



# Newsletter

## 化学コミュニケーションのフロンティア

文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究(研究領域提案型)」2017-2021年度

### 特別企画 第7回公開シンポジウム(誌上シンポジウム)

- 領域代表挨拶
- ニューフロンティアへの挑戦
- 公募研究(第2期)組織紹介
- 第7回公開シンポジウム(誌上シンポジウム)
- 海外派遣だより
- 若手の窓
- お知らせ



## 領域代表挨拶



領域代表・掛谷 秀昭  
(京都大学・薬学研究科・教授)

新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」(略称:化学コミュニ)のNewsletter (vol. 6)が完成いたしましたのでお届けします。

新型コロナウイルスの感染が世界中に蔓延しており、我が国でも多くの方が感染され、命を落とされた方もおられます。ここに謹んで亡くなられた方々のご冥福をお祈り申し上げるとともに、罹患された方々が一刻も早くご快復されることを祈念致します。皆様におかれましても、教育・研究・経済活動等が制限され不便な生活を強いられていることと存じますが、くれぐれもお気を付けてお過ごしください。

本領域では、多種多様な化学コミュニケーションの統合的理解にきわめて有効な「革新的高次機能解析プラットフォームの構築」を行い、「天然物リガンドの真の生物学的意義の解明」及び「ケミカルツール分子・創薬シーズ開発」を推進することにより、医療・農業・食糧分野などへの貢献を目的としています。最終的には、自然環境における多様な生物種における化学コミュニケーションの解明と制御を主眼とした「分子社会学」という新しい学問領域の確立を目指しています。

本年(2020年)4月から、総括班のもと、計画研究代表者(12名)に加えて、公募研究(第2期)代表者(32名、本号参照)を迎えて新しい研究組織が立ち上がりました。斬新で挑戦的な研究課題や萌芽的・意欲的な研究課題が目白押しで、今後の研究成果を楽しみにしています。本年6月21~23日には、新しい研究組織のキックオフを含めて、第7回公開シンポジウム(上田実実行委員長(東北大院理))及び第5回若手シンポジウム(高岡洋輔実行委員長(東北大院理))を仙台にて開催予定でしたが、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の蔓延状況を鑑みて延期とさせて頂きました。新しい開催日程が確定致しましたら、改めて領域ホームページなどで周知させて頂きます。

さて、本号の企画の一部について少し紹介させて頂きます。上述の現状を鑑み、引き続き、領域内外の共同・連携研究を促進するために、誌上シンポジウム(第7回公開シンポジウム)を企画致しました。継続の先生方にはこれまでの研究成果の概要を、新規の先生方には今後の研究計画を中心に紹介頂きました。一方、3年目の中間評価を終え、これまでの総括及びラストスパートに向けて、班長及び若手研究者間での座談会を上述の仙台にて企画していましたが延期となりました。そこで、高岡先生及び高田先生(ニュースレター企画担当)にブレ誌上座談会を企画して頂き、本領域の目指す学理「分子社会学」の創生に向けての特別インタビューを紹介頂きました。

総括班では、本年度は、第8回公開シンポジウム(仙台)及び第5回若手シンポジウム(仙台)に加えて、The 2nd International Symposium on Chemical Communication (ISCC2020)をChemical Communications through Natural and Synthetic Bioactive Compounds (Symposium #79)として、環太平洋国際化学会議2020 (PACIFICHEM 2020, 12/15-20)の期間内に開催予定です。無事、COVID-19が収束に向かい、開催できることを祈念しています。

今後も、総括班会議、全体領域会議などで議論を深めて、班員一同で本領域の目的・ミッションを達成したいと考えています。引き続き、本領域に対して、ご支援とご鞭撻を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

### 特別インタビュー記事:「分子社会学」学理の創生に向けて

皆さんこんにちは。「化学コミュニケーションのフロンティア」領域・ニュースレター担当の東北大・高岡/北里大・高田です。この度の新型コロナウイルス感染症COVID-19により亡くなられた方々のご冥福をお祈り申し上げますとともに、被患された皆様の早期の快復と、感染の収束を心よりお祈り申し上げます。

本来は6月に開催予定であったシンポジウムで企画を用意していたのですが、会の延期に伴い実施が難しくなりました。そこで今回は、領域がちょうど折り返し地点に位置することから、改めて本領域の目指す「分子社会学」学理の創生に向けて、領域メンバーによる共通認識を明確にするべく特別インタビュー記事を用意しました。本領域の班長の先生方に代表していただき、「これまでの研究成果」・「今後の課題や意義」・「今後の抱負」などについてお答えいただきましたので、本領域が目指す理念について共有いただければと思います。

まず初めに、掛谷領域代表に「分子社会学」を簡単に整理していただきます(以下敬称略)。

—改めて本領域のキーワードである「分子社会学」について、ご説明いただけますか？

(掛谷)右図は、本領域の研究概要と学理をイメージしたロゴです。原核生物、真核生物、植物、昆虫、魚類、ヒトなどにおける生物間共生・共存・寄生などには各固有の生物活性リガンド(化学コミュニケーション分子:○印)が存在し、そのリガンドの機能を通じてコミュニケーションやネットワークが形成されていると考えています。さまざまな生物種において、各化学コミュニケーション分子の機能、すなわち、化学コミュニケーション分子の発見・創製や化学コミュニケーション分子が誘導する細胞内シグナルの解明を通じて、これらのネットワークの全貌を明らかにできると考えています。そのためには、本領域のA01、A02、A03班の連携が必須であり、化学コミュニケーション分子を起点に、種を超えてさまざまな生命現象やネットワークを理解・制御する新しい学理を「分子社会学(Molecular Sociology)」と捉えています。



—化学コミュニケーション分子を「言語あるいは道具」と捉えて、これを使った生物種間で起こる共生・共存・寄生などの生命現象やネットワークを「社会」として、これを理解・制御する新しい学理、ということでしょうか。新たな学問の創生が大いに期待できます。

ここからは、各班長の先生方にそれぞれの研究班の内容についてお答えいただきます。

\*A01班(生物間化学シグナルの理解)班長・掛谷 秀昭領域代表

\*A02班(分子間シグナルの理解)班長・入江 一浩先生

\*A03班(化学シグナルの統合解析法)班長・菊地 和也先生



## ニューフロンティアへの挑戦



—これまでの領域内研究活動の状況を教えてください。

(掛谷) A01班は、さまざまな生物現象・表現型スクリーニングに着目し、それらにおける化学コミュニケーションを担う新規天然物リガンドの探索・同定・機能解析などをA02/A03班と連携しながら、オリジナリティーに溢れる研究を展開しています。

(入江) A02班では、生物間コミュニケーションの基盤となる分子間シグナルの理解を目指して、化学コミュニケーションを司る天然物リガンドの標的因子との相互作用を、A01/A03班と連携して行っています。一部の計画研究においては、取得した相互作用情報を活用して、天然リガンドを凌駕する生物活性リガンドの同定に成功しています。また、生物活性リガンドの単離や合成研究も応募時の研究目的に合致した方向で進んでいます。

(菊地) A03班は、分子機能解析のためのツール開発を行い、高次機能解析プラットフォームを構築し、班員間で使用できることを目指しています。まずは、個々の班員の研究として化学プローブによる機能可視化やマルチオミクスデータを集積させ、さらに人工知能技術(AI)を用いた解析を行っています。

—本領域が発足したことによって顕在化した、新たな学術的価値や課題はありますか。

(掛谷) 微生物間、植物—微生物間、カイメン—共生微生物間、ヒト—細菌叢間などにおける化学コミュニケーションの理解・制御に向けて、天然物リガンドの生物学的意義の解析や天然物リガンドを凌ぐ生物活性リガンドの創製など想定以上に進展しています。すでに、医薬品の開発や食糧問題の解決などに貢献できる研究成果も得られつつあります。

(入江) 掛谷領域代表のご努力(領域リトリート、分野横断的な演者を多数招いたシンポジウムの開催など)により、領域内での共同研究が、計画研究のみならず、公募研究も含めて広範に行われています。特に、A03班の研究領域はこれまでの天然物有機化学領域にほとんどなかったものであり、天然物を基盤としたケミカルバイオロジー研究が質的に発展する可能性を秘めています。

(菊地) AIを用いた深層学習の表現学習を用いて、化学コミュニケーション文法という普遍的な原理を表すモデルの獲得を目指しています。これまでに、複数の班員が保有する約30,000個の化合物を統合し、そのケミカルスペースの多様性を認可薬と比較し、可視化することに成功しています。


—「分子社会学」学理の創生に向けての抱負を教えてください。

(掛谷) 各生物現象における化学コミュニケーションの発見・開発、機能解析データを集積すること、これらの機能解析には、本領域内の高次機能解析プラットフォームの活用をフルに考えています。

(入江) 「分子社会学」学理の創生に向けて、今後2年間、最大限の努力をして行くつもりです。

(菊地) 生物活性リガンドの真の生物学的意義の解明や、上記の技術を確立することで、ケミカルツール分子、医薬・農業シーズにつなげることを目指します。





—先生方、お忙しいところご丁寧なご説明ありがとうございました。「分子を起点としたネットワーク」の解明を通して、いくつかの成功事例によってその関係性(社会)が明らかになってきたと感じられます。今後これらの情報を統合して、AI学習を通じて「化学コミュニケーション文法」といった普遍的な原理原則・モデルに落とし込めることを期待しています。

—ここで特別出演ですが、本領域で「化学コミュニケーションAIプラットフォーム」構築に中心的な役割を果たされている慶応大・榊原先生に一言、お願いしました。

(榊原) 上述の約30,000化合物に加えて、昨年12月に慶應大学で開催しました第7回総括班班会議におきまして、AIプラットフォーム構築のために、各班の先生方が保有する天然・非天然を含むさまざまな化合物構造情報をその活性情報とともにご提供頂けることが承認され、データ収集が始まりました。これによって構築されるデータベースやAIによって解析された化学コミュニケーション空間を、独自性の高い研究成果として発信して行きたいと思います。

次回の領域会議の前には、このインタビュー記事を受けて、今度は領域の若手メンバーによる領域の将来構想などを議論する座談会を予定しております。そちらの方にも奮ってご参加いただければ幸いです。ご拝読ありがとうございました。

(高岡・高田)

## A01「生物間化学シグナルの理解」

松浦 英幸(北海道大学大学院農学研究院・教授)

**なぜ植物は共生菌を受容するか?相利共生構築に寄与する化学コミュニケーションの解析**

Why do plants receive symbiotic fungi? Analysis of chemical communication that contributes to symbiosis system

宮崎 雅雄(岩手大学農学部・准教授)

**ネコのマタタビ反応で機能する嗅覚受容体と多幸感に関わる神経回路の同定**

Study on olfactory receptors and neuro-circuits for the matatabi response in domestic cats

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—消化管内分泌細胞間化学コミュニケーションの実体解明**

Elucidation of chemical communication between gastrointestinal enteroendocrine cells and gut microbiota

清川 泰志(東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授)

**社会性動物の情動を制御する生物活性リガンドの同定**

Identification of bioactive ligands that control emotions in social animals

廣田 順二(東京工業大学生命理工学院生命理工学系・准教授)

**母子間化学コミュニケーションを促進する羊水成分の同定と生理機能の解明**

Identification of odorants that promote chemical communication between mother and pups

木谷 茂(大阪大学生物工学国際交流センター・准教授)

**休眠天然物を覚醒する放線菌二次代謝シグナルトークの解明と応用**

Clarification of chemical communication in actinomycetes for activation of cryptic natural products

櫻谷 英治(徳島大学大学院社会産業理工学研究部・教授)

**植物—微生物間の化学コミュニケーションを担う新たな脂質リガンドの探索**

Search for new lipid ligands responsible for chemical communication between plants and microorganisms

甲斐 建次(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・准教授)

**ポリイン類を介した微生物間拮抗現象に潜む双方向性化学コミュニケーション**

Bidirectional Chemical Communication among Microbes

有村 源一郎(東京理科大学基礎工学部生物工学科・教授)

**害虫が分泌するエリシターの植物認識機構**

Herbivore elicitor reception system in plants

清家 泰介(理化学研究所生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員)

**フェロモンを介した酵母の非対称な異性間コミュニケーションの仕組みの解明**

Elucidation of the mechanisms of asymmetric pheromonal communication in yeast

**A02「分子間シグナルの理解」**

門出 健次(北海道大学大学院先端生命科学研究院・教授)

**フルーツ由来マラバリコンの肥満抑制コミュニケーションの解明と医薬展開**

Mechanistic studies of obesity suppression effect of malabaricones isolated from a Malaysian fruit toward drug discovery

市川 聡(北海道大学大学院薬学研究院・教授)

**MraY阻害天然物による化学コミュニケーションの制御と創薬シーズの開発**

Modulation of Chemical Communication Based on MraY Inhibitory Natural Products and Their Application to Drug Lead Discovery

酒井 隆一(北海道大学大学院水産科学研究院・教授)

**マルチオミクス解析で紐解くホヤのケミカルコミュニケーション戦略**

Multioomics approach to reveal chemical communication of tunicates

有本 博一(東北大学大学院生命科学研究所・教授)

**低分子リガンドの高機能化に関する研究**

Development of new molecules from low molecular weight ligands

沓村 憲樹(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構(WPI-IIIIS)・教授)

**新たな痒み伝達経路の解明と掻痒症治療シーズの開発**

Elucidation of novel itch-transmission pathway and development of seeds for pruritus treatment

木越 英夫(筑波大学数理物質系・教授)

**海洋天然物と細胞骨格タンパク質との化学コミュニケーションの解析と応用**

Study of chemical communication between marine natural products and cytoskeleton

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/創製と機能解析**

Screening/development of inhibitors for reactive sulfur species-producing enzymes by utilizing fluorescent probes and their functional analysis

大神田 淳子(信州大学学術研究院(農学系)・教授)

**14-3-3たんぱく質が制御する化学シグナルの解明と制御**

Elucidation and controlling of chemical signals regulated by 14-3-3 proteins

北 将樹(名古屋大学大学院生命農学研究科・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**

Chemical Communication on the Mammalian Venom

中崎 敦夫(名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授)

**外来生物の誘引現象の理解と駆除を目指した強心ステロイドの非天然型アナログの創出**

Development of unnatural analogues of cardiac steroids for understanding attraction responses of invasive species and controlling its populations

井貫 晋輔(京都大学大学院薬学研究科・助教)

**粘膜免疫における細胞間化学コミュニケーションの理解に向けた機能性分子の創製**

Development of chemical tools for elucidating chemical communications in mucosal immunity

下山 敦史(大阪大学大学院理学研究科・助教)

**細胞-宿主間ケミカルエコロジーの理解とワクチンアジュバント開発への展開**

Elucidation of host-bacterial chemical ecology mediated by lipopolysaccharide and development of vaccine adjuvants

山下 敦子(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授)

**T1r味覚受容体による化学シグナル感知機構の構造生物学的解明**

Structural biology of perception mechanisms of chemical signals by taste receptor type 1

新藤 充(九州大学先端物質科学研究所・教授)

**アレロケミカルを起点とした植物コミュニケーション分子の開発**

Plant Chemical Communication Molecules Derived from Allelochemicals

高橋 栄夫(横浜市立大学大学院生命医科学研究科・教授)

**化学シグナル伝達における分子内ネットワークの理解とアロステリック制御機構の解明**

Elucidation of intramolecular network and allosteric regulation mechanism of receptors in chemical signal transduction



### A03「化学シグナルの統合解析法」

鬼塚 和光(東北大学多元物質科学研究所・准教授)

RNA標的創薬を指向したRNA-小分子間化学シグナル大規模解析技術の展開

Expansion of massive analysis of RNA-small molecule chemical signal for RNA-targeted drug discovery

永安 一樹(京都大学大学院薬学研究科・助教)

低分子から中分子に至るあらゆる化学構造のヒト作用予測モデルの開発

Development of prediction tools for therapeutic and adverse effects in human from chemical structures of small to medium-sized molecules

服部 満(大阪大学産業科学研究所永井研究室・助教)

生体を対象としたマルチスケール発光指示薬によるリガンド評価システムの構築

Establishment of a ligand evaluation system in living organisms using a multi-scale bioluminescence indicator

松森 信明(九州大学大学院理学研究院・教授)

脂質が関与する化学コミュニケーション解明のための脂質認識天然物リガンドの探索

Screening of lipid-recognizing natural ligands for elucidation of lipid-related chemical communications

清宮 啓之(公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター分子生物治療研究部 部長)

化学シグナルの統合的分子プロファイリングによる四重鎖核酸の機能解明

Elucidating the functions of quadruplex nucleic acids by integrative molecular profiling of chemical signals

齋藤 大明(北陸大学薬学部・准教授)

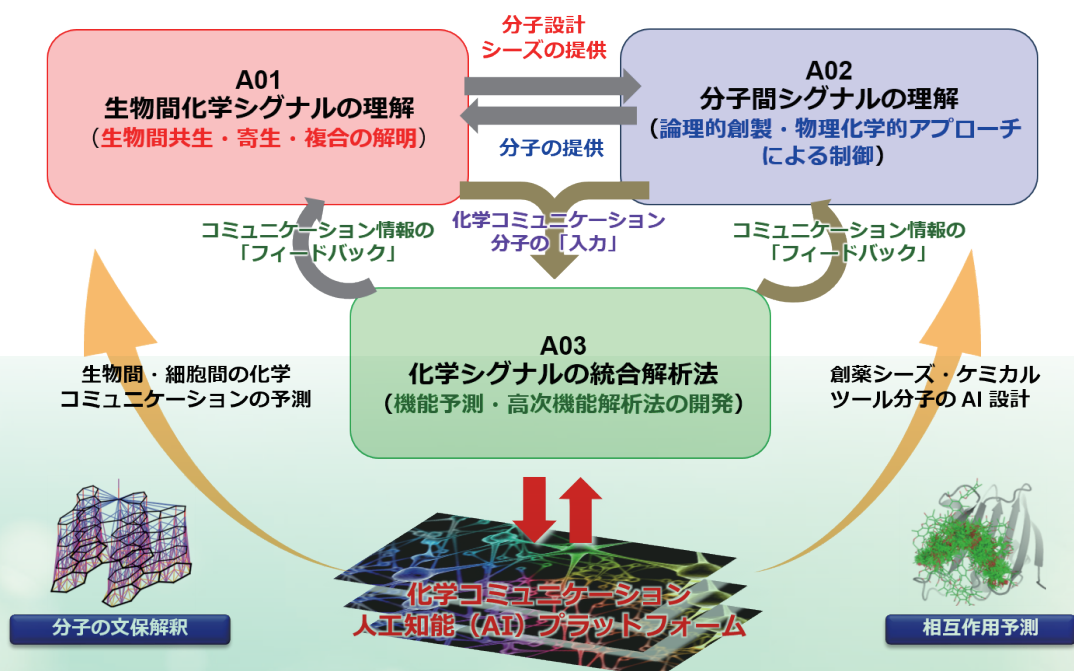
生体膜に会合する化学コミュニケーション分子の機能解明と計算分子設計技術の開発

In silico molecular design for chemical communication molecules bind to membrane

松本 健(理化学研究所環境資源科学研究センターケミカルゲノミクス研究グループ・専任研究員)

ヒト培養細胞でのリガンド作用機序解明技術の確立とそれを用いた翻訳調節化合物の解析

Mechanism of action studies of bioactive molecular ligands in human cultured cells



## 微生物間化学コミュニケーションの理解・制御と有用生物活性リガンドの開発

掛谷秀昭<sup>1</sup>, 倉永健史<sup>1</sup>, 西村慎一<sup>2</sup>, 井本正哉<sup>3</sup><sup>1</sup>京大院薬, <sup>2</sup>東大院農生科, <sup>3</sup>順天堂大医)

## 【学術的背景・研究目的】

微生物が産生する二次代謝産物は、歴史上、化学構造及び生物活性の両面における多様性などから様々な重要なケミカルツール分子や創薬シーズになっている<sup>1)</sup>。しかし、これら二次代謝産物の本来の化学コミュニケーションに基づいた生物学的意義はほとんど解明されていない。そこで、微生物間化学コミュニケーションの解析モデルとして、各種放線菌と *Tsukamurella pulmonis* TP-0596 の複合培養系に着目し、複合培養系特異的二次代謝産物の産生機構や生産菌における機能を明らかにすること、一方、耐熱性放線菌が生産する熱ショック代謝物 (HSMs) の解析及び生産意義に迫ることなどを旨とする。一方、極微量の化学コミュニケーション分子や各種アミノ酸及び生体内ペプチドなどの検出感度の向上は、新しい「分子社会学」創成の礎を担うことが期待され、新規方法論の確立を目指す。さらに、領域内連携を活用して、がん・細菌叢と宿主やがん細胞間の化学コミュニケーション阻害などを標的とした生物活性リガンドの開拓を行い、細胞内化学シグナル解析に有用なケミカルツール分子や創薬シーズの開拓を目指す。

## 【現在までの研究成果概要】

5aTHQ 類及び STAM 類を生産可能な放線菌 *Streptomyces nigrescence* HEK616 と *T. pulmonis* TP-0596 の複合培養系において、[1-<sup>13</sup>C]酢酸、[1,2-<sup>13</sup>C]酢酸を用いた標識実験及び生産菌 *S. nigrescence* HEK116 のゲノム解析と異種発現などによって生合成遺伝子を同定し、酸化度・環化様式が異なる 5aTHQs 及び STAMs がいずれも新規の II 型 PKS によって生合成されることを明らかにした<sup>2)</sup>。さらに、5aTHQ 類の活性体・不活性体の混合物の生物活性発現機構を明らかにすることができ、これら 5aTHQ 類は新しいタイプの細胞膜シグナル制御物質であることが示唆された<sup>3)</sup>。一方、希少放線菌 *Saccharothrix* sp. A1506 と *T. pulmonis* TP-0596 の複合培養により、新規化合物 saccharothriolide C<sub>2</sub> を見出した。さらに、HSMs として、angucyclin-type 化合物や新規化合物 murecholamide などを含む 14 種類の同定に成功した<sup>4)</sup>。

従来の Marfey 法と比較して、より温和な加水分解条件下で生成する極微量のアミノ酸や化学コミュニケーション分子でも検出可能な新規ラベル化剤の開発に成功した<sup>5)</sup>。

領域内連携を活用して、放線菌 KUSC-A08 が生産する verucopeptin の細胞内化学シグナルの解析を行うための *in silico* ネットワーク解析を行うとともに、 $\beta$ -カテニン遺伝子活性型変異がんや去勢抵抗性前立腺がんなどに有効な生物活性リガンドを見出した<sup>6)</sup>。さらに、がん宿主及びヒト腸内細菌叢の化学コミュニケーションの理解・制御を目指して、ショウガ科ウコン由来の curcumin のプロドラッグ型水溶性化合物 CMG の開発に成功し、CMG が治療抵抗性大腸がんにも有効であることを明らかにした<sup>7,8)</sup>。

## 【今後の研究計画】

引き続き、領域内連携を活用して、複合培養系などを利用した微生物間化学コミュニケーションの解析研究及び難治性がんやがん幹細胞などを標的とした有用生物活性リガンドの開拓研究を推進する。

## &lt;参考文献&gt;

- 1) Kakeya, H. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 648. 2) Ozaki, T. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 2370. 3) Sugiyama, R. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 13486. 4) Saito, S. *et al.* **2020**, 73, 203. 5) Kuranaga, T. *et al.* submitted. 6) Ikeda, H. *et al.* submitted. 7) Ozawa, H. *et al. Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 1515. 8) Ozawa-Umeta, H. *et al. Cancer Sci.* in press.



## 冬虫夏草（サナギタケ）のレクチンに関する生体内機能の解明

鈴木智大<sup>1</sup>, 小野晶子<sup>1</sup>, 柏 毅<sup>2</sup>, 本山高幸<sup>2</sup>, 崔 宰熏<sup>3,4</sup>, 平井浩文<sup>3</sup>,  
道羅英夫<sup>3</sup>, 長田裕之<sup>2</sup>, 河岸洋和<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>宇大バイオ,<sup>2</sup>理研 CSRS ケミカルバイオロジー,<sup>3</sup>静岡大グリーン研,<sup>4</sup>静岡大農)

### 【学術的背景・研究目的】

バツカクキン科冬虫夏草属の一種であるサナギタケ (*Cordyceps militaris*)は、昆虫に寄生するキノコの種類であり、栄養補助食品や漢方として広く利用されている(図 1)。しかしながら、本菌の感染方法や子実体形成能の分子メカニズムははまだ解明されていない。本研究では、生物間相互作用に関与するレクチンに着目し、その生体内機能を解明することを最終目的とした。そこで本研究では、1)サナギタケ子実体から、新規のレクチンタンパク質 (CmLec4 と命名) を抽出・精製しその諸性質決定を行うこと、2)カイコ蛹中の CmLec4 標的タンパク質を探索すること、3)酵母を用いた異種発現系を構築し、得られた組換え CmLec4 をカイコの蛹に接種することでその影響を検討すること、4) *cmlec4* 遺伝子破壊株を作出し、子実体形成能を評価することを目的とした。



図 1 実験室で発生させたサナギタケ

### 【現在までの研究成果概要】

#### 1) サナギタケ子実体からの新規レクチン (CmLec4) の精製と諸性質決定

サナギタケ子実体をリン酸緩衝液で抽出後、得られた抽出液を Bovine submaxillary mucin (BSM)-アミノトヨパールアフィニティークロマトグラフィーに供し、部分精製レクチン(CmLec4)を得た。本画分を SDS-PAGE に供した結果、12 および 14 kDa 付近に主要なバンドを示した(図 2)。上記の 14 kDa 付近のバンドを LC-MS/MS 解析に供した結果、Ricin B-related lectin と同定された。さらに *cmlec4* 遺伝子のクローニングを行い、完全長の cDNA 配列の取得に成功した。また、CmLec4 は R 型レクチン特異的な (QXW)<sub>3</sub> のタンデムリピート配列を有しており、Ricin タイプのレクチンに分類されることが明らかになった。

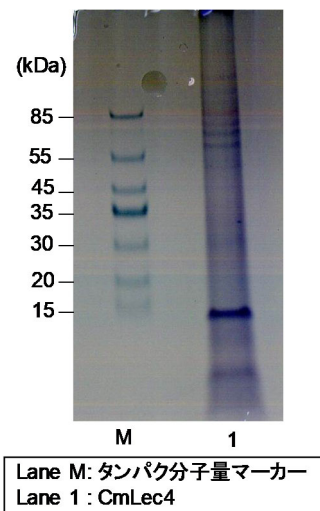


図 2 SDS-PAGE の結果

さらに各種糖および糖タンパク質を用いた赤血球凝集阻害試験を行い、CmLec4 の糖結合特異性を試験した。その結果、単糖およびオリゴ糖ではキチンの 3 糖に最も強い結合を示し、続いて chitopentaose、chitotetraose に強い特異性を示した。また、糖タンパク質では asialo-BSM に最も強い活性を示した。

#### 2) カイコ蛹中の CmLec4 標的タンパク質の探索

次いで、CmLec4 が標的とするカイコ蛹中のタンパク質の探索を試みた。赤血球凝集活性阻害試験を指標として、各種クロマトグラフィーを用いて標的タンパク質の精製に成功した。精製標的タンパク質は SDS-PAGE において 70 kDa に単一のバンドを示し、このバンドを LC-MS/MS 解析に供した結果、Sex specific storage protein2 (SP2)と同定された。さらに各



種機器分析を用いた糖鎖構造解析および PNGase F を用いた N 型糖鎖の切り出し処理等、種々の検討を行った。その結果、SP2 タンパク質は N 型および O 型糖鎖を有すること、CmLec4 が SP2 タンパク質の N 型糖鎖を認識することが明らかになった。

### 3) 酵母を用いた異種発現系の構築と組換え CmLec4 のカイコ蛹への接種

CmLec4 が標的とする SP2 タンパク質は、カイコ蛹体内での栄養素の貯蔵と利用に関与していることが示唆されている<sup>1)</sup>。そこで本研究では、CmLec4 の酵母を宿主とした異種発現の構築を試み、recombinant CmLec4(rCmLec4)をカイコ蛹に接種し宿主に与える影響を検討した。その結果、rCmLec4 を接種したカイコ蛹では対照区と比較して有意にカイコの蛹の羽化を促進することが明らかになった。さらにこのレクチンに特異的に結合する糖タンパク質 asialo-fetuin を同時接種すると、rCmLec4 が与える羽化への影響が観察されなかったことから、CmLec4 のレクチン機能がカイコ蛹の羽化に影響を与えることを明らかにした。

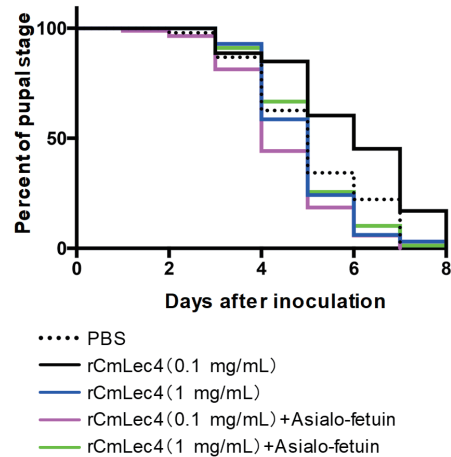


図3 rCmLec4 を接種したカイコの蛹率

### 4) *cmlec4* 遺伝子破壊株の作出とその子実体形成能の評価

アグロバクテリウムを用いた相同組換えによって、サナギタケの *cmlec4* 遺伝子破壊株の作出に成功した。さらに本遺伝子破壊株の子実体形成能の評価を行い、破壊株はカイコ蛹への感染速度が低下すること、子実体形成能が野生株よりも顕著に低下することを明らかにした。

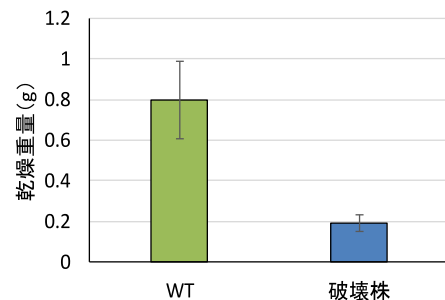


図4 野生株(WT)および *cmlec4* 遺伝子破壊株の子実体重量

#### 【今後の研究計画】

本研究では現在までに、サナギタケ由来の新規レクチンが、宿主(カイコ蛹)の羽化に影響を与えること、サナギタケの *cmlec4* 遺伝子破壊株の子実体形成能が顕著に低下することを明らかにした。今後は、さらに詳細な CmLec4 およびサナギタケの有するその他レクチン遺伝子の機能を解析するため、下記の課題を遂行する。

- ・ CmLec4 の機能解析・生体内での挙動を確認する
- ・ CmLec4 が標的とするカイコ中の SP2 タンパク質の構造および相互作用解析
- ・ サナギタケのゲノム上に存在するその他のレクチン遺伝子の破壊株の作出

上記課題を遂行することにより、サナギタケ-宿主間のレクチンの生体内機能の解明を目指したい。

#### <参考文献>

- 1) Zhou, Y. et al. 2016. *J Insect Physiol* 91-92, 56-62.



### 難培養性共生微生物の可培養化を志向したプロテオミクス

松永茂樹<sup>1</sup>, 高田健太郎<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 東大院農, <sup>2</sup> 北里大海洋)

#### 【学術的背景・研究目的】

カイメンは、陸上微生物や植物には含まれない生物活性物質を多く含むことから、創薬につながる生物医学的に有用な化合物資源であると考えられている。しかし、これらの化合物の生産を担う共生微生物は人工培養が難しいため、未利用微生物資源と捉えられている。本研究グループは、カイメン由来の難培養共生微生物 *Entotheonella* 属が持つ高い化合物生産能に着目し、カイメン・共生微生物間の相互作用の理解を様々な角度から深めることを通して、その可培養化の実現に向けた研究に取り組んでいる。その中のひとつに、オミクス研究から得られる代謝経路情報に基づく培養条件の検討がある。本微生物の培養が可能になれば、生物活性物質の安定的供給の実現が期待される。

#### 【現在までの研究成果概要】

八丈島の同一海域に、内部が黄色のカイメン *Theonella swinhoei* Y(TSY)と内部が白色のカイメン *T. swinhoei* W(TSW)が生息していて、それぞれから異なったタイプの化合物が発見されている<sup>1,2)</sup>。いずれのカイメンの場合も、共生微生物 *Entotheonella* が物質生産に関わることが示されている。そこで、カイメンを解離後、遠心分離等により *Entotheonella* の濃縮画分を得て、これを用いてLC-MSによるプロテオミクスを実施した。TSY由来の *Entotheonella* から得られたタンパク質のペプチド配列を *Candidatus Entotheonella factor*、*Candidatus Entotheonella gemina* の2種のゲノム配列と<sup>1)</sup>、TSWからのものを *Candidatus Entotheonella sarta* のゲノム配列<sup>2)</sup>と参照した結果、それぞれの微生物起源のタンパク質を、順に、906個、673個および249個同定できた。同定されたタンパク質の数は異なるものの、3種のいずれにおいても、類似の代謝経路を構成するタンパク質が検出された。この情報をもとに、培地の炭素源、窒素源を設計し、共生微生物の可培養化に向けた研究を進める。なお、RNAseqも検討中であるため、その情報も可培養化に活かしたい。

#### 【今後の研究計画】

オミクスデータから導かれた炭素源および窒素源の取り込みを、二次元高分解能二次イオン質量分析装置(NanoSIMS)によって調べ、培養条件の最適化に用いる予定である。

#### 〈参考文献〉

- 1) Wilson, M. C. *et al. Nature* **2014**, *506*, 58.
- 2) Mori, T. *et al PNAS* **2018**, *115*, 1718.

## ヒト-細菌叢間 化学コミュニケーションの理解と炎症性腸疾患・がん・がん免疫

西尾和人<sup>1</sup>, 坂井和子<sup>1</sup>, 上嶋一臣<sup>2</sup>, 櫻井俊治<sup>2</sup>, 角田郁夫<sup>3</sup>, 岡田 齊<sup>4</sup>(近大医ゲノム生物学<sup>1</sup>, 消化器内科学<sup>2</sup>, 微生物学<sup>3</sup>, 生化学<sup>4</sup>)

## 【学術的背景・研究目的】

ゲノム解析技術の進歩により、がんや感染症の分野において精密医療への展開に向けた研究開発が進められている。我々は次世代シーケンシング等により、網羅的なヒト組織の遺伝子変化の検出と各種疾患との関連性の解析を実施してきた。ヒトの腸内には 100 兆超の細菌が存在し、宿主であるヒトと腸内細菌との間では、化学コミュニケーションが密に存在する筈である。腸内細菌は宿主であるヒトが代謝できない分子を代謝し、生体内の免疫バランスをとり、炎症制御を行うことによりヒトと共生していると考えられる。本研究では、腸内細菌叢の解析において、ヒト-細菌叢間の化学コミュニケーションに焦点を当て、消化器疾患及び中枢神経疾患領域の中で、難治性炎症性疾患であるクローン病や潰瘍性大腸炎患者における腸内細菌叢の代謝産物を通じての発がんリスクの評価と代謝産物の同定をおこなうと共に微生物と二次代謝産物—ヒト間の相互作用について解析をすすめ、創薬のシーズ開拓へと繋げる。

## 【現在までの研究成果概要】

## 1) 炎症性腸疾患患者における宿主・微生物間の相互作用と病態の類似性

腸内細菌と炎症性腸疾患：炎症性腸疾患（クローン病や過敏性腸症候群）の便中及び内視鏡生検サンプルの腫瘍遺伝子変異解析、全トランスクリプトーム解析と同時に細菌叢のメタゲノム解析を行った。炎症性腸疾患（IBD）における便及び腸生検サンプルの 16S rRNA 解析から IBD においては、*γproteobacteria*、非小細胞肺癌の免疫チェックポイント阻害薬（ICI）治療に起因する消化管関連有害事象（irAE）を示す患者のサンプルでは、*lactobacillales* が、両者に共通する細菌群として *fusobacteriales* が同定された。総じて、潰瘍性大腸炎を含む IBD と ICI に起因する消化管 irAE における 16S プロファイルには相似性が認められた。また *fusobacteriales* 目等の関連細菌叢の特徴は、局所の組織検体でより顕著に認められた。ヒト腸組織のトランスクリプトーム解析では、炎症部と非炎症部の遺伝子発現のクラスタリング、機能的パスウェイ解析を行った。炎症部では炎症反応性のパスウェイが亢進していると共に、各種免疫細胞のトラフィッキングに関連する複数のパスウェイも亢進していた。炎症に起因する免疫細胞の動員が示唆された。irAE と IBD 間の全パスウェイ若しくは炎症反応パスウェイの Z score の相関は炎症部において高く ( $R^2=0.8993$ )、IBD、irAE の炎症部で高い類似性を示した。桜井・上嶋らは潰瘍性大腸炎の病態においてガンキリンが重要と示した<sup>1)2)</sup>。

## 2) 細菌叢—宿主間化学コミュニケーション～微生物叢の変化が宿主細胞に及ぼす影響

DSS/AOM 誘導性腸炎/発癌マウスモデルにおける宿主側のプロファイルとして大腸上皮組織の全トランスクリプトーム解析を実施した（図 1）。ヒト遺伝子に外挿した 16,763 遺伝子から発現程度によりフィルタリングを行い 10,050 遺伝子を選択した。各群（Control, DSS, AOM, DSS/AOM）を分類し得る 3,000 遺伝子を抽出し、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析を行った結果、脂肪酸代謝、酸化リン酸化、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路への集積が見出された（図 2）。環境側のプロファイルとして糞便の 16S メタゲノム解析を行った。各群（Control, DSS, AOM, DSS/AOM）における細菌叢の多様性を比較した結果、腫瘍形成状態と多様性の増加に相関が認められた（図 3）。また、冗長性分析により DSS/AOM 群と他の群との有意な非類似性が示された（図 4）。同時に、属および種に限定された菌叢の OTU 存在量から、Pipillin による機能的パスウェイを推定した結果、スフィンゴ脂質シグナル経路、リポアラビノマンナン生合成経路が見出された（図 5）。細菌叢プロファイルによるリポアラビノマンナン生合成経路は、宿主の PI3K-AKT-mTOR シグナル経路との関連が示唆され、環境



因子により宿主の PI3K-AKT-mTOR シグナル経路遺伝子発現が影響を受けることが示された。これらの結果は、細菌叢—ヒト (マウス) 間化学コミュニケーションを示している。

図1. DSSおよびAOM投与後の大腸病理組織像

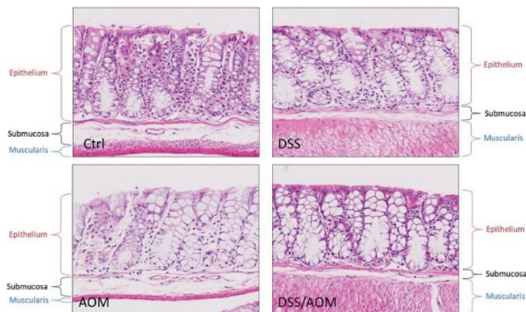


図3. 腫瘍形成の有無に対する細菌叢の多様性比較

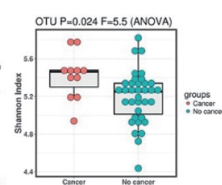


図4. DSSおよびAOM投与における細菌叢の冗長性解析による類似度比較

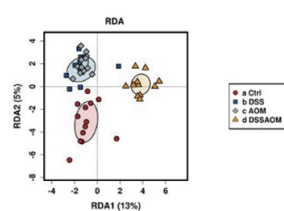


図2. GSEA解析により見出された宿主における変動パスウェイ

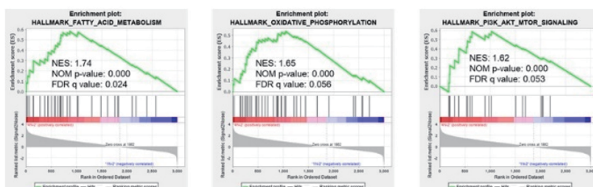
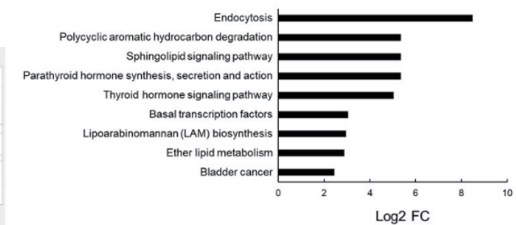


図5.腫瘍形成の有無に対する細菌叢の機能解析から見出されたパスウェイ



また、岡田らは、DSS/AOMによる大腸がん発がんモデルにおいて、宿主の免疫応答性によって誘導される組織の線維化をニコチンアミドモノヌクレオチドが抑制し、同作用を通じて大腸がんの腫瘍形成を抑制することを明らかにした。

腸内細菌と免疫チェックポイント阻害薬 (マウスモデル) を用いた基礎的研究として腫瘍における細菌叢と宿主の双方制御機構に対するICIの影響について検討している。

肺癌、大腸癌移植マウスモデルにて掛谷ら (A01) が開発中の水溶性プロドラッグ型クルクミン CMG の抗腫瘍活性及び抗 PD-1 抗体との併用効果、ならびに CMG の炎症及び腸内細菌叢に対する影響と、細菌叢—マウス細胞との相互作用を検討中である。また、DSS 炎症モデルにおける CMG の効果を検討し、CMG の腸内細菌叢および細菌叢—マウス細胞との相互作用に対する作用を解析中である。

### 3) 中枢神経炎症疾患と細菌叢の化学コミュニケーション

角田らは中枢神経炎症疾患である多発性硬化症とアルツハイマー病のマウスモデルを用い、16S rRNA 解析による細菌叢変化と Internal transcribed spacer 1 (ITS 1) 解析による真菌叢変化と中枢神経内のトランスクリプトームの関連性、両者のクロストークに介在する血中因子の同定を明らかにした。多発性硬化症に特定の腸内細菌叢が関与していることが見い出されつつある。また、多発性硬化症の実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルに対して、CMG の活性本体であるクルクミンの薬効検討を行い実験モデルの臨床症状の軽減が認められた。

#### 【今後の研究計画】

引き続き、領域内連携を活用して、微生物—ヒト間の化学コミュニケーションの解析研究と、難治性がんなどを標的とした治療法の開発研究を推進する。

#### <参考文献>

- 1) Sakurai T, et al. *Intern Med.* **2020**, 59:471. 2) Sakurai T, et al. *Digestion* **2019**, 100:192.

天然 PKC リガンドによる化学コミュニケーションの統合的理解と  
医薬品シーズの開発入江一浩<sup>1</sup>, 村上一馬<sup>1</sup>, 塚野千尋<sup>1</sup>, 柳田 亮<sup>2</sup>( <sup>1</sup>京大院農, <sup>2</sup>香川大農)

## 【学術的背景・研究目的】

プロテインキナーゼ C (PKC) は細胞内シグナル伝達経路の上流に位置する重要なリン酸化酵素ファミリーであり、天然発がんプロモーターの主要な標的タンパク質として知られている。PKC はがん、アルツハイマー病、AIDS など様々な疾患に関与しており、PKC を活性化する PKC リガンドはこれらの疾患に対する治療薬候補として注目されている。しかしながら、10 種類以上存在する PKC アイソザイムの役割と PKC リガンドがもたらす炎症誘導といった副作用の理由について、十分な統合的理解は得られていない。本研究では、アメフラシ由来の PKC リガンド・アプリアトキシシン (ATX) の構造を単純化した Aplog 類の構造最適化・構造展開により、新規医薬品シーズの創出を目的としている。さらに、領域内連携を活用して、人工知能 (AI) を利用した機械学習による *in silico* 探索と実験的検証によって、既知の PKC リガンドとは異なる骨格を有する新規 PKC リガンドの探索とそれらの単純化アナログの合成により、PKC アイソザイム選択性を含む新規機能性を有する PKC リガンドの開発を目指す。

## 【現在までの研究成果概要】

10-Me-Aplog-1 は、天然物に匹敵する PKC 結合能とがん細胞増殖抑制活性を示す最も有望な Aplog 類の 1 つであり、大量合成にも成功している<sup>1)</sup>。10-Me-Aplog-1 のさらなる単純化のため、マクロラクトン環を構成するスピロケタールの一方の環に酸素原子を導入したアセタールアナログと一方の環を除去した超単純化アナログを短段階で合成した<sup>2,3)</sup>。これらのアナログは 10-Me-Aplog-1 と比較して結合能は低下したものの、異なる PKC アイソザイム結合選択性を示す興味深い結果が得られた。

10-Me-Aplog-1 の抗アルツハイマー病活性を初代ラット大脳皮質細胞およびヒト iPS 細胞由来神経細胞で評価したところ、10-Me-Aplog-1 は培地中のアミロイド  $\beta$ 42 (A $\beta$ 42) 量を有意に低減すると共に、A $\beta$  の毒性オリゴマー化を抑制することが明らかとなった<sup>4)</sup> (富山大薬・久米利明教授、京大 iPS 細胞研究所・井上治久教授との共同研究)。また、10-Me-Aplog-1 は、*in vitro* ならびに *in vivo* において潜伏ヒト免疫不全ウイルス (HIV) を活性化すること、BET 阻害剤との併用により炎症誘導作用が抑制されることが明らかとなり、HIV 感染症に対する Shock & Kill 療法における Latent Reversing Agent としての有効性が示された (京大ウイルス研・明里宏文教授との共同研究)。さらに A03 班の榊原康文教授と連携して、機械学習を利用した PKC リガンドの化合物データベースからの探索と実験的活性評価を行い、新規 PKC リガンド候補化合物を複数見いだしている。

## 【今後の研究計画】

引き続き、10-Me-Aplog-1 の構造最適化を行い、がん、アルツハイマー病、AIDS それぞれに対して有望な治療薬シーズの創出を目指す。同時に、AI を利用した探索によって見いだされた新規 PKC リガンド候補化合物を機能指向型合成により単純化し、これまでになく有用な PKC リガンドの開発を推進する。

## &lt;参考文献&gt;

1) Kikumori, M. *et al.*, *Tetrahedron* **2014**, 70, 9776. 2) Hayakawa, K. *et al.*, *Heterocycles* **2018**, 97, 478. 3) Ashida, Y. *et al.*, *Heterocycles* **2019**, 99, 942. 4) Murakami, K. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1179.



### マイトトキシンの標的分子探索

此木敬一<sup>1</sup>, 角替俊輔<sup>1</sup>, 八代田陽子<sup>2</sup>, 松本 健<sup>2</sup>, Katherine Chan<sup>3</sup>, Amy Hin Yan Tong<sup>3</sup>,  
Kamaldeep Kaur Aulakh<sup>3</sup>, Andrea Habsid<sup>3</sup>, 山下まり<sup>1</sup>, Jason Moffat<sup>3</sup>, Charles Boone<sup>2,3</sup>,  
吉田 稔<sup>2</sup>, 村田道雄<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>東北大院農,<sup>2</sup>理研 CSRS,<sup>3</sup>トロント大,<sup>4</sup>阪大院理)

#### 【学術的背景・研究目的】

マイトトキシン (Maitotoxin, MTX) のマウスに対する急性致死毒性は非ペプチド性天然毒として史上最強クラスに属し、フグ毒テトロドトキシンの約 200 倍である。しかし、単離後、約 40 年を経た現在でも作用機序は不明である<sup>1-3)</sup>。我々は、1) MTX がリポソームに内封した蛍光色素を漏洩させないこと、2) MTX の細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入作用を観測し、リン脂質、ガングリオシドが阻害剤となること、3) MTX がゴースト赤血球 (溶血後、細胞質を緩衝液に置換した赤血球) に対しても Ca<sup>2+</sup>流入作用を示すことを明らかにし、その標的分子は脂質成分 (仮説 1)、あるいは膜タンパク質 (仮説 2) であると考察した<sup>4)</sup>。その後、光親和性標識実験<sup>5)</sup>や阻害剤探索<sup>6)</sup>を行ったが、標的分子の決定に至らず、打開策として一細胞中の遺伝子を網羅的に探索することを考えていた。本領域では共同研究者の恩恵に預かり、全遺伝子について欠損株の調達が可能な酵母、そして、CRISPR-Cas9 システムを用いて網羅的に遺伝子を欠損できる一倍体細胞株 HAP1 に対して MTX を投与する実験を実施した。以下、進捗状況を報告させて頂く。

#### 【現在までの研究成果概要】

まず、分裂酵母、出芽酵母は野生株、薬剤感受性株ともに MTX に対して非感受性であった。そこで、本領域のご援助を賜り、2018年9月より約4ヶ月間、修士一年の角替俊輔をトロント大学ドネリーセンターに派遣し、CRISPRスクリーニングを行った。まず、一倍体細胞株 HAP1 に含まれる約 18,000 個の遺伝子の各々を欠損させたライブラリーを構築し、MTX 添加・非添加条件で同細胞を継代培養した。そして、MTX 添加群と非添加群の各々に存在する各遺伝子欠損株の存在比より MTX 耐性・感受性遺伝子を決定した。培養状態 (浮遊系、付着系)、投与濃度 (IC<sub>50</sub>、IC<sub>90</sub>) などの条件を模索し、付着系 HAP1 に対して IC<sub>50</sub> 濃度の MTX を 10 日間 (植え継ぎ 3 回の間)、継続添加した結果、仮説を支持するような関連遺伝子を複数、高いスコアで見い出すことができた。

細胞毒性とマウスに対する急性致死毒性とを関連づけるため、生細胞観察を行った。その結果、MTX 添加後、急性致死毒性が発現する程度の時間で顕著な細胞毒性が現れることがわかり、CRISPRスクリーニングで得られた結果を担保する作業機序の着想に至った。

#### 【今後の研究計画】

今後、CRISPRスクリーニングで見出された候補遺伝子について siRNA を用いたノックダウン、蛍光色素を用いた生細胞観察を実施し、CRISPRスクリーニングの結果検証を行う予定である。

#### <参考文献>

1) Takahashi, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 7287. 2) Murata, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2060. 3) Gusovsky, F. and Daly J. W., *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 39, 1633. 4) Konoki, K. *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12, 993. 5) Konoki, K. *et al.*, *Heterocycles* **2009**, 79, 1007. 6) Nicolaou, K. C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 16444.



### 植物毒素の関与する化学コミュニケーションの理解と制御

上田 実

(東北大院理・院生命)

#### 【学術的背景・研究目的】

植物病原菌が生産する毒素は、植物-微生物間の化学コミュニケーション研究のための重要なツールである。我々は、植物ホルモンミミック植物毒素コロナチン(COR)と、宿主選択的毒素(HST: host-selective toxin)を用いて、化学コミュニケーションの理解と制御を目指している。

植物毒素 COR は、植物の病原菌感染や、虫による食害への防御応答防御に関与する植物ホルモン ジャスモン酸イソロイシンのミミックである。しかし、その植物内標的である COI1-JAZ 受容体には重篤な遺伝的冗長性が見られ、COR は防御応答以外に多くの副作用を引き起こす。本研究では、これまでの実績に基づいて<sup>1-3)</sup>、重篤な遺伝的冗長性をもつ植物ホルモン共受容体に対し、任意のサブタイプを選択的に活性化し機能解析できる化学戦略を開発することで、植物-外敵間の化学コミュニケーションの理解と制御を目指す。

またある種の植物病原菌は、特定の植物種にのみ病害を引き起こす(宿主選択性)。病原菌の生産する HST が、宿主となる植物を決定する病原因子である。なぜ HST は宿主選択性をもつのか?その解明には、HST の作用機構を知ることが必要である。これまでに、エンバク病原菌の HST ビクトリンの標的タンパク質が、モデル植物シロイヌナズナのビクトリン感受性遺伝子変異株を用いて同定されたが、HST の宿主の多くは遺伝学的研究リソースに乏しい非モデル植物であり、今日まで宿主特異性の分子実体はようとして知れない。

#### 【現在までの研究成果概要】

植物毒素 COR を化学ツールとして、重篤な遺伝的冗長性をもつ植物ホルモン共受容体に対し、任意の受容体サブタイプを選択的に活性化し機能解析できる化学戦略として、「反応性アンタゴニスト」、「立体異性体ケミカルライブラリー」、「ヘテロ種受容体-リガンド系導入」の3つの化学戦略を開発している。

HST に関しては、代表的な HST である AK-toxin II や AF-toxin、ACT-toxin に共通してみられるエポキシトリエンデカカルボン酸(EDA)構造をベースに構築した EDA 誘導体ライブラリーから、モデル植物イネに対して毒性を示す宿主拡張型 HST を得た。この毒性は、活性酸素種(ROS)生産誘導によることが分かった。ROS 生産誘導は、病原菌感染に対する植物免疫応答にも見られることから、HST はアレルゲンの様に機能し、宿主植物に対して免疫の過剰応答を引き起こすことが示唆された。即ち宿主選択性の正体は「植物のアレルギ一応答」であると推定された(論文準備中)。

#### 【今後の研究計画】

植物毒素 COR に関しては、引き続き3つの化学戦略の開発を続けると共に、植物個体の表現型評価を進める。また、植物病原菌感染における「宿主選択性」の仕組みは、植物病理学の長年の謎である。引き続き、ROS 生産誘導の仕組み解明と、LRR 型膜貫通キナーゼと推定される HST 受容体の同定を試みる。

#### <参考文献>

- 1) Takaoka, Y. *et al. Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3654. 2) Takaoka, Y. *et al. J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 5074-5081. 3) Ueda, M. *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1124.



## 小分子化合物依存的な光分解性ペプチドの発見

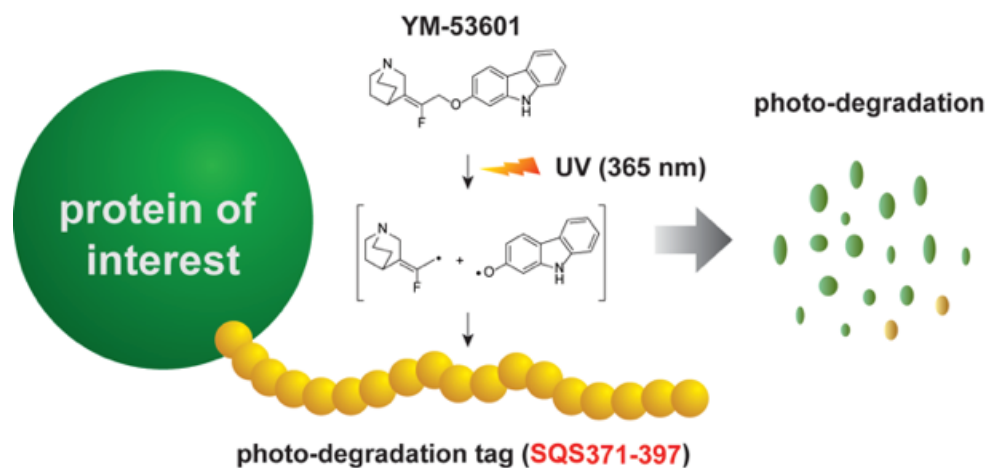
上杉志成, 竹本 靖  
(京大化研)

### 【学術的背景・研究目的】

PROTAC (proteolysis targeting chimeras) や AID (auxin-inducible degron) 法のように、小分子化合物を用いてタンパク質分解を制御する手法は、生細胞や個体中で特定のタンパク質を任意に分解することができるため、生命現象の解明に極めて有用である。今回我々は、タンパク質分解の時空間的制御への応用を期待できる、小分子化合物依存的に光分解が誘導されるペプチドを発見したので報告する。

### 【現在までの研究成果概要】

YM-53601 は、スクアレニン合成酵素 (SQS) の阻害剤として開発された小分子化合物である。我々は偶然にも、YM-53601 の存在下で細胞に紫外線を照射すると、SQS が分解されることを見出した。様々な SQS の欠損変異体を作製し、検討を行なった結果、SQS の C 末領域の 27 アミノ酸 (SQS<sub>371-397</sub>) が YM-53601 による SQS の光分解に重要であった。興味深いことに、SQS の C 末領域からなるペプチドを、GFP 等の SQS とは無関係なタンパク質の N 末側、あるいは C 末側に付加して細胞に発現させ、YM-53601 存在下で紫外線を照射すると、分解された。紫外線照射後の生成物の解析、及び ESR による解析の結果、紫外線照射により YM-53601 のエーテル結合が開裂し、生成したラジカルがタンパク質分解を誘導していることが明らかになった。以上の結果より、SQS の C 末領域のペプチドと YM-53601 の組み合わせを用いることで、小分子化合物と光によりタンパク質分解を制御できる新しい光遺伝学的手法を開発できると考えられる<sup>1)</sup>。



### 【今後の研究計画】

今回発見した手法を改良し、小分子化合物と光によりタンパク質分解を制御できる手法を確立する。また、今回見出した 27 アミノ酸からなるペプチドは、細胞内ラジカルによる化学コミュニケーションを伝達する配列である可能性がある。そこで、今後は、このペプチドを応用して、細胞内のラジカルの挙動を明らかにすることも目的として研究を進める。

### <参考文献>

1) Takemoto, Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 1142

## 時空間解析法による化学コミュニケーション理解と生物活性リガンドの高次機能評価

菊地和也<sup>1,2,3</sup>, 堀 雄一郎<sup>1,2</sup>, 蓑島維文<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 阪大院工、<sup>2</sup> 阪大 IReC、<sup>3</sup> 阪大 QIQB)

### 【学術的背景・研究目的】

本計画研究では化学プローブのデザイン・合成を起爆剤として、化学コミュニケーション理解のための時空間解析技術を駆使し、生物活性リガンドの機能評価に用いる。測定したい対象分子との反応に着目して化学プローブをデザインする発想を基に、時間を特定して標的蛋白質に蛍光団を導入する原理や対象分子を可視化する化学プローブを合成し、分子認識や化学反応を分光情報(蛍光特性変化等)へ変換できるツールを開発し生物応用していく。具体的には、破骨細胞機能の *in vivo* イメージング、合成小分子と蛋白質を駆使した生細胞イメージング技術の開発を目的として研究を進める。この結果、鍵となる分子である天然物リガンド及び本新学術研究から創生された生物活性リガンドの機能を最大限引き出すべく、時空間解析を用いて化学コミュニケーション機能の新機軸となるシグナル解析法を供出していく。生物活性リガンドの「高次機能解析プラットフォーム」となる新技術を生み出すことで、化学コミュニケーションの動作原理を可視化により示す。

### 【現在までの研究成果概要】

これまでの研究経過としては、骨粗鬆症や関節リウマチの原因細胞である破骨細胞を標的として、「骨吸収を行う破骨細胞の蛍光イメージング手法」に着手し、破骨細胞活性をイメージングするための赤色蛍光プローブを開発した<sup>1)</sup>。骨吸収時の低 pH 環境下で蛍光を発するローダミン色素を基にプローブを設計・合成し、破骨細胞の骨吸収に関わる蛋白質複合体、プロトンポンプの機能と動態を *in vivo* で観察した。本プローブで得られたイメージングデータを時空間解析することで、生きたマウス体内で起こる骨吸収の機能を分子レベルで明らかにすることができた。また、この手法を用いてプロトンポンプ阻害剤、関節リウマチ治療薬等の投与後の阻害活性評価を *in vivo* で定量的に追跡することに成功した<sup>2),3)</sup>。

一方で、合成小分子と蛋白質を駆使したハイブリッドプローブを作製し、DNA のメチル化や、内在性膜タンパク質の発現といった機能を生細胞内でイメージングする基盤技術を構築した。これまでに DNA 結合色素であるオキサゾールイエロー (YO) と、メチル化 DNA 結合蛋白質 (MBD) を用いたプローブを合成し、メチル化 DNA の生細胞イメージングに成功し、その動態を追跡することを可能とした<sup>4)</sup>。同様の概念を用い、細胞膜に結合する環境応答性蛍光色素である Nile red と、Nanobody (ラクダ科動物由来抗体断片) を用いたプローブを合成し、細胞表面上の内在性膜蛋白質である上皮成長因子受容体 (EGFR) のイメージングに成功した。

### 【今後の研究計画】

引き続き、化学プローブ開発によるイメージング手法の構築を進める。具体的には骨組織深部における骨溶解、汎用的な内在性膜蛋白質機能をイメージングによって可視化するための基盤技術を確立する。また、確立したイメージング系を用いた生理活性リガンドの時空間的な評価を進める。

### <参考文献>

1) Minoshima, M. *et al. ACS. Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1059. 2) Kikuta, J. *et al. JBMR Plus*, **2018**, *2*, 362. 3) Matsuura, Y. *et al. Ann. Rheum. Dis.* **2018**, *77*, 1219. 4) Hori, Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 1686.





### 人工知能を用いた化学コミュニケーション空間の多様性と共通性の解明

榊原康文<sup>1</sup>, 佐藤健吾<sup>1</sup>, 齋藤 裕<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>慶應義塾大学理工学部, <sup>2</sup>産業技術総合研究所人工知能研究センター)

#### 【学術的背景・研究目的】

生物活性リガンドとその相互作用に関わる膨大な情報が公開データベースに蓄積され、「化学コミュニケーションビッグデータ」の時代が到来している。本研究は、人工知能分野における深層学習 (Deep Learning) を適用して、同種間・微生物叢内・微生物宿主間などの多種多様な化学コミュニケーションを統一的に表現するモデルを開発する。学習されたモデルから化学コミュニケーションにおいて頻出する生物活性リガンドの部分構造や、化学コミュニケーションによって引き起こされる遺伝子発現パターンなどを抽出して、それらを情報科学の文法理論に基づき「化学文法」として体系化する。

#### 【現在までの研究成果概要】

1. 化合物タンパク質相互作用を予測する深層学習手法に、タンパク質タンパク質相互作用および化合物ネットワークのオミックスデータを導入することで、マルチオミックス統合モデルを構築し、既存の手法を予測精度で上回ることができた<sup>1)</sup>。
2. 機械学習による新規 PKC リガンドの探索。A02 入江グループの所有する PKC リガンドを教師データとして畳み込みニューラルネットワークによる深層学習モデルを構築し、PubChem の約 1 億種類の化合物に対してスパコンによる網羅的な結合予測を行った。新規骨格を有するリガンド候補を多数発見することに成功した。現在、A02 入江グループによる活性評価と構造単純化アナログの開発が進行中である。
3. 深層学習手法である Deep Auto Encoder (自己符号化器) に PCA 解析 (主成分分析) を組み合わせることにより、化合物構造の多様性を可視化する手法を開発した。本手法を用いて、掛谷(A01), 上杉(A02), 井貫(A02)が保有する化合物の多様性を、Drug Bank DB (認可薬データベース) の化合物をベースとして比較し、可視化した。
4. 強化学習を用いてバーチャルに化合物構造を生成する手法の開発。深層強化学習手法に、SMILES 文法規則を表す特徴行列を用いた化合物構造の生成モデルを組み込み、分子特性の最大化、学習モデルの最適化を行い、先行研究と比較を行った。3つの分子特性指標 (薬らしさ, 疎水性, 分子量) に関して最適化評価を行った結果、本手法は全てにおいて先行研究に匹敵するかそれ以上の化合物構造最適化能力を示した。

#### 【今後の研究計画】

マルチオミックスデータを組み合わせたタンパク質-化合物相互作用予測手法の精度をさらに向上させることにより次世代 COPICAT の完成を目指す。深層学習手法である Deep Auto Encoder (自己符号化器) に PCA 解析 (主成分分析) を組み合わせることにより、化合物構造の多様性を可視化する手法の開発を続ける。本手法を用いて、掛谷班, 上杉班, 井貫班をはじめとする領域各班が保有する化合物を収集し多様性を可視化することで、AI プラットフォームの構築を行っていく。入江班との新規 PKC リガンドの探索の共同研究も加速させる。

#### <参考文献>

- 1) Watanabe, N. *et al.* submitted. 2) Saito, Y. *et al.* *Scientific Reports*. **2019**, *9(1)*:8338. 3) Liang KC, Sakakibara, Y. *BMC Bioinformatics*. in press.

### 化合物の標的分子同定のためのケミカルゲノミクス基盤の確立

八代田陽子<sup>1</sup>, Lien Pham<sup>1</sup>, Sheena Li<sup>2</sup>, Urvi Bhojoo<sup>2</sup>, 吉村麻美<sup>1</sup>, 木村寛美<sup>1</sup>, 河村優美<sup>1</sup>,  
長田裕之<sup>3</sup>, 松本健<sup>4</sup>, 吉田稔<sup>4</sup>, Jason Moffat<sup>2</sup>, Charles Boone<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>理研 CSRS・分子リガンド標的,<sup>2</sup>トロント大・ドネリーセンター,  
<sup>3</sup>理研 CSRS・ケミカルバイオロジー,<sup>4</sup>理研 CSRS・ケミカルゲノミクス)

#### 【学術的背景・研究目的】

ユニークな生理活性をもつ化合物は生体内に標的分子が存在する。標的分子の同定は、生体機能の解明や創薬の可能性につながる。我々は化合物の標的分子を同定するため、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のゲノムワイドな遺伝子破壊株ライブラリーおよび遺伝子過剰発現株ライブラリーを用いて、各株の化合物感受性をハイスループットにプロファイリングし、そのデータから化合物の標的を推測・同定する酵母ケミカルゲノミクス法<sup>1)</sup>を開発した。さらに、標的分子をコードする遺伝子の自然突然変異による化合物耐性株の取得・変異点の同定も組み合わせた酵母ケミカルゲノミクス基盤により、さまざまな化合物の標的分子同定に取り組む。

#### 【現在までの研究成果概要】

これまでに、理研天然化合物ライブラリーに収蔵される~10,000 個の化合物について、出芽酵母ケミカルゲノミクス基盤を利用した網羅的な解析を実施することにより、標的分子が脂肪酸合成酵素であることを解明した NPD6433 を含めて複数の化合物の作用標的経路を一括して決定することに成功した。化合物の中には、酵母には作用しないが、動物細胞には増殖阻害を示すものもある。そのような化合物に対してもケミカルゲノミクス解析を用いた標的的同定法を確立するため、トロント大の Boone ラボおよび Moffat ラボ、理研 CSRS・ケミカルゲノミクス (A03 松本先生) との共同研究により、ヒト HAP1 細胞を用いたケミカルゲノミクス法の開発を開始した。トロント大で開発された CRISPR レンチウイルスライブラリーを用いて HAP1 細胞において約 18,000 個の各遺伝子をノックアウトした遺伝子欠損株プール<sup>2)</sup>を化合物処理し、感受性遺伝子を網羅的にプロファイリングすることにより、化合物の作用機序が推測できる。現在、A01 掛谷先生、A01 西村先生、A02 酒井先生、A03 清宮先生から提供された化合物について、酵母およびヒト細胞ケミカルゲノミクス法による標的的同定を進めている。

#### 【今後の研究計画】

引き続き、酵母およびヒト細胞ケミカルゲノミクス基盤を用いて、化合物の作用機序解明を目指す。ヒト細胞ケミカルゲノミクス法においては、より多種の化合物の同時処理が可能になるよう、ハイスループット化の条件検討を行う。

#### <参考文献>

1) Piotrowski, JS. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 982. 2) Hart, T. *et al. G3*, **2017**, *7*, 2719.



### プロテオミクスをベースにした化学シグナル解析技術開発

長田裕之, 室井 誠, 川谷 誠

(理化学研究所 環境資源科学研究センター)

#### 【学術的背景・研究目的】

有用な生物活性リガンドは、医薬や農薬などに利用されるほか、生命現象の解明にも役立つ。しかし、これらリガンドには表現型スクリーニングより得られた化合物も多く、標的分子を同定することは必ずしも容易ではない。標的分子の同定法は、生物活性リガンドと標的分子の直接的な相互作用を基に解析する方法(直接法)、と生物活性リガンドが示す表現型を既存薬が示すそれと比較して標的分子を予測解析する方法(間接法)に大別される<sup>1)</sup>。我々はこれまでに、直接法として、光親和型固定化法を用いた化合物ビーズによる標的タンパク質の同定法や化合物アレイを用いた薬剤探索法、また、間接法として、細胞形態やプロテオーム変化を基に薬剤の細胞応答を解析する手法(MorphoBase、ChemProteoBase)を開発し、生物活性リガンドの標的同定・作用解析を行ってきた<sup>2,3)</sup>。これらの手法をさらに発展させることで、様々な化学シグナルに対するリガンドの作用標的解析が可能になると期待される。近年、上記直接法として化合物との結合によって、タンパク質の熱安定性が変化することを利用して結合タンパク質を解析する手法 Cellular Thermal Sift Assay (CETSA) が利用されるようになった。CETSA は従来の化合物ビーズを用いる方法とは異なり、化合物の修飾を必要とせず、また煩雑なステップを伴わない優れた手法である。本研究では、生物活性リガンドの標的同定における間接法である ChemProteoBase を高度化することに加え、プロテオーム解析を用いた直接法である 2DE-CETSA を開発し、より迅速で精度の高い標的同定システムを開発する。

#### 【現在までの研究成果概要】

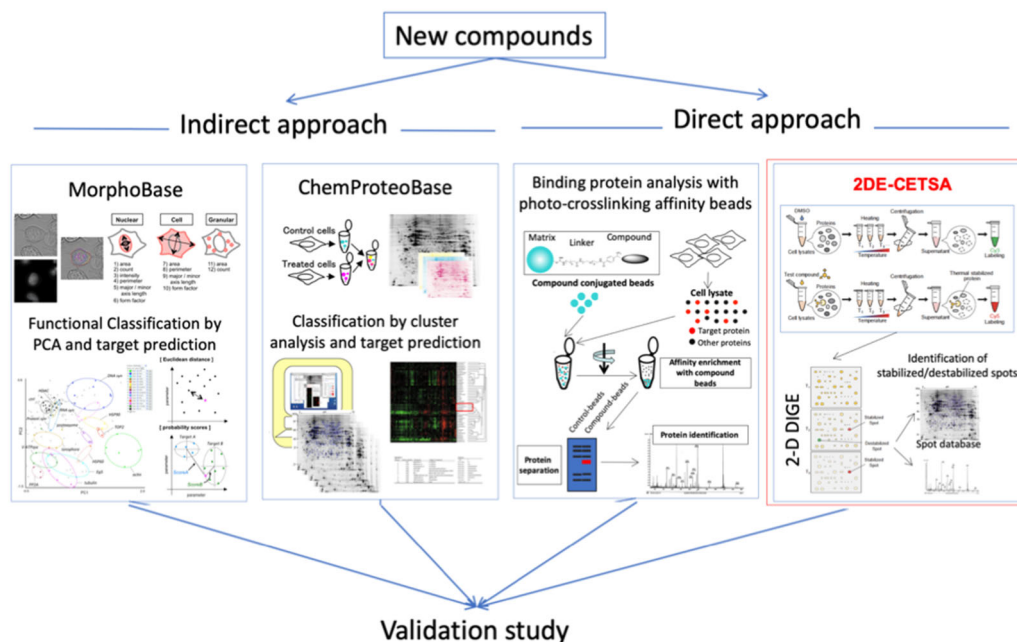
間接法である ChemProteoBase について、作用の明らかな標準化合物で処理した HeLa 細胞のプロテオーム解析を行い、データベースの拡充を行った。本解析に用いる HeLa 細胞の 2次元電気泳動ゲル上の同定済みタンパク質のスポットマップを HP 上に公開した<sup>4,5)</sup>。拡張した ChemProteoBase を用いて新規化合物の解析を行った<sup>6-9)</sup>。さらに、解糖系や TCA 回路などのエネルギー代謝に関わるたんぱく質に着目して解析する手法を開発し、Unantimycin A や NPL40330 が ミトコンドリア呼吸鎖複合体を標的とすることを明らかにした<sup>4,10)</sup>。また、がん幹細胞様細胞を用いたスクリーニングによって取得された化合物 NPD2381 がミトコンドリアに作用することを明らかにした<sup>11)</sup>。

直接法である光親和型固定化法を用いた化合物ビーズについて、新規化合物の解析を行った。理研天然化合物バンク(NPDepo)の化合物ライブラリーよりがん関連線維芽細胞(CAF)の遊走を阻害する化合物として、NPD8733 が探索された。NPD8733 の標的分子を解析する目的で化合物ビーズを用いて結合タンパク質の解析を行った結果、valosin-containing protein (VCP)/p97 が同定された。詳細な解析を行うことによって、NPD8733 が VCP を介して CAF の遊走を阻害することが示唆された<sup>12)</sup>。

さらに、化合物が結合することによって生じるタンパク質の熱安定性の変化を利用した CETSA 法と ChemProteoBase で培った 2次元電気泳動に基づくプロテオーム解析法を組み合わせた 2DE-CETSA 法を構築した<sup>13)</sup>。HSP90 阻害剤であるゲルダナマイシンについて本解析を用いて検討したところ、熱安定性が上昇するタンパク質として HSP90 並びにゲルダナマイシンに結合することが知られている GRP98 が検出され、本解析法が化合物の標的分子網羅的解析法として有効であることが示唆された。大腸がん株化細胞の増殖阻害を指標



としたスクリーニングで見出された化合物 NPD10084 について、2DE-CETSA を用いて解析したところ、熱安定性の変化するスポットとしてピルビン酸キナーゼ PKM2 が同定された。NPD10084 は PKM2 のピルビン酸キナーゼ活性は阻害しなかったが、PKM2 と  $\beta$ -catenin あるいは STAT3 の結合を阻害することによって、増殖シグナルの下流にある c-Myc、Cyclin D1 の発現やリン酸化を阻害することによって、がんの増殖を阻害することが示唆された。



(図) 化合物の標的分子解析法

【今後の研究計画】

領域内の連携を進め、ChemProteoBase や光親和型固定化法を用いた化合物ビーズなどの手法に加え、新たに構築した 2DE-CETSA を用いて、新規生物活性リガンドの標的同定研究を推進する。

<参考文献>

- 1) Muroi, M., *et al. Nat Prod Rep* **2016**, 33, 621. 2) Kawamura, T., *et al.* **2016**, 6, 26521. 3) Kawatani, M., *et al. Sci Rep* **2016**, 6, 38385. 4) Futamura, Y., *et al. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **2019**, 1867, 28. 5) Muroi, M., *et al. Methods Mol Biol* **2019**, 1888, 127. 6) Robke, L., *et al. Angew Chem Int Ed Engl* **2017**, 56, 8153. 7) Cheng, L., *et al. Mol Pharm* **2019**, 16, 1423. 8) Li, J., *et al. J Cell Mol Med* **2019**, 23, 6283. 9) Uesugi, S., *et al. J Antibiot (Tokyo)* **2017**, 70, 429. 10) Lim, C. L., *et al. J Antibiot (Tokyo)* **2016**, 69, 456. 11) Subedi, A., *et al. FEBS Lett* **2019**, 593, 763. 12) Suvarna, K., *et al. J Biol Chem* **2019**, 294, 2988. 13) Nagasawa, I., *et al. Cell Chem Biol* **2019**, 27, 186.



## なぜ植物は共生菌を受容するか？相利共生構築に寄与する 化学コミュニケーションの解析

松浦英幸  
(北大院農)

### 【学術的背景】

植物の成長に有益な効果をもたらす、植物と共生関係にある内生菌（エンドファイト、endophyte）の存在が明らかとされ、様々な研究がなされてきた。その一例として、共生菌の一種、*Veronaeopsis simplex* と共生関係を結んだトマトは、本来トマト幼苗が生育できない低 pH 条件でも通常の生育を示す。本菌は培地上で暗色 (Dark) のコロニーを形成し比較的生育が遅く、菌糸に隔壁 (Septa) があることから、Dark Septate Endophytic fungus (DSE) に属する菌として知られており、根部に感染し植物に対して有益な効果を示す<sup>1,2)</sup>。他の DSE も存在し、その他数多くの別種の共生菌が知られている。しかしながら、『共生したエンドファイトは植物に如何にして劣悪環境突破力をあたえるのか？』、『どうしてエンドファイトは植物に排除されずに感染できるか？』については未だ不明なところが多い。

### 【研究目的】

エンドファイトの培養濾液に植物の劣悪環境突破力を付与する活性を発見しており、本生物現象に關与する低分子生理活性物質の化学構造を明らかとするともに、その活性発現のメカニズムを明らかとする。また、エンドファイトの感染促進効果（右図）を有する化合物を用いて、その促進発現機構を明らかとする。

### 【研究計画・方法】

*V. simplex*, *Heteroconium chaetosnira*, *Phialocephala fortinii* の培養濾液に含まれる、植物の劣悪環境突破力を付与する低分子生理活性物質を単離、構造決定を行うとともに、その生理活性の発現機構を明らかとする。糸状菌由来の生理活性物質、theobroxide に、エンドファイトの感染促進効果を見出していることから、本化合物をケミカルプローブとして用い、エンドファイトが植物から排除されない機構を明らかとする。

### <参考文献>

1) Jumpponen, A. et al., *New Phytol.* **1998**, *140*, 295-310. 2) Khastini, R. et al., *J Microbiol.* **2012**, *50*, 618-624.

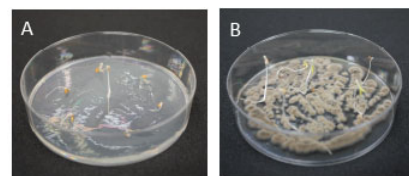


図. *V. simplex* による発芽促進の効果  
A) コントロール、B) *V. simplex* と共培養。  
環境条件を劣悪に設定した培地でのトマトの発芽の様子。共培養により、生育が改善された。

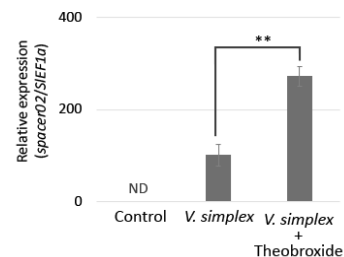


図. トマトへの theobroxide (0.1 mM) 処理による *V. simplex* 感染促進効果。当該菌の ICT 領域遺伝子の一部を増幅し、感染の度合いを qRT-PCR 法で定量。



### ネコのマタタビ反応で機能する嗅覚受容体と多幸感に関わる神経回路の同定

上野山怜子<sup>1</sup>, 西川俊夫<sup>2</sup>, 宮崎雅雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>岩手大農,<sup>2</sup>名大院生命農)

#### 【学術的背景・研究目的】

嗅ぐだけで幸せな気分になれる、しかも体に有害な副作用がない、そのような化学物質があれば、ストレスの多い現代社会において我々の必需品になるだろう。このような夢の物質に出会えたのがネコである。ネコはマタタビを大好物とし、マタタビをみつけると、なめたり、頬をこすり付けたり、体をくねらせ床を転がりまわったりする。麻薬と違いこの反応には依存性がなく、ネコは一連の反応を 5~10 分程度続けると、マタタビに興味を示さなくなる。だから我々はマタタビの木に居座るネコを見ることがない。なぜネコだけがマタタビを嗅ぐと幸せそうにゴロゴロ転がるのか、その素朴な疑問に魅せられた者が研究に取り組んできた。大きな成果は、1950 年代に目博士らがマタタビからイリドミルメシンやアクチニジンなど活性物質を同定したことである。ネコに活性を示す物質が発見されて 60 年以上が経過したが、これらの活性物質がなぜネコにだけ作用してマタタビ反応を誘起するか、なぜマタタビに全く反応しないネコがいるのか、なぜライオンやトラなどマタタビと一生出会うはずのないネコ科動物もマタタビ反応するか、マタタビ反応中のネコは多幸感を得ているか、マタタビ反応の生物学的な意味、など分かっていない。そこで本研究では、ネコがなぜマタタビに反応するか、マタタビ活性物質の受容機構とマタタビ反応の生理的な意義を解明し、動物-植物間の化学コミュニケーションの理解を深めることを目的とする。

#### 【現在までの研究成果概要】

まず我々は、高感度の GC/MS や化学合成で準備した純度の高い活性物質標品を使い、過去の知見を見直した。その結果、驚くことにアクチニジンはマタタビに含まれるが活性が無いこと、イリドミルメシンは活性を持っていたがマタタビに含まれないことを明らかにした<sup>1)</sup>。過去の研究は、活性物質を単離する過程で酸処理やアルカリ条件下で加熱処理していた為、マタタビに存在する活性物質を安定的に抽出するのは困難と考えた。そこで我々は液体クロマトグラフィーを使いマタタビから活性物質の探索を始めからもう一度行い、マタタビ反応を誘起する活性が既知物質より強いネペタラクトールを新たに同定した<sup>2)</sup>。現在は、ネペタラクトール標品を使い、マタタビ反応の生理的意義の解明と嗅覚受容体の特定を目指している。

#### 【今後の研究計画】

引き続き、領域内連携を活用して、①マタタビに反応しないネコの原因遺伝子特定、②ネペタラクトールを受容する嗅覚受容体の特定、③マタタビ反応時に機能する神経回路の特定を行う。

#### <参考文献>

1) Uenoyama, R. *et al.* Submitted, 2) Uenoyama, R. *et al.* Manuscript in preparation

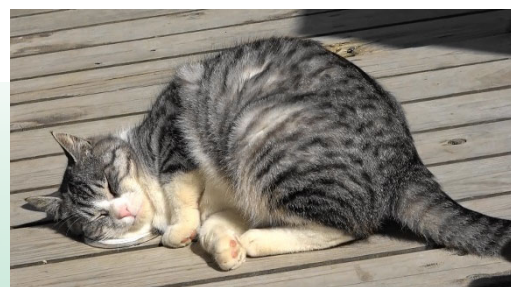


図. ネペタラクトールに反応するネコ





### 腸内細菌叢－消化管内分泌細胞間化学コミュニケーションの実体解明

坪井貴司

(東京大学・大学院総合文化研究科)

#### 【学術的背景・研究目的】

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、肥満マウスに抗生物質を投与し、腸内細菌叢の組成を変化させると、糖尿病の改善が見られる。また、腸内細菌叢によって産生される様々な代謝産物の消化管管腔内濃度を人工的に増加させると、認知機能が向上する。しかし、腸内細菌叢や腸内細菌代謝産物が、どのような機構で糖尿病や認知症などの疾患に関与するのかは不明である。

腸内細菌叢やその代謝産物の影響を受けるのが、小腸や大腸などの消化管である。消化管の機能は、栄養素や水分の吸収、粘膜免疫やホルモン分泌など多岐にわたる。当研究室では、それらの中でも、消化管ホルモンを分泌する消化管内分泌細胞に注目している。

小腸に分布する小腸内分泌L細胞(以下L細胞)は、消化管管腔に面しており、食餌由来成分を感知しホルモンを分泌する。当研究室では、Gタンパク共役型受容体GPCR6Aが、塩基性L-アミノ酸受容体として機能し、L細胞から摂食行動や認知機能を制御する消化管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)の分泌を制御することを見出した<sup>1)</sup>。また、肥満によっ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も、L細胞からのGLP-1分泌を引き起こすことを見出した<sup>2)</sup>。しかし、食餌成分と同様に消化管内に存在する腸内細菌代謝産物と消化管ホルモン分泌の関係性や、動物個体の摂食行動や認知機能に与える影響については検証されていない。そこで本研究では、腸内細菌代謝産物と消化管を起点としたホルモン分泌制御が我々の精神活動や代謝機能に果たす役割を解明し、創薬シーズの開拓を目指す。

#### 【現在までの研究成果概要】

大豆イソフラボン的一种ダイゼインが乳酸菌に代謝されて生じるS-エクオールや苦味物質であるキニーネは、小腸内分泌L細胞からのGLP-1分泌を抑制することを見出した<sup>3,4)</sup>。一方、腸内細菌代謝産物によって産生されるグルタミンは、GLP-1分泌を強力に促進するが、その分泌の制御に味覚受容体的一种であるTAS1R3が重要であることを見出した<sup>5)</sup>。また、細胞内の代謝機能やシグナル伝達を可視化解析するための蛍光タンパク質を基盤としたATP、グルコース、cAMP、cGMPセンサーの開発にも成功した<sup>6,7,8,9)</sup>。

#### 【今後の研究計画】

引き続き、GLP-1分泌を引き起こす腸内細菌代謝産物の同定と個体の摂食行動や認知機能に与える影響を解析し、細胞内シグナル伝達や代謝機能を可視化するための蛍光タンパク質プローブ開発に関する研究を推進する。

#### <参考文献>

- 1) Oya, M. et al. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 4513-4521. 2) Harada, K. et al. *J. Biol. Chem.* **2017**, 292, 10855-10864. 3) Harada, K. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 501, 1009-1015. 4) Harada, K. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 500, 723-730. 5) Nakamura, T. et al. *J. Mol. Endocrinol.* **2020**, 64, 133-143. 6) Matsuda, S. et al. *ACS Sens.* **2017**, 2, 46-57. 7) Harada, K. et al. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 7351. 8) Arai, S. et al. *Angew. Chem.* **2018**, 57, 1087-10878. 9) Mita, M. et al. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 4821-4830.

## 社会性動物の情動を制御する生物活性リガンドの同定

清川泰志

(東大院農)

### 【学術的背景】

社会性の高い動物が正常に生活を営むためには、不安や恐怖といった情動を適切なレベルに制御することが重要である。動物は社会性が高まるほど、仲間とより多くのコミュニケーションを行うようになるため、仲間とのコミュニケーションが不安や恐怖を制御するメカニズムとしての機能を担っていることは、動物にとって適応的である。

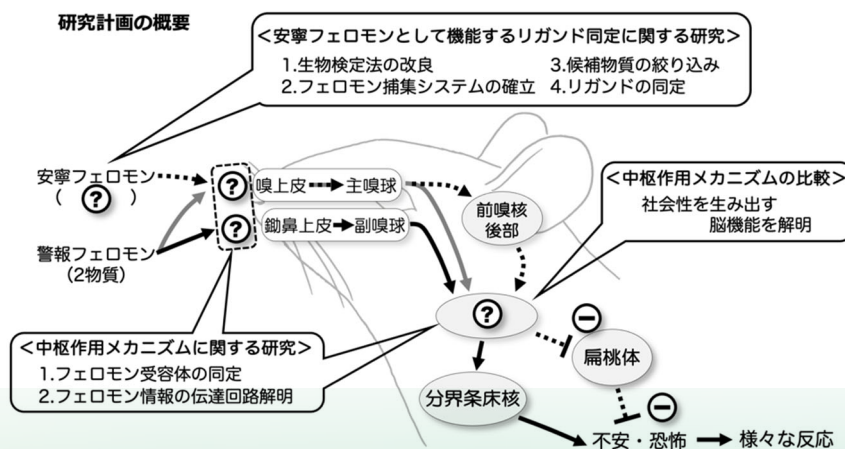
我々のこれまでの研究により、ストレスを受けたラットは 4-メチルペンタナールとヘキサナールという 2 物質から成る警報フェロモンを放出することを明らかにした<sup>1)</sup>。そして、受容された 2 物質が最終的に分界条床核という脳領域を活性化することで受容個体の不安を惹起する、というように、中枢作用メカニズムの一端を明らかにした<sup>2)</sup>。こうした警報フェロモンに関する一連の研究の過程で、逆の作用をもつフェロモン、すなわち不安や恐怖を抑制する安寧フェロモンの存在が発見された<sup>3)</sup>。また、この安寧フェロモンを受容した情報は前嗅核後部へと伝達された後<sup>4)</sup>、おそらくは扁桃核間細胞塊を経て<sup>5)</sup>扁桃核外側核へと伝達され、そこを抑制することで不安や恐怖を抑制する<sup>6)</sup>、というように、中枢作用メカニズムの概要を明らかにすることができた。また安寧フェロモンは揮発性フェロモンであったことから<sup>7)</sup>、ガスクロマトグラフィーを用いた解析を進めているところである。

### 【研究目的】

不安や恐怖を抑制し、ラット安寧フェロモンとして機能する生物活性リガンドを同定することを目的とする。また並行して、2つのフェロモンの中枢作用メカニズムを解明し、両メカニズムを比較することで、社会性の基盤となる脳機能を理解することを目指す。

### 【研究計画・方法】

引き続き安寧フェロモンのリガンド同定を目指す。またフェロモン情報が脳内で伝達されるルートを進めることで、両フェロモンの中枢メカニズムを解明する。そして、これらを比較することで高度な社会性を生み出す脳機能を明らかにする。



### <参考文献>

1) Inagaki, H. *et al. Proc. Nat. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 18751. 2) Breitfeld, T. *et al. Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 321. 3) Takahashi, Y. *et al. Behav. Brain Res.* **2013**, *240*, 46. 4) Kiyokawa, Y. *et al. Eur. J. Neurosci.* **2012**, *36*, 3429. 5) Minami, S. *et al. Behav. Brain Res.* **2019**, *372*, 112065. 6) Fuzzo, F. *et al. Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 99. 7) Kiyokawa, Y. *et al. Behav. Brain Res.* **2014**, *267*, 189.



### 母子間化学コミュニケーションを促進する羊水成分の同定と生理機能の解明

廣田順二

(東工大生命理工)

#### 【学術的背景・研究目的】

自然界は多種多様な化学物質で満ちている。動物はこの複雑な化学情報の中から生存に必要な情報を正確にキャッチ・識別し、生存に必要な行動をとる能力を有する。例えば、食物探索・天敵からの危険回避・生殖行動などは、匂い物質やフェロモンを受容することにより表れる。こうした化学情報の受容を担うのが嗅覚である。これまでの嗅覚研究には、合成香料ライブラリーが主に使われてきたが、自然環境中で実際に動物が感じ、化学コミュニケーションに用いる天然の匂い物質はこれらと異なると考えられる。天然匂い物質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ある。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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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こと、新生児(仔)に安寧効果をもたらすことが知られている<sup>3,4)</sup>。本研究では、羊水中の「母の匂い」の分子実体と生理機能を解明し、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を目的とする。

#### 【現在までの研究成果概要】

匂いを感知する嗅覚受容体は、魚類から哺乳類に共通する水棲型と陸棲動物特異的な陸棲型の2つに分類される。これまでに発現する嗅覚受容体によって異なる2種類の嗅神経細胞産生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いずれかを発現する変異マウスにおける忌避・哺乳・仔育て行動など「母子間化学コミュニケーション」を含む生得的嗅覚行動に異常をきたすことを見出した<sup>3-6)</sup>。また「母の匂い」の源の一つである羊水に着目し、羊水中に嗅覚受容体によって感知され特徴的な行動を誘導する匂い物質が存在することを明らかにし、羊水に応答する嗅覚受容体を複数同定した。羊水中に含まれる生理機能を有する匂い物質の同定を目指し、領域内共同研究によって、羊水の匂い成分解析をおこなった。マウス、犬、牛等の複数の哺乳動物の羊水を解析した結果、羊水の匂い成分中に哺乳動物に共通する複数の匂い成分を見出した。マウス行動実験を指標にこれらの共通匂い物質の生理機能の解析を開始し、これまでにこのうちの1つの匂い物質に抗不安効果があることを見出した。この匂い物質が活性化する脳(嗅球)の部位は極めて限られており、ごく少数の嗅覚受容体がこの物質を受容していることが予想され、現在、その同定を行なっている。

#### 【今後の研究計画】

引き続き、母子間化学コミュニケーションの分子基盤を明らかにするために、羊水応答性の嗅覚受容体が感知する匂い分子を同定し、母子間化学コミュニケーションの分子基盤を目指す。特に、不安効果が認められた羊水成分が嗅覚を介してどのように作用するのか、その作用機序を明らかにする。

#### <参考文献>

1) Logan, DW. *et al. Curr Biol*, **2012**, 22, 1998. 2) Zheng, C. *et al. Neuron*, **2000**, 26, 81. 3) Varendi, H. *et al. Acta Paediatr*, **1996**, 85, 1223. 4) Varendi, H. *et al. Early Human Dev*, **1998**, 51, 47. 5) Hirota, J. Mombaerts, P: *PNAS*, **2004**, 101, 8751. 6) Hirota, J. *et al. Mol Cell Neurosci*, **2007**, 34, 679. 7) Iwata, T. *et al. Nat Commun*, **2017**, 8, 885. 8) Enomoto, T. *et al. Commun. Biol.* **2019**, 2, 296



### 休眠天然物を覚醒する放線菌二次代謝シグナルトークの解明と応用

木谷 茂

(阪大生物工学国際交流セ)

#### 【学術的背景・研究目的】

放線菌は、多彩な生理活性物質を二次代謝産物とする微生物である。しかし、この二次代謝産物の「放線菌における真の生物学的意義」は不明である。一方、放線菌のゲノムがコードする物質生産能力は、ほぼ休眠状態にある。この魅力的な能力を覚醒できれば、有用な新規物質を高効率に発掘できると考えられる。研究代表者は、新型二次代謝誘導シグナルの発見<sup>1)</sup>を機に、有用物質を創出する研究を展開してきた。各種二次代謝シグナル系が放線菌の9割に分布したこと<sup>2)</sup>から、これらのシグナル系のスイッチをオンにできれば、休眠二次代謝を覚醒できると考えた。また、新たな化学シグナルトークを異種放線菌の間に見出したこと<sup>3)</sup>から、放線菌化学コミュニケーションの多様な形態が示唆されている。本研究では、化学シグナルトーク系の多様性解明を経て、放線菌二次代謝産物の生物学的意義を示し、休眠天然物を生産覚醒させる有用物質探索技術を確立する。

#### 【現在までの研究成果概要】

##### 1) 二次代謝シグナル産生菌との共培養による休眠二次代謝覚醒

二次代謝シグナル産生菌 (*Streptomyces albus* J1074 株) を用いた共培養が、対象放線菌の休眠天然物生産を覚醒させるかを検討した。*S. albus* J1074 株と抗寄生虫薬エバーメクチン生産菌を共培養させると、*S. albus* J1074 株のブテノライド型シグナルに応答して、エバーメクチンの生産が誘導される。この現象を応用して、*S. albus* J1074 株と各種放線菌を共培養させた結果、海綿共生放線菌 *Streptomyces* sp. ST70 株の代謝物が *S. albus* J1074 株依存的に変動する現象を見出した。更なる解析により、この代謝物変動はブテノライド型シグナルとは相関しないことが分かった。したがって、*S. albus* J1074 株と *Streptomyces* sp. ST70 株の間には、ブテノライド型シグナルに依存しない新たな二次代謝シグナルトークの存在が示唆された。

##### 2) 覚醒物質の他種放線菌に対する二次代謝誘導能解析

抗寄生虫薬イベルメクチンが放線菌の休眠二次代謝を覚醒させることから、イベルメクチンもしくはイベルメクチン原材料であるエバーメクチンを各種放線菌の培養液に添加し、その代謝物プロファイルを変動解析した。その結果、ある放線菌の培養液に、イベルメクチンを添加した場合、化合物生産が増加することが分かった。

##### 3) 海綿共生放線菌 ST9 株の二次代謝誘導能解析

海綿共生放線菌 ST9 株を *Streptomyces lividans* TK23 株と液体培地にて共培養すると、*S. lividans* の休眠抗生物質生産を覚醒させる現象を見出した。放線菌の休眠二次代謝はミコール酸含有細菌により誘導されるが、ミコール酸含有細菌の共培養時とは異なる挙動を示したことから、新たな二次代謝覚醒機構が示唆された。

#### 【今後の研究計画】

引き続き、領域内連携を活用して、誘導代謝物と二次代謝シグナル分子の化学構造とその誘導機構を解析し、微生物間化学コミュニケーションの解明とその新規物質生産への応用を開拓する研究を推進する。

#### <参考文献>

- 1) Kitani, S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, 108, 16410. 2) Thao, N. B. *et al. J. Antibiot. (Tokyo)*. **2017**, 70, 1004. 3) Nguyen, T. B. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, 84, e02791



### 植物-微生物間の化学コミュニケーションを担う新たな脂質リガンドの探索

櫻谷英治

(徳島大生物資源)

#### 【学術的背景・研究目的】

これまでに、微生物による有用脂肪酸生産研究を対象として、油糧微生物 *Mortierella alpina* の育種研究を基盤にアラキドン酸をはじめ様々な脂肪酸群の微生物生産を可能としてきた<sup>1, 2)</sup>。未利用資源の活用を目指して、廃植物油を利用したバイオディーゼル生成の副産物として得られる廃グリセロールを活用するため菌のスクリーニングを行った結果、本研究課題のフザリウム属糸状菌 *Fusarium* sp. D2 株を得ることに成功した。培養菌体の脂質分析を行ったところ、脂肪酸二次代謝産物 (10-ヒドロキシステアリン酸 (HYB) と 10-オキソステアリン酸 (KetoB)) を蓄積することを見いだした。一部のフザリウム属糸状菌はマメ科植物などに寄生する植物病原菌としても知られている。通常培養では生成されないこれら脂肪酸二次代謝産物は特定のストレス下で生成することから生理活性脂質リガンドとして機能することが期待される。これら脂肪酸二次代謝産物が植物-微生物間における生物活性脂質リガンドとしての役割解明を目指す。

#### 【現在までの研究成果概要】

廃グリセロールを資化する糸状菌 *Fusarium* sp. D2 株はオレイン酸を含む油脂を水酸化脂肪酸へ変換することがわかった。特に、オレイン酸を培地に添加すると効率よく HYB に変換することが見出された。一方、グルコースなどを炭素源として培養するとオレイン酸を貯蔵脂質として蓄積するものの水酸化脂肪酸などの脂肪酸二次代謝産物を生産しないことも分かっている。これまでに、乳酸菌などのバクテリアにおいてオレイン酸の水和により HYB が生成することが明らかになっていることから、*Fusarium* sp. D2 株と近縁糸状菌のドラフトゲノム情報よりオレイン酸水和酵素遺伝子の探索を行ったところ、アミノ酸配列の相同性は低いものの 2 つのホモログ遺伝子を見出した。オレイン酸の添加培養時に一方の遺伝子の転写が確認された。大腸菌を用いた発現解析に供したところ、本酵素はオレイン酸を HYB に、リノール酸を 10-ヒドロキシ-シス-12-オクタデセン酸 (HYA) に変換することを明らかにした。糸状菌に由来するオレイン酸水和酵素の機能解析はこれまでに報告がなく、*Fusarium* sp. D2 株がこれら脂肪酸二次代謝産物を菌体内に高蓄積することは大変興味深いと考えられる。

#### 【今後の研究計画】

微生物において水酸化脂肪酸などの脂肪酸二次代謝産物を生成する例は少ないが、代表的な例としてイネ科植物に感染する麦角菌が二次代謝産物として水酸化脂肪酸であるリシノール酸を生成することが挙げられる。特定の条件下でのみリシノール酸を生成することが知られているものの、麦角菌におけるリシノール酸の機能は解明されていない。一部のフザリウム属糸状菌はトマトの立枯病を引き起こす植物病原菌と知られ、その感染機構が植物病理学分野で研究されてきた。今後、特定の条件下でのみ糸状菌内で生成される脂肪酸二次代謝産物が、微生物-植物のシグナル伝達物質として機能しているかどうかを領域内連携も活用して明らかにする。

#### <参考文献>

1) Sakamoto, T. *et al. Biores. Technol.* **2017**, 245, 1610. 2) Kikukawa, H. *et al. J. Adv. Res.* **2018**, 11, 15.