



蛋白質研究奨励会

量子構造生物学研究会

第4回 研究会（講演会）資料

2026年6月10日（水）

13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）

**蛋白質研究奨励会・量子構造生物学委員会
第4回研究会（講演会）プログラム**

2026年6月10日（水）

会場：ミーティングスペース AP 日本橋
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2
日本橋フロント 6F

13:30 – 13:35

はじめに

油井研一・副代表（協和キリン株式会社）

講 演

13:35 – 14:35 （講演 1）

司会：杉田征彦・会員（京都大学）

タンパク質恒常性の構造生物学

京都大学・大学院理学研究科
深 井 周 也

14:40 – 15:00 休 憩

15:00 – 16:00 （講演 2）

司会：栗栖源嗣・会員（大阪大学）

物理化学解析を基盤としたタンパク質間相互作用阻害剤開発への挑戦

東京大学・大学院工学研究科
長 門 石 暁

16:00 – 16:05

おわりに

中川敦史・代表（JASRI）

16:05 – 17:00 （研究交流会）

委員・講師間の自由討論

タンパク質恒常性の構造生物学

Structural Biology of Proteostasis

京都大学 大学院理学研究科

深 井 周 也

Shuya FUKAI

Graduate School of Science, Kyoto University

1. はじめに

プロテオスタシス (Proteostasis) は、タンパク質 (Protein) と恒常性 (Homeostasis) を合わせた造語で、細胞を正常に保つためにタンパク質の構造・機能・濃度などを維持するシステムを意味する。タンパク質の合成、折り畳み、分解、輸送、品質管理といった過程のバランスの上に成立しており、各過程に多様な分子が関わっている。

私自身のタンパク質立体構造解析の研究を振り返ると、留学先で神経細胞における小胞輸送と膜融合の研究を始め、帰国後は、その関連でエンドサイトーシスを制御するユビキチンシグナルの共同研究を行なったことを機に、Lys63 を介して繋がったユビキチン鎖 (K63 鎖) が制御する細胞内プロセスに関する研究を進め、さらに、Lys6 を介して繋がったユビキチン鎖 (K6 鎖) が関わるミトコンドリア選択的オートファジーに関する最近の研究へと続いている。オートファジーでは、最終的にリソソームによる分解が行われるが、その過程では小胞輸送や膜融合を制御する因子が関わっており、留学から帰国後に行なっていた研究に再び戻ってきたようである。今回の講演では、タンパク質の分解、折り畳み、輸送、品質管理に関わる最近のタンパク質立体構造解析の例を紹介することから、タンパク質恒常性の構造生物学というタイトルとさせていただいた。

2. ミトコンドリア選択的オートファジー

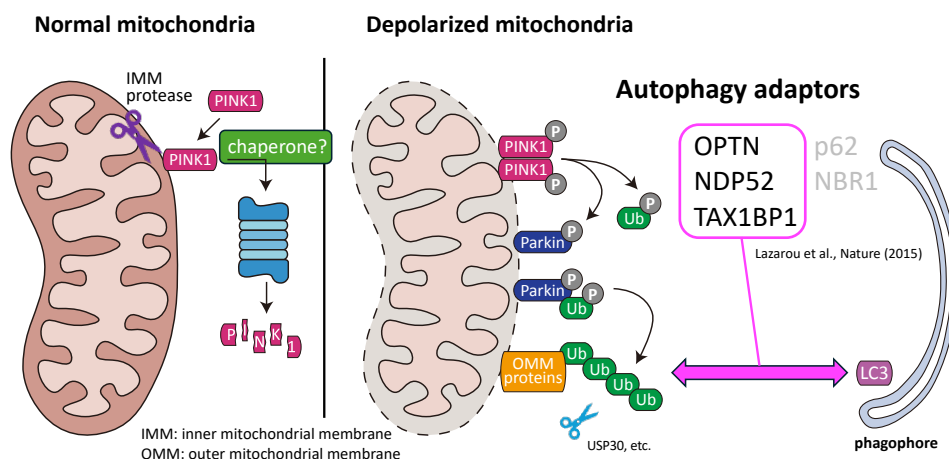


図 1. マイトファジーの分子機構の概略

損傷を受けて膜電位を失ったミトコンドリアは、外膜に局在する膜タンパク質がポリユビキチン化を受けた後、ポリユビキチン鎖と隔離膜上のマーカータンパク質とを繋ぐオートファジーアダプターと呼ばれるタンパク質群によって認識され、オートファジーによって分解される (図 1) [1]。このミトコンドリア選択的オートファジーをマイトファジーと呼ぶ。マイトファジーにおいて、ミトコンドリアに局在するセリンスレオニンプロテインキナーゼである PINK1 は損傷の有無を感知するセンサーの役割を担う。正常なミトコンドリアでは、PINK1 は、N 末端領域が内膜へと引き込まれた後、特定の膜内プロテアーゼによって切断され、ミトコンドリアから解離して細胞質へと移行し、ポリユビキチン化されて最終的にプロテアソームによって分解される。損傷によって膜電位が失われると、PINK1 は外膜上に蓄積し、二量体化による自己リン酸化を経て活性化する。活性化した PINK1 は、ユビキチンおよびユビキチンリガーゼ Parkin のユビキチン様ドメインのセリン残基をリン酸化する。リン酸化されていない Parkin は自己阻害状態であるが、リン酸化を受け、かつ、リン酸化ユビキチンが結合することで自己阻害が解除され、外膜の膜タンパク質にポリユビキチン鎖を付加する。このときに付加されるポリユビキチン鎖は、Lys6、Lys11、Lys63

を介して繋がった鎖であることが報告されている (in vitro の実験では Lys48 を介して繋がった K48 鎖も検出されている)。マイトファジーを抑える役割を担う脱ユビキチン化酵素 (DUB) として、唯一のミトコンドリア局在 DUB である USP30 が同定されている。USP30 は K6 鎖に選択的に結合し、高い DUB 活性を示す。また、K6 鎖以外のポリユビキチン鎖は正常ミトコンドリアでも一定の割合で存在するが、K6 鎖は膜電位の損失によって初めて付加される。これらの知見から、K6 鎖がマイトファジー開始の鍵を握ると考えられている。一方で、K6 鎖を選択的に認識するオートファジーアダプターは報告されていない。

マイトファジーでは、OPTN、NDP52、TAX1BP1 のいずれかのオートファジーアダプターが必須であることが示されている[2]。TAX1BP1 はユビキチン結合モチーフである UBZ がタンデムに繋がったドメイン (UBZ1-UBZ2) を持つが、UBZ2 のみがユビキチン結合能を持ち、特定のユビキチン鎖に対する選択性はないと報告されている[3]。その当時、K48 鎖と K63 鎖、N 末端 (Met1) のアミノ基を介してペプチド結合で繋がった M1 鎖以外のポリユビキチン鎖については調べられていなかったため、その他のポリユビキチン鎖を含めて特定の鎖に対する選択性をプルダウン実験により再検証した。その結果、TAX1BP1 の UBZ1-UBZ2 (UBZ1-UBZ2^{TAX1BP1}) が K6 鎖に対して他の鎖よりも強く結合することが明らかになった。表面プラズモン共鳴による分子間相互作用測定から K_D は 2.5 μ M であると見積もられ、細胞に発現した UBZ1-UBZ2^{TAX1BP1} はミトコンドリアの損傷に伴ってミトコンドリア表面にリクルートされた。そこで、選択的相互作用の分子機構を明らかにするために UBZ1-UBZ2^{TAX1BP1} と K6 鎖 (ジユビキチン) との複合体の結晶構造を決定した (図 2)。

UBZ1 と UBZ2 のユビキチン結合面のアミノ酸残基は似ており、Leu8 と Ile44 からなる疎水

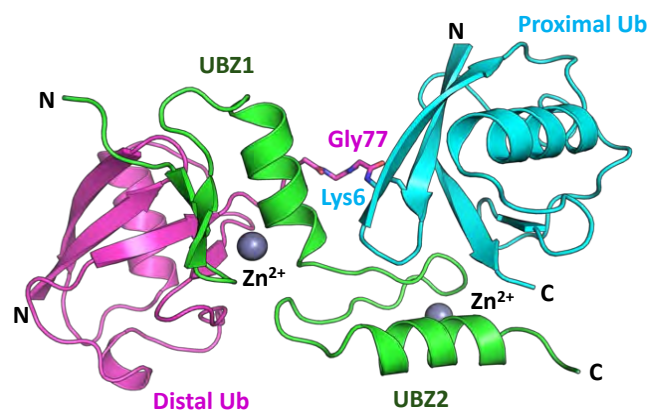


図 2. TAX1BP1 の UBZ1-UBZ2 ドメインと K6 鎖との複合体の結晶構造

性パッチを認識していた。また、UBZ1 と UBZ2 のそれぞれの C 末端に存在する Trp754 と Phe781 は、ユビキチンの Arg42 と π - π 相互作用をしており、Ala への変異によって結合が失われる。データベース上では、Trp754 は UBZ1 には含まれておらず、以前の報告で解析されている UBZ1 も Trp754 は含まれていない。そのために UBZ1 とユビキチンとの相互作用を検出できなかったことが明らかになった。UBZ1 と UBZ2 のそれぞれに結合したユビキチンの配置から、K6 鎖以外のユビキチン鎖では UBZ1 と UBZ2 に同時に結合することができないことも明らかになった。UBZ1 と UBZ2 の相対的な配向は、K6 鎖が結合している状態と結合していない状態で大きく異なっていた。

PINK1-Parkin を軸とするマイトファージでは、損傷センサーである PINK1 の制御が巧妙に行われる。その中で、プロテインキナーゼに選択的なシャペロン複合体 HSP90-CDC37 による PINK1 のフォールディング調節の関与が示唆されている。そこで、HSP90-CDC37 と PINK1 を共発現させた昆虫細胞から HSP90-CDC37-PINK1 三者複合体を精製し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析による立体構造決定を行なった (図 3) [4]。その際、モリブデン酸による HSP90 の ATP 結合状態の固定と化学架橋による複合体の安定化を行なった。プロテインキナーゼの立体構造は N ロープと C ロープと呼ばれる二つの構造ユニットで構成される。これまでに報告されている HSP90-CDC37 とプロテインキナーゼとの複合体と同様に、PINK1 の C ロープは折り畳まれた状態であるのに対して、N ロープは $\beta 5$ が CDC37 と HSP90 で挟まれた溝に結合し、その他の部位は変性して密度が見えない状態であった。CDC37 は N ロープにある HPNI モチーフを持っており、PINK1 の N ロープの代わりに C ロープと相互作用していた。PINK1 の C ロープは C 末端側に PINK1 特異的な延長部位を持つ。この延長部位は α ヘリックスで構成され、一部は HSP90 のミドルドメインと相互作用していた。また、別の一部は電荷を持つアミノ酸残基が豊富で柔軟な構造を持つループ (Flexible charged loop, FCL) と接触していた。

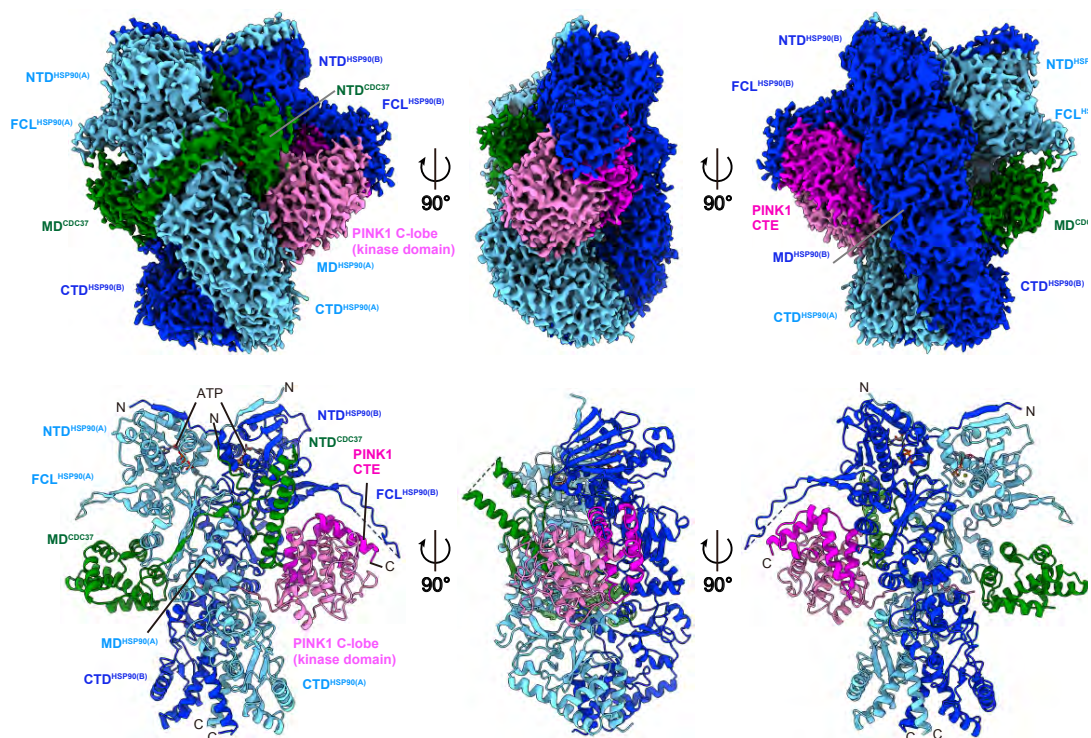


図 3. PINK1-HSP90-CDC37 複合体のクライオ電子顕微鏡構造

3. Rab GTPase の品質管理

低分子量 GTPase である Rab タンパク質ファミリーは 30 種類以上のメンバーで構成される巨大な GTPase ファミリーで、オルガネラ-オルガネラ間、あるいは、細胞膜-オルガネラ間の膜小胞を介した物質輸送を制御する。また、各オルガネラのマーカー分子としても知られている。他の低分子量 GTPase と同様に、不活性状態の GDP 結合型と活性状態の GTP 型をサイクルすることで、分子シグナリングの ON/OFF を制御する。また、C 末端 4 残基に含まれるシステイン残基のプレニル化修飾の有無によってオルガネラ膜や細胞膜への局在による制御も行われる。Rab は比較的安定なタンパク質として認識されていると思われるが、ヌクレオチド結合状態に応じて構造がダイナミックに変化するスイッチ領域に疎水性残基を多く含む一部の Rab は、ヌクレオチドフリーの状態では凝集する傾向にあること、また、そのような Rab を認識してユビキチン-プロテアソーム系で分解するシステムが存在することが明らかになっている[5]。具体的には、凝集状態に近い Rab8 はトリアージタンパク質 Bag6 (タンパク質の

フォールディング状態に応じて分解するかリフォールディングするかを判別する)によって認識され、リクルートしてきたユビキチンリガーゼを介してユビキチン化されてプロテアソームによる分解を受ける。Rab8には、Rab シャペロン(ホルダーゼとも呼ばれる)である RABIF(以前は MSS4 と呼ばれていた)が存在し、ヌクレオチドフリー状態の Rab8 の安定化に寄与していると考えられている。共同研究者の山野晃史博士(都立医学研)らは、エンドソームーリソソーム系路ではたらく Rab のプロテオスタシスに影響するタンパク質を網羅的に探索するプロテオミクス解析を行なった結果、ヌクレオチドフリーの Rab7A に強く結合する機能未知タンパク質 C5orf51 を同定した。C5orf51 をノックアウトすると Rab7A の量が減少することや、大腸菌で Rab7A と C5orf51 を共発現させると可溶性の Rab7A が大幅に増加すること、C5orf51 存在下で変性温度が上昇することなどから、C5orf51 が Rab7A 選択的シャペロンであることが強く示唆された。その詳細な分子機構を明らかにするため、C5orf51 とヌクレオチドフリーの Rab7A との複合体の結晶構造を決定した(図4)[6]。DALI サーバーによると、C5orf51 はテトラトリコペプチドリピート(TPR)を持つタンパク質に分類される。TPR に分類されるタンパク質 LGN と Afadin の C 末端ループ領域との複合体(実際には融合体)で Afadin が結合している位置に対応する C5orf51 の位置に、大きく構造変化した Rab7A のスイッチ I の前後の領域が結合していた。スイッチ I が大きく構造変化した構造は、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)との複合体でも見られるが、C5orf51 との複合体では、スイッチ I と P ループの間に位置し、ヌクレオチド結合状態では α ヘリックスを形成している領域($\alpha 1$)が大きくほどけ、逆にスイッチ I の一部は α ヘリックスを形成していた。同様の構造は、RABIF に結合した Rab8A にも見

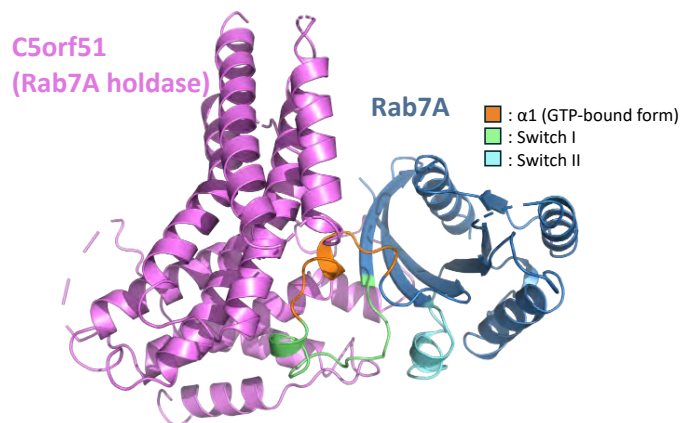


図4. C5orf51 と Rab7A 複合体の結晶構造

られる。C5orf51 と RABIF は GEF に似たヌクレオチド交換活性を持つが、その活性は GEF と比較して 10 倍から 100 倍近く低い。スイッチ I と $\alpha 1$ を含む幅広い領域のリフォールディングを伴う構造変化が交換活性の低さと相関している可能性が示唆された。

1. Okatsu & Fukai Ubiquitin signaling in PINK1/Parkin-dependent mitophagy. *J Biochem* 2026; **179**: 145-154. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaf079>
2. Lazarou *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy *Nature* 2015; **524**(7565):309-314. <https://doi.org/10.1038/nature14893>
3. Ceregido *et al.* The structure of TAX1BP1 UBZ1+2 provides insight into target specificity and adaptability. *J Mol Biol* 2014; **426**: 674-90. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.006>
4. Okatsu *et al.* Structural basis for the folding of PINK1 by the HSP90–CDC37 chaperone complex *eLife* 2026; **15**: RP110255. <https://doi.org/10.7554/eLife.110255.1>
5. Takahashi *et al.* Cytoplasmic control of Rab family small GTPases through BAG6. *EMBO Rep* 2019; **20**: e46794. <https://doi.org/10.15252/embr.201846794>
6. Yamano *et al.* RAB7HD/C5orf51 stabilizes newly synthesized RAB7A and facilitates its GTP loading Res. Square <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-8547387/v1>

物理化学解析を基盤としたタンパク質間相互作用阻害剤開発への挑戦

Challenges in Developing Protein-protein Interaction Inhibitors Based on Physicochemical Analysis

東京大学 大学院工学系研究科

長 門 石 暁

Satoru NAGATOISHI

School of Engineering, The University of Tokyo

はじめに

生体機能を分子レベルで制御することは、細胞システムの本質的な理解と共に、医療などへの応用展開も期待されます。制御分子として低分子は汎用性高く活用されてきましたが、近年の多様化する標的タンパク質の機能や物性に伴い、標的タンパク質に対する特異的低分子リガンドの探索および設計においては、従来の手法では困難な場面が増えています。そこで我々の研究グループでは、『物理化学』的な観点から標的分子と制御剤との相互作用を解明することで、新規な特異的薬剤設計に貢献できるのではないかと考えました。つまり相互作用の質（物理化学的な特徴）に重きを置くことで、低親和性でも特異的な活性を示す低分子リガンドが取得できるのではないかとこの仮説を立てました。そこで熱力学的または速度論的指標から、標的タンパク質に対し特異的に制御できる低分子リガンドを探索することを試みてきました。

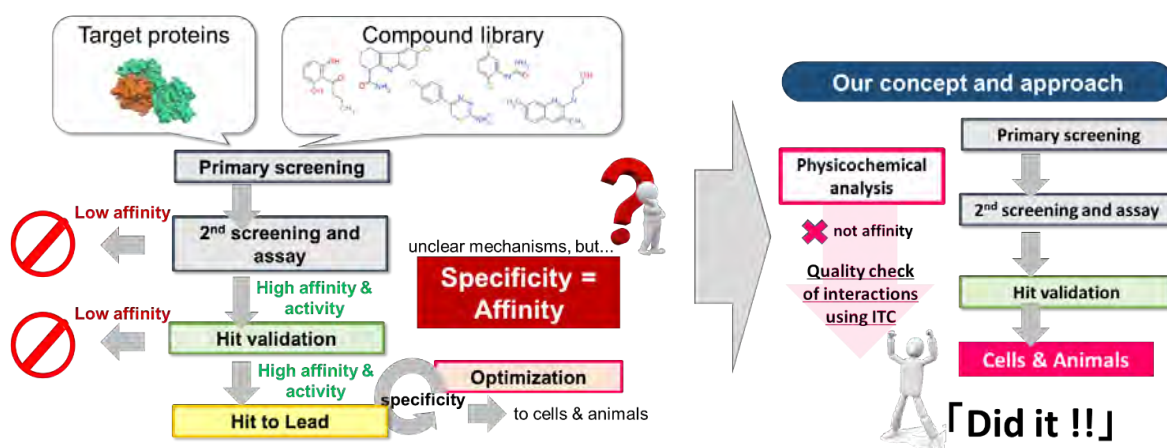
熱力学的アプローチ

その1つである熱力学的アプローチでは、エンタルピー駆動型の結合様式を指標として低分子リガンド探索を行い、結果として特異性を有する低分子リガンドの取得することに成功しました。さらに官能基改変によって、エンタルピー

一駆動型を維持しつつ、エントロピー有利な性質も兼ね備えた高親和性リガンドを設計することもできました。また熱量分析から未解明であった天然分子の結合様式を明らかにすることにも成功しました。さらに製薬会社との共同研究において、エンタルピー駆動型のフラグメント分子の導入によりアイソフォーム選択性が創出されることを提唱できました。このように、いずれのリガンドも低親和性であるが、発熱反応に基づく分子認識が特異性創出に重要な因子であることを実証できました。

速度論的アプローチ

また速度論的アプローチでは、これまで難しいとされてきたホモ会合体を制御するための低分子リガンド探索を試みました。そのために SPR を活用した新しい探索技術の開発し、その技術を用いて、標的タンパク質のホモ会合体形成の過程を阻害できる低分子リガンドを取得することに成功しました。その構造解析より、速度論的アプローチは低分子がタンパク質-タンパク質複合体の形成過程に対して有効な活性を示す手法であることが明らかとなりました。その他にも速度論解析は膜タンパク質やキナーゼといった重篤疾患の標的となりやすいタンパク質に対して、さらには化膿レンサ球菌といった感染症関連タンパク質に対しても、有効なりガンド解析が可能であることが分かりました。また本発表では、演題の通り、上記の物理化学的アプローチを駆使して、他の標的タンパク質-タンパク質間相互作用に対して、特異的に制御できる低分子リガンドの創出にも挑戦しています。



-
1. K Nakano, *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 15337 (2015).
 2. S. Tashiro, *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 2783 (2018).
 3. C. Yoshimura, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **64**, 2669 (2021).
 4. A. Senoo, *et al.*, *Commun. Biol.*, **4**, 1041 (2021).
 5. A. Senoo, *et al.*, *Protein Sci.*, **32**, e4744 (2023).
 6. K. Yoshida, *et al.*, *Biochemistry*, **58**, 504 (2019).
 7. S. Kori, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **52**, 116500 (2021).
 8. S. Ito, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **63**, 14045 (2020).
 9. T Yamawaki, *et al.*, *Sci. Rep.*, **15**, 19341 (2025).