

# 末松ガスバイオロジープロジェクト 24 年度研究概要

研究総括 末松 誠

## 1. 研究進捗状況

プロジェクト 4 年目の人事としては、末松研究総括の下、4 月に研究員 1 名、技術員 2 名を採用し、ケミカルバイオロジーコアグループ 5 名、バイオイメージングコアグループ 4 名、メディカルアプリケーションコアグループ 6 名 (研究員 1 名; Johns Hopkins University へ派遣。研究員 1 名; 技術参事兼任) の体制で研究を実施した。(各グループの人員数は何れもグループリーダーを含む)

**ケミカルバイオロジーコアグループ**は、昨年引き続きガス応答性タンパク質の包括的解析のために、独自のナノアフィニティビーズを用いたタンパク質精製技術を駆使して、ガス分子によって制御されると考えられるタンパク質の取得を試み、約 200 種以上の同定に成功している。これらの中で、解糖系に働く酵素 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に着目して解析を行い、CO ガスがヘム/GAPDH の複合体形成を安定化し、この酵素活性を阻害することを明らかにした。また、このような CO ガスによる GAPDH の応答により、NO ガスによる GAPDH の酸化修飾を顕著に阻害して細胞保護作用を示す事を新たに見出した。このような CO ガスによる GAPDH の機能制御に関する分子構造変換様式を検証するために、**北海道大学理学部の石森浩一郎教授**との共同研究による共鳴ラマン分析および電子スピン共鳴 (EPR) 解析を行い、GAPDH のヘム/CO 配位には、GAPDH 中の酵素活性中心であり NO ガスなどの酸化修飾を受けて機能制御される残基である Cys152 が必須の働きをしていることが明らかにした。また、膜タンパク質である新規ヘム結合性タンパク質を同定している。我々はこのタンパクを介したコレステロールや遊離脂肪酸などの脂質の輸送に関わる事を新たに見出しており、CO ガスがこのような機能を阻害することを明らかにしている (**特願 2011-263015**)。現在、**京都大学の小林拓也准教授**との共同研究による X 線結晶構造解析に成功しており、新たなヘム配位構造および CO ガス応答性を明らかにした。更に、現在、上記のような知見を基盤として、これらのガス応答性タンパク質の遺伝子改変動物を作製し、in vivo モデルの評価系の構築を試みた。

メタボローム解析の結果から CO ガスが transsulfuration pathway の抑制作用があることに着目し、当該代謝系の律速酵素にあたるヘム含有タンパク質 cystathionine  $\beta$  synthase (CBS) が CO ガスにより阻害され、NO ガスでは阻害されない CO ガス特異的な受容体のひとつであることを見出している。この分子機構の解析を行い、CO ガスによる CBS の阻害は含硫アミノ酸プールの増加をもたらし、細胞内の DNA やタンパク質等へのメチル基転移反応の活性変化を引き起こすことを発見した。

**バイオイメージングコアグループ**は、昨年度までに「**定量的質量分析イメージング**」という新規の解析法の構築に成功している (下記の図参照)。平成 24 年度は本技術を武器として、CO ガス産生酵素である heme oxygenase-2 (HO-2) の欠損マウスを用い、左中大脳動脈閉塞による偏在性脳虚血モデルを作成し、部位特異的に惹起される CO ガス感受性の低分子代謝物リモデリングを野生型と比較検討した。その結果、虚血 60 分という急性期の患側脳では、ATP 濃度で規定される虚血コアの領域が、HO-2 欠損マウスで増加することが判明した。さらに、健常側においても、HO-2 欠損マウスでは、ADP, AMP, 乳酸が増加し、ATP は減少することが判明した。従来の方法では困難であった超急性期の虚血病態で惹起される代謝変動を、複数の代謝物の量的変化を指標として、しかも領域特異的に検証することが可能となった。また、一昨年度導入した自動波長チューニング式の**フェムト秒チタンサファイヤレーザー搭載型多光子生体顕微鏡システム**を活用し、脳実質深部の微小循環動態を高時間分解能での real-time 解析を行った。これらの結果から、HO-2/CO 系は、虚血に対して鋭敏に反応し、保護的な役割を担う可能性が示唆された。さきがけ研究代表者である杉浦悠毅博士との共同研究により、脳エネルギー代謝の根幹である glucose metabolism を解析するため、 $^{13}\text{C}$ -full-label glucose を用いた fluxome を、モデルマウスを用いて施行し、虚血時に時間・領域特異的に惹起される代謝のリモデリングを、取り込まれた glucose がどんな代謝経路を辿って何に変換・利用されるかを検証する実験系を立ち上げた。

H<sub>2</sub>S ガスは NO ガス、CO ガス、に続き、第三のガス状メディエーターとして着目されているが、生体内の H<sub>2</sub>S ガスの生産量は、その定量法が確立していないので不明であった。平成 24 年度は H<sub>2</sub>S 特異的な反応により二次的に生成される低分子を [超高速三連四重極型 LC/MS/MS 質量分析装置 \(LCMS-8030\)](#) を駆使して定量化することで、内因性 H<sub>2</sub>S ガスの生体内濃度の定量化に成功した。

**富士フィルム社**との共同研究では、ナノ微細凹凸構造の上に金を蒸着する新規の金属ナノ粒子の配列技術を用い、高い S/N 比を有する表面増強ラマン散乱 (SERS) 基板の開発およびその基板を用いたラマンイメージングに成功した。バイオイメージンググループでは、本デバイス (GNC) を生体サンプルに応用し、ラマン顕微鏡を用いて GNC 基板の基板側から計測した表面増強ラマン散乱スペクトルを測定し、「虚血コア」の部分に特異的な adenylate に由来する振動分光学的信号の検出に成功した。更に、がん細胞を転移させたマウス肝臓の組織切片を GNC 基板に貼付し、尿素由来の SERS 信号のイメージングに成功した。[ERATO で開発された定量的高分解能質量分析技術とラマンイメージングの組み合わせによって、がんで生成されたアンモニアを宿主に解毒させる機構が初めて解明された。](#)

**メディカルアプリケーションコアグループ**は、前年度までに導入・樹立した、薬剤 (doxycyclin) によってターゲット遺伝子をターゲット臓器において破壊できるマウス (Cre-ER, Cre-rtTA マウスなど) を用いて、CO ガスや H<sub>2</sub>S ガスなどのガス分子による脳・心筋・肝などにおけるエネルギー代謝の制御メカニズムについて、引きつづき解析を行った。また、細胞内において H<sub>2</sub>S ガスの生合成に関与している分子の薬剤依存的遺伝子ノックダウンマウスを樹立し、H<sub>2</sub>S ガスの制御機構と、その破綻が細胞・個体に及ぼす影響の解析を行った。酸素濃度センサーの一つであるプロリン水酸化酵素 Phd2 の臓器特異的/薬剤誘導型遺伝子破壊マウスを用い、低酸素応答が細胞の解糖の歳に細胞外に放出される乳酸の制御機構を制御していることを見出した。

**Gregg L. Semenza 教授 (Johns Hopkins (JH) 大学)**との共同研究では、平成 23 年度より研究員を JH 大に一名派遣し、低酸素応答と H<sub>2</sub>S ガスの生体内での役割に関する研究を進めている。

## その他

・プロジェクトのアウトリーチ活動の一環として 4 回の研究講演会を主催・共催した。主な講演会を下記した。

1) 平成 9 月 26 日の開催の **講演会 (質量分析で何が出来るか? 生命科学研究での有用性)** は 100 名近くに参加者があり、我々の研究の主体である質量分析技術を広く参加者に周知出来た。

2) 平成 25 年 1 月 17 日、18 日に癌学会と共催した「**がんと代謝シンポジウム 2013**」は約 380 人の参加者があり、がんにおける代謝 (メタボローム) の重要性が再確認されたシンポジウムであった。これらのアウトリーチ活動は、国が提示する研究戦略目標などでも取り上げられ、[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 \(CREST\)](#)、[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 \(さきがけ\)](#) などの立ち上げの契機となった。

## 2. 研究施設・主要研究設備の状況

研究実施場所としては、平成 21 年度に整備したプロジェクト専属の研究実施スペース（慶應義塾大学医学部総合医科学研究棟 2N1 及び医化学教室の一部）以外に、総合医科学研究棟 3S9 室を新たに整備し、研究を推進した。また、従来通り、医化学教室内のプロジェクト-慶應共同研究実施スペースも活用した。

## 3. 主要研究講演会

講演会名	日時	場所	共催その他
質量分析で何が出来るか？— 生命科学研究での有用性—	平成 24 年 9 月 26 日	慶應総合医科学 研究棟ラウンジ	ERATO、さきがけ、医化学 教室共催 100 人近くの一参加者 があり大変好評
がんと代謝シンポジウム	平成 25 年 1 月 17 日、 18 日	北里講堂	癌学会主催、末松 PJ 共催 約 380 人の産官学の研究 者が参加して活発な議論 が展開

## 4. 論文、学会発表、特許、

12 報の論文を発表、7 回の学術発表、外国（PCT）出願した。主要 3 論文を記載。

	外部発表 投稿票 整理番号	発表年月		タイトル	著者	誌名
3	末 24 発 08	2012	06	Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell.	Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H, Nagano O	Nat Commun. 6:3:883.
9	末 24 発 14	2012	11	Distinct metabolic flow enables large-scale purification of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes..	Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K	Cell Stem Cell, Nov 14. doi:pii: S1934-5909(12)00579-6.
10	末 24 発 29	2013	01	Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells	Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, Goda N, Rahimi Y, Johnson RS, Soga T, Hirao A, Suematsu M, Suda T.	Cell Stem Cell 12, 49-61, January 3, 2013

## 5. 書籍・総説

1	末 24 発 15	2012	05	ノックアウトモデルからみた in vivo 低酸素応答 発生、心臓・腎疾患、がんにおけ る PHD の役割	<u>南嶋洋司</u> 、 <u>末松誠</u>	実験医学, Vol.30, No.8, p1270-1275
2	末 24 発 16	2012	10	がん代謝システムの顕微質量イ メージングによる解析	<u>末松誠</u> 、 <u>久保亜紀子</u> 、 <u>大村 光代</u> 、 <u>菱木貴子</u> 、 <u>梶村真 弓</u> 、 <u>加部泰明</u> 、 <u>杉浦悠毅</u>	実験医学, Vol.30, No.15, p193-202
3	末 24 発 17	2012	10	ガス分子による代謝システム制 御機構の探索と解明	<u>末松誠</u> 、 <u>中西豪</u> 、 <u>梶村真弓</u>	実験医学, Vol.30, No.17, p84-90

以上