

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07298

研究課題名(和文) 19F-NMR法と常磁性効果を用いた細胞内環境下のタンパク質の基質認識機構の解明

研究課題名(英文) Structural analysis of in vivo protein-ligand interactions by 19F-NMR and PRE

研究代表者

小柴 生造 (Koshiba, Seizo)

東北大学・未来型医療創成センター・教授

研究者番号：70332301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生体内でのタンパク質の様々な分子認識機構を解明することを目標として研究を行った。具体的にはストレス応答タンパク質Keap1について、各種基質(Nrf2、各種親電子性物質、創薬候補化合物)とKeap1との相互作用をNMR法を用いて解析した。その結果Nrf2の2つの相互作用部位がKeap1二量体とそれぞれ異なる結合強度で結合し、さらに相互作用を阻害する化合物等を加えるとNrf2の結合が徐々に外れること、その過程で片方の結合部位が外れた状態で存在する中間状態が存在することを明らかにした。また各種創薬候補化合物や親電子性物質がKeap1とNrf2の相互作用に与える影響についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体内におけるストレス応答システムKeap1-Nrf2経路を対象に、各種化合物によるNrf2の活性化のメカニズムの詳細を高次構造変化の視点から明らかにした。Keap1-Nrf2は生体内において様々な疾患に関わることが報告されており、創薬ターゲットとして世界中で研究開発が進められている。本研究成果は今後の創薬開発において重要な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：For Keap1-Nrf2 system, we investigated the mechanism of Nrf2 activation by NMR and found that Nrf2 is dissociated from Keap1 by non-electrophilic inhibitors (Nrf2 inducers) or p62, but is not by electrophilic inhibitors, such as CDDO-Im. While there are two Keap1-binding sites (DLGex and ETGE motifs) in Nrf2, these non-electrophilic inhibitors preferentially inhibit the interaction of DLGex, resulting to the intermediate state in which only one binding site, ETGE motif, interacts with Keap1. These results indicate that there are several Nrf2-activation mechanisms and non-electrophilic inhibitors activate Nrf2 by using "Hinge-Latch mechanism". This study provides significant insights for the pharmacological development of new Nrf2 inducers.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR クライオ電子顕微鏡 動的構造 Keap1 PAH

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2009年に細胞内条件下におけるタンパク質の構造解析が発表になって以降、研究開始時点までに実際に機能している細胞内環境下でのタンパク質の振る舞いを解析した各種成果が報告されていた。しかし、非特異的相互作用の多い細胞内環境では、通常の *in vitro* での NMR 構造解析に使用している均一な安定同位体標識技術は、感度や分解能が非常に悪い。また生体内の他の分子由来の NMR シグナルも同時に観測されるため、濃度が低いとシグナルの重なりが激しく解析が困難である。

これらの問題を克服するため、研究代表者はタンパク質の各種 <sup>19</sup>F 標識法と <sup>19</sup>F-NMR 法を利用した細胞内環境下の NMR 測定 (In-Cell NMR) 法をそれまで開発してきた。これは申請者が開発した高感度なトリフルオロメチル標識タンパク質の合成技術を応用して、細胞内における微量なタンパク質のふるまいや基質認識に伴う構造変化を高速・高感度に測定する技術である。<sup>19</sup>F 核は生体内の他の分子には存在せず、高感度で且つタンパク質の高次構造にほとんど影響を与えないため、細胞内におけるタンパク質の働きを観測するには最適の標識法である。また <sup>19</sup>F 核は周りの環境に非常に敏感に反応しシグナルが変化する性質があるため、細胞内におけるタンパク質の構造変化や相互作用の解析に適している。また、常磁性効果の活用による構造解析技術を In-Cell NMR 法に応用する報告もなされた。

このため研究代表者は、これらの技術を用いて、細胞内におけるタンパク質の動的構造変化、特に基質結合に伴うドメイン間配向変化を解析する技術を開発し、生体内におけるタンパク質の高次構造レベルでの機能メカニズムや分子認識機構を明らかにすることを計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では、それまで研究代表者が研究を進めてきた各種タンパク質 (セリンスレオニンキナーゼ VRK1、ストレス応答タンパク質 Keap1-Nrf2 複合体、PAH 等の各種代謝酵素タンパク質) を用いて、細胞内環境において様々な相互作用に伴う標的タンパク質の動的構造変化を各種 NMR 法を用いて観測することで、実際に機能している環境下でのタンパク質の機能メカニズムを高次構造のレベルで明らかにすることを目的とした。

具体的には、VRK1 については細胞内におけるリン酸化や相互作用に伴う高次構造変化をリアルタイムで観測する方法を開発することを目的とした。また Keap1 については、分子内に多数のシステインが存在し、これらが各種低分子と結合することで酸化ストレス応答が発現することが知られているが、化合物の種類によって結合するシステインが異なり、同じ活性化でもその過程で様々な構造変化の可能性が示唆されていた。このため、様々な基質がどの部位のシステインに結合するか、また結合に際しどのような構造変化が起こるかを明らかにすることを目的とした。さらに PAH については基質結合に伴う PAH のドメイン間配向の動的構造変化を解析し、遺伝子多型が構造変化に与える影響を分子レベルで明らかにすることを目標として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

細胞内環境下におけるタンパク質の動的構造変化を明らかにするため、研究代表者がそれまでに開発してきた <sup>19</sup>F を含む各種安定同位体標識技術を活用して標的タンパク質の各種標識タンパク質を作成する。具体的には研究代表者が開発したトリフルオロメチオニン標識法や、高分子量タンパク質の構造解析で実績のあるメチル基選択標識法などを併用する。対象とするタンパク質は、それまでに研究代表者が研究を進めていたセリンスレオニンキナーゼ VRK1、ストレス応答タンパク質 Keap1-Nrf2 複合体、および PAH 等の各種代謝酵素タンパク質等で、目的に合わせて各種標識を行う。次に標識した各種タンパク質を細胞内に導入し、<sup>19</sup>F-NMR 法等各種 NMR 法で測定することで、基質との相互作用や修飾に伴うタンパク質の高次構造変化を観測する。並行して *in vitro* の環境下での相互作用に伴う高次構造変化の解析も進め、両者を比較することで基質認識のメカニズムをより詳細に明らかにする。

一方、本研究期間中に最新鋭のクライオ専用 300kV 透過型電子顕微鏡が研究代表者の所属機関に新たに導入された。クライオ電子顕微鏡法は結晶化が不要なため、溶液状態により近い構造解析が可能であり、複数のドメインから構成されるタンパク質や複合体など特に分子量の大きいタンパク質の構造解析に有用である。このため、本研究においてもクライオ電子顕微鏡法を活用して、特に全長の構造情報がまだ無い Keap1-Nrf2 複合体や、マルチドメインでかつ多量体を形成する代謝酵素タンパク質群の構造情報の取得を試みた。

### 4. 研究成果

最初に、解析対象である VRK1 や Keap1-Nrf2 複合体について、トリフルオロメチオニン標識など <sup>19</sup>F を含む各種安定同位体標識したタンパク質の作成を試みた。その結果、各タンパク質の標識に成功し、十分な量のタンパク質を得ることができた。次に得られたタンパク質を用いてまず *in vitro* の環境下で各種 NMR スペクトルを測定し、ピークの帰属を行うとともに、基質結合に伴うシグナルの変化について解析を行った。さらに、細胞内環境における NMR 測定を行うため、精製

した各種標識タンパク質について、HeLa 細胞など各種動物細胞に導入を試みた。その結果、細胞内環境下での NMR シグナルを観測することができたが、細胞への導入効率が低い、あるいは導入が安定しない、等の理由により、研究期間内に細胞内環境下でタンパク質の高次構造変化を観測するために十分な感度を安定して得ることができなかった。このため各タンパク質について、細胞への導入条件や測定条件を引き続き検討を行っており、安定して In-Cell NMR 測定ができる条件を確立中である。

一方、Keap1-Nrf2 複合体については、Keap1 の基質である各種化合物と Keap1 との相互作用、およびそれに伴う Nrf2 の活性化のメカニズムを解明するため、NMR 法による滴定実験等で詳細な解析を実施した。その結果、Keap1 の標的タンパク質である Nrf2 の 2 つの相互作用部位が Keap1 二量体とそれぞれ異なる結合強度で結合し、さらに Nrf2 を活性化する 2 種類の非親電子性化合物 (PRL295、NG262) を加えると Keap1 と Nrf2 の結合が徐々に外れること、その過程で Nrf2 の片方の結合部位が外れた状態で存在する中間状態が存在することを明らかにした (図 1、2)。これら非親電子性化合物は Keap1 の DC ドメインにある Nrf2 結合サイトに結合するため、これらの化合物は Nrf2 と Keap1 の相互作用を競合阻害することにより、Keap1 による Nrf2 のユビキチン化を阻害し、Nrf2 を活性化することが想定される。また同様に Keap1 の DC ドメインに結合する p62 タンパク質についても、結合配列を含むペプチドを添加したところ、同様に Nrf2 の解離が観測された。このため p62 タンパク質も非親電子性化合物と同様のメカニズムで働くことが明らかになった。一方、Nrf2 を活性化することが知られている親電子性化合物 (CDDO-Im, SFN, 15d-PGJ<sub>2</sub>) について同様に滴定実験を行ったところ、Keap1 からの Nrf2 の解離は観測されなかった。このため、親電子性化合物による Nrf2 の活性化のメカニズムは、非親電子性化合物や p62 タンパク質とは別のメカニズムで Nrf2 を活性化していることが明らかになった。以上の成果は 2021 年に雑誌 *Communications Biology* で発表した (文献 1)。

一方、新たに導入されたクライオ専用 300kV 透過型電子顕微鏡を用いて、各種タンパク質の解析を行った。その結果、フェニルアラニンを代謝する PAH の 4 量体の構造を 3.5Å の分解能で解析することに成功した。さらに、東北メディカル・メガバンク機構のコホート参加者のゲノム解析の結果明らかになった複数の遺伝子多型に由来するアミノ酸変異体についても同様に構造解析を進め、変異に伴う PAH の構造変化を明らかにしつつある。今後は基質の添加に伴う PAH の高次構造変化を解析するとともに変異に伴う活性変化を解析することで、アロステリック効果による活性制御が報告されている PAH の酵素反応のメカニズムの全容を解明する予定である。また他の代謝関連タンパク質や Keap1-Nrf2 複合体についても同様にクライオ電子顕微鏡法による構造解析を進めており、基質との相互作用に伴う高次構造変化の解明を進めている。以上のように、本研究の標的とする各タンパク質群について、基質など各種分子間相互作用に伴うタンパク質の高次構造変化と機能との関連について研究期間内に様々な成果を得ることができた。今後は最終的な目標である細胞内でのタンパク質の動的構造変化と機能との関連の解明に向けて、引き続き研究を進めていく。

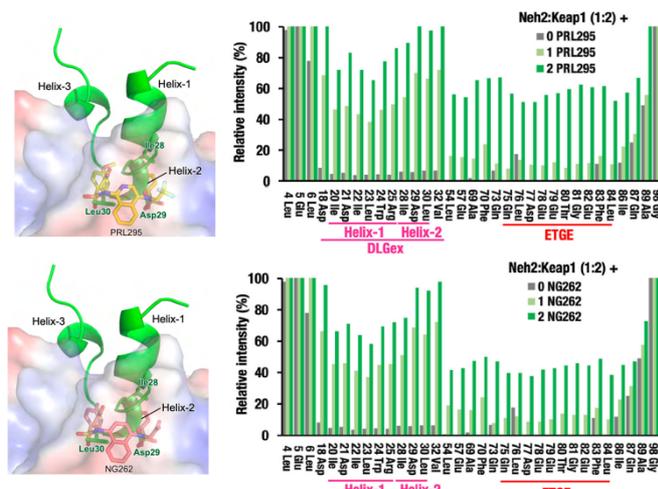


図 1 : 化合物添加に伴う Nrf2 の主鎖のシグナル強度の変化。添加に伴い Nrf2 の 2 つの結合部位がそれぞれ Keap1 から解離する。

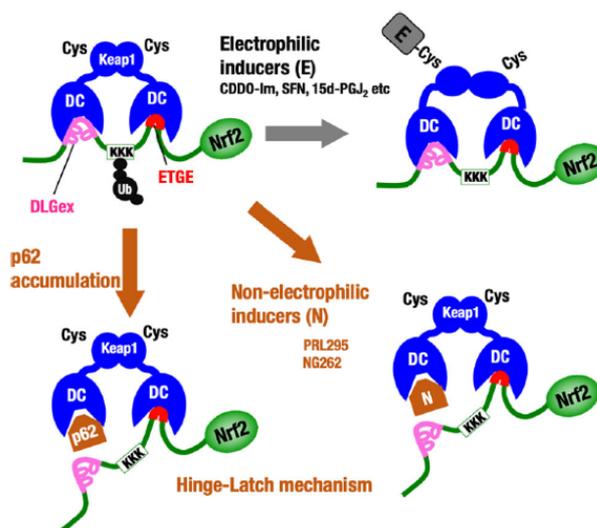


図 2 : Keap1 による Nrf2 の活性制御様式のモデル。化合物の種類によって Nrf2 の活性化のメカニズムが異なる。

1. Horie Y, Suzuki T, Inoue J, Iso T, Wells G, Moore TW, Mizushima T, Dinkova-Kostova AT, Kasai T, Kamei T, Koshiha S, Yamamoto M Molecular basis for the disruption of Keap1-Nrf2 interaction via Hinge & Latch mechanism. *Commun Biol* 2021, 4(1):576

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 26件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 20件）

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Horie Yuta, Suzuki Takafumi, Inoue Jin, Iso Tatsuro, Wells Geoffrey, Moore Terry W., Mizushima Tsunehiro, Dinkova-Kostova Albena T., Kasai Takuma, Kamei Takashi, Koshiba Seizo, Yamamoto Masayuki | 4. 巻<br>4         |
| 2. 論文標題<br>Molecular basis for the disruption of Keap1/Nrf2 interaction via Hinge & Latch mechanism  | 5. 発行年<br>2021年   |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>576 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-021-02100-6  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する      |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Saigusa Daisuke, Matsukawa Naomi, Hishinuma Eiji, Koshiba Seizo                                    | 4. 巻<br>37                    |
| 2. 論文標題<br>Identification of biomarkers to diagnose diseases and find adverse drug reactions by metabolomics | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Drug Metabolism and Pharmacokinetics   | 6. 最初と最後の頁<br>100373 ~ 100373 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.dmpk.2020.11.008  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                     |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Saigusa Daisuke, Hishinuma Eiji, Matsukawa Naomi, Takahashi Masatomo, Inoue Jin, Tadaka Shu, Motoike Ikuko N., Hozawa Atsushi, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Kinoshita Kengo, Ekroos Kim, Koshiba Seizo, Yamamoto Masayuki | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>Comparison of Kit-Based Metabolomics with Other Methodologies in a Large Cohort, towards Establishing Reference Values  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Metabolites  | 6. 最初と最後の頁<br>652 ~ 652 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/metabo11100652  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する            |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Urano Akira, et al. Koshiba Seizo, et al., Yamamoto Masayuki（合計22名、本研究者は16番目）      | 4. 巻<br>4          |
| 2. 論文標題<br>Nrf2 plays a critical role in the metabolic response during and after spaceflight | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>1381 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-021-02904-6  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する       |

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Tsuboi, A., et al., Koshiba, S., et al., Yamamoto, M. (合計33名、本研究者は20番目)                 | 4. 巻<br>251            |
| 2. 論文標題<br>Design and Progress of Oral Health Examinations in the Tohoku Medical Megabank Project | 5. 発行年<br>2020年        |
| 3. 雑誌名<br>The Tohoku Journal of Experimental Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>97 ~ 115 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1620/tjem.251.97   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-              |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Yokose, T., et al., Koshiba, S., et al., Kitagawa, Y. (合計32名、本研究者は26番目)                         | 4. 巻<br>12                |
| 2. 論文標題<br>O-Glycan-Altered Extracellular Vesicles: A Specific Serum Marker Elevated in Pancreatic Cancer | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancers   | 6. 最初と最後の頁<br>2469 ~ 2469 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cancers12092469   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Suzuki, T., et al., Koshiba, S. et al., Yamamoto, M. (合計37名、本研究者は18番目) | 4. 巻<br>3         |
| 2. 論文標題<br>Nrf2 contributes to the weight gain of mice during space travel       | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>496 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s42003-020-01227-2                           | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-         |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Sugawara, J., et al., Koshiba, S., et al., Yamamoto, M. (合計32名、本研究者は21番目)  | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Maternal Baseline Characteristics and Perinatal Outcomes: The Tohoku Medical Megabank Project Birth and Three-Generation Cohort Study | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Epidemiology  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2188/jea.JE20200338   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-       |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Koshiba Seizo, Motoike Ikuko N., Saigusa Daisuke, Inoue Jin, Aoki Yuichi, Tadaka Shu, Shirota Matsuyuki, Katsuoka Fumiki, Tamiya Gen, Minegishi Naoko, Fuse Nobuo, Kinoshita Kengo, Yamamoto Masayuki | 4. 巻<br>3         |
| 2. 論文標題<br>Identification of critical genetic variants associated with metabolic phenotypes of the Japanese population  | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>662 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s42003-020-01383-5  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-         |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Tadaka Shu, Hishinuma Eiji, Komaki Shohei, Motoike Ikuko N, Kawashima Junko, Saigusa Daisuke, Inoue Jin, Takayama Jun, Okamura Yasunobu, Aoki Yuichi, Shirota Matsuyuki, Otsuki Akihito, Katsuoka Fumiki, Shimizu Atsushi, Tamiya Gen, Koshiba Seizo, Sasaki Makoto, Yamamoto Masayuki, Kinoshita Kengo | 4. 巻<br>49                |
| 2. 論文標題<br>jMorp updates in 2020: large enhancement of multi-omics data resources on the general Japanese population  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Nucleic Acids Research  | 6. 最初と最後の頁<br>D536 ~ D544 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/nar/gkaa1034  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Saigusa Daisuke, Matsukawa Naomi, Hishinuma Eiji, Koshiba Seizo                                    | 4. 巻<br>37                    |
| 2. 論文標題<br>Identification of biomarkers to diagnose diseases and find adverse drug reactions by metabolomics | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Drug Metabolism and Pharmacokinetics   | 6. 最初と最後の頁<br>100373 ~ 100373 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.dmpk.2020.11.008   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takuma Kasai, Shunsuke Ono, Seizo Koshiba, Masayuki Yamamoto, Toshiyuki Tanaka, Shiro Ikeda & Takanori Kigawa                            | 4. 巻<br>74            |
| 2. 論文標題<br>Amino-acid selective isotope labeling enables simultaneous overlapping signal decomposition and information extraction from NMR spectra | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biomolecular NMR  | 6. 最初と最後の頁<br>125-137 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10858-019-00295-9   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Akiyama T, Saigusa D, Hyodo Y, Umeda K, Saijo R, Koshiba S, Kobayashi K | 4. 巻<br>74          |
| 2. 論文標題<br>Metabolic Profiling of the Cerebrospinal Fluid in Pediatric Epilepsy   | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Acta Med Okayama  | 6. 最初と最後の頁<br>65-72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.18926/AMO/57955                                    | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-           |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Hozawa, A. et al. Koshiba S. et al. Yamamoto M. (合計 8 2 名、本研究者は 4 5 番目)    | 4. 巻<br>印刷中       |
| 2. 論文標題<br>Study profile of The Tohoku Medical Megabank Community-Based Cohort Study | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>J Epidemiol.   | 6. 最初と最後の頁<br>印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2188/jea.JE20190271                                   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-         |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Kuriyama, S. et al. Koshiba S. et al. Yamamoto M. (合計 6 6 名、本研究者は 5 0 番目)  | 4. 巻<br>49           |
| 2. 論文標題<br>Cohort Profile: Tohoku Medical Megabank Project Birth and Three-Generation Cohort Study (TMM BirThree Cohort Study): rationale, progress and perspective. | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>Int J Epidemiol.   | 6. 最初と最後の頁<br>18-19m |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/ije/dyz169   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-            |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Nagai, K. et al. Koshiba S. et al. Tomioka Y. (合計 1 7 名、本研究者は 1 4 番目)   | 4. 巻<br>印刷中       |
| 2. 論文標題<br>Identification of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma by high-definition mass spectrometry: Ultrahigh-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>Rapid Commun Mass Spectrom.   | 6. 最初と最後の頁<br>印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/rcm.8551  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-         |

|   |                  |
|---|------------------|
| 1. 著者名<br>Tadaka S. et al. Koshiba S. et al. Kinoshita K. (合計25名、本研究者は14番目)                             | 4. 巻<br>6        |
| 2. 論文標題<br>3.5KJPNv2: an allele frequency panel of 3552 Japanese individuals including the X chromosome | 5. 発行年<br>2019年  |
| 3. 雑誌名<br>Hum Genome Var  | 6. 最初と最後の頁<br>28 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41439-019-0059-5   | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-        |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>小柴生造, 山本雅之                           | 4. 巻<br>69            |
| 2. 論文標題<br>ドーピング分析の最前線 日本アンチ・ドーピング研究コンソーシアムの挑戦 | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>体育の化学                                | 6. 最初と最後の頁<br>504-509 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                 | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難         | 国際共著<br>-             |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Koshiba, S., (途中略), Yamamoto, M. (合計21名、本研究者は1番目)   | 4. 巻<br>23            |
| 2. 論文標題<br>Omics research project on prospective cohort studies from the Tohoku Medical Megabank Project. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Genes Cells   | 6. 最初と最後の頁<br>406-417 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/gtc.12588   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Sato, T., (途中略), Koshiba, S., (途中略) Nakazawa, T. (合計15名、本研究者は13番目) | 4. 巻<br>8           |
| 2. 論文標題<br>Metabolomic changes in the mouse retina after optic nerve injury  | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Sci. Rep.  | 6. 最初と最後の頁<br>11930 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-018-30464-z                       | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-           |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Wada, Y., (途中略), Koshiba, S., (途中略), Kure, S. (合計24名、本研究者は22番目)        | 4. 巻<br>印刷中       |
| 2. 論文標題<br>Biallelic GALM pathogenic variants cause a novel type of galactosemia | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>Genet. Med.  | 6. 最初と最後の頁<br>印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41436-018-0340-x                            | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-         |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Sato, T. (途中略), Koshiba, S., (途中略), Arai, Y. (合計15名、本研究者は13番目)  | 4. 巻<br>印刷中       |
| 2. 論文標題<br>Value of global metabolomics in association with diagnosis and clinicopathological factors of renal cell carcinoma | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>Int. J. Cancer  | 6. 最初と最後の頁<br>印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/ijc.32115   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-         |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Sugawara, J. (途中略), Koshiba, S., (途中略), Nagasaki, M. (合計29名、本研究者は21番目)  | 4. 巻<br>9       |
| 2. 論文標題<br>Maternity Log study: a longitudinal lifelog monitoring and multiomics analysis for the early prediction of complicated pregnancy | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>BMJ Open  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1136/bmjopen-2018-025939   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-       |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Yamaguchi-Kabata, Y., (途中略), Koshiba, S., (途中略), Tohoku Medical Megabank Project Study Group. (合計19名、本研究者は5番目)                   | 4. 巻<br>印刷中       |
| 2. 論文標題<br>Estimating carrier frequencies of newborn screening disorders using a whole-genome reference panel of 3552 Japanese individuals | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>Hum. Genet.  | 6. 最初と最後の頁<br>印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00439-019-01998-7   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-         |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yasuda, J., (途中略), Koshiba, S., (途中略), Yamamoto, M. (合計5名、本研究者は23番目)                                      | 4. 巻<br>165           |
| 2. 論文標題<br>Genome analyses for the Tohoku Medical Megabank Project towards establishment of personalized healthcare | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>J. Biochem.   | 6. 最初と最後の頁<br>139-158 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jb/mvy096   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Tadaka S, Saigusa D, Motoike, I.N, Aoki Y, Shiota M, Koshiba S, Yamamoto M, and Kinoshita K. | 4. 巻<br>46              |
| 2. 論文標題<br>jMorp: Japanese Multi Omics Reference Panel   | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Nucleic Acids Res.   | 6. 最初と最後の頁<br>D551-D557 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/nar/gkx978   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yamaguchi-Kabata Y, et al. (本研究者は15番目)   | 4. 巻<br>63            |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of reported pathogenic variants and their frequencies in a Japanese population based on a whole-genome reference panel of 2049 individuals | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Human Genetics  | 6. 最初と最後の頁<br>213-230 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s10038-017-0347-1  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計15件(うち招待講演 4件/うち国際学会 4件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小柴生造、木下賢吾、山本雅之               |
| 2. 発表標題<br>東北大学の最新クライオ電子顕微鏡の活用と共同利用について |
| 3. 学会等名<br>第59回日本生物物理学会大会               |
| 4. 発表年<br>2021年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小柴生造                        |
| 2. 発表標題<br>東北メディカル・メガバンク計画におけるメタボローム解析 |
| 3. 学会等名<br>第31回日本疫学会（招待講演）             |
| 4. 発表年<br>2021年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Koshiba S., Saigusa D., Motoike I., Inoue, J., Shirota M., Aoki Y., Tadaka S., Kinoshita K., Yamamoto M       |
| 2. 発表標題<br>Metabolic phenotyping of individuals in baseline and repeat surveys of Tohoku Medical Megabank Cohort Project |
| 3. 学会等名<br>Metabolomics 2019（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小柴生造, 元池育子, 三枝大輔, 井上仁, 菱沼英史, 青木裕一, 田高周, 城田松之, 木下賢吾, 山本雅之 |
| 2. 発表標題<br>コホート調査における代謝プロファイルの経時変化の解析                               |
| 3. 学会等名<br>第92回 日本生化学会大会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>S. Koshiba, I. Motoike, D. Saigusa, J. Inoue, M. Shirota, Y. Aoki, S. Tadaka, S. Tomo, K. Kinoshita, M. Yamamoto |
| 2. 発表標題<br>Multi Omics Research Project in Tohoku Medical Megabank Organizatio  |
| 3. 学会等名<br>日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018合同大会（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小柴生造, 元池育子, 三枝大輔, 井上仁, 城田松之, 青木裕一, 田高周, 斎藤智, 木下賢吾, 山本雅之 |
| 2. 発表標題<br>ゲノム情報と連携した日本人多層オミックス参照パネルの意義                            |
| 3. 学会等名<br>第61回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)                                |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Seizo Koshiha, Daisuke Saigusa, Ikuko Motoike, Jin Inoue, Matsuyuki Shirota, Yuichi Aoki, Shu Tadaka, Kengo Kinoshita, Masayuki Yamamoto |
| 2. 発表標題<br>Metabolic phenotyping in the population based cohort studies of Tohoku Medical Megabank Project  |
| 3. 学会等名<br>Metabolomics 2018 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Seizo Koshiha, Tatsuro Iso, Jin Inoue, Aki Muramatsu, Takafumi Suzuki, Takanori Kigawa, and Masayuki Yamamoto |
| 2. 発表標題<br>Structural and functional analyses of oxidative stress response by Keap1-Nrf2 system                          |
| 3. 学会等名<br>ICMRBS 2018 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小柴生造, 元池育子, 三枝大輔, 井上仁, 青木裕一, 田高周, 城田松之, 木下賢吾, 山本雅之 |
| 2. 発表標題<br>メタボロームGWASによる日本人の代謝プロファイルの解析                       |
| 3. 学会等名<br>第91回 日本生化学会大会                                      |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>小柴生造              |
| 2. 発表標題<br>コホート研究におけるオミックス解析 |
| 3. 学会等名<br>日本人類遺伝学会 (招待講演)   |
| 4. 発表年<br>2017年              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Seizo Koshiha, Daisuke Saigusa, Ikuko Motoike, Natsuyuki Shirota, Jun Yasuda, Kenga Kinoshita, Masayuki Yamamoto. |
| 2. 発表標題<br>Metabolomics Approach in Tohoku Medical Megabank Project Prospective Cohort Studies.                              |
| 3. 学会等名<br>Metabolomics 2017 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>小柴生造                    |
| 2. 発表標題<br>東北メディカル・メガバンク機構のオミックス解析 |
| 3. 学会等名<br>第11回メタボロームシンポジウム        |
| 4. 発表年<br>2017年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>井上仁, 村松亜紀, 鈴木隆史, 磯達朗, 小柴生造, 山本雅之 |
| 2. 発表標題<br>酸化ストレス応答におけるKeap1の構造・相互作用解析      |
| 3. 学会等名<br>第56回NMR討論会                       |
| 4. 発表年<br>2017年                             |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>小柴生造                  |
| 2. 発表標題<br>高精度日本人多層オミックス参照パネルの提供 |
| 3. 学会等名<br>第90回日本生化学会大会          |
| 4. 発表年<br>2017年                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>井上仁, 三枝大輔, 工藤久智, 峯岸直子, 小柴生造, 山本雅之. |
| 2. 発表標題<br>メタボローム解析による血液検体保管条件の検討             |
| 3. 学会等名<br>第90回日本生化学会大会                       |
| 4. 発表年<br>2017年                               |

〔図書〕 計2件

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>小柴生造                              | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>最新医学社                             | 5. 総ページ数<br>312 |
| 3. 書名<br>最新医学 74巻2号 特集 パイオインフォマティクスの進展・臨床応用 |                 |

|                                       |                 |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>小柴生造、山本雅之                   | 4. 発行年<br>2017年 |
| 2. 出版社<br>メディカルドゥ                     | 5. 総ページ数<br>280 |
| 3. 書名<br>遺伝子医学MOOK(32) 難病研究up-to-date |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北メディカル・メガバンク機構のコホート調査において、対象者のゲノム・オミックス解析を実施し、その成果を「日本人多層オミックス参照パネル」として公開した。

<https://jmorfp.megabank.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|