



研 究 助 成  
業 績 報 告 集

2021 年度

公益財団法人 小柳財団

## 創業者あいさつ



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、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
代表理事	大倉一郎
理事	加藤信子
理事	小柳典子
監事	宮崎一成

## 研究助成選考委員名簿

財団役職	氏名	経歴
選考委員長	小澤 俊彦	日本薬科大学 客員教授 放射線医学総合研究所名誉研究員
選考委員	大倉 一郎	東京工業大学 名誉教授(元東京工業大学副学長)
選考委員	加藤 信子	元 株式会社ブリヂストン 主席フェロー 元 学校法人 日本女子大学 評議員
選考委員	上村 みどり	帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所創薬薬学研究所 上席研究員
選考委員	畑中 研一	東京大学 生産技術研究所 教授
選考委員	三原 久和	東京工業大学 生命理工学院 教授

# 研究助成業績報告書

2021 年度

[2021 年 4 月 1 日～ 2022 年 3 月 31 日]

公益財団法人小柳財団

## 目 次

1	細胞間タイト結合を起点とした皮膚老化メカニズムの解明とアンチエイジング剤の探索…………… 6 研究者▶ 岐阜薬科大学 生命薬学大講座生化学研究室 五十里 彰
2	創薬向け新規ビルディングブロックの開発を指向した多フッ素化キュバン化合物の合成…………… 8 研究者▶ 東京大学 大学院工学系研究科 秋山 みどり
3	進化工学によるメチルトランスフェラーゼ反応フラックスの強化と抗酸化能を持つ エルゴチオネインの微生物発酵生産系への応用…………… 9 研究者▶ 東京工業大学 生命理工学院 平沢 敬
4	ヒトクローン性造血を再現する in vitro モデルの構築と予防法の開発…………… 12 研究者▶ 東京大学 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 合山 進
5	ストレスレジリエンスの獲得・強化に関わる神経基盤の解明…………… 15 研究者▶ 自治医科大学 医学部生理学講座神経脳生理学部門 高柳 友紀
6	スキルス胃癌の予後改善を目指した新規内皮細胞標的治療と機序解析…………… 17 研究者▶ 東京大学 大学院医学系研究科消化器内科 早河 翼
7	食品成分の食べ合わせによるアレルギー抑制の相乗効果…………… 18 研究者▶ 神戸大学 大学院農学研究科 水野 雅史
8	新素材を用いた、量子構造生物学の基盤技術としてのタンパク質大型結晶作製法の開発…………… 20 研究者▶ 北海道大学 大学院 先端生命科学研究院 姚 閔
9	抑うつ状態からの自発的回復における脳内 GPR18 シグナルの役割…………… 22 研究者▶ 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 出山 諭司
10	脳の神経保護機構を支える分子基盤：転写因子 Npas4 の解析…………… 24 研究者▶ 香川大学 医学部分子神経生物学 高橋 弘雄
11	ウイルス RNA とヒト自然免疫の分子攻防の構造基盤…………… 27 研究者▶ 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 竹下 大二郎
12	タンパク質合成系が酸化ストレス耐性を獲得する仕組みの理解…………… 29 研究者▶ 産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 嶋 直樹
13	脂肪細胞分化制御因子 fad104 によるメラニン生成抑制機構の解明…………… 31 研究者▶ 弘前大学 農学生命科学部 食料資源学科 西塚 誠
14	同一個人に由来する腸管組織、ヒト腸管オルガノイド、iPS 細胞由来腸管上皮細胞の機能性評価と 革新的創薬基盤技術開発…………… 33 研究者▶ 大阪大学 大学院薬学研究科 水口 裕之
15	オキシトシン受容体のエピゲノム制御による調和のとれた社会性発達メカニズムの解明…………… 35 研究者▶ 金沢大学 学際科学実験センター 堀家 慎一

16	皮膚の健康を乱す異常な免疫細胞活性化作用を有する黄色ブドウ球菌毒素の探索	38
	研究者▶ 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 衛生化学分野 伊藤 佐生智	
17	網羅的 O 型糖タンパク質分析法を用いた大腸がん治療標的の探索	40
	研究者▶ (公財)がん研究会 プロテオミクス解析グループ 芳賀 淑美	
18	線維性コラーゲンの分泌機構の解明とその制御を目指す基礎研究	42
	研究者▶ 名古屋大学 大学院 生命農学研究科 柴田 秀樹	
19	女性ホルモン調整剤の開発を志向したイリドイド配糖体の合成研究	44
	研究者▶ 日本女子大学 理学部 阿部 秀樹	
20	癒痕を残さない皮膚再生メカニズム	47
	研究者▶ 岡山大学 異分野融合先端研究コア 佐藤 伸	
21	血液の幹細胞の『若返り』現象の解明	49
	研究者▶ 京都大学 高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 山本 玲	
22	抗菌性ペプチド界面活性剤の非リボソームペプチド合成系の確立	50
	研究者▶ 名古屋工業大学 大学院 工学専攻生命・応用化学系プログラム 水野 稔久	
23	筋線維芽細胞から分泌される線維化促進分子の機能解析	53
	研究者▶ 九州大学 大学院 薬学研究院 仲矢 道雄	
24	骨組織を作り出す新たな細胞極性形成メカニズムの解明	55
	研究者▶ 熊本大学 大学院生命科学研究部(医)・細胞情報薬理学講座 菊池 浩二	
25	核内アクチン-ミオシンを介した特異的相同組換え修復機構の解明に基づく抗がん剤の創出	57
	研究者▶ 東京工科大学 応用生物学部 西 良太郎	
26	ヒト腱再生を目指した高再生能動物イモリの腱再生基本原理の解明	59
	研究者▶ 名古屋大学 大学院 工学研究科機械システム工学専攻 前田 英次郎	
27	含フッ素トレオニンならびにアロトレオニンの立体分岐型合成反応の開発とその利用	61
	研究者▶ 東京農工大学 大学院 工学研究院 応用化学部門 山崎 孝	
28	「ミネラルはどのように肥満に関与するのか？」亜鉛シグナルから追求する肥満の制御	63
	研究者▶ 群馬大学 生体調節研究所 福中 彩子	
29	血中エクソソームによる診断を目指した組織特異的エクソソーム精製法の確立	65
	研究者▶ 東京都健康長寿医療センター 老化機構研究チーム・プロテオーム 川上 恭司郎	
30	光活性化タンパク質を利用した嗅覚に関与するイオンチャネルの活性化機構の解明	67
	研究者▶ 光産業創成大学院大学 光産業創成研究科 平野 美奈子	
31	細胞内酸素濃度の絶対量測定可能な新規リン光性色素の開発	69
	研究者▶ 東京工業大学 生命理工学院 伊藤 栄紘	
32	ヒト ORC の Guanin 四重鎖結合と液液相分離の生理的意義	71
	研究者▶ 日本女子大学 理学部 化学生命科学科 和賀 祥	
33	慢性腎不全進行の抑制を目的とした腎糸球体ポドサイトの機械刺激受容機構の解明	74
	研究者▶ 佐野日本大学短期大学 総合キャリア教育学科 栄養士フィールド 市川 純	
34	下垂体毛細血管の孔構築を調節する基底膜由来因子の同定とその分子機序の解明	76
	研究者▶ 帝京大学 医学部 解剖学講座 中倉 敬	
35	食事にリズムを与え肥満を防ぐ摂食制御ホルモンの研究	78
	研究者▶ 岡山大学 大学院 自然科学研究科 相澤 清香	

36	歯周病菌が放出する「細胞外小胞」の胎盤への移行と胎児成長発育への影響 ..... 80 研究者▶ 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 口腔組織学 岡村 裕彦
37	マイクロ流路による細胞接着力評価システムの作製と酸化ストレス検証への応用 ..... 82 研究者▶ 東京工業大学 科学技術創成研究院 柳田 保子
38	嗅覚刺激と代謝シグナルに基づく摂食障害の治療法の開発 ..... 84 研究者▶ 高知大学 教育研究部医療学系基礎医学部門 山口 正洋
39	変形性関節症と骨粗鬆症の予防効果を有する食品機能成分による関節リウマチ予防効果の解明 ..... 86 研究者▶ 福山大学 薬学部 柴田 紗知
40	真珠腫の外科切除における術中光線力学診断の開発 ..... 88 研究者▶ 高知大学 医学部附属光線医療センター 小林 泰輔
41	ネイティブ DNA 配列を用いた高次セントロメア構造の解明 ..... 90 研究者▶ 東京大学 定量生命科学研究所 滝沢 由政
42	電子スピン共鳴 (ESR) 抗酸化能評価による健康長寿抗酸化素材の探索 ..... 92 研究者▶ 神奈川歯科大学 李 昌一

## 研究テーマ

# 細胞間タイト結合を起点とした皮膚老化 メカニズムの解明とアンチエイジング剤の探索

## 研究者

岐阜薬科大学 生命薬学大講座生化学研究室 五十里 彰 (いかり あきら)

### ①研究成果の本文

皮膚にはコラーゲンなどによって形成される角質層と細胞間接着分子によって形成される顆粒層の二重のバリアが存在するが、顆粒層バリアの形成機構は不明な点が多い。顆粒層バリアは主にタイトジャンクションに発現するクローディンによって形成される。クローディンは4回膜貫通型タンパク質で、27種類のサブタイプが存在する。各サブタイプが組織特異的に発現し、ホモまたはヘテロ様式で結合することにより、細胞間結合を形成する。顆粒層にはクローディン-1とクローディン-4が高発現する。クローディン-1ノックアウトマウスは、脱水症状によって生後まもなく死亡するため、顆粒層バリアの形成にクローディン-1が重要な役割を果たすことが明らかになった。また、アトピー性皮膚炎において、クローディン-1の異常発現が報告され、疾患との関連も指摘されている。一方、生理機能および美容の維持におけるクローディン-4の役割は不明なままである。最近申請者は、高齢者の皮膚組織においてクローディン-4の発現が低下することを見出した。本研究では、老化によるクローディン-4の発現低下機構を検討し、その改善作用をもつ機能性天然素材を探索した。

### ②研究方法

ヒトケラチノサイト由来のHaCaT細胞を実験に使用した。フローサイトメトリー法により、細胞周期を解析した。蛍光免疫染色法により、クローディンの細胞局在を調べた。リアルタイムPCR法とウエスタンブロット法により、クローディンのmRNA量とタンパク質量を解析した。細胞間透過性の指標として、上皮膜間電気抵抗値(TER)と水溶性蛍光化合物であるルシファーイエロー(LY)の透過性を測定した。

### ③研究成果

#### 老化によるクローディン発現の変化

ヒト皮膚から調製された組織切片を用いて、クローディン-1とクローディン-4の発現を調べた。その結果、若齢者に比べ、高齢者の皮膚組織でクローディン-4発現が低下していた。一方、クローディン-1発現に大きな差はなかった。

#### 細胞周期に対する老化促進剤の影響

HaCaT細胞を老化促進剤のtenovin-1で処理したところ、G1期の細胞数が増加し、S期の細胞数が低下したため、G1期からS期への進行が抑制されることが明らかになった。本条件下で、クローディン-4発現に対する老化の影響を検討することにした。

#### クローディン-4発現に対する老化促進剤の影響

HaCaT細胞をtenovin-1処理したところ、クローディン-4の発現量が低下した。このクローディン-4発現の低下は、プロテアソーム阻害剤であるlactacystin処理によって阻害されたが、リソソーム阻害剤であるchloroquineは阻害効果を示さなかった。また、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるmonodansylcadaverine(MDC)処理によってクローディン-4発現の低下が阻害された。以上より、老

化促進剤はクローディン-4のクラスリン依存性エンドサイトーシスとプロテアソームによる分解を促進することが示唆された。蛍光免疫染色において、クローディン-4は細胞の隣接部位に分布した。Tenovin-1処理により、クローディン-4の蛍光強度が減弱し、この効果はMDC処理によって阻害された。また、lactacystin処理により、細胞質内におけるクローディン-4の蛍光強度が増大した。この蛍光強度の増大は、プロテアソーム分解が阻害され、クローディン-4が細胞内に蓄積したためと示唆される。

#### セラミド合成酵素の発現に対するクローディン-4発現の影響

siRNAを用いてクローディン-4発現をノックダウンしたところ、セラミド合成に関わるスフィンゴミエリン合成酵素の発現量が低下した。セラミドは角質層の保湿に関与するため、クローディン-4は細胞間バリアだけでなく、角質層バリアにも影響を及ぼすことが示唆された。ヒアルロン酸の合成に関わるヒアルロン酸合成酵素2 (HAS2) と HAS3、分解に関わるヒアルロン酸分解酵素 (HYAL1 ~ 3) の発現に対するクローディン-4発現の効果も検討した。その結果、tenovin-1処理により HAS2発現は増加、HAS3と HYAL1発現は低下、HYAL2と HYAL3は変化しなかった。ヒアルロン酸蓄積に対する各酵素の寄与率が不明なため、ヒアルロン酸濃度を測定することにより、クローディン-4発現の関与を検討する必要がある。

#### 顆粒層バリアに対するクローディン-4発現の影響

HaCaT細胞をtenovin-1処理したところ、TERが低下し、LY透過性が増加した。これらの効果は、p53阻害作用をもつ機能性天然素材の共処理によって改善した。また、tenovin-1処理によるクローディン-4発現の低下もp53阻害剤の共処理によって改善した。以上より、老化によってクローディン-4発現が低下し、皮膚バリア機能が減弱することが解明された。また、p53阻害作用をもつ機能性天然素材は、皮膚バリア増強剤として有用であると示唆された。

本研究において、老化によりクローディン-4発現が低下することを見出し、クラスリン依存性エンドサイトーシスとプロテアソームによる分解が関与することが明らかになった。さらに、p53阻害作用をもつ機能性天然素材がクローディン-4発現の低下を改善させることを解明した。今後、p53阻害作用をもつ機能性天然素材が皮膚に対するアンチエイジング剤として利用されることが期待される。



## 研究テーマ

創薬向け新規ビルディングブロックの開発を  
指向した多フッ素化キュバン化合物の合成

研究者

東京大学 大学院工学系研究科 秋山 みどり (あきやま みどり)

近年、芳香環に置き換える立体的な創薬向けビルディングブロックの開発が盛んに行われている。箱型分子キュバンは、ベンゼン環と大きさが近いこと、ベンゼンの生物学的等価体とみなされ、主な研究対象となっている [Tsanaktsidis ; Savage ; Williams, 2016]。一方、生理活性分子の探索において分子へのフッ素の導入は、脂溶性や水溶性、代謝安定性、酸・塩基性、および水素結合形成に影響を与える重要な手段である。フッ素が複数置換したキュバンは、電子不足な芳香環に置き換わる立体的なビルディングブロックになると考えられる。しかし  $sp^3$  炭素-水素結合のフッ素化はベンゼン環上の  $sp^2$  炭素-水素結合に比べて難しく、既知の方法でキュバンに導入できるフッ素は1分子につき2つが限度である [Irngartinger, 1998]。このような背景のもと、本研究では、低分子創薬の新たなビルディングブロックとなりうる多フッ素化キュバン化合物の合成を目的とした。

本研究期間においては、フッ素ガスを用いた六フッ素化キュバンおよび七フッ素化キュバンの合成方法を確立した。有機合成化学の分野において、有機化合物と爆発的に反応するフッ素ガスを合成に使用することは困難であるとされてきた。しかし、申請者ら独自の技術である直接フッ素化法を用いれば、フッ素ガスの反応性を制御しながら炭化水素の全ての炭素-水素結合を同時に炭素-フッ素結合に変換できる [Okazoe, 2005]。この手法を用いれば、キュバン骨格上に一段階で複数のフッ素を導入できると考え、反応条件の検討を行った。検討の結果、六フッ素化キュバン誘導体が40%、七フッ素化キュバン誘導体が15%ほどの収率で、再現性良く合成できるフッ素化条件を見出した。フッ素化された後の化合物は、その後の変換反応によって、エステル・アミド・アルコールに誘導できた。このことは、得られた多フッ素化キュバンをビルディングブロックとして他の分子に導入できることを示すものである。

創薬応用という本研究の目的からは外れるが、本研究に付随する成果として、全フッ素化キュバンの合成が達成された。本研究で得られた七フッ素化キュバン誘導体は、さらなる変換反応によって全フッ素化キュバンを与えた。全フッ素化キュバンは、優れた電子受容性が予測されて注目を集める分子であったが、これまで合成された例が無かった。全フッ素化キュバンの合成と物性調査についてまとめた論文を投稿し、現在査読プロセス中である。

研究テーマ

# 進化工学によるメチルトランスフェラーゼ反応フラックスの強化と抗酸化能を持つエルゴチオネインの微生物発酵生産系への応用

研究者

東京工業大学 生命理工学院 平沢 敬 (ひらさわ たかし)

## ①研究の背景および目的

エルゴチオネイン (図 1) は、グルタチオンやビタミン C などと比べて非常に高い抗酸化能を示す化合物であり、美肌効果や疾患症状軽減との関連性も報告されていることから、食品添加物やサプリメントへの応用が期待されている。エルゴチオネインの生合成経路は、硫黄原子の供給源としてシステインあるいは  $\gamma$ -グルタミルシステインを用いる 2 種類が報告されているが、いずれにおいても初発反応はヒスチジンの  $\alpha$  アミノ基のメチル化によりヘルシニンを生産する反応である (図 1)。この反応は、S-アデノシルメチオニン (SAM) 依存性メチルトランスフェラーゼである L-histidine N $\alpha$ -methyltransferase により触媒される。また、ヘルシニンにシステインや  $\gamma$ -グルタミルシステインを付加する反応が、エルゴチオネイン生合成の律速段階であるといわれているため、エルゴチオネイン生産のためにはヘルシニンの供給を担う L-histidine N $\alpha$ -methyltransferase 反応のフラックス強化が重要となる。

本研究では、進化工学によりエルゴチオネインの生合成にかかわる SAM 依存性メチルトランスフェラーゼ反応のフラックス強化を行うとともに、当該反応フラックスが強化されたエルゴチオネイン生産株を構築することで、微生物によるエルゴチオネインの新たな発酵生産系を確立することを目的とする。

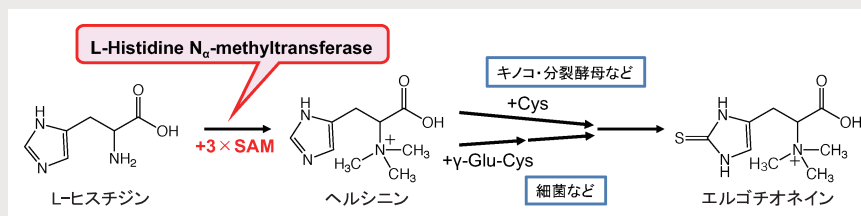


図 1 エルゴチオネイン生合成経路の概略

## ②研究方法

### ・使用菌株・プラスミド・培地

本研究では大腸菌 *Escherichia coli* MG1655 (DE3) 株をベースに、メチルトランスフェラーゼ反応のフラックスに連動して増殖する大腸菌組換え株の構築を行った。また、遺伝子発現用プラスミドの構築には、大腸菌 DH5 $\alpha$  株を使用した。エルゴチオネイン生産には、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4739 株を使用した。

分裂酵母由来 *egt1* 遺伝子の発現には大腸菌ベクター pTrc99A を、また出芽酵母由来 *CYS3*・*CYS4* 遺伝子の発現には大腸菌由来 pACYCDuet-1 を使用した。

大腸菌組換え株の培養には、Lennox (L) 培地および合成培地である M9 培地を使用した。培地には、必要に応じて 50 mg/L アンピシリン、20 mg/L クロラムフェニコール、50 mg/L メチオニン、50 mg/L ヒスチジンを添加した。また、導入したプラスミドからの遺伝子発現の誘導には IPTG を添加した。

出芽酵母の培養には、グルコースを炭素源とした合成培地である SD 培地を使用した。

・メチルトランスフェラーゼ反応のフラックスに連動して増殖する大腸菌組換え株の構築

本研究では、メチルトランスフェラーゼ反応のフラックスに連動して増殖する大腸菌組換え株を構築し、反応フラックスの評価および変異型酵素のスクリーニングを行うこととした。

大腸菌は、解糖系の 3-ホスホグリセリン酸からシステインを合成する。そこで、図 2 に示すように、大腸菌 MG1655 (DE3) 株が持つシステインの生合成反応の一部 (CysE) を破壊するとともに、出芽酵母のシステイン生合成にかかわる CYS3・CYS4 遺伝子を PCR により増幅し、pACYCDuet-1 にクローニングして導入した。そして、分裂酵母の L-histidine N $\alpha$ -methyltransferase をコードする *egt1* 遺伝子を PCR により増幅し、pTrc99A にクローニングして導入した。この組換え株の増殖は、Egt1 により触媒される SAM 依存性メチルトランスフェラーゼ反応のフラックスに連動することを期待した。

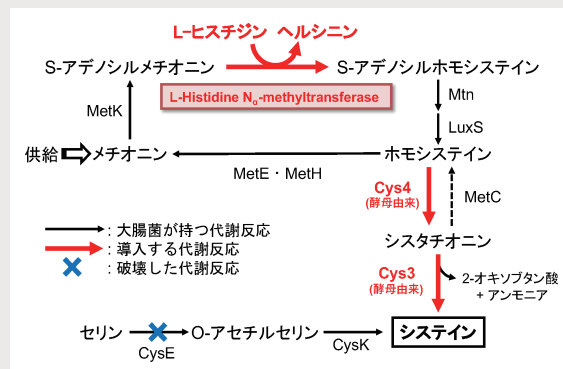


図 2 メチルトランスフェラーゼ反応のフラックスに連動して増殖する大腸菌組換え株の構築  
大腸菌のシステイン生合成経路を SAM 依存性メチルトランスフェラーゼを経由するように改変することで、メチルトランスフェラーゼに依存してシステインが合成される、すなわち増殖速度がメチルトランスフェラーゼ反応のフラックスに連動するようになる。

・Egt1 に増殖が依存すると考えられる大腸菌組換え株の培養操作

構築した大腸菌株の培養は、5 mL の M9 培地を添加した試験管による振とう培養により行った。そして、細胞増殖の評価は、培養液の波長 660 nm における濁度 (OD<sub>660</sub>) を分光光度計により測定することにより行った。

・出芽酵母によるエルゴチオネイン生産

エルゴチオネイン生合成遺伝子を導入した出芽酵母は、50 mL の SD 培地を添加した培養用フラスコを用いて、30°C で回転振とう培養を行った。経時的に OD<sub>660</sub> と培養上清中のエルゴチオネイン濃度を測定した。

③研究成果

・Egt1 に増殖が依存すると考えられる大腸菌組換え株の評価 (1) : 増殖に対する *egt1* 遺伝子導入の効果

Egt1 に増殖が依存すると考えられる大腸菌組換え株として、大腸菌 *cysE* 欠損株に、出芽酵母由来 CYS3・CYS4 遺伝子と、メチルトランスフェラーゼをコードする分裂酵母由来 *egt1* 遺伝子を導入した組換え株を構築した。なお、この菌株では、CYS3・CYS4・*egt1* いずれの遺伝子も IPTG という薬剤の添加により発現が誘導される。

構築した菌株の増殖は *egt1* 遺伝子の導入に依存するはずであるので、CYS3・CYS4 遺伝子のみを導入した菌株を構築し、CYS3・CYS4・*egt1* を導入した株とその増殖を比較した。培養においては、20 mg/L IPTG と 50 mg/L メチオニンを M9 培地に添加した。予想に反して、*egt1* 遺伝子の有無に関係なく、両株ともメチオニンの添加により増殖した (データ省略)。これは、大腸菌が元々持つメチルトランスフェラーゼが機能したことでホモシステインが生合成され、*egt1* 遺伝子を導入しなくても増殖してしまったと考えられる。

・Egt1 に増殖が依存すると考えられる大腸菌組換え株の評価 (2) : *egt1* 遺伝子発現量の変化に対する増殖への影響

*egt1* 遺伝子の導入に関係なく、CYS3・CYS4 遺伝子を導入した大腸菌 *cysE* 欠損株はメチオニン存在下で増殖した。しかし、進化工学によるフラックス強化にこの菌株を利用することの可能性を探るため、

*egt1* 遺伝子の発現量変化に対する増殖の変化を調べた。この菌株では、IPTG 濃度の増加にともない、*egt1* 遺伝子の発現量が増加すると考えられる。そこで、構築した組換え株のメチオニン存在下での増殖に対する IPTG 添加の効果を調べた (図 3)。その結果、IPTG 濃度の増加にともなって増殖が向上していく様子が観察された。このことから、IPTG 添加による *egt1* 遺伝子の発現量が菌株の増殖に依存することが確認された。しかし、その増殖の差は小さく、*egt1* 遺伝子の発現がなくても増殖できることから、現時点では菌株を進化工学の実験に用いることはむづかしく、さらなる菌株の改良が必要であると判断した。大腸菌が持つメチルトランスフェラーゼ、例えば unsaturated-phospholipid methyltransferase をコードする *cfa* 遺伝子などを破壊して、進化工学実験への応用を進める必要があると判断した。

・分裂酵母由来代謝反応を導入した出芽酵母によるエルゴチオネインの生産

最終的には、進化工学により取得したヘルシニン生成フラックスの強化に寄与する変異型 *egt1* 遺伝子の変異体と野生型 *egt2* 遺伝子を出芽酵母に導入してエルゴチオネイン生産を行う。現時点では、出芽酵母に野生型 *egt1*・*egt2* 遺伝子を導入することで、培養開始 336 時間後に約 40 mg/L のエルゴチオネイン生産が確認された (図 4)。

進化工学によるフラックス強化に寄与する変異型 *egt1* 遺伝子取得の段階にはまだたどり着いていないが、そのような遺伝子が取得できた際には出芽酵母によるエルゴチオネイン生産に応用し、生産性の向上を目指す。

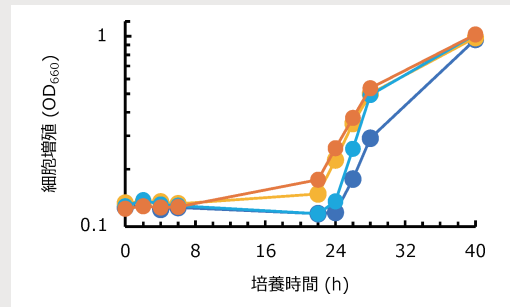


図 3 Egt1 に増殖が依存すると考えられる大腸菌組換え株の増殖に対する *egt1* 遺伝子発現量の影響  
20 (●)、200 (●)、400 (●) µg/mL IPTG を添加した際の *CYS3*・*CYS4*・*egt1* 遺伝子を導入した大腸菌 *cysE* 欠損株のメチオニン存在下での増殖を測定した。●は IPTG を添加していないコントロールを示す。

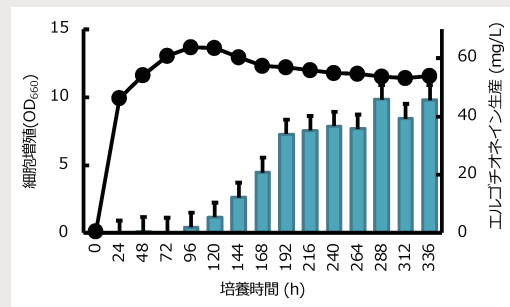


図 4 分裂酵母由来 *egt1*・*egt2* 遺伝子を導入した出芽酵母によるエルゴチオネインの生産  
●：細胞増殖、■：エルゴチオネイン生産

研究テーマ

# ヒトクローン性造血を再現する in vitro モデルの構築と予防法の開発

研究者 ▶ 東京大学 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 合山 進 (ごうやま すずむ)

## ①背景

全身を流れる血液細胞の異常は万病の基となり、様々な疾患発症や老化の原因となる。最近のゲノム解析で、特定の遺伝子変異を持つ血液細胞が増殖する「クローン性造血」が一見健康なヒトの血液中にもしばしば認められることが明らかとなった。またクローン性造血を有する人は、その後の造血器腫瘍や心血管系疾患など様々な疾患の発症率が高く、健康寿命が短いことが判明した。そしてクローン性造血の原因遺伝子として、DNMT3A, TET2, ASXL1 という3つのエピゲノム関連遺伝子の変異が同定された。このような変異を持つ血液細胞が様々な疾患の発症、進展に及ぼすメカニズムを明らかにし、また、高齢者におけるクローン性造血の進行を抑制することができれば、人々の健康寿命の延長に大きく貢献することが期待される。

## ②結果

### (1) ヒトクローン性造血を再現する in vitro 実験系の構築

造血幹細胞維持作用を持つストローマ細胞 MS-5 に、任意の遺伝子の発現を上昇させることのできる dCas9-SunTag を導入した dCas9-SunTag-MS-5 細胞を樹立した。この細胞上で、ヒト臍帯血 CD34+細胞 (造血幹細胞を多く含む分画) を、幹細胞維持用の培地 (alphaMEM+20% FBS+SCF 5 ng/ml, TPO, FLT3, IL-6 各 10 ng/ml, IL-3 1 ng/ml, SR-1 0.75 U/ml) で培養すると、従来の幹細胞培地に比べて、少ないサイトカインで長期間未分化造血幹細胞 (CD34+細胞) を維持できることがわかった (Fig. 1)。

次に、ヒト臍帯血 CD34+細胞に、クローン性造血で高頻度に変異が認められる DNMT3A および TET2 を標的とする sgRNA をレンチウイルスを用いて導入し、さらに Cas9 タンパクを Nucleofector を用いて導入した。これらの細胞を上記幹細胞培養システムを用いて培養したところ、培養開始後2ヶ月程度経ったところから、TET2 標的 sgRNA を導入した細胞が著明に増加することが判明した (Fig. 2)。また、増加した細胞のゲノムを採取してシーケンスを行い、TET2 遺伝子にフレームシフト変異が導入されていることを確認した。増加した TET2 変異細胞は CD34+ の造血幹細胞ではなく、少しミエロイド系に分化した骨髓系前駆細胞であった。培養後期に TET2 変異細胞が増加するという結果は、加齢と共に変異細胞が増加するクローン性造血の病態と類似している。このように、dCas9-SunTag-MS-5 を用いた幹細胞培養システムと幹細胞におけるゲノム編集を組み合わせることによって、クローン性造血の病態を in vitro で再現する実験系の確立

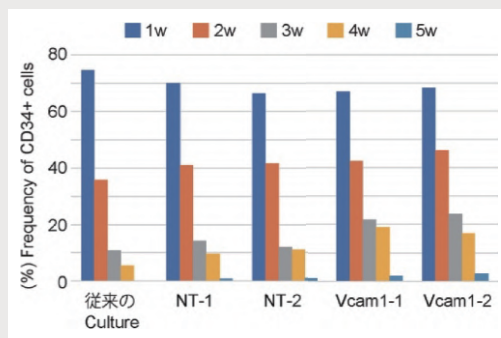


Fig. 1 dCas9-SunTag-MS5 細胞を用いた幹細胞培養系の確立  
dCas9-SunTag 導入 MS-5 に Non-targeting (NT) コントロール sgRNA と Vcam 1 標的 sgRNA を導入し、それらの上でヒト臍帯血 CD34+細胞を培養した。1週間 (w) 置きに CD34 陽性率を FACS で評価した。Vcam 1 発現誘導 MS-5 上では、幹細胞の未分化性が長期間維持された。

に成功した。一方本実験系では、DNMT3A 標的 sgRNA 導入細胞の増加は観察されなかった。このことは、今回確立した実験系が TET2 変異細胞の増殖をサポートするものの、DNMT3A 変異細胞の増殖をサポート出来ていないことを示しており、この原因の究明は今後の課題である。

(2) クローン性造血の固形腫瘍のクロストーク

最近、固形腫瘍患者ではクローン性造血の存在頻度が特に高く、さらにクローン性造血を有する患者の予後が悪いことがわかり、注目されている。しかし、クローン性造血で認められる変異を持つ血液細胞が、実際に固形腫瘍の発症を促進する作用を持つかどうかは、不明であった。

そこで本研究ではクローン性造血のモデルマウスである変異型 ASXL1 ノックイン (ASXL1-MT-KI) マウスを Vav-Cre, LysM-Cre, Lck-Cre マウスと掛け合わせ、全血液細胞、骨髄系細胞、そして T 細胞に変異型 ASXL1 を発現させるマウスを樹立した。これらのマウスに、メラノーマ (B16F10)、肺がん (LLC)、大腸がん (MC-38) の 3 種類の固形腫瘍細胞を移植したところ、Lck-Cre ; ASXL1-MT-KI マウスで固形

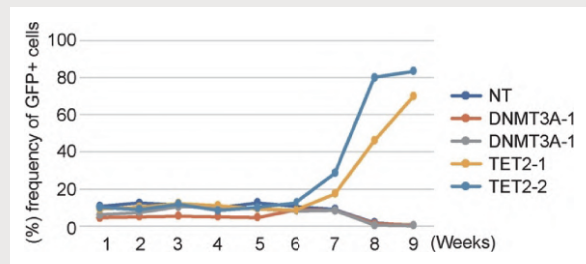


Fig. 2 TET2 変異細胞は、長期培養で増殖優位性を示すヒト臍帯血 CD34+ 細胞に GFP を共発現した sgRNA を導入し、さらに Cas9 タンパクをエレクトロポレーションで導入した。それらを Vcam1 発現 MS-5 細胞上で培養した。培養開始 2 ヶ月後から、TET2 変異細胞の顕著な増殖が認められた。

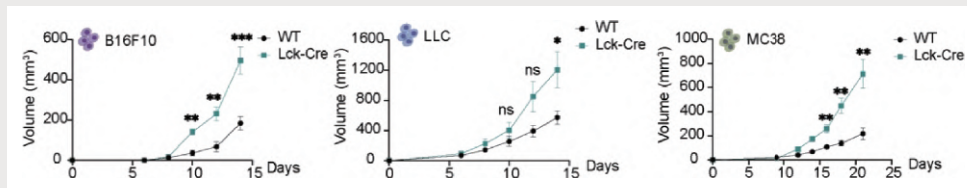


Fig. 3 ASXL1 変異を持つ T 細胞は、移植モデルにおける固形腫瘍の発症を促進する。T 細胞特異的に変異型 ASXL1 を発現させたマウス (Lck-Cre マウス) と野生型マウスに 3 種類の固形腫瘍細胞 (B16F10: メラノーマ、LLC: 肺がん、MC-38: 大腸がん) を移植した。固形腫瘍の増殖は、Lck-Cre マウスで有意に促進された。

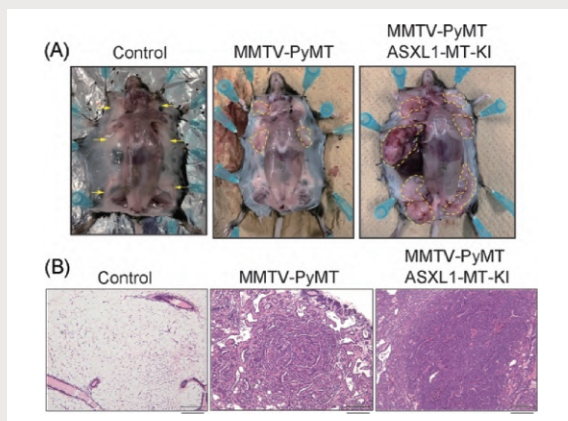


Fig. 4 ASXL1 変異を持つ血液細胞は、乳がんの発症を促進する。VavCre ; ASXL1-MT-KI マウス (血液細胞特異的に ASXL1 変異を持つマウス) に MMTV-PyMT マウス (乳がん自然発症マウス) を掛け合わせたところ、ASXL1-MT-KI マウスでは乳がんの発症が早くなり、より悪性化した。

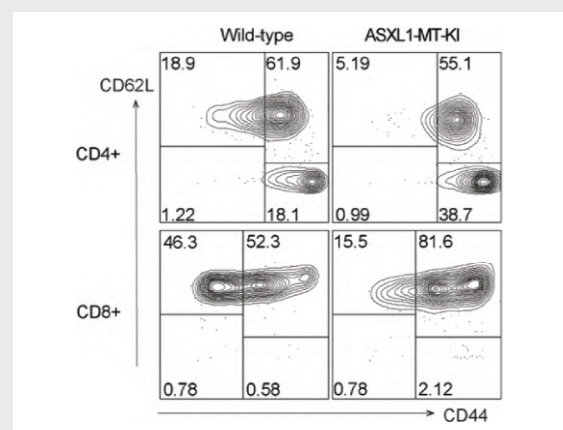


Fig. 5 ASXL1 は T 細胞の naive-effector バランスを制御する。野生型 (Wild-type) と変異型 ASXL1 ノックイン (ASXL1-MT-KI) マウスの脾臓を用いて抹消 T 細胞を解析した。ASXL1-MT-KI マウスでは、CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> naive T 細胞が減少し、CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> effector T 細胞が増加していることが明らかとなった。

腫瘍の増殖が促進された (Fig. 3)。また、ASXL1-MT-KI マウスと乳がんを自然発症する MMTV-PyMT マウスを掛け合わせ、ASXL1 変異を持つ血液細胞が乳がんの自然発症を促進することも突き止めた (Fig. 4)。さらに、ASXL1-MT-KI マウスにおいて抹消 T 細胞における naïve-effector バランスが乱れ (Fig. 5)、T 細胞が老化傾向を示すを明らかにした。これらの結果は、ASXL1 変異を持つクローン性造血が、T 細胞の機能異常を介して固形腫瘍の発症を促進している可能性を示唆している。

### ③考察

本研究では、Vcam1 を高発現させた造血支持細胞 MS-5 を活用して、TET2 変異が誘導するクローン性造血の進展を *in vitro* で再現することに成功した。ただし、DNMT3A 変異細胞の増殖は認められなかったことから、体内の微小環境を十分に再現はできていないと考えられる。今後、任意の遺伝子の発現を誘導できる dCas9-SunTag-MS-5 細胞を用いて他のニッチ因子を高発現させた細胞の造血幹細胞支持能を検証し、実験系の改善に努めたい。

また本研究では、変異型 ASXL1 ノックインマウスをクローン性造血のモデルマウスとして活用して、ASXL1 変異を持つ血液細胞が固形腫瘍の増殖を促進することを見出した。またメカニズムとして、ASXL1 変異が T 細胞の老化を促進し、それによる T 細胞の機能不全が固形腫瘍の増大に関与している可能性を明らかにした。これにより、これまで造血幹細胞や骨髄系細胞での研究が中心であった ASXL1 が、実は T 細胞制御にも関与していることが、はじめて明らかとなった。

本研究の成果を基盤として、今後血液細胞を介した健康長寿実現を目指して研究を進めていきたい。

### ④発表論文

Liu X... Goyama S. CHIP-associated mutant ASXL1 in blood cells promotes solid tumor progression. *Cancer Science* 2022 113 (4) : 1182-1194. doi: 10.1111/cas.15294

研究テーマ

# ストレスレジリエンスの獲得・強化に関わる神経基盤の解明

研究者

自治医科大学 医学部生理学講座神経脳生理学部門 高柳 友紀 (たかやなぎ ゆき)

## ①研究の背景及び目的

ストレス社会と言われて久しい現代において、我々は生涯様々なストレスと共に生きていくために、困難や逆境があったとしても乗り越えるしなやかさ“レジリエンス”を身につける必要がある。レジリエンスは遺伝で規定される資質だけでなく、環境要因とその相互作用によって脳の可塑性を介して生涯にわたって個人が獲得・強化することが可能と考えられている。他個体との愛着形成の様な社会的環境を整えることはレジリエンスを強化する環境要因と言われているが、この機序は未だ不明である。レジリエンスの神経科学的研究は最近注目されてきているが、まだ未解明の部分が多い上に、レジリエンス強化の神経機序に関する研究は進んでいない。

ヒトをはじめとした哺乳動物の子供にとって社会的遊びは報酬価が非常に高く、成熟までの長い時間を社会的遊びに費やす。社会的遊びは快情動を生み出すだけでなく、レジリエンスの発達・強化に重要な役割を果たす事が指摘されている。これには、神経回路の可塑的变化が影響すると考えられているが詳細は不明である。これまでに我々はラットの幼少期の社会的遊び行動が視床下部室傍核尾側部のオキシトシン産生ニューロンを特異的に活性化することを発見した(未発表)。さらに、幼少期に遊び行動を阻害されたラットで成熟後の不安行動が増加することを示してきた(未発表)。これらのことと、我々を含む様々な研究チームが示してきたオキシトシンが不安抑制に働くという報告を勘案し、『幼少期の社会的遊び行動はオキシトシン神経回路を可塑的に亢進し、成熟後のストレスレジリエンスを強化する』という可能性を考えた。そこで、本研究では幼少期の社会的遊びが成熟後のレジリエンスを強化する機序は何かを問いとして研究を進めることとした。

## ②研究方法

1. オキシトシン受容体遺伝子欠損ラットにおける幼少期の社会的遊び行動と成熟後の情動行動・社会行動の解析:遊び行動におけるオキシトシン-オキシトシン受容体システムの機能を明らかにする目的で、CRISPR-Cas9系を用いてオキシトシン受容体遺伝子欠損ラットを作製した。この動物を用いて、幼少期に同じ遺伝子型同士で遊ばせた時の50 kHz帯の超音波発声、成熟後の情動行動(オープンフィールドテスト、高架十字迷路テスト、明暗箱テスト)の評価を行った。

2. 社会的遊び行動で活性化されるオキシトシン産生ニューロンの投射先を同定し、神経回路の活動操作を行うための遺伝子改変ラットの開発:オキシトシン受容体遺伝子座に蛍光タンパク質 Venus と DNA 組換え酵素 Flippase を発現するノックインラットを CRISPR-Cas9 系を用いて作製した。挿入配列付近の DNA シーケンスを解析し、ラインを選定した。

## ③研究成果

1. オキシトシン受容体遺伝子欠損雄ラットを用いて、幼少期の遊び行動時の快情動を示す50 kHz帯の超音波発声と、成熟後の情動・社会行動について評価を行った。幼少期のオキシトシン受容体遺伝子欠



損ラットにおいて、遊び行動テスト中の 50 kHz 帯の超音波発生数は野生型と差が無かった。また、成熟したオキシトシン受容体遺伝子欠損ラットにおいて、オープンフィールドテスト、高架十字迷路テスト、明暗箱テストを用いて情動行動の評価を行ったが、野生型と差は無かった。これらの結果から、幼少期の社会的遊びの惹起・維持と成熟後の情動行動にはオキシトシン受容体が必須では無い可能性が示された。また、成熟後の情動行動については幼少期に社会的遊び行動を阻害されたラットの表現型とは異なっており、幼少期に社会的遊びで活性化されたオキシトシン産生ニューロンの役割も不明のままとなった。これについて3つの可能性を考えた。1つ目はオキシトシン産生ニューロンにおけるオキシトシン系を介さない他の神経伝達物質による作用の可能性、2つ目はオキシトシン受容体遺伝子欠損ラットで胎児期からオキシトシン受容体がないことによる相補的作用による可能性である。さらに3つ目は、幼少期の社会的遊び時に活性化されるオキシトシン産生ニューロンが全く別の機能を担っている可能性である。今後はこれらの可能性について、遺伝子改変ラットを用いて生後にオキシトシン産生ニューロンを破壊するあるいはオキシトシン産生ニューロンの神経活動を抑制して検証を行う予定である。また社会的遊びにおけるオキシトシン産生ニューロンの詳細な役割についても検証を行う。

2. 社会的遊び行動で活性化されるオキシトシン産生ニューロンの投射先を同定し、神経回路の活動操作を行うため、オキシトシン受容体遺伝子座に蛍光タンパク質 Venus と DNA 組換え酵素 Flippase を発現するノックインラットを CRISPR-Cas9 系を用いて作製した。最初に得られた多コピーの個体から2回ゲノム編集を繰り返し、1コピー体を3ライン取得した。さらに、挿入配列付近に塩基の挿入と欠失などの Indel 変異があることを想定し、DNA シーケンスの解析を行った。この中から変異の場所と程度、変異の数などから、1ラインを選定した。現在この動物の脳を採取したところであり、今後免疫染色を行う事によって、Venus が発現していること、オキシトシン受容体の発現が先行論文や我々が作製したオキシトシン受容体-Venus ノックインマウスと比較してどうであるかの解析を行う。また、アデノ随伴ウイルスベクターの局所投与を行い、Flippase 依存的な遺伝子発現を誘導できるかどうかについても検証を行う。

研究テーマ

# スキルス胃癌の予後改善を目指した新規内皮細胞標的治療と機序解析

研究者

東京大学 大学院医学系研究科消化器内科 早河 翼 (はやかわ よく)

胃癌は我が国において罹患率・死亡率の高い疾患であり、特に予後不良なのが、印環細胞型胃癌、いわゆるスキルス胃癌である。印環細胞型胃癌では、E-cadherin の変異もしくは発現低下・遺伝子変異が特徴的であり、細胞接着経路の異常が病態に関与していると考えられている。本研究では、独自の印環細胞型胃癌マウスモデルを用い、スキルス胃癌の発生進展機序を解明し、新規治療標的を探索することを目的とした。

致死的な浸潤型印環細胞胃癌を発症する Tff1-Cre ; LSL-p53R172H ; Cdh1F/F ; Tgfbr2F/F (T1-PTC) マウスの胃組織と腫瘍オルガノイドから RNA を抽出し、bulk RNAseq を施行した(図 1)。その結果、T1-PTC マウス腫瘍細胞では血管新生と関連する CD38・LRG1 が高発現しており、腫瘍組織の間質ではこれらと結合する CD31・CD105 の高発現が認められた。実際病理学的にも腫瘍組織中には活発な血管新生が生じており、これらの分子の相互作用によって間質の血管新生を主体としたリモデリングが生じ、腫瘍進展に寄与していると考えられた。

間質のリモデリング状態をより詳細に解析するため、T1-PTC マウスの腫瘍組織を消化し、単一細胞 RNA シークエンシングを施行した(図 2)。その結果、CD38 は腫瘍細胞とリンパ球に、LRG1 は腫瘍細胞と骨髄球系の免疫細胞に発現していることが分かったが、正常の胃組織由来細胞ではほとんど発現が認められなかった。一方、CD105 は腫瘍内の間質細胞である血管内皮細胞と、腫瘍関連線維芽細胞に発現が認められたが、正常胃組織の間質細胞には発現していなかった。以上の結果から、CD38/CD31・LRG1/CD105 経路は T1-PTC マウスの浸潤性・血管新生と関連がある可能性があり、また腫瘍特異的に発現していることから有望な治療標的となる可能性が考えられた。次に、T1-PTC マウスモデルにおいて CD38・LRG1 を特異的中和抗体(抗 CD38・抗 CD105 抗体)により阻害する検討を行った。中和抗体投与後の胃腫瘍では血管新生、線維芽細胞・免疫細胞の浸潤抑制を認め、さらに腫瘍細胞の粘膜下浸潤も抑制した。また、Tgfbr2・Cdh1 欠損オルガノイドに Crispr/Cas9 システムを用いて CD38・LRG1 遺伝子のノックアウト変異を導入した結果、in vitro での増殖能に差を認めなかったが、免疫不全マウスへの皮下および同所移植モデルにおいて CD38・LRG1 欠損による著明な増殖抑制効果を認めた。以上より、スキルス胃癌の一部では、Tgf シグナルとの相互作用の結果、血管新生などを誘導する CD38・LRG1 遺伝子が高発現することによって間質反応を増強し、最終的に癌進展を促進していることが明らかとなった。CD38・LRG1 はこうした癌に対する有望な治療標的となる可能性が考えられる。

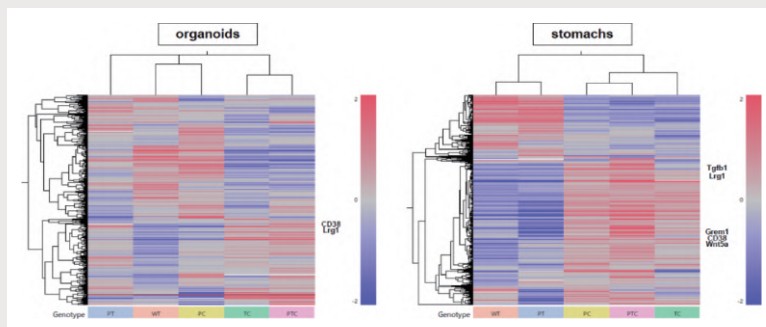


図 1

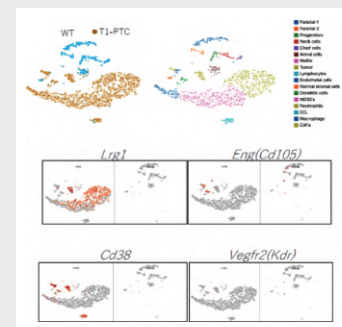


図 2

研究テーマ

# 食品成分の食べ合わせによるアレルギー抑制の相乗効果

研究者

神戸大学 大学院農学研究科 水野 雅史 (みずの まさし)

## ①研究の背景および目的

I型アレルギーは、国民の3人に一人が罹患する国民的疾患になってきている。特に花粉症は冬がやっ  
と終わろうかという2月下旬から発症患者が増加し始め、春を迎える3月上旬から最盛期になってくる。  
このように季節が良くなってくるにもかかわらず、防御対策のためマスクや点眼薬などが欠かせない生活  
を強いられる。これまでの研究から、コンブに含まれるフコイタンを摂取すると花粉症のようなI型アレ  
ルギーを発症した後でも改善できる可能性を明らかにしてきた。その一方で、我々の健康に好ましくない  
成分が含まれていることもあり、安全面から危惧される点を含んでいる。これを解決させる手段として、  
先人からの言い伝えにある「食べ合わせ」を上手く組み合わせることで、この問題の解決を目指した。

## ②研究方法

アレルギー抑制の相乗効果を示す食品因子の探索およびその発現機構を解明するため以下の実験を行っ  
た。

### I. 受動的アナフラキシー反応試験を用いた抗アレルギー実験

5週齢、雌のBALB/cマウスに供試材料を4日間毎日胃内強制投与した後、抗DNP-IgEを尾静脈より  
投与しその30分後に最初の耳介厚を測定した。さらに、その直後抗原(Ag)であるDNPを耳介に塗布し、  
2時間後に再び耳介厚を測定した。この刺激前後の耳介厚の差をIgE/Agによる浮腫とし、その差の増加  
度合いで抗アレルギー効果を判断した。

### II. 能動的アナフラキシー反応を用いた感作過程における抗アレルギー効果の検証

アナフィラキシー発症に至る抗原感受性亢進メカニズムについて明らかにすることが出来る能動的アナ  
フラキシー反応を行った。BALB/cマウス(5週齢、雌)に抗原となる卵白アルブミン/アジュバンドを腹  
腔内に投与することで感作を行い、アレルギー反応を惹起する。供試材料は感作開始の1週間前から4週  
間連続投与し、血中のIgE含量上昇と直腸温度低下の抑制度で抗アレルギー効果を確認した。

## ③実験結果

フコイタンとナラワスサビノリ多糖画分のそれぞれ単体ではアレルギー抑制作用を示さない量での共投  
与によって、アレルギー抑制作用が発揮されるかについて受動的アナフラキシー反応を用いて検討した。  
その結果、フコイタン100μgとノリ由来多糖画分250μg共投与で耳介浮腫の抑制が認められた。この結  
果より、フコイタン単独で抑制効果を示す200μgの半分まで投与量を削減させることができることが明  
らかとなった。また、一般によく研究がなされているポリフェノールについても検討した結果、ケルセチ  
ンあるいはケンフェロールそれぞれ約200μgとの同時摂取により、摂取量を約半分に抑えられることも  
判明した。

さらに感作段階から両食品因子の効果を能動的アナフラキシー反応によって検討した。その結果、受動  
的アナフラキシー反応で活性を示したそれぞれフコイタン100μgとノリ由来多糖画分250μg投与によっ

て直腸温度低下は抑制された。一方、血中の総 IgE 量に関しては感作させたマウスからの IgE 量と変化は見られなかった。これまで知られている食品成分によるアレルギー抑制は、Th1/Th2 バランスを制御することで血中 IgE 量を減少させる機構がよく報告されてきたが、今回の結果はこれまでとの抑制機構とは異なっている点は興味深い。以上の結果から、フコイダンとノリ由来多糖を摂取することで、アレルギーを抑制することが可能であることが明らかとなった。

研究テーマ

# 新素材を用いた、量子構造生物学の基盤技術としてのタンパク質大型結晶作製法の開発

研究者

北海道大学 大学院 先端生命科学研究院 姚 閔 (やお みん)

【研究背景および目的】

タンパク質は生命と共に数十億年をかけて進化してきた精巧な分子機械であり、その機能は複雑かつ階層的に配置している原子の量子力学的性質によって決定されるが、生命現象を支配する膨大な数の化学反応に必要な不可欠な情報である水素原子、特にプロトン・ヒドリドの挙動に関しては依然理解が進んでいない。これは、X線では原子が持つ電子に、電子線では原子の静電ポテンシャルによる散乱現象に立脚するため、プロトン交換性を明らかにできず、また、分解能の制限からプロトンや水素原子を観測できる例は極めて稀だからである。さらに、バイオインフォマティクスの計算科学においても、X線構造に基づいて予測した水素原子位置情報を用いているため、取りうる様々なプロトン化状態の網羅計算と実験事実との照合が必須である。特に、インシリコ創薬において量子化学計算(QM/MM)を組み入れた薬剤候補化合物の設計も、実験的に決定した全原子構造情報を欠く現状のため、精度に限界がある。プロトン交換性や、水素原子の挙動を論じることのできる方法としては、原子核による散乱を観測できる中性子線結晶構造解析に限られる(量子構造生物学)。

一方、中性子線結晶構造解析の技術的な限界、特に回折実験に必要な良質大型結晶(図1)の作製が困難であるため、構造データベースPDBに登録された14.6万の結晶構造中に中性子線による構造は、わずかに全体の約0.1%(170程)しかない。通常、タンパク質結晶構造解析と言えば、「結晶化」が越えなければならない大きな壁として立ちだかっている。現在でも、構造解析に適した高品質の結晶を得るための方法論は確立しておらず、結晶化試薬や、結晶の成長環境の網羅的な探索による“偶然的に”結晶形成させることに依存している。中性子線結晶構造解析に利用できる大型結晶の成長はますます困難である。ここで、本開発では、結晶化の核形成=>成長=>終結の3段階の第2段階の結晶成長に絞り、熱応答ポリマーのタンパク質結晶成長に及ぼす影響を検討し、中性子回折実験に利用可能な、良質の大型結晶を作製する新汎用的な方法を確立したい。このように、中性子構造解析の技術的なボトルネックを乗り越えることで、従来の空間的な分解能(Å)を目指す結晶学から、水素原子をプローブとする量子生命結晶学へのパラダイムシフトを目指す。

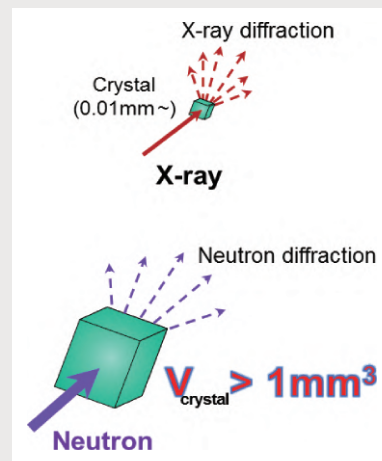


図1 X線と中性子用の結晶

【研究方法】

本研究では、大型結晶の成長に大量のタンパク質が必要であるため、モデルとして大量調製できるタンパク質アミドトランスフェラーゼ GatCAB 複合体、シチジン脱アミノ化酵素、ウイルスシステインプロテアーゼの3種類を選択した。それらのサンプルを精製し、通常の結晶が出ることを確認した。

1. 私たちは見出したタンパク質結晶の成長に効果ある熱応答ポリマーについて、異なる相転移温度を3

種類のポリマーを選ぶ。各サンプルの結晶化条件での相転移変化を測定し、結晶化条件と相転移変化の相関性を見積る方法を検討した。

2. 上記1の結果に従ってポリマーを選択し、大型結晶の成長を試みた。その際、シッティング、キャピラリーバッチ法の結晶化方法の検討を行った。
3. X線と中性線を用いて得られた結晶質を確認し、熱応答ポリマーの効果と汎用性を確認した。

### 【研究成果】

私達が使用しているポリマーを利用すると、結晶成長に有効であることを発見したが、その原理を証明するべく、研究を進めてきた。低温で溶液状態にあるポリマーが温度上昇に伴って不溶化する性質を持つポリマーを使用すると、結晶成長に伴う発熱を、ポリマー不溶化に利用できるという解釈をしている。ポリマー不溶化に伴う水分子の解放 ( $T\Delta S_{\text{solvent}} > 0$ ) を結晶成長に共役させることができ、熱力学第2法則から結晶成長に有利に働く。この反応は、ポリマーがヒステリシス特性を持つため、逆反応が起こらないことがポイントであると考えられる説である。また、塩濃度が高くなると、ポリマーの溶解度が低下するため、塩濃度と溶解度曲線モニターして、適切な温度に変曲点を持つように組み合わせることが重要であり、熱応答ポリマーの有効が結晶化溶液の塩濃度に依存することが分かった。

これまで、アミドトランスフェラーゼ GatCAB 複合体 ( $M_w = 110$  kDa)、シチジン脱アミノ化酵素 ( $M_w = 16$  kDa)、ウイルスシステインプロテアーゼ ( $M_w = 33$  kDa) の3種に対して本方法を適用した。そのうち、2種に対して有効が確認できたが、残りの1つは確認中である。また、既存のバッチ法による結晶巨大化の試みでは、結晶化溶液の組成の変化や、結晶移動の際の微細な物理的衝撃により結晶を損傷することがあった。そこで、キャピラリー内にシード結晶およびタンパク質溶液を配置し、半透膜に見立てたアガロースゲルを隔壁として導入すると、結晶巨大化の成功率が高くなったことを判した。今後、「キャピラリー+熱応答ポリマー結晶化方法」(図2)を実用化する。

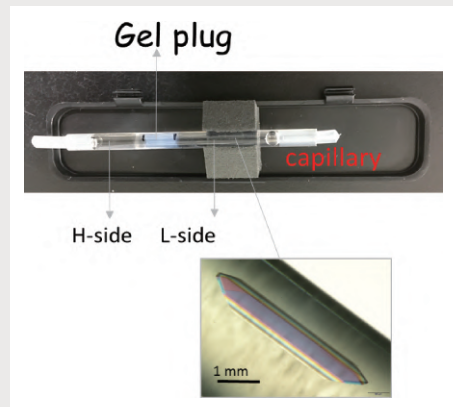


図2 キャピラリー結晶化法

研究テーマ

# 抑うつ状態からの自発的回復における 脳内 GPR18 シグナルの役割

研究者

金沢大学 医薬保健研究域薬学系 出山 諭司 (でやま さとし)

ストレスは、うつ病の危険因子であるが、我々にはストレスによる逆境をはね除けて精神的健康を維持・回復するレジリエンスが備わっているため、ストレスに暴露されても必ずしもうつ病を発症しない。レジリエンスには、ストレス耐性と、一時的に抑うつ状態に陥っても、それを克服する自発的回復の2つの側面がある。しかし、レジリエンスに関する先行研究の大部分がストレス耐性に焦点を当てたものであり、自発的回復を担う分子神経機構はほとんど不明である。一方、マウスに炎症性ストレスとしてリポポリサッカライド (LPS) を投与すると、投与1日後に抑うつ症状が認められる。これまでに我々は、ドコサヘキサエン酸の活性代謝物レゾルビン D2 (RvD2) が、その受容体 GPR18 と mTORC1 活性化を介して LPS による抑うつ症状を抑制することを明らかにしてきた。LPS モデルの抑うつ症状は、LPS 投与3日後には自発的に回復することが知られているが、我々は、この自発的回復が、LPS 投与24、48 および71時間後に GPR18 拮抗薬 PSB CB5 を反復皮下投与することで阻害されることを予備検討で見出した。これらの知見は、内因性の GPR18 シグナル活性化が抑うつ状態からの自発的回復に関与し、その破綻がうつ病の発症・長期化に関与する可能性を示している。本研究では、RvD2 の抗うつ作用発現に重要な脳部位である内側前頭前野 (mPFC) と海馬の GPR18 シグナルに着目して、抑うつ状態からの自発的回復の神経機構の一端を明らかにすることを目的とした。

マウスに LPS を投与した24、48、71時間後に PSB CB5 を皮下、mPFC または海馬内に反復投与し、LPS 投与72時間後に運動量測定を行い、74時間後に抑うつ症状を評価するために強制水泳試験を行った。

PSB CB5 反復皮下投与は、運動量に影響することなく、抑うつ状態からの自発的回復を阻害したが、この自発的回復の阻害は、LPS 投与47または70時間後に RvD2 を mPFC 内に単回局所投与することで抑制された。また、この自発的回復の阻害は、LPS 投与70時間後の海馬内 RvD2 局所投与によっても抑制されたが、LPS 投与47時間後の海馬内 RvD2 投与では抑制されなかった。さらに、LPS 投与24、48 および71時間後に PSB CB5 を mPFC 内または海馬内に反復局所投与することで、反復皮下投与の場合と同様に、LPS モデルの抑うつ状態からの自発的回復は阻害された。これらの結果から、LPS モデルの抑うつ状態からの自発的回復に mPFC および海馬内の GPR18 活性化が重要であることが明らかとなった。また、RvD2 を外因性に投与して両脳部位、特に mPFC 内の GPR18 を刺激することで、PSB CB5 反復皮下投与による抑うつ状態からの自発的回復の阻害が解除される、すなわち、自発的回復過程が促進されることが示唆された。

我々はこれまでに外因性に投与された RvD2 の抗うつ作用に mTORC1 活性化が関与することを明らかにしていることから、次に mTORC1 阻害薬ラパマイシンを mPFC または海馬内に LPS 投与24、48 および71時間後に反復局所投与することで、抑うつ状態からの自発的回復が阻害されるかを調べた。その結果、ラパマイシンの mPFC 内への反復皮下投与は、抑うつ状態からの自発的回復を阻害した。この mPFC 内ラパマイシン反復局所投与による抑うつ状態からの自発的回復の阻害は、mTORC1 活性化を介して即効性抗うつ作用を示すことが知られている NMDA 受容体拮抗薬ケタミンを LPS 投与46時間後に腹腔内投与することで抑制された。一方、海馬内ラパマイシン反復局所投与では、LPS モデルの抑うつ状態から

の自発的回復は阻害されなかった。これらの結果から、LPS モデルの抑うつ状態からの自発的回復に mPFC 内の mTORC1 活性化が関与する一方、海馬内の mTORC1 は関与しないことが示唆された。したがって、海馬内 GPR18 活性化は、mTORC1 以外の細胞内シグナル伝達経路を介して抑うつ状態からの自発的治癒に関与する可能性が考えられる。

以上、本研究の成果から、RvD2 や GPR18 作動薬が、生体に元来備わっている自発的回復力を促進することで有効性を示す、それ故に、副作用の少ない新しいタイプの抗うつ薬になる可能性が示された。今後、抑うつ状態からの自発的回復における mPFC 内 mTORC1 活性化への GPR18 の寄与や、海馬内 GPR18 の下流で自発的回復に関与する細胞内シグナル伝達系の同定など、さらなる検討が必要である。



研究テーマ

# 脳の神経保護機構を支える分子基盤： 転写因子 Npas4 の解析

研究者

香川大学 医学部分子神経生物学 高橋 弘雄 (たかはし ひろお)

## ①研究の背景及び目的

神経細胞は、成体の脳ではほとんど新生しないことが知られている。限られた数の神経細胞を守るため、脳には“内在性の神経保護機構”が存在する。例えば、てんかんにより、神経細胞が過剰に興奮すると、過剰な Ca<sup>2+</sup>流入により細胞死が引き起こされる。このような細胞死を防ぐため、過剰に興奮した海馬の神経細胞では、細胞死を防ぐ9つの Activity-regulated Inhibitor of Death (AID) 遺伝子が誘導される (PLOS. Genet., 5, e1000604, 2013)。

一方、脳梗塞を発症すると、血流の低下により神経細胞では酸素やグルコースが欠乏し、正常な膜電位を維持できなくなる (Neuron, 86, 902, 2015)。非特異的にシナプス小胞が放出され、異常な興奮の伝搬が起こると、Ca<sup>2+</sup>流入などによって細胞死が引き起こされる。国内外の研究により、脳梗塞の重篤化を防ぐ複数の遺伝子 (BDNF, GADD45b, uPA) が報告されている (Int. J. Biol. Sci. 11 353, 2015)。しかしながら、てんかんと脳梗塞のように、異なる疾患で働く神経保護の共通機構はほとんど明らかとされていない。これまでに著者らは、脳梗塞直後に発現変化する遺伝子の網羅的スクリーニングを行った。てんかんの際に働く AID 遺伝子の1つである転写因子 Npas4 が、脳梗塞でも強く発現誘導されることを見出した。Npas4 欠損マウスで脳梗塞モデルを作製すると、細胞死が顕著に増加する。Npas4 は、てんかんと脳梗塞という異なる疾患において、内在性の神経保護の共通機構を担っていると推測される。そこで本研究は、転写因子 Npas4 による神経保護メカニズムの解析を行った。

## ②研究方法

### (A) Npas4 による神経保護のメカニズム

初代培養神経細胞に虚血様処理を行い、虚血時の神経細胞における Npas4 の役割を細胞レベルで解析した。まず、マウス胎仔 (E15.5) の大脳皮質から神経細胞を採取した。エレクトロポレーション法により、Npas4 などの解析遺伝子を発現するプラスミドベクターを導入した後、神経細胞用培地を用いて、7日間培養した。その後、虚血様処理 (1%酸素、グルコース無し) を1時間行った。虚血時の神経細胞における Ca<sup>2+</sup>動態を解析するため、Fluo-4 を用いた Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った。各種イオンチャネルの阻害剤の影響を検討した。24時間後に、ヨウ化プロピジウムにより死細胞を染色し、神経保護作用を定量した。

### (B) 脳梗塞における Npas4 標的遺伝子の同定

転写因子 Npas4 は、標的遺伝子の発現調節を介して、神経細胞の生存を促進すると推測される。そこで下記3つの Test を組合わせて、Npas4 の標的遺伝子の同定を行った。

〈Test 1：脳梗塞により発現が変化する遺伝子の探索〉

Npas4 が強く発現する脳梗塞2時間後の大脳皮質を採取し、RNA-seq 法により発現変化する遺伝子を網羅的に同定した。

↓

〈Test 2 : Npas4 の標的遺伝子の探索〉

野生型と Npas4 欠損マウスから神経細胞を単離して虚血様処理を行った。その後、細胞を採取し、Test1 の上位 200 遺伝子について、発現を定量 PCR でスクリーニングした。その結果、Npas4 の欠損により発現が変化する 15 遺伝子を同定した。

↓

〈Test3 : 細胞保護作用を示す遺伝子の探索〉

野生型マウスから調整した培養神経細胞に、候補遺伝子を過剰発現し、虚血様処理を行った際の神経保護効果を解析した。

得られた最終候補 Gem 遺伝子について、遺伝子欠損マウスや、アデノ随伴ウイルスを用いた過剰発現等で詳細を検討した。

### ③研究成果

#### (A) Npas4 による神経保護のメカニズム

初代培養神経細胞に虚血様処理を行い、細胞レベルで Npas4 の役割を検討した。虚血時の神経細胞は、エネルギーの不足により膜電位が保てなくなり、異常な Ca<sup>2+</sup>流入を起こすことが知られる。培養神経細胞を Ca<sup>2+</sup>イメージングにより解析した結果、虚血様負荷によって異常な Ca<sup>2+</sup>流入が起こり、この時 Npas4 の発現が強く誘導されることを確認した。

次に、Npas4 を培養神経細胞に過剰発現させて、その機能を検討した。Npas4 を過剰発現した神経細胞は、虚血様処理に伴う Ca<sup>2+</sup>流入が顕著に抑制され、24 時間後の細胞の生存が促進された。興味深いことに、同様の効果 (Ca<sup>2+</sup>流入の抑制と、細胞の生存促進) は、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルの阻害剤 Nifedipine の存在下で、通常の神経細胞を虚血様処理した場合にも見られた。そこで培養神経細胞を、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルのアゴニスト BayK8644 で処理して、過剰な Ca<sup>2+</sup>流入による細胞死に対する Npas4 の効果を検討した。Npas4 を過剰発現すると、BayK8644 処理による細胞死は顕著に抑制された。この結果から、Npas4 は電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルの過剰な活性化を抑えることで、神経細胞死を防いでいると考えられる。

#### (B) 脳梗塞における Npas4 標的遺伝子の同定

Npas4 標的遺伝子のスクリーニングの結果、神経保護作用を示す Npas4 の標的遺伝子として、低分子量 GTP 結合タンパク質 Gem を同定した。そこで、内在性の神経保護機構における Gem の役割を検討した。

アデノ随伴ウイルスを用いて大脳皮質の神経細胞で Npas4 を過剰発現すると、Gem の発現は優位に促進された。脳梗塞モデルマウスを用いた解析から、脳梗塞の発症直後に、Npas4 陽性の神経細胞で、Gem の発現が強く見られた。Gem を過剰発現した初代培養神経細胞に虚血様処理を行うと、Npas4 を過剰発現した場合と同様、異常な Ca<sup>2+</sup>流入と細胞死が共に抑制された。そこで、Gem による神経保護メカニズムを検討した。Gem を過剰発現した初代培養神経細胞では、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルを構成する  $\alpha$  サブユニット Cav1.2 の総量に変化は見られないものの、細胞表面に存在する Cav1.2 の量が有意に減少することを見出した。Gem は、細胞表面の Cav1.2 の量を減少させることにより、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルの機能を阻害することが明らかとなった。

最後に、アデノ随伴ウイルスを用いて、脳梗塞モデルマウスにおける Gem の働きを検討した。Gem を過剰発現したマウスでは、脳梗塞に伴う細胞死が顕著に減少した。また、Npas4 欠損マウスに Gem を過剰発現すると、Npas4 の欠損に伴う細胞死の増加は Gem の過剰発現によりレスキューされた。これらの知見から、Npas4 は Gem の発現を誘導することにより、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルの過剰な働きを抑制して、病態時の過剰な Ca<sup>2+</sup>流入に伴う神経細胞死を防いでいると考えられる。

本研究により、Npas4 の下流で神経保護メカニズムを担う分子として、新たに Gem が明らかとなった。

今後は、Npas4 や Gem の働きを詳細に検討して、内在性の神経保護メカニズムをより詳細に明らかとすれば、これらを人為的に活性化することも可能となり、脳疾患から効果的に脳を守る新たな予防や治療法に繋がると期待される。また、神経活動に伴う Npas4 および Gem の誘導は、健常なマウスの脳でも見られる。Npas4 欠損マウスでは、加齢に伴い、大脳皮質や海馬における神経細胞死が顕著に増加する。健常な脳において、神経回路の恒常性を保つために、Npas4 や Gem の果たす役割に関しても、今後その詳細を検討して行きたい。

〈発表論文〉

Ras-like Gem GTPase induced by Npas4 promotes activity-dependent neuronal tolerance for ischemic stroke.

Takahashi H# et al., (#corresponding authors) PNAS. 118, e2018850118 (2021)

最後に、本研究をご支援頂いた小柳財団に心より感謝致します。

研究テーマ

# ウイルス RNA とヒト自然免疫の 分子攻防の構造基盤

研究者 ▶ 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 竹下 大二郎 (たけした だいじろう)

## ①研究の背景と目的

ヒトは、ウイルスに対抗する防御メカニズムとして自然免疫機構を備えている。ヒト PKR (Protein KinaseR) は、ウイルス感染に対抗するタンパク質であり、ウイルス由来の核酸分子を特異的に認識し活性化する。PKR は、細胞内で生じたウイルス由来 RNA の立体構造を認識し、翻訳開始因子 (eIF2alpha) をリン酸化し不活性化する。翻訳開始因子の不活性化は、ウイルスのタンパク質合成を抑制し、ウイルス増殖を妨げる。反対に、ウイルスは PKR 阻害因子を有しており、ヒト PKR に対抗していることがわかっている。真核生物では、PKR と同源性を有する eIF2alpha キナーゼが免疫機構で働いていることがわかっている。これまでの報告で、PKR を含む eIF2alpha キナーゼは、ウイルス増殖を抑制する生体防御機能を担っているが、ウイルスによる免疫抑制の標的ともなっていることが示されている。PKR はウイルス増殖と生体防御の攻防において重要な役割を担っているが、PKR によるウイルス RNA の分子認識と活性発現の仕組みは明らかとなっておらず、現在まで不明なまま残されている。

そこで本研究では、ヒト PKR とウイルス RNA 複合体の構造解析、および PKR 阻害性ウイルス因子と PKR 複合体の立体構造解析と生化学的解析を行い、PKR によるウイルス RNA の認識機構と活性化機構、およびウイルス因子による PKR 阻害機構を解明することを目的とする。本研究は、ヒト PKR が担う自然免疫の分子機構、およびウイルス因子が PKR を抑制する分子機構を原子レベルで解明し、さらにヒト PKR の特性を利用した新規のウイルス治療法を創出することを目標とする。

## ②研究方法

本研究では、PKR-ウイルス RNA 複合体の立体構造、および PKR と阻害性ウイルス因子複合体の立体構造を X 線結晶構造解析、またはクライオ電子顕微鏡解析によって高分解能で決定する。続いて、構造情報を基にした生化学的・生物物理学的解析を実施することを計画している。構造生物学的手法と生化学・生物物理学的手法を合わせて解析を実施して、PKR とウイルス因子間の相互作用を詳細に明らかにすることを目指す。

まず、PKR を調製するため、発現系の構築、および精製を行った。また、構造解析に利用する RNA は試験管内転写、または RNA 化学合成によって取得した。高純度の PKR-RNA 複合体を調製して、結晶化スクリーニングを実施しているが、良質な結晶は得られていない。クライオ電子顕微鏡解析も並行して進めており、現在、測定方法の条件検討を進めている。構造解析を達成するため、発現するタンパク質の領域の検討、構造解析に利用する RNA の構造・鎖長の検討に取り組んでいる。

PKR 阻害性ウイルス因子の一つである PK2 は構造決定に成功しており、生化学的解析を実施した。PK2 と PKR (eIF2alpha キナーゼ) 複合体モデルを構築して、推測される相互作用領域がキナーゼ活性の阻害に必須であることを見出した。PK2 の N 末端は、複合体形成に利用されていたが、この N 末端を欠損した構造解析も実施した。予測される通り、N 末端を欠損した PK2 は単量体構造を呈していた。さらに、詳細な阻害メカニズムを解明するため、PK2-eIF2alpha キナーゼ複合体の結晶化スクリーニングを実施し

たが、これまでのところ良質な結晶を得ることはできていない。今後、発現領域の検討を進めることで、X線回折データの収集が可能な結晶が得られることが期待される。

### ③研究成果

PKR 阻害性ウイルス因子である PK2 の構造情報、生化学的データを取得した。N 末端が複合体形成に関与する特徴的な構造を有していた。PK2 の PKR 阻害活性は、生化学的実験で確認して、予測される相互作用表面が PKR 阻害に利用されていることがわかった。PK2 とキナーゼドメイン複合体の構造情報は、今後、結晶化実験を進めて取得する予定としている。PKR-RNA 複合体構造は、X 線結晶構造解析、または、クライオ電子顕微鏡解析によって、高分解能で構造決定を達成する予定としている。構造決定を達成するための試料調製法は、取得されつつあるため、構造解析を実現する解析手法の改良は今後取り組むべき課題として残されている。

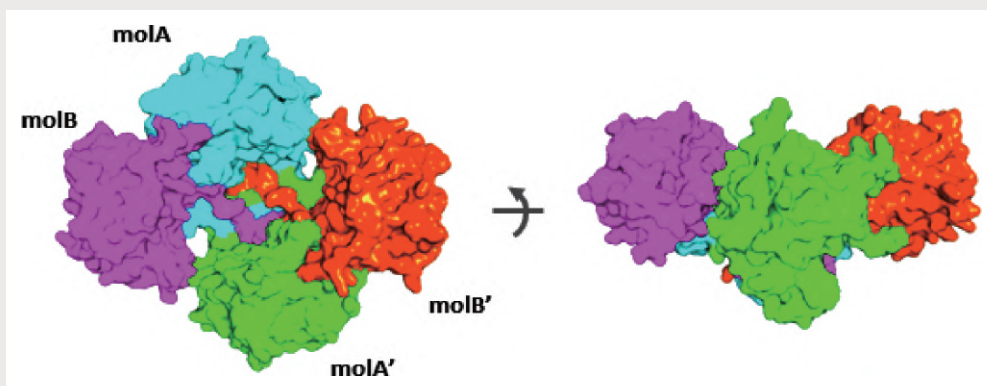


図 1 PK2 全体構造

PK2 は 2 つの異なるコンフォメーション (A, B) を形成し、ホモテトラマーを構築する。ホモテトラマーの形成には PK2 に特徴的な N 末端領域が関与する。

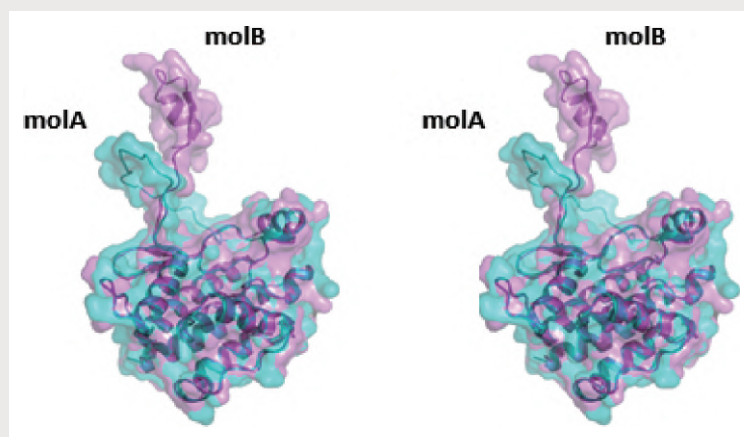


図 2 PK2 プロトマーの構造

PK2 ホモテトラマーを形成するプロトマーのステレオ図。N 末端領域で異なる二次構造を形成し、四量体形成に重要であることが示された。

## 研究テーマ

# タンパク質合成系が酸化ストレス耐性を獲得する仕組みの理解

## 研究者

産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門 嶋 直樹 (しぎ なおき)

## ①研究の背景及び目的

超高齢化社会が到来し、健康長寿社会の実現は喫緊の課題である。タンパク質合成の中心的分子である tRNA には多数の化学修飾がある。修飾がないとタンパク質を正しく作れなくなるため、tRNA 修飾の異常は糖尿病やがんなどの生活習慣病の原因となる。tRNA 分子の化学修飾の一種である硫黄化は、硫黄化酵素によってなされる。しかし、生物種によって、硫黄化酵素の酸素に対する感受性が異なることを独自に見出している。本研究では、これらの感受性の違いを引き起こす反応機構の差異を解明し、酸素および活性酸素などに対して耐性になるしくみと進化の過程を明らかにすることを目標にする。tRNA 修飾異常をとともう重篤な疾病の治療法開発のみならず、将来的には生物間による tRNA 修飾機構の差異に着目した副作用のない抗生物質の開発にも展開していきたい。

タンパク質は生体の主要な構成成分であり、細胞を形作り、また酵素として様々な化学反応を触媒し生命現象を支えている。タンパク質合成において、遺伝子のコドンとタンパク質のアミノ酸に対応させる中心的分子は tRNA である。tRNA には転写後に硫黄原子が導入される(硫黄修飾塩基)。硫黄修飾塩基は mRNA のコドンと対合する位置にあり、正確なコドンの認識に不可欠である。これまでに私たちは遺伝学、生化学、構造生物学を駆使し、硫黄修飾塩基の生合成機構を明らかにしてきた [Ikeuchi ら, Molecular Cell 2006 ; Chen ら, PNAS 2017 等]。

硫黄修飾塩基の生合成をになう硫黄化酵素は、バクテリアからヒトまで高度に保存されているが、大きく2つのグループに分けられることが判明した。還元的環境であるヒト細胞質には酸素感受性の補酵素(鉄硫黄クラスター)を有する硫黄化酵素があり、酸化的環境であるヒトミトコンドリアの酵素は補酵素を必要とせず、酸素耐性がある。さらに酸素耐性の酵素は始原菌の酸素感受性の酵素から進化してできたと考えられる。この独自の発見と考察に基づき、硫黄化酵素の反応機構の詳細と差異を明らかにし、進化についても推定することを目的とする。

## ②研究方法

本研究はこれまで開発してきた、先端解析手法を適用、改良することによっておこなう。具体的には、放射同位体標識反応基質・HPLC・質量分析等を用い、修飾塩基の生成効率を定量解析する [Ikeuchi Y, Shigi N ら, Mol Cell 2006]。またこれまで別種 RNA 硫黄化酵素 (TtuA) の解析を通して運用のノウハウを蓄積してきた、無酸素実験装置を維持管理し(酸素 2 ppm 以下)、酸素のない環境で再現性のよい実験系の構築をおこなう。

予備的な検討から、ヒトの硫黄化酵素は、解析に必要な量を調製するのが困難であることがわかった。そこで本研究では大腸菌(酸素耐性)と好熱性始原菌(酸素感受性)の硫黄化酵素をヒト硫黄化酵素のモデルとして反応機構を解明し、酸素・活性酸素に対する耐性をどのように獲得したのかを明らかにすることを目的とする。大腸菌の硫黄化酵素 EcMnmA(酸素耐性)は立体構造解析にもとづいた生化学解析によりその反応機構の詳細はかなり明らかになっている [Ikeuchi Y, Shigi N ら, Mol Cell 2006] [Numata T ら,

2006 Nature]。そこで私は好熱性始原菌 *Thermus thermophilus* の硫黄化酵素 MnmA (TtMnmA) に着目した。好熱菌の TtMnmA について補酵素を結合した組換えタンパク質の調製に成功し、試験管内で基質 tRNA と無酸素下で反応させる実験系を構築し、酸素感受性の補酵素が反応に必須であることを見出している [Shigi N ら, RNA 2020]。本研究では、この好熱菌 TtMnmA および大腸菌 EcMnmA について反応機構の比較検討を行う。

### ③研究成果

経年劣化したビニール製無酸素チャンバーを更新し、再度無酸素環境をセットアップした。基本的には同一のシステムであるが、既存のものとはリークしてくる酸素の量が異なると考えられ、そのため最適な水素濃度範囲やメンテナンス頻度等を決定し、安定に運用できるようにした。

好熱菌と大腸菌の MnmA のアミノ酸配列の保存性は全長にわたりかなり高い。好熱菌 MnmA の場合、活性中心には3つのシステイン (Cys) 残基があり、ここに酸素感受性の鉄硫黄クラスターが結合し、硫黄化反応に寄与する。大腸菌の場合、鉄硫黄クラスターの結合に必要なアミノ酸残基である Cys の1つがアスパラギン酸 (Asp) になっており、鉄硫黄クラスターなしで硫黄化反応を行うとされている。好熱菌 MnmA のこの Cys を大腸菌型である Asp に置換したが、酸素耐性にはならなかった。そこで Asp 置換に加えて活性中心近傍の運動性の高い領域を大腸菌型にした変異体を調製したが、酸素存在下において活性がある変異体の取得には至っていない。逆に酸素耐性の大腸菌 MnmA についても Asp の代わりに Cys を導入することにより、酸素感受性の活性をもつかを検討したが微弱な活性しか検出できていなかった。大腸菌には硫黄を供給するタンパク質群があり、それらは細胞内での tRNA 硫黄化に必須である。そこでそれらの組換えタンパク質も調製して試験管内で硫黄化反応に添加したが、やはり微弱な活性しか検出できていない。今後も以上の双方向のアプローチを改良し酸素耐性を獲得するしくみを考察する。また別種の酸素感受性酵素についても知見を集めることによって、総合的にタンパク質合成系が酸化ストレス耐性を獲得する仕組みを理解することも大事であると考えている。そこでタンパク質合成に関与する、別の酸素感受性酵素についての検討もおこなった。新規に見出した酸素感受性金属補酵素を有する酵素について、無酸素条件下で金属補酵素の再構成の条件検討を行った。その結果、再現性良く金属補酵素が結合した酵素を調製する条件を見出すことができた。さらに調製した補酵素結合型の酵素をもちいて活性を評価する系の構築に成功し、反応機構の解析をおこなった(東大工学部・理化学研究所との共同研究、論文投稿準備中)。

タンパク質合成系を構成する RNA 修飾酵素等をモデルとして、酸素感受性から耐性への変化のしくみを理解することができれば、酸素の出現という環境の激変に適応して進化を遂げた地球上の生命について深い理解が可能となる。今後は解析が遅れている多数の医学的に重要な酸素感受性酵素の研究にも貢献していきたい。また本研究で開発した酸素濃度を厳密に制御した条件下での酵素の研究手法は、活性酸素等による皮膚への障害等の美容研究にも今後応用することが期待できる。

#### [本研究課題に関する発表]

(発表論文)

Biosynthesis and Degradation of Sulfur Modifications in tRNAs.

Shigi N. *Int J Mol Sci.* 2021, 22 : 11937. doi: 10.3390/ijms222111937.

(学会発表)

酸素感受性の [4Fe-4S] クラスターを有する tRNA 硫黄化酵素の機能解析とその環境適応進化機構

嶋 直樹、堀谷正樹、宮内健常、鈴木 勉、姫野美沙緒

第 44 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2021 年 12 月

研究テーマ

# 脂肪細胞分化制御因子 fad104 によるメラニン生成抑制機構の解明

研究者

弘前大学 農学生命科学部 食料資源学科 西塚 誠 (にしづか まこと)

## 〈研究の背景および目的〉

メラニンは紫外線などの有害光線を吸収することにより、皮膚の細胞を保護する重要な役割を担っている一方、しみやそばかすの原因ともなっており、肌に対する悩みを生じさせている。紫外線や炎症などの刺激を受けた表皮細胞から分泌される  $\alpha$ -MSH (melanocyte-stimulating hormone) などによりメラノサイトが活性化されると、メラニン合成がはじまる。この合成過程は、チロシナーゼなどの酵素群に加え、小眼球症関連転写因子 (MITF) や PKA をはじめとした複数の細胞内シグナル伝達経路により、複雑かつ精緻に制御されているが、その分子機構については未だ不明な点も多い。

我々は脂肪細胞分化を促進する遺伝子として単離した factor for adipocyte differentiation (fad104) の過剰発現がメラノーマ細胞のメラニン合成を抑制する機能を有する可能性を強く示唆される結果をこれまでに得ている。本研究では、fad104 がメラニン生成過程において担う役割について検討を行った。

## 〈実験方法〉

### 1. 細胞培養と fad104 の発現抑制

マウスメラノーマ由来 B16F10 細胞は、10%FBS を加えた RPMI1640 培地で培養した。Fad104 を標的とした siRNA はニッポンジーンで設計、作製した。細胞への導入は lipofectamine 2000 を用いた。

### 2. メラニン含有量

各種細胞に 1 M NaOH を含む buffer を加えピペッティング後、80°C で 30 分処理した。得られた溶解液について、405 nm の吸光度を測定した。

### 3. Tyrosinase 活性測定

各種細胞に 0.1% の triton X100 を含む buffer を加え、cell lysate を調製した。10 ug 相当のタンパク質を含む cell lysate と 0.1% L-DOPA 溶液を混合し、37°C で 1 時間反応した後、470 nm の吸光度を測定した。

### 4. Western Blot 解析

各種細胞から調製した Cell lysate を SDS-PAGE で分離後、MITF、Tyrosinase、fad104、 $\beta$ -actin (loading control) に対する抗体を用いて検出した。

## 〈研究成果〉

これまでの検討では、fad104 過剰発現細胞の沈殿が黒色を呈さないことは明らかにしてきたが、メラニン含量やチロシナーゼの活性などに与える影響については不明であった。そこでまず、fad104 を過剰発現した B16f10 細胞における、メラニン含有量ならびにチロシナーゼ活性を評価した。検討の結果、fad104 過剰発現細胞では、メラニンの含有量が有意に低下していること、さらに、チロシナーゼの活性も低下していることが明らかとなった。これらの結果から、fad104 の過剰発現はメラノーマ細胞のメラニン蓄積を阻害することが強く示唆された。

次に、B16F10 細胞に fad104 を標的とした siRNA を導入し、fad104 の発現を抑制した。細胞を回収し



観察した結果、fad104 発現抑制細胞ではコントロール細胞に比べ強い黒色を呈することが示された (Fig. 1)。そこで次に、fad104 発現抑制がメラニンの含有量とチロシナーゼ活性に与える影響を評価した。検討の結果、fad104 発現抑制は、メラニン含量ならびにチロシナーゼ活性を有意に亢進することが明らかになった。過剰発現ならびに発現抑制実験より、fad104 はメラニン合成を抑制する新規遺伝子であることが示唆された。

メラニンの生成には、MITF やチロシナーゼの発現が必要と考えられる。そこで fad104 がそれらの発現に影響を与えるか否か検討を行った。検討の結果、fad104 発現抑制細胞においては、MITF の発現増加がみられた一方で、チロシナーゼの発現には大きな影響は見られなかった。fad104 過剰発現細胞についても同様の検討を実施した結果、MITF のわずかな減少は観察されたが、チロシナーゼの発現量についてはコントロール細胞と差が見られなかった。これらの結果から、fad104 は MITF の発現制御を介してメラニン生成の抑制に寄与することが示唆された。また、fad104 は、チロシナーゼの発現には影響を与えず、活性制御に寄与する可能性も示唆された。

メラニンの生成は、cAMP の活性化により強く誘導される。そこで cAMP が関与する細胞内シグナル伝達機構に fad104 が影響を与えるか否か検討を行った。fad104 発現抑制細胞にメラニン合成を促進する cAMP の賦活剤 IBMX を添加し、メラニン含有量、チロシナーゼ活性を評価した。IBMX の添加により、コントロール細胞においてメラニン含量とチロシナーゼ活性の上昇が観察された。fad104 の発現抑制細胞においてもコントロール細胞と同程度の上昇がみられた。この結果より、fad104 は cAMP の活性化とは異なる経路でメラニン生成を抑制している可能性が示唆された。

以上の検討により、脂肪細胞分化制御因子として同定された fad104 は、転写因子 MITF の発現制御を介してメラニン生成を抑制する新規遺伝子であることが示唆された。今後、fad104 がどのように MITF の発現を制御するかを含め、fad104 の機能についてより詳細な解析が進むことにより、メラニン生成抑制を標的とした新しい化粧品や創薬開発につながることを期待される。

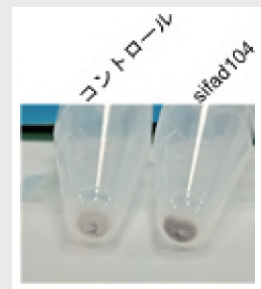


Fig. 1

#### 〈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。

研究テーマ

# 同一個人に由来する腸管組織、ヒト腸管オルガノイド、iPS 細胞由来腸管上皮細胞の機能性評価と革新的創薬基盤技術開発

研究者

大阪大学 大学院薬学研究科 水口 裕之 (みずぐち ひろゆき)

## ①研究の背景および目的

小腸吸収上皮細胞は、様々な薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを発現しているため、経口投与された薬物の吸収や排泄・代謝において重要な役割を担う。しかしながら、ヒト小腸吸収上皮細胞の入手が困難であること、小動物由来小腸組織を用いた方法やヒト大腸癌細胞株である Caco-2 細胞を用いた系では種差や薬物代謝酵素活性の欠落といった問題があり、医薬品候補化合物や食品成分のヒト小腸での吸収・排泄・代謝を評価するための in vitro 評価系はないのが現状である。

我々は、2019年6月、世界初のヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の製品化(タカラバイオ社)に成功した経験を有する。同細胞は既存の評価系としてはベストであると考えられるが、機能面でまだ改善の余地があり、一層の機能向上が必要である。一方、腸管組織由来のオルガノイド培養技術が近年急速に普及し、その創薬研究への応用が期待されるが、申請者らは最近、これまで困難とされてきたオルガノイドを単層膜化する技術開発に成功し(*Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.*, 22, 263-278, 2021)、創薬応用への基盤が構築された。

そこで本研究では、同一個人に由来する腸管生検組織、腸管オルガノイド(3D)、腸管オルガノイド由来単層膜(2D)、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞間で、薬物動態関連遺伝子や腸管機能の比較解析を行い、in vitro 評価系としての各細胞系の特徴や課題を正確に評価することを最終目的とした。薬物動態関連分子の機能は個人差が極めて大きいため、同一個人の生検組織と機能比較することがベストであるが、このような研究はこれまで世界的にみても皆無である。本目的に先立ち、まずは同一個人由来のヒト生検由来腸管オルガノイドとヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド、およびそれらの単層膜の比較検討を行った。

## ②研究方法

ヒト十二指腸生検組織は、共同研究機関の札幌医科大学医学部消化器内科学講座において、研究目的で使用するという同意のもとで採取された。単一のヒト十二指腸生検組織から、生検由来腸管オルガノイドとヒト iPS 細胞の同時樹立を行った。基礎的検討として、樹立したヒト iPS 細胞についてはアルカリホスファターゼ染色、および qRT-PCR による未分化・分化マーカーの遺伝子発現解析を行い、未分化維持状態に問題がないことを確認した。次に、このヒト iPS 細胞を Spence らの方法(*Nature* 470, 105-10, 2011)に基づき iPS 腸管オルガノイドに分化誘導した。樹立した両腸管オルガノイドは半年以上に渡る継代維持培養が可能であった。

両オルガノイドの培養が安定した後、3次元培養状態での特性を詳細に比較し、薬物動態評価系への応用適性を評価した。さらに、実際の薬物動態学的応用を想定して、それぞれをセルカルチャーインサート上に播種した2次元培養状態(単層膜)における比較も実施した。

### ③研究成果

まず、本研究の前提となる生検由来腸管オルガノイドと生検由来 iPS 細胞の由来同一性を確認するために、short tandem repeat (STR) 分析を行った。その結果、生検由来腸管オルガノイドと生検由来 iPS 細胞それぞれのゲノム DNA における分析対象 10 ローカスの全てについて、同一の STR 型が検出され、確かに同一個人に由来することが確認された。

次に、本研究の主目的である両オルガノイドについての性状評価を行った。まず増殖能を比較したところ、生検由来腸管オルガノイドの倍加時間(約 59 時間)は iPS 細胞由来腸管オルガノイド(148 時間)より短く、増殖速度において生検由来腸管オルガノイドが優位であることが明らかとなった。その一方で、生検由来腸管オルガノイドにおける対数増殖期の継続期間(約 6 日間)は iPS 細胞由来腸管オルガノイド(14 日以上)より短く、増殖持続性においては iPS 細胞由来腸管オルガノイドが優位であった。また、生検由来腸管オルガノイドにおける主要な薬物トランスポーター(*peptide transporter 1*; *PEPT1*・*organic solute transporter-alpha*; *OSTA*・*multidrug resistance associated protein*; *MRP3*・*monocarboxylate transporter 1*; *MCT1*・*solute carrier organic anion transporter family member*; *OATP2B1*)、薬物代謝酵素(*cytochrome P450 3A4*; *CYP3A4*・*CYP2C9*・*CYP2C9*)、および腸管分化マーカー(*villin 1*; *VIL1*・*lysozyme*; *LYZ*)の遺伝子発現レベルは、iPS 細胞由来腸管オルガノイドと比べ 15 ~ 27000 倍高かった。

最後に、薬物動態学的応用を見据えた検討として、両オルガノイドをそれぞれセルカルチャーインサート上に 2 次元培養し、各種の比較を行った。経上皮膜抵抗値は iPS 細胞由来腸管オルガノイドの方が高い値を示し、強固なバリア機能を有していると考えられた。主要な薬物代謝酵素と多くの薬物トランスポーターの遺伝子発現レベルは生検由来腸管オルガノイドにおいて高い値を示した。以上の結果より、両オルガノイドの 2 次元培養状態では、バリア機能については iPS 細胞由来腸管オルガノイドの方が優れている一方で、薬物動態学的な応用の面では生検由来腸管オルガノイドの方が優れていることが示唆された。

本研究では、Spence らの方法(*Nature* 470, 105-10, 2011)に基づき、iPS 細胞由来腸管オルガノイドを樹立したが、分化誘導効率の点で改善の余地があると考えられた。そこで現在、iPS 細胞由来腸管オルガノイドの腸管機能を高める分化誘導法の開発について検討中である。今後は、改良された iPS 細胞由来腸管オルガノイドを用いて、本研究の最終目標である同一個人に由来する腸管生検組織、腸管オルガノイド(3D)、腸管オルガノイド由来単層膜(2D)、iPS 細胞腸管オルガノイド(3D)、iPS 細胞腸管オルガノイド由来単層膜(2D)間で、薬物動態関連遺伝子や腸管機能の比較解析を行う予定である。

## 研究テーマ

オキシトシン受容体のエピゲノム制御による  
調和のとれた社会性発達メカニズムの解明

## 研究者

金沢大学 学際科学実験センター 堀家 慎一（ほりけ しんいち）

## 【研究の背景と目的】

愛着の形成や言葉の発達、対人関係といった社会性の確立は、健やかな子どもの脳の発達に極めて重要であり、その破綻は自閉症などの神経発達障害を引き起こす。自閉症は、社会適応能力の障害やコミュニケーション障害、活動と興味の反復性を主徴とする汎性神経発達障害であり、広義にはアスペルガー症候群、レット症候群、アンジェルマン症候群、脆弱性 X 症候群などが含まれる。双生児研究や家族歴研究からその背景には強い遺伝素因があることは明らかであり、10 数個ものシナプス関連遺伝子が関与していると言われているが、未だその全容は明らかにされていない。また、自閉症の発症率は年々増加傾向にあり、最新の調査では、68 人に 1 人の割合で発症するとされ、これまでの遺伝素因だけでなく環境要因を介したエピゲノム変化を含めた複合的な要因によって発症すると考えられている。興味深いことに、これらの社会性障害や情動障害などの神経疾患において性差が存在することは、古くからよく知られている。コミュニケーション障害や常同運動を主徴とする神経発達障害では、男性の発症率が女性に比べ 4~5 倍高いことが知られ、一方、うつ病や不安障害・パニック障害は逆に女性の発症率が男性に比べ 2~3 倍高い。このような性差が生じる要因もまた、性染色体上の遺伝子の関与や性ホルモンの影響など複合的な要素が複雑に絡み合っていることが示唆されるが、その詳細な分子基盤は未だ明らかにされていない。

こうした中、「オキシトシン」と呼ばれるペプチドホルモンが自閉症症状の軽減に有効であるという臨床報告がなされるようになった。オキシトシンは、もともと子宮収縮や乳汁分泌に関与する下垂体後葉ホルモンとして知られていたが、最近の研究で「他人への信頼」が増す効果があることが明らかとなっている。申請者らは、神経発達障害の一つである自閉症に対するオキシトシン臨床試験の過程で、オキシトシン投与の効果が男性に強く現れること、そして男性の中でも非常に大きく現れる者からほとんど効果を示さない者まで、非常にその効果が広範であることを明らかにしてきた。(Munesue, T. et al., 2016.)

そこで、申請者はオキシトシン投与効果における性差やその効果の多様性がオキシトシン受容体遺伝子の発現量と相関する可能性を考え、その遺伝子発現に寄与すると考えられた DNA メチル化解析を行った。自閉症患者におけるオキシトシン受容体遺伝子の DNA メチル化解析は、すでに複数の研究グループから報告されており、自閉症患者特異的に高メチル化を呈するという報告や申請者の結果と同様に、自閉症患者に明確なメチル化差異を見出せなかった報告まで、オキシトシン受容体遺伝子の発現制御における DNA メチル化の役割は不明瞭なままである。(Gregory SG et al. 2009)

一方で、最近申請者はオキシトシン受容体遺伝子の発現制御に、オキシトシン受容体遺伝子のイントロン 3 領域内に存在するエンハンサー様のゲノム領域が重要であることを見出している。このエンハンサー領域はオキシトシン受容体遺伝子の発現状態と相関する DNA メチル化状態を呈することから、性ホルモンや環境因子を介したエンハンサー領域のエピゲノム制御がエンハンサー活性を量的にコントロールし、最終的にオキシトシン受容体遺伝子の転写産物の量をコントロールしている可能性が示唆された。そこで、申請者が見出した OXTR 遺伝子のエンハンサーのエピゲノム状態が遺伝的要因・内分泌要因・環境要因といった複合的な要因により、どのように変化し OXTR 遺伝子の遺伝子発現に影響を与えるか解析する

ことで、健やかな子どもの脳の発達における調和のとれた「社会性」や「コミュニケーション能力」の確立の分子基盤を明らかにする。

**【研究方法】**

**1. 自閉症モデル細胞における OXTR 遺伝子のエンハンサー領域のエピゲノム解析**

申請者独自のヒト染色体移入技術を用いて、15q11-q13 領域が重複した雌雄の iPS 細胞を樹立する。15q11-q13 領域の重複は、自閉症患者で最も頻回に認められる染色体異常であり、以前、研究協力者の Dr. LaSalle との共同研究で樹立した 15q11-q13 領域が重複した SH-SY5Y 細胞は、シナプス関連遺伝子特異的なメチル化異常を呈し、自閉症のモデル細胞として、その発症機序の解明に大きく貢献した。(Meguro-Horike, M. et al. 2011)

本研究課題ではより生体に近いモデルとして雌雄の自閉症モデル iPS 細胞を樹立し、その神経分化に伴う OXTR 遺伝子及び AVPR 遺伝子のエンハンサー領域のエピゲノム変化 (DNA メチル化、ヒストン修飾、eRNA の発現) を解析することで OXTR 遺伝子及び AVPR 遺伝子の発現制御基盤における性差を明らかにする。また、Berkel らの報告にもあるように、樹立した自閉症モデル細胞を性ホルモン (エストロゲンやジヒドロテストステロン) に曝露させ、Oxtr 遺伝子や Avpr 遺伝子の遺伝子発現やエピゲノム状態を解析する。(Berkel S. 2018)

**2. 自閉症モデルマウスにおける Oxtr 遺伝子のエンハンサー領域のエピゲノム解析**

オキシトシンの分泌が障害されている Cd38 欠損マウスは雌で養育行動異常を示し、雄で社会認識記憶喪失を示す。一方、同じくオキシトシンの分泌が障害されている Cd157 欠損マウスは不安障害やうつ症状を示すことがわかっている。そこで、本研究課題では Cd38 欠損マウス及び Cd157 欠損マウスにおける Oxtr 遺伝子や Avpr 遺伝子のエンハンサー領域のメチル化状態を雌雄別に解析する。解析に用いる DNA は、大脳皮質第 5 層の社会性に関わる神経が集まる領域から抽出する。

また、ChIP 法によりエンハンサーに特有なヒストン修飾 (H3K27ac, H3K4me) の状態や RTqPCR 法により eRNA (エンハンサー RNA) の発現についても同様に解析する。また、Cd38 欠損マウス及び Cd157 欠損マウスにオキシトシンを皮下注射し、行動異常の回復が認められた時点で解析を行うことで、オキシトシン投与効果と Oxtr 遺伝子や Avpr 遺伝子の遺伝子発現及びエピゲノム状態の相関関係を明らかにする。

**【研究成果】**

ヒト染色体移入技術を用いて、15q11-q13 領域が重複した雌雄の iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞において、OXTR 遺伝子のメチル化状態を解析したが、正常な核型をもつ iPS 細胞と有意なメチル化の差異を見出すことができなかった。次に、HeLa 細胞において、5-Aza による脱メチル化効果について検討した結果、CD38 遺伝子については、5-Aza 処理に伴う脱メチル化により発現上昇を見出すことができたのに対し、OXTR 遺伝子は、5-Aza 処理に伴う脱メチル化による発現変化を見出すことができなかった。(図 1) つまり、OXTR 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は、遺伝子発現制御に重要でない可能性が示唆された。次に、我々は自閉症患者で多数の

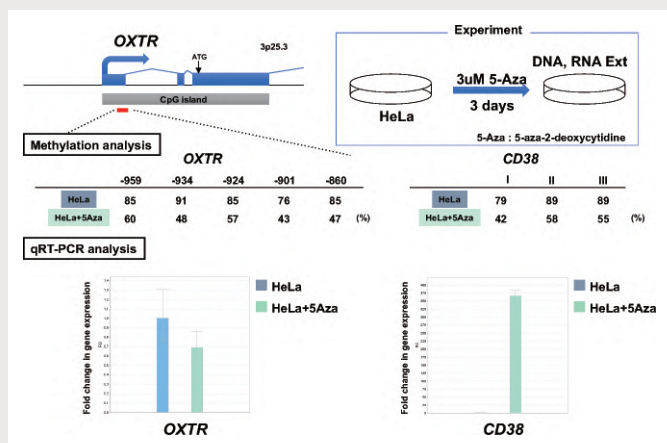


図 1 OXTR 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は遺伝子発現に影響を与えない

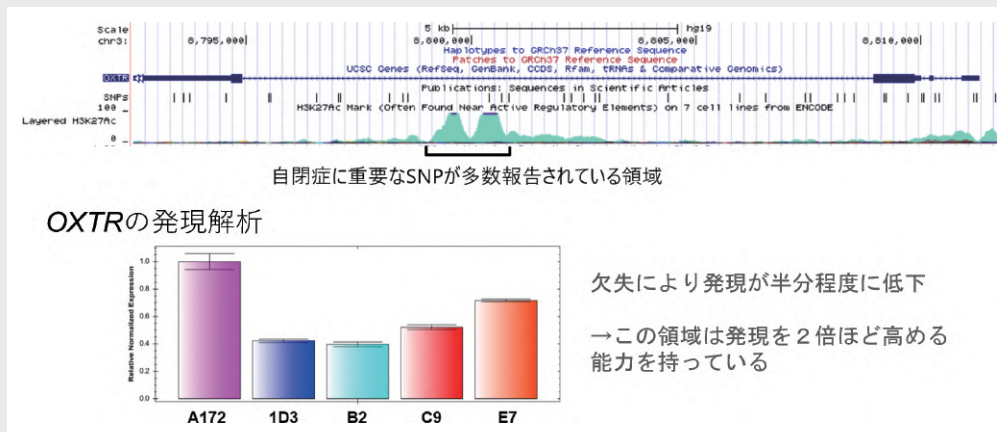


図2 OXTR 遺伝子のエンハンサー領域の重要性

SNPs が見いだされているイントロン3に着目した。非常に、興味深いことにイントロン3領域内に、エンハンサー様のエピゲノム修飾を見出すことができた。

そこで、CRISPR システムで本領域を欠失させた細胞株を樹立したところ、正常より約半分に発現量が低下することを見出した。(図2)しかしながら、エストロゲン暴露に伴う本領域のエピゲノム変化を見出すことはできなかった。さらに、Cd38 欠損マウスにおけるエンハンサー領域のメチル化解析を行ったところ、E15.5 及び P1, P21 期において有意なメチル化異常を見出すことができなかった。

## 研究テーマ

# 皮膚の健康を乱す異常な免疫細胞活性化作用を有する黄色ブドウ球菌毒素の探索

## 研究者

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 衛生化学分野 伊藤 佐生智 (いとう さおとも)

### ①研究の背景および目的の本文

アトピー性皮膚炎に代表される皮膚のアレルギー性炎症は身体的に健康でないのみならず、外見の美しさを損ない、精神的、社会的な健康を損なう疾患である。皮膚炎症は免疫細胞の異常活性化によって引き起こされる。特にマスト細胞は刺激に応答してメディエーターを放出するエフェクター細胞でありマスト細胞の異常活性化は皮膚炎症の決定因子の一つである。一方皮膚細菌叢は免疫細胞に影響を与え、皮膚炎症の発症増悪に関わる。中でもアトピー性皮膚炎患部で高頻度に検出される黄色ブドウ球菌は皮膚炎との関連が指摘されていた。2013年、Nakamuraらにより黄色ブドウ球菌の $\delta$ 毒素がマスト細胞の脱顆粒を誘導することが示されている。申請者らは黄色ブドウ球菌毒素 $\alpha$ ヘモリジンがマスト細胞の活性化を増強すること、スーパー抗原様毒素SSL12がマスト細胞の直接の活性化を惹起することを示している。一方でこれらの毒素が他の免疫細胞を異常活性化するか否かは不明である。また黄色ブドウ球菌は前述の毒素以外にも多彩な毒素を産生とするが、これらの中にマスト細胞を始めとする免疫細胞を異常に活性化するものがあるについては検証がなされていない。本研究では炎症において中心的に働くマスト細胞および他の免疫細胞を異常に活性化する黄色ブドウ球菌毒素を同定し、その分子メカニズムを明らかにすることで黄色ブドウ球菌による皮膚炎発症・増悪メカニズムを明らかにすることを旨とする。アトピー性皮膚炎に代表されるTh2型のアレルギー性炎症に大きな寄与を示す、マスト細胞と好塩基球を用いて、これらの細胞を異常活性化する毒素を探索した。

### ②研究方法

黄色ブドウ球菌毒素はNCTC8325、ATCC27733、ATCC49775株より抽出したゲノムDNAを鋳型とし、PCRにより目的遺伝子を増幅後、真核細胞発現プラスミドpCold-IIにサブクローニングした。その後LPS産生能を欠くClearColiを宿主として組み換えタンパク質を誘導し、超音波は最後Niセファロースを用いて調製した。マスト細胞と好塩基球はBALB/cまたはC57BL/6マウスの骨髄細胞をIL-3存在下12日間および4週間培養することにより調製した。いくつかの実験においては分化誘導した骨髄、マウスより単離直後の骨髄より表面抗原に対する抗体と磁気粒子を用いて、マスト細胞、好塩基球を調製した。マスト細胞の脱顆粒は培養上清への顆粒酵素( $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ)の放出により評価した。サイトカインの分泌はELISAによって評価した。

### ③研究成果

スーパー抗原様毒素SSLは14種類からなる毒素ファミリーである。IL-3存在下二週間培養した骨髄細胞を14種のSSLで処理したところ、SSL10、SSL12、SSL14によって培養上清中へのIL-4産生が認められた。磁気ビーズを用いて好塩基球を調製したところ、SSL12のみがIL-4の産生を誘導した。マウスから単離した直後の骨髄細胞から、各種免疫細胞特異的抗体と磁気ビーズを用いて好塩基球を濃縮あるいは除去した集団を調製したところ、好塩基球濃縮集団ではSSL12によってのみIL-4産生が認められた。

また好塩基球除去集団では SSL12 による IL-4 産生は消失した。続いて SSL12 によるマスト細胞、好塩基球活性化の目名ニズムの探索を行った。FLAG 標識した SSL12 はマスト細胞の表面に結合したことから SSL12 は何らかの表面受容体を介して細胞を活性化していると考えられた。SSL12 によるマスト細胞活性化に対する各種シグナル伝達阻害薬の影響を評価したところ、チロシンキナーゼ阻害薬は SSL12 による細胞の活性化を大きく減じることはなかったが、百日咳毒素は SSL12 によるマスト細胞の脱顆粒を完全に阻害した。したがって SSL12 は Gi 共役型 GPCR を介してマスト細胞を活性化すると考えられた。本研究の成果は黄色ブドウ球菌と皮膚炎症の細菌毒素を介した関係を示すものである。今後皮膚細菌叢の改善、あるいは皮膚の健康に悪影響を及ぼす細菌毒素の産生阻害と中和を作用機作とした医薬品の開発を行うことで、健康で美しい皮膚の維持獲得と健康な生活に貢献することができると考えられる。



研究テーマ

# 網羅的 O 型糖タンパク質分析法を用いた大腸がん治療標的の探索

研究者

(公財)がん研究会 プロテオミクス解析グループ 芳賀 淑美 (はが よしみ)

## ①研究の背景及び目的

O 型糖鎖修飾とは、タンパク質のセリン・スレオニン残基のヒドロキシル基に対する翻訳後修飾である。タンパク質の O 型糖鎖修飾は多くの生理機能を持つことが知られている。特にがんでは特異的な糖鎖構造異常が高頻度に見られ、がん細胞の浸潤、転移、微小環境構築などに関わるだけでなく腫瘍マーカーとしても利用されている。

従来の研究では、N 型・O 型糖鎖の構造を解析する際に「様々なレクチンに対する親和性を調べる」、または「化学的・酵素的にタンパク質から切り離れた糖鎖を蛍光標識して HPLC や質量分析計などで解析する」といった手法によってきた。しかし、これらの分析法では糖鎖がタンパク質のどの部位にどのような付加頻度で結合しているかという重要な情報が得られず、糖鎖が持つ生理機能解明の本質に迫ることが困難であった。特に、本研究でターゲットとする O 型糖鎖は、全ての O 型糖鎖をペプチド鎖から切断、遊離させる酵素が存在せず、付加部位の同定、構造の解明は極めて難しかった。そのため、O 型糖鎖が持つ生理機能はごく限られた断片的な知見しか得られていない。

そこで本研究では、微量の生体試料中の O 型糖鎖修飾部位を網羅的にプロファイル解析する技術の構築を目指した。さらにこの技術を基盤とする、がん特異的に O 型糖鎖が付加される基質・サイトの一斉同定を実施し、がん特異的な O 型糖鎖付加によって惹起される転写や細胞内シグナル伝達機構を解明し、最終的に新しい機序のがん治療薬・診断薬のシーズを見出すことを目的とした。

## ②研究方法

申請者はこれまでに、独自の網羅的 O 型糖タンパク質定量プロファイル法の開発を行ってきた。O 型糖鎖が付加した糖ペプチドを特殊なアルカリ条件下で処理すると構造の種類によらず全ての O 型糖鎖に  $\beta$  脱離反応が起こり、糖鎖付加を受けていない同じ骨格のペプチドと比べて  $-1$  Da の質量シフトが観測される。本研究では本法を発展させ、 $\beta$  脱離で生じたアミノ基を利用した O 型糖ペプチド特異的濃縮法を確立した。 $\beta$  脱離によって露出したアミノ基をビオチンプローブでラベル化後、ストレプトアビジンビーズで濃縮し、質量分析法で解析した。その際、元から存在するアミノ基(全ペプチドの N 末端、及びリジンの側鎖)をブロックすると同時にサンプル間比較定量も可能とする安定同位体ラベリングも組み合わせた。これにより、あらゆる生体試料に対して網羅的な O 型糖鎖付加部位の同定と、その付加頻度の相対定量解析が同時に実施可能となった。LC-MS/MS で溶出ペプチドの分析を行い、データベース検索により、糖鎖付加サイトの同定を行った。O 型培養細胞を用いて系の評価を行った後、大腸がん患者手術検体 20 症例を解析した。

## ③研究成果

### (1) 培養細胞を用いた O 型糖鎖修飾タンパク質特異的濃縮法の確立

本法の有効性を検証するために、まずはモデル系として HCT116 細胞総抽出液を用いて網羅的 O 型糖

タンパク質プロファイル法を実施した。HCT116 細胞総抽出液を用いた実験において、トリプシン消化物をそのまま質量分析計で測定した場合、O型糖鎖修飾糖ペプチドは全ペプチドの0.4%しか存在が確認できなかったのに対し、本法を用いることによりサンプル中の含有率が84%まで上昇した。今回の測定では、現在O型糖タンパク質としてデータベースに登録されている420タンパク質を大きく上回る2,540タンパク質、5,677サイトを同定することに成功している。得られたデータを用いて局在解析やGO解析、パスウェイ解析を行い、ムチンやNF- $\kappa$ Bなど、がんに関連する分子に実際にO型糖鎖修飾が起きていることを確認した。現在、生体サンプル内で存在量の少ないO型糖タンパク質を網羅的に捕捉する新規技術の確立に向けて、手法のさらなる高感度化を目指している。

## (2) 大腸がん手術検体におけるO型糖鎖付加基質の網羅的同定

続いて、大腸がん手術時採取組織(新鮮凍結組織)を用いての解析を実施した。手術検体20症例、同一患者の正常部・癌部組織計40サンプルから、強変性溶媒にてタンパク質の抽出を行った。まずは大腸がん患者組織から抽出されたタンパク質の網羅的定量プロテオーム解析を行った。重複を除く9,481タンパク質が同定有意水準(False discovery rate < 1%)を満たして相対定量化された。これらに対して、上記2群間でPaired t-testを実施したところ、 $p < 0.05$ かつFold change > 2.0を満たすものは826タンパク質であった。この中には、FDAが承認した創薬ターゲットであるDPEP1をはじめ、多くのがん特異的タンパク質が含まれていた。さらに、上記40サンプルに対して網羅的O型糖タンパク質プロファイル法を実施した。O型糖タンパク質として2,984タンパク質、O型糖鎖付加サイトとして6,311サイトを同定した。現在、得られたデータの解析を継続中であり、今後、新規なバイオマーカーやがん治療薬の標的となる分子の選定を行う予定である。

本研究により、微量の生体試料中のO型糖鎖修飾部位を網羅的に解析する基盤となる技術を開発することができたと考えている。

研究テーマ

# 線維性コラーゲンの分泌機構の解明とその制御を目指す基礎研究

研究者

名古屋大学 大学院 生命農学研究科 柴田 秀樹 (しばた ひでき)

## ①研究の背景及び目的

線維性コラーゲンの新生鎖は、小胞体内腔で長さ約 300 nm に及ぶ 3 本鎖らせん構造を形成する。小胞体からの搬出には coat protein complex II (COPII) のはたらきが必要であり、COPII は細胞質から Sec23-Sec24 および Sec13-Sec31 の 2 つのタンパク質複合体が、小胞体の一部である ER exit site (ERES) に動員され輸送小胞を形成する。一般的な COPII 輸送小胞の直径は 60 から 90 nm であり、それ以上のらせん長をもつ線維性コラーゲン前駆体がどのように小胞体からゴルジ体へと輸送されるかは解明されていなかった。我々を含めた複数の研究グループから、コラーゲン前駆体の小胞体からの輸送に関わる分子が複数報告されているが、小胞体における選別から搬出、ゴルジ体への輸送という多段階のプロセスにおいて、未同定のタンパク質が制御している可能性が考えられた。そこで本研究では、近接依存性ビオチン標識法を用いて COPII およびその制御タンパク質に近接するタンパク質の網羅的同定を目指した。

## ②研究方法

ERES は小胞体の一部であるが、細胞質で斑点状に分布する。まず COPII 構成タンパク質やその制御タンパク質とダイズ由来アスコルビン酸ペルオキシダーゼの変異体 APEX2 を融合させたタンパク質を恒常的に発現する細胞を作出した。次に、APEX2 融合タンパク質が ERES 様の細胞内分布を示した細胞株について、培養培地にビオチンフェノールと過酸化水素を添加し、APEX2 近傍タンパク質をビオチン標識した。そして、細胞溶解液からストレプトアビジンビーズを用いてビオチン標識タンパク質を濃縮、精製し、質量分析により精製画分に含まれるタンパク質を同定した。同定されたタンパク質の中から一部を選抜し、それらの緑色タンパク質 (GFP) 融合タンパク質を細胞に発現させ、その局在様式を観察した。また、COPII 被覆タンパク質との結合を検討した。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いたノックアウト細胞株の作出およびテトラサイクリン誘導体の添加により発現抑制が誘導可能な細胞株の作出を試みた。

## ③研究成果

### (1) 近接依存性ビオチン標識法による新規 ERES 局在タンパク質の同定

COPII 構成タンパク質 Sec23A および Sec31A の APEX2 融合タンパク質を発現する A549 細胞株からビオチン標識されたタンパク質として、これまでに ERES への局在が報告されていない PRRC1 が同定された。PRRC1 の GFP 融合タンパク質を細胞に発現させてその局在を観察したところ、そのほとんどがシスゴルジ体に局在する GM130 と共局在したが、一部は ERES に局在する Sec31A と共局在を示した。

### (2) PRRC1 と COPII 構成タンパク質の結合解析

HEK293 細胞に GFP を融合した PRRC1 (GFP-PRRC1) と COPII 構成タンパク質の Myc タグを付与したタンパク質を共発現し、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降した。その結果、GFP-PRRC1 は、Sec23A-Myc および Sec23B-Myc との結合が確認され、一方で Sec31A-Myc との結合は確認されなかった。また、

抗 PRRC1 抗体を用いて HEK293 に発現する内在性 PRRC1 を免疫沈降し、Sec23A/B との結合を確認した。

### (3) PRRC1 の発現抑制が COPII 構成タンパク質の ERES 局在に及ぼす影響

CRISPR-Cas9 システムを用いて PRRC1 のノックアウト細胞の作出を試みたが、PRRC1 が発現しない細胞株は得られなかった。そこでテトラサイクリン誘導体の添加により PRRC1 を標的とする短鎖ヘアピン型 RNA を発現誘導可能な細胞株を樹立した。そして、Sec23A および Sec31A の GFP 融合タンパク質の ERES との親和性を Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 解析により測定した。その結果、PRRC1 の発現を抑制した細胞株では、Sec23A-GFP および Sec31A-GFP の ERES との親和性が上昇した。今後、同様のシステムを用いて I 型コラーゲン前駆体の小胞体からの輸送に PRRC1 の発現抑制が及ぼす影響を検討する予定である。

本研究により、ERES に局在し COPII を制御する新規タンパク質候補を得ることができた。COPII 制御の分子機構に関する研究をさらに推進することで、線維性コラーゲンの分泌操作が可能になることが期待される。

研究テーマ

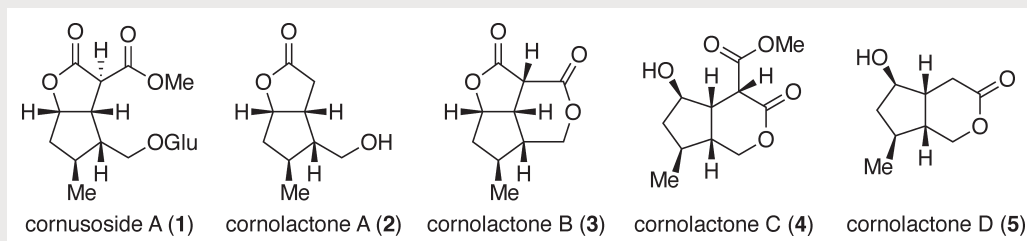
# 女性ホルモン調整剤の開発を志向したイリドイド配糖体の合成研究

研究者

日本女子大学 理学部 阿部 秀樹 (あべ ひでき)

## ①研究の背景及び目的

ホルモンとは我々の体内組織をコントロールする重要な内分泌物質であり、女性の場合女性らしい外見を作り上げる卵胞ホルモン「エストロゲン」と、生殖機能を司る黄体ホルモン「プロゲステロン」の両者の分泌量が周期的に変化することで、女性らしさが保たれている。このホルモンバランスの狂いは、生理不順をはじめとした婦人病や自律神経失調症をもたらすことが知られている。ところで北アメリカ原産の落葉樹ハナミズキから、グルコースが付加したイリドイド配糖体をはじめ多環式ラクトン類 1-5 が単離構造決定された。それらはヒト胚性幹細胞やヒト乳癌細胞株に対し細胞毒性活性を示さず、さらに PPAR $\gamma$  アゴニスト活性も示さないことから、無毒な化合物であるものの、あるとき「女性ホルモン分泌に影響を与える」という記事が web サイトに掲載された。その後その記事は削除されたため真偽が不明となっている。そこでこれら化合物を化学合成し、真偽を明らかにするとともに、女性ホルモン調製剤の創世へ向けた化合物の探索することにした。

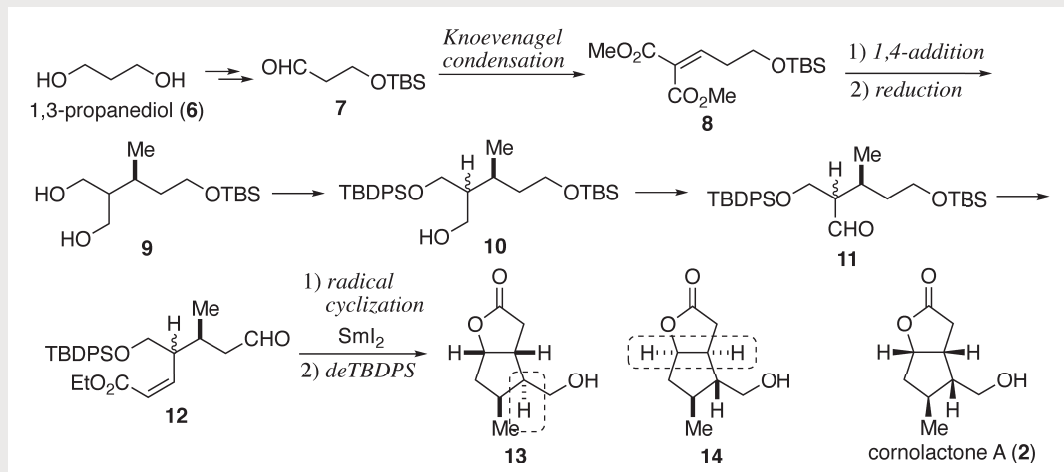


## ②研究方法

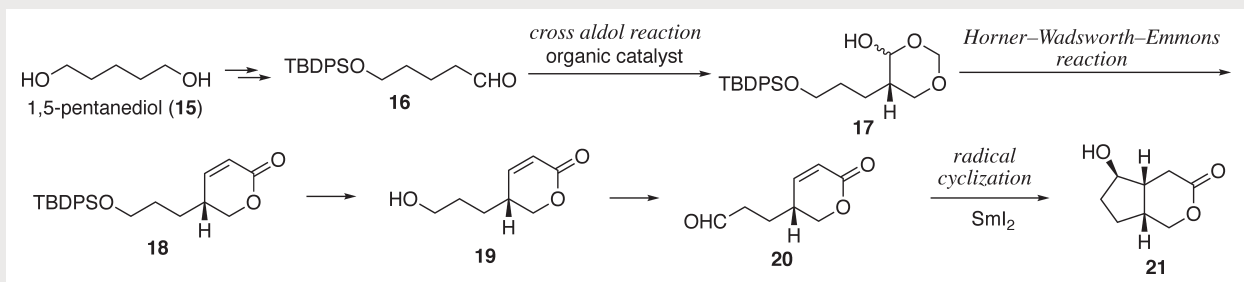
これまでの化学合成の知見をもとに、ハナミズキ由来多環性ラクトン類の合成について検討を行う。それらの合成を達成後、当研究室で既に合成済である他のラクトン類のサンプルとともに合成化合物の女性ホルモン分泌に対する影響を検討する。

## ③研究成果

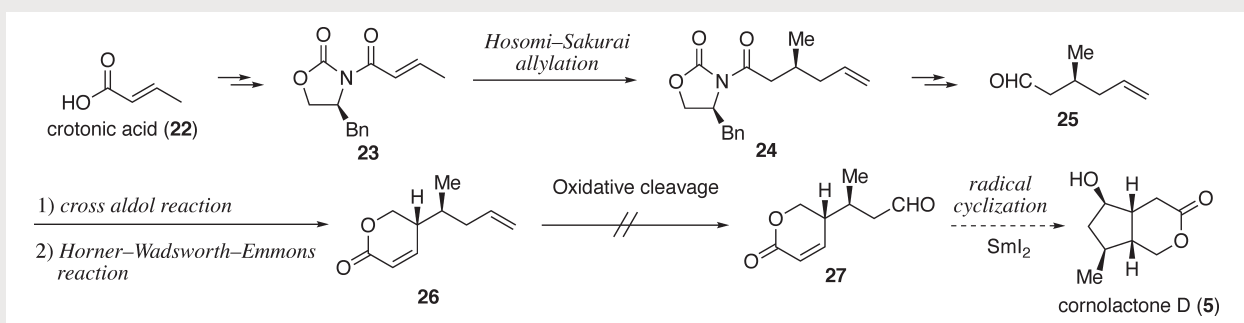
はじめに 1,3-プロパンジオールを出発物質として、ネーベナーゲル縮合反応やメチルアニオンの 1,4-付加反応、そしてヨウ化サマリウムを用いたラジカル環化反応を用いた合成経路により目的物質の 1 つであるコルノラクトン A の合成を試みた。しかし最終的に得られた化合物はコルノラクトン A とは一部(点線四角部分)の立体化学が異なる立体異性体 2 種であり、残念ながら目的とするコルノラクトン A を得ることはできなかった。



そこで1,5-ペンタンジオールを出発物質として、有機触媒を用いたクロスアルドール反応、ホーナーワズワース-エモンズ反応、そしてラジカル環化反応によるコルノラクトンDの合成を行うこととし、メチル基を1つ欠落させたモデル化合物の合成から研究をリスタートした。その結果、目的としたモデル化合物の生成は確認できたものの、複雑な混合物として得られた。



このモデル化合物の検討結果から、合成経路の大まかな部分はクリアできたものと考え、コルノラクトンDの合成に着手した。クロトン酸に対し不斉補助基を導入したのち、細見-櫻井アリル化反応を行い不斉炭素を構築した。不斉補助基を除去した後得られたアルデヒドに前述のクロスアルドール反応と続くホーナーワズワース-エモンズ反応を行い不飽和ラクトンを合成した。次いで二重結合の酸化開裂によりアルデヒドとした後、ラジカル環化反応を行う予定であったが、予想に反し酸化開裂反応に困難を生じ、目的化合物の合成に到ることはできなかった。



合成途中段階であったが、中間体(目的物を合成する際の途中の化合物)の女性ホルモン関連生物活性に関する測定を試みようとした。しかし本研究の目的化合物(天然物)が含まれていないことから測定実施には至らなかった。そのため、合成化合物の生物活性評価として広く用いられている「腫瘍細胞に対す

る増殖抑制活性」を行うことにした。ヒト非小細胞性肺ガン細胞 A549 に対する細胞増殖抑制活性試験は、東京薬科大学薬学部横須賀章人准教授に実施していただいた。その結果、予備実験として実施していた合成経路の合成中間体 2 種が、既存の抗癌剤シスプラチンに匹敵する増殖抑制活性を示すことが明らかとなった（構造式は今後の展開を鑑み省略させていただきます）。

#### ④まとめと今後

今回貴財団からの研究助成により、腫瘍細胞に対する増殖抑制活性試験における有望な部分構造を見出すことができた。

今後は目的とする化合物群を合成し、女性ホルモンに関連した生理活性試験を展開させたいと考えている。また今回の研究成果をもとに、女子大の教員として「乳がん治療薬の開発」を目指し、乳がん細胞に対する増殖抑制活性試験を展開していきたい。

研究テーマ

# 癒痕を残さない皮膚再生メカニズム

研究者

岡山大学 異分野融合先端研究コア 佐藤 伸 (さとう あきら)

## ①研究の背景及び目的

有尾両生類であるメキシコサラマンダーは皮膚を丸ごと剥いても完全に再生できる。対して、ヒトなどの哺乳類は皮膚の大きな損傷後には癒痕形成を伴う「修復」が起こる。皮膚再生の可能な動物を参考に皮膚の再生を促す新しい方策を提案していくことが本研究の大きな目的となる。

メキシコサラマンダー(通称：ウーパールーパー)は脊椎動物の中でも特に高い再生能力を有し、古くから研究の対象となってきた。メキシコサラマンダーは皮膚のみならず、四肢や脳、心臓など多岐にわたる器官の再生が可能である。このうち、四肢と尻尾、歯などの再生を促す共通な「再生誘導因子」の特定に我々は成功している(蒔苗ら、2014, 2016, Dev. Biol.)。同定した因子は FGF2+FGF8+BMP7 (B7FF) というものであったが、その詳細は割愛する。我々は、再生誘導因子の同定以後、他の器官や他動物における効用をさらに検証しようと努めてきた。その中で、皮膚が次なるターゲットとして挙がっていた。皮膚の完全再生のメカニズムを追求するために、さまざまな文献を検索したところ、意外な事実が浮かび上がってきた。それは「そもそも皮膚コラーゲンを合成する細胞が明らかではない」という事である。もちろん、皮膚線維芽細胞がその役割を担う事に疑いの余地はないのだが、では、その皮膚線維芽細胞が実際の皮膚内でどのようにコラーゲンを合成しているのかについては一切の記載を見つけれなかった。この点を明らかにしない限り、正しい皮膚の再生メカニズムの回目の一歩目さえ踏み出せないと考えた。故に、本研究では皮膚の再生メカニズムとともに、コラーゲン合成細胞の同定と可視化を行った。

## ②研究方法

コラーゲンの可視化には一細胞イメージングと第二高周波発生(Second harmonic generation : SHG)という方法を採用した。詳細は③に記す。皮膚再生に関しては、メキシコサラマンダーの皮膚を2×2mmで完全損傷(筋組織が可視化できるほどに深い損傷)させた。再生誘導方法として、神経を損傷部に配向させた。神経は再生誘導因子を放出することを報告しているが、その再生誘導因子として上記のB7FFをタンパク質として添加した。

## ③研究成果

メキシコサラマンダーの皮膚線維芽細胞を電気穿孔法を用いてまばらに標識し、且つ同一細胞にコラーゲンと GFP を融合させたキメラ遺伝子を発現させることで、細胞の形態とその細胞が産生するコラーゲンを同時に一細胞レベルで可視化する事に成功した(図1)。驚嘆すべきことに、コラーゲン繊維と同一な形態を持つ細胞が現れた。このような細胞形態はこれまで明らかにされたことはない。一連の観察によって、この網目状の仮足を持つ細胞が、網目状のコラーゲン繊維を編み込んでい

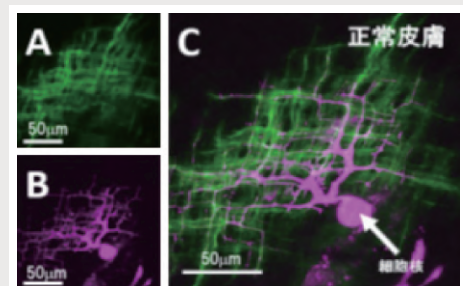


図1 コラーゲン産生細胞と産生コラーゲンの一細胞イメージング。(A) コラーゲン。(B) 産生細胞。(C) 重ね合わせ図



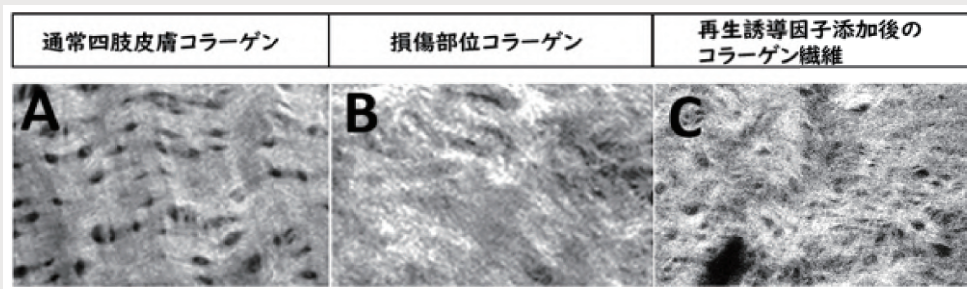


図2 各サンプルにおけるSHGイメージングによるコラーゲン繊維の可視化。  
 (A) 通常皮膚。コラーゲン繊維はきちんと編みこまれている (B) 損傷部位のコラーゲン繊維は網目構造を認められない。(C) 改正誘導因子の添加によって網目構造が回復する

くことを明らかにすることができた。では、皮膚の完全再生が可能だとされてきたメキシコサラマンダーでは、この網目状構造を持つコラーゲンとその合成細胞は再誘導されているのだろうか？ メキシコサラマンダー皮膚の再生過程におけるコラーゲンとコラーゲン合成細胞を可視化したところ、通説とは異なる結果を得ることとなった。コラーゲン繊維方向を定量的に評価したところ、メキシコサラマンダーの皮膚は完全再生できていないことが明らかとなった。コラーゲン産生細胞の形態も正しく網目を形成していないことが分かった。この観察結果から、皮膚の正しい再生にはこのような網目状仮足を持つコラーゲン再生細胞を損傷部に新たに作り出す必要性があると考えた。この正しい形状を誘導するカギとして、我々がこれまでに同定した再生誘導因子の適用がふさわしいと考え、再生誘導因子の添加を行った。その結果、正しい繊維配向を生み出すことに成功している(図2)。申請段階で考えていた部位特異的な遺伝子発現との関連性については、再生誘導因子が *Lmx1b* 遺伝子の発現上昇も誘導できることを証明したため、今後は、部位特異的なコラーゲンの繊維配向性まで迫れると考えている。紙面の都合上、多くを記載できなかったが、本助成によって、コラーゲンの可視化と、一細胞イメージング、SHG光を用いたバルクのコラーゲン観察、そして繊維性の定量をフーリエ変換等をベースにした解析などで行うことができた。以上の結果は現時点(2022.4)で論文の査読中の状態にある。近日中に論文として発表できることを報告させていただく。最後に、本助成によって、本当に大きな研究上の進展を得ることができました。貴財団の皆様方に厚く御礼を申し述べさせていただきます。これからの新しい皮膚再生研究にどうかご期待いただければ幸いです。いただきました、ご助成から飛躍した研究を今後ともどうぞよろしくお見守りいただきますよう心よりお願い申し上げます。

研究テーマ

# 血液の幹細胞の『若返り』現象の解明

研究者

京都大学 高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 山本 玲 (やまもと りょう)

【背景】

申請者は、造血幹細胞の加齢による変化をシングルセル移植により明らかにした。造血幹細胞は加齢により、リンパ球系への分化能力を完全に失い、骨髄球系へのみ分化能力を維持した細胞が増加してくる。これは、加齢により、骨髄球系の血液疾患が増えてくると合致している。しかし、これらリンパ球系への分化能力を失った造血幹細胞は、2次移植をすることによりリンパ球系への分化能力が回復することを初めて明らかにした。これを特に高齢者は、免疫力の低下が知られており、リンパ球系への分化能力の低下がその一因であると考えられており、高齢者のリンパ球系への分化能力の回復は、いわゆる『若返り』とも考えられる。このメカニズムを明らかにすることができれば、加齢に伴う免疫力の回復、加齢に伴う血液疾患・心疾患の抑制などが可能になると期待できる。この特殊な造血幹細胞を latent-HSC と命名した。

【実験結果】

(1) 造血幹細胞の『若返り』現象における外的因子の同定

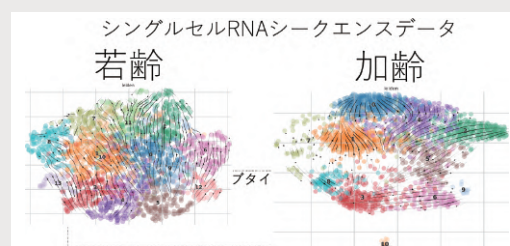
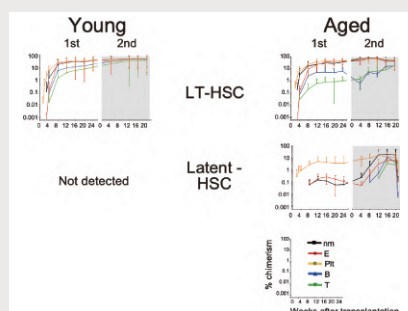
二次移植のレシピエントマウスとして、若齢・加齢マウスを比較したところ、いずれのレシピエントマウスにおいてもリンパ球産生を認めた。

次に、2次移植レシピエントマウスは致死量放射線照射を用いられているため、それによる影響を考えた。その影響をなくすため免疫不全マウス NSG をレシピエントマウスとして2次移植を行った。この場合も、リンパ球産生能力の回復が認められ、latent-type HSC の出現を確認した。この結果は、2次移植における放射線照射の影響は考えにくいことを示唆する。以上の一連の結果は、2次移植マウスの骨髄環境など外的因子より造血幹細胞自身の内的因子が latent-type HSC の出現に寄与していると示唆されるものである。

(2) 造血幹細胞の『若返り』に関する内的因子の探索

まず、造血幹細胞が加齢によりどのように遺伝子発現が変化するかシングルセル RNA シークエンス解析を行った。

若齢(10週齢)と加齢(2才)の B6 マウスより造血幹細胞 CD34-KSL 細胞をシングルセルソーティングし、RNA 採取・cDNA 作製を行った。そしてイルミナのシーケンサーにて RNA シークエンスを行った。下図のように、クラスタリング解析を行い、加齢造血幹細胞に特異的な遺伝子候補を同定した。現在、これらの遺伝子が latent-type HSC に関与しているかマウスを用いて検討を行っている。





遺伝子挿入法により行なった。遺伝子配列の確認を行なったところ、Stop コドンを含まない、ひと続きのタンパク質発現を可能とする遺伝子が拾えていることがわかった。*P. polymyxa* はいくつかの株において、染色体 DNA の complete genome が明らかになっているが、今回用いる NBRC 3020 株に関しては明らかとされていない。配列が明らかとされている DSM36 株 (GenBank : CP049783.1) と比較をしたところ、PmxB 遺伝子においては合計 34 箇所 (全長で 1106 残基) 異なっていたが、これは同じ酵素活性を保持しているとしても、進化系譜の違いからアミノ酸配列の完全な相同性は保たれていない為であると思われた。

(2) PmxB 全長あるいは PmxB に含まれる A ドメイン部分のみのタンパク質発現条件の最適化

構築した発現プラスミドをそれぞれ大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し、IPTG による発現誘導を行った。15% SDS-PAGE 分析からいずれのタンパク質についても生産されていることが確認できたが、大腸菌破碎後の溶解性を評価したところ、いずれも大部分が不溶画分に得られた。この解決のために、25°C 条件下での低温発現 (IPTG 誘導後、25°C で 16 時間発現誘導) を行い、大腸菌破碎後の目的タンパク質の溶解性を評価したところ、大部分が可溶性画分で得ることに成功した (図 2)。そこで、この条件にて大量発現を行い、大腸菌破碎後 Ni-affinity カラムによる単離精製を行った。

その結果、以下の酵素活性評価には十分な純度での精製に成功したため、限外濾過フィルターユニットを用いた濃縮・バッファー交換を行い、以下の酵素活性評価に利用した。

### (3) PmxB あるいは A<sub>10</sub> の各種アミノ酸に対するアデニル化活性の比較

Ishikawa らの報告 (*ACS Chem Biol* 2015, 10, 2816-2826) を参考に、各種アミノ酸 (6 mM)、TCEP (1 mM)、MgCl<sub>2</sub> (10 mM)、NaCl (100 mM)、ピロホスファターゼ (PP, 0.2 unit/mL) の溶解した Tris HCl バッファー (50 mM, pH 7.5) に対して PmxB あるいは A<sub>10</sub> を終濃度 2 μM になるように加え、37°C でプレインキュベート後、更に ATP (終濃度 0.2 mM) を添加することで、各種アミノ酸に対するアデニル化反応を開始した。37°C で 3 時間反応後、Malachite Green Phosphate Assay 試薬 (BioAssay Systems 社) を添加することで反応を停止するとともに、アミノ酸のアデニル化により副生するピロリン酸分解物であるリン酸の量 (PP により 1 分子のピロリン酸は 2 分子のリン酸に分解される) を定量した。リン酸量の上昇は、各種アミノ酸に対してアデニル化された量に対応するため、アデニル化活性の評価が間接的に可能となる。はじめに A<sub>10</sub> について評価を行ったところ、残念ながらいずれのアミノ酸に対しても目立った活性は見られなかった (図 3 上)。このことは、PmxB に含まれる A<sub>10</sub> 部分のみを取り出したことで、適切な立体構造が取れず活性が得られないことが推測された。それに対し PmxB について引き続き評価を行ったところ、元々 Thr に対して選択的にアデニル化を起

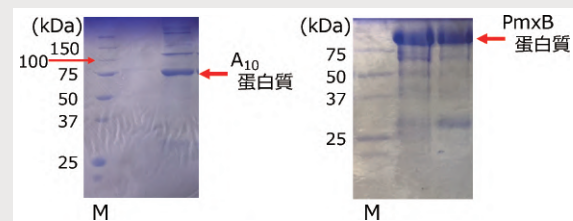


図 2 大腸菌発現系により上清画分として発現された A<sub>10</sub> (左、チオレドキシンの融合蛋白質として発現 79.4 kDa) と PmxB (右、124.6 kDa) の 15% SDS-PAGE による分析

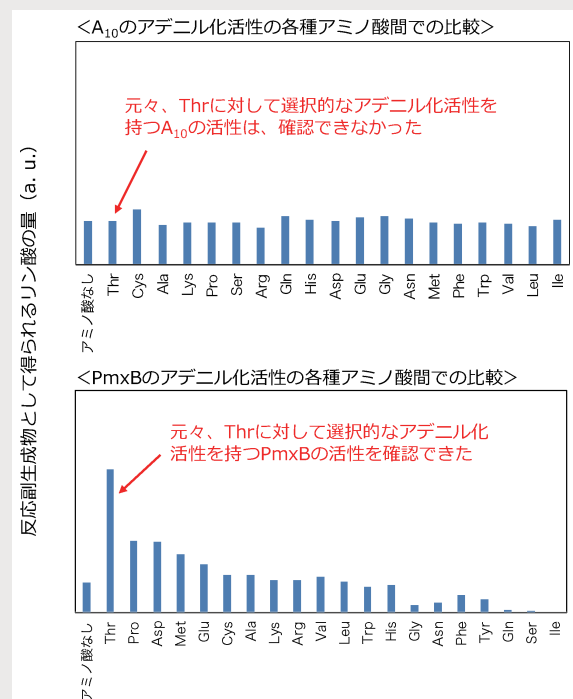


図 3 大腸菌発現系により得られた PmxB あるいは A<sub>10</sub> の各種アミノ酸に対するアデニル化活性の比較

すことが知られている PmxB の性質に一致した、Thr に対する選択的なアデニル化活性が見られることがわかった(図3下)。

#### 〈今後の展望〉

以上の検討から、Polymyxin B の NRPS において 10 番目の Thr の活性化に関与する A ドメイン ( $A_{10}$ ) の活性評価をするには、チオレーションドメイン ( $T_{10}$ )、縮合ドメイン ( $C_{10}$ ) も含めた PmxB 単位で蛋白質発現をして評価することが必須であることがわかった。今後は、基質認識サイトに対してランダムに変異を加えた PmxB 変異体を T7 フェージ表面に提示させるフェージディスプレイ法を利用することで、Cys ( $C_{12}$ ) を基質として利用可能な PmxB 変異体の取得に取り組んでいきたい。この実験スキームが確立できれば、同様の方法で 6 番目の Phe の活性化に関与する A ドメイン ( $A_6$ ) についても Cys ( $C_{12}$ ) を基質として利用可能な変異体取得が可能と期待され、これらを組み合わせることで本研究の最終目的となる、抗菌性ペプチド界面活性剤 (DKDKC<sub>12</sub>-K<sub>3</sub>) の非リボソームペプチド合成 (NRPS) 系の確立を、最終的に図っていきたい。

#### 〈謝辞〉

遺伝子操作、DNA シークエンシング、蛋白質発現、酵素活性評価など、本研究の遂行にあたり必要とされる種々の高価な試薬購入において、貴財団からの研究助成は大変助けになりました。改めて感謝申し上げます。

研究テーマ

# 筋線維芽細胞から分泌される線維化促進分子の機能解析

研究者

九州大学 大学院 薬学研究院 仲矢 道雄 (なかや みちお)

## ①研究の背景および目的

組織の線維化は、コラーゲン等を産生する筋線維芽細胞という細胞群によって実行される(図1)。筋線維芽細胞は、組織が正常な時には存在せず、炎症を契機にして、主として常在性の線維芽細胞が分化する事により生じる。筋線維芽細胞によるコラーゲンなど線維化因子の過剰産生の分子メカニズムは、未だ多くの点が謎に包まれている。

申請者は線維化の治療標的となる新しい分子を同定する目的で、心筋梗塞モデル処置(左冠状動脈前下後枝の結紮)後の線維化に伴ってマウス心臓において発現量が増加し、かつ筋線維芽細胞に特異的に発現する分泌蛋白質を一細胞解析により探索した。そしてさらに線維化を促進する分子を絞り込んだ。その結果、ある分泌蛋白質(FPSP: Fibrosis-Promoting Secreted Protein)が線維化を呈する心臓において筋線維芽細胞に特異的に発現し(図2)(正常時の心臓にFPSPは発現しない)、かつ線維化を促進することを見出した(図3)。

そこで本研究では、FPSPによる線維化促進機序を解明し、FPSPを標的とする新規線維化治療法の基盤を構築することを目指した。

## ②研究方法

### 【臓器線維化モデルマウスの作製】

心筋梗塞(Myocardial infarction: MI)モデルマウスは、心臓の冠動脈左前下行枝を結紮することで作製した。NASHモデルマウスは、choline-deficient, L-amino acid-defined high-fat diet with 60 kcal% fat and 0.1% methionineを10週間与えることで作製した。片側尿管結紮(Unilateral Ureteral Obstruction: UUO)モデルマウスは、左側の尿管を結紮して作製した。

### 【線維化マウス心臓からの筋線維芽細胞の単離】

心筋梗塞モデル処置3日後のマウス心臓を摘出し、酵素処理後、MACS磁気細胞分離法により単離した。

### 【FPSPのノックダウン解析】

線維化マウス心臓から単離した筋線維芽細胞にsiRNAをLipofectamine RNAi MAXを用いて導入した。

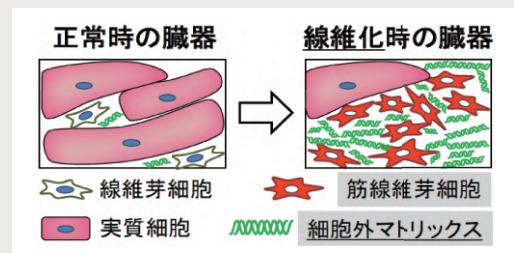


図1 筋線維芽細胞による線維化

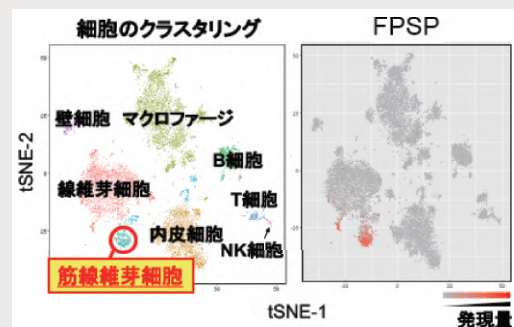


図2 FPSPは心筋梗塞後の線維化した心臓において筋線維芽細胞に特異的に発現する

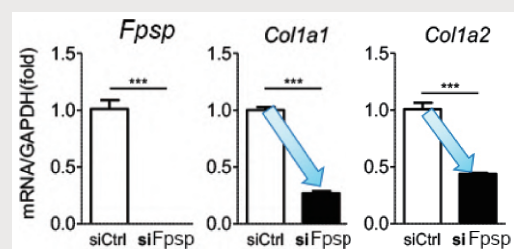


図3 FPSPを筋線維芽細胞においてknockdownすると線維化因子の産生が減少する

その後、RNA を回収し、cDNA へ合成後、リアルタイム RT-PCR を行い、コラーゲンなどの線維化因子の mRNA 量を測定した。

### 【FPSP ノックアウトマウスの作成】

卵管に直接 CAS9 mRNA と sgRNA を注入し、電気穿孔法を行うことでノックアウトマウスを作製する技術である GONAD 法を用いて FPSP ノックアウトマウスの作成を行った。

### ③研究成果

申請者は、心臓で取得した上記一連のデータの普遍性を確かめるべく、肺、肝臓、腎臓における線維化モデルマウスを作成し、それぞれの組織における FPSP の発現量を調べた。

その結果、心臓のみならず上記の組織全てにおいて線維化に伴い、FPSP の発現量が有意に増加することを見出した(図 4)。

FPSP を線維化治療の標的分子とするためには、ヒトの線維化病態との関連性が必要となる。そこで、線維化病態を伴う患者さんの組織サンプルにおいて、FPSP の発現が線維化の程度に伴って増加するかをさらに検討した。

具体的には、心臓の線維化を呈する拡張型心筋症 (DCM) あるいは、虚血性心疾患 (ICM) の患者の心臓の遺伝子発現データセット (GSE116250) を用いて FPSP の発現量を調べた。その結果、DCM および ICM の患者心臓で FPSP の有意な発現上昇が認められ、FPSP がヒトの心臓の線維化とも密接に関与する可能性が考えられた(図 5)。

一方で、心筋梗塞モデル処置後のマウス心臓における FPSP の発現量の経時的な発現変化を測定した。その結果、FPSP は、心筋梗塞処置後すぐの急性炎症期にはほとんど発現せず、慢性炎症期になると発現が増加することを見出した(図 6)。この結果に対応し、FPSP を慢性炎症期の筋線維芽細胞においてノックダウンすると FMOD 等の慢性炎症期筋線維芽細胞を特徴づける因子の発現が有意に減少した。これらの結果から FPSP は、慢性炎症期筋線維芽細胞の機能に密接に関連していると考えられた。

以上の結果から FPSP は、慢性炎症期の線維化に密接に関与していると考えられた。そこで、このことをマウス個体レベルで確かめるべく、FPSP のノックアウトマウスの作成に着手した。FPSP の遺伝子破壊に必要な guide RNAなどをデザインし、電気穿孔法を行った。その結果、FPSP を欠損する可能性のあるマウスが十数匹得られた。現在、これらマウスのゲノムを抽出してシークエンスし、実際に遺伝子が欠損しているかどうかを確認している。確認が取れ次第、繁殖させ、各種組織の線維化を誘導し、FPSPKO マウスで線維化が軽減するかについて qRT-PCR や免疫組織染色などにより明らかにしていく予定である。

なお、責任著者として以下の論文を関連研究論文として発表し、謝辞に koyanagi-foundation を記載した。Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jul 5 ; 561 : 180-186.

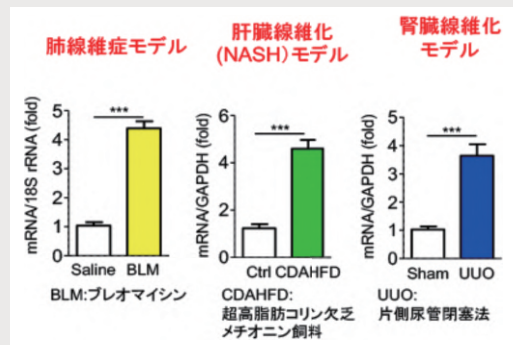


図 4 FPSP は線維化したマウス肺、肝臓、腎臓において発現量が上昇する

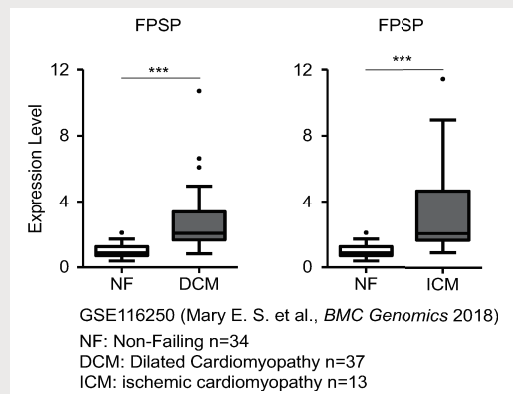


図 5 FPSP は線維化したヒト心臓において発現量が上昇する

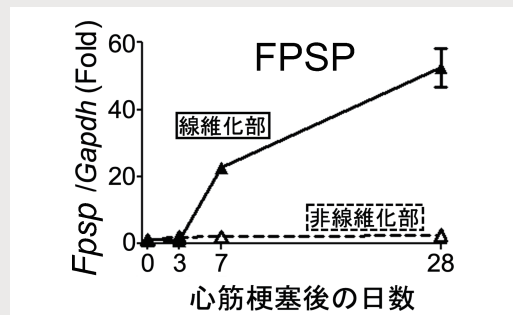


図 6 FPSP は、線維化した慢性炎症期のマウス心臓において発現量が上昇する

## 研究テーマ

## 骨組織を作り出す新たな細胞極性形成メカニズムの解明

研究者 熊本大学 大学院生命科学研究部 (医)・細胞情報薬理学講座 菊池 浩二 (きくち こうじ)

希少難治性疾患群のひとつである骨軟骨異形成症は、結合組織や骨・軟骨の成長・発達異常に伴う骨格の異形成により運動器機能不全を引き起こす。骨軟骨異形成症の発症素因のひとつとして、骨組織の大半を作り出す内軟骨性骨化の異常が挙げられる。内軟骨性骨化では、分化系譜に沿って配列した軟骨細胞と血管・破骨細胞・骨芽細胞などの細胞間相互作用によって、軟骨組織が骨組織へと置換されていく。この時に、分化系譜に沿った軟骨細胞の配列であるカラム形成には、細胞極性：紡錘体軸・細胞挿入・繊毛形成・配列保持が必須である。細胞極性の異常により生じる軟骨細胞の分化の乱れが骨形成に必要な細胞間相互作用に影響すると想定されるが、その詳細は未解明である。私共はショウジョウバエや培養細胞を用いた研究から、微小管と Wnt/PCP シグナル経路 (Wnt/PCP) が関連して細胞極性形成を制御するメカニズム：微小管-Wnt/PCP ネットワークを発見し、その制御分子として微小管結合タンパク質・Map7 とそのパラログである Map7D1 (以降、Map7/7D1) を同定した。さらに、Map7d1 変異マウスの解析を開始し、Map7D1 が軟骨細胞の細胞極性形成に関与する可能性を見出した。そこで、本研究では、「軟骨細胞の細胞極性が微小管-Wnt/PCP ネットワークにより制御されるのか？」という問いに、制御分子：Map7D1 の機能から明らかにする。

本研究で用いた Map7d1 変異マウスは周産期致死であり、また、Map7d1 変異マウス胎仔の重量を測定したところ、野生型マウス胎仔と比較して、若干低体重になる傾向が認められた。Map7d1 変異マウス胎仔の姿勢に変化が見られたため、マイクロ CT によって非破壊的に全身骨格を撮影し、骨格形成への影響を解析した。Map7d1 変異マウス胎仔は脊椎後弯を呈し、脛骨長が短くなる事を見出した。また、マイクロ CT による解析と並行して、トルイジンブルー染色を行った組織切片を用いて脛骨長を測定し、同様に Map7d1 変異マウス胎仔の脛骨長が短くなる事が確認できた。Map7D1 は MAP7 ファミリーに属し、他に 4 つのパラログが存在する。私共は HeLa 細胞を用いた解析により Map7D1 と Map7 が機能重複する事を報告しており、軟骨組織においても機能重複する可能性を考え、軟骨組織における MAP7 ファミリー遺伝子の発現量を RT-qPCR により解析した。軟骨組織では Map7d1 の発現量が最も多く、Map7 の発現量がかなり低かった事から、以降の解析は Map7D1 のみに着目して解析を行う事にした。RT-qPCR の結果を踏まえ、Map7d1-egfp ノックインマウス由来の組織切片を用いて軟骨細胞の分化状態に応じた Map7D1 の発現パターンを解析した。Map7D1 の発現は前肥大軟骨細胞層でピークに達し、また、Map7D1 と複合体を形成する Wnt/PCP の構成因子である Dvl2 も類似した発現パターンを示した。トルイジンブルー染色を行った組織切片を用いて、軟骨組織と接する骨組織の領域を観察したところ、野生型と Map7d1 変異マウス胎仔では構造や細胞の集積が異なる可能性を見出した。

軟骨組織のカラム形成には、軟骨細胞の細胞極性：紡錘体軸・細胞挿入・繊毛形成・配列保持が必須である。細胞分裂とカップルした紡錘体軸の制御、及び、分裂後の姉妹細胞間で行われる細胞挿入は増殖軟骨細胞層で観察される。一方で、軟骨細胞の繊毛は増殖軟骨細胞層以降で発達し、方向性が決定・維持され、前肥大軟骨細胞層で発現する Indian Hedgehog などの外因性のシグナルを感受して肥大軟骨細胞へと分化していくと考えられている。また、細胞挿入後に配列した軟骨細胞は増殖軟骨細胞層以降も配列



が保持されて分化していく。骨形成に関する表現型解析の結果に加え、Map7D1 の発現上昇が前肥大化軟骨細胞層で認められ、また、繊毛の基底部として機能する中心体に局在したことから、Map7D1 が繊毛の発達や方向性の決定・維持、及び、配列保持に関与する可能性を考えている。さらに、Map7d1 変異マウス胎仔において、軟骨組織と接する骨組織の構造や細胞の集積が異なる可能性を見出していることから、Map7d1 の変異により生じる軟骨細胞の分化の乱れが骨形成に必要な細胞間相互作用に影響すると考えられる。

研究テーマ

# 核内アクチン-ミオシンを介した特異的相同組換え修復機構の解明に基づく抗がん剤の創出

研究者

東京工科大学 応用生物学部 西 良太郎 (にしりょうたろう)

## ①研究の背景及び目的

生物が生命を維持するためには、遺伝情報を含むゲノム DNA が安定に保持される必要がある。しかしながら、ゲノム DNA は様々な要因により常に損傷 (DNA 損傷) を受ける危険に曝露されている。その中でも DNA 二本鎖切断 (DNA double-strandbreak : DSB) は極めて細胞毒性の高い DNA 損傷の一つである。DSB が適切に修復されない場合、細胞死等の有害な事象が生じる。したがって、DSB が修復される分子機構を解明することは、生命科学における重要な課題の一つである。

ヒト細胞において DSB は、主に相同組換え修復 (homologous recombination : HR)、あるいは非相同末端再結合により修復される。どちらの修復機構が使用されるかを含め、DSB 修復全体の適切な制御に上流で機能する因子が重要であることは、申請者のこれまでの研究からも明らかである。MRN (MRE11-RAD50-NBS1) 複合体は DSB 部位に最も速くリクルートされる因子の一つであり、DSB 修復機構の選択及び HR に必須の役割を果たしている。一方、DSB 修復は DSB の生じたゲノム上の位置の転写活性状態等により影響され、分子機構は多様であると考えられているが、その詳細は明らかではない。そこで本研究では、多様な DSB 修復の本質を明らかにするために、MRN 複合体のなかの一つの分子と相互作用する新規因子を質量分析により探索し、核内に存在するミオシンの一種を同定した。さらに、細胞をこのミオシンの特異的阻害剤で処理後に DSB を生じる薬剤で処理したところ、HR の初期過程である DNA-end resection とよばれる一本鎖 DNA 形成のマーカである RPA2 のリン酸化 (pRPA2S4/S8) の減弱が認められた。一方、この特異的阻害剤処理により HR が完全に阻害されるわけではないことから、ミオシンを介した制御は特異的な HR にもみ存在することが示唆された。これらのことから、本研究では核内ミオシンを介した特異的な DSB 修復機構を、特に HR に焦点を当てて、その重要性和分子機構を解明することを目的とした。

## ②研究方法

### ②-1 細胞生存率の測定

DSB を生じる薬剤である phleomycin に対する細胞の感受性を colony formation assay により検討した。ヒト骨肉腫細胞株 U2OS を dimethyl sulfoxide もしくはミオシンに対する特異的な阻害剤で処理し、その後様々な濃度の phleomycin で処理した。Phleomycin を除去後にさらに、10~14 日間培養することで colony を形成させ、細胞の生存率を測定した。

### ②-2 共免疫沈降

U2OS 細胞に FLAG タグを融合した MRN 複合体を構成する一分子を、一過性に過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、内在性の核内ミオシンタンパク質との相互作用をイムノブロッティングにより解析した。

### ③研究成果

#### ③-1 核内ミオシンを介した DSB 修復機構は細胞生存に重要である

核内ミオシンを介した DSB 修復機構の重要性を検討する目的で、細胞にこのミオシンの特異的な阻害剤であらかじめ処理しついで、DSB を誘発する薬剤である phleomycin で処理した。図 1 に示すように、細胞はこの特異的な阻害剤処理により、コントロールと比較して、phleomycin に対して高感受性となった。一方、一本鎖 DNA 形成のマーカである pRPA2S4/S8 の定量的な解析から、この阻害剤による DNA-end resection への影響は軽微であるが、有意な差が認められている(図 2)。これらのことは、核内ミオシンによって制御される DSB 修復は、DSB 修復全体からみれば少ない割合であるが、細胞生存に重要な役割を果たすことが示唆された。

#### ③-2 核内ミオシンと MRN 複合体を構成する因子の相互作用解析

ついで、核内ミオシンを介した DSB 修復機構の詳細を明らかにするために、MRN 複合体を構成する因子と核内ミオシンの相互作用部位の同定を試みた。この目的のために、MRN 複合体を構成する因子の様々な欠失変異体を作製し、共免疫沈降を行った。その結果、この因子のカルボキシル末端ドメインが核内ミオシンとの相互作用に十分であることが示された。一方、アミノ末端ドメインは欠失変異体とすることで、ヒト細胞における発現が困難になり、このドメインが核内ミオシンとの相互に關与するかどうかは明確にならなかった。このタンパク質のカルボキシル末端には MRN 複合体中で他の因子と相互作用するドメインおよび、DNA との結合ドメインが含まれており、核内ミオシンが複合体の安定性や DNA 結合の制御を介してヌクレアーゼ活性を制御している可能性が示唆された。

今回、核内ミオシンが DSB 修復に重要な役割を果たすことが明確に示された。さらに、分子レベルにおいては、相互作用部位の特定に至ることができ、今後の研究の進展をより確実なものとすることができた。本研究は、公益財団法人小柳財団に研究助成を頂いたものであり、深く感謝致します。

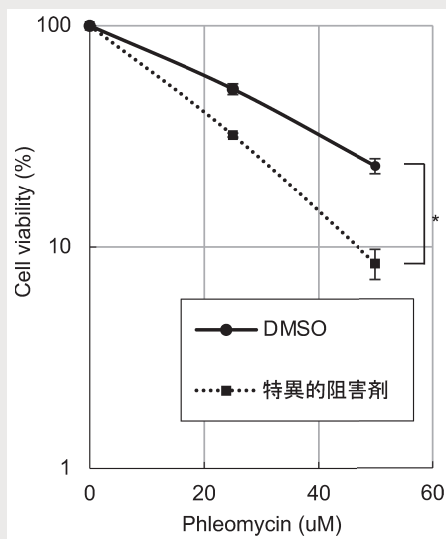


図 1 核内ミオシンを介した DSB 修復は細胞生存に重要である  
特異的阻害剤処理により、細胞は DSB を生じる薬剤 (phleomycin) に高感受性となる。  
\*:  $p < 0.05$

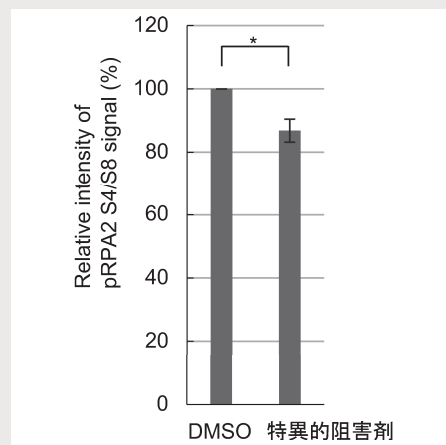


図 2 核内ミオシンは相同組換え修復の初期過程を促進する  
核内ミオシンの特異的阻害剤処理により、カンプトテシン処理後に認められる HR のマーカである RPA2 のリン酸化 (pRPA2 S4/S8) シグナルが軽微であるが、有意に減弱した。  
\*:  $p < 0.05$

研究テーマ

# ヒト腱再生を目指した高再生能動物イモリの腱再生基本原理の解明

研究者 ▶ 名古屋大学 大学院 工学研究科機械システム工学専攻 前田 英次郎 (まえだ えいじろう)

## ①研究の背景と目的

腱・靭帯、椎間板、軟骨などヒト運動器軟組織の疾患および外傷は現在の医療技術では完全な治癒再生に到達せず、その治癒回復度合いによってはその後の人生のあり方に大きな影響を及ぼす。どの年齢でも健康な生活を長く送るために、運動器軟組織の良好な治癒再生を導く再生医療技術の開発が渴望されている。

これまでマウス等従来の哺乳類実験動物を用いて運動器軟組織の損傷修復研究は数多く行われているものの、申請者の過去の研究を含め腱の完全再生法の発見には至っていない。腱損傷部を再生させるには腱の構造と力学的・生理的機能を3次元で再現するための道筋が必要であるものの、哺乳類実験動物を用いた研究では実現象としての腱修復再生が観察できず (Maeda et al. J Biomech 2009 ; J Mech Behav Biomed Mater 2021)、どのような戦略で損傷部の修復再生を目指すべきかが不明であるという大きな課題があり、新しい視点でのアプローチが求められている。そこで本研究プロジェクトでは、高再生能実験動物イモリを用いて腱損傷再生を実現象として研究することでその再生の基本原理を理解し、ヒト腱再生医療への応用を目指すことを目標としている。本申請課題では腱再生現象の確認を含めた研究モデルの確立ならびに基礎的な再生メカニズムの解明を目指す。ここではイモリを用いた腱損傷再生モデルの確立と腱再生過程での遺伝子発現解析を行った。

## ②研究方法

### 2-1 再生腱の力学特性計測

モデル生物としてイベリアトゲイモリは広島大学両生類研究センターから購入した。実験対象としてマウスとの直接対比が可能であり、損傷作製術や引張試験が可能な部位を選定した。

選定した腱に損傷手術を施した。ここでは腱幅1/2を切断する部分切断 (Partial transection, 以下PT) 群、完全切断 (Complete transection, 以下CT) 群の2種類の損傷群を作製した。まず0.2% m-アミノ酸安息香酸エチルメタンスルホナート溶液を用いてイモリを麻酔し、イモリを静置して部分切断または完全切断の損傷を施した。損傷手術後、6週間または12週間飼育し、所定期間終了後に安楽死させて治癒腱を摘出して以下に述べる引張試験および組織観察に用いた。

引張試験の応力を計算する過程で断面積が必要となるため、まず断面積を測定した。単離した腱の一端に1gfの重りを取り付け、もう一方の端をステッピングモータに固定した治具に挟んだ。HF液で満たしたアクリル製水槽の上部にステッピングモータを固定し腱を液中に沈めた。ステッピングモータで腱を14.4°ずつ回転させ、デジタル顕微鏡を用いて水槽正面から腱の画像を取得した。これを25回繰り返し、全方向から撮影した腱の画像を取得した。取得した画像をImageJで解析し、25方向から計測した腱の幅をそれぞれ求め、腱の断面の再構築をして断面積を計算した。

イモリ腱は微小なため市販の材料試験機では引張試験を実施できないことから、微小組織引張試験機を作製した。試料はアルミ板に設置した水槽中で湿潤状態を保ち、同じアルミ板に取り付けたリニアアクチュ

エータとロードセルの間で把持した。リニアアクチュエータはコントローラを介して PC 上の Labview で制御した。ロードセルの出力もひずみアンプを介して同じ Labview プログラムで取得した。試験中の試料の様子は引張試験系を設置した実体顕微鏡に取り付けた CCD カメラにて動画を記録した。

次にひずみ計測用のを腱表面に付着させた。3D プリンタで作製した治具をロードセル側とモータ側に取り付け、腱の端をそれぞれ治具に挟み込んで取り付けた。ひずみアンプの出力を見ながらゆっくりと腱を引張り、予荷重として荷重の値が 0.02 N になる点を原点に設定した。設定した原点からひずみが 0~1% の範囲でプレコンディショニングを 10 回行った後、破断するまで引張速度 1%/s で試験を行った。

取得したひずみアンプの出力電圧から荷重を計算し、その値を 2-3-1 項で求めた断面積で除して応力を求めた。ひずみは撮影した動画のひずみマーカから算出した。最も荷重が高い点を破断点、破断点での応力を引張強度、引張強度の 20-60% の範囲の応力-ひずみ線図の傾きを弾性率とした。

### ③研究結果・考察

図 1 に健常腱、PT 群および CT 群の術後 6 週および 12 週の腱の応力-ひずみ線図を示す。健常腱の引張強度および弾性率の値はそれぞれ約 30 MPa、290 MPa であった。マウスでの同部位の腱についても別途引張試験を行なって強度と弾性率を求めたところ、イモリ腱の強度と弾性率はマウス腱の 71% および 66% であった。統計検定の結果、引張強度および弾性率について、両損傷群において 6 週と 12 週の値に有意な差が見られた。さらに、12 週において、健常腱と同等のレベルまで回復していることが確認された。そのため、腱の機能的な再生が行われたと考えられ、イベリアトゲイモリは腱再生メカニズム解明のモデルとして妥当であると言える。

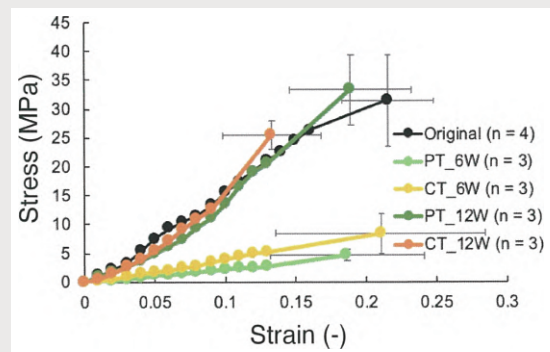


図 1 イモリの健常腱と治療再生腱の応力ひずみ線

2 光子顕微鏡の観察結果からも、術後 12 週の時点で健常腱と同様のコラーゲン組織が形成されていることを確認した。したがって、組織構造の観点からも、切断部に腱が完全に再生されたことが確認された。

このような再生現象は、マウスでの同部位の損傷再生実験では確認されなかった。したがって、腱完全再生能力はイモリ特有のものであると言える。

我々は現在、マウス腱とイモリ腱の再生能力の違いを明らかにするべく、遺伝子発現解析を進めている。健常腱および治療腱での発現遺伝子の違いから、イモリでの腱再生の鍵となる遺伝子を特定したいと考えている。

### ④研究業績

1. F Sato, D Suzuki, T Hayashi, T Matsumoto, E Maeda, Measurement of Mechanical Properties of Iberian Ribbed Newt Tendon Toward Establishment of Complete Tendon Regeneration Model, 2021 Summer Biomechanics, Bioengineering, Biotransport Conference (2021 SB3C), Online, 2021 年 6 月.
2. 佐藤史哉, 鈴木大輔, 林利憲, KimJeonghyun, 松本健郎, 前田英次郎, イベリアトゲイモリ中趾屈筋腱損傷後に形成される再生腱の力学特性計測, 日本機械学会第 32 回バイオフィロンティア講演会, オンライン, 2022 年 1 月.

研究テーマ

# 含フッ素トレオニンならびにアロトレオニンの立体分岐型合成反応の開発とその利用

研究者

東京農工大学 大学院 工学研究院 応用化学部門 山崎 孝 (やまざき たかし)

## 【研究の背景及び目的】

我々の体内にある様々なタンパク質は各種アミノ酸から構成されていることから、アミノ酸類が人類の生命活動において必要不可欠の物質であることは容易に理解できる。ところでフッ素を適当な分子中に導入すると、他の原子では実現できない特異な性質を発現することがしばしば観測されることから、ファインケミカルズ分野、特に医薬等々の生理活性物質にフッ素を組み込むことが広く検討されてきており、そこにはアミノ酸も含まれている。

以前に当研究室では、光学活性な 4,4-ジフルオロならびに 4,4,4-トリフルオロトレオニンの合成方法を確立するとともに、これらががん細胞に対して強い抑制効果を示すことを見出しているが、その合成には多段階を要していたことから、簡便な合成経路の開発が望まれていた。今回我々は、含フッ素トレオニンと立体異性体のアロトレオニンを同一の中間体から、短く容易な経路で合成する方法の開発に注力し、トリフルオロ体で成果を得ることができたので報告する。

## 【研究方法】

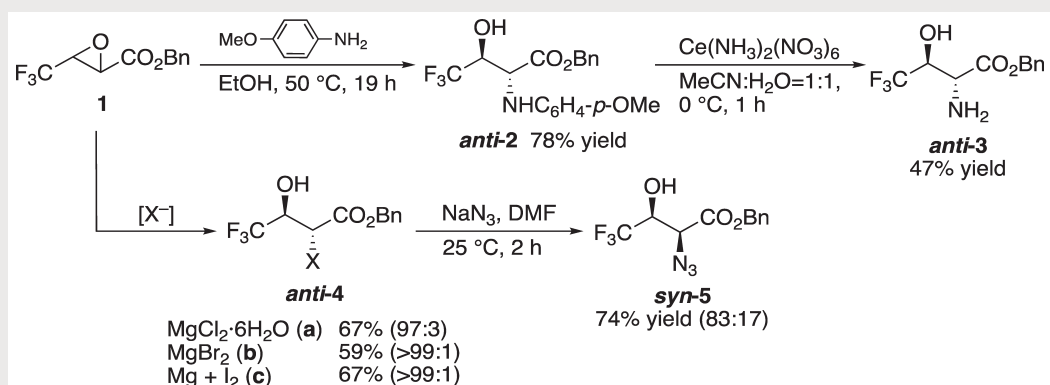
今回は、下記の CF<sub>3</sub> 基を含むエポキシエステル 1 を出発原料に設定した。この 1 は、CF<sub>3</sub> 基の強い電子求引性のため、適当な求核剤の作用で、カルボニル基の  $\alpha$  炭素上での開環が SN<sub>2</sub> 型機構で進行するものと推察されるからである。つまり、1 にアミン類を作用させるとアロトレオニンが調製できることとなるが、一旦、ハロゲン化物などで開環を行った後に、このハロゲン上でさらに SN<sub>2</sub> 型の反応を行うことで、立体異性体であるトレオニンの合成も可能とした。

## 【研究成果】

1 の前駆体である  $\alpha,\beta$ -不飽和エステル 1 の合成は、既に我々によって報告されているが、これを次亜塩素酸ナトリウムと反応させると、86%の収率で 1 を単離できることが判明した。この 1 に対して様々なアミン類を作用させたところ、予期した通り、第一級ならびに第二級アミンがカルボニル基の  $\alpha$  位で高位置選択的な開環反応を SN<sub>2</sub> 的に起こすことが明らかとなり、p-アニシジンとの反応では 78%の収率で望む anti-2 が 78%の収率で得られた。この anti-2 は、さらに CAN (Ce(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>) を用いた酸化により、望む最終生成物であるアロトレオニン anti-3 へと容易に変換することができた。なお、この anti-3 を直接的に与えるはずのアンモニアを 1 に加えても、期待する反応は進行しなかった。

一方、エポキシエステル 1 を適当なハロゲン源を用いて開環させる試みは、各種 Mg 塩を用いることで実現でき、MgCl<sub>2</sub> ではわずかにエピメリ化が起って syn-4a が観測されたものの、臭素やヨウ素の場合には、アミン類と同様に SN<sub>2</sub> 型で開環が進行し、望む anti-4b や 4c が良好な収率で得られた。次に、これらに対する窒素系求核剤の反応を各種検討したところ、syn-3 への変換は既知である syn-5 を NaN<sub>3</sub> を作用させることで調製することができた。しかし、ここでは 20%程度の立体異性体である anti 体の混入が確認された。これは、電子求引性の CF<sub>3</sub> 基の存在がカルボニル基の  $\alpha$  水素の酸性度を向上させたこと

が原因であると推測している。今回は、残念ながら時間の都合により実現できなかったが、今後、このエピメリ化を防ぐために、TMSN3等の試薬の利用を考えている。



研究テーマ

# 「ミネラルはどのように肥満に関与するのか？」 亜鉛シグナルから追求する肥満の制御

研究者

群馬大学 生体調節研究所 福中 彩子 (ふくなか あやこ)

## ①研究の背景及び目的

近年、肥満は日本人においても増加の一途をたどっており、その病態の解明と新規治療薬の開発は急務である。そのため、エネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞を、エネルギーを消費する誘導性の褐色脂肪細胞であるベージュ脂肪細胞へと形質転換(ベージュ化)することによって、太りにくい体質に繋がる食品や薬の開発に注目が集まっている。申請者はこれまでに、亜鉛の恒常性維持に関わる亜鉛トランスポーター ZIP13 のノックアウトマウスの表現型から、ZIP13 がベージュ化に作用し、抗肥満効果の鍵を握る分子の1つとなる可能性を見出している (Fukunaka A, *PLoS Genet.* (2017))。最近研究を進めていく中で、ZIP13 は必ずしも亜鉛の輸送担体として機能するだけでなく、タンパク質間の相互作用を介して様々な分子と協調的に働くことで、細胞内の重要な機能制御を担う可能性を示唆する結果を得た。

そこで本研究では、ZIP13 のベージュ化における作用機序を詳細に解明するため、(1) ZIP13 が直接作用する細胞種の特定、さらに、(2) その下流にある標的分子カスケードの同定という以下に示す2つの方向から研究に取り組んだ。

## ②研究方法・成果

### (1) ZIP13 が直接作用する細胞種の特定

*Zip13* 欠損マウスでは、ベージュ化亢進による肥満改善の表現型が確認できるものの、一方で他の結合組織(骨・歯・皮膚)においては障害がもたらされる。このことから、ベージュ化に特化した ZIP13 を介する分子標的を明確にし、その詳細な作用メカニズムを解明することが ZIP13 を用いた肥満治療への応用において必須な課題と考えられる。そこで、全身で *Zip13* を欠損したマウスで観察されたベージュ化亢進が、脂肪細胞のどの細胞に依存するか調べる。成熟脂肪細胞特異的に *Zip13* を欠損させたマウスにおいてベージュ化の表現型が観察されないことより、ZIP13 は成熟脂肪細胞ではなく、より未分化な前駆細胞の段階でベージュ脂肪細胞数を調節していると考えられる。最近、共同研究者の梶村らはベージュ脂肪細胞への分化が運命づけられているベージュ前駆脂肪細胞の存在を報告し、そのマーカーとして CD81 を同定した (Oguri et al. *Cell* (2020))。CD81 陽性細胞は細胞増殖が亢進しており、これによりベージュ化が亢進する。ZIP13 は、ベージュ前駆脂肪細胞の細胞数を規定している可能性があり、この点に関して、CD81 陽性のベージュ前駆脂肪細胞が *Zip13* 全身欠損マウスで増加しているかどうか、FACS 解析により精査したところ、CD81 陽性の細胞が増加していることが判明した。この結果は ZIP13 が基底レベルのベージュ前駆脂肪細胞の数の調節に関与している可能性を示唆しており、興味深い。今後 CD81-CreERT マウスと *Zip13* flox マウスとの掛け合わせを行い、このマウスでベージュ化が亢進するか検討する。

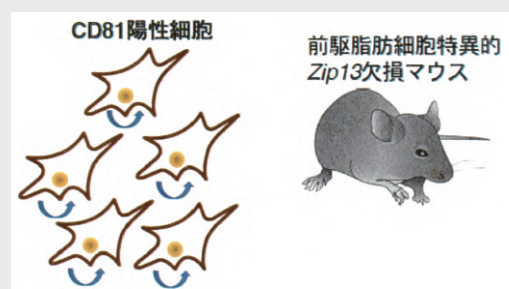


図1 ZIP13 が作用する細胞種の特定



(2) ZIP13 の下流にある標的分子カスケードの同定

我々が開発したベージュ脂肪細胞分化系において、*Zip13* 欠損細胞に ZIP13 を過剰発現させると、ベージュ化は抑制できるが、亜鉛輸送能を失った ZIP13 変異体ではベージュ化抑制ができない。また、培地中に過剰量の亜鉛を添加した場合や、同じゴルジ体に局在し、ZIP13 と最も高い相同性を示す亜鉛トランスポーターを発現した場合には、細胞質内の亜鉛量は増加するにも関わらず、ベージュ化は抑制できない。ZIP13 による亜鉛シグナルには特異性が存在し、ベージュ化抑制を調節していると考えられる。そこで ZIP13-亜鉛シグナルの特異性が生じる機構を解明するために、ZIP13 のベージュ化抑制に必要な領域 (Int-L2) を同定した。さらに、この領域と結合する分子が特異性を決定しているのではないかと仮定し、ZIP13 のベージュ化抑制に必要な領域 (Int-L2) を用いて、yeast two hybrid (Y2H) を行い、結合分子 PIAS3 と Fth1 を選定した。SUMO 化リガーゼの一種である PIAS3 は ZIP13 の有無で発現変動が見られた。ノックアウトや過剰発現の実験より、ZIP13 は PIAS3 のタンパク質量を制御することにより、前駆脂肪細胞からのベージュ化の決定に関与するという「ZIP13-PIAS3 axis」の構図が示された。さらに ZIP13 と PIAS3 の結合の意義を調べるために、PIAS3 と結合能を示さないが亜鉛輸送能を保持する ZIP13 変異体を作成し、ベージュ化への影響を精査した。PIAS3 と結合能を示さない ZIP13 変異体は野生型 ZIP13 のベージュ化抑制能が著しく低下することが判明した。すなわち、ZIP13 を介するベージュ化抑制には ZIP13 と PIAS3 との直接的な会合が必要であり、PIAS3 が直接的な標的分子である可能性が示唆された。さらに、ZIP13 は「PIAS3 タンパク質の発現をどのように制御しているのか」解析した。その結果、*Zip13*-KO 細胞ではプロテアソーム・リソソーム分解経路に依存した機序で PIAS3 のタンパク質の代謝回転が低下していることを見出し、現在、ZIP13 による PIAS3 タンパク質の分解制御に関する分子機序を精査している。PIAS3 を分解する酵素分子を明らかにできれば、白色脂肪細胞のベージュ化を特異的に制御することによる肥満治療の標的分子になる可能性があると考えている。

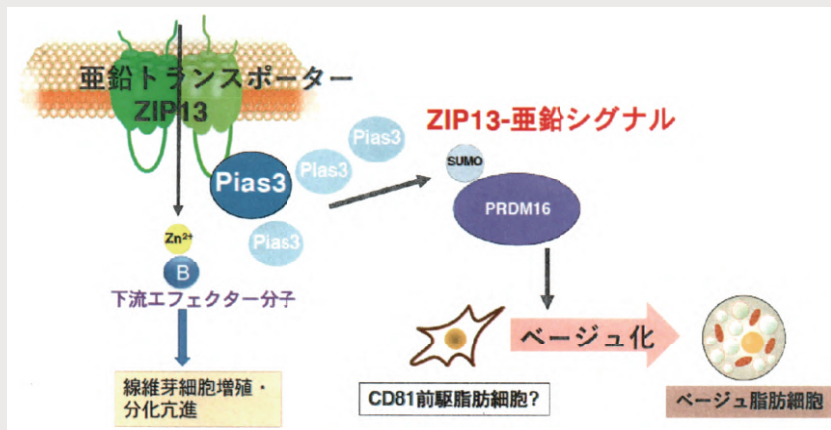


図2 ZIP13 欠損により PIAS3 は安定化しベージュ化を亢進する

研究テーマ

# 血中エクソソームによる診断を目指した組織特異的エクソソーム精製法の確立

研究者 ▶ 東京都健康長寿医療センター 老化機構研究チーム・プロテオーム 川上 恭司郎 (かわかみ きょうじろう)

## ①研究の背景及び目的

エクソソームは細胞から放出される膜小胞の一つで、細胞の近傍だけでなく、血液や髄液などの体液中に存在する。エクソソームは由来細胞の成分(タンパク質・核酸など)を含むため、エクソソームを解析することにより間接的に細胞の状態を知ることが可能になるとして注目されている。また、その性質から、患者血中には患部組織由来の疾患を反映したタンパク質や核酸を持つエクソソームが存在するとされ、エクソソームは採血のみで臓器・組織の状態を知り得る簡便なバイオマーカーとして診断法への応用の期待が高まっている。

申請者らはこれまでに、血清よりエクソソームを高純度で濃縮する方法を確立し、前立腺癌などのエクソソームマーカーを同定した。しかしこれまでのところ、特定の臓器・組織由来のエクソソームを選択的に精製する方法は確立されておらず、組織の状態を血清エクソソームにより調べるのは難しいのが現状であった。

そこで本研究では、血液中における存在量が最も多いと考えられる血管内皮細胞由来のエクソソームを標的とし、血清から血管内皮由来エクソソームを濃縮・精製する方法を確立することを目的とした。これまでのエクソソームの濃縮法に加えて、血管内皮特異的タンパク質のアフィニティ精製を組み合わせることにより、血管内皮由来のエクソソームを濃縮・精製することが可能になると考えた。

## ②研究方法

本研究は今まで困難とされた組織特異的エクソソーム解析への第一歩として、血中に存在する様々な臓器由来のエクソソームの中より、血管内皮から分泌されたエクソソーム(血管内皮由来エクソソーム)の濃縮・精製方法を確立し、解析へつなげるものである。研究方法は以下の手順で進めた。

### (1) VE-カドヘリン陽性エクソソームの測定系の構築

血清中の血管内皮細胞由来エクソソームの精製度合いを確認するため、血管内皮細胞特異的抗原によるサンドイッチ ELISA の構築を行った。血管内皮細胞特異的抗原として VE-カドヘリンを標的とし、エクソソームのサンドイッチ ELISA に適した抗体を選出することとした。3種類のモノクローナル抗体のクローン (BV9, 55-7H1, 16B1) を選び、同じ抗体クローンで挟むことによりエクソソームを検出するサンドイッチ ELISA を構築した。それぞれの抗体を捕捉抗体として ELISA プレートに固相化し、段階希釈した血清を反応させたのち、アルカリフォスファターゼで標識した捕捉抗体と同一クローンの検出抗体でサンドイッチし、発光基質と反応させ、そのシグナル強度を検出した。血清の段階希釈とともにシグナル強度が直線的になる抗体クローンを使用可能な抗体として選出した。

### (2) 血清からの血管内皮細胞由来エクソソーム精製

血管内皮細胞由来エクソソームの精製を実現するために、以下の2段階の精製を行った。1段階目は血清中に存在するアルブミンやグロブリンに代表されるエクソソーム以外のタンパク質の除去(粗精製)、2段階目は粗精製後の血清から血管内皮細胞特異的抗体を用いたエクソソームの精製である。①ウイルス粒

子の精製にも用いられている Capto Core 400 を使用して、血清中に存在する非エクソソームタンパク質の大半を除去した(粗精製液とする)。(2)この粗精製液に対して血管内皮特異的タンパク質を標的としたアフィニティ精製を行った。VE-カドヘリン抗体を結合した磁気ビーズを作製し、粗精製液から血管内皮由来エクソソームの分離を試みた。この時、前述の3種のVE-カドヘリン抗体のうちどの抗体が最も適しているかを、抗体ビーズ反応後の溶液をサンドイッチ ELISA により測定することで確認し、最もシグナル強度が減少した抗体クローンを選択した。選択したVE-カドヘリン抗体で反応させた磁気ビーズは SDS 溶液で溶出し、LC-MS 解析に用いた。

### (3) 培養血管内皮細胞からのエクソソームの精製

血管内皮特異的エクソソームの標品として、培養血管内皮細胞の培養上清からエクソソームを得ることにした。HUEhT-1 細胞(不死化 HUVEC)を無血清培地で24時間培養後、培養上清を回収し、段階的遠心分離と0.22 μm のフィルターを通した後、超遠心法によりエクソソームを得た。

### (4) LC-MS 解析によるタンパク質の同定

上記の方法により精製した血清由来血管内皮細胞特異的エクソソームと培養細胞由来エクソソームは S-Trap 法にてトリプシン消化後に LC-MS によって解析した。

## ③ 研究成果

### (1) VE-カドヘリン陽性エクソソームの測定系の構築

それぞれの抗体クローンをを用いたサンドイッチ ELISA で血清の段階希釈により、シグナル強度が直線的に変化する抗体ペアを検討したところ、クローン BV9 の抗体が適している結果を得た(図1)。

### (2) ビーズ精製に用いる抗体の選出

血清からVE-カドヘリン抗体によりエクソソームが回収可能なクローンを選出するため、抗体反応後の溶液を上記のサンドイッチ ELISA にて測定し、最もシグナル強度が減少しているクローン BV9 を選出した(図2)。

クローン BV9 抗体を用いて、血清中の血管内皮細胞特異的エクソソームを回収した磁気ビーズに SDS 溶液を反応させ、磁気ビーズからエクソソームを溶出し、LC-MS 用サンプルとした。

### (3) 質量分析による血管内皮特異的 EV の検出

血清から血管内皮特異的抗体で精製した抽出液および培養血管内皮細胞より得たエクソソームを用いて、LC-MS 解析を行った。その結果、血清から精製したのものに関しては、アフィニティ抗体として使用した標的のVE-カドヘリンは検出されたものの、CD9, CD63, CD81 に代表されるエクソソームマーカーは検出されなかった。また、培養血管内皮細胞由来のエクソソームからは CD9, CD63, CD81 のエクソソームマーカーが検出されたのに加え、VE-カドヘリンをはじめ、TIE2, MCAM, PECAM1, VEGFR2 の血管内皮細胞マーカーを検出した。

### (4) 結語

血清より、抗体アフィニティ法を用いて、組織特異的エクソソームの精製に取り組んだものの、現状ではアフィニティの標的としたVE-カドヘリンタンパク質は同定されたが、CD9などのエクソソームマーカーの同定には至っていない。抗体ビーズによる精製の条件などさらなる検討が必要である。

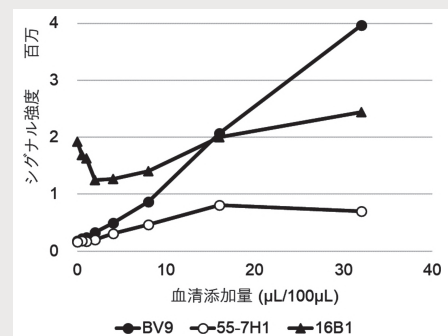


図1 VE-カドヘリンサンドイッチ ELISA の血清段階希釈時のシグナル強度変化

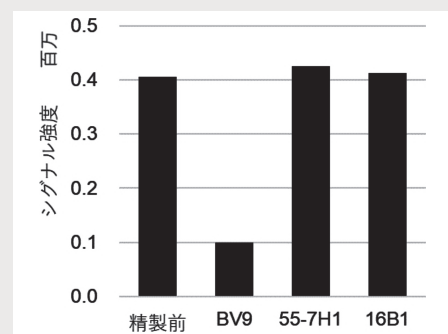


図2 各VE-カドヘリン抗体ビーズで精製後の溶液のサンドイッチ ELISA

研究テーマ

# 光活性化タンパク質を利用した嗅覚に關与するイオンチャネルの活性化機構の解明

研究者

光産業創成大学院大学 光産業創成研究科 平野 美奈子 (ひらの みなこ)

## ①研究の背景及び目的

我々は外界からの刺激を眼や鼻などの受容器に存在する感覚細胞で捉え、その刺激を「イオンチャネル」という膜タンパク質によって電気信号に変換、情報処理して「感覚」として感知している。嗅覚においては、細胞内情報伝達系のセカンドメッセンジャーである cAMP によって活性が調節される「環状ヌクレオチド依存性チャネル (CNG チャネル)」が重要な役割を果たしている。CNG チャネルが細胞で働く仕組みを調べるには、cAMP の産生を促す化学物質や、光照射によって cAMP を放出するケージド化合物という物質を測定時に細胞内に取り込ませて、cAMP 存在下での活性 (イオン透過) を電流として捉える方法が取られてきた。しかしながら、前者の方法では cAMP 産生の時空間制御の問題、後者の方では毒性の問題があり、現状では細胞で時々刻々と変化する動的な CNG チャネルの働きを捉えるのは困難である。

本研究では、我々が近年研究を進めてきた「光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC)」という、光照射によって cAMP を産生するタンパク質を利用し、細胞内 cAMP 量を光制御しながら cAMP 依存的な CNG チャネルの動的な活性変化をリアルタイムに詳細に捉えることを目的とした。PAC を用いることで、非侵襲的な光による精緻な時空間制御が可能になる上、暗所では PAC は不活性であるため毒性の問題がなく、上記の問題が解消される。

## ②研究方法

### 1. アフリカツメガエルの卵母細胞での CNG チャネルと PAC 変異体の共発現

#### 1-1. アフリカツメガエルの卵母細胞の調製

アフリカツメガエルから卵母細胞を取り出し、コラゲナーゼによる化学的処理により個別に分離した後、測定に適した大きくて色のよい卵を選びだした。

#### 1-2. RNA の合成

mMESSAGE mMACHINE Kit (ambion) を用いて、CNG チャネルと PAC 変異体の RNA を合成した。まず、各タンパク質の DNA が組み込まれたプラスミドを制限酵素 PstI で直鎖化して精製した後、直鎖化した鋳型の DNA を RNA 合成溶液に添加し、37°C で 2 h 反応させた。その後 RNA を精製して回収し、アガロースゲル電気泳動により合成を確認した後、吸光度測定により濃度を求め、最終濃度が 1 µg/µl になるように調製した。

#### 1-3. RNA のインジェクション

合成した CNG チャネルと PAC 変異体の RNA を、オートインジェクターを用いて卵母細胞に導入した。まず、微小電極作製装置 (SUTTER 社) で RNA 注入用のガラス管の微小針を作成した。微小針に RNA を吸引した後、用意した卵母細胞に 50 nl ずつ RNA をインジェクションした。その後、インジェクションされた卵母細胞を 18°C で 2 日間保持し、CNG チャネルと PAC 変異体の発現を促した。

### 2. 青色光照射系の作製

卵母細胞に発現した PAC から光照射で cAMP を産生するため、高輝度青色 LED を用いた照射系を作

製した。PACの活性化に最適な445 nmにピークを持つLEDをマイコンボード(Arduino Uno)に接続し、予めプログラムした青色光の照射のオン・オフの時間をボタンで操作できるようにした。

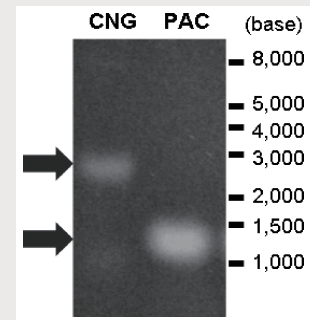
### 3. 電気生理学的手法によるイオンチャネルの活性測定法の確立

アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて、電気生理学的手法の一種である二電極膜電位固定法でイオンチャネルの活性、つまりチャネル電流を測定する測定系を確立した。卵母細胞に電位固定用の電極と電流計測用の電極を刺入れ、電位を-80 mVに固定した後、+20 mV、+30 mV、+40 mV、+50 mV、+60 mV、+70 mVのいずれかの電圧を印加した場合の電流を、Ca<sup>2+</sup>存在下と非存在下で測定した。

## ③研究成果

### 1. アフリカツメガエルの卵母細胞でのCNGチャネルとPAC変異体の共発現

PACを用いて細胞でのCNGチャネルの動的な活性変化をリアルタイムに捉えるため、アフリカツメガエルの卵母細胞でPACとCNGチャネルを共発現させた。まず、PACとCNGチャネルの遺伝子からRNAを合成し、電気泳動で合成したRNAの分子量を確かめた。PACとCNGチャネルを流したレーンではどちらもバンドが1本のみ確認でき、それらの位置は推定される分子量(PAC:約1,300 bp、CNGチャネル:2,800 bp)の位置付近であった(右図)。この結果より、実験に用いたRNAは分解されることなく正常に合成されていることが分かった。



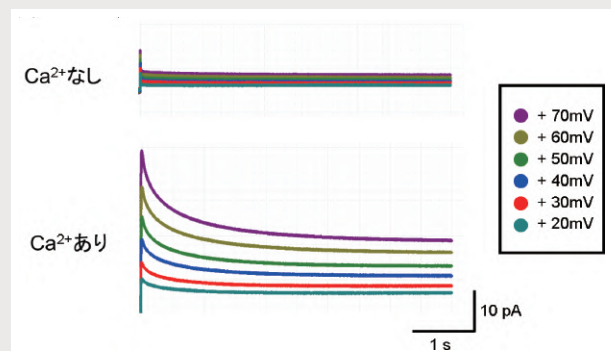
合成したRNAを卵母細胞に注入して培養し、それぞれのタンパク質の発現を促した。培養時間が長くなるにつれ、細胞の形が崩れていく細胞が見られたため、それらは排除した。

### 2. 青色光照射系の作製

PACを発現した卵母細胞に青色光を照射するため、高輝度青色LEDをマイコンボード(Arduino Uno)に接続し、自動で30秒間照射オフの後20秒間照射オンにするプログラムをボタンを押すことでスタートさせる装置を作製した。この装置により、PACがcAMPを産生するのに十分な強度の青色光である5000 μmol/m<sup>2</sup>/sの輝度が卵母細胞に当たっていることをパワーメーターで確認した。今後、この装置と電流取得ソフトや画像取得ソフトと連動させて、光照射のタイミングがわかるようにと測定結果と同期させる予定である。

### 3. 電気生理学的手法によるイオンチャネルの活性測定法の確立

二電極膜電位固定法で卵母細胞のチャネル電流を測定する方法を確立した。まず、卵母細胞に内在的に発現している、Ca<sup>2+</sup>で活性化される塩素チャネル(CaCCsチャネル)のチャネル電流を測定した。Ca<sup>2+</sup>存在下で一過的な内向きの電流が見られたことから、Ca<sup>2+</sup>に依存して活性化されたチャネル電流、つまりCaCCsチャネルの活性を捉えることができたと考えられる。次に、PACとCNGチャネルを共発現させた卵母細胞での



チャネル電流取得を試みた。しかしながら、高い電圧を与えると電流が不安定になり、うまく測定できなかった。原因としてはCNGチャネルの発現量が過剰であることが考えられるため、今後は注入するRNA量を変え、最適な測定条件を決定する予定である。

研究テーマ

# 細胞内酸素濃度の絶対量測定可能な新規リン光性色素の開発

研究者

東京工業大学 生命理工学院 伊藤 栄紘 (いとう ひでひろ)

## ①研究の背景及び目的

酸素は好気性生物にとって非常に重要な分子であり、その動態を調べることは様々な生体内反応の理解につながる。低酸素領域のがん細胞は浸潤性が高く薬剤効果が乏しい難治療性であることが知られており、このような細胞の酸素動態を解明するために簡便かつ高精度な酸素センシング技術の開発が強く求められている。当研究室では、リン光性色素と共焦点レーザー顕微鏡を用いた高解像度の細胞内酸素濃度イメージング (PLIM) を開発した。しかし、細胞内では低分子色素と生体成分が複雑に相互作用するため、発光特性が変化し、正確な酸素濃度測定が困難であるという問題があった。さらに、連続測定の過程で酸素へのエネルギー移動で生じる一重項酸素が細胞障害を引き起こすことも問題であった。

そこで我々は、ナノメートルスケールの細孔を持つメソポーラスシリカナノ粒子 (MSNs) の細孔内にリン光性色素である白金ポルフィリンを修飾した PtP@MSN を開発した。PtP@MSN では、生体成分と色素の相互作用が抑制され発光特性の変化が軽減し、酸素濃度イメージングで発生した一重項酸素が細孔内で不活性化することで、細胞への酸化的ダメージが軽減され酸素障害が抑制された。しかし、PtP@MSN では白金ポルフィリン単独と比べて細胞からの発光量が低く酸素濃度イメージングが難しく、酸素濃度の絶対量測定には至っていない。

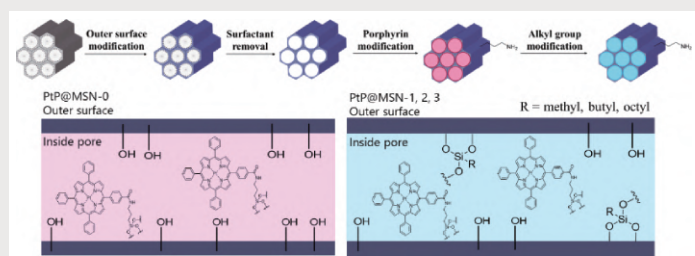
本研究では、従来の PtP@MSN の課題を解決した新たな白金ポルフィリン修飾 MSNs の開発を目的として、細胞内酸素濃度の絶対量測定を目指した。この新規リン光性色素により、PLIM による正確な細胞内酸素濃度イメージングが、生体内の酸素動態の解明に貢献することが期待される。

## ②研究方法

本研究ではこれまでに当研究室で開発した PtP@MSN の問題点である「低い発光量」と「生体内での発光特性変化」を解決するために、以下の研究を実行した。

### A. 白金ポルフィリン修飾メソポーラスシリカナノ粒子 (PtP@MSN) の細孔壁修飾

白金ポルフィリンの発光特性変化を抑制するために、PtP@MSN の細孔壁にアルキル鎖を修飾し、細孔内への生体成分の導入を防ぐことを検討した。PtP@MSN の未反応のシラノール基を介してメチル、ブチル、オクチル基を細孔壁に修飾した (Scheme 1)。MSNs の細孔内に白金ポルフィリンを修飾したものを PtP@MSN-0、PtP@MSN-0 の細孔壁に MTES, BTES, OTES を修飾したものを順に PtP@MSN-1,2,3 と表記する。

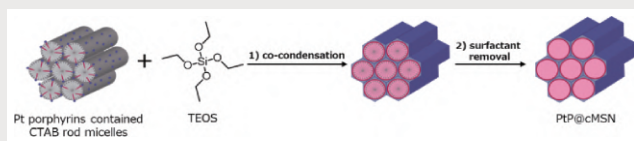


Scheme 1 Inner surface modification of PtP@MSN with alkyl groups.

### B. 共縮合法による白金ポルフィリン修飾 MSNs (PtP@cMSN) の合成

合成した MSN に後から白金ポルフィリンを化学修飾する従来法とは別に、MSNs 合成時にトリエトキ

シシラン (TES) 基を有する白金ポルフィリン (PtP-TES) を混合して 1step で調製する共縮合法を試みた。目的の PtP@cMSN は、白金ポルフィリン含有 CTAB ロッドミセルを鋳型として TEOS を共縮合させて合成した (Scheme 2)。



Scheme 2 Preparation of PtP@cMSN.

## ②研究方法の続き

### C. 合成した新規 PtP@MSNs の分光特性と細胞内酸素濃度イメージングの評価

PtP@cMSN、PtP@MSN-1,2,3 の吸収スペクトルと発光スペクトルを測定し、白金ポルフィリンの分光特性、酸素応答性を評価した。さらに、細胞内にそれぞれの PtP@MSNs を取り込ませて PLIM による細胞内酸素濃度イメージングを試みた。これらの結果を従来の PtP@MSN-0 と比較した。

## ③研究成果

### PtP@MSN-1,2,3、PtP@cMSN の合成

PtP@MSN-1,2,3 の合成は、トルエン中で PtP@MSN-0 とメチルトリエトキシシラン (MTES)、ブチルトリエトキシシラン (BTES)、n-オクチルトリエトキシシラン (OTES) それぞれを加えて還流させて行い、ほぼ 100% 回収した。PtP@cMSN の合成では MSN 調製時に PtP-TES を混合するため、従来の PtP@MSN-0 より MSN 量当たりの PtP-TES 量は 100 分の 1 程度まで減らした。PtP@cMSN は電子顕微鏡観察、ガス吸着測定から 2.6 nm の細孔を持つメソポーラス材料で成ることを確認した。

### PtP@MSNs の分光特性の評価

PtP@MSN-0 と比較して、PtP@MSN-1,2,3 では水溶液中での吸収スペクトルのブロード化が抑制され、アルキル鎖を修飾することで会合体形成の抑制が示唆された。また、PtP@MSN-1 は PtP@MSN-0,2,3 と比較して生体成分を添加した際の吸収および発光スペクトルの変化が抑制され、細孔壁に MTES を修飾することで細孔内への生体成分の導入の抑制を達成できた。PtP@cMSN では、合成時の白金ポルフィリンの修飾率が従来法の 4% から 27% へと向上したが、修飾量は従来よりも低かった。所定の酸素濃度雰囲気下で各 PtP@MSNs の発光スペクトルを測定した結果、いずれも酸素濃度に応じて発光強度が変化しており、酸素応答性を示した (Figure 1)。

### PtP@MSNs を用いた細胞内酸素濃度イメージング

ヒト胃癌由来細胞株へ調製した PtP@MSNs を取り込ませ、細胞内酸素濃度イメージングを行った (Figure 2)。全ての PtP@MSNs で細胞内からの発光が観測され、PLIM システムによるリン光寿命測定が可能であった。また、気相酸素濃度を変化させると、細胞内からのリン光寿命が変化しており、酸素応答していることが確認された。特に本研究で合成した PtP@MSN-1 は、従来の PtP@MSN-0 よりも発光量が高く、生体成分との相互作用を抑制できており、最も細胞内酸素濃度イメージングに適した酸素プローブであると言える。以上の結果から、PtP@MSN の問題点である「低い発光量」と「生体内での発光特性変化」は PtP@MSN-1 により改善された。今後、本研究成果を基に更なる改良を試みる。

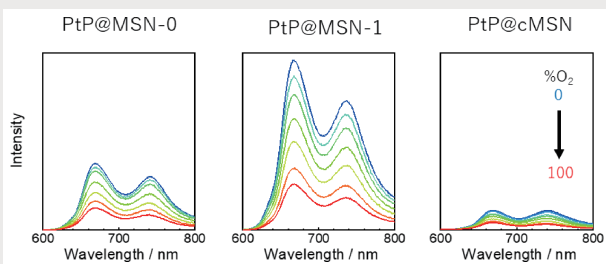


Figure 1 Emission spectra of PtP@MSNs in DMSO under various oxygen concentration.

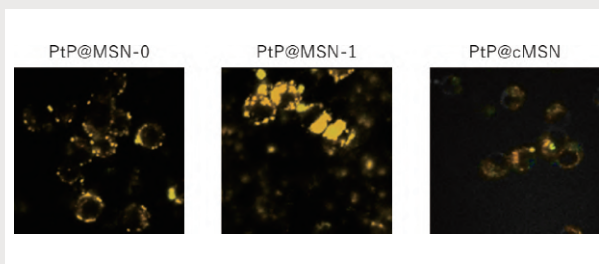


Figure 2 Oxygen concentration images of MKN45 cells stained with PtP@MSNs by using PLIM system.

研究テーマ

# ヒト ORC のグアニン四重鎖結合と液液相分離の生理的意義

研究者

日本女子大学 理学部 化学生命科学科 和賀 祥 (わが しょう)

## ①研究の背景及び目的

DNA は遺伝子の本体である。DNA の複製は、生命の維持に必要な、基本的な生命機能の 1 つである。この DNA 複製に関する研究は、ワトソンとクリックによる 1953 年の DNA 二重らせん構造モデルの発表以来、多くの研究者によって行われてきた。そして、DNA 複製の基本的なしくみはすでに明らかになり、教科書などにも記載されている。しかし、私たち人間のもつ DNA の複製に関しては、未だ解決されていない重要な問題が残されている。

その 1 つは、DNA 複製が始まる DNA 上の地点である複製開始点が、どのようなしくみで DNA 上の特定の位置に決められるのかという問題である。これは 50 年以上も取り組まれてきた問題であるが、未だに解決には至っていない。私は、このヒト複製開始点の問題に取り組んでいる。

細菌の複製開始点は、共通の塩基配列によって決められる。そして、その共通塩基配列を目印に複製開始に働くタンパク質が集合し、DNA 複製が開始する。一方、ヒト複製開始点では、それを規定する共通塩基配列はない。にもかかわらず、決まった地点から複製は始まる。

私は、複製開始点に最初に結合してくるタンパク質である ORC という 6 つのサブユニットからなるタンパク質複合体の解析を進めている。私たちは、DNA 結合に塩基配列特異性はないとされてきたヒト ORC に、グアニン四重鎖 (G4 と略) という特殊な DNA 構造に特異的に結合するという新しい活性を発見した。この活性は、同時期に他グループから報告されたヒト複製開始点の約 80% に G4 が形成できる配列が存在するという知見とも整合性があり、ヒト複製開始点に関する問題の解明につながるきっかけになるものと考えている。本研究の目標は、ヒト ORC の G4 構造への結合の生物学的な意義を追求して、ヒトの複製開始点がどのようなしくみで規定されているかを明らかにすることである。

## ②研究方法

ヒト複製開始点で最初に働くタンパク質複合体である ORC に着目し、下記の方針で研究を進めた。

### (1) ヒト ORC1 サブユニットの N 末端側領域の相分離能の解析

近年、DNA、RNA およびタンパク質による相分離が様々な細胞機能において重要な役割を果たすことが明らかになってきた。DNA 複製においても、最近、複製開始因子 Cdt1 および ORC で DNA 依存的な相分離の報告がなされた。そこで、本研究では G4 も ORC や Cdt1 の相分離を誘導するかを明らかにする解析を進めた。

解析では、ORC を構成する 6 つのサブユニット (ORC1-ORC6) のうち、G4 結合ドメインの解析が進んでいる ORC1 サブユニットに着目した。さらに、広い領域にわたり天然変性領域が存在する N 末端側領域に着目した。なお、同領域に複数の G4 結合ドメインが存在することがすでに分かっている (論文準備中)。

相分離の解析のために、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、プレシジョンプロテアーゼ認識配列、ORC1 断片および緑色蛍光タンパク質 GFP を融合したタンパク質の大腸菌発現ベクターを作製し、



同融合タンパク質の精製を行った。その精製した融合タンパク質を様々な1本鎖DNA(G4および非G4)存在下、プレジジョンプロテアーゼで処理し(GSTが除去される)、相分離を引き起こすかどうかを蛍光顕微鏡で解析した。

### (2) ヒト ORC2 サブユニットの G4 結合活性ドメインの解析

ヒト ORC を構成する6つのサブユニットのうち、ORC1以外の複数のサブユニットでG4結合活性が見出されている。そのうちのORC2について、本研究でG4結合ドメインの解析を進めた。既に機能ドメインとして同定されているC末端側領域ではなく、天然変性領域が存在するN末端側領域に着目し、さらに進化上保存性の高いアミノ酸に着目しながら、様々なアラニン置換変異ORC2を作製した。それらをGST融合タンパクとして精製し、G4プローブを用いたゲルシフト法でG4結合活性を解析した。

### (3) 複製開始タンパク質 Cdt1 の相分離の解析

前述のように、ORCとともに複製開始点で機能するCdt1もDNA依存的に相分離を引き起こすことが、米国のグループにより報告された。そこで、G4もCdt1の相分離を引き起こすかを調べることにした。そこで、GST-プレジジョンプロテアーゼ-Cdt1-GFPという融合タンパク質を大腸菌で発現させ精製し、前述のORC1相分離の解析方法で解析を進めた。

## ③研究成果

### (1) ヒト ORC1 サブユニットの N 末端側領域の相分離

G4結合活性ドメインが複数存在するORC1のN末端側断片のN末端にGSTを、またC末端にGFPを融合させたタンパク質を調製し、プレジジョンプロテアーゼで処理しながら(GSTを切り離しながら)DNAとインキュベートし、相分離を引き起こすかをGFPの蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、DNA非存在下では、不定形の大きな凝集体が形成されたが、プラスミド存在下では凝集体が多数検出された。その微小凝集体にはDNAも含まれることが確かめられたことから、微小凝集体はDNA依存的なORC1断片の相分離を示すものと推測された。プラスミドの代わりに、G4を形成する1本鎖DNAを加えたところ、やはり微小凝集体の形成が確認された。そこで、G4および非G4の様々な塩基配列の1本鎖DNAを使って、G4特異性を調べた結果、調べた配列の中では、非G4では顕著な微小凝集体の形成は認められなかったことから、G4特異性のあることが示唆された。

複製開始タンパク質の相分離でG4特異性が示されたのは、この研究が初めてである。高等真核生物の複製開始点の多くにG4形成配列が存在することと考え合わせると、G4依存的なORCの相分離は興味深い結果であると考えられる。今後は、6量体ORCでもG4特異的な相分離が見られるか調べる必要がある。一方、細胞内で本解析で使ったような1本鎖DNAが生じるとは考えにくい。本解析で用いた1本鎖DNAの役割を、細胞内ではRNAが果たす可能性を今後追求していきたいと考えている。

### (2) ヒト ORC2 サブユニットの G4 結合活性ドメインの解析

ヒトORCサブユニットのうち、ORC1、ORC2およびORC6がG4結合活性を有することが明らかになっている(論文準備中)。

本研究では、このうちORC2のG4結合活性ドメインの解析を行った。ORC2も、ORC1と同様に、そのN末端側領域には塩基性アミノ酸が多く、また天然変性領域が存在する。進化上保存性の高いアミノ酸残基を中心にアラニン置換を導入して、その変異ORC2のG4結合を調べた結果、2つのG4結合活性ドメインを同定することができた。G4および非G4のDNAを用いて特異性を検討した結果、ORC2もORC1と同様なG4への結合特異性が見られた(論文準備中)。複数のG4結合ドメインが存在することから、ORC2もG4依存的な相分離を引き起こす可能性もある。

### (3) 複製開始タンパク質 Cdt1 の相分離の解析

当初の計画にはなかったが、ショウジョウバエCdt1がDNA依存的に相分離を引き起こすことが報告

されたことから、ヒト Cdt1 について GFP 融合タンパク質を作製して調べることにした。その結果、DNA 存在下でのみ、相分離を示すと考えられる Cdt1-GFP の微小凝集体が形成した。さらに、G4 存在下でも微小凝集体が形成することが確認できた。さらに、N 末端側を欠いた変異 Cdt1 ではそのような微小凝集体の形成は認められなかったことから、Cdt1 の N 末端側領域に DNA および G4 が結合し、相分離を引き起こすことが示唆された。

以上のように、複数の ORC サブユニットが G4 結合活性を有し、ORC1 は G4 依存的に相分離を引き起こす。さらに、別の複製開始タンパク質である Cdt1 も G4 存在下で相分離を引き起こす可能性が示された。このように、G4 が共通に関与することから、異なる複製開始タンパク質が複製開始点近傍にある G4 モチーフが関わる共通のしくみに関与することが考えられる。今後は、細胞内の G4 RNA が複製開始タンパク質の制御に関わる可能性を追求していきたい。

## 研究テーマ

# 慢性腎不全進行の抑制を目的とした腎糸球体ポドサイトの機械刺激受容機構の解明

研究者 佐野日本大学短期大学 総合キャリア教育学科 栄養士フィールド 市川 純 (いちかわ じゅん)

### ①研究の背景と目的

腎機能の低下は加齢による生理的な老化だけでなく、生活習慣病との合併症といった病的な原因によっても起こる。加齢に伴いこれらの生活習慣病の頻度も増加するため、一般高齢者に見られる腎機能低下は両者の影響によることが多い。慢性腎不全 (chronic kidney disease : CKD) の患者数は世界的に増加傾向にあり、日本でも血液透析患者数の増加による医療費負担および身体的負担が問題となっている。CKDは罹患すると完治の手立てはなく、進行すれば生活の QOL を著しく損なうことになる。現代の高齢化社会に生きる人々の健康を保つためには、CKD の早期発見や進行を抑える治療薬の探索が必要である。

CKD の多くは、糸球体の濾過構造を形成する足細胞 (ポドサイト) に障害がみられる。ポドサイトは死んで脱落すると再生不可能であるため、いったん障害が起これば腎糸球体の濾過機能が不可逆的に破綻し尿へのタンパク漏出が起こる。近年、ポドサイト偽足間隙に形成されるスリット膜の分子複合体 (非電位依存性陽イオンチャネル TRPC6、アダプター蛋白 podocin, nephrin 等) の遺伝子変異が、糸球体変性と重度のタンパク尿を呈する巣状分節性糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis : FSGS) において報告されている。しかし濾過機能に対するそれらの分子の役割は不明のままである。

TRPC6 チャネルは受容体刺激と機械刺激が協働的に作用すると応答が増すことが、我々のグループによる先行研究で明らかにされている (Circ. Res. 104 : 1399-1409, 2009)。申請者はこれまでに、FSGS の原因となる TRPC6 遺伝子変異体が異常な機械刺激応答を示すこと、また TRPC6 と複合体を形成する podocin や nephrin が TRPC6 の機械刺激感受性を調節していることを、HEK 発現系を用いて明らかにしてきた。本研究ではこれらの成果を手掛かりとして、腎ポドサイトにおける TRPC6 を介した機械刺激感知メカニズムを明らかにすると同時に、タンパク濾過機能に及ぼす効果を精査した。

### ②研究方法

マウス腎臓より樹立されたポドサイト細胞株 (MPC-5, Exp. Cell Res. 236 (1) : 248-258, 1997、浅沼克彦教授より供与) に、レンチウイルスベクターを用いてマウス TRPC6 遺伝子 (野生型および FSGS 変異である M131T) を導入し、安定発現株を作製した。パッチクランプおよび細胞内 Ca イメージング法により受容体刺激および機械刺激の協働応答について検討した。受容体刺激はアンジオテンシン II (1  $\mu$ M)、機械刺激は、膜伸展を引き起こす 2,4,6-trinitrophenol (TNP) (500  $\mu$ M) を用いた。

さらに、上記の安定発現株を用いて in vitro タンパク漏出アッセイを行った。具体的には、ポドサイトを type IV コラーゲン等でコーティングしたセルカルチャーインサート (ポアサイズ 0.4  $\mu$ m) に播種し、分化培養を開始して 7 日後に培地を FITC- アルブミンに置換し、漏出量をプレートリーダーで測定した。測定 48 時間前に 1) 無刺激、2) アンジオテンシン II 刺激、3) アンジオテンシン II + TNP 刺激、の 3 群に分けて前処理した。前処理時に TRPC6 特異的阻害薬 SAR7334 (1  $\mu$ M) を添加し、その効果についても検討した。

### ③研究成果

野生型 TRPC6 を安定発現させたポドサイトにおいてパッチクランプあるいは Ca イメージング法で細胞応答を観察した結果、受容体刺激後に続く機械刺激時に応答が減衰することが明らかとなった。また、FSGS 変異体である M131T-TRPC6 を発現させるとその減衰が消失傾向にあることがわかった。

セルカルチャーインサートを用いた FITC-アルブミン漏出量測定では、受容体刺激+機械刺激によりアルブミン漏出量が抑制されることが明らかとなった。この抑制傾向は野生型 TRPC6 でより顕著であった。また野生型では、SAR7334 添加により上記の抑制効果が消失することが明らかとなった。一方で M131T では、SAR7334 添加により漏出量が増加傾向を示した。野生型・M131T の両者は、機械刺激のみを与えた場合では、細胞応答およびアルブミン漏出量ともに無刺激時と同様の結果を示した。

①で記載した先行研究 (Circ. Res. 104 : 1399-1409, 2009) は HEK 細胞に TRPC6 を強制発現させた結果であり、受容体刺激と機械刺激が協働的に作用すると応答が増強した。しかし本研究でポドサイトを用いると応答が減衰するという真逆の結果が得られた。このことから、ポドサイト特有のアダプター分子である podocin や nephrin が TRPC6 の機械刺激感受性を調節し、生体内で常に受ける糸球体濾過圧等による機械刺激に対し保護的に働いているのではないかと考えられる。M131T ではその機構が破綻し、細胞の応答とタンパク漏出量が過剰になるのではと推測される。

以上の内容は、第 251 回生理学東京談話会 (2021.10.16.)、第 20 回氷川フォーラム (2021.11.13.)、第 95 回日本薬理学会年会 (2022.3.7.)、第 99 回日本生理学会年大会 (2022.3.18.) にて発表した。現在上記内容を主軸とした論文を準備中である。本研究により TRPC6 によるポドサイト特有の機械刺激感受機構の存在が明らかとなり、タンパク漏出との深い関連性が示唆されたことで大きな進展が得られた。貴財団の助成に深謝したい。

研究テーマ

# 下垂体毛細血管の孔構築を調節する基底膜由来因子の同定とその分子機序の解明

研究者

帝京大学 医学部 解剖学講座 中倉 敬 (なかくら たかし)

## ①研究の背景と目的

下垂体は前葉、中葉、後葉からなる脊椎動物における内分泌系の中枢であり、前葉ホルモンの分泌は視床下部から連絡する有窓型毛細血管を介して調節されている。この有窓型毛細血管の壁には直径70 nmの“孔”が無数に開口し、ホルモンが血液—組織間を移動するための通路として機能している。このように、内分泌系による生体恒常性の維持には有窓型毛細血管における孔の存在が不可欠であり、その形成機序の解明は生命科学的知見の蓄積に貢献する重要な課題である。私たちはこれまでに、ラット下垂体前葉を対象にした有窓型血管内皮細胞の簡便な回収法と、基底膜構成因子であるフィブロネクチンを利用した新規培養法の確立に成功しているが(Nakakura et al., Cell Tissue Res., 383: 823-833)、有窓性を調節する分子機序についてはいまだ不明な点が多く残っている。このような中で私たちは現在、有窓型毛細血管に特徴的に発現する遺伝子情報を蓄積するため、ラット下垂体前葉の有窓型毛細血管と脳の連続型毛細血管を対象に比較トランスクリプトーム解析を進めている(図1)。本課題では有窓型群で高発現する基底膜局在性分子に着目し、有窓性調節との関係性を明らかにするため、以下の方法で解析を進めた。

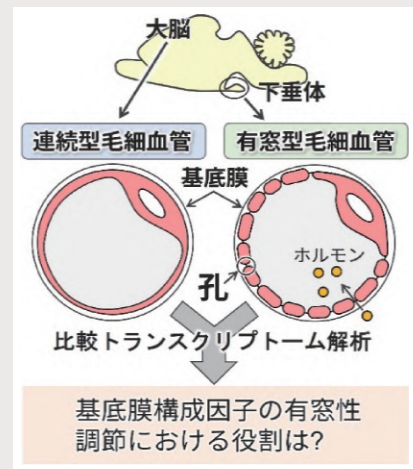


図1 研究の目的

## ②研究方法

抽出した基底膜局在性因子のラット下垂体における分布状況は不明なため、はじめに有窓型群に高発現するCol4a5、Col4a6、Col5a1、Col15a1、Dmbt1、Emilin2を対象に、ターゲット因子に対するcRNAプローブを合成してin situ hybridizationを、特異的抗体を用いて蛍光免疫染色を行うことでラット下垂体におけるmRNA発現細胞やタンパク質局在部位の特定を行った。

次に、ラット下垂体前葉の分散液からDynabeads抗体標識内皮細胞膜マーカーCD31抗体を用いて回収した有窓型内皮細胞を、フィブロネクチンコートした24もしくは48ウェルプレート上で培養し、前述の局在解析で興味深い局在を示した因子を対象にsiRNAノックダウンを行った。遺伝子ノックダウンによる影響を明らかにするため、孔マーカーであるPV-1のmRNA発現変動をリアルタイムPCRで調べた。また同処理した細胞を化学固定した後、PV-1に対する蛍光免疫染色を行った上で共焦点レーザー顕微鏡による観察を実施し、PV-1動態の変化を調べた。

## ③研究成果

in situ hybridizationと蛍光免疫染色による観察の結果、Col15a1が有窓型毛細血管周囲の基底膜に特異的に局在することを見出した(図2)。そこでCol15a1の有窓性における役割を明らかにするため、培養

有窓型内皮細胞に siRNA を導入し、Col15a1 をノックダウンした際の PV-1 mRNA 遺伝子発現の変化を調べた。その結果、PV-1 mRNA 発現がコントロールに比べて 50%程度低下することを見出した。そこでさらに、Col15a1 をノックダウンした際の PV-1 細胞内局在変化を蛍光免疫染色によって調べたところ、コントロールと比較してシグナル強度に低下傾向は見られたが、孔集合体を示す卵型シグナルの構造についてはコントロールとの差は認められなかった。今後は、走査型電子顕微鏡による超微細構造の観察を行うことで孔の構築状況を明らかにするとともに、Col15a1 リコンビナントタンパク質を用いた刺激実験や過剰発現実験を進めることで、Col15a1 の有窓型内皮細胞における役割を特定する。また、基底膜構成因子以外にも研究対象を拡大し、有窓性の調節機序の全貌を明らかにしたい。

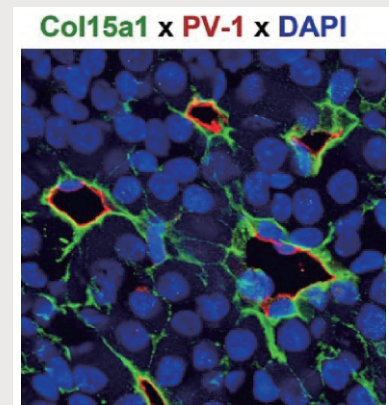


図2 蛍光免疫染色による Col15a1 局在部位の同定  
Col15a1 (緑) が PV-1 (赤) 陽性の有窓型毛細血管周囲に分布している。

研究テーマ

# 食事にリズムを与え肥満を防ぐ摂食制御ホルモンの研究

研究者

岡山大学 大学院 自然科学研究科 相澤 清香 (あいざわ さやか)

## 研究の背景及び目的

不規則な生活や食習慣は肥満や生活習慣病を誘発する。摂食行動を規則正しく制御し、リズムをつくるには体内時計が関わるが、そのメカニズムには不明な点が多い。これまでの研究から摂食制御に関与する多くの因子が同定され、本研究でターゲットとするニューロメジンU(以下、NMU)もその1つである。NMUは摂食制御に関するペプチドホルモンで、げっ歯類ラットでの脳室内投与により摂食を抑制し、体重の減少を誘導する<sup>1)</sup>。我々のこれまでの研究により、ラットの脳内では、Nmu mRNAは脳下垂体の隆起部で高発現しており、その発現は明期に高く、暗期に低い概日リズムを示すことを明らかにした<sup>2)</sup>。その概日リズムの形成には、シグナル因子であるメラトニンによる抑制的な制御やアデノシンによる促進的な制御、さらに細胞内では転写因子である時計遺伝子の直接的な制御の存在があることを明らかにした<sup>3)</sup>。NMUは単に摂食を抑制するだけでなく、摂食にリズムを与える役割をもつ可能性が考えられた。以上より、本研究ではラットにおける内因性のNMUの生理機能を明らかにするために、NMU欠損の摂食リズムや肥満、代謝に及ぼす影響を検討することとした。

## 研究方法

### 1. 体重、摂食量の測定

NMU欠損ラットおよび野生型ラットのオスを用いた。水と餌(オリエンタル酵母MF飼料)は自由摂取させ、体重・摂食量を1週間に1度測定した。摂食リズムの解析は、ZT0とZT12に摂食量を3日間測定し、明期、暗期の摂食量の平均値を算出した。

### 2. 循環代謝マーカーとインスリンおよびレプチンの測定

血清を調整し、血中循環代謝マーカーとして総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG)、遊離脂肪酸(NEFA)、グルコース(GLU)を生化学検査にて測定した。血中インスリン、レプチン濃度はELISA法で測定した。

## 研究成果

### 1. NMU欠損による体重・肥満度への影響

NMU欠損ラットは同腹仔の野生型ラットの肥満度の解析として体重を測定した。その結果はこれまでの知見を元に考えられる結果とは異なっており、驚くべきことに、NMU欠損ラットは測定した24週齢までにおいて有意な体重の増加を示さなかった。詳細な解析として内臓脂肪重量の測定および組織学的解析を行ったが精巣上体脂肪、後腹膜脂肪、腎周囲脂肪のいずれの重量にも違いは見られず、脂肪細胞サイズにも異常はなかった。これよりNMU欠損ラットは肥満を呈さないことが示された。

### 2. NMU欠損による循環代謝因子への影響

NMU欠損ラットおよび同腹仔の野生型において、血中循環脂質関連物質であるT-CHO、TG、NEFAの血中濃度に有意な違いはなかった。さらに、インスリンとレプチンの血中濃度も野生型ラットとNMU

欠損ラットで有意な違いはなかった。

### 3. NMU 欠損による摂食量への影響

NMU は摂食抑制作用をもつことが知られるため、NMU 欠損による摂食量への影響を検討した。その結果は我々の予想に反しており、測定した 9 週齢から 24 週齢のいずれの週齢においても、摂食量に違いはなかった。

### 4. NMU 欠損による摂食リズムへの影響

一般に夜行性動物のラットは摂食のほとんどを暗期に行う。本研究でも、野生型ラットは明期よりも暗期に摂食量が多かった。それは NMU 欠損ラットでも同様であり、概日リズムの有無として明期 / 暗期の比 (L/D Ratio) を解析したが、野生型および NMU 欠損ラットはともに明瞭な概日リズムが示され、NMU 欠損による摂食リズムへの影響はみられなかった。

本研究では NMU の摂食や代謝への機能を、新規に作製した NMU 欠損ラットを用いて解析した。予想に反して、ラットにおいては NMU 欠損による肥満度、代謝、摂食に対する影響は見られないという結果になった。これまでにラットへの NMU 投与実験の報告は数多くあり、肥満や摂食抑制を報告している<sup>1)</sup>。今回の結果を考え合せると、これら NMU の作用は外因性に NMU を投与した薬理的な効果であり、内因性の NMU はその機能を持たないことが示唆される。一方、ラットと同じげっ歯類のマウスの NMU 欠損の報告では、摂食量の有意な増加と肥満を示している<sup>5)</sup>。ラットを用いた本研究ではそれとは異なる結果となり、その原因として、NMU および NMU 受容体の発現部位の違いがあげられる。マウスでは摂食制御に関わる神経核の視床下部背内側核、腹内側核、弓状核での NMU 発現が報告されている<sup>6)</sup>。我々が観察した限り、ラットではこれら神経核での発現は認められず、脳内では下垂体隆起部で高発現していた<sup>2)</sup>。この発現部位の違いにより、ラットを用いた本研究では、NMU 欠損の摂食や代謝制御への影響が見られなかったと考える。今後は高脂肪食給餌などの負荷の強い条件で検討し、ラットにおける内因性 NMU の機能解析を目指す。

## 謝辞

遺伝子改変ラットの作製にあたり、ご協力を頂いた重井医学研究所松山誠博士に深謝します。実験に協力頂いた当研究室所属の院生の後藤佑紀氏および横木杏香氏に感謝します。

## 文献

- 1) Nakazato M, et al.: *Biochem Biophys Res Commun.*, 277, 191-194, 2000.
- 2) Aizawa S, et al.: *PLoS One.*, 8:e67118, 2013.
- 3) Aizawa S, et al.: *Mol Cell Endocrinol.*, 110518, 2019.
- 4) Kobayashi T, et al.: *BMC Biotechnol.*, 18, 19, 2018.
- 5) Hanada R, et al.: *Nat Med.*, 10, 1067-1073, 2004.
- 6) Graham E. S., et al.: *J Neurochem.*, 87, 1165-73, 2003.



研究テーマ

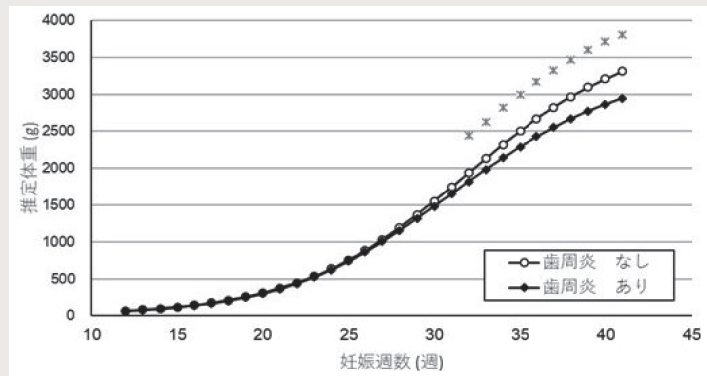
# 歯周病菌が放出する「細胞外小胞」の胎盤への移行と胎児成長発育への影響

研究者

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 口腔組織学 岡村 裕彦 (おかむら ひろひこ)

## 研究の背景及び目的の本文

世界保健機関 (WHO) は 2025 年までに「低体重で生まれる子供」の割合を 30% 減らすことを目標としたものの、その達成に遠く及んでいない。先進国の中でも日本は、低体重出生児の割合が有意に高く、早急な対策が求められている。「歯周病と低体重出生児との関連」については、数多くの疫学研究が行われてきた。我々のグループも、妊婦の歯周状態と胎児の成長発育との関連性について調べた結果、胎児の成長発育が

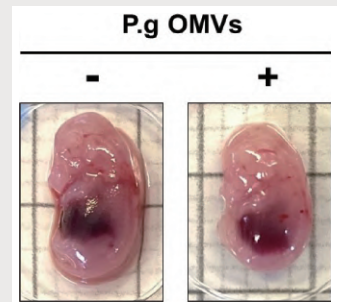


顕著に低いことを明らかにした。(右図: Taniguchi-Tabata at al, Sci Rep, 2020) しかし、“母体の歯周病 (原菌) がどのように胎児の成長発育に関与するか” についての分子生物学的研究は進んでおらず、詳細なメカニズムの解明や客観的な指標の確立に至っていない。そのため、国民の間に歯周病の予防や治療を行うことの重要性が十分に浸透しておらず、妊娠・出産の過程で多くの人々が母子の健康状態の悪化につながる歯周病を放置している。

我々はこれまでに歯周病菌から放出された「細胞外小胞」が肝臓や肺など遠隔臓器に集積し、糖尿病などの全身性疾患の重症化に寄与することを明らかにした。胎生期において、胎児は「胎盤」を介して母体側と栄養や代謝物、ガスの交換を行っている。近年、母体の口腔環境が胎児の成長発育と疾患発症に関与することが分かってきたが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、歯周病菌から分泌される『細胞外小胞』が母体胎盤を介して、胎児の成長発育にどのような影響を及ぼすかを分子生物学的に解明することを目的とした。

## 研究方法

歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis* : P.g) を培養し、上清中から「細胞外小胞」 (P.g OMVs) を回収した。回収した「細胞外小胞」を赤色蛍光で標識し、3日に一度妊娠マウスに投与した。P.g OMVsをCy7で赤色蛍光標識し、In vivo imaging systemを用いて生体内動態を調べた。これらのマウスから胎盤と胎児を回収し、形態学的・組織学的・生化学的解析を行った。具体的には、組織をパラフィン包埋後、切片を作製し、各種染色を行った。組織を培養液中でインキュベートし、組織由来の細胞外小胞を回収した。さらに、胎盤由来の小胞内に含まれる蛋白について質量分析により網羅的に解析した。組織から蛋白とRNAを回収し、ウエスタンブロットやqPCRにより発現を解析した。



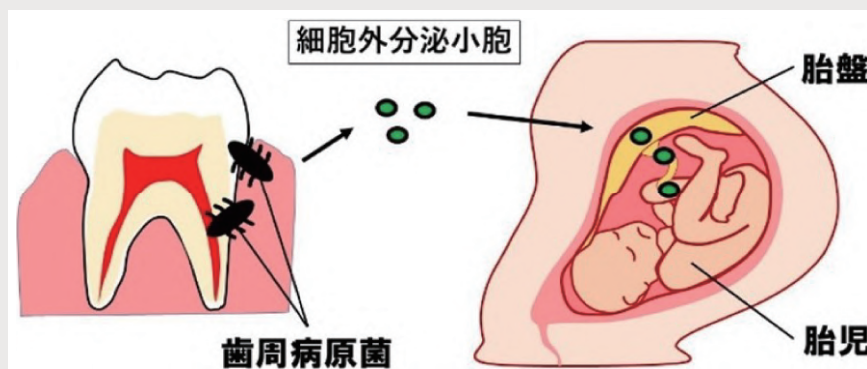
血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、P.g OMVs 処理による増殖や遊走能の変化をスクラッチアッセイなどを用いて調べた。胎児について、骨格標本を作製するとともに、肋骨や肝臓から RNA を回収し、各種分化マーカーの発現を qPCR で解析した。

## 研究成果

P.g OMVs 投与群は、コントロールに比べて、有意に胎盤・胎児の形成が阻害された。In vivo imaging system を用いて、赤色蛍光標識した P.g OMVs の生体内動態を調べたところ、胎盤と胎児に移行することが分かった。赤色蛍光標識した P.g OMVs の集積度と胎盤・胎児の成長阻害の間には相関があると思われた。胎盤の切片を作製し、組織学的に解析したところ、好中球の浸潤など炎症反応は認められなかったが、P.g OMVs 投与群の胎盤の血管形成と配列に異常が認められた。質量分析の結果、P.g OMVs 投与群のサンプルでは血管新生因子群の変動が大きかった。それらの因子からプロテオミクス解析により、VEGFR1 に着目した。VEGFR1 は P.g OMVs 投与群で有意に低下していた。培養細胞レベルの実験において、P.g OMVs は HUVEC 細胞の増殖や遊走能を低下させた。また、P.g OMVs は HUBEC 細胞における VEGFR1 の発現を抑制した。

一方で、P.g OMVs 投与群の胎児の大きさ・骨格は、コントロール群に比べて小さいものの、個体の成長や骨分化を示すマーカー因子の発現はコントロールと有意な差が認められなかった。以上の結果、歯周病菌が分泌する「細胞外小胞」は胎盤の血管構造に影響を与え、胎児への栄養供給に障害を与えることで胎児の成長発育を抑制すると考えられる。歯周病菌が分泌する「細胞外小胞」は脂質二重膜に包まれており、直径が数十ナノメートルと非常に小さいため、胎盤を通過して胎児に到達することが可能であることが分かった。

今後、歯周病菌由来の「細胞外小胞」が胎盤組織および胎児発育に与える影響についてさらに検討し、胎児の健全な成長発育に理想的な母体口腔環境を確立することを目指したい。



研究テーマ

# マイクロ流路による細胞接着力評価システムの作製と酸化ストレス検証への応用

研究者

東京工業大学 科学技術創成研究院 柳田 保子 (やなぎだ やすこ)

## 〈研究の背景と課題、目標〉

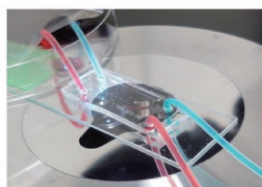
様々な生物学的機能についての一次的な情報を収集するために、現在、初代細胞や不死細胞を用いた *ex vivo* または *in vitro* での細胞培養に基づく研究が広く用いられ、比較的安価に信頼性の高い研究結果が得られている。しかし、*in vivo* の場合と比較した場合には、いくつかの問題点が挙げられている。特に、2次元の基質上で培養された細胞を用いる場合、上面の細胞表層と底面の培養器材との接着環境では細胞膜の分子構造やその役割が異なることから、培養細胞の様々な生理学的性質に影響を与えると予想される。ここで細胞生理学的な観点から注目すべきは、細胞外マトリックス (ECM : Extracellular matrix) の存在である。ECM は組織や臓器における非細胞性の構成成分で、細胞の物理的な足場として組織の形態形成・分化・維持に重要な役割を果たしている。ECM はコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニンといった繊維状タンパク質と、水和ゲルとして細胞外間質の隙間を埋めるプロテオグリカンで構成され、ECM と細胞との接着はインテグリンなど ECM 受容体を介して行われる。そこで、細胞培養時に使用する細胞ならびに ECM 環境を生体内環境により近い状況に調整することにより、細胞や組織構造を維持しながら様々な生理学的条件を再現できるようになってきた。このような条件下で、細胞接着状態をモニタリングする簡便な評価指標があれば、接着細胞による *in vitro* 研究結果の信頼性を保証できるようになる。

これに対し、マイクロ流路を用いた細胞実験では、少数の細胞、少量の試薬量で網羅的な機能解析が可能であり、*in vivo* の細胞周辺のマイクロ空間構造を *in vitro* に再現することも可能となっている。

本研究では、マイクロ流路上での培養細胞の接着強度の測定と、接着細胞の高さと細胞への横方向のせん断応力との関係の流体シミュレーションとを駆使し、マイクロ流路による細胞接着力評価システムの構築を目指す。ECM への酸化ストレス時における培養細胞の接着特性や細胞接着因子の状態の変化を調べることを目的とする。

### <研究その1> マイクロ流路による細胞接着力評価システムの作製

1. マイクロ流路の作製
2. 流路内へECMを塗布
3. 培養細胞の接着・培養
4. 培地還流によるせん断応力印加
5. 細胞培養面からの接着剥離評価

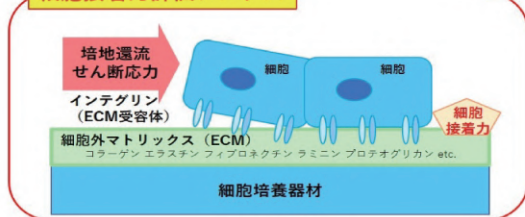


マイクロ流路

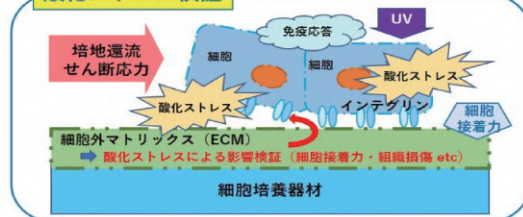
### <研究その2> 細胞接着力評価システムによる酸化ストレス検証

1. 細胞接着力評価用マイクロ流路の作製
2. 培養細胞の接着・培養
3. 酸化ストレス印加 (活性酸素種など)
4. 細胞接着剥離評価
5. 酸化ストレスの *in vitro* 検証

#### 細胞接着力評価システム



#### 酸化ストレス検証



### 〈実験方法〉

マイクロ流路を用いた細胞接着力評価システムを作製し、細胞接着特性や細胞接着因子の評価を行った。具体的には、まず、ECM 構成成分や細胞接着ペプチド (RGD) を塗布した周期構造を配置したマイクロ流路等をガラス基板上に作製した。このマイクロ流路内にヒト肺がん上皮細胞 (A549 細胞) を接着させ、培地還流によるせん断応力による細胞接着剥離制御について、測定結果と流体シミュレーションとを用いて評価した。また、マイクロ流路内に接着した培養細胞に酸化ストレスを負荷した際の細胞接着状態への影響について検討した。

### 〈実験結果〉

#### 1. 微細構造を有するマイクロ流路デバイスの作製と評価

ECM 構成成分や細胞接着ペプチド (RGD) を塗布した周期構造を配置したマイクロ流路を作製した。マイクロパターンとして直径 10 mm、ピッチ 20 mm、高さ 5 mm のパターンを設計し、マスクレスリソグラフィ法を用いてカバーガラス上に 0.6 mm×20 mm となるよう配置した。マイクロ流路形状は一定の流量において広範囲なせん断応力が生じるよう裾広がり形状とし、フォトリソグラフィ法とシリコン材である PDMS (Polydimethylsiloxane) を組み合わせて作製した。

ANSYS Fluent (ANSYS Inc.) を用いてマイクロ流路内の壁面せん断応力を解析したところ、流路幅が広がるほど壁面せん断応力が減少することが示された。またマイクロパターン周りの壁面せん断応力を解析したところ、流れ方向にパターンが存在しない範囲は壁面せん断応力が高く、パターン後方は低いことが示され、マイクロ流路内で様々なせん断応力の影響を検討できることがわかった。

#### 2. マイクロ流路デバイスを用いた細胞剥離実験

A549 細胞を播種する前に、マイクロ流路デバイス内にシランカップリング剤である APTES (3-アミノプロピルトリエトキシシラン) と架橋剤である GA (グルタルアルデヒド) を塗布し、細胞外基質であるフィブロネクチンを 2 mg/ml の濃度でコーティングした。マイクロパターンを有する基板上で A549 細胞を培養したところ、細胞はマイクロパターンの側面に接着するように拡がることを確認された。

#### 3. 細胞接着力測定結果

培地還流によるせん断応力を与える前の細胞数を、与えた後の数で除することで細胞接着率を求めた。マイクロパターンの存在しない平滑なガラス基板に比べ、マイクロパターンに播種した A549 細胞の方が、せん断応力に対する接着率が約 3 倍高いことが示された。しかし、今年度は、酸化ストレスを与えた場合は接着力とせん断応力の比例関係が見られなかった。

### 〈まとめ〉

マイクロパターンを有するマイクロ流路デバイスを作成し、流体力学シミュレーションを組み合わせることで細胞接着力の測定を行った。直径 10 mm、ピッチ 20 mm、高さ 5 mm のパターンを配置した基板上では通常のガラス基板上に比べ、同じせん断応力を与えた際の細胞接着率が 3 倍程度向上することが分かった。今後は、パターンの径、ピッチを変更した際の細胞接着力の変化について検討を進める。また酸化ストレス関連試薬を用いることで、細胞接着部の構造的影響と化学的影響の双方を含む細胞接着力を測定できると考える。

### 〈発表〉

上村、柳田 微細構造による細胞接着への影響 2022 年度精密工学会春季大会学術講演会  
2022 年 3 月 15-17 日、東京工業大学

研究テーマ

# 嗅覚刺激と代謝シグナルに基づく摂食障害の治療法の開発

研究者

高知大学 教育研究部医療学系基礎医学部門 山口 正洋 (やまぐち まさひろ)

## ①研究の背景及び目的

食行動は主に2つの要因で制御されている。1つは食べ物の「嗜好性」「欲求」、もう1つは栄養代謝の「恒常性」である。空腹時には好きな食べ物への欲求が高まり食行動が促進されるが、満腹時には好きな食べ物であっても食行動には結びつかない。健全な食行動は両者の適正なバランスに基づいているが、バランスが崩れると過食・偏食・拒食など食の障害が生じる。これは医学的社会的に大きな問題となっているが、その治療法は未だ不明である。

食べ物は様々な感覚を通じて検知されるが、なかでも食べ物の匂いは食べ物の嗜好性に大きく関わり、食べる欲求を強力に刺激する。研究代表者はマウスを用いて食行動における「嗅覚」の役割を検討し、

- ・マウス嗅覚系には匂い刺激に基づいて食の嗜好性・欲求を促進する特定の領域「嗅結節の前内側ドメイン」がある
- ・この特定領域には体の代謝状態を感知する機構が発達している
- ・この特定領域の代謝シグナルを操作すると食行動が変化する

ことを見出した。つまりこの特定領域は、「食べ物の匂いによる嗜好性」と「体の代謝状態」を結びつけて食行動を誘導する領域であることが分かってきた。

この知見を我々の健全な食行動に結びつけるため、研究代表者はヒトの摂食障害である「神経性食思不振症」のモデルマウスを作成し、その病態を検討した。そして、

- ・栄養欠乏状態にもかかわらず、「嗅結節前内側ドメイン」の活性化が低下していること、つまり食の嗜好性・欲求が低下していることを見いだした。

本研究は、神経性食思不振症モデルマウスの摂食行動異常を詳しく理解し、さらに嗜好性の高い匂い刺激や代謝シグナルの操作によって嗅結節前内側ドメインの活性化を促進し、摂食障害の改善を試みることを目的とした。

## ②研究方法

- ・神経性食思不振症モデルマウス(拒食マウス)の作成

若年正常メスマウスに運動ホイールによる自発運動促進と食事制限(1日の4時間だけえさを与える)を施すことにより、摂食低下、体重減少、活動性亢進を示す神経性食思不振症モデルマウス(以下、拒食マウスと表記)を作成した。

- ・匂いによる誘引行動学習

マウスに匂い(オイゲノール)とえさを同時提示し、特定の匂いに対して誘引行動をとるよう学習させた。

- ・嗅結節前内側ドメインへの薬剤投与

マウス麻酔下に嗅結節前内側ドメインに薬剤注入用カニューレを留置し、シリンジポンプを用いて食欲調節に働く薬剤を局所投与した。

・行動解析

運動ホイールの回転数の計測、行動のビデオ撮影により、連日の行動状態を定性的、定量的に解析した。

・脳の組織解析

マウスを還流固定して脳の薄切標本を作製した。神経活性化のマーカーである c-fos に対する抗体を用いた免疫組織染色により、嗅結節前内側ドメインを中心に脳領域の活性化状態を検討した。

③研究成果

1. 拒食マウスの日内行動の解析

拒食マウスの1日の行動パターンを、運動ホイールの回転数と行動のビデオ記録から詳細に解析したところ、正常のマウスは夜行性であり明期には主に休息しているのに対し、拒食マウスでは明期に活発に運動していることから、拒食マウスの背景に行動の日内リズムの破綻があることが分かってきた。ヒトの拒食症患者でも日内リズムの異常がしばしば観察されることから、この拒食マウスにおける日内リズム異常の理解が重要と考えられた。

また、拒食マウスにえさを与えると、与えた直後にはえさを食べるが、その後の摂食行動の低下によってえさ時間(4時間)の間に食べる総量が低下していることが判明した。このことから、拒食マウスは食欲を完全に喪失している訳ではないが食欲が持続しない点に問題があると考えられた。

2. 拒食マウスの嗅結節前内側ドメインの活性化解析

神経細胞の活性化マーカーである c-fos 拒食の発現を指標に、マウスの嗅結節前内側ドメインの活性化を多くのマウスで解析したところ、活性低下を示すマウスと活性低下を示さないマウスが存在することが分かってきた。その違いを1日の行動に基づいて検討した結果、えさ時間の直前、すなわちマウスがえさの供給を予期する時間になると、拒食マウスも正常マウスと同様に、嗅結節前内側ドメインの活性化がおこっていることが観察され、拒食マウスにおいてもえさの供給時間を学習して予期する働きは保たれていると考えられた。以上より、拒食マウスの摂食行動の改善には、

- ・えさの食べ始めではなく摂食の持続を促進すること
- ・明期の運動促進が摂食に与える影響を理解してそれを改善すること

が必要と考えられた。そこで、えさ時間の終了近く、また明期の運動促進中の嗅結節前内側ドメインの活性化の検討を新たに開始し、現在引き続き解析している。

3. 拒食マウスの食行動の改善

若年マウスに対して、えさと特定の匂い(オイゲノール)を同時提示し、匂い刺激で嗅結節前内側ドメインを活性化し、食欲を促進する実験系を確立した。現在、この匂い学習の後に自発運動促進と食事制限を行って拒食マウスを作成し、その摂食行動、特にその持続時間が匂い刺激で延長するかどうかを検証中である。

また、若年マウスの嗅結節前内側ドメインに、摂食促進に働くホルモン性薬剤を局所投与する手法を確立した。摂食促進シグナルを局所で操作することにより、匂いに基づく摂食行動が変化することを確認した。現在、拒食マウスの嗅結節前内側ドメインへの薬剤局所投与によって、摂食行動の持続時間が延長するかどうかを検証中である。

以上、拒食マウスに対する摂食障害の治療は現在進行中であるが、本研究の行動解析から拒食マウスの異常行動パターンを特定し、それをターゲットにした治療方法を検討することが可能になった。今後、摂食行動の持続時間の延長による治療に加え、日内リズム異常の改善を目指す方法を検討する。

研究テーマ

# 変形性関節症と骨粗鬆症の予防効果を有する食品機能成分による関節リウマチ予防効果の解明

研究者

福山大学 薬学部 柴田 紗知 (しばた さち)

## ①研究の背景及び目的

高齢化が進む現代において、健康寿命を延ばすことは重要な課題であり、健康寿命の短縮をもたらす主な要因である、認知症・ロコモティブシンドローム・メタボリックシンドロームの予防に、食生活も重要な役割を果たすと考えられている。そのため、科学研究の成果を取り入れた食生活を送ることによる積極的な疾病予防が期待されている。このような背景をもとに、報告者はこれまで食品機能成分による加齢性疾患予防効果を検討してきた。そして、老化促進モデルマウスへの投与実験を行い、ハーブ由来のカルノシン酸摂取による生存率維持効果や肝臓・腎臓保護効果について明らかにした。研究の過程で、カルノシン酸の運動器への影響についても検討を進め、カルノシン酸による軟骨細胞保護効果を明らかにするとともに、カルノシン酸を経口摂取することにより変形性膝関節症を予防する可能性も見いだした (Eur J Pharmacol. 2018)。

関節の老化現象に起因する変形性関節症は、生活の質を低下させるとともに、筋力の低下を引き起こすため、予防や進行抑制が重要である。しかしながら、食品機能成分による関節保護効果の報告はグルコサミン (Arthritis Rheum. 2013) 等、わずかしかない。報告者はこれまで、いくつかの食品機能成分が軟骨細胞や滑膜細胞に対して保護的に作用することを明らかにした。さらに興味深いことに、これらの食品機能成分は軟骨組織だけでなく、骨粗鬆症に対しても効果を発揮する可能性を見いだした。骨粗鬆症は、加齢による骨量の低下や骨質の劣化が過度に進行した疾患で、骨折等を招き要介護状態につながることから、高齢者の健康寿命を延ばすことに骨粗鬆症の予防は重要である。骨粗鬆症の予防効果について詳細な検討を行った結果、軟骨細胞保護作用を示した食品機能成分による骨粗鬆症予防効果を明らかにした。

そこで報告者は、変形性膝関節症や骨粗鬆症予防効果を示す食品機能成分の関節リウマチ予防効果に着目した。関節リウマチは関節滑膜の病変を主座とする全身性の慢性炎症性疾患である。関節リウマチの発症には自己免疫異常が関与すると考えられているものの、原因ははっきりとはわかっていない。そのため、発症を未然に防ぎ進行を抑制することや、作用機構を明らかにすることが必要である。本研究では、食品機能成分による関節リウマチ疾患予防効果とその作用機構を明らかにすることを目的に検討を行った。

## ②研究方法

関節リウマチ予防効果について、マウスへの関節炎症カクテル投与実験で検討を行った。この実験は、コラーゲンIIに対する5種類のモノクローナル抗体をカクテルとしてBALB/cマウス(雌)に静脈内投与し、その後LPSを腹腔内投与することによって関節炎を発症させるモデルである。対照群にはそれぞれPBSを静脈内投与、腹腔内投与する。飼育期間中には、対照群・関節リウマチ処理群・関節リウマチ処理+食品機能成分投与群の関節状態の変化をモニタリングした。また、行動科学試験を実施し、関節リウマチの進行により脳機能の低下や不安様行動がみられるか検討した。血液生化学検査や組織化学的解析を行った。

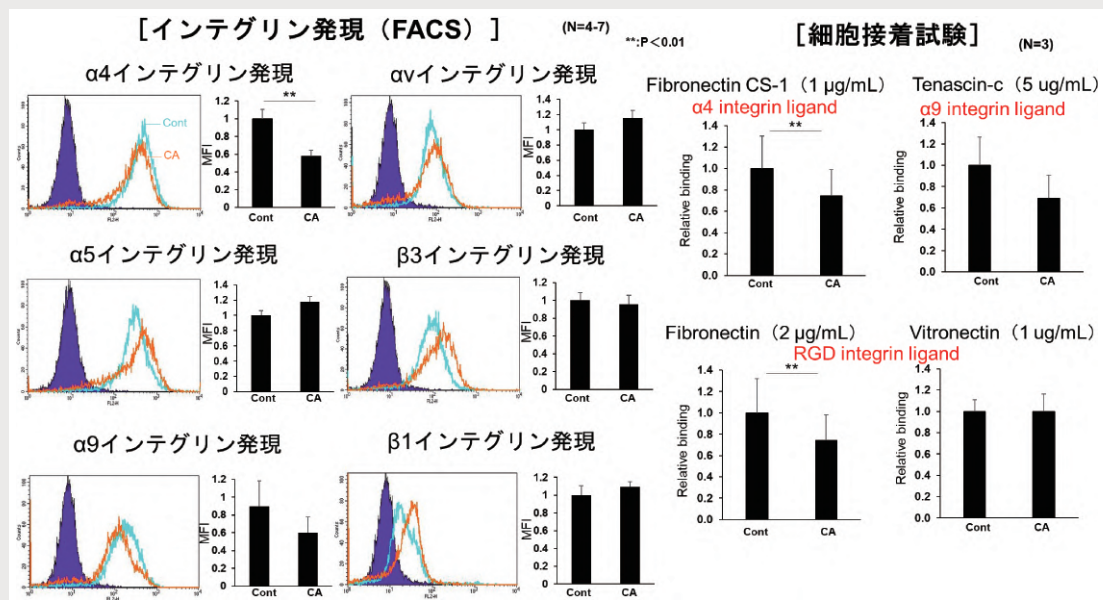
関節リウマチ進行や症状悪化には、 $\alpha 9$  インテグリンの発現が関与している。そこで、B16-BL6細胞を

用いて、細胞上のインテグリン発現についてフローサイトメトリー法と細胞接着試験で検討した。さらに、細胞接着抑制効果が細胞毒性に由来しないことを確認するため細胞毒性試験を行った。

### ③研究成果

いくつかの食品機能成分をマウスに投与し、関節リウマチに対して有効に作用するか検討した。その結果、食品機能成分を摂取することにより、関節リウマチの進行を抑制することを明らかにした。行動科学試験においては食品機能成分摂取の有無による行動変容はみられなかった。

さらに、フローサイトメトリー法で解析した結果、食品機能成分のうち、ローズマリー由来カルノシン酸やヒノキ科サワラの成分のピシフェリン酸は $\alpha 4$ インテグリンを、酒粕含有成分であるオレイルエタノールアミドは $\alpha 5$ インテグリンの発現を抑制することが分かった(下図;カルノシン酸のインテグリン発現抑制効果)。くわえて、カルノシン酸は $\alpha 4$ インテグリン、 $\alpha 9$ インテグリン、RGD配列認識インテグリンを介した細胞接着を濃度依存的に抑制することが分かった。また、これらの結果は、細胞毒性の関与はみられないことも確認した。以上の結果から、食品機能成分によるインテグリン発現抑制を介した関節リウマチ予防効果が示唆された。



(図) カルノシン酸のインテグリン発現抑制効果と細胞接着阻害効果  
Cont: カルノシン酸未処理 CA: カルノシン酸 25  $\mu$ M 処理



研究テーマ

# 真珠腫の外科切除における術中光線力学診断の開発

研究者

高知大学 医学部附属光線医療センター 小林 泰輔 (こばやし たいすけ)

## ①実験方法

真珠腫の手術時に摘出した母膜組織を、生理食塩水で十分洗浄後、半切して、直ちに半分を5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を添加した培養液中で、37°Cで4時間培養した。液体ヘリウムで凍結、OCT コンパウンドで包埋し、クライオスタットで20 μmの厚さで凍結切片を作成した。半切した残りは同様に5-ALA を添加しない培養液中で培養し、以下同様に凍結切片を作成した。凍結切片は以下の方法で観察した。

- a) ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)
- b) 細胞内のプロトポルフィリン IX (PpIX) の蓄積を確認するため共焦点レーザー顕微鏡による観察 (同時に核染色を行い、細胞内に取り込まれていることを確認する)

なお、当初予定していた、真珠腫母膜に発現する Galectin-7 の免疫染色は HE 染色による観察で母膜を確認できるため、行わなかった。コントロールとして、非真珠腫の慢性中耳炎症例で手術を行った症例の乳突洞粘膜の標本を同様な方法作製し、PpIX の集積の有無を観察した。

## ②結果

図1に真珠腫の術中所見と HE 染色像を呈示する。図1aは新鮮例で真珠腫はあたかも真珠腫のように観察され(矢頭)、正常組織との鑑別は容易である。一方図1bは再発例で、内耳の入り口に、はまり込んでおり(矢印)、わかりにくい。さらに、内耳に悪影響を与えないように安全に除去することが求められる。図1cは真珠腫の HE 染色像 (20倍) で上皮の左側にデブリと言われる角化物が蓄積している(\*)。

図2は当初行った検体の組織像でPI(核染色)集積部位に一致して、PpIXの集積が認められた。

別の検体で、5-ALAを添加した場合(図3)としなかった場合(図4)の結果を示す。

図3では上皮の核(図3a)に一致してPpIXの集積が明瞭に認められた(図3a, b)。

同条件で観察した図4では、PIの集積は確認できるが(図4a)、PpIXの集積は認められなかった(図4b)。

真珠腫6標本とコントロール1検体で観察を行い、真珠腫3標本でPpIXの集積が確認でき、コントロー

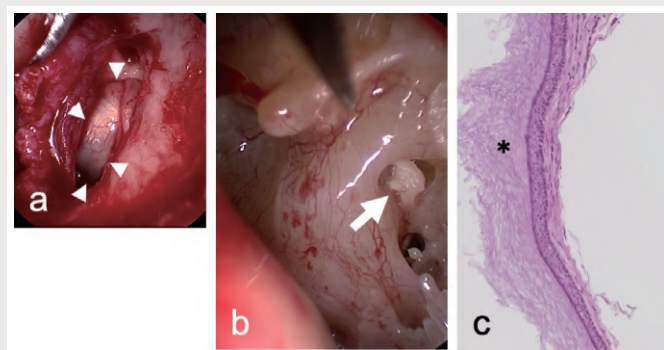


図1

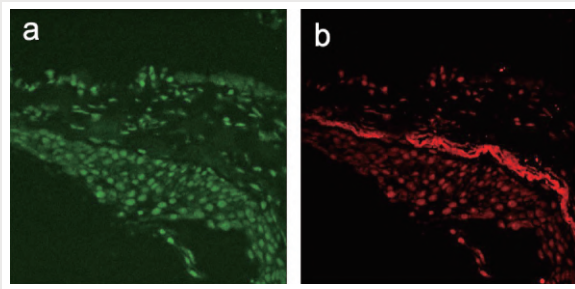


図 2

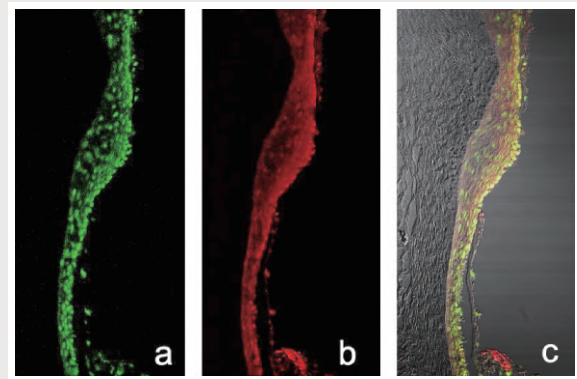


図 3

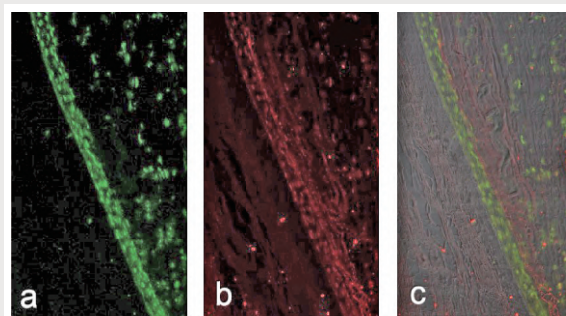


図 4

ル検体では認められなかった。残りの真珠腫 3 検体は細胞の状態が不良で、十分な核染色の像が得られなかった。

### ③考察と今後の展望

これまで、膀胱癌や神経膠芽腫など悪性腫瘍で PpIX が集積することが知られており、すでに臨床応用されている。

悪性腫瘍以外でも尋常性ざ瘡、上皮角化症でも同様に PpIX の集積が報告されている。このような増殖能が亢進した病態で PpIX の集積があると考えられ、真珠腫においても同様の可能性を期待して本研究を行った。

今回の研究結果から、真珠腫母膜にも PpIX が集積することが明らかになった。これにより、真珠腫に 5-ALA を添加すると、細胞内に PpIX が蓄積し、これを 5-ALA が励起可能な手術用顕微鏡や内視鏡で観察することにより、真珠腫母膜の光線力学診断 (PDD) が可能になると期待できる。

今後は臨床応用に向けて、培養組織そのものを膀胱癌の術中診断と同様に青色可視光 (375-445 nm) で励起し、赤色の蛍光 (600-740 nm) で腫瘍細胞を検出することを試みる。このような PDD が可能になれば、将来は PDT (光線力学治療) へ発展させることが期待できる。これにより手術操作困難な部位でも、遺残した真珠腫上皮細胞のみを内耳などに物理的な障害を与えることなく死滅させることができると期待できる。

研究テーマ

# ネイティブ DNA 配列を用いた高次セントロメア構造の解明

研究者

東京大学 定量生命科学研究所 滝沢 由政 (たきざわ よしまさ)

真核生物は、膨大な量のゲノム DNA を、クロマチン構造をとることにより、核内に収納している。クロマチン構造の中でも、特別な領域にセントロメアがある。S 期に複製されたゲノム DNA は、分裂期に染色体構造を形成し娘細胞へと均等に分配される。この染色体の均等分配には、染色体上のセントロメアが基盤となり、キネトコア複合体と呼ばれるタンパク質群が集積してくることが必須である。クロマチン構造の基本単位は、4 種のヒストンタンパク質 (H2A, H2B, H3, H4) に DNA が巻き付いたヌクレオソームと呼ばれる構造体である。セントロメアは、ヒストン H3 のセントロメア特異的なヒストンバリエーションである CENP-A を含む特殊なヌクレオソーム (CENP-A ヌクレオソーム) および  $\alpha$  サテライト DNA と呼ばれるセントロメアに特徴的なリピート DNA 配列が基盤となり、その特異的な機能を担保していると考えられている。 $\alpha$  サテライト DNA の配列は複数あることが知られており、複数の  $\alpha$  サテライト DNA がクラスターを作り、そのクラスターが更に繰り返し存在することにより、数メガ塩基対のアレイを形成している。

セントロメアクロマチンの立体構造は、CENP-A ヌクレオソーム単体が X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡 (クライオ電顕) 構造解析により複数解かれている。また、私は、CENP-A ヌクレオソームを含む 3 つのヌクレオソームがリンカー DNA で繋がれたトリヌクレオソームの立体構造をクライオ電顕を用いて解析し、セントロメアクロマチンの高次構造モデルを提唱している。しかし、得られているトリヌクレオソームの構造は、ヌクレオソームが形成されやすい人工配列を用いており、セントロメアクロマチンのネイティブ DNA 配列が構造に及ぼす影響がその構造機能に重要と考えられているが、ネイティブ DNA 配列を用いた立体構造解析はなされておらず、DNA 配列による高次セントロメアの構造およびセントロメア DNA に特異的に結合する因子の高次クロマチン構造に与える影響は分かっていない。本研究は、申請者が持つ試験管内再構成トリヌクレオソーム作製技術とクライオ電顕解析技術を使い、ネイティブ DNA 配列を含むセントロメアの高次基本構造解析をすることにより、セントロメアの高次構造を解明することを目的としている。

本研究では、セントロメアクロマチンの高次構造を明らかにするため、両側 2 つを CENP-A ヌクレオソーム、真ん中を通常型ヌクレオソームを導入したトリヌクレオソームを設計した。2 つの CENP-A ヌクレオソームには、ヒトセントロメア領域に存在するネイティブ DNA 配列である CENP-B box を導入した。CENP-B box は、ヒトセントロメアの  $\alpha$  サテライト DNA 配列中に存在し、セントロメアタンパク質で唯一 DNA 配列特異的に結合する CENP-B タンパク質が結合する配列であることが知られている重要な DNA 配列である。まず、ライゲーション法によりトリヌクレオソームを作製するため、3 種類のライゲーション可能な DNA 末端を持つ CENP-A ヌクレオソームおよび通常型ヌクレオソームを試験管内再構成により作製した。その後、作製された 3 個のヌクレオソームをライゲーション法を用いて連結し、高次セントロメアの基本単位としてトリヌクレオソームを作製した。高純度に精製されたセントロメアのネイティブ DNA 配列である CENP-B box を含むトリヌクレオソームを用いて、クライオ電顕観察のための試料凍結条件を検討した。グリッドタイプ、プロット時間、プロットフォースなどを検討した結果、多数の

トリヌクレオソームを観察することのできる凍結条件を得ることに成功した。得られたクライオ電顕像では、3つのヌクレオソームがリンカー DNA で繋がったトリヌクレオソーム像を観察することができた。今後は、得られた画像を使い単粒子解析を行うことで、セントロメアに存在するネイティブ DNA 配列を含むトリヌクレオソームの立体構造を解析することにより、CENP-B box を含むセントロメアクロマチンの高次構造モデルを構築する。また、本研究で得られたセントロメアのネイティブ DNA 配列である CENP-B box を含むトリヌクレオソームを用いれば、CENP-B box へ特異的に結合する CENP-B タンパク質のクロマチン構造へ与える影響も解析可能となる。本研究を発展させることにより、基礎生物学的研究だけではなく、クロマチン高次構造形成の破綻に起因する疾患解明への医薬品開発、農作物や家畜の品種改良への応用も期待される。

## 研究テーマ

# 電子スピン共鳴 (ESR) 抗酸化能評価による健康長寿抗酸化素材の探索

## 研究者

神奈川歯科大学 李 昌一 (り まさいち)

### ①研究目的

本研究では、抗酸化物質自体の抗酸化能を、生体試料である唾液中で電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いて評価し、成分それぞれの抗酸化能の性格付け (どの活性酸素種に作用するか) と格付け (それぞれの活性酸素種に対する作用の強度比較) を行うことを目的とした。

### ②研究方法

インフォームドコンセントで同意が得られた 30 ~ 50 代の健康な被験者 10 名の唾液を採取し、in vitro X-band ESR スピントラップ法により、以下の項目を評価した。

試験サンプルのコエンザイム Q10、レスベラトロール、ビタミン C、茶カテキンについて 10 名の唾液それぞれで測定を行った。試験サンプルは全て終濃度が 20  $\mu\text{g/ml}$  となるように調製した。

また、本試験は神奈川歯科大学倫理審査委員会の審査を受け、承認を得た後に実施した (承認番号 217)。

- (1) スーパーオキシド ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) 消去能 (抗酸化能) 評価
- (2) ヒドロキシルラジカル ( $\text{HO}\cdot$ ) 消去能 (抗酸化能) 評価

①  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  系 ②  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  系

(1)、(2) の評価系はフローインジェクション ESR 装置測定を行い、スピントラップ剤は CYPMPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propanoyloxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide) を用いた。

- (3) 一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) 消去能 (抗酸化能) 評価

(3) の評価系はフローインジェクション ESR 装置 (日本電子) 測定を行い、スピントラップ剤は 4-OH-TEMP (2,2,6,6-tetramethylpiperidinol) を用いた。

統計解析は One-way ANOVA 多重比較検定による Scheffe's F test による統計解析を行った (Microsoft Excel & IBM SPSS Statistics)。

### ③研究成果

被験者については平均年齢  $37.5 \pm 6.8$  歳、男性 3 人、女性 7 人の計 10 人であった。

(1) スーパーオキシド ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) 消去能 (抗酸化能) 評価においては唾液の平均  $\text{O}_2\cdot^-$  消去能より有意に高値だったのは茶カテキン、レスベラトロール、ビタミン C であった。また、還元型コエンザイム Q10 ( $56.98 \pm 9.77\%$ ) も有意に亢進した。

(2) ヒドロキシルラジカル ( $\text{HO}\cdot$ ) 消去能 (抗酸化能) 評価の  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  系では全ての試験サンプルにて、唾液の  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  系による  $\text{HO}\cdot$  消去能より有為に高値であった。 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  系による平均  $\text{HO}\cdot$  消去能は唾液に対し、唾液を含んだビタミン C、茶カテキン、レスベラトロール、還元型コエンザイム Q10 の順であった。

$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  系による平均  $\text{HO}\cdot$  消去能では、唾液より有意に高値であったのはビタミン C、茶カテキン、

レスベラトロールであった。

(3) 一重項酸素 (1O<sub>2</sub>) 消去能 (抗酸化能) 評価においては唾液の平均 1O<sub>2</sub> 消去能より有意に高値だったのはビタミン C、茶カテキン、レスベラトロールであった。

#### ④考察と展望

##### (1) 抗酸化物質の活性酸素種に対する性格付け

今回の試験では、唾液の各種活性酸素種 (O<sub>2</sub>・<sup>-</sup>、HO・、1O<sub>2</sub>) に対する消去能が、試験サンプルを添加することにより低下が認められたデータもあるが、平均値として低下することはなかった。

試験サンプルにおける抗酸化物質の性格付けとして、O<sub>2</sub>・<sup>-</sup>消去能については唾液の平均 O<sub>2</sub>・<sup>-</sup>消去能より有意に高値だったのは茶カテキン、ビタミン C、レスベラトロール、還元型コエンザイム Q10 であった。

HO・消去能に対して全ての試験サンプルにて、唾液の Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系による HO・消去能より有為な上昇が確認された。同じ、HO・産生系である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV 系に対してはビタミン C、茶カテキンが唾液の抗酸化能より高値だったことから、これらの抗酸化物質は唾液中で直接的に HO・消去能を発揮することが示唆された。

それ以外のレスベラトロール、コエンザイム Q10 は HO・に対する直接的な作用ではなく、鉄キレート作用により、HO・消去作用を示した可能性が考えられた。1O<sub>2</sub> 消去能においては唾液 1O<sub>2</sub> 消去能より有意に高値だったのはビタミン C、茶カテキン、レスベラトロールであった。

以上の結果より、全ての活性酸素種で唾液のみよりも有為に消去能を増加させたのは、ビタミン C、茶カテキン、レスベラトロールであった。

##### (2) 抗酸化物質の活性酸素種に対する格付け

試験サンプル抗酸化物質の活性酸素種に対する格付けとして、唾液を含有させた O<sub>2</sub>・<sup>-</sup>消去能についてはビタミン C、茶カテキン、レスベラトロールが確認され、茶カテキン、レスベラトロールでの平均 O<sub>2</sub>・<sup>-</sup>消去能がビタミン C より強かった。HO・消去能に対しては、ビタミン C、茶カテキン、レスベラトロールが直接作用を含め、最も強い活性が確認された。

今回の結果から、全活性酸素種を消去するビタミン C に匹敵する茶カテキン、レスベラトロールの抗酸化活性は健康長寿化粧品開発にも今後期待されるものであり、その作用メカニズムについては今後の研究が必要であると思われる。

今回の抗酸化物質の活性酸素種に対する効果は既に認知されていたが、これら抗酸化物質を生体試料である唾液に含有させた場合の作用は確認されていなかった。今回の試験で、唾液中でも抗酸化能を示すサンプルが確認されたことは、本研究プロジェクトの終着点である病的老化を防ぐことが可能であり、人間の美を維持・実現する健康長寿にも役立つこと抗酸化素材開発を可能にする将来的な研究へとつながる結果であり、また抗酸化評価法としての ESR 法の資質を確認するものでもある。