

翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成

実施予定期間:平成20年度～平成29年度

総括責任者:田中 克子(横浜市立大学理事長)

協働機関:(株)メディカル・プロテオスコープ、富士フィルム(株)、ライオン(株)、エーザイ(株)、ファンケル(株)、東ソー(株)、富山化学工業(株)、積水メディカル(株)

1. 概要

プロテオミクス、医学、工学研究チームからなる横浜市立大学と協働機関が連携して翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点創成を目指す。蛋白質の修飾を検出する高感度でハイスループットな技術を開発し、主に修飾異常と疾患との関係を分子レベルで大規模、包括的に解析することにより診断マーカー、創薬ターゲットとなる蛋白質を探索する。また、ゲノム解析、in vivo イメージング法等を用いて、探索された蛋白質を評価すると共に診断マーカーの革新的アッセイ法の開発を進める。さらに創薬ターゲットの立体構造を解析し、新薬の開発を目指して薬物設計を実施する。

1. 機関の現状

横浜市立大学は、融合・統合的な医科学研究分野で優れた研究開発と人材育成の実績をもつ。学内では、ナノ、ゲノム、プロテオーム、構造生物学、分子イメージング、臨床医学の研究者が、蛋白質分析技術の開発、疾患の原因となる蛋白質の検出、蛋白質構造解析、薬物設計、診断技術の開発等に関して先端的な研究を進めており、翻訳後修飾プロテオミクス医療研究を大規模に推進できるポテンシャルを持っている。また、そのために必要な設備機器も整備されている。協働機関であるメディカル・プロテオスコープ社は、肺がん治療薬イレッサの作用機作についてプロテオーム解析手法を用いて研究し、その成果が高く評価された。また、富士フィルムは、高度な有機合成、イメージング等の技術を有し、ライオンは、オーラルケア製品の開発で実績がある。エーザイは、ヘルスケア製品の開発で評価が高く、ファンケルは、機能性食品や化粧品開発で実績がある。東ソーは、機能商品事業の一環としてバイオサイエンス事業を展開し、診断マーカーや創薬標的分子の開発を推進している。積水メディカルは、血液凝固・糖尿病・脂質・リウマチ・感染症の臨床検査薬などの開発で実績を有する。富山化学工業はアルツハイマー型認知症治療剤など神経細胞が障害される疾患の治療剤の開発を目指した研究で成果を挙げている。

2. 拠点化の対象とする先端融合領域及び研究開発

蛋白質は、生体内で合成された後、様々な修飾を受ける。修飾に異常が起こると蛋白質の機能に変化が生じ、その変化が種々の疾患の原因になる。しかし、修飾と疾患の関係に関してはまだ解明されていないことが多い。そこで、蛋白質のあらゆる修飾の異常と疾患に焦点を当てて修飾検出法の開発から修飾異常と疾患の関係の解明、修飾異常疾患診断技術の開発、創薬まで一貫して研究できる翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の創成を目指す。そのために、1)修飾異常を効率的に検出する質量分析装置(MS)の開発、2)精神疾患、神経変性疾患、がん、生活習慣病、アレルギー性疾患等における修飾異常の検出、3)生体内での機能解明のための二光子顕微鏡を用いた細胞分子イメージング技術の確立、4)細胞分子イメージングによる修飾異常と疾患や生理機能との関係の解明、5)修飾異常蛋白質の高次構造の解明による創薬分子基盤の確立、6)修飾異常蛋白質のアッセイ法の開発、7)PET/CT撮影による対象疾患の診断に有効な標識物質の設計と、モデル動物を用いた体内動態の解析、8)疾患治療のための候補薬物動態試験への応用、等に関する研究を推進する。

3. 拠点化構想の内容

理事長直轄組織として設置した先端医科学研究センター(先端研)を核として、すでに施行されている全教員任期制や教員評価制を踏まえ、職責や業績に応じた人事制度を構築する。さらにプロジェクト研究制、フェロウシップ制等の導入により、優れた若手研究者を確保し、多様な人材を活用できる新たな研究推進システムを構築する。また、知財面や研究成果の広報活動、データベース管理等での事務支援体制を確立する。企業より招聘した客員教員による企業側のニーズに即応した大学院教育等により、企業への人材の供給、企業からの人材登用、活用の促進を図る。研究の推進に当たっては、大学及び協働機関のメンバーからなる拠点運営委員会における議決により方針の決定を行う。

協働機関は、分析技術、診断薬、治療薬、機能性食品等の開発を分担すると共に、有機的に連携して効率的に研究を推進できる拠点形成を目指す。本拠点で得られた知見は、新規な治療法、診断技術、診断マーカーの開発、新薬創出の基盤となる。本拠点への医療、製薬関連企業の集結が予測され、国際競争に耐えうる経済・産業基盤が構築される。本拠点は、当該疾患群の診断、治療に関する他の医療研究機関への研究協力、医療情報提供でも大きな役割を果たせる。国内外に修飾プロテオミクス医療研究拠点はなく、修飾異常に係わる基礎研究、医療創薬に対応できる拠点を創成する意義は大きい。

4. 具体的な達成目標

a. 3年目における具体的な目標

質量分析によって修飾蛋白質を1/10¹⁵モルで検出する技術を確立する。この技術を用いて、がん、慢性関節リウマチ、神経変性疾患等に係わる蛋白質を探索し、それらの修飾と疾患の関係を明らかにする。バイオマーカーや創薬の標的候補分子として1疾患につき20～30の修飾異常蛋白質を同定する。また、修飾異常をMRM法によって検査する技術を確立する。修飾による蛋白質の機能変化や構造変化を解析するため、二光子顕微鏡やPET法を用いたイメージング技術を確立する。

b. 7年目における具体的な目標

高度な分析技術をもった翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の完成を目指す。本研究で開発される分析技術を用いて疾患に関連する修飾異常蛋白質を1,000以上同定する。そして、100以上の蛋白質について、生理的機能との関係、遺伝性疾患との係わり、発がん等との関係を明らかにする。また、10以上の修飾異常蛋白質の立体構造をNMRやX線結晶解析によって解明し、薬物設計の基盤を作る。修飾異常のマーカーとなるPET薬剤を見いだす。

c. 10年目(終了時)における具体的な目標

修飾異常を効率的に検出できるMS、臨床検査に利用できるMSについては実用化を目指す。修飾異常の蛋白質の立体構造解析の結果に基づいて薬物設計を試みる。さらに生体内の蛋白質修飾異常部位を臨床的に可視化する診断技術を確立し、修飾の程度と病態との相関、疾病の早期発見、薬物動態試験への応用、開発薬剤の治療効果予測の可能性を明らかにする。

5. 実施期間終了後の取組

本提案における取り組みを通じて、協働機関における研究開発が大きく発展すると共に、新たな協働の芽(同一企業との別のテーマでの協働や他の企業との協働等)が各所に現れると予測される。基礎研究面や応用研究面での学術推進と人材育成という大学・附属病院本来の社会的な役割を果たしつつ、新たな社会的な要請である研究成果の社会還元を果たすべく、大学・附属病院と企業との相互補完的な新たな仕組みを構築する。これらの取り組みを推進することにより、真のイノベーション創出拠点を作ることができる。本拠点で育成された若手研究者を他の研究機関に送り込み、わが国の研究水準を向上させ、蛋白質修飾異常を原因とする疾患研究分野での国際競争力を強化する。

6. 期待される波及効果

修飾異常による疾患の診断技術、治療法の開発、創薬を目指す世界的な研究センターが設立される。これと併行して、国内における円滑な第一相臨床試験の開始は、現時点において国内で遅々として進まない臨床試験の先駆となると期待される。一方、本拠点への医療、製薬関連企業の集結の開始が予測され、国際競争に耐えうる経済・産業基盤が構築されることが期待される。

7. 実施体制

横浜市立大学は、平成17年度の独立行政法人化に際して、運営、人事、教育・研究、診療面におけるわが国では最も先鋭的とも言える改革を行った。この改革で、学長と理事長の分離、全教員の任期制・年俸制の導入、教員評価に基づく給与制度の試行等が行われた。トップダウンの迅速な意思決定を可能にするこのような大学システムを踏まえ、学長の主導の下に、治験推進本部の設置、先端研の設置、FDA等他機関や企業との包括協定の締結、分子イメージングの大学発ベンチャーの立ち上げ等を積極的に行ってきた。本拠点の推進母体となる先端研は、附属病院と協調して、これまで独立に活動していた臨

電子捕獲解離法を採用した MS を用いた修飾基検出法、アミノ酸を利用して蛋白質のイオン化効率を向上させる方法、イオン化効率が高くなる MALDI 基板の開発を推進する。最終的に修飾異常蛋白質を $1/10^{15}$ モルで検出できる技術を開発する。

(b) 翻訳後修飾蛋白質の検出

前年度までに検出された疾患関連リン酸化蛋白質を質量分析により同定する。ホルマリン処理パラフィン固定した (FFPE) 病理切片を用いた高感度な疾患関連蛋白質分析技術を確認する。また、高密度ゲノムアレー解析を行い、遺伝性疾患責任遺伝子を同定する。

(c) 翻訳後修飾蛋白質の機能解析

前年度までに得られた結果を基に、対象とした動物モデル及び細胞モデルにおいて特異的に発現量やリン酸化パターンが変動する蛋白質を同定する。細胞極性や、幹細胞制御、HIV 感染関連蛋白質の修飾の動態を解析する。

(d) イメージング技術の開発と応用

前年度に選定した蛍光蛋白質と解析対象である蛋白質の融合蛋白質を大脳皮質において *in vivo* 観察する。PET 直接標識法の高速化の検討と、微量物質等の標識化技術としての間接標識法を検討する。

(e) 構造・薬物設計

転写因子の修飾による機能制御機構の解析、ヒストンのメチル化修飾とそれを認識する蛋白質の構造機能解析、メチル化酵素とヒストンまたは転写因子の複合体の結晶化を進める。一方、蛋白質間相互作用の分子シミュレーション、全原子系線形応答理論による薬剤結合に伴う誘導適合予測法の開発を行う。

(f) 拠点形成とシステム改革

1. 拠点設備の整備: 先端研建設のための基本設計を作成する。
2. 若手研究者の育成: 若手研究チームの研究を支援する。海外からの研究者の受け入れを推進する。
3. 研究会・シンポジウムの開催: プロテオーム医療創薬研究会、及び修飾プロテオミクスに関する公開シンポジウムを開催する。

(2) 実績

(a) 質量分析装置とその周辺技術の開発

電子捕獲解離法及び新規な水素原子移動解離法を用いた質量分析によるリン酸化部位の高感度 ($1/10^{15}$ モル) 検出法を開発した。リン酸化蛋白質を 1 回の質量分析で 1,500~2,000 同定できるようになった。また、FFPE 組織の蛋白質を同定する質量分析技術を確認した。一方、二光子顕微鏡分析に適した蛋白質を選定した。

(b) 翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析

再燃前立腺がん、転移胃がん等のバイオマーカー候補を同定した。再燃前立腺がんにおける aPKC と IL-6 の役割を解明した。乳腺組織幹細胞の増殖異常マウスの血清蛋白質中にマーカー候補を検出した。幹細胞における DNA 修復や mRNA 監視等に関わるシグナル系を制御する新規分子群を発見した。Pin1 が標的としたリン酸化蛋白質を解析し、前立腺がんの骨転移を早期に予測できるリン酸化抗体を開発した。また、卵巣がん等によってリン酸化が変動する蛋白質を解析し、83 の疾患関連リン酸化蛋白質を見いだした。社会的隔離ラットにおいて AMPA 受容体シナプスの移行が阻害されるが、AMPA 受容体におけるリン酸化異常を解明した。一方、Ehlers-Danlos 症候群のあるタイプが修飾酵素遺伝子の異常であることを示した。神経疾患患者脳組織においてリン酸化蛋白質 CRMP2 陽性細胞が多く、マーカー候補として有望であるとみられた。

(c) イメージング・診断技術の開発と応用

修飾蛋白質を放射性同位元素で標識できれば、その作用機序や、動態の解明が可能になる。蛋白質の構造を損なうことなく、効率的に標識できる技術の開発を行った。また、MRM 法によってバイオマーカーを検出する技術の開発を行った。

(d) 構造・薬物設計

遺伝子発現制御の中心となるエンハンソームのリン酸化による形成と崩壊の機構を分子構造レベルで解明した。メチル化ヒストンを認識するクロモドメインの構造と機能を解明した。また、神経特異的転写抑制因子に結合する化合物を NMR でスクリーニングし、4つの化合物を見いだした。関節リウマチの原因蛋白質 PAD4 の活性を抑制する抗体を作製した。一方、ポリユビキチン鎖結合様式の違いによる構造変化の分子シミュレーションを進めた。

(e) 若手研究プロジェクト

若手研究者の育成を目指し、若手研究者をリーダーとする 2 件のプ

ロジェクトを推進した。

(f) 拠点形成とシステム改革

1. 拠点運営体制の開催: 拠点運営に係わる拠点運営委員会を 2 回、拠点リーダー会議、中間発表会及び諮問委員会を 1 回開催した。
2. 拠点設備の整備: 先端研建設のための基本設計を作成した。
3. 若手研究者の育成: 若手研究チームの研究を支援した。海外からの研究者の受け入れを推進した。
4. 研究会・シンポジウムの開催: プロテオーム医療創薬研究会を 10 回、国際学術フォーラムを 1 回開催した。

c. 平成 22 年度

(1) 計画

質量分析装置とその周辺技術の開発

(a) MRM 法を用いて $1/10^{15}$ モルの修飾異常ペプチドを選択的かつ定量的に検出できる技術を開発する。新規プロテインチップ技術、イオン化の効率化技術の実用化を図る。

(b) 翻訳後修飾蛋白質の検出

アルツハイマー病、卵巣明細胞腺がん、前立腺がん等の疾患についてリン酸化が変動する 20~30 の蛋白質を同定する。同定された蛋白質がバイオマーカーや創薬ターゲットとして利用できるか検証する。検出された疾患責任遺伝子異常と修飾異常の関係を検査する。

(c) 翻訳後修飾蛋白質の機能解析

疾患モデル細胞等で同定された修飾異常蛋白質と疾患との関連の重要性を明らかにするため、生理及び疾患との関わりで鍵となる修飾の機能を修飾酵素 RNAi や、リン酸化の細胞イメージング等の手法を用いて解析する。さらに、ヒト検体を用いて、バイオマーカーや創薬標的としての有用性を評価・検証する。

(d) イメージング技術の開発と応用

病態により生ずる修飾異常蛋白質を大脳皮質にて *in vivo* 観察する。また、PET 技術については、直接標識法及び間接標識法の高速化と収率向上に関して検討し、臨床研究としてのヒト投与が可能となるような Working sample を確定する。

(e) 構造・薬物設計

ヒストンアセチル化酵素の活性制御機構解析、ヒストンリモデリング因子によるヒストン認識及びヒストンの化学修飾の影響、ヒストンのシトルリン化修飾に対する蛋白質の認識機構、メチル化酵素とヒストンまたは転写因子の複合体の初期的な X 線回折実験を行い、薬物設計のための基盤データを収集する。

(f) 拠点形成とシステム改革

1. 拠点運営体制の開催: 拠点運営に係わる拠点運営委員会、拠点リーダー会議、中間発表会及び諮問委員会を開催する。
2. 拠点設備の整備: 先端研施設建設のための実施設計を作成する。
3. 若手研究者の育成: 若手研究チームの研究を支援し、海外若手研究者の受け入れを推進する。
4. 研究会・シンポジウムの開催: プロテオーム医療創薬研究会、及び翻訳後修飾プロテオミクスに関する国際シンポジウムを開催する。

(2) 実績

(a) 質量分析装置とその周辺技術の開発

電子捕獲解離 MS によるリン酸化部位の高感度で効率的な検出方法、修飾蛋白質の分析に適した新規な水素原子移動解離法、アミノ酸を利用してペプチド ($1/10^{18}$ モル) 質量シグナルの検出法の開発に成功した。新規な MALDI 試料ターゲットに用いる撥水濃縮基板を開発した。

これによってイオン収量は 10 倍向上した。一方、アフィニティー精製法と MS を利用し、リン酸化蛋白質リン酸化部位を 1 回の分析で 2,000 以上同定できるようにした。さらに、質量分析では難しいリン酸化状態の異なる蛋白質変異体を分別して解析できるリン酸化アフィニティー電気泳動法を確立した。これらの研究と並行して数百種のヒト蛋白質リン酸化酵素パネルを用いた MRM の技術検討を進めた。また、ホルマリン固定組織切片からレーザーマイクロダイセクションによって特定部位を切り取り、そこで発現しているリン酸化蛋白質を質量分析によって同定する技術を確認した。ホルマリン処理パラフィン固定組織切片から蛋白質をペプチドの混合物として抽出することにも成功した。

(b) 翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析

疾患関連蛋白質について臨床検体を用いた統計解析を進め、再燃前立腺がん、転移胃がん、メラノーマ等の難治性がんのバイオマーカー候補を新規同定した。再燃前立腺がんにおけるリン酸化酵素 aPKC と IL-6 の役割を明らかにした。乳腺組織幹細胞の増殖異常が起きて

いるマウスの血清蛋白質中に特異的マーカー候補を検出した。うち 10 種についてヒト検体での統計解析の準備を進めた。幹細胞における DNA 修復や mRNA 監視等に関わるシグナル系を制御する新規分子群を発見し、その機構を解明した。単離した微量の幹細胞における修飾異常を解析するための技術を確立した。Pin1 が標的としたリン酸化蛋白質を解析し、前立腺がんの骨転移を早期に予測できるリン酸化抗体の開発に成功した。血管壁細胞や前立腺がん細胞における NADPH オキシダーゼ I の標的蛋白質を発見した。この蛋白質の酸化修飾は、増殖刺激により亢進された。そのほか、卵巣がん、前立腺がん、肺がん等によってリン酸化が変動する蛋白質を網羅的に解析し、83 の疾患関連リン酸化蛋白質を見いだした。遺伝子アレー解析によって Ehlers-Danlos 症候群責任遺伝子を同定した。この遺伝子は修飾酵素蛋白質をコードしていた。

(c) 翻訳後修飾蛋白質の機能解析

社会的隔離ラットにおいては AMPA 受容体シナプス移行阻害が見られる。AMPA 受容体における修飾異常及び責任分子の活性を調べ、シナプス提示に重要な AMPA 受容体のリン酸化の減少、さらに AMPA 受容体をリン酸化する CaMKII の活性の低下を認めた。一方、神経疾患患者脳組織においてリン酸化蛋白質 CRMP2 陽性細胞が多く、マーカー候補として有望であると考えられた。

(d) イメージング技術の開発と応用

二光子顕微鏡を用いた *in vivo* 分子イメージングに適した蛍光蛋白質の選定を行い、Venus が強いシグナルを発することを明らかにした。Venus-AMPA 受容体の融合蛋白質を作製して大脳皮質に *in vivo* で発現させることによって、二光子顕微鏡で樹状突起が明瞭に観察できるようになった。また、Spine の観察も可能になった。PET 技術に関しては、⁵-FU の ¹⁸F 標識法と Herceptin の ⁶⁸Ga 標識法をワーキングサンプルの一つとして定め、標識用薬剤を調製し、物質レベルでの構造確認と検定を行い、細胞ならびに動物個体レベルでの安全性を確認した。一方、MRM 法によってごく微量のバイオマーカーを検出する技術を開発するため、特定のリン酸化酵素をモデル蛋白質として MRM 分析の条件検討を行い、fmol レベルで特定の蛋白質由来のペプチドを選択的に検出できるようにした。

(e) 構造・薬物設計

遺伝子発現制御の中心となるエンハンソームのリン酸化による形成と崩壊の機構を明らかにした。メチル化ヒストンを認識するクロモドメインの構造と機能を解明した。また、神経特異的転写抑制因子に結合する化合物を見いだした。抗体によって関節リウマチの原因蛋白質 PAD4 の活性を 30% まで低下させることに成功した。一方、立体構造データベースにある 61 個の蛋白質のリガンド結合状態の結晶構造を線形応答理論によって、再現できる方法を開発した。また、ポリユビキチン鎖結合様式の違いによる構造変化の分子シミュレーションを進めた。

(f) 拠点形成とシステム改革

(1) 拠点運営体制の開催: 拠点運営委員会を 2 回、拠点リーダー会議、中間発表会及び諮問委員会をそれぞれ 1 回開催した。
(2) 拠点設備の整備: 先端研新棟の基本設計を行った。
(3) 若手研究者の育成: 若手研究チームの研究推進を支援した。外国人研究者を受け入れた。
(4) 研究会・シンポジウムの開催: 公開シンポジウムを 1 回、プロテオーム医療創薬研究会を 10 回開催し、参画研究者の資質の向上を図ると共に、市民講座を 2 回開催し、研究成果や情報を一般研究者、市民に提供した。

d. 平成 23 年度

(1) 計画

(a) 質量分析装置とその周辺技術の開発

電子捕獲解離法を採用したイオントラップ型 MS を用いた修飾基検出法の実用化を図る。脂質修飾検出法の確立を図る。

(b) 翻訳後修飾蛋白質の検出

卵巣明細胞腺がん、前立腺がん等の組織、血液、培養細胞におけるリン酸化以外の修飾の異常について解析する。ホルマリン処理パラフィン固定した病理切片を用い疾患関連蛋白質を探索する。

(c) 翻訳後修飾蛋白質の機能解析

モデル系の構築、モデル系を用いた鍵修飾の探索と同定、同定された鍵修飾の機能解析、ヒト検体を用いた有用性の評価といった、鍵修飾の探索と同定に必要な一連の研究の流れの効率化を行う。

(d) イメージング技術の開発と応用

病態により生ずる修飾異常蛋白質を大脳皮質にて *in vivo* 観察する。また、PET 技術については、臨床研究としてのヒト投与が可能となるような Working sample の具体的な検討を行う。さらに、ヒト投与のプロトコルの策定を試みる。

(e) 構造・薬物設計

転写因子及びヒストンの化学修飾特異的にリクルートされる転写関連因子の探索、ヒストンの修飾とヌクレオソームの構造との関連の解析、メチル化酵素とヒストンあるいは転写因子との複合体の X 線結晶構造解析を行う。また、修飾による蛋白質間相互作用変化のシミュレーション等を用いた予測法を開発する。

(f) 拠点形成とシステム改革

(1) 拠点運営体制の開催: 拠点運営に係わる拠点運営委員会を年 2 回、拠点リーダー会議、中間発表会及び諮問委員会を年 1 回開催する。
(2) 拠点設備の整備: 産学共同研究室を含む先端研を建設する。
(3) 若手研究チーム・女性研究チームの公募: 新たな若手研究チームリーダーと女性研究チームリーダーを学内外から公募する。
(4) 研究会・シンポジウムの開催: プロテオーム医療創薬研究会、及び翻訳後修飾プロテオミクスに関する公開シンポジウムを開催する。

(2) 実績

(a) 質量分析装置とその周辺技術の開発

修飾解析に適した電子捕獲解離法や ISD 法を用いた MS 法を確立した。GPI アンカー修飾ペプチドを網羅的に質量分析する技術の開発に成功した。また、免疫沈降で粗分画した試料中の診断マーカーを MRM により感度よく検出できるようになった。

(b) 翻訳後修飾蛋白質の検出

卵巣明細胞腺がんの培養細胞において 20 種類以上の GTP アンカー修飾蛋白質を検出した。NOX1 の活性化に伴い酸化修飾が亢進する蛋白質を見だし、その特性を明らかにした。消化管間質腫瘍イマチニブ耐性に関わるリン酸化蛋白質を見いだした。ホルマリン処理パラフィン固定した病理切片を用い疾患関連蛋白質の探索を行った。一方、人工がん幹細胞モデル細胞系、修飾責任酵素の迅速同定法を開発した。また、機能性食品成分ラクトフェリン投与後、血液中に特定の蛋白質が発現することを質量分析によって見いだした。皮膚の老化や健康のマーカーの開発研究を行うため、モデルマウス表皮試料採取方法を検討した。高密度ゲノムアレーや次世代シーケンサー解析によって 2 疾患の責任遺伝子を解明した。

(c) 翻訳後修飾蛋白質の機能解析

aPKC の発現と、メラノーマの転移、前立腺がんの再燃、乳がん悪性化などとの関係が明らかになった。幹細胞の自己複製では、ヒストン修飾因子 Ring1B による Cdkn2a と Cdkn1a 両方の発現抑制が重要であることがわかった。一方、社会的隔離による AMPA 受容体シナプス移行阻害を rescue するリード化合物を見いだした。また、富環境による AMPA 受容体シナプス移行促進がセロトニンによって仲介されていること、この際、AMPA 受容体のリン酸化が変化することなどを発見した。アルツハイマー病及び統合失調症脳病理組織でリン酸化水準が変化する CRMP を血清試料で検出するため、抗体を作製した。さらに CRMP 遺伝子欠損マウスを作成し、CRMP の機能を解析した。全身性エリテマトーデスに関わる IRF の機能を制御する酵素を見いだした。また、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子産物 Bcr/Abl リン酸化酵素の発現制御に対する IRF の役割などを明らかにした。一方、HIV 複製を強力に阻害する化合物の同定に成功した。Pin1 結合蛋白質 NF- κ B のサブユニット Rel1A リン酸化部位に対する抗体によって前立腺がんの骨転移を予測できる可能性が大きいことを示した。

(d) イメージング技術の開発と応用

大脳皮質で病態により生ずる修飾異常蛋白質を二光子顕微鏡で観察する研究を進めた。一方、PET 技術の撮像技術については、RGD のラベル体を製造し、ラットに投与して PET 画像を得た。また、標識技術開発については、有機化合物チェーンの標識化技術、ならびに F-18 を蛋白質に直接標識する技術の開発を進めた。

(e) 構造・薬物設計

酸化ストレス応答遺伝子を制御する Nrf2-MafG-DNA 複合体の分子構造を決定した。メチル化ヒストン結合蛋白質 Eaf3 のクロモドメインの構造を解析し、リンメチル化の認識機構などを明らかにした。関節リウマチの原因の一つと予想される PAD4 を標的とした抗体治療薬、PAD4 阻害剤の開発研究が進展した。また、神経疼痛や髄芽腫の治療候補化合物の髄芽腫細胞増殖阻害効果などを調べた。IRF などの立

体構造の解析を行い、創薬シーズとしての可能性を検討した。また、ユビキチン化による蛋白質間相互作用変化を分子モデリング、分子動力学計算によって予測した。

(f)拠点形成とシステム改革

(1.拠点運営体制の開催:拠点運営委員会を2回、研究戦略部会を24回、研究推進会議及び諮問委員会を1回開催した。

(2.拠点設備の整備:産学共同研究室、実験室を含む先端研の建設を開始した。

(3.若手研究チーム・女性研究チームの公募:若手研究チームの研究推進を支援、外国人研究者を受け入れた。

(4.公開シンポジウムを1回、プロテオーム医療創薬研究会を17回開催し参画研究者の資質の向上を図ると共に、市民講座を2回開催し、研究成果や情報を一般研究者、市民に提供した。

e.平成24年度

(1)計画

(a)分析技術の開発

(1.質量分析:修飾蛋白質の分析のさらなる効率化に役立つ試料調製法、アフィニティー精製法、質量分析法等の開発を推進する。また、開発された技術を体系化し、研究拠点の基盤を構築する。

(2.構造解析・薬物設計:蛋白質の修飾異常が疾患の原因となっている関連蛋白質構造解析結果に基づいて創薬候補化合物の合成と設計を試みる。また、修飾異常蛋白質の構造変化を予測する方法の開発を行う。また、予測法の実験結果へ適用し、精度を検証する。

(b)翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(がん等)

種々のがんの組織、血液などで特異的に発現が変動する蛋白質修飾を検出・同定し、その機能を解析するシステムを構築する。バイオマーカーや創薬標的候補分子を探索できる翻訳後修飾プロテオミクス研究拠点を構築する。がんに関連する修飾異常を標的とした創薬の基盤的な研究を行う。また、修飾異常蛋白質を利用したPET診断技術の開発研究を進める。

(c)翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(精神神経疾患等)

社会的隔離によるAMPA受容体シナプス移行障害を解除する化合物の有効性等を検証する。抗体を用いたCRMP高感度検出系の確立等も試みる。修飾異常蛋白質の挙動を海馬等の脳深部において観察するための二光子顕微鏡技術の開発を行う。

(d)翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(免疫疾患等)

全身性エリテマトーデスや慢性骨髄性白血病のリン酸化蛋白質の解析等を進める。IRFが関わる疾患におけるIRFの役割を明らかにする。一方、抗HIV-1/AIDS薬や前立腺癌骨転移診断薬等の開発、人工癌幹細胞モデルを活用した癌幹細胞特異的修飾異常の解析を行う。

(e)機能性食品・化粧品

ラクトフェリンによって生体中の蛋白質やリン酸化蛋白質に生じる変化をMSによって解析する。マウス疾患モデルを用いて細胞外基質蛋白質を中心とした蛋白質の修飾の解析の基礎的検討を行う。

(f)拠点形成とシステム改革

(1.拠点運営体制の開催:拠点運営に係わる拠点運営委員会を年2回、拠点リーダー会議、中間発表会及び諮問委員会を年1回開催する。

(2.拠点設備の整備:本プロジェクトの拠点として建設される先端研施設に本プロジェクト関連の設備・機器を集め、効率的な翻訳後修飾プロテオミクス医療研究を産学連携して推進できる拠点を構築する。

(3.若手研究者の育成:若手研究チームの研究を支援する。海外若手研究者の受け入れを推進し、活力のある研究拠点を作出する。

(4.研究会・シンポジウムの開催:公開シンポジウム、プロテオーム医療創薬研究会、市民講座等を開催し、参画研究者の資質の向上を図ると共に、研究成果や情報を一般研究者、市民に提供する。また、建設された先端研施設を利用して修飾異常と疾患の関係を解析する手法を産学の研究者が習得できる実習会を開催する。平成25年9月に横浜で開催予定のヒトプロテオーム機構(HUPO)国際会議の運営で中心的な役割を担う。

(2)実績

(a)分析技術の開発

1回の血漿蛋白質の質量分析(MS)で3千以上の蛋白質を同定できるよう、HPLC、オフゲル分画装置などを用いた試料の前処理方法を改良した結果、1,600以上の蛋白質、190以上のリン酸化蛋白質を検出・同定できるようになった。3千以上の蛋白質を同定できる可能性が高まった。一方、GPIアンカーが結合しているC末端ペプチドを単離し、ペ

プチドの配列を解析する方法や、免疫沈降法とMRM法を用いて血中バイオマーカー候補蛋白質を2.3pg/mLレベルで検出する方法を開発した。また、MSのMLDI-ISD/CID法に利用可能なマトリックスを発見した。酸化ストレス応答遺伝子を制御する蛋白質DNA複合体の活性制御因子を探索し、活性制御に関わる構造ドメインを明らかにした。ヒストン脱アセチル化酵素を神経特異的にリクルートするSin3とNRSFの結合を阻害する化合物の中に繊維筋痛症に対する治療効果のあるものを見いだした。メチル化ヒストン結合蛋白質Eaf3の構造を解析し、Eaf3の関わる遺伝子発現制御機構を解明した。また、HP1のリン酸化による構造変化を明らかにした。新規の抗PAD4抗体を作製したが、いずれの抗体にも関節リウマチ発症抑制効果はなかった。一方、構造シミュレーションによるユビキチンの結合様式と機能の解析が進んだ。

(b)翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(がん等)

乳腺前駆細胞ではaPKCのキナーゼ活性が転写因子TFXを介した増殖因子受容体ErbB2の転写抑制能に必要であること、aPKC異常高発現を伴う胃がんではがん幹細胞の増殖異常が起きていることを見いだした。子宮頸がんの発達過程でaPKCの異常高発現と核への細胞内局在変化があることもわかった。aPKCの基質蛋白質候補群とその周辺分子の修飾を網羅的に解析する準備を整えた。また、Nephrinのエキソサイトーシスが、糸球体の機能維持に重要であり、極性蛋白質群がこの過程に関わることを解明した。ルシフェラーゼレポーターを用いてmRNA監視系の抑制を可視化する細胞株を構築し、阻害剤のスクリーニング系として利用できることを示した。ヒストン修飾を介して組織幹細胞の自己複製に関わるポリコム群蛋白質Ring1Bの下流遺伝子のうち、プロモーター領域において転写活性化型と転写抑制型のヒストン修飾が共局在している遺伝子の抽出を行い、18の転写因子遺伝子を含む107遺伝子を抽出した。消化管間質腫瘍におけるイマチニブ抵抗性に関わるリン酸化蛋白質の役割を解明した。MRMを使って検出したアンドロゲン非依存性細胞に特異的なリン酸化蛋白質VCY1Bの発現を検証した。一方、NOX1-PDI系が血管平滑筋細胞の増殖と肥大における役割を明らかにした。また、卵巣明細胞腺がん培養細胞から分泌される診断マーカー候補蛋白質のELISA測定系を確立した。PET薬剤を自動合成できる装置を完成させた。

(c)翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(精神神経疾患等)

前年度同定した社会的隔離によるAMPA受容体シナプス移行障害をrescueするリード化合物よりも10倍力価が高い化合物を発見した。また、運動野の一部を破壊した動物の運動機能回復過程でAMPA受容体のシナプス移行への関与を明らかにした。精神神経疾患の原因となるCRMPを血液検体で検出できることがわかった。Filamin-AとCRMPの相互作用部位を解明し、その部位がCRMPIC末端のリン酸化修飾による調節を受けることを示した。複数のがん組織標本においてCRMP発現レベル、リン酸化修飾を解析した。また、ヒトにおいてもAMPA受容体シナプス移行が経験依存的に起こることを示す目的でAMPA受容体標識PET Probeを作製した。

(d)翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(免疫疾患等)

全身性エリテマトーデスに関わる転写因子群のリン酸化酵素を同定し、慢性骨髄性白血病病因子リン酸化酵素による転写因子IRF発現抑制の病的意義を解明した。一方、小麦胚芽蛋白質合成系を用いて、HIV蛋白質と標的となる宿主蛋白質間の相互作用を阻害する低分子化合物を複数同定した。iPS細胞の技術を用いて人工がん幹細胞モデルを創出し、がん幹細胞特異的なリン酸化シグナルを明らかにした。

(e)機能性食品・化粧品

ラクトフェリンの生体機能に及ぼす影響を明らかにするため、ラット脂肪細胞中のラクトフェリン結合蛋白質を調べ、170以上の蛋白質を検出・同定した。脂質代謝と密接に関わる解糖系の蛋白質が多数同定された。一方、細胞極性因子aPKCの表皮基底細胞での遺伝子破壊マウスが、発毛サイクルの異常、具体的には毛幹細胞の再生異常を引き起こすことを見いだした。

(f)拠点形成とシステム改革

(1.拠点運営体制の開催:拠点運営に係わる拠点運営委員会を年2回、拠点研究戦略部会、諮問委員会等をそれぞれ年1回開催した。

(2.拠点設備の整備:拠点の中心となる先端研新研究棟を建設した。

(3.若手研究チームの支援:若手研究チームの研究、医理連携研究の推進について支援を行った。

(4.研究会・シンポジウムの開催:公開シンポジウムを年1回、プロテオーム医療創薬研究会を年9回開催し、参画研究者の資質の向上を図

ると共に、市民講座を年3回開催し、研究成果や情報を一般研究者、市民に提供した。バイオインフォマティクス研究会を年1回開催した。

f. 平成25年度以降

(1) 計画

(a) 分析技術の開発

(1. 質量分析: 5年度目までで拠点の大半の基盤技術の整備が完了したが、今後もショットガン分析により3千以上の血漿・血清蛋白質の検出・同定を目指す。MALDI-ISD/CIDによる修飾蛋白質解析法などの確立を図る。ヒトにおいてもAMPA受容体シナプス移行が経験依存的に起こることを証明するため、AMPA受容体をProbeとしたPETイメージング技術の開発を進める。

(2. 構造解析・薬物設計: 修飾による機能制御機構を分子構造レベルで解明し、制御機構の破綻を原因とする疾患に対する創薬のための情報基盤の確立を目指す。trcα エンハンソームのEts1、Runx1-CBF、LEF1とAlyを含む複合体の構造解析を進め、修飾とエンハンソームの機能制御機構を解析する。ヒストン脱アセチル化酵素を神経関連遺伝子に特異的にリクルートするSin3とNRSFの結合を阻害する、髄芽腫や神経疼痛や繊維筋痛症の治療候補化合物を評価する。メチル化ヒストン結合蛋白質Chp1などの構造解析を行い、創薬の基盤を構築する。また、関節リウマチ発症抑制効果に関する新規抗PAD4抗体の評価、脳脊髄の神経再生を阻む作用を抑制するLOTUS及びNogo受容体の大量発現系の構築、神経軸索再生に関わる

CRMP1とFilamin-Aとの相互作用解析などを進める。蛋白質の修飾の結果として表れる立体構造と分子間相互作用の変化について、データベース解析、分子シミュレーションの立場から、その全体像を明らかにし、構造の予測を可能とする研究も行う。

(b) 翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(がん等)

細胞極性やmRNA監視系のオリジナルな分子群に着目し、それらの組織幹前駆細胞とがん幹細胞における修飾異常と機能異常の相関の解析を進め、バイオマーカーや創薬標的としての可能性を探る。様々ながんの臨床検体を用いた検証と探索を進め、得られた成果の臨床的な意義を検証する。ヒト膵がん幹細胞の培養系を確立し、複数の膵がん患者から抗がん剤に治療抵抗性を示す膵がん幹細胞株ライブラリを構築した上で、膵がん幹細胞で発現レベルが高いトランスポーターの機能を解析する。また、膵がん幹細胞の形質変化を明らかにすると共に、膵がん幹細胞で活性化しているシグナル経路の特定を試みる。さらに、原因未解明のヒト発生・発達異常を呈する疾患群を対象にその遺伝的原因を探索・同定する。修飾に関連する酵素遺伝子には特に

注目する。

(c) 翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(精神神経疾患等)

社会的隔離の系を用いてリード化合物Aの物質特許から構造上外れる類縁化合物のスクリーニングを行う。本化合物のリハビリテーション促進薬としての可能性を調べる。また、リード化合物の標的分子を探索する。統合失調症及びアルツハイマー病患者血清標品のCRMP蛋白質と、個々の患者の臨床症状、薬物応答性などの臨床情報との関係などを解析する。

(d) 翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(免疫疾患等)

全身性エリテマトーデスの治療薬開発のため、IRF5の修飾酵素の解析を行う。慢性骨髄性白血病の治療薬開発のため、病因リン酸化酵素Bcr/AbiとIRF8の拮抗作用についてさらに解析する。一方、修飾を基盤とした抗HIV薬の開発、蛋白質の機能的リン酸化修飾を効率的に検出するPin1プロテオミクス技術を活用した前立腺がんにおける修飾異常と病態の解析、人工がん幹細胞モデルを活用した修飾異常の解析、がん幹細胞を標的とするモノクローナル抗体の作製と応用に関する研究などを実施する。

(e) 機能性食品・化粧品

前年度同定されたラクトフェリン結合蛋白質候補の中から、偽陽性蛋白質を排除し、真にラクトフェリンと結合する蛋白質を見いだし、ラクトフェリンの生体内での機能を明らかにする。また、細胞外基質蛋白質を中心とした蛋白質の修飾の解析法の検討を通じて、健康状態の指標として着目すべき蛋白質分子及び修飾の絞り込みを行う。

(f) 拠点形成とシステム改革

(1. 拠点運営体制の開催: 拠点運営に係わる拠点運営委員会、拠点研究戦略部会、諮問委員会等を開催する。

(2. 拠点設備の整備: 先端研新棟内にバイオインフォマティクス解析室を開設する。オミックス解析の共用サーバを導入・整備し、学内にネットで公開する。

(3. 若手研究チームの支援: 若手研究チームの研究、医理連携研究の推進を支援する。

(4. 研究会・シンポジウムの開催: 公開シンポジウム、プロテオーム医療創薬研究会を開催し、参画研究者の資質の向上を図ると共に、市民講座を開催し、研究成果や情報を一般研究者、市民に提供する。先端研施設を利用して修飾異常と疾患の関係を解析する手法を産学の研究者が習得できる実習会を開催する。HUPO国際会議の運営で中心的な役割を担う。

9. 年次計画

項目	1年度目	2年度目	3年度目	4年度目	5年度目	6年度目	7年度目	8年度目	9年度目	10年度目
1. 分析技術の開発 a. 質量分析 b. 構造解析・薬物設計	←————→									
2. 翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(がん等)	←————→									
3. 翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(精神神経疾患等)	←————→									
4. 翻訳後修飾蛋白質の検出・機能解析(免疫疾患等)	←————→									
5. 機能性食品・化粧品	←————→									
6. 拠点形成とシステム改革	←————→									
調整費充当計画 総計	550	550	550	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
うち 調整費分	300	300	300	500	500	500	500	500	500	500

10. 諮問委員会

注) ○: 委員長

委員	所属
○下西 康嗣	大阪大学 名誉教授
黒木 登志夫	(独)日本学術振興会 学術システム研究センター相談役
中村 和行	山口大学 大学院医学系研究科 教授
西島 和三	持田製薬(株) 医薬開発本部 主事
宮脇 敦史	(独)理化学研究所 脳科学総合研究センター グループディレクター
山田 哲司	国立がん研究センター研究所 副所長