

領域略称名：酸素生物学  
領域番号：3602

令和元年度科学研究費助成事業  
「新学術領域研究（研究領域提案型）」  
に係る事後評価報告書

「酸素を基軸とする生命の新たな統合的理解」

（領域設定期間）

平成26年度～平成30年度

令和元年6月

領域代表者（京都大学・工学研究科・教授・森 泰生）

# 目 次

1. 研究領域の目的及び概要	7
2. 研究領域の設定目的の達成度	9
3. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	12
4. 審査結果の所見及び中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況	13
5. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	15
6. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）	18
7. 研究組織（公募研究を含む。）と各研究項目の連携状況	23
8. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	25
9. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	29
10. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況	30
11. 総括班評価者による評価	31

**研究組織** (総：総括班，支：国際活動支援班，計：総括班及び国際活動支援班以外の計画研究，公：公募研究)

研究項目	課題番号 研究課題名	研究期間	代表者氏名	所属機関 部局 職	構成員数
X00 総	26111001 酸素を基軸とする生命の 新たな統合的理解	平成26年度～ 平成30年度	森 泰生	京都大学・大学院工学研究科・教授	16
Y00 支	15K21759 国際ネットワークを基盤と する酸素生物学の推進	平成27年度～ 平成30年度	森 泰生	京都大学・大学院工学研究科・教授	15
A01 計	26111002 低酸素ストレスに対する システミックな生体応答 機構の解明	平成26年度～ 平成30年度	山本 雅之	東北大学・大学院医学系研究科・教授	2
A01 計	26111003 低酸素シグナルが拓く生 活習慣病の新しい病態 制御	平成26年度～ 平成30年度	南学 正臣	東京大学・医学部・教授	3
A01 計	26111004 生体内低酸素ニッチの 形成とその感知・適応に 関する分子生理学的探 究	平成26年度～ 平成30年度	森 泰生	京都大学・大学院工学研究科・教授	6
A01 計	26111005 腫瘍内低酸素応答を利 用した癌悪性化制御法 の開発	平成26年度～ 平成30年度	井上 正宏	京都大学・大学院医学研究科・特定教 授	4
A01 計	26111006 癌化・老化耐性ハダカデ バネズミをモデルとした 低酸素適応・代謝制御 機構の探求	平成26年度～ 平成30年度	三浦 恭子	熊本大学・大学院先端機構・准教授	3
A02 計	26111007 活性酸素センサー分子と そのシグナル伝達機構	平成26年度～ 平成30年度	三木 裕明	大阪大学・微生物病研究所・教授	6
A02 計	26111008 ポリサルファ代謝系を介 する新しい抗酸化ストレ ス制御機構の解明	平成26年度～ 平成30年度	赤池 孝章	東北大学・医学系研究科・教授	7
A02 計	26111009 活性酸素生成の時空間	平成26年度～ 平成30年度	住本 英樹	九州大学・医学研究院・教授	2

	的制御と細胞機能調節				
A02 計	26111010 酸素ストレス感受性転写 因子ネットワークによる生 体内レドックス環境調節 機構の解明	平成 26 年度～ 平成 30 年度	伊東 健	弘前大学・医学研究科・教授	3
A02 計	26111011 酸素受容・活性化に伴う リガンドシグナルの生成 と制御	平成 26 年度～ 平成 30 年度	内田 浩二	東京大学・大学院農学生命科学研究 科・教授	5
A03 計	26111012 酸素生物学研究に資す るイメージングプローブ、 ケージド化合物群の創製	平成 26 年度～ 平成 30 年度	浦野 泰照	東京大学・薬学研究科・教授	3
統括・支援・計画研究 計 13 件					
A01 公	15H01393 緑膿菌の低酸素環境適 応に関わる酸素高親和 性呼吸酵素の機能解析	平成 27 年度～ 平成 28 年度	新井 博之	東京大学・農学生命科学研究科・助教	1
A01 公	15H01396 低酸素応答における転 写因子の核輸送制御機 構の解明－水酸化酵素 PHD の新しい機能－	平成 27 年度～ 平成 28 年度	中山 恒	東京医科歯科・難治疾患研究所・准教 授	2
A01 公	15H01397 光合成の酸素パラドクス を統御する低酸素センサ ー転写制御タンパク質の 作動原理	平成 27 年度～ 平成 28 年度	藤田 祐一	名古屋大学・大学院生命農学研究科・ 教授	3
A01 公	15H01404 TASK チャネルを標的と する低酸素応答機構に 関する研究	平成 27 年度～ 平成 28 年度	古谷 和春	大阪大学・医学系研究科・助教	1
A01 公	15H01405 骨髄内酸素環境が担う 骨代謝制御の役割の解 明	平成 27 年度～ 平成 28 年度	西川 恵三	大阪大学・免疫学フロンティア研究セン ター・特任准教授	1
A01 公	15H01407 水酸化プロテオーム解析	平成 27 年度～ 平成 28 年度	松本 雅記	九州大学・生体防御医学研究所・准教 授	1

	を基軸とした酸素応答システムの統合的理解				
A01 公	17H05523 水酸化酵素 Phd の新規基質の同定を基盤とした低酸素応答システムの解明	平成 29 年度～ 平成 30 年度	中山 恒	東京医科歯科・難治疾患研究所・准教授	3
A01 公	17H05525 光合成と窒素固定の酸素パラドクスを統御する分子機構	平成 29 年度～ 平成 30 年度	藤田 祐一	名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授	1
A01 公	17H05530 骨髄内酸素環境が及ぼす破骨細胞動態の in vivo 解析	平成 29 年度～ 平成 30 年度	西川 恵三	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授	1
A01 公	17H05534 トランスオミクス解析による低酸素応答のシステムの理解	平成 29 年度～ 平成 30 年度	松本 雅記	九州大学・生体防御医学研究所・准教授	1
A01 公	17H05536 酸素センシングと酸素リモデリングにおける TRPA1 の役割解明	平成 29 年度～ 平成 30 年度	桑木 共之	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授	1
A01 公	17H05540 中枢性低酸素換気応答機構の全容解明	平成 29 年度～ 平成 30 年度	岡田 泰昌	独立行政法人国立病院機構村山医療センター(臨床研究部)・電気生理学研究室・室長	1
A02 公	15H01391 活性酸素シグナルのユビキチン化を介した新たな制御システムとストレス応答機構の解明	平成 27 年度～ 平成 28 年度	松沢 厚	東北大学・大学院薬学研究科・教授	1
A02 公	15H01392 レドックスシグナル伝達の可逆性担保における活性イオウ分子の役割	平成 27 年度～ 平成 28 年度	熊谷 嘉人	筑波大学・医学医療系・教授	1
A02 公	15H01395 酸素を基軸とする生物リズムの分子基盤に迫る	平成 27 年度～ 平成 28 年度	吉種 光	東京大学・大学院理学系研究科・助教	2
A02 公	15H01398 NADPH オキシダーゼ活性の時空間的定量法の	平成 27 年度～ 平成 28 年度	吉岡 博文	名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授	1

	確立				
A02 公	15H01406 腫瘍壊死因子が産生する活性酸素によるシグナル制御と炎症と発がん	平成 27 年度～ 平成 28 年度	鎌田 英明	広島大学・医歯薬学総合研究科・准教授	2
A02 公	15H01408 ミトコンドリア酸素・カルシウム制御におけるミトフューजन機能の解明	平成 27 年度～ 平成 28 年度	今泉 祐治	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授	1
A02 公	15H01409 腫瘍関連マクロファージ形成における低酸素及び活性酸素感受性 TRP チャンネルの関与	平成 27 年度～ 平成 28 年度	清水 俊一	帝京平成大学・薬学部・教授	1
A02 公	17H05518 多様な翻訳後修飾による活性酸素シグナルの新規制御システムとストレス応答機構の解明	平成 29 年度～ 平成 30 年度	松沢 厚	東北大学・大学院薬学研究科・教授	1
A02 公	17H05519 電子伝達系におけるユビキノンと活性イオウ分子とのレドックスカップルの意義	平成 29 年度～ 平成 30 年度	熊谷 嘉人	筑波大学・医学医療系・教授	1
A02 公	17H05524 新規ポリサルファ応答性転写因子による低酸素誘導型光合成の制御	平成 29 年度～ 平成 30 年度	増田 真二	東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授	1
A02 公	17H05526 葉緑体で発生する活性酸素シグナルの調節機構	平成 29 年度～ 平成 30 年度	吉岡 博文	名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授	1
A02 公	17H05537 ミトフューजनを中核とした細胞内酸素およびカルシウム制御機構の解明	平成 29 年度～ 平成 30 年度	山村 寿男	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授	1
A02 公	17H05539 1 分子運動解析によるレドックス感受性 TRP の分	平成 29 年度～ 平成 30 年度	三尾 和弘	産業技術総合研究所・先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ・ラボチーム長	2

	子運動基盤				
A03 公	15H01401 遺伝子コードされた FRET 型酸素バイオセン サーの開発	平成 27 年度～ 平成 28 年度	今村 博臣	京都大学・生命科学研究科・准教授	1
A03 公	15H01402 活性酸素種による翻訳 後修飾を検出する蛍光 バイオセンサー	平成 27 年度～ 平成 28 年度	森井 孝	京都大学・エネルギー理工学研究所・ 教授	1
A03 公	15H01403 分子標的 MRI を基盤と した低酸素・活性酸素 種・レドックス活性可視化 への挑戦	平成 27 年度～ 平成 28 年度	近藤 輝幸	京都大学・大学院工学研究科・教授	1
A03 公	17H05528 低酸素・活性酸素種・レ ドックス活性を捉える <i>in</i> <i>vivo</i> 可視化プローブの 創製	平成 29 年度～ 平成 30 年度	近藤 輝幸	京都大学・大学院工学研究科・教授	1
A03 公	17H05529 活性酸素種による翻訳 後修飾を検出する蛍光 バイオセンサー	平成 29 年度～ 平成 30 年度	森井 孝	京都大学・エネルギー理工学研究所・ 教授	1
A03 公	17H05531 MRI による <i>in vivo</i> 酸素 環境測定手法の開発	平成 29 年度～ 平成 30 年度	杉原 文徳	大阪大学・免疫フロンティア研究センタ ー・助教	1
公募研究 計 31 件					

## 1. 研究領域の目的及び概要（2 ページ以内）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募研究領域の着想に至った経緯、応募時までの研究成果を進展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

### ① 研究の学術的背景

分子状酸素(O<sub>2</sub>)は好気性生物の生存に必須の物質であり、その不足は生命維持を脅かす。一方、充足した正常なレベルにあって酸素は、ミトコンドリアや酵素を介して活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)などに変換され、生命体にストレスを与える。しかし、近年、このような旧来の理解を超えた発見に基づいて、新たな観点から酸素の生物学的意義を探究する学術分野「**酸素生物学**」が勃興しようとしている。

酸素生物学における第一の新たな観点が、生体内に形成される生理的な低酸素環境である。個体レベルにおいては、酸素不足による障害に生存が脅かされぬよう、呼吸・代謝調節、造血、血管新生等により酸素供給の増加が誘導されることが知られてきた。しかし、近年、低酸素環境が、幹細胞の未分化・静止状態の維持、腫瘍を悪性化する Warburg 効果におけるエネルギー代謝モデリング等を能動的に導く点が注目されるようになった。また、生物個体内の各組織・器官は、呼吸器から離れるほど酸素分圧がより減じた環境におかれているにもかかわらず、構成細胞は正常な機能を維持している。一方、低酸素応答の鍵となる分子基盤に関しては、プロリンヒドロキシ化酵素(PHD)による低酸素誘導性転写因子 Hypoxia-inducible factor (HIF) の調節が知られているが、PHD の作用標的や PHD 以外の酸素を基質とするヒドロキシ化酵素は多様で、多くの点が未解明である。即ち、「低酸素環境自身が積極的な生物学的意義を有している」という観点から、生体内低酸素環境の形成基盤と意義を解明することは、生命現象の本質的な理解には極めて重要である。

第二の新たな観点が、酸素や酸素を起源とする ROS や親電子分子種が果たす、シグナル分子としての役割である。即ち、酸素はエネルギー産生のための単なる燃素ではなく、また、ROS や親電子分子種は単に酸化ストレス原因物質として、生体に障害や病態を誘導するだけでなく、センサータンパク質を介して細胞内シグナル経路を精密に調節するという考え方である。実際、ROS や親電子分子種は生体リズム形成、神経分化、植物の根毛伸長等、様々な生理的応答を制御する知見が示されつつある。一方、酸化ストレス応答の鍵機構が、高感受性システイン(Cys)残基を含むタンパク質 Keap1 による転写因子 Nrf2 の制御を介した、抗酸化・細胞保護系関連遺伝子の発現誘導である(山本、伊東)。最近、抗酸化 Cys 含有タンパク質 Thioredoxin、Nucleoredoxin(三木)、TRP チャネル群(森)等が担う ROS・親電子分子種のセンサー機能や、細胞シグナルメディエーターとして機能する親電子分子種(赤池、内田)等、新たな分子的機序が次々と発見された。しかし、現象と分子機構の一端が解明されただけで、特定の酸素環境にある系全体からの理解はなされていない。

このように、酸素に対する生物学的理解は大きな転換を迎えようとしており、新たな学術分野「**酸素生物学**」として非常に広範な生命現象の理解に影響を与えていた。

### ② 応募時までの研究成果

【酸素応答の分子基盤と意義に関する研究動向】 HIF の発見(Mol. Cell. Biol., 1992)は、本新学術領域「**酸素生物学**」における第二の観点「酸素はシグナル制御分子として機能する」の最も重要な基盤である。HIF の研究は急速に進展し、その活性調節には酸素、Fe<sup>2+</sup>及びクエン酸回路代謝産物 2-oxoglutarate に依存するヒドロキシ化反応が重要であることが示された。特に、PHD による HIF ヒドロキシ化(三浦班の南嶋、Science, 2010)と、それに引き続くユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解が、正常酸素分圧下での HIF の転写誘導機能を抑制すると理解された。しかし、3 種類の PHD アイソフォーム(PHD1-3)の機能的分業や HIF 以外の作用標的は未解明であった。一方、低酸素環境下では HIF が安定化し核内へ移行、エリスロポエチン、血管内皮細胞増殖因子などの低酸素応答遺伝子を転写活性化し、造血や血管新生を介して酸素供給を亢進する。山本は HIF が駆動するエリスロポエチン遺伝子のプロモーターに着目し、世界に先駆けて長い間謎であった腎臓エリスロポエチン産生細胞(REP 細胞)を発見した(PLoS One, 2011)。このような低酸素への受動的適応に加え、低酸素環境自身が生理的意義を有し、幹細胞の未分化・静止状態の維持、癌細胞悪性化などにおけるエネルギー代謝モデリング等の細胞機能を調節する役割が注目され、低酸素応答研究は新展開を見せていた。

急性(acute)の酸素環境変化への適応における酸素センシングを担う酸素受容器に関しては、Heymans 以来(1938 年ノーベル賞)、頸動脈小体の圧倒的な優位性が信じられてきた。分子機構に関しては、低酸素状態が複数の機構(一酸化炭素 CO や H<sub>2</sub>S の産生酵素、AMP キナーゼ等)を介して、頸動脈小体 glomus 細胞の K<sup>+</sup>チャネル群を閉じることにより膜電位を脱分極させ、神経伝達物質の放出を促して中枢へと情報が伝わることにより、呼吸・心機能・血流が増進すると考えられていた。一方、延髄の呼吸中枢における急性の低酸素状態のセンシングは責任細胞、分子機構ともに未解決であった。また、生体内に偏在するといわれてきた他の酸素受容器(大動脈小体、神経上皮層等)は未同定であった。しかし、森は迷走神経が酸素受容器



として働きうる可能性を示し(Takahashi, *Nature Chem. Biol.*, 2011)、頸動脈小体を絶対無二の中心に据える酸素受容のドグマへの挑戦が胎動しつつあった。

**[ROS・親電子分子種の産生・作用機構と意義に関する研究動向]** 「ROS 毒性説」を乗り越えて、ROS や親電子分子種の生物学的意義が注目されるためには、酸素添加酵素の発見(早石、*JBC*, 1957)と、酸素を基質にする NADPH オキシダーゼ (Nox) 等の内因性 ROS 産生機構の発見が決定的な役割を果たした。Nox 群の中でもユニークな恒常的な活性を示す Nox4 は**住本**が発見した(*JBC*, 2001)。一方、酸素を基質に産生される一酸化窒素(NO)も、血管収縮弛緩を始めとする生理応答に重要な役割を果たしている(*Nature*, 1991)。酸素が下流の ROS シグナルを支配することは言うまでもないが、低酸素環境においてもミトコンドリアの ROS 産生が提唱されていた(Schumacker, *PNAS*, 1998)。しかし、その正統性は確立されていなかった。

重要なシグナルメディエーターとして、多彩な親電子物質が同定されつつあった。**赤池**は一酸化窒素 NO が誘導する cGMP のニトロ化体 8-nitro-cGMP を発見し、それが Cys 残基のグアニル化により H-Ras を活性化し、心筋の早期老化を惹起することを報告した(*Nature Chem. Biol.*, 2007&2012)。**内田**は 30 種以上の親電子物質を同定し、作用アミノ酸残基の同定に成功していた。**森**は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が NAD<sup>+</sup> 或いは代謝体 ADP ribose を介して活性化する Ca<sup>2+</sup>流入チャネル TRPM2 が、炎症応答と自然免疫を強く誘導することを見出していた(*Mol. Cell*, 2002; *Nature Med.*, 2008)。

タンパク質の Cys 残基を介した ROS センサー機能と下流シグナル経路の解明には、日本人研究者が先駆的貢献をなしてきた。特に、Cys 残基を介して ROS や親電子分子種を感知した Keap1 から遊離した Nrf2 が、抗酸化・解毒系タンパク質遺伝子転写の中心的制御因子として働くことを、**山本、伊東**は示した(*Genes Dev.*, 1999)。また、**森**は NO による Cys ニトロシル化が TRP 陽イオンチャネル群を活性化し、血管内皮細胞の Ca<sup>2+</sup>シグナルと NO 産生を促すことを見出した(*Nature Chem. Biol.*, 2006)。さらに、Nucleoredoxin による Wnt シグナルの活性化(**三木**, *Nature Cell Biol.*, 2006)、Peroxioredoxin の酸化還元による概日リズムの調節(*Nature*, 2012)等、Cys 含有抗酸化タンパク質の ROS センサー機能が示されていた。ROS や NO は、植物において根の成長と分化、形態形成、気孔の開閉、感染防御、そして、微生物において病原性、クオラムセンシング、抗生物質耐性、ストレス耐性といった生理機能を有しており(*Cell*, 2010; *Science*, 2009)、生物学の諸分野で必ず考察されるべき重要な因子になるうとしていた。

### ③ 研究領域の目的と全体構想

本研究領域は上述の背景を進展させ、「生体内の構成細胞が、必要とする最適な酸素濃度領域を能動的に構築する」、即ち、生体の**酸素リモデリング(remodeling)**という独自の概念を構想した(図 1)。そして、それがどのような機序により成立するか、また、どのように細胞に感知され、どのような機構を通して生体機能の最適化に能動的に活用されるかを、エネルギー代謝、ROS シグナル等に着目し解明することを目指した。その達成に向けて、次の組織的で機動力のある三つの側面からの研究を推進した。

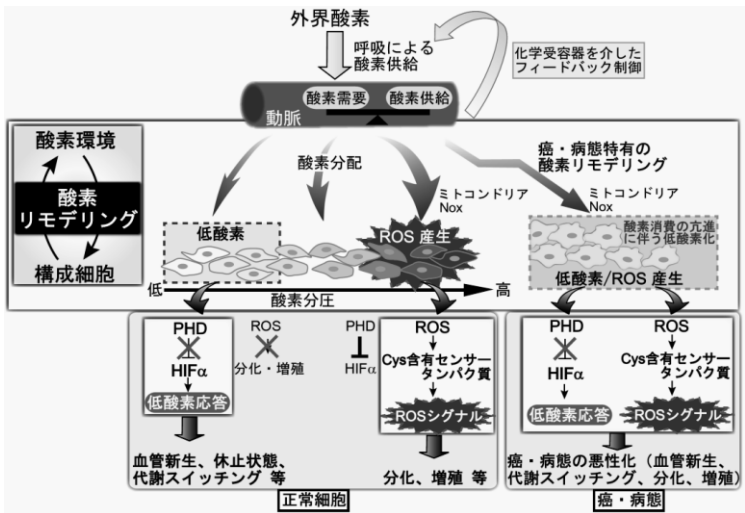


図1. 生体内酸素リモデリングの基盤となる分子機構

#### A01 班：生体内低酸素環境に対する感知と応答の制御機構と意義の解明

酸素受容を担う酸素センサータンパク質群、PHDを中心としたヒドロキシ化酵素により制御される HIF や TRP など低酸素エフェクター群を探索し、それらが調節する酸素リモデリングの分子基盤の解明を目指した。また、幹細胞性の維持、癌細胞悪性化、生活習慣病の発症、及び低酸素環境適応モデル動物(ハダカデバネズミ)の代謝調節機構などに注目し、低酸素応答の制御機構とその生物学的意義に迫った。

#### A02 班：酸素を起源とする活性分子種が担うシグナル機構とその意義の解明

ROS や親電子分子種を介して、生体が酸素環境を能動的に活用し機能を最適化する機構と、その意義を探究した。具体的には、ROS や親電子分子種が Cys 含有センサータンパク質等を介して動員するシグナル経路、及び、シグナル経路をイオウ多量体 persulfide が仲介して精密調節する仕組みの解明、そして、それらが発生・分化、細胞増殖、細胞遊走・浸潤、イオン恒常性等において果たす役割の解明を目指した。

#### A03 班：in vivoを指向した低酸素・活性酸素種・親電子分子種の可視化解析技術の開発

低酸素環境、ROS、親電子分子種等の選択的かつ定量的な可視化イメージング法を、蛍光・発光プローブを活用し開発した。これに、蛍光タンパク質型プローブとその発現動物、光操作により活性分子種を自在に生成できるケージド化合物を補完させ、他班との連携のもと in vivo 時空間動態解析手法の確立を目指した。

## 2. 研究領域の設定目的の達成度（3 ページ以内）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、どの程度達成できたか、また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らしての達成度合いについて、具体的に記述してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目ごとの状況も記述してください。

本領域は、学術分野「酸素生物学」を確立すべく、「**酸素リモデリング**」(図 2)を基本概念にして、生体内酸素環境の形成・調節と感知・応答の機構と意義の解明を目指した。

**A01 班**は分子・細胞・組織(器官)・個体にわたる統合的なアプローチにより、酸素センサー・エフェクタータンパク質群が調節する酸素リモデリングの分子基盤とその生物学的意義の解明を目的に、研究を推進した。

まず、生体の低酸素環境への適応過程で重要になるのが、酸素濃度の変化を監視する**酸素センシング機構の同定**(図 2①)である。**森**は公募班**桑木、岡田**と連携し、哺乳動物の個体中に遍在する急性(acute)の低酸素応答が、酸素センサーTRPA1 チャンネルを介して神経性呼吸調節システムにおいてどのように統合されるかを解明した。即ち、末梢組織においては、迷走神経が高酸素と比較的穏やかな低酸素を、また、酸素受容器として知られてきた頸動脈脈小体が厳しい低酸素を感知し、呼吸回数を調節することを示した。一方の中樞神経系の酸素センサーを担う細胞が長年の論争となっていた。**森**らはアストロサイトにおいて、通常酸素環境が TRPA1 を PHD ヒドロキシ化と NEDD4-1 E3 ligase ユビキチン化により細胞内在化させるが、低酸素環境(6-9%O<sub>2</sub>)は TRPA1 を形質膜へ回復させることを示した。すると Ca<sup>2+</sup>流入が ATP 放出を誘導し、脳幹の呼吸中枢神経リズムを変化させ、呼吸を深くすることが分かった。さらに、TRPA1 が胎盤内血管内皮細胞において低酸素応答を担うことも明らかにし(図 2②)、酸素センシング機構の全容解明に向け前進させた。

次に重要になってくるのが、酸素センシングの下流で誘導される**シグナル経路・転写因子を介した細胞応答の制御と生体機能の最適化の解明**である(図 2③及び④)。ここでは緩徐(chronic)な低酸素応答機構に注目した。**山本**と分担研究者**鈴木**は低酸素誘導性のエリスロポエチン遺伝子発現制御機構に注目し、腎産生細胞(REP 細胞)において、PHD2 が酸素センシングを担い、その下流で HIF-2 $\alpha$ がエリスロポエチン発現を転写活性化することを明らかにした。一方、肝臓においては、3 種の PHD による相補的なエリスロポエチン産生の調節を明らかにした。また、HIF-2 $\alpha$ が HIF-3 $\alpha$ の発現を誘導し、エリスロポエチン遺伝子発現を抑制するという、低酸素環境下での負の制御機構も示した(これはエリスロポエチン過剰産生が引き起こす多血症を防ぎ低酸素環境を設定すると理解できる:図 2②)。さらに、REP 細胞と肝臓等の鉄代謝系がエリスロポエチンと肝細胞由来ヘプシジンを介して、造血システムを統合、調節することも示した。

**南学班**分担研究者の**武田、合田**は**三浦班**分担研究者の**杉浦**と共同で、グルコース代謝を酸素濃度の低下と共にグルコース酸化から解糖系へとシフトする分子機構を明らかにした。即ち、マクロファージ等においては、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が完全に機能する程度の低酸素環境(4-9%O<sub>2</sub>)でも、HIF-1 を介してピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDK1)がピルビン酸のミトコンドリアへの流入を阻害し、解糖系が亢進する現象「Active glycolysis」を発見した。本機構は、マクロファージが血管から末梢へと遊走する際に必須であり、血管から遠位のより低酸素の環境に細胞が備える酸素リモデリングを担うと言える(図 2④)。

本領域の採択とほぼ同時期に**井上**は、一般に低酸素で休止(dormancy:増殖が停止し、エネルギー代謝が低下する)状態にならない癌細胞株とは対照的に、Cancer Tissue-Originated Spheroid(CTOS)が低酸素で容易に dormancy 状態になり、有酸素条件に戻すことで速やかに活動状態に戻ることを明らかにした(Endo, PLoS ONE, 2014: 図 2③)。また、低酸素下で成長因子により活動状態を回復した CTOS は、dormancy 状態の CTOS よりさらに低酸素であり(図 2②)、dormancy 状態には最適な低酸素レベルがあることも示された。また、dormancy 状態では癌の増殖・生存にとって必須のシグナルさえも積極的に抑制されており、それが EGF 受容体変異型肺癌の分子標的治療薬に対する抵抗性の基盤となっていることを明らかにした。

低酸素環境に生育し老化・癌化耐性を示すデバネズミは、「生体内低酸素環境下で生理応答がどのようにリモデリングされて正常性を保つのか」を知るのには絶好のモデル動物である。**三浦**は分担研究者**南嶋、杉浦**とともに、重要なエネルギー代謝上のマウスとの違いを明らかにした。即ち、ハダカデバネズミは、ミトコンドリアの複数の酵素活性の低下を原因とする低酸素消費状態にあり、肝臓ではミトコンドリアクリステの形態的発達度の低下もみられた。メタボロミクス解析などからグルコースの代謝経路に相違がみられたことから、個体への糖負荷実験を行ったところ、マウスにおいて見られる脂肪肝や耐糖能の異常が全く生じなかったが、一

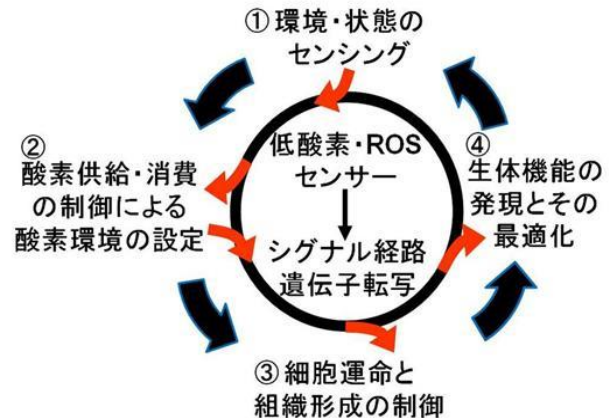


図 2. 本領域研究の基本となる概念「酸素リモデリング」

方、グルコースのペントースリン酸経路への流入やグルタミン代謝は亢進していた。ROS の抑制などを通じ酸化ストレス低減、老化耐性に寄与している可能性が考えられる。また、**三浦**は、ハダカデバネズミ由来の多能性幹細胞 (iPS 細胞) が、未分化な細胞が混入しても腫瘍 (奇形腫) を形成しない点に着目し、癌抑制遺伝子 ARF が仲介する初期化やがん化を防ぐ機構を明らかにした。低酸素条件では iPS 細胞誘導が完全抑制されることも示した。また、**南嶋**は哺乳類全般によく保存された低酸素応答による代謝制御機構を示し、PHD が重症感染症等の致命的な乳酸アシドーシスの治療法の標的になり得る可能性を報告した。さらに、緑膿菌の低酸素環境での生存や、シアノバクテリアの光合成と窒素固定の両立のように、独特の酸素環境における生物体の生存戦略の基盤となる分子機序についての知見も得られた (公募班**藤田**、**新井**)。

**HIF**以外の**PHD**標的に関しても興味深い知見が得られ、低酸素応答の普遍性と多様性を急速に拡大させる役割を担うことができた。**三浦**班分担研究者**南嶋**と公募班**中山**は PHD3 の新標的としてピルビン酸デヒドロゲナーゼ-E1 $\beta$ を見出した。上述のように (前頁 16 行目)、**森**は通常酸素下で TRPA1 チャネルが PHD によりヒドロキシ化され、NEDD4-1 E3 ligase によりユビキチン化されると内在化されるが、低酸素環境下ではそれが起こらず形質膜に維持され TRPA1 を介した低酸素応答が惹起されることを見つけた。これは、「環境変化はセンサータンパク質単体が受容する」という急性期のセンシングの旧来からの理解を覆す知見である。

このように **A01 班**は低酸素環境の形成機構と生物学的意義の解明に向け、生体内に遍在する多様な酸素センシング機構の同定、酸素環境応答のシステムからの統合的理解など、着実な成果をあげている。

**A02 班**は、酸素シグナルの解明に向けて、酸素の ROS・親電子分子種への変換機構、その下流で組織・細胞における機能を最適化する組織・細胞におけるシグナル経路、及びその意義の解明を目指した。

まず、酸素の ROS・親電子分子種シグナルへの変換に関して、**住本班**は、動物で酸素を ROS シグナル ( $O_2^-$ ) へと変換する (図 2①) Nox、酵母で酸素を NO へと変換する NO 産生酵素等の活性制御機構と意義を解明した。特に、**住本**は Nox2 を活性化するのに必要十分な 3 つのスイッチ機構を明らかにし、Nox4 が直接  $H_2O_2$  を、Nox1-3 及び Nox5 が  $O_2$  を生成することを示した。さらに、Nox が生成する ROS がタンパク質のジスルフィド結合形成に関与することを示している。一方、**内田班**は酸素及び ROS・親電子物質とそのセンサータンパク質を LC-ESI-MS/MS により化学構造解析 (図 2①)、多様な新規の酸化生成物やタンパク質の酸化的付加体を見出した。ポリフェノールなどの植物性抗酸化物質が酸素センサーとして働き、酸化型中間体生成を介してタンパク質のカルボニル化や酸化的脱アミノ化反応を惹起することも示した。

ROS シグナルの細胞内機構に関しては、**赤池班**が活発な国際共同研究を展開し、非常に多くのタンパク質において、Cys 残基のスルフヒドリル基にイオウ多量体 (polysulfide:  $S_n$ ) が新生鎖合成の際に付加し、維持されるという、ROS・親電子物質や抗酸化物質酸化体が仲介するシグナルにおける最重要機構を明らかにした。本機構は、Cys 残基のスルフヒドリル基の酸化或いは付加反応に可逆性を付与することから、「(構造維持上重要な生理的ジスルフィド形成を除き)酸化されたタンパク質は分解される」という、生化学上の先入観を一新する発見である。その生理的役割に関しては、分担研究者**上原**が、タンパク質のジスルフィド形成を制御する小胞体のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ PDI において、Cys 残基イオウ多量体付加が PDI の活性に重要な役割を果たす知見を得た (図 2③④)。また、**内田班**分担研究者**西田**、**赤池**、分担研究者**澤**は、心臓の梗塞周辺領域細胞のミトコンドリア過剰分裂を伴う心筋組織老化に、Cys 残基のイオウ多量体の縮退枯渇による Drp1 タンパク質の多量体形成が関与することを見出した (図 2③④)。

ROS シグナル経路の生物学的意義に関しては、**赤池班**分担研究者の**朽津**と公募班の**吉岡**が、植物における ROS とそれを産生する Nox に着目し、花粉管の成長、自然免疫の制御における役割を解明した。特に、**吉岡**が太陽光を浴びた状態では葉緑体がむしろ生体防御上重要な ROS を生産するという発見をし、**朽津**が、植物体の細胞増殖が盛んな部位における ROS が細胞壁を強固にする作用を見出した。また、**内田**と**森**が TRPV1 チャネルの Cys 残基への炎症関連親電子物質 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin  $J_2$  (15d-PGJ $_2$ ) の付加が、PC12 細胞の神経様突起伸長を促すことを示した (図 2③④)。**西田**は、心筋細胞のプリン作動性受容体に親電子物質イソチオシアネート付加すると、下流 G タンパク質シグナルが抑制され、高血圧のリスク要因が軽減することを見出した (図 2③④)。さらに、**三木**は ROS センサーとして働く Cys 含有タンパク質 PRL により  $Mg^{2+}$ トランスポーター CNNM の機能制御を追究し、PRL と CNNM が細胞内  $Mg^{2+}$ 恒常性を制御することによりエネルギー代謝に影響を与え、転移性の高い大腸がん細胞などの浸潤性を高めていることを示した。本機構は  $Mg^{2+}$ 流入を担う TRPM6 チャネルと関連しており、腎臓遠位尿細管や大腸での  $Mg^{2+}$ 流入再吸収を担うことも明らかにした (図 2③④)。ROS シグナルの担う転写制御に関しては、**伊東班**が Cys 含有 ROS センサータンパク質 Keap1 と転写因子 Nrf2 との複合体が酸化的ストレス応答の中心転写調節経路として働くこと (**山本**と発見した)に着目し、タンパク質恒常性 (proteostasis) に関連する転写因子 ATF4 との相互作用を追究した。プロテアソームを阻害するというストレス化において、抗酸化系の中心的なタンパク質であるグルタチオンの合成に必須のシスチントランスポーター xCT が、Nrf2 と ATF4 により協調的に転写調節されることを示した。さらに、国際共同研究により**森**らは、ROS 存在下で Keap1-Nrf2 により転写誘導を受けた TRPA1 チャネルが

Ca<sup>2+</sup>を流入させることにより、AKT キナーゼなどを介した増殖シグナルを活性化することをヒト乳がん細胞で示した。公募班**吉種**は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 応答性のキナーゼ ASK が概日時計を調節するという新しい機構を発見した。

このように **A02 班**は酸素シグナルの確立に向け、酸素から ROS への変換機構と ROS・親電子物質のセンシング機構の解明、Cys 残基に結合するイオウ多量体による ROS・親電子物質付加反応への可逆性の付与の発見など、着実な成果をあげた。

**A03 班**は酸素リモデリング(図 2)の基本となる酸素環境や ROS シグナルを生体内の「実体」として示すことを目指し、*in vivo*を指向した酸素・ROS・親電子分子種の可視化解析技術を開発してきた。

**浦野**は、体深部 *in vivo*での ROS・活性窒素種の検出を可能とする、全く新たな生物発光プローブの開発に成功した。即ち、新規の消光原理(電子移動と細胞膜透過性の制御)に基づき、プローブ自身は生物発光特性を示さないが、ROS や NO により構造が変化すると、強い生物発光を誘導するプローブを創出した。蛍光観察手法の中では深部イメージングに適しているとされる近赤外発光プローブと比較しても、本プローブは圧倒的に高い S/N 比でのリアルタイムイメージングを可能にする。また、**赤池**と連携し、ローダミン類、Si-ローダミン類への分子間、分子内求核付加を活用し、イオウ多量体の可逆的検出を可能にした。

**飛田**は、*in vivo*末梢組織における酸素濃度の定量を目指し、新たにイリジウム錯体 BTP の補助配位にジメチルアミノ基を導入し、カチオン化した BTPDM1 を合成し、細胞内取り込み能を約 20 倍に向上させた。また、**南学**との共同で、腎臓の低酸素環境を定量的に測定することにも成功した。即ち、BTPDM1 を用いたリアルタイムイメージングによる腎臓の酸素分圧測定を行い、マウス腎虚血再灌流モデルにおいて腎臓の酸素濃度の変化を観察した。また、**森**、公募班**西川**、**森**班連携研究者**田久保**との共同でマウス骨髄内において、**井上**との共同で培養癌細胞塊内において、酸素濃度分布測定に成功している。このように、BTPDM1 は生体・細胞内の酸素環境の定量的可視化における最も強力かつ重要なツールになりつつある。

**中川**は、生体内の活性イオウ種の役割を確認するために、光制御型 H<sub>2</sub>S 放出化合物の設計・合成・活性評価を行った。UVA 領域の紫外線で制御出来る化合物を設計合成し、培養細胞に適用したところ、任意の位置・時間で狙った細胞に H<sub>2</sub>S を投与可能であることが明らかとなった。次に、可視光制御可能な NO 放出化合物を開発し、*in vitro*、*in cellulo*、および *ex vivo* 系で青色光制御により高効率に NO 放出させることに成功した。また、色素部分をローダミン型に変更した新規 NO 放出化合物も設計合成し、ラット大動脈血管切片を用いたマグヌス試験により、光強度、光照射時間依存的な血管弛緩を任意に誘導することができた。

このように **A03 班**は ROS・活性窒素種の可視化プローブ、酸素の絶対濃度測定用プローブ、光制御型の H<sub>2</sub>S 或いは NO の放出化合物などを開発し、全てに関して *in vivo* 対応を達成している。また、他班との連携は領域による新しい可視化解析技術の開発に高い波及効果を示している。例えば、**森**は公募班**森井**との共同で、エネルギー代謝における好氣的なミトコンドリアから嫌氣的な解糖系へのスイッチングを定量的に観察できる、蛍光性の温度(熱産生)センサー-tsGFP の有効性の理論的基盤の確立に成功した。また、**浦野**との連携でマウス個体内に形成させた担癌組織における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 環境をイメージングし、その組織内の不均一分布とその意義を明らかにした。**住本**、**浦野**は細胞内コンパートメント毎に空間特異的に ROS を高感度で検出するための方法として、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を特異的に高感度で検出可能な蛍光試薬 NBzF-BG を開発した。PDGF 受容体の膜貫通領域と融合させた SNAP タグを発現させた好中球(Nox2 を高発現)を用いて、NBzF-BG を細胞膜特異的にラベルし、好中球の食作用時の Nox2 による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成を共焦点レーザー顕微鏡により検出することに成功した。

**国際活動支援班**は本新学術領域研究の基本概念である「酸素リモデリング」の国際的な認識と普及ため、酸素生物学分野をリードする研究者による総説特集号「Oxygen Physiology: sensors and ion channels」を、**森**が Executive Editor を務める Pflügers Archiv - European Journal of Physiology において編集した(平成 28 年 1 月号)。本特集号においては、**森**が Editorial に加えて、個別的に、低酸素センサーチャネル TRPA1、TRPM7 の機能・分布を基に、酸素センシング機構が生体内に広く分布していることを論じる総説を、**井上**、**武田**と執筆した。また、**山本**が**鈴木**とともに腎臓の REP 細胞により産生されるエリスロポエチンが担う、システミックな酸素恒常性の制御について執筆した。以上は**森**班、及び**山本**班の個別的な業績であるとともに、総括班・国際支援班の重要な業績でもある。また、酸素生物学の国際的共同研究のネットワークは拡大しつつある。その中でも特筆すべきものとして、酸素センサー機構と呼吸調節(急性の酸素適応)、REP 細胞が産生を司るエリスロポエチンを介した造血系の調節(緩徐な酸素適応)、タンパク質の Cys 残基へのイオウ多量体の付加等に関する研究のネットワークが、本領域を拠点として大きく発展している。

### 3. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1 ページ以内）

研究推進時に問題が生じた場合には、その問題点とそれを解決するために講じた対応策等について具体的に記述してください。また、組織変更を行った場合は、変更による効果についても記述してください。

研究推進を妨げるような問題は生じなかった。

組織変更に関しては、**赤池**班の分担研究者であった**上原**が、平成 28 年度からの発足を目指した新学術領域の応募に計画代表者として参画したので、本領域から脱退した。替わりの分担研究者は、予定されていた分担研究者としての**上原**の役割が完遂していたため、補充しなかった。**森**班においては分担研究者の**長嶋**が医療機関に医師として移り、臓器分野の研究者を補充する必要が生じたため、同じ京都大学大学院医学研究科、糖尿病・内分泌・栄養内科学分野の**矢部**が加わった。また、**三木**班においては、分担研究者の**関根**が留学し、活性酸素種シグナルの重要因子である ASK キナーゼの研究の継続の必要が生じたため同じ東京大学大学院薬学研究科、細胞情報学教室の**服部**が分担研究者として加わった。その後同様に、**服部**が留学したため、同じ教室の**藤澤**が分担研究者として加わった。**内田**班においては、**内田**が東京大学に異動したが、連携研究者の**柴田**は名古屋大学に留まり、別研究室を主宰することになったので、分担研究者として加わった。

#### 4. 審査結果の所見及び中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況（2 ページ以内）

審査結果の所見及び中間評価において指摘を受けた事項があった場合には、当該コメント及びそれへの対応策等を記述してください。

##### <審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況>

審査結果の所見においては、3 件の留意事項および 1 件の参考意見があった。

##### 留意事項

<コメント 1> 研究計画「低酸素ストレスに対するシステミックな生体応答機構の解明」・「腫瘍内低酸素応答を利用した癌悪性化制御法の開発」では、博士研究員の給与に大きな差があり、どのレベルの研究員の雇用を想定しているかを明確にすること。

<それへの対応策> 研究計画「低酸素ストレスに対するシステミックな生体応答機構の解明」においては、遺伝子改変マウスの作出と解析を行う必要があるため、学位取得後 3 年以上の経験を有する博士研究員 1 名を東北大学の規定に準じて雇用する計画を立てた。一方、研究計画「腫瘍内低酸素応答を利用した癌悪性化制御法の開発」においては、代表者**井上**が所属していた大阪府立成人病センターが博士研究員の雇用に関する勤務時間と時間給に厳しい上限を設定しており、その規定に準ずるための金額を設定していた。低い金額のため適当な研究員を見つけれなかったが、代わりに優秀な技術補助員を採用することが出来た。

<コメント 2> 研究計画「癌化・老化耐性ハダカデバネズミをモデルとした低酸素適応・代謝制御機構の探究」では、研究員雇用費が年間 1,050 万円計上されているが、人数や月額の記事がないことから内訳を明確にすること。

<それへの対応策> 申請時には、研究員 3 名を雇用する予定として年間 1,050 万円の雇用費を計上したが、配分額が減額されたため、解析系に改良を加えた上、月額 30 万円で博士研究員を 1 名雇用し対応した。

<コメント 3> 研究計画「ポリサルファ代謝系を介する新しい抗酸化ストレス制御機構の解明」では、初年度の博士研究員と研究支援者の雇用費が同額となっているのはおかしい。精査の上、交付申請に当たっては適切な額を申請すること。

<それへの対応策> 交付申請の際に博士研究員等雇用経費について所属機関の算定基準による正確な算定を行い、この算定額に基づき適切に執行を行っている。

##### 参考意見

<コメント 1> 多光子顕微鏡、質量分析装置などを共通機器として購入し拠点化する計画は、領域運営のために必要なものと認める。しかし、計画研究を見渡したとき、これらが多くの領域組織の研究者で共同利用される見込みがあるものか、不明確であるとの意見があった。

<それへの対応策> 8.研究費の使用状況に記載のとおり(25 頁)、総括班として購入した共通機器は有効に利用されている。即ち、酸素、ROS・親電子分子種の生体内動態解析が枢要であることを鑑み、総括班は技術支援を拠点形成により強力に推進してきた。東北大学(赤池)では、活性イオウ分子種やイオウ多量体の精密定量に不可欠な質量分析システムを導入し、領域内外の連携研究者の要望に応じて、プロテオーム解析を随時行った。これまで、領域内から 12 名月平均 3、4 回、領域外から 21 名(内 8 名は海外)月平均 2 回、イオウ多量体関連の測定依頼に対応した。また、合計 3 回の技術支援セミナーを開催し、領域外や国外から研究者を招き入れ、技術公開だけでなく、技術導入も行った。可視化技術支援は、**浦野**(東京大学)、**飛田**(群馬大学)、**中川**(名古屋市立大学)が担当し、班員からの要望に応じて有機小分子を基盤とする蛍光・発光イメージングプローブやケージド化合物群を開発してきた。**中川**は、**赤池**からの依頼により、オルガネラ局在型イオウ多量体プローブを設計・合成し、共焦点スキャナを備えた蛍光顕微鏡により、培養細胞での新規蛍光プローブの機能を検証した。**飛田**は**南学**とともに、開発したイリジウム錯体型リン光プローブ BTPDM1を腎尿細管細胞に取り込ませ、ORCA-Flash4.0s CMOS カメラや高感度ハイブリッド GaAsP 検出器を装備した顕微鏡により、共焦点りん光寿命画像を測定し、腎臓表面付近の酸素レベルの高空間分解能イメージングに成功している。**浦野**は、**南学**との共同で、正立蛍光顕微鏡による各種プローブの取り込みや局在の評価、組織切片の拡大蛍光画像を取得した。一方、京都大学(**森**)に設置した多光子励起レーザ走査型顕微鏡に関しては、定量性の高いイメージングを可能にする蛍光・りん光減衰解析を強化した光学系を構築した。また、可視化技術セミナーを平成 28 年 8 月 3 日に開催し、領域内には本顕微鏡の指導を行うとともに、領域外から多光子顕微鏡に関する秀でた業績を上げた研究者を招聘し、さらなるセットアップの最適化を行った。一方、**森**、**飛田**、公募班**西川**は連携して、本顕微鏡セットで BTPDM1 のりん光の減衰を解析することにより、空間分解能 1.5 $\mu$ m、時間分解能 10s で生体内深部(200 $\mu$ m)の絶対酸素濃度をイメージングできるセットアップを完成させた(今のところ日本で唯一)。それを用い、例えば、**森**、**西川**、**田久保**がマウス骨髄内における、**井上**が

培養細胞塊内における酸素濃度分布測定に成功している。また、**森、浦野、井上、三木、公募班森井**が連携し、 $H_2O_2$  選択的な有機小分子プローブ Peroxy Green を付加した抗 HER2 抗体を用いて、マウス個体内に形成させた担癌組織における  $H_2O_2$  環境をイメージングし、その組織内の不均一分布を明らかにした。また、担癌組織中で  $H_2O_2$  に高暴露されると、抗酸化系の亢進、代謝のリプログラミング、細胞増殖を亢進する遺伝子群の発現上昇が起こり、悪性化につながるという知見を得た。**中川**も多光子顕微鏡に対応した光制御型 NO 放出化合物を開発し、血管拡張での有効性を示した。

### <中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況>

中間評価の所見においては、2 件の留意事項および 3 件の参考意見があった。

#### 留意事項

<コメント1> 初年度に購入された多光子励起レーザー走査型顕微鏡が十分に活用されていない印象を受ける。積極的な活用により成果創出を図ることが必要である。

<それへの対応策> 審査結果の所見、参考意見<コメント1><それへの対応策>における 13 頁、下から 7 行目～14 頁、6 行目の記述を参照されたい。

<コメント2> 組織内酸素濃度の定量法を開発し、生体内酸素濃度の定量的解析の下で、酸素濃度と生体応答の関係を明らかにすることが必要である。

<それへの対応策> 上の参考意見<コメント1><それへの対応策>にも記述したが、**飛田、南学**は、リン光プローブ BTPDM1 を用い、酸素濃度分布の高空間分解能イメージングに成功し、低酸素空気の吸引、脱血、炎症により実際に腎皮質の尿細管細胞の酸素濃度が減少することを観察した。また、多光子励起レーザー走査型顕微鏡による観察にも BTPDM1 適用し、**森、西川、田久保**は *in vivo* マウス骨髄内において、**井上**は培養癌細胞塊内において酸素濃度の測定に成功している。より具体的には、20%酸素下で培養したヒト胃ガン由来腫瘍塊において、酸素は表層付近で 15～16%、深部(～150  $\mu$ m)で 7～8%の濃度で分布し、一方、20%酸素に暴露したマウス頭骨の骨髄内において酸素は、破骨細胞で 5～8%、骨芽細胞で 3～6%、赤芽球・赤血球では 5%程度と、同一細胞種間でも酸素が不均一に分布することが明らかになった。

#### 参考意見

<コメント1> オミクス手法、特にエピジェネティック修飾における酸素の重要性が明らかになりつつある現状を鑑みると、エピゲノムの視点の導入は想定以上の成果への鍵となる可能性もあるという意見があった。

<それへの対応策> エピゲノムの視点は本領域も重要性に注目し、**A02**班の主要課題としてきた。実際に**赤池**は、非常に多くのタンパク質において、Cys残基のスルフヒドリル基にイオウ多量体がタンパク質合成の段階で酵素的に連結されており、スルフヒドリル基へのROS・活性窒素種や親電子物質の付加がイオウ多量体を介して起きると、「脱」反応が直接的な付加に比べると圧倒的に容易になることを見出している。また、**上原**はCys残基のNOによるニトロシル化のヒストン修飾に与える影響を解明している。一方、**森、合田、中山**等はPHDの重要なヒドロキシ化標的が転写因子HIFs以外に存在することも見出している。

#### <コメント2>

酸素濃度の定量的解析や低酸素による幹細胞の活性化を研究する研究者を公募研究に加えることが望ましいのではないかと意見があった。

<それへの対応策> **森**は連携研究者**田久保**(領域「ステムセルエイジング」計画研究代表:造血幹細胞の休眠状態の維持における低酸素環境の重要性を**須田**らと示してきた)、**西川、飛田**と多光子顕微鏡を用いて、造血幹細胞を休止期に維持する骨髄内低酸素環境をイメージングし、絶対酸素濃度を定量した。また、**三浦**は低酸素環境に生息するハダカデバネズミ由来の iPS 細胞が、未分化な細胞が混入しても腫瘍(奇形腫)を形成しない点に着目し、癌抑制遺伝子 ARF が仲介する、初期化やがん化を防ぐ機構を明らかにした。重要なコメントである公募班への採用に関しては、残念ながら応募がなかったため、達成できなかった。

<コメント3> 低酸素が能動的に作られる機序を明らかにし、個体の理解に結び付ける統合的視点を持った研究が必要であるとの意見があった。

<それへの対応策> 本領域も個体における生体内酸素環境の統合(システム)的視野からのアプローチに注目してきた。例えば、低酸素応答が金属イオン代謝系と統合された恒常性システムとして維持されることを示した。特に、腎臓 REP 細胞と肝臓等の鉄代謝系が、エリスロポエチンと肝細胞由来ヘプシジンを介して、造血システムを統合、調節していることを**山本**が示した。また、**森**が、前脳部に送られる血流中酸素を感知する頸動脈小体、気管・肺等の末梢組織における酸素を感知する迷走神経、延髄の呼吸中枢における酸素を感知するアストロサイト等の役割を、呼吸調節に着目し統合的に解明することを進めた。

## 5. 主な研究成果（発明及び特許を含む）〔研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に整理する〕

（3 ページ以内）

本研究課題（公募研究を含む）により得られた研究成果（発明及び特許を含む）について、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。記述に当たっては、**本研究課題により得られたものに厳に限る**こととします。

### < A01 計画研究 >

**山本班** 腎臓 REP 細胞が司る緩徐な低酸素応答と肝臓等が司る鉄代謝系とが、エリスロポエチンと肝細胞由来ヘプシジンを介して、統合的に造血系を調節していることを示した (Suzuki, *Kidney Int.*, 2018)。これは、生体恒常性の維持・制御機構をシステム的な視点から理解する上で重要な知見である。また、エリスロポエチンの産生を担う腎臓 REP 細胞特異的な転写の低酸素誘導性の制御機構の解明を試み、3 種の PHD アイソフォームのうち、PHD2 がエリスロポエチン産生制御において中心的役割を担っていることを明らかにした。また、3 種の HIF 群では HIF-2 $\alpha$  がエリスロポエチン遺伝子発現を誘導していることを示した (Souma, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016)。一方、胎児期のエリスロポエチン産生組織である肝臓では、3 つの PHD が相補的に低酸素誘導性の産生調節をしていることがわかった。また、HIF-2 $\alpha$  は REP 細胞と同様にエリスロポエチン遺伝子発現を誘導するが、HIF-3 $\alpha$  も発現誘導しエリスロポエチン遺伝子発現を抑制することがわかった (Tojo, *Mol. Cell. Biol.*, 2015) (南学班武田との共同研究)。これは、多血症に繋がる過剰なエリスロポエチン産生の負の制御機構が、低酸素環境下ですでに構成的に作動していることを示唆する。

**南学班** マクロファージおよび肝細胞において、ミトコンドリアが機能的に完全に機能する穏やかな低酸素レベル (4-9%O<sub>2</sub>) であるにもかかわらず、HIF-1 $\alpha$  による PDK1 の発現誘導によりピルビン酸のミトコンドリアへの流入が阻害され、エネルギー代謝が解糖系へとシフトしていることを見出した。また、本代謝シフトはマクロファージが血管から末梢組織へと遊走する際に必須であることを示し、末梢組織の低酸素環境に積極的に備える本現象を Active glycolysis と命名した。 (Semba, *Nature Commun.*, 2016: 三浦班の杉浦と共同)

また、shRNA library を用いたスクリーニングにより、低酸素環境と炎症シグナルとを繋ぐ鍵となる転写因子 CEBPdelta を新たに同定した。CEBPdelta は IL-1 $\beta$  などの炎症シグナルにより誘導され、HIF-1 $\alpha$  のプロモーター領域に結合することで転写活性も増強していた (Yamaguchi, *Kidney Int.*, 2015)。 (山本班との共同)

**森班** 哺乳動物の個体中に遍在する急性の低酸素応答が、神経性呼吸調節システムにおいてどのように統合されるか、特に、長年の論争となっていた中枢神経系の酸素センサー細胞を解明した。アストロサイトにおいて、TRPA1 チャネルは通常酸素下で PHD ヒドロキシ化と NEDD4-1 E3 ligase ユビキチン化により細胞内に局在するが、穏やかな低酸素環境 (6-9%O<sub>2</sub>) で形質膜へと回復すると Ca<sup>2+</sup>を流入させ、ATP 放出を介して脳幹の呼吸中枢神経リズムを変化させ、呼吸を深くすることが分かった (Uchiyama, *Nature Commun.*, 査読中)。全く新しい酸素センシング分子機構の発見である。

また、ROS や熱のセンサーとして働く TRPV1 チャネルにおいて、ホモ4量体中の4組の同一 Cys 残基 (ヒトでは Cys258 と Cys742) が異なった酸化還元状態にあり、異なった役割を果たすことを示した。即ち、Cys258 には、隣接 TRPV1 タンパク質の Cys742 とジスルフィドを形成する酸化型、及び free な還元型が存在し、それぞれが TRPV1 複合体の安定化、及び ROS 感受性を担う。同一 Cys が 4 次構造形成の際に不均化し、タンパク質複合体に ROS 感受性が生じる最初の例である (Ogawa, *J. Biol. Chem.*, 2016)。

さらに、ROS、NO、熱、浸透圧等に対する multimodal なセンサーとして知られる TRPV4 において、チャネル活性制御に phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) が重要であることを示した。即ち、PIP<sub>2</sub> は TRPV4 に対して抑制的に作用し、inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) 等はそれを中和することによりチャネル活性を強く促進することを示した。Ankyrin repeat domain (ARD) の Cys が酸化感受性を担う点が複数の TRP に共通しており、酸素、ROS、NO 等に対する感受性の分子機構を理解する上で非常に重要な知見である。また、ARD に PIP<sub>2</sub> が結合することを初めて示した成果でもある (Takahashi, *Nature Commun.*, 2015)。

**A02 班** と連携し、国際共同研究により、ROS 存在下で Keap1-Nrf2 により転写誘導を受けた TRPA1 チャネルが Ca<sup>2+</sup>を流入させることにより、AKT キナーゼなどを介した増殖シグナル等を活性化することをヒト乳がん細胞で示した (Takahashi, *Cancer Cell*, 2018)。**A03 班** とは共同で、低酸素環境下のエネルギー代謝のミトコンドリアから解糖系へのスイッチングの定量化を可能にする、蛍光性の温度 (熱産生) センサー-tsGFP (自らが開発) の熱・温度感知の理論的基盤を確立した (Kiyonaka, *Nature Methods*, 2015)。また、マウス個体内に形成



図3. 各研究項目間の連携



させた担癌組織における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 環境をイメージングし、その組織内不均一性を明らかにした。

**井上班** 一般に低酸素で dormancy 状態にならない癌細胞株と対照的に、培養癌細胞塊 CTOS は低酸素で容易に dormancy 状態になり、化学療法耐性であること、また、増殖を停止し、エネルギー代謝を低下させるが、有酸素条件に戻すと速やかに活動状態に入ることを、本領域の採択と同時期に明らかにした (Endo, *PLoS ONE*, 2014)。癌の増殖・生存にとって必須のシグナルである上皮成長因子受容体 EGFR シグナルさえも dormancy 下では積極的に抑制されており、実際に EGFR 変異型肺癌における分子標的治療薬に対する抵抗性の基盤になっていることを明らかにした。これは、癌治療において dormancy 細胞を考慮すべきことを証明した画期的な発見である (Endo, *Oncogene*, 2017)。

**三浦班** ハダカデバネズミで iPS 細胞を誘導したところ、樹立された iPS 細胞は腫瘍化耐性であり、ヒト・マウスとは異なり、低酸素下では iPS 細胞樹立は完全に抑制されることを明らかにした。また、癌抑制遺伝子 ARF が仲介する初期化やがん化を防ぐ機構を明らかにした。このことは iPS 細胞において、樹立過程とがん化過程に共通した強い低酸素適応との連関を示唆する成果である (Miyawaki, *Nature Commun.*, 2016)。

さらに、肝細胞において PHD2 の機能を抑制して低酸素応答を活性化すると、血中の乳酸の肝細胞への取り込みや肝細胞での糖新生が活発になり、敗血症などに合併する致死的な乳酸アシドーシスの生存率を劇的に改善することを証明した (Suhara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015)。

### <A01 公募研究>

**中山** PHD3 がピルビン酸デヒドロゲナーゼ-E1βに結合し、活性化することを示した (Kikuchi, *BBRC*, 2014)。

### <A02 計画研究>

**三木班** Cys 含有 ROS センサータンパク質 PRL による Mg<sup>2+</sup>トランスポーターMagEx の機能に関する研究を行い、PRL と MagEx が細胞内 Mg<sup>2+</sup>恒常性を制御することによりエネルギー代謝やその調節シグナル経路に影響を与え、小腸においては Mg<sup>2+</sup>排出を促進し (Ishii, *PLoS Genet.*, 2016)、転移性の高い大腸がん細胞においては浸潤性を高めていることを示した (Funato, *J. Clin. Invest.*, 2014)。

**赤池班** 非常に多くのタンパク質新生鎖の Cys 残基のスルフィド基に、システイニル tRNA 合成酵素がイオウ多量体を付加するという、ROS・親電子物質等が仲介するシグナル伝達における最重要機構の一つを明らかにした。本機構は、Cys 残基のスルフィド基の酸化或いは付加反応に可逆性、即ち、動的な性質を付与することから、「Cys 酸化されたタンパク質は分解される(構造維持上重要な生理的ジスルフィド形成を除き)」という、生化学上の先入観を一新する発見である (Akaike, *Nature Commun.*, 2017)。

また、植物の生殖過程において、花粉管の先端部に局在する ROS 産生酵素が Ca<sup>2+</sup>を介して活性化され、ROS を積極的に生成することにより、花粉管の先端成長を促すという、植物の生殖・受精の新たな仕組みを解明した (Kaya, *Plant Cell*, 2014; Kaya, *Plant Signal. Behav.*, 2015)。

**住本班** 酸素を刺激依存的に ROS に変換する Nox に注目し、Nox2 活性化に必要なスイッチ機構として、「Nox2 活性化タンパク質 p47<sup>phox</sup> の構造変化」、「低分子量 G タンパク質 Rac の GTP 結合型への変換」、「Rac-GTP と結合した p67<sup>phox</sup> の Nox2 との直接相互作用」の 3 つを明らかにした。また、細胞刺激時に細胞膜等から遊離されるアラキドン酸は、上記全てオンにできることを示した (Matono, *J. Biol. Chem.*, 2014)。

**A03 班** と共同で、細胞内コンパートメント特異的に ROS を高感度で検出するための方法として、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を特異的に高感度で検出可能な 5-(4-nitrobenzoyl)carbonylfluorescein を O<sup>6</sup>-benzylguanine 化した蛍光試薬 NBzF-BG を開発した。好中球 (Nox2 を高発現) において、PDGF 受容体の膜貫通領域と融合させた SNAP タグ組み換え体を介して、NBzF-BG を細胞膜特異的にラベルし、食作用時の Nox2 による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて可視化することに成功した (Abo, *Anal. Chem.*, 2014)。

**伊東班** Cys 含有 ROS センサータンパク質 Keap1 と転写因子 Nrf2 との複合体が、酸化的ストレス応答の中心転写調節経路として働くという自らによる発見に注目し、Nrf2 転写因子による炎症抑制メカニズムを解明した。Nrf2 は炎症を増悪させるサイトカイン IL6 や IL1β の発現を阻害することで、炎症を抑えていることがわかった。今回の成果により、Nrf2 を活性化剤を用いた安全で副作用の少ない抗炎症薬の開発が発展することが期待される (Kobayashi, *Nature Commun.*, 2016)。

また、Nrf2 とタンパク質恒常性 (proteostasis) に関連する転写因子 ATF4 との相互作用に着目し、プロテアソーム阻害というストレス下で、酸化系の中心タンパク質の一つであるグルタチオンの合成に必須のシスチントランスポーターxCT を Nrf2 と ATF4 が協調的に転写調節することを示した (Ye, *Mol. Cell. Biol.*, 2014)。

**内田班** LC-ESI-MS/MS を用いた化学構造解析を行い、新規の酸化生成物やタンパク質の酸化付加体 (ピロール化リジン含有タンパク質、脂肪酸付加リジン N<sup>ε</sup>-(8-carboxyoctanyl)lysine、2-オキシヒスチジン含有タンパク質)を見出した (Yoshitake, *Redox Biol.*, in press; Ihara, *J. Biol. Chem.*, 2019)。また、**A01 森班** と共同で TRPV1 チャネルの Cys 残基に内因性の親電子物質 15-Deoxy-Δ<sup>-12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> が付加し、神経様細胞 PC12 細胞の神経様突起伸長を促すことを示した (Shibata, *Sci. Rep.*, 2016)。

また、心筋梗塞後のマウス心臓において、梗塞周辺領域においてミトコンドリア過剰分裂を伴う心筋組織

老化に、Drp1 タンパク質の Cys 残基に付加するイオウ多量体の退縮が引き起こす Drp1 多量体形成が関与することを見出した (Nishimura, *Sci. Signal.*, 2018)。また、加齢高血圧の新たなリスク要因として筋細胞のプリン作動性受容体を同定し、親電子物質イソチオシアネートがこの受容体の Cys 残基に付加すると、下流の G タンパク質シグナルが負に制御され、高血圧症状を改善することを見出した。これは、親電子物質の新たな作用の発見である (Nishimura, *Sci. Signal.*, 2016)。

#### <A02 公募研究>

**吉岡** 植物において、免疫応答を誘導するシグナル分子 ROS を生成する Nox が、MAP キナーゼによりリン酸化された WRKY 型転写因子によって発現制御されることを発見した。この成果は、WRKY 転写因子による発現調節が強い免疫応答に必要であることを示す (Adachi, *Plant Cell*, 2015)。

#### <A03 計画研究>

**浦野班** *in vivo* 体深部での ROS、NO 生成の検出を可能とする、全く新たな生物発光プローブの開発に成功した。具体的には、独自に確立した消光原理 (BioLeT と細胞膜透過性の制御) に基づき、それ自身は生物発光特性を示さないが、ROS や NO が発生している環境では構造が変化し、強い生物発光を示すプローブの開発に成功した。本手法は、腹腔内 *in vivo* 急性炎症モデルラットにおいて、蛍光観察手法の中では深部イメージングに適しているとされる近赤外蛍光プローブよりも、圧倒的に S/N 比が高いリアルタイムイメージングが可能であった (Kojima, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015; Takakura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015)。

また、イリジウム錯体 BTP の補助配位子にジメチルアミノ基を導入し、カチオン化した BTPDM1 を合成し、細胞内取り込み能を ICP-MS (誘導結合プラズマ質量分析計) を用いて分析したところ、BTP に比べて約 20 倍に増加した (Tobita, *Anal. Chem.*, 2015)。A01 班と共同で、腎組織の低酸素環境を定量的に測定することにも成功した。即ち、BTPDM1 を用いたリアルタイムイメージングによる腎臓の酸素分圧測定を行い、マウス腎虚血再灌流モデルでの腎臓の酸素分圧減少を定量した (Hirakawa, *Sci. Rep.*, 2015; *Kidney Int.*, 2018)。

さらに、可視光制御可能な NO 放出化合物を開発し、本化合物が *in vitro*、*in cellulo*、および *ex vivo* 系で青色光制御により高効率に NO 放出を行うことを示した。また、色素部分をローダミン型に変更した新規 NO 放出化合物を設計合成し、ラット大動脈血管切片を用いたマグヌス試験により、光強度・照射時間依存的な血管弛緩を任意に誘導することに成功した (Ieda, *Sci. Rep.*, 2019)。

## 6. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5ページ以内）

本研究課題（公募研究を含む）により得られた研究成果の公表の状況（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。記述に当たっては、本研究課題により得られたものに厳に限ることとします。

- 論文の場合、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に\*印を付してください。
- 別添の「(2) 発表論文」の融合研究論文として整理した論文については、冒頭に◎を付してください。
- 補助条件に定められたとおり、本研究課題に係り交付を受けて行った研究の成果であることを表示したもの（論文等の場合は謝辞に課題番号を含め記載したもの）について記載したもののについては、冒頭に▲を付してください（前項と重複する場合は、「◎▲・・・」と記載してください）。
- 一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

### 1. 発表論文(代表例のみ示す:成果論文は全 915 編)(以下すべて査読有)

#### <計画研究 A01・山本班>

- ◎▲\*Suzuki N, Matsuo-Tezuka Y, Sasaki Y, Sato K, Miyauchi K, Kato K, Saito S, Shimonaka Y, Hirata M, \*Yamamoto M. Iron attenuates erythropoietin production by decreasing hypoxia-inducible transcription factor 2α concentrations in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int.* 94, 900-911, 2018. *with commentary*
- ◎▲Nezu M, Souma T, Yu L, Sekine H, Takahashi N, Wei AZ, Ito S, Fukamizu A, Zsengeller ZK, Nakamura T, Hozawa A, Karumanchi SA, \*Suzuki N, \*Yamamoto M. Nrf2 inactivation enhances placental angiogenesis in a preeclampsia mouse model and improves maternal and fetal outcomes. *Sci. Signal.* 10, eaam5711, 2017. *with commentary*
- ◎▲Hirano I, Suzuki N, Yamazaki S, Sekine H, Minegishi N, Shimizu R, \*Yamamoto M. Renal anemia model mouse established by transgenic rescue with erythropoietin gene lacking kidney-specific regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 37, e00451-16, 2017.
- ◎▲Souma T, Nezu M, Nakano D, Yamazaki S, Hirano I, Sekine H, Dan T, Takeda K, Fong GH, Nishiyama A, Ito S, Miyata T, Yamamoto M, \*Suzuki N. Erythropoietin synthesis in renal myofibroblasts is restored by activation of hypoxia signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 428-438, 2016.
- ◎▲\*Suzuki N, Sasaki Y, Kato K, Yamazaki S, Kurasawa M, Yorozu K, Shimonaka Y, Yamamoto M. Efficacy estimation of erythropoiesis-stimulating agents using erythropoietin-deficient anemic mice. *Haematologica.* 101, e356-360, 2016.
- ◎▲Keleku-Lukwete N, Suzuki M, Otsuki A, Tsuchida K, Katayama S, Hayashi M, Naganuma E, Moriguchi T, Tanabe O, Engel JD, Imaizumi M, \*Yamamoto M. Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 12169-12174, 2015.
- ◎▲Tojo Y, Sekine H, Hirano I, Pan X, Souma T, Tsujita T, Kawaguchi S, Takeda N, Takeda K, Fong GH, Dan T, Ichinose M, Miyata T, Yamamoto M, \*Suzuki N. Hypoxia signaling cascade for erythropoietin production in hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2658-2672, 2015.
- ▲\*Suzuki N, Yamamoto M. Roles of renal erythropoietin-producing (REP) cells in the maintenance of systemic oxygen homeostasis. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* 468, 3-12, 2016.
- \*de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski CE, Lee RG, Graham MJ, Motohashi H, Yamamoto M, \*Edwards PA. MAFG is a transcriptional repressor of bile acid synthesis and metabolism. *Cell Metab.* 21,298-310, 2015.
- Suzuki T, \*Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 93-100, 2015.
- ▲Souma T, \*Suzuki N, \*Yamamoto M. Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Front. Physiol.* 6, 167, 2015.

#### <計画研究 A01・南学班>

- ▲Abe H, \*Takeda N, Isagawa T, Semba H, Nishimura S, Morioka MS, Nakagama Y, Sato T, Soma K, Koyama K, Wake M, Katoh M, Asagiri M, Neugent ML, Kim JW, Stockmann C, Yonezawa T, Inuzuka R, Hirota Y, Maemura K, Yamashita T, Otsu K, Manabe I, Nagai R, Komuro I. Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M. *Nature Commun.* in press
- ▲Suzuki T, Minagawa S, Yamazaki T, Arai T, Kanai M, Shinjo S, \*Goda N. Loss of hypoxia inducible factor-1α aggravates γδ T cell-mediated inflammation during acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology Commun.* 2, 571-581, 2018.
- Matsumoto L, Hirota Y, Saito-Fujita T, Takeda N, Tanaka T, Hiraoka T, Akaeda S, Fujita H, Shimizu-Hirota R, Igawa S, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Fujii T, Osuga Y Hypoxia Inducible Factor 2α in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelial detachment. *J. Clin. Invest.* 128, 3186-3197, 2018.
- ◎▲Hirakawa Y, Mizukami K, Yoshihara T, Takahashi I, Khulan P, Honda T, Mimura I, Tanaka T, Tobita S, \*Nangaku M. Intravital phosphorescence lifetime imaging of the renal cortex accurately measures renal tubular hypoxia. *Kidney Int.* 93, 1483-1489, 2018.
- Ishimoto Y, \*Inagi R, Yoshihara D, Kugita M, Nagao S, Shimizu A, Takeda N, Wake M, Honda K, Zhou J, \*Nangaku M. Mitochondrial Abnormality Facilitates Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mol. Cell. Biol.* 37, e00337-17, 2017.
- ▲Krzywinska E, Kantari-Mimoun C, Kerdiles Y, Sobocki M, Isagawa T, Gotthardt D, Castells M, Haubold J, Millien C, Viel T, Tavitian B, Takeda N, Fandrey J, Vivier E, Sxcl V and Stockmann C. Loss of HIF-1α in Natural Killer cells inhibits tumour growth by stimulating non-productive angiogenesis. *Nature Commun.* 8, 1597, 2017.
- Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, Ootomo Y, Sakai M, Nagamatsu G, Kubota Y, Goda N, Matsumoto M, Nishimura EK, Soga T, Otsu K, Suematsu M, Okamoto S, Suda T, \*Takubo K. p38α Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress. *Cell Stem Cell* 19, 192-204, 2016.
- ◎Semba H, \*Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, Miyazawa H, Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R and Komuro I. HIF-1α-PDK1 axis induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nature Commun.* 7, 11635, 2016.
- Tanaka S, Tanaka T, \*Nangaku M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 307, F1187-F1195, 2014.

#### <計画研究 A01・森班>

- Qian N, Ichimura A, Takei D, Sakaguchi R, Kitani A, Nagaoka R, Tomizawa M, Miyazaki Y, Miyachi H, Numata T, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, \*Takeshima H. TRPM7 channels mediate spontaneous Ca<sup>2+</sup> fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development. *Science Signal.* 12, eaaw4847, 2019.
- ◎Takahashi N, Chen HY, Harris IS, Stover DG, Selfors LM, Bronson RT, Deraedt T, Cichowski K, Welm AL, Mori Y, Mills GB, \*Brugge JS. Cancer cells co-opt the neuronal redox-sensing channel TRPA1 to promote oxidative-stress tolerance. *Cancer Cell* 33, 985-1003, 2018.
- Matsuda K, Okamoto N, Kondo M, Arkwright PD, Karasawa K, Ishizaka S, Yokota S, Matsuda A, Jung K, Oida K, Amagai Y, Jang H, Noda E, Kakinuma R, Yasui K, Kaku U, Mori Y, Onai N, Ohteki T, Tanaka A, \*Matsuda H. Mast cell hyperactivity

- underpins the development of oxygen-induced retinopathy. *J. Clin. Invest.* 127, 3987-4000, 2017.
- 4) \*Numata T, Tsumoto K, Yamada K, Kurokawa T, Hirose S, Nomura H, Kawano K, Kurachi Y, \*Inoue R, \*Mori Y. Integrative approach with electrophysiological and theoretical methods reveals a new role of S4 positively charged residues in PKD2L1 channel voltage-sensing. *Sci. Rep.* 7, 9760, 2017.
  - 5) Liu X, Gong B, de Souza LB, Ong HL, Subedi KP, Cheng KT, Swaim W, Zheng C, Mori Y, \*Ambudkar IS. Radiation inhibits salivary gland function by promoting STIM1 cleavage by caspase-3 and loss of SOCE through a TRPM2-dependent pathway. *Science Signal.* 10, 482, 2017.
  - 6) ▲Sawamura S, Hatano M, Takada Y, Hino K, Kawamura T, Tanikawa J, Nakagawa H, Hase H, Nakao A, Hirano M, Rotrattanadumrong R, Kiyonaka S, Mori MX, Nishida M, Hu Y, Inoue R, Nagata R, \*Mori Y. Screening of Transient Receptor Potential Canonical Channel Activators Identifies Novel Neurotrophic Piperazine Compounds. *Mol. Pharmacol.* 89, 348-363, 2016.
  - 7) Miyake T, Nakamura S, Zhao M, So K, Inoue K, Numata T, Takahashi N, Shirakawa H, Mori Y, \*Nakagawa T, Kaneko S. Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nature Commun.* 7, 12840, 2016.
  - 8) ▲Badr H, Kozai D, Sakaguchi R, Numata T, \*Mori Y. Different contribution of redox-sensitive transient receptor potential channels to acetaminophen-induced death of human hepatoma cell line. *Front. Pharmacol.* 7, 19, 2016.
  - 9) Numaga-Tomita T, \*Nishida M, Putney JW Jr, \*Mori Y. TRPC3 amplifies B-cell receptor-induced ERK signalling via protein kinase D-dependent Rap1 activation. *Biochem. J.* 473, 201-210, 2016.
  - 10) ◎▲Ogawa N, Kurokawa T, Fujiwara K, Polat OK, Badr H, Takahashi N, \*Mori Y. Functional and structural divergence in human TRPV1 channel subunits by oxidative cysteine modification. *J. Biol. Chem.* 291, 4197-4210, 2016.
  - 11) \*Mori Y, Takahashi N, Ogawa N, Gudermann T. Oxygen physiology: sensors and ion channels. *Pflügers Arch.- Eur. J. Physiol.* 468, 1-2, 2016.
  - 12) ▲\*Mori Y, Takahashi N, Polat OK, Kurokawa T, Takeda N, Inoue M. Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation. *Pflügers Arch.- Eur. J. Physiol.* 468, 85-97, 2016.
  - 13) ◎Kiyonaka S, Sakaguchi R, Hamachi I, Morii T, Yoshizaki T, \*Mori Y. Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors. *Nature Methods* 12, 801-802, 2015.
  - 14) Takahashi N, Hamada-Nakahara S, Itoh Y, Takemura K, Shimada A, Ueda Y, Kitamata M, Matsuoka R, Hanawa-Suetsugu K, Senju Y, Mori MX, Kiyonaka S, Kohda D, \*Kitao A, \*Mori Y, \*Suetsugu S. TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P<sub>2</sub>. *Nature Commun.* 5, 4994, 2015.
- <計画研究 A01・井上班>
- 1) ▲Endo H, \*Inoue M. Dormancy in cancer. *Cancer Sci.* 110, 474-480, 2019.
  - 2) Satoh K, Yachida S, Sugimoto M, Oshima M, Nakagawa T, Akamoto S, Tabata S, Saitoh K, Kato K, Sato S, Igarashi K, Aizawa Y, Kajino-Sakamoto R, Kojima Y, Fujishita T, Enomoto A, Hirayama A, Ishikawa T, Taketo MM, Kushida Y, Haba R, Okano K, Tomita M, Suzuki Y, Fukuda S, Aoki M, \*Soga T. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7697-E7706, 2017.
  - 3) ▲Goodwin J, Neugent ML, Lee SY, Choe JH, Choi H, Jenkins DMR, Ruthenberg RJ, Robinson MW, Jeong JY, Wake M, Abe H, Takeda N, Endo H, Inoue M, Xuan Z, Chen M, Ahn JM, Minna JD, Helke KL, Singh PK, Shackelford DB, Kim JW. Distinct Metabolic Phenotypes within Non-small Cell Lung Cancer Define Selective Vulnerability to Glycolytic Inhibition of Lung Squamous Cell Carcinoma. *Nature Commun.* 8, 15503, 2017.
  - 4) ▲Endo H, Okami J, Okuyama H, Nishizawa Y, Imamura F, \*Inoue M. The induction of MIG6 under hypoxic conditions is critical for dormancy in primary cultured lung cancer cells with activating EGFR mutations. *Oncogene* 36, 2824-2834, 2017.
  - 5) ◎Kurokawa H, Ito H, Inoue M, Tabata K, Sato Y, Yamagata K, Kizaka-Kondoh S, Kadonosono T, Yano S, Inoue M, \*Kamachi T. High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime. *Sci. Rep.* 5, 10657, 2015.
  - 6) Yoshida T, Okuyama H, Nakayama M, Endo H, Nonomura N, Nishimura K, \*Inoue M. High-dose chemotherapeutics of intravesical chemotherapy rapidly induce mitochondrial dysfunction in bladder cancer-derived spheroids. *Cancer sci.* 106, 69-77, 2015.
- <計画研究 A01・三浦班>
- 1) ▲Tanaka S, Sugiura Y, Saito H, Sugahara M, Higashijima Y, Yamaguchi J, Inagi R, Suematsu M, Nangaku M, Tanaka T. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition Normalizes Glucose Metabolism and Suppresses Oxidative Stress in Diabetic Kidneys. *Kidney Int.* 94, 912-925, 2018.
  - 2) ◎▲Oyaizu-Toramaru T, Suhara T, Hayakawa N, Nakamura T, Kubo A, Minamishima S, Yamaguchi K, Hishiki T, Morisaki H, Suematsu M, \*Minamishima YA. Targeting oxygen sensing prolyl hydroxylase (PHD) for metformin-associated lactic acidosis treatment. *Mol. Cell Biol.* 37, e00248-17, 2017.
  - 3) ▲Miyawaki S, Kawamura Y, Oiwa Y, Shimizu A, Hachiya T, Bono H, Koya I, Okada Y, Kimura T, Tsuchiya Y, Suzuki S, Onishi N, Kuzumaki N, Matsuzaki Y, Narita M, Ikeda E, Okanoya K, Seino K, Saya H, \*Okano H, \*Miura K. Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats. *Nature Commun.* 7, 11471, 2016.
  - 4) ◎▲Suhara T, Hishiki T, Kasahara M, Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A, Morisaki H, \*Kaelin WG Jr, \*Suematsu M, \*Minamishima YA. Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 11642-11647, 2015.
  - 5) ◎\*Kunisawa, Sugiura Y (co-first author), Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H. Mode of Bioenergetic Metabolism during B Cell Differentiation in the Intestine Determines the Distinct Requirement for Vitamin B1. *Cell Rep.* 13, 122-131, 2015.
- <公募研究 A01>
- 1) Nonaka A, Yamamoto H, Kamiya N, Kotani H, Yamakawa H, Tsujimoto R, \*Fujita Y. Accessory proteins of the nitrogenase assembly, NifW, NifX/NafY, and NifZ, are essential for diastrophic growth in the nonheterocystous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Front. Microbiol.* 10, 495, 2019.
  - 2) Shinozaki Y, Yokota S, Miwakeichi F, Pokorski M, Aoyama R, Fukuda K, Yoshida H, Toyama Y, Nakamura M, Okada Y. Structural and functional identification of two distinct inspiratory neuronal populations at the level of the phrenic nucleus in the rat cervical spinal cord. *Brain Struct. Funct.* 224, 57-72, 2019.
  - 3) Yonashiro R, Eguchi K, Wake M, Takeda N, \*Nakayama K. Pyruvate dehydrogenase PDH-E1β controls tumor progression by altering the metabolic status of cancer cells. *Cancer Res.* 78, 1592-1603, 2018.
  - 4) Osamura T, Kawakami T, Kido R, Ishii M, \*Arai H. Specific expression and function of the A-type cytochrome c oxidase under starvation conditions in *Pseudomonas aeruginosa* *PLoS ONE* 112, e0177957, 2017.
  - 5) ▲Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, Goshima N, Mori M, Kawamura Y, Ogawa K, Fukuda E, Nakatsumi H, Natsume T, Fukui K, Horimoto K, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, \*Nakayama KI. A large-scale targeted proteomics assay resource based on an *in vitro* human proteome. *Nature Methods* 14, 251-258, 2017.
  - 6) Hirai T, Osamura T, Ishii M, \*Arai H. Expression of multiple *ccb<sub>3</sub>* cytochrome c oxidase isoforms by combinations of multiple isosubunits in *Pseudomonas aeruginosa* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12815-12819, 2016.
  - 7) \*Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H, \*Ishii M, Dnmt3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosyl methionine-producing metabolic pathway. *Nature Medicine* 21, 281-7, 2015.
  - 8) Kikuchi D, Minamishima YA, \*Nakayama K. Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1β and

regulates the cellular PDH activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 288-294, 2014.

<計画研究 A02・三木班>

- 1) Yamazaki D, Hasegawa A, Funato Y, Tran HN, Mori MX, Mori Y, Sato T, \*Miki H. Cnm4 deficiency suppresses  $Ca^{2+}$  signaling and promotes cell proliferation in the colon epithelia. *Oncogene* in press
- 2) Funato Y, Furutani K, Kurachi Y, \*Miki H. CrossTalk proposal: CNNM proteins are  $Na^+ /Mg^{2+}$  exchangers playing a central role in transepithelial  $Mg^{2+}$  (re)absorption. *J. Physiol.* 596, 743-746, 2018.
- 3) Gulerez I, Funato Y. (co-first author), Wu H, Yang M, Kozlov G, \*Miki H, \*Gehring K. Phosphocysteine in the PRL-CNNM pathway mediates magnesium homeostasis. *EMBO Rep.* 17, 1890-1900, 2016.
- 4) Ishii T, \*Funato Y, Hashizume O, Yamazaki D, Hirata Y, Nishiwaki K, Kono N, Arai H, \*Miki H.  $Mg^{2+}$  Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 12, e1006276, 2016.
- 5) Hattori K, Naguro I, Okabe K, Funatsu T, Furutani S, Takeda K, \*Ichijo H. ASK1 signalling regulates brown and beige adipocyte function. *Nature Commun.* 7, 11158, 2016.
- 6) Funato Y, Yamazaki D, Mizukami S, Du L, Kikuchi K, \*Miki H. Membrane protein CNNM4-dependent  $Mg^{2+}$  efflux suppresses tumor progression. *J. Clin. Invest.* 124, 5398-5410, 2014.

<計画研究 A02・赤池班>

- 1) Rudyk O, Rowan A, Pryszazhna O, Krasemann S, Hartmann K, Zhang M, Shah MA, Ruppert C, Weiss A, Schermuly RT, Ida T, Akaike T, Zhao L, \*Eaton P. Oxidation of PKG $\alpha$  mediates an endogenous adaptation to pulmonary hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* in press
- 2) Fukuto JM, \*Ignarro LJ, Nagy P, Wink DA, Kevil CG, Feelisch M, Cortese-Krott MM, Bianco CL, Kumagai Y, Hobbs AJ, Lin J, Ida T, \*Akaike T. Biological hydropersulfides and related polysulfides - a new concept and perspective in redox biology. *FEBS Letters* 592, 2140-2152, 2018.
- 3) © \*Akaike T, Ida T, Wei F-Y, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujii S, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto JM, Motohashi H. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nature Commun.* 8, 1177, 2017.
- 4) Nakato R, Ohkubo Y, Konishi A, Shibata M, Kaneko Y, Iwawaki T, Nakamura T, Lipton SA, \*Uehara T. Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* 5, 14812, 2015.
- 5) Chen W, Rosser EW, Matsunaga T, Pacheco A, Akaike T, \*Xian M. The development of fluorescent probes for visualizing intracellular hydrogen polysulfides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 13961-13965, 2015.
- 6) Honda K, Yamada N, Yoshida R, Ihara H, Sawa T, Akaike T, \*Iwai S. 8-Mercapto-cyclic GMP mediates hydrogen sulfide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 56, 1481-1489, 2015.
- 7) Okuda K, Ito A, \*Uehara T. Regulation of Histone Deacetylase 6 Activity via S-Nitrosylation. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1434-1437, 2015.
- 8) Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, \*Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 7606-7611, 2014.
- 9) Kaya H, Nakajima R, Iwano M, Kanaoka MM, Kimura S, Takeda S, Kawarazaki T, Senzaki E, Hamamura Y, Higashiyama T, Takayama S, Abe M, \*Kuchitsu K.  $Ca^{2+}$ -activated ROS production by Arabidopsis RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell* 26, 1069-1080, 2014.

<計画研究 A02・住本班>

- 1) \*Sumimoto H, Minakami R, Miyano K. Soluble regulatory proteins for activation of NOX family NADPH oxidases. *Methods Mol. Biol.* in press
- 2) Kiyohara T, Miyano K, Kamakura S, Hayase J, Chishiki K, Kohda A, \*Sumimoto H. Differential cell surface recruitment of the superoxide producing NADPH oxidases Nox1, Nox2, and Nox5: the role of the small GTPase Sar1. *Genes Cells* 23, 480-493, 2018.
- 3) Kohda A, Yamazaki S, \*Sumimoto H. The nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$  forms a transcriptionally active complex with nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p50 and *Lcn2* promoter via the N- and C-terminal ankyrin repeat motifs. *J. Biol. Chem.* 291, 20739-20752, 2016.
- 4) Yoshikawa Y, Nasuno R, Kawahara N, Nishimura A, Watanabe D, \*Takagi H. Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide* 57, 85-91, 2016.
- 5) Atsuti RI, Watanabe D, \*Takagi H. Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric Oxide* 52, 29-40, 2016.
- 6) Funahashi E, Saiki K, Honda K, Sugiura Y, Kawano Y, \*Ohtsu I, Watanabe D, Wakabayashi Y, Abe T, Nakanishi T, Suematsu M, Takagi H. Finding of thiosulfate pathway for synthesis of organic sulfur compounds in *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of ethanol production. *J. Biosci. Bioeng.* 120, 666-669, 2015.
- 7) Yuzawa S, Kamakura S, Hayase J, \*Sumimoto H. Structural basis of cofactor-mediated stabilization and substrate recognition of the  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase  $\alpha$ TAT1. *Biochem. J.* 467, 103-113, 2015.
- 8) Yamazaki S, Akira S, \*Sumimoto H. Glucocorticoid augments lipopolysaccharide-induced activation of the I $\kappa$ B $\zeta$ -dependent genes encoding the anti-microbial glycoproteins lipocalin 2 and pentraxin 3. *J. Biochem.* 157, 399-410, 2015.
- 9) Matono R, Miyano K, Kiyohara T, \*Sumimoto H. Arachidonic acid induces direct interaction of the p67<sup>phox</sup>-Rac complex with the phagocyte oxidase Nox2, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.* 289, 24874-24884, 2014.
- 10) Abo M, Minakami R, Miyano K, Kamiya M, Nagano T, Urano Y, \*Sumimoto H. Visualization of phagosomal hydrogen peroxide production by a novel fluorescent probe that is localized via SNAP-tag labeling. *Anal. Chem.* 86, 5983-5990, 2014.
- 11) Watanabe M, Terasawa M, Miyano K, Yanagihara T, Urano T, Sanematsu F, Nishikimi A, Côté J-F, Sumimoto H, \*Fukui, Y. DOCK2 and DOCK5 act additively in neutrophils to regulate chemotaxis, superoxide production and extracellular trap formation. *J. Immunol.* 193, 5560-5567, 2014.
- 12) Miyano K, \*Sumimoto H. N-linked glycosylation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 1060-1065, 2014.
- 13) Nasuno R, Aitoku M, Manago Y, Nishimura A, Sasano Y, \*Takagi H. Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1. *PLoS One* 9, e113788, 2014.

<計画研究 A02・伊東班>

- 1) Kasai S, Mimura J, Ozaki T, \*Itoh K. Emerging regulatory role of Nrf2 in iron, heme and hemoglobin metabolism in physiology and disease. *Front. Vet. Sci.* 5, 242, 2018.
- 2) Koizumi S, Hamazaki J, \*Murata S. Transcriptional regulation of the 26S proteasome by Nrf1. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 94, 325-336, 2018.
- 3) \*Suzuki T, Seki S, Hiramoto K, Naganuma E, Kobayashi HE, Yamaoka A, Baird L, Takahashi N, Sato H, \*Yamamoto M. Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. *Nature Commun.* 8, 14577, 2017.
- 4) Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi HE, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Fujimura T, Aiba S, Nakayama K, Okuyama R, \*Yamamoto M. The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of neurotrophic factor Artemin. *Nature Immunol.* 18, 64-73, 2017.

- 5) Uddin MM, Ohigashi I, Motosugi R, Nakayama T, Sakata M, Hamazaki J, Nishito Y, Rode I, Tanaka K, Takemoto T, \*Murata S, \*Takahama Y. Foxn1-β5t transcriptional axis controls CD8+ T-cell production in the thymus. *Nature Commun.* 8, 14419, 2017.
- 6) ◎▲\*Kobayashi HE, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, and \*Yamamoto M. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Commun.* 7, 11624, 2016.
- 7) Koizumi S, Irie T, Hirayama S, Sakurai Y, Yashiroda H, Naguro I, Ichijo H, Hamazaki J, \*Murata S. The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. *Elife* 5, e18357, 2016.
- 8) ▲Saito R, \*Suzuki T (co-first author), Hiramoto K, Asami S, Naganuma E, Suda H, Iso T, Yamamoto H, Morita M, Baird L, Furusawa Y, Negishi T, Ichinose M, \*Yamamoto M. Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 36, 271-284, 2016.
- 9) Ye P, \*Mimura J, Okada T, Sato H, Liu T, Maruyama A, Ohyama C, Itoh K. Nrf2- and ATF4-dependent upregulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition. *Mol. Cell. Biol.* 34, 3421-3434, 2014.
- <計画研究 A02・内田班>
- 1) ◎▲\*Ihara H, Kakihana Y, Yamakage A, Kai K, Shibata T, Nishida M, Yamada, K, \*Uchida K. 2-Oxo-histidine-containing dipeptides are functional oxidation products. *J Biol Chem.* 294, 1279-1289, 2019.
- 2) ◎▲Nakashima F, Shibata T, Kamiya K, Yoshitake J, Kikuchi R, Matsushita T, Ishii I, Giménez-Bastida JA, Schneider C, \*Uchida K. Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins. *Sci. Rep.* 8, 932, 2018.
- 3) ◎▲Nishimura A, Shimauchi T, Tanaka T, Shimoda K, Toyama T, Kitajima N, Ishikawa T, Shindo N, Numaga-Tomita T, Yasuda S, Sato Y, Kuwahara K, Kumagai Y, Akaike T, Ide T, Ojida A, Mori Y, \*Nishida M. Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence. *Science Signal*, 11, eaat5185, 2018.
- 4) ◎▲Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Ito T, Nishimura A, Matsukane R, Oda S, Hoka S, Ide T, Koitabashi N, Uchida K, Sumimoto H, Mori Y, \*Nishida M. TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy. *JCI Insight.* 2, pii: 93358, 2017.
- 5) Hatasa Y, Chikazawa M, Furuhashi M, Nakashima F, Shibata T, Kondo T, Akagawa M, Hamagami H, Tanaka H, Tachibana H, \*Uchida K. Oxidative Deamination of Serum Albumins by (-)-Epigallocatechin-3-O-Gallate: A Potential Mechanism for the Formation of Innate Antigens by Antioxidants. *PLoS ONE.* 11, e0153002, 2016.
- 6) ▲\*Akagawa M, Minematsu K, Shibata T, Kondo T, Ishii T, \*Uchida K. Identification of lactate dehydrogenase as a mammalian pyrroloquinoline quinone (PQQ)-binding protein. *Sci. Rep.* 6, 26723, 2016.
- 7) ◎▲Kitajima N, Numaga-Tomita T, Watanabe M, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, \*Nishida M. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Sci. Rep.* 6, 37001, 2016.
- 8) ◎▲Shibata T, Takahashi K, Matsubara Y, Inuzuka E, Nakashima F, Takahashi N, Kozai D, Mori Y, \*Uchida K. Identification of a prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite as a neuritogenesis enhancer targeting the TRPV1 ion channel. *Sci. Rep.* 6, 21261, 2016.
- 9) ▲Nishimura A, Sunggip C, Tozaki-Saitoh H, Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Hirano K, Ide T, Boeynaems JM, Kurose H, Tsuda M, Robaye B, Inoue K, \*Nishida M. The purinergic P2Y6 receptor heterodimerizes with the angiotensin AT1 receptor to promote angiotensin II-induced hypertension. *Sci. Signal.* 9, ra7, 2016.
- <公募研究 A02>
- 1) Abiko Y, Nakai Y, Luong NC, Bianco CL, Fukuto JM, Kumagai Y. Interaction of quinone-related electron acceptors with hydropersulfide Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: Evidence for one-electron reduction reaction. *Chemical Research in Toxicology* in press
- 2) ▲Toda T, Yamamoto S, Umehara N, Mori Y, Wakamori M, \*Shimizu S. Protective effects of duloxetine against cerebral ischemia-reperfusion injury via Transient Receptor Potential Melastatin 2 Inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 368, 246-254, 2019.
- 3) Imamura K, \*Yoshitane H, Hattori K, Yamaguchi M, Yoshida K, Okubo T, Naguro I, Ichijo H, \*Fukada Y. ASK family kinases mediate cellular stress and redox signaling to circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 3646-3651, 2018.
- 4) \*Yamamura H, Kawasaki K, Inagaki S, Suzuki Y, Imaizumi Y. Local Ca<sup>2+</sup> coupling between mitochondria and sarcoplasmic reticulum following depolarization in guinea pig urinary bladder smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 314, C88-C98, 2018.
- 5) Hirata Y, Katagiri K, Nagaoka K, Morishita T, Kudoh Y, Hatta T, Naguro I, Kano K, Udagawa T, Natsume T, Aoki J, Inada T, Noguchi T, Ichijo H, \*Matsuzawa A. TRIM48 promotes ASK1 activation and cell death through ubiquitination-dependent degradation of the ASK1 negative regulator PRMT1. *Cell Rep.* 21, 2447-2457, 2017.
- 6) Terajima H, \*Yoshitane H (Co-correspondence), Ozaki H, Suzuki Y, Shimba S, Kuroda S, Iwasaki W, \*Fukada Y. ADARB1 catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm. *Nature Genetics* 49, 146-151, 2017.
- 7) Yamaguchi T, Yoshioka M, Fukazawa A, Mori H, Nishizawa NK, Tsutsumi N, Yoshioka H, Nakazono M. An NADPH oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. *Plant Cell* 29, 775-790, 2017.
- 8) Shimizu T, \*Masuda S. Characterization of redox-active cysteine residues of persulfide-responsive transcriptional repressor SqrR. *Commun. Integr. Biol.* 10, e1329786, 2017.
- 9) Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura H, Asai K, \*Imaizumi Y. Hypoxic stress up-regulates Kir2.1 expression and facilitates cell proliferation in brain capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476, 386-392, 2016.
- 10) Yonezawa R, Yamamoto S, Takenaka M, Kage Y, Negoro T, Toda T, Ohbayashi M, Numata T, Nakano Y, Yamamoto T, Mori Y, Ishii M, \*Shimizu S. TRPM2 channels in alveolar epithelial cells mediate bleomycin-induced lung inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 90, 101-113, 2016.
- 11) Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Yoshioka M, Katou Y, Yaeno T, Shirasu K, Yoshioka H. WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 27, 2645-2663, 2015.
- 12) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I, Fukuto JM, Akaike T, \*Kumagai Y. Involvement of reactive persulfides in biological bismethylmercury sulfide formation. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1301-1306, 2015.
- 13) Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Yoshioka M, Katou Y, Yaeno T, Shirasu K, \*Yoshioka H. WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 27, 2645-2663, 2015.
- <計画研究 A03・浦野班>
- 1) Ieda N, Oka Y, Yoshihara T, Tobita S, Sasamori T, Kawaguchi M, \*Nakagawa H. Structure-efficiency relationship of photoinduced electron transfer-triggered nitric oxide releasers. *Sci. Rep.* 9, 1430, 2019.
- 2) Lukina M, Orlova A, Shirmanova M, Shirokov D, Pavlikov A, Neubauer A, Studier H, Becker W, Zagaynova E, Yoshihara T, Tobita S, \*Shcheslavskiy V. Interrogation of metabolic and oxygen states of tumors with fiber-based luminescence lifetime spectroscopy. *Opt. Lett.*, 42, 731-734, 2017.
- 3) \*Tobita S, Yoshihara T. Intracellular and *in vivo* oxygen sensing using phosphorescent iridium(III) complexes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 33, 39-45, 2016.
- 4) Kitamura K, Kawaguchi M, Ieda N, Miyata N, \*Nakagawa H. Visible Light-Controlled Nitric Oxide Release from Hindered Nitrobenzene Derivatives for Specific Modulation of Mitochondrial Dynamics. *ACS Chem. Biol.* 11, 1271-1278, 2016.
- 5) Yoshihara T, Murayama S, \*Tobita S. Ratiometric molecular probes based on dual emission of a blue fluorescent coumarin and a red phosphorescent cationic iridium(III) complex for intracellular oxygen sensing. *Sensors* 15, 13503-13521, 2015.
- 6) ▲Kojima R, Takakura H, Kamiya M, Kobayashi E, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Hanaoka K, Nagano T, \*Urano Y. Development of a Sensitive Bioluminescent Probe for Imaging Highly Reactive Oxygen Species in Living Rats. *Angew. Chem.*

Int. Ed. 54, 14768-14771, 2015.

- 7) ▲Asanuma D, Sakabe M, Kamiya M, Yamamoto K, Hiratake J, Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Nagano T, Kobayashi H, \*Urano Y. Sensitive  $\beta$ -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours *in vivo*. *Nature Commun.* 6, 6463, 2015.
- 8) ▲Takakura H, Kojima R, Kamiya M, Kobayashi E, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Hanaoka K, Nagano T, \*Urano Y. New Class of Bioluminescent Probe Based on Bioluminescent Enzyme-Induced Electron Transfer: BioLeT. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 4010-4013, 2015.
- 9) ▲Ieda N, Hishikawa K, Eto K, Kitamura K, Kawaguchi M, Suzuki T, Fukuhara K, Miyata N, Furuta T, Nabekura J, \*Nakagawa H. A double bond-conjugated dimethylnitrobenzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 3172-3175, 2015.
- 10) ◎▲Hirakawa Y, Yoshihara T, Kamiya M, Mimura I, Fujikura D, Masuda T, Kikuchi R, Takahashi I, Urano Y, Tobita S, \*Nangaku M. Quantitating intracellular oxygen tension *in vivo* by phosphorescence lifetime measurement. *Sci. Rep.* 5, 17838, 2014.

#### <公募研究 A03>

- 1) Hara D, Umehara Y, Son A, Asahi W, Misu S, Kurihara R, \*Kondo T, \*Tanabe K. Tracking the oxygen status in the cell nucleus with a Hoechst-tagged phosphorescent ruthenium complex. *Chem. Bio. Chem.* 19, 956-962, 2018.
- 2) Yoshida T, Kakizuka A, \*Imamura H, BTeam, a Novel BRET-based Biosensor for the Accurate Quantification of ATP Concentration within Living Cells. *Sci. Rep.* 6, 39618 2016.
- 3) Hidaka M, Gotoh A, Shimizu T, Minamisawa K, Imamura H, \*Uchida T. Visualization of  $\text{NO}^3/\text{NO}^2$  dynamics in living cells by fluorescence resonance energy transfer (FRET) imaging employing a rhizobial two-component regulatory system. *J. Biol. Chem.* 291, 2260-2269, 2016.
- 4) ▲Yamada H, Hasegawa Y, Suzuki Y, Imai H, Matsuda T, Kimura Y, Toshimitsu A, \*Aoyama Y, \*Kondo T. Magnetic resonance imaging of tumor with a self-traceable polymer conjugated with an antibody fragment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 2675-2678, 2015.

#### 2. Web、マスメディア、公開行事等による情報発信

##### <マスメディアによる情報発信(代表例のみ示す:情報発信全 166 件)>

- 1) 山本雅之, 新聞掲載「妊娠高血圧症候群における酸化ストレスの意外な役割」東京新聞, 河北新報, 仙台経済界, The Scientist, BIOWORLD Today ほか 2017.5.16
- 2) 山本雅之, 新聞掲載「酸化ストレスが腎臓病の原因」ミヤテレニュース, 日刊工業新聞ほか 2016.10.26
- 3) 近藤輝幸, 新聞掲載「医療機器 痛くない 患者の負担軽く、受診促す」日本経済新聞 2016.5.23
- 4) 西田基弘, 新聞掲載「加齢で血圧が高まるしくみ、マウスで解明」朝日新聞等 2016.1.21
- 5) 森泰生, テレビ出演「日本テレビ世界で一番受けたい授業」放映 2015.9.26
- 6) 山本雅之, 新聞掲載「鎌状赤血球症疾患に光 治療薬候補を発見」日刊工業新聞ほか 2015.9.15
- 7) 森泰生, 新聞掲載「細胞内温度の不均一性めぐり論争がホットに」科学新聞 2015.9.12
- 8) 朽津和幸, 新聞掲載「イネ葉緑体の再利用過程を解明」日経産業新聞など 2015.4.16
- 9) 三浦恭子, 雑誌掲載「日本を突破する 100 人」, AERA, 2014.12.22 発売
- 10) 三浦恭子, 新聞掲載「ハダカデバネズミの老化耐性・癌化耐性研究」中日新聞・東京新聞 2014.9.14

##### <アウトリーチ活動(代表例のみ示す:アウトリーチ活動全 172 件)>

- 1) 鈴木教郎, 山本雅之, NHK スペシャル「人体」制作協力(2018 年 国際版、国内版)および関連書籍(2018 年 東京書籍)
- 2) 鈴木教郎, E テレ バビブベボディ「血液」制作協力(2018 年)
- 3) 朽津和幸, 公開実験講座(東京理科大学サイエンス夢工房):12 回 18 日(2014.8.7-8; 2014.11.22-23; 2015.8.8; 2015.10.25; 2015.11.21-22; 2016.8.8; 2016.11.19-20; 2017.8.10; 2017.11.18-19; 2018.4.22; 2018.8.11; 2018.11.24-25)
- 4) 朽津和幸, JST グローバルサイエンスキャンパス(高校生向講義・実験):3 回(2015.11.8; 2016.11.13; 2017.11.5)
- 5) 三浦恭子, 飼育員カフェ(円山動物園)「ハダカデバネズミ」2016.2.11
- 6) 森泰生, 24 回「地球環境フォーラム市民公開講演「動物にとっての酸素が持つ存外に微妙な意味」2016.2.6
- 7) 森泰生, 京都大学 ELCA S 基盤コース模擬講義「生命体と酸素の存外に微妙な関係」2015.10.17
- 8) 三木裕明, 大阪府立高津高等学校進路講演会「がんの悪性化:集団の中での細胞の振る舞い」2015.10.8
- 9) 朽津和幸, 東京理科大学親子科学教室(市民向実験・観察講座):2015.7.24-26
- 10) 朽津和幸, 埼玉県立春日部高校スーパーサイエンスハイスクールプログラム:2014.6.10

##### <本領域が主催・共催した研究会・シンポジウム等(代表例のみ示す:研究会・シンポジウム等全 22 件)>

- 1) 第 59 回日本植物生理学会年会シンポジウム「Multiple roles of ROS-generating enzymes, MpRbohA and MpRbohB, in growth, development and stress responses in *Marchantia polymorpha*. International Symposium on Stories of Oxygen and Active Molecular Species in Photosynthetic Organisms」2019.3.13-15
- 2) 第 41 回日本分子生物学会年会ワークショップ「酸素生物学のテクニカルシンギュラリティー ～*in vivo* で酸素を見て、働きを知る新たなアプローチ～」2018.11.28
- 3) 第 91 回日本生化学会大会シンポジウム「活性酸素シグナルの破綻と老化・疾患」2018.9.24-26
- 4) 第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議(WCP2018)サテライトシンポジウム「Regulating cell homeostasis: from small molecules (drugs,  $\text{O}_2$ , ROS, and NO) to ion channels, receptors, and systems」2018.7.7-8
- 5) 第 59 回日本植物生理学会年会シンポジウム「Stories of Oxygen and Active Molecular Species in Photosynthetic Organisms」2018.3.29
- 6) 第 39 回日本分子生物学会年会「低酸素バイオロジーの最前線 ―その分子機構から疾患まで―」2016.11.30
- 7) 第 89 回日本生化学会大会(仙台国際センター)2016.9.25-27
- 8) 日本薬学会フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジーシンポジウム「生体防御・ストレス応答研究の新展開」2016.9.10-11
- 9) 2016 年度日本農芸化学会大会「酸素微生物学 ～微生物に学ぶ「酸素リモデリング」とその応用～」2016.3.28
- 10) 日本農芸化学会 2016 年度大会「酸素微生物学 ～微生物に学ぶ「酸素リモデリング」とその応用～」2016.3.29
- 11) シンポジウム「活性イオン分子種の化学と生体機能の解明に向けて」2016.1.23
- 12) BMB2015「NADPH oxidase による活性酸素種の積極的生成と動物・植物・菌類の高次生命機能」2015.12.2
- 13) 国際シンポジウム「An International Symposium on Oxygen Biology」2015.7.26
- 14) 国際研究会「The 3rd Conference of the Japanese Association for Hypoxia Biology」2015.7.25
- 15) 第 15 回日本蛋白質科学年會「酸素リモデリング・レドックスシグナルとタンパク質修飾の新たな潮流」2015.6.25
- 16) 研究会「第 13 回がんとハイポキシア研究会」2015.6.5-6
- 17) 技術支援セミナー「第二回新学術領域技術セミナー」2015.4.30
- 18) 第 88 回日本薬理学会年会シンポジウム「心血管カチオンチャネル研究の最前線」2015.3.19
- 19) 第 88 回日本薬理学会年会サテライトシンポジウム「イオンチャネルの分子多様性とその高次機能制御」2015.3.18
- 20) 国際シンポジウム「Ion channels, transporters, and small molecules as key regulators of homeostatic systems」2015.3.17
- 21) シンポジウム「レドックスシンポジウム:酸素生物学の誕生」2014.10.11

## 7. 研究組織（公募研究を含む。）と各研究項目の連携状況（2 ページ以内）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、総括班研究課題の活動状況も含め、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

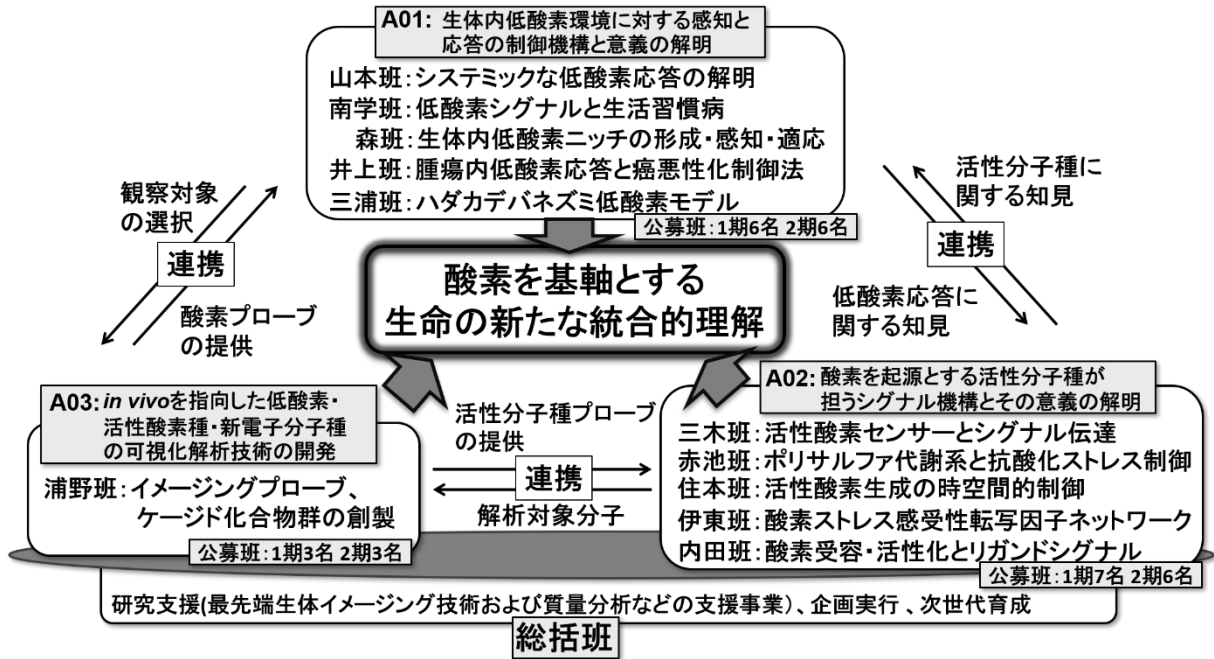


図4. 研究計画の概要

本領域においては、研究対象のユニークさを十分に考慮すると同時に、普遍性の高い酸素生物学の新概念確立をめざす戦略が必須となった。そのために、多彩な専門知識・技術と、異なる研究背景を有するトップランナー参画者が、領域の基本概念である酸素リモデリングに基づいた各研究項目の役割を十分に理解し、有機的連携に積極的に取り組んだ。即ち、生体内低酸素環境の果たす能動的役割を明らかにする **A01** 班は、まさに本領域の独創性に直結する位置づけである。また、機構の精密な考証に基づいて、ユニークな反応性を示す ROS・親電子分子種が果たすシグナル伝達における生理的役割を解明する **A02** 班には、酸素リモデリングの基盤を構築する役割がある。さらに生体内酸素環境を実証するために必須の技術的基盤の開発を担当する **A03** 班は、生体内 *in vivo* における高感度・選択的な酸素、ROS・親電子分子種の観察手法は限られている現状を打破するという認識の下、開発に取り組んだ。各計画代表はこのような研究項目独自の貢献をするだけでなく、項目間の連携(図 4)を担うことにより、領域が全体として機能するよう常に配慮してきた。

本領域では、積極的に領域内での研究の有機的な連携がなされ、合計 51 件の共同研究が行われている(図 5)。計画班同士の共同研究は 30 件あり、その内の約半数である 13 件が項目間の共同研究になっており、領域内の連携は順調に行われた。また、公募研究班と計画研究班の共同研究が 19 件行われた。特に、**A01** 班松本のヒドロキシ化プロテオーム解析などのプロテオーム技術、岡田の脳幹脊髄からの呼吸出力の *ex vivo* 測定技術、**A03** 班今村のタンパク質型蛍光プローブ技術は、計画班にはなかった技術であり、計画班と公募班の共同研究により領域研究の強化ができた。さらに、公募班同士の共同研究も 2 件あり、本領域を通じて新たな研究ネットワークが構築されつつある。

### 具体的な連携研究による成果の例

・ *in vivo* 末梢組織における酸素濃度の定量には、**A01** 班と **A03** 班の密接な連携が必須であった。飛田(浦野班分担)はイリジウム錯体

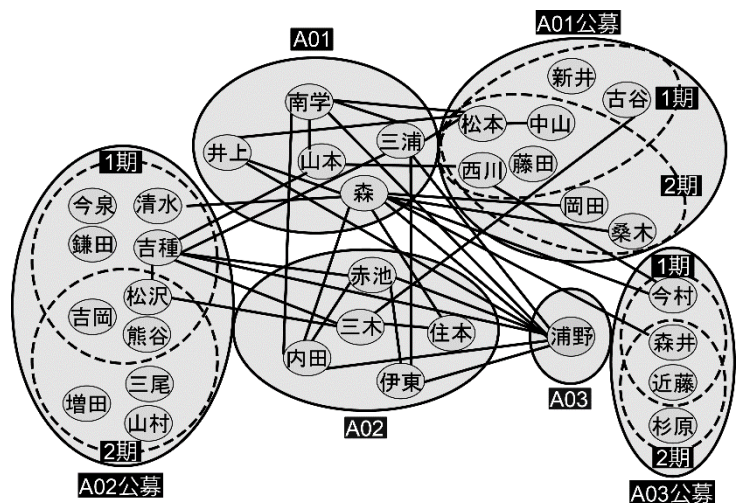


図5. 本領域の連携状況



BTP の補助配位子にジメチルアミノ基を導入し、カチオン化した BTPDM1 を合成し、細胞内取り込み能を約 20 倍に向上させ、りん光の減衰を解析することにより、**南学**との共同で腎組織中の酸素環境を定量的に(酸素分圧として)リアルタイムイメージングすることに成功した(Hirakawa, *Sci. Rep.*, 2015)。また、**森、飛田、井上、A01 公募班西川、森班**連携研究者**田久保**は、BTPDM1 のりん光の減衰を京都大学(森)に設置した多光子励起レーザー走査型顕微鏡による観察に展開し、マウス骨髄内、及び培養癌細胞塊内 CTOS における酸素濃度分布測定に成功した。我が国独自の手法は、生体内深部での絶対酸素濃度のイメージングを可能にし、末梢組織酸素環境(濃度)の *in vivo* 定量における規範となる技術である。

・**赤池班**は**山本、内田、西田、居原**(ともに**内田**班分担)、**A03 公募班熊谷**らと密に連携し、また、非常に活発な国際共同研究を展開し、大多数のタンパク質において、Cys 残基のスルフヒドリル基にイオウ多量体(polysulfide:  $S_n$ )が新生鎖合成時に付加されるという、ROS・親電子物質が担うシグナル伝達における最も重要な発見をすることができた。本機構は、Cys 残基のスルフヒドリル基の酸化或いは付加反応に可逆性を付与することから、「酸化されたタンパク質は分解される(構造維持上重要な生理的ジスルフィド形成を除き)」という、生化学上の先入観を一新する。本発見のさらなる生物学的意義付けにも **A02 班**と **A03 班**の密接な連携が重要であり、**浦野**は**赤池**とローダミン類、Si-ローダミン類への分子間、分子内求核付加を活用し、イオウ多量体を可逆的に検出する手法を開発した。

・非がん細胞におけるグルコース代謝は、酸素濃度の低下と共にグルコース酸化から解糖系へとシフトするが、その分子機構は明らかではなかった。**武田、合田**(ともに**南学**班分担)、**杉浦(三浦班)**は、グルコース代謝を酸素濃度の低下と共にグルコース酸化から解糖系へとシフトする分子機構を明らかにした(Semba, *Nat. Commun.*, 2016)。即ち、マクロファージ等においては、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が完全に機能する程度の低酸素環境(4-9% $O_2$ )でも、HIF-1 を介してピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDK1)がピルビン酸のミトコンドリアへの流入を阻害し、解糖系が亢進する現象「Active glycolysis」を発見した。本機構は、マクロファージが血管から末梢へと遊走する際に必須であり、血管から遠位のより低酸素の環境に細胞が備える酸素リモデリングを担うということができる。

・**森、桑木、岡田**の密接な共同研究によって初めて、哺乳動物の個体中に遍在する急性(acute)の低酸素応答が、神経性呼吸調節システムにおいてどのように統合されるかを解明することができた。即ち、末梢組織においては、酸素センサーTRPA1 チャンネルを介して迷走神経が高酸素と比較的穏やかな低酸素を、また、酸素受容器として知られてきた頸動脈脈小体が厳しい低酸素を感知し、呼吸回数を調節することを示した。また、アストロサイトにおいて、PHD ヒドロキシ化と NEDD4-1 E3 ligase ユビキチン化が誘導する細胞内在化から、低酸素環境(6-9% $O_2$ )が形質膜へとTRPA1を回復させると、TRPA1は $Ca^{2+}$ を流入させ、ATP放出を介して脳幹の呼吸中枢神経リズムを変化させ、呼吸を深くすることが分かった。

・**南学、山本**は、hRNA library スクリーニングにより、低酸素環境と炎症シグナルとを繋ぐ鍵転写因子CEBPdeltaを新たに同定した。CEBPdeltaはIL-1 $\beta$ などの炎症シグナルにより誘導され、HIF-1 $\alpha$ プロモーターに結合することで、その転写活性も増強していた。(Yamaguchi, *Kidney Int.*, 2015)。

・脂肪肝など生活習慣病の病態では慢性的な炎症プロセスが活性化していると考えられるが、エリスロポエチン産生を含む造血系への関わりについては明らかではなかった。**鈴木(山本班)**は**武田(南学班)**との連携により、HIF-2 $\alpha$  依存的なクロマチン構造変化が、肝臓におけるエリスロポエチン産生および脂肪肝の発症に重要であることを明らかにした(Tojo, *Mol. Cell Biol.*, 2015)。

・**住本**は**浦野**と共同で、細胞内コンパートメント毎に空間特異的に ROS を高感度で検出するための方法として、 $H_2O_2$ を特異的に高感度で検出可能な 5-(4-nitrobenzoyl)carbonylfluorescein を  $O^6$ -benzylguanine 化した蛍光試薬 NBzF-BG を開発した。PDGF 受容体の膜貫通領域と融合させた SNAP タグ(SNAP-PDGFR-TM)を発現させた好中球(Nox2 を高発現)を用いて、NBzF-BG を細胞膜特異的にラベル化し、好中球の食作用時の  $H_2O_2$  による  $H_2O_2$  生成を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出する測定系を確立し、好中球食作用時の  $H_2O_2$  生成を可視化することに成功した(Abo, *Anal. Chem.*, 2014)。

・**内田、森**は、TRPV1 チャンネルの Cys 残基への炎症関連親電子物質 15-Deoxy- $\Delta$ -<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>)の酸化的付加が、PC12 細胞の神経様突起伸長を促すことを示した(Shibata, *Sci. Rep.*, 2016)。

・**森、浦野、井上、三木、A03 公募班森井**が連携し、 $H_2O_2$  選択的なプローブ Peroxy Green を付加した抗HER2抗体を用いて、マウス個体内に形成させた担癌組織における  $H_2O_2$  環境をイメージングし、 $H_2O_2$  の組織内不均一分布を明らかにした。また、担癌組織中で  $H_2O_2$  に高暴露されると、抗酸化系の亢進、代謝のリプログラミング、細胞増殖を亢進する遺伝子群の発現上昇が起こり、悪性化につながる知見を得た。また、エネルギー代謝の好氣的なミトコンドリアから嫌氣的な解糖系へのスイッチングを定量的に観察できる、蛍光性の温度(熱産生)センサーtsGFPの有効性の理論的基盤の確立に成功した(Kiyonaka, *Nature Methods*, 2015)。

## 8. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む。）（1 ページ以内）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について記述してください（総括班における設備共用等への取組の状況を含む。）。

本領域は酸素環境や ROS シグナルを生体内の「実体」として示すことを目指しており、*in vivo* での酸素、ROS・親電子分子種の時空間性解析が枢要である。このために、領域全体の技術支援を総括班が拠点形成することにより強力に推進している。以下に、総括班での共通備品を示すと共に、使用状況を報告する。

### メタボローム・アダクトーム解析

・高速液体クロマトグラフ質量分析計・(株)島津製作所製 LCMS-8050・東北大学(赤池)

東北大学(赤池)では、新規なシグナル伝達メディエーターである活性イオウ分子(persulfide)やイオウ多量体等の精密分析拠点を形成している。多種多様なイオウ分子種の精密定量に不可欠な質量分析システムを導入し、領域内外の連携研究者の要望に応じて、ヒト、動物組織、培養細胞の活性イオウ分子・ポリチオール化合物のメタボローム解析、ならびにポリチオール化タンパク質のプロテオーム解析を随時行っている。具体的には、これまで、領域内から12名月平均3、4回、領域外から21名(内8名は海外)月平均2回、ポリスルフィド関連の測定依頼に対応した。この様に、領域内外から多くの依頼測定が行われており、効果的に使用されている。また、合計3回の技術支援セミナーを開催した。一方、アダクトーム解析の技術支援を行う内田も、上原(赤池班分担研究者)から依頼された小胞体ストレスに関連するタンパク質に対する解析を行っており、総括班の共通機器だけでなく、各計画班の備品や専門技術においても、効果的に利用されている。

### プローブ技術支援

・共焦点スキャナ・Molecular Device 社 X-Light-HS・名古屋市立大学(中川)

・高感度ハイブリッド GaAsP 検出器・独国ベッカーアンドヒックル社 HPM-100-40・群馬大学(飛田)

・ORCA-Flash4.0s CMOS カメラ・浜松ホトニクス C11578-22C・群馬大学(飛田)

・正立蛍光顕微鏡・独国ライカマイクロシステムズ社製 DM4000B・東京大学(浦野)

浦野(東京大学)、飛田(群馬大学)、中川(名古屋市立大学)が担当し、班員からの要望に応じて有機小分子を基盤とする蛍光・発光イメージングプローブ群およびケージド化合物群を開発する際に使用している。中川は、赤池からの依頼により、オルガネラ局在型イオウ多量体プローブを設計・合成し、共焦点スキャナを備えた蛍光顕微鏡により、培養細胞での新規蛍光プローブの機能を検証している。飛田は南学からの依頼測定において、腎尿細管細胞に飛田が開発した発光プローブを取り込ませ、ORCA-Flash4.0s CMOS カメラを装備した顕微鏡において観察した。さらに、南学との共同研究で、高感度ハイブリッド GaAsP 検出器を装備した顕微鏡により、腎臓表面の共焦点りん光寿命画像を測定し、腎臓表面の酸化状態を高空間分解能で撮影することに成功している。浦野は、南学との共同研究において、正立蛍光顕微鏡を用いることで、各種プローブの取り込みや局在の評価、組織切片の拡大蛍光画像を取得している。また、共通備品の他にも、遺伝子導入動物の作製を支援する山本は、赤池から依頼されているイオウ多量体代謝化に関与する酵素群の網羅的遺伝子改変マウスの作製支援を行っており、共通機器以外の技術支援の活用も効果的に行われている。

### 可視化測定技術支援

・多光子励起レーザ走査型顕微鏡・オリンパス株式会社 FVMPE-RS・京都大学

器官・組織レベルでの酸素・ROS・親電子分子種等の精密なリアルタイムイメージングの技術支援を目的とし、京都大学(森)多光子励起レーザ走査型顕微鏡設置した。可視化技術セミナーを平成28年8月3日に開催し、領域内には本顕微鏡の指導を行うとともに、領域外から多光子顕微鏡に関する秀でた業績を上げた研究者を招聘し、さらなるセットアップの最適化を行った。一方、森、飛田、公募班西川は連携して、本顕微鏡セットで BTPDM1 のりん光の減衰を解析することにより、空間分解能 1.5 $\mu$ m、時間分解能 10s で生体内深部(200 $\mu$ m)の絶対酸素濃度をイメージングできるセットアップを完成させた(今のところ日本で唯一)。それを用い、例えば、森、西川、田久保がマウス骨髄内における、井上が培養細胞塊内における酸素濃度分布測定に成功している。また、森、浦野、井上、三木、公募班森井が連携し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 選択的な有機小分子プローブ Peroxy Green を付加した抗 HER2 抗体を用いて、マウス個体内に形成させた担癌組織における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 環境をイメージングし、その組織内の不均一分布を明らかにした。また、担癌組織中で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に高暴露されると、抗酸化系の亢進、代謝のリプログラミング、細胞増殖を亢進する遺伝子群の発現上昇が起こり、悪性化につながるという知見を得た。中川も多光子顕微鏡に対応した光制御型 NO ドナーを開発し、血管拡張での有効性を示した。

・研究費の使用状況 ((1), (2), (3) を合わせて3 ページ以内)

(1) 主要な物品明細 (計画研究において購入した主要な物品 (設備・備品等。実績報告書の「主要な物品明細書」欄に記載したもの。) について、金額の大きい順に、枠内に収まる範囲で記載してください。)

年度	品名	仕様・性能等	数量	単価 (円)	金額 (円)	設置(使用)研究機関
26	多光子励起 レーザー走査 型顕微鏡	オリンパス株式会社 FVMPE-RS	1	42,670,800	42,670,800	京都大学
	高速液体ク ロマトグラフ 質量分析計	(株)島津製作所製 LCMS-8050	1	26,978,400	26,978,400	東北大学
	共焦点スキ ャナ	Molecular Device 社 X-Light-HS	1	8,970,000	8,970,000	名古屋市立大学
	高速液体ク ロマトグラフ イーシステム 一式	米国ウォーターズ社製	1	6,517,908	6,517,908	名古屋大学
	慢性実験テ レメトリー自 動計測シス テム 一式	データ取得・解析シス テム ART/Silver 等	1	4,945,482	4,945,482	大阪大学
	640nm レーザ 増設キット	2PMT 付 き (BD FACSJazz 用)	1	3,569,400	3,569,400	東北大学
27	高感度検出 器	オリンパス株式会社・ 冷却 GaAsP PMT 冷却検出器	1	5,605,200	5,605,200	京都大学
28	PLIM 用レ ーザー ON/OFF 制 御ユニッ ト	独国ベッカーアンドヒッ クル社製 AOM-100-1 型	1	11,206,080	11,206,080	京都大学
	共焦点ガル バノスキャナ ユニット	独国ベッカーアンドヒッ クル社製 DCS-120 型	1	7,527,600	7,527,600	京都大学
	時間相関単 一光子係数 測定ユニット	独国ベッカーアンドヒッ クル社製 SIMPLE-TAU-150-DX	1	4,957,200	4,957,200	京都大学
30	全自動ウェ スタンブロッ ティングシス テム	プロテインシンプル社・ Wes	1	6,154,920	6,154,920	京都大学

(2) 計画研究における支出のうち、旅費、人件費・謝金、その他の主要なものについて、年度ごと、費目別に、金額の大きい順に使途、金額、研究上必要な理由等を具体的に記述してください。

【平成26年度】

・旅費

1. 国際 HNE 学会(フランス・トゥールーズ)に参加(名古屋⇄トゥールーズの交通費、宿泊費)782,890 円  
A02 内田班

・人件費・謝金

1. 研究員の雇用 2,869,196 円 (ポリサルファに関する研究従事のため) A02 赤池班  
2. 研究員の雇用 2,060,466 円 (分子生物学的実験のため) A01 森班

・その他

1. 動物飼育費等 4,443,967 円 (遺伝子改変マウスを用いた個体レベル解析のため) A01 南学班  
2. DNA シークエンス外注 848,844 円 (遺伝子配列確認のため) A01 南学班  
3. マイクロアレイ委託解析 777,600 円 (遺伝子発現解析のため) A01 南学班

【平成27年度】

・旅費

1. 10<sup>th</sup> International Luebeck Conference に参加(ドイツ・リュューベック、オランダ・ロッテルダム)(仙台⇄ダブリンの交通費・宿泊費)834,815 円 A01 山本班  
2. keystoneSymposia/Hypoxia:From Basic Mechanisms to Therapeutics に参加(アイルランド・ダブリン)(大阪⇄ダブリンの交通費・宿泊費)225,730 円 A01 井上班  
3. The labex ICST general meeting of the labex ICS(フランス・モンペリエ)(京都⇄フランスの交通費、宿泊費)149,710 円 A01 森班

・人件費・謝金

1. 研究員の雇用 5,443,186 円 (ポリサルファに関する研究従事のため) A02 赤池班  
2. 研究員の雇用 4,145,064 円 (ハダカデバネズミの実験・解析のため) A01 三浦班  
3. 研究員の雇用 4,134,904 円 (分子生物学的実験のため) A01 森班

・その他

1. 動物飼育費等 2,748,037 円 (遺伝子改変マウスを用いた個体レベル解析のため) A01 南学班  
2. 高速シーケンス委託解析 1,425,600 円 (遺伝子発現解析のため) A01 井上班

【平成28年度】

・旅費

1. SFB 894 SYMPOSIUM Cutting edge concepts in Calcium signaling(ドイツ・ホンブルグ)(京都⇄ホンブルグの交通費、宿泊費)477,971 円 A01 森班  
2. The 3<sup>rd</sup> International Seminar on Science(インドネシア・ボゴール)(福岡⇄ボゴールの交通費、宿泊費)117,712 円 A02 住本班  
3. 1st International Conference on Hypoxia(韓国・仁川)(京都⇄仁川の交通費)63,630 円 A01 森班

・人件費・謝金

1. 研究員の雇用 12,508,115 円 (ポリサルファに関する研究従事のため) A02 赤池班  
2. 技術補佐員の雇用 4,390,857 円 (生化学的解析のため) A02 伊東班  
3. 研究員の雇用 4,256,349 円 (ハダカデバネズミの実験・解析のため) A01 三浦班

・その他

1. 動物飼育費等 2,376,000 円 (遺伝子改変マウスを用いた個体レベル解析のため) A01 南学班  
2. 質量分析計移設作業一式 2,356,884 円 (異動に伴う機器移設のため) A02 内田班  
3. マウス飼育管理費 2,061,450円 (遺伝子改変マウスを用いた個体レベル解析のため) A01 森班

【平成29年度】

・旅費

1. Better Cancer Therapy from Redox Biology(アメリカ・ボルティモア/ハンティントン)(仙台⇄ボルティモア/

- ハンティントン)の交通費・宿泊費)801,416円 A01 山本班
2. SfrB2017(米国・ボルチモア)に参加(東京⇄ボルチモアの交通費、宿泊費)660,968円 A02 内田班
  3. The International Union of Microbiological Societies 2017 Congress(シンガポール)(福岡⇄シンガポールの交通費、宿泊費)407,445円 A02 住本班
  4. The 6th International Ion Channel Conference(中国・青島)(京都⇄青島の交通費、宿泊費)144,530円 A01 森班

・人件費・謝金

1. 研究員の雇用 12,425,573円 (ポリサルファに関する研究従事のため) A02 赤池班
2. 研究補助員の雇用 7,581,029円 (マウスの遺伝子型判定・遺伝子発現解析・組織解析のため) A01 山本班
3. 研究員の雇用 6,071,128円 (分子生物学的実験・イメージング解析のため) A01 森班
4. 技術補佐員の雇用 4,453,092円 (生化学的解析のため) A02 伊東班
5. 特任助教の雇用 4,174,882円 (生化学的解析のため) A02 内田班

・その他

1. 動物飼育費等 5,434,481円 (遺伝子改変マウスを用いた個体レベル解析のため) A01 南学班
2. マウス凍結胚復帰 842,400円 (遺伝子改変マウスを用いた個体レベル解析のため) A01 森班
3. 平成29年度コラボスペース料に係る費用振替 (場所使用料のため) 819,000円 A01 山本班
4. 動物実験施設使用料 798,389円 (遺伝子改変マウスを用いた個体レベル解析のため) A01 山本班

【平成30年度】

・旅費

1. The Society for Industrial Microbiology and Biotechnology Annual Meeting(アメリカ・シカゴ)(福岡⇄シカゴの交通費、宿泊費)、739,020円 A02 住本班
2. 第27回国際光化学シンポジウム(アイルランド・ダブリン)に参加(前橋⇄ダブリンの交通費、宿泊費)412,200円 A03 浦野班

・人件費・謝金

1. 研究員の雇用 12,083,485円 (ポリサルファに関する研究従事のため) A02 赤池班
2. 研究補助員の雇用 8,413,021円 (マウスの遺伝子型判定・遺伝子発現解析・組織解析のため) A01 山本班
3. 研究員の雇用 6,244,305円 (分子生物学的実験・イメージング解析のため) A01 森班
4. 研究員の雇用 4,711,992円 (ハダカデバネズミの実験・解析のため) A01 三浦班

・その他

1. 動物飼育費等 3,921,994円 (遺伝子改変マウスを用いた個体レベル解析のため) A01 南学班
2. DNA マイクロアレイ委託解析 1,164,240円 (遺伝子発現解析のため) A01 井上班

(3) 最終年度(平成30年度)の研究費の繰越しを行った計画研究がある場合は、その内容を記述してください。

A02 三木班

本研究で取り組んでいる腎臓での血圧調節における  $Mg^{2+}$  調節の重要性を明らかにするために、腎臓特異的な TRPM6 欠損マウスを作成し、平成30年度にその血圧測定を行っていた。コントロール群と比較して血圧低下や日周変動の消失など顕著な表現型が観察されたが、全般的に血圧レベルが両群で高く、血圧測定条件をさらに検討して解析数を増やして再解析する必要がある。この実験は本研究の重要課題であるため、次年度に研究費を繰り越してその実験を実施している。

A02 内田班

グリコールアルデヒドはタンパク質を修飾しその抗原性を調節することが注目されてきた。平成30年11月、グリコールアルデヒド定量方法の検討過程で、当初想定していた検出方法では感度および特異性が低く、正しいグリコールアルデヒド濃度を測定することが困難であることがわかった。研究遂行上、高感度かつ特異的な検出・定量方法を確立した後、生体試料における定量解析をする必要がある。研究方式を見直し、誘導体化による検出方法を再検討する追加実験を行い、定量方法の確立を再度行う必要が生じた。

## 9. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1 ページ以内）

研究領域の研究成果が、当該学問分野や関連分野に与えたインパクトや波及効果などについて記述してください。

日本人研究者の貢献が顕著であった当該研究分野は、国際的に著しく競争的な状況の下大きく変化し拡大しつつあるため、研究者間連携が取りにくい分散の状況にあった。特に、低酸素応答と ROS の研究分野は、酸素を共通の基盤としつつも独立に成立したことから、連携がなかった。今回、本研究領域を共通の研究プラットフォームとして研究者が集結し、学術レベルの向上・強化と統合・再構築が可能になった。

当該分野におけるインパクトを与えた成果の一つが、i) 生体内 *in vivo* に多様な低酸素環境が成立し、それらに感知・応答して低酸素環境を積極的に利用する多彩な細胞群を示したことである。具体的には、遊走過程で酸素環境の変化がエネルギー代謝の変化を介して、機能に影響を受けるマクロファージ、異なった低酸素レベルを感知・モニターする酸素受容性アストロサイト、腎臓内の低酸素環境を利用し造血因子エリスロポエチンを産生する REP 細胞等を挙げることができる。また、組織内の酸素環境を定性的にでなく明確な数値として示すために、インタクテナ組織構築における ii) 酸素濃度の絶対定量法を開発した点も、本領域成果の重要なインパクトである。また、遺伝子転写が関与する緩徐期 (chronic phase) の低酸素応答と比較すると、酸素受容器・細胞が担う急性期 (acute phase) の低酸素応答における分子機構の理解は圧倒的に混乱状態にあったが、明確なセンシング責任分子群という iii) 確固とした分子基盤の上に、細胞・器官に特有の急性期の酸素受容機構を解明した点も重要な成果である。特に、緩徐期の低酸素応答を制御する転写因子 HIFs 以外にも、PHD が酸素を基質としてヒドロキシ化する分子群が存在し、急性期低酸素応答を調節することを示した。つまり、本領域は、多彩な PHD 作用分子の同定を通して、iv) 酸素受容細胞の遍在性の確立にも大きく貢献したといえる。

ROS、親電子物質、抗酸化タンパク質等が、作用選択性の低い環境因子としてでなく、酸素の下流で特定のシグナル伝達経路の調節因子として働くという、当該領域における新たな理解の確立にも、本領域研究は大きく貢献する。これに関する一連の成果の中で最も重要なのが、Cys 残基のスルフィドリル基に結合するイオウ多量体の発見である。驚くべきことに、このイオウ多量体は非常に多くのタンパク質に既に新生鎖の段階から連結している。また、タンパク質スルフィドリル基への ROS・活性窒素種や親電子物質の付加がイオウ多量体を介して起きると、その「脱」反応は直接的な付加に比べると圧倒的に容易になる。つまり、イオウ多量体は、活性種による Cys 残基の修飾反応に「可逆性」を与え、シグナル伝達の属性である v) オン-オフスイッチ機構をイオウ多量体は酸素シグナル経路に付与する。また、本領域の重要概念である酸素リモデリングにおける、正と負の制御経路を示唆する。

関連分野に与える影響は非常に大きい。そもそも酸素は生体外環境を設定する最も重要な因子の一つであり、生物個体が環境の変動にどう備え、対応するかを明らかにする a) 生体恒常性研究の諸課題と酸素生物学とは密接に関連する。実際に、例えば、鉄代謝系は赤血球分化・増殖を介して、また、腸や癌組織のマグネシウム吸収は Cys 含有抗酸化タンパク質様分子を介して酸素環境と密接に関連するというように、低酸素応答は金属イオン代謝と統合された恒常性システムとして維持されることを本領域は明確に示した。また、酸化・還元活性種はタンパク質品質の恒常性維持機構 (proteostasis) に必須である。一方、生体内組織中に形成される微小環境は、近年、ますますその生物学重要性が認識されているが、本領域成果はまさに b) 酸素レベルによって規定される微小環境の存在を強く示唆する (上 i) と関連)。具体的には、癌細胞の休眠状態、マクロファージの遊走、アストロサイトからのグリオトランスミッター放出等が酸素微小環境やその下流の ROS シグナルによって大きな影響を受けることを示した新知見は、免疫学、腫瘍生物学、神経生物学にインパクトを与える。また、本領域による低酸素環境に適応したハダカデバネズミを用いた c) 低酸素環境適応モデル動物の確立は、非常に広範な分野にインパクトを与える。つまり、ハダカデバネズミを用いれば、哺乳動物でみられる様々な生体応答の解明に低酸素環境から迫ることができる。実際に、ハダカデバネズミからの iPS 細胞の作成の研究から、腫瘍化耐性を担う重要な分子機構が明らかになってきている。

植物は圧倒的に多様な ROS・活性窒素種、親電子物質を産生するが、本領域はそれらが d) 植物における免疫、花粉管形成にはたす生理的役割を示した。植物由来の活性種や環境汚染親電子物質が動物に与える影響を調べる e) 生態学や環境学へのインパクトも大きい。また、*in vivo* でのイメージングは一般に難しく、未だ限定的であるが、本領域の酸素や活性種のイメージングはこのような f) 光学、ケミカルバイオロジー分野にインパクトを与える。さらに、酸素やそれに由来する ROS の作用の解明なしには、その制御異常がもたらす、メタボリックシンドローム、感染・炎症、老化、発癌、神経変性疾患、心不全等の g) 病態解明と抗酸化的な予防対策、治療戦略の確立は不可能である。以上のように、本領域は、基礎生物学、医科学、薬学、農学を含めた幅広い分野に関係し、臨床医学、医工学、食品・発酵化学等の応用生物学的分野、環境科学やケミカルバイオロジーといった学際分野にも結び付き、幅広い学術展開に資する。

## 10. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1 ページ以内）

研究領域内での若手研究者育成の取組及び参画した若手研究者（※）の研究終了後の動向等を記述してください。

※研究代表者・研究分担者・連携研究者・研究協力者として参画した若手研究者を指します。

### 若手会議の開催

若手研究者自身の発案で、新学術領域「ダイニングコード」（領域代表：田中正人）との合同若手会議を2回開催した（千葉：平成28年1月26～28日、宮城：平成30年1月30～2月1日）。第1回は**関根（三木班分担）**、**武田（南学班分担）**、**西田（内田班分担）**を中心に、若手が企画・運営を行った。学生も含む若手研究者に可能な限り多くの発表の機会が設けられ、両領域から総勢97名の多くの若手研究者や学生が参加し、口頭40演題、ポスター42演題の発表があった。生体恒常性の分野で問題意識を共有できる2つの領域が合同することで、緻密な議論の展開により、共同研究にもつながる有意義な機会を得た。この会議を契機として両領域の若手研究者間の交流が活発化し、第2回は**船戸（三木班分担）**、**杉浦（三浦班分担）**、**柴田（内田班分担）**らを中心に企画・運営され、両領域から89名の参加者があった。より議論が深められるよう、口頭発表を28件に厳選する一方、38件のポスター発表が行われた。また、生体恒常性の分野の大局的な発展に関する熱い議論も取り交わされた。この他に、領域内の若手研究者交流会（東京：平成27年3月14日）が開催されており、お互いの研究内容を報告するだけでなく、若手の会の運営方法などが話し合われた。

### シンポジウム・研究会における若手オーガナイザーの積極的起用

本領域の若手研究者は、多くのシンポジウム・研究会でオーガナイザーを務めている（計35件）。

<代表例>（下線は領域内シニア研究者）

1. **鈴木（山本班）**、**南嶋（三浦班）**「低酸素応答システムの分子機構と多様な役割」第87回日本生化学会
2. **西田（内田班）**「心血管カチオンチャネル研究の最前線」第88回日本薬理学会年会
3. **武田（南学班）**、**井上**「低酸素バイオロジーの最前線：細胞機能を制御する低酸素シグナル」第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会
4. **三浦**「オモロイ生き物の分子生物学」第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同
5. **西田（内田班）**、**今泉（公募）**「ミトコンドリア品質管理の生物学的理解とその医療応用」第89回日本薬理学会年会
6. **西田（内田班）**、**森**「蛋白質の機能修飾から読み解く酸素生物学」第16回日本蛋白質科学会
7. **鈴木（山本班）**「低酸素応答とチャネル制御」第69回日本酸化ストレス学会
8. **西田（内田班）**「ミトコンドリア・オルガネラ機能のレドックス制御」第69回日本酸化ストレス学会
9. **中山**「低酸素バイオロジーの最前線-その分子機構から疾患まで-」第39回日本分子生物学会年会
10. **鈴木（山本班）**、**南学**「Hypoxia and disease」第89回日本生化学会大会シンポジウム
11. **西田（内田班）**、**熊谷（公募）**「オルガネラ環境を制御するレドックスシグナル」第89回日本生化学会大会
12. **武田（南学班）**「酸素シグナルを介する心血管リモデリング」第47回日本心臓血管作動物質学会
13. **武田（南学班）**「低酸素応答シグナルを治療標的とする -PHD 阻害薬の治療応用」第92回日本薬理学会年会
14. **鈴木（山本班）**、**伊東**「酸素センシングの蛋白質科学」第69回 日本蛋白質科学会

### 研究室主宰者としての若手研究者

本領域には、主宰者として研究室を運営している多くの若手研究者が参画している。**三浦**は本領域の開始後、特任講師（慶応義塾大学）から講師（北海道大学）を経て、現在准教授（熊本大学）として研究室を主宰している。既に、ハダカデバネズミのiPS細胞作製の成功について論文を責任著者として発表しているだけでなく、一般市民向けの講演やメディアに登場し、積極的なアウトリーチ活動も行っている。**西田（内田班分担：自然科学研究機構・教授）**は、自身の研究室単独だけでなく、**森**、**赤池**、**澤（赤池班分担）**、**熊谷（公募班）**などシニア研究者との共同研究でも成果を上げている。それ以外でも、国際活動支援班の国際ネットワーク構築委員会に加わり、領域の国際ネットワーク構築への貢献や、多くのシンポジウム・研究会のオーガナイザーとして働くなど、本領域のみならず酸素生物学全般にわたる活躍をしている。**南嶋（三浦班分担）**は特任講師（慶応義塾大学）から特任准教授（九州大学）を経て、現在教授（群馬大学）として研究室を主宰し、既にPHDアイソフォームのユニークな役割に関する論文を責任著者として発表している。**山村（公募班）**は教授（名古屋市立大学）として研究室の主宰を開始した。一方、**鈴木（山本班分担）**は責任著者として既に多くの論文を発表している。公募班の中にも研究室主宰者としての活躍する若手研究者（**中山**、**今村**）が採択されており、本領域内での共同研究や人材交流を活発に行った。このように、本領域内において次代を担う若手研究者は順調に育ってきており、総括班や国際支援班が中心となって若手研究者の研究活動や国際共同研究などを積極的に支援した。

## 11. 総括班評価者による評価（2ページ以内）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

本研究領域では、3名の外部評価者が総括班に置かれている。以下、各評価者による評価を記す。

評価者：**長野 哲雄**（東京大学名誉教授、東京大学創薬機構客員教授）

本新学術領域研究の研究課題は、大別して2つの観点から構成されている。

第1の観点は、従来、酸素不足（低酸素）状態は生体においては単に障害であり、それを解消するための酸素供給増加を誘導する生体の応答があると考え、そのための研究が行われてきた。しかし、この新学術領域研究では、生体内の低酸素環境自体が生体において、むしろ積極的な生理的意義を有していると考え、そのための新たな低酸素応答機構を解明する事を目的に研究が行われた。

第2の観点は、従来 ROS や親電子分子種は単に酸化ストレス原因物質として、生体に障害を誘導するものと考えられてきたが、これらの反応種はセンサータンパク質を介して細胞内シグナル経路を精密に調整していると考え、これらの生命現象と機構を網羅的に系全体として理解する事を目指して研究が行われた。

本新学術領域研究は、13件の計画研究、16件の公募研究から構成されており、別の区分をすれば、主として第1の観点を担ったA01班、第2の観点を担当したA02班、そして研究課題で取り扱う分子種の可視化解析技術の開発を行うA03班から構成されている。

成果として、プロリンヒドロキシ化酵素（PHD）、低酸素誘導転写因子（HIF）、Keap1による転写因子 Nrf2の制御、Thioredoxin、Nucleoredoxin、TRPチャンネル群などの生理機能を有する分子種がこの学術領域研究の発足前に報告されていたが、この新学術領域研究により、これらを統合的に理解することを目指して研究が行われた。すなわち「酸素リモデリング」の考えに基づき、低酸素エフェクター群による細胞機能の調節機構、幹細胞の維持、がん細胞の悪性化、低酸素環境適応モデル動物を用いた代謝調節機構等で興味深い成果が次々に報告された。酸素、酸素関連活性種およびイオウ多量体によるシグナル機構の解明およびその生理的意義についての検討も精力的に行われた。更に上記の概念の実証には可視化技術が求められるが、新規のセンサーも数多く発表され、センサーを用いた連携研究も活発に行われた。

各研究班の連携は密に行われており、新学術領域研究の目的の一つである「研究者相互のインタラクションに基づき、新たな学問領域を切り開く」ことにも成功している。

新学術領域研究では個々の研究者の力を合体させることで、質的に異なる大きな成果を生み出し、今までにない全く新しい学問領域を生み出すことが期待されているが、本新学術領域研究ではその端緒を掴んだと言えるであろう。今後、異なる研究分野との連携を深め、得られた成果を更に飛躍的に発展させていくことが望まれる。

評価者：**二木 鋭雄**（東京大学名誉教授、産業技術総合研究所名誉リサーチャー）

本研究課題「酸素生物学」は生物の誕生以来の根本的課題であり、近年のパラダイムシフトもあって、その研究の重要性はますます高まっていると言えよう。酸素生物学の基礎科学から臨床分野まで、極めて広い範囲の課題に取り組んだことが本研究の一つの特徴である。酸素濃度に着目したこと、なかでも細胞にとって最適の酸素濃度を構築するという発想は、数多くある本分野の研究の中でも特異的である。本研究プロジェクトに参加した個々の研究者、グループのもつ高い能力と経験を、共同研究をうまく進めることにより相乗的に成果をあげることにつなげたことは高く評価され、領域代表者である森教授の指導と努力によるところが大きいと考えられる。若い研究者が多く参加し、積極的に取り組んでいた姿が印象的であり、この点もよかったと感じている。

一つ率直に感じたことは、これは生物系の研究でよく見られることであるが、定量的な議論が欠けていると感じたことが少なくなかったことである。本質的に*in vivo*、*ex vivo*系での定量的測定、議論が難しいことは理解できるが、それでもやはり濃度、速度や効果を定量的に示し、考察することが、その事象の生理的重要性を正しく判断するためには欠かせない。膜など不均一系での反応ダイナミクスに関する研究も今後取り入れることが期待される。

総合的に判断して、これまでの全体的な取り組み方、成果から、本研究の所期の目的は達成できたと評価される。本研究はここで一つの区切りをつけることになるが、この課題の重要性を鑑みても、あらためて研究チームを立ち上げ、研究をさらに発展させられることを期待したい。



評価者: **井本 敬二**(自然科学研究機構 理事、生理学研究所長)

地球での生命の進化をたどると、分子状酸素の利用には 10 億年単位の長い時間を要している。このように時間を要したのは、分子状酸素を利用するためには、高エネルギーの発生装置を作り出すだけでなく、副産物として生まれる活性分子種を安全に処理するシステムが備わることが不可欠であったためであろうと推測される。このような生命進化の過程を踏まえると、新学術領域「酸素生物学」の重要性がよく理解される。生体には、エネルギーを可能な限り効率的に用い、組織障害的な分子種の処理を迅速に行うための仕組みが備わっており、それらの仕組みがネットワーク的に機能している。またイオウ化合物は、酸素利用以前に主要エネルギー源であったが、イオウ化合物のシステムは現在もシグナル伝達機構として役割を果たしている。

本研究領域では、この実施期間中に、酸素センシング、低酸素環境、HIF 因子、老化・がん化、ROS・親電子分子種シグナル、ポリスルフィド化などに関する広範な研究を実施するとともに、発光プローブの作成等の解析技術の開発が活発に行われた。また前半・後半ともに 15~16 件の公募研究が行われ、さらに広域な研究が行われた。研究成果は、多くの重要論文として発表されたほか、代表的な生理学の学術誌である *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* で論文集が出されるなど、酸素生物学を広げる努力がなされた。

本新学術領域は、分子から個体までのレベルを超えた生体メカニズムの理解を目指したものであり、領域代表者のリーダーシップが欠かせないものである。研究領域がかなり広範であるため、研究連携にやや不十分と感じられる部分もあるが、領域代表者の努力により、研究領域としての酸素生物学の確立と領域における研究進展は、予想以上の成果を上げたと評価できる。