

[037]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2022年

<https://hdl.handle.net/2324/7162105>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 37, pp.1-, 2023. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :



附属高深度オミクスサイエンスセンター
Medical Research Center for High Depth Omics

ゲノミクス分野

Division of Genomics

准 教 授 : 柴 田 弘 紀

Associate Professor : Hiroki Shibata, Ph.D.

当研究室では、疾病や適応進化と深い関わりを持つ遺伝的多様性の解析を行うことにより、遺伝情報制御機構や分子進化の観点から生命現象を理解することを目指している。疾患原因遺伝子変異の同定のみならず、発症機序解明を目指した動物モデルによる遺伝子変異機能解析も進めている。さらに、非モデル生物のゲノム解析として、衛生動物である南西諸島のハブを対象にした研究も進めている。さらに近年は、潰瘍性大腸炎のバイオーム解析や古人骨のゲノム解析にも参画している。

A. 神経疾患の分子基盤の解明

a. 遺伝性ジストニアの責任遺伝子変異同定

ジストニアは持続性の筋収縮による不随意運動を特徴とする神経疾患であり、一部は家族性である。久留米大学で見出されたジストニア家系に対して、NGSを用いたエクソームシーケンシングにより、責任変異の同定を行った。常染色体優性遺伝を想定して、発端者からヘテロ接合の非道義SNV (Single Nucleotide Variant) を約13万個同定した。これまでに知られていたミオクロヌスおよびジストニアの既知遺伝子セット26個を探索した結果、*SGCE* 遺伝子の第5エクソンにナンセンス変異 (M_003919.3: c.304C > T [Arg102*]) を見出した。また Sanger sequencing により、当該アレルは非発症の父親から継承されていることを確認した。*SGCE* 遺伝子は、ゲノムインプリンティングにより母親由来のアレルが不活化されることが知られていたため、本家系サンプルでアレル特異的 qPCR を行ったところ、発端者では母親由来の正常アレルは発現しておらず、ナンセンス変異を持つ父親由来の変異アレルのみが発現しており、結果として *SGCE* の機能喪失によりジストニアを発症していたことが確認できた。合わせて当該ジストニア家系の疾患責任遺伝子は *SGCE* となり、DYT11型と分子診断された (Morikawa et al. *Hum Genome Var.* 2022)。

b. 遺伝性神経疾患の血中バイオマーカーの同定

痙性対麻痺28型 (Spastic paraplegia type 28, SPG28) は *DDHD1* 遺伝子の機能喪失によって引き起こされる遺伝性神経疾患である。当研究室では *Ddhd1* ノックアウトマウスを樹立し、SPG28のモデルマウスとして有用であることを報告した (Morikawa et al. *Biosci Rep.* 2021)。SPG28の診断に有用な血中バイオマーカーを探索するため、SPG28モデルマウスとSPG28患者の血液を用いたリピドーム解析を実施した。*Ddhd1* ノックアウトマウス

では phosphatidylinositol (PI) と lysosposphatidic acid (LPA) の総量が有意に上昇した。各 PI の変化を調べたところ、9 種類の PI が *Ddhd1* ノックアウトマウスで有意に上昇していた。次に、ヒト血清中におけるこれらの 9 つの PI の変化を調べた。このうち 4 つの PI は SPG28 患者で高いレベルを示し、これらはいずれもオレイン酸を含む PI であった (PI 18:1/18:1, PI 18:1/20:3, PI 18:1/20:4, PI 18:1/22:5)。LPA は *Ddhd1* ノックアウトマウスで観察された結果と異なり、SPG28 患者では低いレベルを示した。本研究から、オレイン酸を含む PI は SPG28 の血中バイオマーカーとして有望であることが示唆された (Morikawa et al. *Biomedicines*. In press)。

B. 毒生物のオミクス解析

生物毒は、生理活性物質の新たな創薬シーズとして、近年大変注目を浴びている。当研究室では、日本独自の創薬シーズ開発を目指して日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) を対象に、オミクス解析及び遺伝的多様性の解析を行っている。

a. 毒腺に高発現するタンパク質修飾酵素の同定と進化的解析

ハブを含むクサリヘビ類の毒液は、金属プロテアーゼをはじめとする多数の毒液タンパク質の複雑な混合物であるが、毒液成分の本体である酵素タンパク質の品質維持機構についてはほとんどわかっていない。毒液におけるタンパク質品質維持機構の解明を目指し、奄美大島産 5 個体の毒腺と、17 の非毒腺組織の RNA シークエンスを行った。その結果、毒液で有意に発現変動している遺伝子 (DEGs) 1,537 個を同定し、このうちタンパク質品質維持機構に関連するタンパク質 5 つが、毒腺特異的に高発現していることを見出した。これらは、1 つが分子シャペロン (*CALR* (第 86 位)) であり、残る 4 つはいずれもタンパク質修飾酵素 (*PAHB* (第 8 位), *PPIA* (第 25 位), *SELENOM* (第 26 位), *PDIA3* (第 32 位)) であった。これらのタンパク質品質維持関連遺伝子は、多重化した多様な毒液タンパク質を基質としていると予想されるが、いずれもゲノム中に 1 コピーのみ存在し、オルソログ解析から進化速度も遅いことが示され、毒液の機能発現に重要な役割を果たしていることが示唆された (Isomoto et al. *Toxins* 2022)。

業績目録

原著論文

1. Nagasue T., Hirano A., Torisu T., Umeno J., Shibata H., Moriyama T., Kawasaki K., Fujioka S., Fuyuno Y., Matsuno Y., Esaki M., Kitazono T. (Apr 2022)

The compositional structure of the small intestinal microbial community via balloon-assisted enteroscopy.

Digestion 8:1-11.

2. Isomoto A., Shoguchi E., Hisata K., Inoue J., Sun Y., Inaba K., Satoh N., Ogawa T., Shibata H. (Apr 2022)

Active expression of genes for protein modification enzymes in the venom gland of habu snakes.

Toxins (Basel) 14:300.

3. Matsuno Y., Torisu T., Umeno J., Shibata H., Hirano A., Fuyuno Y., Okamoto Y., Fujioka S., Kawasaki K., Moriyama T., Nagasue T., Zeze K., Hirakawa Y., Kawatoko S., Koga Y., Oda Y., Esaki M., Kitazono T. (Apr 2022)

One-year clinical efficacy and safety of indigo naturalis for active ulcerative colitis: a real-world prospective study.

Intest Res. 20:260-268.

4. Morikawa T., Miura S., Fan L., Watanabe E., Fujioka R., Motooka H., Yasumoto S., Uchiyama Y., Shibata H. (Aug 2022)

A Japanese family with dystonia due to a pathogenic variant in *SGCE*.

Hum Genome Var. 9:29.

5. Nakata M., Yokota N., Tabata K., Morikawa T., Shibata H., Kenzaka T. (Mar 2023)

Hereditary congenital methemoglobinemia diagnosed at the age of 79 years: A case report.

Medicina (Kaunas) 59(3):615.

6. Morikawa T., Takahashi M., Izumi Y., Bamba T., Moriyama K., Hattori G., Fujioka R., Miura S., Shibata H. (Mar 2023)

Oleic acid-containing phosphatidylinositol is a blood biomarker candidate for SPG28.

Biomedicines. in press.

学会発表

1. 矢内 翔貴, 原尾 朔弥, 竹内 亜美, 前田 真理恵, 柴田 弘紀, 服部 正策, 小田-上田 直子, 千々岩 崇仁. (9/5-6, 2022)
ヒメハブ血清に含まれる毒中和因子:SSP をコードする遺伝子アレイのゲノム構造解析. (口頭発表)
第68回トキシシンポジウム, バーチャルシンポジウム.
2. 渡邊 笑奈, 三浦 史郎, 柴田 弘紀, 内山 雄介. (9/14-16, 2022)
エクソーム解析を用いた若年発症パーキンソン病の責任変異の探索. (口頭発表)
日本遺伝学会第94回大会, 北海道大学.
3. 孫 崑瑞, 柴田 弘紀. (9/14-16, 2022)
全ゲノムデータからの日本産ハブ属4集団の集団動態解析. (口頭発表)
日本遺伝学会第94回大会, 北海道大学.

4. 比留木 成美, 三浦 史郎, 藤下 幸穂, 柴田 弘紀. (9/14-16, 2022)
RDH11 の新規ナンセンス変異を持つ神経および筋肉症状を併発する家族性網膜色素変性症.
(口頭発表)
日本遺伝学会第 94 回大会, 北海道大学.
5. 範 駱鳴, 孫 崑瑞, 森川 拓弥, 藤岡 竜太, 三浦 史郎, 柴田 弘紀. (9/14-16, 2022)
常染色体優性遺伝性運動および感覚神経障害に関連する *IQGAP3* のイントロン変異の機能分析.
(口頭発表)
日本遺伝学会第 94 回大会, 北海道大学.
6. 富永 篤, 寺田 考紀, 嘉陽 翔太, 上江洲 安史, 柴田 弘紀, 戸田 守, 岡 慎一郎, 太田 英利.
(11/5-6, 2022)
沖縄島におけるサキシマハブ, タイワンハブ, 在来種ハブの交雑状況の遺伝学的調査. (口頭
発表)
日本爬虫両棲類学会第 61 回沖縄大会, 琉球大学.
7. 孫 崑瑞, 柴田 弘紀. (11/5-6, 2022)
全ゲノムデータからの日本産ハブ属 4 集団の集団動態解析. (口頭発表)
日本爬虫両棲類学会第 61 回沖縄大会, 琉球大学.
8. 竹林 聖純, 磯本 明子, 日高 将文, 二井 勇人, 柴田 弘紀, 小川 智久. (11/30-12/2, 2022)
ハブ毒腺組織由来プロテインジスルフィドイソメラーゼファミリータンパク質の機能解析.
(ポスター発表)
第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張メッセ.
9. 範 駱鳴, 孫 崑瑞, 藤岡 竜太, 三浦 史郎, 柴田 弘紀. (11/30-12/2, 2022)
常染色体優性運動神経障害および感覚神経障害におけるグアニンヌクレオチド交換因子の異
常な過剰発現. (ポスター発表)
第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張メッセ.

エピゲノミクス分野

Division of Epigenomics

准教授：鵜木 元香

Associate Professor : Motoko Unoki, D.V.M., Ph.D.

特命教授：佐々木 裕之

Specially Appointed Professor : Hiroyuki Sasaki, M.D., Ph.D.

当分野を兼務していたエピゲノム制御学分野の主幹教授・佐々木裕之は令和3年度末を以て定年退職し、令和4年度は特命教授(非常勤)として引き続き研究教育を行った。そのため、正規の教員である鵜木准教授が分野主任を兼務した。また、特任講師・藤英博が令和3年度末を以て国立遺伝学研究所の特命准教授として異動した。

エピゲノミクス分野では疾患における細胞の質的变化をエピゲノムの観点から理解することを目指し、高速 DNA シーケンサーを用いてエピゲノム解析 (WGBS, mRNA-seq, ChIP-seq, RNA-seq) を行っているほか、佐々木は国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) の国際科学運営委員としてエピゲノム解読を推進している。また、学内外の研究室との共同研究を積極的に行い、モデル生物であるマウスのエピゲノム解析を支援している。最終的に、他のオミクス情報と合わせた横断的・統合的な研究を展開し、様々な病気を克服することを目指している。

具体的な研究成果は、エピゲノム制御学分野のA～Fを参照。

業績目録

原著論文

1. Yano S., Ishiuchi T., Abe S., Namekawa S.H., Huang G., Ogawa Y., Sasaki H. (Aug 2022)
Histone H3K36me2 and H3K36me3 form a chromatin platform essential for DNMT3A-dependent DNA methylation in mouse oocytes.
Nat Commun. 13: 4440.
2. Maruyama O., Li Y., Toh H., Au Yeung W.K., Sasaki H. (Sep 2022)
CMIC: Predicting DNA methylation inheritance of CpG islands with embedding vectors of variable-length k-mers.
BMC Bioinform. 23:371.
3. Unoki M., Velasco G., Kori S., Arita K., Daigaku Y., Au Yeung W.K., Fujimoto A., Ohashi H., Kubota T., Miyake K., Sasaki H. (Dec 2022)

Novel compound heterozygous mutations in UHRF1 are associated with atypical immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies (ICF) syndrome with distinctive genome-wide DNA hypomethylation.

Hum Mol Genet. Online publication.

総説

1. Unoki M., Sasaki H. (Oct 2022)
The UHRF protein family in epigenetics, development, and carcinogenesis.
Proc. Japan Acad. Ser. B 98:401-415.

著書

1. 鵜木 元香. (2022年4月)
第8章 第5節 ICF 症候群.
疾患の原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬/診断技術への応用. 511-519, 技術情報協会.
2. 久保 直樹. (2023年2月)
ゲノム3次元構造が司る遺伝子制御.
Medical Science Digest. 49 (2), ニューサイエンス社.

学会発表 (口頭発表)

1. 歐陽 允健. (4/14, 2022)
Maternal factor Stella and DNA methylation in germ cell/母体因子 Stella と生殖細胞の DNA メチル化.
遺伝研研究会 (共催: 熊本大学発生医学研究所): 有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する若手研究者の会, 三島.
2. 鵜木 元香. (6/9-10, 2022)
染色体安定性の守護神としてのDNAメチル化: ICF症候群研究がもたらした知見.
第15回日本エピジェネティクス研究会年会, 福岡.
3. 佐々木 裕之. (6/9-10, 2022)
マウス卵子の発生能とエピゲノム修飾の相互作用ネットワーク. (特別講演)
第15回日本エピジェネティクス研究会年会, 福岡.
4. 鵜木 元香. (6/28, 2022)
DNAメチル化の維持と染色体安定性: ICF症候群研究がもたらした知見. (招待講演)
第74回日本細胞生物学会大会, 東京.
5. 鵜木 元香. (7/4-5, 2022)

- 染色体安定性の守護神としてのDNAメチル化：ICF症候群研究がもたらした知見。 (招待講演)
遺伝研研究会: 染色体安定維持研究会, 三島.
6. 佐々木 裕之. (7/28, 2022)
卵子のエピジェネティクスと発生能. (特別講演)
ART FORUM'22, オンライン.
 7. 鶴木 元香. (9/11-14, 2022)
エピゲノム異常を伴う先天性疾患の多様な発症メカニズム-ICF症候群を例として. (招待講演)
第115回日本繁殖生物学会大会, 東京.
 8. 佐々木 裕之. (9/14-16, 2022)
運命と偶然のはざまを科学する: 私のエピジェネティクス研究. (最終講義)
日本遺伝学会第94回大会, 札幌.
 9. 歐陽 允健. (9/14-16, 2022)
Stellaはマウス始原生殖細胞のCGメチル化リプログラミングに資する.
日本遺伝学会第94回大会, 札幌.
 10. Naoki Kubo. (10/19-22, 2022)
Dynamics of CTCF-dependent and -independent enhancer-promoter contacts during cell differentiation.
The 29th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists Conference & the 2022 Chinese Society of Biochemistry and Molecular Biology Conference, オンライン.
 11. 久保 直樹. (11/9-11, 2022)
Dynamics of enhancer-promoter contacts during cell differentiation.
第95回日本生化学会大会, 名古屋.
 12. Seiichi Yano. (11/16-17, 2022)
Histone H3K36me2 and H3K36me3 form a chromatin platform essential for DNA methylation in mouse oocytes.
The 31th Hot Spring Harbor International Symposium, オンライン.
 13. Hiroyuki Sasaki. (11/23-25, 2022)
Multiple histone-interaction regulates DNMT3A mediating DNA methylation and imprinting in mouse oocytes. (Organizer and Speaker)
The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development", Fukuoka.
 14. 久保 直樹. (12/14-17, 2022)
細胞分化におけるエンハンサー・プロモーター相互作用のダイナミクス.
日本人類遺伝学会第67回大会, 横浜.

15. 久保 直樹. (2/21, 2023)
細胞分化における遠位エンハンサーとクロマチン構造変化の役割.
遺伝研研究会: ゲノム医科学とバイオインフォマティクスの接点と集学研究, 三島.
16. 佐々木 裕之. (2/25, 2023)
早期ライフステージにおける環境ストレスとエピジェネティクス. (特別講演)
第30回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 久留米.
17. Hiroyuki Sasaki. (3/28-31, 2023)
Regulation of DNA methylation and imprinting in mouse oocytes. (招待講演)
The 36th International mammalian Genome Conference (IMGC2023), Tsukuba.

学会発表（ポスター発表 14件）

内訳省略.

トランスクリプトミクス分野

Division of Transcriptomics

教授：大川 恭行

Professor : Yasuyuki Ohkawa, Ph.D.

当分野は8年目を迎え、大川恭行教授、原田哲仁准教授、前原一満助教、富松航佑助教、学術研究員2名、博士課程学生3名、テクニカルスタッフ4名、派遣社員1名、秘書1名の計15名により研究活動を展開している。

当分野はトランスクリプトミクスにより遺伝子発現を定量、定性の両面から網羅的に解析することで生体防御システムの解明に貢献することを目指している。特に超並列シークエンサーや空間オミクスを用いた全遺伝子転写量測定、ゲノムワイドなクロマチン解析およびその技術開発を行っている。現在は、骨格筋分化を中心に、遺伝子が転写可能になるクロマチン構造の解明を行っている。本分野は、エピゲノム・トランスクリプトームの測定およびその成立機序を体系的に解析し、他のオミクス解析を取り入れ、遺伝子発現の普遍的なメカニズムの解明を目指している。

A. 転写能獲得機序の解明：機能的なクロマチン構造の形成に必要な分子の網羅的同定とその機能解析

DNAとヒストンの複合体であるヌクレオソームが連なって形成されるクロマチン構造は、ヒストンの翻訳後修飾やヒストンバリエント（ヒストン亜種）の取り込みによる動的な構造変換によって転写因子のプロモーター領域への結合を規定し、分化や発生の局面に応じたゲノム情報の取捨選択、つまり選択的な遺伝子発現の足場となっている。ヒストンの翻訳後修飾が活発に研究されている一方で、ヒストンバリエントの選択機序は未だ明らかとなっていない。その大きな原因はゲノムにコードされているヒストン遺伝子の全容が明らかでなかったことによる。ヒストン遺伝子は、パラログ間の相同性が極めて高く、ヒトゲノム計画が終了し18年が経過した現段階においても、いまだ解析が滞っている。我々は2015年に、コンピュータを用いた新規手法により未知ヒストンバリエント遺伝子の網羅的探索に成功し、マウスゲノムに存在する未知のヒストンH3様のバリエント遺伝子を14種同定した。以降、新たに同定したヒストンH3バリエントが構成するクロマチン構造が、遺伝子発現をどのように制御しているのか解明を進めている。2016年度では精巣特異的ヒストンバリエントH3tの解析を展開し、新規ヒストンH3tは精子形成の特定の時期に発現し、元々ゲノムに取り込まれていたH3と置き換わり、精子固有のクロマチン構造を形成すること、またこの構造が精子形成に不可欠であること明らかにした。2018年度はさらに、骨格筋幹細胞特異的なヒストンH3mm7につ

いて解析を行った結果から、H3mm7 は骨格筋再生過程において、特定の時期に発現し機能するヒストンであると考えられた (Harada A et al., Nature Commun., 2018). 2020 年度はさらに、ヒストンでありながらもクロマチンに取り込まれない性質を持つ新たなヒストンの解析に着手した. 精巣特異的な発現を示す H3mm15, 骨格筋前駆細胞に発現が認められる H3mm18 の二つである. 1 細胞 RNAseq 技術を用いた解析により H3mm18 は静止期骨格筋サテライト細胞に発現し分化に伴い発現が低下することを発見した (Hirai S, Tomimatsu K et al., Nucleic Acids Res., 2021). そこで、H3mm18 ノックアウトマウスを作出し、その表現型を解析したところ骨格筋再生時の無秩序発現が認められた. そこで、H3mm18 の機能を解析するため各種エピゲノム解析を行った結果、H3mm18 は H3.3 依存的なクロマチン構造形成に関与していることが明らかとなった. またクライオ電顕による単粒子解析を東京大学胡桃坂仁志教授との共同研究で行い、DNA との結合能が極端に低い特徴的な構造を明らかにしている. 今後も、様々な組織において特異的に機能するヒストンバリエントを継続して解析する予定である.

B. トランスクリプトミクス解析

各種トランスクリプトミクス解析についても精力的に行っている. 共同研究を中心に各種病態解明を行った. 本年度も protein coding gene を中心に、特に微量検体を用いたトランスクリプトミクス解析を進めた (Uchino S et al., J Cell Biol., 2022, Kaneshige A et al., Cell Stem Cell, 2022 他 14 報). 今後は、1 細胞レベルの解析がより普及していくことと考えられる. 本分野においても Drop-Seq, CEL-Seq2 の既存の手法による解析を行った.

C. トランスクリプトミクス技術開発

人体に存在する 30 兆個の細胞は全て同一の遺伝情報を持ち、異なる組織を構成する細胞はそれぞれ特定の遺伝子を選択的に発現し固有の性質を獲得する. 現在、次世代シーケンサーによる網羅的に発現する遺伝子をプロファイリングする RNA シークエンス技術の発展により、単一の細胞での遺伝子発現 (個々の遺伝子の RNA の存在量) を解析することが可能となっている. しかしながら、遺伝子の発現制御のメカニズムを理解するために不可欠なエピゲノム解析は、従来の手法では少なくとも数千個の細胞を必要としたため、幹細胞など生体内に僅かにしか存在しない細胞への適用は極めて困難であった. 昨年度、本分野では極めて少数の細胞を用いてエピゲノム情報を取得できる「クロマチン挿入標識 (Chromatin Integration Labeling: ChIL)」法を開発した (Harada A et al., Nature Cell Biol., 2019, Handa T et al., Nature Protoc., 2020). 本手法は、細胞を破壊することなく、任意の転写因子やヒストン修飾などが存在する領域の塩基配列を増幅することができるため、高感度で解析ができる. そのため、遺伝子発現

を制御する転写因子の結合位置やヒストン修飾を単一の細胞で測定することが世界で初めて可能となった。本研究により開発された手法は、がん研究・再生医療などへの応用のために更に tsChIL として発展させ発表した (Maehara K et al., Mol Syst Biol., 2021)。本年度が産学連携の一環として民間企業に技術移転を行い試薬として上市された。また、ChIL-seq を基盤として新たなオミクス解析技術を開発している。特に、ハイスループット化、マルチオミクス化、加えて、これら多次元データに資する独自のデータ解析手法の開発も進めている。特に、今後多様化するトランスクリプトミクスに対応すべく新たな技術開発として、従来の転写因子、クロマチンリモデリング因子に加えて、新たに RNA, DNA 等の修飾核酸認識型特異的モノクローナル抗体の作成と単一細胞レベルでのマルチオミクスの開発を進めている。

D. 空間オミクス技術開発

今年度より、トランスクリプトミクス技術を基盤とした一細胞空間オミクス技術開発を本格化させた。本開発では、組織切片上で細胞をバラバラにすることなく、ゲノムからプロテオーム・メタボローム情報の同時取得を目指している。現段階において、ゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム、プロテオームの各レイヤーにおいて個別に単一細胞レベルでの定量解析に成功し知的財産化を進めた。特にトランスクリプトームについては、先行して行った光化学単離法 (Photo-Isolation Chemistry:PIC 法) を論文発表した (Honda M et al., Nature Commun., 2021)。PIC 法では、世界最高の解像度で空間トランスクリプトームをアンバイアスに行うことが可能である。本技術を含めて体系的な技術開発を進めている。

業績目録

原著論文

1. Moiseeva V., Cisneros A., Sica V., Deryagin O., Lai Y., Jung S., Andrés E., An J., Segalés J., Ortet L., Lukesova V., Volpe G., Benguria A., Dopazo A., Benitah S.A., Urano Y., Del Sol A., Esteban M.A., Ohkawa Y., Serrano A.L., Perdiguero E., Muñoz-Cánoves P. (Jan 2023)
Senescence atlas reveals an aged-like inflamed niche that blunts muscle regeneration.
Nature 613(7942):169-178.
2. Ohishi H., Shimada S., Uchino S., Li J., Sato Y., Shintani M., Owada H., Ohkawa Y., Pertsinidis A., Yamamoto T., Kimura H., Ochiai H. (Dec 2022)
STREAMING-tag system reveals spatiotemporal relationships between transcriptional regulatory factors and transcriptional activity.
Nat Commun. 13(1):7672.

3. Nagasaki M., Sekiya Y., Asakura A., Teraoka R., Otokozawa R., Hashimoto H., Kawaguchi T., Fukazawa K., Inadomi Y., Ken T., Murata K., Ohkawa Y., Yamaguchi I., Mizuhara T., Tokunaga K., Sekiya Y., Hanawa T., Yamada R., Matsuda F. (Feb 2023)
Design and implementation of a hybrid cloud system for large-scale human genomic research.
Hum Genome Var. 10(1):6.
4. Fleming T., Kikuchi Y., Nakajo M., Tachizawa M., Inazumi T., Tsuchiya S., Sugimoto Y., Saito D., Suyama M., Ohkawa Y., Baba T., Morohashi K., Okubo K. (Nov 2022)
Prostaglandin E2 receptor Ptger4b regulates female-specific peptidergic neurons and female sexual receptivity in medaka.
Commun Biol. 5(1):1215.
5. Yoshioka Y., Anzai K., Kowada R., Hiratsuka K., Hirayabu T., Yasuda M., Ohkawa Y., Sato T., Suyama M., Yoshida H., Yamaguchi M. (Nov 2022)
Drosophila transcription factor NF-Y suppresses transcription of the lipase 4 gene, a key gene for lipid storage.
Exp Cell Res. 420(1):113307.
6. Inoue M., Baba T., Takahashi F., Terao M., Yanai S., Shima Y., Saito D., Sugihara K., Miura T., Takada S., Suyama M., Ohkawa Y., Morohashi K. (Sep 2022)
Tmsb10 triggers fetal Leydig differentiation by suppressing the RAS/ERK pathway.
Commun Biol. 5(1):974.
7. Masuda T., Haji S., Nakashima Y., Tsuda M., Kimura D., Takamatsu A., Iwahashi N., Umakoshi H., Shiratsuchi M., Kikutake C., Suyama M., Ohkawa Y., Ogawa Y. (Jul 2022)
Identification of a drug-response gene in multiple myeloma through longitudinal single-cell transcriptome sequencing.
iScience 25(8):104781.
8. Honda M., Kimura R., Harada A., Maehara K., Tanaka K., Ohkawa Y., Oki S. (Apr 2022)
Photo-isolation chemistry for high-resolution and deep spatial transcriptome with mouse tissue sections.
STAR Protoc. 3(2):101346.
9. Kohno K., Shirasaka R., Yoshihara K., Mikuriya S., Tanaka K., Takanami K., Inoue K., Sakamoto H., Ohkawa Y., Masuda T., Tsuda M. (Apr 2022)
A spinal microglia population involved in remitting and relapsing neuropathic pain.
Science 376(6588):86-90.
10. Yoshimoto Y., Uezumi A., Ikemoto-Uezumi M., Tanaka K., Yu X., Kurosawa T., Yambe S., Maehara K., Ohkawa Y., Sotomaru Y., Shukunami C. (Mar 2022)
Tenogenic Induction From Induced Pluripotent Stem Cells Unveils the Trajectory Towards Tenocyte

Differentiation.

Front Cell Dev Biol. 10:780038.

11. Goya T., Horisawa K., Udono M., Ohkawa Y., Ogawa Y., Sekiya S., Suzuki A. (Jul 2022)
Direct Conversion of Human Endothelial Cells Into Liver Cancer-Forming Cells Using Nonintegrative Episomal Vectors.
Hepatology Commun. 6(7):1725-1740.

学会発表（口頭発表）

1. 大川 恭行. (3/3, 2023)
単一細胞マルチオミクスによる骨格筋分化制御機構の解明. (招待講演)
第6回運動器と健康研究会, オンライン.
2. 大川 恭行. (1/16, 2023)
Spatial multi-omics for understanding chromatin dynamics. (招待講演)
2023年度高深度オミクスシンポジウム, オンライン.
3. 大川 恭行. (1/2, 2023)
データから変化を取り出す新たな単一細胞解析技術. (招待講演)
【富士フイルム】講演, オンライン.
4. Yasuyuki Ohkawa. (11/13-14, 2022)
Single-cell multi-targeted chromatin integration labeling technology for understanding chromatin dynamics. (招待講演)
CSHA meeting on Integrative Epigenetics in Plants, 兵庫.
5. 大川 恭行. (11/9-11, 2022)
空間オミクス技術によるクロマチン構造制御メカニズムの解明. (招待講演)
第95回日本生化学会大会, 愛知.
6. 大川 恭行. (11/5-6, 2022)
細胞恒常性を担うシグナルと遺伝子発現の制御. (招待講演)
第16回日本臨床ストレス応答学会, オンライン.
7. 大川 恭行. (10/18-19, 2022)
高深度解析による全ゲノムレベルの単一細胞オミクスへの挑戦. (招待講演)
NGS EXPO 2022, 大阪.
8. 大川 恭行. (10/17-18, 2022)
単一細胞軌跡追跡によるクロマチンダイナミクスの解明. (招待講演)
2022年度国立遺伝学研究所クロマチン研究会, 静岡.
9. Yasuyuki Ohkawa. (10/13-14, 2022)
Chromatin regulation during skeletal muscle regeneration. (招待講演)

第 17 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム, 石川.

10. 大川 恭行. (9/14-15, 2022)
骨格筋分化のクロマチンダイナミクス. (招待講演)
日本遺伝学会第 94 回大会, 北海道.
11. 大川 恭行. (9/6, 2022)
トランスクリプトミクスで迫る細胞分化能. (招待講演)
大阪大学産業科学研究所セミナー, 大阪.
12. Yasuyuki Ohkawa. (8/22-23, 2022)
Spatial multi-omics for understanding gene expression regulated by cell-cell interaction. (招待講演)
Japan-UK Regulation through Chromatin Conference, Leicester, United Kingdom.
13. 大川 恭行. (8/24, 2022)
空間オミクスの現状と高度化. (シンポジウム)
令和 4 年度 BINDS シンポジウム, Online.
14. 大川 恭行. (8/5-6, 2022)
空間オミクスによる骨格筋組織老化機序の解明. (座長, 口頭発表)
第 8 回日本筋学会学術集会, 東京.
15. 大川 恭行. (6/9-10, 2022)
クロマチン解析のための新技術開発の現状と今後の展開. (口頭発表)
第 15 回日本エピジェネティクス研究会年会, 福岡.

質量分析センター・メタボロミクス分野

Mass Spectrometry Center, Division of Metabolomics

教授：馬場 健史

Professor : Takeshi Bamba, Ph.D.

当分野では、代謝物の総体であるメタボロームを解析するための技術開発およびメタボロミクスの応用研究に取り組んでいる。メタボローム解析は、ゲノム情報から転写、翻訳過程を経て生成した酵素に基づく低分子化合物の化学変化を包括的に捉えたものであり、ゲノム情報に最も隣接した高解像度表現型解析手段である。すなわち、遺伝子発現変動や生体内外の環境変動などの様々な摂動下において、その影響がはっきりと表現型に現れにくい場合であっても、メタボロームデータを活用することで生体内の変化を代謝物の変動、すなわち代謝プロファイルとして詳細に表現することが可能である。そのため、メタボローム解析によってゲノム情報の実行結果や各種摂動の影響を詳細に理解できれば、病気の診断や病態発症メカニズムの解析、医薬品の薬効・毒性評価など、幅広い分野での応用が期待できる。我々は、細胞内の代謝情報を高精度に観測するために、数種のクロマトグラフと15台の質量分析計を駆使した高感度かつ定量的なメタボローム分析手法を開発している。さらに、開発した分析手法を用いて疾患と代謝の関連性について基礎から応用までの幅広い研究を展開するとともに、他のオミクスとの統合解析を実施している。

当分野は2015年3月に開設され馬場健史が教授として務めている。2022年度は、馬場健史のほか、和泉自泰（准教授）、高橋政友（助教）、学振特別研究員1名、学術研究員4名、一貫制博士課程大学院生5名、研究生1名、テクニカルスタッフ9名、事務補佐員1名の合計24名の体制で研究活動を行った。また、革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST）、研究成果最適展開支援プログラムA-STEP（JST）、Data-driven iBMSの研究開発（NEDO）、未来社会創造事業（JST）、ムーンショット（JST）、戦略的創造研究推進事業（JST-CREST）、科研費学術変革領域研究A、科研費基盤研究B、科研費基盤研究C、科研費若手研究などの補助金による支援を受け研究を実施した。

A. Unified HILIC/AEX/MSによる次世代メタボローム分析法の開発

解糖系、クエン酸回路、アミノ酸代謝、核酸代謝など、生命活動を担う主幹代謝経路の中間代謝物は、高極性のイオン性（親水性）代謝物である。これらの代謝物を精確にプロファイルすることは、生命システムの理解に大きく貢献し得る。しかし、親水性代謝物は極性、電荷特性、分子量といった物性の範囲が幅広いため、単一手法での包括的測定には至っておらず、第一選択となる分析法の開発は未だ発展途上の段階

である。本研究では、1~3級アミンおよび4級アンモニウム基を修飾したメタクリレートポリマー粒子を充填した新規カラム（GL-HilicAex, 株式会社レゾナック・テクノサービス）を設計し、親水性相互作用と陰イオン交換作用を連続的に組み合わせた親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析法（Unified HILIC/AEX/MS/MS）を開発した。

包括的な親水性代謝物分析法を開発するために、耐アルカリ性の高いポリマー粒子系アミノカラムを用いて LC および MS 条件の最適化に取り組んだ。陽イオン性（ヌクレオシド、核酸塩基、アミノ酸）、陰イオン性（有機酸、糖リン酸、ヌクレオチド、補酵素）の代表的な代謝物を選定し、各種分離条件に対する保持挙動の変化を調査した結果、(1) 本カラムは陰イオン性化合物に対して非常に強い保持を示すこと、(2) 水系移動相の重炭酸アンモニウム濃度の増加あるいは pH を塩基性に寄せることで、保持の強い陰イオン性化合物の溶出が早まること、(3) 陽イオン性化合物の logPow と保持時間の間には強い相関があることが分かった。さらに、陽イオン性代謝物は、HILIC による分離モードによって溶出し、その後、AEX による分離モードによって陰イオン性代謝物が分離・溶出することを見出した。本手法は、ポリマー粒子系アミノカラムにおいて移動相 pH を塩基性に調整し、添加剤の種類と濃度およびグラジエント条件を最適化することで、HILIC と AEX の分離モードが段階的に働く新しいクロマト分離モードであると結論づけた。また、当該 Unified HILIC/AEX 分析法の初期溶媒はアセトニトリルが主であるため、Bligh-Dyer 抽出後の水相試料（水/メタノール = 45/55）に対して遠心濃縮・凍結乾燥などの工程を行わずに直接システムに注入することが可能であった。そのため濃縮操作により加水分解等を受けやすい代謝物についても精確な観測が可能となった。以上の結果から、開発した新規 Unified HILIC/AEX/MS/MS 分析法は、親水性代謝物を対象としたターゲットおよびノンターゲットメタボローム解析法の有効性を示したことから、当分野の第一選択となり得る革新的な方法としての活用が期待できる（原著論文 7）。

B. 超臨界流体クロマトグラフィーを用いた代謝物分析技術の開発

超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）は、超臨界二酸化炭素（scCO₂）を移動相の主成分として用いる分離技術であり、移動相の高拡散性や不燃性・低コストなど、従来の分離技術と比較していくつかの利点がある。二酸化炭素は非極性であり、SFC が疎水性代謝物の分析に有利であることから、脂質分析などでメタボロミクス研究にも広く適用されてきた。しかし、アミノ酸は親水性代謝物であることから、これまで SFC を用いたアミノ酸分析の技術に関する研究はほとんど報告されていない。したがって、分析時間、測定対象の数、ピーク形状、および感度の点から、当技術を改善する余地は数多く残されている。本研究では、SFC とタンデム質量分析（MS/MS）を結合し、標

準液を用いて非誘導体化アミノ酸の超高速キラル分析のための新しい分析法を開発した。具体的には、光学活性クラウンエーテルをキラル固定相とする CROWNPAK CR-I(+) カラムを用いて、アミノ酸のエナンチオマーの分離を検討した。キラル分離に重点を置いた検討では、30% MeOH という低モディファイア比率および流速 1 mL/min の条件下で、18 種類のアミノ酸鏡像体を 6.5 分以内に 1.96~33.62 の分解能 (R_s) でベースライン分離することに成功した。次にスループットも考慮した検討では、40% MeOH および流速 3 mL/min の条件下で、ヒスチジンを除く 17 種類のアミノ酸鏡像体の分離が、超高速クロマトグラフィーの基準 ($t_{R2} \leq 1$ 分および $R_s \geq 1.5$) を満たした。開発した超高速キラル分離法を市販の黒酢を分析することで検証したところ、8 種類の D-アミノ酸が検出され、算出した各 D-体存在比 (%D) は、CR-I (+) 分析と CR-I (-) 分析の間で近似していることが確認できた。以上の結果から、本法は分析対象物のカバー率とスループットの両面で成功し、実用的であることが確認された(原著論文 3)。

SFC は、従来の液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーと同様に、医薬品、農薬、メタボローム解析などのルーチンメソッドとして広く応用されているハイ スループット分離技術である。ユニファイドクロマトグラフィー (UC) は、SFC を発展させたクロマトグラフィーであり、移動相を超臨界から亜臨界、液体へと連続的に変化させるグラジエント溶出を応用し、SFC の応用をさらに広げることができる。UC では、メタノール/水 (95/5) という一般的な移動相に添加剤を加えて、多くの親水性化合物を分析することが可能である。しかし、リン酸関連代謝物や多価カルボン酸の多くは、UC 条件下ではピーク形状が非常に悪く、溶出できないこともあり、UC によるメタボロームカバレッジの妨げになっている。本研究では、UC グラジエントの直後に水系グラジエントを採用し、1 回の測定で UC メタボロームカバレッジを拡張する新しい戦略を基に UC/HILIC の概念実証を提案しました。本方法は、従来の UC 法と比較して、精度と高いスループットを維持しながら、クロマトグラフィー性能とメタボロームカバレッジに関して大きな改善を示した(原著論文 13)。

SFC は、幅広い化学的性質に対応できることから、分析対象物の検出にエレクトロスプレーイオン化質量分析計 (ESI-MS) とのカップリングが多く用いられている。しかし、MS の感度はクロマトグラフィー条件に大きく依存するため、最適なクロマトグラフィー条件を決定するためにはイオン化機構を理解することが重要である。SFC/ESI-MS では、移動相に CO_2 を用いるため、イオン化機構が LC とは異なる。一部の研究では、 CO_2 とアルコールモディファイア-の混合物中にアルコキシカルボン酸が生成し、これらの種が CO_2 アシスト SFC/ESI-MS のイオン化に寄与することが示唆されていた。そこで、本研究では、この仮説を検証するために CO_2 アシスト ESI を検討したところ、メトキシカルボン酸が CO_2 /メタノール混合液中で生成し、ポジティブイオンモードでプロトン供与体として働くことでイオン生成や検出に寄与することを確認

した。このように、SFC/MS で高感度を得るためには、無添加メタノール/CO₂が最も適した移動相であることがわかった。本研究の結果は、CO₂アシスト SFC/MS 分析におけるモディファイアとメイクアップ溶媒の最適条件の選択を明らかにし、SFC/MS におけるメソッド開発に役立つと考えられる（原著論文 15）。

C. 血中代謝物データ統合に向けた絶対定量メタボローム解析システムの開発

代謝物の包括的な解析を旨とする「メタボロミクス」は、医学・医療分野をはじめ、多様な基礎学術研究・産業分野での有効活用が期待されている。一方で、実情として各代謝物の濃度定量を図る「定量メタボロミクス」はほとんど実施されていない。これは、メタボロミクスの第一義的手法である各種クロマトグラフィー質量分析において、生体サンプル由来の夾雑物が測定対象化合物のイオン化効率に影響を与える「マトリクス効果」が生じ、定量性が損なわれるためである。現行の相対的メタボロームデータは、分析バッチ間・装置間・施設間での比較・統合が不可能であり、コホート・バイオバンクなど、データの継続的蓄積や分析拠点間のデータ比較・統合が求められる分野において、定量性なく蓄積されていく従来型のメタボロームデータの有用性に疑問が呈されている。唯一、質量分析計で絶対定量を可能とする「安定同位体希釈法」では、内部標準として高価な安定同位体ラベル化標準品を代謝物ごとに用意する必要があるため、メタボローム解析において現状ではコスト・労力的に非現実的である。本研究では、血中代謝物データ統合に向けて、①既存のメタボローム分析法の性能評価、②絶対定量を実施する際に必要不可欠な「安定同位体ラベル化内部標準群 (stable isotope labeled internal standard mix, SILIS)」の開発、③血液代謝物の濃度真値の推定、を行った。

LC/MS は幅広い代謝物を高感度に測定できることからメタボロミクス分野で汎用的に使用されている。はじめに、約 500 個の親水性代謝物標準品と血漿試料を用いて、代表的な 4 つの LC/MS 分析系 (HILIC/MS, AEX/MS, PFPP-LC/MS, Unified-HILIC/AEX/MS) の性能評価を行った。異性体分離能・ピーク幅・検出感度・網羅性を指標にスコアリングを行うことで各分析系の特徴が明らかとなった。続いて、定量メタボローム分析のための SILIS 開発を行った。LC/MS はイオン化の際に生体試料由来の夾雑物質の影響により、マトリクス効果と呼ばれる目的代謝物のピーク強度が変動し定量性が損なわれる現象が起こる。本課題を解決する方法として SILIS を用いた安定同位体希釈法が挙げられる。当研究室では、¹³C グルコースで培養した大腸菌の代謝物抽出液を SILIS として用いることで低コストの定量メタボローム分析法の開発を進めてきた。しかし、SILIS は大腸菌とヒト血中から共通して検出される代謝物にしか適応できない。そこで、本研究ではヒトの血液中で検出されるバイオマーカー候補代謝物の生合成遺伝子を導入した大腸菌を用いて、b-SILIS (SILIS for blood) を作製した。最後に、b-SILIS

と4種のLC/MS分析系を用いることで血漿中の33種の代謝物の定量情報が取得可能となり、さらに、各分析系で算出された定量値を比較することで各代謝物の血液中の濃度真値の推定にも成功した。

また、今年度は、アミノ酸の汎用的な定量分析を行うための新たな方法論の開発も行った。具体的には、オートサンプラーのニードル内で誘導体化を行い、高速液体クロマトグラフィー蛍光検出(LC/FID)を用いて全自動でアミノ酸の定量分析を行うことのできる In-Needle Pre-Column Derivatization for Amino Acid (iPDAQ) の開発に成功した(原著論文4)。

D. 免疫受容体の新規脂質リガンド探索に資する解析プラットフォームの開発

免疫受容体の一種であるC型レクチン受容体(CLRs)は病原体や損傷自己成分を認識して生体の危機を感知する。CLRに対するリガンドの構造やそれらの生合成機構の解明は、新規感染症治療薬の開発において重要である。本研究では、CLRの脂質リガンドの構造を迅速に決定するために、液体クロマトグラフィー高分解能タンデム質量分析(LC/HRMS/MS)を基盤とした脂質の分取・分析システムとレポーター細胞アッセイを融合した解析プラットフォームの開発を行った。

微量の生体試料抽出液(1~10 mg DW/mL)から脂質分子の分離・分取・同定を同時に達成するためにLC/HRMSとTriVersa NanoMateを組み合わせたLC-TriVersa NanoMate/HRMS/MS解析システムの構築を行った。本システムを用いてマイクロプレートに分取した試料の活性画分の特定を、レポーター細胞アッセイにより行った。次に、活性画分に含まれる脂質分子の構造を決定するために、in-house リピドミクスデータベースを構築した。In-house リピドミクスデータベースには90種の脂質クラス、34種のアシル側鎖脂肪酸を対象にin silicoで予想した1万種以上の脂質分子種の保持時間、HRMS、主要なHRMS/MSフラグメント情報を格納した。リガンド候補化合物の構造推定は、活性画分に該当するHRMSスペクトルおよびHRMS/MSスペクトルと構築したin-house リピドミクスデータベース情報を照合することで実施した。実際に、LC-TriVersa NanoMate/HRMS/MSシステム、in-house リピドミクスデータベースおよびレポーター細胞アッセイを統合した解析プラットフォームを用いることで、複数のCLRの脂質リガンド分子の同定に成功した(原著論文11)。

E. 共同研究

今年度のその他の研究成果として、開発したメタボロミクス解析プラットフォームを用いて、生体防御医学研究所内、国内、海外の大学との共同研究を精力的に行った(原著論文1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16)。

業績目録

原著論文

1. Mizuno R., Hojo H., Takahashi M., Kashio S., Enya S., Nakao M., Konishi R., Yoda M., Harata A., Hamanishi J., Kawamoto H., Mandai M., Suzuki Y., Miura M., Bamba T., Izumi Y., Kawaoka S. (Jun 2022)
Remote solid cancers rewire hepatic nitrogen metabolism via host nicotinamide-N-methyltransferase.
Nat Commun. 13(1):3346.
2. Tatsuguchi T., Uruno T., Sugiura Y., Oisaki K., Takaya D., Sakata D., Izumi Y., Togo T., Hattori Y., Kunimura K., Sakurai T., Honma T., Bamba T., Nakamura M., Kanai M., Suematsu M., Fukui Y. (Jun 2022)
Pharmacological intervention of cholesterol sulfate-mediated T cell exclusion promotes antitumor immunity.
Biochem Biophys Res Commun. 609:183-188.
3. Konya Y., Izumi Y., Hamase K., Bamba T. (Aug 2022)
Ultrafast simultaneous chiral analysis of native amino acid enantiomers using supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry.
J Chromatogr A 1677:463305.
4. Soma Y., Izumi Y., Shimohira T., Takahashi M., Imado Y., Tominaga S., Tokito K., Hata K., Shinadama S., Oshiro M., Hayakawa Y., Bamba T. (Aug 2022)
In-Needle Pre-Column Derivatization for Amino Acid Quantification (iPDAQ) Using HPLC.
Metabolites 12(9):807.
5. Kunduri G., Si-Hung L., Baena V., Vijaykrishna N., Harned A., Nagashima K., Blankenberg D., Izumi Y., Narayan K., Bamba T., Acharya U., Acharya J.K. (Sep 2022)
Delivery of ceramide phosphoethanolamine lipids to the cleavage furrow through the endocytic pathway is essential for male meiotic cytokinesis.
PLoS Biol. 20(9):e3001599.
6. Shibata K., Motozono C., Nagae M., Shimizu T., Ishikawa E., Motooka D., Okuzaki D., Izumi Y., Takahashi M., Fujimori N., Wing J.B., Hayano T., Asai Y., Bamba T., Ogawa Y., Furutani-Seiki M., Shirai M., Yamasaki S. (Nov 2022)
Symbiotic bacteria-dependent expansion of MR1-reactive T cells causes autoimmunity in the absence of Bcl11b.
Nat Commun. 13:6948.
7. Nakatani K., Izumi Y., Takahashi M., Bamba T. (Dec 2022)

Unified-Hydrophilic-Interaction/Anion-Exchange Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Unified-HILIC/AEX/MS): A Single-Run Method for Comprehensive and Simultaneous Analysis of Polar Metabolome.

Anal Chem. 94(48):16877-16886.

8. Morita K., Wada M., Nakatani K., Matsumoto Y., Hayashi N., Yamahata I., Mitsunari K., Mukae N., Takahashi M., Izumi Y., Bamba T., Shirane M. (Dec 2022)
PDZD8-deficient mice accumulate cholesteryl esters in the brain as a result of impaired lipophagy.
iScience 25(12):105612.
9. Hondo T., Ota C., Nakatani K., Miyake Y., Furutani H., Bamba T., Toyoda M. (Dec 2022)
Attempts to Detect Lipid Metabolites from a Single Cell Using Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry Coupled with Micro-Scale Supercritical Fluid Extraction: A Preliminary Study.
Mass Spectrometry 11(1):A0112.
10. Taya N., Katakami N., Omori K., Hosoe S., Watanabe H., Takahara M., Miyashita K., Nishizawa H., Konya Y., Obara S., Hidaka A., Nakao M., Takahashi M., Izumi Y., Shimomura I., Bamba T. (Jan 2023)
Change in fatty acid composition of plasma triglyceride caused by a 2 week comprehensive risk management for diabetes: A prospective observational study of type 2 diabetes patients with supercritical fluid chromatography/mass spectrometry-based semi-target lipidomic analysis.
J Diabetes Investig. 14(1):102-110.
11. Nishimura N., Tomiyasu N., Torigoe S., Mizuno S., Fukano H., Ishikawa E., Katano H., Hoshino Y., Matsuo K., Takahashi M., Izumi Y., Bamba T., Akashi K., Yamasaki S. (Jan 2023)
Mycobacterial mycolic acids trigger inhibitory receptor Clec12A to suppress host immune responses.
Tuberculosis 138:102294.
12. Nakamura J., Yamamoto T., Takabatake Y., Namba-Hamano T., Minami S., Takahashi A., Matsuda J., Sakai S., Yonishi H., Maeda S., Matsui S., Matsui I., Hamano T., Takahashi M., Goto M., Izumi Y., Bamba T., Sasai M., Yamamoto M., Matsusaka T., Niimura F., Yanagita M., Nakamura S., Yoshimori T., Ballabio A., Isaka Y. (Jan 2023)
TFEB-mediated lysosomal exocytosis alleviates high fat diet-induced lipotoxicity in the kidney.
JCI Insight 8(4):e162498.
13. Si-Hung L., Izumi Y., Bamba T. (Feb 2023)
First proof-of-concept of UC/HILIC for extending the versatility of the current art of supercritical fluid separation.
Anal Chim Acta 1240:340741.

14. Shimizu T., Schutt C.R., Izumi Y., Tomiyasu N., Omahdi Z., Kano K., Takamatsu H., Aoki J., Bamba T., Kumanogoh A., Takao M., Yamasaki S. (Feb 2023)
Direct activation of microglia by β -glucosylceramide causes phagocytosis of neurons that exacerbates Gaucher disease.
Immunity 56:1-13.
15. Fujito Y., Izumi Y., Nakatani K., Takahashi M., Hayakawa Y., Takayama M., Bamba T. (Mar 2023)
Understanding the mechanism of CO₂-Assisted electrospray ionization for parameter optimization in supercritical fluid chromatography mass spectrometry.
Anal Chim Acta 1246:340863.
16. Udo T., Matsuoka Y., Takahashi M., Izumi Y., Saito K., Tazoe K., Tanaka M., Naka H., Bamba T., Yamada K.I. (Mar 2023)
Structural Analysis of Intracellular Lipid Radicals by LC/MS/MS Using a BODIPY-Based Profluorescent Nitroxide Probe.
Anal Chem. 95(10):4585-4591.

著書

1. Toshiaki Yoshioka, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba. (Jun 2022)
Determination Method of Acrylamide in Beverages and Foods by Supercritical Fluid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.
Mass Spectrometry for Food Analysis, 281-292, Humana New York, NY.

学会発表

1. 川崎 貴裕, 宮崎 暁人, 和泉 自泰, 高橋 政友, 日高 彩子, 新居 卓朗, 松木 隆典, 木庭 太郎, 橋本 尚子, 辻野 和之, 三木 啓資, 馬場 健史, 木田 博. (4/22, 2022)
間質性肺疾患患者の気管支肺胞洗浄液リポドーム解析. (ポスター発表)
第 62 回 日本呼吸器学会学術講演会, 京都 (ハイブリット開催).
2. 中村 慎太郎, 横溝 久, 大塚 裕子, 和泉 自泰, 高橋 政友, 佐藤 直市, 坂本 竜一, 宮地 康高, 宮澤 崇, 馬場 健史, 小川 佳宏. (5/13, 2022)
SGLT2 阻害薬が肥満糖尿病マウスの骨格筋代謝に与える影響の検討. (口頭発表)
第 65 回 日本糖尿病学会年次学術集会, 神戸 (ハイブリット開催).
3. Emi Ito, Shinsuke Inuki, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Eri Ishikawa, Kensuke Shibata, Takeshi Bamba, Sho Yamasaki. (5/25, 2022)
Novel antigen for mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. (ポスター発表)
EMBO Workshop CD1/MR1-restricted T lymphocytes, Gothenburg.

4. 馬場 健史. (5/25, 2022)
次世代メタボロミクス技術の開発と生物工学的展開. (招待講演)
第9回 SBJ シンポジウム, Web 開催.
5. 馬場 健史. (5/27, 2022)
次世代メタボロミクスが拓く新たな代謝解析の世界. (招待講演)
東京大学社会連携講座「統合分子構造解析講座」オープンイノベーション拠点開設記念 東京大学-三井不動産 産学協創シンポジウム, Web 開催.
6. 細野 裕貴, 富安 範行, 和泉 自泰, 今村 彰宏, 熊ノ郷 淳, 石田 秀治, 馬場 健史, 山崎 晶. (5/28, 2022)
NKT 細胞の内因性抗原解析. (口頭発表)
第68回 生化学会近畿支部例会, 大津 (ハイブリッド開催).
7. Le Si-Hung, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba. (6/8, 2022)
First proof-of-concept of UC/HILIC for extending the versatility of the current art of supercritical fluid separation. (ポスター発表)
70th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (ASMS 2022), Minneapolis, MN.
8. 中谷 航太, 和泉 自泰, 馬越 洋宜, 日高 彩子, 緒方 大聖, 小川 佳宏, 馬場 健史. (6/22, 2022)
LC/MS/MS による生理活性脂質の一斉定量分析法の開発. (口頭発表)
第70回 質量分析総合討論会, 福岡.
9. 池田 和輝, 高橋 政友, 秦 康祐, 中谷 航太, 油屋 駿介, 富安 範行, 相馬 悠希, 馬場 健史, 和泉 自泰. (6/22, 2022)
ヒト初代肝細胞のマルチオミクス解析を基盤とした薬物誘発性肝障害評価法の開発. (口頭発表, ポスター発表)
第70回 質量分析総合討論会, 福岡.
10. 富永 早貴, 山下 俊幸, 高橋 政友, 相馬 悠希, 富安 範行, 松山 清, 和泉 自泰, 馬場 健史. (6/23, 2022)
SFE-SFC-FRC システムを用いた超臨界二酸化炭素中での低分子化合物の溶解度測定法の開発. (口頭発表, ポスター発表)
第70回 質量分析総合討論会, 福岡.
11. 今戸 優理, 高橋 政友, 相馬 悠希, 油屋 駿介, 中谷 航太, 和泉 自泰, 馬場 健史. (6/23, 2022)
血液メタボロミクスデータ統合に向けた LC/MS 分析法の定量性評価. (口頭発表, ポスター発表)
第70回 質量分析総合討論会, 福岡.

12. 和泉 自泰, 秦 康祐, 中谷 航太, 山村 昌平, 松本 雅記, 馬場 健史. (6/23, 2022)
Nano-LC/MS/MS を基盤とした 1 細胞解析システムの開発. (口頭発表)
第 70 回 質量分析総合討論会, 福岡.
13. 馬場 健史. (6/23, 2022)
定量メタボロームデータ取得に向けた分析技術の開発. (招待講演)
第 70 回 質量分析総合討論会, 福岡.
14. 高橋 政友, 鈴木 隆弘, 高原 健太郎, 馬場 健史, 和泉 自泰. (6/24, 2022)
次世代サプレッサーを搭載したイオンクロマトグラフィー高分解能タンデム質量分析 (IC/HRMS/MS) による超網羅的な親水性メタボローム分析法の開発. (口頭発表)
第 70 回 質量分析総合討論会, 福岡.
15. 鳥越 大平, 高橋 政友, 中尾 素直, 相馬 悠希, 池田 和輝, 中谷 航太, 馬場 健史, 和泉 自泰. (6/24, 2022)
LC/HRMS/MS と in silico エピメタボライトデータベース (IEMDB) に基づく未知の親水性代謝物の包括的構造推定. (口頭発表, ポスター発表)
第 70 回 質量分析総合討論会, 福岡.
16. 姉川 彩, 岩橋 福松, 上山 純, 辻井 良政, 羽野 健志, 秦 康祐, 相馬 悠希, 山下 俊幸, 和泉 自泰, 馬場 健史. (6/24, 2022)
GC/MS calibration-curve-locking database (CCLD)を用いたヒト血漿サンプル半定量メタボロミクスワークフローの開発. (口頭発表)
第 70 回 質量分析総合討論会, 福岡.
17. 伊東 瑛美, 井貫 晋輔, 和泉 自泰, 高橋 政友, 石川 絵里, 柴田 健輔, 馬場 健史, 山崎 晶. (6/23, 2022)
MAIT 細胞の新規脂質抗原の探索. (口頭発表)
第 64 回 日本脂質生化学会, 東京.
18. Taihei Torigoe¹, Masatomo Takahashi, Motonao Nakao, Yuki Soma, Kazuki Ikeda, Kohta Nakatani, Takeshi Bamba, Yoshihiro Izumi. (7/11, 2022)
In Silico Epimetabolite Database (IEMDB): Comprehensive Annotation tool for Unidentified Hydrophilic Metabolites. (ポスター発表)
第 24 回 生医研リトリート 2022, 唐津.
19. Kazuki Ikeda, Masatomo Takahashi, Kosuke Hata, Kohta Nakatani, Shunsuke Aburaya, Noriyuki Tomiyasu, Yuki Soma, Takeshi Bamba, Yoshihiro Izumi. (7/11, 2022)
In vitro evaluation assay for drug-induced hepatotoxicity by multi-omics analysis using primary human hepatocytes. (ポスター発表)
第 24 回 生医研リトリート 2022, 唐津.
20. Yuri Imado, Masatomo Takahashi, Yuki Soma, Shunsuke Aburaya, Kohta Nakatani, Yoshihiro

- Izumi, Takeshi Bamba. (7/11, 2022)
Quantitative performance evaluation of LC/MS methods for blood metabolomics data integration.
(ポスター発表)
第24回 生医研リトリート 2022, 唐津.
21. Saki Tominaga, Toshiyuki Yamashita, Masatomo Takahashi, Yuki Soma, Noriyuki Tomiyasu, Kiyoshi Matsuyama, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba. (7/11, 2022)
Development of a solubility measurement method for low molecular weight compounds in SCCO₂ using the SFE-SFC-FRC system. (ポスター発表)
第24回 生医研リトリート 2022, 唐津.
22. 田畑 祥, 和泉 自泰, 高橋 政友, 馬場 健史, 岡田 眞里子. (7/20, 2022)
持続的NF κ B活性による細胞老化メカニズム. (ポスター発表)
第8回 がん代謝研究会, 佐渡.
23. 馬場 健史. (8/17, 2022)
メタボロミクスにおける試料調製のポイント. (招待講演)
アジレントメタボロミクスウェビナーシリーズ 2022, Web 開催.
24. 竹田 浩章, 高橋 政友, 和泉 自泰, 馬場 健史, 津川 裕司. (9/15, 2022)
構造多様性の解析と個々の定量化を目指したマルチリポドーム計測技術の開発. (口頭発表)
第16回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
25. 富安 範行, 和泉 自泰, 高橋 政友, 西村 直矢, 豊永 憲司, 相馬 悠希, 山崎 晶, 馬場 健史. (9/15, 2022)
免疫受容体の脂質リガンド探索プラットフォームの開発. (口頭発表)
第16回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
26. 相馬 悠希, 高橋 政友, 今戸 優理, 松田 貴意, 池田 明夏里, 田邊 芽衣, 寺内 勉, 花井 泰三, 和泉 自泰, 馬場 健史. (9/15, 2022)
安定同位体標識内部標準群 (SILIS) を用いたヒト血漿定量メタボロミクス. (口頭発表)
第16回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
27. 鳥越 大平, 高橋 政友, 中尾 素直, 相馬 悠希, 池田 和輝, 中谷 航太, 馬場 健史, 和泉 自泰. (9/15, 2022)
LC/HRMS/MS と in silico エピメタボライトデータベースによる未知の親水性代謝物の包括的構造推定法の開発. (口頭発表)
第16回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
28. 高橋 政友, 鈴木 隆弘, 高原 健太郎, 馬場 健史, 和泉 自泰. (9/15, 2022)
超網羅的な親水性メタボローム分析に資するイオンクロマトグラフィー高分解能タンデム質量分析法 (IC/HRMS/MS) の開発. (ポスター発表)

- 第 16 回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
29. 富永 早貴, 山下 俊幸, 高橋 政友, 相馬 悠希, 富安 範行, 松山 清, 和泉 自泰. (9/16, 2022)
SFE-SFC-FRC システムを用いた超臨界二酸化炭素中溶解度測定法の開発. (口頭発表)
第 16 回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
30. 今戸 優理, 高橋 政友, 相馬 悠希, 油屋 駿介, 中谷 航太, 和泉 自泰, 馬場 健史. (9/16, 2022)
血液メタボロミクスデータ統合に資する LC/MS 分析法の定量性評価. (口頭発表)
第 16 回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
31. 姉川 彩, 岩橋 福松, 上山 純, 辻井 良政, 羽野 健志, 秦 康祐, 相馬 悠希, 山下 俊幸, 和泉 自泰, 馬場 健史. (9/16, 2022)
GC/MS CCLD を用いたヒト血漿サンプル半定量メタボロミクスワークフローの開発. (ポスター発表)
第 16 回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
32. 池田 和輝, 高橋 政友, 秦 康祐, 中谷 航太, 油屋 駿介, 富安 範行, 相馬 悠希, 松本 雅記, 馬場 健史, 和泉 自泰. (9/16, 2022)
ヒト初代肝細胞を用いたマルチオミクス解析による *in vitro* 肝毒性評価法の開発. (ポスター発表)
第 16 回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
33. 中谷 航太, 和泉 自泰, 馬越 洋宜, 緒方 大聖, 日高 彩子, 小川 佳宏, 馬場 健史. (9/16, 2022)
ワイドターゲット LC/MS/MS による生理活性脂質の一斉定量分析法. (ポスター発表)
第 16 回 メタボロームシンポジウム, 鶴岡.
34. Le Si-Hung, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba. (9/19, 2022)
UC/HILIC, a novel strategy to improve the metabolomics coverage of current unified chromatography. (ポスター発表)
33rd International Symposium on Chromatography (ISC 2022), Budapest.
35. 和泉 自泰, 秦 康祐, 中谷 航太, 馬場 健史. (10/1, 2022)
ナノ液体クロマトグラフィー質量分析を基盤としたシングルセル分子フェノタイプ解析.
(招待講演)
BINDS 発現機能解析インシリコ融合ユニット講習会, 東京 (ハイブリッド開催) .
36. 高橋 政友, 池田 和輝, 秦 康祐, 中谷 航太, 油屋 駿介, 富安 範行, 相馬 悠希, 馬場 健史, 和泉 自泰. (10/19, 2022)
質量分析を基盤としたヒト初代肝細胞の薬物誘発性肝障害評価法の開発. (口頭発表)
第 74 回 日本生物工学会大会, 豊中 (ハイブリッド開催) .

37. 和泉 自泰, 鳥越 大平, 中尾 素直, 相馬 悠希, 池田 和輝, 中谷 航太, 高橋 政友, 馬場 健史. (10/20, 2022)
未知の親水性代謝物の包括的構造推定に向けた *in silico* エピメタボライトデータベース (IEMDB) の開発. (口頭発表)
第 74 回 日本生物工学会大会, 豊中 (ハイブリッド開催) .
38. 相馬 悠希, 高橋 政友, 今戸 優理, 松田 貴意, 池田 明夏里, 田邊 芽衣, 寺内 勉, 花井 泰三, 和泉 自泰, 馬場 健史. (10/20, 2022)
ヒト定量メタボロミクスに資する安定同位体標識内部標準群 (SILIS) のバイオプロダクション. (口頭発表)
第 74 回 日本生物工学会大会, 豊中 (ハイブリッド開催) .
39. 和泉 自泰. (10/27, 2022)
Nano-LC/MS による 1 細胞メタボロミクス・プロテオミクスの開発. (招待講演)
第 42 回 キャピラリー電気泳動シンポジウム, 鶴岡.
40. Yoshihiro Izumi. (11/10, 2022)
Comprehensive exploration of metabolite ligands recognized by immune sensors based on next-generation metabolomics technology. (招待講演)
第 95 回 日本生化学大会, 名古屋.
41. 馬場 健史. (11/22, 2022)
次世代メタボローム解析システム構築に向けた技術開発. (招待講演)
第 19 回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム, 岐阜.
42. 馬場 健史. (11/28, 2022)
超臨界 CO₂ クロマトグラフィー. (招待講演)
超臨界流体部会 2022 年度基礎セミナー, 東京 (ハイブリッド開催) .
43. Yoshihiro Izumi, Kosuke Hata, Kohta Nakatani, Masatomo Takahashi, Mamoru Hirafuji, Shohei Yamamura, Masaki Matsumoto, Takeshi Bamba. (11/30, 2022)
Development of integrated analysis technology for single cell mass spectrometry and imaging. (招待講演)
第 45 回 日本分子生物学会年会, 千葉.
44. 中村 慎太郎, 宮地 康高, 横溝 久, 大塚 裕子, 和泉 自泰, 高橋 政友, 佐藤 直市, 坂本 竜一, 宮澤 崇, 馬場 健史, 小川 佳宏. (12/3, 2022)
カナグリフロジンは遅筋内の AICARP を増加させ AMPK の活性化による代謝亢進を介して肥満糖尿病マウスの遅筋機能を改善させる. (口頭発表)
第 43 回 日本肥満学会・第 40 回 日本肥満治療学会学術集会, 那覇.
45. 今戸 優理, 高橋 政友, 相馬 悠希, 油屋 駿介, 中谷 航太, 花井 泰三, 和泉 自泰, 馬場 健史. (12/3, 2022)

- 血液メタボロミクスデータ統合に向けた LC/MS 分析法の性能評価。 (口頭発表)
第 28 回 日本生物工学会九州支部佐賀大会 (2022) , 佐賀.
46. 富永 早貴, 山下 俊幸, 高橋 政友, 相馬 悠希, 富安 範行, 松山 清, 和泉 自泰, 馬場 健史. (12/3, 2022)
SFE-SFC-FRC システムを用いた新規超臨界二酸化炭素中溶解度測定法の開発。 (口頭発表)
第 28 回 日本生物工学会九州支部佐賀大会 (2022) , 佐賀.
47. Yuki Hosono, Noriyuki Tomiyasu, Yoshihiro Izumi, Akihiro Imamura, Eri Ishikawa, Atsushi Kumanogoh, Hideharu Ishida, Takeshi Bamba, Sho Yamasaki. (12/8, 2022)
Characterization of self glycolipids presented by CD1d that activate NKT cells. (口頭発表, ポスター発表)
第 51 回 日本免疫学会学術集会, 熊本 (ハイブリッド開催) .
48. 池田 和輝, 中谷 航太, 高橋 政友, 馬場 健史, 和泉 自泰. (12/16, 2022)
Unified-HILIC/AEX/MS による脂質と極性代謝物の包括的一斉分析法の開発。 (口頭発表)
第 4 回 脂質駆動学術産業創生研究部会講演会, 福岡.
49. 和泉 自泰. (3/10, 2023)
次世代質量分析オミクス解析技術の開発と医学応用。 (招待講演)
Seminer in Translational Rheumatology and Immunology, Web 開催.
50. 馬場 健史. (3/30, 2023)
次世代メタボローム分析に資する技術開発。 (招待講演)
AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 RNA 標的創薬技術開発/核酸医薬品実用化のための製造及び分析基板技術開発「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」, 豊中.

質量分析センター・プロテオミクス分野

Mass Spectrometry Center, Division of Proteomics

教授：中山 敬一

Professor : Keiichi Nakayama, M.D., Ph.D.

プロテオミクス分野では、タンパク質の総体であるプロテオームを解析するための技術開発とその応用を目指すと共に、多くの研究者に対して最先端技術の提供を行っている。基本技術としては精密質量分析によるショットガン・プロテオミクス、ターゲット・プロテオミクス、ペプチドマスフィンガープリンティング等を用い、さらに ICAT, iTRAQ, SILAC, mTRAQ 等の安定同位体標識を用いた定量情報付加による高度のプロテオミクス技術を擁している。さらに従来個別解析であった MRM 技術を改変して大規模データ取得を目指す次世代プロテオミクス技術 (iMPAQT システム) の開発を行い、すでに実用に供している。現在、多数の質量分析計を有し、幅広いプロテオミクス技術への要請に対応が可能となっている。

プロテオミクス分野は、中山敬一が兼任として教授を務めている。さらに共同研究員 1 名 (高見知代) に加え、技術室所属の技官 1 名 (木庭絵美子) とテクニカルスタッフ 1 名 (小田瑞穂:2023 年 3 月末退職) で実際の研究開発及びサービス業務を進めている (2023 年 3 月 31 日現在)。

A. ASC-1 複合体が走査リボソームに果たす役割の解明

タンパク質を合成する翻訳過程は生命活動になくてはならないものであり、翻訳の異常は様々な疾患の原因になる。翻訳はまず、リボソーム小サブユニットと翻訳開始因子群で構成される走査リボソームが mRNA の 5' UTR 上を進んで翻訳開始点を探し、翻訳開始点が見つかり、リボソーム大サブユニットが結合して翻訳リボソームとなり、実際にタンパク質を合成する。走査リボソームと翻訳リボソームには主要な構成因子以外にも他の様々なタンパク質が結合することで、それぞれの段階が円滑に進むよう補助していることが知られているが、解析が進んでいる翻訳リボソームの結合タンパク質と異なり、走査リボソームは翻訳リボソームと比べて mRNA への結合が弱いため、あまり解析が進んでいなかった。

近年、走査リボソームが結合する mRNA 配列を網羅的に同定する Sel-TCP-seq 法 (selective translation complex profile sequencing) が開発された。Sel-TCP-seq ではまず細胞をホルマリンなどによって固定することで走査リボソームと mRNA の結合を強め、ショ糖密度勾配遠心法 (※4) により走査リボソームが含まれる分画を回収する。この中には走査リボソームと同等の密度の他の巨大分子複合体も含まれているため、翻訳開始因子などに対する免疫沈降により走査リボソームだけを抽出し、次世

代シーケンス解析を行う。われわれはこの手法を応用することで、走査リボソームの結合タンパク質を網羅的に同定できるのではないかと考えた。すなわち、免疫沈降後に次世代シーケンス解析ではなく、質量分析 (Mass spectrometry; MS) を行うことで結合タンパク質を決定する。この新たな手法を Se1-TCP-MS 法と名付けた。

今回われわれはヒト培養細胞を用いて Se1-TCP-MS 解析を行ったところ、新たに ASC-1 複合体を同定した。ASC-1 複合体は翻訳リボソームに結合してリボソーム衝突を解消することが知られていたが、走査リボソームに結合してどのように機能するかは不明であった。そこで、ASC-1 複合体を欠損した細胞を作製したところ、5' UTR 上の走査リボソームが減少したり、途中で走査リボソームが停止して進めなくなることが明らかになった。この結果から、ASC-1 複合体が 5' UTR の固い構造を解くことで、走査リボソームが停止しないように補助するということが判明した。

翻訳リボソームとその結合タンパク質の異常が神経変性疾患等の様々な疾患の原因になることが知られているが、走査リボソームの結合タンパク質と疾患の関連はまだあまり解析が進んでおらず、ASC-1 複合体を含め、今後 Se1-TCP-MS 法で走査リボソームの結合タンパク質の機能を調べていくことで、新たに疾患発症機序が解明されることが期待される。

B. mTORC1 依存的な転写因子 PBX2 のリン酸化とその生物学的意義の解明

細胞内シグナル伝達に関与するセリン/スレオニンキナーゼである mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は、栄養状態や増殖因子などのシグナルに応じて活性化し、様々な標的分子をリン酸化することで脂質合成やエネルギー代謝の促進等、多彩な経路の制御に関与することが知られている。これまでにわれわれはリン酸化プロテオミクスを用いた mTORC1 標的分子の大規模探索を行い、pre-B-cell leukemia transcription factor 2 (PBX2) を mTORC1 新規下流分子として同定し、mTORC1 依存的な PBX2 のリン酸化制御に関与する酵素の同定と、PBX2 欠損マウスを用いた個体レベルでの PBX2 の機能検証実験を行った。

本研究においてわれわれは、PBX2 が mTORC1 活性依存的に脱リン酸化することを細胞レベルで実証し、変異導入実験によって Ser³³⁰ がそのリン酸化部位であることを見出した。一方、PBX2 以外の PBX ファミリー分子は調べた条件下ではリン酸化変動を示さなかった。予想に反して、PBX2 は mTORC1 の活性化によって脱リン酸化され、不活性化によってリン酸化されることがわかった。阻害剤スクリーニングと遺伝子ノックダウン実験から、PBX2 の脱リン酸化は mTORC1 による間接的な効果であること、また PBX2 のリン酸化制御に glycogen synthase kinase-3 (GSK3) と protein phosphatase 1 (PP1) がそれぞれ関与していることが明らかとなった。さらに、*Pbx2* 遺伝子欠損マウスを作製したところ、高脂肪食負荷条件下で体重及び白色脂肪組織量の減少、糖代謝の改善という栄養関連表現型が観察された。以上のことから、メタボリックシンドローム等

の栄養関連疾患において、mTORC1-PBX2軸が関与していることが示唆された。

業績目録

原著論文

1. Huda N., Khambu B., Liu G., Nakatsumi H., Yan S., Chen X., Ma M., Dong Z., Nakayama K.I., Yin X. M. (Apr 2022)
Senescence connects autophagy deficiency to inflammation and tumor progression in the liver.
Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 14:333-355.
2. Fujimoto M., Takii R., Matsumoto M., Okada M., Nakayama K.I., Nakato R., Fujiki K., Shirahige K., Nakai A. (Jul 2022)
HSF1 phosphorylation establishes an active chromatin state via the TRRAP-TIP60 complex and promotes tumorigenesis.
Nat Commun. 13:4355.
3. Shimizu H., Kodama M., Matsumoto M., Orba Y., Sasaki M., Sato A., Sawa H., Nakayama K.I. (Nov 2022)
LIGHTHOUSE illuminates therapeutics for a variety of diseases including COVID-19.
iScience 25:105314.
4. Lozano-Ureña A., Lázaro-Carot L., Jiménez-Villalba E., Montalbán-Loro R., Mateos-White I., Duart-Abadía P., Martínez-Gurrea I., Nakayama K.I., Fariñas I., Kirstein M., Gil-Sanz C., Ferrón S.R. (Jan 2023)
IGF2 interacts with the imprinted gene Cdkn1c to promote terminal differentiation of neural stem cells.
Development 150:dev200563.
5. Takahashi K., Amano H., Urano T., Li M., Oki M., Aoki K., Amizuka N., Nakayama K.I., Nakayama K., Udagawa N., Higashi N. (Feb 2023)
p57Kip2 is an essential regulator of vitamin D receptor-dependent mechanisms.
PLoS One 18:e0276838.
6. Wada R., Fujinuma S., Nakatsumi H., Matsumoto M., Nakayama K.I. (Feb 2023)
Phosphorylation of PBX2, a novel downstream target of mTORC1, is determined by GSK3 and PP1.
J Biochem. 173:129-138.
7. Oka T., Higa T., Sugahara O., Koga D., Nakayama S., Nakayama K.I. (Mar 2023)
Ablation of p57⁺ quiescent cancer stem cells suppresses recurrence after chemotherapy of intestinal tumors.

Cancer Res. in press.

8. Kito Y., Matsumoto A., Ichihara K., Shiraishi C., Tang R., Hatano A., Matsumoto M., Han P., Iwasaki S., Nakayama K.I. (Mar 2023)

The ASC-1 complex promotes translation initiation by scanning ribosomes.

EMBO J. in press.

9. Shiraishi C., Matsumoto A., Ichihara K., Yamamoto T., Yokoyama T., Mizoo T., Hatano A., Matsumoto M., Tanaka Y., Matsuura-Suzuki E., Iwasaki S., Matsushima S., Tsutsui H., Nakayama K.I. (Mar 2023)

RPL3L-containing ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function.

Nat Commun. in press.

10. Yumimoto K., Sugiyama S., Motomura S., Takahashi D., Nakayama K.I. (Mar 2023)

Molecular evolution of Keap1 was essential for adaptation of vertebrates to terrestrial life.

Sci Adv. in press.

11. Fujinuma S., Nakatsumi H., Shimizu H., Sugiyama S., Harada A., Goya T., Tanaka M., Kohjima M., Takahashi M., Izumi Y., Yagi M., Kang D., Kaneko M., Shigeta M., Bamba T., Ohkawa Y., Nakayama K.I. (Mar 2023)

FOXK1 promotes nonalcoholic fatty liver disease by mediating mTORC1-dependent inhibition of hepatic fatty acid oxidation.

Cell Rep. in press.

総説

1. Ichihara K., Nakayama K.I., Matsumoto A. (Aug 2022)

Identification of unannotated coding sequences and their physiological functions.

J Biochem. 173:237-242.

2. 比嘉 綱己, 岡 毅寛, 須賀原 修, 古賀 大介, 中山 敬一. (2022年12月)

時空間リプログラミングは腸管上皮の再生と腫瘍の基盤となる.

消化器病学サイエンス. 6:255-258.

学会発表

1. 中山 敬一. (6/2, 2022)

近未来のライフサイエンス：人工知能によるデータ駆動型サイエンスの時代へ. (シンポジウム)

第95回日本内分泌学会学術総会, 別府.

2. 中山 敬一. (9/18, 2022)

次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：100年来のがんの謎を解く。（ロッテ基金特別講演）

第64回歯科基礎医学会学術大会，徳島。

3. 中山 敬一． (9/27, 2022)
プロテオミクス X AI による創薬革命．（特別講演）
第30回東北生活習慣病研究会，仙台。
4. 中山 敬一． (10/1, 2022)
人工知能によるがん研究．（モーニングレクチャー）
第81回日本癌学会学術総会，横浜。
5. 中山 敬一． (11/10, 2022)
細胞周期阻害分子 p57 が織りなす幹細胞科学：がん幹細胞の撲滅に向けて．（シンポジウム）
第95回日本生化学会大会，名古屋。
6. 古賀 大介，比嘉 綱己，中山 省悟，岡 毅寛，須賀原 修，中山 敬一． (11/30, 2022)
マウス ES 細胞における p57 遺伝子発現制御領域の探索。
第45回日本分子生物学会年会，千葉。
7. 比嘉 綱己，岡 毅寛，須賀原 修，古賀 大介，中山 敬一． (11/30, 2022)
p57 陽性タフト細胞は胃底腺幹細胞として機能する．（ワークショップ）
第45回日本分子生物学会年会，千葉。
8. 白石 大智，片山 雄太，西山 正章，浦 聖恵，昌子 浩孝，宮川 剛，中山 敬一． (11/30, 2022)
クロマチンリモデリング因子 CHD8 の機能異常による ASD 発症の分子基盤の解明．（サイエンスピッチ）
第45回日本分子生物学会年会，千葉。
9. 中山 敬一． (11/30, 2022)
小細胞肺がんの二つのプリン合成経路を標的とする治療法の開発．（ワークショップ）
第45回日本分子生物学会年会，千葉。
10. 杉山 成明，弓本 佳苗，久保田 晋平，高橋 恵生，宮園 浩平，中山 敬一． (12/1, 2022)
原発腫瘍が転移巣の微小環境に及ぼす抑制的作用の解析。
第45回日本分子生物学会年会，千葉。
11. 本村 早麗，弓本 佳苗，中山 敬一． (12/1, 2022)
Fbxw7 に非依存的な新規 c-MYC 分解機構の発見。
第45回日本分子生物学会年会，千葉。
12. 溝尾 太佑，松本 有樹修，市原 知哉，鈴木 健夫，鈴木 勉，中山 敬一． (12/1, 2022)
進化で獲得した Non-AUG 開始コドンをもたらすタンパク質機能の拡張。
第45回日本分子生物学会年会，千葉。
13. 市原 知哉，松本 有樹修，幡野 敦，松本 雅記，茶谷 悠平，田口 英樹，中山 敬一． (12/1,

2022)

翻訳開始因子 eIF2D は翻訳伸長中の内発的リボソーム不安定化 (IRD)を抑制する.

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

14. 湯通堂 紀子, 松崎 芙美子, 宇田 新介, 和泉 自泰, 高橋 政友, 中尾 素直, 油屋 駿介, 馬場 健史, 菊竹 智恵, 須山 幹太, 大川 恭行, 原田 哲仁, 松本 雅記, 中山 敬一, 久保田 浩行. (12/2, 2022)

食餌性肥満によるマウス肝臓変容の時系列トランスオミクス解析.

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

15. 須賀原 修, 古賀 大介, 比嘉 綱己, 岡 毅寛, 杉山 成明, 和田 玲緒名, 中山 敬一. (12/2, 2022)

胆道がんオルガノイドの樹立と腫瘍内好中球を標的とする治療.

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

16. 和田 玲緒名, 藤沼 駿, 中津海 洋一, 松本 雅記, 中山 敬一. (12/2, 2022)

mTORC1 依存的な転写因子 PBX2 のリン酸化とその生物学的意義の解明.

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

17. 小鍛治 俊也, 幡野 敦, 伊藤 有紀, 衛藤 樹, 江上 陸, 柚木 克之, 守田 啓悟, 大野 聡, 藤井 雅史, 廣中 謙一, 寺川 瑛, 土屋 貴穂, 尾崎 遼, 井上 啓, 宇田 新介, 久保田 浩行, 鈴木 穰, 池田 和貴, 有田 誠, 松本 雅記, 中山 敬一, 平山 明由, 曾我 朋義, 黒田 真也. (12/2, 2022)

マウスの肝臓と骨格筋における臓器内および臓器間代謝制御とその肥満による制御異常のトランスオミクス解析.

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

18. 白石 千瑛, 松本 有樹修, 中山 敬一. (12/2, 2022)

Myo-ribosome は心機能に必要な翻訳伸長ダイナミクスを調節する. (ワークショップ)

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

19. 松崎 芙美子, 湯通堂 紀子, 山内 幸代, 宇田 新介, 和泉 自泰, 高橋 政友, 中尾 素直, 油屋 駿介, 馬場 健史, 曾我 朋義, 菊竹 智恵, 須山 幹太, 原田 哲仁, 前原 一満, 大川 恭行, 松本 雅記, 中山 敬一, 黒田 真也, 久保田 浩行. (12/2, 2022)

トランスオミックネットワーク作成による分子制御機構の可視化. (ワークショップ)

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

20. 岡 毅寛, 比嘉 綱己, 中山 敬一. (12/2, 2022)

p57 陽性静止がん幹細胞の除去は大腸がんの治療後再発を抑制する. (サイエンスピッチ)

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

21. 弓本 佳苗, 高橋 大輔, 中山 敬一. (12/2, 2022)

Keap1 の分子進化は生命の陸上生活への適応に必須である. (サイエンスピッチ)

第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

22. 松本 有樹修, 木藤 有紀, 市原 知哉, 岩崎 信太郎, 中山 敬一. (12/2, 2022)
ASC-1 複合体は走査型リボソームと結合して翻訳開始を調節する. (ワークショップ)
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
23. 中山 敬一. (3/17, 2023)
AI 創薬プラットフォーム LIGHTHOUSE による創薬革命. (招待講演)
第 443 回情報計算法学化学生物学会講演会, オンライン.

構造生物学分野

Division of Structural Biology

教授：神田 大輔

Professor : Daisuke Kohda, Ph.D.

蛋白質の立体構造を決定し、他の分子との相互作用を詳細に解析することで、分子認識の問題や酵素活性発現メカニズムを構造生物学の手法を駆使して明らかにする。ターゲット選択にあたっては、単に生物学的機能の重要性だけでなく、分子機能が構造生物学的に興味ある論点を含んでいるかどうかを重視する。研究手法として、X線結晶解析、核磁気共鳴解析、電子顕微鏡（主に単粒子解析）を用いることで、蛋白質の分子認識の構造的基盤の解明を目指す。また、蛋白質分子が短い時間内で立体構造を形成するためにアミノ酸配列が持つべき物理化学的性質を実験的に解析する手法の開発に取り組んでいる。

A. 残基特異的な熱力学・速度論的解析が示す蛋白質フォールディング機構

我々は過去に黄色ブドウ球菌由来の抗菌性ペプチドである nukacin ISK-1 (27 残基) の NMR 解析を行い、残基毎の平衡定数 K と交換速度 k (行きと帰りの2つある) を決定して、 $\log k$ vs. $\log K$ プロットを作ると良い直線関係があることを見いだした。この直線関係はデータ点が一本のポリペプチド鎖の複数の残基から得られるという観点から、新しいタイプの自由エネルギー直線関係 (residue-based Linear Free Energy Relationship; rbLFER) である。この呼称は、横軸の $\log K$ は2状態交換における2つの(基底)状態の自由エネルギー差 ΔG に比例し、一方、縦軸の $\log k$ は遷移状態の活性化エネルギー ΔG^\ddagger に比例することに由来する。

今年度は2つのアプローチで nukacin ISK-1 の実験結果の一般化を行った。rbLFER 関係が蛋白質の構造変化に広く成立しているか否かを調べるために過去の論文をサーチし、 K と k を残基ごとに報告している論文を集めた。その結果、16個の蛋白質(変異体は異なるものとして数える)について18個の $\log k$ vs $\log K$ プロットを作ることができた。対象となった現象は2つの状態間の遅い交換、IDP(天然変性ポリペプチド鎖)のターゲット蛋白質への結合、天然フォールド状態の構造ゆらぎなど多岐にわたり、使われた手法も NMR EXSY, NMR 緩和時間解析、重水素交換(検出には NMR または質量分析を使用)など複数あった。文献情報からは測定バイアスや測定誤差がどの程度残っているかを推定することは困難であるが、ほぼ半数(10)に直線関係が認められ、rbLFER が nukacin ISK-1 だけでなく、蛋白質が関与する多くの現象に広く成立していると結論した(原著論文4)。

次に理論的な背景について考察を進めた。郷信宏(当時、九州大学理学部助教授)

によって 1983 年に提唱された「整合性原理」はタンパク質がスムーズに変性状態からフォールディングするための物理化学的基盤である。整合性原理は天然状態中に存在する相互作用だけが折れ畳み過程に寄与することを要請する。言い換えると、天然状態に存在しない non-native な構造と相互作用はフォールディング過程には存在しないことを仮定する。これまでに計算シミュレーションを用いて整合性原理の有効性が示されてきたが、実験データから直接に証明された例はない。異なる残基が構成する rbLFER は一本のポリペプチド鎖に含まれる複数の残基が構造変化の最中に「協調」関係にあることを示唆する。この協調現象はポリペプチド鎖がスムーズに構造変化するために持つべき物理化学的性質であり、蛋白質が変性状態から天然状態へ折れ畳みをするメカニズムとして郷によって提唱された「整合性原理」の実験的帰結であると想定する。

整合性原理はアミノ酸残基レベルの粗視化モデルを使った分子シミュレーションにおいて、残基間の相互作用のポテンシャルエネルギーを $V = \sum \varepsilon_{ij}$ として、(1) $i, j \in N$ or U (変性状態 U とフォールド状態 N の 2 つしかない)、(2) $\varepsilon_{ij} = -\varepsilon$, if i and $j \in N$ (2 つの残基が状態 N にあるときに引力が働く)、(3) $\varepsilon_{ij} = 0$, else if i or $j \in U$ (それ以外では相互作用が働かない) と定式化できる。

$\log k$ vs $\log K$ プロットで残基 i と j の 2 つのデータ点を結ぶ作る線分の傾きを ρ_{ij} とする

と、任意の初期構造から出発して生成した遷移状態における傾き ρ は 2 つの残基が両方とも状態 N にある時に $\rho^{NN} = 1$ であることが条件(2)から導ける。それ以外の場合の ρ^{NU} と ρ^{UU} は条件(3)から定まらない。次に全ての初期構造に由来する遷移状態アンサンブルを考える。残基 i の周囲が N 状態をとる割合を ϕ_i とすると、条件(1)より、 $\rho_{ij} = \rho^{NN} \phi_i \phi_j + \rho^{NU} \phi_i (1 - \phi_j) + \rho^{NU} (1 - \phi_i) \phi_j + \rho^{UU} (1 - \phi_i) (1 - \phi_j)$ と表せる。平衡定数 K と 2 つの速度定数 k と k' の間には $K = k/k'$ の関係が成り立つことを条件として追加すると $\rho^{NU} = 0.5$ と $\rho^{UU} = 0$ を導くことができる。これを代入すると、 $\rho_{ij} = 1 \phi_i \phi_j + 0.5 \phi_i (1 - \phi_j) + 0.5 (1 - \phi_i) \phi_j + 0 (1 - \phi_i) (1 - \phi_j) = 0.5 (\phi_i + \phi_j)$ という基本関係式を導出できる (図 A.1)。この式を満たすデータ点の集合を考えると、遷移状態アンサンブルが 2 状態の均一な混合状態なら直線に、遷移状態アンサンブルが 2 状態の不均

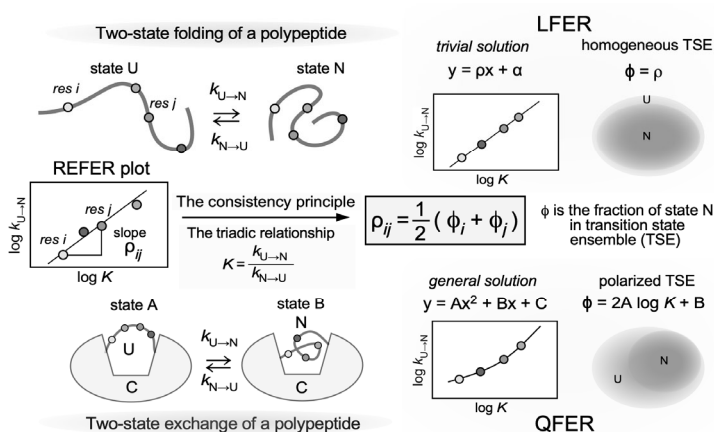


図 A.1 整合性原理は蛋白質のフォールディングだけでなく、蛋白質構造の一部が変化する場合にも適用できる。REFER プロット ($\log k$ vs $\log K$ プロット) 中の 2 つの残基データ点を結ぶ線分の傾きはそれぞれの残基の ϕ 値の平均で表される。 ϕ はその残基の周囲が状態 N である割合を表す。この基本式を満たすデータ点の集合は直線か放物線となり、それぞれ均一な遷移状態アンサンブルと不均一な遷移状態アンサンブルを表す。

一な混合状態なら二次曲線（放物線）となる．この放物線で記述される関係を QFER(Quadratic Free Energy Relationship)と呼ぶことにする．residue-based LFER/QFER 関係を整合性原理の実験的検証・解析するために使うことができる．

放物線関係となる場合の実験例を図 A.2 に示す．Nukacin ISK-1 のケースと IDP である pKID ペプチドが KIX 蛋白質に結合するケースである．データ点の分布を見ると，それぞれ立体構造上のまとまりとデータ点のまとまりが対応していることがわかる（色分けして示す）．これは蛋白質全体が硬い一つのユニットとして挙動するのではなく，複数のユニットがそれぞれ一組の (K, k, k') の値を持って共同的に状態変化を行い，複数のユニットは互いに独立しているという見方ができる（図 A.3）．このようなユニットの存在は過去にも指摘されているが， $\log k$ vs. $\log K$ プロットを作ると直線・放物線上に並ぶことから考えて，スムーズな構造変化を実現するためにユニット間に整合性原理に基づいた協調的な連携があると考える点が新規である．

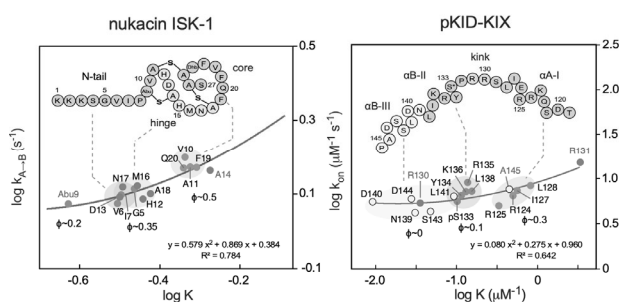


図 A.2 生理活性ペプチド Nukacin ISK-I はコンホメーションの異なる 2 状態をとる (左)．pKID ペプチドは IDP であり，ターゲットである KIX 蛋白質と相互作用してヘリックス構造を作る (右)．それぞれ，EXSY NMR と NMR 緩和時間解析から，残基ごとの K と k を求めて $\log k$ vs. $\log K$ プロットを作れる．立体構造に基づいて色分けしたデータ点はプロット中でクラスターを作っている．例外的にクラスターから離れた位置にあるデータ点もある (マゼンタ色の残基)．



図 A.3 (A) 2 状態交換は通常，完全な共同性を仮定して単一のパラメータセット (K, k, k', ϕ) で解析されるが，(B) 実際は共同性が不完全であり，複数のパラメータセットで記述すべきである．今回見出された新しい見方は複数のユニットが協調して構造変化をしていることにある．これは $\log k$ vs. $\log K$ プロットのデータ点が単一の直線(LFER)あるいは単一の放物線(QFER)に乗っていることからわかる．クラスターから外れる例外残基 (マゼンタ色の星印) もあるが，これらは同一の直線・放物線上に乗っていることから判断して協調的である．遷移状態において，特殊な働きをしていると思われる．

QFER 関係があると，放物線の接線の傾きが ϕ 値となるので，残基ごとの ϕ 値（遷移状態アンサンブルにおける 2 つの状態の割合）を計算できる（図 A.4）． ϕ 値を求める方法としてアミノ酸変異体を使う方法が Alan Fersht によって提案され広く使われてき

た. QFER 関係を使った ϕ 値解析はアミノ酸変異を必要としない新しい方法である.

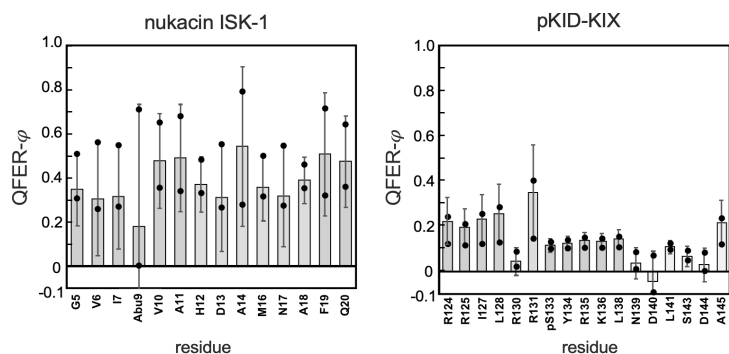


図 A.4 QFER を表す放物線の傾きが ϕ 値であることを利用すると, アミノ酸変異体を使わない ϕ 値解析が可能になる. アミノ酸変異体を使う ϕ 値解析と区別するために QFER- ϕ 解析と呼ぶ. ここで, 従来の ϕ 値と異なることを明示するために異体字の ϕ を使う.

B. 細胞質で起こる N 型糖鎖修飾反応の構造生物学研究

蛋白質のアスパラギン残基への糖鎖付加 (N 型糖鎖付加) は翻訳後修飾の代表であり, 蛋白質のフォールディング, 機能, 局在において重要な役割を担っている. これに対し, バクテリアやウイルスの蛋白質では N 型糖鎖修飾が宿主への接着や感染, 免疫システムから逃れるために利用されている. 肺炎を引き起こすグラム陰性細菌 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*Ap*) では細胞質中で N 型糖鎖修飾反応が起こる. 最初のグルコースを付加する酵素である *ApNGT* とグルコースをさらに付加して伸長させる *alpha6GlcT*, および近縁種の *alpha6GlcT* のホモログ蛋白質である *AmGT* について, X 線結晶構造解析と生化学解析を行なっている. その中で *AmGT* と UDP の共結晶構造 (図 B.1) を決定した. *Ap* においてのみ保存されている *alpha6GlcT* の基質認識に関わるアミノ酸領域を抽出し, *AmGT* に移植する実験を行った. すると期待通りに *AmGT* 変異体のアクセプター分子の基質選択性が変化して *alpha6GlcT* 様になることを見出した.

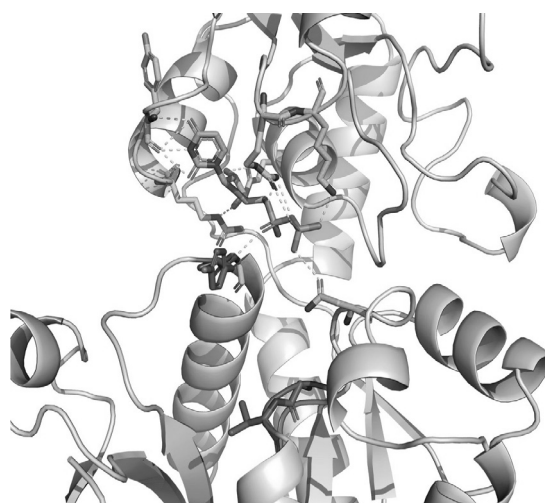


図 B.1 X 線結晶解析から得られた *AmGT* と UDP の立体構造. ドナー分子である UDP を認識するアミノ酸残基をシアンで, アクセプター分子の基質選択性を決めるアミノ酸残基をマゼンタで示した.

これらの酵素の特異な反応を研究することで, 感染制御の応用だけでなく, 糖鎖修飾された様々な分子を酵素的に作るツールとしての利用も考慮して研究を進めている.

C. 膜蛋白質からの新規の構造情報取得技術の開発

これまでにエンドサイトーシス関連蛋白質の脂質膜上での観察技術を確立する過程で, 脂質二重膜中で膜貫通型膜タンパク質を電子顕微鏡により簡便に観察する手法を

開発し、その技術開発と種々の膜蛋白質への応用を進めてきた。この手法は試料への要求性が低いため、ヒトゲノムにコードされた膜蛋白質の約半数を占める一回膜貫通型蛋白質を中心に、試料調製の容易な膜蛋白質についてはすぐに構造情報を取得できるという利点がある。この手法は、昨年度特許登録を行ったが、今年度は海外での産学連携も視野に入れ、海外での国内移行手続きを進めた。また今年度はこの手法を免疫染色と組み合わせて目的膜蛋白質を同定する手法を、種々の膜蛋白質に適用し、有用なデータの取得に成功するとともに、この免疫染色と組み合わせた手法をさらに洗練させた。また取得できる構造情報の、クライオ電子顕微鏡による分解能の向上を目指し、外部機関でのクライオ電子顕微鏡データの取得を開始し、クライオ電子顕微鏡の使用によって実際に分解能が向上したと考えられるデータの取得に成功した。さらにこの手法を用いた製薬企業との共同研究も拡大し、現在2社の製薬企業と共同研究を進めている。さらに今年度は初めて国内学会のシンポジウムでこの手法についての講演を行い、これを契機にアカデミア研究者との共同研究も広がりつつある。また電子顕微鏡関連企業との連携も開始し、今後この手法を社会に浸透させる基盤の構築が進んでいる。

D. 技術支援活動

九州大学共同利用施設である核磁気共鳴装置と生体防御医学研究所技術支援室のクライオ電子顕微鏡 Polara (FEI 社) のユーザー管理を行っている。Polara (Gatan 社 K3 カメラを装備) は日本全国のクライオ電顕ネットワークにおける F1 サイトに登録されている (<https://www.cryoemnet.org/fl-em>)。汎用電顕 T20 (FEI 社) と Polara の共同利用を支援した。電子顕微鏡、試料作製装置の維持管理、利用者の測定のサポートを始め、依頼サンプルの負染色試料の作成や凍結試料の作成、データ収集を行った。

業績目録

原著論文

1. Obita T., Inaka K., Kohda D., Maita N. (Apr 2022)
Crystal structure of the PX domain of Vps17p from *Saccharomyces cerevisiae*.
Acta Crystallogr F Struct Biol. 78:210-216.
2. Hayashi S., Kohda D. (Jun 2022)
The time-zero HSQC method improves the linear free energy relationship of a polypeptide chain through the accurate measurement of residue-specific equilibrium constants.
J Biomol NMR. 76:87-94.

3. Han X., Maita N., Shimada A., Kohda D. (Oct 2022)
Effects of targeting signal mutations in a mitochondrial presequence on the spatial distribution of the conformational ensemble in the binding site of Tom20.
Protein Sci. 31:e4433.
4. Fujinami D., Hayashi S., Kohda D. (Oct 2022)
Retrospective study for the universal applicability of the residue-based linear free energy relationship in the two-state exchange of protein molecules.
Sci Rep. 12:16843.

著書

1. 神田 大輔. (2022年7月)
第4章タンパク質解析 17 結晶構造解析, 18 クライオ単粒子解析, 19 NMR 解析.
論文図表を読む作法. 羊土社.
2. 真柳 浩太. (2023年1月)
九州大学におけるクライオ電子顕微鏡支援.
クライオ電子顕微鏡ハンドブック. 株式会社エヌ・ディー・エス.

学会発表

1. 神田 大輔, 林 成一郎, 藤浪 大輔. (6/8, 2022)
残基特異的 LFER 関係を使って蛋白質分子の構造変化の遷移状態を観る.
第22回日本蛋白質科学会年会, つくば.
2. 林 成一郎, 神田 大輔. (6/8, 2022)
残基特異的な熱力学・速度論解析が明らかにする nukacin ISK-1 の構造変換機構.
第22回日本蛋白質科学会年会, つくば.
3. 山崎 貴大, 神田 大輔. (6/18, 2022)
アクチノバシラス属由来グルコース転移酵素の生化学解析.
令和4年度日本生化学会九州支部例会, 福岡 (Web 開催).
4. 佐藤 想, 神田 大輔. (6/18, 2022)
Actinobacillus pleuropneumoniae 由来 N-glucosyltransferase・アクセプター基質複合体の結晶解析.
令和4年度日本生化学会九州支部例会, 福岡 (Web 開催).
5. 神田 大輔. (6/29, 2022)
蛋白質によるリガンド認識の動的構造解析.
九州大学大学院薬学研究院附属グリーンファルマ構造解析センター記念講演会, 福岡.
6. 藤浪 大輔, 林 成一郎, 神田 大輔. (7/26, 2022)
アミノ酸残基レベルの熱力学・速度論解析が明らかにした自由エネルギー関係. (ポスタ

一)

物性研短期研究会「理論タンパク質物性科学の最前線：理論と実験との密な協働」, 東京.

7. 神田 大輔, 林 成一郎, 藤浪 大輔. (9/28, 2022)
残基特異的 QFER (自由エネルギー2 次関係) はスムーズな蛋白質折れ畳みを実現するコンシステンシー原理の数学的表現である. (ポスター)
第 60 回日本生物物理学会, 函館.
8. 林 成一郎, 藤浪 大輔, 神田 大輔. (9/28, 2022)
残基特異的な熱力学・速度論解析が明らかにするスペクトリン SH3 ドメインの共同性の低いフォールディング. (ポスター)
第 60 回日本生物物理学会, 函館.
9. 神田 大輔, 林 成一郎, 藤浪 大輔. (11/8, 2022)
残基特異的 LFER 関係はポリペプチド鎖のスムーズな構造変化のための物理化学的要件である. (ポスター)
第 61 回 NMR 討論会, 高知.
10. 林 成一郎, 藤浪 大輔, 神田 大輔. (11/8, 2022)
残基特異的な熱力学・速度論解析が明らかにする spectrin SH3 ドメインのフォールディング機構. (ポスター)
第 61 回 NMR 討論会, 高知.
11. 神田 大輔. (11/9, 2022)
酵素蛋白質・糖鎖供与体・糖鎖受容アミノ酸配列の生化学と構造生物学から迫る N 型糖鎖翻訳後修飾の普遍性と多様性.
第 95 回日本生化学会, 名古屋.
12. 山崎 貴大, 神田 大輔. (11/10, 2022)
生化学及び構造生物学手法を用いたアクチノバシラス属由来グルコース転移酵素の解析.
第 95 回日本生化学会, 名古屋.
13. 嶋田 睦. (11/10, 2022)
脂質二重膜中での高次タンパク質集合のイメージング.
第 95 回日本生化学会, 名古屋.
14. 佐藤 想, 山崎 貴大, 神田 大輔. (11/11, 2022)
Actinobacillus pleuropneumoniae 由来 N-glucosyl transferase(ApNGT) —アクセプター・ドナー基質複合体の作製と解析.
第 95 回日本生化学会, 名古屋.

統合オミクス分野

Division of Integrated Omics

教授：久保田 浩行

Professor : Hiroyuki Kubota, Ph.D.

生命現象は全てゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームなどと呼ばれる階層によって制御されている。われわれは、生命現象の全体像を理解する一つのアプローチとして、多階層のオームデータから知識を抽出する「トランスオミクス解析」を提唱し研究を行っている。統合オミクス分野では複数階層のデータ、いわゆる「オームデータ」を統合するための手法開発と、個体の応答とそのメカニズムを理解するために、数理・コンピューターサイエンス・バイオインフォマティクスなどの手法を用いて解析を行っている。解析手法としてはデータベースなどを用いた事前知識を用いたものや、情報学的手法や統計的手法、数理的手法を用いたデータドリブンな解析、またはこれらを組み合わせた解析を行っている。生命現象としては、肥満やインスリン作用に注目して研究を行っている。さらに、多階層にまたがるネットワークの動的特性を解析するために数理モデルを用いた分子のダイナミクスの解析や、情報理論を用いた解析も行っている。

令和4年4月に成瀬諒花さんが参加した。

A. トランスオミクス解析

生命現象はDNA・RNA・タンパク質・代謝物などの各階層にまたがる膨大な数の分子の相互作用、すなわちネットワークによって制御されている。つまり、生命現象全体を俯瞰または理解するには多階層にまたがる複雑なネットワークを同定する必要がある。従来の生物学では、研究者は自分の興味ある数個の分子に注目して研究を行ってきた。これまでの研究により多くの生命現象の理解が進んできたが、これらの研究結果から生命現象全体を俯瞰しようとしても実験条件が異なるために難しい。その一方で、近年の網羅的測定技術の進歩によりエピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームなどの各階層における網羅的データ、いわゆる「オームデータ」が高精度かつ高スループットに取得できるようになってきた。これらの技術により、各階層における全体像を俯瞰することができるようになってきたが、これらのデータだけからでは多階層にまたがるネットワークを明らかにすることはできない。近年、われわれのグループを含めて複数の階層を統合することで生命現象を俯瞰しようとする試み、トランスオミクス解析が行われはじめてきた(Trends Biotechnol. 2016)。更にわれわれは、トランスオミクス解析を行うための技術開発を進め、多階層ネットワークによって生み出されるメタレベルでの制御の理解を進めている(Cell Rep., 2021)。

a. インスリン作用の *in vivo* トランスオミクス解析

われわれは、個体（マウス）を用いたトランスオミクス解析を行うために、生体組織を低温で破碎・均一化し分配することで、同一サンプルから異なるオミクス測定を行える手法を開発した (Sci. Signals 2020, iScience, 2021). これにより、同一個体で比較可能なエピゲノム(メチローム, ヒストン修飾), トランスクリプトーム, プロテオーム(発現プロテオーム, リン酸化プロテオーム), メタボローム(親水性, 疎水性) データを取得できるようになった. われわれはマウスにインスリン刺激を行い, 肝臓のトランスクリプトーム・発現プロテオーム・リン酸化プロテオーム・メタボロームの4階層の網羅的な時系列データを取得した. 取得したデータに分子の機能などに関する既知知見を統合することによって, インスリンのシグナルがどのように肝臓細胞の分子群に伝搬していくかを表すネットワークと, その時間変化の解析を可能にした. その結果, インスリンシグナルの情報を細胞内に広く伝達する経路や, RNA やタンパク質の量を調節する経路, 代謝反応に関連する経路などが, 異なるタイミングで個別の分子レベルではなく機能のレベル (メタレベル) で協調的に働き, 肝臓が適切にインスリンに応答して機能することを見出した (Cell Rep., 2021).

b. 肥満進行のトランスオミクス解析

肥満は糖尿病やがんの危険因子であり, 健康志向の高まりにも関わらず, 近年, 世界的に増加傾向にある. われわれは肝臓における肥満進行の応答を明らかにするため, エピゲノム・トランスクリプトーム・発現プロテオーム・リン酸化プロテオーム・メタボロームの5階層のデータを取得し, その全体像を明らかにすることを目指している. われわれは微分方程式モデルや統計解析などを用いることで階層間の制御と制御開始時期を大規模に推定することに成功し, 多階層に跨るネットワークの構築を行った. 具体的には, エピゲノム (H3K4me3, H3K27ac) を入力として RNA の発現を, RNA を入力としてタンパク質の発現を大規模に推定した. また, 相関を用いてタンパク質のリン酸化の機能を推定した. その結果, 経路に応じて時間的かつ階層に依存した制御がなされていることを見出し, さらに, 経路間の制御が協調的に制御されているというメタレベルな制御も明らかにしている.

c. トランスオミクスデータの解析手法の開発

トランスオミクス解析の問題点の一つが解析手法である. トランスオミクスデータの解析では, 目的や対象とする系に応じて適切な手法を使い分ける必要がある. 例えば, 重要な役割を果たす分子の目星がついていて分子のネットワーク構造の事前知識が豊富で, 系の動的挙動に興味がある場合は微分方程式によるモデルの記述が適して

いる。われわれは遺伝子発現とタンパク質発現を微分方程式モデルで記載するためのプロトコルを開発している。これは今後の大規模データの統合の指針となると期待される (Cell Rep, 2014, iScience, 2018, Genes to Cells, 2018, Cell Rep, 2021)。現在、トランスクリプトームとプロテオームの階層だけでなく、エピゲノムとトランスクリプトームの階層を繋ぐだけでなく、上流因子以外の作用時期を推定するなどの手法も開発している。更に、バイオインフォマティクスの手法に統計的手法を組み合わせることで転写因子を推定する手法の開発も行っている。また、代謝反応の反応速度を求めることは代謝の理解に大きな知見を与えるが、通常このようなデータを得るためには同位体標識実験を用いたトレーサー実験が必要である。しかし、多階層のオームデータから数理モデルを用いて同位体標識実験を用いずに代謝反応の反応速度を推定する手法を開発し、定量的に解析することが出来るようになった (iScience, 2022)。さらに、一つの臓器だけでなく臓器間の関係性にも注目し、肥満における血糖値上昇の一因が筋肉と肝臓の代謝サイクルの破綻であることを見出している (iScience, 2021)。

B. 数理モデルを用いた動的特性の解析

われわれは数理モデルを用いて生命現象を表現し、その動的特性やメカニズムを明らかにすることで生命現象を様々な角度から理解しようと試みている。微分方程式モデルは数理モデルの中でも動的特性やメカニズムを理解するのに良く用いられている。応用においても有用で、任意に入出力を制御できる実験系においては、微分方程式モデルを用いることで出力を生理的応答の範囲で任意に制御することができる (NPJ Syst. Biol. Appli., 2019)。

インスリンは血糖値を減少させることのできる唯一のホルモンである。血中インスリンは複数の時間パターンからなることが知られており、これらのパターンが生体内のインスリン応答に重要であることが報告されている。われわれは血中インスリンの時間パターンの意義を明らかにするため、培養細胞を用いて研究を行ってきた。その結果、インスリンの時間パターン依存的にインスリンシグナル伝達経路分子や代謝分子、そして遺伝子発現を、培養細胞や個体の肝臓において選択的に制御できることを明らかにした (Mol. Cell, 2012, Mol. Syst. Biol., 2013, Sci. Signal., 2016, Cell Syst. 2018)。また、インスリンは血糖値を降下させる唯一のホルモンであるが、血糖値自身にも血糖値を降下させる機能があり、glucose effectiveness として知られている。glucose effectiveness は糖尿病などにも関わるとの報告があるがその実態は不明のままである。われわれはマウスを対象に生物学的実験と数理モデルを作成することで、glucose effectiveness の実体と肥満進行における意義を明らかにしている。

C. 統計的手法によるネットワークの推定と解析

統計的手法に基づくネットワークの推定では、大きなサンプルサイズのデータを必要とするため、現段階では遺伝子発現の単階層に絞って大規模データを取得し、肝臓と筋肉における遺伝子相互作用ネットワークの推定を行っている。推定されたネットワークから肥満に関連する部分ネットワークの抽出を行い、肥満進行のメカニズムの理解を深める。また、肥満により破綻するネットワークの抽出を試みるなど、これまでにない視点で比較解析が出来るかと期待される。

大規模ネットワークに対する従来の解析法としては、ノードクラスタリングやノードクラスタに対するエンリッチメント解析があるが、従来の解析はノードに着目した解析手法が多くエッジに着目した解析はほとんどない。一方で、各ノードが生理的機能を持って互いに作用し合うネットワークにおいては、ノード間を結ぶエッジに着目して比較することによりネットワークの生物学的な特徴を見出せる可能性がある。よって、ノードよりもエッジの種類によるネットワーク比較方法の開発を行った (Sci. Rep., 2023)。開発手法を用いて、健常と肥満マウスのネットワークをエッジの種類を表すエッジタイプにより比較すると、糖攪乱への応答に関してアミノ酸代謝に関連するエッジタイプは比較的差が小さい一方でエネルギー代謝に関連するエッジタイプは差が大きいなど、ノード間の相互作用に生物学的意義が直接結びついたネットワーク比較の結果が得られた。また、ネットワークをエッジタイプの分布で特徴付けることができ、その分布をネットワーク特徴量として用いることで、健常および肥満マウスのそれぞれの状態のネットワークを識別することが可能であることがわかった。今後、さらに実験条件を増やしてネットワークの状態の差異と肥満を結びつけることにより、肥満の理解が進むものと期待される。本手法はネットワーク構造からエッジに関する統計量を抽出し、局所的なエッジの比較に依らないネットワークの比較方法のため、サンプルサイズが小さな状況においても、開発手法は比較的堅牢にネットワークの比較が行える可能性が高いと考えられる。また、オントロロジーの定義次第では、異なる階層間でもエッジに関する統計量を通してネットワークの比較が可能となる利点がある。

業績目録

原著論文

1. Kokaji T., Eto M., Hatano A., Yugi K., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K., Ito Y., Egami R., Uematsu S., Terakawa A., Pan Y., Maehara H., Li D., Bai Y., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Kubota H., Suzuki Y., Hirayama A., Soga T., Kuroda S. (Aug 2022)

In vivo transcriptomic analysis of glucose-responsive metabolism in skeletal muscle reveals core differences between the healthy and obese states.

Sci Rep. 12(1):13719.

2. Ito Y., Uda S., Kokaji T., Suzuki Y., Hirayama A., Soga T., Kuroda S., Kubota H.
Comparison of hepatic responses to glucose perturbation between normal and obese mice using edge type.
Sci Rep. in press.

学会発表（口頭発表のみ）

1. Kubota H. (11/16-17, 2022)
Trans-omic analysis of obesity revealed time-dependent regulation across multiple omic layer.
(Invited)
The 31st Hot Spring Harbor International Symposium, Online.
2. Matsuzaki F., Uda S., Yamauchi Y., Matumoto M., Soga T., Maehara K., Ohkawa Y., Nakayama K.I., Kuroda S., Kubota H. (11/16-17, 2022)
Trans-omic analysis of inulin response in the liver.
The 31st Hot Spring Harbor International Symposium, Online.
3. 久保田 浩行. (11/25, 2022)
トランスオミクス解析による生命現象の理解. (招待講演)
最先端バイオインフォマティクス研究ミニシンポジウム.
4. 松崎 芙美子. (11/30-12/2, 2022)
トランスオミックネットワーク作成による分子制御機構の可視化. (招待講演)
第45回分子生物学会, 千葉.

書籍等

1. 宇田 新介. (2022年11月)
システムバイオロジー.
バイオインフォマティクスシリーズ4. コロナ社.

分子神経免疫学分野

Division of Molecular Neuroimmunology

教授：増田 隆博

Professor : Takahiro Masuda, Ph.D.

当分野は、2023年1月に新設された分野で、増田隆博（教授）、福崎美穂（技能補佐員）、山崎絢斗（修士課程学生：薬学府より出向）の計3名で研究活動を展開している。

当分野は、脳内免疫系に着目した研究を進めており、主に脳内マクロファージの未知なる重要機能の解明を目指した細胞-組織-個体レベルの包括的な研究を行っている。特に、マウス等の動物モデルやヒト死後脳組織などを用いた解析を介して、脳内マクロファージの発生・維持メカニズムや多様性に加え、アルツハイマー病や多発性硬化症などの神経変性疾患、精神疾患など様々な中枢神経系疾患への関与を明らかにするべく、研究に取り組んでいる。こうした取り組みを通じて、「脳がどのように出来上がり、維持され、悪くなるのか」の理解をより深化させ、健やかな脳を形成・維持する方法と提唱し、また現状は治療が困難な中枢性疾患の新たな治療法の確立に繋がりたいと考えている。

A. 脳内マクロファージの発生・維持メカニズムの解明

全身ほぼすべての組織・臓器には、マクロファージという免疫細胞が存在している。脳も例外ではなく、主要な脳内免疫細胞としてミクログリアがよく知られており、その機能的な重要性が次々に明らかになってきている。一方、脳を覆っている髄膜や血管周囲スペース、脈絡叢といった脳境界領域には、脳境界マクロファージという特殊な免疫細胞が存在することが分かってきたが、その詳細はほとんど分かっていなかった。そこで我々は、単一細胞解析法や Fate-mapping 法などの最新研究技術ならびに独自開発した遺伝子改変ツールを駆使して、①脳境界マクロファージとミクログリアは同一の前駆細胞から作り出される姉妹細胞であること、また②脳境界マクロファージは脳の中でミクログリアと異なる遺伝子的また機能的特性を獲得すること、さらには③脳境界マクロファージが非常に複雑かつメカニズムを介して脳境界領域に定着し、④胎児から成体に至る幅広いライフステージにおいて脳境界領域に存在し続けることを世界で初めて明らかにした (Masuda et al, Nature, 2022)。また、名古屋大学との共同研究により、脳境界マクロファージの一部が胎生期の限られた時期に脳実質内へ移行し、ミクログリアへと分化している可能性も示した (Hattori et al, Cell Rep, 2023)。これらの研究により、いまだ完全な理解には至っていない脳の形成メカニズムに関して、特に脳内マクロファージの分布動態や発生学的起源を示すことができた。また、脳内マクロファージを含めた様々なミエロイド系細胞の脳内動態について、その詳細や今

後の展望について総説にまとめた (Amann et al., Nat Immunol, 2023).

一方, これまでミクログリアと脳境界マクロファージの機能を正確に分けて解析するツールが存在していなかった. そこで我々はまず, 脳境界マクロファージには影響を及ぼさず, ミクログリア特異的に細胞機能を操作するツールの開発に着手し, 最近その成果を報告した(Masuda et al., Nat Immunol, 2020). そして今回, そのカウンターパートとなる脳境界マクロファージのみを標的として細胞機能を操作するツールの開発にも成功し (Masuda et al, Nature, 2022), それらを用いたミクログリアおよび脳境界マクロファージ特異的な細胞機能の解析にも着手している. これらは, 認知症や自閉スペクトラム症といった多くの脳関連疾患の発症メカニズムの解明に貢献すると考えられ, 将来的には脳内免疫細胞を標的とした新たな治療法・新薬の開発に役立つことが期待される.

B. 中枢神経系疾患発症における脳内マクロファージの役割

上述の通り, ミクログリアと脳境界マクロファージそれぞれの機能や細胞特性を分けて解析するツールの開発に成功し, 中枢性疾患発症におけるミクログリアおよび脳境界マクロファージ特異的な細胞機能の解析を進める基盤が整った. そこで最近, 開発したツールに加え, 1細胞オミスク解析やFate mapping解析等の最新技術を用いて, 中枢神経系疾患時の脳内マクロファージの分布・動態・遺伝子発現プロファイル・多様性の包括的な解析に着手している. こうした基盤情報を明確にした後, 各種中枢神経系疾患発症における脳内マクロファージの関与について明らかにしていく.

業績目録

原著論文

1. Masuda T., Amann L., Monaco G., Sankowski R., Staszewski O., Krueger M., Gaudio F.D., He L., Paterson N., Nent E., Fernández-Klett F., Yamasaki A., Frosch M., Fliegauf M., Bosch L.F.P., Ulupinar H., Hagemeyer N., Schreiner D., Dorrier C., Tsuda M., Grothe C., Joutel A., Daneman R., Betsholtz C., Lendahl U., Knobloch K.P., Lämmermann T., Priller J., Kierdorf K., Prinz M. (Apr 2022)
Specification of CNS macrophage subsets occurs postnatally in defined niches.
Nature 604(7907):740-748.
2. Kohno K., Shirasaka R., Yoshihara K., Mikuriya S., Tanaka K., Takanami K., Inoue K., Sakamoto H., Ohkawa Y., Masuda T., Tsuda M. (Apr 2022)
A spinal microglia population involved in remitting and relapsing neuropathic pain.

Science 376(6588):86-90.

3. Hattori Y., Kato D., Murayama F., Koike S., Asai H., Yamasaki A., Naito Y., Kawaguchi A., Konishi H., Prinz M., Masuda T., Wake H., Miyata T. (Feb 2023)
CD206+ macrophages transventricularly infiltrate the early embryonic cerebral wall to differentiate into microglia.
Cell Rep. 42(2):112092.

総説

1. Paolicelli R.C., Sierra A., Stevens B., Tremblay M.E., Aguzzi A., Ajami B., Amit I., Audinat E., Bechmann I., Bennett M., Bennett F., Bessis A., Biber K., Bilbo S., Blurton-Jones M., Boddeke E., Brites D., Brône B., Brown G.C., Butovsky O., Carson M.J., Castellano B., Colonna M., Cowley S.A., Cunningham C., Davalos D., De Jager P.L., de Strooper B., Denes A., Eggen B.J.L., Eyo U., Galea E., Garel S., Ginhoux F., Glass C.K., Gokce O., Gomez-Nicola D., González B., Gordon S., Graeber M.B., Greenhalgh A.D., Gressens P., Greter M., Gutmann D.H., Haass C., Heneka M.T., Heppner F.L., Hong S., Hume D.A., Jung S., Kettenmann H., Kipnis J., Koyama R., Lemke G., Lynch M., Majewska A., Malcangio M., Malm T., Mancuso R., Masuda T., Matteoli M., McColl B.W., Miron V.E., Molofsky A.V., Monje M., Mracsko E., Nadjar A., Neher J.J., Neniskyte U., Neumann H., Noda M., Peng B., Peri F., Perry V.H., Popovich P.G., Pridans C., Priller J., Prinz M., Ragozzino D., Ransohoff R.M., Salter M.W., Schaefer A., Schafer D.P., Schwartz M., Simons M., Smith C.J., Streit W.J., Tay T.L., Tsai L.H., Verkhratsky A., von Bernhardi R., Wake H., Wittamer V., Wolf S.A., Wu L.J., Wyss-Coray T. (Nov 2022)
Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads.
Neuron 110(21):3458-3483.
2. Masuda T., Amann L., Prinz M. (Nov 2022)
Novel insights into the origin and development of CNS macrophage subsets.
Clin Transl Med. 12(11):e1096.
3. Masuda T. (Nov 2022)
Recent topic regarding macrophage in the central nervous system.
J Biochem. mvac093.
4. Amann L., Masuda T., Prinz M. (Mar 2023)
Mechanisms of myeloid cell entry to the healthy and diseased central nervous system.
Nat Immunol. 24(3):393-407.
5. 増田 隆博.
正常時および病態時における中枢神経系マクロファージの多様性.
日薬理誌. in press.

著書

1. 増田 隆博. (2022年8月)
多様な脳内マクロファージからみる正常脳と中枢神経系疾患.
科学評論社「臨床免疫・アレルギー科」. Vol.78 No.2.
2. 増田 隆博. (2022年11月)
多様なミクログリアの機能と細胞特性.
実験医学. Vol.40, No.18.
3. 増田 隆博. (2022年11月)
脳実質ミクログリアと脳境界マクロファージ.
実験医学. Vol.40, No.18.
4. 増田 隆博. (2022年12月)
一細胞解析が切り開く医学生物学研究.
アークメディア「臨床精神医学」. Vol.51 No.12.
5. 増田 隆博. (2023年1月)
中枢神経系の間質に常在する脳内マクロファージと疾患.
先端医学社「炎症と免疫」. Vol.31 No.1.

受賞

1. 増田 隆博. (2022年11月)
脳内マクロファージの統合的理解と研究基盤の創出.
中外創薬科学財団, 第一回石館・上野賞.

学会発表

1. Takahiro Masuda. (6/30-7/3, 2022)
Diverse macrophages govern brain environment.
Neuro2022, 沖縄.
2. 増田 隆博. (7/6-7, 2022)
多様な脳内マクロファージから紐解く中枢神経系疾患.
第43回日本炎症・再生医学会, 淡路島.
3. 増田 隆博. (11/30-12/3, 2022)
脳内マクロファージと脳の発達.
第76回日本薬理学会年会, 横浜.
4. 増田 隆博. (2/14, 2023)
多様な脳内マクロファージから脳の形成と異常を理解する.

第 16 大阪大学ニコソイメージングセンター シリーズセミナー, 大阪.

5. 増田 隆博. (2/17, 2023)

Macrophages in the central nervous system: ontogeny and function in health and disease.

第 9 回 Neuroscience Network in Kobe, 神戸.

6. 増田 隆博. (2/17, 2023)

多様な脳内マクロファージから見る脳の形成と機能.

第 15 回 CBIR/ONSA/大学院セミナー共催 若手インスパイアシンポジウム, WEB 開催.

細胞不均一性学分野

Division of Cell Heterogeneity

教授：上住 聡芳

Professor : Akiyoshi Uezumi, Ph.D.

当分野は 2023 年 2 月に新設された研究室で、上住聡芳教授、上住円助教の 2 名で研究をスタートさせている。

当分野は、不均一な細胞群が連携し生み出す秩序によって支えられる生体恒常性システムを理解する目的で、骨格筋組織を中心に研究を行っている。特に、独自に発見した筋間質に存在する間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cell: MSC) に着目し、研究を進めている。筋疾患や加齢に伴うサルコペニアなどの病態において、異常をきたす細胞種や細胞連関を明らかにし、疾患のメカニズムを理解することを目指す。遺伝子改変マウスやヒト細胞を駆使して目的達成を図り、得られた成果を筋疾患やサルコペニアの予防・治療法開発につなげることで健康長寿の実現に貢献する。

A. 骨格筋の間葉系間質細胞に関する研究

骨格筋は実質細胞である筋線維が束を成した組織で、筋線維が収縮することにより私たちは体を動かすことが可能になる。老化に伴う筋量および筋力の低下はサルコペニアと呼ばれ、単に運動能力の低下を招くだけでなく、全身の健康状態をも悪化させる。現在、高齢化は大きな社会問題となっているが、健康長寿の実現にはサルコペニアの克服が必須である。骨格筋組織の維持機構に関する研究は、これまで筋線維に焦点を当てたものが中心であった。これに対して我々は、骨格筋の間質に間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cell: MSC) を発見し (Uezumi A et al., Nat Cell Biol, 2010), MSC を欠損するマウスを作製したところ、顕著な筋萎縮と筋力低下が生じ、早死にすることを見出した (Uezumi A et al., J Clin Invest, 2021)。即ち、MSC は実質細胞である筋線維の維持に必須であり、寿命をも規定する役割を果たしていることが明らかとなった。面白いことに、最近の単一細胞 RNA-seq の研究から、骨格筋の MSC はその遺伝子発現プロファイルに基づき、いくつかのサブポプレーションに分かれることがわかってきた。現在、これらのサブポプレーションが固有の機能を持ち、それらが統合的に筋組織の維持に働いていることを示唆する結果を得つつある。さらに、全身の様々な臓器には似通った MSC が存在しそれぞれの臓器の維持に機能していると考えられるが、各臓器の MSC を比較解析してみると、それぞれ固有の特性を有することもわかってきた。現在、骨格筋の MSC に固有の機能を明らかにする研究も進めている。このように、MSC における 2 つの不均一性「臓器内不均一性」と「臓器間不均一性」の観点から、骨

格筋の恒常性維持機構の理解を目指している。

B. 神経筋接合部の老化メカニズム

加齢に伴う神経筋接合部 (Neuromuscular junction: NMJ) での運動神経の脱落 (加齢性脱神経) は, サルコペニアの要因と考えられているが, その機序は不明であった。我々は, 網羅的なタンパク発現解析から, 老化筋組織で MFG-E8 の発現が増大していることを見出した。MFG-E8 は加齢に伴い NMJ で異常蓄積すること, そして, MFG-E8 欠損マウスでは加齢性脱神経と筋力低下が軽減されることを明らかにした。このことから, MFG-E8 蓄積の病的役割が明らかとなり, MFG-E8 を標的としたサルコペニア治療法が有望であることが示唆された (Ikemoto-Uezumi M et al., Aging Cell, 2022)。今後, NMJ での MFG-E8 異常蓄積を伴うサルコペニア, および, 他の神経・筋疾患を対象に, MFG-E8 異常蓄積の抑制に取り組み, その治療効果を検証する。さらに, MFG-E8 の異常蓄積がどのように疾患の発症につながるのか, その過程の細胞・分子レベルの変化を解析し, 発症を導くメカニズムを明らかにしていく。

C. ヒト骨格筋由来細胞を用いた老化・筋疾患研究

骨格筋組織には上述の MSC に加え, 筋衛星細胞と呼ばれる細胞が存在する。筋衛星細胞は成体において骨格筋に分化できる唯一の細胞で, 骨格筋の幹細胞として他の細胞では代償が効かない役割を他はしている。MSC と筋衛星細胞は筋の疾患や再生, 老化を考える上で, 最も重要となる 2 大細胞と言える。ヒトの病態メカニズムや治療法を研究する上で, ヒト由来のこれらの細胞を用いることは重要と考え, ヒト骨格筋からの MSC と筋衛星細胞の単離・培養法の開発に取り組んできた。これまでに, ヒト骨格筋からの高精度な MSC と筋衛星細胞の単離方法とそれらの大量培養法の確立, そして, ヒト MSC を用いた薬剤探索などの成果をあげている (Uezumi A et al., Stem Cell Reports, 2016; Kasai T et al., Am J Pathol, 2017; Kusano T et al., J Orthop Res, 2021)。現在, ヒト筋衛星細胞が形成する筋管細胞を用いて, 天然由来生理活性物質のスクリーニングを終え, 筋肥大作用を有する候補物質を同定している。今後, これらの作用メカニズム解明と高齢者への適応を目指し研究を進める。

業績目録

原著論文

1. Nawaz A., Bilal M., Fujisaka S., Kado T., Aslam M.R., Ahmed S., Okabe K., Igarashi Y., Watanabe Y., Kuwano T., Tsuneyama K., Nishimura A., Nishida Y., Yamamoto S., Sasahara M., Imura J., Mori

H., Matzuk M.M., Kudo F., Manabe I., Uezumi A., Nakagawa T., Oishi Y., Tobe K. (Nov 2022)
Depletion of CD206+ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration.

Nat Commun. 13(1):7058.

2. Kurosawa T., Ikemoto-Uezumi M., Kaneshige A., Fukada S.I., Uezumi A. (Jul 2022)
Whole-mount immunofluorescence staining of mesenchymal progenitors in murine plantaris muscle.
STAR Protoc. 3(3):101593.
3. Kaneshige A., Kaji T., Saito H., Higashimoto T., Nakamura A., Kurosawa T., Ikemoto-Uezumi M., Uezumi A., Fukada S.I. (Apr 2022)
Detection of muscle stem cell-derived myonuclei in murine overloaded muscles.
STAR Protoc. 3(2):101307.

総説

1. Uezumi A. (Mar 2023)
Adipose tissue boosts muscle regeneration by supplying mesenchymal stromal cells.
Nat Rev Endocrinol. doi:10.1038/s41574-023-00831-6.
2. Fukada S.I., Uezumi A. (Mar 2023)
Roles and heterogeneity of mesenchymal progenitors in muscle homeostasis, hypertrophy, and disease.
Stem Cells. sxad023.
3. 上住 円, 上住 聡芳. (Feb 2023)
骨格筋維持と間葉系前駆細胞.
Clinical Neuroscience. 41(2):202-204.
4. 上住 円, 上住 聡芳. (Dec 2022)
サルコペニアの発症機序.
医学のあゆみ. 283(10):1019-1023.

学会発表（口頭発表）

1. 上住 聡芳. (9/25, 2022)
筋間質の間葉系前駆細胞とサルコペニアの関わり.
第10回日本運動器理学療法学会学術大会, WEB開催.
2. Akiyoshi Uezumi. (9/9, 2022)
Mechanisms coupling muscle regeneration and resolution of inflammation.
12th Japanese-French Workshop “New insights in personalized medicine for neuromuscular diseases: From Basic to Applied Myology”, Giverny, France.
3. 上住 円. (8/6, 2022)

神経筋接合部における MFG-E8 の蓄積は加齢性脱神経の増悪因子である.

第 8 回日本筋学会学術集会, 東京.

4. 上住 聡芳. (5/18, 2022)

間質の間葉系前駆細胞による筋の維持・適応機構.

第 69 回日本実験動物学会総会, 仙台.

遺伝子発現動態学分野

Division of Gene Expression Dynamics

教授：落合 博

Professor : Hiroshi Ochiai, Ph.D.

当分野は、生細胞イメージングによって得られる時系列データ解析、1細胞 RNA-seq 解析、CRISPR ライブラリスクリーニング技術、バイオインフォマティクス、空間オミクス (DNA/RNA-sequential FISH (seqFISH)) 技術など、多岐にわたる分野や技術等を駆使しながら、遺伝子発現動態制御機構の解明を目指している。また、時間軸・空間軸に沿って高精度・高分解能のビッグデータを取得・統合する高深度オミクス研究を実施するためのプラットフォームを構築し、社会的ニーズの高い感染症、アレルギー、がん等を対象とした研究への展開を目指している。今後の方向性として、転写制御機構研究、高深度オミクス研究に関連した技術開発を含む3つの研究の展開を計画している。

当分野は、2023年3月に新設され、落合博教授、大石裕晃助教、テクニカルスタッフ1名によって研究を進めた。

A. 転写制御因子クラスターと転写動態の関係性解明

我々は、遺伝子が転写される場合、連続的に転写される ON 状態と、ほとんど転写されない OFF 状態が断続的に切り替わることを明らかにしてきた (Ochiai et al., Sci Adv., 2020)。これまでに ON 状態の遺伝子領域の周辺に、転写に関連する因子が集まることを見出してきたが (Li et al., Cell, 2019; Li et al., Nat Struct Mol Biol., 2020)、OFF 状態でのタンパク質因子との関係性は不明であった。我々は、遺伝子の機能を阻害することなく、特定遺伝子の転写開始点近傍の細胞核内局在および転写状態を可視化できる技術、Spliced Tet0 REpeAt, MS2 repeat, and INtein sandwiched reporter Gene tag (STREAMING-tag) システムを確立した (Ohishi et al., Nat Commun., 2022)。従来の遺伝子の転写活性を計測する方法では、ON 状態のみを検出するため、OFF 状態では遺伝子が細胞内のどこにあるのか可視化できなかった。本技術では OFF 状態でも遺伝子の場所を把握できるため、OFF 状態においてどのようなタンパク質因子が近傍に集積しているのかを調べることができる。本システムを適用したマウス胚性幹 (ES) 細胞で、RNA ポリメラーゼ II (RPB1) と、転写活性化に重要な役割を担っているコアクティベーター (BRD4)、メディエーター (MED19, MED22) を蛍光タンパク質で標識し、生細胞イメージングを実施した。その結果、RPB1 と BRD4 タンパク質は、ON 状態の遺伝子の近傍でのみ集積することがわかった。一方で、MED19 および MED22 に関しては、ON 状態 OFF 状態関係なく、遺伝子の近傍に集積することが明らかとなった。これら因子のクラスター

化が動的な転写を制御している可能性が示唆された。また、MED19 および MED22 の OFF 状態における遺伝子の近傍でのクラスターを形成は、RPB1 や BRD4 のクラスター形成の足場となる可能性が示唆された。今後も本システムを活用し、転写関連因子の時空間動態を解析し、転写動態制御機構の解明を目指す。

B. 高次ゲノム構造と転写動態制御関係の解明

遺伝子発現量は主に転写によって制御される。一方で、転写は RNA ポリメラーゼ II によって連続的に転写される ON 状態とほとんど転写されない OFF 状態が確率的に切り替わる動的なプロセスである。この転写動態によって遺伝子発現量が決定されるため、その制御機構の解明はあらゆる生命現象の理解に貢献できる。高次ゲノム構造動態が転写活性状態の制御に関連していることが示唆されていたが、その制御機構の詳細は不明である(Ochiai et al., *Nucleic Acids Res*, 2015; Shinkai et al., *NAR Genom Bioinform*, 2020)。我々は、マウス ES 細胞をモデル系とし、生細胞イメージング、seqFISH 技術、数理解析により、高次ゲノム構造動態を介した転写動態制御機構の解明を目指している。遺伝子発現制御機構はあらゆる生命科学分野に関連するため、その詳細解明は医学を含む多くの分野への波及効果が期待される。

C. 空間オミクス技術の高速化・汎用化と細胞運命予測解析プラットフォームの構築

seqFISH は、複数の RNA 分子、複数のゲノム領域、タンパク質または翻訳後修飾の細胞(核)内局在を決定可能な技術である。seqFISH 技術の利用によって膨大なデータの取得が可能であるが、データ取得に多くの時間を要することが課題となっている。そこで、画像取得および画像解析の高速化を達成するために、seqFISH 反応系の改良、顕微鏡光学系の改良、画像解析パイプラインの効率化等の技術開発を進める。また、ゲノムワイド 1 細胞解析技術・seqFISH 技術によって取得された情報と生細胞イメージングで特定モダリティに関して取得した詳細な時空間情報を統合的に解析することで、細胞運命予測が可能な解析基盤の構築を目指す。本基盤はあらゆる試料への適用が可能であるため、社会的ニーズの高い感染症、アレルギー、がん等への研究応用に展開したいと考えている。

業績目録

原著論文

1. Ohishi H., Shimada S., Uchino S., Li J., Sato Y., Shintani M, Owada H., Ohkawa Y., Pertsinidis A., Yamamoto T., Kimura H., Ochiai H. (Dec 2022)
STREAMING-tag system reveals spatiotemporal relationships between transcriptional regulatory factors and transcriptional activity.
Nature Commun. 13:7672.

総説

1. Ochiai H. (Dec 2022)
Facilitating genome function understanding using genome editing dependent bioimaging techniques.
Gene and Genome Editing. 5:100022.
2. 落合 博. (2023年2月)
遺伝子発現ゆらぎとその生物学的意義の探求.
月刊細胞. 55(3):12-15.

著書

1. Ohishi H., Ochiai H. (Sep 2022)
STREAMING-Tag System: Technology to Enable Visualization of Transcriptional Activity and Subnuclear Localization of Specific Endogenous Genes.
In: **Methods Mol Biol.** -Epigenomics-. 2577, 103-122, Springer Nature.

学会発表（口頭発表）

1. 落合 博. (5/11-13, 2022)
超解像イメージングから解き明かす転写動態と転写制御因子クラスターの関係性.
日本顕微鏡学会 第78回学術講演会, 郡山.
2. 落合 博. (7/4-5, 2022)
イメージングによる転写動態制御機構の解明.
国立遺伝学研究所研究会「染色体安定維持研究会」, 三島.
3. 落合 博. (10/14-16, 2022)
高次ゲノム構造と転写ダイナミクス.
一般財団法人 染色体学会 第73回(2022年度)年会, WEB開催.
4. 落合 博. (10/17-18, 2022)

- 高次ゲノム構造と転写の動態.
令和4年遺伝研究会 クロマチン・細胞核構造の動的変換とゲノム機能制御, 三島.
5. Hiroshi Ochiai. (11/15-16, 2022)
Revealing regulatory mechanisms of transcriptional dynamics by single-gene imaging system.
Single Molecule & Chromatin meeting 2022, Sydney, Australia.
 6. Hiroshi Ochiai. (12/1-3, 2022)
単一遺伝子イメージングから解き明かす転写活性依存的な転写制御因子凝集体の形成.
第45回日本分子生物学会年会, 千葉.
 7. Hiroshi Ochiai. (12/5, 2022)
Transcriptional dynamics regulated by non-genomic codes.
The 1st International Symposium on REPLICATION of NON GENOME, 東京.
 8. 落合 博. (12/15-16, 2022)
遺伝子発現動態の定量的理解.
定量生物学の会 第十回年会, 東広島.
 9. Hiroshi Ochiai. (1/24, 2023)
Localization of transcriptional regulator condensates in transcriptional bursting revealed by
STREAMING-tag system.
Cretan RNA Salon Seminar Series, WEB 開催.
 10. 落合 博. (3/6, 2023)
マウス多能性幹細胞における転写動態制御機構の解明.
第4回ゲノム生物物理学セミナー, WEB 開催.

防御分子構築学分野

Division of Molecular Design

I. 客員教授：竹本 龍也 Professor : Tatsuya Takemoto, Ph.D.

当分野では、胚発生初期の重要プロセスである原腸陥入に焦点をあて、多彩な体細胞系列が産出させる仕組みの解明をテーマに研究を進めている。特に、中胚葉系列が生み出される仕組みを対象とし、遺伝子発現制御解析、ゲノム編集を活用した遺伝子改変マウス、ライブイメージングを活用して、研究を続けている。また、ゲノム編集技術を活用してハイスループットに遺伝子改変マウスを作製する技術開発も行なっている。

A. 原腸陥入に伴う多彩な体細胞系列が産み出される仕組みの解明

脊椎動物の胚発生において最初に形成されるのが頭部の組織である。そのうち、体幹部の組織が発生の進行とともに頸部から尾部に向かって段階的に形成される。マウスの胚においては、妊娠 7~8 日目において頭部の組織が形成され、つづいて、体幹部および尾部の組織が約 5 日（妊娠 8~13 日目）をかけて形成される。体軸伸長とよばれるこの過程によって、神経管を中心として側方に体節中胚葉、中間中胚葉、側板中胚葉が形成され、また、神経管の腹側には脊索および内胚葉が形成される。これらの組織は、原腸陥入の場である原条とその周辺のエピブラスト（胚盤葉上層）あるいは尾芽から供給される細胞により形成される。私たちは、原腸陥入に伴って産み出される多様な体細胞系列が、こういった仕組みによって制御されているのかを研究している。

現在、私たちは将来脊椎骨や骨格筋へと発生する中胚葉細胞群がどのようにして産み出されるのかについて、遺伝子発現制御に着目して研究を進めている。転写因子 Tbx6 は、その遺伝子ノックアウトでは中胚葉の代わりに神経系細胞が産出されることから、中胚葉発生において「神経系への分化を抑制（遺伝子群を負に制御）する役割」を担いながらも、中胚葉分化を推し進める遺伝子群を正に制御するという役割を担っている。これら遺伝子群の同定を網羅的に行い、中胚葉発生を明らかにする。具体的には、Tbx6 遺伝子変異体マウスにおいて、こういった遺伝子の発現変化がみられるのかを RNA-seq で、エピゲノム変化を ATAC-seq で解析した。また、ChIL-seq を活用して、転写因子 Tbx6 が作用するゲノム領域を網羅的に探索して、Tbx6 を中心とした中胚葉発生の遺伝子制御-非制御の関係を予想した。同定された遺伝子群について、網羅的にゲノム編集マウス作製を作製して、中胚葉発生を解析して、複数の新規遺伝子群を同定しつつある。

また、中枢神経系と中胚葉とを産み出す体軸幹細胞が維持される仕組み・分化へと

発生する仕組みについても研究を進めている。これまでの研究から体軸幹細胞の維持および中枢神経系・中胚葉への分化のいずれのプロセスにも Wnt シグナルが関与していることが示唆されている。しかしながら、3 つの異なるプロセスに Wnt シグナルがどういった仕組みで使い分けされているのかについては明らかになっていない。私たちは、それぞれの細胞が受け取った Wnt シグナルの強度（量）に依存し、細胞が辿る運命が異なるのではないかと考え研究を行っている。

体軸幹細胞に関与する Wnt シグナルを解明するため、マウス原腸陥入期胚の原始線条に発現する Wnt リガンドを調べたところ、Wnt3a と Wnt8a が主要な Wnt リガンドであることが分かった。さらに、Wnt リガンドの作用した細胞が受け取ったシグナルの強度を明らかにするため、Wnt レポーターWntVis マウスを用いて原腸陥入期胚でのシグナル活性を観察した。その結果、原腸陥入の場である原始線条周辺では EGFP 発現の強い細胞と弱い細胞が混ざり合って存在していた。そこで、それぞれ受け取った Wnt シグナル強度の異なる細胞がどのような遺伝子を発現しているのかについて解析を進めている。

B. ゲノム編集技術を活用した遺伝子改変動物の作製

ゲノム編集は、CRISPR/Cas9 システムの出現によって一般的な技術となりつつある。遺伝子改変マウスに関しても、ゲノム編集システムを受精卵に導入するだけで、簡便に目的ゲノム編集マウスを得ることができるようになった。実際に、遺伝子機能を破壊したマウスや、点変異を導入したマウスなどは苦勞せず作製できるようになりつつある。一方で、蛍光レポーター遺伝子やヒト遺伝子などを挿入した長鎖 DNA ノックインマウスの作製については、未だ効率が悪いという状況である。

私たちは、ゲノム編集動物をハイスループットに作製する技術「受精卵エレクトロポレーション法」を開発して、多種多様な遺伝子改変動物を作製してきた。しかしながら、この方法でも、長鎖 DNA ノックインマウス作製の効率化は達成できていない。

現在、私たちは長鎖 DNA を効率的に目的遺伝子座に挿入する方法の開発を行っており、効率化を達成できる条件を見出すことに成功した。

業績目録

原著論文

1. Hatakeyama Y., Saito N., Mii Y., Takada R., Shinozuka T., Takemoto T., Honda N., Takada S. (Mar 2023)

Intercellular exchange of Wnt ligands reduces cell population heterogeneity during embryogenesis.

Nat Commun. in press.

2. Maruhashi T., Sugiura D., Okazaki I.M., Shimizu K., Maeda T.K., Ikubo J., Yoshikawa H., Maenaka K., Ishimaru N., Kosako H., Takemoto T., Okazaki T. (May 2022)

Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity.

Immunity 55(5):912-924.e8.

学会発表

なし

II. 客員准教授 小野 悠介 Associate Professor : Yusuke Ono, Ph.D.

当部門は、「骨格筋の難病克服から健康寿命の延伸まで」を研究目標として掲げ、骨格筋の再生や可塑性の分子基盤の解明を目指している。本年度は特に、以下の2つの課題「A. 筋萎縮の上流メカニズムの解明」および「B. 骨格筋の位置記憶の解明」に取り組んだ。

A. 筋萎縮の上流メカニズムの解明

筋萎縮を引き起こす上流のメカニズムについてはほとんどわかっていない。我々は、不活動・糖尿病の状態下では、筋組織の血管内皮細胞から Notch リガンドである Dll4 が分泌され、細胞間の接触なしに筋線維に発現する Notch2 を活性化し筋萎縮を引き起こすことを見出した。マウスへの Dll4 中和抗体投与は不活動や糖尿病による筋萎縮を効果的に抑制することを確認した。この「Dll4-Notch2 軸」は筋萎縮のみならず、過負荷による筋肥大を抑制する働きもあった。これらの結果から、Dll4-Notch2 軸は、機械的負荷（不活動）と代謝的過負荷（糖尿病）による骨格筋の適応シグナルを統合して萎縮－肥大を調節する重要な役割を担っていることが明らかになった。今後、不活動、糖尿病に加え、さまざまな筋脆弱症における可溶性 Dll4 の重要性を検証し、幅広い疾患での介入の可能性を探る。

B. 骨格筋の位置記憶の解明

骨格筋の大きさや形状は解剖学的に多様であり、またその機能も身体動作のみならず、姿勢維持、呼吸、咀嚼、嚥下、表情表出等と多岐にわたる。難治性筋疾患である筋ジストロフィーにはさまざまな病型が存在し、顔面肩甲上腕型、肢帯型、遠位型、眼咽頭型と型名の通り、脆弱化しやすい身体位置は病型毎に異なる。また、加齢による筋量・筋力の低下（サルコペニア）も全身を通して均一には起こらない。これらの身体位置による症状は、骨格筋の分類として知られる筋線維タイプや身体活動様式など従来の概念では説明できないことから、それぞれの病態解明に向けた新たな視座を必要としている。我々は、成体の骨格筋およびその再生を担うサテライト細胞は、発生起源に基づく身体位置固有の情報（位置記憶）を保持していることを見出した。この位置記憶は、胎児期から維持されており、胚発生過程にボディープランを司るホメオボックス（Hox）遺伝子群の発現とその遺伝子座の DNA メチル化パターンにより可視化できた。位置特異的な Hox 遺伝子発現分布を基盤としたサテライト細胞の位置記憶は、単なる胎児期からの残存ではなく、身体領域に応じた骨格筋の性質決定に関与する可能性がある。現時点では、サテライト細胞に発現する多くの Hox 遺伝子の機能が未知であり、位置記憶と筋疾患発症メカニズムとの関連については、今後、さらなる解析を進める。

業績目録

原著論文

1. Chen W.J., Lin I.H., Lee C.W., Yoshioka K., Ono Y., Yan Y.T., Yen Y., Chen Y.F. (Jul 2022)
Ribonucleotide reductase M2B in the myofibers modulates stem cell fate in skeletal muscle.
NPJ Regen Med. 7(1):37.
2. Hirano K., Tsuchiya M., Shiomi A., Takabayashi S., Suzuki M., Ishikawa Y., Kawano Y., Takabayashi Y., Nishikawa K., Nagao K., Umemoto E., Kitajima Y., Ono Y., Nonomura K., Shintaku H., Mori Y., Umeda M., Hara Y. (Nov 2022)
The mechanosensitive ion channel PIEZO1 promotes satellite cell function in muscle regeneration.
Life Sci Alliance. 6(2):e202201783.
3. Araki H., Hino S., Anan K., Kuribayashi K., Etoh K., Seko D., Takase R., Kohrogi K., Hino Y., Ono Y., Araki E., Mitsuyoshi N. (Jan 2023)
LSD1 defines the fiber type-selective responsiveness to environmental stress in skeletal muscle.
Elife 12:e84618.

著書

1. 小野 悠介. (2022年6月)
筋肉には胎児期の位置記憶が存在する—骨格筋の部位特異性に新たな視座—.
医学のあゆみ. 281巻11号. 医歯薬出版株式会社, 東京.
2. 小野 悠介. (2023年3月)
がんが及ぼす影響—カヘキシア.
わかる老年腫瘍学. 金原出版株式会社, 東京.

学会・国際会議での発表(口頭)

1. 小野 悠介. (2022年5月28日)
The Dll4–Notch2 axis regulates mechanical unloading- and metabolic overloading-induced muscle atrophy. (シンポジウム)
第19回幹細胞シンポジウム, 淡路夢舞台国際会議場, 兵庫.
2. Yusuke Ono. (7/29, 2022)
Intrinsic and extrinsic regulation of skeletal muscle plasticity and regeneration Mini-Symposium.
(シンポジウム)
Kumamoto University, Kumamoto, Online.
3. 小野 悠介. (2022年8月5日)
血管による骨格筋の機械的・代謝的シグナルの統合と可塑性制御. (シンポジウム)

- 第 8 回日本筋学会，東京大学伊藤国際学術研究センター，東京.
4. Yusuke Ono. (9/13, 2022)
Notch signaling: an emerging therapeutic target for muscle wasting diseases. (Plenary Lecture, Invited Speaker)
Myology 2022, Nice, France.
 5. 小野 悠介. (2022 年 10 月 22 日)
筋萎縮の予防戦略. (シンポジウム)
第 37 回日本糖尿病合併症学会，京都国際会館，京都.
 6. Yusuke Ono. (11/16, 2022)
Dll4-Notch2 axis: an emerging therapeutic target for muscle wasting diseases. (シンポジウム)
The 31st Hot Spring Harbor International Symposium, Kyushu University, Online.
 7. 小野 悠介. (2022 年 11 月 22 日)
骨格筋の再生・可塑性とその加齢変容. (シンポジウム)
第 4 回 B6J Aged 研究会，ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン，東京.
 8. 小野 悠介. (2022 年 12 月 10 日)
サルコペニア克服を目指した骨格筋の基礎研究～微小血管を標的にした抗筋萎縮薬の開発に向けて～. (シンポジウム)
熊本大学大・国立長寿医療研究センター共同シンポジウム，熊本大学，熊本.
 9. 小野 悠介. (2022 年 12 月 21 日)
生まれも育ちも記憶する筋肉～質と量を決める仕組み～. (口頭)
The 126th Scienc-ome, オンライン.
 10. Yusuke Ono. (1/21, 2023)
Dll4-Notch2 axis: an emerging therapeutic target for muscle wasting diseases. (シンポジウム)
The 1st IMEG Meeting of the Research Center for High Depth Omics, Online.

防御システム再生学分野

Division of Regeneration Biology

客員教授：松本 雅記

Professor : Masaki Matsumoto, Ph.D.

生命システムは核酸やタンパク質，さらには代謝物よりなる極めて複雑な分子ネットワーク構造の上に成り立っており，これら分子ネットワーク構造の破綻は，がんを始めとする多くの疾患の発症の要因になると考えられる．分子ネットワークの性質や動作原理を理解するためには，その主な構成因子であるタンパク質を正確に計測する必要がある．われわれは，これまでにタンパク質の発現量や翻訳後修飾，さらにはタンパク質間相互作用を網羅的かつ定量的に計測する様々な技術を開発してきた．特に，われわれが独自に開発した大規模なターゲットプロテオミクスのためのプラットフォームである iMPAQT (in vitro proteome assisted MRM for protein absolute quantification) は，任意の興味あるタンパク質群の存在量を一斉に絶対定量可能な汎用的なタンパク質研究ツールである．これまでに，がん化や悪性進展において生じている代謝ネットワークにおける変化を iMPAQT によって精密定量することで，がん特有の代謝状態が生み出される機構やその意義を明らかにしてきた．さらに，現在，より簡単かつ正確に多数のタンパク質を精密絶対定量できる新技術の開発を進めている．これらのプロテオミクスの技術を複合的に利用することで，様々な疾患を分子ネットワーク構造の観点から理解することを目指している．

A. プロテオミクス技術開発研究

われわれは，全タンパク質の絶対定量を可能とする画期的なプロテオーム解析法 iMPAQT 法を開発したが【Matsumoto et al. *Nat. Methods* 2017】，事前準備の煩雑さや，他の生物種への展開，さらにはデータ解析の手間など解消すべき技術的課題が残っていた．そこで，内部標準作製法などを大幅に改変した iMPAQT ver.2 の開発を進めている．今年度は，多数の定量タグを集合させた人工タンパク質“Quantimer”をデザイン・作製し，これを用いることで多数の内部標準タンパク質の一斉定量が可能な QuantiCode システムを構築した．本システムと DIA を用いたハイスループットプロテオミクスを組み合わせることで多数のタンパク質を極めて高速に絶対定量可能なプラットフォームを開発した．また，質量分析計によるプロテオミクスの最大の課題である測定スループットを改善し，最短 10 分で約 5000 タンパク質の定量解析が可能な系を構築した．さらに，プロテオミクスのハイスループット化におけるもう一つの課題である，試料調製法に関しても，細胞や組織からのタンパク質抽出を必要としない画期的な手法である in situ digestion for alcohol-fixed cells (iSDAC)法を開発した【Hatano et al. *J. Biochem.* 2023】．iSDAC 法を用いれば FACS によっ

て選別した細胞等，比較的微量な試料でのプロテオーム計測が劇的に迅速化・省力化できる．これを利用してオートファジーの活性の違いで分離した細胞集団のプロテオーム違いを明らかにした【Aoyama S. et al. *Cell Chem Biol* 2023】．現在，iSDAC 法の原理に基づきさらに高スループット化・自動化・微量化が可能な，iSDAC-HTP を開発を進めている．上記のように，これまで難しいとされてきた網羅性・感度・分析スループットの全ての能力を有する新たなプロテオミクス技術を活用し，網羅的なタンパク質分解速度や熱安定性，システムワイドな複合体形成状態の解析などより機能的なプロテオーム情報の取得が可能となった．

B. 未開拓プロテオームの全体像の解明

近年，ゲノム情報の整備と質量分析計の高性能化によって一度に数千のタンパク質発現情報を取得できるようになった．その一方で，ゲノムが内包するプロテオームの実像は未だ不明瞭である．例えば，2014 年にはヒトプロテオームのドラフトが報告されたが【Wilhelm M. et al. *Nature* 2014, Kim M.S. et al. *Nature* 2014】，多数の組織や細胞株を対象に数千にもおよぶ質量分析データを集積したにもかかわらず，一定数のタンパク質の発現がいまだ一度も確認されていない．このように，従来のプロテオーム解析技術ではプロテオームの複雑性に十分対応できていない状況である上，近年，プロテオームの定義自体を見直す必要性も生じている．このような未開拓プロテオームの実体を明らかにすべく，ribosome-profiling と DIA 法による in-depth proteomics を組み合わせた解析プラットフォームを構築した．本方法によって，2000 種類におよぶ新規 ORF を発見できている．また，既存の N 末端ペプチドの濃縮法【Na C.H. et al. *Genome Res* 2018, Chang, C.H. et al. *Mol Cell Proteomics* 2021】に新たに開発したデータ解析法である Position Focused Peptide Centric Search (PFoce) を組み合わせることでより信頼性の高い新規 ORF の同定が可能になりつつある．

C. タンパク質動態研究

タンパク質の活性はその発現量だけでなく，安定性，複合体形成，翻訳後修飾，細胞内局在などによって制御されている．このようなタンパク質が発現してから機能を発揮するまでの一連の過程をタンパク質動態と呼ぶ．プロテオーム情報から細胞システムの状態を理解するには，このタンパク質動態およびその制御を定量的に理解する必要がある．このような背景から，われわれはタンパク質の翻訳後修飾や複合体解析を定量的に解析する手法を多数開発し，シグナル伝達やタンパク質分解制御の研究に応用してきた．特に，近年は細胞核内プロテオーム動態に着目しており，クロマチン上に集積するタンパク質の動態をより定量的かつ網羅的に計測するための技術開発を進めている．今年度は化学的あるいは物性ベースでのタンパク質分画法と pulsed SILAC 法，さらには DIA による高深度プロテオミクスを組み合わせることで，10,000 種類におよぶタンパク質の細胞内局在とタンパ

ク質寿命の決定に成功しており，同一タンパク質でも細胞内局在に応じて異なる動態を持つことを明らかとしている。

業績目録

原著論文

1. Aoyama S., Nishida Y., Uzawa H., Himuro M., Kanai A., Ueki K., Ito M., Iida H., Tanida I., Miyatsuka T., Fujitani Y., Matsumoto M., Watada H. (2023)
Monitoring autophagic flux in vivo revealed its physiological response and significance of heterogeneity in pancreatic beta cells.
Cell Chem Biol. in press.
2. Hatano A., Takami T., Matsumoto M. (2023)
In situ digestion of alcohol-fixed cells for quantitative proteomics.
J Biochem. in press.
3. Wada R., Fujinuma S., Nakatsumi H., Matsumoto M., Nakayama K.I. (Feb 2023)
Phosphorylation of PBX2, a novel downstream target of mTORC1, is determined by GSK3 and PP1.
J Biochem. 173:129-138.
4. Shimizu H., Kodama M., Matsumoto M., Orba Y., Sasaki M., Sato A., Sawa H., Nakayama K.I. (Oct 2022)
LIGHTHOUSE illuminates therapeutics for a variety of diseases including COVID-19.
iScience 25(11):105314.
5. Fujimoto M., Takii R., Matsumoto M., Okada M., Nakayama K.I., Nakato R., Fujiki K., Shirahige K., Nakai A. (Jul 2022)
HSF1 phosphorylation establishes an active chromatin state via the TRRAP-TIP60 complex and promotes tumorigenesis.
Nature Commun. 13(1):4355.

学会発表等

1. 松本 雅記. (2/17, 2023)
高速・高深度プロテオミクスが加速する生命科学研究. (基調講演)
第36回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 一ツ橋講堂.
2. 松本 雅記. (8/8, 2022)
高密度・ハイスループットプロテオミクスによるタンパク質動態研究.
日本プロテオーム学会 2022 年大会, 北里大学.
3. 松本 雅記. (6/9, 2022)

高感度・ハイスループットプロテオミクスがもたらすタンパク質研究の新展開. (招待講演)
第22回蛋白質科学会年会, つくば国際会議場.