

領域略称名：非ドメイン生物学
領域番号：21A304

令和6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

「非ドメイン型バイオポリマーの生物学」

領域設定期間

令和3年度～令和7年度

令和6年6月

領域代表者 北海道大学・薬学研究院・教授・中川 真一

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	7

研究領域全体に係る事項

4	研究領域の目的及び概要	9
5	審査結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況	11
6	研究の進展状況及び主な成果	12
7	研究発表の状況	30
8	研究組織の連携体制	35
9	若手研究者の育成に係る取組状況	36
10	アウトリーチ活動に係る取組状況	37
11	研究費の使用状況・計画	38
12	今後の研究領域の推進方策	39
13	総括班評価者による評価	41

研究組織

(令和6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	21H05273 非ドメイン型バイオポリマー領域の組織運営	中川 真一	北海道大学・薬学研究院・教授	9
A01 計	21H05274 マウス変異体を用いた非ドメイン型RNAの生理機能解析	中川 真一	北海道大学・薬学研究院・教授	2
A01 計	21H05275 非ドメイン型タンパク質によるヌアージュ形成制御の遺伝学的解析	甲斐 歳恵	大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	1
A02 計	21H05276 非ドメイン型 lncRNA の機能獲得機構の解析	廣瀬 哲郎	大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	1
A02 計	21H05277 mRNA 非翻訳領域の非ドメイン型RNA配列の解析	稲田 利文	東京大学・医科学研究所・教授	2
A02 計	21H05278 Hero タンパク質の動作機構解明と神経変性疾患への適用	泊 幸秀	東京大学・定量生命科学研究所・教授	3
A02 計	21H05279 クマムシ特異的非ドメイン型タンパク質の探索と機能解析	荒川 和晴	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・教授	3
A03 計	21H05280 非ドメイン型バイオポリマーに関する分子修飾機構の解明	尾山 大明	東京大学・医科学研究所・准教授	3
A03 計	21H05281 非ドメイン型バイオポリマーの立体構造・相互作用解析	伊藤 拓宏	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー	2
A03 計	21H05282 非ドメイン型バイオポリマーの分子動力学計算	依田 隆夫	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授	3
総括班及び総括班以外の計画研究 計 10 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：X01

研究課題名：非ドメイン型バイオポリマー領域の組織運営

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	中川 真一	北海道大学・薬学研究院・教授	総括班の取りまとめ
分担	甲斐 歳恵	大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	若手育成担当
分担	廣瀬 哲郎	大阪大学・大学院生命機能研究科・教授	国際連携担当
分担	稲田 利文	東京大学・医科学研究所・教授	研究集会担当
分担	泊 幸秀	東京大学・定量生命科学研究所・教授	領域事務・企業連携担当
分担	荒川 和晴	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・教授	広報担当
分担	尾山 大明	東京大学・医科学研究所・准教授	技術支援担当
分担	伊藤 拓宏	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー	技術支援担当
分担	依田 隆夫	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授	若手育成担当
合計 9 名			

研究項目：A01 生理機能ユニット

研究課題名：マウス変異体を用いた非ドメイン型 RNA の生理機能解析

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	中川 真一	北海道大学・薬学研究院・教授	研究の立案と実施
分担	荒木 喜美	熊本大学生命資源研究・支援センター・教授	変異マウスの作製
合計 2 名			

研究項目：A01 生理機能ユニット**研究課題名：非ドメイン型タンパク質によるヌアージュ形成制御の遺伝学的解析**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	甲斐 歳恵	大阪大学・大学院生命機能 研究科・教授	研究総括・計画・遂行
合計 1 名			

研究項目：A02 細胞機能ユニット**研究課題名：非ドメイン型 lncRNA の機能獲得機構の解析**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	廣瀬 哲郎	大阪大学・大学院生命機能 研究科・教授	研究総括・計画・遂行
合計 1 名			

研究項目：A02 細胞機能ユニット**研究課題名：mRNA 非翻訳領域の非ドメイン型 RNA 配列の解析**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	稲田 利文	東京大学・医科学研究所・教 授	研究総括・計画・遂行
分担	今高 寛晃	兵庫県立大学・工学研究科・ 教授	試験管内翻訳再構成系を用いた解析
合計 2 名			

研究項目：A02 細胞機能ユニット**研究課題名：Hero タンパク質の動作機構解明と神経変性疾患への適用**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	泊 幸秀	東京大学・定量生命科学研 究所・教授	研究の遂行と取りまとめ
分担	森本 悟	慶應義塾大学医学部・特任 講師	病態モデルを使った研究の遂行
分担	築地 仁美	愛知学院大学大学院薬学研 究科・医療薬学専攻・教授	疾患モデルマウスを使った研究の遂行
合計 3 名			

研究項目：A02 細胞機能ユニット**研究課題名：クマムシ特異的非ドメイン型タンパク質の探索と機能解析**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	荒川 和晴	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・教授	研究の総括・ゲノム解析
分担	國枝 武和	東京大学・大学院理学系研究科・准教授	分子生物学・生化学解析
分担	田中 冨	自然科学研究機構生命創成探究センター・極限環境生命探査室・特任助教	クマムシを用いた遺伝子発現系の構築
合計 3 名			

研究項目：A03 分子機能ユニット**研究課題名：非ドメイン型バイオポリマーに関する分子修飾機構の解明**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	尾山 大明	東京大学・医科学研究所・准教授	分子修飾システム解析
分担	鈴木 健夫	琉球大学医学部・教授	RNA 質量分析
分担	秦 裕子	東京大学・医科学研究所・上席技術専門員	タンパク質質量分析
合計 3 名			

研究項目：A03 分子機能ユニット**研究課題名：非ドメイン型バイオポリマーの立体構造・相互作用解析**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	伊藤 拓宏	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー	立体構造・相互作用解析
分担	西増 弘志	東京大学・先端科学技術研究センター・教授	立体構造解析
合計 2 名			

研究項目：A03 分子機能ユニット**研究課題名：非ドメイン型バイオポリマーの分子動力学計算**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	依田 隆夫	東京大学・医科学研究所・教授	非ドメイン型バイオポリマーへの分子動力学計算の応用
分担	鄭 載運	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任技師	非ドメイン型バイオポリマー分子動力学計算の最適化
分担	譚 丞	国立研究開発法人理化学研究所・計算科学研究センター・特別研究員	非ドメイン型バイオポリマーの粗視化分子動力学計算
合計 3 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]
公	クマムシ由来非ドメインタンパク質の分子ネットワークの実体解明	令和4年度 ～ 令和6年度	矢木 真穂	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師	1
公	eIF3a 天然変性領域の種間多様性が生み出す学習・記憶制御機構の解析	令和4年度 ～ 令和6年度	椎名 伸之	大学共同利用機関法人自然科学研究機構(機構直轄研究施設)・生命創成探究センター・准教授	1
公	膜オルガネラ上で高次集合する非ドメイン型タンパク質の解析	令和4年度 ～ 令和6年度	持田 啓佑	東京工業大学・科学技術創成研究院・助教	1
公	セントロメア微小環境の形成における非ドメイン型 RNA の機能	令和4年度 ～ 令和6年度	野澤 竜介	公益財団法人がん研究会・がん研究所 実験病理部・研究員	1
公	DNA 削減を制御する非ドメイン型タンパク質の動作機構の解明	令和4年度 ～ 令和6年度	片岡 研介	基礎生物学研究所・クロマチン制御研究部門・助教	1
公	I 型 RNA ポリメラーゼがつくる非ドメイン型バイオポリマーの探索と機能解析	令和4年度 ～ 令和6年度	井手 聖	国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・助教	1
公	天然変性タンパク質による「ヒストン模倣」現象の作動原理の解明	令和4年度 ～ 令和6年度	高島 謙	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教	1
公	クロマチン構造に働きかける新奇非ドメイン型タンパク質 AHDC1 の細胞機能の探索	令和4年度 ～ 令和6年度	小布施 力史	大阪大学・大学院理学研究科・教授	1
公	ミジンコの性決定 RNA が多面的に機能する機構の解析	令和4年度 ～ 令和6年度	加藤 泰彦	大阪大学・大学院工学研究科・准教授	1
公	長鎖ノンコーディング RNA のメチル化による天然変性蛋白質の凝集抑制の分子機構	令和4年度 ～ 令和6年度	片平 正人	京都大学・エネルギー理工学研究所・教授	1
公	オーファン核内構造体を構成する RNA の包括的解析	令和4年度 ～ 令和6年度	木村 龍一	熊本大学・生命資源研究・支援センター・特任助教	1
公	非ドメイン型バイオポリマーを介した菌類ウイルス・宿主間の特殊な共生関係	令和4年度 ～ 令和6年度	本田 信治	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授	1

公	非ドメイン型バイオポリマーによるクロマチン制御と発がん機構の解明	令和4年度 ～ 令和6年度	西山 正章	金沢大学・新学術創成研究機構・教授	1
公	新規非ドメイン型ハブ分子と低分子化合物を用いた非膜オルガネラ間-遷移機構	令和4年度 ～ 令和6年度	矢野 真人	新潟大学・医歯学系・准教授	1
公	非ドメイン領域が組み替えるカスパーゼ反応場と・その非細胞死性の機能	令和4年度 ～ 令和6年度	篠田 夏樹	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教	1
公	核小体内凝集体 SPANCL を利用したゲノム構造変換と遺伝子発現誘導法の開発	令和4年度 ～ 令和6年度	安原 崇哲	京都大学・生命科学研究所・教授	1
公	ウイルスから紐解く非ドメイン生物学	令和4年度 ～ 令和6年度	加藤 哲久	東京大学・医科学研究所・准教授	1
公	液-液相分離を制御する非ドメイン型タンパク質の探索と単分子機能解析	令和4年度 ～ 令和6年度	鎌形 清人	岐阜大学・工学部・准教授	1
公募研究 計 18 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。

【本研究領域の研究目的】

分子生物学には「RNA やタンパク質の機能はその配列によって決められており、重要な機能を持つ遺伝子の配列は種を超えて高度に保存されている」という基本的な考え方がある。ところが近年、生物学的に重要な役割を果たしているにも関わらず、種間で広く保存された機能ドメインを持たない RNA やタンパク質が、相次いで同定されている。その代表例が、核内の非膜オルガネラの骨格となる長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) 群、タンパク質を様々なストレスから保護する Hero タンパク質群、クマムシの極限環境耐性に関わる種特異的タンパク質群である。興味深いことに、これらの分子は共通して、強固な構造を取りにくいと予測される配列を、全長にわたって持っている。そのような性質を持つ分子は、進化の過程で特定の構造を保つ必要性が低かったために、配列が高度に保存されてこなかったものと考えられる。また、Hero タンパク質の中には、アミノ酸の組成を保ったまま、配列をランダムにシャッフルさせても、活性が保たれるものさえ見つかっている。配列への機能依存性が低い遺伝子は、変異への耐性が高く、モデル生物の強力な順遺伝学的手法を用いても、同定が困難であったに違いない。これらの事実は、ゲノムの中には、配列への依存性を高めずに機能を進化させてきた未同定の遺伝子が、実は数多く存在している可能性を示している。そしてそれらの遺伝子産物は、特定の構造を取りにくいという柔軟な性質を利用し、配列が構造・機能を決定するというこれまでの分子生物学のドグマとは異なる、独自の機構で生理機能を発揮していることが予想される。本領域では、配列への機能依存性が低い RNA やタンパク質

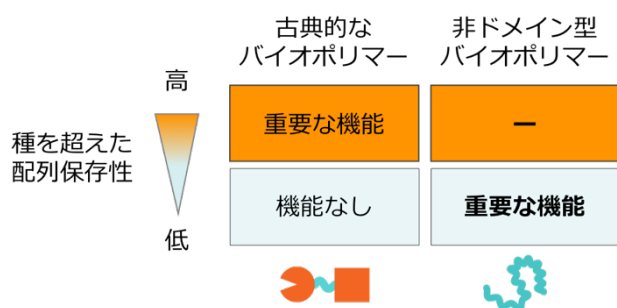


図1 本領域の基本コンセプト

これまでの分子生物学では、種を超えた配列保存性が高い分子ほど重要な機能を持つと考えられてきた。本領域では種間の配列の保存性が低く、分子機能が配列に強く依存しない「非ドメイン型バイオポリマー」に注目し、それらを利用した新規生体分子制御技術の創出を目指す。

てこなかった領域や、保存された配列や顕著な高次構造を持たずに機能する mRNA の非翻訳領域についても、新たな動作原理を提示することができる。また、非ドメイン型バイオポリマーの分子の柔軟性を積極的に利用することで、病原性凝集体の形成を制御する技術や、新規ストレス耐性を獲得した細胞を作出する技術の開発も期待できる。

以上、本領域では、種間で保存された配列を中心に進められてきた従来の分子生物学的アプローチに新たな視点を提供し、**配列への依存性を高めずに分子機能を獲得するというこれまで全く想定されていなかった生物の新たな機能獲得戦略を明らかにしつつ、新たな分子動作原理に基づく、画期的な生体分子制御技術を開発することを目的としている。**

質を総称して、**非ドメイン型バイオポリマー**と定義し、個体レベルでの生理機能の解明から原子レベルでの動作機構の解明まで、全階層横断的に解析を進める。そして、種を超えた配列の保存性に着目して進められてきた従来の解析では見落とされてきた、生物の新たな機能獲得戦略を明らかにする(図1)。本領域を推進することで、配列から機能を予測することが困難なために遺伝子名として番号や記号しかつけられてこなかった機能未知 lncRNA やタンパク質の分類が飛躍的に進むだけでなく、既知タンパク質が持つ内因性の天然変性領域のように明確な機能ドメインとして認識され

【本研究領域の全体構想】

非ドメイン型バイオポリマーの全階層横断的な解析を進めるために、本領域では個体レベルの解析を行う **A01 生理機能ユニット**、細胞レベルでの解析を行う **A02 細胞機能ユニット**、分子動作機構の解析を行う **A03 分子機構ユニット**の3つの研究ユニットを設置する（**図2**）。非ドメイン型バイオポリマーは非ドメイン型RNAと非ドメイン型タンパク質に大別されるため、個体・細胞レベルの各階層の解析ではそれぞれの分子を専門的に取り扱ってきた班員を配置している。一方で、典型的な非ドメイン型RNAである arcRNA などは、天然変性領域をもつタンパク質と分子集合体を形成することでその機能を発揮することが中川と廣瀬の研究から明らかとなっている。RNA分子は自由エネルギー的に同等に安定な複数の構造を取ることが多く、その柔軟な性質によってタンパク質の天然変性領域が仲介する多価の相互作用が働く足場を与えていることが予想される。故に、非ドメイン型バイオポリマーの機能を考える際、常に両分子の相互作用を考慮する必要がある。そこで、分子レベルの詳細な動作機構の解析を行う A03 ユニットには、RNAとタンパク質双方の分子を取り扱える班員をバランス良く配置している。A01 ユニットでは、領域で同定された非ドメイン型バイオポリマーの変異体を作製してその生理機能解析を行うほか、他ユニットと連携して新規非ドメイン型バイオポリマーの探索と個体レベルの機能解析を行う。

A02 ユニットでは、他ユニットに解析対象の非ドメイン型バイオポリマーに関する研究材料や情報を提供するほか、分子生物学的な手法を用いて非ドメイン型バイオポリマーの細胞レベルでの機能を明らかにし、領域における新規分子の同定において指導的な役割を果たす。A03 ユニットでは、配列への依存性の低い分子が機能を発揮する際の詳細な分子動作機構を解明するために、各種構造生物学的アプローチによる解析や、分子動力学計算による動態解析を行う。また、非ドメイン型バイオポリマーの一部は通常タンパク質と比較すると高度に分子修飾を受けていることが泊と尾山の予備的な実験から明らかとなっており、高感度質量分析を用い、特徴的な分子修飾の解析を進める。

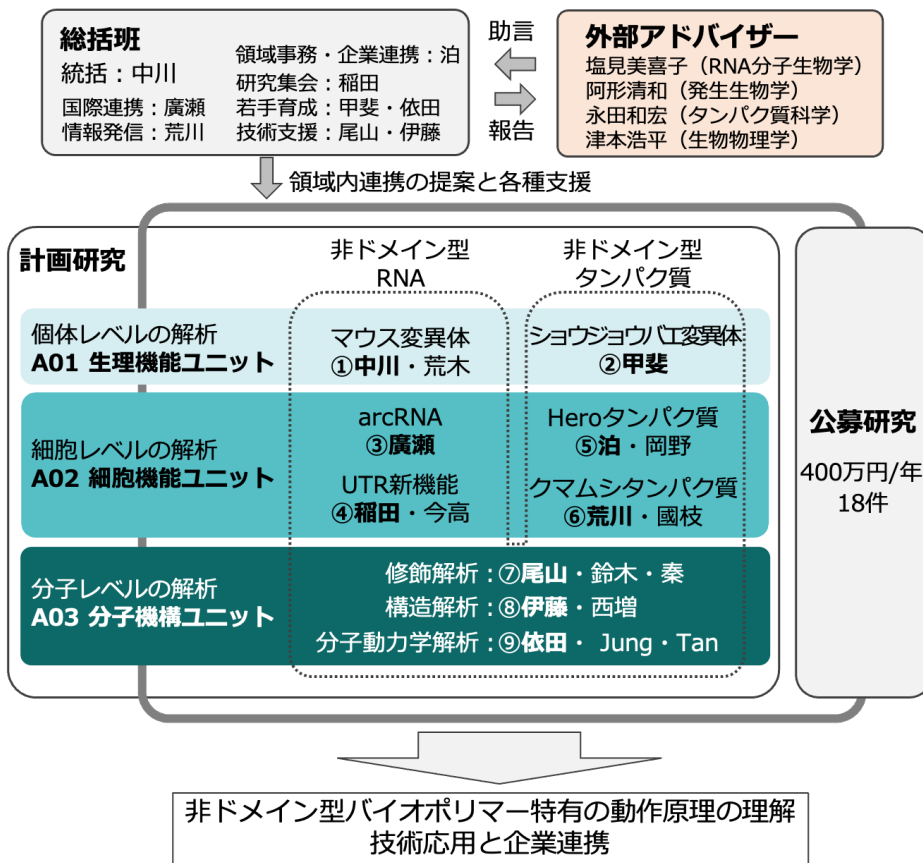


図4 本領域の連携体制と構成員

以上の領域研究を効率的に推進するために、総括班も設置する。総括班は領域内共同研究の提案を積極的に行い、領域全体の研究のマネジメントを行う。また、領域内外の連携のための旅費や滞在費の支援を行うほか、公募班を含めた班員を対象とした技術講習会の開催、海外学術会議への派遣や研究会議開催支援による若手育成と国際交流、領域ホームページならびに公式 SNS の開設と運営を中心としたアウトリーチ活動も行う。さらに、領域で得られた知見を技術応用へ展開するために関連企業との連携を提案する。

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。

審査結果の所見は以下の通りであり、具体的な指摘事項に該当するものはない。研究計画書に沿って領域内の連携を密に取りながら、非ドメイン型バイオポリマーの機能を階層横断的に明らかにするとともに、新規機能性の非ドメイン型バイオポリマーの同定を進めることとした。

(審査結果の所見)

近年、種間で保存された機能ドメインを持たず、特定の構造をとらないタンパク質やRNAが重要な機能を持っていることが分かってきた。本研究領域ではこのようなタンパク質やRNAを非ドメイン型バイオポリマーと定義し、これらの分子が機能を発揮する基本原理の解明を、分子、細胞、個体レベルからの解析により行おうとしている。特に、構成員の発見した非ドメイン型ポリマーである arcRNA、そしてこの RNA と非ドメイン型のタンパク質から成る非膜系複合体、さらには構成員の見つけた他の非ドメインから成るタンパク質の解析などは世界をリードしており、優れた成果が期待される。

本研究領域は、各計画研究が密接に関連するよう組み立てられており、分子の解析は実験科学と分子動力学によるシミュレーション、さらにその機能を細胞・個体レベルで明らかにすることを目指している。また、構成員の発見した既知の分子に留まらず、新たな非ドメイン型ポリマーを細胞内から網羅的に取得しようとするものであり、これらの研究から、非ドメイン型ポリマーの細胞内機能の発揮の共通原理の解明が期待される。

6 研究の進展状況及び主な成果

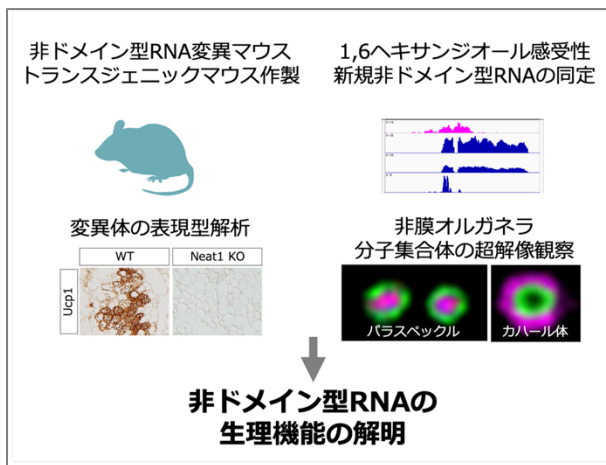
- (1) 及び (2) について、計画研究及びそれと連携している公募研究ごとに、具体的かつ簡潔に記述すること。(一つの計画研究及び連携する公募研究で2頁以内)
- (1) 領域設定期間内及び中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価実施時までにはどこまで研究が進展しているのか
- (2) 各計画研究で得られた成果、及びそれぞれの計画研究と連携している公募研究で得られた成果について、(計画研究・連携する公募研究の順で記載すること。なお、本研究領域内の共同研究等による成果の場合はその旨を明確にすること。)

研究項目 A01 生理機能ユニット

計画研究① マウス変異体を用いた非ドメイン型 RNA の生理機能解析

研究代表者：中川 真一 / 研究分担者：荒木 喜美

(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



本計画研究では、新規非ドメイン型バイオポリマーの生理機能を明らかにすることを主要なミッションとしている。具体的には、領域内で同定した非ドメイン型バイオポリマーの変異マウスを作製し、表現型を解析して生理機能の有無を調べるほか、その表現型に至る分子機構を明らかにすることを目指している。中間評価実施までに、計画研究⑤の泊が同定した新規非ドメイン型タンパク質6種類について変異マウスを作製し、そのうちの少なくとも2種類が胎生致死の表現型を示すことを新たに見出したほか、小胞体に局在する新規非ドメイン型膜貫通タンパク質 UGS148 の変異マウスを作製し、この遺

伝子はマウスの生存には必須ではないことを示した (Takahashi *et al. Genes Cells* 2022)。さらに、計画研究④の稲田が同定した dORF の翻訳産物を検出するための FLAG タグノックインマウスを作製したほか、計画研究⑤の泊が同定した Hero11 の病原性凝集体抑制効果を調べるためのトランスジェニックマウス、および、計画研究⑥の荒川が同定したクマムシ特異的小胞体タンパク質の細胞保護効果を調べるためのトランスジェニックマウスを作製した。現在、これらの変異マウスの表現型解析および分子機能解析を進めている。また、6番染色体と8番染色体には1,6ヘキサンジオール感受性の機能未知の非ドメイン型RNAを産生する巨大な遺伝子クラスターが存在することを見出していたが、それらの変異マウスを作製し、表現型解析を行った。その結果、8番染色体の欠損変異体は見かけ上大きな異常を示さないものの、6番染色体の欠損変異体は着生直後に胎生致死となることを明らかにした。さらに、この6番染色体のクラスターの詳細な表現型解析を行い、選択的スプライシングの制御という、予想外のノンコーディングRNAの新機能を明らかにすることができた (Yoshimoto *et al. Mol Cell* 2023)。

また研究計画書を提出した時点の予備的な解析において、計画研究③の廣瀬が同定した *Neat1* の変異マウスが低温環境への応答異常を示すこと、計画研究⑤の泊が同定した超天然変性タンパク質 Hero11 の変異マウスが胎生致死になることが分かりつつあり、これらの表現型に至る分子機構を明らかにすることも目標としていた。中間評価実施までに、寒冷刺激時における *Neat1* 変異マウスの詳細な表現型解析と分子機能解析を行った (Toya *et al. RNA* 2024) ほか、Hero11 が核小体に局在し、各種核小体タンパク質の細胞内動態を制御していることを見出している (岡部ら・RNA学会口頭発表・2023)。

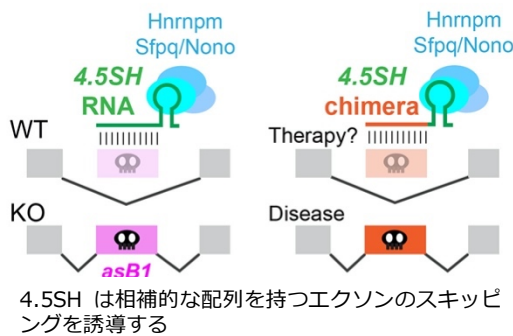
これら変異マウスを用いた解析に加え、これまでに確立してきた超解像観察技術を活かし、非ドメイン型バイオポリマーが濃縮する非膜オルガネラの超解像イメージング技術を確認し、領域に普及させる

こともミッションに掲げていたが、計画研究③の廣瀬による非膜オルガネラのコンパートメント形成機構を明らかとした論文 (Takakuwa *et al. Nat Cell Biol* 2024) にこれらの技術を活かすことができた。

(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 (本計画研究の成果)

ノンコーディング RNA の新機能の発見 (Yoshimoto *et al. Mol Cell* 2023)

4.5SH は 6 番染色体に巨大な遺伝子クラスターを形成するマウス亜目特異的なノンコーディング RNA であり、その塩基配列は 1979 年にすでに決定されていたものの、機能は長らく不明であった。本計画研究によって、4.5SH クラスターを欠損するマウスは着生直後に胎生致死となること、また、4.5SH はマウスが持つ内因の致死性エクソンをスキッピングさせる活性を持ち、いわば天然の遺伝子治療薬のように働くことでマウスの生存を支えている極めて重要な遺伝子であることが明らかとなった。また、4.5SH の標的認識配列を改変することで、任意のエクソンをスキッピングさせる人工キメラ RNA を作製すること



に成功し、異常エクソンが原因となる遺伝病に対する新たな核酸医薬の開発が可能となった。本研究において、計画研究⑦の尾山は 4.5SH のエフェクターの分子の同定のための質量分析解析を、計画研究③の廣瀬はメカニズム解明のための RNA 結合タンパク質繫留システムの提供を行った。本発見は内在性ノンコーディング RNA が選択的スプライシングを制御していることを明確に示した初めての例であり、日経サイエンスや News Picks などの一般メディアにも取り上げられた (左図)。

Neat1 が骨格となる核内構造体パラスペックルの生理機能の解明 (Toya *et al. RNA* 2024)

Neat1 は核内構造体パラスペックルの骨格として働く lncRNA として計画研究③の廣瀬が同定した lncRNA であるが、変異マウスは外見上の異常を示さず、メスマウスにおいて黄体形成不全による妊孕性の低下が見られるものの、その表現型の浸透率は 50%程度で、分子機能の解明が困難であった。今回新たに Neat1 変異マウスが表現型を示す生理的なストレス条件を探索した結果、低温耐性能が低下すること、寒冷刺激時に誘導される熱産生細胞であるベージュ細胞の分化に異常が見られることが明らかとなった。また、ベージュ細胞の分化時に発現変動する遺伝子は染色体上でクラスターを形成しており、それらが寒冷刺激時にパラスペックルに近づいてくることがわかった。これらの結果から、非ドメイン型バイオポリマーが形成する典型的な核内構造体であるパラスペックルは、核内におけるダイナミックな構造変化を引き起こすことで細胞分化をコントロールしている可能性が示された。

その他

長寿かつ腫瘍耐性という特徴的な性質を持つハダカデバネズミにおける Neat1 の詳細な発現解析を行い、Neat1 およびパラスペックル構成タンパク質は種間で異なる発現パターンを示すこと、パラスペックルの形成には種によって異なるタンパク質が関わっていることを明らかにした (Yamada *et al. RNA* 2022)。また、新規膜貫通型非ドメインタンパク質である UGS148 の変異マウスの解析を行い、この遺伝子がマウスの生存には必須ではないことを見出した (Takahashi *et al. Genes Cells* 2023)。その他、Neat1 および Malat1 の変異マウスを海外の研究者に提供し、複数の国際共同研究を行った (Zhao *et al. Nat Commun* 2024, Azam *et al. PNAS* 2024, Wu *et al. Mol Ther* 2022, Park *et al. Cell Metab* 2021)。

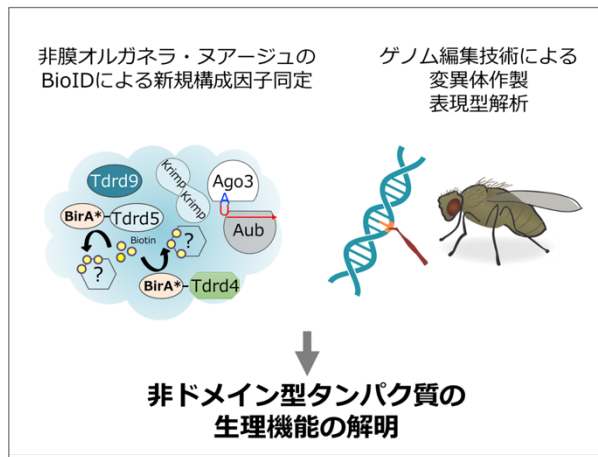
(連携する公募計画研究の成果)

公募研究の椎名は神経細胞の RNA 顆粒を形成する RNA 結合タンパク質 NFAR2 の生理機能を変異マウスを用いて解析し、長い天然変性領域を有する NFAR のスプライシングアイソフォームが恐怖関連の記憶形成において重要な役割を果たしていることを明らかにした (Yamashita *et al. iScience* 2023)。本計画研究は NFAR の天然変性領域を特異的に欠損する変異マウスを作製して提供した。

計画研究② 非ドメイン型タンパク質によるヌアージュ形成制御の遺伝学的解析

研究代表者：甲斐 歳恵

(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



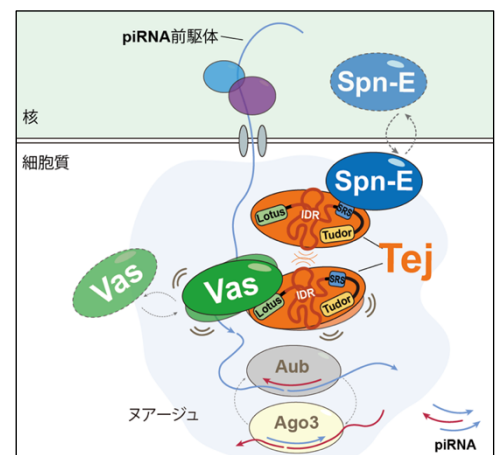
本研究課題では、泊によって報告されたショウジョウバエの Hero タンパク質の変異体を作製して表現型解析を行うほか、國枝が見出したクマムシ特異的な超天然変性タンパク質を過剰発現するトランスジェニック個体を作製し、環境耐性に変化が見られるかを検討した。また、甲斐自身が長年取り組んできた小分子 piRNA 生合成の場であり、非ドメイン型バイオポリマーが多数濃縮する非膜オルガネラ・ヌアージュの機能を非ドメイン型バイオポリマーが働く場として捉え、その構成成分の同定と機能解析を行った。RNA ヘリカーゼである Vasa や、Tudor ドメインタンパク質群はヌアージュの形成に必須であり、

特に Vasa の N 末端側の天然変性領域がその機能に必要であることが明らかとなっているが、その動作原理の詳細は不明である。天然変性領域は多数の弱い相互作用を介して分子集合体を形成することが知られており、通常の免疫沈降では検出できない分子と複合体を形成しているという予備的な結果も得ていた。そこで、一時的な結合もしくは弱い結合因子を同定するために開発された近位依存性ビオチン標識 (BioID) 法を用い、中間評価実施時までには、ヌアージュ構成因子と相互作用する新規因子を同定し、その解析を進めた (一色ら・分子生物学会年会口頭発表・2023; 投稿準備中)。また、既知のヌアージュ構成因子を詳細に解析し、ヌアージュ形成における分子機能や、それらの天然変性領域についても部分欠失変異体を作製するなどして、その生理機能の解明に取り組んだ。その結果、Tudor ドメインタンパク質である Tdrd1 は非膜オルガネラ・ヌアージュの構成因子であることや piRNA の産生に寄与することを明らかにした (Lim *et al. Front Mol Biosci* 2022)。また、甲斐らが以前報告した、Tudor ドメインと、Vasa と相互作用することが知られている LOTUS ドメインの両方を持つ、ヌアージュの構成因子である Tej が、それぞれ異なる領域で Spn-E と Vasa の 2 つの RNA ヘリカーゼと相互作用しそれらをヌアージュヘリクルートすることを明らかにした。Tej はこれらの相互作用によってヌアージュの核として piRNA のプロセシングの場を形成し、piRNA の前駆体をヌアージュヘリクルートすることを見出した (Lin *et al. J Cell Biol* 2023)。

(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 (本計画研究の成果)

Tej は非膜オルガネラ・ヌアージュ形成の核として機能する (Lin *et al. JCB* 2023)

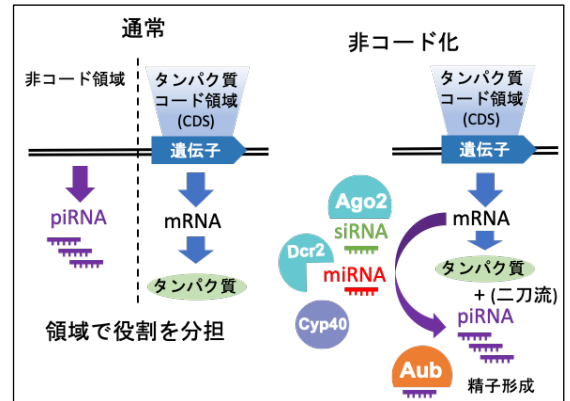
Tudor ドメインとは、メチル化ヒストンやメチル化 Piwi タンパク質を認識し、結合するタンパク質に見られる 50 アミノ酸残基からなる保存されたモチーフである。興味深いことに多くの Tudor ドメインタンパク質は生殖細胞に強く発現し、piRNA 産生の場として機能している非膜オルガネラ・ヌアージュに局在する。Tudor ドメインタンパク質の 1 つである Tejas (Tej; Tdrd5 のハエホモログ) は、2009 年に甲斐らによって報告されていたが、その分子機能は長らく不明であった。Tej は、ヌアージュの構成因子でもある 2 つの RNA ヘリカーゼである Vasa、SpnE とそれぞれ LOTUS と SRS という別個のモチーフを通じて相互作用し、その 2 つのタンパク質をヌアージュヘリクルートしてい



ることを明らかにした。またそれらのヌアージュへのリクルートは、piRNA 前駆体をヌアージュへリクルートするために必須であることや、Tej の非天然編成領域(IDR)が Vasa のヌアージュへの局在と乖離、すなわちダイナミクスを制御し、piRNA のプロセッシングに貢献していることなども見出した。すなわち、Tdrd5 は、ヌアージュ形成と piRNA 前駆体のプロセッシングの中核を担う因子として機能していることが明らかとなった。

タンパク質をコードする RNA から非コード piRNA が生み出される現象を発見 (Iki et al. *Sci Adv* 2023)

ショウジョウバエの精巣生殖細胞のヌアージュで産生される piRNA の中に、タンパク質コード領域の RNA からプロセッシングされるものを見出し、CDS-piRNA と名付けた。すなわち、コード RNA から非コード RNA が産生される「非コード化」現象を見出した。CDS-piRNA の産生は特定の miRNA によって惹起されること、および非コード化により産生される CDS-piRNA がクロマチン制御やスプライシング因子を制御し、精子形成時における遺伝子発現制御に関与していることを明らかにした。



その他

Tdrd1 タンパク質はヌアージュに局在するが、PIWIファミリータンパク質欠損体などでは、その局在が失われる。また、Tdrd1 欠損変異体の卵巣や精巣では piRNA が減少することなどから、Tdrd1 は、piRNA 経路をより堅固にするために補助的に機能していることを明らかにした (Lim et al. *Front Mol Biosci* 2022)。また、領域内の稲田との共同研究によって、RNA の一次配列に依存しない、終結因子のメチル化による翻訳終結の生体内での制御機構を明らかにした。翻訳終結因子・eRF1 が効率よくペプチド合成を終結させるためには、in vitro や酵母、培養細胞等の研究により、保存されたグルタミン残基がメチル化されていることが必要であると知られていたが、生体内でその機能は確認されていなかった。ショウジョウバエ生体内で、このメチル化を行うメチル化転移酵素・HemK2 の機能を阻害すると、翻訳終結の阻害によりタンパク質合成が減少し、かつ mRNA レベルも著しく低下していることが明らかとなった。この翻訳終結阻害による mRNA の減少は、リボソームの停滞によって引き起こされることを見出した (Xu et al. *Development in revision*)。また、國枝らによって報告された、放射線や活性酸素などから DNA を保護するクマムシ特異的 DNA 結合性非ドメイン型タンパク質・Dsup を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作成した。ショウジョウバエ生体の組織でも Dsup タンパク質は DNA 上に局在し、ショウジョウバエ DNA への結合能が示唆された。しかしながら、Dsup タンパク質によるガンマ線照射や熱処理による DNA 損傷の減弱は観察されず、Dsup の生体内での機能解析にはさらに検討が必要である (領域会議口頭発表・甲斐・2022)。

(連携する公募計画研究の成果)

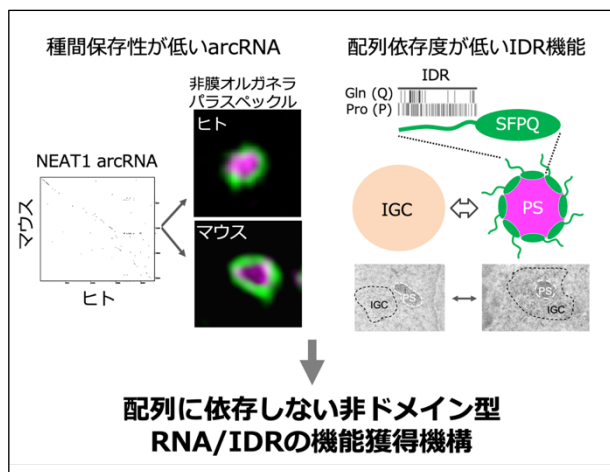
公募研究の木村らが開発した、光活性化プライマーを利用する微小構造体を集積する RNA トランスクリプトーム解析技術を用いて、上述したヌアージュ形成の核となる Tej タンパク質の分子機能をさらに詳細に解明を進めつつある。具体的には Tej による 2 つの RNA ヘリカーゼ・Spn-E と Vasa のリクルートにそれぞれ必要な領域や、Vasa のダイナミクスを制御している天然編成領域を欠損した Tej 変異体のヌアージュに集積する RNA を PIC で解析し、Tej が関与する piRNA プロセッシングのステップの解析を行っている (領域会議口頭発表・甲斐・2023)

研究項目 A02 細胞機能ユニット

計画研究③ 非ドメイン型 lncRNA の機能獲得機構の解析

研究代表者：廣瀬 哲郎

(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



アーキテクチャル lncRNA (arcRNA) は、天然変性領域 (IDR) を持つタンパク質を集約して細胞内相分離を誘発し、非膜オルガネラの形成を主導している。これらの非膜オルガネラはヒトとマウスで共通の微細内部構造を持っており、その構成タンパク質の配列も種間で高度に保存されている。にもかかわらず、非膜オルガネラの骨格を提供する arcRNA の配列の保存性は著しく低い。そこで、種間で保存されていない arcRNA 配列が共通のオルガネラ構造を形成する機構を、各種変異を導入した細胞を用いて明らかにすることを目標にして研究を実施した。また arcRNA に結合した IDR タンパク質が、アミノ酸配列に依存せずオルガネラの物性を決定する機構についても取り上げ、arcRNA と IDR という二つの代表的な非ドメイン型バイオポリマーが配列に依存せず機能を獲得するための条件を同定することを目標とした。また、新たな非ドメイン型 RNA を様々な生物種で探索し、配列非依存的な機能獲得ルールを解明するほか、配列非依存的に機能獲得する arcRNA と IDR の作用基盤を確立するために、超解像イメージング、分子動力学計算、Cryo-ET による構造解析を領域内での連携で実施することを目指した。

中間評価実施時までの進捗状況としては、まず種間保存性の低い arcRNA の解析については、ヒトとマウス間で一次配列の保存性が低いにも関わらず、同じタンパク質を集約してシェル-コア内部構造をもつパラスペックルを形成できる NEAT1_2 arcRNA を解析している。これまでパラスペックル形成を担う RNA 領域の解析が進んでいるヒト NEAT1_2 と、今回新たにマウスの Neat1_2 の必要領域がどのような関係にあるかを解析するために、マウス Neat1_2 の CRISPR 変異解析系の整備を進めた。そのために、Neat1_2 を 1 コピーだけ有する細胞株を樹立するため、CRISPR で片方コピーの NEAT1_2 を欠失させたマウス細胞株を樹立した。今後この細胞株を用いて Neat1_2 のパラスペックル形成の必要配列に関する情報を収集する予定である。一方 arcRNA と IDR タンパク質による非膜オルガネラの物性の決定については、パラスペックルと核スペックル (IGC) の独立性を指標に、それを規定する機構を解明し論文発表した (Takakuwa et al. *Nat Cell Biol* 2023)。

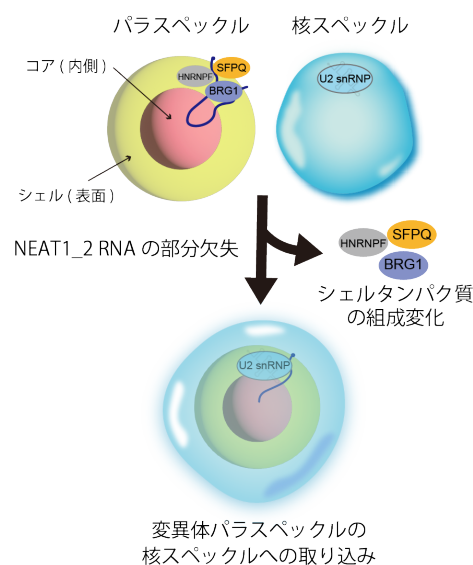
また、新たな非ドメイン RNA の探索についても、独自の難抽出性 RNA-seq 法を駆使して多種多様の arcRNA 候補を取得し、2 報の論文を発表した (Zeng et al. *Nucleic Acids* 2023, Iwakiri et al. *RNA* 2023)。この他の予想外の展開として、ヒトゲノムのサテライト III 領域から熱ストレス時に発現誘導される非ドメイン型 HSATIII RNA の新機能の発見があった。HSATIII RNA は、これまで核内ストレス体という非膜オルガネラの arcRNA としての機能が知られていたが、今回、ストレス回復期になると、この HSATIII RNA が核から細胞質に輸送されて翻訳され、奇妙なりピート配列タンパク質 (HSATIII タンパク質) を合成することが明らかになった。そこで、HSATIII タンパク質を新しい非ドメイン型タンパク質として捉え、その機能解析を実施し、~30kDa の複数タンパク質の混合体として合成されること、ストレス顆粒因子の RNA 結合タンパク質やシャペロンと相互作用することを明らかにした。

(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

(本計画研究の成果)

非ドメイン型 arcRNA と IDR タンパク質による非膜オルガネラの独立性維持機構の解明 (Takakuwa et al. *Nat Cell Biol* 2023)

NEATI_2 lncRNA を骨格に形成されているパラスペックルが、核スペックルという別の非膜オルガネラから独立して存在する機構を解明した。まず *NEATI_2* の CRISPR 部分欠失変異体で形成されるパラスペックルが核スペックル内に取り込まれてしまう表現型を起点として、その *NEATI* 欠失領域に相互作用し、さらにテザリング系によってパラスペックルを核スペックルから分離させる活性をもつ因子として SFPQ, HNRNPF, BRG1 を同定した。そのうち、SFPQ の分離活性には N 末端の IDR 領域が必要で、その領域のプロリンとグルタミンの含有量が重要であることを明らかにした。一方で、相反する活性としてパラスペックルの核スペックルへの取り込みを促進する因子として U2 snRNP を同定した。U2 因子を野生型の *NEATI_2* 上に係留すると野生型パラスペックルでさえ核スペックルに取り込まれてしまうこと、逆に *NEATI* 変異細胞を U2 阻害剤で処理すると、変異パラスペックルが核スペックルから解離することを見出した。以上のことから、2つの非膜オルガネラは、*NEATI* 上に存在する RNA 領域をめぐって相反する2つの機構のバランスで独立性が保たれていることを明らかにした (右図)。



変異体パラスペックルの核スペックルへの取り込み
パラスペックルのシエルタンパク質の組成が核スペックルとの位置関係を決定する。

RNA の難抽出性を利用した新規非ドメイン型 lncRNA の同定 (Zeng et al. *Nucleic Acids Res* 2023; Iwakiri et al. *RNA* 2023)

非膜オルガネラの構造形成に関わる arcRNA は、共通して一般的な RNA 抽出法に対して著しい難抽出性を示し、熱や剪断力によって抽出できるようになる。この性質を利用して新規な難抽出性 RNA を次世代シーケンス解析で探索したところ、数多くの難抽出性 RNA がヒトゲノムから産生されており、またそれらが核内で非膜オルガネラを形成していることが観察された。今回、複数の癌細胞株で難抽出性 RNA-seq を実施し、1,000 種類を超える難抽出性 RNA を検出した。その中には、ヒトゲノム未注釈領域に由来する新規転写物が数多く含まれており、難抽出性であるがゆえに、これまで見逃されていた RNA が多数存在することが示唆された。次にストレス処理細胞で難抽出性 RNA-seq 解析を実施し、数多くのストレス応答性難抽出 RNA を同定した。その中からゲノム未注釈領域由来の新規転写物で、高発現量、難抽出性、血清飢餓ストレスで誘導される 350kb の長大な lncRNA を同定し、その lncRNA が核内で新規な構造体を形成していることを見出した。また、浸透圧または熱ストレス処理した細胞で難抽出性 RNA-seq を実施し、mRNA の 3'末端がリードスルーした多くの DoGs 転写物が難抽出性を示すことを明らかにした。これらの DoGs は各ストレス特有のセットで、高発現 DoGs の個別解析によって、これら非膜オルガネラ様構造体を形成していることを見出した。この成果は RNA 誌に掲載された。このことから、こうして新たに同定した難抽出性 RNA の多くは非ドメイン型 RNA と考えられる。

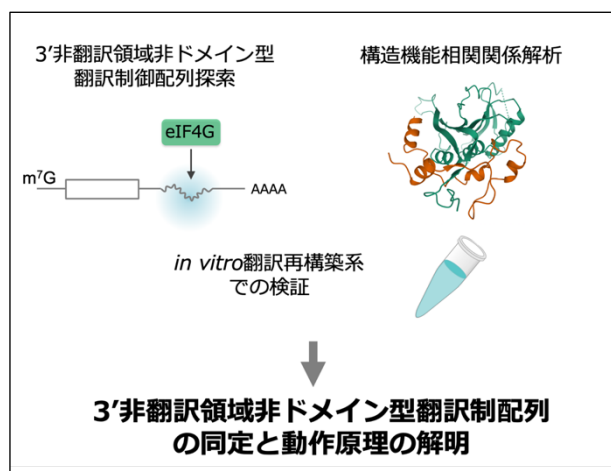
(連携する公募計画研究の成果)

計画研究 9 の依田との共同で SFPQ IDR のプロリンとグルタミンのリピートパターンを変化させた変異体の分子動力学解析を実施し、上記パラスペックル独立性維持活性と IDR 領域の動態の関連を示すデータを得た。公募研究 13 の井手が見出した新規 rDNA 領域由来の lncRNA が、当研究室で見出していた新規な RNA 依存的非膜オルガネラに共局在することが明らかになり、この非膜オルガネラの arcRNA である可能性が浮上した。公募研究 8 の木村が有する PIC 技術を用いて、arcRNA が未同定な非膜オルガネラに局在する RNA の探索を開始し、この前段階として 3'末端にポリ A 鎖を持たない RNA の検出法の開発に至った。

計画研究④ mRNA 非翻訳領域の非ドメイン型 RNA 配列の解析

研究代表者：稲田 利文 / 研究分担者：今高 寛晃

(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



近年、mRNA の 3'非翻訳領域に downstream ORF (dORF) が存在し、生理機能を担うことが明確になってきた。稲田は dORF の翻訳開始機構を解析し、eIF4G が直接 dORF を規定する配列に結合して翻訳を誘導することを見いだした (Nobuta *et al. Nucleic Acids Res* 2020)。そこで、独自に発見した、特に翻訳効率の高い dORF 規定配列の変異マウスを A01 ユニットと連携して作製し、その生理機能の解析をすすめることとした。中間評価実施時までには、dORF 規定配列にタグを付加した dORF の発現をウエスタン解析で試みたが、確認できておら

ず実験条件の改善が必要な状態である。また、dORF 規定配列は、ウイルスが持つ内部リボソーム結合サイト配列 IRES とは異なり、明確な保存配列や顕著な二次構造を持たない非ドメイン型 RNA である。そこで、より多くの dORF 規定配列をリボソームプロファイル情報から抽出する方法論を検討している。分担者の今高は、個別の dORF の翻訳開始について、翻訳系の試験管内完全再構成の最適化を行った。dORF などの非典型翻訳に対応する試験管内完全再構成系の最適化を行った。このシステムを利用し、C9orf72 遺伝子の非翻訳領域に存在する GGGGCC リピートの翻訳機構を解析した。GGGGCC リピートは所謂 RAN (Repeat-Associated Non-AUG)の一つであり筋萎縮性側索硬化症を引き起こすと考えられている。結果、GGGGCC リピートの翻訳は 5'キャップ構造に依存し、eIF2D や eIF2A といった特殊な翻訳開始因子を必要とせず基本的な翻訳因子だけで進行することがわかった (Ito *et al. Sci Rep* 2023)。稲田は、dORF の解析と並行して、mRNA 非翻訳領域由来の非ドメイン構造を持つ CAT テイルを産生する非典型翻訳反応である CAT テイル形成の分子機構の解析を進めた。翻訳品質管理 RQC において、衝突リボソームが強制的に解離される結果、異常新生タンパク質は 60S サブユニットに存在する。この 60S サブユニットに存在する異常新生タンパク質のカルボキシ末端に、アラニンとトレオニンからなる CAT テイル (C-terminal alanine-threonine tail) と呼ばれるタグ配列が mRNA 非依存的に付加される。以前稲田は、mRNA 非翻訳領域由来の非ドメイン構造を持つ CAT テイルが凝集体の蓄積を誘導すること、CAT テイル化タンパク質の蓄積が神経細胞障害の原因であること報告した (Udagawa *et al. Cell Rep* 2021)。通常の翻訳伸長反応では、リボソームの構造変化が常時行われており、翻訳伸長因子 EF-G による GTP 加水分解が転座反応に必要である。稲田は、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析と遺伝学的手法による機能解析によって、EF-G ではなく eIF5A が CAT テイル形成の促進因子としての役割を担うことを発見した (Tesina & Ebine *et al. Mol Cell* 2023)。CAT テイル形成は神経突起伸長を阻害し神経細胞死を誘導するが、反対に CAT テイル形成の不全は神経筋疾患との関連が示唆されている。CAT テイルの形成反応にどの tRNA が使用されるかを決定する分子機構の解明が今後の課題である。

(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

(本計画研究の成果)

HERO45/SERBP1 の RQC 抑制機能解析：非ドメイン型 HERO タンパク質の 1 つである HERO45 は、停止中の 80S リボソームに結合し、休眠中のリボソームを保護する SERBP1 と同一である。HERO45/SERBP1 によって、翻訳品質管理 RQC による衝突リボソームのユビキチン化と翻訳品質管理 NRD による停滞リ

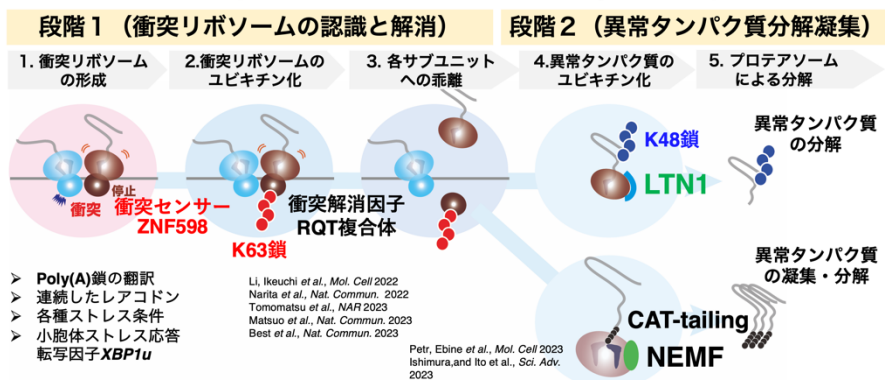
ボソームのユビキチン化が抑制されることが試験管内再構成で示唆された (Miścicka *et al. Nucleic Acids Res* 2023)。従って稲田は、培養細胞 HEK293 を用いて HERO45/SERBP1 が翻訳品質管理 RQC と NRD を抑制する分子機構と生理機能を解析している。これまでに、衝突リボソームを誘導するアニソマイシン処理時の uS10 のユビキチン化と停滞リボソームを誘導する eRF3 分解化合物処理時の uS3/uS5 のユビキチン化の定量を行ない、抑制効果を確認しつつある。さらに稲田は、HERO45/SERBP1 の機能解明の前提となる衝突リボソームを認識する翻訳品質管理 RQC と停滞リボソームを認識する翻訳品質管理 NRD の解明を進め、分子機構の理解が進んだ(Li *et al. Mol Cell* 2022; Narita *et al. Nat Commun* 2022; Tomomatsu *et al. Nucleic Acids Res* 2023; Matsuo *et al. Nat Commun* 2023; Ishimura and Ito *et al. Sci Adv* 2023)。また、中川と共同でリボソームに結合しない変異型 Hero45/Serbp1 の変異マウスを作製した。今後、その表現型解析を共同で行う予定である。

以下に代表的な論文の内容を記載する。

翻訳品質管理 RQC の分子機構の解明 : RQC は、衝突リボソームの認識と解消 (段階 1) と異常タンパク質分解経路 (段階 2) から構成される (図)。衝突リボソームセンサーである ZNF598 が、衝突リボソームの特異的構造を認識し、リボソームタンパク質の uS10 にポリユビキチン鎖を形成することを証明した(Matsuo *et al. Nat Commun* 2023)。

ユビキチン化リボソームを各サブユニットに解離する新規 RQT(RQC-trigger)複合体を同定し、RQT 複合体が、K63 型のポリユビキチン鎖(K63 鎖)依存に衝突リボソームを解離する反応を試験管内反応系で再構築し、これらの分子機構が哺乳類細胞にも保存されていることを示した(Narita *et al. Nat Commun* 2022)。高速 AFM を用いてユビキチン鎖の認識過程をリアルタイムで観察した(Matsuo *et al. Nat Commun* 2023)。RQT 複合体と衝突リボソームの構造解析に基づき、mRNA を牽引する力に依存した衝突リボソームの解離モデルを提唱した(Best *et al. Nat Commun* 2023)。

翻訳品質管理RQC (Ribosome-associated Quality Control)の分子機構



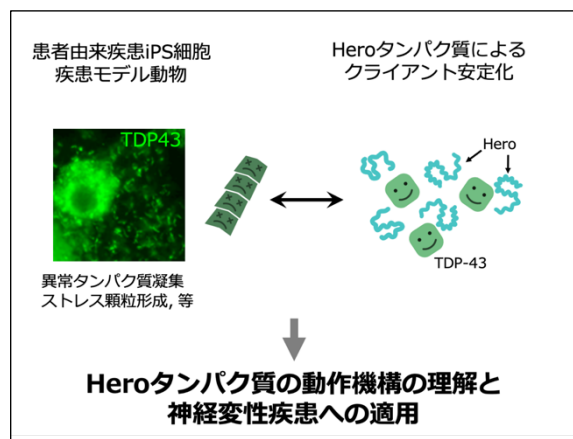
mRNA 品質管理 NGD の分子機構については、衝突リボソーム解消反応への依存性が異なる 2 つの分解経路 (RQC 依存 NGD と RQC 非依存 NGD) を明らかにした。衝突センサー Hel2 がユビキチン化する衝突リボソーム中のリボソームタンパク質(uS10 か eS7)に依存して分解経路が決定されるが、eS7 がポリユビキチン化されると衝突リボソームは解離せず、Cue2 が eS7 のポリユビキチン鎖を認識し、衝突リボソームの上流で mRNA を切断することを明らかにした (Tomomatsu *et al. Nucleic Acids Res* 2023)。

翻訳品質管理 NRD の解明:すべての生物種で保存されている 18S rRNA 内の塩基の置換変異により正確なコドン識別能を欠失したリボソームの品質管理 18S NRD を解析した。遺伝暗号解読活性を失ったリボソームが mRNA 上の開始コドンで停滞し、Mag2 と Fap1 という二つの因子が順に触媒する二段階の反応で uS3 のポリユビキチン化が起こることを見いだした(Li *et al. Mol Cell* 2022)。リボソームプロファイリング法とクライオ電子顕微鏡による構造解析の結果、Mag2 が翻訳速度の遅いリボソームに全般的に結合すること、Fap1 は単独で停滞したリボソームに結合することが明らかとなった (Li *et al., Mol Cell* 2022)。Fap1 がリボソーム上の mRNA の入口、出口それぞれと相互作用する構造を明らかにした。Fap1 が停滞リボソームを特異的に認識することが示唆され、停滞リボソームの認識機構が初めて明らかになった。

計画研究⑤ Hero タンパク質の動作機構解明と神経変性疾患への適用

研究代表者：泊 幸秀 / 研究分担者：岡野 栄之(R3年度)、森本 悟(R4年度～)、築地 仁美(R5年度～)

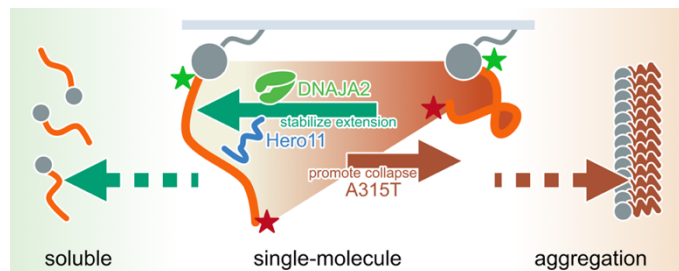
(1) 領域設定期間内及び中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価実施時までどこまで研究が進展しているのか



研究代表者の泊らが見いだした Hero タンパク質は、RNA サイレンシングの中核因子である Argonaute を初めとする 様々なクライアントタンパク質を保護し、TDP-43 をはじめとした神経変性疾患の病原性凝集体形成を強く阻害する活性を持つことが示されている (Tsuboyama *et al.* *PLOS Biol* 2020)。本計画研究では、生化学や生物物理学を駆使するとともに、領域内連携によって分子動力学計算などの多様な研究手法も積極的に取り入れ、Hero タンパク質によるクライアント保護機構の基本原理を解明する。また、CRISPR スクリーニングなどの分子遺伝学を活用して新規非ドメイン

タンパク質を探索・同定し、その生理機能を明らかにする。また、研究分担者の森本が持つ疾患 iPS 細胞ライブラリーや、築地が有する ALS モデルマウスを活用することにより、病原性凝集体の形成機構を解析するとともに、神経変性疾患における非ドメインタンパク質の役割を理解することを目指す。

泊は、中間評価実施時までには、ALS の病原性凝集体形成に関わる TDP-43 を、Hero クライアント分子のモデルとして用い、TDP-43 の C 末端に存在し凝集の「核」となると考えられている Prion-like Low Complexity Domain (LCD)の前後 2 カ所のアミノ酸に 2 つの異なる蛍光色素を部位特異的に導入し、その一分子 Forster 共鳴エネルギー移動 (FRET) を測定することに成功した。その結果、代表的な Hero タンパク質である Hero11 は、Hsp40 ファミリーに属する古典的なシャペロンである DNAJA2 と全く同様、TDP-43 の LCD の状態を伸長させる方向に大きく変化させることが明らかとなった。さらに、家族性 ALS 患者由来の病原性点変異を持つ TDP-43 点変異体(A315T)について同様の解析を行ったところ、その LCD は野生型と比較してよりコンパクトな構造を示すことが判明した。重要なことに、Hero11 および DNAJA2



はともに、このようにコンパクト化した変異体の LCD をも、大きく伸長させることができることが明らかとなった。これらの結果は、TDP-43 の巨視的な凝集形成およびその抑制効果と、一分子レベルでの LCD の状態変化を初めて結びつける重要な知見であり、現在、論文を投稿中である。

また泊は、CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーを用いた 2 段階のスクリーニングを通じて、細胞機能の維持に不可欠な超天然変性タンパク質群を包括的に同定することにも成功した。このうち代表的な 6 種類について、計画研究①の中川によってノックアウトマウスが新たに作成された結果、そのうちの少なくとも 2 種類が胎生致死となることが判明した。これは、非ドメインタンパク質の生理学的重要性を強く指し示すものである。

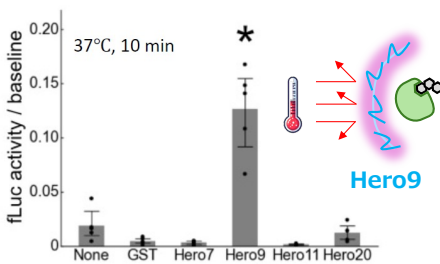
また、研究分担者の森本は、センダイウィルスベクターを使用した新しい迅速な運動ニューロン誘導方法を開発するとともに、IN Carta/SINAP プラットフォームを用いた深層学習による細胞内構造物の評価および細胞分類パイプラインの確立にも成功した。これらにより、運動ニューロンにおける非ドメインタンパク質の機能解析に向けて、健常者及び ALS 患者由来の iPS 細胞からの運動ニューロンの作製がこれまでよりも飛躍的に安定して可能となり、現在、論文を投稿準備中である。また、ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンにおいて、Hero11 を含む各種 Hero タンパク質をノックダウンすることにより、ALS 標的細胞における非ドメインタンパク質の病態生理機能を確認する系も確立した。さらに、研究分担者の築地は、計画研究①の中川と荒木によって作製された Hero11 の過剰発現マウスを用い、ALS 疾患モデルで

ある Q331K 点変異を持つ TDP-43 トランスジェニックマウスとの交配を行い、その表現型の検証を行っている。また、ALS の進行病態で見られる TDP-43 の細胞質への移行と強い凝集形成を表現する変異マウス (NEFT/TDPdNLS) の作成を進めているところである。

また泊は、計画研究⑨の譚と密接に連携し、分子動力学シミュレーションを用いた Hero11 による TDP-43 凝集抑制メカニズムの解析(Tang *et al. JACS Au* 2023)に貢献したほか、計画研究⑧の伊藤との共同研究を通じて、非ドメイン型バイオポリマーを多く含む piRNA 生合成の主要な細胞内反応場であると考えられているニューアージュや、ミトコンドリア外膜上に存在する piRNA 関連因子複合体について、クライオ電子顕微鏡やクライオ電子線トモグラフィーによる構造解析を進めている。

(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 (本計画研究の成果)

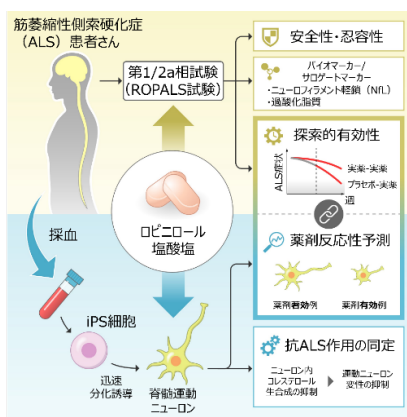
融合タグとしての Hero タンパク質のバイオテクノロジーへの応用 (Morimoto *et al., PLOS ONE* 2022)



泊らは、従来、組換えタンパク質として精製した Hero タンパク質を *in trans* で添加することによって、様々な酵素の活性を乾燥や有機溶媒などのストレスから保護することができることを示していたが(Tsuboyama *et al. PLOS Biol* 2020)、Hero タンパク質のアミノ酸配列と目的タンパク質を直接 *in cis* に融合させることによって、大腸菌における組換えタンパク質発現の質を改善できるだけでなく、精製後の組換えタンパク質の、熱や凍結融解、プロテアーゼ等

に対する耐性を大きく向上させることが可能となることを示した。これは融合タグとしての Hero タンパク質の有用性を示すものであり、バイオテクノロジーへの応用が期待できる。なお、Hero タンパク質については、2023 年 11 月に国内特許が成立している(特許 7380574)ことに加え、欧州においてもすでに登録査定が完了しており、現在米国における登録査定中である。

基礎-臨床的 ALS 病態改善効果の実証と総合的評価基盤の創出 (Okano and Morimoto *Cell Stem Cell* 2022, Morimoto *et al. Cell Stem Cell* 2023, Okano *et al. J Neurochem* 2023)



岡野らは、非ドメイン領域を有する Dopamine 2 Receptor を介して Ropinirole が TDP-43 の凝集・細胞内蓄積を阻害し、ALS 患者運動ニューロンの細胞死を抑制することを見出していたが (Fujimori *et al. Nat Med* 2018)、森本らはその薬剤を用いて治験を行い、実際の ALS 患者でも臨床改善効果を得られることを明らかにした。また、全被験者から iPS 細胞を樹立し、孤発性患者細胞における病態再現、治療効果、さらには臨床表現型・臨床的薬剤効果との相関まで確認することに成功した。この成果により、疾患標的ヒト細胞における非ドメインタンパク質の役割を総合的に評価できる基盤を構築することができた。

(連携する公募計画研究の成果)

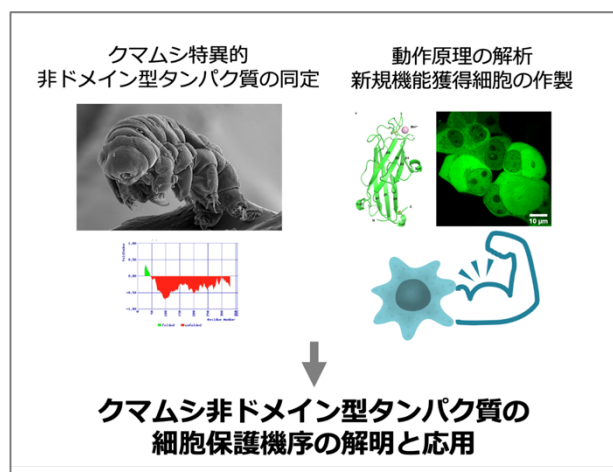
公募研究の木村らは、光活性化プライマーを利用して、細胞内の特定のコンパートメントの RNA を同定できる PIC 法を開発しているが (Honda *et al. STAR Protocols* 2023)、泊との共同研究により、非ドメイン型バイオポリマーを多く含む核膜周辺非膜構造体のニューアージュについて、PIC 法による解析を行ったところ、ニューアージュには通常の mRNA と比較してトランスポゾン由来の RNA が濃縮されており、特に piRNA 産生能が高いトランスポゾンの RNA がより高濃縮されているという非常に興味深い予備的結果を得ている。ニューアージュは、piRNA 生合成の主要な反応場であると考えられているものの、その直接的な「物的証拠」が得られたのは世界的にも初めてであり、今後 piRNA 関連因子の変異体等と組み合わせることにより、大きな成果が期待できる。

計画研究⑥ クマムシ特異的非ドメイン型タンパク質の探索と機能解析

研究代表者：荒川 和晴 / 研究分担者：国枝 武和

(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

クマムシの乾眠には多くのクマムシ特異的非ドメイン型タンパク質が関与し、乾燥時の細胞保護に関わっていると予想される。これは完全な脱水からの復帰を可能にするという意味で明快なフェノタイプを示すため、配列や構造と機能の関係が見出しにくい非ドメイン型タンパクにおける機能解明に特に有用な系であると言える (Arakawa *Annu Rev Anim Biosci* 2022)。そこで、これまでに同定してきたクマムシの非ドメイン型タンパク質を他のユニットに提供し、新たな耐性を獲得した個体を作製することができるか検証すると共に、それらの分子の構造・機能解析を行うことで、詳細な動作機構を明らかにすることを目標とした。



中間評価時までには、脱水ストレスに応じて可逆的に集合体形成する新規非ドメイン型タンパク候補 336 個を同定し (Tanaka *et al. PLOS Biol* 2022)、さらに、特に高発現な CAHS タンパクについて、繊維化を経て可逆的にゲル化を引き起こすことで細胞を防御していること (Yagi-Utsumi *et al. Sci Rep* 2021)、さらに、ゲル化によって細胞の硬化が起きること (Tanaka *et al. PLOS Biol* 2022) などを明らかにした。また、防御だけでなく修復時の影響をみるため、放射線照射後の時系列トランスクリプトーム解析を行い、141 個の変動遺伝子を見出し、さらにそのうちゲノム中に 35 コピーという並外れた

重複を見せる遺伝子について、公募研究の矢木らとの共同研究によるたんぱく質立体構造解析や生化学的解析によって、本非ドメイン型タンパクが新規のマンガン依存型ペルオキシダーゼ活性を持つことを見出した (Yoshida *et al. BMC Genomics* 2022)。本タンパクについては計画研究①の荒木とトランスジェニックマウスを作成し機能解析を進めている。また、異なる綱のクマムシにおいては他の非ドメイン型タンパクの多くがそうであるように、配列保存性のあるタンパクはほとんど見出されないものの、熱可溶性・脱水による構造変化・発現量などが CAHS と極めて類似する非ドメイン型タンパクを発見 (Murai *et al. BMC Genomics* 2021)するに至っている。

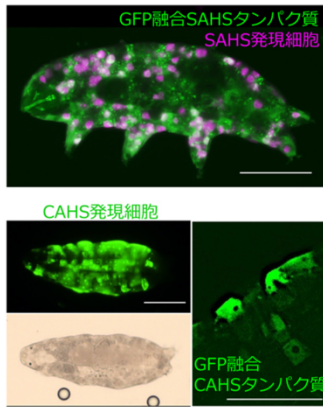
クマムシにおける分子生物学研究では、クマムシ自体を用いた実験ができず、他の生物の培養細胞などを用いなければならない点がボトルネックとなっていたため、本研究領域ではまず中間評価時までにはクマムシ自体で遺伝子操作を行う各種技術の開発を進め、新規のクマムシ *in vivo* 遺伝子発現技術 TardiVec を開発 (Tanaka *et al. PNAS* 2023) した他、DIPA-CRISPR によるゲノム編集が可能であることを確認した (Kumagai *et al. BBRC* 2022)。これにより、クマムシ内部で非ドメイン型タンパクの挙動をライブイメージングすることが可能になり、大きく研究が進展したと考えられる。一方で、クマムシの非ドメイン型タンパクの多くはクマムシ内で強い組織特異性を持つことも明らかになってきているため、細胞組織ごとの機能や役割の違いがあることも示唆されつつある。これらの知見や技術を活かしながら、他のクマムシ非ドメイン型タンパクについても機能や動作原理の解明を進めると共に、新規機能獲得細胞の作成を引き続き目指していく。

その他、領域内の技術支援として、公募班の井手が進めている新規 lncRNA 同定のためのナノポアシーケンサーを用いた配列解析を行ったほか、計画研究①の中川から委託を受けた発現プラスミド 25 種類について全シーケンスの配列の解析を行った。また、計画研究②の甲斐が作製したヌアージュ関連タンパク質変異体のメタボローム解析の支援を行った。

(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 (本計画研究の成果)

クマムシ in vivo 遺伝子発現系 TardiVec の開発 (Tanaka et al., *PNAS* 2023)

本研究では、クマムシに外来遺伝子を導入するために、クマムシのゲノムから各種の遺伝子の発現に必要な領域を抽出して、クマムシ特異的な遺伝子発現ベクターを新たに開発し、「TardiVec」と名付けた

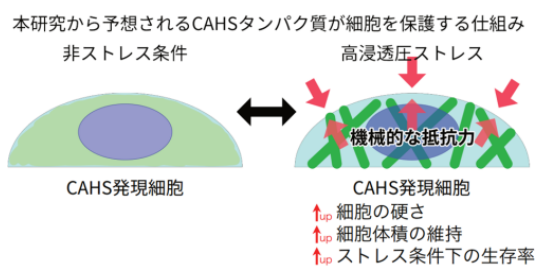


(図1)。マイクロインジェクションなどを用いてこれらをクマムシに直接導入したところ、クマムシ細胞内で発現ベクターが機能し、GFPなどの外来遺伝子が発現する。TardiVecは由来となる各遺伝子の発現組織も維持しており、この特性を利用して、クマムシ固有非ドメイン型タンパクが、クマムシの全身で等しく発現しているのではなく、組織特異的な発現パターンをもっていることを初めて示した。

本研究はクマムシ内でのライブイメージングを初めて実現したものであり、毎日新聞や読売新聞などの一般メディアにも取り上げられた他、筆頭著者の田中が本研究により NIKON JOICO AWARD を受賞した。

クマムシ固有非ドメイン型タンパク CAHS がストレス依存的に細胞を硬化していることを解明 (Tanaka et al. *PLOS Biol.* 2022)

クマムシの非ドメイン型耐性タンパク質の中に、脱水ストレスに応答して可逆的に集合体を形成するものがあるのではないかと予想し、クマムシの破碎液から脱水様のストレスに応答して可逆的に集合するタンパク質群を網羅的に分離する手法を新たに確立し、336種のタンパク質を同定した。このうち、



特に発現量の多い CAHS3 タンパクを発現する昆虫培養細胞株を作出したところ、集合体化を誘導する高浸透圧条件下では CAHS3 発現細胞がコントロール細胞よりも有意に細胞の硬さ(弾性率)が上昇していた。以上の結果は、CAHS3 タンパク質は細胞を物理的に強化し、高浸透圧耐性を向上させる可能性を示唆している。

その他

クマムシにおいて CRISPR-Cas9 によるゲノム編集が可能であることを確認した (Kumagai et al. *BBRC* 2022)。また、クマムシへの放射線照射後の時系列トランスクリプトーム解析により、クマムシがゲノム中に数十コピーという極端に冗長化した新規の非ドメイン型マンガン依存ペルオキシダーゼ AMNP を持つことが明らかとなった (Yoshida et al. *BMC Genomics* 2022)。

(連携する公募計画研究の成果)

公募研究の矢木らは CAHS1 タンパクが繊維化を経て可逆的にゲル化することを示した。(Yagi-Utsumi et al. *Sci Rep* 2021)。加えて、異クマムシにおける配列が保存されていないが、熱可溶性・脱水による構造変化・発現量などが CAHS と極めて類似する非ドメイン型タンパクの発見 (Murai et al. *BMC Genomics* 2021)、上述の AMNP の発見(Yoshida et al. *BMC Genomics* 2022)、さらに、非ドメイン型分泌タンパク SAHS の MD シミュレーションによる脱水時立体構造変化の予想 (Miyazawa et al. *J Phys Chem B* 2021) とリガンド予想 (Miyazawa et al. *J Phys Chem B* 2022) において構造生物学的実験で荒川らと共同研究を展開した。

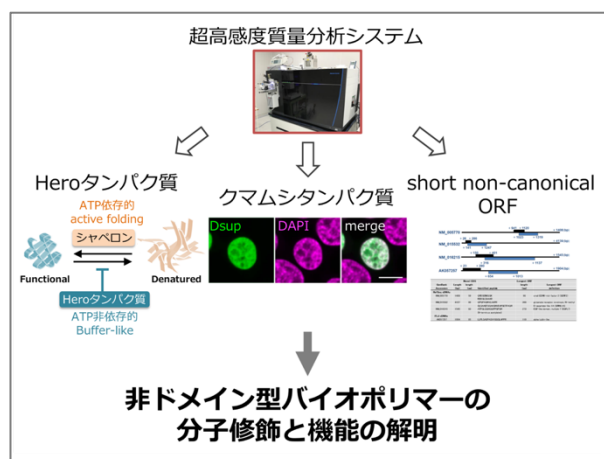
研究項目 A03 分子機能ユニット

計画研究⑦ 非ドメイン型バイオポリマーに関する分子修飾機構の解明

研究代表者：尾山 大明 / 研究分担者：鈴木 健夫・秦 裕子

(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

非ドメイン型バイオポリマーは多様な分子修飾による物性制御を介して柔軟な機能を発揮していると考えられるが、その動態に関する知見は皆無に近い状況である。超天然変性タンパク質として見出されたHeroタンパク質は、RNAサイレンシングのエフェクター複合体RISC (RNA-induced silencing complex) の形成を促進するだけでなく、各種タンパク質を乾燥や有機溶媒への暴露、熱変性などのストレスから保護する活性があること、筋萎縮性側索硬化症をはじめとする神経変性疾患で見られる病原性の凝集体



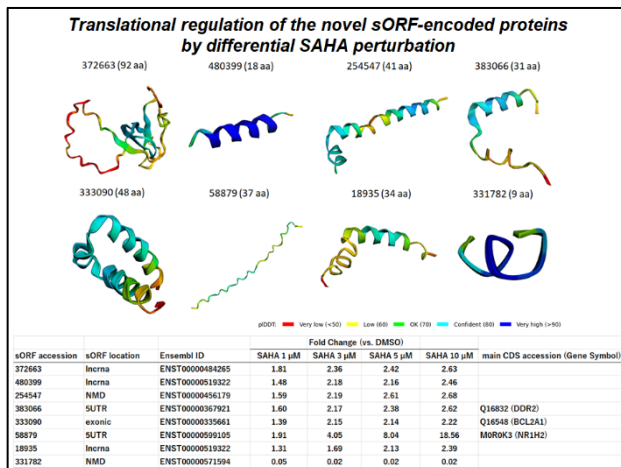
形成を強力に阻害すること、さらにはショウジョウバエの全身に発現させると寿命が40%近く延長するという顕著な生理的活性を有することも分かっている。計画研究⑤の泊との共同研究によって見出された上記のHeroタンパク質や計画研究⑥の荒川・國枝と共に解析を進めているクマムシタンパク質、あるいはarcRNAなどの非ドメイン型バイオポリマーに関して、超高度質量分析技術を駆使することにより包括的に翻訳動態・分子修飾制御や相互作用因子群を同定する測定系を構築すると共に、各修飾部位の役割について高精度定量解析を行い、非ドメイン型バイオポリマー特有の物性制御に果たす分子機

構を修飾部位レベルで精密に議論できる解析プラットフォームの確立を目指している。中間評価実施時までには、近年のリボソームプロファイリング技術によってRNA配列から大規模に見出されている非典型ORF群がコードする翻訳産物を大規模に検出するための高感度プロテオーム解析システムの構築と取得データの定量的な評価を目的として、代表的なヒト癌細胞株であるHeLa細胞を用いてHDAC阻害剤の一種である抗がん剤SAHA依存的翻訳制御に関する大規模定量プロテオーム解析を行ったところ、公共のタンパク質データベースに登録されている既知タンパク質群の他に約5,000種の新規ペプチドが同定され、lncRNAや既知mRNAの5'-UTRにコードされている非ドメイン型の新規タンパク質群の一部が上記薬剤の添加によって量的制御を受けていることを明らかにしている (Kozuka-Hata *et al. Biomolecules* 2023)。また、本計画班では多様な非ドメイン型バイオポリマーに関してタンパク質・RNAの両面から包括的な分子修飾の検出や相互作用因子群の同定による解析支援を横断的に実施することをミッションとしており、中間評価実施時までにはAP-MS法によるタンパク質-タンパク質間相互作用ネットワーク解析 (Miyashita *et al. Elife* 2023; Homma *et al. Life Sci Alliance* 2023) や、リン酸化 (Ohe *et al. Nat Commun* 2022)、ユビキチン化 (Yamaguchi *et al. iScience* 2023) などの高精度翻訳後修飾解析に関する共同研究成果を報告すると共に、計画研究②の甲斐と共同でBioID法に基づくショウジョウバエpiRNA経路新規因子群の探索と同定を精力的に進めている (一色ら、第46回日本分子生物学会年会シンポジウム発表)。また、計画研究⑥の荒川・國枝と共に解析を進めているクマムシ特異的超天然変性タンパク質群は核、細胞質、ミトコンドリアなど異なる細胞区画に各々局在しストレス耐性を与えているものと考えられていることから、クマムシのミトコンドリアにおける乾燥耐性機構獲得に寄与するタンパク質群に焦点を当てたショットガンプロテオーム解析を行い、ミトコンドリア画分に検出された711種類のタンパク質の中で菌類・細菌類などと高い相同性を示した2種類のタンパク質がヒト培養細胞の高浸透圧耐性の向上に寄与することを明らかにしている (田中ら、日本進化学会第25回大会最優秀賞受賞)。

(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 (本計画研究の成果)

リボソームプロファイリングによって規定される非典型 ORF 群に関する大規模定量プロテオーム解析 (Kozuka-Hata *et al. Biomolecules* 2023)

近年のリボソームプロファイリング技術によって新たに見出された非典型 ORF 群がコードする翻訳産物には既知のドメイン構造を持たない非ドメイン型バイオポリマーが大量に含まれていることから、本計画研究においてプロテオミクス解析を担当している尾山・秦はこれらの分子群の細胞内動態制御をシステムレベルで明らかにすることを目的として、最新鋭の Orbitrap Eclipse Tribrid 質量分析システムに実装されている Real-Time Search プラットフォームに基づいてこれらの非典型 ORF 群がコードする未知



翻訳産物を大規模に検出する分析系を新たに構築し、ヒト癌細胞における抗がん剤依存的翻訳制御に関して大規模定量プロテオーム解析を行った。代表的なヒト癌細胞株である HeLa 細胞において、細胞周期・増殖関連タンパク質である UBE2C、PRC1、CENPF などに加え、lncRNA や既知 mRNA の 5'-UTR にコードされている非ドメイン型の新規タンパク質群が HDAC 阻害剤の一種である抗がん剤 SAHA 依存的に量的制御を受けていることを明らかにした

(Kozuka-Hata *et al. Biomolecules* 2023)。また、計画研究①の中川と共同で 4.5SH RNA-タンパク質間相互

作用に関するインタクトーム解析を行い、研究成果をプレスリリースによって報告した他

(Yoshimoto *et al. Mol Cell* 2023)、本領域内での横断的共同研究に向けて BioID 法に基づく大規模分子ネットワーク解析システムを新たに確立し、ストレス顆粒構成因子群のインタクトーム解析に関する研究成果を報告した (Fujikawa *et al. Curr Biol* 2023)。さらに、計画研究⑥の荒川・國枝と共同でクマムシの破碎液から脱水様のストレスに応答して可逆的に集合するタンパク質群を網羅的に分離する手法を新たに確立し、同定された 336 種類のタンパク質群の中でクマムシ固有のカーズ (CAHS) タンパク質が脱水様ストレスに応答して動物細胞内で可逆的に繊維構造を形成すると共に細胞を硬化させ、細胞のストレス耐性を向上させることを明らかにし、プレスリリースを通して研究成果を報告した (Tanaka *et al. PLoS Biol* 2022)。

tRNA の糖修飾がタンパク質合成速度を調節する分子基盤を解明 (Zhao *et al. Cell* 2023)

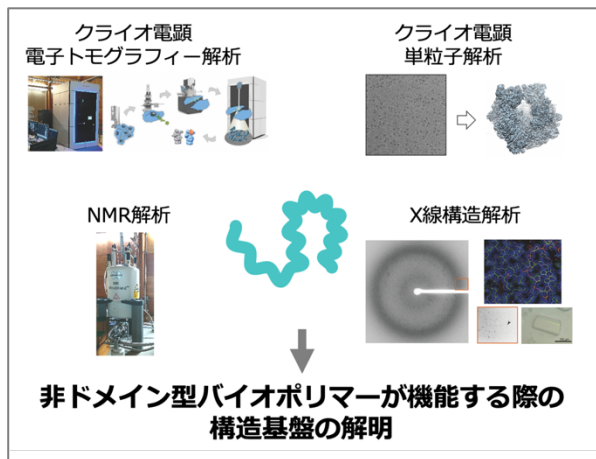
本計画研究で RNA 質量分析を担当する鈴木は、哺乳動物 tRNA のキューオシン (Q) 修飾に糖 (ガラクトースおよびマンノース) を付加する 2 種類の酵素、QTGAL 及び QTMAN を同定し、これらの酵素群の組換えタンパク質を用いた生化学的な解析において糖ヌクレオチドを基質とする tRNA の糖付加 Q 修飾反応を再構成し、酵素の特徴から立体化学選択的な糖転移のしくみを明らかにした。さらに、速度論的な解析を通して糖付加 Q 修飾が細胞内の糖ヌクレオチド濃度によって制御される可能性を見出し、QTGAL および QTMAN の遺伝子破壊株のリボソームプロファイリングによって糖付加 Q 修飾は適切なコドン解読速度を調節する役割があること、また糖付加 Q 修飾による適切な翻訳速度の調節はプロテオスタシスの維持に重要な役割を担っていることを明らかにし、クライオ電子顕微鏡を用いたヒトリボソームと tRNA の複合体立体構造解析から糖付加 Q 修飾がコドン解読を制御する分子基盤を明らかにした。上記に加え、さらに QTGAL および QTMAN を欠損したゼブラフィッシュの変異体に関する表現型解析を行い、糖付加 Q 修飾が欠損すると生後の生育が遅れるという興味深い知見を得ると共に、糖付加 Q 修飾の欠損が統合的ストレス応答を引き起こすことを見出した (Zhao *et al. Cell* 2023)。

計画研究⑧ 非ドメイン型バイオポリマーの立体構造・相互作用解析

研究代表者：伊藤 拓宏 / 研究分担者：西増 弘志

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

本研究では非ドメイン型バイオポリマーを含む非膜オルガネラの内部構造や、実際にそれらの分子が機能する際の構造を、構造生物学の視点から明らかにする。そこで、代表的な非膜オルガネラとしてパラスペックルとヌアージュに注目し、GFP の融合マーカータンパク質を指標に細胞内の位置を同定し、瞬間凍結した細胞を試料としてクライオ電子トモグラフィー解析を行って内部の微細構造並びに分子の配置を調べる。また、クライオ TEM による Hero や Dsup などの超天然タンパク質および標的分子との複合体の単粒子解析を行い、それらが特定の構造をとって機能するのか、複数の構造が混在した状態で機能



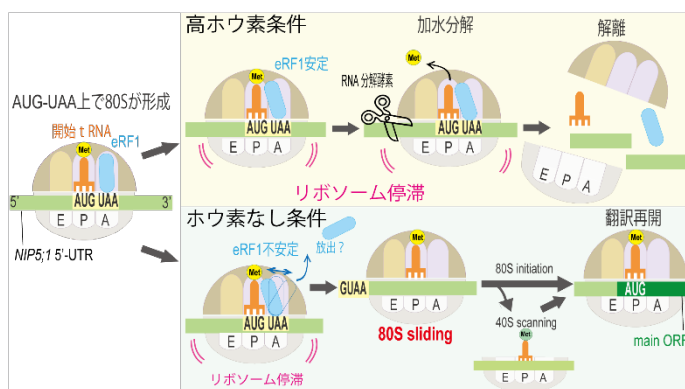
するのかについて検討を行う。また、上記の解析の結果を参考に、X線結晶構造解析、NMR法、高速AFMなどの解析手段から適切な手法を選択し、より詳細な部分構造解析・相互作用解析を行うほか、研究計画⑨の依田らの計算機を用いた結果を相互に参照し、種間で保存された配列を持たない分子がどのようにしてその機能を発揮するのか、その法則の検証を行う。非ドメイン型バイオポリマーを含む非膜オルガネラの微細内部構造や、柔軟な分子に特徴的な分子間相互作用を明らかにすることで、人工的な高機能非ドメイン型バイオポリマーの設計の礎を作る。細胞内非膜オルガネラの構造解析を視野に入れ、クラ

イオ FIB-SEM やクライオ電子トモグラフィーの技術的準備を進めてきた。現在、計画研究③の廣瀬から供与されたパラスペックルがラベルされた細胞、および計画研究⑤の泊から供与されたヌアージュがラベルされた細胞を用いて、クライオ電子顕微鏡トモグラフィー解析を進めている。さらに、中川らと協力して 4.5SH の機能発現機構をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を用いて立体構造的視点から明らかにすることも目指しているほか、計画研究④の稲田と協力して停止リボソームの立体構造解析を、計画研究⑥の分担の國枝と協力してクマムシ特異的タンパク質 Dsup と DNA 複合体の立体構造解析を進めている。

(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 (本計画研究の成果)

植物におけるホウ素濃度検知の新機構 (Tanaka et al. Nat Chem Biol 2024)

翻訳における植物の無機栄養ホウ素の感知とそれに伴うタンパク質合成過程の変化を分子レベルで解明するため、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を進めた。高ホウ素濃度では 80S リボソームの P サイトの開始メチオニル tRNA の隣に位置している A サイトの翻訳終結因子 eRF1 の構造が安定化することを明らかにし、ホウ素濃度が低いときに 80S リボソーム複合体が mRNA 上を滑って移動するプロセスが翻訳制御に重要であることを明らかにした。本研究は翻訳を通じた植物の無機栄養の欠乏に対する反応の分子機構が初めて明らか

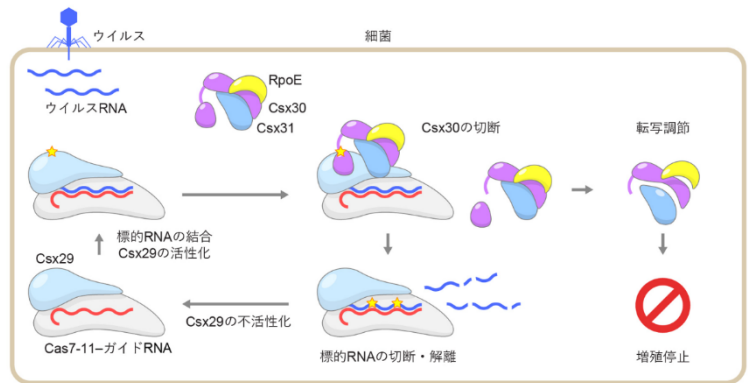


にしたものであり、この仕組みを人為的に変化させることによって、植物の栄養吸収能力を高めたり、栄養をあまり必要としない作物を開発したりできる可能性がある。

原核生物の新規抗ウイルス防御機構 (Kato et al. Science 2022)

原核生物のゲノムに存在する III-E 型 CRISPR-Cas 領域には、Cas7-11 に加えて、Csx29、Csx30、Csx31、RpoE といったタンパク質がコードされている。これら 5 種類のタンパク質が協働して抗ウイルス防御を担っている可能性が示唆されていた。Csx29 は既知のタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）とアミノ酸配列の類似性を持ち、Cas7-11 と複合体を形成することが報告されていたが、Csx29 がプロテアーゼ活性をもつかは不明であった。Csx30 と Csx31 は既知のタンパク質と配列類似性をもたないため、それらの機能は謎に包まれていた。一方、RpoE はシグマ因子として転写制御に関与する可能性が示唆されていたが、その役割は不明だった。III-E 型 CRISPR-Cas システムによる抗ウイルス防御機構の理解を目指し、生化学的解析を行い、(1) Cas7-

11 はガイド RNA および Csx29 と複合体を形成すること、および、(2) ガイド RNA と相補的な標的 RNA が複合体に結合すると Csx29 が活性化し Csx30 を 2 つの断片（N 末端断片 Csx30-1 および C 末端断片 Csx30-2）に切断することを発見した。これらの結果から、Cas7-11-Csx29 複合体は標的 RNA の結合によって活性化する RNA 依存性プロテアーゼであることが明らかとなった。



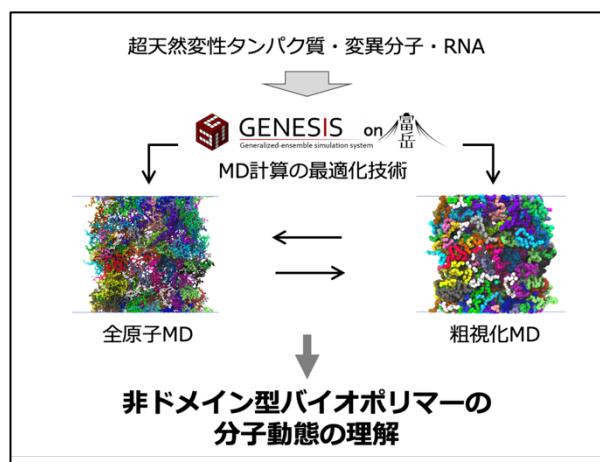
さらに、クライオ電子顕微鏡を用いて、Cas7-11-ガイド RNA-Csx29 複合体、および、Cas7-11-ガイド RNA-Csx29-標的 RNA 複合体の立体構造を決定し、Csx29 は TPR ドメインと CHAT プロテアーゼドメインからなり、Cas7-11 と結合していることを明らかにした。注目すべきことに、標的 RNA が結合していない場合、CHAT プロテアーゼドメインの触媒残基は Cas7-11 によって塞がれているため、Csx29 は Csx30 を切断できない一方、標的 RNA が結合すると Csx29 の立体構造が変化し Csx30 が結合できる活性化状態になることが示唆された。したがって、2 つの構造の比較から、Cas7-11-Csx29 複合体が RNA 依存的プロテアーゼとして機能する分子機構が明らかとなった。

計画研究⑨ 非ドメイン型バイオポリマーの分子動力学計算

研究代表者：依田 隆夫 / 研究分担者：鄭 載運・譚 丞

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

依田らがタンパク質の天然変性領域の研究などで活用してきた一連の拡張アンサンブル法は立体構造空間を効率的に探索できるシミュレーション手法であり、柔軟性に富む非ドメイン型バイオポリマーの構造および分子間相互作用の探索に適している。本研究ではこれらのアルゴリズムを搭載したソフトウェア GENESIS、および「富岳」を活用した先端的なシミュレーションにより、非ドメイン型バイオポリマーの分子動体を可視化している。非ドメイン型バイオポリマーのシミュレーションによりそれらの分子が機能する際の分子動態を明らかにすること、また、変異分子の動態の解析により配列と機能の相関に関する知見を得ることを目標としていた。



中間評価実施時までには、GENESIS に並列実装 (Tan *et al. PLoS Comput Biol* 2022) した粗視化モデル (HPS モデル) を用いて以下の研究を行った。廣瀬らがパラスペックルの核スペックルからの分離に関する発見した SFPQ の部分配列ペプチドの粗視化モデルによる分子動力学計算 (MD) データの分析により、機能を喪失した分子種と野生型の間分子間相互作用の量に顕著な差を見出した。泊らが発見した Hero タンパク質は天然変性タン

パク質でありながら他のタンパク質 (クライアント) を安定化し病的な凝集を抑制する機能を持つ。Hero11 とクライアントである TDP-43 の LCD を多数含む系のスラブ MD を行ったところ、Hero11 が TDP-43 LCD の凝縮を抑制する効果が再現され、これには凝縮相と希薄相で異なる分子間相互作用が寄与していることが示された (Tan *et al. JACS au* 2023)。相互作用を詳細に観測できる全原子モデルを用いた研究も進めた。個々の Hero タンパク質の受け持つクライアントが緩やかに限定されていることから、Hero タンパク質は分子種に依存する作用機構を持つと推測できる。そこで、拡張アンサンブル法の一つである generalized replica exchange with solute tempering (gREST) 法による全原子 MD を行ったところ、MD から得られた二次構造分布とデータベースサーチにより予測される相互作用部位との相関の有無が Hero タンパク質の種類に依存することを見出した。

また、鄭が開発する粗視化シミュレーション高速化技術を用い、これまでよりも大規模・長時間のシミュレーションを実行可能な環境を構築するとともに、非ドメイン型バイオポリマーの全原子力場 (依田) と粗視化手法 (譚) を組み合わせることで、計算の精度と規模を飛躍的に向上させることも目指した。

中間評価実施時までには、Amber ff19sb 力場の GENESIS への実装、大規模 gREST MD の効率化のための新規アルゴリズムの開発 (Jung *et al. J Comput Chem* 2023)、粗視化 MD の高速実行を可能にする動的負荷分散を伴うアルゴリズムの開発と GENESIS CGDYN への実装 (Jung *et al. Nat Commun* 2024) を行った。CGDYN により IDP の液滴の粗視化 MD を行い、液滴同士の融合の観察に成功した。また、上述 (Hero11 と TDP-43 LCD の多分子系) した粗視化 MD で得られた構造をもとに全原子の初期構造を注意深く構築して全原子 MD を行ったところ、粗視化 MD と一致する振る舞いが観察された。

(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 (本計画研究の成果)

効率的な粗視化 MD 計算のための新手法の開発 (Jung *et al. Nat Commun* 2024)

溶媒粒子を露わに含まない粗視化モデルでは、溶質分子 (IDP など) が密集している空間とそれ以外の空間の粒子数密度の差が大きい。さらに、溶質分子が動いて粒子数密度の高い領域がシミュレーショ

ン中に変化する。そのため、従来型の領域分割スキームでは効率的な並列計算が困難であった。この問題を解決するため、鄭らは動的負荷分散を用いた新しい階層的領域分割スキームを開発し、GENESIS CGDYN として実装した。

この新しい手法により、顕微鏡で観察されるサイズに匹敵する大規模な系のシミュレーションが可能となった。多数の天然変性タンパク質 (TDP-43 LCD) 分子を含む系の粗視化 MD により、50 個の小さい液滴が融合して直径約 $0.1 \mu\text{m}$ の大きな液滴が形成される過程を観察することに成功した。その際に、小さな液滴が溶解し、その分子が大きな液滴に再蓄積する現象であるオストヴァルト成長を直接観察できたことが特筆される。

Hero タンパク質とその部分配列ペプチドの gREST 法による立体構造探索と力場依存性の解明

Hero7, 9, 11 は天然変性領域予測 (IUPred3) で分子全体が disordered であると予測されるが、立体構造予測 AI (AlphaFold2) では長い α -ヘリックスを含む構造が得られる。理研の新津らが測定した CD スペクトルにより、いくつかの分子で準安定なヘリックスが実際に存在することが示された。IDP を念頭に開発された 2 つの力場 (Charmm 36m, Amber99SBws-STQ) を用いて全原子 gREST MD で立体構造探索を行ったところ、いずれの力場でも実験値に近いヘリックス含量が得られた。データベースサーチにより予測される相互作用部位と gREST MD でヘリックス形成が予測された部位との間に一定の相関が認められる Hero タンパク質と、認められない Hero タンパク質が存在することが明らかとなった。これは、クライアントタンパク質との相互作用におけるヘリックス構造の役割が Hero タンパク質の種類に依存していることを示唆している。(投稿準備中)

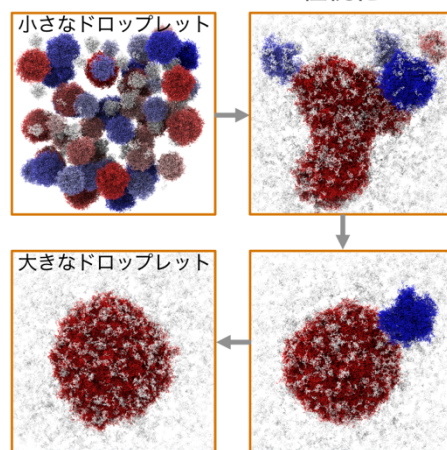
TDP-43 と Hero11 の凝縮相の粗視化 MD (Tan et al. JACS Au 2023)

譚らは相分離を観察できるスラブ MD と全原子 MD により、クライアントである TDP-43 の LCD の凝集を Hero11 が抑制する機構を研究した。その結果、Hero11 が TDP-43 の LCD の凝縮相に浸透し、TDP-43 LCD の構造、分子間相互作用、ダイナミクスの変化を引き起こすことを見出した。また、Hero11 の可能な構造を全原子 MD と粗視化 MD で検討した結果、ヘリックスを含まない Hero11 は凝縮相の表面に集合する傾向があり、ヘリックスを形成している Hero11 は凝縮相の中の方に局在する傾向があるという結果が得られた。凝縮相では Hero11 と TDP-43 LCD の斥力的な相互作用により Hero11 と TDP-43 LCD の接触が減少してより速い拡散と脱凝集が起こること、希薄相では Hero11 と TDP-43 LCD の引力的相互作用により TDP-43 LCD が相対的に伸びた構造になるとともに TDP-43 LCD の飽和濃度が上昇することを見出した。小さい TDP-43 LCD 液滴の表面上の Hero11 は斥力的な相互作用により液滴同士の融合を妨げる可能性がある。提案された機構は、様々な条件下における細胞内の生体分子凝縮の制御について新たな知見を与えるものである。

その他

gREST は効率的な構造探索手法として有用だが、非常に大きな系へ適用する場合の計算量に関する課題も存在した。これを解決するため、鄭はプロセス-レプリカ間の効率的なネットワークマッピング法と gREST MD の on-the-fly エネルギー分析法を開発した (Jung et al. J Comput Chem 2023)。

GENESIS CGDYN で粗視化 MD



IDP 液滴同士の融合

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6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。

複数の計画研究が関わった共著論文は責任著者（*）の計画研究の成果として記載した。

研究項目 X00 総括班

【総説論文】

Arakawa, K., Hirose, T., Inada, T., Ito, T., Kai, T., Oyama, M., Tomari, Y., Yoda, T., and Nakagawa, S.* (2023). Nondomain biopolymers: Flexible molecular strategies to acquire biological functions. *Genes Cells* 28, 539-552.

研究項目 A01 生理機能ユニット

計画研究① マウス変異体を用いた非ドメイン型 RNA の生理機能解析（中川・荒木）

Toya, H., Okamatsu-Ogura, Y., Yokoi, S., Kurihara, M., Mito, M., Iwasaki, S., Hirose, T., and Nakagawa, S.* (2024). The Essential Role of Architectural Noncoding RNA Neat1 in Cold-Induced Beige Adipocyte Differentiation in Mice. *RNA*. in press

Yoshimoto, R., Nakayama, Y., Nomura, I., Yamamoto, I., Nakagawa, Y., Tanaka, S., Kurihara, M., Suzuki, Y., Kobayashi, T., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Mito, M., Iwasaki, S., Yamazaki, T., Hirose, T., Araki, K., and Nakagawa, S.* (2023). 4.5SH RNA counteracts deleterious exonization of SINE B1 in mice. *Mol Cell* 83, 4479-4493.

Takahashi, O., Tanahashi, M., Yokoi, S., Kaneko, M., Yanaka, K., Nakagawa, S.*, and Maita, H.* (2022). The cell type-specific ER membrane protein UGS148 is not essential in mice. *Genes Cells* 27, 43-60.

Yamada, A., Toya, H., Tanahashi, M., Kurihara, M., Mito, M., Iwasaki, S., Kurosaka, S., Takumi, T., Fox, A., Kawamura, Y., Miura, K., and Nakagawa, S.* (2022). Species-specific formation of paraspeckles in intestinal epithelium revealed by characterization of NEAT1 in naked mole-rat. *RNA* 28, 1128-1143.

【総説論文】

Nakagawa, S.*, Yamazaki, T., Mannen, T., and Hirose, T. (2022). ArcRNAs and the formation of nuclear bodies. *Mamm Genome* 33, 382-401.

【学会発表（招待講演）】

Nakagawa, S. 4.5SH functions as an antidote for toxic exonization of SINE B1. *Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting*, Busan, Korea, May 12th (2023).

Nakagawa, S. Regulation of alternative splicing by short noncoding RNA. *EMBL meeting* –The Noncoding Genome, Heidelberg, Germany, Oct 14th (2023).

中川真一 超天然変性タンパク質変異マウスの生理機能解析 第95回日本生化学会大会 名古屋 2022年11月11日

【産業財産権】

人工 RNA 分子（特願 2022-76674）、人工 RNA 分子（PCT/JP2023/015828）

計画研究② 非ドメイン型タンパク質によるヌアージュ形成制御の遺伝学的解析（甲斐）

【原著論文】

Lin, Y., Suyama, R., Kawaguchi, S., Iki, T., and Kai, T. (2023). Tejas functions as a core component in nuage assembly and precursor processing in Drosophila piRNA biogenesis. *J Cell Biol* 222.

Lim, L.X., Isshiki, W., Iki, T., Kawaguchi, S., and Kai, T.* (2022). The Tudor Domain-Containing Protein, Kotsubu (CG9925), Localizes to the Nuage and Functions in piRNA Biogenesis in *D. melanogaster*. *Front Mol Biosci* 9, 818302.

【学会発表（招待講演）】

Kai, T. Tejas Functions in piRNA Biogenesis via Nuage Assembly in Drosophila. *EMBO Workshop* –PIWI Proteins and piRNAs (on line), Apr 6th (2022).

甲斐歳惠 生殖細胞特異的な非膜オルガネラ・ヌアージュの構造と機能 第33回フォーラム・イン・ドージン（オンライン） 2023年10月27日

公募研究

【原著論文】

Horio, T., Ishikura, Y., Ohashi, R., and Shiina, N.* (2023). Regulation of RNG105/caprin1 dynamics by pathogenic cytoplasmic FUS and TDP-43 in neuronal RNA granules modulates synaptic loss. *Heliyon* 9, e17065.

Yamashita, A., Shichino, Y., Fujii, K., Koshidaka, Y., Adachi, M., Sasagawa, E., Mito, M., Nakagawa, S., Iwasaki, S., Takao, K., and Shiina, N.* (2023). ILF3 prion-like domain regulates gene expression and fear memory under chronic stress. *iScience* 26, 106229.

研究項目 A02 細胞機能ユニット

計画研究③ 非ドメイン型 lncRNA の機能獲得機構の解析 (廣瀬)

【原著論文】

Takakuwa, H., Yamazaki, T., Souquere, S., Adachi, S., Yoshino, H., Fujiwara, N., Yamamoto, T., Natsume, T., Nakagawa, S., Pierron, G., and Hirose, T.* (2023). Shell protein composition specified by the lncRNA NEAT1 domains dictates the formation of paraspeckles as distinct membraneless organelles. *Nat Cell Biol* 25, 1664-1675.

Iwakiri, J., Tanaka, K., Chujo, T., Takakuwa, H., Yamazaki, T., Terai, G., Asai, K., and Hirose, T.* (2023). Remarkable improvement in detection of readthrough downstream-of-gene transcripts by semi-extractable RNA-sequencing. *RNA* 29, 170-177.

Zeng, C., Chujo, T., Hirose, T.*, and Hamada, M.* (2023). Landscape of semi-extractable RNAs across five human cell lines. *Nucleic Acids Res* 51, 7820-7831.

【総説論文】

Hirose, T.*, Ninomiya, K., Nakagawa, S., and Yamazaki, T. A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 288-304 (2023).

Obuse, C., and Hirose, T.* Functional domains of nuclear long noncoding RNAs: Insights into gene regulation and intracellular architecture. *Curr Opin Cell Biol* 85, 102250 (2023).

【学会発表 (招待講演)】

Hirose, T. Exploring the role of architectural noncoding RNAs in shaping and regulating phase-separated nuclear bodies. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting* –Regulatory RNAs, Cold Spring Harbor, USA, May 25th (2024).

Hirose, T. NEAT1 lncRNA domains dictate the formation of paraspeckles as distinct membraneless organelles with the internal layered structure. *Keystone Symposia* –Biomolecular condensates, Vancouver, Canada, Feb 1st (2023).

Hirose, T. Construction mechanism of nuclear paraspeckle as an isolated RNP micell. *EMBO/EMBL Symposia* –Cellular Mechanisms Driven by Liquid Phase Separation (online), May 12th (2022).

廣瀬哲郎, 山崎智弘, 二宮賢介 非コード RNA を足場に形成される核内相分離構造体における RNA 結合タンパク質の役割 第 95 回日本生化学会大会 名古屋 2022 年 11 月 9 日

廣瀬哲郎, 高桑 央, 山本 哲也, 山崎 智弘 Construction mechanism of nuclear paraspeckle as an isolated RNP micell. 第 60 回日本生物物理学会年会 函館 2022 年 9 月 28 日

計画研究④ mRNA 非翻訳領域の非ドメイン型 RNA 配列の解析 (稲田・今高)

【原著論文】

Ishimura, R., Ito, S., Mao, G., Komatsu-Hirota, S., Inada, T., Noda, N.N., and Komatsu, M. (2023). Mechanistic insights into the roles of the UFM1 E3 ligase complex in ufmylation and ribosome-associated protein quality control. *Sci Adv* 9, eadh3635.

Matsuo, Y., Uchihashi, T., and Inada, T.* (2023). Decoding of the ubiquitin code for clearance of colliding ribosomes by the RQT complex. *Nat Commun* 14, 79.

Tomomatsu, S., Watanabe, A., Tesina, P., Hashimoto, S., Ikeuchi, K., Li, S., Matsuo, Y., Beckmann, R., and Inada, T.* (2023). Two modes of Cue2-mediated mRNA cleavage with distinct substrate recognition initiate no-go decay. *Nucleic Acids Res* 51, 253-270.

Narita, M., Denk, T., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Kikuguchi, C., Ito, S., Sato, N., Suzuki, T., Hashimoto, S., Machova, I., Tesina, P., Beckmann, R., and Inada, T.* (2022). A distinct mammalian disome collision interface harbors K63-linked polyubiquitination of uS10 to trigger hRQT-mediated subunit dissociation. *Nat Commun* 13, 6411.

Li, S., Ikeuchi, K., Kato, M., Buschauer, R., Sugiyama, T., Adachi, S., Kusano, H., Natsume, T., Berninghausen, O., Matsuo, Y., Becker, T., Beckmann, R., and Inada, T.* (2022). Sensing of individual stalled 80S ribosomes by Fap1 for nonfunctional rRNA turnover. *Mol Cell* 82, 3424-3437.

Tesina, P., Ebine, S., Buschauer, R., Thoms, M., Matsuo, Y., Inada, T.*, and Beckmann, R.* (2023). Molecular basis of eIF5A-dependent CAT tailing in eukaryotic ribosome-associated quality control. *Mol Cell* 83, 607-621.

Udagawa, T., Seki, M., Okuyama, T., Adachi, S., Natsume, T., Noguchi, T., Matsuzawa, A., and Inada, T. (2021). Failure to Degrade CAT-Tailed Proteins Disrupts Neuronal Morphogenesis and Cell Survival. *Cell Rep* 34, 108599.

Ito, H., Machida, K., Hasumi, M., Ueyama, M., Nagai, Y., Imataka, H., and Taguchi, H. (2023). Reconstitution of C9orf72 GGGGCC repeat-associated non-AUG translation with purified human translation factors. *Sci Rep* 13, 22826.

【学会発表（招待講演）】

Inada, T. Ubiquitin code for helicase-driven clearance of colliding ribosomes by the RQT complex. *EMBO workshop* –RNA meets protein decay, Cavtat, Croatia, May 26th (2023).

稲田利文 衝突リボソーム解消によるタンパク質恒常性維持機構と神経変性疾患 第64回日本神経病理学会総会学術研究会 神戸 2023年7月7日

Inada, T. RQC prevents accumulation of CAT-tailed proteins to maintain neuronal morphogenesis and cell survival. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting* –Protein Homeostasis in Health and Disease, Cold Spring Harbor, USA, Apr 28th (2022).

稲田利文 衝突リボソームを解消する翻訳品質管理 RQC の分子機構と生理機能 日本核酸医薬学会 第7回年会サテライトシンポジウム（オンライン） 2022年7月31日

計画研究⑤ Hero タンパク質の動作機構解明と神経変性疾患への適用（泊・森本）

【原著論文】

Morimoto, E., Tsuboyama, K., and Tomari, Y.* (2022). Fusion with heat-resistant obscure (Hero) proteins have the potential to improve the molecular property of recombinant proteins. *PLoS One* 17, e0270097.

Morimoto, S., Takahashi, S., Ito, D., Date, Y., Okada, K., Kato, C., Nakamura, S., Ozawa, F., Chyi, C.M., Nishiyama, A., Suzuki, N., Fujimori, K., Kondo, T., Takao, M., Hirai, M., Kabe, Y., Suematsu, M., Jinzaki, M., Aoki, M., Fujiki, Y., Sato, Y., Suzuki, N., Nakahara, J., Pooled Resource Open-Access, A.L.S.C.T.C., and Okano, H. (2023). Phase 1/2a clinical trial in ALS with ropinirole, a drug candidate identified by iPSC drug discovery. *Cell Stem Cell* 30, 766-780 e769.

【学会発表（招待講演）】

Tomari, Y. Competition Between Adjacent piRNA-producing Sites Autonomously Shapes the Repertoire and Biogenesis Efficiency of piRNAs. *Keystone Symposia* –Regulatory RNAs: Emerging mechanisms, Banff, Canada, Dec 2023

Tomari, Y. Competition between neighboring piRNA production sites autonomously shapes the repertoire and biogenesis efficiency of piRNAs. *EMBL Symposium* –The Non-coding Genome, Heidelberg, Germany, Oct 2023

Tomari, Y. Stability of PIWI proteins during the ping-pong piRNA biogenesis pathway, *EMBO Workshop* –RNA meets protein decay, Dubrovnik, Croatia, May 2023

Tomari, Y. The two Gtsf paralogs in silkworms orthogonally activate their partner PIWI proteins for target cleavage. *The Argonauts conference*, Regensburg, Germany, Sep 2022

Tomari, Y. canonical chaperone and a heat-resistant obscure (Hero) protein mediate similar aggregation suppression and conformational extension of TDP-43. *Cold Spring Harbor Asia* –RNA Biology, Awaji, Japan, 2022

Morimoto S. Mechanism of therapeutic action of ropinirole in spinal motor neurons derived from ALS patients. *Annual Meeting of the Society for Neuroscience* (SfN), Washington, USA, 13th Nov, 2023

計画研究⑥ クマムシ特異的非ドメイン型タンパク質の探索と機能解析（荒川・国枝・田中）

【原著論文】

Fleming, J.F., Pisani, D., and Arakawa, K.* (2024). The Evolution of Temperature and Desiccation-Related Protein Families in Tardigrada Reveals a Complex Acquisition of Extremotolerance. *Genome Biol Evol* 16.

Tanaka, S., Aoki, K., and Arakawa, K. (2023). In vivo expression vector derived from anhydrobiotic tardigrade genome enables live imaging in Eutardigrada. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120, e2216739120.

Yoshida, Y., Satoh, T., Ota, C., Tanaka, S., Horikawa, D.D., Tomita, M., Kato, K., and Arakawa, K.* (2022). Time-series transcriptomic screening of factors contributing to the cross-tolerance to UV radiation and anhydrobiosis in tardigrades. *BMC Genomics* 23, 405.

Miyazawa, K., Itoh, S.G., Yoshida, Y., Arakawa, K., and Okumura, H. (2022). Tardigrade Secretary-Abundant Heat-Soluble Protein Varies Entrance Propensity Depending on the Amino-Acid Sequence. *J Phys Chem B* 126, 2361-2368.

Sugiura, K., Matsumoto, M., and Kunieda, T.* (2022). Description of a model tardigrade *Paramacrobiotus metropolitanus* sp. nov. (Eutardigrada) from Japan with a summary of its life history, reproduction and genomics. *Zootaxa* 5134, 92-112.

Tanaka, A., Nakano, T., Watanabe, K., Masuda, K., Honda, G., Kamata, S., Yasui, R., Kozuka-Hata, H., Watanabe, C., Chinen, T., Kitagawa, D., Sawai, S., Oyama, M., Yanagisawa, M., and Kunieda, T.* (2022). Stress-dependent cell stiffening by tardigrade tolerance proteins that reversibly form a filamentous network and gel. *PLoS Biol* 20, e3001780.

Yoshida, Y., Satoh, T., Ota, C., Tanaka, S., Horikawa, D.D., Tomita, M., Kato, K., and Arakawa, K. (2022). Time-series transcriptomic screening of factors contributing to the cross-tolerance to UV radiation and anhydrobiosis in tardigrades. *BMC Genomics* 23, 405.

Kumagai, H., Kondo, K., and Kunieda, T.* (2022). Application of CRISPR/Cas9 system and the preferred no-indel end-joining repair in tardigrades. *Biochem Biophys Res Commun* 623, 196-201.

Murai, Y., Yagi-Utsumi, M., Fujiwara, M., Tanaka, S., Tomita, M., Kato, K., and Arakawa, K.* (2021). Multiomics study of a heterotardigrade, *Echiniscus testudo*, suggests the possibility of convergent evolution of abundant heat-soluble proteins in Tardigrada. *BMC Genomics* 22, 813.

【学会発表（招待講演）】

荒川和晴 非モデル生物のナノポアシーケンシング：クマムシ・クモ・ミドリムシ 第45回日本分子生物学会年会 幕張 2022年11月30日

荒川和晴 いまこそ本当に面白い生物の研究を - 最強素材クモ糸と最強生物クマムシの観点から 第44回日本分子生物学会年会 横浜 2021年12月1日

公募研究

【原著論文】

Kato, Y.*, Nitta, J.H., Perez, C.a.G., Adhitama, N., Religia, P., Toyoda, A., Iwasaki, W., and Watanabe, H. (2024). Identification of gene isoforms and their switching events between male and female embryos of the parthenogenetic crustacean *Daphnia magna*. *Sci Rep* 14, 9407.

Honda, M., Kimura, R., Harada, A., Maehara, K., Tanaka, K., Ohkawa, Y., and Oki, S. (2022). Photo-isolation chemistry for high-resolution and deep spatial transcriptome with mouse tissue sections. *STAR Protoc* 3, 101346.

研究項目 A03 分子機能ユニット

計画研究⑦ 非ドメイン型バイオポリマーに関する分子修飾機構の解明（尾山・鈴木・秦）

【原著論文】

Kozuka-Hata, H., Hiroki, T., Miyamura, N., Kitamura, A., Tsumoto, K., Inoue, J.I., and Oyama, M.* Real-Time Search-Assisted Multiplexed Quantitative Proteomics Reveals System-Wide Translational Regulation of Non-Canonical Short Open Reading Frames. *Biomolecules* 13 (2023).

Fujikawa, D., Nakamura, T., Yoshioka, D., Li, Z., Moriizumi, H., Taguchi, M., Tokai-Nishizumi, N., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., and *Takekawa, M. (2023). Stress granule formation inhibits stress-induced apoptosis by selectively sequestering executioner caspases. *Curr Biol* 33, 1967-1981 e1968.

Zhao, X., Ma, D., Ishiguro, K., Saito, H., Akichika, S., Matsuzawa, I., Mito, M., Irie, T., Ishibashi, K., Wakabayashi, K., Sakaguchi, Y., Yokoyama, T., Mishima, Y., Shirouzu, M., Iwasaki, S., Suzuki, T., and Suzuki, T.* (2023). Glycosylated queuosines in tRNAs optimize translational rate and post-embryonic growth. *Cell* 186, 5517-5535.

計画研究⑧ 非ドメイン型バイオポリマーの立体構造・相互作用解析（伊藤・西増）

【原著論文】

Tanaka, M., Yokoyama, T., Saito, H., Nishimoto, M., Tsuda, K., Sotta, N., Shigematsu, H., Shirouzu, M., Iwasaki, S., *Ito, T., and *Fujiwara, T. (2024). Boric acid intercepts 80S ribosome migration from AUG-stop by stabilizing eRF1. *Nat Chem Biol* 20, 605-614.

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

【学会発表（招待講演）】

伊藤拓宏 ホウ酸は eRF1 を A サイトで安定化させ、植物 80S リボソームの AUG-ストップ uORF からの下流への移動を阻止する 第 46 回日本分子生物学会年会 神戸 2023 年 12 月 8 日

伊藤拓宏 サンショウバエ熱シチリアウイルス由来 NSs タンパク質による統合的ストレス応答抑制の構造基盤 第 46 回日本分子生物学会年会 オンライン 2023 年 11 月 29 日

伊藤拓宏 翻訳マシナリの機能構造解析の現状と展望 第 45 回日本分子生物学会年会 幕張 2022 年 12 月 1 日

伊藤拓宏 (2021) eIF2B に結合するウイルスタンパク質 NSs は統合的ストレス応答を抑制する 第 44 回日本分子生物学会年会 横浜 2021 年 12 月 3 日

伊藤拓宏 eIF2B 結合性ウイルスタンパク質 NSs による統合的ストレス応答抑制 第 94 回日本生化学会大会 オンライン 2021 年 11 月 5 日

Nishimasu, H. Structural mechanism of IS110 bridge recombinases, *Keystone Symposia* –Regulatory RNAs: Emerging mechanisms, Banff, Canada, Dec 2023

Nishimasu, H. Structure and engineering of CRISPR nuclease-protease, *Frontiers in Genome Engineering*, 2023, India, 2023

Nishimasu, H. Structure, function and engineering of the type III-E CRISPR nuclease-protease complex, *Cold Spring Harbor Asia* –RNA Biology, Awaji, Japan, 2022

計画研究⑨ 非ドメイン型バイオポリマーの分子動力学計算（依田・鄭・譚）

【原著論文】

Jung, J., Tan, C., and Sugita, Y.* (2024). GENESIS CGDYN: large-scale coarse-grained MD simulation with dynamic load balancing for heterogeneous biomolecular systems. *Nat Commun* 15, 3370.

Jung, J., Kobayashi, C., and Sugita, Y. (2023). Acceleration of generalized replica exchange with solute tempering simulations of large biological systems on massively parallel supercomputer. *J Comput Chem* 44, 1740-1749.

Tan, C., Jung, J., Kobayashi, C., Torre, D.U., Takada, S., and Sugita, Y.* (2022). Implementation of residue-level coarse-grained models in GENESIS for large-scale molecular dynamics simulations. *PLoS Comput Biol* 18, e1009578.

Tan, C., Niitsu, A., and Sugita, Y.* (2023). Highly Charged Proteins and Their Repulsive Interactions Antagonize Biomolecular Condensation. *JACS Au* 3, 834-848.

公募研究

【原著論文】

Kamagata, K.*, Ariefai, M., Takahashi, H., Hando, A., Subekti, D.R.G., Ikeda, K., Hirano, A., and Kameda, T.* (2022). Rational peptide design for regulating liquid-liquid phase separation on the basis of residue-residue contact energy. *Sci Rep* 12, 13718.

Kamagata, K.*, Hando, A., Ariefai, M., Iwaki, N., Kanbayashi, S., Koike, R., and Ikeda, K. (2023). Rational design of phase separating peptides based on phase separating protein sequence of p53. *Sci Rep* 13, 5648.

Kamagata, K.*, Iwaki, N., Kanbayashi, S., Banerjee, T., Chiba, R., Gaudon, V., Castaing, B., and Sakomoto, S. (2022). Structure-dependent recruitment and diffusion of guest proteins in liquid droplets of FUS. *Sci Rep* 12, 7101.

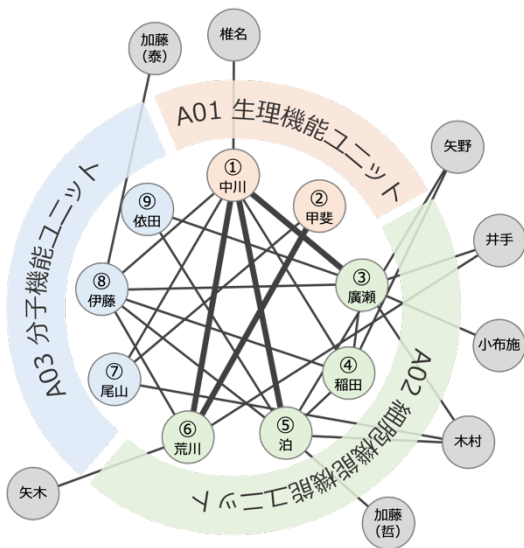
Kamagata, K.*, Kusano, R., Kanbayashi, S., Banerjee, T., and Takahashi, H. (2023). Single-molecule characterization of target search dynamics of DNA-binding proteins in DNA-condensed droplets. *Nucleic Acids Res* 51, 6654-6667.

Eladl, A., Yamaoki, Y., Kamba, K., Hoshina, S., Horinouchi, H., Kondo, K., Waga, S., Nagata, T., and Katahira, M.* (2023). NMR characterization of the structure of the intrinsically disordered region of human origin recognition complex subunit 1, hORC1, and of its interaction with G-quadruplex DNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 683, 149112.

Yagi-Utsumi, M., Aoki, K., Watanabe, H., Song, C., Nishimura, S., Satoh, T., Yanaka, S., Ganser, C., Tanaka, S., Schnapka, V., Goh, E.W., Furutani, Y., Murata, K., Uchihashi, T., Arakawa, K., and Kato, K.* (2021). Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade. *Sci Rep* 11, 21328.

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。



領域内共同研究：細線は一方向の共同研究、太線は双方向の共同研究を示す。グレーの丸は公募班。

領域会議においてそれぞれのメンバーの専門技術のマッチングを行ったほか、Discordのプラットフォームを導入し、継続的かつ緊密な情報交換が可能なプラットフォームを用意した。その結果、すべての計画研究の班員が何らかの技術・材料・情報提供などの共同研究に関わる体制を構築することができた。現在までに領域内の異なる計画研究ならびに公募研究の間で32件の活発な共同研究が進められ、7件の共同研究論文を公表することができた。特筆すべき共同研究として、計画研究①③⑦の共同による分子機能解析で実現したスプライシング制御ノンコーディングRNAの発見 (Yoshimoto *et al. Mol Cell* 2023) と、計画研究①③の共同による超解像顕微鏡観察で実現した相分離核内構造体分子機構の解明 (Takakuwa *et al. Nat Cell Biol* 2023) が挙げられる。

論文の発表に至った共同研究（数字は計画研究・公は公募班）

- ①→③：Neat1の変異マウスの寒冷刺激応答に関する表現型解析 (Toya *et al. RNA* 2024)
- ①→③：パラスペックルの超解像顕微鏡観察技術提供 (Takakuwa *et al. Nat Cell Biol* 2024)
- ①→公（椎名）：ILF-3の天然変性領域特異的変異マウスの供与 (Yamamoto *et al. iScience* 2023)
- ③→①：RNA結合タンパク質繫留システムの供与 (Yoshimoto *et al. Mol Cell* 2023)
- ⑦→①：4.5SHステムループ結合タンパク質群のLC-MS解析 (Yoshimoto *et al. Mol Cell* 2023)
- ⑨→⑤：Heroタンパク質の粗視化分子モデルシミュレーション解析 (Tan *et al. JACS Au* 2023)
- 公（矢木）→⑥：クマムシ特異的タンパク質CAHSの生物物理学的計測 (Yagi-Utsumi *et al. Sci Rep* 2021)

期間内に実施した・現在進行中の共同研究（数字は計画研究・公は公募班）

- ①→④：dORF検出タグKIマウスの作製
- ①→⑤：新規超天然変性タンパク質の変異マウスの作製と表現型解析
- ①→⑤：新規超天然変性タンパク質の過剰発現マウスの作製と神経変性疾患モデルへの効果の検討
- ①→⑥：クマムシ特異的タンパク質を発現するトランスジェニックマウスの作製
- ②→⑥：クマムシ特異的タンパク質を発現するトランスジェニックハエの作製
- ③→公（井手）：新規lncRNA同定法の情報共有
- ④→①⑤：Hero45変異体のリボソーム結合能の検証
- ④→③：HSATIIIのポリソーム解析
- ⑤→①：新規超天然変性タンパク質の細胞レベルでの機能解析に関する情報提供とベクター供与
- ⑤公（矢野）→④：神経細胞におけるリボソーム衝突研究のための材料提供
- ⑥→①：ナノポアシーケンサーを用いた発現ベクターの塩基配列チェック
- ⑥→②：ショウジョウバエ変異体のメタボローム解析
- ⑥→公（井手）：新規lncRNA同定のためのナノポアシーケンサーの技術供与
- ⑦→②：ヌアージュ複合体の近位ビオチンラベル複合体のLC-MS解析
- ⑦→公（木村）：RNAプローブの質量分析解析支援
- ⑧→①：4.5SH-スプライシング複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析
- ⑧→③：核内構造体パラスペックルのクライオ電子顕微鏡トモグラフィー解析
- ⑧→④：停止したリボソームの立体構造解析
- ⑧→⑥：クマムシ特異的タンパク質Dsup/DNA複合体の立体構造解析
- ⑧→公（加藤）：オオミジンコにおけるCas7-11を用いた遺伝子機能抑制法の開発
- ⑨→③：SFPQの天然変性領域の分子動力的計算による動態解析
- 公（木村）→③：PIC法による核内ストレスボディ局在RNAの同定
- 公（木村）→⑤：PIC法によるヌアージュ局在RNAの同定
- 公（矢野）→⑤：神経変性疾患におけるスプライシング異常解析
- 公（小布施）→③：核内ストレス体におけるヘテロクロマチン因子の役割に関する研究

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。

本研究では大学院生からポスドク、若手 PI や研究室スタッフを含む幅広い層を若手研究者と定義し、その育成に努めてきた。領域計画書を提出した段階においては若手研究者の海外研究集会渡航支援や技術講習会の開催等を予定していたが、総括予算の充足率が 65%程度と大幅に交付額が減額されてしまったため、それらについては実施せず、領域会議の充実とオンラインのセミナーを中心に活動を行った。

まず、領域研究に直接関わる若手研究者同士の交流を促進するために、領域会議においては**ワールドポスター**と呼ばれるワールドカフェ形式の交流の時間を設けた。通常のポスター発表では基本的には発表者一人が聴衆数名に対して一方通行の発表を行い、その後質疑応答の時間を設けるのが一般的であるが、ワールドポスターにおいては、一つのテーブルにランダムに数名が座り、各テーブルにアサインされたファシリテーターが指名した発表者2名が A3 のポスターを使いながら話題提供をし、双方向のテーブルディスカッションを行う。何回か席替えを行うと、領域会議程度の規模であればだいたいすべての人と顔と名前が一致するぐらいまで交流を深めることができる。本領域の計画研究の荒川が生物情報科学の若手の研究会で導入したこのディスカッション形式は、発生物学会を始めとして徐々に広まりつつあるが、本領域の3回の領域会議において、若手研究者を含む班員同士の交流に大いに役に立った。

また、本領域の発展のためには領域内の若手研究者の直接的な支援も重要であるが、公募研究の採択率が2割以下であることから分かるように、非ドメイン生物学に関連する研究を行っている領域外の研究者は数多くおり、活発な研究を展開している。そのような領域外の若手研究者と領域内の若手研究者の交流を深めることも重要なミッションであるとの認識のもと、RNA フロンティアミーティングの開催支援および、オンラインランチョンセミナー「タタバイオ分子クラブ」の立ち上げを行った。**RNA フロンティアミーティング**は、若手研究者が中心となって合宿形式で行う RNA 研究関連のミーティングで、2021年度は新型コロナウイルス感染症の流行の影響でオンラインでの開催となったが、2022年度は本領域の公募班員である加藤泰彦博士と、立命館大学の萬年太郎博士が世話人となって大阪大学银杏会館にて10/11-13の日程で開催された。2023年度は九州大学の野島博士と熊本大学の中條岳志博士が世話人となり、ホテルメルパルク熊本にて10/18-20の日程で開催された。領域としては両ミーティングに開催費用として30万円の支援を行ったほか、領域内の若手研究者に積極的な参加を呼びかけ、大阪でのミーティングには12名、熊本でのミーティングには4名の領域関連の若手研究者が参加したほか、熊本のミーティングでは領域の公募班員の安原が特別講演者として講演を行った。**タタバイオ分子クラブ**は、配列から機能を予測することができない非ドメイン型バイオポリマーをはじめとした「従来の常識の枠に収まりきれない分子」の研究をしている若手研究者2名に隔月で話題提供をしてもらうランチョンセミナーシリーズである。なるべく多くの領域外の人にも参加してもらうことを目指し、あえて領域の名前は入れず、関連研究を実施している名古屋大学の松本有樹修教授と奈良県立医科大学の森英一朗准教授と協力を得て、主に領域代表の中川が運営を行った。現在までに16回のセミナーが開催され (<https://sites.google.com/view/tata-biomol/home>)、毎回100名近くが参加している。本領域の公募班員の矢木、鎌形、木村に加え、領域若手研究者の田中(冴)(計画研究荒川の研究分担者)、山崎(計画研究廣瀬の研究室スタッフ)も話題提供者として参加し、領域関連の研究成果を広くアピールし、交流を行った。

さらに、次世代のリーダーとなる若手研究者を育成するため、国内のメジャーな学会における公募シンポジウムへの応募を積極的にうながした。2022年の分子生物学会においては公募班員の野澤がワークショップ「細胞分裂の駆動力」を主催したほか、2023年の分子生物学会では公募班員の井出が公募シンポジウム「Biopolymers without defined structure」を主催し、天然変性タンパク質の相分離研究の第一人者 Richard Kriwacki 博士および分子凝集体のイメージングを進めている若手研究者 Dangeng Cai 博士を交えて緊密なディスカッションを行った。その際の招聘旅費は総括班から支出した。

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。

総括班の活動として、広報担当の荒川が中心となって学術変革領域(A)「非ドメイン型生物学」のホームページ (<https://nondomain.org/>) を作成し、領域のコンセプト、各班員の研究内容、公募情報などを公開した。



非ドメイン型生物学のホームページの人気コーナー「ノンドメインブログ」とPVの履歴

また、各班員のリレーエッセーをブログ形式で掲載した「ノンドメインブログ」を開設し、研究者の日常を広く一般に広めたほか、領域独自の解析技術についても、不定期の投稿記事にて紹介した。非ドメイン生物学のホームページには2023年4月26日の時点において**合計172,476件**のページビュー(PV)があり、**一日平均170件のアクセス**があった(左図)。領域の立ち上げ時や公募情報の掲載時だけでなくコンスタントにPVのアクセスがあったことから、ブログによる情報発信がコンスタントに関心を引き寄せていたと考えられる。なお、2023年の8月に大きなPVのピークがあるが、この期間には公募班員の自己紹介ブログが連日公開され、SNSにて情報を拡散した効果が現れていたものと考えられる。

また、領域の班員は各自積極的にアウトリーチ活動を行い、科学雑誌、市民講演会、高校の出張授業、テレビ番組、YouTube等で研究成果の発表・当学問領域の普及に努めた。以下に代表的なものを記す。

【計画班員】

- ・ 中川真一 「寄生するDNAを無毒化」 日経サイエンス SCOPE & ADVANCE 2024年4月号
- ・ 荒木喜美 「地上でがんばるマウスの話」 第95回日本遺伝学会公開市民講座 熊本大学発生医学研究所 2023年9月9日
- ・ 甲斐歳恵 「生殖細胞特異的な非膜オルガネラ・ヌアーージュの構造と機能」 33rd Forum in DOJIN (オンライン) 2023年10月27日
- ・ 廣瀬哲郎 高校生向け研究室ツアー 2022年7月23日/8月8日・2023年8月8日
- ・ 稲田利文 「遺伝暗号解読装置リボソームの新しい機能と「動き」の解析-mRNA ワクチンから老化疾患まで」 分子生物学会講師派遣事業 東京都立日比谷高等学校 2024年1月10日
- ・ 荒川和晴 「地上最強生物「クマムシ」を顕微鏡で見てみよう！」 慶應義塾大学先端生命科学研究所、2023 青少年のための科学の祭典 2022年11月3日・2023年8月5日 | 「最先端の生命科学で山形県鶴岡市から地球を救う(クマムシ・クモ糸)」 広島中等教育学校アカデミック講演会(オンライン) 2023年3月10日 | 「最強の生物学: 最強素材クモ糸と最強生物クマムシ」 ジュニアドクター鳥海塾(オンライン) 2023年12月9日 | 「サイエンスパークまつり2023」 山形県鶴岡市慶應義塾大学先端生命科学研究所 2023年11月4日 | ラボトラベラー Lab Traveler チャンネル動画 <https://www.youtube.com/watch?v=FzMrVraOqJA&t=4s>
- ・ 國枝武和 「宇宙にも耐える動物クマムシのサバイバル戦略を読み解く」 第35回東京大学理学部公開講演会 東京大学 2023年3月10日 | 「なぜクマムシは極限環境に耐えられるのか? その謎を探る」 日本学術会議・公開シンポジウム(オンライン) 2023年11月26日 | 「クマムシ×國枝武和-地球上の生物を連れて宇宙へ」 あしたワクワク未来予報(毎日放送) 2022年12月18日

【公募班員】

- ・ 安原崇哲 「DNAの損傷と修復-細胞ストレス応答の原理と、がんの本質の理解にむけて-」 関東SSH指定7女子高校等研究交流会特別講義 京都大学 2024年7月24日
- ・ 矢野真人 「RNA結合蛋白質解析の成せる用と美-再生医学との合流点を考える-」 令和5年度日本医師会生涯教育講座 2023年11月18日
- ・ 片岡研介 「生命の基本単位『細胞』を見て、感じて、操作しよう」 基礎生物学研究所 x ニコニコサイエンス、ニコニコ生放送 2023年11月18日 https://www.nibb.ac.jp/niconico_cell/

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。

総括班・計画研究の研究費の平均充足率は約 67%と大幅に減額されたため、苦しい運営を余儀なくされた。一方、公募研究の充足率は 90%であった。非ドメイン型バイオポリマーは萌芽的な学問領域であり、幅広い研究分野から研究提案を受けることが領域の推進につながることを意識し、当初より公募研究を重視していたが、最終的に公募班の予算は全予算のうちの 29%となった（応募要項では 15%以上が義務）。学術変革領域においては公募班の選考における合議制が廃止されたため、領域として戦略的に採択したい公募研究のいくつかは書類選考の結果不採択となってしまったものの、全体としては公募班の研究費が確保されたこともあり、結果として公募班と計画研究の間で数多くの共同研究が生まれた。

本領域の予算（単位：千円）

	2021年度	2022年度	2023年度
総括班	3,200	4,600	4,600
計画研究合計	226,350	145,300	145,400
① 中川	54,400	16,400	16,400
荒木	5,250	4,000	4,000
② 甲斐	18,700	13,800	13,800
③ 廣瀬	15,700	13,800	13,800
④ 稲田	11,200	9,860	9,860
今高	4,500	3,940	3,940
⑤ 泊	15,700	13,400	11,900
岡野	15,000	-	-
森本	-	7,000	5,500
築地	-	-	3,000
⑥ 荒川	16,700	10,200	10,300
國枝	12,000	6,500	6,500
田中	2,000	3,000	3,000
⑦ 尾山	13,400	7,800	7,800
秦	4,500	4,000	4,000
鈴木	4,500	4,000	4,000
⑧ 伊藤	10,400	8,800	8,800
西増	9,000	7,000	7,000
⑨ 依田	6,800	5,200	5,200
鄭	5,300	5,300	5,900
譚	1,300	1,300	700
公募研究 (18件)	-	64,800	64,800
合計	229,550	214,700	214,800

総括班予算は、2021年度が 320 万円、2022、2023年度が 460 万円であった。当初の予算と比較すると充足率は非常に低く（約 65%）、若手研究者の海外研究集会への派遣および技術講習会の開催は行うことができなかった。また、領域内のコミュニケーションツールとして Slack の利用を予定していたが、無料で同等のコミュニケーションが可能な Discord の利用に切り替えた。総括班の予算は、領域関連事務アシスタントの雇用費（約 100 万円/年）、領域会議の開催費（約 100 万円/年）、RNA フロンティアミーティング開催支援費（30 万円/年）、共用超解像顕微鏡保守費（50 万円/年）、アドバイザー・学術調査官の領域会議への旅費（約 50 万円/年）、および領域活動の発表のための旅費、領域内共同研究で作製したモデル動物の飼育費用、その他事務用品の経費として使われた。また、2022年度の第 95 回日本生化学会大会・32nd Tokyo RNA Club では Alex Holehouse (Washington University in St. Louis) 博士と Stephanie Moon (University of

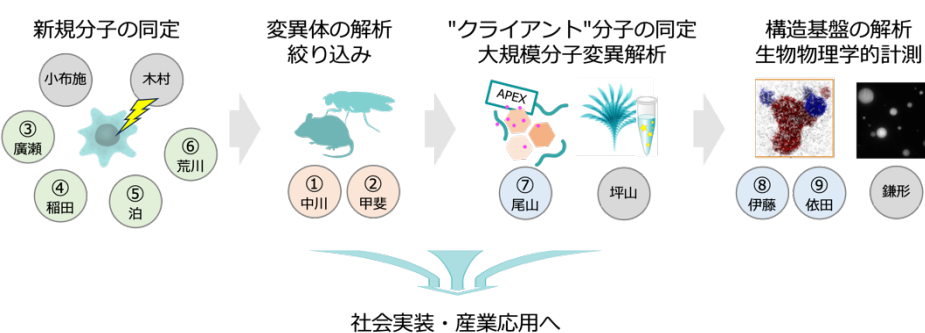
Michigan) 博士を、2023 年度の第 46 回日本分子生物学会年会・理研シンポジウムでは Richard Kriwacki (St. Jude Children's Research Hospital) 博士と Danfeng Cai (Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health) 博士を招聘し、それぞれ約 80 万円/年の経費を使った。総括班では引き続き若手支援として RNA フロンティアミーティング等への研究集会開催支援を行う他、関連研究を精力的に進めている海外の研究者を毎年数名招聘する予定である。2024 年度については日本生化学会大会において Gloria Brar 博士 (UC Berkeley)、Jonathan Bohlen 博士 (Institutimagine) を招聘する予定である。

各計画研究、公募研究においては、適切に予算が執行されていることを確認している。共同研究の項に記載したように、現在領域内では活発な共同研究が行われており、それぞれの班員が保有する設備を有効活用することで、領域全体として機器の重複購入はない。初年度に領域研究者が購入した高額機器は、計画研究①の LSM900 with Airyscan コンフォーカル超解像顕微鏡（38,000 千円）、計画研究⑥のオールインワン蛍光顕微鏡（10,000 千円）、計画研究⑧のクロマトグラフィー一式（8,091 千円）と高純度タンパク質生成システム（7,897 千円）、計画研究⑨の計算機システム（6,050 千円と 5,280 千円）であり、領域内の共同研究、ならびに各計画研究の研究に有効に利用されている。

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3年を経て、非常に緊密かつ迅速な共同研究体制を築き上げることに成功している。この共同研究体制が遺憾なく発揮されたのが、ノンコーディングRNA 4.5SHの新機能を明らかにした計画研究①の中川が主導した研究 (Yoshimoto *et al.* *Mol Cell* 2023) である。この研究の鍵となったのは作動装置を作るRNA結合タンパク質の同定とその機能検証であったが、LC-MSを用いた質量分析法に精通した計画研究⑦の尾山と、計画研究③の廣瀬が本領域の研究を推進するために整備していたRNA結合タンパク質の繫留実験用ライブラリを利用することで、サンプルの調製からわずか半年余りという異例の速度で研究を進めることができた。また、前期の研究で、**機能未知の非ドメイン型バイオポリマーを同定し、変異体の解析を介して重要なものを絞り込み、それらが相互作用する分子を同定して構造解析を通して詳細な分子機能に迫る、という領域総動員のパイプラインを確立することができた。**後述するように、後



前期の研究で確立されたパイプラインと公募研究による補強

期の公募研究ではこのパイプラインを協力的に補強することができるメンバーの研究課題も採択されている。引き続きこのパイプラインを活かしながら非ドメイン型バイオポリマーの生理的意義と動作機構を明らかにしつつ、得られた成果の社会実装を目指してゆく。

現在領域内の連携によって大きな成果が得られつつあるのが、計画研究①の中川と計画研究⑤の泊が主導する非ドメイン型タンパク質、哺乳類特異的な超天然変性タンパク質群に関する研究である。中川は、異常凝集体形成抑制活性及び機能障害時の細胞増殖抑制効果を指標に泊が同定した超天然変性タンパク質について変異マウスを作製し、少なくとも Hero11、Hero45、Fam133b の3種類が胎生致死に成ることを明らかにした。Hero11 に関しては既に計画研究⑨の依田らが粗視化モデルによって TDP43 の異常凝集を抑制する過程を再現できているほか、分子動力学シミュレーションによって、AlphaFold2 によって予測される中央部分の α ヘリックスが必ずしも安定な構造ではないことが明らかとなっている。また、Hero11 と相互作用するタンパク質については近位ビオチンラベル法によって精製したタンパク質群を計画研究⑦の尾山が同定済みであり、本領域で導入した LSM900 Airyscan を駆使したライブイメージングによって、Hero11 がそれらのタンパク質の動態を、特にストレス環境下で制御しているということが、中川の研究によって分かりつつある。今後、Hero11 とクライアントとなるタンパク質の局在の詳細を超解像顕微鏡観察によって解析することで、なぜこのタンパク質が初期発生に必要なのか、また、特定の構造を取りにくい Hero11 がどのようにしてクライアントのタンパク質の動態を制御しているのか、その詳細が明らかになると期待される。また、Hero45 に関しては計画研究④の稲田がリボソームと結合することを見出しており、さらに、稲田が作製したリボソームに結合しない Hero45 の変異を持つ変異マウスも中川が作製済みである。Hero45 と相互作用するタンパク質を計画研究⑦の尾山が同定し、さらにそれらの複合体の構造解析を計画研究⑧の伊藤が実施することで、新しいタイプの翻訳制御の機構が明らかになることが期待される。Fam133b についてはこれまで全く文献上の報告がなく、機能は不明であったが、胎生中期に致死になること、また、KO マウスから作製した MEF ではごく少数の標的遺伝子において、イントロンがスプライシングされずにエクソンとなる、いわゆるイントロンリテンションが起きている

ことが明らかとなっている。これらについてはスプライシングのレポーターを作製し、4.5SHの研究で力を発揮した廣瀬によるRNA結合タンパク質繫留システムや、尾山が確立した近位ビオチンラベルを用いたクライアントタンパク質同定法を用いて、詳細な分子動作機構を明らかにすることができると期待される。これら超天然変性タンパク質の分子機能解析において強力な手段となることが予想されるのが、精製タンパク質を用いた液滴形成アッセイである。前期の公募研究にも参加した鎌形は後期の公募研究にも参加しており、彼が保有するシステムをそのまま使うことで、新たな物理学的なプロパティを明らかにすることが可能となる。また、超天然変性タンパク質は既知の機能ドメインを持たない上に機能的に重要なアミノ酸も不明である。このようなタンパク質の機能解析に関しては、大規模なオリゴプールを利用した deep mutagenesis が有効なアプローチとなることが期待される。今回、公募班では、deep mutagenesis を利用したタンパク質デザインの実績 (Tsuboyama *et al. Nature* 2023) がある坪山が参加している。彼が持つノウハウを広く領域で共有することで、非ドメイン型タンパク質の変異体解析の標準プロトコルを確立することができると期待される。

また、計画研究③の廣瀬が主導する、核内非膜オルガネラを形成するゲノムのリピート領域から転写されている非ドメイン型RNA群に関する研究についても大きな成果が得られつつある。廣瀬はこれまでの領域研究で核内構造体パラスペックルの骨格として働く非ドメイン型RNA *Neat1* の詳細な解析を行い、新規に同定した *Neat1* の作動マシナリーに結合する非ドメイン型RNA結合タンパク質の活性によって、核内非膜オルガネラの分離分配が決められているという大きな成果を上げている (Takakuwa *et al. Nat Cell Biol* 2023)。また、非膜オルガネラに局在する新規ノンコーディングRNAを多数同定することにも成功している。非膜オルガネラ関連の研究では、前半の研究で公募班の木村の研究との連携で大きな進展があった。木村は特定の構造体に含まれるRNAを光刺激によって活性化させる逆転写反応を用いて同定するPIC法を開発し、泊との連携で、ヌアージュを狙って光刺激を行い、そこに局在するRNAを解析したところ、予想通り piRNA の前駆体が得られることが分かった。木村は後期の公募研究への参加が決まっており、前期の研究で始まった廣瀬、計画研究②の甲斐、泊との連携を更に強化して、既知の被膜オルガネラに局在するRNAのさらなる同定を目指すほか、RNA依存的な非膜オルガネラとしては知られているものの、骨格となるRNAが未同定の、いわゆるオーファン非膜オルガネラに局在するRNAの同定も目指す。また、廣瀬の研究により、クロマチンの繰り返し配列を含む領域から転写されたノンコーディングRNAが天然変性領域を持つRNA結合タンパク質と結合してある種の構造体を作っていることが明らかになってきている。後期の公募研究には小布施や野澤など、クロマチン関連の研究を進めている研究者が名を連ねており、さらなる連携研究の展開が期待できる。これらの研究を通して、**ノンコーディングRNAが形成する柔軟な非膜オルガネラの形成機構や分子動作機構の共通原理を探ってゆく。**

そのほか、領域オリジナルの新規タンパク質の同定も着実に進んでおり、特に計画研究⑥の研究代表者荒川および研究分担者國枝らによるクマムシ特異的な非ドメイン型タンパク質同定の研究が著しい。それらが実際に細胞のストレス耐性を向上させるという予備的な結果も得られつつあり、泊が同定したHeroタンパク質群と合わせ、非ドメイン型バイオポリマーの産業応用への期待が高まっている。領域としても、今後産学連携を積極的に後押しする体制を整えたい。最初の試みとして、**2024年度の領域会議においてはベンチャーキャピタルやスタートアップ企業に所属する人を招聘し、領域研究者との交流の時間を設ける。**現時点で、ベンチャーキャピタルのANRI、バイオベンチャー企業のxFOREST、floxbioからの参加が決まっている。その後もBioJapan 2025への参加などを含め、継続的に産学連携の機会を提供し、領域の研究成果の社会実装も合わせて目指してゆく。また、2023年度より、TDP43の疾患モデルマウスを有する築地が計画研究⑤の泊の共同研究者として新たに加わった。同じく泊の研究分担者の森本と共に、疾患モデルマウスを用いた非ドメイン型バイオポリマーの効果についての研究も強化して進めてゆく。

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。

本領域では幅広い専門的観点からの指導を仰ぐべく、異なる専門性を持った以下の4名に総括班の評価者を依頼した。

- ・永田和宏（JT生命誌研究館・館長）：タンパク質科学
- ・阿形清和（自然科学研究機構基礎生物学研究所・所長）：発生生物学・RNA学
- ・塩見美喜子（東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻）：分子生物学・RNA学
- ・津本浩平（東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻）：タンパク質科学

総括班内での連絡はDiscord上で通年行い、常にやり取りを外部からモニターできる仕組みを作った。また、年に1回開催される領域班会議で研究方針ならびに研究成果を外部アドバイザーに報告し、領域が目指すべき方向性について客観的かつ大局的な視点からの助言を得た。非ドメイン型バイオポリマーは大別すると天然変性タンパク質に代表される非ドメイン型タンパク質とノンコーディングRNAに代表される非ドメイン型RNAに分かれるが、永田・津本には主にタンパク質研究の視点からの助言を、阿形・塩見からは主にRNA学の視点からの助言を得ている。

1.研究の進展状況および研究成果について

- ・タンパク質科学の立場からも、配列から機能を予測できない分子種、いわゆる天然変性タンパク質（IDP）についての理解は、構造・物性はもとより、機能との関連が特に重要である。IDPとncRNAが核内非膜オルガネラの選別を制御していること、ncRNA *4.5SH* の機能を明らかにしたこと、HEROタンパク質の新たな機能、等、すでに教科書に新しいページを加えるような優れた成果が上がっている。また、神経変性疾患に関する本質的理解への展開は、本領域の新たな地平の広がりを感じさせる。
- ・本領域「非ドメイン型バイオポリマーの生物学」は、昨今の分子生物学、生化学、細胞生物学の分野で、敢えて問題にする必要がないとして無視されてきた部分に焦点を当て、それらの生物学的な重要性に着目したという点で、まずインパクトの強い研究班である。重要なのはRNAやポリペプチドの配列であり、それらが形成する構造こそが機能の特異性を決定するという従来の考え方を大きく変えることになり、むしろ形をとらないことの重要性を知らしめるものとなった。
- ・領域代表の中川を中心とした共同研究で、ノンコーディングRNA *4.5SH* がマウスの発生に必須であり、かつエキソンスキッピングの活性をもっていることは驚きであり、他にも核内非膜オルガネラの分離分配を決定する非ドメイン型RNA *Neat1* の作用、興味深いところではクマムシ特異的な非ドメイン型タンパク質の同定など、オリジナリティの高い研究が進行中である。研究は着実に進展しており、今後の展開が待たれる領域となっている。
- ・研究領域の設定目的に照らして、着実に研究が進展していると思われる。発表された論文数も領域全体で多く、インパクトの高い論文の割合も多く評価できる。問題点ではないが、中間発表時点でまだ論文が出ていない公募班からの論文発表も今後期待したい。

2.研究組織の連携体制

- ・本領域は、IDPやノンコーディングRNA（ncRNA）を非ドメイン型と捉え、RNAとタンパク質を対象に、特に生物学的機能を生理、細胞、分子の三つのユニットに分け、班員が各々の専門性を発揮、優れた相互連携により重要な研究課題に取り組む体制が構築されている。最先端プロテオミクス、分子動力学等、解析手法に関しても最先端の班員が揃っており、技術面でも申し分ない連携体制にあること、計画班における、あるいは公募班員との有機的連携が強固なものになっていることも高く評価できる。

- ・ 従来はばらばらに個々の分子について研究してきた研究者が一堂に会して、それぞれの個性のなかから普遍的な〈意味〉を抽出しようとする研究班となっており、特に共同研究のなかから大きな成果が生まれつつあることが注目される。また、領域内の共同研究が、多くの具体的な成果を生んでいることも特筆されるべき点である。
- ・ 有機的連携は十分保たれている。領域内の共同研究も数多く進んでおり、今後のさらなる発展が期待される。計画研究と公募研究の調和に関しては、特に公募研究の木村（熊本大学）との共同研究が目立っており、今後、木村自身が責任著者としての論文が発表されることを期待したい。

3.若手育成

- ・ 若手を中心としたコミュニティ作りが真剣に模索されている点が注目される。領域会議でのワールドポスター形式の導入やオンラインでの定期的なランチョンセミナーなどは、若手にいい影響を与えていると思われる。
- ・ 若手研究者の育成のための取り組みも複数なされている。若手が主催で会議を行う企画があっても良いであろう。今後の取り組みに期待したい。

4. アウトリーチ活動

- ・ アウトリーチ活動、班内の勉強会による若手育成等の活動も順調である。
- ・ 研究成果の積極的な公表や普及に関しても、市民講演会や高校での出張授業、TV番組、YouTubeなど、色々な企画があり申し分ない。
- ・ 総括班の予算が限られている中、ブログ形式で領域の活動を紹介することで効果的に情報発信することができているのは良いことである。

5. 今後の研究領域の推進方策

- ・ 「ドメイン型分子と非ドメイン型分子が協調して機能する姿を明らかにする」という、本領域の大目的が、現在の研究対象から次々と明らかになることが強く期待でき、中間報告以降の更なる進展がとても楽しみである。
- ・ 領域の今後の展開として、ベンチャーキャピタルやスタートアップ企業の人材を招聘して、領域研究者との交流を図るとのことであるが、本研究班は、基礎研究として領域が発足したばかりに近い新しい領域であり、あまり性急に応用研究、社会実装に目が向きすぎることを、個人的には危惧している。
- ・ 領域内の共同研究も数多く進んでおり、今後のさらなる発展、論文発表が期待される。2024年度の領域会議においては、ベンチャーキャピタルやスタートアップ企業の人を招聘し、領域研究者との交流の時間を設けるとあるが、非常にユニークな企画で、何かこの様な企画から出現することが期待される。本領域が取り扱っているテーマは非常に重要な研究領域であり、計画通り、あるいはそれを超えてさらに当該研究を進展してもらいたい。
- ・ 環境が変わったときに生物がどのようにフレキシブルに対応するのか。いろいろなストレスがかかったときにどのように生物が耐えるのか。こういった問題を解決するために生物は非ドメイン型バイオポリマーを利用している、ということがこれまでの研究から明らかになりつつある。こういう仕組みがあるからこそ、新しい環境で新しい種が生まれるのかもしれない。さらに領域研究を推進し、今までになかった生物学的なコンセプトを出すことを目指してほしい。また、総括班を始めとして全体的に計画研究の予算の充足率が低く、海外研究集会への若手研究者派遣の中止など、当初の計画の変更を余儀なくされたことは遺憾である。先進的な研究を進めるためにも、十分な予算が確保されるべきであろう。