

先端研究拠点事業—拠点形成型—

平成23年度 実施計画書

採用年度	平成22年度	採用番号	22004	領域	医歯薬学
分科	基礎医学	細目名	医化学一般	細目コード	6905

1. 日本側拠点機関名 京都大学大学院医学研究科

日本側コーディネーター（所属部局・職・氏名） 医学研究科・教授・武田 俊一

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

(英文) Collaboration for Chemical Biology and Proteomics

研究交流課題に係るホームページ <http://rg4.rg.med.kyoto-u.ac.jp/jspssentan/sentantop.html>

2. 採用期間 平成 22 年 4 月 1 日 ~ 平成 24 年 3 月 31 日 (24 ヶ月)

3. 先端研究拠点事業としての全期間を通じた交流目標

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 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。

4. 前年度までの交流活動による目標達成状況

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

当初予定した研究目標をほぼ達成できた。具体的には、スイス側の代表者である Prof. Jiricny と我々とは、共同研究の成果を2010年度に *PNAS USA* 2010 に論文発表した。この論文は、Prof. Jiricny が発見した分子 (FAN1) の機能を、我々の実験手法であるニワトリ DT40 細胞の遺伝子破壊によって、解明したものである。この論文の筆頭著者は、京大の大学院生である。また、共同研究の成果をもう1つの論文に発表するべく、*PNAS USA* に論文投稿中である。この論文では、筆頭著者も最後の著者も京大の研究者である。

京大の廣田准教授は、SILAC と呼ばれる最新のプロテオミクス解析手法をニワトリ DT40 細胞に応用して、チューリッヒ大学で試すことができた。さらに東北大学・薬学研究科の院生と京大放射線生物学研究センターの助教とが、チューリッヒ大学を訪問した。訪問の結果、後者は、プロテオミクス解析の共同研究を開始できることになった。

未達成な実験は、SILAC 解析において、質量分析のデータとニワトリ遺伝子データベースとの照合が完全にはできていないことである。

2. 米国 NIH Chemical Genomics Center (NCGC)

当初予定した研究目標を達成できた。

(2-1) 有害化学物質スクリーニング

DT40 細胞から樹立した遺伝子破壊細胞を使い、約 1,800 種類の化学物質の DNA 毒性を検出する予備実験を終えた。この、1,800 種類の化学物質は、USA National Toxicology Program が持つ、化学物質の毒性を評価する新規実験手法の妥当性を検証する為の標準化学物質のライブラリーである。この共同研究の成果を2011年度に *Environmental Molecular Mutagenesis* に論文発表する。この論文の筆頭著者は、京大で実験している研究者である。

(2-2) 抗がん剤開発

我々は、抗がん治療薬を開発することを目的に、Tdp1 DNA 修復因子を阻害する化学物質を探索する共同研究を Dr. Pommier (米国 NIH) と実施中である。この共同研究遂行の為に、武田は、学術振興会の海外派遣奨学金 (NIH 枠) で研究者 (村井) を派遣した。村井は、我々が作製した Tdp1 遺伝子破壊 DT40 細胞を使って NCGC において阻害剤をハイスループット解析する予備実験を実施した。そして、この探索が感度と特異性において優れており、ハイスループット解析ができることを実証した。Dr. Pommier は、NIH RO3 グラントを応募中であり、それが採択されれば、2011 年秋から 800,000 種類の化学物質ライブラリーのなかから Tdp1 阻害剤を見つけるハイスループット解析を NCGC で開始できる。同様に、Dr. Myung (米国 NIH) も、DNA polymerase η (Pol η) の阻害薬を Pol η 遺伝子破壊 DT40 細胞を使ってハイスループット解析する為の予備実験を開始した。村井や Dr. Myung が行った予備実験に本研究助成で派遣された京大の研究員が参加した。

(2-3) 神経変性疾患の治療薬開発を目的にしたハイスループット解析方法の確立

パーキンソン病の一部は、家族性に発症する。このような患者の一部は、小胞体ストレスやミトコンドリアの品質管理に関与する酵素が機能低下している。このような酵素は、身体のすべての細胞で発現しているが、それが機能低下した場合には、神経症状が最初に顕在化するのである。パーキンソン病の治療薬を開発することを目的に、我々は、DT40 細胞からパーキンソン病の原因遺伝子を破壊した細胞を作った。この細胞の表現型解析を目的に、NIH の National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) に院生を派遣した。

(2-4) 放射線治療増感剤を開発する新たな共同研究の開始

Dr. Bhadrasain と新たな共同研究を開始する交渉をした。Dr. Bhadrasain は、我々と RO1 グラントを共同申請する提案をし、武田が2011年3月に彼と面談した。2011年度内に共同申請をする。このように、Dr. Pommier (NIH) が DT40 細胞を使って薬剤探索に成功した結果、この成果に注目した他の NIH の研究者との共同研究が拡大している。

5. 本年度の交流計画の概要

(共同研究)

1. チューリッヒ大学 Functional Genomics Center (プロテオノミクス) (R23-1)

(1) 若手研究員の派遣

大学院生2名を2ヶ月間派遣する。そして SILAC の実験手法を学ばせる。大学院生が滞在中、教官(廣田准教授)も短期間チューリッヒ大学に滞在する。

(2) 情報工学専攻の教官と学生との派遣

H21年度に未達成な実験は、ニワトリゲノムデータと質量分析の結果とを照合するソフト(開発済み)を SILAC 用に改訂することである。この改訂作業を実施する為に、大阪工業大学の矢野教授と大学院生とをチューリッヒに派遣する。そしてチューリッヒ大学のインフォメーションと情報交換する。

2. NIH・NIH Chemical Genomic Center (NCGC) (ケミカルバイオロジー)

(2-1) 毒物検出を目的にしたハイスループット解析方法の確立 (R23-2)

既に、Myung (NIH) と開始したプロジェクトを継続する。本研究は、変異原性 (= DNA 毒性) が疑われている化学物質について以下の2点を解析することである。(i) 変異原性の確認、(ii) どのような機構で変異が誘導されるかを解明。この2点の実験を完成させる為に、若手研究者を派遣する。

(2-2) 抗がん治療薬の検索を目的にしたハイスループット解析方法の確立 (R23-3)

ニワトリ細胞株を使った抗がん剤のスクリーニングを実施する為に、日本人研究者を1年以上 NCGC に派遣する必要がある。また大学院生(学位取得が2012年までにできる大学院生)1名を NIH に派遣し、研究計画について議論を行わせる。

(2-3) 神経変性疾患の治療薬開発を目的にしたハイスループット解析方法の確立 (R23-4)

昨年と同様に、NIH の National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) に大学院生を派遣する。

(2-4) 放射線治療増感剤の開発 (R23-5)

Dr. Bhadrasain と NIH グラント (RO1) を応募する為に、京大側の分担研究者が NIH を訪問する。そして現地でセミナーを開く。2011年度に、Dr. Bhadrasain とともに我々は NIH グラントを応募する。

NCGC へのインフォメーションの派遣

以下の理由から、ハイスループット解析では多数のインフォメーションが研究に参加する必要がある。ハイスループット解析では、1回の実験で膨大な量のデータが生産される。例えば、化学物質の、細胞への影響を測定する実験では、細胞を使う実験はオートメーション化されているので律速段階ではない。膨大なデータをコンピューターで解析する作業が研究全体の律速段階である。インフォメーションが必要とされるもう1つの理由は、データベースのマイニングの需要が大きく高まったことにある。NCGC では、産生された全てのデータを PubChem において公開する。この公開データベースを効果的にマイニングできることが、新薬開発や化学物質の有害性予測において将来に決定的に重要になる。インフォメーションの育成を目的に、京大薬学研究科に所属する研究者を NCGC に派遣する。そして、新薬開発や化学物質の有害性予測に貢献できる情報工学的手法について研究することができる若手を育成する。

(セミナー)

1. (S23-1) SILAC 解析に関与するチューリッヒ側の研究者との交流を促進する目的で、武田と京大の若手研究者3人がチューリッヒでセミナーを行う。彼等は、同時にミラノにあるがん研究所 (IFOM) でも同様のセミナーを実施する。

2. (S23-2) Dr. Bhadrasain と NIH グラント (RO1) を応募する為に、京大側の分担研究者が NIH を訪問する。そして現地でセミナーを開く。

(研究者交流)

1. 日本側コーディネーターである武田が、4月にオランダで開催される学会 (Responses to DNA damage: from molecular mechanism to human disease) に参加する。

2. 日本側参加者の小林純也が、8月にポーランドで開催される学会 (International Congress of Radiation Research) に参加する。

先端研究拠点事業—拠点形成型—平成23年度実施計画書

6. 実施組織

○日本側実施組織

拠点機関	京都大学大学院医学研究科
実施組織代表者 職・氏名	医学研究科長・湊 長博
コーディネーター 所属部局・職・氏名	医学研究科・教授・武田 俊一
協力機関数	3
協力機関名	京都大学大学院理学研究科、生命科学研究科、放射線生物研究センター、生命科学系キャリアパス形成ユニット 大阪医科大学医学部 東北大学大学院薬学研究科
拠点機関事務組織： 事務総括責任者	京都大学医学研究科事務部長 加藤 正昭
事務総括担当者	京都大学医学研究科総務・人事室総務担当 開原 崇友
経理管理責任者	京都大学医学研究科事務部長 加藤 正昭
経理管理担当者	京都大学医学研究科経理・研究協力室長 小谷 和宏

○相手国側実施組織 1

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

○相手国側実施組織 2

国名	スイス
拠点機関	University of Zurich
コーディネーター 所属部局・職・氏名	Functional Genomics Center・Professor・Josef JIRICNY
協力機関数	0
協力機関名	

○相手国側実施組織 3

国名	
拠点機関	
コーディネーター 所属部局・職・氏名	
協力機関数	
協力機関名	