

学 校 名	大 阪 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	iPS細胞を用いた広域顎口腔組織欠損再生に向けた基礎的研究		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① iPS細胞 ② 間葉系前駆細胞 ③ 広域顎口腔組織再生 ④ 再生医療 ⑤ 幹細胞 ⑥ 3次元織担体 ⑦ 歯学			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
馬 場 俊 輔	歯 学 部	主 任 教 授	総括・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
戸 田 伊 紀	歯 学 部	准 教 授	動物実験・論文作成
橋 本 典 也	歯 学 部	准 教 授	培養実験・論文作成
本 田 義 知	歯 学 部	准 教 授	培養実験・論文作成

iPS細胞を用いた広域顎口腔組織欠損再生に向けた基礎的研究

1. 研究の目的

口腔癌や顎骨骨折等によって生じた広域顎口腔組織欠損は、患者に大きな手術的および、精神的負担を生じさせる。これまでこの治療に対しては、欠損補綴や顎補綴治療が広く用いられてきたものの、利用される補綴物は恒久的な発音障害・審美障害・咀嚼障害を生じさせ、患者の生活の質を大きく損ねている。特に、咀嚼障害は寿命と直結する事が知られている (Takada et al. *Ann Jpn Prosthodont Soc*, 2012)。天然歯と同様に利用可能なインプラントは、潜在的に本課題を改善しうる力を持つものの、土台となる顎骨の広域欠如が本治療の遂行を妨げてきた。これらの背景から、再生医療を用いた顎骨再生法に期待が向けられ、自家骨移植や、骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞治療等が広く試みられている。しかし、広域を満たす程の試料の調達は困難を極め、未だ大きな発展が見られていない。もし、これらの課題を克服する優れたオーダーメイド顎骨組織再生治療が実現すれば、次世代に残された課題と言われる広域顎骨組織欠損治療を著しく前進させ、患者の生活の質を大きく向上させる可能性を持つ。

本研究は、独自開発を進めてきた①癌化し難いiPS細胞と、②生体高分子を任意な形状に織り込む担体合成技術を用い、オーダーメイド広域骨再生治療の具現化を図っている点に最大の特色を持つ。顔貌に応じた形状再建を可能とするオーダーメイド再生治療としては、東京大学が3Dプリンターを用いた人工骨を報告している (Chung et al., *Int J Automation Technology*, 2009)。しかしながら、人工骨は靱性に乏しく、骨置換に数年の年月を要し、大型人工骨では破折が危惧される。一方、吸収性生体高分子は高い靱性をもつものの、低い骨伝導能ゆえに自家骨や骨髄間葉系幹細胞と複合化し研究が進められてきた (Kinoshita et al., *Tissue Eng*, 2007)。しかし、自家骨は採取量に、骨髄由来間葉系幹細胞は細胞数の確保に課題を残し、広域骨再建は大きく進展してこなかった。

申請者が着目したiPS細胞は、①無限に増殖し細胞数の問題を克服し得る、②ドナーの年齢に依存しない調製が可能、③血管前駆細胞への分化誘導も報告されており、血管網を含んだ骨組織の迅速再生を実現しうる、等の利点を有す。更に申請者は、独自にプラスミドベクターを用いた癌化し難いiPS細胞の樹立に成功しており、安全性の高いiPS細胞の調達が可能である。また、生体高分子を紡糸し、織ることで任意の3次元形状へと整形する特殊技術を保持しており、迅速に本研究への着手が可能な状態にある。

以上の点から、本申請内容は既存の広域骨欠損治療と一線を画す革新的な治療法と成り得る事が期待出来る。本研究の着想は自ら蓄積した知見に基づき、“癌化しにくいiPS細胞と3次元織担体を用いたオーダーメイド広域顎骨再生”に着目して研究を進めているグループは国内外無く、極めて新規性が高い研究であると言える。

本申請は、申請者が独自に樹立した、癌化を起しにくい口腔軟組織由来iPS細胞と、任意な3次元構造に生体高分子を織り込む特殊技術で作成した顎骨形状担体を最適に複合化し、次世代のオーダーメイド広域顎口腔組織欠損再生治療を可能とする新規技術創生の基盤を築く事を目的とする。

2. 研究の計画

(1) 新規細胞培養足場材料の開発

ポリ乳酸 (PLLA) 表面は疎水性であり、PLLAはセラミックと比較して可撓性があるという利点はあるが、生体親和性に乏しく細胞接着性、増殖性はもたない。そのために細胞の播種性が悪い。我々はPLLAをアンモニウム処理を行うことで材料表面が親水化し、細胞接着が飛躍的に向上することを報告している (Liao et al. *Mater Sci Eng C*, 2013)。そこで、昨年度に樹立したiPS由来間葉系幹細胞 (MSLC) 表面処理を行った織物スキャホールドに対しドロップレット法を用いて細胞を播種した。しかし、播種細胞数を多くし、長期に培養すると3次元形態を維持することが難

しかった。そこで、同じく吸収性の生体材料として使用される α リン酸三カルシウム (α -TCP) に着目し足場材料としての可能性を探った。塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)のヘパリンとの親和性に着目し、ヘパリンを α -TCP多孔質体に化学的に固定させた薬物担持担体を開発した。 α -TCPは生体吸収材料であり、骨再生材料として使用される。bFGFは人体に広く分布する強力な血管新生因子であり、神経や骨の形成にも関与していることが知られている。 α -TCP (対照群) にオリゴリジン固定化することで表面を正電荷にし、負電荷であるヘパリンを静電的相互作用にて固定した。動物実験は、ビーグル成犬、雌2歳で、体重約10 kgの6匹を使用した。ビーグル犬下顎小白歯を抜去し、8週の治癒を経過後、インプラントドリルを用いて骨窩洞 (直径4.5 mm、深さ6 mm) を3ヶ所形成した。術後2、4、8週に各2匹を安楽死させ、下顎骨を摘出し、還流固定を行った。実験部位をマイクロCTで撮影後にマイクロX線画像解析装置を用いた骨のパラメーター解析を行い、硬組織脱灰研磨・薄切にてヘマトキシリンエオジン (HE) 染色、免疫染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色による病理組織学的観察も行った。

(2) *in vitro*人工骨の作製

研究計画 (1) で作製した α -TCP多孔質体に化学的に固定させた薬物担持担体を用いて細胞播種数、分化期間、分化因子を変化させ、次に行う*in vivo*骨再生実験に向けた複数の*in vitro*人工骨の作製を試みる。bFGF固定化がMSCLCの分化に与える影響を調べた。hMSC をbFGF/ α -TCP多孔質体 (bFGF) 群および α -TCP 多孔質体のみ(α -TCP) 群とともに骨分化誘導培地中で一定期間培養する。細胞増殖能の評価として蛍光色素でアクチン染色を行った。骨芽細胞分化の評価として、それぞれの群からRNA を抽出し、逆転写を行い、cDNA を作製する。リアルタイムPCR 法を用いて I 型コラーゲン、オステオカルシン、RUNX2 の発現を評価し、両群の骨芽細胞分化マーカー発現の定量比較を行なった。

3. 研究の成果

(1) 新規細胞培養足場材料の骨再生評価

骨のパラメーター計測においてbFGF群と対照群を比較して骨密度は、2、4、8週の全てで骨塩量は4、8週において有意差を認めた。一方で、骨体積率では2、4、8週の全てにおいて有意差を認めなかった。病理組織学的観察では、2週においてはbFGF群では結合組織が残存 α -TCP顆粒を取り囲む様に形成され、多数の新生血管や破骨細胞を認めることから骨形成が活発に行われていた。対照群では多数の α -TCP顆粒の残存が観察された。4週においてはbFGF群では新生血管や破骨細胞は少なくなるのに対し、対照群では2週のbFGF群と同様、結合組織が残存 α -TCP顆粒を取り囲む様に形成され、多数の新生血管や破骨細胞を認めることからbFGF群に遅れて骨再生が行われていることが明らかとなった。8週においてはbFGF群では新生血管や破骨細胞はほとんど認めず、大部分の α -TCPは分解され新生骨に置換されるのに対し、対照群では新生血管や破骨細胞が多数確認でき骨形成が続いていることが明らかとなった。さらに、HE染色画像より計測した骨領域率では2、4、8週全てにおいてbFGF群と対照群で有意差を認めた。

以上、bFGFを担持した α -TCP多孔質体薬物徐放担体は、顎骨骨欠損部の骨再生における新規足場材料として臨床応用可能であると示唆された。

(2) *in vitro*人工骨の作製

bFGF群ならびに α -TCP群で細胞増殖を示し、培養3日後で骨芽細胞の初期分化マーカーであるRunx2がbFGF群で有意に高い発現を示すことが明らかとなった。同様にアルカリホスファターゼ遺伝子の発現も有意に高くなった。一方で、培養期間の延長によって両群に差がなくなってくることはbFGFが分化の初期段階に影響を与えていることが考えられる。

4. 研究の反省・考察

当初の研究計画では、ヌードラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いた骨再生評価ならびに安全性評価を行う予定であったが、足場材料を変更したため研究期間内には終了しなかった。しかし、現在、ヌードマウス頭蓋冠に直径5 mmの骨欠損をトレフィンバーにて形成し、上記で作製した *in vitro*人工骨を欠損部に移植し、骨再生能をマイクロCTによるX線評価と病理組織学的評価から解析している。また、癌化の有無についても病理組織学的に評価する予定である。

現在、理化学研究所等で提供されるプラスミドベクターを用いて樹立された歯髄や皮膚由来のiPS細胞株からもMSLCの樹立を行っている。加えて、MSLCのゲノム不安定性や造腫瘍安全性のPOC（概念実証）取得に向けた試験の実施、細胞品質基準の策定、MSLCの免疫不全動物を用いたトランスレーショナル研究についても計画している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kobayashi N, Hashimoto Y, Otaka A, Yamaoka T, Morita S. Porous alpha-tricalcium phosphate with immobilized basic fibroblast growth factor enhances bone regeneration in a canine mandibular bone defect model. *Materials* 2016; 9 (10) Article Number 853 (11pages).

(2) 口頭発表

- ① 橋本典也. インテグレーションフリーiPS細胞からの間葉系幹細胞様細胞の誘導. 第14回日本再生歯科医学会総会・学術大会 2017. 2. 26. 札幌市
- ② Kobayashi N, Hashimoto Y, Otaka A, Yamaoka T, Morita S. Effect of porous alpha-tricalcium phosphate with immobilized basic fibroblast growth factor on bone regeneration in a canine mandibular bone defect model. *International Dental Materials Congress 2016*. 2016. 11. 5. Bali, Indonesia.
- ③ Kubo H, Nishio A, Miya Y, Hashimoto Y, Kishimoto N. Chondrocyte differentiation ability of dedifferentiated fat cells compared with adipose-derived stem cells derived from the human buccal fat pad. *International Dental Materials Congress 2016*. 2016. 11. 4. Bali, Indonesia.

(3) 出版物

- ① 馬場俊輔、橋本典也、笠原真二郎他. 医療用バイオマテリアルの研究開発. シーエムシー出版 2017年2月 73-81.

学 校 名	関 西 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析 －ヒト化マウスによる免疫動態解析技術の樹立－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① ヒト化マウス ②ヒト免疫 ③疾患モデルマウス ④胸腺内分化			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
木 梨 達 雄	関西医科大学 医学部	教 授	研究の統括と推進

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 崎 和 一	関西医科大学 医学部	教 授	疾患モデルの確立と解析
藤 澤 順 一	関西医科大学 医学部	教 授	臍帯血移植によるヒト化マウスの作製
李 成 一	関西医科大学 医学部	准 教 授	ヒト化マウスの解析と改良

ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析 ーヒト化マウスによる免疫動態解析技術の樹立ー

1. 研究の目的

- (1) 免疫学はマウスを中心とした動物実験や培養細胞による実験系より知見を集積してきたが、医学研究に応用される際には種差に基づく差異が問題となってきた。ヒトを対象とした研究手法は倫理的側面から制限がありヒト特有の免疫現象を解明する手法の確立が待望されてきた。ヒト由来血球系幹細胞／前駆細胞を超免疫不全マウスに移植し生着させる「ヒト化マウス」は、*in vivo* 環境でヒト由来免疫系細胞の分化や動態が観察でき、ヒトの免疫を解明する有力なツールである。我々は、ヒト免疫細胞の抗原応答や免疫寛容の成立と維持およびその破綻における動態調節に着目し、ヒト化マウスの免疫学的解析および2光子顕微鏡を用いた組織イメージング解析系樹立を目標とした。
- (2) これまでの研究計画においてなされた免疫学的解析からヒト化マウスの胸腺成熟が抗原刺激で促進されること、組織イメージング等の解析からヒト由来である胸腺細胞と樹状細胞の相互作用が明らかになった。そこで、炎症・感染モデルを用いて以下の項目を検討する。
 - ①胸腺の選択過程や炎症部位へ集積に関与する動態制御分子の可視化し、その重要性を明らかにする。
 - ②免疫関連疾患モデルマウスにおけるイメージング手法を確立し、炎症細胞の動態、病態形成について検討する。

2. 研究の計画

- (1) 細胞動態、活性化を追跡するための蛍光蛋白質でラベルされたプローブを造血幹細胞に導入し、移植する。
 - ①文書による同意により無記名で提供されたヒト臍帯血よりCD133陽性細胞を単離し、超免疫不全マウス (NOGもしくはNSGマウス) の骨髄内に注入する。2カ月後以降、定期的に末梢血を採取し、ヒト由来細胞の生着を確認し、各種免疫細胞の出現状況をフローサイトメトリー法や蛍光免疫組織法にて解析する。免疫グロブリンをELISA法にて測定し抗原抗体反応に基づく抗体産生が行われているかを確認する。
 - ②レンチウイルスベクターを用いて蛍光タンパク感染導入する系を確立する。接着制御分子Rap1の活性化型を認識するプローブ(Rap affinity probe), 細胞内カルシウム検出プローブ(GCAMP3), 細胞増殖シグナルを検出するプローブ(NFATプローブ)をヒト臍帯血由来CD133陽性細胞に感染導入し、NOG(NSG)マウスに移植する。導入前にこれらの蛍光プローブを細胞株に導入し、*in vitro*で2光子顕微鏡による定量的イメージングを確認する。また*in vitro*培養法を検討し、ヒト由来血球系幹細胞／前駆細胞に蛍光タンパクを高効率で導入する感染・培養系を確立する。そして移植されるヒト由来血球系幹細胞／前駆細胞に蛍光タンパク質プローブ遺伝子を導入を確認した上で、NOG(NSG)マウスに移植する。NOG(NSG)マウスに移植後、胸腺の発達とヒトリンパ球の分化・成熟を調べ、胸腺内移動と選択との関連を追跡する。そのためヒト臍帯血由来造血幹細胞由来細胞のキメラ状態を確認後、胸腺組織を取り出し同時導入されたGFPマーカーを指標にexplantまたは組織スライス法にてヒト胸腺細胞の移動、樹状細胞の分布を2光子顕微鏡を用いて解析する。また、末梢リンパ組織(表在リンパ節、腸間リンパ組織)のイメージングを行い、各蛍光プローブによっての関与を抗体等を用いて動態制御の機構について抗原刺激等による変化をマウスと比較検討する。
- (2) 炎症・感染モデルの樹立とイメージング解析系樹立
 - ①炎症、感染モデルのイメージング系を確立する。

- 1) 炎症モデルとしてDSS大腸炎を用いる。大腸を2光子顕微鏡による生体イメージングを確立する。そのため、大腸を固定する装置を対物レンズに装着し、吸引による固定下でイメージングを行う。蠕動運動等の不随意運動が激しい場合は薬剤投与（アトロピン等）、アガロース固定等を試みる。DSS大腸炎はすでに確立されており、DSSを含む飲水を与え、3日から10日の間、排便の状態から炎症状態を推定し、イメージングを行う。
- 2) 感染モデルとしてHTLV-1による感染病態をイメージングにより観察する系を樹立する。HTLV-1感染後、定期的に脾臓の組織切片を作成し、リンパ球（T細胞、B細胞）の増殖を調べる。また、Tatに対するペプチド・アジュバントを投与した場合の効果について調べる。また平行して脾臓の2光子イメージング系を確立する。

3. 研究の成果

- (1) CD133陽性造血幹細胞を骨髄内骨髄移植による直接注入することによって最高で90%のヒト由来細胞生着率を認めた。生着率の向上は、作成個体数の限られるヒト化マウスの解析をすすめる上で非常な利点となった。ヒト由来T細胞が2~3カ月後から観察され、遅れてB細胞が出現した。これらを確認後、OVAペプチドとCFAを用いて免疫刺激を行った場合、リンパ節には胚中心様の組織像は認められなかったが、活性化Tリンパ球が瀰漫性に増殖していた。また、低形成であった胸腺は免疫刺激により増大する現象が再現よく観察された。機能的に髄質に相当するCD4またはCD8陽性胸腺細胞の集積が島状に分布していたが、免疫刺激後、髄質相当部位がとくに増大していることが確認できた。抗体産生をELISAで調べ、IgMが多く産生され、IgGは低値であるが増加していた。
- (2) 蛍光プローブの細胞内局在を2光子イメージングするため、蛍光蛋白質としてVenusを用いたRap affinity probe、カルシウムセンサーであるGCAMP3を293細胞に発現させてイメージングを行った結果、Rap affinity probeは細胞質に存在し、PMA刺激によって細胞膜に移行する過程が観察できた。GCAMP3はカルシウムイオノフォア処理で上昇した。NFATプローブは293細胞では核に移行することを確認した。次にレンチウイルスを効率よく造血幹細胞に導入する条件をVenusを発現するレンチウイルスを用いて検討した。その結果、CD133陽性細胞をレンチウイルス（MOI 100）およびサイトカイン（thrombopoietin, stem cell factor, Flt3 ligand）存在下で24時間培養後、移植した。2カ月後、出現したリンパ球の蛍光を、薄切した胸腺や脾臓の2光子顕微鏡での観察で確認した。Rap affinity probe, GCAMP3, NFATプローブを発現するレンチウイルスをCD133陽性細胞に感染導入後、NOG(NSG)マウスに移植した。今後、解析を進めていく予定である。
- (3) 大腸における炎症細胞の動態を可視化するための腸管固定を検討した。YFPマウスにDSS腸炎を誘発したうえで、吸引装置付きレンズを用いて2光子顕微鏡で生体観察した。麻酔下でマウスを開腹後、腸管を一部露出し、吸引装置のついた状態で観察を行った。その結果、腺構造や粘膜固有層の小血管などの組織構築、および血管内を免疫細胞（白血球）がローリングし、停止する様子が明確に観察できた。疾患モデルとして炎症性腸疾患のモデルであるDSS腸炎に着目した。ヒト化マウスにDSS溶液を飲水させ腸炎を誘発することを組織学的に確認しフローサイトメトリー法にてヒト由来CD4陽性T細胞が炎症の場に集積していることを見いだした。以上、疾患モデルとしてヒト化マウスのDSS腸炎、観察評価方法として蛍光遺伝子導入および2光子顕微鏡による腸管の生体観察が確立できた。今後、炎症状態でのデータ収集のみならず、抗インテグリン抗体などで免疫細胞移動を阻害し腸炎の治療となるか検証していく。

共同研究者である藤澤らはヒト化マウスにヒトにしか感染しえないHTLV-Iを感染させた感染モデルを確立している。HTLV-Iの増殖に重要なtaxのペプチドワクチンを作成しアジュバントとともに経鼻免疫しウイルス増殖の抑制となるかを検討した。ワクチンを投与した感染ヒト化

マウスは致死率が下がりワクチンによるウイルス感染細胞増殖の抑制効果が証明された。感染マウスの脾臓の組織では感染のターゲットとなるCD4陽性T細胞が著増しており、アジュバントがTh1誘導の場合にはCD8陽性T細胞が、Th2誘導ならB細胞が増加していることが観察された。これはHTLV-I感染に続発する成人T細胞白血病(ATL)の治療モデルとなりうるとともに、ヒト化マウスの抗ウイルス免疫が生理的な状態と同様に働いている傍証でもある。

4. 研究の反省・考察

- (1) 本年度の成果として、ヒト胸腺細胞の成熟過程を可視化する方法としてレンチウイルスによる蛍光蛋白質導入により、ヒト胸腺細胞の胸腺内移動や樹状細胞との相互作用を2光子イメージング等を用いて詳細に調べることができる見通しとなった。また、炎症・感染モデルとしてDSS腸炎、HTLV-1感染のイメージングに向けての準備は進んだ。しかし、移植から観察まで3か月から5か月程度経なくてはならず、当初予定したすべての実験の結果を出すことができなかった。今後継続して行っていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Kondo N, Ueda Y, Kita T, Ozawa M, Tomiyaama T, Yasuda K, Lim DS, Kinashi T. NDR1-dependent regulation of kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization. *Mol Cell Biol*. 2017 Jan 30. pii: MCB.00424-16. doi: 10.1128/MCB.00424-16. [Epub ahead of print]
- ② Ueda Y, Kondo N, Ozawa M, Yasuda K, Tomiyaama T, Kinashi T, Sema3e/Plexin D1 Modulates Immunological Synapse and Migration of Thymocytes by Rap1 Inhibition. *J Immunol*. 196(7):3019-31.2016
- ③ Iida T, Saito K, Katagiri K, Kinashi T, Ohta Y. The RacGAP protein FilGAP is a negative regulator of chemokine-promoted lymphocyte migration. *FEBS Lett*. 2016 May;590(10):1395-1408. doi: 10.1002/1873-3468.12189. Epub 2016 May 11.
- ④ Katakai T, Kinashi T Microenvironmental Control of High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node. *Front Immunol*. 2016 May 13;7:194. doi: 10.3389/fimmu.2016.00194. eCollection 2016.

(2) 口頭発表

- ① Kondo N, Ueda Y, Kinashi T, High-affinity LFA-1/ICAM-1 binding triggers the reorganization of vesicular transport regulators to facilitate the maturation of immunological synapse. (1P-0317) The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2016. 11.30-12.2 Yokohama
- ② Ueda Y, Kondo N, Kinashi T, Rap1-deficiency caused defective lymph node homing of lymphocytes and thymocyte-selection.(3-E-W31-11-O/P) The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2016. 12.5-7 Okinawa

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	ペプチド前駆体POMCより生成される新規活性ペプチドの探索 －新規な活性化機構によるペプチドの産生調節－		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①ペプチド ②プロテアーゼ ③基質特異性 ④皮膚 ⑤プロセッシング		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 本 博 之	薬 学 部	講 師	研究総括および発現タンパク質の探索

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 橋 栄 造	薬 学 部	平成29年3月 31 日 退 職	探索試料の調整ならびに評価
井 口 和 明	静 岡 県 立 大 学 薬 学 部	講 師	ペプチド基質合成研究

ペプチド前駆体POMCより生成される新規活性ペプチドの探索 — 新規な活性化機構によるペプチドの産生調節 —

1. 研究の目的

(1) 背景

ペプチドホルモンは小胞体で前駆体が産生された後、ゴルジ体・分泌顆粒中でプロセッシングを受け、活性を有する成熟体に変換されて分泌される。このようなペプチドホルモンの成熟機構は、インスリンや α -MSHの前駆体であるプロオピオメラノコルチン (pro-opiomelanocortin, POMC) をモデルとして、詳細な解析がなされてきた。我々は、皮膚で生成されるPOMCが、細胞内で活性化する古典的な活性化機構で α -MSHを産生するのではなく、角化細胞から分泌されたPOMCが細胞外で酵素により切断を受けて α -MSH(1-8)に活性化する「細胞外活性化機構」の存在を明らかにしている。また、POMCは下垂体において、古典的な活性化経路により、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) や β -エンドルフィンなどの複数の活性ペプチドを生成するが、POMCが細胞外で活性化される機構では、従来の古典的経路とはまったく異なるペプチド断片が生成されることが予想されるが、細胞外プロセッシングによりPOMCから生成される生理活性ペプチドについては未だ明らかになっていない。また、生体内において、プロテアーゼは酵素や生理活性因子を特異的な部位で切断することにより、時間的・空間的な活性調節を担っており、生体内でいつ、どこで、どのような基質特異性を持ったプロテアーゼが発現しているのかを評価することは、生体の機能調節機構を理解するのに重要である。しかしながら、基質特異性の網羅的な解析は、ペプチドマイクロアレイ法やプロテオームスケールの解析が一般的であるが、1回の測定が高価であることや共雑物の多い試料を用いた際の精度などに問題点がある。

(2) 目的

本研究では、神経ペプチドの細胞外活性化機構に関わるプロテアーゼを明らかにすることを目的とし、紫外線曝露時に皮膚で発現するプロテアーゼの探索を実施するために以下の方法にて検討する。

- ① プロテアーゼの基質特異性のハイスループットスクリーニング系の構築
- ② DNAマイクロアレイを用い、紫外線曝露後に発現が変化するプロテアーゼと生理活性因子の探索

2. 研究の計画

(1) MALDI-TOF質量分析計を用いた、酵素特異性のハイスループットスクリーニング系の構築

基質特異性の決定にはペプチド性基質を用いた。ペプチド基質は、プロテアーゼにより切断されるとビオチンを有するN端断片とC端断片を生成する。N端配列は、アミノ酸Xを除く配列が同一の構造を有しており、切断部位のアミノ酸Xの分子量の違いにより酵素の切断特異性を評価することができる。また、同じ分子量を持つロイシンとイソロイシンの評価を可能とするためにイソロイシンのグリシンスペーサーの数を定めることで判別を可能とした。プロテアーゼの基質特異性の決定法を図1示した。すなわち、合成基質をプロテアーゼにより消化した後、消化したビオチン標識ペプチドは、ストレプトアビジン-セファロースを用いてアフィニティ精製を行った。精製したビオチン標識ペプチドは、MALDI-TOF質量分析により解析しプロテアーゼにより消化されたペプチド断片を探索した。

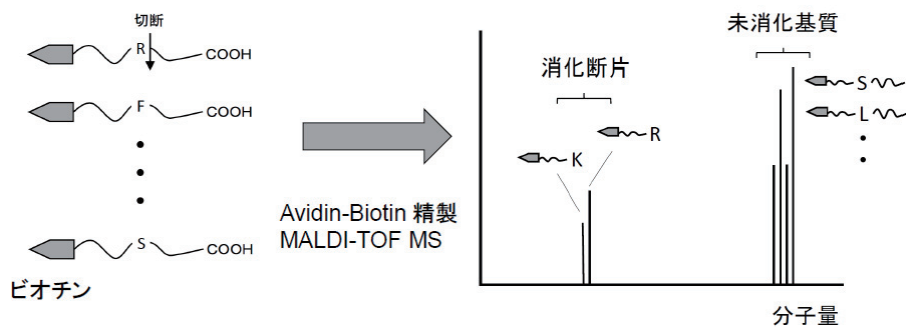


図1

(2) DNAマイクロアレイを用いた発現酵素および生理活性ペプチドの探索

ラット胎児由来皮膚角化細胞FRSKを用いて実験を行った。FRSK細胞はUVB領域の波紫外線で曝露した後、6時間培養したのちトータルRNAを抽出・精製した。調整した試料はDNAマイクロアレイにより遺伝子の発現変動を解析した。また、発現変動の認められた遺伝子を定量RT-PCR法により評価した。

3. 研究の成果

(1) プロテアーゼの基質特異性決定法の構築

① モデルプロテアーゼによる検討

合成基質により基質特異性の決定が可能であるかを、TPCK-トリプシンおよびV8プロテアーゼ、エラスターゼを用いて評価した。その結果、トリプシンでは、リジンおよびアルギニンのC端部位で切断を受けて生成した断片が検出された。また、V8プロテアーゼでは、グルタミン酸およびアスパラギン酸のC端部位で切断を受けて生成した断片が検出された。エラスターゼではアラニンとバリンのC末端で切断された断片が検出された。いずれもプロテアーゼの基質特異性と一致していた。一方、いずれのプロテアーゼもあらかじめ95℃で10分間加熱して失活させることにより、切断断片は検出されなかった。さらに、臭化シアンを用いた化学的な切断においても、メチオニンのC末端部位で切断されたペプチド断片が検出された。以上の結果から、本決定法はプロテアーゼの基質特異性の決定が可能であることが示された。

② 組織中プロテアーゼによる検討

S180サルコーマをICRマウスの皮下に移植して作製した腫瘍組織中のプロテアーゼの基質特異性について評価した。その結果、リジン、チロシンおよびフェニルアラニンのC端部位で切断を受けて生成する断片が検出され、腫瘍組織中にトリプシン様活性およびキモトリプシン様活性を有するプロテアーゼの存在が示唆された。また、腫瘍組織抽出物を沸騰水浴中でプロテアーゼを失活させると消化断片は検出されなかった。以上の結果より、我々が考案したプロテアーゼの基質特異性決定法は、未精製の試料においてもプロテアーゼの基質特異性を決定することができた。

(2) DNAマイクロアレイを用いた発現酵素および生理活性ペプチドの探索

紫外線で曝露したFRSK細胞を6時間培養した後、トータルRNAを抽出・精製した後、発現変動が見られる遺伝子の探索をDNAマイクロアレイにより行なった。その結果、発現変動が見られた酵素が3分子、生理活性因子では5分子同定された。発現変動の認められた一部の遺伝子について定量RT-PCR法により評価を行い、DNAマイクロアレイの結果を確認することができた。

4. 研究の反省・考察

(1) 研究の反省と考察

本研究では、神経ペプチドの細胞外活性化機構に関わるプロテアーゼの探索を試みた。組織

中にはさまざまなタンパク質やその消化断片が存在することから、抽出物を用いて簡便な手法でプロテアーゼの基質特異性を決定できる手法の構築を行なった。我々が考案した、ビオチン標識ペプチドを用いた系は、非常に簡便で高感度にプロテアーゼの基質特異性を評価することができた。今後は、POMCの細胞外活性化が確認できている皮膚組織を用いて、組織中のプロテアーゼの基質特異性の検討を進めている。本系は未精製の抽出物においても簡便に実施できる有用な方法であるが、酵素活性の定量性までは評価できていない。簡便さは失われるものの高速液体クロマトグラフィー質量分析法と組み合わせることにより定量性まで評価できるものと考えられ、今後の検討課題と思われる。また、本系では基質特異性は明らかになるが、プロテアーゼの同定までは行なうことができない。今後は組織に発現するプロテアーゼの同定にも着目した基質ペプチドの合成が必要である。一方、本研究で実施したDNAマイクロアレイは、基質特異性は明らかにすることはできないが、紫外線の曝露により発現が亢進したプロテアーゼを見出すことができた。今後は、発現亢進が認められた酵素や基質特異性の解析結果からPOMCをはじめとする神経ペプチド前駆体の切断部位を推定し、予想されるペプチドの生理活性の評価を実施する予定である。

(2) 研究経過

当初の計画よりも進み、DNAマイクロアレイを用いて発現酵素や生理活性因子の探索まで実施することができた。引き続き、新しく見出された生理活性ペプチドについても活性化のメカニズムの検討を進め、神経ペプチドの細胞外活性化機構が、皮膚組織が持つ中枢を介さない独立した活性調節機構であることを明らかにしたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Hiroyuki Yamamoto, Syota Saito, Yoshikazu Sawaguchi, Michio Kimura, Identification of protease specificity using biotin-labeled substrates, The Open Biochemistry Journal. 11, 27-35, (2017)

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	福 岡 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ゲノム編集を活用した新たながん治療標的分子の探索・同定 -HB-EGF発現に関与する分子群の解析-		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①がん治療 ②標的分子 ③創薬開発 ④HB-EGF ⑤コンパニオン診断薬			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
宮 本 新 吾	医学部産婦人科学教室	教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
四 元 房 典	医学部産婦人科学教室	講 師	実験・論文作成
漆 山 大 知	医学部産婦人科学教室	大 学 院 生	実験・データ整理
深 川 怜 史	医学部産婦人科学教室	大 学 院 生	実験・データ整理
清 島 千 尋	医学部産婦人科学教室	大 学 院 生	実験・データ整理

ゲノム編集を活用した新たながん治療標的分子の探索・同定 —HB-EGF発現に関与する分子群の解析—

1. 研究の目的

本研究の目的は、造腫瘍能のない卵巣癌、乳癌、胃癌のがん前駆細胞を用いて、種々の遺伝子発現ライブラリーを導入し、HB-EGFの発現亢進にともない造腫瘍能の獲得に寄与する分子群を探索・同定する。HB-EGFは上皮系増殖因子ファミリーに属する細胞増殖因子であり、近年、申請者らはHB-EGFが卵巣癌・乳癌・胃癌などの悪性腫瘍の治療の標的分子であること明らかにしている。これまでの研究成果より、血中HB-EGF値や組織中HB-EGF発現量が高い症例が予後が不良であり、HB-EGF特異的阻害剤(BK-UM)投与により血中や組織中のHB-EGF発現が抑制されることは、申請者らにより明らかにされている。本研究の成果による治療診断検査法の開発とBK-UM創薬開発を併行して成果をあげることで、臨床的予後の改善と医療費の削減を同時に目指した医療イノベーションを達成でき、さらなる創薬開発が進むことが期待できる。

- ① 代表的な癌抑制遺伝子p53およびBRCAを欠失させた細胞株を用いて、遺伝子発現ウイルスベクターライブラリーによる癌・増殖に関わる遺伝子を同定する。また、HB-EGFの発現に寄与する遺伝子の同定のため、HB-EGFの3'UTR側にIRES配列に続くGFP遺伝子配列を挿入し、HB-EGFとGFPの発現が相関する細胞に遺伝子発現ウイルスベクターライブラリーを感染させ、HB-EGFの発現を制御する遺伝子を同定する。
- ② HB-EGF特異的阻害剤であるBK-UMの医師主導型臨床試験において、HB-EGF値を臨床試験参加の基準のひとつとして参加症例の選別していた。その場合、患者血清をELISA法によりHB-EGF値を測定し、高値症例にはBK-UMの効果が期待できると期待していた。しかし、ELISA法による測定では遊離したHB-EGFを測定していない可能性があり、測定方法を見直す必要があった。また、BK-UM投与症例のなかに、HB-EGFが低いにも関わらずBK-UMが効果があるなどの問題点があった。以上より、HB-EGF以外または併用でのコンパニオン診断薬の開発が必要であった。

一方でnon-codingRNAといわれるmicroRNAは近年の研究により、癌の増殖、転移に関わることが多数報告されている。さらに、RNAのため血液中では容易に壊れてしまうと考えられていたが、エクソソームに内包されることで、血液中においても安定し存在することが報告された。そこで、我々はmicroRNAに着目しコンパニオン診断薬の開発を開始した。BK-UMの臨床試験参加症例や卵巣癌患者、正常卵巣患者、良性卵巣腫瘍患者の血液を対象にマイクロアレイ解析を実施し、HB-EGFの発現に関わるmicroRNAを検索するとともに、BK-UMのコンパニオン診断薬を開発する。

2. 研究の計画

- ① HEK293細胞を用いて、HB-EGF3' UTR側にIRESに続くGFP遺伝子配列を挿入させた細胞を樹立する。樹立したレポーター細胞を用いて、HB-EGFの発現に寄与する遺伝子をshRNAライブラリーおよびcDNAライブラリーを併用することで、スクリーニングする。同様の検討をがん細胞株、正常乳腺および正常卵巣上皮より樹立した細胞株を用いて試みる。さらに、3種類の乳がん細胞株を用いて、二次元培養サンプルとマウスの皮下に移植したxenograft modelを作製し、CGHアレイを行う。
- ② 臨床試験の参加症例や卵巣癌、良性卵巣腫瘍患者の血清をマイクロアレイ解析する。検出されたmicroRNAを検討し、BK-UMの効果が期待できる症例を診断するmicroRNAを同定して

いる。さらに、HB-EGFとともに変動するmicroRNAを同定し、卵巣癌患者血清を用いて real-time PCR法で臨床的意義を検証していく。

3. 研究の成果

- ① CGHアレイによるスクリーニングやウィルスベクターライブラリーを用いたHB-EGFの制御に関わる遺伝子の探索を行った結果、Y-14 protein(RNA binding motif 8A)を含む3つの遺伝子を同定した。さらに、リポフェクション法によるsiRNAの導入でそれらの遺伝子を抑制すると、HB-EGFを含むEGFR ligandの発現が抑制された。なかでもY-14が最も抑制される結果となった。また、RBM8aを安定し過剰発現または抑制した細胞株をマウスに皮下移植したxenograft modelによる腫瘍増殖能の検討では、Y-14の抑制では腫瘍増殖が抑制され、Y-14の過剰発現では腫瘍増殖が亢進した。卵巣癌患者の血清を対象に、Y14の発現量を比較検討した結果、Y14は6ヶ月以内に再発した予後不良患者で有意に発現が上昇していた。
- ② マイクロアレイ解析の結果、予後不良な卵巣癌患者で優位に発現が上昇するmicroRNA、低下するmicroRNAを同定した。さらに、それらのmicroRNAを用いてRT-PCR法で臨床的意義を確認したところ、卵巣癌患者の予後不良群で優位に発現が上昇しバイオマーカーとなりうる3つのmicroRNAを同定した。さらに3つのmicroRNAを用いて、正常卵巣や良性卵巣腫瘍患者および卵巣癌患者の血液を対象にRT-PCR法で発現解析を行った結果、卵巣癌患者で優位に高く、さらに治療後6ヶ月以内に再発した予後不良症例で優位に発現が上昇するmicroRNAを同定した。
さらに、HB-EGFが高く予後不良で有意に発現が上昇する4つのmiRNA、HB-EGFが高く予後良好な卵巣癌患者血液で有意に発現が低下する5つのmiRNAを同定した。これら9つのmiRNAのプラスミドベクターを作製し、卵巣癌細胞株に遺伝子導入し腫瘍増殖抑制効果等を比較検討している。

4. 研究の反省・考察

- ① Y-14はヒトでは、RNA binding motif 8Aとよばれ、mRNAのスプライシングや輸送、翻訳や調節に関わるエクソジャンクソン複合体の一つである。MAGOH、PYMなどの分子との相互作用により翻訳調節を行うことがわかっている。今回の研究では、Y-14はHB-EGFの発現を調節することを証明した。さらに、HB-EGF発現の低下において、転写後発現調節機構が関与しているかを検討するため、RBM8Aをノックダウンした細胞により得られたRNAで、HB-EGFの全長を増幅させるようなRT-PCRを行った。その結果、RBM8Aをノックダウンした細胞で、全長のPCR産物は減少し、短いフラグメントが増幅され、スプライシング異常が起きていることが判明した。
- ② microRNAの機能の特性として、ひとつの遺伝子を制御するために複数のmicroRNAが関連すると考えられている。反対に複数の標的遺伝子は複数のmicroRNAに制御されている。今回の解析で同定されたmicroRNAは1種類であり、さらに解析を進めることでコンパニオン診断薬の候補として数種類のmicroRNAを同定する必要がある。そのためには、マイクロアレイ解析の結果を再検討し、候補microRNAを検出し、RT-PCR法での臨床的意義の確認を行う必要がある。さらには、同定されたmicroRNAを用いて、卵巣癌細胞株へ遺伝子導入し細胞増殖試験や薬物感受性試験などを行っていく予定である。さらにそれらのmicroRNAを安定的に過剰発現した細胞株をウィルスベクターを用いて作成する。その細胞をマウスの皮下に移植し、xenograft modelでの腫瘍増殖能の検討などを行う必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

BK-UM in patients with recurrent ovarian cancer or peritoneal cancer: a first-in-human phase-I study.

Miyamoto S, Yotsumoto F, Ueda T, Fukami T, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Fukagawa S, Katsuta T, Maehara M, Kondo H, Miyahara D, Shirota K, Yoshizato T, Kuroki M, Nishikawa H, Saku K, Tsuboi Y, Ishitsuka K, Takamatsu Y, Tamura K, Matsunaga A, Hachisuga T, Nishino S, Odawara T, Maeda K, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Ohishi M, Hikita T, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E: BMC Cancer , 17(1), 2017, 89, DOI 10.1186/s12885-017-3071-5, 2017.

(2) 口頭発表

① 「Identification of microRNA as a biomarker in primary ovarian cancer」 深川 怜史
第68回日本産科婦人科学会学術講演会 平成28年4月21日 東京

② 「HB-EGF (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor) に関連した卵巣癌予後予測」 清島 千尋
第68回日本産科婦人科学会学術講演会 平成28年4月21日 東京

③ 「卵巣癌の予後予測因子としての microRNA-135a」 深川 怜史
第15回日本婦人科がん分子標的研究会 平成28年8月19日 札幌

④ 「Screening of microRNA associated with HB-EGF as a biomarker of ovarian cancer prognosis」
清島 千尋
第75回日本癌学会 学術総会 平成28年10月6日 横浜

⑤ 「Identification of microRNA as a biomarker of ovarian cancer prognosis」 深川 怜史
第75回日本癌学会 学術総会 平成28年10月6日 横浜

⑥ 「HB-EGF特異的阻害剤(BK-UM)の静脈内投与による有効性の検討」 深川 怜史
第20回バイオ治療法研究会学術集会 平成28年12月10日 福岡

「翻訳調節分子によるHB-EGFとがん増殖能の制御」 宮田 康平

第14回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 平成27年7月17日 松本

(3) 出版物

なし

学 校 名	福 岡 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークの 解明 －真菌感染症の新しい予防法と治療法の開発－		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①口腔細菌学 ②微生物学 ③歯学 ④免疫 ⑤感染 ⑥炎症 ⑦細胞分化 ⑧シグナル伝達		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 芳 彦	口 腔 歯 学 部	教 授	総括、主な研究の遂行

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
長 環	口 腔 歯 学 部	准 教 授	真菌を用いた実験

口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークの解明 — 真菌感染症の新しい予防法と治療法の開発 —

1. 研究の目的

口腔真菌感染症は、カンジダ菌などの口腔内常在菌が原因で発症する難治性の口腔感染症である。その病態には免疫応答が関与しているが、その制御機構については未だに解明されていない。高齢化が進む中で、義歯の使用と相まって患者数が増加傾向にある。再発を繰り返す抗真菌薬療法には限界があるために新しい予防法と治療法の開発が待たれているが、真菌に特異的な免疫応答を誘導する治療法の開発は進んでいない。

Candida albicans (*C. albicans*)は、口腔真菌感染症の病原菌として最も頻度が高く、その病原因子や生体防御との関係が特に研究されており、獲得免疫系が疾患と深く関与していることが知られている。なかでもインターロイキン-17 (IL-17) 産生を特徴とするヘルパーT細胞Th17が口腔真菌感染症において重要な役割をはたしており、Th17細胞欠損マウスでは口腔真菌感染症が重篤化する。真菌そのものがヘルパーT細胞を分化させる抗原と示唆されているが、T細胞受容体を介した真菌の抗原性に着目してTh17細胞の分化や遊走への影響を包括的に解析した報告は認められない。また、これらのTh17細胞の生体内における主たる分化の「場」が、小腸であることが明らかにされてきたことにより、口腔真菌感染症の研究は口腔から全身を対象とした解析へ移行するパラダイムの転換の必要性が生じてきたと考えられる。

本研究は、病原微生物と宿主免疫応答の両側面からのアプローチによって、研究代表者がこれまで明らかにしてきた免疫系細胞の分化と遊走到に焦点をあて、口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークを解明するとともに、抗原特異的なT細胞エピトープを同定することで、口腔真菌感染症を選択的にターゲットとする新しい予防法と治療法の開発へ向けた分子基盤を確立することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) ヘルパーT細胞の分化と遊走を司る真菌のT細胞エピトープの同定

- ① 網羅的解析によるカンジダ菌のT細胞エピトープの同定：前年度までの成果である候補抗原に対して二次元SDS-PAGEを用いて複数の特異的なスポットが得られており、これらのスポットに対してプロテオミクス解析を行う。プロテオミクス解析は共同研究拠点である九州大学生体防御医学研究所 プロテオミクスセンターの支援を受ける。候補抗原の遺伝子を単離し、タンパク質抗原を作製した後、真菌反応性T細胞の実験系にて候補タンパク質を絞り込む。
- ② 真菌のT細胞抗原を認識するT細胞クローンの樹立：前年度に得られた真菌のT細胞抗原を用いて、抗原を特異的に認識するT細胞クローンの樹立を行う。具体的には、BM-mDCを抗原提示細胞として用いて真菌T細胞抗原を抗原提示させる。これによって、真菌抗原を投与した野生型マウスから単離したCD4⁺T細胞を刺激して増殖を誘導する。複数回抗原刺激を繰り返しながら、限界希釈法によって抗原を特異的に認識するT細胞クローンを樹立する。

(2) 全身における免疫細胞の分化と遊走の解析

- ① 腸管における真菌反応性ヘルパーT細胞の解析：胃ゾンデを用いてマウスの腸管に真菌を直接投与した後、マウスからヘルパーT細胞を単離して、真菌抗原への反応するヘルパーT細胞をFlowcytometryで解析する。その際に腸間膜リンパ節や末梢リンパ節といったマウスの各種2次リンパ組織からヘルパーT細胞を単離して、真菌反応性T細胞の解析を行う。
- ② 真菌反応性ヘルパーT細胞の生体内での分布と局所への遊走の解析：光照射で色が変わるマウスの細胞や臓器を用いて蛍光特性を測定する。具体的には、マウスから単離したヘルパーT細胞での蛍光特性について時間的な解析を行う。また、マウスの腸間膜リンパ節に光照射して、照射直後と24時間後の各種2次リンパ組織における色の变化を解析する。

(3) 分化と遊走を制御している細胞内シグナル経路の同定と機能解析

- ① T細胞に発現する遺伝子ノックダウンの実験系の構築：マウスからT細胞を単離して、アンチセンスオリゴを遺伝子導入装置で細胞内に導入する実験系を構築する。
- ② Th17細胞における免疫系GEFの発現レベルの比較検討：真菌をマウスに感染させて生体内で真菌反応性T細胞を誘導しておき、マウスからヘルパーT細胞を単離した後、再刺激してTh17細胞を分離する。一方、未感染マウスからナイーブT細胞を単離して比較対照群として、これらの細胞において発現する遺伝子プロファイルをマイクロアレイ解析する。

3. 研究の成果

- (1) ヘルパーT細胞の分化と遊走を司る真菌のT細胞エピトープの同定
 - ① 網羅的解析によるカンジダ菌のT細胞エピトープの同定：ヘルパーT細胞の分化能についてIL-17産生を指標として評価した。具体的には、骨髄細胞由来樹状細胞(BM-mDC)を抗原提示細胞とし、抗原として全ゲノムシーケンスが判明している真菌*C. albicans* SC5314株を用いて、IL-17-GFPレポーターマウスから単離したナイーブT細胞をin vitroで分化誘導させて検証した。候補抗原に対して二次元SDS-PAGEを用いて得られた複数の特異的なスポットがあることが確認され、これらのスポットに対してプロテオミクス解析を進めた。これらの成果は、平成28年8月歯科基礎医学会（札幌）にて共同研究者とともに2演題「口腔カンジダ症を制御するT細胞応答の誘導」「*Candida albicans*由来CD4⁺T細胞分化誘導画分の解析」として特に発表した。候補抗原となった複数の遺伝子を単離した。発現ベクターを構築し、タンパク質抗原を作製した後、真菌反応性T細胞の実験系にて候補タンパク質の絞り込みを行った。
 - ② 真菌のT細胞抗原を認識するT細胞クローンの樹立：前年度に得られた真菌のT細胞抗原を用いて、抗原を特異的に認識するT細胞クローンの樹立を試みた。真菌T細胞抗原を抗原提示させたBM-mDCを用いて、真菌抗原を投与した野生型マウスから単離したCD4⁺T細胞を刺激して増殖を誘導し、限界希釈法によって抗原を特異的に認識するT細胞クローンの樹立に成功した。樹立したT細胞クローンを超低温凍結保存するなどして、本年度の本資金で購入した超低温フリーザーを有効に活用している。
- (2) 全身における免疫細胞の分化と遊走の解析
 - ① 腸管における真菌反応性ヘルパーT細胞の解析：真菌を胃ゾンデにてマウスの腸管に投与後、マウスからヘルパーT細胞を単離して、真菌抗原への反応性を解析した。真菌反応性ヘルパーT細胞が腸間膜リンパ節や末梢リンパ節に存在することが明らかになった。
 - ② 真菌反応性ヘルパーT細胞の生体内での分布と局所への遊走の解析：光照射で色が変わるマウスを用いて実験を行った。マウスの腸間膜リンパ節に光照射をしたところ、照射直後はほぼ100%の細胞で色が変化しており、遠隔リンパ節には色が変化した細胞がないことを確認した。24時間後には腸間膜リンパ節では10%程度まで減少しており、遠隔リンパ節では色が変化した細胞が1%未満存在する結果が得られた。
- (3) 分化と遊走を制御している細胞内シグナル経路の同定と機能解析
 - ① T細胞に発現する遺伝子ノックダウンの実験系の構築：本年度の本資金で購入した超純水製造機と遺伝子導入装置を有効に活用し、超純水グレードのアンチセンスオリゴを遺伝子導入装置で細胞内に導入する実験系を構築した。
 - ② Th17細胞における免疫系GEFの発現レベルの比較検討：真菌感染マウスから単離したTh17細胞ならびに未感染マウスから単離したナイーブT細胞において発現する遺伝子プロファイルをマイクロアレイ解析した。また、本年度の本資金で購入したPCR装置を有効に活用して、マウス遺伝子を増幅して解析を進めている。

4. 研究の反省・考察

口腔真菌感染症は常在菌が原因となって発症する疾患であり、宿主の免疫状態に依存して起こる日和見感染症として知られている。しかしながら、抗原特異的なT細胞の解析、特にT細胞受

容体を介して認識する真菌特異的な抗原部位についての解析は国内外を問わず進んでおらず、Th17細胞を誘導するT細胞エピトープは未だに明らかになっていない。近年、Th17細胞に関する知見が集積しており、例えば、歯周病などではTh17細胞そのものが増悪因子となるため、口腔真菌感染症に対するワクチンの開発において、抗原と無関係に単にTh17細胞の免疫応答を誘導するだけでは不十分である。そのため、T細胞受容体を介した真菌特異的な抗原部位の同定は不可欠であると言える。本研究では、我々が取り組んできた「宿主免疫応答」と「病原微生物*C. albicans*」の両側面からのアプローチにより、Th17細胞を誘導する真菌特異的な抗原部位の同定を進めており、プロテオミクス解析を行うことで候補となる抗原を特定しつつある。本研究によって得られた研究成果により病原微生物を選択的にターゲットとする口腔真菌感染症の予防法と治療法の開発へ向けた分子基盤を確立することを目指していく。

口腔感染症は口腔内局所に限局された疾患としてとらえられることが多く、実際、*in vitro*ならびに口腔内局所に限局された解析によって進められてきたが、歯科口腔領域の疾患を全身の健康と密接に関連した疾患としてとらえる「口腔医学」という概念でとらえる必要がある。本研究の研究成果をあげることで、「口腔医学」という新しい領域の発展を目指して、今後の研究を進めていく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Nagao, J., Cho, T., Mitarai, M., Iohara, K., Hayama, K., Abe, S. and Tanaka, Y. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of a salmon protamine peptide and its derived cyclic peptide against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 17: fow099, 2017. DOI: 10.1093/femsyr/fow099.

(2) 口頭発表

① Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Narita, Y., Hashimoto, M., Ikezaki, S., Yasumatsu, K., Arita (Morioka), K., Kojima, H., Tanaka, Y. Investigation of the mechanism of T cell response in oral candidiasis. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Okinawa, Dec. 5-7th (7th), 2016.

② 田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦。口腔カンジダ症を制御する免疫制御機構の解明。第23回日本歯科医学会総会、福岡、10月21-23日(23日)、2016。

③ 池崎晶二郎、長環、田崎園子、橋本麻利江、成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、田中芳彦。Mild heat stress 条件下における*Candida albicans*の遺伝子発現と細胞応答。第58回日本医真菌学会総会・学術集会、東京、10月1-2日(2日)、2016。

④ 田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦。*Candida albicans*に対するT細胞応答を誘導する表層抗原探索。第58回日本医真菌学会総会・学術集会、東京、10月1-2日(2日)、2016。

⑤ 田崎園子、長環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦。口腔カンジダ症を制御するT細胞応答の誘導。第58回歯科基礎医学会学術大会・総会、札幌、8月24-26日(25日)、2016。

⑥ 池崎晶二郎、長環、田崎園子、橋本麻利江、成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、池邊哲郎、田中芳彦。*Candida albicans*のバイオフィルム形成におけるmild heat stress の影響。第58回歯科基礎医学会学術大会・総会、札幌、8月24-26日(25日)、2016。

⑦ 長環、田崎園子、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、田中芳彦。*Candida albicans*由来CD4⁺T細胞分化誘導画分の解析。第58回歯科基礎医学会学術大会・総会、札幌、8月24-26日(26日)、2016。

(3) 出版物

なし

学 校 名	尚 綱 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキスの評価		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 歯周病菌			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
狩 生 徹	生 活 科 学 部	准 教 授	研究代表者 研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
今 村 隆 寿	熊 本 大 学 医 学 部	准 教 授	実験全般
本 田 智 巳	生 活 科 学 部	助 手	実験全般 データ解析

新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキスの評価

1. 研究の目的

(1)

- ①歯周病は、歯肉炎や歯周炎などの慢性疾患の総称であり、う蝕と並ぶ2大口腔内疾患の一つである。近年、歯周病が冠動脈性心疾患や脳梗塞、メタボリックシンドローム、誤嚥性肺炎、骨粗鬆症、早産・低体重児出産などの様々な全身性疾患を誘発することが明らかとなってきた。重度の歯槽膿漏の場合にはペニシリン系、セファム系抗菌薬が経口投与されるが、耐性菌の出現と副作用の問題点から、慎重な選択が必要とされる。歯周病の発症・進行に関わる主要な病原性細菌は、グラム陰性偏性嫌気性菌のPorphyromonas gingivalis (ジンジバリス菌)である。ジンジバリス菌は外界のタンパク質分解・アミノ酸取り込みによりエネルギーを獲得する。そのため、ジンジパインと呼ばれる強力なシステインプロテアーゼを菌体表面や菌体外に分泌する。ジンジパインは、菌の増殖のみならず、補体系、血液凝固系、サイトカインなどの血漿タンパク質の分解や細胞傷害により全身疾患を誘発する病原因子でもある。そのため、ジンジパインインヒビターの解析は、ジンジバリス菌が引き起こす全身疾患への治療薬開発に重要な基礎知見と成り得る。
- ②我々の研究グループでは、良く知られるカテキンやケルセチンの様なフラボノイドと共に、生薬の一つであるイカリソウエキスが含有するプレニル基含有フラボノイド (プレニル化フラボノイド) のジンジバリス菌抑制活性を解析したところ、プレニル基を持たないフラボノイドに比べて制菌活性が増強される傾向が確認出来た。これらの結果から、ジンジバリス菌抑制へのプレニル化フラボノイドの有用性を確認し、これらの成果はJ. of Periodontal Research誌に掲載された。
- ③ジンジバリス菌制菌剤としてのジンジパイン活性阻害剤の探索・開発は現在でも国内外の複数の研究グループが取り組んでいる。しかしながら、口腔内での安定性や口腔内皮細胞への毒性、呈味性(薬剤の苦味)、抗原性等が問題となる。一般的なシステインプロテアーゼ阻害剤であるE-64やロイペプチン等は、安定性が低く、酵素特異性が低いことなどから人体への応用は困難である。プレニル化フラボノイドが長い食経験が有る植物性食品や生薬に存在する安定な成分であることは、製品化への有利な点である。
オーラルケア関連製品は、国内市場は1,292億円に達し、堅調に拡大している。その一方で、通常の医薬品に比べ販売価格の安い歯磨き粉やマウスウォッシュ等へ医薬部外品メーカーが投資出来る開発費用は低く抑えられており、新規化合物の認可申請にメーカーは慎重である。その点において、安価で製造可能かつ認可を受けやすいプレニル化フラボノイドは、他社製品と機能性で差別化を図りたいオーラルケア製品メーカーのニーズに適している。以上のことから、本研究によって新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキスの有効性を確立することは、歯周病とその関連疾患への対策に極めて大きな貢献となる。
- ④本研究では、イカリソウエキスが口腔内局所でのジンジバリス菌増殖のみならず、歯周病が誘発する全身性疾患の抑制における有効性評価を目的とし、まずジンジバリス菌液体培地培養及びバイオフィルム形成阻害アッセイ系の確立を目指す。
- ⑤ジンジバリス菌の主要な病原因子でもあるシステインプロテアーゼ類(Rgp及びKgp)とそれらを含む菌体外微小包(MV)の迅速な調整法を確立し、ジンジバリス菌が誘発する血液循環系への障害に関しての抑制効果を確認することにより新規歯周病治療薬としてのイカリソウエキス有効性を評価する。

2. 研究の計画

(1)

- ①ジンジバリス菌は、偏性嫌気性菌であるため、通常嫌気チャンバーや脱酸素剤を用いたシステムでの培養が必要となる。また菌株によるジンジパイン産生量の違いも考慮に入れなが

ら各アッセイに必要なStrainの選択や培養が重要となる。ヘミン及びメナジオン含有eTSBやBHI等の既成の培養液を用いながら、ジンジパイン高発現Strainのコンスタントな培養が可能となる条件を検討する。また今後のジンジパイン精製を考慮し、Rgp又はKgp欠損菌の培養と培養液からのプロテアーゼ精製を行う。

②血液凝固障害に対する抑制効果

ジンジパインは、プロトロンビンや第X因子を分解・活性化することにより異常な血液凝固を誘発し、播種性血管内凝固症候群や歯周炎を誘発する。また同時にフィブリノーゲンやフィブリンを分解することにより、歯周病局所での易出血性に関わる。ジンジパインの血液凝固・線溶系タンパク質分解に対するイカリソウエキスの効果は、コアグロメーターを用いた血液凝固時間の測定やin vitroにおけるフィブリノーゲン分解量をウェスタンブロッティングで解析することにより評価する。

3. 研究の成果

(1)

①ルイビル大学Dr Potempaとの共同研究によりジンジバリス菌高発現株数種類とジンジパイン欠損ミュータントの培養を行った。eTSB培養液を用いて嫌気チャンバー(10% CO₂、10% N₂)若しくは嫌気パック使用システムで数日間静置培養後、遠心分離した培養上清よりジンジパインのアセトン沈殿による粗精製、イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製、Hisタグカラムによるアフィニティー精製を行った。各精製ステップの確認では、システインプロテアーゼインヒビター処理後にSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い夾雑タンパク質の存在をチェックするとともに、比活性と総酵素量の推定を蛍光合成基質を用いて行った。

②レンサ球菌*Streptococcus gordonii*とジンジバリス菌の共バイオフィーム形成アッセイを習得した。*Streptococcus gordonii*はデンタルプラーク形成に関わる主要な細菌の一つであるとともに、心臓内膜炎などを引き起こす可能性が知られている。*Streptococcus gordonii*をスライドガラス上で1日静置培養後洗浄し、さらにジンジバリス菌培養液を添加することにより、口腔内環境に近い評価をすることが可能となる。これは歯表面に形成されたプラークが、ジンジバリス菌の接着を促進する足場を形成し、さらなるバイオフィーム形成とプロテアーゼ等の病原因子発揮を促進することをin vitroで評価することが可能となる。

③血液凝固障害を確認するためにMV精製のためのBHI培地培養の確立を現在行っている。

4. 研究の反省・考察

(1)

①当初の研究計画より若干の進捗遅延が生じている。これは平成28年4月の熊本震災の影響により、研究教育環境の復旧作業、研究試薬の損失、大学実験機器の損壊が主な原因である。重要な研究サンプルや細胞株等は保全出来たため、今後の研究推進を滞りなく進めていく予定である。

②共同研究者であるDr Potempaが所有するジンジパイン高発現Strainやジンジパイン欠損ミュータント使用することが可能となり、今後のジンジパイン精製とイカリソウエキス影響評価系の確立に大きな進展となった。さらに口腔内バイオフィーム形成に関わる主要なレンサ球菌である*Streptococcus gordonii*の共バイオフィーム形成アッセイを用いることにより、イカリソウエキスの口腔内環境に近い評価が可能となった。これまでの本研究の知見でも、イカリソウエキスに含まれるプレニル化フラボノイドのプロテアーゼ活性に依存しないバイオフィーム形成阻害活性が存在することが示唆されており、ジンジバリス菌と*Streptococcus gordonii*の接着因子相互作用や多糖の高次構造形成等の評価を迅速化することが可能となる。

③今後は全身循環系への影響を血液凝固因子分解を中心に、補体タンパク質分解、血管内費への傷害などとともに評価する。また難培養性のFilifactor alocisがプラークの成熟とバ

イオフィルム共生に関わることから、コラゲナーゼ等Filifactor alocis産生酵素の活性を指標にプレニル化フラボノイドの評価も進めていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①くまもと産業復興支援プロジェクトフォーラム ポスター発表
2017年2月28日 熊本大学
プレニル化フラボノイドの歯周病菌増殖抑制活性
狩生徹

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	関 西 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	海洋性珪藻のオイル生産能向上を目指したCO ₂ 固定系 解明と増強 －CO ₂ 濃縮強化による光合成機能改変の試み－		研 究 分 野	環 境 科 学
キ ー ワ ー ド	①海洋性珪藻 ②光合成 ③CO ₂ 濃縮機構 ④代謝制御 ⑤バイオ燃料 ⑥環境応答			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 田 祐 介	理 工 学 部	教 授	研究代表者:研究の統括および珪藻CO ₂ 濃縮機構のモデル構築

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辻 敬 典	理 工 学 部	助 教	研究分担者:珪藻代謝の工学的改変
中 島 健 介	理 工 学 部	博 士 研 究 員	研究分担者:CO ₂ 取り込みに関わる分子と機能の同定

海洋性珪藻のオイル生産能向上を目指したCO₂固定系解明と増強副 —CO₂濃縮強化による光合成機能改変の試み—

1. 研究の目的

珪藻は地球上における一次生産のおよそ20%を担っている。その生産物質は主にオイルであり、有力なバイオ燃料生産藻類候補としても着目される (Yoshida et al. 2012)。珪藻は、光合成で固定した炭素を多糖 (β-グルカン) やオイル (トリアシルグリセロール) として蓄積する。そのため、CO₂固定効率の強化は、多糖やオイルの高蓄積につながることで期待される。

しかし、珪藻生産力の基礎となる光合成分子メカニズムは、極めてユニークな進化を辿り、その殆どは未解明である。珪藻が生育する海水は高塩・高アルカリであるため溶存CO₂濃度は低く (15 μM)、一方で高濃度のHCO₃⁻ (2 mM) が存在する。我々の先行研究において、海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* が、細胞膜上のHCO₃⁻輸送体 (SLC4) によって積極的にHCO₃⁻を細胞内に取り込み、光合成に利用することを示した (Nakajima et al. 2013, *PNAS*)。SLC4を介したHCO₃⁻利用は、光合成における「CO₂不足」を解消し、海洋性珪藻の生産力を支える重要メカニズムの一つである。

海洋性珪藻の高いオイル生産性を利用するために、CO₂およびHCO₃⁻の取り込みから、葉緑体内での固定に至るまでのプロセスを包括的に理解する必要がある。しかし珪藻では、①取り込まれたHCO₃⁻やCO₂が葉緑体内に輸送されるしくみ、②葉緑体内でHCO₃⁻がCO₂に変換されてCO₂固定酵素であるRubiscoに供給されるしくみ、③Rubiscoの活性化メカニズム、④カルビン回路を律速する酵素などの点が明らかにされていない。また、これらプロセスが環境条件に応じて協調的に調節される機構も不明である。

本研究では、海洋性珪藻のCO₂固定プロセスを包括的に解明し、CO₂固定のボトルネックを解放してオイル生産を高めることを目指している。

2. 研究の計画

(1) SLC4によるNa⁺依存性HCO₃⁻輸送機構の解明

SLC4輸送体は、Na⁺イオン依存的にHCO₃⁻を輸送することが判明したが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。そこで、種々のイオノフォアやNa⁺チャネル阻害剤、およびナトリウム特異的蛍光標識剤等を活用し、細胞内外のNa⁺イオン濃度勾配とHCO₃⁻取込みの共役機構を明らかにする。CO₂応答性を示し、かつ機能未同定のSLC4-1およびSLC4-4の過剰発現体を作成し、の粗機能を決定する。

(2) 葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体の同定

珪藻葉緑体は二次共生により獲得されたため、四枚包膜を有する。葉緑体内のRubisCO酵素にCO₂を供給するためには、HCO₃⁻あるいはCO₂が四枚の包膜を通過するが、この仕組みは不明である。葉緑体包膜上の無機炭素輸送体を同定するために、核ゲノムにコードされる無機炭素輸送体候補を探索し、GFPタギングによる網羅的な局在解析を行う。葉緑体局在が示された候補について、珪藻でのノックダウン実験あるいは異種発現系を利用した機能解析を行う。

(3) SLC4に依存しない無機炭素獲得機構の解明

複数の珪藻種での比較解析から、*Thalassiosira pseudonana*など一部の珪藻種では、SLC4非依存的無機炭素取込みの存在が示唆されている。これらの珪藻では細胞外炭酸脱水酵素 (CA) によってHCO₃⁻をCO₂に変換し、CO₂を細胞内に取り込んでいる可能性が高い。*T. pseudonana*のCA依存的な無機炭素獲得機構を解明するために、CO₂の膜透過性を高めるチャネルおよび輸送体に着目し、それらの局在解析と特性解析を行い、SLC非依存型の無機炭素獲得機構を解明する。

3. 研究の成果

- (1) SLC4によるNa⁺依存性HCO₃⁻輸送機構の解明
 - ① *P. tricornutum*におけるSLC4-1およびSLC4-4遺伝子について、その過剰発現体を取得した。これらの輸送体候補タンパク質はすべて細胞膜に局在した。定常的過剰発現によってこれらの産物が全てHCO₃⁻特異的な輸送体であることが分かった。
 - ② エフェクターイオンはともにNa⁺であるが、その特異性はSLC4-4でSLC4-1に対して低いことが分かった。これらのHCO₃⁻輸送活性は光化学系直線電子伝達の阻害剤によって効果的に阻害され、光化学系からのエネルギーで駆動されることが分かった。これらの成果は国際会議を含む複数の学会で報告した。
- (2) 葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体の同定
 - ① *P. tricornutum*ゲノムにコードされるSLC4-6およびSLC4-7遺伝子について、その過剰発現体を取得した。これらの輸送体候補遺伝子はすべて葉緑体包膜に局在した。
 - ② これら葉緑体包膜型SLC4は、細胞膜型SLC4-2と同時に定常過剰発現させると、無機炭素への親和性の高い光合成を行うことが分かった。これらの成果は現在投稿準備中である。
- (3) SLC4に依存しない無機炭素獲得機構の解明ほか
 - ① 4種の珪藻、*P. tricornutum* (羽状目) *Chaetoceros muleri* (中心目) *T. pseudonana* (中心目) および*Sylindrotheca fuciformis* (羽状目) の進化系統の異なる4種の海洋性珪藻を用いて、これらの光合成無機炭素親和性に対するSLC阻害剤 DIDS および細胞外CA阻害剤 AZA の影響を検証したところ、前者2種の珪藻がDIDSおよび後者2種がAZAの添加によって著しい無機炭素濃縮の阻害をうけた。このことから、珪藻光合成は進化系統にかかわらずSLC4依存型のHCO₃⁻輸送或いは細胞外CA依存的なCO₂取り込みのいずれかの戦略により基質を獲得していることが示された。本研究成果は査読付き英語論文に発表した。
 - ② このほか重要な発見として、葉緑体内で光化学系のプロトン濃度勾配を利用して、CO₂を局所的に発生させるチラコイド内腔局在型CAを発見した。この酵素は新奇一次配列を有するためθ型CAと命名し、植物プランクトンにおける普遍的存在が示唆された。光合成に必須の役割を負うと考えられる。この成果を査読付き英語論文に発表した。

4. 研究の反省・考察

- (1) SLC4によるNa⁺依存性HCO₃⁻輸送機構の解明
 - ① 細胞膜型のSLC4は海洋一次生産を制御する重要因子の一つであることが判明した。
 - ② 細胞膜輸送体増強による一次生産性の増強には繋がっていない。今後増強効果を精査する。
- (2) 葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体の同定
 - ① 葉緑体包膜系は定常的に強いHCO₃⁻輸送を有する事が分かった。十分な細胞膜上の取り込み活性がある場合、葉緑体包膜系がCi供給のボトルネックとなる事が示唆された。
 - ② 葉緑体包膜輸送体増強による一次生産性増強には繋がっていない。今後この増強効果を精査する。
- (3) SLC4に依存しない無機炭素獲得機構の解明ほか
 - ① 2つの無機炭素取り込み戦略が存在することが判明した。この2戦略のエネルギーコストを定量化する必要がある。
 - ② 葉緑体内で重要な働きをするCAが発見された。CCM増強に関わる新たなモデル構築が必要である。アウトプットとして油脂生産に炭素フローを切り替える有効ポイントを見いだす必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 (すべて査読付き原著論文)

- ① Kikutani S, Nakajima K, Nagasato C, Tsuji Y, Miyatake A, Matsuda Y (2016年8月) Thylakoid luminal θ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**(35): 9828–9833, Doi: 10.1073/pnas.1603112113
- ② Shimakawa G, Matsuda Y, Nakajima K, Tamoi M, Shigeoka S, Miyake C (2017年1月) Diverse strategies of O_2 -usage for preventing photodamage under CO_2 -limitation during algal photosynthesis. *Scientific Report* **7**:41022 DOI:10.1038/srep41022
- ③ Matsuda Y, Hopkinson BM, Nakajima K, Dupont CL, Tsuji Y (2017年1月) Mechanisms of carbon dioxide acquisition and CO_2 sensing in marine diatoms - A gateway to carbon metabolism. *Philosophical Transaction B*, Royal Society, In press
- ④ Tsuji Y, Mahardika A, Matsuda Y (2017年3月) Evolutionary-distinct strategies to acquire inorganic carbon from seawater in marine diatoms. *J. Exp. Bot.* DOI: 10.1093/jxb/erx102 In press
- ⑤ Hopkinson BM, Dupont CL Matsuda Y (2016年4月) The physiology and genetics of CO_2 concentrating mechanisms in model diatoms. *Current Opinion in Plant Biology* **31**: 51–67

(2) 口頭発表

- ① The biophysical CO_2 -concentrating mechanism in marine diatoms - diversity of components and convergent aspects in function. Yusuke Matsuda, 2016年8月17日 The 9th International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms. Cambridge, UK (招待講演)
- ② Signal transduction and promoter regulation systems in marine diatoms in response to carbon dioxide and light. 2016年9月27日, Stazione Zoologica, Anton Dorhn, Napoli, Italy (招待講演)
- ③ The biophysical CO_2 -concentrating mechanism in marine diatoms - diversity of components and convergent aspects in function. 2016年10月4日, University of Konstanz, Germany (招待講演)

(3) 出版物 なし

学 校 名	杏 林 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	X線1分子計測法による微小管の極微分子運動現象の 解明 —脳の微小管の分子運動はなぜ小さいのか?—		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	①微小管 ②Tubulin ③X線1分子計測 ④電子線1分子計測		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 山 高 宏	医 学 部	助 教	研究総括および微小管Tubulin精製・組換え体作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 川 直 樹	日 本 大 学 文 理 学 部	非 常 勤 講 師	電子線1分子計測(DET)の実施
佐 々 木 裕 次	東 京 大 学 新 領 域 創 成 科 学 科 研 究	教 授	X線1分子計測(DXT)の実施

X線1分子計測法による微小管の極微分子運動現象の解明 — 脳の微小管の分子運動はなぜ小さいのか? —

1. 研究の目的

(1) 研究の背景

全身性のあらゆる細胞においてその形態維持に必要とされる微小管は、恒常性維持や神経伝達物質の軸索輸送に不可欠な小胞膜輸送機能にも関与していることが知られている。我々はこの小胞膜輸送に対して微小管の重合・脱重合に代表される分子動態の変化が作用し、形質膜表面への小胞輸送に影響を及ぼす現象を明らかにしてきた(Nakayama, *J Cell Sci* 2012)。更に我々はこの微小管の分子動態変化に伴って分子運動自体にも変化が起きることにより輸送小胞との物理的親和性が輸送効率に影響している可能性に着目し、ラット脳より精製した微小管と、水溶タンパク試料にて1ピコメートルの分子運動変化を検出可能な新技術であるX線1分子計測法(DXT)(Sekiguchi, *Sasaki PLoS One* 2013)を用いて、分子運動度の計測を試みた。その結果、脳由来の微小管において、これまで確認されたことのない極微な分子運動が存在する現象を見出してきた。またこの現象が他の臓器由来の微小管においても見られるか検証したところ、脳由来の微小管の方が肝臓由来のもの比べて、その分子運動度が小さくなる現象を見出してきた。興味深いことに同様の現象は、MAPs, Kinesin等の微小管結合タンパクを除いた高純度の微小管でも確認された(Nakayama, Unpublished data)ことから、分子運動度の差は微小管自体の分子運動に起因することが示唆された。この修飾因子を除いた場合、一般的にタンパク質分子の運動に影響を及ぼす因子として分子内極性が大きな比重を占めていると考えられるが、本現象の詳細については更なる解析が必要とされている。

近年、組織特異性を示すTubulin (TUB) isoformが多数同定されてきた。それらの中には、ユビキタス発現型のTUBB5以外にも、TUBB3のような脳に高発現を示し小胞膜輸送に基づくAxonガイダンスに関与したisoformが同定されてきているが、これらisoform間での特にC末端領域においてアミノ酸配列相同性に相違が見られることが知られている(Leandro-Garcia, *Cytoskeleton*, 2010)。またTUBは様々な翻訳後修飾を受けるが、その中でも二量体分子の極性に大きな影響を及ぼすC末端は、リン酸化、パルミトイル化、 $\Delta 2$ 化、脱チロシン化、ポリグリシン化、ポリグルタミン酸化に代表される分子修飾を受けることが知られている。この中で特に大きな荷電変化をもたらすポリグルタミン酸化は、興味深いことに、ほとんどの神経の微小管で特異的に修飾を受けていることが明らかになっている(Janke, *Trends Neurosci* 2010)。これらの知見は、脳と肝臓由来の微小管の間で極微な分子運動度に差が見られた現象が、その構成因子であるTUB二量体のisoformの構造および翻訳後修飾による分子特性の差に起因している可能性を示唆しているものと考えられる。

(2) 研究の目的

従って本研究は、TUBB3, 5に代表される脳と肝臓で高発現を示す内在性TUB二量体の詳細な分子運動度の測定を行う。更に組換えタンパク質を用いた再構成実験によって、微小管の極微な分子運動がTUB配列依存的に決定されるのか、分子修飾依存的に決定されるのかの可否を明らかにすることを通して、微小管の分子運動度に差が生まれる因子を同定し、微小管の新しい小胞輸送機能の解明へ向けた基盤を築くことを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 内在性Tubulin (TUB) 二量体の精製 (中山)

脳由来の微小管で高発現を示すTUBB3, 2A, 2B, 4A, TUBA1Aと脳以外の組織由来の微小管で高発現を示すTUBB5, 2C, 6, TUBA1B, 1C, 4Aについて分子運動度計測のための内在性TUB精製を行う(Nakayama, *J Cell Sci* 2012)。具体的には、内在性TUB二量体を精製するために、ラット脳およ

び肝臓組織より抽出を行う。具体的にはラット脳および肝臓組織にReassembly buffer (RB)を加え、ホモジナイザーにて破碎を行い、238,400 gの超遠心により、TUB-rich上清を得て、グリセロール、GTP存在下にて37°Cで微小管重合反応を行う。100,000 gの超遠心で得られたペレットにRBを加え氷上にて重合微小管の脱重合を行いTUB分画を得る。このTUB分画をPhosphocelluloseカラムに通し、GTP、ADP処理後の超遠心によりMAPs, Kinesinモーター等のTUB結合タンパク質の除去を行った高純度TUB分画を得る。上記TUB isoformについてProtein-GにBis-sulfosuccinimidyl suberateにて架橋したアフィニティー抗TUB抗体カラムを作製し、高純度TUB分画との結合反応、グリシン塩酸による酸溶出、塩基性トリスによる中和、自然重合阻止のための塩化カルシウムの添加を行い、最終的に技法の異なる極微1分子計測(X線、電子線)の為の組織特異的内在性TUB二量体の精製試料を得る。

(2) 内在性TUB二量体のX線1分子計測 (DXT) による分子運動解析 (佐々木)(小川)

(1)にて得られた精製TUB二量体サンプルをもとに、水溶試料にてピコメートルオーダーの極微小な分子変化を検出可能なX線1分子計測法(DXT)と電子線1分子計測法(DET)を用いて分子運動度の評価を行う(Yamamoto, **Ogawa, Sasaki** *FEBS Open Bio* 2016)。特徴として、DXTは早い時分解能(10 μ sec)を持つX線照射によって大量の回折点が得られデータ取得が容易である一方で、DXTは微量サンプル(50nl)でより正確な3次元分子運動測定が可能である。具体的には、1-10 μ gの精製タンパクと金ナノ結晶との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行う。次に水溶試料の計測を可能にするDXTセル内にセットするため、金ナノ結晶架橋タンパク試料を金支持基板上に固定し、100 μ lの緩衝溶液中において、SPRING8-BL40XUによるDXT計測を行う。上記DXT計測法を用いた評価実験に関しては東京大・佐々木裕次 教授との共同研究により行われる。このDXT計測により、早い時間成分におけるTUB二量体の分子運動が定量的に同定可能になる。また電子線1分子計測法(DET) (**Ogawa**, *Scient Rep* 2013)はDXT計測法と同じく水溶試料にて極微分子変化を検出可能である。特徴としては微量サンプル(50nl)でより正確な3次元分子運動測定が可能である一方で、取得データ数と時分解能は悪い(1msec)。具体的には、(I-1)にて得られた精製TUB二量体サンプルと金コロイド粒子との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行った後、厚さ20nm、耐圧1.3気圧の真空蒸着カーボン隔膜と対峙した支持膜上に固定し、DETセル内にて50nlの緩衝溶液中において計測を行う。上記DET計測法を用いた評価実験に関しては日本大・小川直樹 非常勤講師との共同研究により行われる。このDET計測により、遅い時間成分におけるTUB二量体の分子運動が3次元詳細情報として定性的に同定可能になる。技法の異なる一連のDXT、DET計測を通して、より確度の高い分子運動が計測可能になると共に、組織特異性をもつTUB二量体の分子運動度の値から微小管とTUB二量体の分子運動の相関関係を示せることが期待される。またそれらに共通する配列特異性に関する手掛かりが掴めると予想される。

3. 研究の成果

(1) 内在性Tubulin (TUB) 二量体の精製 (中山)

内在性TUB二量体を精製するために、100匹のラット脳、心臓および肝臓組織より抽出を行った。主な実験操作としては、ラット組織にReassembly buffer (RB)を加え、ホモジナイザーにて破碎を行い、238,400 gの超遠心により、TUB-rich上清を得て、グリセロール、GTP存在下にて37°Cで微小管重合反応を行った。100,000 gの超遠心で得られたペレットにRBを加え氷上にて重合微小管の脱重合を行いTUB分画を得た。このTUB分画をPhosphocelluloseカラムに通し、GTP、ADP処理後の超遠心によりMAPs, Kinesinモーター等のTUB結合タンパク質の除去を行った高純度TUB分画を得た。脳由来の微小管で高発現を示すTUBB3(神経型), 4A(神経/グリア型)と脳以外の組織由来の微小管で高発現を示すTUBB2C(心臓/精巣型), 5(全身型)の計4つのisoformの各抗体1mgをBis-sulfosuccinimidyl suberateにてProtein-Gに架橋したアフィニティー抗TUB抗体カラムを作製し、高純度TUB分画との結合反応、グリシン塩酸による酸溶出、塩基性トリスによる中和、自然重合阻止のための塩化カルシウムの添加を行い、最終的に技法の異なる極微1分子計測(X線、電子線)

の為の組織特異的内在性TUB二量体の精製試料を得ることに成功した。

(2) 内在性TUB二量体の極微1分子計測 (DXT、DET) による分子運動解析 (佐々木)(小川)

(1)にて得られた脳由来TUBB3, 4Aと肝臓由来TUBB2C, 5の精製TUB二量体サンプルをもとに、水溶試料にてピコメートルオーダーの極微小な分子変化を検出可能なX線1分子計測法(DXT)と電子線1分子計測法(DET)(Yamamoto, Ogawa, Sasaki *FEBS Open Bio* 2016)を用いて分子運動度の評価を行った。特徴として、DXTは早い時分解能(10 μ sec)を持つX線照射によって大量の回折点を得られデータ取得が容易である一方で、DETは微量サンプル(50nl)でより正確な3次元分子運動測定が可能である。具体的には、1-100 μ gの精製タンパクと金ナノ結晶との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行った。次に水溶試料の計測を可能にする観測セル内にセットするため、金ナノ結晶架橋タンパク試料を金支持基板上に固定し、0.5-100 μ lの緩衝溶液中において計測を行った。その結果、脳由来TUB二量体の方が肝臓由来のものと比較して χ 軸方向の分子運動度が低くなる傾向を示し、微小管運動の結果と相関傾向にあることが示された。一方、これらの isoformの組換えTUBを利用した先行実験を試みたが、現在までのところ明確な運動度の傾向は得られていないが、グリアを含む脳高発現型TUBB4Aの高運動度から神経特異的TUBB3とそれ以外とで配列特異性がある可能性も示唆された。従って、次年度以降に内在性及び組換えTUBの更なる解析を行う予定である。

4. 研究の反省・考察

(1)実施した内在性Tubulin二量体の分子運動度解析は当初計画の半数であったが、脳由来TUB二量体と肝臓由来TUB二量体との間で比較をして、 χ 軸方向の分子運動度が低くなる明確な傾向が得られてきたことは大きな発見であった。この結果は、脳と肝臓由来の微小管で見られた分子運動度の違いが、それを構成するTubulin二量体の差に起因している可能性をあらわしているものと考えられる。それと同時に、この傾向が他のTUB isoformでもあらわれてくるかを明らかにするために更なる解析の必要性があり、その為にもその他のTUB isoformに特異性の高い抗体の取得が急務であると考えている。

5. 研究発表

なし

学 校 名	明 星 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヌクレオソームダイナミクスの分子機構に関する研究 －原子レベルから細胞までの統合的理解－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	① ヌクレオソーム ② クロマチン ③ リモデリング因子 ④ リピート配列 ⑤ ヒストンテール ⑥ ヒストン修飾 ⑦ 転写制御 ⑧ 相同組換え			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
香 川 亘	理 工 学 部	准 教 授	総括、構造生物学・生化学的解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
清 水 光 弘	理 工 学 部	教 授	分子遺伝学・生化学・分子生物学的解析
須 賀 則 之	理 工 学 部	准 教 授	生化学・細胞生物学・分子生物学的解析

ヌクレオソームダイナミクスの分子機構に関する研究 —原子レベルから細胞までの統合的理解—

1. 研究の目的

真核生物において、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、ゲノムDNAを核内に収納するだけでなく、生命の根幹に関わるDNAの転写、修復、組換えなどを制御する機能を有する。このような制御において、ヌクレオソームの構造はダイナミックに変化することが考えられているが、その分子機構はほとんど不明である。そこで本研究では、緊密な共同研究体制を組み、ヌクレオソームダイナミクスに重要と考えられるクロマチンリモデリング因子、ヒストン結合因子、およびDNAの構造特性に着目した。そして、それらを原子レベルでの立体構造解析から細胞における機能解析まで多角的に解析することによって、ヌクレオソームダイナミクスの分子機構を統合的に解明することを目的とした。

2. 研究の計画

(1) リモデリング因子の大量調製系の確立

クロマチンリモデリング因子の機能構造は、未だ明らかにされていない。そこで代表的なクロマチンリモデリング因子として、相同組換えで働くRad54に着目し、そのヌクレオソームとの複合体の立体構造を明らかにすることを目的とした。これまでの研究から、ヒトや出芽酵母 (*S. cerevisiae*) のRad54は、大量発現が困難であることが明らかにされている。そこで本研究では、部分構造が明らかにされているゼブラフィッシュRad54に着目し、その全長タンパク質を大腸菌の発現系を用いて大量調製する系の確立を目指した。

(2) *In vivo*における新規ヌクレオソーム解析法の開発

*In vivo*でのヌクレオソームの位置と動態を解析するために、ヒストンのDNA結合部位特異的切断法の開発を目的とした。出芽酵母ヌクレオソームのX線結晶構造に基づいて、4種類のヒストンH2A、H2B、H3、H4のDNA接触部位を予測した。それらのアミノ酸残基にCys変異を導入し、N-(1,10 phenanthroline-5-yl) iodoacetamideを連結し、Cu²⁺をキレートした後、OHラジカルを局所的に発生させてDNAを切断する方法を計画した。

(3) DNA構造特性によるヌクレオソーム多様性の解析

DNAの構造特性とヌクレオソームダイナミクスとの関係を明らかにすることを目的として、ヒトゲノムに存在する単純反復配列に着目した。ヒトゲノムでは3~5塩基の単純反復配列（マイクロサテライト配列）が広く見出されている。そこでこれらのリピート配列におけるヌクレオソームの形成と安定性について、出芽酵母ミニ染色体の系を用いて解析した。具体的には、ヌクレオソームのポジショニングが確立している出芽酵母ミニ染色体の特定部位に、マイクロサテライト配列を挿入し、*in vivo*でミニ染色体上のヌクレオソームの配置と構造をマイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) およびhydroxylradical footprintingによって詳細に解析した。得られた結果から、マイクロサテライト配列のDNA構造特性とヌクレオソームダイナミクスとの関係を考察した。

3. 研究の成果

(1) リモデリング因子の大量調製系の確立

今回、大腸菌を用いた系で全長Rad54を大量調製するために、先行研究で安定な断片の大量調製が報告されているゼブラフィッシュRad54 (*Danio rerio* Rad54、以下DrRad54) に着目した。まず、DrRad54を大腸菌内で効率よく発現させるために、DrRad54の遺伝子を大腸菌が好むコ

ドンに書き換えた合成遺伝子を用いた。DrRad54を5種類の大腸菌株を用いて大量発現を試みた結果、BLR(DE3)株においてDrRad54の発現が確認された。発現したDrRad54をNiアフィニティークロマトグラフィーおよび陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行ったところ、DrRad54を高純度に精製することに成功した。

(2) *In vivo*でのヌクレオソームのポジションを決定するパラレルマッピング法の確立

ゲノムにおけるヌクレオソームの配置の解析には、従来、micrococcal nuclease (MNase)が広く用いられているが、その塩基配列特異性のために、得られた結果の解釈に問題が指摘されてきた。本研究において、MNase法と併用して、ヒストンH4のDNA部位特異的の化学切断法を核に適用したパラレルマッピング法を確立した。本法によって、*in vivo*でのヌクレオソーム配置の解析がより正確になり、マイクロサテライト配列の形成するヌクレオソームの構造的特徴を新たに見いだした (*PLoS ONE*, 論文投稿中)。

(3) DNA構造特性によるヌクレオソーム多様性の解析

DNAの構造特性がヌクレオソームの形成に及ぼす影響を調べることを目的として、全10種類のトリヌクレオチドリピート配列をデザインした。ポジショニングしたヌクレオソームから構成される出芽酵母ミニ染色体のアッセイ系を用いて、36 bpのトリヌクレオチドリピート配列をヌクレオソームの中央に挿入し、パラレルマッピング法で解析した。その結果、ヌクレオソーム形成を促進する配列と阻害するリピート配列を明らかにした。また、進行性ミオクロームステんかん (EPM1) と筋強直性ジストロフィー2型 (DM2) に関与するCCCCGCCCGCGとCCTGリピートについても解析した。その結果、CCCCGCCCGCGが*in vivo*でヌクレオソームの形成を強く阻害することを見いだした。継続時間を加味した隠れマルコフモデルに基づくヌクレオソーム配置予測解析結果と比較することによって、ヌクレオソーム形成に及ぼすDNA配列特性の寄与について考察した。

さらに、さまざまな塩基配列を含むヌクレオソームの立体構造をX線結晶構造解析法により明らかにするために、塩基配列が異なるDNAを含むヌクレオソームを比較的簡便に大量調製する方法を検討した。このようなヌクレオソームの大量調製のボトルネックとなっているDNAの調製方法として、オリゴDNAを用いたOne-Pot反応を確立した。この方法により、ミニ染色体の系で解析したマイクロサテライト配列を含むDNAを簡便かつ大量に調製することが可能になった。また、プラスミドにNCP再構成用の様々なDNA配列を制限酵素非依存的かつシームレスに、一度に多コピークローニングする迅速で簡便な方法の開発を行った。

(4) ヒストンのDNA結合部位特異的切断によるヌクレオソーム解析法の開発

*In vivo*での多様なヌクレオソーム構造と動態を明らかにするために、ヒストンのDNA結合部位を特異的に切断する方法の開発を目的とした。出芽酵母ヌクレオソームのX線結晶構造に基づいて、4種類のコアヒストンのDNA接触部位を予測し、部位特異的の化学切断法を検討した。これまでに、ヒストンH2AとH2B、ヒストンバリエントH2A.Zの部位特異的切断の検出に成功し、*in vivo*におけるヌクレオソームの新たな解析法の実現性を示した。

4. 研究の反省・考察

本研究は、全長Rad54を大腸菌の大量発現系を用いて大量調製した初めての例であり、今後Rad54のクロマチンリモデリング活性の解析に大きく貢献することが考えられる。また本研究では、様々なDNA配列を含むヌクレオソームを比較的簡便に大量調製する方法を確立した。この方法を用いることにより、*in vitro*でのヌクレオソームの生化学的解析およびX線結晶構造解析が進むことが予想される。一方で、*In vivo*でのヌクレオソームの解析法として、部位特異的の化学切断法をMNaseと併用するパラレルマッピングを確立し、ヒストンのDNA結合部位特異的切断に

よる新規ヌクレオソーム解析法の実現性を示した。*In vivo*でのヌクレオソームマッピングの結果と*in vitro*での結果を相互検証することにより、クロマチンダイナミクスを統合的に理解できることが期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Saotome, M., Saito, K., Onodera, K., Kurumizaka, H. and **Kagawa, W.** Structure of the human DNA repair protein RAD52 containing surface mutations. *Acta Crystallogr. F* **72**, 598-603. (査読あり)
- ② Ichikawa, Y., Morohashi, N., Tomita, N., Mitchell, A. P., Kurumizaka, H. and **Shimizu, M.** Sequence-directed nucleosome-depletion is sufficient to activate transcription from a yeast core promoter *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **476**, 57-62. (査読あり)

(2) 口頭発表

- ① **香川 亘**、ヌクレオソームの多様な構造を解析する技術の開発、クロマチン動構造ワークショップ、ルスツリゾート（北海道）、2016年7月7日～9日
- ② 布施智博、勝俣光司、諸星皓哉、栗原陽平、勅使川原裕太、林俊樹、**清水光弘**（招待講演）、*In vivo*においてポジショニングに依存したヌクレオソーム構造の多様性、第89回日本生化学会大会、東北大学（宮城県・仙台市）、2016年9月25日～27日
- ③ **清水光弘**（招待講演）、部位特異的ヒストンケミカルマッピングによるヌクレオソームの解析、平成28年度国立遺伝学研究所研究会「クロマチン・細胞核の動的構造変換とエピジェネティック制御」、国立遺伝学研究所（静岡県・三島市）、2016年10月27日～28日
- ④ 諸星皓哉、今井洸志、布施智博、**香川 亘**、**清水光弘**、出芽酵母PH05の転写活性化と抑制に伴う+1ヌクレオソームの解析、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）、2016年11月30日～12月2日
- ⑤ **清水光弘**（招待講演）、ヒストンのDNA部位特異的切断による*in vivo*でのヌクレオソームの解析、第4回ヒストンバリエーション研究会、東北大学（仙台市）、2017年2月11日

(3) 出版物

なし

学 校 名	立 命 館 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	圧力が拓く生命科学の新領域「圧力生命科学」 ータンパク質の離合集散の圧力応答研究ー		研 究 分 野 理 学
キ ー ワ ー ド	① 圧力、②生物リズム、③細胞分裂、④タンパク質		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 原 亮	薬 学 部	教 授	研究代表者総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 村 浩 由	生 命 科 学 部	教 授	実験・論文作成
寺 内 一 姫	生 命 科 学 部	教 授	実験・論文作成
北 沢 創 一 郎	薬 学 部	助 教	実験・データ解析
吉 澤 拓 也	生 命 科 学 部	助 教	実験・データ解析

圧力が拓く生命科学の新領域「圧力生命科学」 ータンパク質の離合集散の圧力応答研究ー

1. 研究の目的

- (1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けたFtsZの圧力応答研究
 - ①近年の院内感染の蔓延にともなってメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の新たな創薬ターゲットの開拓が求められている。そこで本研究では、MRSAの細胞分裂タンパク質FtsZのコンフォメーション標的阻害剤の設計基盤を構築することを目的とする。
 - ②FtsZは、細菌の細胞分裂時に中心的な役割を果たすタンパク質で、細胞中央部にリング状のポリマーを形成して細胞膜の陥入を引き起こす。この膜陥入はFtsZの離合集散が関わっており、その離合集散はFtsZの構造多型が関係していると考えられているがそのメカニズムは不明である。そこで本研究では、FtsZの構造多型性と離合集散の関係を解明することを目的とする。
- (2) シアノバクテリアの生物リズムの圧力応答研究
 - ①野生型KaiCのリン酸化/脱リン酸化の周期長は、20~40°C付近で変化しないことが温度補償性として知られているが、圧力に対する応答は全くの未解明である。リン酸化/脱リン酸化の周期長の圧力依存性を調べる。
 - ②寺内ら (Terauchi et al. PNAS 2007) による研究から、リン酸化/脱リン酸化周期長がKaiCのATPase活性の増加と共に短くなるという負の相関が知られている。KaiCのATPase活性の圧力依存性を調べる。

2. 研究の計画

- (1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けたFtsZの圧力応答研究
 - ①FtsZ-構造選択的阻害剤複合体の構造解析を行うとともに、高圧力技術を用いて不安定なコンフォメーションのタンパク質を結晶化する手法 (高圧結晶成長法) の開発を進める。FtsZのコンフォメーション平衡の圧力依存性に基づいて、FtsZの結晶化を行う。
 - ②NMR法、蛍光法を用いて、FtsZの構造多型性を解明する。圧力を用いた新しい結晶化技術を開発する。
- (2) シアノバクテリアの生物リズムの圧力応答研究
 - ①KaiCのリン酸化/脱リン酸化周期長の圧力効果を調べる。耐圧性の光学セルを用いて、30°Cで1~3000気圧において野生型KaiCのリン酸化、脱リン酸化に伴う蛍光強度の変化を測定する。試料は、KaiA、KaiB、KaiC及びATPを含み、KaiAはKaiCのリン酸化を促進し、KaiBはKaiAを阻害することがわかっている。
 - ②KaiCのATPase活性の圧力効果を調べる。
 - ③KaiC及びKaiAの高圧蛍光測定を行い、それらの立体構造や解離・会合の変化を調べる。

3. 研究の成果

- (1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けたFtsZの圧力応答研究
 - ①本研究では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 由来の分解能2.2 Åの立体構造を決定した (*J. Struct. Biol.* 2017)。FtsZは同一結晶の中に、大きく立体構造が違う2種で存在していた (図1)。この立体構造の異なるFtsZは結晶中でフィラメントを形成しており、一方 (黄色の分子) のフィラメント内の



図1 同一結晶内に、構造の異なる2種の分子 (黄色と緑色) が同時に存在していた。この図は2種の分子の重ね合わせを示している。

分子間接触面積は1154 Å²、もう一方（緑色の分子）のフィラメントでは741 Å²であったことから、黄色がフィラメント構造を強固に結合する状態（T状態）で、緑がフィラメント構造から離れる状態（R状態）を示していると予想できた。次に、分子動力学計算によるT状態からR状態へのFtsZの構造遷移の再現を試みた。構造変化経路探索法 (Parallel Cascade Selection MD: PaCS-MD) を適用することで、T状態からR状態への構造遷移の再現に成功した。そのFtsZの構造遷移において、構造遷移が段階的に起きることが分かった。そこで、この段階的構造遷移で特に重要なアミノ酸であるArg29をアラニンに置換した変異体の構造解析を行った。その結果、R29A変異体はT状態とR状態ともに保てないことが実証できた。

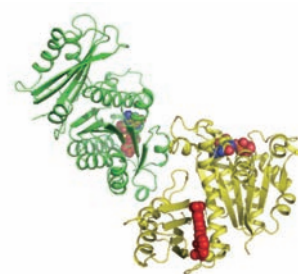


図2 阻害剤（赤色）はT状態の疎水性ポケットにのみ結合していた

- ② FtsZの結晶を阻害剤含有溶液に浸漬することによってFtsZと阻害剤との複合体の構造解析を行った (*ACS Chem. Biol.* 2017)。構造解析の結果、阻害剤はT状態のクレフトに結合していることが分かったが、R状態にはこのクレフトが存在していないためにその結合は見られなかった (図2)。したがって、阻害剤はコンフォメーション選択阻害剤であることが分かった。阻害剤が結合していないアポ体の立体構造と比べても、阻害剤が結合したことによる大きな構造変化は見られなかった。
- ③ 高圧結晶成長法による結晶化方法を開発した。高圧での結晶化については定まった手法がないために、様々な方法を試験した結果、キャピラリーを用いたバッチ法で1000気圧下においてFtsZの結晶を得ることが不十分であるため、さらに高圧下でのFtsZの結晶化条件を最適化しているところである。また、NMR蛍光法の解析に向けてトリプトファン変異体を作製した。

(2) シアノバクテリアの生物リズムの圧力応答研究

- ① 高圧蛍光法による実験から、30°C、1気圧下で21.5時間のリン酸化/脱リン酸化周期長が、高圧力下で変化した。
- ② 30°CにおけるKaiCのATPの加水分解反応速度定数を求めた。
- ③ KaiCとKaiAは、それぞれトリプトファンを有するため、高圧蛍光法により蛍光スペクトルの圧力依存性を確認した。

4. 研究の反省・考察

(1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けたFtsZの圧力応答研究

- ① 同一種のFtsZにおいて、2種類のコンフォメーションが見られたのは初めてで、本研究で見いだした構造遷移を伴いながら、重合・解離サイクルが進行するという分子モデルを提案することができた。今後は、重合サイクルの進行過程を直接観察する手法を試験する必要があると考えている。
- ② 阻害剤は、①で述べたFtsZの機能に必要なT状態からR状態への構造遷移サイクルの進行を阻害する化合物であると予想された。実際、この阻害剤がFtsZのポリマー化を促進するという結果が得られている。これは、解離する構造であるR状態への構造変化を妨げることでFtsZの構造遷移サイクル進行を阻害するという今回の構造解析結果と一致している。また、GTPase活性測定では、阻害剤はFtsZのGTPase活性を上昇させるという結果が得られている。これより阻害剤がGTP結合状態に結合し、重合を促進していることが示唆されるが、この詳細を明らかにするためには、阻害剤存在下でのポリマー化速度を測定する必要があると考えられる。
- ③ 高圧結晶成長法による結晶化方法を確立して、さらにトリプトファン変異体の作製にも成功した。これらは全く初めての試みであったことから多くの課題に直面したが、頻繁に本

異分野グループ内での議論を行うことで解決できた。今後も、同様にグループ内での議論を繰り返し行うことによって、X線結晶構造解析およびNMR蛍光法による解析を行う必要があると考えている。

(2) シアノバクテリアの生物リズムの圧力応答研究

① KaiCにおけるATP加水分解速度は他のタンパク質に比べて極めて遅く、30℃では1日あたり10-12分子程度である。活性部位において、加水分解に関わる水分子の位置がその分解速度の遅さと関係していることが示唆されている(寺内ら, PNAS2007)。KaiCリン酸化周期長及びATPase活性の圧力依存性から、圧力が構造や機能に及ぼす効果について考察した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Fujita J., Maeda Y., Mizohata E., Inoue T., Kaul M., Parhi A.K., LaVoie E.J., Pilch D.S., Matsumura H., Structural flexibility of an inhibitor overcomes drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* FtsZ, *ACS Chem. Biol.*, in press (2017)
- ② Fujita J., Harada R., Maeda Y., Saito Y., Mizohata E., Inoue T., Shigeta Y., Matsumura H., Identification of the key interactions in structural transition pathway of FtsZ from *Staphylococcus aureus*, *J. Struct. Biol.*, 198, 65-73 (2017)
- ③ Kono T., Mehrotra S., Endo C., Kizu N., Matsuda M., Kimura H., Mizohata E., Inoue T., Hasunuma T., Yokota A., Matsumura H., Ashida H., A RuBisCO-mediated carbon metabolic pathway in methanogenic archaea, *Nature Commun.*, 7(13007), 1-12 (2017).
- ④ Kawamura T., Wakamoto T., Kitazawa S., Sakuraba S., Kameda T., Kitahara R., Analysis of O₂-binding sites in proteins using gas-pressure NMR spectroscopy: outer surface protein A. *Biophysical Journal*, *Biophysical Journal*, 112, 1820-1827 (2017).
- ⑤ La Penna G., Mori Y., Kitahara R., Akasaka K., and Okamoto Y., Modeling 15N NMR chemical shift changes in protein backbone with pressure, *J. Chem. Phys.* 145,085104 (2016).
- ⑥ Xue M., Kitahara R., Yoshimura Y., Mulder F.A.A., Aberrant increase of NMR signal in hydrogen exchange experiments. Observations and explanation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 478, 1185-1188 (2016)
- ⑦ Sato T., Kawasaki T., Mine S., Matsumura H., Functional role of the C-terminal amphipathic helix 8 of olfactory receptors and other G protein-coupled receptors, *Int. J. Mol. Sci.*, 17(11), 1930 (2016).
- ⑧ Tominaga Y., Maruyama M., Yoshimura M., Koizumi H., Tachibana M., Sugiyama S., Adachi H., Tsukamoto K., Matsumura H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Yoshikawa H.Y., Mori Y., Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation, *Nature Photonics*, 10, 723-726 (2016)
- ⑨ Maruyama M., Hayashi Y., Yoshikawa H.Y., Okada S., Koizumi H., Tachibana M., Sugiyama S., Adachi H., Matsumura H., Inoue T., Takano K., Murakami S., Yoshimura M., Mori Y., A crystallization technique for obtaining large protein crystals with increased mechanical stability using agarose gel combined with a stirring technique, *J. Crystal Growth*, 452 172-178 (2016)
- ⑩ Sugiyama S., Ishikawa S., Tomitori H., Niiyama M., Hirose M., Miyazaki Y., Higashi K., Murata M., Adachi H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Kashiwagi K., Igarashi K., Matsumura H., Molecular mechanism underlying promiscuous polyamine recognition by spermidine acetyltransferase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 76, 87-97 (2016)
- ⑪ Oyama K., Azai C., Nakamura K., Tanaka S., Terauchi K., Conversion between two conformational states of KaiC is induced by ATP hydrolysis as a trigger for cyanobacterial circadian oscillation. , *Scientific Reports* 6, 32443; doi: 10.1038/srep32443 (2016)
- ⑫ Sugiyama M., Yagi H., Ishii K., Porcar L., Martel A., Oyama K., Noda M., Yunoki Y., Murakami R., Inoue R., Sato N., Oba Y., Terauchi K., Uchiyama S., and Kato K., Structural characterization of the circadian clock protein complex composed of KaiB and KaiC by inverse contrast-matching small-angle neutron scattering. *Scientific Reports* 6, 35567; doi: 10.1038/srep35567 (2016)

(2) 口頭発表

- ① 寺内一姫 「試験管内の概日時計：発振子の正体を追って」北山陽子メモリアルシンポジウム-光合成生物の概日時計機構, 名古屋大学, 2017年3月11日
- ② 松村浩由 「MRSA細胞分裂必須タンパク質の構造遷移」、四私大合同生命科学シンポジウム, 兵庫県西宮市・関学会館, 2017年3月7日
- ③ 松村浩由 「MRSAの細胞分裂をターゲットにした阻害剤開発」、東京生化学研究会成果報告会, 野村コンファレンスプラザ日本橋, 東京都中央区, 2017年3月3日
- ④ 松村浩由 「創薬に貢献するタンパク質結晶化技術」、メディカルジャパン, 大阪市住之江区・インテックス大阪, 2017年2月15日
- ⑤ 松村浩由 「タンパク質の離合集散が織りなす生命現象」、自然科学カフェの集い, 東京都中央区・銀座ルノアール貸会議室プラザ, 2017年2月18日
- ⑥ 松村浩由 「Structural transition pathway of the bacterial cell division protein」、新学術領域研究「動的秩序と機能」第5回国際シンポジウム, 東京大学数理科学研究棟, 東京都目黒区, 2017年1月21日
- ⑦ 北原亮 「High-energy conformations of proteins are new targets for structural biology」、第39回日本分子生物学会年会, 日本分子生物学会, パシフィコ横浜、横浜, 2016年12月1日
- ⑧ 北原亮 「High pressure NMR reveals a fluctuating ubiquitin structure」、第42回内藤コンフェレンス、シャトレーゼキングダムサッポロ、北海道、2016年10月5日、
- ⑨ 松村浩由 「離合集散する柔らかいタンパク質の構造機能解析光合成CO₂固定回路と細胞分裂」、X線の会, 大阪大学蛋白質研究所, 大阪, 2016年9月24日
- ⑩ Kitahara R, Yoshimura Y, Xue M, Kamade T, Mulder FAA, O₂ binding sites in protein cavities detected by gas-pressure NMR spectroscopy, High Pressure Bioscience and Biotechnology, Toronto, Canada, 2016年7月25日
- ⑪ Kitazawa S, Wakamoto T, Ikeya T, Kameda T, Yagi-Utsumi M, Kato K, Roumestand C, Baxter NJ, Williamson MP, Kitahara R, NMR snapshots of a fluctuating ubiquitin structure, EUROMAR2016, Aarhus, Denmark, 2016年7月4日
- ⑫ 松村浩由 「細胞分裂の階層構造ダイナミクスの解明」、平成28年度「動的秩序と機能」全体班会議, 長浜ロイヤルホテル, 滋賀県長浜市, 2016年6月12日
- ⑬ 寺内一姫 「生物時計再構成系の動的秩序探究」平成28年度「動的秩序と機能」全体班会議, 長浜ロイヤルホテル, 滋賀県長浜市, 2016年6月12日
- ⑭ Kitahara R, Solution structure of transiently populated excited states of ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy, Protein NMR beyond, Osaka University, Osaka, 2016年6月3日

(3) 出版物

なし