

# 新潟大学研究推進機構超域学術院 研究プロジェクト 研究成果報告書

## (1) 研究プロジェクト名

「プロテオーム発現系の機能工学的研究」

## (2) 研究プロジェクト構成員・職・氏名

リーダー 内海 利男 (自然科学系教授)  
メンバー 前野 貢 (自然科学系准教授)  
杉本 健吉 (自然科学系准教授)  
小谷 昌司 (自然科学系教授、平成 20 年度で退職)  
伊東 孝祐 (超域研究機構助教、平成 20 年度より参加、  
平成 21 年度より自然科学系助教)  
野村 隆臣 (信州大学繊維学部助教) (学外研究者平成、  
平成 19 年度まで)

## (3) 研究成果の概要

### ①プロジェクトにおいて目標としたもの

生命現象は生体内タンパク質全体（プロテオーム）のネットワークにより演出されている。そのため、プロテオーム発現系は生命活動の根幹に存在する生体反応系であり、全ての生命科学研究の基本となる重要な領域である。最近、特定の遺伝子のタンパク質を人為的に発現させる系が開発され、成果をあげてきた。しかしながら今日でも、構築した発現系が機能しない例や発現タンパク質が不溶化・不活性化する例は頻繁に見られ、ポストゲノム研究の大きな障害となっている。一方、今世紀初頭に、生体内タンパク質合成装置の中心となる巨大分子集合体「リボソーム」の結晶構造が報告され、タンパク質の合成される仕組みが分子・原子レベルで議論できるようになり、タンパク質発現の研究は新たな段階を迎えている。本プロジェクトでは、リボソームを中心としたタンパク質合成系の結晶構造データを基盤として、生体内タンパク質合成装置の動態制御機構を解明し、人為的分子改変により合成装置の機能調節を図る点を主要な目的とする。本研究の最大の特徴は、タンパク質合成反応にエネルギーを提供し、動的機能中心となるリボソーム GTPase センターに研究の焦点を置く点にある。この部位はリボソーム粒子の中で運動性に富み、リボソーム粒子結晶データからは実体が捉えられないミステリアスな部位である。本プロジェクトでは生化学的解析と結晶構造解析からこの部位の分子構造基盤を解明し、様々な分子改変により人為的にタンパク質合成の速度を調節し、タンパク質の発現系の改良に向けた基礎的分子基盤を確立する。得られた知見を活用し、大腸菌細胞の変異体を利用したタンパク質発現系を作成する。さらに、動物細胞内のタンパク質合成系の人為的制御系構築にも展開する。

### ②目標に到達するために選択した方法・手段

タンパク質を合成する速度は得られる産物の質を決める大きな要素の一つとなる。そこで本研究では、タンパク質合成速度を決める機能中心となるリボソームの機能部位“GTPaseセンター”を研究対象の支柱とした。この部位の構造と機能構造を解析した他、変異を導入することによるタンパ

ク質合成活性への効果を解析し、得られた知見を変異型大腸菌細胞構築とタンパク質合成の減速型細胞の作成に向け利用した。さらに動物細胞内のタンパク質合成系の人為的制御系構築を目指す萌芽的研究も実施した。具体的には次のような方法・手段により研究をすすめてきた。

A. リボソーム GTPase センターの構造解析：生化学と結晶構造解析

真核生物、古細菌および真正細菌リボソームの GTPase センターを構成する rRNA 部位とタンパク質成分を生化学的手法で解析し複合体構造を解析した。また、複合体の結晶化および結晶構造解析を試み構造面を解析した。真核、古細菌、真正細菌の構造を比較し、はたらきとの関係を考察した。

B. ハイブリッド型リボソームの構築と利用： ストック複合体の機能

大腸菌リボソーム GTPase センターを構成する主要タンパク質複合体（ストック複合体）を特異的に解離させ、変位導入型ストック複合体を *in vitro* で結合させた変異型再構成リボソームの構築と機能解析を行った。また大腸菌ストック複合体の代わりに真核および古細菌ストック複合体（またはその変異体）を結合させたハイブリッドリボソームを作成し、機能解析を行った。

C. リボソーム GTPase 改変型変異細胞の作成と利用

A と B の知見から大腸菌リボソーム GTPase センターの機能構造を一部改変させタンパク質合成減速型の細胞を作成し、これに真核生物の特定遺伝子を導入し合成されたタンパク質の品質を解析した。

D. 昆虫ウイルス IRES を介したタンパク質合成機構の解析と利用

真核のタンパク質合成速度を左右する開始段階を介さずに直接ペプチド鎖伸長反応をもたらす昆虫ウイルスの IRES（リボソーム内部進入部位）によるタンパク質合成機構を解析し、一般の mRNA のコード配列と連結させ、タンパク質合成を試みる。

E. カエル胚発生期における特定タンパク質合成抑制法の確立

胚発生期における様々なタンパク質発現と細胞分化の関係を解析するために特定タンパク質の発現を調節する系の構築を試みた。

D. 新規無細胞タンパク質合成系の作製

甲殻類 *Artemia salina* の乾燥卵や、イネ胚芽から安価で有効な無細胞タンパク質合成系の作成を試みた。

③その結果、得られた成果

本プロジェクトの実施期間中に、リボソーム GTPase センターの構造と機能面の研究で大きな成果が得られた。特に真核と古細菌の研究については、独自に開発した“ハイブリッド”リボソーム系 (*J. Biol. Chem.* 277, 3857-3862, 2002) を用いた機能解析により、GTPase センターの主要タンパク質成分であるストック複合体の構造と機能面について世界に先駆けた研究成果を上げた。以下に成果内容を記す。

A. リボソーム GTPase センターの機能構造解析：生化学と結晶構造解析

生化学とタンパク質工学の手法により、真核リボソーム GTPase センターの分子成分と集合モードを解析した。その結果、28S rRNA の特定ヘリックス部位 (H42~44) に P0、P1、P2 からなる複合体と eL12 と呼ばれるタンパク質が共に結合し RNA・タンパク質複合体を形成し GTPase センターの主要部位を形成することを明らかにした。さらに、機能面で特に重要な P0 と P1、P2 は、P0 の C 末端側の隣接した部位に 2 個の P1・P2 ヘテロダイマーが結合した 5 量体を形成することを明らかにした（ストック複合体と命名） (*J. Biol. Chem.* 280, 39193-39199, 2005)。これに対し、古細菌のストック複合体では、真核 P0 の相同体である aP0 の C 末端側に、隣接して 3 個の aP1・aP1 ホモダイマーが結合した 7 量体であることを証明した (*J. Biol. Chem.* 282, 32827-32833, 2007)。真核と古細菌のストック

複合体の結晶化を試みたが、古細菌のサンプルでのみ結晶化に成功し、ストーク複合体 aP0(aP1•aP1) (aP1•aP1) (aP1•aP1) の 7 量体構造を 2.1Å の分解能で示すことに成功した (*J. Biol. Chem.* 285, 4747-4756, 2010)。B. で示すように、古細菌のストーク複合体は真核の翻訳因子をも受容することより、得られた結晶構造は真核の相同体 P0 (P1•P2) (P1•P2) と共通の機能構造を保持していることが判明した。

#### B. ハイブリッド型リボソームの構築と利用：ストーク複合体の機能

真正細菌ばかりでなく真核や古細菌のリボソームストーク複合体のはたらきを探る手法として、大腸菌リボソームからストーク複合体を特異的に遊離させ、各種ストーク複合体を結合させた“ハイブリッド型リボソーム”の構築とそれを用いた機能解析系を世界で初めて開発した (*J. Biol. Chem.* 277, 3857-3862, 2002)。この系を用いることで真核生物のストーク複合体がリボソームの真核翻訳因子の特異的受容性とその後の GTPase 活性に関わること (*J. Biol. Chem.* 274, 27578-27582, 1999)、さらに古細菌ストーク複合体が古細菌翻訳因子ばかりでなく真核の翻訳因子をも受容することを示し、真核と古細菌間のストーク複合体間の機能面での類似性を立証した (*Biochemical J.* 396, 565-571, 2006)。その他、真核ストーク複合体を形成する 2 個の P1•P2 ダイマー、さらに古細菌ストーク複合体の 3 個の aP1•aP1 ダイマーのそれぞれのはたらきを解析し、各ダイマーが共有する C 末端配列が翻訳因子との相互作用に関わっており、最もリボソーム本体側に結合するダイマーが翻訳因子依存の GTPase とペプチド鎖伸長反応に関して大きい関与をすることを明らかにした (*J. Biol. Chem.* 285, 4747-4756, 2010)。真核と古細菌で見られるストークダイマーの C 末端配列のはたらきに関しては、真正細菌のストーク L12•L12 とは異なり、真核型翻訳因子受容性に関わる特徴であることが判明した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in revision)。

ハイブリッド型リボソームを用いる実験ではまた、ストーク複合体の他、共に 28S rRNA の H40～44 部位に結合する eL12 (大腸菌では L11) の機能についても解析した。その結果 eL12/L11 は翻訳因子受容性には関与せず、その後の tRNA のトランスロケーション反応に寄与することを示した (*J. Biol. Chem.* 277, 3857-3862, 2002)。また eL12/L11 には翻訳因子作用に関する種特異性は見られなかった。このタンパク質は構造・機能面で真正細菌と真核間でかなり高く保存されていることが示された。

#### C. リボソーム GTPase 改変型変異細胞の作成と利用

A と B の知見より、真正細菌のストーク複合体 L10 (L12•L12) (L12•L12) の一方の L12•L12 を遊離させることでペプチド鎖合成の減速型リボソームを *in vitro* で作成することができた、また大腸菌ゲノム中の L10 の C 末端部位を削除し、一方の L12•L12 を結合できなくした大腸菌を作成した。これはタンパク質合成減速型細胞として利用できる可能性があるが、実用には至っていない。一方、大腸菌の L11 欠損株もトランスロケーションが抑制され、タンパク質合成減速型細胞である。この株に、通常の大腸菌では不溶化してしまう植物のアルドラーゼ遺伝子を導入し、発現させたところ、活性を保持した可溶性アルドラーゼが得られた。この株は減速型でのみ活性を保持した状態で得られる動植物のタンパク質の発現に有効に活用できる可能性があり、特許を獲得した (出願番号：特願 2006-132818 号)。

#### D. 昆虫ウイルス IRES を介したタンパク質合成機構の解析と利用

リボソームへの昆虫ウイルス IRES の結合により、アミノアシル tRNA が直接リボソームに結合し、引き続きペプチド鎖伸長反応が進行するようになるが、その仕組みを解析したところ、この反応にペプチド鎖伸長因子 eEF-2 が関与することが判明した (*J. Biol. Chem.* 282, 7770-7776, 2007)。IRES 結合により eEF-2/リボソーム依存の GTPase 活性が 3 倍に促進し、アミノアシル tRNA のリボソーム結

合が促進した。IRES の結合にはリボソームタンパク質 S25 が関わるということが最近判明し (*Nucleic Acids Res.* 39, 5264-5275, 2010)、この結合に伴い 18S rRNA の H18 部位の構造に変化が検出された。これらの結果より、真核リボソーム小亜粒子への IRES の結合により 18S rRNA のデコーディングセンターに位置する H18 部位の構造を変化させることで eEF-2 の受容性に変化を与え、最初のアミノアシル tRNA のリボソーム中の移動を引き起こし、ペプチド鎖伸長反応を始動させるという IRES 結合によるタンパク質合成開始の仕組みに関する仮説を提唱した。この知見は IRES を特定の遺伝子と連結させ、タンパク質を効率よく合成する反応系構築に利用できるものである。

#### E. カエル胚発生期における特定タンパク質合成抑制法の確立

胚発生期には様々な新たなタンパク質発現により細胞分化が引き起こされており、この特定タンパク質の発現の調節は発生の仕組みを探る上でも重要である。ここでは、人為的に特定 mRNA の情報をブロックするモルフォリノオリゴヌクレオチドを使用し、rdd (repeated D domain-like) 遺伝子が発生初期に血管の形成に関わることを明らかにした (*Mech. Dev.* 125, 284-298)。

#### D. 新規無細胞タンパク質合成系の作製

イネ胚芽抽出液および甲殻類アルテミアサリーナ休止卵の細胞抽出液から *in vitro* タンパク質合成系の作成を試みたが、いずれも翻訳伸長活性は見られたが翻訳開始の活性が得られず系の作成には不適切と判断された。

#### ④研究発表実績

ア 学会誌等 (発表者名, テーマ名, 学会誌名, 巻, 年月日)

#### 2010 年

1. Muhs, M., Yamamoto, H., Ismer, J., Takaku, H., Nashimoto, M., Uchiumi, T., Nakashima, N., Mielke, T., Hildebrand, P. W., Nierhaus, K. H., and Spahn, C. M. (2011) Structural basis for the binding of IRES RNAs to the head of the ribosomal 40S subunit. *Nucleic Acids Res.* 39, 5264-5275.
2. Naganuma, T., Nomura, N., Yao, M., Mochizuki, M., Uchiumi, T., and Tanaka, I. (2010) Structural basis for translation factor recruitment to the eukaryotic/archaeal ribosomes. *J. Biol. Chem.* 285, 4747-4756.
3. Hasegawa, M., Ikeda, Y., Kanzawa, H., Sakamoto, M., Goto, M., Tsunasawa, S., Uchiumi, T., and Odani, S. (2010) Multiple gamma-glutamylolation: a novel type of post-translational modification in a diapausing *Artemia* cyst protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394, 36-41.
4. Kimura, K., Wada, A., Ueta, M., Ogata, A., Tanaka, S., Sakai, A., Yoshida, H., Fushitani, H., Miyamoto, A., Fukushima, M., Uchiumi, T., and Tanigawa, N. (2010) Comparative proteomic analysis of the ribosomes in 5-fluorouracil resistance of a human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Int. J. Oncol.*, 37, 1271-1278.
5. Saito, K., Kobayashi, K., Wada, M., Kikuno, I., Takusagawa, A., Mochizuki, M., Uchiumi, T., Ishitani, R., Nureki, O., and Ito, K. (2010) An omnipotent role of archaeal EF1 $\alpha$  in translational elongation and termination, and quality control of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107, 19242-19247.
6. Saito, Y., Takahashi, Y., Izutsu, Y. and Maeno, M. (2010) Identification and expression of Ventrally associated leucine-zipper (VAL) in *Xenopus* embryo. *Int. J. Dev. Biol.*, 54, 203-208.
7. Kurauchi, T., Izutsu, Y. and Maeno, M. (2010) Involvement of Neptune in induction of the hatching gland and neural crest in the *Xenopus* embryo. *Differentiation*, 4/5, 251-259.

2009年

8. Miyoshi, T., Nomura, T., and Uchiumi, T. (2009) Engineering and characterization of the ribosomal L10/L12 stalk complex: a structural element responsible for high turnover of the EF-G-dependent GTPase. *J. Biol Chem.* 284, 85-92.
9. Nakashima, N., and Uchiumi, T. (2009) Functional analysis of structural motifs in dicistroviruses. *Virus Res.* 139(2): 137-147. Epub 2008 Jul 25.
10. Hattori, M., Jin, Y., Nishimasu, H., Tanaka, Y., Mochizuki, M., Uchiumi, T., Ishitani, R., Ito, K., and Nureki, O. (2009) Structural basis of novel interactions between the small-GTPase and GDI-like domains in prokaryotic FeoB iron transporter. *Structure*, 17, 1345-1355.
11. Saito, Y., Gotoh, M., Ujiie, Y., Izutsu, Y., and Maeno, M. (2009) Involvement of AP-2rep in morphogenesis of the axial mesoderm in *Xenopus* embryo. *Cell Tissue Res.*, 335, 357-369.
12. Mukaigasa, K., Hanasaki, A., Maeno M., Fujii, H., Hayashida, S., Itoh, M., Kobayashi, M., Tochinal, S., Hatta, M., Iwabuchi, K., Taira, M., Onoé, K., and Izutsu, Y. (2009) The keratin-related Ouroboros proteins function as immune antigens mediating tail regression in *Xenopus* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 18309-18314.

2008年

13. Miyoshi, T., and Uchiumi, T. (2008) Functional interaction between bases C1049 in domain II and G2751 in domain VI of 23S rRNA in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 36, 1783-1791
14. Nomura, T., Nakatsuchi, M., Sugita, D., Nomura, M., Kaminishi, T., Takemoto, C., Shirouzu, M., Miyoshi, T., Yokoyama, S., Hachimori, A., and Uchiumi, T. (2008) Biochemical evidence for the heptameric complex L10(L12)<sub>6</sub> in the *Thermus thermophilus* ribosome: in vitro analysis of its molecular assembly and functional properties. *J. Biochem.* 144, 665-673. 【JB 賞受賞】
15. Ito, K., Nakanishi, M., Lee, W. C., Zhi, Y., Sasaki, H., Zenno, S., Saigo, K., Kitade, Y., and Tanokura, M. (2008) Expansion of substrate specificity and catalytic mechanism of azoreductase by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 283, 13889-13896.
16. Shibata, T., Takahashi, Y., Saito, Y., Tasaki, J., Izutsu, Y., and Maeno M. (2008) A role of D-domain-related proteins in differentiation and migration of embryonic cells in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 125, 284-298.
17. Sugimoto, K., and Jiang, H. (2008) Cold stress and light signals induce the expression of cold-inducible RNA binding protein (cirp) in the brain and eye of the Japanese treefrog (*Hyla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 151, 628-636.

2007年

18. Nishiyama, T., Yamamoto, H., Uchiumi, T., and Nakashima, N. (2007) A eukaryotic ribosomal protein interacts with the conserved loop region in a dicistroviral intergenic internal ribosome entry site. *Nucleic Acids Res.* 35, 1514-1521.
19. Yamamoto, H., Nakashima, N., Ikeda, Y., and Uchiumi, T. (2007) Binding mode of the first aminoacyl-tRNA in translation initiation mediated by *Plautia stali* intestine virus IRES. *J. Biol. Chem.* 282, 7770-7776.
20. Naganuma, T., Shiogama, K., and Uchiumi, T. (2007) The N-terminal regions of eukaryotic acidic phosphoproteins P1 and P2 are crucial for heterodimerization and assembly into the ribosomal GTPase-associated center. *Genes to Cells* 12, 501-510.
21. Maki, Y., Hashimoto, T., Zhou, M., Naganuma, T., Ohta, J., Nomura, T., Robinson, C. V., and Uchiumi,

- T. (2007) Three binding sites for stalk protein dimers are generally present in ribosomes from archaeal organism. *J. Biol. Chem.* 282, 32827-32833.
22. Ito, H., Koyama, Y., Takano, M., Ishii, K., Maeno, M., Furukawa, K., and Horigome, T. (2007) Nuclear envelope precursor vesicle targeting to chromatin is stimulated by protein phosphatase 1 in *Xenopus* egg extract. *Exp. Cell Res.* 313, 1897-1910.
23. Ito N, Mita M, Takahashi Y, Matsushima A, Watanabe YG, Hirano S, Odani S. (2007) Novel cysteine-rich secretory protein in the buccal gland secretion of the parasitic lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 35-40.
24. Shata, A., Saisu, H., Odani, S., and Abe T. (2007) Phosphorylated synaphin/complexin found in the brain exhibits enhanced SNARE complex binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 808-813.

#### 2006 年

25. Nomura, T., Nakano, K., Maki, Y., Naganuma, T., Nakashima, T., Tanaka, I., Kimura, M., Akira Hachimori, A., and Uchiumi, T. (2006) *In vitro* reconstitution of the GTPase-associated center of the archaeobacterial ribosome: the functional features observed in a hybrid form with *Escherichia coli* 50S subunits. *Biochemical J.* 396, 565-571.
26. Tashiro, S., Sedohara, A., Asashima, M., Izutsu, Y., and Maeno, M. (2006) Characterization of myeloid cells derived from the anterior ventral mesoderm in the *Xenopus laevis* embryo. *Dev. Growth Differ.* 48, 499-512.
27. Jiang, H. J., Sun, H. S., Wang, X. D., Wang, C. L., Liu, Z. L., Gonda, H., and Sugimoto, K. (2006) HB-1, an acute myeloid leukemic cell line with the capability of infiltrating into the brain in CBA/N mice. *Sheng Li Xue Bao.* 58, 377-383.
28. Nakayama, A., Matsui, H., Fukushima, T., Ichikawa, H., Yamada, K., Amao, T., Hosono, M., and Sugimoto, K. (2006) Murine serum obtained from bone marrow-transplanted mice promotes the proliferation of hematopoietic stem cells by co-culture with MS-5 murine stromal cells. *Growth Factors.* 24, 55-65.

#### 2005 年

29. Hagiya, A., Naganuma, T., Maki, Y., Ohta, J., Tohkairin, Y., Shimizu, T., Nomura, T., Hachimori, A., and Uchiumi, T. (2005) A mode of assembly of P0, P1 and P2 proteins at the GTPase-associated center in animal ribosome: In vitro analyses with P0 truncation mutants. *J. Biol. Chem.* 280, 39193-39199.
30. Takahashi, Y., Hirayama, S., and Odani, S. (2005) Ribosomal proteins cross-linked to the initiator AUG codon of a mRNA in the translation initiation complex by UV-irradiation. *J. Biochem.* 138, 41-46.
31. Saitoh, E., Isemura, S., Chiba, A., Oka, S., and Odani, S. (2005) A novel cysteine protease inhibitor with lectin activity from the epidermis of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 141, 103-109.
32. Takeda, M., Kurauchi, T., Yamazaki, T., Izutsu, Y., and Maeno, M. (2005) Neptune is involved in posterior axis and tail formation in *Xenopus* embryogenesis. *Dev. Dyn.* 234, 63-73.
33. Segawa, M., Niino, K., Mineki, R., Kaga, N., Murayama, K., Sugimoto, K., Watanabe, Y., Furukawa, K., and Horigome, T. (2005) Proteome analysis of a rat liver nuclear insoluble protein fraction and localization of a novel protein, ISP36, to compartments in the interchromatin space. *FEBS J.* 272, 4327-4338.

イ 口頭発表（発表者名，テーマ名，学会等名，年月日）

2010年

1. Uchiumi, T.: The stalk protein complex at the ribosomal GTPase-associated center; Current Issues of Ribosomal Structure and Function (Berlin, Germany, April 9th, 2010) 【招待講演】
2. 内海 利男: リボソームの翻訳因子作用中心に位置する動的タンパク質複合体; 第10回日本蛋白質科学会年会, ノーベル賞特別シンポジウム(2010年6月, 札幌) 【招待講演】
3. 馬場 健太郎, 姚 閔, 田中 勲, 内海 利男: 動物リボソームストークタンパク質複合体 P0(P1-P2)<sub>2</sub> に 5 コピー存在する共通C末端ドメインの機能解析; 第12回日本RNA学会年会 (2010年7月, 東京, 一橋記念講堂)
4. 伊東孝祐, 水口伊玖磨, 青木 健, 浅妻 悟, 三ツ井敏明, 内海利男: リボソーム変異型大腸菌株の真核生物タンパク質発現系への利用; 第5回無細胞生命科学研究会年会 (2010年9月, 岡山大学)
5. 望月 正弘, 北名 真澄, 伊東 孝祐, 内海 利男: 真核型リボソームのストークアンカータンパク質 P0 を構成する 3 ドメインの機能解析; BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会) (2010年12月, 神戸ポートアイランド)
6. Maeno, M., Matsuzaki, Y., Komiyama, K., Otake, A., Hosoya, J., Kurihara, S., and Izutsu, Y.: Distinct mechanisms for differentiation of myeloid cells in the anterior and posterior ventral blood islands in *Xenopus* embryo; 13th International *Xenopus* Conference (Fairmont Chateau Lake Louise, Canada September 2010)
7. 眞塩由佳, 池田徹, 吉岡麻美, 钟秀颖, 杉本健吉: MS-K 腫瘍における血管新生 BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会) (2010年12月, 神戸ポートアイランド)

2009年

8. 野村直子, 長沼孝雄, 望月正弘, 姚閔, 内海利男, 田中勲: リボソーム GTPase センターにおけるストーク複合体の機能解析; 第11回日本RNA学会年会 (2009年7月, 朱鷺メッセ 新潟市)
9. 渡辺裕樹, 三好智博, 内海利男: リボソーム 16S RNA・helix 18 の G505-C507、G524-C526 間塩基対合の生化学的検証: EF-G 依存 GTPase 活性への関与; 第11回日本RNA学会年会 (2009年7月, 朱鷺メッセ 新潟市)
10. 馬場健太郎, 姚閔, 田中勲, 内海利男: 古細菌タンパク質の結晶構造データに基づく動物リボソームストーク複合体の部位特異的変異導入と分子間相互作用の解析; 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月, パシフィコ横浜)
11. 望月正弘, 長沼孝雄, 内海利男: 真核生物・古細菌リボソームタンパク質 P0 に存在する特徴的なドメインの役割; 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月, パシフィコ横浜)
12. 野村直子, 長沼孝雄, 姚閔, 内海利男, 田中勲: リボソーム GTPase センターを構成するストークと翻訳因子の相互作用解析; 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月, パシフィコ横浜)
13. 伊東孝祐, 斉浩, 清水義宏, 三浦謹一郎, 上田卓也, 内海利男: Pth (Peptidyl-tRNA hydrolase) -tRNA ミニヘリックス複合体の X 線結晶構造解析; 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月, パシフィコ横浜)
14. 吉岡麻美, Xiu Ying Zhong, 眞塩由佳, 藤間真紀, 杉本健吉: Effect of vegf gene knock down on growth of the murine sarcoma cell line, MS-K (2009年12月, パシフィコ横浜)

## 2008年

15. 内海利男, 長沼孝雄, 野村直子, 三好智博, 姚閔, 田中勲: リボソーム GTPase センターを構成するストークタンパク質複合体 (シンポジウム講演); 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (2008 年 12 月、神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場) 【招待講演】
16. 井上悠, 水口伊玖磨, 山本紘, 中島信彦, 内海利男: PSIV ゲノム RNA の 3'-UTR による翻訳促進機構の解析: 促進をもたらす構造エレメントの同定; 第 10 回日本 RNA 学会年会 (2008 年 7 月、札幌コンベンションセンター)
17. 森智子, 野村隆臣, 森田喜子, 八森章, 内海利男: 組換え体カイコ翻訳伸長因子 eEF-1 $\alpha$  を用いた機能部位の解析: グアニンヌクレオチド結合部位について; 第 10 回日本 RNA 学会年会 (2008 年 7 月、札幌コンベンションセンター)
18. 宮越広美, 野村隆臣, 阿部香織, 八森章, 内海利男: 大腸菌リボソームにおける L6 タンパク質と 23S rRNA 間の結合モードに関する研究; 第 10 回日本 RNA 学会年会 (2008 年 7 月、札幌コンベンションセンター)
19. 野村直子, 長沼孝雄, 姚閔, 内海利男, 田中勲: 古細菌リボソームストークタンパク質複合体 P0-L12 の構造・機能解析; 第 10 回日本 RNA 学会年会 (2008 年、7 月、札幌コンベンションセンター)
20. 長谷川舞衣, 内海利男, 神澤秀明, 真島豊, 小谷昌司: *Artemia* シストのタンパクに見いだされたグルタミン酸残基を標的とする新規翻訳後修飾; 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (2008 年 12 月、神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場)
21. 望月正弘, 長沼孝雄, 内海利男: 真核生物型リボソームタンパク質 P0 が保有する特徴的ドメインの機能解析; 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (2008 年 12 月、神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場)

## 2007年

22. 内海利男, 山本紘, 三好智博: 翻訳プロセスに関わる rRNA の機能構造 (シンポジウム講演); 日本生物物理学会第 45 回年会 (2007 年 12 月、パシフィコ横浜) 【招待講演】
23. 水口伊玖磨, 浅妻悟, 青木健, 三ツ井敏明, 内海利男: リボソーム変異型大腸菌株の真核生物タンパク質発現系への利用; 第 7 回日本蛋白質科学会年会 (2007 年 5 月、仙台国際センター)
24. 山本紘, 池田裕香, 中島信彦, 内海利男: 昆虫 RNA ウイルス IGR-IRES を介した翻訳会誌における tRNA 結合機構; 第 9 回 RNA 学会年会 (2007 年 7 月、名古屋国際会議場)
25. 水口伊玖磨, 山本紘, 中島信彦, 内海利男: 昆虫ウイルス RNA の開始因子非依存型翻訳は 3' UTR のシス因子により促進される; 第 9 回 RNA 学会年会 (2007 年 7 月、名古屋国際会議場)
26. 三好智博, 野村隆臣, 内海利男: EF-G 依存の GTPase に寄与するリボソームタンパク質構造要素: L10 と L12 の大腸菌・好熱性細菌間キメラ体を用いた解析; 第 9 回 RNA 学会年会 (2007 年 7 月、名古屋国際会議場)
27. 前野貢, 小宮山恭吾: ツメガエル胚前方腹部に由来する白血球の性状と分化制御; 第 27 回胚誘導と形態形成、第 17 回イモリネットワーク共催「脊椎動物の配偶子形成から器官形成まで～仕組みはどこまでわかったか～」 (2007 年 9 月、弘前) 【招待講演】

## 2006年

28. Yasushi Maki, Takao Naganuma, Jun Ohta, Toshio Uchiumi: The stoichiometric analysis of ribosomal stalk proteins in archaeobacteria; 第 29 回日本分子生物学会年会 (2006 年 6 月、国立京都国際会館)



29. Takao Naganuma, Kaori Shiogama, Akiko Hagiya, Tomomi Shimizu, Takaomi Nomura, Akira Hachimori, Toshio Uchiumi : Structural elements of eukaryotic ribosomal protein p1 and P2 essential for heterodimerization and assembly onto functional ribosomes ; 第 29 回日本分子生物学会年会 (2006 年 6 月、国立京都国際会館)
30. 牧泰史, 大田絢, 長沼孝雄, 橋本哲男, 内海利男 : 古細菌リボソームの GTPase センターには 3 対の L12stalk ダイマーが存在する : P0 ダイマーの結合部位の生化学的解析 ; 第 8 回日本 RNA 学会年会 (2006 年 7 月、兵庫県立淡路島夢舞台国際会議場)
31. 水口伊玖磨, 山本紘, 中島信彦, 内海利男 : 開始コドンが必要としない昆虫ウイルス IRES を用いたタンパク質合成系の研究 : 3'UTR の必要性 ; 第 8 回日本 RNA 学会年会 (2006 年 7 月、兵庫県立淡路島夢舞台国際会議場)
32. 山本紘, 池田裕香, 八森章, 中島信彦, 内海利男 : 昆虫ウイルス RNA IGR-IRES の 18S rRNA helix18 の機能構造への影響 ; 第 8 回日本 RNA 学会年会 (2006 年 7 月、兵庫県立淡路島夢舞台国際会議場)

#### 2005 年

33. 野村隆臣, 八森章, 内海利男 : 大腸菌リボソーム GTPase センターの分子解剖 : L10 タンパク質と二つの L7/L12 ホモダイマーの結合機構 ; 第 7 回日本 RNA 学会年会 (2005 年 8 月、弘前大学)
34. 阿保洋一, 野村隆臣, 内海利男, 八森章 : 蚕細胞内リボソームへのタグ付き P タンパク質の導入と機能解析への利用 ; 第 7 回日本 RNA 学会年会 (2005 年 8 月、弘前大学)
35. 西山孝, 山本紘, 内海利男, 中島信彦 : ジシストロウイルスの IGR-IRES と相互作用する 40S リボソームタンパク質 ; 第 7 回日本 RNA 学会年会 (2005 年 8 月、弘前大学)
36. 萩谷聡子, 長沼孝雄, 野村隆臣, 内海利男 : リボソーム GTPase センターの分子集合 : 蚕 P0 タンパク質の分子解剖 ; 第 7 回 RNA 学会年会 (2005 年 8 月、弘前大学)
37. 三好智博, 野村隆臣, 内海利男 : 大腸菌リボソーム GTPase センターを構成する L10 の RNA 結合機構に関する生化学的解析 ; 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005 年 12 月、福岡ヤフードーム)
38. 牧泰史, 大田絢, 三好智博, 内海利男 : 動物・細菌間キメラ型リボソームタンパク質 P0/L10 の作製と機能解析 ; 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005 年 12 月、福岡ヤフードーム)
39. 大田絢, 牧泰史, 長沼孝雄, 内海利男 : 動物・古細菌間キメラ型 P0 タンパク質を含むリボソーム GTPase センター構成タンパク質複合体の機能解析 ; 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005 年 12 月、福岡ヤフードーム)
40. 塩釜香織, 長沼孝雄, 内海利男 : 動物細胞リボソーム GTPase センターの機能誘発に不可欠な P1 と P2 タンパク質の二量化機構 ; 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005 年 12 月、福岡ヤフードーム)

ウ 出版物 (著者名, 書名, 出版社名, 年月日)

1. 内海利男 他 (共筆)、ハーパー・生化学(28 版)、丸善、2011 年 1 月 31 日
2. Izutsu, Y., and Maeno, M. (2005) Analyses of Immune Responses to Ontogeny-Specific Antigens using an Inbred Strain of *Xenopus laevis* (J Strain). In "Developmental Hematopoiesis: Methods in Molecular Medicine" (Baron, M. H. ed), The Humana Press Inc., pp. 149-157, 2005.
3. 杉本健吉 他 (共筆)、理系のための基礎生物学, 菊山宗弘, 酒泉満編著 (分担, 第 8 章)、化学同人, 2010 年 4 月 26 日

## ⑤競争的資金の応募・採択状況

### 内海利男

- ・科学研究費補助金（基盤研究 B）；代表・内海利男；平成 21-23 年度；翻訳反応駆動部となるリボソームタンパク質複合体の分子機能解剖；14,300 千円；採択
- ・科学研究費補助金（新学術領域・公募）；代表・内海利男；平成 22-23 年度；リボソーム動態機能を演出するストーク変性蛋白質；9,142 千円；不採択
- ・科学研究費補助金（特定領域研究・公募）代表・内海利男；平成 20-21 年度；翻訳反応駆動部を構成するリボソームタンパク質・rRNA 複合体の機能構造解析；7,240 千円；不採択
- ・内藤記念科学振興財団研究助成金；代表・内海利男；平成 19-21 年度；自己免疫の優先標的となるリボソーム機能部位のタンパク質・rRNA 複合体構造解析；2,000 千円；採択
- ・佐々木環境技術支援財団助成金；代表・内海利男；平成 20 年度；アルテミア休眠卵孵化シグナルを利用した海水汚染試験系の開発；500 千円；採択
- ・内田エネルギー科学振興財団助成金；代表・内海利男；平成 19 年度；生体内タンパク質合成装置駆動部の分子基盤研究と利用；450 千円；採択
- ・科学研究費補助金（基盤研究 B）；代表・内海利男；平成 16-18 年度；動物遺伝子の機能発現に適した新規翻訳系の開発：リボソーム機能工学の利用；15,700 千円；採択
- ・科学研究費補助金（特定領域研究・RNA 情報網）；計画-代表・内海利男；平成 14-18 年度；リボソーム機能構造の分子解剖；62,600 千円；採択
- ・文部科学省新世紀重点研究創世プラン・タンパク 3000 プロジェクト；サブ拠点代表・内海利男；平成 14-18 年度；リボソームの構造機能解析；108,000 千円；採択

### 伊東孝祐

- ・内田エネルギー科学振興財団助成金；代表・伊東孝祐；平成 22 年度；タンパク質合成システムにおけるエネルギー代謝中心の機能制御研究；400 千円；採択
- ・科学研究費補助金（若手研究（B））；代表・伊東孝祐；平成 21-22 年度；リボソーム結合性 GTPase ファミリーの構造生物学；3,940 千円；採択
- ・シーズ発掘試験 A（発掘型）；代表・伊東孝祐；平成 20 年度；タンパク質低速合成大腸菌株 AM68 を利用した有用タンパク質生産システムの開発；2,000 千円；採択
- ・科学研究費補助金（若手研究（スタートアップ））；代表・伊東孝祐；平成 20 年度；超高熱古細菌リボソームストークタンパク質と GTP 結合翻訳因子の構造・機能研究；1,638 千円；採択

### 前野 貢

- ・科学研究費補助金（基盤研究（C））；代表・前野貢；平成 21-23 年度；両生類胚の腹部血島の分化にかかわる新たな因子の同定と解析；5,070 千円；採択
- ・内田エネルギー科学振興財団助成金；代表・前野貢；平成 20 年度；細胞の運動に関与する新規分泌タンパク質 rdd の基礎研究；500 千円；採択
- ・成茂動物科学振興基金研究助成金；代表・前野貢；平成 16 年；脊椎動物尾部オーガナイザーの実体にかかわる研究；500 千円；採択
- ・佐々木環境技術支援財団助成金；代表・前野貢；平成 16 年度；環境負荷により生ずる発生障害の分子解析；500 千円；採択
- ・科学研究費補助金（基盤研究（C））；代表・前野貢；平成 16-17 年度；組織特異的発現を示す Kruppel 型転写因子の胚発生における機能；3,400 千円；採択

### 杉本健吉

- ・ユニオンツール研究助成金；代表・杉本健吉；平成 21 年度；3 次元空間欠陥形成制御機構；800 千円；採択
- ・内田エネルギー科学振興財団助成金；代表・杉本健吉；平成 21 年度；低温誘導による RNA 結合タ

- ンパク質(CIRP)の遺伝子発現に關与する光の特性；400千円；採択
- ・委任経理金；代表・杉本健吉；平成20年度；造血制御機構に關する研究；500千円

小谷庄司

- ・科学研究費補助金（基盤研究（C））；代表・小谷昌司；平成19-20年度；無顎類口腔腺分泌液における新規の生理活性物質の探索；4,030千円；採択
- ・科学研究費補助金（基盤研究（C））；代表・小谷昌司；平成16-18年度；細胞質タンパク質におけるジスルフィド結合の新しい機能；3,220千円；採択

#### ⑥研究成果による知的財産権の出願・取得状況

1. 内海利男, 浅妻悟, 水口伊玖磨, 山本紘, 三ツ井敏明 (2006) 大腸菌を用いたタンパク質の合成方法、出願中（特願 2006-132818）（工業所有権）
4. 内海利男, 佐藤弘恵, 田中勳 (2006) モノクローナル抗体の作成方法、出願中（特願 2006-295202）（工業所有権）

#### ⑦新聞等のメディアに掲載された事項

「該当なし」

#### ⑧プロジェクトに対する自己評価

本プロジェクトは生体内タンパク質合成系の速度・効率に關わる分子基盤を解明し、有効なタンパク質合成系の構築を目指した研究である。プロジェクトの最も大きな成果として、タンパク質合成の速度制御の機能を担うリボソームのストーク複合体の構造とはたらきの関係を世界に先駆けて解明できた点が上げられる。この成果により、タンパク質合成駆動部の機能中枢への各種分子改変が可能となり、タンパク質合成の速度を調節できることも立証できた。その他、ウイルスの IRES 部位のリボソーム作用機構の解明も加え、今後のタンパク質合成系の改変・利用に向けた多くの基礎的知見が得られた。本プロジェクトの研究内容が独創的である点、成果が掲載された論文の多くはインパクトファクターが 10～3 程度の高い学術雑誌である点、さらに魅力的な研究を残し今後の方針を示した点を考慮し、本プロジェクトはほぼ、当初の目的は達成したと言える。

しかしながら、本プロジェクトでは反省点も残された。本研究の成果は、主に *in vitro* の研究で、*in vivo* の研究成果は少なかった点である。当初の計画では *in vitro* の基礎研究の成果を真核細胞に展開をはかる予定であったが、期間中にそこまで到達できなかった。本プロジェクトは終了したが、現在得られた基盤研究成果を真核生物の酵母細胞に展開させ研究を開始している。