

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 生存戦略としての体内時計システムの分子解剖

東京大学・大学院理学系研究科・教授 ふかだ よしたか
深田 吉孝

研究分野：基礎生物学：動物生理・行動

キーワード：体内時計、サーカディアンリズム、シグナル伝達、脳・神経、光生物学

【研究の背景・目的】

体内時計は、環境のダイナミックな日内変化に同調して生体のさまざまな機能リズムを生み出し、さらには翌日のサイクルを予知できるという圧倒的な有利性から、ほぼ全ての生物の生存戦略として定着した。高等脊椎動物では、視床下部に中枢の時計機能が収斂し、この中枢時計の上に立って高次脳機能が発達した。これを反映して、体内時計の異常は躁うつなどの精神疾患や記憶・情動の不安定化につながり、体内時計は予想以上に広範な脳機能の根底に横たわる。このような体内時計は、環境サイクルと同調するために光など環境因子の日内変化を感受し、その位相を制御するシグナリングは時計システムの「入力系」として定着した。哺乳類の光入力系として網膜神経節細胞に光受容タンパク質メラノプシンが同定されて以来、その光シグナリングは精力的に研究されてきたが、光の強度を時間積分して位相シフトの大きさに変換するシグナリングの分子実体は未だ謎に包まれている。一方、体内時計が生み出す時刻情報は「出力系」として多彩な生体機能を制御するが、単に機能リズムを生み出すだけでなく、神経機能の形成・維持そのものに未知の役割を果たすことが分かってきた。さらに、時を刻む「発振系」を構成する時計遺伝子を眺めてみると、普遍的な細胞機能を支える多彩な因子に時計制御活性が見出されている。このように体内時計の研究は、従来の時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックループの概念を基礎に、新しい発展的概念ネオクロックの構築に向かう黎明期を迎えている。本研究では、起源の古い体内時計が動物の脳機能においてどのように発達・複雑化したか、機能分子の分子進化の観点を含めて動物の生存戦略に迫る。

【研究の方法】

個体の行動リズムと分子的振動という両側の視点から体内時計の成立機序を理解するため、入力-発振-出力という3要素の相互制御について次の3課題に焦点を絞り、独自の手法と着眼点で時計システムの分子解剖に挑む。《1》体内時計は24時間リズムを頑強に刻む一方、外来因子により位相が柔軟に制御される。頑強性と柔軟性という対照的な特徴が両立する仕組みの理解に向け、時計入力系の解析から位相制御の分子的基盤を明らかにする。《2》地球環境のダイナミックな日内変化の中で発達した動物の脳は、中枢時計の出力を受けながら高次機能を獲得した。脳機能の成立背景を踏まえ、謎の多い脳高次機能における体内時計

の生理的役割を探る。《3》時計発振系の基本素子である時計蛋白質は翻訳中・翻訳後に多彩な制御を受ける。24時間という長い周期のリズムが安定に維持される分子機構を理解するため、時計蛋白質の機能の時空間制御の仕組みを解き明かす。

【期待される成果と意義】

夜型の生活や夜食の摂取は体内時計の攪乱を引き起こし、肥満などの代謝異常を誘発する。またシフトワーカーに気分障害が頻発するという報告があり、概日リズムと種々の生体機能は密接に関連すると考えられるが、その多くの事象の分子機序は未解明である。本研究の成果は、現代社会が抱える課題である睡眠障害や肥満、気分障害の発症機構の理解を大きく前進させると期待できる。本研究により体内時計の入力・発振・出力を総合的に理解し、生理機能リズム統合による恒常性維持機構とその変容・破綻のメカニズムに迫る事により、睡眠障害や精神疾患の予防・改善・時間治療に繋がる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Kon, N. *et al.* (2008) Activation of TGF- β /activin signalling resets the circadian clock through rapid induction of *Dec1* transcripts. *Nature Cell Biol.* 10, 1463-9.
- Hatori, M. *et al.* (2011) Light-dependent and circadian clock-regulated activation of sterol regulatory element-binding protein, X-box-binding protein 1 and heat shock factor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 4864-9.
- Yoshitane, H. *et al.* (2012) JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep.* 13, 455-61.

【研究期間と研究経費】

平成24年度-28年度

167,200千円

【ホームページ等】

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/fukada-lab/index-j.html>

sfukada@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

【基盤研究(S)】

生物系 (生物学)



研究課題名 光合成・光化学系 II 複合体の原子分解能における酸素発生機構の解明

大阪市立大学・複合先端研究機構・教授 **かみや のぶお**
神谷 信夫

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析、光合成、水分解酸素発生、酵素反応、人工光合成

【研究の背景・目的】

地球の豊かな生物界は太陽光の恵みによって維持されている。らん藻や植物は一連の光合成反応により水と二酸化炭素から炭水化物をつくりだし、同時に酸素を大気中に放出している。この炭水化物は植物体を構成し、動物は植物を食べて生きている。また酸素は我々人類を含めたすべての好氣的生物の生存に不可欠である。現在の物質文明を支える化石燃料も、光合成により繁殖した太古の植物が化石化したものである。このように光合成は我々にとって最も重要なもののひとつである。また現在では化石燃料の枯渇を目前にして、人工光合成により 21 世紀の持続可能な社会を実現しようとする機運が高まっている。

光化学系 II 複合体 (以後 PSII) は、一連の光合成反応の中でも最初に太陽光を吸収し、水を分解して電子とプロトン、酸素分子を発生させている。PSII は 20 種類ものサブユニットが会合した膜タンパク質であり、その総分子量は 700kDa にも及ぶ。これまで PSII の結晶構造は 3.8–2.9 Å の分解能で報告されていたが、水分解・酸素発生中心として働く Mn_4Ca クラスターの構造は不確かで、PSII を取り巻いて酸素発生に関与する水の構造もまったく不明であった。我々は昨年、PSII の結晶の質を飛躍的に向上させ、SPring-8 の構造生物学関連ビームラインを利用して PSII の結晶構造を 1.9 Å の分解能で解析することに成功した。その結果、 Mn_4Ca クラスターは 5 個の金属原子が 5 個の酸素原子により結びつけられて「歪んだ椅子」の形をしており、酸素発生に直接関係する 4 個の水分子を配位していることが明らかになった (図 1)。

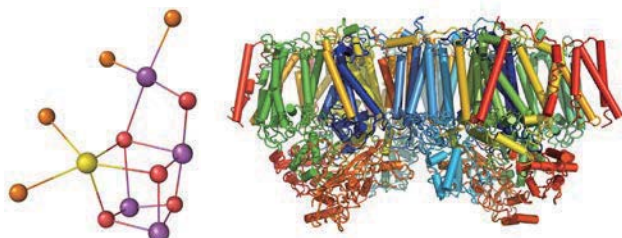


図 1 Mn_4Ca クラスターと PSII ダイマー

この成果は世界的に非常に高く評価され、サイエンス誌により 2011 年の 10 大ブレイクスルーの一つに選ばれた。

PSII の酸素発生機構は、 Mn_4Ca クラスターが 5 つの酸化状態 ($S_i (i = 0 - 4)$) をとり一連の反応を繰り返す Kok サイクルモデルにより説明されている。今回の構造はその S1 状態に対応する。本研究では Kok サイクルの S0 状態と S2 状態の結晶構造解析を 2.0 Å 以上の原子分解能で行い、酸素発生機構の詳細を解明して、人工光合成の実現に向けた突破口を切り拓くことを目的とする。

【研究の方法】

Mn_4Ca クラスターの S0 状態を反映している可能性のある PSII のヨウ素置換体、除草剤複合体、PsbM 欠失変異体の結晶構造解析を原子分解能で行うとともに、Mn 原子の X 線還元を 1% 以下に低減してインタクトな酸化状態を明らかにする。また大強度フェムト秒レーザーの多光子吸収を利用して S2 状態を実現し、その原子分解能の結晶構造解析を行う。

【期待される成果と意義】

我々は Mn_4Ca クラスターの 5 個の金属イオンを結ぶ 5 個の酸素原子の内の一つは水酸化物イオンであり、これと、 Mn_4Ca クラスターに直接配位している 4 個の水の内の一つから酸素分子が形成されるものと予想している。本研究から得られる成果はこの予想をより確かなものとして、今後人工光合成を実現するために不可欠となる光誘起の水分解・酸素発生「触媒」を開発する際のアイデアの元となる点で極めて大きな意義を持っている。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., Kamiya, N., Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, 473(7345), 55-60 (2011).
- Kamiya, N. and Shen, J.-R., Crystal Structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98-103(2003).

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度–28 年度
167,400 千円

【ホームページ等】

<http://www.ocarina.osaka-cu.ac.jp>
nkamiya@sci.osaka-cu.ac.jp

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 嗅覚受容体のナチュラルリガンドの同定とその生物学的機能の解明

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

とうはらかずしげ
東原 和成

研究分野：生物科学

キーワード：嗅覚、匂い物質、受容体、リガンド、生理活性物質

【研究の背景・目的】

生物は、生態系の多様かつ複雑な匂い情報のなかから、仲間、敵、異性などの信号を正確にキャッチして、識別する能力をもつ。マウスにおいて、匂いは嗅上皮の嗅神経細胞に発現する嗅覚受容体によって感知される。マウスで嗅覚受容体は約千種類あるが、そのうち、10%に満たない受容体のリガンドしか見つかっていない。一方、嗅覚受容体遺伝子は、脳、精巣、脾臓、舌上皮、発生初期の心臓、筋肉など、鼻以外の組織でも発現していることが明らかにされている。なかでも、精巣と筋肉では嗅覚受容体が機能的に発現しており、それぞれ精子の走化性および筋細胞の凝集に関わっていることが示唆されているが、内在性のリガンドは不明である。

我々は、ここで、自然界で生活するマウスが嗅覚受容体で感知する匂い物質を「ナチュラルリガンド」と定義する。現在までの研究は、合成香料リガンドとの対応付けがほとんどであり、嗅覚受容体に対するナチュラルリガンドを同定したという報告はほとんど無い。本研究では、マウス嗅覚受容体のナチュラルリガンドを同定するために、組織や分泌腺の抽出液などクルードなサンプルから受容体リガンドをスクリーニングすることができるアッセイ系を確立し、生体内で生合成され、内分泌的に嗅覚受容体発現組織で機能する、または外分泌されて個体間コミュニケーションに使われる嗅覚受容体のナチュラルリガンドを明らかにする(下図参照)。

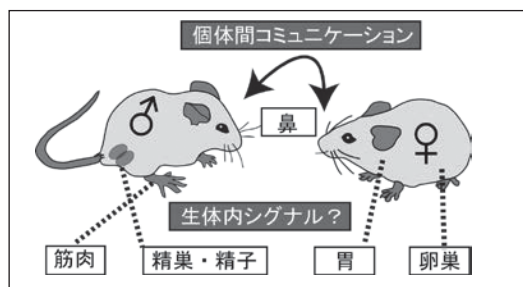


図1 研究の概略

【研究の方法】

ナチュラルリガンドのスクリーニングを行うマウス嗅覚受容体として、鼻に発現している現在までに合成香料リガンドがわかっている嗅覚受容体6種類、鼻以外の組織で発現することが確認されている嗅覚受容体3種類を対象とする。計画は、1)バックグラウンド応答のない効率の良い嗅覚受容体のアッセイ系の

確立、2)各生体内組織や外分泌腺の抽出物に対する嗅覚受容体の応答活性測定、3)ナチュラルリガンド(活性物質)のカラム精製・構造決定、4)同定したナチュラルリガンドの生物学的・生理的機能の解析の順におこなう。また、この研究戦略に成功した場合、他のオーファン嗅覚受容体のナチュラルリガンド大規模スクリーニングを行い、嗅覚受容体ナチュラルリガンドの多くを明らかにする。

【期待される成果と意義】

マウスが実際に生理的条件下で感じている匂いを同定することは、同時にフェロモンも見つかると思われる。すなわち、マウスの社会性行動がどのような化学信号とどの嗅覚受容体の組合せで制御されているかが明らかになるだけでなく、その相互作用をターゲットとして、マウスの繁殖の制御などにもつながる発展性を持つという点で応用性も高い。

嗅覚受容体は、創薬ターゲットであるGタンパク質共役型受容体ファミリーの約半数、全遺伝子の1%をも占めている。嗅上皮以外の組織における嗅覚受容体の機能を明らかにすることは、創薬のフィールドを広げる面というからも意義深いし、嗅覚受容体による生体内分子のセンシングという、新たな生命機能の維持戦略が見えてくることが期待される。

以上、動物の社会性行動の理解、生態環境の制御、および創薬フィールドの拡大という、脳科学、環境問題、医薬領域への波及効果が見込まれるという点で意義深い研究である。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Touhara K.& Vosshall, L.B. "Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors" Annu. Rev. Physiol. 7, 317-332 (2009)
- ・ 東原和成著 "香りを感知する嗅覚のメカニズム" 八十一出版 (2007)

【研究期間と研究経費】

平成24年度-28年度
165,100千円

【ホームページ等】

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biological-chemistry/>

【基盤研究(S)】

生物系 (生物学)



研究課題名 膜輸送体の作動機構の構造基盤の解明

東京大学・大学院理学系研究科・教授

ぬれき おさむ
濡木 理

研究分野：構造生物学、生物物理学、生化学、分子生物学

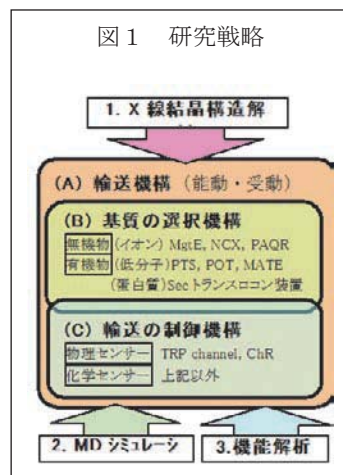
キーワード：膜輸送体、X線結晶構造解析、計算機科学、電気生理学

【研究の背景・目的】

細胞膜は細胞の内外の境界を決め細胞質を外部環境と異なる状態で維持し、細胞の生存にとって不可欠な役割を果たす。物質を生体内外に輸送することでこの異なる環境を作り出しているのが、膜に埋め込まれた**輸送体蛋白質**である。この輸送体が機能するにあたって重要な点は、**(A) その機能の本体である「輸送の駆動機構」**を中心とし、**(B) 輸送する基質の識別機構**、**(C) 輸送の制御機構**である(図1)。しかしながら、輸送体を含む膜蛋白質は試料調製などの問題から立体構造決定は困難であり、これらの理解は世界的にも限られた状況にある。その一方で、我々は既に6つの膜輸送体の構造決定を行うなど、先駆的な成果を挙げてきた。本研究は、現在我々のグループで発展してきた膜蛋白質の構造生物学という先駆的な研究を格段に推進し、この生命現象の根幹をなす輸送体について、**上記3点を中心に総合的に理解することを目的とする。**

【研究の方法】

具体的には、以下に挙げるケースをモデルとして取り上げ、**1. X線結晶構造解析**による構造的基盤の解明、**2. 分子動力学(MD)シミュレーション**によるダイナミクスの解明、**3. *in vivo/vitro*における機能解析**による実験的な検証、3つの手法を協奏的に駆使し問題解決を図る(図1)と同時に、さらに医薬の分野に資する。



1. 二価金属イオンの輸送機構 金属イオン輸送体はイオンを正確に識別して膜内外に輸送し、細胞内外の環境を維持・変化させる役割を持つ。そしてその輸送能は、輸送基質自体の濃度や他の様々な要因により制御されている。本研究では、高等真核生物において生理学的に重要な、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 輸送体を取り上げる。

2. 物理刺激による輸送制御 図1で示したように、輸送制御の機構には、既に挙げた濃度により制御を受ける化学センサーの他に、物理的刺激(光、電位差、圧力、温度等)により制御を受けるケースが知られている。この物理センサーの機構は、新規の構造的基盤を有すると考えられる。

3. 有機物の輸送機構 有機化合物(アミノ酸、核酸、糖、蛋白質等)は以上で取り上げたイオンとは化学的性質が大きく異なるため、これらの輸送体による輸送・識別機構は異なった構造的基盤に成り立つと考えられる(図1)。特に、糖などの有機物に関しては、細胞内外に類似物質が多種存在するため、特異性の高い認識が行われているケースが多い。一方、多剤排出因子や蛋白質輸送体を代表とする、幅広い物質を認識し輸送するケースも多く知られており、これらの基質識別機構は極めて興味深い問題である。本研究では、有機物の中から特に、糖・ペプチド・薬剤・蛋白質の輸送体を取り上げた。

【期待される成果と意義】

本研究では、様々なメカニズムを持つ膜輸送体を標的にして、図1に示した3つの手法を軸に、**世界に先駆けて輸送体の網羅的・総合的理解を進め、generalな膜輸送体の作動機構を解明する。**輸送体蛋白質は様々な疾病に関連するだけでなく、直接的な原因となっているケースも多い。そのため、本研究の成果は、科学的に意義が大きいだけでなく、創薬など医療応用を通じた**一般社会への還元が期待される。**

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・“Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel” H. E. Kato (他12名) K. Deisseroth and O. Nureki *Nature* **482**, 369-374 (2012).
- ・“Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export” T. Tsukazaki (他8名) K. Ito and O. Nureki *Nature* **474**, 235-238 (2011).
- ・“Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures” T. Tsukazaki (他8名) K. Ito and O. Nureki *Nature* **455**, 988-991 (2008).

【研究期間と研究経費】

平成24年度-28年度
167,600千円

【ホームページ等】

<http://www.nurekilab.net/>

【基盤研究(S)】

生物系 (生物学)



研究課題名 高速 AFM が拓く新構造生物学

金沢大学・数物科学系・教授

あんど うしお
安藤 敏夫

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質・核酸の構造・動態・機能、バイオイメージング

【研究の背景・目的】

タンパク質の機能はその構造と密接に関係している。それ故、タンパク質の詳細な構造が広く研究されてきたが、得られる構造は静的なスナップショットに限られる。一方、動作中のタンパク質分子のダイナミックな振舞いは一分子技術によって調べられてきたが、実体であるタンパク質分子そのものは観察に現れない。従って、構造とダイナミクスを同時に調べることは不可能であり、解像度に著しくギャップのあるかき集められたデータからタンパク質がどのように動作して機能するかを推測するしかない。それ故、機能中のタンパク質分子を高い空間時間分解能で直接可視化することは生物学にとって長い間“Holy Grail”（見果てぬ夢、或いは、困難だが探究すべき重要課題）であった。この長い間存在し続けてきた技術的課題を克服すべく安藤は 1993 年から高速 AFM を開発してきた。現在ではその顕微鏡は完成している。実際、安藤グループが最近発表した応用研究の成果は、高速 AFM がタンパク質の機能メカニズムについてユニーク且つ深い洞察を与えられる威力ある新しいアプローチであることをたて続けに実証している（図 1）。更には、生きたバクテリアの細胞表面上で動くタンパク質分子を動画映像としてその場観察することさえ可能であることが最近実証された。この技術革新をベースに本プロジェクトは、更に幅広い応用研究を展開するとともに次世代顕微鏡技術を開発することを目指す。

【研究の方法】

本プロジェクトは以下 3 点の研究を推進する。(a) 幅広い共同研究を通して以下のような多様なタンパク質について高速 AFM によるイメージング研究を行い、それらの機能メカニズムを明らかにする：例えば、モータタンパク質、AAA タンパク質、DNA 関連のタンパク質、天然変性タンパク質、膜輸送タンパク質。(b) バクテリアや、核、ミトコンドリアといった細胞内オルガネラの外表面のその場観察を行い、そこで起こる動的分子プロセスを明らかにする。例えば、核膜孔を通したタンパク質輸送における核膜孔の動的構造変化や、ミトコンドリア外膜におけるタンパク質輸送の分子プロセスを可視化する。(c) 生きた真核細胞の表面構造を可視化するために、非接触型の高速走査型プローブ顕微鏡（高速 SPM）を溶液振動やイオン電流を利用して開発する。また、生きた細胞の内部をも高い空間時間分解能で観察することを可能にすべく、新しい顕微鏡の要素技術の

開発にも挑戦する。

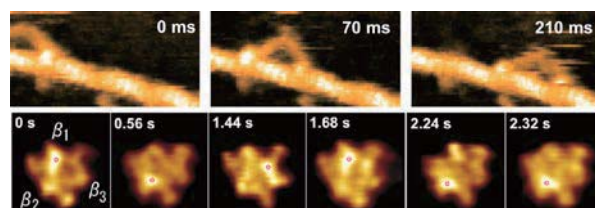


図 1 高速 AFM が捉えた動作中のタンパク質分子の像。上段：歩くミオシン V、下段：回転軸のない F₁-ATPase で起こる構造変化の回転伝搬。

【期待される成果と意義】

動作中のタンパク質分子の動態イメージングが多様なタンパク質系について可能であり、その可視化により機能メカニズムが従来手法よりも明快に解明可能であることが実証されるであろう。それは、現状の構造生物学を革新し、「動的構造生物学」とも呼ぶべき新しい分野を拓くものと期待される。また、完成させた高速 AFM の性能・機能を超える新しい高速 SPM 技術とともに、細胞や細胞内オルガネラ表面で起こる動的現象のその場観察は細胞生物学にも大きなインパクトをもたらすものと期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- N. Kodera et al., “Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy”, *Nature* **468**, 72-76 (2010).
- T. Uchihashi et al., “High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F₁-ATPase”, *Science* **333**, 755-758 (2011).

【研究期間と研究経費】

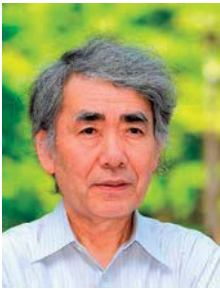
平成 24 年度 - 28 年度
165,800 千円

【ホームページ等】

<http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>
tando@staff.kanazawa-u.ac.jp

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 レドックス制御による小胞体恒常性維持機構の研究

京都産業大学・総合生命科学部・教授

ながた かずひろ
永田 和宏

研究分野: 生物学、生物科学、細胞生物学

キーワード: タンパク質分解、小胞体

【研究の背景・目的】

小胞体において変性したタンパク質は、ERからサイトゾルに逆輸送されたのち、ユビキチンプロテアソーム系によって分解される(小胞体関連分解、ERAD)。ERADの分子機構を研究する過程で、新規還元酵素ERdj5を発見し、その機能解析を行ってきた。ERdj5は、新生タンパク質の酸化還元を通じて、タンパク質の動態調節に必須であるばかりでなく、品質管理にも重要な役割を果たしている。一方で、小胞体内レドックス環境がカルシウムポンプの活性を調節していることが明らかになっている。小胞体内の3つの恒常性(タンパク質、レドックス、カルシウム)は互いに緊密にクロストークを行っているが、本研究では、これら3つの恒常性のクロストークの分子機構を明らかにすることを目的とする。

【研究の方法】

(1) 小胞体関連分解ERADを中心としたタンパク質恒常性維持機構

ERADに関わる還元酵素ERdj5がどのように還元力を得ているのかを明らかにする。サイトゾルから直接GSHを得ているのであれば、そのチャンネルの同定を行う。また、分解すべきタンパク質のジスルフィド結合を開裂して、小胞体膜上のdislocon channelを通過しやすくすることが必須であるが、小胞体の酸化的環境下ではいったん還元したシステインもすぐに酸化してしまうことが考えられる。基質がdisloconまでどのように還元状態を維持するのか、またどのような因子の助けを得て、disloconへリクルートされるのか、それらに関わる因子を探る。

(2) 小胞体レドックス恒常性の維持機構

小胞体には20種以上の酸化還元酵素(OR)が存在する。それらは相互作用し、カスケード反応によって小胞体内レドックス環境を維持しているが、それらの分子機構は依然として不明の部分が多い。代表的な酸化酵素Ero1aとPDIをハブ複合体として、他のORの反応を調節している機構を明らかにする。特に酸化反応における電子伝達経路を明らかにしたい。

(3) 小胞体カルシウム恒常性の維持機構

小胞体はカルシウムの貯蔵オルガネラとして重要な役割を果たしているが、その恒常性はインとア

ウトの2つのカルシウムポンプによって担われている。それぞれのポンプのカルシウム運搬活性は、小胞体レドックス状態によって制御を受けている。そのカルシウムポンプの酸化還元を担っているORは何なのかについて、網羅的に解析を進める。

【期待される成果と意義】

小胞体はタンパク質合成を担う中心的な場であり、総タンパク質の3分の1は小胞体で合成されている。その他に、酸化還元環境を形成し、またカルシウム貯蔵を担うオルガネラでもある。タンパク質合成、レドックス環境、カルシウム濃度はそれぞれ小胞体の恒常性を維持するためのもっとも基本的な要素である。本研究は、それら3つの恒常性が独立に維持されているのではなく、互いに緊密なクロストークのもとに保たれていることに注目し、その分子機構を明らかにしようとするものである。細胞の正常な増殖、機能発現における小胞体の役割について重要な知見が得られるものと期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

Usioda, R. et al., ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* **321**; 569-572 (2008)

Hagiwara, M. et al., Structural bases of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Mol. Cell* **41**; 432-444 (2011)

【研究期間と研究経費】

平成24年度-28年度
167,700千円

【ホームページ等】

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~nagata/index-j.html>

【基盤研究(S)】

生物系(農学)



研究課題名 アミノ基修飾型キャリアタンパク質を介した物質変換機構の解明と応用展開

東京大学・生物生産工学研究センター・教授 にしやま まこと
西山 真

研究分野：応用微生物学、応用生物化学

キーワード：微生物代謝、酵素化学

【研究の背景・目的】

化合物のカルボキシル基に結合し、生合成を効率よく進めるキャリアタンパク質は、脂肪酸合成系、ポリケチド合成系に見いだされるが、アミノ基に結合し生合成のキャリアタンパク質として機能するのはこれまで見いだされていなかった。我々は、好熱菌のリジン生合成において、アミノ基に結合する新規なキャリアタンパク質 LysW を見出した。さらに我々は、LysW のホモログがリジン以外のアミノ酸生合成にも関わっていること、さらには放線菌の二次代謝にも LysW が関わる類似のシステム存在することを見出しつつある。これらの事実は、LysW 類似のキャリアタンパク質が関与する酵素系が生体物質変換系において重要な位置を占めていることを示唆している。

本研究では、LysW ホモログが関わる一次・二次代謝産物生合成システムを構造生物学、遺伝学、天然物化学、バイオインフォマティクスなどの最先端技術を駆使して解析し、LysW と各種代謝酵素群の認識や LysW ホモログが関わる代謝系、およびその制御の全容の解明を目指す。さらに、本研究では、得られる情報を基にして、有用物質生産系の基盤を構築することを目指すものである。

【研究の方法】

我々が好熱菌で見いだしたリジン生合成系において LysW がどのように認識され酵素反応が進行するのか、さらにはリジン生合成とアルギニン生合成において、基質がどのように識別されているかなどが最も興味深い点であるが、その詳細はほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では LysW ホモログがどのようにこれらのアミノ酸生合成マシナリーに組み入れられ、一次代謝生合成に寄与しているのかを構造生物学的手法を取り入れることで分子レベル・原子レベルで明らかにする。

我々は放線菌の二次代謝生合成に LysW およびそれに関連する酵素群のホモログが含まれることも見いだしている。本研究では、放線菌の LysW ホモログに着目し、これらがどのような二次代謝産物の生合成に関わるのかを明らかにする。これらの研究により、アミノ基修飾に関わる LysW ホモログがどのようにして生合成機構に関与しているかを詳細に明らかにできる。また、そこで明らかになる LysW ホモログあるいはその誘導体の分子・原子レベルでの認識機構を基盤として、アミノ酸や二次代謝産物の有用物質生産系確立といった研究の応用還元も視野

に入りたいと考えている。

【期待される成果と意義】

LysW は、リジン生合成において α アミノアジピン酸のアミノ基の保護基となるだけでなく、基質のキャリアタンパク質として機能するというこれまでにない役割を持つ。我々のこの発見は基礎的研究として極めてオリジナリティが高いといえるが、リジン以外のアルギニンにも、さらには二次代謝にも LysW のホモログの関与が示唆されており、LysW ホモログが関わる生合成酵素群を分子・原子レベルで統合的かつ詳細に解析する本研究は、全く新たな生合成システムの提示、さらには新たな研究領域を開拓することにつながる独創的なものと位置づけられる。LysW が関わる生合成は申請者が見出し、それに関する研究は今も最先端に位置しているが、本研究をさらに強力に推し進めることにより、国際的なイニシアティブを確保し続けることにつながるものと期待される。また、本研究は、リジン、アルギニン、さらには生理活性物質の生合成を研究することになるため、基礎的研究の見地のみならず、応用的な見地からも極めて意義深く、大きな波及効果を生み出すことが期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- T. Okada, T. Tomita, A.P. Wulandari, T. Kuzuyama, and M. Nishiyama. Mechanism of substrate recognition and insight into feedback inhibition of homocitrate synthase from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem*, **285**, 4195-4205 (2010)
- A. Horie, T. Tomita, A. Saiki, H. Kono, H. Taka, R. Mineki, T. Fujimura, C. Nishiyama, T. Kuzuyama, and M. Nishiyama. Discovery of proteinaceous N-modification in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 673-679 (2009)

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 28 年度
159,700 千円

【ホームページ等】

<http://park.itec.u-tokyo.ac.jp/biotec-res-ctr/saiboukinou/>

【基盤研究(S)】

生物系（農学）



研究課題名 小胞体ストレス応答の分子機構とその破綻による疾患機序の解明

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

この けんじ
河野 憲二

研究分野：応用生物化学

キーワード：細胞応答・情報伝達

【研究の背景・目的】

小胞体は蛋白質の製造工場であり、新しく合成された蛋白質は小胞体シャペロンの助けをかり正しく折り畳まれ (folding)、蛋白質本来の働きをする。しかし細胞内外のストレスにより folding がうまくいかないと、構造異常蛋白質は小胞体内に留められることが知られており、この状態を小胞体ストレスと呼んでいる。ストレス下の細胞は小胞体ストレス応答経路を活性化し、異常タンパク質の再生や分解を行いストレスを解消する。この応答経路の最上流に IRE1 や ATF6 というセンサーがあり、IRE1α による *XBPI* mRNA の特殊スプライシングや、膜結合型転写因子 ATF6 の膜からの切断・解離という非常にユニークなシグナル伝達機構が重要な役割をしている。さらに小胞体ストレスが、神経変性疾患・糖尿病・大腸炎といった種々の疾患の要因になっていることが報告されている。しかしそれら詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。

本研究は、哺乳動物個体が何故多様化した小胞体ストレス応答経路を進化的に発達させてきたのか、また個体における生理的な小胞体ストレスとはどのようなものを糖尿病や寄生虫感染といった生理的なストレスに着目し、哺乳動物における小胞体ストレス応答の分子機構と生理的意義を明らかにする。

【研究の方法】

哺乳動物個体での生理的な小胞体ストレスとして、糖尿病や寄生虫感染に着目して解析する。これらの解析には、小胞体ストレスセンサー IRE1α, IRE1β, ATF6α などの各種遺伝子破壊マウスを用いる。糖尿病に関しては、マウス個体レベルでの血糖値、インスリン産生、グルコース負荷、などへの応答を測定する。寄生虫感染に関しては、寄生虫や IL33 投与時の小腸杯細胞の組織化学、電子顕微鏡等による形態変化の観察、また杯細胞のムチン (Muc2) 産生に関し、蛍光抗体・電気泳動法などの手法により解析する。これらの個体レベルの解析とあわせ、膵島 B 細胞や杯細胞を培養し、細胞レベルでインスリン産生やムチン産生が各種センサー欠失によりどのような影響を受けるのかを、生化学や遺伝子工学の手法を用いて分子レベルで詳細に解析する。さらに、ストレスセンサー IRE1α の標的分子である *XBPI* mRNA の特殊スプライシング機構に関しては、XBPI 蛋白質が小胞体膜への輸送配列と一時的翻訳停止配列の 2 つをもつことを明らかとしたので、その領域に結合する因子を単離し、質量分析の手法により同定、その役割を解析する。

【期待される成果と意義】

膵島では常に IRE1α-XBP1 経路が活性化していることから、膵島の正常な機能を保つために小胞体ストレス応答経路の活性化が重要と考えられる。そこで IRE1α や IRE1α/ATF6α の 2 重 KO マウスを製作し、ストレス応答経路が遮断されると糖尿病を起こすことを明らかにしたい。さらに IRE1α が膵島 β 細胞のインスリン産生のどのステップに関っているのかを明らかにし、小胞体ストレスと糖尿病との関連を解明したい。さらに、もう 1 つのセンサー IRE1β が寄生虫排除に重要な役割を果たしていることも示したい。これらの研究から、小胞体ストレス応答が生体防御という観点から見て、生理的に重要な役割を果たしていることを証明できると考えている。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., & Kohno, K. Function of IRE1alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 16657-16662 (2009)
- Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., & Kohno, K. Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of *XBPI* mRNA. *Science*, 331, 387-399 (2011)

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 28 年度
159,700 千円

【ホームページ等】

<http://bsw3.naist.jp/kouno/kouno.html>

【基盤研究(S)】

生物系(農学)



研究課題名 オンサイト・リアルタイム細胞分子計測による スピーキング・セル・アプローチ

愛媛大学・農学部・教授

のなみ ひろし
野並 浩

研究分野：農業工学

キーワード：細胞・組織、植物、質量分析

【研究の背景・目的】

平成23年3月末に、植物工場の国内研究拠点として、愛媛大学農学部で植物工場が完成し、トマト栽培が行われ始めた。東日本大震災に代表される大災害からの復興、異常気象からの食料不足、野菜不足の回避が求められ、食の安定供給、食の安全の観点から、日本学術会議からの提言で、植物工場の実用化の必要性が示されており、緊急の課題として平成20年度～平成24年度実施中の基盤研究(S)研究課題の最終年度前年度の応募をするに至った。

本研究は、植物工場においてプレッシャープローブで採集した細胞溶液を探針エレクトロスプレーイオン化により、直接、現場で質量分析を行うシステムを開発し、植物生理情報を制御要素として農業環境制御を行うスピーキング・セル・アプローチ(Speaking Cell Approach)(SCA)法を創成することを目的としている。栽培作物のリアルタイム質量分析を実行し、環境要素変化に伴う代謝変化を植物生理学(理学的)・栽培生理学(農学的)に基づき解明して、省エネを考慮したSCAを確立することによって、食料生産の効率を格段に増大させ、日本が迎える食料危機の回避、食の安全性の確保により、国民を守ることを目指す。

【研究の方法】

前処理なしでのサンプルの直接質量分析はこれまで行われておらず、探針エレクトロスプレーイオン化(PESI: Probe Electrospray Ionization)は混合物でのイオン化を可能にする。

植物細胞膨圧を計測しながら、細胞壁にナノメートルオーダーの探針を突き刺し、細胞壁の成分を取り出すことができると、細胞壁の中に分子が組み込まれる状態が解明でき、植物の生理情報を作物をほとんど破壊することなく検出することが可能となるはずである。

したがって、プレッシャープローブを用いての細胞膨圧、浸透圧、水ポテンシャル、細胞壁弾性率、水の細胞膜透過率、細胞体積などの物理的計測と、探針を用いてのナノメートルオーダーの細胞操作による化学分析を組み合わせることで、細胞分子情報を獲得し、SCA法によりエネルギー効率が高く、高品質の農産物を生産することができる新世代の植物工場を創成することを目的としている。

【期待される成果と意義】

植物生理情報の獲得を非破壊状態で行うことが可能になると、生理情報をフィードバックしながら、作物の栽培環境を制御することが植物工場で可能になる。作物が育つ上で転流が正常に行われる生理条件は作物が環境に順化しているかどうかで異なってくる。また、果実の肥大、糖集積も細胞内での浸透圧調節機能が働いているか、に依存する。栽培条件下で分子情報を直接獲得する手法の基礎技術と本研究は位置づけることができ、本研究の応用により植物工場での栽培の自動化、および省エネルギー化が達成する手法を確立することが期待できる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・野並 浩 (2001) 植物水分生理学. 養賢堂 pp.263
- ・Yu, Z., Chen, L.C., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Hiraoka, K. (2010) Real-time reaction monitoring by probe electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 24 (11), pp. 1507-1513.
- ・Yu, Z., Chen, L.C., Suzuki, H., Ariyada, O., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Hiraoka, K. (2009) Direct profiling of phytochemicals in tulip tissues and in vivo monitoring of the change of carbohydrate content in tulip bulbs by probe electrospray ionization mass spectrometry. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 20 (12), pp. 2304-2311.
- ・Yousef Gholipour, Hiroshi Nonami, and Rosa Erra-Balsells (2008) Application of pressure probe and UV-MALDI-TOF MS for direct analysis of plant underivatized carbohydrates in subpicoliter single-cell cytoplasm extract. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 19: 1841-1848.

【研究期間と研究経費】

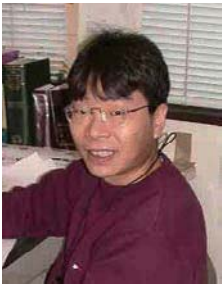
平成24年度～28年度
152,600千円

【ホームページ等】

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~pbb/nonami@agr.ehime-u.ac.jp>

【基盤研究(S)】

生物系(農学)



研究課題名 胆嚢・胆管の形態形成, 再生能と先天性疾患の分子機構の解明

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

かないよしあきら
金井 克晃

研究分野: 農学

キーワード: 発生, 病態

【研究の背景・目的】

脊椎動物間で保存された内胚葉形成の初期分化因子である SOX17 は、器官形成後期において、内胚葉由来の胆管前駆細胞(胆嚢・胆嚢管, 肝外胆管, 総胆管, 膵管の予定領域)に再発現し、成体まで一部の胆管細胞で維持されることが明らかとなっている。この SOX17 陽性の胆管(前駆)細胞は、膵島の内分泌細胞, 肝細胞への分化能を有する内胚葉幹細胞様の特性を維持しているだけでなく、胆管の形態形成, 管構造の分岐, 管壁の維持に関与し、そこでの SOX17 の発現低下により、先天性の胆管閉塞, 胆汁鬱滞, 新生子肝炎・胆管炎の原因となっていることをこれまで見出している。本研究課題は、胆管系の発生・形態形成, 隣接する肝, 膵組織の部分除去による再生過程での SOX17 陽性の胆管前駆細胞の動態・機能を明らかにすることにより、哺乳類の胆管系の構築の分子機序とその形成異常による肝・膵・胆管系の先天性疾患の分子基盤の解明を目的とする。

【研究の方法】

本研究課題は、平成 24 年度からの 5 年間に、*Sox17* 変異系統を用いた解析、*Sox17* 欠損 ES 細胞のキメラ解析と、前腸, 原始胆管を用いた器官培養系を利用して、①SOX17(EGFP)陽性の胆管前駆細胞による、肝・膵芽と連結する胆管の初期分化から形態形成, 機能性胆管の完成までの形成機序、②*Sox17*(B6)ハプロ不全による SOX17 陽性の胆管前駆細胞の異常と先天性の肝・膵・胆管疾患の発症機序、③SOX17 陽性胆管前駆細胞での大規模なトランスクリプトー

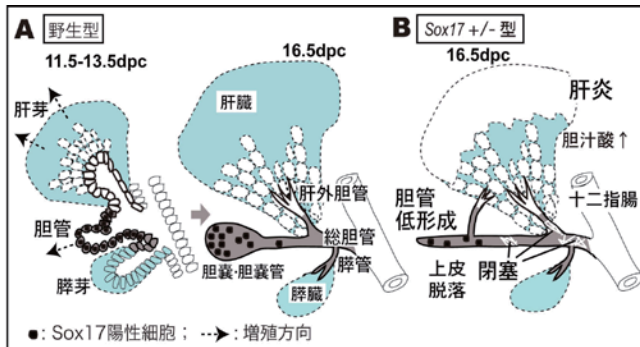


図 1. Sox17ハプロ不全による新生子肝炎

ム解析による SOX17 標的遺伝子群の同定、

④TRECK(Toxin Receptor Cell-Knockout)法を利用した胎生期の肝臓, 膵島細胞の部分除去による、SOX17 陽性の胆管前駆細胞の相補的な多分化能について解析する。これらの異なった角度からの Sox17

陽性の胆管前駆細胞の解析により、胆嚢・胆管の形態形成の分子機序と肝臓, 膵臓発生との関連性, 胆管系の分化・発達・再生過程における SOX17 を中心とした分子基盤の全体像を解明することを目標とする。

【期待される成果と意義】

本研究課題により、SOX17 陽性の胆管前駆細胞の特性の全貌解明が達成できれば、胆嚢・胆管の形態形成機序と先天性疾患の発症機序の解明に繋がり、その予防・出生前診断の技術の開発に大いに貢献できる。また、SOX17 陽性の胆管前駆細胞において、内胚葉幹細胞としての移植用組織の利用により、再生医療による胆肝膵の先天性疾患の克服に繋がる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Saund RS et al., Gut endoderm is involved in transfer of left right asymmetry from the node to the lateral plate mesoderm in the mouse embryo. *Development*, 139(13):2426-2435, 2012.
- Uemura M et al., Expression and function of mouse Sox17 gene in the specification of gallbladder/bile-duct progenitors during early foregut morphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 391(1):357-363, 2010.
- Hara K et al., Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis. *Dev Biol*. 330(2):427-439, 2009.
- Matsui T et al., Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. *J Cell Sci*. 119(17):3513-3526, 2006.
- Kanai-Azuma M et al., Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development*. 129(10):2367-2379, 2002.

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度-28 年度
157,200 千円

【ホームページ等】

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/kaibo/index.html>

【基盤研究(S)】

生物系（農学）



研究課題名 熱帯アジア・アフリカにおける生産生態資源管理モデルによる気候変動適応型農業の創出

京都大学・大学院地球環境学堂・教授

ふなかわ しんや
舟川 晋也

研究分野：土壌学、環境農学

キーワード：資源環境バランス、温暖化対応、熱帯農業、生産生態資源管理

【研究の背景・目的】

地球温暖化の進行がリアリティを増す中で、これをしてできる限り阻止しようとする試みとともに、この変動に適応した社会システムを構築する努力が求められている。なかでも安定した食糧供給の確保は重要課題であるが、経済的基盤が脆弱な熱帯アジア・アフリカの多くの国では、気候変動に対応した農業生産システムの将来像を描き切れていない。本研究は、熱帯農業における諸課題群のプロセス・レベルでの解析を、気候変動に対する技術的対応と持続性対応として構造化した上で GIS によって広域情報へと統合し、国・地域レベルでのフレキシブルな対策に生かそうとするものである。このような手法を通して、気候変動に適応した農業生産システムの構築を、社会・経済的基盤が脆弱な熱帯諸国でも可能なかたちで模索していきたいと考える。

【研究の方法】

本研究では、熱帯地域における気候変動適応型農業の創出をめざした圃場実験およびシミュレーション実験を行う。研究対象地として、タイ・東北部、インドネシア・西スマトラ州、タンザニア・モロゴロ州、カメルーン・東部州の4地域を予定しており、主要な研究課題は、1) 農耕地生態系における炭素・窒素・鉍質資源フラックスの同時管理、2) 土壌微生物の戦略的利用、3) 土壌鉍物性対応型侵食抑止技術の確立、4) 低肥料適応型品種の作出、5) 各課題から持続性対応要素を構造化した生産生態資源管理モデルの開発、6) 各課題から栽培技術的要素を構造化した可変的作付システムの開発から成る（図1）。図2に研究遂行のスケジュールを示す。

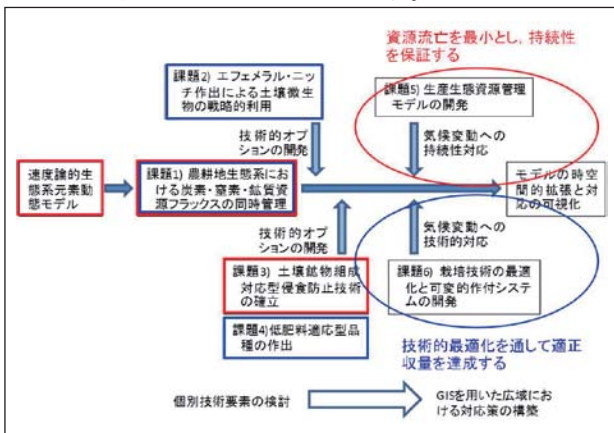


図1 本研究における課題群

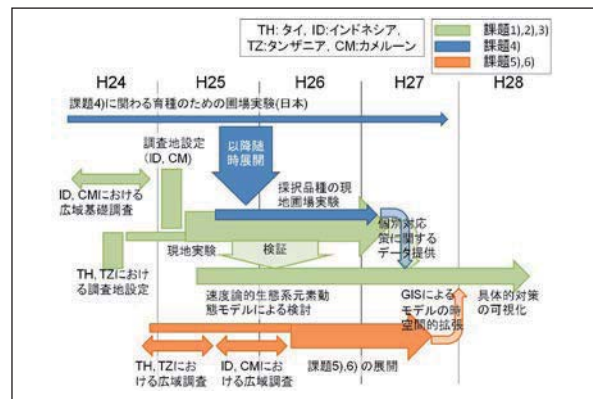


図2 年次計画

【期待される成果と意義】

- 異なる気候・地質条件下において、自然生態系を農耕地化したときの生態学的変容を、生態系元素動態モデルを用いて解明・検証できる。また各地の熱帯農業が内包する脆弱性を、地域間比較の視点から明示できる。
- 個々の課題（課題1）～4）に関するプロセス・レベルでの解析を、気候変動に対する技術的対応と持続性対応として構造化し一定の解答を与えると共に、これを広域情報へと統合し、国・地域レベルでのフレキシブルな対策に生かすことができる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Funakawa S, Watanabe T, Kadono A, Nakao A, Fujii K, Kosaki T 2011: 4. Soil resources and human adaptation in forest and agricultural ecosystems in humid Asia. *In* World Soil Resources and Food Security. Eds. R. Lal and B.A. Stewart. p.53-167, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York.
- Funakawa S, Watanabe T, Nakao A, Fujii K, Kosaki T 2011: 5. Pedogenetic acidification in upland soils under different bioclimatic conditions in humid Asia. 同上, p.169-269.

【研究期間と研究経費】

平成24年度～28年度
155,600千円

【ホームページ等】

<http://rafale.kais.kyoto-u.ac.jp>

【基盤研究(S)】

生物系（農学）



研究課題名 植物免疫システムの分子機構

独立行政法人理化学研究所・植物科学研究センター
グループディレクター

しらす けん
白須 賢

研究分野：農学

キーワード：分子間相互作用

【研究の背景・目的】

本研究では“植物が如何にして身を守っているか”そして“病原体が如何にしてそれを破るか”を分子生物学的に解明する。これまでに数多くの植物免疫に関連する遺伝子や病原体のエフェクターが単離され、動物の自然免疫との共通点や相違点が明らかになってきているが、タンパク質レベルでの分子メカニズム解明にはほど遠いのが現状である。これまでに本研究室で確立したゲノム、プロテオーム、ケミカルゲノミクス、そしてタンパク質構造解析基盤を駆使し、植物免疫および病原性に重要なタンパク質とその複合体の同定、さらにその構造解析を通して植物免疫システムの全容解明を目指す。特に、植物免疫阻害剤ターゲットの新規同定により植物免疫システムにおける新パラダイムの確立を目指す。

【研究の方法】

本研究室において同定された植物免疫阻害剤のターゲットや、免疫センサー複合体、シャペロン複合体（図1）、ユビキチンリガーゼ複合体を軸に、それらの結合タンパク質を高感度質量分析器等を用いて同定し、その複合体の構造機能解析を実施する。また変異体解析、オミックス解析やケミカルゲノミクス的手法を用いて、新規免疫関連因子を同定する。さらに病原体由来のエフェクタータンパク質の構造（図2）を決定しその免疫抑制機能を明らかにする。

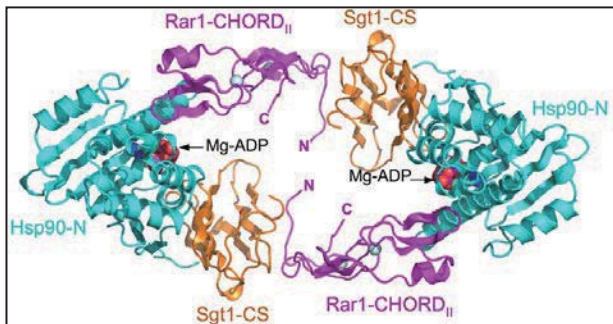


図1 免疫シャペロン複合体 (Mol Cell 2010)

【期待される成果と意義】

植物免疫の研究分野ではこれまでのクラシックな遺伝学的な研究から、ゲノムベースの網羅的/逆遺伝学的研究体制にシフトしてきている。しかしながら、タンパク質の構造をベースにその分子メカニズムを解明した例は未だに数少ない。さらに植物研究にお

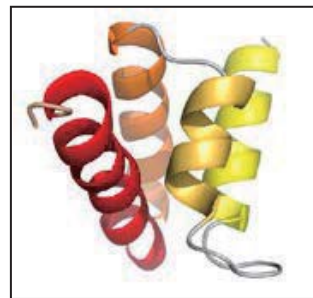


図2 ジャガイモ疫病エフェクターの構造 (PNAS 2011)

けるケミカルゲノミクスの成功例も数えるほどしかない。本研究では、申請者の研究室で確立したケミカルゲノミクス的手法を用いて、世界に先駆けて植物免疫阻害剤のターゲットとして同定されたタンパク質の機能解析をおこなう。また申請者の研究室で得られたノウハウを利用して、また

生化学的機能が不明でかつ重要な植物免疫関連タンパク質複合体の機能解析を推し進める。このように新規ツールを駆使して単離に成功したタンパク質因子を構造レベルまで解析することに特色がある。またレセプター複合体の同定および構造解析等から導き出される植物免疫の制御機構は、病原体による免疫抑制機構を利用した分子育種、および新作用の農薬の開発に大きく貢献すると予想される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., and Shirasu, K., Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, (2011) 108: 14682-14687.
- Zhang, M., Kadota, Y., Prodromou, C., Shirasu, K*, and Pearl, L.H*, Structural basis for assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD protein complexes: implications for chaperoning of NLR innate immunity receptors. *Mol Cell*, (2010) 39: 269-281. *co-corresponding authors

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 28 年度
124,300 千円

【ホームページ等】

<http://ksg.psc.riken.jp/index.ja.html>

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学I)



研究課題名 次世代芳香族科学に向けた新化学、新骨格、新理論、新機能、新技術の創出

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

うちやまさのぶ
内山 真伸

研究分野：有機合成化学、元素化学、理論化学

キーワード：芳香族性、分子変換、材料化学、分光学

【研究の背景・目的】

芳香族とは有機化学における重要な基本概念であり、剛直な平面構造・高い疎水性・置換基の方向規定・低い HOMO-LUMO ギャップなど特有の性質を有しており、医薬品、機能性材料などに広く用いられてきました。様々な特徴を持つ高機能芳香族化合物は、次世代のテクノロジー（記憶媒体、有機半導体、レーザープリンター、癌の光線力学療法、非線形光学物質、分子イメージングなど）には欠かせない材料と考えられています。

本研究課題では、次世代の芳香族科学を開拓することを目的とし、合成化学・元素科学・理論計算・分光学などを結集して、芳香族（芳香族、反芳香族、非芳香族）の原理に立ち返り、全く概念的に新しい金属含有芳香環の創製、極低 HOMO-LUMO ギャップ芳香環の設計・合成法などを切り拓きます。

【研究の方法】

本研究課題では、有機化学・物理化学・理論化学の観点から次世代の芳香環の化学を切り拓くべく以下の4つの課題を中心に取り組みます。

- ① 新しい芳香族反応の開拓（超強酸、超強塩基、触媒、環化反応の開発）
- ② 芳香族（ホモ/メビウス/非ベンゼン系芳香族、反芳香族、非芳香族）の起源にせまる
- ③ 金属含有（有機-無機ハイブリッド型）芳香環の創製
- ④ 太陽電池・分子イメージング・光化学療法を指向した低 HOMO-LUMO ギャップ近赤外芳香族分子の設計と合成

【期待される成果と意義】

本研究課題において期待される成果の一つに、新たな近赤外色素分子の創製が挙げられます。これまでの近赤外色素は、狭い HOMO-LUMO ギャップを実現するために、高い HOMO と低い LUMO が必要とされてきました。しかしながら、この高い HOMO が災いして化合物の安定性に欠ける（酸化に弱い）という欠点が物質としての限界をもたらしていました。本研究課題では、低い HOMO を有する安定な近赤外色素の開発に挑みます。この新たな近赤外色素は、癌の光化学療法や分子イメージングに大変期待されています。近赤外光は、体の奥底まで浸透して細胞の隅々まで届かせることができるからです。次世代有機太陽電池の世界でも、近赤外光を利活用できる分子の創製が求められています。これまで、近

赤外光を利活用できる安定な有機分子が存在しなかったからです。他にも、様々な物性が期待される次世代芳香族化合物の創製と機能創発を目指します。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. A. Muranaka, S. Yasuike, C-Y. Liu, J. Kurita, N. Kakusawa, T. Tsuchiya, M. Okuda, N. Kobayashi, Y. Matsumoto, K. Yoshida, D. Hashizume, M. Uchiyama, "Effect of Periodic Replacement of the Heteroatom on the Spectroscopic Properties of Indole and Benzofuran Derivatives", *J. Phys. Chem. A*, **2009**, *113*, 464-473.
2. A. Muranaka, M. Yonehara, M. Uchiyama, "Azulenocyanine: A New Family of Phthalocyanines with Intense Near-IR Absorption", *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 7844-7845.
3. Y. Yamamoto, Y. Hirata, M. Kodama, T. Yamaguchi, S. Matsukawa, K-Y Akiba, D. Hashizume, F. Iwasaki, A. Muranaka, M. Uchiyama, P. Chen, K. Kadish, N. Kobayashi, "Synthesis, Reactions, and Electronic Properties of 16 π -electron Octaisobutyltetraphenylporphyrin (OiBTTP)", *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 12627-12638.

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 28 年度
167,800 千円

【ホームページ等】

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kisoyuki/>

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学 I)



研究課題名 トランスポーターの関わる薬物動態の個人間変動・薬物間相互作用の定量的予測法の開発

独立行政法人理化学研究所・イノベーション推進センター
特別招聘研究員

すぎやまゆういち
杉山 雄一

研究分野：薬物動態・代謝学

キーワード：トランスポーター、薬物間相互作用、遺伝子多型、生理学的薬物速度論モデル

【研究の背景・目的】

トランスポーターは肝臓・腎臓・小腸・血液脳関門等に発現し、細胞内外への薬物や内在性物質の輸送を担っている。近年、トランスポーターの機能がヒトの遺伝子多型や肝・腎疾患の有無、薬物間相互作用によって変動し、医薬品の体内動態・有効性・安全性に影響を与える例が蓄積されつつある。本研究では、トランスポーターの関わる薬物動態の変動をメカニズムに基づいて定量的に予測する方法論を確立することを目的としている。

【研究の方法】

上記の目的を達成するために、期間内に次の研究を行う。①ヒトに投与可能であり、トランスポーター機能の評価に有用なプローブ薬および阻害薬を開発する。②トランスポーターの遺伝子多型による薬物動態の変動を解析し、定量的予測法を構築する(図1)。③肝・腎疾患時のトランスポーター機能の変動を解析し、定量的な予測を行うための方法論を構築する。④生理学的薬物速度論(PBPK)モデルを用いた薬物間相互作用の定量的予測法を確立する(図2)。過去の相互作用データを用いるが、一部臨床試験を追加する。⑤薬物の体内分布をリアルタイムかつ非侵襲的に測定可能なPET/SPECTプローブを開発し、これらを用いて標的部位における薬効・毒性をより高精度に予測する方法論を構築する。

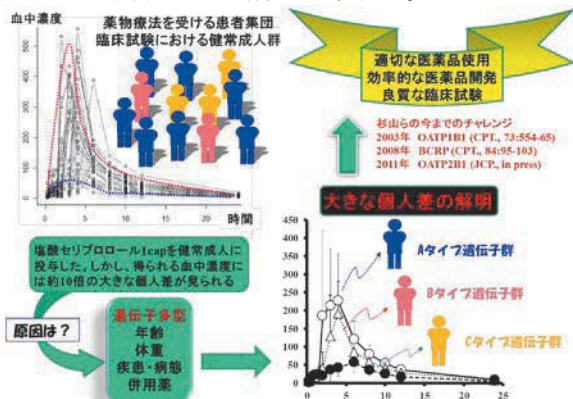


図1 薬物動態の個人間変動の解析・予測

【期待される成果と意義】

本研究により、ヒトにおける薬物トランスポーター機能の変動による薬物動態・薬効・毒性の変動を精度良く予測するための方法論が構築されることから、新薬開発のための臨床試験において薬物動態

ラメータの個人差の解釈や薬物間相互作用点の同定等に即利用可能な形で提案することにより、創薬産業への波及効果は非常に大きいと考えられる。また、臨床においては医薬品の有効性や安全性の向上にも大きく貢献できると考えられる。

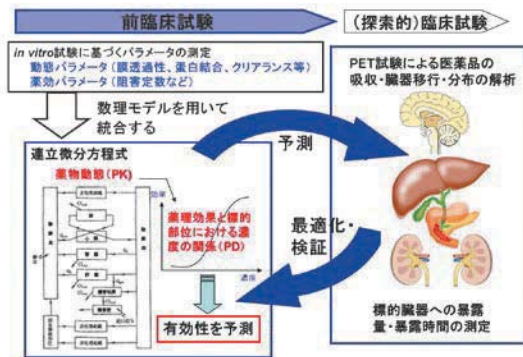


図2 PBPKモデリング・シミュレーションによる薬物動態・薬効の予測

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Ito S, Sugiyama Y et al. Competitive inhibition of the luminal efflux by multidrug and toxin extrusions, but not basolateral uptake by organic cation transporter 2, is the likely mechanism underlying the pharmacokinetic drug-drug interactions caused by cimetidine in the kidney. J Pharmacol Exp Ther 340:393-403, 2012.
- Maeda K, Sugiyama Y et al. Identification of the rate-determining process in the hepatic clearance of atorvastatin in a clinical cassette microdosing study. Clin Pharmacol Ther 90:575-581, 2011.
- Kusuhara H, Maeda K and Sugiyama Y. Impact of drug transporters in the pharmacological and adverse reactions of drugs. In New Horizons in Predictive Toxicology. Current Status and Application, ed. Alan G.E. Wilson, pp 563-588, RSC Publishing, 2012.

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 28 年度
148,500 千円

【ホームページ等】

<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/ippm/index.html>

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学 I)



研究課題名 生体膜リン脂質多様性の生物学

東京大学・大学院医学系研究科・教授

しみず たかお
清水 孝雄

研究分野: 医学

キーワード: リピドミクス、メタボロミクス、リン脂質代謝

【研究の背景・目的】

生体膜の主成分は、両親媒性〔水にも油にも溶ける性質〕のリン脂質である。これが脂質膜二重層を作り、外界から独立した環境-細胞を作り、生命誕生の基盤となった。

ところで、グリセロリン脂質は一位に飽和脂肪酸、二位に多価不飽和脂肪酸 (アラキドン酸など) が結合するという特徴的な非対称性構造を有している。さらに、それぞれに異なる脂肪酸から構成されグリセロリン脂質の種類は一千種にも及ぶと考えられている (多様性)。この様な非対称性と多様性はリン脂質が単なるバリアではなく、それ以上の様々な生物作用を持つことを示唆している。膜の多様性を作る機構は半世紀以上も前に提唱されていたが (Lands 回路)、その酵素実体や生物学的意義は不明だった。

代表者らや、別のグループの近年の研究で膜リン脂質多様性を作る一連の酵素群 (ホスホリパーゼ A2、アシル転位酵素ファミリー) が次々に同定された。

本研究では、発生工学や脂質解析技術 (液体クロマトグラフィー・質量分析型による網羅的脂質解析 = リピドミクス) の組み合わせにより、生体膜リン脂質の動態、及び多様性の生物学的意義を明らかにしようとするものである。

【研究の方法】

ホスホリパーゼ A2、及びアシル転位酵素を特定の細胞に過剰発現させる、あるいは逆に siRNA などで

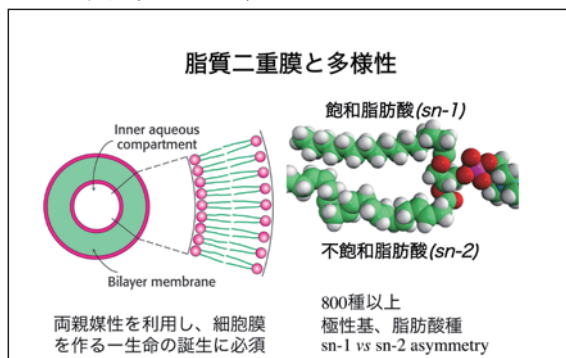


図 1

酵素を消失させた細胞を作り、この細胞の膜脂質組成の変化を解析すると共に、細胞特有の機能の変化を明らかにする。また、各種酵素遺伝子の in vitro の触媒的性質を明らかにすると同時に、酵素遺伝子欠損マウスを作製し、脂質の変化と共に、動物の行動や形態などの変化を解析する

脂質メディエーターや膜リン脂質の網羅的解析や定量に関しては、従来の蓄積したリピドミクス技術を一層発展させ、より感度良く、また、他種類の化合物を迅速に解析出来る技術を開発する。

【期待される成果と意義】

長年の謎であった、生体リン脂質膜の非対称性と多様性の形成機構、及び、その生物学的意義を明らかに出来る可能性が高い。また、膜リン脂質の組成に変化を与えることで細胞の増殖、遊走、脱顆粒などの様々な生物機能を修飾することが可能で、抗ガン剤、抗アレルギー剤などのスクリーニング系の開発から創薬に繋がる可能性もある。さらに、脂質の抽出、保存から高感度解析までのノウハウを蓄積し、機器開発などに結びつく可能性がある。これらの研究を通して、脂質生化学やリピドミクス研究者を育成することも重要な意義があると考えている。

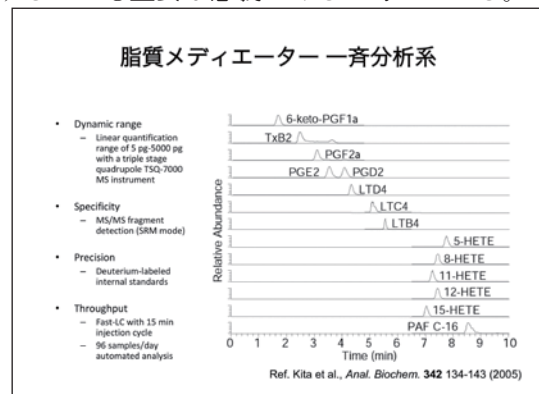


図 2

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Shimizu, T. (2009) Lipid mediators in health and disease. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 123-150.
- Jonson, F, Marcardi, DA, Kita, Y. et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 121, 1484-1496

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 28 年度

167,800 千円

【ホームページ等】

http://biochem2.umin.jp/index_j.html
tshimizu@m.u-tokyo.ac.jp

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学 I)



研究課題名 T 細胞活性化制御の時空間的構造的解析

独立行政法人理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター
グループディレクター

さいとう たかし
齊藤 隆

研究分野：免疫学

キーワード：リンパ球、抗原認識、獲得免疫

【研究の背景・目的】

T 細胞は免疫応答を中心的制御すると共に、一方過剰な活性化で自己免疫・アレルギー疾患を誘導する。そのため T 細胞の活性化とその制御機構の解明は、免疫応答の制御への橋頭堡であり、本研究は、T 細胞の抗原認識と活性化とその時空間的な制御の分子機構の全容を、イメージング・構造解析を中心に明らかにする。

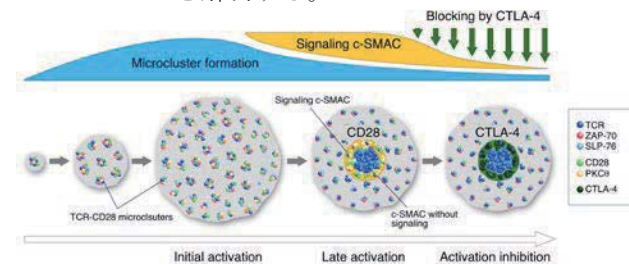
T 細胞の抗原認識から活性化に至る構造とマイクロクラスターを介するシグナル伝達系、それらを制御する種々のシステムを包括的に解明し、自己反応性 T 細胞の活性化と制御機構を明らかにすることで T 細胞活性化の全容を明らかにすることが目的である。そのために、①膜貫通領域を含む TCR 複合体の構造解析により抗原認識・活性化の分子基盤の解明、②我々の発見した活性化ユニット「TCR ミクロクラスター」による活性化シグナルの細胞内空間的制御、in vivo での解明、③細胞接着から活性化に至る「シグナル記憶」の誘導、④活性化シグナルによる細胞動態制御、⑤副刺激や自然免疫シグナルによる制御、⑥自己反応性 T 細胞の活性化制御の解析、を進める。これらによって、TCR ミクロクラスターを中心に T 細胞活性化の制御機構を包括的に解明し、調節への応用を目指す。

【研究の方法】

1. TCR-CD3 複合体と pMHC の全構造を明らかにし、T 細胞活性化の構造的基盤を確立する。細胞膜分子をリポソームの形で配列させて複合体として結晶化させる技術を開発しており(理研蛋白構造解析グループと共同研究)、この技術を TCR 複合体 ($\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$) に応用して、pMHC の認識活性化の際の TCR-CD3 複合体の構造解析を進める。
2. TCR ミクロクラスターによる細胞内空間的活性化制御のみならず、TCR の分解による制御も明らかにする。他のシグナル系による活性化制御のメカニズムを解析して、副刺激 ICOS, PD-1 などによる制御、自然免疫シグナル系による制御、更には細胞骨格系による制御、の機構を明らかにする。マイクロクラスターの解析は、抗原特異的 T 細胞に種々のシグナル分子の蛍光分子融合蛋白を発現させ、GPI アンカー型に変換した MHC/ICAM1/CD80 を発現させた人工脂質二重膜(プレイナー膜)に反応させて、time 0 からの分子動態を TIRF 顕微鏡にてイメージング解析する。TCR 動態は既に作製した CD3 ζ ノックインマウスを用いる。
3. これまで不可能であった細胞間相互作用および

in vivo でのマイクロクラスターの形成とシグナル系の解析を進め、接着から活性化への「シグナルメモリー」の蓄積を Ca シグナルから解析し、活性化シグナルによる細胞動態制御の実態を解明する。

4. T 細胞が樹状細胞との相互作用によって、自己抗原を認識して誘導される半活性化「プレクラスター」のような状態を解析し、これを抑制する活性化制御のメカニズムを解明する。



【期待される成果と意義】

これら特色ある研究のなかからの成果で、T 細胞が日常的にどのようにプレ活性化されており、生体内のどこでどのようにフル活性化されるかが解明される。T 細胞活性化の時空間的シグナル伝達系の解明ができ、単にキナーゼ阻害剤のようなものでなく、時空間軸をとり入れた新しい観点からの免疫阻害剤の開発に繋がると思われる。また、自己反応性 T 細胞の活性化の解明は、自己免疫疾患やアレルギー疾患への制御へと繋がると思われる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・Yokosuka, T., Kobayashi, W., Sakata-Sogawa, K., Saito, T.: Spatiotemporal regulation of T cell costimulation by TCR-CD28 microclusters through protein kinase C θ translocation. *Immunity*. 29: 589-601, 2008.
- ・Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Saito, T.: Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse and T cell activation. *Immunity*. 34:919-931, 2011.

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 28 年度

167,700 千円

【ホームページ等】

<http://www.rcai.riken.go.jp/group/signaling/index.html>

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学Ⅱ)



研究課題名 炎症からの消化器発癌におけるゲノム・エピゲノム異常の統合的解析と生成機構の解明

京都大学・大学院医学研究科・教授 ちば つとむ
千葉 勉

研究分野：医歯薬学、内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：上部消化管学(食道、胃、十二指腸)、下部消化管学(小腸、大腸)、肝臓学

【研究の背景・目的】

消化器癌はわが国の癌死の最も多くをしめるが、その発症の背景には感染症や炎症の持続が重要な役割をはたしている。一方、発癌過程では様々な癌関連遺伝子に変異や欠失などのゲノム異常が生成・蓄積する。興味深いことに、ヒト慢性胃炎やウイルス肝炎などの慢性炎症組織においては、発癌前の早期から発癌関連遺伝子に変異がみられることが明らかになりつつあり、感染・炎症からの発癌過程における遺伝子異常の蓄積の機序が注目されている。

申請者らは、遺伝子編集酵素 Activation induced cytidine deaminase (AID)がヒト DNA 配列に遺伝子変異や組み換えを導入する作用をもつことに着目し研究を進めた結果、(1)マウスの消化器系臓器に AID が持続発現すると発癌を生じること、(2)ヒト臨床検体では、胃炎、肝炎、大腸炎、胆管炎、食道炎など慢性炎症を伴った上皮細胞では AID 発現を認めるとともに、*p53* などの発癌関連遺伝子に変異が蓄積していること、(3)炎症性サイトカイン刺激やピロリ菌、肝炎ウイルス感染などが誘因となり、消化器系上皮細胞に AID 発現が誘導されること、を明らかにしてきた。以上の成績は、消化器系臓器の炎症を背景とした発癌過程において、異所性に発現した AID がゲノム異常を導入して発癌に関与している可能性を強く示唆するものである。しかしながら炎症からの発癌過程で生じるゲノム、エピゲノム異常の全体像やその分子機構については十分明らかではない。本研究では、(1)炎症を背景とした消化器癌の発症過程において多段階的に生じる、ゲノム/エピゲノム異常を経時的かつ統合的に解析し、(2)ゲノム/エピゲノム異常生成の分子機序を AID に焦点を当てて明らかにすることを目的とする。

【研究の方法】

本研究では、AID を持続発現させたマウスの消化器系組織、慢性肝炎・胃炎・大腸炎などのヒト臨床検体組織、を解析対象とし、次世代シーケンサー技術を駆使することにより、AID の作用により生じるゲノム・エピゲノム異常の全体像の解明を目指す。ゲノム異常の解析には、ヒト・マウスの全 exon 領域をカバーする whole exome キャプチャーシステムを用いて、全エクソン配列中のゲノム変化を次世代シーケンサーにより同定・解析する。エピゲノム解析は、解析対象検体から全 DNA を抽出し、メチル化結合蛋白を用いてメチル化されている DNA 断片を結合させることにより、DNA メチル化を受けている遺

伝子領域を特異的に抽出する。引き続き、次世代シーケンサーを用いて包括的に塩基配列変化を解析しコントロールサンプルと比較することにより、AID の持続発現により生じたエピゲノム変化の全体像を検討する。また、消化器系幹・前駆細胞をラベルしたモデルマウスに慢性炎症刺激を加え、経時的に各臓器の幹細胞マーカー陽性細胞を分離・精製し、組織幹細胞に誘導された AID 発現量変化と、幹・前駆細胞に生成・蓄積したゲノム変化の全体像を包括的にとらえることにより、炎症発癌過程において組織幹細胞にもたらされる遺伝子変化と、組織幹細胞が癌細胞の発生源として果たす役割を検証する。

【期待される成果と意義】

発癌過程では多くの遺伝子異常が生成・蓄積するが、これまでは癌の遺伝子変化は外的要因 (mutagen) で生じると考えられてきた。しかしながら、生体内に存在する内因性 mutagen である AID の作用に着目することにより、感染や炎症からの発癌過程におけるゲノム・エピゲノム異常の生成の分子機構の一端が解明できることが期待される。また、次世代シーケンサー技術を駆使することにより、胃癌、肝癌、大腸癌といった本邦できわめて頻度の高い炎症発癌におけるゲノム・エピゲノム異常生成の相互関係の全体像を統合的に理解することを目指す。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Takai A, Marusawa H, Watanabe T, Chiba T, et al.: Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer development despite persistent colonic inflammation. *Oncogene* 31:1733-1742:2012.
- Matsumoto Y, Marusawa H, Chiba T, et al.: *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nature Medicine* 13:470-476:2007.

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 26 年度
132,100 千円

【ホームページ等】

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1304/

【基盤研究(S)】

生物系（医歯薬学Ⅱ）



研究課題名 多発性硬化症と腸内細菌・腸管免疫の関連に関する研究

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所・部長

やまむら たかし
山村 隆

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経病態免疫学

【研究の背景・目的】

近年我が国では難治性神経疾患である多発性硬化症（MS）患者数の顕著な増加傾向を認めており、その原因究明は急務である。腸内常在細菌と免疫系の密接な相互関係が明らかになってきたが、我々は日本における生活習慣の欧米化が腸内細菌叢の変化、ひいては免疫系の変調につながり、その結果 MS が増加している可能性を提唱して来た。

この仮説の妥当性を示す証拠として、我々は腸内細菌叢を抗生物質で偏倚させることによって、自己反応性 Th17 細胞の活性が抑制され、MS の動物モデルが軽症化することを 2008 年に報告した (Yokote et al. 2008)。海外でも我々のアイデアを追試・確認する研究が相次ぎ、MS と腸内細菌叢の関連への関心が高まっている。

本研究の目的は、網羅的・定量的なゲノム解析を導入することによって MS 患者の常在細菌叢偏倚の実態を明らかにし、MS の動物モデルで得られた腸内細菌と自己免疫病連関に関する知見を、世界ではじめて MS 患者で証明することにある。

【研究の方法】

本研究では MS 患者の常在菌異常と免疫機能異常を対応させ、特定の菌種の異常が免疫病態を修飾するメカニズムに迫る。常在菌の多くは培養が困難で

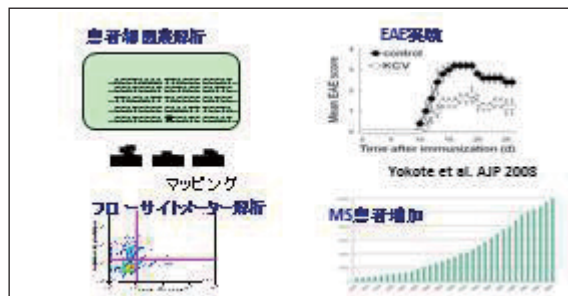


図1 研究の方法論

あり DNA 配列が未知のものが多い。本研究では MS 患者および対照疾患、健康者の腸管常在細菌叢を 16S リボソーム遺伝子 (16S) およびメタゲノム情報から解析する。これらの配列情報は次世代シーケンサーを用いて網羅的に取得する。平行して患者血液リンパ球サブセットの偏倚をフローサイトメーター解析によって明らかにし、ヒト免疫系に決定的な影響を与える菌種の同定を目指す。さらに当該菌種を無菌マウスに接種してノトビオートマウスを作製し、MS の動物モデル EAE を誘導する実験や、当該細菌

の免疫系修飾能を明らかにする試験管内実験を実施する。

解析に用いる試料（血液、糞便、唾液）は国立精神・神経医療研究センター病院通院中の患者より、文書による説明と同意を確認した上で採取する。

【期待される成果と意義】

メタゲノム解析などの最新技術を導入することによって、MS の発症を促進または抑制する既知または未知の腸内細菌を、世界に先駆けて同定できる可能性がある。得られた知見をもとに、特定の腸内細菌を標的とする治療など、MS や関連する疾患（自己免疫疾患など）の新たな予防・治療法の開発につながる可能性がある。我々によって提唱された学説

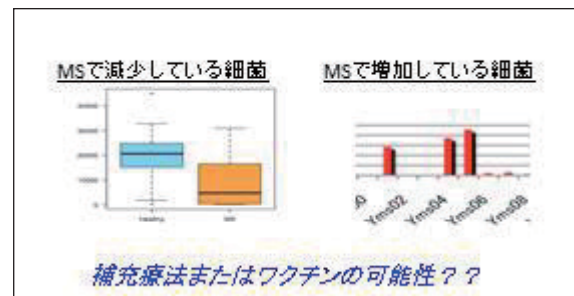


図2 腸内細菌偏倚

(MS の腸内細菌原因仮説) をめぐる世界的な競争の中で、日本人試料を使って研究を進めることは意義が深く、国際的にも重要な研究である。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Yokote H et al. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol* 173:1714-1723, 2008
- Miyazaki Y et al. Mucosal-associated invariant T cells regulate T helper type 1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23: 332-337, 2011

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度－27 年度
112,400 千円

【ホームページ等】

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_men/index.htm

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学Ⅱ)



研究課題名 メタボロミクスによる膵β細胞機能制御機構の解明とその臨床応用

神戸大学・大学院医学研究科・教授 **せい の すすむ**
清野 進

研究分野：糖尿病

キーワード：インスリン分泌、メタボローム

【研究の背景・目的】

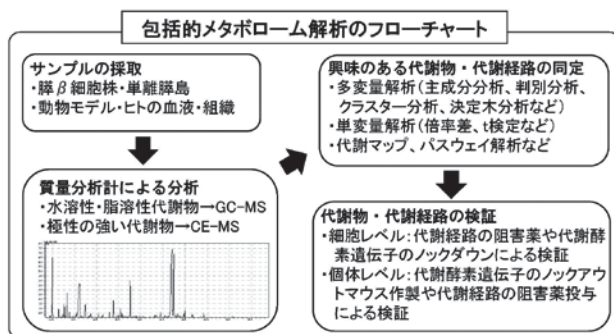
膵β細胞の糖・脂質代謝はβ細胞機能に極めて重要な役割を担っている。しかし、①インスリンの分泌制御、②膵β細胞の分化・再生、③糖尿病の発症や病態において、どのような糖・脂質代謝シグナルがそれらのメカニズムの鍵となっているかは殆ど不明である。本研究では下記の3つの課題を設定し、特性の異なる膵β細胞株、膵島、病態モデル動物やヒトのサンプルを用いて包括的メタボローム解析を行い、上記のメカニズムの鍵となる代謝シグナルを解明する。

1. インスリン分泌における糖・脂質代謝シグナルの同定とその役割の解明
2. 膵β細胞分化・再生における糖・脂質代謝シグナルの同定とその役割の解明
3. 糖・脂質代謝シグナルに由来する新たな糖尿病の病態マーカーと治療標的の同定

【研究の方法】

1. インスリン分泌における糖・脂質代謝シグナルの同定とその役割の解明

種々の条件で刺激した膵β細胞株における細胞内代謝物の包括的メタボローム解析を行い、新たな代謝シグナルを同定する。さらにシグナル間の相互作用を明らかにし、インスリン分泌における役割を細胞レベル、膵島レベル、個体レベルで解明する。



2. 膵β細胞分化・再生における糖・脂質代謝シグナルの同定とその役割の解明

任意のタイミングで膵β細胞を選択的に標識できるマウスを利用して、正常分化の過程や、病的状態における膵β細胞の包括的メタボローム解析を行い、分化・再生における糖・脂質代謝の役割を解明する。

3. 糖・脂質代謝シグナルに由来する新たな糖尿病の病態マーカーと治療標的の同定

2型糖尿病の動物モデルおよび正常、境界型、糖尿病のヒトを対象とした包括的メタボローム解析から糖・脂質代謝シグナルに由来する新たな糖尿病の病態マーカーおよび治療標的を同定する。

【期待される成果と意義】

課題1では、インスリン分泌に不可欠な新規代謝シグナルの発見だけでなく、これらのシグナルの相互作用の役割が明らかになることが予想され、新しい視点からインスリン分泌制御機構が解明されると同時に新規創薬ターゲットが同定されることが期待される。課題2では、細胞代謝というこれまで全く考慮されていない点から膵β細胞の分化・再生を理解できる可能性があり、β細胞の質的改善のみならず、β細胞そのものを増やすという糖尿病の新規な再生治療に結びつくことが期待される。課題3では、血糖やHbA1c以外の全く新しい糖尿病バイオマーカーが同定される可能性があり、糖尿病の発症予防や病態診断のブレイクスルーとなるだけでなく、糖尿病の新たな治療標的となるものと期待される。いずれの成果についても、生物学的な意義があるのはもちろんのこと、臨床応用面でも有用であり、医学的意義も極めて大きい。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest* 121:2118-2125, 2011
- ・ Zhang CL, Katoh M, Shibasaki T, Minami K, Sunaga Y, Takahashi H, Yokoi N, Iwasaki M, Miki T, Seino S. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science* 325:607-610, 2009

【研究期間と研究経費】

平成24年度－28年度
167,600千円

【ホームページ等】

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/phys1/seino@med.kobe-u.ac.jp>

【基盤研究(S)】

生物系（医歯薬学Ⅱ）



研究課題名 医薬品の体内動態の種差：PET マイクロドーズ臨床試験による研究

大阪大学・大学院医学系研究科・教授 はたざわ じゅん
畑澤 順

研究分野：放射線科学、核医学

キーワード：PET、薬物動態、種差

【研究の背景・目的】

疾患の治療に医薬品は欠かせない。現在処方されている医薬品は、動物での薬物動態、すなわち組織への吸収 (Absorption)、分布 (Distribution)、代謝 (Metabolism)、排泄 (Excretion) の情報を元に開発されてきた。そのため、動物では有効であったがヒトでは十分な効果がない、動物ではみられなかった副作用が発現する、などのために治験段階で開発を中止せざるを得ないことがある。“薬物動態の種差”は医薬品開発の効率、安全性の上で大きな障害となってきた。これを克服するために、創薬過程の早期にヒトでの ADME 解析を行い、医薬品開発の迅速化、効率化が図られようとしている (マイクロドーズ試験)。

本研究は“動物レベルでの ADME がどの程度ヒトの ADME に近似しているか”を評価する。薬物動態の種差を明らかにし、創薬の早期過程におけるマイクロドーズ臨床試験の必要性を検証する。

【研究の方法】

小動物およびヒトの医薬品動態は Positron Emission Tomography (PET) を用いて定量的に測定する。予備的な研究で、アルツハイマー病治療薬塩酸ドネペジルの体内動態を解析した (図 1)。

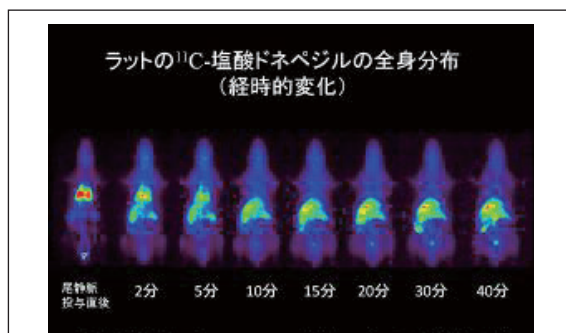


図 1 ラット

ラットでは、静注直後から肝臓への集積が著明で標的臓器への集積は投与量の約 2% であった。投与後 30 分には腸管および尿路への排泄が認められる。

一方、健常人では肝臓以外に脾臓および心筋への高集積が見られる (図 2)。標的臓器への集積はラットと同様投与量の 2% であった。

予備的研究からは、1) すでに有用性が確立された医薬品であっても、標的臓器への取り込みは低い、2) 投与後速やかに胆道系および尿路系から排泄される、3) 標的臓器外への集積には種差がある。

本研究は予備的研究を発展させ、すでに有用性が確立された医薬品について体内動態の種差間の近似

もしくは解離を、PET を用いて検証する。

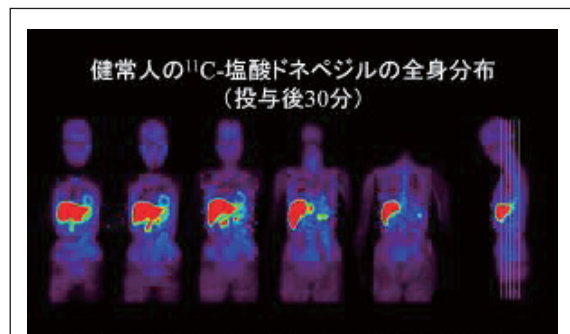


図 2 ヒト

【期待される成果と意義】

医薬品開発における体内動態の種差を明示し、マイクロドーズ臨床試験の有用性を科学的に検証する。さらに、“ヒトで有用な医薬品”の体内動態の必要条件、“ヒトで有用な医薬品”が動物実験段階で備えているべき必要条件を明確にする。

アカデミアの立場から社会に情報発信し、学際的研究成果を医薬品開発の迅速化、効率化、安全化へと還元する。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

・ Hasegawa Y, Kanai Y, Hasegawa S, Okamoto T, Matsui T, Shimosegawa E, Kurachi Y, Hatazawa J. Evaluation of brain and whole-body pharmacokinetics of ^{11}C -labeled diphenylhydantoin in rats by means of planar positron imaging system. *Ann Nucl Med.* 2008 May;22(4):301-7.

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度 - 28 年度
121,200 千円

【ホームページ等】

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/tracer/index-jp.htm>
hatazawa@tracer.med.osaka-u.ac.jp

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学Ⅱ)



研究課題名 骨・腸・代謝関連シグナルの解明と性差の明確化

九州大学・大学院歯学研究院・教授 ひらた まさと
平田 雅人

研究分野：歯科基礎医学、生化学、薬理学

キーワード：オステオカルシン、インスリン、インクレチン、エネルギー代謝、骨

【研究の背景・目的】

肥満とそれに起因するメタボリックシンドロームは、QOLを著しく低下させるとともに、生命の危機にも繋がる合併症を併発する。代謝の活性化機構の解明は、メタボリックシンドロームの予防や治療に関する新しい概念を生み出す可能性を秘めている。

最近、骨の状態(有り様)が膵臓の働きや代謝の活性化に関わる事が報告された。膵臓に加えて、小腸粘膜上皮細胞も関わっていると想定し、これを「骨・腸・代謝関連(Bone-Gut-Metabolism)」(BGM Flow)と名付けた。我々が同定した分子 PRIP がここに深く関わるタンパク質である可能性がある。本研究ではこの関連に関わる分子群の役割の解明とモデル化する PRIP の役割の解明を目指す。

BGM Flow を解析することによって、代謝の活性化に関わる骨の役割と PRIP の関わりに関して学術的成果を得る。加えてこれらの分子群の働きには雌雄差が大きいことが想定されるので雌雄差の原因を探り、性差を区別しながら解析する。

【研究の方法】

雌雄両性を比較しながら、野生型・PRIP 遺伝子欠損マウス、加えて必要に応じて種々の代謝関連遺伝子欠損マウスと PRIP 遺伝子欠損マウスとの mating によって得たマウスの *in vivo* 解析とそれらのマウスから得た細胞・組織の *in vitro* 解析、加えてクローン化細胞(骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、

具体的には、

- ① Bone → Gut: オステオカルシンがインクレチンを分泌するか/その際のインスリン分泌におけるインクレチンの関わり/オステオカルシンの投与方法による相違/オステオカルシンの部分ペプチドの効果/PRIP の有無による相違/雌雄の相違/
- ② Bone → Gut → Metabolism: インスリンシグナリングにおける PRIP の関与/雌雄の相違/オステオカルシンやインクレチンの代謝器官への直接作用/
- ③ Gut → Bone: インスリンやインクレチンの骨芽細胞、破骨細胞分化への影響/骨細胞のカップリング/PRIP の有無による相違/雌雄差/

【期待される成果と意義】

本研究は、PRIP の機能解明研究から得た研究成果を進展させ、インクレチン効果を加えた「骨・腸・代謝関連(BGM)」について、雌雄差を考慮しながら解明するものである。その成果は肥満・エネルギー代謝研究に新しい展開を与え、両性に共通する、あるいはそれぞれに有効な肥満/メタボリックシンドロームの予防や治療に新しい戦略をもたらす可能性を有している。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Tsutsumi, K., Matsuda, M., Kotani, M., Mizokami, A., Murakami, A., Takahashi, I., Terada, Y., Kanematsu, T., Fukami, K., Takenawa, T., Jimi, E. and Hirata, M.: Involvement of PRIP, phospholipase C-related but catalytically inactive protein, in bone formation. *J. Biol. Chem.* 286:31032-31042, 2011.
- ・ Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Fukuda, M. and Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) modulates synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) phosphorylation and exocytosis. *J. Biol. Chem.* 287:10565-10578, 2012.

【研究期間と研究経費】

平成 24 年度-28 年度
167,700 千円

【ホームページ等】

<http://www.mcb.dent.kyushu-u.ac.jp/>
hirata1@dent.kyushu-u.ac.jp

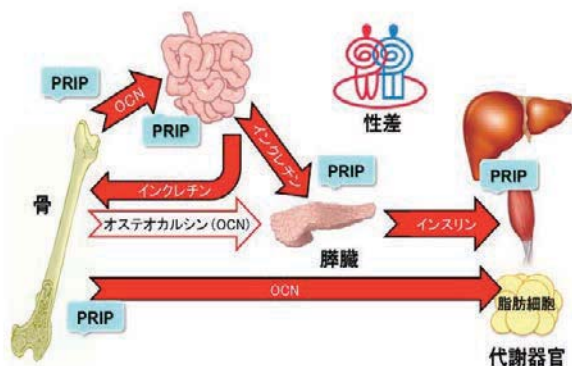


図1: BGM Flow「Bone(骨)-Gut(腸)-Metabolism(代謝)」

膵β細胞、腸上皮細胞)への対象遺伝子の発現やサイレンシング実験などを組み合わせて、「骨の有り様→インスリンの分泌→エネルギー代謝→骨の有り様」の関連について実験を進める(図1参照)。

