

ERATO「袖岡生細胞分子化学」プロジェクト 追跡評価報告書

総合所見

本プロジェクトでは、細胞死、特にネクローシスの仕組みを分子レベルで解明することを目指し、細胞死を制御する低分子の開発、細胞内における標的タンパク質の同定を可能とする新たな化学的研究手法の開発、ラマン顕微鏡の高感度化と生細胞内での特定分子追跡を可能とするアルキンタグラマンイメージング (ATRI) 技術の開発等に成功した。本プロジェクト終了後も発展的に研究は継続され、新たな画期的な成果を生み出しており、研究成果の発展状況や活用状況は極めて高く評価できる。

袖岡は本プロジェクト終了後も細胞死研究を継続し、複数の研究プロジェクトを統括または参画することで技術開発を進展させ、グループリーダーの藤田はラマン分光を利用した細胞イメージング技術の応用研究を進めている。本プロジェクトの研究成果の発展例としては、ネクローシスを抑制する新しいタイプの阻害剤であるインドリルマレイミド (IM) 誘導体の構造展開による虚血再灌流障害を著しく抑制する化合物の創出、新規の光親和性標識プローブとして高い選択性を示す標的タンパク質ラベル化法の開発、アルキンラマンイメージング法の応用拡大、構造化照明法を用いて解像度を向上させたラマン散乱顕微鏡の開発、トリフルオロメチル化反応のペルフルオロアルキル化反応への拡張、などが挙げられる。

本プロジェクト開始時にはアポトーシス以外の細胞死の分子レベルにおける仕組みの多くは未解明であったが、IM 誘導体が酸化ストレスにより誘導される細胞死を阻害することを、ネクロプトーシスおよびフェロトーシスの報告に先立って見出しており、化合物ベースで制御された細胞死 (Regulated cell death: RCD) を研究する先駆けとなり、その新概念構築に貢献した。IM 誘導体は研究試薬としても市販され、生化学者による細胞死の様式検証に広く使われている。無標識ラマンイメージングは蛍光標識に代わる新しいイメージング法として注目を集めており、それに関する論文数は世界的に着実に増加している。本プロジェクトで開発された、標的タンパク質の同定技術、ラマン散乱顕微鏡は、従来技術では解明困難であった、様々な生命科学の命題の解明を可能にする技術であり、生命科学の発展に大きく貢献すると期待され、その波及効果も高い。

本プロジェクトおよび発展研究から得られた成果には、社会的・経済的波及効果も期待できる。本プロジェクト終了後も構造展開が続いている IM 誘導体は、虚血性心疾患の新しい治療法の開発などに繋がる可能性もある。また、新たに開発されたトリフルオロメチル化やペルフルオロアルキル化反応は、医薬品や農薬開発において化合物の資質を向上する手段として応用が期待される。標識などの前処理を必要としない非侵襲的なバイオイメージング技術は、生命活動をリアルに可視化する非常に有用な技術であり、臨床診断ツールとしての展開も期待される。現在、藤田以外にも多くの研究者がラマンイメージングの改良に取り

組んでおり、その動きは産業界にも波及している。

本プロジェクトに参加した研究者のキャリア形成に関しては、多くの若手研究者が助教、講師、准教授に採用されており、若手研究者の育成にも貢献がみられる。本プロジェクト全体を通して、有機化学、生化学、物理学などの異分野のバックグラウンドを持つ研究者が参加することで融合研究が進み、これまでの生物学的アプローチのみでは困難であった細胞死制御機構の解明に向けて、大きな成果をあげている。

1. 研究成果の発展状況や活用状況

本プロジェクトでは、細胞死、特にネクローシスの仕組みを分子レベルで解明することを目指し、細胞死を制御する低分子の開発、細胞内における標的タンパク質の同定を可能とする新たな化学的研究手法の開発、ラマン顕微鏡の高感度化と生細胞内での特定分子追跡を可能とする ATRI 技術の開発等に成功した。

袖岡は本プロジェクト終了後も、科研費新学術領域（研究領域提案型）「細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明」における計画研究「細胞死制御化合物の開発と応用」で研究代表者として細胞死研究を継続し、AMED-CREST「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」研究領域の「生理活性代謝物と標的タンパク質同定のための基盤技術の創出」研究課題で研究代表者として技術開発を進展させた。グループリーダーの鬮鬮（どど）と藤田は、それぞれ前者と後者の共同研究者を務めた。藤田はさらに、CREST「多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出」研究領域の研究課題「多細胞の包括的分子イメージング技術基盤の構築」で研究代表者として、細胞イメージング技術の応用研究を進めており、袖岡はその共同研究者として参画している。これらによりプロジェクトの成果は以下に示すさらなる発展を遂げている。

酸化ストレスによる細胞死に関する研究では、ネクローシスを抑制する新しいタイプの阻害剤である IM-54 の構造展開により、高活性・高水溶性の化合物 IM-17 がラット虚血性心疾患モデルで虚血再灌流による不整脈や突然死を著しく抑制する効果を示した。さらにフェロトーシスやネトーシスに過酸化脂質が関与し、化合物 IM-93 がこの両者を抑制することを明示した。

標的タンパク質ラベル化に関する研究では、新規の光親和性標識プローブとして高い選択性を示す 2-チエニル置換型 α -ケトアミドを開発した。さらに、プロジェクト期間中に開発した Alkyne-tag Raman Screening (ATRAs) 法を大きく発展させ、生理活性物質と標的タンパク質との結合サイトを分析する新たな手法として SERS-ATRAs 法を発表した。

ラマンイメージングに関する研究では、プロジェクト期間中に開発した ATRI 法の応用を拡大し、人工脂質膜中のアルキン標識スフィンゴミエリンの分布観察や植物病原菌の感染因子であるコロナチンの作用機序の解明に成功した。藤田は新たに構造化照明法を用いたラマン散乱顕微鏡を開発して解像度を向上させると共に、他研究者との共同研究により、幹細胞分化のプロセスや免疫細胞の活性化、さらに正常細胞とがん細胞との違いを無標識ラ

マンイメーシングで観察することに成功した。

トリフルオロメチル化反応の発展では、ペルフルオロアルキル化反応に拡張され、安価で工業的に利用可能なペルフルオロアルキル化試薬を用いた反応が開発された。

生理活性物質合成研究では、メチル基の代わりにプロパルギル基を基質タンパク質に導入するプローブとして ProSeAM を用いるメチル化酵素ならびにその基質タンパク質の解析法を開発し、新規なタンパク質メチル化酵素阻害剤を見出した。

このようにプロジェクト終了後も発展的に研究は継続され、新たな画期的な成果を生み出しており、研究成果の発展状況や活用状況は極めて高く評価できる。

2. 研究成果から生み出された科学的・技術的および社会的・経済的な波及効果

(1) 研究成果の科学的・技術的観点からの貢献

本プロジェクト開始時にはアポトーシス以外の細胞死の分子レベルにおける仕組みの多くは未解明であったが、IM 誘導体が酸化ストレスにより誘導される細胞死を阻害することを、ネクロプトーシスおよびフェロトーシスの報告に先立って見出しており、化合物ベースで制御された細胞死 (Regulated cell death: RCD) を研究する先駆けとなり、その新概念構築に貢献した。ネクローシス抑制剤である IM-54 は研究試薬としても市販され、生化学者による細胞死の様式検証に広く使われており、今後、細胞死に関する生化学的研究が進み、様々な発見につながると期待される。例えば Li らは、メタンフェタミンの乱用者で頻繁に発生する心血管虚脱に関連する突然死が、脳幹の血圧維持に関与する吻側延髄膜外側部の機能喪失によることを示すために、IM-54 を酸化ストレス誘発壊死性細胞死阻害剤として使用している。

さらに本プロジェクトにおける特記すべき科学技術として、ラマン散乱を利用したバイオイメーシング技術があげられる。無標識ラマンイメーシングは蛍光標識に代わる新しいイメーシング法として注目を集めており、それに関する論文数は世界的に着実に増加している。本技術は Science 誌の Technology Future (2018 年 3 月) の中でも取り上げられており、本研究成果が国際的に高い水準にあることを示している。また、低分子のアルキンを標識基とする ATRI 法も、蛍光標識に代わる生理活性化合物の細胞内局在性可視技術として汎用されている。本法は、タグサイズが小さいことから、蛍光イメーシングよりも標識分子への影響が少ないことが特徴である。前述の植物病原菌感染因子コロナチンのイメーシングはアルキンタグを用いることで初めて成功した。多くの研究者が ATRI 法による生物活性物質などのイメーシングに成功し、その実用性を実証している。例えば、El-Mashtoly らは分子標的薬である抗がん剤エルロチニブがアルキンを含有することに着目し、共焦点ラマン顕微鏡で、大腸癌細胞におけるエルロチニブが細胞膜の EGFR タンパク質に局在することを見出した。

本プロジェクトで開発された、標的タンパク質の同定技術、ラマン散乱顕微鏡は、従来の技術では解明困難であった、様々な生命科学の命題の解明を可能にする技術であり、生命科

学の発展に大きく貢献すると期待され、その波及効果も極めて高い。

(2) 研究成果の社会的・経済的観点からの貢献

狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患を含む心疾患は、日本人の死因でがんが続く第2位となっている（平成28年）。その治療の際、虚血再灌流障害が大きな問題となっているが、血流が再開した際に大量に発生する活性酸素種により、ネクローシス様の細胞死が誘導されることが要因と推測されている。本プロジェクトで発見され、その後も構造展開が続いている IM 誘導体は、過酸化脂質で誘導されるフェルトーシスやネトーシスを抑制すること、さらにラット疾患モデルで不整脈の発生を抑制することが示されており、虚血性心疾患の新しい治療法の開発に繋がる可能性がある。また、新たに開発されたトリフルオロメチル化やペルフルオロアルキル化反応は、多大な注目を集めている。ペルフルオロアルキル基は、フッ素原子の特性に基づく性質を化合物に付与できることから、医薬品や農薬開発において化合物の資質を向上する官能基として重要である。これらの医薬品への応用が期待される技術に関しては、社会実装に繋がるにはさらに長い年月が必要であると考えられるが、このような技術開発なしには新しい創薬の概念は生まれてこないことから、社会実装に向けた技術としても非常に意義のある研究成果である。

標識などの前処理を必要としない非侵襲的なバイオイメーキング技術は、生命活動をリアルに可視化する非常に有用な技術である。本プロジェクト以前はラマン散乱を利用するイメージング技術のライフサイエンスへの応用は限定的であったが、藤田が開発したスリット走査型ラマン顕微鏡は、観測時間の短縮化と光学系の高精度化を実現し、生物学の研究者にラマンイメージングの有用性を認識させた。この技術を用いた正常細胞と癌細胞の識別、ミトコンドリア機能障害の有無の識別にも成功しており、ラマン計測は臨床診断ツールとしての展開も期待される。現在、藤田以外にも多くの研究者がラマンイメージングの改良に取り組んでおり、その動きは産業界にも波及している。本法は従来の蛍光イメージングでは困難であった、様々な生物活性化合物の作用機構の解明を可能にすると期待される。これらの作用機構解明は、医療、創薬分野、さらには植物における生物活性化合物の作用機構解明による、食料問題の解決など非常に広範囲な分野での成果につながる事が予想され、その社会的・経済的な効果は計り知れない。

(3) その他の特記すべき波及効果

袖岡は本プロジェクトの終了後も、細胞死やケミカルバイオロジー関連の多くの学会で重要な役割を果たしている。また、「遷移金属触媒反応の開発と含フッ素化合物合成への展開」が評価され2016年度の有機合成化学協会賞（学術的）を受賞した。さらに、有機化学分野において高い功績を挙げた研究者に与えられる Arthur C. Scholar Award を2017年に American Chemical Society から授与された。2019年度からは JST の ACT-X プログラム「生命と化学」研究領域の研究総括を務め、採択した若手研究者を指導している。藤田は2018

年10月に大阪大学大学院工学研究科教授に昇任した。また、Co-ChairmanとしてBiomedical Raman Imaging 2019を主催するなど、国内外でラマンイメージング研究をリードする存在となっている。プロジェクトに参加した研究者のキャリア形成に関しては、十数名の若手研究者が助教、講師、准教授に採用されており、若手研究者の育成にも貢献がみられる。

本プロジェクト全体を通して、有機化学、生化学、物理学などの異分野のバックグラウンドを持つ研究者が参加することで融合研究が進み、これまでの生物学的アプローチのみでは困難であった細胞死制御機構の解明に向けて、大きな成果をあげている。

3. その他

日本は画像診断において優れた技術を有する上、近年実用化が進んでいる人工知能を利用した解析でも、そのトップレベルでしのぎを削っている。ラマンイメージングが新たな診断法の開発に繋がる可能性もあるため、今後はデバイスや機器の開発に向けて臨床研究者や産業界との連携を進め、将来「ラマン診断」において日本が最先端を走る時代の到来を期待する。