

研究助成 業績報告集

2018 年度

公益財団法人 小柳財団

創立者あいさつ

人間の健康と美を促進する研究活動を支援し、
より良い社会環境を実現するために

生命科学の健全な発展に寄与し、技術革新と人間重視の両面からより良い社会環境の実現に貢献したいと願っています。

昨今、日本の経済・社会・文化の持続的な発展のために、研究開発の重要性が再認識されています。研究開発のために様々な形の公的施策や、公益法人等により支援措置が取られ、また民間企業においても共同研究などの様々な改善や工夫が行われています。

既成の概念にとらわれず広い視野と新たな発想を持って、農林水産分野、食品分野、生物学分野において、既に存在する課題はもとより未来を見据えた潜在的な課題に取り組む基礎研究活動を応援することを目的として、公益財団法人小柳財団を設立いたしました。



公益財団法人 小柳財団
設立代表者 小柳 昌之

財団概要

財団名	公益財団法人 小柳財団
理事長	大倉一郎
設立	設立 平成 24 年 11 月 1 日
所在地	〒 101-0041 東京都千代田区神田須田町 1-24
TEL	03-5296-6299
FAX	03-5296-6259

役員一覧

評議員	小柳昌之
評議員	知野秀雄
評議員	石川和則
理事長	大倉一郎
理事	蟻川芳子
理事	小柳典子
監事	宮崎一成

2018 年度 研究助成選考委員名簿

財団役職	氏 名	経歴
選考委員長	小澤 俊彦	放射線医学総合研究所 名誉研究員 昭和薬科大学 酸化ストレス研究室 特任教授
選考委員	蟻川 芳子	日本女子大学 名誉教授 (前日本女子大学学長・理事長)
選考委員	大倉 一郎	東京工業大学 名誉教授 (前東京工業大学副学長)
選考委員	上村 みどり	帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所創薬化学研究所 上席研究員
選考委員	畠中 研一	東京大学 生産技術研究所 教授
選考委員	三原 久和	東京工業大学 生命理工学院 教授

● 研究助成業績報告集 ●

2018年度

[2018年4月1日～2019年3月31日]

公益財団法人 小柳財団

目 次

1	核内受容体を介した免疫記憶機構に基づく免疫力強化戦略と 癌免疫療法への応用	P.6
	研究者 > 北海道大学 大学院獣医学研究院：高田 健介	
2	未利用資源のピオーネ廃棄物を利用した機能性食品・機能性化粧品の開発	P.7
	研究者 > 学校法人加計学園 岡山理科大学：濱田 博喜	
3	茶系飲料摂取による腸内細菌改善および肥満抑制効果の分子メカニズム解明	P.8-9
	研究者 > 早稲田大学 先進理工学部 生命医科学科：常田 聰	
4	高齢者の健康な生活を妨げる大脳皮質性視力低下からの回復方法を探る研究	P.10
	研究者 > 徳島大学 大学院医歯薬学研究部医科学部門 生理系機能解剖学分野：富田 江一	
5	高効率かつ持続性の高いオルガネラの生細胞イメージング	P.11
	研究者 > 長崎大学 生命医科学域(薬学系)：大庭 誠	
6	転移RNAのメチル基修飾が乳ガンに与える影響	P.12
	研究者 > 名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態モデル医学分野：大石 久史	
7	健康と美を目指したリン酸化制御に基づく皮膚タイトジャニクションバリアの 保護化合物の探索	P.13-14
	研究者 > 岐阜薬科大学 生命薬学大講座生化学研究室：五十里 彰	
8	プロテインエンジニアリングを指向した含フッ素アミノ酸の合成に関する研究	P.15
	研究者 > お茶の水女子大学 基幹研究院 自然科学系：矢島 知子	
9	睡眠不足が心と肌に及ぼす影響の神経回路レベルでの理解	P.16
	研究者 > 筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構：櫻井 勝康	
10	骨芽細胞の効率的培養のための高機能性ペプチド材料の創製	P.17-18
	研究者 > 東京工業大学 生命理工学院：堤 浩	

-
- 11 痩せの大食いマウスに着目したPPAR-gamma2の生体機能の解析 P.19
研究者 > 徳島文理大学 香川薬学部薬学科：大島 隆幸
-
- 12 低分子化合物併用による新規ミトコンドリア機能向上法の開発 P.20
研究者 > 東京工業大学 生命理工学院：小倉 俊一郎
-
- 13 ビタミンDの副甲状腺での分子作用機序 P.21
研究者 > 横浜市立大学 生命医科学研究科 生体機能医科学研究室：片岡 浩介
-
- 14 理論的予測法の汎用性を実証するためのGPCRのX線結晶構造解析 P.22
研究者 > 関西医科大学 医学部：小林 拓也
-
- 15 植物をモデルにした活性酸素種抑制色素を用いた日焼け止め材料の開発 P.23
研究者 > 東京理科大学 工学部工業化学科：永田 衛男
-
- 16 基質特異性を示すペプチド触媒の開発 P.24 - 25
研究者 > 東京大学 生産技術研究所 物質・環境系部門：工藤 一秋
-
- 17 女性の美と健康のための脂肪嗜好性の調節における女性ホルモンの作用 P.26 - 27
研究者 > 奈良女子大学 研究院 生活環境科学系 生活健康学領域：森本 恵子
-
- 18 がん診断とがん治療のデュアル機能を有するポルフィリンの創成 P.28
研究者 > 宇部工業高等専門学校 物質工学科：廣原 志保
-
- 19 環境因子と遺伝的要因の同時関与によるアトピー性皮膚炎病態発症の
分子基盤解析及び健康と美への影響の評価 P.29
研究者 > 国立研究開発法人理化学研究所：Jafar Sharif (ジャファル シャリフ)
-
- 20 皮膚生理恒常性の強化に向けた超音波治療効果の解明 P.30
研究者 > 明治大学 理工学部物理学科：平岡 和佳子
-
- 21 キトサン-脂肪酸ポリイオンコンプレックス微粒子への
抗酸化成分の担持と安定化 P.31
研究者 > 東京都市大学 工学部エネルギー化学科：黒岩 崇
-
- 22 分子内の隣接カルボニル基の還元-酸化反応を利用する
再活性-再使用可能な有機還元剤分子の開発 P.32
研究者 > 東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門：米澤 宣行
-
- 23 細胞内酸素濃度イメージングによる脂肪燃焼評価系の構築と
新規機能性物質の探索 P.33
研究者 > 東京工業大学 生命理工学院：蒲池 利章
-
- 24 不活性型アデノシン受容体を特異的に認識する
機能性モノクローナル抗体の開発 P.34 - 35
研究者 > 千葉大学 大学院理学研究院 生体構造化学研究室：小笠原 諭
-

研究テーマ

核内受容体を介した免疫記憶機構に基づく免疫力強化戦略と癌免疫療法への応用

研究者 ▶ 北海道大学 大学院獣医学研究院：高田 健介（たかだ けんすけ）

【研究成果の要約】

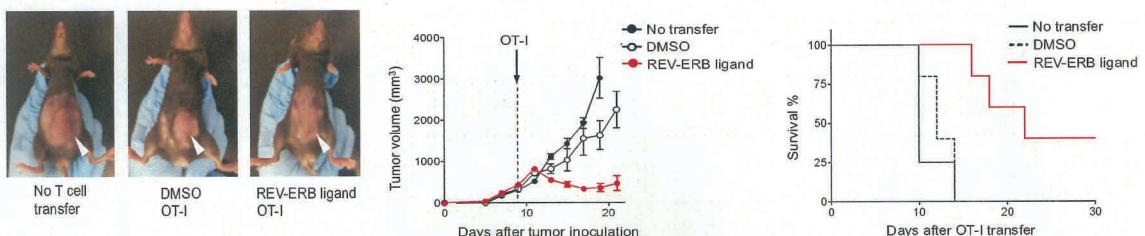
過去に感染したことのある病原体が再び体内に侵入すると、免疫系はより迅速で強力に応答し、病原体は速やかに排除される。この現象は免疫記憶と呼ばれ、ワクチンの基本原理として予防医学に多大な貢献を果たしてきた。免疫記憶の本体は、抗原特異的に活性化した後、長期にわたり体内で維持される記憶リンパ球である。最近の研究から、記憶Tリンパ球が非常に優れた抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなり、癌免疫療法への応用に関心が高まっている。本研究は、Tリンパ球の記憶形成過程で顕著な発現変動を示す核内受容体RORalphaとREV-ERBに着目し、記憶Tリンパ球分化への関与を検証するとともに、これを分子標的とした癌免疫療法の可能性を検討した。REV-ERBリガンドは活性化Tリンパ球の生存を向上させ、逆にRORリガンドは細胞死を促進したことから、これら核内受容体の発現バランスが活性化Tリンパ球の生死を決定し記憶Tリンパ球の分化を規定する可能性が推察された。さらに、マウスを用いた動物実験からREV-ERBリガンドはTリンパ球の抗腫瘍効果を顕著に向上させることができることが示され、免疫療法への応用に端緒が開かれた。

【研究方法】

- 1) Tリンパ球免疫応答における核内受容体の発現変動: 生体内Tリンパ球応答に伴うRORalphaおよびREV-ERBのmRNA発現の変化を検討した。卵白アルブミンを特異的に認識するOT-I 抗原受容体発現Tリンパ球をOT-I トランスジェニックマウスの二次リンパ組織から単離し、レシピエントマウスに養子移入した。さらに、卵白アルブミン由来ペプチドでパルスした樹状細胞を追加移入することで、ドナーTリンパ球に対し抗原刺激を加えた。その後、経時的にレシピエントマウスの二次リンパ組織からドナーTリンパ球を単離し、各種転写因子のmRNA発現を定量的PCRで解析した。
- 2) 核内受容体リガンドがTリンパ球の生存に及ぼす影響: OT-I トランスジェニックマウスの脾細胞を卵白アルブミン由来ペプチドおよびIL-2の存在下で3日間培養し、in vitroで活性化させた。その後、核内受容体リガンドとサイトカイン(IL-2あるいはIL-15)の存在下で培養した。トリパンブルー染色およびPI染色により生存Tリンパ球の数と頻度を計測し、核内受容体を介したシグナルが活性化後のTリンパ球の生存に与える影響を検討した。
- 3) 核内受容体リガンドを用いた腫瘍免疫療法の検討: 卵白アルブミン由来ペプチドの刺激によりin vitroで活性化させたOT-I Tリンパ球をIL-2とREV-ERBリガンドの存在下で2日間培養し、エフェクターTリンパ球を得た。あらかじめ卵白アルブミン発現組換え胸腺腫細胞を皮下投与して腫瘍を形成させたレシピエントマウスに対し、作成したエフェクターTリンパ球を静脈内投与した。

【研究成果】

RORalphaはエフェクター細胞の分化成熟に重要な転写因子であるT-betやBlimp1と同様に、活性化後に急激な発現上昇を示し、その後、記憶形成に伴って減少する傾向を示した。一方、REV-ERBは、記憶細胞の分化に重要なEomesやBcl6と同様、ナイーブTリンパ球で一定の発現が見られ、活性化直後に急激に低下するが、その後回復して記憶期に特に高い発現を示した。REV-ERBリガンドは、活性化Tリンパ球の生存を大きく向上させたのに対し、RORリガンドの存在下では逆に生存が低下した。生体内での抗腫瘍効果を検討したところ、溶媒であるDMSO処理後のTリンパ球を投与された対照群にくらべ、REV-ERBリガンド処理後のTリンパ球を投与された実験群では、腫瘍の成長が顕著に阻害されるとともに、マウスの生存期間が延長した(下図)。



研究テーマ

未利用資源のピオーネ廃棄物を利用した機能性食品・機能性化粧品の開発

研究者 ▶ 学校法人加計学園 岡山理科大学：濱田 博喜（はまだ ひろき）

①研究の背景及び目的の本文

岡山県の特産品であるピオーネぶどうは、ワインなどにも加工されているが、ぶどう皮などの大量の廃棄物が問題となっている。すなわち、ワイン工場、ジュース工場などにおいて、加工の際に生じるピオーネぶどう皮は廃棄物として扱われ、この大量の廃棄物の処理法の検討が課題となっている。また、ピオーネぶどう皮などの廃棄物に含まれる生理活性化合物には、寿命延命効果や抗メタボリックシンドローム作用があることが報告され、食品分野で注目を浴びている。このため、ピオーネぶどうの廃棄物からの抽出物を資源として、有効に利用する事が期待されている。これに対して、既存法による農業廃棄物からの抽出には、溶媒と大型の濃縮装置を使った抽出過程が行われている。廃棄物からの溶媒抽出においては、抽出のあとに、沈殿物が生じる。原料となるピオーネぶどう廃棄物と比較して、総重量は減少するが、抽出によって生じる沈殿物は廃棄物となるため、これ以上は処理することができなくなり、廃棄物の問題は解決されない。ピオーネぶどう廃棄物の利用の産業化のためには、ピオーネぶどう皮の効果的な抽出技術の開発が必要不可欠である。本研究では、ピオーネぶどう皮の効果的な抽出法の開発を行い、さらに、ピオーネぶどう廃棄物の抽出物の有効利用を検証するため、体の内部から美容と健康を促進する、飲むタイプの化粧品として、ピオーネぶどう皮抽出物の剤型化を試みた。

②研究方法

本研究では、現在の農業廃棄物からの抽出時の問題点を解決する、ピオーネぶどう皮の効果的な抽出法の開発を行った。手法として、酵素を利用する新規なピオーネぶどう皮抽出法の検討を行った。加水分解酵素を利用したピオーネぶどう皮の処理を行い、抽出の際に、沈殿物を廃棄物として生じることの無い手法の開発を行った。その際に、酵素反応に最適な条件検討を行い、ピオーネぶどう皮を液化するまで抽出し、ピオーネぶどう廃棄物の資源としての有効活用を図った。使用した酵素は、市販の酵素である加水分解酵素 A、C、D、F、G を使用して、一定量のピオーネぶどう皮の酵素処理を行い、液化率を比較した。さらに、酵素処理をする際の、反応温度、反応添加物の効果を調べた。

③研究成果

ピオーネぶどう皮の抽出条件において、酵素として、加水分解酵素 F と G を使用した場合、および、温度は 36°C で酵素反応を行った場合、1 mM の濃度の Mn²⁺ などの金属イオンを添加した場合、また、10 mM のジチオトレイトルを添加した場合が最適であった。ピオーネぶどう廃棄物の抽出物を有効利用するため、高血圧予防、血糖値改善、コレステロール値改善、中性脂肪抑制などの生活習慣病リスクにも低減作用が期待される、体の内部から美容と健康を促進する、飲むタイプの化粧品として、錠剤型の機能性食品・化粧品を開発した（下図）。



研究テーマ

茶系飲料摂取による腸内細菌改善および肥満抑制効果の分子メカニズム解明

研究者 ▶ 早稲田大学 先進理工学部 生命医科学科：常田 智（つねだ さとし）

1. 緒言

肥満の人口は世界的に増加しており、成人の 44% が肥満傾向にあるとされている。また、肥満が大きな要因とされる生活習慣病の人口が増加しており、肥満改善は重要な課題である。肥満の原因には遺伝的要因と環境要因があり、環境要因には食習慣や運動不足など様々な要因が含まれる。この肥満の環境要因の一つとして、腸内細菌叢が関与していることが明らかになってきた。一方、抗肥満効果があるとされる機能性食品の活用にも関心が寄せられている。例えば、ポリフェノールを含む茶系飲料には抗肥満効果があることが示唆されている。以上のような背景を踏まえ本研究では、肥満モデルマウスを用いて、茶系飲料に含まれるポリフェノールが腸内細菌叢および抗肥満に与える影響を分子生物学的に検証した。

2. 方法

茶系飲料として、緑茶、グアバ茶、黒豆茶、紅茶を用いた。緑茶、グアバ茶、黒豆茶は、ティーバッグ 1 袋をそれぞれ 80°C のお湯 500 ml で 5 分間抽出した。紅茶は茶葉 3 g に対し、100°C のお湯 400 ml で 3 分間抽出した。抽出後、各飲料は 0.2 μ m のメンブレンフィルターで濾過を行った。6 週齢♀の C57BL/6J マウスに 3 週間標準食を与え予備飼育を行った後、高脂肪食を 12 週間与えることで肥満マウスを作製した。作製した肥満マウスを群分けし、標準食とポリフェノール含有飲料を 8 週間与えた。マウスは 1 週間おきに体重、摂食量、飲水量を測定した。また、0 日目、4 週目、8 週目に糞便を採取して DNA を抽出し、PCR 反応により 16S rRNA の V1 ~ V2 領域を增幅した後、精製した PCR 産物の 16Sr RNA 塩基配列を次世代シーケンサーによって解析した。8 週目にイソフルランを用いてマウスを解剖し、臓器の回収および心採血を行った。採取した血液から血清を分離した後、血清中の中性脂肪量、総コレステロール量、GOT 量、GPT 量を測定した。また、回収した肝臓を破碎した後、RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法によって各種遺伝子の発現量を算出した。

3. 研究成果

マウスに 12 週間高脂肪食を与え、肥満を誘導した。12 週間経った段階でランダムに群分けを行い、その段階を 0 日目として標準食および飲料の給餌を開始した。各飲料が肥満マウスの体重に与える影響を調べるため、1 週間おきの体重の推移を調べた。紅茶群とグアバ茶群では体重減少率が大きいことがわかった。また、水群では 2 週目を境に体重が大きく再増加しているのに対し、ポリフェノールを含む飲料群ではそのような現象はほとんど見られなかった。さらに、肥満改善の検証として、血中のバイオマーカー量を測定した。その結果、黒豆茶を除く茶系飲料群において中性脂肪量が減少していた。一方で、血中コレステロール量、GOT および GPT などの酵素量には差がないことがわかった。次に各群の糞便 DNA を抽出し、飲料が細菌叢に与える影響を解析した。細菌叢は飲料を与える前の 0 日目および解剖直前の 8 週目の糞便サンプルを用いて解析した。さらに、腸内細菌の代表的な門である Firmicutes / Bacteroidetes 比 (FB 比) も求めた。飲料を与えた後の 8 週目には茶系飲料群と水群で菌叢が異なることがわかった。特に、茶系飲料群では、Lachnospiraceae 科が減少していることで水群と菌叢が大きく異なっていることがわかった。また、水群に比べて茶系飲料群では FB 比が小さくなる傾向にあることがわかった。茶系飲料による中性脂肪の減少に寄与している要因として、肝臓における遺伝子発現

変化を考えた。そこで、定量 PCR によって肝臓の中性脂肪合成、中性脂肪分解、脂肪酸トランスポーターに関する遺伝子の発現量を調べた。その結果、特に中性脂肪の減少していた緑茶群、紅茶群、グアバ茶群では中性脂肪分解遺伝子である HSL や TGH の発現量が増加していることがわかった。また、これらの群では脂肪酸トランスポーターである CD36 などの遺伝子も発現が亢進していた。以上の結果から、特に緑茶群、紅茶群、グアバ茶群では中性脂肪分解が促されることで中性脂肪が減少し、恒常性が維持されている可能性が示された。本研究の結果から、茶系飲料に含まれるポリフェノールの肥満改善に対する有用性が示唆された。中でも紅茶やグアバ茶は効果が大きいことが示された。また、ポリフェノールは細菌叢や肝臓における遺伝子発現にも影響を及ぼしており、それらが肥満改善に寄与した可能性が示された。

研究テーマ

高齢者の健康な生活を妨げる大脳皮質性視力低下からの回復方法を探る研究

研究者 ▶ 徳島大学 大学院医歯薬学研究部医科学部門 生理系機能解剖学分野：富田 江一 (とみた こういち)

①研究の背景と目的

ヒトは高齢になると、視力が低下して日常生活を送る上で不便を感じるようになることが多い。この視力低下の原因として、レンズの濁り（白内障など）やレンズ調節能力の低下といった眼の機能障害・低下が大きく取り上げられている。一方、視覚認知を司る大脳皮質の視覚認知能力の衰えも高齢者の視力低下の主要な原因の1つと考えられるが、これに関する研究は非常に遅れており、何故加齢とともに大脳皮質の視覚認知能力が衰えるのか成因機序は全く不明である。

本研究では、以下3点の解析を推進し、高齢者に認められる大脳皮質の視覚認知能力の衰えによる視力低下に関する理解を深めることと、その治療方法の開発を目指した。

1. 大脳皮質に注目して、加齢による大脳皮質第一次視覚野の組織学的構築の崩れが、大脳皮質の視覚認知能力の衰えを誘引し、最終的に高齢者の視力を低下させると予想を立て、その仮説を実験的に証明した。
2. このような組織学的構築の崩れを引き起こす分子病態を明らかにした。
3. これら研究成果を基に、加齢による大脳皮質の視覚認知能力の衰えから来る視力低下の治療方法の開発を進めている。

②研究方法

実際には、視覚認知に重要な大脳皮質第一次視覚野上の機能ユニット「眼優位カラム」に注目した。ヒト・サル・ネコなど視覚系の発達した哺乳類では、同側・反対側眼からの視覚情報は、同じ大脳半球に伝えられるものの、それぞれ分かれて第一次視覚野上の機能ユニット「同側・反対側眼優位カラム」に入力する。このように同側・反対側眼優位カラムが、同側・反対側眼からの視覚情報を別々に効率よく伝達・処理するため、個体は遠近感などの視覚情報を短時間で正確に認知できる。この事実を基に、下記の3つの研究を計画した。

1. 申請者は、高齢化すると、第一次視覚野において同側・反対側眼優位カラムの区分が不明瞭になったため、各カラム内での視覚情報処理能力が低下する。そして、大脳皮質の視覚認知能力が衰え、最終的に個体レベルで視力低下が引き起こされると予想した。今回、この予想を証明するために、組織学的手法で眼優位カラムを可視化し、老年期に眼優位カラムの区分が不明瞭になっているかどうかを検討した。
2. 同側・反対側眼優位カラムの区分を維持する働きを持つと考えられる、多くの年齢で同側眼優位カラムに特異的に発現しているシャペロン「同側眼優位カラム特異的シャペロン」の発現が、老年期に乱れていたり変化しているかどうかを *in situ hybridization* 法を用いて検討した。
3. 老年期に、同シャペロンの機能を強化することで、同側・反対側眼優位カラムの区分が明瞭な状態に戻り、個体の視力が回復するかどうかを検討する予定である。

③研究成果

下記のように、研究方法に記した1. & 2.については研究成果を得ており、3.については研究を継続している。

1. 老年期に、眼優位カラム構築を検討したところ、成人期に比べてわずかに乱れと変化が生じていた。
2. 老年期に、同シャペロンの発現パターンを調べたところ、発現しているところと発現していないところの境界部が、成人期に比べてわずかに乱れていた。1. & 2. より同シャペロンの発現が乱れ、そのため同側・反対側眼優位カラムの区分が不明瞭になっていると考えられる。
3. これについては、現在研究を継続中である。

研究テーマ

高効率かつ持続性の高いオルガネラの生細胞イメージング

研究者 ▶ 長崎大学 生命医科学域(薬学系)：大庭 誠(おおば まこと)

①研究成果の本文

本研究では、ペプチドを基盤とした、オルガネラ選択的に高効率かつ長期間集積できるイメージング剤の開発を目的とした。特定のオルガネラへの集積性を向上させ、長期間作用し続けるペプチド開発の戦術として、非天然型アミノ酸の一つである α, α -ジ置換アミノ酸を利用した。 α, α -ジ置換アミノ酸をペプチドに導入すると、ヘリックス二次構造を安定化させ、生体内に豊富に存在している加水分解酵素への抵抗性を獲得することが知られている。実際に細胞膜透過性ペプチドに α, α -ジ置換アミノ酸を導入したところ、ヘリックス構造安定化に伴う細胞膜透過機能の向上と、機能の持続化を達成することができた。

また、オルガネラとしてはミトコンドリアを標的とした。ミトコンドリアに集積することが報告されているcytcoxをベースにペプチドを設計したが、予想に反してミトコンドリアへの集積性は低いものだった。 α, α -ジ置換アミノ酸を導入してヘリックス構造の安定化を図ったが、その効果も低いものだった。一方、蛍光物質であるカルボキシフルオレセイン(CF)の導入位置が集積性に若干影響を与えることが示唆された。また、細胞内にエンドサイトーシスを介して取り込まれたペプチドが後期エンドソーム・リソソームに留まり、細胞質へ脱出できていないことも、ミトコンドリアへの低い集積性の要因であることが示唆された。これらの成果より得られた知見より、ペプチドを再設計して機能評価を行っている。

②研究方法

量子ドット-ペプチドコンジュゲートを合成する前に、まずは導入が容易なカルボキシフルオレセイン(CF)を蛍光物質としてペプチドに導入した。ペプチド合成ならびにCFの導入はFmoc固相法により行った。ミトコンドリアに集積することが知られている12残基からなるペプチド配列cytcoxを基盤に、N末端にCFを導入したもの、C末端にCFを導入したもの、ヘリックス構造安定化のためにC末端に非天然型アミノ酸を導入したもの、カチオン性のアミノ酸からなるペプチドユニットをC末端に導入したものなどを合成した。合成したペプチドは、HPLCとMALDI-TOF-MSにより純度ならびに分子量を確認した。ペプチド二次構造解析はCDスペクトル測定により行った。ミトコンドリアへの集積性については、共焦点顕微鏡観察により評価した。

③研究成果

1. Makoto Oba, Masakazu Tanaka, Cell-penetrating peptide foldamers for drug delivery systems, 10th International Peptide Symposium (Kyoto, December 6th, 2018)
2. Makoto Oba, Structure and function of peptide foldamers containing unnatural amino acids, Biomacromolecular RIKEN Seminar (Wako, January 23rd, 2019)

研究テーマ

転移 RNA のメチル基修飾が乳ガンに与える影響

研究者 ▶ 名古屋市立大学大学院 医学研究科 病態モデル医学分野：大石 久史（おおいし ひさし）

①研究の背景および目的

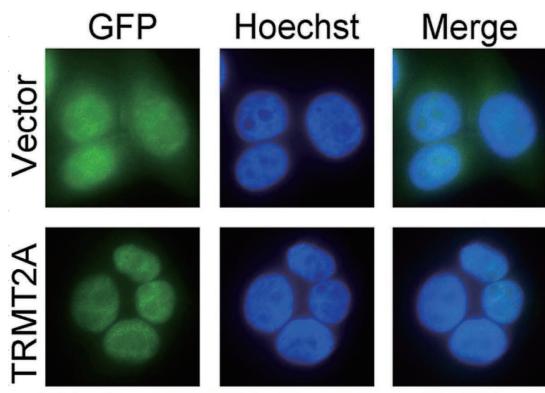
ゲノム DNA の修飾は、エピゲノムの主要な構成要素として転写制御に重要な役割を果たしているが、近年、RNA 修飾も、遺伝子発現制御に重要な役割を有し、エピトランスクリプトームという新たな研究分野が開かれつつある (O'Connell M et al, RNA 2015)。申請者は、これまで酵母の RNA メチル化の研究から、真核生物の成熟 tRNA の 42 番目と 54 番目にメチル基を付加する Trmt2a 遺伝子に注目し、その機能解析を行ってきた。一方で、アメリカの研究グループは、HER2 陽性の乳ガン組織において、TRMT2A 陽性の乳ガン患者は、再発のハイリスク群であると報告した (Hicks DG et al, BMC Cancer, 2010)。本研究提案の目標は、Trmt2a 遺伝子の機能を明らかにし、乳ガン患者において、なぜ TRMT2A の発現によって、再発率がほぼ 2 倍超まで増加するのか、その分子メカニズムを、tRNA のメチル化と細胞ストレス応答の観点から明らかにすることである。

②研究方法

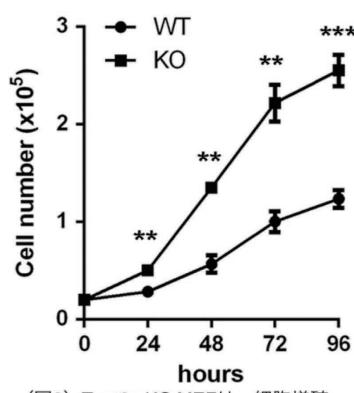
Trmt2a 過剰発現細胞株の解析：HeLa 細胞に、マウス Trmt2a 発現プラスミドを導入し、安定発現細胞株を樹立した。Trmt2a 遺伝子欠損マウスの解析：Trmt2a 遺伝子欠損 ES 細胞を、Knockout Mouse Project (KOMP) から導入した。アグリゲーション法によってキメラマウスを得たのち、C57BL/6 マウスと交配して系統樹立を行い、表現系解析を行った。特に、13.5 日胚から、マウス胎性線維芽細胞 (MEF) を樹立し、細胞増殖能の評価を行った。

③研究成果

Trmt2a の細胞内局在は核にあることが明らかになった (図 1)。現時点では、Trmt2a を過剰発現／欠損させた場合の tRNA のメチル化の状態を明らかにはできていないものの、このタンパクが核に局在することは、メチル基転移酵素としての役割と相違しない。そして、過剰発現細胞は、細胞増殖が有意に遅延しており、特に G1 期が短縮していた。また、細胞の Viability に変化はなく、Trmt2a はアポトーシスとの関連を認めなかった。逆に、遺伝子欠損マウスの MEF は、細胞増殖が亢進し、有意な細胞数の増加を認めた (図 2)。6 ヶ月齢までの遺伝子欠損マウスに乳ガンを含む明らかな発ガン傾向を認めないものの、死亡個体のなかに担ガンの個体を 2 例に認めており、このことは、Trmt2a がおそらく tRNA のメチル化状態、細胞増殖の亢進を介して、乳ガンその他の発ガン機構に関与することを強く示唆する。



(図1) (上：GFP発現細胞、下：GFP-Trmt2a発現細胞)
GFP-Trmt2aのGFP発現は、核に認められる。



(図2) Trmt2a KO MEFは、細胞増殖が亢進する。

研究テーマ

健康と美を目指したリン酸化制御に基づく皮膚タイトジャンクションバリアの保護化合物の探索

研究者 ▶ 岐阜薬科大学 生命薬学大講座生化学研究室：五十里 彰（いかり あきら）

①研究成果の本文

皮膚は体外と体内の境界をなすバリアとして働き、体外からの病原菌や異物の侵入を防ぐとともに、体内からの水分子やイオンの漏出を防ぐ。皮膚にはコラーゲンなどによって形成される角質層と細胞間接着分子によって形成される顆粒層の二重のバリアが存在するが、両者の関係は十分に解析されていない。顆粒層バリアの形成には、タイトジャンクションに発現するクローディンが重要な役割を担う。クローディンには 27 種類のサブタイプが同定されており、組織選択的に各サブタイプが発現する。クローディン-1 を欠損した実験用マウスは、脱水症状によって生後まもなく死亡するため、顆粒層バリアの形成にクローディン-1 が重要な役割を果たすことが明らかになった。最近、クローディン-1 の発現量がアトピー性皮膚炎の症状と逆相関することが報告され、皮膚疾患との関連も明らかになってきた。

これまでに申請者はクローディン-1 の細胞内局在制御機構を検討し、タイトジャンクションへの分布にスレオニン残基のリン酸化が必要なことを解明した。また、酸化ストレスによってクローディン-1 がタイトジャンクションから解離することを見出した。そこで本研究では、顆粒層と角質層の二層性バリアの形成におけるクローディン-1 の関与を検討した。さらに、酸化ストレスによるクローディン-1 の局在異常に対し、改善作用を有する化合物を探索した。本研究により、皮膚バリアの新たな制御機構が解明され、健康と美の持続・維持に有用な機能性香粧品の開発に繋がることが期待される。

② 研究方法

ヒトケラチノサイト由来の HaCaT 細胞を実験に使用した。蛍光免疫染色法により、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、クローディン-1 の細胞局在を調べた。免疫沈降法とウエスタンブロット法により、クローディン-1 のリン酸化量と発現量を解析した。Lipofectamine 2000 を用いて、細胞に siRNA をトランスフェクションした。リアルタイム PCR 法で保湿因子の mRNA 量を測定した。Suc-LLVY-AMC を基質として、蛍光測定法によりキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を算出した。細胞をトランスウェルに培養し、上皮膜間電気抵抗値 (TER) とルシファーイエロー (LY) 透過性を測定することにより、細胞間透過性を評価した。

③ 研究成果

★ 角質層バリアに対するクローディン-1 発現の影響

siRNA を用いてクローディン-1 発現をノックダウンしたところ、カリクレインファミリーに属する KLK7 の発現量が低下した。KLK7 は角質層において角層の剥離に関与し、角質層バリアの形成に寄与する。KLK7 はキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を有するため、培地中の活性を測定したところ、クローディン-1 ノックダウン細胞で活性が低下した。一方、天然保湿因子の形成に関与するブレオマイシン水解酵素やフィラグリンの mRNA 発現量は変化しなかった。以上の結果から、クローディン-1 は KLK7 の発現調節に関与することが明らかになった。クローディン-1 の発現低下は顆粒層のバリア崩壊を引き起こすだけでなく、角質層バリアにも影響を及ぼすことが示唆された。

★ 顆粒層バリアに対するクローディン-1 の脱リン酸化の影響

細胞を過酸化水素 (200 μ M) で処理したところ、クローディン-1 のリン酸化スレオニン量が低下し、クローディン-1 がタイトジャンクションから解離した。これまでにタンパク質のリン酸化に関与するプロテ

インキナーゼ C の活性が低下することを見出していたが、本研究では脱リン酸化に関与するプロテインホスファターゼ活性が増加することを発見した。野菜や果物などに含まれる種々のフラボノイドを用いて、クローディン-1 の局在改善作用を検討したところ、ルテオリンはプロテインホスファターゼ活性を抑制し、タイトジヤンクションにおけるクローディン-1 の分布量を増加させた。また、TER の低下と LY 透過性の増加が、ルテオリン処理によって改善した。以上より、活性酸素によるクローディン-1 の局在異常とバリア崩壊に対し、ルテオリンはプロテインホスファターゼの抑制を介して保護作用を示すことが示唆された。

研究テーマ

プロテインエンジニアリングを指向した含フッ素アミノ酸の合成に関する研究

研究者 ▶ お茶の水女子大学 基幹研究院 自然科学系：矢島 知子（やじま ともこ）

研究の目的： α -アミノ酸は人体を構成する必須の化合物であり、タンパクの構成要素である。人工的なアミノ酸の創成は、医農薬品の開発、タンパクへの取り込みによる新たな機能を有するたんぱく質を作り出すプロテインエンジニアリングの面からも期待される。特にフッ素を有するアミノ酸は「テフロンプロテイン」として撥水性や耐熱性を付与し、その構造制御も可能であることから非常に期待されている。しかし、含フッ素アミノ酸の不斉合成の例は限られており、簡便な合成法の開発は待ち望まれている。この様な背景の中、我々はこれまでに含フッ素アミノ酸の不斉補助基を用いた合成、効率的なフルオラス法による分割等の手法を用いてペルフルオロアルキル基を有するアミノ酸の合成法を開発してきた。これらの方法は、紫外光照射による光ラジカルペルフルオロアルキル化反応を用いてきたが、紫外光を用いる反応では高圧水銀ランプを用いることから高エネルギーを用いる環境負荷の大きな反応であった。今回、この点を克服するために可視光を用いたキラル含フッ素 α -アミノ酸類の合成法を開発することを研究目的とした。

研究方法：我々がこれまでに見出した、有機色素を用いた末端アルケン、アルキンへのヨウ化-ペルフルオロアルキル化反応をデヒドロアミノ酸へのヒドロ-ペルフルオロアルキル化反応に適用し、高い立体選択制でのペルフルオロエオシン Y を有機アルキル基を有するアミノ酸の合成について検討を行った。この反応は入手容易な有機色素である触媒とし、LED を光源とする、金属を一切用いない環境適応型の反応である。

研究結果：合成した不斉補助基としてカンファーサルタムを有するデヒドロアミノ酸に対して、エオシン Y を用いた可視光反応を適用した。種々検討を行った結果、エオシン Y 1 mol% 存在下、アセトニトリル中で白色 LED による光照射を行った際に最も良好な収率で生成物を得ることができた。そこでこの反応条件を用いて種々のペルフルオロアルキルを用い検討を行った (Table 1)。その結果、種々のペルフルオロアルキルラジカルにおいて良好な収率、立体選択性で生成物を得ることに成功した。さらに、得られた生成物のペプチドへの変換を行った。水酸化リチウムを用いてカンファーサルタムをカルボン酸へと変換し、フェニルアラニンと縮合を行った。その後、メチルヒドラジンを用いてフタルイミドの脱保護を行うことにより含フッ素アミノ酸のジペプチドメチルエステルを得た。さらに、反応機構の考察も行った。

以上、本研究では、エオシン Y を光レドックス触媒とする可視光ペルフルオロアルキル化反応を用いて、高い立体選択制で種々のペルフルオロアルキル基を有するアミノ酸の合成を可能とした。これは簡便で安全な含フッ素アミノ酸の合成法であり、今後より複雑なペプチドやタンパクへの取り込みにより、プロテインエンジニアリングの発展につながると考えている。

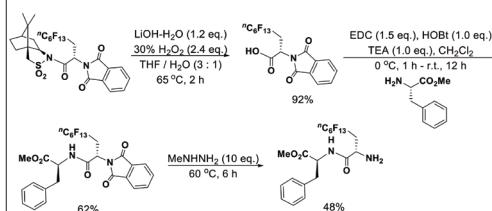
Fluorine notes, Vol. 6, 121, 2018; DOI: 10.17677/fn20714807.2018.06.01 に掲載

Table 1. Results of Perfluoroalkyl radical addition.

entry	EY	Rf	time	yield	% de ¹⁾
1	1 mol%	$^{10}\text{C}_8\text{F}_{13}\text{I}$	6 h	82%	>98
2	1 mol%	$^{10}\text{C}_4\text{F}_9\text{I}$	6 h	89%	>98
3	1 mol%	$^{10}\text{C}_3\text{F}_7\text{I}$	6 h	84%	>98
4 ²⁾	1 mol%	$^{10}\text{C}_3\text{F}_3\text{I}$	16 h	72%	>98
5	5 mol%	$^{10}\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Et}$	16 h	73% ¹⁾	>98

1) Determined by ^1H NMR. 2) $^{10}\text{CF}_3\text{I}$ (16 eq.)

Scheme 1. Results of Synthesis of Amino Acid.



研究テーマ

睡眠不足が心と肌に及ぼす影響の神経回路レベルでの理解

研究者 ▶ 筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構：櫻井 勝康（さくらい かつやす）

①研究の背景及び目的

我々人類の文明や文化の発達は、生活の豊かさをもたらしてきた。例えば、インターネットやスマートフォンなどの発達は、これまでの生活スタイルを一変させただけでなく、社会的コミュニケーションの様式さえも劇的に変えている。一言で言い表すならば、便利になったのである。しかし、この生活の豊かさとは反比例するかのように、多くの生物の生存に必須である“睡眠”は、その量、質とも損なわれつつある。すなわち、我々は生活の豊かさと引き換えに、生命活動の根源のひとつとえることができる睡眠とい恒常性維持機構を犠牲にしているのである。この、現代社会の大きな問題である“睡眠不足”は心身ともに様々な悪影響を及ぼすことが報告されている。「人間の健康と美」という観点から見れば、睡眠不足は心の健康と美、さらには肌の健康と美に対して悪影響をあたえる。こうした問題に対する一番の解決方法は、十分な睡眠をとることである。しかしながら、現代社会においては十分な睡眠を確保することは非常に困難である。それならば、睡眠不足状態でも、心と肌の健康や美を保つ、もしくは回復することができる方法を開発することはできないであろうか？そのためには、睡眠不足が心や肌に影響をおよぼすメカニズムの詳細を知る必要がある。現在のところ、睡眠不足は自律神経やホルモンバランスを乱すことによって、心や肌の状態に悪影響を及ぼすと考えられている。しかしながら、その詳細な神経基盤、すなわち睡眠不足がどのようにして脳活動に影響を与え、睡眠不足がどのようにして脳活動に影響を与え、心や肌の健康に悪影響を及ぼしているのかは明らかにはされていない。そこで本研究課題では、睡眠不足が心や肌の状態に与える影響を、神経回路レベルで理解することを目的とする。

②研究方法

睡眠不足によって神経活動が変化する脳領域および神経細胞群の同定

睡眠不足によって神経活動が変化する脳領域をマッピングするために、マウスを睡眠不足状態にし、それにより活性化した神経細胞群を組織化学的手法で可視化する。活性化した神経細胞のマーカーとしては、神経活動依存的に発現が誘導される Fos 遺伝子を用いる。睡眠不足状態のマウスを作出するためには、以下の方法を用いる。明期（マウスの睡眠時）にマウスのケージをシェーカーにセットし、振動を与え続けることにより、その睡眠を妨げる。6時間睡眠を妨げた後、灌流固定を行い、脳を摘出する。摘出した脳を用いて、脳すべての切片を作成する。すべての脳切片を Fos の抗体を用いて染色する。染色像を共焦点レーザー顕微鏡によって取得する。コントロールとしては、断眠を行って断眠を行っていないマウス脳を用いる。

③研究成果

睡眠不足（断眠 6 時間）のマウス脳の神経活動を Fos の免疫組織化学染色によって可視化した結果、興味深い脳領域において神経活動の亢進が認められた（図 1）。同定された脳領域は脚橋被蓋核である。この脚橋被蓋核は脳幹に位置する神経核のひとつである。図 1 で示したように、睡眠不足状態のマウス脳の脚橋被蓋核の一部（底側部）において、顕著な Fos 陽性神経細胞の増加が観察された。脚橋被蓋核は睡眠・覚醒に関わるだけでなく、痛みや情動など様々な脳機能に関わることがわかりつつある。このことから、睡眠不足が脚橋被蓋核に存在する神経細胞群に作用することにより、睡眠の恒常性維持機構のみならず、自律神経系やホルモンバランスに影響を与えていることが考えられる。今後、個体数を増やし与えていることが考えられる。今後、個体数を増やしてこの現象を確認し、さらにはこれらの神経細胞群の活動を操作し、その機能の詳細を明らかにする必要がある。

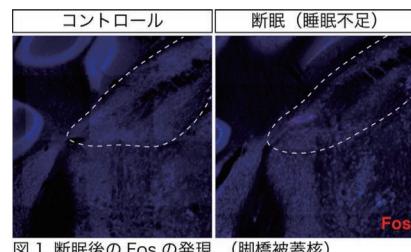


図 1. 断眠後の Fos の発現 (脚橋被蓋核)

研究テーマ

骨芽細胞の効率的培養のための 高機能性ペプチド材料の創製

研究者 ▶ 東京工業大学 生命理工学院：堤 浩 (つつみ ひろし)

本研究では骨芽細胞の効率的培養のために、当研究室で見出されたカルシウムイオン応答性自己組織化ペプチド E1Y9 からなるヒドロゲルを基盤とした細胞足場材料の創製を行った。E1Y9 はカルシウムイオン応答的にヒドロゲルを形成するため、カルシウムイオンを豊富に内包した細胞足場材料として機能し、骨芽細胞の培養と骨形成に適していると考えられる。この E1Y9 に骨芽細胞への分化や増殖を促進する生理活性ペプチド配列を付与することにより、骨芽細胞の培養に適した高機能性の足場材料としての機能化に取り組んだ。骨芽前駆細胞として MC3T3 E1 細胞を用い、細胞の接着や分化を促進することが期待される4種類の生理活性配列を導入した E1Y9 誘導体を設計・合成し、ディスク状に成形した E1Y9 ヒドロゲルを調製し、細胞の培養と分化誘導を行った。

研究方法

以下に示す4つのペプチドを Fmoc 固相合成法により合成した。生理活性配列は E1Y9 ペプチドの C 末端側に3残基のグリシンスペーサーを介して導入している。合成したペプチドは逆相 HPLC により精製し、ESI-MS により同定を行った。

E1Y9: Ac-EYEYKYEYKY-NH2

E1Y9-ALK: Ac-EYEYKYEYKY-GGG-ALKRQGRTLYGF-NH2

E1Y9-DGR: Ac-EYEYKYEYKY-GGG-DGRGDSVAYG-NH2

E1Y9-PRG: Ac-EYEYKYEYKY-GGG-PRGDSGYRGDS-NH2

合成したペプチドの自己組織化特性は、赤外吸収分光法によりペプチドの二次構造の解析、および透過型電子顕微鏡によるナノ構造の観察により評価した。また、カバーガラス上にシリコンリングを固定したマイクロウェルを作成し、このウェル中でペプチド水溶液をカルシウムイオン処理することによりディスク状のヒドロゲルを調製し、MC3T3 E1 細胞の培養を行った。さらに、培地に L-アスコルビン酸と β -グリセロリン酸を添加して、骨芽細胞への分化誘導を行った。

研究成果

生理活性配列を導入した3つの E1Y9 誘導体はいずれも β シート構造へと自己組織化することがわかった。また、E1Y9-DGR と E1Y9-PRG は単独でも E1Y9 と同様のナノファイバーを形成できることができることがわかった。一方、E1Y9-ALK はナノファイバーを形成するものの、一部凝集体を形成していた。また、3つのペプチドはカルシウムイオン処理で安定なヒドロゲルを形成することができなかった。そこで、これらの E1Y9 誘導体と E1Y9 を任意の割合で混合してゲル形成試験を行ったところ、重量比で 20% の E1Y9 誘導体を混合した場合、安定なヒドロゲルを形成可能であることを見いだし、生理活性配列を提示したヒドロゲル材料を調製できることを明らかにした。

生理活性配列を提示したヒドロゲル上で MC3T3 E1 細胞の培養を行った結果、3つの生理活性配列を提示したヒドロゲルは E1Y9 単独のヒドロゲルよりも優れた細胞接着性を示し、細胞増殖を促進することがわかった。中でも、E1Y9-ALK が最も優れた細胞増殖促進能を示した。次に、培養した MC3T3 E1 細胞の骨芽細胞への分化誘導を行った。まず、分化誘導初期のマーカータンパク質であるアルカリフォスファターゼの活性を調べた結果、3つの生理活性配列を提示したヒドロゲルは E1Y9 単独のヒドロゲルよりも高い活性を示すことがわかった。特に、E1Y9-ALK が最も高いアルカリフォスファターゼ活性を誘導していた。

そこで、E1Y9-ALK ヒドロゲルに注目して、分化誘導中期から後期のマーカータンパク質であるオステオポンチンと RUNX2 の発現を蛍光免疫染色により評価した。その結果、E1Y9-ALK は E1Y9 単独よりマーカータンパク質の発現を増強させていることがわかった。興味深いことに、分化誘導後 7 日後では転写因子である RUNX2 が核内に局在していたが、14 日後では RUNX2 の局在が細胞質に変わっていることがわかった。このような RUNX2 の局在の変化は E1Y9 ヒドロゲルでは見られなかったことから、E1Y9 に導入した生理活性配列（特に ALK）が MC3T3 E1 細胞の骨芽細胞への分化を促進しているものと考えられる。これらの結果から、生理活性配列を導入した自己組織化ペプチドを足場材料とすることにより、骨芽細胞の効率的培養ができることがわかった。

研究テーマ

痩せの大食いマウスに着目した PPAR-gamma2 の生体機能の解析

研究者 ▶ 徳島文理大学 香川薬学部薬学科：大島 隆幸（おおしま たかゆき）

①研究成果の本文

本申請課題では、RNA 干渉法を利用した PPAR-gamma2 特異的ノックダウントランスジェニックマウス (KD) を作出して、その発現量に応じたマウスをライン化することで、PPAR-gamma2 の生体内での機能や疾患との関連性を明らかにすることを目的とした。得られた成果は以下の通りである。

- 1). 90 日間の摂食量は、野生型(WT) に比べ、KD マウスの方が有意に高かった。
- 2). 身長差は無かったが、体重は KD が低く「痩せの大食い」の表現系を示した。
- 3). 臓器、組織別重量を測定した結果、腎臓、肝臓、脾臓および心臓に差は認められなかったが、脂肪組織の中でも、肩甲骨間の褐色脂肪以外の白色脂肪細胞は、KD の方が少なかった。
- 4). 各血中パラメーターは、KD はインスリン濃度および血糖値が高かった。
- 5). 高脂肪食負荷後の主要臓器を調べた結果、WT で認められた脂肪肝は KD では全く認められなかった。

②研究方法

まずこれまでに作成している KD マウスのうち、最もノックダウン効率の高い（約 90% 抑制）ものを選択し、90 日間の飲水量、摂食量、体重および身長を断続的に測定した。また同時に、高脂肪食を負荷した個体群に対しても測定した。90 日後に各マウスの血中パラメーターを測定するとともに、主要臓器と器官を取り出してそれぞれの重量、肉眼的知見を得た。中でも肝臓に関しては、さらにパラフィン包埋後に組織切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン染色および Oil red O 染色を行った。また今後、細胞分子生物学的解析を行うために、胎児線維芽細胞を調整するとともに、主要臓器から全 RNA を抽出した。

③研究成果

上記の①とも重複する部分もあるが、KD マウスは摂食量が多いにも関わらず体重は有意に少ないとから、ヒトで見られる痩せの大食いに似た表現系を呈した。まずこの原因として様々な血中パラメーターを測定したが、検出感度の低いものや商品化されていないものに関しては、その差は認められなかった。また過食に関連する原因因子の候補群に関しても測定を試みたが、検出することができなかった。今後はより感度の良い抗体等を入手し、この表現系の原因遺伝子の同定を継続して行う。

また高脂肪食負荷時に認められない脂肪肝については、PPAR-gamma2 の標的遺伝子群および脂質代謝に関わる遺伝子群の発現変動を解析する。これは各主要臓器から抽出した全 RNA を用いて、定量的 PCR を行う。これにより、脂肪肝の原因遺伝子の同定とともに PPAR-gamma2 の新規ターゲット遺伝子群も明らかに出来る。これは褐色脂肪細胞には変化が無かったが、KD では白色脂肪細胞のみ有意に減少していたという大変興味深い表現系の解明にも繋がり、脂肪細胞の巨大化が原因となる肥満の分子メカニズムを明らかに出来る可能性もある。さらに胎児由来線維芽細胞は、インスリンやデキサメサゾンなどのホルモン添加により、容易に脂肪細胞への分化が可能であり、この細胞を用いて、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化段階における過程のどこに障害があるために脂肪細胞ができなかったのか、PPAR-gamma2 の作用点を遺伝子レベルで詳細に解析することが可能である。

以上の結果より、PPAR-gamma2 の活性を特異的に阻害する薬剤は肥満防止に役立つ可能性があり、大変魅力的である。一方で摂食中枢の異常に起因する過食症になることも十分考えられ、将来的には過食ではないが「食べても太らない」程度の薬剤の開発に繋がることも期待できる。

研究テーマ

低分子化合物併用による新規ミトコンドリア機能向上法の開発

研究者 ▶ 東京工業大学 生命理工学院：小倉 俊一郎（おぐら しゅんいちろう）

①研究成果の概要

加齢・肥満・生活習慣病などにおいてはミトコンドリア機能の低下が報告されている。このミトコンドリア機能を正常に戻すための研究は種々の病態改善に大きく寄与するといえる。これまでにミトコンドリア機能を向上させるアプローチとして、ポリフェノールの一種であるレスベラトロール (RSV) を用いる方法が提唱されている。これは活性化補助因子である PGC-1 α を介してミトコンドリア新生を促し、ミトコンドリア量を増加・活性化させると考えられている。また、これまでに当研究室では、ヘム前駆体であるアミノレブリン酸 (ALA) が細胞のミトコンドリア機能を向上させることを見出していたが、ALA がミトコンドリア新生に及ぼす影響については十分な理解が進んでいなかった。そこで本研究はミトコンドリアの量ならびに質に対する複数のアプローチを統合することによってミトコンドリアの機能向上を目指す。初めに RSV ならびに ALA によるミトコンドリア機能向上のメカニズムを詳細に検討し、両者の単独の効果と併用効果を調べる。異なる経路からミトコンドリア機能向上を促しているため、効果的な機能向上が期待できる。ここで得られる機能向上は「人間の健康と美」に対する新たなアプローチとなる。

②研究方法

本研究では、マウス筋由来細胞株 C2C12 を用いて以下の実験を行った。2 % ウマ血清を用いて分化誘導した細胞に対し 1 mM ALA / 0.5 mM SFC / 50 μ M RSV を添加し、4 日間培養後 PGC-1 α のタンパク質発現解析及びミトコンドリア関連遺伝子群の mRNA 発現解析を行った。また、ミトコンドリア数の指標としてミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数を定量した。

③研究成果

PGC-1 α は転写共役活性化因子として働くが、この活性のためには脱アセチル化が必要であることが報告されている。そこで、PGC-1 α を脱アセチル化する Sirt1 の誘導剤である RSV を ALA・SFC と併用することで、一層効果的なミトコンドリア新生の活性化を目指した。C2C12 において ALA・SFC・RSV の併用により、PGC-1 α によって制御されるミトコンドリア関連遺伝子の mRNA 発現量が増加した (図 1A)。ミトコンドリア数に関しても、ALA・SFC と RSV の併用効果が確認された (図 1B)。以上の結果から、ALA・SFC・RSV の併用がミトコンドリア新生誘導のための有用な手段となる可能性が示唆された。本研究で見いだされたミトコンドリア機能向上法を図 2 にまとめる。本方法は ALA・SFC によって PGC-1 α を誘導し、RSV によって活性型の PGC-1 α を産生させる新しいアプローチであり、極めて効果的なミトコンドリアの機能向上を達成できたと言える。

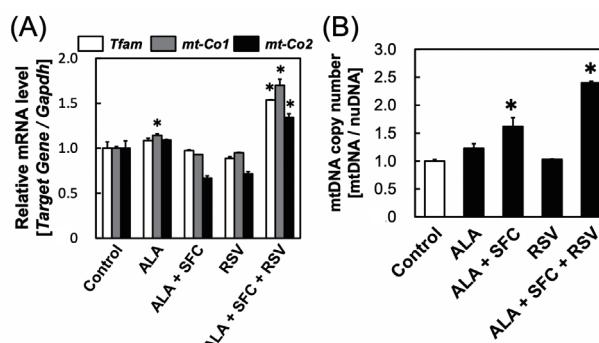


図1 (A) ALA・SFC・RSV 添加後のミトコンドリア関連遺伝子の発現量
(B) ALA・SFC・RSV 添加後の mtDNA コピー数 (*: $p < 0.05$)

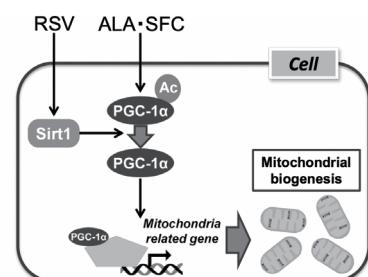


図2 本研究で提唱できた低分子化合物併用によるミトコンドリア機能向上

研究テーマ

ビタミン D の副甲状腺での分子作用機序

研究者 ▶ 横浜市立大学 生命医科学研究科 生体機能医科学研究室：片岡 浩介（かたおか こうすけ）

研究の背景および目的

アンチ・エイジング機能を持つビタミン D は、副甲状腺機能を抑制することにより、カルシウム代謝も調節しているが、加齢に伴ってビタミン D 量は低下する。「ビタミン D／カルシウム／副甲状腺機能」のバランスが崩壊することは、老化を進めてしまう要因のひとつとなっている。しかし、副甲状腺でのビタミン D の作用機序はほとんど分かっておらず、したがって加齢に伴うバランス崩壊を防ぐ手立てもないのが現状である。

研究方法

副甲状腺はごく小さな組織であることから、取り扱いや生化学的解析が困難なことなどが障害となり、研究が進んでこなかったという側面がある。私たちは、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone : PTH) 遺伝子の発現に必須な転写制御因子を4つ (Gata3, Gcm2, MafB, SP1) 同定し、これらを用いて、取り扱いが容易で詳細な解析が可能な非副甲状腺細胞で、PTH 遺伝子の発現をビタミン D 依存的に抑制する系を再構築することに世界で初めて成功した。本研究は、この独自の系を利用して、ビタミン D による PTH 発現抑制の分子機構の解明を目指した。

研究成果

まず、PTH 遺伝子の発現制御領域 (エンハンサー・プロモーター領域およそ 5 kb) から、ビタミン D による発現抑制に必須な領域の特定を行った。すると、Gcm2 と MafB が結合する遠位エンハンサー領域と、Gata3/SP1 が結合する近位プロモーター領域だけで十分であることが分かった。近位プロモーター領域には、ビタミン D の受容体である VDR-RXR が結合すると従来考えられてきた配列が存在するが、それを削除してもビタミン D による発現抑制は起きたことから、VDR-RXR が DNA に直接結合することは、発現抑制には必要がないことが示唆された。

一方で、発現抑制効果に必須な転写因子の特定を行ったところ、MafB と Gata3、あるいは MafB と Gcm2 が共存することが必須であった。このことは、これらの転写因子が特定の組み合わせで共存した場合に起きる何らかのイベントを、ビタミン D/VDR-RXR が抑制することを示唆していた。

そのようなイベントの候補として、転写調節因子の発現量の変化に注目して解析を進めた。例えば、MafB は Gata3 と共存することによって発現量が著しく増加すること（タンパク質として安定化すること）を明らかにした。この現象は、MafB と Gata3 の間での転写活性の協調的な活性化の機構を一部説明するものである可能性がある。また、この現象において MafB の量の変化に関与するユビキチン・リガーゼの候補をひとつ見出している。しかし残念ながら予想に反して、Gata3 共存による MafB 量の変化は、ビタミン D/VDR-RXR の存在下でもなんら影響を受けることはなかった。一方で、副甲状腺の機能を抑制することが知られるカルシウムによるシグナル（カルシウム感知受容体 CaSR を介したシグナルであるが、この抑制機構もに現在不明である）によって、Gata3 と MafB の量は、両者の共存下でのみ、ともに著しく減少することが分かった。以上の知見は、副甲状腺機能を抑制するビタミン D とカルシウムは、明らかに異なる分子メカニズムで PTH 遺伝子の発現を抑制することを示している。副甲状腺の機能を調節する機構の複雑さを反映していると同時に、人為的に介入することのできる作用点が複数存在することも示している。現時点ではこの分子機構の全体像の解明には至っておらず途上であるが、詳細な分子機構を解明することの意義を一層強調するものと言えるだろう。

現在、その解決の糸口として、MafB と VDR-RXR が直接に相互作用することを見出しており、MafB と Gata3、あるいは MafB と Gcm2 の間の相互作用に対して、VDR-RXR が干渉する可能性などを引き続き探っている。

研究テーマ

理論的予測法の汎用性を実証するための GPCR の X 線結晶構造解析

研究者 ▶ 関西医科大学 医学部：小林 拓也（こばやし たくや）

①研究成果の目的

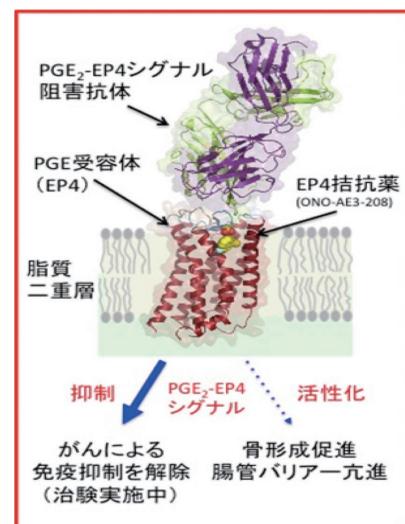
がん・心臓疾患・脳血管疾患など日本人の死因の上位を占める疾患、ならびにそれらの発症・増悪を誘発する主因ともなる糖尿病・高血圧症・高脂血症等に対する治療薬の開発には強い社会的要請がある。医薬品の標的分子の精密立体構造情報を活用した、より合理的でかつ副作用の少ない医薬品および医療法の開発が、医学・創薬研究における大きな課題となっている。現在市販されている医薬の 7 割程度が、G タンパク質共役受容体 (GPCR)、チャネル、膜輸送体、膜酵素などの細胞膜中に存在する膜タンパク質を作用点とすることが知られているが、ヒト・哺乳類由来の膜タンパク質の構造決定は依然として難度が高いため、現時点では構造ベースの創薬研究の展開はきわめて限定的で停滞している。

②研究方法

木下正弘（京都大学）との共同研究により、理論的予測法を使って、様々な種類の G 蛋白質共役受容体 (GPCR)、例えば、プロスタグランジン E 受容体 (EP3, EP4 サブタイプ) などに応用する。まず始めに、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を野生型膜タンパク質の C 末端に融合させたコンストラクトを出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の発現系で生産し、蛍光サイズ排除クロマトグラフィー (FSEC) により発現レベルと分子サイズ分布の单分散性を評価する。種々の温度にて一定時間、加熱処理した試料を用いて FSEC を行うことにより熱安定性評価を行う。このとき膜タンパク質に対して結合する高親和性の低分子化合物（アゴニスト・アンタゴニスト等のリガンド）が存在することが既知の場合は、その添加・非添加の差分評価も実施する。また、膜タンパク質の可溶化に用いる界面活性剤の種類を検討し、その最適化も行う。最も良好な性状を示した変異体については昆虫細胞 Sf9 発現系を構築し、大量精製・精製の予備実験を行う。構造解析ターゲットとしての適性が良好とみなされるものについて、膜タンパク質の結晶化に適した脂質キューピック相 (LCP) 法により、結晶を作製して SPring-8 の放射光マイクロフォーカスビームにより回折データを収集する。

③研究成果

プロスタグランジン E 受容体 (EP4 サブタイプ) の第 3 膜貫通領域の 3.39 部位を Arg または Lys に置き換えることで、アンタゴニスト結合型に安定化されることを見出した。この変異体を用いて結晶化を行ったところ、結晶の分解能が向上し、不活性型構造を決定することに成功した（図、Nature Chemical Biology, 15:18-26, 2019）。また、内因性アゴニスト (PGE2) の結合した EP3 サブタイプの活性型構造を決定することに成功した (Nature Chemical Biology, 15: 8-10, 2019)。



研究テーマ

植物をモデルにした活性酸素種抑制色素を用いた日焼け止め材料の開発

研究者 ▶ 東京理科大学 工学部工業化学科：永田 衛男（ながた もりお）

【研究成果の内容】

現在流通している多くの日焼け止めには紫外線吸収剤として酸化チタンが利用されている。酸化チタンは紫外線を吸収すると、物質を酸化・還元する力を持ち、これが活性酸素種を生成している。活性酸素種は人体に対して悪影響を及ぼすことが知られており、これを抑制することが望まれている。

本研究では植物のエネルギー散逸過程を模倣して、酸化チタンにカロテノイド色素の一種であるアスタキサンチンを複合することで活性酸素種の抑制を行なった。作製した複合日焼け止め材料は酸化チタンに比べ、大幅に活性酸素種の生成が抑制されていることが確認された。

【研究方法】

○複合日焼け止め材料の合成

日焼け止め材料である酸化チタンに対し、アスタキサンチンを複合し (0.1, 0.5 mM)、複合日焼け止め材料を作製した。作製したサンプルを図 1 に示した。

○活性酸素抑制性能の評価

日本工業規格 JIS R 1757 の手法をもとに、得られた複合日焼け止め材料を用いて活性酸素抑制性能の評価を行った。サンプルを 0.3 g シャーレに量りとり、アセトアルデヒドを 50 ppm 含んだ空気を流通させた装置中で 20 分間静置しアセトアルデヒドの吸着平衡を待った。その後、蛍光灯 (10W × 2 本, 0.080mM/cm²) を光源として光照射を行い、装置内のアセトアルデヒドと二酸化炭素の濃度を測定した (図 2)。アセトアルデヒドは活性酸素によって分解されるため、活性酸素が抑制されたサンプルではアセトアルデヒドの分解速度が減少する。

【研究成果】

卒業研究として東京理科大学内での報告を行った [K. Kato and M. Nagata, 植物をモデルにした活性酸素種抑制色素を用いた日焼け止め材料の開発]。

また、今後メカニズムの詳細を解析した後、学会での発表を予定している。

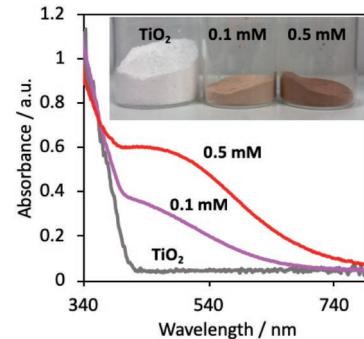


図1 作製した複合日焼け止め材料

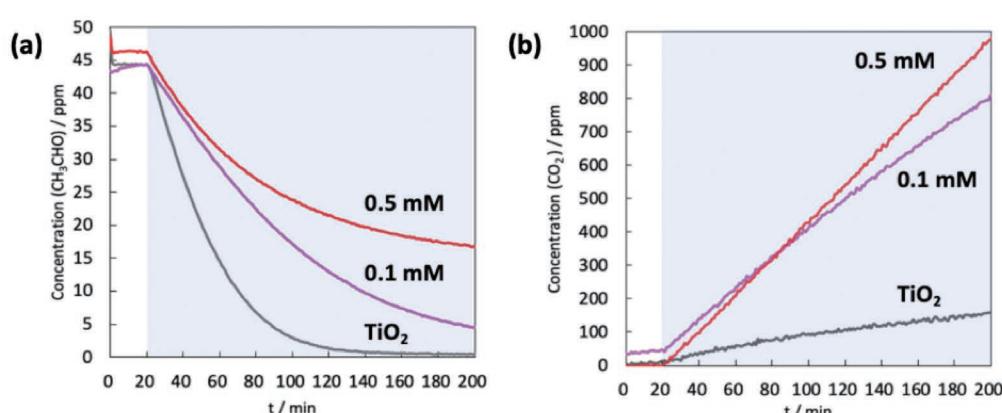


図2 活性酸素種抑制性能の評価 (a) アセトアルデヒド濃度 (b) 二酸化炭素濃度

研究テーマ

基質特異性を示すペプチド触媒の開発

研究者 ▶ 東京大学 生産技術研究所 物質・環境系部門：工藤 一秋（くどう かずあき）

①研究の背景および目的

薬の標的タンパク質が酵素である場合、その触媒反応を阻害することはできても、促進することはできない。薬分子は酵素に結合するだけであって、それ自体には触媒作用がないためである。もしも触媒作用を示す薬分子があれば、酵素の“手助け”はもとより、好ましくない分子の選択的な分解など、創薬の新たなアプローチになるものと期待される。そのような分子の候補としてペプチドを考えることができる。

我々は、2005 年以降多くのペプチド触媒反応を開発してきた。それらは水あるいは水 - 有機溶媒混合系で機能するものが多く、生体内環境との適合性は高いと期待される。しかし、生体内には多種の分子があるため、やみくもに反応を触媒するのではなく、酵素様の基質特異性も求められるが、現在までにそのようなペプチド触媒の開発には至っていない。以上の背景のもと、基質特異性をもつペプチド触媒の開発を目的とした。

②研究方法

1) 我々はこれまでに、樹脂固定化ペプチド触媒によるエナールへのエナンチオ選択的共役付加反応を報告している。その中には、求核剤に *b*-スチリルボロン酸を、求電子剤にヒドロキシ基をもつ (E)-4-hydroxybut-2-enal を用いたものも含まれる (Org. Biomol. Chem. 10, 4839 (2012))。この求電子剤は触媒との間でヒドロキシ基を介しての相互作用が期待できるものの、用いたペプチド触媒の配列は Pro-D-Pro-Aib-(Ala)₅-resin であり、N 末端のアミノ基はエナールとの反応に使われるため、ヒドロキシ基との積極的な相互作用はない。そこで、今回、側鎖に水素結合性のある Trp, Tyr, His を導入して反応性の向上を検討した。その際、当研究室で以前報告している固定化ペプチドライブアリのハイスループットスクリーニング法を活用することを考え、求核剤として青色のアズレン-2-ボロン酸を用いた。今回スクリーニングしたライブアリは D-Pro-AA₁-AA₂-AA₃-AA₄-AA₅-AA₆-resin, AA_{1~6} = {Aib, His, Leu, D-Pro, Trp, Tyr} である。(Aib = 2-アミノイソ酪酸)

2) 上述の研究で用いたアズレンは炭化水素にも関わらず 1.0 Debye の双極子モーメントをもち、7 員環が正、5 員環が負に分極している。このため、アズレン部位をもつ基質はペプチド触媒の被認識分子としての作用が期待できる。このことから、含アズレン基質特異的な相互作用を期待して、ペプチド触媒によるアルデヒド不斉 *a*-アミノ化を試みた。

③研究成果

1) 触媒活性のあるペプチドが提示された樹脂のみが青く発色することを確認し、それらの配列を ESI-MS によって解析した。その一部を右表の Entry1-5 に示す。他にも複数の配列が見出され、いずれも最低 2 種以上の水素結合性側鎖をもつアミノ酸を含んでいた。しかし、特異的に頻度の高い配列はなく、また水素結合性アミノ酸の位置に規則性はなかった。最も

Entry	AA ₁	AA ₂	AA ₃	AA ₄	AA ₅	AA ₆	conv/%	ee/%
1	Tyr	Trp	Tyr	His	Leu	Aib	87	7
2	Tyr	Tyr	Tyr	Aib	Trp	His	67	20
3	Aib	Trp	Trp	Aib	Trp	His	90	54
4	Aib	His	Trp	Trp	Trp	Tyr	90	5
5	Trp	Trp	Trp	Leu	Trp	Leu	90	5
6	Ala	Trp	Trp	Aib	Trp	His	88	34
7	Aib	Ala	Trp	Aib	Trp	His	88	10
8	Aib	Trp	Ala	Aib	Trp	His	95	41
9	Aib	Trp	Trp	Ala	Trp	His	95	4

高い選択性をもつEntry 3のペプチドについて、アラニンスキンを行った結果がEntry 6-9である。触媒活性はこの程度の配列の変更では大きな影響を受けないものの、エナンチオ選択性はかなり大きく変わった。このことより、ペプチド鎖N末端のアミノ基は比較的むき出しになっていて、基質をイミニウムイオンとして補足する過程は配列の影響を受けづらいが、反応のエナンチオ面選択性に関しては、側鎖との微妙な相互作用が関わっていることが推測される。特に興味深いのはEntry 9の結果で、水素結合性のないAibをAlaに置換して大きくeeが低下している。このことは、Aibが選択性の発現に必要なペプチド二次構造を作り出していたためと推測されるが、さらなる検討が必要である。

2) $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ をペプチド触媒の作用によってエナミンとし、これにアゾジカルボン酸ジエステルを作用させることにより、アルデヒド不斉 α -アミノ化を行った。なお、本反応については、 $\text{Ar} = \text{Ph}$ の基質について報告済みであり(Adv. Synth. Catal., 2-3, 294 (2013))、その際の最適ペプチド配列はD-Pro-Aib-Ser-Ser-resinであった。 $\text{Ar} = \text{グアイアズレン-3-イル}$ の基質に対して、このペプチド触媒を作らせたところ、収率・選択性とも低いものであった。この基質についてペプチド配列を最適化し、Pro-Pya-Phe-Trp-Trp-Tyr-resin (Pya = ピレニルアラニン) で転化率(conv) 76%, 82%eeという結果を得た。末端のPro以外すべて芳香族アミノ酸であり、 π - π 相互作用による分子認識が関わっていると推定される。このペプチド触媒を用いて他の5種類の基質について反応を行ったところ、 Ar の違いによって、転化率、eeとも大きく異なった。このことはペプチド触媒による基質認識が確かに起こっていることを示唆している。今後、さらなる検討を続け、基質特異性を確立したい。

研究テーマ

女性の美と健康のための脂肪嗜好性の調節における女性ホルモンの作用

研究者 ▶ 奈良女子大学 研究院 生活環境科学系 生活健康学領域：森本 恵子（もりもと けいこ）

①研究の背景及び目的の本文

現代日本ではライフスタイルの変化により、高脂肪食の食習慣やそれに伴う肥満が問題となっている。特に、女性では月経前症候群に伴う体重増加、閉経後肥満など、女性の美と健康に対して深刻な影響をもたらしている。近年、CD36 や GPR120・40 などが脂肪酸受容体として作用し、脂肪の味の感受性に関与すると報告された。しかし、日本人女性における脂肪酸感受性と脂質摂取量との関係に関する研究はほとんどない。我々は女性ホルモンが口腔内脂肪酸感受性を調節し、脂質摂取量に影響を与える可能性について検討した。また、ラットを用いて、女性ホルモンであるエストロゲンが高脂肪食嗜好性を抑制する可能性とそのメカニズムを検証した。これにより、女性ホルモンの関連が考えられる閉経後肥満、月経前症候群、摂食障害などの予防に繋がる基礎データを得て、女性の美と健康に資することを目的とした。

②研究方法

(1)女性における口腔内脂肪酸感受性・脂肪嗜好性

健康な若年（20-25 歳）女性（20 名）および中高年（45-55 歳）の閉経前と閉経後女性（各 10 名）を対象とした。月経周期や閉経による女性ホルモンの変動が以下の指標に及ぼす影響を検討した。

- ・口腔内オレイン酸閾値（全口腔法、3 肢選択法）：12 時間絶食後、閉眼・鼻栓装着下で 18 種類の濃度のオレイン酸サンプルを用いてオレイン酸の味の検知閾値の測定を行った。
- ・脂肪嗜好性・脂質摂取量：4 種類の濃度の植物油添加スープによる脂肪嗜好性・脂肪ランキング実験を行った。さらに、実験室での自由摂食実験と実験日前後 2 日間の食事調査を実施し、脂質摂取量、脂肪エネルギー比率を算出した。
- ・血中女性ホルモン：血中エストラジオール（E2：生理活性の最も強いエストロゲン）、プロゲステロン濃度の測定を行った。

(2)閉経・高脂肪食誘発性肥満モデルラットにおける脂肪嗜好性に対するエストロゲンの影響とそのメカニズム

- ・卵巣摘出ラットの脂肪嗜好性に対する E2 補充の影響：13 週齢雌性ラットを卵巣摘出後偽薬投与（Pla）群と E2 補充群に分け、さらに、高脂肪食（HFD:脂肪エネルギー比率 58%）群と普通食（SD: 同 13%）群の 4 群（各群 6 ~ 20 匹）にて、体重、摂食量を測し、エストロゲンの脂肪摂取抑制作用を検証した。加えて、医療用脂肪乳剤（大塚製薬）を用い、経口、胃内ゾンデおよび静脈カテーテルによる投与を行い、経時的な高脂肪食の摂食量測定と採血により脂肪乳剤の摂食抑制効果と脂質・コレシストキニン（CCK）・グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）の血中濃度の変化を比較した。さらに、舌・小腸にて CD36 や GPR120、エストロゲン受容体発現を測定した。

③研究成果

(1)若年女性において口腔内オレイン酸感受性は月経周期に依存して変動し、排卵前期で最も高いことが判明した。しかし、脂肪嗜好性や自由摂食実験時の脂質摂取量には月経周期性変化はなく、血漿 E2 やオレイン酸感受性との明確な関連は見られなかった。なお、自由摂食による脂肪エネルギー比率と血漿プロゲステロン濃度との間には正の相関関係が認められた。一方、中高年女性において、口腔内オレイン酸感受性は閉経前に比べ閉経後女性では低値であり、オレイン酸感受性が BMI や体脂肪率

に影響を与える可能性が示唆された。

(2)閉経モデルラットでは、4週間の高脂肪食投与によりエネルギー摂取量の増加に伴い体重が増加したが、E2補充を行うと摂食量が減少し、体重増加が抑制された。また、16時間絶食後の摂食実験では30分目のHFD摂食量がE2補充で抑制された。さらに、脂肪乳剤の口腔内投与は血漿CCK濃度の増加をもたらしたが、E2補充はこのCCK増加反応を促進した。したがって、エストロゲンは口腔内脂肪刺激によりCCK分泌を促進し、その結果、高脂肪食の摂食量を抑制している可能性が示唆された。以上、本研究より、女性ホルモンが口腔内脂肪酸感受性を介して摂食量を調節する可能性を示唆する興味深い所見が得られた。

今後は、例数を増やしてさらなる検討を重ね、そのメカニズムの解明を推進する予定である。

研究テーマ

がん診断とがん治療のデュアル機能を有する ポルフィリンの創成

研究者 ▶ 宇部工業高等専門学校 物質工学科：廣原 志保（ひろはら しほ）

①研究成果

わが国は超高齢化社会に向かっており、それにともないがんによる死亡率も増加している。そのため、完治可能な期間での早期がん発見し、がん発見と同時に低侵襲性かつ非観血的に治療するがんセラノスティクスが求められている。本研究では、共同研究者的小幡（山梨大）が開発したポリマーと、がん予防能、がん診断能およびがん治療能を有するポルフィリンなどの色素を用い、色素内包ミセル（図）を合成し、がん予防薬、がん診断薬、がん治療薬及びがんセラノスティクス薬剤として In vitro で性能評価した。In vitro の結果、合成した様々な色素を内包したミセルは、高い水溶性、高いがん細胞集積性および高い治療効果を示した。

②研究方法

（合成）

小幡（山梨大）が開発したポリマー溶液にがん予防能、がん診断能およびがん治療を有するポルフィリンなどの機能性色素溶液を混合し、リン酸緩衝液中で機能性色素を内包したミセルを合成した。

（In vitro 評価）

合成した色素内包ミセルについて、がん細胞株を用いた蛍光顕微鏡観察（がん診断能評価）、細胞毒性試験（薬剤自身の毒性試験、がん治療能評価）を行った。

③研究成果

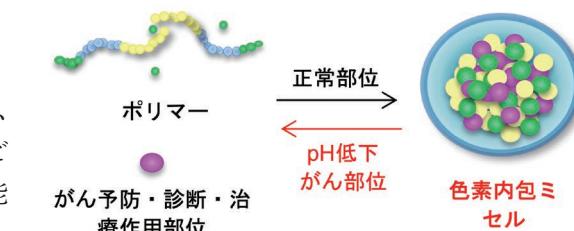
（合成）

色素の Stock solution の溶媒および濃度を調整することで、ミセル中の色素内包量がかえることができ、色素ごとに適切な溶媒の種類と濃度があることが分かった。また得られたミセル体は、非常に高い水溶性を有していることも分かった。

（In vitro 評価）

合成した様々な色素を内包したミセルについて、がん細胞株をもちいた毒性試験を行った。その結果、色素のみの場合と同様にどのミセル体も薬剤自身に毒性がほぼないことが分かった。がん診断能 (PDD) を有する色素を内包したミセルは、薬剤接触 4 時間以降で細胞内に局在し、強い蛍光性を示した。このことから、PDD 能を有するミセルは、がん診断薬として期待できることがわかった。また、がん治療能 (PDT) を有する色素を内包したミセルは、色素のみの場合や市販薬剤に比べて非常に高い PDT 効果を示した。また、その他のがん予防能、がん診断能やがん治療能を有する色素を内包したミセルは、それぞれがん予防薬、がん診断薬およびがん治療薬として有用であることがわかった。また、セラノスティクス能 (PDD, PDT) を有する色素を内包したミセルは、高いがん診断能と高いがん治療効果を示した。

本研究で開発した色素内包ミセルは現在、特許出願準備中である。



研究テーマ

環境因子と遺伝的要因の同時関与によるアトピー性皮膚炎病態発症の分子基盤解析及び健康と美への影響の評価

研究者 ▶ 国立研究開発法人理化学研究所：Jafar Sharif (ジャファル シアリフ)

① 研究成果の本文：

皮膚疾患の代表的な例であるアトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) は、皮膚のかゆみや炎症を伴い、毎日の生活の快適さを妨げるだけでなく、罹患者の肌質の保全や美容にも大きく影響を及ぼす。現在、日本では AD の患者数が 45万人を超えていると推定され、この数は 30 年前と比べて 2 倍にも増加している。さらに、小児性 AD の場合は、全国民の 10%以上が罹患するとも言われている。しかし、日本における AD の発症例は年々増加の一途を辿っているにも関わらず、AD に対する効果的な診断・治療法は開発されていない。その主な原因として、典型的な多因子疾患である AD の分子機構が未だ解明されていないことが挙げられる。AD の原因として、主に遺伝的な要因と環境要因が存在する。本研究では、JAK1 遺伝子に変異を持つマウスを用い、さらに同マウスを隔離飼育したことにより環境ストレスを与え、AD の分子メカニズム解明を試みた。

② 研究方法：本研究では、AD の病態発症に関わっている (Fridman et al., JID, 2011) JAK1 (Janus Kinase 1) 遺伝子に着目した。実際に、研究代表者の所属している研究グループは、DNA の点変異 (R878H, Jak1^{spade/spade}) により JAK1 遺伝子が恒常的に活性化するマウスを作製した (Yasuda et al., JCI, 2016)。興味深いことに、このマウスでは自発的に AD に似た症状が観察される。そこで、研究代表者はマウスを 4 つの群（それぞれ、雄マウス 5 匹ずつ）に分け、実験を行なった。これらは、(1) CNT (野生型、通常飼育)、(2) CNT-Iso (野生型、1 匹ずつ隔離飼育)、(3) Spade (JAK1 点変異、通常飼育)、(4) Spade-Iso (JAK1 点変異、1 匹ずつ隔離飼育) である。

研究成果：まず、通常飼育の CNT と Spade 群 (8 週齢) マウスから、耳の上皮を回収し、上皮細胞 (ケラチノサイト) における網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行なった。予想通り、CNT と比較し、Spade では、多くの炎症や免疫に関する遺伝子が発現上昇をしていた。興味深いことに、同サンプルで網羅的なエピゲノム解析 (DNA methylation-seq) を行なった結果、発現が上昇した免疫系の遺伝子の一部では、プロモーター付近の DNA メチル化が低下していた。研究代表者ら、これまで DNA メチル化は遺伝子の転写抑制に寄与することを、マウスモデルを用いて明らかにしてきた。すなわち、Spade マウスで観察される遺伝子の発現変化には、DNA メチル化が関与している可能性がある。今後、DNA メチル化を制御する酵素の Dnmt1 を条件付きでノックアウトできるマウス (Dnmt1 conditional KO, Sharif et al., 2016) と Spade を交配させ、Spade マウスにおける遺伝子発現の変化において DNA メチル化の機能的な役割を解明していく予定である。一方、1 匹ずつ隔離飼育したマウスでも、同じ解析を行なったが、この場合は、個々のマウスの間の遺伝子発現の変化には大きなばらつきが見られた。そのため、現段階では、隔離飼育による環境ストレスが AD の病態発症にどのように影響をするのか、その機構を明らかにする目標には至っていない。本研究では、生後 3 週齢から 8 週齢の間にマウスを隔離飼育する方法を選んだが、遺伝子発現のばらつきを無くすには、隔離飼育の期間を変えることも一つの選択肢であると考えられる。

研究テーマ

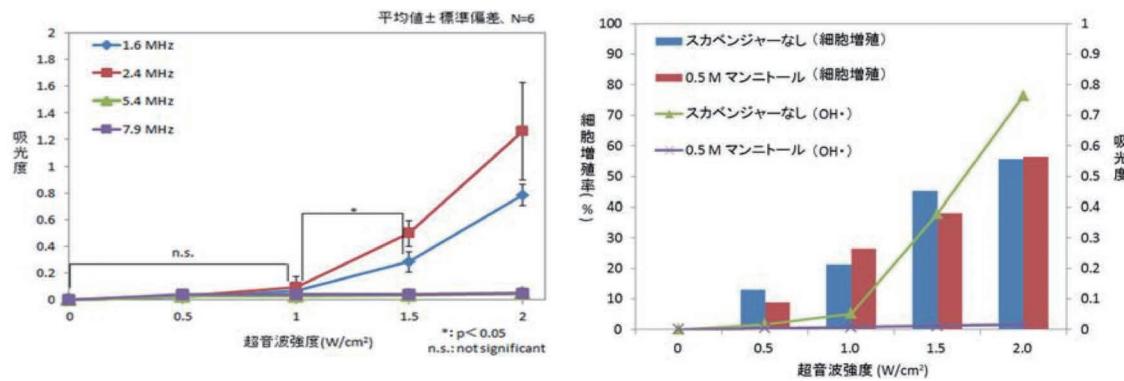
皮膚生理恒常性の強化に向けた超音波治療効果の解明

研究者 ▶ 明治大学 理工学部物理学科：平岡 和佳子（ひらおか わかこ）

1. 研究概要 高齢患者の増加や術後の QOL (Quality of Life) の重視などの社会的な傾向を背景に、侵襲性の低い治療技術として超音波技術へのニーズが高まっている。しかしながら、医療現場での実用実績は多くなく、超音波の生体作用に関する基礎的データの蓄積が求められている。本研究では超音波による皮膚生理の向上と安全性の見積もりのため、1 MHz-10 MHz の周波数で低強度の超音波による細胞への影響と、そのメカニズムを検討した。本研究を通じて OH[·] の定量、細胞増殖・細胞破裂・アポトーシスを検出し、実施周波数領域の超音波強度依存性を明らかとした。さらに、キャビテーション由来の OH[·] による化学的作用と、気泡の振動・衝撃波等による機械的作用の両者が、生物効果を引き起こすことを明らかとし、周波数と強度に依存し、化学的作用と機械的作用の割合が変化することを実証した。

2. 研究方法 1 MHz-10 MHz の周波数で低強度の超音波照射水槽は自作した。照射実験モデルとして、ヒト組織球性白血病細胞株 U937 を用いた。超音波の作用については、超音波キャビテーションによる化学的作用に重要とされる OH[·] を定量し、細胞増殖・細胞死との相関関係を検討した。超音波照射によって発生した OH[·] は、KI 水溶液中の I⁻ イオンとの反応によって生じた I₃⁻ の量から間接的に定量するため、0.1 M の KI 水溶液に超音波を 10 秒間照射し、生成した I₃⁻ の吸収極大 355 nm を分光光度計 (Hitachi 製 U-2800) で測定した。照射直後の破裂細胞、照射 24 時間後のアポトーシス・細胞増殖率の算出には、フローサイトメーター (Beckman Coulter、CytomicsTM FC500)、細胞数分析装置 (Beckman Coulter Coulter Counter Z1) を用いた。

3. 研究成果 1.6 MHz, 2.4 MHz で 1.0 W/cm² 以上の強度を持つ超音波では、効率的にキャビテーションが発生し、水が分解され OH[·] が生成することが示された。細胞への照射を行った実験では、細胞の増殖率も著しく減少することが示された。一方、細胞破裂は、強度に依存して増加することが確認された。5.4 MHz の超音波では、他の細胞効果に比べ、アポトーシスに傾く細胞が多いことが示唆された。一方、ラジカルスカベンジャーを用いた実験では、キャビテーション由来の OH[·] による化学的作用および、気泡の振動・衝撃波等による機械的作用の両者が、超音波による生物効果を引き起こしていることが明らかとなった。また、周波数や強度の違いにより化学的作用と機械的作用の割合が変化し、生物効果に影響を与えることが実証された。以上の研究から、1 MHz-10 MHz の超音波による細胞障害性の強度限度が明確となり、また、この振動数領域での超音波による細胞効果のメカニズムは、化学的要因よりもメカニカルな要因が大きいことを明らかとした。



研究テーマ

キトサン-脂肪酸ポリイオンコンプレックス微粒子への抗酸化成分の担持と安定化

研究者 ▶ 東京都市大学 工学部エネルギー化学科：黒岩 崇（くろいわ たかし）

①研究の背景および目的

高齢化や老化に伴い、様々な生活習慣性疾患のリスクが高まる。これらの疾患の多くには、生体内における酸化ストレスが密接に関わっている。食品由来の抗酸化物質は、効果的な摂食により酸化ストレスを低減し、各種疾患の予防につながる可能性を有している。食品由来の抗酸化物質は、ビタミンCなどの水溶性成分のほか、ビタミンEのように脂溶性成分も多く存在し、それぞれの体内動態を考慮すると、両者をバランスよく摂取することが望ましい。

脂溶性の抗酸化物質の例としては、ビタミンEをはじめ、トウガラシ由来のカプサイシン、ウコン由来のクルクミンなどがあげられる。これらは、水への溶解度が非常に低いえ、自己酸化により分解されやすいため、食品中に安定に長時間保持することが難しく、その利用が制限される場合が多い。一方で、高齢者や消化器系疾患の患者では、嚥下能力や消化機能の低下により通常の食事による栄養機能成分の摂取が難しいケースがある。水や柔らかいゲルを分散媒とする液状食品が有望であるが、その機能化を図るためには、液状食品における脂溶性抗酸化成分の分散性や安定性の向上が必要である。筆者らは、海洋バイオマスとして有効利用が期待されている多糖類の一種であるキトサンと、動植物に由来する長鎖脂肪酸とを水溶液中で「混合するだけ」という極めてシンプルなプロセスにより、水難溶性の機能成分を担持・分散化できる食品用微粒子の製造法を開発し、主としてこれまで微粒子の物理化学的な特性に着目した検討を行ってきた。本微粒子は、アミノ多糖であるキトサンに由来する正電荷と、イオン化した脂肪酸に由来する負電荷の間にはたらく静電的相互作用により、両者が複合化して形成したポリイオンコンプレックス微粒子であり、微粒子内部の疎水性領域には水難溶性成分を担持できる。以上の背景をふまえ、本研究では、脂溶性の抗酸化成分をキトサン-脂肪酸ポリイオンコンプレックス微粒子にその分散安定性と長期安定性を向上させることを目指して、微粒子の作製条件や保存条件が微粒子の担持し、分散特性や抗酸化成分の担持特性に及ぼす影響について検討を行った。

②研究方法

市販の試薬グレードのキトサンを酢酸緩衝液に溶解し、5.0 g/L、pH 5.0 のキトサン溶液を作製した。このキトサン溶液を攪拌しながら、所定量のオレイン酸と抗酸化成分（ビタミンE、カプサイシン、クルクミン）を溶解したエタノールを滴下した後、室温下で約24時間攪拌を続け、全体が白濁した分散液を得た。微粒子の粒子径はレーザー回折式粒度分布計で測定した。微粒子分散液中の抗酸化成分量は、メタノールで希釈した分散液をメンブレンフィルターでろ過した後、紫外可視分光光度計を用いてUVスペクトルを測定し、極大吸収波長における吸光度から検量線を用いて測定した。

③研究成果

上記の方法により、ビタミンEを担持したキトサン-オレイン酸ポリイオンコンプレックス微粒子を得ることが出来た。粒子径分布を測定した結果、平均径0.85マイクロメートル程度のサイズ均一性が高い微粒子が形成していることがわかった。ビタミンEを担持した微粒子分散液を室温で1カ月以上保存した場合にも平均径に顕著な変化はみられず、本コンプレックス微粒子はビタミンEを担持しながら安定な分散状態を維持できることが明らかとなった（図1）。同様に、本法によりカプサイシンやクルクミンを担持した微粒子分散液を作製したところ、本微粒子を用いることで、分散媒に対する溶解度の数十倍から数百倍に相当する抗酸化成分を水溶液中に保持できることが明らかとなった。本研究に寄り、抗酸化成分を利用した健康機能食品や化粧品の開発につながる有意義な成果を得ることが出来た。

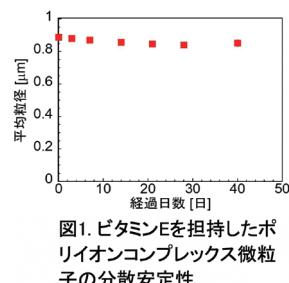


図1. ビタミンEを担持したポリイオンコンプレックス微粒子の分散安定性

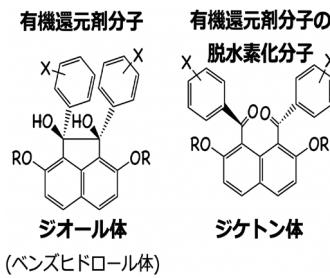
研究テーマ

分子内の隣接カルボニル基の還元-酸化反応を利用する 再活性-再使用可能な有機還元剤分子の開発

研究者 ▶ 東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門：米澤 宣行（よねざわ のりゆき）

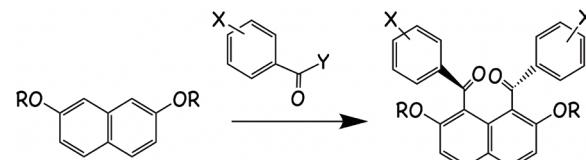
①研究成果の本文

研究代表者（米澤）は共同研究者・岡本昭子講師とともに、有機化合物の還元剤として働きかつ酸化と還元を繰り返して受けることの可能な「有機分子媒介体系」の開発を試みている。本研究課題は、分子内の近接した位置に二つのケトンカルボニル基を有するナフタレン化合物の還元とその逆反応を利用した、有機分子の還元剤の開発の一環として位置づけられるものである。本年度の研究は、その第一段階として、図に示す「有機還元剤分子の脱水素化分子」の候補化合物群（ジケトン体）の合成反応の検討およびそれに対応する「有機還元剤分子」（ジオール体）への分子変換反応挙動解析を、それぞれの分子の空間構造解析も併せて行った。



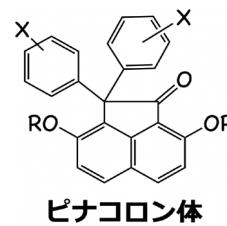
②研究方法

ジケトン体の合成は、ナフタレン環の 2,7- 位にアルコキシ基を有する出発原料分子に対して対応する芳香族カルボン酸の酸クロリドのフリーデルークラフツ二重アシル化によるナフタレン環の隣接する二つの内側炭素 (peri- 位)へのアロイル基の導入により行った（右式）。この選択的な peri- アロイル化反応は共同研究者が見出したものである（Okamoto, Yonezawa, Chem. Lett. 2009, 38 (9), 914-915）。アロイル基上の置換基は、ハロゲン他一般的なものであり、一置換体では p- 位体を中心 o- 体, m- 体を合成した。多置換体もいくつか合成した。ジオール体の合成は対応するジケトン体のベンズヒドロール化（還元的炭素-炭素結合生成）により行った。この還元的炭素-炭素結合生成の進みやすさと、ジオール体からジケトン体への逆反応の起こりやすさから酸化還元挙動の定性的な評価を行った。合成した化合物の分子構造確認は、¹H- および ¹³C-NMR、赤外分光法、質量分析または元素分析による通常の有機合成手法により行った。空間構造については溶液中の構造は NMR スペクトル（必要に応じ、溶媒を変更した NMR 測定、二次元 NMR、温度を換えた NMR 測定も実施）により解析した。結晶構造は適切な溶媒を用いて作製した高品質の結晶について X 線結晶構造解析を行い、求めた。熱分析を行い、熱によるジオール体とジケトン体の構造変化も整理した。



③研究成果

ジケトン体の合成はこれまでの類縁化合物合成の常法で達成することができた。生成しやすさの置換基依存性についてはこれまでの傾向と変わるものではなかった。ジオール（ベンズヒドロール）の合成反応は還元剤を金属亜鉛として行った。ジオール化の進行しやすさは置換基の種類や位置の影響を大きく受けることがわかった。その際、右図のピナコロン体がジケトン合成段階でも混入するものも見られた。ジオール体の酸化、ケトンに戻る反応は還元過程に比べて反応の起こりやすさの差は小さいものの、ピナコロン生成を含めた選択性は多様であった。合成した化合物全体の 1/4 ~ 1/3 程度の化合物について、良好な結晶が得られて結晶構造解析を行うことができ、単分子の空間構造と分子集積構造が解明できた。結果の一部は第 99 回日本化学会春季年会（甲南大学 岡本キャンパス；2I3-17）で口頭発表した。



研究テーマ

細胞内酸素濃度イメージングによる脂肪燃焼評価系の構築と新規機能性物質の探索

研究者 ▶ 東京工業大学 生命理工学院：蒲池 利章（かまち としあき）

肥満の予防と対策は、「人間の美容と健康」において重要な位置づけを持つ。日本においても食生活を取り巻く社会環境の変化から、肥満の予防・対策が急務となっている。肥満とは、体脂肪が過剰に蓄積した状態であり、糖尿病や脂質代謝異常症・高血圧・心筋疾患など様々な疾患の原因となるため、その予防・対策は重要であるといえる。生体内で脂肪の蓄積を主に担っている細胞が、脂肪細胞である。脂肪細胞では、摂取エネルギーと消費エネルギーのバランスが余剰側に傾いた際に、余剰のエネルギーを脂肪として蓄積する。蓄積された脂肪は、エネルギー消費が高まると細胞内で分解され、生体内のエネルギー源である ATP へと変換される。この ATP 生産は、主にミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によって行われ、酸素分子が最終電子受容体として消費される。つまり、生体内での脂肪の燃焼や、生体内でのエネルギー消費の増加は細胞内の酸素消費につながる。

そこで、本申請研究では、細胞内酸素濃度イメージングによる脂肪燃焼評価系の構築と新規機能性物質の探索をおこなった。これまでに、当研究室では共焦点光学顕微鏡を用いたリン光寿命イメージング (PLIM) により、一細胞内の酸素濃度イメージングシステムの開発を行ってきた (研究者研究業績・論文5、Scientific Report 2015)。本システムを用いると、細胞内酸素濃度の分布および継時変化を高解像度でとらえることができる。具体的には、PLIM を用いた脂肪燃焼評価系を構築し、脂肪の燃焼を含む細胞内エネルギー代謝変化の測定をおこない、細胞内酸素消費と脂肪滴の同時観察を行い、脂肪の燃焼と酸素消費の関係を明らかにした。

＜薬剤添加による細胞内酸素濃度変化＞

マウス線維芽細胞 3T3-L1 を用いた。3T3-L1 細胞は、MDI 法を用いてにより脂肪細胞に分化させ、分化前後の細胞内酸素濃度を測定した。細胞内酸素濃度イメージングには、細胞に取込ませたリン光性色素 Pt(II) tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin (PtTCPP) のリン光寿命測定を利用した共焦点レーザー顕微鏡システムを使用したを用いて下で測定し、細胞内酸素濃度イメージングを行った。測定した。また、分化前後の 3T3-L1 細胞に、ミトコンドリアに存在するタンパク質複合体 III 阻害剤 antimycin A と、myxothiazol を添加し、添加後の細胞内酸素濃度を経時測定した。その結果、阻害剤の違いにより、酸素消費速度の変化が異なることをイメージングで解明することができ、本システムが、脂肪燃焼に伴う、細胞内酸素消費速度の変化をとらえることができることが示唆された。

＜脂肪滴と細胞内酸素濃度の同時イメージング＞

脂肪滴を蓄積した 3T3-L1 脂肪細胞に対し、脂肪滴の染色を行い、細胞内酸素濃度との相関を測定した。脂肪分解を促す薬剤の添加により、脂肪の分解がイメージングでき、また、PtTCPP を用いた酸素濃度変化を測定した。その結果、脂肪分解と酸素消費がイメージングできることが分かった。これを利用すれば、脂肪分解のメカニズムと、酸素代謝の関係の解明が可能であるといえる。現在、継続して、研究を進めているところである。

研究テーマ

不活性型アデノシン受容体を特異的に認識する機能性モノクローナル抗体の開発

研究者 ▶ 千葉大学 大学院理学研究院 生体構造化学研究室：小笠原 諭（おがさわら さとし）

【研究の背景と課題、目標】

膜蛋白質は、創薬においても重要なターゲットと位置づけられ、立体構造解明は構造に基づいた医薬分子設計において非常に重要である。しかし、膜蛋白質は安定性が非常に乏しく、大量に生産、精製することが非常に困難、つまり構造を得るための結晶化に至らない場合が多い。この問題を解決するため、本研究室では、統計熱力学計算法を用いて理論的にGPCRの耐熱化変異体を予測法する方法を開発した（エントロピー基盤法：EBM）。この計算方法は「生体膜を形成するリン脂質の炭化水素鎖の並進配置エントロピーが膜蛋白質の熱安定性を決定づける最も重要な因子である」という全く新しい理論に基づき、1つのアミノ酸置換に伴う生体膜のエントロピーの利得（損失）を液体の統計力学理論と形態熱力学的アプローチの統合型計算を行うものである。

耐熱化モデルGPCRとして、我々が既に抗体を用いて構造決定したアデノシンA2a受容体（A2aR）についてEBMを適用した。A2aR拮抗薬はパーキンソン病等の治療薬、一方で作動薬は線内障改善、創傷治癒などの目的で開発が進んでいる。さらに近年、A2aRは新しいがん免疫の分子標的として注目されている。がん細胞で過剰に放出されるアデノシンがA2aRに受容されることで、T細胞活性を抑制し、がん細胞が免疫回避することが明らかとなってきた。A2aR阻害は、PD-L1やCTLA-4等の免疫チェックポイント分子に対する阻害効果を增幅し、CD73阻害活性を増加することが報告され、A2aR拮抗薬はがん免疫療法薬として開発が盛んとなってきている分子である。EBMにより、野生型に比べて12度の上昇する耐熱化変異体が得られた。興味深いことにこの変異型A2aRは作動薬が結合せず、拮抗薬のみが結合する、つまり不活性型構造であることが示唆されている。EBMは迅速に熱安定化置換体が得られ、かつリガンド非存在下でGPCRを機能性構造へ安定化する変異体が得られる方法であり、安定的に固定化されたGPCRを抗原として抗体作製を行うことで、機能性抗体を積極的に取得できる可能性が期待される。

本研究では、不活性型A2aRを抗原に、構造解析を目指す立体構造認識抗体、および抗体単独でアンタゴニスト（拮抗薬）様活性を有する機能性抗体の開発を目的とする。2018年度は、不活性型A2aRを抗原として複数のモノクローナル抗体を樹立した。得られた抗体をツールとしてGPCRの不活性型構造の解明と、抗体の応用利用を目指した。

【研究方法】

出芽酵母により発現・精製したヒトアデノシンA2a受容体はリン脂質を用いてプロテオリポソームへ再構成した。このプロテオリポソームをマウスへ免疫して抗体価の上昇を確認後、ハイブリドーマを作製した。プロテオリポソームを用いたELISA法によりスクリーニングを行って、モノクローナル抗体を樹立した。樹立した抗体は、蛍光検出を用いたゲルfiltrationクロマトグラフィー、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、タンパク質間相互作用解析、免疫蛍光細胞染色等、種々の解析を行なって性質決定を行なった。

【研究成果】

Balb/cマウスにヒトアデノシンA2a受容体プロテオリポソームを免疫し、抗体価の上昇を確認したところで、脾臓細胞を摘出し、ミエローマ細胞と細胞融合することでハイブリドーマを作製した。ハイ

ブリドーマを培養して得られた培養上清を用い、ヒトアデノシン A2a 受容体プロテオリポソーム ELISA とウェスタンブロッティング、およびゲルfiltrationクロマトグラフィーのスクリーニングから、ヒトアデノシン A2a 受容体の立体構造を認識する抗体を 20 クローン樹立することに成功した。さらに、ヒトアデノシン A2a 受容体を強制発現させた動物培養細胞株を用いたフローサイトメトリー解析から、細胞外領域を認識する抗体を選抜する系を構築し、樹立した抗体のうち 2 クローンが、ヒトアデノシン A2a 受容体の細胞外領域を認識する抗体であることを確認した。さらに、アデノシン受容体のサブファミリーである A1、A2b、A3 を強制発現させた動物培養細胞株を用いてフローサイトメトリー解析した結果、この 2 クローンは反応しないことから、A2aR 特異的な抗体であった。さらに精製したヒトアデノシン A2a 受容体を用いたゲルfiltrationクロマトグラフィー解析では、樹立した全ての抗体が結合した状態であることを確認した。

今後、タンパク質間相互作用解析により、詳細な結合親和性を測定するとともに、細胞外領域を認識する抗体については、機能性測定、内在性のヒトアデノシン A2a 受容体に反応する可動化などの検討を行っていく予定である。

公益財団法人 小柳財団
