

先端研究拠点事業  
事業実績報告書  
(事後評価資料)

平成24年 4月3日

採用番号	22004
領域	医歯薬学
分科	基礎医学
細目	医化学一般
分科細目コード	6905
研究交流課題名 (和文)	ケミカルジェネティクスとプロテオミクスの為の国際連携計画
研究交流課題名 (英文)	Collaboration for Chemical Biology and Proteomics
採用期間	平成22年 4月 1日 ~ 平成24年 3月31日 (24ヶ月)

《実施組織体制》

日本側

拠点機関名	京都大学大学院医学研究科
実施組織代表者 (所属・職・氏名)	医学研究科・医学研究科長・湊 長博
コーディネーター (所属・職・氏名)	医学研究科・教授・武田 俊一
協力機関数	3
参加者数	53

相手国1

国名	米国
拠点機関名	National Institute of Health
コーディネーター (所属・職・氏名)	National Cancer Institute・Chairman・Yves POMMIER
協力機関数	0
参加者数	

相手国2

国名	スイス
拠点機関名	University of Zurich
コーディネーター (所属・職・氏名)	Functional Genomics Center・Professor・Josef JIRICNY

協力機関数	0
参加者数	

※交流相手国が複数の場合、適宜、枠を追加して記入すること。

## 交流目標の達成状況

目標の達成状況を、A～Eのそれぞれの観点から、ポイントを絞って記載すること。

A 学術的な成果 B 持続的な協力関係の基盤構築 C 若手研究者育成における成果  
D 国際的学術情報の収集整備 E 事業の波及効果

### ① 全交流期間を通じての達成目標（申請書で示された内容と同一のもの）

日本側コーディネーターの武田は、ニワトリBリンパ細胞株（DT40）の遺伝子破壊の実験系を樹立した。我々と共同研究者とは100種類以上の遺伝子破壊細胞を作った。本研究は、DT40由来の遺伝子破壊細胞株を、(A)酵素の基質同定を目的にしたSILAC（Stable Isotopic Labeling by Amino Acids in Cell Culture）と呼ばれる最先端プロテオミクス解析および(B)ケミカルバイオロジー（新薬シーズのスクリーニングと化学物質の毒性の検索）とに応用するものである。

#### (A) チューリッヒ大学 Functional Genomics Center（プロテオミクス）

本実験計画では、SILACと呼ばれる最新のプロテオミクス解析手法をスイスで実施する。SILACとは、質量分析の機器の能力を最大限に生かすための、質量分析前に細胞に対して実施する前処理方法である。SILACを使うと、約5千種類のタンパク分子（発現量と、リン酸化やユビキチン化などの化学修飾）を、2種類の試料間で精確に”比較”できる。この”比較”は、DT40細胞のような、遺伝的バックグラウンドが同一の遺伝子破壊細胞株間で実施すると、最も威力を発揮する。交流期間中に、CDK1（Cyclin-dependent kinase）とUBC13（Ubiquitin ligase）と呼ばれる2種類の酵素の基質を同定する。

#### (B) 米国 NIH Chemical Genomics Center（ケミカルバイオロジー）

新薬シーズのスクリーニングや毒物検出を目的にした、従来のバイオアッセイは、野生型細胞のみを使っていた。我々が提案する手法は、化学物質に曝露された時の、細胞の応答を、野生型細胞と遺伝子破壊細胞（例、DNA修復欠損細胞）とで”比較”することである。共同研究先は、研究テーマを公募するオープンラボであり、800,000種類の化学物質について、その生物効果をハイスループットに検索できるロボットをもつ。この”比較”は、DT40細胞のような、遺伝的バックグラウンドが同一の遺伝子破壊細胞株間で実施すると、最も威力を発揮する。交流期間中に、既に合意が成立した、DNA polymerase η および Tdp1 と呼ばれる DNA 修復酵素の阻害薬（既存の抗がん剤の作用を増強）をスクリーニングする。

### ② 交流目標の達成状況 ※成果公表の状況を、別表1にて作成のこと。

※派遣・受入等の交流実施については、別表4-1、4-2にて作成のこと。

#### A 学術的な成果

##### スイス：

- チューリッヒでSILACと呼ばれるプロテオミクスの実験を実施した。
- 共同研究した結果、2つの論文をそれぞれPNAS USA. 発表できた。

##### 米国：

- 我々と米国 National Toxicology Program と共同で NCGC において実施した化学物質の毒性評価について、論文とレビューとをそれぞれ発表した。
- DNA 修復酵素に対する阻害薬を検索した結果、Tdp1 および DNA polymerase H に対する阻害薬（リード化合物）を同定できた。
- Tdp1 に関する共同研究を論文発表した。

#### B 持続的な協力関係の基盤構築

##### スイス：

日本側とスイス側のコーディネーターである武田と Prof. J. Jiricny とが共同研究をすることによって、Functional Genomics Center（チューリッヒ州立大学と連邦工科大学との共同運営）のプロテオミクス解析のサービスを利用できることになった。武田の研究グループ以外に、もう1つの研究グループ（京大・放射線生物研究の小松教授）もサービスを利用できることになった。

##### 米国：

我々の治療薬スクリーニング手法（ニワトリ由来の遺伝子破壊細胞株を利用）が有用であることを米国国立衛生研究所（NIH）の研究者に知らしめた。有害化学物質の新規検出法を開発する研究は、共同研究を継続する基盤ができた。2012年秋から研究員を1年間派遣する予定である。

## ② 交流目標の達成状況（つづき）

### C 若手研究者育成における成果

#### スイス：

若手研究者4名がプロテオミクスを学んだ。

#### 米国：

若手研究者5名がハイスループットスクリーニングを学んだ。

若手研究者1名が米国国立衛生研究所（NIH）のデータベース構築担当者と情報交換した。

### D 国際的学術情報の収集整備

スイスでプロテオミクス解析を、そして米国 NIH でハイスループットスクリーニングをそれぞれ継続的に実施することにより、それらの解析手法に関する学術情報を継続的に得られるようになった。

### E 事業の波及効果

#### スイス：

次世代プロテオミクス（SILAC）は、(i) 古典的生化学に加えて、(ii) 質量分析機器の操作、(iii) そこから得られる大量の情報を分析の3種類のスキルを必要とする。京大ではSILACを若手研究者に学ばせる機会はない。本事業により京大生にスイスでSILACを学ばせる機会を長期的に提供できる共同研究体制を構築した。

#### 米国：

共同研究によって、我々の開発した遺伝子破壊細胞を使ったハイスループット解析が医薬品の開発および有害化学物質の同定に有用であることが証明できた。そしてハイスループット解析の為の実験手法を最適化できた。

京大では、ハイスループット解析から生産される大量の情報を処理できる情報技術者・教官はいない。本事業により京大生に米国国立衛生研究所（NIH）で情報処理を学ばせる機会を長期的に提供できる共同研究体制を構築した。

将来の医学・生物学では、データベースに蓄積された大量の情報をマイニングする技術が必要である。マイニングを学ぶ世界最高の研究機関は、様々な高品質の公開データベースを作製・管理している NIH である。上記のハイスループット解析の実験結果もすべて公開データベース（PubChem）に蓄積される。本事業により京大生に NIH で PubChem のデータをマイニングする手法を学ばせる機会を長期的に提供できる共同研究体制を構築した。

## 実施状況

### 研究交流計画実施にあたる実施体制

#### 国内外の拠点機関及び協力機関の間の、協力連携の状況

※研究参加者リストを、別表2にて作成のこと。

#### スイス FAN1 タンパク分子とファンconi貧血 DNA 修復経路の、機能解析

スイス側のコーディネーターである Prof. J. Jiricny (以下に **JJ** と記載) は、武田が開発したニワトリリンパ細胞株 (DT40) を使った遺伝学的実験手法を自分の研究室に導入することを希望した。本研究は、と武田との共同研究である。

#### スイス DNA 損傷に伴って起こるユビキチン化の網羅的解析

廣田准教授 (2012年4月から首都大学東京・教授に栄転)、矢野准教授 (大阪工業大学・情報学)、武田が日本側研究者であり、Functional Genomics Center (チューリッヒ州立大学と連邦工科大学との共同運営) では **JJ**、Dr. Bernd Roschitzki (質量分析)、Dr. Simon Barkow (バイオインフォーマティクス) が共同研究に従事した。

#### 米国 化学物質の変異原性をハイスループット解析する手法とデータベースを検索する手法の開発

大阪医大・衛生学の大学院生 (山本) が米国国立保健衛生研究所 (NIH) の中の Chemical Genomics Center (NCGC) でハイスループット解析を実際に実施した。NCGC では、Austin, C. (所長)、Xia, M. (グループリーダー) が共同研究者である。研究の取りまとめは、Tice, R. (National Toxicology Program) が行う。データの情報学的解析は、山田教授 (京大医・統計遺伝学) と奥野教授 (京大薬学)、そのポスドクのブラウン博士である。

#### 米国 治療薬の開発および作用機序の解明

治療薬の開発では、米国国立衛生研究所 (NIH) の中の4つのグループ (Dr. Y. Pommier、Dr. KJ. Myung、Dr. Neule、Dr. Paul Liu) が、武田、皆川 (京大・神経内科)、上久保 (東大・血液内科) と共同研究した。作用機序の解明では、NIH Dr. Beverly A. Teicher が武田と共同研究した。

#### 日本側拠点機関における研究交流課題への取り組み (事務支援体制等の観点より)

海外派遣に際し、事務が円滑に手続きを行ってくれる等、研究交流に対して十分な支援をしてくれた。そのおかげでほぼ予定通りの海外交流が進められ、より多くの成果を得ることができた。

## 共同研究

交流計画をふまえ、共同研究を実施するにあたっての枠組み、活動内容、得られた成果等  
(国内外の拠点機関・協力機関との連携状況も、考慮すること)

### (1) スイス FAN1 タンパク分子の機能解析

スイス側のコーディネーターである Prof. J. Jiricny (以下に **JJ** と記載) は、FAN1 と呼ばれる DNA 切断酵素に着目し、その機能解析の為の共同研究を武田に提案した。日本側の貢献により、**JJ** は 2010 年に PNAS. USA. に発表できた。この論文の筆頭著者は、武田 (日本側のコーディネーター) の研究室の大学院生であり、ラストオーサーが **JJ** である。この共同研究により FAN1 が架橋剤 (例、抗がん剤、シスプラチン) によって生じた架橋 (2 重鎖 DNA の鎖間に生成した共有結合) を除去する機能を持つことが判った。2010 年および 2011 年に研究員を派遣した結果、FAN1 と FAN1 以外の DNA 切断酵素との協調的な働きがわかった。

2010 年にスイスに博士課程院生を 2 名 (東北大学薬学研究科 井上絵里、京大 西原佳那) 約 2 ヶ月ずつ、修士課程院生を 1 名 (京大 杉村杏子) 派遣し、2011 年に博士課程院生 (塩田哲也) を 1 名 2 ヶ月派遣した。

### (2) スイス ファンコニ貧血 DNA 修復経路の機能解析

ファンコニ貧血 DNA 修復経路は、シスプラチン (抗がん剤) 治療によって生じた架橋 (2 重鎖 DNA の鎖間に生成した共有結合) を除去する修復経路である。この経路に DNA 切断酵素が関与するか否か、関与するとしたらどんな DNA 切断酵素が関与するのが不明であった。**JJ** との共同研究により、FAN1 のみならず S1x4 タンパク分子と結合する DNA 切断酵素もファンコニ貧血 DNA 修復経路のなかで機能することが判った。本論文は、2011 年に PNAS. USA. に発表できた。筆頭著者とラストオーサーとは、いずれも武田研究室の研究員である。

### (3) スイス DNA 損傷に伴って起こるユビキチン化の網羅的解析

放射線治療や多くの抗がん治療は、染色体 DNA を損傷して、結果的に癌細胞を自殺させる。DNA 損傷が発生すると、細胞の中では >1,000 種類のタンパクがユビキチン化される。どのユビキチン化が自殺誘導や損傷の修復反応に重要かを解明することが本研究の目標である。この目標を達成する上で、**JJ** と武田とは、それぞれ以下に説明する優位性を持ち、その共同研究により相乗効果が期待できる。**JJ** の優位性は、所属するチューリッヒ大学において先端的プロテオミクス解析手法 (SILAC) を使える Functional Genomics Center を設立したことにある。武田の優位性は、単一の親株 (DT40) から由来する 8 種類もののユビキチン化酵素の遺伝子破壊株をそれぞれ単離したことにある。そして、各遺伝子破壊株の表現型解析から、どのユビキチン化酵素がどんな生物作用を有するかを系統的に解明できた。両者の間の共同研究から、各遺伝子破壊株のユビキチン化 (>1,000 種類のタンパクのユビキチン化) を解析できる。この実験によって、各ユビキチン化酵素の基質を同定し、さらに各基質のユビキチン化の機能を解明できる。そして実際にニワトリ DT40 細胞用に SILAC を行う実験条件の最適化ができた。

2010 年に廣田准教授 (2012 年 4 月から首都大学東京・教授に栄転) が Functional Genomics Center (チューリッヒ州立大学と連邦工科大学との共同運営) で SILAC を実施し、予備実験のデータを得た。2011 年に廣田准教授、矢野准教授 (大阪工業大学・情報学)、武田の 3 名が **JJ** を訪問した。

### (4) 米国 化学物質の変異原性をハイスループット解析する手法の開発

毎年 1,000 種の新規化学物質が市場に出る。先進国の政府は、これらの化学物質が有する変異原性を 40 年前に開発された手法 (Ames test) を使って評価している。そして変異原性以外の毒性は、事実上調査されていない。米国政府は、化学物質が持つ様々な毒性をハイスループットに解析する手法を開発する Tox21 project を開始した。我々は、変異原性をハイスループットに解析する手法を Tox21 project の実施機関の 1 つである National Toxicology Program (NTP) に提案した。我々の提案は採用され、大阪医大・衛生学の大学院生 (山本) が米国国立保健衛生研究所 (NIH) の中の Chemical Genomics Center (NCGC) でハイスループット解析を実際に実施した。

山本は筆頭著者としてこの成果を論文発表した（ラストオーサーは NTP の長である Dr. Ray Tice）。また武田は、この実験結果をレビューに発表した。

#### （５） 米国国立衛生研究所（NIH）のデータベースを検索する手法の開発

企業で開発された化学物質の中で有害性があるものを正確に同定する手法の開発は、社会的ニーズが非常に高い。しかし医薬品と異なり、産業で使われる化学物質はその単価が安いので、その安全性を調べるときにコストをかけることはできない。その故に、市場に出る全新規化学物質について、動物実験や培養細胞を使った安全性試験を行うことは非現実的である。化学物質の構造からその毒性をコンピューターで予測する手法の開発が必要である。コンピューターで正確に予測するアルゴリズムを開発する為には、コンピューターに予め質の高い学習データを学習させる必要がある。では、質の高い学習データをどこから得ればよいだろうか？米国 NIH Chemical Genomics Center は、400,000 種類の化合物から成るケミカルライブラリーを使ったすべてのハイスループット解析のデータを PubChem site において公開している。そこで、我々はこの公開データを学習データとしてコンピューターに学習させ、アルゴリズムを開発するプロジェクトを開始した。このプロジェクトを達成することを目的に、バイオインフォマティクスを専門とする Brown 博士（京大薬学研究科・ポスドク）は 2011 年に合計 3 回 NIH を訪問した。一方、NTP の長である Dr. Ray Tice は、京都を 2011 年に訪問した。

#### （６） 米国 治療薬の開発

我々は、米国国立衛生研究所（NIH）の中の 4 つのグループ（Dr. Y. Pommier、Dr. KJ. Myung、Dr. Neule、Dr. Paul Liu）と新薬開発を目的とした共同研究を実施した。

酵素の阻害剤を探索する実験は、多くの場合、精製された酵素を使った試験管内反応によって探索されてきた。しかし、阻害剤が見つかったとしても、それは、試験管内反応ではよく働くが、生きた細胞において機能しない場合が多かった。実際、Dr. Y. Pommier (Chief, Molecular Pharmacology Branch) は、抗がん治療薬の開発を目的に、Tdp1 と呼ばれる DNA 修復酵素を阻害する薬剤を、精製された Tdp1 酵素を使って探索したが、見つかった阻害剤は細胞には期待したほど機能しなかった。そこで我々は、Y. Pommier にニワトリ細胞（Tdp1 遺伝子破壊細胞）を使った阻害剤探索方法を提案した。我々の教室から Y. Pommier（米国 NIH）にポスドク（村井博士）を派遣し、彼女がハイスループット解析の予備実験を NCGC で実施した。この研究に清水准教授（大阪医大・衛生学）が本研究助成を得て参加した。予備実験で既に生きた細胞の中の Tdp1 に働きかける薬剤を見つけることができた。村井博士は、Tdp1 に関する共同研究を論文発表した。

Dr. KJ. Myung は、抗がん治療薬の開発を目的に、DNA 修復酵素（DNA polymerase H）の阻害剤をスクリーニングした。我々は、Dr. KJ. Myung に 2 種類の細胞（DNA polymerase H 遺伝子破壊細胞とそこにヒト DNA polymerase H を発現した細胞）を提供した。この共同研究を遂行するために、2 名の研究員（Kim Sunmi、Lee Sang Woo）を本研究助成により派遣できた。

Dr. Neule のもとには、皆川栄子（京大神経内科）が神経変性疾患（パーキンソン病）の治療薬を開発することを目的に 3 ヶ月間研修した。Dr. Paul Liu の研究室を、上久保靖彦（東大血液内科）が抗がん治療薬（ヒストン修飾酵素阻害薬）の治療薬を開発することを目的に訪問した。

#### （７） 米国 治療薬の作用機序を遺伝学的手法によって解析

本研究は、Dr. Beverly A. Teicher (Chief, Molecular Pharmacology Branch) との共同研究である。修士課程院生を 1 名（京大 杉村杏子）が 3 ヶ月共同研究を実施した。本研究の結果、抗がん治療に使われる複数種類のヒストン修飾酵素阻害薬（HDAC 阻害薬）が、その作用機序について違うことが解明でき、作用機序を分類分けする合理的な方法が開発できた。

## セミナー

- ・研究交流計画におけるセミナーの位置づけを、他の交流形態と関連させつつ述べること
  - ・交流目標達成に向け、セミナーが果たした貢献を、具体的に述べること
- ※具体的な実施状況及び成果については、別表3にて作成のこと

- (1) 「紫外線やシスプラチン（抗がん剤）が誘導する DNA 損傷に対する応答機構を阻害する薬剤の開発」米国国立保健衛生研究所（NIH）にて開催（NIH 側責任者：Dr. KJ. Myung & Y. Pommier）  
NIH（ベセスダキャンパス）には、我々の研究室出身のポスドク（本年度京大に戻る予定）が勤務し、合計 5 名の研究員（うち 1 名はグローバル COE から助成）を派遣した。本セミナーの目的は NIH 側責任者と我々との共同研究の打ち合わせである。共同研究の結果、2 種類の DNA 修復酵素に対する阻害薬をそれぞれ我々が開発したスクリーニング方法を使って同定できた、
- (2) 「遺伝子破壊細胞を使った医薬品開発」NIH にて開催（NIH 側責任者：Dr. Bhadrasain）  
京大 医学部・放射線生物研究センターと National Cancer Institute（NIH/NCI）とが放射線治療の増感剤の開発を進める共同研究の可能性を議論するために、武田が日本側の代表者として NCI 放射線生物研究ユニットの研究者（ヘッド：Dr. Bhadrasain）らと討論した。その結果、共同研究を始める合意ができた。放射線生物研究センターは、共同研究推進を目的に増感剤開発の為に機器（ハイスループット画像解析装置）を概算要求し、2012 年秋にセンターに設置されることが決まった。
- (3) 「遺伝子破壊細胞を使った医薬品開発」NIH にて開催（NIH 側責任者：Dr. Beverly A. Teicher）  
Y. Pommier（NIH）が我々の研究を NIH の抗がん治療グループリーダーミーティングにおいて Dr. Beverly A. Teicher に紹介した。この紹介が契機になって Dr. Beverly A. Teicher と我々との共同研究が 2011 年に開始された。武田は我々の実験手法を紹介する為に、NIH フレデリックキャンパスにおいてセミナーを実施した。
- (4) 「ニワトリ DT40 細胞を使った抗がん治療薬の作用機序解析」チューリッヒ州立大学（NIH 側責任者：Dr. Josef Jiricny）  
我々がなぜプロテオミクス解析を必要とするかをスイス側に納得させることができた。

## 研究者交流

- ・研究交流計画における研究者交流の位置づけを、他の交流形態と関連させつつ述べること
  - ・交流目標達成に向け、研究者交流が果たした貢献を、具体的に述べること
- ※具体的な交流状況については、別表4-1、4-2にて作成のこと

### (1) スイス

共同研究は相互互惠の関係を構築することが重要である。武田は、J. Jiricny のニーズを正確に理解し、彼が必要とする実験手法（ニワトリ DT40 細胞株を使った遺伝学的実験手法）やデータを提供してきた。一方、J. Jiricny は、チューリッヒ大学の研究支援機関（Functional Genomic Center）を我々が利用することに便宜をはかった。我々が、Functional Genomic Center を利用して、ニワトリ DT40 細胞株用に次世代プロテオミクス解析手法（SILAC）を最適化することにより、J. Jiricny の研究にさらに貢献する。

京大では、次世代プロテオーム解析手法である SILAC が実施できる施設は無い。我々は、若手を外国に派遣して共同研究を通じて SILAC を学ばせることにより、社会貢献できた。

### (2) 米国

先端拠点事業を開始する前から、National Toxicology Program の Ray Tice および NIH の Y. Pommier と共同研究をしていた。彼等との共同研究（遺伝子破壊細胞を使った、化学物質の生物作用をハイスループット解析）が成功したことにより新たに、2010 年には KJ. Myung（NIH）および Dr. RJ. Neule（NIH）と共同研究を始め、2011 年には Dr. Beverly A. Teicher（NIH）と共同研究を開始できた。

京大医学研究科では、昨年に化学物質をスクリーニングする施設が整備された。しかしこの施設は、NIH Chemical Genomic Center や企業のスクリーニング施設に比べると、規模が小さく、そこから若手研究者が学べることに限られている。我々は、若手を外国に派遣して共同研究を通じて先端的ケミカルスクリーニングを学ばせることにより、社会貢献できた。