

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

化学コミュニケーションのフロンティア

第 8 回公開シンポジウム要旨集

2021 年 7 月 2 日（金）10:00～18:00

オンライン開催

主催：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」総括班

実行委員長：掛谷秀昭（京大院薬・教授）

共催：日本化学会、日本薬学会

後援：日本農芸化学会

目次

プログラム	12
ポスター発表演題一覧	14
口頭発表要旨	18
ポスター発表要旨	48

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

「化学コミュニケーションのフロンティア」第8回公開シンポジウム

シンポジウム

日時：2021年7月2日（金）10:00～18:00

オンライン開催（運営場所：京都大学大学院薬学研究科マルチメディア講義室）

第9回総括班班会議、第8回領域全体会議（合同会議）

日時：2021年7月2日（金）9:00～9:45

オンライン開催

プログラム

10:00-10:10 領域代表挨拶、概要説明 掛谷 秀昭（京都大学大学院薬学研究科・教授）

〔座長：松永茂樹（東大院農）、坪井貴司（東大院総合文化）〕

10:10-10:40

○-1 腸内細菌叢と腸管粘膜組織の interactome 解析の試み

A01 班 西尾 和人（近畿大学医学部・教授）

10:40-10:55

○-2 ラット安寧フェロモンの同定に向けて

A01 班 清川 泰志（東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授）

10:55-11:10

○-3 酵母の2つのフェロモン受容体が配偶者認識に及ぼす役割

A01 班 清家 泰介（大阪大学大学院情報科学研究科・助教）

11:10-11:25

○-4 糸状菌の感染を促進するセオブロキシドの生理活性

A01 班 松浦 英幸（北海道大学大学院農学研究院・教授）

11:25-11:40

○-5 食品由来マラバリコーンCの多様な生理活性とその機構解明

A02 班 門出 健次（北海道大学大学院先端生命科学研究科・教授）

11:40-13:00 休憩

〔座長：入江一浩（京大院農）、北将樹（名大院生命農）〕

13:00-13:30

○-6 栄養素結合体の化学コミュニケーション

A02 班 上杉 志成（京都大学化学研究所・教授）

13:30-13:45

○-7 天然物誘導体による 14-3-3 たんぱく質の化学シグナルの解明

A02 班 大神田 淳子 (信州大学学術研究院 (農学系)・教授)

13:45-14:00

○-8 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:
多様な酸化型ステロイドの自在合成

A02 班 中崎 敦夫 (岩手大学理工学部・教授)

14:00-14:15

○-9 RNA-小分子間化学シグナル大規模解析技術の展開

A03 班 鬼塚 和光 (東北大学多元物質科学研究所・准教授)

14:15-14:30

○-10 あらゆる化合物の親和性予測手法の開発とヒト薬効・副作用予測への応用

A03 班 永安 一樹 (京都大学大学院薬学研究科・助教)

ポスター発表

14:35-15:15 (奇数番号)

15:15-15:55 (偶数番号)

[座長: 八代田陽子 (理研 CSRS)、清宮啓之 (がん研化療セ)]

16:00-16:30

○-11 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

A03 班 菊地 和也 (大阪大学大学院工学研究科・教授)

16:30-16:45

○-12 生体物質を対象とした発光指示薬および簡易計測法の開発

A03 班 服部 満 (大阪大学産業科学研究所・助教)

16:45-17:00

○-13 脂質-膜タンパク質相互作用解析法の開発とその応用

A03 班 松森 信明 (九州大学大学院理学研究院・教授)

17:00-17:15

○-14 ヒト培養細胞での遺伝学的スクリーニングを用いた化合物の作用機序同定

A03 班 松本 健 (理化学研究所環境資源科学研究センター・専任研究員)

[座長: 掛谷秀昭 (京大院薬)]

17:15-18:00 <特別講演>

SL-1 Proteins in action - 高速分子動画法

岩田 想 (京都大学大学院医学研究科・教授)

18:00 閉会

ポスター発表演題一覧

- P-1 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¹, 倉永健史¹, 池田拓慧¹, 西村慎一², 井本正哉³
(¹京大院薬, ²東大院農, ³順天堂大医)
- P-2 カイメンの共生微生物が生産する化合物
松永茂樹¹, 高田健太郎²
(¹東大院農, ²北里大海洋生命)
- P-3 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¹, 眞木準平¹, 奥田創元¹, 押村亜沙美¹, 塚野千尋¹, 柳田 亮²
(¹京大院農, ²香川大農)
- P-4 マイトトキシンの標的分子探索
此木敬一¹, 松本 健², 木下祥尚³, 角替俊輔¹, 後藤萌香¹, 吉尾柊太郎¹, 田端滉樹¹,
長 由扶子¹, 八代田陽子², Katherine Chan⁴, Amy Hin Yan Tong⁴, Kamaldeep Kaur
Aulakh⁴, Andrea Habsid⁴, 山下まり¹, 松森信明³, Jason Moffat⁴, Charles Boone^{2,4},
吉田 稔², 村田道雄⁵
(¹東北大院農, ²理研CSRS, ³九大院理, ⁴トロント大, ⁵阪大院理)
- P-5 遺伝的冗長性をもつシグナル伝達系と植物-微生物間の化学コミュニケーション
上田 実
(東北大院理)
- P-6 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¹, 佐藤健吾¹, 齋藤 裕², 落合俊貴¹, 渡邊成望¹, 大貫雄人¹
(¹慶大理工, ²産総研AIRC)
- P-7 分裂酵母ケミカルゲノミクスを用いた生理活性物質の作用機序解析
八代田陽子¹, 富田啓介², 木村寛美¹, 吉村麻美¹, 河村優美², 吉田稔^{1,2}, 酒井隆一³,
岡田憲典², Charles Boone^{1,4}
(¹理研CSRS, ²東大院農, ³北大院水産, ⁴トロント大ドネリーセンター)
- P-8 Finding the targets of novel compounds using high-throughput chemical genomics
Lien Pham¹, Sheena Li^{1,2}, Yoko Yashiroda¹, Mami Yoshimura¹, Hiromi Kimura¹, Yumi
Kawamura¹, Minoru Yoshida³, and Charles Boone^{1,2}
(¹Molecular Ligand Target Research Team, RIKEN CSRS; ²The Donnelly Centre,
University of Toronto; ³Chemical Genomics Research Group, RIKEN CSRS)
- P-9 GLUT阻害剤glutipyranの同定とプロテオーム解析
川谷 誠, 室井 誠, 長田裕之
(理研CSRS)

- P-10 **ネコのマタタビ反応は蚊への化学防除を可能にする**
 上野山怜子¹, 西川俊夫², 宮崎雅雄¹
 (¹岩手大院総合科学農, ²名大院生命農)
- P-11 **細胞内乳酸およびピルビン酸動態を可視化する蛍光タンパク質センサーの開発**
 原田一貴, 三田真理恵, 坪井貴司
 (東大院総合文化)
- P-12 **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**
 久保田理子, 岩田哲郎, 廣田順二
 (東工大生命理工)
- P-13 **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)
- P-14 **希少脂質生産を目指したフザリウム属糸状菌の分子育種**
 櫻谷英治, 葭田 快, 村川直美, 阪本鷹行
 (徳島大生物資源)
- P-15 **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の解明**
 甲斐建次
 (阪府大院生命環境)
- P-16 **害虫が分泌するエリシターの植物認識機構**
 有村源一郎, 出崎能丈
 (東京理科大生命システム工)
- P-17 **MraY阻害天然物スファエリミシン誘導体の設計と合成**
 市川 聡, 谷部美友紀, 勝山 彬, 山本一貴
 (北大院薬)
- P-18 **海綿アルカロイドパプアミンで探る海綿のケミカルコミュニケーション戦略**
 宮脇ふく子¹, 宮古 圭¹, 辺 浩美¹, 藤田雅紀¹, 山羽悦郎², 遠藤祐助¹, 酒井隆一¹
 (¹北大院水産科学研究院, ²北大北方圏フィールド科学センター)
- P-19 **低分子リガンドの高機能化に関する研究**
 有本博一
 (東北大院生命)
- P-20 **掻痒誘起作用を有する非天然型モルヒナン誘導体の創製**
 飯尾啓太¹, 杓村憲樹^{1,2,3}, 南雲康行², 斉藤 毅^{2,3}, 徳田明久³, 橋本佳応³, 山本直司²,
 木瀬亮次⁴, 井上飛鳥⁴, 溝口広一⁵, 長瀬 博^{1,2}
 (¹筑波大数理物質, ²筑波大睡眠研究機構 (WPI-IIIIS) , ³筑波大人間総合, ⁴東北大薬,
⁵東北医科薬科大薬)

- P-21 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
木越英夫, 菊地いまり, 小西翔太, 大好孝幸
(筑波大数理物質系)
- P-22 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
花岡健二郎
(慶応大薬)
- P-23 哺乳動物毒における化学コミュニケーションの解明
北 将樹, 矢野佑介, 福岡 凌
(名大院生命農)
- P-24 MAIT細胞の活性化を担うMR1リガンドの探索研究
松岡巧朗¹, 本園千尋^{2,3}, 服部 明¹, 掛谷秀昭¹, 山崎 晶^{2,3}, 大石真也¹, 大野浩章¹,
井貫晋輔¹
(¹京大院薬, ²阪大微研, ³阪大IFReC)
- P-25 リピドAを介した細菌-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
下山敦史^{1,2}, 山浦遼生¹, 宇戸智哉¹, Davie Kenneth¹, 松田彩那¹, 細見晃司³, Di
Lorenzo Flaviana⁴, 藤本ゆかり⁵, Molinaro Antonio⁴, 國澤 純³, 清野 宏⁶, 深瀬
浩一^{1,2}
(¹阪大院理, ²阪大院理PRC, ³医薬健栄研, ⁴University of Naples Federico II, ⁵慶大
理工, ⁶東大医科研)
- P-26 メダカ味覚受容体T1r2a/T1r3リガンド結合ドメインに対する疎水性アミノ酸結合の構
造生物学的解析
新田純矢¹, 渥美菜奈子¹, 日下部裕子², 山下敦子¹
(¹岡大院医歯薬, ²農研機構)
- P-27 アレロケミカルを起点とした植物間コミュニケーション分子の開発
新藤 充, 岩田隆幸, 杉山裕美
(九大先導研)
- P-28 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
横井誠矢, 登坂綺水, 鈴木里佳, 大久保優美, 坂倉正義, 高橋栄夫
(横市大院生命医)
- P-29 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
清宮啓之¹, 新家一男², 長澤和夫³
(¹がん研化療セ, ²産総研, ³東京農工大院工)

- P-30 分子動力学シミュレーションを用いたヘルペスウイルス類の膜内構造と凝集性
齋藤大明¹, 叶直樹²
(¹北陸大薬, ²星薬科大医薬品化学研究所)
- P-31 Determination of membrane protein-specific lipids using gold nanoparticle-based method.
Supakorn Wangamnuayporn, 川井隆之, 木下祥尚, 松森信明
(九大院理)
- P-32 シアノバクテリア由来色素スキトネミン類の合成研究
宇田川裕多郎, 細川誠二郎
(早大院先進理工)

腸内細菌叢と腸管粘膜組織の interactome 解析の試み

西尾和人, Marco A De Velasco, 倉 由吏恵, 坂井和子, 岡田 齊,
天野恭志, 櫻井俊治, 角田郁生, 尾村誠一
(近畿大学・医学部)

【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 precision medicine 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ているが、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、多発性硬化症における腸内細菌叢の代謝産物を通じたリスク評価と代謝産物の同定に関する研究を行う。

【研究成果・今後の展望】

1) 炎症性腸疾患 (IBD)、免疫関連有害事象(irAE)における宿主・微生物間の相互作用免疫チェックポイント阻害薬(ICI)免疫関連有害事象 (irAE) と潰瘍性大腸炎(UC) の病態比較)をおこなった。腸管粘膜組織の全トランスクリプトームと細菌叢 16S rDNA シークエンスを行った。パスウェイ解析により炎症部位および非炎症部における消化管 irAE と UC の病態と微小環境の類似性と相違点を示した。i) irAE 大腸炎と UC の間には、白血球の漏出と免疫応答の経路に富む等の類似性,ii) irAE の非炎症性粘膜は免疫細胞のリクルートが特徴 (whole transcriptome) iii)irAE 炎症部で *Bacteroides* 種の発現量が減少 (16s rRNA シークエンス) iv)irAE と UC 炎症部で脂肪酸を含む分子輸送系に関連するパスウェイが濃縮 (Piphillin) v)UC は局所的に炎症を起こした領域を持つが、irAE は免疫細胞の再構成が行われるコロニー粘膜の非炎症領域にまで及ぶことを示した。また、微生物組成が炎症の重症度や治療効果と関連していることが明らかになった。

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 炎症性腸疾患—大腸癌マウスモデルを用い、マウス大腸上皮組織の全トランスクリプトーム、パスウェイ解析をおこなった。GSEA 解析により、脂肪酸代謝、酸化的リン酸化、PI3K-AKT-mTOR シグナル経路への集積、糞便の 16S メタゲノム解析により、腫瘍形成と細菌叢多様性の増加に相関をみとめること、Piphillin 解析により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集積していることを示した。宿主と細菌叢の微小環境下での相互作用として、細菌叢リポアラビノマンナン生合成経路は、宿主の PI3K-AKT-mTOR シグナル経路と関連することを示した。

同モデルを用いて発がん抑制実験を行い、ニコチンアミドモノヌクレオチドにより、TNF α や TGF β など炎症の分子経路が抑制され、腸内細菌叢で低下する *Firmicutes/Bacteroidetes* 比が回復すること、ニコチンアミドモノヌクレオチド投与により腫瘍形成が抑制されることを示した。

潰瘍性大腸炎(UC)の治療効果に対する宿主と細菌叢との相互作用についても検討を行った。UCに対する抗TNF治療中止後の長期寛解UC患者と再発患者における粘膜微生物叢および大腸粘膜遺伝子発現のネットワーク解析から、再発リスクに関連する因子を探索した。Gene Set Enrichment Analysisを用い再発群で24週目に高発現する遺伝子を同定した。同遺伝子は、膜ドッキング、小胞体ストレスへの応答、RNAの代謝、NF- κ B活性化等のGene Ontology群と関連していた。MCODEによるタンパク質間相互作用により、mRNA調節、Rho GTPase、NF- κ Bシグナル等が関連経路として同定された。ChiP-X Enrichment Analysisにより、再発に関連する転写因子は、MYSM1、GABPA、ZNF83、KMT2Aであることが示された¹⁾。また、大腸前癌病変において発現亢進しているガンキリン(GK)の大腸発癌に対する作用を検討した。上部小腸でのGK欠損は、デキストラン硫酸ナトリウムで大腸炎を誘発した場合、コントロールマウスに比べて炎症活性を増強した。また、生化学的解析により、GKが欠損すると上部小腸での抗菌ペプチドである α -Defensin-5および-6の発現が低下することが明らかになった²⁾。

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

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て、細菌叢変化と中枢神経(遺伝子発現)のクロストークに介在する血中因子を同定した³⁾。また、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルで、CMGの投与により症状が抑制されることを示した。多発性硬化症モデルにおいて菌叢変化が中枢神経内の免疫関連遺伝子発現と相関すること、腸管免疫の主体であるIgAが中枢神経で高発現していることを示した⁴⁾。

Pten KOマウスにおける前立腺がん発症モデルにおいて水溶性のプロドラッグであるクルクミンモノグルクロニド(CMG)の急性投与により、AR標的遺伝子の発現レベルが低下、前立腺腹側葉ではアポトーシスが亢進し、白血球の浸潤が増加した。また、免疫関連遺伝子発現解析により、CMG投与マウスでは、食作用、抗原提示、Th1分化、T細胞活性化、マクロファージ活性などのシグナルが濃縮していた。また、CMG投与マウスの腫瘍部で、遊走性樹状細胞とNK細胞が増加した。CMGを4週間投与の腫瘍縮小効果をもとめた。これらの結果は、CMGの免疫調節機能と抗腫瘍効果を示す結果である。本発表では、上記研究で試みてきた、腸内細菌叢の細菌組成から紐づけ、外挿したヒトパスウェイと遺伝子の特徴とヒト腸粘膜における遺伝子発現解析に基づいたパスウェイとの関連性をみるinteractome解析について議論したい。

<参考文献>

- 1) Sakurai T. et al. *BMC Gastroenterol.* **2020**, 20(1), 12. 2) Sakurai T. et al. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 19186
3) Omura S. et al. *Front Immunol.* **2019**, 10, 516. 4) Omura S. et al. *Front Immunol.* **2020**, 11, 1138.

<略歴>

1961年 大阪府堺市生まれ
1986年 和歌山県立医科大学卒業
1988年 和歌山県立医科大学付属病院紀北分院内科助手
1990年 国立がんセンター研究所リサーチレジデント
1992年 国立がんセンター研究所薬効試験部研究員
1996年 国立がんセンター研究所薬効試験部耐性研究室室長
2006年 近畿大学医学部ゲノム生物学教室主任教授
専門分野：腫瘍生物学、バイオマーカー

ラット安寧フェロモンの同定に向けて

清川 泰志

(東京大学・大学院農学生命科学研究科)

【学術的背景・研究目的】

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。このような一例として、同種の個体がそばにいとストレスが軽減される現象である社会的緩衝が挙げられる。動物は進化の過程で社会的緩衝を獲得した結果、自身のストレスを軽減させるために他個体に近づくことが増え、その結果群れが形成され、社会性を発達させていったと考えられる。そのため社会的緩衝は社会性の基盤となる現象であると考えられるが、その理解が進んでいなかった。そこで本研究ではラットにおける社会的緩衝の存在を検討し、それを生み出すコミュニケーションの全容を理解することを目指した。

【研究成果・今後の展望】

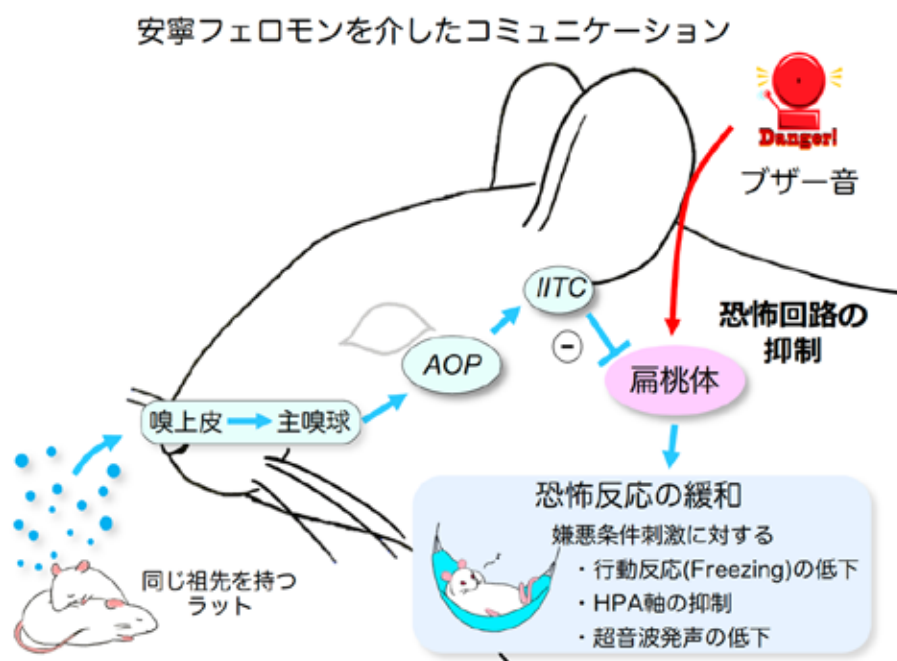
まず、ラットにおいて社会的緩衝が存在することを確認した。電気ショックとブザー音を同時に提示される恐怖条件づけを体験した被験ラットは、ブザー音に対してすくみ行動をはじめとした様々なストレス反応を示すようになる。しかしブザー音を提示される際に他のラット（同伴ラット）が存在すると、これらのストレス反応がほぼ完全に緩和されることが明らかになった^{1,2)}。そのため、ラットにおいて社会的緩衝が存在することが明らかになった。

次に、社会的緩衝が起こる条件を検討した。まず、異種動物であるモルモットでは社会的緩衝は起こらなかったことから、相手はラットであることが重要であることが示唆された³⁾。次に、様々な系統のラットを用いて検討したところ、社会的緩衝を起こすのは被験ラットと同じ系統のラットや、被験ラットから作出された系統のラットに限られることが明らかになった⁴⁾。さらに、被験ラットが自発的に示す選好性を検討したところ、被験ラットは社会的緩衝を起こすラットを起こさないラットより選好することが明らかになった⁵⁾。これらのことから、仲間の存在が安寧を喚起するために社会的緩衝が起こることが考えられた。

また社会的緩衝の中核メカニズムに関する検討も進めてきた。まず、社会的緩衝を起こすシグナルを受容する感覚系を検討した。その結果、被験ラットと同伴ラットを5cm離れた2重の金網で分けても社会的緩衝は起こることから、触覚の関与は小さいと考えられた⁴⁾。また2重の金網の間に透明なアクリル板を立てると社会的緩衝が起こらなくなったことから、視覚と聴覚の重要性も低いことが示唆された⁴⁾。一方で、嗅覚の感覚上皮である嗅上皮を損傷すると、2重の金網の向こうに同伴ラットが存在していても社会的緩衝が起こらなくなったことから、嗅覚系が重要であることが明らかになった⁴⁾。その後様々な神経科学的解析を行った結果、嗅上皮で受容されたシグナルは前嗅核後部複合体へと伝達された後⁶⁾、恐らくは扁桃核間細胞塊を経て⁷⁾扁桃体外側核へと伝

達され、そこを抑制することでストレス反応を緩和しているという⁸⁾、中枢メカニズムの概要が明らかになってきた。

嗅上皮で受容するシグナルが社会的緩衝に重要であることが明らかになったことから、リガンドの同定に向けた研究を開始したところである。あらかじめ同伴ラットを留め置いた箱で試験を行うと、試験時に同伴ラットが居なくても社会的緩衝が起こることから⁹⁾、社会的緩衝を引き起こす安寧フェロモンの存在が示された。また社会的緩衝が起こるためには、同伴ラットを留め置いたエリアに接触する必要がないことが明らかになり、安寧フェロモンは揮発性分子であることが確認された¹⁰⁾。そのため現在、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。



<参考文献>

1) Kiyokawa, Y. et al. *Behav Neurosci.* **2004**, 118, 798-804. 2) Kiyokawa, Y. et al. *Eur J Neurosci.* **2007**, 26, 3606-3613. 3) Kiyokawa, Y. et al. *Eur J Neurosci.* **2009**, 29, 777-785. 4) Nakamura, K. et al. *Horm Behav.* **2016**, 82, 72-77. 5) Kogo, H. et al. **2021**, in revision. 6) Kiyokawa, Y. et al. *Eur. J. Neurosci.* **2012**, 36, 3429-3437. 7) Minami, S. et al. *Behav. Brain Res.* **2019**, 372, 112065. 8) Fuzzo, F. et al. *Front. Neurosci.* **2015**, 9, 99. 9) Takahashi, Y. et al. *Behav. Brain Res.* **2013**, 240, 46-51. 10) Kiyokawa, Y. et al. *Behav. Brain Res.* **2014**, 267, 189-193.

<略歴>

1977年 東京都大田区生まれ
 2002年 東京大学農学部獣医学専修卒業
 2006年 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻修了
 2006年 日本学術振興会特別研究員
 2010年 東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻助教
 2019年 東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻准教授 現在に至る
 専門分野：獣医動物行動学

酵母の2つのフェロモン受容体が配偶者認識に及ぼす役割

清家 泰介

(大阪大学・大学院情報科学研究科)

【学術的背景・研究目的】

1つの種からどのようにして2つの種が誕生するのかは、進化における最も注目すべき局面の一つである。新しい種の確立には、元々の種との交配を妨げる生殖隔離が重要であり、その原因の一つにフェロモンによる異性の識別機構の変化が挙げられる。性フェロモンは昆虫・両生類のような動物から酵母のような微生物まで、異性を誘引するのに使われており、フェロモンと受容体間の特異性は、同種間の維持に役立っている。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* には2つの交配型 (Plus型・Minus型) が存在し、異なる交配型細胞間でペプチドフェロモンをやり取りすることで交配する。私はこれまでフェロモンと受容体の作用機序とこれらの遺伝子の多様性に関する研究を行ってきた。そして最近、M型フェロモンは種特異的に作用するが、P型フェロモンはある程度の近縁種には作用することを発見し、実際に自然界に棲息する分裂酵母においてM型フェロモンは厳密に保存されているが、P型フェロモンは多様化していることを明らかにした¹⁾。また以前の研究で、M型フェロモンと受容体の組み合わせを人為的に改変することにより、生殖隔離が生じることを実験的に証明することにも成功している²⁻³⁾。

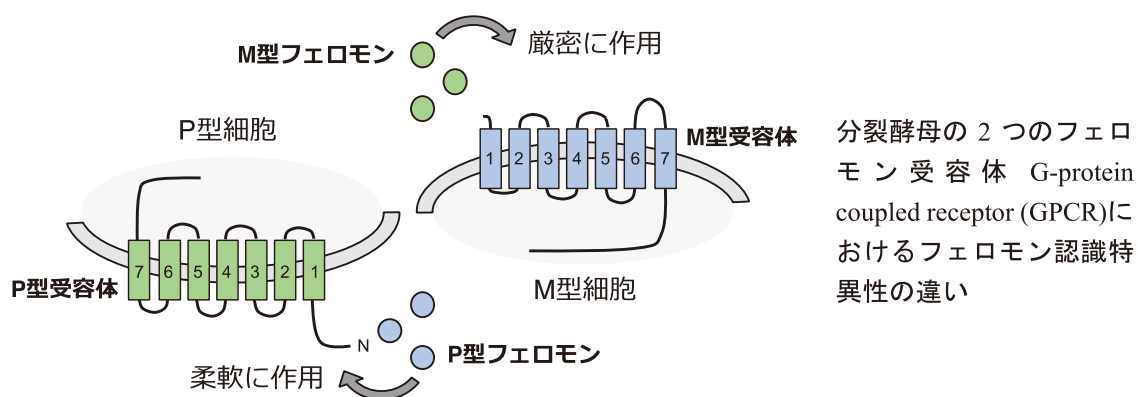
以上のことから、M型フェロモンは厳密に制御され種の維持に働いているようであるが、一方でP型フェロモンは比較的特異性が低く近縁種にも作用するようである。しかし、このような異性間コミュニケーションにおける「非対称性」が、なぜ酵母の交配・進化に有益かは不明である。そこで本研究では、フェロモン機構の違いが酵母の配偶者認識に果たす役割について調べ、酵母の異性間認識システムの解明を目指す。

【研究成果・今後の展望】

まず私はフェロモンの認識特異性に非対称性が生まれる原因として、「受容体によるフェロモン認識レベルの違いが異性間で異なるから」と仮説を立てた。そこでまず、*S. pombe* の最も近縁種である *Schizosaccharomyces octosporus* のフェロモン及び受容体遺伝子をクローニングし、*S. pombe* 細胞の自身の遺伝子と置き換えた。その結果、*S. octosporus* のM型フェロモンとその受容体はいずれも *S. pombe* では機能せず交配を誘導することはなかったが、興味深いことに *S. octosporus* のP型フェロモンとその受容体は *S. pombe* で機能し、交配して子孫を作ることができた⁴⁾。酵母の受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体であり、Gタンパク質を介したシグナル伝達経路は2つの受容体間で同じである。そのため、この違いは仮説通り、「受容体のフェロモン認識特異性の違い」で説明できると考えられる。

そこで現在、フェロモン (鍵) と受容体 (鍵穴) の特異性について、遺伝学的にハイスループットに検証できる系を構築を行っている。まず第1段階として、受容体遺伝子の全長にランダム変異を導入し、遺伝的な変化が交配に及ぼす影響について調べることにした。それぞれの受容体遺伝子 (およそ1kb) をランダム化した後、それと連結する形で

15 bp からの DNA バーコードを挿入した。変異受容体と DNA バーコードを含む PCR 断片をナノポアシーケンサー minION で解析することにより、受容体の変異とバーコードの種類への対応づけを行った。続いて、これらのプラスミドライブラリーを酵母細胞に導入して、1,000 個程度のランダムな変異受容体を発現する細胞集団を作製した。この細胞集団を交配を誘導する培養環境下で継代培養し、有性生殖をした細胞（つまり、フェロモンを認識できる受容体を発現する細胞）を濃縮した。最終的に得られた細胞集団からプラスミドを回収し、DNA バーコード部分の種類と数をイルミナシーケンサー MiSeq で解析した。現在は解析中であるが、酵母の遺伝学を駆使した実験系を使うことで、フェロモン受容体の「変異への許容性の違い」が議論できると期待している。さらには、フェロモン側もランダム化させることにより、フェロモンと受容体の鍵-鍵穴の特異性の検証を目指している。そして最終的に、異性間での非対称なコミュニケーションの仕組みを理解し、それが同種間の維持と新しい種の確立にどのように貢献しているかを解明したいと考えている。



<参考文献>

- 1) Seike, T. *et al. PLoS Biol.* **2019**, 17, e3000101.
- 2) Seike, T. *et al. Genetics* **2012**, 191, 815-825.
- 3) Seike, T. *et al. PNAS.* **2015**, 112, 4405-4410.
- 4) Seike, T. *et al.* **2021**, submitted (bioRxiv: doi.org/10.1101/2020.07.22.215566)

<略歴>

1985 年 京都府京都市生まれ
 2014 年 大阪市立大学大学院理学研究科後期博士課程修了 博士(理学)取得
 2014 年 産業技術総合研究所生物プロセス研究部門 博士研究員
 2015 年 国立遺伝学研究所系統生物研究センター 日本学術振興会特別研究員 PD
 2018 年 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
 2020 年 大阪大学大学院情報科学研究科 助教 現在に至る
 2020 年 理化学研究所生命機能科学研究センター 客員研究員 (兼務)
 2021 年 大阪大学先導的学際研究機構産業バイオイニシアティブ研究部門 教員 (兼務)

専門分野：遺伝学、進化学、応用微生物

糸状菌の感染を促進するセオブロキシドの生理活性

長田憲幸, 北岡直樹, 犬飼 剛, 増田 税, 松浦英幸

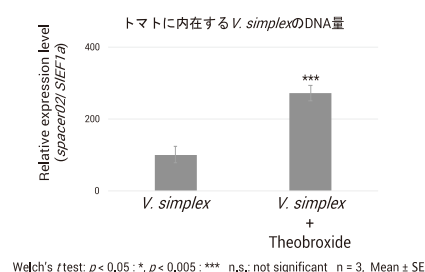
(北海道大学大学院・農学研究院)

【学術的背景・研究目的】

表題にある化合物、セオブロキシド(theobroxide)は、糸状菌、*Lasiodiplodia theobromae* の培養ろ液より、バレイショ(*Solanum tuberosum* L.)塊茎誘導物質として単離、報告された化合物である¹⁾。培養ろ液、1Lほどから、数百ミリグラム単離でき、『どうして、わざわざこのような化合物を大量に産生するのか?』、『ひょっとすると、植物への感染を有利に進めるために本菌が生合成するのでは?』と、学術的に興味のもたれる化合物である。その後の研究により、アサガオ(*Pharbitis nil*)の花芽形成誘導活性を持つことが明らかにされ²⁾、実際の圃場試験においても、バレイショの収量増収効果が見出されている³⁾。また、セオブロキシドを植物に灌水処理することで、矮化を誘導することが発見され、かつ、乾燥耐性も付与されることが明らかとなった。乾燥耐性付与の効果はセオブロキシドの灌水処理により、植物ホルモンの一種、アブシシン酸(ABA)の蓄積量が上昇し、乾燥耐性が付与されると判明した⁴⁾。ABA蓄積量の上昇に関しては、グルコースエステルとして蓄積されているABA-glucoseの加水分解に関わるタンパクをコードする遺伝子(*BG1*)の転写誘導と、活性型ABAの不活化に関わるタンパクをコードする遺伝子(*CYP707A3*)の転写抑制によるものであることが発見された。上述の矮化誘導に関しては、植物ホルモンの一種、ジベレリン(GA)の生合成に影響を及ぼし、蓄積したABAが活性型のGAの生合成に関与するタンパクをコードする遺伝子(*GA3ox1*, *GA3ox2*)の転写抑制によるものであることも発見された。ABAとGAに互いに影響を及ぼす現象(クロストーク)は報告があるものの、生物学的に起こり得る濃度で、議論された初めての報告となった⁴⁾。ABAのクロストークに関しては、植物の防御応答のKey化合物、サリチル酸(SA)との抑制タイプのクロストークが知られ、セオブロキシドの灌水処理によりウィルス感染ならびに植物に有益な作用をもたらす共生菌(*Veronaeopsis simplex*)の感染亢進(右図)が、予想通りに観察された。よって、*L. theobromae*はセオブロキシドを化学シグナルとして用い、植物への感染を有利に進めているのではと想定され、本発表では『*L. theobromae*が感染を有利に進めるための作用機序』について報告する。

【研究成果・今後の展望】

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を播種後33日、35日、37日目に、3回、0.1mM セオブロキシド水溶液を灌水処理によって、ウィルス感染亢進が確認されている。ウィルス感染亢進が生じる原因を特定する目的で、セオブロキシド灌水処理のシロイヌナズナを用いて、マイクロアレイ解析を行った。このとき、SAの下流のシグナル伝達経路のうち、*TGA7* 遺伝子の発現量が增大していることが明らかとなった。*TGA7* は防御応答発現に必須な *PR1* の発現を負に制御することが



報告されている。マイクロアレイ解析の結果を確認するために、ABA 灌水处理のシロイヌナズナをもちいて qRT-PCR 解析を行ったところ、*TGA7* の転写量の増加、*PR1* の転写量の減少を確認できた。セオブロキシド灌水处理によって、ABA の蓄積量の上昇が生じない、*bg 1* 変異体を用いたところ、*TGA7* の転写量には、非処理との植物の値と比べ有意な差は観察されなかった。よって、蓄積量の上昇した ABA によって、*TGA7* の転写量が上昇していると予想された。セオブロキシド処理により、内生の ABA の蓄積量が増加することから、抑制タイプのクロストークの観点より ABA によって SA の生合成が阻害されると予想された。これを確かめるために上述のようにセオブロキシドを灌水处理したシロイヌナズナにおける、SA およびそのグルコースエーテル体(SAG)の蓄積量を測定し、合わせて SA 依存性の抵抗性を示すために必須な遺伝子(*NPR1*, *PR1*)の転写量を qRT-PCR を用いて測定した。この結果、*PR1* の転写量の減少が確認でき、ウイルス感染亢進の生物現象を支持するものであった。しかしながら、SA, SAG の蓄積量と *NPR1* の転写量には、非処理との植物の値と比べ有意な差は観察されなかった。また、ABA の生物学的に起こり得る蓄積量となるように ABA を灌水处理したところ、上記と同様に *PR1* の転写量のみを減少させた。これに加え、セオブロキシド灌水处理によって、ABA の蓄積量の上昇が生じない、*bg 1* 変異体を用いたところ、*PR1* の転写量には、非処理との植物の値と比べ有意な差は観察されなかった。以上のことからセオブロキシド灌水处理によって、内生量の上昇した ABA によって SA シグナル系の下流が阻害され、*PR1* の転写が阻害されたと結論した。今後の展望は、*TGA7* の欠損体、並びに過剰発現体を用いて、セオブロキシド、ならびに ABA 処理および、病原抵抗性に関する表現型を確認し、セオブロキシドを化学シグナルとして用い植物への感染を有利に進めている、*L. theobromae* の生きる知恵を明らかとする。

<参考文献>

- 1) Nakamori, K. et al. *Phytochemistry*. **1994**, 35, 835-839.
- 2) Yoshihara, T. et al. *J. Plant Growth Regul.* **2014**, 19, 457-461.
- 3) Aoi, A. et al. *Nat. Pro. Comm.* **2016**, 11, 673-676.
- 4) Yamashita, Y. et al. *Plant & Cell Physiol.* **2016**, 57, 986-999.

<略歴>

1963 年 北海道 富里生まれ
 1988 年 北海道大学農学部農芸化学科卒業
 1993 年 北海道大学大学院農学研究科博士後期課程修了
 1993 年 ブリティッシュ・コロンビア大学 (Prof. Nile Towers 研 博士研究員)
 1996 年 日本学術振興会特別研究員
 1998 年 北海道科学技術振興財団 (現・北海道科学技術総合振興センター) 雇用研究員
 2001 年 北海道大学大学院農学研究科 助手
 2003 年 北海道大学大学院農学研究科 助教授
 2007 年 北海道大学大学院農学研究科 准教授
 2016 年 北海道大学大学院農学研究科 助手 教授 現在に至る

専門分野：天然物化学、植物生理学

食品由来マラバリコーン C の多様な生理活性とその機構解明

門出 健次

(北海道大学・大学院先端生命科学研究院)

【学術的背景・研究目的】現在、我が国の死亡原因はガンに続き、心疾患、脳血管疾患が上位を占める。その要因は主として脂質代謝疾患による脂質蓄積の異常が原因であると考えられている。また、近年メタボリックシンドローム、アルツハイマー病等を指向した脂質ターゲットの創薬探索が国内外で進行している。脂質合成酵素の内、スフィンゴミエリン合成酵素(SMS)はセラミドをスフィンゴミエリンへ変換する酵素である。近年、本酵素 SMS の阻害によるガン免疫亢進¹⁾、オートファジー制御²⁾、抗脂肪肝³⁾、アミロイドβのクリアランス効果を持つエクソソーム産生亢進⁴⁾等が続々と報告されており、本酵素 SMS は、創薬ターゲットのみならず脂質代謝をコントロールする重要酵素として注目されている。しかし、これまで SMS を制御する画期的な低分子化合物の報告はほとんどされていない。我々は、ごく最近、自前の植物抽出物ライブラリーに対して SMS 阻害スクリーニングを実施、イチヨウ葉より得られたギンコール酸⁵⁾やマレーシア産フルーツより得られるマラバリコーン C が極めて高い SMS 阻害能 ($IC_{50} \sim 1.5 \mu M$)を有することを発見している。本研究の骨格となる阻害剤マラバリコーン C は、フルーツ由来であることから人体への安全が確保されており、既に *in vivo* においても SMS 活性の抑制や耐糖性、肥満抑制効果を実証済みである⁶⁾。しかし、またマラバリコーン C による耐糖性や肥満抑制効果については、既報の SMS ノックアウトマウスによるその効果といくつか異なるデータ（血中脂質の割合比率など）が得られ、その詳細な分子機構は明らかとなっていない。さらに SMS 阻害はガン免疫亢進などの他の効果も期待される。即ち、この分子機構（化学コミュニケーション）を明らかにすることは将来、ガン、肥満抑制などのアンメットメディカルニーズを開発する上で貴重な情報源になることは疑いもないことから、本分子機構解明を目指す。

【研究成果】

i) RNA seq.による耐糖性や肥満抑制に関わる RNA 分子の発現変動を定量的に解析

マラバリコーン C 添加による HepG2 細胞での遺伝子発現レベルを検討したところ、コントロールと比べ 85 種の遺伝子、なかでもインスリン様増殖因子結合タンパク質 1 (IGFBP1)、アンジオポエチン様 4 (ANGPTL4)の発現レベル上昇が確認された。前者はペプチドホルモンである IGF-I と結合することがわかっており、これによりインスリン抵抗性を抑制している可能性が示された。また後者の活性は血中のトリグリセリド値を低下する報告⁷⁾があることから肥満抑制の起因になっていることが示唆された。現在は負の発現レベル遺伝子についても調査、検討を行なっている。

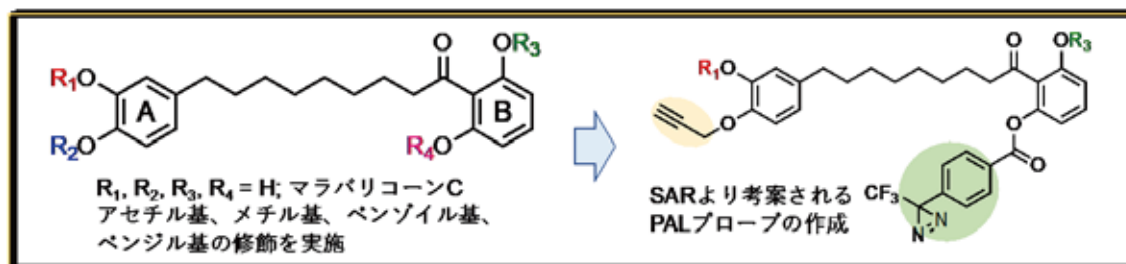
ii) マラバリコーン C の構造活性相関と化合物動態の検討

今後の創薬を指向し、より強力な SMS 阻害、肥満抑制効果かつバイオアベイラビリティを狙ったマラバリコーン C アナログの創製（構造活性相関: SAR）を実施した。マラバリコーン C フェノール水酸基（4 箇所）においてアセチル化、メチル化、ベンズイル

化、ベンジル化の検討を行ったところアセチル基はほとんど SMS 阻害活性に影響しないことが判明した。またメチル基についてもその活性にさほど影響を与えなかった。いっぽう嵩高いベンゾイル基やベンジル基の修飾は、SMS 阻害活性の低下を招く結果となった。特にその影響は B 環よりも A 環への修飾の際に大きく見られた。現在は、マラバリコーン C のアルキル鎖の変化による SAR を検討している。

iii) PAL を用いたマラバリコーン C の標的分子及び PPI 分子の釣り上げ研究

マラバリコーン C による SMS 以外の生体分子相互作用の可能性も考えられるため、光アフィニティーラベル法 (PAL) による相互作用分子釣り上げの検討も視野にいった。現在 SAR によって得られた情報を元に、A 環にクリックケミストリーによる検出基導入可能なアルキン、B 環にフェニルジアジリン基導入を実施している。



<参考文献>

- 1) Taniguchi, M. and Okazaki, T. *J. Lipid Atherosclerosis*. **2020**, 9, 380-405.
- 2) Gulbins, A. *et al.*, *Molecular Psychiatry*. **2018**, 23, 2324-2346.
- 3) Mitsutake, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 28544-28555.
- 4) Yuyama, K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 10977-10989.
- 5) Swamy, Mahadeva M. M. Murai, Y. Ohno, Y. Jojima, K. Kihara, A. Mitsutake, S. Igarashi Y. Yu, J. Yao, M. Suga, Y. Anetai, M. Monde, K. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 12758-12761.
- 6) Othman MA. Yuyama, K. Murai, Y. Igarashi Y. Mikami, D. Sivasothy, Y. Awang, K. Monde, K. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10, 1154-1158.
- 7) Frederick, E. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **2016**, 374, 1123-1133.

<略歴>

1961 年 広島県広島市生まれ
 1988 年 北海道大学理学研究科化学専攻博士課程単位満期退学
 1988 年 北海道大学理学部化学科 助手
 1998 年 コロンビア大学化学科 (中西香爾 研, 博士研究員)
 1996 年 東北大学反応化学研究所 助手
 2001 年 北海道大学理学研究科 助教授
 2010 年 北海道大学先端生命科学研究院 教授 (現在に至る)

専門分野 : キラル化学・脂質ケミカルバイオロジー

栄養素結合体の化学コミュニケーション

上杉 志成

(京都大学・化学研究所)

【学術的背景・研究目的】

天然物の利点は、生物活性に富むことである。しかし、天然物の数には限りがある。一方、合成化合物の利点は、ほぼ無限に合成できることである。しかし、それらの多くは生物活性を示さない。本新学術研究では、天然物と合成化合物の中間にあたる「人工栄養素結合体」という新しい分野を開拓してきた。栄養素という天然物の人工的な結合体は、生物活性に富む合成化合物になるだろう。また、栄養素は細胞に取り込まれやすく安全であるので、それらの人工結合体も細胞透過性に優れた安全な化合物である可能性が高い。

ヒトの体内には様々な栄養素(Nutrients)が存在している。例えば、脂質、アミノ酸、糖質、核酸、ビタミン、そして、それらの代謝物である。栄養素は細胞に取り込まれやすく、補酵素や生体分子の構成物、時にはシグナル分子として、生体内で利用される。このため、栄養素は疾病を予防するサプリメントとして利用されたり、安全な医薬品の源流となってきた。これらの栄養素や代謝物の複数を化学結合させた栄養素結合体を網羅的に600種化学合成した。ほとんどの化合物が分子内に4つの栄養素構造をもっている。全て新規物質である。

人工栄養素結合体ライブラリーは、さまざまな活性をもつ化合物の源になるかもしれない。本講演では、この栄養素結合体ライブラリーから実際に発見した2つの生理活性化合物について議論する。

【研究成果・今後の展望】

●グルコース細胞内取り込み阻害化合物「DHG」¹⁾

人工栄養素結合体に期待される生物学的活性の一つは、哺乳類細胞のエネルギー代謝の調節である。概念実証のために、細胞内脂質生合成を制御する司令塔であるステロール制御要素結合タンパク質(SREBP)のレポーター遺伝子を用いてライブラリーをスクリーニングした。SREBPは、哺乳類のエネルギー代謝経路の最下流に位置しているため、SREBPレポーター遺伝子の活性は、様々な細胞内エネルギー代謝変化の指標となる。

人工栄養素結合体ライブラリーをスクリーニングした結果、DHGと名づけた化合物を発見した。この化合物はDHA、グルコサミン、アミノ酸の結合体である。作用メカニズム解析を行ったところ、この化合物はグルコーストランスポーターを阻害している。それにより細胞内のATP濃度が下がり、AMPKが活性化され、SREBP転写因子が阻害される。DHGをマウスに経口投与するとグルコースの腸管吸収を抑制し、摂食時の血糖値上昇を抑制した。この結果は、人工栄養素結合体がエネルギー代謝を調節する新しい化学的ツールや医薬シーズの供給源となることを示唆している。

●自己集合性ワクチンアジュバント「コリカマイド」²⁾

ワクチンは感染症を予防するための最もすぐれた医学的介入である。疾患を引き起こす病原体に由来する弱毒化ワクチン（生ワクチン）は、主に自然免疫と獲得免疫の両方の反応を継続的に刺激するため、効果的なワクチンとして作用する。弱毒化ワクチンは非常に効果的な感染症予防の手段だが、安全面において改善の余地がある。この課題を解決するために病原体の抗原となる部分を取り出した不活性化ワクチン（サブユニットワクチン、スプリットワクチン）が開発され、臨床的に広く用いられてきた。しかしながら、不活性化ワクチンは十分な免疫原性を有しておらず、十分な免疫応答を誘導するためにはアジュバントと呼ばれる抗原性補強剤との併用が必要。これまでにアラム（アルミニウム塩）や水中油型エマルジョンなどの古典的なアジュバントが開発されているが、選択肢が極めて少ない。安価で安全な合成アジュバントが求められている。

一般に、免疫応答とアジュバント活性には、分子の大きさが関与していることが知られている。人工栄養素結合体を含めた 8,000 個の化学物質の中から水中で自己集合して巨大化する化合物を選び、その中からワクチンアジュバント活性のある化合物を見いだした。スクリーニングの結果、胆汁酸、ジアミン、ペプチドの三分子からなる人工栄養素結合体に自然免疫活性化能を見出した。その化合物の類縁体を化学合成することによって強力なアジュバント活性をもつ化合物を発見し、コリカマイドと名付けた。この胆汁酸結合体は自己集合してウイルスに似た大きさと形状になり、免疫細胞に取り込まれ、Toll-like receptor 7 というウイルス受容体に認識される。いわば、ウイルスになりすまして免疫細胞を活性化する。マウスにインフルエンザワクチンと共に投与すると、インフルエンザワクチンの効果を増強し、マウスがインフルエンザに耐えうようになった。

コリカマイドは化学構造が単純であり、工業化が可能。今後、コリカマイドや胆汁酸誘導体を合成し、免疫細胞のコミュニケーションの研究試薬や新興ウイルスのワクチンアジュバントとしての利用が期待される。

<参考文献>

- 1) Furuta, T. et al. *ACS Chem. Biol.* **2019**, 14, 1860-1865.
- 2) Jin, S. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 961-969.

<略歴>

1967年 大阪市生まれ
 1990年 京都大学薬学部製薬化学科 卒業
 1992年 京都大学大学院薬学研究科薬学専攻修士課程 修了
 1995年 京都大学大学院薬学研究科薬学専攻博士後期課程 修了 博士（薬学）
 1995年 米国ハーバード大学 化学部 内藤財団博士研究員・アメリカ白血病財団フェロー
 1998年 米国ペイラー医科大学 生化学・分子生物学科 助教授
 2005年 米国ペイラー医科大学 生化学・分子生物学科 准教授 (Tenured)
 2005年 京都大学 化学研究所 教授 現在に至る

専門分野：ケミカルバイオロジー

天然物誘導体による14-3-3たんぱく質の化学シグナルの解明

大神田 淳子

(信州大学・学術研究院農学系)

【学術的背景・研究目的】

14-3-3 たんぱく質は、酵母からヒトに至るすべての真核細胞生物に発現するシグナル調節因子であり、発生、増殖、分化、細胞死、エピゲノム制御等々、生命維持に重要な事象のあらゆる局面に関与している。有機化合物による 14-3-3 化学シグナルの自在な操作が可能になれば、天然変性リン酸化たんぱく質の過渡的な分子集合体に関与する生命現象の解明と、heterogenous な細胞内反応場を標的とした新しい創薬への道が拓けると期待される。しかし、7つのアイソフォームと2千を超えるリン酸化たんぱく質が司る 14-3-3 シグナルは膨大であり、その全容は解明されていない。我々は、細胞内の 14-3-3・リン酸化たんぱく質間相互作用 (PPIs) を対象として、植物病原真菌が生産するジテルペン配糖体フシコクシン (FC)を基盤とした阻害剤、安定化剤、検出剤の創出と細胞内機能に関する研究を進めてきた¹⁾。その結果、天然型 FC の半合成誘導体が、天然型には観察されない特異な抗腫瘍活性を示し^{2,3)}、その作用機序が特定の 14-3-3 シグナルの亢進に基づくことを示唆する結果を得た^{3,4)}。加えて、反応性 FC 誘導体の細胞内中分子化により、14-3-3 シグナルを負に制御可能なことも示してきた^{5,6)}。本研究では、抗がん活性 FC 誘導体の変調する 14-3-3 PPIs の網羅的同定と定量を基礎とした作用機序の解明に取り組む。さらに、アイソフォーム毎のインタラクトームの定量解析により 14-3-3 シグナルネットワークの全貌の描出を目指す。

【研究成果】

我々はこれまでに、天然型 FC の 12 位水酸基を還元的に除去した誘導体が低酸素条件下で顕著な細胞増殖阻害活性を示すことなどから、ジテルペン骨格の 12 位置換基が化合物の生物活性を決定する構造要因であることを明らかにしている³⁾。一連の検証実験から、12 位水酸基が、リン酸化たんぱく質の 14-3-3 結合配列中の i+2 位プロリン残基との立体反発により、14-3-3・リン酸化リガンドとの3者会合体形成を妨げている可能性が示唆された。換言すると、12 位無置換 FC 誘導体は、相互作用に適した結合配列を持つ特定のリン酸化リガンドと 14-3-3 と会合体を形成し、相互作用を亢進している可能性を意味する。そこで、天然型および 12 位無置換体を用いた 14-3-3 共免疫沈降実験により、12 位水酸基がどのように 14-3-3 PPIs に影響を及ぼすかを検証することとした。実験は、14-3-3ζの N 末端に Flag と Strep-Tag II をタンデムに付与して細胞に強制発現させ、化合物処理後に連続的な共免疫沈降およびプロテオミクス解析を行った。検出された 1,174 個の 14-3-3 相互作用たんぱく質のうち、12 位無置換体が有意に相互作用を増強したたんぱく質が複数同定され、このうち 12 位無置換体との相互作用に適した結合配列を持つたんぱく質（ここでは"Protein X"とする）に着目して詳細な検証実験を行った。

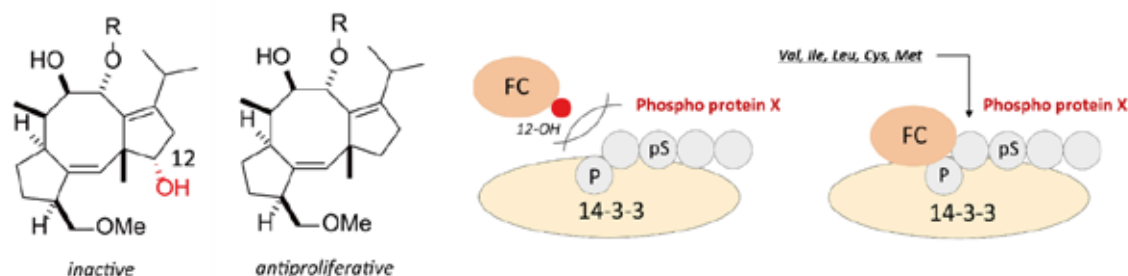
"Protein-X"は mRNA 抑制複合体の構成要素のひとつだが、その機能や 14-3-3 との関連は明らかではなく、また mRNA 抑制複合体の詳細についても不明な点が残されている

る。抗体を用いた検証実験の結果、免疫沈降試料において化合物による有意なバンドの増強が確認された一方、12位ヒドロキシル体ではコントロールとの差は認められなかった。次に、"Protein X"で免疫沈降すると、今度は14-3-3のバンド強度が化合物依存的に増加した。さらに、BioOrthogonal Non-Canonical Amino acid Tagging (BONCAT)法により細胞のたんぱく質合成に及ぼす化合物の影響を検証したところ、予想通り12位無置換体の処理により新生たんぱく質が顕著に減少することを見出した。

以上の結果から、"Protein-X"は14-3-3と相互作用し12位無置換体はその相互作用を安定化することが明らかになった。また12位無置換体が新生たんぱく質合成を阻害したことから、mRNA翻訳抑制には"Protein-X"と14-3-3の相互作用が必要であることが強く示唆された。

【今後の展望】

"Protein X"の14-3-3結合サイトを同定し、mRNA抑制複合体の形成と機能発現において14-3-3がどのような役割を果たしているのかを明らかにする。この現象が14-3-3 ζ アイソフォーム特異的かどうかにも興味深い。今後全てのアイソフォームについてプロテオミクス解析を進めて14-3-3シグナルの全容を明らかにし、FCを基盤とする本創薬概念が対象とし得る疾患のリストアップと新たな医薬品シードの開発を目指したい。



<参考文献>

1) Ohkanda, J. *Chem. Lett.* **2021**, 50, 57-67. 2) Kawakami, K. *et al. Anticancer Agents Med. Chem.* **2012**, 12, 791-800. 3) Ohkanda, J. *et al. Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 16066-16071. 4) Takahashi, M. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 509-512. 5) Parvatkar, P. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 15624-15627. 6) Masuda, R. *et al. Chem. Asian J.* **2020**, 15, 742-747.

<略歴>

1965年 埼玉県川越市生まれ
 1988年 東京学芸大学教育学部中等理科教員養成課程卒業
 1990年 お茶の水女子大学大学院理学研究科化学専攻修士課程修了
 1990年 (株)リコー中央研究所
 1991年 成蹊大学工学部工業化学科助手
 1996年 博士(工学)取得(東京大学、西郷和彦教授)
 1998年 エール大学化学科博士研究員(A. D. Hamilton教授)
 2003年 アキリオン製薬創薬部門(コネチカット州ニューヘイブン市)
 2004年 東京学芸大学自然科学系専任講師
 2005年 大阪大学産業科学研究所准教授
 2013年 京都大学化学研究所准教授
 2016年 信州大学学術研究院(農学系)教授 現在に至る
 専門分野: 生物有機化学・ケミカルバイオロジー

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：多様な酸化型ステロイドの自在合成

中崎 敦夫

(岩手大学理工学部)

【学術的背景・研究目的】

侵略的外来生物は、在来種に対する捕食・競合・遺伝的攪乱を介して既存の生態系を大きく脅かしていることから駆除の対象となっている。駆除における最も重要なポイントは、いかにして環境へ負荷をかけず、生物種特異的に侵略的外来生物のみを駆除するかという点である。

ヤツメウナギ科の両側回遊魚であるウミヤツメは、口にある巨大な吸盤で食用魚などに吸着して血液や体液を吸い尽くすことによって死に至らしめることから、五大湖では侵略的外来種として問題となっている。ペトロマイゼストロステロール (1) (図 1) は、オスのウミヤツメから単離された酸化型ステロイドであり、同種のメスの嗅上皮を選択的に刺激するフェロモン様物質である¹⁾。一方、オオヒキガエルは、オーストラリアや沖縄県石垣島等に生息し、世界中で問題となっている侵略的外来生物である。何でも食べる大食漢であるため、固有種豊かな環境の在来種絶滅をひき起す脅威となっている。興味深いことに、オオヒキガエルのオタマジャクシは、彼らが身を守るための防御毒ブファジエノリド (強心ステロイド; 例えばブフォリピン A (2)) に強く誘引されることが報告されている²⁾。これら酸化型ステロイド 1 や 2 がそれぞれの生物を特異的に誘引するという結果から、強力な誘引活性を持ち、合成の容易さを考慮した構造単純化アナログ (非天然型アナログ) が外来生物の駆除に利用できるのではないかと期待される。

我々は、侵略的外来生物であるウミヤツメやオオヒキガエルが、同種を誘引するための化学コミュニケーション分子として酸化型ステロイドを利用しているという生態学的特徴に着目し、誘引機構の解明と駆除法の開発を目指すこととした。具体的には、i) 非天然型アナログも含めた酸化型ステロイドの化学合成、および ii) 誘引活性を指標とする構造活性相関研究、という 2 点について検討する。これにより、誘引活性の発現部位の特定とともに、環境負荷が小さく、駆除に利用可能な非天然型アナログの創出を目指す。

【研究成果・今後の展望】

構造活性相関を指向して、様々な酸化型ステロイドを自在合成できる鍵中間体 7 と 9 を設定し、それらを利用した 1 と 2 の合成を目指した (図 2)。この際、以前に開発したエストロゲン様化合物の合成法^{3a)}を基盤として合成することとした。CD 環セグメント 3 を共通の出発物質として、エストロゲン骨格を持つ 1 の合成では、4 との溝呂木-Heck 反応によって A 環となるアリール基を導入した。Friedel-Crafts 型脱水環化によって鍵中間体 7 を得た後、B 環上のアルケンを活用して 7 位水酸基を導入した。続いて、未確

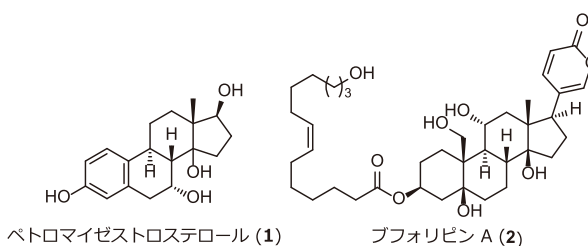


図 1. 侵略的外来種に対する誘引活性を持つ酸化型ステロイドの化学構造

定の 14 位の相対立体化学を決定する目的で、1 のメチルエーテル体の 14 位に関する両エピマーを合成した。NMR スペクトルの比較から 14 位は α 配向であることが明らかとなった⁴⁾。

一方、強心ステロイドである 2 の合成では、3 に対し A 環に相当する 5 を使って 2-ピロンを導入し、数工程を経て環化前駆体 9 とした。この分子内 Diels-Alder 反応によって AB 環を構築し、鍵中間体 10 を得た。この反応では一般的な有機溶媒ではなく水を溶媒として反応を行うことで、目的のジアステレオマーを得ることができた^{3b)}。得られた鍵中間体 10 は、各環に酸素官能基化の足掛かりとなるアルケンまたは水酸基を有していることから、多様な強心ステロイドの自在合成を可能とする優れた分子である。このことを立証する目的で、鍵中間体 10 を起点として植物由来のカルデノリド系強心ステロイドであるカンノゲノールの全合成を達成した⁵⁾。

ブファジエノリドの全合成に向けて残る二つの課題（鍵中間体を基質とする酸化的構造修飾と、17 位の 2-ピロンの構築）を解決し、現在、プフォリピン A (2) を含む天然型ブファジエノリドの全合成を検討中である。また、強心ステロイド特有の Na^+/K^+ -ATPase 阻害に由来する毒性と誘引活性の相関を明らかにする計画である。

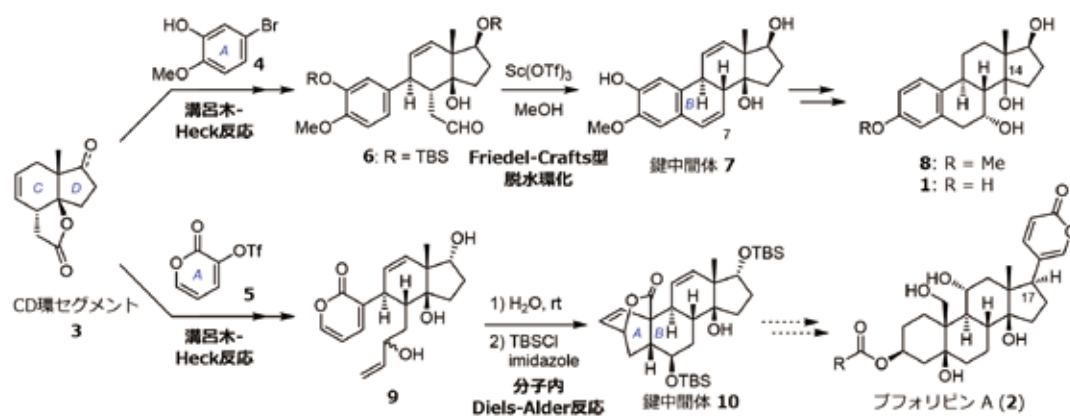


図 2. エストロゲン様化合物と強心ステロイドの合成アプローチの概要

<参考文献>

- 1) Li, K. *et al. Steroids* **2012**, *77*, 806.
- 2) Haramura, T. Shine, R. *et al. Proc. R. Soc. B.* **2012**, *279*, 3436.
- 3) (a) Nakazaki, A.; Hashimoto, K.; Ikeda, A.; Shibata, T.; Nishikawa, T. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9097.
(b) Watanabe, S. Nishikawa, T. Nakazaki, A. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7410.
- 4) Manuscript in preparation.
- 5) Watanabe, S. Nishikawa, T. Nakazaki, A. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 3605.

<略歴>

1973 年 岩手県盛岡市生まれ
 1996 年 東京工業大学工学部 卒業
 2001 年 東京工業大学大学院理工学研究科博士課程 修了
 2001 年 米国ハワイ大学化学科 博士研究員
 2003 年 東京理科大学薬学部 助教
 2009 年 名古屋大学大学院生命農学研究科 准教授
 2021 年 岩手大学理工学部 教授 現在に至る
 専門分野：有機合成化学、天然物化学

RNA-小分子間化学シグナル大規模解析技術の展開

鬼塚 和光¹, 小松 リチャード 馨², 齊藤 博英², 永次 史¹

(¹ 東北大学・多元物質科学研究所, ² 京都大学・iPS細胞研究所)

【学術的背景・研究目的】

RNA 標的創薬は近年、オリゴ核酸に加え、経口投与可能な小・中分子でも効果を期待できる標的が増え、開発が飛躍的に進展している。RNA 標的医薬の中には、重篤な遺伝性疾患に対して治療効果が期待できるものもあり、遺伝性・難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。RNA は様々な分子内相互作用により、様々な高次構造を形成することが知られている。創薬標的として、このような高次構造モチーフを小・中分子で狙う場合、多くの類似した構造から標的のみを選択的に認識し、強く結合する必要があるため、高い結合性と選択性を併せ持つ優れた RNA 結合分子の開発は容易ではない。そのため、標的特異的結合分子を創出する優れた探索法の開発が強く望まれている。

我々は、これまでに開発してきた DNA マイクロアレイ¹⁾を用いる大規模解析法により、既存の技術では得ることの難しい結合大規模情報、すなわち、意味のある RNA 配列に対する結合強度のランク化を可能にした。これらは一度の測定で数千～数万の RNA との化学シグナルを原理的に調査できることから、化合物ごとの真の選択性を評価することができ、さらに予期せぬシグナルの発見やシグナルのデータベース化が可能になる。このような背景のもと、本研究では我々の大規模解析技術を利用・応用することで実現できる下記2つの目的を設定した (Fig. 1)。

- ① RNA 結合分子のハイスループット探索：RNA に結合することで蛍光性が大きく変わる蛍光指示薬の RNA 結合データベースを構築することでハイスループット探索系の拡大およびヒット化合物の取得を目指している。
- ② RNA のアルキル化効率ランク化：独自に開発したビニルキナゾリノン (VQ) ユニットは、その安定前駆体である SPh 体と平衡状態で存在しており、近傍に U が存在すると速やかに反応する²⁾。また S(O)Me 体は自発的な脱離反応の後、アルキル化を引き起こすことも明らかにしている。この VQ ユニットを本大規模解析法に適用させ、アルキル化効率のランク化を目指している。

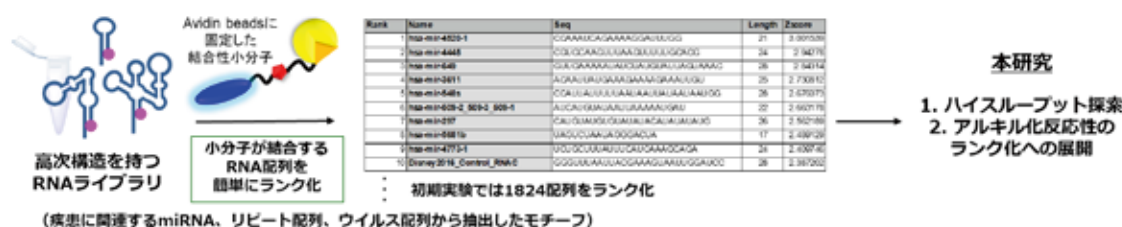


Fig. 1 本研究の概要

【研究成果・今後の展望】

- ① 蛍光指示薬の探索・活用：結合により蛍光変化のあるチオフラビン T (ThT)、チア

ゾールオレンジ誘導体 (TO-1、TO-3) の RNA 親和性大規模情報を取得した。今後、情報をもとにした蛍光指示薬競合置換アッセイにより、様々な化合物ライブラリからヒット化合物を探索する (Fig. 2)。

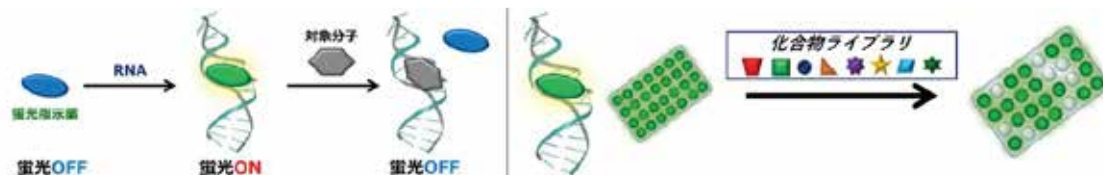


Fig. 2 蛍光指示薬競合置換アッセイ

② 我々が開発した VQ ユニットを核酸結合分子であるアクリジンにコンジュゲートし、さらに評価のためのアジド基を修飾したアクリジン-VQ-S(O)Me-N₃ を合成した (Fig. 3)。次に、マイクロアレイ法に付すことでアルキル化効率のランク化を試みた (Fig. 4)。得られた結果を実際に検証したところ、精度よくランク化できていることが分かった。今後は、他の核酸結合分子でも本系を試み、一般性を確認していく予定である。

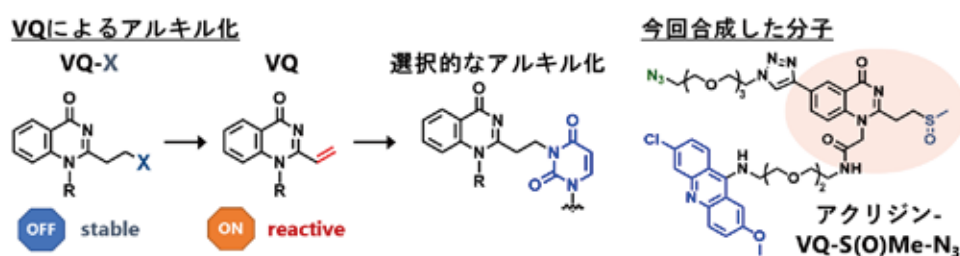


Fig. 3 VQ によるアルキル化反応および今回用いた分子の構造

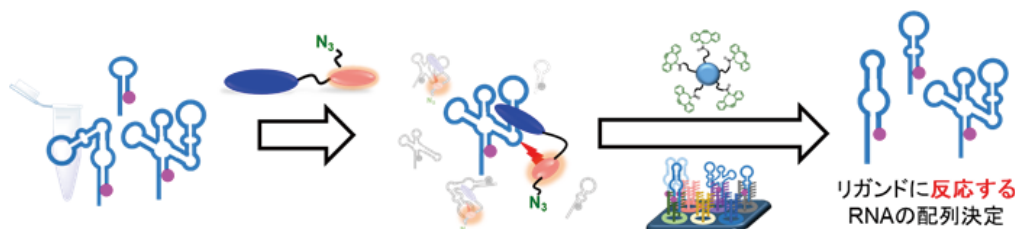


Fig. 4 RNA アルキル化反応の大規模解析法

<参考文献>

- 1) Komatsu, R.K. *et al. Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6275. 2) a) Onizuka, K. *et al. Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 6578-6589. b) Onizuka, K. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 2891-2894.

<略歴>

1982年 福岡県福岡市生まれ
 2010年 九州大学大学院薬学府創薬科学専攻博士課程修了
 2010年 カリフォルニア大学デービス校 (Peter Beal 研 博士研究員 (学振 PD))
 2012年 理化学研究所訪問研究員 (学振 PD)
 2013年 理化学研究所基礎科学特別研究員
 2013年 東北大学多元物質科学研究所助教
 2018年 東北大学多元物質科学研究所准教授 現在に至る
 専門分野: 有機化学、核酸化学、ケミカルバイオロジー

あらゆる化合物の親和性予測手法の開発と ヒト薬効・副作用予測への応用

永安 一樹, 酒井 幸, 金子 周司

(京都大学大学院・薬学研究科)

【学術的背景・研究目的】

新薬開発に必要な費用はこの20年で大きく増加している。さらに、ヒト臨床試験における副作用および薬効不十分での開発中止例は後を絶たず、ヒトへの外挿性が高い作用予測手法の開発は急務である。また、発症確率が極めて低いが重篤な副作用は、臨床試験においても見落とされる確率が非常に高く、市販後調査に基づき緊急安全性情報・安全性速報が出される事例は多数存在する。このような稀な副作用も予測することができれば、重大な薬害を未然に防ぐことができると期待される。またこの逆に、疾患や副作用の発症確率を低減させる偶然の併用薬とその作用メカニズムを一挙に臨床データから導き出すことができれば、新規薬剤の開発の観点からも有用であると考えられる。

近年、患者ごとの使用医薬品と有害事象のセルフレポートを集積したデータベースであるFDA adverse event reporting system (FAERS)や、患者の診断病名一処方医薬品が記載されているレセプトを集積したJMDC Claimsなどの臨床ビッグデータを解析することで、既承認医薬品がもつ予期せぬ治療効果が数多く「発見」されている^{1), 2)}。我々も、抗精神病薬誘発性のジスキネジアに対するアセトアミノフェンの治療効果³⁾、アミオダロン誘発性の肺障害に対するダビガトランの治療効果を見出してきた⁴⁾。一方、本手法の解析対象は既承認医薬品に限られ、新たな化学構造がどのような作用をもたらすかを予測することは不可能であった。

本研究の目的は、任意の化学構造が、ヒトでどのような作用をもたらすかを予測する技術を開発することである。

【研究成果・今後の展望】

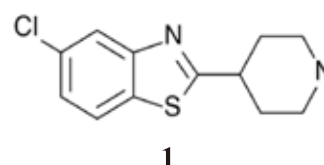
任意の化学構造に対する作用を予測するためには、化学構造から何らかの方法で「特徴」を抽出する必要がある。深層学習は、この特徴抽出を訓練データから自動で行うことに特徴がある。一方、上述の臨床データは、件数こそ非常に多いものの多様性は高くなく、多様かつ大量の訓練データを必要とする深層学習には適さないと考えられる。従って、化学構造から、ヒトでの作用を直接予測する手法の開発は困難であると考えられた。

そこで本研究では、医薬品がヒトに作用する際のインターフェースにあたる、薬理学的作用点(受容体、酵素、トランスポーターなど)を、中間の特徴量とすることで、上記問題の解決を図った。すなわち、多様かつ大量の訓練データが存在する化学構造—薬理作用情報予測には深層学習を用い、計算された薬理作用情報—ヒトでの作用予測には、より少数の事例から重要なルールを抽出するのに適した勾配ブースティング木を用いた。

英国のChEMBLには、200万以上の化合物の薬理学的作用点に関する実験結果が集積されている。我々はまず、上記の薬理学的作用点の中でも、多様かつ多数の化学構造に対する親和性情報が報告されているものについて、予測技術の確立を図った。その結

果、画像認識 AI を用いた既存手法を大きく超える標的数と (25 vs. 127)、高い予測精度 (二乗平均平方根誤差 = 0.68 ± 0.07 vs 0.49 ± 0.11) での定量的予測が可能であることが明らかになった。次に、構築した予測モデルの妥当性を評価した。セロトニン神経は抗うつ薬の作用点であり、我々も光遺伝学的手法を用いることで、背側縫線核セロトニン神経の活性化が抗うつ効果/抗アンヘドニア作用を引き起こすことを報告してきた^{5),6)}。そこで、このセロトニンの濃度を調節するセロトニントランスポーターに作用すると予測された化合物 1 について、実証実験を行った。その結果、1 がセロトニントランスポーターによる基質取り込みを阻害し、その pIC50 が 8.2 と予測値 8.0 に極めて近いこと、マウスにおいて抗うつ薬様作用を引き起こすことを見出した⁷⁾。集積されている化学構造の多様性の観点から、ChEMBL を用いた薬理作用予測標的数の限界は約 500 と推定されたことから、予測モデルの拡張を行い、542 の標的に対する予測モデルを構築したところ、その 75% は評価データセットに対する平均誤差が 0.6 以下の高い予測精度であった。

次に、この薬理作用予測モデルを用いて、ヒト作用予測技術の確立を図った。有害事象のセルフレポートを集積した FAERS に含まれる副作用レポートを、2017 年以前のものと 2018 年以降のものに分け、前者を訓練データとしてヒト作用予測モデルを構築し、後者でその性能評価を行った。



その結果、SMQ でグルーピングされた 176 種類の疾患/副作用のうち 43 について 0.8 以上の非常に高い ROC-AUC で、91 について 0.7-0.8 の高い ROC-AUC で発症を予測可能なモデルが構築できた。さらに、個々の疾患/副作用予測モデルを細かく見ると、抗精神病薬により誘発される副作用であるアカシジア・ジスキネジアについてはドパミン D2 受容体が、無顆粒球症については好中球の遊走に関わる CXCR2 が、それぞれ重要度の高い特徴として抽出された。今後、JMDC Claims 等のレセプトデータへと応用し、投与量・時系列を含む作用予測モデルを構築することで、あらゆる化学構造のヒトでの作用を予測できる手法を確立できると考えられる。

<参考文献>

- 1) Zhao, S. et al. *Sci Transl Med.* **2013**, 5, 206ra140.
- 2) Nagashima, T. et al. *Sci Rep.* **2016**, 6, 26375.
- 3) Nagaoka, K. et al. *JCI Insight.* in press
- 4) Siswanto, S. et al. in revision
- 5) Nishitani, N. et al. *Neuropsychopharmacol.* **2019**, 44, 721-732.
- 6) Nagai, Y. et al. *Int J Mol Sci.* **2020**, 21, 2160.
- 7) Sakai, M. et al. *Sci Rep.* **2021**, 11, 525.

<略歴>

1985 年 兵庫県伊丹市生まれ
 2008 年 京都大学薬学部総合薬学科卒業
 2013 年 京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了
 2013 年 大阪大学大学院薬学研究科特任助教
 2016 年 京都大学大学院薬学研究科特定助教
 2017 年 京都大学大学院薬学研究科薬学専攻助教 現在に至る
 専門分野：薬理学、情報薬学、神経科学

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

(大阪大学・大学院工学研究科, 免疫学フロンティア研究センター,
量子情報, 量子生命研究センター)

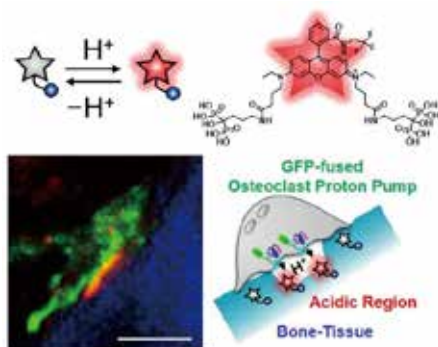
【学術的背景・研究目的】

化学コミュニケーションの理解において、細胞内外に作用する分子の働きを、その場で解明することが求められている。この目的達成には生きた状態における生体分子の空間的な局在性とその時間的な変化、量的・質的な変化を解析する手法が有効である。そこで、本計画研究では、化学プローブをデザイン・合成し、生体分子を時間と空間を制御して可視化することで生物活性リガンドのこれまで見えてこなかった機能解析を行う。分子リガンドの機能を解明するための技術プラットフォームを確立し、「化学コミュニケーションの統合的理解」を深めることに貢献する。

骨組織ではさまざまな細胞が働いており、骨の形成と吸収が繰り返されて組織を再構築し、恒常性が維持されている。破骨細胞は骨を溶かす細胞であり、骨組織の再構築に重要な役割を果たす一方で、その骨吸収活性が亢進すると骨粗鬆症、関節リウマチ等の骨疾患の発症につながるということが知られている。また、骨組織内部には骨芽細胞から分化した骨細胞が広く分布しており、骨細管とよばれる管で他の骨小腔や骨表面とつながり、細胞間のコミュニケーションを介して骨組織の維持に寄与していると考えられている。骨細胞は周辺の骨を溶解、吸収することがこれまでの研究から示唆されているが、本現象は生きた動物で観察されておらず、未だ議論の余地が残されていた¹⁾。われわれはこれまでに pH 感受性の緑色蛍光プローブを開発し、骨を溶かす破骨細胞が形成する低 pH 領域を、*in vivo* で可視化してきた²⁾。この破骨細胞による骨吸収における分子機構をさらに明らかにするため、また、骨細胞による骨吸収を可視化するための蛍光プローブの開発を目指す。

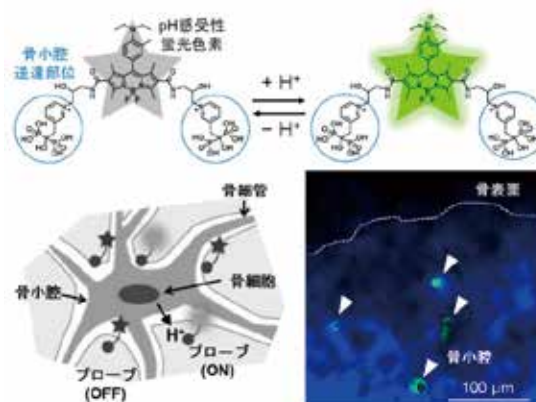
【研究成果・今後の展望】

1) **破骨細胞プロトンポンプ機能の *in vivo* イメージング解析**: 破骨細胞の骨吸収に重要な分子、プロトンポンプ複合体に着目し、機能解析を目的とした pH 感受性赤色蛍光プローブの開発を行った。赤色蛍光を示すローダミンを基にした pH 感受性色素を設計、合成し、光学特性を評価した。その結果、スピロラクタムの窒素上置換基に 2,2,2-trifluoroethyl 基を導入した色素が酸性領域を検出するために適切な pK_a 値、ならびに迅速な応答を示すことが判明した。この色素に骨組織に強く結合する alendronate を導入し、骨組織送達能を付与した蛍光プローブ、Red-pHocas を開発した。破骨細胞のプロトンポンプに GFP を発現させたマウスに Red-pHocas を投与し、二光子励起顕微鏡による生体イメージングを行っ



た。骨組織上で破骨細胞プロトンポンプ由来の蛍光と酸性領域を示す蛍光が重なって観察され、プロトンポンプを介して酸を放出している様子を可視化することに成功した。さらにイメージング解析により、破骨細胞プロトンポンプの集積と酸性領域形成に強い相関があることが明らかとなった。また、プロトンポンプ阻害剤、Bafilomycin A による機能阻害を時空間的なイメージング解析により示した³⁾。

2) **骨細胞による骨溶解を時空間解析する蛍光プローブの開発**：これまで骨組織送達に用いていた alendronate を含むプローブは、骨細胞が存在する骨組織内部まで送達されず、骨細胞による骨溶解を検出することはできなかった。そこで、骨への親和性が下がることで骨表面より内部への浸透が可能になると考え、親和性のより低い risedronate を pH 応答性 BODIPY 色素に導入したプローブ、pHocas-RIS を設計した。このプローブをマウスに投与し、骨組織内部を観察したところ、いくつかの骨小腔の輪郭に沿って円盤状の蛍光シグナルが得られた。この結果は骨組織内部までプローブが送達され、骨細胞が存在する骨小腔における低 pH 環境をはじめて可視化できたものと考えられる⁴⁾。



今回観察された蛍光シグナルは定常状態の骨小腔における pH を可視化したものであり、骨溶解が促進するといわれる授乳期のマウスを用いて今後は検証を行う。また、これらの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) H. Sano, *et al. Bone*. **2015**, 74, 134.
- 2) H. Maeda, *et al. Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 579.
- 3) M. Minoshima, *et al. ACS. Cent. Sci.* **2019**, 5, 1059.
- 4) R. Hashimoto, *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 20996.

<略歴>

1965年 富山県富山市生まれ
 1994年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了
 1994年 カリフォルニア大学サンディエゴ校 (Roger Y. Tsien 研, 博士研究員)
 1995年 スクリプス研究所 (Donald Hilvert 研, 博士研究員)
 1997年 東京大学大学院薬学系研究科助手
 2000年 東京大学大学院薬学系研究科助教授
 2005年 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻教授
 2020年 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻教授 現在に至る

専門分野：ケミカルバイオロジー

生体物質を対象とした発光指示薬および簡易計測法の開発

服部 満

(大阪大学・産業科学研究所)

【学術的背景・研究目的】

生物由来の物質が元々の役割とは別に、リガンドとして他の生物の生命現象に作用する例は非常に多い。その作用の有無を判断するためには、リガンドそのものを検出するだけでなく、リガンドによって生体がどのような影響を受けるか調査するための適切な検査システムが不可欠である。サンプル中の特定の物質を検出する方法の1つとして、対象を特異的に認識して標識するプローブ技術がある。我々が主に使用している生物発光は、発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) による化学反応の結果生じる光であり、蛍光プローブのように励起光が必要なく高いシグナル/バックグラウンド比を示す高感度な標識方法である。

一般に、ヒトの健康状態、疾患の判定、薬剤導入の影響などを調査する目的においては、血液、尿、唾液などの体液をサンプルとした検査が行われる。本研究では、リガンド添加の影響を調査することを想定して、血液中の特定成分を高感度で正確に検出するための生物発光技術を用いた指示薬の開発、さらには簡便で迅速な検査を実現するためのスマートフォンカメラを用いた簡易検査法の確立を目的とした。

【研究成果・今後の展望】

簡便な血液検査法を確立するために、モデルケースとして血中のビリルビンを対象として開発を進めた。ビリルビンのうち人体に有害となる成分、間接ビリルビン (Unconjugated Bilirubin, UCBR) は、赤血球の代謝や、肝臓、胆管などの異常によりその血中濃度が増加するため、健康診断において健康状態を測る指標とされている。特に新生児は血中 UCBR 増加により黄疸と呼ばれる症状に陥りやすく、重症な場合には核黄疸、難聴、および脳性麻痺などの重篤な症状を引き起こすため、重要な指標として診断がなされる。

この UCBR を検出するため、UCBR 特異的に結合し緑色蛍光を呈するタンパク質 UnaG および高光度生物発光タンパク質 NanoLuc を組み合わせて、BRET 型タンパク質指示薬 BABI (Bilirubin Assessment with Bioluminescent Indicator) を開発した (図 1)。BABI は通常青色発光を示すが、UCBR の結合により発光色が緑色に変化する。BABI の発光は目視できるほど明るく、高感度な検出機器を用いなくても汎用的な装置により検出することが可能である。そこでヒト血中 UCBR 濃度の定量を想定して、マウス血液に BABI を添加して市販のスマートフォンカメラを用いてその発光色変化を撮影した。結果、マウス血液中の UCBR 濃度に応じて発光色が青色から血液を介して橙色に変化する様子が撮影された。この画像成分を RGB (赤緑青) 分離して赤/青を計算した結果、UCBR 濃度に依存したレシオ値が得られたことから、BABI は血中 UCBR の濃度変化を高感度に検出することが可能であると示された。

本方法では、世界で最も普及している検出デバイスといえるスマートフォンを利用することで、新規に検査プラットフォームを導入するコストを最小限に抑えることができる。また、スマートフォンカメラでの検出を実現するために、明るく明瞭な信号変化を示す生物発光指示薬を新規に開発した。指示薬の原理は様々な対象に対して適用できるため、検出ニーズがある場合には、指示薬開発という形で協力が可能である。領域内連携により生物由来リガンドの評価プロセスが飛躍的に進むことを目指し、開発を進める。

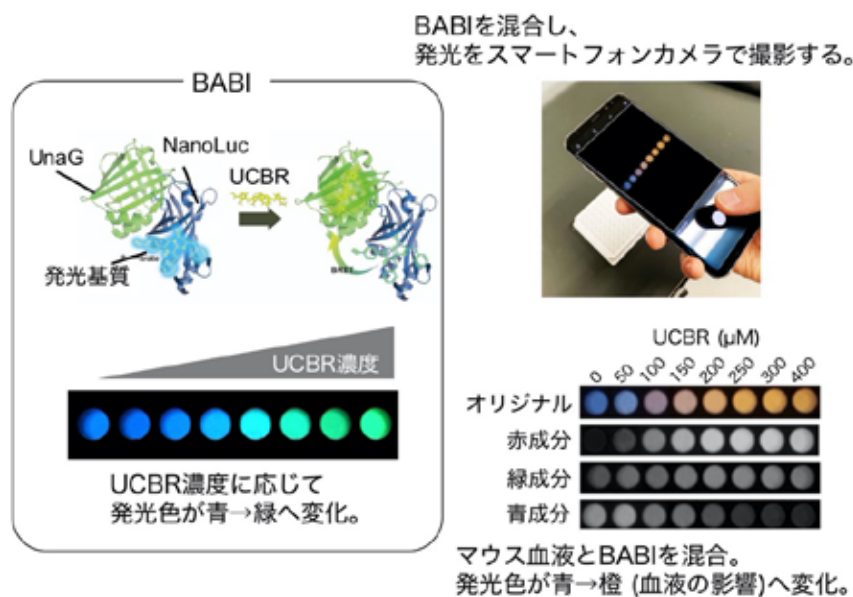


図1. 指示薬BABIによるUCBR検出

<参考文献>

- 1) Itoh, Y. et al. *ACS Sensors*, **2021**, 6(3), 889-895.
- 2) Hattori, M. et al. *Sensors* **2020**, 20,7166.
- 3) Nadim, M.H. et al. *Sensors* **2020**, 20(11), 3164.
- 4) Hattori, M. et al. *Anal. Chem.* **2016**, 88(12), 6231–6238.
- 5) Endo, M et al. *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 23976.
- 6) Hattori, M, Ozawa, T. *Anal. Sci.* **2015**, 31, 327-330.
- 7) Takamura, A. et al. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 3366–3372.
- 8) Hattori, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, 110(23), 9332-9337.
- 9) Hattori, M. et al. *Mol. BioSyst.* **2013**, 9, 957-964.
- 10) Takakura, H et al. *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 999-1005.
- 11) Misawa et al., *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2552-2560.

<略歴>

- 1980年 岐阜県海津市生まれ
- 2003年 名古屋大学理学部生命理学科卒業
- 2008年 名古屋大学大学院生命理学専攻博士課程修了
- 2008年 東京大学大学院理学系研究科化学専攻 (小澤研 特任研究員)
- 2016年 福井大学学術研究院医学系部門 助教
- 2017年 大阪大学産業科学研究所 特任助教 (常勤)
- 2018年 大阪大学産業科学研究所 助教 現在に至る

専門分野：生体分子計測、イメージング

脂質－膜タンパク質相互作用解析法の開発とその応用

松森 信明

(九州大学・大学院理学研究院)

【学術的背景・研究目的】 生体膜には数千種類に及ぶ脂質が存在するが、脂質二重膜を形成するためであればこれほど多様な脂質は必要ない。この「脂質多様性」の意義は現在でも十分理解されていない。一方で、近年膜タンパク質と脂質の共結晶構造が数多く報告され、さらに脂質が膜タンパク質の構造および機能を能動的に制御している事例が次々に明らかになってきた。つまり、脂質は膜タンパク質を浮かべる単なる媒質ではなく、相互作用を介して様々な膜タンパク質の機能調節を行っている。これが上述の「脂質多様性」の意義の一つと考えられる。しかし、脂質－膜タンパク質間の相互作用解析法が欠如しているために、相互作用に基づいた系統的な脂質の機能研究は進展していない。そこで我々は脂質－膜タンパク質相互作用の実用的解析手法の開発に着手した。

【研究成果・今後の展望】

1) 表面プラズモン共鳴を利用した膜タンパク質特異的脂質の解析

我々はまず表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用い、膜タンパク質と脂質の相互作用を簡便に評価する方法を開発した¹⁾。本手法では、センサー表面を比較的短い炭素鎖の自己組織化単分子膜 (SAM) で覆い、ここに膜タンパク質を多少埋もれた状態で結合させる (図 1a)。SAM との疎水性相互作用によって多量の膜タンパク質をセンサー表面に結合できるようになった。また、SAM により膜環境もある程度付与されることから、膜タンパク質の安定化も期待できる。次に本手法を、高度好塩菌により産生される膜タンパク質バクテリオロドプシン (bR) に適用し、脂質との相互作用を評価した。その結果、高度好塩菌由来糖脂質 S-TGA-1 が bR に対して nM オーダーの解離定数で強く相互作用することが示された。さらに S-TGA-1 が bR の三量体形成や光駆動プロトンポンプ活性を促進する機能を有する特異的脂質であることも明らかにした (図 1b)²⁾。

さらに本手法を放線菌由来カリウムチャンネル KcsA に適用した。KcsA がカルジオリピン (CL) と強く相互作用することを同様の方法で見出し、KcsA のチャンネル活性が CL 存在下で顕著に向上することを示した (図 1c)³⁾。特に CL が KcsA の細胞外側ドメインに結合することで、細胞質側のゲートを開かせるアロステリック効果を見出した。

このように、代表的な膜タンパク質である bR や KcsA ですら方法論の欠如により脂質との相互作用や脂質の効果が十分解明されておらず、逆に本手法の有用性が示された。

2) 金ナノ粒子を利用した膜タンパク質特異的脂質の解析

上記の SPR を用いた方法では、特異的脂質を見つけるために単離精製した種々の脂質を SPR 分析する必要がある。そこで金ナノ粒子表面を SAM で修飾し、これに膜タンパク質を固定化することで、膜タンパク質特異的脂質をプルダウンする手法を検討した (図 1d)。まずは bR を用いてコンセプト実証実験を行った。高度好塩菌から抽出した脂質混合物を bR 固定化金ナノ粒子に作用させ LC-MS 分析したところ、S-TGA-1 と 2 番目に親和性の高い脂質 PGP-ME のみが検出された。この手法により、特異的脂質の同定が簡便にできると期待される。また、本方法は膜タンパク質に相互作用する脂質ばかり

でなく薬剤の探索にも応用できると期待され、この検討も開始した。

3) 脂質特異的膜タンパク質の解析

上記2つの手法は「膜タンパク質特異的脂質」解析用であるが、「脂質特異的膜タンパク質」の解析も目指し、各種脂質を固定化したビーズを調製してきた。特に脂質ラフトの構成脂質であり生理活性も強いスフィンゴミエリンやセラミドを固定したビーズを調製し、これらに特異的に相互作用するタンパク質を同定した(図2)。

一方、脂質特異性を示すのはタンパク質ばかりではなく、天然物も報告されている⁴⁾。そこで、この脂質固定ビーズが脂質認識天然物リガンドの探索にも役立つのではないかと考え、検討を行っている(図2)。このような脂質認識能を有する天然物リガンドは、創薬シーズや脂質を標識するプローブとして利用でき、脂質に関連した化学コミュニケーションの理解を加速すると期待される。

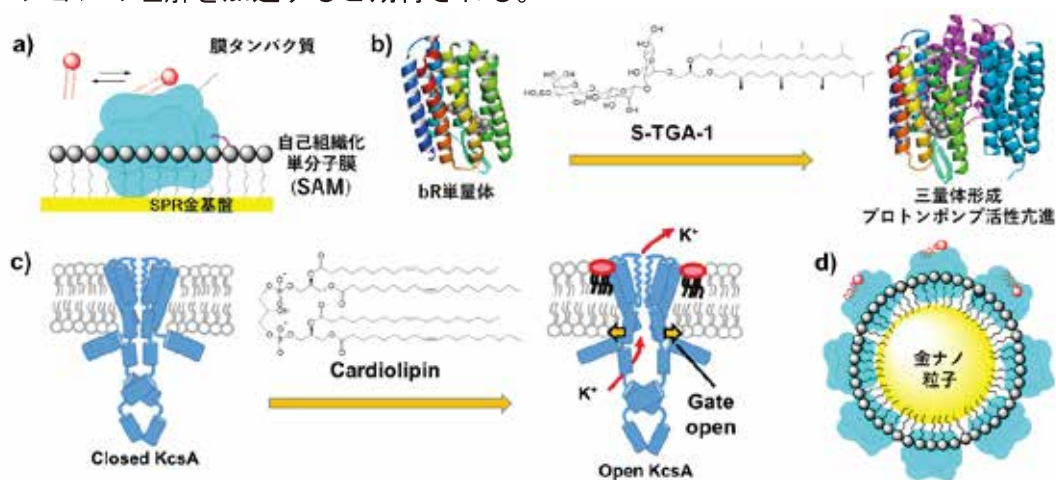


図 1

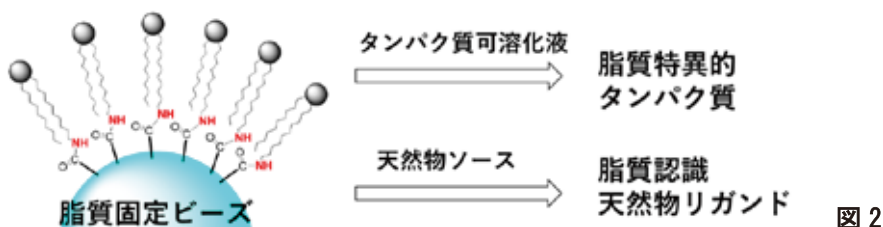


図 2

<参考文献>

1) Inada, M. *et al. Anal. Chim. Acta* **2019**, *1059*, 103-112. 2) Inada, M. *et al. ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 198-204. 3) Inada, M. *et al. submitted*. 4) Nishimura, S., Matsumori, N. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 677-702.

<略歴>

1969年 神奈川県厚木市生まれ
 1992年 東京大学理学部化学科卒業
 1997年 東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了(橘研)
 1997年 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻(堀之内研、学振研究員)
 1999年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻助手(村田研)
 2000年 マサチューセッツ工科大学化学科(R. G. Griffin 研、在外研究員)
 2010年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻准教授(村田研)
 2014年 九州大学大学院理学研究院化学部門生体分析化学研究室教授 現在に至る
 専門分野: 生体分析化学、ケミカルバイオロジー、天然物化学

ヒト培養細胞での遺伝学的スクリーニングを用いた化合物の作用機序同定

松本 健, 八代田陽子, Charles Boone, 吉田 稔

(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】

新規の生理活性物質はもちろん、表現型スクリーニングによって得られた物質についても、その標的因子あるいは標的経路を明らかにすることはとても重要であるが同時に困難な課題である。標的の同定には、結合因子の同定などの生化学的方法、トランスクリプトームやメタボロームを既知物質のデータベースと比較する表現型プロファイリング法とともに、遺伝学的方法が有効である。RNA 干渉やゲノム編集技術の発展により、培養細胞でも遺伝学的手法が利用できるようになってきた。本研究では、ヒト培養細胞の増殖を抑制する生理活性物質の標的の同定のため、ゲノムワイドな shRNA ライブラリースクリーニング¹⁻³⁾ および CRISPR ライブラリースクリーニングを行い、細胞増殖抑制に関与する遺伝子を網羅的に同定する。それとともに、生化学的方法や表現型プロファイリング法を組み合わせることによって、生理活性物質の標的因子あるいは標的経路の同定を効率的に行うことを目指す。特に、研究代表者が興味を持っている翻訳調節にかかわる生理活性物質および、当領域で見いだされる新規生物リガンドについて、それらの標的因子や、それらの作用との合成致死遺伝子を明らかにしたい。

【研究成果・今後の展望】

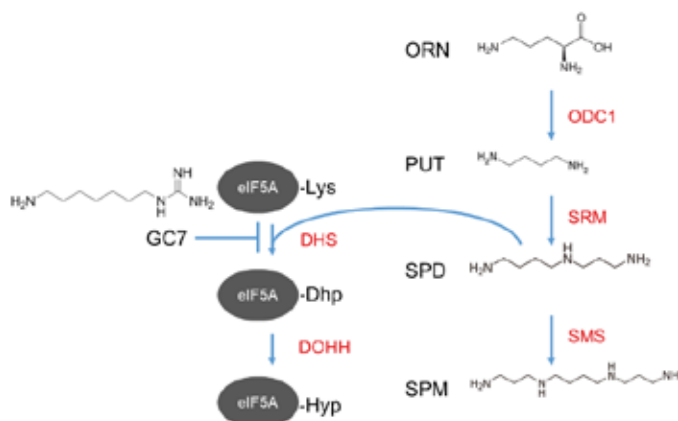
1) Thioviridamide 誘導体³⁾

Prethioviridamide はアデノウイルスE1A 発現細胞にアポトーシスを誘導する活性を持つ Thioviridamide の誘導体である。トランスクリプトーム解析、結合蛋白質同定により、ミトコンドリアのFoF1-ATP合成酵素に結合して活性を阻害すること、および Prethioviridamide 処理によってATF4下流遺伝子が活性化することが分かった。shRNA スクリーニングの結果、ノックダウンによって見かけ上 Prethioviridamide の感受性を下げる遺伝子として、ミトコンドリアタンパク質やtRNAアミノアシル化酵素を含む7つを同定した。さらに、Prethioviridamide 処理によってミトコンドリアが断片化することや細胞の全体的な翻訳活性が低下することが分かり、以上の結果から Prethioviridamide は、ミトコンドリアストレスを介した統合ストレス応答 (GCN2-eIF2 α -ATF4 経路) を活性化し、結果としてアポトーシスを引き起こすと考えられた。

2) GC7 (N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane)

タンパク質の翻訳後修飾の一つであるハイプシン化は、これまでのところ翻訳伸長因子 eIF5A のみに起きると考えられており、この修飾は eIF5A の活性に必要である。ハイプシン化はスペルミジンのアミノブチル基を eIF5A の特定のリジンに転移してデオキシハイプシンとする DHS と、水酸化する DOHH という2つの酵素が担う。GC7 は DHS の阻害剤として同定されたが、各種がん細胞における増殖抑制活性を持つことが知られ

ている。GC7 による細胞増殖抑制にどのような遺伝子が関わるかを調べるとともに、GC7 作用と合成致死の関係にある遺伝子を明らかにする目的で、ヒト培養細胞での shRNA スクリーニングを行った。その結果、ノックダウンによって GC7 感受性を上昇させる遺伝子として、ポリアミン合成の律速



酵素である ODC1 と、あるミトコンドリアタンパク質の遺伝子を同定した。GC7 が一部のミトコンドリアタンパク質の量の減少を引き起こすことを見出しており、今後、今回見出したミトコンドリアタンパク質遺伝子の機能と GC7 の作用とのかかわりを追及したいと考えている。

<参考文献>

- 1) Kobayashi, H. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 467, 121.
- 2) Takase, S. *et al. Sci. Rep.*, **2017**, 7, 2002.
- 3) Takase, S. *et al. ACS Chem. Biol.* **2019**, 14, 1819.

<略歴>

1965年 東京都生まれ
 1987年 東京大学薬学部薬学科卒業
 1992年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了
 1992年 三菱化成生命科学研究所特別研究員
 1993年 米国国立衛生研究所 (NIH) 博士研究員
 1997年 理化学研究所研究員
 2001年 理化学研究所前任研究員
 2007年 理化学研究所専任研究員 現在に至る

専門分野：分子生物学

Proteins in action – 高速分子動画法

岩田 想

(京都大学大学院医学研究科・理化学研究所放射光科学研究センター)

従来、タンパク質が機能する際の動的な構造変化を原子分解能で追跡することは非常に困難であった。X線結晶構造解析は高い空間分解能でのタンパク質構造決定を可能にしたが、通常は、“静止”した状態の構造である。最近になって、超高輝度、極短パルス、高空間コヒーレンスという特徴を有するX線自由電子レーザー(XFEL)が利用できるようになり、放射線による影響によって化学結合が切断されるより短い時間(<10fs)でデータを測定することが可能となった。高速分子動画法は、XFELによる多数の結晶の回折像より構造解析を行う方法で、フェムト秒~ピコ秒といった高い時間分解能での時分割実験が可能である。

我々はXFEL施設SACLAにて、高速分子動画法によるタンパク質結晶構造解析の技術開発に取り組み、最近では、膜タンパク質を始めとした様々なタンパク質における構造変化や化学反応を原子分解能で捉えることに成功している¹⁾⁻³⁾。この技術を核として我々は新学術領域「高速分子動画」を立ち上げた。本研究領域の第一の目標は、「高速分子動画」法から制限をできるだけ取り除き、より多くの生体高分子観察に適用できる普遍的な方法として確立することである。そのために、ビームラインのエンジニアリング、タンパク質工学、ケミカルバイオロジーなどの技術を最大限に活用する。そして第二の目標は、その結果を新しい生体高分子の制御法の開発に生かしていくことである。実際に観察された「高速分子動画」を計算科学や分光学的手法を用いて定量的、理論的に理解することを目指している。これをもとに新しい機能性タンパク質や生体高分子を制御できる新規化合物などを創生することにより、イメージング、光遺伝学、光薬理学といった幅広い分野に貢献したいと考えている。

講演では本領域のコンセプトと最新の成果について紹介する。

<参考文献>

- 1) Nogly P. *et al.*, “Retinal isomerization in bacteriorhodopsin captured by a femtosecond x-ray laser” *Science* 361(6398): eaat0094 (2018)
- 2) Suga M. *et al.*, “Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL” *Nature* 543, 131-135 (2017)
- 3) Nango E. *et al.*, “A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin” *Science* 354, 1552-1557 (2016)

SL-1

<略歴>

1991年 農学博士（東京大学）

1999年 スウェーデン、ウプサラ大学生化学科 教授

2000年 イギリス、インペリアルカレッジロンドン 教授

2005年（独）科学技術振興機構 ERATO 岩田ヒト膜受容体構造プロジェクト研究統括

2007年 京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学 教授

2012年（独）理化学研究所放射光科学総合研究センター SACLA 利用技術開拓グループ
グループディレクター 兼任

専門分野：膜タンパク質の構造生物学