

領域略称名：新生鎖生物学
領域番号：3607

平成 26 年度～平成 30 年度
科学研究費助成事業（科学研究費補助金）
「新学術領域研究（研究領域提案型）」
研究成果報告書

「新生鎖の生物学」に関する総合的研究

令和 2 年 6 月

領域代表者 田口 英樹

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

「新たに生まれた鎖」は伸び続ける

2014 年度にスタートした新学術領域研究「新生鎖の生物学」が終了した。本領域のエッセンスを一言で言えば、「これまでタンパク質合成の単なる中間体と考えられていた翻訳途上の新生ポリペプチド鎖（新生鎖）を主役とした新たなバイオロジーを切り拓く」というものである。

言うまでもなく細胞内のすべてのタンパク質は新生鎖を経由して産まれる。生命のセントラルドグマにおける翻訳は伝統ある研究分野だが、従来の新生鎖は受動的な産物としての位置付けであった。誰もが見ていたが、詳細に見てみようという発想がなかった分子（新生鎖）に視点を与えたのが本領域であるとも言える。領域内が盛り上がるだけでなく、学会でのシンポジウム、領域主催の国際シンポジウムなどを通して国内外の班員以外にもこのコンセプトが浸透した意義は大きいと考える。

いざ始まってみると、領域申請時に想定していた以上に新たなバイオロジーが展開した。その詳細は本成果報告書の後半に各班員の成果が掲載されているのでご覧になってほしいが、例えば、新生鎖が自らの翻訳伸長を一時停止する現象の普遍性、分子機構、生理機能が続々と明らかとなったり、場合によっては、新生鎖は終止コドンが来る前に自らの翻訳を途中終了したりするなど新たな品質管理機構も見つかった。これまで遺伝情報の発現制御として転写レベルや翻訳開始時の調節機構はよく研究されてきたが、翻訳が開始してポリペプチド鎖が伸びていきながらもさまざまな制御が可能であるという新たなコンセプトを確立したとも言える。

領域活動の集大成的な位置付けとなる国際会議 "Proteins; from the Cradle to the Grave" は 2018 年 8 月に開催された（滋賀県・延暦寺会館）。この国際会議は京都産業大学タンパク質動態研究所との共催で、海外演者 14 名を含む参加者約 180 名という盛大なミーティングとなった。2016 年の河口湖での国際会議に続けて、延暦寺での国際会議も *Nature Structural Molecular Biology* (NSMB) 誌にミーティングレポートが掲載された (Herrmann JM *et al*, NSMB 2018)。さらに、延暦寺では *Nature* 誌と NSMB 誌のエディターが会議に参加したことからも本領域の注目度、重要性がわかっていただけたと思う。

さて、領域名称の「新生鎖の生物学」は英語で Nascent-chain biology、領域ウェブサイトの URL では nascentbiology とした。URL では短い方がいいだろうという軽い気持ちであったが、ある方から、これだと「未熟な生物学」みたいなニュアンスになってしまうがこれでいいのか、というご指摘があった。確かにそうであると思うと同時に、nascent を辞書で調べたところ、“ just coming into existence and beginning to display signs of future potential ” ということで、「産まれたばかりで今後のポテンシャルを持つ」生物学と言うことなら、それはそれでよいだろうと納得した。

まだまだ生まれたての領域であり、ここで終了するのは忍びない。しかし、「新生鎖の生物学」で新たに生まれた「鎖」、つまりネットワークはまだまだ nascent、つまり伸長途上である。今後の展開が予想付く内容もあれば、まったく想像すらしていない展開もあるだろう。いずれにしても、この新学術領域から始まった研究の発展を祈念しながら筆をおきたい。

(領域ニューズレター vol 5 の巻頭言を一部改変)

科研費新学術領域研究「新生鎖の生物学」領域代表
東京工業大学・科学技術創成研究院・細胞制御工学研究センター 教授
田口 英樹

研究組織

(計画研究)

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	p.8
研究分担者	今高 寛晃	兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授	p.10
研究分担者	富田 (竹内) 野乃	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授	p.12
研究代表者	稲田 利文	東北大学・薬学研究科・教授	p.13
研究分担者	長尾 翌手可	東京大学・大学院工学系研究科・助教	p.15
研究分担者	岩川 弘宙	東京大学・定量生命科学研究所・助教	p.16
研究代表者	田中 元雅	国立研究開発法人理化学研究所・ 脳科学総合研究センター・チームリーダー	p.17
研究代表者	稲葉 謙次	東北大学・多元物質科学研究所・教授	p.18
研究分担者	門倉 広	東北大学・多元物質科学研究所・准教授	p.21
研究代表者	河野 憲二	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授	p.23
研究分担者	木俣 行雄	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授	
研究代表者	藤木 幸夫	九州大学・生体防御医学研究所・特任教授	p.25
研究分担者	田村 茂彦	九州大学・基幹研究院・教授	
研究代表者	千葉 志信	京都産業大学・総合生命科学部・准教授	p.28
研究分担者	伊藤 維昭	京都産業大学・研究機構・シニアリサーチフェロー	

(公募研究)

研究代表者	内藤 哲	北海道大学・大学院農学研究院・教授	p.31
研究代表者	船津 高志	東京大学・大学院薬学系研究科・教授	p.32
研究代表者	川口 寧	東京大学・医科学研究所・教授	p.34
研究代表者	伊野部 智由	富山大学・准教授	p.35
研究代表者	秋山 芳展	京都大学・ウイルス研究所・教授	p.37
研究代表者	市橋 伯一	大阪大学・情報科学研究科・准教授	p.38
研究代表者	中井 正人	大阪大学・蛋白質研究所・准教授	p.39
研究代表者	岡本 浩二	大阪大学・生命機能研究科・准教授	p.41
研究代表者	田中 良樹	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教	p.42
研究代表者	佐藤 明子	広島大学・大学院総合科学研究科・准教授	p.44
研究代表者	西頭 英起	宮崎大学・医学部・教授	p.46
研究代表者	阪口 雅郎	兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授	p.47
研究代表者	吉久 徹	兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授	p.48
研究代表者	潮田 亮	京都産業大学・総合生命科学部・助教	p.49
研究代表者	森戸 大介	京都産業大学・タンパク質動態研究所・主任研究員	p.52
研究代表者	渡辺 洋平	甲南大学・理工学部・准教授	p.53

研究代表者	伊藤 拓宏	国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー	p.53
研究代表者	鵜澤 尊規	国立研究開発法人理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員	p.55
研究代表者	池内 与志穂	東京大学・生産技術研究所・講師	p.56
研究代表者	姚 関	北海道大学・先端生命・教授	p.58
研究代表者	齋尾 智英	北海道大学・理学系・助教	p.59
研究代表者	高橋 広夫	金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授	p.61
研究代表者	三嶋 雄一郎	東京大学・分子研・助教	p.63
研究代表者	森 博幸	京都大学・再生研・准教授	p.63
研究代表者	石濱 泰	京都大学・薬学研・教授	p.65
研究代表者	山下 暁朗	横浜市立大学・医学部・准教授	p.67
研究代表者	土居 信英	慶應義塾大学・理工学部・教授	p.69
研究代表者	喜井 勲	信州大学・准教授	p.71
研究代表者	岩崎 信太郎	国立研究開発法人理化学研究所・主任研究員	p.73
研究代表者	清水 義宏	国立研究開発法人理化学研究所・チームリーダー	p.74
研究代表者	佐伯 泰	公益財団法人東京都医学総合研究所・室長	p.76

交付決定額（配分額）

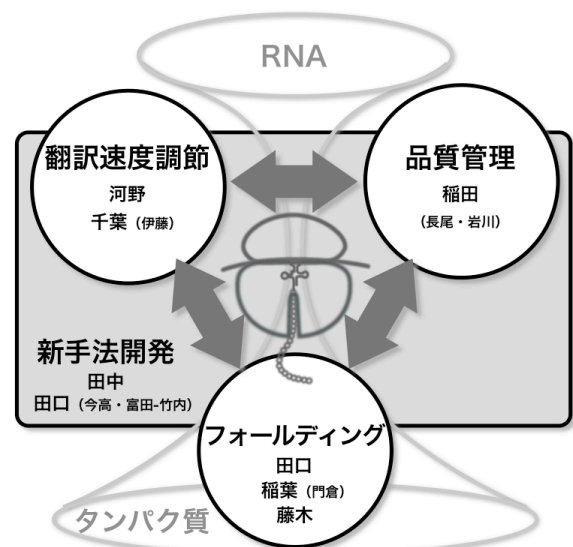
	合計	直接経費	間接経費
平成 26 年度	337,090,000 円	259,300,000 円	77,790,000 円
平成 27 年度	319,800,000 円	246,000,000 円	73,800,000 円
平成 28 年度	314,210,000 円	241,700,000 円	72,510,000 円
平成 29 年度	312,130,000 円	240,100,000 円	72,030,000 円
平成 30 年度	313,040,000 円	240,800,000 円	72,240,000 円
総計	1,596,270,000 円	1,227,900,000 円	368,370,000 円

【研究目的と研究成果の概要】

正確な遺伝子発現は生命現象の根幹である。DNA に刻み込まれた遺伝情報は RNA を経てリボソームによってアミノ酸配列に翻訳される。この翻訳途上の新生ポリペプチド鎖をここでは新生鎖 (nascent chains) と呼ぶ。数千から数万種におよぶ細胞内のタンパク質はいきなり完成するわけではなく、mRNA の情報がポリペプチド鎖へと変換される過程で、すべて新生鎖の状態を経過する。従来、新生鎖はポリペプチド合成反応の単なる過渡的な中間体にすぎないと理解されてきたが、新生鎖が自分自身の機能化や品質管理も含めて、細胞全体の生命現象の制御と調節に関わることが領域発足前に徐々に明らかになってきた。すなわち、これまで受動的な反応中間体と考えられていた新生鎖そのものが、リボソームをプラットフォームとして、ときには独自の機能を獲得し、積極的にさまざまな生命現象に関与するのである。さらに、新生鎖の成熟・品質管理機構の破綻が細胞の恒常性を攪乱し、さまざまな疾患の原因となっていることも明らかになりつつあった。このように新生鎖の重要性が認識されはじめているものの、まだ未開拓の分野であった。

そこで本領域では、生命現象の根幹に関わる新生鎖を主役に据えた「新生鎖の生物学」を設定することで、新生鎖をハブとする遺伝情報発現と細胞機能制御のネットワーク解明および分子機構を理解し、「新生鎖を介した細胞機能の恒常性維持」という新しいパラダイムを構築することを目的とした。

本領域では、新生鎖の生物学という新しい分野を「新生鎖の翻訳速度調節」「新生鎖の品質管理機構」「新生鎖のフォールディング・修飾・局在化」の3つにブレイクダウンするとともに、「新生鎖研究のための新たな方法論の開発と応用」にも注力し、研究期間内に以下の問いに答えることを当初の目標とした。それらに対する達成度合いをまとめる (個別の研究成果は後述)。



【1. 新生鎖の翻訳速度調節】

a. 翻訳アレストや翻訳速度微調整の仕組みとその制御機構はどのようなものか？

遺伝子の発現制御における翻訳速度調節の重要性をいち早く見出したのは、2001年に伊藤維昭が発見した大腸菌の SecM の翻訳伸長の一時停止 (翻訳アレスト) である (*Mol Cell* 2001, *Cell* 2002)。その後、翻訳アレストの制御機構については我が国の貢献が大きく、本領域でもさまざまに研究を推進した。

千葉志信らは、SecMに加えて、千葉が自ら発見した翻訳アレストである枯草菌 MifMなどを主な材料とし、翻訳アレストの制御機構の解明に注力した。これまでに、1) MifM とリボソームとの翻訳アレスト複合体の構造解析をミュンヘン大学の Daniel Wilson 博士と行い、MifM-リボソーム相互作用の詳細を明らかにした (*Nat Commun* 2015)。2) MifM の翻訳アレスト解除における分子機構を明らかにした (*PNAS* 2015)。3) 公募班の秋山芳展、森博幸 (京大) らとの共同研究で、ビブリオ菌において生理機能に直結した新規アレスト因子 VemP を見出した (*PNAS* 2015)。

河野憲二らは、2011年に哺乳動物の小胞体ストレス応答時に起こる Xbp1u タンパク質による翻訳アレストが自身をコードする mRNA を小胞体膜に局在させる機能をもつことを見出し (*Science* 2011)、その分子機構を本領域にて主に研究した。翻訳アレストを起こした XBP1u-mRNA 複合体を小胞体膜上のトランスロコンまで運ぶのはシグナル認識粒子 (SRP) であることを見出し、ノンカノニカルな SRP 経路と名付けた (*PNAS* 2016)。さらに、翻訳アレストがどのように起こるのかを光架橋法、質量分析、免疫沈降、無細胞翻訳系、クライオ電顕など領域内の連携をフルに活かして解析し、Xbp1u 新生鎖と

リボソーム uL4 サブユニット相互作用が重要であることを突きとめた。

b. 翻訳アレストの普遍性は？

c. 翻訳速度と新生鎖フォールディングはどう相関しているのか？

上記二つは関連しているので一緒に記載する。

翻訳アレスト（翻訳一時停止）は細胞内での翻訳時にどのくらい普遍的に起こる現象なのであろうか。この問題に関して田口英樹らは千葉志信（および伊藤維昭）らと連携して、大腸菌ゲノム上の遺伝子の約 1/4 に相当する 1038 遺伝子の翻訳途中の新生鎖（ペプチジル tRNA）がどの程度一時停止するのかを、生きた大腸菌 (*in vivo*) および大腸菌の再構築型無細胞翻訳系（PURE システム：*in vitro*）を用いて解析した。この新生鎖プロファイリング（iNP = integrated *in vivo* and *in vitro* nascent chain profiling と命名）の結果、80%以上の遺伝子で、翻訳途上産物の蓄積が 1 回あるいは複数回起こっていることがわかり、翻訳の一時停止は、これまで考えられた以上に普遍的な生命現象であることが明らかとなった（*PNAS* 2016）。

また、この結果を生物情報学的に解析した結果、翻訳一時停止の頻度と自発的フォールディングの効率とに相関があることが示唆され、今後、翻訳の一時停止がどのようにフォールディングに影響を与えるのか、またシャペロンによるフォールディング支援とどう関連するのかという問題に発展している。

【領域発足後の新展開】新規の非典型的な翻訳動態の発見

さらに田口、千葉（伊藤）、長尾は、上記の iNP 解析の発展研究で連携した結果、領域発足時には全く想定していなかった新規の翻訳動態を発見した。具体的には、大腸菌において負電荷アミノ酸の翻訳時にリボソームが解離して終止コドンとは無関係に翻訳が途中終了する現象である（*Mol Cell* 2017）。これは新生鎖依存でリボソームが不安定化（IRD = Intrinsic ribosome destabilization）するために起こる全く新規の翻訳動態である。この IRD は翻訳系の一種の不備とも言えるが、大腸菌は IRD を細胞内のマグネシウム濃度のセンサーとして活用していることも見出した。この IRD 研究は、真核生物でどうなのか？、他の生理機能は？、既知 ORF に依らないタンパク質の翻訳など、大きな広がりを見せている。

【2. 新生鎖の品質管理機構】

a. 異常 mRNA の品質管理において新生鎖はどのような役割をもつのか？

b. 新生鎖がフォールディングするか分解されるかの運命決定機構はどうなっているのか？

c. 異常 mRNA の品質管理因子が、異常新生鎖の分解にどのような役割をもつのか？

真核生物の新生鎖の品質管理は稲田利文らが世界に先駆けて開拓した。具体的には、連続した塩基性配列を持った新生鎖が翻訳アレストを引き起こした結果、新生鎖のユビキチン化とプロテアソームによる迅速な分解（Ribosome-associated Quality Control: RQC）が起こる。本領域にて、稲田は、RQC と mRNA の品質管理機構（NGD）における新生鎖の運命決定機構の解析を目指し、以下のような結果を得た。1) E3 ユビキチンライゲース RQT1(RQC-Triggering factor 1)/HEL2 が翻訳伸長中に停滞したリボソームの特異的な構造を認識し、リボソームタンパク質 Rps20 をユビキチン化することが RQC に必須であることを発見、さらに、停滞した 80S リボソームを各サブユニットに解離する新規の因子 RQT2/3/4 複合体を世界で初めて同定した（*Nat Commun* 2017、公募班の佐伯、岩崎との連携）。2) NGD と RQC が共役していて、停滞した2つのリボソームが1つの単位（ダイソーム）として品質管理機構が発動することを見出した（*EMBO J* 2019、公募班の佐伯との連携）。3) 機能欠

損リボソームを認識して排除する品質管理機構として 18S NRD を解析した結果、リボソームタンパク質 uS3 のユビキチン化が必須であることを証明し、必須な E3 ユビキチンライゲース群を同定した (*Cell Rep* 2019)。

長尾翌手可 (稲田の研究分担者) は、翻訳初期段階における品質管理機構の一つ、リボソームドロップオフの解析をペプチジル tRNA の液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) での分析により行った。ペプチジル tRNA の MS 解析は田口・千葉との連携につながった (長尾-田口-千葉ら *Mol Cell* 2017)。

岩川弘宙 (稲田の研究分担者) は、RISC による RNA とタンパク質の品質管理機構の解明を目指して研究した結果、RISC 依存のリボソーム停滞の役割に関する新知見を得た。

【3. 新生鎖のフォールディング・修飾・局在化】

a. 新生鎖のフォールディングにおける各種シャペロンの連携・役割分担の機構は？

翻訳に伴ってリボソームから新たに生まれてくるポリペプチド鎖 (新生鎖) がどのように立体構造を形成 (フォールディング) するのはセントラルドグマ終端における重要課題の一つである。田口英樹らは大腸菌の再構築型無細胞翻訳系 (大腸菌 PURE システム) を用いて、これまでに 4000 種類を超える大腸菌の全タンパク質を個別に翻訳してフォールディングの性質やシャペロンの影響を解析、シャペロンの細胞内基質を同定するなど、新生鎖のフォールディング研究に新たなアプローチを導入した。本課題では、その系を拡張し、翻訳に伴った膜タンパク質フォールディング (*Sci Rep* 2015)、プロテアーゼを使った大規模な翻訳時フォールディングアッセイ系の確立 (*Protein Sci* 2019)、500 種類超の出芽酵母タンパク質の翻訳時フォールディングとシャペロン効果の解析 (*Sci Rep* 2018) を行った。さらに翻訳伸長の一時停止の大規模実験から翻訳一時停止の頻度がフォールディングに影響を及ぼしうることを示した (*PNAS* 2016)。

b. 新生鎖ヘジスルフィド結合はどのように導入されるのか？

ジスルフィド結合の形成は、新生鎖の合成・局在化・立体構造形成過程において、PDI と新生鎖間の特異的な相互作用に依存して進行すると予想される。稲葉謙次は構造生化学および細胞生物学の両方のアプローチにより、多くの成果を得た。1) PDI 酸化酵素の Ero1 α や Prx4、PDI ファミリーの ERp44 の機能と構造が小胞体-ゴルジ体間の pH 勾配や亜鉛イオンにより制御を受けることを発見し、その分子構造基盤を解明した (*PNAS* 2017、*Nat Commun* 2019)。2) PDI の 1 分子解析により PDI の新たな触媒機構を解明した (*Nat Chem Biol* 2019)。3) PDI ファミリー酵素の発現維持に小胞体ストレスセンサー Ire1 α が働き、新たに合成されたインスリンのフォールディングに必要なことを発見した (*J Cell Biol* 2018 河野らとの連携) 4) 分担者の門倉 広らとともにリボソーム上で翻訳合成されつつ小胞体内で伸長する LDL 受容体の新生鎖にジスルフィド結合が導入される過程を観察する系を構築した。

c. 新生鎖はオルガネラ膜へどのような機構で挿入されるのか？

真核生物の新生鎖の 20~30% は膜に挿入されるらしい。では、どのような因子の助けを借りて新生鎖はオルガネラ膜へと挿入されるのだろうか。この問いについて、藤木幸夫らは、テイルアンカー型膜タンパク質 (TA) をモデルとしてリボソーム翻訳時およびその直後における新生鎖の運命決定機構を解明し、品質管理システムと共役したタンパク質翻訳後選別輸送機構という新たな概念の創出を目指した。藤木らは、無細胞翻訳系と中性条件下での SDS-PAGE を組み合わせて翻訳途上の新生鎖 TA を検出する *in vitro* 実験系を確立し、ペルオキシソーム局在性 TA の翻訳速度が遅延していることを見出した (*JBC* 2017)。

また、TA が関与するペルオキシソーム機能の制御機構として、a) 細胞死促進因子 BAK (TA) の一部ペルオキシソーム局在化とカタラーゼのサイトゾルへの放出による酸化ストレス抵抗性抗細胞死作用

を発見 (*JCB* 2017) ;b)ペルオキシソームの細胞内移動を担う Miro1 のスプライシングバリエント 2 種 (TA)を同定した (*JCB* 2018)。

【新生鎖研究の新しい方法論の開発と応用】

a. tRNA リボソームプロファイリングの開発とその応用

2009 年に Ingolia, Weissman らによって開発されたリボソームプロファイリング (Ribo-Seq) は次世代シーケンサーを使って細胞内の翻訳状況を網羅的、かつ、コドンレベルでの精度で解析できる画期的な手法である。そこで本領域では、新生鎖研究に必須の新技术の一つとして、Ribo-Seq にも注力した。従来の Ribo-Seq では tRNA は解析できなかったが、田中元雅らは、リボソームに結合した tRNA を網羅的かつ 1 塩基レベルの高分解能で調べることができる tRNA リボソームプロファイリング法および tRNA/mRNA 同時リボソームプロファイリング法を新規に開発した (田中ら *Cell Rep* 2018)。さらに、公募研究後半では、Ingolia ラボでポスドクを終えたあとに独立した岩崎信太郎が加わり、一層 Ribo-Seq 体制が充実し、連携研究も含めて多くの成果を挙げた (岩崎-稲田ら *Nat Commun* 2017、岩崎-今高-伊藤拓宏ら *Mol Cell* 2019 など)。領域発足当初は実施したくても実現が難しかった Ribo-Seq が今では比較的気軽に試せるツールになったのは大きな進展である。

b. 真核生物の翻訳系はどのように再構成できるのか？

新生鎖研究に再構成系は必須である。大腸菌の翻訳系をベースとした再構築型無細胞翻訳系 (大腸菌 PURE システム) は上田卓也 (早稲田大) らによって開発されたあと市販されており、国内外の新生鎖研究の重要なプラットフォームとなっている。大腸菌に加えて、真核生物由来の PURE システム (真核 PURE システム) が国内外で強く望まれていたので、本領域では重点分野として真核 PURE システムの開発を強く推進し、領域内外との連携に活用することを申請時の目標の一つとした。その支援もあって、ヒト因子については今高寛晃、出芽酵母については富田野乃 (どちらも田口の研究分担者) らが真核 PURE システムを完成させた。特に、今高らによるヒト由来の系は、さまざまな連携研究が進展し、そのいくつかは論文発表につながっている (今高-田口ら *Sci Rep* 2018、今高-岩崎-伊藤拓宏ら *Mol Cell* 2019、今高-伊藤拓宏ら *Mol Cell* 2019)。本領域で開催した国際シンポジウムなどでの口コミも含めて国外からの問い合わせも多数届いており、領域を組織するときには予想した以上に、真核 PURE システムは世界中が待ち望んでいた実験系であった。本新学術領域を立ち上げた大きな成果だと考える。

計画研究

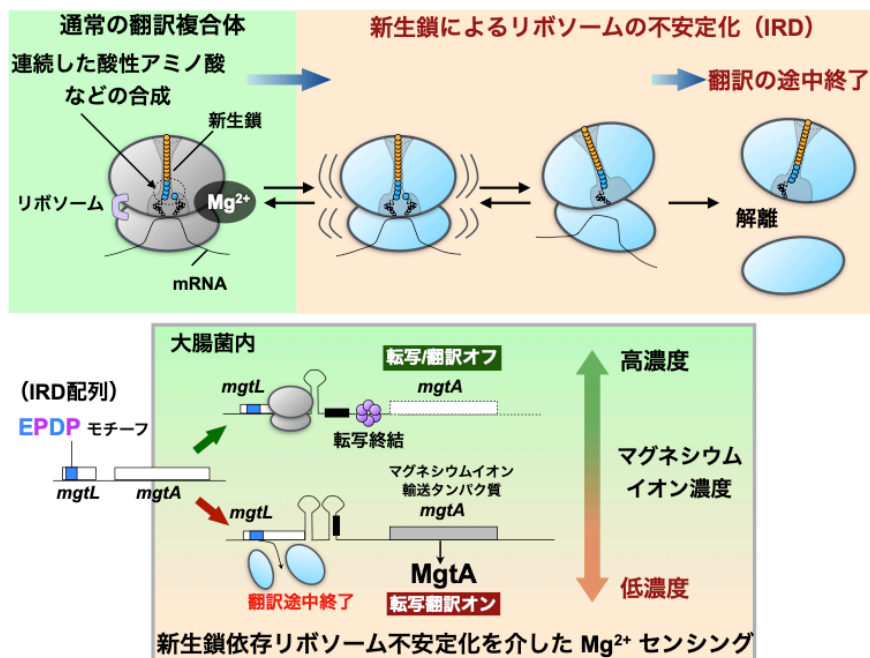
領域代表

田口 英樹 東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター 教授

研究課題名：新生鎖フォールディングとシャペロン効果の網羅解析

研究成果の概要：

1. 翻訳動態研究：千葉志信・伊藤維昭らとの共同研究にて、大腸菌の 1000 種類以上の遺伝子の翻訳時にどのくらいの頻度で翻訳伸長の一時停止が起こるかを、新生鎖を直接検出するアプローチ（新生鎖プロファイリング）によって調べた。その結果、80%以上の遺伝子で、翻訳途上産物の蓄積が1回あるいは複数回起こっていることを見出した。翻訳伸長の原則自体は tRNA や mRNA に起因する場合がこれまででもよく知られていたが、ここで見出した翻訳の一時停止の半数以上が新生鎖に起因していることを示唆する結果を得た。以上より、翻訳の一時停止はこれまで考えられた以上に普遍的な生命現象であることを明らかとした（Chadani Y *et al.* *PNAS* 2016）。大腸菌において、負電荷アミノ酸の連続配列や、負電荷アミノ酸とプロリンとの混合配列の翻訳時に、合成されてきた新生鎖がリボソームを不安定化して翻訳を途中で終了する現象（Intrinsic Ribosome Destabilization: IRD）を発見した。この IRD は翻訳系の不備と捉えることもできるが、大腸菌はこの IRD を使って細胞内のマグネシウム濃度をモニターしてマグネシウム輸送タンパク質の発現を制御していることも明らかとした（Chadani Y *et al.* *Mol Cell* 2017）（模式図）。
2. 翻訳に共役したフォールディング・シャペロン研究：大腸菌の再構築型無細胞翻訳系（PURE システム）を用いて、膜タンパク質フォールディング、出芽酵母タンパク質のフォールディングやシャペロンの効果について大規模な解析を行った（Niwa T *et al.* *Sci Rep* 2015, Uemura E *et al.* *Sci Rep* 2018, Niwa T *et al.* *Protein Sci* 2019 など）。



代表的な論文：

1. †Konno H, †Watanabe-Nakayama T, Uchihashi T, Okuda M, Zhu L, Kodera N, Kikuchi Y, *Ando T, *Taguchi, H.

- Dynamics of oligomer and amyloid fibril formation by yeast prion Sup35 observed by high-speed atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 7831-7836 (2020)
2. Muta M, *Iizuka R, Niwa T, Guo Y, Taguchi, H. and *Funatsu T. Nascent SecM chain interacts with outer ribosomal surface to stabilize translation arrest. *Biochem J* 477, 557-566 (2020)
 3. Niwa T, Uemura E, Matsuno Y, *Taguchi, H. Translation-coupled protein folding assay using a protease to monitor the folding status. *Protein Science* 28, 1252-1261 (2019)
 4. *Nojima T, Niwa T, *Taguchi, H. Proteome analysis of phase-separated condensed proteins with ionic surfactants revealed versatile formation of artificial biomolecular condensate. *Biomacromolecules* 20, 539-545 (2019)
 5. Sugita S, Watanabe K, Hashimoto K, Niwa T, Uemura E, Taguchi, H., *Watanabe YH. Electrostatic interactions between middle domain motif-1 and the AAA1 module of the bacterial ClpB chaperone are essential for protein disaggregation. *J Biol Chem* 293, 19228-19239 (2018)
 6. Uemura E, Niwa T, Minami S, Takemoto K, Fukuchi S, Machida K, Imataka H, Ueda T, Ota M, *Taguchi, H. Large-scale aggregation analysis of eukaryotic proteins reveals an involvement of intrinsically disordered regions in protein folding. *Sci. Rep.* 8:678. doi: 10.1038/s41598-017-18977-5. (2018)
 7. Chadani Y, Niwa T, Izumi, T., Sugata, N., Nagao, A., Suzuki, T., Chiba S, *Ito K. and *Taguchi, H. Intrinsic ribosome destabilization underlies translation and provides an organism with a strategy of environmental sensing. *Mol. Cell* 68, 528-539 (2017)
 8. *Fujiwara, K., Sawamura, T., Niwa, T, Deyama, T, Nomura, MS, Taguchi, H., Doi, N. In vitro transcription-translation using bacterial genome as a template to reconstitute intracellular profile. *Nucleic Acids Res.* 45, 11449-11458 (2017)
 9. Chadani Y, Niwa T, Chiba S, *Taguchi, H., *Ito K. Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113, E829-38 (2016)
 10. Niwa. T, Fujiwara., K., *Taguchi, H. Identification of novel *in vivo* obligate GroEL/ES substrates based on data from a cell-free proteomics approach. *FEBS Lett.* 590, 251-257 (2016)
 11. Niwa T, Sugimoto R, Watanabe L, Nakamura S, Ueda T, *Taguchi, H. Large-scale analysis of macromolecular crowding effects on protein aggregation using a reconstituted cell-free translation system. *Front Microbiol.* 6, 1113 (2015) doi: 10.3389/fmicb.2015.01113. eCollection 2015
 12. Niwa T, Sasaki Y, Uemura E, Nakamura, S., Akiyama, M., Ando, M., Sawada, S., Mukai, S., Ueda, T., *Taguchi, H., *Akiyoshi, K. Comprehensive study of liposome-assisted synthesis of membrane proteins using a reconstituted cell-free translation system. *Sci. Rep.* Dec 15;5:18025. doi: 10.1038/srep18025. (2015)
 13. Okuda, M, Niwa, T., *Taguchi, H., Single-Molecule Analyses on the Dynamics of Heat Shock Protein 104 (Hsp104) and Protein Aggregates. *J. Biol. Chem.* 290, 7833-7840 (2015)

総説：

1. 丹羽 達也、田口 英樹
「再構築型無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質凝集性の網羅解析」
タンパク質の凝集と溶解性 シーエムシー出版 印刷中 (2018)
2. 田口 英樹
「新生鎖の生物学：翻訳途上の新生ポリペプチド鎖が積極的に関与する生命現象」
蛋白質代謝医学 医学のあゆみ別冊 267, 19186-19192 (2018)
3. 田口 英樹、茶谷 悠平、千葉 志信、伊藤 維昭
「終止コドンに依らず翻訳を途中終了させる酸性アミノ酸の連続配列」
バイオサイエンスとインダストリー 76, 239-241 (2018)

4. 茶谷 悠平、千葉 志信、伊藤 維昭、田口 英樹
「翻訳途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化とその生理的意義」
実験医学 **36**, 5月号 1364-1367 (2018)
 5. 茶谷 悠平、千葉 志信、伊藤 維昭、田口 英樹
「翻訳の途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化および環境のセンサーとしての利用」
ライフサイエンス新着論文レビュー
(2017) DOI: 10.7875/first.author.2017.130
 6. 伊藤 維昭、茶谷 悠平、千葉 志信、田口 英樹
「タンパク質は合成のされ方にも個性～緩急リズム～がある」
バイオサイエンスとインダストリー **74**, 428-430 (2016)
 7. 田口 英樹
「タンパク質フォールディングの「理想」と「現実」: 凝集形成とシャペロンの役割」
生化学 **87**, 194-204 (2015)
 8. ***Taguchi, H.** Reaction cycle of chaperonin GroEL via symmetric "football" intermediate (review). *J. Mol. Biol.* **427**, 2912-2918 (2015)
-

計画研究 分担

今高寛晃 兵庫県立大学 大学院工学研究科 教授

研究課題名: ヒト因子由来再構成型翻訳システムの構築とその応用

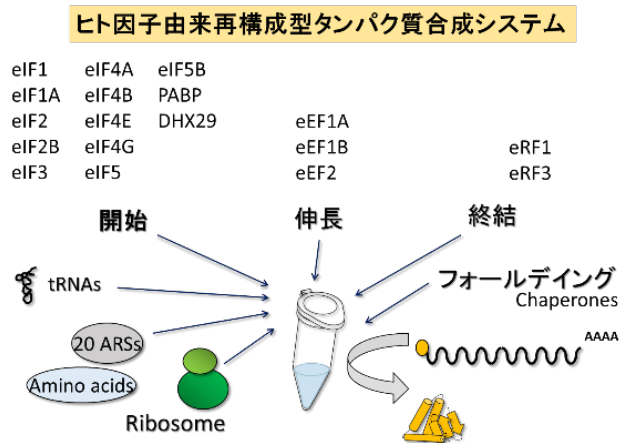
研究成果の概要:

2014-2018 年度の間、我々は真核細胞の新生鎖合成、そしてそのプロセッシングやフォールディングの研究基盤を構築するため、ヒト型試験管内翻訳システムの開発を行った。2014 年度以前にすでに我々はヒト細胞抽出液由来の試験管内タンパク質合成システムを開発している。そこでまず、このシステムを用いてハンチントン遺伝子産物の polyQ 依存性凝集の解析を行い、*in vitro*、特に人工細胞様体でこの現象を研究できるようにこの合成系を発展させた (3)。この系を利用して CCT や Hsp といったシャペロンを投入することにより polyQ 依存性凝集阻止を化学量論的に解析することに成功した (3)。

再構成型翻訳システムの開発に関しては、まず、2014 年度に翻訳開始因子を必要としない「HCVIRES 依存性再構成型翻訳システム」を開発した (4)。このシステムを用いて、脳心筋炎ウイルスの 2A-2B の分断メカニズムを追求した。2A-2B 間の分断はプロテアーゼによるものではないことは知られていたが、我々はこの分断が新生鎖伸長の最中に起こり、特別な因子を必要としないことを証明した (4)。次に、この HCVIRES 依存性再構成型翻訳システムを用いて polyQ 依存性凝集の解析を行った。polyQ 依存性凝集は再構成型人工細胞様体においても、生きた細胞内での凝集と同じ様に起こることがわかり、このシステムが新生鎖合成の新たな研究を切り開く場であることを示した (2)。

最終年度において、本研究の最終目標であった翻訳開始因子を含めた「ヒト因子由来完全再構成翻訳システム」の構築に成功した (1) (図)。真核細胞の翻訳開始複合体は 13 種類もの翻訳開始因子により構成されており、翻訳開始反応は極めて複雑な機構で進行する。これらの因子をすべて含み、さらにペプチド鎖伸長、翻訳終止、リボソームリサイクル、新生鎖フォールディングに関与する因子を包含した系 (図) を完成させた。この「ヒト因子由来完全再構成翻訳システム」は、mRNA の cap 構造、poly-A 構造、そして、それらに結合する翻訳因子に依存しながらタンパク質合成を行う (1)。従って、このシステムは新生鎖のみならず、真核細胞のタンパク質

合成及びその関連機構に関する研究を遂行するのに絶好の実験系と言える。



代表的な論文：

1. Oguro, A., Shigeta, T., Machida, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Matsufuji, S., and Imataka, H. (2020) Translation efficiency affects the sequence-independent +1 ribosomal frameshifting by polyamines. *J. Biochem.* in press doi.10.1093/jb/mvaa032
2. Abe, T., Nagai, R., Shimazaki, S., Kondo, S., Nishimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Imataka, H., Tomita K., and Takeuchi-Tomita N. (2020) *In vitro* yeast reconstituted translation system reveals function of eIF5A for synthesis of long polypeptide. *J. Biochem* 167, 451-462
3. Abe, T., Nagai, R., Imataka, H., and Takeuchi-Tomita, N. (2020) Reconstitution of yeast translation elongation and termination *in vitro* utilizing CrPV IRES-containing mRNA. *J. Biochem* 167, 441-450
4. Yokoyama, T., Machida, K., Iwasaki, W., Shigeta, T., Nishimoto, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Yonemochi, M., Harada, Y., Shigematsu, H., Shirouzu, M., Tadakuma, H., Imataka, H., and Ito, T. (2019) HCV IRES captures an actively translating 80S ribosome. *Mol. Cell* 74: 1205-1214
5. Iwasaki, S., Iwasaki, W., Takahashi, M., Sakamoto, A., Watanabe, C., Shichino, Y., Floor, S.N., Fujiwara K., Mito, M., Dodo, K., Sodeoka, M., Imataka, H., Honma, T., Furuzawa, K., Ito, T., and Ingolia, N.T. (2019) The translation inhibitor Rocaglamide targets a biomolecular cavity between eIF4A and polypurine RNA. *Mol. Cell* 73, 738-748.
6. Machida, K., Shigeta, T., Yamamoto, Y., Ito, T., Svitkin, Y., Sonenberg, N., and Imataka, H. (2018) Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. *Scientific Reports* 8:17435
7. Machida, K., Kanzawa, K., Shigeta, T., Yamamoto, Y., Tsumoto, K., and Imataka, H. (2018) Huntingtin polyglutamine-dependent protein aggregation in reconstituted cells. *ACS Synthetic Biology* 7: 377-383
8. Machida, K., Shigeta, T., Kobayashi, A., Masumoto A., Hidaka, Y., and Imataka, H. (2016) Cell-free analysis of polyQ-dependent protein aggregation and its inhibition by chaperone proteins. *J. Biotechnology* 239:1-8
9. Machida, K., Mikami, S., Masutani, M., Mishima K., Kobayashi, T., and Imataka, H. (2014) A translation system reconstituted with human factors proves that processing of encephalomyocarditisvirus proteins 2A and 2B occurs in the elongation phase of translation without eukaryotic release factors. *J. Biol. Chem.* 289: 31960-31971

総説：

1. 重田友明、町田幸大、今高寛晃 (2017) ヒト完全再構成型タンパク質合成システム pp23-29 人工細胞の創生とその応用 監修：植田充美 シーエムシー出版

- Machida, K., and Imataka, H. (2015) Production methods of virus particles. *Biotechnology Letters* 37: 753-760
- Kobayashi, T., Machida, K., and Imataka, H. (2014) Human cell extract-derived cell-free systems for virus synthesis. In: Alexandrov, K. and Johnston, W.A. (Eds.), *Methods in Molecular Biology* 1118, Cell-free protein synthesis: Methods and Protocols. Humana Press, pp149-156.

計画研究 分担

富田（竹内）野乃 東京大学大学院新領域創成科学研究科 准教授

研究課題名：酵母由来再構築型翻訳システムの開発：翻訳伸長制御のメカニズムとその意義

研究成果の概要：

翻訳速度の制御は遺伝子発現の様々な局面で積極的に利用されており、翻訳伸長中のリボソームは、翻訳伸長制御因子やリボソーム結合シャペロンなどの因子の作用により翻訳速度/ペプチド転移反応の制御を受ける。本研究では、酵母由来再構築型翻訳システムを確立し、これを利用して様々な因子によるペプチド転移反応の制御機構について解析を進めた。

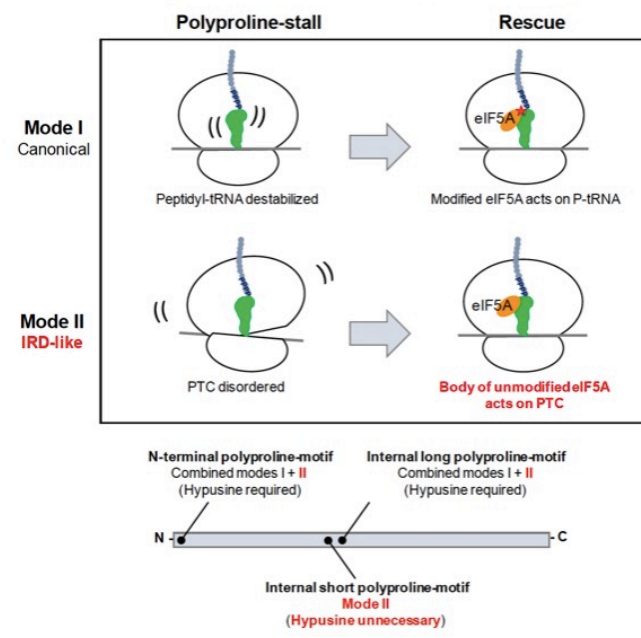
ポリプロリン配列による新しい翻訳停止機構の発見と eIF5A (eukaryotic Initiation Factor 5A) の機能の解明：eIF5A はバクテリア EF-P の真核細胞ホモログで、ポリプロリン配列による翻訳抑制を解消する。最近では、ポリプロリン以外の配列の翻訳を促進することや翻訳終結反応を促進することも明らかにされ、eIF5A は遅いペプチド転移反応を促進し、翻訳においてグローバルに機能する翻訳因子と理解されている。eIF5A はリボソームの E-site 近傍に結合し、自身の翻訳後修飾ハイプシンを介して P-site のペプチジル tRNA を安定化してペプチド転移反応を促進すると考えられてきた。しかし、eIF5A の翻訳におけるグローバルな役割をハイプシン修飾がどのように促進するのかは不明であった。

確立した酵母翻訳系を利用することによって、以下が明らかになった。① ポリプロリン配列は Intrinsic Ribosome Destabilization (IRD) 様のメカニズムによって翻訳を停止する (IRD: 新生鎖中の連続した酸性アミノ酸配列が、リボソームトンネル PTC 近傍の構造を乱すとともにリボソームを不安定化して翻訳を停止する現象 (Chadani Y. et al., 2017))。

- ② eIF5A はハイプシン修飾を必要とせずにポリプロリン配列による IRD 様の翻訳停止を解消する。
- ③ ハイプシン修飾は、タンパク質 N 末のポリプロリン配列、およびタンパク質内部の長いポリプロリン配列、などの特定のポリプロリン配列の翻訳に必要となる。

eIF5A がハイプシン修飾なしにポリプロリン配列による IRD 様の翻訳停止を解消することは、eIF5A の本体が PTC の構造を維持する役割をもつことを意味する。従来、eIF5A の主な機能は、ハイプシン修飾を介してペプチジル tRNA の配向を整

Mechanism of the polyproline-mediated ribosome stalling and its rescue by eIF5A in yeast



えることだと理解されてきたが、eIF5A 本体の PTC の構造を維持するはたらきが eIF5A の翻訳におけるグローバルな役割の分子基盤であると考えられる。また、ペプチジルポリプロリン tRNA がリボソーム上で不安定もしくは異常な配向をとる場合にのみ、ハイプシン修飾の補助が必要になると考えられた。

その他の因子 (eEF3, Stm1, Ssb・RAC, NAC など) の機能解析にも取り組み、RNA や新生鎖の品質管理機構をはじめとした翻訳と共役した遺伝子発現制御機構の解析を進めている。

代表的な論文：

1. Abe, T., Nagai, R., Shimazaki, S., Kondo, S., Nishimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Imataka, H., Tomita, K. & **Takeuchi-Tomita, N.*** in vitro yeast reconstituted translation system reveals function of eIF5A for synthesis of long polypeptide. *J Biochem.* (2020) 167(5):451-462. doi: 10.1093/jb/mvaa022.
2. Abe, T., Nagai, R., Imataka, H. & **Takeuchi-Tomita, N.*** Reconstitution of yeast translation elongation and termination in vitro utilizing CrPV IRES-containing mRNA. *J Biochem.* (2020) 167(5):441-450. doi: 10.1093/jb/mvaa021.
3. Hayashi, H., Nagai, R., Abe, T., Wada, M., Ito, K. & ***Takeuchi-Tomita, N.**
Tight interaction of eEF2 in the presence of Stm1 on ribosome. *J Biochem.* 163, 177-185. (2018)
4. Akabane, S., Ueda, T., Nierhaus, KH. & ***Takeuchi, N.**
Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in mammalian mitochondria. *PLoS Genet.* 10, e1004616. (2014)

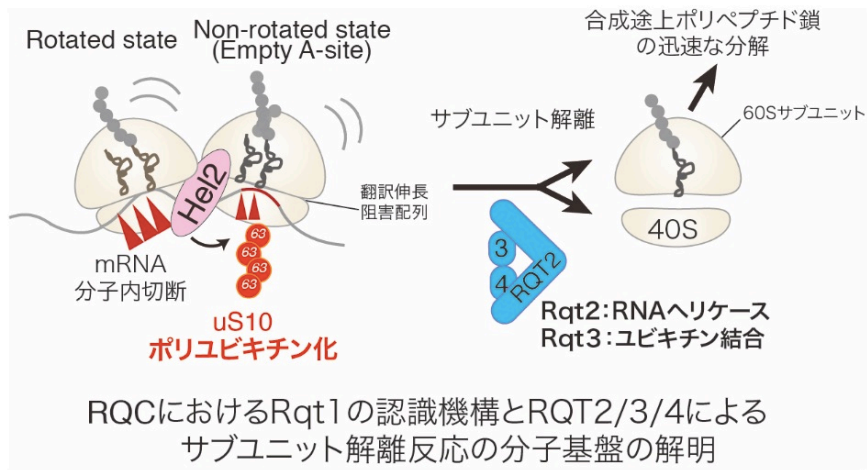
計画研究

稲田 利文 東北大学 大学院薬学研究科 教授

研究課題：mRNA とタンパク質の品質管理機構における新生鎖の新規機能の解明

研究成果の概要：

正確な遺伝子発現は生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。正確な翻訳伸長反応を保証するシステムとして、細胞は異常な翻訳伸長阻害を認識し排除する品質管理機構を保持している。我々は、連続した塩基性配列を持った新生鎖が翻訳伸長反応を停止（翻訳アレスト）させる結果、新生鎖のユビキチン化とプロテアソームによる迅速な分解(RQC: Ribosome-associated Quality Control)が起こることを世界に先駆けて報告した。また、翻訳アレストに共役した mRNA の分子内切断機構である NGD についても、RQC との相互関係も含めて解析を進めている。本計画研究では、遺伝子発現の正確性を保証するとタンパク質品質管理機構(RQC) と、mRNA の品質管理機構(NGD)における新生鎖の運命決定機構の解明をめざした。



我々は、翻訳伸長中に停滞したリボソームを認識し解離させる分子機構を解析し、E3 ユビキチンライゲース RQT1(RQC-Triggering factor 1)/HEL2 が翻訳伸長中に停滞したリボソームの特異的な構造を認識し、リボソームタンパク質 Rps20 をユビキチン化することが RQC に必須であることを発見した(*Nature Commun*, 2017)。また停滞した 80S リボソームを各サブユニットに解離する新規 RQT2/3/4 複合体を世界で初めて同定した(*Nature Commun*, 2017)。さらに NGD と RQC が共役した品質管理機構であり、停滞した 2つのリボソームを 1つの単位(Disome)として起こることを見出した(*EMBO J.*, 2018)。NGD と RQC には、リボソームタンパク質 Rps20 の K6/K8 リジン残基での K63 結合型ポリユビキチン化が必須であり、RQT 複合体による停滞した 80S リボソームの各サブユニットへの解離が必須であった。さらに RQC と共役しない NGD を見出し、リボソームタンパク質 Rps7 での K63 結合型ポリユビキチン化が必須であることを明らかにした(*EMBO J.*, 2018)。

代表的な論文：

1. Ikeuchi, K., Tesina, P., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Cheng, J., Saeki, Y., Saeki, Y., Tanaka, Becker, T., K., Beckmann, R. and *Inada, T. Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *EMBO J.* (2018) DOI:10.15252/embj.2018100276
2. Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., Ingolia, NT., Beckmann, R. and *Inada, T. Ubiquitination of Stalled Ribosome Triggers Ribosome-associated Quality Control. *Nat. Commun.* DOI 10.1038/s41467-017-00188-1 (2017)
3. Sugiyama T, Nobuta R, Ando K, Matsuki Y, *Inada, T. Crucial role of ATP-bound Sse1 in Upf1-dependent degradation of the truncated product. *Biochem Biophys Res Commun.* 488, 122-128. (2017)
4. Ikeuchi, K., Yazaki, E., Kudo, K. and *Inada, T. Conserved functions of human Pelota in mRNA quality controls for nonstop mRNA. *FEBS Let.* 18, 3254-3263 (2016)
5. Ikeuchi, K. and *Inada, T. Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Sci. Rep.* 6, 28234. (2016)
6. Tsuboi, T., Yamazaki, R., Nobuta, R., Ikeuchi, K., Makino, S., Ohtaki, Y., Suzuki, Y., Yoshihisa, T., Trotta, C. and *Inada, T. The tRNA Splicing Endonuclease Complex Cleaves the Mitochondria-localized *CBP1* mRNA. *J Biol. Chem.* 290, 16021-16030. (2015)
7. Matsuda, R., Ikeuchi, K., Nomura, S. and Inada, T. Protein quality control systems associated with No-Go and Nonstop mRNA surveillance in yeast. *Genes Cells* 19, 1-12. (2014)

総説：

1. Inada, T. The Ribosome as a platform for mRNA and nascent polypeptide quality controls. *Trends Biochem. Sci.* 16, 30161-7 (2016)
2. Inada, T., Makino, S. Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation. *Front Genet.* 5, 135 (2014)

計画研究 分担

長尾 翌手可 東京大学大学院工学系研究科 助教

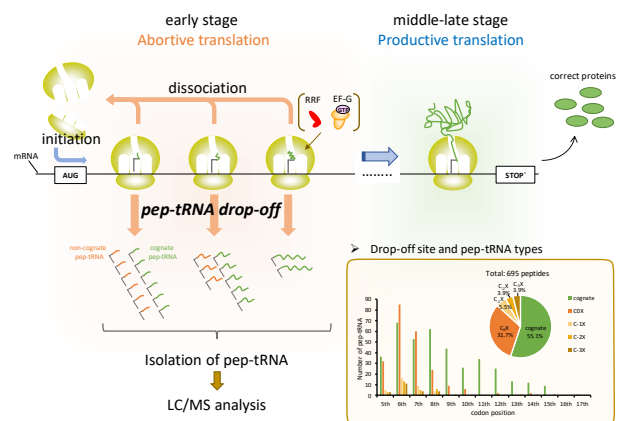
研究課題名：質量分析法による新生ペプチド鎖の解析～翻訳初期段階におけるペプチジル tRNA の脱落と校正機構～

研究成果の概要：

バクテリアの翻訳初期段階では、伸長途中の pep-tRNA がリボソームから脱落する pep-tRNA drop-off と翻訳再開を頻繁に繰り返すといった異常な翻訳状態 (abortive translation) があることが知られています。この現象はタンパク質合成に何らかの役割を担っていると考えられていますが、その生理学的意義や分子メカニズムについては未解明な部分が多く残っていました。その原因の一つとして、従来の細胞内 pep-tRNA の検出法は電気泳動に基づいており、実際はスメアバンドとしてでしか検出されないため、ペプチド部分のアミノ酸組成や配列についての情報を得ることができなかつたことが挙げられます。そこで、私たちは、pep-tRNA の tRNA3'末端のアデノシンにはペプチドが付加しているため特徴的な分子量を持つことに着目し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) によって個々の pep-tRNA のペプチド部分のアミノ酸配列を同定し、どのような pep-tRNA がどのような mRNA から脱落しているのかについて知ることができるのではないかと考えました。実際に pep-tRNA 加水分解酵素 (Pth) 温度感受性株において drop-off した pep-tRNA の検出に成功しました。また、tRNA 単離精製法と組み合わせることで tRNA 種ごとのペプチドについても解析することができ、最終的に約 700 種類の pep-tRNA の配列同定に成功しました。詳細な解析の結果、遺伝子通りの配列をもつ pep-tRNA (cognate pep-tRNA) の他に、遺伝子配列とは異なるペプチドをもつ pep-tRNA

(noncognate pep-tRNA) を多数発見し、それらの多くは tRNA のミスデコーディングによって生じていることを突き止めました。さらにレポーターアッセイによって、翻訳初期段階ではミスデコーディングによって noncognate pep-tRNA が生じてしまった場合、pep-tRNA drop-off によってそれらを翻訳系から排除することで翻訳精度を維持する機構があるということを見出しました[投稿準備中]。これまでのデコーディング精度維持機構の定説では、A サイト

内で起きる mRNA と tRNA 間のコドン-アンチコドン対合による『Initial selection』と EF-Tu がリボソームから解離した後、aa-tRNA が A サイトに順応するかどうかによって判断される『Proofreading』の二つのチェック機構が主であるとされ、ペプチジル転移反応以降では RF3 による校正機構が知られています。今回の研究によって見出された機構は、それらに続く第三の翻訳精度維持機構であると考えています。



代表的な論文：

1. Chadani Y, Niwa T, Izumi T, Sugata N, Nagao A, Suzuki T, Chiba S, Ito K, Taguchi H

Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental

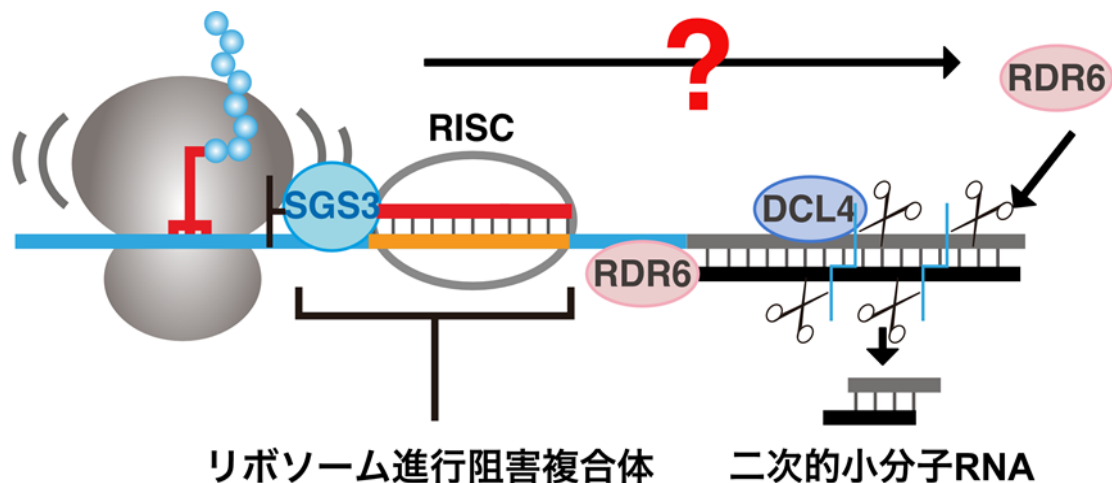
計画研究 分担

岩川 弘宙 東京大学 定量生命科学研究所 助教

研究課題名：RISCによる遺伝子発現制御とRNAとタンパク質の品質管理機構

研究成果の概要：

20から30塩基程度の長さをもつ小分子RNAはArgonauteと呼ばれるタンパク質とRNA-induced silencing complex (RISC)と呼ばれる機能複合体を形成し、相補性を持つ標的RNAの遺伝子発現を負に制御する。我々は以前、植物のRISCが標的mRNAのタンパク質コード領域に結合すると、リボソームの停滞を引き起こすことを見出していた (Iwakawa and Tomari, *Mol Cell*, 2013)。しかしながら、その分子メカニズムおよび生物学的な意義は解明できていなかった。本研究で、試験管内系を用いた生化学、および植物個体を用いたリボソームプロファイリングにより、効率的にリボソームを停滞させるためには、二本鎖結合タンパク質であるSGS3と植物RISCが複合体を形成する必要があること明らかにした (未発表：公募班、岩崎信太郎博士との共同研究)。また、RISC依存的にリボソーム停滞が引き起こされる標的RNAからは、RNA依存性RNAポリメラーゼ6 (RDR6)とDICER-LIKE4 (DCL4)によって二次的な小分子RNAが作り出される傾向があることも明らかになってきた (未発表)。これらの結果は、リボソームの停滞が二次的小分子RNA生成を促進する役割をもつ可能性を示唆する。今後は、本研究で開発したリボソーム停滞と二次的小分子RNA生成を同時に再現できる新規試験管内系 (未発表)を用いて、リボソーム停滞または新生鎖がどのようにしてRNAサイレンシングに影響を与えるのかを調べていく予定である。



代表的な論文：

1. Wu H, Li B, **Iwakawa HO**, Pan Y, Tang X, Ling-Hu Q, Liu Y, Sheng S, Feng L, Zhang H, Zhang X, Tang Z, Xia X, Zhai J, and *Guo H.
Plant 22-nt siRNAs mediate translational repression and stress adaptation. *Nature* 581: 89–93, 2020.
2. Kyungmin Baeg, Yukihide Tomari, *Hiro-oki Iwakawa. In vitro RNA-dependent RNA Polymerase Assay Using Arabidopsis RDR6. *Bio-protocol*, 8 巻, 1 号, 2018.
3. Yukihide Tomari and *Hiro-oki Iwakawa. In vitro analysis of microRNA-mediated translational repression in plants.

Methods in *Molecular Biology*, 1640 巻 55-71 頁, 2017 年

4. Mariko Watanabe, Hiro-oki Iwakawa, Hisashi Tadakuma, *Yukihide Tomari. Biochemical and single-molecule analyses of the RNA silencing suppressing activity of CrPV-1A. *Nucleic acids research*, 45 巻, 18 号, 10873 - 10844 頁, 2017 年.
5. Yuri Tajima, Hiro-oki Iwakawa, Kiwamu Hyodo, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, and *Tetsuro Okuno. Requirement for eukaryotic translation initiation factors in cap-independent translation differs between bipartite genomic RNAs of red clover necrotic mosaic virus. *Virology*, 509 巻 152-158 頁, 2017 年
6. Kyungmin Baeg, *Hiro-oki Iwakawa and *Yukihide Tomari. The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into substrates for gene silencing. *Nature Plants*, Vol.3 | Article number: 17036, 2017 年.
7. #Takashi Fukaya, #Hiro-oki Iwakawa, *Yukihide Tomari. MicroRNAs block assembly of eIF4F translation initiation complex in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 56 巻, 67-78 頁, 2014 年.

総説 :

1. *Hiro-oki Iwakawa and *Yukihide Tomari. Silencing messages in a unique way. *Nature Plants*, 3 巻, 10 号, 769-770 頁, 2017 年.
2. 岩川 弘宙. 植物の RNA サイレンシング機構が自己の mRNA を攻撃しないメカニズム. *BSJ-Review*, 8 巻, 58-70 頁, 2017 年
3. 岩川 弘宙, 泊 幸秀. 植物と動物における microRNA による翻訳制御機構. 「化学と生物」, 53 巻 8 号, 510-514 頁, 2015 年
4. Hiro-oki Iwakawa and *Yukihide Tomari. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology*, 2015 年.

計画研究

田中元雅 国立研究開発法人理化学研究所 脳神経科学研究センター

タンパク質構造疾患研究チーム チームリーダー

研究課題名 : tRNA リボソームプロファイリングの開発と応用

研究成果の概要 :

細胞は環境ストレスに応答し、mRNA の翻訳モードを変え、機能を変化させる。この際、翻訳開始、伸長、終結に関わる tRNA は環境ストレスの標的になると考えられる。しかし、翻訳最中のリボソームの中に存在する tRNA を詳しく調べる手法がこれまでにないため、環境ストレスによる mRNA 翻訳の変化に tRNA がどのように関わるかについて、多くの不明な点が残されていた

本研究では、次世代シーケンサーを用いて、リボソームに結合した mRNA に加え、tRNA をも網羅的かつ一塩基の高分解能で調べる新たな tRNA リボソームプロファイリング法を開発した。この手法を用いて、様々な環境ストレス下における出芽酵母のリボソーム内 tRNA の種類、量および修飾を調べた結果、リボソームに結合した tRNA は、環境ストレス下における翻訳阻害の状態を特徴づけ、翻訳のどの過程で翻訳阻害が生じているかを示すバイオマーカーになる得ることを見出した。また、同じ細胞からの tRNA、mRNA の同時リボソームプロファイリング法を用いて、酸化ストレスが tRNA の 3' 末端配列の一部を切断させ、その異常な tRNA がリボソーム内に入ってしまう、翻訳を停止させる可能性を見出した。これら結果は、環境ストレス下において、tRNA がより直接的に翻訳制御に関わることを示している。このように、我々が開発した網羅的翻訳解析手法は、翻訳が関与

する生命現象の解明を目指した様々な研究において、重要な知見を与えると期待できる。

翻訳の異常は、多くの神経変性疾患の発症に関与していることが知られている。そこで、神経変性疾患の一つである前頭側頭葉変性症(FTLD)において、FTLDの特徴である顕著な精神障害が現れる原因に翻訳異常が関与しているのか、その解明を目指した。その結果、FTLDの原因タンパク質である TDP-43 と、統合失調症、うつや不安障害など幅広く精神障害に関わる DISC1 とが神経細胞内で共凝集していることを見出した、さらに、その共凝集によって可溶性 DISC1 の量が減少し、それに伴う神経細胞の翻訳の異常が、前頭側頭葉変性症に顕著な過活動や社会性の低下などの精神障害をもたらすことを明らかにした。

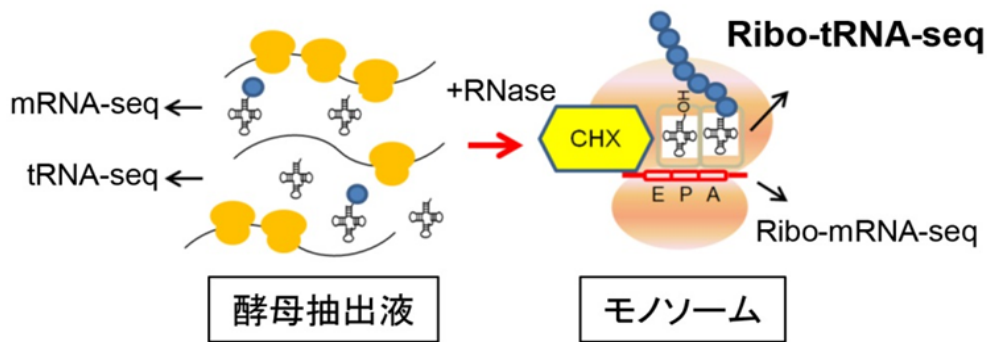


図 tRNA/mRNA 同時リボソームプロファイリング法の開発

同一酵母から四つのライブラリーを作成した。酵母抽出液から tRNA-seq、mRNA-seq 用のライブラリー、RNA 分解酵素 (RNase) 処理後のモノソームから Ribo-tRNA-seq、Ribo-mRNA-seq 用を作成した。

代表的な論文：

1. Endo, R., Takashima, N., Nekooki-Machida, Y., Komi, Y., Hui, K.K., Takao, M., Akatsu, H., Murayama, S., Sawa, A., and Tanaka, M. TDP-43 and DISC1 Co-Aggregation Disrupts Dendritic Local Translation and Mental Function in FTLD. *Biol. Psychiatry*, 84, 509-521 (2018).
2. Chen, C.W. Tanaka, M. Genome-Wide Translation Profiling by Ribosome-Bound tRNA Capture. *Cell Reports*, 23, 608-621 (2018).

計画研究

稲葉 謙次 東北大学 多元物質科学研究所 教授

研究課題名：新生鎖の立体構造形成を支えるジスルフィド結合形成システムの解明

研究成果の概要：

ほ乳動物細胞の小胞体においてジスルフィド結合の形成・還元に関わる種々の酵素の新生鎖に対する作用機序に関する分子構造レベル、細胞レベルの研究を行い、以下の主たる成果を挙げた。

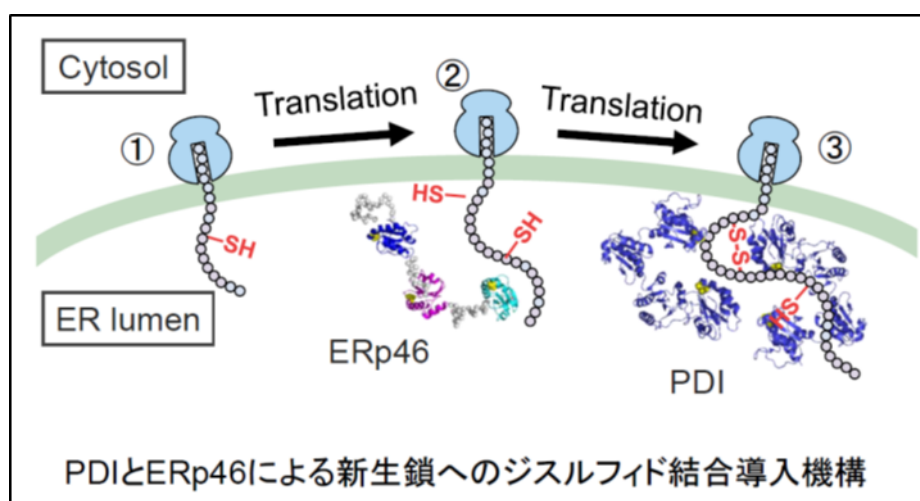
①PDI ファミリー酵素の一つ ERp46 が新生鎖のフォールディング初期にジスルフィド結合を迅速に導入することを突き止め、またその全長の溶液構造を X 線小角散乱法と X 線結晶構造を組み合わせることにより決定し、ERp46 の高いジスルフィド結合導入能に関する構造的知見を得た。(Kojima et al., Structure 2014)

②PDI 酸化酵素である Ero1a の酸化活性が、従来報告されていたシステインペア間のジスルフィド結合形成開裂

に加え、Cys208-Cys241 間の酸化還元により制御されることを発見した。さらに X 線小角散乱法により Ero1a 全長の溶液中における構造ゆらぎと活性制御の相関に関する重要な構造的知見を得た。(Ramming et al., *Redox Biology* 2016; Kanemura et al., *JBC*2016)

③高速原子間力顕微鏡により PDI を一分子観察することにより、酸化還元依存的なダイナミクス制御を解明した。さらに基質存在下で PDI の振る舞いを一分子観察することにより、同酵素による酸化的フォールディングの新たな触媒機構を解明した。(Okumura et al., *Nat. Chem. Biol.* 2019)

④再構成型タンパク質合成系を用いてリボソーム上で合成途上の異なる長さの新生鎖を系統的に作製し、PDI ファミリー酵素による新生鎖—リボソーム複合体のジスルフィド結合形成モニタリングシステムの開発に成功した。これにより、新生鎖に対する PDI ファミリー酵素の異なる機能的役割と作用機序が解明された(下図参照)。(Hirayama et al., in preparation)



⑤ERdj5 の二つの異なる結晶構造を決定し、高速原子間力顕微鏡により ERdj5 の大きなドメインのゆらぎを一分子レベルで観察することに成功した。さらにこの動的性質が、同酵素による効率的な小胞体関連分解促進に重要な役割を担うことを解明した。(Maegawa et al., *Structure* 2017)

⑥初期分泌経路におけるタンパク質品質管理において重要な役割を担う ERp44 の結晶構造を pH7.2 と pH6.5 の条件で決定することに成功し、小胞体とゴルジ体間の pH 勾配に依存した ERp44 の機能制御機構を解明した。さらに、ERp44 の機能が亜鉛イオンによって活性化されることを新たに発見し、その生理的意義と構造基盤を解明した。(Watanabe et al., *PNAS* 2017; Watanabe et al., *Nat. Commun.* 2019)

代表的な論文：

1. Kadokura, H., Dazai, Y., Fukuda, Y., Hirai, N., Nakamura, O., **Inaba, K.** “Observing the nonvectorial yet cotranslational folding of a multidomain protein, LDL receptor, in the ER of mammalian cells” *Proc Natl Acad Sci U S A.* in press
2. Okumura, M.^{*,} Noi, K.[#], Kanemura, M., Kinoshita, M., Saio, T., Inoue, Y., Hikima, T., Akiyama, S., Ogura, T.^{*} and **Inaba, K.*** (#equal contribution) “Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative folding” *Nature Chemical Biol.* 15, 499-509 (2019)
3. Watanabe, S., Amagai, Y., Sannino, S., Tempio, T., Anelli, T., Harayama, M., Masui, S., Sorrentino, I., Yamada, M., Sitia, R. and **Inaba, K.*** Zinc regulates ERp44-dependent protein quality control in the early secretory pathway. *Nat*

Commun. 10, 603 (2019)

4. Okada, S., **Matsusaki, M.**, Araki, K., Hidaka, Y., **Inaba, K.**, **Okumura, M.**, and Muraoka, T. Coupling effects of thiol and urea-type groups for promotion of oxidative protein folding; *Chem. Commun.* in press (2018)
5. **Fujimoto, T.**, **Nakamura, O.**, Saito, M., Tsuru, A., Matsumoto, M., Kohno, K., **Inaba, K.** and **Kadokura, H.** "Identification of the physiological substrates of PDIp, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member; *J. Biol. Chem.* 293, 18421-18433 (2018)
6. O'Brien, H., **Kanemura, S.**, **Okumura, M.**, Baskin, P., Bandyopadhyay, P., Ellgaard, L., **Inaba, K.** and Safavi-Hemami, H. "Ero1-mediated reoxidation of PDI accelerates the folding of cone-snail toxins; *Int. J. Mol. Sci.* 19, E3418 (2018)
7. Arai, K., Takei, T., Shinozaki, R., Noguchi, M., Fujisawa, S., Katayama, H., Moroder, M., Ando, S., Okumura, M., **Inaba, K.**, Hojo, H. and Iwaoka, M. "Characterization and optimization of two-chain folding pathways of insulin via native chain assembly" *Cumunications Chemistry* 26 (2018)
8. Akaike, T., Ida, T., Wei, F.-Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M. M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., **Inaba, K.**, Shima, H., Tamura, N., Minkyung, J., Fujii, S., Watanabe, Y., Ohmuraya, M., Nagy, P. Feelisch, M., Fukuto, J.M. and Motohashi, H. "CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics" *Nature Communications*, 8, 1177 (2017)
9. Arai, K., Takei, T., Okumura, M., Watanabe, S., Amagai, Y., Asahina, Y., Moroder, L., Hojo, H. *, **Inaba, K.** * and Iwaoka, M. * (*co-corresponding authors) "Preparation of selenoinsulin as a long-lasting insulin analog" *Angewandte Chemie* 56, 5522-5526 (2017)
10. Watanabe, S., Harayama, M., Kanemura, S., Sitia, R. and **Inaba, K.** * "Structural basis of pH-dependent client binding by ERp44, a key regulator of protein secretion at the ER-Golgi interface" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114, 3224-3232 (2017)
11. Maegawa, K., Watanabe, S., Noi, K., Okumura, M., Amagai, Y., Inoue, M., Ushioda, R., Nagata, K., Ogura, T. and **Inaba, K.** * "The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation" *Structure*, 25, 846-857(2017)
12. Kanemura, S., Okumura, M., Yutani, K., Ramming, T., Hikima, T., Appenzeller-Herzog, C. , Akiyama, S. and **Inaba, K.** * "Human ER oxidoreductin-1 (Ero1) undergoes dual regulation through complementary redox interactions with protein-disulfide isomerase", *J. Biol. Chem.*, 291, 23952-23964 (2016)
13. Cao, Z., van Lith, M., Mitchell, L. J., Pringle, M. A., **Inaba, K.** and Bulleid, N. J. "The membrane topology of Vitamin K Epoxide Reductase is conserved between human isoforms and the bacterial enzyme" *Biochem. J* 473, 851-858 (2016)
14. Ramming, T., Kanemura, S., Okumura, M., **Inaba, K.** * and Appenzeller-Herzog, C. * (*co-corresponding authors) "Cysteines 208 and 241 in Ero1 α are required for maximal catalytic turnover", *Redox Biology* 7, 14-20 (2016)
15. Ramming, T., Okumura, M., Kanemura, S., Baday, S., Birk, J., Moes, S., Spiess, M., Jenö, P., Berneche, S., **Inaba, K.** and Appenzeller-Herzog, C. "A PDI-catalyzed thiol/disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Ero1" *Free Rad. Biol. Med.* 83, 361-372 (2015)
16. Okumura, M., Kadokura, K., Hashimoto, S., Yutani, K., Kanemura, S., Hikima, T., Hidaka, Y., Ito, L., Shiba, K., Masui, S., Imai, D., Imaoka, S., Yamaguchi, H. * and **Inaba, K.** * Inhibition of the functional interplay between ER oxidoreductin-1 α (Ero1 α) and protein disulfide isomerase (PDI) by the endocrine disruptor bisphenol A. *J. Biol. Chem.* 289, 27004-27018 (2014)
17. Sannino, S., Anelli, T., Cortini, M., Masui, S., Degano, M., Fagioli, C., **Inaba, K.**, Sitia, R. Progressive quality control of secretory proteins in the early secretory compartment by ERp44. *J. Cell. Sci.* 127, 4260-4269 (2014)
18. Kojima, R., Okumura, M., Masui, S., Kanemura, S., Inoue, M., Saiki, M., Yamaguchi, H., Hikima, T., Suzuki, M., Akiyama, S. and **Inaba, K.** * "Radically different thioredoxin domain arrangement of ERp46, an efficient disulfide-

bond introducer of the mammalian PDI family”, *Structure*, 22, 431-443 (2014)

総説 :

1. Matsusaki, M., Kanemura, S., Kinoshita, M., Lee, Y.H., **Inaba, K.*** and Okumura, M.* “The protein disulfide isomerase family: from proteostasis to pathogenesis” *Biochem. Biophys. Acta. General Subject* 1864(2) 129338 (2020)
2. Fujimoto, T., **Inaba, K.**, and Kadokura, H.* “Methods to identify the substrates of thiol-disulfide oxidoreductases;” *Protein Science* 28, 30-40 (2019)
3. Okumura, M., Watanabe, S. and **Inaba, K.*** Structural insights into disulfide bond formation and protein quality control in the mammalian endoplasmic reticulum. *Oxidative folding of proteins 2nd Edition* Chapter 3.3 224-248 (2018)
4. Okumura, M.[†], Kadokura, K.[†] and **Inaba, K.*** ([†]contributed equally to this work) "The structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum." *Free Rad. Biol. Med.* 83, 314-322 (2015)
5. Appenzeller-Herzog, C., **Inaba, K.**, Delaunay-Moisan, A. “Cell biology of cysteine-based molecular switches.” *Int. J. Cell Biol.* 2014, 157038-039 (2014)
6. 天貝 佑太、渡部 聡、稲葉 謙次「初期分泌経路における新たなタンパク質品質管理機構—亜鉛イオンと ERp44 の協奏—」*実験医学* 38, 109-116 (2020)
7. 奥村 正樹、稲葉 謙次「高速原子間力顕微鏡により明らかにされたプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の構造ダイナミクス」*生化学会誌ミニレビュー* 92, 107-112 (2020)
8. 奥村 正樹、稲葉 謙次「PDI ファミリー酵素群の構造ダイナミクスに基づく機能制御」月刊『細胞』 51, p41-46 (2019)
9. 奥村 正樹、稲葉 謙次「高速原子間力顕微鏡を用いた酵素の触媒機構の可視化： PDI ファミリー酵素を例に」月刊『細胞』 51, p47-52 (2019)
10. 渡部 聡、稲葉 謙次「細胞のタンパク質の品質を監査する仕組み」放射光利用の手引き p2-7 (2019)
11. 奥村 正樹、稲葉 謙次「細胞のタンパク質の立体構造を頑強にする仕組み」放射光利用の手引き p8-12 (2019)
12. 奥村 正樹、稲葉 謙次「PDI ファミリー酵素による小胞体のタンパク質品質管理機構」アルツハイマー病—発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発 p133-143 (2018)
13. 金村 進吾、奥村 正樹、稲葉 謙次「X線小角散乱解析が明らかにした PDI ファミリータンパク質 ERp46 及び PDI 酸化酵素 Ero1 α の構造ダイナミクスと機能」*分子研レターズ* Vol. 76, p34-36 (2017)
14. 奥村 正樹、金村 進吾、稲葉 謙次「新規 PDI ファミリータンパク質 ERp46 の構造と機能」*日本生物物理学会会報誌*, 55 (1) 034-036 (2015)
15. 奥村 正樹、稲葉 謙次「哺乳動物細胞の小胞体におけるジスルフィド結合形成ネットワークの構造基盤」*実験医学 (羊土社)* Vol. 30, p208-215 (2014)

計画研究 分担

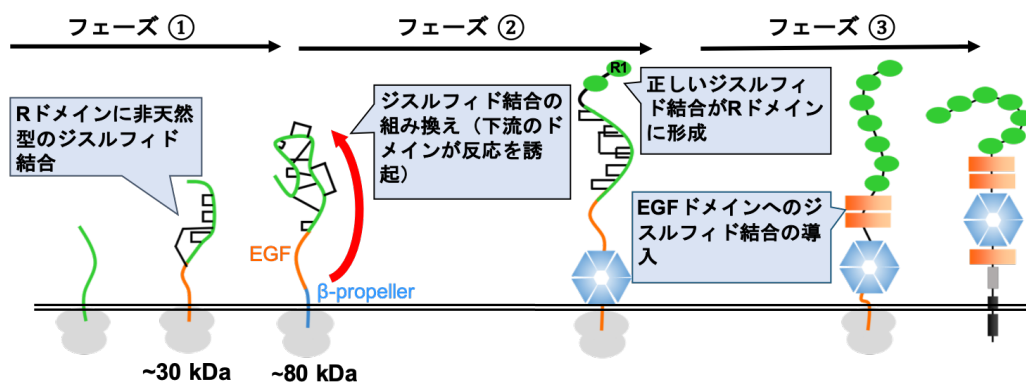
門倉 広 東北大学 多元物質科学研究所 准教授

研究課題名：新生鎖の立体構造形成を支えるジスルフィド結合形成システムの細胞生物学的研究

研究成果の概要：

ジスルフィド結合は細胞表層タンパク質の立体構造形成に欠かせない分子内架橋であり、小胞体内に存在する PDI ファミリー酵素によってその形成、切断、修復が触媒される。しかし、ヒト細胞の小胞体に送り込まれてくる翻訳合成途上のタンパク質の新生鎖に、いつ、どのようにしてジスルフィド結合が導入されるのかについてはほとんど分かっていなかった。この仕組みを解明するため、我々は LDL コレステロールの代謝に必要な LDL 受容体(LDLR)をモデルとして用いた。LDLR は複数のドメインからなる膜タンパク質であり、ジスルフィド結合は、7 個の R ドメインと 3 個の EGF ドメインの各々に 3 本ずつ存在する。放射性アミノ酸を利用したパルスチェイス実験と非還元-還元 2 次元電気泳動を用いることで、リボソーム上で翻訳合成されつつ小胞体内で伸長する LDLR の新生鎖にジスルフィド結合が導入される過程を観察するための、ジスルフィド結合形成反応モニタリング系を構築することに成功した。この系および立体構造特異的な抗体を用いた解析から、LDLR の新生鎖が 30kDa の大きさにまで伸長すると天然構造にはない組み合わせのシステイン間にジスルフィド結合が導入され（下図、フェーズ①）；更に、80 kD の大きさにまで伸長し下流に存在する β -プロペラドメインの一部が合成されると、先の非天然型のジスルフィド結合が正しい結合へと組み換えられる（フェーズ②）ことを見出した。ジスルフィド結合の組み換え反応は、複数のドメインから構成されるタイプの様々な細胞表層タンパク質の立体構造形成において鍵となる反応ステップであるが、当該タンパク質の翻訳合成が終わった後、数十分の時間をかけてゆっくりと進行すると信じられてきた。本研究から、この反応は、翻訳合成とカップルするかたちで、従来考えられていたよりも遥かに高速に、かつ、精緻な制御のもと、進行しうることが初めて明らかになった（Kadokura et al., *PNAS* 印刷中）。

更に、PDI ファミリー酵素 PDIP は膵臓の外分泌細胞で特異的に発現し、新合成された消化酵素の前駆体が凝集体を形成するのを抑制し、その正しい折り畳み過程を促進する作用があることを突き止めた(Fujimoto et al., *J. Biol. Chem.*, 2018)。また、低分子化合物 BPA が PDI の酸化を特異的に阻害することを見出し、PDI の役割を解明するための新たなツールの開発に成功した（Okumura, Kadokura et al. *J Biol. Chem.*, 2014）。



に、河野班との共同研究により、小胞体ストレスセンサー IRE1 α が、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞中で PDI ファミリータンパク質の発現維持に働いており、その機能はインスリンの正しい折り畳みに必要であることを見出した(Tsuchiya et al., *J Cell Biol.*, 2018)。

代表的な論文：

1. Kadokura, H., Dazai, Y., Fukuda, Y., Hirai, N., Nakamura, O., Inaba, K.
Observing the nonvectorial yet cotranslational folding of a multidomain protein, LDL receptor, in the ER of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (印刷中)
2. Fujimoto T, Nakamura O, Saito M, Tsuru A, Matsumoto M, Kohno K, Inaba K, Kadokura H.
Identification of the physiological substrates of PDIP, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member. *J. Biol. Chem.*, 293, 18421-18433 (2018)
3. Tsuchiya Y, Saito M, Kadokura H, Miyazaki J-I, Tashiro F, Imagawa Y, Iwawaki T, Kohno K.
IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic β cells

J. Cell Biol. 217, 1287-1301 (2018)

4. Okumura M, **Kadokura H**, Hashimoto S, Yutani K, Kanemura S, Hikima T, Hidaka Y, Ito L, Shiba K, Masui S, Imai D, Imaoka S, Yamaguchi H, Inaba K.

Inhibition of the functional interplay between endoplasmic reticulum (ER) oxidoreductin-1 α (Ero1 α) and protein-disulfide isomerase (PDI) by the endocrine disruptor bisphenol A

J. Biol. Chem. 289, 27004-27018 (2014)

総説：

1. 門倉 広

「哺乳動物細胞 PDI ファミリー酵素の生理的な基質の同定 ヒト由来分泌タンパク質の効率よい生産系の開発にむけて」

化学と生物 印刷中

2. Fujimoto T, Inaba K, **Kadokura H**.

Methods to identify the substrates of thiol-disulfide oxidoreductases.

Protein Sci. 28, 30-40 (2019)

3. Okumura M, **Kadokura H**, Inaba K.

Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum

Free Radical Biology and Medicine, 83, 314-322 (2015)

計画研究

河野憲二 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教授

研究課題名：mRNA の局在化に働く新生鎖の機能解析

研究成果の概要：

本研究は、翻訳休止（ポーシング）により起こる、翻訳途上蛋白質とリボソームの品質管理機構、また翻訳レベルでの新生鎖とリボソームの生理機能について明らかにすることを目的としている。モデル蛋白質として、哺乳動物細胞の小胞体ストレス応答に重要な XBP1u の翻訳休止による XBP1u mRNA の小胞体膜への輸送機構と翻訳休止機構を解明する。小胞体膜への輸送のためには、「疎水性領域(HR2)と翻訳休止配列 (PS) の2つが必要であり、SRP が HR2 に結合するためには翻訳休止することが必要である (Kanda et al., PNAS, 2016) ので、通常の SRP 経路とは翻訳休止の順序が逆である。また、SRP 経路で小胞体膜上のトランスロコンに運ばれるが、大部分の XBP1u は、膜に挿入されず膜から遊離する結果を得ている。これらの結果は、通常の SRP 経路とは異なるので、私達はこの経路を noncanonical SRP 経路と呼んでいる。この生理的意義と何故膜内に挿入されにくいのかに関してはさらなる検討が必要であるが、同様な経路を使っているタンパク質が今後の解析によりさらに増え、より一般的な経路になるのではないかと考えている。

今年度は HR2 により何故翻訳休止が起きるのか、という点に絞り研究を進めた。翻訳休止を起こす時には、HR2 領域はリボソームトンネル内にあることから (図参照)、当然 rRNA やリボソームタンパク質との直接的相互作用により翻訳休止が起こることが予想される。この相互作用する分子を見出すために、HR2 と相互作用するリボソームタンパク質を光架橋法と質量分析により検索した。その結果、架橋頻度の高いタンパク質として、RPL4,

3, 7 が検出された。この中で、リボソームトンネル狭窄部位を形成しかつ検出頻度も一番高かった RPL4(uL4)に注目した。新生鎖と相互作用する可能性のあるアミノ酸が既に報告されているので、このアミノ酸を他のアミノ酸に変えた変異型 RPL4 を発現し、XBP1u の翻訳休止に変化が出るかどうかを検討し、このアミノ酸が XBP1u の休止に関与しているという結果を得た。今後はこの結果をさらに発展させ、翻訳休止をしなくなった場合、小胞体ストレス応答にどのような影響が出るのかを解析する。

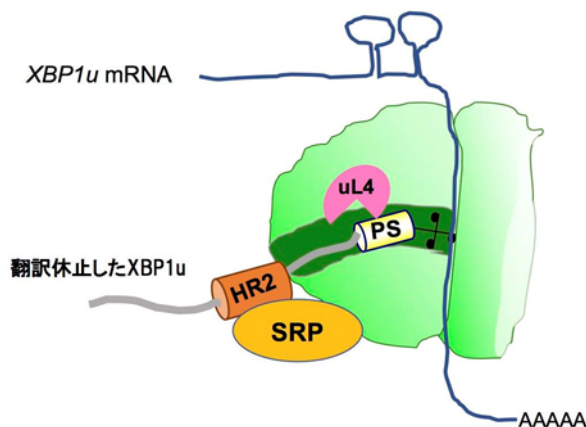


図 翻訳休止した状態の mRNA・リボソーム・XBP1u 新生鎖複合体を模式的に示した。260 番目の Met が P サイトに位置した状態で休止していることがわかっている。HR2: 疎水性領域；PS: 翻訳休止配列；uL4: リボソーム大サブユニット L4 タンパク質；SRP: シグナル認識粒子

代表的な論文：

1. Han, P., Mito, M., Shichino, Y., Hashimoto, S., Udagawa, T., Kohno, K., Yoshida, M., Mishima, Y., Inada, T., and Iwasaki, S. Genome-wide survey of ribosome collision. *Cell Rep.* 31(5) 107610 (2020)
2. Shanmuganathan, V., Schiller, N., Magouloupoulou, A., Cheng, J., Braunger, K., Cymer, F., Berninghausen, O., Beatrix, B., Kohno, K., von Heijne, G., and Beckmann, R. Structural and mutational analysis of the ribosome-arresting human XBP1u. *eLife*, 8:e46267 (2019)
3. Fujimoto T, Nakamura O, Saito M, Tsuru A, Matsumoto M, Kohno K, Inaba K, Kadokura H. Identification of the physiological substrates of PDIp, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member. *J Biol Chem.* 293: 18421-18433 (2018)
4. Tsuchiya Y, Saito M, Kadokura H, Miyazaki JI, Tashiro F, Imagawa Y, Iwawaki T, Kohno K. IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic β cells. *J Cell Biol.* 217: 1287-1301 (2018)
5. Mai CT, Le QG, Ishiwata-Kimata Y, Takagi H, Kohno K, Kimata Y. 4-Phenylbutyrate suppresses the unfolded protein response without restoring protein folding in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 8(2) (2018)
6. Yamaoka Y, Choi BY, Kim H, Shin S, Kim Y, Jang S, Song WY, Cho CH, Yoon HS, Kohno K, Lee Y. Identification and functional study of the endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 94: 91-104 (2017)

7. Sato H, Shiba Y, Tsuchiya Y, Saito M, Kohno K. 4 μ 8C inhibits insulin secretion independent of IRE1 α RNase activity. *Cell Struct Funct.* 42: 61-70 (2017)
8. Tschurtschenthaler M, Adolph TE, Ashcroft JW, Niederreiter L, Bharti R, Saveljeva S, Bhattacharyya J, Flak MB, Shih DQ, Fuhler GM, Parkes M, Kohno K, Iwawaki T, Janneke van der Woude C, Harding HP, Smith AM, Peppelenbosch MP, Targan SR, Ron D, Rosenstiel P, Blumberg RS, Kaser A. Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 α drives Crohn's disease-like ileitis. *J Exp Med.* 214: 401-422 (2017)
9. Kanda S, Yanagitani K, Yokota Y, Esaki Y, Kohno K. Autonomous translational pausing is required for *XBPlu* mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113: E5886-E5895 (2016).
10. Tsuru A, Imai Y, Saito M, Kohno K. Novel mechanism of enhancing IRE1 α -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Sci Rep.* 6: 24217 (2016)

総説 :

1. Kimata Y, Nguyen TMP, Kohno K. Response and cytoprotective mechanisms against proteotoxic stress in yeast and fungi. In "Stress Response Mechanisms in Fungi" ed. By Skoneczny M. Springer International Publishing AG, in press.
2. 大古殿美加、河野憲二
「小胞体膜へのタンパク質の標的化」
タンパク質の個性に応じた新規な小胞体膜への標的化について
医学のあゆみ 印刷中
3. 土屋雄一、河野憲二
「小胞体ストレスセンサーIRE1 α によるプロインスリンの酸化的折り畳みの制御機構」
化学と生物 印刷中
4. 土屋雄一、斉藤美知子、河野憲二
「小胞体ストレス応答機能障害による糖尿病の発症機序」
Yakugaku Zasshi 136 巻 6号 817-825 (2016)

計画研究

藤木 幸夫 九州大学生体防御医学研究所 特任教授

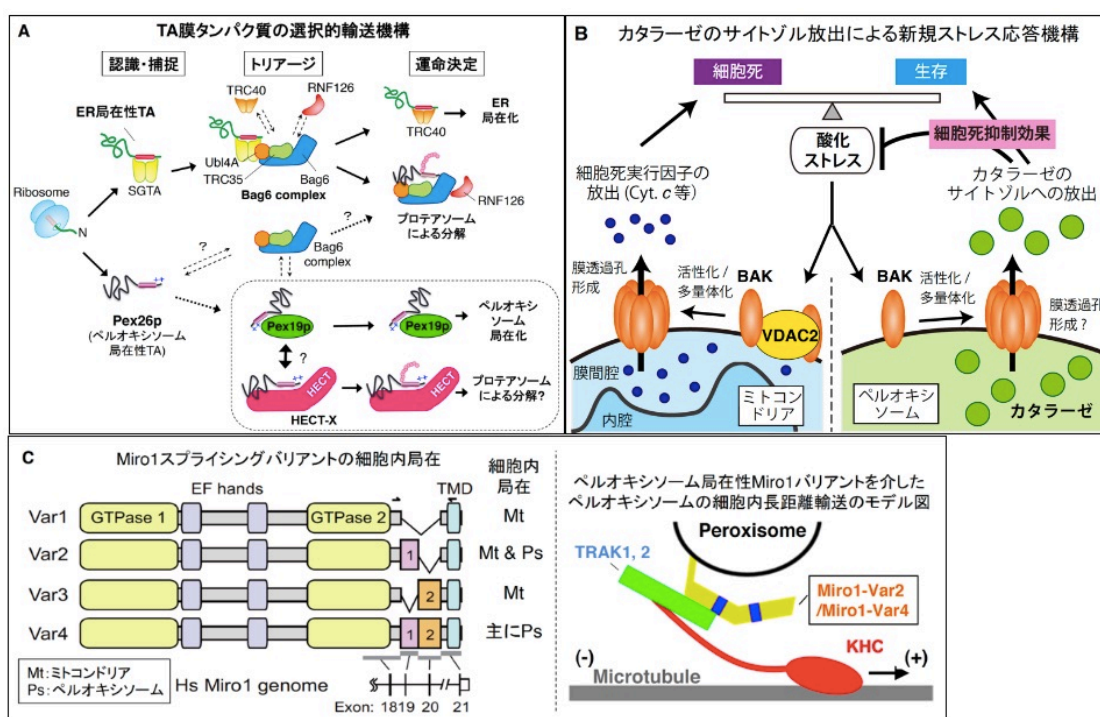
研究課題名 : 新生鎖テイルアンカー型タンパク質 (TA) の輸送・膜挿入と品質管理

研究成果の概要 :

分子内 C 末端に存在する 1 つの膜貫通領域により脂質二重膜にアンカーされるテイルアンカー型膜タンパク質(TA)は、リボソームでの翻訳後にサイトゾルへの放出を経て、種々のオルガネラ膜へ直接輸送される。TA の細胞内選別輸送はリボソームでの新生鎖翻訳時およびその直後から品質管理を伴って実行されると考えられているが、その詳細は不明な点が多い。本研究では、TA をモデルとした新生鎖の運命決定機構、およびオルガネラ膜への局在化の分子機構の解明を目的とした。

新たに輸送基質として明らかにした N 末アンカー型(ATAD1)や 4, 6 回膜貫通型を含む多様なペルオキシソーム膜タンパク質 (*Traffic* 2016) と同様に、ACBD5 (acyl-CoA binding domain-containing 5) や Miro1 をはじめとした新

規合成ペルオキシソーム局在性 TA はその標的化因子である Pex19p に認識され、小胞体局在性 TA の標的化因子 TRC40 非依存的に輸送される (JBC 2017, JCB 2018)。ACBD5 において見出した翻訳遅延とペルオキシソーム輸送局在化効率の関連性、およびペルオキシソーム TA である Pex26p を認識するサイトゾル局在性 HECT 型 E3 の新規同定とペルオキシソーム TA 輸送における品質管理への関与を明らかにしつつある (図 A)。さらに複数の TA が関与するペルオキシソーム機能の新たな制御機構を見出した: 1) ミトコンドリア TA である細胞死促進因子 BAK がペルオキシソームにも一部局在化し、カタラーゼをペルオキシソームからサイトゾルへ放出させることで、酸化ストレス抵抗性および抗細胞死作用を呈することを発見 (JCB 2017, MCO 2017; JCS 2020 図 B)。また、酸化ストレスや細胞周期依存的 Pex14 のリン酸化によるカタラーゼのペルオキシソームへの輸送を抑制し、サイトゾル性カタラーゼによる細胞の酸化ストレス抵抗性を高めるという新規抗酸化ストレス応答機構も発見した (bioRxiv 2020; JCB 2020)。さらに、ヒト全遺伝子に対する網羅的な機能阻害スクリーニングにより細胞の酸化ストレス抵抗性獲得におけるサイトゾル局在性カタラーゼの必須性を見出した (Cell Rep. 2020); 2) 網膜変性症の病因因子としてクローニングした ACBD5 が果たす、ペルオキシソーム内への極長鎖アシル-CoA の取り込みと β 酸化反応における重要な役割 (JBC 2017); 3) 新たなペルオキシソーム TA タンパク質として Miro1 のスプライシングバリエント (Var2, Var4) を同定、これらが哺乳類ペルオキシソームの微小管依存的な細胞内長距離移動を担うことを発見 (JCB 2018; 図 C); 4) 非症候性難聴患者家系のエクソーム解析により Pex26p 中にアミノ酸置換 (F51L) をもたらす DNA 変異を 4 例同定し、変異型 Pex26p の不安定化による軽度のペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送障害が難聴の原因の一つであることを明らかにした (CSH-MCS 2019)。その他、ペルオキシソーム TA である Far1 の分解調節による細胞内プラスマローゲン合成の制御機構 (Sci. Rep. 2017) や、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シズン) を用いたペルオキシソーム分裂装置の形成制御機構 (JCS 2017)、ならびにその Dnm1 GTPase 依存的な分裂が必要とする高濃度 GTP を局所的に供給し、ペルオキシソームとミトコンドリア分裂増殖の根幹を成す新規因子 Dynamo1 の発見 (Nature Commun. 2018)、致死性のペルオキシソーム形成異常症における小脳形態形成障害の原因が、神経栄養因子 BDNF とその不活性型受容体 TrkB-T1 の発現上昇であるとの世界初となる病態発症機構の解明 (LSA 2018)、さらにサイトゾル局在性カタラーゼが NADH など還元性代謝産物を増加させ、BDNF の発現を上昇させることを見出した (JBC 2020) など、ペルオキシソーム形成および機能制御機構の解明に特筆すべき進展が得られた。



代表的な論文：

1. Okumoto, K., El Shermely, M., Natsui, M., Kosako, H., Natsuyama, R., Marutani, T., and *[Fujiki, Y.](#): Peroxisome counteracts oxidative stresses by suppressing catalase import via phosphorylation of Pex14 in the import machinery. *bioRxiv* preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.072132>. (2020; *eLife*, in revision).
2. *Imoto, Y., Itoh, K., and *[Fujiki, Y.](#): Molecular basis of mitochondrial and peroxisomal division machineries. *Int. J. Mol. Sci.* in press (2020).
3. [†]Yamashita, K., [†]Tamura, S., Honsho, M., Yada, H., Yagita, Y., Kosako, H., and *[Fujiki, Y.](#): Mitotic phosphorylation of Pex14p regulates peroxisomal import machinery in mammals. *J. Cell Biol.* in press (2020). ([†]equally contributed)
4. Imoto, Y., Abe, Y., Honsho, M., Okumoto, K., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and *[Fujiki, Y.](#): Molecular basis of local energy generation during mitochondrial and peroxisomal division. *Plant Morphology*, in press (2020).
5. *[Fujiki, Y.](#), Abe, Y., Imoto, Y., Tanaka, A.J., Okumoto, K., Honsho, M., Tamura, S., Miyata, N., Yamashita, T., Chung, W.K., and Kuroiwa, T.: Recent insights into peroxisome biogenesis and associated disease *J. Cell Sci.* **133**: jcs236943 (2020).
6. Abe, Y., Honsho, M., Kawaguchi, R., Matsuzaki, T., Ichiki, Y., Fujitani, M., Fujiwara, K., Hirokane, M., Oku, M., Sakai, Y., Yamashita, T., and *[Fujiki, Y.](#): Reductive cytosol state by peroxisome deficiency up-regulates brain-derived neurotrophic factor pathway. *J. Biol. Chem.* **295**: 5321-5334 (2020).
7. Dubreuil, M.M., Morgens, D.W., Okumoto, K., Honsho, M., Contrepois, K., Lee-McMullen, B., Traber, G.M., Sood, R.S., Dixon, S.J., Snyder, M.P., *[Fujiki, Y.](#), and *Bassik, M.C.: Systematic identification of regulators of oxidative stress reveals non-canonical roles for peroxisomal import and the pentose phosphate pathway. *Cell Rep.* **30**: 1417-1433 (2020).
8. Koyano, F., Yamano, K., Kosako, H., Kimura, Y., Kimura, M., [Fujiki, Y.](#), Tanaka, K., and *Matsuda, M.: Parkin-mediated ubiquitylation redistributes MITOL/March5 from mitochondria to peroxisomes. *EMBO Rep.* e47728 (2019).
9. Takahashi, T., Honsho, M., Abe, Y., and *[Fujiki, Y.](#): Plasmalogen mediates integration of adherens junction. *J. Biochem.* **166**: 423-432 (2019).
10. Honsho, M., Dorninger, F., Abe, Y., Setoyama, D., Ohgi, R., Uchiumi, T., Kang, D., Berger, J., and *[Fujiki, Y.](#): Impaired plasmalogen synthesis dysregulates liver X receptor-dependent transcription in cerebellum. *J. Biochem.*, **166**: 353-361 (2019).
11. Tanaka, H., *Okazaki, T., Aoyama, S., Yokota, M., Koike, M., Okada, Y., [Fujiki, Y.](#), and Gotoh, Y.: Peroxisomes control mitochondrial dynamics and the mitochondrion-dependent pathway of apoptosis. *J. Cell Sci.* **132**: jcs224766 (2019).
12. Mukai, S., Matsuzaki, T., and *[Fujiki, Y.](#): The cytosolic peroxisome-targeting signal (PTS)-receptors, Pex7p and Pex5pL, are sufficient to transport PTS2 proteins to peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1866**: 441-449 (2019).
13. Imoto, Y., Abe, Y., Okumoto, K., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and *[Fujiki, Y.](#): Dynamics of nucleoside diphosphate kinase protein DYNAMO2 correlates with global GTP level during cell cycle of *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **95**: 75-85 (2019).
14. Niwa, H., Miyauchi-Nanri, Y., Okumoto, K., Mukai, S., Noi, K., Ogura, T., and *[Fujiki, Y.](#): A newly isolated Pex7-binding, atypical PTS2 protein P7BP2 is a novel dynein-type AAA+ protein. *J. Biochem.* **164**: 437-447 (2018).
15. Abe, Y., Honsho, M., Kawaguchi, R., Itoh, R., Fujitani, M., Fujiwara, K., Hirokane, M., Matsuzaki, T., Nakayama, K., Ohgi, R., Marutani, T., Nakayama, K.I., Yamashita, T., and *[Fujiki, Y.](#): Peroxisome biogenesis deficiency attenuates the BDNF-TrkB pathway-mediated development of cerebellum. *Life Sci. Alliance* **1**: e201800062 (2018).
16. [†]Tanaka, A. J., [†]Okumoto, K., [†]Tamura, S., Abe, Y., Hirsch, Y., Deng, L., Ekstein, J., Chung W. K., and *[Fujiki, Y.](#): A newly identified mutation in the *PEX26* gene is associated with a milder form of Zellweger spectrum disorder. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* **5**: a003483 in press ([†]equally contributed).
17. Imoto, Y., Abe, Y., Honsho, M., Okumoto, K., Ohnuma, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and [Fujiki, Y.](#): Onsite GTP fuelling

via DYNAMO1 drives division of mitochondria and peroxisomes. *Nat. Commun.* 9: 4634 (2018).

18. Okumoto, K., Ono, T., Toyama, R., Shimomura, A., Nagata, A., and *Fujiki, Y.: New splicing variants of mitochondrial Rho GTPase-1 (Miro1) transport peroxisomes. *J. Cell Biol.* 217: 619-633 (2018).
19. *Fujiki, Y., Miyata, N., Mukai, S., Okumoto, K., Cheng, E. H.: BAK regulates catalase release from peroxisomes. *Mol. Cell. Oncol.* 4: e1306610 (2017).
20. Honsho, M., Abe, Y., and *Fujiki, Y.: Plasmalogen synthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci. Rep.* 7: 43936 (2017).
21. Imoto, Y., Abe, Y., Okumoto, K., Honsho, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and *Fujiki, Y.: Defining dynamin-based ring organizing center on the peroxisome-dividing machinery isolated from *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Cell Sci.* 130: 853-867 (2017).
22. Hosoi, K., Miyata, N., Mukai, S., Furuki, S., Okumoto, K., Cheng, E. H., and *Fujiki, Y.: The VDAC2-BAK axis regulates peroxisomal membrane permeability. *J. Cell Biol.* 216: 709-721 (2017).
23. Yagita, Y., Shinohara, K., Abe, Y., Nakagawa, K., Al-Owain, M., Alkuraya, F. S., and *Fujiki, Y.: Deficiency of a retinal dystrophy protein, acyl-CoA binding domain-containing 5 (ACBD5), impairs peroxisomal β -oxidation of very-long-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 292: 691-705 (2017).
24. Liu, Y., Yagita, Y., and *Fujiki, Y.: Assembly of peroxisomal membrane proteins via the direct Pex19p-Pex3p pathway. *Traffic* 17: 433-455 (2016).
25. Yoshida, Y., Niwa, H., Honsho, M., Itoyama, A., and *Fujiki, Y.: Pex11 mediates peroxisomal proliferation by promoting deformation of the lipid membrane. *Biology Open*, 4: 710-721 (2015).
26. Tamura, S., Matsumoto, N., Takeba, R., and *Fujiki, Y.: AAA peroxins and their recruiter Pex26p modulate the interactions of peroxins involved in peroxisomal protein import. *J. Biol. Chem.* 289: 24336-24346 (2014).
27. Yamashita, S., Abe, K., Tatemichi, Y., and *Fujiki, Y.: The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy. *Autophagy* 10: 1549-1564 (2014).
28. Okumoto, K., Noda, H., and *Fujiki, Y.: Distinct modes of ubiquitination of peroxisome-targeting signal type 1 (PTS1)-receptor Pex5p regulate PTS1 protein import. *J. Biol. Chem.* 289: 14089-14108 (2014).

総説 :

1. Fujiki, Y.: Peroxisome biogenesis and human peroxisome-deficiency disorders. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 92:463-477 (2016).
2. *Fujiki, Y., Okumoto, K., Mukai, S., Honsho, M., and Tamura, S.: Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Front. Physiol.* 5: article 307 (2014).

計画研究

千葉 志信 京都産業大学 総合生命科学部 准教授

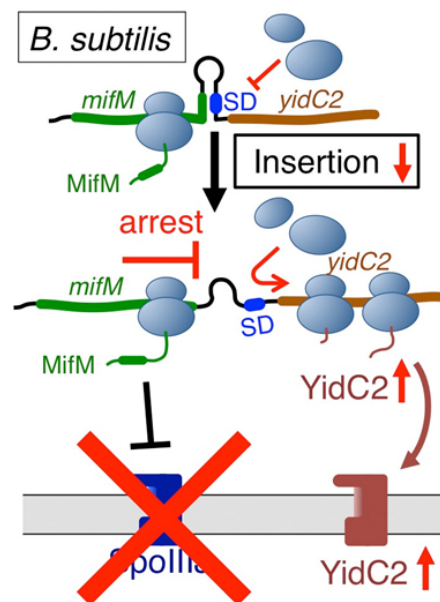
研究課題名 : 働く新生鎖の生理機能と分子機構

研究成果の概要 :

近年、翻訳途上で生理機能を発揮する新生鎖がいくつか見出された。我々は、そのような機能性新生鎖である枯草菌 MifM、大腸菌 SecM の生理機能と分子機構の解明を目指してきた。とりわけ、翻訳アレストとその解除機構の解明は本研究課題の中心的なテーマであったが、ドイツ・ミュンヘン大学の D. Wilson 博士 (現ハンブル

グ大)、R. Beckmann 博士らとの共同研究により、構造生物学および遺伝学的手法を用いて、翻訳アレストに必要な MifM-リボソーム相互作用の詳細を明らかにした (1)。さらに、MifM の翻訳アレストが、リボソームの PTC 付近、トンネル内のみならず、構造解析からは見出すことのできなかったリボソーム表面での相互作用にも依存していることを示した (2)。MifM の翻訳アレストの解除には、MifM の YidC 依存的な膜挿入が必要であるが、YidC が脂質二重層内に形成する溝構造の親水性が MifM の膜挿入と翻訳アレストの解除に重要であることを示した (3)。生理機能に関しては、以下の知見が得られた。MifM は、枯草菌の第一の YidC ホモログである SpoIIIJ の活性の変動を感知し、SpoIIIJ 活性の低下に呼応して第二のホモログである YidC2 の発現を誘導することが示されていたが、それに加えて、YidC2 の活性をも感知する能力があり、この性質を利用し、枯草菌は、SpoIIIJ と YidC2 のトータルの膜挿入活性をモニターし、YidC2 の細胞内量をフィードバック制御していることが示唆された (4)。

他の班員との共同研究：京大・秋山芳展教授・森博幸准教授らとは海洋性ビブリオ菌 VemP の解析 (5) に関して、東工大・田口英樹教授らとは、翻訳プロファイルの網羅的解析 (6)、ならびに新生鎖による翻訳伸長の強制終了 (IRD) の発見 (7) に関して、それぞれ共同研究を行った。



代表的な論文：

1. Sohmen, D., Chiba, S., Shimokawa-Chiba, N., Innis, A., Berninghausen, O., Beckmann, R., Ito, K. and Wilson, D. (2015) Structure of the Bacillus subtilis 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling. *Nat. Commun.* 6, 6941.
2. Fujiwara, K., Ito, K. and Chiba, S. (2018) MifM-instructed translation arrest involves nascent chain interactions with the exterior as well as the interior of the ribosome. *Sci Rep.* 8, 10311.
3. Shimokawa-Chiba, N., Kumazaki, K., Tsukazaki, T., Nureki, O., Ito, K. and Chiba, S. (2015) Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112, 5063-5068.
4. Chiba, S. and Ito, K. (2015) MifM monitors total YidC activities of Bacillus subtilis including that of YidC2, the target of regulation. *J Bacteriol.* 197, 99-107. (* corresponding author)
5. Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama, Y. and Mori, H. (2015) Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112, E5513-E5522.
6. Chadani, Y., Niwa, T., Chiba, S., Taguchi, H. and Ito, K. (2016) Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113, E829-E838.

7. Chadani, Y., Niwa, T., Izumi, T., Sugata, N., Nagao, A., Suzuki, T., Chiba, S., Ito, K. and Taguchi, H. (2017) Intrinsic ribosome destabilization underlies translation and provides an organism with a strategy of environmental sensing. *Mol Cell*. 68, 528-539.e5.

総説 :

1. Ito, K., Mori, H. and Chiba, S. (2018) Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 365, 11.
 2. 千葉志信 (2018) 調節性翻訳アレストペプチドによる細胞機能の制御. 生化学 第90巻第2号, 147-157.
 3. 茶谷悠平、千葉志信、伊藤維昭、田口英樹 (2018) 翻訳途上の新生ポリペプチド鎖が引き起こすリボソームの不安定化とその生理的意義. 実験医学 Vol. 36, No. 8 (5月号) 1364-1367.
 4. 伊藤維昭、茶谷悠平、千葉志信、田口英樹 (2016) タンパク質の翻訳伸長には個性(緩急リズム)がある. バイオサイエンスとインダストリー (B&I) 74, 428-430
-

公募研究 (平成 27~28 年度) (平成 29~30 年度)

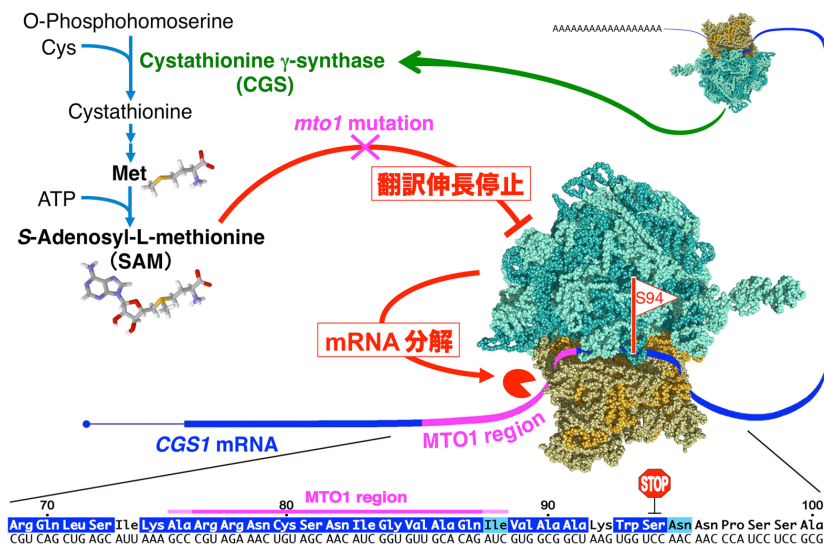
内藤 哲 北海道大学 大学院農学研究院 教授

研究課題名：シロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子における翻訳停止と mRNA 分解機構の研究

研究成果の概要：

シロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子は高等植物におけるメチオニン生合成の鍵となる段階を触媒するシスタチオン γ -シンターゼ (CGS) をコードする。CGS はアロステリック酵素ではなく、*CGS1* 遺伝子の発現は、メチオニンの代謝産物である *S*-アデノシルメチオニン (SAM) に応答した翻訳伸長の一時停止 (アレスト) と、これと共役した mRNA 分解によってフィードバック制御される。MTO1 領域と名付けた十数アミノ酸残基の領域直後の Ser-94 コドンでアレストが起こり、ペプチジル-tRNA が蓄積する。リボソームの転座前の段階でアレストが引き起こされ、このとき、MTO1 領域を含む新生鎖はリボソーム出口トンネル内で縮んだコンフォメーションをとるとともに、26S rRNA にもペプチジルトランスフェラーゼセンター近傍と出口トンネル狭窄部位近傍でコンフォメーション変化が起こる。リボソームタンパク質 uL4 に変異を導入したトランスジェニック・シロイヌナズナ株を用いた解析により、CGS1 のアレストにおける狭窄部位の関与を示す生化学的知見を得た。

CGS1 でのアレストは翻訳伸長過程で起こるが、uORF でのアレストは、終止コドンで起こるものが多い。ポリアミン合成に関わる SAM デカルボキシラーゼ (SAMDC1) mRNA の uORF の終止コドンにおけるポリアミンに応答したアレストと、これと共役した nonsense-mediated mRNA decay による mRNA 分解を以前に報告している。CGS1 の研究で得た知見を、上流 ORF (uORF) でのアレストの解析に敷衍した共同研究を行った。シロイヌナズナ bZIP11 は、ショ糖に応答してアミノ酸代謝を制御する転写因子である。2つ目の uORF の終止コドンにおけるショ糖に応答したアレストを明らかにした。この uORF には連続した3つの Arg があるが、これを Ala に置換することでアレストが強まることを示した。ホウ酸は植物の必須元素だが、過剰に存在すると毒性を示す。シロイヌナズナのホウ酸トランスポーター NIP5;1 の mRNA は4つの uORF を持ち、そのうちの2つは AUGUAA からなる最小の ORF である。ホウ酸過剰では AUGUAA でリボソームの滞在時間が長くなり、mRNA の切断が起こる。mRNA 分解中間体の5'末端は、CGS1 と同様にアレストしたリボソームの5'近傍に位置する。また、高橋広夫氏との共同研究で見出した、種間でアミノ酸配列が保存された uORF の解析により、新たに4つのアレストを引き起こす uORF を同定した。



代表的な論文：

1. *Takahashi H, Hayashi N, Hiragori Y, Sasaki S, Motomura T, Yamashita Y, Naito S, Takahashi A, Fuse K, Satou K, Endo T, Kojima S, *Onouchi H: Comprehensive genome-wide identification of angiosperm upstream ORFs with peptide sequences conserved in various taxonomic ranges using a novel pipeline, ESUCA. *BMC Genomics*, 21: 260 (2020).
2. Takamatsu S, Ohashi Y, Onoue N, Tajima Y, Imamichi T, Yonezawa S, Morimoto K, Onouchi H, *Yamashita Y, *Naito S: Reverse genetics-based biochemical studies of the ribosomal exit tunnel constriction region in eukaryotic ribosome stalling: spatial allocation of the regulatory nascent peptide at the constriction. *Nucleic Acids Res.*, 48: 1985-1999 (2020).
3. Aibara I, Hirai T, Kasai K, Takano J, Onouchi H, **Naito S**, Fujiwara T, *Miwa K: Boron-dependent translational suppression of the borate exporter *BORI* contributes to the avoidance of boron toxicity. *Plant Physiol.*, 177: 759-774 (2018).
4. Hayashi N, Sasaki S, Takahashi H, Yamashita Y, **Naito S**, *Onouchi H: Identification of *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosomal arrest. *Nucleic Acids Res.*, 45: 8844-8858 (2017).
5. *Yamashita Y, Takamatsu S, Glasbrenner M, Becker T, **Naito S**, *Beckmann R: Sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling at the stop codon of *Arabidopsis* bZIP11 uORF2. *FEBS Lett.*, 59: 1266-1277 (2017).
6. Tanaka M, Sotta N, Yamazumi Y, Yamashita Y, Miwa K, Murota K, Chiba Y, Hirai MY, Akiyama T, Onouchi H, *Naito S, *Fujiwara T: The Minimum Open Reading Frame, AUG-Stop, Induces Boron-Dependent Ribosome Stalling and mRNA Degradation. *Plant Cell*, 28: 2830-2849 (2016).
7. Ebina I, Takemoto-Tsutsumi M, Watanabe S, Koyama H, Endo Y, Kimata K, Igarashi T, Murakami K, Kudo R, Ohsumi A, Noh AL, Takahashi H, **Naito S**, *Onouchi H: Identification of novel *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames that control expression of the main coding sequences in a peptide sequence-dependent manner. *Nucleic Acids Res.*, 43: 1562-1576 (2015).

総説：

1. 山下由衣, 尾之内均, **内藤 哲**: 止まって働くリボソーム – 新生ペプチドが司る植物の細胞内恒常性維持機構. *化学と生物*, 54: 191-197 (2016).

公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

船津 高志 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究課題名：SecM および TnaC の翻訳アレスト機構の 1 分子計測による解明

研究成果の概要：

DNA に蓄えられた遺伝情報は一時的に mRNA にコピーされ、リボソームによってタンパク質に翻訳される。翻訳の制御は、生命活動の根幹に関わる重要なプロセスである。「翻訳アレスト」は、新生ポリペプチド鎖が翻訳を一時的に停止させる現象であり、原核細胞から真核細胞まで普遍的に存在している。この翻訳を停止させる機構に関する生化学的、分子生物学研究は盛んに行われているが、1 分子計測を用いた精緻な生物物理学研究は、ほとんど行われていない。本研究では、SecM および TnaC の翻訳アレストの維持・解除機構を 1 分子計測により明らかにすることを目的とし、以下の成果を得た。

(1) SecM の翻訳アレスト維持・解除機構

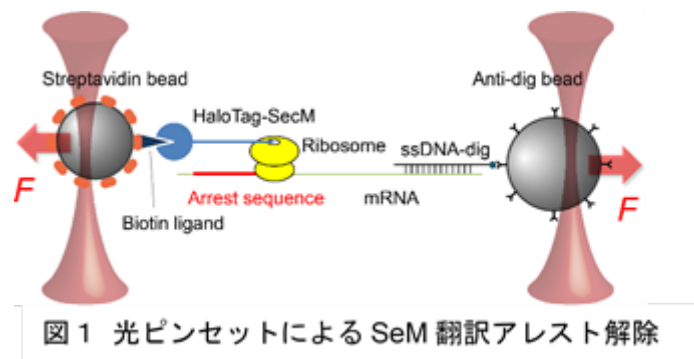
SecM の翻訳アレストの安定性に、アレスト配列だけでなくリボソーム外の領域も影響することを見出した。そこで様々な SecM 変異体の翻訳アレストの寿命を解析し、翻訳アレストの安定化に寄与する領域・残基を特定し

た。また新生 SecM と光架橋する分子を同定することにより、SecM と相互作用するリボソームタンパク質を決定した。

さらに、新生 SecM が物理的に引っ張られることで翻訳アレストが解除され、翻訳が再開することを実証するため、光ピンセット（図1）または磁気ピンセットを利用した1分子計測系を構築した。これらを利用し、張力により翻訳アレストが解除され、実際に翻訳が再開されることを1分子レベルで示した。

(2) TnaC の翻訳アレスト維持・解除機構

TnaC の翻訳アレスト解除機構を解析する過程で、TnaC の翻訳がリーディングフレームの終止コドンで終結せず、新たな産物が生じることを見出した。この産物は、TnaC の翻訳アレスト依存的に生じる+1 フレームシフトにより生じていた。また、翻訳アレストを誘起する L-トリプトファン濃度を増大させると、フレームシフト産物が主な翻訳産物となった。以上の結果から、TnaC の翻訳アレストは+1 フレームシフトを誘導することで、翻訳が停止したりリボソームを解放することが示唆された。



代表的な論文：

1. Muta, M., *Iizuka, R., Niwa, T., Guo, Y., Taguchi, H., *Funatsu, T.
Nascent SecM chain interacts with outer ribosomal surface to stabilize translation arrest.
Biochem. J. 477 (2): 557-566 (2020)
2. Masubuchi, T., *Endo, M., Iizuka, R., Iguchi, A., Yoon, D.H., Sekiguchi, T., Qi, H., Iinuma, R., Miyazono, Y., Shoji, S.,
Funatsu, T., *Sugiyama, H., Harada, Y., *Ueda, T., Hisashi *Tadakuma, H.
Construction of integrated gene logic-chip.
Nat. Nanotechnol. 13 (10): 933-940 (2018)
3. Hoshi, Y., Okabe, K., Shibasaki, K., **Funatsu, T.**, Matsuki, N., Ikegaya, Y., *Koyama, R.
Ischemic brain injury leads to brain edema via hyperthermia-induced TRPV4 activation.
J. Neurosci. 38(25): 5700-5709 (2018).
4. Hattori, K., Naguro, I., Okabe, K., **Funatsu, T.**, Furutani, S., Takeda, K., *Ichijo, H.
ASK1 signaling regulates brown and beige adipocyte function.
Nat. Commun. 7: 11158 (2016).
5. Nakamura, K., *Iizuka, R., Nishi, S., Yoshida, T., Hatada, Y., Takaki, Y., Iguchi, A., Yoon, D. H., Sekiguchi, T., Shoji, S.,
***Funatsu, T.**
Culture-independent method for identification of microbial enzyme-encoding genes by activity-based single-cell sequencing using a water-in-oil microdroplet platform.
Sci. Rep. 6: 22259 (2016)
6. Yang, Z., Iizuka, R., ***Funatsu, T.**
Nascent secM chain: outside the ribosome reinforces translation arrest.

総説：

1. 藤井聡一郎、中村和貴、飯塚怜、船津高志
マイクロ・ナノデバイスを用いた生体分子の機能解析と有用遺伝子の探索・回収
Molecular Electronics and Bioelectronics 28(3): 165-168 (2017)
2. 船津高志
細胞内 mRNA の選択的蛍光標識とイメージングによる細胞機能解析
Drug Delivery System 31(2): 110-118 (2016)
3. 船津高志
蛍光顕微鏡法の展開
Drug Delivery System 31(2): 108 (2016)

公募研究（平成 27～28 年度）

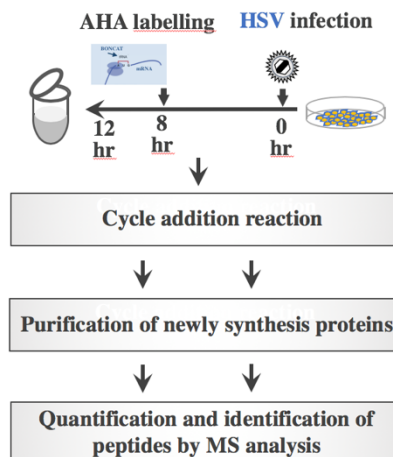
川口 寧：東京大学医科学研究所 教授

研究課題名：ウイルス感染におけるタンパク質の品質管理制御とそれに基づく広域阻害剤の薬効評価

研究成果の概要：

- (i) 単純ヘルペスウイルス(HSV: herpes simplex virus)感染が、シャペロン活性を促進すること、また、当該シャペロン阻害剤が、培養細胞系およびマウス病態モデルにおけるウイルス増殖や病態を著しく阻害することを明らかにした。
- (ii) ウイルス感染細胞では、宿主タンパク質の新規合成がシャットオフされる。この特性を利用して、BONCAT (bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging)法と質量解析法を組み合わせた、超高感度かつ新規合成タンパク質のみを検出可能な系を構築し、HSV 感染細胞における新生ウイルスタンパク質のスクリーニングを行った (図)。その結果、HSV の新しいタンパク質コード遺伝子を複数同定し、その中の 1 つに関して in depth 解析を行ったところ、新しい HSV 病原性因子をコードしていることが明らかになった。

Identification of newly synthesized viral proteins in HSV-infected cells



原著論文(全て研究代表者が責任著者)

1. **Cell Host & Microbe** 23: 254-265, 2018
2. **Nat. Immunol.** 19: 1071-1082, 2018.
3. **Nat. Commun.** 9: 3379, 2018.
4. **J. Virol.** 92: e01035-18, 2018
5. **J. Virol.** 92: e00807-18, 2018
6. **J. Clin. Invest.** 127: 3784-3795, 2017
7. **J. Virol.** 91: e00271-17, 2017
8. **J. Virol.** 91: e000271-17, 2017
9. **J. Virol.** 90: 10170-10181, 2016
10. **J. Virol.** 90: 8754-8767, 2016
11. **J. Virol.** 90: 6738-6745, 2016
12. **J. Virol.** 90: 5622-5635, 2016
13. **J. Virol.** 90: 3173-3186, 2016
14. **J. Virol.** 90: 457-473, 2016
15. **J. Virol.** 89: 8982-8998, 2015
16. **J. Virol.** 89: 7799-7812, 2015

著書 (研究代表者が編集者)

1. **Adv. Exp. Med. Biol.** (Springer Nature) Vol. 1045, 2018

公募研究 (平成 27~28 年度) (平成 29~30 年度)

伊野部智由 富山大学 先端ライフサイエンス拠点 特命助教

研究課題名: 新生鎖分解の Unstructured 領域を介した多層的制御機構

研究成果の概要:

リボソーム上の新生ポリペプチド鎖 (新生鎖) は、作られている最中に分解を運命づけられることがある。一般的な新生鎖でも、構造を形成していない Unstructured 領域を多く含み、細胞内で分解の脅威にさらされているが、翻訳に何らかのエラーがあり翻訳伸長反応が止まってしまった異常新生鎖には、リボソーム上でポリユビキチン鎖が付加され、さらに CAT-tail とよばれる Unstructured 領域も取り付けられる。CAT-tail は、分子シャペロンとの相互作用や、凝集体形成誘導効果を持つと報告されており、異常新生鎖の運命決定機構への関与が注目されている。

我々はこれまで、プロテアソームによる効率的な蛋白質分解には、ポリユビキチン化だけでは不十分で、基質蛋白質自身に Unstructured 領域が必要であることを明らかにしている。さらにこのような Unstructured 領域が蛋白質の分解制御に関わっていると提唱し、多くの人工的分解制御技術を報告している。

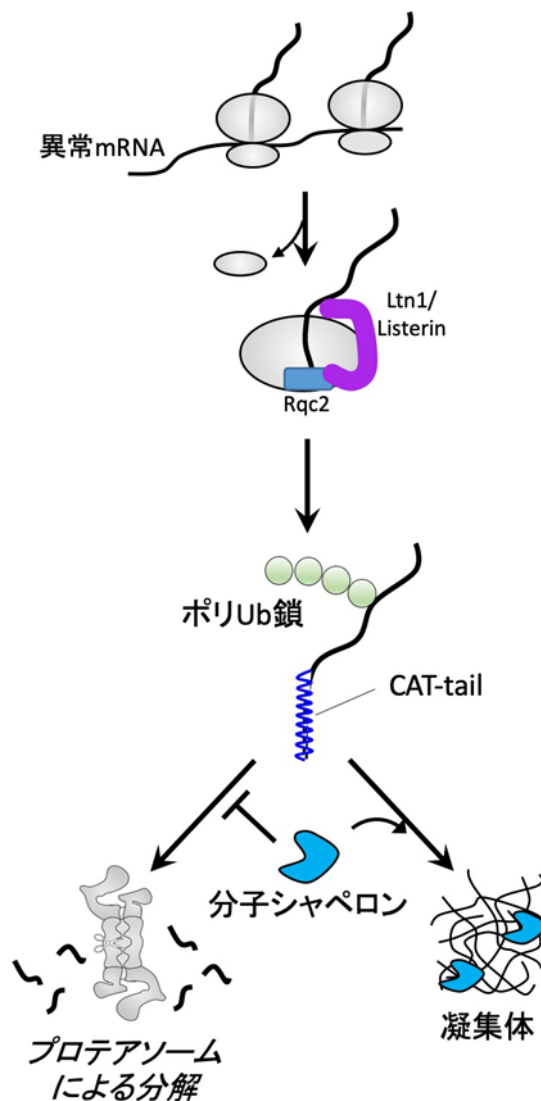
このような背景から、我々は、新生鎖の運命決定にも Unstructured 領域が関与していると考え、プロテアソームによる異常新生鎖分解に対する CAT-tail などの Unstructured 領域の影響を調べた。

その結果、翻訳アレストを引き起こすポリリシンなどの連続したアミノ酸配列は、この配列を取り付けたモデルタンパク質の分解を引き起こさないことがわかった。これに対し、アレスト配列の後に取り付けられる CAT-tail は、強い分解誘導効果を持つことが明らかとなった。このことは CAT-tail は翻訳アレスト異常新生鎖をリボソームから追い出し、ポリユビキチン化を促進するだけでなく、プロテアソームによる分解をも促進していることを示唆している。

しかしながら 20 残基以上の長い CAT tail は、高濃度な細胞内環境で凝集を起こしやすいことがわかった。Ssa1 やそのコシャペロンである Sis1 は可溶性の短い CATtail とはほとんど相互作用しないが、長い CAT-tail の凝集体に巻き込まれるような形で CAT-tail と相互作用するらしい。

酵母においてこのような長い CAT-tail を持つ蛋白質を過剰発現すると、酵母の生育阻害を引き起こし、高い細胞毒性を示した。異常新生鎖への CAT-tail の付加はプロテアソームによる分解を促進するものの、過剰な CAT-

tail 付加異常新生鎖は分子シャペロンを巻き込んだ凝集体形成につながり、細胞内のプロテオスタシスネットワークに破綻をきたすのではないかと考えられる。今後、CAT-tail を介した分解と凝集が細胞内でどのように制御されているか調べる必要がある。



代表的な論文：

1. Matsumoto, G., **Inobe, T.**, Amano, T., Murai, K., Nukina, N. and Mori, N. (2018) N-Acyldopamine induces aggresome formation without proteasome inhibition and enhances protein aggregation via p62/SQSTM1 expression. *Sci. Rep.* 8, 9585.
2. **Inobe, T.***, Tsukamoto, M., and Nozaki, M. (2018) Proteasome-mediated protein degradation is enhanced by fusion ubiquitin with unstructured degron. *Biochem Biophys Res Commun*, 501, 948-954.
3. Yu, H., Singh Gautam AK., Wilmington, S., Wylie, D., Martinez-Fonts, K., Kago, G., Warburton, M., Chavali, S., **Inobe, T.**, Finkelstein, I., Babu, MM., and Matouschek, A. Conserved sequence preferences contribute to substrate recognition by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 291, 14526-39 (2016)
4. Kurosawa, N., Wakata, Y., **Inobe, T.**, Kitamura, H., Yoshioka, M., Matsuzawa, S., Kishi, Y., and Isobe, M. Novel method for the high-throughput production of phosphorylation site-specific monoclonal antibodies.

Sci. Rep. 6, 25174 (2016)

5. ***Inobe, T.** and Nozaki, M.

Proteasomal degradation of damaged polyubiquitin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 471, 34-40 (2016)

6. ***Inobe, T.** and Nukina, N.

Rapamycin-induced oligomer formation system of FRB-FKBP fusion proteins.

J. Biosci. Bioeng. 122, 40-46 (2016)

7. Takahashi, K., Matouschek, A. and ***Inobe, T.**

Regulation of proteasomal degradation modulating an unstructured proteasomal initiation region of a substrate.

ACS Chem. Biol. 10, 2537-2543 (2015)

公募研究（平成 27～28 年度）

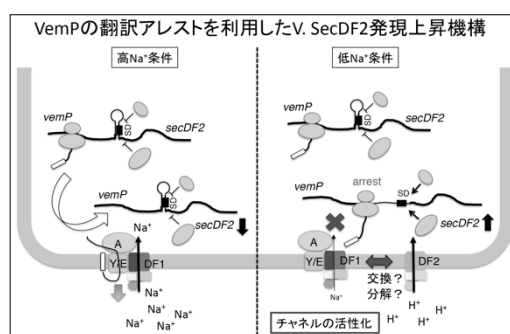
秋山芳展 京都大学 ウイルス研究所 教授

研究課題名：ビブリオ菌における新生鎖機能を介したタンパク質膜透過の制御

研究成果の概要：

我々は、「ほぼ全てのビブリオ属細菌が2種類の SecDF パラログ(V.SecDF1, V.SecDF2) (タンパク質膜透過促進因子)を保持しており、海洋性ビブリオ菌を用いた解析から、V.SecDF1 は細胞質膜を挟んで形成される Na⁺濃度勾配を、V.SecDF2 は H⁺濃度勾配をエネルギーに利用してタンパク質膜透過を促進している」事を見出したが、これら2種のパラログの発現様式や生理的機能に関しては明らかではなかった。

Na⁺駆動型の V.SecDF1 は恒常的に発現しているのに対して、H⁺駆動型の V.SecDF2 は、低 Na⁺環境などタンパク質膜透過能が低下した際に特異的に発現上昇し、膜透過装置を remodeling することにより、H⁺濃度勾配を用いてタンパク質膜透過能を維持する巧妙な機構を持つことを明らかにした(図)。加えて、V.secDF2 の同一オペロン上流に位置する *orf* によってコードされる分泌タンパク質 VemP (Vibrio protein export monitoring polypeptide)が、細胞のタンパク質膜透過能をモニターする因子として働く事、リボソームによる VemP の合成が膜透過能の低下時に安定に停止(アレスト)し、これが下流の V.SecDF2 の合成に必須である事を見出した。



本研究により、SecM, MifM に続き、自身のアミノ酸配列だけで安定に翻訳が停止する新しい翻訳停止モチーフの存在を明らかにすると共に、ビブリオ属細菌は、塩環境変化に対する適応に新生鎖の翻訳停止を介した膜透過モニター機能を利用していることを示した。

代表的な論文：

1. Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama, Y., and Mori, H. (2015). Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E5513-E5522.
2. Akiyama, K., Mizuno, S., Hizukuri, Y., Mori, H., Nogi, T., and Akiyama, Y. (2015). Roles of the membrane-reentrant β -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. *eLife* 4, e08928.
3. Daimon, Y., Narita, S.-i., and Akiyama, Y. (2015). Activation of TA system toxins suppresses lethality caused by the loss

of σ^F in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 197, 2316-2324.

- Miyazaki, R., Yura, T., Suzuki, T., Dohmae, N., Mori, M., and Akiyama, Y. (2016). A novel SRP recognition sequence in the homeostatic control region of heat shock transcription factor σ^{32} . *Sci. Rep.* 6, 24147.

総説：

- 檜作洋平、秋山芳展 (2015) 膜内部でのタンパク質分解とストレス応答制御 別冊・医学のあゆみ 「レドックス UPDATE —ストレス制御の臨床医学・健康医学」(監修：平家俊男、淀井淳司) 医歯薬出版株式会社 pp 69-74.

公募研究 (平成 27~28 年度)

市橋 伯一 大阪大学 情報科学研究科 准教授

研究課題名：新生鎖研究のためのリボソーム in vitro 人為選択技術の開発

研究成果の概要：

リボソームの研究を難しくしている一因は、変異体を得ることの難しさにある。リボソームは細胞内で極めて重要な役割を担っているために、リボソーム RNA (rRNA) やタンパクの変異導入は多くの場合、細胞にとって致死になってしまう。したがって現状で研究に使える変異体は限られており、リボソームやそのサブユニットもつ様々な機能を区別して調べることができていない。この障害を越える方法の 1 つは、in vitro でリボソームの変異体を構築することである。リボソームの in vitro 再構成は古くから行われており、近年 rRNA の転写と共役した再構成が報告された (Jewett et al 2013)。これまでに申請者らはこの方法を人工脂質小胞 (liposome) に封入した再構成無細胞翻訳系中で起こすことに成功した。本研究では、これをさらに申請者の独自技術である「セルソーターを使った脂質小胞の選択技術」(Nishikawa et al 2013) と組み合わせることにより、変異 rRNA を持つリボソームの人為選択方法を開発した。

選択方法の概要を図に示す。この方法では大腸菌 16S rRNA の変異体ライブラリー(DNA)を作成し、リボソーマルタンパク質群、50S リボソーマルサブユニット、転写酵素、リボソームを除く翻訳タンパク質群等と共に人工脂質小胞に封入する。転写された 16S rRNA は 30S リボソーマルサブユニットになり、レポーター遺伝子を翻訳し、蛍光を発する。すなわち、高い翻訳能力をもった 16S rRNA を発現する脂質小胞が強い蛍光を持つことになる。こうした強い蛍光をもつ脂質小胞をセルソーターで回収し、16S rRNA をコードした DNA を回収するというサイクルを複数回繰り返した。その結果、無細胞翻訳反応液中で元の配列よりも数倍高い翻訳活性を示す 16S rRNA 変異体を得ることができた。その後の研究から、この変異型 16S rRNA は、rRNA の化学修飾がない条件で、かつ高い塩濃度の条件での翻訳活性を上げていたことから、導入された変異は 16S rRNA のフォールディングの安定化に働いている可能性がある。ちなみに、大腸菌の 16S rRNA をこの変異体で置き換えようとしたが、そういうものは得られなかった(復帰変異体ばかりが得られた)ことから、この変異は in vivo では毒性があると考えられる。すなわち、本研究で開発した完全に in vitro での 16S rRNA の選択技術を使えば、胞内では致死になるようなリボソーム変異体を得ることができるようになった。本研究成果を用いれば、今後、より幅広い性質をもつリボソーム変異体の取得ができるようになることが期待される。

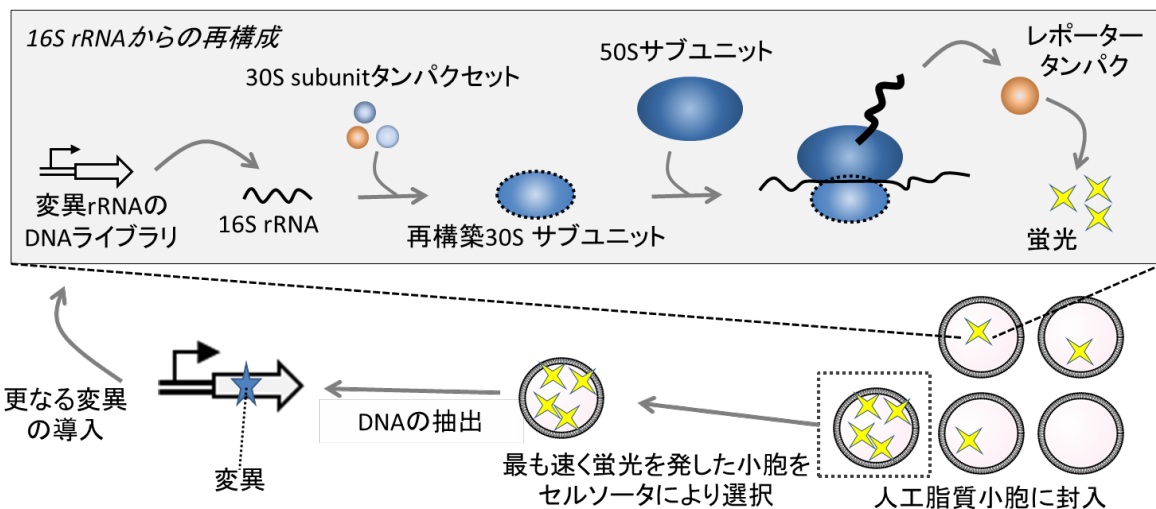


図 リボソーム再構成とrRNAの人為選択の模式図

代表的な論文：

1. Murase, Y., Nakanishi, H., Tsuji, G., Sunami, S., Ichihashi, N.*
 In vitro evolution of unmodified 16S rRNA for simple ribosome reconstitution
ACS Synthetic Biology, 7, 576–583 (2018)
2. Tsuji, S., Ichihashi, N.*
 Translation activity of chimeric ribosomes composed of Escherichia coli and Bacillus subtilis or Geobacillus stearothermophilus subunits
Biochem Biophys Rep, 10, 325-328 (2017)

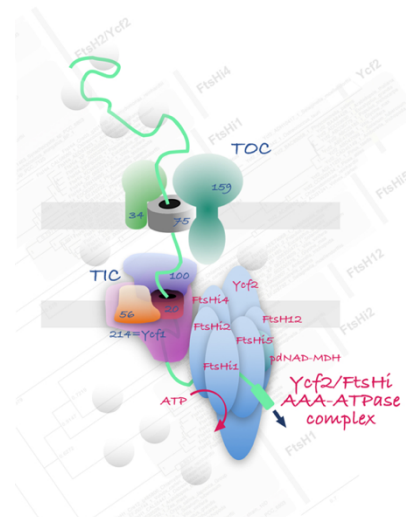
公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

中井 正人 大阪大学・蛋白質研究所 准教授

研究課題名：サイトゾルで合成される葉緑体蛋白質新生鎖の二重包膜膜透過連携機構の解析

研究成果の概要：

植物や藻類の葉緑体は外包膜、内包膜の二重膜に囲まれ、細胞質で合成された新生鎖はこの包膜を通過して運ばれる。われわれは、モデル植物シロイヌナズナを用いたこれまでの研究で、葉緑体蛋白質の新生鎖は、外包膜の1メガダルトンの蛋白質膜透過装置 TOC と内包膜の1メガダルトンの膜透過装置 TIC を介して運ばれること明らかにしてきた。包膜膜透過の駆動には ATP の加水分解エネルギーが必要であり、膜透過装置に付随したモーター蛋白質の関与が示唆されていたが、その実体については長年不確定であった。われわれは、その実体が計7種類の因子から構成されるまったく新奇な2メガダルトンの AAA 型 ATPase モーター複合体であることを見出した。この複合体が内包膜において TIC と超分子複合体を形成して機能していることも明らかにした。この ATPase モーターの進化的起源は、葉緑体の起源であるシアノバクテリア様内共生体が持っていた FtsH プロテアーゼであり、進化の過程でプロテアーゼとしての機能は消失する一方で、膜から蛋白質を引き抜くという活性が保持さ



れ、それが TIC トランスロコンと機能的に結びつくことで葉緑体蛋白質膜透過に必須なモーター複合体として確立されてきたことがわかった。TIC とモーター複合体には それぞれ Ycf1 と Ycf2 という葉緑体ゲノムコードの蛋白質が含まれており、これらが共進化してきたことも示した。これらの研究成果は、2018 年 10 月に *Plant Cell* 誌に BREAKTHROUGH REPORT として掲載された。さらに緑藻 *Chlamydomonas* においても、基本的に同等の TIC-ATPase モーターを葉緑体蛋白質輸送に用いていることが分かった。緑藻においては外包膜の TOC も二重の葉緑体包膜を介し TIC と物理的に強く相互作用して新生鎖の膜透過を担っている事を示すデータも得ている (論文投稿中)。葉緑体の TOC-TIC を結びつける因子として最近 TamB ホモログである Tic236 が提唱された。しかしこの蛋白質は、われわれの植物や緑藻での TOC-TIC-モーターや輸送中間体の高感度質量分析でも、他のグループの TOC-TIC-モーター複合体の構成因子の質量分析においてもまったく検出されていない。われわれは TOC-TIC との物理的接触には別の既知あるいは未知の因子が介在していると推測している。現在これらのことも含め、輸送装置の全体像をより明確にするため TOC-TIC-モーター超分子複合体の一部あるいは全部のクライオ電顕による構造解析のための試料調製を進めている。

代表的な論文：

1. Kikuchi S, Asakura Y, Imai M, Nakahira Y, Kotani Y, Hashiguchi Y, Nakai Y, Takafuji K, Bédard J, Hirabayashi-Ishioka Y, Mori H, Shiina T, ***Nakai M.**
2. A Ycf2-FtsHi heteromeric AAA-ATPase complex is required for chloroplast protein import. *Plant Cell.*, (in press) doi: 10.1105/tpc.18.00357. (2018)

総説：

1. ***Nakai M.**
New Perspectives on Chloroplast Protein Import.
Plant Cell Physiol., 59(6), 1111-1119. (2018)
2. ***中井 正人**
特集：真核細胞の共生由来オルガネラ研究最前線一広がり続ける多様性と機能。
葉緑体のタンパク質輸送機構について—シアノバクテリアの内共生から始まったユニークな進化
生物の科学: 遺伝 3月号 (株式会社 NTS) 70(2), 105-109 (2016)
3. ***Nakai M.**
Ycf1: A Green TIC.
Plant Cell., 27(7), 1834-1838. (2015)
4. ***Nakai M.**
The TIC complex uncovered: The alternative view on the molecular mechanism of protein translocation across the inner envelope membrane of chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta., 1847(9), 957-967. (2015)

公募研究（平成 27～28 年度）

岡本浩二 大阪大学大学院生命機能研究科 准教授

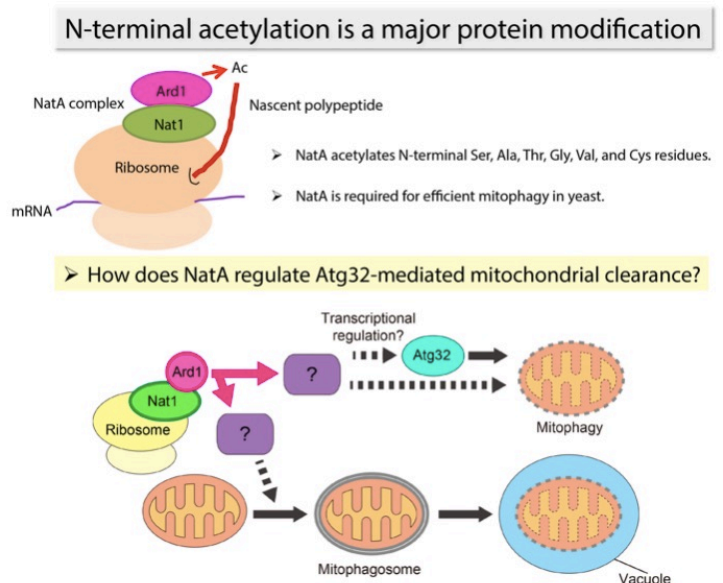
研究課題名：新生鎖の N 末端アセチル化を介したミトコンドリアの恒常性制御

研究成果の概要：

タンパク質の修飾は発現・局在・相互作用・分解など様々な制御に重要であり、多くの反応がリボソームでの合成完了後に起こる翻訳後修飾として広く知られている。一方、N 末端アセチル化は翻訳途上の新生ポリペプチド鎖（新生鎖）を基質としており、生物種を超えて保存された基本的な機構である。ヒトでは全タンパク質の 80%以上が N 末端アセチル化を受けており、汎用性の高い修飾反応であるが、その生理的意義は未だ多くの謎に包まれている。私たちの研究グループは、出芽酵母の N 末端アセチル化酵素 NatA の欠失変異体において、選択的ミトコンドリア分解「マイトファジー」が強く抑制されていることを見出した。一方、他の N 末端アセチル化酵素 NatB/C/D/E は、長期の呼吸増殖下で誘導されるマイトファジーに重要でないこと、オートファジーやタンパク質を積み荷とした選択的オートファジーは NatA 欠失細胞でも部分的な影響しか受けないことを明らかにした。これらの結果から、NatA はミトコンドリア分解に特異的に関与していると考えられる。また、NatA のリボソーム結合部位に変異を導入すると、マイトファジーが障害されることもわかった。以上の知見から、リボソームでの合成過程で NatA 依存的に N 末端アセチル化される未知の新生鎖が存在し、それらの因子がマイトファジーの誘導に重要な役割を果たしていると思定できる。加えて、NatA 欠失細胞は長期の呼吸増殖下で生存率が劇的に低下することから、ミトコンドリアの機能維持にも障害が起こっていると考えられた。

代表的な論文：

1. Eiyama A, *Okamoto K. Protein N-terminal acetylation by the NatA complex is critical for selective mitochondrial degradation. *J. Biol. Chem.*, 290, 25034-25044 (2015).
2. Sakakibara K, Eiyama A, Suzuki SW, Sakoh-Nakatogawa M, Okumura N, Tani M, Hashimoto A, Nagumo S, Kondo-Okamoto N, Kondo-Kakuta C, Asai E, Kirisako H, Nakatogawa H, Kuge O, Takao T, Ohsumi Y, *Okamoto K. Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J.*, 34, 2703-2719 (2015).
3. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K, Sakata Y, *Otsu K. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat. Commun.*, 6, 7527 (2015).



総説：

1. Eiyama A, *Okamoto K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 33, 95-101 (2015).

公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

田中良樹 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 構造生命科学研究室 助教

研究課題名：新生膜タンパク質の膜組込み過程の構造生物科学研究

研究成果の概要：

細胞内で生合成されたタンパク質が細胞外や細胞膜で機能するためには、脂質二重膜を越える、または組み込まれるための輸送の仕組みが必要である。Sec トランスロコン(protein-conducting channel)複合体はすべての生物に保存されたタンパク質膜透過のための基本的な装置である。我々のグループでは、Sec トランスロコン複合体を形成するタンパク質の輸送におけるダイナミックな構造変化の詳細を解明するために、結晶構造解析を主な手法として研究を進めている。

・ SecYEG 高分解能構造決定

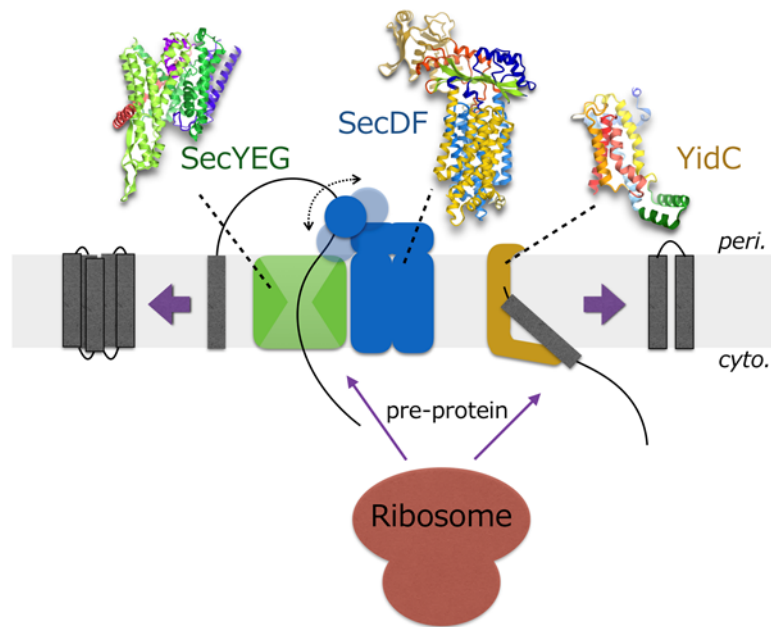
バクテリアの Sec トランスロコン SecY-SecE-SecG 三者複合体の結晶構造を高い分解能(2.7 Å 分解能)で決定した。これにより、これまで不明確であったループ領域のモデル構築に成功した。特に SecG のループが、SecY のタンパク質透過孔を塞ぐ位置にあることが判明し、変異体解析にてこの領域が活性へ影響することも明らかにした。この閉状態の SecYEG では、タンパク質の自発的な透過を防止するために SecG が透過孔に「キャップ」をし、膜透過状態でのみ「キャップ」が退くという、膜透過調節方法の仮説を提唱した。SecY、SecE、SecG すべての構成要素を含む完全な Sec トランスロコンの構造情報は「新生膜タンパク質」の輸送に関する解析に幅広い利用が期待される。

・ SecDF 構造変化の可視化

SecDF はプロトン駆動型モータータンパク質であり、SecYEG によるタンパク質の輸送を促進する。ペリプラズム側のドメインが新生鎖を引き出していると予想されていたが、実際の動きや、プロトン透過経路については分かっていなかった。我々は結晶化条件などを変えて、既知構造(F-form)とは別状態にある構造 (I-form 及び Super F-form と呼称) を決定した。新たに決定した構造から、膜貫通領域のプロトン透過経路やペリプラズム領域の構造変化と膜貫通ヘリックスの連動について新たな知見が得られた。

・ YidC 高分解能構造決定

膜へのタンパク質挿入に関わる YidC の結晶構造を高い分解能 (2.8 Å 分解能) で決定した。以前の構造から分解能を向上させたことで、細胞質側ループ領域まで精度の高いモデル構築が可能になった。YidC には膜貫通領域に親水性の溝が存在しており、この部分で基質タンパク質を一旦結合させてから挿入を行う。これまで見ていなかったループ領域のモデルが構築されたことで、ループが溝への入り口を塞いでいることが判明した。また、全長構造を用いて短時間の分子動力学シミュレーションを行ったところ、溝までの経路を開く方向に動きやすい傾向がループ領域周辺に見られ、ループ領域の動きがタンパク質輸送の調節に関わると考えられる。



代表的な論文

1. Shahrizal M, Daimon Y, **Tanaka Y**, Hayashi Y, Nakayama S, Iwaki S, Narita S, Kamikubo H, Akiyama Y and Tsukazaki T. "Structural basis for the function of the beta-barrel assembly-enhancing protease BepA." *J. Mol. Biol.* Available online (2018)
2. **Tanaka Y**, Izumioka A, Abdul Hamid A, Fujii A, Haruyama T, Furukawa A, Tsukazaki T. "2.8-Å crystal structure of Escherichia coli YidC revealing all core regions, including flexible C2 loop." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 505, 141-145 (2018)
3. Furukawa A, Nakayama S, Yoshikaie K, **Tanaka Y**, Tsukazaki T. "Remote Coupled Drastic β -Barrel to β -Sheet Transition of the Protein Translocation Motor." *Structure*. 26(3):485-489.e2. (2018) ^[1]_{SEP}
4. Sugano Y, Furukawa A, Nureki O, **Tanaka Y**, Tsukazaki T. "SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport." *PLoS One* 12(8) e0183434 (2017)
5. Furukawa A, Yoshikaie K, Mori T, Mori H, Morimoto YV, Sugano Y, Iwaki S, Minamino T, Sugita Y, **Tanaka Y**, Tsukazaki T. "Tunnel Formation Inferred from the I-Form Structures of the Proton-Driven Protein Secretion Motor SecDF." *Cell Rep* 895-901 (2017)
6. **Tanaka Y**, Sugano Y, Takemoto M, Mori T, Furukawa A, Kusakizako T, Kumazaki K, Kashima A, Ishitani R, Sugita Y, *Nureki O and *Tsukazaki T. "Crystal structures of SecYEG in lipidic cubic phase elucidate a precise resting and a peptide-bound states." *Cell Rep*. 1561-8 (2015)

公募研究（平成 27～28 年度）

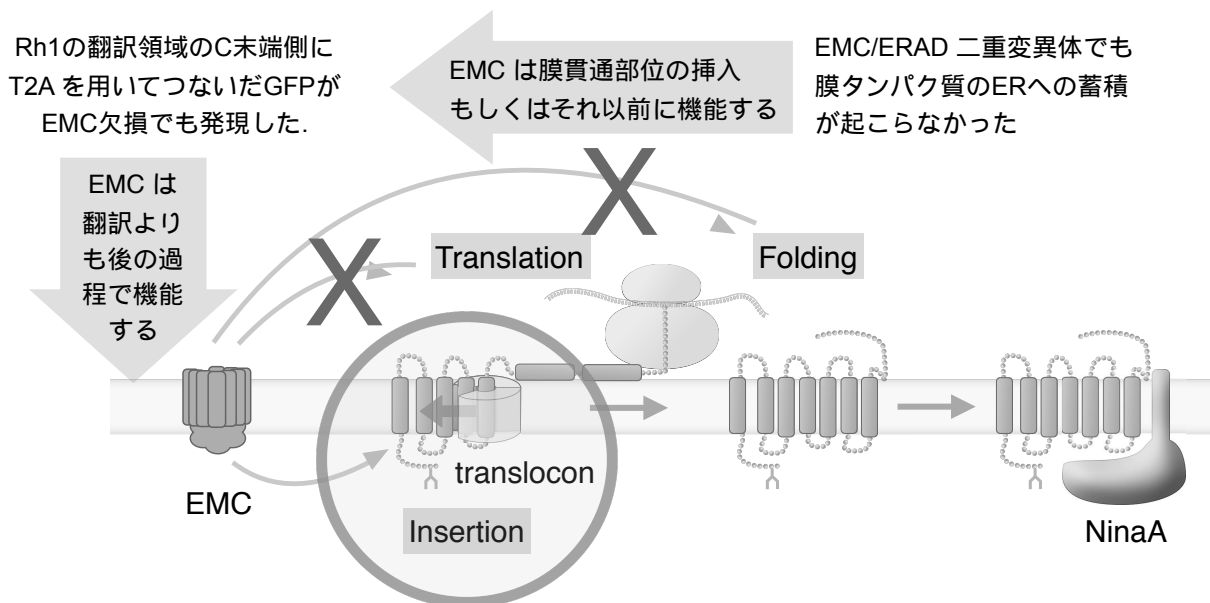
佐藤 明子 広島大学・大学院総合科学研究科 准教授

研究課題名：新生膜貫通タンパク質の ER 膜挿入・フォールディングに関わる変異体の解析

研究成果の概要：

真核生物のほとんどの分泌タンパク質・膜タンパク質は、ER 膜上のリボソームにより合成され、トランスロコンにより ER 内腔に輸送、あるいは ER 膜に組み込まれる。ER 膜での膜貫通ヘリックスの脂質二重膜への挿入は、新生鎖の翻訳に並行して随時行われると考えられており、この過程にはトランスロコンに加え TRAM や TRAP/SSR などが関与することが報告されているが、特に複数回膜貫通タンパク質の組み込みのメカニズムは完全に解明されたわけではない。私達の研究グループでは、ロドプシンの光受容膜への蓄積が欠損する変異体の大規模なスクリーニングを行い、多くの輸送の変異体と共に EMC (ER membrane protein complex) の 3 つのサブユニットの変異体を単離した。EMC は、広く真核生物に存在すること、その欠損が UPR (unfolded protein response) をひきおこすことなどから、膜タンパク質のシャペロン機能を持つと考えられていた。本研究では、EMC による膜タンパク質合成の分子機構を解明する事を目的として遺伝学的解析を行い、以下の 5 つの結果を得た。

(1) EMC 変異細胞において約 50 種類のタンパク質の発現を検討した結果、EMC はある種の複数回膜貫通型タンパク質の発現に必要であることがわかった。(2) 膜貫通ドメインの数を変更した Rh1 の合成に対する EMC の必要性を検討したところ、1 回膜貫通型と 3 回膜貫通型 Rh1 が EMC に依存しなかったのに対し、5 回膜貫通型と 7 回膜貫通型 Rh1 は EMC に強く依存した。また、野生型細胞において 3 回膜貫通型と 5 回膜貫通型は EMC と強く共局在するが、1 回膜貫通型は共局在しないことが分かった。従って、EMC は 3 回以上の膜貫通部位を持つ Rh1 と強く結合し、それ以上の膜貫通ドメインの合成もしくは挿入を促す役割を持つ可能性がある。(3) 小胞体関連分解と EMC の二重変異細胞では、一回膜貫通型である Nrv は蓄積するのにに対し、複数回膜貫通型タンパク質はいずれも蓄積しなかったことから、EMC は膜タンパク質の膜への挿入以前に機能していると考えられた。(4) Rh1-T2A-GFP を発現させた結果、Rh1-T2A は EMC 欠損細胞で非常に減少するのに対し、GFP は EMC に影響されなかったことから、EMC は翻訳より後の過程で機能していると考えられた。これらの結果を総合すると、EMC はある種の複数回膜貫通型タンパク質の膜への挿入に必要であると考えられる。



代表的な論文

1. Otsuka Y., Satoh T., Nakayama N., Inaba R., Yamashita H. and Satoh A. K. Parcas is the predominant Rab11-GEF for rhodopsin transport in Drosophila photoreceptors. *Journal of Cell Science*, 132: jcs231431, 2019
2. Ogi S., Matsuda A., Otsuka Y., Liu J. Satoh T. , and Satoh A. K. Syndapin constricts microvilli necks to form a united rhabdomere in Drosophila photoreceptors. *Development*, 146: dev169292, 2019
3. Hiramatsu N., Tago, T., Satoh T. , and Satoh A. K. ER membrane protein complex is required for the insertions of late-synthesized helices of Rh1 in Drosophila photoreceptors. *Molecular Biology of the Cell*, 30, 2890-2900, 2019
4. Fujii S., Kurokawa K., Inaba R., Hiramatsu N., Tago T., Nakamura Y., Nakano A., Satoh T. and Satoh A. K. Recycling endosomes are attached to trans-side of Golgi units both in Drosophila and mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 133: jcs236935, 2020.
5. Nakamura Y., Ochi Y., Satoh T and Satoh A. K. Crag/Rab10/Ehbp1 module regulates the polarized transport of Na⁺K⁺ATPase to the basolateral membrane in Drosophila photoreceptors. *Journal of Cell Science*, 133: jcs238790, 2020.
6. Fujii S., Tago T., Sakamoto N., Yamamoto T., Satoh T and Satoh A. K. Recycling endosomes are attached to trans-side of Golgi stacks in sea urchin embryos. *Communication and Integrated Biology*, 13: 59-62, 2020.
7. Iwanami, N.*, Nakamura, Y.*, Satoh, T*. and **Satoh, A. K.** (*: contribute equally) Rab6 is required for multiple apical transport pathways but not for basolateral transport pathway in Drosophila photoreceptors. *PLOS Genetics*.12, e1005828. (2016)
8. Satoh, T., Ohba, A., Liu, J., Inagaki, T., and **Satoh, A. K.** dPob/EMC is essential for biosynthesis of rhodopsin and other multi-pass membrane proteins in Drosophila photoreceptors. *eLife*, doi: 10.7554/eLife.06306. (2015)

総説 :

1. 佐藤卓至・中村祐里・佐藤明子 (2016). ショウジョウバエ視細胞の膜タンパク質選別輸送における低分子量 G タンパク質 Rab6 の役割 顕微鏡 51
 2. 佐藤明子(2015). EMC は複数膜貫通ドメイン膜タンパク質の合成に特異的な因子である. 生化学 87, 870781
-

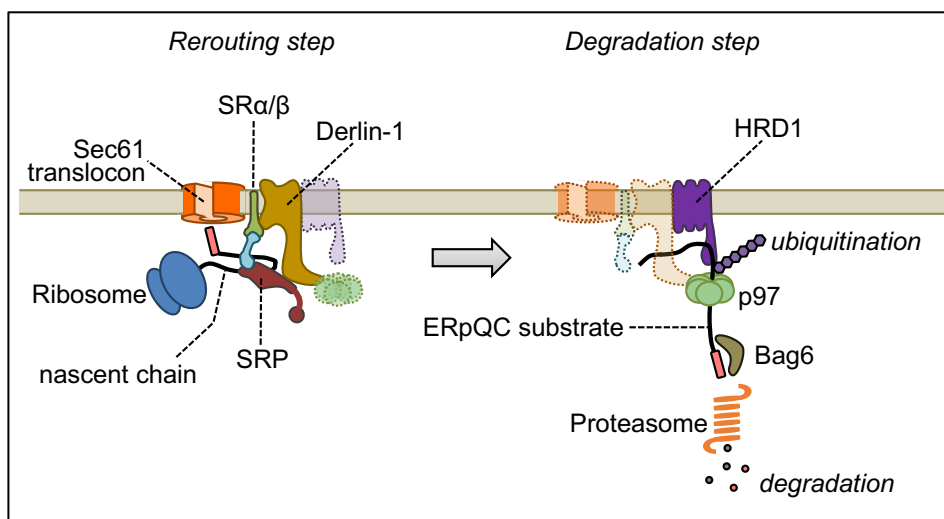
公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

西頭英起 宮崎大学 医学部 教授

研究課題名：新生鎖分解による小胞体の予防的品質管理システムに関する研究

研究成果の概要：

多くの新規合成タンパク質は翻訳後すぐに分解されることと、リボソームの多くが小胞体に結合していることを併せ考えると、翻訳時挿入に関わるリボソーム上での新生鎖分解機構を明らかにすることは、真核細胞のタンパク質品質管理の観点から極めて重要と考えられます。細胞は、ストレス時に小胞体ホメオスタシスの破綻を避けるために、本来小胞体に挿入されるべきシグナル配列を持つタンパク質の翻訳を細胞質内で完了し直接分解します（小胞体の予防的品質管理システム、ER stress-induced pre-emptive quality control：ERpQC）。しかし、その分子メカニズムは不明でした。私たちは、小胞体膜分子 Derlin がストレス時に分泌タンパク質などを「小胞体を經由した分泌」から「細胞質での分解」へと運命を変化させること、さらには AAA ATPase である p97 ならびにコシャペロン分子 Bag6 がそれらの分解を担うことを明らかにしてきました（*Cell Rep.* 2015）。本研究期間において、ERpQC の更なる分子メカニズムを解明とその生理的意義について検証することを目指しました。明らかになった分子メカニズムは、ERpQC による分解システムが、①分泌タンパク質などが小胞体ストレス時には、Derlin と SRP 複合体およびトランスロコンの結合によって小胞体への挿入が阻害されシグナル配列を有したまま細胞質で翻訳されること（Rerouting step：図）と、②Rerouting された基質が、膜型 E3 リガーゼ HRD1、シャペロン Bag6、p97 AAAATPase を介して分解される（Degradation step：図）2つのステップからなることを明らかにしました。現在は、ERpQC 基質がどのようにして Rerouting されるのか、また分解に至る詳細な分子メカニズムを結合分子解析やリボソームプロファイルなどにより解析しています。



代表的な論文

1. Kadowaki H, Satrimafitrah P, Takami Y, Nishitoh H

Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1.

Sci. Rep., 8:7317. (2018)

2. Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Takami Y, Satrima_trah P, Kato H, Honda A, Hatta T, Natsume T, Sato T, Kai H, Ichijo H, Nishitoh H.

Preemptive quality control protects the ER from protein overload via the proximity of ERAD components and SRP.

総説：

1. Kadowaki H, Nishitoh H.
Endoplasmic reticulum quality control by garbage disposal.
FEBS J, in press (2018)
doi: 10.1111/febs.14589
2. Kato H, Nishitoh H.
Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer.
Front Oncol, 5, 93 eCollection (2015)
3. 西頭英起
小胞体におけるタンパク質の品質管理の分子機構および中枢神経系における小胞体ストレス応答の役割.
領域融合レビュー, 4, e009 (2015)
<http://leading.lifesciencedb.jp/4-e009/#more-1147>

公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

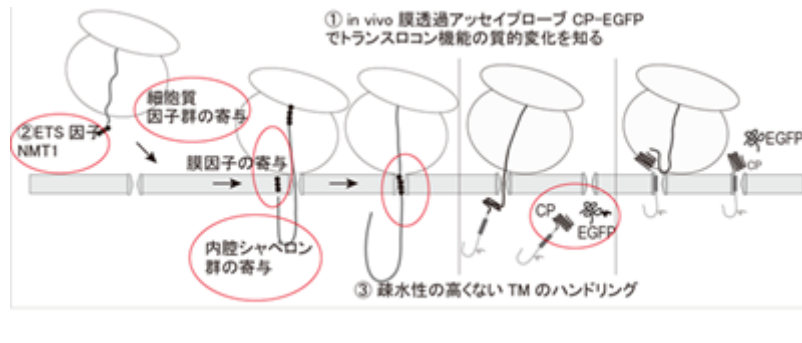
阪口 雅郎 兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 教授

研究課題名：膜タンパク質の伸長途上鎖をハンドリングする分子機構の解明

研究成果の概要：

新生鎖の小胞体標的化と膜組み込みにおけるハンドリング機構を追求し下記の成果を得た。

- ①フォールディングプローブ（CP-EGFP）を開発し、細胞内での透過状況の定量解析を可能とした。それを用いて、出芽酵母細胞のトランスロコン関連遺伝子欠損の系統的解析に着手し、トランスロコン機能に影響する遺伝子を複数見出した。(1)特定のリボソーム結合型細胞質シャペロン系が、合成共役型の標的化を抑制していることを見出した。(2)小胞体内腔の特定のコシャペロン（Scj1p など）が Kar2p の機能を抑制し、合成共役型の透過を抑制していることを見出した。小胞体内腔 Hsp70 の新しい機能ネットワークの可能性を考えている。(3)合成完了型膜透過因子と信じられてきたトランスロコン因子 Sec71p/Sec72p が、リボソーム・トランスロコン複合体機能に関連していることを見出した（いずれも論文作成中）。これらは、合成共役型透過における Sec61-膜透過チャネルの作用が、多くの因子群によって質的に影響を受けていることを示している。
- ②ペルオキシソーム膜タンパク質 PMP70 の小胞体標的化抑制（ETS）因子として、nmt1 を見出した。その基質ペプチド結合ポケット変異で標的化抑制機能がなくなること、nmt1 タンパク質が直接的に N-末端モチーフに結合することなどを確認し、ETS 作用に直接結合が必要なことを明らかにした（論文作成中）。
- ③膜結合状態のリボソームから伸長する新生鎖がトランスロコンによってスキャンされその特性が解読される。正電荷が動きを抑制し、膜に分配され得ない「中度疎水性配列」（mH）もトランスロコンで保持される。その、透過ポアに次ぐいわばトランスロコンの「第 2 サイト」がラテラルゲート付近および透過ポアのヒンジ側の 2 ヶ所にあることを見いだした（Kida & Sakaguchi）。後続の組み込みを許容する mH の疎水特性をも明らかにした（論文作成中）。



代表的な論文：

1. Kida, Y., *Sakaguchi, M. Interaction mapping of the Sec61 translocon identifies two Sec61 α regions interacting with hydrophobic segments in translocating chains. *J. Biol. Chem.*, 293, 17050-17060 (2018)
2. Kida, Y., Ishihara, Y., Fujita, H., Onishi, Y. and *Sakaguchi, M. Stability and flexibility of marginally hydrophobic segments stalling at the endoplasmic reticulum translocon. *Mol. Biol. Cell*, 27, 930-940 (2016)
3. Sakaue, H., Iwashita, S., Yamashita, Y., Kida, Y., *Sakaguchi, M. The N-terminal motif of PMP70 suppresses cotranslational targeting to the endoplasmic reticulum. *J. Biochem.*, 159, 539-551 (2016)
4. Kang, K., Takahara, M., Sakaue, H., *Sakaguchi, M. Capsid protease domain as a tool for assessing protein-domain folding during organelle import of nascent polypeptides in living cells. *J. Biochem.*, 159, 497-508 (2016)

公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

吉久 徹 兵庫県立大学 生命理学研究科 教授

研究課題名：機動的翻訳速度制御と tRNA レパートリー

研究成果の概要：

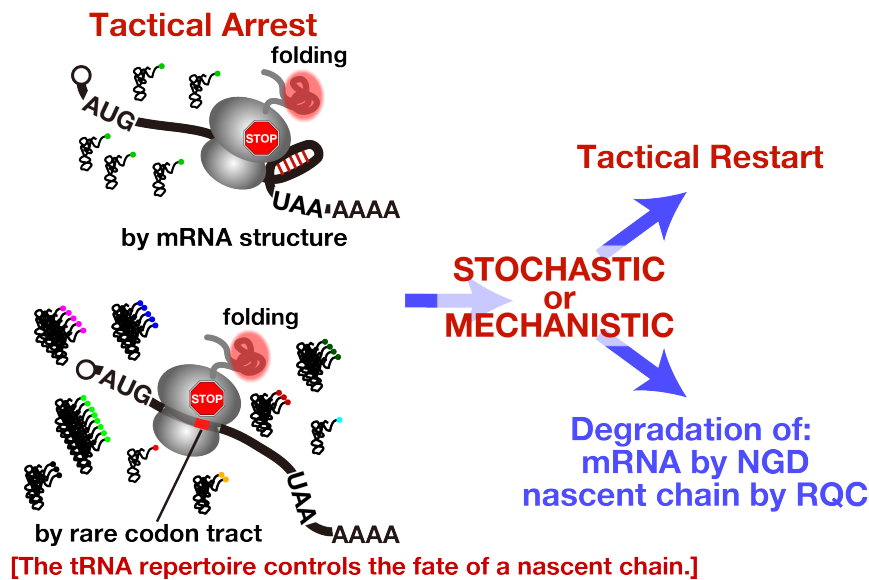
近年の ribosome profiling 等の解析で、意図された翻訳停止／再開、すなわち機動的翻訳制御は新生鎖の機能化に関わる普遍的現象であることが示されつつある。こうした新生鎖の伸長制御は、各 tRNA 種の濃度や量比、即ち“tRNA レパートリー”の影響下にあると考えられる。しかし、真核細胞の tRNA レパートリーが翻訳に及ぼす影響や、機動的に停止した翻訳の解除機構には不明な点が多い。さらに、正常な翻訳停止状態が、No-Go Decay (NGD) 品質管理の対象となる異常な翻訳中断とどう区別されるかも判っていない。本研究では、新生鎖の機能化に関わる機動的翻訳制御について、tRNA レパートリーという視点で、出芽酵母を用いた研究を進めた。

まずは、翻訳の重要なパラメーターである各 tRNA 種の絶対量の新规定量法 (OTTER 法) を開発した。これにより、富栄養培地で対数増殖中の酵母のほぼ全ての tRNA 種が、0.030～0.73 pmol/ μ g RNA の範囲で存在することを明らかにした。酵母の tRNA 量は各 tRNA 種の遺伝子数と予想以上に高い相関 ($r^2=0.89$) を示す一方で、遺伝子当たりの発現量は最低の tRNA-Cys_{GCA} と最高の tRNA-Thr_{CGU} とでは 5 倍の開きがあった。また、単位 RNA 当たりの tRNA 量は定常期になると対数増殖期のおよそ 1.6～3.8 倍に増えることが判った。こうしたことから、数倍程度という狭い幅ではあるが、生育環境に応じた tRNA 種特異的な発現制御の存在が示された。

次に、tRNA レパートリーの人為的制御を目的として、CRISPRi を利用した galactose 誘導型の tRNA ノックダウン系を構築した。tRNA-Leu_{UAG} に対してこれを適用することで野生型の 30～40%までこの tRNA 量を特異的に低下させると、この tRNA のアンチコドンに相補的な Leu の CUA コドンの連続配列を持つレポーター遺伝子の発現は半分程度にしか抑制されないのに対して、wobbling でデコードされる CUG コドンのレポーターの発現は

極端に低下した。すなわち、wobbling によるデコードの方が tRNA 量低下に対してより敏感であることが明らかとなった。

他方、機動的に翻訳される mRNA の候補として、近年明らかとなったモノソーム画分に集積する傾向のある mRNA 群のうち、特にミトコンドリアへ局在するタンパク質をコードした mRNA に着目して解析を進めた。このうち、pumilio ファミリーの RNA 結合タンパク質である Puf3 依存にミトコンドリア表面に移行する mRNA では、*PUF3* 遺伝子の欠失でモノソーム集積が強まることが判った。従って、モノソーム状態から正常に翻訳が進むポリソーム状態への移行には Puf3 が関わる事が示された。



代表的な論文：

1. Takano, T., Kajita, T., Mochizuki, M., Endo, T., and Yoshihisa, T.
Cytosolic Hsp70 and co-chaperones constitute a novel system for tRNA import into the nucleus. *eLife*, 4, e04659 (2015)

総説：

1. Yoshihisa, T. Nucleocytoplasmic shuttling of tRNAs and implication of the cytosolic Hsp70 in tRNA import, *Nucleus*, 6, 339-343 (2015)
2. 吉久 徹. tRNA の成熟化と核-細胞質間ダイナミクス. *Plant Morphology*, 30, 37-58 (2018)
Herrmann, J. M., Carvalho, P., Hayer-Hartl, M., and Yoshihisa, T. Life of Proteins: from nascent chain to degradation (Meeting Report). *Nat. Struct. Biol.* 25, 996-999 (2018)

公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

潮田 亮 京都産業大学 総合生命科学部 助教

研究課題名：新生鎖による小胞体還元ネットワーク構築機構の解明

研究成果の概要：

リボソームから合成された新生ポリペプチド鎖（新生鎖）は、システイン残基のチオール基が開裂（還元）状態で小胞体に挿入され、立体構造形成に寄与するジスルフィド結合の形成（酸化）はその機能発現に必須である。

タンパク質のジスルフィド結合形成の場として小胞体が優れている点は、レドックス環境がサイトゾルと比較し、酸化的に保たれている点にある。一方、我々は、小胞体で初めて還元活性に特化したジスルフィド還元酵素 ERdj5 を同定し、タンパク質品質管理、特に小胞体関連分解に重要な役割を果たすことを示した (R. Ushioda *et al. Science* 2008、 R. Ushioda *et al. Mol. Biol. Cell.* 2013)。また、最近では小胞体カルシウムポンプのジスルフィド結合を解離することにより、ポンプ活性を促進することがわかり、小胞体カルシウム恒常性にも寄与することを明らかにした (R. Ushioda *et al. PNAS.* 2016)。この通り、小胞体の還元反応は小胞体恒常性維持に重要であることが証明した一方で、小胞体における還元力の起源とそのパスウェイは全く同定されておらず、世界的にも多くの研究者が還元メカニズムの解明に注目している。

我々は、ERdj5 の活性中心に特異的に相互作用する因子を質量分析によって探索した結果、小胞体酸化酵素 Ero1 α を同定した。Ero1 α はリボソームから合成された新生鎖から PDI ファミリーを介して電子を奪い、最終的に分子状酸素に電子を受け渡すことで、基質の酸化反応を終結させる。我々は、通常の PDI ファミリーとは異なる結合様式によって、ERdj5 が Ero1 α と結合することを見出し、この結合が Ero1 から ERdj5 への電子の移行を実現するということを発見した (論文投稿準備中)。このことは、ERdj5 が奪った電子を自身の還元力として利用するという小胞体内腔の全く新しい還元パスウェイを明らかにしたことになり、小胞体内腔の電子ダイナミクスを理解する上で重要な知見であると同時に、新生鎖自身が小胞体のレドックス環境を構築するという新生鎖のまったく新しい役割を明らかにしたことになる。

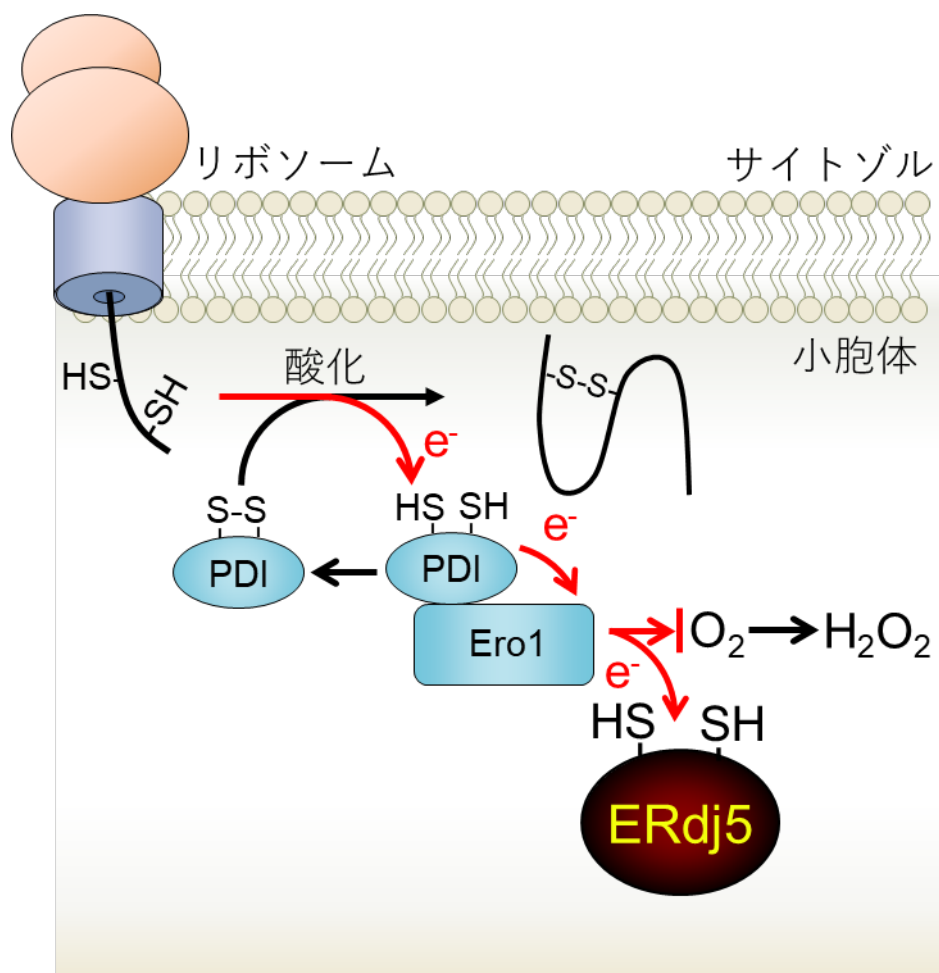


図 新生鎖を介したジスルフィド還元酵素 ERdj5 への電子伝達

代表的な論文：

1. Sasikumar, P., AlOuda, K. S., Kaiser, W. J., Holbrook, L. M., Kriek, N., Unsworth, A. J., Bye, A. P., Sage, T., **Ushioda,**

R. Nagata, K., Farndale, R. W., and Gibbins, J. M.

The chaperone protein HSP47: a platelet collagen binding protein that contributes to thrombosis and hemostasis.

Journal of thrombosis and haemostasis, 16(5):946-959 (2018)

2. Caba, C., Ali Khan, H., Auld, J., **Ushioda, R.**, Araki, K., Nagata, K., and Mutus, B.
Conserved Residues Lys(57) and Lys(401) of Protein Disulfide Isomerase Maintain an Active Site Conformation for Optimal Activity: Implications for Post-Translational Regulation.
Frontiers in molecular biosciences, 5:18 (2018)
3. Maegawa, K., Watanabe, S., Noi, K., Okumura, M., Amagai, Y., Inoue, M., **Ushioda, R.**, Nagata, K., Ogura, T. and Inaba, K.
The highly dynamic nature of ERdj5 is key to efficient elimination of aberrant protein oligomers through ER-associated degradation
Structure, S0969-2126(17)30102-8. (2017)
4. Araki K, **Ushioda R**, Kusano H, Tanaka R, Hatta T, Fukui K, Nagata K, Natsume T
A crosslinker-based identification of redox relay targets
Anal. Biochem. 1;520:22-26. (2017)
5. **R. Ushioda**, A. Miyamoto, M. Inoue, S. Watanabe, M. Okumura, K. Maegawa, K. Uegaki, S. Fujii, Y. Fukuda, M. Umitsu, J. Takagi, K. Inaba, K. Mikoshiba, and K. Nagata
Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5
Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 11;113(41):E6055-E6063(2016)
6. Kawasaki K, **Ushioda R**, Ito S, Ikeda K, Masago Y, Nagata K
Deletion of the Collagen-specific Molecular Chaperone Hsp47 Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis of Hepatic Stellate Cells.
J Biol Chem. 290. 3639-3646 (2015)
7. Avezov E, Konno T, Zyryanova A, Chen W, Laine R, Crespillo-Casado A, Melo E, **Ushioda R**, Nagata K, Kaminski CF, Harding HP, Ron D
Retarded PDI diffusion and a reductive shift in poise of the calcium depleted endoplasmic reticulum
BMC Biol. 10;13(1):2 (2015)

総説 :

1. **R. Ushioda** and K. Nagata
The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5.
Cold Spring Harb Perspect Biol, In press
2. 潮田 亮
エレクトロニクスによる小胞体恒常性維持機構
ニュー・サイエンス社 月刊細胞 (2019 刊行予定)
3. 潮田 亮
タンパク質品質管理のための小胞体関連分解
医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ「蛋白質代謝医学」 (2018)
4. 潮田 亮
レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の解明—還元反応の場としての小胞体—
羊土社 実験医学増刊号「レドックス疾患学」、p79-86 (2018)
5. 潮田 亮、永田 和宏

公募研究（平成 27～28 年度）

森戸大介 京都産業大学 タンパク質動態研究所 主任研究員

研究課題名：N 末端アレスト配列による巨大新生鎖の翻訳速度調節

研究成果の概要：

ミステリンは 5207 アミノ酸からなる巨大な細胞内タンパク質（約 600 kDa）で、ヒトゲノムにコードされるタンパク質のうち、21 番目に大きい（UniProt）。2 つの AAA+ドメインと 1 つの RING finger ドメインを持つ、知られているうちで唯一の ATP アーゼ/ユビキチンリガーゼハイブリッド酵素である。進化的には脊索/脊椎動物に保存されており、ヒト/マウスでの組織発現はユビキタスとされる。もともと日本人に多い脳血管疾患もやもや病の責任遺伝子として分子クローニングされたが、生理的には脂肪代謝の制御因子としてはたらくことが最近、明らかとなった。ただし、もやもや病と脂肪代謝の関係については今後の解明を要する。

ミステリンの N 末端付近には翻訳アレスト配列が存在する。この配列を欠くことでミステリンの翻訳スピードは上昇するが、一方、驚いたことに、全長ミステリンの合成効率率はむしろ低下していた。すなわちミステリンの生合成を完了するためには翻訳スピードの適切な調節（抑制）が重要であることが示唆された。この翻訳スピード調節がうまくはたらかない場合、巨大新生鎖が過剰に合成され、アンフォールディング状態で互いに相互作用して凝集を生じ、合成途上での翻訳停止を招いてしまうらしい。これらの事実について特に、新たに開発した新生鎖プロファイリング法を用いて明らかにした。またこのような巨大新生鎖翻訳スピード調節はミステリン以外の巨大タンパク質の合成時にも起こっているらしいことを見出した。

代表的な論文

1. Sugihara M, *Morito D, Ainuki S, Hirano Y, Ogino K, Kitamura A, Hirata H, Nagata K. The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin stabilizes cytoplasmic lipid droplets. *J Cell Biol*, in press
2. Kotani Y, *Morito D, Sakata K, Ainuki S, Sugihara M, Hatta T, Iemura SI, Takashima S, Natsume T, Nagata K. Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor. *Sci Rep*. 2017 Mar 9;7:44293
3. Kotani Y, *Morito D, Yamazaki S, Ogino K, Kawakami K, Takashima S, *Hirata H, *Nagata K. Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. *Sci Rep*. 2015 Nov 4;5:16161.
4. Morito D, Nishikawa K, Hoseki J, Kitamura A, Kotani Y, Kiso K, Kinjo M, Fujiyoshi Y, *Nagata K. Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Sci Rep*. 2014 Mar 24;4:4442.

総説：

1. 森戸大介 ミステリン—もやもや病の責任遺伝子産物 医学のあゆみ（第 5 土曜特集 蛋白質代謝医学—構造・機能の研究から臨床応用まで） 267 巻 13 号（2018 年 12 月 29 日発行）

公募研究（平成 27～28 年度）

渡辺 洋平 甲南大学 理工学部 准教授

研究課題名：新生鎖の翻訳およびフォールディングの実時間測定系の開発

研究成果の概要

新生タンパク質（新生鎖）の翻訳速度や翻訳後のフォールディングの制御が、細胞の生存や、環境応答などに重要な役割を果たしている様子が、次々と明らかになっている。私たちは、このような、新生鎖に関わる様々な現象の分子基盤を解明する、あるいは、新たな現象を見つけるためのツールとして、「翻訳速度」及び「フォールディング速度」を高い時間分解能で、感度よく、簡便に測定できる技術の開発に取り組んできた。

「翻訳速度」の測定に関しては、分離型の蛍光タンパク質を利用して、特定の遺伝子が翻訳される様子を、ある程度の配列分解能を持って、リアルタイムに検出することに成功した。またこの系を用いて、翻訳開始領域周辺のコドンの偏りが、その遺伝子の翻訳速度に非常に大きな影響を与える様子を直接的に示すことができた（未発表）。現在は、遺伝子内部の特定配列部分の翻訳速度を直接測定できるよう、測定系の改良を進めている。

「フォールディング速度」の測定に関しては、変性タンパク質を結合する分子シャペロン DnaK の構造変化を、融合させた蛍光タンパク質の FRET で検出する実験系の構築を進めた。しかしこちらは、ATP の結合など変性タンパク質以外の因子による構造変化の影響が大きく、当初の目的は達成できなかった。一方で、DnaK の 2 つの構造状態（変性タンパク質との結合解離が早く、親和性が低い Open 構造と、結合解離が遅く、親和性の高い Closed 構造）の変化をリアルタイムで追跡することができるようになった。この系を用いて、ATP や GrpE などの補助因子による DnaK の構造変化や、変異の影響などを評価することができた (*Sci.Rep.*, 2017)。

本研究領域に参加できたことで、関連分野の様々な研究者と交流し、多くの助言や刺激をいただくことができた。今後も、本研究分野にしっかりと貢献していきたい。

代表的な論文：

1. Sugita, S., Watanabe, K., Hashimoto, K., Niwa, T., Uemura, E., Taguchi, H., and ***Watanabe, YH.** Electrostatic interactions between middle domain motif-1 and the AAA1 module of the bacterial ClpB chaperone are essential for protein disaggregation. *J. Biol. Chem.*, 293, 19228-19239 (2018).
2. †Uchihashi, T., †***Watanabe, YH.**, Nakazaki, Y., Yamasaki, T., Watanabe, H., Maruno, T., Ishii, K., Uchiyama, S., Song, C., Murata, K., *Iino, R., and *Ando, T. Dynamic structural states of ClpB involved in its disaggregation function., *Nat. Commun.*, 9, 2147 (2018)
3. †Hayashi, S., †Nakazaki, Y., Kagii, K., Imamura, H., and ***Watanabe, YH.** Fusion protein analysis reveals the precise regulation between Hsp70 and Hsp100 during protein disaggregation. *Sci. Rep.*, 7, 8648 (2017)
4. Yamasaki, T., Oohata, Y., Nakamura, T., and ***Watanabe, YH.** Analysis of the cooperative ATPase cycle of the AAA+ chaperone ClpB from *Thermus thermophilus* by using ordered heterohexamers with an alternating subunit arrangement. *J. Biol. Chem.*, 290, 9789-9800 (2015)

公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

伊藤拓宏 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター ユニットリーダー

研究課題名：ウイルスが引き起こす非標準的な翻訳機構の構造基盤

研究成果の概要：

翻訳中のリボソームに結合する C 型肝炎ウイルス (HCV) 由来の IRES の cryo-EM 法による立体構造解析に取り組んだ。HCV IRES は Cap 依存的に翻訳中のヒト由来リボソームの 40S サブユニットに、進行中の翻訳反応を阻害しないように結合していることが明らかになった (図)。すなわち、HCV IRES の構造のうち「ロングアーム」と名付けたドメイン II 領域の長いステム構造が E サイトへと向かって伸びている翻訳開始時のものとは異なり、翻訳中のリボソームに結合している HCV IRES のロングアームは E サイトへは向かわず、一定の構造を取っていないことが明らかになった。さらに HCV IRES 依存的に翻訳を開始したリボソームの立体構造についても同様に cryo-EM 法により決定したところ、図と同様に 40S サブユニットに HCV IRES が結合している立体構造を得た。驚くべきことに、Cap 依存的に翻訳しているリボソームは空のリボソームよりも HCV IRES にとってより良い基質となることが、生化学的な実験により示唆された。これらの立体構造と生化学的な実験の結果を考えあわせ、HCV IRES は空の 40S サブユニットに結合して IRES 下流の翻訳を誘導するという従来の機構のみならず、翻訳中の 80S リボソームに結合することによって効率よく IRES 下流の翻訳を誘導する機構が存在することを提唱した。

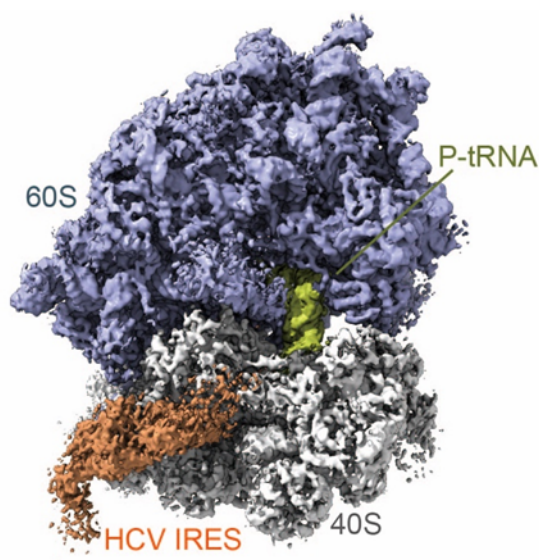


図 Cap 依存的に翻訳を開始した翻訳中ヒトリボソームに結合する HCV IRES の cryo-EM 構造

代表的な論文：

1. Yokoyama, T.#, Machida, K.#, Iwasaki, W.#, Shigeta, T., Nishimoto, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Yonemochi, M., Harada, Y., Shigematsu, H., Shirouzu, M., Tadakuma, H.*, Imataka, H.* and **Ito, T.*** (2019) HCV IRES captures an actively translating 80S ribosome. *Mol Cell*, **74**, 1205-1214. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.04.022 (# equally contributed) (* co-corresponding authors)
2. Kashiwagi, K., Yokoyama, T., Nishimoto, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Yonemochi, M., Shirouzu, M. and **Ito, T.*** (2019) Structural basis for eIF2B inhibition in integrated stress response. *Science*, **364**, 495-499. DOI: 10.1126/science.aaw4104
3. Iwasaki, S.*, Iwasaki, W.#, Takahashi, M.#, Sakamoto, A., Watanabe, C., Shichino, Y., Floor, S.N., Fujiwara, K., Mito, M., Dodo, K., Sodeoka, M., Imataka, H., Honma, T., Fukuzawa, K., **Ito, T.*** and Ingolia, N.T.* (2019) The translation inhibitor Rocaglamide targets a bimolecular cavity between eIF4A and polypurine RNA. *Mol Cell*, **73**, 738-748. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.11.026 (# equally contributed) (* co-corresponding authors)
4. Iwasaki, S.*, Iwasaki, W.#, Takahashi, M.#, Sakamoto, A., Watanabe, C., Shichino, Y., Floor, S.N., Fujiwara, K., Mito, M., Dodo, K., Sodeoka, M., Imataka, H., Honma, T., Fukuzawa, K., **Ito, T.*** and Ingolia, N.T.* Translation inhibitor

Rocaglamide targets a bimolecular cavity between eIF4A and polypurine RNA. *Mol Cell*, in press. (# equally contributed)
(* co-corresponding authors)

5. Machida, K., Shigeta, T., Yamamoto, Y., **Ito, T.**, Svitkin, Y., Sonenberg, N. and Imataka, H. (2018) Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. *Sci Rep*, **8**, 17435. DOI: 10.1038/s41598-018-35753-1.
6. Kuwasako, K., Nameki, N., Tsuda, K., Takahashi, M., Sato, A., Tochio, N., Inoue, M., Terada, T., Kigawa, T., Kobayashi, N., Shirouzu, M., **Ito, T.**, Sakamoto, T., Wakamatsu, K., Güntert, P., Takahashi, S., Yokoyama, S. and Muto, Y. (2017) Solution structure of the first RNA recognition motif domain of human spliceosomal protein SF3b49 and its mode of interaction with a SF3b145 fragment. *Protein Sci*, **26**, 280-291. DOI: 10.1002/pro.3080.
7. Christian, T., Sakaguchi, R., Perlinska, A.P., Lahoud, G., **Ito, T.**, Taylor, E.A., Yokoyama, S., Sulkowska, J.I. and Hou, Y.-M. (2016) Methyl transfer by substrate signaling from a knotted protein fold. *Nat Struct Mol Biol*, **23**, 941-948. DOI:10.1038/nsmb.3282. (Epub 2016 Aug 29)
8. Kashiwagi, K., Shigeta, T., Imataka, H., **Ito, T.*** and Yokoyama, S.* (2016) Expression, purification, and crystallization of *Schizosaccharomyces pombe* eIF2B. *J Struct Funct Genomics*, **17**, 33-38. DOI: 10.1007/s10969-016-9203-3. (Epub 2016 Mar 29) (* co-corresponding authors)
9. Kashiwagi, K., Takahashi, M., Nishimoto, M., Hiyama, T.B., Higo, T., Umehara, T., Sakamoto, K., **Ito, T.*** and Yokoyama, S.* (2016) Crystal structure of eukaryotic translation initiation factor 2B. *Nature*, **531**, 122-125. DOI: 10.1038/nature16991. (Epub 2016 Feb 22) (* co-corresponding authors)
10. **Ito, T.**, Masuda, I., Yoshida, K., Goto-Ito, S., Sekine, S., Suh, S.W., Hou, Y.-M. and Yokoyama, S. (2015) Structural Basis for methyl-donor-dependent and sequence-specific binding to tRNA substrates by knotted methyltransferase TrmD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, E4197-E4205. DOI: 10.1073/pnas.1422981112. (Epub 2015 Jul 16)

総説 :

1. Goto-Ito, S., **Ito, T.*** and Yokoyama, S.* (2017) Trm5 and TrmD: two enzymes from distinct origins catalyze the identical tRNA modification, m¹G37. *Biomolecules*, **7**, E32. DOI:10.3390/biom7010032. (Epub 2017 Mar 21) (* co-corresponding authors)
2. Kashiwagi, K., **Ito, T.*** and Yokoyama, S.* (2017) Crystal structure of eIF2B and insights into eIF2-eIF2B interactions. *FEBS J*, **284**, 868-874. DOI:10.1111/febs.13896. (Epub 2016 Sep 14) (* co-corresponding authors)
3. 柏木一宏、**伊藤拓宏**、横山茂之 (2017) 翻訳開始因子 eIF2B の立体構造-CATH/VWM 型白質脳症の発症機構解明への手がかりとして. *BRAIN and NERVE—神経研究の進歩*, 69(1), 45-50. DOI: 10.11477/mf.1416200635.

公募研究 (平成 27~28 年度)

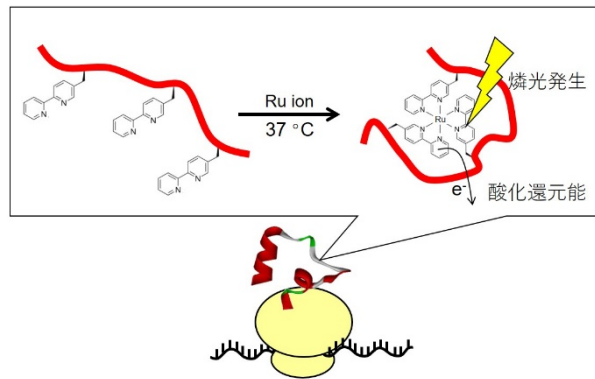
鶴澤尊規 国立研究開発法人理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 専任研究員

研究課題名 : ポリペプチド鎖合成におけるレアコドンによる正の折り畳み制御機構の検討

研究成果の概要 :

レアコドンによる翻訳の遅延が実際にリボソーム上での構造形成に影響を及ぼしているのかを直接観察するためのペプチドプローブの開発を行った。具体的には、非天然アミノ酸として bipyridylalanine (BpyAla)を用い、3つの BpyAla がルテニウムイオンに配位することで形成される Ru(bpy)₃ 類縁体を、分光学的および電気化学的に観察可能なプローブとして利用することを目指した。BpyAla 間のアミノ酸残基数を3から5塩基としたランダム配列のペプチド集団から、ルテニウムイオンに配位することで燐光を発するようになる最適なアミノ酸配列を

有するペプチドをリボソーム内翻訳系および FACS を用いて選出した。結果的には、3つの BpyAla を含むペプチドであればアミノ酸配列や BpyAla 間のアミノ酸数に関係なく、ルテニウムイオンと結合し $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 類縁体を形成することが明らかとなった。3つの BpyAla を含むペプチドは、いずれも $\text{Ru}(\text{bpy})_3 \text{Cl}_2$ の三重項励起状態に特徴的な長寿命の燐光特性や電気化学的特性、さらには酸化還元能も保持していることを明らかとした。3つの BpyAla が導入されていれば、BpyAla 間のアミノ酸数や配列に依存せずに、分光学的および電気化学的活性を示すルテニウム錯体を作成できることが示されたこと、および BpyAla はアミノアシル tRNA 合成酵素を使って効率良くタンパク質に導入できることから、3つの BpyAla を含む系はリボソーム翻訳の過程を分光学的および電気化学的に観察できるツールとしての応用が期待できる。

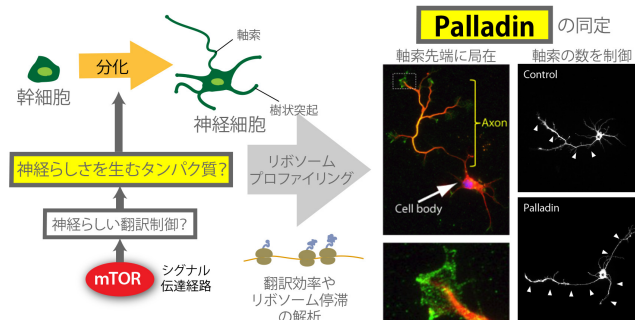
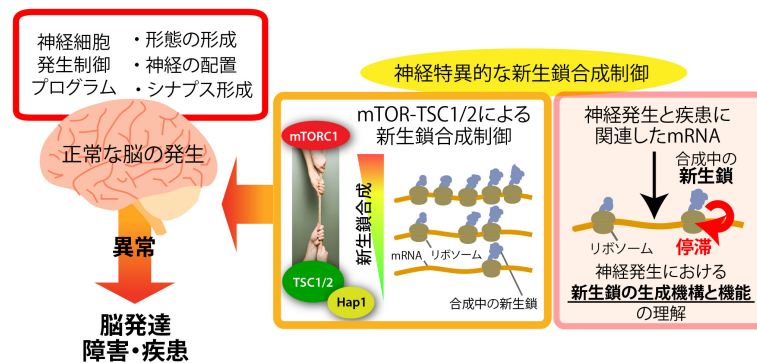


公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

池内与志穂 東京大学 生産技術研究所 講師

研究課題名：H27-28 年度 神経発生を司る mTOR シグナル伝達経路依存的な新生鎖合成制御機構の解析

H29-30 年度 神経の発生と疾患に於ける新生鎖の生成機構と機能



研究成果の概要：

神経細胞は、精密にタンパク質合成を制御することによって適切な形を作り出し、正しく回路に組み込まれて働くことができる。この過程は脳の正常な働きに重要であり、タンパク質合成の制御異常は自閉症や知的障害などの脳の疾患を引き起こすことが知られている。しかし、神経細胞の発生および形態形成における新生鎖タンパク質合成の制御の実態と機能は十分に理解されていなかった。そこで、神経細胞における新生鎖合成ダイナミクスの特徴を捉えるためにリボソームプロファイリング法による網羅的な解析を行った。mTOR シグナル伝達経路は細胞内新生鎖合成を制御する主要な経路であり、神経発生に深く関わっていることが知られているため、mTOR 阻害剤の有無の条件で比較を行った。神経細胞と胚性幹細胞の比較解析を行い、各遺伝子から転写された mRNA の情報をリボソームが読み出す効率を比較したところ、神経特異的に mTOR シグナル伝達経路下流で新生鎖合成の制御を受ける遺伝子を多数見いだすことができた。胚性幹細胞で特異的に新生鎖合成の制御を受ける遺伝子群にはミトコンドリア関連遺伝子が多く含まれた一方で、神経特異的に新生鎖合成の制御を受ける遺伝子群には細胞骨格や細胞接着に寄与する遺伝子を多く含まれていた。神経特異的遺伝子群の中に、Palladin という細胞骨格制御因子を見出した。免疫染色解析を行ったところ、Palladin は神経の軸索の先端に存在していた。軸索を単離した状態でも Palladin の量は mTOR 阻害剤の影響を受けたことから、Palladin は軸索内部で合成されることが示唆された。海馬神経を培養すると通常 1 本しか軸索を持たないが、mTOR シグナル経路の阻害タンパク質である TSC1 を失うと 1 つの培養海馬神経に複数本軸索が生じることが知られていた。TSC1 喪失と同様に Palladin の過剰発現も培養海馬神経に複数の軸索を生じさせた。また、TSC1 喪失に加えて Palladin も喪失させると、培養海馬神経は軸索を 1 本のみ持つ傾向を示したため、TSC1 や mTOR の下流で Palladin が機能することが明らかになった。これらの結果から、Palladin は神経細胞において特異的に mTOR シグナル伝達経路によって合成を制御され、神経の軸索の形態形成に重要な役割を果たすことがわかった。さらに、タンパク質を合成している途中でリボソームが mRNA 上の特定の位置で停滞する現象（ストーリング）が起こる位置をリボソームプロファイリング法によって網羅的に同定した。この結果、神経および胚性幹細胞特異的にストーリングが起こる部位を見出した。また、神経細胞と胚性幹細胞でコドンごとにリボソームが異なる効率で mRNA を結合している様子を明らかにした。これらのことから、細胞種ごとに異なるダイナミクスで新生鎖タンパク質合成が制御されている様子が明らかになった。軸索内の新生鎖合成ダイナミクスをさらに詳しく調べるためには、軸索を単離する必要がある。本研究では軸索束をマイクロデバイス内で形成させ、軸索を大量に取得する方法も確立することができた。

代表的な論文：

1. Kawada J, Kaneda S, Kirihara T, Maroof A, Levi T, Eggan K, Fujii T, Ikeuchi Y. "Generation of a Motor Nerve Organoid with Human Stem Cell-Derived Neurons." *Stem Cell Reports*. 2017 Nov 14;9(5):1441-1449. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.021.
2. Umegaki Y, Brotons AM, Nakanishi Y, Luo Z, Zhang H, Bonni A, Ikeuchi Y. "Palladin Is a Neuron-Specific Translational Target of mTOR Signaling That Regulates Axon Morphogenesis." *Journal of Neuroscience*. 2018 May 23;38(21):4985-4995. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2370-17.2018.

総説：

1. Chow A, Ikeuchi Y. 「神経細胞内タンパク質合成の解析手法の発展と現状」生産研究 vol 69, pp 115-121, 2017 doi:10.11188/seisankenkyu.69.115

公募研究（平成 29～30 年度）

姚 閔 北海道大学大学院 先端生命科学研究院 教授

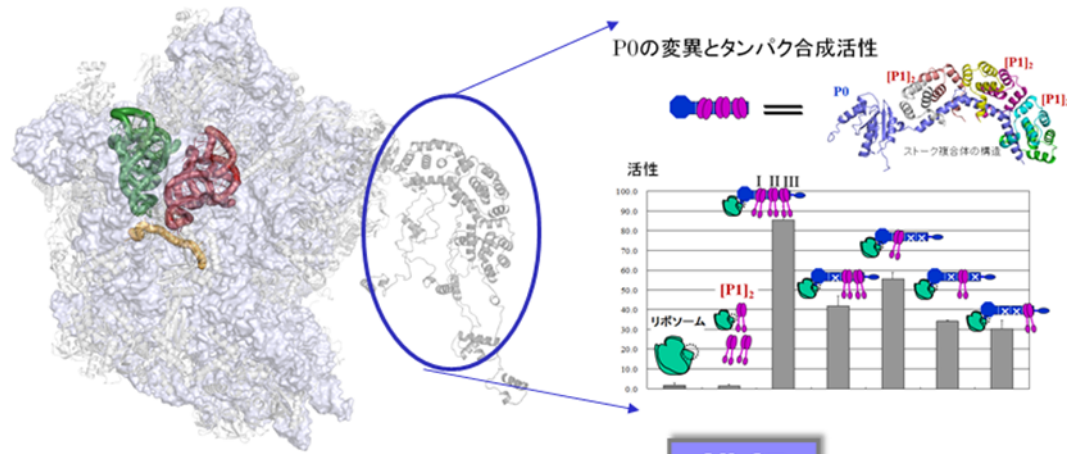
研究課題名：新生鎖の合成速度を段階的に変える翻訳システムの創成

Developing a translation system that has a variable speed of the nascent chain elongation

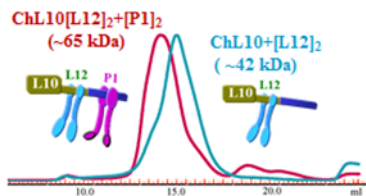
研究成果の概要：

リボソームによる新生鎖合成のメカニズムが明らかになってきた現在、その得られた情報をもとに、新生鎖合成を自在に制御できるような次世代型新生鎖合成システムの創成が期待される。我々は、新生鎖合成に必要なエネルギーを供給する GTPase（開始因子、伸長因子など）を運搬する真核型ストーク複合体の構造解析に成功した（図上中）。このストーク複合体は、リボソーム本体に固く結合した足場タンパク質 P0（バクテリアでは L10）に、複数の翻訳因子と結合するタンパク質 P1 二量体の 3 個（大腸菌では L12 二量体が 2 個）結合した複合体（P0[P1]₂[P1]₂[P1]₂）である。その構造をもとに、P0 の改変によって様々な P1 欠損ストークを作製し、各 P1 二量体は独立して翻訳因子を運搬することを明らかにした（図右上）。さらには、バクテリア型と真核型のストーク構成成分は交換可能であることも示された。大腸菌と比べて真核生物の新生鎖合成速度（ターンオーバータイム）は、10 分の 1 であることが知られており、その差は、ストークの性質と GTPase、特に運搬頻度の高い伸長因子 EF-2 と EF-1 α （バクテリアでは EF-Tu と EF-G）の種差によるものと考えられる。ここで、我々は、大腸菌リボソームのストークの一部を真核型に変換することによって、大腸菌を使いながらも、真核型伸長因子をリクルートできる低速翻訳システムを実現することができると考えた（図右下）。成功すれば、大腸菌を用いた可溶性発現の改善が期待できる。以上、本研究課題では、大腸菌 L10 の改変により、真核の性質を持つキメラ型 L10 を作製し、それに結合する L12 二量体又は P1 二量体の個数を調節することで、新生鎖の合成速度を人工的に数段階調節できる翻訳システムを創出することを試みる。

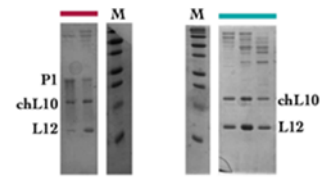
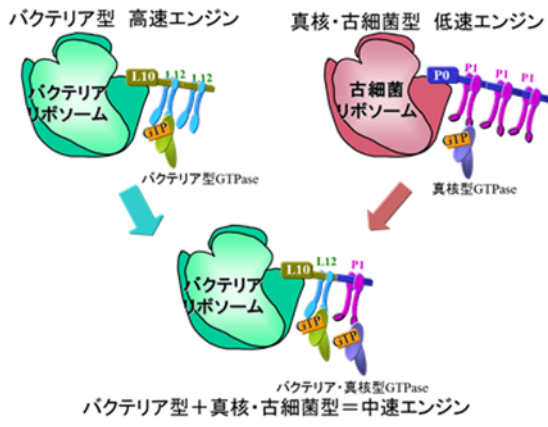
大腸菌 L10 の構造がまだ解析されていないため、既に発表された *Thermotoga maritima* の L10-L12(NTD)複合体の配列の比較と構造の予測を行った。また、報告された変異体の結合実験の結果を参考し、2 番目の L12 二量体を欠損する大腸菌 L10 の変異体(C 末端 helix の欠損体)を作成することが出来た。その変異体に P1 二量体と結合できる *Pyrococcus horikoshii*.P0 の helix を付けて、L10 の 2 番目の L12 二量体と結合する helix を P1 二量体と結合できる古細菌の P0 の helix に置き換えたキメラストック chL10[L12]₂[P1]₂ の作成に成功した(図左下)。そのキメラストックを用いて、翻訳 GTPase 因子との結合を確認したところ、EF-2 と結合できることが分かった。現在キメラストック chL10[L12]₂[P1]₂ と EF-G の結合、および in vivo と in vitro での chL10[L12]₂[P1]₂ 機能のテストをしている。その機能が確認できたら、一般応用へ展開する。



構想



結果



代表的な論文：

1. T. Tanzawa, K. Kato, D. Girodat, T. Ose, Y. Kumakura, H.-J. Wieden, T. Uchiumi, I. Tanaka, and *M. Yao (2018), The C-terminal helix of ribosomal P stalk recognizes a hydrophobic groove of elongation factor 2 in a novel fashion *Nucleic Acids Res.* 46, 3232-3244
2. M.-r. Chen, K. Kato, Y. Kubo, Y. Tanaka, Y. Liu, F. Long, W. Whitman, P. I. Lill, C. Gatsogiannis, S. Raunser, N. Shimizu, A. Shinoda, A. Nakamura, I. Tanaka, and *M. Yao (2017) Structural basis for the tRNA-dependent cysteine biosynthesis *Nature Comm.*, 8, 1512-1532

総説：

1. 姚 閔、陳 美容
tRNA 依存的アミノ酸システインの生合成複合体の分子機構
生化学, 第 90 卷 第 4 号, pp.512-518 (2018)

公募研究（平成 29～30 年度）

齋尾智英 北海道大学 大学院理学研究院 助教

研究課題名：分子シャペロンの基質選択と活性発現における動的構造基盤

研究成果の概要：

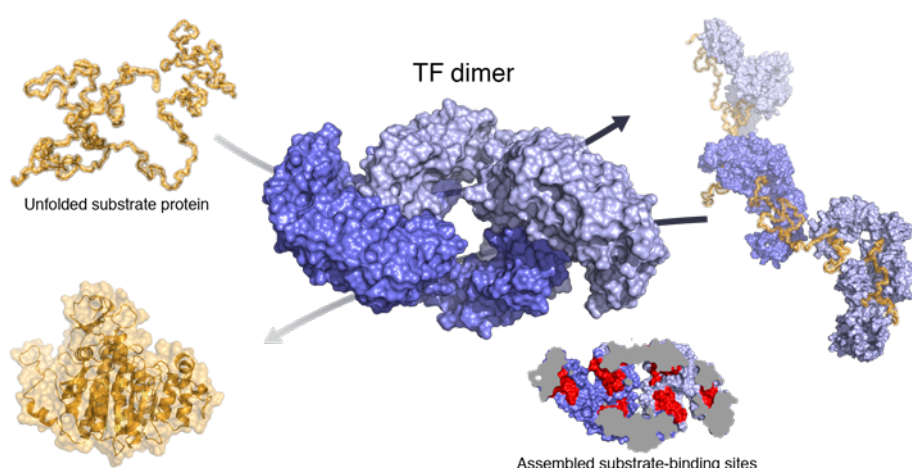
シャペロンは、リボソームによって合成された多数の新生タンパク質 (基質タンパク質) の特性を見分け、それぞれが進むべき経路へと振り分ける。しかしそのようなシャペロンの多彩な機能についての詳細なメカニズムはほとんど明らかになっていない。その最大の要因の一つが、高分解能立体構造情報の欠如である。シャペロンは、高次構造をとらない未成熟な状態 (変性状態) の基質タンパク質との直接的な相互作用によって機能するが、基質タンパク質の認識や、活性発現についての詳細なメカニズムはほとんど明らかにされていなかった。我々は、溶液 NMR を主体とした立体構造解析と速度論解析によって、Trigger Factor (TF) シャペロンの活性発現メカニズムの一端を解明した。

TF は溶液中で二量体を形成するが、その意義や活性への影響は明らかにされていなかった。そこで本研究ではまず、溶液 NMR によって 100 kDa TF 二量体の高分解能立体構造を決定した (Saio et al. 2018 *eLife*)。その結果、TF は逆平行の対称二量体を形成し、それによって基質結合サイト (Saio et al. 2014 *Science*) が寄せ集められ、一つの大きな面を形成することが明らかになった。速度解析の結果、TF はこの基質結合サイトの集積によって基質タンパク質との結合速度を上昇させていることが明らかになった。さらに、TF は二量体形成によって基質タンパク質を変性状態に保つ holdase 活性や、凝集を抑制する抗凝集活性を向上させていることが明らかになったことから、TF は二量体形成によって基質との結合速度を制御し、活性を調節しているという新たなメカニズムが明らかになった (Saio et al. 2018 *eLife*)。

さらに本研究では、TF の活性ドメインであるプロリン異性化ドメイン PPD の触媒メカニズムを明らかにした。TF^{PPD} はプロリン残基直前のペプチド結合の *cis/trans* 異性化を促進するが、そのメカニズムについては諸説提唱され、真相は謎に包まれていた。我々は、プロリンを含む基質ペプチドとの複合体立体構造解析と MD シミュレーションによって、TF^{PPD} によるプロリンの認識と、*cis/trans* 反応の遷移状態の安定化メカニズムについての詳細を明らかにした (Kawagoe et al. 2018 *J Biol Chem*)。

以上のように本研究では、TF シャペロンを対象とした立体構造解析・速度論解析によって、他の多くのシャペロンに共通し得る普遍的なメカニズムを解明した。

(1084)



代表的な論文：

1. Yoshizawa T, Nozawa RS, Jia TZ, Saio T, Mori E. Biological phase separation: cell biology meets biophysics. *Biophys Rev.* 2020 Apr;12(2):519-539. doi: 10.1007/s12551-020-00680-x
2. Kawagoe S, Nakagawa H, Kumeta H, Ishimori K, Saio T Structural insight into proline *cis/trans* isomerization of unfolded

proteins catalyzed by the trigger factor chaperone. *J Biol Chem.* 293, 15095-15106, 2018.

3. Saio T, Kawagoe S, Ishimori K, Kalodimos CG. Oligomerization of a molecular chaperone modulates its activity. *Elife.* 7, e35731, 2018.

総説 :

1. Tomohide Saio, Fuyuhiko Inagaki. Structural Study of Proteins by Paramagnetic Lanthanide Probe Methods (Part:Contributor, Pages 227-252 in "Experimental approaches of NMR spectroscopy -Methodology and application to life science and materials science-") Springer Nov 2017

公募研究 (平成 29~30 年度)

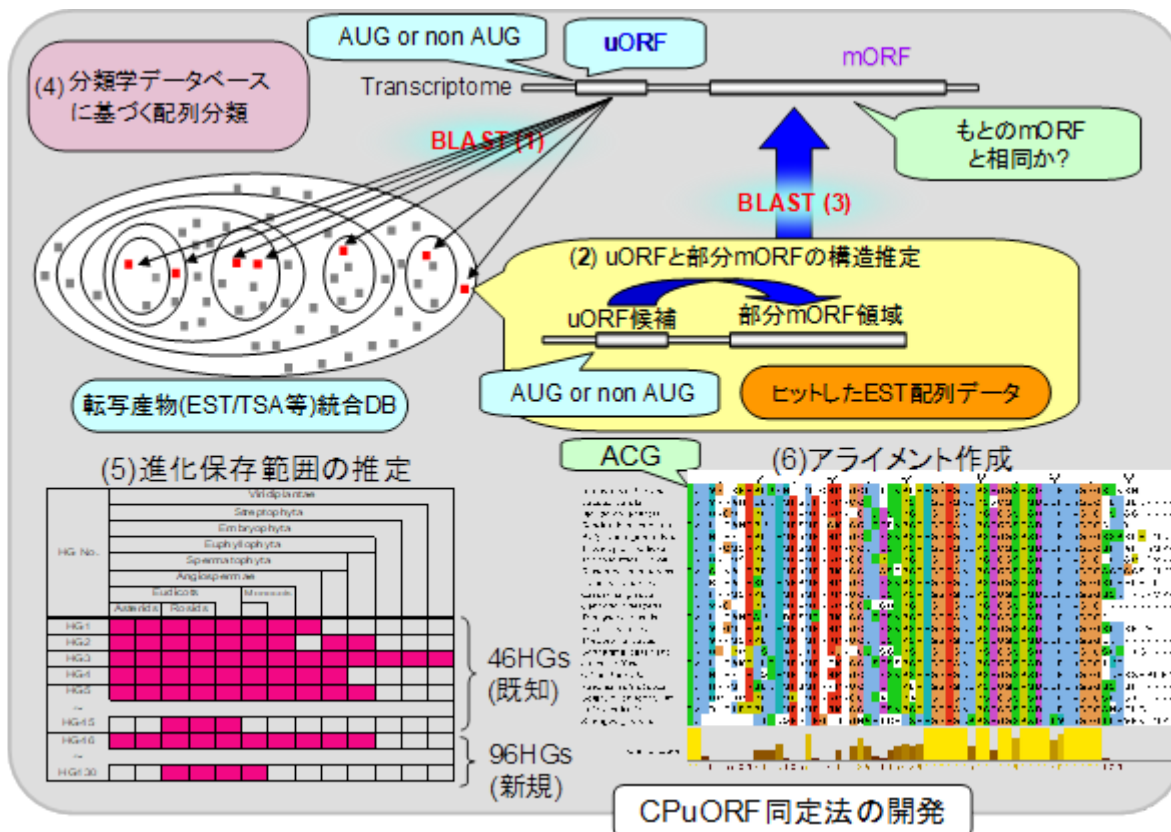
高橋 広夫 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 准教授

研究課題名 : 疾患に関わる非 AUG 型上流 ORF の情報工学的網羅同定法の開発

研究成果の概要 :

真核生物の 10-50% の mRNA には、non-coding RNA (ncRNA) 領域である 5'非翻訳領域に上流 ORF (uORF) と呼ばれる短い ORF が存在するが、その生物学的意義は軽視されてきた。しかし、近年、一部の uORF は下流の main ORF (mORF) の翻訳制御に関わっていることが分かってきた。そこで、これまで、ペプチド配列が進化的に保存されている uORF (conserved peptide uORF: CPuORF) なら機能が保存されていると仮定し、このような CPuORF を網羅的に抽出するために、バイオインフォマティクスに基づく新しい方法論の開発を行ってきた。本研究では、さらに、① 非 AUG-uORF に対応させた CPuORF の網羅同定法の高度化・応用、および、② CPuORF の分類・体系化を行った。

本提案は、最終的に、ヒトの疾患に関わる非 AUG 型の翻訳制御型 uORF を同定することを目的としているが、小さなデータセットを用いることは方法論の開発には有効である。また、非 AUG-CPuORF を同定するためには、あらかじめ AUG 型 CPuORF を網羅的に確定する必要がある。CPuORF を同定するための我々の独自の方法論は、RNA の網羅配列データベースを横断解析に基づく手法である。方法論の概要は、図に示した様に、ゲノム情報から uORF 候補配列を抽出し、塩基配列データベースから uORF と mORF の類似領域を持つ配列を抽出する。続いて、種分類データベースと統合解析することで、進化保存範囲を決定し、進化的によく保存された CPuORF を同定するものである。植物の AUG 型 CPuORF は、我々が、シロイヌナズナの解析から新規同定した 17 ファミリー (Homology Group: HG) を含めて、46HG が報告されていたが、新手法を 5 種の植物ゲノムに応用することで、新たに、96HG を同定することに成功した(図左下)。動物 AUG 型 CPuORF については、ヒトを含む 4 種の動物ゲノムに応用することで、動物界から約 1400HG の CPuORF を同定した。HG 数の確定のため、uORF と mORF の相同性を同時に評価するためのクラスタリング手法を新たに開発した。約 1400HG のうちの約 1100HG はヒト CPuORF で、ヒトゲノムでは、他の生物と比べ、多くの HG が存在することが明らかとなった。これらの CPuORF については、一部について実験的に検証し、およそ、25-30% は、翻訳抑制効果を持つと推測している。この中には、疾患に関わる遺伝子が多数含まれていた。AUG 型 CPuORF がおおよそ確定したので、引き続き、非 AUG 型 CPuORF の解析を行った。非 AUG 型は AUG 型に比して候補が多いために、解析に時間がかかっており、全て計算が終わっているわけではないが、図の右下に示した様に、既知の ACG 型の CPuORF などの同定に成功しており、その他、多数の新規の非 AUG 型 CPuORF の同定にも成功している。



代表的な論文：

- Hayashi N., Sasaki S., **Takahashi H.**, Yamashita Y., Naito S., and *Onouchi H., Identification of Arabidopsis thaliana upstream open reading frames encoding peptide sequences that cause ribosomal arrest, *Nucleic Acids Res.*, 45(15), 8844-8858, 2017
- Kita K., Fukuda K., **Takahashi H.**, Tanimoto A., Nishiyama A., Arai S., Takeuchi S., Yamashita K., Ohtsubo K., Otani S., Yanagimura N., Suzuki C., Ikeda H., Tamura M., Matsumoto I., *Yano S., Patient-derived xenograft models of non-small cell lung cancer for evaluating targeted drug sensitivity and resistance, *Cancer Sci.*, 110(10), 3215-3224, 2019
- Vial-Pradel S., Hasegawa Y., Nakagawa A., Miyaki S., Machida Y., Kojima S., *Machida C., ***Takahashi H.**, SIMON: Simple methods for analyzing DNA methylation by targeted bisulfite next-generation sequencing, *Plant Biotechnol.*, 36(4), 213-222, 2019
- Luo L., Ando S., Sakamoto Y., Suzuki T., **Takahashi H.**, Ishibashi N., Kojima S., Kurihara D., Higashiyama T., Yamamoto K., *Matsunaga S., *Machida C., *Sasabe M., *Machida Y., The formation of perinucleolar bodies is important for normal leaf development and requires the zinc-finger DNA-binding motif in Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2, *Plant J.*, 101(5), 1118-1134, 2020
- *Shimada T. L., Yamaguchi K., Shigenobu S., **Takahashi H.**, Murase M., Fukuyoshi S., Hara-Nishimura I., Excess sterols disrupt plant cellular activity by inducing stress-responsive gene expression, *J. Plant Res.*, 133(3), 383-392, 2020
- *#Takahashi H.**, #Hayashi N., Hiragori Y., Sasaki S., Motomura T., Yamashita Y., Naito S., Takahashi A., Fuse K., Satou K., Endo T., Kojima S., and *Onouchi H., Comprehensive genome-wide identification of angiosperm upstream ORFs with peptide sequences conserved in various taxonomic ranges using a novel pipeline, ESUCA, *BMC Genomics*, 21, 260, 2020

総説：

1. **高橋広夫**・伊藤素行・尾之内均, 「バイオインフォマティクスによる配列データベース横断解析に基づく機能上流 ORF の推定」生物工学会誌, 97(8), 496-499, 2019

公募研究 (平成 29~30 年度)

三嶋 雄一郎 東京大学 分子研 助教

研究課題名：新生鎖合成中のリボソームによる mRNA 安定性制御機構の解明

研究成果の概要：

リボソームによる mRNA の翻訳は、遺伝暗号であるコドンの配列からタンパク質を合成するセントラルドグマの中核を成す反応である。各コドンを読み取る際のリボソームの挙動は一様ではなく、コドンに対応する tRNA の量やコドン-アンチコドン対合の様式、合成中の新生鎖の影響によって大きく変化することが知られている。我々は、ゼブラフィッシュをモデルとして用いた研究から、受精直後の mRNA 安定性が ORF のコドン組成によって規定されていることを見出した (Mishima et al., *Mol Cell*. 2016)。この発見は、新生鎖合成中のリボソームにはコドンの違いを感知して mRNA の安定性を調節する未知機能が備わっていることを示唆している。しかしリボソームによる特定のコドンの翻訳がどのようにして mRNA の安定性の変化につながるのか、その分子メカニズムは現在のところほとんど明らかになっていない。

本研究では、各コドンが mRNA 安定性に及ぼす効果を純粋に検出できる独自の実験系として、PACE 法 (Parallel Analysis of Codon Effects) を開発した。この PACE 法を用いてゼブラフィッシュ初期胚におけるコドン効果を解析した結果、コドンが mRNA 安定性に与える影響はリボソームによる翻訳伸長速度とよく一致すること、さらにこのコドン効果と翻訳伸長速度は対応する tRNA の細胞内量によって決定されることが明らかとなった。すなわち、tRNA によるコドン認識が律速となってリボソームがコドン上で停滞することが、コドン依存的な mRNA 分解の引き金になっていることが示唆された。リボソームが翻訳途中で異常に停止すると、Ribosome Quality Control (RQC) によるサブユニットの乖離と No-go decay (NGD) による mRNA の分解が引き起こされることが知られている。この経路がコドン依存的な mRNA 分解に関与しているかを検証するため、RQC と NGD に必須である Znf598 のゼブラフィッシュ変異体を作成した。この変異体ではリボソームの異常停滞による NGD は起こらなくなっていたが、コドン依存的 mRNA 分解は正常に起こっていた。また、zfn598 変異体ではゼブラフィッシュ初期胚の内在 mRNA の安定性には顕著な変化は見られなかった。このことから、コドン依存的な mRNA 分解の引き金になっているリボソームの停滞は、RQC/NGD の標的となる異常なリボソーム停止と質的に異なることが明らかとなった。

代表的な論文：

1. *Mishima Y and Tomari Y. (2017) Pervasive yet nonuniform contributions of Dcp2 and Cnot7 to maternal mRNA clearance in zebrafish. *Genes to Cells* 22(7):670-678.

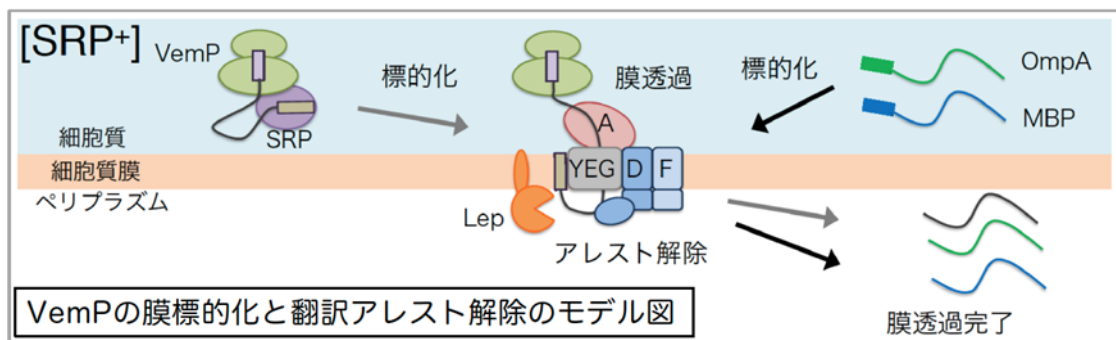
公募研究 (平成 29~30 年度)

森 博幸 京都大学 ウイルス再生医科学研究所 准教授

研究課題名：新生鎖 VemP の翻訳伸長停止／解除機構の解明

研究成果の概要：

「*Vibrio* 族細菌は、2 種類の SecDF パラログを保持しており、高 Na⁺環境下では Na⁺駆動型の SecDF1 のみを利用しているが、低 Na⁺条件下ではプロトン駆動型の SecDF2 を特異的に発現誘導し、タンパク質の膜透過能を維持する機構を持つ。」事を我々はこれまでに見出ししている。VemP (*Vibrio* protein export monitoring polypeptide)は、159 アミノ酸残基からなる分泌タンパク質であり、上記の発現制御機構に必須の役割を持つ。VemP は菌の膜透過活性をモニターし、活性が低下した際には自身の翻訳伸長を C 末端近傍で安定に停止させ、同一オペロン下流に位置する *secDF2* の発現量を増加させる。この翻訳伸長の停止は、膜透過が正常な時は一過的であり速やかに解除される。翻訳停止を介した下流遺伝子の発現制御機構は、大腸菌 *secM-secA* において最初に見出され詳しく研究がなされているが、VemP の予想翻訳停止配列 (アレストモチーフ) は、SecM のそれと全く異なっている。本研究では、1) VemP の翻訳停止能を簡便に評価できるレポーターシステムを構築し、VemP の C 末端高度保存領域の徹底的な変異解析を通して VemP 翻訳アレストモチーフを同定し、翻訳停止の分子機構について考察した (Mori *et al.* (2018) *JBC*)。2) VemP の翻訳停止/解除の分子機構を明らかにすることを旨として、VemP がリボソームで合成された後、翻訳停止/解除の過程を経て、膜透過が完了するまでに生じる他のタンパク質因子との一過的な相互作用を、最近我々が開発した PiXie 法 (Pulse-chase and *in vivo* X-linking experiment) (Miyazaki *et al.* (2018) *JBC*) を用いて解析した。相互作用因子の同定、変異株を用いた *in vivo* 解析から、i) VemP は SRP 経路を介して膜透過装置まで標的化されること、ii) 翻訳アレストの解除は、シグナル配列が切断を受ける状態まで膜透過反応が進行した後に初めて起こること、iii) VemP が別の経路で標的化された場合には、アレスト解除能を失い膜透過チャンネルのジャミングを引き起こすことを見出した。これらの知見は、VemP の翻訳停止を解除する分子機構の解明の大きな手がかりになると期待される。(1012 文字)



代表的な論文：

1. Daimon, Y., Masui, C., Tanaka, Y., Shiota, T., Suzuki, T., Miyazaki, R., Sakurada, H., Lithgow, T., Dohmae, N., Mori, H., Tsukazaki, T.*, Narita, S.* and Akiyama, Y*. (2017) BepA mediates productive transfer of substrate proteins to the β -barrel assembly machinery (BAM) complex. *Mol. Microbiol.* **106**, 760-776
2. Furukawa, A., Yoshikaie, K., Mori, T., Mori, H., Morimoto, Y. V., Sugano, Y., Iwaki, S., Minamino, T., Sugita, Y., Tanaka, Y. and Tsukazaki, T.* (2017) Tunnel formation inferred from the I-form structures of the proton-driven protein secretion motor SecDF *Cell Reports* **19**, 895-901
3. Yura, T.*, Miyazaki, R.#, Fujiwara, K.#, Ito, K., Chiba, S., Mori, H. and Akiyama, Y.* (2018) Heat shock transcription factor σ^{32} defective in membrane transport can be suppressed by transposon insertion into the genes for a restriction enzyme subunit or a putative autotransporter in *E. coli*. *Genes & Genetic Systems* in press
4. Mori, H.*, Sakashita, S., Ito, J., Ishii, E. and Akiyama, Y. (2018) Identification and characterization of arrest motif in VemP by systematic mutational analysis. *J. Biol. Chem.* **293**, 2915-2926
5. Miyazaki, R., Myogo, N., Mori, H. and Akiyama, Y.* (2018) A new photo-cross-linking approach for analysis of protein

総説：

1. Ito, K.*, Mori, H. & Chiba, S. (2018) Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 365, fny109 (Mini review)
2. 森 博幸*、石井英治 (2017) 「タンパク質膜透過の駆動メカニズム」 *分子マシンの科学* **26**, 76-83 (日本化学会編、化学同人)
3. 石井英治*、森 博幸 (2017) 「ビブリオ属細菌における2つのタンパク質膜透過促進因子の生理的意義と使い分け機構」 *医学の歩み*, **261**, 1178-1179

公募研究 (平成 29~30 年度)

石濱 泰 京都大学 大学院薬学研究科 教授

研究課題名：タンパク質新生鎖の末端プロテオーム解析

研究成果の概要：

大腸菌プロテオーム完全解析を可能にした独自の nanoLC/MS/MS システムに、新規末端ペプチド濃縮法である CHARGE-Mounted Positional separation (CHAMP)法を新規に開発し、末端プロテオーム解析プラットフォームを確立した。N, C 末端由来のペプチドを濃縮する従来の方法は、煩雑な化学修飾マルチステップを経るものであり、大規模解析への展開は困難であった。今回新たに開発した N 末端ペプチドに対する CHAMP 法は、Lys, Arg の N 末側を切断するプロテアーゼ Tryp-N による消化と、それに続く強カチオン交換クロマトグラフィー(SCX)による分離のみで構成される。Tryp-N による消化では、タンパク質 N 末端由来以外のペプチド (内部ペプチド) はすべて N 末端に+2 価の電荷が局在するのに対し、タンパク質 N 末端由来ペプチドはその N 末端の電荷が+1 もしくは 0 となる。これを利用し、SCX カラムを用いた HPLC によりタンパク質 N 末端由来ペプチド画分を分離するものである。HEK293T 細胞を用いて条件を最適化した結果、タンパク質 20 µg の Tryp-N 消化物から 1,550 種の N 末アセチル化ペプチドと 200 種の N 末非修飾ペプチドを 1 回の LC/MS/MS 測定から同定することが可能であった。この時のタンパク質 N 末端由来ペプチド画分中における非 N 末端由来ペプチドの含量は 4%以下であり、従来法よりもはるかに高い濃縮率の実現に成功した。また、タンパク質 C 末端ペプチドに対しても同様に、内部ペプチドの C 末端のみに局在する物性を利用して、それらをクトマトグラフィー分離し、タンパク質 C 末端由来ペプチド画分を濃縮することに成功した。新生ポリペプチド鎖に安定同位体標識もしくは化学的な標識を施し、本手法と組み合わせて解析することにより、従来法にはない特長を有する新生鎖プロテオームプラットフォームを確立することに成功した。

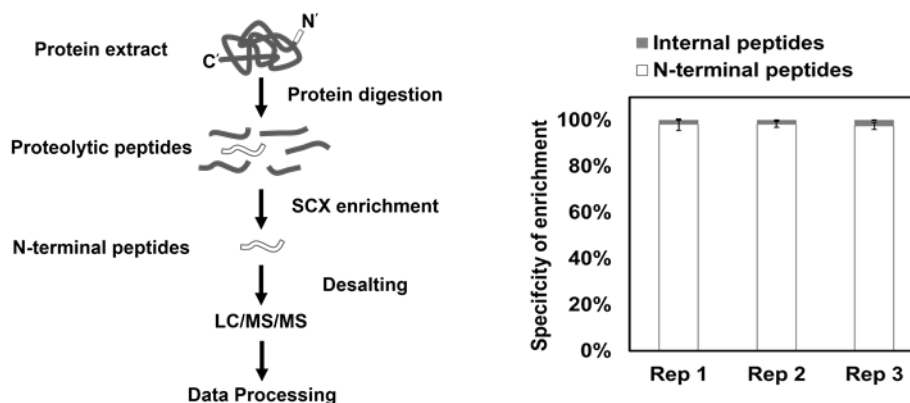


Figure 1 Comprehensive analysis of protein N-termini by CHAMP separation.

(Left) Workflow of protein N-terminal peptide enrichment by CHAMP separation, (Right) specificity of protein N-terminal peptide enrichment in three technical repeats.

代表的な論文：

1. Sugiyama, N.; Miyake, S.; Lin, M. H.; Wakabayashi, M.; Marusawa, H.; Nishiumi, S.; Yoshida, M.; [Ishihama, Y.](#), Comparative proteomics of *Helicobacter pylori* strains reveals geographical features rather than genomic variations. *Genes Cells* **2018**, doi: 10.1111/gtc.12662.
2. Ogata, K.; Krokhin, O. V.; [Ishihama, Y.](#), Retention Order Reversal of Phosphorylated and Unphosphorylated Peptides in Reversed-Phase LC/MS. *Anal Sci* **2018**, *34* (9), 1037-1041.
3. Moriya, Y.; Kawano, S.; Okuda, S.; Watanabe, Y.; Matsumoto, M.; Takami, T.; Kobayashi, D.; Yamanouchi, Y.; Araki, N.; Yoshizawa, A. C.; Tabata, T.; Iwasaki, M.; Sugiyama, N.; Tanaka, S.; Goto, S.; [Ishihama, Y.](#), The jPOST environment: an integrated proteomics data repository and database. *Nucleic Acids Res* **2018**.
4. Imami, K.; Milek, M.; Bogdanow, B.; Yasuda, T.; Kastelic, N.; Zauber, H.; [Ishihama, Y.](#); Landthaler, M.; Selbach, M., Phosphorylation of the Ribosomal Protein RPL12/uL11 Affects Translation during Mitosis. *Mol Cell* **2018**, *72* (1), 84-98 e9.
5. Giese, S. H.; [Ishihama, Y.](#); Rappsilber, J., Peptide Retention in Hydrophilic Strong Anion Exchange Chromatography Is Driven by Charged and Aromatic Residues. *Anal Chem* **2018**, *90* (7), 4635-4640.
6. Fustin, J. M.; Kojima, R.; Itoh, K.; Chang, H. Y.; Ye, S.; Zhuang, B.; Oji, A.; Gibo, S.; Narasimamurthy, R.; Virshup, D.; Kurosawa, G.; Doi, M.; Manabe, I.; [Ishihama, Y.](#); Ikawa, M.; Okamura, H., Two Ck1delta transcripts regulated by m6A methylation code for two antagonistic kinases in the control of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115* (23), 5980-5985.
7. Urisman, A.; Levin, R. S.; Gordan, J. D.; Webber, J. T.; Hernandez, H.; [Ishihama, Y.](#); Shokat, K. M.; Burlingame, A. L., An Optimized Chromatographic Strategy for Multiplexing In Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry: Insights from Quantitation of Activated Kinases. *Mol Cell Proteomics* **2017**, *16* (2), 265-277.
8. Tsai, C. F.; Ku, W. C.; Chen, Y. J.; [Ishihama, Y.](#), Absolute Phosphorylation Stoichiometry Analysis by Motif-Targeting Quantitative Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* **2017**, *1636*, 313-325.
9. Takatsu, H.; Takayama, M.; Naito, T.; Takada, N.; Tsumagari, K.; [Ishihama, Y.](#); Nakayama, K.; Shin, H. W., Phospholipid flippase ATP11C is endocytosed and downregulated following Ca(2+)-mediated protein kinase C activation. *Nat Commun* **2017**, *8* (1), 1423.
10. Okuda, S.; Watanabe, Y.; Moriya, Y.; Kawano, S.; Yamamoto, T.; Matsumoto, M.; Takami, T.; Kobayashi, D.; Araki, N.; Yoshizawa, A. C.; Tabata, T.; Sugiyama, N.; Goto, S.; [Ishihama, Y.](#), jPOSTrepo: an international standard data repository

for proteomes. *Nucleic Acids Res* 2017, 45 (D1), D1107-D1111.

総説 :

1. Sugiyama, N.; *Ishihama, Y., Large-scale profiling of protein kinases for cellular signaling studies by mass spectrometry and other techniques. *J Pharm Biomed Anal* 2016, 130, 264-272.
2. Iwasaki, M.; *Ishihama, Y. Challenges Facing Complete Human Proteome Analysis. *Chromatography* 2014, 35, 73-80.

公募研究 (平成 29~30 年度)

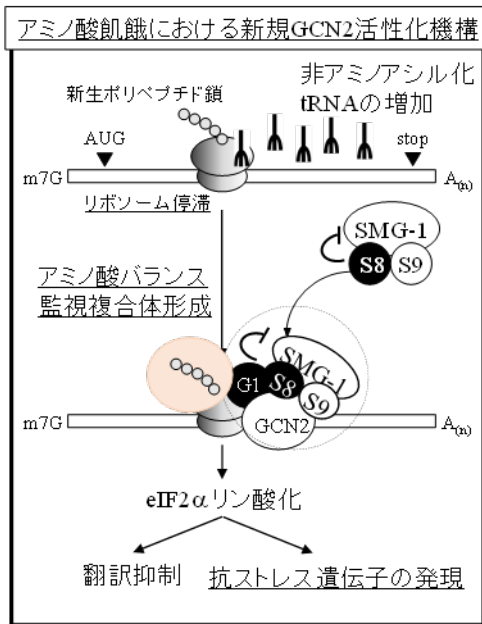
山下暁朗 横浜市立大学 医学部 准教授

研究課題名 : アミノ酸飢餓応答における停滞リボソーム-新生鎖複合体の解析

研究成果の概要 :

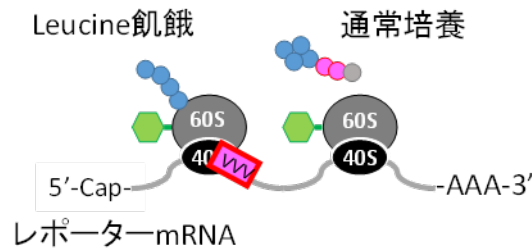
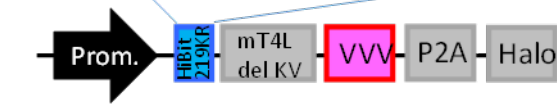
生物は栄養が不足した際に、消費を抑えて、飢餓による細胞死を防ぐ仕組みを持つ。こうした仕組みは出芽酵母からヒトを含む高等動物にまで共通であり、mTORC1 不活性化と GCN2 活性化により翻訳が抑制される。しかし、哺乳動物における GCN2 活性化機構や飢餓アミノ酸をコードするコドン上で停滞したリボソーム上の新生鎖の運命についてはほとんど解析が進んでいない。本研究では、アミノ酸飢餓時に飢餓アミノ酸コドン上で停滞したリボソーム上の新生鎖を簡便に解析するレポーターを新たに作成し、mTORC1 や GCN2 などのシグナル経路と新生鎖の運命の関わりを解明を目指した。

GCN2 のシグナル制御機構の解析においては、Nonsense-mediated mRNA decay 制御因子である SMG1 が GCN2 活性化を制御することを明らかにし、その分子機構の解明に成功した (図)。一步、当初計画していた NanoLuc を用いたレポーターにおいて、全リジンのアルギニンへの変異、全アルギニンのリジンへの変異に成功した。しかし、それ以外のアミノ酸変異では、十分な NanoLuc 活性が得られなかった。そこで、NanoLuc の Split peptide である HiBit tag (VSGWRLFKKIS) を改変した mHiBit (SGWRKFRRIS) を樹立し、安定な T4 Lysozyme と融合させたレポーターを構築した (図)。また、ribosome の簡易精製のための eGFP-rpS10a 融合タンパク質を安定発現する細胞株を樹立し、ribosome に結合する mRNA を解析する方法 (TRAP 法: Translating ribosome affinity purification) についても導入を進め、次世代シーケンス解析により、ロイシン飢餓依存的翻訳パターン変動を解析した (図)。その結果、4 時間のロイシン飢餓では、mRNA について ribosome との結合に変化が生じず、upstream open reading frame (uORF) を有する遺伝子を含む、一部の mRNA についてのみリボソームとの結合が上昇することが明らかになった。イシン以外の様々なアミノ酸について、1 種類の飢餓では、翻訳抑制が起きていないことがレポーターを用いた解析により明らかとした。



Nascentレポーター

Peptide	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
HiBit	V	S	G	W	R	L	F	K	K	I	S
HiBit-219		S	G	W	R	L	F	K	K	I	S
HiBit-219-KR		S	G	W	R	L	F	R	R	I	S



代表的な論文：

1. Yamashita A, Ohnishi T, Kashima I, Taya Y, Ohno S. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 15(17):2215-28. 2001
2. Ohnishi T, Yamashita A, Kashima I, Schell T, Anders KR, Grimson A, Hachiya T, Hentze MW, Anderson P, Ohno S. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell.* 12(5):1187-200. 2003
3. Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol.* 12(12):1054-63. 2005
4. Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, Ohno M, Dreyfuss G, Ohno S. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20(3):355-67. 2006
5. Yamashita A, Izumi N, Kashima I, Ohnishi T, Saari B, Katsuhata Y, Muramatsu R, Morita T, Iwamatsu A, Hachiya T, Kurata R, Hirano H, Anderson P, Ohno S. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 23(9):1091-105. 2009
6. Arias-Palomo E, Yamashita A, Fernández IS, Núñez-Ramírez R, Bamba Y, Izumi N, Ohno S, Llorca O. The nonsense-mediated mRNA decay SMG-1 kinase is regulated by large-scale conformational changes controlled by SMG-8. *Genes Dev.* 25(2):153-64. 2011
7. Okada-Katsuhata Y, Yamashita A, Kutsuzawa K, Izumi N, Hirahara F, Ohno S. N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-8: SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Res.* 40(3):1251-66. 2012
8. Usuki F, Yamashita A, Shiraishi T, Shiga A, Onodera O, Higuchi I, Ohno S. Inhibition of SMG-8, a subunit of SMG-1 kinase, ameliorates nonsense-mediated mRNA decay-exacerbated mutant phenotypes without cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(37):15037-42. 2013

9. López-Perrote A, Castaño R, Melero R, Zamorro T, Kurosawa H, Ohnishi T, Uchiyama A, Aoyagi K, Buchwald G, Kataoka N, Yamashita A, Llorca O. Human nonsense-mediated mRNA decay factor UPF2 interacts directly with eRF3 and the SURF complex. *Nucleic Acids Res.* 44(4):1909-23. 2016
10. Melero R, Hug N, López-Perrote A, Yamashita A, Cáceres JF, Llorca O. The RNA helicase DHX34 functions as a scaffold for SMG1-mediated UPF1 phosphorylation. *Nat Commun.* 7:10585. 2016
11. Usuki F, Yamashita A, Fujimura M, Higuchi I. Environmental stresses suppress nonsense-mediated mRNA decay, which has potential to affect the expression of genes that arise from PTCs. *Scientific Rep.* In press

総説：

1. Schweingruber C, Rufener SC, Zünd D, Yamashita A, Mühlemann O. Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1829(6-7):612-23. 2013
2. Yamashita A. Role of SMG1-mediated Upf1 phosphorylation in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Cells.* 18(3):161-75. 2013
3. Yamashita A, Takeuchi O. Translational control of mRNAs by 3'-Untranslated region binding proteins. *BMB Rep.* 50(4):194-200. 2017
4. Yamashita A. SMG1 Homolog, Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinase. In “Encyclopedia of Signaling Molecules” (Ed) Choi S, *Springer*, 2018
5. 山下暁朗. mRNA 品質管理機構の最新理解と新たな標的治療の可能性. 実験医学. 30(9): 1471-1480, 2012
6. 山下暁朗, 竹内 理. mRNA 3'UTR 結合タンパク質による翻訳制御. 細胞工学. 34 (8):762-765. 2015
7. 山下暁朗. miRNA による標的制御. 実験医学. 33(20): 3244-3255. 2015
8. 山下暁朗. HEK293T 細胞を用いたリコンビナントタンパク質精製. 実験医学. 34(18):3057-3064. 2016

公募研究（平成 27～28 年度）（平成 29～30 年度）

土居 信英 慶應義塾大学 大学院理工学研究科 教授

研究課題名：mRNA ディスプレイ法による翻訳アレスト配列の大規模探索

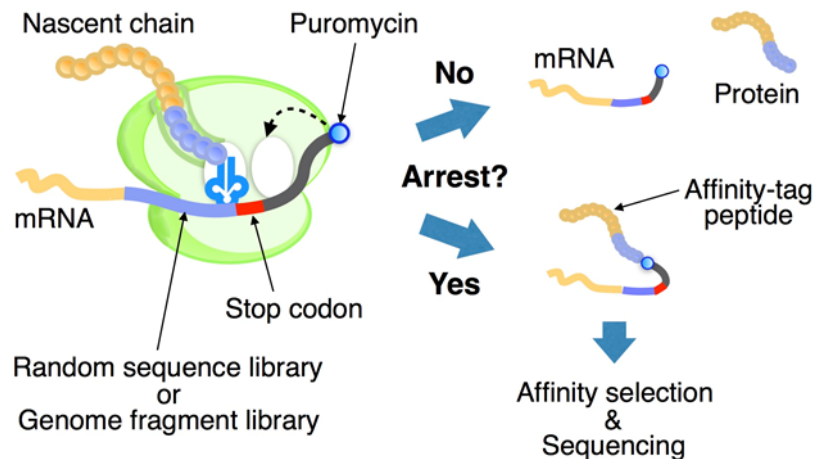
研究成果の概要：

本研究では、これまでに我々がタンパク質の進化工学や相互作用解析に活用してきた「mRNA ディスプレイ法」を応用して、莫大なサイズのライブラリーから完全に *in vitro* で翻訳アレスト配列を選択できる手法を開発し、STALL-seq (Selection of Translational Arrest sequence from Large Library - deep sequencing) と命名した。

従来の mRNA ディスプレイ法では、終止コドンを含まない mRNA の 3'末端にスパーサーを介してピューロマイシンを付加して無細胞翻訳を行うことで、リボソームが mRNA の末端で停止している間に新生鎖の C 末端にピューロマイシンが共有結合して mRNA-タンパク質連結分子が形成される。今年ノーベル化学賞を受賞したファージディスプレイ法と比べて生細胞を経由しないためライブラリーサイズが桁々大きくそれだけ多様な配列を選択できる利点がある。図に示すように、終止コドンを含む mRNA では mRNA-タンパク質連結分子は形成されないが、終止コドンの前のライブラリー中に翻訳アレスト配列が存在する場合、mRNA-タンパク質連結分子が形成され、共通の親和性タグを利用して精製した後、mRNA 部分を増幅し配列解読することで翻訳アレスト配列を簡便に同定することが期待できる。実際に、大腸菌由来無細胞翻訳系 PURE システムを用いた mRNA ディスプレイ法を確立し、この原理を応用してランダム配列ライブラリーや大腸菌ゲノム断片ライブラリーからの新規の翻訳アレストペプチドを多数取得することに成功した。

まず、ランダム配列ライブラリーから8ラウンドの試験管内選択を行い、得られた候補配列について、ペプチジル tRNA の検出により翻訳アレスト活性を確認し、Toe-printing アッセイにより新規の翻訳停止部位を特定した。また、変異解析により翻訳停止が塩基配列ではなくペプチド配列によるものであることを確認した。

また、大腸菌ゲノム断片ライブラリーから4ラウンドの試験管内選択を行い、次世代シーケンサーで解読した遺伝子断片を大腸菌ゲノムにマッピングした。これらのデータを様々な角度から解析し、大腸菌の7割以上のORFの部分配列が濃縮されていることを明らかにした。既存のリボソームプロファイリングなどの大規模データと比較して翻訳アレストの程度が大きく異なる遺伝子断片を数十個抽出し、得られた新規の翻訳アレスト候補遺伝子についてペプチジル tRNA の形成を確認した。この違いの原因の1つとしてPUREシステムには存在しないアレスト制御因子が大腸菌内に存在している可能性が考えられることから、現在、これらの遺伝子の機能から制御因子を推定し、新規のアレスト配列の生物学的意義を解析している。



代表的な論文：

1. Fujiwara, K., Sawamura, T., Niwa, T., Deyama, T., Nomura, S.M., Taguchi, H., **Doi, N.**
In vitro transcription–translation using bacterial genome as a template to reconstitute intracellular profile.
Nucleic Acids Res. 45, 11449-11458 (2017)
2. Sudo, K., Niikura, K., Iwaki, K., Kohyama, S., Fujiwara, K., **Doi, N.**
 Human-derived fusogenic peptides for the intracellular delivery of proteins.
J. Control. Release 255, 1-11 (2017)
3. Fujiwara, K., **Doi, N.**
 Biochemical preparation of cell extract for cell-free protein synthesis without physical disruption.
PLoS ONE, 11, e0154614 (2016)
4. Nagumo, Y., Fujiwara, K., Horisawa, K., Yanagawa, H., **Doi, N.**
 PURE mRNA display for *in vitro* selection of single-chain antibodies.
J. Biochem. 159, 519-526 (2016)

総説：

1. 須藤慧, 藤原慶, 土居信英
 mRNA ディスプレイ法によるペプチドのスクリーニング.
 技術情報協会 (2017)

公募研究（平成 29～30 年度）

喜井 勲 信州大学 准教授

研究課題名：リン酸化酵素の新生鎖における品質管理機構の解明

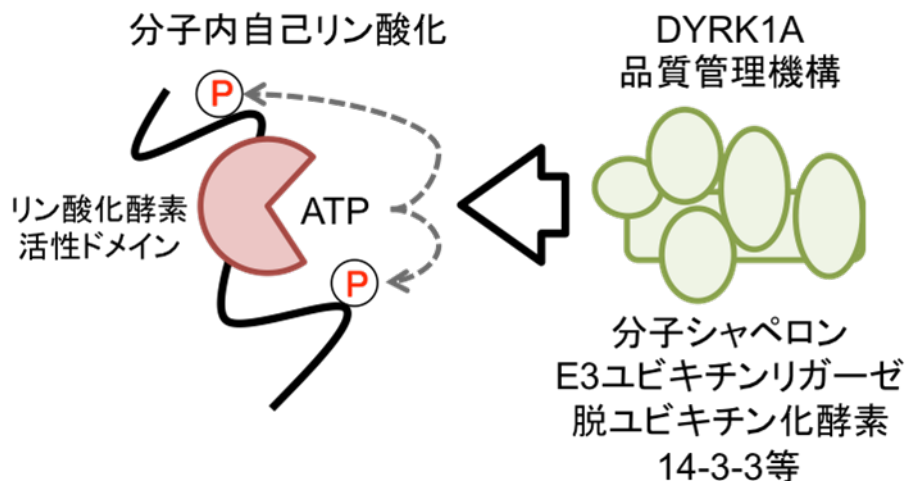
研究成果の概要：

リン酸化酵素の新生鎖は、翻訳と同時にフォールディングされ、活性ドメインを形成すると報告されています (Lochhead et al., Cell 2005)。活性ドメインは、同一分子内の新生鎖を基質としてリン酸化します。この分子内自己リン酸化は、リン酸化酵素の構造を最適化し、成熟を促進することで、新生鎖の品質管理機構として機能しています。

私たちは、アルツハイマー病などの神経変性疾患に関与すると報告されているリン酸化酵素 DYRK1A に着目し、研究を進めています。この研究の過程で、私たちは、DYRK1A のフォールディング途中に一過的に存在する「中間体構造」が触媒する分子内自己リン酸化を特異的に阻害する低分子化合物を発見し、その化合物を FINDY (Folding intermediate-selective inhibitor of DYRK1A) と名付けました (代表的な論文 No. 4)。

興味深いことに、FINDY は完成型 DYRK1A による基質リン酸化は阻害しませんでした。これらの結果から、フォールディング中間体は、完成型とは異なる特異な構造を有していると考えられます。さらに FINDY によって自己リン酸化を阻害された DYRK1A フォールディング中間体は、速やかに分解されることを見出しました (代表的な論文 No. 4)。この結果は、フォールディング中間体の品質管理機構が存在することを示唆しています。

本研究では、この品質管理機構の解明を目的として、DYRK1A の分子内自己リン酸化依存的に結合・解離するタンパク質群を網羅的に同定しました。その結果、自己リン酸化依存的に、14-3-3 等のリン酸化部位に結合するタンパク質群や脱ユビキチン化酵素が結合することや、HSP90 等の分子シャペロンや E3 ユビキチンリガーゼが乖離することを見出しました。さらに、FINDY の DYRK1A 活性ドメインへの作用を詳細に解析したところ、FINDY は活性ドメインに直接作用し、その熱力学的な不安定化を誘導することを見出しました。これらの結果は、フォールディング途中に FINDY が作用しうる一過的中間状態が存在すること、さらにその品質管理機構には自己リン酸化依存的な様々なタンパク質の結合・解離が関与することを示しています。今後は、これらの成果を他のリン酸化酵素へと応用し、リン酸化酵素新生鎖を標的とした医薬品開発技術の確立を目指します。



代表的な論文：

1. Meguro T, Terashima N, Ito H, Koike Y, **Kii I**, Yoshida S, Hosoya T.
Staudinger reaction using 2,6-dichlorophenyl azide derivatives for robust aza-ylide formation applicable to bioconjugation in living cells. *Chem Comm* 54(57):7904-7907 (2018)
2. Nakano-Kobayashi A, Awaya T, **Kii I**, Sumida Y, Okuno Y, Yoshida S, Sumida T, Inoue H, Hosoya T, Hagiwara M.
Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(38):10268-10273 (2017)
3. Abu Jhaisha S, Widowati EW, **Kii I**, Sonamoto R, Knapp S, Papadopoulos S, Becker W.
DYRK1B mutations associated with metabolic syndrome impair the chaperone-dependent maturation of the kinase domain. *Sci Rep* 7:6420 (2017)
4. **Kii I**, Sumida Y, Goto T, Sonamoto R, Okuno Y, Yoshida S, Kato-Sumida T, Koike Y, Abe M, Nonaka Y, Ikura T, Ito N, Shibuya H, Hosoya T, Hagiwara M.
Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process. *Nat Commun.* 7:11391 (2016)
5. Sonamoto R, **Kii I**, Koike Y, Sumida Y, Kato-Sumida T, Okuno Y, Hosoya T, Hagiwara M.
Identification of a DYRK1A Inhibitor that Induces Degradation of the Target Kinase using Co-chaperone CDC37 fused with Luciferase nanoKAZ. *Sci Rep.* 5:12728. (2015)
6. Masaki S, **Kii I**, Sumida Y, Kato-Sumida T, Ogawa Y, Ito N, Nakamura M, Sonamoto R, Kataoka N, Hosoya T, Hagiwara M.
Design and synthesis of a potent inhibitor of class 1 DYRK kinases as a suppressor of adipogenesis. *Bioorg Med Chem.* 23(15):4434-41 (2015)
7. Morooka S, Hoshina M, **Kii I**, Okabe T, Kojima H, Inoue N, Okuno Y, Denawa M, Yoshida S, Fukuhara J, Ninomiya K, Ikura T, Furuya T, Nagano T, Noda K, Ishida S, Hosoya T, Ito N, Yoshimura N, Hagiwara M.
Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 That Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice. *Mol Pharmacol.* 88(2):316-25 (2015)
8. Yamamoto M, Onogi H, **Kii I**, Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T, Hagiwara M.
CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. *J Clin Invest.* 124(8):3479-88 (2014)
9. Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, **Kii I**, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, Hagiwara M.
Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat Commun.* 1:86 (2010)

総説：

1. **喜井 勲**、萩原 正敏
「リン酸化酵素に対する選択的阻害剤の開発」 生物活性分子のケミカルバイオロジー
CSJ カレントレビュー Vol. 19 (2015)
2. **喜井 勲**、萩原 正敏
「キナーゼの多彩な立体構造を標的とした創薬」
研究成果を薬につなげる アカデミア創薬の戦略と実例
実験医学増刊 Vol. 32, No. 2 (2014)

公募研究（平成 29～30 年度）

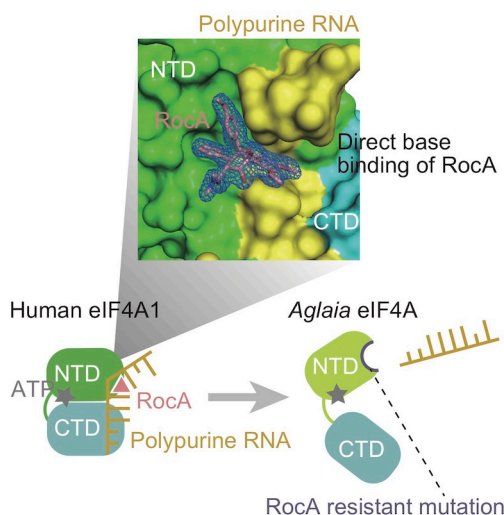
岩崎 信太郎 理化学研究所 主任研究員

研究課題名：Chasing translation along the time by novel ribosome profiling

研究成果の概要：

新生鎖合成を網羅的かつ定量的に解析するための手法として **ribosome profiling** と呼ばれる手法がある。この手法では、RNase 処理後、リボソームによって保護された mRNA の断片を次世代シーケンサーによって解読することにより、翻訳の俯瞰図を得ることができる。実際に本研究ではこの手法を駆使し、酵母における異常翻訳の品質管理機構 (Matsuo et al. *Nat. Commun.* 2017) (稲田研究室との共同研究)、植物が光に応答し 5' UTR 配列を変化させ、翻訳効率を制御する現象 (Kurihara et al. *PNAS* 2018)、新規 RNA 修飾である cap 構造下流に生じる m⁶Am による翻訳制御 (Akichika et al. *Science* 2018) など、多岐にわたる生物種において新生鎖合成が司る多様な生命現象の理解に取り組んできた。

特に本領域内の共同研究として、理研伊藤拓宏ユニットリーダーによる X 線結晶構造解析、兵庫県立大今高寛晃教授による *in vitro* 翻訳再構成系を **ribosome profiling** と組み合わせることにより、Rocaglamide A と呼ばれる抗がん作用をもつ翻訳阻害剤の作用メカニズムを解明した (Iwasaki et al. *Mol. Cell* in press)。



代表的な論文：

1. Han P, Shichino Y, Schneider-Poetsch T, Mito M, Hashimoto S, Udagawa T, Kohno K, Yoshida M, Mishima Y, Inada T, and Iwasaki S*.
Genome-wide survey of ribosome collision.
Cell Rep. 31(5):107610 (2020)
2. Kurihara Y, Makita Y, Shimohira H, Fujita T, Iwasaki S, and Matsui M.
Translational landscape of protein-coding and non-protein-coding RNAs upon light exposure in Arabidopsis.
Plant Cell Physiol. 61(3):536-545. (2020)
3. Hia F, Yang SF, Shichino Y, Yoshinaga M, Murakawa Y, Vandenbon A, Fukao A, Fujiwara T, Landthaler M, Natsume N, Adachi S, Iwasaki S, and Takeuchi O.
Codon bias confers stability to human mRNAs.

EMBO Rep. e48220 (2019)

4. Fujita T, Kurihara Y, and Iwasaki S*.
The plant translome surveyed by ribosome profiling.
Plant Cell Physiol. 60(9):1917-1926 (2019)
5. Mito M, Kadota M, Nakagawa S, and Iwasaki S*.
tChIP-Seq: cell-type-specific epigenome profiling.
J Vis Exp. (143), e58298. (2019)
6. Iwasaki S*, Iwasaki W., Takahashi M., Sakamoto A., Watanabe C., Shichino Y., Floor SN., Fujiwara K., Mito M., Dodo K., Sodeoka M., Imataka H., Honma T., Fukuzawa K., Ito T.*, and Ingolia NT*. Translation inhibitor Rocaglamide targets a bimolecular cavity between eIF4A and polypurine RNA”, *Mol. Cell*, in press
7. Akichika S., Hirano S. (equal contribution), Shichino Y., Suzuki T., Nishimasu H., Ishitani R., Sugita A., Hirose Y., Iwasaki S., Nureki O., and Suzuki T. Cap-specific terminal N⁶-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science*. Epub Ahead of Print. (2018)
8. Komatsu T., Yokoi S., Mito M., Fujii K., Kimura Y., Iwasaki S., and Nakagawa S.* UPA-Seq: Prediction of functional lncRNAs using differential sensitivity to UV crosslinking *RNA*. 24: 1785-1802. (2018)
9. Kurihara Y., Makita Y., Kawashima M., Fujita T., Iwasaki S., and Matsui M.* Transcripts from downstream alternative transcription start sites evade uORF-mediated inhibition of gene expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(30):7831-7836 (2018)
10. Mito M., Kadota M., Tanaka K., Furuta Y., Abe K., Iwasaki S.*, and Nakagawa S.* Cell-type specific survey of epigenetic modifications by tandem chromatin immunoprecipitation sequencing. *Sci Rep.* 8:1143. (2018)

総説 :

1. Iwasaki S.* and Ingolia NT. The growing toolbox for protein synthesis studies. *Trends Biochem Sci.* 42(8):612-624 (2017)
2. Iwasaki S, Ingolia NT. PROTEIN TRANSLATION. Seeing translation. *Science*. 17, 352(6292), 1391-2. (2016)
3. 七野 悠一, 岩崎 信太郎 “リボソームプロファイリングが切り拓く翻訳研究の未来” *実験医学*, 35(11), 1868-1873 (2017).
4. 岩崎 信太郎 ncRNA 判定法 (リボソームプロファイリング) ノンコーディング RNA RNA 分子の全体像を俯瞰する *化学同人* (2016)

公募研究 (平成 29~30 年度)

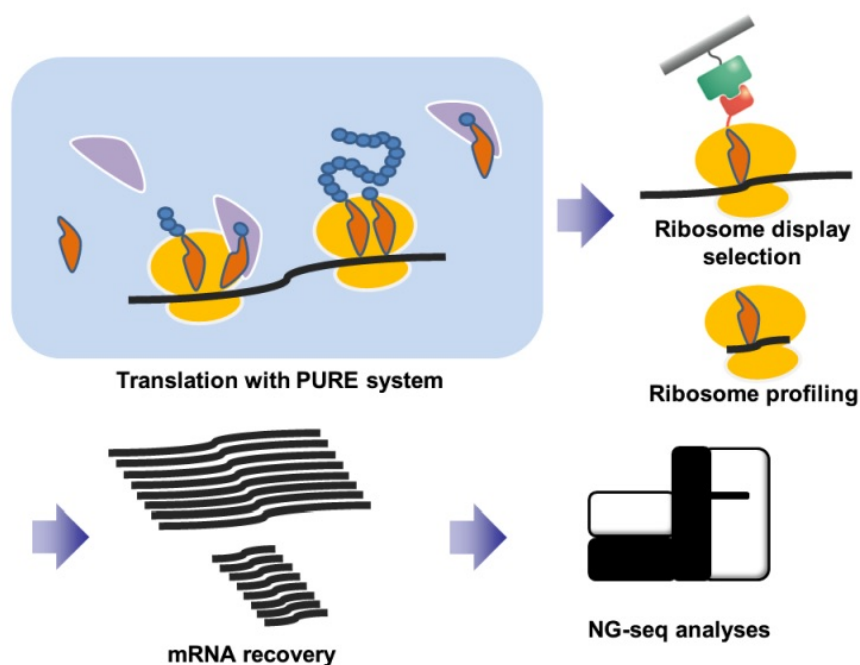
清水 義宏 理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー

研究課題名 : 翻訳鋳型核酸の部位特異的大規模解析によるセントラルドグマが持つ高次性の解明

研究成果の概要 :

細胞内外の多様な生命活動を支えるために、タンパク質は 20 種類もしくはそれ以上のアミノ酸で構成されるポリペプチド鎖からなる膨大な一次配列空間から適切な配列を選択し、多様な生体システムを形成している。こうした多様性を支えるためには、リボソームを中心としたタンパク質合成システムが多様な配列に対応できるような汎用性を備えていると考えられてきた。しかしながら、近年になって、こうしたタンパク質合成装置の高い汎用性に数多くの例外が存在すること、さらに、その例外が様々な生命活動において役割を担っていることが明らか

かにされており、核酸が持つ遺伝暗号がタンパク質のアミノ酸配列を規定しているという単純明快に見えたセントラルドグマで記述されるプロセスが、より複雑な階層構造を持ったシステムであることが示唆されている。本研究では、次世代シーケンサおよび再構成型無細胞タンパク質合成システムである PURE system を利用して、リボソームが mRNA の多様性に対して保持する一般性または特異性を包括的に解析し、セントラルドグマで記述されるプロセスにおける複雑な階層構造を定量的に記述することを目指した。これまでに、部位特異的にランダム化させた鋳型を用いた進化分子工学的アプローチによる選択系を用いて配列とタンパク質合成効率の関連の測定や、質量分析法を利用した 1000 種類強のペプチドの合成量を指標にした配列とペプチド合成量の関連を測定し、鋳型核酸配列とタンパク質合成効率の関係性を明らかにするいくつかのアプローチの構築に成功しており、データ解析によってタンパク質合成活性に高い影響を与える特徴的な配列の抽出を行うことが可能になった。



代表的な論文：

1. Hibi, K., Amikura, K., Sugiura, N., Masuda, K., Ohno, S., Yokogawa, T., Ueda, T., Shimizu, Y. (2020) Reconstituted cell-free protein synthesis using *in vitro* transcribed tRNAs. *Commun. Biol.* *In press*.
2. Nakamoto, K., Abe, N., Tsuji, G., Kimura, Y., Tomoike, F., Shimizu, Y., Abe, H. (2020) Chemically synthesized circular RNAs with phosphoramidate linkages enable rolling circle translation. *Chem. Commun.* **56**: 6217-6220.
3. Susaki, E. A., Shimizu, C., Kuno, A., Tainaka, K., Li, X., Nishi, K., Morishima, K., Ono, H., Ode, K. L., Saeki, Y., Miyamichi, K., Isa, K., Yokoyama, C., Kitaura, H., Ikemura, M., Ushiku, T., Shimizu, Y., Saito, T., Saido, T. C., Fukayama, M., Onoe, H., Touhara, K., Isa, T., Kakita, A., Shibayama, M., Ueda, H. R. (2020) Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. *Nat. Commun.* **11**: 1982.
4. Shimojo, M., Amikura, K., Masuda, K., Kanamori, T., Ueda, T., Shimizu, Y. (2020) *In vitro* reconstitution of functional small ribosomal subunit assembly for comprehensive analysis of ribosomal elements in *E. coli*. *Commun. Biol.* **3**: 142.
5. Demeiry, M. E., Ali, A., Abouleila, Y., Shimizu, Y., Masujima, T., Salam, R. A., Hadad, G., Emara, S. (2020) Quantification and targeted detection of ciprofloxacin in dosage form and human urine by direct injection nano-electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Microchem. J.* **153**: 104534.
6. Karimiavargania, M., Tada, S., Minagawa, N., Shimizu, Y., Hirose, T., Ito, Y., *Uzawa, T. (2019) Phosphorogenic and

spontaneous formation of tris(bipyridine)ruthenium in peptide scaffolds. *J. Pept. Sci.*, **25**: e3158.

7. Ali, A., Abouleila, Y., Shimizu, Y., Hiyama, E., Watanabe, T. M., Yanagida, T., *Germond, A. (2019) Single-cell screening of tamoxifen abundance and effect using mass spectrometry and Raman-spectroscopy. *Anal. Chem.*, **91**: 2710-2718.
8. Abouleila, Y., Onidani, K., Ali, A., Shoji, H., Kawai, T., Lim, C. T., Kumar, V., Okaya, S., Kato, K., Hiyama, E., Yanagida, T., Masujima, T., *Shimizu, Y., *Honda, K. (2018) Live single cell mass spectrometry reveals cancer-specific metabolic profiles of circulating tumor cells. *Cancer Sci.*, **110**: 697-706.
9. Matsumoto, A., Uehara, Y., Shimizu, Y., Ueda, T., Uchiumi, T., *Ito, K. (2018) High-resolution crystal structure of peptidyl-tRNA hydrolase from *Thermus thermophilus*. *Proteins*, **87**: 226-235.
10. Gessesse, B., Nagaike, T., Nagata, K., Shimizu, Y., *Ueda, T. (2018) G-Protein Coupled Receptor Protein Synthesis on a Lipid Bilayer Using a Reconstituted Cell-Free Protein Synthesis System. *Life (Basel)*, **8**:E54.
11. Tamaru, D., *Amikura, K., Shimizu, Y., Nierhaus, K. H., Ueda, T. (2018) Reconstitution of 30S ribosomal subunits in vitro using ribosome biogenesis factors. *RNA*, **24**:1512-1519.
12. Tainaka, K., Murakami, T. C., Susaki, E. A., Shimizu, C., Saito, R., Takahashi, K., Hayashi-Takagi, A., Sekiya, H., Arima, Y., Nojima, S., Ikemura, M., Ushiku, T., Shimizu, Y., Murakami, M., Tanaka, K. F., Iino, M., Kasai, H., Sasaoka, T., Kobayashi, K., Miyazono, K., Morii, E., Isa, T., Fukayama, M., Kakita, A., *Ueda, H. R. (2018) Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep.*, **24**:2196-2210.e9.
13. *Matsuura, T., Hosoda, K., Shimizu, Y. (2018) Robustness of a reconstituted *Escherichia coli* protein translation system analyzed by computational modeling. *ACS Synth. Biol.*, **7**:1964-1972.
14. Senoussi, A., Lee Tin Wah, J., Shimizu, Y., Robert, J., Jaramillo, A., Findeiss, S., Axmann, I. M., Estevez-Torres, A. (2018) Quantitative Characterization of Translational Riboregulators Using an in Vitro Transcription-Translation System. *ACS Synth. Biol.* **7**:1269-1278.
15. Murakami, T. C., Mano, T., Saikawa, S., Horiguchi, S. A., Shigeta, D., Baba, K., Sekiya, H., Shimizu, Y., Tanaka, K. F., Kiyonari, H., Iino, M., Mochizuki, H., Tainaka, K., Ueda, H. R. (2018) A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. *Nat. Neurosci.* **21**: 625-637.

総説 :

1. 清水義宏, 松浦友亮 (2019) タンパク質合成と数理モデル. *生物工学* **97**: 492-495.
2. 清水義宏, Yasmine Abouleila, Ahmed Ali, 鬼谷薫, 渡邊朋信, Arno Germond, 本田一文 (2019) 一細胞質量分析によるメタボローム解析. *Proteome Letters* **4**: 1-7.
3. Ali, A., Abouleila, Y., Shimizu, Y., Hiyama, E., Emar, S., *Mashaghi, A., *Hankemeier, T. (2019) Single-cell metabolomics by mass spectrometry: Advances, challenges, and future applications. *Trends Analyt. Chem.* **120**: 115436.
4. Narumi, R., Masuda, K., Tomonaga, T., Adachi, J., Ueda, H. R., and *Shimizu, Y. (2018) Cell-free synthesis of stable isotope-labeled internal standards for targeted quantitative proteomics. *Synth. Syst. Biotechnol.* **3**: 97-104.
5. 鳴海良平, 清水義宏, 上田泰己 (2017) 無細胞合成ペプチドを利用したタンパク質絶対定量. *Proteome Letters* **2**: 75-82.

公募研究 (平成 29~30 年度)

佐伯 泰 公益財団法人東京都医学総合研究所 蛋白質代謝研究室 室長

研究課題名 : 不良新生鎖に提示される分解シグナルの解明

研究成果の概要：

翻訳と協調したタンパク質品質管理に中心的な役割を果たしているのがリボソーム品質管理機構である。本公募研究では、リボソームからユビキチン化された不良新生鎖の引き抜きを実行するユビキチン選択的シャペロン Cdc48 (別称 p97、VCP) が識別するユビキチン修飾について詳細な解析を実施し。以下の成果を得た。

① Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体のユビキチン鎖タイプ選択性

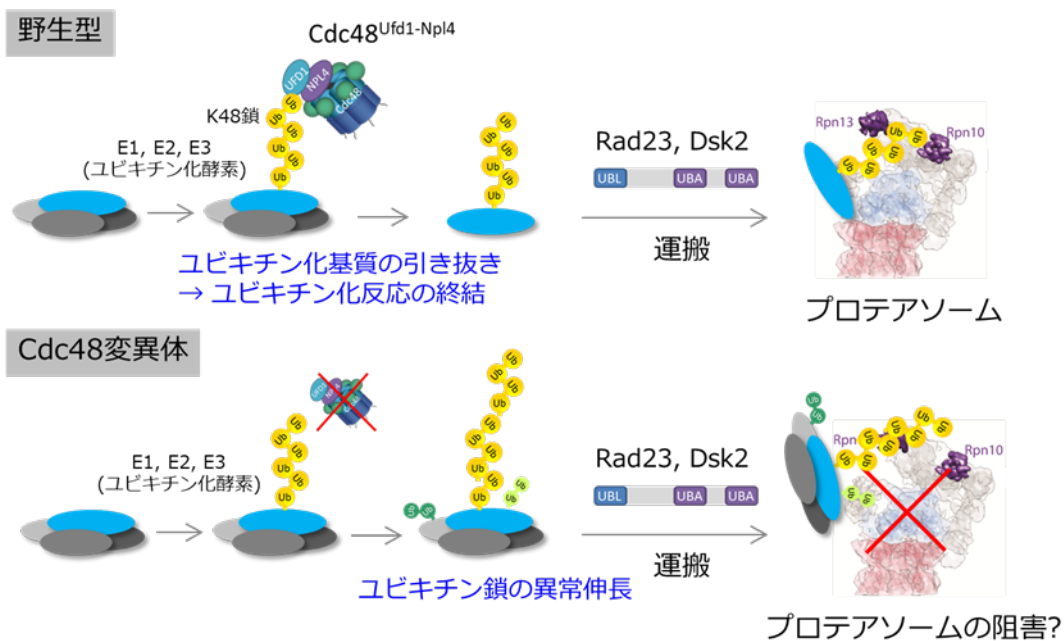
Cdc48 は複数のユビキチン結合コファクターをもち、プロテアソーム依存的なタンパク質分解だけではなく、エンドサイトーシスや DNA 複製、オートファジーなどを制御することが知られている。今回、細胞内におけるユビキチン結合コファクターのユビキチン鎖タイプ選択性について、高感度定量プロテオミクス解析法を用いて網羅的に解析したところ、Ufd1-Npl4、Shp1、Ufd3 のいずれも Lys48 結合ユビキチン鎖に高い選択性を示すことを明らかにした。さらに、ユビキチン化された不良新生鎖の識別を識別する Npl4 から新規の Lys48 鎖結合ドメインを同定することに成功した (原著論文 1)。

② Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体によるユビキチン鎖長制御

我々が開発したユビキチン鎖長解析法 (Ub-ProT 法) を用いて、Cdc48 および Cdc48 コファクター変異体中におけるユビキチン化基質のユビキチン鎖長を解析した。その結果、Cdc48 変異体 (*cdc48-3*) と Npl4 変異体 (*npl4-1*) において、ユビキチン化基質が高度に蓄積しており、基質上のユビキチン鎖長が大きく伸長していることが明らかとなった。よって、Cdc48-Ufd1-Npl4 複合体はユビキチン鎖長の制御分子であり、同複合体のユビキチン化基質の引き抜き活性がユビキチン化反応を終結させるというタイマーモデルを提唱した (原著論文 2)。

③ その他

計画班・稲田教授の研究グループと RQC 経路の新規分子の同定、不良新生鎖の質量分析解析を実施した (原著論文 2、4)。



Cdc48^{Ufd1-Npl4}はK48結合ユビキチン鎖を認識し、基質タンパク質を引き抜く

代表的な論文：

1. Tsuchiya, H., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Yasuda, S., Tanaka, K., and Saeki, Y. In vivo ubiquitin linkage-type analysis reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 axis contributes to K48-linked chain specificity of the proteasome. *Mol.*

Cell 66, 488-502 (2017)

2. Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., Ingolia, N.T., Beckmann, R., and Inada, T. Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nature Commun.* 8, 159 (2017)
3. Tsuchiya, H., Burana, D., Ohtake, F., Arai, N., Kaiho, A., Komada, M., Tanaka, K., and Saeki, Y. Ub-ProT reveals global length and composition of protein ubiquitylation in cells. *Nature Commun.* 9, 524 (2018)
4. Ikeuchi, K., Tesina, P., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Cheng, J., Saeki, Y., Tanaka, T., Becker, T., Beckmann, R., and Inada, T. Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *EMBO J.* in press
5. Sato Y, Tsuchiya H, Yamagata A, Okatsu K, Tanaka, K, *Saeki Y., *Fukai S. Structural insights into ubiquitin recognition and Ufd1 interaction of Npl4. *Nat. Commun.* 10, 5708 (2019)
6. Matsuo Y, Tesina P, Nakajima S, Mizuno M, Endo A, Buschauer R, Cheng J, Shounai O, Ikeuchi K, Iwasaki S, Saeki Y., Becker T, *Beckmann R., *Inada T. RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 323-332 (2020)
7. Yasuda S, Tsuchiya H, Kaiho A, Guo Q, Ikeuchi K, Endo A, Arai N, Ohtake F., Murata S., Inada T., Baumeister W, Fernandez-Busnadiego R, *Tanaka K., *Saeki Y. Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome. *Nature* 578, 296-300 (2020)

総説 :

1. Ohtake, F., Tsuchiya, H., Tanaka, K., and Saeki, Y. Methods to measure ubiquitin chain length and linkage. *Methods Enzymol.* In press
2. Yoshida, Y., Saeki, Y., Tsuchiya, H., and Tanaka, K. TR-TUBE system: Method for detecting ubiquitination activity and identifying ubiquitinated substrates. *Methods Enzymol.* In press
3. 佐伯 泰、土屋光、大竹史明、田中啓二: Update review 「UPS の未解決問題に挑む〜ついに明かされるプロテアソーム分解の制御機構」 実験医学、羊土社、35 巻 16 号 2756-2763、2017