

末松ガスバイオロジープロジェクト平成 25 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 5 年目の人事としては、4 月時点で、末松研究総括の下、ケミカルバイオロジーコアグループ 5 名、バイオイメーjingコアグループ 5 名、メディカルアプリケーションコアグループ 6 名の体制で研究を開始した(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、①これまでに独自のナノアフィニティビーズを用いて、ガス応答性を示す特性のある補欠分子族へムに特異的に結合するタンパク質を系統的に精製することにより、CO、NO、O₂などのガス分子によって制御される因子群の網羅的同定を行い、約 200 種以上のタンパク質の同定に成功している。この解析で、新たな CO 応答性タンパク質として同定された PGRMC1 は、progesterone が結合する 1 回膜貫通型の細胞膜タンパク質であり、中央部に *cytochrome b5* に相同性のあるへム結合モチーフが存在する。**京都大学医学部・小林拓也准教授**との共同研究による X 線結晶構造解析によって、PGRMC1 が 113 番目の tyrosine 残基を介して *cytochrome b5* とは異なる特異な様式でへム配位することを明らかにした。即ち、この tyrosine 配位のへムはタンパク表面上に突出した構造を取っており、PGRMC1 のアミノ酸残基をほとんど介さずに突出したへム同士が会合した特異な heme-stacking oligomer 構造を取ることが分かった。さらに**北海道大学理学部・石森浩一郎教授**との共同研究による分光学的解析により、CO ガスは tyrosine-Fe-CO の 6 配位構造を取ることが明らかにした。更に、漢方薬の成分で肝炎などの炎症疾患の治療に臨床的に用いられる医薬品の標的分子の探索を行い、同定された受容体が上述の PGRMC1 であることを明らかにした。CO ガスや薬剤による PGRMC1 の阻害機構の解明は、新たなガン治療薬の開発などの創薬基盤となる事が期待される。これらの PGRMC1 の制御の知見に関して出願した特許が、(「一酸化炭素 (CO) による脂肪酸、コレステロールの取り込み阻害」; 特願 2011-263015 ; PCT/JP2012/065058) 9 月の JST 知財委員会で各国移行 (米国、欧州等) が決定した。

腸内細菌叢における食物繊維の発酵により酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸などの揮発性の短鎖脂肪酸類(ガス分子の一種)が生産されるが、これらをリガンドとして特異的に結合する標的因子のスクリーニングを行い、新たな短鎖脂肪酸結合タンパク質を同定した。

②ERATO 国際化活動支援の一環として、NIH/Harvard University の **Rakesh K Jain 教授**との「生体内における固形腫瘍の代謝システム異常の空間的解析」を開始した。*In vivo* における固形腫瘍形成過程における腫瘍内の代謝システムの不均一性と薬剤耐性の関連を解明するために必要な新技術開発を進めた。ヒト由来がん細胞株の超免疫不全マウスへの異種移植モデルにおいて検討を重ねた結果、硫化水素の存在によって生成される 2 次代謝物である glutathione persulfide や Glutathione S-sulfonate など、親電子性の抗がん剤を無力化できる新規代謝物が腫瘍部に多く含まれ、腫瘍細胞の生存に関わる可能性があることが明らかになった。

③中枢神経ミエリン細胞であるオリゴデンドロサイトの前駆細胞の初代培養系において、低酸素条件下で、細胞がその分化能を保ったまま休眠状態に誘導される事を見出し、特許 (特願 2014-008780) 出願した。

バイオイメーjingコアグループは、①効果的質量分析イメーjingのための試料調製法の開拓において、麻酔したマウスの心拍を維持しながら、同時に頭蓋局所を液体窒素で急速冷却する in-situ freezing 法を確立した。平成 25 年度は、さらに効率のよい方法論の確立を目指し、マウスを非麻酔下で脳にフォーカスしたマイクロ波を短時間照射することによって、脳組織の温度を瞬時に 90℃まで上昇させ酵素を不活化させることにより、安楽死後の組織の autolysis を防ぎ、個体の代謝を瞬時に停止させる focused microwave (FMW) 法を開発し、論文発表を行った (Proteomics)。

より詳細な質量イメージの取得を可能にするため、試料前処理を行う装置であるマトリクス蒸着装置を購入した。この装置を駆使して、質量イメージングを行う際の空間解像度と代謝物の検出感度を向上させ、病態モデルを用いた局所の代謝解析の研究を加速させる。

②ガスを含む低分子代謝物は各種の金属と相互作用して、特異的な振動分光学的信号情報を発する性質をもつ。共同研究者である**富士フイルム社**は、アルミやアルミナの水熱処理によって形成したベーマイトの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比の増強ラマン散乱(SERS)を有する金ナノ微細構造基板 (Gold Nano Coral= GNC)の開発に成功した(特願 2013-80164)。このデバイスを用いて、「虚血コア」の部分に adenylate に由来する特異的な振動分光学的信号の検出に成功した(ACS Nano)。更に、GNC-based SERS-imaging の利点を、細胞内に高濃度で存在しながらも、これまで MALDI によるイメージングが困難であった尿素分子のイメージングに応用した。

③**慶應義塾大学理工学部塚田孝祐准教授**との共同研究は、ガス透過性ポリマーPDMS 内を微細加工し、ガスチャネルの構造や配置をアレンジすることで、細胞培養層に自在な酸素勾配を形成することに成功した。更に、培養層上の内皮細胞には酸素勾配に依存した Pimonidazole の染色と VEGF の発現が認められ、細胞実験からも有効性を証明した。

メディカルアプリケーションコアグループは、①硫化水素 (H_2S) 産生酵素である CBS の遺伝子欠損マウスを用いて、CBS 欠損によって引き起こされる骨粗鬆症の発症メカニズムについて解析を進め、CBS 欠損マウスではカルシウム代謝の異常と水腎症をきたすことを明らかとした。また、合成酵素に比べて解明が進んでいないミトコンドリアにおいて H_2S を分解すると考えられる分子のテトラサイクリン誘導性遺伝子発現ノックダウンマウスを作製し、 H_2S の分解機構の破綻が生体に与える影響の *in vivo* レベルでの解析を行った。その結果、硫化水素の分解機構の破綻は心筋や骨格筋において硫化水素やチオール含有代謝産物が蓄積し、ミトコンドリアの傷害を引き起こし、重篤な心筋症のためにマウスが死亡する事を見出した。

②低酸素応答による細胞内エネルギー代謝制御機構の解明を試み、低酸素応答が乳酸の産生だけでなく乳酸代謝全体を *in vivo* レベルで制御していることを発見し、個体レベルでの乳酸の制御機構である Cori サイクルが、低酸素応答によって制御されているという、生体における低酸素応答の新しい機能・概念を提唱した。

③**Johns Hopkins (JH) 大学**との共同研究では、低酸素時に HIF 依存的に硫化水素産生酵素のひとつである CBS の発現が誘導されることを分子レベルで明らかにした。さらに、長期間低酸素に暴露したラット脳においても HIF 依存的に CBS が誘導されることを明らかとし、産生された硫化水素が血流維持や細胞ダメージの軽減等の環境適応のメカニズムの一端を担っていることを示唆し、論文発表した (Biochem J)。

また、CO/CBS 系による蛋白のメチル化制御によって糖代謝酵素 PFKFB3 の安定性が変化することを見出した。また、がん細胞では通常、PFKFB3 がメチル化修飾されているが、CO によって脱メチル化されると PFKFB3 のポリユビキチン化が進行し、酵素タンパク質が分解され、結果的に解糖系フラックスが抑えられる事を見出した。更に、グルコースの利用がペントースリン酸回路へとシフトしグルタチオンの還元力として機能する NADPH 量を増大させる、がん細胞の酸化ストレス耐性獲得のメカニズムを解明し、論文発表 (Nat Commun.) すると共に JST・慶應義塾でプレスリリース を実施した。(平成 26 年 3 月 17 日 ; <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140317-2/>)。

④質量イメージング法による組織切片中のガス分子の局在を明らかにする方法の開発において、低真空下におけるマトリクス蒸着と大気圧イオン源をもつ質量分析イメージング装置を利用した生体組織切片中に存在するアンモニアの分布を計測する方法を開発した(特願 2013-209000)。この方法を用いて、ヒト大腸がん細胞を移植したモデル動物の、担がん肝組織切片中のアンモニアの分布を検討した。この病態モデルにおいては、アンモニアは大腸がん転移病巣部ではなく、肝臓実質組織に蓄積されていることが明らかになった。

2. 研究施設・主要研究設備の状況

研究実施場所としては、昨年度に引き続き慶應義塾大学医学部総合医科学研究棟医化学教室の一部等で研究を推進した。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。平成25年度は、次の大型機器、①キャピラリー電気泳動-三連四重極型質量分析装置 (CE-QTOF)、②ガスクロマトグラフィー質量分析装置、③イメージング質量顕微鏡用卓上マトリックス蒸着装置を購入し研究を推進した。

3. 研究講演会

番号	講演会名【講演者】	日時	場所	共催その他
1	先端メタボロミクスを駆使して展開する新しい代謝生物学 【末松誠、今村博臣（京大生命科学研究科特定准教授）、杉浦悠毅（慶應義塾大学医学部医化学教室特任講師）、山口良文（東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室助教）、有田誠（東京大学大学院薬学系研究科衛生化学准教授）】	平成25年9月18日	ラウンジ	ERATO、さきがけ、医化学教室共催。 約80名参加者があり大変好評
2	「Nrf2 - a key regulator of redox signalling in fetal vascular cells in health and disease」 【Prof. Giovanni Mann School of Medicine King's College London】	平成26年3月27日	ラウンジ	ERATO、医化学教室

JST ERATO(東大ガスバイオロジープロジェクト)

 JST さきがけ(炎症の慢性化機構の解明と制御)

 慶應義塾大学医学部医化学教室

 共同講演会

先端メタボロミクスを駆使して展開する新しい代謝生物学

日時/2013年9月18日(水) 14時~18時
 場所/慶應義塾大学医学部 総合医科学研究棟 1階ラウンジ

はじめに 14:00-14:15 | 末松 誠
慶應義塾大学医学部教授 医化学教室 JST ERATO 東大ガスバイオロジープロジェクト研究員

新しい技術編 14:15-15:00 | 今村 博臣
京大大学院生命科学研究科 特定准教授
 『生細胞ATP濃度イメージングによって明らかになってきた細胞内ATP濃度の時空間動態』

15:00-15:45 | 杉浦 悠毅
慶應義塾大学医学部医化学教室 特任講師 JST SAKIGAKE 炎症の慢性化機構の解明と制御 研究員
 『代謝の“フラックス”を可視化する -安定同位体を用いたイメージング質量分析-』

15:45-16:00 | 休憩

応用編 16:00-16:45 | 山口 良文
東京大学大学院薬学系研究科 遺伝学教室 助教
 『哺乳類のエネルギー代謝が劇的に変わるとき -胚発生と冬眠制御-』

16:45-17:30 | 有田 誠
東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学 准教授
 『脂質メタボロミクスによる炎症の制御機構の解明』

総括 17:30-18:00 | 末松 誠

参加費無料 参加希望者は下記までご連絡下さい。
 TEL/03-6457-8321 E-mail/info@gsabio.jst.go.jp
 慶應義塾大学 JST ERATO 編内 正

日時: 3月27日(木) 17:00-18:00
 場所: 総合医科学研究棟 1階ラウンジ

Nrf2 - a key regulator of redox signalling in fetal vascular cells in health and disease

Prof. Giovanni Mann

Cardiovascular Division
 BHF Centre of Research Excellence
 School of Medicine
 King's College London

連絡先: 医化学教室 梶村
 内線 63668

4. 特許出願

下記の3報の特許を出願した。

特願 2013-80164 特願 2013-209000 特願 2014-008780

5. 論文 (16報の論文を発表した)

以下に主な論文を記載。

	番号	年月	タイトル	著者	掲載誌名 号数
4	末 25 発 05	2013. 08	Visualization and quantification of cerebral metabolic fluxes of glucose in the awake mice.	Y.Sugiura, K.Honda, <u>M.Kajimura, M.Suematsu.</u>	Proteomics. 2013 Aug 23.
6	末 25 発 07	2013. 07	Cilostazol strengthens the endothelial barrier of postcapillary venules from the rat mesentery in situ.	Y.Sugiura, <u>T.Morikawa,</u> T.Takenouchi, <u>M.Suematsu, M.Kajimura.</u>	Phlebology. 2013 Jul 15.
7	末 25 発 08	2013. 07	Microscopic imaging mass spectrometry assisted by on-tissue chemical derivatization for visualizing multiple amino acids in human colon cancer xenografts.	S.Toue, Y.Sugiura, <u>A.Kubo, M.Ohmura,</u> S.Karakawa, T.Mizukoshi, J.Yoneda, H.Miyano, Y.Noguchi, T.Kobayashi, <u>Y.Kabe, M.Suematsu.</u>	Proteomics. 2013 Jul 1.
8	末 25 発 09	2013. 06	Energy management by enhanced glycolysis in G1 phase in human colon cancer cells in vivo and in vitro.	Y.Bao, K.Mukai, <u>T.Hishiki,</u> <u>A.Kubo, M.Ohmura,</u> Y.Sugiura, <u>T.Matsuura,</u> <u>Y.Nagahata, N.Hayakawa,</u> T.Yamamoto, R.Fukuda, H.Saya, <u>M.Suematsu,</u> <u>YA.Minamishima</u>	Mol Cancer Res. 2013 Jun 5.
9	末 25 発 10	2013.	Hartnup disorder-like neutral aminoaciduria in cystathionine β -synthase-deficient mice, an animal model of homocystinuria.	N.Akahoshi, S.Kamata, M.Kubota, <u>T.Hishiki,</u> <u>Y.Matsuura, C.Yamazaki,</u> Y.Yoshida, H.Yamada, Y.Ishizaki, <u>M.Suematsu,</u> T.Kasahara, and I.Ishii.	Journal of Biological Chemistry /2013/523803
10	末 25 発 11	2014. 03	PFKFB3 demethylation regulates CO/CBS-dependent directional glucose biotransformation to pentose phosphate pathway for cancer cell survival.	T.Yamamoto, <u>N. Takano, K.Ishiwata,</u> M.Ohmura, <u>Y. Matsuura,</u> A.Kamata, K.Sakamoto, <u>T.Hishiki, and</u> <u>M.Suematsu.</u>	Nature Communications, 2014 Vol.5 3480 DOI:10.1038/ncomm s4480

13	末 25 発 33	2013. 12.	Hypoxia-inducible factors regulate human and rat cystathionine β -synthase gene expression	<u>Naoharu Takano</u> , Ying-Jie Peng, Ganesh K. Kumar, Weibo Luo, Hongxia Hu, Larissa A. Shimoda, <u>Makoto Suematsu</u> , Nanduri R. Prabhakar and Gregg L. Semenza	Biochem. J. (2014) Mar 1;458(2):203-11
----	--------------	--------------	--	--	--

6. 書籍

実験医学別冊 質量分析実験ガイド (2013年)

- “リガンド結合タンパク質を見つける” **加部泰明、末松誠**
“ガス分子を量る～チオールプローブを用いた H₂S の定量” **菱木貴子**
“細胞のエネルギー代謝を量る～低酸素環境下での代謝フラックスの定量” **南嶋洋司**
“タンパク質の‘構造変化’を量る” **山本竜也**
“細胞の‘エネルギー代謝’をイメージングする” **梶村真弓**

7. 事後（予備）評価

平成 25 年 12 月 25 日、評価委員の先生方に慶應義塾大学医学部総合医科学研究棟 2 階会議室にお集まり頂き、一日「末松ガスバイオロジーPJの事後（予備）評価委員会」を開催した。

評価報告書の JST ホームページ掲載先

http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/posteriori/20140609_jigoyobi.html

8. その他

- 1) 平成 25 年 5 月 16 日、平成 25 年度第 2 回理事長記者会見で「質量顕微鏡で見えてきた『がんの代謝』」と題して、末松誠総括が講演をおこなった。
- 2) 平成 25 年 8 月 20 日の日経新聞に「メタボロミクスを活用したがんの増殖メカニズム解明に挑む」としてプロジェクトの研究が紹介された。

以上