



京都大学大学院薬学研究科

■ 生命・化学情報に基づく融合創薬研究者養成 ■



■ 平成18年度 魅力ある大学院教育イニシアティブ報告書



▶ Contents

1 あいさつ

2 プログラム概要

■融合研究プロジェクト成果概要

6 富田 健嗣／ペプチドを基盤とした新規癌転移抑制剤の開発研究

8 HAO XINYU／Boc-L-Valine連結型キラルアミドモノホスファン ーロジウム（I）触媒を用いたアリールボロキシンのN-ホスフィノイルイミンへの不斉付加反応

10 山岡 庸介／有機触媒を用いた不斉Petasis反応の研究と生理活性物質探索への応用

12 池田 恵介／アミロイドβタンパク質と脂質膜との結合における分子間相互作用解析

14 井村 雄一／抗菌性ペプチドと生体膜の相互作用に関する研究と細胞内分子導入ベクターへの応用

16 佐藤 友美／ヒトP糖タンパク質の結晶化を目指した研究

18 Takafumi Hara／Development of in silico ligand screening approach of G protein coupled receptors (GPCRs) based on chemical genomic information.

20 張 焱／α7ニコチン受容体に対する植物アルカロイドの薬理作用の探索的研究

22 鈴木 祐一／セロトニン神経含有中脳冠状切片培養系を用いた 違法ドラッグによるセロトニン神経毒性の分子機序に関する研究

24 伊藤 悦子／副作用情報のテキストマイニングを目標とした薬理学作用点データベースの開発

26 Hajime Yamauchi／The role of zebrafish Fgf21 in primitive hematopoiesis

28 中山 喜明／Fgf19の眼形成における役割の解明

30 石崎 玲／細胞内小胞輸送における低分子量G蛋白質ARFのGDP/GTP交換因子の役割

32 倉本夕香里／免疫活性化CpG DNAの細胞選択的ターゲティングに基づく新規癌免疫療法の開発

34 泉 安彦／パーキンソン病治療薬プラミペキソールの神経保護作用機序の解明

36 石野 誠悟／分子イメージング法を用いた動脈硬化プラークの質的診断用放射性薬剤の開発

38 吉田 寛幸／DNAによる免疫応答誘導機構の解明

コース名

■ケミカルバイオロジー

■ゲノム創薬

■ファーマコゲノミクス

魅力ある大学院教育イニシアティブ
「生命・化学情報に基づく融合創薬研究者養成」
融合研究プロジェクト 平成18年度 成果報告にあたって



魅力ある大学院教育イニシアティブプログラムとして平成17年度に採択されて2年目を迎えた本事業は、研究科の得意とする創薬教育と21世紀COEプログラム「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」によって実施中のバイオインフォマティクス教育とを融合し、将来性の豊かな人材の育成へと結びつけることを目標に掲げて京都大学大学院薬学研究科において計画、実行されてきた。

平成18年度には、教育システムの充実の面からは、実質的なコンテンツとして2つの学部科目を含めて全体で10科目のe-learning教材を開発した。再編成された大学院ゲノム創薬カリキュラムと新たに設置された大学院バイオインフォマティクス講義に対するインターネット学習システム（WebCT）が構築され、バイオインフォマティクスに対する横断的連携教育システムを推進する基盤ができた。

もうひとつの重要な本プログラムの柱である大学院生の融合研究コースでは、今年度は27件の自立的研究提案の応募の中から、選考委員会による選考の結果、融合研究によって研究の発展が大いに期待できる17件を採択した。その内訳は『ゲノム創薬コース』5件、『ケミカルバイオロジーコース』9件、『ファーマコゲノミクスコース』3件であったが、分野の異なる複数指導教員、研究科横断的な討論と評価、など意欲的な試みが実施できたことは喜ばしい。

研究科内だけではなく、企業連携型インターンシップも実施できた。海外企業に1名と国内企業に5名の大学院生が、企業内で研究能力の向上に努めたことも本研究科では画期的な出来事であった。

本成果報告書は、大学院生の融合研究コース研究報告会の発表内容を編集したもので、ホームページによる公開と併せて、研究成果を広く公表し社会に還元することを目的とする。本書に報告された研究内容は、自立的な研究の推進を基盤とし、各大学院生が、研究テーマの立案、実験計画の策定、実験結果の解析等に、融合コースとしての総合的な立場に基づく指導のもとで、意欲的に取り組んだ研究活動の貴重な記録となっている。関係各位の更なるご指導ご鞭撻をお願いするとともに、大学院生が限りなく大きく育ってくれることを祈念する。

京都大学大学院薬学研究科長
富岡 清

教育プログラムの概要（記録：金子周司）

京都大学大学院薬学研究科における魅力ある大学院教育イニシアティブ「生命・化学情報に基づく融合創薬研究者養成」プログラムでは、情報科学に立脚した創薬研究者の養成を推進するため、いくつかの新しい教育改革を実践した。それらの成果について概要を説明する。

1. WebCT e-learning システムの構築と運用

大学院において講義（特論）は、カリキュラムにおいて定時の参加が求められているが、遠隔地において研究を行っている者や、実験の都合によって出席が困難な者は、出席できないという不都合に直面する。また、講義は本来その場に出席した者に対してのみライブで行われるものであるが、これを講師の了解の元にアーカイブとして保存しておくことによって、受講生は任意の機会に学習を反復することが可能になる。さらに将来的には社会人大学院生などに対する学習機会を保证する意味でも、講義アーカイブとe-learningシステムの整備は有効な具体的解決策であろう。

本プログラムでは、アメリカにおいて開発されたe-learningシステムであるWebCTシステムを用いて、講義の音声と講義に用いたスライドを受講生が自由にダウンロードして受講し、講師が提示した課題に対するレポート提出ができるようにした（図1～3）。本システムの特徴は次の通りである。

- ・講義記録は一般的に動画で行われるが、スライド使用の場合には講師の映像自体は意味を持たないため、講師音声のみを記録した。これによって、サーバの負荷が軽減した。
- ・パワーポイントスライドをPDF形式にするにあたり、画像データ等の部分抽出が不可能で、低解像度での印刷のみを許す制限をかけ、講師の著作権を保護した。
- ・受講生は音声聞きながら自らPDFページを繰って講義の進行を把握するようにした。これは教科書を見ながら行う通常の学習環境に準拠しており、動画の視聴に依存する受動的な学習より主体性が求められると考えられる。

これまでにWebCTにおいてスライドと音声に掲載した科目は次の通りである。

■薬学研究科（博士課程）

- *ゲノム情報解析特論
- *ネットワーク情報解析特論
- *先端バイオインフォマティクス演習
- *テクニカルライティング演習
- *バイオインフォマティクス実習

■薬学研究科（修士課程）

- *バイオインフォマティクス概論
- *生命薬科学概論

■薬学部

- *基礎バイオインフォマティクス
- *応用バイオインフォマティクス



図 1



図 2



図 3

2. 教育研究環境インフラの整備

学会における口頭発表では電子スライドを用いることが標準的になり、最近ではポスター発表においてもB0あるいはA0判などの大型用紙を用いて視覚的に優れたフルカラーポスターを掲示することが一般的になってきた。また、医薬データベースの整備や教科書の電子化に伴って、図書館の電子化が必要となってきた。

本プログラムではこれらの要求に応えるため、次の教育研究環境インフラの整備を行った。これらは設置後から大学院生および教師によって頻繁に使われている。

(1) 学生用ノートパソコン (図4)

本プログラムにて15台のノートパソコンを導入し、医療人GPにて導入した30台のパソコンと併せて、図書室の共通OPAC端末(5台)および一時貸し出しパソコン(30台)として整備した。貸し出しは9時から5時まで、職員証あるいは学生証と引き替えに図書カウンターにて行っている。また、図書OPAC端末では、ChemDraw Ultraで化学構造式を描出することや、今日の診療データベースなど医薬資源データベースが自由に検索できる。



図4

(2) DSP超薄型プロジェクタ

3台のポータブルDSP超薄型プロジェクタと3本のレーザーポインタを教務掛にて貸し出している。図書室の貸し出しパソコンと組み合わせて教室セミナーや研究会、勉強会、学会発表練習などで活用されている。



図5

(4) 録音撮影キット (図6)

講義や特論の音声記録と学習風景およびフィールドワークの記録を目的として教室音響設備からのライン録音が可能となるICレコーダーおよびデジタルカメラからなる録音撮影キットを教務掛にて貸し出している。

(5) 無線LAN設備

構内4カ所(図書室、マルチメディア講義室、南北棟1階、南北棟2階)に無線LANステーションを設置した。持参したノートパソコンと組み合わせて研究打合せなどでインターネットが使えるように通信環境を整備した。

(6) 教育資源アーカイブサーバ

教育資源を学部内に提供する種々のサーバを構築した。

- WebCT講義アーカイブ 音声・動画配信、レポート受付、成績管理
- 教育資源やプロダクトをアーカイブするイントラファイルサーバ。
- 今日の診療イントラネットサーバ 同時に5人までログイン可能。



図6

3. 研究会および研究報告会の実施

本プログラムでは、大学生のゲノム創薬に対する理解を推進するため、21世紀COEゲノム科学との共催により、「ゲノム創薬フォーラム」を実施した。また、本プログラムで実施した融合研究コースの成果発表を21世紀COEゲノム科学との共催で年度末に行った（図7～10）。成果報告会においては、優秀発表に対して奨励賞を授与した。



公開国際シンポジウム

日時：2007年1月29日（月）～30日（火）
会場：京都大学医学部 芝蘭会館（稲森ホール・山内ホール）

PROGRAM

January 29

- 9:00～12:00 Poster session (Student)
- 13:00～13:10 Opening remark
- 13:10～14:00 Hiroaki Mitsuya, M.D., Ph.D. (Kumamoto University)
"Development of therapeutics for AIDS:
Structure-based molecular targeting,"
- 14:00～14:40 Kazuya Kikuchi, Ph.D. (Osaka University)
"Design, synthesis and biological application of
chemical probes which convert
biological signals to chemical output,"
- 15:00～15:40 Ho-Jeong Kwon, Ph.D. (Yonsei University)
"Chemical genomics toward angiogenesis,"
- 16:00～16:40 Sunghoon Kim, Ph.D. (Seoul National University)
"Chemical modulation of essential enzymes
in their intra- and intermolecular space,"
- 16:40～17:20 Kenta Funatsu, Ph.D. (University of Tokyo)
"Chemoinformatics for prediction and design,"

January 30

- 9:00～11:30 Oral presentation (P.D.)
- 12:30～17:00 Oral presentation (Student)
- 17:00～17:10 Closing remark

参加費無料

主催：京都大学21世紀COEプログラム
「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」
共催：京都大学薬学研究科
「魅力ある大学院教育イニシアティブ」

Kyoto University
21st Century COE Program
Genome Science
<http://www.sbc.kyoto-u.ac.jp/COE/>

連絡先：京都大学大学院薬学研究科
21COE拠点室
TEL: 075-753-4551・FAX: 075-753-4570
E-mail: coe21@pharm.kyoto-u.ac.jp

図7



ゲノム創薬フォーラム

キーテクノロジー2006

ファーマコプロテオミクス・ケモゲノミクス

2006.9.19(火) 10:00～17:00 京都リサーチパーク

コーディネーター：辻本 豪三、田中 利男、内田 和彦
(京都大学大学院薬学研究科) (三重大学薬学部) (奈良大学薬学部)

- 10:00-10:15 Opening Remark 野口 照久 (ゲノム創薬フォーラム 代表)
- 10:15-10:55 長野 哲雄 (東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室 教授)
「バイオイメージングプローブの開発と生体への応用に関する研究」
- 11:00-12:00 Dr. Anton Simeonov (Chief, NIH Chemical Genomics Center)
「NIH Chemical Genomics Center: Opening a New Door to Discovery」
- 12:00-12:30 ランチョンセミナー (Dr. Victor Sementchenko・Affymetrix)
「Tiling Arrays: Applications and Data Analysis」
- 12:40-13:10 最新技術紹介
(株式会社津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス研究所 西橋 勲)
- 13:10-14:30 展示ブース見学
- 14:30-15:10 上杉 志成 (京都大学化学研究所ケミカルバイオロジー研究室 教授)
「合成小分子化合物によるケミカルバイオロジー」
- 15:10-15:50 大川 克也 (京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構
先端技術センター生体分子解析グループ助教・グループリーダー)
「タンパク質の微量分析技術とその意義」
- 16:10-16:50 坂田 恒昭 (大阪大学サイバーメディアセンター 客員教授)
「ゲノム・ポストゲノム時代の創薬研究」
- 16:50-17:00 Closing Remark 辻本 豪三 (京都大学大学院薬学研究科 教授)
- 17:20-19:00 懇親会 (懇親会費一律2,000円) **入場無料**

主催／参加申込：ゲノム創薬フォーラム TEL: 03-3523-9633
shimada@pharmdesign.co.jp <http://www.genome.na.jp/gdd/>

共催：21世紀COEプログラム「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」
・「魅力ある大学院教育」イニシアティブ「生命・化学情報に基づく融合創薬
研究推進」プログラム

■会場／京都リサーチパーク TEL: 075-322-7800 (JH・近鉄・地下鉄)

図8

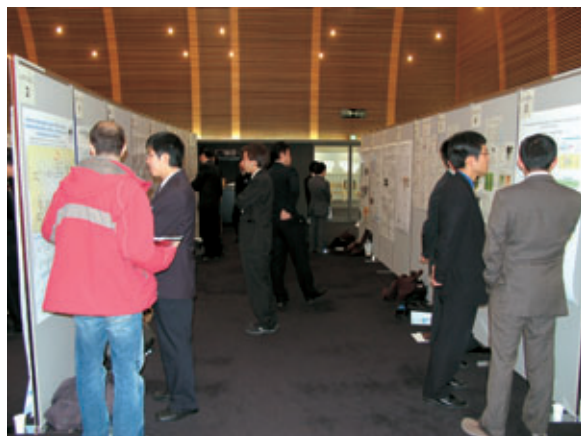


図 9



図10

これらのプログラムは次の通りである。

- (1) ゲノム創薬フォーラム キーテクノロジー2006
 2006年9月19日(火) 京都リサーチパーク
 主催：ゲノム創薬フォーラム
 共催：21世紀 COEプログラム
 「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」
 魅力ある大学院教育イニシアティブ
 「生命・化学情報に基づく融合創薬研究者養成」
- 10:00 Opening Remark
 野口 照久 (ゲノム創薬フォーラム 代表)
- 10:15 長野 哲雄 (東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室 教授)
 「バイオイメーシングプローブの開発と生体への応用に関する研究」
- 11:00 Dr. Anton Simeonov (Chief, NIH Chemical Genomics Center)
 「NIH Chemical Genomics Center : Opening a New Door to Discovery」
- 12:00 ランチョンセミナー (Dr. Victor Sementchenko・Affymetrix)
 「Tiling Arrays : Applications and Data Analysis」
- 12:40 最新技術紹介
 (株)島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス研究所
 西根 勤
- 13:10 展示ブース見学
- 14:30 上杉 志成 (京都大学化学研究所ケミカルバイオロジー研究室 教授)
 「合成小分子化合物によるケミカルバイオロジー」

- 15:10 大川 克也 (京都大学大学院医学研究科先端領域融合医学研究機構先端技術センター生体分子解析グループ助教授・グループリーダー)
 「タンパク質の微量分析技術とその意義」
- 16:10 坂田 恒昭 (大阪大学サイバーメディアセンター 客員教授)
 「ゲノム・ポストゲノム時代の創薬研究」
- 16:50 Closing Remark
 辻本 豪三 (京都大学大学院薬学研究科 教授)

(2) 公開国際シンポジウム

(魅力ある大学院教育イニシアティブ適合研究コース成果報告会)

日時：2007年1月29日(月)～30日(火)

会場：京都大学医学部 芝蘭会館(稲森ホール・山内ホール)

January 29

9:00～12:00 Poster session (Student)

13:00～13:10 Opening remark

13:10～14:00 Hiroaki Mitsuya, M.D., Ph.D.
 (Kumamoto University)

「Development of therapeutics for AIDS: Structure-based molecular targeting」

14:00～14:40 Kazuya Kikuchi, Ph.D.
 (Osaka University)

「Design, synthesis and biological application of chemical probes which convert biological signals to chemical output」

15:00～15:40 Ho Jeong Kwon, Ph.D.
 (Yonsei University)

「Chemical genomics toward angiogenesis」

16:00～16:40 Sunghoon Kim, Ph.D.
 (Seoul National University)

「Chemical modulation of essential enzymes in their intra- and intermolecular space」

16:40～17:20 Kimito Funatsu, Ph.D.
 (University of Tokyo)

「Chemoinformatics for prediction and design」

January 30

9:00～11:30 Oral presentation (P.D.)

12:30～17:00 Oral presentation (Student)

17:00～17:10 Closing remark

4. 大学院生の研究職インターンシップの実施

本プログラムにおいては、大学院学生を対象にして研究職の就業体験(インターンシップ)を企画した。研究科教員によるアレンジと、内外の製薬および化学系メーカーや大学研究所の協力を得て、合計6名の大学院生が実際の創薬・生命科学研究の現場を体験した。それぞれに受け入れ環境や期間などは異なり、大学院生が実社会を体験した時間は最短1日から最長1ヶ月にまでわたるが、それぞれに強い印象をもった点で貴重な体験ができ、研究に対するモチベーションの高揚につながったと思われる。

3名の学生が残した感想文を掲載するが、この場を借りてインターンシップに協力いただいた企業各社および大学研究所に感謝を申し上げたい。また今後、製薬業界において研究職インターンシップが広まっていくことを期待したい。

(40頁に続く▶)

ペプチドを基盤とした 新規癌転移抑制剤の開発研究

(薬品有機製造学分野) 富田 健嗣

研究指導主任 薬品有機製造学分野 教授 藤井 信孝

研究指導協力者 ゲノム創薬分野 教授 辻本 豪三



■ 研究内容

【研究背景・目的】

GPR54はヒトゲノム解析から発見された7回膜貫通型のGPCRであり、その内在性リガンドは近年ヒトの胎盤から単離、同定された約5.8kDaの生理活性ペプチドである。このペプチドは、ヒト癌転移抑制遺伝子KiSS-1の遺伝子産物であることからkisspeptinと命名された。以前、kisspeptinは肺移行性GPR54発現黒色腫細胞をはじめ、様々な腫瘍細胞の転移能を有意に阻害することが示された。さらに、近年、脳内GPR54にアゴニストが作用することによりゴナドトロピン等の性ホルモンの放出が促進されること、GPR54の機能欠損が性機能低下症の原因になることが報告された。従って、kisspeptin/GPR54系は癌転移抑制及び性機能性疾患の両面において非常に魅力的な創薬標的である。我々は、GPR54を標的とする新規化学療法剤の開発を目標として低分子アゴニストの創製研究に着手した。

以前、その第一段階としてkisspeptinの約10倍ものGPR54結合親和性を有するkisspeptin-10を基盤骨格とするkisspeptinの低分子化研究を行った。文献情報を基に、C末端側にRW-amide骨格を配置し、スパーサーを介してN末端側に塩基性官能基を有する短鎖ペプチドを設計し、種々誘導体の合成、活性評価を行った結果、kisspeptin (分子量5857.5) と同等のGPR54アゴニスト活性を有しながら大幅に低分子化されたペンタペプチド誘導体FM052a (同992.2) およびFM053a (同852.0) を見出した。FM052aとFM053aの構造上の相違はペンタペプチド配列のN末端に存在するアシル基のみながら生物活性に違いが認められることから、N末端アシル基はアゴニスト活性に影響を与えていると考えられる。我々は、高活性新規GPR54アゴニストの開

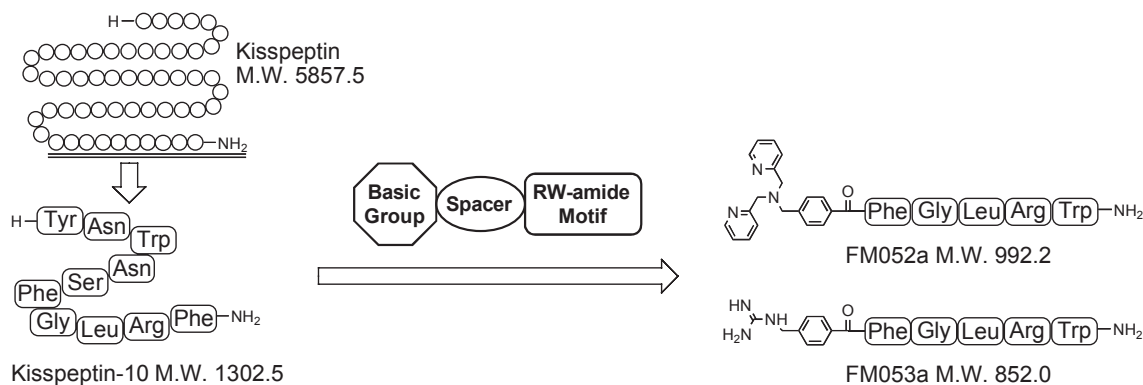
発を目的として、これら为先導化合物とする構造活性相関 (SAR) 研究を行い、さらに合成した一連の化合物に対して定量的構造活性相関 (QSAR) 研究を展開することで統計的な解析を行うことにした。

【方 法】

すべてのペンタペプチド誘導体はRink-amide樹脂を用いた従来のFmoc固相合成法により調製し、そのGPR54アゴニスト活性は受容体刺激に付随する細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を蛍光強度として測定するFluor assay法により評価する。各化合物の活性値は、アッセイプレート間の誤差を考慮し、kisspeptin-10との比活性値Q (=EC50(compound)/EC50(kisspeptin-10)) として算出する。QSAR解析は置換基の化学パラメーターを利用したClassical QSAR解析に加え、3D-CoMFA法を用いた三次元的な解析も行う。

【期待される成果】

すべてのペンタペプチド誘導体はRink-amide樹脂を用いた従来のFmoc固相合成法により調製し、そのGPR54アゴニスト活性は受容体刺激に付随する細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を蛍光強度として測定するFluor assay法により評価する。各化合物の活性値は、アッセイプレート間の誤差を考慮し、kisspeptin-10との比活性値Q (=EC50 (compound)/EC50(kisspeptin-10)) として算出する。QSAR解析は置換基の化学パラメーターを利用したClassical QSAR解析に加え、3D-CoMFA法を用いた三次元的な解析も行う。



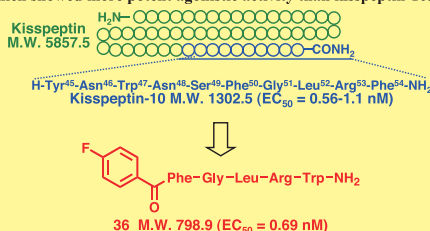
1 Course A
(Chemical Biology)Structure-Activity Relationship Study on GPR54 Agonist
as Novel Anti-Metastatic Agent

Kenji Tomita (Bioorganic Medicinal Chemistry)

Nobutaka Fujii (Bioorganic Medicinal Chemistry)

Gozoh Tsujimoto (Genomic Drug Discovery)

Structure-activity relationship study on kisspeptins was conducted, affording a novel pentapeptide GPR54 agonist **36**, which showed more potent agonistic activity than kisspeptin-10.



Introduction

GPR54 is a member of Gq-protein coupled receptor family. Its endogenous ligand is a RF-amide peptide called kisspeptin-54 which is a fragment of the protein encoded by *KISS-1* gene. This ligand/receptor pair was initially found to attenuate the invasion and migration of cancer cells. Recent investigations revealed that they were involved in a variety of physiological processes, including the release of sexual hormones such as gonadotropins. On the other hand, loss of GPR54 function leads to hypogonadotropic hypogonadism in mice and humans, suggesting that GPR54/metastin system is also involved in the onset of puberty. Although their physiological roles have been described, there are few reports on identifying of specific GPR54 agonists/antagonists to date. Herein, we demonstrate the development of novel GPR54 agonists by structure-activity relationship (SAR) study on kisspeptins.

Several invertebrate neuropeptides also possess agonistic activity for GPR54. Some of the peptide sequences and their EC₅₀ values determined by Clements et al and Muir et al. are shown in below table. The sequences of these peptides are similar to that of the kisspeptin C-terminal region.

EC₅₀ values of several invertebrate neuropeptides for human GPR54.

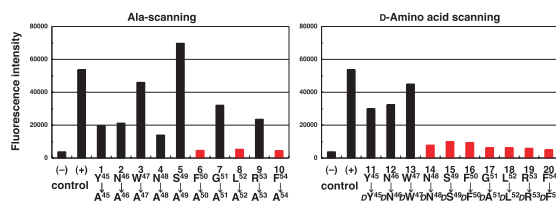
Peptide	Sequence	EC ₅₀ (μM) ^a	EC ₅₀ (μM) ^b
Antho-RW amide II	pEGLRW-NH ₂	1.5 ± 0.2	1.862
NF1	H-NRNFRLRF-NH ₂	8.0 ± 0.7	
Trp ³ -NF1	H-NRNFRLRW-NH ₂	2.1 ± 0.3	
Gly ³ ,Trp ⁷ -NF1	H-NRNLRLRW-NH ₂	0.2	
Kisspeptin-54	...DLPNYNWNSFGLRF-NH ₂		0.00120
Kisspeptin-10	H-YNWNFGLRF-NH ₂		0.00050

Abbreviations: pE = pyroglutamic acid.

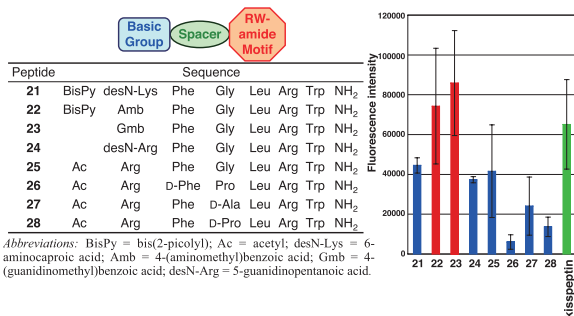
^a Clements, M. K. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 284, 1189.^b Muir, A. I. et al. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 28969.

Downsizing study of kisspeptin-10

Ala and D-amino acid scanning of kisspeptin-10 by lacZ reporter gene assay.

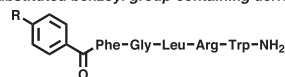


Bioactivities of shortened kisspeptin derivatives by lacZ reporter gene assay.



SAR and QSAR study on 4-substituents of the N-terminal acyl group in pentapeptide GPR54 agonists

Structures, bioactivities, and chemical parameters for classical QSAR analysis of 4-substituted benzoyl group-containing derivatives.



Peptide	R	EC ₅₀ (nM) ^a	Q ^{a,b}	F ^c	E _s ^d	Observed -logQ	Calculated -logQ
Kisspeptin-10		0.56-1.1	1.0				
22	N,N-bis(2-picolyl)aminomethyl	3.3	3.1				
23	guanidinomethyl	1.4	1.6				
29	H ₂ NCH ₂ -	3.1	3.4	0.04	-1.21 ^e	-0.531	-0.636
30	H ₂ N-	1.6	2.9	0.08	-0.61	-0.462	-0.368
31	HOCH ₂ -	3.0	4.7	0.03	-1.21	-0.672	-0.647
32	MeO-	1.2	1.6	0.29	-0.55	-0.204	-0.109
33	H-	0.99	1.6	0	0	-0.204	-0.232
34	O ₂ N-	1.0	1.5	0.65	-1.77 ^f	-0.176	-0.155
35	Cl-	1.3	1.3	0.42	-0.97	-0.114	-0.118
36	F-	0.69	0.63	0.45	-0.46	0.201	0.105

^a Values were calculated based on Flupr assay. ^b Q values are calculated as $Q = EC_{50}(\text{compound})/EC_{50}(\text{kisspeptin-10})$. ^c Electronic parameter. ^d Steric parameter. ^e E_s value of HOCH₂- was used for QSAR analysis. ^f The average E_s value of O₂N- (-1.01 and -2.52).

Classical QSAR analysis.

$$-\log Q = 1.13(\pm 0.39)F + 0.37(\pm 0.17)E_s - 0.23(\pm 0.16)$$

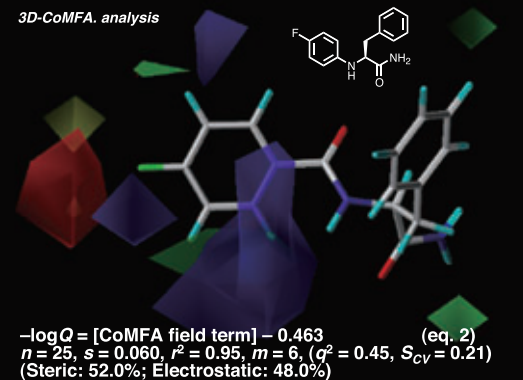
$$n = 8, s = 0.089, r^2 = 0.92, q^2 = 0.82$$

$$n: \text{number of compounds } s: \text{standard deviation } r: \text{correlation coefficient}$$

$$q: \text{leave-one-out cross-validated correlation coefficient}$$

The values on parentheses are 95% confidence intervals.

3D-CoMFA analysis



Contour diagrams of CoMFA steric and electrostatic fields drawn with N-terminal 4-fluorobenzoyl-Phe. Red: Electronegative groups are favored; Blue: Electropositive groups are favored; Green: Bulky groups are favored; Yellow: Bulky groups are disfavored.

Conclusion

- (1) Through the downsizing study on kisspeptin-10, a series of N-terminally acylated pentapeptide analogues were identified as small-molecule GPR54 agonists.
- (2) It was demonstrated by the classical QSAR analysis on a series of 4-substituted benzoyl pentapeptide analogues that the inductively negative and sterically small substituents could be preferred at the 4-position of N-terminal benzoyl group.
- (3) 4-Fluorobenzoyl analogue **36** was identified as a most potent GPR54 agonist reported so far.

Acknowledgements

Lac-Z reporter assay

Prof. Stephen C. Peiper, Dr. Zixuan Wang, Dr. Jean-Marc Navenot (Medical College of Georgia)

Flupr assay

Takeda Pharmaceutical Company Limited.

QSAR analysis

Dr. Miki Akamatsu (Kyoto University)

Boc-L-Valine連結型キラルアミドモノホスファン

—ロジウム(I)触媒を用いたアリールボロキシンのN-ホスフィノイルイミンへの不斉付加反応

(薬品合成化学分野) HAO XINYU

研究指導主任 薬品合成化学分野 教授 富岡 清

研究指導協力者 薬品作用解析学分野 教授 赤池 昭紀



研究内容

触媒的不斉炭素—炭素結合形成反応は特に薬学や材料化学分野で重要であり、効率の高い不斉触媒の発見と開発は基礎的で重要な研究課題のひとつとなっている。

近年、イミンの触媒的不斉アリール化反応は数多く報告された。当研究室ではすでにキラルアミドモノホスファン配位子 1 (Figure 1) —ロジウム錯体が環状エノンの共役付加型不斉アリール化反応において優れた不斉触媒として機能することを見出し、さらに、本反応においてキラルアミドモノホスファンが準安定二座配位子、即ちHemilabile Ligandとして機能していることを明らかにした。また、この知見を基にアミノ酸連結型アミドモノホスファン 2 (Figure 1) を設計および合成し、アミノ酸連結型アミドモノホスファンリガンド—ロジウム(I)を触媒として、イミンへのアリールホウ素試薬の触媒的不斉付加反応の初めての成功例を報告した。最高99%収率、94% eeで得られたアリール付加体はHMPA/THF中、加熱還流条件下SmI2で還元的に脱トシル化することができる。

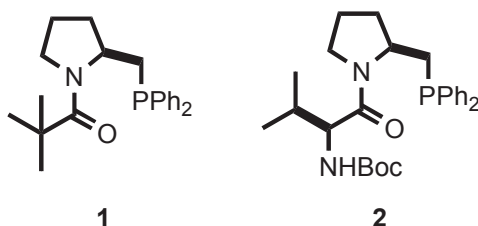
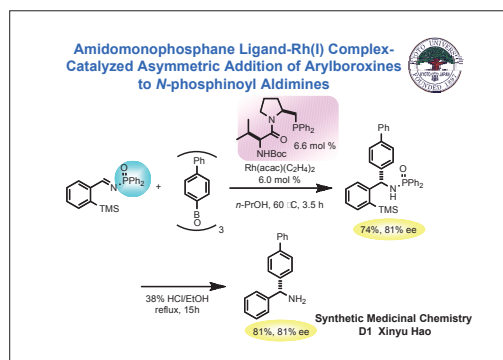


Figure 1 Chiral Phosphine Ligand 1 and 2

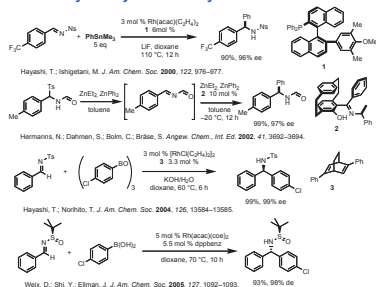
申請者はさらなる開拓研究の結果、当研究室の不斉触媒を用いて、様々な官能基の共存下、穏やかな酸性条件下容易に除去できるホスフィノイルイミンへの不斉アリール化反応でも最高95%収率、81% eeでアリール付加体を得られた。また、得られた付加体を再結晶した後、穏やかな酸性条件で脱ホスフィノイル化を行

うと高い光学純度のアミンを得ることができる。

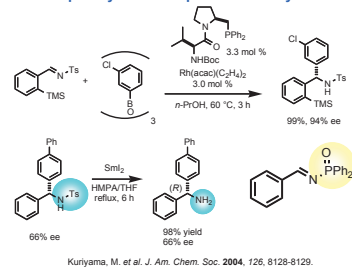
本研究ではアミドモノホスファン配位子のさらなる修飾について検討し、立体選択性に必要な部分構造の解析を行っていく。当研究室では初めての成功例を報告したアミノ酸連結型アミドモノホスファンリガンド? ロジウム(I)を触媒として、イミンへのアリールホウ素試薬の触媒的不斉付加反応では、イミンのアリール基上オルト位置置換基は不斉誘起に影響し、基質の汎用性に影響した。ホスファン部位やアミド部位の修飾による最適化がどこまで可能なのかについて系統的な知見を得ることを目的として、ほかのアミドモノホスフィン配位子をデザイン、合成し、ロジウムを代表する遷移金属を用いた炭素—炭素結合形成反応に応用する。さらにこのアミドモノホスファン配位子と遷移金属とどのような不斉空間を構築しうるのであるかを調べ、化学および物理学的手法を用いて反応活性種の構造的解明を行う。以上の研究から得られた系統的な知見をもとにして、さらなる汎用キラルモノホスフィン配位子の設計と開発を行う。新規不斉炭素—炭素結合形成反応の開拓および天然物などの有用化合物の不斉全合成に取り組んで、有効な合成手段として用いることができると期待する。



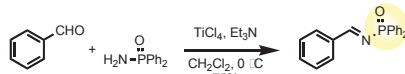
Catalytic Asymmetric Arylation of Imines



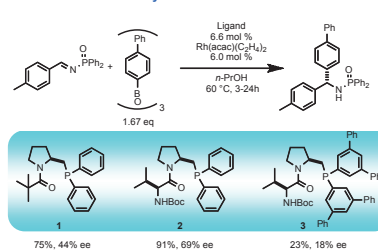
N-Phosphinoylimines in place of N-Tosylimines



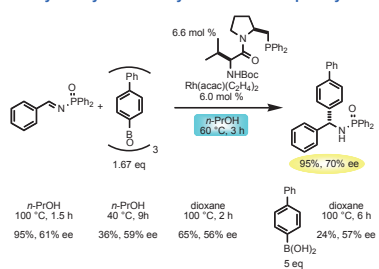
Preparation of N-Phosphinoylimine



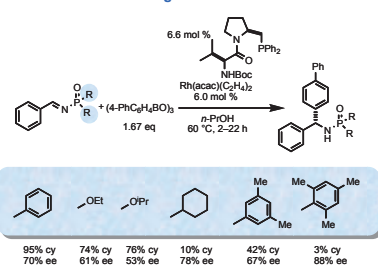
Amidomonophosphane-Rhodium(I)-Catalyzed Asymmetric Arylation of Imine



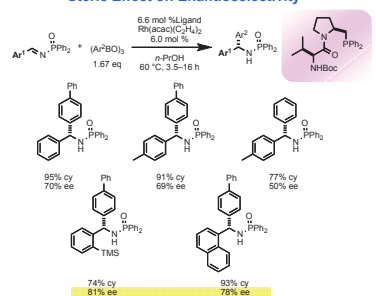
Catalytic Asymmetric Arylation of N-Phosphinoylimine



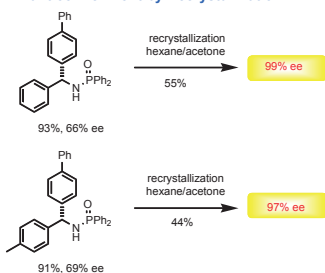
Screening of P-Substituents



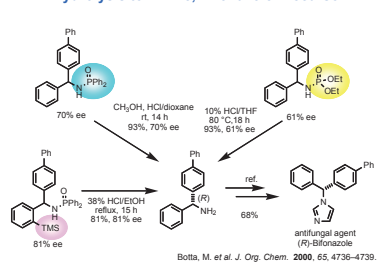
Steric Effect on Enantioselectivity



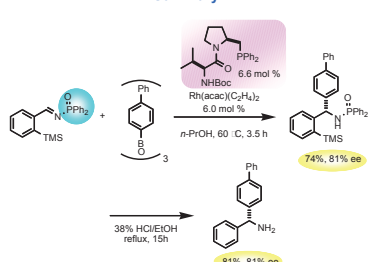
Enantioenrichment by Recrystallization



Hydrolysis to Amine, Bifonazole Precursor



Summary



有機触媒を用いた不斉Petasis反応の研究と生理活性物質探索への応用

(薬品分子化学分野) 山岡 庸介

研究指導主任 薬品分子化学分野 教授 竹本 佳司

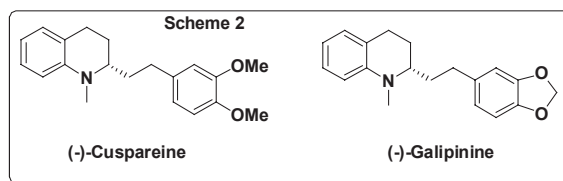
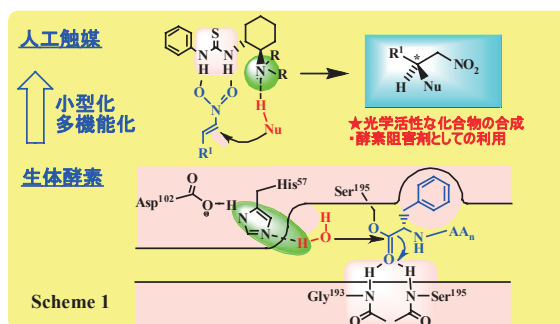
研究指導協力者 生体機能解析学分野 教授 金子 周司



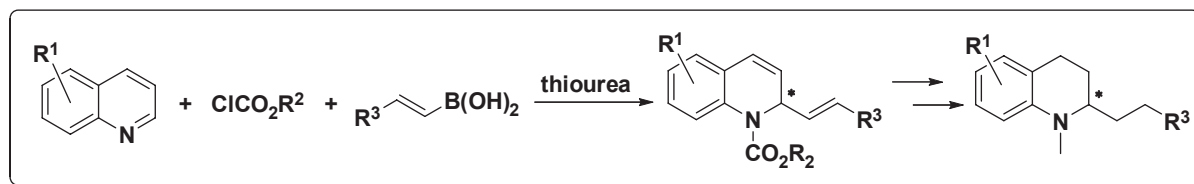
研究内容

私は、セリンプロテアーゼに注目し、その活性部位と酵素反応機構を参考に類似の機能を有する低分子化合物の設計と合成を行い、生体高分子の低分子化とモデル化に取り組んでいる。その結果、3級アミノ基を有するチオ尿素体が酵素反応と同様に、一般酸・塩基作用を協同的に行う優れた触媒機能を有することを初めて明らかにした (Scheme 1)。今回は、新たな反応として、アルカロイド類の合成に利用できるpetasis反応に着目し、本反応を触媒できる新規多機能有機触媒を開発し、アルカロイドなどの生理活性物質合成への応用を検討する。

含窒素複素環化合物は様々な生理活性を有するものが多く、それらを効率的、立体選択的に合成することは、非常に有用である。特に我々は、tetrahydroquinoline alkaloids (Scheme 2) に注目し、それらの立体選択的な合成と誘導体合成を目指している。カギ反応として、新規不斉有機触媒を用いたQuinoline類への立体選択的なpetasis反応 (Scheme 3) を使い、2工程の還元を行えば、tetrahydroquinoline alkaloidsとその誘導体合成を容易におこなえると考えられる。その後Petasis反応により得られる種々の官能基修飾された化合物ライブラリーを構築し、様々な生理活性をスクリーニングする計画である。

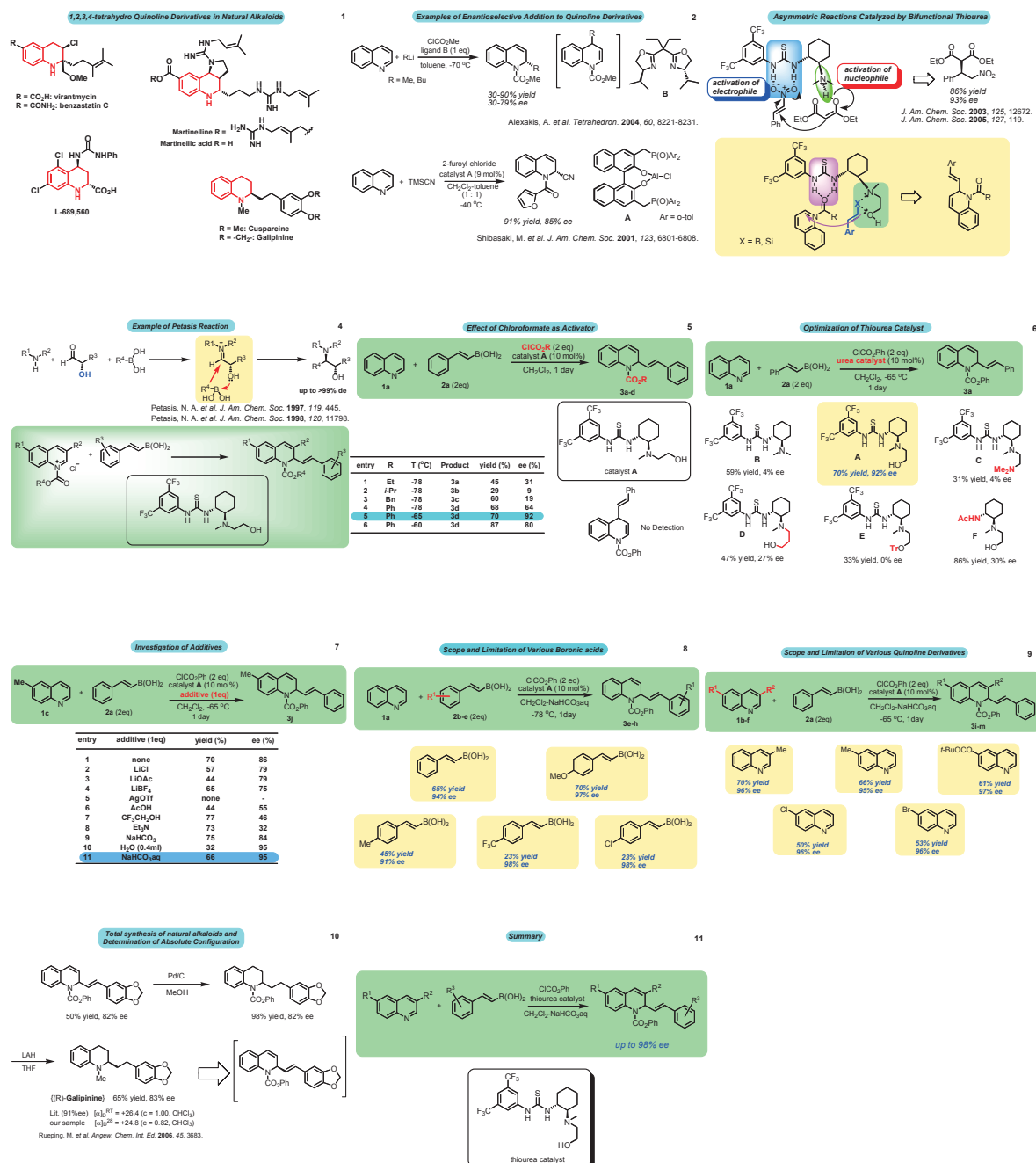


Scheme 3. Petasis Boronic Acid-Mannich Reaction



Enantioselective Petasis Reaction of Quinolines Catalyzed Multi-Functional Thiourea

Organic Chemistry D2 Yousuke Yamaoka



アミロイドβタンパク質と脂質膜との結合における分子間相互作用解析

(薬品機能解析学分野) 池田 恵介

研究指導主任 薬品機能解析学分野 教授 松崎 勝巳

研究指導協力者 製剤機能解析学分野 教授 半田 哲郎



研究内容

【背景】

アルツハイマー病 (AD) の基本病理はアミロイド沈着、神経原線維変化、神経細胞脱落である。ADのアミロイド線維は、神経細胞膜表面に存在しているアミロイド前駆タンパク質から、 β セクレターゼ、 γ セクレターゼという2種の酵素によって切り出されて生成する40-42残基の小さいタンパク質であるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) が自己凝集することで形成される。

$A\beta$ -(1-42): DAEFRHDSGY EVHHQKLIVFF
AEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

$A\beta$ の凝集過程において、これまで脂質、糖、金属など生体内で $A\beta$ の凝集を促進・触媒する物質の存在が示唆されている。このような分子はADの危険因子として位置づけられ、発症メカニズムとの関連を論じられてきた。1995年に柳澤らは、神経細胞膜に豊富に存在している糖脂質GM1ガングリオシドに結合した $A\beta$ がAD患者脳から検出されたと報告した。GM1は細胞膜において、スフィンゴミエリン (SM)、コレステロール (Chol) などの脂質とともに脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインを形成していると考えられている。脂質ラフトは機能性タンパク質が集合し、シグナル伝達場として注目を集めている。申請者のグループはGM1および脂質ラフトに着目し、脂質膜を介した $A\beta$ の凝集メカニズムについて研究を行っている。GM1、SM、Cholからなる脂質ラフト様リボソームおよび神経モデル細胞を用いた研究より、(1) GM1がChol濃度依存的に密集したクラスター構造を形成し、(2) GM1クラスターを認識して結合した $A\beta$ が α ヘリックス、 β シートなどの二次構造変化を起こし、(3) 凝集核となって、 $A\beta$ の凝集・線維形成を促進していることを明らかにした。我々はこの過程がAD患者の脳内でも起こり、Chol量の増加が引き金となりアミロイド沈着を促進してADの発症につながる可能性を指摘している。

【目的】

GM1を介した $A\beta$ の凝集過程は、GM1- $A\beta$ 間に働く相互作用、 $A\beta$ 構造変化のメカニズム、凝集中間体の存在など、不明な点が多い。この過程を解明するには、種々の物理化学的手法を用いた測定が必須となる。申請者は、この過程の最初のステップである、GM1と $A\beta$ の結合に関わる分子間相互作用(静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合など)の寄与について定量的に評価するため、以下の実験を行う。

【方法】

GM1は負電荷を持った糖であるシアル酸を含む五糖からなる極性頭部をもっていることから、この糖鎖が $A\beta$ との結合に重要ではないかと考えられる。そこで、極性頭部を構成している糖残基数が異なる糖脂質 (GM1、アシアロGM1、ラクトシルセラミド、スルファチド、ホスファチジルイノシトールなど) を含むリボソームを用いて、N末端に蛍光色素 (7-diethylaminocoumarin-3-carbonyl) をラベルした $A\beta$ -(1-40)との結合性について評価を行う。さらに、静電相互作用の影響を検討するため、結合のイオン強度依存性について評価する。また、糖鎖を持たず、正あるいは負電荷を持つ脂質との結合性を評価する。各脂質と $A\beta$ の結合パラメータ (結合定数、結合サイト数) を算出、比較検討を行う。

【成果】

近年、ADDLSや、アミロスフェロイドといった神経細胞に対して強い毒性を示す $A\beta$ 凝集体が注目を集めているが、これらの凝集体は低温、低pHなど、生理的な条件とは著しく異なる条件下で形成されている。それに対し、GM1と $A\beta$ の相互作用は生体内で起こりうる反応であり、AD発症メカニズムへの関与が強く示唆される。この過程の解明により、AD発症メカニズムの解明において真に有用な情報が得られると期待される。さらに、直接 $A\beta$ を標的として凝集を抑制する薬物ばかりでなく、 $A\beta$ とGM1の相互作用を阻害することで結合、およびそれに引き続く $A\beta$ 凝集を抑制する薬物の開発にも繋がると考えられ、ADの予防・治療に際してより多角的な治療戦略を提供できる可能性が拓け、魅力的な創薬ターゲットとして期待できる。

Binding Mechanisms between Amyloid β -protein with Lipid Bilayers

Analytical chemistry, D1 Keisuke Ikeda

Abstract

Aggregation of amyloid β -protein ($A\beta$) is considered to be a key step in the etiology of Alzheimer's disease (AD). Accumulating evidence suggests that lipid bilayers play important roles in the aggregation of $A\beta$. Yanagisawa et al. discovered monosialoganglioside GM1-bound $A\beta$ in the brains of patients with AD. Our liposomal studies revealed that $A\beta$ specifically binds to a GM1 cluster whose formation is facilitated by cholesterol and alters its conformation from random coil to α -helix- or β -sheet-rich structures. GM1-bound $A\beta$ acts as a seed for the fibrillization of $A\beta$.

In this study, we investigated the binding of $A\beta$ with various glycolipids and charged lipids, and the effects of interfacial pH in the vicinity of the membranes on the binding to elucidate the binding mechanisms of $A\beta$ with lipid bilayers using a dye-labeled $A\beta$.

The interfacial pH dependence of the binding of $A\beta$ with charged membranes was completely correlated with the net charges of $A\beta$. At low pH (< 5), positively charged $A\beta$ bound to negatively charged phosphatidylglycerol vesicles and at high pH (> 7), negatively charged $A\beta$ bound to positively charged 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane membranes by electrostatic interactions. In contrast, $A\beta$ did not bind to these membranes at neutral pH (5-7), suggesting that interactions between hydrophobic amino acid residues of $A\beta$ and acyl groups of lipids were not important. However, the binding of $A\beta$ with glycolipid-containing membranes were observed even at neutral pH. The increase in the number of sugar residue of glycolipids induced the stronger binding with $A\beta$, suggesting that hydrogen bonds and/or hydrophobic interactions with sugar clusters are crucial for binding at neutral pH.

1

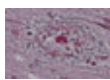
Interactions between amyloidogenic proteins and lipid membranes

Disease	Protein or peptide determinant	Membrane system
Parkinson's disease	α -Synuclein	PA/PC, PG/PC, PS/PC, PGPE vesicles Planar PC/PS bilayers PC, PA, PS, PI vesicles Brain membrane fractions Synaptosomal membranes
Alzheimer's disease	$A\beta$ peptide	Total brain lipid bilayers, PC/PG vesicles PC/ganglioside vesicles PA, PS, PI, PIP, PIP2, CL, PC, PE, SM, Chol, DG, gangliosides, sonicated lipid suspensions
Type II diabetes	Islet amyloid polypeptide	PG/PC vesicles, liposomes from pancreas lipids PC, PS/PC vesicles, rat insulinoma tumor cells
Alzheimer's disease	Tau	PS vesicles
Spongiform encephalopathies	Prion protein	PG, PC, PC/Chol/SM vesicles
Familial polyneuropathy, systemic amyloidosis	Transthyretin	PC/PS, PC/PG vesicles

Kinnunen P.K.J. (2006) Chemistry and Physics of Lipids

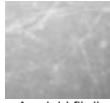
3

Alzheimer's disease (AD)
➢ Progressive neurodegenerative disease
➢ Neurofibrillary tangles and senile plaques



Senile plaques

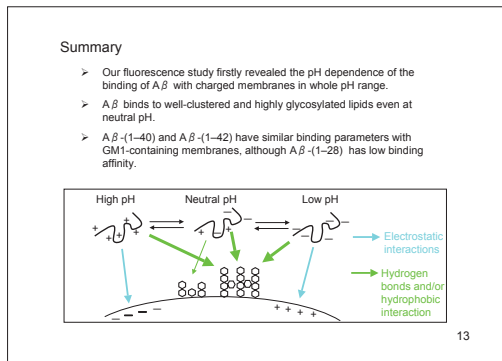
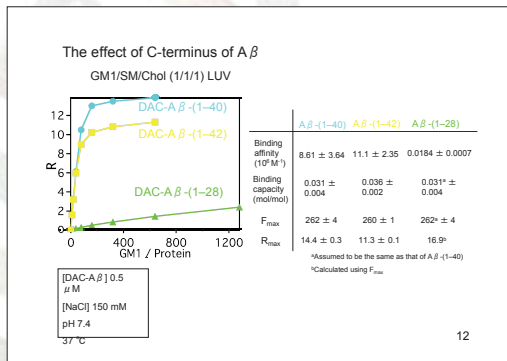
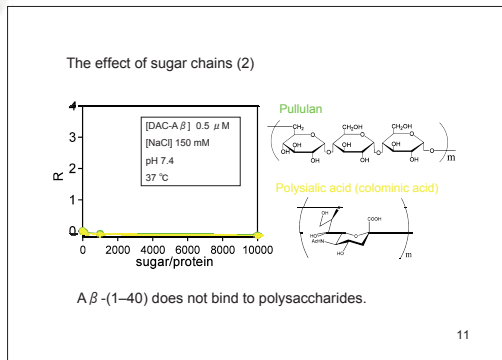
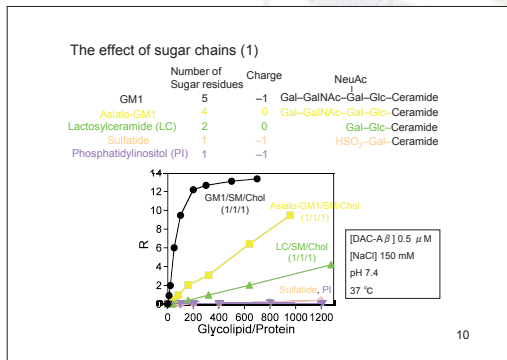
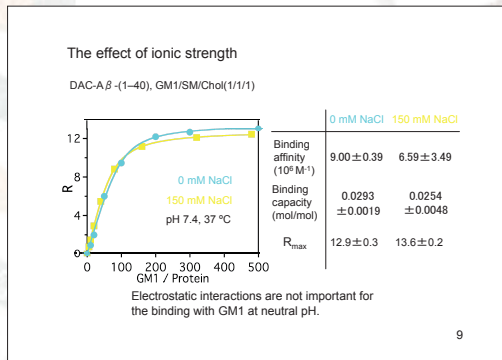
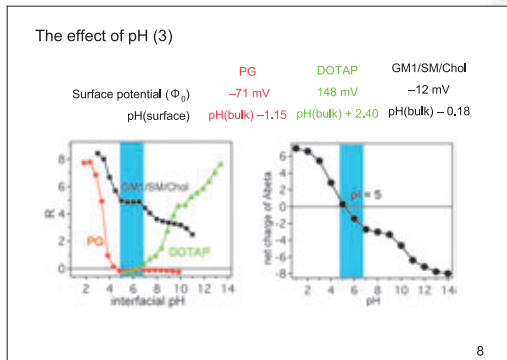
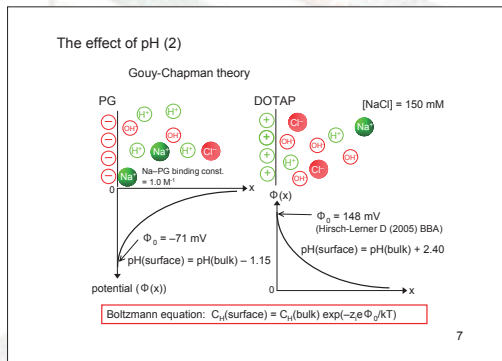
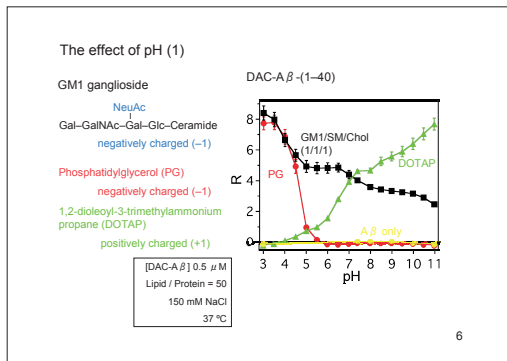
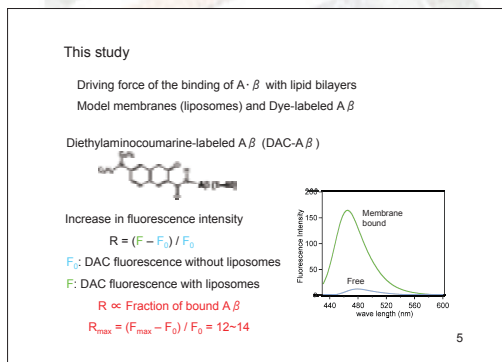
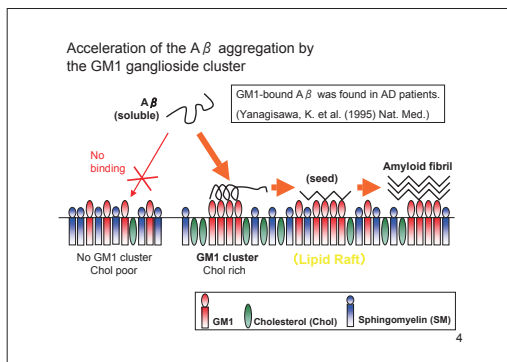
Amyloid β -proteins ($A\beta$)
➢ 40-42 residue proteins
➢ Main components of senile plaques
➢ The aggregation of $A\beta$ is a key step of the pathology of AD.



Amyloid fibril

$A\beta$
DAEFRHDSGY¹⁰ EVHHQKLIVFF²⁰ AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV⁴⁰ IA

2



抗菌性ペプチドと生体膜の相互作用に関する研究と細胞内分子導入ベクターへの応用

(薬品機能解析学分野) 井村 雄一

研究指導主任 薬品機能解析学分野 教授 松崎 勝巳

研究指導協力者 病態情報薬学分野 教授 高倉 喜信



■ 研究内容

【背景】

抗菌性ペプチドは10-50残基からなるペプチドで、ヒトを含む様々な生物から単離されている。そのアミノ酸配列や二次構造は多様性に富むが、抗菌性ペプチドの多くは塩基性と疎水性のクラスターを併せ持つ両親媒性で、酸性脂質に富んだ細菌細胞膜に直接的に作用する。細菌細胞膜はATP産生場で、その性質を変化させることは容易でなく、細胞膜を標的とするこの作用機構は耐性菌の出現を抑えられると考えられる。近年、多剤耐性菌の出現や再興感染症が問題となり、新規の抗菌剤の開発が急務となっている中、抗菌性ペプチドは理想的な候補として期待されている。多くのペプチドは標的膜のバリアー能を破壊して細菌の細胞膜電位を消失させることで抗菌作用を発揮するが、一部のペプチドは膜と相互作用するものの、膜を乱さずに細胞内に入り、DNAなどの細胞内標的と結合することでDNAやタンパク質の合成を阻害する。このようなペプチドは細胞内へ薬剤などの分子を導入するベクターとしての応用も期待できる。このように、抗菌性ペプチドは抗菌剤や分子導入ベクターとしての可能性を秘めている。これらの応用に際しては抗菌性ペプチドと生体膜との相互作用に関する情報が必要不可欠であるにもかかわらず、ほとんど明らかになっていない。

これまでに当研究室はアフリカツメガエルより単離された抗菌性ペプチドmagainin 2 (GIGKWLHSAKKF-GKAFVGEIMNS) の作用機構を、リボソームを用いて明らかにしてきた。Magainin 2は脂質膜に脂質を抱き込んだ一時的な超分子複合体ポアを形成し、内容物の流出させることで抗菌活性を発揮していると考えられる。このポアを通じ脂質のflip-flopが起き、ポア崩壊時には一部ペプチドが内在化 (translocation) する。

【目的】

本研究では抗菌性ペプチドと生体膜との相互作用を詳細に検証し、細胞内分子導入ベクターとして応用することを目的とする。本研究室は主に物理化学的な手法を用いて作用機構を解明してきたが、特に細胞内分子導入ベクターとして応用する際には、ドラッグデリバリーに基づく視点や手法が必要になるため、融合研究として行うことでより興味深い結果が得られると考えられる。

【方法】

本研究では以下のように、①Magainin 2と生体膜の相互作用の研究、②Magainin 2を用いた細胞内導入ベクターの開発を行う。

- ① Magainin 2が細菌や哺乳類の細胞膜において超分子複合体ポアを形成し、内容物の流出、脂質のflip-flop、ペプチドのtranslocationを引き起こすかどうかを調べる。水溶性の蛍光色素カルセインを用いて、内容物の流出を確認する。また、通常の哺乳類細胞

では細胞膜の細胞質側にある脂質、ホスファチジルセリンに選択的に結合するannexin Vを用いて、脂質のflip-flopを検出する。ペプチドに色素ラベルを導入することで、ペプチドのtranslocationを観察を行う。また、内容物の流出、脂質のflip-flop、ペプチドのtranslocationのカップリングを共焦点レーザー顕微鏡を用いて可視化する。

- ② ペプチド核酸などのカーゴ分子を導入したmagainin 2が細胞内へ効率よくtranslocationし、カーゴ分子の活性が発揮されるかどうか共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べる。ペプチドによる細胞内内容物の流出が激しく、細胞毒性が著しいようであれば、アミノ酸配列の改変を行う。これまでに、両親媒性 α ヘリックスのモデルペプチドの疎水面に α ヘリックスを不安定化するペプチドを導入すると、膜を乱さずにtranslocationすることが報告されている。ペプチドは細胞毒性に関して不明であるという点と、大量合成が難しいので、magainin 2の疎水面に α ヘリックスを不安定化するプロリン残基を導入し、効率良いtranslocationが見られるかどうか確認する。我々は逆に、膜を乱さずにtranslocationする抗菌性ペプチdbuforin 2のプロリン残基をアラニン残基に置換することで、膜を大きく乱すようになることを報告した [Kobayashi, S et al. (2000) *Biochemistry*, 39, 8648]。

【成果】

抗菌性ペプチドと生体膜との相互作用を研究することは、抗菌剤や遺伝子治療のベクターとして応用する際には必要不可欠な情報である。また、TATなどのアルギニンリッチペプチドも遺伝子治療のベクターとして期待されているが、これらのペプチドは主としてエンドサイトーシス経路で細胞内に入るため、細胞質内への導入効率はあまり良くない。一方抗菌性ペプチドは細胞膜を直接経路して膜透過すると考えられるのでより直接的で効率よく導入を行うことが出来ると考えられる。

Chemical Biology

Elucidation of the action mechanism of antimicrobial peptides: Interaction of antimicrobial peptides with biological membranes

Analytical chemistry D2 Yuichi Imura

Abstract:

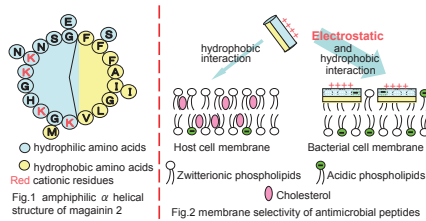
Antimicrobial peptides have been isolated from plants, insects, animals including human, and considered to play an important role in innate immunity of their host species. Most of the peptides take the amphipathic secondary structure, and interact with bacterial cell membrane directly to kill bacteria. The peptides are promising candidates of novel therapeutic agents against drug resistant bacteria because of broad antimicrobial spectra.

The action mechanism of the peptides have been studied mainly using liposomes. We have demonstrated that an antimicrobial peptide magainin 2 forms toroidal pores and induces lipid flip-flop in liposomes. However, the interaction of the peptide with biological membranes is still unknown. In this study, we studied the interaction of the peptide with the membranes of *Bacillus megaterium* and Chinese Hamster Ovary (CHO) cells.

Magainin 2 formed pores also in biological membranes. The sizes of pore formed by the peptide is significantly different between the bacteria and the mammalian cell. Magainin 2 induced lipid flip-flop in biological membranes.

What are antimicrobial peptides?

- isolated from plants, insects, animals including human (~ 880)
- play an important role in innate immunity.
- take amphiphilic structures and interact directly with membranes

**Magainin 2**

magainin 2 α -helical structure
(African clawed frog, *Xenopus laevis*)
GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS

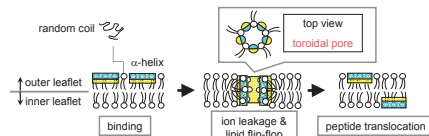
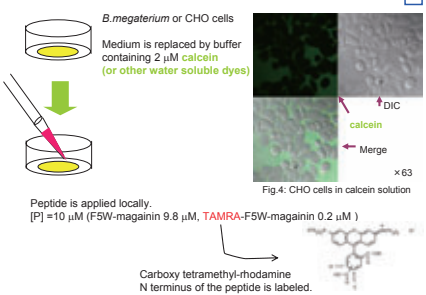
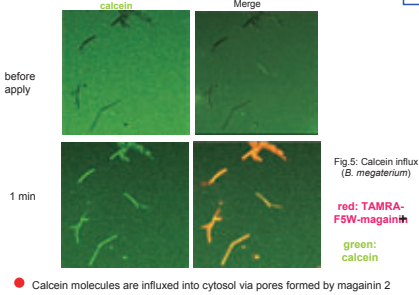
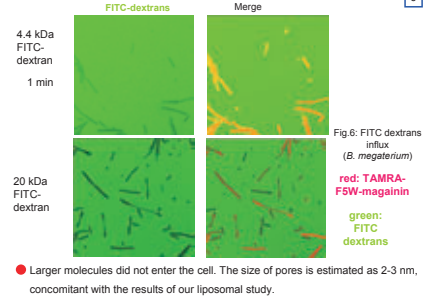
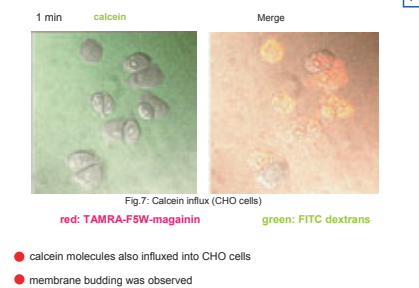
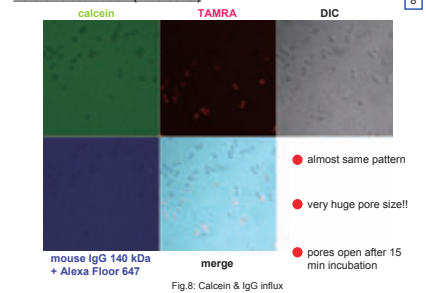
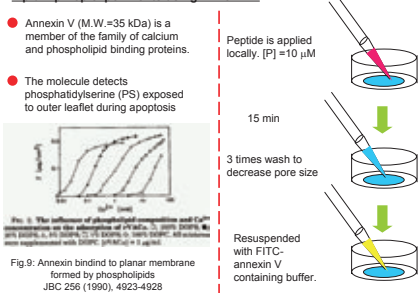
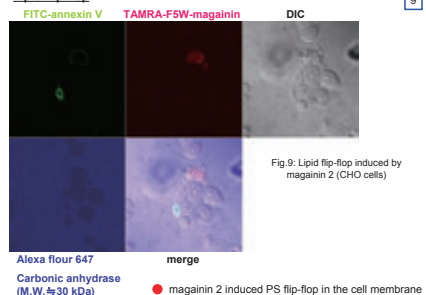


Fig.3: Toroidal pore model of magainin 2 (liposomal study)

Fluorescent molecule influx experiment**Membrane permeabilizing activity (*B. megaterium*)****Pore size estimation (*B. megaterium*)****Membrane permeabilizing activity (CHO cells)****Pore size estimation (CHO cells)****Lipid flip-flop experiments using Annexin V****Lipid flip-flop****Summary**

- Magainin 2 formed pores in the biological membranes.
- The size of pore observed in the bacterial membrane was 2-3 nm, concomitant with the results of our liposomal study.
- The sizes of pore formed by the peptide is significantly different between the bacteria and the mammalian cell.
- Magainin 2 induced PS flip-flop in the biological membrane.

ヒトP糖タンパク質の結晶化を目指した研究

(構造生物薬学分野) 佐藤 友美

研究指導主任 構造生物薬学分野 教授 加藤 博章

研究指導協力者 生体情報制御学分野 教授 中山 和久



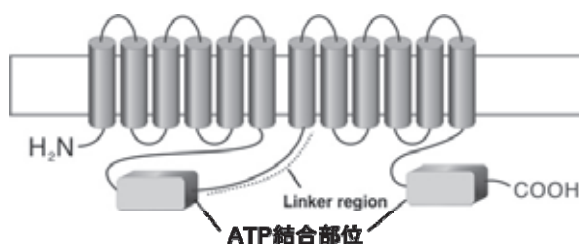
■ 研究内容

【背景・目的】

P糖タンパク質は、ATP加水分解エネルギーを利用して、多様な構造の薬物を細胞外へと排出するABCトランスポーターである。P糖タンパク質は、6回膜貫通領域と1つのATP結合部位から構成される基本構造単位が、Linker regionを介して2つタンデムに繋がった構造であると予想されている(図1)。P糖タンパク質の最も注目すべき点は、癌細胞で高発現し、構造の異なる様々な抗癌剤を排出するため、癌細胞に多剤耐性を与えてしまうことである。従って、P糖タンパク質の精密な立体構造が解明できれば、リード化合物の設計など多剤耐性克服を目指した新たな医薬品の開発に大きく貢献できるものと考えられる。しかし、これまでP糖タンパク質のX線結晶構造解析は全く行われていない。

申請者は、これまでにバキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて、ヒトP糖タンパク質の大量発現-精製系を確立している。しかし、これまで通常の方法でP糖タンパク質の結晶化を行っても解析可能な結晶は得られていない。このことは、P糖タンパク質の結晶化を成功させるためには、新しいアプローチが必要であることを示している。

P糖タンパク質の結晶化を成功させるためには、構造を安定化させることが重要である。実は、P糖タンパク質の発現をプロテアーゼインヒビターなしで行うと、精製標品が一部分解を受けていることが確認されている。この事実、P糖タンパク質の中に構造の不安定な部分があることを示唆している。P糖タンパク質の結晶化のためにはまずこの構造の不安定な部分を特定する必要があると考えられる。また、P糖タンパク質を基質と結合させることによる構造の安定化も期待できる。そこで、本研究では結晶化に向けてP糖タンパク質の構造の不安定な部分の特定と、基質の結合による安定化条件の探索を行うことを目的とする。



Abstract

P-glycoprotein (MDR1) is a 170 kDa plasma membrane protein that exports wide variety of structurally unrelated compounds from cells. For the structural study, we achieved large scale expression and purification of human MDR1 using Sf+ insect cells. For crystallization, stabilization of MDR1 is important. In order to identify unstable region of MDR1 and to search ligands which stabilize MDR1, I carried out limited proteolysis experiments.

The N-terminal amino acid sequence analyses of the fragments indicated that MDR1 was initially cleaved at its central Linker region. Vanadate trapping stabilized purified MDR1. Surprisingly, the digestion increased specific activities of MDR1. K_m values for smaller drugs tend to be decreased by the digestion. These results suggest that the Linker region could contribute to effective transport of larger drugs.

【方 法】

1. 構造の不安定な部分の特定

タンパク質は、構造の不安定な部分がプロテアーゼによる分解を受けやすいことが知られている。そこで、精製標品のプロテアーゼによる限定加水分解を行う。さらに、分解産物のN末端配列解析を行うことにより、分解されやすい位置を同定する。

2. 基質の結合による安定化条件の探索

P糖タンパク質を安定化させる基質を探索するため、様々なリガンド存在下で限定加水分解を行う。SDS-PAGEにより分解速度を比較し、P糖タンパク質を最も安定化させるリガンドを検討する。

3. ATPase活性測定による結晶化に有効な基質の探索

P糖タンパク質の活性を低下させる基質は、P糖タンパク質と強く結合することにより安定化に寄与すると考えられる。そこで、ATPase活性を測定することにより結晶化に有効な基質を探索する。

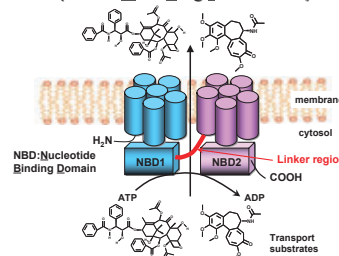
【期待される成果】

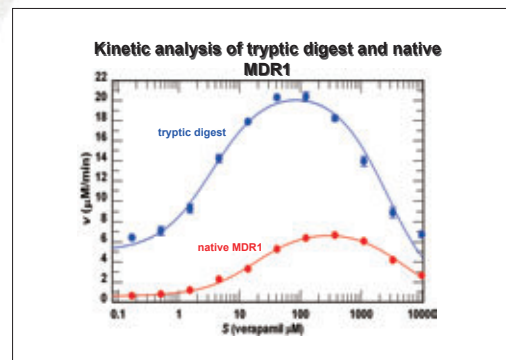
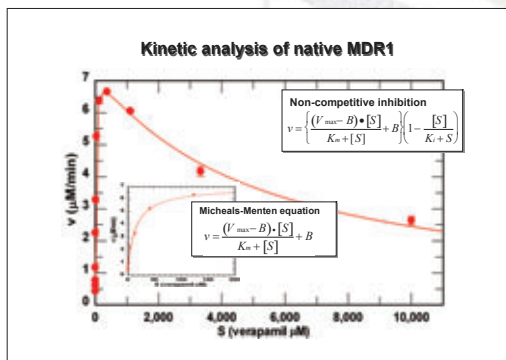
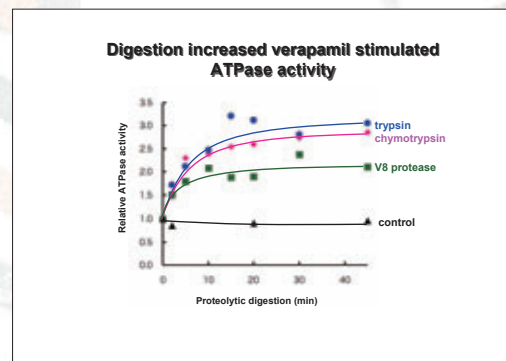
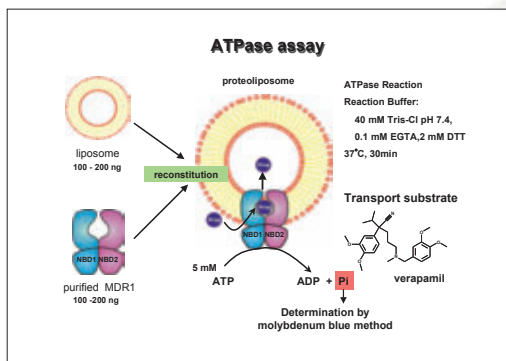
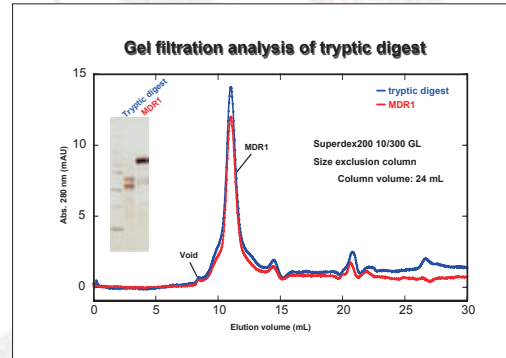
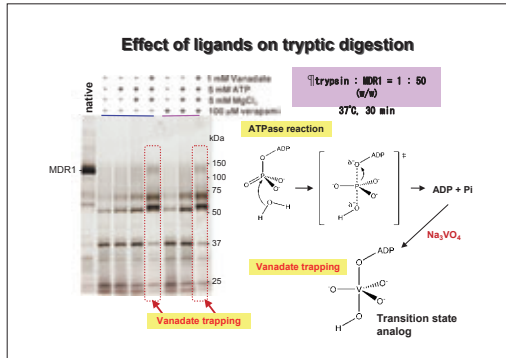
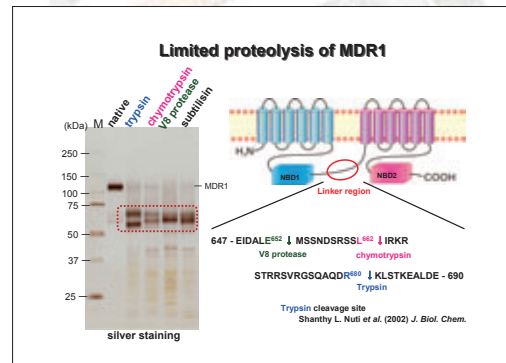
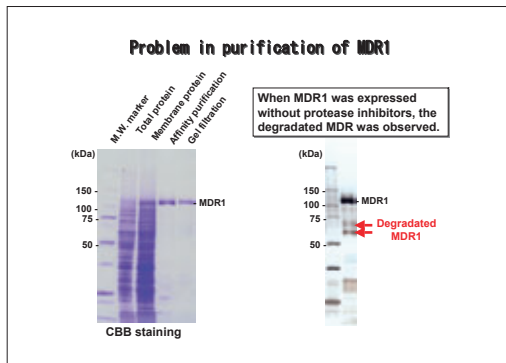
P糖タンパク質が、どのように構造の異なる薬物の認識-排出を行っているかは明らかにされておらず、その重要性から薬物輸送機構の解明が希求されている。X線結晶構造解析は薬物輸送機構解明に大きく寄与すると考えられるが、その結晶化の困難さから未だに達成されていないのが現状である。本研究提案は、P糖タンパク質の安定性の向上をねらうものであり、結晶化成功の一助となると考えられる。

Studies toward crystallization of human P-glycoprotein

Department of Structural Biology
Tomomi Sato

P-glycoprotein (MDR1: Multi-drug resistance 1)





Kinetic parameters of tryptic digest and native MDR1

	k_{cat} (s ⁻¹)		K_m (μM)		k_{cat}/K_m (s ⁻¹ ·μM ⁻¹)		M.W.
	native	tryptic	native	tryptic	native	tryptic	
No Drug	0.2	1.6	75.6	27.7	20	207	342
Rhodamine 123	1.5	5.7	1023.0	378.0	1	14	399
colchicine	1.5	5.2	19.0	4.5	140	1,799	440
verapamil	2.0	7.2	6.9	0.4	2,167	18,198	479
niroglime	2.1	4.8	1135.0	138.0	2	35	761
vinblastine	1.8	5.1	1.5	1.6	1,197	3,248	808
calcein-AM	3.0	8.3	4.7	4.8	635	1,718	996
valinomycin	2.9	9.1	14.3	14.1	202	644	1111

drugs which digestion decreased its K_m values

drugs which digestion unaffected its K_m values

- ### Conclusions
1. The Linker region was most susceptible region to protease digestion.
 2. Vanadate trapping stabilized purified MDR1.
 3. Digestion increased specific activity of MDR1.
 4. The Linker region could contribute to effective transport of larger drugs.

Development of in silico ligand screening approach of G protein coupled receptors (GPCRs) based on chemical genomic information.

(Genomic Drug Discovery Science D1) **Takafumi Hara**

研究指導主任 ゲノム創薬科学分野 教授 辻本 豪三
研究指導協力者 総合薬学教育開発分野 助教授 奥野 恭史



■ 研究内容

【Introduction】

G protein coupled receptors (GPCRs), which play an important biological role, are valuable molecular targets for drug discovery. Based on the genomic information, we have been working on the various functional analyses of GPCRs and exploring new ligands. In the early stage of ligand screening, a large number of candidate compounds must be examined. In order to reduce the high-cost problem, we have developed a novel approach for in silico ligand screening. Previous prediction methods utilized only chemical information of the ligand. Our method improves the performance and reliability of in silico screening by processing not only chemical information of the ligands but also amino acid sequence information of the target receptor. In this study, we predicted the ligands for β_2 adrenergic receptor using this method, and verified the performance of this algorithm by ligand binding assay experiments. This algorithm was proven to be effective for exploring new ligand of GPCRs.

【Method】

For the validation of ligand prediction, we applied this algorithm to the β_2 adrenergic receptor, which has comparatively a lot of reports for already known ligands, and explored the new ligand. We used Support Vector

Machine (SVM) algorithm to predict chemical-protein interactions. Ligand-receptor information was collected from public available database such as GLIDA and IUPHR Receptor database. To examine the affinity of the candidate compounds predicted from the algorithm, competitive ligand binding assay was done. Membrane preparation from β_2 adrenergic receptor expressed in HEK293 cells was assayed using [125 I]-cyanopindolol. The compounds of the highest scoring subset (best 50) were verified. As a control, the lowest scoring subset (worst 50) was also verified.

【Result】

In the highest scoring subset (best 50), 21 compounds were examined. As a result, 17 compounds had the binding affinity. The hit rate was 80.9%. Then in the lowest scoring subset (worst 50), 9 compounds were examined. 7 compounds didn't have the binding affinity. The hit rate was 22.2%. All compounds that we examined had no previous reports as β_2 adrenergic receptor ligand. As a conclusion, the ligand prediction algorithm that we developed is available and efficient for exploration of GPCR ligand. Further investigation is required, but this algorithm is useful for the drug discovery for unknown ligand-receptor interaction.

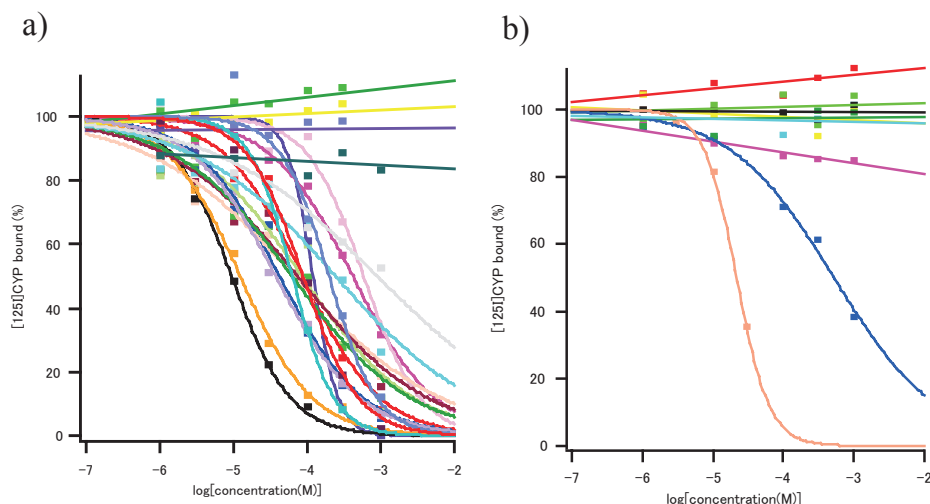


Fig. 1. The results of binding assay in SVM scoring subset best 50 (a) and worst 50 (b).

Development of *in silico* ligand screening approach of G protein coupled receptors (GPCRs) based on chemical genomic information.

Kyoto university Graduate School of Pharmaceutical Sciences
Genomic Drug Discovery Science

OTakafumi Hara

【Introduction】

G protein coupled receptors (GPCRs), which play an important biological role, are valuable molecular targets for drug discovery. Based on the genomic information, we have been working on the various functional analyses of GPCRs and exploring new ligands. In the early stage of ligand screening, a large number of candidate compounds must be examined. In order to reduce the high-cost problem, we have developed a novel approach for *in silico* ligand screening. Previous prediction methods utilized only chemical information of the ligand. Our method improves the performance and reliability of *in silico* screening by processing not only chemical information of the ligands but also amino acid sequence information of the target receptor. In this study, we predicted the ligands for β_2 adrenergic receptor using this method, and verified the performance of this algorithm by ligand binding assay experiments. This algorithm was proven to be effective for exploring new ligand of GPCRs.

【Method】

For the validation of ligand prediction, we applied this algorithm to the β_2 adrenergic receptor, which has comparatively a lot of reports for already known ligands, and explored the new ligand. We used Support Vector Machine (SVM) algorithm to predict chemical-protein interactions. Ligand-receptor information was collected from public available database such as GLIDA and JUPHAR Receptor database. To examine the affinity of the candidate compounds predicted from the algorithm, competitive ligand binding assay was done. Membrane preparation from β_2 adrenergic receptor expressed in HEK293 cells was assayed using [125 I]-cyanopindolol. The compounds of the highest scoring subset (best 50) were verified. As a control, the lowest scoring subset (worst 50) was also verified.

【Result】

In the highest scoring subset (best 50), 21 compounds were examined. As a result, 17 compounds had the binding affinity. The hit rate was 80.9%. Then in the lowest scoring subset (worst 50), 9 compounds were examined. 7 compounds didn't have the binding affinity. The hit rate was 22.2%. All compounds that we examined had no previous reports as β_2 adrenergic receptor ligand. As a conclusion, the ligand prediction algorithm that we developed is available and efficient for exploration of GPCR ligand. Further investigation is required, but this algorithm is useful for the drug discovery for unknown ligand-receptor interaction.

Introduction

G protein coupled receptor as the therapeutic target

- * G protein coupled receptors (GPCRs) form a large protein family that plays an important role in many physiological processes. Today, more than 50% of drug targets are based on GPCRs.
- * In human, close to 400 non-olfactory GPCRs have been determined. However, the endogenous ligand still remain unknown for about 150 GPCRs.
- * Identification of GPCR-ligand interaction is important for the pharmaceutical development.

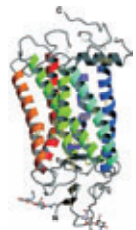


Fig. The structure of rhodopsin.

In silico ligand prediction

Traditional approach

Based on the chemical information of the compounds
→ difficult to find the new structure.

Based on the docking simulation using structure

→ difficult to analysis about 3D-structure since the less information of X-ray structure analysis of GPCR.

New approach

In addition to the chemical information, we use the GPCR sequence information. It is possible to predict the new compounds that have new structure.

Motivation

Development of new *in silico* ligand screening approach for GPCR.



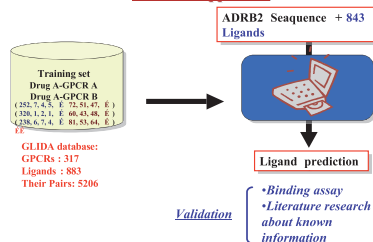
GPCR-Ligand Database (GLIDA)

focused on the interaction information between GPCRs and their ligands.

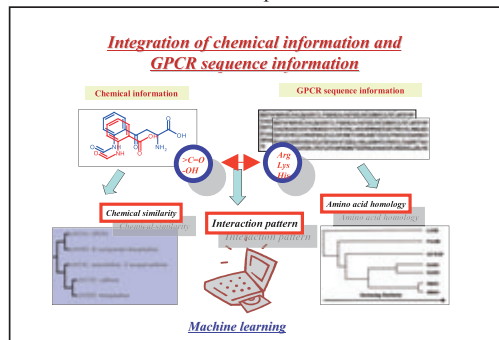
<http://kddi.pharm.kyoto-u.ac.jp/8001/gclid/>

Method

Prediction of β_2 adrenergic receptor ligand with new approach



Concept



Result

Top50 compounds

Compound	CFR	DBP	Score	Target
1	0.900	0.900	0.900	0.900
2	0.897	0.897	0.897	0.897
3	0.893	0.893	0.893	0.893
4	0.889	0.889	0.889	0.889
5	0.885	0.885	0.885	0.885
6	0.881	0.881	0.881	0.881
7	0.877	0.877	0.877	0.877
8	0.873	0.873	0.873	0.873
9	0.869	0.869	0.869	0.869
10	0.865	0.865	0.865	0.865
11	0.861	0.861	0.861	0.861
12	0.857	0.857	0.857	0.857
13	0.853	0.853	0.853	0.853
14	0.849	0.849	0.849	0.849
15	0.845	0.845	0.845	0.845
16	0.841	0.841	0.841	0.841
17	0.837	0.837	0.837	0.837
18	0.833	0.833	0.833	0.833
19	0.829	0.829	0.829	0.829
20	0.825	0.825	0.825	0.825
21	0.821	0.821	0.821	0.821
22	0.817	0.817	0.817	0.817
23	0.813	0.813	0.813	0.813
24	0.809	0.809	0.809	0.809
25	0.805	0.805	0.805	0.805
26	0.801	0.801	0.801	0.801
27	0.797	0.797	0.797	0.797
28	0.793	0.793	0.793	0.793
29	0.789	0.789	0.789	0.789
30	0.785	0.785	0.785	0.785
31	0.781	0.781	0.781	0.781
32	0.777	0.777	0.777	0.777
33	0.773	0.773	0.773	0.773
34	0.769	0.769	0.769	0.769
35	0.765	0.765	0.765	0.765
36	0.761	0.761	0.761	0.761
37	0.757	0.757	0.757	0.757
38	0.753	0.753	0.753	0.753
39	0.749	0.749	0.749	0.749
40	0.745	0.745	0.745	0.745
41	0.741	0.741	0.741	0.741
42	0.737	0.737	0.737	0.737
43	0.733	0.733	0.733	0.733
44	0.729	0.729	0.729	0.729
45	0.725	0.725	0.725	0.725
46	0.721	0.721	0.721	0.721
47	0.717	0.717	0.717	0.717
48	0.713	0.713	0.713	0.713
49	0.709	0.709	0.709	0.709
50	0.705	0.705	0.705	0.705

List of prediction

Compound	CFR	DBP	Score	Target
1	0.900	0.900	0.900	0.900
2	0.897	0.897	0.897	0.897
3	0.893	0.893	0.893	0.893
4	0.889	0.889	0.889	0.889
5	0.885	0.885	0.885	0.885
6	0.881	0.881	0.881	0.881
7	0.877	0.877	0.877	0.877
8	0.873	0.873	0.873	0.873
9	0.869	0.869	0.869	0.869
10	0.865	0.865	0.865	0.865
11	0.861	0.861	0.861	0.861
12	0.857	0.857	0.857	0.857
13	0.853	0.853	0.853	0.853
14	0.849	0.849	0.849	0.849
15	0.845	0.845	0.845	0.845
16	0.841	0.841	0.841	0.841
17	0.837	0.837	0.837	0.837
18	0.833	0.833	0.833	0.833
19	0.829	0.829	0.829	0.829
20	0.825	0.825	0.825	0.825
21	0.821	0.821	0.821	0.821
22	0.817	0.817	0.817	0.817
23	0.813	0.813	0.813	0.813
24	0.809	0.809	0.809	0.809
25	0.805	0.805	0.805	0.805
26	0.801	0.801	0.801	0.801
27	0.797	0.797	0.797	0.797
28	0.793	0.793	0.793	0.793
29	0.789	0.789	0.789	0.789
30	0.785	0.785	0.785	0.785
31	0.781	0.781	0.781	0.781
32	0.777	0.777	0.777	0.777
33	0.773	0.773	0.773	0.773
34	0.769	0.769	0.769	0.769
35	0.765	0.765	0.765	0.765
36	0.761	0.761	0.761	0.761
37	0.757	0.757	0.757	0.757
38	0.753	0.753	0.753	0.753
39	0.749	0.749	0.749	0.749
40	0.745	0.745	0.745	0.745
41	0.741	0.741	0.741	0.741
42	0.737	0.737	0.737	0.737
43	0.733	0.733	0.733	0.733
44	0.729	0.729	0.729	0.729
45	0.725	0.725	0.725	0.725
46	0.721	0.721	0.721	0.721
47	0.717	0.717	0.717	0.717
48	0.713	0.713	0.713	0.713
49	0.709	0.709	0.709	0.709
50	0.705	0.705	0.705	0.705

● known β_2 ligand
● binding
● not binding
● not available

Validation by binding assay

Table. Assay result of top 50 compounds

• verified compounds by experiments.	21
• hit compounds	17
• Revealed to be known ligand by literature research.	14
• not available compounds.	16

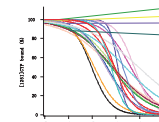
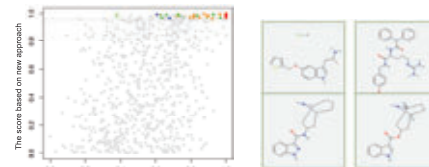


Fig. Competitive ligand binding assay was done. Membrane preparation from β_2 adrenergic receptor expressed in HEK293 cells was assayed using [125 I]-cyanopindolol.

We identified 17 new β_2 adrenoceptor ligands with this algorithm.

Comparison of traditional approach and new approach



The Score based on chemical information
Fig. Comparison of traditional approach and new approach.

Fig. The compounds of new structure.

Conclusion

- In this study, we have developed GPCR-ligand interaction screening approach including GPCR sequence information.
- We predicted and identified β_2 adrenoceptor ligands that have new structure with binding assay.

小胞体新規カルシウム結合膜タンパク Caluminに関する研究

(生体分子認識学分野) 張 焱

研究指導主任 生体分子認識学分野 教授 竹島 浩
研究指導協力者 ゲノム創薬科学分野 教授 辻本 豪三



■ 研究内容

【研究目的】

小胞体Ca²⁺ストアは様々な生体反応に重要であるが、小胞体の構造とその機能については不明な点が多く残されている。本研究では我々が新規に同定した小胞体膜タンパク質Caluminの生理学的意義の解明を目的としている。

【研究背景】

これまでに本研究室では新規小胞体膜タンパク質を単離し、Caluminと名付け、Calumin欠損マウスを作製している。Calumin欠損マウスの74%は胎生10.5日目前後に死亡し、一方、26%は生まれてくるが生後一日以内に死亡する。

申請者はCalumin欠損胎仔からmouse embryonic fibroblast (MEF) を単離し、小胞体ストレスの刺激に対してCalumin欠損MEFがアポトーシスを生じやすいことも明らかにした。さらに、組換えCaluminタンパクを用いてそのカルシウム結合能を明らかにしており、カルシウムイメージングからはCalumin欠損MEFの小胞体カルシウム容量の減少とストア作動性カルシウム流入の減弱を示唆する結果を得ている。

ストア作動性カルシウム流入に欠陥がある細胞は、転写因子NFATの活性化にも障害があることがすでに報告されている。

これまでの結果から、Caluminは小胞体のカルシウムストアとストア作動性カルシウムの流入に重要な役割を果たしていると考えられ、Caluminの欠損により、細胞内カルシウムハンドリングが影響を受け、細胞内シグナル伝達に障害が起きる。その結果、細胞の生存に必要なCalcineurin-NFAT経路も障害が起きたため、小胞体ストレスの刺激に対してアポトーシスを生じやすいと考えられる。

【研究方法】

この仮説の検証のためには、以下の実験が必須となる。

1. Calumin欠損MEF細胞で認められたCalcium handlingの異常がCalumin欠損によるものであることを確認するため、外来性のCaluminによるレスキュー実験を行う。
2. 小胞体ストレス以外の刺激 (Staurosporine、Tumor necrosis factor など) に対するCalumin欠損MEF細胞のアポトーシスを検討する。
3. 小胞体ストレスの刺激によって、小胞体内に正しくfoldingされないタンパク質が蓄積され、その結果、UPR反応が引き起こされる。Calumin欠損MEF細胞に於けるunfolded protein response (UPR) 反応を検討する。
4. Calumin欠損MEF細胞に於けるCaspaseの活性化を検討する。

【期待される成果】

今年3月のNature誌に、ストア作動性カルシウムの流入に寄与するOrail分子が、ある種の遺伝性重症複合免疫不全症 (SCID) の原因遺伝子であることが報告された。免疫反応、細胞生死などにストア作動性カルシウムの流入の役割が明らかになってきた。ストア作動性カルシウムの流入の関係分子はゲノム創薬の標的になるのも予想される。Caluminのストア作動性カルシウムの流入における役割及び病態への関連を解明し、Caluminがゲノム創薬標的の候補分子になることが期待できる。

Calumin, a novel Ca^{2+} binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum



Miao Zhang, Tetsuo Yamazaki, Masayuki Yazawa, Susan Treves, Miyuki Nishi, Machiko Murai, Eisuke Shibata, Francesco Zorzato and Hiroshi Takeshima

Department of Biological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan.

Abstract

We have identified a novel endoplasmic reticulum (ER)-resident protein, named "calumin", expressed in various tissues. This protein has a molecular mass of ~60 kDa and is composed of an ER-luminal domain rich in acidic residues, a single transmembrane segment, and a large cytoplasmic domain. Biochemical experiments demonstrated that the amino-terminal luminal domain is capable of binding Ca^{2+} with a high capacity and a moderate affinity. In embryonic fibroblasts derived from calumin-knockout mice exhibiting embryonic and neonatal lethality, fluorometric Ca^{2+} imaging detected insufficient Ca^{2+} contents in intracellular stores and attenuated store-operated Ca^{2+} entry. Moreover, the mutant fibroblasts were highly sensitive to cell death induced by ER stress. These observations suggest that calumin plays an essential role in ER Ca^{2+} handling and is also implicated in signaling from the ER, which is closely associated with cell-fate decision.

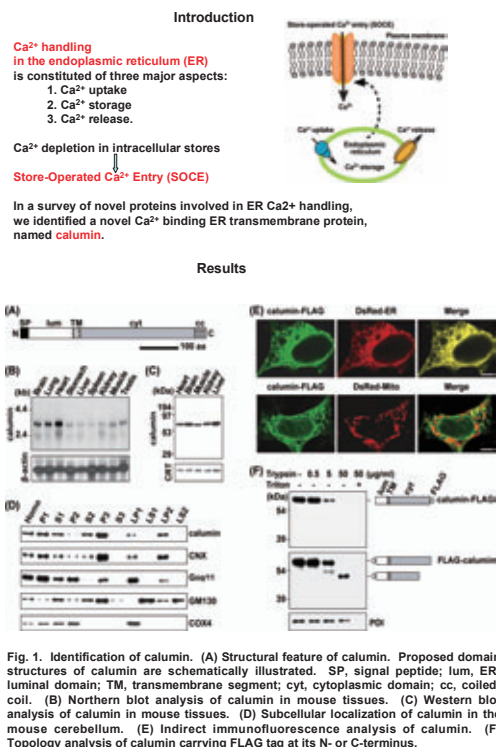
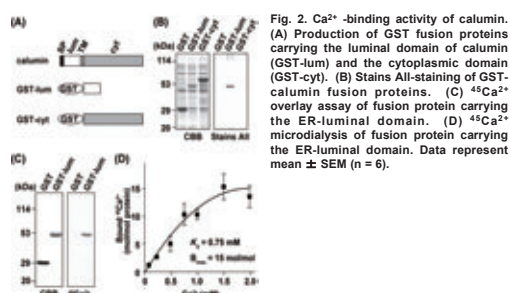


Fig. 1. Identification of calumin. (A) Structural feature of calumin. Proposed domain structures of calumin are schematically illustrated. SP, signal peptide; lum, ER-luminal domain; TM, transmembrane segment; cyt, cytoplasmic domain; cc, coiled-coil. (B) Northern blot analysis of calumin in mouse tissues. (C) Western blot analysis of calumin in mouse cerebellum. (D) Subcellular localization of calumin in the mouse cerebellum. (E) Indirect immunofluorescence analysis of calumin. (F) Topology analysis of calumin carrying FLAG tag at its N- or C-terminus.



Discussion

Calumin-knockout MEFs seem to retain normal death-associated pathways for UPR and caspase activation under ER stress conditions. Therefore, the decreased resistance against ER stress in the calumin-knockout MEFs may imply defective pro-survival signals.

In calumin-knockout MEFs
attenuated SOCE
↓
poor NFAT activation
↓
deficient survival

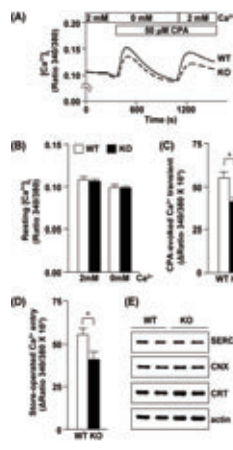
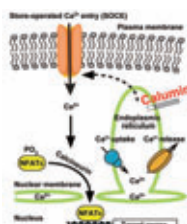


Fig. 3. Impaired Ca^{2+} signaling in calumin-knockout MEFs. (A) Weak Ca^{2+} responses of calumin-knockout MEFs to cyclopiazonic acid (CPA). Fura 2-measurements were performed with MEFs derived from six embryos of each genotype (~50 cells per embryo), and normalized traces are shown. (B) Normal resting Ca^{2+} levels of calumin-knockout MEFs in 2mM Ca^{2+} and nominally Ca^{2+} -free bathing solutions. (C) Reduced CPA-induced Ca^{2+} release in calumin-knockout MEFs. (D) Weak SOCE in calumin-knockout MEFs. * $P < 0.05$ in Student's t-test. Values represent mean $\pm$ SEM. (E) Immunoblot analysis of major Ca^{2+} store-related proteins in MEFs. WT, wild type; KO, calumin knockout.

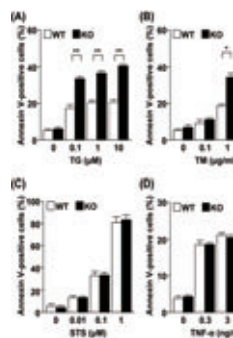


Fig. 4. Enhanced vulnerability of calumin-knockout MEFs to ER stress. MEFs were cultured for 24 hr with (A) thapsigargin (TG); (B) tunicamycin (TM); (C) staurosporine (STS); or (D) tumor necrosis factor (TNF- α) plus cycloheximide (10 mg/ml) at the concentrations indicated. Percentages of cells positive for annexin V were flow cytometrically determined in triplicates. Data represent mean $\pm$ SEM. Statistical differences between calumin-knockout (KO) and wild-type (WT) MEFs are marked with asterisks (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ in Student's t-test). Representative data from at least three independent experiments are shown.

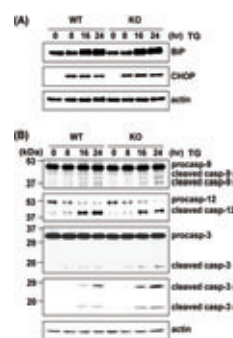


Fig. 5. Apparent normal caspase activation in TG-treated calumin-knockout MEFs. MEFs were treated with TG (1 μM) for the times indicated and lysed for the following analyses. (A) Detection of BIP and CHOP induction by immunoblotting. Actin was blotted as a loading control. (B) Detection of cleaved caspases by immunoblotting. Representative data from at least three independent experiments are shown and no significant differences were detected between calumin-knockout (KO) and wild-type (WT) MEFs.

Conclusion

Calumin is a novel Ca^{2+} -binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum. Our observations with calumin-knockout MEFs suggest that calumin may play a role in ER Ca^{2+} handling and is also implicated in signaling from the ER, which is closely associated with cell-fate decision.

Reference

Zhang M, Yamazaki T, Yazawa M, Treves S, Nishi M, Murai M, Shibata E, Zorzato F, Takeshima H. Cell Calcium. 2007 Jan 2; (in press)



セロトニン神経含有中脳冠状切片培養系を用いた 違法ドラッグによるセロトニン神経毒性の分子機序に関する研究

(生体機能解析学分野) 鈴木 祐一

研究指導主任 生体機能解析学分野 教授 金子 周司

研究指導協力者 薬品資源学分野 教授 本多 義昭



■ 研究内容

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA、通称エクスタシーなど) や5-methoxy-N, N-diisopropyl-tryptamine (5-MeO-DiPT、通称foxyなど) は、中枢興奮作用の他、幻覚作用なども有しており、欧米諸国だけでなく、ここ数年日本においてもとくに若年層において急速に普及し、最近麻薬指定された“違法ドラッグ”の一つである。MDMAの主な作用点としては、セロトニン神経終末に存在するセロトニントランスポーター (SERT) が知られており、セロトニン再取り込み阻害作用を示すだけでなく、MDMA自身がSERTからシナプス終末に取り込まれ、セロトニンをシナプス間隙に放出させる。また、MDMAの反復摂取により精神依存が引き起こされ、比較的選択的にセロトニン神経毒性を生じ、細胞内セロトニン含量の低下や、セロトニン神経終末の変性などを引き起こすことが知られている。一方、幻覚剤の一種と考えられる5-MeO-DiPTも、セロトニン神経に対して作用し、その摂取によりMDMAよりもさらに強い神経毒性が生じることが知られている。しかし、このような違法ドラッグによるセロトニン神経毒性の詳しい分子メカニズムは未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、セロトニン神経を含有する中脳冠状切片培養系を用いて、各種違法ドラッグやその代謝物による神経毒性を、セロトニン遊離量、細胞内セロトニン量やSERT発現量などを指標と

して解析を行い、その分子メカニズムを明らかにする。本脳切片培養系は、個体動物に比べて安定性があり、多量のスクリーニングが簡単に出来ることや、さらに遺伝子導入や遺伝子ノックダウンなどの技術が比較的容易に適応できるなどの優れた点を有していると考えている。本多教授には、これらの違法ドラッグもしくは現在流行している類似のドラッグおよび、それらと同様の幻覚作用を有するような天然物由来の生理活性物質を提供して頂き、本培養系に適応することで、それらのセロトニン神経毒性の分子作用メカニズムを薬理学的に解明して行きたいと考えている。こういった化合物は、一般的に入手が困難で、巷に回っているドラッグは実際とは中身が異なるものや、不純物が混入して入るケースが多く、その成分が不明なものが多い。従って、それらの純粋な化合物を得ることは、目的とする違法ドラッグそのものの作用を薬理学的に解析する上で、基本的かつ大変重要なことである。本研究により、各種違法ドラッグやその類似体、および天然物由来幻覚剤によるセロトニン神経毒性の分子メカニズムが明らかにできるだけでなく、様々な違法ドラッグの法的整備の根拠や、さらに薬物乱用防止のための啓蒙活動の一部になり、社会に対して貢献できるものと考えられる。

副作用情報のテキストマイニングを目標とした薬理学作用点データベースの開発

(生体機能解析学分野) 伊藤 悦子

研究指導主任 生体機能解析学分野 教授 金子 周司

研究指導協力者 臨床薬学教育開拓分野 助教授 矢野 義孝



■ 研究内容

【研究の背景】

近年、臨床現場においては電子カルテの導入に表されるように医療情報の電子化がめざましく、また基礎研究から得られる知見も電子データベースとして蓄積され、相乗的に膨大な量の情報が発信されている。このような情報の膨大化は医療の発展に貢献する一方、必要な情報を効率的に検索することを困難にさせている。従って、これらの膨大な情報の管理が必須であり、言語環境などの障壁を超え電子カルテや文献目録に対しあるデータベースに則った一定のメタ情報を付与することで、臨床的に意義のある分類を可能とするシステムの構築が求められている。

【目 的】

公開されている膨大な文献情報の中から臨床的に意義のある薬物に焦点を絞り、現場からの要求に即した情報を提供する目的で視認性の高いデータベースを開発する。さらに構築したデータベースを利用して副作用情報のテキストマイニングをおこなう。

【方 法】

方法としては、当初、自然言語処理技術を用いた機械的な相互作用解析を独自に開発することも考えられたが、同様の目的で既に公開されているサービスであるDRUGBANKの試用において、情報量の多さに比例してノイズな情報もまた相当量含まれていることがわかった。従って、より質の高い情報を提供するために、人為的に情報を入手し整理することとした。このとき参照した資料は教科書・雑誌といった一次データベースの他 PubMed、EBIMedをはじめとする各二次的データベースである。二次的データベースの内容については必要に応じて元文献にまで遡り人為的に報告の信頼度を評価していく。

また、最近ではシステム生物学の一分野としてインタクトローム解析と呼ばれる新たな研究分野が注目を

浴びつつある。生体内分子間、特にタンパク質間あるいは遺伝子間について、その相互作用を網羅的に解析する学問分野のことであり、効率的な二項間関係候補の抽出やそれに伴う研究開発のコストダウンが期待されており、発展めざましい一分野である。この分野の成果を随時利用・参照しつつより情報の正確さを検討する。

医薬品としては、ATC分類（Anatomical Therapeutic Chemical Classification System）に収載されている全4155薬物を対象とする。

記述子としては、自然言語ではなくバイオインフォマティクス分野で広く使われている言語コードを採用する。自由記述に関してはLSDプロジェクト内で整備されているMeSH用語(Medical Subject Headings terms)を用いたが、下位概念の記述に関してはデータベースとしての有用性を高める目的で可能な限りRefSeqによる遺伝子コード及びEC番号の情報を付与することとする。

【期待される成果】

今後、LSDプロジェクトの一環として行うことで、国内外を問わず言語の壁を越えて情報を送受信することができる。またLSD構築の過程で培われた共起頻度や類語情報と言った用語情報を実装することで、要求に応じた迅速な対応が可能になると考えられる。また、今回構築したデータベースには今後薬物の吸収・分布・代謝・排泄に関する情報を付与する予定であり、医療用医薬品の情報プラットフォームとしてより一層の充実を目指す。

従って薬理ゲノクス情報を網羅するデータベースを提供する一方で、それらを利用した情報マイニングにより副作用情報を予測するシステムの構築が期待できる。

Pharmacogenomics course

Development of pharmacological drug database aimed at textmining of adverse effects

Etsuko Ito DC1

Department of Molecular Pharmacology
Graduate School of Pharmaceutical Sciences
Kyoto University

Research directors

Department of Molecular Pharmacology
Professor Shuji KANEKO
Department of Clinical Pharmacy
Associate Professor Yoshitaka YANO

Abstract

Natural Language Processing is a useful tool for transforming natural texts into machine-readable forms. An NLP system specialized for the analysis of medical documents will help to extract the 'evidence' of proper drug usage or to find unexpected adverse effects from exploding amounts of therapeutic records. However, the success of pharmaceutical NLP system requires a well-constructed, semantic lexicon that describes the interactions among drugs, diseases and biomolecules. Although previous efforts have established various lexicons and thesauri for chemicals (PubChem), diseases (MeSH, MedDRA and ICD-10), and biological molecules (Gene Ontology and MeSH) individually, there are few knowledge-bases linking these lexicons by molecular pharmacological points of view. Therefore, as the first step toward the establishment of medical NLP system, I have developed a pharmacological database linking medical agents to their target molecules with optimal descriptors.

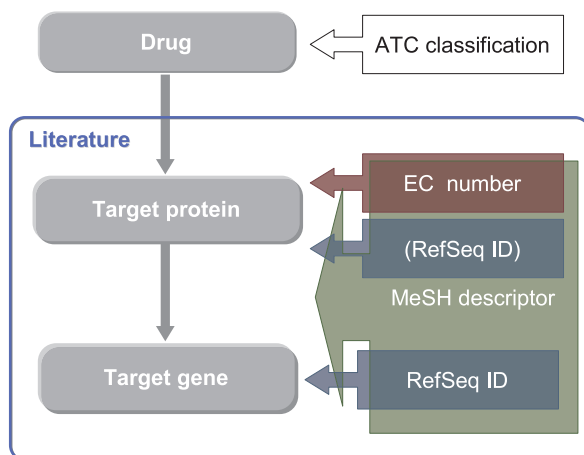


Fig.1 Overview and components of YAKURI database. English names of medical drugs were extracted mainly from Life Science Dictionary (LSD). The drugs were pharmacologically and structurally categorized according to the WHO Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification with some original sub-categorization for discriminating different targets. Each category of drug was manually assigned to a single or few biomolecules of the primary target proteins and genes using MeSH descriptors, RefSeq and/or EC number.

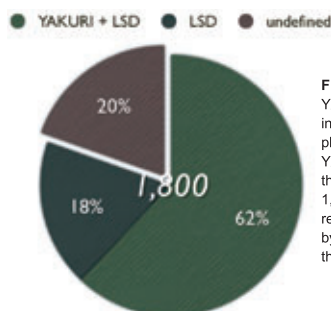


Fig. 4 Correlation between YAKURI database and active ingredients listed in JAPIC pharmaceutical encyclopedia. YAKURI database can provide the target information in 62% of 1,800 JAPIC drugs. The remaining 18% will be covered by incorporating LSD terms at the next step.

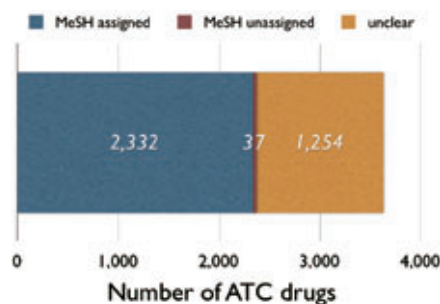


Fig.2 Number of drugs assigned to their targets with MeSH descriptors. As of the end of 2006, I have assigned 2,369 drugs to the target biomolecules expressed by MeSH descriptors, RefSeq and/or EC number. The resting 1,254 drugs were not assigned to any known categories.

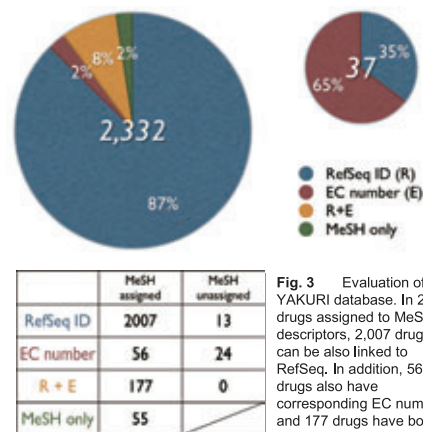
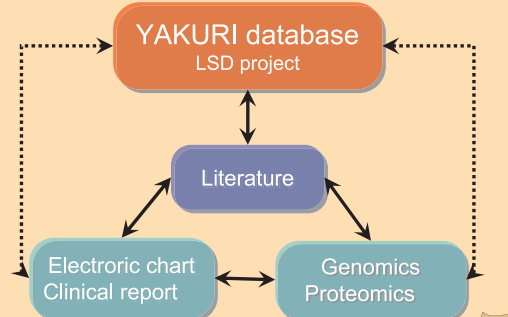


Fig. 3 Evaluation of YAKURI database. In 2,332 drugs assigned to MeSH descriptors, 2,007 drugs can be also linked to RefSeq. In addition, 56 drugs also have corresponding EC numbers, and 177 drugs have both links.

In future



The role of zebrafish *Fgf21* in primitive hematopoiesis

(Genetic Biochemistry D2) **Hajime Yamauchi**

研究指導主任 遺伝子薬学分野 教授 伊藤 信行
研究指導協力者 先端薬学教育開拓分野 助教授 杉倉 匡文



■ 研究内容

【Introduction】

Fibroblast growth factors (Fgfs) function as key secreted signaling molecules in many developmental events. The vertebrate Fgf family is large comprising 22 members. We identified mouse *Fgf21* that was expressed in the liver. However, the roles of *Fgf21* remain to be elucidated.

The zebrafish animal model offers a unique opportunity to discover and study novel genes required for the control of normal vertebrate developmental events. To examine the roles of *Fgf21* in developmental events, we identified zebrafish *Fgf21* and inhibited *Fgf21* signaling in zebrafish embryos.

【Method】

Using BLAST to search for zebrafish genomic DNA sequences with the amino-acid sequence of human *FGF21*, zebrafish *Fgf21* genomic DNA was identified. To examine the expression of *Fgf21* and marker genes for blood cells, whole-mount in situ hybridization using a digoxigenin-labelled antisense probe was performed. To inhibit *Fgf21* function in zebrafish embryos, *Fgf21* antisense morpholino oligonucleotide (MO) was injected into two-cell embryos. Proliferating cells were examined by immunohistochemistry using an anti-phosphohistone H3 antibody. Apoptotic cells were examined by TUNEL assay.

【Result】

Zebrafish *Fgf21* was expressed in the notochord adjacent to the intermediate cell mass where primitive hematopoiesis occurred. In addition, *Fgf21* knockdown zebrafish embryos lacked erythroid and myeloid cells but not lymphoid cells and blood vessels. The loss of erythroid cells was definitely rescued by injection of *Fgf21* RNA. The embryos treated with SU5402, an Fgf receptor inhibitor also had much fewer erythroid cells. These results indicate that the *Fgf21* MO specifically inhibited the functions of *Fgf21*, and that *Fgf21* is required for erythropoiesis.

Distinct types of blood cells are derived from hematopoietic stem cells as a result of a highly conserved gene program. The knockdown embryos had hemangioblasts and hematopoietic stem cells. However, the knockdown embryos had much fewer myeloid and erythroid progenitor cells. However, *Fgf21* had no significant effect on cell proliferation and apoptosis.

In conclusion, *Fgf21* is a newly identified regulator essential for determination of myelo-erythroid progenitor cell fate. The present finding for the first time indicate that Fgf signaling functions in developmental hematopoietic events, and provide new insight into vertebrate hematopoiesis.

【Reference】

Yamauchi, H., Hotta, Y., Konishi, M., Miyake, A., Kawahara, A., Itoh, N. *EMBO Rep.* **2006**, 7, 649-654

The role of zebrafish *Fgf21* in primitive hematopoiesis

Department of Genetic Biochemistry, Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Sciences

D2 Hajime Yamauchi
Ph.D. Nobuyuki Itoh
MD. Tadafumi Tochikura

Summary

Zebrafish *Fgf21* was expressed in the notochord adjacent to the intermediate cell mass where primitive hematopoiesis occurred. *Fgf21* knockdown embryos lacked erythroid and myeloid cells but not blood vessels and lymphoid cells. The knockdown embryos had hematopoietic stem cells. However, the knockdown embryos had significantly fewer myeloid and erythroid progenitor cells. In contrast, *Fgf21* had no significant effect on cell proliferation and apoptosis in the intermediate cell mass. In conclusion, *Fgf21* is a newly identified regulator essential for determination of myelo-erythroid progenitor cell fate. The present finding for the first time indicate that *Fgf* signaling functions in developmental hematopoietic events, and provide new insight into vertebrate hematopoiesis.

Introduction

Fibroblast growth factors (*Fgf*) function as key secreted signaling molecules in many developmental events. The vertebrate *Fgf* family is large comprising 22 members. We identified mouse *Fgf21* that was expressed in the liver. However, the roles of *Fgf21* remain to be elucidated.

To examine the roles of *Fgf21* in developmental events, we identified zebrafish *Fgf21* and inhibited *Fgf21* signaling in zebrafish embryos.

The role of *Fgf21* in primitive hematopoiesis

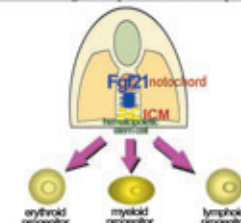


Fig.3 The role of *Fgf21* in primitive hematopoiesis. *Fgf21*, a newly identified signaling molecule from the notochord, predominantly regulates myeloid, erythroid and lymphoid progenitor cell fates.

The expression pattern of *Fgf21* during zebrafish embryonic development

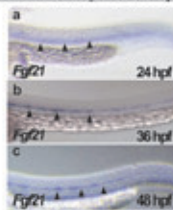


Fig.5 The expression pattern of *Fgf21* during zebrafish embryonic development. (a-c) The expression of *Fgf21* in the trunk at 24, 36 and 48 hpf was examined by whole mount *in situ* hybridization (arrowheads).

The expression patterns of *Fgf21* and *gata1* at transverse sections

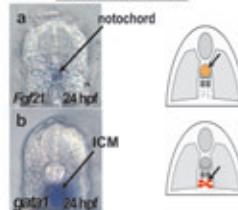


Fig.6 The expression patterns of *Fgf21* and *gata1* at transverse sections at 24 hpf. To determine the *Fgf21* expression region, the transverse sections of the trunk at 24 hpf were examined. (a) *Fgf21* was expressed in the notochord adjacent to the intermediate cell mass (ICM) where primitive hematopoiesis occurred. (b) *gata1* was expressed in the ICM.

The effects of *Fgf21* on blood circulation

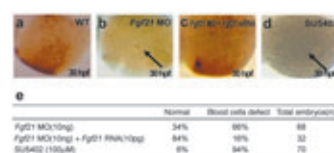


Fig.7 The effects of *Fgf21* on blood circulation. To visualize erythroid cells, the embryos were processed for whole-mount in situ hybridization. (a) Erythroid cells were detected in wild-type embryos. (b) However, *Fgf21* MO embryos lacked erythroid cells. (c) The line of erythroid cells in *Fgf21* MO embryos was partially rescued by the injection of *Fgf21* RNAi. (d) Furthermore, the embryos were treated with the *Fgf* receptor inhibitor SU4454 from 12 to 24 hpf. The SU4454-treated embryos lacked erythroid cells. These results indicate that the *Fgf21* MO specifically inhibited the function of *Fgf21*, and that *Fgf21* is required for erythropoiesis. (e) Phenotypes of *Fgf21* MO embryos. *Fgf21* MO-*Fgf21* RNAi embryos and SU4454-treated embryos.

The expression patterns of marker genes for blood cells in *Fgf21* MO embryos

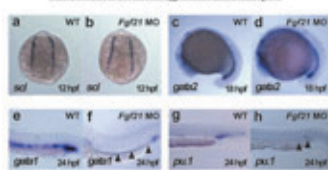


Fig.8 The expression patterns of marker genes for blood cells in *Fgf21* MO embryos. The expression of marker genes for blood cells was examined by whole mount *in situ* hybridization. (a-d) The expression of *gata1* for hematopoietic stem cells was also observed in *Fgf21* MO embryos. (e-h) However, the expression of *gata2* for erythroid progenitors and *gata3* for myeloid progenitors were greatly reduced in the ICM of *Fgf21* MO embryos.

The expression patterns of marker genes for blood cells in *Fgf21* MO embryos

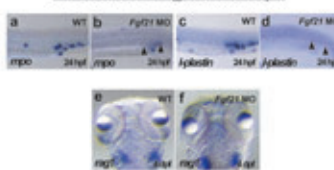


Fig.9 The expression patterns of marker genes for blood cells in *Fgf21* MO embryos. (a-d) To examine cell survival, wild-type and *Fgf21* MO embryos were examined by TUNEL labeling at 12 and 24 hpf. The rates of apoptotic cells in the ICM were not significantly affected by *Fgf21* MO. These results indicate that *Fgf21* is not essential for cell survival in the ICM.

The effects of *Fgf21* MO on the expression of marker genes for blood cells

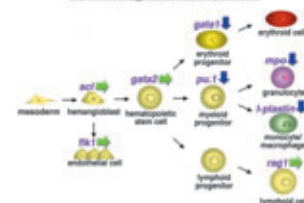


Fig.10 The effects of *Fgf21* MO on the expression of marker genes for blood cells. These findings indicate that *Fgf21* is essential for myelo-erythroid progenitor cell fate.

The effect of *Fgf21* on cell proliferation

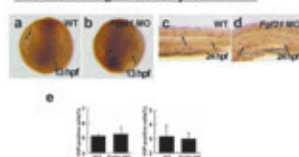


Fig.11 The effect of *Fgf21* on cell proliferation. (a-d) Proliferating cells, positive for *gata1*, were examined in wild-type and *Fgf21* MO embryos at 12 and 24 hpf. TUNEL-positive cells were also observed in *Fgf21* MO embryos. (e) The rates of TUNEL-positive cells in the ICM were not significantly affected by *Fgf21* MO. These results indicate that *Fgf21* is not essential for cell proliferation.

The effect of *Fgf21* on apoptosis

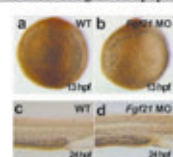


Fig.12 The effect of *Fgf21* on apoptosis. (a-d) To examine cell survival, wild-type and *Fgf21* MO embryos were examined by TUNEL labeling at 12 and 24 hpf. The rates of apoptotic cells in the ICM were not significantly affected by *Fgf21* MO. These results indicate that *Fgf21* is not essential for cell survival in the ICM.

Fgf19の眼形成における役割の解明

(遺伝子薬学分野) 中山 喜明

研究指導主任 遺伝子薬学分野 教授 伊藤 信行

研究指導協力者 分子微生物学分野 助教授 渡部 好彦



■ 研究内容

【背景及び目的】

Fgf (Fibroblast Growth Factor, 線維芽細胞増殖因子) は、線維芽細胞をはじめとする様々な細胞に対して、増殖活性や分化誘導などの多様な生物活性をもつ細胞間シグナル因子である。これまでにFgfが成体で血管新生、創傷治癒、神経細胞生存維持、胎児期で四肢形成、中胚葉誘導、脳形成といった多様な機能を持っていることが明らかにされており、これらの知見が遺伝子治療や医療の分野で応用されている。現在Fgfファミリーとしては22種類のFgfがヒト及びマウスにおいてそれぞれ同定されており、このうちヒトFgf19は当研究室において単離、同定されており、また他のグループによりFgf19欠損マウスが作成され、胎生12.5日以降にほとんど死亡することが報告されている。そこで我々は比較的容易に条件付き機能阻害実験を行うことができるゼブラフィッシュを実験動物に選択し解析を行っている。我々はこれまでにゼブラフィッシュFGF19遺伝子を単離・同定し、FGF19が発生初期の脳で神経上皮細胞の増殖・生存維持に関与していること、及び胎児期の前脳においてFGF19が神経上皮細胞からGABA作動性ニューロンとオリゴデンドロサイトへの分化に関与していることを明らかにしている。ヒトFGF19及びゼブラフィッシュFgf19はいずれも胎生期の眼に発現しており、ゼブラフィッシュFgf19の機能阻害胚において眼の形態に異常が見られることから、Fgf19は眼形成に関与していることが予想される。以上の知見から当研究はゼブラフィッシュを用いてFgf19の眼形成過程における役割の解明を目的とする。

【方 法】

1. *Fgf19* mRNAの眼の発生初期における発現パターンの検討

ゼブラフィッシュ胚の発生初期の眼におけるFgf19の詳細な発現パターンを検討するため、whole mount *in situ* hybridization法を行い*Fgf19* mRNAを検出する。

2. *Fgf19*機能阻害実験

ゼブラフィッシュ*Fgf19*の翻訳開始領域及びスプライシング領域に機能阻害胚及びFGF19過剰発現胚の発生初期脳及び網膜における増殖関連因子、生存維持関連因子の発現様式を解明する。

3. Fgf19の網膜軸特性決定における役割の検討

Whole mount *in situ* hybridization法によりゼブラフィッシュFgf19機能阻害胚の発生初期網膜における前後軸及び背腹軸特性獲得関連因子の発現様式を解明する。さらに蛍光色素の網膜領域への注入によりFgf19機能阻害胚における中脳視蓋への視神経の投射パターンを検討する。

【期待される成果】

培養細胞の実験によりFgfシグナルは眼形成過程における誘導、増殖、分化の様々な段階で機能していることが報告されているが、実際に生体で働くFgfリガンドの特定はほとんどされていない。また、網膜神経細胞や晶体細胞の細胞増殖や生存維持に関わるFgfの分子機構を明らかにすることは、網膜神経細胞死によって発病する神経変性疾患や晶体細胞の増殖・分化・細胞死によって引き起こされる白内障の病態解明と治療法の開発にとって重要であると考えられる。魚類の網膜神経は哺乳類のそれとは異なり、再生能を有していることが報告されていることから、魚類の網膜神経の発生機構の解明は網膜組織再生への重要な基盤研究になると期待される。

Fgf19 is Required for Cell Survival and Axial Patterning in the Prospective Neural Retina

Department of genetic biochemistry D2 Yoshiaki Nakayama

Research directors: Ph.D. Nobuyuki Itoh

Ph.D. Yoshihiko Watanabe

Abstract

Fibroblast growth factors (Fgfs) function as key secreted signaling molecules in many physiological events. We previously identified zebrafish *Fgf19* and reported its roles in brain development. Although *Fgf19* is expected to participate in eye development too, the roles remained to be elucidated. We investigated the spatiotemporal expression pattern of *Fgf19*. *Fgf19* was expressed in the retina and lens in the early formation period. We analyzed the *Fgf19* function by knocking down it. *Fgf19* knockdown embryos exhibited a significant reduction in the size of the retina and the lens, and morphological abnormalities in the eye. To determine if the inhibition of *Fgf19* functions affected cell proliferation and cell death in the retina and the lens, we detected dividing cells and apoptotic cells. The ratio of dividing cells was not affected, but the ratio of apoptotic cells was increased. These results indicate that *Fgf19* is required for cell survival in the eye. Furthermore, we investigated whether *Fgf19* is required for retinal patterning along the anterior-posterior and dorsal-ventral axis. In *Fgf19* knockdown embryos, the nasally expressed gene *efna5a* was repressed, the temporally expressed *epha4b* was nasally expanded slightly. In addition, the genes expressed in the optic stalk (the proximal region of optic vesicle) were expanded. These results suggest that *Fgf19* is involved in retinal axial patterning during early eye development.

Conclusion

Fgf19 is required for cell survival in the lens and retina.

Fgf19 involves retinal axial patterning during early eye development.

Zebrafish eye development

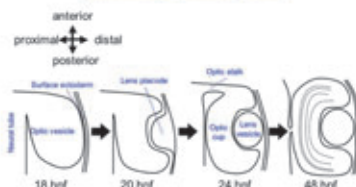


Fig. 1 The model of zebrafish eye development. Zebrafish eye is first induced as eye field in a anterior part of neural plate. Continued evagination of the optic primordia leads to the formation of the two optic vesicles at 18 hpf. These extend towards the overlying, non-neural surface ectoderm that will ultimately give rise to the lens placode at 20 hpf. Coordinated invagination of the lens placode and the optic vesicle results in the formation of the lens vesicle and a double-layered optic cup at 24 hpf. At this stage, the differentiation of neural retina is initiated, and the lamination of six types of retinal neurons is formed at 48 hpf.

Expression of *Fgf19* in the eye

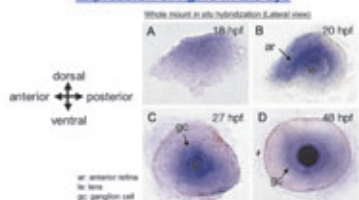


Fig. 2 Expression pattern of *Fgf19* in zebrafish embryonic eye. The expression patterns were determined by whole mount *in situ* hybridization. (A) *Fgf19* was expressed in the future anterior retina at 18 hpf as indicated by ar. (B) By 20 hpf, the expression was confined to the anterior half of the neural retina. *Fgf19* expression in the lens was first detected at 20 hpf as indicated by le. (C) *Fgf19* expression intensified in the ganglion cells and the lens at 27 hpf. (D) *Fgf19* expression was detected from the ganglion cell layer to the inner plexiform layer at 48 hpf.

Inhibition of *Fgf19* functions

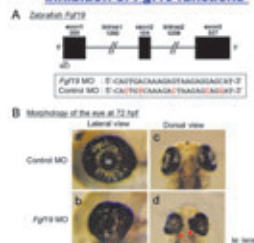


Fig. 3 Morphology of the eye in the *Fgf19* MO-injected embryos. A: (a) The coding region of *Fgf19* was divided by three introns. Black boxes and black lines indicate exons and introns, respectively. *Fgf19* MO is targeted at initiation site of transcription of *Fgf19* mRNA. B: *Fgf19* MO-injected embryos exhibited a significant reduction in the size of the lens and the retina. A failure of the choroid fissure to close, indicated by an red arrow in (b), was observed. (d) A progressive expansion of retinal tissue to the midline of the forebrain, indicated by red arrowhead, was observed.

Cell proliferation and cell death in *Fgf19* MO-injected embryos

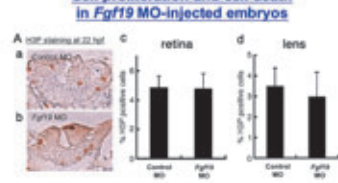


Fig. 4 Comparison of cell proliferation and cell death patterns in the lens and retina of control and *Fgf19* MO-injected embryos. A: Control and *Fgf19* MO-injected embryos were stained using an anti-H3P antibody. (a, b) Panels show representative transverse sections of the eye at 22 hpf. (c, d) The percentage of proliferating cells labeled with anti-phosphorylated Histone H3 antibody in the retina and lens. The ratio of the number of proliferating cells to the total number of cells in the lens and retina of *Fgf19* MO-injected embryos was not significantly different from that in the lens and retina of control embryos. B: Apoptotic cells in the eye of control and *Fgf19* MO-injected embryos were marked by TUNEL staining. (e, f) Panels show their representative transverse sections of the eye at 24 hpf. (g, h) The percentage of apoptotic cells in the retina and lens of control and *Fgf19* MO-injected embryos. The ratio of the number of apoptotic cells to the total number of cells in the lens and retina increased significantly in *Fgf19* MO-injected embryos.

Axial patterning of the retina in *Fgf19* MO-injected embryos

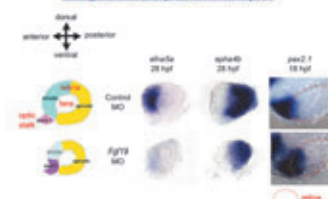


Fig. 5 Axial patterning of the retina in *Fgf19* MO-injected embryos. The expression of *efna5a* was severely reduced in the anterior retina of *Fgf19* MO-injected embryos. The expression of *epha4b* in the posterior half of the prospective retina slightly expanded into the anterior retina in *Fgf19* MO-injected embryos. An increased expression of *pax2.1* in the optic stalk was detected in *Fgf19* MO-injected embryos at 18 hpf.

Guidance of retinal ganglion cell axons in *Fgf19* MO-injected embryos

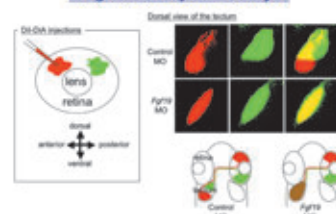


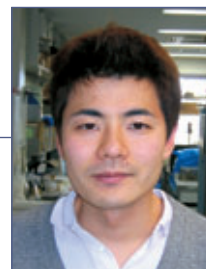
Fig. 6 Guidance of retinal ganglion cell axons in *Fgf19* MO-injected embryos. Embryos were injected with control and *Fgf19* MO. Retinal ganglion cell axons anterogradely double-labeled by Dil (green) and DAPI (red) in the posterior and anterior halves. In control embryos, anterior and posterior retinal ganglion cells projected to the posterior and anterior tectum, respectively. Both anterior and posterior retinal ganglion cells projected to the entire tectum in *Fgf19* MO-injected embryos. B: Schematics of guidance of retinal ganglion cell axons in control and *Fgf19* MO-injected embryos. Dorsal views with anterior to the top.

細胞内小胞輸送における低分子量G蛋白質ARFのGDP/GTP交換因子の役割

(生体情報制御学分野) 石崎 玲

研究指導主任 生体情報制御学分野 教授 中山 和久

研究指導協力者 薬品構造生物学分野 教授 加藤 博章

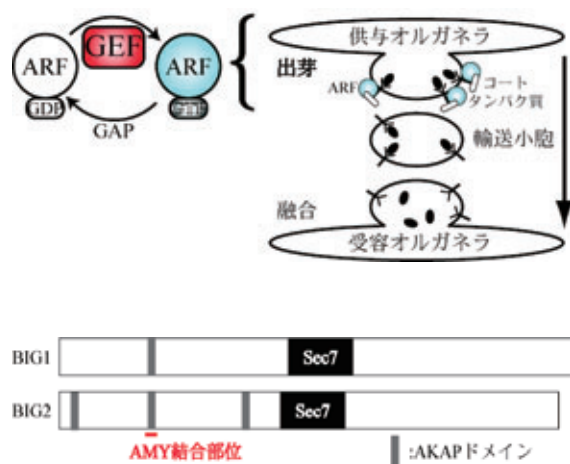


■ 研究内容

【背景】

AMY-1 (Associate of c-MYC) は、もともとc-MYCと結合するタンパク質として同定された。その後、**AKAP** (A-kinase anchoring protein) 84と結合してミトコンドリア上に局在することが報告されているが、その局在の決定は過剰発現系を用いて行われた。そこで、申請者は抗AMY-1抗体を作製して蛍光抗体法により細胞内局在を観察した。その結果、**AMY-1はゴルジ体に局在していることが判明した。**

「AMY-1は、①結合するAKAPに依存して局在を変化させること、②これまでに報告されているAMY-1結合タンパク質のなかにはゴルジ体に局在するものがないこと」などから、AKAPドメインを有してゴルジ体に局在する未知のAMY-1結合タンパク質が存在すると考え、AMY-1と共沈降するタンパク質の解析を行なった。その結果、200 kDaと190 kDaのAMY-1結合タンパク質を見だし、質量分析により**BIG** (Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange factor) **1**と**BIG2**であることを同定した。両者はいずれもゴルジ体に局在し、低分子量GTP結合タンパク質ARFのGDP/GTP交換因子 (GEF) であり、ARFに結合するGDPのGTPへの交換反応を触媒して活性化することにより、輸送小胞の出芽を引き起こす重要な調節因子である。さらに**BIG1**と**BIG2**はいずれもAKAPドメインを持ち、このドメインを介して**AMY-1に結合することが明らかとなった。**



AMY-1のゴルジ体への局在はBIG1もしくはBIG2が決定するのではないかと考え、RNAi法によるBIG1とBIG2のノックダウンを行った。BIG2をノックダウンした時にのみAMY-1のゴルジ体への局在が完全に消失した。この結果から、**AMY-1はBIG2と結合してゴルジ体に局在することが証明された。**

【目的】

申請者がこれまでに行った研究により、AMY-1はBIG2と結合してゴルジ体に局在するタンパク質であることが明らかになったが、試験管内ではAMY-1はBIG1とBIG2いずれとも結合する。この差はBIG1とBIG2の立体構造の違いによると考えている。立体構造の知識をふまえ、これまでの結果からは説明できなかったBIG1とBIG2の違いを明確にするのが本実験の目的である。これらの研究はタンパク質立体構造に精通した薬品構造生物学分野の加藤教授の助言の下、融合研究によって初めて実現されるものである。

【方法】

RNAi法によりBIG1とBIG2をそれぞれ特異的にノックダウンした細胞に、BIG1あるいはBIG2の様々な欠損変異体を発現させる部分的な機能回復実験によって、BIG1とBIG2の各ドメインの持つ機能の差を明確にする。

【期待される成果】

BIG2に変異を持つヒトは小脳症を発症することから、BIG2は小胞輸送の調節を介して脳の発達にも関与すると考えられる。この変異はSec7ドメイン以外の領域で起こっており、Sec7ドメイン以外の領域の重要性が示唆される。Sec7ドメインについては同じドメインを持つタンパク質の構造解析が行われているものの、それ以外の領域について構造的知識は非常に乏しい。立体構造にも注目した申請者の研究によって、BIG1とBIG2それぞれの固有の機能、BIG1とBIG2のSec7ドメイン以外の領域の機能が明らかとなれば、小胞輸送の複雑なメカニズムの解明につながるばかりか脳の発達における小胞輸送の役割の解明にもつながると考えられる。

AMY-1 is localized on the *trans*-Golgi network in association with brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange factors for ARFs

○ Ray Ishizaki,^{1,2} Hye-Won Shin,¹ Sanae M. M. Iguchi-Ariga,³ Hiroyoshi Ariga,² Hiroaki Kato,¹ and Kazuhisa Nakayama¹

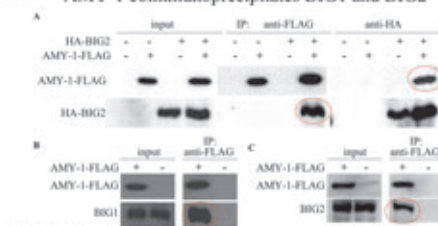
¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University; and ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences and ³Graduate School of Agriculture, Hokkaido University

1 Abstract

AMY-1 was identified as a 11-kDa protein that interacts with c-Myc and regulates its transcription activity. Moreover, AMY-1 binds the A-kinase anchoring proteins (AKAPs), including AKAP95 and S-AKAP84, through interacting with their binding domain for the PKA RII subunit (AKAP domain), and shows varying intracellular localization dependent on that of associated AKAPs.

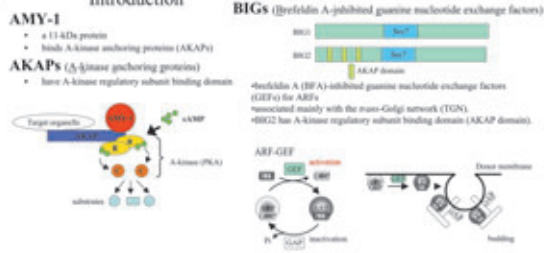
In this study, we found that endogenous **AMY-1** localizes on the Golgi apparatus using newly prepared anti-AMY-1 antibody. Moreover, we found that **BIG2** and **BIG1**, brefeldin A (BFA)-inhibited guanine nucleotide-exchange factors (GEFs) for ARFs were coimmunoprecipitated with **AMY-1** from CHO cell extracts. Analysis using various **BIG2** and **BIG1** fragments revealed that **AMY-1** binds the AKAP domains. **AMY-1** colocalized with **BIG2** on the *trans*-Golgi network (TGN). Knockdown of **BIG2**, but not that of **BIG1**, with siRNA caused redistribution of endogenous **AMY-1** to the nucleus. Overexpression of **BIG2** and AKAP95, a nuclear AKAP, caused concentration of **AMY-1** on the TGN and in the nucleus, respectively. These results indicate that its interaction with **BIG2** determine the localization of **AMY-1** to the TGN, where it may modulate guanine nucleotide-exchange activity of **BIG2**.

5 AMY-1 coimmunoprecipitates BIG1 and BIG2

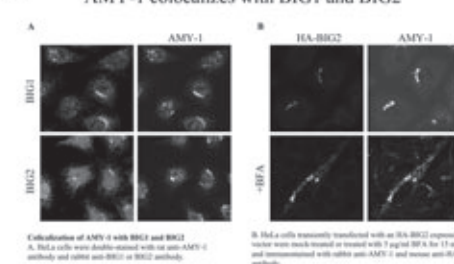


Interaction of AMY-1 with BIG1 and BIG2
A. Extracts from HEK293T cells transfected with an expression vector for either AMY-1-FLAG or HA-BIG2 alone, or their combination, were immunoprecipitated with anti-FLAG or anti-HA antibody, and subjected to immunoblot analysis.
B. Extracts from HEK293T cells transfected with an AMY-1-FLAG expression vector were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and subjected to immunoblot analysis.
C. Extracts from HEK293T cells transfected with an AMY-1-FLAG expression vector were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and subjected to immunoblot analysis.

2 Introduction

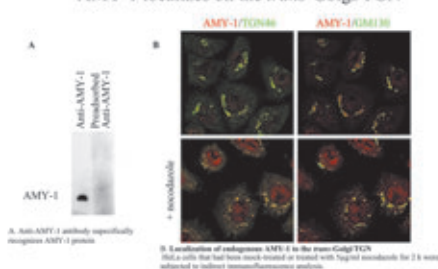


6 AMY-1 colocalizes with BIG1 and BIG2



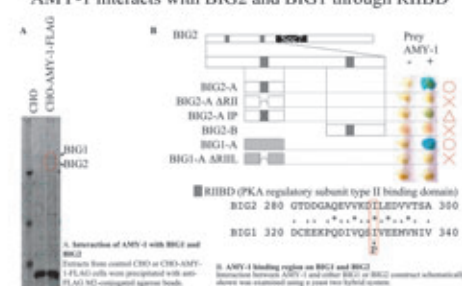
Colocalization of AMY-1 with BIG1 and BIG2
A. HeLa cells were transfected with anti-AMY-1 and anti-BIG1 or anti-BIG2 antibodies and stained with anti-AMY-1 and anti-BIG1 or anti-BIG2 antibodies.
B. HeLa cells transfected with HA-BIG2 and AMY-1 were stained with anti-HA and anti-AMY-1 antibodies.

3 AMY-1 localizes on the *trans*-Golgi/TGN



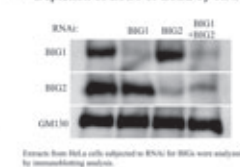
A. Anti-AMY-1 antibody specifically recognizes AMY-1 protein.
B. Localization of endogenous AMY-1 to the trans-Golgi TGN. HeLa cells transfected with AMY-1-FLAG and BIG1 or BIG2 were stained with anti-AMY-1 and anti-BIG1 or anti-BIG2 antibodies.

4 AMY-1 interacts with BIG2 and BIG1 through RIIBD



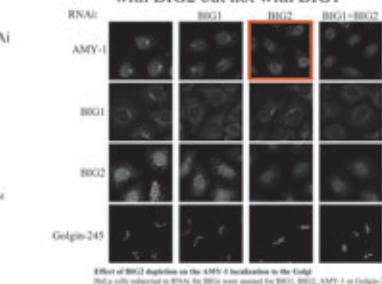
A. Interaction of AMY-1 with BIG1 and BIG2. Extracts from CHO cells transfected with AMY-1-FLAG were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and subjected to immunoblot analysis.
B. AMY-1 binding region on BIG1 and BIG2. Interaction between AMY-1 and either BIG1 or BIG2 was examined using a yeast two-hybrid system.

7 Depletion of BIG1 or BIG2 by RNAi



Extracts from HeLa cells transfected with siRNA for BIG1 or BIG2 were analyzed by immunoblot analysis.

8 AMY-1 is associated with the TGN by interacting with BIG2 but not with BIG1



Effect of BIG2 depletion on the AMY-1 localization to the Golgi
HeLa cells transfected with siRNA for BIG1 or BIG2 were stained for BIG1, BIG2, AMY-1 or Golgi-245.

9 Summary

- AMY-1 localizes on the *trans*-Golgi/TGN. (3)
- AMY-1 interacts with BIG2 and BIG1. (4,5)
- AMY-1 is associated with the TGN through interacting with BIG2 but not with BIG1. (6,8)



免疫活性化CpG DNAの細胞選択的ターゲティングに基づく新規癌免疫療法の開発

(薬品動態制御学分野) 倉本夕香里

研究指導主任 薬品動態制御学分野 教授 橋田 充
研究指導協力者 病態機能解析学分野 教授 佐治 英郎



■ 研究内容

【研究の背景】

核酸医薬品を用いた治療は新しい医療として期待されているが、生体内での安定性や細胞内への取り込み能などに改善すべき点が残されている。CpGモチーフはバクテリアゲノムに特徴的なDNA配列であり、脊椎動物の生体内でマクロファージ等の免疫担当細胞に発現するToll様受容体に認識され、抗腫瘍活性のあるTh1型免疫応答を誘導する。このため、CpGモチーフを含む短鎖DNA (CpG DNA) が近年注目を集め、新規癌免疫治療への応用が期待されている。しかしながら、他の核酸医薬品と同様にその利用が制限され、デリバリーシステムの構築が重要な課題になっている。

【目 的】

CpG DNAによる効果的な癌免疫療法を構築するためには、①生体内での安定性向上、②免疫担当細胞への取り込み能増大、③Toll様受容体への認識に基づくTh1型サイトカインの効果的誘導までを総合的に考慮したキャリア設計が必要である。核酸医薬品を生体内に導入する非ウイルス性ベクターの利用により、CpG DNAの生体内での安定性向上が期待できる。また、免疫担当細胞への選択的ターゲティングには、各細胞が有する比較的厳密で基質特異性を有する糖鎖認識機構を利用することが可能である。これらを総合的に考慮に入れた新規DDS製剤設計をおこない、免疫担当細胞選択的にCpG DNAを送達し、免疫応答を効率化することで、安全かつ有効な抗腫瘍免疫療法の確立を目指す。

【方 法】

CpG DNAに対し、細胞内への核酸導入効率の高い非ウイルスベクターであるカチオン性リポソームおよびポリマーとの複合体形成に基づく免疫応答性を比較し、キャリアの最適化をおこなう。難治性の腹膜播種性癌転移モデルに対し、最適化したCpG DNA複合体の腹腔内投与による抗腫瘍効果を評価する。また、申請者の所属する研究室において開発したマンノース修飾リポソームを用いることでCpG DNAの免疫担当細胞選択的ターゲティングをおこない、*in vitro*および*in vivo*での免疫応答性の増強について検討する。

【期待される成果】

腹膜播種における最大の問題点は、臓器漿膜から離脱した癌細胞が、経リンパ行性に転移することであるが、通常行なわれている全身化学療法ではリンパ節転移の克服は不可能である。このため、腹膜播種の患者では5年生存率が0～5%と低く、新規治療法の開発が望まれる。本研究において開発するCpG DNAデリバリーシステムを適用することで、リンパ節移行性に大きく寄与するキャリア粒子径の精密制御が可能であり、CpG DNAのリンパ節移行を効率化可能と考えられる。さらに、CpG DNAの生体内での安定性向上および免疫応答効率化により、腹腔内における強力な癌細胞増殖抑制効果が期待できる。本研究の発展により、リンパ節転移治療を視野に入れた新規の腹膜播種治療法を確立できるものと考えている。

Chemical biology

Immunostimulatory CpG DNA delivery system for inhibition of peritoneal dissemination

○Yukari Kuramoto¹, Makiya Nishikawa², Shigeru Kawakami¹, Fumiyoshi Yamashita¹, Hideo Saji³, and Mitsuru Hashida¹

Department of ¹Drug Delivery Research, ²Biopharmaceutics and Drug Metabolism, ³Patho-Functional Bioanalysis

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Japan

Abstract

Single-stranded oligodeoxynucleotides containing CpG dinucleotides (CpG DNA) are recognized by Toll-like receptor (TLR) 9 on antigen presenting cells (APCs), to stimulate Th-1 type immune responses. Therefore, CpG DNA have been used as therapeutic agent in cancer. For the effective use of CpG DNA, following matters should be considered: i) avoiding enzymatic degradation, ii) enhancing cellular uptake, and iii) improving the production of Th-1 type cytokines. To control these procedures, CpG DNA delivery system is needed to develop non-viral vectors such as cationic liposomes and cationic polymers have been extensively employed as a vehicle for plasmid DNA in gene therapy trials, because they protect plasmid DNA from degradation, enhance its cellular uptake, and greatly improve its transgene expression activity. It is also well known that mannose receptors are expressed exclusively on APCs, therefore, introduction of mannose residues to cationic liposome formulations could provide an effective targeting system for CpG DNA.

Here, we prepared CpG DNA/cationic liposomes complexes in terms of immunostimulatory effects, and apply the system to peritoneal dissemination therapy. We also developed mannoseylated cationic liposomes (Man-liposomes) for effective targeting of CpG DNA to APCs, and production of Th-1 type cytokines by administration of CpG DNA/Man-liposome complex (CpG DNA/Man-lipoplex) were examined in vivo. CpG DNA/cationic polymer complex (CpG DNA/polyplex) showed more potent immune activation than CpG DNA/cationic liposome complex, which is prepared by linear polyethylenimine (PEI). Intraperitoneal administration of CpG DNA/lipoplex inhibited the proliferation of tumor cells in peritoneal cavity, and prolonged survival time of peritoneal dissemination model mice (Fig.2-4). CpG DNA/Man-lipoplex showed significantly higher immune activation than CpG DNA/lipoplex (Fig.5,6). These results indicated that liposome-based CpG DNA delivery system is promising for cancer immunotherapy.

Materials and Methods

oligonucleotide

ODN with a phosphodiester (PO) or phosphorothioate (PS) backbone were synthesized by Coperon.

The sequence for CpG DNA was 5'-TCCAGCTTTGAGCTTTGAGCTTTT-3' and for control DNA, 5'-TCCAGCTTTGAGCTTTGAGCTTTT-3' were used.

Preparation of lipoplex and polyplex

Cationic liposome and mannoseylated liposome (Man-liposome) were prepared by mixing of DOTMA, cholesterol, and Man-C4-cholesterol at a molar ratio of 1:1:1 and 1:0.5:0.5, respectively. Linear polyethylenimine (PEI) (25kDa) was used for cationic polymer.

Lipoplex was formed by adding an equal volume of CpG DNA to cationic liposomes at a mixing ratio (i/v) of 1:0.2:3 and stored at 37 °C for 30 min. Polyplex was formed by adding an equal volume of CpG DNA to linear PEI at a mixing ratio (i/v) of 20 and stored at room temperature for 30 min.

Production of Th1-type cytokines in serum by intravenous administration of CpG DNA

Female ICR mice were intravenously injected CpG DNA, CpG DNA/polyplex, CpG DNA/lipoplex, or CpG DNA/Man-lipoplex (20 µg DNA). At specific time points after administration, blood was collected from the tail vein. Serum was collected and serum TNF-α, IL-12, IFN-γ concentrations were determined by ELISA. (Fig. 1,6)

Establishment of tumor cell lines stably expressing reporter protein

Murine melanoma B16-BL6 tumor cells and murine adenocarcinoma colon26 cells were transfected with plasmid DNA encoding firefly luciferase under the control of cytomegalovirus immediate early promoter complexed with LipofectAMINE2000 (Invitrogen) to obtain B16-BL6Luc and colon26Luc, respectively.

Production of Th1-type cytokines in peritoneal cavity by intraperitoneal administration of CpG DNA

Male C57BL/6 mice were intraperitoneally injected B16-BL6Luc cells (5.0 × 10⁵ cells). Then, saline, CpG DNA/lipoplex, control DNA/lipoplex were administered intraperitoneally (10 µg DNA). At specific time points after administration, peritoneal wash was collected by injection of 3 ml PBS into peritoneal cavity. The levels of TNF-α and IL-12 (p70) in the peritoneal wash were determined by ELISA. (Fig. 2)

Antitumor effect of CpG DNA administration following tumor cell inoculation

Male C57BL/6 mice and male CDF1 mice were intraperitoneally injected B16-BL6Luc cells (5.0 × 10⁵ cells) or colon26Luc (1.0 × 10⁵ cells), respectively. Then, saline, CpG DNA, CpG DNA/lipoplex, and control DNA/lipoplex were intraperitoneally administered (10 µg DNA). At specific time points after administration, peritoneal wash was collected by injection of 3 ml PBS into peritoneal cavity. The levels of TNF-α and IL-12 (p70) in the peritoneal wash were determined by ELISA. Seven days after the inoculation, greater amount were excised and the effect of CpG DNA/lipoplex was evaluated by measuring the luciferase activity. (Fig. 3)

The survival of mice receiving intraperitoneal colon26Luc cells was also examined. (Fig. 4)

Production of TNF-α from peritoneal macrophages by treatment of CpG DNA

Resident peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of female ICR mice with ice-cold PBS. Cells were plated in the 24-well culture plate at a density of 4 × 10⁶/well. Seventy-two hours after, CpG DNA/lipoplex or CpG DNA/Man-lipoplex were diluted in 0.5 ml Opti-MEM. The cells were incubated with Opti-MEM containing lipoplex for 3 h, then, washed with PBS and incubated with Opti-MEM for 10 h. The supernatants were collected for ELISA to determine TNF-α. (Fig. 5)

Establishment of delivery system for immunostimulatory CpG DNA

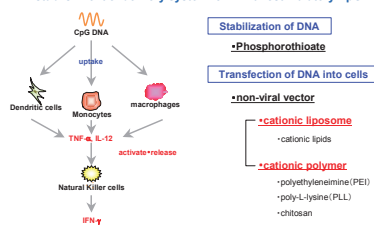
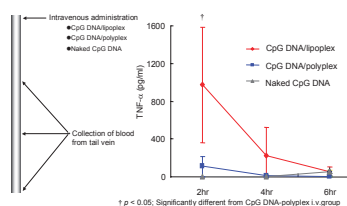


Fig.1 Production of TNF-α in serum by intravenous injection of CpG DNA/non-viral vectors complex



Enhancement of uptake of cationic liposomes into cells by mannoseylation

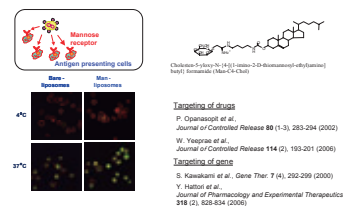


Fig.2 Production of Th1-type cytokines in peritoneal wash by intraperitoneal injection of CpG DNA/lipoplex

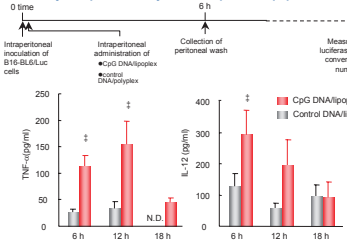


Fig.5 Production of TNF-α from peritoneal macrophages by CpG DNA/Man-lipoplex

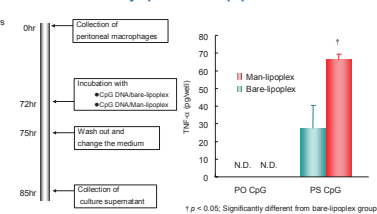


Fig.6 Production of Th1-type cytokines in serum by intravenous injection of CpG DNA/Man-lipoplex

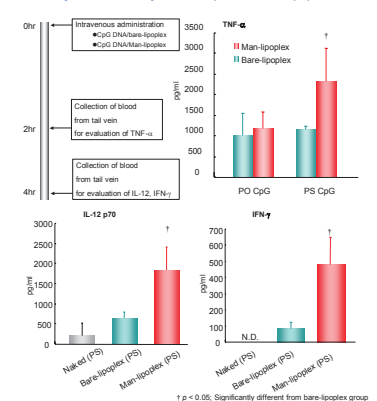


Fig.3 Antitumor effect of intraperitoneal injection of CpG DNA/lipoplex in peritoneal dissemination model

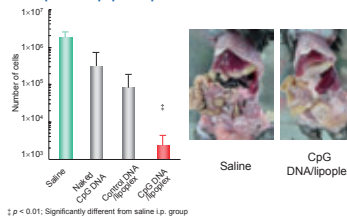
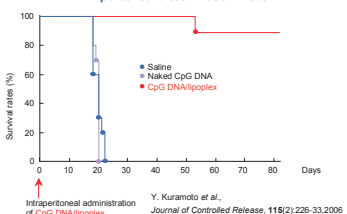


Fig.4 Prolongation of survival rates by CpG DNA/lipoplex in peritoneal dissemination model



Summary

●Formation of cationic liposome complex with CpG DNA (CpG DNA/lipoplex) enhanced immunostimulatory effect, and intraperitoneal administration of CpG DNA/lipoplex was able to inhibit peritoneal dissemination.

●Targeting of CpG DNA to the APCs by mannoseylated liposome induced more effective immunostimulation in vivo.



パーキンソン病治療薬プラミペキソールの神経保護作用機序の解明

(薬品作用解析学分野) 泉 安彦

研究指導主任 薬品作用解析学分野 教授 赤池 昭紀
研究指導協力者 生体機能解析学分野 教授 金子 周司



■ 研究内容

パーキンソン病は中脳黒質ドパミン作動性神経の選択的な変性・脱落を特徴とし、線条体のドパミン量減少が原因の錐体外路障害を主症状とする神経変性疾患である。現在までのところ病因は不明であり、進行を抑制する根治療法はなく、専らドパミン補充による対症療法のみである。近年、上市されたドパミンD₂受容体アゴニストであるパーキンソン病治療薬プラミペキソールは、臨床において神経変性の進行を抑制する可能性が報告されている。しかし、その神経保護作用機序についてはほとんど解明されておらず、その詳細な機序の解明はパーキンソン病の根治療法を目指した神経保護戦略に重要な知見を与えるものと考えられる。

また、パーキンソン病進行期において線条体のドパミン量減少が視床下核のグルタミン酸神経系を過剰興奮させることが知られている。視床下核のグルタミン酸神経は中脳黒質にも投射しており、パーキンソン病病態時には中脳黒質ドパミン神経はグルタミン酸により過度に刺激されていることが示唆される。グルタミン酸は興奮性神経伝達物質であるとともに、過剰な遊離は興奮性神経毒として細胞死を引き起こす。

そこで、本研究では、グルタミン酸長期間曝露を進行期のモデルと位置づけ、プラミペキソールの神経保護作用機序について解析する。実験にはラット胎仔より摘出、単離した中脳初代培養細胞を用い、ドパミン神経はマーカーとしてドパミン生合成酵素ドパミンβヒドロキシラーゼによる免疫細胞化学で同定する。我々はこれまでに中脳初代培養細胞でグルタミン酸により選択的ドパミン神経細胞死が惹起されることを見出し、さらにこの選択的ドパミン神経細胞死には内在性のドパミンが寄与することを示してきた。したがってプラミペキソールが内在性ドパミンに与える影響について検証する必要がある。神経伝達物質の詳細な解析や微量検出には、ラジオアイソトープを用いた検討が有効であると考えられる。細胞内および細胞外のドパミンを解析することは、神経変性疾患において重要な神経保護と神経伝達の両方を包括的に研究できる点で意義深い。プラミペキソールが内在性ドパミンを調節することで神経保護作用を発現することが明らかになれば、パーキンソン病において新たな治療法の手がかりになることが期待される。

Novel neuroprotective mechanisms of pramipexole, an anti-Parkinson drug, against glutamate-induced neurotoxicity

Yasuhiko Izumi

Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Abstract

Glutamate, one of the excitatory neurotransmitters, contributes to neuronal degeneration associated with Parkinson's disease. Several studies have demonstrated that pramipexole, a D₂-type dopamine agonist, exerts protective actions. In this study, we investigated the neuroprotective effect of pramipexole against glutamate-induced neurotoxicity. A 24-hr glutamate exposure in rat mesencephalic cultures selectively induced dopaminergic neuronal death. Treatment with pramipexole attenuated glutamate-induced neurotoxicity. The selective dopaminergic cell death caused by glutamate was also prevented by α -methyl-p-tyrosine, a tyrosine hydroxylase inhibitor. Pramipexole as well as α -methyl-p-tyrosine decreased intracellular dopamine content. These results suggest that pramipexole, at least in part, protects against glutamate toxicity by depletion of intracellular dopamine.

Introduction

Pramipexole, an aminobenzothiazole derivative dopamine D₂/D₃ receptor agonist, has been used to treat both early and advanced Parkinson disease (Fig. 1).

Human clinical trials demonstrated that a reduction in striatal dopaminergic nerve terminals was significantly lower in patients treated with pramipexole when compared with those treated with levodopa. Although it is suggested that pramipexole can abrogate the progression of neurodegeneration, the precise mechanism remains unknown.

Because glutamate-induced neurotoxicity is postulated to be involved in the continued degeneration of dopaminergic neurons, we investigated the effect of pramipexole against neurotoxicity caused by exposure of rat mesencephalic cultures to glutamate.

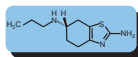


Fig. 1 Structure of pramipexole.

Experimental procedures

Primary mesencephalic cultures

The ventral mesencephalon was dissected from rat embryos and dissociated. Cells were plated at a density of 1.3×10^5 cells/cm² and maintained in Eagle's MEM containing fetal calf or horse serum.

Evaluation of neurotoxicity

Cultured cells were exposed to drugs for 24 hr at 9 days in vitro and incubated in drug-free medium for a further 48 hr. Cultures were processed for tyrosine hydroxylase (TH) and microtubule associated protein (MAP-2) immunocytochemistry. TH- and MAP-2-immunoreactive cells were identified as viable dopaminergic and non-dopaminergic neurons, respectively.

Measurement of dopamine content

Dopamine content was measured using high performance liquid chromatography. Treated cells were sonicated in extraction buffer and aliquots were analyzed with electrochemical detection at an oxidative potential of +750 mV.

Western blotting

Cells were harvested in lysis buffer. The lysate was separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The membrane was incubated with antibodies and detected by an ECL detection system.

Measurement of TH activity

TH activity was determined by measuring the amount of L-DOPA accumulated in the presence of carbidopa, an inhibitor of aromatic L-amino acid decarboxylase.

Measurement of vesicular dopamine uptake

Cultures were incubated with digitonin to selectively permeabilize the plasma membrane. Uptake was started by adding Mg-ATP and 50 nM [³H]dopamine. Radioactivity was measured by scintillation counting.

ESR spectrometry of dopamine-semiquinone radical

Dopamine-semiquinone radical was formed from dopamine (10 mM) by horseradish peroxidase and detected by electron spin resonance (ESR).

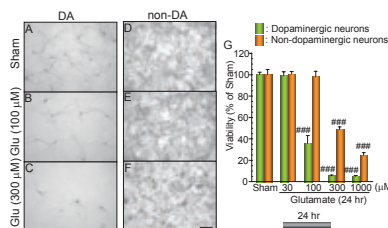


Fig. 2 Dopaminergic neurons (DA) are more vulnerable than non-dopaminergic neurons (non-DA) to chronic glutamate (Glu)-induced toxicity (A-F) Representative photographs of immunostained dopaminergic (A-C) and non-dopaminergic (D-F) neurons. (G) Neurotoxicity induced by glutamate in mesencephalic cultures. Cultures were exposed to 30-1000 μM glutamate for 24 hr. Bar = 200 μm. ### $p < 0.001$ vs. sham-treatment.

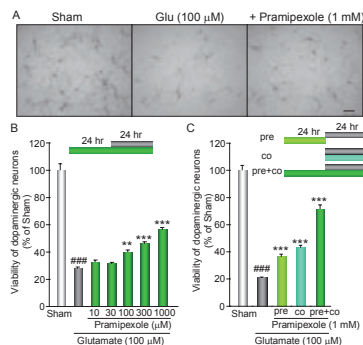


Fig. 3 A: Photographs showing protective effect of pramipexole on dopaminergic neurons against glutamate neurotoxicity. Bar = 200 μm. B-C: Protective effect of pramipexole on glutamate neurotoxicity is concentration-dependent (B) and enhanced by pre-incubation (C). Cultures were exposed to glutamate for 24 hr with or without pramipexole as indicated period. ### $p < 0.001$ vs. sham treatment. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. glutamate alone.

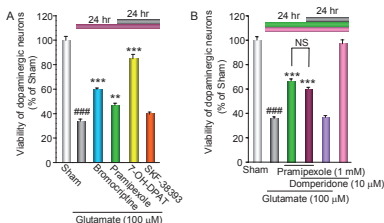


Fig. 4 Pramipexole-mediated dopaminergic neuroprotection is irrelevant to dopamine D₂-like receptor activation. (A) Effects of dopamine agonists on glutamate neurotoxicity. Dopamine agonists (100 μM) were applied for 24 hr before and 24 hr during glutamate exposure. (B) Effect of domperidone, a dopamine D₂ receptor antagonist, on neuroprotection of pramipexole. Domperidone (10 μM) was concomitantly applied with pramipexole (1 mM). ### $p < 0.001$ vs. sham treatment. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. glutamate alone.

Table 1 Comparison of binding affinity of dopamine agonists to dopamine receptor subtypes.

Ki (nM)	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
Bromocriptine ^a	>1000	3.3	5.0	18
Pramipexole ^a	>1000	6.9	0.9	15
7-OH-DPAT ^a	>1000	1.0	0.2	135
SKF-38393 ^b	68	>1000	>1000	>1000

^a Ki values are taken from Piercy et al. (1996)

^b Ki values are taken from Kraxner et al. (2000)

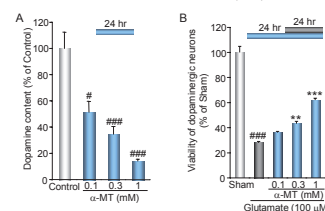


Fig. 5 Endogenous dopamine is involved in glutamate-induced neurotoxicity. (A) Effect of α-MT on dopamine content. Cultures were treated with α-methyl-p-tyrosine (α-MT; a tyrosine hydroxylase inhibitor) for 24 hr before and 24 hr during glutamate exposure. α-MT was applied for 24 hr before and 24 hr during glutamate exposure. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. sham-treatment. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. glutamate alone.

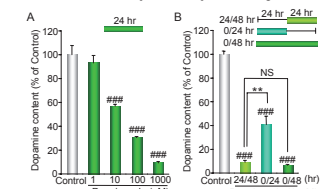


Fig. 6 Effect of pramipexole on dopamine content. (A) Concentration-dependent effect of pramipexole on dopamine content. Cultures were treated with various concentrations of pramipexole (1-1000 μM) for 24 hr. (B) Reversibility of reduction in dopamine content by pramipexole. Cultures were incubated with pramipexole (1 mM) for the indicated period. ### $p < 0.001$, vs. control. ** $p < 0.01$, NS, not significant.

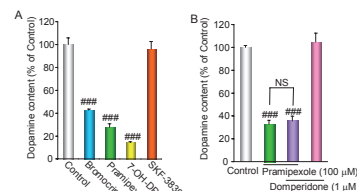


Fig. 7 Reduction of dopamine content by pramipexole is irrelevant to dopamine D₂-like receptor activation. (A) Effects of dopamine receptor agonists on dopamine content. Dopamine receptor agonists (100 μM) were added to culture medium for 24 hr. (B) Effect of domperidone on reduction of dopamine content by pramipexole. Domperidone (1 μM) was concomitantly applied with pramipexole (100 μM) for 24 hr. ### $p < 0.001$ vs. control. NS, not significant.

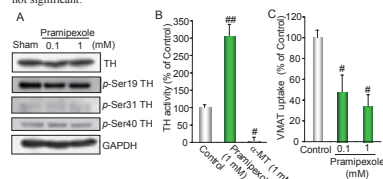


Fig. 8 Effects of pramipexole on dopamine synthesis and storage. (A) Representative blots of total and phosphorylated TH and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Cultures were treated with pramipexole (100 μM and 1 mM) for 24 hr. (B) Effect of pramipexole on TH activity. Cultures were incubated for 24 hr with pramipexole (1 mM) or α-MT (1 mM). (C) Effect of pramipexole on vesicular monoamine transport (VMAT). Digitonin-permeabilized cells were incubated with pramipexole (100-1000 μM) in the presence of [³H]dopamine for 30 min. [³H]dopamine uptake into permeabilized cells was determined by scintillation counting. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. control.

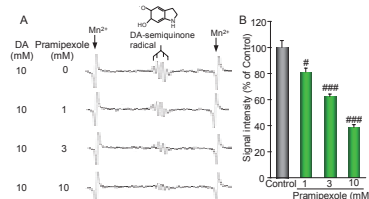
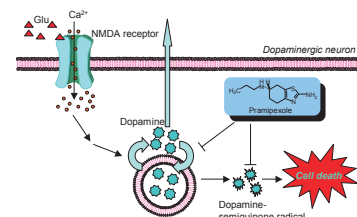


Fig. 9 Effect of pramipexole on dopamine (DA)-semiquinone radical formation. (A) Representative ESR spectra of DA-semiquinone spin adduct. DA was incubated for 2.5 min in the presence or absence of pramipexole. (B) Concentration-dependency of DA-semiquinone radical-scavenging activity of pramipexole. Signal intensity was presented as percentage of the second peak for DA-semiquinone radical spin adduct of DA alone. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. control.

Summary

- Pramipexole prevented glutamate neurotoxicity independently of dopamine receptor stimulation.
- Depletion of intracellular dopamine provided protection against glutamate neurotoxicity.
- Pramipexole decreased intracellular dopamine independently of dopamine receptor stimulation.
- Pramipexole did not depress dopamine synthesis, but interfered with dopamine storage.
- Pramipexole inhibited dopamine-semiquinone radical formation.

These results suggest that pramipexole protects against glutamate toxicity by depletion of intracellular dopamine.



分子イメージング法を用いた動脈硬化プラークの質的診断用放射性薬剤の開発

(病態機能分析学分野) 石野 誠悟

研究指導主任 病態機能分析学分野 教授 佐治 英郎

研究指導協力者 薬品動態制御学分野 教授 橋田 充



■ 研究内容

【背景・目的】

動脈硬化によって形成される不安定な動脈硬化プラークはその破裂、崩壊とそれに続く血栓形成により、心筋梗塞や脳梗塞などの虚血性疾患の主要な原因となっており、その不安定性を評価する診断法の確立が期待されている。したがって、動脈硬化プラークにおいて血管内皮細胞への炎症細胞の接着促進、マクロファージの泡沫化促進、平滑筋細胞のアポトーシスの誘導、コラーゲン線維の分解などその不安定化に多面的に関与し、プラークの形成や破綻過程で特異的に発現する酸化LDLスカベンジャー受容体、Lectin-like Oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) に着目し、このLOX-1の発現分布を可視化しうる『LOX-1の分子イメージング』に適した放射性薬剤を開発することにより、虚血性疾患の予測診断や薬物などの治療効果の定量的評価、治療方針の決定、動脈硬化治療薬の開発などにおいて有効なイメージング法を確立することを本研究の目的とし、以下の検討を行うこととした。

【方 法】

まずin vivoにおいてLOX-1が動脈硬化プラークの不安定性の評価を目的とした放射性薬剤の標的として妥当であるかについて検討を行うため、WHHLMIウサギ(動脈硬化モデル)の大動脈のパラフィン切片を用いた組織学的検討を行い、動脈硬化病変におけるLOX-1の発現とその組織学的特徴との関連性について明らかにした。次にその結果に基づいて、LOX-1を標的とした分子イメージング用放射性薬剤の開発を行うこととした。その母体分子としてはLOX-1に高い親和性を有する抗LOX-1抗体を選択し、この抗LOX-1抗体との結合に必要な部分と放射性核種を安定に結合するに必要な部分とを独立して同一分子内に有する『二官能性放射性薬剤』という概念の基に、新しいタイプの分子イメージング用放射性薬剤(^{99m}Tc標識抗LOX-1抗体)を設計・合成する。次に、WHHLMIウサギおよびコントロールウサギを用いたin vivo投与実験を行い、SPECTによる体外からの動脈硬化病変のイメージングの可能性について検討を行い、続いて投与後24時間後に大動脈を摘出し、その放射能集積量測定を行う。摘出した大動脈を凍結後、輪切切片を作製し、放射能分布を調

べるためのオートラジオグラフィー、組織学的特徴を検討するためのAzan-Mallory組織染色、HE染色、LOX-1、マクロファージ、平滑筋細胞に対する免疫染色をそれぞれ行うことにより、動脈硬化病変への放射能集積量とLOX-1の発現分布との関連性、およびその組織学的特徴との関連性について検討する。

【期待される結果】

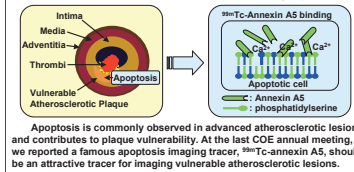
これまでの検討により、動脈硬化病変においてLOX-1の発現は組織学的な不安定性の指標としてのPlaque instability index (macrophages + extracellular lipid deposits / smooth muscle cells + collagen fibers) と正の相関を示したことを示し、LOX-1の放射性薬剤の標的としての妥当性を明らかにした。^{99m}Tc標識抗LOX-1抗体は二官能性キレート試薬としてのHydrazino-nicotinic acid (HYNIC) を用いることで、免疫活性を失うことなく合成できると考えられる。合成した^{99m}Tc標識抗LOX-1抗体のウサギ生体内放射能分布実験において、動脈硬化病変を有するWHHLMIウサギの大動脈はそのLOX-1の発現に起因してより高い放射能集積を示しうることから、動脈硬化病変のより鮮明なイメージング画像が得られることが期待でき、これにより体外から非侵襲的に動脈硬化プラークの不安定性の評価を行うにあたっての有用性を評価しうる。さらに、母体分子として抗LOX-1抗体を用いている点から、動脈硬化病変のLOX-1の発現に応じた放射能分布が期待でき、LOX-1が複合的に関与するより不安定な病変において特異的な放射能集積を示す可能性がある。さらに、WHHLMIウサギの動脈硬化病変をアメリカ心臓学会(AHA)の動脈硬化病変の分類に関する基準をもとに新生内膜病変、不安定性プラークを示すアテローム性病変、安定性プラークを示すフィブroadテローム性病変、コラーゲンリッチ病変と四分類し、各病変における放射能集積量について検討を加えることにより、その組織学的特徴と放射能集積量とのより詳細な関連性について調べることができると考える。以上の結果を総合的に捉えることにより、LOX-1を標的とした分子イメージング用放射性薬剤の有効性について評価できうる。

^{99m}Tc-anti-LOX-1 Antibody for Evaluating the Vulnerability of Atherosclerotic Lesions; Comparative Studies with ^{99m}Tc-Annexin A5

Patho-Functional Bioanalysis
D3 Seigo Ishino

Background-1

The spontaneous rupture of vulnerable atherosclerotic plaques and the subsequent formation of thrombi are currently recognized as the primary mechanism of myocardial and cerebral infarctions. Therefore, the detection of vulnerable plaques is clinically important.



Background-2

Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)

The implication in the atherosclerosis progression,
- superoxide formation,
- adhesion molecules expression induction,
- foam cell transformation,
- apoptosis induction,
- MMPs expression induction.

LOX-1 plays multiphasic roles in the formation of vulnerable atherosclerotic lesions.

LOX-1 could be a potential target of a radiotracer for evaluating the vulnerability of atherosclerotic lesions.
• We designed and prepared a LOX-1 imaging tracer, ^{99m}Tc-anti-LOX-1 monoclonal IgG (^{99m}Tc-anti-LOX-1 mAb).

Purpose

To evaluate the usefulness of ^{99m}Tc-anti-LOX-1 mAb as an atherosclerosis imaging tracer, in comparison with ^{99m}Tc-annexin A5.

We investigated...

- (1) Accumulation of these tracers in the atherosclerotic aorta,
- (2) Distribution of these tracers based on the different stages of atherosclerotic lesions.

using a rabbit model of spontaneous atherosclerosis (myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits; WHHLMI rabbits) which was relevant to human atherosclerosis.

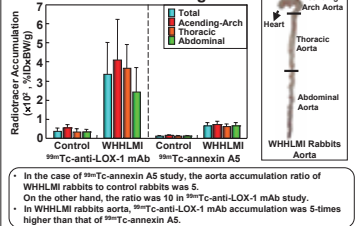
Methods-1

1. **Animal Model**
WHHLMI and control rabbits (n24/group) were used.
2. **Preparation of ^{99m}Tc-anti-LOX-1 mAb**
Anti-LOX-1 mAb was derivatized with HYNIC for ^{99m}Tc labeling.
(Radiochemical yield; > 35 %)
(Radiochemical purity; > 95 %)
3. **Preparation of ^{99m}Tc-annexin A5**
HYNIC derivatized annexin A5 was labeled with ^{99m}Tc using an annexin kit.
(Radiochemical yield; > 80 %)
(Radiochemical purity; > 98 %)

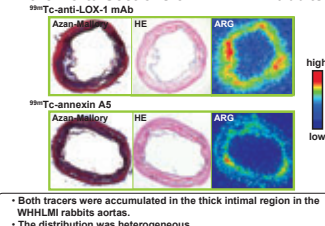
Methods-2

4. **Ex Vivo Biodistribution Study**
After the injection of ^{99m}Tc-anti-LOX-1 mAb or ^{99m}Tc-annexin A5, the radioactivity in tissues was determined by ex vivo tissue counting methods at 24 or 3 hours, respectively.
5. **Autoradiography (ARG)**
ARG was performed to determine the regional radioactivity accumulation in the aorta sections.
6. **Histological Studies**
Azan-Mallory and HE staining, and immunohistochemical staining for macrophages (RAM-11) and smooth muscle cells (1A4) were performed to determine histological characteristics using serial aorta sections.

Distribution of Each Radiotracer Accumulation in Aortic Segments



Distribution of Each Radiotracer in the Aorta Sections of WHHLMI Rabbits

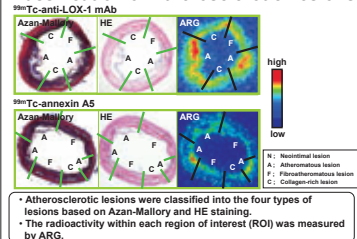


Classification of Atherosclerotic Lesions

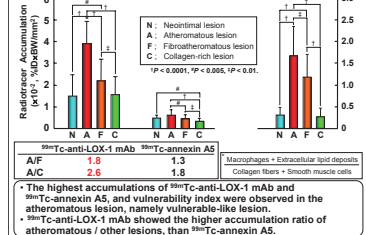
Atherosclerotic lesions in WHHLMI rabbits were divided into 4 categories based on the AHA classification scheme:

- N** Neointimal lesion (AHA Type I-III)
Thickening of intima consisted of mainly smooth muscle cells and few macrophages; early lesion
- A** Atheromatous lesion (Type IV)
Thin fibrous connective tissue and a dense accumulation of extracellular lipid and foam cells; vulnerable-like lesion
- F** Fibroatheromatous lesion (Type Va-Vb)
Lipid cores, separated by thick layers of fibromuscular connective tissue; relatively stable to rupture
- C** Collagen-rich lesion (Type Vc)
Predominantly collagenous component contained smooth muscle cells; stable lesion

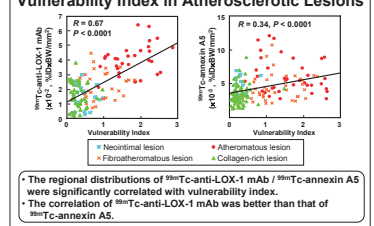
Classification of Atherosclerotic Lesions



Radiotracer Accumulation / Vulnerability Index in Each Atherosclerotic Lesions



Correlation between Tracer Accumulation and Vulnerability Index in Atherosclerotic Lesions



Summary

In comparison with ^{99m}Tc-annexin A5, the characteristics of ^{99m}Tc-anti-LOX-1 mAb were...

- 5-times higher accumulation into the atherosclerotic aorta segments,
- 1.5-times higher atheromatous-to-other lesions accumulation ratio, namely more specific accumulation into vulnerable lesions,
- better correlation of regional accumulation with vulnerability index.

^{99m}Tc-anti-LOX-1 mAb should be a potential tracer for predicting lesions prone to rupture and monitoring the effects of timely treatment in patients with advanced atherosclerosis.

Acknowledgment

We would like to thank...

Theseus Imaging Corporation for providing annexin kit,

Dr. Kume (Kyoto Univ.) for providing LOX-1-mAb,

Dr. Shiomi (Kobe Univ.) for providing WHHLMI rabbits.

DNAによる免疫応答誘導機構の解明

(病態情報薬学分野) 吉田 寛幸

研究指導主任 病態情報薬学分野 教授 高倉 喜信

研究指導協力者 ゲノム創薬科学分野 教授 辻本 豪三



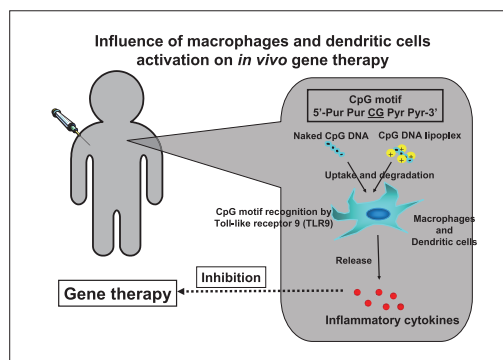
■ 研究内容

代表的な非ウイルスベクターであるプラスミドDNA (pDNA) は、安全性・生産性の観点から遺伝子治療を実現する上で有用なベクターになるものと期待されている。しかしながら、pDNAには細菌由来DNAに特徴的な非メチル化 CpG 配列 (CpG モチーフ) が多数存在し、これがマクロファージ (MΦ) や樹状細胞に Toll-like receptor-9 (TLR9) を介して危険信号として認識されることで、炎症性サイトカイン産生などの免疫活性化反応を惹起することが報告されている。当研究室ではこれまでに、CpG モチーフが多い pDNA をマウスに静脈内投与すると、その大部分が肝臓や脾臓などの組織に集積し、血中炎症性サイトカインレベルが上昇することを報告した。CpG モチーフが非常に少ない子ウシ胸腺 (CT) DNA の投与では炎症性サイトカインの産生は認められず、CpG モチーフを認識する TLR9 が DNA に対する免疫応答において重要な役割を担うことが示唆された。一方、マウスから単離・培養した腹腔 MΦ を用いた pDNA の取り込みおよび分解特性、免疫活性化機構に関する検討においては、pDNA 単独では CpG モチーフが存在するにも関わらず炎症性サイトカインがほとんど産生されないという興味深い現象を見出した。しかしながら、カチオン性リポソームとの複合体 (lipoplex) とした場合には、pDNA だけでなく CT DNA に対しても炎症性サイトカインが産生されること

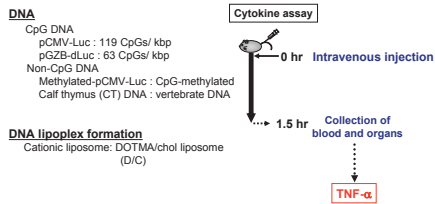
も明らかになった。さらに、この活性化は、lipoplex を形成するリポソームの種類によって大きく異なることも見出している。以上のように、マウスに静脈内投与した場合と培養腹腔 MΦ に添加した場合では、pDNA に対する反応性が大きく異なっていることが明らかとなった。その一因として腹腔 MΦ とその他の MΦ 系細胞とで DNA に対する反応性が違う可能性が挙げられる。静脈内投与した pDNA はおもに肝臓や脾臓に集積することから、静脈内投与の場合には肝 Kupffer 細胞や脾臓 MΦ の反応性が重要と考えられる。そこで本研究では、腹腔 MΦ に加えてマウスの脾臓、肝臓、腎臓から MΦ を含む細胞を単離・培養し、各細胞の DNA に対する免疫応答を炎症性サイトカイン産生を指標に検討する。また、lipoplex では CpG モチーフに非特異的な反応が認められたことから、TLR9 非依存的な細胞活性化機構の存在が考えられる。そこで TLR9 ノックアウトを用いて、個体、及び初代培養細胞の lipoplex による活性化を行い、DNA に対する免疫応答における TLR9 の関与を明らかにする。また DNA 処理を行なった各種細胞から mRNA を抽出、逆転写することで cDNA を調製し、TLR9 をはじめとする DNA 取り込みや分解、炎症性サイトカイン産生に関わるタンパク質群の発現変動についても検討を行い、DNA による免疫応答誘導機構の解明を図る。

Cytokine Secretion Profiles in Primary Cultured Cells and in Mice Stimulated with Plasmid DNA

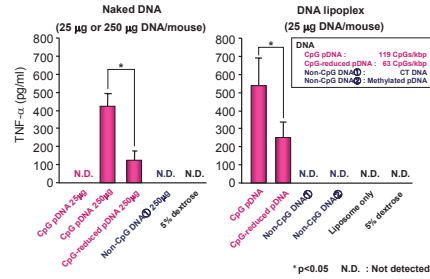
Hiroyuki Yoshida, Makiya Nishikawa
and Yoshinobu Takakura
Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism



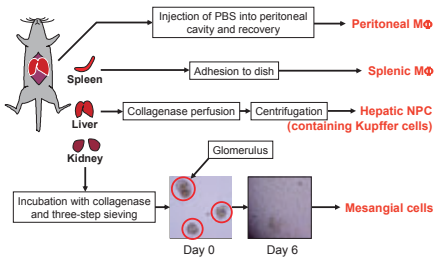
Materials and methods in vivo study



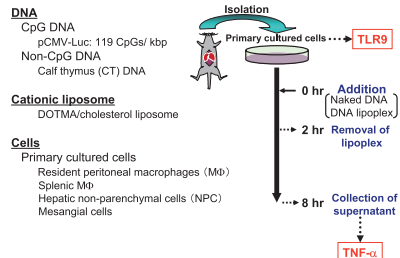
TNF- α level in mouse serum after intravenous injection of naked DNA and DNA lipoplex



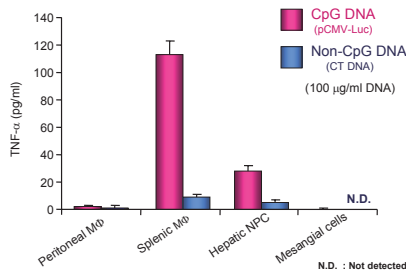
Isolation procedures of primary cultured cells



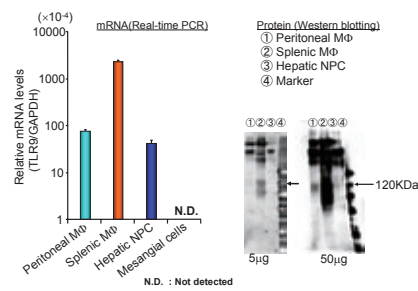
Materials and methods in vitro study



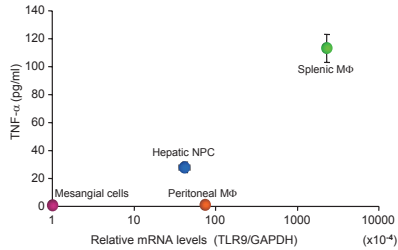
TNF- α secretion from primary cultured cells induced by naked DNA



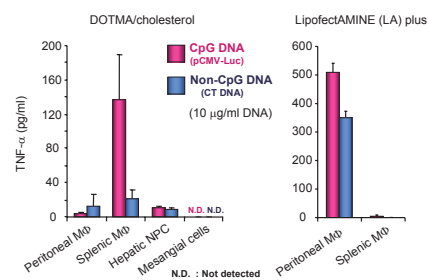
TLR9 expression in various cells



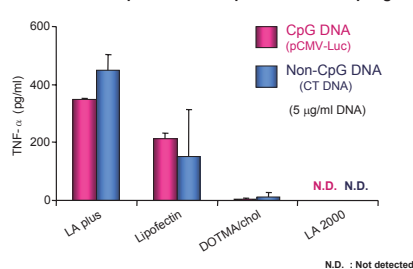
Correlation between TLR9 mRNA expression and TNF- α secretion induced by naked CpG DNA in primary cultured cells



TNF- α secretion from primary cultured cells induced by DNA lipoplex



Cytokine release induced by DNA complexed with various cationic liposomes from peritoneal macrophages



Conclusions

- Intravenous injection of either naked DNA or DNA lipoplex into mice induced TNF- α production dependently on the amount of CpG motifs.
- Splenic macrophages and hepatic non-parenchymal cells released TNF- α stimulated with naked CpG DNA.
- Peritoneal resident macrophages showed abnormal response to naked DNA and DNA lipoplex.

●国内インターンシップ感想文1

2006年7月24日から9月1日の間、間にお盆休みを1週間頂いて合計5週間、P社中央研究所でインターンシップをさせていただきました。

住居は知多半田駅周辺。研究所のある知多武豊駅からは3駅離れた、お酢の香りのする栄えた町でした。通勤はそこから電車で知多武豊駅まで行き、その後、会社のシャトルバスに乗り込んで10分で研究所に到着です。通勤では私が配属された同じ部署で働いている人たちと一緒にすることが多く、仲良くさせていただき、色々なお話を聞かせていただきました。

具体的な生活はどのようなものだったかというと、朝は7時半起きで、軽くランニングをし、朝ご飯を食べて出勤。会社が終わリ、スーパーマーケットで夕食の材料を買い、家に着くと夜の7時。それから就寝までの3時間で夕食を作り、食べ、その日会社で学んだことを復習し、充実感と共に就寝し次の日のために備えるという生活でした。本当にあっという間に過ぎていきました。

中央研究所での仕事は朝9時から始まり、夕方6時まで、非常に濃密で充実した時間を過ごさせていただきました。研究所内はこれまで大学での研究生活しか知らない私にとって新鮮な驚きに満ちていました。凄い、と感じたところは多くてとても書き切れませんが、中でも、研究所全体が人を大事にしているのが感じられたのがとても素敵でした。他人を尊敬し意見を尊重する風潮が、アイデアに溢れた、磨き抜かれた研究所運営・創薬研究戦略にも繋がっているのではないかと感じました。ポッとやってきたインターンシップ生も大事にしていただいて会社の方々には本当に感謝しています。この機会を与えて下さった方々、本当にありがとうございました。

(山内陽介)



●国内インターンシップ感想文2

インターンシップに参加させて頂き、大変ありがとうございました。自分にとって今回の研修での一番の収穫は、T社研究所のアクティブな研究者に直接触れることができたことです。創薬現場におられる様々な研究者と、研究道に対する姿勢や考え方について直接話させて頂いた経験は、将来の自分の研究者像を模索する上で非常に有意義でした。また、自分の専門領域について討論して頂くことで、その領域に対し企業が現在求めている知識や技能を具体的に知ることができ、更に、大学の研究室では機会の少ない「創薬」の観点から自分の研究を見つめ直すことができ、自分に欠けていた角度からの視点を身につけることができました。その一方で研究の進め方、条件設定や問題解決のアプローチ方法は、大学での研究と比較して本質的に大差なく感じ、その点では今までと変わらない大学で研究を進めていくことが将来必ず役立つと考えられ安心しました。

また、「創薬」において自分の位置付けや活かすべき場所が理解できたこと、すなわち探索研究の存在とその役割を把握できたことが大きな収穫です。大学では様々な学問（薬理、合成、動態、物性等）が独立して存在しているのに対し、探索研究では、すべての学問を総合的に応用した実学として薬学の全知識を活かすことができ、それでいて、新しい創薬標的を創成することができる非常に魅力溢れる部署であることが分かり、大変興味が引き立てられました。

今回得た貴重な経験に基づき、大学での研究を今まで通り遂行すると共に、自分の研究に対して、創薬としての価値や、自分の専門である薬理学以外の動態や合成などを合わせて多角的に考察できるよう、より勉強に精進し、将来は探索研究者を目指したいと思います。本研修を通じて、自分の夢である創薬研究者に向けて一歩前進することができました。大変ありがとうございました。

(中尾賢治)



●海外インターンシップ感想文

大学院博士課程の最終年度にあたり学位審査に向けた研究発表と論文作製を終了し、今回の米国でのインターンシップ研修の機会を与えていただきました（平成19年3月1～9日）。この春からアメリカ合衆国でのポストドク研究員として活躍の場を模索している時期でしたので、短期間ではありましたが非常に有意義な経験になりました。

3月1日朝に成田空港を発ち、まだまだ真冬の様子の子ニューヨークJFK空港に到着しました。地下鉄と電車を乗り継ぎ、Piscataway市にあるニュージャージー州立大学医学部（UMDNJ）の生理学教室に向かいました。そこには現在所属する生体分子認識学分野（竹島教授）との共同研究が行われているJianjie Ma教授の研究室があり、4日間に渡り研究成果に関する打ち合わせと共に筋細胞の生理学実験の研修が主な目的でした。博士課程で手掛けたcaluminと命名した新規小胞体タンパク質が、小胞体のCa²⁺含量の低下とともに誘導される容量依存性Ca²⁺流入（SOCE）機構に関与するという成果に対して、Ma研究室の方々に注目してもらいました。成果発表の後、数名の教室員の先生方から様々な意見をいただき、手掛けている研究がまだまだ不完全な研究段階であることについて再認識させられました。特に、caluminのSOCE機構への関与を示すデータが胎児性繊維芽細胞のみでの実験であり、筋細胞系での実験を計画する必要性を指摘されたことが印象に残り、わずかに残された時間内に少しでも研究を進めたいと考えています。また、Dr. Noa WislederとDr. Zui Panより、マウスの足よりFDB骨格筋細胞を酵素処理により単離し、小胞体Ca²⁺放出の基本要素であるCa²⁺ sparkの測定や膜電位固定による膜電流測定の実験を行い、得られた生データを統計解析する方法を教えてくださいました。博士課程での研究は主に生化学的な実験手法によるものでしたので、Ma研究室で行われている生理学実験は新鮮で、その貴重な経験を今後手掛ける研究に有効活用したいと考えております。

ニュージャージー州は米国内でも有数の製薬企業研究所が置かれていることでも有名です。Piscataway市にはJohnson & Johnsonの研究所があり、3月3日には循環器系などの筋細胞薬理学の実験グループの見学をMa教授にアレンジしていただきました。写真から雰囲気は伝わるように研究所はモダンな近代建築であり、内部に入ると幾重にも手洗い、エアシャワー、着替えが実践されている製薬会社の徹底的な衛生管理には呆れるばかりでした。具体的な疾患ターゲットと研究内容の詳細などは教えていただけませんでしたが、薬物スクリーニングに関する大型機器が散在している有様は、これまで見たこともない実験室で、アカデミック研究環境との大きな違いに驚かされました。

3月5日から3日間に渡り、Baltimoreで行われたいた米国生物物理学会年会に出席しました。80以上のシンポジウム、3000以上のポスター発表が企画されており、約7000人の参加者を集める学会の規模に圧倒されました。博士課程での研究課題に関連する小胞体やCa²⁺シグナル研究領域においても、ノーベル賞受賞者や米国アカデ

ミー会員など著名な研究者の講演が多く企画されており、極めて印象的でした。写真に示すように、7日には博士論文の成果をポスター発表し、学会最終日にもかかわらず多数の研究者に訪れ、その質問やコメントへの対応に追われました。また、学会参加期間中およびその終了直後には、ポストドク研究員として応募している研究室のボスによるインタビューもあり、気の抜けない状況が続きました。

今回の渡米の機会で、生物学研究を行う上での共通言語としての英語の重要性を痛感させられました。自分自身の研究成果を正確に伝え、相手の実験データやその目的を理解して、有意義な議論を行えるようになる必要性が自覚できました。また、所属教室内のみでの意見交換でまとめられた学位論文の成果をさらに発展させるためには、研究分野の多少異なる研究者との意見交換の重要性も理解させられました。博士課程終了後は、渡米してポストドク研究員として、細胞生物学的研究の研鑽を継続する予定です。今後の発展を目指して、これらの貴重な体験を有意義に活用したいと考えております。“魅力ある大学院教育イニシアティブ”からは、博士課程の研究遂行にて部分的にサポートをいただき、さらに渡米による短期研修の機会も与えていただきました。京都大学薬学部の“生命・化学情報に基づく融合創薬研究養成”に尽力されている先生方に対して、この場を借りまして御礼申し上げます。

（張 焱）

