

「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 領域活動・評価報告書

－平成28年度終了研究課題－

研究総括 小田 吉哉

1. 研究領域の概要

本研究領域は創薬・診断・予防といった医療応用を見据え、生体内化合物の動態解析を出発点とした、疾患を反映する代謝産物等の探索およびその情報に基づく標的分子の分析を加速する技術の創出を目的とします。

具体的には、新規疾患関連因子の発見につながる超高感度検出技術、見出された因子の同定技術・定量計測技術、そしてこれらのスループットを飛躍的に高める技術や多種因子同時分析技術、各種情報技術等を開発します。また、既知の生理活性化合物が作用する代謝産物やタンパク質、代謝経路の特定を通じて、医療応用につなげるための標的分子を解析する一連の技術群の開発・高度化もあわせて行います。これらの成果により技術的アプローチを多様化し、医療応用を目指す上で標的となりうる生体内分子を核としたヒト疾患制御の概念実証に貢献します。

本研究領域ではナノテクノロジー、合成化学、工学等の分野とライフサイエンスの融合研究を積極的に支援し、イノベーションの源泉を涵養します。また、対応する 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（以下「CREST 対応領域」と表記。平成 27 年 4 月 1 日付けで日本医療研究開発機構(A-MED)に移管予定）とは緊密に連携して運営します。そのため、独立した研究者として各研究課題を担うさきがけ研究者には、CREST 研究領域と有機的なつながりを持ったバーチャル・ネットワーク型研究所の一員としての活躍にも強く期待します。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 7件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「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」領域に設けた選考委員10名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info986/sankou2.html>) の他、以下の点を重視した。
 - ・オリジナリティが高く、成果(技術)の社会実装が見込める野心的な課題であること。
 - ・創薬や診断の標的分子の分析、およびそれに向けて鍵となる疾患関連因子の検出・同定・定量に関する基盤技術の開発を目的としたもの。
 - ・疾患に関連する代謝産物に焦点を当て、それらの分析法の開発や関連因子(タンパク質やマイクロRNA 等)の解析技術に関する研究開発を実施するもの。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー10名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			7件	内 訳	3年型	7件
対象数	129件	20件			5年型	0件

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

5. 研究実施期間



平成 25 年 10 月～平成 31 年 3 月(3 年型)

6. 領域の活動状況

領域会議: 7 回

- | | |
|------------------------------------|----------------------|
| 第 1 回 CREST・さがけ合同領域会議(東京都千代田区) | 平成 26 年 1 月 27 日 |
| 第 1 回さがけ単独領域会議(宮城県仙台市) | 平成 26 年 9 月 1～2 日 |
| 第 2 回 CREST・さがけ合同領域会議(山形県鶴岡市) | 平成 26 年 12 月 2～3 日 |
| 第 2 回さがけ単独領域会議(茨城県つくば市) | 平成 27 年 6 月 15～16 日 |
| 第 3 回 AMED-CREST・さがけ合同領域会議(京都府京都市) | 平成 27 年 11 月 29～30 日 |
| 第 3 回さがけ単独領域会議(福岡県福岡市) | 平成 28 年 5 月 24～25 日 |
| 第 4 回 AMED-CREST・さがけ合同領域会議(静岡県三島市) | 平成 29 年 1 月 12～13 日 |

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

研究開始後に、研究総括と技術参事(さらに可能であれば領域担当)が研究実施場所を訪問し、さがけ研究課題の設定に至った経緯、研究の進捗状況、研究体制(学生や研究補助者)、実験施設や機器類などについてヒアリングを行った。また、法令等の遵守と安全衛生の確保の観点からも、研究費の適切な執行や試薬管理方法の確認を行い、スプリンクラーや消火器の設置場所、地震対策などについても注意を喚起した。上司と会見出来た場合には、さがけ研究の実施についての協力依頼も行った。

SciFoS(Science for Society)活動:

平成 26 年度に本領域の研究者 4 名が参加した。

報告書: <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/research/scifos26.pdf>

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

- | | |
|-------------|-------------|
| 平成 29 年 2 月 | 研究総括による事後評価 |
| 平成 29 年 3 月 | 被評価者への結果通知 |

8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4) 世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)

9. 評価結果

いずれの研究課題も、十分にあるいは殆ど目的を達成できたと思われる。本さがけ疾患代謝領域の単独領域会議や AMED-CREST 疾患代謝領域との合同領域会議において、第 1 期生の研究者 7 名は研究総括、領域アドバイザー、第 2 期生 8 名、CREST 研究者と活発に議論を行った。またこれらの領域以外の研究者とも積極的にコンタクトし、多くの共同研究につながり、また成果発表も精力的に行ったことは高く評価できる。

オリジナリティが高く、成果(技術)の社会実装が見込める野心的な課題という観点から、研究課題「G タンパク質共役型受容体の活性化に影響を及ぼす代謝物の同定」においては、創薬で重要な GPCR についてユニークな活性化検出法を開発して、脂質により活性化される様々な受容体を見出し、TRP チャネルの活性化検出法も開拓した。また、検出法の改良もおこない、アッセイをハイスループット化し、より迅速・簡便・低コスト化し、アカデミアや産業界にも検出法の普及に努力した。よって、早期の社会実装

への可能性が期待される。AMED-PRIME に採択されたので、さらに研究を加速してほしい。また、研究課題「硫黄循環・代謝を基軸とした生体恒常性制御基盤の構築」では、G タンパク質サイクルが活性イオンによっても制御されるという発見、高血圧治療薬シルニジピン（ジヒドロピリジン系 Ca^{2+} 拮抗薬）が心筋梗塞後の慢性心不全や、ストレプトゾチン誘発性の血糖値増加も有意に抑制するという発見がマウスでなされた。今後の臨床研究への展開が期待される。

創薬や診断の標的分子の分析、およびそれに向けて鍵となる疾患関連因子の検出・同定・定量に関する基盤技術の開発という観点から、研究課題「創薬標的の同定・解析を可能とする革新的ツールの創製」においては、精製が困難なタンパク質標的の同定にユニークな転移反応を利用するもので、ツールとしての基本的性能は達成出来たと思われるので、共同研究により、さらに完成度を向上していくことが期待される。標的が未知の薬剤は多数あることから、今後も難しい標的の同定に挑戦してほしい。また、研究課題「タンパク質の動的機能の理解に基づく新たな疾患バイオマーカー・創薬標的分子探索法の開発」においては、酵素活性の網羅的解析を実施する「enzyme-omics」という概念を提唱し、これに用いる方法論を開発し、様々な疾患マーカー候補を見出した。酵素活性の異常（亢進や抑制）が疾患の発症や病態と関連する例は今後も多数報告されると思われることから、医療・診断分野の研究者との連携が期待される。

疾患に関連する代謝産物に焦点を当て、それらの分析法の開発や関連因子（タンパク質やマイクロ RNA 等）の解析技術に関する研究開発の観点から、研究課題「タンパク質分子上に形成されるアダクトーム解析法の確立」においては、興味深い様々な修飾付加体の存在が明らかとなり、高脂血症のマーカー候補としての修飾付加体の発見もあった。高脂血症患者の血清アルブミンのホモシステイン化修飾による炎症の誘導はその分子メカニズムが興味深い。また、研究課題「脂質ラジカル選択的蛍光・質量分析マルチプローブの開発と疾患モデルへの適用」においては、蛍光団とスピン化合物を組合せてプローブを開発し、脂質ラジカルの極めて高感度な検出・同定を可能とした。また、安定スピン化合物により、様々な疾患の治療可能性がモデル動物で示唆された。ラジカル捕捉剤を治療薬に利用するというアイデアは既にあるが、ユニークな化合物に着目することで、治療法の確立されていない様々な疾患のための創薬にもつながることが期待される。また、研究課題「代謝経路フラックスイメージング法による“局所”疾患代謝の解明」においては、マイクロウェーブを利用した試料調製法、組織切片上における誘導体化法、安定同位体標識の化合物を活用した定量的なイメージング技術などが開発された。これにより、疾患代謝の視点から細胞レベルでイメージング出来る本ツールの利用が、広範な疾患モデル動物のより詳細な病態解析へとつながることが期待される。

以上のように、1 期生の採択は 7 名であったが、革新的医療基盤技術の創出につながると期待される重要な成果が多数得られたと評価している。一部の研究課題では、既にアカデミアや産業界の診断・医療分野の研究者との連携が始まっており、今後のさらなる研究展開や社会実装が効率的に展開することを期待している。

1. 井上 飛鳥 研究者「G タンパク質共役型受容体の活性化に影響を及ぼす代謝物の同定」

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は創薬において最も重要な標的タンパク質群の一つであり、その活性化に関与する生体内化合物の同定や阻害剤の発見は極めて重要である。しかしながら、汎用的な活性化の検出は困難がともなう場合が多い。本さがけ研究では、GPCR のユニークな活性化検出手法である TGF α 切断アッセイを利用して、抗炎症性酸化脂質により活性化される受容体やリゾリン脂質に応答する受容体、生理活性脂質リゾホスファチジルスレオニンにより活性化される受容体、酸化リン脂質を認識する受容体などを見出した。また、TGF α 切断アッセイの改良もおこない、アッセイをハイスループット化し、より迅速・簡便・低コスト化した。TGF α 切断アッセイに使用可能な安定発現細胞を作製する手法も確立した。

さらに、TRP チャネルの活性化についても、TGF α 切断アッセイにより検出可能であることを実証した。その他にも、酸化リン脂質受容体 MRGX4 のリガンド同定・機能解析、GPCR 遺伝子と疾患との関連、GPCR と下流シグナルの統合理解、GPCR 解析ツール開発と普及などについても、大きな成果が得られた。

これらの優れた研究成果が認められ、本さがけ研究領域内での共同研究や国際的に著名な研究グループとの共同研究にも発展し、本分野の先駆的研究者の一人として注目されるようになった（平成 28 年度 10 月に准教授に昇任）。よって、さがけ研究が研究者としての大きな飛躍につながった。また、開発した GPCR 研究ツールをアカデミアのみならず企業へもその導入を支援するなど、科学技術及び社会・経済への波及効果が大きいことが期待される。

さらに、活性型 GPCR を創成する手法を開発したことにより、国立研究開発法人日本医療研究開発機構の平成 28 年度 革新的先端研究開発支援事業「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」の PRIME にも、研究課題名「リガンドが不要な革新的 GPCR ツールを用いた脂質関連オーファン受容体の機能解明」が採択され、平成 28 年度 10 月から研究が開始された。今後も、TGF α 切断アッセイのさらなる改良をコア技術として、新たな研究分野を開拓していくことが期待される。

2. 小松 徹 研究者「タンパク質の動的機能の理解に基づく新たな疾患バイオマーカー・創薬標的分子探索法の開発」

生体内には数千種類の酵素が存在すると予想されているが、その活性、代謝調節における役割や疾患との関連などについては不明な酵素が多い。本研究は、酵素活性の網羅的高感度検出を目的として、多種類の高感度蛍光基質を開発し、これを用いて非変性電気泳動法で分離された酵素の活性を網羅的に測定する手法により、疾患バイオマーカー・創薬標的分子探索法の開発を目指したものである。

このアプローチにより、薬剤の標的候補分子となりそうな臓器特異的なカルボキシルエステラーゼや肺炎マーカー候補（平成 29 年度薬学会奨励賞）、大腸癌マーカー候補などの発見につながった。今後、ヒトでの有用性の検証が期待される成果である。

また、酵素 PIMT の活性を高スループットに評価する分子ツールを開発し、世界初の PIMT 阻害剤の発見につながったことは、今後の創薬分野にも少なからぬインパクトを与えたと思われる。

さらに、解糖系の阻害剤スクリーニング系を確立し、強い解糖系阻害作用を示す化合物を取得するなど、癌の治療薬への今後の展開が興味深い。

他のさきがけ研究者との共同研究にも積極的に取り組み、細胞表面のプロテアーゼ活性を可視化する蛍光プローブの開発や有機小分子を使って細胞表面のタンパク質のはたらきを制御する実験系の確立など、新規研究分野の開拓につながる可能性が期待される。

研究成果による知的財産についても、その確保に努力した。本さきがけ研究の成果が認められ、主要な国内・国際学会の招待講演が増え、本分野の有力メンバーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。近年、癌組織において、特定の酵素活性が亢進していることが癌の原因と考えられる症例が数多く知られるようになってきた。今後も酵素活性の網羅的解析を実施する「enzym-omics」により、新たな疾患バイオマーカーの発見や創薬標的分子の同定において、大きな貢献がなされることを期待する。

3. 重永 章 研究者「創薬標的の同定・解析を可能とする革新的ツールの創製」

生理活性化合物の標的の同定は、薬の作用・副作用の分子レベルでの作用機序解明や対象疾患の絞込み、化合物を使ったバイオロジーのさらなる理解などのために極めて重要である。よって標的の同定方法については、多種多様な方法が既に報告されている。しかしながら、例えば生理活性化合物が比較的低分子であり、その標的が精製が難しいタンパク質である場合において、その標的の同定は必ずしも容易ではない。即ち、生理活性化合物の誘導体化合物を結合させた担体に、標的タンパク質を含む細胞抽出液を加え、特異的に結合・溶出するアフィニティクロマトグラフィーの原理は確立しているが、標的タンパク質以外の複数種類のタンパク質なども（担体や容器への非特異的結合などにより）溶出画分に混入することは珍しくない。

本研究はこのような重要な問題点の解決を目指し、本研究者らが見出した SEALide（N-sulfanylethylanilide）の酸塩基触媒応答型 N $\rightarrow$ S アシル基転移反応を利用して、標的タンパク質の高効率同定のためのトレーサブルリンカー、および標的タンパク質の機能解明のためのラベル化試薬の開発を目指したものである。

トレーサブルリンカーは溶出された標的タンパク質が蛍光ラベルされているという特徴があり、実際にタンパク質混合物中の標的タンパク質の選択的ラベル化が可能であることが示された。

ラベル化試薬については、赤血球細胞内に含まれる炭酸脱水酵素の選択的ラベル化に成功した。また、統合失調症関連酵素である D-アミノ酸化酵素（DAO）の阻害剤の新たな結合部位の同定にも成功したことから、ラベル化試薬の創薬への波及効果も期待される。

特定の生理活性化合物について、その未知の標的タンパク質の同定・機能解明までは残念ながら達成出来なかったが、本さきがけ研究をきっかけとして、領域内外の研究者と多くの共同研究を開始しており、今後の展開が期待される。標的が未知の天然・人工の生理活性化合物や薬剤は多数あることから、さきがけ研究で培ったプローブ設計や有機合成の経験とアイデアを活かして、共同研究もより積極的におこない、創薬標的の同定・解析の成功例を増やして欲しい。

4. 柴田 貴広 研究者「タンパク質分子上に形成されるアダクトーム解析法の確立」

ヒト生体内のタンパク質の多くで、そのリジンやヒスチジンなどのアミノ酸残基に様々な化学構造の修飾付加体が形成されることが知られている。しかしながら、従来は個別の修飾付加体について解析がなされてきた傾向があるため、様々な修飾付加体について、その生成機構や構造、タンパク質の安定性・機能への影響、疾患・老化との関連などについては不明な点が多い。そこで、本研究では、酸化脂質を中心とした代謝産物に注目し、これによるタンパク質修飾付加体の総体について、質量分析計で分析する“アダクトーム”解析法を確立することを目指した。

まずヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、リジン残基およびヒスチジン残基に対するアダクトーム解析の基本的方法が確立した。次に、各種酸化脂肪酸により形成される既知の付加体のアダクトームマップを作成し、このマップをもとに、ヒト酸化 LDL のモデルについてもアダクトーム解析をおこない、6 種類のヒスチジン修飾付加体および 7 種類のリジン修飾付加を同定できた。また、未知付加体の中で主要なリジン修飾付加体が N ϵ -(8-carboxyoctanyl)-Lys (COL) であることも明らかにした。これらの成果により、本アダクトーム解析法が有用な方法であることが強く示唆された。一方で、解析が難しいため化学構造の決定には至らなかった未知の修飾付加体もあることから、今後はアダクトーム解析法をさらに発展させ、これら未知の修飾付加体の解析にも挑戦してほしい。

疾患と修飾付加体との関連を調べる研究としては、高脂血症モデルマウスである apoE 欠損マウスやヒト高脂血症患者の血清サンプルで COL 付加体が有意に増加することも判明し、疾患マーカーへの応用が期待される。さらに、S-ホモシステイン化された血清アルブミンが、リガンド結合能が増強され、マクロファージ細胞における炎症誘導活性を示すことも明らかとなった。よって、修飾付加体の疾患マーカーとしての利用のみならず、治療標的としての研究についても今後検討してほしい。

このような修飾付加体の疾患マーカーとしての応用については、医療・診断分野の研究者や企業とも連携し、ヒト血清サンプルのアダクトーム解析や迅速・簡便・低コストな検査キットの開発を効率的に進めることを期待している。

以上のように、さきがけ研究が大きな飛躍につながり、平成 28 年 1 月に准教授に昇格した。

5. 杉浦 悠毅 研究者「代謝経路フラックスイメージング法による”局所”疾患代謝の解明」

ヒトの疾患診断マーカーの開発、創薬標的タンパク質の同定およびそのタンパク質の代謝経路やシグナル伝達経路での役割の解明には、培養細胞や疾患モデル動物での研究が必要となる。このモデル動物の利用においては、多くの場合で臓器摘出などの操作が不可欠である。しかしながら、従来は「(1) 摘出操作中の細胞成分(代謝産物やタンパク質など)の変化」については、十分に検討や対策がなされてきたとは言いがたかった。また、疾患の病巣は細胞集団であるが、この集団は往々にして正常細胞と異常細胞から構成されている。しかしながら、「(2) 疾患の原因となっている異常な細胞の検出・同定」は容易でない場合が多く、代謝物の高感度なイメージング技術の進歩が望まれていた。さらに、疾患における代謝の基礎的な知見を得るために、疾患の原因となる「(3) 代謝経路の変化を病巣内部の局所において調べる技術」の開発も課題であった。

本研究は、近年のイメージング質量分析や化合物分離・精製法の進歩を活用し、これら 3 つの課題を解決するメソッドパッケージを確立・提供し、創薬ターゲットとなる細胞や代謝経路の同定や、代謝物バイオマーカーの産生機序解明を in vivo で遂行することを目指した野心的な研究である。その目的は十分に達成されたと思われる。具体的には、(1) 標的臓器(脳と心臓)へフォーカスしたマイクロウェーブを 1 秒以下照射することで、細胞内酵素の瞬間的な熱失活により代謝物の死後分解を防止することができたことは、今後の試料調製法として広く普及していくと思われる。また(2) 標的化合物の組織切片上における誘導体化法を開発し、Fourier transform-MS も利用し、高感度で網羅的な化合物イメージング法を開発したことで、モデル動物の疾患代謝や病態の解析で飛躍的な情報量の増加が期待される。さらに、(3) 安定同位体標識の化合物を活用して、モデル疾患動物の臓器の代謝異常を定量的にイメージングする技術の開発は、ヒト心筋梗塞のみならず、様々な疾患の予防・治療のための研究に新たなアプローチを提供すると思われる。

これらの成果の多くは積極的な共同研究によるものである。即ち、アイデアと初期の研究成果が認められ、本さきがけ研究領域内での共同研究や領域外の研究グループとの多数の共同研究にも発展した。また、成果発表(論文、学会など)も積極的に行い、国内外の招待講演も増え、本分野(代謝のイメージングなど)の世界レベルの研究者の一人として注目されるようになった。よって、さきがけ研究が研究者としての大きな飛躍につながったと言える。

さきがけ研究期間内で、様々な疾患モデル動物の病態を、疾患代謝の視点から細胞レベルでイメージングするツール(メソッドパッケージ)の重要性が明らかとなり、より広範な疾患モデル動物の解析へとつながることが期待される。また、疾患モデル動物で得られた知見を創薬に活かすべく、アカデミアや産業界との共同研究もさらに推進し、この優れたメソッドパッケージの普及を促進してほしい。現時点で非公開の興味深い研究成果も多数あることから、これらについても今後の発表と知財確保を期待する。

6. 西田 基宏 研究者「硫黄循環・代謝を基軸とした生体レドックス恒常性制御基盤の構築」

活性酸素種の新たな役割が解明されるにつれて酸化ストレスと疾患に対する考え方も大きく変わりつつある。本研究では、主にタンパク質が有する活性イオウ種の生成・代謝系とその生理機能制御機構を明らかにし、新規の生体レドックス恒常性制御基盤を構築することを目標として開始した。

マウス慢性心不全モデルを用いた実験から、心不全の重症度に伴って酸化修飾を受ける GPx3 が同定された。この酸化修飾のメカニズムについても調べ、TRPC3-Nox2 共役の阻害が心不全治療の新たな標的戦略となる可能性が示された。ヒト心不全患者では、マウスとは同様の結果とはならず残念であったが、この結果が新たな研究開始の契機となることは確かで、今後の展開が期待される。

また、マウス心筋梗塞モデルを用いた実験から、内因性 Drp1 はシステインにポリ硫黄鎖をもち、この枯渴が Drp1 を活性化させる引き金となる可能性が示された。G タンパク質サイクルが活性イオウによっても制御されるという非常に興味深い結果である。また、Drp1 活性化を阻害する化合物として高血圧治療薬シルニジピンも同定し、臨床研究も開始された。

さらに、アンジオテンシン II 誘発性高血圧のメカニズムの研究過程で、P2Y6 受容体がアンジオテンシン type1 受容体と 2 量体を形成し、高血圧リスクを高めることをマウスで見出した。

以上のように、本さきがけ研究で新たな研究分野を開拓し、その成果を積極的に論文、学会などで発表した。

これらの他にも現時点では非公開の重要な研究成果も多数有り、今後の学会発表や論文発表が期待される。

本さきがけ研究の活性イオウによるミトコンドリア品質管理に関する成果が認められ、複数の学会でのシンポジウム企画立案や、生理学研究所にて異分野融合型のオルガネラ研究会を立ち上げる等、新たな研究分野を開拓しつつある。また、心臓イオウ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本研究分野の顕著な研究者の一人として注目され、新たな共同研究にも発展し、基盤研究特設分野「ネオ・ジェロントロジー」への応募・採択につながっている。さらに、本さきがけ研究領域内では、柴田研究者、富澤アドバイザーや魏研究者との研究交流の成果が新たな共同研究に発展し、新学術領域の立ち上げ・応募につながりつつある。このように、本さきがけ研究が、研究者としての飛躍につながった。

7. 山田 健一 研究者「脂質ラジカル選択的蛍光・質量分析マルチプローブの開発と疾患モデルへの適用」

生体内で生じる活性酸素であるヒドロキシラジカルは、極めて反応性が高く、脂質、タンパク質、糖質、DNA など様々な生体物質と反応し細胞や組織にダメージをもたらす、癌、生活習慣病、老化などの原因・危険因子であると考えられている。しかしながら、ヒドロキシラジカルより生じる様々なラジカルは、極めて反応性が高く微量なために、従来は検出が非常に困難であった。そのため、疾患発症や病態の進行において、細胞や組織のどこで、どのようなラジカルが生成し、いかなる疾患を生じさせるかについてや、その治療薬開発のための基礎的知見については不明な点が多かった。

そこで、本研究は、ヒドロキシラジカルにより生じる重要なラジカルの一つである脂質ラジカルに着目し、まずその高感度検出のための蛍光プローブ NBD-Pen を開発した。この非常に優れた蛍光プローブの開発は、化学製品の製造で利用されているラジカル捕捉剤からヒントを得たスピン化合物と蛍光団の組み合わせを検討したもので、分子設計のアイデアを様々な基礎・応用分野に求めるという本研究者の柔軟な発想が実を結んだと思われる。

本プローブは抽出液試料の脂質ラジカルの分析のみならず、培養細胞やミトコンドリア、疾患モデル動物の組織切片においても、画像解析により脂質ラジカルの高感度検出が可能となった。さらに脂質ラジカル結合部位のみを肝細胞がんモデルラットに注射することにより、3 ヶ月後の肝細胞のがん化部位を有意に減少させたことは、創薬のための基礎データとしてたいへん興味深い。

さらに、サラセミア症とそのモデル動物の LDL 酸化時に生成する脂質ラジカル、そして動脈硬化モデルや肥満症+DEN 投与モデル、四塩化炭素投与(急性肝障害)モデルなどで生成する脂質ラジカルなども、蛍光プローブ NBD-Pen で検出できた。よって、脂質ラジカルの生成が主因・危険因子である様々な

疾患を対象とした創薬のために、蛍光プローブ NBD-Pen の脂質ラジカル結合部位（およびその誘導体）の利用が期待される。

学会発表、論文発表、共同研究を積極的に行い、本さがけ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本分野の顕著な研究者の一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった（平成 28 年 4 月に教授に昇任）。

今後も柔軟な発想で、脂質ラジカルに対するより高感度なプローブの開発、迅速・簡便・低コストな検出キットの開発、脂質ラジカルによる疾患発症の分子メカニズムの解明など広範な分野で研究を展開していくことを期待する。また、現時点で非公表の研究成果も多数あることから、これらの今後の展開（学会・論文発表、知財確保）にも期待する。

10. 評価者

研究総括 小田 吉哉 エーザイ・プロダクトクリエーション・システムズ バイオマーカー&パーソナライズド・メディスン機能ユニット プレジデント

領域アドバイザー（五十音順。所属、役職は平成 29 年 3 月末現在）

飯田 順子 (株)島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部 シニアマネージャー
石濱 泰 京都大学 大学院薬学研究科 教授
上杉 志成 京都大学 物質-細胞統合システム拠点 教授
浦野 泰照 東京大学 大学院薬学系研究科・医学系研究科 教授
北野 宏明 特定非営利活動法人システム・バイオロジー研究機構
／沖縄科学技術大学院大学 会長／教授
澤田 拓子 塩野義製薬(株)取締役 専務執行役員／経営戦略本部長
清水 孝雄*1 国立国際医療研究センター 理事 脂質シグナリングプロジェクト長
曾我 朋義 慶應義塾大学 先端生命科学研究科 教授
富澤 一仁 熊本大学 大学院生命科学研究部 教授
福崎 英一郎 大阪大学 大学院工学研究科 教授
眞野 成康 東北大学病院 教授・薬剤部長

*1 平成 27 年 6 月～平成 29 年 3 月まで参画

(参考)

件数はいずれも、平成 29 年 3 月末現在。

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	7	110	117
口 頭	149	37	186
その他	48	14	62
合 計	204	161	365

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
5	2	7

(3) 受賞等

- ・小松 徹
平成 29 年度薬学会奨励賞(H29.3)
- ・柴田 貴広
日本農芸化学会 農芸化学奨励賞(H26.3)
- ・杉浦 悠毅
日本質量分析学会 奨励賞受賞 (H27.6)

日本医用マススペクトル学会 奨励賞受賞 (H26.10)

・西田 基宏

第 25 回 アステラス病態代謝研究会 最優秀理事長賞受賞 (H26.10)

・山田 健一

日本酸化ストレス学会 学術賞 (H28.8)

(4)招待講演

国際 18件

国内 45件

別紙

「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」領域
事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
井上 飛鳥 (兼任)	G タンパク質共役型受容体の活性化に 影響を及ぼす代謝物の同定 (東北大学大学院薬学研究科)	東北大学大学院薬学研究科 准教授 (同上 助手)	56
小松 徹 (兼任)	タンパク質の動的機能の理解に基づく 新たな疾患バイオマーカー・創薬標的 分子探索法の開発 (東京大学大学院薬学系研究科)	東京大学大学院薬学系研究科 特任助教 (同上 特任助教)	42
重永 章 (兼任)	創薬標的の同定・解析を可能とする革 新的ツールの創製 (徳島大学大学院医歯薬学研究部)	徳島大学大学院医歯薬学研究部 講師 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエ ンス研究部 助教)	44
柴田 貴広 (兼任)	タンパク質分子上に形成されるアダクト ーム解析法の確立 (名古屋大学大学院生命農学研究科)	名古屋大学大学院生命農学研究科 准教授 (同上 助教)	54
杉浦 悠毅 (兼任)	代謝経路フラックスイメージング法によ る”局所”疾患代謝の解明 (慶應義塾大学医学部医化学教室)	慶應義塾大学医学部医化学教室 専任講師 (科学技術振興機構さきがけ研究者)	55
西田 基宏 (兼任)	硫黄循環・代謝を基軸とした生体レドッ クス恒常性制御基盤の構築 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサ イエンスセンター)	自然科学研究機構岡崎統合バイオサ イエンスセンター 教授 (九州大学大学院薬学研究院 准教 授)	56
山田 健一 (兼任)	脂質ラジカル選択的蛍光・質量分析マ ルチプローブの開発と疾患モデルへの 適用 (九州大学大学院薬学研究院)	九州大学大学院薬学研究院 教授 (同上 准教授)	62

研 究 報 告 書

「G タンパク質共役型受容体の活性化に影響を及ぼす代謝物の同定」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研 究 者: 井上 飛鳥

1. 研究のねらい

疾患を反映する代謝産物を同定することと並んで、その代謝産物の標的分子を同定することは、疾患の機序解明や創薬開発において極めて重要である。しかし、多数の候補タンパク質の中でどの標的分子に代謝産物が作用するかを明らかにすることは困難を極める。本研究では、私は独自に開発した G タンパク質共役型受容体(GPCR)の活性化検出手法(TGF α 切断アッセイ)を利用し、疾患関連代謝物・生理活性物質の GPCR 標的を探索する。TGF α 切断アッセイは既存の GPCR アッセイと比べて広範囲の受容体の活性を同一のアッセイ条件で検出可能であるとともに、安価に多数の検体を評価できる。また、TGF α 切断アッセイを改良し、GPCR シグナル解析やリガンド作動性イオンチャネルへ適用することで、GPCR の活性化検出に加えて幅広い解析技術への応用を試みる。特に、代謝産物がどのような GPCR シグナルを誘導するかを詳細に理解することは、代謝産物の生理活性の分子機構の解明につながる。これを可能とする GPCR 解析ツールの開発にも取り組む。GPCR シグナルの異常、すなわち代謝産物が正常に機能しない状況は多くの疾患に関わるが、その寄与を理解するには遺伝子変異(先天性遺伝子疾患や腫瘍組織の遺伝子変異)からの情報が極めて有用である。この点において、GPCR や GPCR シグナル因子の変異解析を通じて、疾患発症や病態進行の分子機構を理解する。GPCR は創薬開発の最も重要かつ成功確率の高い標的群であることから、本研究で明らかにする疾患関連代謝物・生理活性物質の受容体を標的とした創薬基盤の確立が期待される。

2. 研究成果

(1)概要

TGF α 切断アッセイの改良を図り、多検体の GPCR 応答を高精度かつ低コストに測定する手法を確立した。この手法を用いて、生理活性化合物を始めとする代謝物が GPCR を活性化するかを指標にヒト GPCR ライブラリーのスクリーニングを行い、複数の GPCR 標的を同定した。同定した GPCR の一部に関しては、共同研究により遺伝子欠損マウスを用いた解析を行い、個体レベルで実際に標的受容体を介して生理作用を有していることを明らかにした。特に脂質の酸化代謝物に関しては、これを認識する GPCR を複数同定しており、今後の研究の展開で酸化脂質の重要性が明らかとなることが期待される。また、GPCR の細胞内シグナル伝達を解析する手法を構築し、GPCR に作用する代謝物がどのような機序で細胞応答を制御するかを明らかにした。さらに、疾患患者において見出された GPCR 遺伝子や GPCR 関連遺伝子の変異による機能変化を解析し、GPCR シグナルの異常による疾患発症の一端を明らかにした。これらの GPCR 解析基盤技術は代謝物の GPCR シグナル制御とその破綻による疾患の発症機構、さらには GPCR 作用薬の薬効機序を理解する上で有用なツールとなる。

(2) 詳細

研究テーマ A 「GPCR スクリーニング実施」

標的が未知の生理活性物質(主に共同研究先から提供)及び化合物ライブラリー(市販品を購入)を用いて、所有する GPCR ライブラリー(後述)に対する応答性を TGF α 切断アッセイにより評価した。その結果、抗炎症性酸化脂質により活性化される受容体として FFA1/GPR40、リゾリン脂質に応答する受容体として GPR55、生理活性脂質オレアミドに応答する複数の受容体、生理活性脂質リゾホスファチジルスレオニンにより活性化される受容体、酸化リン脂質を認識するマウス受容体(後述)を見出した。酸化脂質およびリゾリン脂質の個体レベルにおける機能は共同研究先(医薬基盤研・國澤純プロジェクトリーダー、理研・上口裕之チームリーダー・平林義雄チームリーダー)が受容体ノックアウトマウス等を用いて解析を進め、この受容体を介して生理機能を発揮することを確認した(Nagatake et al. submitted, Guy et al. Science 2015)。

薬剤はヒトが摂取した後、排泄物を介して薬剤やその代謝物が環境中に拡散することが懸念されているが、その実態や影響は明らかになっていない。下水中に含まれる GPCR 作用薬の残存活性を京大・井原賢博士との共同研究により評価し、19 種類の GPCR 中、8 種類に対するアンタゴニスト活性と 1 種類に対するアゴニスト活性を検出した(Ihara, Inoue, et al. Environ Sci Technol 2015)。特に AT1 受容体アンタゴニスト活性が顕著であった。

本さがけ研究の開始前に生理活性脂質リゾホスファチジルセリン(LysoPS)に応答する 2 種類のオーファン GPCR(P2Y10, GPR174)を同定したが、これら受容体のさらなる機能解析には高親和性・サブタイプ選択的な薬理学的ツールの開発が必要である。東大・大和田智彦教授との共同研究により LysoPS 骨格をもとに合成展開し、LysoPS 受容体アゴニストを創生した。LysoPS の部分骨格の合成展開のパターンにより複数のシリーズのリガンドを合成し、サブタイプ選択的あるいはパンアゴニストを開発した(Uwamizu, Inoue, et al. J Biochem 2015; Ikubo, Inoue et al. J Med Chem 2015; Jung, Inoue et al. J Med Chem 2016; 特許出願 2)。

網羅的な GPCR スクリーニングを行うには、GPCR 発現プラスミドライブラリーの拡充とその活性検出方法の検証が必要である。本さがけ研究期間中に 132 種類のヒト GPCR 発現プラスミドを作製し、開始前に保有していた 173 種類と合わせて、合計 305 種類の発現プラスミドに拡張した。このうち、代謝物・創薬の主要な標的であるクラス A の GPCR は 282 種類中 263 種類(9 割超)の発現プラスミドを有する。マウス GPCR 発現プラスミドの拡充も行い、オーファン GPCR や脂質 GPCR を中心に 42 種類の GPCR 発現プラスミドライブラリーを加えた。保有するマウス GPCR 発現プラスミドが機能的な受容体をコードしているか、またその活性を検出可能であるかどうか検証し、163 種類の GPCR のうち 151 種類(93%)の GPCR について活性を TGF α 切断アッセイにより検出できることを確かめた。

研究テーマ B 「TGF α 切断アッセイの改良」

本研究費で購入した機器(高速プレートリーダー、プレートスタッカー、液体ディスペンサー、96/384 ウェル・分注機)を用いて、TGF α 切断アッセイをハイスループット化した。また、実

験のアッセイ条件を検討し、プレート枚数が増えてもアッセイの精度を保って実験結果が出る条件を確立した。例えば、アルカリホスファターゼ反応の温度管理を工夫することで、エッジ効果を大幅に低減することができ、またテスト化合物をあらかじめ分注しておくことで化合物の添加に伴う時間差や温度変化を少なくすることができた。これらの工夫により、1日に96ウェルプレート50枚程度の実験をルーチンに行う実験環境を整備した。ランニングコストを抑えた実験フォーマットにも対応しており、例えば1バッチ96ウェルプレート10枚の実験を3,000円程度のコストで遂行することが可能である（一斉分注機を用いる場合、同8,000円程度）。

AP-TGF α コンストラクトに含まれる胎盤アルカリホスファターゼ(ALPL)を別の酵素に置換可能か試したところ、ルシフェラーゼや高活性アルカリホスファターゼを融合させたコンストラクトでもAP-TGF α コンストラクトと同程度のエクドメイン切断と培養上清への放出が生じた。今後、ALPLや吸光反応と相性の悪い実験系が出てきた場合、他の酵素を選択することが可能である。

Flp-Inシステム(Invitrogen社製)を用いてTGF α 切断アッセイに使用可能な安定発現細胞を作製する手法を確立した。AP-TGF α -IRES-GPCRコンストラクトをドナープラスミドに組み込みFlp-In細胞に導入することで、目的のコンストラクトを発現するポリクローナルな安定発現細胞を樹立することができた。キメラG α サブユニットの共発現が必要なGPCRにおいては、AP-TGF α -IRES-GPCR-2A-G α のコンストラクトを用いた。受容体活性化によるTGF α 切断応答は一過性発現細胞と同程度であったが、安定発現細胞は均質の細胞を大量に調製可能であり、数万検体の化合物スクリーニングなどに有用である。

各種Gタンパク質を欠損させたHEK293細胞(G α _i/11二重欠損、G α _{12/13}二重欠損、G α _q/11/12/13四重欠損)をCRISPR-Cas9システムを用いて作製し、これらの細胞を用いたTGF α 切断アッセイを行うことで、特定のGタンパク質シグナルを解析することに有用であることを実証した。特に、キメラG α サブユニットを1種類ずつ四重欠損に導入することで、Gタンパク質の共役やバイアスドリガンドを簡便かつ定量的に評価する手法を確立した(特許出願1)。

研究テーマC「TRPチャンネルへの応用」

TRPチャンネルの活性化をTGF α 切断アッセイにより検出可能であることを実証した。TRPV1, TRPA1, TRPM8の発現プラスミドを導入したHEK293細胞に対し、各々のアゴニストを添加してGPCRと同様のTGF α 切断アッセイを行ったところ、顕著なTGF α 切断応答が誘導された。TGF α 切断アッセイを用いるとアンタゴニスト活性も精度よく評価できた。なお、本研究で樹立したGタンパク質四重欠損細胞は内在のGPCRを介したTGF α 切断応答は完全に消失する一方、TRPチャンネルの応答性は変化しないため、化合物のバックグラウンド応答を低下させたTRPチャンネルの活性評価が可能であった。その例として、TRPV1のリゾホスファチジン酸に対する応答性を良好に検出することができた。

20種類のTRPチャンネル遺伝子のクローニングを行い、受容体発現プラスミドライブラリーに追加した。TRPチャンネルに対する生理活性物質のスクリーニングを行ったところ、2種類の生理活性物質がTRPチャンネルを活性化することを見出した。

TACE/ADAM17欠損HEK293細胞を樹立し、TGF α 切断応答を解析したところ、GPCRによる

TGF α 切断応答は TACE のみが担う一方、TRP チャネルによる TGF α 切断応答は TACE と ADAM10 が担うことを見出した。エクストドメイン切断は種々の生命現象に関わることが知られているが、その活性制御は未解明な点が多い。GPCR と TRP チャネルが異なる機構で ADAM 膜型プロテアーゼを制御することから、今後それぞれのシグナルの差異に着目した解析によりエクストドメイン切断の理解が進むものと期待される。また、TACE 欠損細胞は GPCR シグナルによる TGF α 切断応答は引き起こさないため、GPCR による TRP チャネルのトランス活性化を解析するよいツールとなりうる。

研究テーマ D「酸化リン脂質受容体 MRGX4 のリガンド同定」、研究テーマ E「酸化リン脂質受容体 MRGX4 の機能解析」

本研究者は、本さがけ研究開始以前にオーファン受容体 MRGX4 が酸化リン脂質により活性化されることを見出した。純品の酸化体の MRGX4 活性画分の精製実験から、MRGX4 はリン脂質の脂肪酸の二重結合の位置が高度に酸化された化合物を認識することを見出していたが、このような代謝物が産生されるかは明らかでなかった。培養細胞に MRGX4 を発現させると細胞増殖が低下し、この作用は酸化リン脂質処理で亢進し、抗酸化物質の処理で減弱した。ゼブラフィッシュ初期胚に MRGX4 mRNA をインジェクトしたところ、胚が過剰分裂して形態形成が異常になることがわかった。この MRGX4 発現ゼブラフィッシュ胚を抗酸化剤トコフェロールで処理したところ、過剰な細胞分裂異常が抑制された。従って、培養細胞とゼブラフィッシュにおいて、MRGX4 を活性化する代謝物が酸化反応依存的に産生されることが強く示唆された。また、MRGX4 は酸化 LDL に応答することを見出した。酸化リン脂質は動脈硬化時の疾患関連代謝物として知られるが、その作用標的として MRGX4 の関与が想定された(Ishiguro, Inoue et al., submitted)。

アミノ酸配列上、明確なヒト MRGX4 のマウスオルソログが存在しなかったため、マウスの MRG ファミリーメンバーを網羅的にクローニングし、酸化リン脂質の応答性をスクリーニングしたところ、Mr gb5 と Mr gg が酸化リン脂質(特に酸化カルジオリピン)に対して応答性を示すことを見出した。マウスオルソログの同定によりノックアウトマウスの解析が可能となった。

追加研究テーマ「GPCR と疾患」

リゾホスファチジン酸(LPA)は毛包内で産生される脂質メディエーターであり、その代謝物の欠失は毛髪形成異常を引き起こす。産生酵素 PA-PLA1 α /LIPH や受容体 LPA6/LPAR6 の遺伝子欠損患者は先天性乏毛症と呼ばれる疾患を生じる。新潟大・下村裕准教授との共同研究で日本人の先天性乏毛症患者から新たな変異を見出し、培養細胞を用いた実験によりこれが機能的に欠失していることを検証した(Hayashi, Inoue et al. J Dermatol Sci 2015)。乏毛症患者の LPAR6 の遺伝子変異として報告のある点変異のうち、一部は機能減弱型であることを見出しており、これらの患者は高親和性 LPA6 アゴニストが治療薬となる可能性がある。

LPA6 の結晶構造を東京大・濡木理教授との共同研究で解明した(Taniguchi, Inoue et al. in submission)。LPA6 はそのリガンドが脂質であるとともに G12/13 と選択的に共役する受容体

であるため、その活性を検出することは困難であった。TGF α 切断アッセイを活用することで、LPA6 結晶化コンストラクトの最適化および点変異コンストラクトによるリガンド結合の検証が可能となった。LPA6 アゴニストは上記の乏毛症患者(主に産生酵素 PA-PLA1 α /LIPH 欠損患者)の疾患治療薬となる可能性があり、LPA6 の結晶構造を利用した今後の LPA6 アゴニストの創生が期待される。

近年の臨床検体の大規模ゲノムシーケンスにより、がんに関わる遺伝子変異が次々と見出されてきている。共同研究先(米国・NIH(現UCSD)・Gutkind教授)はGNA13-RHOA経路の遺伝子変異がリンパ腫で高頻度に検出されることを見出した。本研究者はG13シグナルを高感度に検出できるTGF α 切断アッセイを用いて、G α 3 変異体の機能解析を行い、リンパ腫で見出された多くの変異は機能減弱型となることを示した。共同研究先はマウス担がん実験を行い、G α 3 変異体の機能低下が腫瘍形成を促進することを検証した(O' Hayre, Inoue, et al. Oncogene 2016)。

追加研究テーマ「GPCRと下流シグナルの統合理解」

GPCRは複数のGタンパク質と共役し、それぞれ固有の細胞応答を引き起こすが、すべてのGタンパク質に対してどの程度の共役活性を示すかどうかの定量的な理解は欠けている。本研究者はGPCRの共役するGタンパク質を網羅的かつ簡便に評価する手法を確立した(出願特許1)。この手法はバイアスドリガンドの評価にも有用であることを実証した。代謝物の中にはバイアスシグナルを誘導することで特異的な細胞応答を引き起こすものがあると想定され、このような活性を評価する際に有用である。さらに、148種類のヒトGPCRに対してGタンパク質の定量的な共役データを取得した。共役データと既存の組織発現データを組み合わせることで、GPCRの個体内の機能やGPCR作用薬の薬効・副作用の推定が可能となると期待される。

カルシトニン受容体アゴニスト(ヒトCT、サーモンCT)の薬理効果に関してオーストラリア・モナッシュ大学・Patrick Sexton教授と共同研究を行い、これらアゴニストがリガンド/受容体/Gsの複合体を介して異なったGsの活性化構造を誘導することを明らかにした。バイアスリガンドがGタンパク質エフェクターに対して異なる構造変化を誘導するという新しい概念を提唱した(Furness et al. Cell 2016)。

追加研究テーマ「GPCR解析ツール開発と普及」

CRISPR-Cas9システムを用いて各種Gタンパク質を欠損させたHEK293細胞や β アレステン欠損HEK293細胞を樹立し、GPCRエフェクター欠損細胞パネルを構築した。HEK293細胞はトランスフェクションによるタンパク質発現が容易であり、これまでの解析手法では混沌としているGPCRシグナルに明確な答えを与えることができる。Gタンパク質欠損細胞を利用することで、例えば、副甲状腺機能低下症の機能獲得型GNA11遺伝子変異(Roszkó et al. JCI Insight 2017)、低分子Gq阻害剤の特異性を示すこと(Schrage et al. Nat Commun 2015)、GqシグナルバイアスのデザイナーGPCRの開発(Hu et al. J Biol Chem 2016)に貢献した。

近年開発された高輝度ルシフェラーゼの断片補酵素法 NanoBit を利用して、G タンパク質シグナルの上流を検出する手法を開発した。既存の FRET や BRET と比べて容易な実験手法であるとともに高精度である。これらのツールを利用することで、GPCR に作用する代謝物・薬物がどのような細胞内シグナルを介して細胞応答に影響するかを解明することができる。

TGF α 切断アッセイを始めとする本研究者が開発した GPCR ツールを多数の研究者に供与し、GPCR 解析手法の普及に努めた。本研究期間中、TGF α 切断アッセイの技術指導 23 件（国内 15 件、国外 8 件）、GPCR アッセイプラスミド供与 47 件（国内 27 件、国外 20 件）、GPCR エフェクター欠損細胞供与 54 件（国内 9 件、国外 45 件）に達した。

以上、代謝物・生理活性物質の標的 GPCR を同定することで、その作用機構の理解が加速した。また、GPCR シグナルに着目した研究から、代謝物がどのようなシグナルを制御して細胞応答を担うか、その破綻がどのような疾患に結びつくかについての知見が得られた。これらの研究成果は、疾患の機構の一端を解明するとともに、GPCR を標的とした創薬開発を加速することが期待される。

3. 今後の展開

生理活性物質の標的として見出した GPCR が実際に着目する生理機能を担う受容体であるかどうかは受容体選択的アゴニスト・アンタゴニストや遺伝子欠損マウス等を用いた解析により検証する必要がある。また、オーファン GPCR のリガンドとして同定した化合物は、これが生体内で産生されて受容体に作用する量が存在するか不明の場合が多い。この場合は質量分析計などを用いた定量系を構築し、臨床検体や疾患モデル動物の濃度を測定することでどの疾患に関与するかヒントが得られる。いずれの場合も、GPCR の下流シグナルを丹念に解析することで、個体での機能の手がかりが得られる。見出した GPCR 標的の疾患における寄与を明らかにすることができれば、GPCR は創薬標的として極めて有望なタンパク質群であることから、新たな疾患治療薬の開発につながる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的である GPCR のリガンド同定は十分な成果を上げた。これらの受容体を介して生理活性を担うことを検証した。研究実施に関しては、第2年度から補佐員を雇用することができ、培養細胞の実験を順調に進めることができた。研究費は計画通り執行した。一部、研究が想定以上に進んだため研究費の増額があり、これによる研究加速も期待通りであった。本研究を通じて、国内・国外への GPCR 研究ツールの普及に努め、ツールの標準化に貢献した。また、企業に対しても GPCR 研究ツールの導入を支援した。これらの成果は GPCR を標的とした創薬研究の加速に貢献する。中長期的には、本研究成果が新規 GPCR 標的薬の開発につながり、疾患の治療に寄与する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は創薬において最も重要な標的タンパク質群の一つであり、その活性化に関与する生体内化合物の同定や阻害剤の発見は極めて重要である。しかしながら、汎用的な活性化の検出は困難がともなう場合が多い。本さがけ研究では、GPCR のユニークな活性化検出手法である TGF α 切断アッセイを利用して、抗炎症性酸化脂質により活性化される受容体やリゾリン脂質に応答する受容体、生理活性脂質リゾホスファチジルスレオニンにより活性化される受容体、酸化リン脂質を認識する受容体などを見出した。また、TGF α 切断アッセイの改良もおこない、アッセイをハイスループット化し、より迅速・簡便・低コスト化した。TGF α 切断アッセイに使用可能な安定発現細胞を作製する手法も確立した。

さらに、TRP チャネルの活性化についても、TGF α 切断アッセイにより検出可能であることを実証した。その他にも、酸化リン脂質受容体 MRGX4 のリガンド同定・機能解析、GPCR 遺伝子と疾患との関連、GPCR と下流シグナルの統合理解、GPCR 解析ツール開発と普及などについても、大きな成果が得られた。

これらの優れた研究成果が認められ、本さがけ研究領域内での共同研究や国際的に著名な研究グループとの共同研究にも発展し、本分野の先駆的研究者の一人として注目されるようになった(平成 28 年度 10 月に准教授に昇任)。よって、さがけ研究が研究者としての大きな飛躍につながった。また、開発した GPCR 研究ツールをアカデミアのみならず企業へもその導入を支援するなど、科学技術及び社会・経済への波及効果が大きいことが期待される。

さらに、活性型 GPCR を創成する手法を開発したことにより、国立研究開発法人日本医療研究開発機構の平成 28 年度 革新的先端研究開発支援事業「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」の PRIME にも、研究課題名「リガンドが不要な革新的 GPCR ツールを用いた脂質関連オーファン受容体の機能解明」が採択され、平成 28 年度 10 月から研究が開始された。今後も、TGF α 切断アッセイのさらなる改良をコア技術として、新たな研究分野を開拓していくことが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Masaru Ihara, Asuka Inoue, Seiya Hanamoto, Han Zhang, Junken Aoki and Hiroaki Tanaka. Detection of physiological activities of G protein-coupled receptor-acting pharmaceuticals in wastewater. Environmental Science & Technology. 2015, 49(3), 1903-11.
2. Ryota Hayashi, Asuka Inoue, Yasushi Suga, Junken Aoki, Yutaka Shimomura. Expression and functional studies of unique compound heterozygous mutations in the LPAR6 gene identified in a Japanese family with autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis. Journal of Dermatological Science. 2015, 78(3), 197-205.
3. Adam T. Guy, Yasuko Nagatsuka, Noriko Ooashi, Mariko Inoue, Asuka Nakata, Peter Greimel, Asuka Inoue, Takuji Nabetani, Akiho Murayama, Kunihiro Ohta, Yukishige Ito, Junken Aoki, Yoshio Hirabayashi, Hiroyuki Kamiguchi. Glycerophospholipid regulation of

modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. Science. 2015, 349(6251): 974-7.

4. Morgan O' Hayre, Asuka Inoue, Irina Kufareva, Constantinos Mikelis, Fukun Guo, Zhiyong Wang, Silvia Avino, Kira Finkel, Giovanni DiPasquale, Alfredo Molinolo, Junken Aoki, Yi Zheng, J. Silvio Gutkind. Inactivating mutations in GNA13 and RHOA in Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a tumor suppressor function for the G α 13/RhoA axis in B cells. Oncogene. 2016, 35(29):3771-80.

5. Elisa Alvarez-Curto, Asuka Inoue, Laura Jenkins, Sheikh Zahir Raihan, Rudi Prihandoko, Andrew B. Tobin and Graeme Milligan. Targeted Elimination of G proteins and Arrestins Defines their Specific Contributions to both Intensity and Duration of G protein-Coupled Receptor Signalling. Journal of Biological Chemistry. 2016, 291(53):27147-27159.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2 件

1.

発 明 者: 青木淳賢、井上飛鳥

発明の名称: Gタンパク質共役型受容体のシグナル伝達の検出方法

出 願 人: 国立大学法人東北大学

出 願 日: 2014/2/25

出 願 番 号: PCT/JP2014/000992

2.

発 明 者: 大和田智彦、尾谷優子、佐山美紗、ジョンセジン、青木淳賢、井上飛鳥

発明の名称: 多環式リゾホスファチジルセリン誘導体

出 願 人: 国立大学法人東京大学、国立大学法人東北大学

出 願 日: 2015/3/24

出 願 番 号: 特願 2015-61535

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会発表 口頭発表

International Conference on Pharmacology and Drug Development (ICoPaDD) (2014),
Singapore

6th international conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2015) (2015)

Keystone Symposia Conference B3: G Protein-Coupled Receptors: Structure, Signaling and
Drug Discovery (2016)

プレスリリース

神経回路構築を制御する脂質を発見(2015 年 8 月 28 日)

https://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20150824_02web.pdf

研究報告書

「タンパク質の動的機能の理解に基づく新たな疾患バイオマーカー・創薬標的分子探索法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 小松 徹

1. 研究のねらい

ヒト生体内には、数千種類を超える酵素が存在し、これらの機能の異常が疾患と繋がる例は多く知られていますが、いまだ、「疾患との関わりが見出されていない」、「疾患との関わりは知られているがその分子メカニズムが明らかにされていない」、「疾患との関わり、分子メカニズムが明らかにされているが、その機能を制御する手法が確立されていない」といった酵素は数多く存在します。本研究では、酵素の動的機能の理解を可能とするケミカルバイオロジーの研究ツールを開発し、これらの疾患関連酵素の理解を進め、疾患と関連する酵素を「探す」「見る」「操る」ことを目指した研究を進めて参りました。

具体的には、申請者らが開発した、目的の生理活性を有する未知の標的タンパク質をタンパク質の総体(プロテオーム)中から機能に応じた形で見出す新たな探索研究の実験系(蛍光法の利点である高感度測定と、酵素反応のターンオーバーを利用したシグナルの増幅を実現し、プロテオーム中にタンパク質 100,000～1,000,000 分子に1分子以下の割合で存在する微量の酵素を、その機能に応じた形で、網羅的に検出することを可能とするもの)を基盤技術とし、疾患に関連するタンパク質の動的な機能を理解するツール開発と合わせることで、タンパク質の網羅的探索を進め、新たな創薬標的タンパク質、疾患バイオマーカーの確立に繋げていくことを目指して、以下に纏める研究を実施しました。

2. 研究成果

(1)概要

上記の背景・目的の下、本研究は、大きく2つの方向性をもっておこなわれてきました。一方は、生体中で活性を有する酵素の総体を「enzym-ome」と定義し、これらの網羅的解析により、疾患と関わる酵素活性の異常を効率的に見出し、その活性本体タンパク質を決定していくという手法です。そしてもう一方は、疾患と関わることが知られている代謝物やその代謝活性に着目し、これを担う酵素のはたらきを高感度に可視化する研究ツールを開発し、さらには、その活性を制御する手法を確立するというものです。前者の活性タンパク質探索の研究成果としては、酵素活性の網羅的解析を実施する「enzym-omics」という概念を提唱し、これに用いる方法論を開発し、実際に、(A) 薬剤の選択的活性化に関わる酵素、(B) 肺炎症時に肺胞洗浄液中での活性上昇に関わる酵素、(C) 大腸癌の癌部位で活性上昇が見られる酵素、の発見を実現し、これらを学会発表・論文発表しました。後者の可視化ツール開発・活性制御の研究成果としては、これまでに活性評価法の確立されていなかった、(D) isoaspartyl 基の生成と代謝に関わる酵素、(E) 癌細胞のエネルギー代謝系に関わる酵素、のそれぞれについて、新たな酵素活性評価法を確立し、特許出願すると共に、これらを用いた活性制御化合物

の取得をおこない、その有用性を検証した成果の一部を学会・文献発表しました。また、これ以外にも、酵素活性評価のツール開発を通じたさがけ内の共同研究を実施し、(F) 細胞表面のプロテアーゼ活性を可視化する蛍光プローブの開発、(G) 細胞表面のタンパク質機能を制御する実験系の構築、などの共同研究成果を得て、これらの成果の一部を学会発表・論文発表しました。

(2) 詳細

活性タンパク質探索の研究成果

研究テーマA「薬剤の選択的活性化に関わる酵素の発見」

生体内の興味深い代謝活性をスクリーニングし、活性本体タンパク質の同定とその利用への展開を目指す enzym-omics 研究の一例として、「種々の反応点を有し、特定の代謝活性によって代謝されると蛍光性を獲得する」という性質を有する pro-fluorescent 蛍光プローブ群(約 60 種類)を開発し、マウスの各臓器間の活性の違いを調べるプロファイリングをおこないました。その結果、肝臓において選択的に蛍光上昇を示す構造として、ピルビン酸のアミド構造を選択的に加水分解するという興味深い活性が見出され、その臓器特異的な活性の責任酵素を、研究代表者らが開発した酵素探索手法を用いて探索した結果、carboxylesterase の特異的なサブタイプがこの活性を担っていることが明らかとなりました。更に、このようにして見出された臓器特異的な活性を利用することで、臓器選択的に狙った分子の機能を発現させるプロドラッグシステムの開発にも成功しました。

enzym-omics の概念提唱をおこない、新たな代謝活性の発見を実現した本研究成果は、*Journal of the American Chemical Society* 誌に掲載されました。

研究テーマB「肺炎症時に肺胞洗浄液中での活性上昇に関わる酵素の発見」

上記のシステムを、肺炎症モデルマウスの肺胞洗浄液(肺内を生理食塩水で洗浄して回収した体液。ヒトでも実際の臨床診断にも用いられる)中の網羅的酵素活性検出へと適用し、マウスの肺炎症時に、肺胞洗浄液中の酵素 acylamino acid releasing enzyme(APEH)の活性が大幅に上昇することを明らかにしました。また、その分子メカニズムについて理解を進め、肺炎症によって肺胞内に APEH 活性を有する免疫細胞が浸潤してくることが、その活性上昇に繋がっていることを確かめました。実際の臨床診断の新たなツールを与えることにも繋がり得る本成果は、*Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 誌に cover article として掲載され、本研究成果をもって、平成 29 年度薬学会奨励賞を受賞しました。

研究テーマC「大腸癌の癌部位で活性上昇が見られる酵素の発見」

enzym-omics の方法論を更に一般化するため、タンパク質の加水分解によって調整したペプチドライブラリーを用いて、生体サンプル中の 100 種類以上のペプチド代謝活性を同時に評価することを可能とする実験系の開発をおこないました。これを用い、AMED-CREST 疾患代謝領域の浦野泰照教授、東京大学腫瘍外科の渡邊聡明教授らとの共同研究により、大腸癌患者の手術検体中から、癌部位で選択的に上昇している酵素活性を探索する研究を実施し、酵素 neurolysinを見出しました。新たな enzym-omic の方法論の確立から疾患関連タンパク質の

発見までを実現した本成果は、*Journal of the American Chemical Society* 誌に掲載されました。

可視化ツール開発・活性制御の研究成果

研究テーマD「isoaspartyl 基の生成と代謝に関わる酵素の活性評価法の確立」

isoaspartyl 基を選択的にメチル化する酵素 protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) は、2012年に、癌抑制タンパク質 p53 のはたらきを制御する酵素として、癌の悪性化との関わりが示唆されました。しかしながら、いまだその活性評価法や活性制御化合物が見出されていないことが、その詳細な分子メカニズム研究や、これを癌のバイオマーカー、治療標的として確立していく臨床研究に向けたハードルとなっています。本研究で、高い基質認識能を有する加水分解酵素を用いて、特定の基質の isoaspartyl 基のメチル化の有無を見分ける仕組みを確立し、蛍光特性の変化によって酵素 PIMT の活性を高スループットに評価する分子ツールを開発し、特許出願をおこないました。また、東京大学創薬機構との共同研究により、20 万化合物のスクリーニングをおこない、世界初の PIMT 阻害剤の発見を実現しました。新規の癌関連タンパク質である PIMT の創薬標的としての有用性を検証するツールを与える本研究成果は、*Angewandte Chemie International Edition* 誌に掲載されました。

研究テーマE「癌細胞のエネルギー代謝系に関わる酵素の活性評価法の確立」

癌細胞の多くは、増殖速度の変化などの特有の性質を実現するために、そのエネルギー代謝系を大きく変化させることが知られています。このような、癌細胞特異的な代謝活性の制御化合物を取得する阻害剤スクリーニング系の開発は、特に癌をはじめとする代謝が関わる疾患治療薬の新たな候補化合物の取得に繋がることが期待されるものですが、現在は、これに用いることができるアッセイ系の多くは、個々の酵素に着目した *in vitro* での酵素アッセイに留まっており、生細胞レベルで目的のエネルギー代謝系を制御する薬剤のスクリーニング系の開発が強く求められています。研究代表者らは、これに用いることができるアッセイ系として、特定の代謝物(input)を細胞に与えた場合に目的の代謝系を介して細胞外に放出される代謝物(output)を高感度検出する pathway-oriented screening という概念を提唱し、これに用いることができる分子ツールを開発し、癌において亢進の見られる代謝系のひとつである解糖系の阻害剤スクリーニング系を確立しました(特許出願済)。これを用いて、東京大学創薬機構との共同研究により、生理活性既知の化合物群の中から、新たに強い解糖系阻害作用を示す薬剤を取得することに成功しました。本成果は、日本薬学会年会などにおいて発表をおこないました。

研究テーマF「細胞表面のプロテアーゼ活性を可視化する蛍光プローブの開発(疾患代謝領域 井上飛鳥研究者との共同研究)」

さががけ内共同研究として、細胞表面プロテアーゼの活性を評価する分子ツールの設計原理を確立し、種々の疾患との関わりが注目されている細胞表面プロテアーゼの活性を高感度に検出する実験系の確立をおこないました。現在、論文投稿準備中です。

研究テーマG「細胞表面のタンパク質機能を制御する実験系の構築(細胞機能領域 井上尊生研究者との共同研究)」

さががけ内共同研究として、有機小分子を使って細胞表面のタンパク質のはたらきを制御する実験系を確立し、任意のタイミングで細胞に対して、他の細胞を貪食する性質を付与する実験系の開発をおこないました。細胞の機能を、有機小分子を用いてコントロールする新たな概念を提唱する本研究成果は、*Science Signaling* 誌の cover article として掲載され、JST よりプレスリリースがおこなわれました。

3. 今後の展開

本研究を通じて、世界に先駆けて「enzyme-omics」という概念の提唱をおこない、その方法論と端緒となる成果を報告することを達成しました。これは、従来の遺伝子、mRNA、タンパク質レベルの網羅的解析法、あるいは代謝活性の産物である代謝物をベースとした網羅的解析法とは異なるポイントでの生体サンプルの評価を可能とする概念であり、多くの酵素活性の可視化ツールの開発に携わってきた本研究者においてはじめて達成可能なものであったと考えております。今後は、既に確立されている他の omics 研究の結果との橋渡しをおこないつつ、独自の疾患関連タンパク質の探索法として発展していくと期待されます。

特に、本研究を通じて見出されたシードの活用先としては、以下のものが考えられます。(1) 見出された酵素の活性変化に着目した生物学研究(疾患との関わり方の解明)、(2)疾患の原因としての可能性が確かめられた場合、これを抑える薬剤を開発する、(3) 見出された酵素活性の更なる高感度・高精度な活性測定系を開発することにより、疾患の早期診断や予後予測などをおこなうバイオマーカーとして確立する。

現在、本研究者が確立した本手法によって、様々な生体サンプルについて、興味深い酵素活性が次々と見つかり得る状況が実現しつつあり、今後、本手法を通じ、また、更なる手法の発展を図ることで、継続的な疾患関連タンパク質の発見を可能とする研究基盤として発展していくことと期待されます。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さががけ研究において、本研究者は、酵素活性を視る研究ツールの開発を通じたケミカルバイオロジー研究というフィールドにおいて、*Journal of the American Chemical Society* 誌、*Angewandte Chemie International Editions* 誌、*Science Signaling* 誌などのジャーナルをはじめとする7件の仕事について、責任著者としての論文発表をおこないました。これと併せて、本さががけ研究の成果を含む研究成果についてまとめた国内の書籍3編(実験医学など)、国際学術誌のレビュー5編(*ACS Chemical Biology* 誌など)を執筆し、関連分野への情報発信に努めました。これらの成果をもって、本研究者の論文被引用数はさががけ期間を通じて大幅に上昇し、2017年1月現在で1,700件を超え、さががけ研究者として十分な成果の発信をおこなうことができたと考えています。また、研究成果の波及を目指して、本さががけ研究を通じて開発された3件の分子ツールに関して、特許出願をおこないました。

代表的な研究成果としては、さががけ研究開始時から携わった酵素活性の網羅的評価に

基づく探索研究である「enzym-omics」の研究について、その概念提唱にあたる論文を2015年に発表し(この時点では enzym-omics の概念に基づく学術論文は皆無であった)、2017年、その新たな方法論を確立した論文を投稿中(リバイス中)である。更に、これらの方法論に基づいて、疾患に関わる新たな疾患関連タンパク質の候補を見出すことにも成功しており、これらの成果によって、新たな研究のフィールドを拓く仕事に繋がった点は、本さがけ研究の大きな収穫として捉えることができると考えています。

本研究は、手法の立ち上げから自身でおこなってきたこともあり、3年半の研究期間では、見出されたシードを臨床研究での成果として収める段階までには至らず、発表論文も手法開発を中心とした化学系の論文が主となった点は大変残念ではありますが、確立された技術と見出されたシードをもって、今後、精力的な橋渡し研究を進めていくことが可能となると考えています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

生体内には数千種類の酵素が存在すると予想されているが、その活性、代謝調節における役割や疾患との関連などについては不明な酵素が多い。本研究は、酵素活性の網羅的高感度検出を目的として、多種類の高感度蛍光基質を開発し、これを用いて非変性電気泳動法で分離された酵素の活性を網羅的に測定する手法により、疾患バイオマーカー・創薬標的分子探索法の開発を目指したものである。

このアプローチにより、薬剤の標的候補分子となりそうな臓器特異的なカルボキシルエステラーゼや肺炎マーカー候補(平成29年度薬学会奨励賞)、大腸癌マーカー候補などの発見につながった。今後、ヒトでの有用性の検証が期待される成果である。

また、酵素PIMTの活性を高スループットに評価する分子ツールを開発し、世界初のPIMT阻害剤の発見につながったことは、今後の創薬分野にも少なからぬインパクトを与えたと思われる。

さらに、解糖系の阻害剤スクリーニング系を確立し、強い解糖系阻害作用を示す化合物を取得するなど、癌の治療薬への今後の展開が興味深い。

他のさがけ研究者との共同研究にも積極的に取り組み、細胞表面のプロテアーゼ活性を可視化する蛍光プローブの開発や有機小分子を使って細胞表面のタンパク質のはたらきを制御する実験系の確立など、新規研究分野の開拓につながる可能性が期待される。

研究成果による知的財産についても、その確保に努力した。本さがけ研究の成果が認められ、主要な国内・国際学会の招待講演が増え、本分野の有力メンバーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。近年、癌組織において、特定の酵素活性が亢進していることが癌の原因と考えられる症例が数多く知られるようになってきた。今後も酵素活性の網羅的解析を実施する「enzym-omics」により、新たな疾患バイオマーカーの発見や創薬標的分子の同定において、大きな貢献がなされることを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Jun Onagi, Toru Komatsu*, Yuki Ichihashi, Yugo Kuriki, Mako Kamiya, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Hiroyuki Matsuzaki, Keisuke Hata, Toshiaki Watanabe, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano*
“Discovery of cell-type-specific and disease-related enzymatic activity changes via global evaluation of peptide metabolism”
Journal of the American Chemical Society, **in press** (DOI: 10.1021/jacs.6b11376)
2. Yusuke Kimura, Toru Komatsu*, Kouichi Yanagi, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Hirotsugu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano*
“Development of chemical tools to monitor and control isoaspartyl peptide methyltransferase activity”
Angewandte Chemie International Edition **2017**, *56*, 153–157.
3. Kentaro Yoshioka, Toru Komatsu*, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano*
“Discovery of pyruvylated peptide-metabolizing enzyme using a fluorescent substrate-based protein discovery technique”
Chemical Communications **2016**, *52*, 4377–4380.
4. Kentaro Yoshioka, Toru Komatsu*, Akihiro Nakada, Jun Onagi, Yugo Kuriki, Mitsuyasu Kawaguchi, Takuya Terai, Tasuku Ueno, Kenjiro Hanaoka, Tetsuo Nagano, and Yasuteru Urano*.
“Identification of tissue-restricted bio-reaction suitable for in vivo targeting by fluorescent substrate library-based enzyme discovery”
Journal of the American Chemical Society **2015**, *137*, 12187–12190.
5. Hiroki Onuma, Toru Komatsu*, Makoto Arita, Kenjiro Hanaoka, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Tetsuo Nagano and Takanari Inoue*
“Rapidly Rendering Cells Phagocytic Through a Cell-surface Display Technique and Concurrent Rac Activation”
Science Signaling **2014**, *7*, 334, rs4.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 3件

1.

発 明 者: 長野 哲雄, 花岡 健二郎, 小松 徹, 木村 勇亮

発明の名称: 酵素活性検出用試薬

出 願 人: 東京大学

出 願 日: 2014/2/28

出 願 番 号: 特願 2014-038427

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

〔主要な学会発表〕

さきがけ研究の成果について、日本薬学会年会、日本生化学会大会などの主要な国内学会において9件の招待講演をおこなった他、5件の国際学会発表(うち1件は招待講演)などの成果発信をおこないました。また、研究代表者は、日本薬学会第 136 年会(2016 年)内のシンポジウム『『疾患代謝』から解明される生命現象と創薬研究への応用』においてオーガナイザーを務めました。

〔受賞〕

本さきがけ研究の成果をもって、平成 29 年度薬学会奨励賞を受賞しました。

〔著作物〕

1. 小松 徹

「表現型アッセイ①:アカデミア創薬における創薬標的タンパク質の探索研究」

実験医学 2014 年 1 月増刊号『研究成果を薬につなげる アカデミア創薬の戦略と実例』

2. 小松 徹

「代謝活性を視る. 標的酵素を探す. - レポーター基質による代謝活性の評価と探索研究のしくみ」

実験医学増刊 Vol.32 No.15 2014 『驚愕の代謝システム - メタボロームの階層から解き明かす疾患研究の新たなステージ』

3. 小松 徹, 浦野 泰照

酵素のはたきを「見る」ケミカルバイオロジー研究

科学のとびら 60 「天然物の化学 - 魅力と展望」

〔プレスリリース〕

細胞に「食べる」機能を付与 ～細胞に新機能を付与する新しい研究ツール～

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140716/index.html>

(論文発表 4 の業績に対応. 細胞機能領域 井上尊生研究者との共同)

研 究 報 告 書

「創薬標的の同定・解析を可能とする革新的ツールの創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研 究 者: 重永 章

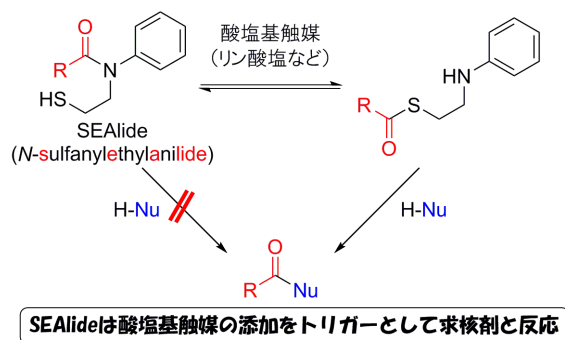
1. 研究のねらい

本研究では私たちの見出した SEALide の酸塩基触媒応答型N→Sアシル基転移反応(図1)を基盤とし、生物活性化合物が標的とするタンパク質の高効率同定を可能とするトレーサブルリンカー、および標的タンパク質の機能解明に資する標的タンパク質ラベル化試薬の開発を目指した。

生物活性化合物が標的とするタンパク質(標的タンパク質)の同定・機能解明は、これら化合物を医療応用へつなげるためには必要不可欠である。標的タンパク質の同定には、プロテオーム中の標的タンパク質の精製が必須となる。しかし多くの場合、容器などに吸着されていた非標的が標的に混入するため、その同定は困難を伴う。そこで私は、標的タンパク質の精製にあわせて標的タンパク質選択的ラベル化が可能となれば、ラベルを指標とした標的・非標的の区別が可能となることから、その後の同定も容易となると考えた。そこで本研究では1つ目のツールとして、標的タンパク質の精製・ラベル化をワンステップで可能とする高機能性リンカーであるトレーサブルリンカーの開発を計画した。

また、生物活性化合物を創薬研究へ展開するうえで、標的タンパク質上の生物活性化合物結合部位の知見が求められる。あわせて、標的タンパク質の機能解明も求められるが、その際は単離・精製した標的タンパク質の機能のみではなく、生細胞内での機能も明らかにすることが望ましい。このためには、細胞内での標的タンパク質選択的ラベル化法が必須となる。そこで本研究では2つ目のツールとして、細胞内でも使用可能な、新たな標的タンパク質ラベル化試薬の開発を計画した。

本研究では上述トレーサブルリンカーおよび標的タンパク質ラベル化試薬の創製を、私たちの見出した SEALide の酸塩基触媒応答型アシル基転移反応を基盤として目指すこととした。



2. 研究成果

図1. SEALide の酸塩基触媒応答型反応 (Nu: 求核性官能基)

(1) 概要

本研究では SEALide を基盤とした2つのツール、すなわちトレーサブルリンカーおよび細胞内標的タンパク質ラベル化試薬の開発を行った。前者の研究ではトレーサブルリンカーを設計・合成し、これを用いた細胞抽出液中の標的タンパク質の精製に成功するとともに、ラベルを指標とした標的・非標的の判別が可能であることを実証した(5. 主な研究成果リスト (1))

論文(原著論文)発表 1)。後者については標的タンパク質ラベル化試薬を設計・合成し、タンパク質混合物中の標的タンパク質選択的ラベル化が可能であることを証明した。さらに本試薬を基盤とし、赤血球細胞内での標的タンパク質選択的ラベル化を達成した(5. 主な研究成果リスト (1)論文(原著論文)発表 2)。また、本ラベル化試薬によるラベル化が標的タンパク質の生物活性化合物結合部位の近傍で起こることを見出し、この性質を利用して統合失調症に関与する酵素である D-アミノ酸酸化酵素の阻害剤結合部位を解明した(投稿準備中)。

(2) 詳細

研究テーマ A「トレーサブルリンカーの開発」

プロテオーム中に含まれる生物活性化合物が標的とするタンパク質を精製する方法として近年、クリーバブルリンカーを用いた方法が汎用されている(図2)。この方法では、まず標的未知の生物活性化合物上へ光親和性部位およびアルキンを導入した後、これをプロテオームへ添加し紫外線を照射する。すると、プロテオーム中の標的タンパク質のみがアルキンを提示した状態となる。ここへ、一方にビオチンを、他方にアジドを有するクリーバブルリンカーを加えたのち、クリック反応により標的タンパク質をビオチン化する。最後にビオチン化標的タンパク質をアビジンビーズへ吸着させたのち夾雑物を洗い流し、リンカーを切断すると標的タンパク質が得られるという手法である。本手法は非常に実用性が高いものの、容器などに吸着されていた非標的タンパク質が最終精製物に混入し、いずれが真の標的タンパク質か判別困難な場合があるという課題が残っていた。

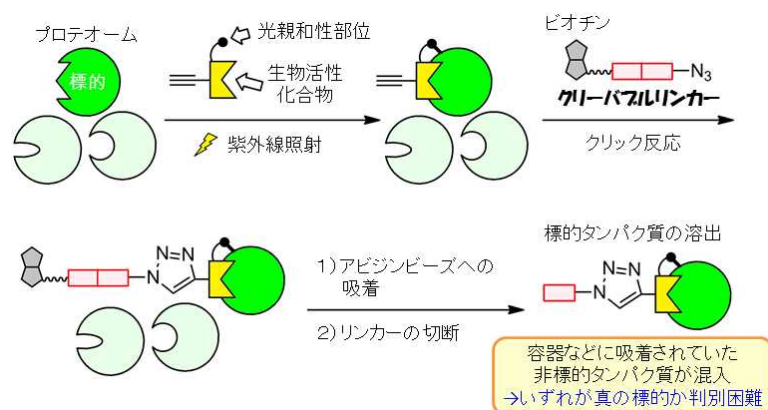


図2. 従来のクリーバブルリンカーを用いた標的タンパク質精製法

そこで私は、リンカー切断の際に標的タンパク質のみが選択的にラベル化できれば、ラベルを指標とした標的・非標的の簡便な区別が可能になると考えトレーサブルリンカーを設計した(図3)(5. 主な研究成果リスト (1)論文(原著論文)発表 1)。トレーサブルリンカーはSEAlide を挟み、一方にアジドを、他方にビオチンを有する。これを、アルキンを導入したタンパク質とのクリック反応に付したのち、生じるビオチン化標的タンパク質をアビジンビーズへ吸着させる。ここまで酸塩基触媒が存在しないため、トレーサブルリンカーは安定に取り扱うことができる。続いて、酸塩基触媒であるリン酸塩および求核性部位を有するラベル化試薬を加

える。すると、トレーサブルリンカーがチオエステルへと活性化されたのちラベル化試薬と反応し、リンカー切断に伴いラベル化された標的タンパク質が溶出する設計である。

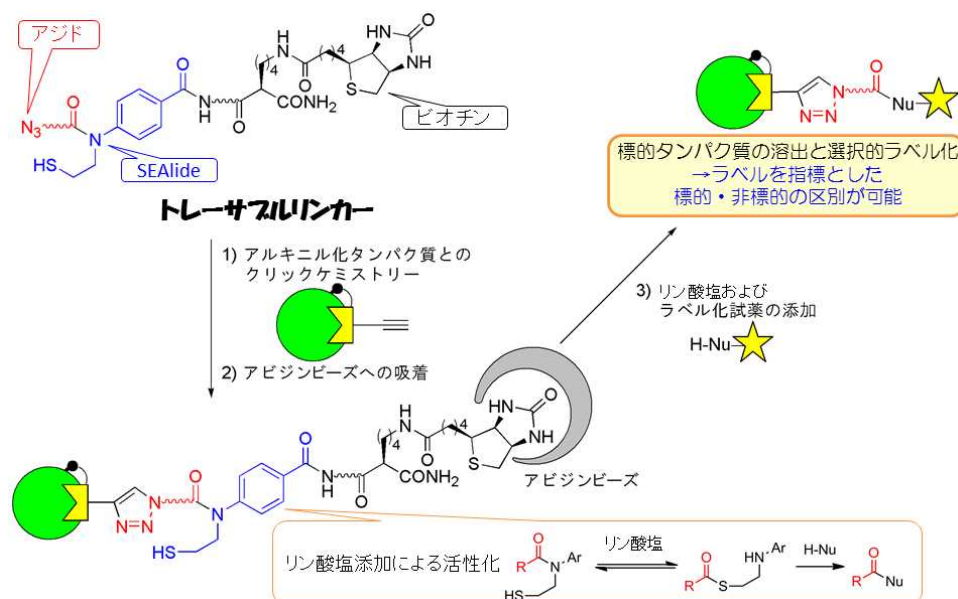


図3. トレーサブルリンカーの分子設計 (Ar: 芳香環; Nu: 求核性官能基)

実験結果を図4に示す。本実験では、細胞抽出液中に含まれるアルキニル化標的タンパク質の精製・ラベル化に挑戦した。この結果、標的タンパク質を含む3種のタンパク質がつり出された。従来のクリーバブルリンカーを用いた場合、この3種のうちのいずれが真の標的かは分からない。しかしトレーサブルリンカーを用いた場合、同じサンプルのラベル部分を可視化することにより、標的と非標的を簡単に区別することに成功した。現在、トレーサブルリンカーを用いた標的未知生物活性化合物の標的タンパク質同定を目指した研究が進行中である。

研究テーマ B「標的タンパク質ラベル化試薬」

本テーマではSEAlideを基盤とした標的タンパク質ラベル化試薬を開発したのち、これを用いた細胞内での標的タン

パク質のラベル化(研究テーマ B-1)およびタンパク質の生物活性化合物結合部位の同定(研究テーマ B-2)に挑戦することとした。ラベル化試薬の分子設計を図5に示す(5. 主な研究成果リスト (1)論文(原著論文)発表 (2)。ラベル化試薬として SEAlide を挟み、一方に標的タンパク質に結合する生物活性化合物誘導体を、他方にラベルを導入した化合物を設計した。本試薬をタンパク質へ加えると、生物活性化合物誘導体を介して標的タンパク質に選択的に結合する。つづいて、タンパク質表面には酸性・塩基性官能基が多数存在することから標的タンパク質自身が酸塩基触媒として働き、ラベル化試薬をチオエステルへと活性化する。この結果、ラベル部分が近傍の標的タンパク質求核性官能基と反応し、標的タンパク質

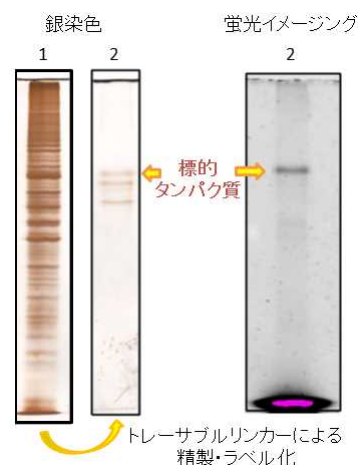


図4. トレーサブルリンカーによる標的タンパク質の精製・ラベル化 (1: アルキニル化標的タンパク質を含む細胞抽出液; 2: トレーサブルリンカーを用いた精製・ラベル化後のサンプル)

選択的ラベル化が達成されると考え研究を開始した。

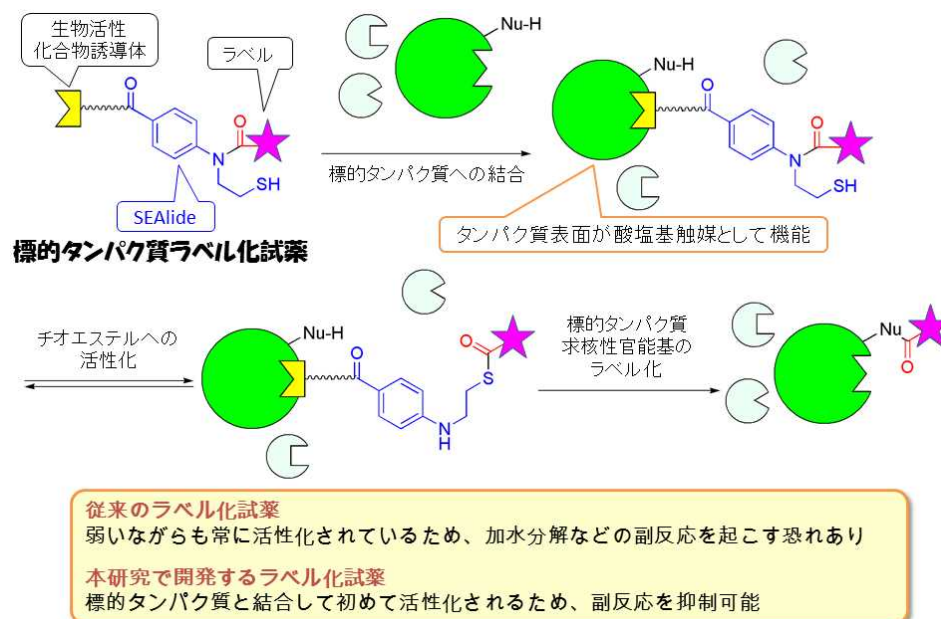


図5. 標的タンパク質ラベル化試薬の分子設計 (Nu: 求核性官能基)

研究テーマ B-1「細胞内での標的タンパク質ラベル化試薬」

本テーマでは、赤血球細胞内に含まれる炭酸脱水酵素のラベル化に挑戦した(5. 主な研究成果リスト (1)論文(原著論文)発表 (2)。生物活性化合物誘導体として炭酸脱水酵素の選択的阻害剤であるベンゼンスルホンアミドを、ラベルとしてビオチンを有するラベル化試薬を合成し、これを用いた細胞内でのラベル化実験を行った(図6)。この結果、赤血球細胞内での標的タンパク質選択的ラベル化に成功した。さらに、標的タンパク質の生物活性化合物結合部位近傍にラベルが導入されることを見出した。そこでこの性質を利用し、ラベル導入位置からタンパク質の生物活性化合物結合部位を明らかにする研究(研究テーマ B-2)に着手した。

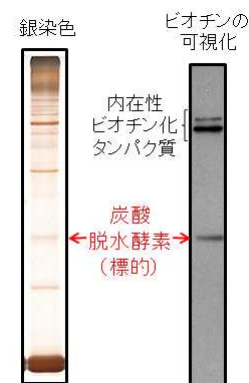


図6. 赤血球細胞内での標的タンパク質ラベル化

研究テーマ B-2「タンパク質の生物活性化合物結合部位の同定」

本テーマでは統合失調症関連酵素であるD-アミノ酸酸化酵素(DAO)の阻害剤結合部位の解明を目的とした。すなわち、私の所属する研究室が所有する化合物ライブラリから見出された DAO 阻害剤が DAO のどこへ結合するのかを明らかにするため、タンパク質ラベル化実験および in silico ドッキングスタディーの両面から研究を行った。すると両実験の結果は完全に一致し、当初予測された結合部位に加え、新たな結合部位を明らかにすることに成功した(論文執筆中)。

3. 今後の展開

本研究ではトレーサブルリンカーおよび標的タンパク質ラベル化試薬の開発に成功した。こ

れらツールはまだ開発されたばかりであるため、これらツールを用いた未知標的タンパク質の同定や機能解明には至っていない。そこで、本さがけ研究終了後もこれらツールを用いた未知標的・機能解明研究を継続するとともに、積極的にバイオ系研究者への技術導出を行う計画である。特に、現在まではアカデミアへの導出を行ってきたが、今後は SciFoS (Science For Society) 活動で得た経験および人的ネットワークを活かして製薬企業との共同研究についてもその可能性を探り、アカデミアおよび企業のそれぞれ異なった視点からのフィードバックをいただくとともに、これらを基にトレーサブルリンカーおよび標的タンパク質ラベル化試薬の更なる改良を行い、真に実用的なツールへと昇華させていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況:

本研究では私たちの見出した SEAlide の反応性に着目して設計した2つのツール、すなわちトレーサブルリンカーおよび細胞内標的タンパク質ラベル化試薬の開発という当初の目的を達成することができた。さらにラベル化試薬を用い、統合失調症に関与する酵素であるD-アミノ酸酸化酵素の新たな阻害剤結合部位を明らかにすることに成功した。期間内での生物活性化合物の未知標的タンパク質同定・機能解明に至らなかった点は反省すべきであるものの、本同定・機能解明研究を推進するため、さがけ本領域関係者をはじめとする様々なバイオ系研究者と積極的に共同研究を開始し現在も継続していることは、今後の大きな財産になるとともに、当初の計画よりも時間はかかるだろうとも未知標的タンパク質同定・機能解明につながるものと確信している。

研究実施体制および研究費執行状況:

私および大学院生2名を中心として研究を遂行した。研究費執行状況については、特に問題などなかった。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果:

本研究で開発に成功したトレーサブルリンカーおよび標的タンパク質ラベル化試薬は、創薬標的タンパク質の同定や機能解明を可能とするツールであり、その成果は天然資源に乏しい我が国の成長牽引産業にすべき創薬に直接的に資するものである。これらツールは開発されたばかりであるため、本ツールを用いた未知標的タンパク質の同定および機能解明にはまだ至っていない。そこで、本さがけ研究終了後もこれらツールを用いた未知標的・機能解明研究を継続するとともに積極的にバイオ系研究者への技術導出を行い、これらツールを真に実用的なものへと昇華させることを経て、今後の創薬研究や標的・機能解明のためのデファクトスタンダードツールに位置づけられることを目指したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

生理活性化合物の標的の同定は、薬の作用・副作用の分子レベルでの作用機序解明や対象疾患の絞込み、化合物を使ったバイオロジーのさらなる理解などのために極めて重要である。よって標的の同定方法については、多種多様な方法が既に報告されている。しかしながら、例えば生理活性化合物が比較的低分子であり、その標的が精製が難しいタンパク質である場合において、その標的の同定は必ずしも容易ではない。即ち、生理活性化合物の誘導体化合物を結合させた担体に、標的タンパク質を含む細胞抽出液を加え、特異的に結合・溶出するアフィニティクロマトグラフィーの原理は確立しているが、標的タンパク質以外の複数種類のタンパク質なども(担体や容器への非特異的結合などにより)溶出画分に混入することは珍しくない。

本研究はこのような重要な問題点の解決を目指し、本研究者らが見出した SEAlide (N-sulfanylethylanilide) の酸塩基触媒応答型N→Sアシル基転移反応を利用して、標的タンパク質の高効率同定のためのトレーサブルリンカー、および標的タンパク質の機能解明のためのラベル化試薬の開発を目指したものである。

トレーサブルリンカーは溶出された標的タンパク質が蛍光ラベルされているという特徴があり、実際にタンパク質混合物中の標的タンパク質の選択的ラベル化が可能であることが示された。

ラベル化試薬については、赤血球細胞内に含まれる炭酸脱水酵素の選択的ラベル化に成功した。また、統合失調症関連酵素であるD-アミノ酸酸化酵素(DAO)の阻害剤の新たな結合部位の同定にも成功したことから、ラベル化試薬の創薬への波及効果も期待される。

特定の生理活性化合物について、その未知の標的タンパク質の同定・機能解明までは残念ながら達成出来なかったが、本さがけ研究をきっかけとして、領域内外の研究者と多くの共同研究を開始しており、今後の展開が期待される。標的が未知の天然・人工の生理活性化合物や薬剤は多数あることから、さがけ研究で培ったプローブ設計や有機合成の経験とアイデアを活かして、共同研究もより積極的におこない、創薬標的の同定・解析の成功例を増やして欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Morisaki, T.; Denda, M.; Yamamoto, J.; Tsuji, D.; Inokuma, T.; Itoh, K.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “N-Sulfanylethylanilide-based traceable linker for enrichment and selective labelling of target proteins” *Chem. Commun.* **2016**, 52, 6911–6913.
2. Denda, M.; Morisaki, T.; Kohiki, T.; Yamamoto, J.; Sato, K.; Sagawa, I.; Inokuma, T.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Labelling of endogenous target protein via N-S acyl transfer-mediated activation of N-sulfanylethylanilide” *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 6244–6251. (Highlighted in Current Hot Articles in Organic & Biomolecular Chemistry)
3. Eto, M.[#]; Naruse, N.[#]; Morimoto, K.; Yamaoka, K.; Sato, K.; Tsuji, K.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Development of an anilide-type scaffold for the thioester precursor N-sulfanylethylcoumarinyl amide” *Org. Lett.* **2016**, 18, 4416–4419. ([#]equal contribution)
4. Yamamoto, J.[#]; Maeda, N.[#]; Komiya, C.; Tanaka, T.; Denda, M.; Ebisuno, K.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Development of a

fluoride-responsive amide bond cleavage device that is potentially applicable to a traceable linker” *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5122–5127. (*equal contribution)

5. Yamamoto, J.; Denda, M.; Maeda, N.; Kita, M.; Komiya, C.; Tanaka, T.; Nomura, W.; Tamamura, H.; Sato, Y.; Yamauchi, A.; Shigenaga, A.*; Otaka, A.* “Development of a traceable linker containing a thiol-responsive amino acid for the enrichment and selective labelling of target proteins” *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3821–3826.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表など

1. 重永 章「N-S アシル基転移反応を基盤としたタンパク質完全化学合成法の開拓」有機合成化学協会中国四国支部主催第74回パネル討論会『次世代を切り拓く全合成研究の若い力』(徳島)、2016年10月1日
2. 重永 章、大高 章「ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー研究のための基盤技術の開拓」日本薬学会第136年会(シンポジウム「疾患代謝」から解明される生命現象と創薬研究への応用)(横浜)、2016年3月26–29日
3. 重永 章「ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー研究のための基盤技術の開拓」名古屋大学大学院生命農学研究科食品機能化学特別セミナー(名古屋)、2015年10月16日
4. 重永 章「「さがけ」採択の体験談と申請に向けたアドバイス」第2回研究推進セミナーー大型競争的資金の獲得にむけてー(徳島)、2015年7月28日
5. 重永 章「Peptide/Protein-based Chemical Biology のための基盤技術の開発」第18回スクリプス・バイオメディカルフォーラム(大阪)、2014年11月22日
6. 重永 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開」2014年日本化学会中国四国支部大会(若手セッション「ペプチド・タンパク質科学における若手研究者の化学的アプローチと今後の展望」)(山口)、2014年11月8–9日

著作物

1. Shigenaga, A.*; Yamamoto, J.; Kohiki, T.; Inokuma, T.; Otaka, A.* “Invention of stimulus-responsive peptide-bond-cleaving residue (Spr) and its application to chemical biology tools” *J. Pept. Sci.* in press (doi: 10.1002/psc.2961) (Akabori Special Issue, invited review).
2. 重永 章、大高 章「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への展開」化学工業(特集 ペプチド化学の新潮流(1)) **2014**, *65*, 849–856.
3. 重永 章、山本 純、大高 章「生物活性小分子の結合パートナータンパク質を知りたいーリンカー分子を用いたタンパク質精製法ー」実験医学増刊号 驚愕の代謝システム〜メタボロームの階層から解き明かす疾患研究の新たなステージ〜(末松 誠、杉浦悠毅編)、羊土社、150 (2482)–156 (2488)、**2014**.

研究報告書

「タンパク質分子上に形成されるアダクトーム解析法の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 柴田 貴広

1. 研究のねらい

生体内では、酸化ストレスや炎症反応などにより様々な代謝産物が生成されるが、その中には親電子性を有し、生体成分と高い反応性を示す活性種が存在している。例えば、アラキドン酸やリノール酸などの多価不飽和脂肪酸は、酵素的あるいは非酵素的な変換反応を経て、様々な酸化脂肪酸へと変換される。多くの酸化脂肪酸は、その高い親電子性ゆえに、タンパク質中の求核性アミノ酸残基に対して高い反応性を有する。このような代謝産物により、タンパク質分子上には様々な化学構造を有した修飾付加体が形成される。このような点から、タンパク質の修飾構造の種類や量比は、生体内における疾患状態を表しているものと予想される。これまでの研究では、それぞれ個別の修飾付加体に注目した研究がなされてきたが、実際の生体内においては、複雑多岐にわたる修飾付加体が形成しているものと想定されるため、その全体を解析する必要があると考えられる。このような背景から、本研究課題では酸化脂質を中心とした代謝産物による複雑なタンパク質修飾付加体を総体として理解する“アダクトーム”解析法を確立することを目的としている。さらにこの方法を利用し、疾患特異的マーカーや疾患発症に関与するタンパク質修飾の同定を行い、疾患の予防や治療、創薬につながる基盤的な研究を展開することを目指す。

本研究課題では、これまでに免疫化学的方法や化学試薬を用いた検出方法が主なものであった酸化脂質修飾タンパク質に対して、質量分析計を利用することにより、複雑多岐にわたるタンパク質修飾付加体の総体“アダクトーム”を、網羅的に解析する手法の確立を目指す。さらに、この手法を用いて、様々な疾患モデル動物あるいはヒト患者サンプルなどを用いて、ディファレンシャル解析を行い、疾患特異的なタンパク質修飾付加体を明らかにし、疾患バイオマーカーの創出を目指した研究を展開する。

2. 研究成果

(1) 概要

ヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、アダクトーム解析のためのタンパク質サンプル調製方法、および質量分析計による測定条件を決定し、アダクトーム解析法を確立した。また、各種酸化脂肪酸により形成される修飾付加体を解析し、既知の付加体(ヒスチジン修飾体 30 種類、リジン修飾体 62 種類)に関するアダクトームマップを作成した。これらを基に、*in vitro* で酸化させたヒト低密度リポタンパク質(LDL)のアダクトーム解析を行い、既知付加体のアダクトームマップとの比較を行った。その結果、酸化 LDL において生成される修飾付加体として、6 種類のヒスチジン修飾付加体および 7 種類のリジン修飾付加を同定した。しかしながら、最も主要なリジン修飾付加体は、既知の付加体とは一致せず、その化学構造は未知であった。そこで、各種機器分析を行い、この修飾付加体を *N*-(8-carboxyoctanyl)-Lys (COL) と

同定し、その生成経路を明らかにした。次に、安定同位体希釈法による COL 付加体の高感度検出・定量法を確立し、高脂血症モデルマウスである apoE 欠損マウスの血清サンプルにおける定量解析を行った。その結果、コントロールマウスと比較して、apoE 欠損マウスにおいて COL 付加体が有意に増加することを明らかにした。さらに、ヒト高脂血症患者血清サンプルにおける COL 付加体の定量を行った結果、健常者と比較して血清中の COL 付加体の有意な増加が認められた。この COL 付加体濃度は、血中の LDL 値とも正の相関を示しており、高脂血症におけるよいマーカーとなる可能性が示された。

また同じく高脂血症患者血清タンパク質の解析から、ヒト血清アルブミンにおいてホモシステインなどの低分子チオール化合物による S-チオール化が顕著に起こっていることがわかった。さらに、S-ホモシステイン化された血清アルブミンが、マクロファージ細胞における炎症誘導活性を示すことも明らかになった。以上の結果から、血清アルブミンのホモシステイン化修飾は高脂血症における重要なタンパク質化学修飾である可能性が示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A「モデルタンパク質を用いたアダクトーム解析方法の確立」

ヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、アダクトーム解析方法の確立を行った。アダクトームの中には、比較的不安定な化学構造を有するものも多いため、水素化ホウ素ナトリウム処理により付加体を安定化させる方法も合わせて検討した。また、通常、塩酸雰囲気下で加熱し加水分解をするが、酸条件下では不安定な付加体もあったため、アルカリ加水分解による検討も合わせて行い、サンプル調製方法を確立した。さらに、LC-ESI-MS/MS を用いて、リジン残基およびヒスチジン残基に対する付加体にそれぞれ特徴的なフラグメントパターンを利用した網羅的検出(SRM 解析)のための条件設定も完了し、この2種類のアミノ酸残基に対するアダクトーム解析方法を確立した。

研究テーマ B「各種酸化脂肪酸によるアダクトームマップの作成」

acrolein や 2-nonenal などの 2-alkenal 類や 4-hydroxy-2-nonenal などの酸化脂肪酸とヒト血清アルブミンとを in vitro で反応させた修飾タンパク質について、水素化ホウ素ナトリウム処理後、酸加水分解を行い、ヒスチジン残基およびリジン残基に対するアダクトーム解析を行った。その結果を、横軸を LC の保持時間、縦軸を m/z とし、また検出されたピーク面積を円の面積で表記したアダクトームマップを作成した。化学構造既知のヒスチジン修飾体 30 種類およびリジン修飾体 62 種類についてそれぞれ分析し、標品のアダクトームマップを完成した。

リノール酸、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸(計 5 種類)を、モデルタンパク質であるヒト血清アルブミンの存在下において、鉄-アスコルビン酸により自動酸化を行った。24 時間後、水素化ホウ素ナトリウムにより還元処理を行った後、トリクロロ酢酸によりタンパク質を沈殿させ、酸加水分解を行った。それぞれのサンプルにおいて、アダクトームマップを作成した。リジンとヒスチジンに対する修飾を重点的に解析し、各脂肪酸に特徴的に生成される修飾リジン残基、および修飾ヒスチジン残基が認められた。

研究テーマ C「酸化 LDL におけるアダクトーム解析」

ヒト血清より単離した低密度リポタンパク質（LDL）を Cu^{2+} イオンにより *in vitro* で酸化させたものを酸化 LDL のモデルとして、アダクトーム解析を行った。その結果、未酸化の LDL と比較して、酸化 LDL において有意に増加する修飾付加体が多数検出された。構造既知の修飾付加体に関するアダクトームマップデータと比較したところ、ヒスチジン修飾付加体として 6 種類、またリジン修飾付加体として 7 種類を同定した。ヒスチジン修飾付加体のうち、最も主要なものは 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) によるマイケル付加体であることがわかった。一方で、最も主要なリジン修飾付加体は既知付加体とは一致せず構造未知であったため、質量分析計や NMR など各種機器分析による詳細な解析を行い、最終的に、*N*-(8-carboxyoctanyl)-Lys (COL) であることを突き止めた（図 1）。このリジン修飾体は、リノール酸などの多価不飽和脂肪酸から酸化的開裂により生成される 9-oxononanoic acid のシッフ塩基付加体であることが判明した。安定同位体希釈法による COL 付加体の定量方法を確立し、酸化 LDL における COL 量を測定したところ、他の修飾付加体と比較してかなり多く（apoB タンパク質 1 分子あたり約 36 分子程度）含まれることが明らかとなった。

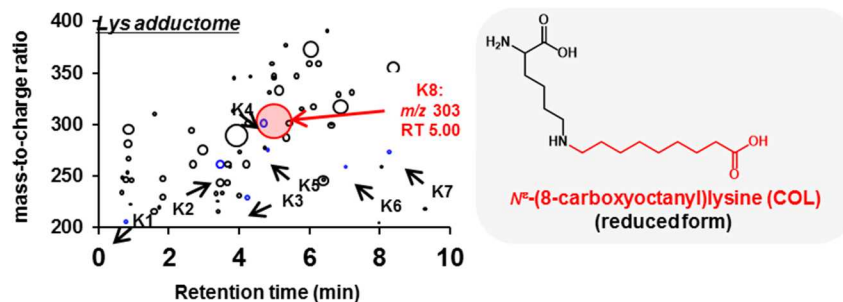


図1 酸化LDLにおけるリジンアダクトーム解析

アダクトーム解析の結果、酸化LDL中に生成される最も主要なリジン付加体として、COL付加体を同定した。

さらに、この COL 付加体について、*in vivo* サンプルにおける定量値と疾患との関連性について検討を行った。高脂血症や動脈硬化症のモデル動物として知られている apoE 欠損マウスより調製した血清タンパク質について、COL 付加体の定量解析を行った。その結果、コントロールマウスと比較して、apoE 欠損マウスにおいて有意に増加していることが明らかとなった。さらに、ヒト高脂血症患者血清における COL 付加体の定量を行ったところ、健常者と比較して、高脂血症患者血清

において有意に COL 付加体が増加することが明らかとなった（図 2）。この COL 付加体の血清タンパク質あたりの濃度は、血清中の LDL 濃度と比較的よい正の相関が認められた。以上の結果から、COL 付加体は高脂血症におけるよいマーカーとなりうる可能性が示唆された。

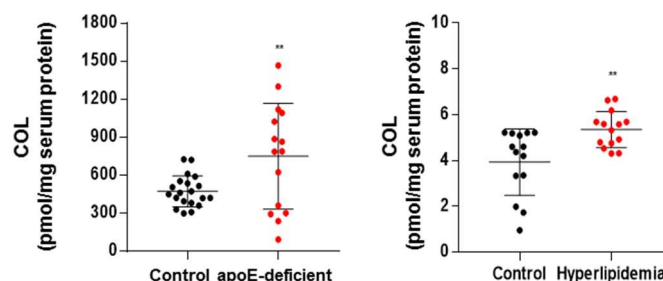


図2 *in vivo*におけるCOL付加体の定量

高脂血症モデルマウス血清（左図）および高脂血症患者血清（右図）において、コントロールと比較しCOL付加体が有意に増加している。

研究テーマ D「高脂血症患者血清アルブミンにおける酸化的修飾の解析」

高脂血症患者より採取された血清について、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分析を行った結果、健常者血清と比較して酸化型の血清アルブミンが有意に増加することが確認された。またその酸化様式として、血清アルブミン中のシステイン残基にシステインもしくはホモシステインなどの低分子チオール化合物がジスルフィド結合していることを明らかにした。そこで、血清アルブミン中のどのシステイン残基が酸化に関与しているのかを明らかにするため、ヒト高脂血症患者より、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより酸化型と還元型の血清アルブミンをそれぞれ分取したのち、トリプシン消化し、質量分析により解析を行った。その結果、血清アルブミン中に唯一存在する遊離のシステイン残基だけでなく、分子内ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基においても低分子チオール化合物が結合していることを見出した。また、リコンビナントヒト血清アルブミンを用いた解析から、S-ホモシステイン化により血清アルブミンのリガンド結合能が増強され、さらにマクロファージ細胞における炎症誘導活性を示すようになることを明らかにした。以上の結果から、血清アルブミンの S-チオール化修飾は高脂血症における重要なタンパク質化学修飾である可能性が示唆された。

3. 今後の展開

本研究により、タンパク質アダクトーム解析方法とそれを利用した疾患マーカー探索手法を確立することができた。今後は、様々な疾患サンプルを数多く解析することにより、それぞれの疾患に関するアダクトーム情報を蓄積し、疾患特異的な修飾付加体の探索を行っていく必要がある。さらなる解析により、タンパク質の化学修飾を指標としたよりよい疾患マーカーの探索を行い、臨床応用に向けた研究を展開していきたい。特に、疾患マーカーとしての有用性を示しながら、臨床応用が可能な簡便な検出方法の開発につなげていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究において、研究目的の主眼であったアダクトーム解析方法の確立をすることができた。また、酸化 LDL におけるアダクトーム解析から、新規な修飾リジン構造を明らかにしただけでなく、マウス高脂血症モデルやヒト高脂血症患者においても新規な修飾リジン構造が有意に増加することを見出し、高脂血症に関連したタンパク質修飾を指標とした疾患マーカーの可能性を見出すことができたと考えている。実際に臨床検査などへの応用には、まだまだ検討しなければならない点が多いというのが現状であるが、本研究で開発したタンパク質アダクトーム解析技術は、タンパク質の翻訳後修飾を指標とした疾患マーカーの探索とそれを基盤とした創薬開発などに資するものであると考える。研究実施体制ならびに研究費執行状況に関しては、追加措置を受けつつ、概ね当初の計画の通りに実施することができたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ヒト生体内のタンパク質の多くで、そのリジンやヒスチジンなどのアミノ酸残基に様々な化学構

造の修飾付加体が形成されることが知られている。しかしながら、従来は個別の修飾付加体について解析がなされてきた傾向があるため、様々な修飾付加体について、その生成機構や構造、タンパク質の安定性・機能への影響、疾患・老化との関連などについては不明な点が多い。そこで、本研究では、酸化脂質を中心とした代謝産物に注目し、これによるタンパク質修飾付加体の総体について、質量分析計で分析する“アダクトーム”解析法を確立することを目指した。

まずヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、リジン残基およびヒスチジン残基に対するアダクトーム解析の基本的方法を確立した。次に、各種酸化脂肪酸により形成される既知の付加体のアダクトームマップを作成し、このマップをもとに、ヒト酸化 LDL のモデルについてもアダクトーム解析をおこない、6 種類のヒスチジン修飾付加体および 7 種類のリジン修飾付加を同定できた。また、未知付加体の中で主要なリジン修飾付加体が N^{ϵ} -(8-carboxyoctanyl)-Lys (COL) であることも明らかにした。これらの成果により、本アダクトーム解析法が有用な方法であることが強く示唆された。一方で、解析が難しいため化学構造の決定には至らなかった未知の修飾付加体もあることから、今後はアダクトーム解析法をさらに発展させ、これら未知の修飾付加体の解析にも挑戦してほしい。

疾患と修飾付加体との関連を調べる研究としては、高脂血症モデルマウスである apoE 欠損マウスやヒト高脂血症患者の血清サンプルで COL 付加体が有意に増加することも判明し、疾患マーカーへの応用が期待される。さらに、S-ホモシステイン化された血清アルブミンが、リガンド結合能が増強され、マクロファージ細胞における炎症誘導活性を示すことも明らかとなった。よって、修飾付加体の疾患マーカーとしての利用のみならず、治療標的としての研究についても今後検討してほしい。

このような修飾付加体の疾患マーカーとしての応用については、医療・診断分野の研究者や企業とも連携し、ヒト血清サンプルのアダクトーム解析や迅速・簡便・低コストな検査キットの開発を効率的に進めることを期待している。

以上のように、さきがけ研究が大きな飛躍につながり、平成 28 年 1 月に准教授に昇格した。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Miyashita H, Chikazawa M, Otaki N, Hioki Y, Shimozu Y, Nakashima F, Shibata T, Hagihara Y, Maruyama S, Matsumi N, & Uchida K. Lysine pyrrolation is a naturally occurring covalent modification involved in the production of DNA mimic proteins. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5343.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 内田浩二、柴田貴広

発明の名称: 動脈硬化症マーカー及びその利用

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2015/7/16

出 願 番 号: 特願 2015-141652

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

(1) ○柴田貴広、内田浩二 「タンパク質の化学修飾を指標とした疾患マーカーの探索」
日本薬学会第 136 年会(横浜) シンポジウム 2016 年 3 月

(2) ○柴田貴広、中島史恵、内田浩二 「ヒト血清アルブミンの S-チオール化修飾と病態」
第89回日本生化学会大会(仙台) シンポジウム「チオールバイオロジーの新たな展開」
2016 年 9 月

受賞

農芸化学奨励賞(日本農芸化学会)平成 26 年 3 月

著作物

内田浩二、柴田貴広「アダクトーム解析法を用いた新しい疾患バイオマーカーの探索」バ
イオサイエンスとバイオインダストリー, 2016, 74, 26-29

研究報告書

「代謝経路フラックスイメージング法による”局所”疾患代謝の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 杉浦 悠毅

1. 研究のねらい

ヒト疾患実態を反映した代謝物マーカーの開発/創薬ターゲットとなる代謝経路の同定には、疾患モデル動物臓器での機序解明が欠かせない。しかし現状、モデル動物の“摘出臓器”における代謝物測定の技術には、以下3つの重大な課題がある。

- ① 生細胞の中心代謝回転は高速であり(秒オーダー)、動物を麻酔し、臓器摘出する間も劇的に進行する『死後分解を抑制するサンプル調製法』が必須である。
- ② 多数の細胞種が混在する動物臓器において、疾患代謝をもたらしている責任細胞種を可視化し同定できる『代謝物イメージング技術』が必須である。
- ③ 生体内の臓器では血液を介した不足/過剰な代謝物の補充/排出が常に行われる。このため、疾患の原因となる代謝経路の亢進/減弱を浮き彫りにするには、安定同位体で標識した化合物を活用した『動物臓器での代謝経路トレース解析』が必須である。

本研究では、上記を全て解決するメソッドパッケージを確立/提供する。その結実として『動物臓器における代謝経路フラックスのイメージング法』を実現する。本法により、疾患臓器の局所において、『どの細胞種』が、『どのような代謝経路の異常』を惹起しているのかを明らかにする。

さらに本法の普及展開により、創薬ターゲットとなる細胞種/代謝経路の同定、または代謝物バイオマーカーの産生機序解明を *in vivo* で遂行できるツールを共有/提供する。

2. 研究成果

(1) 概要

in vitro では一様な代謝を示す疾患モデル細胞であっても、*in vivo* においては正常細胞と代謝ネットワークを巡らせ、微小環境に応じた異なる代謝特性を示すサブポピュレーションを形成する。たとえば固形がんにおいては、増殖の盛んながん細胞は隣接する間質細胞や正常宿主細胞と代謝カップリングをすることで、増殖能に見合うエネルギーを得ると考えられる。従って、*in vivo* での疾患代謝の(不均一な)特性を解明しなければ、その正確な理解と制御を行うことは難しい。

本研究では、疾患モデル動物における代謝解析実施に必須の3つの技術を確立した。

代謝物の死後分解を伴わない Focused microwave(FMW)法の開発

質量分析は侵襲法であり、動物臓器から“活動時”の代謝情報を精確に得るには、『代謝物の死後分解』という非常に大きな問題があった。生細胞の中心代謝回転は非常に高速であり、実験動物の心停止後には血流停止に伴う酵素的代謝改変が秒オーダーで進行する。この点を、FMW 法導入により、脳と心臓において、ほぼ完全な死後分解の停止を実現した。FMW 法では標的臓器へフォーカスしたマイクロウェーブを1秒以下照射する。これにより細胞内酵素の瞬間的な熱失活が達成され、質量分析に供するまでの試料調製中において、一切の死後分解の影響を排除される事を示した。

高感度イメージング質量分析法の開発

従来のイメージング質量分析では、代謝経路上の化合物を網羅的に検出するには感度不足であった。本研究において、標的化合物の誘導体化法を開発/拡張し、生体内に非常に低濃度に存在する生理活性分子に至るまで、代謝経路上の網羅的な化合物イメージング法を開発した。

in vivo 代謝経路トレース解析法の開発

動物臓器で特定経路の代謝亢進/減弱を浮き彫りにする為に、「外因性の安定同位体で標識した代謝基質」をトレーサーとして用いた代謝経路トレース解析を開発した。具体的には、 ^{13}C で標識した化合物から代謝生成された化合物は、 ^{13}C を含むため、質量分析により内因性化合物と区別して定量/イメージングする事ができる。これを利用し、一例として心筋梗塞時に ^{13}C 標識グルコースを投与し、 ^{13}C 含有乳酸を定量/イメージングする事で『解糖系がどの程度亢進したか?』『組織のどの部位において亢進したのか?』といった問いに定量的な解を与えるに至った。

上記技術をメソッドパッケージとして確立/運用する事で『動物臓器における代謝経路フラックスのイメージング法』を実現するに至った。

(2) 詳細

本さがけ研究では (A)技術開発と、その(B)疾患モデルへの適用を行った。

【研究テーマ A1— focused microwave irradiation (FMW)法による臓器試料の調製】

質量分析によるメタボロミクスの手法は、高感度かつ網羅的な代謝プロファイリングを実現する。その一方で侵襲法であるが故に、個体動物を対象とする場合は臓器摘出に伴う死後分解 (postmortem degradation)による代謝改変が問題であった。

FMW 法では、ごく短時間(1 秒以内)のマイクロウェーブ照射により、臓器温度を酵素失活が達成できる 80 度近辺にまで到達させる。これにより、“任意の瞬間”の臓器の代謝状態を保持したまま、質量分析による定量/イメージング解析を実施できる。

脳と心臓は、血流途絶後に急激かつ大規模な代謝変動が生じる。従って特に FMW 法が有用であると考えられる為、実験プロトコルを確立した。その結果、図 1 で示すように、マウス心臓を FMW 法（青）、麻酔下で迅速に開胸/心摘出（黄）、または血流途絶後 10 分後に摘出（赤）し、メタボローム解析を行ったところ、解糖系（図中 A）においては Lactate 産生と Pyruvate 減少が、TCA サイクル（同 B）においては Succinate 蓄積が、さらに NADH/NAD 比（同 C）の上昇抑制が FMW 法により達成された。すなわち、サンプル調製中の心筋低酸素暴露による代謝改変（より具体的には、解糖系亢進と電子伝達系阻害のアーチファクト）を除外した代謝プロファイルを、FMW 法により得ることが出来た。

FMW法は心臓摘出に際する虚血/低酸素に起因した代謝改変を抑制した

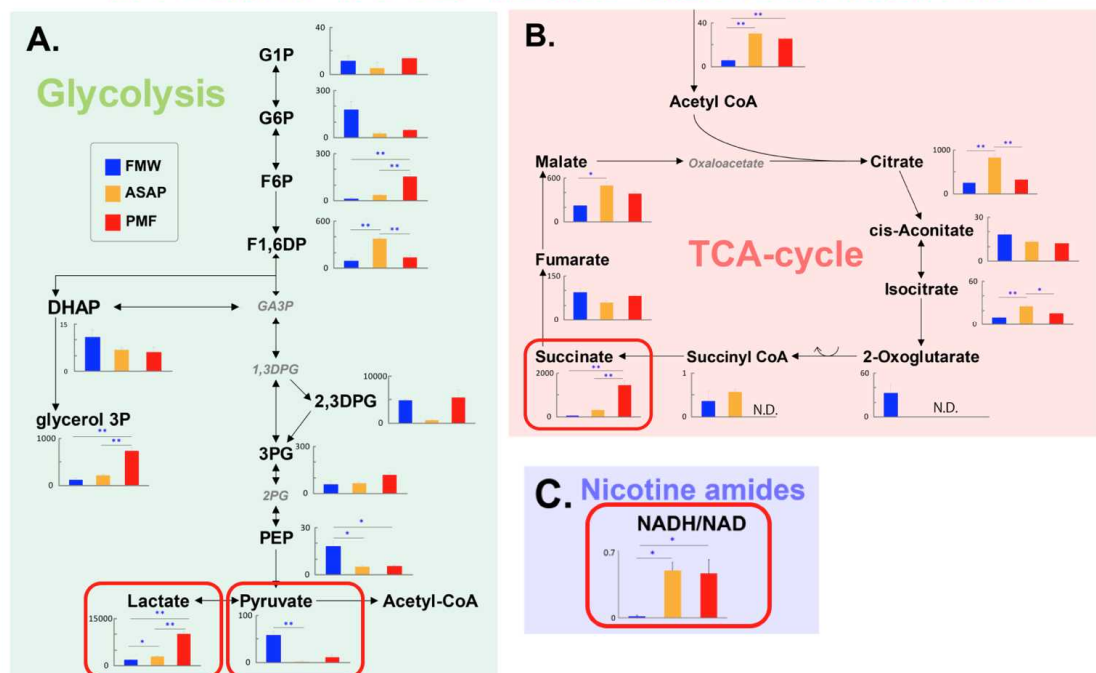


図 1: マウス心臓を FMW 法（青）、麻酔下で迅速に開胸/心摘出（黄）、または血流途絶後 10 分後に摘出（赤）し、メタボローム解析を行った結果を示す。（文献 1 より改変）

【研究テーマ A2— 高感度イメージングによる網羅的な代謝物イメージング】

イメージング質量分析では組織切片を直接分析する。従って多量の夾雑物中から、ごく微量の目的化合物を検出する事が困難であった。しかし代謝経路を半網羅的にトレースする為には、微量化合物検出に十分な感度とシグナル選択性を得る必要がある。この問題を以下の 2 つの技術を用いることで解決した。

(1) on-tissue 誘導体化法による感度向上

イメージング質量分析における標的化合物の検出感度向上の為、組織切片上における化合物誘導体化法（on-tissue 誘導体化法）を開発した。これは標的化合物と選択的に反応する試薬を切片上に供給することで、位置情報を保持したまま誘導体化を達成し、質量分析にお

ける標的検出感度を大きく改善する手法である。我々が発表した試薬(TAHS, Toue et. al. 2014)と研究期間中に報告のあった試薬(DPP Shariatgorji et. al., 2014)を検討した結果、従来は検出が困難であったアミノ酸誘導体、カテコールアミン、さらにはステロイドホルモンのイメージングが可能になった。

(2) 高質量分解能-質量分析計による選択性向上

さらに化合物シグナルの選択性を高める工夫も行った。低分子化合物は質量が非常に近い値を持つものが多い。従って、質量分析で検出される質量電荷比(m/z)のピークも近接し、従来から汎用される飛行時間型の質量分析計では各々のシグナルを分離する事が難しい。この問題を解決する為に、高質量分解能の質量分析計(Fourier transform-MS, FT-MS)を活用した。その結果、高質量分解能測定により、化合物に特異的なシグナルを夾雑物から分離して計測する事が出来た。マウス胚(E9.5)のごく小さな試料切片から、解糖系および TCA サイクル代謝産物群を半網羅的にイメージングする事が出来た。

以上の技術開発を経て、これらを適用する事で以下の成果を得た。

(文献 2) 腸管免疫のビタミン B1 を介した生体防御メカニズム、

(文献 3) 新生児脳虚血モデルに対する低体温療法の代謝経路上の作用点解明、

(文献 4) マクロファージの低酸素適応機構の解明、

(文献 5) 発生胎児における、胎盤接続に伴うエネルギー代謝経路スイッチの解明

以降はマウス心筋梗塞モデル解析(文献 1)について詳細に報告する。

【研究テーマ B—梗塞心筋における補償的エネルギー代謝機構の解明】

心臓はその時々環境に適応し、鋭敏に自らのエネルギー代謝を改変する事でポンプ機能を維持する。従って心臓を外科的に摘出すると、即座に虚血/低酸素暴露に応答した、いわば全虚血心の代謝プロファイルを呈してしまう。この事から冠動脈結紮による心筋梗塞モデルが、マウス心臓においてどのような疾患代謝に帰結するかについて、(摘出によるアーチファクトを除外して)直接アプローチする手法に乏しかった。

本研究テーマ A-1 により心臓の FMW 法固定が可能になった。すなわち心筋梗塞時における、ごく一部の心壁が虚血に陥った状態を瞬間的に固定し、観察する事が可能となった。これにより、これまで不明であった平常時、心筋梗塞時の代謝イメージングを高い時間解像度、空間解像度で分析する事が可能となった。

○ 梗塞巣に隣接した penumbra 領域は ATP 減少に抵抗性である

FMW 法で固定した冠動脈結紮-心筋梗塞モデル心のイメージング質量分析によりまず明らかになった事は、梗塞巣に隣接する領域は ATP 減弱に抵抗性であるという所見であった。図 4 に示すように、梗塞巣が非常に明瞭にアデニンヌクレオチド・Energy Charge (ATP, ADP, AMP から算出されるインデックス)が減弱するのに対し、隣接する Penumbra 領域では常に Energy

Charge が保持される(図 3 矢印)。

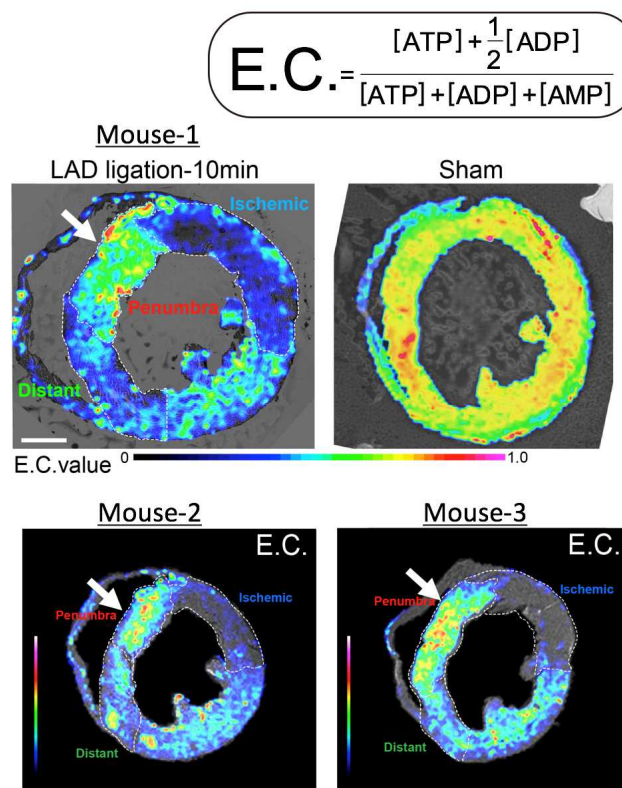


図 2:心筋梗塞 10 分後のマウス心臓における、Energy Charge(E.C.)-index のイメージング像: Penumbra 領域と名付けた梗塞巣隣接領域において、常に E.C.減弱に抵抗性が観察された。

○ Penumbra 領域ではグルコースの酸化的代謝が亢進している

次に、Penumbra 領域がどのような代謝機構で Energy Charge を維持しているかを調べるために、 $^{13}\text{C}_6$ グルコースまたは $^{13}\text{C}_3$ 乳酸を負荷し、その後これらの代謝運命をイメージングと定量解析によりトレースした。

一般に心筋梗塞では、血管狭窄点から心尖部に下降するに従い、梗塞部位は拡大していく。このような異なるサイズの虚血部位を含む複数の心断面において、Sham 群(=開胸/結紮なし)と比較して、すべての心断面で 10 倍以上の ^{13}C 標識グルコース代謝(総量)の増大が観察された。これは最も心虚血の程度が大きい心尖部位で最大であり、上昇率は実に平常時の 15 倍に上る。さらに、虚血が進行するに従い、糖代謝の質的な変化として解糖系の割合が上昇していくことが明らかになった。

さらにイメージング質量分析により、これらの増大する複数の経路の $^{13}\text{C}_6$ グルコース代謝が、どの心領域で支配的におきているのかを解析した。予想通り、 $^{13}\text{C}_3$ 標識乳酸(嫌氣的グルコース代謝の指標)により梗塞部位における乳酸産生(=嫌氣的グルコース代謝、赤で表記)の劇的亢進が示された(図 3 左)。興味深いことに、 $^{13}\text{C}_2$ -グルタミン酸(好氣的グルコース代謝の指標)の局在を可視化した結果、Penumbra 領域とほぼ一致する領域において亢進している様

子が観察された(図3中央)。すなわち Penumbra 領域の心筋は、隣接部位が虚血に陥った際にも、グルコースを好氣的に代謝する事で、エネルギー産生を維持していることが示され、心機能補償の代謝-代償メカニズムが示唆された。

$^{13}\text{C}_6$ -Glucose metabolism

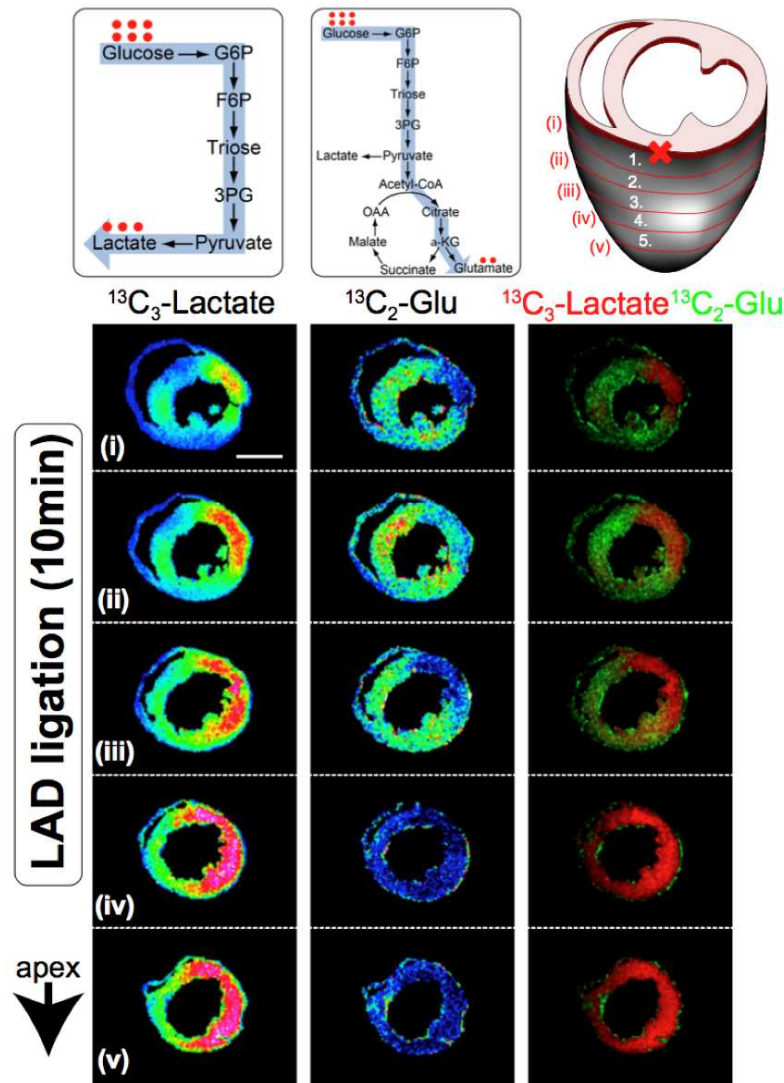


図 3: 心筋梗塞時の $^{13}\text{C}_6$ グルコース代謝経路トレースイメージング

$^{13}\text{C}_6$ グルコースから異なる代謝経路を経て生成した化合物をイメージングする事で、異なる心領域において、異なる代謝経路が用いられていることが可視化された。

本メソッドパッケージは、非侵襲分子イメージング法である FDG(Fludeoxyglucose)-PET(positron emission tomography)と対比すると、長短所が分かり易い。すなわち本法では、単純な糖取り込みの多寡をイメージングするのみでなく、どのような下流-代謝経路で取り込んだエネルギー基質が代謝されているかを、高空間解像度でイメージング

する事が出来る。また安定同位体-標識基質のバラエティも豊富であり、高い拡張性を備える。しかしながら、侵襲法である為に同一個体から経時的な情報が得られず、ヒト診断法としての応用は不可能である事が短所である。

一方で FDG-PET では糖の取り込みのみをモニターする手法であり、感度、空間解像度ともに本法には劣る。しかしながら、非侵襲法であるが故に経時的な代謝動態をモニターする事が出来、さらに診断法として確立されたものである。本研究で開発されたツールを、相補的な特徴を持つ非侵襲分子イメージング法と組み合わせる事で、基礎/臨床の疾患代謝解析に資する知見を今後生み出すものと期待される。

3. 今後の展開

本研究では、「本技術でしか達成できない疾患代謝の理解」をもたらす事を主眼に据えた。一例としては上述した『梗塞心筋における微小領域の補償的エネルギー代謝機構』の解明である。これまで難しかった個体動物内の疾患代謝を、高い時間/空間解像度で捉える事で、多くのモデル動物の代謝研究が新たな展開を迎えて進行中である。

この様に、研究実施者が企図する展望は本技術によりもたらされた知見がブレークスルーとなり展開する、多くの疾患代謝の基礎研究である。すなわち、分析化学者の視点から技術的な問題提起を成し、その解決法の提供をしたい。疾患モデル動物臓器を用いたメタボローム解析は、主として試料を持ち込む研究者と、質量分析を行う研究者の完全分業として行われることが多い。そのような状況から、本研究で掲げた死後分解のような問題が見過ごされてきたと考える。

長期的展望にはヒト疾患の治療・予防・診断という臨床への貢献を視野に入りたい。単なる技術開発にとどまることなく、疾患モデルを徹底的に理解するというスタンスを貫徹する事で、ヒト代謝疾患の理解と制御という最終着地点への到達を今後のマイルストーンとして課したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

疾患モデル動物での詳細なメカニズム解明は、ヒト疾患研究の基礎をなす。このモデル動物の“摘出臓器”における代謝物測定において、3つの問題提起を行い、これらを解決する事で疾患臓器の局所において、『どの細胞種』が、『どのような代謝経路の異常』を惹起するのかを明らかにするツール創出が、私のさきがけ研究のテーマである。

これらは、①『死後分解を抑制するサンプル調製法』、②『高感度代謝物イメージング技術』、③安定同位体で標識した化合物を活用した『動物臓器での代謝経路トレース解析法』として確立された。

さらに応用研究として(文献 1)マウス心筋梗塞モデル解析、(文献 2)腸管免疫のビタミン B1 を介した生体防御メカニズム、(文献 3)新生児脳虚血モデルに対する低体温療法の代謝経路上の作用点解明、(文献 4)マクロファージの低酸素適応機構の解明、(文献 5)発生胎児における、胎盤接続に伴うエネルギー代謝経路スイッチの解明、として報告する事が出来、技術の浸透は着実に進んでいる。

以上の技術開発の成果と、その浸透の早さは、私が研究開始当初考えていた予想を超えるものであり、一定の自己評価を与えて良いと考えている。

一方で、モデル動物で得られる基礎的な知見から、疾患制御に直接貢献する創薬ターゲットとなる細胞種/代謝経路の同定、または代謝物バイオマーカー同定や産生機序解明は、今後もさらに進展させていく必要がある。

最後に、3年間の研究実施期間において、申請時に掲げた医学—分析化学—工学と一体になった取り組みを全力で行なう事が出来たと考えるが、それらの成果は、本さがけ領域のアドバイザーの先生方、さがけ研究者仲間との数多くの共同研究、議論によるところが大きく、このような研究機会を与えていただいた小田総括をはじめとするアドバイザーの先生方に深く感謝いたします。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ヒトの疾患診断マーカーの開発、創薬標的タンパク質の同定およびそのタンパク質の代謝経路やシグナル伝達経路での役割の解明には、培養細胞や疾患モデル動物での研究が必要となる。このモデル動物の利用においては、多くの場合で臓器摘出などの操作が不可欠である。しかしながら、従来は「(1) 摘出操作中の細胞成分(代謝産物やタンパク質など)の変化」については、十分に検討や対策がなされてきたとは言い難かった。また、疾患の病巣は細胞集団であるが、この集団は往々にして正常細胞と異常細胞から構成されている。しかしながら、「(2) 疾患の原因となっている異常な細胞の検出・同定」は容易でない場合が多く、代謝物の高感度なイメージング技術の進歩が望まれていた。さらに、疾患における代謝の基礎的な知見を得るために、疾患の原因となる「(3) 代謝経路の変化を病巣内部の局所において調べる技術」の開発も課題であった。

本研究は、近年のイメージング質量分析や化合物分離・精製法の進歩を活用し、これら3つの課題を解決するメソッドパッケージを確立・提供し、創薬ターゲットとなる細胞や代謝経路の同定や、代謝物バイオマーカーの産生機序解明を *in vivo* で遂行することを目指した野心的な研究である。その目的は十分に達成されたと思われる。具体的には、(1) 標的臓器(脳と心臓)へフォーカスしたマイクロウェーブを1秒以下照射することで、細胞内酵素の瞬間的な熱失活により代謝物の死後分解を防止することができたことは、今後の試料調製法として広く普及していくと思われる。また(2) 標的化合物の組織切片上における誘導体化法を開発し、Fourier transform-MS も利用し、高感度で網羅的な化合物イメージング法を開発したことで、モデル動物の疾患代謝や病態の解析で飛躍的な情報量の増加が期待される。さらに、(3) 安定同位体標識の化合物を活用して、モデル疾患動物の臓器の代謝異常を定量的にイメージングする技術の開発は、ヒト心筋梗塞のみならず、様々な疾患の予防・治療のための研究に新たなアプローチを提供すると思われる。

これらの成果の多くは積極的な共同研究によるものである。即ち、アイデアと初期の研究成果が認められ、本さがけ研究領域内での共同研究や領域外の研究グループとの多数の共同研究にも発展した。また、成果発表(論文、学会など)も積極的に行い、国内外の招待講演も増え、本分野(代謝のイメージングなど)の世界レベルの研究者の一人として注目されるよう

になった。よって、さががけ研究が研究者としての大きな飛躍につながったと言える。
さががけ研究期間内で、様々な疾患モデル動物の病態を、疾患代謝の視点から細胞レベルでイメージングするツール(メソッドパッケージ)の重要性が明らかとなり、より広範な疾患モデル動物の解析へとつながることが期待される。また、疾患モデル動物で得られた知見を創薬に活かすべく、アカデミアや産業界との共同研究もさらに推進し、この優れたメソッドパッケージの普及を促進してほしい。現時点で非公開の興味深い研究成果も多数あることから、これらについても今後の発表と知財確保を期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sugiura Y, Katsumata Y, Sano M, Honda K, Kajimura M, Fukuda K, Suematsu M. *“Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart.”* **Sci Rep.** 6:32361, 2016
2. Kunisawa J, Sugiura Y*(**equally contribution**), Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H. *“Mode of Bioenergetic Metabolism during B Cell Differentiation in the Intestine Determines the Distinct Requirement for Vitamin B1”*. **Cell Reports.** 13(1):122-31., 2015
3. Takenouchi T, Sugiura Y*(**equally contribution**), Morikawa T, Nakanishi T, Nagahata Y, Sugioka T, Honda K, Kubo A, Hishiki T, Matsuura T, Hoshino T, Takahashi T, Suematsu M, Kajimura M: *“Therapeutic hypothermia achieves neuroprotection via a decrease in acetylcholine with a concurrent increase in carnitine in the neonatal hypoxia-ischemia.”* **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 35:794-805, 2015
4. Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, Miyazawa H, Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R, Komuro I. *“HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity.”* **Nat Commun.** 18:7:11635. 2016
5. Miyazawa H, Yamaguchi Y, Sugiura Y, Honda K, Kondo K, Matsuda F, Yamamoto T, Suematsu M, Miura M. *“Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching.”* **Development.** 144(1):63-73. 2017.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(受賞歴)

2014 年 日本質量分析学会 奨励賞受賞

2014 年 日本医用マスペクトル学会 奨励賞受賞

(主要な学会発表)

2014/07/14 国際 口頭

Yuki Sugiura “*Visualization and quantification of brain metabolic fluxes of glucose in the awake mice by mass spectrometry*” “5th AOMSC and 33rd CMSS (中国 北京)”

2015/09/15 国際 口頭

Yuki Sugiura “*In vivo visualization and quantification of myocardial metabolic fluxes of glucose by mass spectrometry*” **ANZSMS25 & AOMSC6** (Brisbane, Australia)

2014/9/10-12 国際 口頭

Yuki Sugiura “*In vivo visualization and quantification of myocardial metabolic fluxes of glucose by mass spectrometry*” **The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014**, (Kyoto)

2015/9/26 国際 口頭

Yuki Sugiura “*Development of an imaging mass spectrometry technique for visualizing localized cellular signaling mediators in tissues.*” **10th World congress for Microcirculation** (Kyoto)

2016/5/20-22 国際 口頭

Yuki Sugiura “*Highly sensitive Imaging Mass Spectrometry*”
the 9th international conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (Sendai)

2016/5/20-22 国際 口頭

Yuki Sugiura “*Time resolved analysis of brain energy metabolism by micro-dialysis linked ion chromatography-mass spectrometry*”
the 16th Annual Conference for American Society for Mass Spectrometry (San Antonio, USA)

研 究 報 告 書

「硫黄循環・代謝を基軸とした生体恒常性制御基盤の構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研 究 者: 西田 基宏

1. 研究のねらい

活性酸素種(Reactive OxygenSpecies: ROS)が単なる酸素毒ではなく、細胞内の重要なシグナル仲介分子として働くことが次々と明らかにされ、酸化ストレスと疾患に対する考え方も大きく変わりつつある。化学反応性の高い ROS や活性窒素種(RNS)に加えて、ROS/RNS と生体分子との反応によって生じる親電子物質もまた酸化ストレスの原因物質として働き、慢性心不全を誘導する。これら化学反応性の高い ROS/RNS や親電子物質の生体内不活性化および代謝は、求核性の高い活性イオウ種により制御されることが最近わかってきた。そこで本研究では、主にタンパク質がもつ活性イオウ種の生成・代謝系とその生理機能制御機構を明らかにし、その動作原理を機軸とした新奇な生体レドックス恒常性制御基盤を構築する。この概念に基づき、疾患モデル動物およびヒト患者の血液中で不可逆的に酸化修飾を受ける、疾患の重症度と高い相関性を示すタンパク質を同定し、疾患に依存した酸化修飾の様式を特定する。これを特異的に検出する方法を構築することで、糖尿病合併症の予防診断を可能にする革新的な基盤技術を創出する。また、疾患時の血漿タンパク質で酸化修飾が増えるメカニズムを明らかにすることで、治療につながる分子標的を同定し、新たな創薬戦略を確立する。さらには、筋組織や血管内皮組織における活性イオウの生成・代謝異常の是正が糖尿病合併症の治療に結びつくことを証明するとともに、活性イオウを基盤とするレドックス恒常性維持に寄与する化合物の探索が新たな糖尿病合併症治療薬の開発につながることを示す。

2. 研究成果

(1)概要

心臓の病態形成に関わるレドックスシグナルを、タンパク質の親電子修飾と求核置換という視点で解析した結果、タンパク質中に含まれるシステインポリ硫黄鎖が ROS/RNS や親電子物質によるタンパク質の酸化的活性化を負に制御する活性イオウの分子実体であることを新たに見出した。その生理学的意義の一つとして、ミトコンドリア分裂促進 G タンパク質 dynamin-related protein 1 (Drp1)が自身のカルボキシル末端に存在するシステインにポリ硫黄鎖を形成することで Drp1 の活性を負に調節していること、親電子物質は Drp1 のポリ硫黄鎖を枯渇させることで抑制を解除し、ミトコンドリア分裂を誘導することを明らかにした。Drp1 活性化は心筋虚血(低酸素)や高血糖負荷によって誘発されることから、虚血性心疾患や糖尿病合併症の新規創薬標的になると考え、既承認薬を用いて、病態時における Drp1 活性化を阻害する薬の探索を行ったところ、ヒット化合物一つを得ることに成功した(国際特許出願済、臨床試験実施中)。このヒット化合物が病態時特異的に Drp1 活性を阻害するメカニズムを、プロテオミクスを駆使して網羅的に調べた結果、Drp1 はアクチン結合タンパク質 filamin と

相互作用することでミトコンドリアの病的過剰分裂を誘発することが明らかとなった。

心不全の重症度に相関して血液中で酸化修飾される血漿タンパク質の探索にも着手し、glutathione peroxidase 3 (GPx3)を同定した。マウス心不全モデルにおいて、Gpx3 の親電子修飾は心臓の硬化（線維化）率と強く正に相関することがわかった。心臓の線維化に伴ってGPx3 の親電子修飾が増える機序を解析した結果、心筋細胞膜上の TRPC3 チャネルが活性酸素依存的な線維化シグナルを増強する創薬標的分子となることを見出した（Sci. Rep.2報に発表）。

機能性食品中の親電子物質が血圧低下に働くことに着目し、その作用点を探索した結果、Gタンパク質共役型のプリン作動性P2Y6受容体であることを明らかにした。P2Y6受容体はアンジオテンシン受容体とヘテロ2量体を形成し、アンジオテンシンIIによる高血圧応答を増強することを、P2Y6欠損マウスを用いて実証した（Science Signaling 誌に発表）。

(2) 詳細

(A) 組織および血液中の親電子シグナル評価技術の構築と疾患モデル動物への適用

マウスの横行大動脈を結紮し圧負荷を誘発することで慢性心不全モデルを作製した。心不全の重症度に伴って親電子修飾を受けるタンパク質を同定するため、ビオチンマレイミド試薬を血漿タンパク質と反応させ、アビジンビーズでプルダウンしたサンプルを質量分析により解析したところ、GPx3 が同定された。GPx3 が酸化修飾されるメカニズムを明らかにするため、圧負荷に対して抵抗性を示す、あるいは脆弱性を示す遺伝子改変マウスを用いて比較したところ、TRPC3 チャネル欠損マウスの血漿において、GPx3 の酸化修飾が顕著に抑制されていることに気付いた

($r^2=0.53$)。このマウスでは圧負荷による心臓の拡張機能障害と硬化（線維化）が抑制されており、心筋細胞膜上の TRPC3 チャネルは NADPH oxidase 2 (Nox2)と複合体を形成することで Nox2 を安定化し、機械伸展刺激による活性酸素の生成を増大させ、これが線維化シグナルを誘導

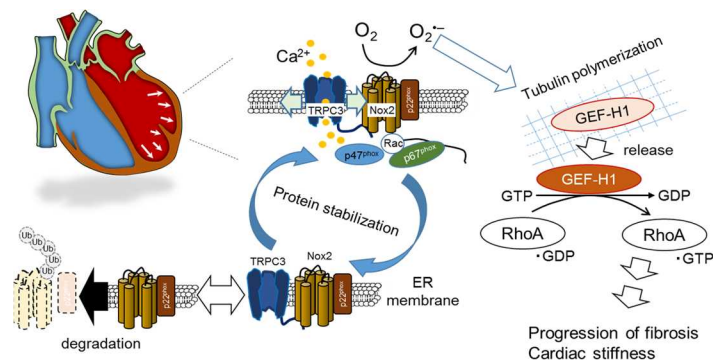


図1 TRPC3-Nox2 機能共役による心臓の硬化（線維化）誘導の分子メカニズム

していることが明らかになった（図1）。一方、TRPC3 と機能的相同性の高い TRPC6 欠損マウスでは、圧負荷によって血漿 GPx3 の酸化修飾は全く抑制されておらず、心臓の線維化は抑制されていたものの、心機能不全は抑制されなかった（Sci. Rep., 投稿準備中）。以上より、TRPC3-Nox2 共役の阻害が心不全治療の新たな標的戦略となる可能性が示された。

マウスでの知見をもとに、ヒト心不全患者（40 症例）の血漿サンプルを用いて心不全重症度と GPx3 親電子修飾との相関性を調べた結果、残念ながら、心筋収縮率 (EF) や血中心不全マーカー (BNP) と GPx3 酸化修飾の間には、マウスほどの有意な相関性は認められず ($r^2=0.13$)、心不全の背景にあるリスク要因をあわせて精査しなおす必要性が示唆された。

(B) 心臓における活性イオウシグナル制御機構の解析と疾患治療への応用

心不全時において心臓組織中に活性イオウ種が増えているかどうか調べるため、sulfane sulfur 検出蛍光指示薬 SSP4 を凍結心臓切片に処置した結果、心筋梗塞モデルマウス心臓の梗塞周辺領域において強い蛍光が観察された。梗塞周辺領域の心筋細胞で何が起きているか電子顕微鏡で形態観察を行ったところ、心筋細胞のミトコンドリアが著しく分裂していることに気付いた。そこで、ミトコンドリア分裂促進 G タンパク質 Drp1 の活性を GTP-agarose を用いたプルダウンアッセイで評価したところ、GTP 結合型 Drp1 量が有意に増加していた。梗塞周辺領域では低酸素シグナルが活性化しており、HeLa 細胞に Drp1 変異体を発現させた系で解析した結果、Drp1 は低酸素刺激によりカルボキシル末端のシステイン依存的に活性化することが明らかになった。システイン依存的な Drp1 活性化は、親電子性の高い環境汚染物質（メチル水銀）を細胞毒性を示さない低濃度で曝露させた際にも同じ現象が確認された。タンパク質ポリ硫黄鎖を検出する Tag-switch-tag アッセイにより、内因性 Drp1 はシステインにポリ硫黄鎖をもつこと、メチル水銀や低酸素負荷によるポリ硫黄の枯渇が Drp1 を活性化させる引き金となる可能性が示された（東北大学・赤池孝章教授との共同研究、Nature Commun., in revision）。以上の結果は、これまで GEF や GAP のみで制御されると信じられた G タンパク質サイクルが活性イオウによっても制御されるという、固定概念を覆す画期的な知見といえる（図2）。

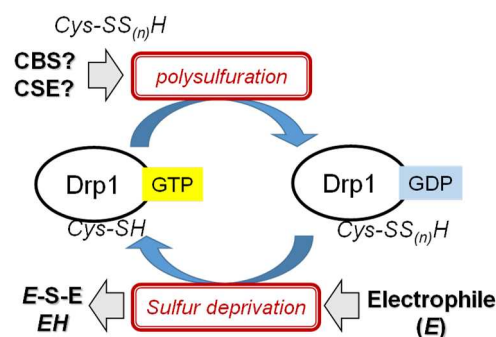


図2 活性イオウによる G サイクル制御

(C) 親電子シグナルを起点としたインスリン抵抗性の原因標的分子の同定と創薬展開

Drp1 は MeHg などの親電子物質だけでなく、低酸素や高血糖などの負荷によっても活性化される。心筋細胞の低酸素／再酸素化によるミトコンドリア過剰分裂を指標に Drp1 活性化を阻害する化合物の探索を行い、わが国の既承認薬の中から高血圧治療薬シルニジピン（ジヒドロピリジン系 Ca^{2+} 拮抗薬）を同定した（国際特許出願済み）。本薬剤は心筋梗塞後の慢性心不全だけでなく、ストレプトゾトシン誘発性の血糖値増加も有意に抑制することをマウスレベルで見出した。動物レベルでの薬効とメカニズムを基に、九大病院循環器内科・井手友美講師と連携し、医師主導の臨床研究（Treatment for Type 2 Diabetes with cilnidipine by Randomized Prospective study (DRP study)）を開始した。

キャベツやワサビ、ブロッコリーに含まれる親電子物質（イソチオシアネート）には血圧低下作用があり、心血管病リスクを軽減することが知られている。アンジオテンシン II 誘発性高血圧のメカニズムを解析している過程で、血管平滑筋細胞に発現するプリン作動性 P2Y6 受容体がアンジオテンシン type1 受容体とヘテロ 2 量体を形成し、高血圧リスクを高めることをマウスで見出した（Science Signal., 2016）。P2Y6 受容体の唯一の阻害薬である MRS2578 には 2 つのイソチオシアネート基があり、MRS2578 はイソチオシアネートの親電子性を介して P2Y6

受容体を阻害することを明らかにした。

3. 今後の展開

・TRPC3-Nox2 複合体は圧負荷による心臓の線維化時だけでなく、抗がん剤投与マウスの萎縮した心臓でより強く発現増加することも最近明らかにしている(論文投稿中)。今後は、萎縮性心筋症での TRPC3-Nox2 複合体形成のメカニズム解析や、その血漿における GPx3 酸化修飾を調べることで、萎縮性心筋症の重症度を反映するバイオマーカーとしての GPx3 酸化修飾の重要性を確立させていく。

・Drp1 ポリイオウ鎖の枯渇と心筋リスクとの直接的な因果関係を明らかにするためには、Drp1 (C624S)変異体発現マウスでの心臓リスク評価に加えて、Drp1 の Cys-SH 基へのイオウ供給酵素の過剰発現・欠損による効果なども in vivo レベルで評価していく。

・創薬標的としての P2Y6 受容体の重要性を確立するためには、イソチオシアネート鎖を基盤に P2Y6 受容体と最も効率よく反応し、心血管疾患に対して強い保護効果をもつヒット化合物を同定する必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

硫化水素を投与したマウスで心不全や心筋細胞老化が抑制されるという動物実験の知見を基盤に求核性の高い活性イオウが生体内で循環し、心臓に取り込まれて保護効果を発揮するという仮説で研究をスタートさせたが、研究初期の段階で心臓組織中でも活性イオウが存在することがわかり、早期の段階で血液や組織中の活性イオウ量を測定することに意味がないことに気付いた。しかし私はすぐにフリーのイオウ分子からタンパク質システインに含まれるポリ硫黄に視点を変更し、創薬戦略構築をゴールに見据えた研究に方向転換した。その結果、血漿 GPx3 の酸化修飾をツールとして、TRPC3 や P2Y6 受容体が心血管病リスク因子となる可能性を見出している。また、ミトコンドリア品質管理が Drp1 タンパク質のポリ硫黄によって制御されることを明らかにし、これを指標とする既承認薬のスクリーニングからドラッグ・リポジショニングにつながりうるヒット化合物の同定に成功した。本さきがけ研究開始に異動のためのラボ立ち上げが重なったため、学術論文の成果が出始めるのに3年を要してしましたが、既報3本と国際特許1つ・臨床試験1つに加えて、新たな論文も3本投稿しており、学術的にも着実に成果が出始めている。既報3本の論文はすべて新聞やインターネット上で広く報道され、製薬企業や異分野研究者からの問い合わせも複数あり、実用化(創薬)や異分野連携を目指した共同研究が芽生え始めている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

活性酸素種の新たな役割が解明されるにつれて酸化ストレスと疾患に対する考え方も大きく

変わりつつある。本研究では、主にタンパク質が有する活性イオウ種の生成・代謝系とその生理機能制御機構を明らかにし、新規の生体レドックス恒常性制御基盤を構築することを目標として開始した。

マウス慢性心不全モデルを用いた実験から、心不全の重症度に伴って酸化修飾を受けるGPx3が同定された。この酸化修飾のメカニズムについても調べ、TRPC3-Nox2 共役の阻害が心不全治療の新たな標的戦略となる可能性が示された。ヒト心不全患者では、マウスとは同様の結果とはならず残念であったが、この結果が新たな研究開始の契機となることは確かで、今後の展開が期待される。

また、マウス心筋梗塞モデルを用いた実験から、内因性 Drp1 はシステインにポリ硫黄鎖をもち、この枯渇が Drp1 を活性化させる引き金となる可能性が示された。G タンパク質サイクルが活性イオウによっても制御されるという非常に興味深い結果である。また、Drp1 活性化を阻害する化合物として高血圧治療薬シルニジピンも同定し、臨床研究も開始された。

さらに、アンジオテンシンⅡ誘発性高血圧のメカニズムの研究過程で、P2Y6 受容体がアンジオテンシン type1 受容体と2量体を形成し、高血圧リスクを高めることをマウスで見出した。

以上のように、本さがけ研究で新たな研究分野を開拓し、その成果を積極的に論文、学会などで発表した。

これらの他にも現時点では非公開の重要な研究成果も多数有り、今後の学会発表や論文発表が期待される。

本さがけ研究の活性イオウによるミトコンドリア品質管理に関する成果が認められ、複数の学会でのシンポジウム企画立案や、生理学研究所にて異分野融合型のオルガネラ研究会を立ち上げる等、新たな研究分野を開拓しつつある。また、心臓イオウ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本研究分野の顕著な研究者の一人として注目され、新たな共同研究にも発展し、基盤研究特設分野「ネオ・ジェロントロジー」への応募・採択につながっている。さらに、本さがけ研究領域内では、柴田研究者、富澤アドバイザーや魏研究者との研究交流の成果が新たな共同研究に発展し、新学術領域の立ち上げ・応募につながりつつある。このように、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishimura A., Sunggip C., Tozaki-Saitoh H., Shimauchi T., Numaga-Tomita T., Hirano K., Ide T., Boeynaems JM., Kurose H., Tsuda M., Robaye B., Inoue K. and Nishida M*. (2016) The purinergic P2Y6 receptor heterodimerizes with the angiotensin AT1 receptor to promote angiotensin II-induced hypertension. *Science Signaling* 9, ra7. doi: 10.1126/scisignal.aac9187. (*corresponding author)
2. Numaga-Tomita T., Nishida M*, Putney J.W. Jr., and Mori Y*. (2016) TRPC3 amplifies B-cell receptor-induced ERK signalling via protein kinase D-dependent Rap1 activation. *Biochemical Journal* 473(2):201-10. doi: 10.1042/BJ20150596.
3. Kitajima N., Numaga-Tomita T., Watanabe M., Kuroda T., Nishimura A., Miyano K., Yasuda S., Kuwahara K., Sato Y., Ide T., Birnbaumer L., Sumimoto H., Mori Y. and Nishida M*. (2016)

TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. Scientific Reports 6:37001. doi: 10.1038/srep37001.

4. Numaga-Tomita T., Kitajima N., Kuroda T., Nishimura A., Miyano K., Yasuda S., Kuwahara K., Sato Y., Ide T., Birnbaumer L., Sumimoto H., Mori Y. and Nishida M*. (2016) TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. Scientific Reports 6:39383. doi: 10.1038/srep39383.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: 西田 基宏、石川 達也

発明の名称: Drp1 重合阻害剤

出 願 人: EA ファーマ(株)、自然科学研究機構と九州大学(日本のみ)

出 願 日: 平成 27 年 11 月 20 日

出 願 番 号: 特願 2015-082688, WO2016/080516

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・国際学会発表(招待講演のみ)

1. Nishida M., Shimauchi T., Nishimura A., and Numaga-Tomita T. TRPC channels in cardiovascular stress resilience. International and Interdisciplinary Symposium 2016 “Towards a New Era of Cardiovascular Research”. July 11-13 (2016). Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

2. Nishida M. New strategies for drug development of heart failure. Medical Research Seminar in Malaysia Sabah University, Jan 23 (2017). Kota Kinabalu Sabah, Malaysia.

3. Nishida M., Numaga-Tomita T., Shimauchi T., Matsukane R. and Nishimura A. Imitation of kinesitherapy by inhibition of TRPC6 channel activities. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (ISCIDK2015). Oct 16-17 (2015). Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

4. Nishida M. Negative regulation of cardiac remodeling by S-polythiolation of G proteins. 2nd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecule. Sep1 (2015). Showa Pharmaceutical University, Tokyo, Japan.

5. Nishida M. Covalent modification of H-Ras by nitric oxide-derived reactive species underlies development of chronic heart failure in mice. 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology (WCP2014), 13-18 July (2014). Cape Town, South Africa.

6. Nishida M. Role of TRPC channels in mechano-chemo transduction in hearts. The 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia Sep 12-15 (2013). Oxford, UK.

・受賞

1. 第 25 回アステラス病態代謝研究会 最優秀理事長賞受賞(2014 年 10 月)

・英文総説

1. M. Nishida*, A. Nishimura, T. Matsunaga, H. Motohashi, S. Kasamatsu and T. Akaike*, "Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells" Free Rad. Biol. Med. (in press).
2. S. Fujii, T. Sawa, M. Nishida, H. Ihara, T. Ida, H. Motohashi and T. Akaike*, "Redox signaling regulated by an electrophilic cyclic nucleotide and reactive cysteine persulfides" Arch. Biochem. Biophys. 595:140–146 (2016). doi: 10.1016/j.abb.2015.11.008..
3. M. Nishida, Y. Kumagai, H. Ihara, S. Fujii, H. Motohashi and T. Akaike*, "Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species" J. Clin. Biochem. Nutr. 58(2):91–98 (2016). doi: 10.3164/jcbtn.15-111.
4. M. Nishida, K. Kuwahara, D. Kozai, R. Sakaguchi and Y. Mori* "TRP Channels: Their Function and Potentiality as Drug Targets" Innovative Medicine: Basic Research and Development (Springer Open, edited by Nakao K, Minato N and Uemoto S), ISBN 978-4-431-55651-0 (eBook) 195–218 (2015). DOI 10.1007/978-4-431-5561-0_17.
5. M. Nishida*, T. Toyama and T. Akaike "Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling" J. Mol. Cell. Cardiol. 73, 10–7 (2014). doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.003.

・プレスリリース

- 「加齢高血圧の原因タンパク質を特定」2016.1.20 朝刊およびウェブ掲載(中日新聞、朝日新聞、毎日新聞、日経産業新聞、共同通信、NN マイナビニュースなど)
- 「目耳録 ～高血圧～」2016.3.14 朝刊掲載(中日新聞)
- 「圧負荷により心臓が硬くなる原因を解明」2016.1.20 朝刊およびウェブ掲載(中日新聞、朝日新聞、読売新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞など)

研究報告書

「脂質ラジカル選択的蛍光・質量分析マルチプローブの開発と疾患モデルへの適用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 山田 健一

1. 研究のねらい

脂質は、エネルギー産生やシグナル伝達など多くの生理機能を有している。しかし、ひとたび酸化されると過酸化脂質を生じ、その後様々なアルデヒド体に代謝分解される。そしてこれら酸化代謝産物のひとつひとつが炎症や変異原性を誘発する。さらに近年では、この代謝産物がタンパク質と複合体を形成し、腫瘍血管新生や加齢黄斑変性など疾患に密接に関わるということが報告された。ここで、これら代謝産物や複合体の生成基点は、「脂質ラジカル」である。さらに、脂質ラジカルは連鎖反応の中心の分子である。すなわち脂質ラジカルを検出できれば、疾患に至る過程で最もアクティブな場・分子を特定でき、疾患の予防・治療に大きく貢献できるのではないかと考えた。しかし、代謝中間体である脂質ラジカルは、極めて反応性が高く微量なために検出が非常に困難であった。

ここで私は、異分野で利用されている技術に着目した。つまり、スピン化合物が持つ物理化学的性質である蛍光消光作用、および炭素中心のラジカル結合能を利用できれば、脂質ラジカルを特異的に検出できるのではないかと考えた。そこで、脂質ラジカルに対する反応選択性を付与するために、スピン化合物の新規合成法を開発し、実際に選択性の高い化合物をこれまで見出ししてきた。さらに、脂質ラジカル選択的蛍光検出系を考案し、脂質ラジカルと反応すると蛍光が ON になる化合物開発にも成功している。

以上の背景のもと本研究では、「脂質ラジカルを選択的・高感度に検出・構造解析できる技術を開発し、疾患成因に直接関わる分子を明らかにすること」を目的とした。そのために、1) 検出技術の確立、2) 動物実験による概念実証、3) 他疾患モデルへの適用、などの研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、疾患実態を反映する分子として「脂質ラジカル」に着目し、1) 検出技術の確立、2) 動物実験による概念実証、3) 他疾患モデルへの適用、などを研究目的とした。

まず、様々な蛍光団とスピン化合物を組合せ、物理化学的パラメーター等を測定・比較することで、脂質ラジカルを高感度に検出できる蛍光プローブを開発した。実際に、本プローブを肝炎症モデルであるニトロソアミン(DEN)誘発培養細胞、および動物モデルに投与したところ、蛍光強度が上昇し、脂質ラジカルを検出することができた。また、その産生時期は非常に早い段階であることがわかった。ここでもし、脂質ラジカルが疾患に密接に関与しているのであれば、その抑制により疾患は軽減するはずである。そこで、DEN 誘発動物モデルにて脂質ラジカルが産生している時期に、上記蛍光プローブの脂質ラジカル反応部位のみを投与すると、その後の

炎症ならびに発がんは劇的に減少した。したがって、本検討より、脂質ラジカルおよびその代謝産物が疾患に密接に関与しているという概念を実証することができた。加えて、他の疾患モデルにも適用した。

以上の結果より、高感度検出技術の開発および疾患モデルでの概念実証を行うことで、「脂質ラジカル」が疾患実態を反映する分子のひとつであることを明らかにできた。

(2) 詳細

上記、研究目的毎に記載する。

1) 検出技術の確立

蛍光検出: 脂質ラジカルを検出するために、いくつかの蛍光団と我々が開発したニトロキンドを組み合わせた蛍光プローブを複数合成した(図 1A)。脂質ラジカルとの反応性、化合物の物理化学的パラメーターから、脂質ラジカルと最も効率的に検出できるプローブ NBD-Pen を今後の実験に用いることとした(図 1B)。また、開発した蛍光プローブの過渡吸収、酸化還元電位を測定し、エネルギーダイアグラムを作成した。NBD-Pen の消光メカニズムは光誘起電子移動反応(PeT)であることが分かった。

2) 動物実験による概念実証

次に、培養細胞にて脂質ラジカルを検出できるか否か検討した。細胞に、アラキドン酸、あるいはニトロソアミン(DEN)などにて、刺激することにより、NBD-Pen の蛍光強度が有意に上昇した(図 1C)。さらに、阻害剤を添加することで、蛍光強度の上昇は抑制された。加えて、蛍

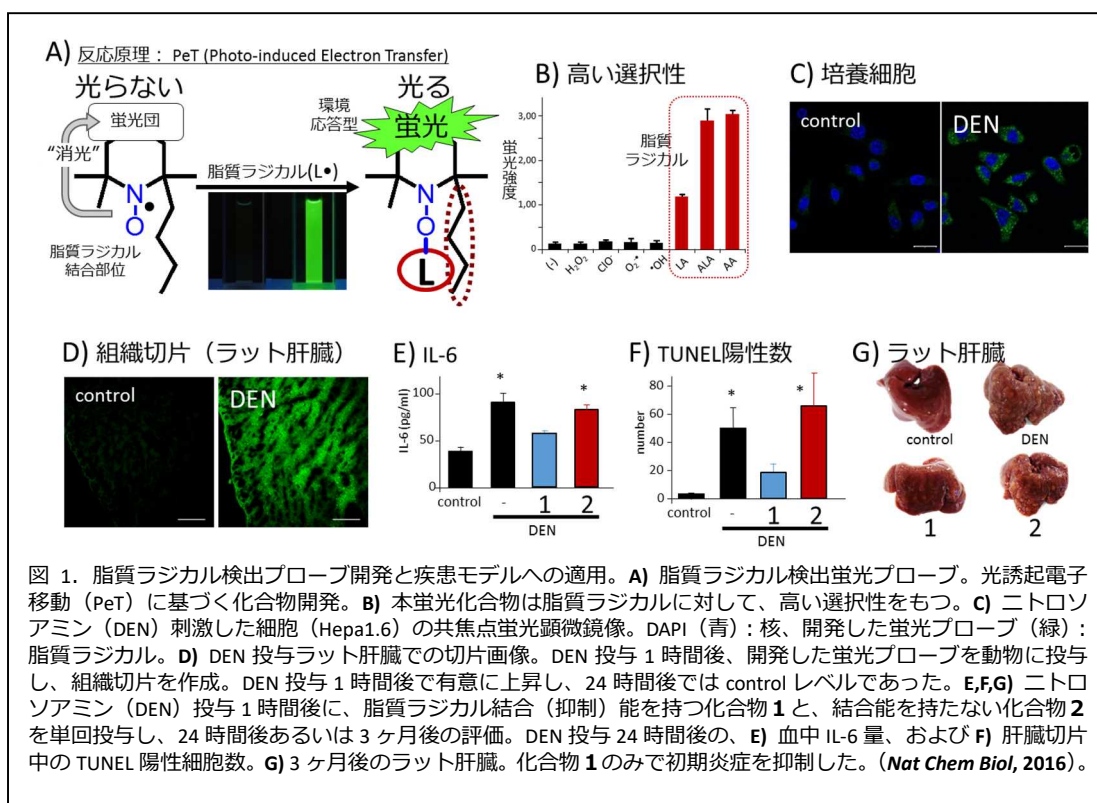


図 1. 脂質ラジカル検出プローブ開発と疾患モデルへの適用。A) 脂質ラジカル検出蛍光プローブ。光誘起電子移動 (PeT) に基づく化合物開発。B) 本蛍光化合物は脂質ラジカルに対して、高い選択性をもつ。C) ニトロソアミン (DEN) 刺激した細胞 (Hepa1.6) の共焦点蛍光顕微鏡像。DAPI (青): 核、開発した蛍光プローブ (緑): 脂質ラジカル。D) DEN 投与ラット肝臓での切片画像。DEN 投与 1 時間後、開発した蛍光プローブを動物に投与し、組織切片を作成。DEN 投与 1 時間後で有意に上昇し、24 時間後では control レベルであった。E,F,G) ニトロソアミン (DEN) 投与 1 時間後に、脂質ラジカル結合 (抑制) 能を持つ化合物 1 と、結合能を持たない化合物 2 を単回投与し、24 時間後あるいは 3 ヶ月後の評価。DEN 投与 24 時間後の、E) 血中 IL-6 量、および F) 肝臓切片中の TUNEL 陽性細胞数。G) 3 ヶ月後のラット肝臓。化合物 1 のみで初期炎症を抑制した。(Nat Chem Biol, 2016)。

光共染色により本プローブは、細胞全体に分布していた。以上の結果より、本蛍光プローブは培養細胞でも脂質ラジカルを検出できることが示された。

一方、ミトコンドリアは、生体内で活性酸素を産生する主要な部位であることから、脂質過酸化反応も亢進していることが想定される。そこで、ミトコンドリア移行性を付与した脂質ラジカル検出蛍光プローブを合成した。さらに、刺激した培養細胞にて、確かにミトコンドリアで脂質ラジカルが生成していることが、蛍光共染色することにより分かった。

次に本プローブが疾患モデルにも適用できるか否か検討した。疾患モデルとして、肝細胞がんモデルであるニトロソアミン(DEN)誘発モデルラットを用いた。DEN 投与初期に本蛍光プローブをラットに投与すると、蛍光強度が肝組織にて有意に上昇した(図 1D)。さらにこの上昇は、DEN の代謝酵素阻害剤で有意に減少した。そこで、蛍光強度が上昇した時間(DEN 投与 1 時間後)に脂質ラジカル結合部位のみ(蛍光プローブから蛍光団部位を除いた安定スピロ化合物)を肝細胞がんモデル動物に注射した。その結果、DEN 投与 24 時間後に上昇していた脂質過酸化代謝産物、アポトーシス、肝障害、8-OHdG(8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアニン、DNA 酸化損傷のマーカー)などが有意に低下した。さらに、興味深いことに、脂質ラジカルが上昇していた DEN 投与 1 時間後に、化合物の脂質ラジカル結合部位のみをラットに 1 度投与すると、3ヶ月後の肝細胞のがん化部位を有意に減少させた(図 1E~G)。以上の結果より、NBD-Pen は疾患モデル動物でも利用できること、DEN 投与モデルにおいては、脂質ラジカルが初期炎症および発がんの初期に密接に関与していることが分かった(Yamada K, *et al.*, *Nat Chem Biol*, 2016)。したがって、本検討より、脂質ラジカルおよびその代謝産物が疾患に関与しているという概念を実証することができた。

3) 他疾患モデルへの適用

本プローブが、他疾患モデルにも適用できるか否か検討した。国際強化支援策として、タイマヒドン大学の Dr. Noppawan Phumala Morales と共同で、サラセミア症の増悪に關与する酸化 LDL 内の脂質ラジカルを検出を目的とした。LDL を Cu イオンおよび Fe イオンで刺激後 NBD-Pen を加え、試料を電気泳動した。その結果、NBD-Pen を用いることで、LDL の酸化時に生成する脂質ラジカルをきちんと蛍光検出できることがわかった。さらに、サラセミア疾患モデル動物である鉄過剰症モデルでも、NBD-Pen を用いることで血中および肝臓中での脂質ラジカルを検出できた。また、動脈硬化モデル、肥満症+DEN 投与モデル、四塩化炭素投与モデルなどにおいても、脂質ラジカルを検出できた。

以上の研究結果より、当初予定をほぼすべて達成できたと考えている。

3. 今後の展開

上記結果より、脂質ラジカルあるいはその代謝産物が疾患に密接に関与しているのは間違いない。しかし、どのように疾患を発症させるのかそのメカニズムなどは不明である。また、疾患毎にその経路は異なるのか、また肥満症によりその経路は変動するのかなど、解決すべき点が多い。今後はより高感度なプローブ、またより特異的な阻害剤の開発などを進め、疾患の発症メカニズム解析などを進めていく予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、生体内標的分子として脂質ラジカルを想定し、その効率的な検出・構造解析手法を開発した。さらに脂質ラジカルが疾患実態を反映する分子であり、創薬標的にもなり得ることを証明した。これらの成果は、領域内外の研究者と共同研究を推進することにより、より大きな成果につなげることができた。今後、これら技術をさらに深化させることにより、疾患実態を反映する脂質ラジカル等、酸化障害を基点とした創薬基盤技術の確立につながると確信している。

したがって、以上の成果は、新たな技術創出のみでなく、創薬基盤への寄与が見込まれ、当初予定を上回る成果であると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

生体内で生じる活性酸素であるヒドロキシルラジカルは、極めて反応性が高く、脂質、タンパク質、糖質、DNA など様々な生体物質と反応し細胞や組織にダメージをもたらす、癌、生活習慣病、老化などの原因・危険因子であると考えられている。しかしながら、ヒドロキシルラジカルより生じる様々なラジカルは、極めて反応性が高く微量なために、従来は検出が非常に困難であった。そのため、疾患発症や病態の進行において、細胞や組織のどこで、どのようなラジカルが生成し、いかなる疾患を生じさせるかについてや、その治療薬開発のための基礎的知見については不明な点が多かった。

そこで、本研究は、ヒドロキシルラジカルなどにより生じる重要なラジカルの一つである脂質ラジカルに着目し、まずその高感度検出のための蛍光プローブ NBD-Pen を開発した。この非常に優れた蛍光プローブの開発は、化学製品の製造で利用されているラジカル捕捉剤からヒントを得たスピン化合物と蛍光団の組み合わせを検討したもので、分子設計のアイデアを様々な基礎・応用分野に求めるという本研究者の柔軟な発想が実を結んだと思われる。

本プローブは抽出液試料の脂質ラジカルの分析のみならず、培養細胞やミトコンドリア、疾患モデル動物の組織切片においても、画像解析により脂質ラジカルの高感度検出が可能となった。さらに脂質ラジカル結合部位のみを肝細胞がんモデルラットに注射することにより、3 ヶ月後の肝細胞のがん化部位を有意に減少させたことは、創薬のための基礎データとしてたいへん興味深い。

さらに、サラセミア症とそのモデル動物の LDL 酸化時に生成する脂質ラジカル、そして動脈硬化モデルや肥満症+DEN 投与モデル、四塩化炭素投与(急性肝障害)モデルなどで生成する脂質ラジカルなども、蛍光プローブ NBD-Pen で検出できた。よって、脂質ラジカルの生成が主因・危険因子である様々な疾患を対象とした創薬のために、蛍光プローブ NBD-Pen の脂質ラジカル結合部位(およびその誘導体)の利用が期待される。

学会発表、論文発表、共同研究を積極的に行い、本さがけ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本分野の顕著な研究者の一人として注目されるようになり、研究者

としての飛躍につながった(平成 28 年 4 月に教授に昇任)。

今後も柔軟な発想で、脂質ラジカルに対するより高感度なプローブの開発、迅速・簡便・低コストな検出キットの開発、脂質ラジカルによる疾患発症の分子メカニズムの解明など広範な分野で研究を展開していくことを期待する。また、現時点で非公表の研究成果も多数あることから、これらの今後の展開(学会・論文発表、知財確保)にも期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. *Yamada K, Mito F, Matsuoka Y, Ide S, Shikimachi K, Fujiki A, Kusakabe D, Ishida Y, Enoki M, Tada A, Ariyoshi M, Yamasaki T, Yamato M. Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals. *Nat Chem Biol*. 2016, 12(8):608–613.
2. Matsuoka Y, Ohkubo K, Yamasaki T, Yamato M, Ohtabu H, Shirouzu T, Fukuzumi S, *Yamada K. A profluorescent nitroxide probe for ascorbic acid detection and its application to quantitative analysis of diabetic rat plasma. *RSC Advances*, 2016, 58(1):16–22.
3. Yamato M, Kawano K, Yamanaka Y, Saiga M, *Yamada KI. TEMPOL increases NAD⁺ and improves redox imbalance in obese mice. *Redox Biol*. 2016, 8:316–322.
4. Matsuoka Y, Yamato M, *Yamada K. Fluorescence probe for the convenient and sensitive detection of ascorbic acid. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 2016, 58(1):16–22.
5. Tun X, Yasukawa K, *Yamada K. Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radic Biol Med*. 2014, 74:108–117.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. 山田健一、「多様な酸化還元電位を有するニトロキシドの開発とその応用」、第 18 回 ESR フォーラム研究会、2014 年 7 月 26 日、愛知
2. Ken-ichi Yamada: Development and Application of α -Substituted Piperidine Nitroxides: Special Seminar, Seminar in Pharmacology (SCPM681): 2015/2/6 (Bangkok, Thailand)
3. Ken-ichi Yamada: Functional fluorescence probe for lipid derived radicals detection: Pacificchem2015: 2015/12/15–20 (Hawaii, USA)
4. 山田健一、「脂質ラジカル蛍光検出プローブの開発とその応用」、第 19 回 Vitamin E Update Forum、2016 年 8 月 16 日、東京
5. Ken-ichi Yamada: Fluorescence Probes to Detect Lipid-derived Radicals and Its Application: 2016 ISLS:2016/11/24(Taipei, Taiwan)

6. Ken-ichi Yamada: Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals:Frontiers2016 joint Symposium of the EPFL:2016/12/6(Lausanne, Switzerland)
7. 山田健一、「脂質ラジカルの検出と構造解析技術開発」、日本生物工学会 学際的脂質創生研究部会、2017 年 1 月 27 日、福岡
8. Ken-ichi Yamada: Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals and its application. The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and 33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences (JSPS-NRCT 2017 and IAMPS33), 2017/3/2-3 (Bangkok, Thailand)
9. 山田健一、「脂質ラジカルの検出と疾患への応用」、第 13 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、2017 年 3 月 16～17 日、奈良

シンポジウム

1. 山田健一、「脂質ラジカルをターゲットとした機能性造影剤の開発」日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25～28 日、神戸
2. 山田健一、「脂質ラジカル蛍光検出プローブ開発とその応用」、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26～29 日、横浜
3. 山田健一、「酸化ストレスと還元ストレス」、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26～29 日、横浜

受賞

1. 日本酸化ストレス学会学術賞(2016 年 8 月 30 日)

プレスリリース

1. 「脂肪の「錆び」が 癌化を促進することを発見！」、九州大学、2016 年 6 月 14 日
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/25>