

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム  
研究者派遣プログラム

成果報告書

提出日：平成 28 年 8 月 24 日

【基本情報】

○申請者

採 択 年 度：平成27年度

部 局 名 等：生命科学研究科 統合生命科学専攻

職 名：助教

氏 名：宮前 友策

研究課題名：リガンド及び光照射により制御可能な細胞内タンパク質分解システムの構築

○渡航先

国 名：アメリカ合衆国

研究機関名：スタンフォード大学

研究室名等：[研究室名] The Wandless Lab.

[職名等・氏名] Professor & Vice-Chairman, Thomas J. Wandless

渡 航 期 間：平成27年9月25日～平成28年8月19日（330日）

○渡航期間中の出張

出 張 先： 該当なし

目 的：

期 間：

出 張 先：

目 的：

期 間：

出 張 先：

目 的：

期 間：

## 京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム 研究者派遣プログラム

### ・[成果]

#### ○プロジェクトの成果及び今後の展開

##### ・研究概要

受入れ研究室では、小分子リガンド添加により細胞内のタンパク質存在量を迅速かつ可逆的に制御可能なシステムを構築している。本システムは、細胞内に発現させた際、速やかに分解される変異タンパク質 destabilized domain (DD) を基盤とする。DD の不安定性は、DD に結合する細胞膜透過性の小分子リガンドを添加することで、構造が安定化され、レスキューされる。DD に任意のタンパク質 (Protein-of-interest: POI) を融合させて発現することで、融合したタンパク質そのものの存在量を、リガンド添加により迅速かつ可逆的に、またリガンドの濃度依存的に制御可能になる。本システムは、細胞内のタンパク質存在量を制御するためのツールとして、生命科学に広く用いられてきた。しかしながら従来の DD は POI に恒久的に融合させることが必須であり、ある種のオルガネラ局在性タンパク質などに対しては、POI が有する機能そのものを損なってしまう欠点があった。渡航者は、この問題を解決するため、リガンドにより DD が安定化を受けの際に、DD から POI を切断することのできる新規システムの構築を目的として研究を行った。細胞内でプロテアーゼにより容易にプロセシングされるタンパク質に着目し、これを DD と POI の間に挿入した融合タンパク質を発現するコンストラクトをデザインした。適切な被プロセシング活性を示す変異体を同定し、リガンド添加時にのみ POI が遊離し、リガンド非存在化では、DD の被分解活性により POI が速やかに除去されることを可能にした。また、本プロジェクトと平行して、免疫遺伝子治療への応用を目指した新規 DD の開発にも従事した。FDA 承認薬とその受容体タンパク質の組み合わせを DD に応用するというものであり、手法そのものは既存の DD の開発手法に則ったものであるが、ランダム変異スクリーニングからどのように目的の活性を有する変異タンパク質を選抜していくか、DD というシステムを構築するための過程ならびに技術を学ぶ機会を得た。

##### ・国際共同研究の立上げ・ネットワークの構築

上述した研究を論文化するため、受け入れ研究者と、帰国後の研究分担を明確にし、今年度内に論文投稿を目指すことを合意した。また、DD を基盤とした新たな研究プロジェクトについて意見交換し、今後も共同研究の形で研究を継続していく旨、合意した。また同僚のポスドクが翌年に他大学にて faculty のポジションを得ることになり、今後、セミナー開催や共同研究などで協力していく旨、合意した。学会参加については、渡航期間短縮に伴い、当初予定していた学会に参加することができなかった。しかしながら所属 department が主催している Cutting Edge Lecture に可能な限り参加し、議論に参加した。本講演会は世界中からケミカルバイオロジー、システムズバイオロジー分野のトップランナーが招聘され、毎週のように学内で開催されていた。また、所属 department が参画している Center for Systems Biology では、ポスドク、大学院生向けに共同研究を前提とした学内グラントを公募しており、これに採択されたグループが、毎週 weekly seminar で口頭発表を行っていた。渡航者は可能な限り両方の会合に参加することで、大学にいながらアメリカを含め世界の研究動向を探ることができた。

##### ・国際共著論文の投稿・発表等の状況、国際学会等での発表状況 [予定を含む]

現時点でまだ投稿に至っていないが、上記の研究概要で述べた内容を元にした下記の論文を今年度内に投稿する方針で合意した。

Yusaku Miyamae, Ling-Chun Chen, Alexander Lu, Thomas J. Wandless, "A novel system for immunogene therapy by using FDA-approved drug" Manuscript in preparation.

## 京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム 研究者派遣プログラム

### ・在外研究経験によって習得した能力等

渡航者は元来、生物活性物質の探索・合成や作用機序解析を主とする研究を行ってきたが、自身の研究を、化合物を用いて細胞内生体分子の機能を自在に制御する研究へと発展させたいという展望を持っていた。受入れ研究室では、分子生物学、遺伝子工学的実験手法を用いた、化合物応答性タンパク質の機能改変と、その生命科学分野への応用を目指して研究を行うことができ、将来展望の基盤となる知識、技術を習得することができた。また、受入れ研究者は有機合成の分野で学位を取得した後、化合物を用いて細胞内タンパク質の機能を制御する現在の研究を展開するに至っているが、その基盤は、学位論文研究で合成した化合物とその受容体タンパク質の応用であることから、自らの基盤となる知識、技術、強みを明確に認識し、周辺分野の知識をうまく取り入れて発展させることの重要性を改めて実感した。

研究室の運営方法としては、研究者、ラボマネジャー、テクニシャンの仕事がそれぞれ明確に区別されていた。またラボに蓄積されている知見や試料などの情報が、共有されており、現在、そして将来の研究に上手く活用されていた。概してシステムティックであり、研究が効率的に進むための環境づくりが積極的になされていた。

教育・人材育成方針として印象に残ったことは、ポスドク、学生の研究テーマの決め方である。渡航者自身も含め、ラボに新たに加わったメンバーは、テーマを決める際、その人の興味だけでなく、ゴールやビジョンを明確にさせ、そのテーマに従事することで何を学びたいのか、身に付けたいのか、その人の将来のキャリアにどのように作用するのかを話し合った上で決めていた。教員の意向が強く反映されるトップダウン型と異なり、ポスドクや学生にとって有意義であると同時にモチベーションを高める効果のある方法であるように感じた。また、大学院生とポスドクではテーマの方針を明確に分けていた。大学院生は PhD を取得するための専門性を身につけることを重視し、一つのテーマを深掘することを求めている。その上で、副となるテーマを与えられていた。一方ポスドクは、希望により、複数のテーマを同時に進行したり、共同研究に従事するなど、自身の研究の“幅”を広げることを奨励されていた。単なる歯車ではなく、テーマ従事者のステージに十分配慮された効果的な方法であると感じた。

### ・在外研究経験を活かした今後の展開

研究については、本渡航で行った研究の論文投稿に向け、帰国後も継続していきたい。また本研究で得た知識、技術、経験を生かし、化合物を用いて細胞内生体分子の機能を自在に制御する新たな研究へと展開させていきたい。また、構築したネットワークを生かして国際共同研究の継続や新規立ち上げについても積極的に行っていく所存である。

## 英文成果報告書

### ○申請者情報

部 局 名 : Graduate School of Biostudies

職 名 : Assistant Professor

氏 名 : Yusaku Miyamae

研究課題名 : Development of Novel Destabilized Domain for Posttranslational Control of Protein Function

渡 航 期 間 : From Sep.25,2015 to Aug.20,2016

### ○渡航先情報

国 名 : United States of America

研究機関名 : Chemical and Systems Biology, School of Medicine, Stanford University

研究室名等 : The Wandless Lab

受入研究者名 : Thomas J. Wandless

### ○渡航報告

I am most grateful to the sponsorship of the Jong Mung Program for the great opportunity to my research promotion in US. I visited the Department of Chemical and Systems Biology, Stanford University, for ten and half months from October 1<sup>st</sup> 2015 to August 19<sup>th</sup> 2016. The Department of Chemical and Systems Biology is uniquely focused on understanding cell biology at molecular and systems levels, and many researchers join it from various discipline such as molecular biology, biochemistry, chemistry, bioengineering, physics, pharmacology and computational science.

Dr. Tom Wandless, my host researcher, is one of leading researchers in the field of chemical biology, especially chemical genetic control for cellular protein stability. He and his colleagues have developed an experimental system in which the stability of protein depends on the presence or absence of a cell-permeable small molecule ligand. This system is based on the engineered proteins that are metabolically unstable and degraded when expressed in eukaryotic cells. These domains are called as "destabilized domain" or "DDs", and their instability can be rescued by addition of ligands. During my visiting research, I created a new DD system that was regulated using an FDA-approved drug for potential application to human therapeutics. In parallel with this, I joined another project, specifically a creation of a novel version of DDs in which the DD is cleaved from the partner protein when it is stabilized with ligand. This allows us to regulate proteins that are not functional when fused to the DD. I devised a discovery strategy which led to the discovery of a couple of mutants of the protein tag that have the desired activity. In the absence of DD ligand, the DD and any fused partner proteins are degraded by proteasome. However, when the stabilizing ligand is present, the DD is metabolically stable, allowing ubiquitous intracellular protease enzymes to cleave the mutant, thus liberate partner protein to perform its desired function. These projects enabled me to learn a lot of fundamental skill related to genetic screening based on

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム  
研究者派遣プログラム

random mutagenesis, and how to establish the strategy to obtain the desired function using these techniques. I have agreed with Dr. Wandless that we will submit a manuscript based on these results to the journal in early 2017.

The Wandless lab is a small group which consists of six people but lab members are friendly and motivated to achieve their own projects. Dr. Wandless is always open and helpful, and gives us useful advice. Lab member can visit his office without hesitation, and discuss own projects. We have a lab meeting once two weeks, where we discussed each research progress, and I have given a talk several times.

Unfortunately, I was not able to attend the conference or meetings in US because of shortening of my visiting duration. But our department invites many excellent researchers from over the world and holds "cutting edge lectures" series twice a month. Also the Stanford Center for Systems Biology provides the grant with the group consisting of students and postdocs within Stanford, and successful groups gave some talks in a weekly seminar. I actively joined these seminar series and obtained the knowledge and information on research trend over the US and world. People in Stanford make a highly interactive community and conduct research collaboration easily. I think that such environment moves forward their researches dramatically and it is one of the reasons why Stanford ranks the top university in the world. Overall I have no doubt the invaluable experiences in US will contribute greatly to my future research.