

A01 班 公募研究・研究代表者 宮崎雅雄 (岩手大学・農学部・准教授)

「なぜネコはマタタビに反応するのか？ マタタビ活性物質の分子標的同定と生理意義解明」

ネコが落葉ツル性植物のマタタビをみつけると、なめる、かむ、よだれを垂らす、頭をこすり付ける、体をくねらせ転がる(通称マタタビ踊り)、泥酔するなどの反応を提示する。このマタタビ反応は、ライオンやトラ、ヒョウなど他のネコ科動物にも見られるが、ネコ科動物以外の食肉目の動物には見られない。これまで多くの化学者がネコにマタタビ反応を誘起する化合物の同定に取り組み、1950年代に大阪市立大学の目博士らによりマタタビからイリドミルメシンやアクチニジンなどが同定された。マタタビと同じ反応はハーブの一種であるキャットニップを嗅いだネコにも同様の反応が認められ、ネペタラクトンが活性物質であると分かっている。

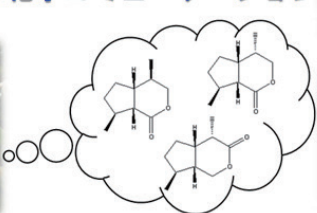
マタタビやキャットニップからネコに活性を示す化合物が発見され60年以上が経過したが、これらの活性物質がなぜネコ科動物にだけ作用して特有の反応を誘起するか、またマタタビ反応の生物学的意義など全く分かっていない。また活性物質が一般的なにおい物質を感知する主嗅覚系とフェロモンなどを受容する鋤鼻系のどちらで受容されるか、ネコ科動物にのみマタタビ反応を起こすための特異的な受容体や神経回路が存在するか、なども分かっていない。

ネコのマタタビ反応には個体差があり、マタタビに全く反応しないネコがいることも知られている。マタタビ反応の個体差は常染色体優性遺伝が関与し、片親だけがキャットニップに反応する場合、子がキャットニップに反応する確率は50%、両親ともキャットニップに反応する場合に子がキャットニップに反応する確率は75%と報告されている。しかしマタタビやキャットニップに対する反応の個体差に嗅覚受容体の遺伝子多型が影響しているか、嗅覚受容体以外の遺伝子が影響しているかなどは全く分かっていない。

このように多くの謎が残されているにも関わらずネコのマタタビ反応に関する研究がこれまで進展してこなかった背景には、ネコの行動を化学的視点から研究しているものが殆どいなかったこと、活性物質の標品が市販されておらず活性物質を使った実験が難しかったことが原因にある。そこで本研究では、マタタビ活性物質の嗅覚受容体同定、マタタビ反応の個体差が生じる原因遺伝子の特定、マタタビ反応を誘起する神経回路と生物学的意義を解明し、ネコのマタタビ反応をモデルに動物・植物間の化学コミュニケーションの理解を深める。

本研究ではまず過去の研究を見直すことから始め、アクチニジンはマタタビに含まれるが活性が弱いこと、マタタビにイリドミルメシンが含まれずその異性体のイソイリドミルメシンのみが含まれていること、マタタビにこれまで未同定であった新たな活性物質が含まれることを明らかにした(論文準備中)。またネコの嗅覚系でケミカルシグナルの受容に関わる新規受容体の同定(1)、ネコの嗅覚識別能力などについても明らかにした(2)。これまでにネコのマタタビ反応に情動系が関与している可能性も見出すことができたので、今後はこれに関連する血中ホルモンの動態解析、および次世代シーケンサーでマタタビ反応するネコとしないネコの全ゲノムを解読し、マタタビ反応の有無と相関する遺伝子多型を明らかにする予定である。

動物植物間の化学コミュニケーション



反応するネコとしないネコがいるのはなぜ？

反応中のネコの生理状態は？

なぜマタタビに依存性が無いのか？

なぜネコ科動物だけがマタタビに反応するのか？

マタタビ反応にどんな意味があるか？

ネコのマタタビ反応に関する様々な謎？

1. Suzuki, H., Nishida, H., Iwata, T., Yoda, R., Kondo, H., Iwata, T., Nakayama, K., Enomoto, T., Wu, J., Moriyama, K., Miyazaki, M., Wakabayashi, Y., Kishida, T., Okabe, M., Suzuki, Y., Ito, T., Hirota, J., and Nikaido, M. A single pheromone receptor gene conserved across 400 million years of vertebrate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 35, 2928–2939, 2018.
2. Suzuki, C., Miyazaki, T., Yamashita, T., and Miyazaki, M. GC×GC-MS-based volatile profiling of domestic cat urine and the olfactory abilities of cats to discriminate temporal changes and individual differences in urine. *J. Chem. Ecol.*, In press, 2019.

A01 班 公募研究・研究代表者 坪井 貴司 (東京大学・大学院総合文化研究科・教授)

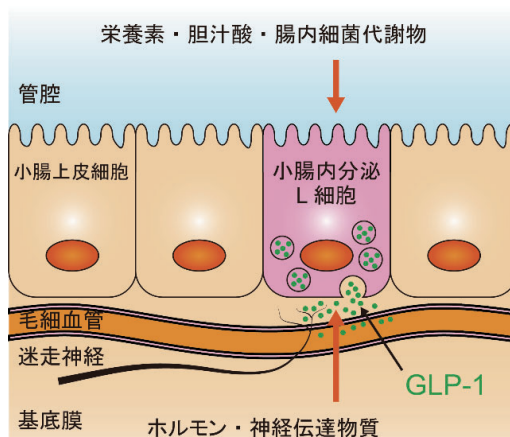
「腸内細菌叢による小腸内分泌細胞の分泌機能制御」

哺乳類宿主とその腸内細菌叢との共生関係が、宿主のエネルギー摂取や認知機能などに関与する。例えば、糖尿病や認知症、自閉症などは、腸内細菌叢の機能異常によって発症する例が報告されている。さらに、肥満マウスと正常マウスとを比較すると腸内細菌叢の組成や代謝産物が異なっており、肥満マウスでは特定の腸内細菌と代謝産物が増加している。しかし、腸内細菌代謝産物が、どのようなメカニズムで糖尿病や認知症、自閉症などの疾患発症に関与しているのかは不明である。

腸内細菌叢やその代謝産物から大きな影響を受けるのが、胃や小腸をはじめとする消化管である。消化管の機能は、栄養素の吸収や粘膜免疫など多岐にわたるが、中でも我々が注目しているのが、消化管ホルモンを分泌する消化管内分泌細胞である。消化管ホルモンには、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP)、コレシストキニン (CCK)、セロトニン、グレリンなどがあり、血糖値調節をはじめとする代謝恒常性への関与に加え、摂食行動や記憶などの認知機能にも影響する。例えば、小腸に分布する小腸内分泌 L 細胞 (以下 L 細胞) は、GLP-1 を分泌し、GLP-1 は膵 β 細胞へ作用してグルコース依存性に起こるインスリン分泌を促進するだけでなく、迷走神経にも作用して食欲を抑制する。

そこで我々は、糖尿病患者において血中濃度が上昇するリゾホスファチジルイノシトール (lysophosphatidylinositol: LPI) と GLP-1 分泌の関係を解析した。LPI によりイオンチャネルの一種 transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) の細胞膜への移行が促進され、その結果細胞内に大量の Ca^{2+} が流入することによって GLP-1 分泌量が増加することが分かった¹⁾。一方、腸内細菌によって大豆イソフラボンから産生される S-エクオールは、GLP-1 の分泌を抑制することが分かった²⁾。

今後は、食物と同様に消化管内に存在する腸内細菌代謝産物のうち、どのような物質が L 細胞からの GLP-1 分泌を引き起こすのか、そして、腸内細菌代謝産物が GLP-1 分泌を引き起こすとすればどのような細胞内シグナル伝達を介して起こるのかについて、新たに開発した蛍光センサータンパク質³⁾を用いて研究を進めている。



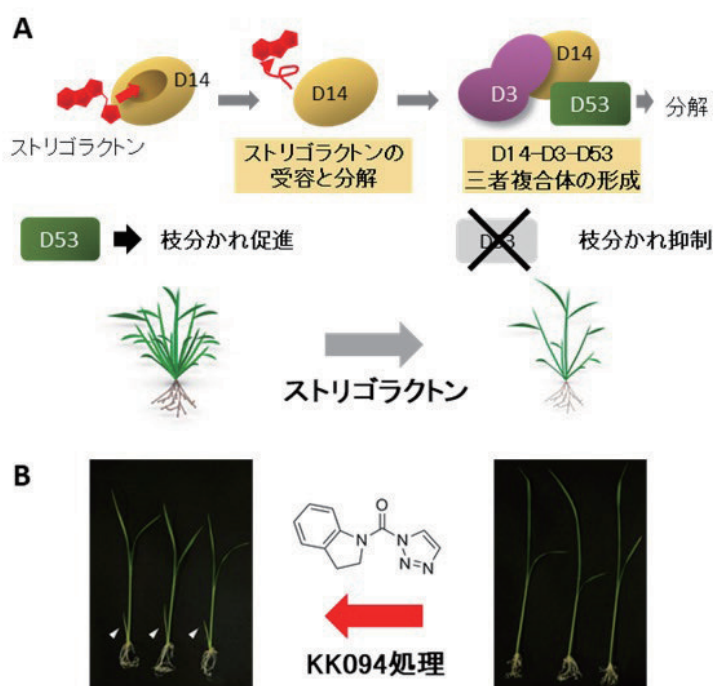
1. Harada K, Kitaguchi T, Kamiya T, Aung KH, Nakamura K, Ohta K, Tsuboi T. Lysophosphatidylinositol-induced activation of the cation channel TRPV2 triggers glucagon-like peptide-1 secretion in enteroendocrine L cells. *J. Biol. Chem.* 292, 10855-10864, 2017.
2. Harada K, Sada S, Sakaguchi H, Takizawa M, Ishida R, Tsuboi T. Bacterial metabolite S-equol modulates glucagon-like peptide-1 secretion from enteroendocrine L cell line GLUTag cells via actin polymerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 501, 1009-1015, 2018.
3. Mita M, Ito M, Harada K, Sugawara I, Ueda H, Tsuboi T, Kitaguchi T. Green fluorescent protein-based glucose indicators report glucose dynamics in living cells. *Anal. Chem.* 91, 4821-4830, 2019.

A01 班 公募研究・研究代表者 中村英光 (東京大学・農学生命科学研究科・助教)
 「ストリゴラクトン機能制御剤の選択性を利用した根圏化学コミュニケーションの機構解明」

ストリゴラクトン (SL) は、腋芽の休眠状態を保ち、枝分かれを抑制する働きを持つ植物ホルモンであり、このホルモンを作ることのできない変異体は枝分かれが旺盛になる。また、SL は、ストライガやヤセウツボなど、根寄生雑草の発芽も促す。特にストライガは、地中海沿岸やアフリカ大陸など、世界中の多くの地域に甚大な被害を与えている。SL は受容体 D14 に認識され、D14 欠損変異型の植物は枝分かれが増大する。D14 が SL を認識すると、枝分かれ促進因子である D53 とタンパク質分解を導くタンパク質である D3 との三者複合体形成が誘導され、D53 が分解されることで、枝分かれを抑制しているという仕組みも分かってきている。また D14 は $\alpha\beta$ 加水分解酵素と呼ばれる酵素のファミリーに属していて SL を分解する酵素活性も併せ持つという、他の様々な受容体にはない性質を持っていることもこれまでに明らかになっている (図 A)。本研究では D14 と強力に結合する化合物を開発した。

D14 は $\alpha\beta$ 加水分解酵素と呼ばれる酵素のファミリーに属するが、動物細胞にも数多くの $\alpha\beta$ 加水分解酵素が存在し、その阻害薬も数多く開発されている。その中にトリアゾール尿素を基本骨格とした化合物が $\alpha\beta$ 加水分解酵素と共有結合し、酵素活性を特異的に強力に阻害することが知られていた。そこで本研究ではトリアゾール尿素を基本骨格とした化合物を 140 種類以上合成し、その中から D14 の加水分解活性を阻害する化合物 KK094 を見出したり。KK094 は、結晶構造解析の結果から、実際に D14 の活性中心に共有結合していること、そして、イネへの投与実験から、イネの枝分かれ (分げつ) を促進する効果があることも見出した (図 B)。また、ストライガの種子発芽も阻害する効果があることも発見した。

さらに本研究では、トリアゾール尿素化合物中より、KK094 よりもストライガ種子発芽阻害効果の高い化合物も見出している。この化合物は、ストライガの SL 受容体 HTL の有する加水分解活性を KK094 よりも強く阻害することを見出した。また、我々のグループでは、ストライガの種子発芽時に機能する SL 受容体 HTL と D14 の結晶構造解析を行い、その比較を行っている²⁾。今後、その結晶構造の情報をもとにした合理的デザインを行うことにより、実際の農業現場での応用が可能な SL 受容体阻害剤を創製することを目指している。



1. Nakamura, H., Hirabayashi, K., Miyakawa, T., Kikuzato, K., Hu, W., Xu, Y., Jiang, K., Takahashi, I., Niiyama, R., Dohmae, N., Tanokura, M., Asami, T. Triazole ureas covalently bind to strigolactone receptor and antagonize strigolactone responses. *Mol. Plant* 12, 44-58, 2019.
2. Xu, Y., Miyakawa, T., Nosaki, S., Nakamura, A., Lyu, Y., Nakamura, H., Ohto, U., Ishida, H., Shimizu, T., Asami, T., Tanokura, M. Structural analysis of HTL and D14 proteins reveals the basis for ligand selectivity in *Striga*. *Nat. Commun.* 9,3947, 2018.

A01 班 公募研究・研究代表者 廣田順二（東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授）
 「母子間化学コミュニケーションを可能にする嗅神経系の分子基盤の解明」

膨大な匂い情報を感知する嗅神経細胞は、多様な個性を有する細胞集団として産生される。その個性を規定する嗅覚受容体 (OR) はゲノム上最大の遺伝子ファミリーを形成し、系統的に魚類から哺乳類に共通した水棲型 (Class I OR、マウスでは約 150 個) と陸棲動物特異的な陸棲型 (Class II OR、マウスでは約 950 個) の 2 つに分類される。これまでの嗅覚受容体のリガンドスクリーニングでは、主に合成揮発性化合物が使われており、自然界で動物が実際に感じ、化学コミュニケーションに用いる匂い物質 (天然物リガンド) は、これらと大きく異なると考えられる。

嗅覚を介した化学コミュニケーションの一つに母子間コミュニケーションが挙げられる。哺乳動物の新生仔は、嗅覚によって「母の匂い」を感知することで、初期哺乳行動をとる。嗅盲マウスは、この生得的な嗅覚行動をとることができず、そのほとんどが脱水症によって新生仔致死となる。この「母の匂い」源のひとつが羊水である。羊水には、胎生動物の新生仔が嗜好性を示す匂い物質が存在し、初期哺乳行動を誘導する。母マウスの乳首を水で洗浄すると、哺乳未経験の仔は乳首を見つけることができない。しかし、そこに羊水を塗布すると短時間で乳首を見つけて吸引し、母乳を飲むことができる。ヒトにおいても、誕生直後の新生児は、母乳よりも羊水の匂いに顔を向けることから、羊水の匂いを最初の「母の匂い」として認識されていると考えられている。さらに、新生児に羊水の匂いを嗅がせると泣く時間が有意に減少することから、羊水の匂いの安寧効果も示唆されている。しかしながら、羊水中のどのような化学物質が嗅覚受容体で受容されているのか、そして初期哺乳行動や安寧効果をもたらす羊水の作用機序は明らかになっていない。

最近我々は、嗅神経細胞の水棲型か陸棲型かの二者択一的運命決定の分子機構を明らかにし、水棲型もしくは陸棲型の嗅覚受容体のみを発現する変異マウスの作出に成功した¹⁾。この変異マウスでは、忌避行動のほか、哺乳行動や母マウスの子育て行動など匂いによって誘導される生得的行動に異常が生じる。このことは、嗅覚を介した母子間化学コミュニケーションの存在することを改めて支持するものである。本研究では引き続き、「母子間の化学コミュニケーション」に着目し、「母の匂い」源のひとつである羊水から、新生仔に生得的行動を誘導する匂い分子とそれらを受容する嗅覚受容体の同定をおこなう。この母子間化学コミュニケーションの分子基盤を確立することは、あらたな生理機能を有する匂い分子の同定だけでなく、それら天然物リガンドがどのような嗅覚受容体を介して作用するのかなど、嗅覚を介した生体への作用機序の解明に繋がるものと考えられる。

また領域内連携を活用し、羊水成分の解析、他の化学コミュニケーションを担う生理活性物質の受容体同定の共同研究を推進していく。(共同研究者：宮崎雅雄 (岩手大, A01 班)、西川俊夫 (名古屋大, A01 班)、高田健太郎 (北里大, A01 班))

1. Enomoto, T., Nishida, H., Iwata, T., Fujita, A., Nakayama, K., Kahsiwagi, T., Hatanaka, Y., Kondo, H., Kajitani, R., Itoh, T., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Hirota, J. Bcl11b controls odorant receptor class choice in mice. *Commun. Biol.*, in press, 2019.



図 1. マウス新生仔の嗅覚を介した吸乳行動

マウス新生仔は、嗅覚を介して初期吸乳行動を示す。母マウスの乳首を水で洗浄すると、新生仔は吸乳行動を示さない。しかし、そこに羊水を塗布すると乳首を見つけて吸引し、母乳を飲むことができる。

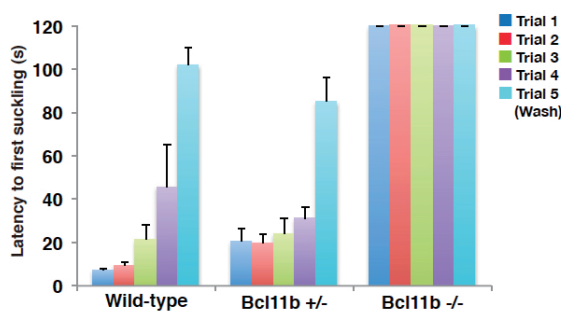


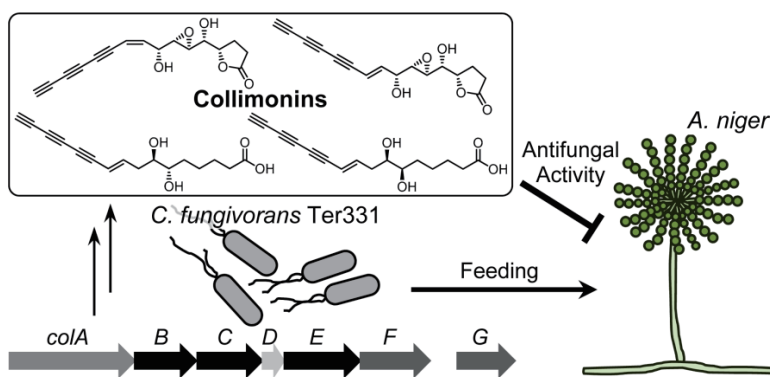
図 2. Bcl11b ノックアウトマウスにおける初期吸乳行動異常

野生型および Bcl11b ヘテロ欠損、ホモ欠損マウスの新生仔の吸乳行動にかかる時間を縦軸に示す。Bcl11b ノックアウトマウスでは、新生仔の鼻腔を母マウス乳首に近づけても吸乳行動を示さない。

A01 班 公募研究・研究代表者 甲斐建次 (大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授)
「双方向性の化学コミュニケーションから探る異種微生物間相互作用」

微生物二次代謝産物の多くは、生理学・生態学的な役割とは隔離したヘテロな系に対する生理活性を指標に単離・構造決定されてきた。しかし近年、微生物二次代謝産物の本来の機能、つまり生態学的な機能に大きな注目が集まっている。*Collimonas fungivorans* Ter331 株は、*Aspergillus niger* などの真菌を資化するグラム陰性細菌として発見された。この特性には、*C. fungivorans* が産生する抗真菌化合物とキチナーゼが関与することが示唆されていた。前者の産生に関わる col 遺伝子クラスターが見出され、それらが連続した炭素-炭素三重結合を有するポリイン類を産生することが予想された。このユニークな細菌-真菌相互作用を探る上でポリイン類 (collimonin 類と名付けた) は重要な化合物群であるが、それらの化学構造は明らかにされていなかった。末端アルキンから始まる共役ポリイン化合物は極めて不安定であるため、単離・構造決定されたのは数例のみであった。そこで本研究では、本菌が産生する collimonin 類の単離・構造決定と生物活性評価を進めた。

C. fungivorans Ter331 株の培養物を EtOAc で抽出し、それを *A. niger* 菌糸に処理すると顕著な生育阻害が認められた。抽出物を ODS カラムクロマトグラフィーで分画したところ、1つの画分に強い抗真菌活性が観察された。本画分には collimonin A-D が含まれており、これらが本菌の抗真菌性に寄与することが予想された。光と室温以上の高温、エバポレーターによる乾固を避け、構造決定に足る量の collimonin 類を単離した。



各種 NMR と MS により、これらの平面構造を決定したところ、いずれも ene-triynes 構造と複数のオキシメチンを有することが分かった。Collimonin 類は多くの不斉炭素原子が存在したことから、それらの絶対立体配置決定が重要であった。しかし、前述したようにとても不安定であったため、通常の X 線結晶構造解析やモッシュャー法などの誘導体化にはとても耐えることができなかった。そこで、collimonin A と B に関しては末端アルキンに対して benzylazide をクリック反応で導入して安定化し、collimonin C と D に関しては接触水素化・メチルエステル化で直鎖脂肪酸メチルエステルへと変換することで、それぞれを結晶スポンジ法による X 線結晶構造解析と MPA 法による絶対立体配置決定法に供した。それらの結果、全ての collimonin 類の絶対立体配置を決定することができた。単離した collimonin 類は、*A. niger* に対して抗真菌活性を示した。興味深いことに、collimonin B は *A. niger* 菌糸内に黄色色素の蓄積を顕著に誘導した。

引き続き、collimonin 類が真菌に対して作用するメカニズムを、酵母などのモデル系を用いて調べることを計画している。さらに、collimonin 類の産生を活性化する真菌側のシグナル分子同定も進めて行きたい。

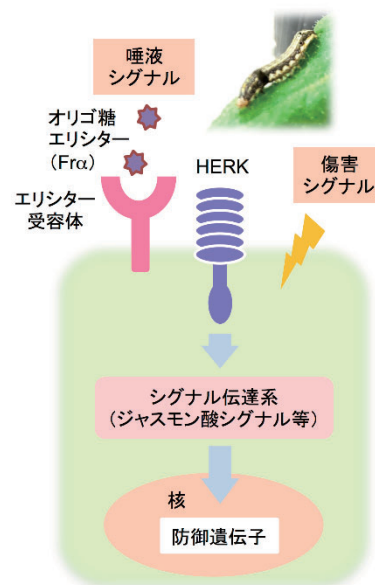
1. [Kai, K.](#), Sogame, M., Sakurai, F., Nasu, N., and Fujita, M. Collimonins A–D, unstable polyynes with antifungal or pigmentation activities from the fungus-feeding bacterium *Collimonas fungivorans* Ter331. *Org. Lett.* 20, 3536-3540, 2018.
2. [甲斐建次](#). 双方向性の化学コミュニケーションから探る異種微生物間相互作用. *アグリバイオ*, 2, 68-71, 2018.

A01 班 公募研究・研究代表者 有村源一郎（東京理科大学・基礎工学部生物工学科・教授）
 「植物の害虫エリシター受容システムの解明」

害虫に被食された植物において防御応答を誘導する、害虫唾液に含まれるエリシターは酵素、脂肪酸、糖、タンパク質（ペプチド）によって構成される化合物群である¹⁾。近年、害虫エリシターの寄主植物における、ジャスモン酸やサリチル酸等を介したシグナル伝達機構への特異的な作用機序に関する理解が急速に進んできた¹⁻³⁾。しかし、害虫エリシターを特異的に認識する植物の受容体タンパク質は未だ同定されていない。そこで本研究では、ハスモンヨトウ幼虫唾液内オリゴ糖成分のエリシター受容体を同定し、HERK を介した寄主植物における防御応答メカニズムの解明を試みた。

害虫由来エリシターを認識する受容体タンパク質を同定するために、ダイズ receptor-like kinase (RLK) ファミリーから受容体候補遺伝子を選抜し、これらを恒常的に発現する組換えシロイヌナズナを作出した⁴⁾。15 候補遺伝子の過剰発現シロイヌナズナ系統にハスモンヨトウ幼虫吐き戻し液 (OS) を処理したところ、2 系統における防御遺伝子 *PDF1.2* の発現量がコントロール株よりも顕著に誘導された。また、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製された、糖化合物を含むエリシター画分 (Fr α) を上記 2 系統に処理した際、*PDF1.2* の発現はコントロール株と比べて亢進された。さらに、ウイルスベクターを用いて HERK の発現を抑制したノックダウンダイズ系統に Fr α 処理を行ったところ、防御遺伝子の発現量がコントロール株に比べて有意に低下したことから、HERK は Fr α の特異的受容体もしくは Fr α 依存的なシグナル伝達因子としての役割を担うことが示唆された。一方で、等温滴定量熱計 (ITC) を用いた解析から、HERK は Fr α と直接は相互作用しないことも示された。つまり、HERK はリガンドと直接相互作用する受容体の共受容体もしくは細胞膜上の 2 次シグナル伝達因子として機能することが考えられる。今後、受容体複合体を形成する相互作用タンパク質を同定することで、エリシター受容システムを詳細に明らかにする必要がある。また、我々はハスモンヨトウ以外の害虫として、ナミハダニからタンパク質型エリシター「テトラニン」をすでに同定していることから²⁾、今後、テトラニンの受容体の同定にも挑戦したい。

（共同研究：澤崎達也（愛媛大プロテオサイエンスセンター、根本圭一郎（岩手生工研，A01 班）等）。



1. Uemura, T., Arimura, G. Current opinions about herbivore-associated molecular patterns and plant intracellular signaling. *Plant Signal. Behav.* in press, 2019.
2. Iida, J., Desaki, Y., Hata, K., Uemura, T., Yasuno, A., Islam, M., Maffei, M.E., Ozawa, R., Nakajima, T., Galis, I., Arimura, G. Tetransins: new putative spider mite elicitors of host plant defense. *New Phytol.* in press, 2019.
3. Ali, M.R.M., Uemura, T., Ramadan, A., Adachi, K., Nemoto, K., Nozawa, A., Hoshino, R., Abe, H., Sawasaki, T., Arimura, G. The ring-type E3 ubiquitin ligase JUL1 targets the VQ-motif protein JAV1 to coordinate jasmonate signaling. *Plant Physiol.* 179, 1273, 2019.
4. Uemura, T., Hachisu, M., Sano Y., Hoshino, R., Ito, A., Nozawa, A., Yoshida, A., Nemoto, K., Miura, S., Nishiyama M., Nishiyama, C., Horito, S., Desaki, Y., Sawasaki, T., Arimura, G. Herbivore elicitor receptors in plants. submitted, 2019.

A01 班 公募研究・研究代表者 室井喜景 (帯広畜産大学・獣医学研究部門・准教授) 「母親の行動を制御する化学コミュニケーション」

動物は社会性を有し種特有の社会関係を築いている。その一つとして親子関係が挙げられる。特に哺乳類は少数の未熟な仔を産み乳で育てる繁殖様式をとるため、母親は仔の生存率を高めるため、一方仔は母親に自分を養育してもらうために母仔間で緊密な関係を構築する必要がある。近年ヒトの親による子の虐待(ネグレクトや暴力など)が社会問題となっており、行政を中心とした生活支援などの対策がとられている。一方親による子の虐待が異常行動だとする視点を持てば、様々な精神疾患でみられる異常行動への対策と同じように神経科学的知見に基づく対策が可能だと考えられる。養育行動の発現を制御する機構の抑制はネグレクトに、攻撃対象が外敵でなく自分の仔である場合が仔に対する暴力に繋がると考えられるため、我々は仔育て中の母マウスが発現する養育行動と攻撃行動に着目し、その制御機構を明らかにすることを目指している。

母マウスは出産後速やかに仔を養育するだけでなく、居住域への侵入者に対して攻撃を仕掛けるようになる。養育に関して母マウスは許容性が高く、生物学的な自分の仔以外の幼若仔も養育する。これに対し、ある日齢を過ぎてしまえば自分の仔でない個体に対して攻撃を仕掛けるようになる。すなわち、母マウスは対象の情報に基づき養育または攻撃のどちらか一方の行動を発現することを意味している。はじめに出産後3-5日の初産BALB/c系雌マウスが居住するケージ内に3日齢から28日齢までの各日齢のC57BL/6J雄マウス(侵入者)を導入し母マウスの行動を評価した。その結果、母マウスは14-15日齢以降の侵入者を攻撃することがわかった。次に嗅覚受容器の一つである鋤鼻器を摘出した母マウスに侵入者を提示したところ、養育行動は発現するが攻撃行動は発現しなくなった。このことから鋤鼻器で受容される嗅覚シグナル、すなわち侵入者に由来するフェロモンによって母マウスの攻撃行動が誘起される可能性が示唆された。次に侵入者の性差を検討するため雌マウスを母マウスに提示したところ、攻撃行動が誘起されたため侵入者の性差は攻撃行動の誘起に関係ないと考えられる。さらに侵入者の系統差を検討するため様々な系統の雄マウスを提示したところ、BALB/c系の侵入者はBALB/c系母マウスから攻撃を受ける頻度が少ないことがわかった。またBALB/c系母マウスに養育されたC57BL/6JマウスもBALB/c系母マウスから攻撃を受ける頻度が減少したことから、系統に由来するシグナルが攻撃行動の誘起に影響することがわかった。

以上の結果を踏まえ、母マウスの攻撃行動を誘起するフェロモンを含む生物試料の特定を試みた。侵入者から候補試料Xを取り除くと母マウスの攻撃を受ける頻度が有意に減少したことから、候補試料X中に母マウスの攻撃行動を誘起するフェロモンが含まれている可能性がある。現在、領域内研究者である岩手大学宮崎雅雄先生(A01班)の協力を得てこのフェロモンの同定を試みている。

次に母マウスの養育行動と攻撃行動を制御する神経機構を明らかにするため、内側前頭前皮質や外側手綱核からグルタミン酸神経の入力を受けている背側縫線核に着目した。内側前頭前皮質や外側手綱核から背側縫線核に投射する神経の活動を逆行性トレーサーや免疫組織化学的手法を用いて解析したところ、攻撃行動を発現する時に両脳領域から背側縫線核に投射する神経が活性化することがわかった。特に内側前頭前皮質から投射する神経は噛みつき行動を発現する個体でのみ活性化した。そこで背側縫線核のグルタミン酸シグナルの関与を薬理的に解析したところ、同シグナルは攻撃行動の発現に必要なであるが、養育行動の発現に抑制的に作用することがわかった。すなわち背側縫線核のグルタミン酸シグナルによって養育行動と攻撃行動が相反的に制御されている可能性が示唆された¹⁾。

今後は母マウスの攻撃行動を誘起するフェロモンを含むと考えられる試料から候補分子を単離し、これまでに得た結果を踏まえ、神経科学・行動学的手法を用いてその有効性を評価する予定である。これを切り口として母親の行動を制御する化学コミュニケーションの一端を明らかにできるだけでなく、母親の行動制御に関わる神経基盤を明らかにできると考えている。



1. [Muroi Y., Ishii, T. Glutamatergic Signals in the Dorsal Raphe Nucleus Regulate Maternal Aggression and Care in an Opposing Manner in Mice. *Neuroscience*. 400, 33-47, 2019.](#)

A02 班 公募研究・研究代表者 酒井隆一 (北海道大学・大学院水産科学研究院・教授)
「海洋生物のポリカチオンケミカルコミュニケーション」

海洋生物には様々な生理活性物質が含まれています。時にはフグ毒のような強力な毒や医薬品になる化合物など様々です。しかしそのような化合物が海洋生物にとってどのような役割を持っているのか？という問いに答えることは容易ではありません。海洋生物の生理活性成分を追っているとしばしば分子内に多数の窒素原子を持つ水溶性の成分に出会います。これらの陽電荷を複数もつ生理活性化合物（ポリカチオン）が海洋生物の化学コミュニケーションで何らかの役割を担っているのではないかと考え実験を計画しました。スナギンチャクと呼ばれる腔腸動物はパリトキシンといった強力な毒を作り出すことで知られていますが、パラオに生息する *Epizoanthus illoricatus* という種から非常に面白い構造をした KB343 を発見しました。グアニジン基を3つ分子内に持ち、不飽和ケトンを持つ構造です (図1)。

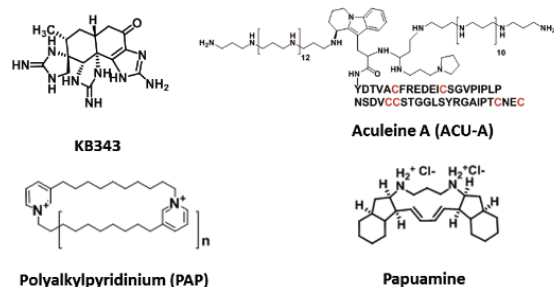


図1 マリンポリカチオン化合物の例

このようにコンパクトな分子でグアニジンを3つも持つ天然化合物は他に無く、何か面白い生理活性があるに違いありません。KB343 をマウスの脳室内に投与すると数日で死に至ります。また強い細胞毒性や抗カビ性も示します。KB343 は水溶性であるにもかかわらず細胞膜を透過し、細胞内で何らかの標的に作用していると考えられます。現在その多彩な生理活性のメカニズムを探るため A03 班 Boon グループの八代田博士、清宮博士のグループと共同研究を進めています。海洋生物、特に海綿は図1に示したようなポリカチオンを含んでいますがタイマイというカメは海綿を好んで食べると言われています。タイマイはポリカチオン化合物にどのような反応を示すのだろうか？この疑問を解決するため石垣島で実験を行っています。

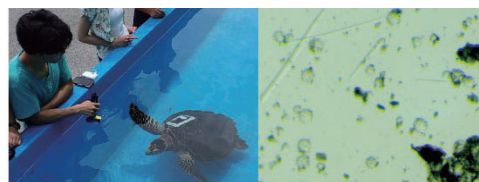


図2 タイマイの摂餌実験風景(左とタイマイ糞中の骨片(右))

実験は地元の腕利き漁師が採捕した野生のタイマイ1頭を長期飼育し行っています (図2)。タイマイの餌には魚の養殖飼料を与えていますが、よく食べます。海綿以外のものも食べる雑食性なのです。しかしカメの糞を分析したところ採捕後1か月に渡って海綿の骨片が排出されていました (図2、透明な針状・球状の物体が骨片)。やはり野生では海綿を食べているのです。そこで、西表島で採集した海綿の水抽出物を餌にしみこませてカメに与える実験を行ったところ、意外にもほとんどの海綿で餌を拒絶する反応を示しました。その一つであるハリコンドリア属海綿の水抽出物に、ポリカチオン化合物パプアミンが含まれていました。

興味深いことに脂溶性のパプアミンの大部分が水抽出物に得られ、一部は高分子画分に含まれていました。パプアミンは海綿の中で塩として、もしくはタンパク質と結合して存在するのかもしれませんが。一方でタイマイは ACU-A や PAP といったポリカチオンを含む餌は食べてしまいました。タイマイにとってこれらのポリカチオンは特に「忌避すべき化合物」ではないのかもしれませんが。これらの化合物を採捕したサンゴ礁の魚に与えたところ、避けようとする行動は観察できませんでしたが、実験魚は死亡しました。実験をしていると「野生」の魚を捕獲し水槽で実験をする際、魚の習性によっては、環境になじめないためか異常と思われる行動を示します。これらの実験はやはりフィールドで行うことが重要であることを実感しました。そこで海綿の水抽出物を海綿に含まれる程度の濃度の調整した餌を海中に設置し (図3左)、自由摂食させたところ、ほとんどの抽出物が摂食阻害を示しました (図3右のグラフ)。やはり海綿は「食べられるのを防ぐ」ために生理活性物質を作っているのでしょうか？今後はこのようなコミュニケーション活性を示す化合物の同定を進め、その構造・生理活性を調べるとともに、実際に水中に放出されているのか、どのような形態で貯蔵されているのか、どのように生合成されるのかといった課題にチャレンジしたいと考えています。

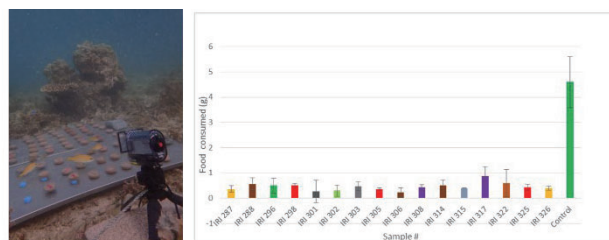


図3 海中に設置した餌試料(左)と魚による摂食(右)

野生動物を用いた実験は北海道大学および西海区水産研究所(石垣)の動物実験委員会の承認を受け実施した。またタイマイは沖縄県の特別採捕許可を受け捕獲・飼育した。

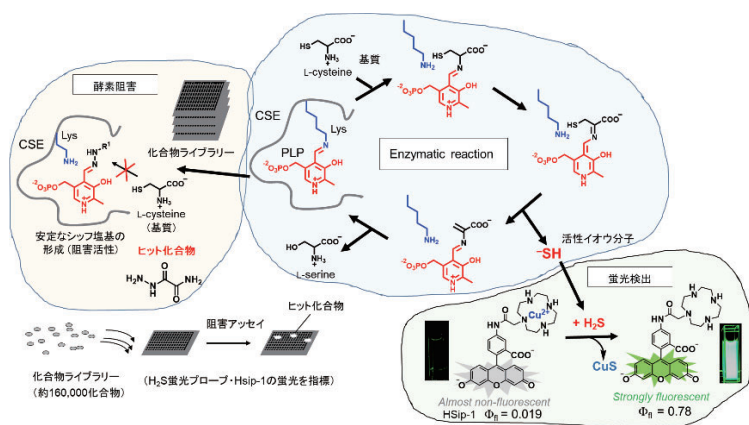
A02 班 公募研究・研究代表者 花岡健二郎 (東京大学・大学院薬学系研究科・准教授)
「蛍光プローブを活用した活性イオウ分子産生酵素の阻害剤の探索・創製」

活性イオウ分子とは、生体内に存在する反応性の高い含硫黄小分子である。硫化水素 (H_2S) は代表的な活性イオウ分子として、血管拡張や炎症等に関与するガス状シグナル伝達物質として着目されてきた。さらに近年では、0価の硫黄原子である sulfane sulfur が、シグナル伝達やレドックス制御において重要な生理機能に関与することが報告されている。これらの活性イオウ分子は、生体内で酵素依存的に産生され、現在までに cystathionine γ -lyase (CSE)、cystathionine β -synthase (CBS)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST)、cysteinyl-tRNA synthetases (CARSs) の4つの産生酵素が報告されている。CSE、CBS 及び CARSs は pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を補酵素とする PLP 依存性酵素である。活性イオウ分子の産生において各酵素は複雑に関わり合っており、どの酵素が活性イオウ分子産生の主要な酵素であるのか、その全貌は未だ明らかになっていない。活性イオウ分子の機能解明において、阻害剤は重要なケミカルツールとして活用されてきたが、CSE、CBS に関しては、選択性の低い阻害剤が汎用されているのが現状である。そこで本研究において、CSE に対して高い選択性を示す新規阻害剤の開発に取り組んだ。

これまでに、我々が開発した H_2S 選択的蛍光プローブ(HSip-1) [*J. Am. Chem. Soc.* 133, 18003 (2011), *Sci. Rep.* 7, 40227 (2017)]を用いて、161,600 の化合物ライブラリーからスクリーニングすることで、CSE を選択的に阻害する化合物として oxamic hydrazide ($\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$) を見出すことに成功した。さらに、阻害機構の解析とそれを基にした誘導体化に取り組んだ。X 線結晶構造解析の結果、oxamic hydrazide のヒドラジノ基は、PLP とシッフ塩基を形成していることが分かった。次に、CSE の表面に存在し、かつ側鎖との相互作用が比較的小さいと考えられる末端のアミノ基を修飾した 3 化合物の合成・評価を行った。阻害活性の評価は、 H_2S 検出蛍光プローブ HSip-1 を用いて、各化合物を添加時の H_2S 産生量を測定することで行った。その結果、oxamic hydrazide にメチル基を導入した化合物が最も強い阻害活性を示し ($\text{IC}_{50} = 0.41 \mu\text{M}$)、その他の化合物に関しては、強い阻害活性は示さなかった。さらに、阻害活性を示した 2 化合物に関して選択性に関する検討を行い、既存の阻害剤である D,L-propargylglycine (PAG) と比較した結果、oxamic hydrazide にメチル基を導入した化合物や PAG が他の PLP 依存性酵素である methionine γ -lyase (MGL) に対しても阻害作用を示したのに対し、oxamic hydrazide は高い CSE 選択性を示すことが明らかとなった。さらに oxamic hydrazide の阻害形式に関して精査を行った。SPR 測定により oxamic hydrazide は不可逆的に CSE と結合を形成していることが明らかとなった。

その他、蛍光プローブの母核となりうる蛍光色素骨格の新たな合成法の確立や、国際共同研究によって、活性イオウ分子である H_2S や sulfane sulfur をそれぞれ検出する蛍光プローブの供与によって、N-アセチルシステインの抗酸化作用や細胞保護作用のメカニズムを明らかにすることにも成功している²⁾。

また、領域内連携を活用して、新規 CSE 阻害剤と CSE との MD シミュレーションによる阻害形式の解明 (共同研究者: 齋藤大明 (理研 生命機能科学研究セ)) や小腸内分泌細胞における H_2S 産生の可視化研究 (共同研究者: 坪井貴司 (東大院総合文化)) を推進している。



1. Hanaoka, K., Kagami, Y., Piao, W., Myochin, T., Numasawa, K., Kuriki, Y., Ikeno, T., Ueno, T., Komatsu, T., Terai, T., Nagano, T., Urano, Y. Synthesis of unsymmetrical Si-rhodamine fluorophores and application to a far-red to near-infrared fluorescence probe for hypoxia. *Chem. Commun.* 54, 6939, 2018.
2. Ezerin, D., Takano, Y., Hanaoka, K., Urano, Y., Dick, T. P. N-Acetyl cysteine functions as a fast-acting antioxidant by triggering intracellular H_2S and sulfane sulfur production. *Cell Chem. Biol.* 25, 447, 2018.

A02 班 公募研究・研究代表者 北 将樹 (名古屋大学・生命農学研究科・教授)

「哺乳動物毒における化学コミュニケーションの解明」

動物由来の天然毒には、フグ毒テトロドトキシンなど、ユニークな構造や切れ味鋭い活性をもつものが多い。また加速進化により、有毒動物の生理活性ペプチドには構造や機能に多様性がみられる。このような新規神経毒の化学的解明は、薬理学・神経科学・精神医学など広範な生命科学の基礎研究に寄与し、また疼痛治療薬など新規薬剤の開発にも直結する。我々は、化学生態学や進化学の観点からも興味深い、希少な哺乳類由来の有毒物質の構造と機能を解明し、より高活性な神経毒アナログの創製を目指している。またこれらの神経毒について、異種の哺乳動物がもつ類似化合物と構造や機能を比較し、独自に進化してきた種がもつ有毒物質 (=化学コミュニケーション物質) の生物学・生態学的意義を探ることを目指している。

構造や機能がユニークな麻痺性神経毒は、痛みや麻痺関連の受容体や器官に特異的に作用すると予想される。これまでに希少な哺乳類が持つ有毒物質に注目し、トガリネズミの唾液からプロテアーゼ毒ブラリナトキシン (BLTX) を哺乳類由来で初の致死毒として発見した [PNAS 101, 7542 (2004)]。一方でこの動物が獲物に噛み付き、ごく短時間で麻痺させる現象に注目して活性成分を精製した結果、新規の麻痺性神経毒ペプチド BPP 類を単離し、48 および 53 アミノ酸残基からなる一次構造を決定した。BPP 類はヒト培養細胞で発現させた Ca チャネルに対する開口活性を示したことから、昆虫など主な餌だけでなく、哺乳類の神経系にも特異的に作用することが強く示唆された。現在、BPP 類のリコンビナント体を合成し、立体構造と生物活性の評価を検討している。

また単孔目の仲間であるカモノハシが持つ毒について、これまでに豪州の動物園と連携して毒液を採取し、C 型ナトリウム利尿ペプチドホルモン (CNP) の部分断片ペプチドなど 11 種の物質を発見した [JACS 131, 18038 (2009), Pure Appl. Chem. 84, 1317 (2012)]。これらのペプチドを化学合成して種々の薬理活性評価を行った結果、ある種のイオンチャネル受容体に対してポジティブアロステリックモジュレーターとして働くことが分かった。現在、構造活性相関や特異性の評価を行っている。

さらに、標的分子との結合様式を詳細に解析するため、ラベル支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (LA-LDI MS) に適用できる新規蛍光基、アミドピレン誘導体を独自のツールとして開発した [Org. Biomol. Chem. 14, 8564 (2016)]。この蛍光基を導入したリガンド解離型プローブによる標的分子の選択的ラベル化、ラベル化ペプチドの選択的検出、およびドッキングシミュレーションを組み合わせることで、標的分子-リガンド間の結合様式を高精細に解析できる手法を開発した¹⁾。[特願 2019-119846]

今後は、BPP 類の標的受容体との結合様式の解明や高活性アナログの創出、トガリネズミ麻痺性神経毒の種間比較を行い、特異な神経毒の化学コミュニケーションにおける役割について新たな知見を得ることを目指したい。また、今回開発したケミカルプローブ解析法を様々なリガンド・

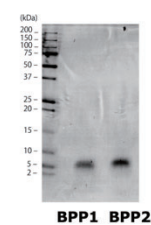
標的分子間の結合様式の解析に適用するため、汎用性を高めるとともに、共同研究をより推進することで本領域の発展に貢献していきたい。



ブラリナトガリネズミ



新規麻痺性ペプチド BPP 類 (痙攣, 麻痺作用)



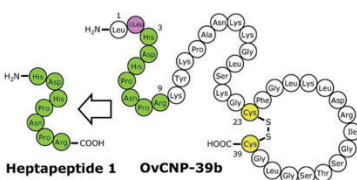
神経系 Ca チャネル?



カモノハシ



CNP 断片ヘプタペプチド (炎症惹起, 痙攣)



グルタミン酸受容体? ヒスタミン受容体?

1. Watanabe, R., Hu, Y., Iio, K., Yoneda, K., Hattori, A., Arai, A., Kigoshi, H., Kita, M. Specific protein-labeling and ligand-binding position analysis with amidopyrene probes as LDI MS tags. *Org. Biomol. Chem.* 16, 7883, 2018.

A02 班 公募研究・研究代表者 井貫晋輔 (京都大学・薬学研究科・助教)
 「腸管免疫に関わる化学シグナルの理解と制御を目指したケミカルツールの創製と機能解析」

外界と接する器官である腸管は、常に膨大な数の腸内細菌群、食物成分に曝されている。これら由来の代謝物は、腸管粘膜組織との相互作用を介して、生体防御を担う宿主免疫機能の恒常性に関与するとされている。また近年、腸内細菌組成や食事性成分と、炎症性腸疾患や食物アレルギー等との関りについて、多くの議論が進められており、その詳細を理解するために分子レベルからの解析が望まれている。例えば、本研究課題の連携研究者である國澤 (医薬基盤研) らは、腸管における食物アレルギーに脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) が関わることを報告している。また、食物アレルギーモデルマウスにおいて S1P シグナル経路を遮断すると、アレルギー性下痢の発症が抑制されることが知られている。

このような背景のもと、我々は腸管免疫に関わる化学シグナルとして S1P に着目し、S1P 産生に関わる鍵酵素であるスフィンゴシンキナーゼ (SphK) やセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (SPT) を制御するケミカルツールの創製を目指して研究を行っている。

SphK を制御する化合物については、SphK 阻害活性を有する海洋天然物 jaspine B からの誘導化によって見出した高活性誘導体 4-*epi*-jaspine B を基にした構造展開を行った。4-*epi*-Jaspine B の側鎖アルキル基部分に着目して、様々な官能基を導入した化合物を合成し評価した (図 1)。その結果、エーテル基を側鎖アルキル基部分に導入した化合物が、SphK の 2 つのアイソフォーム SphK1 および SphK2 のうち、自己免疫疾患や炎症性疾患に関わる SphK2 に対する選択的阻害活性を示すことを見出した¹⁾。

SPT の制御に関わる化合物としては、SPT 阻害剤として知られる天然由来スフィンゴシン類縁体 myriocin (図 2) に着目し、構造展開を見据えた新規合成法を確立した²⁾。開発した合成経路は、myriocin の不斉四置換炭素を効率的に構築することが可能であるとともに、様々な立体異性体の合成や、アルキル鎖部位の誘導化についても容易に展開可能である。

引き続き、SphK 阻害剤については、これまでの構造活性相関研究を基に、より高活性かつ選択的な阻害剤の開発を継続する。SPT 阻害剤については、確立した合成経路を用いて、種々の誘導体の合成を行う。特に myriocin の立体異性体や、脂質部位に様々な官能基を導入した誘導体の合成を検討する予定である。

1. Inuki, S., Miyagawa, T., Oishi, S., Ohno, H. Introduction of a Polar Functional Group to the Lipid Tail of 4-*epi*-Jaspine B Affects Sphingosine Kinase Isoform Selectivity. *Chem. Pharm. Bull.* 66, 866, 2018.
2. Miyagawa, T., Inuki, S., Oishi, S., Ohno, H. Construction of Quaternary Carbon Stereocenter of α -Tertiary Amine through Remote C-H Functionalization of Tris Derivatives: Enantioselective Total Synthesis of Myriocin. *Org. Lett.* in press, 2019.

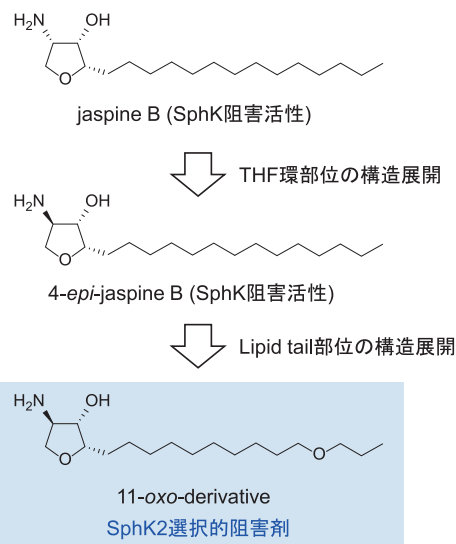


図 1. Jaspine B の構造展開

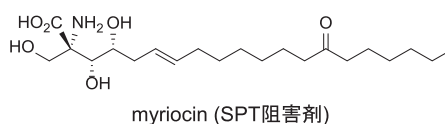


図 2. Myriocin の構造