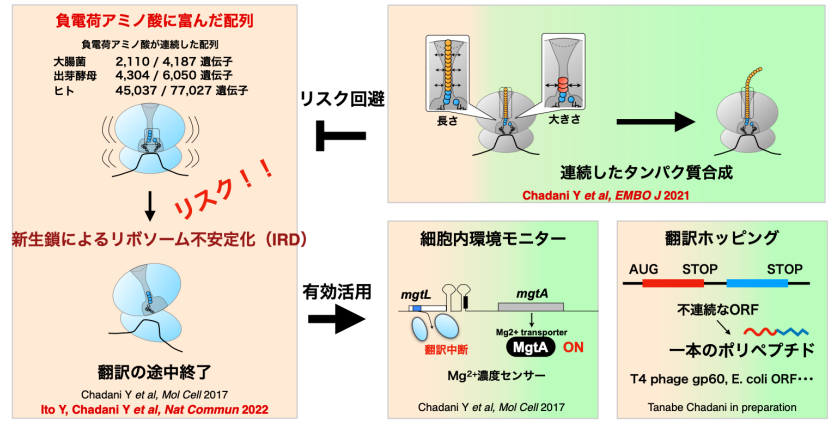


図 2 負電荷に富んだ新生鎖による翻訳途中終了 (IRD)

ことでもある。実際、プロテオームレベルで N 末端付近の D/E 配列を避ける傾向があることもわかった (図 2, Ito *et al. Nat Commun* 2022)。この研究でのヒトの再構成型翻訳系 (ヒト PURE システム) に関しては公募班の町田幸大博士 (兵庫県立大学) との共同研究の成果である。

1-3) 新規の新生鎖 (ペプチジル tRNA) の大規模解析法の開発 : 新生鎖の化学的な実体は新生ポリペプチド鎖と tRNA が結合したペプチジル tRNA である。これまでの細胞内での新生鎖解析は合成直後のタンパク質の質量分析によるプロテオーム解析 (BONCAT など) か、翻訳途上の mRNA 解析 (リボソームプロファイリング) というどちらも間接的な解析法である。そこで、細胞内のペプチジル tRNA を濃縮して大規模に解析する手法 (PETEOS 法) を開発した (図 3, Yamakawa *et al. Nucleic Acids Res* 2023)。また、非典型的な翻訳に関する総説を計画班の千葉志信博士と共同執筆した (Chiba *et al. J. Biochem* 2023)

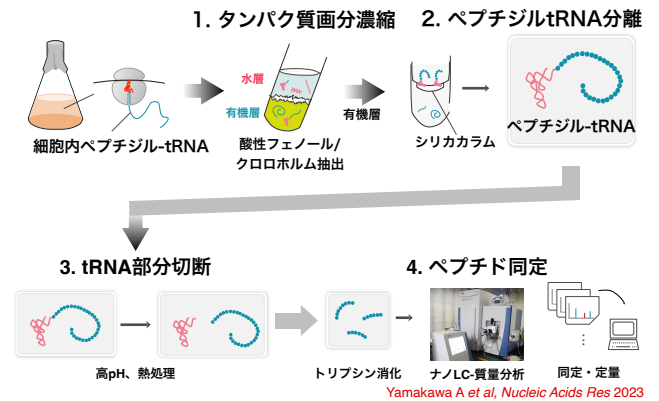


図 3 細胞内ペプチジル tRNA (新生鎖) 解析法 (PETEOS 法)

研究 2. 非典型的な翻訳から産まれるタンパク質の多様性 : 2-1) 翻訳バイパス現象 : 非典型的な翻訳、特に翻訳バイパスと呼ばれる現象に由来するタンパク質がどのくらい存在するのか系統的に探索した。

翻訳バイパスとは、二つの不連続な遺伝子読み枠 (ORF) から 1 本のポリペプチド鎖が合成される非典型的な翻訳である。翻訳バイパスはこれまでに T4 フェージの gp60 でしか知られていなかったが、大腸菌のゲノム内に翻訳バイパス現象を起こす ORF があることを見出した。さらに、そのバイパス現象の分子機構を解析した結果、バイパス現象を起こす配列をデザインすることもわかった (投稿準備中)。2-2) 新規プロテオミクス手法の開発 : 従来のタンパク質データベースにないタンパク質を質量分析 (LC-MS/MS) によって探索・同定する新規手法を開発した。具体的には、細胞内の小さなタンパク質/ペプチドを分離型電気泳動装置で分離したのちに、注釈されていない ORF も含めたプロテオームデータベースを元に同定を行った (投稿準備中)。

研究 3. 疾患に関与する非典型的な翻訳 (RAN 翻訳) の分子機構・細胞内動態 : 非典型的な翻訳はさまざまな疾患に関与することがわかってきている。中でも、塩基リピートが関与する神経変性疾患で開始コドン ATG に依存しない非典型的な翻訳 (Repeat-Associated Non-ATG (RAN) 翻訳) は、想定される全ての読み枠から ATG がなくても翻訳が起こり、分子機構、細胞内動態に不明点が多い。そこで、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関わる C9orf72 遺伝子の GGGGCC_n リピートから起こる RAN 翻訳 (C9-RAN) に関して、計画班の永井義隆博士 (近畿大学)、公募班の町田幸大博士 (兵庫県立大学) との共同研究を行った。その結果、C9-RAN をヒト因子由来の PURE システムで再構成した。再構成することで複雑な翻訳反応を素過程に分割し、翻訳伸長過程や塩基リピート長と翻訳効率との関連について興味深い知見が得られた (投稿中: bioRxiv)。

研究課題：機能性翻訳途上鎖の生理機能と分子機構

計画研究代表者：千葉志信（京都産業大学 生命科学部 教授）

研究分担者：内藤 哲（北海道大学院農学研究院・研究員）

(1) 中間評価実施時までに何をどこまで明らかにしようとし、中間評価までにどこまで進展したのか
機能性翻訳途上鎖（翻訳アレスト因子）は、自身の翻訳伸長を途中で一時停止（アレスト）する性質を持ち、多くのものは、それを利用して、翻訳途上鎖の状態、細胞内の環境を感知するセンサーとして働く。本研究計画は、機能性新生鎖の生理機能や分子機構の普遍性や多様性を明らかにすることを最終的な目的としている。そのために、代表者・千葉が真正細菌由来の翻訳アレスト因子の生理機能と分子機構を解明し、分担者・内藤が、真核生物由来のアレスト因子の分子機構を解明しようとしている。

具体的には、まず、代表者の千葉は、領域設定期間内に、最近自身が見出した新規アレスト因子である放線菌 ApcA、ApdA、および、根粒菌 ApdP の3種類のアレスト因子を中心に、遺伝学的、生化学的、および、構造生物学的な解析から、アレストに重要な新生鎖-リボソーム相互作用を明らかにし、これらの因子間や、これらの因子と過去に見出されたアレスト因子との間での、分子機構や生理機能上の共通性や多様性を理解することを目指している。また、その応用として、アレスト因子のもつ「引っ張り力感受性」を利用したセンサーを人工的に構築し、タンパク質バイオジェネシス研究への適用を目指した技術的な基盤の構築を目指している。中間評価実施時までに、ApcA、ApdA、ApdP の分子機構の解明を進め、また、大腸菌、枯草菌、放線菌を用いた生理機能の解析の基盤を作成することを目指した。また、アレスト配列を用いたタンパク質膜組込センサーの構築を目指した。

分担者の内藤は、独自に開発したシロイヌナズナの *in vitro* 翻訳系をさらに改変し、アレストに重要とされる新生鎖-リボソーム相互作用の解明を行うとともに、真核生物の *in vitro* 翻訳系を用いた解析から、様々な真核生物由来のアレスト因子について、翻訳アレストの強さを定量的に議論しようとしている。

(2) これまでに得られた成果

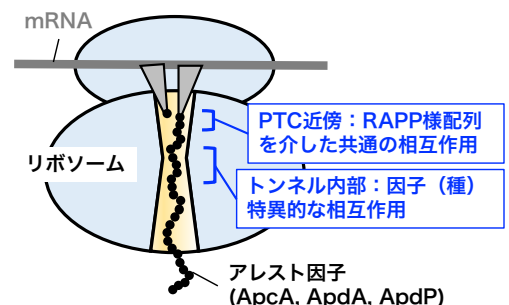
【真正細菌からのアプローチ（千葉）】

ApcA、ApdA、ApdP の *in vivo*、*in vitro* の解析から、これらがいずれも枯草菌細胞で強固にアレストを起こすことを見出した。また、これらが、C末端付近にある類似の配列 (R-A-P-P/G) に依存してアレストを起こすこと、そのアレスト位置も同じ (3番目の Pro) であることが分かり、リボソームの活性中心 (PTC) 付近での類似の相互作用を介してリボソームをアレストすることが示唆された。一方で、リボソームトンネルの狭窄部位の変異の効果は ApcA にのみ表れることや、大腸菌では ApdP のみアレストを起こすことなどから、PTC から離れたリボソームトンネル部位での相互作用には各々で違いが見られることも示唆された (Sakiyama *et al. Nucleic Acids Res* 2021、および未発表)。以上の結果は、これら三者の PTC 付近での相互作用の共通性と、それを支える N 末端側での相互作用の多様性 (進化における柔軟性) を示唆している (図)。

以前千葉が見出したアレスト因子 MifM の C 末端アレストモチーフに、枯草菌由来の様々な膜タンパク質の膜挿入配列を融合した各種「膜挿入センサー」を構築した。膜挿入依存的なアレスト解除の有無を指標に各膜タンパク質の膜挿入における YidC 依存性を調べ、8 種類の新規 YidC 基質を同定した (Shiota, *et al. J Mol Biol* 2023, *in press*)。

【真核生物からのアプローチ（内藤）】

翻訳アレストの強さは生理的効果に影響すると考えられるが、その定量的な議論は行われていなかった。試験管内翻訳系で短時間の翻訳を行い、アレスト産物と全長翻訳産物の蓄積の経時変化を数理モデルで解析することで、定量的議論を可能にした。植物、哺乳類、カビの数種の遺伝子をコムギ胚芽抽出液の系で調べた結果、アレストするリボソームの割合はいずれも 80%以上であるのに対し、アレスト状態の継続時間 (半減期) は遺伝子により 10 倍以上の違いがあり、アレストの強さを決めていた。また、ウサギ網状赤血球ライセートの系では、アレスト産物が不安定であり、数理モデルにこの項を導入する必



要があった（投稿論文作成中）。

上流 ORF による翻訳アレストの探索を行った。また、植物の小胞体ストレス応答に関わる転写因子を産生する *bZIP60* 遺伝子の解析により、シロイヌナズナ、イネ、ヒメツリガネゴケのオルソログでは翻訳伸長過程で、また、下等シダ植物では翻訳終止過程でアレストが起こることを示した（論文投稿中）。

研究課題：新規 AUG 非依存性 RAN 翻訳の分子機構とその神経変性病態における役割

計画研究代表者：永井義隆（近畿大学 医学部 脳神経内科・教授）

研究分担者：森 康治（大阪大学 大学院 医学系研究科精神医学・講師）

本計画研究では、本領域で開拓する非典型的な翻訳などの拡大し変容するタンパク質のマルチファセットな世界において、医学領域の視点からの研究を展開した。近年、遺伝子非翻訳領域内のリピート配列の異常伸長を原因とする筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄小脳失調症（SCA）など多くの神経変性疾患において、リピート関連非 AUG 依存性（RAN）翻訳という新規の翻訳機構によりリピートペプチド（RAN-P）が産生され、神経変性を引き起こすことが明らかになった。本研究では、RAN 翻訳の分子機構とそれに伴う神経変性機序を解明することを目的として研究を行い、以下の成果を得た。

1) RAN 翻訳レポーター細胞を用いた RAN 翻訳分子機構の解明

分担者の森グループを中心として、主に培養細胞モデルを用いて RAN 翻訳の分子機構の解析を行った。C9-ALS の原因となる *C9orf72* 遺伝子の異常伸長 GGGGCC リピート配列から 3 つのフレームで翻訳される 3 種類のジペプチドリピートタンパク質、すなわち poly-(Gly-Ala)、poly-(Gly-Pro)、poly-(Gly-Arg) の下流にそれぞれ NanoLuc ルシフェラーゼを融合させた RAN 翻訳レポーターを開発した。これらの RAN 翻訳レポーターを用いて、それぞれの翻訳フレームごとの RAN 翻訳効率を評価したところ、poly-(Gly-Ala) フレームでの発現量が最も多く、ついで poly-(Gly-Arg) であり、poly-(Gly-Pro) の発現量は最も低かった。

さらにこれらの RAN 翻訳 NanoLuc ルシフェラーゼレポーターと共に、コントロールとして開始コドン AUG 依存性にホタルルシフェラーゼを発現する Fluc レポーターの両者を発現させた細胞を用いて、21 種類の翻訳関連因子をそれぞれ siRNA による RNA 干渉によりノックダウンし、デュアルルシフェラーゼアッセイによるスクリーニングを実施した。その結果、発現ノックダウンにより RAN 翻訳と AUG 依存性翻訳の翻訳効率を変化させる因子が複数存在する可能性が示唆された。現在これらの因子について妥当性を検証するための実験を行っている。

2) 疾患モデル細胞・ショウジョウバエを用いた RAN 翻訳の神経変性病態への役割の解明

代表者の永井グループを中心として、主に異常伸長 GGGGCC リピート RNA を発現する C9-ALS モデルショウジョウバエを用いて、様々な RNA 結合タンパク質（RBP）や翻訳開始因子などの過剰発現もしくはノックダウンによる RAN 翻訳および神経変性に対する影響を検討した。

まず、GGGGCC リピート RNA に結合する RBP 20 種類についてスクリーニングを行い、C9-ALS モデルショウジョウバエの複眼変性を抑制する RBP を 10 種類同定した。このうち顕著な抑制効果を示した FUS、IGF2BP1、hnRNPA2B1、hnRNPA3 について解析を進め、IGF2BP1、hnRNPA2B1、hnRNPA3 は、GGGGCC リピート RNA 量を減少させる一方で、FUS は GGGGCC リピート RNA の量には影響を与えずに複眼変性を抑制することを明らかにした。そして、森グループや領域代表の東京工業大学・田口グループ、公募班の兵庫県立大学・町田グループとの共同研究にて *in vitro* の解析を進め、FUS は RNA シャペロンとして GGGGCC リピート RNA の G-quadruplex 構造を変化させることで RAN 翻訳を阻害し、神経変性を抑制することを見出した（Fujino *et al. eLife, in press*）。さらに G-quadruplex 構造を標的とする他の RBP も FUS と同様に RAN 翻訳を阻害し、C9-ALS モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを示した。森グループは、培養細胞モデルにおいて、やはり GGGGCC リピート RNA の G-quadruplex 構造に結合する TMPyP4 が、RAN 翻訳の伸長過程を阻害することを明らかにした（Mori *et al. J Biol Chem* 2021）。一方、hnRNPA3 については、GGGGCC リピート RNA 量を減少させた結果、RAN 翻訳を減少させて神経変性を抑制することを明らかにした（Taminato *et al. Hum Mol Genet* 2023、プレスリリース）。

また、培養細胞モデルにて RAN 翻訳活性に影響を与えると報告されている 49 遺伝子についても、永井グループにて C9-ALS モデルショウジョウバエを用いた *in vivo* スクリーニングを行い、複眼変性に有意な影響を与える 3 遺伝子を同定した。現在これらの遺伝子について、RAN 翻訳への影響、その分子機構などの解析を進めている。

一方、永井グループは *NOP56* 遺伝子内の GGCCTG リピート配列の異常伸長を原因とする SCA36 についても解析を進め、初めてのショウジョウバエモデルの樹立に成功し、RAN 翻訳による poly-(Gly-Pro) ペ

ペプチドの産生、複眼変性を呈することを明らかにした。この SCA36 モデルショウジョウバエを用いた RBP のスクリーニングを開始し、RAN 翻訳、複眼変性に影響を与える複数の RBP を同定した。現在これらの RBP についての詳細な解析を進めている。

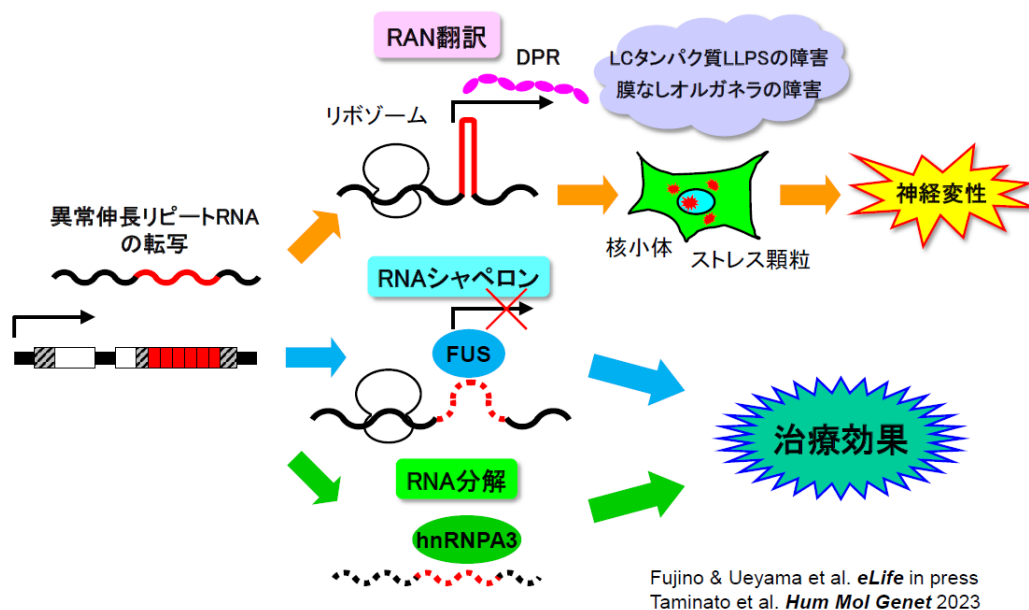
3) RAN 翻訳ペプチドによる神経変性機序の解明

RAN 翻訳により産生されるリピートペプチド (RAN-P) は、数種類のアミノ酸の単純な繰り返し配列のいわゆる低複雑性 (LC: low complexity) ドメインであり、他の LC ドメインを持つ RBP など様々なタンパク質と相互作用することが知られているため、これらの RBP の液-液相分離 (LLPS: liquid-liquid phase separation) 過程、それによる非膜性オルガネラ形成における関与に着目し、研究を進めた。

代表者の永井グループは、法政大学・石黒亮博士 (2023 年度より公募班員) との共同研究にて、FUS の LLPS による液滴形成過程が、G-quadruplex 構造を持つ RNA との相互作用により促進されることを明らかにした。さらに家族性 ALS の原因となる FUS P525L 変異体は、G-quadruplex 構造を持つ RNA との結合能が低下して液滴形成が減少し、RNA との相互作用を介さずに凝集体を形成することを見出した (Ishiguro *et al.* *J Biol Chem* 2021)。

また、永井グループでは培養細胞モデルを用いて、ALS の原因となる TDP-43 の LLPS によるストレス顆粒の形成において、微小管輸送がストレス顆粒の解離過程に関与し、その機能低下により TDP-43 の凝集体形成が促進されることを明らかにした。さらに TDP-43 を発現する ALS モデルショウジョウバエを用いて、微小管輸送の機能低下により TDP-43 凝集体形成、複眼変性が増悪することを見出した (論文投稿準備中)。一方、TDP-43 の凝集を標的とした治療法開発をめざして、TDP-43 mRNA に対するアンチセンス核酸 (ASO) をスクリーニングし、TDP-43 を発現する ALS モデルマウスの脳室内に投与して、一過性の TDP-43 発現量の低下により長期間にわたる TDP-43 凝集体の減少、神経症状の抑制効果が得られることを明らかにした (Takeuchi *et al.* *Mol Ther Nucleic Acids* 2023、プレスリリース)。

C9-ALS/FTDIにおけるRAN翻訳による神経変性メカニズムと FUSによるRAN翻訳の制御、hnRNPA3によるリピートRNA分解



研究課題：ノンコーディング RNA から産生されるタンパク質の生理機能
 計画研究代表者：松本有樹修（名古屋大学 大学院理学研究科・教授）

(1) 中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価までにはどこまで進展したのか

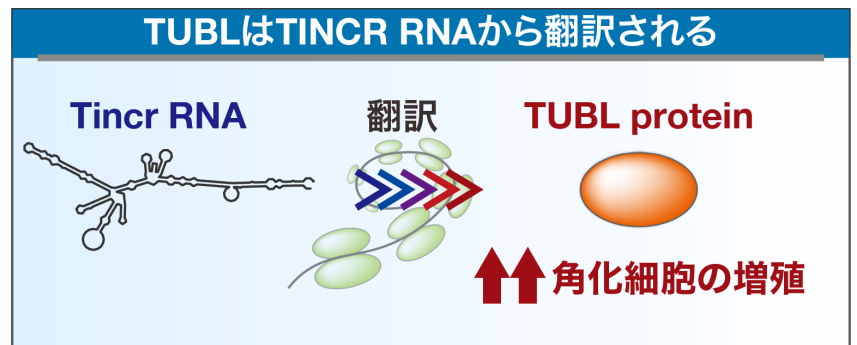
Long non-coding RNA (lncRNA) の定義は「タンパク質をコードしない 200 塩基以上の RNA」とされているが、実は 100 アミノ酸残基以下の小さな Open Reading Frame (ORF) を持つと予測されるものも多い。われわれはこれまでに質量分析計を用いて、lncRNA に存在する小さな ORF から翻訳される新規タンパク質を同定し、それらが重要な機能を持つことを明らかにした (Matsumoto *et al. Nature* 2017)。すなわち、これら lncRNA は「ノンコーディング」ではなく、「コーディング」RNA であり、存在すらしないと思われていた未開拓のタンパク質を翻訳している。このような新規タンパク質は、これまで見逃されてきた新たな機能性のタンパク質であり、原因不明のさまざまな疾患に関与している可能性が考えられる。そこで、lncRNA 由来新規タンパク質をさらに同定し、それら新規タンパク質に対する結合タンパク質の同定やノックアウトマウスの解析などを行い、それらの生理機能を明らかにしていくことを目標とした。

(2) これまでに得られた成果

中間評価までの期間においてわれわれは、皮膚の再生を促進する TUBL と、精子の機能に必須な Kastor と Polluks という、lncRNA と思われていた RNA から翻訳される新規ポリペプチドを同定し、それらの機能を解析して論文に報告した (Nita *et al. PLoS Genet* 2021, Mise *et al. Nat Commun* 2022)。

・皮膚の再生を亢進する新規ポリペプチド TUBL を同定した

これまでに同定されている lncRNA について、進化的に保存されている ORF 領域の存在を *in silico* で評価した。その結果、皮膚特異的な lncRNA として知られていた TINCR において、その一部の領域が高度に保存され、さらにその領域が翻訳された場合のアミノ酸配列を予測すると、ユビキチン様ドメインを持つことが明らかとなり、タンパク質が翻訳される可能性が強く示唆された。そこで、この TINCR RNA から翻訳されるタンパク質を TINCR-encoded ubiquitin-like protein (TUBL) と名付けた (上図)。



実際に、TUBL タンパク質が産生されるかを評価するために、TUBL タンパク質領域の末端にタグ配列を挿入したノックインマウスを作製すると、TUBL タンパク質の存在が認められた。次に、TUBL の機能を評価するために、TUBL を過剰発現した角化細胞を用いて RNA シークエンスを行うと、細胞周期関連遺伝子の発現上昇が認められ、さらに細胞周期解析により細胞周期が亢進していることが明らかとなった。しかし、この状態では、この領域の RNA 構造が機能している可能性が否定できないため、RNA の構造は全く異なるが、同一のタンパク質を翻訳するような変異体を作製し、細胞周期解析を行った。その結果、RNA の構造は関係なく、TUBL タンパク質の機能により、角化細胞の細胞周期が亢進していることが明らかとなった。

次に、TUBL ノックアウトマウスを作製し、表皮の遺伝子発現パターンを RNA シークエンスで評価し、野生型マウスと TUBL ノックアウトマウスから樹立した初代角化細胞を用いて同様に細胞周期解析を行うと、TUBL ノックアウト初代角化細胞では、過剰発現細胞とは逆に細胞周期関連遺伝子の発現低下と細胞周期の遅延が認められた。そこで、マウスの皮膚の損傷実験を行い、皮膚の損傷からの治癒を経時的に評価すると、TUBL ノックアウトマウスの皮膚では、損傷治癒にかかる時間が遅れていることが明らかとなった。

最後に、TUBL タンパク質の機能を評価するために、TUBL と直接結合する遺伝子を網羅的に同定した。その結果、TUBL は細胞周期に深く関与するタンパク質分解酵素であるプロテアソームの構成因子と

複結合することが明らかとなった。以上の結果より、TUBL タンパク質はプロテアソームに結合することで、角化細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。

本研究結果により、これまでノンコーディング RNA と考えられていた TINCR が、実際は TUBL タンパク質を産生しており、TUBL タンパク質は皮膚角化細胞の細胞周期を亢進させていることが明らかとなった。TINCR は皮膚以外の臓器において、がんが高発現するという報告もあり、これは TUBL タンパク質の高発現によるものである可能性が考えられる。今回の発見は、皮膚の再生や種々の臓器でのがん治療の一助となることが期待される。

・新規ポリペプチド Kastor と Polluks の欠損は不妊になる

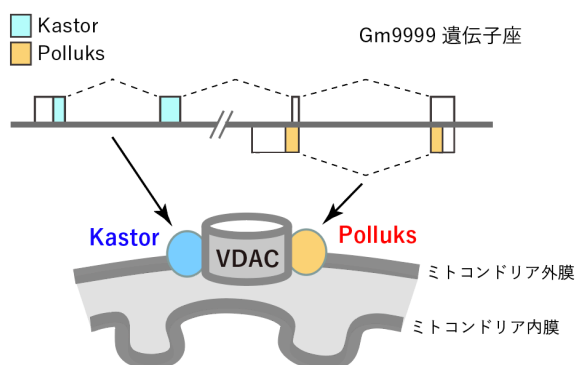
精巣特異的に発現することが知られている lncRNA について、タンパク質が産生される可能性を探索した結果、Gm9999 遺伝子を候補の遺伝子として見出した。興味深いことに、Gm9999 は 1 つの遺伝子座から 2 種類の小さなタンパク質を産生する可能性が示唆され、これらのタンパク質を Kastor と Polluks と名付けた (下図左)。

Kastor タンパク質と Polluks タンパク質が本当に産生されているのかを検証するために、Kastor と Polluks タンパク質の末端にタグ配列をもつノックインマウスを作製し、ウエスタンブロット発現解析によって、Kastor と Polluks タンパク質が存在することを証明した。さらに、Kastor と Polluks の機能を推定するために、ノックインマウスを用いて Kastor と Polluks の結合タンパク質を探索した。免疫沈降とプロテオミクス解析から、Kastor と Polluks は共に電位依存性アニオンチャンネル (VDAC) と結合していることが分かった。同一遺伝子座から翻訳される、アミノ酸配列が異なる 2 つのポリペプチドが、どちらも同じ分子 (VDAC) に強く結合するという事は、予想外の結果であった。

VDAC3 欠損マウスは、精子ミトコンドリア鞘の形態異常により、精子の運動性が低下し、雄性不妊になることが知られていた。そこで、Kastor と Polluks の両方を欠損するマウスを作製したところ、VDAC3 欠損マウスと同様に、雄性不妊を示した。さらに、走査電子顕微鏡を用いてこれらの精子ミトコンドリア鞘を観察したところ、Kastor と Polluks の両方を欠損する精子ミトコンドリアも、明らかな形態異常を示した。さらに、この形態異常は VDAC3 を欠損した精子ミトコンドリアと非常に類似していた。このミトコンドリアの形態異常は精子の運動性の低下を引き起こし、その運動異常によって最終的に不妊になることが分かった (下図右)。以上の結果から、Kastor と Polluks が VDAC3 依存性のミトコンドリア鞘形成に必須な役割を果たし、それが雄の生殖機能に必要であることが分かった。

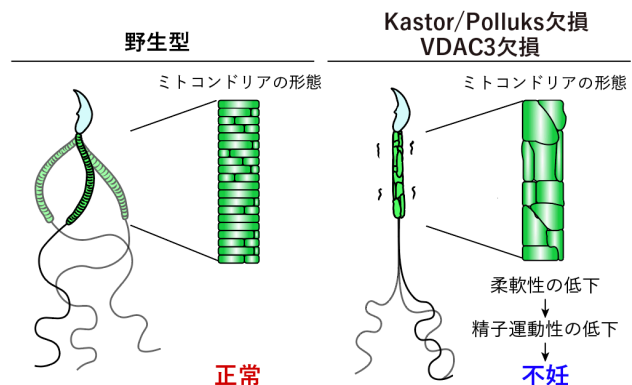
本研究では、これまで lncRNA と思われていた Gm9999 が、実は Kastor と Polluks という 2 種類の小さなタンパク質を産生しており、それらが精子ミトコンドリアの形態制御を担っていることを明らかにした。Kastor と Polluks は共にヒトを含む哺乳類に広く保存されており、これらの生物では、共通した機能を持つと考えられる。精巣特異的な遺伝子の機能解析は、男性不妊の原因解明だけでなく、これらを標的とした避妊薬の開発への展開が期待される。

1, Gm9999 は Kastor と Polluks を産生する



2, Kastor と Polluks はミトコンドリア外膜に局在し、VDAC と相互作用する

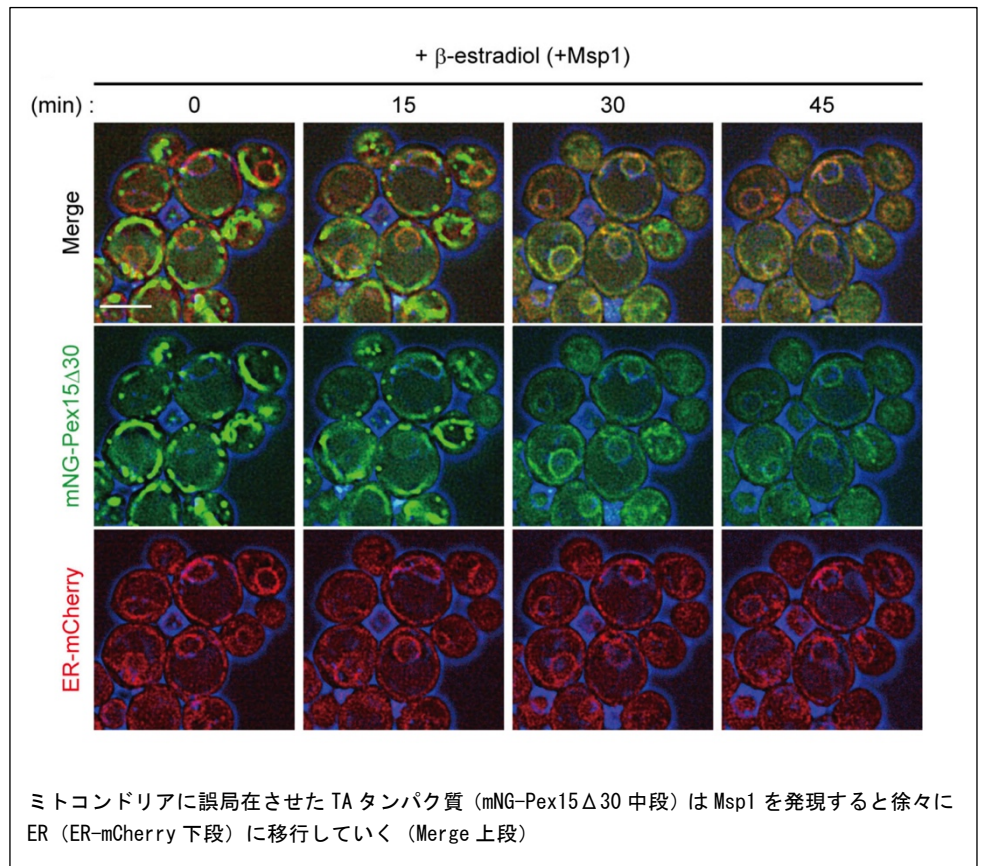
3, Kastor と Polluks を欠損するマウス精子は、ミトコンドリアの形態異常により不妊になる。VDAC3 欠損も同様である



(1) 中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価までどこまで進展したのか
細胞内で合成されたタンパク質は、機能すべき細胞内区画（ミトコンドリア，ER，核などのオルガネラやサイトゾル，細胞膜）に正しく局在化することが重要である。これまでこうしたタンパク質の細胞内輸送は、タンパク質がもつ移行シグナルにしたがって正確に行われ、万一移行に失敗したタンパク質は速やかに分解される、と考えられてきた。しかし遠藤らは、タンパク質の配送は間違いが起こりうる、しかし細胞内にはこうした間違いを校正するシステムが存在することを見出した。すなわちミトコンドリア外膜の Msp1 は、外膜に誤配送されたテイルアンカー（TA）タンパク質を ATP のエネルギーを使って引き抜き、ER 膜に送り込むことで ER の強力な品質管理システムに供し、分解か配送のやり直しかが決まる。本研究ではこの研究を発展させ、「配送の校正（やり直し）」という新たな観点から、細胞内タンパク質輸送の新たなパラダイム確立を目指した。そして、Msp1 の基質はどこまで一般化できるか？ Msp1 は他のオルガネラでも機能できるか？ Msp1 の配送の校正にパートナー因子は必要か。校正基質はオルガネラ間コンタクト部位を介して移動するか？といった問題の解明をめざして研究を開始した。その後この分野の急速な発展に伴い、これらの問題に加えて、他のオルガネラでも同様の配送のやり直しが起こるかどうか、が最重要かつ喫緊に解決すべき課題として浮上した。

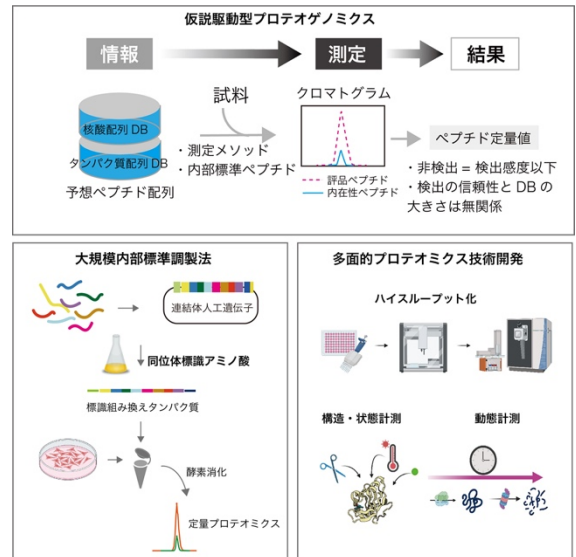
(2) これまでに得られた成果

1. 遠藤らは、Msp1 による誤配送 TA タンパク質のミトコンドリアから ER への移行をリアルタイム観察することに成功した。複数のプロモーター制御系を用いて、Msp1 欠損下でモデル TA タンパク質をミトコンドリアに誤配送させ、次に誤配送タンパク質の発現を止め、Msp1 の発現を開始して、誤配送 TA タンパク質の局在変化をタイムラプスケイ光顕微鏡観察した（右下図）。そして誤配送 TA タンパク質がミトコンドリアから ER に移動する様子をモニターすることに成功した。また、ミトコンドリアから ER への誤配送 TA タンパク質の移行は通常は新規合成された TA タンパク質の ER への移行に関わる GET システム（サイトゾルのシャペロン Get3+ER 膜の受容体 Get1/2）を必要とすること、さらにモデルタンパク質ではなく、オーセンティックな ER の TA タンパク質（Frt1）についてもミトコンドリアに誤配送させるとミトコンドリアから ER に移行することを確認できた。一方で Msp1 を過剰発現すると、この ER 移行における GET 依存性を回避できることから、GET システムに依存しないマイナーな ER 移行経路の存在も示唆された（Matsumoto *et al. J Cell Biol* 2022）。



(1) 中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価までにどこまで進展したのか

近年、ゲノム情報の整備と質量分析計の高性能化によって一度に数千のタンパク質発現情報を取得できるようになった。その一方で、ゲノムが内包するプロテオームの実体は未だ不明瞭である。特に、近年、ノンコーディング RNA からの翻訳や、異常スプライシング、翻訳途上終結、ストップコドンのリードスルー、RAN 翻訳などさまざまな非典型的翻訳が見出されており、ゲノムには隠された広大な未開拓プロテオームの存在が示唆されている。これら未知タンパク質の同定には大規模に取得したペプチドの MS/MS スペクトルを核酸配列から想定されるアミノ酸配列に照合する、いわゆる探索型のプロテオゲノミクスが行われているが、このようなアプローチでは、ペプチド同定の信頼性の担保が極めて困難である。このような問題を解消するには、標的ペプチドを事前に設定し、それを狙い撃ち的に計測するターゲットプロテオミクスが有効であるが、測定前に標的ペプチドの選定や内部標準の取得を必要とするため、網羅的解析には向かない。そこで、本計画研究では、未開拓プロテオームの実体解明に資する「仮説駆動型プロテオゲノミクス」の技術基盤を確立するとともに、プロテオームの特性や機能を包括的に理解するための様々な機能プロテオミクスの手法を開発し、これらを組み合わせることでプロテオームの性質や機能の理解を目指す（右図）。



中間評価時点での到達目標として、「仮説駆動型プロテオゲノミクス」の技術基盤ならびに、複数の機能プロテオーム解析法の確立を計画した。

(2) これまでに得られた成果

1) 仮説駆動型プロテオゲノミクスの技術基盤の構築

現状の iMPAQT 法では標準的なタンパク質しか対応しておらず、非典型翻訳等に由来する未開拓プロテオームを対象とする解析に必要な情報や内部標準ペプチドが不足している。そこで、本研究では、1) バイオインフォマティクスを用いた未知のペプチドの選定ツールの開発、2) 遺伝子合成技術を用いた大規模な同位体標識内部標準ペプチド合成技術の開発、および3) 新規の高出力・高深度質量分析技術の確立を行った。

1)に関しては、任意のタンパク質配列や核酸配列情報を登録し、質量分析に適した感度と特異度を有するペプチドを選定し可視化できるデータベースの開発を行った。さらに、松本(有)班などが取得した RiboSeq データを取り込み、新規 ORF 情報を質量分析データ解析に利用できるよう整備した。2)に関しては、まず内部標準ペプチド連結体取得法を確立した。上述したデータベースを用いて、標的タンパク質特異的ペプチドを組み合わせた連結体をデザインした。また連結体タンパク質を同位体標識するが必要であるが、標識効率を最大限高めるためにアミノ酸合成経路酵素を欠失した変異株を作製し、高効率（99.95-99.97%）に標識を入れることを可能とした。次に、それぞれの連結体を識別定量するために定量タグ (QuantiCode) を開発した。最終的に 100 種類に上る異なる QuantiCode タグを開発し、これらを組み込んだベクター系を構築した。タグを付加した連結体は同時に試料中に添加することが可能であり、正確かつ容易に絶対定量を実施できることを確認し、細胞がん化や細胞老化の分子基盤の解明に応用した (Johmura *et al. Science* 2021)。次に、3) 超高出力定量プロテオーム解析システムの確立を行った。具体的には、測定法として Data-independent acquisition (DIA) と呼ばれる手法を取り入れた。さらに、イオンモビリティによる気相分画法を利用することで、より高深度の解析を可能とした。データ解析法としては既存のソフトウェアである DIA-NN を用いた Library-free search 法を導入した。しかし、DIAN-NN は内部標準を用いた定量に十分に対応していないことから、DIA-NN の結果を用いて内部標準ペプチドを含むデータを再解析する手法を開発し、独自に開発している定量解析環境である iMPAQT-Quant に実装した。さらに、より微量なタンパク質の検出を可能とするため、内在性シグナルが検出できなかったペ

プチドに対して、内部標準トリガーで超高感度ターゲットプロテオミクスを実施する手法である Sequentially Linked Mass spectrometry (SLiM) 法を考案し、その解析ワークフローを iMPAQ-Quant に実装した。

次に、これまで開発した高深度プロテオミクスを用いて 130 種類以上のがん細胞パネルに対するプロテオーム解析を実施した。また、典型的な 4 種類の細胞株を対象に、気相分画等を組み合わせてより深いデータの取得も行なった。これらのデータを RiboSeq で得られる非典型翻訳を含む ORF データベースに基づき peptide centric にデータ解析を行なったところ、2000 種類に上る新規ペプチドが同定された。一方、これらのデータの精査を行っている過程で、新規ペプチドとして同定された配列の一部が、トリプシン消化時に生じる非特異的切断によって生じたアーティファクトである可能性を見出した。このことは、これまで報告されている質量分析計を用いた新規 ORF 探索研究の結果も含め、改めて再精査する必要性があることを示している。

2) 未開拓プロテオームを含むタンパク質機能の包括的解析基盤の確立

機能未知のタンパク質を理解するためには、プロテオームワイドにさまざまなタンパク質機能や特性を計測する技術の構築が必須である。今年度までに以下の技術基盤の整備と最適化を行なった。

1) ハイスループット定量プロテオミクスのための技術基盤

短時間で多数のタンパク質を高い精度で定量でき、かつ高い堅牢な質量分析システムの構築を検討した。まず、チップ型トラップカラムを用いた試料導入が可能な HPLC の接続し DIA 測定パラメーターの最適化を行なった。さらに、各種 emitter の検討や最適化を行うことで、長時間にわたり安定なイオン化を実現できる条件を見出した。本システムを用いて HeLa 細胞消化物を用いたベンチマーク試験を行い、10 分分析で 5000 タンパク質、20 分分析で 6500 種類程度のタンパク質を極めて高い再現性 (CV median: ~0.05) で定量可能であることを確認した。本システムを用いて、松本 (有) 班と共同で Rpl31 ノックアウトマウスにおける心臓の発現プロテオーム解析を実施し、心筋収縮や拡張型心筋症に関連するタンパク質の発現量に変化していることを見出した (Shiraishi *et al. Nat Commun* 2023)。

次に、プロテオーム解析をハイスループットに実施するための試料調製法を開発に取り組み、タンパク質抽出なしにショットガンプロテオミクスのための試料調製を可能とする新技術の開発に成功した (Hatano *et al. J Biochem* 2023)。本方法を利用して、オートファジーの不均一性に基づいてセルソーターで分離した微量細胞におけるプロテオーム解析を行い、オートファジー活性の強弱がプロテオームに与える影響を明らかにした (Aoyama *et al. Cell Chem Biol* 2023)。さらに、現在、マルチウェルプレート上に固定した細胞を用いて、免疫染色によるイメージングと質量分析計によるプロテオーム解析を同一試料で実施できる新たな方法論の開発を進めており、これによって、薬剤や遺伝子ノックダウンなどの作用をプロテオームならびに表現型レベルで迅速かつ大規模に定量化できるプラットフォームを構築することが期待される。

2) タンパク質動態の多面性計測技術の構築

プロテオームワイドにタンパク質の動態や機能を解析する技術の構築を計画した。まず、タンパク質の局在とタンパク質の動態の関係性を調べるために、pulsed SILC (pSILAC)法によるターンオーバー解析とクロマチン濃縮法である ChEP 法 (Kustatscher G. *et al. Nat Protoc* 2014) や化学分画法 (Martinez-Val A. *et al. Nat Commun* 2021) を組み合わせ、これを DIA を用いたハイスループット定量プロテオミクスによって計測することで、同一タンパク質であってもそのターンオーバーが局在によって大きくことなることを見出した。また、タンパク質の状態変化を包括的に解析できる、状態依存的化学標識法を開発し、細胞周期の違いにおいて状態変化する多数のタンパク質を見いだした。

(1) 領域設定期間内及び中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価実施時までにはどこまで進展しているのか

本課題では、様々な異分野技術との融合を通じて、疑似細胞環境におけるタンパク質の多元的かつ網羅的な解析基盤を実現し、未開拓タンパク質の作動機序を解明することにある。我々の班では、工学的なアプローチにより、細胞機能の細胞外再構築技術を確立すると共に、タンパク質のアミノ酸変異群を1分子ごとに分離・機能検出できる「1分子機能オミックス解析技術」を開発する。そして、それらを“未開拓タンパク質”へと適応することで、従来の研究に革新を起こすべく、新しい研究手法の確立を目指す。これを例えるならば、本領域全体が目指すタンパク質世界の開拓において、我々の計画班は高性能の顕微鏡(基盤技術)を製造し、他の班が標的とするタンパク質の世界を多元的かつ網羅的に解析できる新規計測基盤を提供する役割を担うものと考えている(図1)。また、中間評価実施までには、1) 新規リアクターの開発により、未開拓タンパク質の1分子計測を実現すること、2) 遺伝子変異と機能の相関を1分子計測の分解能で明らかにすることを目的としており、それらの内容について順調に研究活動は進捗した。



図1：本課題のコンセプト

(2) 計画研究で得られた成果

i) 新規リアクターの開発と未開拓タンパク質の1分子計測の実現

従来、ガラス基板を用いたマイクロリアクターチップが1分子計測に汎用されてきたが、コスト・精度が課題となっていた。そこで、本課題では、プラスチック基板を用いたマイクロリアクターチップを開発し(図2A)、その射出成型プロセスにより、コスト・精度の改善と併せて、量産化体制を構築することに成功した。また、新規チップを用いた自動計測装置等を開発し(図2B)、CRISPR-Cas13aなどの未開拓タンパク質の1分子機能計測に成功するとともに、その機能・活性についての新知見を導出し、更には、新種のCasタンパク質をメタゲノムから見出すことに成功した。今後は、他の計画班・公募班と連携し、CRISPR-Cas以外の未開拓タンパク質の1分子機能計測にも展開したいと考えている。

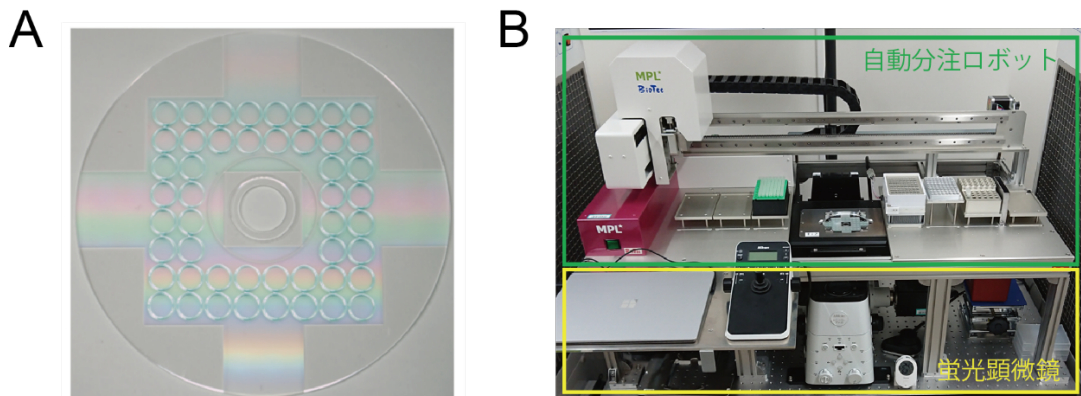


図2：新規リアクターチップと全自動1分子計測装置

研究課題：未開拓タンパク質データ収集・特徴抽出・予測

計画研究代表者：太田元規（名古屋大学 大学院情報学研究科・教授）

研究分担者：福地佐斗志（前橋工科大学 工学部・教授）

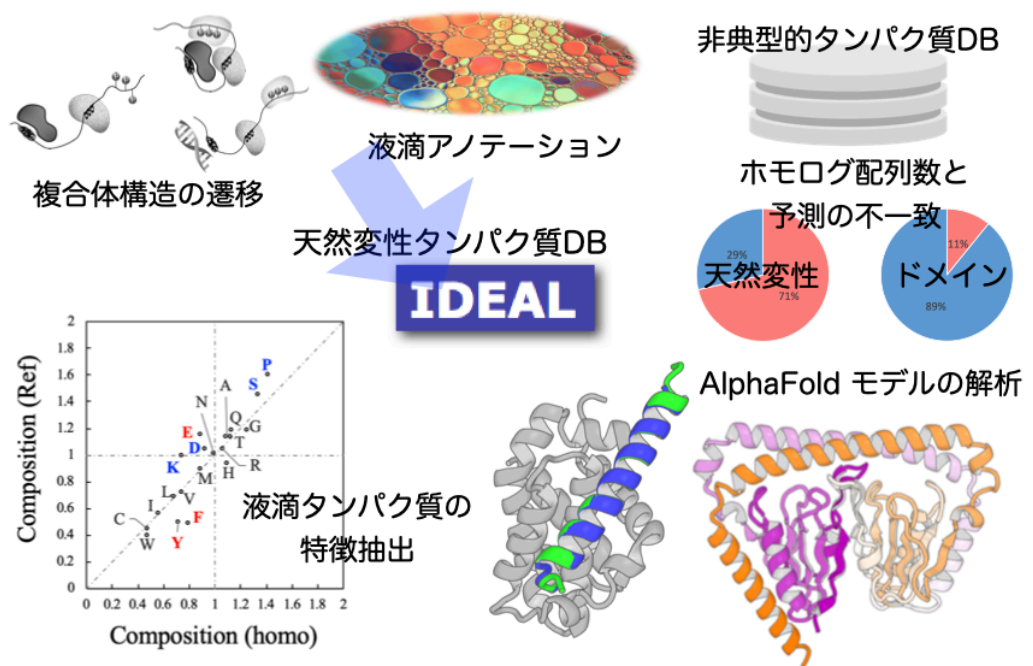
(1). 概略および領域設定期間内、中間審査実施時までのマイルストーンと中間審査までの進展

本研究の目的は、未開拓タンパク質についてアミノ酸配列などの基礎情報を収集すると共に、それらを解析して特徴を抽出し、構造や機能などを推定する手法を研究することである。具体的な対象は lncRNA 由来の翻訳物（新しい種類のタンパク質）や、液-液相分離（LLPS）を誘起する天然変性タンパク質（新しい様式で機能するタンパク質）などである。領域発足後、高精度な立体構造予測が可能な AlphaFold (AF) が公開され、予め AF で予測したモデルを収録した AlphaFold DB も公開された。AlphaFold DB のモデル数は PDB 登録数の 1000 倍にも及ぶため、これらの中には人類未知の新構造のタンパク質も含まれていると期待できる。よって AF モデルも研究対象として追加した。

「未開拓タンパク質の収集・特徴抽出・予測」を実現するための基盤として2つのデータベースを開発もしくは拡充する。1) lncRNA 由来のタンパク質データベースの開発：lncRNA 由来配列のタンパク質について報告した論文から取得した DNA 配列（ゲノム情報）やアミノ酸配列情報について、それらの整合を確認し、天然変性領域予測やドメイン同定の結果を整理、まとめてデータベースに格納する。2) 天然変性タンパク質データベース、IDEAL の高度化：10 年ほどに渡り IDEAL を開発してきたが、細胞内での LLPS の役割が注目されるようになるなど、天然変性タンパク質の見方にも変化が起きている。よって、タンパク質の機能アノテーションとして LLPS 関連事項と翻訳後修飾などに起因する天然変性タンパク質の状態遷移を取り入れ、IDEAL を高度化する。中間評価実施時までに 2 つのデータベースのプロトタイプを作成しサンプルデータなどを取り込む（形式の作成）。その後の領域設定期間においてデータ数や事例を増やし、新知識獲得に適したデータを提供できるようにする（量の拡充）。また、収集したデータなどを利用した未開拓タンパク質の特徴や予測研究を実施し、アミノ酸配列や構造についての理解を進展させ、（ここで対象とした）未開拓タンパク質についての情報論的一般像の確立をめざす。

中間審査実施時までに、1) のデータベースについては、情報元となる論文リストのページ、データのまとめり（例えば同一論文内のヒトのデータやマウスのデータ）のページ、各データのページ、各タンパク質と DNA（ゲノム）配列のページといった階層構造を意識したアーキテクチャを設計し、それぞれに見合ったデータを格納した。例えば各タンパク質のページでは、タンパク質の配列に添って構造ドメイン同定の結果、複数手法による天然変性領域予測の結果が閲覧できる。2) のデータベースについては（詳細は次項 3）現 IDEAL のページを「構造情報」の欄とし、新たに「機能情報」の欄を作成して状態

遷移の情報を格納した。現在 LLPS 関連タンパク質について情報公開しているデータベースが複数あるが、それらのデータを精査して IDEAL のエントリーから参照できるようにした。加えて、これまでにデータベースに格納されたタンパク質配列、もしくは他のデータベースから取得した未開拓タンパク質について、バイオインフォマティクス解析を



太田班の中間審査までの活動と成果のイメージ

実施した。

(2). 中間評価までの成果

1. データベース開発のために lncRNA から翻訳されるタンパク質を著名な論文から収集し、構造ドメイン同定や天然変性領域予測を実施した。結果をまとめていく過程で天然変性領域予測では、ホモログの配列数が少ないと予測法によって結果が大きく異なることを発見した。この法則は一般的で、UniProt に登録されている配列にもあてはまり lncRNA 由来のタンパク質特有の現象ではない。これは天然変性領域予測法のベンチマークなどでも指摘されておらず、lncRNA から翻訳されるタンパク質について解析したことで初めて得られる論点である。論文化にむけて結果をまとめている。

2. 公開されている複数の LLPS に関与するタンパク質のデータベースを精査し、信頼性の高いタンパク質配列を抽出した。それらを、単独で相分離するもの、他のタンパク質と一緒に相分離するもの、核酸と一緒に相分離するもの、に 3 分類し、特徴を調べた。他のタンパク質や核酸と相分離するものはアミノ酸組成が一般のタンパク質と同等であったが、単独で相分離するタンパク質はアミノ酸組成が統計的に異なることを発見した。特殊なアミノ酸組成は相分離に必要な多価相互作用を、他の分子に依存せず実現するためのものと解釈している (Ozawa Yet al., *J Biochem.*)

3. 天然変性タンパク質が翻訳後修飾などを受け、相互作用などの状態が変化していく様子を記述するために専用エディタを開発した。これを用いて 50 程度のタンパク質についてデータ化 (XML フォーマット) グラフ化 (SBGN フォーマット) を行い IDEAL に格納した。2.の研究を実施するために選択した LLPS 関連タンパク質として信頼できるものについて、IDEAL からの参照を実装した。新バージョンの IDEAL は今秋公開予定。

4. いくつかの天然変性タンパク質は、立体構造を形成して相互作用の相手と結合する「結合に伴う折れたたみ部位」を持つ。IDEAL ではこのような部位 (Protean Segment: ProS) を収集している。モノマー状態の AF モデルについて、ProS がどう予測されているかを調査した。AF の予測信頼性 (pLDDT) が高い場合、ProS は正しく予測される傾向があった。このような ProS は 1 本の長い α ヘリックスか構造ドメインの一部が多かった。pLDDT が中程度であっても、短い α ヘリックスと末端ループが比較的球状の構造をとっている場合も正しく予測される傾向があった (Anbo H et al., *Biology*). AF の予測パラメータの学習開始以降に PDB に登録された ProS とその相互作用の相手を対象としたベンチマーク (本当の Blind prediction) も実施しており、 β ストランドをとって結合する ProS は精度が高く予測されるという予備的結果を得ている。

5. 2 億構造からなる AlphaFold DB からまだ人類に知られていない未知タンパク質を発見することに挑戦している。これまでに 1 つの β シートにヌクレオチド結合用の P-loop motif を 2 つ持つ、新構造のタンパク質を見出した。

連携する公募研究との共同研究の成果

市之瀬班ではショウジョウバエの脳で発現しているタンパク質についてストップコドンの読み飛ばし (RT: Read Through) が起こるのかをリボソームプロファイリングを利用して網羅的に調査している。市之瀬氏からデータを提供してもらい、341 本の RT 配列 (リボソームが 1 割以上の確率で RT する) と 1494 本のノーマル配列について、構造ドメイン同定、天然変性領域予測、AF による立体構造予測を実施した。ノーマル配列の天然変性領域率は 43% であった。RT する配列のストップコドン前領域の天然変性領域率はノーマル配列と同等 (43%) であったのに対し、ストップコドン後領域では圧倒的に多かった (69%)。またストップコドン後領域から α ヘリックス型の新構造となる AF モデルを予測した。市之瀬班では、RT する配列のいくつかについて細胞内局在の変化を同定している。また RT 変異体を利用した実験では、記憶学習に障害のある変異体を見出している。新規 RT 配列の同定、その構造の特徴、細胞内局在や表現型、などをまとめて論文化する予定である。

7 研究発表の状況

研究項目ごとに計画研究・公募研究の順で、本研究領域により得られた研究成果の発表の状況（主な雑誌論文、学会発表、書籍、産業財産権、主催シンポジウム等の状況。令和5年6月末までに掲載等が確定しているものに限る。）について、具体的かつ簡潔に5頁以内で記述すること。なお、雑誌論文の記述に当たっては、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、研究代表者（発表当時、以下同様。）には二重下線、研究分担者には一重下線、corresponding author には左に*印を付すこと。

原著論文は全て査読有り。番号に網掛けがある文献は領域内での共同研究

【計画研究】

領域全体として *Journal of Biochemistry* 誌の Special Issue (April 2023) – **Multifaceted Protein World** (Guest Editors: Hideki Taguchi and Richard I. Morimoto, <https://academic.oup.com/jb/issue/173/4>)

田口英樹

1. Miwa T, *Taguchi H. *Escherichia coli* small heat shock protein IbpA plays a role in regulating the heat shock response by controlling the translation of σ^{32} . *Proc Natl Acad Sci USA*, in press (2023).
2. *Chiba S, Fujiwara K, Chadani Y, *Taguchi H. Nascent chain-mediated translation regulation in bacteria: translation arrest and intrinsic ribosome destabilization. (review) *J Biochem* 173, 227–236 (2023). (*J Biochem Special Issue*)
3. Yamakawa A, *Niwa T, *Chadani Y, Akinao Kobo, *Taguchi H. A method to enrich polypeptidyl-tRNAs to capture snapshots of translation in the cell. *Nucleic Acids Res* 51, e30 (2023).
4. Onodera H, Niwa T, *Taguchi H, *Chadani Y. Prophage excision switches the primary ribosome rescue pathway and rescue-associated gene regulations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 119, 44–58 (2023).
5. Minami S, Niwa T, Uemura E, Koike R, Taguchi H, *Ota M. A method that predicts chaperonin GroE substrates using small structural patterns of proteins. *FEBS Open Bio* 13, 779–794 (2023).
6. Ito Y, *Chadani Y, Niwa T, Yamakawa A, Machida K, Imataka H, *Taguchi H. Nascent peptide-induced translation discontinuation in eukaryotes impacts biased amino acid usage in proteomes. *Nat Commun* 13, 7451 (2022).
7. Niwa T, Nakazawa K, Hoshi K, Tadakuma H, Ito K, *Taguchi H. Application of fluorescence correlation spectroscopy to investigate the dynamics of a ribosome-associated trigger factor in *Escherichia coli*. *Front Mol Biosci* 9, 891128 (2022).
8. Fujita T, Yokoyama T, Shirouzu M, Taguchi H, Ito T, *Iwasaki S. The landscape of translational stall sites in bacteria revealed by monosome and disome profiling. *RNA* 28, 290-302 (2022).
9. Niwa T, Chadani Y, *Taguchi H. Shotgun proteomics revealed preferential degradation of misfolded *in vivo* obligate GroE substrates by Lon protease in *Escherichia coli*. *Molecules* 27, 3772 (2022).
10. Nakagawa Y, Shen HC-H, Komi Y, Sugiyama S, Kurinomaru T, Tomabechei Y, Krayukhina E, Okamoto K, Yokoyama T, Shirouzu M, Uchiyama S, Inaba M, Niwa T, Sako Y, *Taguchi H, *Tanaka M. Amyloid conformation-dependent disaggregation in a reconstituted yeast prion system. *Nat Chem Biol* 18, 321–331 (2022).
11. *Chadani Y, Sugata N, Niwa T, Ito Y, Iwasaki S, *Taguchi H. Nascent polypeptide within the exit tunnel stabilizes the ribosome to counteract risky translation. *EMBO J* 40, e108299 (2021).
12. Miwa T, Chadani Y, *Taguchi H. *Escherichia coli* small heat shock protein IbpA is an aggregation-sensor that self-regulates its own expression at post-transcriptional levels. *Mol Microbiol* 115, 142–156 (2021).

千葉志信・内藤哲

1. Shiota N, Shimokawa-Chiba N, Fujiwara K, *Chiba S. Identification of *Bacillus subtilis* YidC substrates using a MifM-instructed translation arrest-based reporter. *J Mol Biol*, in press (2023).
2. *Obana N, Takada H, Crowe-McAuliffe C, Iwamoto M, Egorov AA, Wu KJY, Chiba S, Murina V, Paternoga H, Tresco BIC, Nomura N, Myers AG, Atkinson GC, *Wilson DN, *Haurlyuk V. Genome-encoded ABCF factors implicated in intrinsic antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: VmlR2, Ard1 and CplR. *Nucleic Acids Res* 51, 4536-4554 (2023).
3. *Chiba S, Fujiwara K, Chadani Y, *Taguchi H. Nascent chain-mediated translation regulation in bacteria: translation arrest and intrinsic ribosome destabilization. (review) *J Biochem* 173, 227–236 (2023). (*J Biochem Special Issue*)
4. Hiragori Y, Takahashi H, Karino T, Kaido A, Hayashi N, Sasaki S, Nakao K, Motomura T, Yamashita Y, Naito S, *Onouchi H. Genome-wide identification of *Arabidopsis* non-AUG initiated upstream ORFs with evolutionarily conserved regulatory sequences that control protein expression levels. *Plant Mol Biol* 111, 37–55 (2023).
5. *Takada H, Mandell ZF, Yakhnin H, Glazyrina A, Chiba S, Kurata T, Wu KJY, Tresco BIC, Myers AG, Atkinson GC, *Babitzke P, *Haurlyuk V. Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor VmlR is regulated by



- RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp. *Nucleic Acids Res* 50, 6174–6189 (2022).
- *Sotta N, Chiba Y, Aoyama H, Takamatsu S, Suzuki T, Miwa K, Yamashita Y, *Naito S, *Fujiwara T. Translational landscape of a C4 plant *Sorghum bicolor*, under normal and sulfur-deficient conditions. *Plant Cell Physiol* 63, 592–604 (2022).
 - Sakiyama K, Shimokawa-Chiba N, Fujiwara K, *Chiba S. Search for translation arrest peptides encoded upstream of genes for components of protein localization pathways. *Nucleic Acids Res* 49, 1550–1566 (2021).

永井義隆・森康治

- Fujino Y, Ueyama M, Ishiguro T, Ozawa D, Sugiki T, Ito H, Murata A, Ishiguro A, Gendron TF, Mori K, Tokuda E, Taminato T, Konno T, Koyama A, Kawabe Y, Takeuchi T, Furukawa Y, Fujiwara T, Ikeda M, Mizuno T, Mochizuki H, Mizusawa H, Wada K, Ishikawa K, Onodera O, Nakatani K, Taguchi H, Petrucelli L, *Nagai Y. FUS regulates RAN translation through modulating the G-quadruplex structure of GGGGCC repeat RNA in *C9orf72*-linked ALS/FTD. *eLife*, in press (2023).
- *Mori K, Gotoh S, Ikeda M. Aspects of degradation and translation of the expanded *C9orf72* hexanucleotide repeat RNA. *J Neurochem*, in press (2023).
- Taminato T, *Takeuchi T, Ueyama M, Mori K, Ikeda M, Mochizuki H, *Nagai Y. Therapeutic reduction of GGGGCC repeat RNA levels by hnRNPA3 suppresses neurodegeneration in *Drosophila* models of *C9orf72*-linked ALS/FTD. *Hum Mol Genet* 32, 1673–1682 (2023).
- Fujino Y, Mori K, *Nagai Y. Repeat-associated non-AUG translation in neuromuscular diseases: mechanisms and therapeutic insights. (review) *J Biochem* 173, 273–281 (2023). (*J Biochem Special Issue*)
- *Takeuchi T, Maeta K, Xin D, Oe Y, Takeda A, Inoue M, Nagano S, Fujihara T, Matsuda S, Ishigaki S, Sahashi K, Minakawa EN, Mochizuki H, Neya M, Sobue G, *Nagai Y. Sustained therapeutic benefits by transient reduction of TDP-43 using ENA-modified antisense oligonucleotides in ALS/FTD mice. *Mol Ther Nucleic Acids* 31, 353–366 (2023).
- *Mori K, Gotoh S, Uozumi R, Miyamoto T, Akamine S, Kawabe Y, Tagami S, Ikeda M. RNA dysmetabolism and repeat associated non-AUG translation in Frontotemporal Lobar Degeneration/Amyotrophic Lateral Sclerosis due to *C9orf72* hexanucleotide repeat expansion. *JMA J* 6, 9–15 (2023).
- Wang ET, Freudenreich CH, Gromak N, Jain A, Todd PK, *Nagai Y. What repeat expansion disorders can teach us about the Central Dogma. (review) *Mol Cell* 83, 324–329 (2023).
- Czuppa M, Dhingra A, Zhou Q, Schludi C, König L, Scharf E, Farny D, Dalmia A, Täger J, Castillo-Lizardo M, Katona E, Mori K, Aumer T, Schelter F, Müller M, Carell T, Kalliokoski T, Messinger J, Rizzu P, Heutink P, *Edbauer D. Drug screen in iPSC-Neurons identifies nucleoside analogs as inhibitors of (G4C2)_n expression in *C9orf72* ALS/FTD. *Cell Rep* 39, 110913 (2022).
- *Mori K, Ikeda M. Biological basis and psychiatric symptoms in frontotemporal dementia. *Psychiatry Clin Neurosci* 76, 351–360 (2022).
- Fujino Y, *Nagai Y. The molecular pathogenesis of repeat expansion diseases. (review) *Biochem Soc Trans* 50, 119–134 (2022).
- *Ishiguro A, Lu J, Ozawa D, Nagai Y, Ishihama A. LS-linked FUS mutations dysregulate G-quadruplex-dependent liquid–liquid phase separation and liquid-to-solid transition. *J Biol Chem* 297, 101284 (2021).
- *Mori K, Gotoh S, Yamashita T, Uozumi R, Kawabe Y, Tagami S, Kamp F, Nuscher B, Edbauer D, Haass C, Nagai Y, Ikeda M. The porphyrin TMPyP4 inhibits elongation during the non-canonical translation of the FTL/ALS-associated GGGGCC repeat in the *C9orf72* gene. *J Biol Chem* 297, 101120 (2021).
- *Ishiguro T, *Nagai Y, *Ishikawa K. Insight into spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) from *Drosophila* model. (review) *Front Neurosci* 15, 648133 (2021).
- *Minakawa EN, *Nagai Y. Protein aggregation inhibitors as disease-modifying therapies for polyglutamine diseases. (review) *Front Neurosci* 15, 621996 (2021).
- Shibata T, Nagano K, Ueyama M, Ninomiya K, Hirose T, Nagai Y, Ishikawa K, Kawai G, *Nakatani K. Small molecule targeting r(UGGAA)_n disrupts RNA foci and alleviates disease phenotype in *Drosophila* model. *Nat Commun* 12, 236 (2021).

松本有樹修

- Shiraishi C, *Matsumoto A, Ichihara K, Yamamoto T, Yokoyama T, Mizoo T, Hatano A, Matsumoto M, Tanaka Y, Matsuura-Suzuki E, Iwasaki S, Matsushima S, Tsutsui H, *Nakayama KI. RPL3L-containing ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function. *Nat Commun* 14, 2131 (2023).
- Kito Y, *Matsumoto A, Ichihara K, Shiraishi C, Tang R, Hatano A, Matsumoto M, Han P, Iwasaki S, *Nakayama KI. The ASC-1 complex promotes translation initiation by scanning ribosomes. *EMBO J* 42, e112869 (2023).
- Ichihara K, *Nakayama KI, *Matsumoto A. Identification of unannotated coding sequences and their physiological

- functions. (review) *J Biochem* 173, 237–242 (2023). (***J Biochem Special Issue***)
- Higa T, Okita Y, **Matsumoto A**, Nakayama S, Oka T, Sugahara O, Koga D, Takeishi S, Nakatsumi H, Hosen N, Robine S, Taketo MM, Sato T, *Nakayama KI. Spatiotemporal reprogramming of differentiated cells underlies regeneration and neoplasia in the intestinal epithelium. *Nat Commun* 13, 1500 (2022).
 - Mise S, ***Matsumoto A**, Shimada K, Hosaka T, Takahashi M, Ichihara K, Shimizu H, Shiraishi C, Saito D, Suyama M, Yasuda T, Ide T, Izumi Y, Bamba T, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Miyata H, Ikawa M, *Nakayama KI. Kastor and Polluks polypeptides encoded by a single gene locus cooperatively regulate VDAC and spermatogenesis. *Nat Commun* 13, 1071 (2022).
 - Nita A, ***Matsumoto A**, Tang R, Shiraishi C, Ichihara K, Saito D, Suyama M, Yasuda T, Tsuji G, Furue M, Katayama B, Ozawa T, Murata T, Dainichi T, Kabashima K, Hatano A, **Matsumoto M**, *Nakayama KI. A ubiquitin-like protein encoded by the “noncoding” RNA TINCR promotes keratinocyte proliferation and wound healing. *PLoS Genet* 17, e1009686 (2021).
 - Ichihara K, ***Matsumoto A**, Nishida H, Kito Y, Shimizu H, **Shichino Y**, Iwasaki S, Imami K, Ishihama Y, *Nakayama KI. Combinatorial analysis of translation dynamics reveals eIF2 dependence of translation initiation at near-cognate codons. *Nucleic Acids Res* 49, 7298–7317 (2021).
 - Nita A, Muto Y, Katayama Y, **Matsumoto A**, Nishiyama M, *Nakayama KI. The autism-related protein CHD8 contributes to the stemness and differentiation of mouse hematopoietic stem cells. *Cell Rep* 34, 108688 (2021).

遠藤斗志也・松本俊介

- ***Matsumoto S**. Msp1-mediated proofreading mechanism for localization of tail-anchored membrane proteins. *J Biochem*, in press (2023).
- Akabane S, Watanabe K, Kosako H, Yamashita SI, Nishino K, Kato M, Sekine S, Kanki T, Matsuda N, **Endo T**, *Oka T. TIM23 facilitates PINK1 activation by safeguarding against OMA1-mediated degradation in damaged mitochondria. *Cell Rep* 42, 112454 (2023).
- Takeda H, Busto JV, Lindau C, Tsutsumi A, Tomii K, Imai K, Yamamori Y, Hirokawa T, Motono C, Ganesan I, Wenz L-S, Becker T, Kikkawa M, Pfanner N, Wiedemann N, ***Endo T**. A multipoint guidance mechanism for β -barrel folding on the SAM complex. *Nat Struct Mol Biol* 30, 176–187 (2023).
- Matsumoto S**, ***Endo T**. Proofreading of protein localization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1. (review) *J Biochem* 173, 265–271 (2023). (***J Biochem Special Issue***)
- Kakimoto-Takeda Y, Kojima R, Shiino H, Shinmyo M, Korokawa K, Nakano A, ***Endo T**, Tamura Y. Dissociation of ERMES clusters plays a key role in attenuating the endoplasmic reticulum stress. *iScience* 25, 105362 (2022).
- Araiso Y, ***Endo T**. Structural overview of the translocase of the mitochondrial outer membrane complex. *Biophys Physicobiol* 19, e190022 (2022).
- Matsumoto S**, Ono S, Shinoda S, Kakuta C, Okada S, Ito T, Numata T, ***Endo T**. GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER. *J Cell Biol* 221, e202104076 (2022).
- Araiso Y, Imai K, ***Endo T**. Role of the TOM complex in protein import into mitochondria: structural views. *Ann Rev Biochem* 91, 679–703 (2022).
- Takeda H, Tsutsumi A, Nishizawa T, Lindau C, Busto JV, Wenz L-S, Ellenrieder L, Imai K, Straub SP, Mossmann W, Qiu J, Yamamori Y, Tomii K, Suzuki J, Murata T, Ogasawara S, Nureki O, Becker T, Pfanner N, Wiedemann N, Kikkawa M, ***Endo T**. Mitochondrial sorting and assembly machinery operates by β -barrel switching. *Nature* 590, 163–169 (2021).
- Araiso Y, Imai K, ***Endo T**. Structural snapshot of the mitochondrial protein import gate. *FEBS J* 288, 5300–5310 (2021).

松本雅記

- Kito Y, ***Matsumoto A**, Ichihara K, Shiraishi C, Tang R, Hatano A, **Matsumoto M**, Han P, Iwasaki S, *Nakayama KI. The ASC-1 complex promotes translation initiation by scanning ribosomes. *EMBO J* 42, e112869 (2023).
- Shiraishi C, ***Matsumoto A**, Ichihara K, Yamamoto T, Yokoyama T, Mizoo T, Hatano A, **Matsumoto M**, Tanaka Y, Matsuura-Suzuki E, Iwasaki S, Matsushima S, Tsutsui H, *Nakayama KI. RPL3L-containing ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function. *Nat Commun* 14, 2131 (2023).
- Aoyama S, *Nishida Y, Uzawa H, Himuro M, Kanai A, Ueki K, Ito M, Iida H, Tanida I, Miyatsuka T, Fujitani Y, **Matsumoto M**, Watada H. Monitoring autophagic flux *in vivo* revealed its physiological response and significance of heterogeneity in pancreatic beta cells. *Cell Chem Biol* 30, 658–671 (2023).
- Hatano A, Takami T, ***Matsumoto M**. *In situ* digestion of alcohol-fixed cells for quantitative proteomics. *J Biochem* 173, 243–254 (2023). (***J Biochem Special Issue***)

5. Fujimoto M, Takii R, **Matsumoto M**, Okada M, Nakayama KI, Nakato R, Fujiki K, Shirahige K, *Nakai A. HSF1 phosphorylation establishes an active chromatin state via the TRRAP-TIP60 complex and promotes tumorigenesis. *Nat Commun* 13, 4355 (2022).
6. Johmura Y, Yamanaka T, Omori S, Wang T, Sugiura Y, **Matsumoto M**, Suzuki N, Kumamoto S, Yamaguchi K, Hatakeyama S, Takami T, Yamaguchi R, Shimizu E, Ikeda K, Okahashi N, Mikawa R, Suematsu M, Arita M, Sugimoto M, Nakayama KI, Furukawa Y, Imoto S, *Nakanishi M. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science* 371, 265-270 (2021).
7. Matsuzaki F, Uda S, Yamauchi Y, **Matsumoto M**, Soga T, Maehara K, Ohkawa Y, Nakayama KI, Kuroda S, *Kubota H. An extensive and dynamic trans-omic network illustrating prominent regulatory mechanisms in response to insulin in the liver. *Cell Reports* 36,109569 (2021).

渡邊力也

1. Ueda T, *Shionda H, Makino A, Yoshimura M, Iida T, **Watanabe R**. Purification/amplification-free RNA detection platform for rapid and multiplex diagnosis of plant viral infections. *Anal Chem*, in press (2023).
2. Iida T, Ando J, Shinoda H, Makino A, Yoshimura M, Murai K, Mori M, Takauchi H, Noda T, Nishimasu H, **Watanabe R**. Compact wide-field femtoliter-chamber imaging system for high-speed and accurate digital bioanalysis. *Lab Chip* 23, 684-691 (2023).
3. Shinoda H, Iida T, Makino A, Yoshimura M, Ishikawa J, Ando J, Murai K, Sugiyama K, Muramoto Y, Nakano M, Kiga K, Cui L, Nureki O, Takauchi H, Noda T, *Nishimasu H, **Watanabe R**. Automated amplification-free digital RNA detection platform for rapid and sensitive SARS-CoV-2 diagnosis. *Commun Biol* 5, 473 (2022).
4. Shinoda H, Taguchi Y, Nakagawa R, Makino A, Okazaki S, Nakano M, Muramoto Y, Takahashi C, Takahashi I, Ando J, Noda T, *Nureki O, *Nishimasu H, **Watanabe R**. Amplification-free RNA detection with CRISPR-Cas13. *Commun Biol* 4, 476 (2021).

・産業財産権

1. 浦野泰照, 小松徹, 鏡味優, 坂本眞伍, 笠井貴文, **渡邊力也**. マイクロデバイス用のペプチド結合加水分解酵素検出用蛍光プローブ. 出願国: 日本. 出願番号: 特願 2022-79082 (2022年5月12日).
2. **渡邊力也**, 安藤潤. 酵素の測定方法、マイクロチャンバーアレイ、キット、ラマン散乱像の撮影方法、及び目的分子の測定方法. 出願国: 日本. 出願番号: 特願 2021-199642 (2021年12月8日).

太田元規・福地佐斗志

1. Anbo H, Sakuma K, **Fukuchi S**, ***Ota M**. How AlphaFold2 predicts conditionally folding regions annotated in an intrinsically disordered protein database, IDEAL. *Biology* 12, 182 (2023).
2. **Fukuchi S**, Noguchi N, Anbo H, Homma K. Exon elongation added intrinsically disordered regions to the encoded proteins and facilitated the emergence of the last eukaryotic common ancestor. *Mol Biol Evol* 40, msac272 (2023).
3. Minami S, Niwa T, Uemura E, Koike R, **Taguchi H**, ***Ota M**. A method that predicts chaperonin GroE substrates using small structural patterns of proteins. *FEBS Open Bio* 13, 779-794 (2023).
4. Ozawa Y, Anbo H, **Ota M**, ***Fukuchi S**. Classification of proteins inducing liquid-liquid phase separation: sequential, structural and functional characterization, *J Biochem* 173, 255-264 (2023). (*J Biochem Special Issue*)
5. *Kanematsu Y, Narita A, Oda T, Koike R, **Ota M**, Takano Y, Moritsugu K, Fujiwara I, Tanaka K, Komatsu H, Nagae T, Watanabe N, Iwasa M, *Maeda Y, *Takeda S. Structures and mechanisms of actin ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 119, e2122641119 (2022).
6. *Takeda S, Koike R, Fujiwara I, Narita A, Miyata M, **Ota M**, Maeda Y. Structural insights into the regulation of actin capping protein by twinfilin C-terminal tail, *J Mol Biol* 433, 166891 (2021).
7. *Takeda S, Koike R, Nagae T, Fujiwara I, Narita A, Maeda Y, **Ota M**. Crystal structure of human V-1 in the apo form. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 77, 13-21 (2021).

【公募研究（一部のみ）】

松尾芳隆

1. ***Matsuo Y**, Uchihashi T, *Inada T. Decoding of the ubiquitin code for clearance of colliding ribosomes by the RQT complex. *Nat Commun* 14, 79 (2023).
2. Tomomatsu S, Watanabe A, Tesina P, Hashimoto S, Ikeuchi K, Li S, **Matsuo Y**, Beckmann R, *Inada T. Two modes of Cue2-mediated mRNA cleavage with distinct substrate recognition initiate No-go decay. *Nucleic Acids Res.* 51(1):253-270. (2023).
3. Narita M, Denk T, **Matsuo Y**, Sugiyama T, Kikuguchi C, Ito S, Sato N, Suzuki T, Hashimoto S, Machova I, Tesina P, *Beckmann R, *Inada T. A distinct human disome collision interface harbors K63-linked polyubiquitination of uS10 to trigger hRQT-mediated subunit dissociation. *Nat Commun* 13, 6411 (2022).
4. Li S, Ikeuchi K, Kato M, Buschauer R, Sugiyama T, Adachi S, Kusano H, Natsume T, Berninghausen O, **Matsuo Y**,

Becker T, *Beckmann R, *Inada T. Sensing of individual stalled 80S ribosomes by Fap1 for non-functional rRNA turnover. *Mol Cell* 82, 3424–3437 (2022).

田中良和

1. Watari H, Kageyama H, Masubuchi N, Nakajima H, Onodera K, Focia PJ, Oshiro T, Matsui T, Kodera Y, Ogawa T, Yokoyama T, Hirayama M, Hori K, Freymann DM, Komatsu N, *Araki M, *Tanaka Y, *Sakai R. A marine sponge-derived lectin reveals hidden pathway for thrombopoietin receptor activation. *Nat Commun* 13, 7262 (2022).

岩川弘宙

1. *Iwakawa H, *Tomari Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell* 82, 30–43 (2022).

今見考志

1. Uchiyama J, Roy R, Wang DO, Morikawa K, Kawahara Y, Iwasaki M, Yoshino C, Mishima Y, *Ishihama Y, *Imami K. pSNAP: Proteome-wide analysis of elongating nascent polypeptide chains *iScience* 25, 104516 (2022).

花田耕介

1. Takeda T, Shirai K, Kim Y-W, Higuchi-Takeuchi M, Shimizu M, Kondo T, Ushijima T, Matsushita T, Shinozaki K, *Hanada K. A *de novo* gene originating from the mitochondria controls floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 111, 189-203 (2023)

町田幸大

1. Ito Y, *Chadani Y, Niwa T, Yamakawa A, Machida K, Imataka H, *Taguchi, H. Nascent peptide-induced translation discontinuation in eukaryotes impacts biased amino acid usage in proteomes. *Nat Commun* 13, 7451 (2022).
2. *Machida K, Miyawaki S, Kanazawa K, Hakushi T, Nakai T, Imataka H. An *in vitro* reconstitution system defines the defective step in the biogenesis of nutated β -actin proteins. *ACS Synth Biol* 10, 3158–3166 (2021).

藤岡優子

1. Ikeda R, Noshiro D, Morishita H, Takada S, Kageyama S, Fujioka Y, Funakoshi T, Komatsu-Hirota S, Arai R, Ryzhii E, Abe M, Koga T, Motohashi H, Nakao M, Sakimura K, Horii A, Waguri S, *Ichimura Y, *Noda NN, *Komatsu M. Phosphorylation of phase-separated p62 bodies by ULK1 activates a redox-independent stress response. *EMBO J*, in press (2023).

山形敦史

1. *Yamagata A, Murata Y, Namba K, Terada T, Fukai S, Shirouzu M. Uptake mechanism of iron-phytosiderophore from the soil based on the structure of yellow stripe transporter. *Nat Commun* 13, 7180 (2022).

七野悠一

1. †Miyake T, †Inoue Y, Shao X, Seta T, Aoki Y, Nguyen Pham KT, Shichino Y, Sasaki J, Sasaki T, Ikawa M, Yamaguchi Y, Okamura H, Iwasaki S, *Doi M. Minimal upstream open reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm *Cell Rep*, 112157 (2023).
2. Chen M, Kumakura N, Saito H, Muller R, Nishimoto M, Mito M, Gan P, Ingolia NT, Shirasu K, Ito T, Shichino Y, *Iwasaki S. A parasitic fungus employs mutated eIF4A to survive on rocaglate-synthesizing *Aglaia* plants *eLife* 12, e81302 (2023).
3. †Miyake T, †Inoue Y, Shao X, Seta T, Aoki Y, Nguyen Pham KT, Shichino Y, Sasaki J, Sasaki T, Ikawa M, Yamaguchi Y, Okamura H, Iwasaki S, *Doi M. Minimal upstream open reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm *Cell Rep* 112157 (2023).
4. *Shichino Y, *Iwasaki S. Compounds for selective translational inhibition *Curr Opin Chem Biol* 69, 102158 (2022).
5. *Wu Q, Shichino Y, Abe T, Suetsugu T, Omori A, Kiyonari H, Iwasaki S, *Matsuzaki F. Selective translation of epigenetic modifiers affects the temporal pattern and differentiation of neural stem cells *Nat Commun* 13, 470 (2022).
6. †Kashiwagi K, †Shichino Y, †Osaki T, Sakamoto A, Nishimoto M, Takahashi M, Mito M, Weber F, *Ikeuchi Y, *Iwasaki S, *Ito T. eIF2B-capturing viral protein NSs suppresses the integrated stress response *Nat Commun* 12, 7102 (2021).

足達俊吾

1. Kato K, Okazaki S, Schmitt-Ulms C, Jiang K, Zhou W, Ishikawa J, Isayama Y, Adachi S, Nishizawa T, Makarova KS, Koonin EV, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, *Nishimasu H. RNA-triggered protein cleavage and cell growth arrest by the type III-E CRISPR nuclease-protease. *Science* 378, 882–889 (2022).

8 研究組織の連携体制

研究領域全体を通じ、本研究領域内の研究項目間、計画研究及び公募研究間の連携体制について、図表などを用いて具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

【領域内の連携状況】

- ・ 田口英樹×千葉志信：新生鎖依存的な翻訳の強制終了現象（IRD）の普遍性
- ・ 田口英樹×永井義隆×町田幸大：ヒト因子由来翻訳再構成系を使った RAN 翻訳の再構成（Ito H *et al. bioRxiv* 2023）
- ・ 田口英樹×松本有樹修：真核生物 IRD に関わる新規因子の解析
- ・ 田口英樹×山形敦史：酵母プリオンのクライオ電子線トモグラフィ解析
- ・ 田口英樹×町田幸大：ヒト因子由来翻訳再構成系を使った IRD 解析（Ito Y *et al. Nat Commun* 2022）
- ・ 千葉志信×太田元規：新規翻訳アレスト因子のスクリーニング法の開発
- ・ 永井義隆×田口英樹×森康治：RAN 翻訳に関与する RNA 結合タンパク質の機能解析（Fujino *et al. eLife* 2023, *in press*）
- ・ 松本有樹修×田中良和：リボソームの構造解析
- ・ 松本雅記×門倉広：プロテオミクスを活用した新生鎖フォールディング促進因子の解析
- ・ 松本雅記×松本有樹修：RiboSeq データの基づくペプチドセントリックプロテオゲノミクス
- ・ 松本有樹修×松本雅記：組織特異的リボソームタンパク質欠損マウスの発現プロテオーム解析
- ・ 太田元規×田口英樹：シャペロニン GroEL 基質の共通構造（Minami S *et al. FEBS Open Bio* 2023）
- ・ 田中良和×松尾芳隆：品質管理因子結合型リボソームのクライオ電顕解析
- ・ 田中良和×市之瀬敏晴：ストップコドンリードスルーの分子機構
- ・ 門倉広×七野悠一：選択的リボソームプロファイリングを利用した新生鎖フォールディング解析
- ・ 岩川弘宙×七野悠一：FAPS 法を用いた相互作用因子の探索
- ・ 花田耕介×七野悠一：植物に特化したリボソームプロファイリング法の開発
- ・ 七野悠一×松本有樹修×今見考志：リボソーム 40S サブユニットの結合箇所を解析する TCP-Seq の開発（Ichihara K *et al. Nucleic Acids Res* 2021）
- ・ 七野悠一×市之瀬敏晴：リボソームプロファイリングを用いたショウジョウバエの学習・記憶における翻訳制御機構解明（Ichinose T *et al. bioRxiv* 2023）
- ・ 七野悠一×吉久徹：リボソームプロファイリングを用いた tRNA イントロンの解析
- ・ 市之瀬敏晴×太田元規：リードスルータンパク質の AlphaFold2 による構造予測

9 若手研究者の育成に係る取組状況

研究領域全体を通じ、本研究領域の研究遂行に携わった若手研究者（研究協力者やポスドク、途中で追加・削除した者を含む。）の育成に係る取組状況について、具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。なお、本研究領域が育成に取り組んだ「若手研究者」の定義を始めに示すこと。

領域発足後に、昇進した若手研究者は以下の通りである。ここでの若手研究者とはPIになる前の研究者と定義する。

田口 英樹

茶谷 悠平 東京工業大学 特任助教 → 岡山大学 学術研究院 環境生命自然科学学域 准教授
(2023年4月)

永井 義隆

田港 朝也 近畿大学 助教B(近畿大学) → 助教A(近畿大学) (2023年4月)

松本 有樹修

松本 有樹修 九州大学 准教授 → 名古屋大学 理学研究科 教授 (2023年6月)

太田 元規

安保 勲人 前橋工科大学 博士研究員 → 前橋工科大学 工学部 生命工学領域 助教 (2023年4月)

岩川 弘宙

岩川 弘宙 東京大学 助教 → 立教大学 理学部 生命理学科 准教授 (2022年4月)

今見 考志

今見 考志 京都大学大学院・薬学研究科 特任講師 → 理化学研究所生命医科学研究センター・ユニットリーダー (2023年4月)

藤岡 優子

藤岡 優子 微生物化学研究所 上級研究員 → 北海道大学 遺伝子病制御研究所 助教 (2022年4月) → 同 准教授 (2022年6月)

足達 俊吾

足達 俊吾 産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門・主任研究員 → 国立がん研究センター研究所・プロテオーム研究部門・部門長 (2023年4月)

10 アウトリーチ活動に係る取組状況

研究領域全体を通じ、一般向けのアウトリーチ活動に係る取組状況について、具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

【中学・高校での模擬授業など一般向け講演】

田口英樹

1. 国立高校 2020年12月3日 (他1件)

千葉志信

1. 三重県立上野高校「私たちの生命活動を支えるタンパク質の世界」2022.3/11 (Zoom オンライン)
2. 私立大谷中学高校「生命科学の魅力」2023.2/14 (京都)

遠藤斗志也

篠田沙緒里：【井出庸生文部科学副大臣への研究室紹介】実施日時：2022年9月28日

場所：日本科学未来館遠藤プロジェクト研究室

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

(他6件)

太田元規

卓越大学院プログラム GTR・生化学若い研究者の会 共催 第133回創薬科学セミナーでの講演
2021.3.26

田中良和

・函館高専の生徒への構造解析の実習

函館高専の生徒の精製した海洋生物由来タンパク質のクライオ電顕単粒子解析を3名の高専生と一緒に実施した。得られた成果は、第60回日本生物物理学会に発表し、当該学生は High School Presentation Award (最優秀発表賞) を受賞した。

・小学生への出前授業 「水に溶けていた物を取り出してどんなことがわかるのかな？」仙台市立馬場小学校 2022年11月10日 (他2件)

・シニア大学での講演 八木山シニア大学 講義「分子の形を見るとわかること」2023年5月14日

【Youtube 発信】

遠藤斗志也

【You Tube ライブ配信「トークセッション：研究者に聞く、そんなに化学は面白いの？」】実施日時：2020.10.25 (他1件)

メディア報道 (抜粋)

永井義隆

- 2023年1月16日 関西テレビ「報道ランナー」にて報道「難病 ALS 原因物質抑えるたんぱく質発見」
- 2023年2月6日 テレビ大阪「やさしいニュース」にて報道「ALS と認知症の治療薬を開発 難病に

プレスリリース (抜粋)

遠藤斗志也

1. 2023年1月6日

ミトコンドリアにバレル (円筒) 型膜タンパク質をつくる仕組みを解明

Takeda et al. Nat Struct Mol Biol. (2023)

2. 2021年11月23日

ミトコンドリアにバレル (円筒) 型膜タンパク質を組み込む仕組みを解明

Takeda et al. Nature (2022)

11 研究費の使用状況・計画

研究領域全体を通じ、研究費の使用状況や今後の使用計画、研究費の効果的使用の工夫、設備等（本研究領域内で共用する設備・装置の購入・開発・運用、実験資料・資材の提供など）の活用状況について、総括班研究課題の活動状況と併せて具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

田口 英樹：質量分析によるプロテオミクス解析 Q-Exactive (Thermo)、Triple TOF6600 (Sciex) の分析費用 総額 800 万円

用途：非典型的翻訳産物の探索に使用。

千葉 志信：SeqStudio ジェネティックアナライザー (Thermo) : 812 万円

用途：新規に見出された翻訳アレスト因子の翻訳停止位置の同定 (toeprinting) や、プラスミド構築時の DNA 塩基配列解析など。

松本 雅記：質量分析装置リース 5 年間総額 6,269 万円

用途：未開拓プロテオームの同定・定量やさまざまな機能プロテオームデータの取得。

遠藤 斗志也：セルフラックスアナライザー (Agilent) 957 万円

用途：出芽酵母の母細胞・娘細胞での局所翻訳を明らかにするために、退色のない高感度での蛍光イメージングを行うため。

太田 元規：GPGPU などを含めた計算サーバ (1,300 万円)

用途：主に AlphaFold2 によるタンパク質の立体構造予測や天然変性領域の予測。領域内共同研究にも活用。lncRNA 由来の翻訳産物予測、ストップコドンリードスルー配列予測 (市之瀬)、翻訳アレスト配列予測 (千葉志信)。

12 今後の研究領域の推進方策

研究領域全体を通じ、今後の本研究領域の推進方策について、「これまでの学術の体系や方向を大きく変革・転換させることを先導する」観点から、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、今後実施する公募研究の役割を明確にすること。また、研究推進上の問題点がある場合や、国際的なネットワークの構築等の取組を行う場合は、その対応策や計画についても記述すること。

領域発足後、本領域が掲げる「拡大し変容するタンパク質の世界」の重要性は国内外でますます認識されるようになってきている。現在までのところ、計画研究を中心に、順調な成果があがり、領域の分野設定など適切だったと考えている。これまでの学術の体系や方向を大きく変革・転換するという観点から、学術変革(A)の研究プラットフォームを活用して、さらに領域内の交流を深めて、連携研究を推進するとともに、海外も含めた領域外との共同研究も推進していく。

さらに、以下の点に特に留意しながら領域を推進していきたい。

【1. 領域内連携の更なる促進】

(1) 共同研究： 領域設定前からの共同研究は当然のこと、領域発足をきっかけとした共同研究が多数産まれてきている。その中には、田口、永井、森という3つのラボ間での非典型的な翻訳に関する共同研究での論文 (**Fujino et al. eLife 2023**) に見られるように既に成果が得られた共同研究もある (**8. 研究組織の連携体制**に詳述)。密な共同研究以外でも、領域会議や若手ワークショップでの発表や班員間交流などをきっかけとした試料の提供や実験技術のノウハウの伝授などは枚挙にいとまがない。このような良い連携の雰囲気を維持、さらに加速するために残りの研究期間においてもより一層の交流の機会を設ける。特に、オンラインでのセミナー、若手ワークショップなどを通じて、若手も含めて一層の交流を深める。

(2) 情報共有： 拡大し変容するタンパク質の世界を開拓していく研究は、まだ特定の分野としては認知されていないが、今後の生命科学の発展を考える際に重要な分野となるであろう。関わる分野は多岐にわたっており、分子生物学、生化学、細胞生物学、構造生物学を軸としながら、さらにバイオインフォマティクス、1分子研究も含めた生物物理学なども重要な部分を占めるようになってきているので、領域内の連携を深めていく。

【2. 重点研究領域のさらなる強化】

拡大するタンパク質の世界を多面的に研究する際に必須だが、現状で国内の研究の厚みが十分でない領域がいくつかある。手法的には、ショットガンプロテオミクス、次世代シーケンサーを使用したリボソームプロファイリング、クライオ電顕などである。

本領域の申請時にも、上記分野が重要であるとの認識はあり、ある程度は注力していたが、今後、公募班も含めてさらに重点的に研究を強化する。これらに加えて、2021年のAlphaFold2公開に伴うタンパク質立体構造予測の革命を忘れてはならない。このタンパク質の立体構造に関する新たな常識についても計画班員でバイオインフォマティクスの専門家の太田を中心としてフォローしていき、新たなタンパク質世界の開拓に活用していく。

【3. 海外との連携・共同研究】

コロナ禍での領域発足ということもあり、これまでの領域活動にて海外との連携は活発とは言えなかった。今後、既存の共同研究に加えて、さらに新しい共同研究がスタートできるよう班員に働きかけていく。

関連して、最終年度の2024年9月には国際会議を計画している (International meeting on multifaceted protein dynamics、9月2日～5日、ザ・ルイガンズスパ&リゾート福岡。京都産業大学タンパク質動態研究所との共催)。現状の予定では、海外からのスピーカーを10人程度、国内のスピーカー20名程度を予定している。海外のスピーカーについては、この分野のトップの研究者に依頼を出し、快諾をもらいはじめている状況である。学会の規模としては参加者総数120名、ポスター50件程度を予定している。

【4. 若手育成】

本学術変革(A)研究では、コロナ禍が少し落ち着いた 2022 年 12 月に若手ワークショップを開催した。学生を含めた若手研究者の発表の機会とともに、極めてレベルの高い研究成果発表と、活発な討論の場となったので、今後も引き続き、毎年開催していく。若手の育成，新しい研究グループの支援は，本学術変革(A)研究の重要な使命であると認識している。

【5. 広報活動】

ニュースレターを既に 2 号発行し、今後も定期的に発行を続け、班員間の情報交換、領域外への広報活動を行う。さらにはウェブサイトも一層の充実を図って広報活動にも注力する。



領域ニュースレターの表紙

13 総括班評価者による評価

研究領域全体を通じ、総括班評価者による評価体制（総括班評価者の氏名や所属等）や本研究領域に対する評価コメントについて、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。

【総括班評価体制】

本領域の評価委員、海外アドバイザーは以下の通りであり、総括班会議、全体領域会議などで本領域の評価と助言をいただく体制となっている。

役割	代表者	所属・職名	総括班におけるおもな役割
領域評価委員	永田 和宏	JT 生命誌研究館・館長	領域の評価と助言
領域評価委員	吉田 賢右	京都産業大学・シニアフェロー	領域の評価と助言
領域評価委員	田中 啓二	東京都医学総合研究所・所長	領域の評価と助言
領域評価委員	米田 悦啓	医薬基盤 健康 栄養研究所・理事長	領域の評価と助言
海外アドバイザー	Richard Morimoto	ノースウェスタン大学・教授	領域の評価と助言
海外アドバイザー	Judith Frydman	スタンフォード大学・教授	領域の評価と助言

【総括班評価委員によるコメント】

永田 和宏（JT 生命誌研究館・館長、京都大学・京都産業大学名誉教授）

わが国の分子シャペロン、タンパク質フォールディング、タンパク質品質管理の研究分野は、前新学術研究「新生鎖の生物学（2014・2018）」（領域代表：田口英樹）が大きな成功をおさめ、世界的に見てもきわめてレベルの高い研究レベルを維持している。特に本研究班「マルチファセットプロテインズ」に入ってから、若手研究者と本領域において長年研究を続けてきた研究者との間の活発な議論、共同研究の推進によって、大きな成果が生まれつつある。

本領域の起点となった発見は、伊藤維昭による SecM による翻訳の一時停止に求められるが、翻訳自体が細胞の状態に応じて制御されるという観点から、世界的に新生鎖の生物学が爆発的な発展を遂げてきた。そんななかで日本の研究者は中心的な役割を担ってきたが、本研究班にはその中心的なメンバーが集結しており、研究代表者の田口による、目配りの行き届いた領域の運営によって、班員がそれぞれ有機的にかつ強い独自性を発揮して成果を生みだせる環境を構築している

タンパク質合成、タンパク質の動態に関して、これまでの教科書的な知識が根底から覆されるような成果が、この研究班から生まれつつあることが明らかである。ORF という概念を変えるような非典型的な翻訳が決して例外ではなく普遍的に起こっているという発見、それとともに、従来はノンコーディング RNA と処理されていた短鎖 RNA からも機能ペプチドが産生されているという発見、神経疾患における非典型的な翻訳の生理的意義、さらに翻訳が途中で停止した新生鎖に生理的機能があることの発見など、いずれもパラダイムシフトと呼ぶべき成果であり、今後のさらに大きな発展が期待される。全体として、申し分なく成果の上がっている研究班である。

吉田賢右（京都産業大学・シニアフェロー、東京工業大学名誉教授）

この学術変革（A）の3年間の活動によって、非典型的な翻訳の世界の理解がさらに広がりつつある。いくつかが印象的なことをあげれば、今までタンパク質をコードしていないだろうと予想されていた短い読み枠が実は翻訳されていて重要な機能を持っていること、リボソームトンネル内の翻訳遅滞は全生物で起きている現象で、N端近くの負電荷に富んだ残基部分では翻訳が途中で終わる可能性すらあるが、bulky 残基では起こりにくいこと、遅滞を次のタンパク質の翻訳の制御に使うシステムも全生物にありC端付近の数残基配列が重要であること、タンパク質をコードしていないと思われていたALSの繰り返し塩基配列から繰り返し配列を持つポリペプチドが合成されていること、その繰り返し塩基配列に結合するたんぱく質はALSの症状を軽減する可能性があること、ミトコンドリア外膜に間違っ

た小胞体タンパク質をミトコンドリア外膜に戻す機構があること、類似の機構が他にもあるらしいこと、などの発見がある。いずれの発見についても、その機構や広がりさらなる解明をこの事業の後半に期待する。

Richard Morimoto (ノースウエスタン大学教授)

領域代表の田口が参加した EMBOWorkshop on Protein Quality Control (2023年5月21-26日)にて30分ほどの時間をいただいて領域の概要を説明した上で、以下に記すコメントをいただいた。

「日本は由良隆(故人・京大名誉教授)の大腸菌熱ショックタンパク質の研究以来、細胞内でのタンパク質研究に関して長い伝統がある。実際、日本の科研費研究で大成功を収めた「タンパク質の一生」というキーワードは、現状のプロテオスタシスの概念につながっている。そのコミュニティが少しずつ形を変えながら、継続しているのは素晴らしいことである。Multifaceted protein world の概念も時代を先取りしているし、多くの成果があがっていて応援したい。今後は、特に若手をエンカレッジすること、また、今以上に国際的なコミュニティの中に入って存在感を増していくのがよい。来年度開催予定の国際会議も海外の若手ポスドクなどを呼ぶことも検討するとよいだろう」