

研 究 助 成 業 績 報 告 集

2023 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

公益財団法人 小柳財団
設立代表者 小柳 昌之

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、化学、生化学及び生命科学の分野の研究の中で、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。

財団概要	
財団名	公益財団法人 小柳財団
代表理事	大倉一郎
設立	設立 2012 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	03-5298-8161

役員一覧	
評議員	知野秀雄
評議員	石川和則
評議員	岩崎泰一
評議員	瀧澤木の実
代表理事	大倉一郎
理 事	加藤信子
理 事	小柳典子
理 事	西口 徹
監 事	古俣徳康

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	日本薬科大学 客員教授 放射線医学総合研究所名誉研究員
選考委員	大倉 一郎	東京工業大学 名誉教授 (元東京工業大学副学長)
選考委員	加藤 信子	元 株式会社ブリヂストン 主席フェロー 元 学校法人 日本女子大学 評議員
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薬学研究所 上席研究員
選考委員	畑中 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

研究助成業績報告書

2023 年度

[2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日]

公益財団法人 小柳財団

目 次

1	リボヌクレアーゼ H2 の遺伝性変異と、ゲノム DNA 中のリボヌクレオチド量増加および自然免疫応答亢進との関連..... 6
	研究者▶ 京都大学 大学院農学研究科食品生物科学専攻 保川 清
2	メラノーマにおけるアミノ酸輸送体高発現機構の解明による低侵襲治療の開発..... 8
	研究者▶ 大阪大学 大学院理学研究科附属フォアフロント研究センター 兼田 加珠子
3	HER2 を標的とした光感受性物質修飾ナノボディの開発 10
	研究者▶ 鳥取大学 農学部共同獣医学科獣医外科 大崎 智弘
4	生理的抗アルツハイマー病因子 BRI2/BRI3 の機能活性化の認知症創薬への応用 12
	研究者▶ 高知大学 教育研究部医療学系基礎医学部門 麻生 悌二郎
5	医薬品・化粧品開発に資するタンパク質構造中の弱い相互作用の系統的理解..... 14
	研究者▶ 茨城大学 理学部 高妻 孝光
6	哺乳動物の卵・初期胚における細胞機能の光制御..... 16
	研究者▶ 岡山大学 学術研究院ヘルスシステム統合科学学域 大槻 高史
7	健康長寿の実現を目指した、免疫遺伝学的メカニズムの解明による高血圧性疾患の新奇予防・治療法開発..... 18
	研究者▶ 島根大学 医学部病理学講座病態病理学 大原 浩貴
8	高精度分子シミュレーションに基づく核内受容体の機能解明 20
	研究者▶ 豊橋技術科学大学 情報・知能工学系 栗田 典之
9	加齢に伴う脳機能低下のメカニズム解明 22
	研究者▶ 島根大学 医学部医学科 発生生物学 藤田 幸
10	糞便微生物移植治療により見出せた腸内放線菌の役割～健康づくりと疾病予防法の開発～ 24
	研究者▶ 徳島文理大学 薬学部 阪口 義彦
11	新規ホルモン FNDC4 とその受容体 ADGRF5 が血管内皮細胞の機能調節に及ぼす影響に関する研究 26
	研究者▶ 東京工業大学 生命理工学院 中村 信大
12	線虫の低温休眠を制御する新規遺伝子の寿命における機能解析 28
	研究者▶ 広島大学 大学院 統合生命科学研究科 堀川 誠
13	ニュートリオミクスを駆使したがん代謝システムの解明 30
	研究者▶ 東京大学 先端科学技術研究センター 大澤 毅
14	皮膚研究を加速させる新規皮膚モデルの開発 32
	研究者▶ 信州大学 繊維学部 根岸 淳

15	脳上衣腫治療薬創成を目指した構造生物研究 34 研究者▶ 奈良先端科学技術大学 大学院 藤間 祥子
16	相分離液滴の in cell 再構築による HSP 機能の解析 36 研究者▶ 東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 三木 卓幸
17	発生制御タンパク質の非同義置換が与えるヒトの解剖学的変化と病態解析 38 研究者▶ 京都工芸繊維大学 応用生物学 野村 真
18	腸内プロテオバクテリアの増殖を誘導する小腸由来アミンの作用機序解明 40 研究者▶ 富山大学 学術研究部医学系 森永 芳智
19	非侵襲的に脳・神経活動を制御する低出力収束超音波刺激法の開発 42 研究者▶ 杏林大学 医学部 病態生理学教室 三嶋 竜弥
20	動物実験代替法としての培養細胞を利用した消毒薬の安全性・毒性評価系の開発 44 研究者▶ 東京医療保健大学 大学院 医療保健学研究科 松村 有里子
21	エピソードに着目した掌蹠膿疱症の病態解明 46 研究者▶ 札幌医科大学 医学分附属フロンティア医学研究所 亀倉 隆太
22	神経回路修復機構解明のための in vitro 髄鞘化評価システムの創製 48 研究者▶ 東京大学 生産技術研究所 機械・生体系部門 松永 行子
23	ビタミン E 同族体の脂質吸収阻害作用を介した抗肥満作用のメカニズム解明 50 研究者▶ 鳥取大学 医学部病態解析医学講座 生物学分野 加藤 優吾
24	AI により酵素を改変、機能性成分を作る 52 研究者▶ 静岡県立大学 薬食生命科学総合学府 伊藤 創平
25	糖鎖を基盤とした新たな認知症の健康管理システムの開発 54 研究者▶ 東京都健康長寿医療センター研究所 三浦 ゆり
26	Fragment Based Drug Discovery におけるリード化合物創出のための基盤技術の開発 56 研究者▶ CBI 研究機構 平坂 雅男
27	食品添加物摂取による脳—精巣—腸内フローラに及ぼす影響とその予防法の開発 58 研究者▶ 京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 南山 幸子
28	苦味細胞の分化における転写因子 Eya1 の必要性の検証 60 研究者▶ 高崎健康福祉大学 應本 真
29	雌の発生に必須な遺伝子群の同定と機能解析 62 研究者▶ 東京工業大学 生命理工学院 岩田 哲郎
30	天然多糖由来大孔径多孔質材料の開発と特性評価 64 研究者▶ 近畿大学 産業理工学部 生物環境化学科 菅野 憲一
31	光ペルフルオロアルキル化を利用したアミノ酸、ペプチドの直接フルオロアルキル化 66 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
32	メタノールを原料にしてビタミン A を生産する微生物の開発 68 研究者▶ 東京工業大学 生命理工学院 折田 和泉
33	含窒素反応活性種の精密制御を基盤とする合成手法の開発と機能性分子合成への展開 70 研究者▶ 東京工業大学 生命理工学院 秦 猛志
34	ポリグルタミン酸 (PGA) ハイドロゲルによる微小粒子捕捉をクライオ電子顕微鏡で可視化する 72 研究者▶ 国立大学法人 東北大学 多元物質科学研究所 濱口 祐

35	エビジェネティック創薬：人工ミニプロテインを基盤とする新規モダリティの開発 74 研究者▶ 大阪公立大学 大学院理化学研究科 生物化学専攻 藤原 大佑
36	有機低分子の機能賦活法としての結晶工学的アプローチ 76 研究者▶ 東京大学 環境安全研究センター 北條 博彦
37	材料から創薬まで微量な微小結晶の電子線回折法の基盤技術開発 78 研究者▶ 国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学研究センター イメージング開発チーム 眞木 さおり

研究テーマ

リボヌクレアーゼ H2 の遺伝性変異と、ゲノム DNA 中のリボヌクレオチド量増加および自然免疫応答亢進との関連

研究者

京都大学 大学院農学研究科食品生物科学専攻 保川 清（ヤスカワ キヨシ）

【目的】

リボヌクレアーゼ H (RNase H) は RNA/DNA ハイブリッドの RNA を加水分解する。本酵素は RNase H1 と H2 に大別される。RNase H2 は二本鎖 DNA 中の 1 塩基のリボヌクレオチド (R) の 5' 末端側を加水分解するが、RNase H1 は R が 4 塩基以上の場合のみ加水分解する。哺乳類の RNase H2 は 3 つのサブユニット (RH2A, RH2B, RH2C) から成り、ゲノム DNA に取り込まれた R の除去に関与する。RNase H2 の遺伝性変異は神経疾患エカルディエーグティエール症候群 (AGS) を引き起こす。我々はヒト組換え RNase H2 を調製し、RH2A の AGS 関連変異 G37S は活性を低下させるが N212I と R291H は低下させないこと、RH2C の AGS 関連変異 R69W は活性を低下させないことを報告した (1)。我々は、CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス線維芽細胞株 NIH3T3 の RNase H2 A サブユニット (RH2A) 欠損株を作製し、これらは野生株よりもゲノム DNA に R が多く蓄積していることを報告した (2, 3)。本研究では、RH2C を欠損させた NIH3T3 (KO 株) を樹立し、KO 株に AGS 関連変異 R69W と K145I を有する RH2C をそれぞれ発現させ、細胞への影響を調べた。本研究ではさらに、細胞種によって RNase H2 への AGS 変異がゲノム DNA に与える影響が異なるかどうかを調べることを目的に、RH2A 欠損ヒト胎児腎細胞株 HEK293 を作製し、同様の解析を行った。

【方法・結果】

1. KO 株の作製：NIH3T3 に、Rnaseh2c exon 1.2 を標的としたピューロマイシン耐性遺伝子を含むベクターを導入した。薬剤セレクトーションの後、モノクローン化し KO 株を樹立した。2. KO 株と野生型 (WT) 株の比較：12 塩基 RNA (12R) と、これに相補的な 12 塩基 DNA (12D) から成る二本鎖 (12R/12D)、あるいは 1 塩基の R を含む 12 塩基 DNA (1R) と 12D から成る二本鎖 (1R/12D) を基質とし、pH 8、25°C で細胞抽出液と反応させた。KO 株の抽出液は 12R/12D を分解したが 1R/12D を分解しなかった。WT 株の抽出液は両基質を分解した。このことから、KO 株は WT 株よりもゲノム DNA に多くの R が蓄積していることが示された。3. AGS 関連変異をもつ RH2C の一過性発現：WT および変異 R69W、K145I を有する RH2C を KO 株でそれぞれ一過性発現させた。いずれの場合も、細胞抽出液は上記の両基質を分解し、ゲノム DNA 中の R の蓄積量は WT と同程度まで減少した。本結果は、G37S 以外の AGS 関連変異をもつ RH2A を RH2A の KO 株に一過性発現させた結果と同様であった (4)。4. RH2A 欠損 HEK293 (KO 株) の樹立：pGuide-it-ZsGreen1 ベクターを用いて、RH2A をコードする遺伝子 *Rnaseh2a* を標的とするガイド RNA および Cas9 タンパク質を HEK293 細胞に導入した。KO 株は、顕微鏡で観察された形態は野生株と同じであった。一方、増殖速度は野生型の 60% であった。5. RH2A の一過性発現：pCMV-S_FLAG ベクター (理研バイオリソース研究センター) にヒト RH2A 遺伝子 (野生型または AGS を引き起こす変異型 G37S、N212I、R291H) を挿入した。これを KO 株に導入し、1-10 日目の細胞を回収し、細胞抽出液およびゲノム DNA を調製した。結果、1-10 日目で RNase H2 タンパク質が発現しており、細胞の RNase H2 活性は 2-5 日 KO 株に G37S を発現させても RNase H2 活性は変わらなかったが、N212I あるいは R291H

を発現させると野生株と同じレベルになった。

【文献】

- (1) Nishimura T et al. *J Biochem* **166**, 537-545 (2019)
- (2) Tsukiashi M et al. *J Biochem* **165**, 249-256 (2019)
- (3) Kanabashi M et al. *J Biochem* **172**, 225-231 (2022)
- (4) Hara H et al. *Biosci Biotechnol Biochem* **87**, 865-876 (2023) 本財団の助成
- (5) Yano H et al. Manuscript in preparation 本財団の助成

研究テーマ

メラノーマにおけるアミノ酸輸送体高発現機構の解明による低侵襲治療の開発

研究者

大阪大学 大学院理学研究科附属フォアフロント研究センター 兼田 加珠子（カネダ カズコ）

①研究の背景及び目的

メラノーマは放射線抵抗性があり且つ抗がん剤の効果も低い悪性度の高いがんの一つである。メラノーマ治療の主体は外科的切除であり、病変を取り切ることが原則である。メラノーマはその厚さで進行度も変わり、病変から 5 mm から 2 cm 離して広範囲に切除を行う。リンパ節に転移が認められた場合はリンパ節郭清が行われる。切除範囲が広範囲に渡ることによる再建の問題、リンパ節郭清の結果生じるリンパ浮腫による機能的問題が生じる。メラノーマにおける低侵襲治療の開発は、審美的な面からも必要性の高いものであると考えられた。一方で LAT1 の転写制御機構は未だ明らかになっておらず、そのメカニズムを解明することによって、メラノーマに限らず他のがん種の増悪機構の解明にも役立つことが期待できる。

②研究結果

研究計画：現象として確認されている「LAT1 の発現の上昇と増悪度の上昇」、そして「LAT1 の発現の低下と増殖抑制」の制御機構を明らかにすることを目的として、次の検証を行った。

2-1. 薬剤耐性性と LAT1 の発現の相関

抗がん剤の長期曝露によって複数のがん種の抗がん剤耐性株を作出した。親株との LAT1 の発現比較を行ったところ、細胞株において異なったパターンを示すことが明らかとなった。

例えば、LAT1 が増強されるもの（肺がん 1 株、膵がん 1 株、大腸がん 1 株）と減弱するもの（大腸がん 3 株、膵がん 3 株）が現れた。

また、どうしても作出できないものもあり、細胞における LAT1 の寄与度が異なることが確認された。

2-2. LAT1 転写制御機構の検証

Prdm16 は固形がんで強発現が確認されている転写因子である。LAT1 のプロモーター領域のクローニングを行ったところ、近位（約 +100 bps）と遠位（約 -3000 bps）に Prdm16 の結合サイト（GAAGAT）の存在が確認された。これらの配列と Luc の結合したプラスミド DNA を用いてプロモーターアッセイを行ったところ、Prdm16 の存在下において、プロモーター活性が 10 倍以上になることが確認された。本年度中にはメチル化・脱メチル化処理によるプロモーター活性の変化の検討は完了できなかったが、LAT1 の発現制御に Prdm16 が関わっている可能性が確認されたため、さらなる検討を進める予定である。

2-3. アスタチン 211 標識核医学治療薬による治療効果の検証

メラノーマ B16F10 細胞では抗がん剤耐性株の構築が困難であった。3-1 で構築した膵がん及び肺がん等の固形がんの抗がん剤耐性株を用いて LAT1 の発現と治療効果との相関を検証した。LAT1 の発現が増強した細胞株においては、より標的薬の効果が増強することが確認された。

また、LAT1 の阻害薬で処理すると B16F10 細胞の運動性や転移能が阻害されて抗腫瘍効果を発揮するが、LAT1 をノックダウンすると同様の結果が認められた。B16F10 は LAT1 の寄与度が高いと考えられる。

2-4. アスタチン 211 標識薬による治療効果におけるエピジェネティックな影響の検証

メラノーマモデル (転移、同所移植モデル) において、LAT1 を分子標的とした薬剤は非常に効果が高い。いずれも単回投与によって長期間の治療効果を認めている。一方で、アスタチン 211 標識薬 (LAT1 高選択性化合物に標識) は、7.2 時間の化学的半減期に加え、生物学的半減期は 3 時間程度であることが確認された。標識薬投与マウスでは、抗腫瘍免疫促進作用のあるサイトカインの上昇も認められた。つまり長期間の治療効果の持続にはサイトカインの誘導に由来する可能性が強く示唆された。臨床現場でのメラノーマの治療における第一選択は、BRAF の変異を標的としたビラフトニやゼルボルニといった低分子 BRAF 阻害剤である。しかしながら、B16F10 は正常型 BRAF を持つため、変異 BRAF を持つ WM266-4 細胞株との治療効果を比較確認する予定である。

③結論

LAT1 の機能阻害によるメラノーマ細胞株の形態の変化は大きい (メラニン顆粒の減少、運動能の低下)。この変化には mTORC シグナルが関わっている。LAT1 を分子標的とする核医学治療薬は、LAT1 阻害薬と同様にメラノーマの低侵襲性の治療法として効果的であった。抗がん剤耐性と LAT1 の発現との相関にはさらなる検証が必要であると思われるが、LAT1 の発現メカニズムを明らかにすることで、より効果的な薬剤の開発への貢献が期待できる。

Inhibition of cancer-type amino acid transporter LAT1 suppresses B16-F10 melanoma metastasis in mouse models. Shi Z, Kaneda-Nakashima K, Ohgaki R, Xu M, Okanishi H, Endou H, Nagamori S, Kanai Y. Sci Rep. 2023 Aug 25; 13 (1) : 13943. doi: 10.1038/s41598-023-41096-3.

LAT1 の発現レベルと取り込み量には相関が認められ、発現量の高い細胞株には多く取り込まれることが確認された。一方で LAT1 の発現が増強していた一部の薬剤耐性株においては、LAT1 高選択性の標識薬の効果がより強くなることが確認された。LAT1 は転移巣でその発現が増強することが知られている。LAT1 を阻害することで運動能が低下することからも LAT1 の発現と運動能 (転移) は深く関係していると思われる。

転写因子 Prdm16 は近年分化の制御因子であるという報告が見られる。造血細胞における白血病の予後不良マーカー、白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞への分化、骨軟骨への分化等である。これらに共通しているのは、遺伝的な変異を伴わない細胞運命制御に関わるということである。LAT1 が Prdm16 を介して細胞外環境による細胞運命制御に関わっている可能性が示唆されたため、同プロモーターに存在する AARE (Amino acid Reactive Elements) と合わせて制御機構の解明は急務と言える。メラノーマで特に深刻となるのは転移例である。手術不要な転移巣の治療は QOL を高く維持することに貢献できる。LAT1 高選択性の核医学治療薬は、転移例の治療において期待できる低侵襲性治療と言えるだろう。

研究テーマ

HER2 を標的とした光感受性物質修飾ナノボディの開発

研究者

鳥取大学 農学部共同獣医学科獣医外科 大崎 智弘（オオサキ トモヒロ）

①研究の背景と目的

光線力学療法 (Photodynamic therapy: PDT) とは、腫瘍組織に集積する特性のある光感受性物質 (PS) を投与した一定時間後に、PS の集積した腫瘍組織に特定波長の光線を照射すると、腫瘍細胞内で活性酸素が産生されて腫瘍細胞を選択的に破壊する治療法である。正常組織への副作用が少ないため、超高齢化社会を迎えるわが国において低侵襲な腫瘍の治療法としてその開発が期待されている。

現在、国内では第2世代の Talaporfin sodium (TS) による PDT が、早期肺癌、脳腫瘍、化学放射線療法後再発食道癌に対して保険適用となっている。しかしながら、TS の腫瘍選択性ならびに集積性は不十分で、より優れた PS による PDT の開発が望まれている。

腫瘍細胞が高効率に糖を取り込む事象は Warburg 効果として知られ、グルコースの2位の水酸基を陽電子放出核種であるフッ素 18 で置換した誘導体である 18F-FDG (フルデオキシグルコース) が高感度の癌診断が可能な PET-CT 検査薬として応用されている。そこで我々は、第2世代の PS として、糖を PS であるクロリンに連結したグルコース連結クロリン (G-Ce6) を新規に開発した。G-Ce6 は、in vitro において優れた腫瘍細胞選択性および抗腫瘍効果を実現した。しかしながら、in vivo においては、G-Ce6 は体外排泄性が早いため、腫瘍組織に十分に集積しなかった。そのため、仮説で期待したほどの抗腫瘍効果は得られなかった。

そこで、より腫瘍集積性を向上させる目的で、抗体に殺細胞効果を有する化合物を結合した抗体薬物複合体が研究されている。しかしながら、使用する抗体自体の抗がん作用や免疫原性が問題となっている。近年、抗体のこれらの問題点を解決したナノボディ (NB) の研究も進んでいる。ナノボディは、抗原を認識できる最小のタンパク質断片であり、補体依存性細胞障害活性を持たず、免疫原性が低いメリットがある。これまでに申請者らは、HER2 (細胞増殖に関わるタンパク質の一種) NB に Pheophorbide a を修飾した化合物を合成し、HER2 を発現する (HER2 positive) 腫瘍細胞および HER2 を発現しない (HER2 negative) 腫瘍細胞を用いて、HER2-NB の機能性を確認している。本研究の目的は、Pheophorbide a 修飾 HER2-NB の腫瘍細胞への集積性と PDT による殺細胞効果を評価することを目標とする。この新規化合物の有用性が認められれば、より低侵襲かつ腫瘍選択的に腫瘍を治療できるようになる。

②研究方法

本申請者が保有する各種イヌ初代培養腫瘍細胞 (扁平上皮癌、前立腺癌、乳腺癌) を HER2 抗体を用いて HER2 の発現を確認する。性状を確認した HER2 positive および HER2 negative 腫瘍細胞を以下の実験に供する。in vitro 試験において、HER2 positive および HER2 negative 腫瘍細胞に Pheophorbide a 修飾 HER2-NB を添加し、蛍光顕微鏡を用いて細胞への集積性を評価する。各腫瘍細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 個/well になるように播種する。24 時間後に Pheophorbide a 修飾 HER2-NB を各濃度で添加する。24 時間後に培養液を交換し、レーザー光を 0、1、5、10 J/cm² 照射する。24 時間後に細胞生存率、アポトーシス陽性細胞率、および活性酸素陽性細胞率を測定する。また、蛍光顕微鏡を用いて Annexin V や PI 染

色により細胞の状態を評価する。さらに、活性酸素の発生の有無も評価する。in vivo において、担がんマウスに Pheoporbide a 修飾 HER2-NB を投与し、腫瘍組織および正常組織を採取し、腫瘍集積性を評価する。さらに、血液検査による毒性の評価と、in vivo における PDT の腫瘍成長抑制効果を評価する。

③研究成果

* HER2 発現性の確認

犬初代培養移行上皮癌細胞である TKK および YDP に対して、HER 蛍光免疫染色を行ったところ、TKK では HER2 に対する蛍光が認められたが、YDP では認められなかった。

* Pheoporbide a 細胞内集積性

TKK および YDP 細胞に Pheoporbide a 修飾 HER2-NB を添加したところ、HER2 陽性の TKK 細胞において Pheoporbide a の赤色蛍光が認められたのに対し、HER2 陰性の YDP 細胞では Pheoporbide a の赤色蛍光は認められなかった。Pheoporbide a 修飾アルブミンおよび Pheoporbide a 添加時、いずれの細胞においても蛍光は認められなかった。

* Pheoporbide a 細胞内取り込み量の評価

TKK 細胞において 2.5 nM の Pheoporbide a 修飾 HER2-NB を添加した条件下では、Pheoporbide a 修飾アルブミンを添加した場合と比較して、有意に平均蛍光輝度値が上昇した。

* 光線力学療法による殺細胞効果

各細胞に対して、2.5 nM の Pheoporbide a 修飾 HER2-NB、Pheoporbide a 修飾アルブミンおよび Pheoporbide a を添加し、1 時間後にレーザー光を照射し、24 時間後に細胞生存率を算出した。TKK 細胞の各生存率は、13%、105%および 101%であった。また、YDP 細胞の各生存率は、73%、101%および 87%であった。

* まとめ

Pheoporbide a 修飾 HER2-NB は、HER2 陽性を示した細胞に特異的に取り込まれ、それらの細胞において PDT による細胞傷害性が示された。よって、HER2 陽性細胞において Pheoporbide a 修飾 HER2-NB を用いた光線力学療法は、新たな治療法となりうる可能性が示唆された。今後は、in vivo において HER2 標的 PS の安全性および臨床例における有用性を検討して行く予定である。

研究テーマ

生理的抗アルツハイマー病因子 BRI2/BRI3 の機能活性化の認知症創薬への応用

研究者

高知大学 教育研究部医療学系基礎医学部門 麻生 悌二郎 (アソウ テイジロウ)

① 研究の背景及び目的

アミロイド前駆体 (APP) 結合タンパク質である BRI2 と BRI3 は、APP 上の β -並びに γ -セクレターゼの結合部位をマスクして APP のプロセッシングを阻害し、アミロイド β ($A\beta$) の産生を抑制する。両 BRI 因子は $A\beta$ と相互作用して $A\beta$ のオリゴマー化も抑制する。さらに、BRI2 は Insulin degrading enzyme (IDE) の細胞からの分泌量を増加させ、 $A\beta$ の分解も促進する。同時に BRI2 は、2 型糖尿病の発症及び同病へのアルツハイマー病 (AD) 合併に深く関与する膵島アミロイドポリペプチド (IAPP) のオリゴマー化の抑制や IDE を介した IAPP の分解促進にも寄与する。また、BRI2 遺伝子の変異による正常 BRI2 タンパク質量の減少は、AD 類似の臨床症状と神経病理学的所見を示す家族性の英国型認知症並びにデンマーク型認知症の発症原因にもなることが知られている。

最近申請者らは、NRBP1 を基質認識タンパク質としてもつユビキチンリガーゼ (NRBP1-E3) が BRI2/BRI3 を選択的にユビキチン化して分解に導くことを発見した。さらに、神経系細胞における NRBP1 の機能阻害が、BRI2/BRI3 の細胞内在量の増加と共に $A\beta$ 産生量の有意な減少を誘導することを明らかにした (*Cell Reports* 2020)。以上より、NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用を特異的に阻害する化合物を開発すれば、両 BRI 因子の抗 AD 機能を人為的に活性化させることが可能となり、AD に対する根本治療薬の創製に資するのではないかと着想し、当該阻害剤探索のためのアッセイ系を構築した (特許取得済み)。

理研の支援の下、3 万種類 (低分子 約 1 万と天然物 約 2 万) の化合物を対象に初回スクリーニングを行い、12 個のヒット候補化合物を得た。次いで、培養神経細胞を用いて細胞系評価を行った結果、2 つの化合物が細胞内 BRI2 量の増加と共に $A\beta$ 産生の抑制を誘導することが判明し、本創薬コンセプトの実証に成功した。しかしながら、両化合物とも分子構造が複雑で合成展開を進めるのが困難という問題に直面している。

そこで、本研究では革新的 AD 治療薬の開発を目指して、NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用を特異的に阻害する中分子化合物の探索の課題に取り組む。

② 研究方法

タンパク質間相互作用 (PPI) の阻害を予測して分子設計・合成され、かつ合成展開が可能な AMED 中分子化合物 (15,000 サンプル) のライブラリーを用いてハイスループットスクリーニング (HTS) を実施した。尚、BRI3 と比べて BRI2 の方が強力な $A\beta$ および IAPP への毒性低減作用を有するため、HTS には BRI2 を用いた。分泌型 *Gaussia* ルシフェラーゼ (Gluc) を N 末側 (luci; Gn) と C 末側 (ferase; Gc) の 2 つの断片に分割して不活性体とし、各々を BRI2、NRBP1 と連結させて、BRI2-Gn、NRBP1-Gc の 2 種類の発現コンストラクトを作製した。両融合体を培養動物細胞で共発現させた際、BRI2 と NRBP1 が相互作用できる場合に限り、Gn と Gc が近接して培養上清の Gluc 活性が回復し発光が検出されるが、化合物により BRI2 と NRBP1 間の相互作用が阻害されると発光が検出されなくなる二分子発光補完法を用いた。

一次評価では、化合物濃度 5 μ m にて、NRBP1-BRI2 間相互作用に対する阻害率が 50% 以上を示し、

かつ細胞増殖阻害率が50%以下であった化合物を選抜した。

二次評価では、濃度依存的に NRBP1-BRI2 間相互作用を阻害する化合物を選抜した。また、全長 Gluc を用いたカウンター試験を行い、非特異的な阻害作用を示す化合物を除外した。

高次評価では、 $A\beta$ 産生総量の増加を招くスウェーデン変異を導入した APP を安定発現するヒト神経系培養細胞 SH-SY5Y に二次ヒット化合物を添加して、24 h 後に細胞と培養上清を回収した。(1) BRI2 の細胞内在量の増加は、細胞溶解液中の BRI2 タンパク質量を抗 BRI2 抗体を用いた Western blot で調べて確認した。(2) $A\beta$ 産生の抑制は、培養上清中の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ の濃度を $A\beta$ ELISA キットを用いて測定して確認した。また、(3) $A\beta$ 凝集の抑制は、Gn- $A\beta_{42}$ と Gc- $A\beta_{42}$ (東大神経病理の橋本唯史博士よりプラスミド DNA を供与) の安定共発現 293T 細胞に二次ヒット化合物を添加して、24 h 後に培養上清を回収、上清中の Gluc 活性の低下により確認した。

③ 研究成果

理化学研究所の創薬・医療技術基盤プログラム(理研 DMP)の支援のもと、15,000 サンプルを含む次世代創薬シーズライブラリーを対象に二分子発光補完法による一次評価を実施し、321 個のヒット化合物を得た。次いで、NRBP1-BRI2 間相互作用阻害の濃度依存性試験、カウンター試験および細胞毒性試験から成る二次評価を実施し、19 個のヒット化合物を得た。

これらのうち合成品の入手が可能であった 16 化合物について高次評価(終濃度 2~15 μm の範囲で培養細胞に添加)を実施した。BRI2 の細胞内在量については、全長 BRI2 である immature BRI2 並びにその Furin 切断産物である mature BRI2 の量的増加はほとんど認められなかったが、いくつかの化合物により ADAM10 切断により生じる NTF (N-terminal fragment) の量的増加が認められた(図 1)。また、 $A\beta$ 産生の抑制についても、 $A\beta_{40}$ 並びに $A\beta_{42}$ の産生量を再現性を伴って抑制する化合物は存在しなかった。一方、ほとんどの化合物が $A\beta$ 凝集抑制作用を示し、その作用強度と NTF 量増加との間に一定の関連性が認められた。

結論として、今回得られた中分子ヒット化合物のいくつかで BRI2-NTF 量の増加と $A\beta$ 凝集の抑制が確認されたものの、内在性 mature BRI2 量の増加と $A\beta$ 産生の抑制を誘導するのに十分な作用強度の活性を保持した化合物は存在しないと考えられた。

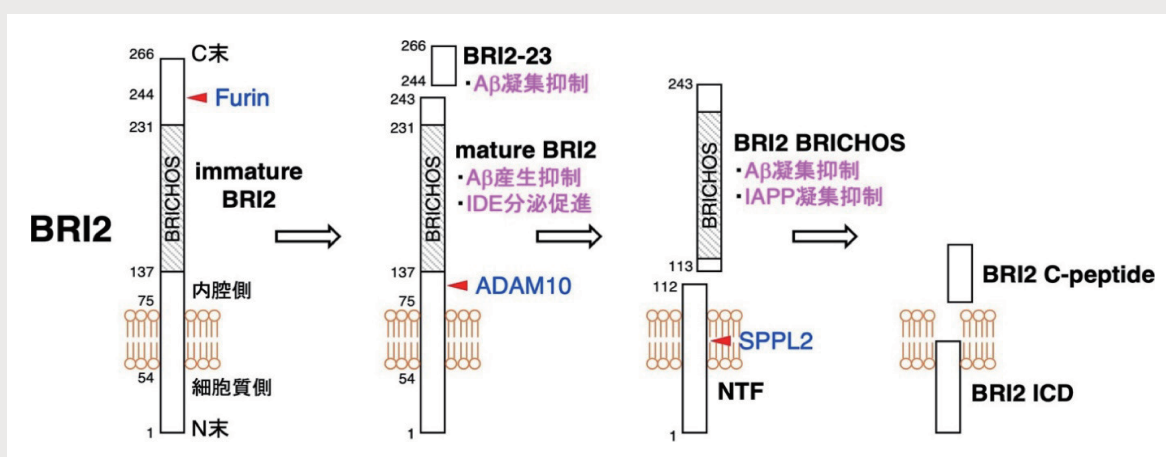


図 1 BRI2 のプロセッシング様式と各産物の AD 制御における役割

研究テーマ

医薬品・化粧品開発に資するタンパク質構造中の弱い相互作用の系統的理解

研究者

茨城大学 理学部 高妻 孝光 (コウヅマ タカミツ)

概要・背景

バイオ医薬品にはその有効性等において多くの期待が寄せられており、タンパク質の持つ特異的な相互作用について分子レベルでのシステマティックな知見はバイオ医薬品の開発において重要となっている。タンパク質における弱い相互作用をファインチューニングし、計算機化学によるバイオ医薬品等の合目的設計と有効性の向上等につなげるためには、従来型の水素結合に加味して、CH- π 相互作用等を含む拡張型水素結合や、 π - π 相互作用のような弱い相互作用における精密な構造情報と系統的理解が必要である。本研究では、バイオ医薬品開発及び生体触媒において重要なタンパク質における弱い相互作用に関する基礎知見を得るためにモデルタンパク質となるシュウドアズリンとその M16X 変異体の大型結晶作成および中性子・X 線結晶構造解析と、新たなモデル系である亜硝酸還元酵素の発現系の構築を行った。

脱窒菌から見出されるシュウドアズリンは、タンパク質中に単核のタイプ 1 銅を有する電子伝達タンパク質である。シュウドアズリンの銅イオンに配位する His81 のイミダゾール環と、第二配位圏の Met16 側鎖の間に働く弱い S- π 相互作用が、タイプ 1 銅の構造や分光学的性質を制御していることを報告してきた。シュウドアズリンでは、Met16 を置換し、 π - π 相互作用や CH- π 相互作用を導入することで、タンパク質の構造安定性が大きく変化することが明らかになっている。

亜硝酸還元酵素は、シュウドアズリンと同じく活性中心にタイプ 1 銅をもつ。亜硝酸還元酵素の Met56 とシュウドアズリンの Met16 が空間的に等価であることや、活性中心付近に、分子内電子移動反応のカップルしながらプロトンを提供する Asp92 などのアミノ酸残基が存在することを踏まえ、シュウドアズリンと合わせて中性子・X 線結晶構造解析を行い、酵素機能における弱い相互作用の理解が重要である。そこで、第二配位圏の変異体の作製などに必要な遺伝子組み換えによる発現系を作製した。

結果・考察

バイオ医薬品開発及び生体触媒における基礎知見として重要なタンパク質における弱い相互作用を中性子結晶構造解析によって検討するために、まず、モデルタンパク質となるシュウドアズリンとその M16X 変異体の大型結晶の作製をおこなった。嫌気結晶化環境を利用することで、シュウドアズリン M16L 変異体のミリ角サイズ結晶を重水中から得ることに成功した。さらにこの結晶を J-PARC のタンパク質中性子回折装置構造解析装置 iBIX に持ち込み予備回折データを測定したところ、約 2 Å の分解能データを与える良質な結晶であることが判明したため、3 月中に全データセットの収集を行なった。今後、このデータを利用することで、M16L 変異体の活性中心付近に導入した CH- π 相互作用や、近傍の水素結合の詳細の解析が可能になった。中性子回折データの収集と並行して、シュウドアズリンの高分解能 X 線結晶構造解析を行なった。X 線結晶構造解析で、決定したシュウドアズリンとその M16X 変異体の構造に基づいて量子化学計算を行い、タンパク質構造中の S- π 相互作用、 π - π 相互、CH- π 相互作用等のエネルギーを定量的に解析した結果は、論文として報告した。さらに、1.2 Å 分解能で決定した M16G 変異体の構造では、WT に本来存在した S- π 相互作用を除いたことで、鎖間の水素結合の変化とともに、近傍ルー

ブの構造に変化が生じることが判明した。

さらに、弱い相互作用の詳細を検討するための新たなモデルとして、亜硝酸還元酵素の発現系を大腸菌で作成した。シュウドアズリンの構造に倣った設計によって作製した M56F 変異体では、変異によって酸性における構造の安定性が低下することも明らかになった。

研究期間中に構造解析に至らなかったシュウドアズリンの中性子回折データや、作製した亜硝酸還元酵素の発現系を利用していくことで、弱い相互作用に関するシステムティックな研究がさらに発展すると期待できる。

研究テーマ

哺乳動物の卵・初期胚における細胞機能の光制御

研究者

岡山大学 学術研究院ヘルスシステム統合科学学域 大槻 高史 (オオツキ タカシ)

①研究の背景および目的

本研究の目的は、筆者らの開発した光応答性分子 (Tat-protein-PS) による哺乳動物の卵細胞・初期胚の細胞機能の光制御法を確立することである。ここでは、Tat-protein-PS (図 1 左上) によりタンパク質や RNA の作用を細胞内で光制御する技光増感剤 (PS) を化学結合でつないだ化合物であり、図 1 の機構で光依存的に細胞質内に運ばれる。具体的には、細胞に投与後 2-3 時間でエンドソーム内に蓄積し、その後、光増感剤に対する励起光を当てるとエンドソームを脱出して細胞質内に届き、結果として光依存的に細胞内で機能する。Tat-protein-PS のタンパク質部分を RNA 結合タンパク質 (U1A) にした Tat-U1A-PS を用いると、短い U1A 認識配列を付加した RNA (翻訳抑制を起こす miRNA や、RNA 干渉 [RNAi] を起こす shRNA など) を光依存的に細胞質内に運ぶことができる。しかしながら、本技術の適用は、これまで培養細胞に限られており、動物個体への適用については例が無い。そこで本研究では、この独自技術を発生初期の哺乳動物 (卵～初期胚) に適用し、初期胚内での RNAi 誘導および初期発生事象の時空間制御に取り組んだ。

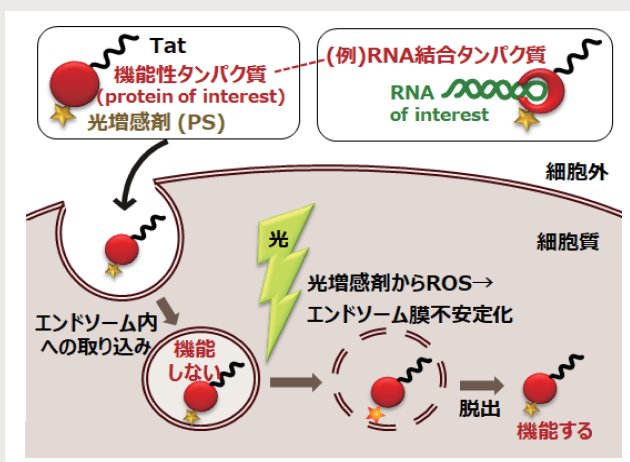


図 1 光依存的なタンパク質 / RNA の細胞質内導入

②研究方法

【TatU1A-PS を用いた shRNA 導入による 1 細胞 RNAi】

まず、TatU1A-PS を用いた shRNA 導入による 1 細胞 RNAi を行った。マウスの初期胚の細胞に GFP と BFP の mRNA をマイクロインジェクションにより導入し、GFP と BFP を発現させた。この GFP・BFP 発現細胞に図 1 の方法で光依存的に anti-GFP 配列の shRNA を導入し、その後の細胞分裂と GFP のノックダウンを追跡した。(BFP は比較対象である。このようにして 2～8 細胞期の胚の中の 1 細胞に対するができるかを検証した。さらに、同様な方法で、胚の中の 1 細胞に対して細胞極性制御因子 aPKC のノックダウンも試み、このことが細胞分化に及ぼす影響についても検討した。

【Tat-PLC ζ -PS を用いた人為的卵活性化】

続いて、図 1 左上の分子の機能性タンパク質部分を卵活性化因子 PLC ζ とする Tat-PLC ζ -PS を作製した。受精時に導入される PLC ζ により Ca²⁺ オシレーションと呼ばれる反復性の細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇により卵が活性化し発生が始まる。この卵活性化機構が不全なケースは男性不妊要因として知られる。この解決策として、Tat-PLC ζ -PS をマウスの卵に作用させて光照射の強度やタイミングを検討して、人為的な Ca²⁺ オシレーションを引き起こせるかを調べた。

③研究成果

【TatU1A-PS を用いた shRNA 導入による 1 細胞 RNAi】

TatU1A-PS (PS 部分には Alexa546 を用いた) と FAM 標識 shRNA を投与した 2、4、8 細胞期のマウス胚に対して、1 細胞のみを PS の励起光により照射し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。その結果、2、4、8 細胞期胚のいずれにおいても光照射後に shRNA と TatU1A-PS の蛍光が細胞質中に拡がっていることが分かった。この結果から、本方法による細胞特異的な shRNA の導入ができたことが示された(図 2)。また、4、8 細胞期胚において、胚発生の追跡を行った。その結果、4、8 細胞期胚のいずれも胚盤胞期まで発生が進んでいることが分かった(図 2 下)。したがって、本方法による光照射が胚発生に目立ったダメージを及ぼすことはないことが示された。

RNAi については、GFP のノックダウンを BFP をネガティブコントロールとして実証した。GFP および BFP の mRNA を 4 細胞期胚の 2 つの細胞に導入したのちに、TatU1A-PS と shRNA で処理し、1 細胞だけを光照射した。その結果、図 3 に示すように、光照射した細胞のみにおいて 1～2 日後に GFP ノックダウンを観測することができた。同様に aPKC のノックダウンも行うことができたが、その細胞分化への影響については明確に判断できず、その点は今後の課題となった。これらの結果から、胚において狙ったタイミングで狙った細胞において RNAi を光照射により引き起こせることを示すことができた。将来的には、この方法は、時空間的に遺伝子/RNA 機能を制御することにより、胚発生研究への応用が期待される。

以上の成果は、下記論文に掲載された。

Ikawa & Ohtsuki et al, Scientific Reports, 13, 13050 (2023)

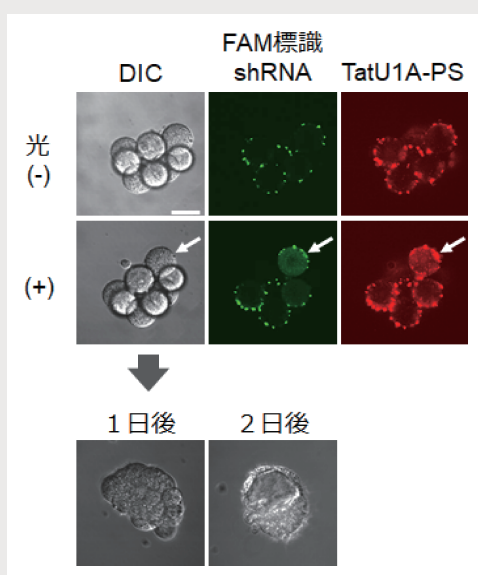


図 2 8 細胞期胚の 1 細胞への shRNA 導入とその後の発生

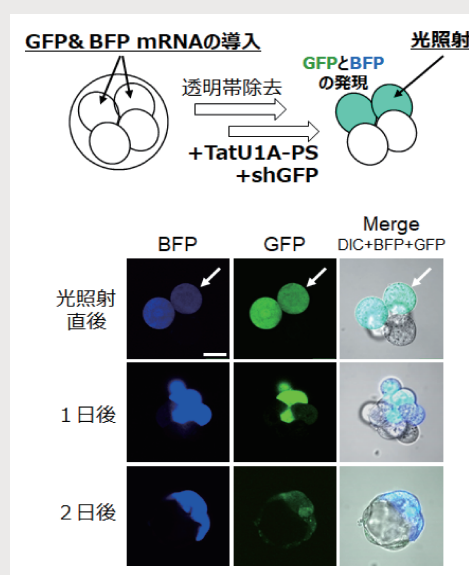


図 3 1 細胞特異的な GFP ノックダウン

【Tat-PLC ζ -PS を用いた人為的卵活性化】

Tat-PLC ζ -PS は Tat-PLC ζ 部分のタンパク質合成(発現ベクターの作製と大腸菌による発現)と PS の付加により合成することができた。これをマウス卵に投与し、光照射の強さやタイミングを検討したが、人為的な Ca²⁺オシレーションを観測することはできなかった。Tat-PLC ζ が発現しづらく、精製度の高いものを充分量得るのが難しかったことが、本実験を全体的に困難なものにしたと言える。今後はタンパク質部分の設計改良により本コンセプトの実証に至ることが期待される。

研究テーマ

健康長寿の実現を目指した、免疫遺伝学的メカニズムの解明による高血圧性疾患の新奇予防・治療法開発

研究者

島根大学 医学部病理学講座病態病理学 大原 浩貴 (オオハラ ヒロキ)

①研究の背景及び目的

高血圧は脳血管障害や心筋梗塞、慢性腎臓病といった脳心腎血管病の主たる危険因子である。これら高血圧性臓器障害は一般に加齢性疾患であり、発症後に一命を取り留めたとしても QOL の低下は避けられず、健康長寿実現の大きな障害となる。1970 年代に京都大学で確立された「脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP)」は、本態性高血圧および高血圧性臓器障害を遺伝的に自然発症し、高血圧性疾患の病態モデルとして頻用されている。申請者は、SHRSP と正常血圧ラット (WKY) の間で特定の染色体領域を交換した「コンジェニックラット」の表現型解析を行うなかで、SHRSP に WKY 由来の約 0.6-Mbp の第 1 染色体断片を移入した「SPwch1.71」という系統が、SHRSP よりも高い血圧と脳卒中感受性を示すことを発見した¹⁾。このコンジェニック領域の中から、SPwch1.71 の脾臓で約 3 倍の高発現を認めた、T 細胞に特異的に発現する ADP リボシルトランスフェラーゼ 2b (*Art2b*) を、候補遺伝子として同定した¹⁾。一方、SPwch1.71 よりも広いコンジェニック断片を持つ SPwch1.72 の血圧は SHRSP と同等でありながら、臓器障害の進行は緩徐である。そのため、SPwch-1.72 だけが持つ領域に、SPwch1.71 の病態を強力に抑制する遺伝子が存在すると推測される。その候補遺伝子として、ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) の必須因子で、SHRSP ではナンセンス変異により機能低下が生じている stromal interaction molecule 1 (*Stim1*) を見い出している。ART2b と STIM1 は T 細胞における Ca^{2+} シグナル制御分子という共通点を持つため、「分子間協調作用の遺伝的な異常による新奇の免疫遺伝学的メカニズム」を介した、高血圧性疾患の発症・進展機序の解明につながることを期待して、本研究を立案した。

②研究方法および研究成果

次に示す 3 系統の雄ラットを用いた：SHRSP/Izm, SPwch1.71, および SHRSP における *Stim1* ナンセンス変異の原因となる一塩基多型を野生型に置換したノックインラット (*Stim1*-KI SHRSP)²⁾。

血圧は個体差が大きく、飼育環境などの外的要因の影響も受けやすいため、血圧に関わる表現型はしばしば再現性の担保が課題となり得る。そこでまず、既報¹⁾での観察期間 (6 か月) を 12 か月に延長するとともに、使用する飼育ケージのタイプを統一して飼育条件を適切に揃えた上で再評価し、系統差が確実に存在することを確認した (図 1)。

次に、STIM1 と ART2b が制御性 T 細胞の活性化やアポトーシス誘導といったプロセスに関わるとされることから、T 細胞サブセットに着目した解析を実施した。具体的には、高血圧が成立した 12 ~ 15 週齢オス SHRSP/*Stim1*-KI SHRSP/SPwch-1.71 の脾臓・末梢血中のヘルパー (Th)、細胞傷害性 (Tc)、および制御性 T 細胞 (Treg) の存在比率を分析した。

Th と Tc について、*Stim1*-KI SHRSP が低値傾向であり、野生型 SHRSP や SPwch1.71 と比較して炎症が抑制状態にある可能性が示唆された。一方、Treg については SPwch1.71 の末梢血において高値であり、臓器障害に伴う炎症制御のため、末梢組織への動員が亢進しているためと推測した。また、「高血圧発症前」の 5 週齢の末梢血において、SPwch1.71 の Th 比率は SHRSP および *Stim1*-KI SHRSP のそれよりも有意

に高かったが、Tc および Treg では有意差は見られなかった。これらの結果は、成獣での各 T 細胞サブセットの系統差が、加齢あるいは血圧の上昇に伴い形成されることを示唆している。

また、*Art2b* 遺伝子をノックアウト (KO) した *Art2b*-KO SPwch1.71、および *Stim1* のナンセンス変異を野生型配列に置換した *Stim1*^{WT}-KI SPwch1.71 を rGONAD 法により作製した (図 2)。ホモ化の完了後、脳卒中感受性の比較などを行う予定である。これらのゲノム編集ラットも用いて、STIM1 と ART2b という 2 つの遺伝子が高血圧ラットの高血圧性臓器障害の発症・進展に強く影響する遺伝子セットであるか、またその機序は何かといった点について調査を継続したい。

末尾になりますが、本研究へのご支援をいただきました小柳財団に心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Ohara H et al. *J Hypertens*. 2024; 42:118-128.
- 2) Odongoo B et al. *Clin Exp Hypertens*. 2021; 43:34-41.

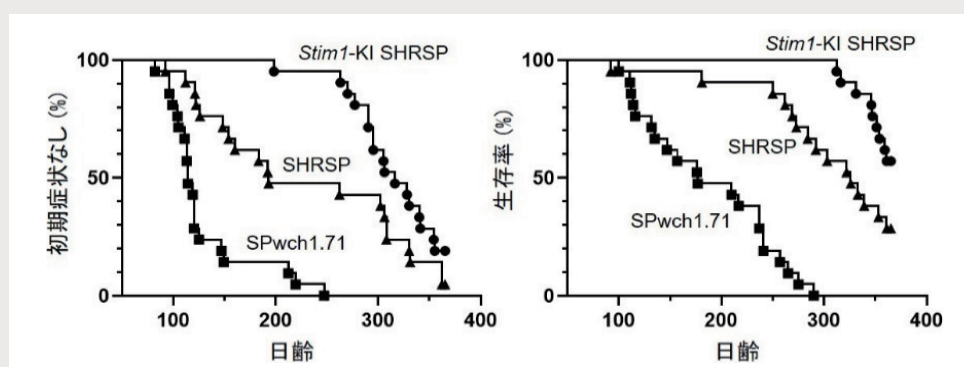


図 1 1 年を打ち切りとして、痙攣発作や自発活動の低下などの脳卒中発症を示唆する所見を初めて観察するまでの期間 (左) および生存率を評価した (各 n=21)。

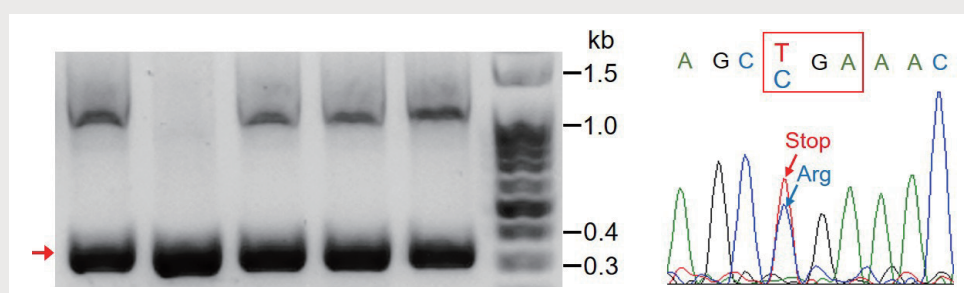


図 2 *Art2b*-KO/*Stim1*^{WT}-KI SPwch1.71 の作製
(左) *Art2b* 配列にホモもしくはヘテロ欠失をもつ個体を確認した (矢印)。
(右) *Stim1* のナンセンス変異 (TGA) がヘテロで野生型 (CGA) に置換されている個体を確認した。

研究テーマ

高精度分子シミュレーションに基づく 核内受容体の機能解明

研究者

豊橋技術科学大学 情報・知能工学系 栗田 典之（クリタ ノリユキ）

①研究の背景及び目的

核内受容体は、細胞核内で遺伝情報の転写機構を制御するために必須なタンパク質ファミリーであり、生体内での発生、恒常性、代謝などの生命維持の根幹に係わる遺伝子の転写機構に深く関与している。核内受容体に異常が生じ、この転写機構が制御不能になると、がん、心血管系疾患、炎症性疾患、および生殖異常などの様々な疾患が発症することが判明しており、そのため、核内受容体をターゲットにした様々な治療薬の開発が進められている。また、これまでの構造生物学の実験により、この受容体には様々な低分子が結合し、結合する低分子の僅かな構造の違いにより、受容体の構造が特異的に変化し、転写機構を巧みに制御することが判明している。しかし、この特異的構造変化の原因は、未解明であり、核内受容体に対する新規阻害薬の開発におけるボトルネックになっている。本研究では、独自に開発した高精度分子シミュレーションを用いて、この特異的構造変化を原子・電子レベルで解析し、どのような低分子が受容体の構造変化をより効果的に誘発するかを解明することを第一の目的とする。その結果を基に、核内受容体により強く結合し、その機能を効果的に阻害する化合物を提案し、核内受容体の異常により発症する様々な疾患に対する有効な治療薬の開発に資する。

②研究方法

本研究では、まず、核内受容体の一種であるアンドロゲン受容体 (AR) を計算対象として採用し、分子動力学 (MD) 計算を用い、AR が関与する転写機構を原子レベルで解析する。さらに、高精度フラグメント分子軌道 (FMO) 法を用い、AR に低分子が結合した複合体の電子状態を計算し、上記の構造変化が起こる原因を電子レベルで明らかにする。その結果を基に、AR 中の転写活性領域の構造をより顕著に変化させる新規低分子を提案することが最終目標である。以下に、具体的な計算手順を示す。

- (1) AR と低分子の複合体の構造最適化：分子力場計算を使用
- (2) 生体内における複合体の構造変化の解析：温度 (37°C) で MD 計算を実行
特に、AR 中の転写活性領域の構造変化に注目し、結合する低分子が変化した際に、この領域の構造がどのように変化するかを、長時間の MD 計算により解明する。
- (3) 複合体中の AR のアミノ酸残基と低分子間の相互作用解析：FMO 計算を使用
MD 計算で明らかになった構造変化の中で、構造が大きく変化する前後の構造をピックアップし、それらの構造の電子状態を FMO 計算により高精度に計算する。その結果から、AR のアミノ酸残基間の相互作用、および低分子と残基間の相互作用を電子レベルで解析し、大きな構造変化が生じる原因を電子レベルで明らかにする。
- (4) AR の構造をより大きく変化させる新規低分子の提案
(3) の結果を基に、AR により強く結合し、その構造をより大きく変化させる低分子を提案し、上記の計算を実行し、AR の新規阻害剤の候補となる低分子を提案する。

③研究成果

本研究では、AR に対する作動薬として R1881、及び拮抗薬として CA4 を採用し、これらの薬が AR に結合した際の AR の構造変化、及び AR 内の相互作用の変化を、上記の高精度分子シミュレーションを用いて解析し、従来の実験で明らかになった現象の原因を、原子・電子レベルで明らかにした。計算結果の概要を以下に示す。

- (1) 薬が結合していない AR 複合体においては、Helix12 とコアクチベータの位置が大きく変化し、AR の転写活性は高くない。
- (2) 作動薬 R1881 が結合した AR 複合体においては、Helix12 とコアクチベータは同じ位置に安定に存在し、その結果、AR の転写活性は向上する。
- (3) 拮抗薬 CA4 が結合した AR 複合体においては、Helix12 及びコアクチベータの位置が大きく変化し、AR の転写活性は減少する。従って、今回の MD シミュレーションにより、AR への作動薬及び拮抗薬の影響の相違を矛盾なく説明することが出来た。
- (4) 拮抗薬 CA4 の影響に関しては、拮抗薬と AR の Helix4 が引き合うことにより、Helix4 と Helix12 間の水素結合が消失したことが、Helix12 の大きな揺らぎの原因であることが明らかになった。
- (5) FMO 計算の結果から、AR に拮抗薬 CA4 が結合した際、AR のどのアミノ酸間の相互作用が変化して、AR の構造変化のトリガーとなるかを電子レベルで解明した。
- (6) FMO 計算の結果から、AR に作動薬が結合した際、Helix12 とコアクチベータ間の引力相互作用が強まり、コアクチベータの位置が安定化することを解明した。
- (7) AR に対するより効果的な拮抗薬を提案する目的で、CA4 と AR のアミノ酸間の相互作用を詳細に解析し、CA4 をベースとした新規拮抗薬の候補を提案した。

今後、本研究を様々な核内受容体に拡張し、それらの構造変化の原因を解明し、核内受容体の構造をより効果的に変化させる新規低分子が提案できれば、核内受容体が関与するがん、心血管系疾患、炎症性疾患、および生殖異常など様々な疾患の新規治療薬の開発に役立つと考えられる。

研究テーマ

加齢に伴う脳機能低下のメカニズム解明

研究者

島根大学 医学部医学科 発生生物学 藤田 幸（フジタ ユキ）

① 研究の背景及び目的

我が国では世界でも類を見ない勢いで高齢化が進み、従来の医療では対応しきれない問題が生じている。高齢化に伴う心身諸機能の低下は生物学的に必然であり、さらに加齢性疾患の発生と共に自立生活が困難になることも避けられない。特に、認知症患者数は増加傾向にあり、2020年の高齢者有病率は16.7%、2025年には高齢者の約5人に1人に達することが見込まれている。認知機能の低下は、精神面・身体面・社会面から複合的な健康問題を引き起こし、そのことが生活の継続を困難にさせる要因となり、医療費拡大にもつながっている。こうした背景から、脳機能低下を引き起こす老化関連疾患に共通した発症、進行、増悪のメカニズムを明らかにすることが、社会的にも経済的にも喫緊の課題である。

神経系では、大人の脳内においても、神経細胞を生み出す幹細胞が存在し、失われた神経細胞を補充する仕組みが存在する。しかし、加齢に伴い、その修復力は低下して、ダメージが蓄積して、次第に記憶や認知機能などの様々な生理機能が低下していく。本研究では、神経幹細胞からの神経細胞へ分化するメカニズムを明らかにし、加齢に伴う記憶・認知機能の低下を克服する方法の確立に貢献することを目指した。

② 研究方法

・免疫染色

麻酔下で、4% PFA/PBS を灌流固定し、マウスの脳を摘出した。その後、組織を OCT compound で包埋し、凍結標本を作製した。クライオスタットを使用し、脳下室帯 (subventricular zone:SVZ) を中心に、冠状方向に厚さ 20 μ m の凍結薄層切片を作製し、クエン酸処理により不活化を行った。5% BSA/PBS で室温 1 時間ブロッキングを行った。その後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。切片を PBS で洗浄をした後、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体を室温遮光下で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、Fluorescent mounting medium を用いて封入した。封入後のサンプルを観察、撮影した。観察、撮影には蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

・SVZ 細胞増殖能の検討

成体マウス側脳室付近の脳室下帯より神経幹細胞を回収し、培養した。HDAC 阻害剤を DMSO:PBS = 1:1 の溶媒で溶かし、1 mL/well になるよう播種した細胞培養ディッシュに加え、37°C、5% CO₂ で処理した。その後、ニューロスフェアの観察とサイズ測定を行い、細胞を回収、定量した。また、最終濃度 10 μ M になるように Growth media に溶かした BrdU (Bromodeoxyuridine) を加え、反応させた。その後、免疫染色を行い、増殖細胞を測定した。ニューロスフェアの観察及びサイズ測定は蛍光顕微鏡を使用した。

③ 研究成果

本研究は成体神経新生における HDAC の関与を明らかにすることを目的とした。SVZ における HDAC の発現解析を行ったところ、Nestin 陽性細胞で Class1 HDAC が強く発現していることがわかった。さらに、ニューロスフェア法による細胞培養から、HDAC 阻害は SVZ 神経幹細胞の増殖を抑制することが示され

た。これらの結果から、HDAC は、成体 SVZ における神経幹細胞の in vivo での増殖と分化の制御に関与することが示唆された。

これまでに、成体神経幹細胞周期の進行の遅れが神経前駆細胞の分化を制御し、神経新生に異常をもたらすことが報告されている。成体においても細胞周期の障害は脳機能に影響を及ぼすと推測できる。本研究を通して、HDAC が成体 SVZ 神経新生において増殖・分化に関与していることが分かった。成体神経新生の変化は記憶や学習などの高次脳機能や中枢神経系の疾患など様々な疾患に関連しているため、HDAC の成体神経新生への役割と分化のメカニズムの理解を深めることは、治療につながる重要な洞察を提供する可能性がある。

研究テーマ

糞便微生物移植治療により見出せた腸内放線菌の役割～健康づくりと疾病予防法の開発～

研究者

徳島文理大学 薬学部 阪口 義彦（サカグチ ヨシヒコ）

①研究の背景および目的

私たちの健康と疾患には、腸が深く関与している。腸内には多種多様な細菌が生息し、フローラを形成している。近年、その乱れと疾患の関連を示唆するデータが多く報告されており、Clostridioides difficile 感染症 (CDI) も挙げられる。その治療法として、我々は、CDI 患者に対して糞便微生物移植療法 (FMT) を行いその治療に成功したが、糞便中の何が効果を示しているのか明らかでなかった。そこで、我々は、腸内フローラの解析を行うことで、CDI 患者の治癒に伴って腸内に多種多様な“放線菌”が検出されることを明らかにした。放線菌は、通常好気的な環境(土壌、農作物)に生息しており、様々な食物を代謝することで、多様な生理活性物質を生産することが知られている。これらの事象から、腸内の有益な放線菌が腸活に重要な役割を担っていると推察し、腸内に常在する放線菌を利用した健康・疾病予防への応用に着目した。本研究テーマでは、ヒト糞便から放線菌を分離および同定し、分離株の C. difficile およびその毒素に対する生理活性評価を行った。

②研究方法

ヒト糞便は、北里大学医学部倫理委員会の承認を得て、被験者の同意のもと収集し実験に用いた。病原菌の取り扱いについては、北里大学バイオセーフティ委員会の承認を得て、病原体等取扱規定に基づいて実験を行った。

②-1 放線菌の分離・同定

ヒト糞便検体を我々が独自に確立した分離寒天培地に混釈し、1～4週間培養後、生育したコロニーを同組成寒天培地へ釣菌することで放線菌を分離した。分離株の 16S rRNA 遺伝子をシーケンス解析することで分離株の菌種を同定した。

②-2 分離株の代謝産物の抗菌活性評価

2で分離した放線菌を生産培地にて1週間培養した。その培養液を各種菌株に対して生物活性評価を行った。C. difficile を含む種々の病原菌に対する抗菌活性をペーパーディスク法により判定した。

②-3 分離株の代謝産物の C. difficile 毒素に対する阻害活性評価

②-2の培養液と毒素(トキシンA、トキシンB)を37℃で30分間反応させ、培養細胞(MDCK-2、Caco2など)に作用させた。24時間後、細胞を固定しクリスタルバイオレット染色により細胞の生死を評価した。

③研究成果

③-1 ヒト糞便からの放線菌の分離

ヒト糞便を抗生物質含有分離寒天培地に混釈して1～4週間培養することで放線菌のコロニーが生成し、6属14種20株の放線菌を分離することに成功した。また、分離株は、多様性に富み新種と推定される放線菌も含まれていた。通常、環境中に生息する放線菌門においては、このような多様性は認められな

い。従って、ヒトの腸内では、放線菌は自然環境（土壌や農作物など）と比べて多様化していることが推察される。今後、異なる食生活のヒト糞便から放線菌を分離することで、食生活と腸内の放線菌との関連性を明らかにする知見が得られる。

③-2 分離株における代謝産物の抗菌活性評価

ヒト糞便由来分離株 14 種を各種生産培地で培養し、4 株の *C. difficile* に対する抗菌活性試験を行ったところ、2 種のみ阻止円が認められた。また、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、枯草菌および緑膿菌についても生理活性を調べた。その結果、MRSA、緑膿菌、MSSA、MRSA および枯草菌に対してそれぞれ 1 種が抗菌活性を示した。

③-3 分離株の代謝産物の *Clostridioides difficile* の毒素に対する阻害効果

C. difficile は、毒素（トキシン A、トキシン B）を産生し、強力な細胞毒性を示す。そこで、培養細胞（MDCK-2、Caco2 など）を用いて、放線菌代謝産物の毒素に対する阻害活性を評価した。その結果、14 種中 1 種が *C. difficile* に対して抗菌活性を示した。また、*C. difficile* の毒素に対して阻害（抑制）効果を示す放線菌も認められた。今後、代謝産物に含まれる活性化合物を単離し、その化合物の生理活性評価、安全性試験などを行う必要がある。また、細胞でのコラーゲン発現およびエラスチン産生性を調べることで、健康保持増進（抗老化、疾病予防）への発展が期待される。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 小柳財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。また、共同で実験を行って頂きました北里大学医学部微生物学の武 晃 助教、岡山大学学術研究院保健学域検査技術科学分野微生物・遺伝子学講座の後藤和義 准教授、国立大学法人岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 細胞生物学分野の阪口政清 教授、藤田医科大学先端光学診療学講座の大宮直木 教授に深く感謝申し上げます。

【本研究課題に関する学会発表】

1. 阪口義彦、武 晃、後藤和義、竹原正也、友信奈保子、山本健一、菊池雄太、坂本光央、加藤はる、大宮直木、阪口政清、永浜政博、糞便微生物移植治療から見出した腸内の放線菌の生理活性評価。日本組織培養学会第 95 回大会、岡山、2023 年 8 月。
2. 武 晃、阪口義彦、稲橋佑起、後藤和義、林 俊治、農作物および肥料からの放線菌の分離と分類、第 37 回日本放線菌学会大会、広島、2023 年 9 月。
3. 阪口義彦、武 晃、後藤和義、友信奈保子、山本健一、竹原正也、塩見慎也、吉田昌裕、久保美和、野路征昭、和久田光毅、阪口政清、加藤はる、大宮直木、永浜政博、再発性 *Clostridioides difficile* 感染症に対する糞便微生物移植療法から見出した腸内放線菌の生理活性評価。日本薬学会第 144 年会、横浜、2024 年 3 月。

研究テーマ

新規ホルモン FNDC4 とその受容体 ADGRF5 が血管内皮細胞の機能調節に及ぼす影響に関する研究

研究者

東京工業大学 生命理工学院 中村 信大（ナカムラ ノブヒロ）

①研究の背景及び目的

血管の内側を一層に覆う血管内皮細胞は、一酸化窒素やエンドセリンなど様々な生理活性物質を産生放出して、血管の拡張や収縮、血管透過性、抗血液凝固作用、炎症細胞の接着と浸潤など様々な血管機能を調節している。血管内皮細胞の機能低下は、血管の慢性炎症を引き起こして動脈硬化を進展させ、脳卒中や心筋梗塞に代表される脳心血管イベントを誘発することが知られている。血管内皮の機能低下は、高血圧、糖尿病、脂質異常症、肥満などで認められているものの、血管内皮細胞の機能調節や炎症惹起の分子メカニズムは十分に解明されていない。我々は、全身の血管内皮細胞に発現する G タンパク質共役型受容体 ADGRF5 のノックアウトマウスを作製したところ、肺などの組織の血管内皮細胞で炎症性のサイトカイン、ケモカイン、接着分子の発現量が上昇して慢性炎症を引き起こすことを明らかにした。このことから、ADGRF5 が血管内皮の免疫恒常性の新たな調節分子であり、その機能不全が炎症反応を促進するのではないかと予想している。我々は、ADGRF5 のリガンドとして肝臓から分泌されるペプチド FNDC4 を同定し、FNDC4 が脂肪細胞の ADGRF5 に結合するとインスリン刺激による血中グルコースの取り込み輸送を活性化することを明らかにした。しかしながら、FNDC4 が血管内皮細胞の細胞機能に対する影響については不明である。そこで本研究では、“血管の健康”に重要な血管内皮の恒常性維持における ADGRF5 の作用機序を解明するために、血管内皮細胞の ADGRF5 が FNDC4 刺激に答えるのか、応答するのであればどのような血管内皮機能の調節に関与するかを明らかにすることを目的とした。

②研究方法

CHO-K1 細胞および PEAK 細胞に ADGRF5 安定発現させた細胞株を作製した。安定発現させた ADGRF5 が機能するか評価するために、96 ウェルプレートに播種した細胞株に ADGRF5 アゴニストとなる合成ペプチド (TSFSILMSPDSPD) を 150 μ M の濃度で刺激をした。刺激前後の細胞内カルシウムイオン濃度の変化をカルシウム傾向指示薬 Calbryte を用いて経時的に計測した。FNDC4 への応答性の評価は、マウス FNDC4 の 41 ~ 163 アミノ酸残基の領域の合成ペプチド、および HeLa 細胞に強制発現させて培養液中に分泌されたマウス FNDC4-His6 をニッケルアガロースで生成したものをを用いて行った。細胞内 cAMP の測定は化学発光 (cAMP-Glo Assay Kit) を用いて行った。

ずり応力負荷実験は、ドーナツ状のシリコンシート (内径 2 cm、外径 3 cm) をを 35 mm ディッシュに播種し、細胞密度がコンフルエントに達した状態で実験に使用した。実験の 1 時間前に培養液を無血清の DMEM 培地に置換した。実験直前にシリコンシート及び培養液を取り除き、庄野式灌流培養チャンバー (ネッパジーン) にディッシュを装着した。ペリスタポンプで細胞に 30 dyn/cm^2 のずり応力がかかるように培養液を灌流したのちに細胞をウェスタン解析に用いた。

③研究成果

まず、FNDC4 への ADGRF5 の応答性を確認するにあたって ADGRF5 の安定発現細胞株 (CHO-K1 細

胞と PEAK 細胞) を作製した。これらの細胞における ADGRF5 が正常に機能するかを、既知の ADGRF5 の活性化リガンドとして知られている Stachel 配列 (TSFSILMSPDSPD) の合成ペプチドを用いて細胞内カルシウムイオン濃度の変化を蛍光カルシウム指示薬により測定することで評価した。細胞に 150 μ M の Stachel ペプチドを添加すると添加直後に細胞内カルシウムイオン濃度が上昇した。コントロールのペプチドではこのような変化が認められなかったことから、安定発現細胞株の ADGRF5 が機能することを確認した。次に、ADGRF5 安定発現細胞株に 2 種類の FNDC4 (合成ペプチド (sFNDC4) および HeLa 細胞で発現分泌させて精製したもの (FNDC4-His6)) で刺激し、その前後の細胞内カルシウムイオン濃度変化について調べた。その結果、100 μ M までの濃度で検討したがいずれも FNDC4 による細胞内カルシウムイオン濃度の変化は認められなかった (図 1)。脂肪細胞における ADGRF5 の FNDC4 への応答では cAMP の上昇が起こることが報告されているので (Georgiadi et al. 2021 Nat. Commun. 12, 2999) cAMP の濃度変化について調べたが、ADGRF5 安定発現細胞株では FNDC4 処理による cAMP 濃度変化に影響は認められなかった (図 2)。さらにマウスの初代肺血管内皮細胞に FNDC4 処理を行った場合でも同様にシグナル応答の変化は認められなかった。以上の結果から、ADGRF5 安定発現細胞株および血管内皮細胞ともに FNDC4 刺激による応答を認めることはできなかった。脂肪細胞のように応答性が認められた細胞が存在していることが報告されていることから、FNDC4 に対する ADGRF5 の応答性には細胞特異性があることも考えられる。我々は、FNDC4 とは異なる ADGRF5 の活性化メカニズムが血管内皮細胞に存在するのではないかと考えている。

本研究では、我々は血管内皮細胞でのシグナル伝達で最近注目されている血流によるずり応力刺激 (shear stress) が ADGRF5 の活性化に関与しているのではないかと予想し、その検証解析を行った。ADGRF5 安定発現細胞株を還流培養装置内で 30 dyn/cm² のずり応力を付加し、30 分後の ERK1/2 のリン酸化状態についてウェスタン解析によって調べた。その結果、ADGRF5 非発現細胞と比較して、ADGRF5 安定発現細胞株ではずり応力刺激によってリン酸化が有意に上昇することを認めた。ADGRF5 が血流刺激によって活性化する可能性が示唆されたことから、今後は ADGRF5 がずり応力刺激によってカルシウムシグナル応答をするのか、血管内皮細胞において同様の応答を示すのかについて解析を進めていく必要がある。

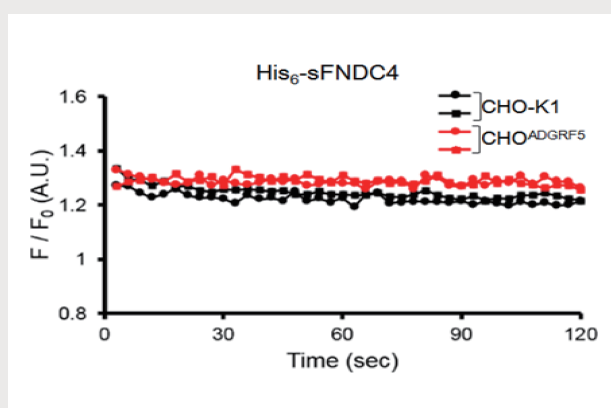


図 1 ADGRF5 過剰発現細胞において sFNDC4 処理が細胞内 Ca²⁺ イオン濃度を与える影響

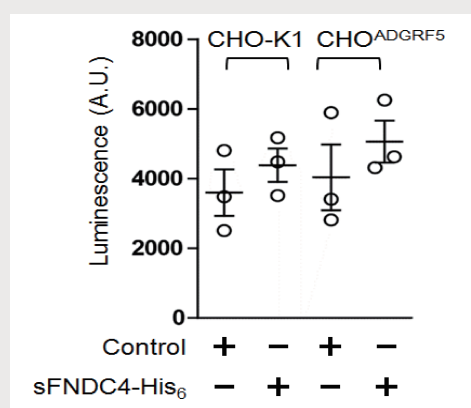


図 2 ADGRF5 過剰発現細胞において sFNDC4 処理が細胞内 cAMP 濃度を与える影響

研究テーマ

線虫の低温休眠を制御する新規遺伝子の寿命における機能解析

研究者

広島大学 大学院 統合生命科学研究科 堀川 誠 (ホリカワ マコト)

①研究の背景および研究目的

申請者は線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いた先行研究において、HSP90 や HSF1 など熱ショック応答やタンパク質フォールディングなどを制御するタンパク質の一群が低温特異的寿命制御にも関与している事を発見し (Horikawa, 2015, PLoS Genet.)、この発見を研究基盤として低温環境におけるシャペロンの機能解析を進めたところ、熱ショックタンパク質の発現を中心的に制御する転写因子 *hsf-1* (Heat Shock Factor-1) の機能欠損株が低温環境 (9°C) で発生を停止して休眠状態に入る事を発見した。この新しい休眠現象を『低温休眠』と名付け、その制御に関わる遺伝子の探索および低温休眠の制御メカニズムと寿命制御メカニズムの関係性を解析したところ、既知の寿命延長遺伝子である *daf-16*/FOXO (インスリンシグナル)、*xbp-1*/XBP1 (ER ストレス応答)、*skn-1*/Nrf2 (酸化ストレス応答)、*hlh-30*/TFEB (オートファジー) などを高発現する事で低温休眠現象が抑制される事を明らかにした。この低温休眠の表現型と寿命制御の関係性 (図 1) から、低温休眠の表現型を指標とした長寿変異株の遺伝学的スクリーニング系を開発し、低温休眠が抑制される変異株の約 30% において寿命延長がみられる事を明らかにした。

本研究では、この低温休眠を利用したスクリーニングから得られた長寿変異株に対して全ゲノムシーケンス解析を行う事で、低温休眠と寿命を制御する遺伝子を同定し、新規の寿命制御遺伝子・メカニズムの発見を目的とした。

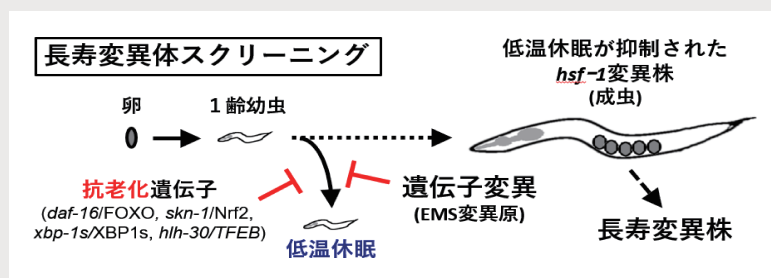


図 1 低温休眠を指標とした長寿変異株スクリーニングの模式図

②研究方法

先行研究の低温休眠スクリーニングによって得られた長寿変異株に対して、QTL (Quantitative trait locus: 量的形質遺伝子座) 解析と全ゲノムシーケンス解析を組み合わせた MutMap 解析 (Abe, A., Nat. Biotechnol, 2012) により低温休眠の制御遺伝子変異が含まれる染色体ならびに遺伝子座を絞り込み、さらに全ゲノムシーケンス解析結果より責任遺伝子座に含まれるノンセンス変異を低温休眠制御遺伝子の候補として抽出した。得られた低温休眠制御遺伝子の候補に対し、遺伝子変異部位が異なる欠損変異株との比較解析、または RNAi 法によるノックダウン実験により低温休眠制御遺伝子を同定した。同定された低温休眠制御遺伝子の欠損変異株に関しては、さらに寿命測定実験を行い、低温休眠制御遺伝子の寿命における機能を解析した。

③研究成果

低温休眠スクリーニングによって得られた長寿変異株の全ゲノムシーケンス解析により、低温休眠を制御する新規遺伝子を複数同定する事に成功した。この新規遺伝子は主に MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) 経路の制御因子 *nsy-1*/MAPKKK, *mtk-1*/MAPKKK および MAPK 経路下流の転写制御因子 *sur-2*/MED23、NMD (nonsense mediated mRNA decay) 経路の制御因子 *smg-1*/SMG1 および *smg-2*/SMG2、機能未知の新規遺伝子 *rcd-1* (Regulator of Cold-inducible Diapause, 申請者らが新規に命名) に分類された。

興味深い事に、*nsy-1* はカロリー制限時の寿命延長に必要である事が報告されており (Uno, 2013, Cell Rep.), *smg-1* の機能欠損は寿命を延長する事が報告されている (Masse, 2008, PLoS One) など、低温休眠の制御遺伝子として同定された遺伝子のいくつかは既知の寿命制御遺伝子でもあり、この結果は低温休眠を指標としたスクリーニングが長寿変異株の単離に有効である事をより強く支持する結果であった。さらに、寿命制御における機能が報告されていない低温休眠制御遺伝子 *sur-2*/MED23 機能欠損株の寿命測定を行った結果、*sur-2* 変異株は長寿表現型を示す事、すなわち新規の寿命制御遺伝子であることを明らかにした。一方、*rcd-1* 機能欠損株および RNAi による *rcd-1* の発現抑制は低温休眠の導入を抑制したが、寿命には影響を与えなかった。この結果は、寿命制御とは独立して低温休眠のみを制御する遺伝子も存在する事を示唆している。

これらの研究成果は、①低温休眠の制御に MAPK 経路や NMD 経路などが関与する事

②低温休眠は長寿変異株のスクリーニングにおいて有効な観察指標として機能する事

③低温休眠を利用したスクリーニングより新規の寿命制御遺伝子 *sur-2*/MED23 を同定する事に成功など、低温休眠の制御メカニズムの解明と抗老化研究における新しいアプローチとしての低温休眠の有用性の実証を同時に達成する事につながった。

また申請者は関連する研究において低温休眠が神経制御を受けている事を発見し、低温休眠の制御に関わる神経因子として栄養応答や睡眠に関わる神経ペプチド neuromedin U の線虫ホモログ *capa-1* およびその受容体である *nmur-1*、モノアミン神経伝達物質であるチラミンの合成酵素 TDC-1 (Tyrosine decarboxylase) などを明らかにする事に成功している。そして、低温休眠に関する本研究および関連する研究の成果をまとめた論文を Nature Communication 誌に投稿し、現在査読中である。なお、全査読者より受理相当という審査結果を既に受けており、編集者より一部文章の最終修正を残すのみである。

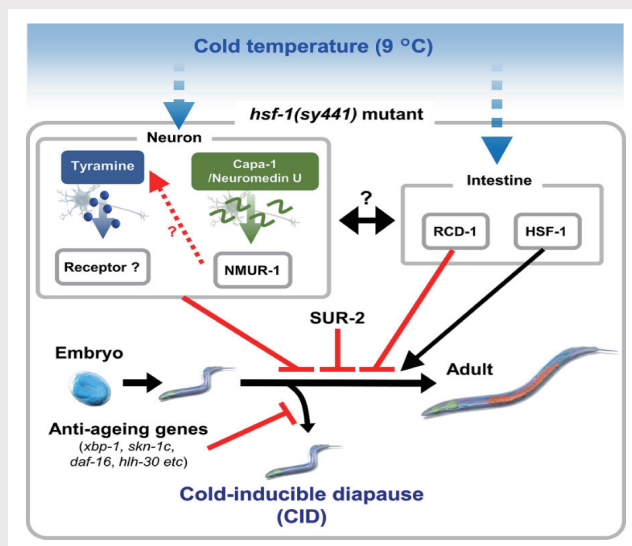


図2 低温休眠の制御メカニズムの概要図

学会発表

発表者：堀川 誠、学会名：線虫研究の未来を創る会 2023、発表日：2023 年 8 月 17 日、開催場所：理研 (神戸)

形式：ポスター、発表タイトル：低温休眠現象の制御機構と抗老化研究への応用

発表者：堀川 誠、水沼 正樹、学会名：第 46 回 日本分子生物学会年会、発表日：2023 年 12 月 8 日

開催場所：ポートアイランド (神戸)、形式：口頭およびポスター

発表タイトル：栄養応答メカニズム mTORC2 により制御される線虫の低温休眠現象

研究テーマ

ニュートリオミクスを駆使したがん代謝システムの解明

研究者

東京大学 先端科学技術研究センター 大澤 毅 (オオサワ ツヨシ)

1. 研究の背景及び目的の本文

がんの転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には、腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、低酸素・低栄養・低 pH の過酷な腫瘍微小環境ががん悪性化を促進することを報告してきた (PNAS 2011, Nature Commun. 2012, Cancer Res. 2013, Cell Reports 2017, Cell Reports 2019, 図 1)。また、がん細胞は、低酸素・低栄養・低 pH の過酷な腫瘍微小環境が、解糖系、次いで酢酸代謝、さらにグルタミン代謝という多重の代謝適応システムで生存し悪性化を獲得する知見を報告してきた (図 1)。

近年、がんや生活習慣病の研究領域では、アミノ酸の代謝異常が注目されている。ロイシン、バリンなど必須アミノ酸の欠乏には mTOR 複合体を介したアミノ酸認識機構が存在する。一方、申請者はグルタミンなど非必須アミノ酸の欠乏で、がん細胞は mTOR 複合体を介さない新しいアミノ酸認識メカニズムを利用する可能性を見出している (図 2)。

本研究は、ニュートリ・オミクス情報の抽出と計測データ解析技術を駆使して、これまで知られていない腫瘍微小環境における新しいアミノ酸欠乏の感知機構を解明し、環境適応で悪性化するがん代謝適応システムを攻略する新たながん治療法への応用に繋げる。本研究は、がん治療法の開発だけではなく、小児科領域の難治性先天性アミノ酸代謝異常疾患の病態生理解明や治療法にも応用であり、さらに「mTOR 研究」や「オートファジー研究」などの学術体系の変革や転換にも繋がる可能性をもつ挑戦的な研究である。

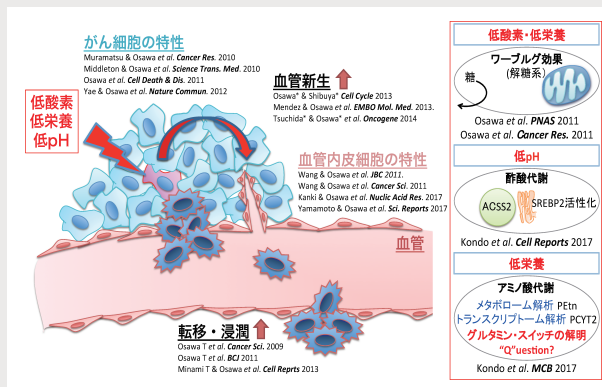


図 1 低酸素・低栄養・低 pH は多重の代謝適応システムを促しがんの悪性化に寄与する

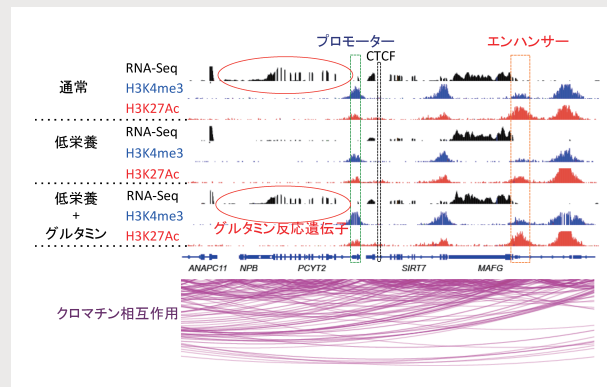


図 2 グルタミンに反応する遺伝子の発現はプロモーターのみならずクロマチン相互作用による遠隔エンハンサーが関与する

2. 研究方法

腫瘍微小環境におけるがん細胞は mTOR 非依存的なアミノ酸感知機構を介しがん悪性化を促進するという研究仮説をもとに、申請者が持つ独自の低栄養培養系 (PNAS 2011, Cell Reports 2017) に、アミノ酸を 1 種類ずつ添加することで、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 アミノ酸に起因する系統的な遺伝子発現解析、エピゲノム解析やメタボローム解析を正常細胞とがん (HeLa, PANC1) 細胞の比較から実現する。具体的には、申請者独自の実験系を駆使して本研究期間内で、以下の 2 項目に

研究テーマ

皮膚研究を加速させる新規皮膚モデルの開発

研究者

信州大学 繊維学部 根岸 淳 (ネギシ ジュン)

①研究の背景及び目的

積層化した表皮細胞からなる表皮層、細胞と真皮特異的な細胞外マトリックス (ECM) からなる真皮層および皮下組織で皮膚は構成されている。現在、皮膚の機能解明、化粧品や医薬品の開発に様々な皮膚モデルが使用されている。ヒト培養表皮細胞モデルはヒト細胞を用いた評価が簡便に可能であるが、真皮層を有していない。また、コラーゲンゲルとヒト細胞からなるモデルは真皮層を代替しているが、真皮特異的 ECM は再現されていない。ヒト皮膚はヒト皮膚細胞と真皮特異的な ECM を有しているが供給が不足しており、実験動物はヒトとの種間差や倫理的な課題があるため、新たな皮膚モデルの開発が望まれている。

本研究では、ヒトと組織の構造やサイズが類似している胎児ブタの皮膚から細胞を除去した脱細胞化ブタ真皮を基材とし、ヒト皮膚細胞と真皮 ECM からなる皮膚モデルの開発に取り組んだ。

②研究方法

脱細胞化ブタ真皮の作製と特性解析

研究用胎児ブタの皮膚から表皮層を除去し、高静水圧を印加した。その後、核酸分解酵素溶液とエタノールによる細胞残渣洗浄、凍結乾燥を行って脱細胞化胎児ブタ真皮を作製した。未処理の胎児ブタ真皮と脱細胞化胎児ブタ真皮の残存 DNA 定量と H&E 染色を行い細胞除去と組織構造評価を行った。

脱細胞化胎児ブタ真皮へのヒト線維芽細胞とヒト角化細胞の播種と TEWL 評価

脱細胞化胎児ブタ真皮にヒト線維芽細胞懸濁液を添加、一定期間培養後の DNA 定量と DAPI 染色を行って脱細胞化ブタ真皮内の細胞量と細胞分布を評価した。ヒト線維芽細胞を含有した脱細胞化ブタ真皮を SUS リングで固定、表皮側からヒト角化細胞を播種、培地浸漬して液相培養した。その後、培地を表皮側が露出する程度まで減らして気相培養を行った。気相培養前後の DAPI 染色を行いヒト角化細胞の積層化および角質形成を評価した。また、気相培養前後の TEWL 評価により角質形成と水分保持を評価した。

③研究成果

脱細胞化胎児ブタ真皮のヒト真皮との類似性

未処理の胎児ブタ真皮と比較し、脱細胞化胎児ブタ真皮の DNA 量の有意な減少が認められた。H&E

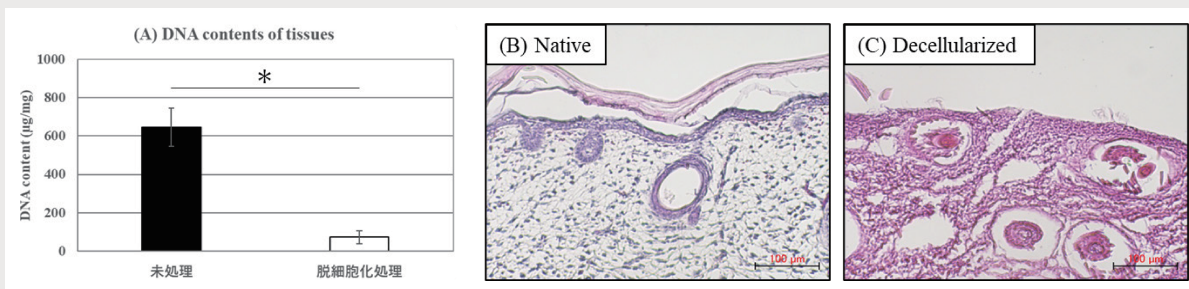


図 1 未処理胎児ブタ真皮と脱細胞化胎児ブタ真皮の DNA 量と H&E 染色画像 ($p < 0.005$)。

染色において、未処理胎児ブタ真皮には細胞核が認められたが、脱細胞化胎児ブタ真皮には細胞核が認められず、ブタ細胞の除去が確認された。また、脱細胞化胎児ブタ真皮にはコラーゲン線維の配向が存在し、ヒト真皮と同様の構造を有し、脱細胞化胎児ブタ真皮の ECM の構造および組成がヒト真皮と類似していることが明らかになった。

ヒト皮膚細胞と脱細胞化胎児ブタ真皮からなる皮膚モデルの作製

ヒト線維芽細胞播種から 7 日目の脱細胞化胎児ブタ真皮の DAPI 染色において、脱細胞化胎児ブタ真皮全体で細胞核が認められ、DNA 定量によって脱細胞化胎児ブタ真皮内でヒト線維芽細胞が増殖したことが確認された。ヒト角化細胞を播種した脱細胞化胎児ブタ真皮の液相培養と気相培養後、DAPI 染色により積層化したヒト角化細胞が観察された。また、気相培養後、核を持たない細胞が認められ、ヒト角化細胞の角質化の兆候が示された。気相培養前と比較し、気相培養後の脱細胞化胎児ブタ真皮の水分蒸発量が少なかったことから、脱細胞化胎児ブタ真皮に播種されたヒト角化細胞が角質化し、保水性を向上させた可能性が示唆された。

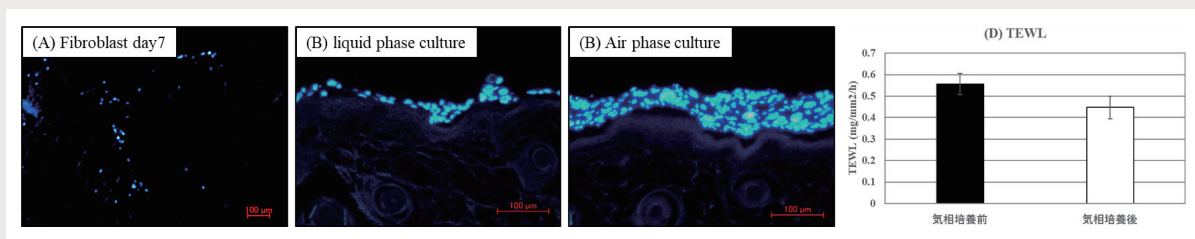


図 2 (A) 線維芽細胞播種、(B) 液相培養、(C) 気相培養後の DAPI 染色と (D) 気相培養前後の TEWL。

本研究により、脱細胞化胎児ブタ真皮とヒト細胞で構成され、真皮特異的 ECM 組成と構造を有した皮膚モデル作製の基盤が確立された。今後は、脱細胞化ブタ真皮を基材とする皮膚モデルの機能を既存皮膚モデルと比較し、真皮 ECM の細胞機能への影響の解明および化粧品や医薬品開発に向けた皮膚モデルの開発に取り組む。

研究テーマ

脳上衣腫治療薬創成を目指した構造生物研究

研究者

奈良先端科学技術大学 大学院 藤間 祥子（トウマ サチコ）

研究の背景および目的

脳上衣腫は子供や若い成人に多い。有効な化学療法が存在しないため、手術により完全に摘出する以外の完治療法が無い。WHO 2021 年の脳腫瘍グレードでグレード 2(5 年以上は生存できるであろう)～3(治療後平均 3 年くらいは生存できるであろう)に分類される。2014 年に、ZFTA と RelA2 つの転写因子が融合した ZFTA-RelA 融合蛋白質が脳上衣腫発症に関わることが報告された。ZFTA-RelA 融合蛋白質は外部刺激なしに恒常的に核内に輸送される。その後、この恒常的な核輸送により ZFTA-RelA は上衣腫発生および悪性化に関与する遺伝子群の発現を誘導すること、ZFTA (1-213) 上に融合蛋白質の恒常的核輸送を担う未知の核局在化シグナル配列(NLS)が存在することが国内外で相次いで報告され、上衣腫発症の分子メカニズムは徐々に解明にされつつある。

上衣腫の発生および悪性化を決定づける細胞内の 2 つの重要なイベントとして、核移行と核内におけるがん化遺伝子群の発現誘導がある(図 1 左)。脳上衣腫では ZFTA, RelA それぞれの融合領域が異なる複数の融合蛋白質が発現している。中でも、FUS1 と名付けられた ZFTA (1-213) とほぼ全長の RelA (4-551) [() の中は各蛋白質内でのアミノ酸番号] から成る蛋白質が発現する腫瘍は最も悪性度が高い。申請者の研究グループは、核輸送に着目して研究をすすめ、これまで、ZFTA-RelA の恒常的な核輸送を担う ZFTA 上に存在する非古典的な NLS とその核内輸送受容体の同定し、さらに NLS と受容体複合体の構造決定にも成功した(未発表)。一連の研究を通して、ZFTA 上の NLS 領域部分が DNA 結合能を持つことが強く示唆された。ZFTA, RelA 両方の DNA 結合部位に特異的に結合する人工合成 DNA を創成は、ZFTA-RelA 融合蛋白質の持つ上衣腫悪性化の 2 つのイベント、核移行とがん化遺伝子群の発現の両方を 1 度に阻害できる画期的な治療薬となる可能性がある(図 1 右)。

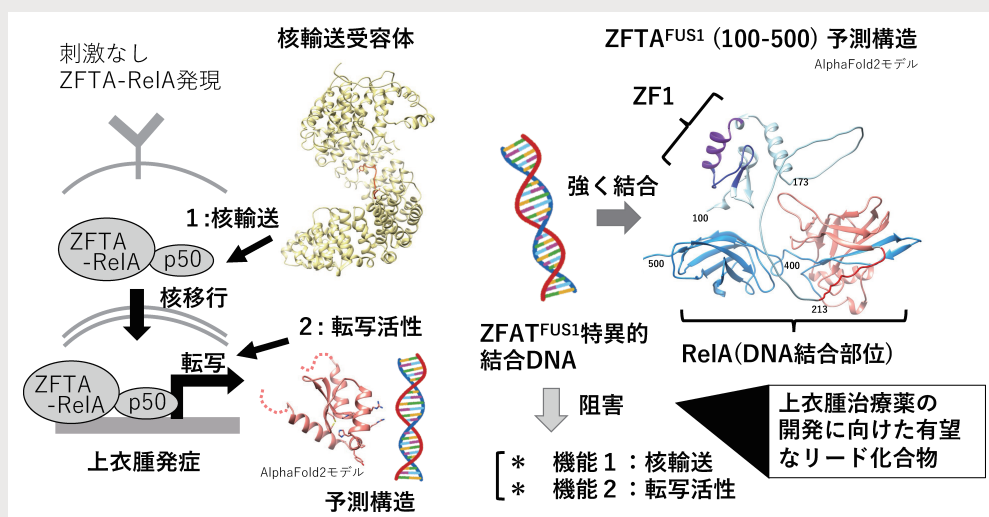


図 1 ZFTA-RelA の発現による上衣腫発症機構と本研究の概要

そこで本申請では、ZFTA および ZFTA-RelA の DNA 結合に着目し、DNA 結合による核輸送受容体との結合阻害、および DNA 結合の分子メカニズムを立体構造の観点から明らかにすることを目的に研究を行なった。

研究方法

支援期間内に、① ZFTA/DNA 複合体形成の検討、② DNA 結合による ZFTA と核輸送受容体との結合阻害活性の評価、③ ZFTA の DNA 結合ドメインの結晶構造解析、④ ZFTA の DNA 結合と DNA の複合体の結晶化、を行なった。各項目について研究方法を記す。

- ① 蛋白立体構造予測プログラム Alpha Fold2 を用い、融合蛋白質に含まれる ZFTA (1-213) の構造を予測したところ、1つの小さな球状ドメイン以外は明確な 2 次構造を有しない天然変性構造であった。そこで、球状ドメイン構造と予測された部分を含む領域を大腸菌を宿主として GST 融合蛋白質として発現させ、高純度精製方法を確認し、ZFTA が標的とする 2 本鎖 DNA との結合をゲル濾過クロマトグラフィーにより評価した。
- ② GST-プルダウンアッセイ法を用いて、DNA 共存下における核輸送受容体との結合阻害活性を測定した。
- ③ 結晶化スクリーニング後、結晶化条件を最適化し、構造決定可能な結晶を析出させた。放射光施設 SPring-8BL32XU で回折実験を行い、Zn-SAD 法を用いて位相決定し、構造解析した。
- ④ 複数の異なる長さの DNA を用いて複合体の結晶化スクリーニングを行なった。

研究成果

本研究の結果、ZFTA が直接 2 本鎖 DNA と結合することを明らかにした。DNA 添加により、核輸送受容体との結合が低下を確認した (図 2A)。これは、ZFTA の核輸送受容体結合部位は DNA 結合部位としての機能を持つという仮説を支持する結果である。

次に、ZFTA の DNA 結合ドメインの X 線結晶構造を 1.95 Å 分解能の高分解能で決定することに成功した。決定した構造を (図 2B) に示す。結晶学的に独立な空間に 4 つの分子が存在していた。AF2 の予測構造とは異なり、N 末端の構造がほどけ、隣接分子の N 末端とスワップしたスワッピングダイマーを形成していた (図 2B)。結晶構造内の Artifact 構造である可能性も含めて今後検討の必要があるが、N 末端部分はダイナミックに構造変化をしている可能性が示された。DNA 複合体の結晶化も試行し、微結晶を得ることに成功した。今後は結晶化条件を改善し、構造決定を目指したい。

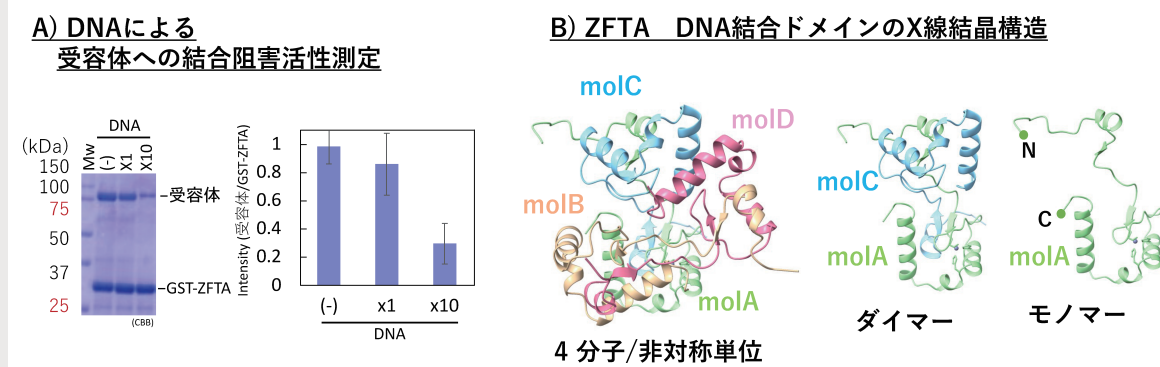


図 2 阻害活性測定と構造解析

研究テーマ

相分離液滴の in cell 再構築による HSP 機能の解析

研究者

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 **三木 卓幸**（ミキ タカユキ）

生命の基本単位である細胞には、蛋白質や核酸が液-液相分離現象によって、sub μ m- μ m スケールの「液滴」と呼ばれる構造体を形成する。遺伝子発現や代謝の制御など、細胞の活動に重要な役割を果たす。一方で液-液相分離は様々な疾患にも深く関わる。例えば、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因物質とされる α -シヌクレインや FUS 蛋白質は、一過的に自身と相互作用して可逆的な相分離液滴を形成する (Soumiket al. Nat. Chem. 2020; Avinash et al. Cell 2015)。その後に液滴状態から不可逆的な病原性のフィブリル (アミロイド様構造体) となる (図 1)。特に ALS 患者由来の変異 FUS 蛋白質は、その相転移が早いことも知られる。近年では、HSP40 や HSP70、HSP90 (Heat shock protein) などの分子シャペロンがフィブリル形成を抑制することが示唆され、議論的となっている。そのため、液滴からフィブリルへの相転移が生じプロセスや、それを抑制する HSP 蛋白質の作用機序の本質を理解することは極めて重要である。

相分離現象の解析は、これまで個々の事象に着目し、分析する「Top-down」アプローチの研究に依存してきた。しかし、分析研究では現象の「把握」に留まる。そのため、相転移を抑制する機構のエッセンスを同定し詳細なメカニズムを解明するには、細胞内で人工的「相分離モデル」を作成し、評価する「再構築研究」が重要である。

【研究内容】

分子シャペロンが、天然の様々な液滴に含まれることが知られる。同時に、分子シャペロン自身が自己集合して自発的に液滴を形成する報告もある。そこで、この現象を模倣し、細胞内でシャペロンを分子を

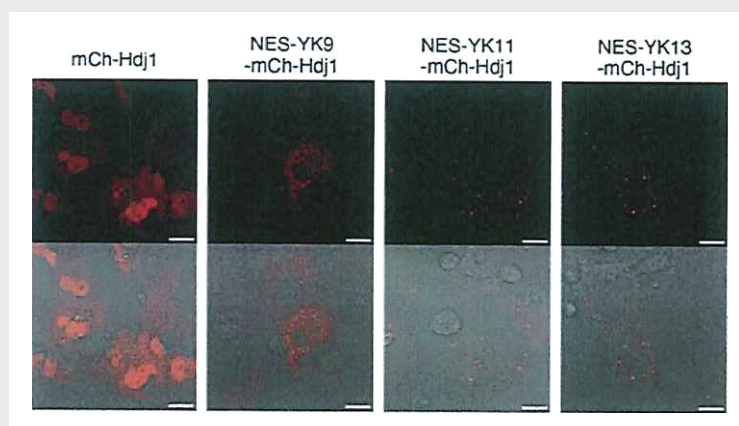


図 1 YK ペプチドタグ融合 HSP40 (Hdj1) の液滴形成
HSP40 (Hdj1) を発現するだけでは液滴は形成されないが YK タグを融合して凝集コアを形成させると液滴に成長した。また、鎖長を長くすることで、より明瞭な集合体が形成したが、FRAP 解析によって流動性の欠けたゲル状の集合になった。

主とする液滴を人工的に作成することにした。その手法として、筆者らが独自に開発してきた自己集合性ペプチドタグを用いた。これは、ペプチドを遺伝子工学的に標的タンパク質に融合することで、液滴の核形成を誘導し、相分離液滴を人為的に作成する手法である。

本研究では、液滴を形成することが報告される HSP40 と HSP70 に対して、評価を行った。具体的には、自己集合性ペプチド (YK ペプチド) と蛍光タンパク質 mCh を融合した HSP40 と HSP70 をそれぞれ COS-7 細胞に一過的に発現させ、その後に共焦点顕微鏡によって液滴形成を観察した。その結果、それぞれが細胞内で球形の集合体として観察された。これらの集合体に関して FRAP (蛍光褪色後回復) 解析を行ったところ、流動性のある動的な集合体であることが判明し、相分離液滴の形成が確認できた。また、自己集合性ペプチドの鎖長を長くすることで、液滴の流動性が低下し、凝集体となることが判明した。これらの結果から、HSP40 や HSP70 は、相分離液滴を形成するタンパク質であることが判明し、同時に、凝集核が強固である場合には、liquid to solid の相転移が生じて凝集体となることが判明した。この様に、筆者らの独自のペプチドタグ技術を用いた手法により、細胞内の本来の環境で分子シャペロンの液滴形成や凝集のポテンシャルを評価できた。

研究テーマ

発生制御タンパク質の非同義置換が与えるヒトの解剖学的変化と病態解析

研究者

京都工芸繊維大学 応用生物学 野村 真 (ノムラ タダシ)

①研究の背景及び目的

胚発生過程を制御する様々なタンパク質の構造と機能は種間で高度に保存されており、こうしたタンパク質の変異は重篤な発生異常や胎生致死をもたらす。一方、ヒトの集団に特異的な一塩基多型 (SNPs) の多くはゲノムやタンパク質の保存性の低い領域に見られるが、こうした多型をもたらすタンパク質の機能変化と表現型への寄与については、これまでほとんど研究が進んでいなかった。GLI3 は胚発生過程における様々な細胞の分化運命決定や器官構築に極めて重要な役割を果たしている。GLI3 の C 末端側は種間で保存性が低く、現生人類の一部の集団では 1537 番目のアルギニンがシステインに変化している。興味深いことに、絶滅したネアンデルタール人やデニソワ人では、この GLI3 多型 (R1537C) をホモ接合で持っていたことが明らかとなっている。しかしながら、このアミノ酸の変化により GLI3 タンパク質の機能や個体の表現型にどのような影響が出るのか、未だ明らかとなっていない。

②研究方法

そこで本研究ではゲノム編集によって化石人類型の多型を GLI3 に導入したノックインマウスを用いて、化石人類型の GLI3 多型 (R1537C) が個体の解剖学的特徴や下流の遺伝子発現にどのような影響がでるのかを解析した。まず、R1537C を導入した転写活性測定アッセイにて、GLI3R1537C が持つ転写活性の測定を行った。また免疫組織化学的手法やアルシアンシアンブルーとアリザリン・レッドによる軟骨・硬骨染色や RNAseq による下流制御遺伝子制御の解析を行った。

③研究成果

GLI3 タンパク質の生化学的解析により、化石人類型のアミノ酸置換は GLI3 の構造やタンパク質安定性を大きく破壊しないこと、また GLI3 の主要な機能であるヘッジホッグシグナルの伝達に影響を与えないことが明らかとなった。一方、RNAseq 解析による網羅的な転写産物の変化を検討した結果、化石人類型の多型の導入により、これまで GLI3 の制御が報告されていない遺伝子群、特に骨形成に関わる遺伝子やヒメクレオソームの構成タンパク質をコードする遺伝子の発現変化が認められた。その中でもヒストン H4 遺伝子については、ヒトおよびマウスにおいて種を超えて発現変化が認められていること、ヒストン H4 遺伝子に変異を持つ患者では頭蓋や四肢の形成異常が報告されていることなどから、化石人類型 GLI3 多型はクロマチン構成遺伝子の発現に影響を与えている可能性が示唆された。さらに、CRISPR を用いたゲノム編集技術により化石人類型の GLI3 多型を導入したマウスでは頭蓋骨の肥大化、肋骨の非対称な形成、椎骨の異形成、胸椎や腰椎の数の変化など、骨格系を中心に多様な形態異常が認められた。HPO (Human Phenotype Ontology) データベースとの照合により、こうした表現型の一部はネアンデルタール人の解剖学的特徴と一致することが示唆された。また表現型-ゲノム関連解析 (PheWAS) により統計学的には有意ではないものの現生人類に存在する当該多型は変形性関節炎、腰痛、角質病変などの疾患と関連することが示された。

これらの研究成果を論文化し、プレプリントとして発表した。また査読後の論文は下記国際誌に掲載された。

A. Agata, S. Ohtsuka, R. Noji, H. Gotoh, K. Ono, T. Nomura.

A Neanderthal/Denisovan GLI3 variant contributes to anatomical variations in mice.

Front Cell Dev Biol 11, 1247361 (2023)

(謝辞に Koyanagi Foundation からの助成支援を得たことを記載)

研究テーマ

腸内プロテオバクテリアの増殖を誘導する小腸由来アミンの作用機序解明

研究者

富山大学 学術研究部医学系 森永 芳智（モリナガ ヨシトモ）

①研究の背景及び目的

私たちの腸内には 100 兆個ともいわれる腸内細菌が生息している。私たちは、栄養や免疫で腸内細菌に依存しているが、逆に細菌側も宿主に依存する共生関係にある。

腸内細菌としてよく知られる大腸菌は、実は腸内に 0.1% もおらずそのほとんどは嫌気性菌である。ところが、医療を必要とする人では大腸菌を含むプロテオバクテリアが 100 倍以上となる人がおり、逆に嫌気性菌が極端に減少する。減少した嫌気性菌は免疫学的な不安定さをもたらすことが知られるが、プロテオバクテリアの増殖の意義とその機序は明らかでない。

そこで、腸内環境に生息するプロテオバクテリアが宿主の炎症の度を調節すると仮定し、その機序には増殖に不可欠な鉄と鉄取り込み機構が関係していると考え、その機序解明に取り組むこととした。

②研究の方法

プロテオバクテリアを代表とする細菌として大腸菌をモデルとして、鉄イオン (Fe^{3+}) の利用を制限する条件で培養することで、培地中で培養しながら大腸菌が増殖しにくい環境を作製した。鉄イオンを含む血清の添加、鉄取り込み分子と類似構造をとるノルエピネフリンの添加、にて細菌の増殖への影響を評価した。

大腸菌が鉄を取り込む際に利用する qseC、qseE の二つの分子に着目し、それぞれの欠損株を作製した。

C57Bl6/J マウスを利用し、リポポリサッカライド (LPS) 接種することで敗血症モデルを作製した。腸管内容物のプロテオバクテリア菌数を培養法で、ノルエピネフリン濃度を ELISA で測定した。小腸でのみカテコラミン産生ができないコンディショナルノックアウトマウスを作製するために、腸上皮特異的に発現する遺伝子である villin のプロモーター支配下で Cre を発現するマウス (Villin-Cre) マウスと、カテコラミン合成酵素である SOX9 遺伝子ヘテロ欠損マウスとを交配させて腸上皮特異的にカテコラミン産生が欠損したマウスを作製した。

③研究の成果

鉄イオン利用制限培地において、ノルエピネフリンの存在下で大腸菌が有意に増殖することを見出した。さらに、大腸菌だけではなく、おなじプロテオバクテリアに属する Klebsiella 属、Enterobacter 属でも同様の現象が保存されていた。さらに、鉄取り込み分子の qseC、qseE の各欠損株では非欠損株と比較して増殖が抑制されていたことから、プロテオバクテリアによる鉄イオンの利用をノルエピネフリンが促進している可能性が示唆された。しかしながら、qseC と qseE の各単独欠損株では抑制効果が不十分であったため、両者が補完しあっている可能性を考えて、qseC/qseE 欠損株の作製に着手した。

敗血症モデルマウスでは、腸管内のプロテオバクテリア数が 2 日で 10000 倍以上に急増し、さらに腸管内容物のノルエピネフリン濃度が、LPS 接種後 30 分という短時間で 100 倍以上となることを確かめた。これらの所見は in vitro で観察した所見と同様の機序が in vivo でも存在している可能性を支持するもの

であった。カテコラミン特異的な作用を明らかにするために、腸管でカテコラミンを産生しない Villin^{Cre}SOX9 ノックアウトマウスを作製した。本マウス作製の基盤となるマウスの繁殖に時間を要したため、現在頭数を増加させ、LPS 接種による敗血症モデルにおける、腸内プロテオバクテリア増加ならびに敗血症重症度の評価に取り掛かっている。

以上より、カテコラミン利用を介したプロテオバクテリアの増殖と炎症との接点が明らかとなった。あたらしい微生物-宿主の関係の解明と、過剰に増殖した細菌の制御法の臨床的意義を踏まえた上で、各種感染症の治療標的への展開の可能性を検討していくこととしている。

研究テーマ

非侵襲的に脳・神経活動を制御する 低出力収束超音波刺激法の開発

研究者

杏林大学 医学部 病態生理学教室 三嶋 竜弥（ミシマ タツヤ）

〈研究の背景と目的〉

本研究は難治性の脳・中枢神経疾患の新たな治療法として、薬物によらないパルス超音波を用いた脳刺激法（ニューロモデュレーション法）の開発を行うものである。ニューロモデュレーションとは電子デバイスを用いて頭外から脳を刺激し、神経の機能を調節する手法を指す。ヒトや実験動物を用いた先行研究では、超音波ニューロモデュレーションによって痙攣の抑制作用といった神経の興奮性を正常化する効果や、脳の高次機能（運動機能や知覚機能）の亢進/抑制作用などの神経機能の可塑的な変化を誘導する効果が観察されている。超音波ニューロモデュレーション法の特徴として、超音波は生体透過性が高く脳深部に到達できる点、低強度の超音波を用いるために非侵襲であり安全性が高い点、また照射した超音波を脳内部で収束させることでミリメートルサイズの局所領域に局限した刺激が可能である点に加え、治療対象とする疾患に最適な刺激プロトコルを開発することで幅広い精神神経疾患（てんかん・うつ病・パーキンソン病・アルツハイマー型認知症等）に適用できる点が挙げられる。これらの特徴から、超音波ニューロモデュレーション法は、これまでの薬物や外科的手術による精神神経疾患の治療法とは一線を画する医療技術となる可能性があり、その実用化に向けた研究は日本の学術的発展に大きく寄与するものと考えられる。

本研究テーマでは特に、超音波ニューロモデュレーションにより、過興奮した神経活動を鎮静化することで、てんかんの発症を抑制する技術の開発を目指す。てんかんの有病率は0.5～0.9%であり、日本国内だけでも患者数は約100万人とされる。そのうち約20～30%は現在使用できるとの抗てんかん薬にも抵抗性を示す難治性てんかんと呼ばれる。有効な治療法として外科的治療が考慮されるが、手術により症状の改善が期待できる症例はごく一部にとどまり、新たな治療法の開発が必要とされている。そこで、超音波ニューロモデュレーションのてんかん治療への応用に向けて②神経活動を抑制する刺激プロトコルの開発および②超音波刺激の作用機序の解明を目指す。本研究の最終目標として、薬や外科的手術によらない新たなてんかん治療法として、超音波を用いたニューロモデュレーションによる非侵襲的で安全性の高い新たな脳刺激法の開発を目指す。

〈研究方法〉

神経細胞の培養と記録

生後0-1日齢の新生仔マウスから海馬を採取し、カバーガラス上のアストロサイトフィーダー上に播種した。培養14-21日目の神経細胞からパッチクランプ法にて膜電位及び膜電流を記録した。

超音波刺激

超音波刺激に直径2 mm、中心周波数5 MHz、浸漬型平面トランスデューサ（5C1I, KGK）を用いた。超音波刺激プロトコルは以下の通りであった。①パルス波：持続時間0.5 msのトーンバースト、パルス繰り返し周波数100 Hz、デューティサイクル5%、超音波照射時間合計2秒。②連続波：持続時間100ミリ秒、デューティサイクル100%。両プロトコルとも音圧は100 kPaとした。

〈研究成果〉

シナプス応答、膜電位、自発性の再帰性バーストに対する単発のパルス波及び連続波の影響を解析した所、刺激による影響は一切見られなかった。そこで、両パターンを10秒間隔で繰り返し加え、神経機能に影響がみられるかを解析した。その結果、繰り返し連続波刺激は神経機能に影響を与えなかったが、繰り返しパルス波刺激によって再帰性バースト活動が低下することがわかった。局所神経ネットワークにおける自発的ネットワーク活動のレベルを決定する上で興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの活動のバランスが重要である。そこで、抑制性シナプス伝達を遮断した場合の繰り返しパルス波刺激の効果を調べたところ、活動電位発火の頻度は超音波刺激による影響を受けなくなった。このことから、GABA作動性抑制性シナプス伝達が、繰り返しパルス波刺激の抑制効果に重要な役割を果たしていることがわかった。

次に、繰り返しパルス波刺激がGABA作動性シナプス伝達に作用する部位を調べたところ、超音波はGABAの放出に影響を与えなかった。そこで、GABA受容体拮抗薬ガバジンを用いて、繰り返しパルス波刺激が周囲のGABAレベルを変化させるかどうかを調べた。低濃度のガバジンはシナプス外GABA_A受容体にはほとんど作用せず、シナプスGABA_A受容体のみを選択的に遮断する。繰り返しパルス波刺激は、ガバジンによって一過性GABA_A電流が遮断されていてもネットワーク活動を抑制したことから、超音波の作用機序には持続性GABA_A電流が関与していることが示唆された。このことからGABAの取り込みが影響を受けている可能性が示された。

放出されたGABAの取り込みは、シナプス前末端とアストロサイトに発現するGABAトランスポーターによって媒介される。アストロサイトのフィーダー層なしで培養したニューロンの活動に対する、繰り返しパルス波刺激の効果を観察したが超音波刺激はニューロンのネットワーク活性低下が見られなかった。このことからアストロサイトが超音波による周囲のGABAレベルの上昇に関与していることが示された。アストロサイトに発現する機械刺激受容チャネルであるTRPA1が繰り返しパルス波刺激による発火抑制効果に関与しているかどうかを調べるため、超音波刺激を加える代わりにTRPA1のアゴニストであるAITCでTRPA1を活性化させた。AITCは繰り返しパルス波刺激と同様にネットワーク活性を低下させた。このことは、反復PW刺激がアストロサイトのTRPA1を活性化することにより、ニューロンのネットワーク活動を抑制することを示している。最後に、繰り返しパルス波刺激によるTRPA1の活性化が周囲のGABAレベルを増加させるかどうかを測定した。超音波の反復刺激は、持続性GABA電流の振幅を増加させた。以上の結果から、繰り返しパルス波刺激はTRPA1を介して周囲のGABAレベルを上昇させ、ネットワーク活動を抑制することが示された。

〈謝辞〉

本研究の遂行にあたり、御支援頂きました公益財団法人小柳財団に厚く御礼申し上げます。また、超音波トランスデューサーの音圧測定は東京工業大学田原麻梨江准教授の協力によって行われました。心より感謝申し上げます。

〈発表論文〉

Mishima T, Komano K, Tabaru M, Kofuji T, Saito A, Ugawa Y, Terao Y.
Repetitive pulsed-wave ultrasound stimulation suppresses neural activity by modulating ambient GABA levels via effects on astrocytes.
Front Cell Neurosci. (2024) 18: 1361242

研究テーマ

動物実験代替法としての培養細胞を利用した消毒薬の安全性・毒性評価系の開発

研究者

東京医療保健大学 大学院 医療保健学研究科 松村 有里子 (マツムラ ユリコ)

①研究の背景と課題、目標

近年、世界的に大流行している新型コロナウイルス感染症の影響で、日本では日常的にアルコールをベースとした手指消毒薬による手指衛生が行われている。これは、接触感染による伝播を防ぐ目的で行われており、医療現場での基本的な感染対策として実施されている方法である。手指衛生に使用される消毒薬には、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（薬機法）による承認を受けた医薬品と医薬部外品、指定医薬部外品、化粧品に加え、除菌を目的とした雑品がある。特に、薬機法による承認には、医薬品申請時にヒトに対する安全性を確保するために「ホ．急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、催奇形性その他の毒性に関する資料」の提出を要する。この資料の作成には、実験動物を用いた毒性試験結果が必要である。しかし、近年、動物福祉や倫理の観点から実験動物を用いない代替法による試験の実施が推奨され、特に欧州では2013年に動物実験が行われた化粧品の販売が禁止されている。化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的に合意された試験方法のコレクションである経済協力開発機構（OECD）テストガイドラインには、現在、10のカテゴリーで動物実験にかわる代替試験法が収載されているものの、医薬品申請時に使用できる代替試験法は収載されていない。日本でも、2020年に「動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針」に、世界的な動物実験の基準理念である「3R（Reduction, Replacement, Refinement）の原則」に基づく内容が規定され、代替試験法に関する研究が加速してきている。

消毒薬の評価における代替試験法として、これまでにヒト繊維芽細胞を用いた細胞毒性評価（J. Antimicrob. Chemother. 2008; 61: 1281-1287.）やヒト気道上皮の線毛細胞の細胞株を用いた検討（Skin Pharmacol. Physiol. 2010; 23: 35-40.）が報告されているが、実用化には至っていない。本申請研究では、実験動物の代替として培養細胞を用いる試験系の確立に向けて、由来の異なるヒトの株化細胞を用い、細胞に対する消毒薬の影響を多角的に検討することとした。

②実験方法

培養細胞には、皮膚に対する試験で汎用されるラット表皮由来のFRSK細胞（JCRB0005）、ヒト成人結膜由来のChang conjunctiva細胞（Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival cell line、大日本製薬株式会社）、ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞（名古屋衛研より分与）、ヒト皮膚線維芽細胞のHuman Dermal Fibroblast細胞（Cell Systems）を用いた。消毒薬には、汎用されている塩素系消毒薬として、市販の塩素系消毒薬である微弱酸性次亜塩素酸水溶液（フリーキラ[®]、有効塩素濃度150～260 ppm、株式会社フリーキラ製薬）と消毒用エタノール（日本薬局方消毒用エタノール[®]、76.9～81.4 v/v%、富士フイルム和光純薬株式会社）、その他の消毒薬は以下の消毒薬成分について、MilliQ水で100 ppmに調整して用いた。

次亜塩素酸ナトリウム水溶液は次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光純薬工業株式会社）を、亜塩素酸ナトリウム水溶液は亜塩素酸ナトリウム（Sigma-Aldrich）を、グルコン酸クロルヘキシジン水溶液は20% グル

コン酸クロルヘキシジン溶液（富士フィルム和光純薬株式会社）を、塩化ベンザルコニウム水溶液は塩化ベンザルコニウム（ナカライテスク株式会社）から、塩化ベンゼトニウム水溶液は塩化ベンゼトニウム（東京化成工業株式会社）を用いた。

消毒薬の安全性評価には、細胞生存率の評価方法（MTT 法と NR 法）と Vitrigel-EIT 法を用いた。

③研究成果

MTT 法と NR 法により算出された細胞生存率は、Chang conjunctiva 細胞及び Human Dermal Fibroblast 細胞を用いた場合、 $p < 0.2$ の許容範囲ではいずれの細胞でも 6 点で異なる値を示し、一致率は 82.9% であった。一方、HeLa 細胞と FRSK 細胞は、いずれの細胞でも 2 点で異なる値を示し、一致率は 94.3% であった。細胞の種類によらず $p < 0.2$ の許容範囲で算出された細胞生存率に乖離が認められる消毒薬は、低水準消毒薬であるグルコン酸クロルヘキシジン水溶液と塩化ベンザルコニウム水溶液と塩化ベンゼトニウム水溶液であった。

FRSK 細胞に 100 ppm の各種消毒薬を暴露しても、TEER プロファイルの解析結果に大きな差は認められなかった。

低水準消毒薬では細胞生存率の求め方によって乖離した結果となったことから、消毒薬の毒性を評価する際には消毒薬の作用機序を勘案して生細胞数の適切な評価方法を選択する必要があることが示唆された。

④結論

ある特定の細胞株を使用しても生細胞数の評価方法で細胞生存率が異なることに加え、消毒薬と細胞間の感受性も異なることが明らかとなった。本検討では、評価対象とする生体消毒薬に適した細胞と評価系の組み合わせを明示できていないが、生体への安全性の評価には、評価対象に応じた系を選択する必要があることが示唆された。

研究テーマ

エピムノームに着目した掌蹠膿疱症の病態解明

研究者

札幌医科大学 医学分附属フロンティア医学研究所 亀倉 隆太（カメクラ リュウタ）

①研究の背景及び目的

掌蹠膿疱症 (palmoplantar pustulosis; PPP) は手掌と足底に水疱と膿疱を繰り返す慢性炎症性の皮膚疾患である。喫煙歴のある中高年の女性に多く (70-90%)、整容的な問題だけでなく、手作業や歩行をはじめとする日常生活に影響を与え、QOL を著しく低下させる。また、扁桃病巣感染が原因の一つと考えられており、口蓋扁桃摘出術の有効性が知られている。最近になり生物学的製剤 (抗 IL-23 抗体製剤) が登場したが、依然として治療法は確立していない。そこで我々は口蓋扁桃に着目し、PPP の病態解明を試みることにした。口蓋扁桃には組織学的に上皮細胞とリンパ球が近接して存在する特殊な構造 (リンパ上皮共生が存在すること、PPP の治療として口蓋扁桃摘出術が著効する (改善率 90% 以上) ことから、我々は口蓋扁桃で上皮細胞とリンパ球が相互に作用し、活性化したリンパ球が血液を介して手掌と足底にホーミングして PPP の病態を形成しているという仮説を立てた。

本研究の目的は、口蓋扁桃における上皮細胞と免疫細胞の相互作用 (エピムノーム) の異常が PPP の病態の本質であることを明らかにし、PPP の難治例に対する新規治療法の開発に繋げることである。

②研究方法

1. PPP の病態形成に関与する $CD4^+$ T 細胞サブセットの同定と機能解析

治療目的に両側口蓋扁桃摘出術を受けた PPP 患者の扁桃摘出前後の末梢血リンパ球、特に PPP の病態との関連が示唆されている $CD4^+$ T 細胞サブセットをフローサイトメトリー (FACS) で解析し、PPP の病態形成の鍵となる $CD4^+$ T 細胞サブセットを同定し、皮疹の重症度 (PPPASI スコア) との関係について検討を行った。

2. PPP に対する口蓋扁桃摘出術後の CLA^+ Th17 細胞の変化の検討

口蓋扁桃摘出術前と術後 (3, 6, 12 か月目) の PPP 患者の末梢血リンパ球を FACS で解析し、扁桃摘出術前後の血液 CLA^+ Th17 細胞の割合の変化を観察した。

3. PPP の病変部位における CLA^+ T 細胞の局在

PPP の病変部位 (手掌または足底) の生検組織中の CLA^+ T 細胞の局在について免疫染色を行い検討した。

4. 扁桃 $CD4^+$ T 細胞における CLA の発現誘導のメカニズム

CLA^+ $CD4^+$ T 細胞の分化誘導実験を行った。具体的には、recombinant truncated IL-36 γ とタバコ煙抽出物の存在下で扁桃由来のナイーブ $CD4^+$ T 細胞を培養し、FACS で CLA の発現が誘導されるかを検証した。

③研究成果

- 予備実験で、PPP 患者の扁桃と末梢血リンパ球中では、反復性扁桃炎患者由来の扁桃リンパ球や健康者の末梢血リンパ球と比較して CLA^+ Th17 ($CD3^+$ $CD4^+$ $CCR4^+$ $CCR6^+$ $CXCR5^-$ CLA^+) 細胞が増加

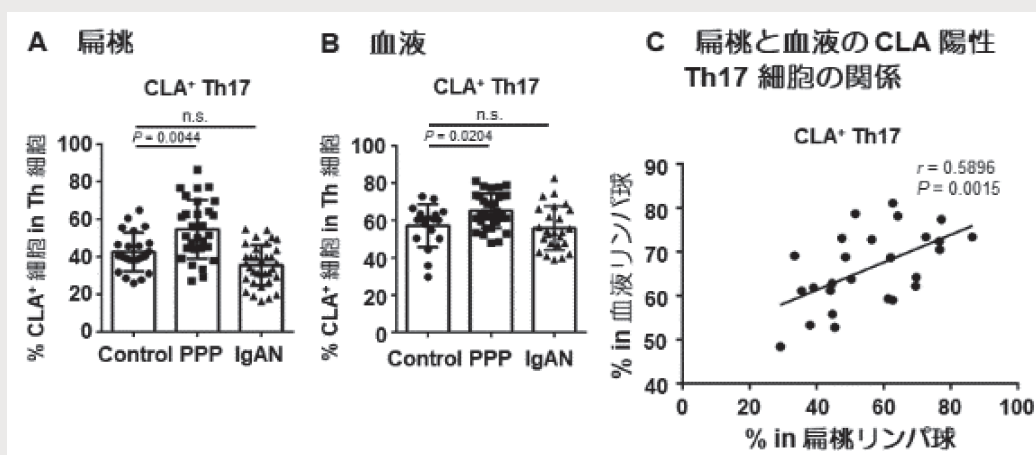


図 1

していたことから、我々はこの CLA⁺ Th17 細胞が PPP の病態形成に重要な役割を担っている細胞群であると考え検討を進めた。症例数を増やして検討したところ、同様の結果が得られ、さらに血液 CLA⁺ Th17 細胞の割合は PPPASI スコアと有意な正の相関を認めた(図 1A-C)。

- 口蓋扁桃摘出術後 3 か月に手術前と比較して血液中の CLA⁺ Th17 細胞の割合が有意に減少した(図 2)。
- PPP 患者の病変皮膚では膿疱周囲に CLA 陽性細胞が多数浸潤しており、さらに CD4⁺ T 細胞が CD8⁺ T 細胞と比較して優位に膿疱周囲に浸潤していた。
- Recombinant truncated IL-36 γ 処理により扁桃由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞の CLA の発現が誘導された。

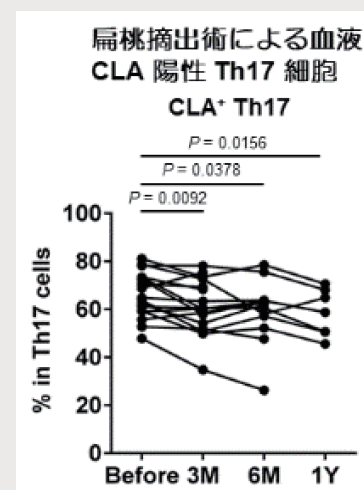


図 2

④まとめ

本研究から、PPP の病態形成に関与する CD4⁺ T 細胞サブセットとして、CLA⁺ Th17 細胞を同定することができた。さらに、IL-36 γ 処理により扁桃由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞の CLA の発現が誘導されたことから、我々の過去の報告(Kobayashi K, et al. J Invest Dermatol. 2020)と合わせると、喫煙などにより刺激を受けた扁桃上皮細胞から産生された IL-36 γ が扁桃リンパ球に作用して活性化し、CLA の発現が誘導されることで病変部(手掌・足底)への遊走能を獲得し、病態形成に関与するという仮説を証明することができた。この現象は、口蓋扁桃における上皮細胞と免疫細胞の相互作用(エピムノーム)が PPP の病態形成により刺激を受けた扁桃上皮細胞から産生された IL-36 γ が扁桃リンパ球に作用して活性化し、CLA の発現が関係することを示していた。

研究テーマ

神経回路修復機構解明のための in vitro 髄鞘化評価システムの創製

研究者

東京大学 生産技術研究所 機械・生体系部門 松永 行子（マツナガ ユキコ）

〈緒言〉

オリゴデンドロサイトによる神経軸索への再髄鞘化（巻き付き）のメカニズムは未だ不明な点が多く、本研究では、人工軸索を模したナノファイバー状の足場を有する in vitro 評価系を構築し、再髄鞘化におけるオリゴデンドロサイトの巻き付を定量的に評価可能な in vitro 培養プラットフォームを開発する。

バイオマテリアルのナノファイバー形成と三次元プリンティングを組み合わせたパターン化ナノファイバー培養基板を試作した。生体適合性を有するポリ-ε-カプロラクトン（PCL）を用い、顕微鏡での細胞観察を容易にするため、透明なガラス基板上へのパターンニング条件について種々検討を行い、ヒトオリゴデンドロサイト細胞株（MO3.13）によるミエリン様構造の形成について検討した。

〈方法〉

【エレクトロスピンニング法による配列を制御した人工軸索アレイ基板の作製】

人工軸索を模したナノファイバー形成には、自作の走査型エレクトロスピンニング装置（Direct-writing electrospinning: DWE）を用いた。装置はXYZ軸に稼働する導電性ステージ、高圧電源に接続された注射針、注射針にPCLの高分子溶液を供給するシリンジポンプで構成される。

一定の走査速度、印加電圧条件でカバーガラス上へ間隔 50 μm の平行な配列の形成を試みた。

人工軸索に対し、酸素プラズマ処理とラミニンコート処理を行い、表面処理によるミエリン様構造形成への影響について検討した。

【細胞培養】

MO3.13 を人工軸索アレイ基板上に播種し、10% FBS 含有高グルコース DMEM で培養した。

培養 24 時間後、細胞核およびアクチンを染色し、共焦点レーザー顕微鏡により画像を取得した。

画像解析により人工軸索上に形成されたミエリン様構造を被覆率として評価した。

〈結果〉

湿度制御およびガラス基板と導電性ステージの間に導電性溶液を封入する帯電抑制を施すことで、ナノファイバー同士が融合することなく、50 μm 間隔の高精度でパターンニングすることに成功した。

細胞培養評価においては、コントロールガラス表面では、細胞の配向性は確認されなかったが、人工軸索アレイ基板上で培養した MO3.13 はナノファイバーと同じ方向への配向が観察された。

また、酸素プラズマ処理とラミニンコート処理は、ミエリン様被覆構造形成を有意に向上させることが示された。

〈結論〉

絶縁体ガラス基板上で、50 μm 間隔の高精度で高分子溶液のパターンニングを達成した。

ヒトオリゴデンドロサイト細胞株による人工軸索アレイ基板上へのミエリン様構造形成について評価を

行い、再髄鞘化におけるオリゴデンドロサイトの巻き付を定量的に評価可能な in vitro 培養プラットフォームの基盤技術を構築した。

研究テーマ

ビタミン E 同族体の脂質吸収阻害作用を介した抗肥満作用のメカニズム解明

研究者

鳥取大学 医学部病態解析医学講座 生物学分野 加藤 優吾 (カトウ ユウゴ)

①研究の背景及び目的

目的：トコトリエノール (T3) が脂質の吸収を阻害することにより、抗肥満作用を発揮していることの証明

肥満は様々な疾患を惹起するため、世界中で予防への取り組みが進んでいる。実際に日本でも、抗肥満薬としてサノレックスが認可されているが、依存の問題から3か月以上連続しての使用はできない。さらに、抗肥満作用が報告されているポリフェノールやカフェインなどの物質は、ワインやコーヒーに多く含まれていることから、摂取可能な人が限られる。この為現状、多くの人が摂取可能で安全・低コストな抗肥満作用を発揮する物質は存在しない。

申請者らは、2019年に肥満モデルマウスに対するT3の体重増加抑制作用を報告し、T3はそれ以外にも、脂肪肝の抑制や血清コレステロール濃度の低下、白色脂肪組織重量の減少などの抗肥満作用を持つことを明らかにした。T3はビタミンEの一種であり、脂溶性ビタミンであるが、今のところ深刻な過剰症の報告は無い。さらに、全粒粉や玄米、ナッツ、パーム油などに多く含有されており、日常的・容易に摂取可能である。この為、T3は有用な抗肥満物質となる可能性がある。しかしながら、現状T3の抗肥満作用の分子メカニズムは明らかになっていない。申請者らは、HFD摂取による肥満時にはT3が強力に体重増加を抑制するが、高脂肪高糖質食 (HFSD) 摂取による肥満時は、その効力が低下することを確認している。この結果からT3の抗肥満作用は、脂質の吸収を阻害することで発揮されるのではないかと考えた。これまでにT3と脂質吸収阻害に関する報告は存在しない。そこで本研究では、T3摂取による肥満予防可能な社会の実現を目指して、T3が脂質吸収を阻害することの証明に取り組んだ。

②研究方法

1. Oral fat tolerance test の樹立

まず、マウスの脂質吸収度測定の為、Oral fat tolerance test の樹立を行った。C57BL/6 雄性マウスに10 μ L/g B.W. のオリーブオイルを経口投与し、0, 30, 60, 120 分後に採血を行い血清中の中性脂肪量を測定した。オリーブオイル経口投与の30分前に、中性脂肪代謝を抑えるTyloxapolを0.5 g/kg B.W. で腹腔内投与した。血清中性脂肪の測定には、FUJIFILM DRI-CHEM 7000 V を用いた。

2. T3 が脂質吸収に与える影響の測定

T3 が脂質吸収に与える影響を精査する為、T3の有無でOral fat tolerance testを行った。T3の投与方法は経口投与を選択した。投与時期により作用が異なる可能性があった為、オリーブオイル投与前、同時投与など様々な投与タイミングで検討を行った。

③研究成果

まず、マウスを用いたOral fat tolerance testの樹立は成功し、オリーブオイル投与後に血清中の中性脂肪が上昇することを確認した。そこで、T3の影響を精査する為、T3投与を行ったマウスでOral fat tolerance testを行った。T3は構造の違いにより、 α -、 β -、 γ -、 δ -体の4種類存在するが、そのすべてで検討

を行った。まず、100 µg/kg B.W. の T3 同時投与で検討したが、4 種類どの T3 も脂質吸収に影響を与えなかった。そこで次に高脂肪食で抗肥満作用を示した T3 濃度（脂質量当たりの T3 含有量）と同様の条件で検討を行った。しかしながら、やはりどの T3 同族体も脂質吸収に影響を与えなかった。高脂肪食投与マウスでの検討で T3 は飼育期間の後半で抗肥満作用を示していたため、T3 の投与タイミングをオリーブオイル投与前に変更し、再度検討を行った。今回、様々なオリーブオイル、T3 の投与量、投与タイミング、マウスの週齢を用いて検討を行ったが、どの条件でも T3 は中性脂質吸収に影響を与えなかった。そこで、コレステロール吸収への影響を精査しようと試みたが、オリーブオイルの経口投与では、血清中のコレステロール濃度に変化はなかった。

以上の結果より、これまで T3 が脂質吸収に与える影響に関しては一切報告が無かったが、本研究により T3 が脂質吸収に影響しないことが明らかとなった。このことから、T3 の抗肥満作用は脂質吸収阻害でなく別のメカニズムであることが分かった。今後も継続して T3 による抗肥満作用のメカニズム解明に取り組みたい。最後に、本研究をご支援いただいた小柳財団に心より感謝いたします。

本研究に関する発表

第 46 回日本基礎老化学会 発表

第 76 回日本ビタミン学会、若手シンポジウムで発表予定

研究テーマ

AI により酵素を改変、機能性成分を作る

研究者

静岡県立大学 薬食生命科学総合学府 伊藤 創平（イトウ ソウヘイ）

タンパク質・酵素の立体構造を解析することは、構造から規則性を見出し合理的に理解、応用する1つの手段である。その立体構造予測は、生命科学において最も困難かつ重要な課題の1つであったが、AI構造予測プログラム（AlphaFold2 など）の出現により、実験構造レベルの立体構造の入手が容易な時代となり、タンパク質・酵素の応用研究が加速している。しかし、タンパク質・酵素の弱点ともいえる生産性や安定性といった副次的な機能を、合理的に改変するのが困難である。構造情報があっても、配列と機能の相関の解析が人の目では困難であることに起因している。

我々のグループは、タンパク質・酵素の配列の中でも不規則性が高い領域に注目、配列・立体構造情報と実験結果を照合しながら、インシリコで配列をデザインするプログラムの開発を行ってきた。本研究で研究対象としている、GABA 合成酵素は、天然型と比較し 100 点近い変異が導入されたことで、耐熱性/生産性/活性の大幅に向上に成功した人工的な配列を持つ酵素である。しかし、このような配列を持つ遺伝子は、カルタヘナ法による規制の対象となり、社会実装の障壁となっている。カルタヘナ法の対象外となるためには、セルフクロニングやナチュラロオカレンシスの範囲内で天然型の GABA 合成酵素を改変、高機能化をする技術が必要となる。つまり、可能な限り変異の数を抑え、例えば乳酸菌等の有用微生物の遺伝子を改変する事ができれば、社会実装までの障壁が薄くなり、タンパク質・酵素改変を通じて、人々の健康へアプローチすることも可能となる。ゲノム編集食品として上市している、GABA 高含有トマト、成長が早いトラフグ、肉厚なマダイなどは、タンパク質・酵素に合理的な改変が加えられたものである。

本研究計画において、フルコンセンサスおよび祖先型設計法により高機能化した GABA 合成酵素 (H. Takagi, *et al.*, *ChemBioChem* (2021)) に導入された約 120 箇所のうち、機能変化の責任変異部位の同定を

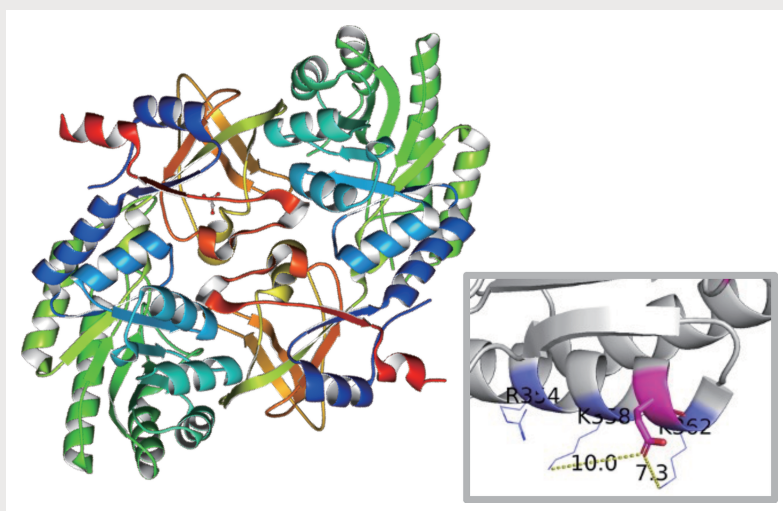


図 耐熱性の向上が認められた変異体。
周囲にはアルギニン、リジンといった塩基性アミノ酸が集まっていた。

試みた。天然型 GABA 合成酵素配列とライブラリー配列と比較、配列の保存性、変異部位前後の配列の保存性、アミノ酸配列の各種パラメータ (BLOSUM スコア、疎水性度など) の矛盾などから、59 点の点変異体をデザインした。内、58 変異体の GABA 合成酵素の発現、52 変異体についてシーケンスを確認した。1st スクリーニングにおいて、GABA 合成酵素遺伝子を発現させた大腸菌培養液の破碎上清による、活性および熱安定性の簡易評価を行った。結果、12 変異体で活性および耐熱性の向上が示唆された。しかし、天変型の GABA 合成酵素の安定性等が低いことと、単独の変異では機能変化が小さいことから、結果の再現性が得られなかった。

ゲノム編集食品として上市している、トラフグやマダイでは、複数個所の遺伝子へ変異が導入されている。そこで、変異の組み合わせを最適化するプログラム GAOptimizer (H. Ozawa, *et al.*, *Cell Rep. Phys. Sci.* (2023)) にて、GABA 合成酵素の多点変異体を現在デザインしている。

GAOptimizer は、静岡県大で開発されたプログラムであり、質の良い変異を組み合わせることで、機能向上を達成する変異群の絞り込みを行う予定である。

研究テーマ

糖鎖を基盤とした新たな認知症の健康管理システムの開発

研究者

東京都健康長寿医療センター研究所 三浦 ゆり（ミウラ ユリ）

1. 研究の背景と目標

日本は世界にも類をみない速度で高齢化が進行している。この超高齢社会を維持するための最も本質的な解決策の一つは「健康寿命を延ばすこと」である。健康寿命の延伸を阻む老化関連病態には様々なものがあるが、本研究では日本における要介護要因の第一位である「認知症」に着目する。認知症は、患者本人の QOL を著しく下げただけでなく、介護する家族の生活をも巻き込む社会問題となっている。またその診断法は、認知機能検査や画像診断など、高齢者が定期的な健康診断として気軽に受けられるものではない。一方で、認知症は早期診断と適切な介入によって、進行を遅らせられることが知られており、早期にかつ簡便に診断するためのバイオマーカーが求められている。本研究では、認知症を早期に発見し適切な介入を行うための糖鎖バイオマーカーを開発し、リスクファクターや病態メカニズムに基づいて策定する認知症の予防法・介入法を統合した「糖鎖を基盤とした新たな認知症健康管理システム」を構築することを目的とする。

2. 研究方法

1) 解析対象者の抽出

解析対象者の抽出にあたっては、個人差を抑制するため個人ごとに状態の変化を解析することができる「縦断コホート」を用いた。高齢者の大規模長期縦断コホート SONIC (Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians) は、3 年毎に継続的に調査を行い、認知機能検査の他、血液検査等の医学データ、運動機能データ、歯学・栄養学データなどの取得を行っている。初回調査時に 70 歳だった SONIC 参加者から、認知機能検査 MoCA-J (Japanese version of the Montreal Cognitive Assessment) のスコアを指標として、6 年間連続的に認知機能が低下したグループを抽出した。また対照として、同じ年齢で 6 年間認知機能が維持されているグループを抽出した。個人ごとに認知機能が低下する前と低下した後の、血漿糖ペプチドを比較することとした。

2) グライコプロテオミクス

血漿中に大量にあるアルブミンと IgG を、Alb & IgG Depletion Spin Trap を用いて除去した。タンパク質定量後に各サンプルのタンパク濃度を 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ とし、還元、アルキル化後、Trypsin と Glu-C を用いて酵素消化した。Tri-fluoroacetic acid を加えて酵素反応を停止させ、遠心して上清を分取した後サンプルを 2 つに分けた。1 つは脱塩してプロテオーム解析に用い、もう 1 つはアミド担体を用いた StageTip により糖ペプチドを濃縮し、糖ペプチド解析に用いた。LC-MS/MS 測定を行った後、タンパク質の同定と定量解析、N-型糖鎖を持つ血漿糖タンパク質由来の糖ペプチドについては、糖鎖構造の推定と定量解析を行った。

今後は、解析対象者個人ごとに、認知機能低下前と低下後の変化を算出し、多変量解析により認知機能変化に伴って発現変動する糖ペプチドを抽出する。さらに、認知機能を維持していた対照グループについても同様の解析を行い、個人ごとに 6 年間に变化した糖ペプチドを抽出する。認知機能低下グループと対

照グループにおいて6年間に变化した糖ペプチドを比較し、認知機能の低下によって特異的に变化した糖ペプチドをバイオマーカー候補糖ペプチドとする。

3. 結果と考察

初回調査時に70歳で、初回、3年後、6年後の調査に参加した560名の中から、MoCA-Jスコアが継続的に低下した31名を認知機能低下グループとした。また、6年間MoCA-JスコアがCutoff値26点以上であった26名を認知機能維持グループ(対照)とした。解析対象者の初回調査と6年後調査の血漿について、前述のような前処理を行った後、LC-MS/MSを測定した。今回は、糖鎖の構造解析の妥当性について精査した。MS/MSスペクトルにおける糖のオキシニウムイオンの出現、特にシアル酸(*N*-acetylneuraminic acid)のオキシニウムイオン(NeuAc; m/z 292, NeuAc-H₂O; m/z 274)の検出を確認し、アンモニウム付加体を同定した。今後、アンモニウム付加体を追加したGlycan Databaseを用いて解析し、認知機能低下のバイオマーカー候補となる糖ペプチドを明らかにする。

研究テーマ

Fragment Based Drug Discoveryにおけるリード化合物創出のための基盤技術の開発

研究者

CBI 研究機構 平坂 雅男（ヒラサ マサオ）

①研究目的

Fragment Based Drug Discovery (FBDD) は、創薬ターゲットに対して生物活性を示さない弱い結合力のフラグメントを出発点として HTS で見出せないような新規性、進歩性を持つ化合物を創製する有力な手法である。我々は大阪大学蛋白質研究所の児島らとフッ素を含む官能基を持つフラグメントを 19F シグナルを用いてさらに効率的に見出す方法を開発した (Shinya, S et al. RSC Med Chem. 13 (9): 1100-1111 (2022))。

この手法を用いて、実際に未充足な分野への創薬を具体的創薬ターゲットで実施するのが目的である。小柳財団助成金の理念にもあるように、生涯「美と健康」に貢献する創薬分野の標的として老化を選択した。さらに老化の中で近年注目を浴びている glutaminase 1 (GLS-1) を創薬ターゲットと決めた。このターゲットを選択した理由は GLS-1 阻害剤が老化細胞を選択的に除去し、加齢現象/老年病/生活習慣病を改善すると期待される論文が2021年に発表されたからである (Johmura et al., Science 371, 265-270 (2021))。

プリミティブな阻害剤ではあるが老齢マウスや加齢疾患マウスでかなりの効果がみられている。すなわち老化細胞の代謝特異性に着目して老化細胞の除去による老化抑制をめざす。老化細胞は、リソゾーム膜に損傷が生じることで、細胞 pH が低下し、その結果として、GLS-1 阻害剤により感受性を示す。

上記を具体的に説明すると、GLS1 は老化細胞で高発現しその生存に必須の遺伝子である。新たな準培養により、純化した老化細胞を用いて、生存に必須な遺伝子をスクリーニングした結果 GLS-1 が同定された。一方ヒトの皮膚には老化とともに、GLS-1 が高発現することも知られており、老化との関連が明確になっている。

GLS-1 阻害剤 (PTES) を、老齢マウスに投与した結果、非投与群に比較して腎臓の糸球体硬化や、肺の線維化および肝臓の炎症細胞の浸潤等、さまざまな臓器の生理機能が改善された。加えて動脈硬化も大幅に改善したとの報告もある。このように GLS-1 阻害剤によりさまざまな臓器の老化に歯止めがかかることが期待される。

FBDD を用いて新たな阻害剤を創製する意味は、以下のようなメリットがある。

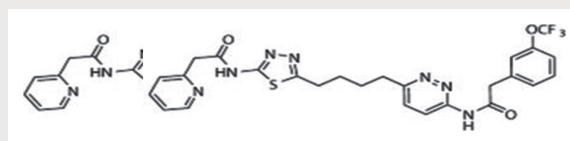
まず、現在の開発中の阻害剤であるが、特許調査の結果、現在のところ米国のベンチャーが GLS-1 選択的阻害剤をがん適応で開発し、Phase1, Phase1/2 臨床に入っているのみであり、競合がそれほどではないこと (Telaglenastat (CB-839), IPN60090)。かつ物質特許はなく、用途特許でカバーされているのみであり、FBDD で新たな化合物取得による物質特許の出願が狙えること。Protein Data Bank にはすでに、GLS-1 の構造が登録されており、阻害剤との結合構造や結合様式取得への足が速いと予想されること。しかも化合物展開の際に、フッ素を導入すると活性が上昇することが報告されており、我々が得意とする含フッ素ライブラリーを用いた 19FNMR をスクリーニング系として用いることができること。(J Med Chem. 2020 Nov 12; 63 (21): 12957-12977)。

また、合わせて、活性評価キットや、ポジコンとなる阻害剤も購入可能であることなど、構造解析に用いる GLS-1 の作成以外は、比較的必要なツールが手に入りやすい。

PDB: PDB 8BSL (compound 12), 5UQE (kidney type), 8BSK (compound 3), 8BSM (compound 18) 8BSN (compound 27) 8GWR (kidney type + DDP), 4O7D (DON)

生物評価系キット : <https://www.funakoshi.co.jp/contents/67462>

購入可能な阻害剤 1. Teleglanastat (CB-839)



①研究成果

・ GLS-1 の発現精製

横浜国大児島先生の研究室で GLS-1 のタンパク生成を分担実施していただいた。

GLS-1 蛋白質の発現には大腸菌大量発現系を、精製には Ni カラムとゲルろ過カラムを用いた。

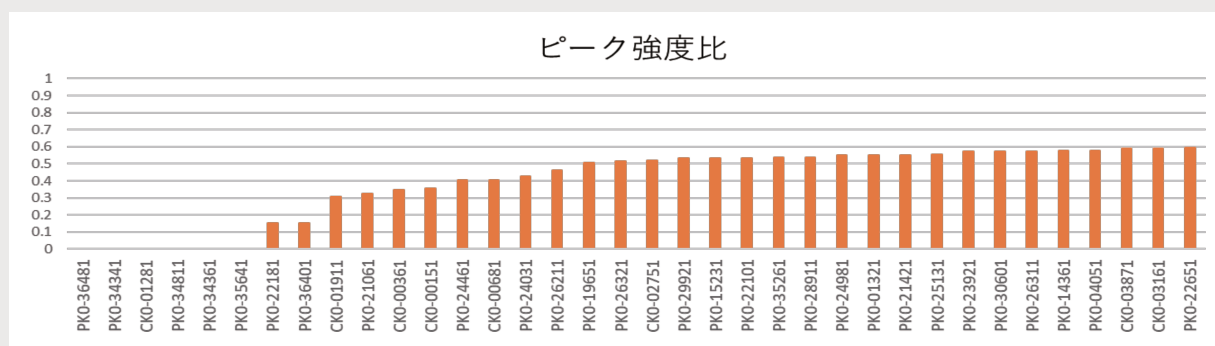
最終的に SDS-PAGE 検出においてシングルバンド純度まで GLS-1 蛋白質を精製することで、19F ライブラリースクリーニングの実施に必要な大量 (5 μ M, 5 mL) の高純度 GLS-1 蛋白質を得た。

・ 19F ライブラリースクリーニング

AMEDBINDS の創薬支援プログラムを活用して、大阪大学蛋白質研究所の 400MNMR を用いて蛋白研保有の 19F ライブラリーを用いてスクリーニングを実施した。

① 19F 含有フラグメントミックス (17~21 フラグメントの混合物) ② 19F 含有フラグメントミックス + タンパク質のサンプルに対し、19F 1D および 19F T2 フィルタースペクトルを測定した。19F 1D はサンプルの確認 19F T2 フィルターはタンパク質との結合評価に用いた。

化合物ミックスを 10set の測定の結果、以下のようにヒット化合物取得した。



ピーク強度比 < 0.6 の化合物

異なるスキファールドからなる複数のフラグメント化合物を取得するに至った。

現在、購入したポジコン (CB-839) による拮抗実験を実施中である。

研究テーマ

食品添加物摂取による脳—精巣—腸内フローラに及ぼす影響とその予防法の開発

研究者

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 南山 幸子（ミナミヤマ ユキコ）

①研究の背景

申請者らは、本申請で食品添加物の内分泌系（精子）—脳神経系への関連動態と腸内細菌叢の変化の関連を明らかにするために、生体への影響を検討した。

②方法

雄性 Wistar ラットに、BPA（溶出限界 2.5 ppm）、防かび剤のオルトフェニルフェノール（OPP）、ジフェニル、人工甘味料のアスパルテム（APM）、ネオテム（NTM）を最大無毒性量（NOAEL）の 1 万分の 1 量で飲水に混ぜ、最大無毒性量（NOAEL）の 1 万分の 1 量で飲水に混ぜ 8 週間投与した。さらに、 α -トコフェロール（VE, 100 mg/kg/day）を添加物投与の 1 週間前から投与する群を作成した。

ラットを麻酔し、血液、精巣上体、睪丸、脳（海馬、脳）、肝、腎を採取し、解析した。さらに、糞便のメタゲノム解析を行った。

③研究成果

(1) 精子運動能の解析

食品添加物摂取により、精子の総運動率に影響は無かったが、受精に重要な曲線速度は 50% 以下に低下し、VE 投与群はその低下を有意に改善した。

(2) 精巣における活性酸素（ROS）産生、脂質過酸化マーカーと細胞増殖に及ぼす影響

食品添加物摂取により、精子からの ROS 産生、精巣の脂質過酸化マーカーである 4-ヒドロキシノネナール（4-HNE）が有意に上昇し、VE 投与はそれを有意に改善した。また、細胞増殖マーカーの PCNA も有意に低下し、VE 投与によって改善傾向を示した。

(3) 腸内フローラへの影響

食品添加物摂取により、菌種の多様性を示す α -多様性が著しく低下した。また、菌の構成内容を示す β -多様性解析では、食品添加物群と対照群では異なる分布となった。しかしながら、VE はこれらの変化を改善しなかった。

(4) 海馬への影響

TaqMan Array による酸化ストレス関連遺伝子のスクリーニングでは、食品添加物摂取群において ROS を産生する NADPH oxidase4 (Nox4) および Dual oxidase 1 (Duox1) の遺伝子発現が上昇することが判明した。さらに、ROS により増加する p-Erk および p-JNK タンパク質量が上昇した。また、アルツハイマー関連遺伝子のスクリーニングでは、食品添加物摂取群によっていくつかの遺伝子の増減が判明した。今後、タンパク量の変化を含めた解析を行う必要がある。

(5) 肝代謝酵素および酸化ストレス関連遺伝子への影響

薬物代謝第 1 相反応酵素である CYP1A2、CYP2E1、CYP3A2 および第 2 相反応の SULT1A1 遺伝子およびタンパク量に食品添加物摂取による変化はなかった。酸化ストレス関連遺伝子スクリーニングでは、

幾つかの遺伝子の増減があり、今後タンパク質量変化などの確認が必要である。

以上の結果より、ごく微量の食品添加物摂取でも内分泌系（精子）—脳神経系—腸内フローラに影響があることが示唆された。その変化の一部は、VE の予防投与で改善しうることが判明した。

研究テーマ

苦味細胞の分化における転写因子 Eya1 の必要性の検証

研究者

高崎健康福祉大学 應本 真（オウモト マコト）

研究の背景及び目的

食物摂取の際に生じる味覚は、食品中に含まれる呈味物質が口腔内に存在する味蕾と呼ばれる組織中の味細胞により受容されることにより生じる感覚である。ヒトが容易に認識、識別できる味として、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の5基本味がある。これまでの研究により、味覚受容体として、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）である甘味・旨味受容体（T1Rファミリー分子）および苦味受容体（T2Rファミリー分子）が同定された。酸味や塩味はこれらのGPCRを発現しない味細胞により受容される。酸味はOtop1を発現する味細胞により、ナトリウムの味である塩味はENaCaを発現する味細胞の一部の細胞により受容される。これらの基本味は互いに異なる味細胞により受容されることから、味覚の多様性は味細胞の種類の多様性と相関する。細胞の分化の決定は転写因子の発現状態によりコントロールされる。味蕾の場合、転写因子Skn1aが甘味、旨味、苦味、塩味細胞への分化を決定づけることが知られているが、各味細胞へと機能分化する分子機構は不明である。しかし近年、我々は、転写因子Eya1が苦味細胞および未分化の味蕾細胞に特異的に発現することを見出した。本研究では、味蕾特異的にEya1遺伝子を欠損したマウスにおいて、(1) 苦味受容体の発現や苦味細胞自体が減少あるいは消失するのか、(2) 苦味に対する忌避行動が観察されるのかを検証することにより、苦味細胞の産生・分化に転写因子Eya1が必要であるか明らかにすることを目的とする。

研究方法

1) 味蕾特異的にEya1を欠損するマウス(Eya1 cKO)の作製

Eya1遺伝子の1つのエクソンを挟むようにしてloxP配列を導入したアリルを持つEya1(flox/+)マウスおよびKrt5遺伝子の終始コドン直後にires-CreERT2配列が導入されたアリルを持つKrt5(CreERT2/+)マウスを用い、Krt5(CreERT2/+); Eya1(flox/flox)マウスを作出した。このマウスに対し、タモキシフェンを腹腔投与し、投与後2ヶ月以上経過したマウスをEya1 cKOとして実験に使用した。対照群としてタモキシフェンを投与していないマウスを用いた。

2) Eya1 cKOマウスにおける味覚関連遺伝子発現解析

in situ hybridization法を用いて、Eya1 cKOおよびコントロールマウスの有郭乳頭における味覚関連遺伝子（甘味・旨味受容体Tas1r3、苦味受容体Tas2r104, Tas2r105, Tas2r118, Tas2r126、および甘味・旨味・苦味受容細胞に発現するTrpm5）の発現を調べた。

3) 溶液に対する行動解析(リック試験)

味溶液に対するマウスのリック数を測定するために、リックング装置を用いて、水に対する5秒間のリック数、次いで、味溶液に対する5秒間のリック数を測定した。味溶液は、濃度の低いものから高いものの順番で測定を行い、各濃度の味溶液の測定の間には10秒間アクセスできない時間を設けた。解析方法として、各濃度における5秒間のリック数を、水に対する5秒間のリック数で除して、相対値を算出した。

研究成果

Eya1 cKO マウスの有郭乳頭の味蕾における味覚関連遺伝子の発現の様子を in situ hybridization により調べた。その結果、苦味受容体である Tas2r のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは大きく減少していた (図 1)。一方、甘味・旨味受容体である Tas1r3 のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは増加していた (図 1)。甘味、旨味、苦味細胞に共通して発現する Trpm5 のシグナルは、コントロールマウスと Eya1 cKO マウスで大きな差は見られなかった (図 1)。これらの結果から、Eya1 cKO マウスの味蕾では、苦味細胞が大きく減少し、代わりに甘味、旨味細胞が増加していることが示唆され、Eya1 は苦味細胞の発生・分化に関与すると考えられる。

次に、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスを用いて、苦味物質であるデナトニウムおよびキニーネを用いて味溶液に対する行動解析を行った。デナトニウムに対するリック試験の結果では、コントロールマウスはデナトニウムの濃度が高くなるにつれてリック数が減少していき、Eya1 cKO マウスでは、リック数の減少傾向は緩やかであり、高濃度のデナトニウムに対するリック数はコントロールマウスより大きかった (図 2)。キニーネに対する応答も同様の結果が得られた (図 2)。これらのことから、Eya1 は苦味の受容に関与することが明らかとなった。

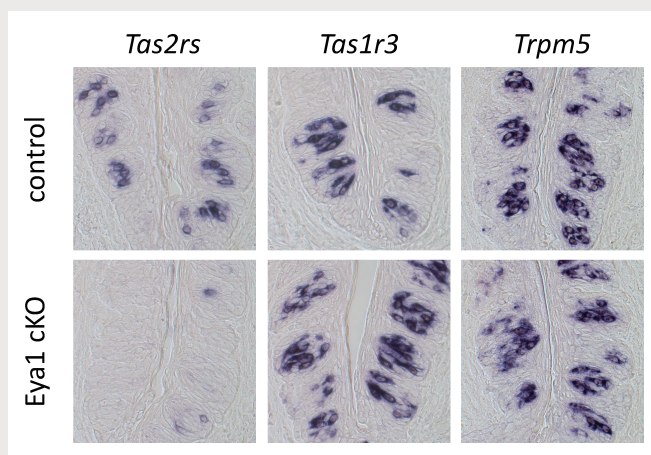


図 1 in situ hybridization による味覚関連遺伝子の発現
コントロールマウス (上) および Eya1 cKO マウス (下) の有郭乳頭における遺伝子の発現を調べた。Tas2r のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは大きく減少していた。一方、Tas1r3 のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは増加していた。Trpm5 のシグナルは、コントロールマウスと Eya1 cKO マウスで大きな差は見られなかった。

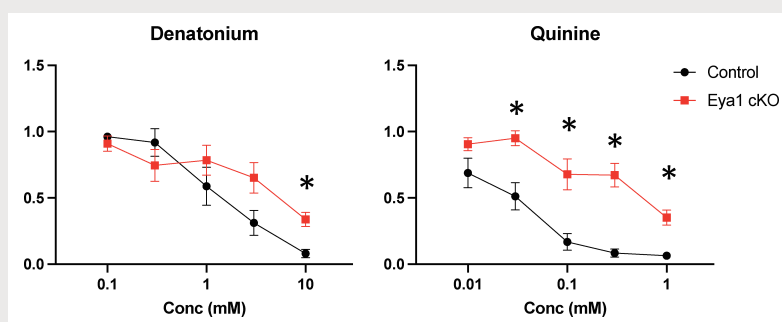


図 2 リック試験による苦味応答の解析
各濃度の水溶液に対する 5 秒間のリック数を計数し、水に対する 5 秒間のリック数との比で示した。値が 1 に近いほど多くリックしたことを示し、値が 0 に近いほどリック数が減少した、つまり水溶液を忌避したことを示す。Control (黒, n=5)、Eya1 cKO (赤, n=5)、*P<0.05

研究テーマ

雌の発生に必須な遺伝子群の同定と機能解析

研究者

東京工業大学 生命理工学院 岩田 哲郎（イワタ テツロウ）

①研究の背景および目的

性別は有性生殖をおこなう動植物において基盤となる個体形質の1つであり、性の決定とその後の発生過程は個体発生における重要なプロセスである。哺乳類の雄においては、Y染色体上に存在する性決定遺伝子 Sry が、生殖腺の精巣への分化誘導をおこなうことで、雄への性分化が促進されることが広く知られている。また雌においては、2つあるX染色体の遺伝子量補償のため、一方のX染色体を不活性化するX染色体不活性化が重要である。

申請者は最近、環境中の匂い分子を受容する嗅覚受容体の機能を明らかにする目的で、7番染色体に存在する約150万塩基対の嗅覚受容体遺伝子クラスターを欠失させた遺伝子改変マウスを作出した。この解析過程で、非常に興味深いことに、ホモ欠失変異を有する雌個体を得られないことが明らかになった。詳しく調べたところ、ホモ欠失雌マウスは胎生期10-12日頃に耐性致死となっていた。このマウスの欠失領域には、嗅覚受容体以外の遺伝子がいくつか含まれている。嗅覚受容体の欠失が雌特異的な個体発生に影響を及ぼすことは考えづらいことから、雌特異的な胎生致死という表現型は、嗅覚受容体と同時に欠失させたいくつかの“非”嗅覚受容体遺伝子によるものであることが示唆された(図1)。一方で、それら単独の機能欠失マウスにおいて報告されている表現型を調べたところ、個体発生に直接関与する機能が報告されているものは見当たらなかった。そこで本研究では、偶然見出した雌特異的な胎生致死の原因を明らかにすることで、雌の発生に重要な機能をもつ遺伝子を同定しその役割を明らかにすることを目的とした。

②研究方法

ノックアウトマウスの作製：CRISPR-Cas9によるゲノム編集により、“非”嗅覚受容体遺伝子の欠失マウスを作製した。欠失させたいゲノム領域の両端に対してそれぞれgRNAをデザインし、2つの合成gRNA、合成tracrRNAおよびCas9タンパク質(RNP)複合体(IDT社)をエレクトロポレーションにより受精卵へ導入した。処理した受精卵を偽妊娠レシピエント雌マウスの卵管に移植した。出生したマウスの尻尾からDNAを精製し、PCRにより標的ゲノム領域の欠失を解析した。

胎仔の組織学的解析：胎生致死となる前の胎生期9.5日の胎仔および胎盤を摘出し、4%PFA/PBSで固定して凍結切片を作製した。胎仔の遺伝子型と性別は、胚体外膜のDNAを用いてPCRにより判定した。胎盤切片は、HE染色により組織構造を解析した。胎仔切片は、10mMクエン酸バッファーにより抗原賦活化処理し、抗H3K27me3抗体および抗H2AK119u1抗体を用いて免疫組織化学染色をおこなった。

③研究成果と展望

1) 雌特異的な胎生致死となる原因遺伝子の解析

先に欠失させた7番染色体の嗅覚受容体遺伝子クラスター領域において、雌特異的な胎生致死の原因であることが示唆される3種類の非嗅覚受容体遺伝子ファミリーを見出した(図1、A~C)。これら3種類の遺伝子位置は離れていたが、それぞれが3~10個の小さい遺伝子クラスターを形成しており、同時に

全ファミリー遺伝子を欠失させることが可能であった。そこで、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集により、各遺伝子ファミリーの欠失マウスを作出し、ホモ欠失において嗅覚受容体遺伝子クラスター欠失と同様に雌特異的な胎生致死が認められるかを調べた。

もっとも先頭の遺伝子ファミリー欠失マウスでは、雄雌ともにホモ欠失マウスの産仔が生まれ、原因遺伝子ではなかった。一方、欠失領域中央に存在していた遺伝子ファミリーの欠失マウスでは、雌のホモ欠失産仔が得られず、胎生致死が起きていることが確認された。もっとも後方にある遺伝子ファミリーについては、欠失したファウンダーマウスを得ることができなかったが、中央の遺伝子ファミリー欠失マウスにおいて、嗅覚受容体遺伝子クラスター欠失マウスと同じ胎生致死を確認したことから、この遺伝子ファミリーの欠失が雌特異的な胎生致死の原因になっていることが明らかになった。

2) 雌特異的な胎生致死の原因の解析

雌の発生プロセスに特徴的な現象として X 染色体不活性化が挙げられ、不活性 X 染色体の形成異常は妊娠中期に雌特異的な胎生致死を引き起こすことが報告されている (Almeida A. *et al. Science* 2017)。この類似性に着目し、本研究で着目した欠失マウスにおいて不活性 X 染色体の形成異常の表現型が認められるかを解析した。まず、胎盤の構造を調べるため HE 染色をおこなった。ホモ欠失雌マウスの胎盤ではヘテロ欠失雌マウスの胎盤に比べてラビリンス構造 (胎仔と接する部位) が小さい個体も確認されたが、不活性 X 染色体の形成異常ほど顕著な影響は認められなかった。次に、不活性 X 染色体に特徴的に集積する 2 種類のヒストン修飾 (H3K27me3 および H2AK119u1) に対する免疫染色をおこなった。ヘテロ欠失雌 (+/-) とホモ欠失雌 (-/-) の両方での集積したスポット状のシグナルが認められたことから (図 2) 不活性 X 染色体の形成に見かけ上異常は認められなかった。不活性 X 染色体からの遺伝子発現が正常に抑制されているのかを評価する必要があるが、見かけ上明確な不活性 X 染色体のシグナルが認められたことから、本研究で着目した欠失マウスの胎生致死は X 染色体不活性化異常とは別の要因であることが示唆される。

3) 今後の展望

嗅覚受容体遺伝子クラスター欠失マウスにおける雌特異的な胎生致死は、同時に欠失した“非”嗅覚受容体遺伝子サブファミリーが原因であった。このサブファミリーには 10 個の遺伝子が含まれているため、現在どの遺伝子が原因であるのか絞り込みを試みている。この遺伝子サブファミリーには互いに高い相同性があること、データベースにおいて個々の機能が明らかになっていないことから、雌特異的な胎生致死は単一遺伝子による影響ではなく、機能が重複した遺伝子サブファミリーの同時欠失によって生じる現象であることも考えられる。また、この遺伝子ファミリーはユビキチン化に関わる機能を有していることが報告されており、雌の発生のどのようなプロセスに関与しているのか明らかにすることも今後の課題である。本研究で見出された雌特異的な胎生致死となるマウスでは、雄のホモ欠失マウスは見かけ上問題なく成長し交配に使用することも可能である。この雌特異的な珍しい表現型をもたらす原因を明らかにすることで、雌の発生プロセスにおける新たな知見を見出すことができると期待される。最後になりますが、本研究をご支援いただいた小柳財団に深く感謝いたします。

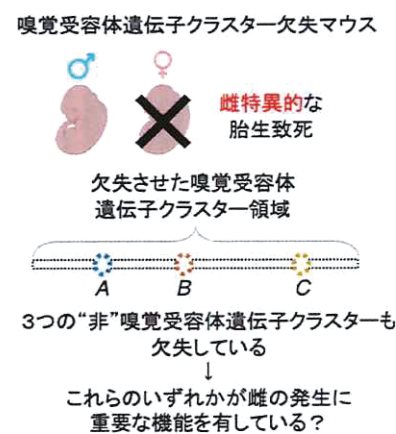


図1 本研究のきっかけと目的

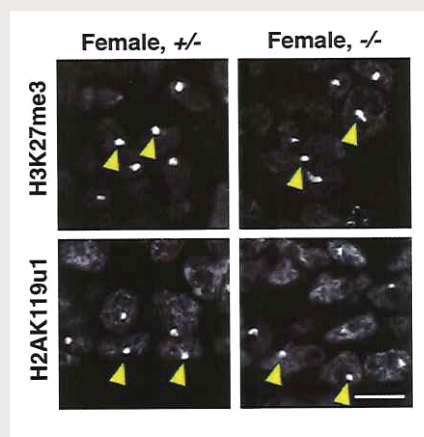


図2 不活性 X 染色体に特徴的なヒストン修飾の免疫染色
矢印はスポット状に認められる不活性 X 染色体の代表的なシグナル

研究テーマ

天然多糖由来大孔径多孔質材料の開発と特性評価

研究者

近畿大学 産業理工学部 生物環境化学科 菅野 憲一（カンノ ケンイチ）

研究の背景および目的

海藻由来の潤い成分(多糖)へアクリル系ポリマーをグラフトするなどして、粘性の向上について研究し、その後もアオサをはじめとする海藻由来多糖の機能化に取り組んできた。これらの生物由来多糖は持続可能な開発において重要な資源となる。一方、凍結・解凍プロセスによって巨大な孔を持ったゲル(クリオゲル)が報告されている。この巨大な孔を生かした保水材料、コロイド粒子の保持・放出材料などへの応用が期待される。

本研究では、持続可能な材料を用い、凍結・解凍プロセスによって巨大な孔を持った多孔質材料を開発を目的として、凍結・解凍プロセスによって巨大な孔を持つ天然多糖由来大孔径多孔質材料の開発と特性評価を行った。

クリオゲル化条件と多孔質構造

天然多糖としてキサンタンガム、ローカストビーンガム、グアーガムの3種類の天然多糖を用いた。温度可変可能な冷凍庫およびクールインキュベータを用いて、凍結・解凍サイクルによってクリオゲルを調製した。

多糖 2 g に対し、純水 5 ml を持って混練し、ロウ状の混合物とし、これをプラスチックシャーレに所定量移し、「-20℃凍結 22 時間」―「25℃解凍 2 時間」のサイクルを 5 回繰り返した。凍結乾燥することで、多孔質材料を得た。得られたクリオゲルの赤外吸収スペクトルを原料と比較したところ新たな吸収はなく、また、種々の条件で X 線回折 (XRD) を測定したが、結晶に由来するピークが観察されないことから、これらのクリオゲルが結晶成長による架橋はないことが示唆された。それぞれの多孔質構造は走査電子顕微鏡 (SEM) によって観察した。

ローカストビーンガムは、均一に近い多孔質構造を与えたのに対して、他の 2 種類の多糖は不均一な構造であった。ローカストビーンガムが単体ではゲル化しないが、凍結・解凍プロセスによってゲル化することが報告されている。そのため、3 種類のロウ状多糖濃厚溶液のうち、ローカストビーンガムのみがゲル化し、多孔質構造を与えたことが考えられる。

クリオゲルの吸水特性

JISK7223:1996「高吸水性樹脂の吸水量試験方法」にしたがって得られたクリオゲルの吸水量を調べた(図 1)。いずれも、紙おむつ等々に使用されている高吸水性ポリマー (SAP) ほどの吸水量ではなかった。多孔質構造自体は、スポンジの吸水のように毛細管現象と同様であるので、高い吸水量を示さない結果となった。しかし、ポリアクリル酸ナトリウム等の吸水材料は高分子の持つイオ

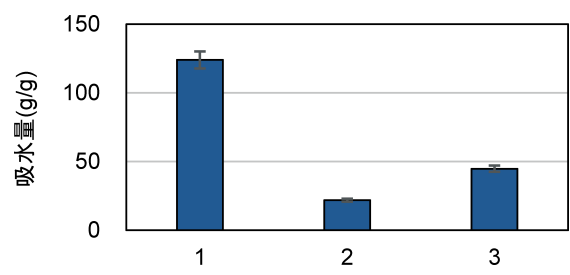


図 1 クリオゲルの吸水量
(1: キサンタンガム、2: ローカストビーンガム、3: グアーガム)

ン強度等に由来する浸透圧によって高い吸水性を発現する。同様に、カルボン酸塩を有するキサンタンガムは、中性多糖であるローカストビーンガムおよびグアーガムと比較して高い吸水量を持つことが示された。

大孔径多孔質材料へのコロイド粒子の吸着・徐放

以下の方法によって、クリオゲルへのタンパク質の保持・放出を評価した。リパーゼは、医薬品や洗濯洗剤など、幅広い分野で利用されていることから、タンパク質としてリパーゼを用いた。

- ①クリオゲル 0.15 g をタンパク質溶液 (5.0 g/L pH 7.0 リン酸バッファー溶液) 30 mL に一晩浸透させた。
- ②凍結乾燥ゲルを走査電子顕微鏡—エネルギー分散型 X 線分光法 (SEM-EDX) によって多孔質構造を観察し、さらに、クリオゲルにはなくリパーゼに存在する硫黄元素 (S) をマッピングすることで、クリオゲル表面にリパーゼが保持されていることを確認した (図 2)。
- ③リン酸バッファー溶液 30 mL に浸漬し脱気した。
- ④ 1, 3, 6, 24, 48 時間後にサンプリングし、ブラッドフォード試薬によって発色し、吸光度を測定した。各 3 本ずつ実験を行い、その平均値をグラフにプロットした (図 3)。



図 2 リパーゼを吸着したゲルの SEM-EDX 画像 (硫黄マッピング)
(左：キサンタンガム 中：ローカストビーンガム 右：グアーガム)

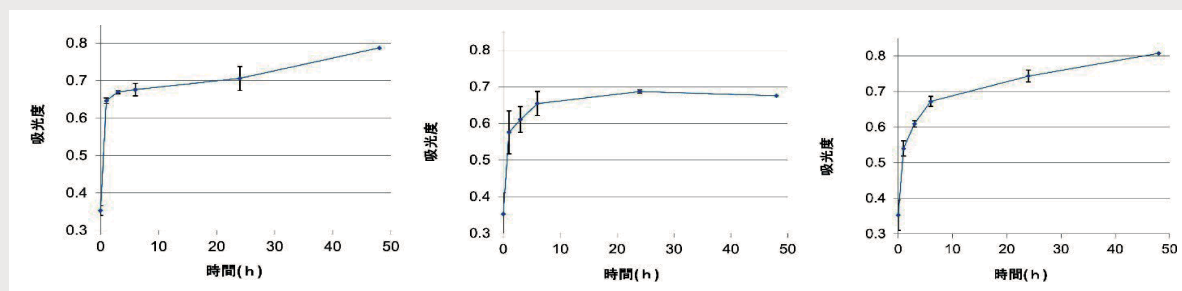


図 3 リパーゼの徐放試験
(左：キサンタンガム、中央：ローカストビーンガム、右下：グアーガム)

研究成果

本研究では、持続可能な材料として 3 種類の天然多糖から巨大な孔を持ったクリオゲルを開発した。特に、ローカストビーンガムは比較的均一な多孔質構造を与えた。その一方で、多孔質構造は、吸水メカニズムにおいては、多孔質構造よりもゲル本体の持つイオン強度に由来する浸透圧の方が、吸水量を向上することから、中性多糖であるローカストビーンガムおよびグアーガムのクリオゲルよりも、カルボン酸塩を持つキサンタンガムのクリオゲルの方が高い吸水量を示すことが明らかになった。巨大な孔を生かしたコロイド粒子の保持・放出に関しては、有用なタンパク質であるリパーゼを用いて調べた。リパーゼは 3 種類のクリオゲルに保持されていることが SEM-EDX による硫黄元素マッピングによって明らかにされた。さらに、リパーゼを保持したクリオゲルを pH 7.0 リン酸バッファーに浸漬することで、放出することも可能であることが示された。

研究テーマ

光ペルフルオロアルキル化を利用したアミノ酸、ペプチドの直接フルオロアルキル化

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 (ヤジマ トモコ)

①研究の背景及び目的

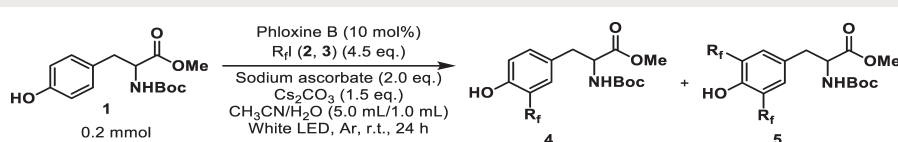
含フッ素アミノ酸・ペプチドは医薬品原料として注目される化合物であるが、その例は限られており、合成法の開発は重要な課題となっている。我々はこれまでに、ラジカル反応を用いた含フッ素アミノ酸の合成法に関する研究を行ってきたが、本研究では芳香環を有するアミノ酸・ペプチド類への直接ペルフルオロアルキル化によって、より簡便な手法での含フッ素アミノ酸・ペプチドの合成法を開発することを目的とした。

②研究方法

はじめに、ラジカル阻害作用があるフェノール骨格を持つチロシンへのフルオロアルキル化を念頭において、フェノールとヨウ化ペルフルオロヘキシルとの、光触媒を用いた可視光反応について、用いる触媒、光源、溶媒、試薬の当量数などの反応条件の最適化を行った。ここで得られた最適条件を基に、チロシンへのフルオロアルキル化反応について検討を行った。さらに、その他のベンゼン環を有するアミノ酸である、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンへのフルオロアルキル化反応、さらにその競争反応について検討を行った。最後に、芳香族アミノ酸を含むペプチドへの、直接光ペルフルオロアルキル化反応についても検討を行った。

③研究成果

フェノールへのフルオロアルキル化反応においての最適条件であった、フロキシシン B を可視光触媒とする反応条件を用いて、チロシンへの様々なフルオロアルキル基の導入を可能とした (Table 1)。チロシンに対してヨウ化ペルフルオロアルキルを 4.5 当量用い、アスコルビン酸、炭酸セシウム存在下、フロキシシン B を触媒とする白色光による反応により、様々なフルオロアルキル基が導入できた。このとき、フ



Entry	R _f I	Total yield	4 ^{a)}	5 ^{a)}
1	2a : C ₆ F ₁₃ I	67%	54%	13%
2 ^{b)}	2b : CF ₃ I	35%	29%	6%
3	2c : C ₃ F ₇ I	59%	48%	11%
4	2d : C ₈ F ₁₇ I	62%	44%	18%
5	2e : ⁱ C ₃ F ₇ I	n.d.	-	-
6	3c : IC ₄ F ₈ I	31%	31%	trace
7	3b : IC ₈ F ₁₆ I	60%	48%	12%

a) Determined by crude ¹⁹F NMR using BTF as an internal standard.
b) 9.0 eq. of CF₃I (2b) was used.

Table 1 Fluoroalkylation of tyrosine.

Boc-Tyr + Boc-AA		Phloxine B (10 mol%) C ₆ F ₁₃ I (2a) (1.0 or 4.5 eq.) Sodium ascorbate (2.0 eq.) Cs ₂ CO ₃ (1.5 eq.) CH ₃ CN/H ₂ O (5.0 mL/1.0 mL) White LED, Ar, r.t., 24h		Boc-Tyr-C ₆ F ₁₃ + Boc-AA-C ₆ F ₁₃	
6	7-10			11	12-15
0.2 mmol	1.0 eq.				
Entry	Boc-AA (7-10)	11-15 ^{a)}	Competitive experiment		
			11 ^{a)}	12-15 ^{a)}	
1	6 : Tyrosine	60% ^{b)}	-	-	
2	7 : Histidine	17%	25%	4%	
3	8 : Phenylalanine	22%	18%	7%	
4	9 : Tryptophan	56% ^{c)}	2% ^{c)}	25% ^{c)}	
5	10 : Cysteine	31%	21%	5%	

a) Determined by crude ¹⁹F NMR using BTF as an internal standard.
b) Yield of mono- (52%) and bis-adducts (8%). c) Installing rate of C₆F₁₃ group was estimated by crude ¹⁹F NMR using BTF as an internal standard.

Table 2 Reaction of various amino acids.

<p>Boc-Gly-Tyr-tBu : 16a^{a)} 17a : 38% (mono/bis=31/7)</p>	<p>Boc-Phe-Tyr-tBu : 16b^{a)} 17b : 28% (mono/bis=24/4) Phe : 14%</p>	<p>H-Tyr-Leu-Gln-OH : 16c^{b)} 17c : 20%</p>
Determined by crude ¹⁹ F NMR using BTF as an internal standard. a) 0.2 mmol scal. b) 0.05 mmol scal.		

Table 3 Perfluoroalkylation of peptides.

ルオロアルキル基が2つ導入された生成物も見られた。また、ヨウ化イソプロピルを用いた際には反応の進行は確認されなかった。

次に、異なる芳香族アミノ酸との反応について検討を行った (Table 2)。左側にそれぞれのアミノ酸を用いた場合の反応結果を示している。ヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファン、システインに対して反応を行ったところ、全ての場合に反応は進行し、ペルフルオロヘキシル基が導入されたアミノ酸が得られた。

特に、トリプトファンのときに、56%という高い収率で含フッ素アミノ酸を得ることができた。右側には、チロシンと、その他のアミノ酸の1:1混合物に対して反応を行い、どちらが優先してフルオロアルキル基が導入されるかについて検討を行った。トリプトファンの場合は、チロシンよりもトリプトファンの選択性が高かったが、その他のアミノ酸の場合には、チロシンが優先してフルオロアルキル化されることを明らかにした。

さらに、ペプチドに対するフルオロアルキル化を行った (Table 3)。ここでは代表的なものを挙げる。グリシン-チロシンのジペプチドでは、38%の収率でチロシンのペルフルオロヘキシル基が導入された。同じく芳香族を持つアミノ酸であるフェニルアラニンとチロシンのジペプチドでは、チロシンへのフルオロアルキル化に加えて、フェニルアラニンへのフッ素鎖の導入が観測された。トリペプチドに対しても反応を行い、生成物を得ている。

以上、本研究では、アミノ酸、ペプチドへの直接可視光ペルフルオロアルキル化反応について検討を行い、芳香族を有するアミノ酸への反応を達成した。今後、さらに研究を進め、より長いペプチドやタンパク質への反応について検討を行い、より有用な反応へと展開していく。

研究テーマ

メタノールを原料にしてビタミン A を生産 する微生物の開発

研究者

東京工業大学 生命理工学院 折田 和泉 (オリタ イズミ)

①研究の背景及び目的

メタンやメタノールなどの C1 化合物はカーボンリサイクルの観点から近年特に注目されており、これら C1 化合物を原料にしたバイオもののづくり (C1 バイオテクノロジー) は循環型社会構築に貢献する技術として、その発展が期待されている。なかでも様々な化学品への転換が可能な基幹物質であり、水素キャリアとしての展開も期待されているメタノールを単一炭素源・エネルギー源として利用出来る C1 微生物のモデル微生物である *Methylobacterium extorquens* AM1 は、メタノール培地で生育中、 β -カロテンなどのカロテノイドを菌体内に蓄積することが知られている。 β -カロテンは、目の健康および美容の両観点から重要なビタミン A の前駆体となることから、本研究は、*M. extorquens* の代謝改変によりメタノールを原料にビタミン A を生合成する技術を開発することを目的とした。

②研究方法

M. extorrruens は最少培地に単一炭素源として 0.5% メタノールを加え、30°C で振とう培養した。分子育種の宿主には、細胞の凝集を抑制するためにセルラーゼ遺伝子を破壊した Δ celA 株の他、 Δ cel 株を基に C1 代謝経路を改変した C1 代謝経路改変株と実験室進化により取得した高濃度メタノール耐性実験室進化株を使用した。遺伝子発現には、ランタノイド添加により誘導されるプロモーターを配した広宿主域ベクターを用い、必要に応じて、培地に終濃度 30 μ M LaCl_3 (ランタン) を添加した。相同組換え用のベクターには pK18mobsacB を用い、pop-in/pop-out 法により組換え株を得た。

③研究成果

1) ビタミン A 生合成経路の構築

上述のように、*M. extorquens* はビタミン A の前駆体である β -カロテンを生合成することが報告されていたため、 β -カロテンジオキシゲナーゼ (Blh) の導入によりレチナールを、さらにレチノールデヒドロゲナーゼ (YbbO) を導入することでレチノールが生合成されることが期待された (図 1)。そこで、これらの遺伝子を異種発現するためのベクターを構築し、構築した発現ベクターで形質転換した Δ celA 株をメタノール添加培地で培養したところ、誘導剤であるランタンの添加条件において、*blh* 単独、*blh-ybbO* 共

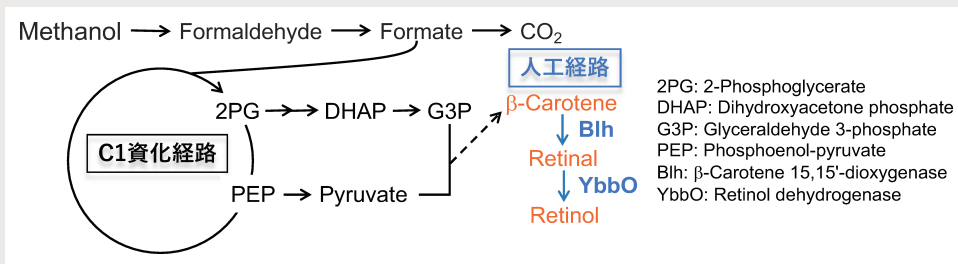


図1 *M. extorquens* 代謝改変株におけるビタミンA生合成経路

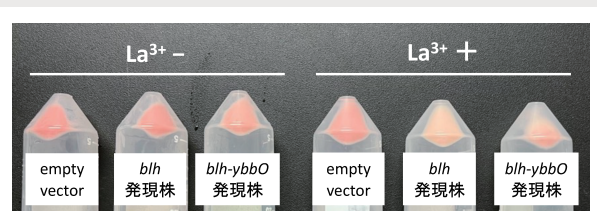


図2 *M. extorquens* Δ*celA* 形質転換体のメタノール培養菌体

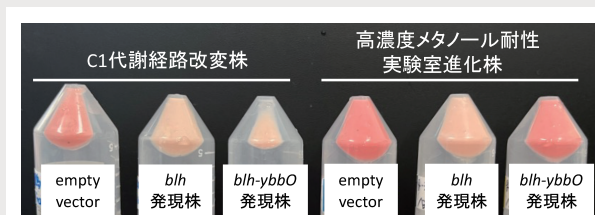


図3 β -カロテン生合成経路導入株のメタノール培養菌体 (すべてランタン添加条件で培養)

発現株共に菌体の色の変化し、メタノール生育能の低下が見られた(図2)。このことから、菌体内の β -カロテンからビタミンAが生合成されたことが予想された。しかし、研究期間中に*M. extorquens* AM1で合成されるカロテノイドは β -カロテンなどの C_{40} のカロテノイドではなく、 C_{30} のカロテノイドが主であるという報告がなされた(Synth Syst Biotechnol, 8: 527, 2023)。そこで、計画を変更し、 β -カロテン生合成遺伝子を染色体上で異種発現するための相同組換え株を構築した。その結果、培養後の菌体の色は相同組換え前と変化がなかったものの、これをその後の宿主として使用した。ビタミンA生合成遺伝子発現ベクターで相同組換え株を形質転換したところ、相同組換えの宿主に高濃度メタノール耐性実験室進化株を用いたときに、高い生育能を維持したまま菌体の色の変化した(図3)。

β -カロテン生合成遺伝子導入の効果は定かではないものの、実験進化株では、良好なメタノール生育とビタミンA生合成が両立できる可能性が示された。今後、構築した各種遺伝子組換え株が生合成したカロテノイドおよびビタミンAを分析していく予定である。

2) 包括的転写機構改変(gTME)によるカロテノイド高生産菌の取得

RNAポリメラーゼのサブユニットのうち、DNA配列特異的認識に関わる σ 因子にランダム変異を導入することで、複数の遺伝子発現を同時に制御し、表現型を変化させた株を一度に多数取得する包括的転写機構改変(gTME)を β -カロテン生合成遺伝子発現株に適用し、 β -カロテン生合成能株がさらに強化された株の取得を試みた。 σ^{70} をコードする*rpoD*遺伝子にエラプローンPCRによりランダム変異を導入し、変異導入*rpoD*断片をメガプライマーとするMEGA-WHOP法により構築した*rpoD*変異ライブラリーで β -カロテン生合成遺伝子発現株を形質転換した。これまでのところ、明らかにコロニーの色が変化した変異体は取得できていないため、今後もスクリーニングを継続する。

研究テーマ

含窒素反応活性種の精密制御を基盤とする合成手法の開発と機能性分子合成への展開

研究者

東京工業大学 生命理工学院 秦 猛志 (ハタ タケン)

①研究背景および目的

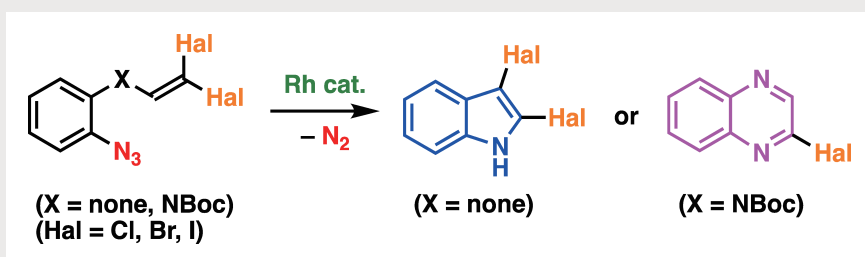
窒素原子は、医薬品、化粧品素材、有機エレクトロニクス分子をはじめとする機能性分子に多く含有しており、それらの機能や物性発現に大きく寄与している。そのため、より高活性または高機能な分子を構築するためには、窒素原子を分子内に精密に配置させる必要があり、効率的かつ多様性に富む含窒素化合物の合成法が強く求められ、これまで数多くの研究が展開されている。

そこで、本研究では、遷移金属触媒または有機金属反応剤と活性種前駆体から発生する「含窒素反応活性種」を縦横に利用して、効率的かつ多様性に富む含窒素化合物を合成する手法の開発、および得られた種々の含窒素化合物から、天然有機化合物、医薬、およびヘテロπ共役系化合物などの機能性分子の簡便合成へ展開することを目的とした。

②研究成果

(1) ロジウム触媒とアリールアジドから発生する含窒素反応活性種によるヘテロ環合成

2,2-ジハロビニル基をオルト位に有するアリールアジドとロジウム触媒を利用した2,3-ジハロインドールの合成法を確立した。具体的には、1-アジド-2-(2,2-ジブロモビニル)ベンゼンに対して、5 mol%のビス[ロジウム($\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -テトラメチル-1,3-ベンゼンプロピオン酸)]を添加し、クロロベンゼン中120度で加熱したところ、発生したナイトレンの分子内付加、ブロモ基の転位により、2,3-ジブromo-1H-インドールを収率74%で得られた。また、クロロ基とヨード基を持つ基質として1-アジド-2-(2-クロロ-2-ヨード)ベンゼンと5 mol%のオクタン酸ロジウム(II)ダイマーを、クロロベンゼン中120度で加熱したところ、2-クロロ-3-ヨード-1H-インドールを収率51%で、ほぼ単一の異性体として得られた。このことより、本反応は転位能の高いヨード基が選択的に転位したと考えられ、反応機構上有用な知見が得られた。なお、得られた2,3-ジハロインドール体は、逐次クロスクロスカップリング反応がおこなえるが、2位と3位の反応性の違いを活かし、相補的に利用できると考えられる。次に、さらなる含窒素ヘテロ環化合物の新規合成法の開発として、アミノ *tert*-ブチルカルボニル基を導入したジハロビニル基を有するアリールアジドとロジウム触媒による、2-ハロキノキサリンの合成法を検討した。具体的には、*tert*-ブチル(2-アジドフェニル)(2,2-ジブロモビニル)カルバメートと5 mol%のオクタン酸ロジウム(II)ダイマーを、クロロベンゼン中120度で加熱したところ、発生したナイトレンの分子内付加、続くブロモ基の転位によって発



生したジヒドロキノキサリンの芳香化、あるいは *tert*-ブチルカルボニル基の分解による芳香化によって、2-ブロモキノキサリンが収率 88% で得られた。

なお、本研究成果は、欧文雑誌「Advanced Synthesis & Catalyst」に掲載し、本財団の助成であることも明記した。

“Rhodium-Catalyzed Intramolecular Cyclization and Rearrangement of 1-Azido-2-(2,2-Dihalovinyl) arenes and 1-Azido-2-[(2,2-Dihalovinyl) (Boc) amino] arenes for the Preparation of 2,3-Dihaloindoles and 2-Haloquinoxalines”

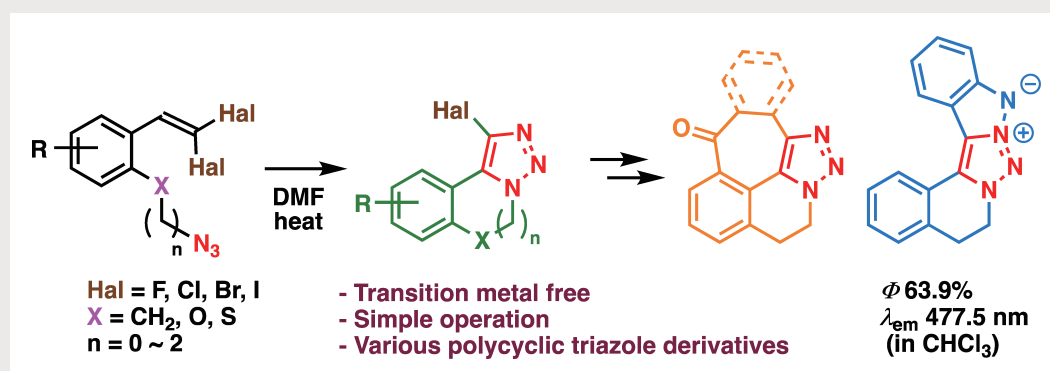
Teppey Abe, Kazuki Kobayashi, Seiya Kikukawa, Yuuki Kanai, and Takeshi Hata*

Adv. Synth. Catal. **2023**, *365*, 4562-4566. DOI: 10.1002/adsc.202300885

(2) ハロゲン基が置換した 3 環性トリアゾールを用いた多環性トリアゾール誘導体の合成

2,2-ジハロビニル基をオルト位に有するベンジルアジドからハロ置換 3 環性トリアゾールの合成法を確立した。

具体的には、1-(2-アジドエチル)-2-(2,2-ジブロモビニル) ベンゼンを DMF 中 150 度で加熱すると、1-ブロモ-5,6-ジヒドロ-[1,2,3] トリアゾロ [5,1-*a*] イソキノリンが収率 85% で得られた。続いて、得られた 1-ブロモ-5,6-ジヒドロ-[1,2,3] トリアゾロ [5,1-*a*] イソキノリンとアクリル酸 *tert*-ブチルとの溝呂木-ヘック反応による炭素鎖伸長、続く水素添加と脱保護により 3-(5,6-ジヒドロ-[1,2,3] トリアゾロ [5,1-*a*] イソキノリン-1-イル) プロパン酸を得た。得られたカルボン酸を酸クロリドに変換し塩化アルミニウムを添加すると、3,4,9,10-テトラヒドロ-5*H*-1,2,10*a*-トリアザナフト [2,1,8-*cde*] アズレン-5-オンが収率 90% で得られた。次に、1-ブロモ-5,6-ジヒドロ-[1,2,3] トリアゾール [5,1-*a*] イソキノリンと (2-ニトロフェニル) ボロン酸との鈴木-宮浦反応により 1-(2-ニトロフェニル)-5,6-ジヒドロ-[1,2,3] トリアゾロ [5,1-*a*] イソキノリンを合成し、トリフェニルホスフィン添加すると、蛍光性を有する 5,6-ジヒドロインダゾロ [2',3':3,4] [1,2,3] トリアゾロ [5,1-*a*] イソキノリン-9-イウム-10-イドが収率 91% で得られた。



なお、本成果は、欧文雑誌「Organic Biomolecular Chemistry」に掲載し、本財団の助成であることも明記した。

“Facile Preparation of Polycyclic Halogen-substituted 1,2,3-Triazoles by Using Intramolecular Huisgen Cycloaddition”

Kazuki Kobayashi, Nozomi Kasakura, Seiya Kikukawa, Shota Matsumoto, Satoru Karasawa, and Takeshi Hata*

Org. Biomol. Chem. **2023**, *21*, 9610-9615. DOI: 10.1039/D3OB01283B

研究テーマ

ポリグルタミン酸（PGA）ハイドロゲルによる微小粒子捕捉をクライオ電子顕微鏡で可視化する

研究者

国立大学法人 東北大学 多元物質科学研究所 濱口 祐（ハマグチ タスク）

納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) が生産するポリグルタミン酸は保水性に富んだ非常に有用なハイドロゲルを形成する。このハイドロゲルは水溶液中に分散した微小粒子などを吸着し、水質浄化作用があることが報告されている。また、納豆の糸の中には“生きた”菌が生育しており、高浸透圧ストレス下でどのように生存しているかは非常に興味深い。本研究では納豆の糸に含まれる高粘性成分がクライオ電子顕微鏡でどのように可視化されるか、また、糸の中に捕捉された微粒子がどのように可視化されるかについて焦点を当て、研究を行った。

クライオ電子顕微鏡は試料を急速凍結し、非晶質の水に閉じ込めて観察することができる画期的な手法で、試料に含まれる水を保持したまま、本来の形を観察することができる。この手法は主にタンパク質の構造解析（単粒子構造解析）において目覚ましい発展を遂げており、現在では数時間の測定から 3 Å 分解能に迫る高分解能構造解析を可能としている。クライオ電子顕微鏡の利用は単粒子構造解析に留まらず、電子線トモグラフィーや電子線回折により、従来の電子顕微鏡では観察できなかった溶媒存在下での構造解析・形態観察が進められている。本研究課題では納豆の糸に焦点を当て、ポリグルタミン酸ポリマーの直接可視化と、ポリグルタミン酸ハイドロゲルに捕捉された納豆菌の可視化を達成した。

納豆の糸を水溶液中に懸濁し、クライオ電子顕微鏡で観察したところ、ミセル様に分離した層から伸びるポリグルタミン酸ポリマーと思われる構造の観察に成功した。単鎖ポリマーの直接観察事例はほとんどなく、ポリグルタミン酸ポリマーでは全体のネガティブチャージにより電子線との相互作用が強められ、効率的に観察されたものと考えられた。次に、納豆の糸を直接クライオ電子顕微鏡観察することを試みた。納豆の糸を引き延ばし、細くなったものを観察用グリッドに塗布した後、急速凍結を行い、観察を行った。この時、観察用グリッドとの親和性から納豆の糸が三次元的に盛り上がっており、接着が弱いことが問題となったが、グリッド親水化条件の検討により糸が効率よく付着する条件を見出した。

得られた納豆の糸像は図にあるように厚みが大きく、電子線が透過する厚みに調整することは困難であった。このことから、大阪大学難波教授および牧野招へい准教授の助力を得、クライオ FIB-SEM を用いた試料の薄膜化について検討を行った。クライオ FIB-SEM では凍結した試料について液体窒素温度を維持しつつ、収束イオンビーム (FIB) を用いて任意の厚みへと加工することが可能である。この特性を活かし、凍結した納豆の糸の加工を行った。詳細なプロセスは図を参考いただくが、グリッドに付着した納豆の糸を FIB 加工行い、掘削面を SEM 観察することでハイドロゲル中に存在する納豆菌の様子を可視化することに成功した。この時、納豆菌の配置は糸の伸展方向に整列しており、糸の粘度と伸長時に発生する力の関係について可視化することも興味深い課題である。

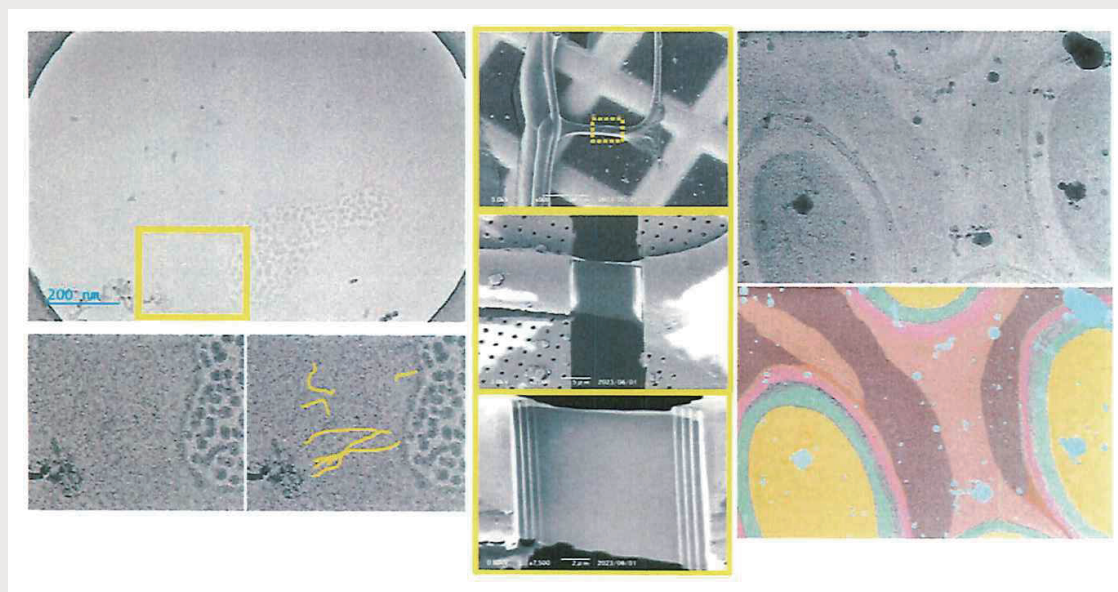
加工した薄膜（ラメラ）について、日本電子製透過型クライオ電子顕微鏡 (CRYOARM300II) に装填し、液体窒素温度を維持したまま透過像を得たところ、図に示したように納豆菌の微細構造を可視化するとともに、納豆菌を取り巻くハイドロゲル環境の詳細を可視化することに成功した。可視化した画像の中で、納豆菌の細胞はペプチドグリカン層の外側に特殊な殻を備えており、納豆菌が芽胞を形成し糸の中で生存していることが明らかとなった。芽胞は一般的に凝集性が高く、クライオ電子顕微鏡での観察事例は極め

て少ない。また、クライオ FIB-SEM では通常グリッド上に分散した細胞をそれぞれ薄膜加工することから作業効率が低く、また難度が高い傾向がある。しかし、本研究課題でポリグルタミン酸ハイドロゲル中の納豆菌芽胞を観察したところ、ハイドロゲル中に単分散した芽胞が容易に観察することができた。このことは、ポリグルタミン酸ハイドロゲルによって従来観察の難しかった芽胞の詳細観察手法が開発可能である可能性を示している。芽胞形成菌では食中毒の原因となるウルシュ菌や、重大な病態を引き起こす炭疽菌などが含まれており、効率的かつ高解像度解析が可能な手法が開発されれば、これら菌の芽胞形成メカニズム解明や、芽胞に効果を示す薬剤の開発などにも貢献できる可能性がある。

さらに、透過型クライオ電子顕微鏡では試料を傾斜させ、トモグラフィー像の撮影にも成功した。トモグラフィー像では納豆菌の周囲を低コントラスト領域が覆っており、この部分は水に由来する領域であると考えられた。

またその周囲にはコントラストが高い領域が存在しており、この領域がポリグルタミン酸および多糖リッチな領域であると考えられた。この一部で水溶液懸濁した際に見られたフィラメント様構造が見られたことから、高コントラスト領域がポリグルタミン酸リッチである事を示唆している。

本研究課題で得られたポリグルタミン酸ポリマーの直接観察ならびに納豆菌芽胞の観察から見た、ポリグルタミン酸ハイドロゲルの芽胞観察への可能性については第 79 回日本顕微鏡学会サテライトシンポジウム、第 24 回国際マイコプラズマ学会学術集会および第 61 回日本生物物理年会において成果発表を行い、大変好評を得ている。



左：溶媒に懸濁した納豆の糸成分と、ミセル様分離相から伸びたポリマーのクライオ電子顕微鏡による可視化。
 中：急速凍結した納豆の糸の SEM 像、FIB 加工したラメラ断面の SEM 像および低加速電圧によるチャージコントラストによって見えたラメラ中の納豆菌の様子。
 右：クライオ FIB-SEM 加工したラメラのクライオ電子顕微鏡像。細胞だけでなく周囲環境についても明瞭に観察された。黄、菌体内部；緑、ペプチドグリカン；ピンク、芽胞に特有の殻；オレンジ、水領域と思われる低コントラスト領域；紫、ポリマーリッチと思われる高コントラスト領域；水色、付着した霜

研究テーマ

エピジェネティック創薬：人工ミニプロテインを基盤とする新規モダリティの開発

研究者

大阪公立大学 大学院理化学研究科 生物化学専攻 藤原 大佑（フジワラ ダイスケ）

生体内では、細胞の種類や状態によって、発現する遺伝子の種類や発現量、発現時期が異なり、巧みな遺伝子発現制御によって細胞の役割が精緻に制御されている。遺伝子発現制御に関する研究領域を、エピジェネティクス研究と呼ぶ。近年、エピジェネティクス関連タンパク質が、疾患発症原因となることが明らかとなっている。これらのタンパク質をターゲットとする医薬品開発は、エピジェネティック創薬と称される。エピジェネティクス疾患タンパク質の中でも、開発が困難であるために、ほとんど手付かずなターゲット群がある。それが、翻訳後修飾 (PTM) を受けたヒストン・タンパク質と、それを認識する「読むタンパク質 (Reader)」との相互作用である (細胞内の翻訳後修飾 (PTM) 依存型のタンパク質間相互作用 (PPI): 以下、細胞内 PTM-PPI とよぶ)。PTM-PPI の相互作用面は、医薬品開発ターゲットとされてきた、空間的に狭い鍵穴をもつ“酵素の活性中心”とは異なり、比較的なだらかで、平らな凹凸からなっている。このため、低分子阻害剤の開発が非常に困難であった。

これまでに、独自の強固な立体構造を持つヘリックス-ループ-ヘリックス (HLH) ペプチド (ミニプロテイン) をもとに、細胞内のタンパク質-タンパク質相互作用阻害剤を獲得してきた (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 10612.). HLH ペプチドは、ターゲットタンパク質に対して広い相互作用部位をもち、高い結合活性と、優れた特異性、ならびに高いタンパク質分解耐性をもつため、新規な創薬モダリティとして開発が期待できる。本研究では、新たに、エピジェネティック創薬を可能とする、HLH ペプチドの開発に挑戦した。

本課題では、リシンの側鎖がアセチル化されたヒストン H4 と、そのアセチル基リシンをホット・スポットとして認識する Bromodomain-containing protein 4 (Brd4) との相互作用に特異的な阻害剤 (抗がん剤開発) を目標とした (図 1)。Brd4 は細胞分裂期に機能し、がん細胞中では過剰発現していることから、抗がん剤開発のターゲットとして知られる。ヒトプロモドメインはヒトゲノム中に 61 種存在することが明らかとなっており、これらプロモドメインのアセチル化リシン認識ドメインは高度に保存されている。このため、従来の低分子阻害剤は、特異性が低いことが課題であった。本申請課題では、HLH ペプチドを分子基盤として、Brd4 阻害剤の獲得を目標とした。

本研究は以下の 3 つのステップからなる。まず、アセチル化リシンをもつ HLH ペプチド・ライブラリーを構築して、Brd4 に対してスクリーニングする。(図 2a)。次に、獲得されるペプチドを合成し

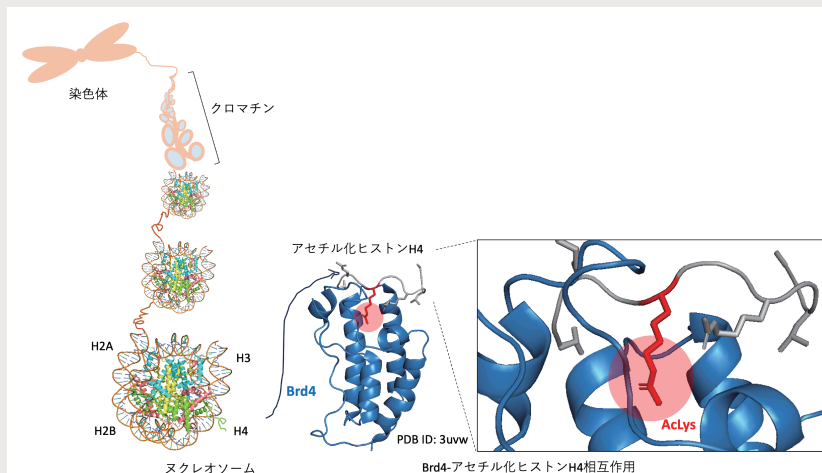


図 1 Bromodomain-containing protein (Brd4)-アセチル化ヒストン相互作用

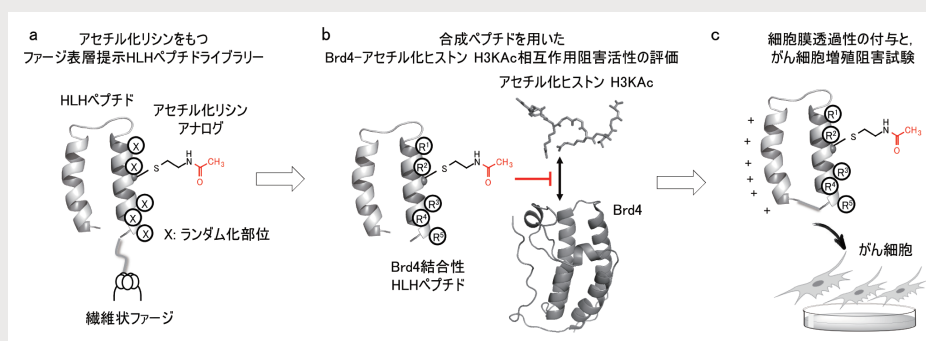


図2 アセチル化ヒストン-Brd4 特異的な HLH ペプチド阻害剤開発のスキーム。(a) アセチル化リシンをもつファージ表面提示HLHペプチドライブラリー。(b) 獲得ペプチドの活性評価。(c) 細胞内送達。

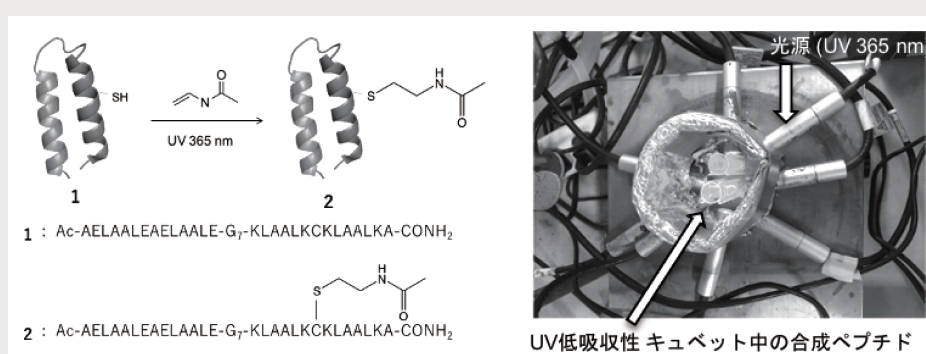


図3 チオール・エンクリック反応を利用した、アセチル化リシン模倣体（アセチルチアリシン）の導入方法（左）と、反応開始に用いている UV 照射装置（LED 光源 L11921-40）を用いた実験の様子。

て、結合活性/阻害活性を測定する（図 2b）。さらに細胞膜透過性を付与する（図 2c）。これまでに図 2 (a) の新規ライブラリー構築を進めてきた。図 3 に示したチオール・エン・クリック反応を利用した、アセチル化リシン模倣体の導入方法を開発している。2023 年度は、アセチル化リシンをもつファージ表面 HLH ペプチドを構築し、ライブラリースクリーニングによって Brd4 結合活性ファージクローンを単離する。続いて、同ファージがコードするペプチドを合成する、Brd4-アセチル化ヒストン H4 相互作用阻害活性を評価する。61 種あるプロモドメインにおける Brd4 に対する特異性の検討を行うことを目標とした。

2023 年度計画に基づいて、ファージ表面提示 HLH ペプチド・ライブラリー上での、システイン選択的な化学修飾の確認研究を行った。2022 年度に確立できた条件を用いて、システインを 1 残基もつ HLH ペプチド (YT1-A28C) の合成ペプチドに対するチオールエン-ラジカル付加反応によるビオチン化の進行を、HPLC および質量分析により確認した。本反応をファージ表面提示ペプチド YT1-A28C でも検討するために、同配列をもつファージのシングルクローンを作製した。ELISA プレートに固定化したストレプトアビジンに、ビオチン化処理をファージ表面提示ペプチド YT1-A28C のファージ溶液を加えたところ、ストレプトアビジン選択的結合を確認した。すなわち、チオール-エン-ラジカル付加反応によるファージ表面提示ペプチド・ライブラリー作製条件を確立した。続いて、ファージ表面提示 YT1-A28C を基盤とするライブラリーを構築した。ライブラリー作製のオリゴヌクレオチドを用いて、シングルクローン YT1-A28C と同様の手順でファージの作製ライブラリーを作製した。得られたファージベクター・バリエーションの DNA シーケンスを行ったところ、多様性をもった目的のライブラリーの構築を確認した。Brd4 に対するライブラリー・スクリーニングおよび獲得ペプチドの評価を、研究計画に基づき行う (2023 年度予算執行率 73%。2024 年度に必要予算を繰り越した)。貴財団のご助力により本課題を力強く推進することができた。

研究テーマ

有機低分子の機能賦活法としての結晶工学的アプローチ

研究者

東京大学 環境安全研究センター 北條 博彦 (ホウジョウ ヒロヒコ)

①研究の背景および目的

同一分子が異なる結晶構造を与える結晶多形の現象は、医薬品の安定性、生物学的利用能等の観点で重要な問題を生じうる。有機分子の結晶形を自在に制御し、機能の最適化をはかる“クリスタルエンジニアリング(結晶工学)”は、固溶体、共結晶、包摂結晶など様々な結晶性材料を積極的に設計・作成することを通じて、化学の未踏領域を開拓する学問分野である。分子性結晶の化学は、溶液の化学に比べて未解明、未着手の問題が圧倒的に多い。問題を難しくしている要因として、分子環境の異方性や特異的な分子間相互作用の存在が挙げられる。

サリチリデンアミン(SA)は1960年代より盛んに研究され続けているフォトクロミック色素である。SA類縁体はその分子構造や結晶形によってフォトクロミズム(PC)やサーモクロミズム(TC)、またはその両方(T/PC)が発現する。本研究課題ではSAの三種の結晶多形($\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β 型)を対象として結晶中の分子環境を定量的に比較し、分子環境がクロミック特性に及ぼす影響の起源を理論的に明らかにすることを目的とした。

②研究方法

従来、SAのクロミズム研究は粉体試料を対象とした拡散反射スペクトル法を用いて行われる例がほとんどであり、単結晶レベルで調べた研究はほとんどない。我々の研究グループでは光学顕微鏡と光ファイバ分光器を組み合わせた独自の装置により、これまでに、SA類縁体の単結晶試料に対して、温度依存クロミック特性を評価し、データとして蓄積してきた。上述のようにSA類縁体は分子構造および結晶構造に依存してPC、TC、T/PC特性を示し、その光応答は温度の関数である。このように複雑な現象を整理して結晶構造との相関を解明していくためには、測定方法を標準化する一方で、光定常状態からの退色特性を記述する適切なパラメータを確立すること、およびそれらのパラメータと結晶構造との関連を明らかにすることが必要である。研究の全体像は、(1)標準化された条件下での退色過程測定、(2)退色曲線の速度論解析による特性量抽出、(3)結晶構造に基づく理論計算による機能発現機構の解明、と整理することができる。項目(1)(2)については、最近(2022年)SAの結晶多形について報告したところであり、独自の速度論式に基づいた解析により結晶構造とクロミック特性量のデータが蓄積されている。本研究課題では(3)に注力し、ONIOM法などのハイブリッド量子化学計算法により、結晶場の効果を明示的に考慮した反応経路解析を行い、結晶構造とクロミック特性量との関係を明らかにする。

③研究成果

1. 結晶構造を模したクラスターモデルの構築

結晶中の分子環境の効果を理論的に見積もるためには、モデルの精度と計算負荷とのバランスを考慮する必要がある。本研究では中心分子とその最近接の分子のみを考慮したミニマルクラスターを計算対象とし、階層的ハイブリッドQM/QM'法を利用した構造最適化とその妥当性評価を含めた一連の手続きを提案した。X線結晶構造を初期値として構築したクラスターについて、周辺分子を固定した状態で中心分子のみを最適化し、最適化された構造で周辺分子を置き換えるという過程を繰り返した(図1)。構造の収束条件として総エネルギー値および初期構造との根二乗平均(RMS)誤差に注目し、2回乃至3回の繰り返しの十分収束したと判断した。収束した構造を用いて基準振動計算を行ったところ、各多形に対する赤

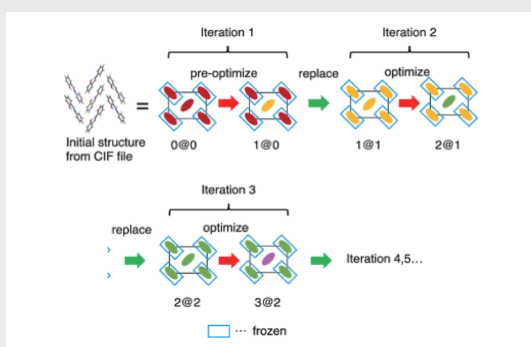


図1 繰り返し法によるクラスターモデルの最適化

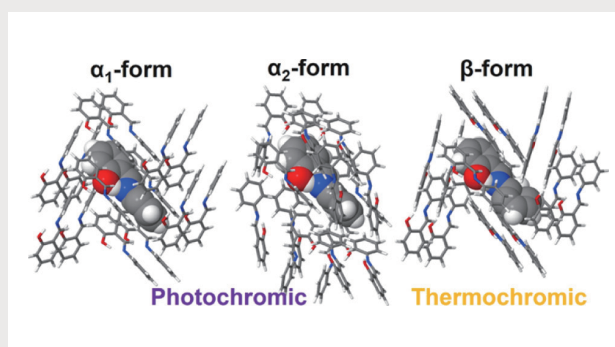


図2 SAの結晶多形のクラスターモデル

外吸収スペクトルのパターンをよく再現することができ、構造の信頼性が示された。

2. ポテンシャル曲面の計算によるローカルイベントの解析

最適化したミニマルクラスターの構造(図2)を用い、TC, PCに伴う中心分子の構造変化(ローカルイベント)に関するポテンシャル曲面(PES)を計算した。各結晶多形に対応するクラスターのPESは、比較として計算した孤立分子のPESと概形的には同じ傾向を示したが、数値的には結晶構造に依存した差異を示した。たとえば、エノール体とcis-ケト体のエネルギー差は α_1 -, α_2 型に比べて β 型のクラスターで有意に小さく、三種の中で β のみがTCを示すことと符合する結果となった。また、trans-ケト体のエネルギーは、 α_1 型に比べて α_2 の方が圧倒的に低く、結果としてcis-ケト体に戻る際の活性化エネルギーが大きくなることが示された。これはPCを示す α_1 -, α_2 型間の比較において、 α_2 型の退色時間が10倍以上長いという実験結果と一致する。このように、結晶中の分子環境の影響を明示的に取り入れた計算により、結晶多形による光・熱応答の違いを説明できたことは、結晶工学上の有意義な成果だといえる。

3. 静電ポテンシャルマップを利用した分子環境の可視化

クラスター計算によるPES形状の差異が、結晶中の分子間相互作用を反映していることは明らかである。無電荷の分子結晶においては、電荷分布の偏りによる静電的な安定化/不安定化の効果が支配的であると考えられる。我々はこの効果を可視化して比較できるようにするため、クラスターモデルを用いて静電ポテンシャル(ESP)マップの解析を行った。クラスターの中心分子がつくる静電ポテンシャル場をそれ自身のファン・デル・ワールス(vdW)表面上に投影して作成するESPマップをinternal ESP(i-ESP)マップ、周囲分子がつくる静電ポテンシャル場を中心分子のvdW表面に投影したマップをexternal ESP(e-ESP)マップと名付け、それぞれ作成できるようにした。結晶内の各点におけるi-ESP、e-ESP両数値の積は分子間の静電相互作用の目安になると考え、その値をvdW表面上に投影したマップをESP-based Attraction and Repulsion(ESPAR)マップと名付けた。

さらにvdW表面上の各点におけるi-ESP、e-ESP両数値を平面座標上にプロットしたもの(ESPARプロット)を作成し、各多形における分子間の静電相互作用の特徴を可視化することに成功した。ESPARプロットでは、第2、第4象限に点が多く分布しているほど静電的な安定化が、第1、第3象限に多く分布しているほど不安定化が働いていることを示している。 α_2 相のtrans-ケト体の安定化には隣接分子との水素結合が寄与していることがわかった。

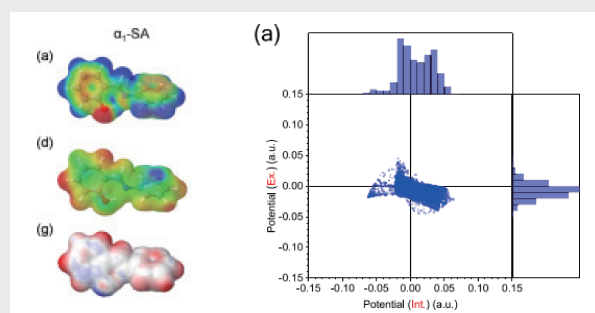


図3 SA(α_1 型)結晶のESPARマップとESPARプロット

論文発表

- (1) R. Koibuchi, K. Omasa, I. Yoshikawa, H. Houjou, J. Phys. Chem. Lett. 14 (2023), 8320-8326.
- (2) R. Koibuchi, I. Yoshikawa, Y. Shigemitsu, H. Houjou, Cryst. Growth Des. 24 (2024), 238-251.

研究テーマ

材料から創薬まで微量な微小結晶の電子線回折法の基盤技術開発

研究者 国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学研究センター イメージング開発チーム 眞木 さおり (マキ サオリ)

サプリメントなどの健康補助食品や化粧品などに含まれる有効成分は、低・中分子の有機化合物で構成されており、これらの成分の分子構造を明らかにすることは、極めて重要である。一般的に用いられる X 線結晶構造解析では、数百 μm 以上の高品質な単結晶試料が必要とされているが、試料によっては微小な結晶しか得られないものもある。また、ある種の薬剤は微小結晶のみが効果を示すことも知られており、微小結晶自体の構造を決定できる技術は、非常に重要である。

電子線を用いた三次元結晶構造解析技術 (3DED あるいはマイクロ ED と呼ばれる) は、低・中分子化合物や 50 kDa 以下のタンパク質結晶の構造解析において大きな可能性を秘めた技術として注目されている。電子線は、X 線に比べて 4～5 乗も強く物質と相互作用するため、X 線回折ではデータ測定が不可能な微小で薄い結晶からでも高い空間分解能まで回折点を測定できる。私たちの研究グループでは、ミクロンからサブミクロンサイズの微小結晶や薄膜結晶 (厚みが数 nm から数百 nm) の電子線結晶構造解析をクライオ電子顕微鏡 CRYO ARM300 (日本電子) を使って回折測定技術開発を進め、世界最高精度の解析が可能であることを示してきた。しかし、電子線回折法には、現状、2つの大きな問題があり、①電子線の透過能の制限で、試料の厚さは数百 nm 以下が望ましいこと ②試料ステージの回転範囲は、±約 70°以下に限られるため、いわゆる「ミッシングコーン」と呼ばれるデータ欠損領域があることである。これらは、高精度構造解析を妨げる大きな要因にもなっている。そこで、私たちは試料の厚さやデータ欠損領域を補完するための基盤技術開発を進めた。

①クライオ FIB-SEM による微小結晶の加工

クライオ FIB-SEM は、生体試料や薄膜試料などを凍結状態でイオンビームによる微細加工をおこなう技術であり、試料を凍結することは、試料の状態を保つだけでなく、イオンビームによる損傷を防ぐ効果もある。クライオ FIB-SEM Aquilos 2 (エフィアイ・サーモフィッシャー) を使って、微小結晶のラメラを作製する際に問題になるのが、イオンビームによって温度が上昇し氷が融解、この氷が試料に付着する現象である。このような氷による試料汚染を低減させるために CERES Ice Shield シャッター (delmic) を導入した。液体窒素温度に冷却されたシャッターは、試料上部に設置され、中央の孔を通して FIB 加工がおこなわれる。この氷による試料汚染は、FIB 加工時だけでなく、加工後の試料をクライオ FIB-SEM 装置から取り出した際にも生じる。これは、装置よりも低真空なホルダーによる温度上昇が原因と考えられた。そこで、高真空 (1×10^{-6} mbar) を保持するトランスファーロード (delmic) と窒素ガス置換グローブボックス (delmic) を導入した。大気中での凍結試料調製に比べて液体窒素中での氷による汚染は低減され、クライオ FIB-SEM 装置から透過型電子顕微鏡 CRYO ARM300 への導入後も氷による汚染が低減されていることを確認した (図 1a, b)。

②クライオミクロトームによる微小結晶の加工

クライオミクロトームは、凍結した試料の超薄切片を作製する装置であり、このような加工により細胞

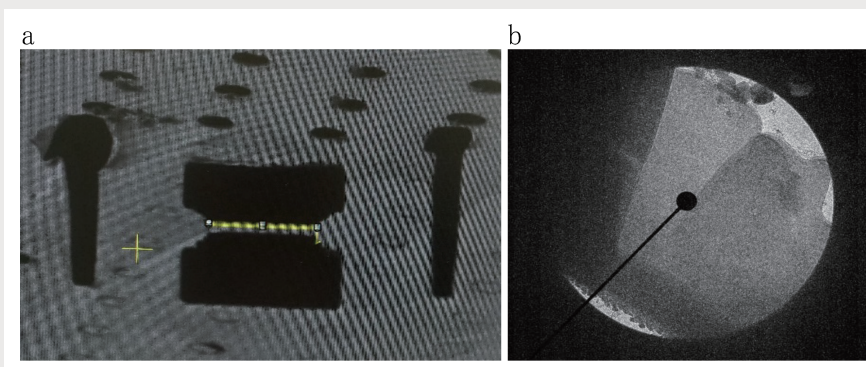


図1 a. クライオ FIB-SEM (Aquilos 2) で加工した有機半導体薄膜結晶 b. a. を CRYO ARM300 で撮影

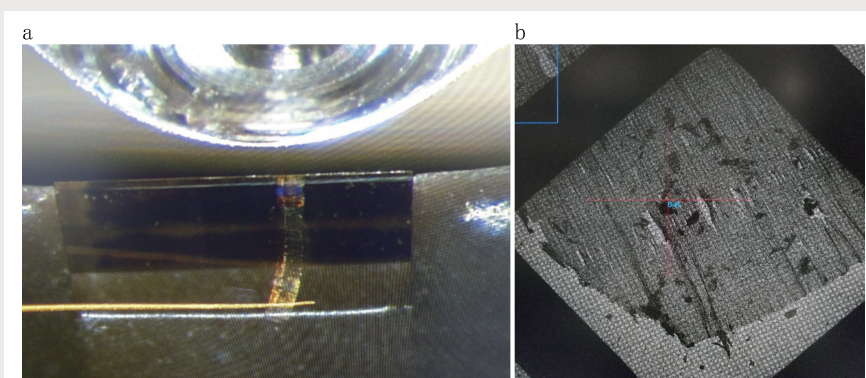


図2 a. クライオマイクロトーム (FC-7, Leica) で作製した超薄切片 b. a. を CRYO ARM300 で撮影

や組織の内部切断面を観察することができる。凍結することで試料が硬くなり、常温による切削よりも薄い切片を作製することが可能であり、切削によるダメージを防ぎ、柔らかい生体試料の処理に適している。また、FIB-SEM のイオンビームによる損傷に弱い試料にも適している。クライオマイクロトーム FC7 (ライカ) 装置は、試料部、ナイフ、チャンバー雰囲気を高精度に制御することが可能であり、この装置を使って最適なトリミング加工、超薄切片作製条件を調べた。

抗凍結剤などの成分が多い溶液では、十分に硬い凍結試料を調製することができず、スライス加工をすることが困難であったが、適切な溶媒を検討した後、トリミング加工条件の検討もおこなった。凍結状態の溶媒の硬さと微小結晶の硬さが異なるため、切削時のナイフのスピードによっては微小結晶は削れず、溶媒領域の形状が崩れる現象がおこった。トリミング加工の温度、スピード、超薄切片作製時の温度、スピードの条件検討をおこなうことで、300 nm 程度の超薄切片を加工することに成功した (図 2a)。クライオマイクロトームを用いた試料加工のメリットは微小結晶が無作為に配向されることであり、これによりクライオ電子顕微鏡によるデータ欠損領域「ミッシングコーン」は解消され、全方位電子回折像のデータ取得が可能になった (図 2b)。しかし、微小結晶を凍結するための溶媒の種類が限定されてしまうため、現在、凍結条件を検討している。

公益財団法人 小柳財団

