

戦略的創造研究推進事業
個人型研究(さきがけ)
追跡評価用資料

研究領域
「代謝と機能制御」
(2005 年度～2010 年度)

研究総括:西島 正弘

2019 年 3 月

目次

要旨	1
第1章 追跡調査概要	3
1.1 研究領域概要	3
1.1.1 戦略目標	3
1.1.2 研究領域概要	3
1.1.3 研究総括	3
1.1.4 領域アドバイザー	3
1.1.5 研究課題及び研究者	4
1.2 研究領域終了後の発展と波及効果	7
1.2.1 研究成果の発展状況や活用状況	7
1.2.2 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果	8
1.3 研究領域の展開状況(系譜図)	10
第2章 追跡調査(研究領域全体動向)	12
2.1 追跡調査について	12
2.1.1 調査の目的	12
2.1.2 調査の対象	12
2.1.3 調査方法	12
2.2 研究成果概要	14
2.2.1 研究助成金	14
2.2.2 論文	25
2.2.3 特許	27
2.3 科学技術や社会・経済への波及効果	29
2.3.1 科学技術への波及効果	29
2.3.2 社会・経済への波及効果	31
第3章 各研究課題の主な研究成果及び波及効果	35
3.1 2005年度採択研究課題	35
3.1.1 生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明(青木淳賢)	35
3.1.2 二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製(阿部郁朗)	38
3.1.3 オーフエン受容体の脂質天然リガンドの探索(石井聡)	43
3.1.4 機能性RNAによる代謝調節の分子基盤の解析(稲田利文)	48
3.1.5 「肥満症」におけるエネルギー・脂質代謝制御と血管新生制御との関連の解明 (尾池雄一)	52
3.1.6 気孔開閉と細胞膜H ⁺ -ATPaseの活性調節機構の解明(木下俊則)	58

3.1.7	プリオン凝集体の代謝産物に着目した細胞機能制御(田中元雅).....	61
3.1.8	細胞膜脂質による分裂軸方向の制御とがん化に伴う変化(豊島文子).....	66
3.1.9	耐病性植物作出を目指した植物細胞死制御系の解明(初谷紀幸).....	71
3.1.10	シナプス機能における S-アシル化動態の時空的解析(深田正紀).....	75
3.1.11	分泌性ホスホリパーゼ A ₂ 群の分子種固有の機能の解明(村上誠).....	80
3.1.12	胎生期低栄養による成長後の代謝異常発生機序の解明とその予防戦略の開発 (由良茂夫).....	85
3.2	2006 年度採択研究課題.....	89
3.2.1	炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析(有田誠)	89
3.2.2	脂質ヒドロペルオキシドによる細胞機能制御と疾病との関連の解析(今井浩孝)	94
3.2.3	脳神経ネットワーク形成における脂質機能の網羅的解析(榎本和生).....	99
3.2.4	硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明(川島博人).....	104
3.2.5	オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生(小松雅明)	108
3.2.6	代謝産物の変化情報に基づく心筋機能制御法の確立(佐野元昭).....	111
3.2.7	複合系の代謝制御ーアブラムシ細胞内共生系をモデルとして(重信秀治) ..	116
3.2.8	受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用 (新藤隆行).....	121
3.2.9	オートファジーにおける脂質膜組織化機構の解明(中戸川仁).....	126
3.2.10	異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明(西野邦彦).....	131
3.2.11	ストレス応答破綻としてのメタボリックシンドロームと動脈硬化の分子機構 解明(眞鍋一郎).....	136
3.3	2007 年度採択研究課題.....	141
3.3.1	細胞の極性形成に関わる膜ドメインの形成・維持機構の解明(池ノ内順一)	141
3.3.2	蛍光 ATP プローブを用いた ATP 代謝の解析(今村博臣).....	146
3.3.3	細胞内の蛋白質代謝を管理するストレス応答機構の解明(岩脇隆夫).....	151
3.3.4	オーキシン調節による植物の成長制御機構の解明(酒井達也).....	155
3.3.5	ブラシノステロイド情報伝達による発生と自然免疫制御の分子機構(中野雄司)	159
3.3.6	オルガネラの pH によるタンパク質輸送の制御(前田裕輔).....	163
3.3.7	老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明(南野徹).....	168
3.3.8	「骨代謝」における破骨細胞の細胞融合と代謝制御(宮本健史).....	173
3.3.9	癌浸潤転移における細胞膜脂質代謝及びドメイン構造の機能解析(山口英樹)	

.....	178
第4章 科学技術イノベーションの創出に資する研究成果.....	183
4.1 生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明(青木淳賢).....	183
4.1.1 研究の概要.....	183
4.1.2 研究成果の波及と展望.....	184
4.2 気孔開閉と細胞膜 H ⁺ -ATPase の活性調節機構の解明(木下俊則).....	192
4.2.1 研究の概要.....	192
4.2.2 研究成果の波及と展望.....	193
4.3 オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生(小松雅明) ..	200
4.3.1 研究の概要.....	200
4.3.2 研究成果の波及と展望.....	201

要旨

本資料は、戦略的創造研究推進事業のさきがけ(個人型研究)の研究領域「代謝と機能制御」(2005～2010 年度)において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況等を明らかにし、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)事業及び事業運営の改善等に資するために、追跡調査を実施した結果をまとめたものである。

本研究領域は、細胞内の代謝産物を解析し、細胞機能を効率的に制御することを可能とする基盤的な技術に関して、個人の独創的な発想に基づく革新的な技術の芽の創出を目指す研究を対象とする。

具体的には、脂質、糖、アミノ酸、核酸関連物質などの代謝産物群の体系的あるいは網羅的解析、代謝産物情報に基づく細胞状態の評価・分類、細胞の代謝経路のモデル化とシミュレーション、代謝経路を制御する化合物の予測と設計、新機能を付与した細胞の作製などに関して、新たな方法論の創出や技術展開の契機となることが期待される研究であり、それぞれの要素技術から細胞制御研究までを対象とする。

これらの研究の成果として、領域全体の研究成果の論文数は520、継続と発展に関する論文数は927であった。研究期間中に国内26件、海外16件、研究期間終了後に国内68件、海外31件の特許出願が行われており、イノベーションへ向けた技術波及の好影響が持続されている。また、研究期間中に6名、研究期間終了後に4名が文部科学大臣表彰の若手科学者賞を受けている。さらに、複数の研究課題が、その後国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ(AMED-CREST)、内閣府最先端・次世代研究開発プログラム(NEXT)、JSTの先端的低炭素化技術開発(ALCA)など様々な大型プロジェクトなどに採択され、継続・発展している。

特筆すべき研究成果として、新規生理活性リゾリン脂質の同定、生理機能の解明など、この分野で圧倒的に世界をリードし、また選択的オートファジーの基質の同定及びその分子機構の解明、さらに、青色光から気孔開口に至る H^+ -ATPase を介したシグナル伝達及び H^+ -ATPase 活性化による農作物増産などの研究成果が得られた。

採択当時には世界的にも端緒にすぎたばかりのメタボローム研究において、本研究領域から独創的な研究成果が得られ、「代謝」に関わる分野に大きなインパクトを与え、国際的にも第一級の成果であり、我が国の研究基盤の強化に貢献したと考えられる。将来、実用化への展開につながることを期待される。

上記のような研究発展を、改めて、以下のような構成に沿って、本報告書をまとめた。

第1章は、研究領域の追跡調査の概要で、32 研究課題についてそれぞれの研究終了後、研究者を中心にどのように研究が進展したかについて調査した結果をまとめた。さらに、これらの研究からどのような新たな科学技術上の成果が生み出されたか、あるいは得られた成果が社会や経済にどのような影響を及ぼしたかについてまとめた。

第2章では、各研究者について研究期間中及び終了後の一連の研究成果やその展開状況を調査した結果をまとめた。2.1 項で本調査の目的と対象、調査方法を記載した。2.2 項は

研究成果概要として、各研究者が獲得した研究助成金、研究期間中及び終了後に発表した原著論文の数、出願及び登録された特許の数を表にまとめた。2.3項は科学技術や社会・経済への波及効果として、各研究者の受賞、学会・研究会などへの貢献、共同研究、報道、企業との連携、昇進などの活動状況を調査した結果をまとめた。

第3章は、本研究領域の各研究課題について、研究終了後の発展状況を調査した結果を研究期間中の成果とともにまとめた。研究終了後の発展状況としては、まず、研究者による研究の全体像、さらに、科学技術の進歩に貢献した代表的成果を取り上げた。その上で社会的、経済的な波及効果についてまとめた。

第4章では、研究課題終了後、特徴ある成果を上げている研究者のうち、3名の研究者にインタビューを行い、本研究領域開始以前も含め研究課題に関わる国内の状況、海外での共同研究の状況、さらに、科学技術や社会・経済への波及と展望をまとめた。

第1章 追跡調査概要

1.1 研究領域概要

1.1.1 戦略目標

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」

1.1.2 研究領域概要

本研究領域は、細胞内の代謝産物を解析し、細胞機能を効率的に制御することを可能とする基盤的な技術に関して、個人の独創的な発想に基づく革新的な技術の芽の創出を目指す研究を対象とする。細胞内代謝産物の解析に関しては、脂質、糖、アミノ酸、核酸関連物質などの代謝産物群の体系的あるいは網羅的解析、代謝産物情報に基づく細胞状態の評価・分類、細胞の代謝経路のモデル化とシミュレーションを研究対象として含み、細胞機能の効率的な制御に関しては、代謝経路を制御する化合物の予測と設計、新機能を付与した細胞の作製などの新たな方法論の創出や技術展開の契機となることが期待される研究を含む。

研究領域の具体的な内容は、メタボローム研究に資する新しい分析手法の開発、微生物・動物・植物の変異・病態・発生過程等におけるメタボローム解析、特定の細胞状態を規定する代謝産物の同定、新しい代謝過程の発見、代謝産物の変化情報に基づく細胞機能の解明と制御など、広い分野の研究課題に注目して進められた。広い専門分野の研究者やアドバイザーの交流により活発な研究課題の展開が見られ、新しいメタボローム研究の流れが示された。研究領域の出口としては、新しい生理活性代謝産物の発見、疾患特異的な代謝マーカーによる診断法の開発、並びに、代謝疾患治療薬の開発、有用な代謝産物を効率良く産生する実用生物の開発に結び付くことが期待される。

1.1.3 研究総括

西島正弘

採択時：国立医薬品食品衛生研究所 所長

現：昭和薬科大学 学長

1.1.4 領域アドバイザー

本研究領域の研究課題に理論的・実践的基盤を与えているのは、生化学、脂質化学、バイオ、脳神経科学、植物科学などの諸分野である。各分野で日本を代表する研究者の方15人を領域アドバイザーに定め、研究者の指導に当たった。表1-1に全領域アドバイザーを示す。

表 1-1 領域アドバイザー

領域アドバイザー	所属	役職	任期
新井 洋由	東京大学大学院薬学系研究科	教授	2005年～2011年
稲垣 暢也	京都大学大学院医学研究科	教授	2005年～2011年
寒川 賢治	国立循環器病研究センター研究所	所長	2005年～2011年
木下 タロウ	大阪大学免疫学フロンティア研究センター／微生物病研究所	副拠点長／教授	2005年～2011年
斉藤 和季	千葉大学大学院薬学研究院	教授	2005年～2011年
鈴木 明身	東海大学未来科学技術共同センター	教授	2005年～2011年
鈴木 紘一	東京大学	名誉教授	2005年6月～2010年4月
田口 良	東京大学大学院医学系研究科	客員教授	2005年～2011年
寺部 茂	兵庫県立大学	名誉教授	2005年～2007年5月
富田 勝	慶應義塾大学先端生命科学研究所／環境情報学部	所長／教授	2005年～2007年5月
永井 良三	東京大学大学院医学系研究科	教授	2006年6月～2010年4月
西村 紀	島津製作所ライフサイエンス研究所	技術顧問	2005年～2011年
深見 希代子	東京薬科大学生命科学部	教授	2005年～2011年
正木 春彦	東京大学大学院農学生命科学研究科	教授	2005年～2011年
横田 明徳	奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科	教授	2005年～2011年

(注)所属と役職はさきがけ終了時点を記載

1.1.5 研究課題及び研究者

各研究課題の研究期間を表 1-2 に、また研究課題と研究者を表 1-3 に示す。

表 1-2 研究期間

期(採択年度)	研究期間
第1期(2005)	2005年10月～2009年3月
第2期(2006)	2006年10月～2010年3月
第3期(2007)	2007年10月～2011年3月

表 1-3 研究課題と研究者(第1期、第2期、第3期)

期(採択年度)	研究課題	研究者	採択時の所属・役職	終了時の所属・役職	追跡調査時の所属・役職
第1期(2005)	生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明	青木 淳賢 Junken Aoki	東京大学大学院薬学系研究科 助教授	東北大学大学院薬学研究科 教授	東北大学大学院薬学研究科 教授
第1期(2005)	二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製	阿部 郁朗 Ikuro Abe	静岡県立大学薬学部 講師	静岡県立大学薬学部 准教授	東京大学大学院薬学系研究科 教授
第1期(2005)	オーファン受容体の脂質天然リガンドの探索	石井 聡 Satoshi Ishii	東京大学大学院医学系研究科 講師	東京大学大学院医学系研究科 准教授	秋田大学大学院医学研究科 教授
第1期(2005)	機能性 RNA による代謝調節の分子基盤の解析	稲田 利文 Toshifumi Inada	名古屋大学大学院理学研究科 助教授	名古屋大学大学院理学研究科 准教授	東北大学大学院薬学研究科 教授
第1期(2005)	「肥満症」におけるエネルギー・脂質代謝制御と血管新生制御との関連の解明	尾池 雄一 Yuichi Oike	慶應義塾大学医学部 講師	熊本大学大学院医学薬学研究部(医) 教授	熊本大学大学院生命科学研究部 教授

期 (採択年度)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第 1 期 (2005)	気孔開閉と細胞膜 H ⁺ -ATPase の活性調節機構の解明	木下 俊則 Toshinori Kinoshita	九州大学大学院理 学研究院 助手	名古屋大学大学院 理学研究科 准教授	名古屋大学大学院 理学研究科 教授 名古屋大学 WPI ト ランスフォーマテ ィブ生命分子研究 所 教授 名古屋大学遺伝子 実験施設 施設長
第 1 期 (2005)	プリオン凝集体の代謝 産物に着目した細胞機 能制御	田中 元雅 Motomasa Tanaka	UCSF ポストドクトラル フェロー	理化学研究所脳科 学総合研究センタ ー ユニットリーダー	理化学研究所脳科 学総合研究センタ ータンパク質構造 疾患研究チーム チームリーダー
第 1 期 (2005)	細胞膜脂質による分裂 軸方向の制御とがん化 に伴う変化	豊島 文子 Fumiko Toyoshima	京都大学ウイルス 研究所 助手	京都大学ウイルス 研究所 教授	京都大学ウイル ス・再生医学研究 所 教授
第 1 期 (2005)	耐病性植物作出を目指 した植物細胞死制御系 の解明	初谷 紀幸 Noriyuki Hatsugai	京都大学大学院理 学研究科 日本学術振興会 特別研究員	北海道大学大学院 医学研究科 特任助教	University of Minnesota System, Department of Plant Post-Doctoral Associate
第 1 期 (2005)	シナプス機能における S-アシル化動態の時空 的解析	深田 正紀 Masaki Fukata	国立長寿医療セン ター研究所 省令室長	自然科学研究機構 生理学研究所 教授	生理学研究所細胞 器官研究系生体膜 研究部門 教授
第 1 期 (2005)	分泌性ホスホリパーゼ A ₂ 群の分子種固有の機 能の解明	村上 誠 Makoto Murakami	東京都臨床医学総 合研究所 副参事研究員	東京都臨床医学総 合研究所 副参事研究員	東京大学大学院 医学系研究科 教授
第 1 期 (2005)	胎生期低栄養による成 長後の代謝異常発生機 序の解明とその予防戦 略の開発	由良 茂夫 Shigeo Yura	京都大学医学部附 属病院大学院 助手	京都大学医学部附 属病院 研究員	由良産婦人科・小 児科 医師
第 2 期 (2006)	炎症反応の収束に関わ る脂質性メディエータ ーの代謝と網羅的解析	有田 誠 Makoto Arita	ハーバード大学医 学部 講師	東京大学大学院薬 学系研究科 准教授	理化学研究所統合 生命医科学研究セ ンターメタボロー ーム研究チーム チームリーダー 慶應義塾大学薬学 部 教授
第 2 期 (2006)	脂質ヒドロペルオキシ ドによる細胞機能制御 と疾病との関連の解析	今井 浩孝 Hirotaka Imai	北里大学薬学部 助教授	北里大学薬学部 准教授	北里大学薬学部 教授
第 2 期 (2006)	脳神経ネットワーク形 成における脂質機能の 網羅的解析	榎本 和生 Kazuo Emoto	情報・システム研 究機構国立遺伝学 研究所 助教授	情報・システム研 究機構国立遺伝学 研究所 准教授	東京大学大学院理 学系研究科 教授

期 (採択年度)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第 2 期 (2006)	硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明	川島 博人 Hiroto Kawashima	静岡県立大学薬学部 助教授	静岡県立大学薬学部 准教授	千葉大学大学院薬学研究院 教授
第 2 期 (2006)	オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生	小松 雅明 Masaaki Komatsu	順天堂大学医学部 助手	東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員	新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授
第 2 期 (2006)	代謝産物の変化情報に基づく心筋機能制御法の確立	佐野 元昭 Motoaki Sano	慶應義塾大学医学部 講師	慶應義塾大学医学部 講師	慶應義塾大学医学部 准教授
第 2 期 (2006)	複合系の代謝制御ーアブラムシ細胞内共生系をモデルとして	重信 秀治 Shuji Shigenobu	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 助手	科学技術振興機構 さきがけ研究者	基礎生物研究所生体機能解析センター 特任准教授
第 2 期 (2006)	受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用	新藤 隆行 Takayuki Shindo	信州大学大学院医学系研究科 教授	信州大学大学院医学系研究科 教授	信州大学大学院医学系研究科 教授
第 2 期 (2006)	オートファジーにおける脂質膜組織化機構の解明	中戸川 仁 Hitoshi Nakatogawa	自然科学研究機構 基礎生物学研究所 分子細胞生物学研究部門 助手	東京工業大学フロンティア研究機構 大隅研究室 特任助教	東京工業大学生命理工学院 准教授
第 2 期 (2006)	異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明	西野 邦彦 Kunihiko Nishino	大阪大学産業科学研究所感染制御学研究分野 特任助手	大阪大学産業科学研究所感染制御学研究分野 准教授	大阪大学産業科学研究所生体分子制御科学研究分野 教授
第 2 期 (2006)	ストレス応答破綻としてのメタボリックシンドロームと動脈硬化の分子機構解明	眞鍋 一郎 Ichiro Manabe	東京大学大学院医学系研究科 特任講師	東京大学大学院医学系研究科 特任准教授	千葉大学大学院医学研究院 教授
第 3 期 (2007)	細胞の極性形成に関わる膜ドメインの形成・維持機構の解明	池ノ内 順一 Junichi Ikenouchi	日本学術振興会 特別研究員	京都大学大学院工学研究科 准教授	九州大学大学院システム生命科学府 教授
第 3 期 (2007)	蛍光 ATP プローブを用いた ATP 代謝の解析	今村 博臣 Hiromi Imamura	日本学術振興会 特別研究員	科学技術振興機構 専任研究者	京都大学大学院生命科学研究科 准教授
第 3 期 (2007)	細胞内の蛋白質代謝を管理するストレス応答機構の解明	岩脇 隆夫 Takao Iwawaki	理化学研究所フロンティア研究システム ユニットリーダー	群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット 講師	金沢医科大学総合医学研究所 教授
第 3 期 (2007)	オーキシン調節による植物の成長制御機構の解明	酒井 達也 Tatsuya Sakai	理化学研究所植物科学研究センター チームリーダー	新潟大学大学院自然科学研究科 准教授	新潟大学理学部 教授
第 3 期 (2007)	ブラシノステロイド情報伝達による発生と自然免疫制御の分子機構	中野 雄司 Takeshi Nakano	理化学研究所基幹研究所中央研究所 専任研究員	理化学研究所基幹研究所 ユニットリーダー	理化学研究所環境資源科学研究センター機能開発研究グループ 専任研究員
第 3 期 (2007)	オルガネラの pH によるタンパク質輸送の制御	前田 裕輔 Yusuke Maeda	大阪大学微生物病研究所 准教授	大阪大学微生物病研究所 准教授	大阪大学微生物病研究所 准教授

期 (採択年度)	研究課題	研究者	採択時の 所属・役職	終了時の 所属・役職	追跡調査時の 所属・役職
第 3 期 (2007)	老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明	南野 徹 Tohru Minamino	千葉大学大学院医学研究院医学部附属病院 助教	千葉大学大学院医学研究院 講師	新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授
第 3 期 (2007)	「骨代謝」における破骨細胞の細胞融合と代謝制御	宮本 健史 Takeshi Miyamoto	慶應義塾大学医学部 講師	慶應義塾大学医学部 特別研究准教授	慶應義塾大学医学部 特別研究准教授
第 3 期 (2007)	癌浸潤転移における細胞膜脂質代謝及びドメイン構造の機能解析	山口 英樹 Hideki Yamaguchi	東京薬科大学生命科学部 講師	国立がん研究センター研究所 ユニット長	公益財団法人佐々木研究所附属佐々木研究所腫瘍細胞研究部 部長

1.2 研究領域終了後の発展と波及効果

1.2.1 研究成果の発展状況や活用状況

本研究領域では、メタボローム、代謝産物を中心とした代謝と機能制御に関する研究を行った。

その後、AMED 関連事業に 13 件採択され、そのうちの大型プロジェクト 6 件の採択課題名を表 1-4 に示した。また、内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム」(NEXT)には 7 件採択されている。さらに、JST 関連事業には 6 件採択され、そのうちの大型プロジェクトとしては表 1-5 に示した研究課題が採択されている。

表 1-4 AMED 関係の大型プロジェクト採択課題名

研究者	研究期間(年度)	研究課題名	金額(百万円)
青木 淳賢	2013～2018	AMED-CREST 疾患関連リゾリン脂質の同定と医療応用	500.0
青木 淳賢	2017～2021	LEAP リゾリン脂質メディエーター研究の医療応用	750.0
尾池 雄一	2013～2018	AMED-CREST 組織修復に基づく恒常性維持機構の変容による生活習慣病の病態解明と制御	248.3
村上 誠	2013～2018	AMED-CREST PLA ₂ メタボロームによる疾患脂質代謝マップの創成とその医療展開に向けての基盤構築	500.0
川島 博人	2016～2020	技術開発提案 A 世界初の抗糖鎖抗体医薬の開発に向けた革新的抗糖鎖モノクローナル抗体作製技術の確立	150.0
新藤 隆行	2014～2019	AMED-CREST 生理活性因子の情報制御システムに基づく革新的な医薬品の創出	500.0

表 1-5 JST 関係の大型プロジェクト採択課題名

研究者	研究期間(年度)	研究課題名	金額(百万円)
尾池 雄一	2017～2019	START ANGPTL2 を標的とする画期的心不全等遺伝子治療薬の開発	117.0
木下 俊則	2010～2014	ALCA 気孔開度制御による植物の光合成活性と生産量の促進	500.0

1.2.2 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果

本調査に先駆けて、西島正弘研究総括にヒアリングさせていただき、さきがけ「代謝と機能制御」の研究者の中で特に研究進捗が顕著である研究者として、何名か推挙いただき、それを踏まえて、青木淳賢、木下俊則、小松雅明の3名を選んだ。以下の各章・各節にこの3名の活動成果が頻繁に出てくるが、このような背景があることを付記しておく。

(1) 研究成果の科学技術の進歩への貢献

青木は、開発したGタンパク質共役型受容体(GPCR)活性化測定法による新規GPCRの同定、その動脈硬化促進機能を示し、また、リゾホスファチジン酸(LPA)シグナル制御の血管形成における重要性、さらにLPA受容体LPA₃の子宮内膜増殖への関与を示した。

池ノ内は、多様な脂質分子が生体膜に存在する理由として、脂質メディエーターの多様性以外に、タイトジャンクション(TJ)のような特定の細胞膜構造の形成に特定の脂質分子が必要であることを実証した。

村上は、分泌性ホスホリパーゼA₂のそれぞれのアイソザイムが、生殖、免疫、アレルギー、動脈硬化、メタボリックシンドローム、皮膚異常等の多様な生命現象に関わることを見いだした。

尾池は、血管新生に関与するタンパク質の遺伝子欠損マウスを用いてメタボリックシンドロームを解析するという意外性のある計画を立て、肥満・糖代謝・炎症関連のパラメータを網羅的に解析することにより成果を上げた。

小松は、非選択的タンパク質分解系であると信じられていたオートファジーにおいて、選択的分解機構の存在を示し、哺乳動物におけるオートファジーの役割を明らかにした。

新藤は、アドレノメデュリン(AM)-受容体活性調節タンパク(RAMP)システムの解析により、AMの血管保護作用、臓器保護作用がRAMP2により制御されていること、また心臓では心臓保護に働くことを明らかにした。

西野は、細菌ゲノムに潜む異物排出トランスポーターを同定して薬剤耐性化における役割を解明し、また、多剤耐性化と細菌病原性という本来結び付かなかった現象に、つながりを見いだした。

宮本は、骨を破壊する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞によるリモデリングと呼ばれる組織再構築の総和としての骨代謝機構の解明に貢献した。

川島は、末梢リンパ節高内皮細静脈(HEV)に特異的に発現すると考えられていた硫酸基転移酵素が鼻咽頭関連リンパ節のHEV及び大腸上皮細胞にも発現することを見だし、それぞれの組織特異的機能を明らかにした。

木下は、気孔開口に関わる新奇変異体を複数単離し、青色光からH⁺-ATPaseの活性化による気孔開口に至るシグナル伝達の分子機構の詳細を解明した。

(2) 研究成果の応用に向けた発展状況

青木によるLPA受容体LPA₆の構造解明は、LPA₆を標的とする薬剤開発の基礎情報を提供するとともに、将来的な先天性乏毛症治療薬や抗がん剤の創薬開発研究を大きく進展させるものとして期待される。

池ノ内の研究成果は、その実用的な側面として、精緻な細胞膜機能を持たせた人工組織材料の実用化や新たなドラッグデリバリーシステムの開発において重要な基盤技術になる可能性がある。

村上が脂質分子の疾患への関わりに関して明らかにした、皮膚における脂質代謝酵素PNPLA1 やその産物アシルセラミドの量は、難治性皮膚疾患の診断用新規バイオマーカーとなる可能性があり、また、PNPLA1 の発現量や機能を向上させる薬物は、難治性皮膚疾患の新規予防・治療法の開発につながることを期待される。

尾池は、慢性炎症を基盤とした生活習慣病の発症・発がんにアンジオポエチン様タンパク質 2 (ANGPTL2) が関与することを明らかにし、ANGPTL2 がこれらの病態の治療標的になる可能性を示した。また、ANGPTL2 を不活性化する分解酵素も発見し、ANGPTL2 の分解を標的とした新規がん転移抑制法の開発につながることを期待される。

小松は、選択的オートファジーのアダプタータンパク質 p62 の蓄積が、Keap1 と転写因子Nrf2 との相互作用を阻害することを見だし、その結果として肝障害等を引き起こすことを示した。p62 による Nrf2 活性化を防ぐ新規化合物 K67 を同定し、これが肝細胞がんの増殖を抑制するとともに、既存の抗がん剤の薬効を高めることを確認した。今後、肝細胞がん治療薬としての臨床応用が期待される。

宮本が研究成果で示した、破骨細胞の活性を完全には抑制せず、しかも骨芽細胞を活性化し、骨代謝状態を un-coupling の状態にすることで、生理的な骨量増加を果たすことが可能になれば、骨粗鬆症のコントロールが更に発展することが期待される。

川島の樹立した抗糖鎖抗体は今後、糖鎖を標的とした新しい炎症性疾患治療薬の開発に寄与することが期待され、また、これらの抗糖鎖抗体を用いて病態バイオマーカーの検出やドラッグデリバリー等への応用も期待される。

木下は、植物の気孔孔辺細胞における細胞膜 H⁺-ATPase の発現量を増加させることで、気孔の開口を大きくし、植物の CO₂ 吸収量と生産量を増加させることに世界で初めて成功した。この技術を利用することで、農作物やバイオ燃料用植物の生産量増加、また、大気中 CO₂ 削減への応用が期待される。

1.3 研究領域の展開状況(系譜図)

本研究領域では、2005年度から2010年度にかけて、代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出を目標として研究を進めた。本研究領域の終了後、得られた研究成果は、後継のNEXT(内閣府)、AMED-CREST、AMED、ALCA(JST)等の大型プロジェクトに引き継がれている(図1-1参照)。

尾池(生活習慣病)、小松(オートファジー)、新藤(慢性臓器障害)、西野(薬剤排出ポンプ)は、NEXT(内閣府)を経て、AMED-CREST、AMEDへと研究を発展させた。

脂質を研究対象とする青木(リゾリン脂質)、池ノ内(細胞膜脂質)、村上(PLA₂脂質代謝)は、CREST、さきがけを経て、AMEDへ研究を発展させている。

脳神経を研究対象とする田中(神経変性)、深田(シナプス疾患)は、NEXTを経て、科研費(新学術領域)へ、佐野(心不全予防)は厚労科研費を経てさきがけへ、宮本(骨代謝制御)、川島(抗糖鎖抗体)はAMEDへ、植物を研究対象とする木下はALCA(JST)へと研究を発展させている。

2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020

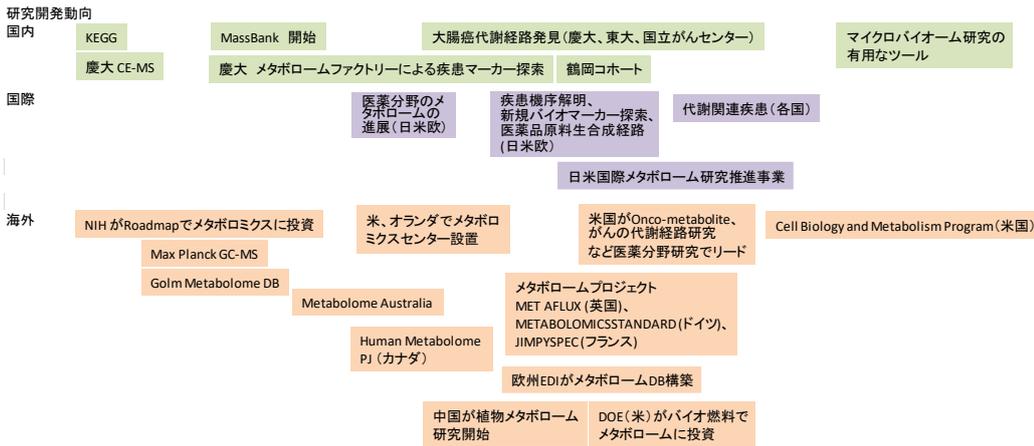
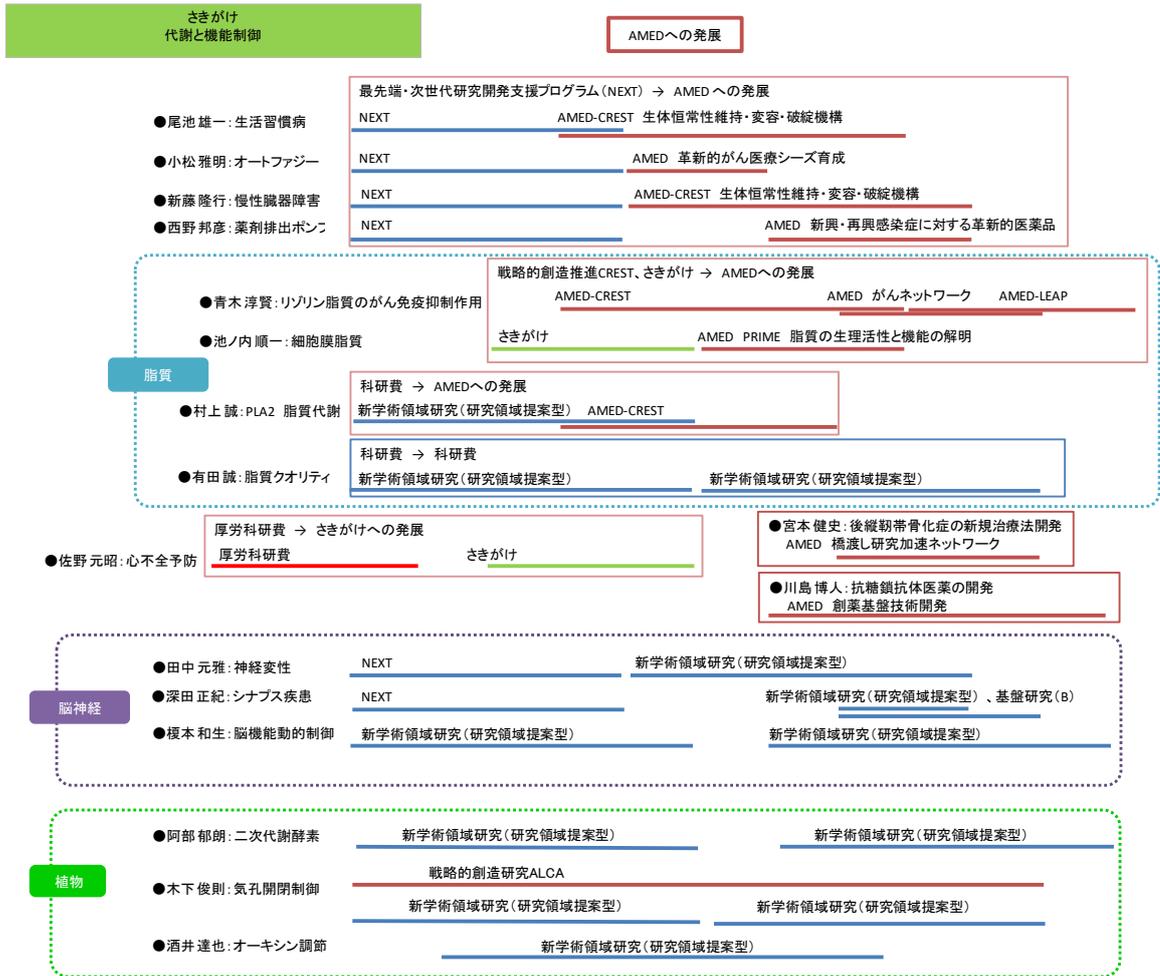


図 1-1 研究領域(さきがけ)との系譜図

第2章 追跡調査(研究領域全体動向)

2.1 追跡調査について

2.1.1 調査の目的

本追跡調査は研究終了後、一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、JSTの事業及び事業運営の改善に資するために行うもので、研究領域終了後の研究者の研究課題の発展状況等を調査した。

2.1.2 調査の対象

本追跡調査はさきがけ研究領域「代謝と機能制御(2005年度～2010年度)」の研究者を対象とした。調査対象期間は調査項目ごとに「2.1.3 調査方法」の項で示した。

2.1.3 調査方法

(1) 研究助成金

本研究領域の研究者が研究代表者となっているプロジェクトを中心に調査した。その中から、研究課題終了後に実施したもの(期間中に開始を含む)で、助成金総額が1千万円/件以上のものを表2-1に示した。研究助成金の獲得状況の調査については、主に下記のウェブサイトを利用した。

- ・研究者の研究室、若しくは所属している研究室のウェブサイト
- ・競争的研究資金の担当機関のウェブサイト
- ・競争的研究資金の担当機関データベース検索(科学研究費助成事業データベース、NEDOライブラリ成果報告書データベースなど)

(2) 論文

論文の抽出は、文献データベース Scopus(エルゼビア社)を用い、研究者の著者名検索により論文リストを出力し、article と review に絞り込み、さらに本研究課題に直接関係しないと思われる論文を除いた。得られた論文の発行年で、研究課題終了年の12月までに発行された論文を①さきがけの研究成果の論文に、終了年の翌年1月以降に発行された論文を②さきがけの研究成果の継続と発展に関する論文に、まずは分類した。次いで、②のうち終了時点で投稿中の論文や期間中の成果を終了後に発表したものを①に再分類し、当方で判断が困難なものは研究者に直接確認して分類し、論文数を求めた。さらに、②のうち研究者が責任著者(筆頭著者、最終著者又は連絡先著者)となっている論文数も求めた。

(3) 特許

特許出願及び登録状況は、特許データベース Shareresearch(株式会社日立製作所)を用い、

本研究者が発明者となっているもので、その発明の名称からそれぞれの研究課題と関連していないと思われるものを上記と同様にして除いた。出願日(PCTによる国際出願の場合は優先日)が研究課題終了時以前のもものを期間中に分類した。

(4) 受賞、招待講演、ベンチャー、報道

受賞、国際会議の招待講演、ベンチャー、報道について、ウェブ検索を用い、各研究者の研究室ホームページ、科研費ホームページ、日経テレコン等を参考にして、それぞれのリストを作成した。さらに研究者に直接確認して追加した。これらは、各研究課題終了後を対象とした。

2.2 研究成果概要

2.2.1 研究助成金

各研究者が研究代表者として獲得した助成金のリストを表 2-1 に示す。ここでは、研究課題終了後に実施したもの(期間中に開始を含む)で、助成金額が1千万円/件以上のものだけを取り上げている。研究者は、これらのほかにも助成金(研究分担者として、あるいは研究代表者であるが比較的少額)を獲得して研究を進めている。

表 2-1 研究者の研究助成金獲得状況

研究者	研究期間(年度)	研究種目	研究課題	獲得状況																				金額(百万円)
				JST	科研費	文部科学省	内閣府	AMED	厚生労働省	ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム	その他民間財団等	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	
青木淳賢	2005～2008	さきがけ	生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	62.0		
	2007～2011	文部科学省 TPRP(ターゲットタンパク研究プログラム)	がんや様々な疾病に関与する NPP ファミリータンパク質の機能構造解析から創薬まで																			233.3		
	2008～2009	科研費 特定領域研究	がん細胞遊走因子オートタキシンの血管形成促進機構の解明とその意義																			18.0		
	2009～2011	科研費 基盤研究(B)	生理活性リゾリン脂質生体内機能の包括的理解																			18.5		
	2009～2013	独立行政法人 医薬基盤研究所	生理活性脂質リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンをターゲットとした新規特発性間質性肺炎治療薬と病態マーカーの開発																			190.0		
	2010～2014	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	モデル生物を用いた生理活性リゾリン脂質機能の包括的研究																			127.8		
	2013～2015	科研費 基盤研究(B)	新規脂質メディエーター、リゾホスファチジルセリンの免疫抑制機構の解明と創薬研究																			18.7		
	2013～2018	AMED 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ(AMED-CREST)	疾患関連リゾリン脂質の同定と医療応用																			500.0		
	2016～2018	科研費 基盤研究(B)	脂質メディエーター、リゾホスファチジルセリンのリンパ球における新規機能の解明																			17.9		
	2017～2019	AMED 革新的がん医療実用化研究事業	生理活性脂質リゾホスファチジルセリンのがん免疫抑制作用の解明と創薬応用																			90.0		

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)		
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
				5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	
	2017～2021	AMED 革新的先端研究開発支援事業インキュベータータイプ (LEAP)	リゾリン脂質メディエーター研究の医療応用																			750.0	
阿部 郁朗	2005～2008	さきがけ	二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製																			48.0	
	2008～2010	科研費 基盤研究(B)	二次代謝酵素の結晶構造解析を基盤とする酵素機能の開拓と物質生産																			19.1	
	2010～2014	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	メロテルペノイド生合成アセンブリーラインの解明と制御																			55.6	
	2011～2014	科研費 基盤研究(A)	二次代謝酵素の機能制御と物質生産																			49.4	
	2014～2017	科研費 基盤研究(B)	海綿由来生物活性物質の生合成遺伝子の収集調査と生合成機構の解明																			17.7	
	2015～2017	科研費 基盤研究(A)	複雑骨格天然物の生合成マシナリーの解明と物質生産																				40.3
	2016～2020	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	人工生合成マシナリーの合理的再構築による次世代天然物化学																				108.7
	2016～2020	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	生合成リデザイン・国際活動支援班																				42.5
	2016～2020	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	生合成リデザイン・研究総括班																				26.8
	2017～2020	SICORP 日本-中国共同研究	植物共生菌相互作用の包括的利用による二次代謝産物の網羅的解析																				18.0
石井 聡	2005～2008	さきがけ	オーファン受容体の脂質天然リガンドの探索																			48.0	
	2011～2012	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	液性免疫を調節する脂質メディエーターの探索																			15.7	
	2011～2013	科研費 基盤研究(B)	脂質メディエーター受容体を標的とした創薬基盤																			19.5	
	2013～2014	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	新規リゾホスファチジン酸受容体群による病態制御機構の解明																			14.6	
	2016～2018	科研費 基盤研究(B)	三量体Gタンパク質G12/13を介した生理活性脂質の生体制御																			17.3	
稲田 利文	2005～2008	さきがけ	機能性RNAによる代謝調節の分子基盤の解析																			49.0	
	2007～2009	科研費 基盤研究(B)	ポリ(A)鎖の翻訳によるノンストップmRNAの翻訳抑制と異常タンパク質の分解機構																			18.1	
	2008～2012	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	遺伝子発現の正確性を保証するmRNA品質管理機構																			138.8	

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)		
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
				5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	
	2008～2012	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム研究の総合的推進																			44.2	
	2010～2012	科研費 基盤研究(B)	新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストにおける RACK1 の機能解明																				18.7
	2013～2014	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	mRNA 品質管理機構におけるユビキチン化の新規機能の解析																				11.7
	2014	武田科学振興財団 生命科学研究所助成	翻訳伸長段階での品質管理機構におけるリボソーム修飾の機能解明																				10.0
	2014～2016	科研費 基盤研究(B)	異常 mRNA 由来のタンパク質分解促進機構の解析																				16.5
	2014～2018	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	mRNA とタンパク質の品質管理機構における新生鎖の新規機能の解明																				223.2
尾池 雄一	2005～2008	さきがけ	「肥満症」におけるエネルギー・脂質代謝制御と血管新生制御との関連の解明																			55.0	
	2005～2009	科研費 特定領域研究	がん組織におけるリンパ管・血管新生の共通分子機構																				48.8
	2009～2010	科研費 基盤研究(B)	ANGPTL シグナル制御による心血管病・メタボリックシンドロームの治療戦略																				12.8
	2010	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	スフィンゴ脂質と病態代謝の分子基盤																				25.2
	2010～2013	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)	生活習慣病とがんの共通分子病態解明による健康長寿社会実現を目指した基盤研究																				174.0
	2013～2018	AMED 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ(AMED-CREST)	組織修復に基づく恒常性維持機構の変容による生活習慣病の病態解明と制御																				248.3
	2014～2016	科研費 基盤研究(B)	心臓リモデリングとその変容による心不全発症・進展の分子機構解明																				16.6
	2015～2016	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	免疫老化と幹細胞制御機構変容との関連解明																				11.2
	2017～2018	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	造血幹細胞老化の新規分子基盤解明とその制御																				12.2
	2017～2019	JST 研究成果展開事業 大学発新産業創出プログラム(START)	ANGPTL2 を標的とする画期的心不全等遺伝子治療薬の開発																				117.0
木下 俊則	2005～2008	さきがけ	気孔開閉と細胞膜 H ⁺ -ATPase の活性調節機構の解明																			49.0	
	2008～2010	科研費 基盤研究(B)	気孔孔辺細胞における青色光シグナル伝達機構の解明																				19.1

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)		
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
				5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	
	2010～2014	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	環境変動に対する気孔開閉制御の分子機構																			84.1	
	2010～2019	ALCA	気孔開度制御による植物の光合成活性と生産量の促進																			500.0	
	2011～2013	科研費 基盤研究(B)	オーキシンによる細胞膜プロトンポンプの活性化機構の解明																				16.4
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	細胞膜プロトンポンプの多様な生理機能と活性制御機構の解明																				17.9
	2015～2019	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	植物の成長可塑性を支える環境認識と記憶の自律分散型統御システム																				249.3
	2015～2019	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	環境刺激による気孔開度制御機構の解析																				96.9
	2015～2019	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	植物の成長可塑性を支える環境認識と記憶の自律分散型統御システム																				84.8
田中元雅	2005～2008	さががけ	プリオン凝集体の代謝産物に着目した細胞機能制御																			58.0	
	2007～2009	科研費 若手研究(A)	酵母を用いたポリグルタミン病発症分子機構の解明																				20.9
	2010～2012	科研費 若手研究(A)	神経変性と精神疾患をつなぐアミロイド:ハンチントン病における精神障害機構の解明																				17.9
	2010～2013	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)	アミロイドの総合的理解によるその形成と伝播の制御																				151.0
	2011～2013	ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム	プリオンの立体配座空間の1分子技術を用いた評価																				33.6#
	2014～2018	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	tRNA リボソームプロファイリングの開発と応用																				138.3
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	アミロイドの生成・脱凝集機構の新たなパラダイム創成																				16.3
豊島文子	2005～2008	さががけ	細胞膜脂質による分裂軸方向の制御とがん化に伴う変化																			58.0	
	2009～2010	科研費 若手研究(A)	細胞分裂期における小胞輸送の制御機構																				28.1
	2010～2013	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)	細胞分裂軸の新たな制御機構の解析と皮膚の形成・恒常性維持における役割																				148.0
	2016～2018	科研費 基盤研究(B)	妊娠期における母体表皮幹細胞制御と生殖機能における役割の解明																				17.6

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)		
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
				5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	
	2017～ 2020	AMED 革新的先端研究開発 支援事業ソロタイ プ(PRIME)	皮膚の新陳代謝におけるメ カノセンサーの機能解明																		40.0	
初谷 紀幸	2005～ 2008	さきがけ	耐病性植物作出を目指した 植物細胞死の制御系の解明																		46.0	
	2009～ 2010	科研費 若手研究(A)	植物の病害抵抗性と細胞死 機構の時空間的制御メカニ ズムの解明																			22.4
深田 正紀	2005～ 2008	さきがけ	シナプス機能における S-ア シル化動態の時空的解析																		48.0	
	2006～ 2008	ヒューマン・フロ ンティア・サイエ ンス・プログラム	Molecular mechanism for dynamic protein palmitoylation																			42.0
	2008～ 2011	科研費 若手研究(S)	新規 AMPA 受容体制御因子群 によるシナプス機能制御の 解明																			59.9
	2010～ 2013	内閣府 最先端・次世代研 究開発支援プログ ラム(NEXT)	シナプス伝達制御機構とそ の破綻によるシナプス疾患 の病態機構の解明																			173.0
	2014～ 2016	科研費 基盤研究(B)	真の脱パルミトイル化酵素 の同定と生理機能の解明																			16.6
	2016～ 2019	武田科学振興財団 生命科学研究助成	脳高次機能における S-ア シル化サイクルの生理的意義 の解明																			10.0
	2017～ 2018	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	LGI1 を中心とするシナプス 蛋白質ネットワークの老化 と認知症の分子病態																			10.7
	2017～ 2019	科研費 基盤研究(B)	シナプス-ナノカラムを形づ くる分子の配置原理とシナ プス疾患																			
2017～ 2019	堀科学芸術振興財 団 第1部研究費助成	シナプス伝達制御機構とそ の破綻によるてんかん病態 の解明																				15.0
村上 誠	2005～ 2008	さきがけ	分泌性ホスホリパーゼ A2 群 の分子種固有の機能の解明																			53.0
	2009～ 2011	科研費 基盤研究(B)	分泌性ホスホリパーゼ A2 酵 素群の生体内機能に関する 総合解析																			18.5
	2010～ 2014	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	ホスホリパーゼ A2 分子群に より制御される新しい脂質 ネットワークの解析																			137.5
	2012～ 2014	科研費 基盤研究(B)	新規ホスホリパーゼ分子群 の機能的脱オフファン化																			18.6
	2013～ 2018	AMED 革新的先端研究開 発支援事業ユニッ トタイプ(AMED- CREST)	PLA ₂ メタボロームによる疾 患脂質代謝マップの創成と その医療展開に向けての基 盤構築																			500.0
	2016～ 2020	科研費 基盤研究(A)	健康環境因子としての脂質 代謝の新機軸																			

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)		
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
				5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	
由良茂夫	2005～2008	さきがけ	胎生期低栄養による成長後の代謝異常発生機序の解明とその予防戦略の開発																			46.0	
	2006～2009	さきがけ	炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析																				52.0
		2009～2011	科研費 基盤研究(B)	ω3脂肪酸由来の新規抗炎症性メディエーターの同定および作用機構の解明																			18.9
	2010～2014	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	ω3系脂肪酸の代謝と生理的機能についての包括的メタボローム解析																			110.6	
	2011～2015	さきがけ	炎症の収束機構の分子基盤の確立と慢性疾患への適用																			64.0	
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	脂質代謝バランス異常を伴う疾患の病態解明と創薬に向けた基盤研究																			17.0	
	2015～2019	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	脂肪酸クオリティの最先端リポドミクスと生理的意義の解明																			93.9	
	2015～2019	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	「リポクオリティ」領域研究の推進																			184.0	
有田誠	2015～2019	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	「リポクオリティ」領域研究の国際連携																			66.8	
	2006～2009	さきがけ	脂質ヒドロペルオキシドによる細胞機能制御と疾病との関連の解析																			47.0	
	2017～2022	AMED 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ(AMED-CREST)	代表 山田健一 酸化脂質をターゲットとした疾患メカニズム解明および創薬基盤研究 研究分担者 今井浩孝 脂質ラジカル依存的新規細胞死の作用機序解明とラジカル抑制剤の In vivo 評価																			10.0	
	2006～2009	さきがけ	脳神経ネットワーク形成における脂質機能の網羅的解析																				49.0
		2009～2011	科研費 基盤研究(B)	ニューロン樹状突起の維持を司る分子基盤と作動原理の遺伝学的研究																			18.5
		2010～2015	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	血管-神経相互作用を担うシグナル分子の網羅的探索																			163.9
		2012～2015	科研費 基盤研究(B)	感覚ニューロン受容領域の形成と維持を担う分子細胞基盤に関する遺伝学的研究																			19.0
		2015～2016	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	Hippo-NDR シグナルによる神経突起間競合メカニズムの解明																			11.7
2015～2016	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	モノアミン作動性ニューロンによる嗅覚嗜好性制御機構の解明																			17.9		
榎本和生	2006～2009	さきがけ	脳神経ネットワーク形成における脂質機能の網羅的解析																			49.0	
	2009～2011	科研費 基盤研究(B)	ニューロン樹状突起の維持を司る分子基盤と作動原理の遺伝学的研究																			18.5	
	2010～2015	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	血管-神経相互作用を担うシグナル分子の網羅的探索																			163.9	
	2012～2015	科研費 基盤研究(B)	感覚ニューロン受容領域の形成と維持を担う分子細胞基盤に関する遺伝学的研究																			19.0	
	2015～2016	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	Hippo-NDR シグナルによる神経突起間競合メカニズムの解明																			11.7	
	2015～2016	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	モノアミン作動性ニューロンによる嗅覚嗜好性制御機構の解明																			17.9	

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)		
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
				5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2		
	2016～2018	科研費 基盤研究(A)	神経回路の組織化と維持・管理を担う分子細胞基盤																		43.3		
	2016～2020	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御																			56.3	
	2016～2020	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	神経突起コンパートメント化によるスクラップ&ビルド																			241.8	
	2016～2020	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御																			74.4	
川島 博人	2006～2009	さきがけ	硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明																		46.0		
	2009～2011	科研費 基盤研究(B)	高内皮細静脈特異的遺伝子改変マウスを用いたリンパ球ホーミングの分子機構の解析																			16.5	
	2012～2015	科研費 基盤研究(B)	新規抗糖鎖抗体を用いた慢性炎症性疾患における糖鎖の機能解明																			18.1	
	2016～2018	科研費 基盤研究(B)	腸内細菌バランスの正常化に基づく炎症性腸疾患の新規治療法の開発																			17.4	
	2016～2020	AMED A研究課題データ	世界初の抗糖鎖抗体医薬の開発に向けた革新的抗糖鎖モノクローナル抗体作製技術の確立																			150.0	
小松 雅明	2006～2009	さきがけ	オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生																			49.0	
	2009～2010	科研費 若手研究(S)	オートファジーの破綻によるヒト病態発症機序の解明																			66.3	
	2010～2013	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)	オートファジーの異常に伴う疾患の克服:健康社会実現へ向けて																			139.0	
	2010～2012	Global Research Laboratory Program(National Research Foundation of Korea)	Role of autophagy in the control of cellular function and metabolism																			30.9*	
	2013～2015																						30.9*
	2016～2018																						
	2013～2017	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	オートファジー-選択的基質による細胞制御とその病態生理																			213.7	
	2014	武田科学振興財団 特定研究助成	選択的オートファジーの破綻によるがん、代謝性疾患発症の解明																			30.0	
2014～2015	AMED 革新的がん医療シーズ育成領域	細胞内ストレス応答機構を標的とした分子標的薬の開発																			120.0		

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)	
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
				5	6	7	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
	2014～2016	科研費 基盤研究(A)	オートファジーが司る転写因子群による代謝制御機構																		41.5
	2014～2016	ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム	Sensors and modulators of autophagy networks in vivo																		25.1#
	2015～2019	日本学術振興会 日中韓フォーサイト事業	オートファジー、代謝と神経変性疾患																		23.9
	2016	武田科学振興財団 特定研究助成	オートファジーの異常が伴う加齢性疾患の克服																		50.0
佐野 元昭	2006～2009	さきがけ	代謝産物の変化情報に基づく心筋機能制御法の確立																		51.0
	2008～2010	科研費 基盤研究(B)	心筋レドックス応答におけるアミノ酸代謝の重要性																		19.0
	2008～2010	厚生労働省 厚生科研費	臓器特異的ストレス応答探索マウスを用いた疾病予防法の開発																		25.9
	2011～2013	科研費 基盤研究(B)	免疫学的介入による心筋梗塞後リモデリング予防法の開発																		19.2
	2012～2015	さきがけ	炎症の制御に基づく心不全の予防と治療																		45.0
	2015～2017	科研費 基盤研究(B)	加齢とメタボリックシンドロームに伴う心血管障害に共通の分子基盤の解明																		
重信 秀治	2006～2009	さきがけ	複合系の代謝制御ーアブラムシ細胞内共生系をモデルとして																		43.0
	2010～2012	科研費 若手研究(A)	共生による新規性創出の遺伝子基盤の解明																		25.7
	2013～2015	科研費 基盤研究(B)	共生による生命システムの統合と進化：アブラムシ細胞内共生系をモデルに																		17.7
	2017～2020	科研費 基盤研究(B)	共生系の遺伝子ネットワークの制御機構とその進化																		17.4
新藤 隆行	2006～2009	さきがけ	受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用																		56.0
	2008～2010	科研費 基盤研究(B)	RAMPによる代謝、血管制御メカニズムの解明と、代謝異常、血管合併症治療への展開																		18.6
	2009～2011	産学連携・技術移転事業 A-STEP 産学協同促進ステージ ハイリスク挑戦タイプ	創薬シーズ開発の効率化に向けた次世代疾患モデルマウスの迅速作製技術開発																		60.0
	2010～2013	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)	新しい血管統合機構に基づく、慢性臓器障害治療薬の開発																		152.0

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)		
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
				5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	
	2014～ 2016	科研費 基盤研究(B)	臓器間連携と恒常性を司る、新しい生体内情報制御システムの解明と応用展開																		16.5	
	2014～ 2019	AMED 革新的先端研究開発 支援事業ユニット タイプ(AMED- CREST)、	生理活性因子の情報制御システムに基づく革新的な医薬品の創出																			500.0
中 戸 川 仁	2006～ 2009	さきがけ	オートファジーにおける脂質膜組織化機構の解明																		45.0	
	2008～ 2011	科研費 若手研究(A)	オートファゴソーム形成を支える膜動態の解析																			25.2
	2010～ 2013	内閣府 最先端・次世代研 究開発支援プログ ラム(NEXT)	オートファジーにおける膜新生駆動システムの実体と全容の解明																			83.0
	2013～ 2016	科研費 若手研究(A)	選択的オートファジーにおける分解標的認識制御機構の解明																			26.1
	2013～ 2017	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	酵母・無細胞系を用いたオートファジー関連因子の分子機能の解明																			125.3
	2017～ 2021	科研費 基盤研究(A)	オートファジーによるオルガネラ分解の分子基盤と生理的意義の解明																			42.1
西 野 邦 彦	2006～ 2009	さきがけ	異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明																			49.0
	2007～ 2010	科研費 若手研究(S)	オーファン輸送体による多剤耐性機構の解明と新規治療薬開発																			64.5
	2010	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	マルチコンポーネント型薬剤排出ポンプの機能と複合体形成機構の解明																			11.2
	2010～ 2013	内閣府 最先端・次世代研 究開発支援プログ ラム(NEXT)	薬剤排出ポンプによる細菌多剤耐性化・病原性発現制御機構の解明と新規治療法開発																			142.0
	2014～ 2015	科研費 若手研究(A)	トランスポーター制御による細菌恒常性維持機構の解明と新規治療戦略の開発																			23.9
	2016～ 2018	AMED 感染症実用化研究 事業	細菌多剤排出ポンプ阻害剤開発に関する研究																			30.0
	2017～ 2019	科研費 基盤研究(B)	トランスポーターによる多剤耐性・病原性発現機構解明と新規治療法の開発																			18.1
眞 鍋 一 郎	2006～ 2009	さきがけ	ストレス応答破綻としてのメタボリックシンドロームと動脈硬化の分子機構解明																		45.0	
	2008～ 2010	科研費 基盤研究(B)	心血管代謝疾患病態基盤としての小胞体ストレス・転写因子翻訳後修飾シグナル分子機構																			18.5

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	金額 (百万円)
	2011～2013	科研費 基盤研究(B)	臓器連関と慢性炎症による心血管疾患発症・進展分子機構の解明と診断・治療法への応用																			19.1
	2016～2018	科研費 基盤研究(B)	心血管疾患の多臓器連携機序の解明と臨床応用																			17.4
	2017～2019	科研費 基盤研究(B)	生活習慣病におけるマクロファージの時空間多様性をもたらす作動原理の解明と医療応用																			18.6
池ノ内順一	2007～2010	さきがけ	細胞の極性形成に関わる膜ドメインの形成・維持機構の解明																			50.0
	2009～2012	科研費 若手研究(A)	細胞膜を構成する脂質分子の同定とその新規機能の解明																			16.1
	2012～2015	さきがけ	人工細胞作出に向けた人工脂質二重膜と生体膜の違いの解明																			44.0
	2013～2015	科研費 若手研究(A)	微絨毛形成におけるスフィンゴミエリンの機能解明																			18.6
	2015～2018	AMED 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ(PRIME)	上皮間葉転換における細胞膜脂質の変化とその意義の解明																			39.0
	2016～2018	科研費 基盤研究(B)	タイトジャンクション形成の制御機構の解明																			17.4
今村博臣	2007～2010	さきがけ	蛍光ATPプローブを用いたATP代謝の解析																			49.0
	2010～2012	科研費 若手研究(A)	ATPイメージングによるアポトーシスにおける細胞内ATPの意義の解明																			25.4
	2014～2016	科研費 基盤研究(B)	膵臓ランゲルハンス島における細胞外ATPシグナルの時空間動態の解明																			16.6
	2017～2019	科研費 基盤研究(B)	蛍光バイオセンサーを用いたミトコンドリア分岐鎖アミノ酸輸送体の同定およびその解析																			17.4
岩脇隆夫	2007～2010	さきがけ	細胞内の蛋白質代謝を管理するストレス応答機構の解明																			50.0
	2012～2013	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	異常タンパク質インターフェイスとしての天然変性領域の機能解析																			11.3
	2012～2014	科研費 基盤研究(B)	生体内における細胞ストレス応答の分子生物学的理解からストレス順応モデルの作製へ																			18.7
	2016	東レ科学技術研究助成	小胞体ストレス応答関連分子が制御する高次神経系機能の探索と分子基盤の解明																			11.0

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
酒井達也	2007～ 2010	さきがけ	オーキシン調節による植物の成長制御機構の解明																	41.0
	2011～ 2012	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	光屈性におけるオーキシン調節機構の解析																	15.1
	2013～ 2014	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	光屈性を誘導するフォトトロピンシグナル伝達経路の解析																	16.4
	2016～ 2017	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	オーキシン不均等分布に依存しない偏差成長誘導機構の解析																	10.4
	2017～ 2019	科研費 基盤研究(B)	タンパク質リン酸化修飾を介した光屈性制御機構の解明																	17.9
中野雄司	2007～ 2010	さきがけ	ブラシノステロイド情報伝達による発生と自然免疫制御の分子機構																	50.0
	2012～ 2017	CREST 二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出 研究総括：磯貝彰	研究代表者浅見忠男 植物ホルモン間クロストークと化学・生物学的制御技術を利用したバイオマス高生産性植物の開発 共同研究者 中野雄司 ブラシノステロイド情報伝達ネットワークとクロストーク分子機構の化学生物学的解明と応用基盤開発研究																	120.0
前田裕輔	2007～ 2010	さきがけ	オルガネラの pH によるタンパク質輸送の制御																	50.0
	2011～ 2013	科研費 基盤研究(B)	酸性オルガネラにおける pH 恒常性の制御機構の解明																	20.5
南野徹	2007～ 2010	さきがけ	老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明																	50.0
	2009～ 2011	科研費 基盤研究(B)	細胞老化・個体老化シグナル制御による心血管治療法の開発に関する基盤研究																	18.2
	2011～ 2014	さきがけ	長寿・老化モデルマウスを用いた慢性炎症機構の解明																	39.0
	2012	武田科学振興財団 生命科学助成	老化シグナル活性化による生活習慣病発症機序の解明																	10.0
	2012～ 2014	科研費 基盤研究(B)	p 5 3 依存性老化シグナル活性化による生活習慣病発症機序の解明																	17.8
	2014～ 2016	バイエル薬品	Possible role of factor Xa in age-associated disease																	21.5
	2014～ 2018	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	血管ニッチによって制御されるステムセルエイジングと加齢関連疾患発症機序の解明																	94.9

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	金額 (百万円)		
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
				5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	
	2015	先進医薬研究振興財団 特定研究助成	血管ニッチにおける老化シグナルを介した組織幹細胞不全発症機序の解明																		10.0	
	2015～ 2016	田辺三菱製薬	細胞老化および加齢関連疾患における SGLT2 阻害薬の役割に関する研究																			10.0
	2016	武田科学振興財団 特定研究助成	オートファジーの異常に伴う加齢性疾患の克服																			10.0
	2017～ 2019	科研費 基盤研究(B)	細胞内代謝を標的とした生活習慣病の診断・治療法の開発																			16.8
宮本 健史	2007～ 2010	さきがけ	「骨代謝」における破骨細胞の細胞融合と代謝制御																			49.0
	2009～ 2011	科研費 若手研究(A)	加齢と骨代謝制御																			24.4
	2012～ 2014	科研費 基盤研究(B)	破骨・骨芽細胞制御による骨恒常性制御																			18.3
	2015～ 2017	科研費 基盤研究(B)	性ホルモンと低酸素応答性分子による骨恒常性制御																			16.6
	2017～ 2019	AMED 橋渡し研究戦略的 推進プログラム事業	後縦靭帯骨化症の新規治療法の創出を目指した研究																			210.0
山口 英樹	2007～ 2010	さきがけ	癌浸潤転移における細胞膜脂質代謝及びドメイン構造の機能解析																			49.0

2017年9月8日調査

*: 助成金(ウォン)を円換算(2017.11.29換算レート)

#: 助成金(USドル)を円換算(2017.11.29換算レート)

2.2.2 論文

各研究課題の研究者が発表した ①さきがけの研究成果の論文数と ②さきがけの研究成果の継続と発展に関する論文数を表 2-2 にまとめた。また、②の中で研究者が責任著者となった論文数も示している。

26名の研究者が研究期間中の成果よりも継続・発展で多くの論文を発表している。特に第1期研究者の青木、阿部、尾池と、第2期研究者の小松、佐野は60件以上と際立って多くの論文を発表している。

表 2-2 研究者の論文(原著論文)数

期 (採択 年度)	研究課題	研究者	①さきがけ の研究成果 の論文数	②さきがけ の研究成果 の継続と発 展に関する 論文数	③左記②の 論文のうち 責任著者の 論文数
第 1 期 (2005)	生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明	青木 淳賢	54	88	23
	二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製	阿部 郁朗	30	91	70
	オーファン受容体の脂質天然リガンドの探索	石井 聡	19	23	6
	機能性 RNA による代謝調節の分子基盤の解析	稲田 利文	10	27	18
	「肥満症」におけるエネルギー・脂質代謝制御と血管新生制御との連関の解明	尾池 雄一	24	87	51
	気孔開閉と細胞膜 H ⁺ -ATPase の活性調節機構の解明	木下 俊則	9	38	22
	プリオン凝集体の代謝産物に着目した細胞機能制御	田中 元雅	9	9	5
	細胞膜脂質による分裂軸方向の制御とがん化に伴う変化	豊島 文子	5	12	11
	耐病性植物作出を目指した植物細胞死制御系の解明	初谷 紀幸	6	9	5
	シナプス機能における S-アシル化動態の時空的解析	深田 正紀	18	26	13
	分泌性ホスホリパーゼ A2 群の分子種固有の機能の解明	村上 誠	22	36	22
胎生期低栄養による成長後の代謝異常発生機序の解明とその予防戦略の開発	由良 茂夫	11	2	0	
第 2 期 (2006)	炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析	有田 誠	25	45	13
	脂質ヒドロペルオキシドによる細胞機能制御と疾病との関連の解析	今井 浩孝	6	9	2
	脳神経ネットワーク形成における脂質機能の網羅的解析	榎本 和生	9	12	10
	硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明	川島 博人	13	11	8
	オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生	小松 雅明	47	79	18
	代謝産物の変化情報に基づく心筋機能制御法の確立	佐野 元昭	22	66	20
	複合系の代謝制御ーアブラムシ細胞内共生系をモデルとして	重信 秀治	10	7	0
受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用	新藤 隆行	10	21	16	

期 (採択 年度)	研究課題	研究者	①さきがけ の研究成果 の論文数	②さきがけ の研究成果 の継続と発 展に関する 論文数	③左記②の 論文のうち 責任著者の 論文数
	オートファジーにおける脂質膜組織化機構の解明	中戸川 仁	11	21	13
	異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明	西野 邦彦	22	23	10
	ストレス応答破綻としてのメタボリックシンドロームと動脈硬化の分子機構解明	眞鍋 一郎	22	28	12
第 3 期 (2007)	細胞の極性形成に関わる膜ドメインの形成・維持機構の解明	池ノ内 順一	5	8	4
	蛍光 ATP プロローブを用いた ATP 代謝の解析	今村 博臣	11	24	4
	細胞内の蛋白質代謝を管理するストレス応答機構の解明	岩脇 隆夫	21	34	5
	オーキシン調節による植物の成長制御機構の解明	酒井 達也	11	11	5
	ブラシノステロイド情報伝達による発生と自然免疫制御の分子機構	中野 雄司	9	12	7
	オルガネラの pH によるタンパク質輸送の制御	前田 裕輔	17	20	3
	老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明	南野 徹	20	40	27
	「骨代謝」における破骨細胞の細胞融合と代謝制御	宮本 健史	15	28	24
	癌浸潤転移における細胞膜脂質代謝及びドメイン構造の機能解析	山口 英樹	13	8	3
研究領域全体*			532	939	451

2017年8月18日調査

*: 複数研究者による共著論文があるため、各研究課題の単純合計とは一致しない。

2.2.3 特許

特許出願及び登録は、研究目的と段階によりその数は異なるが、当該研究が最終的に一定の成果を収め、実用化による社会貢献につながる段階に達したことを示す重要な指標でもある。

本研究領域の研究者による特許出願数及び登録数を表 2-3 に示す。研究領域期間中の国内出願は青木、南野が 4 件、眞鍋、中野が 3 件、阿部、有田、新藤が各 2 件出願している。外国出願は中野が 4 件、眞鍋が 3 件、有田、新藤が各 2 件である。研究領域期間終了後の国内出願は、青木が 18 件の出願であり、登録も 7 件と際立っている。外国出願は青木の 8 件、中野の 5 件、佐野の 4 件が多い。

表 2-3 研究領域期間中・終了後の特許の出願と登録状況

採択年度	研究代表者	研究領域の期間中				研究領域の期間終了後			
		国内		海外(国際)		国内		海外(国際)	
		出願 件数	登録 件数	出願 件数	登録 件数	出願 件数	登録 件数	出願 件数	登録 件数
2005 年度	青木 淳賢	4	3	1	1	18	7	8	1
	阿部 郁朗	2	2	1	0	2	0	0	0
	石井 聡	0	0	0	0	2	1	0	0
	尾池 雄一	1	0	0	0	1	0	1	0
	木下 俊則	0	0	0	0	7	0	2	0
	村上 誠	0	0	0	0	3	0	0	0
2006 年度	有田 誠	2	1	2	1	4	2	2	1
	今井 浩孝	0	0	0	0	8	3	0	0
	小松 雅明	1	1	1	0	1	0	2	2
	佐野 元昭	1	0	0	0	5	1	4	0
	新藤 隆行	2	2	2	1	0	0	1	0
	西野 邦彦	1	0	0	0	4	2	1	1
	眞鍋 一郎	3	0	3	0	4	0	2	1
2007 年度	池ノ内 順一	0	0	0	0	1	0	0	0
	今村 博臣	1	0	1	1	0	0	0	0
	岩脇 隆夫	1	1	1	1	1	0	1	0
	中野 雄司	3	1	4	0	2	0	5	0
	南野 徹	4	1	0	0	3	0	1	0
	宮本 健史	0	0	0	0	2	0	1	0

領域全体	26	12	16	5	68	16	31	6
------	----	----	----	---	----	----	----	---

2017 年 8 月 29 日調査

研究領域期間中あるいは終了後における PCT 出願された特許は、出願件数は PCT 出願の 1 件のみを計上し、各国展開分は含めない。海外の登録件数は、いずれかの国で登録されていれば 1 件とする。

2.3 科学技術や社会・経済への波及効果

2.3.1 科学技術への波及効果

受賞、学会・研究会等への貢献、共同研究等について、調査結果から主なものを例示する。

(1) 受賞

科学技術の進歩への貢献や研究成果に関する評価を示す指標の一つとして、受賞歴が挙げられる。研究課題終了後の研究者の主な受賞歴を示す。

科学技術分野の文部科学大臣表彰の若手科学者賞は、豊島、小松、中戸川、池ノ内の4名が受賞している。榎本はブレインサイエンス振興財団の塚原仲晃記念賞を受賞している。田中、小松、中戸川は日本学術振興会賞を受賞している。小松は Thomson Reuter の The World's Most Influential Scientific Minds に2014年から2年連続で選ばれている。

(2) 学会・研究会等への貢献

学会・研究会等への主な貢献を例示する。

青木は、リピッド合同カンファレンス2016を京大化学研究所、北大薬・遺伝子病制御研と合同開催し、日本生化学会東北支部第83回例会(2015年度)の世話人、第55回日本脂質学会大会(2013年度)の大会長を務めた。また日本分子生物学会・日本生化学会プログラム委員(2017年度)、日本薬学会生物系薬学部会長(2016年度)を歴任した。

阿部は、日本薬学会生薬天然物部会の常任世話人(2011年度～)、庶務幹事(2013～2015年度)、部会長(2015～2017年度)、日本生薬学会評議員(2010年度～)、常務理事(2014～2018年度)、副会長(2017～2018年度)、天然有機化合物討論会世話人(2009年度～)などを務めている。また、日本生薬学会会長(2018～2019年度)に就任し、日本生薬学会第65回年会(2018年度)を主催する予定である。

石井は、第58回日本脂質生化学会大会(2016年度)を主催し、稲田は、ミニシンポ New frontiers in RNA biology(2017年度)を主催し、第69回細胞生物学会(2017年度)、第89回日本生化学会大会(2016年度)、RNA 2016 satellite(2016年度)のシンポジウムを主催した。

尾池は、病態代謝・血管医学セミナー(2007年度～)の当番世話人を複数回務め、また、分子遺伝学セミナー(2008年度～)、Meet The Expert(2011年度～)、実地医家臨床セミナー(2012年度～)を主催した。

木下は、日本植物学会・共催シンポジウム(2015年度)のオーガナイザー、日本植物生理学会代議員(2016～2017年度)、同・編集委員(2012年度)、日本植物学会会計幹事(2011～2012年度)を歴任した。

深田は、第47回生理研国際シンポジウム(2016年度)のチーフオーガナイザー、FASEB カンファレンス(2015年度)のオーガナイザーを歴任し、また、シナプス関連の研究会(2008年

度～)を主催した。

村上は、第 42 回日本医用マスペクトル学会年会(2017 年度)のシンポジウムオーガナイザーを務めた。現在、日本生化学会関東支部幹事(2017～2019 年度)である。

有田は、第 42 回日本医用マスペクトル学会年会(2017 年度)の会長、日本脂質生化学会の幹事、日本医用マスペクトル学会の理事を務めている。今井は、第 26 回ビタミン研究会(2015 年度)を主催した。

小松は、第 6 回日本生化学会大会プログラム委員(2016 年度)、がんと代謝研究会(2013 年度～)の実行委員を複数回、第 6 回オートファジーに関する国際会議(2012 年度)の組織委員、日本生化学会関東支部代議員(2017～2019 年度)を務めている。

今村は、第 54 回日本生物物理学会(2016 年度)のシンポジウムオーガナイザー、岩脇は、可視化マウス研究会の会頭(2014 年度)、南野は、第 18 回～第 19 回日本抗加齢医学会総会(2018～2019 年度)のプログラム委員長を務めている。

(3) 共同研究

共同研究については、海外との共同研究を中心に例示する。

青木は、ハンガリー Semmelweis 大 Benyo 研(2017: リゾホスファチジン酸 1 依存性 トロンボキサン A2)、韓国釜山大 Kim 研(2016: オートタキシンの卵巣癌幹細胞維持機能)、阿部は、中国暨南大学 Yao 研(2017: ステロイド抗生物質の微生物生産系)、中国科学院 Lie グループ(2015: 抗生物質アンチマイシンのポリケタイド骨格改変)、チューリッヒ工科大 Piel 研(2014: 海綿由来細胞毒性物質の生合成)と、共同研究を行っている。

石井は、台湾国立中央大 Sun 研(2017: T 細胞死関連遺伝子 8)、稲田は、米カリフォルニア大 Weissman 研(2012: リボソーム結合品質制御複合体)、尾池は、韓国忠南大 Shong 研(2017: アンジオポエチン様タンパク質 6)と、共同研究を行っている。

木下は、英グラスゴー大 Christie 研(2017: シロイヌナズナフォトトロピン 1)、米カリフォルニア大 Schroeder 研(2016: アブシジン酸シグナリング)、田中は、米カリフォルニア大 Weissman 研(2015: プリオン様タンパク質凝集体の抗ウイルス機能、2010: 酵母プリオンタンパク質)と、共同研究を行っている。

深田は、オランダ Utrecht 大 Hoogenraad 研(2017: 微小管関連タンパク質(MAP)6)、同 Erasmus 大 Meijer 研(2014: てんかん患者の LGI1 ミスセンス変異)、村上は、米バンダビルド大 Brash 研(2017: PNPLA1 によるアシルセラミド生合成制御)、米ワシントン大 Gelb 研(2015: II F 型分泌性ホスホリパーゼ A₂)、有田は、イタリア Chieti-Pescara 大 Recchiuti 研(2018: レゾルビン D1 による緑膿菌肺炎症の増悪)、米コロラド大 Furuta 研(2015: 好酸球産生脂質メディエーターによるマウス大腸炎抑制)と、共同研究を行っている。

榎本は、米スクリプス研究所 Yates 研、同ロックフェラー大 Gleeson 研(2017: DCLK1 による MAP7D1 のリン酸化)、同ミシガン大 Ye 研(2014: ショウジョウバエ Trim9 の機能)、川島は、米スタンフォード大 Butcher 研(2014: リンパ球ホーミング)、小松は、韓国忠南大 Jo 研

(2017:新規環化ペプチドのオートファジー活性化による抗菌応答)、ドイツ Goethe 大 Dikic 研(2017:サルモネラのユビキチン化によるオートファジー活性化)と、共同研究を行っている。

重信は、米プリンストン大 Stern 研(2013:アブラムシ共生用新規分泌タンパク質)、中戸川は、ドイツ・マックスプランク研究所 Dimova 研(2014:Atg8 の膜脂質への結合による膜構造変化)、西野は、ドイツ・ハノーバー獣医大 Kehrenberg 研(2014:サルモネラ異物排出トランスポーター EmrAB、AcrEF)、池ノ内は、米コロンビア大 Shoen 研(2012:アルツハイマー病におけるミトコンドリア関連小胞体膜)と、共同研究を行っている。

今村は、ドイツ・マックスプランク研究所 Hirrlinger 研(2017:白質路における ATP モニタリング)、岩脇は、英ケンブリッジ大 Mallat 研(2016:壊死細胞センサー Clec4e)、米コーネル大 Qi 研(2015:小胞体関連分解の内因性基質 IRE1 α)、南野は、オランダ・アムステルダム大 Wilde 研(2013:カテコールアミン作動性多形性心室頻拍症)、山口は、米アルバート・アインシュタイン医科大 Condeelis 研(2012:N-WASP 介在性浸潤突起形成の乳癌浸潤及び肺転移への関与)と、共同研究を行っている。

2.3.2 社会・経済への波及効果

本研究領域の研究成果の報道について以下に例示する。

(1) 主な新聞報道・テレビ放送

青木：リゾホスファチジン酸(LPA)受容体 LPA₆の構造解明(日本経済新聞：2017/08/10)

阿部：生物由来生合成酵素の分子構造情報に基づく新規生体触媒の開発(日本経済新聞：2018/01/09)

尾池：心不全の新たな発症メカニズム解明と新規遺伝子治療法の開発(熊本日日、読売、毎日、日本経済、産経新聞：2016/09/29)

木下：気孔の開口を大きくして植物の生産量増加(朝日、日本経済新聞：2013/12/24、毎日新聞：2013/12/28)

豊島：妊娠期に腹部の皮膚が広がる仕組みの解明(産経新聞：2017/09/12、朝日新聞：2017/09/15)

榎本：痛覚を逃避行動へと変換する脳神経回路の解明(日本経済新聞：2015/03/12)

小松：選択的オートファジーの発見(毎日新聞：2014/04/03、読売新聞：2015/08/06 の特集記事)

新藤：アドレノメデュリンの血管・臓器保護作用の解明(信濃毎日、中日新聞：2013/02/16、NHK 長野放送局：2017/02/15)

(2) 主なプレスリリース

稲田：タンパク質合成の正確性を保証する品質管理の新機構(東北大学：2017/08/08)
田中：プリオン様タンパク質凝集体の抗ウイルス機能の発見(理化学研究所：2015/11/20)
深田：タンパク質の異常構造の修復によるてんかんの軽減(生理学研究所：2014/12/09)
村上：皮膚バリア機能に必要な不可欠な新規脂質代謝酵素の発見(東京都医学総合研究所：2017/03/01)
有田：魚類のオメガ脂肪酸による心臓保護機構の解明(理化学研究所、東京大学、JST：2014/07/21)
小松：肝臓がんを抑制する新規化合物の同定(新潟大学：2016/06/28)
佐野：多様な疾患の原因となる内臓脂肪型肥満による免疫老化(慶應義塾大学：2016/11/28)
重信：アブラムシと細菌の共生細胞で働く新規遺伝子ファミリーの発見(基礎生物学研究所：2012/11/22)
中戸川：細胞の核と小胞体を分解する新しい仕組みの発見(東京工業大学、JST：2015/06/04)
西野：多剤排出タンパク質の発現抑制を解除する機構の解明(大阪大学：2013/06/25)
眞鍋：心不全の新しいメカニズムの解明(千葉大学、自治医科大学、東京大学、九州大学、JST：2017/04/11)
池ノ内：癌細胞の浸潤や転移に関わる細胞運動の仕組みの解明(九州大学：2016/03/15)
今村：細胞内カルシウムイオンの局所的濃度変化の脳の原型づくりにおける重要性(基礎生物学研究所：2017/03/07)
岩脇：細胞の中で生じるストレスの可視化技術(金沢医科大学：2017/04/07)
酒井：植物の光感受性変換機構の発見(新潟大学：2015/04/15)
中野：タンパク質の集合と拡散による植物草丈制御機構の発見(理化学研究所、JST：2015/02/07)
南野：血管老化による筋肉のエネルギー消費の障害の発見(新潟大学、JST：2014/05/23)
宮本：迷走神経とニコチンが骨粗鬆症を誘引するメカニズムの解明(慶應義塾大学：2017/03/28)

本研究領域の研究成果に関する企業との連携について、以下に特許出願を基に例示する。

青木：オートタキシン阻害剤について塩野義製薬株式会社と、抗オートタキシンモノクローナル抗体について小野薬品工業株式会社と、オートタキシン測定による疾患の検査法について東ソー株式会社と特許を出願している。

石井：オートタキシン測定によるステロイド服用効果の検査法について東ソー株式会社と特許を出願している。

今井：リン脂質を用いた疲労の判定方法に関して大正製薬株式会社と、心不全による突然死予防剤について坂元醸造株式会社と特許を出願している。

佐野：肺動脈高血圧症の治療薬について株式会社スタージェンと、自己心拍再開後の予後改善物質について大陽日酸株式会社と、腎間質繊維化の抑制剤・予防剤について株式会社ビー・エム・エルと特許を出願している。

西野：抗菌薬感受性検査方法について、株式会社フコクと特許を出願している。

岩脇：細胞内ストレス可視化技術について、株式会社トランスジェニックと特許を出願している。

中野：植物のバイオマスを増大させる遺伝子について、日本たばこ産業株式会社と特許を出願している。

本研究領域では、研究成果の先進性・重要性により研究者の評価が高まり、本研究領域の多くの若い研究者が昇進を果たしている。

石井：東京大学大学院医学系研究科 准教授から秋田大学大学院医学研究科生体防御学講座 教授に異動・昇進した。

稲田：名古屋大学大学院理学研究科 准教授から東北大学大学院薬学研究科遺伝子制御薬学分野 教授に異動・昇進した。

木下：名古屋大学大学院理学研究科 准教授から同研究科植物生理学グループ 教授へ昇進した。

村上：東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員から東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター 教授に異動・昇進した。

有田：東京大学大学院薬学系研究科 准教授から慶應義塾大学薬学部代謝生理化学 教授に異動・昇進した。

今井：北里大学薬学部 准教授から同学部衛生化学教室 教授に昇進した。

榎本：国立遺伝学研究所 准教授から東京大学大学院理学系研究科脳情報学分野 教授に異動・昇進した。

川島：静岡県立大学薬学部 准教授から千葉大学大学院薬学研究院微生物薬品化学研究室 教授に異動・昇進した。

小松：東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員から新潟大学大学院医歯学総合研究科分子生物学分野 教授に異動・昇進した。

佐野：慶應義塾大学医学部 講師から同医学部内科学教室 准教授に異動・昇進した。

重信：自然科学研究機構基礎生物学研究所 研究員から同研究所生物機能解析センター特任准教授に昇進した。

中戸川：東京工業大学フロンティア研究機構大隅研究室 特任助教から同大学生命理工学院 准教授に昇進した。

西野：大阪大学産業科学研究所感染制御学研究分野 准教授から同研究所生体分子制御科学研究分野 教授に昇進した。

眞鍋：東京大学大学院医学系研究科 特任准教授から千葉大学大学院医学研究院長寿医学 教授に異動・昇進した。

池ノ内：京都大学大学院工学研究科 准教授から九州大学大学院システム生命科学府教授に異動・昇進した。

今村：大阪大学産業科学研究所 科学技術振興機構さきがけ専任研究員から京都大学大学院生命科学研究所高次生体統御学 准教授に異動・昇進した。

岩脇：群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット 講師から金沢医科大学総合医学研究所細胞医学研究分野 教授に異動・昇進した。

酒井：新潟大学大学院自然科学研究科 准教授から同大学理学部 教授に昇進した。

南野：千葉大学大学院医学研究院 講師から新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科学教室 教授に異動・昇進した。

山口：国立がん研究センター研究所 ユニット長から公益財団法人佐々木研究所腫瘍細胞研究部 部長に異動・昇進した。

第3章 各研究課題の主な研究成果及び波及効果

3.1 2005年度採択研究課題

3.1.1 生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明(青木淳賢)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

近年、リゾリン脂質が生理活性脂質として細胞間あるいは膜間のシグナリング分子となつて機能し、生体内で重要な役割を担っていることが明らかになってきており、これらの分子は、プロスタグランジン、ロイコトリエンとは構造・機能が大きく異なる第二世代の生理活性脂質として注目されている(図3-1)。本研究者らは、これらの生理活性リゾリン脂質の作用・代謝機構を解明し、その個体レベルでの意義を明らかにしてきた。本研究では、生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義を明らかにすることを目標に、(1)従来のリン脂質性生理活性脂質(リゾホスファチジン酸(LPA)、リゾホスファチジルセリン(LPS))の多様な分子種の実態とその意義を明らかにし、(2)新規生理活性リン脂質の同定、代謝機構、さらにその機能に関する解析を行った¹。

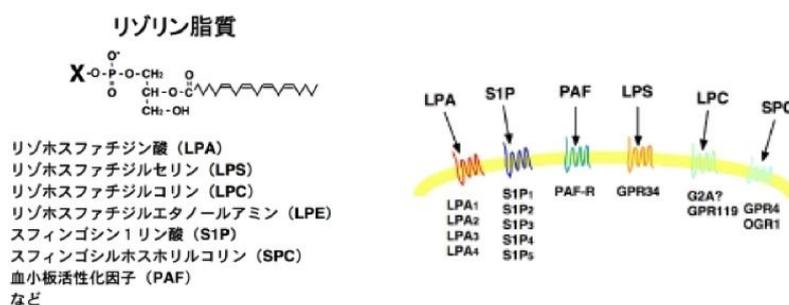


図3-1 生体内に存在するリゾリン脂質(左)とその細胞膜受容体(右)²

② 期間中の研究成果

(i) 生理活性リゾリン脂質 LPA の産生機構とその意義

(A) LPA 産生酵素オートタキシン(Autotaxin;ATX)の機能^{[1], [2], [3]}

(B) LPA産生酵素PA-PLA₁αの発毛における機能

(ii) 新規生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジルスレオニン(LPT)の発見

¹ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/lki/aoki.htm>

² <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/seika-j.shtml>

上記研究の詳細は第 4 章で記述する。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Tanaka M., Okudaira S., Kishi Y., Ohkawa R., Iseki S., Ota M., Noji S., Yatomi Y., Aoki J., Arai H. “Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid”, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(35), 25822-25830.
- [2] Kishi Y., Okudaira S., Tanaka M., Hama K., Shida D., Kitayama J., Yamori T., Aoki J., Fujimaki T., Arai H. “Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid”, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(25), 17492-17500.
- [3] Inoue M., Ma L., Aoki J., Chun J., Ueda H. “Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain”, *Molecular Pain*, 2008, 4, 6.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「生理活性リゾリン脂質生体内機能の包括的理解」(2009～2011 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「モデル生物を用いた生理活性リゾリン脂質機能の包括的研究」(2010～2014 年度)、基盤研究(B)「新規脂質メディエーター、リゾホスファチジルセリンの免疫抑制機構の解明と創薬研究」(2013～2015 年度)、基盤研究(B)「脂質メディエーター、リゾホスファチジルセリンのリンパ球における新規機能の解明」(2016～2018 年度)、さらに、AMED-CREST 疾患における代謝産物の解析及び代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出「疾患関連リゾリン脂質の同定と医療応用」(2013～2018 年度)、革新的がん医療実用化研究事業 領域 1: がんの本態解明に関する研究がんネットワークの臨床的意義の理解に基づく医療シーズの開発研究「生理活性脂質リゾホスファチジルセリンのがん免疫抑制作用の解明と創薬応用」(2017～2019 年度)及び革新的先端研究開発支援事業(インキュベータータイプ)LEAP「リゾリン脂質メディエーター研究の医療応用」(2017～2021 年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

本研究者らが開発した G タンパク質共役型受容体(GPCR)活性化測定法を用いて、酸化リン脂質に反応性を示す新規 GPCR を同定し、その生化学的特性を明らかにし、動脈硬化促進機能を持つことを示した^[1]。

LPA シグナルは産生酵素、受容体、分解酵素によってその作用部位が厳密に制御されており、この制御が血管形成に重要であることを明らかにした^[2]。

LPS の構造類似体を合成し、2 種の新規 GPCR に特異的かつ LPS に比べ 1000 倍高い活性の作動薬を創製することに成功した^[3]。

LPA 受容体 LPA₃ の子宮内膜増殖への関与を明らかにし、子宮内膜症の治療薬としての LPA₃ 拮抗薬を探索しリード化合物を得た^[4]。

上記研究も含めて詳細は第 4 章で記述する。

②社会・経済への波及効果

ATX ががんの新たな分子標的になるという知見は、新たな抗がん剤の開発につながり、経済的な貢献の可能性も期待される。

その他の波及効果等の詳細は第 4 章に記述する。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Inoue A., Ishiguro J., Kitamura H., Arima N., Okutani M., Shuto A., Higashiyama S., Ohwada T., Arai H., Makide K., Aoki J. “TGF α shedding assay: An accurate and versatile method for detecting GPCR activation”, *Nature Methods*, 2012, 9(10), 1021–1029.
- [2] Yukiura H., Hama K., Nakanaga K., Tanaka M., Asaoka Y., Okudaira S., Arima N., Inoue A., Hashimoto T., Arai H., Kawahara A., Nishina H., Aoki J. “Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish”, *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(51), 43972–43983.
- [3] Ikubo M., Inoue A., Nakamura S., Jung S., Sayama M., Otani Y., Uwamizu A., Suzuki K., Kishi T., Shuto A., Ishiguro J., Okudaira M., Kano K., Makide K., Aoki J., Ohwada T. “Structure-activity relationships of lysophosphatidylserine analogs as agonists of G-protein-coupled receptors GPR34, P2Y10, and GPR174”, *Journal of Medical Chemistry*, 2015, 58(10), 4204–4219.
- [4] Aikawa S., Kano K., Inoue A., Wang J., Saigusa D., Nagamatsu T., Hirota Y., Fujii T., Tsuchiya S., Taketomi Y., Sugimoto Y., Murakami M., Arita M., Kurano M., Ikeda H., Yatomi Y., Chun J., Aoki J. “Autotaxin-lysophosphatic acid-LPA₃ signaling at the embryo-epithelial boundary controls decidualization pathways”, *EMBO Journal*, 2017, 36(14), 2146–2160.

3.1.2 二次代謝酵素の機能開拓と新規生物活性物質の創製(阿部郁朗)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

天然物の基本骨格を構築する二次代謝酵素の広範な基質特異性と潜在的触媒能力を活用することにより、効率的な物質生産が可能になり、また、酵素タンパクの合理的な触媒機能の改変により、更なる分子多様性と新規骨格の創出が期待される(図3-2)。本研究は、人為的な酵素機能の制御と分子多様性創出の格好のモデルである植物Ⅲ型ポリケタイド合成酵素(PKS)に着目した。今回、この特異な酵素のX線結晶構造解析により、基質及び生成物特異性を決定する酵素活性中心構造の解明、さらに合理的な変異の導入により、C₂単位縮合数の拡大、非天然型炭素-炭素結合の形成、また、芳香環縮合系の構築など酵素触媒機能の操作を行った³。



図 3-2 生合成リデザイン：

狙ったものを正確に作る、天然物をしのぐ新規格の機能分子の大量安定供給の実現⁴

②期間中の研究成果

(i) アロエ由来新規触媒活性を有する植物ポリケタイド合成酵素

ポリケタイドを豊富に産生する薬用植物キダチアロエ (*Aloe arborescens*) から新規Ⅲ型 PKS 酵素、ペンタケタイドクロモン合成酵素 (PCS) 及びオクタケタイド合成酵素 (OKS) を単離した。両酵素は、植物に普遍的に存在するフラボノイド生合成の鍵酵素となるカルコン合成酵素 (CHS) とはアミノ酸レベルで60%程度の配列相同性を示すものの、クマロイルCoAを基質とするカルコンの合成能は示さず、代わりにそれぞれ5分子あるいは8分子のマロニルコエンザイムA (CoA) を直接縮合して芳香族ポリケタイドを生成した³。

(ii) ポリケタイド鎖長と生成物特異性の制御

これらPCS、OKSにおいては、CHSの触媒残基Cys164、His303、Asn336が全て保存されてい

³ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/abe.html>

⁴ <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/letter1.pdf>

る一方で、活性中心キャビティを構成する三つのアミノ酸残基Thr197、Gly256、Ser338(CHSのナンバリング)が置換されているのが特徴的であった。これらの残基に部位特異的の変異を導入することにより、酵素活性に及ぼす影響を調べた結果、酵素活性が劇的に変化して、単一アミノ酸残基の置換によってPCSとOKSの酵素機能が相互変換した。この結果から、酵素活性中心キャビティを構成する、化学的に不活性な、単一アミノ酸残基側鎖の立体的な嵩高さに応じて、ポリケタイド鎖伸長ポケットの大きさとマロニルCoAの縮合数が決定されることが明らかになった。Ⅲ型PKSにおけるこのような縮合数の制御と分子多様性の創出はこれが最初の報告である^{[1],3}

(iii) 結晶構造に基づく触媒機能の拡張と新規骨格創出

PCSとCHSのX線結晶構造の比較から、両酵素はタンパク全体ではほぼ同一の立体構造を共有するが、活性中心キャビティの大きさはPCSの方が明らかに小さく、こうしたキャビティの大きさと形状の違いが、酵素反応の基質及び生成物特異性を決定することが示された。PCS野生型とM207G変異型の構造の比較により、Met207をGlyに置換することで、実際にキャビティの大きさが劇的に変化することが示された。活性中心キャビティを構成する3アミノ酸残基のうち、197番の残基以外にも、256番と338番の残基(CHSのナンバリング)が酵素反応の基質と生成物特異性の決定に重要な役割を担うことを明らかにした。活性部位キャビティを広げてやることにより、9分子のマロニルCoAを縮合して、これまでに例のない非天然型新規化合物が生成されることを見いだした。単純な構造のⅢ型PKSによるマロニルCoA9分子の縮合はこれが最初の例であり、しかも変異の導入により、芳香環縮合系の合成能を新たに獲得した点は特徴的である^{[2], [3],3}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Abe I., Watanabe T., Lou W., Noguchi H. “Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase”, *FEBS Journal*, 2006, 273(1), 208-218.
- [2] Morita H., Kondo S., Oguro S., Noguchi H., Sugio S., Abe I., Kohno T. “Structural insight into chain length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from *Aloe arborescens*”, *Chemistry & Biology*, 2007, 14(4), 359-369.
- [3] Abe I., Morita H., Oguro S., Noma H., Wanibuchi K., Kawahara N., Goda Y., Noguchi H., Kohno T. “Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: Formation of an unnatural nonaketide naphthopyrone”, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(18), 5976-5980.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「二次代謝酵素の結晶構造解析を基盤とする酵素機能の開拓と物質生産」(2008～2010年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「メロテルペノイド生合成アセンブリーラインの解明と制御」(2010～2014年度)、基盤研究(A)「二次代謝酵素の機能制御と物質生産」(2011～2014年度)、基盤研究(B)「海綿由来生物活性物質の生合成遺伝子の収集調査と生合成機構の解明」(2014～2017年度)及び新学術領域研究(研究領域提案型)生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学「人工生合成マシナリーの合理的再構築による次世代天然物化学」(2016～2020年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

キダチアロエ由来OKSの結晶構造解析に基づく合理的な変異の導入により、マロニルCoA12分子の縮合による非天然型新規ポリケタイドを生産し、人工基質を用いた非天然型新規ピリドイソインドール骨格を創出した。また、ダイオウ由来Ⅲ型PKSベンザルアセトン合成酵素(BAS)はジケタイドの骨格を構築する酵素で、これにアミノ酸CoAチオエステルを作用させることにより生物活性テトラミン酸誘導体を創出した。さらにBASの結晶構造解析、酵素反応機構の解明も行った。Ⅲ型PKSによるジケタイドへの触媒機構を解明したのは、これが最初の例であり、しかも酵素反応中間体構造の取得に成功した^{[1],5}。

テルペノイドとポリケタイドの構造を併せ持つメロテルペノイドに注目し、糸状菌由来メロテルペノイドの生合成遺伝子クラスターの同定、その遺伝子異種発現・物質生産系を構築した。また、これらの生合成アセンブリーライン(図3-3)に、メロテルペノイドの構造多様性を生み出す新規膜結合性環化酵素や多機能型酸化酵素などを見だし、その反応機構を明らかにした^{[2],6}。

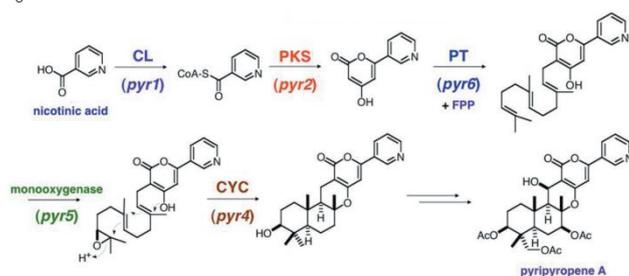


図3-3 メロテルペノイド pyripyropene A の生合成アセンブリーライン⁷

X線結晶構造解析を基盤として、タンパク工学の手法を駆使することにより、二次代謝酵素の更なる酵素触媒機能の拡張に成功した。また、人工基質を作用させることなどにより、新規超天然型天然物を創出し、さらに、カリクリン、テレオシジン、アンチマイシンなどの

⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20310136/>

⁶ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-22108004/>

⁷ <http://kanaya.naist.jp/machinery/NEWSLETTERN01.pdf>

複雑骨格生物活性二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターのクローニングと生合成マシナリーの解明に成功した^{[3],8}。

これまでに2万以上の生物活性物質が報告されている海綿に注目し、その生物活性物質生合成遺伝子クラスターの単離、比較検討を行った^{[4],9}。

人為的な機能制御と分子多様性創出の格好な材料である、ポリケタイド、メロテルペノイド生合成触媒酵素について、X線結晶構造解析などにより、触媒機構の立体構造基盤を確立し、これに基づき酵素機能を合理的に改変、操作し、これらを組み合わせた人工生合成マシナリーの合理的再構築により、天然物をしのぐ新規希少有用物質の大量安定供給を実現することを目指している⁴。

②社会・経済への波及効果

人為的な酵素機能制御と分子多様性創出の格好の材料ともいえる、植物ポリケタイド合成酵素の立体構造解明は今後、更なる酵素機能の改変や物質生産への応用により、抗がん剤など新しい医薬品の開発につながるものと期待される。また、資源が枯渇しつつある現代にあって、生合成反応を利用した効率的な物質生産が重要になり、取得した天然物生合成遺伝子クラスターを微生物に異種発現、醗酵生産させることにより、希少有用天然物の大量、安定供給が可能になる。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Morita H., Shimokawa Y., Tanio M., Kato R., Noguchi H., Sugio S., Kohno T., Abe I. “A structure-based mechanism for benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(2), 669–673.
- [2] Itoh T., Tokunaga K., Matsuda Y., Fujii I., Abe I., Ebizuka Y., Kushiro T. “Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases”, *Nature Chemistry*, 2010, 2(10), 858–864.
- [3] Wakimoto T., Egami Y., Nakashima Y., Wakimoto Y., Mori T., Awakawa T., Ito T., Kenmoku H., Asakawa Y., Piel J., Abe I. “Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont”, *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(8), 648–655.
- [4] Takeshige Y., Egami Y., Wakimoto T., Abe I. “Production of indole antibiotics induced by exogenous gene derived from sponge metagenomes”, *Molecular BioSystems*, 2015, 11(5), 1290–1294.

⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23241068/>

⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26303005/>

④その他

本研究者は研究終了後に、FAOBMB Osamu Hayaishi Lecture Award(2015 年)、住木・梅津記念賞(2017 年)、及び日本生薬学会学会賞(2017 年)を受賞している。

3.1.3 オーファン受容体の脂質天然リガンドの探索(石井聡)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

哺乳動物では数百種類存在し、タンパク質の中で最大のスーパーファミリーを形成しているGタンパク質共役型受容体(GPCR)は、7回の膜貫通部位を持ち、細胞膜上に存在して多彩な細胞内シグナルを惹起する。GPCRは、外来刺激(匂い、フェロモン、味、光など)に反応するものと、生体代謝産物(天然リガンド:脂質、ペプチド、アミン、核酸など)に反応するものに大別される(図3-4)。後者のGPCRはヒトの生理現象や病態に重要な役割を果たしていると考えられ、事実、市販薬の多くは天然リガンドに反応するGPCRを標的としている。ヒトゲノム解析の結果から100を超えるリガンド不明のGPCR(オーファンGPCR)の存在が明らかになったが、一部の脂質はこのオーファンGPCRを介して病態生理学的に強い影響を生体へ及ぼしている可能性が高い。そこで本研究は、オーファンGPCRの脂質天然リガンドの発見(脱オーファン化)を目的とした。さらにそのGPCRの生物学的機能を解析することにより、関連疾患を解明することに加え、新規薬剤の開発を介して疾患治療に貢献する可能性を模索した¹⁰。

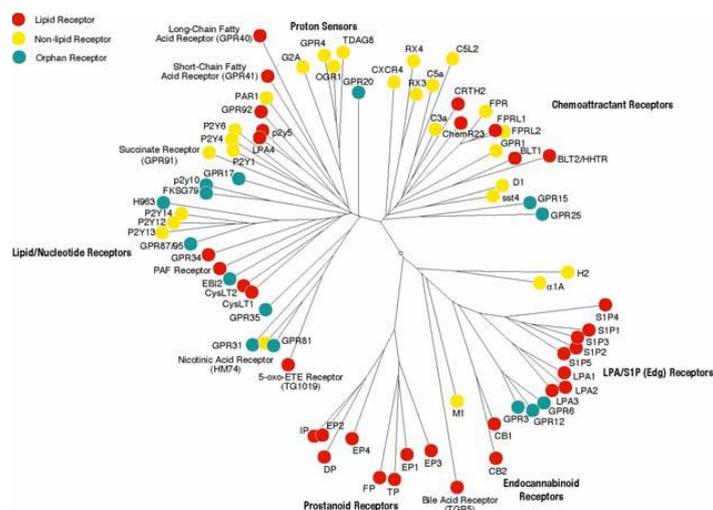


図 3-4 種々のヒト GPCR のアミノ酸配列を基に構築した系統樹¹⁰

② 期間中の研究成果

(i) P2Y5 受容体の脱オーファン化

本研究の対象となる「脂質をリガンドとすることが予想される」オーファンGPCR候補(約20種類)の安定発現細胞を樹立し、それぞれに対して約200種類の脂質分子を作用させ、細胞に及ぼす変化を観察した。その結果、オーファンGPCRの一つであるP2Y5を安定発現した細胞

¹⁰ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/ishii.html>

において、リゾホスファチジン酸(LPA)が神経突起退縮、小疱形成を引き起こすことが判明し、P2Y5が新規LPA受容体であることを明らかにした。またP2Y5はG13タンパク質と共役して細胞形態を調節する機能を持つことが示唆された。さらに、P2Y5は血管内皮細胞における形態変化を通して血管透過性の調節因子として働く可能性が示された。P2Y5のリガンド指向性に関しては2-アシルLPAの方が1-アシルLPAよりも高く、この結果は共に毛包の内根鞘に発現するP2Y5又はmPA-PLA₁の欠損が毛髪成長異常に至ることと矛盾しないと考えられた。LPAは多彩な生理機能を発揮する脂質メディエーターで、現在までに5種類のGPCR(LPA1-LPA5)が明らかになっている。本研究の結果はP2Y5の生物学的機能の一端を明らかにしたと同時に、P2Y5が第6番目のLPA受容体LPA6と命名できる分子であることを示した^{[1],10}。

(ii) LPA4 受容体の機能解析

神経細胞におけるLPA4の機能を評価するために、LPA4を安定発現したB103細胞における細胞内シグナル伝達経路の解析をLPA1を比較対象として行った。その結果、LPA4はLPA1と同様にG_qとG_{12/13}と共役する一方で、LPA1とは異なりG_{i/o}とは共役しておらず、この性質の違いが、細胞形態変化の違いをもたらすと考えられた。すなわち、LPA4細胞はLPAに反応して顕著な細胞形態変化、神経突起の退縮及び細胞凝集を示したが、一方、LPA1細胞はLPA刺激時に扁平化及び分散化に至った。しかし、G_{i/o}の活性を阻害したLPA1細胞は、LPA4細胞のように凝集化するようになったことから、LPA1細胞ではG_{i/o}によって活性化されたRacがRhoの活性を抑制するため、ふだんはG_{12/13}からの細胞内シグナルがマスクされていることが示唆された。以上の結果から、LPA4はLPA1とは異なった細胞内シグナルを介して、発生期の神経細胞移動、さらには神経回路のリモデリングやシナプスの可塑性などに対して独特の機能を発揮している可能性が示唆された^{[2],10}。

(iii) プロトン感知性 G タンパク質共役型受容体 TDAG8 の機能

TDAG8は、従来リゾ脂質性シグナル分子受容体として同定されたが、細胞外pH(プロトン)も感知する機能を持つ。しかし、その生理機能はほとんど解明されていなかった。そこで、プロトンセンサー機能を保証するGタンパク質シグナルの特定とその機能を解析し、TDAG8が細胞外pH低下によるマクロファージからのリポポリサッカライド誘起の炎症性サイトカイン分泌の抑制に関与することが判明した^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Yanagida K., Masago K., Nakanishi H., Kihara Y., Hamano F., Tajima Y., Taguchi R., Shimizu T., Ishii S. “Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6”, 2009, 284(26), 17731-17741.
- [2] Yanagida K., Ishii S., Hamano F., Noguchi K., Shimizu T. “LPA4/p2y9/GPR23 mediates Rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line”,

Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(8), 5814-5824.

- [3] Mogi C., Tobo M., Tomura H., Murata N., He X.-D., Sato K., Kimura T., Ishizuka T., Sasaki T., Sato T., Kihara Y., Ishii S., Harada A., Okajima F. “Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages”, Journal of Immunology, 2009, 182(5), 3243-3251.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「プロトン感知性Gタンパク質共役型受容体TDAG8による生体制御」(2008～2010年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「液性免疫を調節する脂質メディエーターの探索」(2011～2012年度)、基盤研究(B)「脂質メディエーター受容体を標的とした創薬基盤」(2011～2013年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「新規リゾホスファチジン酸受容体群による病態制御機構の解明」(2013～2014年度)及び基盤研究(B)「三量体Gタンパク質 $G_{12/13}$ を介した生理活性脂質の生体制御」(2016～2018年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

細胞外pH感知性GPCRであるTDAG8が肺での腫瘍形成を促進することを見いだした(図3-5)。TDAG8はヒトの細胞株や腫瘍組織で発現の亢進が認められることから、腫瘍内で酸性化した細胞外pHによって活性化されたTDAG8が細胞の生存や増殖を促し、腫瘍形成の進展につながることを示唆された^{[1],11}。



図 3-5 TDAG8 による肺での腫瘍形成の促進¹¹

骨代謝における細胞外pH感知性GPCRの機能を調べるため、卵巣摘出術後の骨欠損時の破骨細胞活性におけるTDAG8の役割を評価した。骨ミネラル含有量を観察することにより、TDAG8遺伝子のホモ接合体突然変異マウスで骨吸収が有意に悪化することが分かった。さらに、ホモ接合体マウス由来の破骨細胞は、ヘテロ接合体マウス由来の破骨細胞よりもインビトロでカルシウムを再吸収した。酸性条件下での破骨細胞形成の障害は、TDAG8突然変異における培養骨髄細胞で改善され、細胞外酸性化は、TDAG8-Rhoシグナル伝達経路を介して破

¹¹ <https://kaken.nii.ac.jp/file/KAKENHI-PROJECT-20590305/20590305seika.pdf>

骨細胞の細胞形態を変化させた。これらの結果は、TDAG8機能の増強が、骨粗鬆症のような骨吸収疾患を予防するための新しい戦略であることを示唆した^[2]。

骨吸収性疾患に関連すると思われるGPCRを網羅的に解析した結果、その中の一つ、ロイコトリエン受容体の遺伝子抑制により骨吸収を抑制できることを見いだした。また、他の複数のGPCRについても骨疾患との関連性について解明を進めた¹²。

オーファン受容体であるEpstein-Barr virus induced molecule-2 (EBI2)の内在性脂質リガンドの同定を試みたが、他の研究者による報告があり、7,25-ジヒドロキシコレステロールをリガンドとして追試確認した¹³。

白色脂肪細胞においてLPA4がRhoとRhoキナーゼ系を介してミトコンドリア増殖抑制シグナルを送り、脂肪細胞の分化を抑制する作用があることを明らかにし、化合物ライブラリーからLPA4アンタゴニストのスクリーニングも行った。本研究者らは先に、LPA4が2型糖尿病の増悪化に関与していることを明らかにしている¹⁴。

骨髄間質細胞に発現するLPA4が造血幹細胞ニッチの機能を持つ可能性について検討した。その結果、骨髄抑制ストレス後の回復期において骨髄間質細胞が産生するSCF等のサイトカインは造血回復のための重要因子であるが、LPA4が間葉系幹細胞においてSCFの産生を制御することによって、造血に寄与する可能性が示唆された^{[3],15}。

高内皮細動脈(HEV)を介したリンパ球移動の分子機構に関し、LPA受容体の影響を解析した。その結果、LPA4欠損マウスではリンパ球の移動が抑制されていたが、LPA6欠損マウスでは有意な変化は見られなかった。以上から、LPA4を介したシグナルがリンパ球のHEV内皮細胞層の通過を正に制御していることが示唆された^[4]。

②社会・経済への波及効果

天然リガンドに反応するGPCRはヒトの生理現象や病態に重要な役割を果たしていると考えられ、事実、市販薬の多くはこれらのGPCRを標的としており、その割合は30%とも50%ともいわれている。オーファンGPCRのリガンド探索・機能解明は創薬面における更なる発展を促すとともに、経済的発展も期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

- [1] Ihara Y., Kihara Y., Hamano F., Yanagida K., Morishita Y., Kunita A., Yamori T., Fukayama M., Aburatani H., Shimizu T., Ishii S. “The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40), 17309-17314.

¹² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20390508/>

¹³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-23116502/>

¹⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23390061/>

¹⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/en/report/KAKENHI-PUBLICLY-25116703/251167032014jisseki/>

- [2] Hikiji H., Endo D., Horie K., Harayama T., Akahoshi N., Igarashi H., Kihara Y., Yanagida K., Takeda J., Koji T., Shimizu T., Ishii S. “TDAG8 activation inhibits osteoclastic bone resorption”, *FASEB Journal*, 2014, 28(2), 871-879.
- [3] Igarashi H., Akahoshi N., Ohto-Nakanishi T., Yasuda D., Ishii S. “The lysophosphatidic acid receptor LPA4 regulates hematopoiesis-supporting activity of bone marrow stromal cells”, *Scientific Reports*, 2015, 5, 11410.
- [4] Hata E., Sasaki N., Takeda A., Tohya K., Umemoto E., Akahoshi N., Ishii S., Bando K., Abe T., Kano K., Aoki J., Hayasaka H., Miyasaka M. “Lysophosphatidic acid receptors LPA4 and LPA6 differentially promote lymphocyte transmigration across high endothelial venules in lymph nodes”, *International Immunology*, 2016, 28(6), 283-292.

3.1.4 機能性 RNA による代謝調節の分子基盤の解析 (稲田利文)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

DNA 変異等に起因する異常 mRNA は、生命活動を担うタンパク質の発現量や活性の低下を介して、様々な悪影響を細胞にもたらす可能性がある。これらの異常 mRNA に共通する性質は、翻訳終結の異常である。しかしながら、細胞の持つ品質管理機構によって異常タンパク質の発現は強く抑制され、細胞は生存可能となる。ナンセンス変異を持った mRNA は、ナンセンス変異依存分解系 (NMD) によって速やかに分解され、終止コドン自体を含まない mRNA は、ノンストップ mRNA 分解系 (NSD) により分解される (図 3-6)。本研究者らは、ノンストップ mRNA の翻訳と分解について解析し、ノンストップ mRNA 由来翻訳産物が非常に低いレベルに抑制されること、また、リボソームの動態を解析することにより、リボソームが mRNA の 3' 端で停滞する結果、ノンストップ mRNA の翻訳効率が顕著に低下することを最近明らかにした。この品質管理機構における翻訳開始以降の段階での新たな制御機構の分子メカニズムを明らかにすることを目標に解析を行った¹⁶。

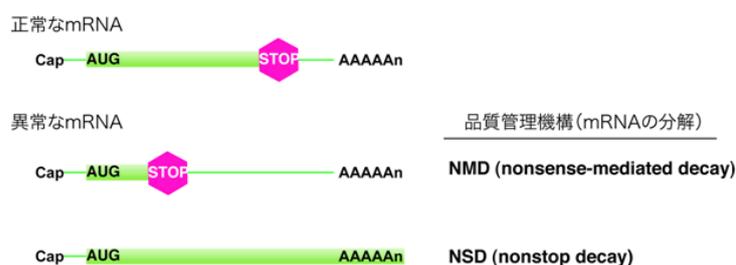


図 3-6 異常な mRNA を排除する既知の品質管理システム¹⁷

② 期間中の研究成果

(i) 代謝ストレスに応答した遺伝子発現制御と新規機能性 RNA の探索

解糖系遺伝子を始めとする多数の代謝系変異株の作成並びに確認と、網羅的な翻訳効率の解析条件を確立した。網羅的なポリソーム解析を行い、ポリソーム中の mRNA の分布の変化について解析し、候補遺伝子を探索した。代謝遺伝子欠損変異株における遺伝子発現制御については、翻訳制御に関する新たな知見は得られなかった¹⁶。

(ii) 遺伝子発現の正確性を保証する品質管理機構の解析

ノンストップ mRNA における翻訳抑制と異常タンパク質分解機構について解析を行った結果、通常翻訳されないポリ(A)鎖が翻訳され、1) 合成中のポリリジンとリボソームとの相互

¹⁶ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/inada.html>

¹⁷ <https://www.jst.go.jp/pr/info/info381/index.html>

作用による翻訳アレスト(一時停止)と、2)プロテアソームによる異常タンパク質の速やかな分解、を見いだした。この結果は、ポリ(A)鎖の翻訳自体が、多段階での発現抑制機構を作動させ、品質管理機構において必須な役割を果たすことを初めて明確に示した。真核生物のmRNAの普遍的な修飾であるポリ(A)鎖が、翻訳開始とmRNA安定性制御に加えて、品質管理機構にも重要な役割を果たすことを世界に先駆けて明らかにした^{[1], [2], 16}。

さらにポリ(A)鎖由来の連続したリジン残基のみでなく連続したアルギニン残基によっても翻訳アレストが引き起こされることが明らかとなり、塩基性新生ポリペプチド鎖の持つ正の電荷とリボソームトンネルを形成するrRNAの負の電荷の間の静電的相互作用による翻訳抑制機構が示唆された。この結果は、限定された例のみが報告されている合成途中の新生ポリペプチド鎖とリボソームトンネルとの相互作用による翻訳制御が普遍的であることを強く示唆した^{[3], 16}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Ito-Harashima S., Kuroha K., Tatematsu T., Inada T. “Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast”, *Genes & Development*, 2007, 21(5), 519-524.
- [2] Kuroha K., Tatematsu T., Inada T. “Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome”, *EMBO Reports*, 2009, 10(11), 1265-1271.
- [3] Dimitrova L.N., Kuroha K., Tatematsu T., Inada T. “Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome”, *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(16), 10343-10352.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の新学術領域研究(研究領域提案型)多様性と非対称性を獲得するRNAプログラム研究の総合的推進「遺伝子発現の正確性を保証するmRNA品質管理機構」(2008～2012年度)、基盤研究(B)「新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストにおけるRACK1の機能解明」(2010～2012年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)ユビキチンネオバイオロジー: 拡大するタンパク質制御システム「mRNA品質管理機構におけるユビキチン化の新規機能の解析」(2013～2014年度)、基盤研究(B)「異常mRNA由来のタンパク質分解促進機構の解析」(2014～2016年度)及び新学術領域研究(研究領域提案型)新生鎖の生物学「mRNAとタンパク質の品質管理機構における新生鎖の新規機能の解明」(2014～2018年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

連続した塩基性アミノ酸により引き起こされる翻訳アレストに伴い、E3ユビキチンライゲースNot4、Ltn1により新生ポリペプチド鎖が分解されることを見いだした。また、ノンストップmRNAの迅速な分解に必須なリボソームのmRNAからの解離を翻訳終結因子eRF1/eRF3複合体と相同なDom34/Hbs1複合体が担うこと、この複合体はノンストップmRNAの迅速な分解に必須であることを証明した(図3-7)。さらに、未成熟終始コドン(PTC)を持つ異常mRNAの分解促進に必須なUpf1/2/3複合体がプロテアソームによる分解を促進することを見いだした^{[1], 18}。また、翻訳アレストに起因するmRNA分子内切断に必須なE2/E3ユビキチンライゲースUbc4/He12の機能解析も行った^{[2], 19}。

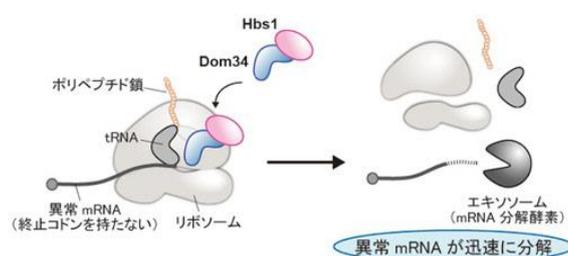


図 3-7 ノンストップ mRNA の除去機構^[1]

新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストに必須な分子として、RACK1を同定し、この分子の40Sリボソームへの結合が翻訳アレストに重要であることを示した^{[3], 20}。

ナンセンス変異を持つ異常mRNA由来の短鎖型タンパク質分解機構を解析し、Upf複合体による短鎖型タンパク質の分解促進にはユビキチン化が必須であることを示した。また、Hsp70のADP/ATP交換因子であるSse1がUpf1による短鎖型タンパク質の分解促進に必要であることが判明した^{[4], 21}。

さらに特異的配列を持つ新生鎖による翻訳アレストの分子機構の解明、アレストによる新生鎖分解と切断におけるE3ユビキチンライゲースHe12の機構解析、フォールディングか分解かの新生鎖の運命決定機構とmRNA品質管理因子の機能解析を進めた²²。

②社会・経済への波及効果

遺伝子疾患の原因変異は数多く同定されているが、ほとんどの遺伝病についていまだ治療法は確立されていない。異常mRNAに由来する異常タンパク質は、細胞の正常な機能を阻害する可能性があり、品質管理機構で発現が抑制されると考えられる。ヒトの遺伝病の主要な原因変異であるナンセンス変異は、異常な位置での翻訳終結を引き起こし、この異常mRNA

¹⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-20112006/>

¹⁹ http://ubiquitin.jp/newsletter/ubiquitin_neobiology_nl_voll.pdf

²⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-22370062/>

²¹ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-26291002/>

²² http://www.pharm.tohoku.ac.jp/nascentbiology/pdf/newsletter/ncb_01.pdf

は NMD によって認識され、迅速に分解される。本研究者らはナンセンス変異異常 mRNA から合成される異常タンパク質のプロテアソームによる分解が、NMD 因子によって促進されることを見いだした。このように、この分野の研究の進展は、遺伝病の治療薬の開発につながる可能性がある。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Tsuboi T., Kuroha K., Kudo K., Makino S., Inoue E., Kashima I., Inada T. “Dom34:Hbs1 plays a general role in quality control systems by dissociation of stalled ribosome at 3’ end of aberrant mRNA” , *Molecular Cell*, 2012, 46(4), 518-529.
- [2] Kuroha K., Akamatsu M., Dimitrova I., Ito T., Kato Y., Shirahige K., Inada T. “RACK1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest” , *EMBO Reports*, 2010, 11(12), 956-961.
- [3] Matsuda R., Ikeuchi K., Nomura S., Inada T. “Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast” , *Genes to Cells*, 2014, 19(1), 1-12.
- [4] Sugiyama T., Nobuta R., Ando K., Matsuki Y., Inada T. “Crucial role of ATP-bound Sse1 in Upf1-dependent degradation of the truncated product” , *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 488(1), 122-128.

3.1.5 「肥満症」におけるエネルギー・脂質代謝制御と血管新生制御との連関の解明(尾池雄一)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

近年、脂肪組織、骨格筋、肝臓、消化管、脳、血管、血球細胞などが様々な生理活性物質を分泌して遠隔臓器、細胞の機能を調節する臓器間クロストークによる生体防御システムが注目されている。本研究者らの研究により、アンジオポエチン様タンパク質 (ANGPTL: Angiopoietin-like protein) ファミリー分子が個体レベルで様々な遠隔臓器を標的とし、多彩な機能を示すことが明らかになってきた(図 3-8)。本研究では、メタボリックシンドロームの基盤病態の一つである「内臓脂肪型肥満」を研究対象に、発症、進展への生体防御機構に ANGPTL ファミリー分子がどのように関わっているかを解明し、新規治療法、診断法開発を目指した基礎研究を行った。また生体の脂質蓄積・分解・燃焼・消費システムにおける恒常性維持の分子基盤解明、さらには新しい代謝過程の発見、新しい生理活性代謝産物の同定、血管新生制御とエネルギー、脂質代謝制御の連関解明、新規創薬標的の特定を目指した

²³。

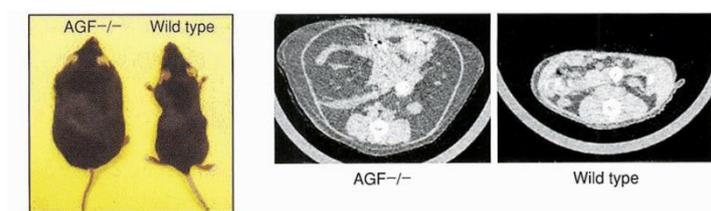


図 3-8 AGF/ANGPTL6 ノックアウトマウス (AGF^{-/-}) の体重増加
生後 8 か月齢の外見(左)、CT による内臓脂肪所見(右)の比較²⁴

② 期間中の研究成果

(i) AGF/ANGPTL6 に関する成果

AGF/ANGPTL6による血管新生促進とエネルギー代謝制御の連関解明を目的として研究を行った結果、マウス下肢虚血モデルを用いた研究により、強力な血管新生因子である血管内皮細胞増殖因子(VEGF)と遜色なく、AGF/ANGPTL6により新規な血管新生と側副血行路の形成が促進されることにより、虚血改善が認められ、血管再生医療への血管新生因子としてのAGF/ANGPTL6の機能が明らかになった。また、AGF/ANGPTL6の血管新生因子としての機能にはERK-eNOS-NO経路²⁵の活性化が重要であることを見いだした。AGF/ANGPTL6の血管新生作用と

²³ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/oike.html>

²⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778720>

²⁵ 細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)-内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)-一酸化窒素(NO)経路

代謝作用(抗肥満作用)には何らかのリンクが存在していると考えられるが、基本的にはAGF/ANGPTL6の代謝作用(抗肥満作用)は、血管新生に非依存的に発揮されることを見いだした。メタボローム解析により、AGF/ANGPTL6の遺伝子欠損マウスが示す内臓脂肪型肥満の特徴としては、①肝臓のリン脂質及びトリグリセリドにおいて、飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸に対して多価不飽和脂肪酸(PUFA)の比率が減少する、②PUFAの中でもエイコサペンタエン酸はアラキドン酸やドコサヘキサエン酸に比べて比率が高い、③内臓脂肪のトリグリセリドの解析から、酸化型トリグリセリドが蓄積されており、肥満発症時にこれが増加傾向にあることなどが判明した。肥満の脂肪組織における脂質成分及び酸化状態の改善が内臓脂肪型肥満に伴うメタボリックシンドロームの新規治療標的になる可能性が考えられた^{[1],23}。

(ii) ANGPTL2 に関する成果

血管新生因子ANGPTL2とメタボリックシンドローム病態との関連を検討した結果、血中ANGPTL2濃度が糖尿病患者では、内臓脂肪面積、インスリン抵抗性、CRP値と正相関し、インスリン感受性とは負に相関することを見いだした。また、血管内皮細胞、マクロファージの走化性の促進、Racの活性化、また、NF- κ Bを活性化させ炎症シグナルの活性化にも寄与していた。以上の結果より、ANGPTL2シグナルが炎症性変化を伴う血管新生、骨髄由来の炎症性細胞の浸潤促進を介して肥満に伴う脂肪組織リモデリング促進に寄与していることが明らかになり、ANGPTL2シグナルを減弱させることが肥満に伴う脂肪組織の炎症、糖代謝異常に対する新たな治療戦略になることを見いだした²³。

(iii) ANGPTL4 に関する成果

脂質代謝及びアテローム性動脈硬化症におけるANGPTL4の機能をその欠損マウスを用いて解析した結果、トリグリセリドレベルの低下、動脈硬化病変の減少、マクロファージの泡沫細胞化の有意な減少が見られた。以上から、ANGPTL4欠損はアテローム性動脈硬化の発症・進行を防ぎ、マクロファージの泡沫細胞化も強く抑制することが判明した^[2]。

(iv) その他の成果

脂肪組織リモデリングにおける骨髄由来細胞の役割を明らかにするために、細胞周期を抑制的に制御するユビキチンリガーゼFbxw7の骨髄細胞特異的遺伝子欠損マウスを解析した結果、高脂肪食負荷による肥満や、メタボリックシンドロームになりにくいことを見いだした。予想外にこの欠損マウスは、約半数がT細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)を発症し、このマウスの白血病細胞は、その中に白血病幹細胞の存在が示唆された。さらに日本人のT-ALLの44症例中8症例でFbxw7の遺伝子変異が存在することも確認し、Fbxw7が造血幹細胞を細胞周期の静止期にとどめ、過剰な細胞分裂に伴う造血幹細胞の枯渇を未然に防ぐとともに白血病発症を阻止する安全弁としても機能していることを明らかにした^{[3],23}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Urano T., Ito Y., Akao M., Sawa T., Miyata K., Tabata M., Morisada T., Hato T., Yano M., Kadomatsu T., Yasunaga K., Shibata R., Murohara T., Akaike T., Tanihara H., Suda T., Oike Y. “Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model”, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2008, 28(5), 827-834.
- [2] Adachi H., Fujiwara Y., Kondo T., Nishikawa T., Ogawa R., Matsumura T., Ishii N., Nagai R., Miyata K., Tabata M., Motoshima H., Furukawa N., Tsuruzoe K., Kawashima J., Takeya M., Yamashita S., Koh G.Y., Nagy A., Suda T., Oike Y., Araki E. “Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379(4), 806-811.
- [3] Matsuoka S., Oike Y., Onoyama I., Iwama A., Arai F., Takubo K., Mashimo Y., Oguro H., Nitta E., Ito K., Miyamoto K., Yoshiwara H., Hosokawa K., Nakamura Y., Gomei Y., Iwasaki H., Hayashi Y., Matsuzaki Y., Nakayama K., Ikeda Y., Hata A., Chiba S., Nakayama K.I., Suda T., “Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL”, *Genes & Development*, 2008, 22(8), 986-991.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「ANGPTLシグナル制御による心血管病・メタボリックシンドロームの治療戦略」(2009～2010年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「スフィンゴ脂質と病態代謝の分子基盤」(2010年度)、基盤研究(B)「心臓モデリングとその変容による心不全発症・進展の分子機構解明」(2014～2016年度)、さらに、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「生活習慣病とがんの共通分子病態解明による健康長寿社会実現を目指した基盤研究」(2010～2013年度)、AMED-CREST生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出「組織修復に基づく恒常性維持機構の変容による生活習慣病の病態解明と制御」(2013～2018年度)、JST大学発新産業創出プログラム(START)「プロジェクト支援型」「ANGPTL2を標的とする画期的心不全等遺伝子治療薬の開発」(2017～2019年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

セラミドからスフィンゴミエリン(SM)を合成する酵素スフィンゴミエリン合成酵素1(SMA1)を欠損させたマウス(SMA1-KOマウス)で見られる「痩せ」の表現型の原因とされる脂肪組織の機能異常を調べた結果、脂肪組織におけるセラミド量の増加に伴う酸化ストレス

の亢進と細胞死が「痩せ」の原因であると推定された。また、この欠損マウスの表現型が、抗酸化ストレス剤(N-アセチルシステイン、NAC)の投与により、生後死亡率の改善、脂肪組織の萎縮の若干の改善、高グリセリド血症の改善が明らかになった^{[1], 26, 27}。

肥満の脂肪組織に由来するANGPTL2が持続的高発現だけでなく、血管内皮細胞における局所的高発現が動脈硬化性疾患の発症や進展に直接関与している可能性を示し、KOマウスの解析から、血管における局所的なANGPTL2発現誘導が大動脈瘤や内膜肥厚の病態形成及び進展に寄与していることが示唆され、これらの病態の治療標的になる可能性が示された²⁸。

さらに、ANGPTL2の発現には概日リズムが存在し、これが概日時計機構により制御されていること、概日時計機構の破綻によるANGPTL2の高発現が、発がんや生活習慣病の発症・進展の共通の分子基盤になっていることが示された(図3-9)。また、がん微小環境によってがん細胞が高い転移能を獲得する分子機構として、脱メチル化によりANGPTL2の発現が誘導され、がん細胞の転移が促進されることを明らかにした。さらに、ANGPTL2を不活性化する分解酵素TLL1を発見し、ANGPTL2の分解を標的とした新規がん転移抑制法の開発につながることを期待される^{[2], 29}。

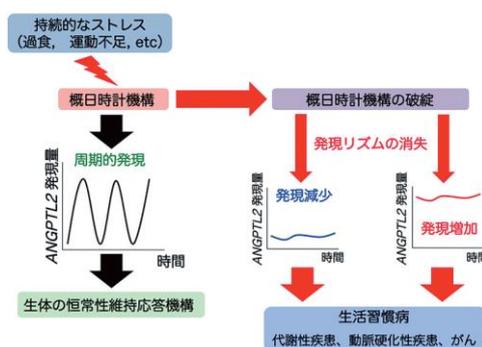


図 3-9 概日時計機構による ANGPTL2 の発現制御：持続的なストレスによる概日時計機構の破綻が生活習慣病の発症や進展につながる²⁹

老化や圧負荷などのストレスにより、心筋細胞において ANGPTL2 の発現が誘導され、その結果、心筋細胞における AKT の分解が促進され、SERCA2A の発現が低下し、カルシウムイオン濃度の調節機能が低下することで、心臓の収縮力低下、さらにミトコンドリア生物学的活性の低下により心筋細胞のエネルギーホメオスタシスの変容がもたらされ、心不全病態の発症は促進されることが明らかになった^{[3], 30}。また、一連の仕事から心肥大・心不全病態に関連する複数の重要な新たな遺伝子の同定に成功し、新規心不全治療薬の開発につながる

²⁶ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20659127/>

²⁷ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23590340/>

²⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21390245/>

²⁹ http://www8.cao.go.jp/cstp/sentan/jisedai/seika/51s_98.pdf

³⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26293190/>

ことが期待される。

造血幹細胞ニッチにおいてANGPTL2が造血幹細胞やPD-1+CD4+メモリーT細胞において高発現しており、一方、ANGPTL2の受容体の一つであるPirBはlineage marker陽性細胞に豊富に発現していることを明らかにした。さらに、造血幹細胞におけるANGPTL2の発現はほかの造血幹細胞老化マーカー遺伝子同様に加齢に伴い上昇することや、KOマウスを用いた解析から、ANGPTL2シグナル亢進が造血幹細胞を負に制御している可能性が示唆された³¹。

恒常性維持応答機構において、組織修復や免疫応答の調節因子として機能することが明らかになったANGPTLに着目し、恒常性維持機構の過剰反応や応答不全に起因する生活習慣関連疾患の新規予防・診断・治療法の開発に向けた基盤技術の創出を目指した。ANGPTL2が乳がんの骨転移を促進すること、また、抗がん剤に対するがん細胞の抵抗性獲得に関与していることを明らかにした^{[4], 32}。

②社会・経済への波及効果

本研究により慢性炎症を基盤とした生活習慣病の発症・発がんに関与することが明らかになり、これらの病態の治療標的になる可能性が示された。また、ANGPTL2を不活性化する分解酵素も発見され、ANGPTL2の分解を標的とした新規がん転移抑制法の開発につながることを期待される。さらに、過剰なANGPTL2シグナルが慢性炎症をもたらすほかに、エネルギーホメオスタシスの変容・破綻にも関与することが明らかとなった。老化関連疾患が、責任細胞のエネルギーホメオスタシスの変容・破綻を起因とすることから、過剰なANGPTL2シグナルがこれらの疾患の治療標的になる可能性が示された。過剰なANGPTL2シグナルの抑制に向けた遺伝子治療の開発なども進んでおり、JST 大学発新産業創出プログラム (START) 支援によるベンチャー企業の実設が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Tabata M., Kadomatsu T., Fukuhara S., Miyata K., Ito Y., Endo M., Urano T., Zhu H.J., Tsukano H., Tazume H., Kaikita K., Miyashita K., Iwakaki T., Shimabukuro M., Sakaguchi K., Ito T., Nakagata N., Yamada T., Katagiri H., Kasuga M., Ando Y., Ogawa H., Mochizuki N., Itoh H., Suda T., Oike Y.
“Angiopoietin-like Protein 2 Promotes Chronic Adipose Tissue Inflammation and Obesity-Related Systemic Insulin Resistance”, *Cell Metabolism*, 2009, 10(3), 178-188.
- [2] Aoi J., Endo M., Kadomatsu T., Miyata K., Nakano M., Horiguchi H., Ogata A., Odagiri H., Yano M., Araki K., Jinnin M., Ito T., Hirakawa S., Ihn H., Oike Y.
“Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory

³¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-15H01520/>

³² https://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/nenpou/h26/JST_1111067_13417915_2014_YR.pdf

carcinogenesis and metastasis” , Cancer Research, 2011, 71(24), 7502-7512.

- [3] Odagiri H., Kadomatsu T., Endo M., Masuda T., Morioka M.S., Fukuhara S., Miyamoto T., Kobayashi E., Miyata K., Aoi J., Horiguchi H., Nishimura N., Terada K., Yakushiji T., Manabe I., Mochizuki N., Mizuta H., Oike Y. “The Secreted Protein ANGPTL2 Promotes Metastasis of Osteosarcoma Cells Through Integrin $\alpha 5 \beta 1$, p38 MAPK, and Matrix Metalloproteinases” , Science Signaling, 2014, 7(309), ra7.
- [4] Tian Z., Miyata K., Kadomatsu T., Horiguchi H., Fukushima H., Tohyama S., Ujihara Y., Okumura T., Yamaguchi S., Zhao J., Endo M., Morinaga J., Sato M., Sugizaki T., Zhu S., Terada K., Sakaguchi H., Komohara Y., Takeya M., Takeda N., Araki K., Manabe I., Fukuda K., Otsu K., Wada J., Murohara T., Mohri S., Yamashita JK., Sano M., Oike Y., “ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism” , Nature Communications, 2016, 7, 13016.

④その他

本研究者は研究終了後、日本肥満学会学術奨励賞(2010年)を受賞している。

3.1.6 気孔開閉と細胞膜 H⁺-ATPase の活性調節機構の解明(木下俊則)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

植物の表皮に存在する気孔は、光合成に必要な二酸化炭素の唯一の取入口で、太陽光に含まれる青色光に応答して開口し、植物と大気間のガス交換を行い、乾燥ストレスに曝されると、植物ホルモン・アブシジン酸に応答して気孔を閉鎖し、植物からの水分損失を防いでいる。本研究者はこれまでに、青色光による気孔開口において、植物特有のフォトトロピンが青色光受容体として機能し、受容された光シグナルは、細胞内シグナル伝達を経て、細胞膜プロトンポンプ (H⁺-ATPase) がC末端のスレオニン残基のリン酸化とリン酸化C末端へのP14-3-3タンパク質の結合により活性化し、気孔開口の駆動力を形成していることを明らかにした(図3-10)³³。しかし、詳細については不明の点が多い。本研究では、気孔開閉のシグナル伝達機構、さらに、様々な物質輸送に関わる細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節機構について、生理・生化学的、分子遺伝学的手法を駆使し、分子レベルで解明することを目指した³⁴。

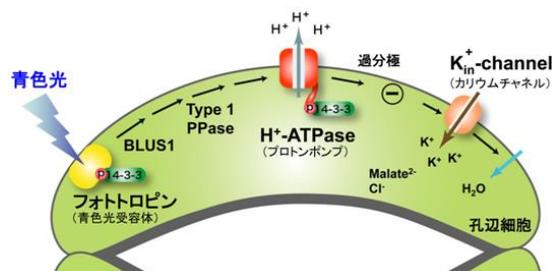


図 3-10 青色光による気孔開口の分子機構モデル³³

② 期間中の研究成果

- (i) 青色光シグナル伝達機構の解析^{[1], [2]}
- (ii) シロイヌナズナを用いた気孔開度変異体の単離
- (iii) 細胞膜 H⁺-ATPase の活性調節機構^[3]
- (iv) 孔辺細胞に特異的に発現する遺伝子の同定

上記研究の詳細は第 4 章で記述する。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Takemiya A., Kinoshita T., Asanuma M., Shimazaki K. “Protein phosphatase 1

³³ <http://plantphys.bio.nagoya-u.ac.jp/research.html>

³⁴ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/kinoshita.html>

positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(36), 13549–13554.

- [2] Inoue S., Kinoshita T., Matsumoto M., Nakayama K., Doi M., Shimazaki K. “Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(14), 5626–5631.
- [3] Hayashi Y., Nakamura S., Takemiya A., Takahashi Y., Shimazaki K.I., Kinoshita T. “Biochemical characterization of in vitro phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase”, Plant and Cell Physiology, 2010, 51(7), 1186–1196.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「気孔孔辺細胞における青色光シグナル伝達機構の解明」(2008～2010年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「環境変動に対する気孔開閉制御の分子機構」(2010～2014年度)、基盤研究(B)「オーキシシンによる細胞膜プロトンポンプの活性化機構の解明」(2011～2013年度)、基盤研究(B)「細胞膜プロトンポンプの多様な生理機能と活性制御機構の解明」(2015～2017年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)植物の成長可塑性を支える環境認識と記憶の自律分散型統御システム「環境刺激による気孔開度制御機構の解析」(2015～2019年度)、さらに、戦略的創造研究推進事業ALCA研究領域「生物資源の制御によるバイオマス・有用成分の増産」の研究課題「気孔開度制御による植物の光合成活性と生産量の促進」(2010～2019年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

気孔開度変異体の解析を進め、孔辺細胞の H⁺-ATPase のリン酸化を検出することが可能となった^[1]。

細胞膜 H⁺-ATPase の進化的解析から、植物が陸上へ進出する過程でこの H⁺-ATPase を獲得したことが示唆された^[2]。

人為的に気孔の開口を大きくすることで植物の生産量増加に成功し、気孔開度制御化合物を開発した^[3]。

光合成が、スクロースの葉への蓄積を通して、プロトンポンプのリン酸化、活性化を誘導することを明らかにした^[4]。

上記研究も含めて詳細は第4章で記述する。

② 社会・経済への波及効果

気孔の開閉機構調節技術により、農作物やバイオ燃料用植物の生産量増加、CO₂削減効果

が期待される。

その他の波及効果等の詳細は第4章に記述する。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

- [1] Hayashi M., Inoue S., Takahashi K., Kinoshita T. “Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells”, *Plant & Cell Physiology*, 2011, 52(7), 1238-1248.
- [2] Okumura M., Inoue S.-I., Takahashi K., Ishizaki K., Kohchi T., Kinoshita T. “Characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase in the liverwort *marchantia polymorpha*”, *Plant Physiology*, 2012, 159(2), 826-834.
- [3] Wang Y., Noguchi K., Ono N., Inoue S., Terashima I., Kinoshita T. “Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(1), 533-538.
- [4] Okumura M., Inoue S., Kuwata K., Kinoshita T. “Photosynthesis activates plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation”, *Plant Physiology*, 2016, 171(1), 580-589.

3.1.7 プリオン凝集体の代謝産物に着目した細胞機能制御(田中元雅)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

プリオン病はこれまでに有効な治療薬のない神経難病であり、その治療・予防法の開発は、近年のウシからヒトへのプリオン感染からも、急務となっている。プリオン感染がプリオンタンパク質の凝集体(アミロイド³⁵)に由来することが証明され、そのアミロイド構造が異なる表現型を示す酵母プリオン株³⁶の物理的基盤になっていることが明らかになった。プリオン株の異なる表現型を決定する分子機構には不明な点が多い。本研究では、ヒトのプリオン病モデルとして、酵母プリオン³⁷タンパク質 Sup35 の凝集形成によって生じるプリオン化酵母を用いて、酵母プリオン Sup35 モノマーから、凝集初期核(オリゴマー)、アミロイド、酵母表現型のグローバルな相関関係(図 3-11)の全容解明を目指した。本研究成果は、プリオン病などタンパク質のミスフォールディングや凝集体形成に関わる他の神経変性疾患の分子機序解明や新規な治療法の開発にもつながると期待される³⁸。

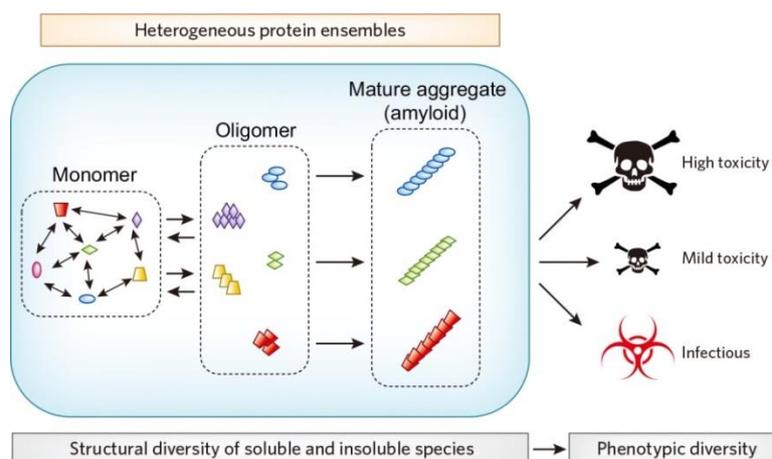


図 3-11 酵母プリオンタンパク質のモノマー・凝集体構造と細胞表現型との相関³⁹

② 期間中の研究成果

プリオンの伝搬は一般的に、プリオン凝集体の成長と分割という二つの基本的な過程の繰り返しによると考えられており、プリオン凝集体の成長速度と分割速度が細胞内プリオン

³⁵ ある特定の構造を持つ水に溶けない繊維状のタンパク質

³⁶ 同一のアミノ酸配列から成るにもかかわらず、異なる病態や性質を示す系統の各プリオン化酵母のこと

³⁷ 哺乳動物のプリオンタンパク質と相同性はないが、それらと同様の振る舞いをする酵母に存在するタンパク質

³⁸ <http://www.jst.go.jp/pr/info/info304/index.html>

³⁹ Tanaka M., Komi Y. “Layers of structure and function in protein aggregation”, Nature Chemical Biology, 2015, 11, 373-377.

の凝集量を制御するパラメーターになる。酵母内において、プリオン粒子の分割速度を測定したところ、Sup35を4°Cで重合させたSc4プリオン粒子は37°Cで重合させたSc37プリオン粒子より速く分割されることが明らかになり、前者は後者に比べてより小さかった。したがって、脆いSc4アミロイドは容易にシャペロンなどによって分断され、より多くの種を生じ、それがより多くのSup35モノマーをアミロイドへ取り込むことができるためにSup35の凝集体量が増えることが明らかになった³⁸。

Sup35の会合状態をX線小角散乱法で調べたところ、4°CのSup35タンパク質は10-20量体から成るオリゴマーを形成し、37°Cではモノマーのみが存在していることが判明した。また、このオリゴマーは、アミロイドに見られるようなβシート構造はほとんど含まず、強い表現型を出すアミロイド形成途中において、その核形成に必須であり、その後のアミロイド伸長反応の足場として働いていることが明らかになった³⁸。

オリゴマーのコアとなるアミノ酸領域を調べた結果、アミロイドのコア領域(1-35アミノ酸)とは全く異なり、80-110番目のアミノ酸領域がコアになることが判明した。つまり、一見、アミロイド内には存在しないような非天然な相互作用を利用することで、オリゴマー形成を促進させ、それによって、アミロイド生成を効率良く進行させていることが明らかになった。一方、Sc37アミロイドを形成する場合は、オリゴマーは形成されず、Sup35のモノマータンパク質が構造変化し、それが“核”になってアミロイドが形成されていくことが示唆された。このように、モノマータンパク質の微妙な構造の違いが凝集初期核や凝集経路を大きく変え、異なるアミロイド構造、異なる表現型を引き出す基礎になっていることが判明し、これらの制御が、原因タンパク質のアミロイド形成を伴う神経変性疾患の治療戦略を考える上で非常に重要であることが示唆された^{[1], [2], 38}。

また、アミロイドの線維回析に有用な、線維乾燥中に一定の湿度維持が可能なチャンバーを共同研究により開発した^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Tanaka M., Collins S.R., Toyama B.H., Weissman J.S. “The physical basis of how prion conformation determine strain phenotype”, *Nature*, 2006, 442(7102), 585-589.
- [2] Krzewska J., Tanaka M., Burston S.G., Melki R. “Biochemical and functional analysis of the assembly of full-length Sup35p and its prion-forming domain”, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(3), 1679-1686.
- [3] McDonald M., Kendall A., Tanaka M., Weissman J.S., Stubbs G. “Enclosed chambers for humidity control and sample containment in fiber diffraction”, *Journal of Applied Crystallography*, 2009, 41(1), 206-209.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(A)「酵母を用いたポリグルタミン病発症分子機構の解明」(2007～2009年度)、若手研究(A)「神経変性と精神疾患をつなぐアミロイド：ハンチントン病における精神障害機構の解明」(2010～2012年度)、基盤研究(B)「アミロイドの生成・脱凝集機構の新たなパラダイム創成」(2015～2017年度)、さらに、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「アミロイドの総合的理解によるその形成と伝播の制御」(2010～2013年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

ハンチントン病の原因タンパク質ハンチンチン凝集体(アミロイド)の多形を脳由来アミロイドから明らかにし、線条体由来アミロイドが最も高い細胞毒性を示した。したがって、ポリグルタミンのアミロイド構造がハンチントン病の疾患部位特異性を決める一つの要因であることを示した。また、ハンチントン病モデルマウスの脳において、ハンチンチン凝集体の中に家族性精神障害の原因タンパク質 DISC1 が取り込まれ、ハンチンチン凝集化が著しく加速されることを見いだした。この結果から、ハンチンチン凝集体の存在下で、DISC1の凝集化によるその機能低下がハンチントン病に見られる精神障害の発現に関与していることが示唆された^{40,41}。さらに、ハンチンチン凝集体は DISC1 凝集体に加えて cAMP 分解酵素ホスホジエステラーゼ 4(PDE4)とも複合体を形成し、PDE4 活性の調節異常を引き起こし、精神症状に関与することも判明した^[1]。

ハンチントン病などのポリグルタミン病はポリグルタミンタンパク質のアミロイド蓄積を特徴とするが、発症における加齢の役割は明確ではない。一時的なポリグルタミン発現が若いハエよりも高齢のハエでより重篤な毒性を示すこと、高齢のハエ由来のポリグルタミンアミロイドは SDS 耐性結果から、より高い毒性を有する可能性を示唆し、アミロイド特性の加齢による変化がポリグルタミン病発症の引き金になる可能性を示した^[2]。

プリオン様タンパク質凝集体の不均衡分配に関わることが示唆される遺伝子を複数同定した。また遺伝子破壊株における Sup35 オリゴマーの挙動を調べた結果、自発的な拡散による流入よりも、娘細胞から母細胞への輸送によって不均等分配がなされている可能性が示唆された⁴²。

モノマーにおける局所構造がアミロイドの構造多形を生み出す源になっていることを見いだした。さらに独自のスクリーニング法により、新規の酵母プリオン Mod5 を発見し、Mod5 が凝集してプリオン状態を引き起こすことで抗真菌剤に対する耐性を獲得し、プリオン換が細胞生存に関わることを明らかにした(図 3-12)⁴³。また、プリオン様のタンパク質性細胞質遺伝因子(KIL-d)が、酵母に侵入したキラーウイルスのゲノムに新規な変異を導入させてエラーカラストロフィーを誘導し、そのキラーウイルスを不活性化するという、プリオン様

⁴⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-19680017/>

⁴¹ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-22680030/>

⁴² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-22020036/>

⁴³ http://www8.cao.go.jp/cstp/sentan/jisedai/seika/51s_129.pdf

因子による新規な抗ウイルス分子機構を明らかにした^[3]。

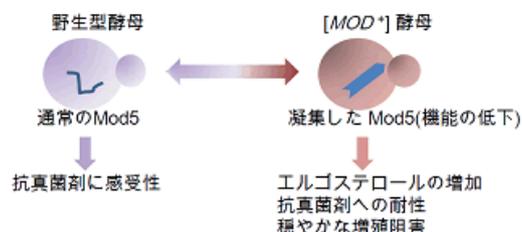


図 3-12 プリオン化(MOD⁺)酵母の抗真菌剤に対する耐性獲得⁴³

シナプスに存在する、統合失調症や自閉症の危険因子タンパク質の多くが過剰発現により凝集化しやすいことを明らかにするとともに、これらのタンパク質の凝集化が精神障害の発現に関わっていることが示唆された⁴⁴。

Sup35NM アミロイドの脱凝集化について検討し、シャペロン Hsp104 の ATPase 活性が、脱凝集化の際のモノマー化の過程に関わることが示唆された。一方で、Sup35NM モノマーのオリゴマー化に対して、Hsp104 が他のシャペロン群と協調して働くことが明らかになった⁴⁵。

②社会・経済への波及効果

本研究成果は、タンパク質の凝集形成を毒性の低いアミロイド構造へ仕向けるなど、アミロイドに関わる疾患に対する新たな治療戦略の開発に役立つと期待される。また、プリオン変換が環境ストレスに関わるという知見から、タンパク質の凝集状態に着目した菌類の薬剤耐性や多剤耐性菌に対する新たな対処療法に道を拓くと期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Tanaka M., Ishizuka K., Nekooki-Machida Y., Endo R., Takashima N., Sasaki H., Komi Y., Gathercole A., Huston E., Ishii K., Hui K.K.W., Kurosawa M., Kim S.H., Nukina N., Takimoto E., Houslay M.D., Sawa A. “Aggregation of scaffolding protein DISC1 dysregulates phosphodiesterase 4 in Huntington’s disease”, *Journal of Clinical Investigation*, 2017, 127(4), 1438–1450.
- [2] Tonoki A., Kuranaga E., Ito N., Nekooki-Machida Y., Tanaka M., Miura M. “Aging causes distinct characteristics of polyglutamine amyloids in vivo”, *Genes to Cells*, 2011, 16(5), 557–564.
- [3] Suzuki G., Weissman J.S., Tanaka M. “[*KIL-d*] Protein Element Confers Antiviral Activity via Catastrophic Viral Mutagenesis”, *Molecular Cell*, 2015, 60(4),

⁴⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-11F01512/>

⁴⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-13F03510/>

651-660.

④その他

本研究者は研究終了後に、日本学術振興会賞(2013年)を受賞している。

3.1.8 細胞膜脂質による分裂軸方向の制御とがん化に伴う変化(豊島文子)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

生物が卵からその固有の形を作っていく過程では、個々の細胞が一定の軸方向に沿って分裂する現象が重要な役割を果たす。最近、細胞が分裂する方向、すなわち「細胞分裂軸」の異常が腫瘍形成や多発性嚢胞腎病の発症に関わることが明らかになってきており、細胞分裂軸を制御する分子機構の解明は、これらの病態発症のメカニズムを理解する上でも重要な研究課題となっている。細胞分裂の軸方向(図3-13)は、紡錘体と細胞表層に存在する因子との相互作用で決まる。これまでに、この分子機構には微小管やモータータンパク質などの細胞骨格関連因子が必須であることが、多くのモデル生物で明らかになってきた。しかしながら、細胞膜脂質の役割についてはほとんど解析がなされていなかった。本研究では、細胞膜の脂質成分が分裂軸方向を制御する分子メカニズムの解明を目指した⁴⁶。

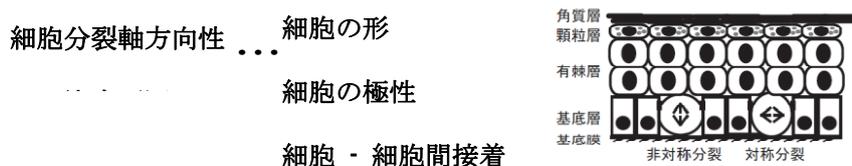


図 3-13 細胞分裂軸方向性の決定要因(左)及び皮膚基底細胞の対称・非対称分裂(右)⁴⁷

② 期間中の研究成果

細胞の分裂方向は、分裂期の紡錘体軸によって決まり、この方向を決める要因として、「細胞の形」、「細胞極性」、「細胞-細胞間接着」が知られてきた。本研究では、哺乳類培養細胞において、紡錘体軸の方向を決める第4の要因として、インテグリンを介した「細胞-基質間接着」の存在を明らかにした。すなわち、HeLa細胞などの通常の接着細胞をフィブロネクチンなどの細胞外基質の上で培養すると、紡錘体が基質面に対して平行に配置されることを見だし、かつこの現象は細胞-細胞間接着や重力には非依存的であり、インテグリンを介した細胞-基質間接着に依存することを明らかにした。さらに、この現象にはアクチン細胞骨格と微小管が必要であることも明らかにした^{[1],46}。

次に、インテグリンがどのような因子を介して紡錘体軸を制御するかについて研究を行った。インテグリンの下流で活性化する幾つかの細胞内シグナル伝達因子に注目して調べ

⁴⁶ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/toyoshima.html>

⁴⁷ <http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/05/84-02-02.pdf> 図3を改変した。

た結果、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3キナーゼ)が分裂期にインテグリン依存的に活性化することを見いだした。また、PI3キナーゼが作る脂質であるホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸PI(3,4,5)P3が、紡錘体を基質面に対して平行に配置するのに必須であることを見いだした。さらに、PI(3,4,5)P3は、分裂期の細胞の中央表層に局在し、微小管モータータンパク質であるダイニン・ダイナクチン複合体を中央表層に濃縮させることが明らかになった。通常の状態では、この濃縮により、紡錘体を引っ張る力が細胞の中央領域で平衡化するため、紡錘体が基質面に対して平行に配置されることが示された。これらの結果は、細胞膜の脂質成分に細胞分裂の方向を制御する機能があることを世界で初めて明らかにしたものである^{[2],46}。

次に、HeLa細胞における紡錘体軸制御機構にPI(3,4,5)P3とともに必要であることが判明したアクチン細胞骨格との協調的制御を担う分子として、低分子量Gタンパク質の可能性について検討した。その結果、PI3キナーゼの分裂期での活性化は、RhoAやRac1には非依存的で、Cdc42に依存的であることを見いだした。また、Cdc42はPI3K-PI(3,4,5)P3経路とは別の経路で、分裂期でのアクチン再編成を制御しており、この二つの経路が共に紡錘体軸を制御することが示唆された。さらに、Cdc42の下流の別の経路で制御する因子としてp21-activated kinase(PAK2)を同定した。この分子機構には、PAK2のキナーゼ活性は必要ではなく、PAK2はCdc42及びRac1のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)である β Pixへの結合を介して、アクチン細胞骨格再編成と紡錘体軸制御を行うことを明らかにした。以上の結果から、Cdc42はPI3K-PI(3,4,5)P3経路とPAK2/ β Pix経路の二つの経路を介して、紡錘体軸を制御することが明らかになった^{[3],46}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Toyoshima F., Nishida E. “Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner”, *EMBO Journal*, 2007, 26(6), 1487-1498.
- [2] Toyoshima F., Matsumura S., Morimoto H., Mitsushima M., Nishida E. “PtdIns(3,4,5)P3 regulates spindle orientation in adherent cells”, *Developmental Cell*, 2007, 13(6), 796-811.
- [3] Mitsushima M., Toyoshima F., Nishida E. “Dual role of Cdc42 in spindle orientation control of adherent cells”, *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(10), 2816-2827.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(A)「細胞分裂期における小胞輸送の制御機構」(2009~2010年度)、基盤研究(B)「妊娠期における母体表皮幹細胞制御と生殖機能における役割の解明」(2016~2018年度)、さらに最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「細

胞分裂軸の新たな制御機構の解析と皮膚の形成・恒常性維持における役割」(2010～2013年度)、革新的先端研究開発支援事業(AMED-PRIME)「皮膚の新陳代謝におけるメカノセンサーの機能解明」(2017～2020年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

細胞分裂期における小胞輸送、特にインテグリン小胞の輸送制御機構について解析した結果、分裂期に主要な役割を果たすキナーゼPolo-like-kinase1(PLK1)が、そのキナーゼ活性によりインテグリン小胞だけでなく他の小胞や初期エンドソームの融合を阻害することにより制御することが明らかになった。また、PLK1は初期エンドソームの融合に必須なRab5(活性型)の増加に必要であることも判明した^{[1], 48}。

マウス皮膚基底細胞の分裂軸制御におけるc-Ab1キナーゼの機能解析を行った。c-Ab1阻害剤グリベックをマウスに投与したところ、胎児の皮膚形成過程において分裂軸の異常が観察され、c-Ab1-K0マウスでも同様な異常が起こった。これらの結果は、c-Ab1が細胞分裂軸を制御することを生体内で初めて示したものである⁴⁹。

培養細胞を利用した簡便な分裂軸解析系を用いて分裂軸制御に必要な遺伝子を網羅的に探索した結果、ABL1を同定した。ABL1は進化的に保存された主要な分裂軸制御因子であるLGN/NuMA複合体を直接制御することが判明した。また、ABL1は皮膚組織でもLGN、NuMA及び分裂軸を制御することを証明した。すなわち、ABL1の機能を抑制すると、LGNの過剰蓄積により分裂軸が不安定となり、LGNが細胞側面や底面に存在するようになり、それにより分裂軸も変化することを見いだした(図3-14)^{[2], 50}。

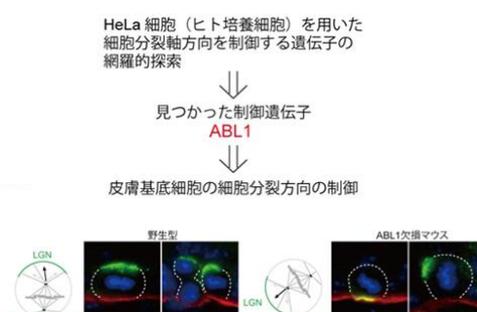


図 3-14 ABL1 による皮膚基底細胞分裂軸の制御⁵⁰

ES/iPS細胞の臨床応用における問題点の一つである残存未分化細胞に着目し、マウス細胞において、残存未分化細胞が、多能性を維持したまま細胞周期を停止した静止状態になっていることを見いだした。この静止多能性細胞では、発生に関わる転写因子(FoxO3等)や脂

⁴⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21687017/>

⁴⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-22019019/>

⁵⁰ http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/ex_ivr/Lab/Toyoshima-HP/documents/Nat_Communications_2012.pdf

質代謝制御因子が顕著に発現増加していることが判明した。これらの結果から、残存未分化細胞を除去する方法として、FoxO3や静止状態制御機構を標的としたアプローチの可能性が示唆された⁵¹。

ステロイドホルモン前駆体プレグネノロン(P5)に着目し、P5が細胞分裂期の紡錘体極に局在し、紡錘体の多極化を防ぐことを見いだした。P5を細胞から除去すると、分裂期において中心小体の接着が早期に乗離し、多極分裂した。また、P5による中心体制御機構は、複数種類のがん細胞では機能するが、正常細胞では機能しなかったことから、この機構を標的とした治療戦略が期待された^{[3], 52}。

妊娠期には、胎児の成長に伴って、母体腹側の皮膚が急速に拡張していくが、その背景となる細胞動態や仕組みは不明であった。本研究者らは、妊娠マウスの腹側皮膚を構成する細胞の動きを観察した結果、妊娠が進むとともに、皮膚の最外層に当たる表皮の奥に、表皮幹細胞を起源とする高い増殖能を持つ細胞集団が出現することを発見した。この細胞集団の出現には転写因子Tbx3が必要であり、Tbx3を腹側皮膚で働かないようにしたマウスでは妊娠しても皮膚が拡張しにくくなることが明らかになった^{[4], 53}。

②社会・経済への波及効果

生体幹細胞は、対称分裂して自らと同様の細胞を生じるとともに、ある条件下で非対称分裂して分化の方向に向かうが、この際細胞分裂軸の決定が重要である。生体幹細胞、がん幹細胞の分裂制御の解明は、再生医療に対しても基礎的な知識と技術を提供することが期待される。また、皮膚については、加齢に伴う皮膚の老化や皮膚がん等が社会的に多くの関心を持たれており、医学・医療への応用を通じて、社会的課題の解決に寄与することが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Ikawa K., Satou A., Fukuhara M., Matsumura S., Sugiyama N., Goto H., Fukuda M., Inagaki M., Ishihama Y., Toyoshima F. “Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis”, *Cell Cycle*, 2014, 13(1), 126-137.
- [2] Matsumura S., Hamasaki M., Yamamoto T., Ebisuya M., Sato M., Nishida E., Toyoshima F. “ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin”, *Nature Communications*, 2012, 3, 626.
- [3] Hamasaki M., Matsumura S., Satou A., Takahashi C., Oda Y., Higashiura C., Ishihama Y., Toyoshima F. “Pregnenolone functions in centriole cohesion during

⁵¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-26116712/>

⁵² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26650035/>

⁵³ http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/170911_1.html

mitosis” , Chemistry & Biology, 2014, 21(12), 1707-1721.

- [4] Ichijo R., Kobayashi H., Yoneda S., Iizuka Y., Kubo H., Matsumura S., Kitano S., Miyachi H., Honda T., Toyoshima F. “Tbx3-dependent amplifying stem cell progeny drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration” , Nature Communications, 2017, 8(1), 508.

④その他

本研究者は研究終了後、日本生化学会奨励賞(2010年)及び文部科学大臣表彰若手科学者賞(2010年)を受賞している。

3.1.9 耐病性植物作出を目指した植物細胞死制御系の解明(初谷紀幸)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

植物が本来持つ自己防衛能力を強化した耐病性作物の分子育種が注目されており、その技術基盤として、病原体感染に対する植物の生体防御機構を分子レベルで解明することが緊急かつ必須の課題である。植物の防御系の中でも汎用性の高い防御戦略が、「過敏感細胞死」である。これは感染を受けた細胞が自らを犠牲にして自発的に死ぬことによって、病原体を封じ込め、周囲の健全細胞への感染拡大を抑制する防御機構である。本研究者は、動物の細胞死の実行因子Caspase-1活性を示す酵素が植物の液胞プロセシング酵素(VPE, Vacuolar Processing Enzyme)であることを既に見いだしており、このVPEがタバコモザイクウイルス感染に伴い液胞の崩壊を導くことにより細胞死を引き起こすことを証明した(図3-15)。本研究では、植物病原細菌感染による過敏感細胞死の分子機構を解明することによって、植物独自の細胞死システムを提唱することを目指した。植物が獲得した生体防御戦略を理解し、細胞死における液胞の機能を制御することで病害抵抗性作物の分子育種に役立てようとするものである⁵⁴。

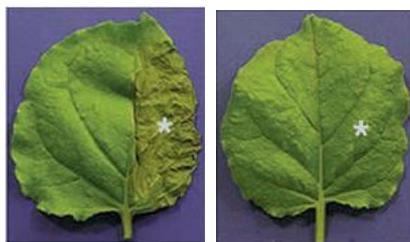


図 3-15 タバコウイルス感染による過敏感細胞死(左、★の部分)及び VPE 遺伝子欠損によるその抑制(右)⁵⁵

② 期間中の研究成果

(i) 植物の Caspase-3 様活性を示す酵素の実体

シロイヌナズナの葉に植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) strain DC3000 (avrRpm1) を接種した際に誘導される防御発現系をモデルとして研究を進めた。この細菌の接種により、12時間以内に過敏感細胞死が誘導され、感染細胞は死に至った。この過敏感細胞死がプロテアソーム阻害剤並びにCaspase-3阻害剤で抑制されることを見いだした。さらにCaspase-3様活性はプロテアソーム阻害剤で抑制され、一方、プロテアソーム活性はCaspase-3阻害剤で抑制されたことから、プロテアソームにCaspase-3様活性がある

⁵⁴ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/hatsugai.html>

⁵⁵ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15297671>

ことが示唆された。プロテアーゼ活性を持つプロテアソームの三つのサブユニット($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$)のうち、PBA1遺伝子によりコードされている・1発現抑制株(ipba1)を調べた結果、プロテアソーム活性とともにCaspase-3様活性が低下しており、両者の活性は相関関係を示した。この結果から、Caspase-3様活性を示す酵素の実体がプロテアソームのPBA1であることが判明した^{[1], 54}。

(ii) プロテアソームは過敏感細胞死を制御する

過敏感細胞死におけるプロテアソームの関与を調べるためipba1植物に病原細菌Pstを接種した結果、野生型とは異なり、感染細胞に過敏感細胞死は起こらず、病原細菌が増殖していた。この結果から、プロテアソームが過敏感細胞死において重要な役割を担っていることが判明した^{[1], 54}。

(iii) 過敏感細胞死におけるプロテアソームの役割

過敏感細胞死を起こしつつある細胞の形態変化を電子顕微鏡並びにバイオイメーキングを用いて観察した結果、液胞膜が細胞膜と融合することが分かり、この膜融合により液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることも判明した。この漏出はプロテアソーム阻害剤の添加により阻害された。これら結果から、プロテアソームが植物の細胞死の過程において液胞膜と細胞膜の融合に関わり、膜融合の結果、液胞内の分解酵素群が細胞外に放出されることが示唆された^[1]。これにより、植物細胞は細胞間隙に潜む細菌を攻撃すると同時に自らも死に至った。一方、細菌と異なり細胞内で増殖するウイルスに対するVPE/Caspase-1様活性を介する防御戦術では、液胞の崩壊を導くことによって素早く感染細胞を死に至らせることが特徴である^[2]。これまではウイルス、細菌、カビなど全ての病原体に対して植物は共通した防御戦術を発動していると信じられてきたが、本研究成果は、病原体それぞれの生活様式に応じた防御戦術を植物は進化させてきたことを示唆している⁵⁴。

(iv) 植物の生体防御に関わる小胞体(ER)ボディ

小胞体由来の新奇オルガネラである小胞体(ER)ボディはアブラナ科植物の子葉表皮に恒常的に存在するが、成熟葉には存在せず、一方、成熟葉に傷害を与えると傷口の周りにERボディが誘導される。恒常型と誘導型ERボディを比較解析した結果、前者の主構成成分が β グルコシダーゼPYK10であるのに対し、後者は β グルコシダーゼBGLU18であった。以上から、恒常型と誘導型の内容物は異なることが明らかになり、それぞれのERボディが異なった機能を果たしていることが示唆された^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Hatsugai N., Iwasaki S., Tamura K., Kondo M., Fuji K., Ogasawara K., Nishimura M., Hara-Nishimura I. “A novel membrane fusion-mediated plant immunity against

bacterial pathogens”, Genes and Development, 2009, 23(21), 2496-2506.

- [2] Hatsugai N., Kuroyanagi M., Nishimur M., Hara-Nishimura I. “A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death”, Apoptosis, 2006, 11(6), 905-911.
- [3] Ogasawara K., Yamada K., Christeller J.T., Kondo M., Hatsugai N., Hara-Nishimura I., Nishimura M. “Constitutive and inducible ER bodies of Arabidopsis thaliana accumulate distinct β -glucosidases”, Plant and Cell Physiology, 2009, 50(3), 480-488.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(A)「植物の病害抵抗性と細胞死機構の時空間的制御メカニズムの解明」(2009～2010年度)、基盤研究(C)「植物の病原体感染に応答した細胞死シグナルの動態解析」(2011～2013年度)などへ引き継がれた。

① 科学技術の進歩への貢献

過敏感細胞死はATP分解によるエネルギー依存的な細胞内構造のリモデリングを伴うが、この構造変化とATPレベルとの関係は明らかになってない。蛍光プローブを用いて定常状態における細胞内ATP濃度の基本的性質、空間分布を明らかにするとともに、非病原性細菌と病原性細菌感染植物細胞の形態変化と細胞内ATP濃度変化を同時にイメージングすることに成功し、ATP濃度変化と植物細胞死の関連性に関する知見が得られた(図3-16)^[1]。

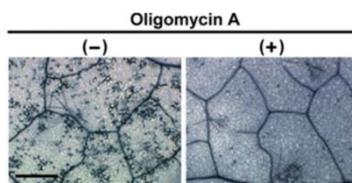


図 3-16 過敏感細胞死への ATP の関与^[1]

ATP 合成阻害剤 Oligomycin A(+)により細胞死が抑制される
(死細胞のトリパンブルー染色)

さらに、化学発光タンパク質と蛍光タンパク質をハイブリッド化した、従来よりも10倍以上明るい「nano-lantern」の開発に成功し、葉緑体でこのハイブリッド化タンパク質を発現する形質転換体を用いて、光合成反応により生産されるATP濃度の変化を観察、計測することにも成功した^{[2], 56}。

細胞膜に存在しクラスリン依存的エンドサイトーシスに関わるアダプタータンパク質2(AP-2)及びその四つのサブユニット α 、 β 、 δ 、 μ をシロイヌナズナにおいて同定した。

⁵⁶ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23570043/>

μ サブユニット (AP2M) 変異体の解析の結果、花器形成に異常が認められ、AP-2依存性エンドサイトーシスの花器形成における役割が判明した^[3]。さらに、このAP2M変異体は、抵抗性(R) 遺伝子RPM1、RPS2を介したエフェクター誘導免疫の低下を示した。この結果から、AP2Mは細胞膜局在R遺伝子を介したエフェクター誘導免疫に関与することが明らかになった^[4]。

②社会・経済への波及効果

病虫害による食糧損失の軽減は、現在食糧危機を救う重要な課題になっている。薬剤防除技術に頼らない環境に調和した新たな技術の開発が求められている中、本研究の成果を応用することによって、植物が本来持つ自己防衛能力を強化させる技術の開発への貢献が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Hatsugai N., Perez Koldenkova V., Imamura H., Noji H., Nagai T. “Changes in cytosolic ATP levels and intracellular morphology during bacteria-induced hypersensitive cell death as revealed by real-time fluorescence microscopy imaging”, *Plant Cell Physiology*, 2012, 53(10), 1768-1775.
- [2] Saito K., Chang Y.F., Horikawa K., Hatsugai N., Higuchi Y., Hashida M., Yoshida Y., Matsuda T., Arai Y., Nagai T. “Luminescent proteins for high-speed single cell and whole body imaging”, *Nature Communications*, 2012, 3, 1262.
- [3] Yamaoka S., Shimono Y., Shirakawa M., Fukao Y., Kawase T., Hatsugai N., Tamura K., Shimada T., Hara-Nishimura I. “Identification and dynamics of arabidopsis adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development”, *Plant Cell*, 2013, 25(8), 2958-2969.
- [4] Hatsugai N., Hillmer R., Yamaoka S., Hara-Nishimura I., Katagiri F. “The μ subunit of Arabidopsis adaptor protein-2 is involved in effector-triggered immunity mediated by membrane-localized resistance proteins”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016, 29(5), 345-351.

3.1.10 シナプス機能における S-アシル化動態の時空的解析 (深田正紀)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

パルミトイル化に代表される S-アシル化修飾は多くの機能タンパク質に見られる脂質修飾であり、タンパク質を特定の膜ドメインに輸送し、その機能をダイナミックに制御する。S-アシル化は外界刺激依存的に、可逆的に代謝回転する唯一の脂質修飾である。本研究者はこれまでに、S-アシル化に関わると考えられる S-アシル化酵素群 (全 23 種類の DHHC タンパク質) をゲノムワイドに探索し単離した。また、神経シナプスでイオンチャネルの機能発現を制御するタンパク質 PSD-95 を特異的に S-アシル化する酵素 P-PAT を同定した (図 3-17)。本研究ではこの新規 S-アシル化 (パルミトイル化) 酵素群を手掛かりとして、PSD-95 などのシナプス機能タンパク質のパルミトイル化動態を測定、可視化する技術の創出、さらにはパルミトイル化酵素の活性制御機構の解明によりパルミトイル化修飾反応の全容解明を目指すとともに、特に神経シナプス機能制御機構との関連の解明を目指した⁵⁷。

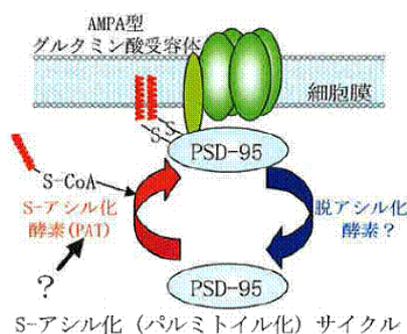


図 3-17 シナプス機能タンパク質 PSD-95 の S-アシル化サイクル⁵⁷

② 期間中の研究成果

(i) パルミトイル化動態の可視化技術の創出

(A) ABE (Acyl-Biotinyl-Exchange) 法による神経細胞パルミトイル化タンパク質の精製法の確立

最近報告された ABE 法に改良を加え、再現性良く高感度にパルミトイル化タンパク質を精製する技術を確認し、神経機能タンパク質のパルミトイル化レベルを簡便にまた網羅的にモニタリングすることが可能となった。PSD-95 のパルミトイル化レベルは神経活動を遮断した際に、2 時間以内に大きく上昇することが明らかになった。本研究では、細胞内で異なる制御を受ける基質 PSD-95^[1] と G α ^[2] に焦点を絞り、研究を進めた。

(B) 全反射顕微鏡によるパルミトイル化動態の可視化技術の創出

⁵⁷ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/fukata.html>

全反射顕微鏡を用いた可視化により、神経活動遮断後1~2時間以内に、シナプス後部膜のPSD-95が増加することを見いだした^[1]。また、内在性のPSD-95のパルミトイル化動態を可視化するために、パルミトイル化PSD-95のみを特異的に認識する抗体の作成を試み、有望なクローン(PF11)が得られた⁵⁷。

(ii) パルミトイル化酵素の活性制御機構の解明

(A) 神経シナプスにおけるPSD-95パルミトイル化の制御機構^[1]

神経活動依存的にPSD-95をパルミトイル化すると考えられたDHHC2と神経活動非依存的なDHHC3につき、その存在部位と制御機構について調べた結果、DHHC2は樹状突起内及びスパイン近傍に小胞状に存在した。神経活動の低下に伴い、シナプス後部膜近傍に移動し、PSD-95のパルミトイル化レベルを増加させ、AMPA型グルタミン酸受容体のシナプス発現量を増加させることを見いだした。一方、DHHC3はゴルジ装置に限局して存在し、神経活動とは無関係に様々な基質タンパク質をパルミトイル化していると考えられた。このように、1)23種類のパルミトイル化酵素は外界刺激の下流で分子種により異なる制御を受けていること、2)パルミトイル化酵素の細胞内局在がパルミトイル化のON/OFFを規定すること、さらに3)パルミトイル化酵素がシナプス機能(AMPA受容体の発現量)を一定に保つホメオスタシス現象を制御していることを見いだした^{[1],57}。

(B) 脳内PSD-95複合体の同定^[3]

脳内の生理的PSD-95複合体を精製、同定する過程で、てんかん関連タンパク質LGI1、ADAM22及びStargazinが、脳内でPSD-95と相互作用する主要なタンパク質であることを見いだした。これら複合体の結合様式を解析した結果、分泌タンパク質LGI1は膜タンパク質ADAM22を受容体として結合し、ADAM22はPSD-95によりシナプスに裏打ちされることが明らかになった。LGI1をAMPA受容体の機能を促進する新たなリガンド/受容体として同定した^{[3],57}。

(C) Gタンパク質シグナルにおけるパルミトイル化酵素の役割^[2]

DHHC(Asp-His-His-Cys)配列を持つDHHCファミリーからGタンパク質サブユニットG α s、G α q、G α i2をパルミトイル化する酵素を探索し、DHHC3及びDHHC7が特異的にG α のパルミトイル化を亢進することを見いだした。これらのDHHCの発現を抑制したところ、G α qのパルミトイル化が低下するとともに細胞膜への局在が減弱した。また、G α qを介した情報伝達系にDHHC3/7が必須であることを示した。さらに、G α qはパルミトイル化依存的にゴルジ装置-細胞膜間を双方向に恒常的にシャトルしており、これにはDHHC3/7によるゴルジ体でのパルミトイル化が必須であることを明らかにした^{[2],57}。

(D) パルミトイル化酵素ファミリーの基質特異性の解明

PSD-95以外にも様々な基質に対する特異的パルミトイル化酵素をスクリーニングする手法を確立し、30種類以上の基質タンパク質(SNAP-25、GAP-43、G α ^[2]、H-Ras、Lck、eNOS、CSP、NCAMなど)の候補酵素のスクリーニングを終え、パルミトイル化酵素群にサブファミリー

一が存在することを明らかにした⁵⁷。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Noritake J., Fukata Y., Iwanaga T., Hosomi N., Tsutsumi R., Matsuda N., Tani H., Iwanari H., Mochizuki Y., Kodama T., Matsuura Y., Bredt D.S., Hamakubo T., Fukata M. “Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95”, *Journal of Cell Biology*, 2009, 186(1), 147-160.
- [2] Tsutsumi R., Fukata Y., Noritake J., Iwanaga T., Perez F., Fukata M. “Identification of G-protein alpha subunit palmitoylating enzyme”, *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(2), 435-447.
- [3] Fukata Y., Adesnik H., Iwanaga T., Bredt D.S., Nicoll R.A., Fukata M. “Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulates synaptic transmission”, *Science*, 2006, 313(5794), 1792-1795.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(S)「新規 AMPA 受容体制御因子群によるシナプス機能制御の解明」(2008～2011 年度)、基盤研究(B)「真の脱パルミトイル化酵素の同定と生理機能の解明」(2014～2016 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)脳タンパク質老化と認知症制御「LGI1 を中心とするシナプス蛋白質ネットワークの老化と認知症の分子病態」(2017～2018 年度)、さらに、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「シナプス伝達制御機構とその破綻によるシナプス疾患の病態機構の解明」(2010～2013 年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

パルミトイル化脂質修飾酵素及びてんかん関連リガンド LGI1 に着目して、AMPA 受容体制御機構の解明を目指した。LGI1 KO マウスの性状解析を行い、このマウスにおける AMPA 受容体機能異常及び海馬組織における局所異常を見いだした^{[1],58}。また、LGI1 に対する自己抗体がシナプス機能異常を引き起こし、辺縁系脳炎を惹起している可能性が極めて高いことを明らかにした⁵⁹。さらに、LGI1 が ADAM22 受容体を介してシナプス伝達を制御すること、自己免疫性辺縁系脳炎では LGI1 自己抗体が LGI1-ADAM22 結合を阻害することを明らかにした。また、ADAM22 も LGI1 と同様に AMPA 受容体を介したシナプス伝達を制御すること、LGI1 と ADAM22 との結合が阻害されると重篤な脳疾患が引き起こされることが明らかになった

⁵⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20670005/>

⁵⁹ http://www8.cao.go.jp/cstp/sentan/jisedai/seika/51s_123.pdf

[2],⁶⁰。また、エクソーム解析により、進行性の脳萎縮と痙攣、知的障害を呈する患者において、ADAM22 の変異を見いだした。

超解像顕微鏡 (STED 顕微鏡) と新たに開発した蛍光プローブを用いることにより、これまで知られていなかったシナプス中のナノサイズのサブドメインを発見した (図 3-18) [3],⁶¹。また、脂質修飾酵素 DHHC2 がそのオーガナイザーとして、シナプスの数とサイズを規定する重要な酵素であることを見いだした [3],⁵⁹。

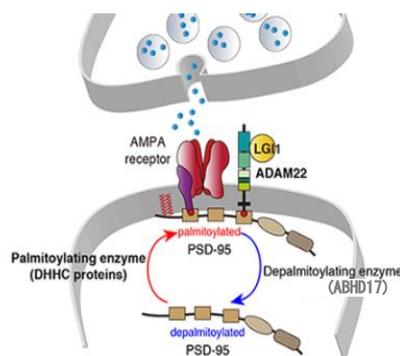


図 3-18 AMPA 受容体制御因子*及びパルミトイル化 PSD-95 で構成されるナノドメイン⁶²

*: パルミトイル化酵素 DHHC

脱パルミトイル化酵素 ABHD17

てんかん関連リガンド/受容体 LGI1・ADAM22

PSD-95 を脱パルミトイル化する酵素を探索、同定しその生理機能の解明を目指した。その結果、38 種類のセリン分解酵素の中から PSD-95 を脱パルミトイル化する活性を有する候補酵素 5 種類を単離した。中でも ABHD17A, 17B, 17C タンパク質が、過剰発現により、内在性 PSD-95 のパルミトイル化レベルを著しく減少させることを見いだした。これら ABHD17 のノックダウンにより、PSD-95 のパルミトイル化プロセスが有意に遅延することを見だし、ABHD17 が生理的な PSD-95 脱パルミトイル化酵素であることを報告した [4],⁶³。さらに、タンパク質のパルミトイル化のストイキオメトリーを評価できる手法として APEGS 法を独自に開発した [4],⁶⁴。

シナプス後膜 (PSD) ナノドメインの構築機構について、パルミトイル化修飾と脂質環境という側面から研究を進めた⁶⁵。また、LGI1 を中心とするタンパク質ネットワークの加齢に伴う変化、LGI1-ADAM22 経路の破綻による病態機構の解明を目指して研究を進めた⁶⁶。

⁶⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PUBLICLY-15H01570/>

⁶¹ <http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2013/07/-dhhc2.html>

⁶² <https://www.nips.ac.jp/fukata/abstract/> HP の図を一部改変した。

⁶³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26291045/>

⁶⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26291045/>

⁶⁵ <https://sites.google.com/site/lipoqualityjpn/public-offering-study/1717>

⁶⁶ <http://www.protein-dementia.jp/organization/projects2017-2018/>

②社会・経済への波及効果

脳の中の神経と神経のつながりであるシナプスの働きが異常を来たすと、様々な脳神経機能の障害、精神発達遅滞やてんかん、統合失調症などの神経の病気につながると考えられる。本研究において発見されたパルミトイル化酵素群の巧みな働きによって、ふだんはシナプスの働きが正常に保たれているものと考えられる。それゆえ、パルミトイル化酵素を標的にした新しい治療薬開発の可能性が期待される。また、脳内 PSD-95 複合体として同定したリガンド・受容体(LGI1 と ADAM22)はこれまでのイオンチャネルを標的とした抗てんかん薬と異なる新たな抗てんかん薬のターゲットとして期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Fukata Y., Lovero K.L., Iwanaga T., Watanabe A., Yokoi N., Tabuchi K., Shigemoto R., Nicoll R.A., Fukata M. “Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(8), 3799-3804.
- [2] Yokoi N., Fukata Y., Kase D., Miyazaki T., Jaegle M., Ohkawa T., Takahashi N., Iwanari H., Mochizuki Y., Hamakubo T., Imoto K., Meijer D., Watanabe M., Fukata M. “Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy”, *Nature Medicine*, 2015, 21(1), 19-26.
- [3] Fukata Y., Dimitrov A., Boncompain G., Vielemeyer O., Perez F., Fukata M. “Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains”, *Journal of Cell Biology*, 2013, 202(1), 145-161.
- [4] Yokoi N., Fukata Y., Sekiya A., Murakami T., Kobayashi K., Fukata M. “Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes”, *Journal of Neuroscience*, 2016, 36(24), 6431-6444.

3.1.11 分泌性ホスホリパーゼ A₂ 群の分子種固有の機能の解明(村上誠)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

膜グリセロリン脂質を加水分解して脂肪酸とリン脂質を生成する酵素ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) には多数の分子種が存在し、細胞内に存在する cPLA₂ 及び iPLA₂ 群と、細胞外に分泌される sPLA₂ (secreted PLA₂) 群に大別され、sPLA₂ には 11 種のアイズォイムが存在する (図 3-19)⁶⁷。細胞内 PLA₂ 群の役割については多くの解析がなされてきたが、異なる組織分布を示す多数の sPLA₂ 分子種の役割については、一部を除いてほとんど未解明であった。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて 6 種 (II D、II E、II F、III、V、X)⁶⁸ の機能未知の sPLA₂ の生理的・病的機能を解明し、脂質メタボロームの見地から各酵素の生体内基質を同定することを目指した⁶⁹。

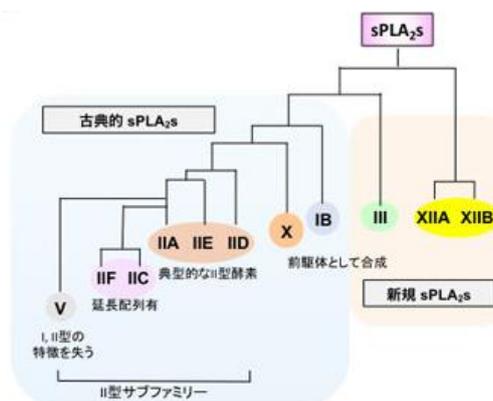


図 3-19 sPLA₂ ファミリーの 11 種類のアイズォイム⁶⁷

② 期間中の研究成果

(i) sPLA₂ と生殖、アレルギー、動脈硬化・メタボリックシンドローム

sPLA₂ 群のノックアウト (KO) マウスのうち、sPLA₂-III KOマウスのみが著明な繁殖異常を示した。検討の結果、sPLA₂-IIIは精巣上体起始部の上皮細胞から内腔に分泌されて精子の細胞膜あるいは液中のリン脂質輸送体の脂質ホメオスタシスの制御に関わっており、この代謝系の破綻が精子の機能不全を導くものと推察された。

IgE/抗原依存的な受動皮膚感作アレルギー (PCA) 反応についても、sPLA₂-III KOマウスにおいてのみ、著しい軽減が観察された。sPLA₂-IIIはマスト細胞に局限して発現しており、KOマウスのマスト細胞はPCA反応に不応答であった。以上の結果から、sPLA₂-IIIは組織中マスト

⁶⁷ <http://www.igakuken.or.jp/public/news/024/cont5.html>

⁶⁸ https://www.jstage.jst.go.jp/article/inflammregen/28/5/28_5_454/_pdf

⁶⁹ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/murakami.html>

細胞の最終成熟並びにそれに付随するエフェクター機能に関与すると考えられ、sPLA₂-IIIが内因性のマスト細胞調節因子であることが強く示唆された。

sPLA₂-III/V/Xがリポタンパク質粒子(LDL/HDL)のホスファチジルコリン(PC)を分解してリゾホスファチジルコリン(LPC)を生成することを見いだした。sPLA₂-III過剰発現(Tg)マウスでは血中の変性LDLが増加し、動脈硬化発症モデル動物apoE KOマウスと交配後に高コレステロール食を負荷すると、動脈硬化の増悪が観察された。以上の結果から、動脈硬化病巣におけるsPLA₂依存的なりポタンパク質の代謝異常が動脈硬化の進展を促進すると予想された。以上の結果から、sPLA₂-IIIはリポタンパク質粒子中のPCのLPCへの変換、小径LDLの生成に関わり、この代謝系の長期にわたる亢進は動脈硬化の進行に影響を及ぼすと推察された [1], [2], [3], 69。

(ii) sPLA₂ と皮膚

sPLA₂-X Tgマウスは第一毛周期に完全に脱毛した。しかしながら、sPLA₂-X KOマウスでは、皮膚の体毛関連遺伝子群の部分的な発現減少を認める以外に目立った所見は観察されず、本質的に体毛の増殖分化の制御には大きく関わらないと考えられた。一方、sPLA₂-II Fは表皮と皮脂腺に発現している主要なアイソザイムで、乾癬などのヒト表皮肥厚疾患で発現が顕著に増加することが判明した。sPLA₂-II F Tgマウスは著しい皮膚異常を発症し、皮膚ではドコサヘキサエン酸(DHA)を含むホスファチジエタノールアミン(PE)が顕著に減少し、DHAの代謝物であるProtectin D₁の産生が亢進していた。したがって、皮膚の病態生理にメインに関わるアイソザイムはsPLA₂-II Fであると考えられた⁶⁹。

(iii) sPLA₂ と樹状細胞

マウス臓器の中で脾臓とリンパ節に特に発現が高い sPLA₂-II Dは、CD11c+樹状細胞に特異的に発現している sPLA₂であることが明らかになった。sPLA₂-II D KOマウスでは接触性皮膚炎に伴うTh1免疫応答の増悪が認められた。以上の結果から、sPLA₂-II Dは樹状細胞を中心とする免疫ネットワークの調節に関与しているものと考えられた⁶⁹。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3報以内

- [1] Kimura-Matsumoto M., Ishikawa Y., Komiyama K., Tsuruta T., Murakami M., Masuda S., Akasaka Y., Ito K., Ishiguro S., Morita H., Sato S., Ishii T. “Expression of secretory phospholipase A2s in human atherosclerosis development”, *Atherosclerosis*, 2008, 196(1), 81-91.
- [2] Sato H., Kato R., Isogai Y., Saka G., Ohtsuki M., Taketomi Y., Yamamoto K., Tsutsumi K., Yamada J., Masuda S., Ishikawa Y., Ishii T., Kobayashi T., Ikeda K., Taguchi R., Hatakeyama S., Hara S., Kudo I., Itabe H., Murakami M. “Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal

potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis”, *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(48), 33483-33497.

- [3] Sato H., Taketomi Y., Isogai Y., Masuda S., Kobayashi T., Yamamoto K., Murakami M. “Group III secreted phospholipase A2 transgenic mice spontaneously develop inflammation”, *Biochemical Journal*, 2009, 421(1), 17-27.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「新規ホスホリパーゼ分子群の機能的脱オフエン化」(2012～2014 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)脂質クオリティが解き明かす生命現象「リポクオリティ異常に起因する疾患の同定とその分子機構の解明」(2015～2019 年度)、基盤研究(A)「健康環境因子としての脂質代謝の新機軸」(2016～2020 年度)、さらに、AMED-CREST 疾患における代謝産物の解析及び代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出「PLA₂ メタボロームによる疾患脂質代謝マップの創成とその医療展開に向けての基盤構築」(2013～2018 年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

脂質代謝の最上流酵素 PLA₂ 分子群とその下流の酵素・受容体の遺伝子改変マウスを網羅的に活用し、疾患固有の脂質パスウェイを同定するとともに、これを標的とした新たな疾患制御技術の創成を目指した。PLA₂ の欠損による $\omega 3/\omega 6$ を始めとするリポクオリティ異常が影響する疾患を同定し、介在する脂質受容体シグナルに着目することで、リポクオリティ受容体-疾患連関の解明と疾患発症の分子機構の理解を目的として研究を進めた⁷⁰。

sPLA₂-III 依存的マスト細胞の成熟制御を解析した結果、sPLA₂-III はサイトカイン SCF の刺激によりマスト細胞から分泌され、隣接する線維芽細胞のプロスタグランジン(PG)D 合成酵素 L-PGDS と関連して PGD₂ を産生した。産生された PGD₂ はマスト細胞に発現誘導される PGD 受容体 DP1 を活性化してマスト細胞の成熟を促進した。以上より、sPLA₂-III-L-PGDS-DP1 パラクリンループがマスト細胞の成熟を制御することが明らかになった^{[1], 71}。また、腸管上皮に発現する sPLA₂-III がリゾリン脂質を産生し、大腸炎や大腸がんを増悪することが明らかになった^{[2], 72}。

肥満に伴い脂肪細胞に発現誘導される Metabolic sPLA₂ として、肥満に防御的に働く sPLA₂-V と肥満を促進する sPLA₂-II E を同定した(図 3-20)。また、表皮角化細胞の分化に伴い発現誘導される Epidermal sPLA₂ として、乾癬や皮膚がんなどの表皮肥厚性疾患の増悪に関わる sPLA₂-II F を同定した^{[3], 73}。さらに、sPLA₂-II D が Resolving sPLA₂ として獲得免疫応

⁷⁰ https://sites.google.com/site/lipoqualityjpn/plan/plan_c01

⁷¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23790119/>

⁷² <http://lmmhs.m.u-tokyo.ac.jp/Research/research17.html>

⁷³ http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/nenpou/h26/h26_10.html

答の収束に関わること、sPLA₂-Xが Gastrointestinal sPLA₂として大腸炎を抑制することを発見した。

PNPLA7がLPCを分解するリゾホスホリパーゼとして肝臓のコリン代謝の制御を介して全身の代謝調節に関わること、PNPLA7の上流にPNPLA8が位置することを明らかにした⁷⁴。また、表皮特異的に発現しているPNPLA1がアシルセラミドの生合成を介して皮膚バリア機能に関わることを明らかにした⁷⁵。

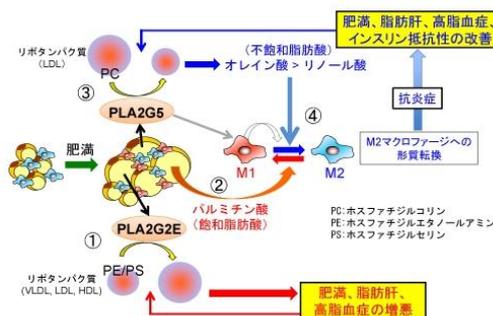


図 3-20 メタボリック sPLA₂による代謝免疫制御とその意義⁷⁶

肥満に伴い脂肪細胞から誘導される2種類のsPLA₂の作用機序

- ①、②: PLA2G2E (sPLA₂-II E)による脂肪蓄積の促進
- ③、④: PLA2G5 (sPLA₂-V)によるメタボリックシンドロームの進行の抑制

マスト細胞がエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸などの ω 3脂肪酸が酸化されて生じた「エポキシ ω 3脂肪酸」を常時産生していることを発見した。さらに、これらの脂肪酸が、PLA₂の一種である PAF-AH2によって細胞膜から遊離され、活性化マスト細胞の細胞内シグナル伝達を調節するという、新しいアレルギー反応の調節メカニズムを解明した。PAF-AH2の働きを止める薬剤によりアナフィラキシー反応が抑制されたことから、PAF-AH2はアレルギーの全く新しい創薬標的として有用であることが示唆された^{[4],77}。

②社会・経済への波及効果

本研究により、脂質分子の疾患への関わりが明らかになった。皮膚における sPLA₂-II Fとその産物であるリゾプラズマローゲン、PNPLA1とその産物であるアシルセラミドの量は、難治性皮膚疾患の診断のための新規バイオマーカーとなる可能性がある。また、sPLA₂-II Fの発現量や機能を低下させる薬物、あるいはPNPLA1の発現量や機能を向上させる薬物は、難治性皮膚疾患の新規予防・治療法の開発につながることを期待される。また、本研究により新しいアレルギー反応の調節メカニズムが明らかになり、sPLA₂-IIIや

⁷⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15K14957/>

⁷⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/file/KAKENHI-PROJECT-24390021/24390021seika.pdf>

⁷⁶ <http://www.igakuken.or.jp/topics/2014/0606.html>

⁷⁷ <http://lmmhs.m.u-tokyo.ac.jp/Research/research18.html>

PAF-AH2 の新たな創薬標的としての有用性が示唆されたことは、アレルギーの治療法の開発に新しい可能性を拓くものである。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Taketomi Y., Ueno N., Kojima T., Sato H., Murase R., Yamamoto K., Tanaka S., Sakanaka M., Nakamura M., Nishito Y., Kawana M., Kambe N., Ikeda K., Taguchi R., Nakamizo S., Kabashima K., Gelb M.H., Arita M., Yokomizo T., Nakamura M., Watanabe K., Hirai H., Nakamura M., Okayama Y., Ra C., Aritake K., Urade Y., Morimoto K., Sugimoto Y., Shimizu T., Narimiya S., Hara S., Murakami M. “Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis”, *Nature Immunology*, 2013, 14(6), 554-563.
- [2] Murase R., Taketomi Y., Miki Y., Nishito Y., Saito M., Fukami K., Yamamoto K., Murakami M. “Group III phospholipase A2 promotes colitis and colorectal cancer”, *Science Reports*, 2017, 7(1), 12261.
- [3] Sato H., Taketomi Y., Ushida A., Isogai Y., Kojima T., Hirabayashi T., Miki Y., Yamamoto K., Nishito Y., Kobayashi T., Ikeda K., Taguchi R., Hara S., Ida S., Miyamoto Y., Watanabe M., Baba H., Miyata K., Oike Y., Gelb M.H., Murakami M. “The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA₂G5 and PLA₂G2E play distinct roles in obesity”, *Cell Metabolism*, 2014, 20((1), 119-132.
- [4] Shimanaka Y., Kone N., Taketomi Y., Arita M., Okayama Y., Tanaka Y., Nishito Y., Mochizuki T., Kusuhara H., Adibekian A., Cravatt B.F., Murakami M., Arai H. “ ω 3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that control the magnitude of IgE-mediated mast cell activation”, *Nature Medicine*, 2017, 23(11), 1287-1297.

④その他

本研究者は研究終了後に、テルモ科学技術振興財団テルモ財団賞(2014 年)及び東京都福祉保健局長賞(2015 年)を受賞している。

さらに本研究者は研究終了後に、*Advances in Immunology*(2016)、*Methods in Enzymology*(2017)を執筆している⁷⁸。

⁷⁸ Murakami M., Yamamoto K., Miki Y., Murase R., Sato H., Taketomi Y. “The roles of the secreted phospholipase A2 (sPLA₂) gene family in immunology”, *Advances in Immunology*, 2016, 132, 91-134. Yamamoto K., Miki Y., Sato H., Murase R., Taketomi Y., Murakami M. “Secreted phospholipase A2 specificity on natural membrane phospholipids.”, *Methods in Enzymology*, 2017, 583, 101-117.

3.1.12 胎生期低栄養による成長後の代謝異常発生機序の解明とその予防戦略の開発(由良茂夫)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

近年、本邦では低出生体重児の割合が増加し、20年前に比べて2倍近くになっており、これらの低出生体重児は出生前に低栄養環境に置かれていると考えられ、将来高率にメタボリック症候群や種々の疾患を発症する可能性が想定される(図3-21)。

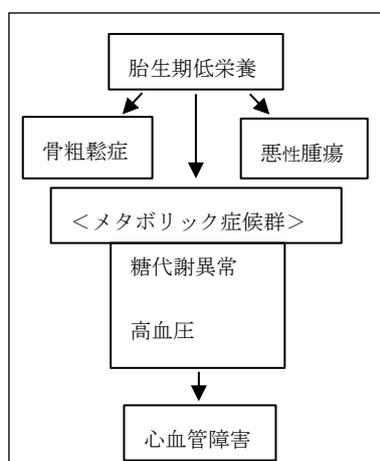


図3-21 胎生期低栄養による成長後の疾患発症リスクの増加⁷⁹

一方、脂肪組織は多数の生理活性因子を産生し、特に、レプチンやレジスチン、アディポネクチン、TNF- α は全身の臓器における代謝調節に関与し、生活習慣病とりわけメタボリック症候群の病態形成に深く関与する。本研究者らはこれまでに、妊婦において脂肪組織のみならず胎盤でレプチンやレジスチンが産生され、母児のエネルギー代謝や性成熟の制御において重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。さらに、マウスにおける胎生期の低栄養環境によって出生児が成獣期に易肥満性を来し、メタボリック症候群を発症することを確認し、成獣期の代謝異常の発現に新生児期における血中レプチン濃度の一過性の上昇「レプチンサージの早期化」が重要な役割を果たす可能性を示した。本研究では胎生期低栄養に起因する成長後の代謝異常発生機序を解明し、その予防戦略を開発することを目的とした⁷⁹。

⁷⁹ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/yura.html> 図3-21ではHPの図を一部改変した。

②期間中の研究成果

(i) 胎生期低栄養モデル動物におけるメタボリック症候群の病態解析

母獣摂餌制限によるマウス胎生期低栄養モデルでは、成獣期に血圧上昇並びに心肥大や冠動脈周囲線維化の亢進などの心臓の形態的变化を来すことが明らかになった。これらの心リモデリングには心臓局所におけるレニン・アンジオテンシン系の関与が想定された。胎生期低栄養マウスでは高脂肪食飼育で血中コレステロール値の有意な上昇が見られた。また、肝重量は普通食飼育で対照群と比較して有意に高値を認め、重量当たりのリン脂質含量が低値を示し、中性脂肪は高値の傾向であった。肝臓におけるacetyl-CoA carboxylase (ACC)、acyl-CoA oxidase (ACO)、peroxysome proliferator activated receptor α (PPAR α)、PPAR γ 等の発現増加がこれらの変化に関与していると考えられた^{[1],79}。

(ii) 新生仔期のレプチンへの暴露がメタボリック症候群の発症機序に及ぼす影響

レプチン遺伝子を欠損するob/obマウスの場合、胎生期に低栄養に暴露しても成獣期に易肥満性を示さず、一方新生仔期にレプチンを投与すると成獣期の肥満が増強することを示した。このことから、新生仔期の過剰なレプチンへの暴露が易肥満性の獲得に重要と考えられた。新生仔期のレプチンサージの時期の変化による影響を検討した結果、成長後の高脂肪食飼育下の肥満がレプチンサージの早期化によって増強し、レプチンサージの晩期化によって抑制された^{[2],79}。

(iii) 母体の食事組成の調整によるメタボリック症候群発症予防

母獣摂餌制限による胎生期低栄養マウスモデルにおいて、母獣のタンパク質摂取量を増量することによって、胎仔の発育を改善し、成長後の血圧上昇や心肥大を改善できた。また、妊娠中の母獣でタンパク質摂取の増量によって、分岐鎖アミノ酸(BCAA)血中濃度の上昇を認めた。母獣のタンパク質摂取量ないしBCAA摂取量を増量することにより、母獣及び胎仔肝臓におけるIGF-1/2の発現が増加しており、これが胎仔発育の改善に関与していると考えられた。ラット妊娠母獣へのBCAA付加餌の投与により、母獣摂餌制限による出生仔の発育制限や成長後の血圧上昇を抑制する可能性が示唆された^{[3],79}。

以上の研究により、胎生期低栄養に起因する成長後のメタボリック症候群の発症機序の一端が明らかにされ、その予防戦略開発の糸口を見いだすことが可能になった⁷⁹。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Kawamura M., Itoh H., Yura S., Mogami H., Suga S., Makino H., Miyamoto Y., Yoshimasa Y., Sagawa N., Fujii S. “Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease”, *Endocrinology*, 2007, 148(3), 1218-1225.

- [2] Yura S., Itoh H., Sagawa N., Yamamoto H., Masuzaki H., Nakao K., Kawamura M., Mogami H., Ogawa Y., Fujii S. “Neonatal exposure to leptin augments diet-induced obesity in leptin-deficient Ob/Ob mice”, *Obesity*, 2008, 16(6), 1289-1295.
- [3] Mogami H., Yura S., Itoh H., Kawamura M., Fujii T., Suzuki A., Aoe S., Ogawa Y., Sagawa N., Konishi I., Fujii S. “Isocaloric high-protein diet as well as branched-chain amino acids supplemented diet partially alleviates adverse consequences of maternal undernutrition on fetal growth”, *Growth Hormone and IGF Research*, 2009, 19(6), 478-485.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(C)「胎児期の発育障害に起因するメタボリック症候群の発症機序解明とその予防戦略の開発」(2009～2011年度)、基盤研究(C)「子宮内環境の変化に対するチオレドキシシン結合蛋白によるストレス応答システムの解析」(2014～2016年度)へ引き継がれた。

① 科学技術の進歩への貢献

ヒト胎盤における神経栄養因子ノイロトロピン(NT)及びその受容体(NTR)の発現が子宮環境及び胎児発育に与える影響を解析した結果、脳由来神経栄養因子(BDNF)は絨毛膜に発現し、胎内発育遅延や子癩前症では有意に高かった。BDNF受容体TrkBの発現はヒト妊娠性絨毛がん細胞(JEG-3)において過酸化水素(H₂O₂)により亢進し、BDNFはH₂O₂処理JEG-3のアポトーシス細胞数を減少させた。以上の結果は、BDNF/TrkBシグナリングがJEG-3における酸化ストレスに対する抗アポトーシス作用を持つことを示した^[1]。

抗酸化作用を有するチオレドキシシン結合タンパク質(TBP-2)が、正常な妊娠の進行や胎盤内の酸素条件に応じて変動し、胎児発育障害の病態に関与することを示した。すなわち、正常妊婦、妊娠高血圧症候群(PIH)妊婦、子宮内胎児発育不全(IUGR)妊婦から妊娠初期の絨毛及び分娩時の胎盤組織を採取し、TBP-2の遺伝子発現を検討した結果、TBP-2の発現は妊娠初期絨毛では妊娠中期・後期に比べて低値を示した。PIH+IUGRの胎盤では、正常及びIUGRのみの胎盤に比べて、TBP-2遺伝子発現が低下していた。また、ヒト胎盤組織を用い、酸素濃度1%の低酸素環境下で培養したところ、標準酸素濃度下(20%)と比較してTBP-2遺伝子発現が低下することが明らかになった(図3-22)。また、母体の急性栄養障害に際して、TBP-2が血糖値の維持に重要な役割を演じること、さらに妊娠中の分岐鎖アミノ酸補充が母体低栄養による児の成長後の血圧上昇を改善する可能性を示した^{80,81}。

新生仔期のレプチンサージを受けた成体マウスのインスリンの腹腔内投与後の血糖値は、

⁸⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21592094/>

⁸¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26462487/>

対照マウスよりも有意に高かった。このことから、早期のレプチンサーージが、新生仔初期のプログラミングシグナル、インスリン感受性障害の発症起源に本質的な役割を果たすことを示した^[2]。

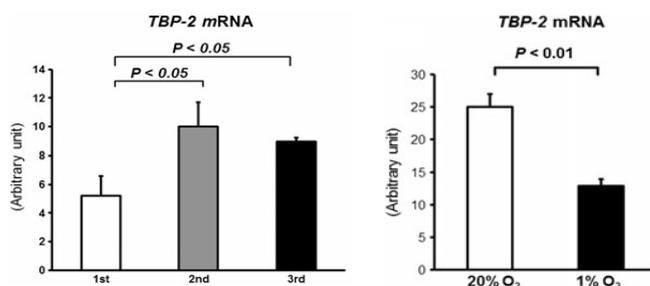


図 3-22 チオレドキシシン結合タンパク質 TBP-2 mRNA の発現⁸²：
妊娠第 1～3 半期のヒト胎盤(左)及び酸素濃度の影響(右)

②社会・経済への波及効果

本邦で増加傾向にある低出生体重児の将来的なメタボリック症候群の発症リスクを減らすことは重要な課題であり、その予防戦略を開発する上で、本研究成果の臨床応用が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Fujita K., Tatsumi K., Kondoh E., Chigusa Y., Mogami H., Fujii T., Yura S., Kakui K., Konishi I. “Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors”, *Placenta*, 2011, 32(10), 737-744.
- [2] Itoh H., Yura S., Sagawa N., Kanayama N., Konihi I. “Neonatal exposure to leptin reduces glucose tolerance in adult mice”, *Acta Physiologica*, 2011, 202(2), 159-164.

⁸² <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jog.13149/epdf>

3.2 2006 年度採択研究課題

3.2.1 炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析(有田誠)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

急性炎症反応は「起炎反応」とそれに続く「収束過程」に分けられる。起炎反応は好中球が炎症部位に浸潤して異物を排除する過程であり、起炎性メディエーターが関与している。一方の収束過程においては、好中球が減少する一方でマクロファージの流入が増大し、アポトーシスした好中球や組織片がマクロファージに貪食され、さらにリンパ管から所属リンパ節へ向かうドレナージを介する炎症浸出液の吸収及び炎症細胞の消散が認められる(図3-23)。炎症から正常状態へ回復する上で重要な収束過程の分子機構に関してはいまだ不明な点が多い。一方で、魚油に含まれる ω 3系脂肪酸(エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA))由来の抗炎症性代謝物が、炎症の収束に関わる可能性が示唆されている。そこで本研究では、炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝フローを総合的に捉えるためのメタボローム解析を行い、炎症部位での収束性メディエーターの産生機構を解明することにより、炎症収束の制御メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした⁸³。

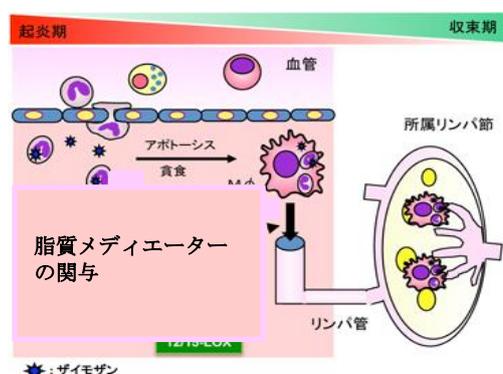


図 3-23 炎症の起炎反応と収束過程⁸⁴

② 期間中の研究成果

(i) 脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析システムの確立

炎症を制御する脂質性メディエーターの代謝フローを総合的に捉える目的で、三連四重極型質量分析計のmultiple reaction monitoring(MRM)を利用した脂肪酸代謝物の一斉定量分析システムを確立した。この系を用いることで、アラキドン酸、 ω 3系脂肪酸代謝物を網

⁸³ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/arita.html>

⁸⁴ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/report/pdf/0201arita.pdf> 図3を改変した。

羅する約120種類の代謝物をピコグラム感度で一斉定量分析することが可能になった^[1]。

(ii) 炎症の収束期に誘導される脂肪酸代謝物についての解析

酵母ザイモザンで惹起したマウス急性腹膜炎の炎症局所から採取した炎症浸出液をLC-MS/MSによりメタボローム解析した結果、シクロオキシゲナーゼ (COX)、リポキシゲナーゼ (LOX) などの脂肪酸代謝酵素の産物がそれぞれ特徴的な挙動を示すことが明らかになった。特にマウス12/15-LOX により産生される一連の代謝物が、炎症開始とともに減少し、炎症収束期に再び増加するパターンを示し、その中にはDHAから産生される抗炎症性メディエーター、プロテクチンD1 (PD1) が含まれていた。この結果から、12/15-LOXを発現してPD1を産生する何らかの細胞が、収束期に炎症部位に集積している可能性が考えられた⁸³。

(iii) 炎症の収束期に出現する PD1 産生細胞の同定と機能解析

炎症の収束期から PD1 の主要な産生細胞を探索し、これが収束期に特徴的に出現する好酸球であることを明らかにした^[1]。すなわち、収束期に特徴的に出現する好酸球が抗炎症性メディエーターPD1 の産生を介して炎症の収束に関わる可能性が浮上した。そこで、抗インターロイキン 5 (IL-5) モノクローナル抗体を用いて好酸球を除去すると、PD1 を始め 12/15-LOX 系の代謝物の大幅な低下、及び炎症収束の明らかな遅延が認められた。なお、炎症の収束は、(1) 収束期の炎症部位に残存する好中球の数、(2) 蛍光標識したザイモザンを含む貪食細胞の所属リンパ節への移行、を指標に評価した。さらにこの炎症収束の遅延は、外から好酸球を補うことで回復したが、この効果は PD1 を産生できない好酸球 (12/15-LOX 欠損) では認められなかった。さらに PD1 を腹腔内に直接投与することによっても炎症収束の回復が認められた。以上の結果から、炎症の収束期に現れる好酸球は、PD1 など 12/15-LOX 系の抗炎症性メディエーターを必要なタイミングで産生し、炎症が収束する環境を整える役割を果たしていると考えられた^[2]。

(iv) 好酸球が生成する新しい抗炎症性脂質メディエーターの同定

好酸球から生成する活性代謝物の包括的探索を行った結果、EPA 由来の抗炎症性代謝物として 17, 18-diHEPE を見だし、RvE3 と命名した^[3]。RvE3 は好中球の遊走活性を僅かなノモルレベルの濃度で抑制し、マウス急性炎症モデルにおいても、初期の好中球浸潤を低用量で強力に抑制する活性を有していた。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Arita M. “Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution”, *Journal of Biochemistry*, 2012, 152(4), 313-329.

[2] Yamada T., Tani Y., Nakanishi H., Taguchi R., Arita M., Arai H.

“Eosinophils promote resolution of acute peritonitis by producing

proresolving mediators in mice”, FASEB Journal, 2011, 25(2), 561-568.

- [3] Isobe Y., Arita M., Matsueda S., Iwamoto R., Fujihara T., Nakanishi H., Taguchi R., Masuda K., Sasaki K., Urabe D., Inoue M., Arai H. “Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid”, Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(13), 10525-10534.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「 ω 3 脂肪酸由来の新規抗炎症性メディエーターの同定及び作用機構の解明」(2009~2011 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「 ω 3 系脂肪酸の代謝と生理的機能について包括的メタボローム解析」(2010~2014 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「脂質マシナリー領域研究の推進」(2010~2015 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「脂質クオリティが解き明かす生命現象」(2015~2019 年度)、さらに、さきがけの研究領域「炎症の慢性化機構の解明と制御」の研究課題「炎症の収束機構の分子基盤の確立と慢性疾患への適用」(2011~2015 年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

好酸球が炎症の収束に関わる脂質メディエーターを産生することが本研究により明らかになった⁸³。そこで、好酸球が産生するメディエーターについて LC-MS/MS を用いた包括的メタボローム解析を行った結果、新しい抗炎症性代謝物レゾルビン E3 (RvE3) を同定し、さらに 12-hydroxy-17,18-epoxy-EETE (12-OH-17,18-EpETE) を同定した^{83,85,86}。これらの新規代謝物はナノモルレベルで好中球の遊走を抑制する内因性の抗炎症性代謝物であり、その活性は既存の抗炎症化合物をしのぐものであった。また、これら化合物の立体異性体をそれぞれ有機合成し、生体内で生成する天然型の立体構造を決定した。構造活性相関の検討から、抗炎症作用は天然型に強い構造特異性が認められ、生体内に特異的受容体が存在することが強く示唆された。EPA 代謝物のメタボローム解析に加え、炎症部位における DHA 代謝物の包括的メタボローム解析を行った。その結果 14,20-dihydroxy-DHA が、好酸球から 12/15-LOX 依存的に生成する主要な DHA 代謝物の一つとして新たに見いだされた^{85,86}。

腸管粘膜層は恒常的に好酸球が多く存在していることが知られているが、好酸球を欠損したマウスでは、デキストラン硫酸で誘導される腸炎が大幅に悪化することを見いだした。その際にプロテクチン D1 など 12/15-LOX 代謝物の量が大幅かつ選択的に低下しており、そこにプロテクチン D1 を投与することで、腸炎及び生存率の大幅な改善が認められた⁸⁶。

さらに、好酸球が 12/15-LOX 依存性機構を介して、マクロファージの CXCL13 の発現調節により、炎症収束を促進することが判明した^[1]。

⁸⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-22116006/>

⁸⁶ <https://projectdb.jst.go.jp/grant/JST-PROJECT-10104012/>

インフルエンザウイルス感染症において 12/15-L0X 代謝系及びプロテクチン D1 が内因性の制御因子であることを見いだした^{[2], 86}。プロテクチン D1 には従来抗炎症作用が示されていたが、今回インフルエンザウイルス感染に対する有効性が認められた。さらにその作用機構として、ウイルス RNA が核内から細胞質へ移行する過程を阻害するという、従来の治療薬にはない新規の作用点であることが明らかになった。

ω 3 脂肪酸合成酵素 (fat-1) のトランスジェニックマウスを用いた解析から、心臓マクロファージが生成する EPA 代謝物 18-HEPE に心不全抑制作用があることを見いだした。また、ヒト重症喘息のメタボローム解析から、プロテクチン D1 などの ω 3 系の代謝異常を見だし、病態の進展に関わる可能性を示した^{[3], [4], 85, 86}。

LC-MS/MS による脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析システムにイオンモビリティ技術の導入を試み、これまでにない高感度かつ高分解能の分析が可能になった (図 3-24)。この系を用いることで国内外のグループとの共同研究を通じて、疾患制御における脂肪酸代謝バランスの重要性に関する基礎研究を牽引した。また、食用油に含まれる ω 3 脂肪酸バランスが食物アレルギーの発症に影響することを明らかにした⁸⁷。

脂質分子種の多様性がかさどる機能的な性質をリポクオリティと捉え、生命現象におけるリポクオリティ多様性の意義を明らかにすることを目的として、リポクオリティ多様性を識別できる最先端の質量分析技術を開発し、その機能発現に関わる脂質分子や標的分子の同定、及びその動作原理の解明を目指している⁸⁸。

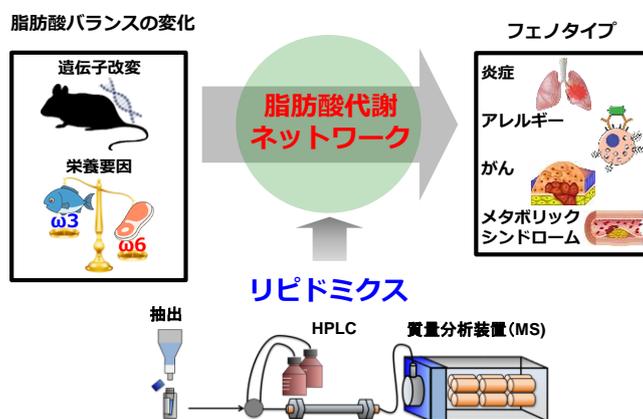


図 3-24 疾患制御における脂肪酸代謝バランスの重要性
(有田教授提供)

⁸⁷ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15H04648/>

⁸⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-AREA-3701/>

②社会・経済への波及効果

本研究により、疾患との関連において、RvE1 を始め EPA 由来抗炎症性メディエーターの肺線維化に対する有効性、EPA 代謝物 18-HEPE の心不全抑制作用、ヒト重症喘息における PD1 などの ω 3 系の代謝異常が明らかになり、今後臨床応用、創薬開発が期待される。また、 ω 3 脂肪酸を多く含む食用油によって食物アレルギーの発症や進展が制御できることが明らかになり、今後、機能性食品や創薬シーズとしての応用が大いに期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Tani Y., Isobe Y., Imoto Y., Segi-Nishida E., Sugimoto Y., Arai H., Arita M. “Eosinophils control the resolution of inflammation and draining lymph node hypertrophy through the proresolving mediators and CXCL13 pathway in mice”, *FASEB Journal*, 2014, 28(9), 4036-4043.
- [2] Morita M., Kuba K., Ichikawa A., Nakayama M., Katahira J., Iwamoto R., Watanebe T., Sakabe S., Daidoji T., Nakamura S., Kadowaki A., Ohto T., Nakanishi H., Taguchi R., Nakaya T., Murakami M., Yoneda Y., Arai H., Kawaoka Y., Penninger J.M., Arita M., Imai Y. “The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza”, *Cell*, 2013, 153(1), 112-125.
- [3] Miyata J., Fukunaga K., Iwamoto R., Isobe Y., Niimi K., Takamiya R., Takihara T., Tomomatsu K., Suzuki Y., Oguma T., Sayama K., Arai H., Betsuyaku T., Arita M., Asano K. “Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 131(2), 353-360.
- [4] Endo J., Sano M., Isobe Y., Fukuda K., Kang J.X., Arai H., Arita M. “18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling”, *Journal of Experimental Medicine*, 2014, 211(8), 1673-1687.

④その他

本研究者は研究終了後に、日本脂質栄養学会賞ランズ賞—学術賞(2016 年)を受賞している。

3.2.2 脂質ヒドロペルオキシドによる細胞機能制御と疾病との関連の解析(今井浩孝)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

生体膜を構成するリン脂質は、活性酸素などにより、酸化を引き起こし、リン脂質ヒドロペルオキシドが生じ、これは更に代謝され、細胞膜の崩壊などを伴う細胞死を引き起こす。本研究者らはこれまでに、リン脂質ヒドロペルオキシド還元酵素、リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(PHGPx)(図 3-25)に着目し、その機能の解析を通して、脂質ヒドロペルオキシドの生理的な役割として、エイコサノイド産生制御機能、アポトーシス制御などを明らかにしてきた。PHGPxには一つの遺伝子から、(a)核小体、(b)細胞質や核などオルガネラ(非ミトコンドリア)、(c)ミトコンドリアに局在する三つのタイプが存在する。PHGPx全欠損マウスは発生初期過程で致死となるが、その原因は不明であった。本研究では、PHGPx欠損による発生初期過程での致死の機構解明、関連する酸化脂質の同定、この細胞死の特異性、脂質ヒドロペルオキシド起因による疾病について、酸化脂質メタボローム解析を行い明らかにすることを目的とした。これらの解析から新たな脂質ヒドロペルオキシドの機能としての新規細胞死制御機構や病態発生のメカニズムを明らかにすることを旨とした⁸⁹。

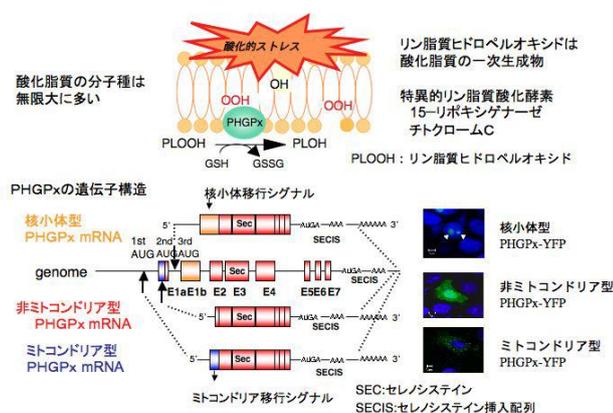


図 3-25 リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) の構造と機能⁸⁹

②期間中の研究成果

(i) 発生過程における三つのタイプの PHGPx の機能解析

核小体型、非ミトコンドリア型、ミトコンドリア型の3タイプのPHGPxのどれが発生過程で重要なのかを調べた結果、非ミトコンドリア型PHGPxのみでES細胞の元になる Inner Cell Mass (ICM) 形成不全を抑制できた。脂質の過酸化を抑制できるビタミンE、その誘導体トコロ

⁸⁹ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/imai.html>

ックス及びPHGPx活性を持つエブセレンによりICM形成不全を抑制できたが、スーパーオキシドを消去できるMnTBAPや過酸化水素生成を抑えるN-アセチルシステインやグルタチオンでは抑制することができなかった。以上の結果から、ICM形成の際には何らかの脂質過酸化反応が常に起こっており、正常なICM形成にはPHGPxによるこの脂質酸化物の生成を抑制することが必須であることが明らかになった⁸⁹。

(ii) PHGPx 欠損による新規細胞死の解析

PHGPx欠損による細胞死は一般の細胞でも認められ、その脂質過酸化は細胞質側の脂質過酸化が起因となっていると考えられた。そのメカニズム検討の結果、典型的なアポトーシスとは異なること、ネクローシスでもないこと、オートファジー性細胞死とも異なる全く新しい細胞死が誘導されていることが明らかになった。本細胞死におけるリン脂質の変化のメタボローム解析から、PHGPxは細胞増殖必須因子であり、膜リン脂質酸化を抑制あるいは還元することにより、細胞膜のホメオスタシスを維持し、細胞増殖を正常に維持しており、このホメオスタシスの破綻により新規の細胞死が誘導されることが明らかになった⁸⁹。

(iii) 組織特異的 PHGPx 欠損マウスの表現型の解析

男性不妊症患者のうち重度乏精子症の約3割の患者において、精子中のPHGPxが著しく低下した症例を見いだしていた⁹⁰。精巣特異的PHGPx欠損マウスを用いた解析の結果、雄において精母細胞の約80%の細胞死、著しい精子数の減少、精子ミトコンドリア膜電位の消失、尻尾が折れ曲がる表現型を示し、雄が不妊となることが明らかになった。また、この異常はミトコンドリア型PHGPxの欠損によるものであることが明らかになった^[1]。

土壌中のセレン欠乏地域に住むヒトでは心筋症を引き起こすことが知られている。心筋特異的PHGPx欠損マウスを用いた解析の結果、このマウスでは心臓は正常に形成されていたが、17.5日に致死となることが明らかになった。PHGPxは心筋における機能、生存に重要な役割をしていることが判明した。

肝臓特異的PHGPx欠損マウスを用いた解析の結果、このマウスは出生後に速やかに死亡することが明らかになった。17.5日以降、肝臓の萎縮及びTUNEL陽性細胞が出現し、肝細胞の脱落が観察され、18.5日ではPCOOH(ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド)の蓄積及び血液中GOTの著しい上昇が見られ、肝障害により致死となることが示された⁸⁹。

(iv) PHGPx のプロモーター領域の解析

3タイプのPHGPxのプロモーター領域を解析した結果、それぞれ異なるコア領域を持つことが判明し、非ミトコンドリア型コアプロモーターが他の2者に比し高い活性を示した。ま

⁹⁰ Imai H., Suzuki K., Ishizaka K., Ichinose S., Oshima H., Okayasu I., Emoto K., Umeda M., Nakagawa Y. "Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males", *Biology of Reproduction*, 2001, 64, 674-683.

たTNF α によるPHGPxの発現亢進を解析した結果、転写因子C/EBP ϵ がTNF α 誘導PHGPxの発現亢進において重要な転写因子であることが明らかになった^{[2],[3]}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内

- [1] Imai H., Hakkaku N., Iwamoto R., Suzuki J., Suzuki T., Tajima Y., Konishi K., Minami S., Ichinose S., Ishizaka K., Shioda S., Arata S., Nishimura M., Naito S., Nakagawa Y. “Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice”, *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(47), 32522-32532.
- [2] Imai H., Saito M., Kirai N., Hasegawa J., Konishi K., Hattori H., Nishimura M., Naito S., Nakagawa Y. “Identification of the positive regulatory and distinct core regions of promoters, and transcriptional regulation in three types of mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase”, *Journal of Biochemistry*, 2006, 140(4), 573-590.
- [3] Hattori H., Imai H., Kirai N., Furuhashi K., Sato O., Konishi K., Nakagawa Y. “Identification of a responsible promoter region and a key transcription factor, CCAAT/enhancer-binding protein ϵ , for up-regulation of PHGPx in HL60 cells stimulated with TNF α ”, *Biochemical Journal*, 2007, 408(2), 277-286.

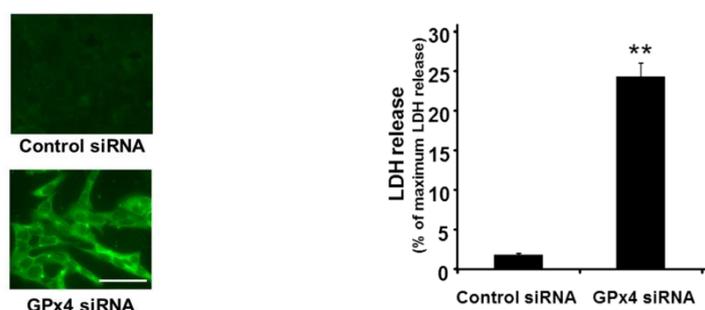
(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(C)「shRNA ライブラリーにより同定した新規細胞死実行因子の機能解析」(2014~2016 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明「心不全の原因となる脂質酸化依存的フェロトキシ様新規細胞死の分子メカニズムの解析」(2015~2016 年度)、「脂質酸化依存的新規細胞死「リポキトーシス」実行因子の細胞及び個体での機能解析」(2017~2018 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)脂質クオリティが解き明かす生命現象「酸化リン脂質代謝フラクソーム解析を用いたオキシリポクオリティ制御機構の解析」(2016~2017 年度)、AMED CREST 脂質 酸化脂質をターゲットとした疾患メカニズム解明および創薬基盤研究「脂質ラジカル依存的新規細胞死の作用機序解明とラジカル抑制剤の In vivo 評価」(2017~2022 年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

光受容細胞特異的グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)4 コンディショナルノックアウトマウスを用いて光受容細胞の酸化ストレスに対する GPx4 の機能を解析した結果、GPx4 が光受容細胞の成熟、生存に極めて重要であることが明らかになった^[1]。また、網膜においても、GPx4 発現の欠損により、酸化ストレス誘発細胞死が亢進することが判明した(図 3-26)^[2]。

さらに、GPx4 は角膜上皮細胞の酸化ホメオスタシス、生存及び創傷治癒においても重要な役割を担うことが明らかになった^[3]。



GPx4 siRNA: siRNA による GPx4 発現抑制 LDH(乳酸脱水素酵素)による細胞死アッセイ
図 3-26 GPx4 発現抑制による過酸化脂質レベル(左)及び酸化ストレス誘発細胞死(右)^[2]

PHGPx 欠損マウス胚線維芽細胞(MEF 細胞)を用いて化合物ライブラリーや shRNA ライブラリーをスクリーニングすることにより新規細胞死に関与する分子の同定を行い、致死を抑制する化合物 6 種類、致死を抑制する 20 以上の shRNA 遺伝子の同定に成功した。これらの分子は既知の細胞死誘導因子とは異なるものであった⁹¹。GPx4 欠損細胞死の実行遺伝子(ノックダウンにより細胞死が抑制できた遺伝子群)のうちクローニングできた 19 遺伝子についてその発現分布を調べた結果、二つが細胞膜あるいは小胞体に存在し、一つは核及び核小体、残りは全て細胞質に存在するタンパク質であることが示唆された。しかし、いずれも脂質酸化に応じた移動は観察されなかった⁹²。

GPx4 欠損細胞死とサルファサラジン(SAS)添加によるフェロトーシスとでその細胞死経路の違いを検討した結果、フェロトーシスは鉄依存性であるが、GPx4 欠損細胞死は鉄非依存性であること、また脂質ヒドロペルオキシド生成についても同様であることが判明した。これらの結果から、両者は異なるメカニズムを介する細胞死であることが明らかになった⁹³。また GPx4 欠損細胞死の実行遺伝子のノックダウン細胞株は、抗がん剤によるフェロトーシスを抑制できなかった。そこで抗がん剤によるフェロトーシスとは異なる細胞死であることからリポキシトーシスと名付け、これを担うリポキシトーシス実行因子 lipo 遺伝子の細胞、個体レベルでの機能の解明を目指した^{[4], 94}。

重水素型 PCOOH を用いた酸化リン脂質の代謝フラクソーム解析系を構築し、GPx4 細胞死及びその実行因子群(lipo 遺伝子群)のノックダウン細胞を用いて重水素型 PCOOH の代謝産物の経時的変化を追うことにより、新たな PCOOH 代謝経路、酵素、新規細胞死の実行に関わ

⁹¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23590089/>

⁹² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26460075/>

⁹³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-15H01386/>

⁹⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PUBLICLY-17H05513/>

る酸化脂質分子の全体像(フラクソームマップ)を明らかにすることを旨とした⁹⁵。

②社会・経済への波及効果

本研究により、脂質ヒドロペルオキシド及びリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(PHGPx)の生理機能、疾病との関連の一端が明らかになり、臨床応用、創薬開発の可能性が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Ueta T., Inoue T., Furukawa T., Tamaki Y., Nakagawa Y., Imai H., Yanagi Y. “Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells”, *Journal of Biological Chemistry*, 287, 2012(10), 7675-7682.
- [2] Sakai O., Uchida T., Roggia M.F., Imai H., Ueta T., Amano S. “Role of glutathione peroxidase 4 in glutamate-induced oxytosis in the retina”, *PLoS One*, 2015, 10(6), e0130467.
- [3] Sakai O., Uchida T., Imai H., Ueta T. “Glutathione peroxidase 4 plays an important role in oxidative homeostasis and wound repair in corneal epithelial cells”, *FEBS Open Bio*, 2016, 6(12), 1238-1247.
- [4] Imai H., Matsuoka M., Kumagai T., Sakamoto T., Koumura T. “Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis”, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, 403, 143-170.

⁹⁵ <https://sites.google.com/site/lipoqualityjpn/public-offering-study>

3.2.3 脳神経ネットワーク形成における脂質機能の網羅的解析(榎本和生)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

アルツハイマー病やダウン症候群など精神疾患患者の脳では、神経突起の構造や分岐の異常が頻繁に観察されることから、神経突起の形態異常に起因する神経回路の破綻が発症の主因である可能性が指摘されている。一方で、脂質代謝機構に異常が生じると、神経突起の形成不全を伴う精神疾患を発症する確率が高いことから、脂質が神経突起形成(図3-27)⁹⁶において重要な機能を果たしていることが予想されているが、その機能メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、ショウジョウバエを個体モデルとして、脳神経系の多様な脂質代謝物を生み出す分子基盤を網羅的に同定するとともに、その神経突起形成における機能を解明することを目的とした。さらに、脂質代謝物の動態や神経機能を生体脳内において直接評価するための新技术を創出することにより、脂質による脳神経ネットワーク形成制御機構を総合的に理解することを目指した⁹⁷。

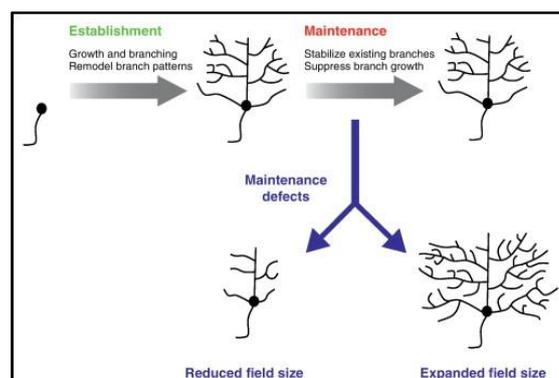


図 3-27 樹状突起受容領域の形成と維持の主な過程⁹⁶:

維持機構の破綻は受容領域の縮小あるいは拡大を引き起こし、しばしば神経障害に関係する

② 期間中の研究成果

(i) ダウン症候群関連分子 Dscam の樹状突起形成における機能

Dscam変異体を用いた解析の結果、感覚ニューロン樹状突起の領域形成に異常が生じることを見いだした。すなわち、通常、樹状突起同士はほとんど混じり合うことはないが、Dscam変異体では、突起同士が交差し合い、樹状突起の形成が不全になった。したがっ

⁹⁶ <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438812000633>

⁹⁷ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/emoto.html>

て、Dscamは樹状突起間に生じる反発運動に必須であることが判明した^[1]。

(ii) 感覚ニューロン樹状突起の形成・維持・再編に関わる脂質代謝酵素群の網羅的同定

脳神経系に発現する脂質代謝関連遺伝子群を同定するとともに、樹状突起の「伸長」、「分岐」、「停止」、「シナプス形成」の各ステージに特異的な表現型を示す遺伝子群を抽出した。その結果、「伸長・分岐」25遺伝子、「停止」11遺伝子、「シナプス形成」5遺伝子において特徴的な表現型が観察された⁹⁷。

(iii) イノシトールリン脂質代謝と TOR キナーゼによる樹状突起伸長・分岐と領域化の制御

上記の「伸長・分岐」遺伝子群の中には、ホスファチジルイノシトール(PI)代謝経路関連因子群が多数含まれることに着目し、PI代謝と樹状突起形成との関連について検討した結果、脂質メディエーターPIP3の産生が樹状突起の分岐・伸長制御に必須であることが示された。さらに、PIP3の主要な下流エフェクター因子群としてAktキナーゼとTOR(Target of Rapamycin)キナーゼを同定した。TORキナーゼ2種の機能解析の結果、TORC1は突起伸長・分岐に必須であり、TORC2は突起伸長の領域化(樹状突起の大きさが一定値に達すると突起伸長を停止する)に必須であることが明らかになった。つまり、TORC1はPIP3→Akt経路の下流で樹状突起の伸長・分岐を促進するのに対して、TORC2はPIP3→Akt経路に対してネガティブに働きかけることが示され、TORキナーゼが、樹状突起の「伸長・分岐(=アクセル)」と「停止(ブレーキ)」を協調的に制御することで、樹状突起の大きさが一定に保たれるという作動モデルを提唱した^{[2], 97}。

(iv) 樹状突起のリモデリングを制御する細胞外マトリックス代謝

ショウジョウバエ感覚ニューロンの樹状突起リモデリングを解析モデルとして、リモデリングに必須な遺伝子の網羅的検索の結果、細胞外マトリックス分解酵素Matrix metalloproteinase(Mmp)を同定した。さらに、Mmpの発現が樹状突起リモデリングに合わせて一過的に上昇し、誘導されたMmpは感覚ニューロン周辺の細胞外基質を限定分解することにより樹状突起リモデリングを促すことを明らかにした。これらの結果は、細胞外マトリックスの限定分解が、樹状突起リモデリングの基本制御メカニズムであることを初めて示した成果である^{[3], 97}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Soba P., Zhu S., Emoto K., Younger S., Yang S.J., Yu H.H., Lee T., Jan L.Y., Jan Y.N. “Drosophila Sensory Neurons Require Dscam for Dendritic Self-Avoidance and Proper Dendritic Field Organization”, *Neuron*, 2007, 54(3), 403-416.

[2] Koike-Kumagai M., Yasunaga K., Morikawa R., Kanamori T., Emoto K. “The target

of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of *Drosophila* sensory neurons through the Tricornered kinase signaling pathway”, *EMBO Journal*, 2009, 28(24), 3879-3892.

- [3] Yasunaga K., Kanamori T., Morikawa R., Suzuki E., Emoto K. “Dendrite reshaping of adult *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes”, *Developmental Cell*, 2010, 18(4), 621-632.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「ニューロン樹状突起の維持を司る分子基盤と作動原理の遺伝学的研究」(2009～2011 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「血管-神経相互作用を担うシグナル分子の網羅的探索」(2010～2015 年度)、基盤研究(B)「感覚ニューロン受容領域の形成と維持を担う分子細胞基盤に関する遺伝学的研究」(2012～2015 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)行動適応を担う脳神経回路の機能ソフト機構「モノアミン作動性ニューロンによる嗅覚嗜好性制御機構の解明」(2015～2016 年度)及び新学術領域研究(研究領域提案型)「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御」(2016～2020 年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

神経系で特異的に発現するユビキチンリガーゼ様タンパク質を発見し、Dap(defective in axon patterning)と名付けた。Dap 変異体の解析から、Dap は末梢神経系の軸索パターンを規定する決定因子と考えられた。また、Dap と機能的相関を示す分子として、軸索ガイダンス因子 Netrin とその受容体 Frazzled を同定した⁹⁸。

樹状突起を安定化させる分子機構の解明のため、本研究者らが同定した、隣接するショウジョウバエ感覚ニューロン間の突起間競合において中心的な役割を担う、Hippo pathway を構成するリン酸化酵素 Hippo キナーゼと NDR キナーゼによるリン酸化シグナルに着目し、先に確立した高感度ライブ・イメージングシステムを用いて解析した結果、受容領域を確立したニューロンの樹状突起先端部において明瞭なシグナルを確認することができた。また、Hippo-NDR リン酸化シグナルの下流で働く因子群の同定を行い、候補遺伝子 32 個を単離し、その中から細胞骨格系制御への関与が予測される 5 遺伝子について更に解析を進めた⁹⁹。また、突起間競合バランス制御における Hippo-NDR シグナルのゲイン・コントロール機構を明らかにすることを目指した¹⁰⁰。

末梢神経系の機能分化及びリプログラミング機構を簡便に評価できるアッセイ系を構築

⁹⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-21025033/>

⁹⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21300143/>

¹⁰⁰ <http://cell-competition.com/blog/invitation/%E6%A6%8E%E6%9C%AC%E3%80%80%E5%92%8C%E7%94%9F/>

し、この系を用いてスクリーニングを行い、8個のエピジェネティック制御因子が末梢神経分化に関わる可能性を見いだした。また、ニューロン選択的細胞死を規定するエピジェネティック因子として、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 を同定した。さらに神経細胞リプログラミングの可視化のため細胞内シグナル変動の網羅的検索を行う過程で、神経細胞内におけるカルシウム振動がリプログラミングの制御に関わることが示唆された¹⁰¹。

ショウジョウバエの気管網と末梢神経回路網を解析モデルとして、血管(気管)-神経相互作用に介在する新規因子群の網羅的探索を行った結果、IgG ファミリーに属する細胞接着因子 Fas II/NCAM が成虫羽原基における気管-神経相互作用に介在することにより、末梢ニューロンの求心性神経軸索投射を制御することを見いだした¹⁰²。

ショウジョウバエ成虫感覚ニューロンの解析を行い、樹状突起の再編において、不要突起の刈り込みの制御機構として、刈り込まれる樹状突起のみにカルシウム流入が起きることにより、タンパク質切断因子カルパインの活性化を誘導し、その突起の不安定化が誘導されることを示した^[1]。また、樹状突起再編に関わる新たな因子として Rab5 と Dynamin を同定した。両者が樹状突起局所のエンドサイトーシスを誘導することにより突起構造の変形を促し、突起のコンパートメント化と除去のトリガーとなる可能性を示した(図 3-28)^[2]。

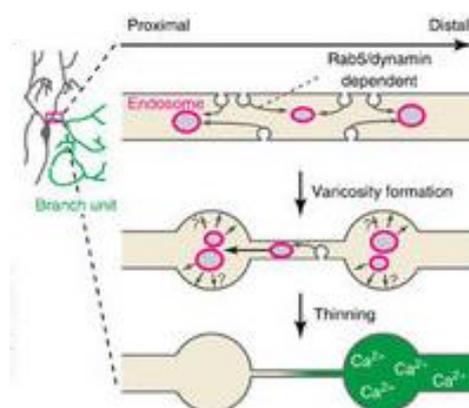


図 3-28 Rab5/dynamin による局所エンドサイトーシスの誘導及び Ca^{2+} の流入^[2]

さらに、樹状突起間に生じる反発作用には依存しない受容領域形成機構の責任因子として、Wnt5 と、その受容体 DrI を同定した。DrI の下流シグナルの同定もを行い、低分子量 G タンパク質 RhoGTPase の GDP/GTP 交換因子(GEF)である Trio が RhoA の活性化を介して細胞骨格の再編を誘導することを示した^{[3],103}。

ヒトの情動行動を規定する主要制御因子であるモノアミンに着目し、ドーパミン作動性ニューロンとオクトパミン作動性ニューロンが協調してショウジョウバエの嗅覚嗜好性を

¹⁰¹ https://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/JST_1111057_09154540_EE.pdf

¹⁰² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-22122008/>

¹⁰³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24300124/>

規定することを示した。また D1 型ドーパミン受容体下流で働く PKA 生理基質を探索し、進化上高度に保存されたリン酸化酵素 DCLK を同定した。さらに DCLK キナーゼは種間で共通に働くドーパミン・シグナル因子であることが示唆された^[4]。

脳神経系において特徴的に見られる創造的破壊(スクラップ&ビルド)現象に着目し、それを担う分子実体と連動メカニズムを解明し、更に明らかにした分子実体や制御基盤を手掛かりとして、神経回路スクラップ&ビルドと脳機能や病態との連関を個体レベルで解明することを目指した¹⁰⁴。

②社会・経済への波及効果

ダウン症候群などの神経疾患では、一旦構築された機能的脳神経回路が、その後徐々に退縮・変性することが報告されている。したがって、構築された脳神経回路は積極的に維持・管理されていることが示唆される。神経回路の形成・維持に関する本研究成果は、将来的に神経疾患の予防や治療に役立つ基礎データを提供できる可能性がある。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Kanamori T., Kanai M.I., Dairyo Y., Yasunaga K., Morikawa R.K., Emoto K. “Compartmentalized calcium transients trigger dendrite pruning in *Drosophila* sensory neurons”, *Science*, 2013, 340(6139), 1475-1478.
- [2] Kanamori T., Yoshino J., Yasunaga K., Dairyo Y., Emoto K. “Local endocytosis triggers dendritic thinning and pruning in *Drosophila* sensory neurons”, *Nature Communications*, 2015, 6, 6515.
- [3] Yasunaga K., Tezuka A., Ishikawa N., Dairyo Y., Togashi K., Koizumi H., Emoto K. “Adult *Drosophila* sensory neurons specify dendritic territories independently of dendritic contacts through the Wnt5-DrI signaling pathway”, *Genes & Development*, 2015, 29(16), 1763-1775.
- [4] Koizumi H., Fujioka H., Togashi K., Thompson J., Yates JR.3rd, Gleeson J.G., Emoto K. “DCLK1 phosphorylates the microtubule-associated protein MAP7D1 to promote axon elongation in cortical neurons”, *Developmental Neurobiology*, 2017, 77(4), 493-510.

④その他

本研究者は研究終了後に、塚原伸晃記念賞(ブレインサイエンス振興財団)(2014 年)を受賞している。

¹⁰⁴ http://www.mext.go.jp/component/a_menu/science/detail/__icsFiles/afieldfile/2017/07/03/1386953_11.pdf

3.2.4 硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明(川島博人)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

糖鎖は糖転移酵素や硫酸基転移酵素などの糖鎖関連遺伝子産物を介して産生される代謝産物で、細胞接着、免疫、がん転移、ウイルス感染、タンパク質品質管理などにおいて重要な役割を果たしている。本研究者はこれまでに、高内皮細静脈(HEV)に特異的に発現する硫酸化糖鎖 PNAd(peripheral lymph node addressin)(図 3-29)が、末梢リンパ節へのリンパ球ホーミングに必須の役割を果たすことを示してきた。本研究では、硫酸化糖鎖の組織特異的機能解析及びその発現を制御する硫酸基転移酵素の発現制御機構の解明を通じて、代謝産物である糖鎖の機能及び発現制御機構を組織特異的に解析するための基盤技術の整備を指向した研究を進めた¹⁰⁵。

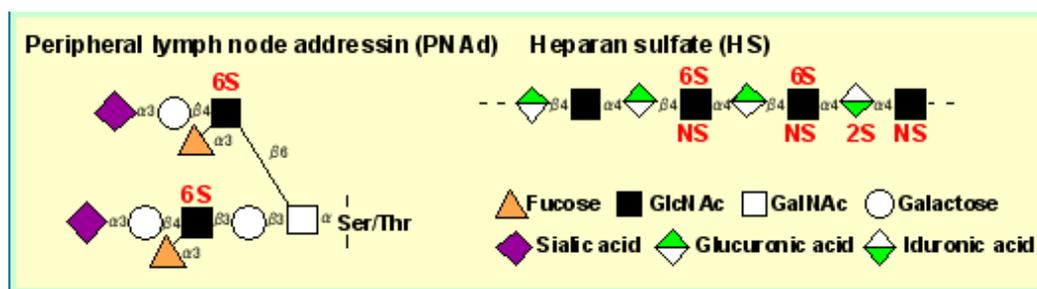


図 3-29 本研究で着目した硫酸化糖鎖の構造¹⁰⁵

② 期間中の研究成果

(i) GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスの樹立

PNAd生合成に関与する硫酸基転移酵素GlcNAc6ST-2遺伝子のプロモーター/エンハンサーの支配下にCreリコンビナーゼを発現する新規トランスジェニック(Tg)マウス(GlcNAc6ST-2-Cre Tgマウス)を樹立した。このマウスは外見・行動・受精共に正常であり、リンパ球ホーミングアッセイによる検討を行ったところ、リンパ球の体内動態も正常であった。GlcNAc6ST-2の組織分布を調べた結果、末梢リンパ節(PLN)のみではなく、鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)のHEV及び大腸上皮細胞においても発現が認められた^{[1], 105}。

(ii) NALTのHEVにおける硫酸化糖鎖の機能解析

NALTのHEVにおける硫酸化糖鎖の機能解析の結果、GlcNAc6ST-2単独欠損マウスではPNAdの発現は低下するものの完全には欠失しなかったことから、GlcNAc6ST-1とGlcNAc6ST-2の両者がNALTのHEVにおけるPNAdの生合成に関与すると考えられた。また、PNAdはこれまでに

¹⁰⁵ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/kawashima.html>

知られていたPLNへのホーミングのみでなく、粘膜系のリンパ組織の一種であるNALTへのホーミングにも関与すること、また経鼻的に侵入する抗原に対するアレルギー反応にも関与することが明らかになった。これらの知見から、PNAdを標的とした新しい抗アレルギー薬の開発が可能であることが示唆された¹⁰⁵。

(iii) 大腸上皮細胞における硫酸化糖鎖の機能解析

大腸上皮細胞における硫酸化糖鎖の機能解析の結果、GlcNAc6ST-2は大腸内において腸内細菌の嫌気発酵産物である酪酸によりその発現が制御され、分泌型ムチンMuc2のO-結合型糖鎖を硫酸化することで上皮細胞の保護や恒常性の維持及び大腸炎に対する防御機能を果たすことが示唆された^{[2], 105}。

(iv) ヘパラン硫酸コンディショナルノックアウトマウスの作製とその解析

末梢リンパ節HEV及び大腸上皮細胞特異的ヘパラン硫酸欠損マウスを作製し、HEV及び大腸上皮細胞におけるヘパラン硫酸(HS)の発現がほぼ欠損することを確認した。また、HEVに局在するケモカインCCL21の量が大きく低下し、ヘパラン硫酸がHEV上におけるケモカインの提示に関与することが明らかになった^{[3], 105}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Kawashima H., Hirakawa J., Tobisawa Y., Fukuda M., Saga Y. “Conditional gene targeting in mouse high endothelial venules”, *Journal of Immunology*, 2009, 182(9), 5461-5468.
- [2] Tobisawa Y., Imai Y., Fukuda M., Kawashima H. “Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice”, *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(9), 6750-6760.
- [3] Bao X., Moseman E. A., Saito H., Petryanik B., Thiriot A., Hatakeyama S., Ito Y., Kawashima H., Yamaguchi Y., Lowe J. B., von Andrian U. H., Fukuda M. “Endothelial heparan sulfate controls chemokine presentation in recruitment of lymphocytes and dendritic cells to lymph nodes”, *Immunity*, 2010, 33(5), 817-829.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「新規抗糖鎖抗体を用いた慢性炎症性疾患における糖鎖の機能解明」(2012～2015年度)、基盤研究(B)「腸内細菌バランスの正常化に基づく炎症性腸疾患の新規治療法の開発」(2016～2018年度)、さらに、AMEDの次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発 糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業 技術開発

提案 A「世界初の抗糖鎖抗体医薬の開発に向けた革新的抗糖鎖モノクローナル抗体作製技術の確立」(2016~2020 年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

糖鎖合成酵素欠損マウスにおいてはその欠損している酵素で合成される糖鎖が高い抗原性を示すという原理に基づく、効率の良い抗糖鎖モノクローナル抗体(mAb)作製法を樹立した(図 3-30)^[1]。その応用例として、硫酸基転移酵素欠損マウスを用いて抗硫酸化糖鎖 mAb を作製し、同抗体を用いて硫酸化 N-型糖鎖及び O-型糖鎖がリンパ球ホーミングと免疫監視に協調的に機能することを明らかにした^{106, 107}。

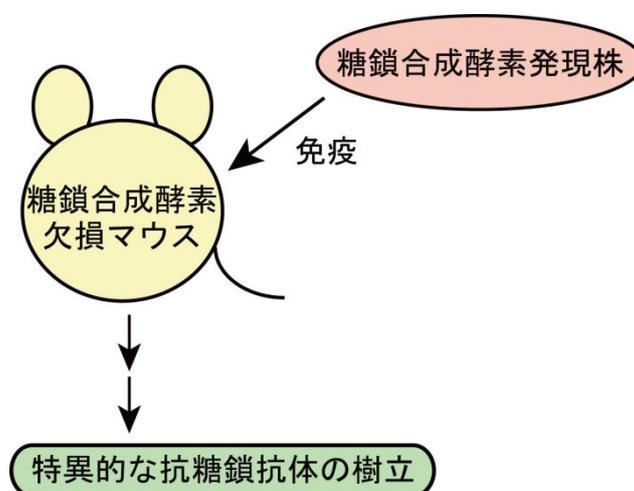


図 3-30 新規抗糖鎖モノクローナル抗体作成法¹⁰⁷
糖鎖遺伝子欠損マウスを糖鎖遺伝子過剰発現細胞で免疫する

この独自に開発した方法論に基づき、ユニークなフコシル化糖鎖抗原シアリルルイス X に特異的な mAb (F1、F2) の樹立に成功した。マウス接触性皮膚炎モデル及びシリカ誘発性慢性肺炎モデルにおいて、F1、F2 を用いた検討の結果、特定のタイムポイントでシアリルルイス X の機能を阻害することにより、効果的に炎症を抑制できることが判明した^{[2], 108}。

HS による HEV へのケモカインの提示はリンパ球の末梢リンパ節へのホーミングの必要条件なのかどうかを、HS 合成に必須なグリコシルトランスフェラーゼをコードする Ext1 の HEV 特異的欠損マウスを用いて解析した結果、このマウスでは HEV 特異的に HS の発現とケモカインの提示の抑制が見られ、リンパ球ホーミングが 30~40%低下していた。この結果か

¹⁰⁶ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-22659018/>

¹⁰⁷ Hirakawa J., Tsuboi K., Sato K., Kobayashi M., Watanabe S., Takakura A., Imai Y., Ito Y., Fukuda M., Kawashima H. “Novel anti-carbohydrate antibodies reveal the cooperative function of sulfated N- and O-glycans in lymphocyte homing”, *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285, 40864-40878.

¹⁰⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24390018/>

ら、HS による HEV 表面におけるケモカインの提示は、リンパ球ホーミングに必須ではないが、促進する働きを持つことが示唆された^[3]。

びまん性硬化型甲状腺乳頭がん (DSPTC) の特徴の一つがリンパ球の濃密な浸潤である。17 例の DSPTC を解析した結果、HEV 様細静脈が、細胞間接着分子 1 (ICAM-1) とともにシアリルルイス X グリカンを発現していることを見いだした。HEV 様細静脈に浸潤した主なリンパ球は CD8⁺T 細胞であり、DSPTC がん細胞もシアリルルイス X グリカンを発現していた。以上の結果から、DSPTC においてシアリルルイス X グリカンは ICAM-1 とともに CD8⁺T 細胞をリクルートする役割を持ち、がん細胞上のシアリルルイス X グリカンは DSPTC の転移にも貢献していることが示唆された^[4]。

②社会・経済への波及効果

本研究で樹立された抗糖鎖抗体は今後、糖鎖を標的とした新しい炎症性疾患治療薬の開発に寄与することが期待される。また、これらの抗糖鎖抗体を用いた病態バイオマーカーの検出やドラッグデリバリー等への応用も期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Kawashima H. “Generation of anti-sulfated glycan antibodies using sulfotransferase- deficient mice”, *Methods in Molecular Biology*, 2013, 1022, 51-60.
- [2] Matsumura R., Hirakawa J., Sato K., Ikeda T., Nagai M., Fukuda M., Imai Y., Kawashima H. “Novel antibodies reactive with Sialyl Lewis X in both humans and mice define its critical role in leukocyte trafficking and contact hypersensitivity responses” *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(24), 15313-15326.
- [3] Tsuboi K., Hirakawa J., Seki E., Imai Y., Yamaguchi Y., Fukuda M., Kawashima H. “Role of high endothelial venule-expressed heparan sulfate in chemokine presentation and lymphocyte homing”, *Journal of Immunology*, 2013, 191(1), 448-455.
- [4] Low S., Sakai Y., Hoshino H., Hirokawa M., Kawashima H., Higuchi K., Imamura Y., Kobayashi M. “High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma”, *Pathology*, 2016, 48(7), 666-674.

3.2.5 オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生(小松雅明)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

栄養飢餓などで著しく誘導されることが明らかになっているオートファジーは、富栄養条件下でも基底レベルで起こっている。この恒常的オートファジーが細胞の恒常性維持に不可欠であり、その破綻が様々なヒト疾病の発症原因となることが判明し、このプロセスにおいて中心的な役割を担う分子としてp62タンパク質が同定された。本研究は、p62について分子から個体レベルの研究を包括的に推進し、恒常的オートファジーの機構解明を行うとともに、神経変性疾患や糖尿病発症に関与するp62モニター系の確立及びその代謝を制御する化合物の同定を行い、病態発症機構及び発症予防・治療方法の確立を目指した(図3-31)¹⁰⁹。

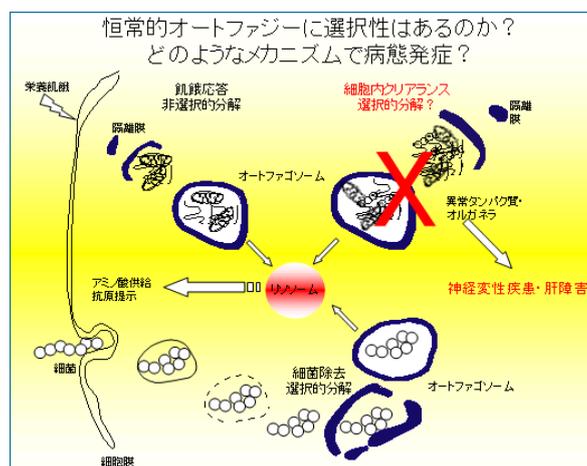


図 3-31 オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生¹⁰⁹

②期間中の研究成果

- (i) オートファジーの選択的基質 p62^[1]
- (ii) オートファジーによる p62 認識分子機構^[2]
- (iii) p62 の代謝異常による病態発症機序^[3]

上記の研究成果の詳細は第 4 章で記述する。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Komatsu M., Waguri S., Koike M., Sou Y.S., Ueno T., Hara T., Mizushima N.,

¹⁰⁹ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/komatsu.html>

Iwata J. I., Ezaki J., Murata S., Hamazaki J., Nishito Y., Iemura S., Natsume T., Yanagawa T., Uwayama J., Warabi E., Yoshida H., Ishii T., Kobayashi A., Yamamoto M., Yue Z., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. “Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice”, *Cell*, 2007, 131(6), 1149-1163.

[2] Ichimura Y., Kumanomidou T., Sou Y. S., Mizushima T., Ezaki J., Ueno T., Kominami E., Yamane T., Tanaka K., Komatsu M., “Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy” *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(33), 22847-22857.

[3] Komatsu M., Kurokawa H., Waguri S., Taguchi K., Kobayashi A., Ichimura Y., Sou Y. S., Ueno I., Sakamoto A., Tong K. I., Kim M., Nishito Y., Iemura S., Natsume T., Ueno T., Kominami E., Motohashi H., Tanaka K., Yamamoto M., “The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1” *Nature Cell Biology*, 2010, 12(3), 213-223.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(S)「オートファジーの破綻によるヒト病態発症機序の解明」(2009～2010 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)オートファジーの集学的研究:分子基盤から疾患まで「オートファジー選択的基質による細胞制御とその病態生理」(2013～2017 年度)、基盤研究(A)「オートファジーが司る転写因子群による代謝制御機構」(2014～2016 年度)、さらに、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「オートファジーの異常に伴う疾患の克服:健康社会実現へ向けて」(2010～2013 年度)、AMED 戦略推進部(がん研究課)次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム(P-DIRECT [AMED])革新的がん医療シーズ育成領域公募課題 A「細胞内ストレス応答機構を標的とした分子標的薬の開発」(2014～2015 年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

p62 の蓄積、凝集を介した Nrf2 の活性化は、肝細胞がんの生存戦略に利用され、オートファジー欠損マウス肝臓において p62 の過剰蓄積を伴った腫瘍が形成されることを見いだした^{[1],[2]}。

p62-Keap1-Nrf2 経路の発見を基盤に、p62 を標的にした抗がん剤としての低分子化合物のハイスループットスクリーニング方法を確立し、Keap1 とリン酸化 p62 (p-p62) との結合を選択的に阻害し得る低分子化合物 K67 を得た^[3]。

肝細胞特異的プロテアソーム機能減弱マウスによる、Atg7 又は p62 の同時欠損実験結果から、細胞はタンパク質恒常性の破綻に应答した複数の細胞防御機構を発揮できることを

明らかにした^[4]。

上記研究も含めた詳細は第4章で記述する。

②社会・経済への波及効果

本研究によって、オートファジーの機能不全が、がんや神経変性疾患など加齢に伴う疾患の病態と密接に関連することが明らかになった。

その他の波及効果等の詳細は第4章に記述する。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

- [1] Inami Y., Waguri S., Sakamoto A., Kouno T., Nakada K., Hino O., Watanabe S., Ando J., Iwadate M., Yamamoto M., Lee M.S., Tanaka K., Komatsu M. “Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells”, *Journal of Cell Biology*, 2011, 193(2), 275-284.
- [2] Ichimura Y., Waguri S., Sou Y.S., Kageyama S., Hasegawa J., Ishimura R., Saito T., Yang Y., Kouno T., Fukutomi T., Hoshii T., Hirao A., Takagi K., Mizushima T., Motohashi H., Lee M.S., Yoshimori T., Tanaka K., Yamamoto M., Komatsu M. “Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy”, *Molecular Cell*, 2013, 51(5), 618-631.
- [3] Saito T., Ichimura Y., Taguchi K., Suzuki T., Mizushima T., Takagi K., Hirose Y., Nagahashi M., Iso T., Fukutomi T., Ohishi M., Endo K., Uemura T., Nishito Y., Okuda S., Obata M., Kouno T., Imamura R., Tada Y., Obata R., Yasuda D., Takahashi K., Fujimura T., Pi J., Lee M.S., Ueno T., Ohe T., Mashino T., Wakai T., Kojima H., Okabe T., Nagano T., Motohashi H., Waguri S., Soga T., Yamamoto M., Tanaka K., Komatsu M. “p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming”, *Nature Communications*, 2016, 7, 12030.
- [4] Kageyama S., Sou Y.S., Uemura T., Kametake S., Saito T., Ishimura R., Kouno T., Bedford L., Mayer R.J., Lee M.S., Yamamoto M., Waguri S., Tanaka K., Komatsu M. “Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway”, *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(36), 24944-24955.

④その他

本研究者は研究終了後に、文部科学大臣表彰若手科学者賞(2010年)、東京都固有職員表彰(2010年)、Thomson Reuter:The World's Most Influential Scientific Minds 2014, 2015(2014年、2015年)、日本学術振興会賞(2018年)及び日本学士院学術奨励賞(2018年)を受賞している。

3.2.6 代謝産物の変化情報に基づく心筋機能制御法の確立(佐野元昭)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

心不全(心機能低下)は心筋梗塞を始めとする全ての心臓病の終末像でありその生命予後は不良である。高齢化社会を迎えて、心不全患者に占める高齢者の比率が増加している。最近の薬物療法や非薬物療法の進歩によって心筋梗塞、心不全の患者の生命予後は改善されてきてはいるものの、まだ社会的要望を満たしているとはいえない。心不全に対する有効な治療法を確立するには、心不全の発症の分子メカニズムをその背後にある「心筋の老化」という修飾因子も考慮に入れて理解する必要がある(図 3-32)。本研究は、心筋細胞内代謝や新規の心臓生理活性物質の探索を介して、心筋保護による新規心臓病治療法の開発を目指した¹¹⁰。

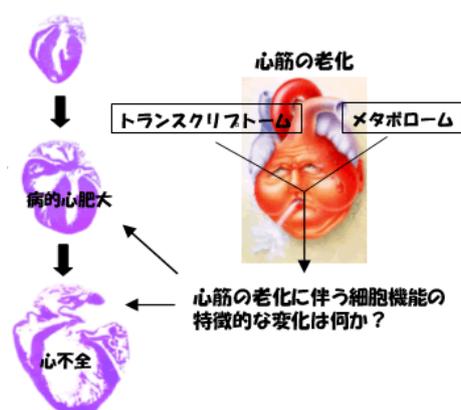


図 3-32 「心筋の老化」を考慮した心不全発症メカニズムの理解¹¹⁰

② 期間中の研究成果

(i) ミトコンドリア酸化ストレスに対する心筋細胞代謝リモデリング

心筋細胞は、グルコースや脂肪酸のミトコンドリアでの酸化的リン酸化によって、効率良くエネルギー(ATP)を産生している。一方で心臓に血行力学的負荷が加わると、脂肪酸の酸化とミトコンドリアでの酸化的リン酸化が抑制され、代わりにグルコースの心筋細胞内への取り込みが亢進する。ミトコンドリア内でアルデヒドを無毒化するアルデヒド脱水素酵素ALDH2を不活性化した遺伝子操作酸化ストレスモデルマウスにおける心筋細胞内代謝応答を網羅的に検討した結果、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の低下、グルコースの取り込みの亢進が見られたが、心筋細胞内エネルギー貯蔵レベルの指標であるクレアチンリン酸やATPの低下はなく心筋収縮力も正常に維持されていた。解糖系の亢進に伴ってペントースリン酸経路やアミノ酸合成経路が活性化され、結果的に抗酸化ストレス応答を担う還元型

¹¹⁰ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/sano.html>

グルタチオン濃度が高いレベルに維持されていることが分かった。以上の結果から、ストレスをかけられた心筋細胞における代謝リモデリングは、ミトコンドリアでの酸化リン酸化を抑えて、活性酸素の発生を抑えるという点では生体にとって有利に働く適応現象である可能性が示唆された。また、心筋収縮機能維持に必要なエネルギー産生は、解糖系の亢進によるミトコンドリアでの酸化リン酸化の低下を補える可能性が示唆された^{[1], 110}。

(ii) グルココルチコイドによる心筋保護効果とプロスタグランジン D2

抗炎症・抗免疫作用のあるグルココルチコイドの心筋細胞における標的遺伝子を網羅的に解析した結果、グルココルチコイドは例外的にphospholipase A2 (PLA2)、cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現を誘導してアラキドン酸代謝を活性化させることが明らかになった。この心筋保護効果はCOX-2阻害剤で消失することから、アラキドン酸代謝の活性化が心筋保護効果に直接関与していると考えられた。グルココルチコイドによりリポカリン型プロスタグランジン (PG) D2合成酵素 (L-PGDS) が誘導され、PGD2を優位に産生させることも見いだした。以上の結果から、心筋細胞に対してグルココルチコイド治療は細胞保護的に作用するがその効果はCOX-2依存性であることが判明した。臨床の現場でしばしば解熱鎮痛剤として投与されるCOX-2阻害剤との併用によってグルココルチコイドの心筋細胞保護効果がマスクされている可能性が示唆された^{[2], [3], 110}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Endo J., Sano M., Katayama T., Hishiki T., Shinmura K., Morizane S., Matsuhashi T., Katsumata Y., Zhang Y., Ito H., Nagahata Y., Marchitti S., Nishimaki K., Wolf A.M., Nakanishi H., Hattori F., Vasiliou V., Adachi T., Ohsawa I., Taguchi R., Hirabayashi Y., Ohta S., Suematsu M., Ogawa S., Fukuda K. “Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart”, *Circulation Research*, 2009, 105(11), 1118-1127.
- [2] Yoshikawa N., Nagasaki M., Sano M., Tokudome S., Ueno K., Shimizu N., Imoto S., Miyano S., Suematsu M., Fukuda K., Morimoto C., Tanaka H. “Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in cardiac metabolism”, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2009, 296(6), E1363-1373.
- [3] Tokudome S., Sano M., Shinmura K., Matsuhashi T., Morizane S., Moriyama H., Tamaki K., Hayashida K., Nakanishi H., Yoshikawa N., Shimizu N., Endo J., Katayama T., Murata M., Yuasa S., Kaneda R., Tomita K., Eguchi N., Urade Y., Asano K., Utsunomiya Y., Suzuki T., Taguchi R., Tanaka H., Fukuda K. “Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by

activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis” ,
Journal of Clinical Investigation, 2009, 119(6), 1477-1488.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「心筋レドックス応答におけるアミノ酸代謝の重要性」(2008～2010年度)、基盤研究(B)「免疫学的介入による心筋梗塞後リモデリング予防法の開発」(2011～2013年度)、基盤研究(B)「加齢とメタボリックシンドロームに伴う心血管障害に共通の分子基盤の解明」(2015～2017年度)、さらに、さきがけ 研究領域「炎症の慢性化機構の解明と制御」の研究課題「炎症の制御に基づく心不全の予防と治療」(2012～2015年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

酸化ストレスのメディエーター脂質アルデヒドに着目し、これが細胞内アミノ酸インバランスを起こすことによって GCN2-eIF2 α -ATF4¹¹¹経路を活性化させ細胞内アミノ酸代謝を活性化することによって抗酸化ストレス応答を高めることを見いだした¹¹²。また、eIF2 α に注目して解析した結果、虚血及び再還流で心筋の eIF2 α は活性化され、その活性化レベルの違いが心臓の未来を決定する因子である可能性が示唆された¹¹³。

メダカ変異体を用いた解析から、心室形成不全の原因遺伝子が versican というコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであると同定した。プロテオグリカンは接触している心筋幹細胞の移動を能動的に制御して微小環境を形成していることが明らかになった。心室形成のためには心筒形成後に外部からの心臓幹細胞の流入が必要であることを示した¹¹⁴。

心肥大/心臓リモデリングの分子機構を、転写伸長反応促進因子 P-TEFb の抑制タンパク質 HEXIM1 を基軸に解析した結果、HEXIM1 の過剰発現は P-TEFb 活性抑制による RNA ポリメラーゼ II 依存性転写の抑制作用を介して、各種刺激による心肥大発症を抑制した。この結果から、HEXIM1 は新規心肥大/心臓リモデリング抑制療法の分子標的として有用と考えられた^{[1], 115}。

心筋梗塞後の炎症、損傷治癒過程において、樹状細胞はマクロファージの機能を制御することにより、治癒過程を促進させて心不全発症を抑制し、 $\gamma\delta$ T細胞は IL-17 の分泌を介して炎症の遷延化に関与し、肺 NK 細胞は IL-10 を産生することにより、肺血管内皮細胞のバリア機能を維持し、血管内から肺組織への好中球の侵入を抑制していることを明らかにした^{[2], [3], 116}。

¹¹¹ キナーゼ(GCN2)-翻訳開始因子(eIF2 α)-活性化転写因子(ATF4)

¹¹² <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-20390228/>

¹¹³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-22659158/>

¹¹⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-21390248/>

¹¹⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-22790693/>

¹¹⁶ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-23390217/>

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)によって合成されたプロスタグランジン(PG)D2 が、免疫応答の調節を介して、腎臓線維化に関与していること、心筋細胞に対しては、Nrf2 と呼ばれるストレス応答分子の活性化を介して細胞死から守る方向に作用することが明らかになった¹¹⁷。

大動脈解離モデルマウスを用いた解析から、大動脈解離発症後血管壁の外膜側細胞において好中球走化性因子 CXCL-1/G-CSF の発現が亢進し、浸潤してきた好中球が産生する IL-6 を介して血管壁の構造を更に傷害し、解離の進展と拡大、破裂を引き起こしていることを見いだした(図 3-33)¹¹⁸。

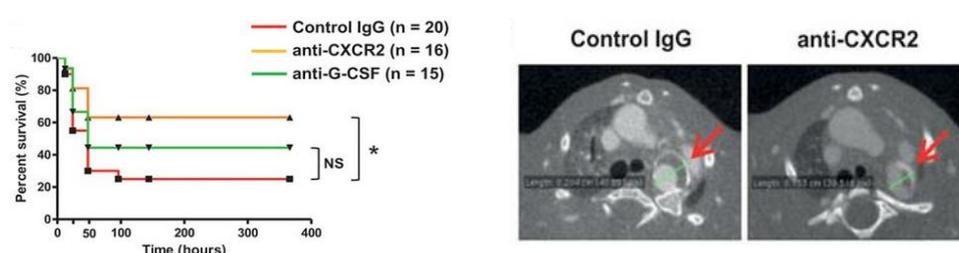


図 3-33 CXCR2 抗体による大動脈解離誘導後の死亡率(左)と大動脈解離の CT 像(右、赤矢印) CXCL-1/2 : CXCR2 のリガンド¹¹⁸

心不全の増悪に伴う副腎組織の低酸素化とマクロファージの浸潤に着目した解析の結果、低酸素刺激によりアルドステロン合成酵素の発現上昇が認められ、また一度副腎組織中にマクロファージが浸潤すると、副腎皮質細胞との液性因子を介した相互作用により RAS 非依存的にアルドステロン合成の亢進が起きることを明らかにした¹¹⁹。

高脂肪食負荷若齢マウスの内臓脂肪の T リンパ球の解析から、CD153 陽性 PD-1 陽性 T リンパ球が著しく増加することを見いだした。この T リンパ球は細胞老化の特徴を兼ね備え、オステオポンチンという強力な炎症性サイトカインを大量に産生する性質を持っていた。肥満における内臓脂肪内での T 細胞老化が肥満に伴う慢性炎症とインスリン抵抗性の病態形成に深く関与していることが示唆された^{[4], 120}。

②社会・経済への波及効果

本研究成果である NK 細胞の機能をいかした NK 細胞療法は、心筋梗塞後の心不全患者の低酸素血症を改善する、新たな治療法として期待される。本研究成果の応用により、大動脈解離発症後急性期に、C 反応性タンパク質(CRP)高値などの血管炎症の強い患者に対して、血管の炎症を軽減させ、大動脈関連事象を予防する効果が期待され、治療の選択肢が広がる

¹¹⁷ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-24659395/>

¹¹⁸ https://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2014/osa3qr000000i7mv.html

¹¹⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-25670396/>

¹²⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PUBLICLY-15H01160/>

可能性が考えられる。また、CD153 陽性 PD-1 陽性 T リンパ球を標的とした免疫機能の回復により、内臓脂肪型肥満に関する生活習慣病の発症予防を目指す治療法開発の可能性も示唆される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Yoshikawa N., Shimizu N., Maruyama T., Sano M., Matsushashi T., Fukuda K., Kataoka M., Satoh T., Ojima H., Sawai T., Morimoto C., Kuribara A., Hosono O., Tanaka H. “Cardiomyocyte-Specific Overexpression of HEXIM1 Prevents Right Ventricular Hypertrophy in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice”, PLoS ONE, 2012, 7(12), e52522.
- [2] Anzai A., Anzai T., Nagai S., Maekawa Y., Naito K., Kaneko H., Sugano Y., Takahashi T., Abe H., Mochizuki S., Sano M., Yoshikawa T., Okada Y., Koyasu S., Ogawa S., Fukuda K. “Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling”, Circulation, 2012, 125(10), 1234-1245.
- [3] Yan X., Shichita T., Katsumata Y., Matsushashi T., Ito H., Anzai A., Endo J., Tamura Y., Kimura K., Fujita J., Shinmura K., Shen W., Yoshimura A., Fukuda K., Sano M. “Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and $\gamma\delta$ T cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction”, Journal of American Heart Association, 2012, 1(5), e004408.
- [4] Shirakawa K., Yan X., Shinmura K., Endo J., Kataoka M., Katsumata Y., Yamamoto T., Anzai A., Isobe S., Yoshida N., Itoh H., Manabe I., Sekai M., Hamazaki Y., Fukuda K., Minato N., Sano M. “Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue”, Journal of Clinical Investigation, 2016, 126(12), 4626-4639.

④その他

本研究者は研究終了後に、心不全学会学術賞(2014年)を受賞している。

3.2.7 複合系の代謝制御ーアブラムシ細胞内共生系をモデルとして(重信秀治)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

ヒトを含む多くの多細胞生物は体内に共生微生物を保有しており、自前で合成できない栄養分を共生微生物から得たり、消化できない物質の分解を共生微生物に依存したりしている。このような「複合系」の協調的代謝の例は多数知られているものの、その遺伝子・分子基盤についてはほとんど明らかになっていない。アブラムシ(*Acyrtosiphon pisum*)は、腹部体腔内に共生器官を持ちその細胞内に共生細菌ブフネラ(*Buchnera aphidicola*)を恒常的に維持している。両者の間には絶対的な相互依存関係が築かれ、相利栄養共生であり、お互い相手無しでは生存が不可能である(図 3-34)。本研究者らはこれまでに、共生細菌のゲノムを解読し、宿主に依存できる代謝経路の遺伝子は失われていることを明らかにした。本研究は、進化の過程で欠失した代謝パスウェイが、宿主との相互作用によってどのように補償され、一つの共生系として統合的に機能しているのかを明らかにすることを目指した¹²¹。



図 3-34 アブラムシの細胞内共生系¹²¹

細胞内共生系における代謝制御のメカニズムを理解する

② 期間中の研究成果

(i) 宿主昆虫のゲノム解読：共生微生物と相補的遺伝子レパートリー、免疫系遺伝子の欠如

本研究者は国際コンソーシアムにグループリーダーとして参加し、宿主昆虫エンドウヒゲナガアブラムシ *A. pisum* のゲノム 450Mbp を解読し、コンピュータプログラムにより約 3 万 5 千個の遺伝子を予測した。先の共生細菌のゲノム、今回の宿主昆虫のゲノム解析により、本研究者が以前に報告したアミノ酸等の生合成遺伝子セットの相補性が更に強く裏付けられ、ヌクレオチドなど他の代謝経路においても遺伝子セットの相補性を見いだした。アブラムシでは、多細胞生物としては例外的に、細菌に対する免疫系遺伝子が失われているこ

¹²¹ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/shigenobu.html>

とが明らかになった。重複している遺伝子は、クロマチン修飾や miRNA 経路など遺伝子発現調節に関わる遺伝子群、ウイルス媒介に重要な膜輸送関連遺伝子、脊椎動物様エピジェネティック制御遺伝子など、多岐にわたり、また、アブラムシ特有の遺伝子が全遺伝子の約 4 割を占めた^{[1], [2], [3], 121}。

(ii) ホメオボックス転写因子 *D11* の機能解析

共生器官の発生のごく初期から核で発現する転写因子であり、協調的プロセスを制御する master gene である可能性が高いと考えられていた *Distal-less (D11)* について、アブラムシ *D11* の同定、クローニングに成功した。アブラムシは *D11* を 1 コピー持ち、アミノ酸配列は他の昆虫と高い保存性を示した。抗体を用いた発現パターンの解析の結果、*D11* は共生細菌が感染する直前から将来共生器官になる核で発現を開始し、その後アブラムシのライフサイクルを通して強い発現が維持されることが明らかになった。さらに、*D11* は進化的に高度に保存されている肢形成に関わる発生遺伝子であり、他の昆虫と同様、形成途中の付属肢の先端でも発現が見られた。この結果から、*D11* が付属肢形成の機能を保持した上で、共生への関与という新規の機能を獲得したことが示唆された¹²¹。

(iii) 共生器官のトランスクリプトーム解析

アブラムシと共生細菌の協調的代謝を支える遺伝子制御ネットワークを明らかにするため、共生器官のトランスクリプトーム解析を、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 法により行った。この新技術により発現遺伝子 1 万以上、enrich している遺伝子 1000 以上を同定した。予想どおり、アミノ酸代謝遺伝子が高い発現を示し、これらの遺伝子の全ての N 末にシグナルペプチドがコードされていた。これらの新規分泌タンパク質が共生細胞との相互作用において重要な役割を果たしている可能性が示唆された¹²¹。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Legeai F., Shigenobu S., Gauthier J.P., Colbourne J., Rispe C., Collin O., Richards S., Wilson A.C., Murphy T., Tagu D. “AphidBase: a centralized bioinformatic resource for annotation of the pea aphid genome”, *Insect Molecular Biology*, 2010, 19(SUPPL. 2), 5-12.
- [2] Shigenobu S., Richards S., Cree A.G., Morioka M., Fukatsu T., Kudo T., Miyagishima S., Gibbs R.A., Stem D.L., Nakabachi A. “A full-length cDNA resource for the pea aphid, *Acyethosiphon pisum*”, *Insect Molecular Biology*, 2010, 19(SUPPL. 2), 23-31.
- [3] Shigenobu S., Bickel R.D., Brisson J.A., Butts T., Chang C-C., Christiaens O., Davis G.K., Duncan E.J., Ferrier D.E.K., Iga M., Janssen R., Lin G-W., Lu H-L., McGregor A.P., Miura T., Smaghe G., Smith J.M., Van Der Zee M., Velarde

R.A., Wilson M.J., Dearden P.K., Stern D.L. “Comprehensive survey of developmental genes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Frequent lineage-specific duplications and losses of developmental genes”, *Insect Molecular Biology*, 2010, 19(SUPPL. 2), 47-62.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(A)「共生による新規性創出の遺伝子基盤の解明」(2010～2012年度)、基盤研究(B)「共生による生命システムの統合と進化：アブラムシ細胞内共生系をモデルに」(2013～2015年度)及び基盤研究(B)「共生系の遺伝子ネットワークの制御機構とその進化」(2017～2020年度)へ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

さきがけ研究で得られたデータと技術を使った探索の結果、アブラムシが共生器官で大量に発現する新規の分泌ペプチド群を発見し BCR ファミリーと命名した(図 3-35)。ある BCR は細菌の増殖に影響を与えることも判明した¹²²。BCR ファミリーの機能解析を行い、BCR が様々な細菌に対して抗菌活性を有することや、抗体染色により、共生細菌の周囲に局在することが明らかになった^{[1], [2], 123}。BCR タンパク質が共生細菌と相互作用する宿主因子であることを示しており、共生系におけるその役割に興味を持たれる。また、BCR は、抗菌活性を持つが似た遺伝子が他の生物に見付からないことから、新規の抗菌ペプチドといえる。BCR は新規の細菌制御手段として農学的、医学的な応用の可能性も秘めているといえる。

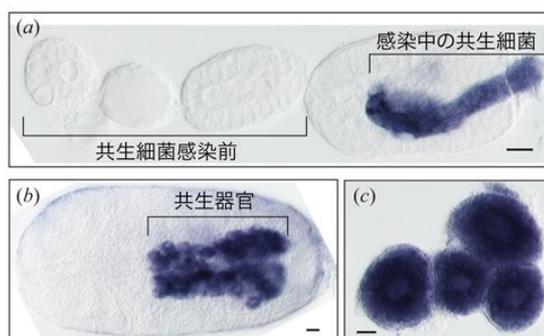


図 3-35 共生器官細胞特異的分泌タンパク質 BCR4 の遺伝子発現パターン¹²²(BCR4 mRNA、紺色)

(a) 胚発生初期: 共生細菌が感染する胞胚期に発現開始

(b) 胚発生後期: 共生器官のみで特異的に発現

(c) 成虫の共生器官細胞

アブラムシのアミノ酸トランスポーターを解析した結果、アブラムシは、ゲノム既知昆虫

¹²² <https://kaken.nii.ac.jp/file/KAKENHI-PROJECT-22687018/22687018seika.pdf>

¹²³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25291083/>

中でも最多の40個のアミノ酸トランスポーターを持ち、その中には菌特異的に高発現する遺伝子が存在することが明らかになった。

これらのアブラムシ=ブフネラ間の共生系の研究を基盤にして、国内外の研究者と多様な共生系の研究を開始し、共生系における共通原理に迫る研究を展開している。

織毛虫のパラメシウム・ブルサリア (*P. bursaria*) と共生する緑藻類クロレラ属 (*Chlorella* sp.) は共生関係にあるものの、それぞれがいなくても増殖できるし、互いに接触すると容易に共生関係を確立できる。このことから、*P. bursaria* は、異なる原生生物間の共生による細胞-細胞相互作用及び真核細胞の進化を研究するための優れたモデルである。RNA-Seq 分析により共生関係の有無と遺伝子発現状態を比較した^[3]。

マメ科作物の深刻な害虫 *Riptortus pedestris* と共生関係にある *Burkholderia* sp. の RPE67 株の全ゲノム解析を行った^[4]。昆虫-微生物共生の重要な遺伝子を示し、共生関係の進化的起源研究の基礎となるものである。

ゴキブリは細胞内共生細菌ブラタバクテリウム (Bc) と共生関係にあるが、ゴキブリが社会性ゴキブリであるシロアリへ進化していく過程で Bc は失われている。この原因の解明のため、Bc を保有するムカシシロアリ及びシロアリに近縁なキゴキブリからそれぞれ Bc の全ゲノム解析を行った結果、どちらの系統の細菌も幾つかのアミノ酸とビタミンを合成する遺伝子を失っていることが判明した。さらに、シロアリやキゴキブリとは系統的に離れた食材性ゴキブリであるオオゴキブリの Bc についても同様に解析した結果、オオゴキブリの Bc は雑食性ゴキブリの系統と全く遜色なくほぼ全ての必須アミノ酸の合成遺伝子をゲノムにコードしていることが判明した。この結果から、Bc におけるアミノ酸やビタミン生合成遺伝子の欠落は宿主の食性の変化とは関係がないことが明らかになった。Bc における遺伝子欠落の原因は宿主の社会性行動の発達に伴う腸内細菌共生系の影響によるものであることが示唆された^{[4], 124}。

②社会・経済への波及効果

本研究成果を応用することにより、重要な農業害虫であるアブラムシの安全で効果的な駆除法の開発に役立つとともに、環境問題解決に向けてのエコロジー研究に貢献することが期待される。また、本研究者は所属研究所において次世代シーケンサー・RNA-seq 法などの責任者となっており、これらの新技術による解析が必要な他の研究者と複数の共同研究を進めており、その研究成果に貢献している。

¹²⁴ Tokuda G., Elbourne L.D.H., Kinjo Y., Saitoh S., Sabree Z., Hojo M., Yamada A., Hayashi Y., Shigenobu S., Bandi C., Paulsen I.T., Watanabe H., Lo N. "Maintenance of essential amino acid synthesis pathways in the *Blattabacterium cuenoti* symbiont of a wood-feeding cockroach", *Biology Letters*, 2013, 9, 20121153.

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

- [1] Shigenobu S., Stern D. “Aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont”, *Proceedings of the Royal Society of London B*, 2013, 280(1750), 20121952.
- [2] Mergaert P., Kikuchi Y., Shigenobu S., Nowack E.C.M. “Metabolic integration of bacterial endosymbionts through antimicrobial peptides”, *Trends in Microbiology*, 2017, 25(9), 703-712.
- [3] Kodama Y., Suzuki H., Dohra H., Sugii M., Kitazume T., Yamaguchi K., Shigenobu S., Fujishima M. “Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts”, *BMC Genomics*, 2014, 15(1), 183.
- [4] Takeshita K., Shibata T.F., Nikoh N., Nishiyama T., Hasebe M., Fukatsu T., Shigenobu S., Kikuchi Y. “Whole-genome sequence of *Burkholderia* sp. strain RPE67, a bacterial gut symbiont of the bean bug *Riptortus pedestris*”, *Genome Announcements*, 2014, 2(3), e00556-14.

3.2.8 受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用(新藤隆行)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

全身の組織で広範に産生され、52 個のアミノ酸から成るペプチドであるアドレノメデュリン (AM) は、強力な血管拡張作用を有する降圧物質として発見されたが、それ以外にも多彩な生理活性を有することが明らかになり、生活習慣病などの病態との関連も示唆されている。本研究者は、AM が抗動脈硬化作用、臓器保護作用を有すること、血管新生に必須であることを初めて明らかにした。一方、AM とそのファミリー因子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、同一の G タンパク共役型受容体である CLR を共用している。AM の受容体 CLR は受容体活性調節タンパク RAMP1/2/3 のいずれかと重合することにより AM ファミリー因子との親和性が制御されている (図 3-36)。本研究は、RAMP システムの病態生理学的意義とそのメカニズムを明らかにするとともに、血管新生療法や、血管合併症などに対する新規治療法の開発へと展開させることを目的とした¹²⁵。

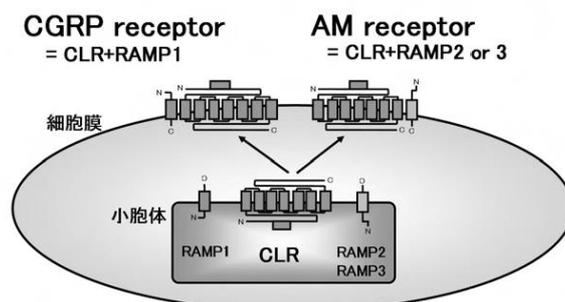


図 3-36 AM 及び CGRP の受容体システム¹²⁶

アドレノメデュリン (AM)

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)

G タンパク共役型受容体 (CLR: calcitonin receptor-like receptor)

受容体活性調節タンパク (RAMP)

② 期間中の研究成果

(i) AM-RAMP2 系と血管新生

AM ノックアウト (KO) マウスが致死となる胎生中期の血管において、特に RAMP2 の発現が亢進していることに着目し解析した結果、RAMP2 欠損により、血管の発生における機能的 AM

¹²⁵ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/shindo.html>

¹²⁶ http://www.jsbmg.jp/products/pdf/BG34-3/34-3_27-30.pdf

受容体が失われること、その他の RAMP との間には機能的な相補性がなく、血管の正常な発生には、AM-RAMP2 系が必須であることが初めて明らかになった。一方、成体が得られた RAMP2^{+/-}マウスの解析から、成体における AM の血管新生作用においても、AM-RAMP2 系が中心的役割を担い、血管構造安定化にも寄与していることが推測された。さらに血管内皮細胞の AM-RAMP2 系を選択的に賦活化させることにより、管腔形成の亢進に加えて、血管構造の安定化が得られることが証明された^{[1], 125}。

(ii) 血管・心臓特異的ジーンターゲティングによる RAMP2 の機能解析

血管における RAMP2 の意義を直接明らかにするために、血管内皮細胞特異的 RAMP2 KO マウス (E-RAMP2^{-/-}) を樹立した。その 95% は出生直前に致死であり、血管の RAMP2 発現が 2 割程度残存する 5% のマウスでは、成体が得られた。この成体マウスの解析の結果、発生段階及び成体期共に、AM-RAMP2 系が血管新生及び血管恒常性維持に必須であることが明らかになった^[2]。一方、薬剤投与誘導型心筋特異的 RAMP2 KO マウス (C-RAMP2^{-/-}) の解析の結果、心筋における AM-RAMP2 系は、酸化ストレスや、心リモデリングの制御に加え、心ミトコンドリア機能維持を介して、心保護的に働いていることが明らかになった^{[3], 125}。

③研究成果に関連した主な成果論文リス 3 報以内

- [1] Ichikawa-Shindo Y., Sakurai T., Kamiyoshi A., Kawate H., Iinuma N., Yoshizawa T., Koyama T., Fukuchi J., Iimuro S., Moriyama N., Kawakami H., Murata T., Kangawa K., Nagai R., Shindo T. “The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity”, *Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(1), 29-39.
- [2] Koyama T., Ochoa-Callejero L., Sakurai T., Kamiyoshi A., Ichikawa-Shindo Y., Iinuma N., Arai T., Yoshizawa T., Iesato Y., Lei Y., Uetake R., Okimura A., Yamauchi A., Tanaka M., Igarashi K., Toriyama Y., Kawate H., Adams R.H., Kawakami H., Mochizuki N., Martínez A., Shindo T. “Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis”, *Circulation*, 2013, 127(7), 842-853.
- [3] Yoshizawa T., Sakurai T., Kamiyoshi A., Ichikawa-Shindo Y., Kawate H., Iesato Y., Koyama T., Uetake R., Yang L., Yamauchi A., Tanaka M., Toriyama Y., Igarashi K., Nakada T., Kashihara T., Yamada M., Kawakami H., Nakanishi H., Taguchi R., Nakanishi T., Akazawa H., Shindo T. “Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system”, *Hypertension*, 2013, 61(2), 341-351.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「RAMPによる代謝、血管制御メカニズムの解明と、代謝異常、血管合併症治療への展開」(2008～2010年度)、基盤研究(B)「臓器間連携と恒常性を司る、新しい生体内情報制御システムの解明と応用展開」(2014～2016年度)、さらに、産学連携・技術移転事業 A-STEP 産学協同促進ステージ ハイリスク挑戦タイプの研究開発課題「創薬シーズ開発の効率化に向けた次世代疾患モデルマウスの迅速作製技術開発」(2009～2011年度)、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「新しい血管統合機構に基づく、慢性臓器障害治療薬の開発」(2010～2013年度)、AMED-CREST 生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出「生理活性因子の情報制御システムに基づく革新的な医薬品の創出」(2014～2019年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

RAMP2 の代謝制御における意義を RAMP2^{+/-}マウスを用いて検討した結果、このマウスでは、内臓脂肪における炎症性サイトカイン、ケモカインの発現亢進とアディポネクチンの発現低下を認め、脂肪組織における慢性炎症が、肥満や耐糖能異常の一因になっていることが推測された。また血管障害モデルの解析から、動脈硬化病変部に強い炎症反応が惹起されていることが示され、酸化ストレスレベルの亢進も示された¹²⁷。また、心血管特異的欠損 RAMP2、RAMP3 マウスを用いた解析の結果、RAMP2 は心血管系の恒常性機能維持に重要な働きを持ち、一方、RAMP3 は炎症応答に関与していることが明らかになり、個体レベルで両者は異なる機能に関与していることが判明した¹²⁸。RAMP2 は心血管系の恒常性維持機能に続いて腎臓においても臓器保護、恒常性維持機能を担うことを示した(図 3-37)^[1]。一方、RAMP3 はこの機能には関与せず、少なくとも自然免疫系細胞での炎症応答に関わることを示した^{[2], 129}。

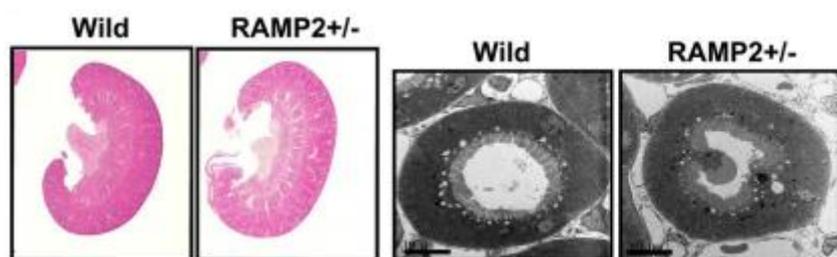


図 3-37 RAMP2 欠損マウス(RAMP2^{+/-})における腎臓(左)、尿細管(右、EM 像)の変化^[1]

間質性浮腫、刷子縁の破壊が認められる

最新の CRISPR/Cas 法に加え、新たに本研究者が独自に開発した技術を導入し、複数の遺伝子を同時改変したり、成体になってから初めて目的とする遺伝子を改変するシステム

¹²⁷ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20390221/>

¹²⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20590395/>

¹²⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23590456/>

を、短期間で作成可能にした^{[3],130}。このシステムにより、成体において任意の時期に RAMP2 遺伝子を欠損できる、誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 欠損マウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) を樹立し、腫瘍細胞移植実験を行った結果、AM-RAMP2 系は、腫瘍血管新生を介して、腫瘍増殖に寄与することが明らかになった¹³¹。

全身のほとんどの細胞に存在する AM-RAMP2 系に関し、各細胞・臓器特異的欠損マウスの解析から、この系が各細胞・臓器のエネルギー代謝、酸化ストレス、小胞体ストレスなどを直接制御していることを見いだした。オミクス解析による疾患標的分子の網羅的解析も進め、また治療薬開発に関し、RAMP 構造解析を完了し、RAMP 結合化合物のスクリーニング系を構築した¹³²。

RAMP システムによる生体内恒常性維持とシステム間の相互連携の研究成果を基に、創薬への展開を目指した。特に、RAMP システムに対するヒト型化抗体や低分子化合物などを応用し、情報制御システムに人為的に介入、操作することで、メタボリックシンドロームと生活習慣病、動脈硬化症とその合併症、がんや糖尿病網膜症などの血管恒常性破綻病態、自己免疫疾患などの難治性疾患に対する医薬品の創出を目指した^{[1],133}。

②社会・経済への波及効果

AM-RAMP2 系を標的とすることで、従来 of 血管再生療法の問題であった、再生血管の退縮や、浮腫などの弱点を克服し、構造的、機能的に安定した血管を作出する新たな血管新生療法への応用、さらに、AM-RAMP2 系の血管透過性抑制作用、抗浮腫作用を応用することで、難治性浮腫の新規治療法開発への展開などが期待される。このように AM-RAMP2 システムの分子メカニズムに立脚した治療薬が開発されれば、メタボリックシンドロームなどの様々な病態を包括的に改善する、新たな治療法開発が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Uetake R., Sakurai T., Kamiyoshi A., Ichikawa-Shindo Y., Kawate H., Iesato Y., Yoshizawa T., Koyama T., Yang L., Toriyama Y., Yamauchi A., Igarashi K., Tanaka M., Kuwabara T., Mori K., Yanagita M., Mukoyama M., Shindo T. “Adrenomedullin-RAMP2 system suppresses ER stress-induced tubule cell death and is involved in kidney protection”, PLoS ONE, 2014, 9(2), e87667.
- [2] Yamauchi A., Sakurai T., Kamiyoshi A., Ichikawa-shindo Y., Kawate H., Igarashi K., Toriyama Y., Tanaka M., Liu T., Xian X., Imai A., Zhai L., Owa S., Arai T., Shindo T. “Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system”, Journal of Molecular and Cellular

¹³⁰ <http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/>

¹³¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26293183/>

¹³² <http://www8.cao.go.jp/cstp/sentan/jisedai/jigo/ls053.pdf>

¹³³ http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/nenpou/h26/JST_1111067_14531654_2014_YR.pdf

Cardiology, 2014, 77, 73-85.

- [3] Xian X., Sakurai T., Kamiyoshi A., Ichikawa-Shindo Y., Tanaka M., Koyama T., Kawate H., Yang L., Liu T., Imai A., Zhai L., Hirabayashi K., Dai K., Tanimura K., Liu T., Cui N., Igarashi K., Yamauchi A., Shindo T. “Vasoprotective activities of the adrenomedullin-RAMP2 system in endothelial cells”, Endocrinology, 2017, 158(5), 1359-1372.

④その他

本研究者は研究終了後に、信州大学医学部顕彰特別賞(2010年)及び財団法人博慈会優秀研究ダ・ヴィンチ賞(2014年)を受賞している。

3.2.9 オートファジーにおける脂質膜組織化機構の解明(中戸川仁)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

オートファジーは、飢餓応答を始めとして発生や分化、抗原提示等、多彩な生理機能に伴い誘導される。小さな扁平状の膜が細胞質に現れ、これが袋状に伸展して細胞質の一部やオルガネラを包み込み、最終的に閉じてオートファゴソームが形成される。これが種々の加水分解酵素を含むリソソームや液胞と融合することで、その中身が消化される(図3-38)。本研究者らは出芽酵母をモデル生物として、オートファゴソームの形成機構に関する研究を進めてきた。オートファゴソームの形成に必須の因子として、Atgが同定され、その詳細な解析が進んでいるが、オートファゴソーム膜の形成メカニズムははまだ不明である。本研究では、Atg8というユビキチン様タンパク質に注目し、オートファゴソーム形成機構の全容解明に向けて突破口を開くことを目的とした¹³⁴。

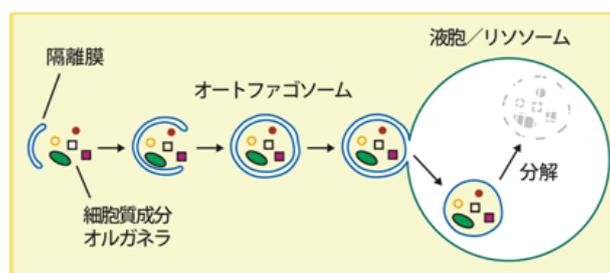


図 3-38 オートファジーの進行過程¹³⁴

②期間中の研究成果

(i) Atg8-PE の機能の解明

Atg8 は、オートファゴソームの形成に必要なユビキチン様タンパク質で脂質分子ホスファチジルエタノールアミン(PE)の親水性頭部のアミノ基に結合する。Atg8 と PE との結合反応は、Atg8、E1 酵素 Atg7、E2 酵素 Atg3、PE 含有人工膜小胞、ATP を含む *in vitro* 反応系で再構成できる。この系を用いた解析の結果、Atg8 には、PE と結合すると多量体を形成し、自身がアンカーされた脂質膜をつなぎ合わせ、ヘミフュージョン(向かい合う2枚の脂質二重層において近接した外層同士のみが融合すること)させる機能があることが判明した^{[1], 134}。

(ii) Atg8 の機能とオートファゴソーム形成との関連

Atg8機能低下変異体を発現する酵母細胞では、オートファゴソームが形成されず、Atg8に

¹³⁴ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/nakatogawa.html>

よる膜のつなぎ合わせとヘミフュージョンが、オートファゴソームの形成に重要であることが示唆された。Atg8による膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンは、特にオートファゴソームの膜の伸張過程に重要であることが示唆された。以上の結果は、これまで全く未知であったオートファゴソームの形成メカニズムについて、膜動態と直接関連し得るAtg機能の発見とその重要性を示すことができた^{[1],134}。

(iii) 脂質修飾サイクルによる Atg8 の機能制御機構

Atg8 から PE を切り離す活性を持つシステインプロテアーゼである Atg4 により、Atg8-PE の脱結合反応を再構成することに成功した。これにより、Atg8 の多量体が解離し、人工膜小胞の凝集も速やかに解消されることが明らかになり、Atg8 の機能は脂質修飾サイクルによって可逆的に制御され得るものであることが示唆された。また、膜のつなぎ合わせとヘミフュージョン及び多量体化に重要な Atg8 の立体構造上の分子表面領域を特定した。Atg8 は PE と結合すると N 末端領域に構造変化を起こし、この分子表面領域を露出させ、多量体を形成して膜のつなぎ合わせとヘミフュージョンを誘起するというモデルを提唱した^{[1],134}。

(iv) 選択的オートファジーにおける Atg8 の役割

Atg8 の変異解析の過程で、飢餓誘導性オートファジーには欠損を示さないが、選択的オートファジーと同等の経路を介した Ape1 酵素の液胞への輸送に異常を示す変異体を同定し、それら変異体には Ape1 の受容体 Atg19 との相互作用に異常があることを明らかにした。Atg8 と Atg19 との複合体の構造解析の結果、Atg19 の C 末端領域にある Trp-X-X-Leu 配列が、上記 Atg8 の分子表面にある疎水性のポケットに深く入り込んで結合していることが示された^[2]。Atg8 の哺乳動物ホモログ LC3 と選択的オートファジー受容体 p62 との結合、E2 酵素 Atg3 との結合^[3]、さらに、酵母におけるミトコンドリアの選択的オートファジー受容体 Atg32 も同様の相互作用様式で Atg8 と結合することが明らかになった。このように、選択的オートファジーにおいて、積荷、生物種を問わないユニバーサルな Atg8-受容体タンパク質間相互作用が明らかになった¹³⁴。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Nakatogawa H., Ichimura Y., Ohsumi Y. “Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion” *Cell*, 2007, 130(1), 165-178.
- [2] Noda N.N., Kumeta H., Nakatogawa H., Satoo K., Adachi W., Ishii J., Fujioka Y., Ohsumi Y., Inagaki F. “Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy”, *Genes to Cells*, 2008, 13(12), 1211-1218.
- [3] Yamaguchi M., Noda N.N., Nakatogawa H., Kumeta H., Ohsumi Y., Inagaki F.

“Autophagy-related protein 8 (Atg8) family interacting motif in Atg3 mediates the Atg3-Atg8 interaction and is crucial for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway”, *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(38), 29599-29607.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(A)「オートファゴソーム形成を支える膜動態の解析」(2008～2011年度)、若手研究(A)「選択的オートファジーにおける分解標的認識制御機構の解明」(2013～2016年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)オートファジーの集学的研究:分子基盤から疾患まで「酵母・無細胞系を用いたオートファジー関連因子の分子機能の解明」(2013～2017年度)、基盤研究(A)「オートファジーによるオルガネラ分解の分子基盤と生理的意義の解明」(2017～2021年度)、さらに、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「オートファジーにおける膜新生駆動システムの実体と全容の解明」(2010～2013年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

機能未知のタンパク質複合体構成因子 Atg2 及び Atg18 欠損細胞内に、オートファゴソーム膜の中間体と考えられる膜構造が蓄積することを見いだした。同膜構造が pre-autophagosomal structure と呼ばれる液胞近傍の構造体で他の Atg の協調的な働きにより形成されることを明らかにした。Atg2-Atg18 複合体と人工膜小胞を用いた解析の結果、Atg2 は曲率の高い膜小胞に強い親和性を示すこと、Atg18 が膜小胞に結合するには Atg2 とホスファチジルイノシトール 3-リン酸との相互作用が必要であること、Atg2 の C 末端領域は Atg18 の膜小胞への結合に重要な役割を担うことなどを明らかにした¹³⁵。

オートファゴソーム膜前駆体の単離法を確立した。またオートファゴソーム形成過程に関わる新規遺伝子を探査し、複数の遺伝子候補を同定した^{[1], 136}。

タンパク質キナーゼ Hrr25 が、Atg19、Atg34、Atg36 をリン酸化し、これらと Atg11 との結合を強化することで、それぞれが誘導する選択的オートファジー経路を正に制御することを明らかにした。また、窒素源飢餓条件下で、核及び小胞体の選択的オートファジーが誘導されることを明らかにし、それぞれのレセプターとして Atg39、Atg40 を同定した(図 3-39)。

Atg39 依存による分解は、窒素飢餓時の細胞の生存に重要であり、また、Atg40 は哺乳類の ER ファジーレセプター FAM134B の機能的ホモログであることが示唆された^{[2], [3], [4], 137, 138}。

¹³⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PLANNED-25111003/>

¹³⁶ <http://www8.cao.go.jp/cstp/sentan/jisedai/jigo/ls044.pdf>

¹³⁷ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-25711005/>

¹³⁸ https://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/nenpou/h27/JST_1111068_13417964_2015_PYR.pdf

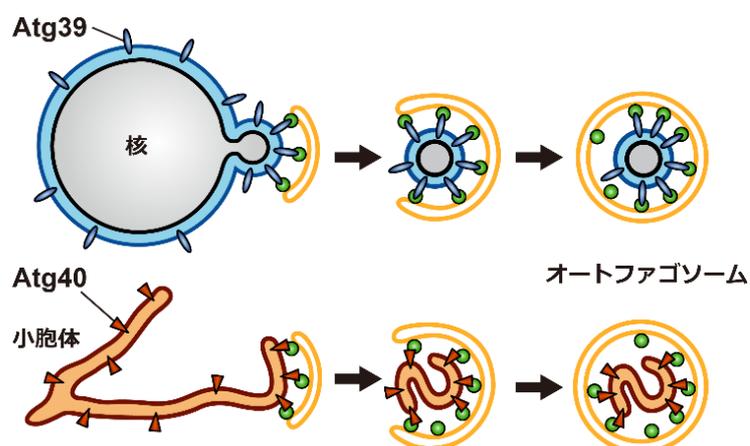


図 3-39 Atg39、Atg40 をオートファジー受容体とする
核と小胞体の選択的オートファジー¹³⁹

②社会・経済への波及効果

オートファジーは、タンパク質の代謝、神経変性疾患、老化等、ライフィノベーションの推進に結びつく様々な事項と関連しており、そのメカニズムの解明は、将来的に医療技術の開発や創薬に必要な情報基盤の構築に貢献することが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Sakoh-Nakatogawa M., Matoba K., Asai E., Kirisako H., Ishii J., Noda N.N., Inagaki F., Nakatogawa H., Ohsumi Y. “Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site”, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2013, 20(4), 433-439.
- [2] Tanaka C., Tan L.J., Mochida K., Kirisako H., Koizumi M., Asai E., Sakoh-Nakatogawa M., Ohsumi Y., Nakatogawa H. “Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins”, *Journal of Cell Biology*, 2014, 207(1), 91-105.
- [3] Mochida K., Ohsumi Y., Nakatogawa H. “Hrr25 phosphorylates the autophagic receptor Atg34 to promote vacuolar transport of α -mannosidase under nitrogen starvation conditions”, *FEBS Letters*, 2014, 588(21), 3862-3869.
- [4] Mochida K., Oikawa Y., Kimura Y., Kirisako H., Hirano H., Ohsumi Y., Nakatogawa H. “Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus”, *Nature*, 2015, 522(7556), 359-362.

④その他

¹³⁹ <http://first.lifesciencedb.jp/archives/10387>

本研究者は研究終了後に、日本生化学会奨励賞(2013年)、文部科学大臣表彰若手科学者賞(2014年)、手島精一記念研究賞(2016年)、及び日本学術振興会賞(2017年)を受賞している。

3.2.10 異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明(西野邦彦)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

細菌ゲノム配列が解読され、細菌染色体上に異物排出トランスポーター遺伝子が数多く潜在していることが明らかとなってきた。このトランスポーターは抗菌薬や細胞障害性異物を菌体外に排出することにより、細菌を様々な化合物に対して耐性化させるばかりでなく、代謝産物の輸送、情報伝達物質の排出、及び細菌病原性の発現にも関与していることが明らかになってきた(図3-40)。本研究は、病原細菌の薬剤耐性化と病原性発現における異物排出トランスポーターの役割とその生理機能を解析し、トランスポーターによる細菌機能制御の仕組みを解明することを目的とした。研究を通して、生理的基質排出による細菌機能調節機構を理解すると同時に、多剤耐性細菌による感染症を克服するための情報基盤の構築を目指した¹⁴⁰。

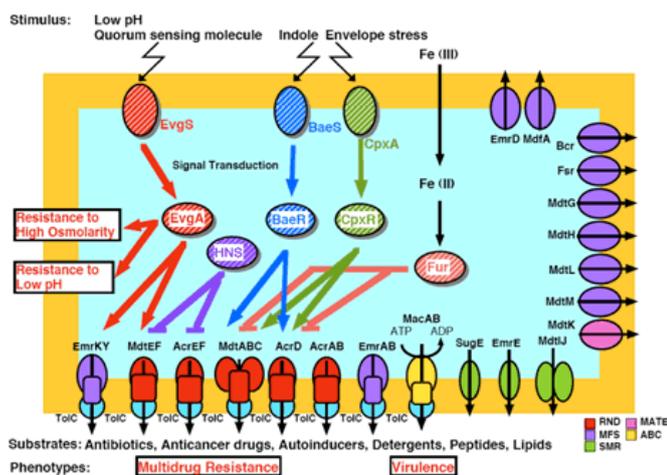


図 3-40 異物排出トランスポーターによる細胞機能制御¹⁴⁰

細胞には基質が未知の異物排出トランスポーター「オーファン輸送体」が数多く存在する

② 期間中の研究成果

(i) 細菌ゲノムに潜む異物排出トランスポーターの同定と薬剤耐性化における役割

サルモネラ属菌の異物排出トランスポーターの網羅的解析の結果、少なくとも 9 個が存在していることが判明した。うち 1 個はサルモネラ特異的に存在し、MdsABC と名付けた。これらトランスポーターの発現はいずれも、サルモネラを薬剤耐性化させ、トランスポーター欠損株は抗菌薬・色素・界面活性剤といった様々な化合物に対して感受性化していることが判明した^{[1], [2], 140}。

¹⁴⁰ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/nishino.html>

(ii) 病原性における異物排出トランスポーターの役割

上記異物排出トランスポーターの本来の生理機能を調べた結果、細菌病原性発現に関与することが明らかになった。最も病原性に関与しているものはMacABであり、サルモネラ病原性を調節する二成分情報伝達系PhoPQによって厳密に制御され、その発現がマクロファージ内で調節されていることが明らかになった¹⁴⁰。

(iii) 異物排出トランスポーター発現制御機構の解明

宿主環境中に存在する代謝産物インドールや胆汁酸が、新規のレギュレーターRamA を介して、二つの制御機構、すなわちインドールはRamAの発現を上昇させることにより、一方、胆汁酸はRamAに直接結合して活性化させることにより、AcrABを誘導することを見いだした^{[3], 140}。

(iv) 異物排出トランスポーター生理機能の解明

(A) 鉄代謝における異物排出トランスポーターの役割

サルモネラの異物排出トランスポーターAcrDとMdtABCは、鉄欠乏条件下において誘導される鉄代謝調節因子Furにより制御されていること、同条件下において、これらトランスポーターが細菌の生育に必要であり、鉄キレーター「エンテロバクチン」を排出して、鉄獲得に関与していることを見いだした。この鉄キレーター排出機構が病原性成立に関与していることが示唆された¹⁴⁰。

(B) 抗菌ペプチド耐性とLPS構造維持における異物排出トランスポーターの役割

サルモネラの全ての異物排出トランスポーター欠損株は、抗菌ペプチド・ポリミキシンB (PL-B) への感受性が100倍以上高くなっており、また、サルモネラ特異的トランスポーターMdsABC-TolCは、PL-Bの標的LPSのlipidAのリン酸基数を調整し、抗菌ペプチド耐性化に関与していると考えられた。このように異物排出トランスポーターは、薬剤耐性化だけではなく、宿主の自然免疫から逃れるという生理機能も担っていることが示唆された¹⁴⁰。

(v) 異物排出活性測定デバイスの開発

異物排出活性を細菌1細胞レベルで高感度に検出する新手法を開発し、フェムトリッターチャンバーやマイクロ流路を用いて、10～15分で細菌の排出活性並びに阻害剤の効果の両方を測定することに成功した¹⁴⁰。

(vi) 異物排出トランスポーター阻害剤による新規治療法確立の試み

異物排出トランスポーター阻害剤(PAβN)には、細菌の多剤耐性化を軽減させ、病原性も軽減させる効果があることが判明し、これまで無効とされていた抗菌薬も阻害剤の併用により、有効に利用することが可能になった。さらに、阻害剤は単独で、サルモネラの細胞侵

入性低下を引き起こし、また、カイコへの致死性を減弱させ、細菌病原性を軽減させる効果もあることが判明した¹⁴⁰。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Horiyama T., Yamaguchi A., Nishino K. “TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(7), 1372-1376.
- [2] Nikaido E., Shirotsuka I., Yamaguchi A., Nishino K. “Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to indole and paraquat”, *Microbiology*, 2011, 157(3), 648-655.
- [3] Nikaido E., Yamaguchi A., Nishino K. “AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals”, *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(35), 24245-24253.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の新学術領域研究(研究領域提案型)「マルチコンポーネント型薬剤排出ポンプの機能と複合体形成機構の解明」(2010年度)、若手研究(A)「トランスポーター制御による細菌恒常性維持機構の解明と新規治療戦略の開発」(2014~2015年度)、基盤研究(B)「トランスポーターによる多剤耐性・病原性発現機構解明と新規治療法の開発」(2017~2019年度)、さらに、最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)「薬剤排出ポンプによる細菌多剤耐性化・病原性発現制御機構の解明と新規治療法開発」(2010~2013年度)、AMED 感染症実用化研究事業 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「細菌多剤排出ポンプ阻害剤開発に関する研究」(2016~2018年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

可溶性(s)RNA と mRNA の両方に結合し標的 mRNA への sRNA の結合を促進させる RNA シャペロン Hfq が、トランスポーターAcrB の転写後調節を行うことで、薬剤耐性制御に関係していることを明らかにした。また、細菌において最も研究が進んでいる sRNA である DsrA が、シグマ因子 RpoS を介して、MdtEF 薬剤排出システムを制御することにより、多剤耐性制御に関係していることを見いだした¹⁴¹。

サルモネラ異物排出トランスポーター9個のうち7個(AcrAB、AcrAD、AcrEF、MdsAB、MdtABC、EmrAB、MacAB)が、外膜タンパク質 TolC と共役し、薬剤を排出していることが判明した。また、MdsAB は MdsC 外膜タンパク質とも複合体を形成して機能していることが明らかになっ

¹⁴¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-21022026/>

た¹⁴²。

多剤耐性と病原性発現に關与するサルモネラ薬剤排出ポンプのリプレッサー制御因子 RamR と複数の抗菌性物質との共結晶構造決定に世界で初めて成功し、細菌の抗菌薬抵抗性制御の新たなメカニズムを明らかにした(図 3-41)^{[1], 143}。

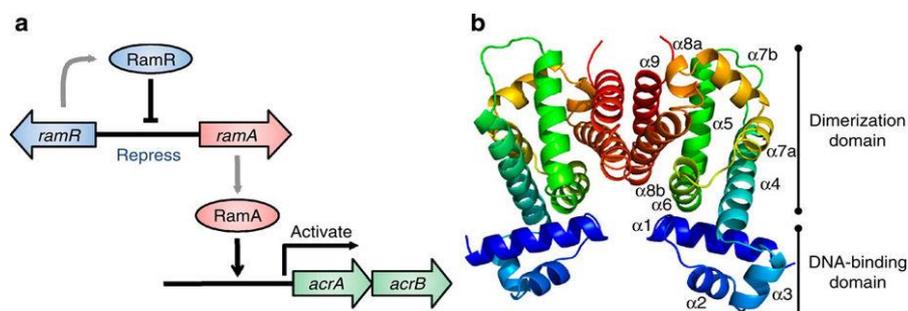


図 3-41 サルモネラの薬剤抵抗性制御ネットワーク (a) 及び RamR の構造 (b) ^[1]

多剤排出タンパク質遺伝子 *acrAB* は、アクチベーター RamA とリプレッサー RamR により、その発現が制御されている

大腸菌の多剤排出トランスポーターが、薬剤排出だけでなく、バイオフィルムの形成維持においても重要な役割を担っていることを明らかにした。また、鉄欠乏時に細菌体内で合成されたエンテロバクチンを、外環境から鉄を獲得するためにトランスポーターが輸送している事実を突き止めた。さらに、メチルグリオキサールの多剤耐性緑膿菌に示す抗菌性や、消毒剤のトリクロサン耐性におけるサルモネラ多剤排出トランスポーターの役割についても明らかにした^{[2], [3], 144}。

また、多剤耐性菌に対応するため、緑膿菌に対する迅速な薬剤感受性試験を可能にするマイクロ流路デバイスを開発した^[4]。四つのマイクロチャネルの 5 セットで構成される。緑膿菌 101 株の臨床的に単離された株での結果は、通常のミューラーヒントンブロスを用いて得られた結果と強く相関した。この細菌性薬剤感受性の迅速決定は、他の病原性種にも適用可能であり、高価な機器を必要とせずに臨床検査室に容易に導入することができる。

②社会・経済への波及効果

本研究成果により、異物排出トランスポーターを阻害することで、細菌の薬剤耐性化及び病原性が軽減される可能性が示され、これまで無効とされていた抗菌薬も阻害剤を併用することにより、有効に利用することが可能になると示唆された。将来、多剤耐性菌による感染症を克服する新たな治療戦略につながることを期待される。

¹⁴² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-22121514/>

¹⁴³ http://www8.cao.go.jp/cstp/sentan/jisedai/seika/51s_80.pdf

¹⁴⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26713004/>

大阪府豊能町が「健康に良い野菜」として特産化を目指す南米アンデス原産のヤーコンを基にしたサプリメント開発が進められている。腸内善玉菌の栄養源となるフラクトオリゴ糖の研究を始めた本研究者が、この糖を多く含むヤーコンに注目し、町へサプリメント開発への協力を働きかけた。町は「ヤーコンで新しい産業を生み、若者が働く場を広げたい」と期待を寄せている(毎日新聞地方版 2016年1月22日)。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Yamasaki S., Nikaido E., Nakashima R., Sakurai K., Fujiwara D., Fujii I., Nishino K. “The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs”, *Nature Communications*, 2013, 4, 2078.
- [2] Horiyama T., Nishino K. “AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export in *Escherichia coli*”, *PLoS ONE*, 2014, 9(9), e108642.
- [3] Hayashi K., Fukushima A., Hayashi-Nishino M., Nishino K. “Effect of methylglyoxal on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*”, *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, 180.
- [4] Matsumoto Y., Sakakihara S., Grushnikov A., Kikuchi K., Noji H., Yamaguchi A., Iino R., Yagi Y., Nishino K. “A microfluidic channel method for rapid drug-susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*”, *PLoS ONE*, 2016, 11(2), e0148797.

④その他

本研究者は研究終了後に、大阪大学功績賞(研究部門)(2011年)を受賞している。

さらに本研究者は研究終了後に、*Methods in Molecular Biology*(2018年)で執筆している¹⁴⁵。

¹⁴⁵ Nishino K. “Regulation of the Expression of Bacterial Multidrug Exporters by Two-Component Signal Transduction Systems”, *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1700, 239-251.
Iino R., Sakakihara S., Matsumoto Y., Nishino K. “Large-scale femtoliter droplet array for single cell efflux assay of bacteria”, *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1700, 331-341.

3.2.11 ストレス応答破綻としてのメタボリックシンドロームと動脈硬化の分子機構解明 (眞鍋一郎)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

メタボリックシンドロームと動脈硬化は、病態の初期から互いに関連し合いながら進展する。その背景には、代謝に関わる臓器と血管の両方で同時に、肥満や代謝異常に伴う様々なストレスへの絶えざる応答とその破綻による臓器の機能低下や、高次構築の改変が進んでいると考えられる。脂肪組織は、単に脂肪を蓄積するばかりでなく、多様な生理活性物質も分泌し、メタボリックシンドロームに中心的な役割を果たしている(図3-42)。本研究者らは、生きている脂肪組織を観察する新しい手法を開発し、肥満脂肪組織にダイナミックな炎症変化が起こっていることを見だし、この変化は、動脈硬化形成過程に見られる変化と多くの共通点を持つ慢性炎症と捉えられた。本研究では、生活習慣病の病態メカニズムについて、代謝組織における炎症の意義、心血管系と代謝系に共通したストレス応答転写制御機構、共通の代謝ストレスの同定とそのシグナル機構、転写因子KLF5の機能の解明を目指した¹⁴⁶。

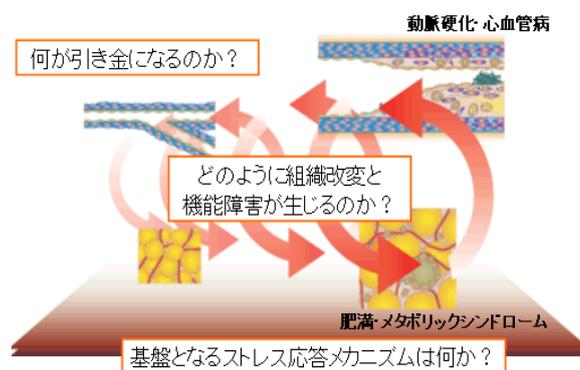


図 3-42 メタボリックシンドロームと動脈硬化
- 同時進行するストレス応答とその破綻¹⁴⁶

② 期間中の研究成果

(i) 肥満は内臓脂肪組織の炎症を惹起する

生きている脂肪組織を未固定のまま観察できる新しいイメージング法を開発した。この方法を用いた肥満過程の観察の結果、まず adipo-/angiogenic cell clusters により脂肪細胞新生が起こり、肥満の進行によってマクロファージが王冠状に脂肪細胞の周囲に集合する細胞集団 Crown-like structures が形成された。肥満によって血管内皮と白血球の相互作用が亢進し、血流の低下も認められ、血管機能の変化が脂肪組織機能異常の原因となっ

¹⁴⁶ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/manabe.html>

ている可能性が示唆され、慢性炎症と捉えられた。その誘導メカニズムの解析の結果、CD8+ T細胞が、マクロファージ、脂肪細胞との密接な相互作用を介して、脂肪細胞肥満における炎症カスケードの誘導・維持に必須であることが示された。これらの現象の多くは、動脈硬化の進展過程でも認められることから、両者に共通したメカニズムが機能していることが示唆された^{[1], [2], 146}。

(ii) 心血管疾患と代謝疾患の両者に重要な転写因子 KLF5

本研究からは先に、転写因子KLF5が脂肪細胞の分化を制御する転写ネットワークの重要な構成因子であることを見いだした。KLF5の機能を更に解析した結果、KLF5のSUMO化¹⁴⁷が、転写のon/offスイッチの機能を持つことが判明し、KLF5は心血管疾患とメタボリックシンドロームの両方で重要な機能を持つことが示された^{[3], 146}。

(iii) 共通した病態惹起因子と慢性炎症を標的とした治療戦略

肥満を背景として増加する病態因子として、遊離脂肪酸に着目し、これが血管と代謝系の両方で細胞機能異常を惹起することを見いだした。慢性炎症が基盤病態として重要なことから、このプロセスに介入する新しい治療戦略が考えられ、また一方で、炎症はナノ粒子による良い治療標的となり得ると考えられた¹⁴⁶。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Nishimura S., Manabe I., Nagasaki M., Hosoya Y., Yamashita H., Fujita H., Ohsugi M., Tobe K., Kadowaki T., Nagai R., Sugiura S. “Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels”, *Diabetes*, 2007, 56(6), 1517-1526.
- [2] Nishimura S., Manabe I., Nagasaki M., Seo K., Yamashita H., Hosoya Y., Ohsugi M., Tobe K., Kadowaki T., Nagai R., Sugiura S. “In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue”, *Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(2), 710-721.
- [3] Oishi Y., Manabe I., Tobe K., Ohsugi M., Kubota T., Fujiu K., Maemura K., Kubota N., Kadowaki T., Nagai R. “SUMOylation of Krüppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR- δ ”, *Nature Medicine*, 2008, 14(6), 656-666.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「心血管代謝疾患病態基盤としての小胞体ストレス・転写因子翻訳後修飾シグナル分子機構」(2008～2010年度)、基盤研究(B)「臓器連

¹⁴⁷ 翻訳後修飾の一種で、低分子ユビキチン様修飾因子(Small Ubiquitin-like Modifier)が付加すること

関と慢性炎症による心血管疾患発症・進展分子機構の解明と診断・治療法への応用」(2011～2013年度)、基盤研究(B)「心血管疾患の多臓器連携機序の解明と臨床応用」(2016～2018年度)、及び基盤研究(B)「生活習慣病におけるマクロファージの時空間多様性をもたらす作動原理の解明と医療応用」(2017～2019年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

血管の代謝ストレス応答機構を解析し、遊離脂肪酸が血管及び脾ランゲルハンス島で小胞体ストレスを惹起し、両者の機能障害を引き起こすことを見いだした。また、TLR4 シグナルを介して炎症プロセスを活性化することが明らかになった¹⁴⁸。肥満脂肪組織からの放出が増加する遊離脂肪酸が、心血管系での炎症を誘導するという心血管-脂肪連関がメタボリックシンドロームにおける心血管疾患リスクの増大に重要であることを見いだした。心腎連関が心臓のストレスへの応答に重要であるとともに、心不全の進展にも寄与することを明らかにした。また、この臓器連携のメディエーターが病態を修飾することを見いだした^{[1], 149}。さらに遊離脂肪酸により常在 M2 型マクロファージが減少し、M1 型マクロファージないしは炎症性単球が増加することを見いだした。また、マクロファージの移動に S100 タンパクが重要であることを明らかにした¹⁵⁰。

骨髄由来平滑筋 α -アクチン陽性細胞が、炎症性単球由来であることを見だし、これらの細胞は傷害の強い血管での炎症及び組織リモデリングに寄与すると考えられた¹⁵¹。また、血管平滑筋細胞が遊離脂肪酸によって形質転換を生じ、その制御機構として、NADPH oxidase による活性酸素種の産生が重要であることを見いだした^{[2], 152}。

血中パルミチン酸を直接増加させることにより生じる病態の悪化について、特に、慢性炎症プロセスを惹起するメカニズムに着目した解析を行い、パルミチン酸が β 細胞の TLR4 シグナルを活性化し、炎症を惹起することを見いだした。また、マクロファージが心臓で保護的機能を持つことを見いだした¹⁵³。

転写因子 KLF5 と KLF6 に着目して解析を行い、心臓の心筋細胞では KLF6 が、線維芽細胞では KLF5 が働き、心臓肥大や線維化を制御していることを見いだした(図 3-43)^[3]。また、KLF6 が大動脈瘤解離の病態に重要であることを示した。腎臓においては、KLF5 が腎障害に対する炎症を制御しており、慢性腎臓病に寄与することを見いだした。さらに KLF5 が大腸がんに関連することを明らかにした¹⁵⁴。

マウスリンパ浮腫モデルを用いて、リンパ浮腫の基盤にある炎症プロセスと過剰なリン

¹⁴⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20390220/>

¹⁴⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23659412/>

¹⁵⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24659382/>

¹⁵¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21659196/>

¹⁵² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21659195/>

¹⁵³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-22117504/>

¹⁵⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-22229006/>

血管新生について検討した結果、未熟リンパ球の過剰な新生が浮腫を惹起することを見だし、その分子機序として免疫細胞が寄与する炎症プロセスが重要であることを見いだした。また、リンパ浮腫を抑制する薬剤を同定し、その作用機序が炎症抑制であることを明らかにした^{[4], 155}。



図 3-43 KLF6 欠損マウス (Klf6^{+/-}) における心筋線維化の減少^[3]
アンジオテンシン (Ang II) 刺激後 14 日目

慢性炎症においてマクロファージを制御する非翻訳 (nc) RNA の同定とその機能解析を行い、これまで報告のない長鎖非翻訳 (lnc) RNA を 1000 種以上同定した。特に 2 種の lncRNA について、マクロファージの LPS 刺激における応答を制御することを見いだした。これらの lncRNA は、傷害刺激によって発現が誘導されることから、病態におけるマクロファージ機能を制御している可能性が高いことが示唆された¹⁵⁶。長期的な時間の中でのマクロファージの機能変化が内在するプログラムによって制御されているかを検討した結果、細胞時計と炎症を制御する転写因子との間に相互作用があることが示唆された¹⁵⁷。

新規に同定した細胞群 (APDP 細胞) が、脂肪組織炎症プロセスの引き金を引くことを見いだした。加齢マウスでは APDP 細胞が集積し、また DNA 傷害シグナルが、APDP 細胞の分化に重要なこと、そのトランスクリプトーム解析から、マクロファージとは異なる特有の遺伝子発現を示すことを見いだした¹⁵⁸。

②社会・経済への波及効果

本研究成果により、慢性炎症が肥満、心血管系疾患の基盤病態として重要であることが判明したことから、慢性炎症プロセスに介入する新しい治療戦略が考えられる。この点で転写因子 KLF5 はこれらの疾患の治療法開発において魅力的な標的分子である。今後さらに、ストレス応答や慢性炎症プロセスによる病態発症メカニズムの解明により、新たな治療標的が同定されることが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

¹⁵⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23659412/>

¹⁵⁶ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25670381/>

¹⁵⁷ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26670393/>

¹⁵⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-15H01506/>

- [1] Fujiu K., Shibata M., Nakayama Y., Ogata F., Matsumoto S., Noshita K., Iwami S., Nakae S., Komuro I., Nagai R., Manabe I. “A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation” , *Nature Medicine*, 2017, 23(5), 611-622.
- [2] Shen H., Eguchi K., Kono N., Fujiu K., Matsumoto S., Shibata M., Oishi-Tanaka Y., Komuro I., Arai H., Nagai R., Manabe I. “Saturated fatty acid palmitate aggravates neointima formation by promoting smooth muscle phenotypic modulation” , *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2013, 33(11), 2596-2607.
- [3] Sawaki D., Hou L., Tomida S., Sun J., Zhan H., Aizawa K., Son B.K., Kariya T., Takimoto E., Otsu K., Conway S.J., Manabe I., Komuro I., Friedman S.L., Nagai R., Suzuki T. “Modulation of cardiac fibrosis by Kruppel-like factor 6 through transcriptional control of thrombospondin 4 in cardiomyocytes” , *Cardiovascular Research*, 2015, 107(4), 420-430.
- [4] Ogata F., Fujiu K., Matsumoto S., Nakayama Y., Shibata M., Oike Y., Koshima I., Watabe T., Nagai R., Manabe I. “Excess Lymphangiogenesis Cooperatively Induced by Macrophages and CD4+ T Cells Drives the Pathogenesis of Lymphedema” , *Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(3), 706-714.

3.3 2007 年度採択研究課題

3.3.1 細胞の極性形成に関わる膜ドメインの形成・維持機構の解明(池ノ内順一)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

上皮細胞の細胞膜は、消化管や腎尿細管などの管腔に面するアピカル膜と、基底膜と接するバソラテラル膜に分けられ、両膜の境界に、細胞接着構造タイトジャンクションが認められる。細胞膜の主たる構成成分である膜タンパク質と脂質分子のうち、脂質分子については、それぞれの細胞膜領域における組成は、ほとんど明らかになっていない(図3-44)。

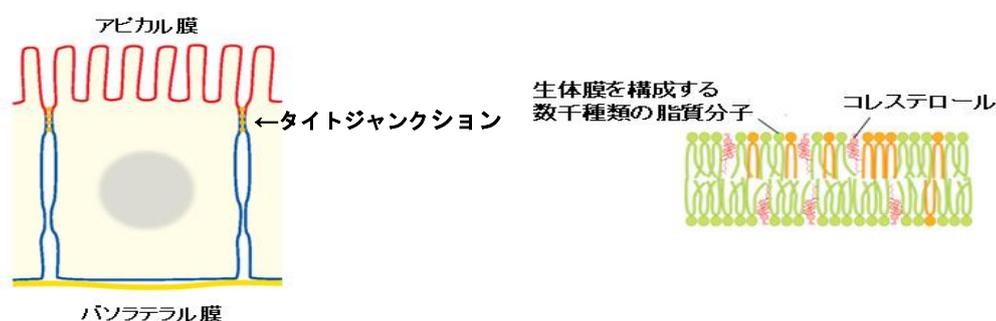


図 3-44 上皮細胞の極性形成や機能の発揮に重要な細胞膜脂質の探索¹⁵⁹

本研究は上皮細胞の細胞膜ドメインの脂質組成を明らかにし、特にタイトジャンクション(TJ)について詳細に解析し、細胞膜構造の形成における脂質代謝の重要性や膜タンパク質と脂質分子の自己組織化過程の解明を目指した。また、細胞膜ドメインを形成する上で、膜タンパク質や脂質分子の自由拡散を防いでいる分子機構の解明も目指した。本研究者らはこれまでに、TJ欠損細胞を樹立し、TJがなくてもアピカル膜とバソラテラル膜の分離が正常に起こることを報告しており、両膜の分離に関する新たな分子機構を提唱するため、分離に関わる新規遺伝子群の探索も行った¹⁶⁰。

② 期間中の研究成果

(i) 細胞膜を構成する脂質分子組成の解析法の確立

細胞膜のみを単離するため、コロイド状シリカ粒子を用いた新たな技術を確立した。この技術は、陽電荷を付与したシリカ粒子を負電荷を帯びる細胞膜に付着させた後、細胞を破碎し、密度勾配遠心により、シリカ粒子の付いた細胞膜(アピカル膜画分)をペレットとして回

¹⁵⁹ http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/tubulology/research_s05.html 図 3-44 は一部改変した。

¹⁶⁰ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/ikenouchi.html>

収する技術である。バソラテラル膜は、破砕時に培養皿に残る膜画分として回収した¹⁶⁰。

(ii) タイトジャンクションを構成する脂質の同定と機能解析

TJ領域の細胞膜構造のモデルとして、膜タンパク質同士が接着する「タンパク質モデル」が広く受け入れられているが、TJ構成膜タンパク質クローデインの細胞外領域が細胞膜から突き出た構造で果たしてイオンや水の透過性を制御できるか、疑問が残った。本研究者は、クローデインと特定のコーン型脂質分子種が協調して逆ミセル構造を主体とする膜構造をとっているのではないかと考えた。クローデイン発現L細胞と、TJを持たない元来のL細胞の細胞膜脂質分子組成の解析を行ったところ、特定の脂質分子種がクローデイン発現L細胞の細胞膜に多く含まれていた。さらに本研究者の提唱モデルを検証するため、TJ細胞膜領域の脂質組成を反映させたリポソームと精製クローデインタンパク質を用いてTJの試験管内再構成に取り組んだ^{[1], [2], 160}。

(iii) 脂質分子を可視化するための小分子プローブの探索

リン脂質の一つ、ホスファチジン酸(PA)は、小胞輸送やシグナル伝達などの生命現象において重要なリン脂質であるが、有効なプローブが存在しないため、細胞内局在について不明であった。そこで、PAのプローブの候補となる化合物を見付け出すため、約2000種類の真菌の培養上清ライブラリーをスクリーニングした結果、目的の真菌培養上清を同定した。この上清中に含まれるPAに結合する化合物について、液体クロマトグラフィとNMRを用いて、分離・精製と物質の同定を進めた¹⁶⁰。

(iv) 上皮細胞の細胞膜ドメインの分離に関わる分子機構の解明

上皮細胞のアピカル膜及びバソラテラル膜という非対称な細胞膜ドメインの形成に関わる新規遺伝子の探索を行った。上皮細胞の極性形成に重要とされる遺伝子群として、ZO-1、ZO-2、Par-3、Par-6、aPKCなどが知られているが、いずれも上皮細胞の細胞接着初期過程においてはスポット状の接着部位に局在し、後期過程においては、TJに局在した。細胞接着過程で、同様の局在の変化を示すタンパク質をスクリーニングした結果、新規遺伝子であるFRMD4A (FERM domain containing 4A) を同定した。FRMD4A遺伝子及びFRMD4Aと高い相同性を示す遺伝子GRSP-1を同時にノックダウンすると極性形成過程が顕著に遅延した。FRMD4Aの結合相手を探索した結果、FRMD4Aは、Par-3とArf6の活性化因子Cytohesinの双方に結合するScaffoldingタンパク質であることが判明した^{[3], 160}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Ikenouchi J., Sasaki H., Tsukita S., Furuse M., Tsukita S. “Loss of occluding affects tricellular localization of tricellulin”, *Molecular Biology of Cell*, 2008, 19(11), 4687-4693.

- [2] Masuda S., Oda Y., Sasaki H., Ikenouchi J., Higashi T., Akashi M., Nishi E., Furuse M. “LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells”, *Journal of Cell Science*, 2011, 124(4), 548-555.
- [3] Ikenouchi J., Umeda M. “FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(2), 748-753.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(A)「細胞膜を構成する脂質分子の同定とその新規機能の解明」(2009～2012年度)、若手研究(A)「微絨毛形成におけるスフィンゴミエリンの機能解明」(2013～2015年度)、基盤研究(B)「タイトジャンクション形成の制御機構の解明」(2016～2018年度)、さらに、さきがけ 研究領域「細胞機能の構成的な理解と制御」の研究課題「人工細胞作出に向けた人工脂質二重膜と生体膜の違いの解明」(2012～2015年度)、PRIME 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「上皮間葉転換における細胞膜脂質の変化とその意義の解明」(2015～2017年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

シリカ粒子法により単離したアピカル膜とバソラテラル膜の脂質解析の結果、両膜に SM がほぼ同量、豊富に存在した。SM に結合するタンパク質ライセニンは、アピカル膜 SM が集積した膜ドメインにのみ選択的に結合した。TJ を欠く上皮細胞においても、アピカル膜の SM クラスターが形成された。SM クラスターはアピカル膜の微絨毛に分布し、その形成に重要な役割を果たすこと、SM 分解酵素処理により、微絨毛が完全に消失することを見いだした^{[1], 161}。SM と特異的に共役して微絨毛を形成する膜タンパク質複合体(Podocalyxin-1-EBP-50-PIP5K β) (図 3-45)を同定した^{[2], 162}。さらに、SM によるアクチン細胞骨格の制御機構についても明らかにし、並行して、微絨毛とは異なる突起構造であるブレブの形成機構についても解析した^{[3], 163}。

SM の生合成に関わる酵素の阻害剤を添加して上皮細胞を三次元培養した結果、ポドカリンを欠損させた場合と同様に、上皮管腔構造の形成に異常が生じることが判明した。また、上皮管腔構造の形成の初期段階では SM が細胞内部に集積する様子が観察された¹⁶⁴。

¹⁶¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21687016/>

¹⁶² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-24112511/>

¹⁶³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25711012/>

¹⁶⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-26112713/>

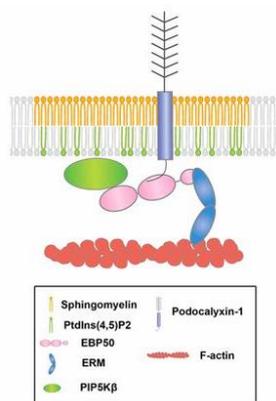


図 3-45 スフィンゴミエリンと協働する分子複合体^[2]

TJ の脂質組成を解析した結果、他の形質膜領域に比し、長鎖スフィンゴミエリンやプラズマローゲン型ホスファチジルエタノールアミンが多いことを見いだした。この研究過程で、カルモジュリンキナーゼ (CaMK II) 阻害剤で細胞を処理すると、TJ がラテラル膜まで拡大することを見いだした。また細胞膜ブレブ (Bleb : 細胞膜の突出構造) を安定的に観察できる細胞と方法論を確立し、ブレブの伸展や退縮の際に興味深い挙動を示す分子を複数同定した^{[4], 165}。

上皮細胞と間葉細胞の細胞膜脂質を比較した結果、上皮細胞に限定して認められる脂質分子種が存在することが明らかになった。脂質分子の可視化に適した脂質結合タンパク質の探索及び脂質プローブの開発に取り組み、また、上皮間葉転換によらないがん細胞の浸潤性の獲得機構として、細胞膜ブレブによる細胞運動が挙げられることから、細胞膜ブレブの形成における細胞膜脂質の関与について更に検討を進めた¹⁶⁶。さらに、ブレブの形成・退縮に関わる RhoA と Rnd3 の相互抑制機構に関し、そのシグナル伝達機構の解明を目指した¹⁶⁷。

②社会・経済への波及効果

本研究成果は、その実用的な側面として、精緻な細胞膜機能を持たせた人工組織材料の実用化や新たなドラッグデリバリーシステムの開発において重要な基盤技術になる可能性がある。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Ikenouchi J., Suzuki M., Umeda K., Ikeda K., Taguchi R., Kobayashi T., Sato S.B., Kobayashi T., Stolz D.B., Umeda M. “Lipid polarity is maintained in absence of tight junctions”, *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(12),

¹⁶⁵ http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/posteriori/h27/JST_P11_synbio_2015.pdf

¹⁶⁶ http://www.amed.go.jp/program/houkoku_h27/0107023_09.html

¹⁶⁷ <http://math-signal.umin.jp/member/kobo/ikenouchi.html>

9525-9533.

- [2] Ikenouchi J., Hirata M., Yonemura S., Umeda M. “Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli”, *Journal of Cell Science*, 2013, 126(16), 3585-3592.
- [3] Aoki K., Maeda F., Nagasako T., Mochizuki Y., Uchida S., Ikenouchi J. “A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(13), E1863-1871.
- [4] Shiomi R., Shigetomi K., Inai T., Sakai M., Ikenouchi J. “CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier”, *Science Reports*, 2015, 5, 13262.

④その他

本研究者は研究終了後に、文部科学大臣表彰若手科学者賞(2014年)、第7回井上リサーチアワード(2014年)及び第12回柿内三郎記念奨励研究賞(2015年)を受賞している。

3.3.2 蛍光 ATP プローブを用いた ATP 代謝の解析(今村博臣)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

細胞内の主要なエネルギーであるアデノシン三リン酸(ATP)は、様々な生体内反応を進行させるために不可欠であり、また、細胞内外のシグナル伝達物質としての役割も持っている(図3-46)。従来の細胞破碎による細胞内ATP量分析法では、細胞内コンパートメントや細胞ごとのATP濃度の分布やダイナミクスを調べることはできず、そのため、生きた細胞や組織・生体におけるATPの時空間的な動態の理解はほとんど進んでいなかった。本研究では、個々の生きた細胞内のATP濃度を可視化・定量する技術を確立し、細胞内ATPの基本的性質や制御機構、さらに生命現象(特に細胞死、細胞周期、インスリン分泌)におけるATPの役割を明らかにすることを旨とした¹⁶⁸。

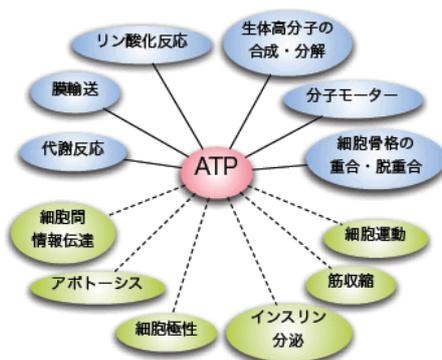


図 3-46 ATP が関与する代表的な細胞プロセス¹⁶⁸

②期間中の研究成果

(i) 蛍光 ATP プローブ(ATeam)の開発

ATP濃度に応じてフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)効率が変化する蛍光プローブ(ATeam)の開発を行い、バクテリアFoF1-ATP合成酵素の調節サブユニット ϵ をシアン色蛍光タンパク質(CFP)及び黄色蛍光タンパク質(YFP)で挟んだ融合タンパク質を作成した。この融合タンパク質では、ATP結合による ϵ サブユニットの構造変化によりCFPとYFPの距離と向きが変化し、CFPからYFPへのFRET効率が変化すると予想された。ATP濃度が高い時にはYFP/CFP比は高くなり、逆にATP濃度が低ければYFP/CFP比は低くなった^{[1], [2], 168}。

(ii) ATP の細胞内分布

HeLa細胞の細胞質、核、そしてミトコンドリアマトリックスにATeamを発現させて、ATeam

¹⁶⁸ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/imamura.html>

のFRETシグナルを比較した結果、細胞質と核ではYFP/CFP比に大きな違いは見られず、一方、ミトコンドリアマトリックスではYFP/CFP比が顕著に低く、ATP濃度が低く保たれていることが明らかになった。脱共役剤であるCCCPを加えると濃度差が解消したことから、細胞質とミトコンドリアのATP濃度差はミトコンドリア膜電位依存的に保たれていることが明らかになった^{[2], 168}。

(iii) がん細胞内 ATP 濃度の薬剤感受性

HeLa細胞の細胞内ATP濃度の、解糖系あるいは酸化的リン酸化阻害剤に対する応答を、ATeamを用いて調べた結果、この細胞におけるATP合成の酸化的リン酸化への依存度は非常に低く、解糖系だけでも細胞内ATP濃度を維持できることが判明した。また、解糖系を主としたHeLa細胞のエネルギー代謝が一つの培地成分の違いによって酸化的リン酸化を主としたものに変換することが示された^{[2], 168}。

(iv) 改変 ATeam を用いたカルシウムによるミトコンドリア ATP 合成活性化の可視化

ミトコンドリア内ATPと細胞内カルシウムの同時イメージングのため、新しいATPバイオセンサーを開発し、GO-ATeamと名付けた。GO-ATeamは紫外領域の光でほとんど励起されないため、蛍光カルシウムセンサーfura-2との蛍光のクロストークはほとんど見られない。同時イメージングの結果、細胞当たりのカルシウム上昇とATP上昇の幅に正の相関が認められ、カルシウムが実際に細胞内でもミトコンドリアATP合成を亢進していることが明らかになった^{[3], 168}。

(v) 細胞死における ATP のダイナミクスの解析

カスパーゼに耐性なプローブATeamDNDGを開発し、これを用いて単一のHeLa細胞のアポトーシスの進行とATPの変化を同時に計測した結果、細胞質ATP濃度は、ミトコンドリアからのチトクロームcの放出に続くミトコンドリア膜電位の消失後に徐々に低下し、その後枯渇することが明らかになった。またアポトーシスにおけるミトコンドリア膜電位の消失によって細胞のATP合成が解糖系のみ依存することが改めて確認された¹⁶⁸。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Okuno D., Fujisawa R., Iino R., Hirono-Hara Y., Imamura H., Noji H.

“Correlation between the conformational states of F1-ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(52), 20722-20727.

[2] Imamura H., Nhat K.P., Togawa H., Saito K., Iino R., Kato-Yamada Y., Nagai T., Noji H. “Visualization of ATP levels inside single living cells with

fluorescence energy transfer-based genetically encoded indicators”, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(37), 15651-15656.

- [3] Nakano M., Imamura H., Nagai T., Noji H. “Ca²⁺ regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level”, ACS Chemical Biology, 2011, 6(7), 709-715.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(A)「ATP イメージングによるアポトーシスにおける細胞内 ATP の意義の解明」(2010～2012 年度)、基盤研究(B)「膵臓ランゲルハンス島における細胞外 ATP シグナルの時空間動態の解明」(2014～2016 年度)及び基盤研究(B)「蛍光バイオセンサーを用いたミトコンドリア分岐鎖アミノ酸輸送体の同定及びその解析」(2017～2019 年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

蛍光ATPプローブATeamに、低い温度で適応できるように改良を加えた。この新しいプローブによりショウジョウバエS2細胞内ATPを25°Cでオリジナルプローブよりもより感度良く検出することができた^[1]。また、一つの蛍光タンパク質と一つの細菌ATP結合タンパク質から成る新たなATPプローブ「QUEEN」を開発した。これは細菌内ATP濃度の定量に有用であり、大腸菌内ATP濃度を測定した結果、個々の菌で有意な違いが認められた^[2]。さらに、ATeamの蛍光タンパク質CFPをNanoLucに置き換えることにより、ATP濃度依存的に生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)効率が変化する新規発光ATPプローブ「BTeam」を開発した(図3-47)^[3]。これにより生細胞内のATP濃度をマイクロプレートリーダーあるいは顕微鏡によって高い定量性で測定することが可能になり、生細胞内ATP測定の適用範囲が大きく広がった¹⁶⁹。

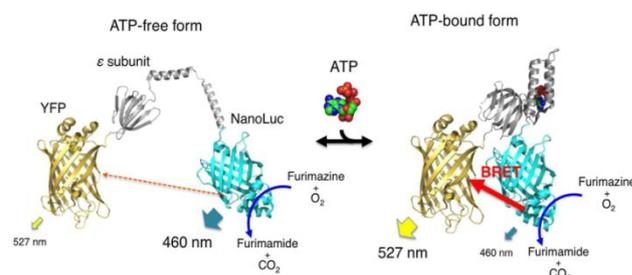


図 3-47 BTeam の模式図

ATP結合タンパク質 ϵ への結合によってNanoLucとYFP間の距離が変化することでBRET効率が増減する^[3]

¹⁶⁹ http://www.promega.co.jp/pdf/kawara_1710_p6.pdf

蛍光 ATP プローブを実験前に導入する系で ATP、Ca²⁺濃度を測定した結果、高グルコース刺激により、細胞内で ATP→Ca²⁺の順で細胞内濃度が上昇し、この ATP 濃度の上昇が初期の Ca²⁺濃度の上昇に必須であること、Ca²⁺濃度のオシレーション変動の際にも、ATP 濃度のオシレーション変動は生じていないことを明らかにした。GO-ATeam 遺伝子導入マウスでも、上記の場合と同様の ATP 濃度及び Ca²⁺濃度動態が認められた^{[4],170}。

アポトーシスにおける細胞質 ATP 濃度減少の機構を解析した結果、カスパーゼによって活性化されたパネキシン 1 (PANX1)からの ATP の漏出が、その主たる原因であることが示唆された¹⁷¹。

②社会・経済への波及効果

エネルギー代謝と疾病との関連が注目を集めており、本研究成果でも示されたが、がん細胞では正常細胞とは全く異なるエネルギー代謝を行っていることが知られている。そのため細胞のエネルギー代謝を詳しく理解することはこうした疾病の治療に将来的に役に立つと考えられる。実際、国内外の複数の企業と蛍光 ATP プローブの利用に関するライセンス契約を既に締結しており、創薬スクリーニングの場で本手法の利用が進みつつある。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Tsuyama T., Kishikawa J.-I., Han Y.-W., Harada Y., Tsubouchi A., Noji H., Kakizuka A., Yokoyama K., Uemura T., Imamura H. “In vivo fluorescent adenosine 5' -triphosphate (ATP) imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures”, *Analytical Chemistry*, 2013, 85(16), 7889-7896.
- [2] Yaginuma H., Kawai S., Tabata K.V., Tomiyama K., Kakizuka A., Komatsuzaki T., Noji H., Imamura H. “Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging”, *Scientific Reports*, 2014, 4, 6522.
- [3] Yoshida T., Kakizuka A., Imamura H. “BTeam, a novel BRET-based biosensor for the accurate quantification of ATP concentration within living cells”, *Scientific Reports*, 2016, 6, 39618.
- [4] Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, Imamura H. “Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca²⁺ influx and subsequent Ca²⁺ oscillations”, *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(4), 2205-2216.

¹⁷⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25461346/>

¹⁷¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-22687011/>

④その他

本研究者は研究終了後に、公益財団法人 長瀬科学技術振興財団長瀬研究奨励賞(2016年)を受賞している。

3.3.3 細胞内の蛋白質代謝を管理するストレス応答機構の解明(岩脇隆夫)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

生体内にはタンパク質の品質を広い範囲で管理し、その代謝過程を調節している機構が存在するが、その実態は完全には明らかになっていない。異常なタンパク質の排除や機能的なタンパク質の供給というタンパク質の品質管理は、特に分泌タンパク質や膜タンパク質の場合、細胞に備わっている小胞体ストレス応答や小胞体関連分解(ERAD)機構がその一部を担っている(図3-48)。本研究では、小胞体ストレス応答のメカニズムを分子レベルで解析することにより、分泌タンパク質及び膜タンパク質の生成や分解の制御機構の解明を目指した。また、小胞体ストレス応答の役割を生物個体レベルで解析することにより、分泌タンパク質や膜タンパク質の品質管理がどのような生理現象で特に重要になるのかの解明も目指した¹⁷²。

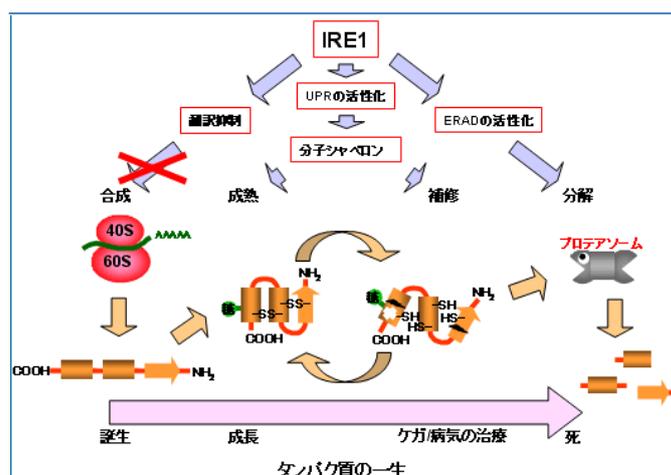


図 3-48 小胞体ストレスセンサーIRE1 が担当するストレス応答とタンパク質品質管理¹⁷²

② 期間中の研究成果

(i) IRE1 α による小胞体ストレス感知機構

酵母から哺乳動物に至るまで進化的に保存されている小胞体ストレスセンサーIRE1に着目して解析した結果、酵母では分子シャペロンBiPの結合/解離と変性タンパク質の直接結合との2段階で調節されるのに対し、哺乳動物のIRE1はBiPの結合/解離だけで調節されることを見だし、小胞体ストレス感知の進化における重要な知見を得た^{[1], 172}。

¹⁷² <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/iwawaki.html>

(ii) IRE1 α による基質 RNA 認識機構

IRE1 α の基質RNAの網羅的な探索を行い、既知のXBP1以外に新たに13種類同定した。そのうちの8種類について切断サイトの決定と切断サイト付近の二次構造比較を行った結果、これらは共通したコンセンサス配列(CUGCAG)及び構造(ステムループ構造)を有し、これらの特徴がIRE1の基質認識に重要であることが判明した。また、XBP1のmRNAは小胞体膜上に局在し、効率良くIRE1に認識される仕組みが備わっていることも明らかになった^{[2], 172}。

(iii) 生体レベルでの小胞体ストレス可視化と IRE1 α 条件的破壊マウスの表現型解析

マウス生体で小胞体ストレスをイメージングできる技術を世界に先駆けて開発した。この技術を更に改良し、他の組織での小胞体ストレスも検出できるようにし、胎盤での小胞体ストレス(狭義的にはIRE1 α 活性)を発見した。またIRE1 α 条件的破壊マウスの解析から、小胞体ストレス応答分子の胎児の生育、インスリン生合成への関与という新たな機能も示唆された^{[3], 172}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Oikawa D., Kimata Y., Kohno K., Iwawaki T. “Activation of mammalian IRE1 alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins”, *Experimental Cell Research*, 2009, 315(15), 2496-2504.
- [2] Oikawa D., Tokuda M., Hosoda A., Iwawaki T. “Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha”, *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(18), 6265-6273.
- [3] Iwawaki T., Akai R., Yamanaka S., Kohno K. “Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(39), 16657-16662.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の新学術領域研究(研究領域提案型)「異常タンパク質インターフェイスとしての天然変性領域の機能解析」(2012~2013年度)及び基盤研究(B)「生体内における細胞ストレス応答の分子生物学的理解からストレス順応モデルの作製へ」(2012~2014年度)などへ引き継がれた。

① 科学技術の進歩への貢献

小胞体ストレスセンサーIRE1 β は IRE1 α と異なり、ストレス依存的により安定で巨大な

複合体を形成すること、さらに、モデル異常タンパク質と直接相互作用することを明らかにした¹⁷³。小胞体内に構造異常タンパク質が少ない時、IRE1 α は分子シャペロン BiP と結合状態にあり、その活性は抑制されており、構造異常タンパク質が多い時は、IRE1 α は BiP から解放されるため二量体又は多量体を形成することが判明した。一方、IRE1 β は構造異常タンパク質の変化に関わらず BiP とは結合せず、異常タンパク質が多い時はそれらと直接結合して多量体を形成することが明らかになった。また BiP や構造異常タンパク質との結合領域が IRE1 の天然変性領域と一致していた¹⁷⁴。

IRE1 や XBP1 が脂質代謝、アセトアミノフェン代謝、胎盤血管新生、腸腫瘍増殖抑制^[1]、腸管パネート細胞機能、プラズマ細胞における抗体産生制御及び樹状細胞の抗原提示機能に関与することを見いだした^[2]。

OKD48 遺伝子を利用し、ルシフェラーゼをレポーターとして酸化ストレスを持つ細胞を発光で可視化する可視化マウス (Tg 型 OKD-Luc マウス)を開発した (図 3-49)^[3]。このマウスを用いて脳虚血時及びマラリア感染時に生じる酸化ストレスを解析した¹⁷⁵。また、小胞体ストレス性過食マウスモデルの確立と摂食行動中枢における小胞体ストレス関連分子の動態調査を行った¹⁷⁶。

さらに炎症性サイトカインである IL-1 β の発現制御システムを利用した IDOL (IL-1 β based Dual Operating Luciferase) 遺伝子とルシフェラーゼをレポーターとして炎症可視化マウスを開発した^[4]。

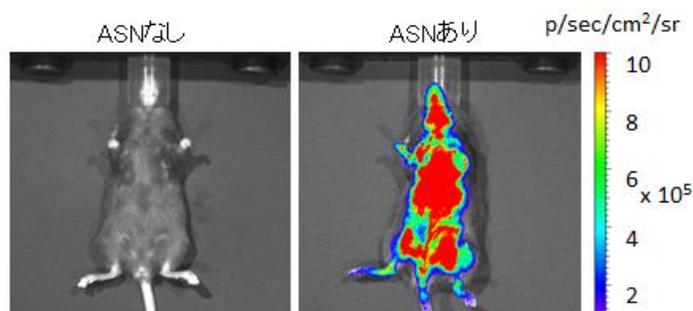


図 3-49 亜ヒ酸 (ASN) 投与による酸化ストレスの検出¹⁷⁷

②社会・経済への波及効果

小胞体ストレスはアルツハイマーなどの神経変性疾患、メタボリックシンドロームなどの要因になると考えられており、また老化現象、虚血性疾患、様々なウイルス感染症等との関連も注目されていることから、その機構の解明は重要であり、本研究成果の発展により、将来的な治療法の開発や創薬への貢献が期待される。

¹⁷³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-22113524/>

¹⁷⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-24113702/>

¹⁷⁵ <https://kaken.nii.ac.jp/file/KAKENHI-PROJECT-24390049/24390049seika.pdf>

¹⁷⁶ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15K15038/>

¹⁷⁷ <http://www.transgenic.co.jp/products/mice-product/model.php>

また、ストレスの可視化モデルマウスなどは株式会社トランスジェニックで販売されている。

本研究成果は、「ストレス「見える化」金沢医科大など研究グループ、光るマウスを開発」という見出しで新聞掲載された(北國新聞 2016 年 10 月 22 日)。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Niederreiter L., Fritz T.M.J., Adolph T.E., Krismer A.-M., Offner F.A., Tschurtschenthaler M., Flak M.B., Hosomi S., Tomczak M.F., Kaneider N.C., Sarcevic E., Kempster S.L., Raine T., Esser D., Rosenstiel P., Kohno K., Iwawaki T., Tilg H., Blumberg R.S., Kaser A. “ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells”, *Journal of Experimental Medicine*, 2013, 210(10), 2041-2056.
- [2] Osorio F., Tavernier S.J., Hoffmann E., Saeys Y., Martens L., Vettters J., Delrue I., De Rycke R., Parthoens E., Pouliot P., Iwawaki T., Janssens S., Lambrecht B.N. “The unfolded-protein-response sensor IRE-1 α regulates the function of CD8 α + dendritic cells”, *Nature Immunology*, 2014, 15(3), 248-257.
- [3] Iwawaki T., Akai R., Toyoshima T., Takeda N., Ishikawa T.-O., Yamamura K.-I. “Transgenic mouse model for imaging of ATF4 translational activation-related cellular stress responses in vivo”, *Scientific Reports*, 2017, 7, 46230.
- [4] Iwawaki T., Akai R., Oikawa D., Toyoshima T., Yoshino M., Suzuki M., Takeda N., Ishikawa T.-O., Kataoka Y., Yamamura K.-I. “Transgenic mouse model for imaging of interleukin-1 β -related inflammation in vivo”, *Scientific Reports*, 2015, 5, 17205.

3.3.4 オーキシン調節による植物の成長制御機構の解明(酒井達也)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

植物ホルモン・オーキシンは、細胞の成長、分裂、分化、ひいては個体の大きさ、発生、生殖など様々な植物の営みを制御している。細胞内オーキシン量の調節は、生合成・代謝調節及び細胞膜に局在するオーキシン輸送体を介した細胞内外への流出入調節によってなされているが、その分子機構の詳細は不明である。本研究は、三つの主要な光受容体フィトクロム(phy)、クリプトクロム(cry)、フォトトロピン(phot)に着目し、光による偏差成長制御、光屈性反応(図3-50)をモデルとして、オーキシン量調節の分子機構の解明を目指した。さらに、光によるオーキシン制御が葉や根器官の光形態形成に与える可能性を検証し、農作物の物質生産性及び環境適応性の向上に資するオーキシン作用の人工調節技術の基盤創出を目指した¹⁷⁸。



図 3-50 光屈性研究：オーキシン代謝と機能制御のモデル研究¹⁷⁸

② 期間中の研究成果

光屈性において光受容体phy及びcryが胚軸屈曲の抑制に働くオーキシン輸送体ABCB19の発現を抑制することによって、間接的に光屈性を促進していること、共同研究によりABCB19が別のオーキシン輸送体PIN1の細胞膜局在を安定化し、その活性を調節することを明らかにした^[1]。また、phy・cryはphot1シグナル伝達因子RPT2の転写発現制御を介して光屈性を促進すること、cryはジベレリン生合成・代謝関連遺伝子の発現制御を介してジベレリン量を減少させ、屈性の促進を行うことを明らかにした^{[2], 178}。

オーキシン輸送阻害剤NPAの屈性阻害効果はABCB19の存在に依存しており、ABCB19変異体はNPA存在下でも十分に屈性を示すことを明らかにした。さらに、新規オーキシン輸送

¹⁷⁸ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/sakai.html>

阻害剤Bz-NAAはシロイヌナズナ胚軸及び根の重力屈性を効果的に阻害するが、光屈性の阻害効果は低いことが判明した^[3]。研究計画初期の予想に反し、phy・cryのオーキシン生合成・代謝調節機構は光屈性反応への貢献度が低いことが推測され、オーキシン輸送体の機能もこれまでの予想よりも低い可能性が示唆された¹⁷⁸。

また共同研究にて、オーキシン生合成の主経路同定を行った¹⁷⁹。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Nagashima A., Uehara Y., Sakai T. “The ABC subfamily B auxin transporter AtABCB19 is involved in the inhibitory effects of N-1-naphthylphthalamic acid on the phototropic and gravitropic responses of Arabidopsis hypocotyls”, *Plant Journal*, 2008, 49(8), 1250-1255.
- [2] Tsuchida-Mayama T., Sakai T., Hanada A., Uehara Y., Asami T., Yamaguchi S. “Role of the phytochrome and cryptochrome signaling pathways in hypocotyl phototropism”, *Plant Journal*, 2010, 62(4), 653-662.
- [3] Tsuda E., Yang H., Nishimura T., Uehara Y., Sakai T., Furutani M., Koshiba T., Hirose M., Nozaki H., Murphy A.S., Hayashi K.-I. “Alkoxy-auxins are selective inhibitors of auxin transport mediated by PIN, ABCB, and AUX1 transporters” *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(3), 2354-2364.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の新学術領域研究(研究領域提案型)植物の環境感覚: 刺激受容から細胞応答まで「光屈性におけるオーキシン調節機構の解析」(2011~2012 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)植物の環境感覚: 刺激受容から細胞応答まで「光屈性を誘導するフォトトロピンシグナル伝達経路の解析」(2013~2014 年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)植物発生ロジックの多元的開拓「オーキシン不均等分布に依存しない偏差成長誘導機構の解析」(2016~2017 年度)及び基盤研究(B)「タンパク質リン酸化修飾を介した光屈性制御機構の解明」(2017~2019 年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

phot は、ユビキチンプロテアソーム経路により暗条件下で分解されている光屈性シグナル伝達因子 RPT2 のタンパク質安定化を誘導することを明らかにした。また RPT2 による phot1 光感受性調節機構を明らかにした¹⁸⁰。シグナル伝達因子 NPH3 は暗所でリン酸化され

¹⁷⁹ Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K., Kamiya Y., Kasahara H. “The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108, 18512-18517.

¹⁸⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26440134/>

て phot1 と結合し、一次光屈性誘導のシグナル伝達を可能にしている。青色光照射によって phot1 が活性化すると、NPH3 の脱リン酸化を誘導し NPH3 が phot1 及び細胞膜から解離して一過的に不活化する。光屈性シグナル伝達因子 RPT2 は光により発現誘導され、phot1 の光感受性を下げることによって NPH3 脱リン酸化を抑制し、NPH3 のリン酸化状態、細胞膜局在 phot1 との結合をそれぞれ回復させ、二次光屈性が誘導されることが明らかになった(図 3-51)^[1]。

オーキシン輸送体 PIN の光屈性における機能解析を行い、PIN1、PIN3、PIN7 に依存した光屈性誘導機構を明らかにし、さらに非依存的分子機構の存在も示した^[2]、¹⁸¹。オーキシン分布調節を介さずに、光によって直接オーキシン応答に関係する制御因子が機能調節を受ける可能性が示唆された¹⁸²。根の光屈性に正に働く転写因子 ARF7・ARF19 の機能調節機構を解明するため、YFP 融合遺伝子の作製、形質転換体の作製を行った。ARF 転写因子の機能調節に働く Aux/IAA 転写制御因子の網羅的機能解析を行い、一つの遺伝子に特徴的な偏差成長異常が観察された¹⁸³。

RING型E3ユビキチンタンパク質リガーゼWAV3及びそのファミリータンパク質が、根の重力屈性に関与すること、さらにオーキシン分布制御・感受性に関与することを明らかにした^[3]、¹⁸⁴。またオーキシンの一種であるフェニル酢酸が、重力によって移動方向が変わらないユニークな特徴を持つことを発見した^[4]。

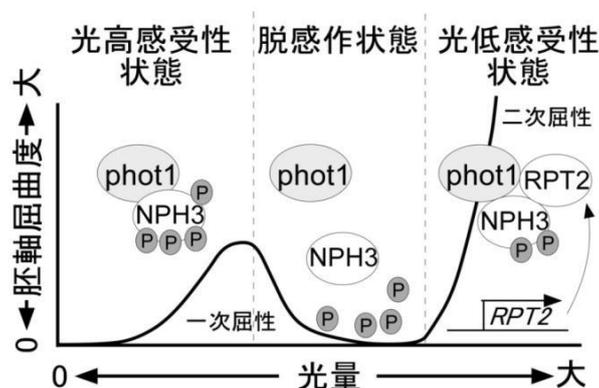


図 3-51 光屈性誘導機構のモデル図¹⁸⁵

シグナル伝達因子RPT2が発現していない暗所ではフォトトロピン1(phot1)は高感受性を示し、光照射によってRPT2が発現するとphot1は低感受性に変化する

②社会・経済への波及効果

¹⁸¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-22570058/>

¹⁸² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24657027/>

¹⁸³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-25120710/>

¹⁸⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-23120510/>

¹⁸⁵ <https://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2016/03/270415.pdf>

本研究成果は、オーキシン作用の人工調節技術の基盤創出の可能性を含み、将来的には、植物の物質生産性、環境適応性向上への応用が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

- [1] Haga K., Tsuchida-Mayama T., Yamada M., Sakai T. “Arabidopsis ROOT PHOTOTROPISM2 contributes to the adaptation to high-intensity light in phototropic responses”, *Plant Cell*, 2015, 27(4), 1098-1112.
- [2] Harada A., Takemiya A., Inoue S.-I., Sakai T., Shimazaki K.-I. “Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1”, *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54(1), 36-47.
- [3] Sakai T., Mochizuki S., Haga K., Uehara Y., Suzuki A., Harada A., Wada T., Ishiguro S., Okada K. “The wavy growth 3 E3 ligase family controls the gravitropic response in Arabidopsis roots”, *Plant Journal*, 2012, 70(2), 303-314.
- [4] Sugawara S., Mashiguchi K., Tanaka K., Hishiyama S., Sakai T., Hanada K., Kinoshita-Tsujimura K., Yu H., Dai X., Takebayashi Y., Takeda-Kamiya N., Kakimoto T., Kawaide H., Natsume M., Estelle M., Zhao Y., Hayashi K.-I., Kamiya Y., Kasahara H. “Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants”, *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(8), 1641-1654.

3.3.5 ブラシノステロイド情報伝達による発生と自然免疫制御の分子機構(中野雄司)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

ステロイドホルモンは生物の種を越えて広く保存される生理活性化合物であり、植物においてはブラシノステロイド(BR)が重要な役割を担っている。本研究では、BR合成阻害剤を用いて、BRによる植物の発生と自然免疫の共制御機構、植物BR情報伝達経路と動物情報伝達経路との進化的保存性の解明を目指し、新規植物BR情報伝達遺伝子の同定、これらの遺伝子群の植物における発生と自然免疫の共制御機構の解明、植物BRの哺乳類における生理活性の検証を目的とした(図3-52)¹⁸⁶。

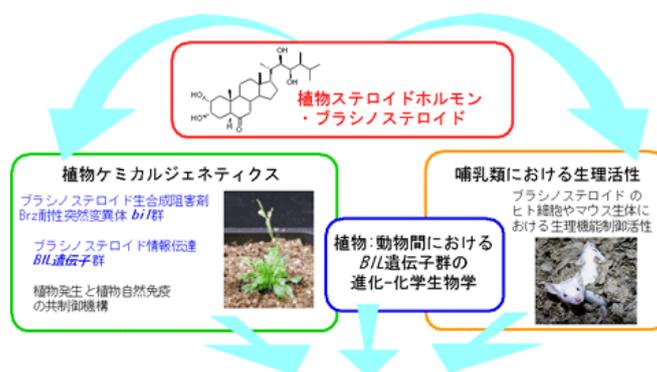


図 3-52 植物ブラシノステロイド情報伝達ネットワークによる発生と自然免疫の制御機構の解明¹⁸⁶

②期間中の研究成果

(i) 植物ケミカルバイオロジーによる新規 BR 情報伝達遺伝子群の探索

BR合成酵素の特異的阻害剤Brzを実験植物シロイヌナズナに適用した網羅的スクリーニングの結果、Brz耐性突然変異体BILを単離し、先に同定したbHLH型転写因子BIL1/BZR1に続き、数種類のBIL遺伝子候補を特定した¹⁸⁶。またBrz存在下でも双葉の緑色が薄い変異体BRG2を発見し、このBRG2遺伝子の破壊により、葉緑体に異常が起こることを見いだした^[1]。

(ii) 新規 BR 情報伝達遺伝子群の機能解析

Brz耐性の胚軸徒長型変異体BIL5は、細矮性形質を示し、その機能解析の結果、BIL5遺伝子はBRによる発生と自然免疫の双方のシグナリングの要となる主要遺伝子であることが判明した。BIL5に類似のBrz耐性を示す半優性変異体BIL4は、BIL5と同傾向の形質を示し、その変異原因遺伝子は7回膜貫通ドメインを持つ新規タンパク質であることが確認された。

¹⁸⁶ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/nakano.html>

BIL4タンパク質は、細胞伸長初期にはエンドソームに、中期には液胞膜へ局在し、BIL4遺伝子もBRによる発生と自然免疫の重要遺伝子である可能性が示唆された。Brz高感受性の胚軸矮化型変異体BSS1の変異候補遺伝子として、哺乳類の自然免疫系の調節に関わるikBと相同性を持つ遺伝子を同定した。BSS1タンパク質は、先に単離したBR情報伝達経路上の主要転写因子bHLHタンパク質BIL1/BZR1と直接的に相互作用することが確認された。一方、BSS1の隣接遺伝子の高発現株BIL6は、逆に胚軸伸長形質を示し、その遺伝子は哺乳類自然免疫系のリン酸化酵素IRAKと相同性が高く、さらに植物自然免疫との関わりが示唆された^{[2], 186}。

(iii) 植物 BR の哺乳類における生理機能

植物BR情報伝達BIL遺伝子群は、動物に相同遺伝子が存在することが多く、そのうちの数種は特に哺乳類の自然免疫のシグナル伝達経路上に認められる遺伝子であった。哺乳類に対する生理活性を検討した結果、少なくともヒトの9種類のがん細胞に対して*in vitro*での抗がん活性を持つこと、*in vivo*でもマウス皮膚に移植したがん細胞の抑制活性を持つことが明らかになった。さらに、哺乳類の自然免疫制御にBRが関与する予備的な知見も得られた¹⁸⁶。

(iv) BR とオーキシンのシグナリングにおける相互作用

植物ホルモン・オーキシンの誘導されるイネに特有なラミナジョイント(葉と茎の境界)の屈曲に及ぼすBRの影響を、BR生合成系変異体を用いて解析した。その結果、BR合成中間体であるC-22水酸化BR欠損により、オーキシンに対する応答が減弱することが判明し、オーキシンシグナリングにC-22水酸化BRが関与することが明らかになった^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Komatsu T., Kawaide H., Saito C., Yamagami A., Shimada S., Nakazawa M., Matsui M., Nakano A., Tsujimoto M., Natsume M., Abe H., Asami T., Nakano T. “The chloroplast protein BPG2 functions in brassinosteroid-mediated post-transcriptional accumulation of chloroplast rRNA”, *Plant Journal*, 2010, 61(3), 409-422.
- [2] Yamagami A., Nakazawa M., Matsui M., Tsujimoto M., Sakuta M., Asami T., Nakano T. “Chemical genetics reveal the novel transmembrane protein BIL4, which mediates plant cell elongation in brassinosteroid signaling”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(2), 415-421.
- [3] Nakamura A., Fujioka S., Takatsuto S., Tsujimoto M., Kitano H., Yoshida S., Asami T., Nakano T. “Involvement of C-22-hydroxylated brassinosteroids in auxin-induced lamina joint bending in rice”, *Plant & Cell Physiology*, 2009, 50(9), 1627-1635.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、CREST「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」「植物ホルモン間クロストークと化学・生物学的制御技術を利用したバイオマス高生産性植物の開発」（2012～2017 年度）及び科学研究費の挑戦的萌芽研究「植物成長促進化合物 PPG の機能発現機構の解明」（2015～2016 年度）へ引き継がれた。

① 科学技術の進歩への貢献

BIL2 タンパク質が、ミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア ATP 産生酵素のタンパク質フォールディング制御を介して、ATP 産生を向上させ、BR 情報伝達経路を活性化する機構を明らかにした^[1]。また葉緑体因子 BPG3 が、BR シグナリングの下で、葉緑体のクロロフィルの蓄積、光化学系 II の電子伝達系において重要な機能を担っていることを明らかにした^[2]、¹⁸⁷。

BR 情報伝達抑制因子 BSS1 によるタンパク質複合体の「集合と拡散」による植物草丈制御機構を明らかにした。すなわち、Brz により BR を欠損した状態では BSS1 は「集合」して大きなタンパク質の塊を形成して植物の茎の伸長を抑制した。一方、BR を添加した場合は、BSS1 は「拡散」して塊は消失し、茎の伸長が促進された。同時に、BR のマスター転写因子 BIL1 が、BSS1 の「集合」によって捕捉され、「拡散」によって解放されることで、BIL1 の細胞質から核への移行が制御される機構も判明した(図 3-53)^[3]、¹⁸⁷。

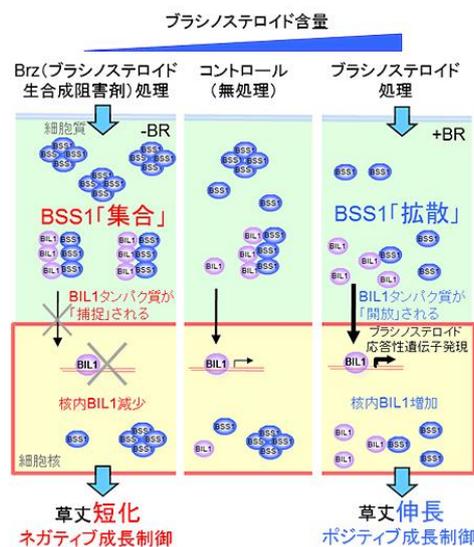


図 3-53 BSS1 タンパク質の機能発現のモデル¹⁸⁸

BIL4 タンパク質が BR 受容体 BRI1 の分解を防ぐ機能を持ち、その分解抑制により BR 情報伝達を活性化し、植物の胚軸や緑葉の細胞伸長を促す機能を持つことを見いだした^[4]、¹⁸⁷。

¹⁸⁷ http://www.jst.go.jp/presto/plantsci/crest/h24_01asami.html

¹⁸⁸ http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150207_1/

植物の葉・茎・根について、形態を異常にすることなく、成長を促進させる新規化合物 PPG を発見した。PPG の化学構造は、既知の天然及び合成植物ホルモンのいずれとも全く異なっており、細胞分裂を活性化することが示された¹⁸⁹。

②社会・経済への波及効果

本研究成果には、植物バイオマス増産や植物バイオマスでの物質生産に貢献し得る部分が多くあり、国・地球レベルでの課題とされる低炭素社会の実現へ向けた実用化研究への活用が期待される。また、ブラシノステロイドの哺乳類における活性については、健康食品や医薬シーズとしての応用展開の可能性がある。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Bekh-Ochir D., Shimada S., Yamagami A., Kanda S., Ogawa K., Nakazawa M., Matsui M., Sakuta M., Osada H., Asami T., Nakano T. “A novel mitochondrial DnaJ/Hsp40 family protein BIL2 promotes plant growth and resistance against environmental stress in brassinosteroid signaling”, *Planta*, 2013, 237(6), 1509-1525.
- [2] Yoshizawa E., Kaizuka M., Yamagami A., Higuchi-Takeuchi M., Matsui M., Kakei Y., Shimada Y., Sakuta M., Osada H., Asami T., Nakano T. “BPG3 is a novel chloroplast protein that involves the greening of leaves and related to brassinosteroid signaling”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, 78(3), 420-429.
- [3] Shimada S., Komatsu T., Yamagami A., Nakazawa M., Matsui M., Kawaide H., Natsume M., Osada H., Asami T., Nakano T. “Formation and dissociation of the BSS1 protein complex regulates plant development via brassinosteroid signaling”, *Plant Cell*, 2015, 27(2), 375-390.
- [4] Yamagami A., Saito C., Nakazawa M., Fujioka S., Uemura T., Matsui M., Sakuta M., Shinozaki K., Osada H., Nakano A., Asami T., Nakano T. “Evolutionarily conserved BIL4 suppresses the degradation of brassinosteroid receptor BRI1 and regulates cell elongation”, *Scientific Reports*, 2017, 7(1), 5739.

¹⁸⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-15K14714/>

3.3.6 オルガネラの pH によるタンパク質輸送の制御(前田裕輔)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

細胞内小器官であるゴルジ装置のpH調節はタンパク質輸送・糖鎖修飾・ゴルジ装置の形態を制御する根幹的なホメオスタシスの一つである。本研究では、これまでほとんど明らかになっていないpHの調節機構、及びpHによるタンパク質輸送の制御機構の仕組みを明らかにすることを旨とした(図3-54)。分泌経路、エンドサイトーシス経路に位置するゴルジ装置、分泌顆粒、エンドソーム、リソソームなどは各々固有の酸性pHを持ち、タンパク質の流れに沿ってより酸性になるpH勾配を維持している。ゴルジ装置で酸性pHが維持されているメカニズムの解明、次いで、pH調節・維持の異常が及ぼす影響を細胞や個体レベルで調べることで、その機序や生理的重要性の解明を目指した¹⁹⁰。

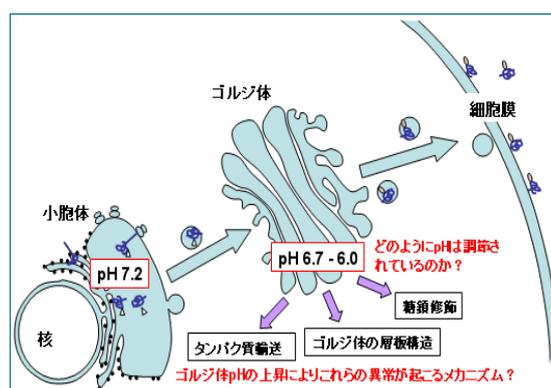


図 3-54 オルガネラ pH のホメオスタシス¹⁹⁰

②期間中の研究成果

(i) ゴルジ装置の pH 調節機構の解明

非常に強いタンパク質輸送遅滞を示すCHO細胞由来変異細胞株は、ゴルジ装置の変形異常、糖鎖修飾異常を示し、ゴルジ装置のpHが正常細胞より0.3~0.5程度上昇していることが確認され、原因タンパク質をGPHR(Golgi pH Regulator)と命名した。GPHRの機能を検討した結果、GPHRはゴルジ装置で初めて同定されたカウンターイオンチャネルであり、pHの調節に必須であること、ゴルジ装置のpH上昇が、輸送障害・糖鎖障害を起こすのに十分であることが明らかになった^{[1], [2], 190}。

(ii) ゴルジ装置の酸性 pH によるタンパク質輸送(小胞輸送)の制御機構の解明

¹⁹⁰ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/maeda.html>

ゴルジ装置内腔側のpHを感受して細胞質側に情報を伝える分子、すなわちpHセンサーの同定はできなかった。タンパク質輸送障害に関して、GPHR欠損細胞では、順方向の輸送障害に加え、ゴルジ装置から小胞体への逆行輸送も障害されており、また、ゴルジ装置に局在するタンパク質の側方流動性も著しく悪くなっていることが判明した¹⁹⁰。

(iii) 細胞・個体におけるゴルジ装置の酸性 pH の生理的役割の解明

CHO由来変異細胞と同様の異常表現型を示すマウス (GPHR^{-/-}) の胎児線維芽細胞 (MEF) を作成し、その転写産物解析の結果、コレステロールの生合成に関与する遺伝子群の転写レベルが低下していることが判明した。小胞輸送を抑制するSarI-H79G変異タンパク質を発現するMEF細胞でコレステロール量の有意な低下が認められたことから小胞輸送がコレステロール輸送・分布に関与していることが示唆された。コンディショナルノックアウトマウス GPHR^{fllox}マウスとK5-Creマウスとの交配により作出されたマウスは、基底細胞の機能異常から生じる毛根機能の低下、皮膚バリア機能の低下を示し、角質層などの肥厚と強い落屑を伴う魚鱗癬様症状を呈した¹⁹⁰。

(iv) グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質の輸送の解析

GPIアンカー型タンパク質 (GPI-AP) の小胞体から細胞膜への輸送機構を、輸送欠損変異細胞を用いて解析した結果、責任遺伝子PGAP5 (post-GPI-attachment to protein 5) を同定した。PGAP5はホスホエステラーゼファミリーに属し、GPI-APのグリカン部分のリモデリングを担い、これがGPI-APの輸送を制御していることが明らかになった^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Maeda Y., Ide T., Koike M., Uchiyama Y., Kinoshita T. “GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus”, *Nature Cell Biology*, 2008, 10(10), 1135-1145.
- [2] Maeda Y., Kinoshita T. “The acidic environment of the golgi is critical for glycosylation and transport”, *Methods in Enzymology*, 2010, 480, 495-510.
- [3] Fujita M., Maeda Y., Ra M., Yamaguchi Y., Taguchi R., Kinoshita T. “GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi”, *Cell*, 2009, 139(2), 352-365.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「酸性オルガネラにおける pH ホメオスタシスの制御機構の解明」(2011~2013 年度)、挑戦的萌芽研究「ペルオキシソーム-小胞体間の膜接触部位の構成蛋白質の同定」(2014 年度)、挑戦的萌芽研究「オルガネラ膜接触部位微小空間におけるイオン濃度のリアルタイム測定法の確立」(2015 年度)などへ引き継がれ

た。

①科学技術の進歩への貢献

GPHR 欠損線維芽細胞の解析から、コレステロール生合成酵素群の転写とコレステロール量が共に低下するメカニズムとして、膜接触部位を介したコレステロール輸送が障害されその分布異常が起こっていること、皮膚基底細胞特異的 GPHR KO マウスの解析から、基底細胞の空胞化や層板顆粒の形態・機能異常により表皮のホメオスタシスが破壊され異常な水分損失と毛根形成不全が起こることを明らかにした(図 3-55)^[1]、¹⁹¹。

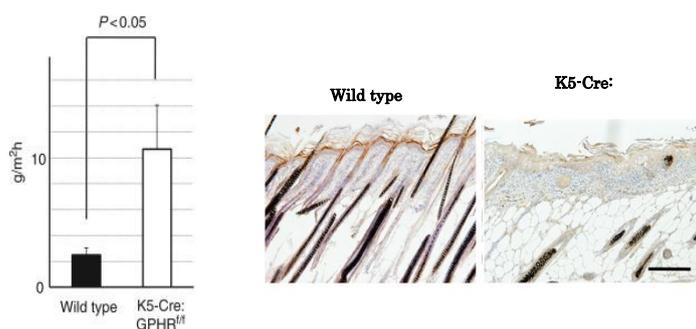


図 3-55 皮膚基底細胞特異的 GPHR 欠損マウス (K5-Cre:GPHR^{f/f}) の異常な表皮水分損失(左、g/m²h)及び毛根形成不全(右)^[1]

リアルタイムに生細胞で膜接触部位の可視化を試み成功した。これにより可視化された接触部位の経時的定量観察が可能になり、コレステロールなどの輸送動態・調節機構の解明が期待される¹⁹²。膜接触部位の変異細胞樹立のため、ゲノムワイド Cas9/CRISPR gRNA library を用いて樹立を試みた¹⁹³。また膜接触部位を介したオルガネラ間コミュニケーションの動態を明らかにするため、オルガネラ特異的レポーターにイオン感受性蛍光タンパク質を結合させることで膜接触部位の pH 及びカルシウム濃度をリアルタイムで測定できる系を確立した¹⁹⁴。

小胞体-ゴルジ体間の順行輸送と逆行輸送は密接に関係し、一方の機能障害によりもう一方の機能も損なわれる。しかし、ゴルジ体と細胞表面の間の両者の関係に関しては議論が分かれていた。そこで、順行輸送に関与する遺伝子の網羅的な同定を試み、エンドソームからトランスゴルジネットワークへの逆行輸送に関与するゴルジ関連逆行性タンパク質 (GARP) 複合体のサブユニットを同定した。サブユニットノックアウト細胞の解析の結果、膜貫通型及び GPI アンカー型タンパク質の順行輸送が遅延し、後者がゴルジ体に滞留していた。以上

¹⁹¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23370060/>

¹⁹² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25650034/>

¹⁹³ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26650060/>

¹⁹⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15K14488/>

から、ゴルジ体からの順行輸送に逆行輸送が必要なことが示された^[2]。

GPI-APの最も顕著な特徴の一つは、脂質ラフト¹⁹⁵におけるそれらの集積である。この集積の生物学的意義の解明のため、GPI-AP脂肪酸リモデリング欠損のPGAP3^{-/-}マウスを用いて解析した結果、このマウスは自己免疫様症状を呈し、この原因として、PGAP3^{-/-}マウスにおける常在性マクロファージによるアポトーシス細胞の食食障害が示唆された。また、Th1/Th2バランスの異常が見られた。以上から、GPI-APのPGAP3依存性脂肪酸リモデリングが、アポトーシス細胞の除去及びTh1/Th2バランスの調節を通して、自己免疫の制御に貢献していることが判明した^[3]。

主に細胞表面に局在するホスホリパーゼ A2 で、GPI-AP から GPI を切断する新規酵素 PGAP6 (post-GPI-attachment to protein 6) を見いだした。初期の胚発生において重要な役割を果たす GPI-AP であり、Nodal¹⁹⁶ 共受容体として働く CRIPTO は、PGAP6 の高感度基質であり、PGAP6 により分断されると、共受容体活性はそのまま、PGAP6 発現時、細胞関連活性は低下した。PGAP6 欠損マウスは、初期の胚発生、特に前方-後方軸における欠損を示した。以上から、PGAP6 は CRIPTO を介して Nodal シグナル伝達に重要な役割を果たすことが示唆された^[4]。

②社会・経済への波及効果

ゴルジ装置によるタンパク質の修飾や切断は細胞の最も基本的な営みであり、これらの機能がうまく働かないと、糖鎖修飾不全症といった疾患が起こってくる¹⁹⁷。糖鎖修飾不全症にはまだ原因が同定されていない疾患も多数存在することから、それらの同定、治療、発症予防に本研究成果が役立つことが期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Tarutani M., Nakajima K., Uchida Y., Takaishi M., Goto-Inoue N., Ikawa M., Setou M., Kinoshita T., Elias P.M., Sano S., Maeda Y. “GPHR-dependent functions of the Golgi apparatus are essential for the formation of lamellar granules and the skin barrier”, *Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132(8), 2019-2025.
- [2] Hirata T., Fujita M., Nakamura S., Gotoh K., Motooka D., Murakami Y., Maeda Y., Kinoshita T. “Post-Golgi anterograde transport requires GARP-dependent endosome-to-TGN retrograde transport”, *Molecular Biology of the Cell*, 2015, 26(17), 3071-3084.
- [3] Wang Y., Murakami Y., Yasui T., Wakana S., Kikutani H., Kinoshita T., Maeda Y.

¹⁹⁵ スフィンゴ脂質とコレステロールに富む細胞膜上のドメイン

¹⁹⁶ 細胞へシグナルを入れる分泌タンパク質

¹⁹⁷ <http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/pages/GPHR.html>

“Significance of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein enrichment in lipid rafts for the control of autoimmunity” , Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(35), 25490-25499.

- [4] Lee G. -H., Fujita M., Takaoka K., Murakami Y., Fujihara Y., Kanzawa N., Murakami K-I., Kajikawa E., Takada Y., Saito K., Ikawa M., Hamada H., Maeda Y., Kinoshita T. “A GPI processing phospholipase A2, PGAP6, modulates Nodal signaling in embryos by shedding CRIPTO” , Journal of Cell Biology, 2016, 215(5), 705-718.

3.3.7 老化シグナルにより制御される代謝ネットワークの解明(南野徹)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

① 研究のねらい

糖尿病やメタボリック症候群といった代謝性疾患では、肥満に伴う内臓脂肪の蓄積と、それによって惹起されるインスリン抵抗性はその病態の基盤にあると考えられている。しかし、蓄積した内臓脂肪がどのようにしてインスリン抵抗性を惹起するのか、また、加齢に伴ってこれらの疾患が増えるのはなぜかについては明らかになっていない。加齢に伴って生じる組織における老化細胞の集積、あるいは、細胞老化シグナルの活性化が、寿命や加齢関連疾患の病態生理に関与する可能性がある(図3-56)。そこで本研究では、細胞老化シグナルによって制御される加齢関連疾患の病態生理を解明し、次世代の治療法を開発することを旨とした¹⁹⁸。

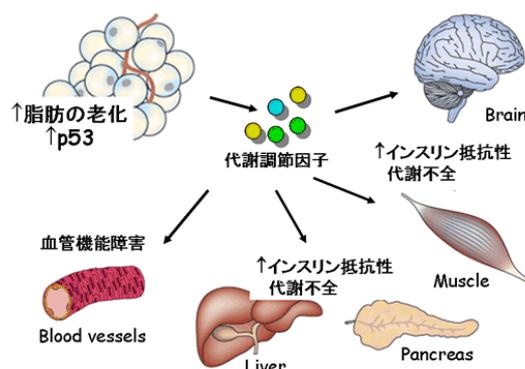


図 3-56 老化シグナルによって制御される代謝ネットワーク¹⁹⁸

② 期間中の研究成果

(i) 2型糖尿病の脂肪組織における老化シグナル

2型糖尿病モデルマウスの脂肪組織の老化形質について調べた結果、老化染色陽性の老化細胞が多数存在し、老化分子p53やp21の発現が増加し、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が増加していた。p53欠損糖尿病マウス及び脂肪組織特異的p53欠損マウスを用いた解析から、糖尿病の脂肪組織ではp53が活性化されることによって悪玉アディポカインの産生が増加し、全身のインスリン感受性を低下させていると考えられた^{[1], 198}。

(ii) 脂肪組織における老化シグナルの活性化とインスリン抵抗性

¹⁹⁸ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/minamino.html>

テロメレース欠損マウス (Tert欠損マウスの4世代継代マウスであるG4マウス) では脂肪細胞のテロメア長が短縮することが確認され、その脂肪組織では、老化染色陽性細胞が多数認められ、p53の蓄積を伴い、マクロファージの浸潤や悪玉アディポカインの産生が亢進していた。このマウスに高脂肪高蔗糖食負荷を行うと、全身のインスリン抵抗性が惹起されていた。以上より、テロメアの短縮モデルにおいても、p53依存性の老化シグナルにより、脂肪組織において炎症が惹起され、全身のインスリン抵抗性が生じるものと考えられた^{[1], 198}。

(iii) 脂肪組織の老化シグナル活性化の機序

糖尿病モデルマウスの脂肪組織の解析から、糖尿病では、脂肪組織で産生される活性酸素によりDNA傷害が生じ、p53依存性の老化シグナルの活性化により、NF- κ Bを介して悪玉アディポカインが産生され、全身のインスリン感受性が低下するものと考えられた¹⁹⁸。

(iv) 糖尿病患者の脂肪組織の老化形質

胃がん、大腸がん患者の手術の際摘出される内臓脂肪を解析したところ、糖尿病を合併した脂肪組織では老化染色陽性細胞を複数認め、p53が蓄積し、悪玉アディポカインの産生の増加を認めた。以上より、ヒトの脂肪組織においてもp53依存性の老化シグナルが活性化され、糖尿病の発症・進展に密接に関わっている可能性が示唆された¹⁹⁸。

(v) 老化シグナルの心老化への関与

p53は心筋梗塞後に心筋に蓄積し、心筋細胞のアポトーシスを引き起こし、心不全への進行に重要な役割を果たす。p53のアンタゴニストであることが分かったHsp70相互作用タンパク質C末端(CHIP)は、低酸素によりダウンレギュレーションが起こることで心筋梗塞後の心臓におけるp53蓄積の原因となることを見いだした^[2]。

拡張型心筋症モデルマウス (mActin-Tgマウス) を確立した。mActin-Tgマウスにおいて、Bcl-2の過剰発現又はp53のダウンレギュレーションは、アポトーシス心筋細胞数を減少させ、心機能を改善したが、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ II δ (CaMK II δ) を阻害すると、p53及びアポトーシス心筋細胞数が増加し、心機能の改善が妨げられた。CaMK II δ はmActin-Tgマウスにおいて、心不全発症の重要な役割を持つことが分かった^[3]。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Minamino T., Orimo M., Shimizu I., Kunieda T., Yokoyama M., Ito T., Nojima A., Nabetani A., Oike Y., Matsubara H., Ishikawa F., Komuro I. “A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance”, *Nature Medicine*, 2009, 15(9), 1082-1087.
- [2] Naito A.T., Okada S., Minamino T., Iwanaga K., Liu M.-L., Sumida T., Nomura S., Sahara N., Mizoroki T., Takashima A., Akazawa H., Nagai T., Shiojima I.,

Komuro I. “Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury”, *Circulation Research*, 2010, 106(11), 1692–1702.

- [3] Toko H., Takahashi H., Kayama Y., Oka T., Minamino T., Okada S., Morimoto S., Zhan D.-Y., Terasaki F., Anderson M.E., Inoue M., Yao A., Nagai R., Kitaura Y., Sasaguri T., Komuro I. “Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II δ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy”, *Circulation*, 2010, 122(9), 891–899.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の基盤研究(B)「細胞老化・個体老化シグナル制御による心血管治療法の開発に関する基盤研究」(2009～2011年度)、基盤研究(B)「p53依存性老化シグナル活性化による生活習慣病発症機序の解明」(2012～2014年度)、新学術領域研究(研究領域提案型)「ステムセルエイジングから解明する疾患原理「血管ニッチによって制御されるステムセルエイジングと加齢関連疾患発症機序の解明」(2014～2018年度)、基盤研究(B)「細胞内代謝を標的とした生活習慣病の診断・治療法の開発」(2017～2019年度)、さらに、さきがけ 研究領域「炎症の慢性化機構の解明と制御」の研究課題「長寿・老化モデルマウスを用いた慢性炎症機構の解明」(2011～2014年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

心不全が脂肪における p53 活性化とそれに伴う炎症性の亢進によって全身性のインスリン抵抗性を惹起していることを明らかにした。p53 の活性化には、交感神経系の活性化による脂肪融解が重要な役割を果たしていた^{[1],199}。

ハッチンソンギルフォード早老症候群(HGPS)における動脈硬化の発症機構にDNA損傷経路の活性化とそれに伴う炎症分子の発現亢進が重要であることを明らかにした²⁰⁰。

心血管系に対して病態生理学的な役割を果たしていることが示唆されている脳由来神経栄養因子(BDNF)と虚血性心疾患との関係に注目して検討した結果、心筋梗塞後には中枢神経系を介しての BDNF の発現が調節され、心臓保護的に働いていることが示唆された²⁰¹。また BDNF の摂食や代謝・脂肪蓄積への関与を検討した結果、正常食下における摂食・脂肪蓄積に対して、脂肪細胞で BDNF は発現しているが、その役割は低いと考えられた²⁰²。

肥満と高カロリー食負荷により老化状態となった脂肪細胞が、p53依存的にセマフォリン(Sema)3Eを分泌し、それに対してSema3Eの受容体プレキシンド1を高発現する骨髄由来マクロファージが引き寄せられて脂肪組織に浸潤し、炎症と糖代謝を引き起こすことを明らか

¹⁹⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21390237/>

²⁰⁰ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23659411/>

²⁰¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-23126504/>

²⁰² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-25126706/>

にした。さらに、糖尿病患者でも血中Sema3Eレベルの上昇が確認され、ヒトにおいてもこのSema3E-プレキシニンD1経路が糖代謝異常に関与している可能性が示唆された^{[2], 203}。

血管内皮細胞での p53 活性化は骨格筋への糖の取り込み、ミトコンドリア合成の障害を促進し脂肪蓄積や炎症惹起を起こすことで肥満とそれに関わる代謝異常を増悪させることが明らかになった^{[3], 204}。また高カロリー食投与によって引き起こされた血管老化が、筋肉でのエネルギー消費を阻害することをマウスモデルで見いだした。血管の細胞老化によって肥満や糖尿病が更に進行する悪循環を引き起こしている可能性を示した(図 3-57)²⁰⁵。

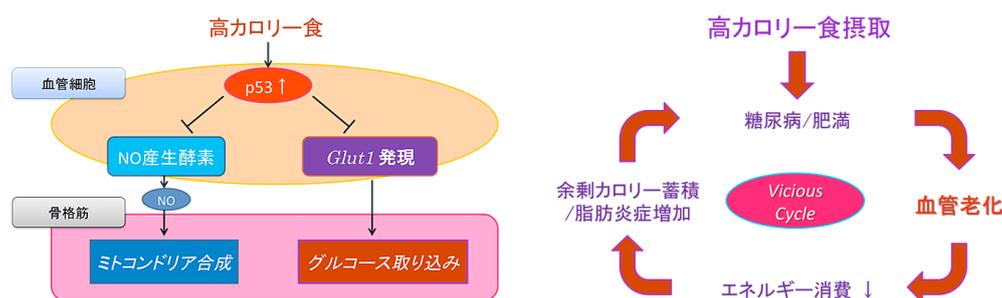


図 3-57 血管細胞で活性化した p53 によるグルコース消費の抑制(左)及び糖尿病・肥満で合併する血管老化が更に糖尿病・肥満を悪化させる悪循環(右)²⁰⁵

血管内皮細胞で細胞老化が誘導されると、CDC42 が活性化することを見いだした。さらにその働きにより炎症が強まり、動脈硬化が促進することをマウスで見いだした。さらに線虫モデルにおいて、CDC42 が過剰な免疫反応の促進と、それによる寿命の短縮を引き起こすことも見いだした^{[4], 206}。老化関連マーカーとして GPNMB を同定し、血管内皮細胞の老化に伴い GPNMB の発現増加が認められること、ノックダウンにより血管内皮細胞の viability が低下することなどから、老化抑制因子として働く可能性が示唆された²⁰⁷。

テロメア長の解析を行い、女性で有意に長く、年齢と逆相関し、総コレステロール、LDLコレステロールと相関が認められた。また、p53の発現と年齢に相関があり、動脈硬化症疾患のある症例では、p21の発現が高いことが明らかとなり、マーカーとしての有用性が示唆された²⁰⁸。

欧米以外では世界初の糖尿病患者対象の千人規模の大規模臨床介入研究として、東アジア人糖尿病患者に関する臨床エビデンスを数多く樹立した。生活習慣強化介入群で脳卒中発症リスクが有意に低下し、生活習慣教育を主体とする治療介入が合併症を予防し得るこ

²⁰³ http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/posteriori/h27/JST_P09_inflam_2015.pdf

²⁰⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24390195/>

²⁰⁵ <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140523/index.html>

²⁰⁶ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24790272/>

²⁰⁷ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15K15306/>

²⁰⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25670382/>

とを示した世界初の貴重なエビデンスとなった²⁰⁹。

②社会・経済への波及効果

本研究成果は、加齢に伴って増加する生活習慣病の発症機転を探る糸口となると思われ、また、脂肪組織の老化シグナルを標的とした治療方法を開発することで老化を制御し、糖尿病の新たな治療法につながる可能性があると考えられる。また糖尿病・肥満において合併する血管老化を標的とした新しい糖尿病治療の開発が期待される。

新潟大学大学院医歯学総合研究科は、健康寿命を延ばすための診断や治療、食品開発を目的とした寄付講座「先進老化制御学講座」（本研究者が担当）を開設した。菓子メーカー「ブルボン」から3年間で約6000万円の寄付を受け、老化のメカニズムを解明して、発症初期の診断方法や治療法の創出などを目指している（東京読売新聞2014年6月20日）。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト4報以内

- [1] Shimizu I., Yoshida Y., Katsuno T., Tateno K., Okada S., Moriya J., Yokoyama M., Nojima A., Ito T., Zechner R., Komuro I., Kobayashi Y., Minamino T. “p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure”, *Cell Metabolism*, 2012, 15(1), 51-64.
- [2] Shimizu I., Yoshida Y., Moriya J., Nojima A., Uemura A., Kobayashi Y., Minamino T. “Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity”, *Cell Metabolism*, 2013, 18(4), 491-504.
- [3] Yokoyama M., Okada S., Nakagomi A., Moriya J., Shimizu I., Nojima A., Yoshida Y., Ichimiya H., Kamimura N., Kobayashi Y., Ohta S., Fruttiger M., Lozano G., Minamino T. “Inhibition of endothelial p53 improves metabolic abnormalities related to dietary obesity”, *Cell Reports*, 2014, 7(5), 1691-1703.
- [4] Ito T.K., Yokoyama M., Yoshida Y., Nojima A., Kassai H., Oishi K., Okada S., Kinoshita D., Kobayashi Y., Fruttiger M., Aiba A., Minamino T. “A crucial role for CDC42 in senescence-associated inflammation and atherosclerosis”, *PLoS ONE*, 2014, 9(7), e102186.

④その他

本研究者は研究終了後に、日本医師会研究奨励賞(2011年)を受賞している。

²⁰⁹ <https://research-er.jp/projects/view/149042>

3.3.8 「骨代謝」における破骨細胞の細胞融合と代謝制御(宮本健史)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

骨は骨を吸収する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞により常にリモデリングが行われ、恒常性が制御されている。この骨代謝の恒常性の破綻は骨粗鬆症などの疾患を引き起こす。本研究者らはこれまでに、単核の細胞同士の融合により多核化する破骨細胞の細胞融合に DC-STAMP (dendritic cell specific transmembrane protein) が必須であることを遺伝子欠損マウスを用いて世界で初めて報告した。本研究は、DC-STAMP の発現制御機構を切り口に、破骨細胞の細胞融合を標的とした骨代謝制御機構の解明並びに新たな破骨細胞分化制御機構の解明を目指した(図3-58)²¹⁰。

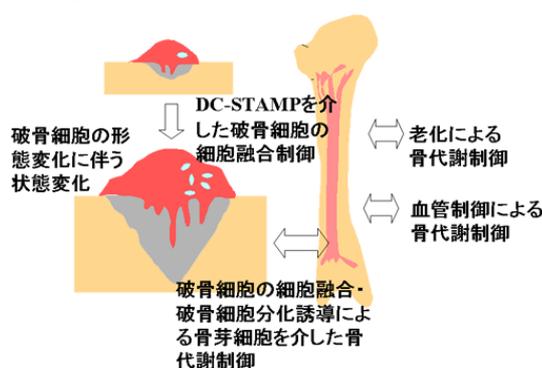


図 3-58 「骨代謝」における破骨細胞の細胞融合と代謝制御²¹⁰

②期間中の研究成果

(i) 破骨細胞の細胞融合による骨芽細胞制御

多核の破骨細胞が存在しないDC-STAMP欠損マウス、逆にDC-STAMPを過剰に発現することで巨大な破骨細胞を形成するDC-STAMP過剰発現マウスを用いた解析により、破骨細胞の細胞融合が破骨細胞の骨吸収効率を上昇させること、さらにDC-STAMP欠損した単核破骨細胞は、効率的に骨芽細胞による骨形成を誘導することを見いだした。以上から、DC-STAMPが破骨細胞の細胞融合を介して、骨芽細胞の活性をも制御すること、またDC-STAMPを標的とすることで、骨のリモデリングを止めることなく、骨量増加を果たすことが可能になることが示された^{[1], 210}。また、破骨細胞における単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) の欠損により、正常破骨細胞において高度に発現されたDC-STAMP、転写因子NFATc1、及び破骨細胞に特異的に発現するタンパク質分解酵素Cathepsin Kの発現が低下し、破骨細胞分化が阻害されたことから、破骨細胞形成はその分化誘導因子RANKL刺激下でMCP-1による自己分泌/傍分泌様式で調節されていることが判明した^[2]。

²¹⁰ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/miyamoto.html>

(ii) Blimp1-Bcl6 axis による破骨細胞分化制御

細胞融合因子DC-STAMPの発現を制御する分子をスクリーニングし、転写抑制因子Bcl6を見いだした。Bcl6は、DC-STAMPばかりではなく、既知の分化のマスター転写因子NFATc1や破骨細胞に特異的に発現するタンパク質分解酵素Cathepsin K、それぞれの制御分子群を直接負に制御する分子であることが明らかとなった。一方、Bcl6の発現は破骨細胞分化誘導因子RANKLにより強く抑制されていた。そこで、RANKL刺激によるBcl6の発現抑制分子の検索を行い、やはり転写抑制因子であるBlimp1を同定した。Blimp1はBcl6とは逆に、RANKL刺激により発現が上昇した。破骨細胞特異的Blimp1欠損マウスは、破骨細胞分化障害と制御分子群の発現の強力な抑制、さらに破骨細胞分化抑制による骨量増加を示した。さらに、Blimp1が破骨細胞分化の過程でBcl6の発現抑制に必須の分子であることが明らかになった。以上から、RANKLの下流で、RANKL-Blimp1-Bcl6-制御分子群というaxisが破骨細胞の分化、細胞融合及びタンパク質分解能を制御する必須のものであることが初めて明らかになった^{[3], 210}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Iwasaki R., Ninomiya K., Miyamoto K., Suzuki T., Sato Y., Kawana H., Nakagawa T., Suda T., Miyamoto T. “Cell fusion in osteoclasts plays a critical role in controlling bone mass and osteoblastic activity”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 377(3), 899-904.
- [2] Miyamoto K., Ninomiya K., Sonoda K.H., Miyauchi Y., Hoshi H., Iwasaki R., Miyamoto H., Yoshida S., Sato Y., Morioka H., Chiba K., Egashira K., Suda T., Toyama Y., Miyamoto T. “MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 383(3), 373-377.
- [3] Miyauchi Y., Ninomiya K., Miyamoto H., Sakamoto A., Iwasaki R., Hoshi H., Miyamoto K., Hao W., Yoshida S., Morioka H., Chiba K., Kato S., Tokuhisa T., Saitou M., Toyama Y., Suda T., Miyamoto T. “The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis”, *Journal of Experimental Medicine*, 2010, 207(4), 751-762.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の若手研究(A)「加齢と骨代謝制御」(2009～2011年度)、基盤研究(B)「破骨・骨芽細胞制御による骨恒常性制御」(2012～2014年度)、基盤研究(B)「性ホルモンと低酸素応答性分子による骨恒常性制御」(2015～2017年度)、さらに、革新的医療技術創出拠点プロジェクト 橋渡し研究戦略的推進プログラム事業:シーズB(非臨床POC取得及び治験届提出を目指す研究課題等) 支援拠点:慶應義塾大学「後縦靭帯骨化症の新

規治療法の創出を目指した研究」(2017～2019年度)などへ引き継がれている。

①科学技術の進歩への貢献

転写抑制因子 Blimp1 及び Bcl6 により、破骨細胞に特徴的な遺伝子群の発現が直接制御されることで、破骨細胞分化と骨の恒常性が制御されていることを見いだした。また、破骨細胞の細胞融合に必須の分子として新たに OC-STAMP を同定した。OC-STAMP と DC-STAMP は独立して破骨細胞の融合を制御することが判明した。また、早期老化モデルである FoxO3a 欠損マウスや SOD1 欠損マウスでは、加齢に伴い骨量が野生型より低下することを見いだした²¹¹。骨芽細胞においては Bcl6 が Stat1 の発現抑制を介して分化を制御していること、Bcl6 欠損マウスに見られる骨芽細胞形成不全は、Bcl6/Stat1 二重欠損マウスにおいて回復することを見いだした。また、骨粗鬆症治療におけるビタミンアナログであるエルデカルシトールの破骨細胞抑制活性の標的が低酸素誘導因子 HIF1 タンパクであることを見いだした²¹²。

閉経後骨粗鬆症の発症にはエストロゲン欠乏により破骨細胞で安定化する HIF1 α が重要な働きをすることを見いだした(図 3-59)²¹³。すなわち、破骨細胞特異的 HIF1 α 欠損マウスではエストロゲン欠乏により骨粗鬆症状態になったマウスでみられる破骨細胞の活性化や骨量の減少が起こらなくなった。また HIF1 α 阻害剤投与により閉経後でも骨密度が増加し、骨粗鬆症の発症が抑制できることが判明した。以上の結果は、HIF1 α が閉経後骨粗鬆症の治療標的となることを世界で初めて示したものである^[1]。

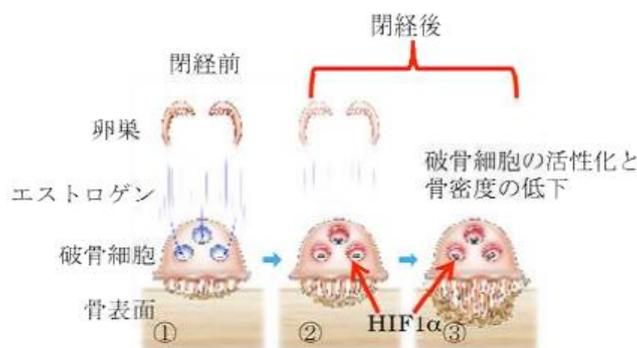


図 3-59 閉経後の破骨細胞の活性化と骨粗鬆症の発症メカニズム²¹³

- ①閉経前はエストロゲンにより破骨細胞のHIF1 α は常に抑制されている
- ②閉経に伴うエストロゲン欠乏によりHIF1 α が破骨細胞の中で安定化する
- ③その結果破骨細胞が活性化し骨密度の低下から骨粗鬆症へと進行する

骨粗鬆症の治療薬として利用されるタモキシフェン、ラロキシフェン又はバゼドキシフェンといった選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) を作用メカニズムとする抗

²¹¹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-21689040/>

²¹² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24390359/>

²¹³ https://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2013/kr7a430000cgzf0-att/130905_3.pdf

骨吸収性薬物が HIF1 α タンパク質蓄積を抑制することを示した。SERM のような介入が、エストロゲン不足条件下で HIF1 α 及び破骨細胞の活性阻害に利用できる可能性を示した^[2]。

男性骨粗鬆症、特にアンドロゲン欠乏性の骨粗鬆症の発症が破骨細胞 HIF1 α の蓄積によって発症することを解明し、HIF1 α 抑制剤の投与により発症が完全に阻止できることを世界で初めて見いだした。このことは、前立腺がんの治療等において実施されるホルモン枯渇療法において見られる男性骨粗鬆症のマネージメント法を明らかにすることにもつながった^[3]。²¹⁴

自律神経である迷走神経、またタバコの成分であるニコチンが骨量を減らす作用を有することを世界で初めて明らかにした^[4]。すなわち、ニコチン並びに副交感神経の神経伝達物質として機能するアセチルコリンの受容体 ($\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体) 欠損マウスでは骨量が有意に増加していた。また、欠損マウスでは破骨細胞の数が有意に減少していた。このことは、アセチルコリン受容体が通常の機能として破骨細胞数を増加させ、骨量を減少させる機能を発揮していることを示した²¹⁵。

②社会・経済への波及効果

今日、骨粗鬆症薬として承認されている薬の多くは、破骨細胞の活性を抑制するものであり、行き過ぎた破骨細胞の抑制は骨の大理石骨病化や大腿骨の非定型骨折、顎骨壊死など、様々な問題を呈することも報告されている。本研究成果に示すような、破骨細胞の活性を完全には抑制せず、しかも骨芽細胞を活性化し、骨代謝状態を un-coupling の状態にすることで、生理的な骨量増加を果たすことが可能になれば、骨粗鬆症のコントロールが更に発展することが期待される。また HIF1 α が閉経後骨粗鬆症の治療標的となることが明らかになり、今後の臨床応用が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Miyauchi Y., Sato Y., Kobayashi T., Yoshida S., Mori T., Kanagawa H., Katsuyama E., Fujie A., Hao W., Miyamoto K., Tando T., Morioka H., Matsumoto M., Chambon P., Johnson R.S., Kato S., Toyama Y., Miyamoto T. “HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(41), 16568-16573.
- [2] Morita M., Sato Y., Iwasaki R., Kobayashi T., Watanabe R., Oike T., Miyamoto K., Toyama Y., Matsumoto M., Nakamura M., Kawana H., Nakagawa T., Miyamoto T. “Selective estrogen receptor modulators suppress Hif1 α protein accumulation in mouse osteoclasts”, *PLoS ONE*, 2016, 11(11), e0165922.

²¹⁴ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15H04963/>

²¹⁵ <https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/3/28/28-20206/>

- [3] Tando T., Sato Y., Miyamoto K., Morita M., Kobayashi T., Funayama A., Kanaji A., Hao W., Watanabe R., Oike T., Nakamura M., Matsumoto M., Toyama Y., Miyamoto T. “Hif1 α is required for osteoclast activation and bone loss in male osteoporosis”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 470(2), 391-396.
- [4] Mito K., Sato Y., Kobayashi T., Miyamoto K., Nitta E., Iwama A., Matsumoto M., Nakamura M., Sato K., Miyamoto T. “The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential negative regulator of bone mass”, Scientific Reports, 2017, 7, 45597.

④その他

本研究者は研究終了後に、日本骨代謝学会学術賞(2012年)を受賞している。

3.3.9 癌浸潤転移における細胞膜脂質代謝及びドメイン構造の機能解析(山口英樹)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

①研究のねらい

浸潤性がん細胞を生理的な細胞外基質上で培養すると、細胞外基質分解活性を持つ浸潤突起と呼ばれる構造が細胞底部に観察される。がん細胞の浸潤突起形成能と浸潤・転移能には強い相関が見られ、がん転移において重要な役割を果たすと考えられているが、いまだその分子機構には不明な部分が多い。そこで本研究は、浸潤突起形成のトリガーとして働くと考えられる細胞膜脂質に着目し、局所的シグナル伝達に関わる細胞膜ドメイン構造である脂質ラフトと、シグナル伝達脂質であるイノシトールリン脂質について機能解析を行い、がん浸潤・転移治療法の開発につながる分子基盤を得ることを目的とした(図3-60)²¹⁶。

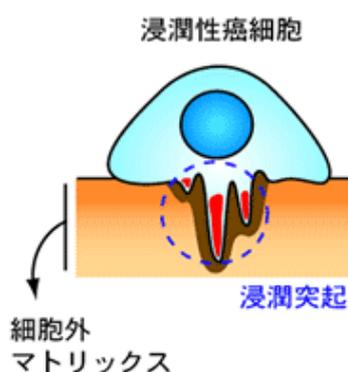


図 3-60 浸潤突起形成を制御する細胞膜脂質及び代謝関連分子の網羅的解析²¹⁶

②期間中の研究成果

(i) 脂質ラフトと Caveolin-1 の機能解析

浸潤突起を介したがん細胞の浸潤活性における脂質ラフトとその関連分子の機能解析を、ヒト乳がん細胞株を用いて行った結果、浸潤突起は脂質ラフトに富む膜ドメインであり、脂質ラフトの形成が浸潤突起を介したがん細胞の浸潤活性に必要であることが示唆された。また高浸潤性の乳がん細胞は、脂質ラフト構成タンパク質Caveolin-1の発現依存的に浸潤突起を形成することが明らかになった。さらに浸潤突起の細胞外基質分解活性を担うマトリックスメタロプロテアーゼであるMT1-MMPが脂質ラフトに存在し、Caveolin-1がその機能に必須であることが判明した^{[1], 216}。

²¹⁶ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/3ki/yamaguchi.html>

(ii) イノシトールリン脂質代謝の機能解析

細胞膜構成脂質イノシトールリン脂質とその産生代謝酵素の浸潤突起形成における機能解析の結果、ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸PI(4,5)P₂及びホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸PI(3,4,5)P₃にそれぞれ特異的に結合するタンパク質ドメインの過剰発現により機能を阻害したところ、浸潤突起形成及び細胞外基質分解活性が顕著に抑制された。またPI(4,5)P₂産生酵素タイプI ホスファチジルイノシトール-4-リン酸-5-キナーゼ(PIP₂ I)、PI(3,4,5)P₃産生酵素クラスI ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ(PI3-キナーゼ)p110 α の発現抑制を行った結果、浸潤突起形成が阻害された。以上の結果から、イノシトールリン脂質代謝ネットワークががん細胞の浸潤活性を担う浸潤突起形成を制御することが明らかになった^{[2],216}。

(iii) アクチン細胞骨格制御タンパク質の機能解析

浸潤突起は、アクチン繊維を含む前駆体の形成、更なるアクチン重合による安定化、マトリックスメタロプロテアーゼの集積による細胞外基質分解と突起伸長、という過程を経て形成される。Ena/VASPファミリータンパク質の一つであり、細胞外からのシグナルに応じてアクチン細胞骨格を制御するMenaが浸潤突起の構成分子であり、転移がんの特異的に発現するMenaアイソフォームが浸潤突起の安定性とがん細胞の浸潤能を亢進し、動物モデルにおいて乳がんの転移を促進することを明らかにした。また、乳がんの15%で遺伝子増幅と発現の亢進が見られるEMS1遺伝子がコードするアクチン結合タンパク質Cortactinを解析し、そのリン酸化が他のアクチン結合タンパク質との相互作用や活性調節のトリガーとなり、浸潤突起の成熟過程を制御することを明らかにした^{[3],216}。

③研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Yamaguchi H., Takeo Y., Yoshida S., Kouchi Z., Nakamura Y., Fukami K. “Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells”, *Cancer Research*, 2009, 69(22), 8594-8602.
- [2] Yamaguchi H., Yoshida S., Muroi E., Yoshida N., Kawamura M., Kouchi Z., Nakamura Y., Sakai R., Fukami K. “PI3-kinase signaling pathway mediated by p110 α regulates invadopodia formation”, *Journal of Cell Biology*, 2011, 193(7), 1275-1288.
- [3] Oser M., Yamaguchi H., Mader C., Arias M., DesMarais V., van Rheenen J., Koleske J., Condeelis J. “Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation”, *Journal of Cell Biology*, 2009, 186(4), 571-587.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究はその後、科学研究費の新学術領域研究(研究領域提案型)「細胞内ロジスティクスによる癌細胞浸潤能の制御機構の解明」(2011~2012年度)、基盤研究(C)「癌細胞の浸潤突起形成におけるアクチン細胞骨格制御機構の解析」(2013~2015年度)及び挑戦的萌芽研究「多色蛍光イメージングによるスキルス胃癌腹膜播種の腫瘍不均一性の解明」(2016~2017年度)などへ引き継がれている。

① 科学技術の進歩への貢献

がん治療標的分子として注目されている I 型膜タンパク質 CDCP1 について、浸潤突起形成及び細胞内ロジスティクスとの関連性を検討した結果、CDCP1 は主に脂質ラフト/カベオリン(Caveolin)小胞に存在して、これに含まれる機能分子の細胞内輸送に関与し、細胞外基質分解を制御している可能性が示唆された(図 3-61)^{[1], 217}。活性型 Ras を発現する難治がんにおいては、CDCP1 の発現が亢進し、細胞老化機構の一部である細胞内空胞化とそれを介した細胞死を抑制すること、発現亢進した CDCP1 は脂質ラフトに局在し、細胞外基質分解酵素 MT1-MMP と結合することによって浸潤突起へ MT1-MMP を輸送すること、さらに CDCP1 は MMP 群(MMP-2、MMP-9)の活性及び輸送に関与してがん伸展に関与していることを明らかにした²¹⁸。

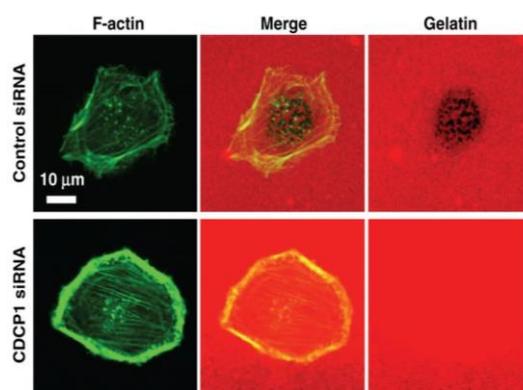


図 3-61 ヒト乳がん細胞の浸潤突起形成及び細胞外基質分解への CDCP1 の関与^[1]
蛍光ゼラチン上での細胞培養 CDCP1 siRNA: siRNA による CDCP1 の発現抑制

膜タンパク質 CDCP1 は、転移性腫瘍や造血系・非造血系幹細胞の表面抗原足場非依存性や浸潤能を制御する重要分子である。CDCP1 は腫瘍で活性化した Src ファミリーのキナーゼによってリン酸化されることにより、タンパク質キナーゼ C δ (PKC δ) と結合して腫瘍悪性化に関わるシグナルを媒介する。CDCP1-PKC δ 経路のシグナル阻害分子は、新たな作用機序に

²¹⁷ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PUBLICLY-23113729/>

²¹⁸ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24501327/>

よる画期的な抗がん剤として期待される。シグナルを阻害し腫瘍の進展を抑制する化合物として糖結合型パラジウム錯体(Pd-0qn)を見いだした。Pd-0qn は、免疫沈降アッセイから PKC δ とリン酸化 CDCP1 の細胞間相互作用阻害、軟寒天中の胃腺がん 44As3 細胞のコロニー形成及びその浸潤の阻害、マウスモデルにおいて、胃腺がん細胞の腹膜播種及び脾臓がん同所性異種移植の腫瘍増殖の顕著な減少を示した^[2]。

がん悪性化に関わるアクチン束化タンパク質アクチニン-4 の機能解析の結果、アクチニン-4 は浸潤突起に局在し、アクチン構造の形成と細胞外基質分解に必要であることが判明した。またアクチニン-4 の過剰発現により浸潤突起形成が促進されたが、この作用にはアクチン束化活性を担うアクチン結合ドメインを必要とした。したがって、アクチニン-4 は浸潤突起においてアクチン繊維を束化するタンパク質であり、がん浸潤・転移において重要な役割を果たすことが示唆された^{[3], 219}。

全ての胃がんの中で最も予後の悪いスキルス胃がん(SGC)の病変部及び腹膜転移部内で間質線維芽細胞(SF)の増殖が亢進していることから、SF がこの疾患の進行に貢献していることが示唆されている。しかし、両者の相互作用は明らかでない。そこでSGC細胞による細胞外マトリックス(ECM)の浸潤におけるSFの役割を解析した結果、SGC細胞とSFの共培養により、大きな細胞凝集体が形成され、ECMの広範な収縮及びリモデリングと関連していた。以上から、SFがSGC細胞によるECMのリモデリングを仲介し、それによりSGCの浸潤及び腹膜播種を促進することが明らかになった^[4]。

②社会・経済への波及効果

本研究成果は、細胞膜脂質や関連分子ががん浸潤・転移治療の分子標的となる可能性を示した。将来的には、浸潤突起形成の分子機構の解析で得られた知見を応用することにより、がん浸潤・転移の分子機構の理解や新しい治療法の開発が期待される。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

- [1] Miyazawa Y., Uekita T., Ito Y., Seiki M., Yamaguchi H., Sakai R. “CDCP1 regulates the function of MT1-MMP and invadopodia-mediated invasion of cancer cells”, *Molecular Cancer Research*, 2013, 11(6), 628-637.
- [2] Nakashima K., Uekita T., Yano S., Kikuchi J.-I., Nakanishi R., Sakamoto N., Fukumoto K., Nomoto A., Kawamoto K., Shibahara T., Yamaguchi H., Sakai R. “Novel small molecule inhibiting CDCP1-PKC δ pathway reduces tumor metastasis and proliferation”, *Cancer Science*, 2017, 108(5), 1049-1057.
- [3] Yamaguchi H., Ito Y., Miura N., Nagamura Y., Nakabo A., Fukami K., Honda K., Sakai R. “Actinin-1 and actinin-4 play essential but distinct roles in invadopodia formation by carcinoma cells”, *European Journal of Cell Biology*,

²¹⁹ <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25430126/>

2017, 96, 685-694.

- [4] Yamaguchi H., Yoshida N., Takanashi M., Ito Y., Fukami K., Yanagihara K., Yashiro M., Sakai R. “Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells”, PLoS ONE, 2014, 9(1), e85485.

④その他

本研究者は研究終了後に、日本がん転移学会研究奨励賞(2013年)及び日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員(書面担当)表彰(2016年)を受賞している。

第4章 科学技術イノベーションの創出に資する研究成果

4.1 生理活性リゾリン脂質の多様性とその意義の解明(青木淳賢)

4.1.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

さきがけでの研究成果を以下に示す。

(i) 生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジン酸(LPA)の産生機構とその意義

(A) LPA産生酵素オートタキシンの機能

LPAの生化学的産生経路の一つは、まず、リゾホスファチジルコリン(LPC)などのリゾリン脂質が産生され、続いてリゾリン脂質にリゾホスホリパーゼDという血漿酵素が作用しLPAが産生される経路である。本研究者らはこのリゾホスホリパーゼDががん細胞浸潤促進因子であるオートタキシン(Autotaxin; ATX)と同一であることを明らかにしていた。ATXは脳腫瘍、リンフォーマなど様々ながん細胞で発現が亢進していること、ATXはLPAを産生しLPA受容体を介してがん細胞の細胞運動を促進すること、血中ATXは慢性肝硬変、妊娠末期で顕著に上昇し、様々な生理的条件、病態で血中レベルが変動することなどを明らかにした。また、ATXが胎生期の血管新生に必須の分子であり、宿主の血管形成の促進によりがんの形成に深く関与し、またリンパ節内へのリンパ球の流入、神経因性疼痛に関与する重要な因子であることも明らかにした^{[1], [2], [3], 220}。

(B) LPA産生酵素PA-PLA₁αの発毛における機能

LPA産生のもう一つの経路は、ホスファチジン酸(PA)が産生され、PAのアシル基が加水分解されLPAが産生される経路である。PA産生酵素としてホスホリパーゼD(PLD)とジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)が、PAからLPAを産生する酵素としてホスホリパーゼA₁(PLA₁)とA₂(PLA₂)がある。本研究者らは、膜結合型ホスファチジン酸特異的ホスホリパーゼA₁(PA-PLA₁α)を同定し、ノックアウト(KO)マウスの解析の結果、PA-PLA₁αは毛包に特異的に発現し、KOマウスは縮毛の表現型を示した。ヒトでもPA-PLA₁αの遺伝性変異が見付かり、PA-PLA₁αの欠損者は脱毛症を引き起こすことが報告された。また、P2Y₅という機能未知のオーファンGPCR(Gタンパク質共役型受容体)の欠損が、ヒトにおける脱毛症の原因遺伝子であることも報告された。P2Y₅はPA-PLA₁αと同じく毛包に高レベルで発現していた。本研究者らは、PA-PLA₁αにより産生されたLPAがP2Y₅を効率良く活性化し、その下流で膜結合型プロテアーゼを活性化するシグナル系の存在を明らかにした²²⁰。

(ii) 新規生理活性リゾリン脂質リゾホスファチジルスレオニン(LPT)の発見

²²⁰ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/aoki.html>

LPA、S1P に続く新しいリゾリン脂質リゾホスファチジルセリン(LPS)は、その極性頭部にアミノ酸セリン残基を有しており、マスト細胞脱顆粒促進活性、細胞遊走、T細胞増殖抑制活性、神経細胞突起伸長促進作用などが報告されている。中でも、LPSによるマスト細胞の脱顆粒促進作用は、多くの研究グループにより解析されているが、作用メカニズムは全く不明であった。そこで本研究者は様々なLPS誘導体を合成し、マスト細胞の脱顆粒促進活性を示す化合物の探索を行い、LPSよりも数十倍強い活性を示す誘導体、リゾホスファチジルスレオニン(LPT)を獲得した。LPTはラット、マウス血清に存在することが明らかになり新規生理活性リゾリン脂質である可能性が示唆された²²⁰。

(2) 海外での共同研究の状況

最近の例では、イスラエル Weizmann 研究所の Reiner 研(2015)と ATX の大脳皮質形成における機能について、韓国釜山大学の Kim 研(2016)と ATX の卵巣がん幹細胞維持機能について、ハンガリー Semmelweis 大の Benyo 研(2017)と血管平滑筋細胞収縮への LPA₁ 依存性トロンボキサン A₂ の関与について共同研究を行っている。

4.1.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

研究期間終了後の主な研究成果を以下に示す。

LPA の受容体としても機能する GPCR の活性化測定法を新規に開発した(図 4-1)^[4]。本法を用いて LPA に対する三つの受容体 P2Y₁₀、GPR174、A630033H20 の発見に成功した。この成果は、創薬開発の効率化に貢献するとともに、LPA の機能に関する研究の発展にも寄与するものとして注目された²²¹。

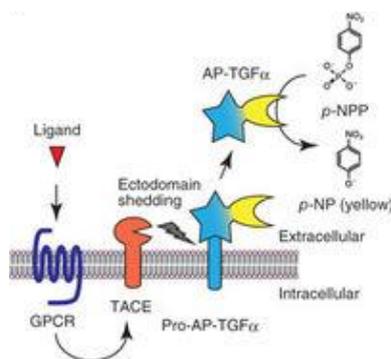


図 4-1 TGF α 切断を用いた新規 GPCR 活性化測定法リガンドの刺激により活性化した GPCR は TGF α の膜結合型前駆体 (pro-AP-TGF α) からエクドメインを切断し、遊離された AP-TGF α はアルカリフォスファターゼ (AP) 活性の測定により定量化される^[4]

LPS に特異的に反応する 2 種の新規 GPCR (P2Y₁₀、GPR174) の KO マウスがリンパ腫の症状を示すことを見だし、LPS が P2Y₁₀、GPR174 を介し、免疫抑制作用を発揮することを明ら

²²¹ <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120918/index.html>

かにした。また、LPS の構造類似体を合成し、それぞれに特異的かつ LPS に比べ 1000 倍高い活性の作動薬を創製することに成功した^{[5], 222}。

マウス ATX の単体及び LPA との複合体の X 線結晶構造を共同研究により決定した。その結果、四つのドメインが密接に相互作用して一つの構造体を形成し、異なる LPA はそれぞれ異なる形に折れ曲がって酵素活性部位の疎水性ポケットに収容され、触媒ドメインの 1 か所のループ領域が Enpp ファミリータンパク質の酵素基質特異性を規定していることが明らかになった^{[6], 223}。

LPA が神経障害性疼痛の初発原因分子であることが明らかになったが、その分子機構として LPA₁ 受容体を介した脱髄現象並びに一次知覚神経や脊髄後角細胞における疼痛関連遺伝子群の発現の上昇を見いだした^[7]。また、神経突起の分岐を担う新たな脂質「リゾホスファチジルグルコシド」を発見した。この脂質は脊髄内の固有感覚の神経突起が通る特定の部位のみに存在し、痛覚の神経突起を反発させることで、両方の神経突起は混ざり合うことなく別の目的地へ投射することが明らかになった^[8]。いずれも共同研究による成果である。

LPA 産生酵素である PA-PLA₁ α 及び LPA 受容体 LPA₆ が、毛包形成に関与することが示されたが、そのシグナル伝達の詳細な分子機構は明らかになっていなかった。本研究者は、PA-PLA₁ α ノックアウト (KO) マウスにおいて毛根の形態異常と縮毛が観察され、KO マウスとヒト遺伝病でほぼ同じ表現型が現れることを確認した。この表現型は腫瘍壊死因子 α 変換酵素 (TACE)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) α の KO マウス、上皮成長因子受容体 (EGFR) の点突然変異を持つ変異マウスの表現型と似ていることが分かった。詳細な解析の結果、毛包において PA-PLA₁ α 、TACE、TGF α 、EGFR が共局在していること、PA-PLA₁ α KO マウスにおいて遊離型 TGF α の産生量が顕著に減少し EGFR の活性化が減弱していることが判明した。また LPA₆ の下流で、G $\alpha_{12/13}$ 経路を介して TACE が活性化し、TGF α が切断されることも明らかになった。これらの知見から、PA-PLA₁ α -LPA-LPA₆ シグナルが TACE-TGF α -EGFR 経路を介して毛包の形成を制御するという、新たな毛胞の形成制御機構を明らかにした (図 4-2)^{[9], 224}。

²²² <https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-25293010/25293010seika.pdf>

²²³ <http://first.lifesciencedb.jp/archives/2034>

²²⁴ https://www.jstage.jst.go.jp/article/faruawpsj/48/6/48_KJ00009649763/_article/-char/ja/

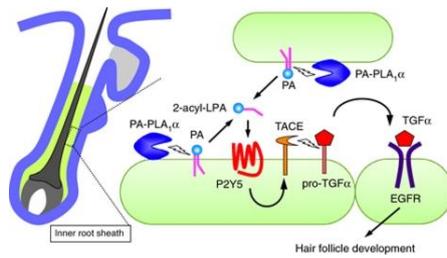


図 4-2 毛包形成における LPA シグナル^[9]

本研究者らはモデル生物としてマウスを用いてきたが、KO マウスは作製に長時間を要する上、経済的な観点からも効率が悪い場合がある。また、ファミリー分子間での機能重複の問題にしばしば遭遇し、ダブル、トリプル KO マウスの作製・解析を余儀なくされる。このような問題を解決する一つの方策として、ゼブラフィッシュ系を導入した(図 4-3)。

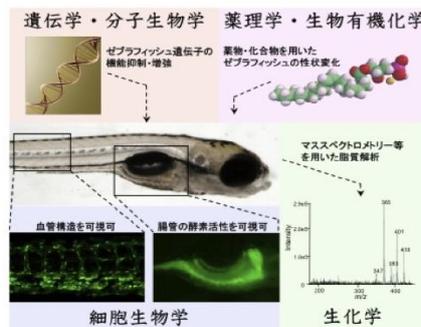


図 4-3 ゼブラフィッシュと脂質生物学²²⁵

ゼブラフィッシュの利点は、胚が透明であり、また細胞特異的に蛍光を発する種々のトランスジェニック系統が確立されており、発生期の器官形成の観察が容易であることである。特に、脊椎動物であるため、血管や骨などの器官を持ち、この点は、ショウジョウバエや線虫と大きく異なる。また、哺乳類に存在するほとんどの遺伝子が、ファミリー分子に至るまでほぼ保存されており、特記すべきは、産生酵素や受容体などのリゾリン脂質メディエーター関連遺伝子が、魚類以上の高等生物にのみ高度に保存されていることである。したがって、ゼブラフィッシュはリゾリン脂質シグナル経路の解明に有用なモデル生物であると考えられる²²⁵。さらにはアンチセンスモルフォリノ (MO) や mRNA の投与により、複数の遺伝子を同時にノックダウンあるいは過剰発現させることが可能である。本研究者らはこの系を用い LPA 産生酵素 ATX の胎生期血管形成機能を解明した。特に、これまで作製されたとの LPA 受容体の KO マウスも ATX の KO マウスと同様の表現型を示さないことから、ATX の下流で機能する LPA 受容体は不明であった。まず、血管に GFP を発現させることで胎児期の血管形成過程を可視化できるゼブラフィッシュ胚に ATX MO を投与したところ、初期の血管は形成さ

²²⁵ <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H28/article.html>

れるものの、この初期血管から枝分かれする血管の伸張に異常が生じることが分かった。この系を用い、複数の LPA 受容体の機能抑制を行ったところ、LPA₁、LPA₄ の二つの LPA 受容体の発現を同時に抑制した場合に、ATX の発現を抑制した場合と同様の血管形成異常が観察された。したがって、ATX-LPA シグナルは血管形成を促進する新しい経路であることが判明した^{[10], 225}。

肺線維症の原因タンパク質である ATX を阻害する DNA アプタマー²²⁶を共同研究により取得した。ATX-DNA アプタマー複合体の結晶構造を決定し、アプタマーが ATX の働きを抑えるメカニズムを解明した。さらに、立体構造に基づき、ATX の働きをより強力に抑えるアプタマーを作製し、肺線維症モデルマウスにおいて治療効果を確認することに成功した(図 4-4)^[11]。得られた抗 ATX アプタマーは、肺線維症の新規な治療薬の開発につながることで期待される²²⁷。

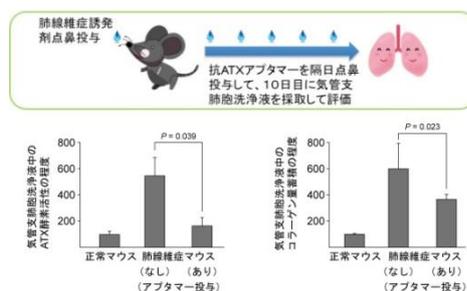


図 4-4 肺線維症のモデルマウスにおける抗 ATX アプタマーの治療効果^[11]

肺線維化に伴い気管支肺胞洗浄液にコラーゲンが顕著に蓄積するが、
抗 ATX アプタマーの投与によりその蓄積を抑制できる

本研究者は先に、LPA受容体LPA₃あるいはATXの欠損により、多くの生殖上の欠陥が生じることを示した。これに関連して子宮内膜上皮に特異的に発現するLPA₃を介する脱落膜化の分子機構を明らかにした。受精卵が子宮内膜上皮を介して着床する際、受精卵が持つリゾホスファチジルコリンが、母体側の子宮内膜上皮に発現するLPA産生酵素ATXによりLPAに変換され、同じく、母体側の子宮内膜上皮に発現するLPA₃が活性化される。この子宮内膜上皮におけるLPA₃の活性化は子宮内膜上皮でのヘパリン結合性上皮成長因子(HB-EGF)とシクロオキシゲナーゼ(COX-2)の発現を誘導し、さらにその下流で間質細胞でのBmp2とWnnt4の発現を上昇させることで脱落膜化が進行するという新しいモデルを提唱した(図4-5)^[12]。このモデルは、受精卵由来のLPAが母体側の受容体によって認識されることで、受精卵の周りでのみ脱落膜化とその後の胎盤形成が起こることを示す²²⁸。

²²⁶ <http://www.kenq.net/dic/66.html>

²²⁷ <https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2016/4632/>

²²⁸ https://www.amed.go.jp/content/files/jp/houkoku_h27/0107023_01/15gm0710001h0003.pdf

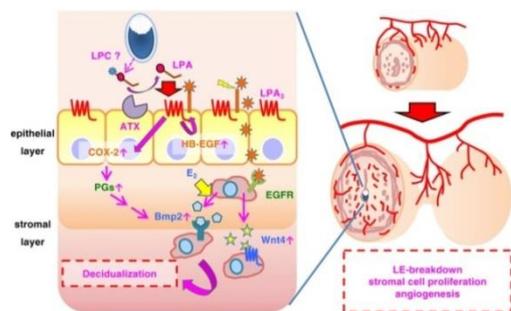


図 4-5 ATX-LPA₃ 軸を介して LPA に誘導される脱落膜化のモデル^[12]

LPA₆ は、毛髪形成に関わることが知られており、その機能不全により先天性乏毛症が引き起こされる。東大濡木研との共同研究により、LPA₆ の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、LPA₆ が LPA を認識する仕組みを明らかにした^[13]。ヒト LPA₆ と 80% 程度の配列類似性を持つゼブラフィッシュ由来 LPA₆ の立体構造を、LPA 分子が結合していない状態で決定した(図 4-6)。LPA₆ の立体構造の中央には、細胞の外側に向かって大きく開いたポケットが形成されており、ここに LPA 分子が収容されると予想された。加えて、LPA₆ は受容体側面にも脂質膜中に向かって開いた細長い溝を持っており、これは受容体中央のポケットともつながっていた。このような LPA₆ の特徴的な構造と LPA 分子の化学構造に基づき、細長い溝に LPA 分子の炭化水素鎖が、中央のポケットに負電荷を帯びた頭部が収容されるという、LPA₆ による LPA 分子認識のモデルが予想された。東大大和田研との共同研究による LPA 分子のドッキングシミュレーションでも、この予想に合致する LPA 分子の結合様式が確認された(図 4-6)。網羅的な変異体解析を行うことで、シミュレーションで得られた LPA 分子の結合様式を実験的に検証し、LPA 分子の認識に関わるアミノ酸残基の特定に成功した。

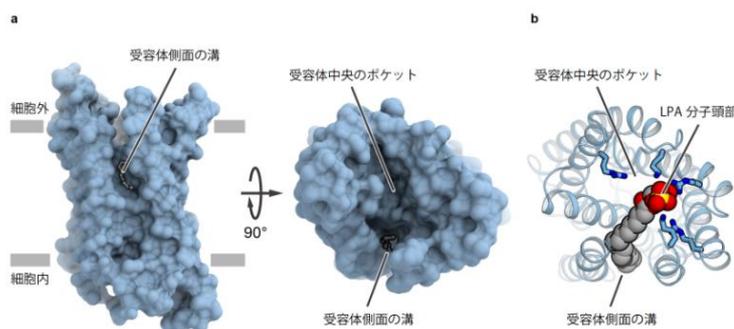


図 4-6 a : 決定された LPA₆ の全体構造

b : ドッキングシミュレーションにより予想された分子の結合モデル²²⁹

以上のような多面的な解析により、LPA 分子の頭部は受容体中央のポケット内で四つの正電荷を帯びたアミノ酸残基により認識され、LPA 分子の炭化水素鎖は受容体側面の溝の内部で、溝が作り出す形状に対するはまり込みやすさで認識される、という LPA 分子の認識機構

を提唱した(図 4-7)。

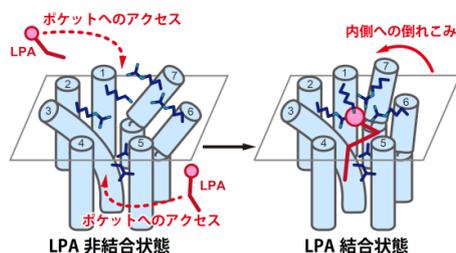


図 4-7 提唱された LPA 分子認識機構の模式図²²⁹

また、他の受容体の立体構造との比較から、LPA 分子頭部の認識に伴い誘起される立体構造の変化が受容体の活性化に重要である可能性が示唆された。従来、膜受容体は中央に形成されたポケットの中で情報伝達物質を認識すると考えられており(図 4-8)、これまでに報告された多数の膜受容体の立体構造からもその考えが支持されていた。

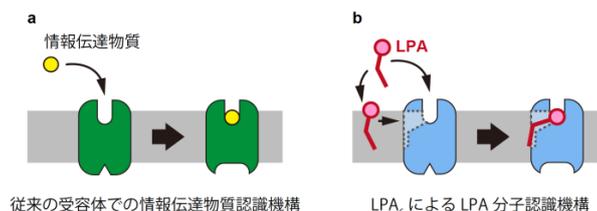


図 4-8 受容体による情報伝達物質認識機構の比較²²⁹

本研究で提唱された受容体側面の溝を用いての LPA 分子の炭化水素鎖の認識機構は、この従来の考え方からは予想できなかった完全に新規な仕組みであり、膜受容体の立体構造の多様性について新たな知見を与えるものである²²⁹。

(2) 社会・経済への波及と展望

LPA 産生酵素 PA-PLA₁ α を欠損する患者が国内でも多く存在することが判明し、実に 50 人に 1 人がヘテロザイゴートであり、このことは欠損患者が国内に約 1 万人存在することを意味する。本研究者の属する東北大学薬学部では、LPA 類縁体や LPA 受容体 LPA₆ アゴニストを探索するため、数十万の化合物ライブラリーをスクリーニングするシステムの構築が進められている。これにより、夢の育毛剤を作り出すことを目指した創薬研究が展開されている。

LPA₆ によるユニークな LPA 分子の認識機構及び受容体の活性化に重要な立体構造の変化に関する示唆は、LPA₆ 標的化合物の合理的な設計への道を切り開くものとして有用である。LPA₆ は比較的近年同定された受容体であり、その生理機能についての基礎研究も薬剤開発を目指しての創薬研究も十分には進んでいない。本研究により LPA₆ の立体構造と LPA 分子

²²⁹ http://www.amed.go.jp/news/release_20170810.html

の認識機構についての理解が飛躍的に深まったことで、LPA₆ を標的とする薬剤候補化合物の探索と改変の試みが今後大きく進展していくことが期待される。

引用文献

- [1] Tanaka M., Okudaira S., Kishi Y., Ohkawa R., Iseki S., Ota M., Noji S., Yatomi Y., Aoki J., Arai H. “Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid”, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(35), 25822–25830.
- [2] Kishi Y., Okudaira S., Tanaka M., Hama K., Shida D., Kitayama J., Yamori T., Aoki J., Fujimaki T., Arai H. “Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid”, *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(25), 17492–17500.
- [3] Inoue M., Ma L., Aoki J., Chun J., Ueda H. “Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain”, *Molecular Pain*, 2008, 4, 6
- [4] Inoue A., Ishiguro J., Kitamura H., Arima N., Okutani M., Shuto A., Higashiyama S., Ohwada T., Arai H., Makide K., Aoki J. “TGF α shedding assay: An accurate and versatile method for detecting GPCR activation”, *Nature Methods*, 2012, 9(10), 1021–1029.
- [5] Ikubo M., Inoue A., Nakamura S., Jung S., Sayama M., Otani Y., Uwamizu A., Suzuki K., Kishi T., Shuto A., Ishiguro J., Okudaira M., Kano K., Makide K., Aoki J., Ohwada T. “Structure–activity relationships of lysophosphatidylserine analogs as agonists of G-protein-coupled receptors GPR34, P2Y10, and GPR174”, *Journal of Medical Chemistry*, 2015, 58(10), 4204–4219.
- [6] Nishimasu H., Okudaira S., Hama K., Mihara E., Dohmae N., Inoue A., Ishitani R., Takagi J., Aoki J., Nureki O. “Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators”, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2011, 18(2), 205–213.
- [7] Nagai J., Uchida H., Matsushita Y., yano R., Ueda M., Niwa M., Aoki J., Chun J., Ueda H. “Autotaxin and lysophosphatidic acid1 receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and intrathecal lysophosphatidylcholine”, *Molecular Pain*, 2010, 6, 78.
- [8] Guy A.T., Nagatsuka Y., Ooashi N., Inoue M., Nakata A., Greimel P., Inoue A., Nabetani T., Murayama A., Ohta K., Ito Y., Aoki J., Hirabayashi Y., Kamiguchi

- H. “Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord” , *Science*, 2015, 349(6251), 974-977.
- [9] Inoue A., Arima N., Ishiguro J., Prestwich G.D., Arai H., Aoki J. “LPA-producing enzyme PA-PLA₁α regulates hair follicle development by modulating EGFR signaling” , *EMBO Journal*, 2011, 30(20), 4248-4260.
- [10] Yukiura H., Hama K., Nakanaga K., Tanaka M., Asaoka Y., Okudaira S., Arima N., Inoue A., Hashimoto T., Arai H., Kawahara A., Nishina H., Aoki J. “Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish” , *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(51), 43972-43983.
- [11] Kato K., Ikeda H., Miyakawa S., Futakawa S., Nonaka Y., Fujiwara M., Okudaira S., Kano K., Aoki J., Morita J., Ishitani R., Nishimasu H., Nakamura Y., Nureki O. “Structural basis for specific inhibition of autotaxin by a DNA aptamer” , *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23(5), 395-401.
- [12] Aikawa S., Kano K., Inoue A., Wang J., Saigusa D., Nagamatsu T., Hirota Y., Fujii T., Tsuchiya S., Taketomi Y., Sugimoto Y., Murakami M., Arita M., Kurano M., Ikeda H., Yatomi Y., Chun J., Aoki J. “Autotaxin-lysophosphatic acid-LPA₃ signaling at the embryo-epithelial boundary controls decidualization pathways” , *EMBO Journal*, 2017, 36(14), 2146-2160.
- [13] Taniguchi R., Inoue A., Sayama M., Uwamizu A., Yamashita K., Hirata K., Yoshida M., Tanaka Y., Kato H.E., Nakada-Nakura Y., Otani Y., Nishizawa T., Doi T., Ohwada T., Ishitani R., Aoki J., Nureki O. “Structural insights into ligand recognition by the lysophosphatidic acid receptor LPA₆” , *Nature*, 2017, 548(7667), 356-360.

4.2 気孔開閉と細胞膜 H⁺-ATPase の活性調節機構の解明(木下俊則)

4.2.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

さきがけでの研究成果を以下に示す。

(i) 青色光シグナル伝達機構の解析

シロイヌナズナの写真トロピンphot1を用いて、自己リン酸化部位の同定を行い、8か所のセリン又はスレオニンの自己リン酸化部位を同定した。これらの自己リン酸化部位のうちキナーゼドメイン中の849番と851番のセリンの自己リン酸化がphot1のシグナル伝達に必須であることが明らかになった。また、細胞内シグナル伝達において正の制御因子として働くタイプ1プロテインホスファターゼ(PP1)のホスファターゼ活性をなくした不活性型PP1の場合には、青色光による気孔開口が阻害された。一方、細胞膜H⁺-ATPaseを直接的に活性化するカビ毒素フシコクシンは、不活性型PP1を発現させた場合にも気孔開口を引き起こすことから、PP1が細胞内シグナル伝達において正の制御因子として関与していることが明確となった^{[1], [2], 230}。

(ii) シロイヌナズナを用いた気孔開度変異体の単離

気孔開度に依存した葉の重量変動、フォトトロピンの仲介反応の一つである葉の横伸展を指標にした気孔開度変異体のスクリーニングの結果、気孔が閉じているstd(slow transpiration in detached leaf)変異体2株と、顕著に開口しているftd(fast transpiration in detached leaf)変異体2株を単離した。このうち、ftd1変異体の原因遺伝子はアブシジン酸受容体Mg-キラーターゼHサブユニットに新奇のミスセンス変異を持っており、ftd2変異体は、気孔開口シグナル伝達における抑制因子の新奇の突然変異体と考えられた。葉の横伸展を指標にしたスクリーニングでは、気孔が顕著に開口し葉が平らに伸展した変異体20株を単離した。これらのうち、db10-2と名付けた変異体の原因遺伝子は、花芽形成の抑制因子ELF3(early flowering 3)であることが明らかになった²³⁰。

(iii) 細胞膜 H⁺-ATPase の活性調節機構

細胞膜H⁺-ATPaseの活性化に必須であるC末端のリン酸化に関与するプロテインキナーゼやホスファターゼを同定した。プロテインキナーゼは一般的なキナーゼ阻害剤k-252aやスタウロスポリンに非感受性であること、ホスファターゼは、タイプ1/2Aホスファターゼ特異的阻害剤カリクリンAに非感受性であり、EDTAにより阻害される2価カチオン要求性のタイプ2Cプロテインホスファターゼ(PP2C)であることが明らかになった^{[3], 230}。

²³⁰ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/1ki/kinoshita.html>

(iv) 孔辺細胞に特異的に発現する遺伝子の同定

マイクロアレイ解析とRT-PCR解析を行った結果、これまでに気孔開閉への関与が知られていない約200の遺伝子が孔辺細胞において特異的・顕著に発現していることが分かり、このうち60候補遺伝子についてRT-PCRを行い、20遺伝子に特異的発現の見られることを確認した。

(2) 海外での共同研究の状況

最近の例では、南京農業大学とイネを用いた H^+ -ATPase 過剰発現株について、米カリフォルニア大学 Schroeder 研とアブシジン酸シグナリングについて共同研究が進行している。また本研究者が代表を務める科学研究費の新学術領域研究(研究領域提案型)「植物の成長可塑性を支える環境認識と記憶の自律分散型統御システム」(2015~2019 年度)について、The Sainsbury Laboratory(英)と共同研究が進められている。

4.2.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

研究期間終了後の主な研究成果を以下に示す。

花芽形成に必須な役割を果たすフロリゲン(FT:FLOWERING LOCUS T)が気孔開口を正に制御すること、FT は細胞膜 H^+ -ATPase をリン酸化し、高い活性状態に保つ働きがあることを見いだした。すなわち、シロイヌナズナの FT は気孔の孔辺細胞にも発現しており、FT の過剰発現株はより大きく開口した気孔を示し、一方、FT 機能不全変異株は気孔が閉鎖しており、青色光に反応した細胞膜 H^+ -ATPase の活性化ができなかった(図 4-9)^[4]。また、FT 以外にも、光周性花成誘導に関与する TWIN SYSTEM OF FT(TSF)、SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1(SOC1)などが孔辺細胞にも発現しており、光による気孔開口の正の制御因子として間接的に関与していることも判明した^{[5],[6]}。

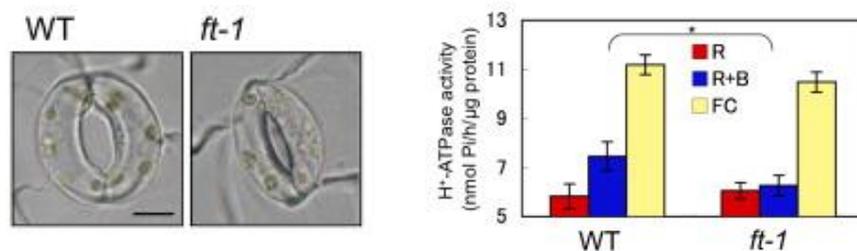


図 4-9 野生株(WT)と FT 機能不全変異株(*ft-1*)の気孔(左)及び H^+ -ATPase 活性(右)^[4]

R: 赤色光 B: 青色光 FC: フシコクシン (H^+ -ATPase activator) 処理

活性化型細胞膜 H^+ -ATPase である C 末端から 2 番目のリン酸化スレオニン残基を特異的

に認識する抗体の作出に成功した。この抗体を用いた表皮組織における免疫組織染色法を確立することで、シロイヌナズナのロゼット葉1枚～数枚で、気孔孔辺細胞における青色光に依存した細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化を検出することが可能となった(図 4-10)。この免疫染色法を利用したスクリーニングにより、複数の突然変異体や H^+ -ATPase のリン酸化レベルに影響を与える化合物が単離された^{[7], [8], 231}。

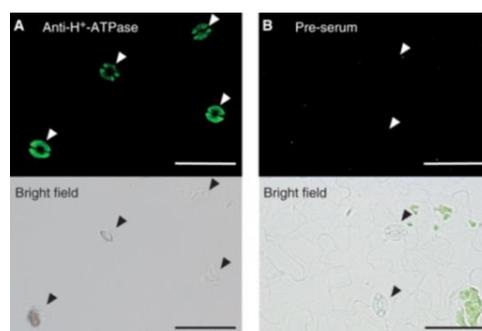


図 4-10 免疫組織染色によるロゼット葉気孔孔辺細胞の H^+ -ATPase リン酸化の検出^[8]

A: H^+ -ATPase 抗体 B: 対照血清

アブシジン酸(ABA)に誘導される気孔閉鎖への Mg-キラーターゼの影響に関して、ABA 非感受性の気孔開度変異体の解析から、Mg-キラーターゼの H サブユニット (CHLH) が ABA による気孔閉鎖に関与することを明らかにした^[9]。また、興味深いことに、赤外線サーモグラフィにより単離した気孔開度変異体の解析から、Mg-キラーターゼの I1 サブユニット (CHLI1) が ABA による気孔閉鎖に関与することを示した^[10]。Mg-キラーターゼはクロロフィル生合成に関わる酵素であり、CHLH と CHLI に CHLD を加えた三つのサブユニットから成る複合体を形成して働く。したがってこれらの結果から、Mg-キラーターゼやそれが関わるクロロフィル生合成が ABA による気孔閉鎖に関与することが示唆された²³¹。

ABA による気孔閉鎖に影響を与える CHLH のシロイヌナズナの孔辺細胞における発現量を調節した形質転換体を作成し、気孔の表現型の観察を行った。その結果、RNAi により CHLH の発現量が低下すると ABA に対する感受性が低下し、一方、過剰発現により CHLH の発現量を増加させると、野生株では部分的にしか気孔閉鎖を誘導しない $1 \mu M$ の ABA によっても有意に気孔閉鎖が促進され、ABA に対する感受性が増加することが示された。そこで、CHLH 過剰発現株における乾燥耐性を調べた結果、通常、野生株では枯死してしまう乾燥条件下においても、CHLH 過剰発現株では依然葉が緑で成長していた(図 4-11)^[11]。以上の結果から、孔辺細胞の ABA に対する感受性を高めることで、植物の乾燥耐性が向上することが初めて実証され、CHLH を孔辺細胞に過剰発現させることが有用であることが判明した²³¹。

²³¹ http://bsj.or.jp/jpn/general/BSJ-review_7C_97-109.pdf

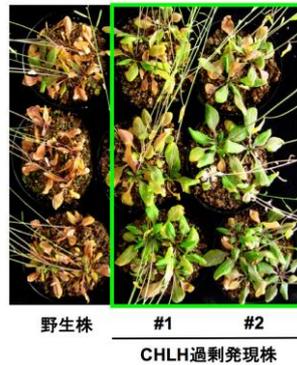


図 4-11 CHLH 過剰発現による植物への乾燥耐性の付与^[11]
通常条件下で 3 週間生育後、18 日間水やりを停止した時の植物

現存する陸上植物の中で最も進化的に古い系統と考えられる苔類の H^+ -ATPase について解析し、ゼニゴケでは、C 末端から 2 番目にスレオニンを持つ典型的な高等植物タイプの pT H^+ -ATPase (pT: penultimate Thr) と、緑藻類が持つタイプの non-pT H^+ -ATPase の両方が存在していることが明らかになった^[12]。さらに緑藻類と苔類の間に位置するシャジクモの H^+ -ATPase を解析した結果、シャジクモは pT H^+ -ATPase を持たないことが示唆され、pT H^+ -ATPase は植物が陸上へ進出する過程で出現したものと考えられた(図 4-12)²³²。

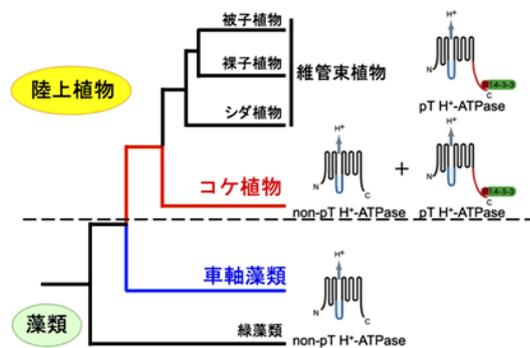


図 4-12 植物の系統樹と H^+ -ATPase の構造²³²

維管束植物(シダ植物及び種子植物)においても光合成に依存した細胞膜 H^+ -ATPase のリン酸化が誘導されるのかをシロイヌナズナを用いて解析した結果、苔植物と同様に、維管束植物においても H^+ -ATPase が光合成に依存してリン酸化・活性化されることを見いだした。また、糖が蓄積している変異体では暗所においても H^+ -ATPase のリン酸化レベルが高く、糖の合成が損なわれた変異体では光合成に依存した H^+ -ATPase のリン酸化が抑制された^[13]。以上の結果から、光合成に依存した H^+ -ATPase のリン酸による活性化は、維管束植物で共通

²³² <http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/paper/2012-19/13.html>

の応答であり、光合成によって合成された糖によって仲介されていることが明らかになった²³³。

光による気孔開口反応に関わる主要因子の発現量をシロイヌナズナの孔辺細胞においてのみ上昇させ、気孔開口を促進することができるかを調べた。その結果、気孔開口の駆動力を形成する細胞膜 H⁺-ATPase の孔辺細胞での発現量を増加させることで、気孔の開口が野生株よりも約 25%大きくなることを発見した(図 4-13)。一方、暗条件や気孔を閉じさせる作用のある ABA 存在下では、H⁺-ATPase 過剰発現株も野生株と同様に気孔が閉鎖しており、光刺激により気孔開口が促進されたときのみ、気孔が大きく開口することが確認された。そこで、二酸化炭素吸収量(光合成活性)の測定を行った結果、H⁺-ATPase 過剰発現株の生葉では、光強度 200 μmol/m²/s より強い光条件において、野生株に比し、吸収量が約 15%増加していた(図 4-13)。一方、弱い光条件(光強度 200 μmol/m²/s 以下)では、有意な差は認められなかった。さらに、植物の生産量について調べたところ、光強度 200 μmol/m²/s の条件において播種後 25 日目の栄養成長期の植物の地上部の重量は、野生株と比べ、1.4~1.6 倍増加していた(図 4-13)^[14]。以上の結果から、気孔開口促進には孔辺細胞における細胞膜 H⁺-ATPase の過剰発現が有用であること、さらに気孔開度が光合成と生産量の制限要因となっていることが実証された²³⁴。

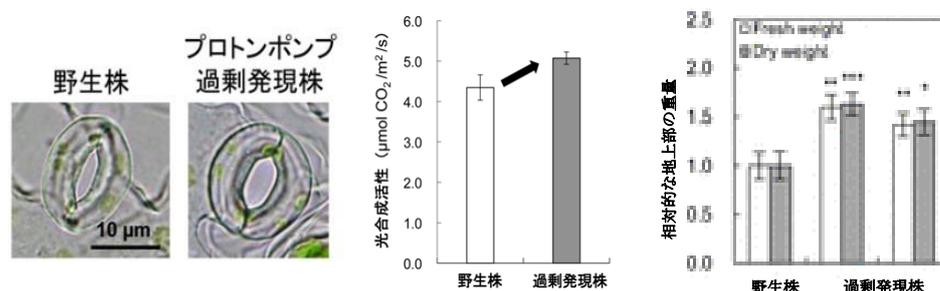


図 4-13 野生株とプロトンポンプ(H⁺-ATPase)過剰発現株の気孔(左)、CO₂吸収量(光合成活性)(中)及び地上部重量(右)の比較²³⁴

本研究者らの開発した孔辺細胞プロトンポンプの活性化を簡便に検出する方法を用いて、青色光によるプロトンポンプ活性化を抑制するプロテインキナーゼ阻害剤を化合物ライブラリーから選抜した。プロテインキナーゼ阻害剤の標的となる生体分子(タンパク質)を、アミノ酸配列の相同検索により探索し、最終的に BHP(Blue light-dependent H⁺-ATPase phosphorylation)を候補として見いだした。BHP を欠損した変異体の気孔では、青色光によるプロトンポンプの活性化が見られず、正常に気孔が開きなかった(図 4-14)。さらに、これまでに明らかになっている気孔開口調節因子である BLUS1 や PP1 との結合を調べ、BHP がフォトトロピンや BLUS1 とともに細胞内で複合体を形成し、気孔開口の初期過程で重要

²³³ <http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/paper/2016-27/10.html>

²³⁴ <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131224-2/index.html>

な働きを持つことが示された。BHP がフォトトロピンとプロトンポンプの間をつなぐ重要なシグナル伝達因子であることを証明した(図 4-15)^{[15], 235}。

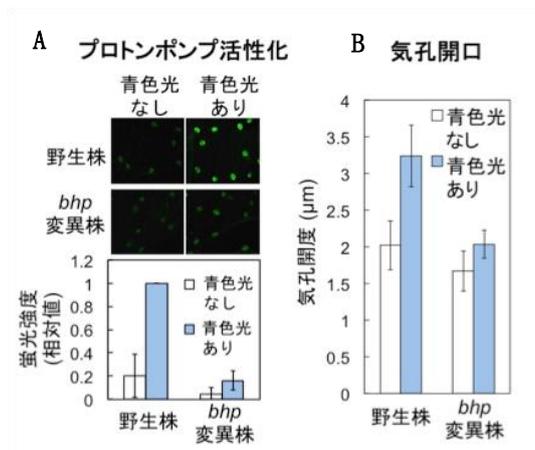


図 4-14 *bhp* 変異株の気孔の応答²³⁵

A : 上の蛍光画像は孔辺細胞プロトンポンプ活性化の比較、
 下のグラフはその蛍光強度の定量結果
 B : 野生株と *bhp* 変異株の気孔開口の比較

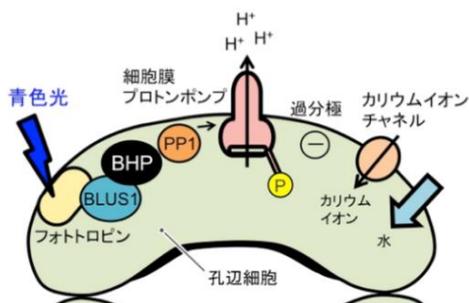


図 4-15 青色光による気孔開口の分子メカニズム²³⁵

BHP がフォトトロピンと細胞膜プロトンポンプの間をつなぐ重要なシグナル伝達因子であることを証明

(2) 社会・経済への波及と展望

本研究により、人為的に気孔の開口を大きくすることで植物の生産量を増加させることに世界で初めて成功し、農作物やバイオ燃料用植物の生産量増加、大気中 CO₂ 削減への応用が期待される。一方、気孔孔辺細胞のアブシジン酸 (ABA) に対する感受性を高めることで、気孔の閉鎖が促進されることが明らかになり、植物への乾燥耐性付与効果も期待される。また、本研究成果である BHP の発見は、BHP の量を調節した植物の作出や、BHP 阻害剤の利用・改変などを通じ、人工的に気孔開度を制御して植物の乾燥耐性や成長を向上させる技術へ

²³⁵ http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/research/20170331_SciRep_JP_PressRelease_ITbM.pdf

と応用が可能であり、新たな農作物の開発につながることを期待される。

引用文献

- [1] Takemiya A., Kinoshita T., Asanuma M., Shimazaki K. “Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(36), 13549–13554.
- [2] Inoue S., Kinoshita T., Matsumoto M., Nakayama K., Doi M., Shimazaki K. “Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(14), 5626–5631.
- [3] Hayashi Y., Nakamura S., Takemiya A., Takahashi Y., Shimazaki K. I., Kinoshita T. “Biochemical characterization of in vitro phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H-ATPase”, *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(7), 1186–1196.
- [4] Kinoshita T., Ono N., Hayashi Y., Morimoto S., Nakamura S., Soda M., Kato Y., Ohnishi M., Nakano T., Inoue S.-I., Shimazaki K.-I. “FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening”, *Current Biology*, 2011, 21(14), 1232–1238.
- [5] Ando E., Ohnishi M., Wang Y., Matsushita T., Watanabe A., Hayashi Y., Fujii M., Ma J.F., Inoue S.-I., Kinoshita T. “TWIN SISTER OF FT, GIGANTEA, and CONSTANS have a positive but indirect effect on blue light-induced Stomatal opening in *Arabidopsis*”, *Plant Physiology*, 2013, 162(3), 1529–1538.
- [6] Kimura Y., Aoki S., Ando E., Kitatsuji A., Watanabe A., Ohnishi M., Takahashi K., Inoue S.-I., Nakamichi N., Tamada Y., Kinoshita T. “A flowering integrator, *SOC1*, Affects stomatal opening in *arabidopsis thaliana*”, *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(4), 640–649.
- [7] Hayashi Y., Nakamura S., Takemiya A., Takahashi Y., Shimazaki K.-I., Kinoshita T. “Biochemical characterization of in vitro phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H-ATPase”, *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(7), 1186–1196.
- [8] Hayashi M., Inoue S.-I., Takahashi K., Kinoshita T. “Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells”, *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(7), 1238–1248.
- [9] Tsuzuki T., Takahashi K., Inoue S., Okigaki Y., Tomiyama M., Hossain M.A., Shimazaki K., Murata Y., Kinoshita T. “Mg-chelatase H subunit affects ABA

- signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in *Arabidopsis thaliana*”, *Journal of Plant Research*, 2011, 124(4), 527–538.
- [10] Tomiyama M., Inoue S.-I., Tsuzuki T., Soda M., Morimoto S., Okigaki Y., Ohishi T., Mochizuki N., Takahashi K., Kinoshita T. “Mg-chelatase I subunit 1 and Mg-protoporphyrin IX methyltransferase affect the stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*”, *Journal of Plant Research*, 2014, 127(4), 553–563.
- [11] Tsuzuki T., Takahashi K., Tomiyama M., Inoue S.-I., Kinoshita T. “Overexpression of the Mg-chelatase H subunit in guard cells confers drought tolerance via promotion of stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*”, *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4, 440.
- [12] Okumura M., Inoue S.-I., Takahashi K., Ishizaki K., Kohchi T., Kinoshita T. “Characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase in the liverwort *Marchantia polymorpha*”, *Plant Physiology*, 2012, 159(2), 826–834.
- [13] Okumura M., Inoue S., Kuwata K., Kinoshita T. “Photosynthesis activates plasma membrane H⁺-ATPase via sugar accumulation”, *Plant Physiology*, 2016, 171(1), 580–589.
- [14] Wang Y., Noguchi K., Ono N., Inoue S.-I., Terashima I., Kinoshita T. “Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(1), 533–538.
- [15] Hayashi M., Inoue S.-I., Ueno Y., Kinoshita T. “A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening”, *Scientific Reports*, 2017, 7, 45586.

4.3 オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生(小松雅明)

4.3.1 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

さきがけでの研究成果を以下に示す。

(i) オートファジーの選択的基質 p62

p62 は、オートファゴソームの膜に局在しその後リソソームで分解される LC3²³⁶分子との相互作用を介して、オートファゴソーム-リソソーム系で分解されることが判明した。LC3 を含むオートファジー必須遺伝子 Atg 真核生物に保存されているが、p62 は多細胞生物から出現しており、オートファジーの選択的基質と考えられた。肝臓若しくは脳特異的にオートファジー必須遺伝子 Atg7 を欠損させると、p62 は蓄積、不溶化し、p62 陽性の封入体が形成された。それら封入体のほぼ全てはユビキチン陽性であり、ヒト神経変性疾患や肝疾患の病変部位において同定されてきた構造体と酷似していることが判明した。Atg7 欠損組織において p62 を同時に欠損させると、封入体形成はほぼ完全に抑制された。これらの結果から、ヒト神経変性疾患や肝疾患で観察される封入体形成がオートファジーの減弱に起因し得ること、そして p62 が封入体形成の責任分子であることが強く示唆された^{[1], 237}。

(ii) オートファジーによる p62 認識分子機構

マウス p62 分子内の 11 アミノ酸が LC3 によって認識される配列(LRS)であることを見いだした。LRS と LC3 の共結晶構造解析から、(1)LRS 内 Trp-340 及び Leu-343 と LC3 のユビキチンフォールド内の二つの疎水性ポケットとの相互作用、(2)LRS 内酸性クラスターと LC3 分子表面の塩基性アミノ酸との相互作用が明らかになった。LC3 との相互作用能を欠失した変異 p62 は、オートファジーによる分解を逃れ、PB1 ドメイン依存的にユビキチン化タンパク質を含んだ封入体を形成することが判明し、LC3 を介した p62 の分解阻害のみで、封入体形成が十分であることが示された。さらに、PB1 ドメインを介した p62 のオリゴマー形成は、オートファジーを介した p62 の効率的な分解に重要であった^{[2], 237}。

(iii) p62 の代謝異常による病態発症機序

ストレス応答タンパク質群の遺伝子発現は転写因子 Nrf2 により正に制御されるが、p62 が Nrf2 のユビキチンリガーゼアダプター Keap1 と直接相互作用することを見いだした。さらに、p62 が結合する Keap1 の領域は、Nrf2 が結合する Keap1 の領域と全く同一であることを明らかにした。これらの結果から、p62 が Keap1 と Nrf2 との結合を競合的に阻害し、

²³⁶ 酵母オートファジー関連遺伝子 Atg8 の哺乳類のホモログでユビキチン様蛋白質、リン脂質と結合する。

²³⁷ <http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/complete/metabolism/2ki/komatsu.html>

その結果として Nrf2 の活性化とそれに引き続く抗酸化タンパク質群や解毒酵素群の遺伝子発現を上昇させるという新しい転写制御機構があることが判明した。さらに、このストレス応答転写制御機構がオートファジー欠損肝臓において異常亢進しており、その結果として肝障害を引き起こすことを明らかにした^{[3], 237}。

(2) 海外での共同研究の状況

最近の例では、中国科学院、韓国の延世大学との日中韓フォーサイト事業「オートファジー、代謝と神経変性疾患」(2015～)において、韓国忠南大学校 Jo 研(2017)と新規環化ペプチドのオートファジー活性化による抗菌応答について、独 Goethe 大学 Dikic 研(2017)とサルモネラのユビキチン化によるオートファジー活性化について、中国科学院 Hu 研(2017)とユビキチン・ホメオスタシスへの p62 の関与について、韓国延世大学 Bae 研(2016)と高コレステロール血症薬による Nrf2-Keap1 系の活性化について、Helsinki 大学 Lehesjoki 研(2016)及び Merck Serono 社 Kirkin 研(2016)とユビキチン様修飾因子について、米 Kansas 大学 Ding 研(2016)と p62 の過剰小胞体除去への関与について、フランス国立保健医学研究機構 Burnol 研(2016)とインスリン受容体と p62-Nrf2 シグナリングのクロストークについて共同研究を行っている。

4.3.2 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

研究期間終了後の主な研究成果を以下に示す。

マウスの肝臓においてオートファジーに必須な遺伝子である Atg5 あるいは Atg7 を欠損させると肝臓に良性の腫瘍が形成されることを見いだした。この腫瘍細胞には p62 の蓄積、ミトコンドリアの膨潤、酸化ストレス反応が認められた。この腫瘍の増殖は p62 遺伝子を同時に欠損させることにより大幅に抑制されたことから、p62 の蓄積が腫瘍の増殖に貢献することが判明した(図 4-16)。また、p62 の蓄積による転写因子 Nrf2 の恒常的な活性化が腫瘍の増殖を促進することも明らかになった。

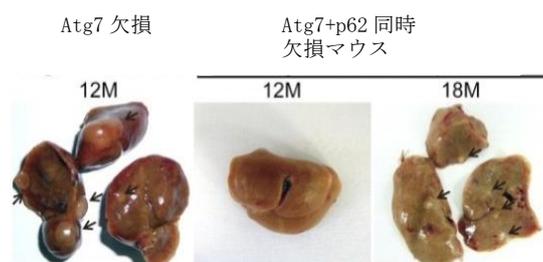


図 4-16 p62 欠損による肝特異的 Atg7 欠損マウスの腫瘍増殖の抑制^{[4], 238}
矢印：腫瘍、M：month

ヒトの肝細胞がんやグリオーマにおいても、オートファジーの欠損による肝腫瘍と同様に、p62 が過剰に蓄積し凝集することが知られている。本研究者らもヒト肝細胞がん検体において p62 の蓄積及び凝集化を確認するとともに、ヒト肝細胞がん患者の約 25% (102 検体中 26 検体) において p62 と Keap1 陽性の凝集体が形成され、その腫瘍部位において転写因子 Nrf2 が活性化されていることを見いだした。p62 を過剰に蓄積するヒト肝細胞がん株において、p62 遺伝子を欠損させると、がん細胞の増殖が抑制されることが確認された。したがって、p62 の蓄積、凝集を介した Nrf2 の活性化は、肝細胞がんの生存戦略に利用されていた。さらに、Keap1 は p62 依存的にオートファジーにより分解されており、Atg7 欠損によりオートファジーが機能しなくなると p62 とともに Keap1 も蓄積し、Nrf2 の活性化を引き起こすことを見いだした^{[4], [5], [6], 239}。

本研究者らは、p62 の 351 番目のセリン残基がリン酸化されると、ユビキチンリガーゼアダプタータンパク質である Keap1 との結合親和性が著しく上昇し、Keap1 の標的である転写因子 Nrf2 が安定化することにより一連の生体防御遺伝子の発現が上昇することを見いだした。この p62 のリン酸化は選択的なオートファジーを誘導したとき、つまり、p62 がタンパク質の凝集体や異常なミトコンドリアに局在したときに観察された。このことは、選択的なオートファジーと Keap1-Nrf2 系とが連動していることを意味した。p62 は酸化ストレスにより出現したタンパク質凝集体、脱共役剤により膜電位を消失した異常なミトコンドリア、さらに、細胞内に侵入したネズミチフス菌に集積する。重要なことに、これら選択的オートファジーにより分解される構造体に集積した p62 はその Ser351 がリン酸化されており、細胞質に存在する Keap1 のこれらの構造体への局在の変化も観察された。p62 のリン酸化及び Keap1 の局在の変化と並行して、Nrf2 の安定化及び核への移行が起こり、Nrf2 の標的遺伝子の発現誘導が起こった。p62 遺伝子の欠損は、これらのストレスに応じた Nrf2 の核への移行及び標的遺伝子の発現誘導を有意に抑制した。このことは、p62 の Ser351 のリン酸化を介し、選択的オートファジーと Keap1-Nrf2 系とが連動することを意味した(図 4-17)。

²³⁸ 引用文献[4]の Figure5 を一部改変した。

²³⁹ <http://first.lifesciencedb.jp/archives/7692>

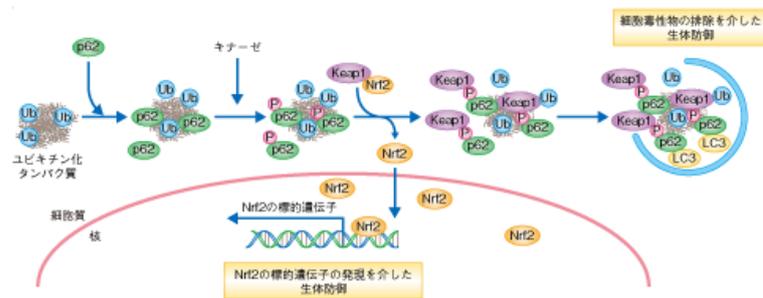


図 4-17 正常細胞における選択的オートファジーと Keap1-Nrf2 系との連動機構²³⁹

p62 がタンパク質凝集体、異常なミトコンドリア、細胞に侵入した細菌に集積すると、p62 がリン酸化され、その結果、Keap1 との結合が著しく増強されて Keap1 が不活性化し、Nrf2 が活性化する

Ub : ユビキチン化、P : リン酸化

この p62-Keap1-Nrf2 経路は、正常細胞では選択的オートファジーの起動時に一過的に活性化するのに対し、肝特異的オートファジー欠損マウス腫瘍、肝細胞がんにおいては恒常的に p62 が蓄積、そしてリン酸化され、Nrf2 が活性化されていた(図 4-18)。これらの結果は、p62 のリン酸化を介した Nrf2 の活性化が肝細胞がんの増殖に決定的であることを意味した [7].²³⁹

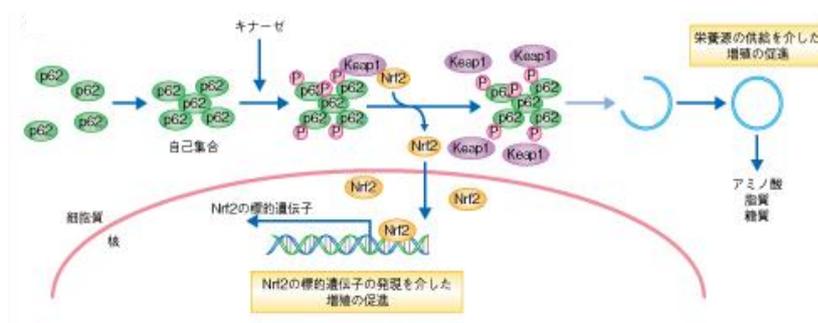


図 4-18 がん細胞における p62 を介した恒常的な Nrf2 活性化機構²³⁹

過剰に発現誘導された p62 が自己凝集することにより、Ser351 がリン酸化されると考えられる

Ub : ユビキチン化、P : リン酸化

p62 による腫瘍増殖促進の分子機構に関し、ヒト肝細胞がん株、リン酸化 p62 を蓄積し肝腫瘍を形成する肝臓特異的 Atg7 欠損マウス、そして肝細胞がん患者検体を用いた解析により以下のことが明らかになった^{[8], 240}。

1. 肝細胞がんにおけるリン酸化 p62 を介した Nrf2 の活性化は、グルコースから UDP-グル

²⁴⁰ <http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc1/jpn/research2/NC2016.html>

クロン酸の合成、及びグルタミンからグルタチオン合成を促進させた(図 4-19)。

2. 薬剤抱合に關与する UDP-グルクロン酸及びグルタチオンの産生亢進により、リン酸化 p62 を持つ肝細胞がんは抗がん剤耐性を獲得した。グルタチオンの産生亢進は、腫瘍の増殖を促進させた。

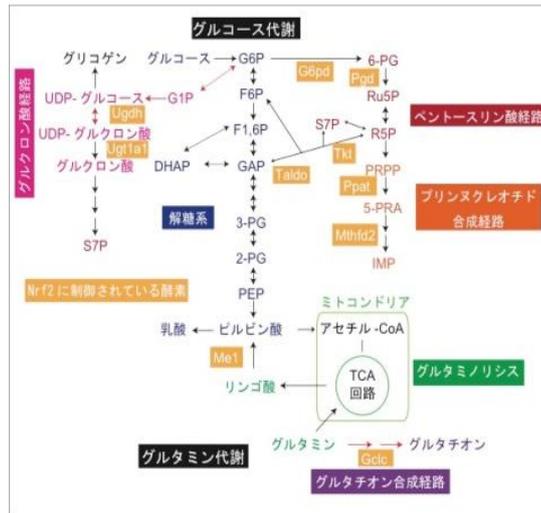


図 4-19 Nrf2 に制御されている代謝酵素群²⁴⁰

3. 肝臓特異的 Atg7 欠損マウス肝臓において、腫瘍形成以前にプリンヌクレオチド合成やグルタチオン合成促進などの代謝変化が確認され、それは Nrf2 の同時欠損により完全に回復した。

4. C 型肝炎ウイルス陽性の HCC 患者において、顕著なリン酸化 p62 の蓄積が認められた。

5. リン酸化 p62 による Nrf2 活性化を防ぐ新規化合物 K67 を同定し、K67 が肝がん細胞の増殖を抑制するとともに、既存の抗がん剤の薬効を高めることを確認した(図 4-20)²⁴⁰。

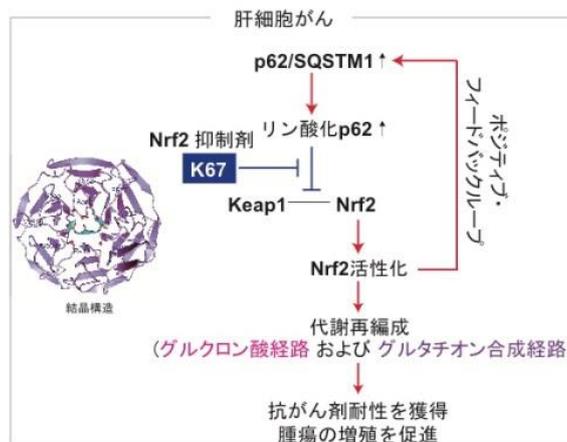


図 4-20 p62 の発現亢進による肝細胞がんの発症機構モデル及び K67 によるがん細胞増殖抑制²⁴⁰

ユビキチン-プロテアソームは細胞内のタンパク質恒常性に決定的であり、その障害は非機能的で潜在的に毒性を有する変性タンパク質、そしてユビキチン陽性タンパク質凝集体の蓄積を引き起こす。タンパク質凝集体はプロテアソームでは分解できないことから、オートファジーが代償的に誘導され、凝集体の分解を担うことが提唱されてきた。しかし、それら二つの細胞内分解システムが *in vivo* において代償的に働くか否かは不明なままであった。これらの問題点を明らかにするため、J. Mayer らのグループと共同で作成した肝実質細胞特異的にプロテアソーム機能を減弱させたマウスを解析した結果、このマウスはユビキチン及び p62 陽性のタンパク質凝集体形成を伴った肝障害を呈した。それら凝集体は選択的にオートファジーにより排除されており、このマウスにおいて Atg7 を同時欠損させると、肝障害は劇的に増悪した。対照的に、p62 を欠損させた場合には、凝集体の形成は著しく抑制されるものの、肝障害の状態に変化は認められなかった。さらに、プロテアソーム変異マウス肝臓において p62 は S351 がリン酸化されており、Nrf2 の活性化が確認された。Nrf2 の同時欠損は、このマウスの病態を著しく悪化させたことから、選択的オートファジー発動時の Nrf2 活性化が生体防御に働くことが初めて明らかになった。この *in vivo* の結果は、細胞はタンパク質恒常性の破綻に応答した複数の細胞防御機構を発揮できることを意味した^{[9], 241}。

原因不明のてんかんや小頭症を伴う重度発達障害がユビキチン様タンパク質 UFM1 を活性化する酵素 UBA5 をコードする遺伝子の変異によって引き起こされることを明らかにした。

UFM1 は UBA5 により活性化された後、UFC1 酵素に転移され、最終的に細胞内の標的タンパク質を修飾する。この UFM1 システムに必須な因子が欠損すると p62 が蓄積するなど、オートファジーとの関連が明らかになりつつある。原因不明の遺伝性重度発達障害患者の遺伝子解析を行った結果、UBA5 をコードする遺伝子に変異があり、その変異により UBA5 酵素活性が減弱し、結果的に UFM1 によるタンパク質修飾も障害された。さらに、中枢神経系特異的 UFM1 遺伝子欠損マウスを解析した結果、神経細胞死を伴った小頭症を呈し、生後数日以内に死亡することを見いだした(図 4-21)^[10]。これらの結果から、UFM1 タンパク質修飾機構の異常が、遺伝性重度発達障害を引き起こすことが明らかになった²⁴²。

²⁴¹ http://proteolysis.jp/a_forum/thread.php?id=46

²⁴² https://prw.kyodonews.jp/prwfile/release/M102154/201608193503/_prw_PR1f1_M7b134Bt.pdf

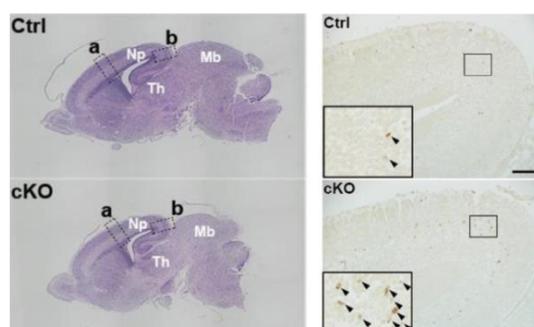


図 4-21 野生型(Ctrl)と神経特異的 UFM1 欠損(cKO)マウスの脳切片染色像(左)及び細胞死マーカー(切断型カスパーゼ 3)免疫染色像(右)^[10]
 cKO マウス脳は全体的に小さく、多数の神経細胞死が確認された
 Np:新皮質、Th:視床、Mb:中脳

(2) 社会・経済への波及と展望

本研究によって、オートファジーの機能不全が、がんや神経変性疾患など加齢に伴う疾患の病態と密接に関連することが明らかになった。一部の特殊な病態への関与ではなく、高齢化社会における様々な健康障害や疾患の予防・治療に貢献できると考えられる。さらに、本研究成果から、オートファジー若しくは p62 が新たな治療薬開発の標的になると考えられる。特に、p62 選択的オートファジーの活性化若しくは p62 と Keap1 の相互作用を阻害することにより、Nrf2 の分解促進が可能であり、肝細胞がんやグリオーマの増殖や抗がん剤耐性を抑制できると考えられる。本研究者らの同定したリン酸化 p62 による Nrf2 の活性化を抑制する新規化合物 K67 は今後の臨床応用が期待される。この新規化合物 K67 による肝細胞がん増殖抑制効果については各種メディアで報道された(新潟日報 2016 年 6 月 30 日、NHK 首都圏ニュース 2016 年 8 月 27 日)。

引用文献

- [1] Komatsu M., Waguri S., Koike M., Sou Y.S., Ueno T., Hara T., Mizushima N., Iwata J.I., Ezaki J., Murata S., Hamazaki J., Nishito Y., Iemura S., Natsume T., Yanagawa T., Uwayama J., Warabi E., Yoshida H., Ishii T., Kobayashi A., Yamamoto M., Yue Z., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. “Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice” *Cell*, 2007, 131(6), 1149-1163.
- [2] Ichimura Y., Kumanomidou T., Sou Y.S., Mizushima T., Ezaki J., Ueno T., Kominami E., Yamane T., Tanaka K., Komatsu M. “Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy” *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(33), 22847-22857.
- [3] Komatsu M., Kurokawa H., Waguri S., Taguchi K., Kobayashi A., Ichimura Y., Sou

- Y.S., Ueno I., Sakamoto A., Tong K.I., Kim M., Nishito Y., Iemura S., Natsume T., Ueno T., Kominami E., Motohashi H., Tanaka K., Yamamoto M. “The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1” *Nature Cell Biology*, 2010, 12(3), 213–223.
- [4] Takamura A., Komatsu M., Hara T., Sakamoto A., Kishi C., Waguri S., Eishi Y., Hino O., Tanaka K., Mizushima N. “Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors” , *Genes & Development*, 2011, 25(8), 795–800.
- [5] Inami Y., Waguri S., Sakamoto A., Kouno T., Nakada K., Hino O., Watanabe S., Ando J., Iwadate M., Yamamoto M., Lee M.-S., Tanaka K., Komatsu M. “Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells” , *Journal of Cell Biology*, 2011, 193(2), 275–284.
- [6] Taguchi K., Fujikawa N., Komatsu M., Ishii T., Unno M., Akaike T., Motohashi H., Yamamoto M. “Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis” , *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(34), 13561–13566.
- [7] Ichimura Y., Waguri S., Sou Y.S., Kageyama S., Hasegawa J., Ishimura R., Saito T., Yang Y., Kouno T., Fukutomi T., Hoshii T., Hirao A., Takagi K., Mizushima T., Motohashi H., Lee M.-S., Yoshimori T., Tanaka K., Yamamoto M., Komatsu M. “Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy” , *Molecular Cell*, 2013, 5(5)1, 618–631.
- [8] Saito T., Ichimura Y., Taguchi K., Suzuki T., Mizushima T., Takagi K., Hirose Y., Nagahashi M., Iso T., Fukutomi T., Ohishi M., Endo K., Uemura T., Nishito Y., Okuda S., Obata M., Kouno T., Imamura R., Tada Y., Obata R., Yasuda D., Takahashi K., Fujimura T., Pi J., Lee M.S., Ueno T., Ohe T., Mashino T., Wakai T., Kojima H., Okabe T., Nagano T., Motohashi H., Waguri S., Soga T., Yamamoto M., Tanaka K., Komatsu M. “p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming” *Nature Communications*, 2016, 7, 12030.
- [9] Kageyama S., Sou Y.S., Uemura T., Kametaka S., Saito T., Ishimura R., Kouno T., Bedford L., Mayer R.J., Lee M.S., Yamamoto M., Waguri S., Tanaka K., Komatsu M. “Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(36), 24944–24955.
- [10] Muona M., Ishimura R., Laari A., Ichimura Y., Linnankivi T., Keski-Filppula R., Herva R., Rantala H., Paetau A., Pöyhönen M., Obata M., Uemura T., Karhu T., Bizen N., Takebayashi H., McKee S., Parker M.J., Akawi N., McRae J., Hurles

M.E., Kuismin O., Kurki M.I., Anttonen A.K., Tanaka K., Palotie A., Waguri S., Lehesjoki A.E., Komatsu M. “Biallelic variants in UBA5 link dysfunctional UFM1 ubiquitin-like modifier pathway to severe infantile-onset encephalopathy”, *American Journal of Human Genetics*, 2016, 99(3), 683-694.