

研 究 助 成 業 績 報 告 集

2024 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	小柳典子
理 事	西口 徹
理 事	金澤秀子
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 (元東京工業大学理事・副学長) 大阪公立大学 特命教授
選考委員	加藤 信子	元 株式会社ブリヂストン 首席フェロー 元 学校法人 日本女子大学 評議員
選考委員	上村 みどり	CBI 研究機構量子構造生命科学研究所 所長
選考委員	畑中 研一	東京大学 名誉教授
選考委員	中村 聡	東京工業大学 名誉教授 沼津工業高等専門学校 名誉教授

研究助成業績報告書

2024 年度

[2024 年 4 月 1 日～ 2025 年 3 月 31 日]

公益財団法人 小柳財団

目 次

1	革新的技術開発により加齢に伴う認知機能低下を防ぐ 6 研究者▶ 東邦大学 理学部 生物分子科学科 上田 奈津実
2	角質層弱酸性 pH 環境の維持に対する細胞間タイト結合分子と老化の影響 8 研究者▶ 岐阜薬科大学 薬学部 生化学研究室 五十里 彰
3	病原菌においてヘム濃度を感知・調節するタンパク質ダイナミクスの解明 10 研究者▶ 筑波大学 計算科学研究センター 原田 隆平
4	遺伝子治療を指向した光ノックダウン分子ツールの開発 12 研究者▶ 東京科学大学 生命理工学院 湯浅 英哉
5	歯垢の形成を抑える糖複合体の化学合成法の開発 14 研究者▶ 岐阜大学 工学部 岡 夏央
6	肥満治療の新規標的としての褐色脂肪細胞の新規 H ⁺ チャネルの生理的役割の解明 16 研究者▶ 北海道大学 大学院獣医学研究院 基礎獣医科学分野 生理学教室 山口 聡一郎
7	非膜構造体を体系的に同定し疾患との関連を探索 18 研究者▶ 産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 小林 慎
8	ビタミン D 誘導体の神経疾患適応とその作用メカニズムの解明 19 研究者▶ CBI 研究機構 量子構造生命科学研究所 近藤 史郎
9	ミトコンドリア代謝経路を標的とした高リスク白血病の抗がん剤耐性克服療法の創成 21 研究者▶ 横浜市立大学医学部 血液・免疫・感染症内科 國本 博義
10	加齢に従って減少するコラーゲンの編み手細胞の解明と細胞補充によるアンチエイジング 24 研究者▶ 岡山大学 異分野融合先端研究コア 佐藤 伸
11	酵素を利用した新規高機能抗酸化化合物の創出 26 研究者▶ 東京大学 大学院薬学系研究科 森 貴裕
12	抗酸化物質によるラジカル消去反応の量子機構に対する反応環境の影響 28 研究者▶ 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子生命科学研究所 中西 郁夫
13	極性転換を利用する新規 NSAID 医薬品合成法の開発 30 研究者▶ 三重大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 溝田 功
14	分子プローブ合成を指向した有機触媒を用いる環境にやさしい分子官能基化法の開発 32 研究者▶ 日本女子大学 理学部 化学生命科学科 澁谷 正俊
15	ミトコンドリア解析を包含した多層統合マルチオミックス解析による pan-negative 肺がんの 病態解明 34 研究者▶ 理化学研究所 革新知能統合研究センター がん探索医療研究チーム 浅田 健

16	オーファン G タンパク質共役受容体 Gpr176 を標的とした線維化に対する新たな治療戦略36 研究者▶ 川崎医科大学 岡本 安雄
17	右手と左手の関係にある部分構造をもつ天然分子の探索と意義の解明38 研究者▶ 大阪公立大学 大学院理学研究科 森本 善樹
18	光エネルギーを利用して大気から窒素含有化合物を生産する微生物の開発40 研究者▶ 東京都立大学 理学部 得平 茂樹
19	歯周病における活性酸素種による酸化ストレス病因論の検討42 研究者▶ 神奈川歯科大学 全身管理歯科学講座障害者歯科学分野 小松 知子
20	美白化粧品等の開発を目指した酸化酵素チロシナーゼの反応機構解明44 研究者▶ 茨城大学 理学部理学科化学コース 藤澤 清史
21	中枢体内時計が時差ボケを生じるメカニズムの解明とその解消法の探索46 研究者▶ 金沢大学 医薬保健研究域・医学系・統合神経生理学 三枝 理博
22	環境適応に関わる TOR 経路の解析48 研究者▶ 日本女子大学 理学部化学生命科学科 大野 速雄
23	D ペプチドによるアルツハイマー病候補薬の開発50 研究者▶ 神戸大学 大学院工学研究科応用化学専攻 丸山 達生
24	環境・製品中の糖鎖原料による炎症性呼吸器疾患誘導機構の解明52 研究者▶ 杏林大学 保健学部 新江 賢
25	ナノポア形成をシグナル増幅として用いるエクソソーム計測技術の開発と単一粒子測定への応用54 研究者▶ 東京薬科大学 薬学部 生体分析化学教室 守岩 友紀子
26	下痢症ウィルスの感染感受性を規定する腸内環境因子の同定56 研究者▶ 大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野 金井 祐太
27	運動器疼痛治療に適したジバニリンによる新規分解性粒子の調製58 研究者▶ 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 網代 広治
28	三次元血管網を有する非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルの開発60 研究者▶ 京都大学 大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻 松本 倫実
29	光架橋反応を利用した高効率 turn-on 光増感剤の開発62 研究者▶ 東京科学大学 生命理工学院 金森 功吏
30	皮膚毛包幹細胞の分化系譜における必須ミネラルの役割解明64 研究者▶ 徳島文理大学 薬学部 原 貴史
31	嗅覚に着目したアルツハイマー病の早期診断および予防法の開発66 研究者▶ 東京大学 大学院理学系研究科 竹内 春樹
32	難合成タンパク質生産のための酵素によるタンパク質ライゲーション技術の確立67 研究者▶ 京都大学 複合原子力科学研究所 粒子線基礎物性研究部門 粒子線物性学研究分野 奥田 綾
33	海藻に学ぶ：光合成集光タンパク質における色素の結合性を制御する因子の解明70 研究者▶ 大阪公立大学 人工光合成研究センター 藤井 律子
34	AI を導入した新世代の前眼部診断方法の開発72 研究者▶ 東京大学 大学院情報理工学系研究科システム情報学専攻 曾我部 舞奈
35	胃腺構造の伸長・極性形成を担う Ephrin シグナルの解析74 研究者▶ 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究領域幹細胞工学研究室 印東 厚

36	植物の力を最大限引き出すための植物光周性の制御メカニズムの解明.....76 研究者▶ 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域・植物生理学 遠藤 求
37	バクテリオファージによる健康に関わる腸内細菌叢の精密制御78 研究者▶ 自治医科大学 医学部 感染・免疫学講座 細菌学部門 宮永 一彦
38	高い抗酸化作用を有するシリコン製剤の作用機序の化学的解明80 研究者▶ 大阪大学 大学院理学研究科化学専攻 船橋 靖博

研究テーマ

革新的技術開発により加齢に伴う認知機能低下を防ぐ

研究者

東邦大学 理学部 生物分子科学科 上田 奈津実（アゲタ ナツミ）

昨今、軽度認知障害は正常と認知症の中間状態（日常生活に支障はないが、エピソード記憶の保持障害などが生じる）と定義された。軽度認知障害から年間 10-30% が認知症に進行する一方で、5 年後に 38.7% が正常化したという報告もなされた。認知症を根治薬物療法は存在しないことから、可逆性の残る軽度認知障害に対する創薬候補分子の探索や治療法の確立が求められている。

記憶には、数分から数時間持続する短期記憶と、数日から数週、数年以上保持される長期記憶がある。いずれの記憶も獲得の基盤は、情報を受け渡すニューロンの軸索末端と、情報を受け取るニューロンの樹状突起スパインが作り出す接着部位（シナプス）において伝達効率の上昇が長期的に持続する長期増強（LTP）である。一方で、短期記憶から長期記憶への転換（記憶固定化）には、LTP の持続が必要である考えられているが、分子機構は不明な点が多い。実際、シグナル分子などのスパイン内での滞在時間は数十秒から数分であり、長い分子でも 1 時間程度であることから、長時間にわたって LTP を維持するための何からのメカニズムの存在が示唆されており、記憶固定化に関わると考えられているが、その実体はほとんど明らかになっていない。

報告者はアクチン、微小管、中間径フィラメントに次ぐ第 4 の細胞骨格であるセプチン（SEPT1-14）の神経系における役割を探索してきた。セプチンは、ほぼすべての細胞種で発現し、細胞分裂時に赤道面でリング状に形成される収縮環の構成成分として分子の非対称性を保証する拡散障壁となり、細胞質を 2 つに分割するが、セプチンは非分裂細胞ニューロンで高発現し、多様な精神・神経疾患との関連が示唆されている。しかし、いずれも病態との因果関係や寄与度は不明である。

報告者は認知機能に関与するセプチン・サブユニットを探索する目的で、長期記憶モデルとして局所的電気刺激でシナプス伝達の後期長期増強（L-LTP）を誘発したラット海馬における SEPT1-14 の免疫反応性をスクリーニングし、脳特異的かつニューロン選択的に発現する SEPT3 がリモデリングすることを見出した。また、報告者は SEPT3 の生理的役割を探索するため、行動/回路/細胞/分子レベルで解析を行い、以下の結果を得た。

- ①セプチン 3（SEPT3）欠損マウスが短期記憶から長期記憶への記憶固定化障害（軽度認知症に酷似した表現型）を示す
- ②強い刺激に伴いスパインに Ca^{2+} 供給源である滑面小胞体（ER）が侵入する
- ③ SEPT3 とモータータンパク質 MyosinVa（MYO5A）の活性化を介し、スパインへ ER が侵入することで、スパイン内の Ca^{2+} 応答が増幅すること（Ageta-Ishihara et al., Cell Reports 2025）。

加えて、ER の移動が記憶固定化の基盤」という概念を活用した新たな創薬戦略を提案することを目的とし、化学的タンパク質二量体化法により ER 局在を操作する技術を構築し動作確認を行った。化学的タンパク質二量体化法の一つである PROTAC（標的タンパク質分解誘導化合物）を応用したタンパク質分解創薬が注目されており、E3 ユビキチンリガーゼと標的タンパク質とを結びつけることで、標的タンパク質の分解を引き起こす。

この作動原理を応用するため、Ubiquitin like 3 の過剰発現マウスを作出し、脳内の標的タンパク質群を網羅的に同定した (Ageta et al., Molecular Brain 2024)。また、標的タンパク質との細胞内での会合場所を同定するため、可視化システムを構築した (Terada et al., Biology Open 2024)。将来的には、これらの知見を総合し、老化に伴う認知機能低下の早期改善に貢献する。

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援をいただきました公益財団法人小柳財団に心より感謝申し上げます。

発表論文

- ・ Ageta-Ishihara N# (#共同責任著者), Fukazawa Y, Arima-Yoshida F, Okuno H, Ishii Y, Takao K, Konno K, Fujishima K, Ageta H, Hioki H, Tsuchida K, Sato Y, Kengaku M, Watanabe M, Watabe M-A, Manabe T, Miyakawa T, Inokuchi K, Bito H, Kinoshita M#. Septin 3 regulates memory and L-LTP-dependent extension of endoplasmic reticulum into spines Cell Reports,; 44 (3) : 115352, 2025.
- ・ Terada Y, Obara K, Yoshioka Y, Ochiya T, Bito H, Tsuchida K, Ageta H#, Ageta-Ishihara N# (#共同責任著者). Intracellular dynamics of ubiquitin-like 3 visualized using an inducible fluorescent timer expression system Biology Open, 13 (11) : bio060345, 2024.
- ・ Ageta H#, Nishioka T, Yamaguchi H, Tsuchida K#, Ageta-Ishihara N# (#共同責任著者). Comprehensive identification of ubiquitin-like 3 (UBL3) -interacting proteins in the mouse brain Molecular Brain, 17 (1) : 57, 2024.

研究テーマ

角質層弱酸性 pH 環境の維持に対する細胞間タイト結合分子と老化の影響

研究者

岐阜薬科大学 薬学部 生化学研究室 五十里 彰（イカリ アキラ）

①研究の背景及び目的の本文

皮膚は外界からの異物の侵入と体内成分の漏出を防ぐため、角質層バリアと顆粒層バリアの二重のバリアを形成する。角質層バリアは、天然保湿因子、ヒアルロン酸、コラーゲンなどの細胞外液成因子で形成されるのに対し、顆粒層バリアは細胞間タイト結合分子であるクローディン (CLDN) によって形成される。CLDN には 20 種類以上のサブタイプが存在し、顆粒層には主に CLDN1 と CLDN4 が発現する。CLDN1 はアトピー性皮膚炎との関連が指摘されているが、CLDN4 と皮膚疾患との関係は不明である。最近我々は、老化により CLDN4 の発現量が減少することを発見した (J. Cell. Biochem., 2025 年)。また、ヒトケラチノサイト由来 HaCaT 細胞において、老化促進剤である tenovin-1 を処理、または siRNA を用いて CLDN4 の発現をノックダウンしたところ、ナトリウム/プロトン交換体である NHE1 の発現量が減少した。NHE1 はナトリウムイオンを細胞内へ取り込み、プロトンを細胞外へ排出することにより、皮膚の pH 維持に関与すると考えられる。また、皮膚の pH は弱酸性に保たれ、外部からの刺激や細菌の増殖が抑制されている。そのため老化による NHE1 の発現低下は、高齢者の皮膚疾患に関与すると推察される。そこで、ケラチノサイトにおける NHE1 の発現調節機構と生理機能を検討した。

②研究方法

実験には、C57BL マウスおよびヒトケラチノサイト由来 HaCaT 細胞を実験に使用した。mRNA 発現はリアルタイム PCR 法で、タンパク質発現はウェスタンブロット法で、細胞局在は蛍光免疫染色法で測定した。細胞内 pH の測定には pH 感受性蛍光指示薬の pHRodo を、細胞外 pH の測定には LAQUAtwin を使用した。細胞間バリア機能を評価するため、volt ohm メーターを用いて上皮膜間電気抵抗値 (TER) を測定した。遺伝子発現を網羅的に調べるため、RNA-seq 解析を行った。

③研究成果

★ NHE1 発現に対する老化の影響

若齢マウスに比べ、老齢マウスの皮膚組織では、老化マーカー分子である p53 のアセチル化量が増加し、NHE1 の mRNA 量が減少した。また、老化促進剤である nutlin-3a を HaCaT 細胞に処理したところ、tenovin-1 と同様に NHE1 の発現量が減少した。Tenovin-1 は sirtuin-1 を阻害し、nutlin-3a は Mdm2 を阻害することにより p53 を活性化する。蛍光免疫染色法により p53 の細胞局在を調べたところ、tenovin-1 と nutlin-3a の処理により核内のアセチル化 p53 量が増加した。以上より、HaCaT 細胞において tenovin-1 と nutlin-3a は老化シグナルを活性化し、NHE1 の発現量を減少することが示唆された。また、tenovin-1 と nutlin-3a は NHE1 の転写活性を阻害したため、転写レベルで発現を阻害することが示唆された。

★細胞内外の pH に対する老化促進剤と NHE1 発現の影響

pHRodo を用いて細胞内の pH 変化を調べたところ、tenovin-1 処理により酸性側にシフトした。また、

細胞外溶液を回収し、pH メーターを用いて細胞外の pH 変化を調べたところ、tenovin-1 処理によりアルカリ側にシフトした。siRNA を用いて NHE1 発現をノックダウンしたところ、tenovin-1 と同様に細胞内外の pH が変化した。以上の結果から、NHE1 はケラチノサイトの pH 維持を担うことが示唆された。外部からの刺激や細菌の増殖を抑制するため、皮膚は弱酸性に維持される必要があるが、老化による NHE1 発現の低下により、pH バランスが異常になる可能性がある。

★ケラチノサイトの遺伝子発現に対する NHE1 の影響

ケラチノサイトの機能維持における NHE1 の役割を解明するため、RNA-seq 解析を行った。NHE1 のノックダウンにより、132 個の遺伝子発現が 2 倍以上増加し、184 個の遺伝子発現が 2 分の 1 以下に低下した。GO 解析により発現変化した遺伝子のグループを検索したところ、アニオントランスポーター、有機酸トランスポーター、細胞走化性に関連する遺伝子発現が多く変化していた。その中に、皮膚の構造維持やバリア維持に関わるケラチンが含まれていたため、ケラチンの発現に対する老化と NHE1 発現の影響を検討した。その結果、若齢マウスに比べ、老齢マウスの皮膚組織において、ケラチン -1 (KRT1) と KRT10 の発現量が減少した。同様に、HaCaT 細胞を tenovin-1 処理または NHE1 発現をノックダウンすることにより、KRT1 と KRT10 の発現量が減少した。以上の結果から、NHE1 は細胞内外の pH 調節だけでなく、ケラチン産生の調節にも関与することが示唆された。

★ヒト皮膚モデルにおける老化促進剤の影響

ヒト皮膚三次元モデルにおける老化促進剤の影響を解明するため、LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュエンジニアリング社) を使用した。Tenovin-1 で 24 時間処理したところ、TER が低下した。また、NHE1、KRT1、KRT10 の mRNA 量が減少し、細胞外 pH が塩基性側にシフトした。以上の結果から、ヒト皮膚三次元モデルにおいても、NHE1 は細胞外 pH の維持に関与しており、その機能が老化によって低下することが示唆された。

★まとめ

本研究において、老化により皮膚の NHE1 発現が低下することを見出した。さらに、NHE1 発現の低下により、細胞内外の pH が変化するだけでなく、皮膚の構造維持やバリア維持に関わるケラチンの発現も低下することを解明した。高齢者の皮膚バリアの維持において、NHE1 が新たな予防・治療標的になると考えられるため、機能的食品や治療薬の開発が期待される。

研究テーマ

病原菌においてヘム濃度を感知・調節するタンパク質ダイナミクスの解明

研究者

筑波大学 計算科学研究センター 原田 隆平 (ハラダ リュウヘイ)

【背景】

ヘム過剰は細胞毒となるため、ヘム濃度調節タンパク質が機能する。「アガラクチア菌」内に存在するタンパク質 (PefR) は、過剰なヘムと結合してヘム排出タンパク質の発現を誘導し、菌外へ排出する。ヘム排出機構に関して「ヘム非結合型」と「ヘム結合型」の実験構造が決定されているが、遷移プロセスは不明である。本研究では、ヘム結合に伴う PefR の遷移プロセス を計算科学的に抽出し、ヘム濃度調節ダイナミクスの解明を試みた。

【方法】

PefR-DNA 複合体にヘムが結合するシナリオは、MET1-ヘム、HIS114-ヘムについて片方ずつできる場合、両方同時に できる場合の 3 通り考えられる。本研究では、MET1-ヘムの結合が先にできるシナリオを検証した。はじめに、ヘムが結合した 複合体構造 (PDB id: 7DVV) をもとに分子動力学計算 (MD) を 10 ns ほど実行した。続けて、PefR-DNA 複合体のヘム結合 に対する応答をみるため、7 ns から 10 ns のトラジェクトリからスナップショットを抽出し、ヘムを MET1 に結合させて 5 つの複合体 を作成し、50 ns の MD を実行して計算結果を解析した。

【結果と考察】

MD の結果、10 ns を通してヘムなしの PefR は DNA に結合したままであった。結晶構造の主鎖に関する構造のブレ (RMSD) は MD を通して 1.4 Å 程度であることから、システム設定から生じる不安定さは無いと考えられ、本研究において作成した MD パラメータに問題は無い。また、PefR へのヘムの結合について、特定のモノマーの MET1 は立体障害のためにヘムを結合させることができなかったが、これは DNA 結合型の PefR ダイマーの非対称性に起因するものと考えられる。事実、結晶構造では ASN3 主鎖の N は MET1 と GLU2 を欠損しているモノマーではタンパク質側に、もう一方の MET1 のみを欠損しているモノマーでは 溶媒側に暴露されていた。その結果、片方のモノマーの MET1 主鎖の N にはヘムが結合できるだけの空間が存在していたが、もう一方のモノマーではタンパク質内部に埋まっており、ヘムを片方のモノマーにのみ結合させることができたものと考察される。よって現実でも、ダイマーの非対称性から片方のモノマーへ先にヘムが結合する可能性は大いに考えられる。

次に、50 ns の MD を通して解析してみると、片方のモノマーの MET1 にヘムを結合させた 50 ns X 5 トライアルにおいて PefR は DNA から解離することではなく、PefR と DAN の分子間相互作用は保たれたままであった。定量的には、PefR-DNA 複合体に関する結晶構造から測定した構造差 (RMSD) は 2 Å 程度で揺らいでおり、安定性を示した。このことから、MET1 にヘムが結合した のち、PefR が DNA から解離するまでの間には 50 ns よりも長い時間スケールのダイナミクスが存在する可能性があることがわかった。ここで、ヘムが結合する他のシナリオを考えた場合、短い時間スケールで PefR-DNA 解離を引き起こす可能性もある。ゆえに、今回考慮したヘムの結合パターンは 1 種類であるため、実際の DNA 解

離プロセスが誘起される時間スケールがどれくらいなのか、全てのヘム結合パターン、および MD のトライアル回数を増やして十分な統計量を考慮し、より定量的な議論を展開していく必要がある。

【展望】

今後は、HIS114 が結合する全てのシナリオを検証しつつ、MET1 にヘムが結合したのちに PefR から DNA が解離する 長時間ダイナミクスを抽出する。具体的には、申請者が独自に開発を進めている長時間ダイナミクス抽出法 (PaCS-MD: R Harada et al. J. Chem. Phys. 2013) を適用し、DNA 解離プロセスを抽出する。

DNA 解離プロセスをより定量的に解析するため、PaCS-MD から生成されるトラジェクトリを統合し、マルコフ状態モデルを構築することでヘム結合に伴う PefR の構造変化を記述する自由エネルギーを計算し、準安定状態や遷移状態を特定する。これにより、実験構造からは抽出できない PefR の機能に関する重要なダイナミクスを同定する。当初の研究計画では、PaCS-MD の適用まで進む予定であったが、金属タンパク質特有の MD パラメータの作成やヘムの結合パターンの検討に時間を要し、PaCS-MD の適用が遅れてしまった。しかしながら、MD パラメータの検証は完了して計算結果の妥当性も確認できたため、現在の計算結果をもとに速やかに PaCS-MD を実行してヘム結合に伴う PefR からの DNA 解離について長時間ダイナミクスを抽出かつ解析できる状態にある。最終的に、全ての計算結果をまとめ、論文投稿を目指す予定である。

研究テーマ

遺伝子治療を指向した光ノックダウン分子ツールの開発

研究者

東京科学大学 生命理工学院 湯浅 英哉（ユアサ ヒデア）

①研究の背景及び目的

我々は、標的タンパク質の RNA 配列に相補的なアンチセンスオリゴ核酸 (AO) に独自開発のニトロビフェニル増感剤 (NBP) を結合させた複合体 NBP-AO を用いて、光照射時のみ RNA ノックダウンが起こる方法を創出した。本法は、がん患者から白血球細胞を取り出し遺伝子操作をしてから再注入する ex vivo 治療において、標的細胞の免疫抑制物質の選択的ノックダウンが可能である。NBP はラジカル反応を起こさないように設計されており、標的以外の生体分子に傷害を及ぼすことがない。しかし、ニトロ誘導体特有の変異原性への疑義により医薬品開発展開が困難である。そこで本研究では、ニトロ基を持たずにラジカル非反応性増感能を示す第二世代の小さなアセトビフェニル増感剤 (ABP) の開発を行う。すなわち、増感機構別阻害剤を用いることで「一重項酸素 (1O2) 生成増感能/ラジカル性増感能」比を求め、これが大きいビフェニル誘導体の探索を行う。開発した ABP を AO と複合化した ABP-AO をがん細胞株に添加後光照射することで、標的タンパク質に対する選択的光ノックダウン効果を検証する。

②研究方法

NBP は、電荷移動 (CT) を伴う光吸収を起こすと 2 つのフェニル基が電子反発でねじれ、続いて電子のスピン軌道カップリング (SOC) による項間交差を起こすことで π ビラジカルの性質を持つ T1 が生じる。本研究では、ラジカル反応を起こさない増感機構として CT-SOC 機構を可能にするビフェニル構造を残しつつ、ニトロ基の替りにケト基を持つ化合物として第二世代アセトビフェニル増感剤 (1 ~ 4) の合成を行い (図 1)、光物性の測定を行った (表 1)。

図 2 に示した配列を持つ DNA と RNA を合成した。ここで U は ABP 誘導体 1 が導入されたモノヌクレオチドである。これらの ABP-AO 複合体 (2 μ M) とそれぞれの相補鎖で二量体を形成させた後、光照射 (365 nm, 30 mW/cm², 10 min) することにより相補鎖中のグアニン (G) の光酸化による G の消費と酸化グアニン (8-oxo-G) の生成を調査した (図 3)。その結果、DNA 相補鎖に関しては、NBP-AO (DNA 相補鎖) で観察されたのと同様に B 型らせん構造の表面を 1O2 が拡散するモデルで説明される周期性 (増感剤と G の間の塩基数 n=7 で反応率極大、n=9 で極小、n=15 で再極大) が観察された。いっぽう、RNA 相補鎖に関しては NBP-AO (RNA 相補鎖) でも観察されたように DNA で見られる

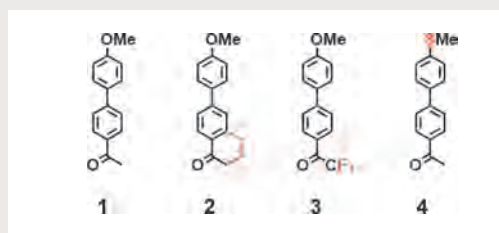


図 1 本研究で合成したアセトビフェニル誘導体

表 1 ビフェニル誘導体 (1 ~ 4) の光物性値

Compd	λ_{\max}^a /nm	ϵ^b /Lmol ⁻¹ cm ⁻¹	I_f^c /nm	ϕ_f^d	ϕ_D^e
1	300	18,300	390	< 0.01	0.55
2	305	23,200	383	< 0.01	0.49
3	332	18,700	481	0.58	0.06
4	312	26,800	443	0.03	0.54

- a. 最大吸収波長、b. λ_{\max} におけるモル吸光係数、
c. λ_{\max} で励起した時の最大蛍光波長、
d. 同蛍光量子収率、
e. λ_{\max} で励起した時の¹O₂生成量子収率 (CH₃CN中)



図2 本研究で合成したオリゴヌクレオチド

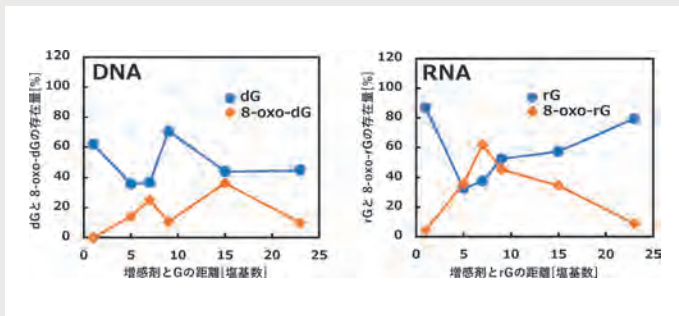


図3 ABP-AO を用いた相補鎖 DNA と RNA の G の酸化効率と増感剤からの距離

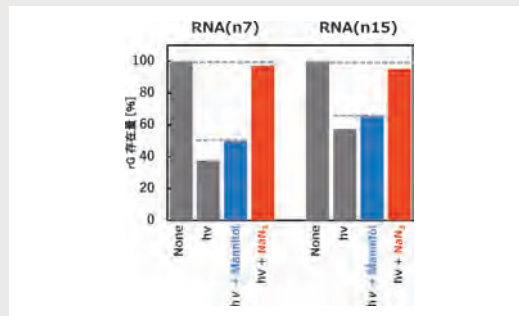


図4 ABP-AO(RNA)によるRNAの光酸化効率に対するHO・と1O2のスカベンジャーの影響

周期性は観察されなかった。これは、A 型らせん構造に特有の螺旋軸まわりの空間により中空のチューブが形成され 102 が螺旋構造の外側に拡散しにくくなるためと考えている。

次に、ABP-AO (RNA 相補鎖) を用いて光酸化機構の調査を行った。Type I 増感機構で生じるヒドロキシラジカル ($\text{HO}\cdot$) を死活化するマンニトール、Type II 増感機構で生じる 1O_2 を死活化する NaN_3 をそれぞれ光酸化反応系に添加することで反応率への影響を調べた (図 4)。その結果、増感剤と G の距離 ($n=7$ or 15) に関わらず NaN_3 は光酸化反応を 90% 以上阻害した。いっぽう、マンニトールでも 10% 程度の阻害が見られた。この結果は、ABP は光照射により主に 1O_2 を生成する Type II 機構により増感するが、ヒドロキシラジカルを生成する Type I 機構による増感も若干みられることを示す。現在、がん細胞株に添加後光照射することで、標的タンパク質に対する選択的光ノックダウン効果の検証を行っている。

③研究成果

論文

1. Diffusion of $^{1}O_2$ along the PNA backbone diminishes the efficiency of photooxidation of PNA/DNA duplexes by biphenyl photosensitizer, Y. Du, T. Kanamori, Y. Yaginuma, N. Yoshida, S. Kaneko, H. Yuasa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 114 (2024) 129988.

学会発表

1. 有機分子での励起三重項生成と応用(招待)、湯浅英哉、量子生命研ワークショップ、QST 量子生命研、2024 年 8 月 27 日
2. Development of a photoknockdown method using a small photosensitizer-conjugated antisense oligonucleotide, N. Yoshida, S. Kaneko, Y. Du, M. Ozawa, T. Kanamori, H. Yuasa, XXV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Tokyo University of Science Katsushika Campus, 2024 Sep 3-6.
3. Removing barriers in the photooxidation of DNA by biphenyl photosensitizer-PNA conjugates, Y. DU, T. Kanamori, N. Yoshida, S. Kaneko, Y. Yaginuma, H. Yuasa, XXV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Tokyo University of Science Katsushika Campus, 2024 Sep 3-6.

研究テーマ

歯垢の形成を抑える糖複合体の化学合成法の開発

研究者

岐阜大学 工学部 岡 夏央（オカ ナツヒサ）

①研究の背景及び目的

虫歯や歯周病は、現代においても多くの人が罹患しており、食生活や社会生活、ひいては全身の健康にまで悪影響を及ぼす国民病である。本研究では、虫歯の原因菌であるミュータンス菌 (*Streptococcus mutans*) が産生する酵素デキストランスクラーゼを阻害し、歯垢の元となる粘着性多糖デキストランの生成を抑制する天然物リボシトリン [1] の化学合成法の開発を目的とした。リボシトリンは、3つのリボースから成る三糖の還元末端に (S)-ホモクエン酸が連結した糖複合体であり、*Streptomyces neyagawaensis* というストレプトマイセス属細菌が産生する。その生産量は極めて少なく、現在でも入手が困難であることから、これまでに報告されている性質は、デキストランスクラーゼに対する阻害活性など限られたものにとどまり、詳細な研究はほとんど進んでいない。化学合成により十分量の純粋なリボシトリンを得ることが可能となれば、その作用機序の解明、類似する糖代謝酵素に対する阻害活性の評価、さらには毒性試験など、医薬品や食品添加物としての応用に向けた多角的な研究が可能になると期待される。しかしながら、リボシトリンはその構造の複雑さから、これまで化学合成法は報告されていない。そこで本研究では、当研究室で開発されたヨウ化糖を活性種とする α -リボフラノシドの合成法 [2] を応用し、この課題の克服を目指してリボシトリンの化学合成法の確立に取り組んだ。

②研究方法

リボシトリンの化学合成を困難なものとしている最大の要因は、3つのリボースとトリカルボン酸であるホモクエン酸が全て α -グリコシド結合で連結している点にある。このような α -グリコシド結合を完全な立体選択性で形成することは難しく、ほとんどの場合 β -グリコシド結合が副生するが、我々は、ヨウ化糖を活性種とすることで、このような α -グリコシド結合の形成が99%以上の α 選択性で進行することを見出した [2]。本研究では、この α 選択的リボフラノシル化反応を応用して、まずリボシトリンの三糖部位の化学合成法の開発に取り組んだ。2,3,5位ヒドロキシ基がベンジル基で保護されたヨウ化糖ユニット1(三糖の非還元末端糖となる)、3,5位がベンジル基、2位がトリメチルシリル基で保護されたヨウ化糖ユニット2(三糖の中心の糖となる)、2,5位がベンジル基、1位が別の条件で脱保護可能な保護基で保護された糖ユニット3(三糖の還元末端糖となる)を合成し、3+2のグリコシル化による二糖の合成、得られた二糖に対する1のグリコシル化を行うことで、目的とする三糖を合成する計画を立案した。加えて、三糖の還元末端の選択的脱保護、及びエステル基を有するアルコールとの α 選択的グリコシル化による連結反応について検討した。これらの脱保護及びグリコシル化は、三糖とトリカルボン酸(ホモクエン酸)の連結に必要不可欠である。

③研究成果

まず、三糖の非還元末端糖に当たるヨウ化糖ユニット1の合成を行った。リボースを塩化水素触媒存在下メタノールと反応させることで、メチルリボフラノシドを合成し、水素化ナトリウム、臭化ベンジルと順に反応させることで、メチル2,3,5-トリ-O-ベンジル-リボフラノシドを得た。これを塩酸-酢酸混合溶液で2,3,5-トリ-O-ベンジル-リボフラノースへと加水分解した後、1位をN,O-ビス(トリメチルシリル)

アセトアミドでトリメチルシリル化して、2,3,5-トリ-O-ベンジル-1-O-トリメチルシリルリボフラノースを得た。総収率は49%であった。このリボース誘導体はヨウ化糖ユニット1の前駆体であり、トリメチルシリルヨージドと反応させることで、ヨウ化糖ユニット1を発生させることができる。

次に、三糖の中心の糖となるヨウ化糖ユニット2の合成を行った。1,2,3,5-テトラ-O-アセチルリボフラノースとトリメチルアルミニウムを反応させることで、3,5-ジ-O-アセチル-1,2-O-イソプロピリデンリボフラノースを得た。3,5位をナトリウムメトキシドで脱アセチル化し、ヨウ化糖ユニット1の合成の様にベンジル基で保護することで、3,5-ジ-O-ベンジル-1,2-O-イソプロピリデンリボフラノースを得た。最後に、希硫酸-ジオキサンで脱アセタール化し、1,2位をトリメチルシリル化することで、3,5-ジ-O-ベンジル-1,2-ビス-O-トリメチルシリルリボフラノースを得た。総収率は57%であった。この化合物はヨウ化糖ユニット2の前駆体であり、トリメチルシリルヨージドとの反応でヨウ化糖ユニット2へと変換される。最後に、三糖の還元末端糖に当たるリボースユニット3の合成を行った。還元末端の保護基にはアリル基を採用した。1-O-アセチル-2,3,5-トリ-O-ベンゾイルリボフラノースに対し、アリルアルコール、三フッ化ホウ素-エーテル錯体を反応させることで、1位にアリルオキシ基を導入し、ナトリウムメトキシドでベンゾイル基を除去した後、3,5位をジ-*t*-ブチルシリレン基、2位をベンジル基で保護した。フッ化物イオンでジ-*t*-ブチルシリレン基を除去した後、5位選択的ベンジル化を行うことで、リボースユニット3であるアリル 2,5-ジ-O-ベンジルリボフラノースを得た。総収率は35%であった。

以上の様に、三種類のリボースユニットの合成に成功したので、 α 選択的リボフラノシル化反応による連結を試みた。3,5-ジ-O-ベンジル-1,2-ビス-O-トリメチルシリルリボフラノースをトリメチルシリルヨージドと反応させてヨウ化糖ユニット2へと変換し、糖ユニット3と反応させた。生成した二糖の未反応のトリメチルシリル基をフッ化物イオンで除去した後、精製することで、中間体である二糖が収率80%で得られていることを確認した。得られた二糖に対し、2,3,5-トリ-O-ベンジル-1-O-トリメチルシリルリボフラノースから調製したヨウ化糖ユニット1を反応させたところ、三糖が収率74%で得られた。三糖の合成過程で用いた α 選択的リボフラノシル化反応では、目的の α 体が完全な立体選択性で得られており、これはヨウ化糖を用いる糖連結反応の利点と言える。得られた三糖の還元末端のアリル基をDIBALで除去し、還元末端をアセチル基で保護することで、リボシトリン合成に用いる三糖ユニットが得られた。また、全てのベンジル基をパラジウム触媒を用いる水素添加で除去し、遊離のヒドロキシ基をアセチル化した後、 ^1H NMR スペクトルなどで構造決定した。得られたデータは、天然物由来のアセチル化三糖のもの[3]と完全に一致し、分子構造が確認できた。

最後に、エステル基を有するアルコールの α 選択的グリコシル化について検討した。トリカルボン酸であるホモクエン酸のモデル化合物として、モノカルボン酸であるグリコール酸を選択し、そのメチルエステルに対するリボフラノシル化について検討した。まず、一般的な1-フェニルチオリボフラノシドを用いたリボフラノシル化を検討したところ、 $\alpha:\beta$ 選択性は最大で60:40であった。これに対し、ヨウ化糖ユニット1を用いたところ、 $\alpha:\beta$ 選択性が89:11まで向上した。この様に、ヨウ化糖がエステル基をもつアルコールのリボフラノシル化においても有効であり、立体選択性を劇的に向上させることを見出した。

以上の様に、本研究では、リボシトリン三糖の高収率・高立体選択的な合成法を初めて確立できた。各ユニット同士の連結反応でヨウ化糖を用いることで、副生成物となる立体異性体の生成がほぼ完全に抑制できたことが合成達成の一つの鍵であったと言える。

〈謝辞〉

本研究の推進を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。

〈参考文献〉

- [1] Ohnuki, T. et al. *Tetrahedron Lett.*, 22, 1267 (1981).
- [2] Oka, N. et al. *J. Org. Chem.*, 79, 7656 (2014).
- [3] Pospíšil, S. et al. *J. Nat. Prod.*, 70, 768 (2007).

研究テーマ

肥満治療の新規標的としての褐色脂肪細胞の新規 H^+ チャネルの生理的役割の解明

研究者 北海道大学 大学院獣医学研究院 基礎獣医科学分野 生理学教室 山口 聡一郎（ヤマグチ ソウイチロウ）

①研究の背景及び目的

近年、新たな H^+ チャネル（形質膜で H^+ を選択的に通す膜タンパク質）として Otopetrin1 (OTOP1) が同定された。OTOP1 は味細胞で酸味を受容する。Otop1 の mRNA は、データベースや自分の実験結果によると、褐色脂肪にも高発現することが分かった。

褐色脂肪は脂質を貯蔵する白色脂肪と異なり、ミトコンドリアに発現する uncoupling protein 1 (UCP1) の働きにより、脂質を燃焼させて熱を産生するため、肥満の予防と解消に重要な役割を果たす。これまで褐色脂肪細胞では、OTOP1 どころか H^+ チャネルの発現すら知られていなかった。

そこで本研究では、OTOP1 という H^+ チャネルが mRNA だけでなく、褐色脂肪細胞において機能的に発現することを明らかにすることを第一の目的とした。続いて、OTOP1 が褐色脂肪細胞の熱産生能に与える影響を調べ、OTOP1 が褐色脂肪細胞に高発現する生理学的意義を明らかにすることを第二の目的とした。さらに、OTOP1 機能を修飾する因子を探る過程において、OTOP1 を培養細胞に強制発現させてウェスタンブロット法で検出した際にバンドが二本に見られたことから、翻訳後修飾によるとの仮説のもと二本となる原因を調べた。

②研究方法

分化させた初代培養褐色脂肪細胞を作製するため、野生型マウスあるいは Otop1 欠損マウスから stromal vascular fraction (SVF) の細胞をコラゲナーゼ処理により、分離し、採取した。培養して増殖させたのち、インスリン、IBMX、デキサメサゾン、甲状腺ホルモンなどの処置により、褐色脂肪細胞に分化させた。

得られた初代培養細胞は H^+ 電流を測定できるパッチクランプ法に使用した。パッチクランプ法では多くの実験でピペット内液として、200 mM HEPES, 93 mM CsOH, 10 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, pH=7.3 の溶液を用いた。逆転電位の測定では、pH バッファーとして HEPES の代わりに MES を用いて、pH を 5.5 に調整した溶液を用いた。細胞外液は、NMDG-Glutamate を基本とし、酸の濃度に応じて、バッファーとして、HEPES, MES, Citric acid を使い分けて pH を調整した。

生体における OTOP1 の有無による影響を調べるため、同腹の雄あるいは雌の野生型マウスと Otop1 欠損マウスを同じケージ内で飼育し、5 週齢から 20 週齢までの体重変化を測定した。20 週齢到達後に安楽死処置を行い、褐色脂肪、鼠径部周囲白色脂肪、鼠径部白色脂肪の重量も測定した。

OTOP1 のウェスタンブロットでの解析は OTOP1 を強制発現させた HEK293T 細胞からタンパク質を抽出して標本とした。OTOP1 をコードする発現ベクターを、トランスフェクションである TransiT-293 を用いてトランスフェクションし、30 時間後に 1% Triton X-100 を含むバッファーを用いて、細胞を溶解した。溶解液を遠心し、その上清を、Urea を主成分とするサンプルバッファーと混ぜて、37°C 10 分加温したものをアクリルアミドゲルにロードした。SDS-PAGE ののち、PVDF 膜に転写し、抗 OTOP1 抗体でメンブレン上の OTOP1 を検出した。

③研究成果

これまでの研究で、RT-PCR により、褐色脂肪および初代培養褐色脂肪細胞に Otop1 が発現していることは明らかにできていた。そこで、OTOP1 が機能的に褐色脂肪細胞に発現していることを明確にするために、初代培養褐色脂肪細胞にパッチクランプ法を適用し、 H^+ 電流の測定を行った。

細胞外液の pH を 7.4 から 5.0 に変化させると nA レベルの大きな内向き電流が測定された。この電流は既知の OTOP1 阻害薬である亜鉛イオンにより有意に抑制された。また、我々が OTOP1 阻害薬として見出し報告した Cibacron Blue 3G-A によっても抑制された。さらにこの内向き電流が H^+ 電流であることを明確にするために逆転電位の測定を行った。pH を 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 に変化させた時の逆転電位の変化量はネルンストの式から計算される H^+ 選択性にほぼ一致した。この結果より、この内向き電流が H^+ 電流であることが示された。さらに、この内向き電流は Otop1 欠損マウスから取得した初代培養褐色脂肪細胞では、pH が 5.0 あるいは 4.5 の際に、完全にあるいはほとんど測定されなかった。阻害薬の薬理学的特性に加えて、Otop1 の欠損により電流が消失したことから、野生型マウスの初代培養褐色脂肪細胞で見られた H^+ 電流が OTOP1 によって担われていることが明らかとなった。これは褐色脂肪細胞で OTOP1 が機能的に発現していることを示唆している。これらの結果を論文としてまとめて投稿しようとしているところである。

一方で、生体での体重変化測定は、雌雄ともに野生型マウスと Otop1 欠損マウスとで有意な差はなかった。褐色脂肪や白色脂肪の重量に関しても差はなかった。さらに、分離褐色脂肪細胞を用いた酸素消費量測定においても、ノルアドレナリンで刺激される酸素消費量に、雌雄ともに野生型マウスと Otop1 欠損マウスとで有意な差はなかった。これらの結果から、OTOP1 の有無によって、少なくとも正常な状況では褐色脂肪細胞の機能に大きな変化は生じないことが明らかとなった。今後は例えば OTOP1 が活性化される酸性条件になった際などの褐色脂肪細胞機能など、OTOP1 の病態生理に対する関与を調べていく予定である。

強制発現させた OTOP1 のウェスタンブロットのバンドが二本で現れることについては、翻訳後修飾が行われている可能性を考えた。翻訳後修飾の 1 つである糖鎖付加は、多くのイオンチャネルを調節することが知られている。そこで、OTOP1 が糖鎖付加されているかどうか、また、糖鎖付加が OTOP1 の機能にどのように影響するかを調べた。薬理学的および酵素学的検査 (N 型糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシンおよび PNGaseF) により、過剰発現したマウス OTOP1 は N 型糖鎖付加されていることが明らかとなった。すなわち、その糖鎖付加により、二本のバンドになっていたことが明らかとなった。さらに、糖鎖は Endo H 感受性であったため、高マンノース型である可能性が高いことも明らかとなった。部位特異的変異誘発法によって、第 5 膜貫通領域と第 6 膜貫通領域 (L5-6) の間の第 3 細胞外ループにある 2 つのアスパラギン残基 (N238 と N251) の両方が糖鎖付加部位であることも明らかにできた。アスパラギン残基の変異またはツニカマイシン処理による糖鎖付加の防止は、OTOP1 電流密度を減少させた。細胞表面ビオチン化アッセイの結果、糖鎖付加の防止は細胞膜での OTOP1 の表面発現を減少させることが示された。これらの結果から、マウス OTOP1 は N238 と N251 で N 型糖鎖付加されており、糖鎖付加は OTOP1 の形質膜上での発現を促進することが明らかとなった。これらの結果を論文としてまとめて、Journal of Cellular Physiology 誌に発表した。

(J Cell Physiol, 2024 Sep; 239 (9) : e31403. doi: 10.1002/jcp.31403.)

研究テーマ

非膜構造体を体系的に同定し疾患との関連を探る

研究者

産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 小林 慎（コバヤシ シン）

背景・目的

細胞内には、核やミトコンドリアのように「膜」を持つオルガネラに加えて、膜を持たず相分離によって液滴状の構造を形成する「非膜構造体」も存在する。例えば、リボソームの合成に関与する核小体はその一例である。こうした非膜構造体は細胞内で様々な生理機能を担っており、近年では、特定の非膜構造体の形成異常が、筋萎縮性側索硬化症（ALS）やアルツハイマー病（AD）などの神経変性疾患に深く関与することが明らかになりつつある。しかしながら、非膜構造体の全体像は未だ十分に解明されておらず、疾患との関係についても限定的な知見にとどまっている。その主な要因としては、構成タンパク質の配列保存性の低さや、膜を持たないため構造体を物理的に分離・解析することが困難である点が挙げられる。本研究では、こうした技術的課題を、独自の材料と解析系を用いることで克服し、非膜構造体の体系的同定を実現することで、その生物学的意義および疾患との関連性の解明に向けた基盤を構築することを目的とした。

方法

非膜構造体の主な構成要素として知られる RNA 結合タンパク質（RBP）の中から、液滴様構造を形成するものに着目した。まず、産業技術総合研究所が独自に開発した cDNA クローン局在データベース（約 6000 遺伝子）を活用し、液滴様の局在を示す RBP を 90 遺伝子選定した。これらの RBP にビオチンリガーゼを融合し、近接するタンパク質を生細胞内でビオチン化標識することで、細胞を破壊せずに相互作用因子を網羅的に検出できる BIO-ID 法を適用した。これにより、非膜構造体の網羅的な同定に世界で初めて成功した。得られた質量分析データをもとにヒートマップを作成し、代表的な 12 個の候補タンパク質を抽出した。これらについて免疫染色により細胞内局在を解析した結果、全てが核内に局在し、液滴様の局在パターンを示すことを確認した。これらの結果から、本手法が高い精度で非膜構造体の構成要素を同定し得る有効なアプローチであることを示した。

研究成果

BIO-ID 法を用いた 90 個の RBP に関する質量分析を通じて、非膜構造体の体系的同定に向けた基礎データを確立した。さらに、得られたデータにクラスタリング解析を適用することで、非膜構造体を構成するタンパク質複合体の分類、機能予測、および細胞内局在に関する情報を導出する道筋を明確にした。本研究により、非膜構造体を網羅的に捉えるための新たな解析プラットフォームの有効性が実証され、その結果、疾患関連因子との関係を明らかにするための基盤が整備できたと考える。これらの成果は、今後の非膜構造体研究および神経変性疾患の分子病態解明に向けた研究展開に貢献するものと考えられる。

研究テーマ

ビタミン D 誘導体の神経疾患適応とその作用メカニズムの解明

研究者

CBI 研究機構 量子構造生命科学研究所 近藤 史郎 (コンドウ シロウ)

1. 研究の背景と目標

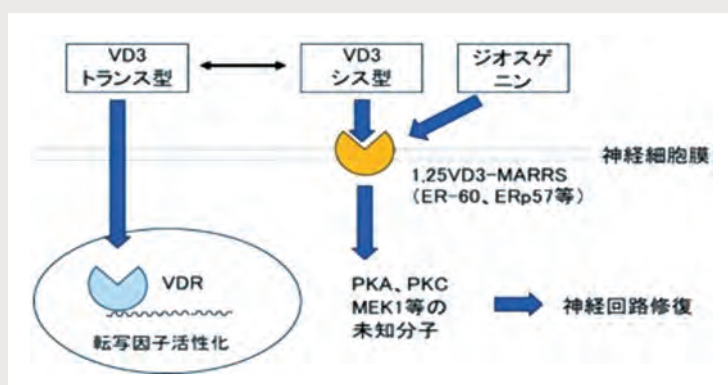
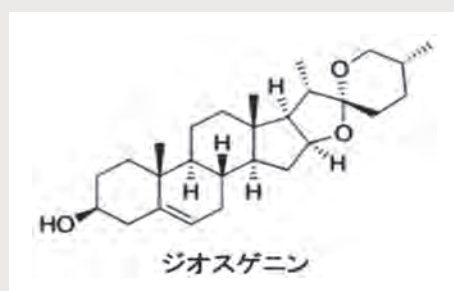
ビタミン D は古くからカルシウム (Ca) 代謝や骨形成の主要調節因子として知られており、活性代謝物やその類縁体は骨粗しょう症の治療薬などに使われている。天然のビタミン D は肝臓と腎臓で水酸化され活性型ビタミン D である 1,25-(OH)₂ ビタミン D₃ (VD3、カルシトリオール) に変わる。1980 年代にこの VD3 が細胞分化誘導作用を有することが報告されて以来、Ca 代謝だけでなく、様々な生理作用に関わることが明らかになった。また、ビタミン D が核内受容体スーパーファミリーのメンバーであるビタミン D 受容体 (VDR) に結合することが解明されたことから、作用メカニズムの解明が急速に発展し、結合することにより起こる VDR の構造変化が、種々の転写共役因子の作用に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

一方、神経疾患であるアルツハイマー病 (AD) は認知症の最も一般的な形態で、脳内にアミロイド斑やタウタンパク質凝集物 (神経原線維変化として知られる) が蓄積することが特徴である。いくつかの大規模コホート研究では、認知能力の障害が食事からのビタミン D 摂取や血清中のカルシトリオール濃度の低下と関連することなどが報告されている。

申請者の共同研究者である富山大学の東田らは、生薬の成分であるジオスゲニンという化合物が AD モデルマウスで記憶障害の改善や健常人の認知機能の改善作用を有することを報告している。さらにこのジオスゲニンが神経細胞の膜受容体である MARRS (1,25VD3-membrane associated, rapid response steroid-binding) に結合し、神経軸索の伸展に関わることを明らかにしている。MARRS は ER-60, ERp57 などとも呼ばれ、小胞体内のシャペロン蛋白質としての機能も知られており、a'-a''-b'-b'' のサブユニットから構成されている。天然型 VD3 は、この MARRS の a' domain に強く結合することが ITC を用いた結合実験で示唆されている。

ジオスゲニンと構造が類似しているシス型で結合を直接確認できれば、軸索伸張にかかわる VD3 誘導体を合成的にデザインできると考えている。

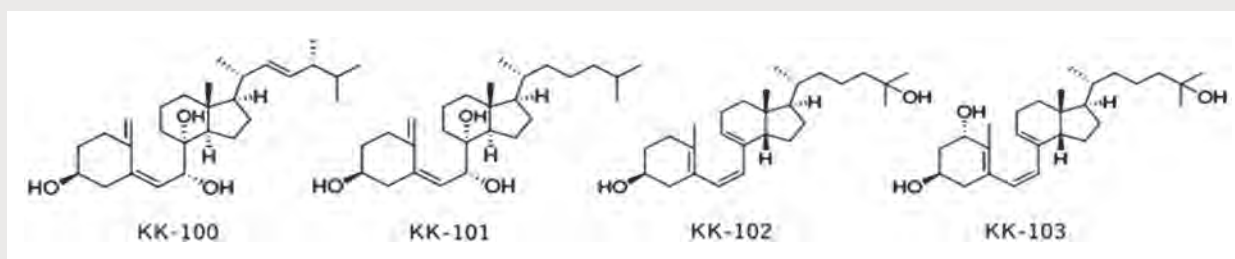
同じく申請者の共同研究者である帝京大学の橘高らはすでに種々の VD3 誘導体を合成しその生理活性



を探索しているが、その中に VDR に強い親和性を持ちながら Ca 上昇作用が少ない化合物や、シス型構造を取り易い化合物を所有していることから、これらの化合物を足掛かりにノンジェノミックに MARRS を経由し神経変性疾患に働く新しい VD3 誘導体の開発を試みることにした。

2. 研究結果と今後の展開

まず、橘高らによって合成された VD3 誘導体 4 化合物を、東田らが有する $A\beta$ 惹起による primary の corticalneuron 死を防御する評価系、及び同様に $A\beta$ で惹起した軸索萎縮、樹状突起萎縮を抑制する評価系の両方でジオスゲニンを経験として評価を実施した。KK-102, KK-103 にジオスゲニンに比較して弱いながらも薬効が確認された。両化合物は VD3 に比べて比較的シス型構造を取りやすいことが NMR 等の機器分析で明らかになっていることから、シス型 VD3 誘導体が軸索伸展を促進する可能性が示唆された。



今後さらに、シス型構造を取りうる VD3 誘導体を立案・合成するとともに、MARRS 受容体 (ER-60, ERp57 等) とジオスゲニンの結合部位の推定、及び BBB 通過の可能性等を見極めることにより高活性な VD3 誘導体の神経変性疾患対応をめざしていく。

研究テーマ

ミトコンドリア代謝経路を標的とした高リスク白血病の抗がん剤耐性克服療法の創成

研究者

横浜市立大学医学部 血液・免疫・感染症内科 國本 博義（クニモト ヒロヨシ）

①研究の背景及び目的

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) は難治性血液腫瘍であり、白血病細胞が有する染色体遺伝子異常が強力な予後因子である。網羅的遺伝子発現と臨床データを統合した解析の結果、小児・成人 AML の約 30% にみられる *PRDM16* 遺伝子の高発現例では低発現例に比べて、初回抗がん剤治療に対する奏功が不良で予後も悪いことが明らかにされた。しかし *PRDM16* 高発現 AML が抗がん剤耐性を獲得する詳細な分子基盤は不明である。申請者はその分子基盤を明らかにするため白血病特異的融合遺伝子 *MLL::AF9* で形質転換させたマウス白血病細胞にコントロール又は *Prdm16* 発現ベクターを導入し、*MLL::AF9* コントロール白血病細胞 (MA9 コントロール) 及び *MLL-AP9/Prdm16* 高発現細胞 (MA9/*Prdm16*) を作製し、初回抗がん剤治療薬シタラビンの半数阻害濃度 (IC50) を測定したところ、MA9/*Prdm16* 細胞はシタラビンの IC50 が有意に高く、シタラビンに対する抗がん剤耐性を有することが示唆された。更に MA9 コントロールと MA9/*Prdm16* 細胞から RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現変動・エンリッチメント解析を行ったところ、MA9/*Prdm16* 細胞においてがん遺伝子 *Myc* の発現上昇とともに、*Myc* シグネチャー及びミトコンドリアの酸化リン酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) シグネチャーの有意かつ強力な集積がみられることを見出した。以上から申請者は、白血病細胞において *Prdm16* 高発現が *Myc* 経路を介したミトコンドリア好気性代謝の活性化を通じて抗がん剤シタラビンへの耐性を誘導するのではないかという仮説モデルを考えるに至った。またその場合、ミトコンドリア好気性代謝経路は *Prdm16* 高発現白血病におけるシタラビン耐性に対する有望な治療標的になり得ると考えられる。本研究では、*Prdm16* 高発現が *Myc*/ミトコンドリア OXPHOS 経路を活性化してシタラビンの抗がん剤耐性を引き起こすのか、またこの経路を薬理的に阻害することでシタラビンに対する感受性を回復させ得るのかを明らかにすることを目的として、研究を行なった。

②研究方法

(1) MA9/*Prdm16* マウス白血病モデルを用いた解析

本研究ではまず *Prdm16* 高発現によりミトコンドリア OXPHOS が増強されるのかを明らかにするため、MA9 コントロールと MA9/*Prdm16* 細胞を用いてフラックスアナライザーによるミトコンドリア酸素消費速度の解析を行なった。次に *Prdm16* 高発現による OXPHOS の活性化の背景に α KG 以降の TCA 回路反応の促進があるのかを明らかにするため、MA9 コントロール細胞と MA9/*Prdm16* 細胞の代謝産物を含む細胞抽出液をもとにメタボローム解析を実施した。また *Prdm16* 高発現白血病における OXPHOS 並びに α ケトグルタル酸 (α -ketoglutarate, α KC) 以降の TCA 回路反応促進の基盤として、*Myc* による *Slc1a5* の誘導と細胞内グルタミン取り込み亢進が関与しているのかを明らかにするため、MA9 コントロールと MA9/*Prdm16* 細胞から RNA とタンパク質を抽出し、*Myc* 及び *Slc1a5* の mRNA、タンパク質発現量を各々定量 PCR 並びにウェスタンブロット法で検証した。更に *Myc*-*Slc1a5* 経路を介したグルタミン及びグルタミン酸の細胞内への取り込みが MA9 コントロールに比べて MA9/*Prdm16* 細胞で亢進しているのかを

明らかにするため、MA9 コントロールと MA9/Prdm16 細胞を用いて Glutamine/Glutamate Glo Assay を実施した。ミトコンドリア OXPHOS の活性化が Prdm16 高発現白血病のシタラビン耐性を誘導しているのかを明らかにするため、MA9 コントロールと MA9/Prdm16 細胞をシタラビン単独又はシタラビンとミトコンドリア代謝阻剤(電子伝達系複合体 I 阻害剤であるメトホルミン又はミトコンドリアタンパク質合成阻害剤であるチゲサイクリン)存在下で培養し、細胞生存解析を行なった。また Prdm16 高発現白血病が生体内でシタラビン耐性を示すのかを明らかにするため、MA9 コントロール細胞又は MA9/Prdm16 細胞を放射線照射後のレシピエントマウスに移植して Prdm16 低発現及び高発現白血病モデルマウスを作製し、これらのマウスをシタラビンで治療してシタラビンによる生存期間延長効果を検証した。

(2) ヒト PRDM16 高発現白血病による解析

ヒト AML においても PRDM16 高発現がシタラビン耐性を誘導するのかを明らかにするため、レトロウィルスベクターを駆使して PRDM16 を高発現するヒト白血病細胞株 THP-1、MOLM13 を作製し、シタラビン存在下で培養後に細胞生存解析を行う。更にヒト AML 患者においても PRDM16 高発現と MYC/OXPHOS 経路の活性化との相関がみられるのかを明らかにするため、日本小児白血病研究グループ AML-05 臨床試験に参加登録した 139 例の小児 AML 患者検体の RNA シーケンス解析結果をもとにエンリッチメント解析を実施した。

③研究成果

(1) MA9/Prdm16 マウス白血病細胞ではミトコンドリア好気性代謝が亢進している

Prdm16 高発現によりミトコンドリア OXPHOS が増強されるのかを明らかにするため、MA9 コントロールと MA9/Prdm16 細胞を用いてフラックスアナライザーによるミトコンドリア酸素消費速度の解析を行なった結果、MA9 コントロールに比べて MA9/Prdm16 細胞ではミトコンドリアの基礎及び最大酸素消費量 (oxygen consumption rate, OCR) が有意に増加していることを見出した。

(2) Prdm16 高発現白血病細胞では TCA 回路反応の促進を認める

Prdm16 高発現による OXPHOS の活性化の背景に α KG 以降の TCA 回路反応の促進があるのかを明らかにするため、シタラビン存在下で培養後の MA9 コントロール細胞と MA9/Prdm16 細胞の代謝産物を含む細胞抽出液をもとにメタボローム解析を実施した。その結果、MA9 コントロールに比べて MA9/Prdm16 細胞ではミトコンドリア TCA 回路における α KG 以降の中間代謝産物であるコハク酸(succinate)、フマル酸(fumarate)、マレイン酸(malate)が増加していることを確認した。

(3) Prdm16 高発現白血病では Myc-Slc1a5 経路を介したグルタミン・グルタミン酸の細胞内取込が亢進している

AML において Myc は、TCA 回路の α KG の原料であるグルタミンを細胞内に取り込むトランスポーターをコードする Slc1a5 の遺伝子発現を直接誘導することが報告されている。Prdm16 高発現白血病における OXPHOS 並びに α KG 以降の TCA 回路反応促進の基盤として、Myc による Slc1a5 の誘導と細胞内グルタミン取り込み亢進が関与しているのかを明らかにするため、MA9 コントロールと MA9/Prdm16 細胞から RNA とタンパク質を抽出し、Myc 及び Slc1a5 の mRNA、タンパク質発現量を各々定量 PCR 並びにウェスタンブロット法で検証した。その結果、MA9 コントロールに比べて MA9/Prdm16 細胞では Myc 及び Slc1a5 とともに mRNA 発現量とタンパク質発現量ともに有意に増加していることを確認した。更に Myc-Slc1a5 経路を介したグルタミン及びグルタミン酸の細胞内への取り込みが MA9 コントロールに比べて MA9/Prdm16 細胞で亢進しているのかを明らかにするため、MA9 コントロールと MA9/Prdm16 細胞を用いて Glutamine/Glutamate Glo Assay を実施したところ、MA9 コントロールに比べて MA9/Prdm16 細胞では予想通りグルタミン及びグルタミン酸の細胞内への取り込みが有意に増加していた。

(4) ミトコンドリア好気性代謝の活性化が Prdm16 高発現白血病のシタラビン耐性を直接誘導している

ミトコンドリア OXPHOS の活性化が Prdm16 高発現白血病のシタラビン耐性を誘導しているのかを明らかにするため、MA9 コントロールと MA9/Prdm16 細胞をシタラビン単独又はシタラビンとミトコンドリア代謝阻害剤（電子伝達系複合体 I 阻害剤であるメトホルミン又はミトコンドリアタンパク質合成阻害剤であるチゲサイクリン）存在下培養し、細胞生存解析を行なった。その結果、シタラビンにメトホルミンまたはチゲサイクリン併用存在下での培養で、MA9 コントロールと MA9/Prdm16 細胞の間でシタラビンに対する半数阻害濃度 (IC50) の差が消失することを確認した。

(5) Prdm16 高発現白血病は生体内でもシタラビン耐性を示す

Prdm16 高発現白血病が生体内でシタラビン耐性を示すのかを明らかにするため、MA9 コントロール細胞又は MA9/Prdm16 細胞を放射線照射後のレシピエントマウスに移植して Prdm16 低発現及び高発現白血病モデルマウスを作製し、これらのマウスにシタラビンを 5 日間腹腔内投与してシタラビンによる生存期間延長効果を検証した。その結果、MA9 コントロール細胞のレシピエントマウスではシタラビンによる生存期間の有意な延長を認めたのに対して、MA9/Prdm16 細胞のレシピエントマウスではシタラビンによる生存期間延長効果が消失することを確認した。

(6) ヒト AML 細胞株においても PRDM16 高発現がシタラビン耐性を誘導する

ヒト AML においても PRDM16 高発現がシタラビン耐性を誘導するのかを明らかにするため、レトロウィルスベクターを駆使して PRDM16 を高発現するヒト白血病細胞株 THP-1、MOLM13 を作製し、シタラビン存在下で培養後に細胞生存解析を行なった。その結果、コントロールの細胞に比べて PRDM16 高発現細胞では THP-1、MOLM13 いずれもシタラビンに対する IC50 が有意に上昇することを確認した。

(7) ヒト AML 患者においても PRDM16 高発現は MYC/OXPHOS 経路の活性化と相関する

ヒト AML 患者においても PRDM16 高発現と MYC/OXPHOS 経路の活性化との相関がみられるのかを明らかにするため、日本小児白血病研究グループ AML-05 臨床試験に参加登録した 139 例の小児 AML 患者検体の RNA シーケンス解析結果をもとにエンリッチメント解析を実施した。その結果、100 例の PRDM16 低発現例に比べて 39 例の PRDM16 高発現例では OXPHOS 並びに MYC シグネチャーの有意な蓄積を認めた。

本研究は臨床的に予後不良な PRDM16 高発現 AML の抗がん剤耐性機構がミトコンドリア好気性代謝の活性化を基盤として引き起こされていること、ミトコンドリア好気性代謝阻害が抗がん剤シタラビン耐性の克服を目指す上で有望な治療標的になりうることを明らかにした。

これまでに本研究課題の成果を日本血液学会学術集会、米国血液学会で発表した。

現在、海外学術誌に研究成果を投稿中である。

研究テーマ

加齢に従って減少するコラーゲンの編み手細胞の解明と細胞補充によるアンチエイジング

研究者

岡山大学 異分野融合先端研究コア 佐藤 伸（サトウ アキラ）

本研究の目的は、皮膚の構造形成と加齢変化の分子細胞メカニズムを解明することである。皮膚は加齢により弾力や構造が変化し、しわやたるみ、硬化などが生じることが知られているが、その根底にある細胞・線維レベルの実態は未解明な点が多い。特に、真皮における主構成要素であるⅠ型コラーゲンの形成過程や、加齢に伴う線維構造の変化に関しては、哺乳類皮膚の不透明性のため観察が困難であった。本研究では、皮膚が透明であるという特性をもつ両生類モデル・アホロートルを用いることで、発生初期から加齢期に至る皮膚の構造形成過程および加齢による構造変化を詳細に可視化・解析することを目指した。

皮膚は大きく表皮と真皮から構成され、真皮はさらに多層構造をとるが、その成り立ちや発達過程、さらにはその各層における細胞の寄与の全容は不明な点が多い。また、近年の再生医療や美容医療の発展に伴い、皮膚老化の抑制や真皮再構築への関心が高まっているが、加齢によって変質した真皮構造が元に戻らない理由や、どの細胞がその修復に寄与しうるかといった根本的な問いに対する答えは未だ得られていない。従って、本研究では、真皮コラーゲンの形成機構の全体像を捉えること、および加齢に伴う構造変化の実態を明らかにすることを通じて、皮膚老化の理解とその介入法の開発に資する基盤情報を提供することを目的とした。

本研究は、大きく2つの軸から構成された。第一に、「真皮構造の発生と成熟の過程」に関しては、体長5-12 cmのアホロートル皮膚を対象とし、蛍光プローブ (DAF-FM および DAR-4M) やコラーゲンプロモーター駆動の蛍光レポーターを用いてⅠ型およびⅢ型コラーゲンの産生・分布を可視化した。また、*in situ* hybridization や免疫染色法を併用し、コラーゲン産生細胞の同定を行った。さらに、バルスチェイス実験や顕微鏡観察を用いて、ケラチノサイトと線維芽細胞の寄与の時系列的変遷を追跡した。第二に、「加齢による真皮構造の変化」に関しては、体長8-22 cmのアホロートル皮膚を用いて組織学的および定量的解析を行った。Picro-Sirius Red 染色、SHG (Second Harmonic Generation) 顕微鏡、Hoechst 核染色、電気穿孔法による細胞形態標識などを用い、真皮各層 (stratum baladachinum, spongiosum, compactum) の厚み、細胞密度、フィロポディア構造、線維網の配列秩序性を評価した。特に、線維の配向性と格子構造の乱れをFFT (Fast Fourier Transform) 解析およびニューラルネットワークによる画像分類手法により定量化し、加齢に伴う定性的定量的変化を多角的に検討した。

まず皮膚発生過程の解析では、これまで真皮コラーゲンは主に線維芽細胞由来とされてきた常識に反し、皮膚形成の初期段階では表皮の基底層ケラチノサイトが主たるⅠ型コラーゲン産生細胞であることが明らかとなった。体長5 cmのアホロートルでは、真皮の格子状コラーゲン構造 (*stratum conjunctum*) 形成において、線維芽細胞がほとんど存在しないにもかかわらず、格子状構造が形成されていた。*in situ* hybridization により、Col1a1 の mRNA が表皮細胞に豊富に存在すること、免疫電子顕微鏡によりプロコラーゲンが基底膜を貫通して真皮側へと分泌されていることが確認された。

また、バルスチェイス実験により、ケラチノサイト由来の新規コラーゲンが真皮上層に層状に堆積する様子を明示し、この供給が成長段階での真皮形成に寄与することが示された。体長8 cm以降になると、線維芽細胞が侵入し、filopodia を介してコラーゲン線維の配向や構造を修飾する役割を担い始める。この

時点で真皮は、*stratum baladachinum* (SB)、*spongiosum* (SS)、*compactum* (SC) の三層構造へと移行する。中でも SC 層においては、線維芽細胞が格子状フィロポディアを形成し、整然とした格子状コラーゲン構造を構築することが示された。

一方、加齢に伴う構造変化の解析では、体長 13 cm から 22 cm へと成長するにつれ、明確な加齢兆候が皮膚構造に現れることが確認された。まず、SC 層における格子状フィロポディアをもつ線維芽細胞の出現頻度が著しく減少し、同時に格子構造が局所的に崩れる傾向が観察された。さらに、細胞密度も年齢依存的に低下し、特に SC 層における核数の減少が顕著であった。FFT 解析では、格子構造の正交性および明瞭性の指標が加齢に伴い低下し、コラーゲン線維の配列が乱れる傾向が示された。加えて、ニューラルネットワークによる分類でも、若齢群と老齢群で明確な線維パターンの違いが検出され、線維構造の加齢変化が定量的に裏付けられた。

さらに、III 型コラーゲン (COL3a) の局在も加齢により変化することが確認された。若齢個体では、COL3a は SC の下層に局在するが、老齢個体では SS 層の表層部へと偏在するようになり、皮膚の弾力性維持との関連が示唆された。これはヒト皮膚においても観察される分布様式であり、アホロートル皮膚のモデル性の高さが裏付けられた。

総じて、本研究は、発生初期の皮膚形成におけるケラチノサイトの主導的役割と、加齢に伴う線維芽細胞機能の低下およびコラーゲン配列の乱れを明らかにした。これにより、皮膚構造の恒常性維持機構および老化現象の分子基盤が解明され、皮膚再構築技術や老化制御医療の発展に資する重要な知見が得られた。

以上の研究成果は以下の論文に報告した

2. “Collagen fiber and cellular dynamics of axolotl skin with aging” Shima C.^{*}, Ohashi A.^{*}, Furukawa S., Yamamoto S., Kashimoto R., and **Satoh A.** Development, Growth and Differentiation, in press, DOI: 10.1111/dgd. 70005, 2025, *Correspondence author*
1. “Keratinocyte-Driven Dermal Collagen Formation In the Axolotl Skin”. Ohashi A., Sakamoto H., Kuroda J., Kondo Y., Kamei Y., Nonaka S., Furukawa S., Yamamoto S., and **Satoh A.**, Nature Communications, 16 (1757), 2025. *Correspondence author*

研究テーマ

酵素を利用した新規高機能抗酸化化合物の創出

研究者

東京大学 大学院薬学系研究科 森 貴裕（モリ タカヒロ）

Nanaomycin K は、EGT を含む化合物の一つであり、*Streptomyces rosa* subsp. *notoensis* OS-3966 から単離された化合物である 11。本化合物は、形質転換成長因子 (TGF) β 1 により誘導された Madin-Darby カニクイザル腎 (MDCK) 細胞の上皮間葉転換 (EMT) を阻害する細胞毒性を有することが報告されている 12。Nanaomycin 類の単離報告論文において nanaomycin K は B 環にエポキシド構造を有する nanomycin E と EGT から非酵素的に生成されることが示されていたが、その効率は低く、酵素的に反応が加速されている可能性も考えられた。そこで、EGT が酵素的に導入されるかどうかを検討すべく、Nanaomycin K の生合成遺伝子クラスター探索のため *Streptomyces rosa* subsp. *notoensis* OS-3966 のゲノム解析を行なった。まず、最適な遺伝子抽出条件の検討のため、培養条件の最適化を実施した。具体的には、振とう培養および静置培養の比較を行い、培養期間の最適化を試みた。その結果、2 日間の振とう培養が最適な DNA 抽出条件であることが示された。ゲノムを放線菌から抽出し、ゲノムシーケンス解析を行なった結果、99.98% のカバー率で 8,453,407 bp の配列を取得した。Nanaomycin K はその中心骨格が actinorhodin¹³ や granaticin¹⁴ と類似した benzoisochromanquinone 骨格であり、I 型のポリケタイド合成酵素により生合成されることが推測された。しかし、その一方でいくつかの置換基が異なっており、新規な酸化還元酵素が関与している可能性が示唆される。特に、EGT を導入するためのエポキシド構造の導入に関わる酸化酵素の存在が必要であり、II 型のポリケタイド合成酵素および、P450 などの酸化反応を触媒する酵素遺伝子が含まれるクラスターが存在することが考えられた。

そこで、actinorhodin の生合成に関わる II 型のポリケタイド合成酵素をクエリーとしてゲノム中の類似酵素遺伝子を探索した結果、II 型のポリケタイド合成酵素遺伝子とその他酸化酵素遺伝子を含む推定 nanomycin 生合成クラスターを発見した。クラスターには、minimal PKS と呼ばれる malonyl-CoA を利用して炭素鎖の伸長を触媒する、acyl carrier protein、polyketide chain length factor、polyketide beta-ketoacyl synthase の三つと伸長したポリケタイド鎖を閉環し、bicyclic 中間体を形成する aromatase が含まれていた。また、その周辺に actinorhodin の生合成で見られる酸化還元酵素等も保存されており、同様な生合成経路により、基本骨格が形成されることが示唆された。一方、actinorhodin やその他類縁体の生合成に見られない機能未知酵素や FAD 結合型酸化酵素が存在していたことから、これらの酵素遺伝子が nanomycin 類の特徴的な修飾反応に関わっていることが推測される。また、異なる遺伝子部位には EGT の生合成に関わると考えられる遺伝子群を見出した。これらの遺伝子群によって生産された EGT が nanomycin K の合成に使用されることが考えられるが、この EGT 生合成クラスターと上記の nanaomycin 生合成クラスターは近くにはおらず、異なる発現制御を受けていると考えられる。

これらの遺伝子情報と類縁体生合成経路の情報をもとに、推定 nanomycin 類生合成経路を図 1 のように予測した。本経路においては、まず、actinorhodin や granaticin と同様に II 型ポリケタイド合成酵素、ポリケタイド還元酵素、環化酵素により二環性の bicyclic 中間体が形成したのちに、3-ketoacyl-CoA thiolase Orf16 もしくは Orf18 により三環目が構築される。その後、B 環の酸化反応がフラビン要求性の酸化酵素により触媒され、キノン中間体を生成したのちに、異なるフラビン要求性の酸化酵素によってエポキシドが形

成する。その後、EGT がエポキシドに求核攻撃することにより nanaomycin K が生成すると推測される。

クラスター内で nanaomycin K の生産に関与していない遺伝子は、本放線菌から単離された別の nanaomycin 類縁体の生合成に関与している可能性が示唆される。発見されたクラスターの内部には、機能未知の酵素が複数存在していたが、硫黄原子の導入に関与すると考えられる遺伝子は見出されなかった。周辺遺伝子の機能を探索した

結果、テーブルに示した遺伝子の外側には候補となる遺伝子は存在せず、FAD-oxidase によるエポキシ化が鍵となり、非酵素的に硫黄が導入される経路が最も可能性が高いと考えられる。しかし、機能未知酵素もいくつか存在するため、今後、クラスター内遺伝子及び、周辺遺伝子をノックアウトし、生成物のプロファイルの変化を検証する遺伝子破壊実験や、放線菌を用いた異種発現系の構築を試みていく予定である。

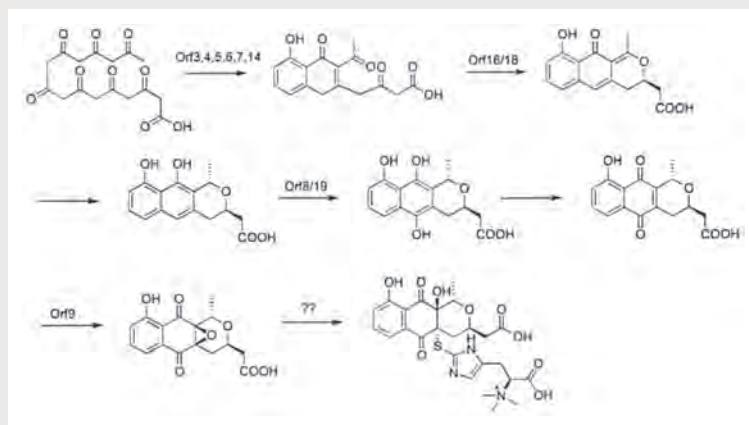


図 1

表 1 推定 nanomycin 類生合成クラスター

gene	aa	proposed function	homolog	identity
orf1	215	ABCtransporter	ABCtransporter [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]	
orf2	402	histidine kinase	Sensor histidine kinase Desk [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]	
orf3	422	Polyketide beta-ketoacyl synthase	Ganaticis polyketide putative beta-ketoacyl synthase [Streptomyces violaceoruber]	88
orf4	407	Polyketide chain length factor	Actinorhodin polyketide putative beta-ketoacyl synthase [Streptomyces coelicolor A3 (2)]	69
orf5	85	Acyl carrier protein	Granaticin polyketide synthase acyl carrier protein [Streptomyces violaceoruber]	62
orf6	313	aromatase	Granaticin polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase [Streptomyces violaceoruber]	59
orf7	117	polyketide synthesis Hydroxylase	Tetracenomycin polyketide synthesis hydroxylase TemH [Streptomyces glaucescens]	34
orf8	363	acyl-CoA dehydrogenase	Flavin-dependent monooxygenase, oxygenase subunit HsaA [Rhodococcus jostii RHA1]	25
orf9	540	FAD-binding oxidoreductase	Aclacinomycin-N/aclacinomycin-A oxidase [Streptomyces galilaeus]	48
orf10	482	MFS transporter	Multidrug-efflux transporter [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]	27
orf11	229	oxidoreductase	Uncharacterized protein YwbO [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]	22
orf12	135	HxIR-like helix-turn-helix	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YtfH [Escherichia coli K-12]	35
orf13	340	F420-dependent oxidoreductase	Putative coenzyme F420-dependent oxidoreductase Rv3520c [Mycobacterium tuberculosis H37Rv]	51
orf14	246	beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase	Granaticin polyketide synthase putative ketoacyl reductase ORF6 [Streptomyces violaceoruber]	75
orf15	254	beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase	Granaticin polyketide synthase putative ketoacyl reductase ORF5 [Streptomyces violaceoruber]	85
orf16	142	ActVI-ORF1	3-ketoacyl-CoA thiolase [Photobacterium laumondii subsp. laumondii TTO1]	30
orf17	263	AfsR/SARP family transcriptional regulator	Regulatory protein DnrI [Streptomyces peucetius]	52
orf18	309	Dehydratase: ActI-ORF5	Acyl-coenzyme A thioesterase [Aeromonas hydrophila]	27
orf19	170	Flavin-reductase: ActVB	Flavin reductase (NADH) [Kitasatospora aureofaciens]	42

研究テーマ

抗酸化物質によるラジカル消去反応の量子機構に対する反応環境の影響

研究者 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子生命科学研究所 中西 郁夫（ナカニシ イクオ）

①研究の背景及び目的

がんや心疾患、脳血管疾患をはじめとするほとんどの生活習慣病は、生体内で過剰に生成した活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) による酸化ストレスが原因であることが明らかとなっている。また、老化は ROS による DNA やタンパク質などの生体分子の酸化的損傷が蓄積することによって進行するといわれている。ROS は、好気性生物が分子状酸素を 4 電子還元してエネルギーを得る「呼吸」の過程で副産物として生成する。また、放射線や紫外線によっても ROS が発生することが知られている。従って、過剰に生成した ROS を効率良く消去することができれば、生活習慣病を予防し、老化を抑制できるだけでなく、放射線がん治療に伴う正常組織への副作用を軽減することもできると考えられる。その結果、超高齢化社会を迎えるわが国において、健康寿命の延伸およびそれに伴う医療費の削減に大きく貢献できる可能性がある。

ビタミン C (アスコルビン酸) やビタミン E などの抗酸化物質は、ROS の中でも不対電子を有するラジカル種に対して非常に優れた消去活性を示すため、生活習慣病の予防や老化の抑制への応用が期待されている。しかし、試験管内における抗酸化物質のラジカル消去活性が細胞実験や動物実験で得られた抗酸化活性とは必ずしも相関しない。これは、抗酸化物質のラジカル消去機構を完全には解明できていないためであると考えられる。

一方、近年、「量子生命科学」という新しい学問分野が誕生し、国内外で注目が集まっている。生命現象は分子レベルだけでは完全に説明できないことから、そこに潜む量子論的挙動を明らかにする必要がある。抗酸化物質のラジカル消去反応では、水素原子の移動が起こるため量子論的現象であるトンネル効果に関与する可能性がある。そこで本研究では、抗酸化物質からラジカル種への水素移動の反応機構を量子レベルにまで踏み込み、速度論的同位体効果からトンネル効果の関与の有無を検討する。種々の溶媒中で反応を行い、速度論的同位体効果に対する反応環境の影響についても明らかにする。

②研究方法

本研究では、抗酸化物質としてアスコルビン酸および Trolox (ビタミン E の水溶性類縁体)、(+)-カテキン、コーヒー酸を用い (図 1)、活性酸素ラジカルのモデルとして頻用されている 2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカルとの反応について検討した。DPPH ラジカルは水にまったく溶けないため、水溶液中では β -シクロデキストリンを用いて水溶化した。反応速度はユニソク RSP-1000-02NM 型ストップフロー分光測定装置を用いて測定した。抗酸化物質の濃度が DPPH ラジカルの濃度に対して 10 倍以上の擬一次条件下では、DPPH ラジ

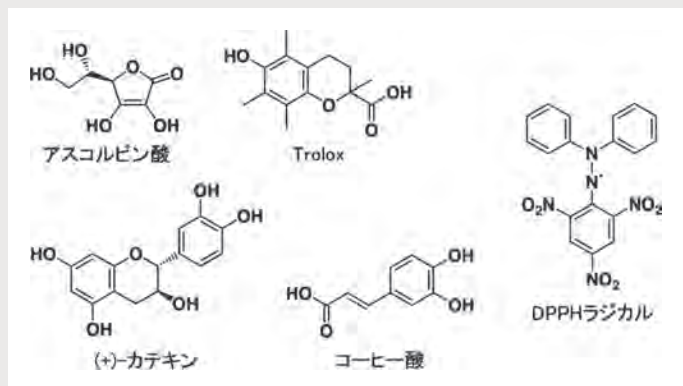


図 1 本研究で用いた抗酸化物質と DPPH ラジカル

カルに由来する吸収の吸光度は一次速度式に従って減衰した。この吸光度の経時変化の対数を時間に対してプロットすると直線が得られ、その傾きから擬一次速度定数 (k_{obs}) を決定した。種々の濃度の抗酸化物質に対して k_{obs} 値をプロットすると原点を通る直線が得られ、その傾きから抗酸化物質と DPPH ラジカルとの二次反応速度定数を決定した。

③研究成果

リン酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) 中、25°C で、DPPH ラジカルに Trolox を加えると、DPPH ラジカルに由来する 527 nm の吸収が減少した。これは Trolox が DPPH ラジカルを消去したことを示している。527 nm の減衰の経時変化をストップフロー法により追跡し、得られた結果を速度論的に解析することにより、Trolox から DPPH ラジカルへの水素移動の二次反応速度定数 (k_{H}) を $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と決定した。重水 (D_2O) 中ではフェノール性 OH 基が OD 基に変わることが知られている。そこで、水の代わりに D_2O を用いて調製したリン酸緩衝液 (0.05 M, pD 7.0) 中で、Trolox と DPPH ラジカルとの反応を行った。その結果、二次反応速度定数 (k_{D}) は顕著に小さくなった ($2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)。速度論的同位体効果 (kinetic isotope effect, KIE) ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$) は 7.4 となり、Trolox から DPPH ラジカルへの水素移動にトンネル効果の関与が示唆された。種々の pH および pD のリン酸緩衝液 (0.05 M) 中で同様に k_{H} 値および k_{D} 値を決定した結果を図 2 に示す。水および重水のいずれの場合にも pH および pD の増大に伴って k_{H} 値および k_{D} 値が大きくなった。KIE 値も pH および pD の増大に伴って大きくなり、pH が高い方がトンネル効果の関与が大きくなることが分かった。他の抗酸化物質の場合にも同様の傾向が観測されたが、アスコルビン酸の場合は KIE 値が比較的小さく (< 6) 測定した pH 領域ではトンネル効果が関与していないと考えられる。次に、リン酸緩衝液の代わりにメタノール (MeOH) またはメタノール- d (MeOD) を用いて Trolox と DPPH ラジカルとの反応について検討した。MeOD 中では重水中と同様にフェノール性 OH 基が OD 基に変わると考えられる。その結果、MeOH 中における k_{H} 値は $2.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であるのに対し、MeOD 中における k_{D} 値は $6.3 \times 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と顕著に小さくなった。KIE 値は 4.4 となり、MeOH 中ではトンネル効果が関与していないことが示唆された。一方、アスコルビン酸と (+)-カテキン、コーヒー酸の場合には、 k_{D} 値が k_{H} 値よりも大きくなり、逆速度論的同位体効果が観測された。この理由については現在検討中である。溶媒にアセトニトリル (MeCN) を用いた場合には、10% (v/v) の H_2O または D_2O を共存させて反応速度を測定した。後者の場合には、抗酸化物質中の OH 基が OD 基に変わると考えられる。その結果、 k_{H} は $2.7 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 k_{D} は $7.4 \times 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ となり、KIE は 3.7 であった。 H_2O または D_2O の代わりに 10% (v/v) の MeOH または MeOD を MeCN に共存させた場合には、 k_{H} は $2.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 k_{D} は $5.0 \times 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ となり、KIE は 3.9 であった。従って、MeCN でもトンネル効果が関与しないことが示唆された。

以上のように、KIE は反応環境の影響を顕著に受けることが明らかとなった。今後は、種々の抗酸化物質やラジカル種を用い、どのような条件下でトンネル効果が起こるのか検討を続ける予定である。意図的にトンネル効果を起こすことができれば、古典力学では実現できない高効率な抗酸化物質の開発につながると考えられる。

謝 辞

本研究をご支援いただきました公益財団法人小柳財団に深く感謝申し上げます。

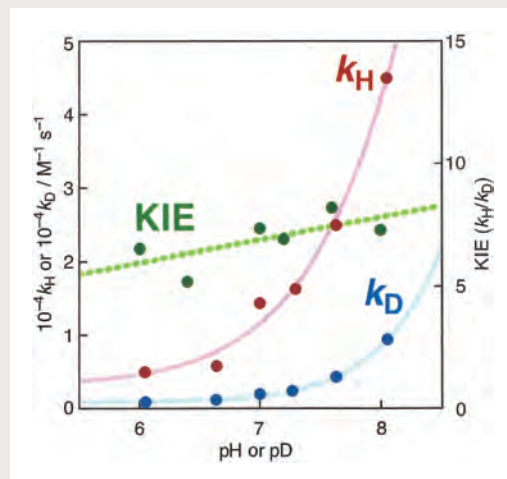


図 2 リン酸緩衝液 (0.05 M) 中、25°C における Trolox と DPPH ラジカルとの反応の二次反応速度定数および速度論的同位体効果 (KIE) の pH および pD 依存性

研究テーマ

極性転換を利用する新規 NSAID 医薬品合成法の開発

研究者

三重大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 溝田 功 (ミゾタ イサオ)

①研究の背景及び目的の本文

含硫黄有機化合物は古くから医薬品として用いられ、ヒトの体内にも含硫黄アミノ酸として多く存在する重要な化合物群である。中でも、チアゾリジンアミドは 11b-HSD1 阻害活性を有し、また、チオモルホリンは鎮痛薬、NSAID 等のアレルギー疾患薬として用いられている化合物である。そのため、その簡便かつ多様な合成法開発が現在も強く望まれている。

本研究は、チアゾリン骨格を組み込んだ α -イミノカルボニル化合物に対する極性転換反応と、それに続く共役付加反応/アルキルチオ基の転位を活用するチオモルホリン合成法の開発を目的とした。本反応を活用し、11b-HSD1 阻害剤および NSAID 医薬品合成と、それら類縁体合成法の確立を目指した。

②研究方法

[1] 11b-HSD1 阻害剤合成を志向するチアゾリン骨格含有イミノカルボニル化合物への極性転換反応の開発

これまでにモデル基質として、チアゾリン骨格を有する α -イミノエステルに対して、Grignard 反応剤を用いることで極性転換反応が進行し、低収率ながら対応するチアゾリジンエステルが生成することを予備的に見出している。そこで今回、11b-HSD1 阻害活性を有するアダマンチルチアゾリジン-2-カルボキシアミドの類縁体合成を目指すため、 α -イミノアミドに対する検討を重点的に行った。そのためイミノアミドの合成検討およびそれに対する極性転換反応の検討を行った。また、後の官能基変換を見据え、アミドの置換基も PMP 等の導入を行った。その他の反応条件検討として、一般的な有機金属反応剤やLewis 酸等の添加剤、反応溶媒等も検討した。

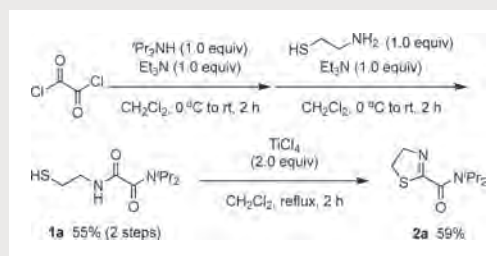
[2] チアゾリン含有イミノカルボニル化合物への極性転換に続く共役付加/転位によるチオモルホリン合成

極性転換を活用するもう一つの反応として、反応後のエノラート中間体に対し α,β -不飽和カルボニル化合物を加え共役付加およびチアゾリンのアルキルチオ基の転位を狙ったチオモルホリン合成の検討を行った。具体的には、フェニルビニルケトン (不飽和ケトン) などの末端無置換のものを用い、生成物の複雑化を避けた。反応条件の検討としては、 NiCl_2 や CuI 等の添加剤、反応温度等を検討し、所望の反応開発を目指した。上述の α -イミノアミドだけでなく、イミノケトンへと変更しエノラートの反応性を制御することでも反応開発を進めた。

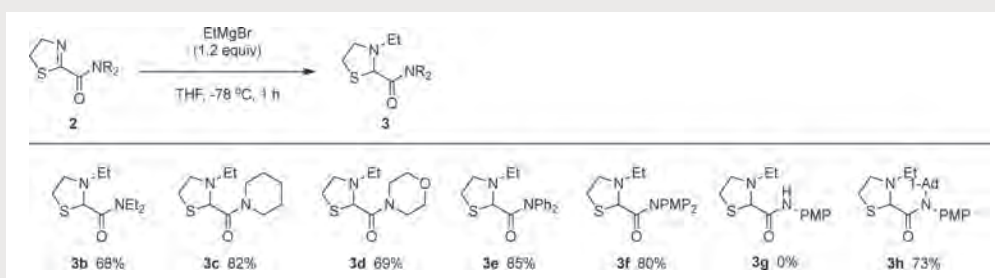
③研究成果

[1] まず初めに、新たな基質であるチアゾリン骨格を有する α -イミノアミドの合成検討を行った (Scheme 1)。反応は、出発物質にジアルキルアミンを用いて全 3 段階で合成することができた、即ち、ジアルキルアミンに対し、オキサリルクロリド 1.5 当量、 Et_3N 1.0 当量、ジクロロメタン溶媒中 0°C から室温で 2 時間反応させた後、アミノエタンチオール 1.0 当量と反応させることで、ジアミド 1a とした。得られたジアミド 1a に対し、 TiCl_4 2.0 当量とともに加熱還流させ目的の α -イミノアミド 2a を良好な収率で合成した。

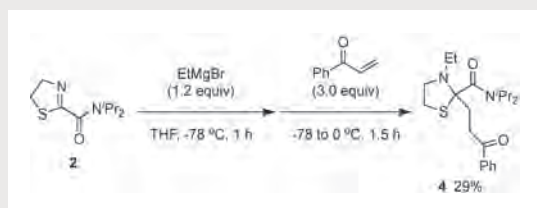
イミノアミドの合成に成功したので極性転換反応の検討を行った (Table 1)。初めに求核剤である有機金属反応剤の検討を行った。イミノアミド 2a に対し各種求核剤を THF 溶媒中で反応させた。その結果、ジエチル亜鉛では目的の *N*-エチル化体を得ることはできなかったが、Grignard 試薬では 84% で、また塩化ジエチルアルミニウムでは、45% でそれぞれ生成物 3a を得ることに成功した (entries 1-3)。そこで、Grignard 試薬を最適求核剤とし、溶媒検討を行ったところ、いずれの溶媒でも生成物を得ることはできたが、THF 溶媒の収率を超える



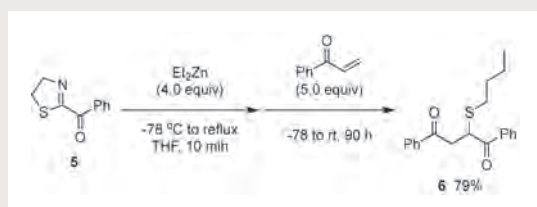
Scheme 1.



Scheme 2.



Scheme 3.



Scheme 4.

Table 1.

Entry	Et-M (x eq)	Solv.	Temp. (°C)	Yield (%)
1	Et ₂ Zn (4.0)	THF	-78 to reflux	0
2	EtMgBr (3.0)	THF	0 to rt	84
3 ^a	Et ₂ AlCl (3.0)	THF	0 to rt	45
4	EtMgBr (3.0)	Et ₂ O	0 to rt	68
5	EtMgBr (3.0)	MeCN	0 to rt	69
6	EtMgBr (3.0)	CH ₂ Cl ₂	0 to rt	57
7	EtMgBr (3.0)	Toluene	0 to rt	72
8	EtMgBr (3.0)	THF	-78	91
9	EtMgBr (3.0)	THF	0	90
10	EtMgBr (3.0)	THF	rt	83
11	EtMgBr (3.0)	THF	-40	78
12	EtMgBr (2.0)	THF	-78	89
13	EtMgBr (1.5)	THF	-78	88
14	EtMgBr (1.2)	THF	-78	86

^a 4 h.

ことはなかったため THF を最適溶媒とした (entries 4-7)。また反応温度の検討では -78°C で行うことで目的物を 91% で得たためこれを最適温度とした (entries 8-11)。さらに求核剤の当量検討も行い 1.2 当量でも 86% と同等の収率で目的物を得たため、本反応条件を最適と結論づけた (entry 14)。

そこで得られた最適条件の下、様々な基質を合成しその適用範囲の検討を行った (Scheme 2)。アミド部位について、他のジアルキルアミドでも良好な収率で生成物 3b を得ることができ、またピペリジンやモルホリンなどの環状アミン由来のアミドや芳香族アミドの場合でも良好な収率で生成物 3c-f を得ることができた。一方で、モノ-4-メトキシフェニルアミドでは、窒素上に酸性プロトンが存在するため、生成物 3g は得られなかった。さらに、アダマンチル基を有する基質でも高収率で目的物 3h を得ることができた。本生成物は、PMP 基を CAN 等で除去することで、11b-HSD1 阻害剤誘導体へと変換できることから、新しい医薬品合成法として期待できる。

[2] 次に、極性転換反応後に形成されるエノラートを活用し、タンデム反応によるチオモルホリン合成を試みた (Scheme 3)。反応は、 α -イミノアミド 2a に対し最適条件にて極性転換反応を行った後、求電子剤としてフェニルビニルケトンに 3 当量加え行った。その結果、望みのチオモルホリンは得られず、単純な 1,4-付加体 4 が 29% で得られた。1,4-付加は進行していることから、続くアルキルチオ基の転位が進行していないと考えられる。そこで、出発物質をより求電子的なイミノケトンにすることで、チオモルホリン合成が促進されると考えた。対応する α -イミノケトン 5 を合成後、極性転換反応の最適条件を探ったところ亜鉛試薬が適していることを見出したため、これによる極性転換反応を行い、反応後フェニルビニルケトンに作用させて反応を行った (Scheme 4)。その結果、チオモルホリンは得られなかったが、予想しなかった生成物 6 が 79% で得られることを見出した。これは中間体エノラートが Breslow 中間体として機能し、アシルアニオン等価体として働いた可能性を示唆している。

以上まとめとして、今回チアゾリン骨格含有 α -イミノカルボニル化合物の極性転換反応を検討し、本基質が極めて有効な基質であることを突き止めた。本反応は幅広い基質適応範囲を示し、11b-HSD1 阻害剤誘導体合成への適用も可能であることを見出した。また、本反応を活用するタンデム反応開発において、チオモルホリンは得られなかったが、一方で有機合成上、極めてめづらしく難度の高いアシルアニオンの発生を示唆する結果を得ることに成功した。今後更なる反応条件の検討を進めることで様々な医薬品への応用やアシルアニオンとしての新たな反応への展開が期待できる。

研究テーマ

分子プローブ合成を指向した有機触媒を用いる環境にやさしい分子官能基化法の開発

研究者

日本女子大学 理学部 化学生命科学科 澁谷 正俊 (シブヤ マサトシ)

①研究の背景および目的

生物活性を持つ有機化合物を使って生体機能を解明するケミカルバイオロジー研究の発展に伴って、蛍光団やビオチンなどのタグ分子を導入する手法の重要性が高まっている。生物活性分子が元々持っている極性官能基を使ってそのような構造単位を導入するのが最も容易であるが、極性官能基は、生物活性発現のために重要な役割を担っていることが多く、そのような修飾によって生物活性が大きく低下したり、無くなってしまうことが多い。

そのため、生物活性化合物の炭化水素部の炭素-水素結合に対して新たな極性官能基を導入する手法が必要となる。炭化水素の炭素-水素結合への官能基導入法としては、化学量論量のクロム酸を用いるベンジル位酸化反応が知られているが、クロム酸は毒性が高く、環境への負荷も大きい実用的な方法とは言えない。そのような毒性の高い試薬を用いることなく、分子を変換する方法として炭素、水素、酸素、窒素などの元素からなる有機分子触媒を用いる方法が近年注目されている。その一つである *N*-ヒドロキシフタルイミド触媒を用いると、酸化剤として分子状酸素を用いてベンジル位炭素-水素結合が酸化できることが石井らによって見出された (J. Org. Chem, 1997, 62, 6810)。この方法を生物活性分子の修飾に適用する場合、生物活性分子は、ヒドロキシ基等の極性官能基を持つことが多いことから、それら極性官能基とは反応せずにベンジル位の炭素-水素結合と化学選択的に反応させる必要がある。このような化学選択的変換には従来、極性官能基を一時的に反応しないように保護基を導入する方法が使われてきた。しかしながら、保護基は、保護基由来の廃棄物が生じる点や保護-脱保護工程が必要となることから無駄な資源と時間の浪費につながる。そこで、極性官能基を保護することなく、目的部位を化学選択的に変換する方法が有用となる。

私達は、有機分子触媒を用いて、環境負荷の大きい試薬を用いることなく、無保護のヒドロキシ基を持つ反応基質に対する化学選択的ベンジル位炭素-水素結合官能基化法を開発することを目的として本研究を行った。

②研究方法

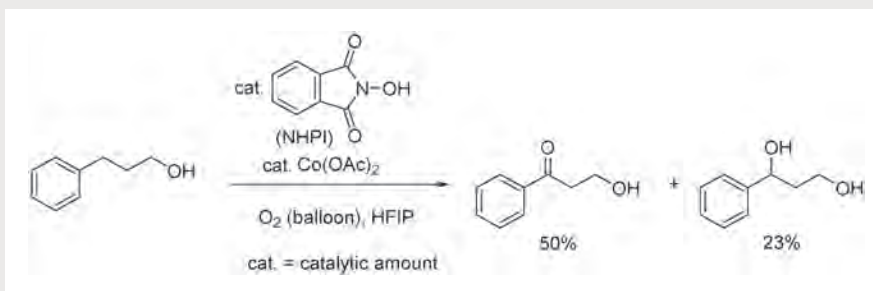
これまでの研究において、無保護ヒドロキシ基を持つ基質のベンジル位炭素-水素結合に対して窒素原子を導入するベンジル位アミノ化法の開発に成功している (Chem. Commun. 2021, 57, 8742.)。この研究において *N*-ヒドロキシフタルイミド触媒を使った反応で通常用いられるアセトニトリルや酢酸エチルを溶媒とした場合には、化学選択的に反応が進行しないのに対して、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を溶媒とするとベンジル位アミノ化反応が化学選択的に進行することを見出した。本研究では、この知見を活かして、ベンジル位酸化反応やベンジル位炭素-炭素結合構築法の開発を検討した。また、*N*-ヒドロキシフタルイミド触媒と同様に炭素-水素結合から水素原子を引き抜く活性を持ち、異なる反応性を持つ触媒の開発を目的として、アミジルラジカルを活性種とする触媒開発を検討した。

③研究成果

- *N*-ヒドロキシフタルイミド触媒を用いる化学選択的ベンジル位 C-H 酸化反応

N-ヒドロキシフタルイミド触媒を使ったアミノ化反応の条件を基に、アミノ化剤の代わりに分子状酸

素を酸化剤とし、無保護ヒドロキシ基を持った3-フェニルプロパノールを基質として反応を検討したところ、反応は化学選択的に進行して目的の生成物が収率良く得られた。しかしながら、この反応の基質一般性を調べたところ、少し炭素の数が異なる反応基質では、効率的に反応が進行しないことが分かった。その原因を解明するため、様々な検討を行った。その結果、ベンジル位とアルコール部が相互作用する距離にある基質において収率低下が顕著になることから、反応中間体で生じるベンジルラジカルが分子内反応を引き起こすが原因である可能性が示唆された。現在は、それを確かめるために、そのような相互作用をしにくい基質に対する一般性や重水素によって標識した反応基質での実験を行っている。



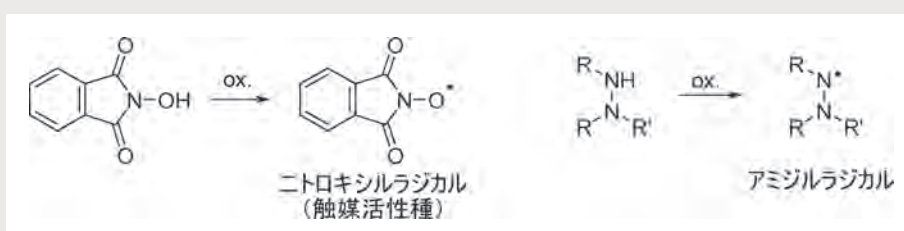
・ベンジル位炭素-水素結合に対する化学選択的な炭素-炭素結合形成反応

炭素-炭素結合形成反応は、有機分子の骨格構築のための重要な反応である。通常、ベンジル位の炭素-水素結合を修飾して炭素-炭素結合を構築するためには、ベンジル位ハロゲン化反応によって一度ベンジル位にハロゲン原子を導入した後に、炭素-炭素結合を形成する必要がある。ベンジル位の炭素-水素結合を修飾して直接、炭素-炭素結合を形成できれば有機合成の効率化につながり、廃棄物の削減にもつながる。

そこで、*N*-ヒドロキシフタルイミド触媒を使って炭素-水素結合から水素原子を引き抜き、炭素-炭素結合を構築するオキシアルキル化反応の報告 (J. Org. Chem. 2001, 66, 6425.) を参考に検討を行った。この報告では、アダマンタンやシクロヘキサンなどの炭化水素に対する反応が報告されていたが、ベンジル位の炭素-水素結合に対する反応を検討したところ、目的の生成物が全く得られなかった。電子密度や立体的要因について種々検討したところ、低収率ながらベンジル位での反応が進行することを見出した。現在、収率改善に向けて検討を行っている。その後、無保護ヒドロキシ基を持った基質に対する反応について検討する予定である。

・アミジルラジカルを活性種とする新規有機分子触媒の開発

N-ヒドロキシフタルイミド触媒は、酸素によって酸化されてニトロキシルラジカルが生じ、それが触媒活性種となり炭素-水素結合からの水素原子を引き抜き反応が進行する。このような炭素-水素結合から水素原子を引き抜く活性を持つ有機分子触媒は、ごく限られている。*N*-ヒドロキシフタルイミド触媒と同様に炭素-水素結合から水素原子を引き抜く活性を持つ触媒が開発できれば、*N*-ヒドロキシフタルイミド触媒では効率が低い反応基質などに対しても効率的に進行する反応の開発へとつながる可能性がある。そこで、*N*-*N*結合を持つ化合物に着目してアミジルラジカルを生成する触媒の開発を検討した。その結果、検討した触媒はアミジルラジカルが安定であるため炭素-水素結合の酸化触媒活性が極めて低いことが分かった。現在は、より不安定なアミジルラジカルを生成する触媒の開発に向けて再検討している。



研究テーマ

ミトコンドリア解析を包含した多層統合マルチオミックス解析による pan-negative 肺がんの病態解明

研究者

理化学研究所 革新知能統合研究センター がん探索医療研究チーム 浅田 健（アサダ ケン）

Precision medicine（個別化医療）の推進と共にがんでも precision oncology の重要性が示唆されている。

しかしながら現在用いられている遺伝子パネル検査だけでは求められる precision medicine・precision oncology を達成することは困難であり、実現にはゲノム・エピゲノム・トランスクリプトームデータなどのマルチオミックスデータを統合的に解析することが重要である。日本における死因の第一位は悪性腫瘍（がん）であり、その中でも肺がんは部位別死亡率の第一位である。ドライバー変異が見つかっていない症例が三割程度存在し（肺がん pan-negative 症例）、その治療法は限られている（アンメットニーズ）。日本人肺がん和欧米系肺がんの間には異なる遺伝的バックグラウンド（人種差）があることが知られている。つまり日本人肺がん研究のためには日本人データセットを用いた解析が必要である。

本研究では国立がん研究センターで構築されている世界最大規模の日本人肺がんマルチオミックスデータベースを活用しミトコンドリアゲノム・コピー数・ミトコンドリア遺伝子発現と、ゲノム・エピゲノム・トランスクリプトームデータを統合したマルチオミックス解析を行うことで、日本人肺がんの分子メカニズム解明を目指した。

核ゲノムに挿入された mtDNA 由来の断片を NUMT (nuclear mitochondrial DNA segment) と呼び、これまでに 760 以上の NUMTs が知られており、近年ではがんにおいて新規の NUMTs が見出されている。

本研究では全ゲノム (WGS) データを用いて、日本人肺腺がんにおいて de novo NUMTs が同定されるかどうかを検討したところ、複数の NUMTs が同定された。なお核ゲノムに挿入された NUMT の長さはほとんどが 100 bp 以下であったものの、1,000 bp 以上の挿入も複数症例で観察された。なお同定された NUMTs は chr3, chr8, および chr11 の特定の領域に蓄積していた（図 1）。我々は以前にゲノム構造多型によるスーパーエンハンサーの形成が、がん遺伝子の発現上昇を引き起こすがンドライバー変異であることを報告している（Molecular Cancer 2024 23: 126.）。

本研究で得られた NUMT に関しても近傍を含む遺伝子発現に影響を与えていると仮説を立てて、解析を続けている。また核ゲノムではなくミトコンドリアゲノム変異に注目した解析結果からは、A および C の繰返配列が多数挿入された変異箇所を同定した。興味深いことにこれら変異に関して既報の大規模解析では、ミトコンドリアゲノム変異とコピー数との相関を報告した（Nature. 2024 630 (E10)）。

またこの論文では、核ゲノムの SNPs と遺伝子発現には相関が認められないものの、SNPs とミトコンドリアコピー数とヘテロプラスミーの間では相関があることを報告している。なおミトコンドリアコピー数に関してはがん種ごとに異なる報告がなされている。本研究ではコピー数は正常に比較してがんで増加していることを明らかにした。一方で肺腺がん症例に限定した比較検討からは、コピー数が増加している症例の方が予後良好であることを見出しており（図 2）、コピー数多型と臨床転帰に関して、詳細に解析を続ける予定である。

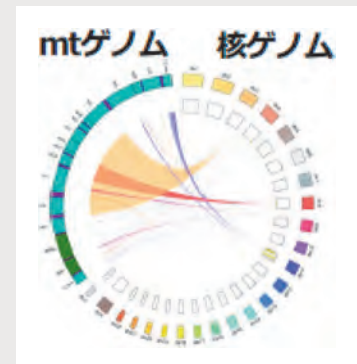


図 1 日本人肺腺がん検出された NUMTs

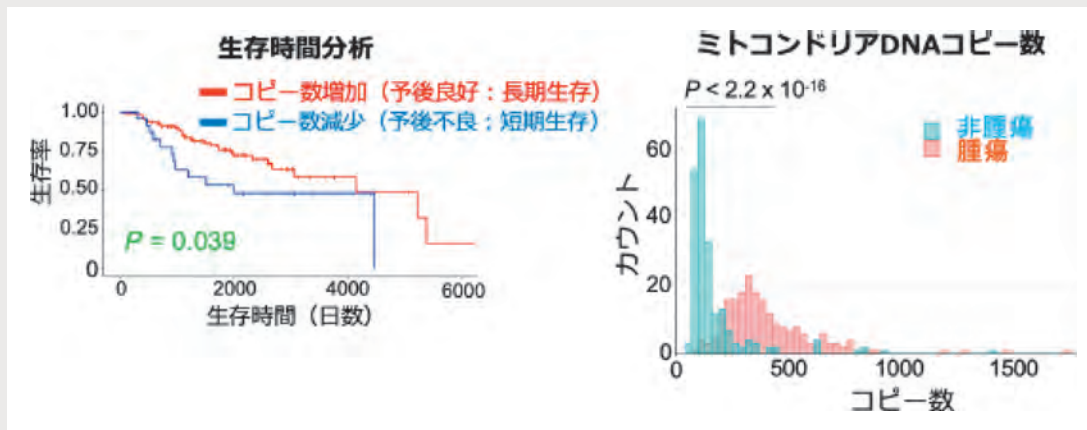


図2 ミトコンドリアDNAコピー数と生存予後

ミトコンドリア関連遺伝子の発現解析からは、肺腺がん患者のクラスタリング(患者層化)ができることが明らかとなった。紙面の関係上全ての成果を報告することはできないが、他にも興味深い結果が得られている。今後も詳細な解析を進めることで、新規モダリティにおける分子マーカーや創薬標的の同定、およびがんにおける精緻な分子メカニズムの解明につなげていきたいと考えている。

末筆ではございますが、小柳財団にご支援いただきましたこと、心より御礼申し上げます。

研究テーマ

オーファン G タンパク質共役受容体 Gpr176 を標的とした線維化に対する新たな治療戦略

研究者

川崎医科大学 岡本 安雄（オカモト ヤスオ）

①研究の背景及び目的の本文

慢性的な炎症が生じると、過剰な損傷修復反応により、活性化線維芽細胞（筋線維芽細胞）から産生されるコラーゲンなどの細胞外マトリックス（ECM）が沈着し、線維化が進行する。線維化が進んだ臓器は最終的に機能不全に陥るため、線維化に対する画期的な治療法・治療薬の開発が強く望まれている。

私たちは、ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いた網羅的遺伝子発現解析により、ブレオマイシン投与後2週および4週の両時点で発現が2倍以上に増加していた G タンパク質共役受容体（GPCR）の中から、オーファン GPCR である Gpr176 に着目した。さらに、Gpr176 の線維化における役割を検討した結果、腎臓・肝臓・心臓のいずれの線維化モデルにおいても Gpr176 の遺伝子発現が増加しており、線維化に応答して臓器横断的に発現誘導されることが示唆された。また、Gpr176 を siRNA によりノックダウンすると、TGFβ1 刺激による筋線維芽細胞の分化マーカーである αSMA タンパク質発現が減弱した。これらの結果から、Gpr176 は線維芽細胞の活性化を制御し、線維化を促進する可能性が示された。Gpr176 はリガンド非依存的な構成的活性を有する Gz 共役型 GPCR であることが知られており、その活性を抑制する逆アゴニストやアロステリックモジュレーターは、筋線維芽細胞への分化を抑制し、線維化の新たな治療標的となり得る。

本研究では、以下を目的として実施した。

1. Gpr176 の過剰発現およびノックダウン細胞を用いて、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を制御する分子機構を解明すること。
2. Gpr176 の逆作動活性を示すリガンドのスクリーニングを行うためのアッセイ系（TGFα シェディングアッセイおよび cAMP-Glo™ アッセイ）を構築すること。

②研究方法

1. GPR176 の過剰発現およびノックダウン細胞を用いた解析

ラット腎線維芽細胞株 NRK-49F およびヒト肺線維芽細胞株 WI-38 において、GPR176 または Gz の α サブユニットを siRNA でノックダウンした。また、FLAG タグ付きヒト GPR176（GPR176-FLAG）を過剰発現させた NRK-49F 細胞をレンチウイルスを用いて作製した。TGFβ1 刺激後、αSMA タンパク質の発現誘導、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンのタンパク質発現およびコラーゲン遺伝子の発現を、ウェスタンブロットおよび定量 PCR により評価した。GPR176 と Gz の共役については、Gi を抑制する百日咳毒素（PTX）処理後に cAMP-Glo アッセイを用い、cAMP 抑制活性の変化を検討した。細胞のストレス応答は WST-8 アッセイ、代謝関連遺伝子の発現は qPCR で解析した。

2. GPR176 活性測定のためのアッセイ系の確立

GPR176-FLAG をレンチウイルスベクターで 293A または 293T 細胞に導入し、過剰発現をウェスタンブロット（抗 FLAG 抗体）で確認した。細胞内 cAMP レベルは cAMP-Glo™ アッセイ（Promega）で測定し、WST-8 アッセイにより正規化した。

TGF α シェディングアッセイでは、Gq/z およびアルカリホスファターゼタグ付き TGF α (AP-TGF α) を発現させた細胞を用いた。また、Gs/z キメラを HEK293 細胞に導入し、cAMP レベルを測定した。

③研究成果

NRK-49F において GPR176 をノックダウンすると、TGF β 1 刺激によるフィブロネクチンおよびコラーゲンの発現が抑制された。WI-38 でも同様に、GPR176 ノックダウンにより TGF β 1 刺激による α SMA、フィブロネクチン、コラーゲンの発現上昇が抑制された。ヒト GPR176 を過剰発現させた NRK-49F では、リガンド非依存的な cAMP 抑制活性が認められ、PTX の影響を受けなかったことから、GPR176 は Gz と共役していると考えられた。

本成果は以下の論文で発表した (図 1) : Okamoto Y, Kitakaze K, Takenouchi Y, et al. GPR176 promotes fibroblast-to-myofibroblast transition in organ fibrosis progression. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1871, 119798 (2024)

また、川崎学園よりプレスリリースが発行され、科学新聞 (2024 年 8 月 23 日号)、Science Japan (2024 年 9 月)、および客観日本 (2024 年 9 月) でも紹介され、英語・中国語を含む国際的な情報発信がなされた。

加えて、GPR176 ノックダウン細胞では Erastin 感受性が上昇し、過剰発現細胞では低下した。GPR176 ノックダウンにより PGC-1 α 、HK2、LDHA、ATP5B、NDUFB8 の mRNA 発現が増加し、過剰発現では低下した。

これらのことから、GPR176 は代謝を抑制し、フェロトーシス感受性を低下させることで線維化を促進する可能性が示唆された。一方、GPR176 の構成的活性の検出は困難であり、Gs/z キメラを用いた cAMP 測定では、GPR176 過剰発現細胞で cAMP レベルが低下し、TGF α 切断アッセイでは一貫した活性が得られなかった。これは、GPR176 が Gz に強く結合し、Gs/z や Gq/z キメラとの共役が阻害されている可能性を示唆する。

今後、Gz をノックアウトすることで、GPR176 活性のさらなる評価を行う予定である。

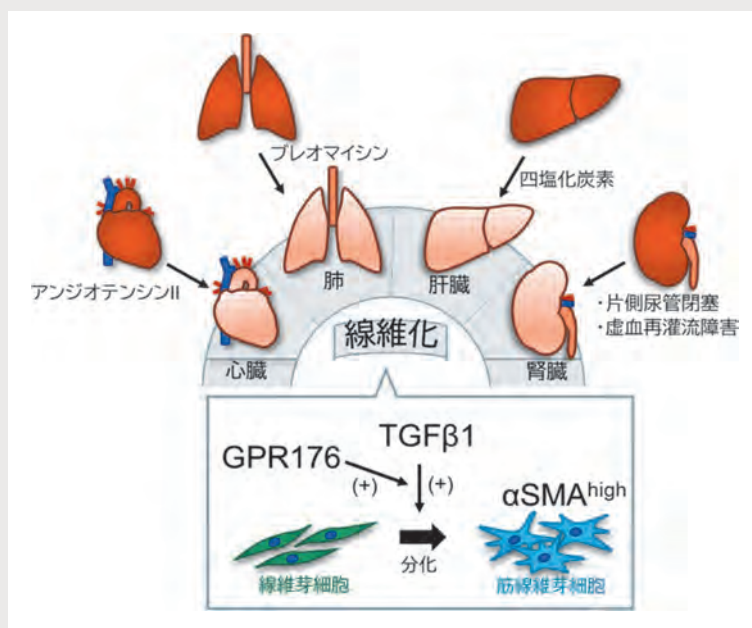


図 1

研究テーマ

右手と左手の関係にある部分構造をもつ天然分子の探索と意義の解明

研究者

大阪公立大学 大学院理学研究科 森本 善樹（モリモト ヨシキ）

①研究の背景及び目的の本文

「多様性」という言葉は現代社会において持続可能な社会を構築するための重要なキーワードとなっている。少しくらい優れていたとしても一つの集団で社会を構成するよりも、多種多様な集団で社会を構成した方が長期的にはより持続性の高い社会を構築できるということだと思われる。このことは地球の存続とか、生物種の存続等にも真実であり「生物多様性」という言葉は人類の存続のためにも重要な概念である。化学の世界に当てはめると、生物が作り出す生物活性分子（生物に対して何らかの相互作用を及ぼすような分子）も多種多様な分子を生産する方が持続可能性には都合が良いということになるとと思われる（分子の構造多様性）。

右手と左手の関係は互いに鏡像体の関係にある。即ち、右（左）手を鏡に写したときの鏡像が左（右）手となることからそのような関係になり、3次元的に重ね合わせることができないので、物質的には両者は全く違う物質である。右手と左手のように物質が対称面を持たない性質のことをキラルであると言い、対称面を持つものをアキラルであるという。自然界では生物が細胞の中で様々な有機化合物の分子（化学用語で天然物）を作っており（合成しており）、生物が生存していく上で重要な機能・役割（例えばホルモン等）を担っている。天然物にも鏡像体の関係にあるキラルな分子が存在し、化学ではそのような分子を互いにエナンチオマーと呼ぶ。生物が合成するキラルな分子は、普通は2つのエナンチオマーのうちの一方の分子のみが選択的に合成される。従って天然物においては両方のエナンチオマーが存在することは珍しい。もっと珍しい天然物は分子中の構造の一部がエナンチオマーの関係になっている天然物で、これまでにほとんど報告されていない。

生物が作り出す天然物分子は無限とも思える炭素-炭素結合のつながり、複雑な骨格構造、多種多様な官能基、エナンチオマーのような立体異性体（分子を構成する原子の結合の仕方は同じであるが分子の立体的な形が異なるために生じる異性体）などの組み合わせにより構造多様性を獲得している。そして分子構造の違いによりその属性である生物活性（酢酸を舐めると酸っぱいとかエタノールを飲むと酔っ払うとか）を発現する。天然物を生産する生物はその生産意図に関わらず、生産する生物活性天然物が生物にとって良い方に働くか悪い方に働くかによってその存続が左右される。天然物が構造多様性を示すのはそれを生産する生物の生き残り戦略と考えるならば、エナンチオマーの関係にある分子も両方生産した方が異性体（分子式が同じで構造が異なる分子）の数は増えるので構造多様性を獲得するには都合が良いと思われる。生物は細胞の中で天然物を合成している（これを生合成という）が、その合成反応を担っているのはタンパク質の酵素である。従って異性体の数だけを増やすのであれば、酵素は立体異性体の2つのエナンチオマーも両方合成した方が良いことになる。しかしながら、化学や生物学の教科書には酵素は基質の3次元構造を厳密に認識して、一方のエナンチオマーのみを選択的に生成する反応を触媒すると記述されている。従って天然物においては両方のエナンチオマーが存在することは稀である。さらに分子中の構造の一部がエナンチオマーの関係になっている天然物（分子全体としてはエナンチオマーの関係にはない）は極めて稀な分子である。我々は最近そのような極めて稀な天然物が、海洋に生息する海藻の一つである *Laurencia* 属の紅藻の化学成分として存在することを発見した。しかも同じ種の紅藻 (*Laurencia viridis*) から単離された異性体同士間での現象であり、生合成酵素の関与が示唆されることから生物学的にも興味深い。我々はこのような事象をエナンチオ発散現象と呼んでいるが、そのような天然物は他にも存在するのか、紅藻は他の生物と違ってなぜそのような天然物を生産しているのか、紅藻はどのようにして酵素反応によりそのような天然物を合成しているのか、エナンチオ発散現象の生物学的な意義は何なのかという

ような学術的問いに対する答えを見つけないといけない。これらの問いに対する答えを解き明かすことにより、地球上で繁栄してきた 37 億年の歴史を誇る生物の謎に迫りたい。

②研究方法

我々が見つけたエナンチオ発散現象を示す天然物類縁体を Figure 1 に示す。それらは *Laurencia* 属の紅藻から単離されたチフェロール類と呼ばれている含臭素トリテルペノイド (臭素原子を含んだ炭素数 30 になる分子) という仲間属する類縁体で、これまでに 30 種ほどが知られている。チルシフェロール類は共通する部分構造として ABC 環部を有しており、C14 位に構造の異なる側鎖をもつユニークな構造をしている。生物活性としては強いもので P388 マウス白血病細胞 (癌細胞の一種) に対して $IC_{50}=0.47$ nM (試験している癌細胞数の半分を殺すのに必要な化合物の濃度) の強力な細胞毒性 (癌細胞を殺す能力) を示すことが報告されている。1 の構造は既に決まっていたがイソデヒドロチルシフェロールの構造は未解明であった。我々は可能な立体異性体の化学合成 (市販されている簡単な化合物から目的とする複雑な化合物を人工的に作ること) を行い、その完全な構造を 2 の様に決定した。その結果、類縁体に共通する部分構造である ABC 環部の構造が 1 の ABC 環部とエナンチオマー (鏡像) の関係になっていることを見つけた。しかも 1 と 2 は同じ種の紅藻 *Laurencia viridis* から単離されたものである。本研究では、これまで化学合成が達成されていない 1 の不斉化学合成法をまず確立し、その後 18, 23 位の水酸基をアセチル化することにより天然分子 15 (28)-アンヒドロチルシフェリルジアセタートの完全な構造を決定する計画である。

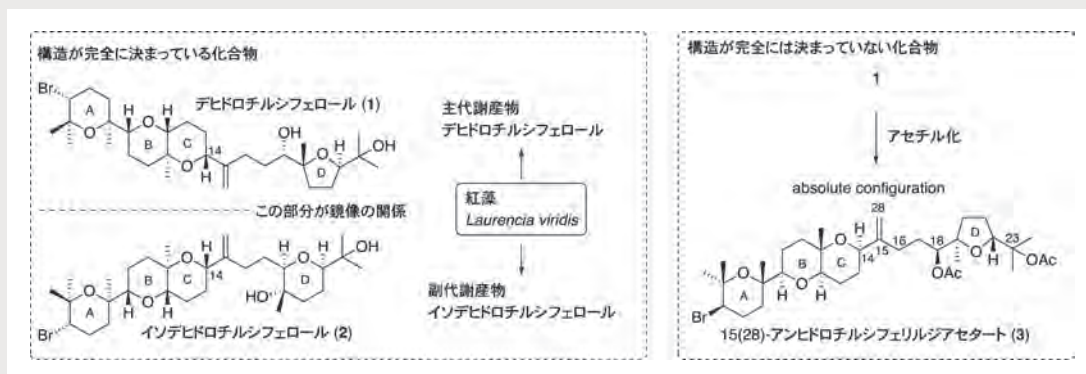


Figure 1. 紅藻由来のチルシフェロール類におけるエナンチオ発散現象。

③研究成果

デヒドロチルシフェロールは *Laurencia viridis* から単離される前、元々は 1984 年に Martin らによってマカロネシアのカナリア諸島周辺の紅藻 *Laurencia pinnatifida* のアセトン抽出物から単離、構造決定されたトリテルペンポリエーテルである。マウスのリンパ球性白血病細胞 P388 に対して強力な細胞毒性活性を示すことが報告されている。我々はイソデヒドロチルシフェロールの化学合成で確立した ABC 環部フラグメントと既知の光学活性ジオールから 11 工程で調製される D 環部フラグメントの C15-C16 位間での鈴木-宮浦クロスカップリングにより両フラグメントを連結し、デヒドロチルシフェロール (1) の初めての不斉化学合成に成功した。

15 (28)-アンヒドロチルシフェリルジアセタートは 1987 年に鈴木らによって日本近海の海洋産紅藻マギレソゾ *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux の中性画分から単離、構造決定されたトリテルペノイドで、マウスのリンパ球性白血病細胞 P388 に対して強力な細胞毒性活性を示すことが報告されている。本天然分子の絶対配置は実験的には決定されていない。15 (28)-アンヒドロチルシフェリルジアセタートは絶対配置既知の 1 の 18, 23 位の水酸基のジアセチル体であることから、先に化学合成した 1 をアセチル化することにより 3 の初の不斉化学合成を達成した。合成した 3 と報告されている天然分子 15 (28)-アンヒドロチルシフェリルジアセタートの旋光度が良い一致を示したことから、3 の ABC 環部の絶対配置は 1 のそれと同じ絶対配置であることが分かった。現在、合成した化合物や合成中間体のいくつかのがん細胞に対する細胞毒性試験が進行中である。

研究テーマ

光エネルギーを利用して大気から窒素含有化合物を生産する微生物の開発

研究者

東京都立大学 理学部 得平 茂樹（エヒラ シゲキ）

①研究の背景および目的

カーボンニュートラルな社会の実現のため、石油化学への依存から脱却し、二酸化炭素を資源として有効に利用する技術開発が求められている。本研究では、大気中の二酸化炭素と窒素ガスからナイロンの原料となる化合物ジアミンを作り出す。ナイロンはジカルボン酸とジアミンを繰り返し重合させることで合成されるポリマーであり、年間700万トン生産される最も重要な工業用ポリマーの一つである。現在は石油から作られたジカルボン酸とジアミンが原料として使用されているが、本研究では光合成生物であるシアノバクテリアを利用して、大気からのナイロン原料生産を目指す。現在生産されているナイロンの多くは、炭素数6のジアミンとジカルボン酸から合成されるナイロン-6,6である。最近、生物による合成が可能な炭素数4のジアミンを原料とするナイロン-4,4が、優れた耐熱性と吸水性をもつことが示されると同時に、生分解性であることも分かり、環境調和型のナイロンとして注目されている。ナイロンは原料として化石燃料が用いられており、れるだけでなく、その製造工程でも多くの温室効果ガスが排出されており、ナイロン原料のバイオマス資源からの生産は温室効果ガス排出削減への貢献が期待できる。

②研究方法

本研究では、炭素数3のジアミンである1,3-ジアミノプロパン（以下、DAP）をシアノバクテリアを用いて、二酸化炭素と窒素ガスから生産させることを目指した。DAPは生物が合成するジアミンの一種であり、我々は *Synechococcus* sp. PCC 7002（以下、PCC 7002）や *Anabaena* sp. PCC 7120（以下、PCC 7120）などのシアノバクテリアがDAPを合成する酵素を持つことを見出した。DAPは、細胞内への鉄の取り込みに関わる化合物であるシデロホアの一種リゾバクチンを合成する代謝経路の中間体として生成される（図1）。通常はDAPが生成しても、DAPを基質とする酵素によりすぐに次の化合物へと変換されてしまうため、DAPが生産されることはない。しかし、DAPを基質とする酵素を欠損させれば、DAPが生産されると期

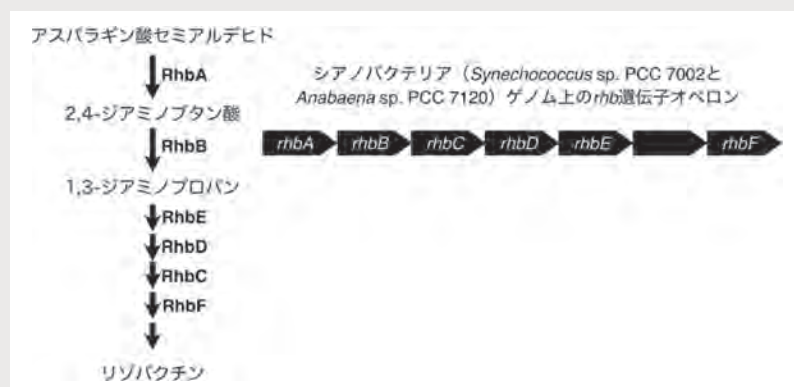


図1 シアノバクテリアにおけるリゾバクチン合成経路と合成遺伝子
リゾバクチンはアスパラギン酸セミアルデヒドから、6個の酵素（RhbA, RhbB, RhbC, RhbD, RhbE および RhbF）の働きにより合成される。

待できる。そこで、DAP を基質とする酵素をコードする遺伝子 (rhbE) を PCC 7002 と PCC 7120 で欠失させ、DAP が生産されるかを評価した。また、シデロホア合成の出発物質であるアスパラギン酸セミアルデヒドから DAP の生成反応を触媒する酵素をコードする遺伝子 (rhbA と rhbB) を、シデロホアを合成しないシアノバクテリアに導入することで DAP 生産能を付与することができるか評価した。

③研究成果

(I) PCC 7002 による二酸化炭素からの DAP 生産

PCC 7002 において DAP を生産させるために、DAP からシデロホアの生成経路で働く rhbC、rhbD、そして rhbE 遺伝子を欠失させた Δ rhbCDE 株を作製した。まず、野生株と Δ rhbCDE 株を通常培養条件下で培養し、培地中の DAP 濃度を定量したが、どちらの株においても DAP は検出されなかった。シデロホアの合成は鉄が欠乏した環境において誘導されることが知られており、PCC 7002 においても rhbA と rhbB の発現は鉄欠乏条件下で上昇する。そこで、鉄のキレート剤であるピピリジルを培地に添加することで鉄欠乏状態にして DAP を生産させたところ、 Δ rhbCDE 株において DAP が検出された (図 2)。培養 2 日目には 3.5 ± 0.1 mg/L の DAP が生産されたが、その後 DAP 濃度は低下していった。PCC 7002 株に RhbE 以外の DAP を基質とする酵素が存在している可能性が示唆された。

(II) Synechococcus elongatus PCC 7942 による二酸化炭素からの DAP 生産

PCC 7002 において DAP を分解する活性が見られたため、DAP の合成経路を持たない *S. elongatus* PCC 7942 (以下、PCC 7942) を用いて DAP の生産を試みた。PCC 7002 の rhbAB を PCC 7942 に導入した 7942/rhbAB 株を作製し、培養を行なった。その結果、7942/rhbAB 株では培養 10 日目まで DAP 濃度が増加し続け、 7.0 ± 0.3 mg/L の DAP が生産された (図 3)。したがって、rhbAB を導入することで DAP 生産能を付与することができ、また PCC 7942 が DAP の生産ホストとして適していることも示された。

(III) Anabaena sp. PCC 7120 による二酸化炭素と窒素ガスからの DAP 生産

窒素固定能をもつ PCC 7120 を生産ホストとして、二酸化炭素だけでなく、窒素ガスも利用した DAP 生産に取り組んだ。PCC 7120 において Δ rhbCDE 株を作製し、培地中に窒素化合物が存在するために窒素固定は行わない条件下で培養したところ、0.32 mg/L の DAP が生産された (図 4)。PCC 7120 でも DAP が生産されることが確認できたため、次に培地から窒素化合物を除き、窒素固定を行う条件下で培養した。しかし、窒素固定条件下においては、DAP の生産を確認することができなかった。窒素固定条件下では、DAP を生産するために必要な窒素化合物が十分に供給できていない可能性が考えられる。今後、窒素固定活性を高める遺伝子改変を加えていくことで、二酸化炭素と窒素ガスからの DAP 生産が実現すると期待できる。

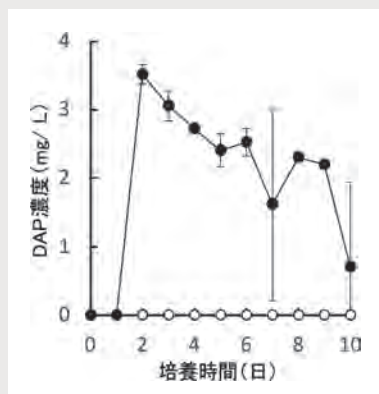


図 2 PCC 7002 による DAP 生産
野生株 (○) と Δ rhbCDE 株 (●) を培養し、培地中の DAP 濃度を測定した。

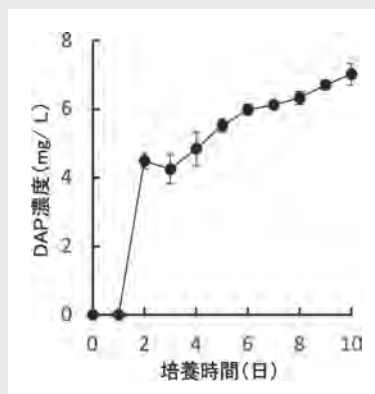


図 3 PCC 7942 による DAP 生産
7942/rhbAB 株 (●) を培養し、培地中の DAP 濃度を測定した。

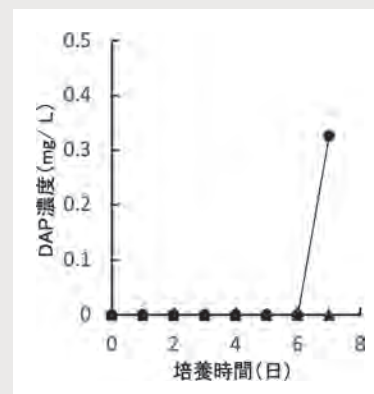


図 4 PCC 7120 による DAP 生産
 Δ rhbCDE 株を非窒素固定 (●) および窒素固定 (▲) 条件下で培養し、DAP 濃度を測定した。

研究テーマ

歯周病における活性酸素種による酸化ストレス病因論の検討

研究者

神奈川歯科大学 全身管理歯科学講座障害者歯科学分野 小松 知子（コマツ トモコ）

研究背景と目的

「令和4年 歯科疾患実態調査」では、8020 達成者（75 歳以上 85 歳未満の数値から推計）は 51.6%で、4 mm 以上の歯周ポケットを持つ人の割合は、全体では 47.9%で、高齢になるにつれ増加傾向にあることが報告された。また、21 世紀に入り、歯周病が糖尿病や認知症など様々な全身疾患や病態と関連があるという研究報告が重ねられ、ペリオドンタルメディスン（歯周病医学）が浸透した。このような状況において、歯周病の発症を早期から予防することは非常に重要である。

歯周病を早期に発症し、重症化することが知られている Down 症候群（DS）では、成人期以降、アルツハイマー病、糖尿病などに罹患しやすく、酸化ストレスの感受性が健常者（C）と異なることが報告されている。また、歯周病原菌の早期定着・増殖、歯周病原菌の歯周組織構成細胞への侵入経路の相違による易感染性、好中球の半減期の短縮、走化性の低下、貪食能の相違による免疫力の低下、歯周組織の破壊の亢進および修復力の低下（PLoS One. Oct11; 11 (10) : e0162988, 2016, J Periodontol 72: 368-73, 2001, J Clin Pediatr Dent 22: 141-6, 1998, Oral Dis. 18: 346-52, 2012, Oral Diseases 7: 47-55, 2001）などが知られ、研究代表者からも報告しているが、未だ十分な疾患メカニズムの解明に至っていない。

そこで研究者らは、これまでに明らかにしてきた様々な分子生物学的解析を背景として、本研究では、歯周病の病態にいかなる活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）による酸化ストレスと抗酸化システムが作用するかを解明することを目的とした。

対象と方法

(1) 研究材料の採取と歯肉線維芽細胞の分離

神奈川歯科大学附属病院を受診した Down 症候群（DS）患者および健常人（C）の抜歯処置に際し、研究の趣旨を十分説明し、理解、同意が得られた患者の抜去歯に付着した辺縁部の歯肉を採取した。抜歯前に抜歯予定部位の歯周組織検査を行い、歯周ポケットの深さ（PD）が 3 mm 未満で歯肉炎指数（GI）が 1 以下であることを確認し、検査の詳細については記録した。抜去歯から得られた歯肉を用いて初代培養を開始し、歯肉線維芽細胞（FG）を分離した。初代培養は、10%血清添加の条件で行った。

(2) 分離した細胞への炎症性サイトカイン刺激

その後、8-9 継代の十分な活性を有する状態の FG を用いて、Gordon Sato らの方法にのっとり無血清培養を行った。

プレートに細胞を一定密度で植え込み、種々の濃度のサイトカイン（PMA、IL-1 β 、TNF- α ）を添加し、十分な細胞活性を有した条件で培養上清を集めた。

(3) 電子スピン共鳴法（ESR）法による ROS の検出

回収した培養上清中の ROS の検出を spin-trap 剤を用いて、ESR 法にて測定した。

結 果

これまでの ESR フリーラジカル検出技術の改良に加え、spin-trap 剤を駆使してこれまで不可能とされ

ていた生理学的濃度に近いレベルの ROS を検出した。

1. PMA (Phorbol Myristate Acetate) 刺激による ROS 産生について

以前に検証した炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α) 刺激によるパイロットスタディーでは、ROS 産生量の検出に ESR 法の積算法を用いる必要があった。今回は積算法を用いず、生理学的に ROS 産生量を検討できるようにすることを目指し、多核形白血球において ROS 産生を促進する PMA (Phorbol Myristate Acetate) 刺激時による検討を行った。その結果、DS 由来 FG (DS-GF) ならびに C 由来 FG (C-GF) の培養上清からヒドロキシルラジカル (HO \cdot) 産生量を検出することに成功した。PMA 刺激後 1 時間では C-GF と DS-GF でコントロールと同程度であったが、3 時間刺激後では、DS-GF では ROS 産生量が増加傾向を示した。

2. IL-1 β 刺激による ROS 産生について

C-GF を用いて、IL-1 β (1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml) 刺激して予備実験を行った。Fenton 反応系による ROS 産生量は濃度依存的に優位な変化を認めなかった。一方で、X/XO 系によるスーパーオキシド (O $_2^{\cdot-}$) 産生量は 30 ng/ml 以上で濃度依存的に抑制傾向がみられた。そこで、10 ng/ml IL-1 β を用いて 0, 1, 3 時間刺激後の C-GF と DS-GF での経時的变化による ROS 産生を検討した。その結果、C-GF では発生率に変化を認めなかったが、DS-GF では経時的に ROS 産生が増加傾向を示した。

3. TNF- α 刺激による ROS 産生について

C-GF を用いて、TNF- α (1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml) 刺激して予備実験を行った結果、Fenton 反応による HO \cdot 産生量、X/XO 系による O $_2^{\cdot-}$ 産生量ともに濃度依存的に優位な差を認めなかった。そこで、10 ng/ml TNF- α を用いて、0, 1, 3 時間刺激後の C-GF と DS-GF での経時的变化による ROS 産生を検討した。その結果、C-GF では発生率に優位な変化を認めなかったが、DS-GF では経時的に ROS 産生が増加した。

4. 位相差顕微鏡による形態観察

位相差顕微鏡による形態観察において、IL-1 β および TNF- α 刺激した DS-GF では C-GF に比較して、3 時間刺激後は明らかに紡錘形が扁平して、弱体化している様子が観察できた。

考 察

人間の健康と美を阻む病的老化を起こす主たる原因の一つは、抗酸化システムを破綻させる ROS の産生亢進による酸化ストレスである。今回、炎症性サイトカインの刺激により、DS-GF でこれまで定性和定量が難しかった ROS 産生を確認することができた。また、DS-GF の ROS 産生が C-GF より亢進した結果から、DS の歯周病易罹患のメカニズムとして ROS による酸化ストレスの感受性が高いことが示唆された。

今後は、これらの結果に加えて、歯周病の病態メカニズムへ ROS による酸化ストレス病因論を補強し、これまで融合が難しかった歯周病の細菌感染から引き起こされる病因論に加え、細菌感染と血管病の両病態からの炎症による ROS の酸化ストレスによる歯周病における新しい歯周病病態学としての酸化ストレス病因論の確立に向けて、さらなる検討を行う予定である。さらに、これらの病因論が確立した後は、酸化ストレスと抗酸化システムの破綻による病態の改善、予防につながる新たな検査と治療法による抗酸化療法の開発の基盤となるエビデンスの獲得をゴールとしている。

謝 辞

本研究は公益財団法人小柳財団の助成により実施されました。厚く御礼申し上げます。

研究テーマ

美白化粧品等の開発を目指した酸化酵素チロシナーゼの反応機構解明

研究者

茨城大学 理学部理学科化学コース 藤澤 清史 (フジサワ キヨシ)

①研究の背景及び目的

本研究は、生体機能を巧みに利用した小分子活性化機構を理解し、特に酸化酵素チロシナーゼの反応機構を、小分子モデル錯体を用いて決定し、美白化粧品等の新しい薬剤開発等に繋げる、さらに生体模倣小分子活性化触媒系の構築も併せて行う。目的達成の手法として、

- 1) 最新の機器と極低温での実験手法を駆使し、酸化酵素チロシナーゼの酸素中間体の構造決定と未検出反応中間体を検出する、
- 2) 生成物、反応機構により酸化酵素チロシナーゼの反応を抑制するにはどのようにするのが有効かの考察を行う。

生体内では、遷移金属イオンのイオン半径、最適な配位数と配位構造、酸・塩基の硬さ・軟らかさの指標に起因する配位アミノ酸残基や側鎖との配位結合の強さ等により、高効率・高選択性触媒反応を達成している。我々は、配位空間と遷移金属イオンを巧みに組み合わせて、数々の生物無機化学の分野で重要な発見を行ってきた。これらはなぜ生体はこの金属元素を選択したか、なぜこの配位子系を選択したかという単純であるが生命の基本原理に対する問いに対し、一部回答を与えた。しかし、この問いに対してさらに踏み込んで議論するには、反応中間体を模した錯体の構造解析例が少ない、短寿命反応中間体の情報不足等、課題点が数多く残される。

本研究では、酸化酵素チロシナーゼの反応機構の解明を行う。チロシナーゼはメラニン生合成の最初の反応を触媒する酵素である。この触媒反応機構を明らかにするために、最新の機器と極低温での合成手法、大規模理論計算を駆使して反応機構を詳細に検討する。最終目的は、小分子活性化機構を、小分子モデル錯体を用いて明らかにし、美白効果等有用な全く新しい薬剤等を開発し、さらに環境に優しい触媒反応系の構築を目指す。

②研究方法

本研究を実施のする為には配位子を選択しなくてはならない。申請者は、図1に示した含窒素配位子系を用いて数多くの遷移金属酸素錯体の構造解析に成功してきた。特にヘモシアニン・チロシナーゼの酸素付加体サイドオン型パーオキサイド ($\mu-\eta^2:\eta^2$) 2核銅(II)錯体他、多くの酸素錯体は申請者が初めて構造解析した。さらに、30年以上にわたり共同研究をスタンフォード大学ソロモン教授と行った。本研究では、銅(I)錯体と酸素の反応を行い、生じた銅(II)錯体の構造を単結晶X線構造解析により決定した。

③研究成果

本研究では、今まで不明であった酸化生成物の解析を中心に行った。配位子としてはピラゾールの3位にフェニル基、5位にメチル基を導入した配位子Lを用いた。図2に示したように配位子と塩化第一銅を嫌気下で反応させ生じた塩を脱塩した後、酸素を低温下で導入した。溶液の色は変化しなかったことから、酸素錯体の生成は低温下では観測されなかった。酸素

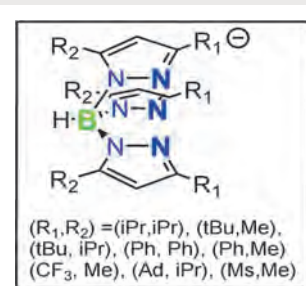


図1 本研究で用いた含窒素配位子

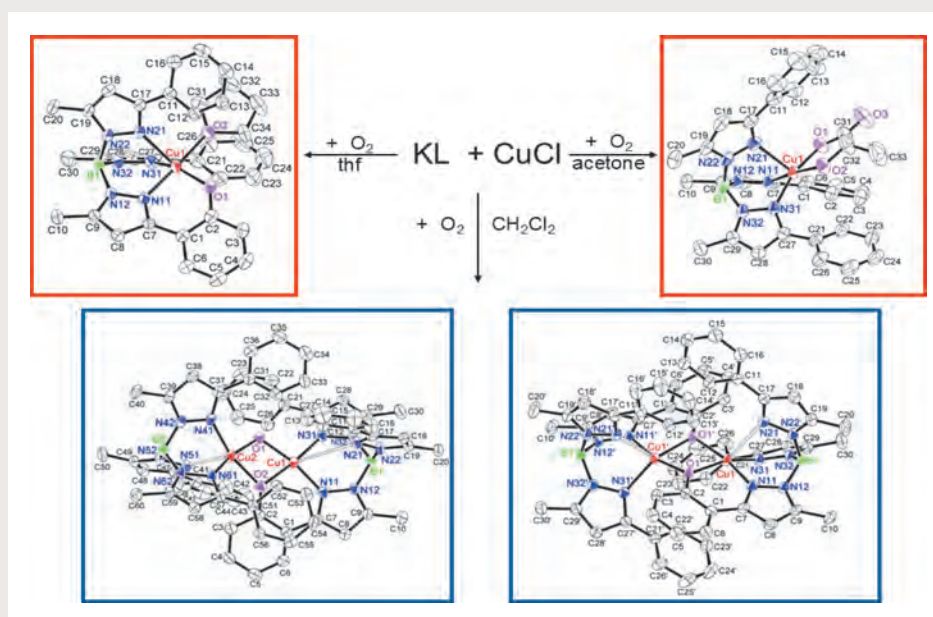


図2 溶媒の違いにより異なる、酸素との反応で得られた生成物の構造

雰囲気下のまま溶液温度を上げていくと徐々に緑色に変化した。この反応を、溶媒を変えて行った。

- ① アセトン溶液中で酸素化反応を行い、再結晶を行うと図2右上部の錯体を得られた。示した構造はL-乳酸が配位しているが、この結晶は対称心を持つ $P\bar{1}$ であることから、結晶中では反転構造も同数存在しうるので、ラセミ体として解析していることがわかる。アセトンから乳酸へ2つの酸素原子が挿入されたジオキシゲナーゼ型の反応が単核銅サイトで起こったことを示している。今後、この酸素原子の由来を、18酸素を用いたラベル実験を行い、2つの酸素原子が挿入されているかの確認を行う。
- ② 一方、テトラヒドロフラン中で反応させると、配位子のフェニル環のオルト位が酸化され配位した溶媒が配位した単核フェノラート銅(II)錯体を得られた。その構造を図2左上部に示す。
- ③ さらに、この反応を塩化メチレン中で行うと、2種類の2核銅(II)錯体を得られ、その構造を図2下部に示した。先ほど②で示した単核フェノラート銅(II)錯体と同じく1つのフェニル環のオルト位が水酸化され、今度は架橋配位子として2つの銅(II)イオンを結んでいる構造であった。下部左側は1つのオルト位が水酸化され、もう1つの架橋配位子は水酸化物イオンであり、右側が2つとも水酸化され、両方架橋配位子として作用していた。②とともに、①と同じく酸素が用いた酸素由来か、少量含まれる外部水由来かを明らかにする必要がある。

結 論

肌は紫外線やストレス等の刺激を受けると、活性酵素種が肌の表面に発生し、表皮の角化細胞から色素形成細胞であるメラノサイトへ情報伝達物質が送られる。その結果、活性化されるのが酸化酵素チロシナーゼと言われている。この酵素の多くは、生体内防御反応に関与し、メラニン色素の生成には、この酵素が最初の段階、チロシンからカテコールへの変換に関与している。このチロシナーゼの反応を押さえることができれば、黒色メラニンが生成されず、美白へと繋がると考えられる。美白化粧品を研究している企業では、この酸化酵素チロシナーゼ阻害物質について多様な実験を行い、美白化粧品を商品化している。この中でもコウジ酸を使用した美白化粧品は有名である。さらに、この酵素反応を理解することは、皮膚の炎症などの軽減にも寄与できると考えられる。本研究では、低分子量モデル錯体を用いて、銅(II)イオン近傍に存在するベンゼン環が水酸化されフェノールとして配位する銅(II)錯体と溶媒のアセトンが酸化され乳酸イオンが配位した単核銅(II)錯体を得られた。これらの結果は、銅(I)イオンの近傍にあるベンゼン環を有する有機物や溶媒として用いたアセトンが容易に酸化されることを示している。今後どのようにこの酸化反応を防御・制御していくか、および酸化型チロシナーゼ反応機構を考察していく。

研究テーマ

中枢体内時計が時差ボケを生じるメカニズムの解明とその解消法の探索

研究者

金沢大学 医薬保健研究域・医学系・統合神経生理学 三枝 理博（ミエダ ミチヒロ）

①研究の背景および目的

睡眠を始め、殆どの生体機能は約 24 時間周期の概日（サーカディアン）リズムにより制御される。哺乳類では、視床下部視交叉上核（SCN）の中枢体内時計が概日リズムを自律的に発振し、全身に時刻情報を発信する。また中枢時計は、網膜視床下部路を介して伝わる外界の明暗（昼夜）サイクルに同調する（光同調）。中枢時計の内因性周期は 24 時間から少しずれているので（概日時計）、光同調は 24 時間周期の社会生活を健全に営む上で極めて重要である。中枢時計は本来、天候や季節などの外乱に乱されることなく昼夜の環境変化を予測する極めて適応的なシステムである。しかし頑強な中枢時計に備わった光同調能は、現代に実現した急速な大陸間移動に伴う昼夜サイクルの突然の大きなシフトについていくには十分ではなく、時差ボケの原因となる。慢性的な時差ボケは死亡率をも顕著に増加させることが、動物実験で報告されている。

SCN は背内側部（shell）と腹側部（core）の二領域に大別される。網膜視床下部路は core に投射して光情報をまず core 細胞に伝え（「光入力部」）、その後 core から shell に情報が送られ、SCN 全体の位相がシフトする。昼夜サイクルのシフト後に、core 領域は比較的迅速に新たなサイクルに再同調できるが、shell 領域は再同調に時間がかかると考えられている。Shell は細胞数も多く概日振動も大きい「振動部」と言え、core と shell のリズムが本来の位相関係に戻って新たな昼夜サイクルの時を刻むことが、時差ボケ解消に必須である。Shell の主要な細胞は AVP（バソプレシン）産生細胞で、core の細胞で光同調や SCN ニューロン間の同調に重要な役割を果たすのが VIP（血管作動性腸管ペプチド）産生ニューロンである。そこで本研究では主に SCN ネットワーク内での AVP ニューロンと VIP ニューロンの相互作用に着目し、SCN による概日リズム生成と光同調の神経メカニズムを明らかにし、効果的な時差ボケ解消法の開発につなげることを目的とした。

②研究方法

④ VIP 欠損により概日リズムが大きく乱れることが知られている。主要な概日ペースメーカー細胞である AVP ニューロンが VIP によりどのような調節を受けるのかを明らかにするために、正常および VIP 欠損マウスにおける AVP ニューロン、VIP ニューロンの概日細胞内 Ca^{2+} リズム（AVP- Ca^{2+} 、VIP- Ca^{2+} ）を自由行動化のマウスで長期計測した。組換え AAV ベクターを用いて AVP ニューロンには緑色、VIP ニューロンには赤色蛍光 Ca^{2+} センサータンパク質を導入し、ファイバーフォトメトリー法により計測した。

⑤ AVP ニューロン、VIP ニューロンも含む全ての SCN ニューロンは GABA を含有する。AVP ニューロンが GABA を介して VIP ニューロンをどのように調節するかを明らかにするために、AVP ニューロン特異的 Vgat 欠損マウスおよび VIP ニューロン特異的 GABAA 受容体欠損マウスにおける概日行動リズムと VIP- Ca^{2+} リズムの関係を検討した。また、AVP ニューロンの光遺伝学刺激に対する VIP ニューロンの応答を、in vivo、ex vivo で計測した。

- ③ 光同調に異常を示す AVP ニューロン特異的 Nalcn (漏洩 Na^+ チャンネル) 欠損マウスについて、光パルスを与えた時の AVP ニューロン、VIP ニューロンの応答の異常を *in vivo* で計測した。

③研究成果

- ① 正常マウスでは AVP- Ca^{2+} 、VIP- Ca^{2+} とともに明瞭な概日リズムを示す。VIP 欠損マウスでは、VIP- Ca^{2+} は恒常暗条件下で急速にリズムが消失する一方で、AVP- Ca^{2+} は振幅は小さいながらも概日リズムが安定的に継続した。しかしその位相は前進し、行動リズムと一致した短周期のリズムを示した。様々な実験から、「ペースメーカー細胞・AVP ニューロンが刻むリズムに合わせて VIP ニューロンは神経活動を増減させ VIP を適切なタイミングで放出し、放出された VIP は AVP ニューロン群を適度に同調させてリズム振幅を高める、AVP ニューロンの固有リズム周期はやや短め (~22.5 時間) で、VIP は AVP ニューロンに作用し毎日リズム位相を遅らせて周期を 24 時間に近づける」とのフィードバックループ神経回路 (SNFL: SCN Neuronal Feedback Loop) を中枢時計のリズム生成機構の有力な仮説として提唱するに至った。以上の成果をまとめた論文を現在投稿中である。
- ② AVP ニューロン特異的 Vgat 欠損マウスでは行動リズムの活動期が延長、休息期が短縮した。AVP- Ca^{2+} リズムには変化がないが、VIP- Ca^{2+} リズムは休息期に合わせて高 Ca^{2+} の時間が短縮した。VIP ニューロン特異的 GABAA 受容体欠損マウスではその逆で、行動リズムは活動期短縮・休息期延長、VIP- Ca^{2+} リズムは休息期に合わせて高 Ca^{2+} の時間が延長した。また、*in vivo*、SCN スライスの両方で、AVP ニューロンを光遺伝学刺激すると VIP- Ca^{2+} は増加した。様々な実験から、「SCN ネットワーク内において、VIP ニューロンは中間 GABA ニューロンにより抑制を受ける、AVP ニューロンから放出される GABA は中間 GABA ニューロンを抑制することにより、間接的に VIP ニューロンを脱抑制する、VIP ニューロンの活動が高い時間が行動リズムの休息期を規定する」との結論に至った。以上の成果をまとめた論文を現在投稿中である。
- ③ AVP ニューロン特異的 Nalcn 欠損マウスは、夜後期の光パルス照射により生じる概日リズム位相前進が、極度に亢進していた (正常マウス: 約 1 時間、欠損マウス: 8 時間以上)。網膜からの入力を直接受けない SCN shell 特異的な遺伝子操作で、これほど明瞭な光同調異常を示した例はこれまでになく、光同調のメカニズムを理解する上で非常に有用なモデルとなる。ファイバーフォトメトリー法を用いて AVP- Ca^{2+} 、VIP- Ca^{2+} を計測したところ、光パルスに対する VIP- Ca^{2+} 応答は正常であるが、AVP- Ca^{2+} の応答が欠損マウスで亢進していることが明らかになった。スライス電気生理解析等の様々な実験を合わせて、現在論文を執筆中である。

研究テーマ

環境適応に関わる TOR 経路の解析

研究者

日本女子大学 理学部化学生命科学科 大野 速雄（オオノ ハヤオ）

①研究の背景及び目的

研究代表者は、分子生物学における優れたモデル生物である線虫 *C. エレガンス*（以下、単に線虫）を主に用いて、環境適応に関わる分子メカニズムを明らかにしてきた (Ohno et al., *Science* 345, 2014; Ohno et al., *eLIFE* 6, 2017; Ohno et al., *Cell Rep.* 20, 2017; Sakai, Ohno et al., *PLoS ONE* 12, 2017; Ohno and Bao, *Science Adv.* 8, 2022 など)。線虫は、外界の塩化ナトリウム（塩）の濃度と餌の有無を関連づけて記憶でき、過去に餌とともに経験した塩濃度を好み、逆に飢餓を経験した塩濃度は避けるようになる学習（塩走性学習）を行う (Ohno et al., *Science* 345, 2014)。哺乳類にも保存された多くの遺伝子がこのシンプルな行動可塑性に関与することが明らかとなっており、この現象の解析は記憶・学習をつかさどる普遍的なメカニズムの理解へとつながることが期待される。最近になって研究代表者らは、この線虫の学習を TOR (Target of Rapamycin) とよばれるタンパク質が制御することを明らかにした (Sakai, Ohno et al., *PLoS ONE* 12, 2017)。

TOR は免疫調節薬剤ラパマイシンの標的分子として発見されたキナーゼである。TOR は、構成分子と機能の異なる二種類の複合体 (TORC1 と TORC2) を形成するが、このうち特に TORC2 が、線虫の学習の制御に重要である (Sakai, Ohno et al., *PLoS ONE* 12, 2017)。古くから TOR 経路は様々な病態・疾患と関連することが指摘されており、TOR 経路のうち TORC2 経路についてもがんや寿命への関与が示唆されている (Laplanche and Sabatini, *Cell* 149, 2012; Xiao et al., *Cell* 152, 2013)。TOR 経路の作用機構について明らかにすることは、人間の病気の予防・治療、さらには健康寿命の延長を実現するうえで役立つ可能性が高いと考えられる。

人間の美容にとって特に重要な、皮膚の形成や老化についても、TOR 経路の関与が疑われている。TOR 経路は皮膚の形態形成や表皮のバリア形成に関わり (Ding et al., *Nat. Commun.* 7, 2016)。また、TOR 経路の阻害剤であるラパマイシンを皮膚に塗布すると、しわやたるみの減少、光老化の抑制など、皮膚の外観が改善する (Chung et al., *GeroScience* 41, 2019)。ただ、医療現場ではラパマイシンなどの TOR 阻害剤が既に免疫抑制剤として運用されているものの、長期間投与による神経機能・代謝機能への影響を調べた知見は少ない。長期間にわたって TOR 経路を阻害する影響を正しく評価するためには、TOR 経路の生体内での作用メカニズムを詳細に知る必要がある。

本研究では、線虫の学習において TOR 経路の下流で機能する関連分子とその機能部位の同定を通じて、TOR 経路が果たす作用を詳細に明らかにすることを目指した。

②研究方法

TORC2 の下流因子を同定するため、成長速度が遅い *ric1-1* (TORC2 の特異的構成因子である Rictor のホモログ) の変異体に化学変異原処理を行って、成長速度が野生型と同程度まで回復した抑圧変異体 (サプレッサー) を単離する順遺伝学的スクリーニングを以下に行った。

ric1-1 (*mg360*) 変異体株を同調飼育し、40 mM のメタンスルホン酸エチル (EMS) を用いて、4 時間化

学変異原処理を行った。F₂ 世代まで継代飼育した後、成長速度が回復したと思われる個体を単離・継代した。*ric-1(mg360)* 株、得られた変異体、野生型について、それぞれ卵の状態から 24・48 時間後に各成長期にいる個体の数をカウントすることにより、株ごとの成長速度を調べた。

獲得した抑圧変異体における責任変異の同定は、変異導入前の株との戻し交配と全ゲノムシーケンスを組み合わせた方法 (Zuryn et al., *Genetics* 186, 2010) によって行うこととした。

③研究成果

上述のスクリーニングの結果、成長速度が回復した抑圧変異体と思われる株を 3 種類 (CAT34、CAT35、CAT36) 単離することに成功した (図 1)。これらの株について、継代した後表現型が維持されていることを確認した後、変異導入前の *ric-1(mg360)* 株との戻し交配を 3 回ずつ行うことに成功している。

今後、さらに 1~2 回程度ずつ戻し交配を行ってバックグラウンド変異を取り除いたうえで、全ゲノムシーケンスにより責任遺伝子を同定する。これらの抑圧変異体が TORC2 経路変異体の学習異常も抑圧するかを確認したうえで、同定された遺伝子の機能する部位と時期、さらに関連遺伝子との物理的・遺伝学的相互作用を解析していくことで、TOR 経路の機能様式を詳細に明らかにすることを目指す。

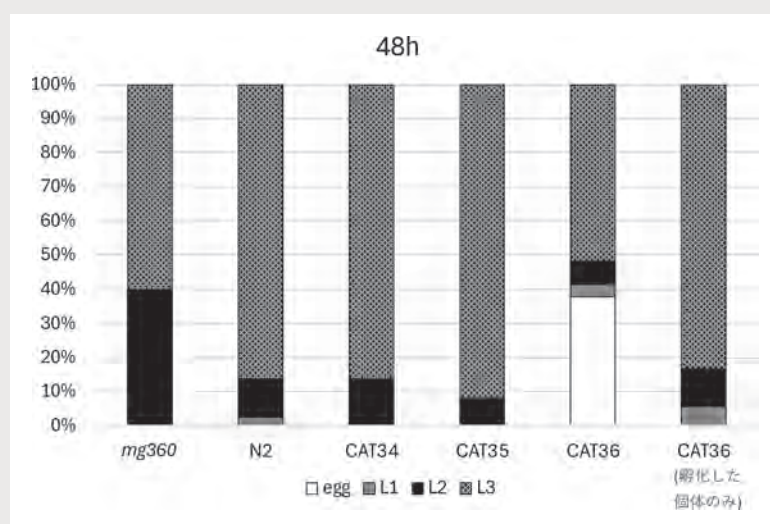


図 1 48 時間後の各株の成長

研究テーマ

D ペプチドによるアルツハイマー病 候補薬の開発

研究者

神戸大学 大学院工学研究科応用化学専攻 丸山 達生 (マルヤマ タツオ)

【緒言】

アルツハイマー病の原因および発症にはアミロイド β ($A\beta$) と呼ばれるタンパク質が密接に関わっているとされている。 $A\beta$ は線維状の凝集を形成し、神経毒性を示す。現在、用いられているアルツハイマー病の薬は症状を緩和あるいは進行を多少遅らせるものであり、根治を目指した薬の開発が強く求められている。本研究では、短鎖 D ペプチドを用いて $A\beta$ とのステレオコンプレックス形成により $A\beta$ の線維化阻害を目指した。ステレオコンプレックスとは、鏡像異性体の関係にある D 体と L 体の物質を混合したときに形成される複合体のことである。L 体アミノ酸で構成される $A\beta$ に対して、 $A\beta$ の一部のアミノ酸配列を模倣した D 体短鎖ペプチドを用いることで、 $A\beta$ の一部の配列でステレオコンプレックスを形成する可能性がある。これにより $A\beta$ の立体構造を変化させ、 $A\beta$ の線維化凝集を阻害することができるのではないかと考えた。我々の研究グループではこれまで D 体/L 体ペプチド間でステレオコンプレックスを形成しうることを実証してきた。このステレオコンプレックス形成には、疎水性相互作用と静電的相互作用が影響していることが示唆されている。そこで本研究においては、 $A\beta$ のアミノ酸配列内の疎水的な部位と電荷をもつ部位に着目し、これを模倣した D 体短鎖ペプチドをデザインした (図 1)。 $A\beta$ のアミノ酸配列中のフェニルアラニンが 2 つ連なる配列に着目し、数種の D 体短鎖ペプチドを $A\beta$ の線維化阻害剤として検討した。

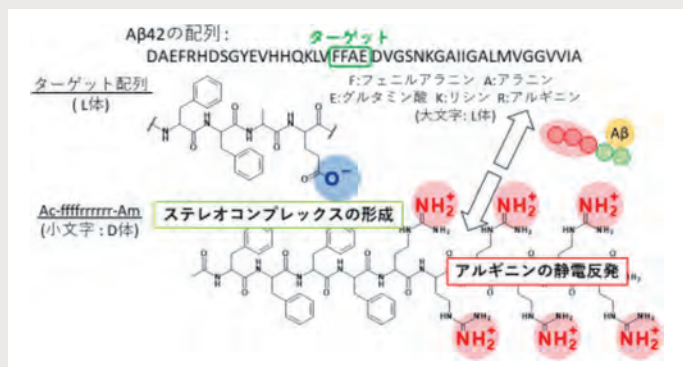


図 1 設計した D ペプチドの分子構造と予想した $A\beta$ との相互作用

【実験方法】

D-アミノ酸からなる D ペプチド Ac-fnr6-Am (f: D-Phe, r: D-Arg, n=2 ~ 5) を合成した。これらの $A\beta$ 線維化に対する阻害効果をチオフラビン T (ThT) の蛍光アッセイにて評価した。ThT は $A\beta$ 線維構造の基となるタンパク質の β -シート構造と特異的に結合し、特徴的な蛍光 (Ex: 450 nm, Em: 490 nm) を発する。この蛍光強度を経時的に測定することによって線維化の様子を観測可能となる。また、設計した D ペプチドを蛍光ラベル化し、 $A\beta$ の部分配列を混合し消光実験を行うことにより、D ペプチドと $A\beta$ の相互作用について検討した。 $A\beta$ と D-ペプチドの複合体の構造解析は CD スペクトル測定と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察にて行った。また D ペプチドを加えたときの $A\beta$ の毒性評価を、神経細胞の PC12 細胞を用いて行った。

【結果と考察】

我々は先行研究において L 体と D 体の N-Acetyl-phenylalanine-phenylalanine-lysine (Ac-FFK/Ac-ffk) が相互作用を有することを発見している。そこで本研究では $A\beta$ 中の L-フェニルアラニンが連続するアミノ酸

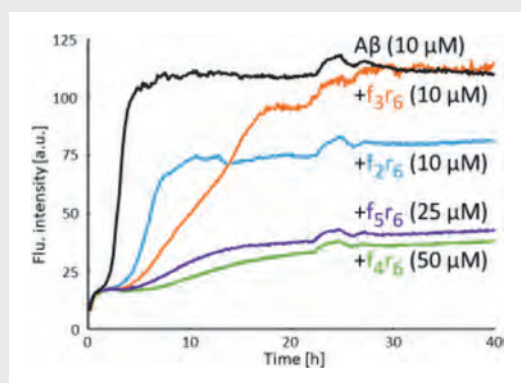


図2 設計したDペプチドがAβの線維化に及ぼす影響

配列(-VFFAE-)に着目し、-VFFAE-と相互作用し、かつ静電的に反発するDペプチドを複数設計した。設計したペプチドは、D体フェニルアラニンがn個有し(n=2~5)、カチオン性を示すD体アルギニンが6つ有するものとした。

ThT蛍光アッセイによりAβの線維化を評価したところ、Ac-f₄r₆(N-Ac-ffffrrrrrr)がAβの線維化を最も効果的に抑制した(図2)。設計したDペプチドは配列中のD-フェニルアラニンの数に応じて異なる線維化阻害効果を示すことが判明した。D-フェニルアラニンの残基数が2および

3のDペプチドではThT蛍光強度の立ち上がりが遅れたことから、Aβ線維化の核生成が抑制されたと考えられる。D-フェニルアラニンの残基数が4および5のDペプチドではThT蛍光強度が上昇しなかったため、Aβ線維の伸長が抑制されたと考えられる。

これらDペプチド存在下で形成したAβの凝集物を透過型電子顕微鏡にて観察した(図3)。Aβのみの凝集物では、既報の通り線維状のAβ凝集物が観察された。Dペプチドを添加すると、どのDペプチドにおいても線維状構造物は観察されず、不定形の凝集体が観察された。つまり、いずれのDペプチドにおいてもDペプチドとAβが相互作用し、線維化しなかったものと考えられる。

線維化Aβの凝集物が神経細胞毒性を示すことが知られている。そこで神経細胞モデルであるPC12細胞を用いてAβの細胞毒性試験を行った。ここではプロメガ社製CellTiter-Glo™ Cell Viability Assayを用いて、Aβの細胞毒性にDペプチドが与える影響を検討した(図4)。Aβのみを添加した系では細胞の生存率が約50%程度まで低下した。一方で、Dペプチドと同じアミノ酸配列を持つLペプチド(Ac-F₄R₆)を添加した系では、多少の細胞生存率の向上が見られたものの、生存率はやはり50~65%程度であり、Aβに由来した毒性が観察された。Aβと等量のDペプチド(Ac-f₄r₆)を添加した系では、細胞生存率が75%以上であった。Dペプチドの添加量を増やすとその生存率は向上し、2.5モル等量以上ではAβの細胞毒性を完全になくすことに成功した。

以上より、本研究で開発したDペプチドはAβの線維化を効果的に阻害し、かつAβ凝集体の細胞毒性を大幅に低減可能であることを実証した。アルツハイマー型認知症においてAβの線維化が問題視されるなか、比較的簡単な分子かつDペプチドという生体適合性の高い化合物でAβの線維化阻害に成功したことは大きい。今後動物実験等を進めて、アルツハイマー型認知症の候補薬を開発していく予定である。

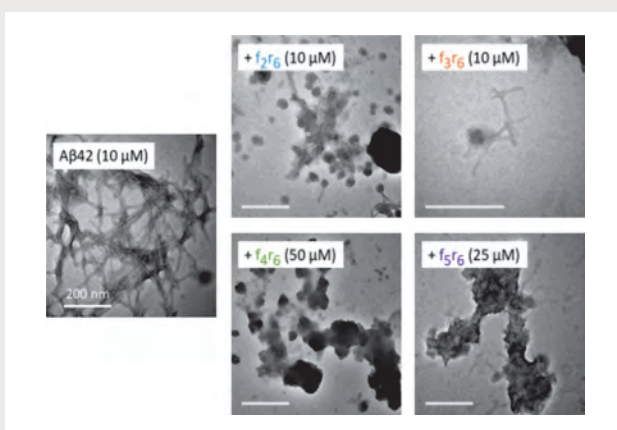


図3 Dペプチド非存在下および存在下で形成したAβ凝集体のTEM観察像

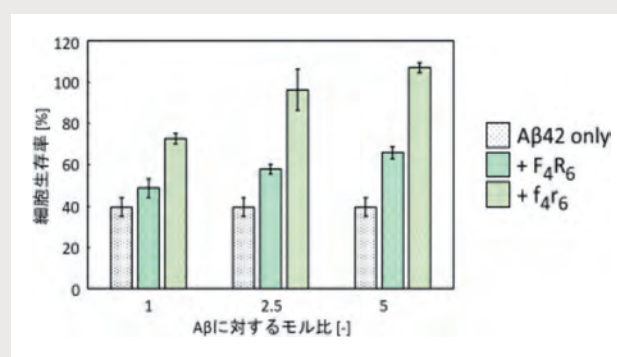


図4 Aβの細胞毒性に及ぼすDペプチドおよびLペプチドの影響

研究テーマ

環境・製品中の糖鎖原料による炎症性呼吸器疾患誘導機構の解明

研究者

杏林大学 保健学部 新江 賢（アラエ ケン）

①研究の背景及び目的

近年、我が国では、アレルギー性気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患（COPD）、突発性間質性肺炎といった慢性的炎症性呼吸器疾患が増加しており、社会的及び医療経済上の問題となっている。これらの原因は不明ながら、遺伝的背景の他に環境因子などによる日常的な気道炎症が想定できる。

申請者が注目している糖鎖抗原は直鎖状の多糖類で、花粉やカビ、さらには主要アレルゲンであるダニなどに共通する外套成分である。したがって、居住環境においては、それらを吸入することにより日常的に糖鎖抗原に暴露されていると考えられる。

一般的にこの糖鎖抗原は人体に無害とされており、様々な製品（フィルター、コンタクトレンズ、人工皮膚等）の原料として利用されてきたが、糖鎖抗原を吸入すると、自然免疫を介した気道炎症が誘発されることが明らかとなっている。これは、ハウスダスト中の花粉・カビや、ダニの破片などの糖鎖抗原を含有する粒子を日常的に吸入することにより、将来的にアレルギーやCOPDなどの慢性炎症性呼吸器疾患が誘導される可能性があることを示している（図1）。

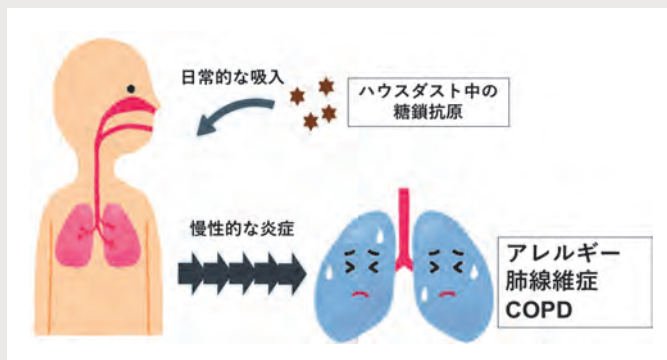


図1 糖鎖抗原は様々な疾患の原因かもしれない

事実、糖鎖抗原を分解排除できないと、肺線維症を自然発症することが報告されている。したがって、この糖鎖抗原による慢性的な気道炎症を制御出来れば、様々な炎症性呼吸器疾患の発症をコントロールできると考えられる。しかしながら、糖鎖抗原による気道炎症誘発機構の詳細は、受容体をはじめ依然不明なままである。

申請者は、糖鎖抗原に結合して炎症誘発に関わる分子として、糖鎖結合分子（以下分子A）を独自に同定している。この分子Aは、重症のアレルギー喘息やCOPDなど患者血清で有意に増加することが報告されており、様々な慢性気道炎症のバイオマーカーとなり得ることが知られている。その一方で、その機能についてはほとんど明らかとされていない。

申請者らは、免疫細胞を分子A存在下で糖鎖抗原で刺激したときだけ炎症性サイトカインが多量に産生されることを明らかとしており、糖鎖抗原が分子Aと複合体を形成して細胞内にシグナルが伝わると考えている（図2実験①）。

さらに、CRISPR/Cas9システムで新たに樹立した分子A欠損マウスに糖鎖抗原を吸入させると炎症病態がほとんど消失することから、気道粘液中の分子Aが糖鎖抗原による気道炎症誘発に強く関わることを明らかとしている（図2実験②）。現在までところ、糖鎖抗原/分子Aが結合する細胞上の受容体等は全く不明である。

しかしながら、分子 A の産生細胞を特定し、その産生機構が明らかとなれば、それを標的とした糖鎖抗原による慢性的な気道炎症の抑制方法、すなわちアレルギーや COPD などの慢性炎症性疾患の予防方法の開発に有用である。

②研究方法

- 1) そこでまず、分子 A 産生細胞の同定を目的に、肺の組織細胞（免疫細胞＋非免疫細胞）をソーティングにより分取し、1 細胞 RNA シークエンス（scRNA-seq）解析をこれにより、分子 A の mRNA を発現する細胞集団を特定することができる。
- 2) 特定した分子 A 産生細胞を、1) と同様にソーティングにより分取し、様々なサイトカインで刺激して培養液中の糖鎖結合分子濃度を評価する。これにより、分子 A の産生に関わるサイトカインが明らかとなる。

③研究成果

- 1) 糖鎖抗原を吸入させたマウスの肺の免疫細胞および非免疫細胞をソーティングにより分取し、scRNA-seq 解析を実施した。その結果、分子 A 産生細胞の候補として、II 型肺胞上皮細胞が明らかとなった。
- 2) 次に、マウス肺の II 型肺胞上皮細胞のソーティング、糖鎖結合分子産生能およびその産生機構の解明を試みた。その結果、マウス肺組織からの II 型肺胞上皮細胞の分離とフローサイトメーターによる検出が可能となった。

今後は、II 型肺胞上皮細胞を分取・培養し、この分子 A の産生に関わるサイトカインの特定を目指す。



図 2 糖鎖結合分子が炎症誘発に関与

研究テーマ

ナノポア形成をシグナル増幅として用いるエクソソーム計測技術の開発と単一粒子測定への応用

研究者

東京薬科大学 薬学部 生体分析化学教室 守岩 友紀子（モリイワ ユキコ）

①研究の背景及び目的

生体試料に含まれるエクソソームは、様々な疾患のバイオマーカーとして期待されている。我々は人工細胞膜とエクソソームの膜融合を観察するためのアッセイ法を構築しており、このアッセイ法で得られた知見をもとに、エクソソームの捕捉とセンシングを一体化した計測技術の開発を目指した。

この方法では、リン脂質のみで作製した蛍光色素封入リポソーム (SMV) にエクソソームを膜融合させることで、エクソソーム由来のコレステロールを SMV 膜に移行させる。アムホテリシン B (AmB) を添加すると、膜内のコレステロールと相互作用してナノポアを形成し、封入されていたマーカー色素が漏出される。膜融合するエクソソームの個数に依存して AmB のポア数が増加し、多量のマーカー色素が漏出されるため、本法は優れたシグナル増幅能を有することになる。さらに、漏出したマーカー色素を感度良く検出するために、単一粒子測定 (Single particle detection: SPD) に着目した。少数のマーカー分子であっても、1 粒子に濃縮することで検出可能になる。そのため、エクソソームが膜融合した SMV 量も少量でよいと、計測感度の向上が期待される。

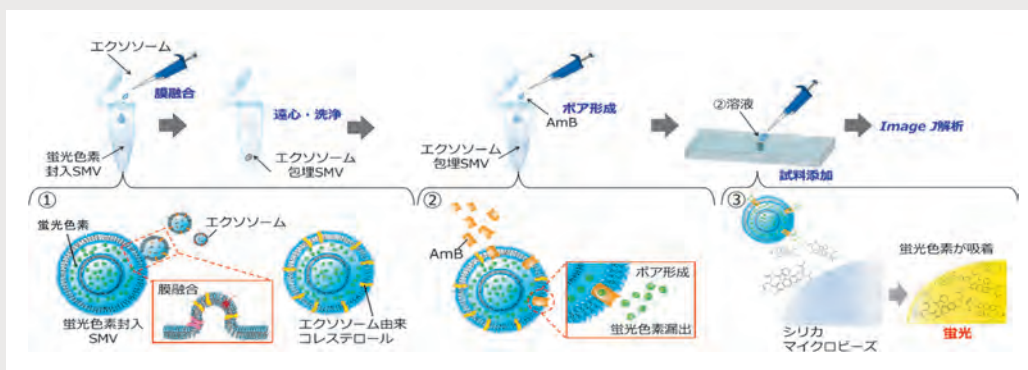


Fig. 1 本研究の概要図

②研究方法

SPD 用マイクロウェルの作製: 3D プリンターを用いて円錐台形の細孔を有する平面基板を作成し、その細孔に 1 粒子のシリカマイクロビーズ (直径: 500 μm) を固定化した。続いて、生検トレパンを用いて直径 3 mm の穴をあけた厚さ 2 mm のポリジメチルシロキサンシートを両面テープで平面基盤に張り合わせることで、固定化したビーズ上にマイクロウェルを作製した。

AmB を用いた膜孔形成の評価: 蛍光色素溶液を内水相とした SMV を作製した。蛍光色素封入 SMV に AmB を反応後、その溶液をマイクロウェルに移した。マイクロウェル上でインキュベーション後、溶液を洗浄し、蛍光顕微鏡を用いてシリカマイクロビーズの蛍光画像を撮影した。撮影した画像を Image-J 1.8 により解析し、蛍光強度を算出した。

SPD によるエクソソームの検出: 脂質二分子膜にコレステロールを含有しない蛍光色素封入した SMV

を作製し、A549 細胞株 (肺癌) 由来のエクソソームと膜融合させた。続いて、AmB を反応させ、エクソソーム由来のコレステロールによる膜孔を形成させた。その後は AmB を用いた膜孔形成の評価と同様な手順でシリカマイクロビーズの蛍光強度を算出した。

③研究成果

蛍光色素濃度依存的なシリカマイクロビーズの蛍光

蛍光色素溶液中にシリカビーズを懸濁させると、蛍光色素が吸着しシリカビーズ自体が蛍光を発した。3D プリンターを用いて作製した SPD 用マイクロウェルに蛍光色素溶液を添加したところ、単一のシリカ粒子表面に蛍光色素が凝集し、濃度依存的な蛍光強度の増加を検出することができた (Fig. 2)。

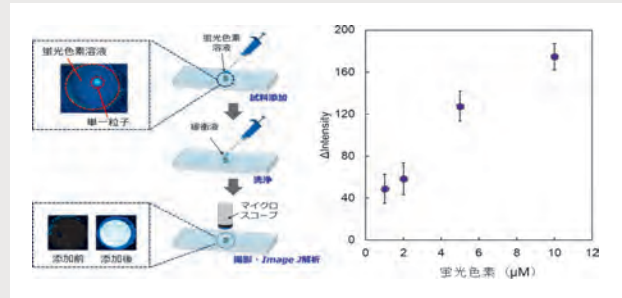


Fig. 2 蛍光色素濃度依存的なシリカビーズの蛍光強度

コレステロール含有量の異なる SMV 中の蛍光色素量

コレステロール含有量の異なる SMV を作製し、封入される蛍光色素量に変化がないか調査した。各 SMV をエタノールを用いて溶解させた後、その溶液を SPD 用マイクロウェルに添加し、粒子の蛍光強度を測定した。Fig. 3 の結果より、コレステロール含有量が異なっても封入される蛍光色素量に大きな変化はないことが明らかになった。

AmB を用いたポア形成の評価

脂質二分子膜にコレステロールを含有する蛍光色素封入 SMV と AmB を用いて、本アッセイ法が機能するか調査した。その結果、コレステロールを指標にしてポアを形成する AmB により SMV にポアが形成され、封入された蛍光色素が漏出し、ビーズが蛍光を発することがわかった (Fig. 4)。SMV をエタノールを用いて溶解した場合と比較すると、蛍光強度は低い結果となった。この理由として、SMV は多重膜であることが挙げられる。AmB は外側の層のコレステロールを標的とし、ポアを形成している。そのため、封入されている全ての色素を漏出することはできず、蛍光強度が小さくなったと考えられる。

AmB を用いたポア形成の評価

本アッセイ法をエクソソームの検出に適用するために、エクソソームを脂質二分子膜にコレステロールを含有しない蛍光色素封入リポソームに膜融合させ、脂質膜中にエクソソーム由来のコレステロールを包埋させた。膜融合後、AmB 溶液を添加した溶液を SPD 用マイクロウェルに添加したところ、AmB のポア形成により蛍光色素が漏出し、ビーズの蛍光強度が大きくなることを明らかにすることができた (Fig. 5)。その結果、10 万個程度のエクソソームを検出することに成功した。

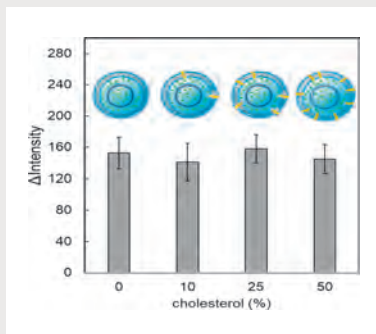


Fig. 3 コレステロールの含有量の異なる SMV 中の蛍光色素量

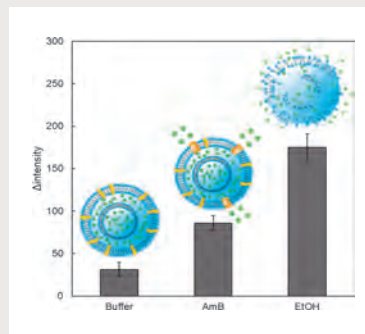


Fig. 4 蛍光色素の漏出によるシリカビーズの蛍光強度

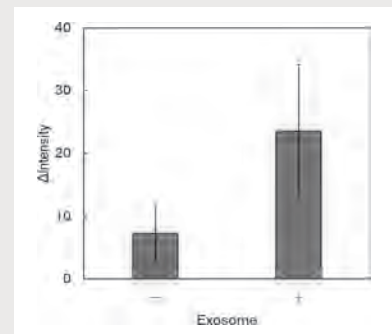


Fig. 5 SMV とエクソソームの膜融合の有無によるシリカマイクロビーズの蛍光強度

研究テーマ

下痢症ウイルスの感染感受性を規定する腸内環境因子の同定

研究者

大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野 金井 祐太（カナイ ユウタ）

ロタウイルスは、乳幼児に重篤な下痢症を引き起こすウイルス性腸炎の主要な原因ウイルスであり、特に5歳以下の小児においては命に関わる症状を呈することもある。2006年以降、弱毒化ロタウイルスワクチンの導入が世界各国で進められ、先進国を中心に重症例や死亡率の大幅な減少が報告されている。しかしながら、医療体制が整っていない低所得国ではワクチンの普及率が依然として低く、現在でも毎年約10万人の乳幼児がロタウイルス感染によって命を落としているのが現状である。さらに、ロタウイルスに対して有効な特異的抗ウイルス薬は存在せず、治療は主に補液などの対症療法に頼らざるを得ない状況である。申請者はロタウイルス感染に関与する腸内環境の研究を進めており、これまでに無菌マウスにおいてロタウイルス感染が顕著に抑制されることを見出している。さらに通常飼育マウスの糞便懸濁液を無菌マウスに経口投与し、腸内細菌叢を再構築したところロタウイルス感染能が正常レベルまで回復したことから腸内細菌がロタウイルス感染に必要であることが示唆された。

そこで様々な抗生物質マウスに投与したところ、ロタウイルス感染を抑制するものとししないものがあることを見出しており、特定の腸内細菌がロタウイルス感染に関与していることが示唆されている。さらにマウスの飼料を変更することでロタウイルス感染能が顕著に変化することも見出しており、腸内細菌を含む腸内環境が変化することで腸管感染性ウイルスに対する感受性が容易に変化することを明らかにしている。こうした結果から、抗生物質や食事等により人工的に腸内環境を改変することで腸管ウイルス感染を抑制できると考えている。この結果を踏まえ、本研究ではロタウイルス感染に関連する腸内細菌の特定を行うため、マウスの標準的な腸内細菌12種(OMM12)を無菌マウスに経口接種したノトバイオームマウスを構築した。このノトバイオームマウスに対しロタウイルス感染を行ったが、ロタウイルス感染は回復しなかった。ノトバイオームマウスの糞便サンプルからOMM12の検出を試みたが一部の細菌は検出できなかったことから、定着していない可能性が考えられた。今後は細菌の定着条件を再度検討しロタウイルス感染実験を繰り返すと共に、OMM12以外の細菌種の定着実験も試みる予定である。次に腸内細菌の有無による腸管上皮細胞の表現型の変化とロタウイルス感染との関連を明らかにするため、抗生物質を投与したマウスの腸管上皮細胞における遺伝子発現変化を調べた。ペニシリンを2週間投与したマウスから盲腸を採取し、トランスクリプトーム解析を行ったところ、約650の遺伝子がペニシリン投与マウスにおいて発現上昇し、約1,700の遺伝子は発現が低下していることが明らかとなった。発現が変化した遺伝子とロタウイルス感染との関連を調べるため、マウスの腸管から初代培養細胞を分離し、SV40 large T抗原を使用し、不死化細胞株(Immortalized Cells of Balb/c: ICBc細胞)を樹立した。特に発現の上昇が認められた49の遺伝子についてはレンチウイルスベクターを用いて、ICBc細胞に過剰発現した後にロタウイルス感染を行った。

また発現低下が認められた77の遺伝子については、レンチウイルスベクターを用いて発現のノックダウンを行った後に、ロタウイルス感染を試みた。複数回実験を繰り返した後に、9遺伝子については過剰発現することでロタウイルス感染が抑制されることが示され、45遺伝子についてはノックダウンすることで同様にロタウイルス感染が抑制されることが示された。今後は個々の遺伝子発現とロタウイルス感染

との詳細な分子メカニズムや腸内細菌の有無と腸管上皮細胞の発現系の関連を調べる。さらに無菌マウスに対して OMM12 を含む様々な腸内細菌の安定定着条件を再検討し、ロタウイルス感染実験に必要な腸内細菌の特定を試みる。得られた結果から、特定の腸内細菌や宿主遺伝子を標的とした腸内環境改変による腸管ウイルス制御法の開発に取り組む。

研究テーマ

運動器疼痛治療に適したジバニリンによる新規分解性粒子の調製

研究者

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 網代 広治（アジロ ヒロハル）

①研究の背景及び目的

超高齢社会を迎え健康寿命の延伸は重要課題であるが、運動器機能が長寿に追いつけなくなっている。その原因のひとつに慢性疼痛があり、患者数は2300万人と推定されている。この背景の下、Interventional Radiology (IVR) を用いて、X線透視やCTなどの画像ガイド下に体内を透視しながらカテーテルや梁を使用して行う治療が着目されている。ここに、観測される異常血管を、カテーテルから粒子を注入して閉塞をすることで、除痛効果が得られる治療が知られている。これは新しい治療法として、今後保険診療として認められることが期待されている。現在最も効果が認められているのが、イミペネム・シラスタチンというカルバペネム系の抗菌剤であり、適応外使用として用いられてきた。しかしながら、これは抗菌剤であるため、適用認可される見込みが低いと考えられ、したがって、これに代わる粒子の開発が望まれる。

そこで、短時間で分解することができる新しい分解性高分子で、かつ分解物も毒性が低いものを新しく分子設計した。また、これを血管を閉塞するサイズの粒径で粒子化することを試みたので、研究成果を報告する。

②研究方法

文献 (A. Hufendiek et al., Polym. Chem. 2019, 10, 9 等) に従い、Divanillin (1) を合成した。またこのジバニリンに含まれる2つのアルデヒド基と反応してアセタール基を形成するジオール部分を、さらに二つ含む、テトラオールとして、左図に示す化合物2,3を選択した。文献 (F. Zhen et al., ACS Sustainable Chem. Eng. 2020, 8, 9095) の手法に従って、アセタール部を高分子主鎖に導入する反応を行なった。得られたポリマーは、NMR 分析、SEC 分析を行なって高分子構造を確認した。また、このポリマーを用いてマイクロ粒子の調製を試みた。

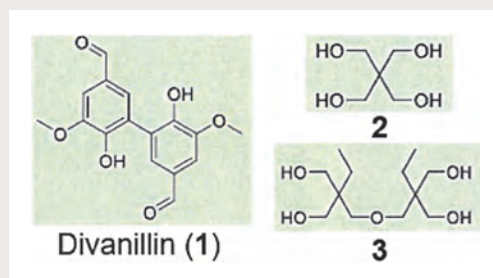


図1 本研究で用いた化合物の

③研究成果

化合物1は二つのヒドロキシル基を有するため、その置換基が重合反応性に影響する。そのため、化合物1のヒドロキシル基を保護したDivanillin (4) も合成した。化合物1を3.02 g (10 mmol)、ヨードメタン3.8 mL (60.8 mmol) 炭酸カリウム5.85 g (42.3 mmol) を、46 mL のジメチルホルムアミド (DMF) 反応させて目的物を得た (79.6%)。化合物1および化合物4を、テトラオール2および3と反応させて、高分子合成を行なった。まず、化合物4を3.00 g (9.08 mmol)、化合物2を1.24 g (9.08 mmol)、およびp-Toluene sulfonic acidを触媒として95.5 mgを用いて、溶媒にTolueneを使用し重合反応を行なった。反応時間を2時間、16時間、24時間ごとにサンプリングしてNMRを測定したところ、約5.5 ppm付近に反応して形成されるアセタール構造のピークが出現し、24時間後には69%反応していることが見積もられた。反応混合物は、クロロホルムに溶解させて、出発物質を沈殿させ、フィルターろ過で取り除くことでクロロホルム可溶部を生成ポリマーとして回収した。ジバニリン化合物1についても同様に反応させて、種々

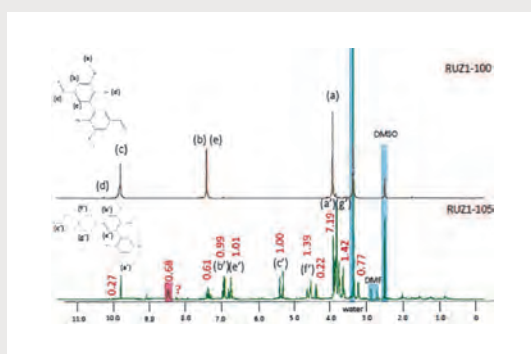


図2 本研究の高分子のNMR

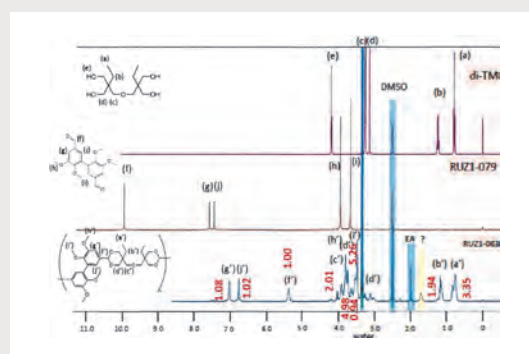


図3 本研究で合成した高分子のNMR

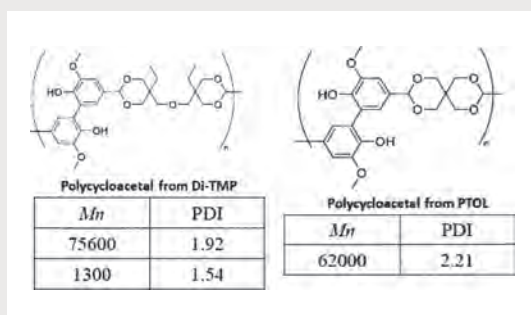


図4 粒子化に用いた高分子の分子量

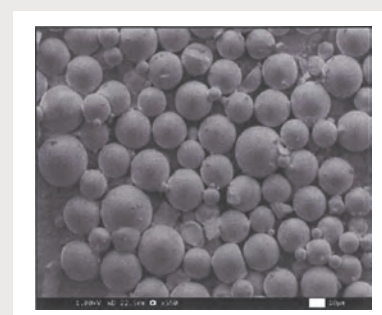


図5 本研究から得られた粒子のSEM図

のポリマーを得た。図2に出発物質と得られたポリマーの化合物のそれぞれプロトンNMRスペクトルを示した。これらを比較したところ、アセタールに由来するピークの出現を確認した。

さらに収率の向上を目指して、テトラオール反応性と溶解性の改善を考え、化合物3を用いて重合反応を行なった。例えば、ジバニリン化合物4を0.85 g (2.57 mmol) と化合物3を0.64 g (2.57 mmol)、触媒としてp-Toluene sulfonic acidを27.6 mg (0.154 mmol)を用い、溶媒としてDMSO 12.8 mLとbenzene 64 mLを用いて反応を行なった。その結果、0.24 gのポリマーが得られた(収率18.5%。この場合、SEC分析を行ったところ、数平均分子量(Mn)は5500、分子量分布(PDI)は1.25であった。このときのNMR分析を行った結果を図3に示す。図2の場合と同様に、アセタール由来のピークを確認し、高分子合成の達成を確認した。以上と同様に化合物1を用いてゆく数の高分子化合物を調製した。

続いて、マイクロサイズの粒子の調製を試みた。分解性と親水性を考慮して、ジバニリンして化合物1を選択した。粒子化に用いる高分子化合物で、テトラオールとして3および4をそれぞれ用いたものをSEC分析したものを図4に示した。

まず、水中の油滴中に水溶性の滴を形成させるW/O/Wを試みた。それぞれのポリマーのジクロロメタン溶液中に水を滴下した後、超音波をかけて有機溶媒中の水滴を形成させた。続いてこれを0.5%ポリビニルアルコール(PVA)溶液へ滴下した。この試料をレーザー顕微鏡で観察したところ、不揃いな形の凝集物しか観測されなかった。そこで次に、水中の油滴を利用するO/Wの系を試した。つまり、ポリマー2 gを40 mLに溶解させこれを0.5% PVA溶液滴下し、一晩700 rpmで攪拌した。ここで析出された沈殿物を、遠心分離を行ない、純粋で3回洗浄した。この後、得られた粒子を凍結乾燥を行うことで、試料を回収した。ここで得られた試料をSEMによって観察した結果を図5に示す。その結果、形状がきれいな粒形を保っていることが確認された。その粒径は、直径6~30 μm という結果となった。体内の毛細血管が約5~10 μm であることが知られており、研究代表者の最近の報告によるイミペネム・シラスタチンの粒径が16から57 μm であることから(R. Zhang et al., Colloid Surf. A. 2024, 701, 134896)今後血管の閉塞作用に用いるために適当なサイズに収まったものが得られた。

今後は、これら粒子が管状の中における閉塞挙動や、分解挙動を明らかにすることで、イミペネム・シラスタチンに代わる医用材料として評価することが望まれる。

研究テーマ

三次元血管網を有する非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）モデルの開発

研究者

京都大学 大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻 松本 倫実（マツモト サトミ）

本研究ではマイクロ流体デバイス内で、血管を有する肝スフェロイドを構築し、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の病態を模倣する実験系の確立を目指した。本 *in vitro* モデルの確立は、NAFLD の病態解明や創薬評価系として有用であると期待される。

まず、肝スフェロイド内部に灌流可能な血管網の形成可能なデバイスを開発した（図 1）。本デバイスは 3 本のマイクロチャネルと、それらを仕切るマイクロピラーから構成されており、細胞が各チャネル間を遊走可能な構造を有している。HepaRG 細胞、肝類洞内皮細胞（LSEC）、線維芽細胞（LF）からなる肝スフェロイドを LF とともにフィブリングルに包埋して中央チャネルへ播種し、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を側面のチャネルへ播種し、三次元共培養することで図 2 に示すような血管化された肝スフェロイドの形成に成功した。なお、スフェロイドの初期形成条件が血管網の発達に影響することが明らかとなった。96 ウェルプレートで 5 日間培養して作製したスフェロイドでは、スフェロイド周囲の血管網の発達が不十分であった。一方、3%メチルセルロースを添加した培養液により 1 日で迅速に形成したスフェロイドでは、スフェロイド内部から血管が伸展し、血管網が形成された。

ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色により、デバイス培養スフェロイドの細胞の健全性と細胞分布を確認し、96 ウェル培養スフェロイドと比較した。96 ウェル培養スフェロイドでは LSEC および LF が HepaRG 細胞の内側に層状に偏在していたのに加えて中心部に壊死が認められた。デバイス培養スフェロイドでは細胞が均等に分布し、壊死が認められなかった。結果から、デバイス培養では均等な細胞分布によって血管のスフェロイド内部への伸展が促進されたこと、形成された血管網を介して養分がスフェロイド全体に行き渡っていたことが示唆された。

デバイス内培養された血管化肝スフェロイドについて肝機能の評価をおこなった。免疫染色による観察結果から、スフェロイド内の肝細胞において、肝機能の主要マーカーであるアルブミンおよび胆管排泄機能を担う Resistance-associated Protein 2（MRP2）の発現を確認した。さらに、1 週間デバイス培養したスフェロイドのアルブミン産生量、尿素合成量はそれぞれ 2D 培養の初代培養肝細胞と同程度、3 倍程度を示した。本結果は、今回確立した培養系において形成された血管化肝スフェロイドが、現在創薬過程で用いられている主要な非臨床試験系と同等以上の肝機能を保持していることを示している。

次に、肝星細胞株 LX-2 を培養系に導入し、LX-2 細胞の導入部位（ゲル中、スフェロイド内、またはその両方）を変化させた条件下で検討を行い、新生血管の形態変化を評価することで、共培養方法の構築



図 1 デバイス写真

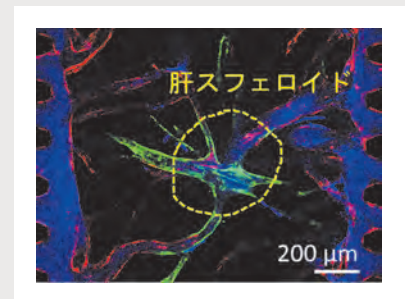


図 2 血管化肝スフェロイドにおける、マイクロビーズの経血管的灌流時の蛍光撮影画像（赤：HUVEC、緑：LSEC、青：マイクロビーズ）

と最適化を行った。肝星細胞は脂肪肝状態において活性化し、線維化を誘導することから、NAFLD モデルの構築において不可欠である。ゲル中の LF を LX-2 に置換した条件では、血管網の形成が不十分であった。これは、LX-2 が血管新生に必要な因子を十分に分泌していないためと考えられる。ゲル中に LF を包埋し、肝スフェロイドから LF を除去して同数の LX-2 に置換した条件において、同様に血管化されたスフェロイドの形成に成功した。以上より、LX-2 をスフェロイド内に、LF をゲル中に配置する培養方法が血管網形成に最適であると判断された。

最後に、NAFLD モデルの構築を目的として、オレイン酸とパルミチン酸を 2:1 で混合した遊離脂肪酸 (FFA) を培養 1 日目から添加した条件でデバイス内培養を行った。LX-2 の導入条件は前述の最適化結果に基づいて設定した。その結果、脂肪蓄積を伴いつつ血管構造を維持した肝スフェロイドが形成され、脂肪化環境を有する血管化肝モデルの構築に成功した (図 3)。

本件に関連した令和 6 年度の研究成果の発表を以下に示す。

【国内学術会議】

- [1] Y. Sun, S. Matsumoto, J. Sugawa, A. K. Kopec, J. Harney, L. Tomlinson, N. Khan, K. Fujimoto and R. Yokokawa: “Creating Stable and Perfusable Vascular Networks in Microfluidic Devices to Mimic Liver Microenvironment for Liver Function Evaluation,” 第 41 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 26A3-PS-68, 仙台, 2024 年 11 月.
- [2] 洲河青, 松本倫実, Anna K. Kopec, Julie Harney, Lindsay Tomlinson, Nasir Khan, 藤本和也, 横川隆司: “類洞内皮細胞由来の血管を介する薬剤拡散を目指した血管化肝臓モデルの構築”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 49 回研究会, 2P31, 東京, 2024 年 6 月.

【国際学術会議】

- [1] S. Matsumoto, Y. Sun, J. Sugawa, A. K. Kopec, J. Harney, L. Tomlinson, N. Khan, K. Fujimoto and R. Yokokawa: “Evaluation of Vasculature Formation and Hepatocyte Function of a Vascularized Liver spheroid,” The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2024), M158. h, Montréal, Canada, October 2024.
- [2] S. Matsumoto, Y. Sun, J. Sugawa, A. K. Kopec, J. Harney, L. Tomlinson, N. Khan, K. Fujimoto and R. Yokokawa: “Development of a ascularized liver spheroid model by creating a pseudospace of Disse with collagen and using fibroblasts that secrete angiogenic factors,” International Vascular Biology Meeting (IVBM 2024), 02.034, Amsterdam, The Netherlands, July 2024.
- [3] S. Matsumoto, Y. Sun, J. Sugawa, A. K. Kopec, J. Harney, L. Tomlinson, N. Khan, K. Fujimoto and R. Yokokawa: “Vascularization of a Collagen-Containing Tri-Culture Liver Spheroid in a Microfluidic Device,” The 19th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2024), 3P4#7355, Kyoto, Japan, May 2024.



図 3 FFA 添加時における、LX-2 導入済み血管化肝スフェロイド (緑: LSEC, HUVEC)

研究テーマ

光架橋反応を利用した高効率 turn-on 光増感剤の開発

研究者

東京科学大学 生命理工学院 金森 功吏（カナモリ タカシ）

①研究の背景及び目的

本研究の目的は、低副作用ながんの光治療法に用いる光増感剤の次世代基盤技術開発である。光を用いたがんの治療法として、光免疫療法と光線力学療法がある。近年開発された光免疫療法は抗体を用いており高いがん選択性を示すが、薬価が非常に高いという課題を抱えている。そこで本研究では、申請者の独自の低分子 turn-on 光増感剤に、増感効率を向上させる光架橋反応を導入した次世代型の安価な光治療薬開発を目指す。

②研究方法

(1) GFP 色素誘導体の構造の探索

申請者はこれまでに、GFP 色素の蛍光強度の粘度応答性を向上させるため、アミノ基とベンゼン環のねじれを固定するためジュロリジン骨格を用いた GFP 色素誘導体 (Julo-BIT-Ph) の開発を行っていた。一方、過去の報告からピロリジンを導入したアニリン誘導体においてもアミノ基のねじれ抑制の可能性が示唆されていることから Pyrro-BIT-Ph の合成を行った。このものの粘度依存的な光増感能を $^1\text{O}_2$ トラップ剤の存在下に照射し詳細に評価した。

(2) turn-on 光学特性の理解のため励起状態計算

Turn-on 光増感特性を得るには、励起状態でベンジリデン骨格の二重結合がねじれることが鍵となる。そこで、Pyrro-BIT-Ph において励起一重項状態でねじれが安定化されるか量子化学計算を行った。

(3) がん細胞と非腫瘍細胞を見分けるプローブ開発とその作用機序の解明

本研究では turn-on 光増感剤の開発後に、適切なリガンドを用いてがん細胞選択的に集積させる必要がある。そこで申請者の過去の知見から見出した、グルコースとペプチド残基をコンジュゲートした GFP 色素誘導体の、がん細胞選択性を詳細に調べた。集積したかどうかは、GFP 色素誘導体の turn-on 蛍光特性を利用して共焦点顕微鏡で観察した。

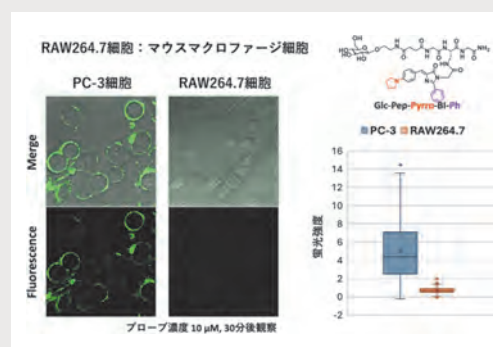
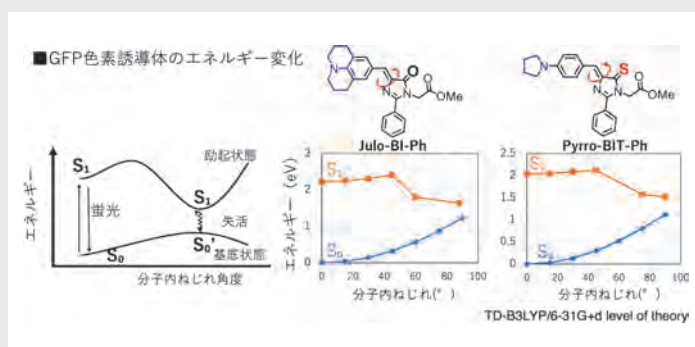
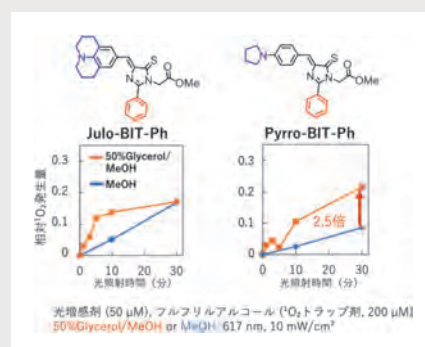
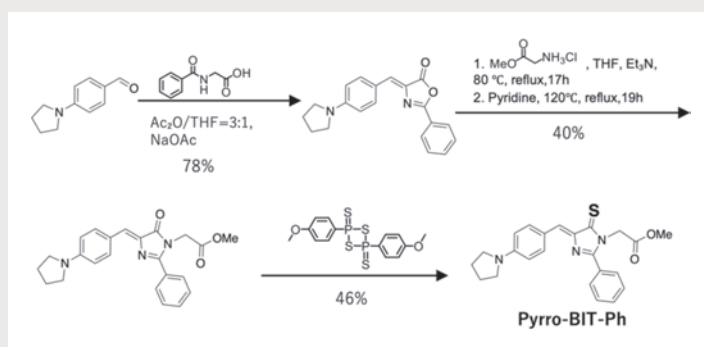
③研究成果

(1) GFP 色素誘導体の構造の探索

左下図に示すスキームのように Pyrro-BIT-Ph の合成を行った。次に、粘度依存的な光増感能を調べた。右下図に示すように、これまで開発していた Julo-BIT-Ph よりと比べ、高い粘度依存的増感能を有することを見出した。一方で、粘度依存的な光増感能比は 2.5 倍にとどまり、さらなる向上が求められる。そこで、分子設計の鍵となる励起状態でのねじれやすさを調べた。

(2) turn-on 光学特性の理解のため励起状態計算

GFP 色素は下図に示すように、励起状態において二重結合部位がねじれた状態が安定化されることが知られている。Pyrro-BIT-Ph について計算したところ、 S_1 において概ね同様にねじれて失活することが示された。ジュロリジン誘導体と概ね同程度のねじれ障壁を示したことから、Julo-BIT-Ph との光増感能



の違いは、ねじれ特性以外の要因が考えられ、一つの可能性として、光増感剤自体の分解されやすさが示唆されており検討を進めている。

(3) がん細胞と非腫瘍細胞を見分けるプローブ開発とその作用機序の解明

申請者の過去の知見をもとに、Pyrro-BIT-Ph とペプチド残基及びグルコースをコンジュゲートした蛍光プローブを合成した。その結果、過去の Julo-BIT-Ph 誘導体の場合よりも高い蛍光強度で前立腺がん細胞 PC-3 の細胞膜付近を無洗浄で蛍光染色することに成功した。さらに非腫瘍細胞モデルとしてマウスマクロファージにおいて同条件で染色したところ、ほとんど蛍光を示さず、がん細胞選択的に蛍光染色できる可能性が示された。標的分子として脂質膜や細胞外マトリックスなどの可能性が考えれ、その標的特定に向けて検討を進めている。

これらの検討に加え、本研究では Pyrro-BIT-Ph のフェニル基にアジド基を導入し、標的細胞内環境で周囲のタンパク質との共有結合により粘度応答を高める分子開発も進めている。

学会発表 1 件

学会名：第 18 回バイオ関連化学シンポジウム (2024 年 9 月 13 日、於 つくば)

タイトル：グルコース修飾 turn-on 型蛍光プローブを用いた細胞イメージング (ポスター発表)

著者：定井佑樹、金森功史、飛田健司、能城地洋、小倉俊一郎、湯浅英哉

研究テーマ

皮膚毛包幹細胞の分化系譜における必須ミネラルの役割解明

研究者

徳島文理大学 薬学部 原 貴史 (ハラ タカフミ)

①研究の背景及び目的

生体内の必須ミネラルである亜鉛の重要性は、1963年に Dr. Prasad らによって亜鉛欠乏症が報告されたことによって認知されるようになった。亜鉛は生体内で極めて微量に存在するミネラルでありながら、その欠乏によって、免疫応答の異常、成長遅延、皮膚障害、精神障害などのさまざまな症状を呈することが知られている。生体内において亜鉛は、タンパク質の活性や構造の維持に寄与することが知られている。全遺伝子の約10%が、ジンクフィンガーモチーフ等に代表される亜鉛要求性のタンパク質をコードしていることが報告されており、亜鉛が生体内の様々な反応に広く寄与していること、また生体内の亜鉛の恒常性の破綻が様々な疾患と関連することがこれまでに報告されている。本申請課題で着目する皮膚との関連では、亜鉛の減少が皮膚の脆弱化や脱毛と関係していること、また臨床においても様々な皮膚の疾患に亜鉛を含む軟膏が使用されていることから、健康的な皮膚の維持に亜鉛が密接に関連していることが知られている。しかし、亜鉛の役割は多岐に渡っていることから、必ずしも十分にその役割や分子メカニズムが理解されているわけではなく、亜鉛の新たな役割を知ることが、生物学的な観点のみならず皮膚の健康維持や審美的な観点からも重要な課題となっている。

亜鉛の恒常性維持を担う主要な分子メカニズムの一つとして、亜鉛の輸送体である亜鉛トランスポーターが知られている。この10年余りでその役割の解明は飛躍的に進歩しており、亜鉛トランスポーターの研究によって、これまで栄養因子の一つと捉えられていた亜鉛が、シグナル因子としても機能することが明らかとなりつつある。また、亜鉛トランスポーターの失調が疾患の原因となり得ることも報告され始めていることから、亜鉛のみならずその輸送体の働きの理解が急務である。我々は、皮膚の亜鉛恒常性維持に関わる亜鉛トランスポーターとして、これまでに ZIP10 に着目しており、ZIP10 の機能の失調が、皮膚や皮膚毛包の恒常性の破綻に関連していることを報告している。しかし、皮膚における ZIP10 発現細胞の役割やその分子メカニズムには不明な点が多く、本申請課題において ZIP10 の役割解明から皮膚の恒常性維持に繋がる新たな分子メカニズムの解明や、ZIP10 を標的とした毛包の維持や再生方法の開発に繋がる新たな知見を得ることができると考え検討を実施した。

②研究方法

1: ZIP10 発現細胞の性状とその系譜解析

我々はこれまでの検討から、皮膚における ZIP10 発現細胞の一部が幹細胞マーカーを発現することを確認している。そこで、ZIP10 発現幹細胞とその細胞系譜を解析することを目的として、*Zip10* 遺伝子のプロモーター下流に GFP を導入した *Zip10-GFP*-ノックイン (KI) マウス作成し、皮膚における GFP の局在や GFP 発現細胞について解析を実施した。また、系譜解析については、ZIP10 発現細胞の時空間的变化を解析するために、*Zip10-GFP*-KI マウスと、*Rosa26*-tdTomato レポーターマウスを交配し、ZIP10 発現が消失した後も tdTomato を発現する *Zip10-GFP*/tdTomato マウスを作成し解析を実施した。

2: ZIP10 シグナルを制御する化合物探索のためのスクリーニング系の構築

毛包の形成に関連する ZIP10 発現細胞が、どのような分子メカニズムによって皮膚毛包の恒常性に関与するのかを *in vitro* で解析するために、マウス頬髭毛包の初代培養系および、毛包を構成する上皮系細胞と間葉系細胞の共培養によって構成される毛包オルガノイドの培養系構築をそれぞれ試みた。これらの培養系について、培養中の形態や遺伝子発現の変化を *in vivo* における皮膚毛包のこれらの変化と比較することで、実験系としての妥当性を評価するとともに、本培養系が毛包の構築を支持する化合物や天然成分などの新規物質を評価するためのスクリーニング系として適用可能かを検討した。

③研究成果

前述の *Zip10-GFP*-KI マウスの皮膚懸濁液を調製して、毛包形成に関連する各分子マーカー抗体による染色を経たのち FACS による解析を実施したところ、幹細胞マーカー陽性の細胞集団に GFP が存在することが確認された。興味深いことに、毛包幹細胞の細胞集団については、GFP の発現量の違いによってさらに2つの細胞集団として検出された。つまり、毛包幹細胞集団には GFP の発現が高い集団が含まれてることが確認された。これらの細胞集団を FACS で単離して遺伝子解析を実施したところ、それぞれが異なる性状を有する集団である可能性が示唆されたため、現在 RNA-seq による解析を検討している段階である。

Zip10/GFP 発現幹細胞の系譜解析については、*Rosa26-tdTomato* レポーターマウスとの交配によって得られた *Zip10-GFP/tdTomato*-KI マウスの背部皮膚の解析において、毛包に沿った *tdTomato* の発現と、毛包周囲組織における *tdTomato* の発現をそれぞれ確認した。特に、毛包周囲の *tdTomato* の発現については、管状の *tdTomato* の局在が確認されたことから、血管や神経などの皮膚組織内の特定の細胞へと分化している可能性が示唆された。現在、組織内の局在の情報を元に *tdTomato* 発現細胞の性状について、遺伝子発現および FACS を用いた解析からその詳細について解析を進めている。

in vitro 培養系の確立に関して、頬髭毛包の初代培養系については、単離した頬髭毛包を培養することで、毛包組織中の毛髪が経時的に伸長している様子が観察された。従って、検討を実施した培養日数の期間においては、毛包の機能として毛髪の伸長が維持されているものと考ええる。また、上述の *Zip10-GFP/tdTomato*-KI マウスから採取した頬髭毛包を培養したところ、マウス皮膚で観察された *tdTomato* の局在変化と同様に、毛包に沿った時空間的な *tdTomato* の局在変化が観察されたため、マウスの皮膚毛包内で生じている *Zip10/GFP* 発現細胞の変化と同様の変化が初代培養系においても生じていると考えられた。毛包オルガノイド培養系については、形態学的な観察からも既報と同様に細胞塊が形成され、毛包形成に関連する分子マーカーの発現変化を評価できる条件を確立している。今後、これらの両培養系を用いて、毛包形成の各段階において *Zip10* 発現の変化やオルガノイド毛包中の *Zip10/GFP* 発現細胞の局在変化について解析を進める予定である。さらに、本培養系によって形態や遺伝子発現の評価が可能となったことから、これらを評価指標としたスクリーニング系として、毛包や皮膚周囲組織の再生に繋がる化合物の評価に本実験系を適用する予定である。

本研究課題に関連した論文成果

Yoshigai, E., Hara, T., Hashimoto, M. *et al.* ZIP13 marks muscle satellite cells and contributes to their quiescent and active phase balance. *Sci Rep* 15, 9206 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92501-y>

研究テーマ

嗅覚に着目したアルツハイマー病の早期診断および予防法の開発

研究者

東京大学 大学院理学系研究科 竹内 春樹（タケウチ ハルキ）

本研究では、アルツハイマー病 (AD) の早期発見および進行抑制に向けて、嗅覚に着目した新たな診断および介入手法の開発を進めている。AD は発症後の治療が極めて困難であるため、認知機能障害が現れる以前に異常を捉えることが重要である。そこで、AD モデルマウスを用いて嗅覚試験を実施したところ、4 ヶ月齢の時点で一部の匂いに対して嗅覚低下が確認され、さらに2 ヶ月齢では特定の種類の匂いに対する嗅覚過敏が観察された。これらの結果は、AD の前駆段階において嗅覚異常が出現し、匂いの種類によって感受性が異なる可能性を示唆している。

この嗅覚変化の背景を探るため、嗅上皮を用いた RNA シークエンス解析および組織学的染色を行い、遺伝子発現の変化や構造的変化の検出を試みている。また、AD 病態に関わるアミロイド β の動態に対して、嗅覚刺激がどのような影響を及ぼすかを検証する目的で、3 ヶ月齢の AD モデルマウスに対し、一部の匂いを1週間暴露する実験を行った。その結果、匂い A は嗅覚関連脳領域におけるアミロイド β 量を、匂い B は記憶を担う海馬におけるアミロイド β 量を有意に減少させることが判明した。さらに、半年にわたる長期匂い暴露を実施することで、AD モデルマウスの認知機能が改善することも確認された。これらの行動変化は、新奇物体認識試験などの標準的な認知機能評価バッテリーにより検証された。

また、これらの長期匂い暴露を安定して行うために、プログラムタイマーを用いて毎時5分間自動的に匂いを提示できる飼育システムを独自に構築し、少なくとも1年間にわたる運用が可能であることを確認した。このような実験環境の整備により、時間的にも空間的にも制御された刺激条件下での介入研究が可能となっている。

アミロイド β 減少のメカニズムについては、これまで免疫染色法を用いてミクログリアの活性化を評価したが、匂い暴露による顕著な変化は認められなかった。そこで現在は、脳の老廃物排出系として注目されるグリンパティックシステムの関与を中心に、脳スライスを用いた蛍光トレーサー流入実験や関連遺伝子の発現解析を通じて検討を進めている。

さらに、神経活動レベルでの嗅覚異常を把握するため、嗅球および嗅皮質における局所場電位記録を導入し、匂い提示時の電気生理学的応答を解析している。これらの取り組みにより、分子・細胞・行動レベルの多層的なデータを統合し、AD における嗅覚異常の意義とその介入可能性を明らかにすることを目指している。将来的には、これらの知見をヒトにおける早期診断法および介入法の開発へと発展させることが期待される。

研究テーマ

難合成タンパク質生産のための酵素によるタンパク質ライゲーション技術の確立

研究者

京都大学 複合原子力科学研究所 粒子線基礎物性研究部門 粒子線物性学研究分野 奥田 綾（オクダ アヤ）

①研究の背景及び目的

タンパク質ライゲーション技術とは、ポリペプチドもしくはタンパク質のN末端とC末端をペプチド結合で繋ぎ合わせる技術である。この技術により、安定同位体標識や蛍光プローブ、非天然アミノ酸など様々な生化学的・生物物理学的に有用なプローブを特定のドメイン等の狙った領域のタンパク質に組み込むことが可能である。しかし、タンパク質ライゲーションは発展途上の技術であり、現状ではペプチドや小さなドメインを2つ繋ぎ合わせた例や、変性条件でライゲーションを行った後にリフォールドした例がほとんどである。ところが、重要な生命機能を担うタンパク質の大部分は複雑かつ大きな構造を持ち、リフォールディングにより元の構造と機能を取り戻すことは極めて困難である。また、複数のペプチドおよびドメインを繋ぎ合わせるには、多段階でライゲーションする必要があるため、十分な産物を得るには各段階のライゲーション効率ができる限り高い必要がある。

しかし、多段階ライゲーションを実現可能とする高効率ライゲーション技術は確立されていない。さらに、タンパク質試料調製のための時間的・人的コストの点からも、ライゲーションの高効率化は重要な課題である。

つまり、「複数のタンパク質」を「高効率」かつ「非変性条件下」でライゲーションする技術が求められており、本研究はこの技術確立を目的とする。さらに、ライゲーション技術を幅広いタンパク質に一般化して適用するためにも、いかなるタンパク質であっても自由自在にライゲーション可能な技術の確立も目指す。

②研究方法

タンパク質のライゲーション法は複数知られているが、アミノ酸変異を伴う認識配列が少なく、非変性条件下でライゲーション反応を行うことが出来る酵素 OaAEP を用いた方法を選択した。多段階で高効率のライゲーション反応が可能になるよう技術確立を行うために、反応条件を綿密に検討した。まず、ライゲーション基質とライゲーション位置の検討については、酸化性的フォールディング酵素 ER-60 および PDI、クリスタリン、ユビキチンといった特徴的な構造と機能を持つタンパク質をターゲットとした。これらのライゲーション位置を綿密に検討することで、ライゲーション位置のリンカーの長さ、による反応効率の情報を得て、効率的なライゲーション反応に必要な構造と配列の一般的指標の確立を目指した。ライゲーション反応条件については、酵素や基質の濃度比率、添加物（酸化/還元剤等）の綿密な検討を行った。膨大な条件の組み合わせは所属研究室が所有している自動分注装置を用いることで効率的かつ正確に検討を行った。また、ライゲーション効率は電気泳動により評価した。さらにライゲーション産物を分子量（質量分析）、構造（SAXS）、機能の保持（活性測定）の点から検証した。

③研究成果

酸化性的フォールディング酵素 ER-60 は a-b-b'-a' の4つのチオレドキシンドメインが連なったドメイン構造をしている。

ER-60 をターゲットとしたライゲーションについてはライゲーション位置を a-b ドメイン間で2か所、b'-a' ドメイン間で4か所検討を行った (Fig. 1)。それぞれのドメイン間で分割した二つのドメインをライゲーション酵素 OaAEP と混合し、反応を開始すると、a-b 間についてはサイト1は二つのドメインのライゲーション反応が進行したが (Fig. 2A)、サイト2は反応が進まなかった (Fig. 2B)。b'-a' 間についてはサイト1は反応が進まず (Fig. 2C)、サイト2, 3, 4 については反応が進んだものの、その効率は異なっていた (Fig. 2D, E, F)。つまり、ライゲーション効率がライゲーション位置によって異なることが示された。特に、N-side の基質の C 末端側が露出している必要があり、ライゲーション酵素が認識配列にアタックできるかが非常に重要であることが示された。他の PDI、クリスタリン、ユビキチンといった基質についてもライゲーション位置の選択が効率の良いライゲーション反応のためには重要であることが示されている。

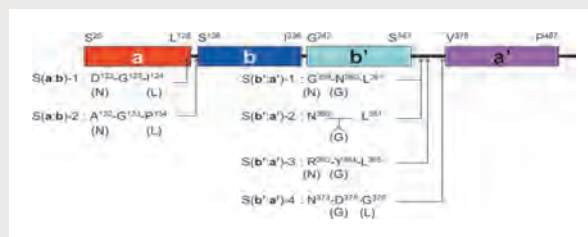


Fig. 1 ER-60 のライゲーション位置検討

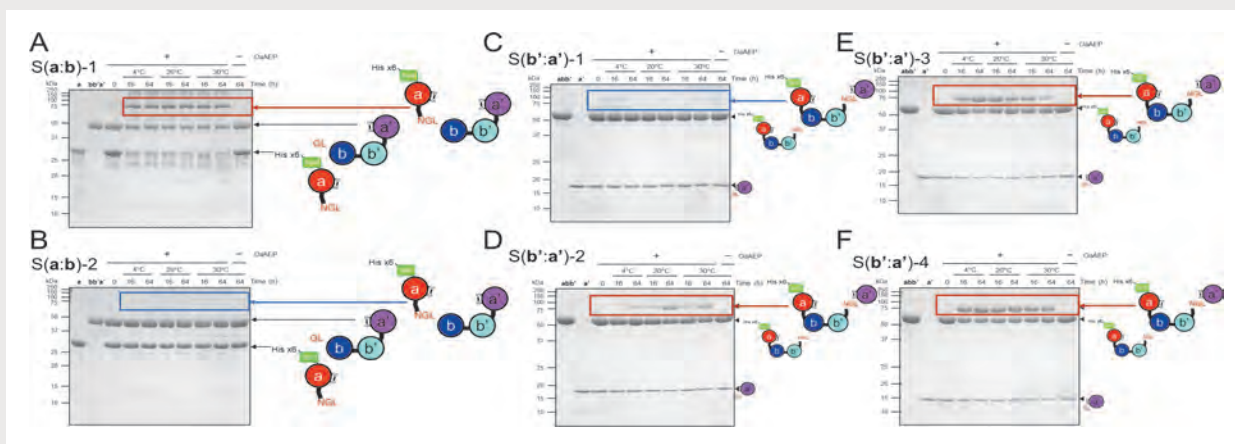


Fig. 2 ER-60 のライゲーション位置検討結果

次に、中性子の小角散乱法による部分構造解析に用いる区分重水素化試料の調製を行った。機能に直結した構造解析を行うことを目指し、a および a' ドメインを可視化するために、a, a' ドメインは軽水素化、b, b' ドメインは75%重水素化されている必要がある。この区分重水素化試料を調製するには、b'-a' 間、a-b 間の二段階のライゲーション反応が必要である。これまでの条件検討で高効率であることが示された b'-a' 間はサイト3を、a-b 間はサイト1を使用し、二段階のライゲーション反応を行った (Fig. 3)。各ドメインを数 10 mg 用意して、最終産物である区分重水素化試料を約 2 mg 調製することに成功した。こうして調製した区分重水素化試料が正しい構造をとっているかを X 線小角散乱 (SAXS) 法を用いて検証した (Fig. 4A, B)。区分重水素化試料の回転半径 R_g は $32.8 \pm 0.4 \text{ \AA}$ 、全てのドメインが軽水素化された WT は $32.0 \pm 0.2 \text{ \AA}$ とほとんど差はなく、SAXS プロファイルにも明確な差は存在しなかった。つまり、ライゲーションや重水素化が試料に与える影響はほとんどないと考えられた。こちらの試料を用いて SANS 測定を行うと、粗視化分子動力学計算から得られた構造のスナップ

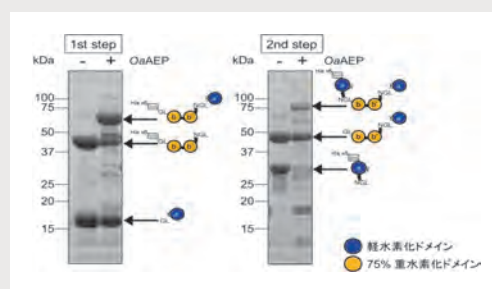


Fig. 3 二段階ライゲーションによる区分重水素化タンパク質 ER-60 の調製

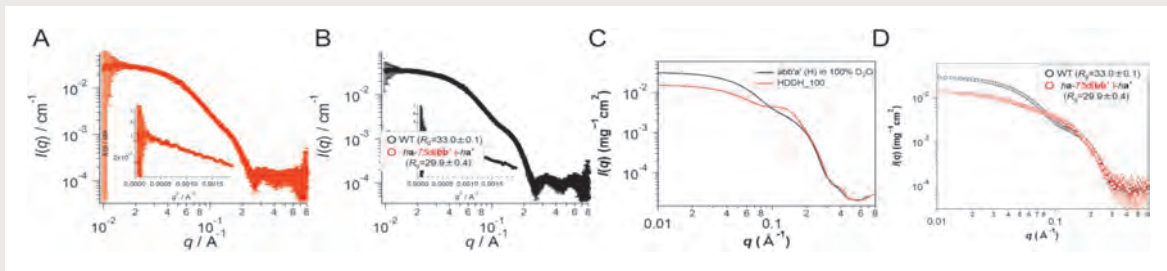


Fig. 4 区分重水素化タンパク質 ER-60 (A) と軽水素化 WT ER-60 (B) の SAXS プロファイル。粗視化分子動力学計算から得られたモデルから計算された SANS プロファイル (C) と実際に測定された SANS プロファイル (D)。

ショットから算出した SANS プロファイル (Fig. 4C) と同様に、区分重水素化試料と軽水素化 WT では明らかにプロファイルが異なっており (Fig. 4D)、確かに a および a' ドメインのみの散乱情報が得られていることが示された。現在、この SANS プロファイルの解析を進めている。

研究テーマ

海藻に学ぶ：光合成集光タンパク質における色素の結合性を制御する因子の解明

研究者

大阪公立大学 人工光合成研究センター 藤井 律子（フジイ リツコ）

【研究の背景及び目的】

地球温暖化による食糧難の解決には、穀物の太陽光利用効率の向上が有効である。植物の光合成で主にこの役割を担うのは、光合成アンテナ (LHCII) である。しかしながら植物は、安全に光を逃す消光機構を獲得して、陸上の強い白色光に適応してきており、太陽光の放射スペクトルが最も強い青緑色光の利用効率はあまりよくない。一方、海洋で生育する大型緑藻ミルは、海中の青緑色光を高効率で利用する光合成アンテナ LHCII を持つ。LHCII は膜タンパク質に色素と膜脂質が結合した単量体による三量体で機能する。植物（ほうれん草）の LHCII とミルの LHCII では、タンパク質のアミノ酸配列や色素の結合位置、三量体の全体構造まで非常に似ているが、結合している色素の組成と化学構造だけが異なることを、我々は世界に先駆けて明らかにした。ここでは、一部のクロロフィル (Chl) 色素が、青紫光を吸収する Chl a から青緑光を吸収する Chl b に置換していること、ルテインというカロテノイド色素が独特のカルボニルカロテノイドであるシフォナキサンチン (Sx) 及びその脂肪酸エステル (Sn) に置換していること、を構造生物学的に解明した (図 1, 文献 1)。これは、置換された Chl 色素が、14 種類のサイトにランダムに結合しているのではなく、選択的に特定のサイトに結合することを示す。そこで我々は、この「特定の色素を特定のサイトに結合させる仕組み」を解明することにより、穀物の LHCII に青緑色光利用を促進する改変を施す分子設計の指針をたてることを目指している。

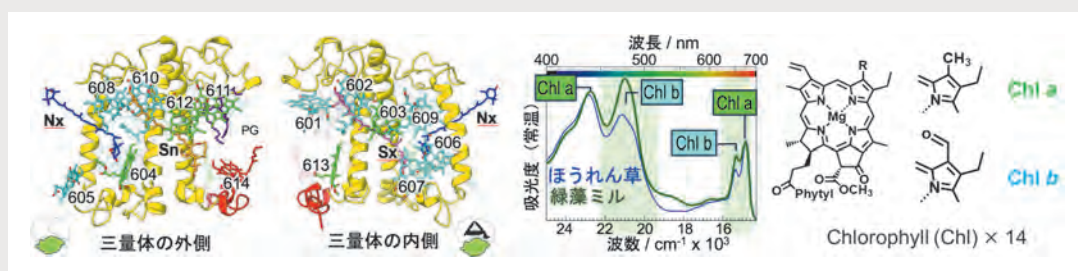


図 1 ミルの光合成アンテナ LHCII の構造、吸収スペクトル、Chl a と b の化学構造式の違い。14 種類の Chl の結合サイト 601～614 のうち、ミルでは二箇所の Chl a 結合サイトが Chl b に変わっていた。PDB: 7WLM

当面の課題は、色素置換の駆動力は、蓄積している色素の組成比なのか、タンパク質のアミノ酸配列なのかという問題である。この課題に解を与える実験手法として、試験管内再構成法がある。これは、大腸菌などで発現させたりコンビナントタンパク質と天然などから得た色素抽出液を混合し、疎水性タンパク質を可溶化している界面活性剤を徐々に抜くことにより、自己集積的に色素とタンパク質をフォールディングさせ、再構成 LHCII を得るという手法である (図 2)。この手法で得られた再構成 LHCII は分光学的には天然の LHCII と類似した性質を示しており、植物の LHCII の構造が高分解能で解明されるより前から現在に至るまで、特定の結合サイトのクロロフィル分子と吸収帯を紐付ける実測値として引用されている。しかしながら、再構成体と天然体で全てのクロロフィルがそれぞれ特定のサイトに結合しているのか、クロロフィル a と b

が置換しやすいサイトと置換しにくいサイトがあるのか、という問題点があった。このような背景の中、今回我々は、ほうれん草のタンパク質を用いた再構成 LHCII の構造をクライオ電顕法により高分解能で解明することに世界で初めて成功し、構造と分光学的応答を直接紐づけることに成功した(文献2)。

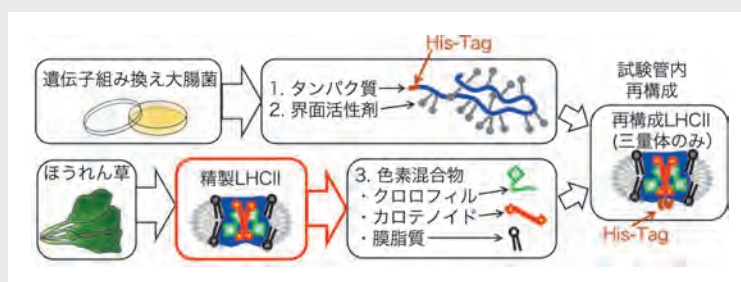


図2 光合成アンテナ LHCII の試験管内再構成法の概要。

(文献1) : S. Seki, R. Fujii, et al., BBA Advances, 2: 100064 (2022).

(文献2) : S. Seki, R. Fujii, et al., PNAS Nexus, 3: 405 (2024).

文献2は本財団の助成による成果であり、日本語、英語でプレスリリースを行なった結果、いくつかの web 記事として取り上げられた。

【研究方法と成果】

構造生物学的手法で高分解能を得るためには、なるべく均一性の高い再構成体を調製する必要がある。そこで我々はまず色素混合物の精査を行なった。一般に普及している手法では、色素混合物にはほうれん草から直接抽出した脂溶性成分を用いるため、光合成アンテナの構成成分以外の細胞膜脂質や色素などの成分が大量に含まれている。そこで、ほうれん草からまず光合成膜を取り出し、界面活性剤で可溶化し、ショ糖密度勾配法で分離して、粗精製光合成アンテナ (LHCII) を調製し、ここから抽出した脂溶性成分を色素混合物とした。さらに、試験管内再

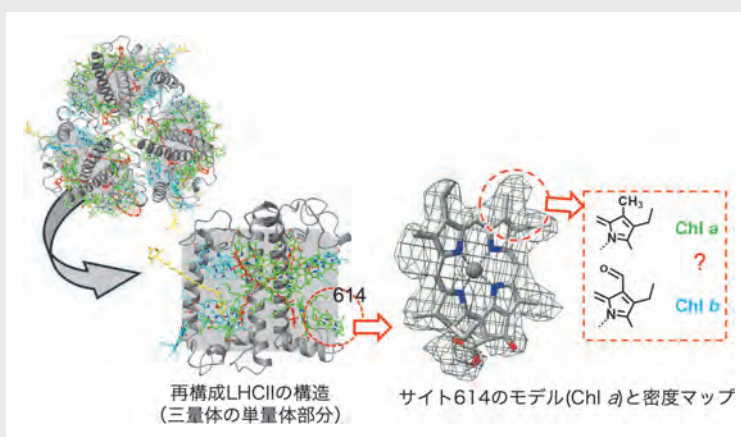


図3 ほうれん草のタンパク質を用いた再構成 LHCII の構造 (三量体及びその単量体部分)。サイト 614 のモデル (Chl a) と密度マップを比較すると Chl a ではメチル基の部分に余分な密度が少し見られ、このサイトに Chl b が結合している個体も存在することを示唆する。PDB: 8YEE

構成では、三量体にならなかった単量体も生じるため、再構成体をアフィニティカラムで精製したあと、さらにショ糖密度勾配遠心法を行って三量体のみを精製し、これをクライオ電顕法に供した。これらの実験上の工夫により、高分解能構造を得ることに成功した。また、クライオ電顕法により、天然から我々が精製した LHCII の構造も同様の手法で高分解能で解析し、天然と再構成体の構造を精密に比較した。

その結果、再構成体ではほとんどのサイトで Chl a と Chl b の結合サイトははっきりとどちらかで占有されていたなか、サイト 614 だけは Chl a だけでなく、Chl b が結合しているタンパク質も存在している可能性が初めて示された(図3)。さらに、C 末端につけた His-Tag3 本が一塊になり、これが C 末端側のアミノ酸残基の位置をふらつかせていることをことを実験的に明らかにした。これより、これまで影響はないと考えられてきた His-Tag には改良の余地があることが明らかになった。

本成果により、これまでに膨大な数実施されてきた試験管内再構成法を用いた分光学的研究を再評価することが可能となった。また、ミルと LHCII のタンパク質の違いを元に新しく設計したタンパク質を用いて三量体を調製すれば、クライオ電顕法で構造を確認するという新しい方法論が成立することが示された。これらの成果はこの研究分野の今後の発展に寄与すると考えている。

研究テーマ

AIを導入した新世代の前眼部診断方法の開発

研究者

東京大学 大学院情報理工学系研究科システム情報学専攻 曾我部 舞奈（ソガベ マイナ）

研究の背景および目的

世界的に眼科医の不足や診療時間の長さが問題となっていて、特に途上国や地方の医療資源が乏しい地域では、眼科的な問題の初期診断が遅れる傾向にある。初期診断の遅れは視力を失うリスクにつながる。また、緑内障や糖尿病性網膜症などのような慢性的な病気は、早期に診断して治療を始めることが極めて重要であり、我々のQOLに直結する。

眼科診療に利用される器具は数多くあるが、その中でもスリットランプは小型かつ持ち運び可能なデバイスも存在しており、場所問わず広く診断に応用できるというメリットがある。しかしながら、スリットランプ計測自体は単純な機構であるにもかかわらず、ハンディタイプを用いて正確な診断を行うためには専門的な知識とスリットランプ操作に関する技術が必要である。

そのため、積極的に診断に取り入れられていないケースもある。

本研究では、ハンディタイプのスリットランプ計測装置を用い、眼科診断の効率化を目指した。具体的には、スリットランプ計測情報から患者の眼疾患の推定をアシストするAIのためのデータセット、形状抽出AIの開発を行った。

研究手法

AIのデータセットの構築、スリットランプデータの形状抽出手法を開発を行った。

学習データ収集

スリットランプ顕微鏡により5,000枚以上の犬・猫の眼前節高解像度画像（1920×1080ピクセル）を獣医眼科専門医と連携して収集した。照明条件（スリットビームの角度・強度）、撮影距離、ピント位置、眼球姿勢などを意図的に変化させ、多様な臨床環境を模擬した。550枚の画像に対してピクセルレベルのマスクアノテーションを付与し、うち500枚をトレーニング、50枚を検証用に割り当てた。正常例と病変例の両方を含むデータセット構成とした。

AIフレームワーク

SegGAN++という二重パス型敵対的学習フレームワークを開発した。具体的には低解像度（160×90）と高解像度（320×180）の二つの生成器を用いて、大域的特徴と局所的詳細を同時に捉えるフレームワークを提案する。空間変換ネットワークを導入し、入力画像の位置ずれや変形に対応し。さらに、異なるサイズの画像特徴を統合するための注意機構を導入し、より精度の高い領域検出を実現した。トレーニングには敵対的損失、特徴マッチング損失などを組み合わせ、不確実性に基づく自動重み付けを実現した。

研究成果

前眼部用データセットの取得

本研究では、眼前節に対する深層学習ベースの解析モデルの構築に資することを目的として、スリット

ランプ顕微鏡によって撮影された動物の眼画像を中心とする独自のデータセットを整備した。対象は主に犬および猫であり、動物種や体格、被毛色などによって眼球画像に現れる構造的・光学的ばらつきを十分に考慮した構成となっている(図1左)。

撮影は専門的な診療現場で実施され、1画像あたり1920×1080ピクセルの高解像度静止画として取得された。照明条件(スリットビームの角度、強度)、撮影距離、ピント位置、眼球の開き方や姿勢などを意図的に変化させ、多様な現場環境下で得られる画像条件を模擬した。また、軽度から高度までの複数の眼疾患を含む構成とし、正常例と病変例の両方が含まれている。

取得画像は計5,000枚を超え、解析モデルのトレーニングを想定して一部に対してはピクセルレベルのマスクアノテーションを付与した。特に、解析対象とする構造については専門家の知見に基づき選定し、臨床で有用な領域抽出が行えるように設計している。アノテーション付与数は全体の約10%程度に留めつつ、残余のデータを活用できるよう、教師なし・半教師あり学習への応用を見据えた構成とした。さらに、アノテーション付き画像には照明反射や角膜混濁、涙膜の乱れなど現実的なノイズが含まれており、こうした要因へのロバスト性の評価が可能なテストベンチとしても活用できる。これにより、通常の臨床現場で得られる“非理想的な画像”を扱えるモデル開発・評価に資するデータセットとなっている。

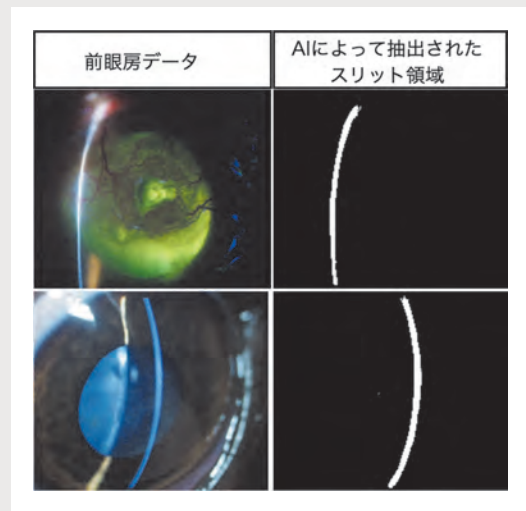


図1 データセットに利用した画像と抽出されたスリットビーム画像の例

スリットランプデータの抽出 AI の開発

本研究では、スリットランプ顕微鏡により取得された眼前節画像に対して、特定構造領域の抽出を自動化する深層学習技術の開発を行った。これまでの眼科画像解析では、光干渉断層計(OCT)やトポグラフィといった専用装置が主に用いられていたが、日常診療でより一般的に用いられるスリットランプ画像には、照明条件や疾患の多様性による画質変動が大きく、安定的な画像解析の導入が進んでいなかった。

そこで本研究では、画像条件のばらつきに頑健な領域抽出AIを実現することを目指し、スリットビーム画像に特化した新しい学習モデルの構築を試みた。特に、限られたアノテーション情報しか利用できない状況下でも高精度な領域分割が可能となるよう、画像の空間分解能に応じて2段階の処理を行う多解像度アーキテクチャを採用した。さらに、入力画像の位置ズレや歪みに柔軟に対応できる空間変換機構、およびチャンネル・空間的注意機構を含む情報統合モジュールを導入し、対象構造の局所性と形状特性の抽出精度を向上させた。これにより、医療現場で直面するような非定型画像においても、信頼性の高い自動抽出が可能となることを確認した(図1右)。

本成果は、将来的な眼科診療支援システムへの応用を見据えた技術的基盤として機能するものであり、特にスリットランプ画像の定量的利用を促進するものと期待される。また、獣医医療領域においても、動物に負担をかけずに得られる視覚情報の自動解析が可能となることで、診断の客観性や再現性の向上が見込まれる。

研究テーマ

胃腺構造の伸長・極性形成を担う Ephrin シグナルの解析

研究者

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究領域幹細胞工学研究室 印東 厚（イントウ アツシ）

①研究の背景および目的

胃粘膜上皮は、発生過程で胃腺と呼ばれる陥入構造を形成し、幹細胞を含む多様な細胞が極性をもって配置される。この極性構造は胃の機能維持に不可欠だが、胃がんや胃潰瘍の初期段階で崩壊することが知られており、その制御機構の解明は疾患研究上、重要な課題である。申請者はマウス ES 細胞の解析から Ephrin シグナルが細胞間反発を介し、方向性ある移動を制御する可能性を示した。さらにヒト iPS 細胞解析により、マウスとは異なる Ephrin 受容体ファミリーの関与を示唆する結果を得た。本研究ではマウスとは異なるヒト胃腺の極性形成を制御する遺伝子を同定し、ヒト特有の胃腺形成機構を明らかにすることを目指す。

②研究方法

本研究ではヒト iPS 細胞 201B7 株を用いて胃オルガノイドを 30 日間培養し、その後に表層粘液細胞 (pit)、および主細胞 (chief)、腺頸部粘液細胞 (neck) や壁細胞 (parietal) を含む胃底腺細胞群へと成熟させた。これらにおける EPH 受容体群と Ephrin リガンド群の発現パターンを解析した。また、公開されている胃上皮細胞のシングルセル RNA-seq を再解析し、ヒトとマウスにおける Ephrin メンバーの差異について検証を行った。

③研究成果

1. ヒト iPS 細胞由来胃オルガノイド成熟条件の検討

胃オルガノイドの作製において、目的とする粘膜細胞と胃底腺細胞への効果的な分化誘導法の検討を行った。まず、多能性幹細胞から平面培養法を検討し、胚体内胚葉への効果的な分化誘導法を決定した。次に後部前腸への分化誘導法として 3 次元マトリゲル包埋培養法、および浮遊培養法の検討を行った。胃前駆細胞マーカーとして

PDX1 や *SOX2* の発現誘導、および中後腸マーカーとして *CDX2* の抑制を指標に、30 日間の未成熟胃オルガノイドの効果的な培養条件を決定した。次に粘膜細胞、および胃底腺への成熟誘導をそれぞれ行い、各成熟細胞種マーカーの発現上昇を確認した (図 1)。

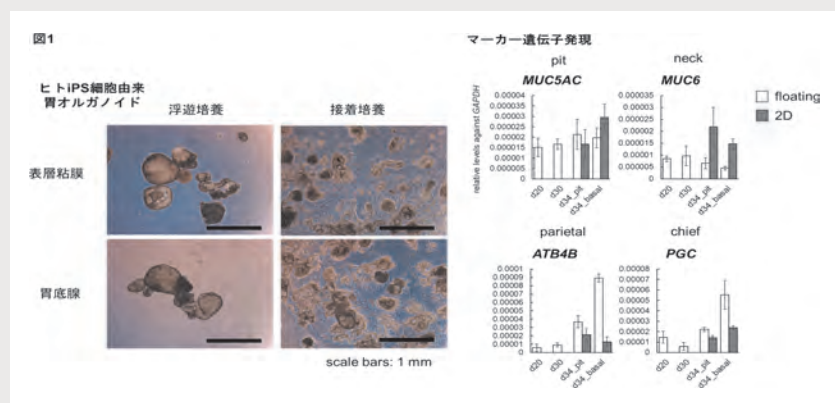


図 1

2. ヒト粘膜細胞と胃底腺細胞における Ephrin 遺伝子発現の相関

未分化ヒト iPS 細胞から胃オルガノイド成熟まで、EPH 受容体群と Ephrin リガンド群の発現変動パターンをリアルタイム PCR 解析で追跡した。これらの発現変動と胃腺上皮の各細胞マーカーとの発現について相関係数を算出し、強い正の相関関係をもつ受容体、リガンド群を同定した(図 2)。これらの結果から、胃腺極性に関与する候補因子としてタイプ B 受容体 *EPHB3*、および EphrinB2 (*EFNB2*) を同定した。

3. ヒトとマウス胃腺における Ephrin 遺伝子の発現

公開されているシングルセル RNA-seq 解析データを用いて、ヒト ES 細胞由来胃オルガノイド (GSE178858)、ヒト生体胃上皮 (GSE225275)、およびマウス胎児期胃上皮 (GSE216139) の再解析を行い、胃腺上皮の各細胞マーカーとの発現相関を解析した。これらの結果のうち、胎児期胃に相当する ES 細胞由来胃オルガノイドと生体胃いずれにおいても *EFNB2* が粘膜細胞マーカーと正に相関していることが分かった。これは胃腺の形成だけでなく極性を保つホメオスタシスにおいても同様の Ephrin シグナルが関与していることを示唆する。一方、マウス胃腺形成においては *Efnb2* ではなく *Efnb1* が同様の相関を示していることも明らかになった(図 3)。胃腺細胞群のヒトとマウスの構成配置の違いがこれらの遺伝子機能の差異によって引き起こされていることを示唆している。今後、これらの因子がヒトとマウスの胃腺構成や極性へ寄与していることをヒト iPS 細胞や体性幹細胞由来オルガノイドを用いて証明していく。

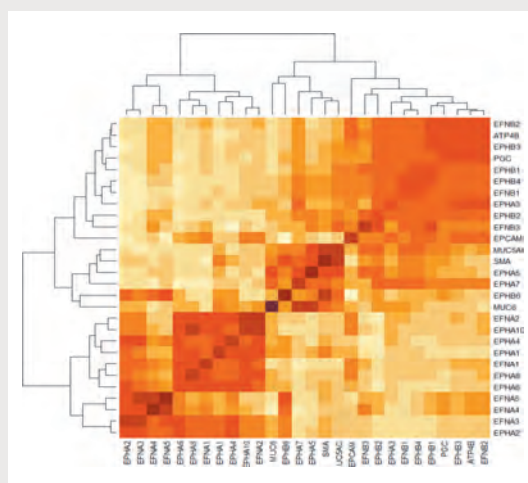


図 2 clustering & heat-mapping

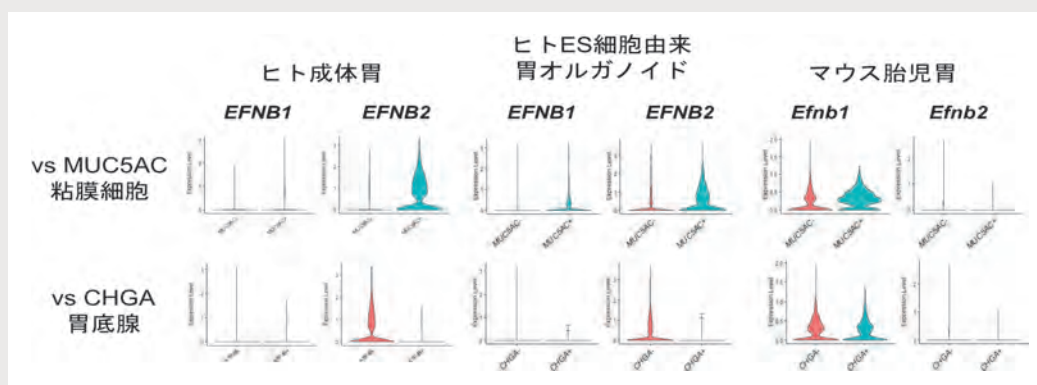


図 3

4. 本研究に関する発表

[論文発表]

EPHA2 is a novel cell surface marker of OCT4-positive undifferentiated cells during the differentiation of mouse and human pluripotent stem cells. Intoh A., et al., Stem Cells Transl Med. 2024; 13 (8) : 763-775. doi: 10.1093/stcltm/szae036.

[学会発表]

[3PS-02-14 (3P-570)] ヒト幹細胞におけるエフリン受容体の機能解析と再生医療への応用 印東 厚、栗崎 晃 第 47 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、および公募シンポジウム口頭発表 2024 年 11 月 29 日

研究テーマ

植物の力を最大限引き出すための植物光周性の制御メカニズムの解明

研究者

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域・植物生理学 遠藤 求 (エンドウ モトム)

①研究の背景及び目的

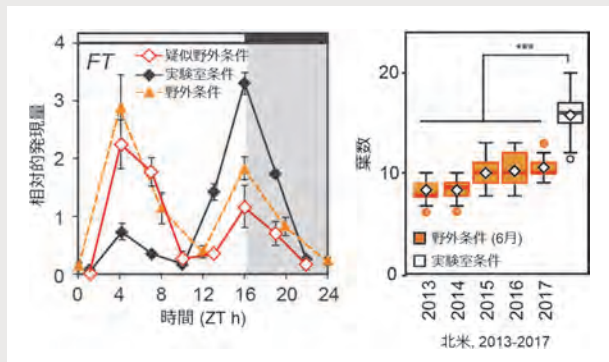
植物は健康な体を作るための日々の栄養素をもたらすだけでなく、医薬品の原料としても有用である。また、香料や油、色素、美容成分など人の美を追求する上でも欠かせない。植物にとって花が咲くタイミングは非常に重要であり、原料となる植物の収量や品質にも大きく影響する。こうした中において、温暖化により花が咲くタイミングが狂いつつあることが大きな問題となっている。2022年の世界平均気温は19世紀後半の平均気温と比較して約1.1℃高く、今年には単月として過去最高の平均気温を記録している。温暖化の影響はイネ、ブドウなどをはじめ幅広い植物種にすでに進行しつつあるこうした温暖化が花成にどのような影響を及ぼすかについてはほとんど明らかにされていない。

申請者らは野外におけるシロイヌナズナの花成研究から、日中の気温上昇が花成を誘導することを明らかにし(Song et al. Nature plants 2018)、野外における花成シグナル伝達を実験室内でも再現することに成功しており、これらの条件を用いて温度による花成促進の関連因子をいくつか同定している。さらに、共同研究を通じて、高温での花成促進に関わる因子と低温で花成抑制に関わる因子を見出しており、これらが温度依存的な多量体形成に関わっている証拠も得ている。

そこで本研究では、温暖化によって特に影響の大きい植物の花成を対象として温度シグナルの受容応答メカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究は、いまだ謎の多い植物の温度応答を明らかにするという基礎的な観点から、温暖化の根本問題解決までの現実的な対策として植物に高温耐性を付与し、人の健康と美において重要な農業生産を持続するための研究である。

②研究方法

周囲の環境変化を的確に感知し適応することは、移動能を持たない植物の生存戦略として重要である。そのような環境応答の代表例として花成が挙げられる。花成とは栄養成長から生殖成長への転換のことであり、概日時計や光、温度など様々な要因で制御されている。花成経路では、花成ホルモンをコードしているFT遺伝子が中心的な機能を担っており、シロイヌナズナでは長日条件下で発現が誘導され、花成を促進している。植物は温度に応じて様々な温度応答メカニズムを働かせており、これらのメカニズムと概日時計や内在性の情報などが統合され、複雑なネットワークを機能させている。しかし、高温下の花成促進機構の大半は、8時間から12時間明期の短日条件を中心に解析が進められている。長日条件下では光周性シグナルによる花成促進効果が強いいため、30℃程度の高温に曝さない限り明確な花成促進が観察されないことが主要な原因と推察されるものの、シロイヌナズナが自生する野外環境において、8時間付近の短日条件と高温は共存し得ない。したがって、上述の花成促進機構が、初夏に向けた気温の上昇による花成促進機構にどの程度適用できるかは不明である。この問いに答えるた



め、北米の野外において、6月から7月にかけてのFT発現様式が解析されたところ、朝FT発現量は6月のものと比較して、約4倍に上昇することが見出された(上図左)。両月の日長は、6月が約16時間、7月が約15.5時間とほとんど変化しておらず、最低気温もほぼ同じであるのに対し、7月の日中最高気温が上昇傾向にあった(上図右)。このことから、日中の気温上昇が朝FTの発現を誘導する可能性が考えられていたものの、複雑条件である野外環境で得られたデータだけでは、高温と朝FTの誘導の因果関係を検証し具体的な分子メカニズムに迫ることが不可能であった。そこで本研究では、すでに確立している疑似野外条件を用いて、日中の高温朝FTの発現を制御する可能性を検証し、具体的な分子メカニズムを明らかにする研究に取り組んだ。

③研究成果

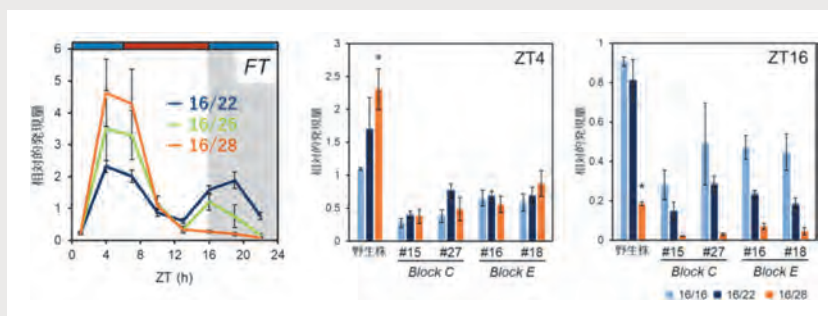
実験室条件および野外条件でのFT遺伝子発現パターンを比較した結果、野外を模した条件では夏至〜7月頃の気温上昇に伴って朝FTの発現量が顕著に増加し、花成時期が早期化した。これは日中温度の上昇が朝FT発現を誘導したためだと考えられた。そこで、

実験室において暗期を16°C、明期をそれぞれ22°C、25°C、28°Cに設定した温度変動条件(16/22、16/25、16/28)を設定し、日中の温度上昇がFT遺伝子発現に与える影響を調査した。その結果、日中の気温が上昇するにつれて、夕FTの発現量は減少し、逆に朝FTの発現量が増加した(図、左)。温度応答はFT遺伝子発現の温度依存性を強く示唆しており、特に朝FTの発現が温度上昇に対して敏感であることを確認した。

次に、FT遺伝子近傍のエンハンサー領域が高温に対してどのような役割を持つかを調査した。BlockCやBlockEと呼ばれるエンハンサー領域は温度応答に重要な転写因子群が作用することが知られている。実際、16/22、16/25、16/28と温度が上昇するにつれ、朝FTの発現が段階的に増加し、BlockCやBlockEをメチル化させた系統(#5、#27、#16、#18)ではそうした傾向は見られず、また夕FTの発現はメチル化の有無に関係なく温度上昇に応じて減少した(図、中央と右)。このことから、BlockCおよびBlockEが高温に応じて朝FTの誘導を担っていることを明らかにした

FTの温度応答を空間的に解析するため、FT::GUS発現株を使用し、FT発現の場所と温度応答を観察した。16°C/28°Cの温度条件下では、FTの発現が維管束篩部伴細胞で強く誘導される傾向を確認し、温度応答が特定の組織で顕著に現れることを示した(右図)。温度上昇がFT発現を促進する際に、特に維管束組織での発現量が増加することを確認した。この結果は、FT遺伝子が温度応答に特異的に反応することを支持しており、温度変動が植物内の特定の細胞で発現を誘導するメカニズムについて新たな知見が得られた。

以上の結果より、日中温度の上昇がFT遺伝子発現を促進し、花成を早期化することを確認した。温度応答に関与するエンハンサー領域の役割や、FTとそのボモログであるTSFの協調的な温度応答が花成促進において重要であることを明らかにした。これらの知見は、温度変動が植物の花成に与える影響を理解するための基盤となり、特に気候変動に伴う農業生産への影響を考慮する上で重要な知見が得られた。今後、温度変動が作物の生育と花成に与える影響を調整する技術の開発が進めば、温暖化に対応した作物の育成が可能になる。また、本研究の成果は、化粧品業界における植物由来原材料の生産にも応用できる。温度変動を利用して有用成分の生産量を最大化する技術が確立されれば、温暖化への適応と共に安定した供給が実現可能となるだろう。



研究テーマ

バクテリオファージによる健康に関わる腸内細菌叢の精密制御

研究者

自治医科大学 医学部 感染・免疫学講座 細菌学部門 宮永 一彦（ミヤナガ カズヒコ）

①研究の背景及び目的

近年、腸内細菌叢が人間の健康、疾患に深く関係していることは公知の事実となっている。しかしながら、細菌叢が攪乱された場合、腸内細菌叢の制御はプロバイオティクスや抗生物質の添加などにより細菌叢の制御する手法はあるものの、標的細菌のみを選択的に殺菌し除去する腸内細菌叢の精密な制御技術はまだ確立されていない。そのため、バクテリオファージ（ファージ）の宿主特異性を利用した標的細菌の殺菌は、腸内細菌叢の精密な制御方法の一つの可能性を有している。

本研究では、疾患に関与していると考えられる腸内細菌叢を健康な状態に戻すために、攪乱された細菌叢における優占菌に対して特異的に感染・殺菌が可能なファージを用いた腸内細菌叢の精密制御方法の確立を目指した。標的細菌として肥満に関与していると報告されている *Thomasclavelia ramosa* (旧名 *Clostridium ramosum*) を用いた。本菌は健常人の腸内にも存在している偏性嫌気性菌であり、これまでに動物実験において高脂肪食マウスに優占化することが明らかとなっている。

②研究方法

(1) 標的細菌およびファージ

T. ramosa ファージは、宿主細菌として *T. ramosa* JCM 1298 を用い、附属病院排水より単離をおこなった。また、本菌にリファンピシン耐性を付与させることで、複合微生物系においても選択的に培養することが可能となり、マウス腸内細菌叢内の菌数を評価した。

(2) 複合微生物系におけるファージの殺菌効果

複合微生物のモデルとして、マウス糞便を用いた。SPF マウス糞便中には *T. ramosa* は生息していなかった。そこで、まずマウス糞便にリン酸緩衝液加え糞便を懸濁させ、その懸濁液の全菌数の約 1-10% になるように *T. ramosa* を加えた。更に、加えた *T. ramosa* の 10 倍、100 倍、1000 倍となるようにファージ (phiTR001) をそれぞれ添加した。ファージを加えずリン酸緩衝液のみを加えた系をコントロールとした。動物実験は、C57BL/6 および BALB/c の近交系マウスを用いた。*T. ramosa* は培養懸濁液 (2×10^6 cells in 0.2 mL) をマウスに 3 日間経口投与した後にマウス糞便を回収し (Before treatment)、その後、ファージ溶液 (2×10^9 PFU in 0.2 mL) を経口投与した。ファージ投与後、1 日後、3 日後の糞便を採取し (After treatment)、標的菌体および細菌叢の解析をおこなった。細菌叢解析は、マウス糞便よりゲノムを抽出し、16S rRNA 遺伝子配列を解析した。

③研究成果

(1) 標的細菌およびファージ

附属病院排水より *T. ramosa* ファージを 10 種類単離した。そのうち phiTR001 を用いて *T. ramosa* JCM 1298 との共培養をおこなった。phiTR001 は、ゲノム解析および形態観察により、ゲノムサイズが約 100 kbp のシホウイルスであった (図 1)。感染多重度 (MOI) が 10 以上で溶菌による濁度の減少がみら

れた後、培養約 20 時間後に phiTR001 に対する耐性菌が出現した。しかし、phiTR004 はこの phiTR001 耐性菌に感染可能であった。これらのファージはそれぞれ宿主を認識する受容体が異なっていると考えられる。この結果より、複数種のファージを用いることにより、ファージ耐性菌の出現をなくすもしくは遅らせることが可能となると期待される。

(2) 複合微生物系におけるファージの殺菌効果

マウス糞便懸濁液中の *T. ramosa* を培養法および 16S 遺伝子解析によって評価したところ、どちらも MOI 10 以上の条件で、*T. ramosa* が減少していることが明らかとなった。この結果より、*T. ramosa* ファージは標的細菌の純粋培養の場合と同様、他の細菌が多く存在する複合微生物系においても、標的細菌を選択的に除去できる可能性があると言える。

また、3 日間連続で菌体懸濁液をマウスに経口投与することで、糞便中に *T. ramosa* が検出され、マウス腸管内に定着していることが示された。更に、マウスに一般固形飼料のかわりに牛乳を与えることで *T. ramosa* が腸内で増殖することも明らかとなった。

マウス糞便を回収し、phiTR001 ファージ投与前 (BT) の菌数およびファージ投与後 (AT) の菌数を測定した。ファージ投与 1 日後の菌数は、ファージ溶液の代わりに緩衝液を加えたコントロールと比較して、有意に減少していた。しかしながら、3 日後にはファージ投与した系においても、1 日後の菌数よりも増えていた。この結果は、1 種類のファージでは動物実験においてもファージ耐性菌が出現し得ることを示しているものと考えられる。そこで、phiTR001 ファージ耐性菌に感染可能な異なるファージも一緒に混合 (カクテル化) したものを投与することで、単種ファージの投与よりも長期間、標的細菌の菌数を抑えることができた。動物実験においても、ファージのカクテル化は効果があると考えられる。

また、16S rRNA 遺伝子解析による細菌叢の変化を調べたところ、ファージを用いた系では、細菌叢の変化はほとんど見られなかった。よって、ファージによる細菌叢の制御は、周辺の細菌叢を乱すことなく標的細菌を除去することが可能であることが示された。

更に、*T. ramosa* を連続投与し、腸内に定着させたマウスに、抗生物質 (バンコマイシン) を経口投与を加えた場合、標的細菌が減少していたものの腸内細菌叢が顕著に変化していた。マウスの糞便も、柔らかくなっており、下痢を起こしていた。このように、抗生物質による治療は、標的細菌のみならず、周辺の細菌叢も大きく影響してしまうのに対し、ファージによる腸内細菌叢の制御は、周辺の細菌叢に影響を与えることなく標的細菌の除去が可能である。

本研究ではファージによる細菌叢制御の標的細菌のモデルとして肥満細菌を用いた。腸内環境を美しく (乱れていない状態) することは、健康を維持することに繋がる。近年では、腸内細菌が能と密接に関与している「腸脳相関」についても研究が進められており、今後ますます腸内細菌叢の精密制御が重要になってくると考えられる。本研究で、細菌を化合物、細菌を細菌、で制御する以外にも、細菌をファージで制御する方法があることを示した。今後は、表現型への影響についても検討を行い、更なるファージの可能性を示していく予定である。

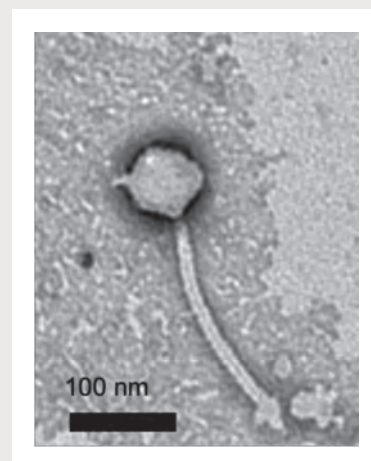


図 1 phiTR001 の TEM 写真

研究テーマ

高い抗酸化作用を有するシリコン製剤の作用機序の化学的解明

研究者

大阪大学 大学院理学研究科化学専攻 船橋 靖博（フナハシ ヤスヒロ）

①研究の背景及び目的

細胞の酸化によって身体が錆びると老化と同時に様々な疾患が発症する。この酸化ストレスの原因となる活性酸素を消滅させることは、ひとの健康の維持のために最も重要である。酸化ストレスによって起こる様々な疾患を図1に示す。本研究グループの大阪大学の産業科学研究所の小林らは、太陽電池の半導体材料から作られた高純度のシリコン微粒子が、生理条件下で水と反応して水素 H_2 を発生することを見出した。ラットやマウスへの給餌実験により、酸化ストレスが大きな原因である慢性腎臓病やパーキンソン病の悪化を抑制できることを示した。潰瘍瘍性大腸炎モデルマウス、顔面神経麻痺モデルマウス、肺線維症モデルマウス、抗がん剤投与の副作用モデルマウス、母体免疫活性化による自閉スペクトラム症モデルマウス、母子感染モデルマウスにも多くの症状の改善が認められた。このようにシリコン製剤が生体内で抗酸化作用、抗炎症作用を示すことや、一部の活性硫黄の産生を高め、各種疾患に対する効果を示すことが報告されている (*Sci. Rep.*, 12, 9634, 2022)。これらを背景として、本研究の課題と目標としては、シリコン製剤が食品添加物として用いられた場合に、最大限の効果を発揮する体内環境を化学的にシミュレートすることとした。

②研究方法

シリコン製剤は胃などの酸性条件では水との反応性に乏しく、腸管内の $pH=8$ 程度の弱アルカリ性条件下で水と反応することが分かっている。腸内環境を再現した化学的なモデル系による実験を以下の通り行い、詳細に検討した。まず、1) シリコン製剤と大腸菌などの腸内細菌が鉄(III)イオン捕捉能を有するシデロフォアを産生することを想定し、カチコラト型のキレート剤である $H_6EMECAM$ に適当な塩基を併せて加え、そのシリコン錯体の合成を行った。図2に示すようなシリコン微粒子の表面のシリカ層や中間層のモデルとしてケイ酸メチルエステル $Si(OMe)_4$ を原料として用い、メタノール $MeOH$ 中で合成した。つぎにシリコン製剤は胃などの酸性条件では水との反応性に乏しく、腸管内の $pH=8$ 程度の弱アルカ

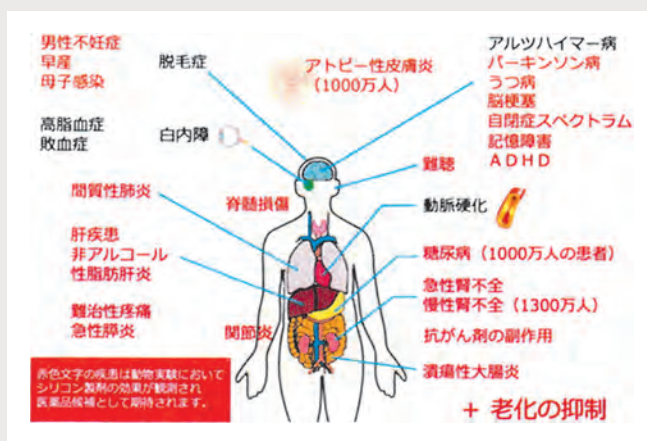


図1 酸化ストレスが誘発する疾患

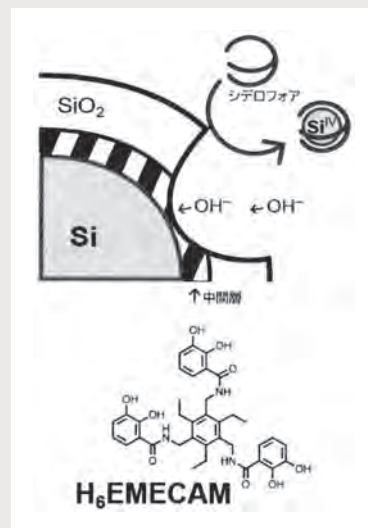


図2 シリコン製剤の表面の反応

り性の生理的条件下で水と反応することが分かっている。そこで、2) pH=8 の Tris Buffer 水溶液中において Yeast 由来の β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド NAD^+ (酸化型) を良くすり潰したシリコン製剤に添加し、生成した NADH (還元型) が示す 339 nm の極大波長を有する吸収帯を追跡した。

③研究成果

シリコン製剤はケイ素 Si は半金属だが、アルミニウム Al とは異なり、胃などの酸性条件では水との反応性に乏しいことが幸いしている。腸管内において各種の消化酵素などが示す至適 pH からみても、pH=8 程度の弱アルカリ性条件下でシリコン製剤は水と反応すると考えられ、実験室において実際に pH=8 の条件下で水素 H_2 を発生しながら少しずつ安全に溶解した。1) 腸内環境を再現した化学的なモデル系を検証するため、鉄 (III) イオンの精密な人

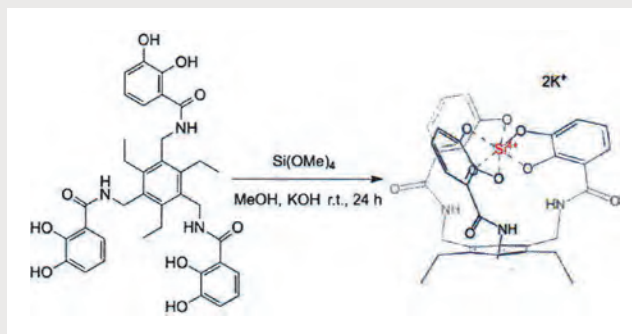


図3 $[\text{K}_2(\text{Si-EMECAM})]$ の合成

工シデロフォアとして Raymond らが報告した H_6EMECAM を用いて、 $\text{Si}(\text{OMe})_4$ から MeOH 中で Si (IV) 錯体を合成し、単結晶 X 線構造解析に成功した。 H_6EMECAM は、*Escherichia coli* や *Salmonella typhimurium* といったグラム陰性細菌が産生する Enterobactin と同じトリス (カテコラト) 型の配位様式を示すことが知られており、今回の Si (IV) 錯体においても脱プロトン化した EMECAM^{6-} の三つのカテコールが Si 原子周りに六配位八面体構造によって、Si 原子を安定に捕捉した (図3)。Enterobactin では生理的 pH に近い pH=7.6 でケイ酸ナトリウム Na_2SiO_3 から Si (IV) 錯体が形成することを Sussmuth らが報告しており、我々の結果と合わせると、カテコールを配位基として有するキレート剤ならば、容易に Si (IV) 錯体が生成することが分かり、腸管内において各種の腸内細菌が産生するシデロフォアやそれに類するキレート剤の付与により、図2に示すようなシリコン微粒子の表面のシリカや中間層の剥離が進むと考えられる。

つぎに 2) シリコン製剤 pH=8 程度の弱アルカリ性条件下に置き、良くすり潰した状態で β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド NAD^+ (酸化型) を添加したところ、 NADH (還元型) が有意に生成することが分かった。これはシリコン製剤のケイ素 Si が還元剤として働き、 NAD^+ を NADH へと還元できることを示している。ジスルフィド結合 $-\text{S}-\text{S}-$ を有するシスチンを還元してチオール $-\text{SH}$ を有するシステイン (Cys-SH, cysteine) を生成するシスチンレダクターゼ (cystine reductase) や、同じくジスルフィド結合 $-\text{S}-\text{S}-$ を有する酸化型グルタチオンを還元してチオール $-\text{SH}$ を有する還元型グルタチオンを生成するグルタチオンジスルフィドレダクターゼ (glutathione-disulfide reductase) はいずれも NADH を必須の補酵素として用いることが知られており、Cys-SH や還元型還元型グルタチオンは抗酸化活性があるだけでなく、Cys-SH から硫化水素 H_2S や、活性硫黄としてパーサルファイドである H_2S_n や過酸化システイン Cys-SSH を生成するピリドキサルリン酸依存性酵素や 3-メルカプトピルビン酸の代謝経路などがあることが木村らによって報告されており、シリコン製剤が NAD^+ を NADH へと還元できることは活性硫黄の生成に寄与するため大変興味深い。

謝 辞

提案したことの全てが実を結んだというわけではなかったが、腸管内において、1) シリコン製剤と腸内細菌の環境が相互に作用している可能性や、2) シリコン製剤による NADH の生成を見出し活性硫黄との関連を指摘するデータが得られたことは、貴財団の支援の賜物であり、心より厚くお礼申し上げます。

公益財団法人 小柳財団

