分　子　機　能　制　御　学　部　門

Department of Molecular and Structural Biology

エピゲノム制御学分野

Division of Epigenomics and Development

教　授：佐々木　裕之
Professor：Hiroyuki Sasaki, M.D., Ph.D.

平成30年度は，主幹教授・佐々木裕之，助教・鵜木元香，石内崇士，特任講師・藤英博の体制で研究・教育を行った．佐々木は副学長（研究担当），高等研究院長，エピゲノミクス分野教授を，また藤はエピゲノミクス分野特任講師を兼務した．これらの教員に加え，博士課程学生10名（うち国費留学生1名），学術研究員1名，テクニカルスタッフ2名，技術補佐員1名，事務補佐員3名の計20名が研究・教育活動の実施や支援を行った．

当分野は生命機能の恒常性維持や生体防御に重要なエピジェネティクス及びエピゲノムの制御機構の解明を中心研究テーマに据え，とくに生殖細胞におけるゲノムインプリンティングや発生・分化能のリプログラミング，X染色体不活性化の機構，エピジェネティクスによるゲノム安定性維持機構，エピゲノムと種間多様性などについて精力的に研究している．

平成30年度は佐々木が科学研究費補助金の特別推進研究に採択され，九州大学で初となる上原記念生命科学財団の上原賞（研究業績褒賞）を受賞した．また，鵜木，石内はそれぞれ基盤研究（C），若手研究を獲得して研究を行なった．さらに，得られた競争的資金を利用して最新鋭の次世代DNAシーケンサーを研究所に設置した．

Ａ．生殖細胞系列の分化とゲノム刷り込みの制御機構

正常な配偶子の形成にはDNAメチル化を含むエピゲノムの制御が重要であり，その制御機構の解明は不妊や流産の克服に役立つ．我々は，京大・斎藤通紀らとの共同研究により，培養下でヒト多能性幹細胞から卵原細胞を誘導・分化させることに成功した（Science 2018）．この卵原細胞では期待通りにインプリントの消去などのエピゲノムリプログラミングが生じており，生体の卵原細胞に近いエピゲノム状態が形成されていることを確認した．また，シンシナチ小児病院の行川賢らとの共同研究により，精原細胞では生殖細胞特異的なポリコム蛋白質SCML2がヒストンH3K27me3修飾に関わること，このタンパク質はH3K4me2/3に富む領域に結合して，これら抑制型と活性型の修飾が共存する二価のクロマチンを形成することを明らかにした（Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018）．この二価のクロマチンをもつゲノム領域には，発生関連遺伝子や体細胞特異的な遺伝子群が存在しており，受精後に重要な機能を果たすことが推察された．さらに，ヒストンH3K9me2修飾を導入する酵素Ehmt2/G9aを卵子形成過程においてノックアウトし，この抑制型のヒストン修飾が卵子や初期胚で果たす役割を調べた．

その結果，体細胞とは異なり，卵子において H3K9me2 は DNA メチル化や遺伝子発現の制御には関与せず，むしろヘテロクロマチン形成や染色体分配に寄与することで，受精後の胚発生に貢献していることを見つけた（Cell Rep. 印刷中）．ゲノム刷り込みの生理的意義について，2016 年にイタリアの Erice で EMBO の国際会議が開催され，佐々木も招待講演を行なったが，その参加者が共同でゲノム刷り込みの生理的意義に関する総説を執筆した（Cell 2019）．今後の研究の方向性を考える上で重要な指標になると思われる．

Ｂ．Ｘ染色体の不活性制御機構の解析

ヒトを含む哺乳類の雌は 2 本の X 染色体のうちの片方を不活性化することで，同染色体を 1 本しか有しない雄との間の遺伝子量の不均衡を是正する．近大・佐渡敬らとの共同研究により，X 染色体不活性化において重要な働きをすると考えられている SmcHD1 蛋白質の作用について解析を行った．その結果，SmcHD1 を欠損した雌マウス胚由来の線維芽細胞では，不活性 X 染色体に特徴的なヒストン修飾 H3K27me3 の分布に異常があり，そのような領域に存在する遺伝子の多くが再活性化していた．すなわち，SmcHD1 は不活性化過程の初期に正常なヒストン修飾パターンを確立するために必須の働きをし，その異常がのちに再活性化の原因となることが示された（Development 2018）．

Ｃ．ＥＳ細胞における配列依存性の単一アレル遺伝子発現の解析

哺乳類の様々な細胞において単一アレル遺伝子発現が報告されているが，その意義や制御機構については不明な点が多い．我々はマウスのナイーブ胚性幹細胞において単一アレル発現を示す遺伝子の網羅的な解析を行ない，インプリント遺伝子を除く全ての単一アレル発現遺伝子が DNA 配列に依存的した発現の違いによることを示した．これらの遺伝子は塩基多型やレトロトランスポゾン挿入多型に富み，アレル間で H3K27me3 の違いが見られたが，DNA メチル化には差がなかった．また細胞が分化するとほとんどの遺伝子が両アレル発現に転じた（投稿中）．野生個体群では発生ステージや組織により，様々な遺伝子が単一アレル発現を示すことが示唆された．

Ｄ．エピジェネティクス異常に基づくヒト疾患の解明

ICF 症候群は免疫不全，セントロメア不安定性，顔貌異常を主徴とする劣性遺伝病で，DNA メチル化酵素 DNMT3B（1 型 ICF 症候群），転写制御因子 ZBTB24（2 型），核内蛋白質 CDCA7（3 型），クロマチン再構成因子 HELLS/LSH（4 型）の遺伝子変異で生じる．しかし，その分子病態や発症機構の詳細は未だ不明である．今回我々は，1 型～4 型 ICF で共通に見られる表現型として，DNA 二重鎖切断の修復機構の異常を見出した（J. Clin. Invest. 2019）．診断や治療法の開発に役立つと考えられる重要な発見である．

さらに，2 型 ICF の原因蛋白質である ZBTB24 の各蛋白質ドメインが，細胞内局在や遺伝子発現に果たす役割を明らかにした（投稿準備中）．また，防衛医大の釜江智佳子らと共に国内の ICF 症候群患者の臨床像をまとめて国際誌に報告した（J. Clin. Immunol. 2018）． 一方，小細胞肺がんの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤治療中に生じるゲノム変化を次世代シーケンサーにより網羅的に同定し，薬剤抵抗性を生じると推測される変異とその作用機序について知見を得た（Anticancer Res. 2019）．さらに，母体糖尿病モデルマウスから生まれた仔において，低出生体重・耐糖能の低下などの表現型を見出した．仔の膵臓や肝臓に着目して遺伝子発現解析を実施したところ，肝臓の糖新生関連遺伝子群を誘導するシグナル伝達系が活性化していることを見出した（投稿中）．糖尿病リスクグループの同定や早期介入に貢献する可能性のある成果である．

Ｅ．哺乳類のミトコンドリア DNA のメチル化

哺乳類のミトコンドリア DNA にシトシンメチル化が存在するか否かは長い間論争の的であった．今回，医学研究院の安川武宏・康東天らとの共同研究により，種々の方法を組み合わせた複数の方法で厳密な解析を行い，マウス・ヒトのミトコンドリア DNA に生理的なシトシンメチル化は存在しない（検出限界以下）という明確な結論を得た（Sci. Rep. 2018）．これにより長年の論争に決着をつけた．

Ｆ．胎盤発生制御因子の同定と解析

哺乳類における胎盤の発生・形成は，次世代の生命の誕生に必須の事象である．しかしながら，この重要な器官の発生・分化を支える分子基盤はあまり分かっていない．そこで，マウスにおける遺伝学的スクリーニングにより胎盤の発生を制御する新規因子を探索したところ，Zfp281 を候補として同定した．詳細な解析の結果，Zfp281 は胎盤の幹細胞集団で高発現し，標的遺伝子近傍に結合し，それらの発現を活性化することで，胎盤の発生に重要な機能を果たすことが明らかになった（投稿中）．胎盤・妊娠・胎児の発生の研究に大きなインパクトを与える成果である．

業績目録

原著論文

1. Matsuda, S., Yasukawa, T., Sakaguchi, Y., Ichiyanagi, K., Unoki, M., Gotoh, K., Fukuda, K., Sasaki, H., Suzuki, T. & Kang, D. 2018.
   Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA.
   Sci. Rep. 8, 5801.
2. Maezawa, S., Hasegawa, K., Yukawa, M., Kubo, N., Sakasita, A., Alabattam, K.G., Sin, H.-S.,

Kartashov, A.V., Sasaki, H., Barski, A. & Namekawa, S.H. 2018.
Polycomb protein SCML2 facilitates H3K27me3 to establish bivalent domains in the male germline.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 115, 4957-4962.

3. Sakakibara, Y., Nagao, K., Blewitt, M., Sasaki, H., Obuse, C. & Sado, T. 2018.
Role of SmcHD1 in establishment of epigenetic states required for the maintenance of the X-inactivated state in mice.
Development 145, dev166462.

4. Yamashiro, C., Sasaki, K., Yabuta, Y., Kojima, Y., Nakamura, T., Okamoto, I., Yokobayashi, S., Murase, Y., Ishikura, I., Shirane, K., Sasaki, H., Yamamoto, T. & Saitou, M. 2018.
Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro.
Science 362, 356-360.

5. Kamae, C., Imai, K., Kato, T., Okano, T., Honma, K., Nakagawa, N., Yeh, T.-W., Noguchi, E., Ohara, A., Shigemura, T., Takahashi, H., Takakura, S., Hayashi, M., Honma, A., Watanabe, S., Shigemori, T., Ohara, O., Sasaki, H., Kubota, T., Morio, T., Kanegae, H. & Nonoyama, S. 2018.
Clinical and immunological characterization of ICF syndrome in Japan.
J. Clin. Immunol. 38, 927-937.

6. Unoki, M., Funabiki, H., Velasco, G., Francastel, C. & Sasaki, H. 2019.
CDCA7 and HELLS mutations undermine non-homologous end joining in centromeric instability syndrome.
J. Clin. Invest. 129, 78-92.

7. Kubo, N., Harada, T., Shiraishi, Y., Nosaki, K., Nakagaki, N., Takeshita, M., Ouchi, H., Iwama, E., Tanaka, K., Okamoto, I., Sasaki, H. & Nakanishi, Y. 2019.
Identification of genomic alterations acquired during treatment with EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer.
Anticancer Res. 39, 671-677.

8. Au Yueng, W.K., Brind'Amour, J., Hatano, Y., Yamagata, K., Feil, R., Lorincz, M.C., Tachibana, M., Shinkai, Y. & Sasaki, H.
Histone H3K9 methyltransferase G9a in oocytes is essential for preimplantation development but dispensable for CG methylation protection.
Cell Rep. (in press).

総説

1. 藤英博, 佐々木裕之. 2018.
エピジェネティクスと国際ヒトエピゲノムコンソーシアム.
医学のあゆみ　266, 475-478.

2. 阿部周策，佐々木裕之．2018.
エピジェネティクスと蛋白質生合成の制御.
医学のあゆみ 267, 893-897.
3. Tucci, V., Isles, A., Kelsey, G., Ferguson-Smith, A.C. & The Erice Imprinting Group. 2019.
Genomic imprinting and physiological processes in mammals.
Cell 176, 952-965.

学会発表（口頭発表）

1. Sasaki, H. (2018, 4/18). 招待講演
Role of UHRF1 in de novo DNA methylation in oocytes and maintenance methylation in preimplantation embryos
Cold Spring Harbor Asia Conference: Chromatine, Epigenetics & Transcription, 2018, Shanghai.
2. 鵜木元香 (2018, 5/10). 招待講演
ICF 症候群の分子基盤～DNA 修復とエピジェネティック制御はつながるか？～
発生研セミナー, 熊本.
3. 鵜木元香, 佐々木裕之 (2018, 5/24 - 5/25).
ICF 症候群の分子基盤：CDCA7 は HELLS と結合し非相同末端結合型 DNA 修復を促進する
第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会, 北海道.
4. 佐々木裕之 (2018, 6/30). 招待講演
エピジェネティクスと細胞記憶と疾患
平成 30 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡.
5. 鵜木元香 (2018, 9/4 - 9/5). 招待講演
ICF 症候群の分子基盤：CDCA7 は HELLS と結合し非相同末端結合型 DNA 修復を促進する
第２回エピジェネティック因子の構造と機能をつなぐ会, 福岡.
6. 上村修平 (2018, 9/4 - 9/5). 招待講演
エピジェネティック制御因子 Uhrf1 の卵母細胞及び着床前胚の細胞質における機能解析
第２回エピジェネティック因子の構造と機能をつなぐ会, 福岡.
7. 佐々木裕之 (2018, 9/6). 招待講演
エピジェネティクスと細胞記憶と疾患
第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡.
8. Sasaki, H. (2018, 9/11 - 9/15). 招待講演
Distinct roles of epigenetic regulators in mouse oocytes and somatic sells
Cold Spring Harbor Meeting: Epigenetics & Chromatine, New York.
9. 鵜木元香, 佐々木裕之 (2018, 10/10 - 10/13).

ICF syndrome proteins CDCA7 and HELLS promote non-homologous end joining
日本人類遺伝学会第 63 回大会, 横浜.

10. Au Yeung, W.K., Brind'Amour, J., Hatano, Y., Yamagata, K., Feil, R., Lorincz, M.C., Tachibana, M., Shinkai, Y., Sasaki, H. (2018, 10/27).
Histone H3K9 methyltransferase G9a in oocyte is essential for preimplantation development but dispensable for CG methylation protection
International Human Epigenome Consortium Annual Meeting 2018, Hong Kong.

11. 佐々木裕之 (2019, 3/11). 上原賞受賞者記念講演
エピジェネティクスと細胞記憶と疾患
上原記念生命科学財団平成 30 年度贈呈式, 東京.

12. Motoko Unoki (2019, 3/18). 招待講演
CDCA7 and HELLS mutations undermine non-homologous end joining in centromeric instability syndrome
第 2 回九州大学女性研究者ダイバーシティー推進シンポジウム, 2019, 福岡.

免疫ゲノム生物学分野

Division of Immunology and Genome Biology

教　授：馬場　義裕

Professor：Yoshihiro Baba, Ph. D.

免疫は感染症やがんから身を守る生体防御システムとして重要であることは広く知られている．一方で，免疫が自身を攻撃したり，過剰に反応したりすることで，自己免疫疾患やアレルギー，炎症の発症や増悪化にも深く関わる．しかし，この多様な免疫制御の仕組みや分子基盤は不明な点が多く，解決すべき課題が山積している．免疫ゲノム生物学分野では，液性免疫の要である B 細胞に中心に，ゲノム・分子・細胞・個体レベルで免疫細胞の分化および機能を明らかにし，難治疾患の発症原因や病態の理解に取り組んでいる．

平成 30 年度は，馬場義裕（教授），保田朋波流（准教授），田中伸弥（助教）に加えて，テクニカルスタッフ 2 名，技術補佐員 1 名，博士課程大学院生 4 名，修士課程大学院生 2 名の計 12 名により，研究および教育活動を行なった.また，馬場は発生工学実験室長を兼任し，技術専門職員 1 名，技術補佐員 4 名，技能補佐員 17 名で動物飼育管理および遺伝子組換えマウス作製業務サービスを進めている．

平成 30 年度は革新的先端研究開発支援事業（AMED-PRIME），AMED 難病研究課免疫アレルギー疾患等実用化研究事業，科研費などの補助金による支援を受けた．

A．B 細胞分化機序の解明

B 細胞はプラズマ細胞へと最終分化し，抗体を分泌することにより感染防御の役目を果たす．そこに至るまでに，B 細胞は胚中心 B 細胞となって抗体の親和性亢進やクオリティーを変化させる．また，B 細胞は記憶 B 細胞へと分化し，免疫記憶の役割を担う．一方，B 細胞は自分自身を攻撃する抗体（自己抗体）を産生することもあり，自己免疫疾患の増悪因子にもなる．このように，適切な B 細胞分化が生体防御において重要であり，その仕組みを明らかにすることは疾患制御や医学応用への発展に貢献すると考えられる．私たちは，B 細胞の分化を支える細胞内因子（遺伝子発現，シグナル伝達，エピジェネティクス制御，BCR レパトア）や環境因子（場所，時間，老化，細胞間相互作用）を明らかにすることで，正常と異常な B 細胞分化を理解することを目指している．

今年度は，　胚中心 B 細胞の分化機序を明らかにすることを試みた．胚中心は抗体，B 細胞レセプター（B cell receptor: BCR）の親和性を上昇させる場である．リンパ組織の胚中心では，B 細胞が抗原刺激を受けて活性化し，抗体の親和性を高めていくことから，胚中心の形成は抗体が効率良く病原体を排除するために必須のプロセスで

ある．胚中心B細胞が活性化されるには，まず， BCRを介して濾胞性樹状細胞上に存在する抗原を認識し，BCRシグナルを受ける必要があるが，その意義は不明であった．われわれは，Ca^{2+}レポーターマウスと抗原特異的BCRを有するトランスジェニックマウスを利用し，2光子顕微鏡を用いて，胚中心B細胞の *in vivo* イメージングを行うことにより，胚中心B細胞が濾胞性樹状細胞と相互作用する時に，細胞内Ca^{2+}濃度が上昇することを見出した（未発表）．我々は，これまでに，小胞体Ca^{2+}センサーであるSTIM1とSTIM2を欠損させるとBCR依存的Ca^{2+}流入のみを阻害することができることを報告している（*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2008; *Immunity,* 2011）ことから，B細胞特異的STIM1/2二重欠損マウスを利用することで，胚中心B細胞形成におけるCa^{2+}流入の重要性を検証したところ，Ca^{2+}シグナルの消失が胚中心B細胞を減少させることを突き止めた（未発表）．現在，これら現象を支える分子機序の解明に取り組んでいる．

B．免疫応答を抑制するB細胞の全容解明

B細胞は自己免疫疾患，炎症，アレルギーの原因となったり病態を悪化させたりすることが知られているが，それとは逆に，免疫反応を抑制するB細胞として“制御性B細胞”の存在が明らかにされ注目されている．特に，抗炎症性サイトカインIL-10を産生する制御性B細胞は，さまざまな疾患モデルマウスを用いた研究から，炎症や自己免疫疾患，さらには，感染免疫や腫瘍免疫などに対する抑制能がつぎつぎと示され，その制御の対象は多様であることが示されている．さらに，IL-10以外の機序により免疫を抑制する制御性B細胞の存在も示唆されており，この研究領域は発展しつつある．私たちの研究室では，これまでに，生体内におけるIL-10産生制御性B細胞として$CD138^{+}CD44^{hi}$プラズマブラストを同定し，多発性硬化症のマウスモデルである自己免疫性脳脊髄炎に対する抑制作用を示した（*Immunity*, 2014）．さらに，プラズマブラストのIL-10産生には，TLRおよびBCR刺激で活性化されるIRF4やNFATが必要であることを明らかにした．現在，IL-10産生プラズマブラスト特異的な遺伝子発現や分化の分子機序の解明を目指して研究を進めている．同時に，IL-10以外の新規抑制作用を持ったB細胞の同定を試みており，今年度は，そのひとつの候補遺伝子のB細胞特異的ノックアウトマウスを樹立し，機能解析を進めている．

C．カルシウムシグナルと免疫応答

B細胞が抗原と出会い，活性化・分化するためには，BCRによる抗原認識が必須となり，その情報はシグナル伝達として細胞内に伝わる．私たちは，このBCRシグナル伝達の分子メカニズムやその生理的な意義について研究を進めている．これまでに，STIM1に結合するタンパク質を複数同定しているが，そのなかのひとつの新規分子（こ

こでは，STBP1 ：STIM1 binding protein1 と呼ぶ）の機能解析を行った．STBP1 を欠損させた B 細胞株を樹立・解析したところ，STBP1 が欠失すると B 細胞が致死となることが判明した．生体での役割を検証するため，コンディショナルマウスを作製し，現在，解析を進めている．

D．ヒト B 細胞免疫学の研究

B 細胞の分化や性状はマウスとヒトで異なることが多いため，ヒト B 細胞研究は重要だと考えている．特に，ヒト制御性 B 細胞の実体や病態への関与については未解決な課題が多い．われわれは，この疑問にも取り組んでおり，ヒトプラズマブラストが IL-10 を産生することを見出している（*Immunity*, 2014）．そこで，将来の医学応用を視野に入れ，*in vitro* でヒト IL-10 産生制御性 B 細胞を選択的かつ効率よく培養する方法の樹立を試みている．また，ヒトにしかみられない B 細胞型をマウスで再構築する試みにも取り組んでいる．

E．発生工学技術支援

総合研究棟 9F と生医研別館 3F の動物飼育室の運営を担当しており，SPF 動物の飼育，健康管理を行なっている.凍結精子および凍結受精卵の作製や CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いたノックアウトマウス作製に加えて，昨年度から始めた Cas9 タンパク質および gRNA をエレクトロポレーションによって受精卵に導入する方法の支援業務も軌道に乗った.

業績目録

原著論文

1. Nakai A, Fujimoto J, Haruhiko M, Stumm R, Narazaki M, Schulz S, Baba Y, Kumanogoh A, Suzuki K. 2019.
   The COMMD3/8 complex is a determinant of GRK6 specificity for chemoattractant receptors.
   J. Exp. Med. in press.
2. Kondo Y, Higa S, Iwasaki T, Matsumoto T, Maehara K, Harada A, Baba Y, Fujita M, Ohkawa Y. 2018.
   Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images.
   PLoS One. 13, e0191532.
3. Tanaka S, Jiang Y, Martinez GJ, Tanaka K, Yan X, Kurosaki T, Kaartinen V, Feng XH, Tian Q, Wang X, Dong C. 2018.

Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells.
J Exp Med. 215(7):1853-1868.

4. Tanaka K, Martinez GJ, Yan X, Long W, Ichiyama K, Chi X, Kim BS, Reynolds JM, Chung Y, Tanaka S, Liao L, Nakanishi Y, Yoshimura A, Zheng P, Wang X, Tian Q, Xu J, O'Malley BW, Dong C. 2018.
Regulation of Pathogenic T Helper 17 Cell Differentiation by Steroid Receptor Coactivator-3.
Cell Rep. 23(8):2318-2329.
5. Imami K, Milek M, Bogdanow B, Yasuda T, Kastelic N, Zauber H, Ishihama Y, Landthaler M, Selbach M. 2018.
Phosphorylation of the ribosomal protein RPL12/uL11 affects translation during Mitosis.
Mol. Cell, 72, 84-98.

著書

1. 川上亮，馬場義裕．2018.
制御性 B 細胞と疾患.
炎症と免疫（先端医薬社），vol.26 No. 5，pp86-91.
2. 齋藤雄一，馬場義裕．(in press)
アレルギーを制御する B 細胞.
アレルギー.

学会発表

1. Yoshihiro Baba (2018, 12/10).
Regulation of humoral immune response
The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Fukuoka.
2. Shinya Tanaka, Wataru Ise, Takeshi Inoue, Yoshihiro Baba, Masato Kubo, Haruhiko Koseki, Jafar Sharif, Tomohiro Kurosaki (2018, 12/10).
Tet2 and Tet3 regulate B cell tolerance
The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Fukuoka.
3. Shinya Tanaka (2018, 10/18).
B cell-mediated inflammation by epigenetic regulators
Fall international convention of the pharmaceutical society of Korea, South Korea.
4. Yasuda T, Baba Y, and Rajewsky K. (2018, 10/18).
Active B cell division on plasma cell niche is required for lymphoma development.

The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences joint with the 3rd Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine and the 28th Hot Spring Harbor Symposium.

5. 馬場義裕 (2018, 11/12).
第 50 回日本小児感染症学会，福岡.

6. 馬場義裕 (2018, 7/21).
B 細胞による炎症制御機構
第 9 回 中国免疫不全症研究会，広島.

構造生物学分野

Division of Structural Biology

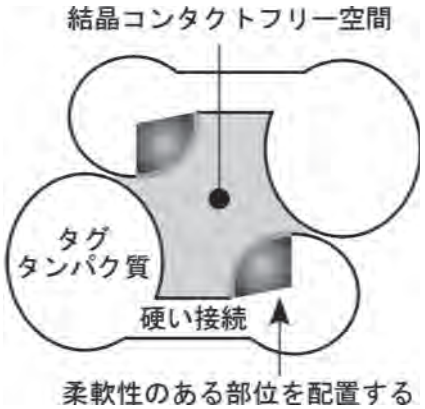
教　授：神田　大輔

Professor : Daisuke Kohda, Ph.D.

タンパク質の立体構造を決定し，他の分子との相互作用を詳細に解析することで，分子認識の問題や酵素活性発現メカニズムを構造生物学の手法を駆使して明らかにする．ターゲット選択にあたっては，単に生物学的機能の重要性だけでなく，分子機能が構造生物学的に興味ある論点を含んでいるかどうかを重視する．生物現象として，細胞内のタンパク質の行き先を指定する仕組み，タンパク質の糖鎖修飾，エンドサイトーシス，ＤＮＡ複製，修復，組み換えなど対象は多岐にわたっている．研究手法として，Ｘ線結晶解析，核磁気共鳴解析，電子顕微鏡（主に単粒子解析）を用いることで，タンパク質の分子認識の構造的基盤の解明を目指している．特に，相互作用が弱くかつ特異性が広いケースに興味があり，これを「ゆるい分子認識（promiscuous recognition)」と呼び，集約的な研究を進めている．

Ａ．結晶コンタクト効果フリー空間を利用するタンパク質結晶構造解析技術の開発

結晶コンタクト効果フリーな“隙間”を結晶格子中につくり,「結晶コンタクトによる柔動構造の変形・固定問題」の解決を目指している（図 A.1)．２つの技術要素は，①タグタンパク質との融合タンパク質の作製，②タグタンパク質と対象タンパク質を一本の長いヘリックスを用いて硬く接続，である．結晶コンタクトフリー空間の利用の一つとして，結晶コンタクトによるタンパク質構造の変形を除くことがある．結晶構造と溶液 NMR 構造の両方が決定されていて，一部のループのコンホメーションが異なる例として酵母の Tim21 タンパク質を選択した．結晶構造のループ構造を見ると結晶コンタクトによって変形していることが推察される，一方，NMR のループ構造は収束が悪い多数のコンホメーションの集団となっている．そこで，MBP と Tim21 の融合タンパク質を作成し，結晶化と構造決定を行った．接続に使ったαヘリックスの長さを複数



図A.1　対象タンパク質をタグタンパク質に硬い接続を用いて融合させることで，２つのタンパク質の間に隙間空間を創り，そこに対象タンパク質の一部分を意図的に配置する．

用意して結晶化を行い，3 つの結晶構造を得ることができた．結晶コンタクト効果フリーな“隙間”（以下，crystal contact-free space，CCFS と呼ぶ）がデザイン通り出来ていることを評価するために，当該ループの温度因子を比較した．その結果，３つの結晶構造のうち一つでほぼ完全な CCFS が出来ていることがわかった．この CCFS 中のループの構造（大きな温度因子を持つので，薄い電子密度に無理矢理置いたモデル構造）を，通常の結晶構造と NMR 溶液構造と比較した．その結果，どちらとも異なることが判明した．したがって，CCFS 中のループのモデル構造が真の溶液構造（のアンサンブル平均）と見なして良いかどうかの判断ができない事態となった．そこで，NMR 構造を新規に決定し直すこと（自動帰属プログラムを使用する．横浜国立大学・児嶋教授との共同研究）と，分子シミュレーション計算による溶液構造の推定（理研・宮下博士との共同研究）を進めている．

Ｂ．オリゴ糖転移酵素の構造生物学

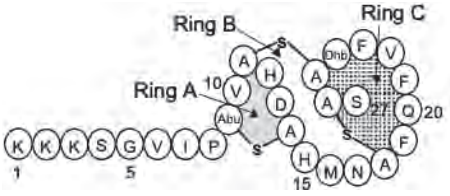
タンパク質のアスパラギン残基への糖鎖付加（Ｎ型糖鎖付加）は翻訳後修飾の代表である．コンセンサス配列 Asn-X-Thr/Ser 中の Asn 残基への糖鎖の転移反応はオリゴ糖転移酵素と呼ばれる膜タンパク質酵素が触媒している．Ｎ型糖鎖修飾は真核生物だけでなく，古細菌にも広く存在する．また，真正細菌の一部にも存在する．オリゴ糖転移酵素の触媒サブユニットは STT3/AglB/PglB（真核/古細菌/真正細菌）と呼ばれる膜タンパク質酵素である．古細菌のオリゴ糖転移酵素は触媒サブユニット AglB のみからなるシングルポリペプチド酵素であり，大腸菌の膜フラクションに活性のある形で発現することができるため構造生物学研究に適している．

AglB の基質は２つあり，コンセンサス配列を含むアミノ酸配列と脂質結合型糖鎖（Lipid-Linked Oligosaccharide，LLO）である．酵素活性発現メカニズムや基質認識メカニズムを明らかにするには，基質あるいは基質アナログとの複合体の結晶解析が有効である．今年度は天然の糖鎖供与体の大量調製を進めた．古細菌を大量培養して，有機溶媒抽出（クロロホルム・メタノール・水の混合溶媒）を用いて抽出する．培養と精製を繰り返して，結晶化に必要なスケールの精製品を調製した．システインを導入した酵素蛋白質（G671C 置換体）に基質ペプチド（C 末端にシステインを含む，N 末端に蛍光色素が結合している）を，ジスルフィド結合を介してテザリングした．一方，糖鎖供与体はモノオレインとあらかじめ混合した．両者を混合して LCP（Lipidic Cubic Phase）法で結晶化スクリーニングをおこない，複数の条件で微結晶を得た．微結晶に蛍光ペプチド基質に由来する色がついていることから，タンパク質の結晶であることが確認できた．また，SPring8 の BL44XU および BL32XU で回折測定を行い，多数の微結晶回折データをマージしたデータセットを得た．通常のペプチドを用いた場合は酵素反応が進行して糖ペプチドが生成し，（糖）ペプチドの電子密度が見えなくなってい

たので，アスパラギン残基をジアミノ酪酸に置換した基質ペプチドアナログを用いた．最終的に分解能 2.6Å の構造解析ができ，基質ペプチドと糖鎖供与体の一部の電子密度を確認できた．現在，精密化を進めている．二価金属イオンに配位した 3 個の水分子がはっきり確認できるので，触媒機構について以前より進んだ議論ができると期待している．

C．ランチオニンペプチドの NMR 解析

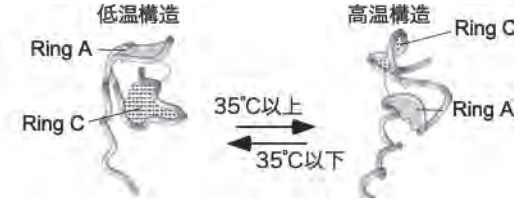
ヒト表皮常在グラム陽性菌 *Staphylococcus warneri* が産生するペプチド Nukacin は Lipid II と相互作用して抗菌活性を発揮する．Nukacin は 27 残基よりなる抗菌ランチペプチドのひとつである．ランチペプチドは配列内に翻訳後修飾により生じた不飽和アミノ酸とモノスルフィド結合を有する（図 C.1）．これまでに Nukacin の ^{13}C, ^{15}N 安定同位体標識は大腸菌を宿主とした組換えタンパク質発現系で ^{13}C-グルコースと ^{15}N-塩化アンモニウムを添加した最小培地を用いて行っていたが，収量とモノスルフィド結合の導入効率が低いことが問題であった．



図C.1 Nukacinの一次構造

そこで，発現系を Nukacin 産生菌である *S. warneri* にすることと，^{13}C, ^{15}N 標識クロレラ抽出物を含む CHL 培地を培養に用いることで ^{13}C, ^{15}N 標識 Nukacin の大量調製を可能とした．

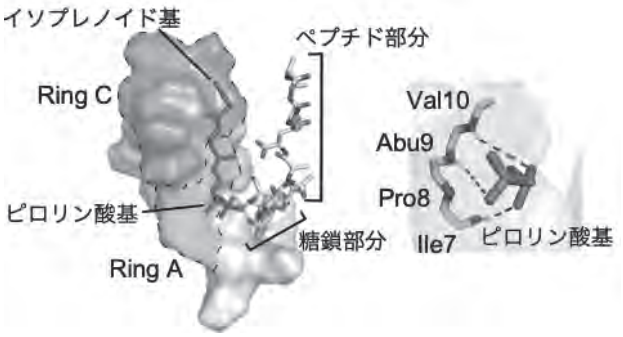
溶液 NMR スペクトルから Nukacin は溶液中で二種類の状態の平衡にあることがわかった．それぞれの構造は 35℃以上で誘起される「高温構造」と 35℃以下で誘起される「低温構造」である（図 C.2）．NMR 測定温度を 10℃と 50℃に設定することで，高温構造と低温構造の構造決定を独立に行った．Nukacin 中の３つのモノスルフィド結合で囲まれた領域（モノスルフィド環）を Ring A～Ring C と呼ぶ（図 C.1）．高温構造と低温構造ではモノスルフィド環のトポロジーが異なっていた．高温構造では Ring A の下に Ring C が位置するのに対し，低温構造では Ring A の上に Ring C が位置する（図 C.2）．



図C.2 Nukacinの立体構造

次に Nukacin と Lipid II との相互作用解析を化学シフト摂動法により行い，相互作用に関わる領域をアミノ酸残基レベルで明らかにした．高温構造において Ring A のアミノ酸残基（Ile7, Abu9, Val10）が Lipid II のピロリン酸基と，Ring C の疎水性アミノ酸残基（Phe21, Val22, Phe23）が Lipid II のイソプレノイド基と相互作用していることが判明した．高温構造の Lipid II に対する解離定数は 1.4μM であった．一

方，低温構造はLipid IIに対して全く結合を示さなかった．得られた相互作用情報を拘束条件に構造計算ソフト HADDOCK を用いて，高温構造-Lipid II 複合体の構造を計算した（図 C.3）．構造中で Ring A のペプチド主鎖は Pro8 により折れ曲がった構造を取っており，主鎖アミド基が溶媒面に露出していた．これらの主鎖アミド基はLipid IIのピロリン酸基との間に水素結合を形成している．またRing Cにある疎水性アミノ酸側鎖は溶媒面に露出しており，イソプレノイド基との疎水性相互作用に関与していた．Nukacin の Lipid II への相互作用様式は現在までに報告例がない新規なものであった（原著論文6，九州大学農学研究院・園元教授との共同研究）．



図C.3 Nukacinの高温構造とLipid II複合体のHADDOCKモデル

D．エンドサイトーシスに関与するタンパク質群の構造機能解析

エンドサイトーシスは真核生物が外部から物質を細胞内に取り込む仕組みであり，クラスリンと呼ばれるタンパク質に依存するクラスリン依存性エンドサイトーシスや細菌等のより大きな基質を取り込む機構である食作用 （ファゴサイトーシス）を含む．これまでに食作用に関与するタンパク質である GAS7 の結晶構造を決定し，GAS7 の膜変形モジュールである F-BAR ドメインが他のタンパク質の F-BAR ドメインにはない特徴的な挿入構造を保持することを解明している．GAS7 のこの挿入構造は GAS7 の膜上でのシート状多量体への重合に関与すると考えられるが，膜上における GAS7 のシート状多量体への会合機構の詳細は不明である．本年度は GAS7 の膜上での会合状態を直接観察するため，カーボン膜を張った電子顕微鏡用のグリッドに脂質一分子膜を張り，その上で GAS7 を重合させ，その負染色像を電子顕微鏡により観察した．その結果，GAS7 の形成するシート状構造の直接観察に成功した．現在トモグラフィー像を取得し，GAS7 のシート状構造中における GAS7 の配置を決定するための解析を進めている．この脂質一分子膜を用いた実験系はエンドサイトーシス関連の他の主要テーマである，クラスリンが最初に細胞膜表面で格子状に重合するステップ（クラスリン重合ステップ）の機構の研究にも役立てる予定であり，関連タンパク質の精製標品の準備を進めている．またクラスリン重合ステップの研究について，これまでに構築したクラスリン重合モデルを検証するための細胞生物学実験に用いるプラスミドの構築，相互作用解析のための試料調製も進めた．

E. 超分子複合体の電子顕微鏡による単粒子解析

電子顕微鏡単粒子解析法は革新的な発展を遂げた電子直接検出(DED)カメラによって，これまでより格段に分解能が向上し原子レベルの解析も可能となっている．我々は結晶構造解析が困難な DNA の複製，修復，組換え等に働く超分子複合体を中心に解析を進めている．

昨年度に引き続き DNA ポリメラーゼ D (PolD)，ヌクレオソーム・リモデリング因子複合体の解析を行った．高分解能の解析が可能である電子直接検出器 (DED) カメラではあるが，国内でこれを装備しかつ使用可能な電子顕微鏡は数台しか存在しない．極めて限られているマシンタイムを有効に利用するため，当研究所のクライオ電子顕微鏡によって試料凍結条件等の最適化と初期立体構造の構築を行い，高分解能の解析が見込まれるものについて，大阪大学の共同利用施設等に設置されている DED カメラ搭載の電子顕微鏡を使って解析を行っている．PolD に関してはその活性化因子及び DNA との複合体の構造解析を分解能 6.9 Å まで進めている．また，同じ溶液中に少なくとも２種類の形態が存在していることが判明した．ヌクレオソームの系に関しては，リモデリング因子との複合体の構造解析も側鎖の可視化が始まる 4.5 Å まで分解能が向上しており，より詳細なヌクレオソーム破壊の機構が明らかになりつつある．

F. 技術支援活動

九州大学共同利用施設である核磁気共鳴装置（２台）と，生体防御医学研究所技術室のクライオ電子顕微鏡（ポララ，FEI 社）のユーザー管理を行っている．ポララを日本全国のクライオ電顕ネットワークにおける F1 サイトに登録した(https://www.cryoemnet.org/f1-em)．F1 サイトは予備的なスクリーニングを担当する.真柳は汎用電顕FEI T20及びクライオ電顕FEI Polaraの共同利用の支援を行った．電子顕微鏡，試料作製装置の維持管理，利用者の測定のサポートを始め，依頼サンプルの負染色試料の作成や凍結試料の作成，データ収集を行った．今年度は九州工業大学のトモグラフィー観察の支援，新潟大学，東京工業大学，横浜市立大学，長浜バイオ大学，及び学内の依頼による観察を行った．

神田は新学術領域研究「動的構造生命」(平成 26 年度～30 年度）の領域代表として，「従来の構造生物学手法を新発想に基づいてタンパク質の動的構造解析のための強力な計測手法としてバージョンアップし，新しい分子動力学計算手法の適用によって検証を行う」全国規模の研究を推進している．第 18 回日本蛋白質科学会年会（新潟，6 月）において共催ワークショップ「生体高分子のインセル測定技術」，“In-cell measurement techniques of biomacromolecules and beyond”（英語セッション）と，第 56 回日本生物物理学会年会（岡山，9 月）において共催シンポジウム「promiscuous だが洗練されたタンパク質の分子認識」，“Ingenious mechanisms behind promiscuous

recognition, in contrast to precise recognition, by protein molecules”（英語セッション）を開催した.

業績目録

原著論文

1. Yamasaki T and Kohda D, 2019.
   A Radioisotope-free Oligosaccharyltransferase Assay Method.
   Bio-protocol 9: e3186.
2. Kouyama K, Mayanagi K, Nakae S, Nishi Y, Miwa M, Shirai T, 2019.
   Single-particle analysis of full-length human poly(ADP-ribose) polymerase 1.
   Biophys Physicobiol. 16:59-67.
3. Takashima N, Ishino S, Oki K, Takafuji M, Yamagami T, Matsuo R, Mayanagi K, Ishino Y, 2019.
   Elucidating functions of DP1 and DP2 subunits from the *Thermococcus kodakarensis* family D DNA polymerase.
   Extremophiles. 23:161-172.
4. Srivastava A, Tama F, Kohda D, Miyashita O, 2019.
   Computational investigation of the conformational dynamics in Tom20-mitochondrial presequence tethered complexes.
   Proteins. 87:81-90.
5. Mayanagi K, Ishino S, Shirai T, Oyama T, Kiyonari S, Kohda D, Morikawa K, Ishino Y, 2018.
   Direct visualization of DNA baton pass between replication factors bound to PCNA.
   Sci Rep. 8:16209.
6. Fujinami D, -Mahin AA, Elsayed KM, Islam MR, Nagao JI, Roy U, Momin S, Zendo T, Kohda D, Sonomoto K, 2018.
   The lantibiotic nukacin ISK-1 exists in an equilibrium between active and inactive lipid-II binding states.
   Commun Biol. 1:150.

総説

1. Kohda D, 2018.
   "Multiple partial recognitions in dynamic equilibrium" in the binding sites of proteins form the molecular basis of promiscuous recognition of structurally diverse ligands.
   Biophys Rev. 10, 421-433. (doi: 10.1007/s12551-017-0365-4.)
2. Kohda D, 2018.

Structural basis of protein Asn-glycosylation by oligosaccharyltransferase
Adv Exp Med Biol. 1104:171-199. (Glycobiophysics, doi: 10.1007/978-981-13-2158-0_9.)

著書

1. 八木達彦，遠藤斗志也，神田大輔．2018.
   生化学の論理：物理化学の視点から　第 6 章 生化学における物理化学的方法.
   新刊化学の要点シリーズ 25　生化学の論理—物理化学の視点—
   日本化学会，東京.
2. 神田大輔．2018.
   3-18 糖鎖関連タンパク質の立体構造解析(1)
   未来を創るグライコサイエンス-我が国のロードマップ- pp178-179
   日本糖鎖科学コンソーシアム（JCGG）編，埼玉.

学会発表

1. 韓喜玲，嶋田睦，神田大輔 (2018, 6/30).
   Visualization of the spatial distribution of a presequence peptide in the binding site of the mitochondrial presequence receptor, Tom20, using crystal contact-free space created in protein crystals
   平成 30 年度日本生化学会九州支部例会，福岡.
2. Daisuke Fujinami, Abdullah-Al-Mahin, Khaled M. Elsayed, Jun-ichi Nagao, Takeshi Zendo, Kenji Sonomoto, and Daisuke Kohda (2018, 8/20).
   The lantibiotic Nukacin ISK-1 exists in an equilibrium between active and inactive lipid-II binding states
   XXVIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Dublin, Ireland.
3. 真柳浩太 (2018, 8/31).
   クライオ電顕で見る超分子複合体の立体構造（口頭発表）
   第 42 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム，佐賀.
4. 真柳浩太 (2018, 9/4).
   FACT-ヌクレオソーム複合体の単粒子解析（口頭発表）
   第 2 回 エピジェネティック因子の構造と機能をつなぐ会，福岡.
5. Keisuke Oki, Takeshi Yamagami, Mariko Nagata, Natsuki Takashima, Kouta Mayanagi, Sonoko Ishino, and Yoshizumi Ishino (2018, 9/17).
   Family D DNA polymerase tethers primase and helicase in the replisome in *Thermococcus kodakarensis*.
   12th International Congress on Extremophiles. Naples, Italy.

6. Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Tsuyoshi Shirai, Shinichi Kiyonari, Namiko Imai, Takuji Oyama, and Yoshizumi Ishino (2018, 9/17).
Biochemical and Structural analyses of replication proteins bound to PCNA.
12th International Congress on Extremophiles Naples, Italy.
7. 藤浪大輔，Abdullah Al Mahin，Khaled M Elsayed，永尾潤一，善藤威史，園元謙二，神田大輔 (2018, 9/18).
NMR による抗菌ペプチド nukacin ISK-1 の溶液構造決定と熱力学的解析（口頭発表）
第 57 回 NMR 討論会，札幌.
8. 韓喜玲，嶋田睦，神田大輔 (2018, 9/24).
Creating crystal contact-free space in protein crystals makes the spatial distribution of a presequence peptide in the binding site of the mitochondrial presequence receptor, Tom20, visible（口頭発表）
第 91 回日本生化学会大会，京都.
9. Yuki Kawasaki, Kouta Mayanagi, Ashutosh Srivastava, Hirotaka Ariyama, Florence Tama, Toshio Ando, and Daisuke Kohda (2018, 10/18).
Integrative approach combining electron microscopy and high-speed AFM revealed the dynamic conformational exchange of the oligosaccharyltransferase in lipid bilayers
第 13 回研究所ネットワーク国際シンポジウム，福岡.
10. 神田大輔 (2018, 10/24).
計算生命科学の基礎Ⅴ「X 線結晶解析・NMR・電子顕微鏡・AFM を統合した相関構造解析」
遠隔インタラクティブ講義，神戸大学計算科学教育センター，兵庫.
11. Yuki Kawasaki (2018, 11/3).
Integrative approach combining electron microscopy and high-speed AFM revealed the dynamic conformational exchange of the oligosaccharyltransferase in lipid bilayers (oral presentation)
Workshop “Trends in Computational Molecular Biophysics”, Kanazawa.
12. 津中康央，真柳浩太，七種和美，七種和美，宮崎直幸，明石知子，岩崎憲治，西村善文，森川耿右 (2018, 11/28).
ヌクレオソーム構造変換における FACT 酸性天然変性領域の新たな分子機能
第 41 回日本分子生物学会年会，横浜.
13. 沖啓輔，山上健，永田麻梨子，高島夏希，真柳浩太，白井剛，石野園子，石野良純 (2018, 11/29).
超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来ファミリーD DNA ポリメラーゼの分子解剖による機能分布の解明
第 41 回日本分子生物学会年会，横浜.
14. 山口淳子，嶋田睦 (2018, 11/29).

クラスリン依存性エンドサイトーシスにおけるクラスリン重合調節機構の構造的基盤
第 41 回日本分子生物学会年会，横浜.

15. 真柳浩太 (2018, 11/14).
DNA-蛋白質複合体の単粒子解析（口頭発表）
生理研研究会 2018，岡崎.

16. 真柳浩太，沖啓輔，石野園子，宮崎直幸，岩崎憲治，神田大輔，白井剛，石野良純 (2018, 11/30).
クライオ電顕で「見る」古細菌複製フォーク複合体の機能構造（口頭発表）
第 41 回日本分子生物学会年会，横浜.

17. Yoshizumi Ishino, Keisuke Oki, Mariko Nagata, Kouta Mayanagi, Tsuyoshi Shirai, Takuji Oyama, Kosuke Morikawa, Takeshi Yamagami, and Sonoko Ishino (2018, 12/18).
Replisome structure and its functions in Archaea
OKAZAKI Fragment Memorial Symposium: Celebrating the 50th anniversary of the discontinuous DNA replication model, Nagoya.

18. 石野園子，真柳浩太，白井剛，清成信一，今井奈美子，大山拓次，山上健，石野良純 (2019, 3/24).
超好熱性アーキア由来クランプ PCNA 上で働く DNA 複製タンパク質の生化学および構造の解析
日本農芸化学会 2019 年度大会，東京.