

**酸素を基軸とする
生命の新たな統合的理解
(領域番号:3602)**

**平成 26 年度～平成 30 年度
科学研究費補助事業(科学研究費補助金)
「新学術領域研究(研究領域提案型)」
研究成果報告書**

令和 2 年 2 月

**領域代表者 森 泰生
京都大学・工学研究科・教授**

はじめに

—生命の仕組みを酸素から読み解く—

森 泰生（京都大学大学院 工学研究科）

私たちが酸素分子 O_2 にこれほど親しみを感じるのは、とりまく大気に豊富にあって私たちの生命を O_2 が維持してくれるからです。しかし、多くの生命体にとって O_2 は不必要でありかつ毒でさえあります。また、 O_2 が存在しない環境に生命は起源すると思われています。実は、多細胞生物の生体内には様々なレベルで低 O_2 環境が形成されています。当然、生体は不足に陥らぬよう O_2 の供給を維持しますが、むしろ O_2 レベルの適切な抑制にこそ積極的な意義があると考えられます。今、 O_2 が ATP 産生に必要な燃素であるという単純な理解を超えて、新たな観点から O_2 の意義を探究する「酸素生物学」のうねりが起きつつあります。私たちの領域研究 (www.oxygenbiology.net/) はこの新しい「酸素生物学」に正面から取り組むために、生体の構成細胞が最適な低 O_2 領域を能動的に構築する「酸素リモデリング」という独自の概念を提案しました。そして、それがどのような機序により成立し、細胞に感知され、生体機能に活用されるかを、エネルギー代謝、 O_2 等の担うシグナル伝達に着目し探究しました。また、 O_2 や O_2 を起源とする活性酸素種等のシグナル分子としての役割にも注目し、新たに見出された酸化反応や活性分子種がどのように、特定の生体内 O_2 環境に置かれた組織・器官において働くかの解明に挑みました。それらの研究成果をここにとりまとめさせていただきます。

O_2 を通した新たな生命像を探究するのは、生物学の永遠の中心テーマです。ノーベル賞生理学・医学賞は、1931年に Otto Warburg の「呼吸酵素の特性および作用機構の発見」("for his discovery of the nature and mode of action of the respiratory enzyme")、そして1938年に Corneille Heymans の「呼吸調節における静脈洞と大動脈機構の役割の発見」("for the discovery of the role played by the sinus and aortic mechanisms in the regulation of respiration") に引き続いて、2019年に William Kaelin、Peter Ratcliffe、Gregg Semenzano の3名の酸素生物学者による「細胞による酸素量の感知とその適応機序の解明」("for their discoveries of how cells sense and adapt to oxygen availability") に対して授与されました。本領域はここでの具体的な研究対象となった、 O_2 依存的なプロリンヒドロキシ化酵素 PHDs とそれらの主要標的である低酸素誘導性転写因子 HIFs を原点として構想されたものです。従って、本領域で展開した研究こそが「酸素生物学」の新たな潮流になるべきものです。今後ますます「酸素生物学」が発展し、私も含めた本領域メンバーが独創的な研究成果により、その源となることを望んでやみません。

目次

はじめに	1
目次	2
研究組織	3
交付決定額（配分額）	5
研究領域の概要	6
研究成果	18
研究領域に対する評価	103

研究組織

<総括班>

研究代表（全体統括）

森 泰生 京都大学・大学院工学研究科・教授

国際活動支援班

森 泰生 京都大学・大学院工学研究科・教授

<計画研究>

研究項目 A01

山本 雅之 東北大学・大学院医学系研究科・教授

南学 正臣 東京大学・医学部・教授

森 泰生 京都大学・大学院工学研究科・教授

井上 正宏 京都大学・大学院医学研究科・特定教授

三浦 恭子 熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究項目 A02

三木 裕明 大阪大学・微生物病研究所・教授

赤池 孝章 東北大学・医学系研究科・教授

住本 英樹 九州大学・医学研究院・教授

伊東 健 弘前大学・医学研究科・教授

内田 浩二 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究項目 A03

浦野 泰照 東京大学・薬学研究科・教授

<公募研究>

研究項目 A01

新井 博之 東京大学・農学生命科学研究科・助教（平成 27～28 年度）

中山 恒 東京医科歯科・難治疾患研究所・准教授（平成 27～30 年度）

藤田 祐一 名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授（平成 27～30 年度）

古谷 和春	大阪大学・医学系研究科・助教（平成 27～28 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 （平成 27～30 年度）
松本 雅記	九州大学・生体防御医学研究所・准教授（平成 27～30 年度）
桑木 共之	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授（平成 29～30 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（平成 29～30 年度）

研究項目 A02

松沢 厚	東北大学・大学院薬学研究科・教授（平成 27～30 年度）
熊谷 嘉人	筑波大学・医学医療系・教授（平成 27～30 年度）
吉種 光	東京大学・大学院理学系研究科・助教（平成 27～28 年度）
吉岡 博文	名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授（平成 27～30 年度）
鎌田 英明	広島大学・医歯薬学総合研究科・准教授（平成 27～28 年度）
今泉 祐治	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授（平成 27～28 年度）
清水 俊一	帝京平成大学・薬学部・教授（平成 27～28 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 （平成 29～30 年度）
山村 寿男	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授（平成 29～30 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（平成 29～30 年度）

研究項目 A03

今村 博臣	京都大学・生命科学研究科・准教授（平成 27～28 年度）
森井 孝	京都大学・エネルギー理工学研究所・教授（平成 27～30 年度）
近藤 輝幸	京都大学・大学院工学研究科・教授（平成 27～30 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 （平成 29～30 年度）

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
平成 26 年度	¥255,400,000	¥76,620,000	¥332,020,000
平成 27 年度	¥240,100,000	¥72,030,000	¥312,130,000
平成 28 年度	¥268,900,000	¥80,670,000	¥349,570,000
平成 29 年度	¥245,200,000	¥73,560,000	¥318,760,000
平成 30 年度	¥241,800,000	¥72,540,000	¥314,340,000
平成 31 年度	¥3,000,000	¥900,000	¥3,900,000
総計	¥1,254,400,000	¥376,320,000	¥1,630,720,000

研究領域の概要

[1] どのような学術的な背景があるか

分子状酸素(O₂)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。近年、このような旧来から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た。

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が、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リ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。そもそも、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発揮することができる。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、**酸素のシグナル分子としての機能**である。酸素はそれ自身が、また、酸素を起源とする ROS や親電子分子種を介して、細胞内シグナル伝達を制御する。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。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ようとしていた。

[2] 研究は具体的にどのような動向にあったか

[低酸素応答の分子基盤と意義]

低酸素誘導性転写因子 Hypoxia-inducible factor (HIF) の発見 (Semenza, *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、Fe²⁺及びビ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、プロリンヒドロキシ化酵素 (PHD) による HIF ヒドロキシ化と、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 (Ratcliffe, *Science*, 2001; Kaelin, *Science*, 2001)。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。また、PHD 以外の酸素を基質とするヒドロキシ化酵素も非常に多様である。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、鈴木らは 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リモデリング等の細胞機能を PHD-HIF 経路を介して積極的に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。つまり、低酸素応答性の PHD-HIF 経路の発見が、「生命体が低酸素状態を享受する能力を有する」という考え方を可能にしたのである。

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、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 H₂S 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⁺チャン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。しかし、各機構の相対的な重要性や相関性を含め、統一的な理解はされてこなかった。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、森ら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]

「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)。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が(Schumacker, *PNAS*, 1998)、その正当性は確立されていなかった。

シグナルメディエーターとしての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、H₂O₂ が NAD⁺ 或いは代謝体 ADP ribose を介して活性化する Ca²⁺流入チャンネル 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**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 陽イオンチャンネル群を活性化し、血管内皮細胞の Ca²⁺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りつつある。

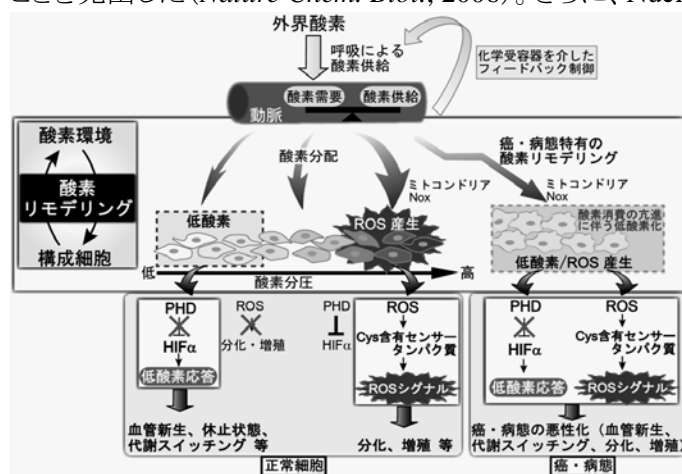


図1. 生体内酸素リモデリングの基盤となる分子機構

[3] 何を指し、どう構想したか

「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、図 2)。また、それがどのような機序により成立するか、どのように細胞に感知され、どのような経路を通して生体機能の最適化に活用されるかを、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。そして、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。

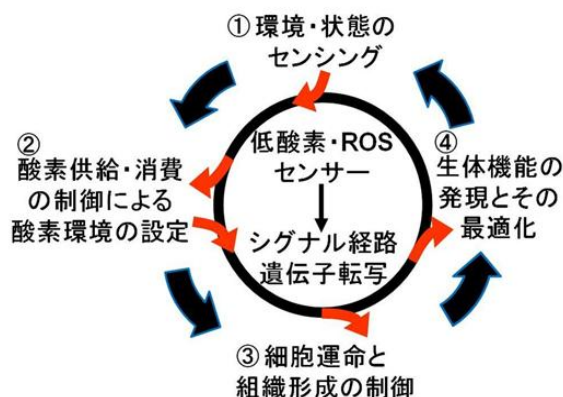


図 2. 本領域研究の基本となる概念「酸素リモデリング」

[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、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。

[4] 何を具体的に達成できたか

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]

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を解明した。

まず、酸素濃度の変化を監視する**酸素センシング機構**の同定を目指し、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、長年の論争となっていた中枢神経系の酸素センシングを、アストロサイトが担うことを示した。さらに TRPA1 と PHD が中心となった、その分子的基盤も明らかにした。

次に、**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**緩徐(chronic)な低酸素応答**を追究した。造血系に関しては、腎産生細胞(EP 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 α がエリスロポエチン遺伝子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 α が HIF-3 α 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。さらに、EP 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。

エネルギー代謝に関しては、酸素濃度の低下と共にグルコース酸化から解糖系へとグルコース代謝を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%O₂)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。さらに、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死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。

本領域の採択とほぼ同時期に、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)。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、dormancy 状態には最適な低酸素レベルがあることも示された。

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。ここでは、重要なエネルギー代謝上のマウスとの違いを追究し、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。一方、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。また、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。マウスと全く対照的に、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。

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の分子基盤となる知見も得られた。

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。ここでは、まず、PHD3 の新標的としてピルビン酸デヒドロゲナーゼ-E1 β を見出した。また、上述のように、通常酸素下で TRPA1 チャネルが PHD によりヒドロキシ化、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。

[A02 班]

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・細胞機能を最適化するシグナル経路、及びその意義を解明した。

まず、**酸素の ROS・親電子分子種シグナルへの変換機構**に関して、動物細胞で酸素を ROS シグナル(O_2^-)へと変換する NADPH oxidase (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。また、**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し、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、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、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、また、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形成や縮退が関与することを見出した。

ROS シグナル経路の生物学的意義に関しては、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、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 を生産する知見や、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、TRPV1 チャンネルの Cys 残基への炎症関連親電子物質 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 (15d-PGJ₂)の付加が、PC12 細胞の神経様突起伸長を促すことを示した。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も見出した。さらに、ROS センサーとして働く Cys 含有タンパク質による Mg^{2+} トランスポーターの機能制御が細胞内 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 チャン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。ROS シグナルの担う転写制御に関しては、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に着目し、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 とタンパク質恒常性関連転写因子 ATF4 により協調的に転写調節されることを示した。H₂O₂ 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も発見した。

[A03 班]

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た。

まず、**体深部 *in vivo* での ROS・活性窒素種を検出**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蛍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。

in vivo 末梢組織における酸素濃度の定量を可能にする、イリジウム錯体 BTP 誘導体(補助配位子にジメチルアミノ基を導入、カチオン化した)BTPDM1 を新たに合成し、細胞内取り込み能を約 20 倍に向上させた。また、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。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。

生体内の活性イオウ種の役割を確認するために、光制御型放出化合物の設計・合成・活性評価も行った。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 H₂S 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。

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た。例えば、BTPDM1 を領域共通機器である多光子顕微鏡と組み合わせ、マウス骨髄内及び培養癌細胞塊内における、酸素濃度分布の測定に成功した。また、マウス個体内に形成させた担癌組織における H₂O₂ 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。さらに、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、H₂O₂ を特異的に高感度で検出可能な蛍光試薬を開発、好中球の食作用時の Nox2 による H₂O₂ 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。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も成功した。

【国際活動支援班】

研究成果の国際的認知の強化と、個別的な共同研究の波及的な発展の基盤となりうる**国際ネットワークの構築**、及び**個別的な国際共同研究の支援**を、国際活動支援班が担った。前者の枠組みを実際に担うのが、国際ネットワーク構築委員会であり、後者の枠組みを担うのが国際共同研究推進委員会及び研究派遣企画・実行委員会である。

国際ネットワーク構築は、あくまでも新学術領域研究「酸素生物学」が中心役割(付随的な役割でなく)を担えるネットワークづくりを、二つのルートから目指した。第一のルートが、ヨーロッパを代表する生理学分野の国際誌、Pflügers Archiv.-European Journal of Physiology であり、第二のルートが、体内低酸素環境と心臓・腎臓機能との関連の解明を目指したヨーロッパ、日本、オセアニアの有力大学の研究コンソーシアム、Cardio Renal Paradigms Elucidated through an International Exchange Scheme (CARPEDIEM)である。第一のルートにおいては、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、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、Editorial に加えて、個別的にも、酸素センシング機構の普遍性、及び腎臓により産生されるエリスロポエチンが担うシステム的な酸素恒常性の制御についての総説を執筆した。第二の CARPEDIEM のルートにおいては、平成 26 年の設立時から引き続き、研究派遣・受け入れによる共同実験、及び情報交換をヨーロッパ、オセアニアの諸大学との間で活発に継続した。

個別的な国際共同研究の支援により、酸素生物学の国際的共同研究のネットワークは大きく拡大した。その中で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国際的ネットワークが、本領域を拠点として大きく発展した。

[5] 当該・関連分野へのインパクト

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的状況にあった。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、当該研究分野の学術レベルの向上・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、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、インタクトな組織構築における**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)の低酸素応答に比較すると、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、**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した。最も重要なのが、**Cys 残基のスルフヒ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、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**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**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**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。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**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 細胞の作製の研究から、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**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**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**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**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。

[6] 組織内でどう連携したか

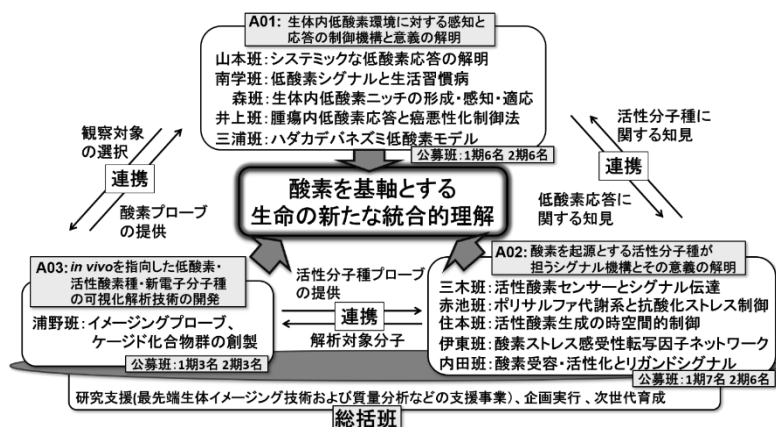


図 3. 研究計画の概要

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。さらに生体内低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 3)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いた。

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

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加者が、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

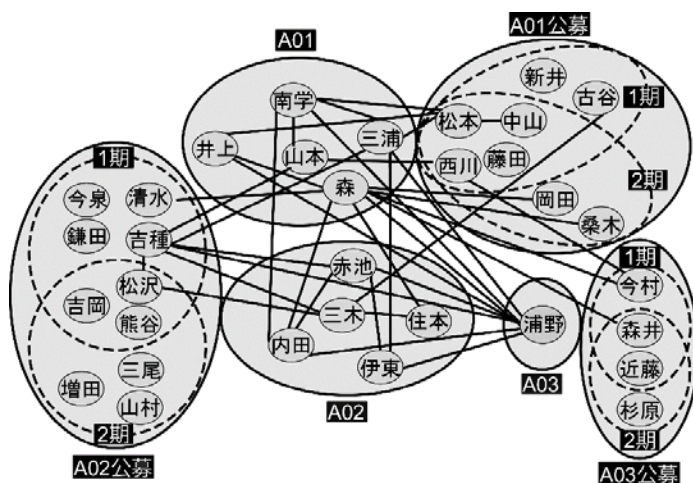


図 4. 本領域の連携状況

れている(図 4)。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、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、脳幹脊髄からの呼吸出力の *ex vivo* 測定技術、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た。

連携研究の具体的成果例

- ・ *in vivo* 末梢組織における酸素濃度の定量。
- ・ イオウ多量体の発見、イメージングと生物学的意義の解明。
- ・ 低酸素環境で起きるエネルギー代謝のシフトの分子基盤と生物学的意義の解明。
- ・ 哺乳動物の個体中に遍在する急性(*acute*)の低酸素応答の解明。
- ・ 低酸素環境と炎症シグナルとの関連の解明。
- ・ 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プローブ開発
- ・ マウス個体内に形成させた担癌組織における H₂O₂ 環境のイメージング。
- ・ 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するイメージングの理論的基盤の確立。

[7] 若手研究者の領域活動

[若手会議の開催]

若手研究者自身の発案で、若手が企画・運営の全てを行う合同若手会議を、新学術領域「ダイニングコード」(領域代表: 田中正人)と 2 回共催した(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]

(代表例のみ示す: 全 35 件: 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 回日本心脈管作動物質学会
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

[8] 領域に関する情報の発信

[マスメディアによる情報発信]

(代表例のみ示す：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：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: 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, O₂, 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ーその分子機構から疾患までー」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「活性イオウ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会「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

研究成果

研究課題名： 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
Systemic mechanisms of response to hypoxic stresses
研究期間： 平成 26 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 26111002
研究代表者名： 山本 雅之（東北大学 大学院医学系研究科 教授）
研究分担者名： 鈴木 教郎（東北大学 大学院医学系研究科 准教授）（28-30 年度）
（東北大学 大学院医学系研究科 講師）（26-27 年度）

<研究の目的>

本研究では、赤血球造血制御系を酸素恒常性維持における主要な生体応答系として捉え、その分子機構を多臓器連関の見地から解明し、腎臓病、がん、炎症や貧血など、分子病態の解明されていない様々な疾患との関わりについて理解することを試みた。また、酸素の必要性に加え、酸素が内包する細胞傷害性（酸化ストレス）についても理解する必要があると考え、酸化ストレスに対する個体レベルの影響についても研究を進めた。

<研究の成果>

(1) 赤血球造血制御系による個体レベルの低酸素応答機構の解明（論文 1, 4, 5, 12-14）

全身への酸素供給は赤血球が担っており、個体が低酸素に曝されると赤血球造血が活性化する。赤血球造血はエリスロポエチン（EPO）によって調節されていることから、EPO 産生制御機構は個体レベルの低酸素応答機構の根幹をなす。本研究では、腎臓に存在する EPO 産生細胞（REP 細胞）における EPO 遺伝子の組織特異的・低酸素誘導的遺伝子発現制御機構を解析し、REP 細胞の EPO 遺伝子発現は低酸素センサー分子 PHD2 と低酸素誘導性転写因子 HIF2 α で構成される経路によって制御されることを明らかにした。また、HIF2 α は EPO 遺伝子の転写開始点上流 10 kb の領域に作用することを見出した。

REP 細胞の細胞株樹立などを通して、慢性腎臓病で REP 細胞が EPO 産生能を喪失し、腎性貧血が発症する分子機序についても解析した。その結果、腎障害により REP 細胞の PHD2 が異常活性化して HIF2 α を恒常的に不活性化する段階に引き続き、EPO および HIF2 α の遺伝子が DNA メチル化によって不活性化する段階の 2 段階で EPO 産生能が失われることを発見した。また、REP 細胞の EPO 産生能喪失には鉄過剰状態や TGF β などの炎症シグナルが関与することを明らかにした。

(2) 酸化ストレス応答機構と病態との関連の解明（論文 6-11, 15）

酸化ストレス防御にはたらく転写因子 Nrf2 が、酸素環境を適正にコントロールするために様々な局面で機能していることを明らかにした。Nrf2 の活性化は生体防御に必要であることが改めて理解された一方で、妊娠高血圧症候群では胎盤血管新生を抑制し、病態を増悪させるという Nrf2 活性化の負の側面を発見した。また、炎症の鎮静化において Nrf2 が機能することを発見し、これまで転写活性化因子として考えられていた Nrf2 が炎症関連遺伝子に対しては転写抑制因子として機能することを見出した。

(3) 低酸素・酸化ストレス応答系の分子機構解明（論文 2, 3）

酸素恒常性維持に関わる分子の機能解析を行い、酸素代謝状態のセンシングから遺伝子発現誘導に至る分子機構を明らかにした。低酸素応答系では、HIF による可逆的なヌクレオソーム構造変換機構が低酸素依存性の遺伝子発現において機能することを見出した。一方、酸化ストレス応答系については、酸化ストレスセンサー分子である Keap1 の複合体結晶構造解析や分子解剖解析を行い、Keap1 に多数あるシステイン残基の特異的な組み合わせが、多様な親電子性物質などの酸化ストレス源を感知する分子メカニズ

ムを明らかにし、「システインコード」の概念を確立した。また、Nrf2による迅速な転写誘導においてメディエーターなどの転写共役因子が重要な役割を担うことを見出した。

<研究の意義・展望>

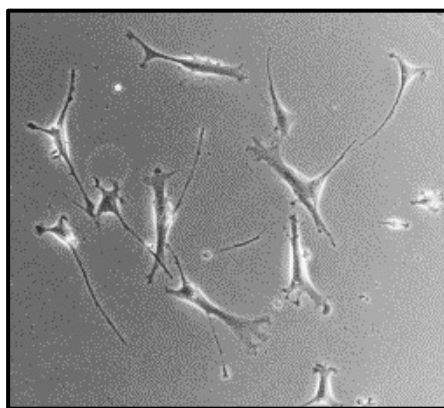
赤血球造血制御の基盤となる低酸素誘導的 EPO 産生制御機構について、個体レベルで明らかにしたことから、全身性の酸素リモデリングの分子基盤を理解した。また、REP 細胞と肝実質細胞では異なる分子機構がはたらいていたことから、1つの遺伝子の低酸素誘導的発現が組織によって異なるメカニズムで制御されていることを見出した。PHD 阻害薬は、EPO 製剤に代わる腎性貧血治療薬として、2019 年から世界に先駆けてわが国で使用開始された。本研究は、腎性貧血の分子病態解明を大きく前進させただけでなく、本薬剤の作用機序を解明したものであり、薬剤の改良や効果的な使用法の確立に直結する成果となった。

Nrf2 の活性化が様々な疾患からの臓器保護に有効であることを示した結果、Nrf2 活性化剤の開発が国内外で盛んに進められるようになった。わが国では、これまで特効薬のなかった糖尿病性腎症に対する新薬として、Nrf2 活性化剤の臨床試験が国際的に先行して進められている。また、Nrf2 が炎症関連遺伝子に対して転写抑制因子として機能することを見出したことから、抗炎症薬開発のために Nrf2 阻害剤の創薬スクリーニングを進めている。さらに、システインコードの解明により、生体の内外環境の変化を各細胞が巧妙な分子機構で感知することが理解され、がんや生活習慣病などの酸化ストレスが深く関与する難治疾患に対して革新的医療法の開発につながることを期待される。

<主な研究発表>

- 1) Sato K, Hirano I, Sekine H, Miyauchi K, Nakai T, Kato K, Ito S, Yamamoto M, Suzuki N. An immortalized cell line derived from renal erythropoietin-producing (REP) cells demonstrates their potential to transform into myofibroblasts. *Sci. Rep.* 9, 11254, 2019.
- 2) Suzuki N, Vojnovic N, Lee KL, Yang H, Gradin K, Poellinger L. HIF-dependent and reversible nucleosome disassembly in hypoxia-inducible gene promoters. *Exp. Cell. Res.* 366, 181-191, 2018.
- 3) Sekine H, Okazaki K, Kato K, Alam MM, Shima H, Katsuoka F, Tsujita T, Suzuki N, Kobayashi A, Igarashi K, Yamamoto M, Motohashi H. O-GlcNAcylation Signal Mediates Proteasome Inhibitor Resistance in Cancer Cells by Stabilizing NRF1. *Mol. Cell. Biol.* pii: MCB.00252-18, 2018.
- 4) 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 2 α concentrations in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int.* 94, 900-911, 2018. *with commentary*
- 5) 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, pii: e00451-16, 2017.
- 6) 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*
- 7) Suzuki T, Seki S, Hiramoto K, Naganuma E, Kobayashi EH, Yamaoka A, Baird L, Takahashi N, Sato H, Yamamoto M. Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. *Nat. Commun.* 24, 14577, 2017.
- 8) Yagishita Y, Uruno A, Fukutomi T, Saito R, Saigusa D, Pi J, Fukamizu A, Sugiyama F, Takahashi S, Yamamoto M. Nrf2 improves leptin and insulin resistance provoked by hypothalamic oxidative stress. *Cell Rep.* 18, 2030-2044, 2017.

- 9) Nezu M, Souma T, Yu L, Suzuki T, Saigusa D, Ito S, Suzuki N, Yamamoto M. Transcription factor. Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression. *Kidney Int.* 91, 387–401, 2017.
- 10) Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi EH, 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 the neurotrophic factor artemin. *Nat. Immunol.* 18, 64-73, 2017.
- 11) Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, Yamamoto M. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* 7, 11624, 2016.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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. USA.* 112, 12169-12174, 2015.
- 15) 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.



システミックな低酸素応答を司る REP 細胞の細胞株
マウスの REP 細胞を不死化し、「Replic 細胞株」を樹立した。

研究課題名： 低酸素シグナルが拓く生活習慣病の新しい病態制御
The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of lifestyle related diseases
研究期間： 平成 26 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 26111003
研究代表者名： 南学 正臣（東京大学 医学部附属病院 教授）
研究分担者名： 合田 亘人（早稲田大学 理工学術院 教授）（26-30 年度）
武田 憲彦（東京大学 医学部附属病院 助教）（26-30 年度）

<研究の目的>

本研究は生活習慣病に関連する臓器の組織酸素濃度を定量的に計測する技術を構築し、その病態形成・進展において酸素環境、酸素応答機構が果たす役割を明らかにすることを旨とした。腎臓、肝臓、心臓は生体内において特に酸素消費量が高い臓器であり、エネルギーを大量に産生・消費することでその機能と恒常性を維持している。本課題では低酸素応答機構に着目することで生活習慣病の病態を新たに理解し、診断・治療応用に向けた分子基盤を同定すべく下記研究を遂行した。

<研究の成果>

(1) 組織酸素レベルの定量的計測法の開発（論文 5, 26）

新規燐光プローブを用いて腎臓の細胞内酸素分圧を定量的に測定する方法を開発、病態モデルでの検証を行った。

(2) 低酸素環境でのエピジェネティック制御を介する慢性腎臓病進展機構を解明（論文 6, 15, 16）

糖尿病性腎症における細胞内代謝様式を解析し、糖尿病に伴ってクエン酸回路の代謝物が腎臓に蓄積し、活性酸素産生が増加すること、またそれらが SGLT2 阻害薬投与により回復することを見出した。併せて低酸素環境における転写制御とエピジェネティックな変化が慢性腎臓病の進展過程に及ぼす影響を明らかにし、更にその治療介入の可能性を示した。更にミトコンドリアの以上とそのエネルギー産生に与える影響が腎疾患発症の引き金になっていることを同定した。

(3) HIF-1 α を介するアセトアミノフェン肝障害、脂肪肝進展機構を解明（論文 9, 11）

アセトアミノフェン肝障害において、自然免疫様 $\gamma\delta$ T 細胞における HIF-1 α シグナルが関わっていることを明らかにした。また非アルコール性脂肪肝において、肝細胞の HIF-1 α -Lipin1 経路がペルオキシゾームの脂肪酸酸化の増悪を抑制することで病態の進展に抑制的に作用することを報告した。

(4) 低酸素シグナルにより誘導される心線維化抑制因子 Oncostatin-M を同定（論文 1, 24）

HIF-1 α を介する解糖系代謝シフトがマクロファージ遊走能に必須であること、また心臓マクロファージにおける低酸素シグナルが Oncostatin-M 分泌を介して組織線維化を抑制していることを同定した。

<研究の意義・展望>

本研究で得られた成果は今後の酸素生物学の進展における重要な技術的基盤になると共に、生活習慣病における新たな診断ツールや治療標的としての応用が期待される。

<主な研究発表>

- 1) 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 and Komuro I. Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M. *Nature Commun.* 10, 2824, 2019.
- 2) Wake M, Takeda N, Isagawa T, Sato T, Nakagama Y, Morioka MS, Hirota Y, Asagiri M, Maemura K, Manabe I, Tanabe K and Issei Komuro I. Cell cycle perturbation induces collagen production in fibroblasts. *Int Heart J.* 60, 958-963, 2019.
- 3) Minatsuki S, Takeda N, Soma K, Katoh M, Maki H, Hatano M, Takimoto E, Manabe I, Komuro I. Murine model of pulmonary artery overflow vasculopathy revealed macrophage accumulation in the lung. *Int Heart J.* 60, 451-456, 2019.
- 4) Osada-Oka M, Goda N, Saiga H, Yamamoto M, Takeda K, Ozeki Y, Yamaguchi T, Soga T, Tateishi Y, Miura K, Okuzaki D, Kobayashi K, Matsumoto S. Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for Mycobacterium tuberculosis infection. *Int Immunol.* 31 (12): 781-793, 2019
- 5) 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 hypoxia. *Kidney Int.* 93, 1483-1489, 2018.
- 6) 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 the kidneys of diabetic mice. *Kidney Int.* 94, 912-925, 2018.
- 7) Saito H, Tanaka T, Tanaka S, Higashijima Y, Yamaguchi J, Sugahara M, Ito M, Uchida L, Hasegawa S, Wakashima T, Fukui K, Nangaku M. Persistent expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and M2 macrophage markers and chronic fibrosis after acute kidney injury. *Physiol Rep.* 6, e13707, 2018.
- 8) Mimura I, Hirakawa Y, Kanki Y, Nakaki R, Suzuki Y, Tanaka T, Aburatani H, Nangaku M. Genome-wide analysis revealed that DZNep reduces tubulointerstitial fibrosis via down-regulation of pro-fibrotic genes. *Sci Rep.* 8, 3779, 2018.
- 9) Arai T, Tanaka M, Goda N. HIF-1-dependent lipin1 induction prevents excessive lipid accumulation in choline-deficient diet-induced fatty liver. *Sci Rep.* 8, 14230, 2018.
- 10) Miura Y, Mstui S, Miyata N, Harada K, Kikkawa Y, Ohmuraya M, Araki K, Tsurusaki S, Okochi H, Goda N, Miyajima A, Tanaka M. Differential expression of Lutheran/BCAM regulates biliary tissue remodeling in ductular reaction during liver regeneration. *eLife.* 7, e36572, 2018.
- 11) Suzuki T, Minagawa S, Yamazaki T, Arai T, Kanai M, Shinjo S, Goda N. Loss of hypoxia inducible factor-1 α aggravates $\gamma\delta$ T cell-mediated inflammation during acetaminophen-induced liver injury. *Hepato Comm.* 2, 571-581, 2018.
- 12) Matsumoto L, Hirota Y, Saito-Fujita T, Takeda N, Tanaka T, Hiraoka T, Akaeda S, Fujita H, Shimizu-Hirota R, Igaue S, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Fujii T, Osuga Y. Hypoxia Inducible Factor 2 α in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelial detachment. *J Clin Invest.* 128, 3186-3197, 2018.
- 13) Yonashiro R, Eguchi K, Wake M, Takeda N, and Nakayama N. Pyruvate dehydrogenase PDH-E1beta is downregulated under prolonged hypoxic condition, and controls the progression of tumor growth by altering the metabolic status in cancer cells. *Cancer Res.* 78, 1592-1603, 2018.
- 14) Goodwin J, Choi H, Hsieh MH, Nuegent ML, Ahn JM, Hayenga HN, Singh PK, Shackelford DB, Lee IK, Shulaev V, Dhar S, Takeda N, Kim JW. Targeting HIF-1 α /PDK1 Axis by Dichloroacetate (DCA) Suppresses Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 58, 216-231, 2018.

- 15) Ishimoto Y, Inagi R, Yoshihara D, Kugita M, Nagao S, Shimizu A, Takeda N, Wake M, Honda K, Zhou J and Nangaku M. Mitochondrial Abnormality Facilitates Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Mol Cell Biol.* 37, e00337-17, 2017.
- 16) Mimura I, Hirakawa Y, Kanki Y, Kushida N, Nakaki R, Suzuki Y, Tanaka T, Aburatani H, Nangaku M. Novel lnc RNA regulated by HIF-1 inhibits apoptotic cell death in the renal tubular epithelial cells under hypoxia. *Physiol Rep.* 5, e13203, 2017.
- 17) Yamaguchi J, Tanaka T, Saito H, Nomura S, Aburatani H, Waki H, Kadowaki T, Nangaku M. Echinomycin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells in a HIF-independent manner. *Sci Rep.* 7, 6516, 2017.
- 18) Krzywinska E, Kantari-Mimoun C, Kerdiles Y, Sobacki M, Isagawa T, Gotthardt D, Castells M, Haubold J, Millien C, Viel T, Tavitian B, Takeda N, Fandrey J, Vivier E, Sexl V and Stockmann C. Loss of HIF-1 α in Natural Killer cells inhibits tumour growth by stimulating non-productive angiogenesis. *Nature Commun.* 8, 1597, 2017.
- 19) Goodwin J, Neugent ML, Lee SY, Choe JH, Choi H, Jenkins DMR, Ruthenborg RJ, Robinson MW, Jeong JY, Wake M, Abe H, Takeda N, Endo H, Inoue M, Xuan Z, Yoo H, 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.
- 20) Shinjo S, Jiang S, Nameta M, Suzuki T, Kanai M, Nomura Y, Goda N. Disruption of the Mitochondria-Associated ER Membrane (MAM) Plays a Central Role in Palmitic Acid-Induced Insulin Resistance. *Exp Cell Res.* 359, 86-93, 2017.
- 21) Arai T, Ono Y, Arimura Y, Sayama K, Suzuki T, Shinjo S, Kanai M, Abe S, Semba K, Goda N. Type I neuregulin1 α is a novel local mediator to suppress hepatic gluconeogenesis in mice. *Sci Rep.* 7, 42959, 2017.
- 22) Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Arif A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K. HIF-1 α in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. *Diabetes.* 65, 3649-3659, 2016.
- 23) 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. p38 α Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress. *Cell Stem Cell.* 19, 192-204, 2016.
- 24) 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-1 α -PDK1 axis induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nature Commun.* 7, 11635, 2016.
- 25) Fujimoto Y, Urashima T, Shimura D, Ito R, Kawachi S, Kajimura I, Akaike T, Kusakari Y, Fujiwara M, Ogawa K, Goda N, Ida H, Minamisawa S. Low Cardiac Output Leads Hepatic Fibrosis in Right Heart Failure Model Rats. *PLoS One.* 11, e0148666, 2016.
- 26) 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, 2015.
- 27) Suzuki T, Shinjo S, Arai T, Kanai M, Goda N. Hypoxia and Fatty liver. *World J Gastroenrol.* 20, 15087-15097, 2014.

研究課題名： 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
Molecular physiological studies of in vivo hypoxia niche: formation, sensing and adaptation

研究期間： 平成26年度～平成30年度

研究課題番号： 26111004

研究代表者名： 森 泰生（京都大学 工学研究科 教授）

研究分担者名： 長嶋 一昭（京都大学 医学研究科 講師）（26-28年度）

矢部 大介（京都大学 医学研究科 特定准教授）（28-30年度）

研究協力者名： 永松 剛（九州大学 医学研究科 准教授）（26-30年度）

田久保 圭誉（国立国際医療研究センター研究所

生体恒常性プロジェクト プロジェクト長）（26-30年度）

森 誠之（京都大学 工学研究科 准教授）（26-30年度）

黒川 竜紀（京都大学 工学研究科 助教）（26-28年度）

坂口 怜子（京都大学 高等研究院 特定助教）（26-30年度）

<研究の目的>

分子状酸素 (O_2) の生物学的研究においては、好気性生物に備わる酸素の供給の不足を回復する仕組みの研究が主流であったが、本領域は生体内の低酸素環境が積極的な意義を有する点に注目した。

生体の低酸素環境への適応過程で最初に重要なのが、酸素濃度の変化の見張り役となるセンシング機構である。急性の (acute) 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、頸動脈小体の血中酸素濃度感知における圧倒的な優位性が信じられてきた。分子機構に関しても精力的に研究がすすめられ、複数の機構 (CO や H_2S の産生酵素、AMP キナーゼ等) を介して、低酸素環境が K^+ チャンネル群を閉じることにより膜電位を脱分極させ、頸動脈小体 glomus 細胞からの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きた。しかし、延髄等中枢神経等によるセンシング機構は未解明であり、また、生体内に偏在するといわれてきた他の酸素センサー大動脈小体、神経上皮層等) も未同定である。森は迷走神経が呼吸器による酸素取り込みを調節することを示し、頸動脈小体のドグマへの挑戦が胎動しつつあった。一方、緩徐な (chronic) 適応における酸素センシングに関しては、プロリン (Pro) 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、分子基盤として鍵となることが認識されていた。しかし、PHD の作用標的や他の酸素を基質とする多様なヒドロキシ化酵素や、体内に広汎に発現する HIF が大多数の生体構成細胞において果たす役割は未解明である。さらに急性相と緩徐相の酸素センシングの間に関係は全く未解明であり、酸素生物学の重要課題である。

TRP (Transient Receptor Potential) は、各々がユニークな活性化の物理的・化学的感受性を示すセンサーチャンネル群である。森は世界に先駆け、TRPM2 が活性酸素種 (ROS) 高感受性を示す Ca^{2+} 透過型陽イオンチャンネルであることを示した。また、Cys 酸化を介して、ROS、一酸化窒素 (NO)、親電子物質等を感知する TRP 群を見出した。特に、TRPA1 が迷走神経における酸素センサーとして、体外の低酸素或は高酸素環境に対する呼吸機能の適応を担うことを示し、組織・器官への酸素到達の調節にレドックスセンサーTRP が深く関与する最初の例となった。TRPM7 は、無酸素環境により強く活性が増強され神経細胞死を惹起するが、酸素存在下では Mg^{2+} 流入により PI-3 キナーゼ-Akt 経路を介して、細胞増殖を増進することが報告されていた。

このような背景の元、本研究では生体内における低酸素環境の形成・感知・適応の基盤となる機構とその意義の解明を目指した。まず、主として「急性」の酸素適応応答に

関連する酸素センシング機構の全体像を解明すべく、酸素受容器（頸動脈小体、延髄等中枢神経等）の酸素センシングに果たす、TRPA1 チャンネルを中心としたレドックスセンサーTRP 群の役割を探究した。次に、酸素或いは ROS プローブに 2 光子顕微鏡イメージング等を組み合わせた生体内酸素環境の可視化手法を、領域内連携により開発した。さらに、より生理的な生命現象へと研究を展開し、酸素環境がいかに関与し、シグナル経路・転写活性化に影響を与え、生命現象を惹起するかの探究を目的として研究を推進した。

<研究の成果>

(1) アストロサイトの酸素センシング機構の解明

中枢神経系において、アストロサイトが担う酸素センシングの基盤となる分子機構を解明し、その脳内部位間の不均一性を示した（未発表）。

(2) 細胞増殖における ROS 感受性チャンネル TRPA1 の役割の解明（論文 7）

酸素の下流で働く ROS を介したシグナル経路に関連し、ヒト乳がん細胞において ROS 存在下で Keap1-Nrf2 により転写誘導を受けた TRPA1 チャンネルが Ca^{2+} を流入させることにより、AKT キナーゼ等を介した増殖シグナルを活性化することを解明した。

(3) 4 量体 TRPV1 チャンネル中のサブユニット間での ROS 感受性不均一性（論文 22）

ROS や熱のセンサーとして働く TRPV1 チャンネルにおいて、ホモ 4 量体中の 4 組の同一 Cys 残基（ヒトでは Cys258 と Cys742）が異なる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、及びフリーな還元型が存在し、各々が 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 感受性を生じさせることを示した最初の例である。

(4) ミトコンドリアにおけるエネルギー産生定量化の理論的基盤（論文 27）

エネルギーの代謝は、酸素環境に依存してミトコンドリアにおける好氣的な酸化的リン酸化から、嫌氣的な解糖系へ切り替える。それを定量的に観察できる蛍光性の温度（熱産生）センサー-tsGFP の有効性について、熱力学的な視点から理論的基盤を確立した。

(5) ROS 感受性チャンネル TRPV4 の制御因子としての PIP_2 の評価（論文 28）

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、チャンネル活性制御に phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) が重要であることを示した。即ち、 PIP_2 は TRPV4 に対して抑制的に作用し、inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) 等はそれを中和することによりチャンネル活性を亢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_2 が結合することを初めて示した成果でもある。

<研究の意義・展望>

本研究によって、酸素センサー細胞・分子の同定を中心に、生体内低酸素環境の形成・感知・適応の基盤となる機構、及びその意義の理解を前進させることができた。また、成果は基礎生物学、医科学、薬学等の幅広い分野に関係し、臨床医学、医工学、食品、環境科学やケミカルバイオロジーといった学際・応用分野の発展にも結び付いた。

<主な研究発表>

- 1) 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 Ca²⁺ fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development. *Science Signal*. 12, eaaw4847, 2019.
- 2) Ota W, Nakane Y, Kashio M, Suzuki Y, Nakamura K, Mori Y, Tominaga M, Yoshimura T. Involvement of TRPM2 and TRPM8 in temperature-dependent masking behavior. *Sci. Rep.* 9, 3706, 2019.
- 3) Andoh C, Nishitani N, Hashimoto E, Nagai Y, Takao K, Miyakawa T, Nakagawa T, Mori Y, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. TRPM2 confers susceptibility to social stress but is essential for behavioral flexibility. *Brain Res.* 1704, 68-77, 2019.
- 4) Polat OK, Uno M, Maruyama T, Tran HN, Imamura K, Wong CF, Sakaguchi R, Ariyoshi M, Itsuki K, Ichikawa J, Morii T, Shirakawa M, Inoue R, Asanuma K, Reiser J, Tochio H, Mori Y, Mori MX. Contribution of coiled-coil assembly to Ca²⁺/Calmodulin-dependent inactivation of TRPC6 channel and its impacts on FSGS-associated phenotypes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 30, 1587-1603, 2019.
- 5) 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.
- 6) Tsutsui M, Hirase R, Miyamura S, Nakagawa T, Mori Y, Shirakawa H, Kaneko S. TRPM2 exacerbates central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing production of CXCL2 chemokines. *J. Neurosci.* 38, 8484-8495, 2018.
- 7) 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.
- 8) Miyanohara J, Kakae M, Nagayasu K, Nakagawa T, Mori Y, Arai K, Shirakawa H, Kaneko S. TRPM2 channel aggravates CNS inflammation and cognitive impairment via activation of microglia in chronic cerebral hypoperfusion. *J. Neurosci.* 38, 3520-3533, 2018.
- 9) Gershkovitz M, Caspi Y, Fainsod-Levi T, Katz B, Michaeli J, Khawaled S, Lev S, Polyansky L, Shaul ME, Sionov RV, Cohen-Daniel L, Aqeilan RI, Shaul Y, Mori Y, Karni R, Fridlender ZG, Binshtok AM, Granot Z. TRPM2 mediates neutrophil killing of disseminated tumor cells. *Cancer Res.* 78, 2680-2690, 2018.
- 10) Miyake T, Nakamura S, Meng Z, Hamano S, Inoue K, Numata T, Takahashi N, Nagayasu K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. Distinct mechanism of cysteine oxidation-dependent activation and cold sensitization of human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 channel by high and low Oxaliplatin. *Front. Physiol.* 8, 878, 2017.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Numata T, Tsumoto K, Yamada K, Kurokawa T, Hirose S, Nomura H, Kawano K, Kurachi Y, Inoue R, Mori Y. Integrative approach with electrophysiological theoretical methods reveals a role of S4 positively charged residues in PKD2L1 voltage-sensing. *Sci. Rep.* 7, 9760, 2017.
- 14) 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.

- 15) Numaga-Tomita T, Kitajima N, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M. TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 39383, 2016.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) So K, Tei Y, Zhao M, Miyake T, Hiyama H, Shirakawa H, Imai S, Mori Y, Nakagawa T, Matsubara K, Kaneko S. Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci. Rep.* 6, 23261, 2016.
- 19) 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.
- 20) Shibata T, Takahashi K, Matsubara Y, Inuzuka E, Nakashima F, Takahashi N, Kozai D, Mori Y, chida K. Identification of a prostaglandin D2 metabolite as a neuritogenesis enhancer targeting the TRPV1 ion channel. *Sci. Rep.* 6, 21261, 2016.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Takaya J, Mio K, Shiraishi T, Kurokawa T, Otsuka S, Mori Y, Uesugi M. A potent and site-selective agonist of TRPA1. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 15859-15864, 2015.
- 25) 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, 2015.
- 26) Ostapchenko VG, Chen M, Guzman MS, Xie YF, Lavine N, Fan J, Beraldo FH, Martyn AC, Belrose JC, Mori Y, MacDonald JF, Prado VF, Prado MA, Jackson MF. The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) channel contributes to β -Amyloid oligomer-related neurotoxicity and memory impairment. *J. Neurosci.* 35, 15157-15169, 2015.
- 27) 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.
- 28) 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)P2. *Nature Commun.* 5, 4994, 2014.
- 29) Jang Y, Lee MH, Lee J, Jung J, Lee SH, Yang DJ, Kim BW, Son H, Lee B, Chang S, Mori Y, Oh U. TRPM2 mediates the lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in the developing brain. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* 466, 1987-1998, 2014.
- 30) Qian X, Numata T, Zhang K, Li C, Hou J, Mori Y, Fang X. Transient receptor potential melastatin 2 protects mice against polymicrobial sepsis by enhancing bacterial clearance. *Anesthesiology* 121, 336-351, 2014.

研究課題名： 腫瘍内低酸素応答を利用した癌悪性化制御法の開発
Development of cancer therapy based on the hypoxia response of cancer cells
研究期間： 平成 26 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 26111005
研究代表者名： 井上 正宏（京都大学 医学研究科 特定教授）
研究分担者名： 青木 正博（愛知県がんセンター研究所 分野長）（26-30 年度）

<研究の目的>

癌組織の内部環境は低酸素であり、低酸素は癌の転移などの悪性化や治療抵抗性と密接に関連している。癌細胞は、供給の不足下で酸素消費をすることで低酸素になると、酸素消費を落として危機的な酸素欠乏を回避すると同時に、幹細胞性の獲得や分化誘導など質的な変化が惹起される。このような酸素リモデリングによって確立する動的平衡の実態を明らかにすることを目的とした。低酸素状態の癌細胞の特徴を、我々の開発した癌細胞初代培養法 Cancer Tissue-Originated Spheroid 法 (CTOS 法) を用いて生化学的、分子生物学的に明らかにするとともに、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、dormancy マーカーの探索およびそれを利用して dormancy マーカー遺伝子のプロモーターで細胞標識し dormancy 細胞の運命を追跡することを計画した。また、マウスモデルを用いて、腸管腫瘍の形成における低酸素関連因子の役割を明らかとすることを目的とした。

<研究の成果>

(1) 低酸素でがん遺伝子活性を抑制して休眠状態を誘導するメカニズムの解明（論文 1, 2, 6）

癌の増殖はドライバー変異によって維持されているが、環境変化による微調整があるのかどうか明らかでなかった。まず、我々は EGFR 活性型変異を有する肺癌由来 CTOS は、大腸癌と同様に、低酸素下で可逆的な休眠状態に陥ること、この休眠状態下の CTOS は、EGFR TKI 耐性であることを明らかにした。低酸素下で dormancy 状態にある肺癌 CTOS は、EGFR がドライバー変異を持っているにも関わらず、EGFR と HER3 の会合が低下し、HER2、HER3 のリン酸化が低下した。EGFR の内因性阻害物質 MIG6 (ERRFI1) の発現は低酸素で上昇し、MIG6 の発現を抑制すると dormancy 状態にならない。EGFR 活性型変異を有する肺癌細胞は、MIG6 の誘導により積極的に EGFR シグナルを抑制することで dormancy に陥ることを示した。つまり、がん細胞は環境によって積極的にドライバーシグナルを抑制することで dormancy 状態になることが実証された。これは典型的な「酸素リモデリング」の一例である。

活動状態と dormancy 状態の遺伝子発現を網羅的に比較解析し dormancy マーカーの探索を試みたが、遺伝子発現と蛋白レベルとの不一致が顕著であった。これは dormancy 状態におけるタンパク合成の低下や分解の亢進によるものと考えられる。MIG6 のように低酸素状態下でも mRNA が polysome 分画に存在する蛋白を網羅的に解析することが、dormancy マーカーの探索に有用である可能性が示唆された。CTOS を用いたハイスループット化合物スクリーニング系を開発し、dormancy CTOS を対象として dormancy 細胞を障害する薬剤のスクリーニングを行い、共通の標的をもつ複数の分子標的薬を同定した（論文投稿準備中）。

(2) 子宮頸部小細胞癌・腺癌混合腫瘍における低酸素による分化方向性の決定機構（論文査読中）

CTOS 法の利点の一つは、患者ががんの分化形質を培養条件下でも保持するこ

とである。子宮頸部小細胞神経内分泌癌は臨床的にしばしば腺癌との混合癌を形成するが、一つの CTOS ラインは患者腫瘍と同様に混合腫瘍の表現型を示した。患者腫瘍やマウス移植腫瘍、CTOS を、小細胞癌、腺癌それぞれのマーカーで染色すると、明確に一方のマーカーが検出される部位と両者が発現する部位、全く発現していない部位が混在することが分かった。そこで、まず CTOS に EGFP を導入して単細胞追跡し、両成分がクローナルな起源をもつことを証明した。単細胞遺伝子発現解析の結果、明確に二つの組織型の特徴を示すクラスターに加え、小細胞癌の傾向は示すが特徴的でないクラスターの存在が示された(論文査読中)。また、HIF 下流の遺伝子が鮮明に活性化しているクラスターが存在したことから、低酸素が分化方向を規定する因子であるとの仮説を立てた。実際に低酸素培養すると小細胞がんマーカーの発現が減弱し(図 2)、それは HIF-1 α と Notch シグナル依存的であった。他の小細胞癌 CTOS ラインでも、低酸素下で、小細胞がんマーカーが減弱した(論文査読中)。このような分化方向の制御も、酸素リモデリングの一例と言える。肺癌では腺癌が治療中に小細胞がんに変換することは臨床的に報告されており、本研究は今後の治療法の開発に重要な知見となる。

(3) 腸管腫瘍形成における低酸素関連因子の役割の解明

大腸がんマウスモデルである Apc Δ 716 マウスの腸管腫瘍では、HIF-1 α 、HIF-2 α およびそれらの標的遺伝子の発現は細胞増殖が盛んな部分で亢進しており、高度な低酸素領域とは合致しなかった。腸管上皮細胞特異的に HIF-1 α 、HIF-2 α をそれぞれ欠失させたところ、いずれも腫瘍サイズ、数ともに顕著に減少した。腸管腫瘍内では低酸素非依存的に HIF-1 α 、HIF-2 α が発現誘導され、それらが腫瘍細胞の増殖に寄与することを示した。正常大腸上皮では、腸内細菌叢により作り出された生理的低酸素環境により HIF が発現誘導されることから、腸管における低酸素および低酸素疑似環境の重要性が明らかになった。(論文投稿準備中)。

Apc Δ 716 マウスの腸管上皮細胞特異的に MyD88 を欠失させたところ、HIF-1 α のタンパク量の減少および標的遺伝子の発現低下を伴って腫瘍数が顕著に減少した。腸管腫瘍細胞由来オルガノイドで MyD88 を欠失させるとアポトーシスが引き起こされ、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 においても MyD88 のノックダウンは同様の作用を示したことから、Wnt 経路活性化と MyD88 の欠失が合成致死に働くことを明らかにした。また、腸管腫瘍上皮細胞での MyD88 欠失により mTORC1 経路が強く抑制されること、HIF-1 α は MyD88 の下流で mTORC1 により発現調節されることが分かり、大腸がんにおいて MyD88/mTOR/HIF-1 α 経路が治療標的となる可能性が示された(論文投稿準備中)。

<研究の意義・展望>

癌は増殖疾患であるため、増殖を標的とした治療法が開発されてきた。分子標的治療法もその一翼を担うが、一定の効果はあるものの、癌を根治することができない。本研究は、本領域研究が提唱した酸素リモデリングの概念、つまり、「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」ことを、dormancy を軸に実証した。本研究で得られた成果は、がんにおける治療抵抗性を理解し、新たな治療戦略を開発する基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Endo H, Inoue M. Dormancy in cancer. *Cancer Sci.* 110, 474-480, 2019.
- 2) Kondo J, Ekawa T, Endo H, Yamazaki K, Tanaka N, Kukita Y, Okuyama H, Okami J, Imamura F, Ohue M, Kato K, Nomura T, Kohara A, Mori S, Dan S, Inoue M. High-Throughput Screening in Colorectal Cancer Tissue-Originated Spheroids. *Cancer Sci.* 110, 345-355, 2018.
- 3) Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, Aoki M. HNRNPLL

- stabilizes mRNAs for DNA replication proteins and promotes cell cycle progression in colorectal cancer cells. *Cancer Sci.* 109, 2458-2468, 2018.
- 4) Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, Aoki M. HNRNPLL, a newly identified colorectal cancer metastasis suppressor, modulates alternative splicing of CD44 during epithelial-mesenchymal transition. *Gut.* 67, 1103-1111, 2018.
 - 5) Goodwin J, Neugent ML, Lee SY, Choe JH, Choi H, Jenkins DMR, Ruthenborg RJ, Robinson MW, Jeong JY, Wake M, Abe H, Takeda N, Endo H, Inoue M, Xuan Z, Yoo H, Chen M, Ahn JM, Minna JD, Helke KL, Singh PK, Shackelford DB, Kim JW. The distinct metabolic phenotype of lung squamous cell carcinoma defines selective vulnerability to glycolytic inhibition. *Nature communications.* 8, 15503, 2017.
 - 6) 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.
 - 7) Fujishita T, Kojima Y, Kajino-Sakamoto R, Taketo MM, Aoki M. Tumor microenvironment confers mTOR inhibitor resistance in invasive intestinal adenocarcinoma. *Oncogene.* 36, 6480-6489, 2017.
 - 8) 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.
 - 9) Kiyohara Y, Yoshino K, Kubota S, Okuyama H, Endo H, Ueda Y, Kimura T, Kimura T, Kamiura S, Inoue M. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer Sci.* 107, 452-460, 2016.
 - 10) Mori Y, Takahashi N, Polat OK, Kurokawa T, Takeda N, Inoue M. Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation. *Pflugers Archiv: European journal of physiology.* 468, 85-97, 2016.
 - 11) Furukawa T, Yuan Q, Jin ZH, Aung W, Yoshii Y, Hasegawa S, Endo H, Inoue M, Zhang MR, Fujibayashi Y, Saga T. A limited overlap between intratumoral distribution of 1-(5-fluoro-5-deoxy- α -D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazole and copper-diacetyl-bis[N(4)-methylthiosemicarbazone]. *Oncology reports.* 34, 1379-1387, 2015.
 - 12) 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. *Scientific reports.* 5, 10657, 2015.

研究課題名： 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

Investigation of hypoxia adaptation and metabolic regulation in the cancer- and senescence-resistant rodent, the naked mole rat.

研究期間： 平成 26 年度～平成 30 年度

研究課題番号： 26111006

研究代表者名： 三浦 恭子（熊本大学 大学院先端機構 准教授）

研究分担者名： 南嶋 洋司（群馬大学 大学院医学系研究科 教授）（26-30 年度）

杉浦 悠毅（慶應義塾大学 医学部 講師）（26-30 年度）

<研究の目的>

本研究では、ハダカデバネズミと通常酸素下に生息するマウスとの線維芽細胞・iPS 細胞・肝臓等の臓器の種間比較解析により、ハダカデバネズミ種特異的な低酸素適応を制御する分子代謝機構の解析を進め、ハダカデバネズミのがん化・老化耐性の表現型を制御する代謝メカニズムの解明を目指した。

<研究の成果>

(1)ハダカデバネズミにおける特徴的な中心代謝プロファイルの解明

ハダカデバネズミとマウスのメタボローム・トランスクリプトームの種間比較を実施し、低酸素適応動物であるハダカデバネズミにおける低代謝プロファイルを、細胞及び臓器レベルで明らかにした。メタボロミクスの解析結果から着想したある条件において、個体への負荷実験を実施したところ、この条件でマウスにおいて生じる異常が、ハダカデバネズミではまったく生じないという結果が得られた。この耐性メカニズムは、ハダカデバネズミの加齢性疾患への抵抗性の一因となっていると考えられた。また、ハダカデバネズミで酸化ストレス低減、老化耐性に寄与していると考えられる代謝経路の亢進部位についても明らかにすることができた。本内容については、現在論文投稿準備中である。

(2)ハダカデバネズミ iPS 細胞における、種特有の腫瘍化抑制機構の解明（論文 5, 8）

ハダカデバネズミ iPS 細胞を樹立したところ、興味深いことに他の動物種とは異なり、低酸素下では初期化が抑制されることが明らかになった。また、培養下では多分化能を持つにも関わらず、他の動物種由来 iPS 細胞とは異なり、生体への移植後に腫瘍（奇形腫）を形成しなかった。その特有の腫瘍化耐性の分子機構として、ヒトやマウスの iPS 細胞で発現抑制されるがん抑制遺伝子 ARF (Alternative Reading Frame) のハダカデバネズミ特異的な発現亢進およびマウス ES 細胞の造腫瘍性に重要ながん遺伝子 ERAS の機能欠失が寄与することが明らかとなった。ARF は様々なストレスに応じて発現が亢進し、p53 依存性および非依存性な経路により細胞の増殖を抑制する。ヒトやマウス細胞のリプログラミング過程では、初期化のストレスにより ARF が一旦発現し、その後 ARF が抑制された細胞が iPS 細胞になると考えられている。なぜハダカデバネズミ iPS 細胞では ARF が活性化したまま初期化されているのかを明らかにするため、我々は、ハダカデバネズミ線維芽細胞において初期化を誘導中に、ARF の発現を人為的に抑制した。その結果、ARF を抑制したハダカデバネズミ線維芽細胞では、種特異的に細胞老化が誘導された。つまりハダカデバネズミ線維芽細胞は、初期化時に ARF が抑制されると細胞増殖が停止するため、対照的に ARF の発現が維持された増殖能をもつ細胞が、コロニーを形成して ARF 活性化型の腫瘍化耐性 iPS 細胞として選択されたと考えられた。我々はさらに、ARF ががん遺伝子の活性化などによる異常な細胞増殖シグナルによっても発現亢進するという事実と、初期化とがん化には類似性があるという、近年明らか

になってきた知見に着目し解析を進めた。その結果、この ARF 抑制時の細胞老化は初期化時のみならず、Myc 強制発現によるがん化ストレスや培養ストレスの存在下でも生じることが明らかになり、iPS 細胞だけではなくハダカデバネズミ個体のがん化耐性にも寄与すると考えられた。以上の結果から我々はこの現象を「ASIS : ARF suppression-induced senescence (ARF 抑制時細胞老化)」として報告した。ハダカデバネズミでは、ARF の抑制というヒトやマウスではがん化につながるような事象が生じた場合、ASIS という種特有の細胞老化を起こし、がん化の危機を回避していると考えられる。

(3)変温性・低代謝齧歯類ハダカデバネズミにおける褐色脂肪組織の役割 (論文 1)

ハダカデバネズミ特有の低代謝には、個体の変温性も密接に関わると考えられる。恒温性哺乳類の体温・代謝の制御に関わる褐色脂肪組織について解析を進めたところ、変温性哺乳類であるハダカデバネズミにおいては、非寒冷環境において社会的地位・行動依存的に、褐色脂肪組織の活性化が生じることを明らかにした。社会状況変化を感知した代謝制御は、低酸素環境における通常時の酸素消費節約と必要に応じた速やかな活発化を両立する仕組みと考えられ、低酸素適応哺乳類における体温維持メカニズムとして非常に興味深い。本内容については論文投稿中である。また、麻布大学との共同研究により閉鎖環境での低代謝にも関連する集団社会性の制御機構について新たな知見が得られ、論文化した。

(4)ユニークな分析法の確立 (論文 2, 3, 4, 6)

分担研究者の杉浦らは、上記項目(1-3)にも使用した、高感度な質量分析メタボローム法を開発した。従来は水溶性代謝物のメタボローム解析はキャピラリー電気泳動・質量分析法が用いられて来たが、感度が低い事が問題であった。本研究において、Thermo Fisher Scientific 社と共同研究を行い、新しいクロマトグラフィー法 (ion chromatography(IC))と質量分析を組み合わせた高感度メタボローム解析法(IC/MS)を確立した。さらに、組織(臓器)のメタボローム解析では、臓器を構成する多くの細胞種のうち、どのポピュレーションに代謝変動が見られるかは分からない。イメージング質量分析を高感度化させ、生体内で酸素添加酵素により産生されるステロイドホルモンや、モノアミンをイメージング可能とした。ステロイドホルモンは、コレステロールを原料とし、多様な酸素添加酵素により産生される。中でも高度に酸素添加されたアルドステロンは、原発性アルドステロン症患者血中で上昇するが、この様な高度な酸素添加反応を、患者副腎のどの細胞が産生しているかは不明であった。高感度イメージング質量分析法を用いる事で、従来考えられていた巨大な副腎腫瘍が生じるよりも以前に、Aldosterone producing cell cluster (APCC)と呼ばれる細胞群が存在し、これらが機能的にアルドステロンを産生する様子を初めて可視化した。

(5)低酸素応答による新規代謝制御機構の解明 (論文 7, 9, 10)

低酸素環境下で生息するハダカデバネズミの特殊な代謝システムを理解する上で、種を越えて共通な「低酸素応答による代謝制御機構」そのものの全貌を把握することは必須である。低酸素環境下においては、細胞のエネルギー代謝は、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化(酸素を必要とする)から、解糖の活性化(酸素を必要としない)へと劇的にシフトし、その結果大量の乳酸が細胞外へと放出されるのだが、しかし個体が乳酸アシドーシスに陥ることはない。すなわち、低酸素環境において、全身の細胞で低酸素応答が活性化して大量の乳酸が細胞外(血中)に放出される状況においてもなお、我々の身体には乳酸を処理するメカニズムが備わっているということになる。分担研究者の南嶋らは、低酸素応答は①血中乳酸の肝臓(あるいは腎臓)への取り込みと、②肝

(・腎)における乳酸からの糖新生を活性化することを、マウスを用いて明らかにした。この結果は、低酸素環境下での個体レベルでのエネルギー代謝制御機構についての新しい知見をもたらしただけでなく、致死率が非常に高い乳酸アシドーシスに対する新規治療法の開発へのヒントをもたらし、臨床現場へのインパクトの大きな研究成果が得られた (WO2017-175859: 乳酸アシドーシスの予防又は治療のための医薬)。

<研究の意義・展望>

本研究で得られた成果は、非モデル動物を用いた酸素環境応答・疾患研究の基盤として非常に重要である。さらに、高感度かつ位置情報を保持可能な分析法の確立、また新規の低酸素応答的な代謝制御機構の解明を通じ、ハダカデバネズミだけでなく、今後、より広範な生物学・医学研究に応用されることが期待できる。

<主な研究発表>

- 1) Watarai A, Arai N, Miyawaki S, Okano H, Miura K, Mogi K and Kikusui T. Responses to pup vocalizations in subordinate naked mole-rats are induced by estradiol ingested through coprophagy of queen's feces. *PNAS*. 115, 9264-9269, 2018.
- 2) 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 International*. 94, 912-925, 2018.
- 3) Sugiura Y, Takeo E, Shimma S, Yokota M, Higashi T, Seki T, Mizuno Y, Oya M, Kosaka T, Omura M, Nishikawa T, Suematsu M, and Nishimoto K, Aldosterone and 18-Oxocortisol Coaccumulation in Aldosterone-Producing Lesions. *Hypertension*. 72, 1345-1354, 2018.
- 4) Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N. PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. *Cancer Cell*. 33, 355-367.e7, 2018.
- 5) Miyawaki S, Okada Y, Okano H, Miura K. Teratoma Formation Assay for Assessing Pluripotency and Tumorigenicity of Pluripotent Stem Cells. *Bioprotocol*. 7, e2518, 2017.
- 6) Miyazawa H, Yamaguchi Y, Sugiura Y, Honda K, Kondo K, Matsuda F, Yamamoto T, Suematsu M, Miura M. Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching. *Development*. 144, 63-73, 2017.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Futatsugi K, Tokuyama H, Shibata S, Naitoh M, Kanda T, Minakuchi H, Yamaguchi S, Hayashi K, Minamishima YA, Yanagita M, Wakino S, Itoh H. Obesity-induced kidney injury is attenuated by amelioration of aberrant PHD2 activation in proximal tubules. *Sci Rep*. 6, 36533, 2016.
- 10) 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, 11642-47, 2015.

研究課題名： 緑膿菌の低酸素適応に関わる酸素高親和性呼吸酵素の機能解析
Studies on the high affinity terminal oxidases for microaerobic respiration in
Pseudomonas aeruginosa

研究期間： 平成 27 年度～平成 28 年度

研究課題番号： 15H01393

研究代表者名： 新井 博之（東京大学大学院 農学生命科学研究科 准教授）

<研究の目的>

緑膿菌は抗生物質や各種ストレスに対する耐性が高いことから感染症治療の面で問題となっている日和見細菌である。本菌は高度に分岐した呼吸鎖電子伝達系を持ち、低酸素もしくは嫌気的環境である感染病巣での生存能力が高い。本菌の好気呼吸においては、酸素濃度に依らず *cbb*₃ 型の酸素高親和性シトクロム *c* 酸化酵素が主に働くことで、病原性発現に有利な低酸素もしくは還元的環境を自ら作り出していると考えられる。緑膿菌のゲノムには *cbb*₃ 型酵素を構成するサブユニットの遺伝子が複数存在し、それらにコードされるイソサブユニットの組み合わせを換えることで性質の異なる 16 種類の活性型酵素アイソフォームを生産する。本研究では、各アイソフォームが緑膿菌のストレス耐性や病原性に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

<研究の成果>

(1) *cbb*₃ 型酵素アイソフォームの機能解析（論文 4）

緑膿菌はゲノム上に *cbb*₃ 酵素複合体(CcoNOP)のサブユニットをコードする 2 個の完全遺伝子群(*ccoN1O1Q1P1*, *ccoN2O2Q2P2*)と 2 個の不完全遺伝子群(*ccoN3Q3*, *ccoN4Q4*)を持ち、これらの遺伝子産物であるイソサブユニットの組み合わせにより 16 種類の *cbb*₃ 酵素アイソフォームを生産することができる。これらは主要サブユニット(CcoN)の種類により 4 タイプ(N1～N4 型)に分類できる。各タイプのアイソフォームについて、プロトン排出効率、および、酸素に対する親和性を調べた結果、いずれのアイソフォームもプロトン排出効率に大差は無く、また、いずれのアイソフォームも酸素に対する *K_m* 値が低く、高親和性酵素であることが示された。しかし、N3 型と N4 型酵素は、それぞれ亜硝酸とシアンに対する耐性が高く、低酸素環境における活性窒素や呼吸阻害剤耐性に寄与していることが明らかとなった。

(2) N3 型および N4 型酵素の発現制御解析

N3 型酵素と N4 型酵素は、それぞれ亜硝酸イオンおよびシアン化物イオンにより誘導発現する。*ccoN3Q3* と *ccoN4Q4* の転写を制御する調節因子を探索した結果、*ccoN3* プロモーターは亜硝酸に応答する LysR タイプの調節因子、*ccoN4* プロモーターはシアン化物イオンに応答する GntR タイプの調節因子によって制御されることを明らかにし、それぞれの転写調節因子を NirY、CicR と名付けた。大腸菌で異種発現、精製した CicR を用いた機能解析の結果、CicR はピリドキサルリン酸(PLP)を補因子として持ち、PLP とシアン化物イオンがシアノヒドリンを形成することで、シアン化物イオンを感知することが示唆された。また、ゲルシフト解析により、CicR は *ccoN4* 遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合するのに対し、高酸素条件でのシアン耐性呼吸に関わる Cyanide insensitive oxidase の発現制御には直接関与しないことが明らかになった。

(3) *cbb*₃ 酵素複合体形成機構の解析

CcoQ は *cbb*₃ 酵素複合体のアセンブリーに関与すると推定されているが、その具体的な役割は不明である。緑膿菌の 4 個の *cco* 遺伝子群にはそれぞれ *ccoQ* 遺伝子が存在す

るため、*cbb*₃ 酵素アイソフォームの形成にそれぞれの *ccoQ* 遺伝子産物が関与していると考えられた。*CcoN1O1P1* または *CcoN2O2P2* のみを発現し、*ccoQ1* または *ccoQ2* を欠失した発現プラスミドを用いた場合には、シトクロム *c* 酸化活性を示さなかったため、*CcoQ1* と *CcoQ2* は活性型酵素の形成に必要であることが示された。しかし、*ccoQ1* を別の発現プラスミドで相補した場合に活性が回復しなかったため、遺伝子クラスターの構造や発現順序が酵素複合体の形成に必要と予想された。

<研究の意義・展望>

緑膿菌は低酸素～嫌気条件での生存力が高く、この性質が本菌の感染力や病原性に寄与していると考えられている。本研究の成果により、酸素高親和性の性質の異なる複数の *cbb*₃ 型シトクロム *c* 酸化酵素を生産し、それらを主要な呼吸酵素として利用することが、低酸素環境である感染病巣での緑膿菌のストレス耐性に寄与することが示された。*cbb*₃ 型酵素は細菌特有であり、コレラ菌やピロリ菌などの病原菌も、感染病巣での生存にこのタイプの酵素を利用することから、*cbb*₃ 型酵素を標的とする薬剤の探索により、新たな感染症治療への道が開ける可能性が示された。

<主な研究発表>

- 1) Yamagiwa R, Kurahashi T, Takeda M, Adachi M, Nakamura H, Arai H, Shiro Y, Sawai H, Tosha T. *Pseudomonas aeruginosa* overexpression system of nitric oxide reductase for *in vivo* and *in vitro* mutational analyses. ***Biochim. Biophys. Acta*** 1859, 333–341, 2018.
- 2) 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.
- 3) Terasaka E, Yamada K, Wang PH, Hosokawa K, Yamagiwa R, Matsumoto K, Ishii S, Mori T, Yagi K, Sawai H, Arai H, Sugimoto H, Sugita Y, Shiro Y, Tosha T. Dynamics of nitric oxide controlled by protein complex in bacterial system. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 114, 9888-9893, 2017.
- 4) Hirai T, Osamura T, Ishii M, Arai H. Expression of multiple *cbb*₃ cytochrome *c* oxidase isoforms by combinations of multiple isosubunits in *Pseudomonas aeruginosa*. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 113, 12815-12819, 2016.

研究課題名： 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－
Localization of transcription factors under hypoxic condition
- new role of prolyl-hydroxylase PHD -
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
Analysis of hypoxic response system based on characterizing Phd substrates

研究期間： 平成 27 年度～平成 30 年度

研究課題番号： 10451923

研究代表者名： 中山 恒（東京医科歯科大学 難治疾患研究所 准教授）

連携研究者名： 片岡 直行（東京大学 農学研究科 准教授）(27-30 年度)
與那城 亮（東京医科歯科大学 難治疾患研究所 助教）(29-30 年度)

<研究の目的>

本研究は、Phd と相互作用するタンパク質の機能解析から、低酸素応答の新たな制御機構の解明を目指した。Phd ファミリー(Phd 1, 2, 3)は、低酸素応答の中心因子である HIF- α のプロリン残基を水酸化する酵素であり、低酸素応答制御で主要な役割をする。Phd はその酵素活性に酸素を必要とすることから生体内の低酸素センサーと位置づけられ、タンパク質の「プロリン水酸化修飾」という形で酸素状態の変化を細胞内で伝達する。しかし、Phd が水酸化する HIF- α 以外の標的タンパク質の全容や、三種類の Phd の使い分けなど、未解明な点も多く残されている。研究代表者はこれまで継続して Phd3 の研究を行ってきた。これまでに、Phd3 が、グルコース代謝経路の主要分子であるピルビン酸脱水素酵素 PDH と結合して、その活性を正に保持する分子であることを明らかにしてきた。Phd3 と PDH は相互作用することから、PDH が Phd3 の新たな基質となり、PDH の活性調節には水酸化修飾が関与する可能性が考えられた。そこで、PDH の通常酸素・低酸素間での活性制御機構の詳細と、PDH の水酸化と活性状態との関連を明らかにするために研究を実施した。

<研究の成果>

(1) 低酸素環境下での代謝の切り換わりに働くピルビン酸脱水素酵素 PDH の新たな制御機構の発見（論文 3）

細胞は、低酸素環境では、エネルギー代謝を解糖系に依存した状態へと変化させる。この代謝の変化にはピルビン酸脱水素酵素 PDH が関与しており、PDH が低酸素下でリン酸化されて、その活性が抑制されることが重要であることがこれまでに報告されていた。低酸素下での PDH の活性制御機構をより詳しく解析したところ、リン酸化に加えて、PDH の発現が長期的な低酸素培養で減少することを明らかにした。そこで、この発現低下の意義を追究するために、PDH を shRNA で構成的にノックダウンした乳がん細胞株を樹立したところ、この細胞では TCA 回路の働きが顕著に低下しており、高度に解糖系に依存した典型的な低酸素性の代謝を示すことが明らかになった。次に、この低酸素性の代謝状態ががん細胞の腫瘍形成能にどのような影響を与えるのかを検証するために、PDH ノックダウン細胞株を免疫不全マウスに移植したところ、その腫瘍形成能が有意に低下していることが明らかになった。したがって、PDH の発現低下によって形成される、高度に解糖系に依存した代謝状態に恒常的に陥ることは、がん細胞の腫瘍形成に抑制的に働くことが示された。

(2) 長期的な低酸素応答で ER ストレスが引き起こされることを同定（論文 4）

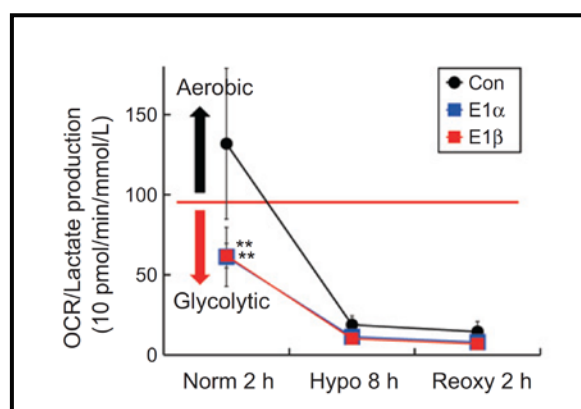
低酸素応答には、Hypoxia-Inducible Factor (HIF)をはじめ、さまざまな転写因子が関与している。長期的な低酸素応答時には、CREBが活性化されることをこれまでに見出ししていた。本研究では、新たにCREBがERストレス応答時にも活性化されることを明らかにした。この時に、活性化されたCREBはERストレスシグナルとクロストークして、ERストレスの増強にはたらくことが示された。一方、長期的な低酸素応答においてもERストレスシグナルは活性化されており、CREBは低酸素シグナルとERストレスシグナルの両者を制御する役割を担うことが明らかになった。この時のCREB活性は、がん転移を促進する働きをし、CREBをノックダウンすることにより、マウスモデルにおけるがん転移の有意な減少が認められた。

<研究の意義・展望>

がんは低酸素状態をはじめとした、さまざまな体内微小環境に巧みに適応して、増悪化していく。この過程で、多様な細胞内シグナル伝達系の活性化や、代謝機構の変化が起きていることが、次々と明らかにされている。本研究では、代謝酵素PDHの発現ががん性代謝を規定するのに重要な働きをすることと、CREBを介したシグナル伝達系ががんの悪性化に関わることを明らかにすることができた。本研究で得られた成果は、これらの分子を標的とした新しいがん治療戦略の基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Eguchi K., Nakayama K. Prolonged hypoxia decreases nuclear pyruvate dehydrogenase complex and regulates the gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 520, 128-135, 2019.
- 2) Nakayama K., Kataoka N. Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 20, E3278(1-15), 2019.
- 3) Yonashiro R, Eguchi K, Wake M, Takeda N, Nakayama K. Pyruvate dehydrogenase PDH-E1 β controls tumor progression by altering the metabolic status of cancer cells. *Cancer Res.*, 78, 1592-1603, 2018.
- 4) Kikuchi D., Tanimoto K., and Nakayama K. CREB is activated by ER stress and modulates the unfolded protein response by regulating the expression of IRE1 α and PERK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 243-250, 2016.



PDH ノックダウンによる解糖性代謝の確立

細胞は通常酸素環境 (norm) では好氣的な代謝をし、低酸素環境 (hypo) では解糖系に依存した代謝を示すようになる (●)。一方、PDHをノックダウンした細胞では、通常酸素環境においても解糖性の代謝を示す (■、■) ことが明らかになった (論文3)。

研究課題名： 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

Regulatory mechanisms of low-oxygen sensor transcriptional regulators for
the oxygen paradox between photosynthesis and nitrogen fixation

研究期間： 平成 27 年度～平成 28 年度

研究課題番号： 15H01397

研究代表者名： 藤田祐一（名古屋大学 大学院生命農学研究科 教授）

<研究の目的>

酸素発生型光合成は、太陽光のエネルギーをもちいた水分子の酸化によって分子状酸素 (O₂) を地球環境に持続的に供給する。光合成の光反応において中心的な役割を担うクロロフィルは、多数の酵素反応を経て生合成されるが、この生合成系には酸素によって不活性化される酵素が含まれる。これらの酵素は光合成のためにクロロフィル供給に寄与しながら、光合成によって生じる酸素によって不活性化されるという“酸素パラドクス”を抱えている。同様のパラドクスはシアノバクテリアの窒素固定系でも認められる。窒素固定反応を担う酵素ニトロゲナーゼは酸素に脆弱な酵素である。その駆動に必要な ATP と還元力は光合成によって供給されるが、光合成で作られる酸素によってニトロゲナーゼが不活性化されてしまう。低酸素を感知して転写を活性化するタンパク質は、酸素パラドクスの統御に重要な役割を担っていると推察される。本研究では、低酸素センサー転写制御タンパク質の作動原理を明らかにし、酸素感知機構の意義をエネルギー代謝の観点から考察する。

<研究の成果>

(1) シアノバクテリアの窒素固定のマスターレギュレーターCnfR が認識する上流 cis 配列の同定 (論文 1)

CnfR は、窒素固定遺伝子クラスターの主要プロモーターである *nifB* および *nifP* の遺伝子間領域から両方向への転写を活性化する、窒素固定のマスターレギュレーターである。*Leptolyngbya boryana* の CnfR は 534 個のアミノ酸残基からなり、C 末端ドメイン (約 80 アミノ酸残基) に DNA 結合ドメイン、N 末端ドメイン (約 60 アミノ酸残基) にはフェレドキシン (2 つの[4Fe-4S]クラスターを介して酸化還元を担う) と同様の 8 つのシステイン残基の特徴的な配置が認められる。この特徴から、CnfR は[4Fe-4S]クラスターを介して低酸素を感知していると推察される。本論文では、窒素固定能を有しないモデルシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 において CnfR 発現と *nifB* および *nifP* の上流配列をレポーター遺伝子に連結したレポーター株を構築し、上流配列に CnfR によって認識される共通エレメントを同定した。

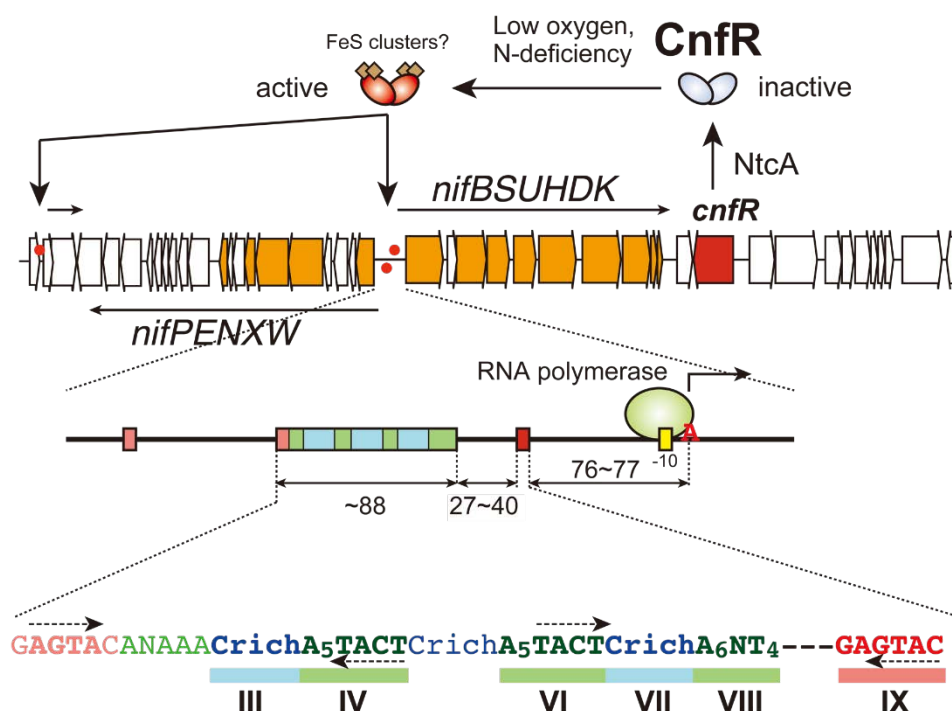
<研究の意義・展望>

シアノバクテリア窒素固定のマスターレギュレーターCnfR の DNA 認識 cis エレメントの解明により、CnfR による転写活性化が非窒素固定生物においても作動することが明らかになった。今後は、CnfR 発現系を活用し非窒素固定シアノバクテリアでの *nif* 遺伝子群の転写活性化により、窒素固定能の付与の実現に向けて具体的な遺伝子構築を進める。また、CnfR の生化学的解析により配列から予想されるように鉄硫黄クラスターを有することが示唆された。これらの成果は、今後、CnfR による低酸素感知機構および窒素欠乏感知機構の解明に向けて研究をさらに深化させる研究基盤となる。さらに、進化的観点に立てば、低酸素感知機構は地球環境の酸素レベルが上昇してきたことに応答して成立した環境応答機構の一つと捉えることができる。シアノバクテリアの低酸素

感知機構の分子機構の解明は、生物が酸素レベル上昇に反応してどのように既存の酸素に脆弱な分子システムを適応させてきたのかの具体的な足跡に迫る。

<主な研究発表>

- 1) Tsujimoto, R., Kamiya, N., and Fujita, Y. Identification of a *cis*-element in nitrogen fixation genes recognized by CnfR in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Mol. Microbiol.* 101, 411–424, 2016.



CnfR による *nif* 遺伝子群の発現制御系と *nifB* および *nifP* 上流で保存された CnfR 認識 *cis* 配列

cnfR 遺伝子の発現はグローバル窒素制御タンパク質 NtcA によって制御される。CnfR は、低酸素および窒素枯渇に反応して活性化型となり、*nifB* と *nifP* 上流から両方向への転写を活性化する。その際、認識する *cis* 配列は転写開始点から上流約 110 bp にある 88 bp 程度の配列である。配列の特徴に基づきモチーフ I~IX と便宜的に分割して捉えている。この配列の特徴は窒素固定性シアノバクテリアに広く保存されている。

研究課題名： 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
Molecular mechanisms to solve the oxygen paradox between photosynthesis and nitrogen fixation
研究期間： 平成 29 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 17H05525
研究代表者名： 藤田祐一（名古屋大学 大学院生命農学研究科 教授）

<研究の目的>

本研究は、酸素に脆弱な酸素ニトロゲナーゼが酸素をつくる光合成が両立するという“酸素パラドクス”を統御する分子機構の解明を目指す。具体的には、酸素センサー型転写制御タンパク質 CnfR, ChlR の生化学的解析、ニトロゲナーゼの修飾による酸素防御機構および酸素防御に関わる遺伝子の探索を行う。光合成と窒素固定という地球上の生命を支える二大生化学過程の両立に酸素防御と酸素感知が重要な役割を果たしている。この分子機構を解明することを通して広く酸素を基軸とする生命の統合的理解に貢献する。

<研究の成果>

(1) シアノバクテリアの低酸素センサー型転写制御タンパク質 ChlR の活性化に関わるアミノ酸残基の同定（論文 1）

ChlR は、シアノバクテリアにおいて低酸素に応答して低酸素型クロロフィル・ヘム生合成系オペロン *chlA_I-ho2-hemN* の転写を誘導する MarR 型転写制御タンパク質である。好気条件では生育できない *chlA_I* 欠損株に対し、エラープライム PCR により増幅した *chlR* 遺伝子断片によって形質転換することで、好気条件でも生育できる偽復帰変異を単離した。これら偽復帰変異株の *chlR* の塩基配列から、ChlR が好気条件でも同オペロンの転写を活性化することができるスーパーアクティベーター型変異を 8 種類同定した。アミノ酸置換のほとんどは ChlR の N 末端領域に局在しており、この領域の構造変化が活性型への構造変化に重要な役割を担っていることを明らかにした。MarR 型転写制御タンパク質で鉄硫黄クラスターを有するアクティベーターという特徴は ChlR 固有であることから、新規な分子機構の解明につながることを期待される。

(2) シアノバクテリアの窒素固定生育におけるニトロゲナーゼのアクセサリータンパク質の必要性（論文 2）

これまでに従属栄養性の窒素固定細菌においてニトロゲナーゼのアセンブリに関与するアクセサリータンパク質の機能が提唱されているが、これらのタンパク質についてシアノバクテリアの窒素固定における役割は不明であった。本論文では、*Leptolyngbya boryana* の窒素固定遺伝子クラスターの機能解析を進め、ニトロゲナーゼの成熟過程に関わるアクセサリータンパク質 NifW, NifX/NafY, NifZ が、従属栄養窒素固定細菌において考えられていたよりも窒素固定性シアノバクテリアにおいてはより重要なはたらきを担っていることが分かった。これらのアクセサリータンパク質が酸素パラドクスの統御に関与している可能性が示唆される。

(3) 窒素固定性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* におけるトランスポゾンを用いたランダム変異導入系の確立（論文 3）

ヘテロシストを形成しないシアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* においてトランスポゾンによる変異導入系を確立し、光合成と窒素固定の両立に関わる遺伝子のスクリーニングを行った。窒素固定生育が低下する変異株の一つのゲノムリシーケンスから、こ

の変異株では Cu 輸送性 P 型 ATPase 遺伝子 *ctaA* にトランスポゾンが挿入されていることがわかった。このことは、Cu 輸送による呼吸活性促進が窒素固定生育に重要であることが分かった。呼吸活性促進が酸素パラドクスの統御に関与している可能性が示唆される。

(4) 非窒素固定性シアノバクテリアへの窒素固定遺伝子群の導入と発現制御 (論文 4)

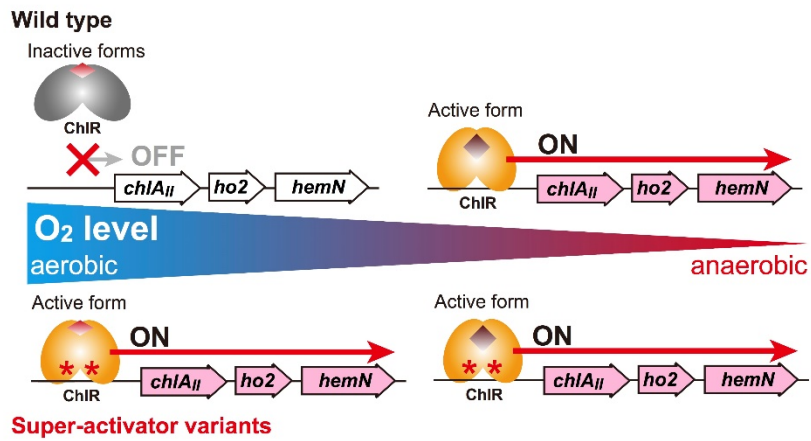
CnfR は、窒素固定性シアノバクテリアに分布し、低酸素と窒素枯渇を感知し、窒素固定 (*nif*) 遺伝子群の転写を活性化するマスターレギュレーターである。CnfR による低酸素・窒素欠乏に応答した誘導を利用しニトロゲナーゼ遺伝子群を発現する非窒素固定性シアノバクテリア形質転換体を単離し、ニトロゲナーゼ活性を検出することに成功した。これらの形質転換体は、酸素パラドクス統御機構解明に向け、格好のモデルとなる。

<研究の意義・展望>

CnfR と ChlR という 2 つの酸素感知型転写制御タンパク質の作用機作の解明を通して、光合成と窒素固定の両立機構の一端を明らかにした。具体的には、CnfR の DNA 認識 *cis* エレメントの解明、CnfR を利用したニトロゲナーゼ活性の異種発現系の確立および ChlR の活性化に関わるアミノ酸残基の同定を行った。また、さらに新たな遺伝子同定を目指して、窒素固定性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* においてトランスポゾン変異導入系を確立した。また、*nif* 遺伝子クラスターの詳細な解析を通してこれまで重要視されていなかったニトロゲナーゼアクセサリタンパク質がシアノバクテリアの窒素固定生育には非常に必要であることを示した。以上のように、CnfR と ChlR の主に機能的側面についてこの研究期間内に明らかにすることができた。本研究で得られた成果は、光合成と窒素固定の両立を支える分子機構の全貌解明に向けた基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Hiraide, Y., Yamamoto, H., Kawajiri, Y., Yamakawa, H., Wada, K., and Fujita, Y. Super-activator variants of the cyanobacterial transcriptional regulator ChlR essential for tetrapyrrole biosynthesis under low oxygen conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.* 84, 481-490, 2020.
- 2) Nonaka, A., Yamamoto, H., Kamiya, N., Kotani, H., Yamakawa, H., Tsujimoto, R., and 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.
- 3) Tomatsu, C., Uesaka, K., Yamakawa, H., Tsuchiya, T., Ihara, K., and Fujita, Y. *In-vivo* transposon tagging in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *FEBS Lett.* 592, 1632-1642, 2018.
- 4) Tsujimoto, R., Kotani, H., Yokomizo, K., Yamakawa, H., Nonaka, A. and Fujita, Y. Functional expression of an oxygen labile nitrogenase in an oxygenic photosynthetic organism. *Sci. Rep.* 8, 7380, 2018.



酸素センサー型転写制御タンパク質 ChIR のスーパーアクティベーターバリエーション

野生型 ChIR は低酸素条件下のみ活性化型となり *chlA_{II}* オペロンの転写を活性化する。本研究では、好気条件下でも転写を活性化するスーパーアクティベーター型バリエーションとなる 8 個のアミノ酸置換を特定した。

研究課題名： TASK チャンネルを標的とする低酸素応答機構に関する研究
Hypoxia-induced regulation of TASK channel function

研究期間： 平成 27 年度～平成 28 年度

研究課題番号： 15H01404

研究代表者名： 古谷 和春（大阪大学 医学系研究科 助教）

<研究の目的>

本研究は、頸動脈小体タイプ I グロムス細胞の酸素感受性カリウムチャンネルとして考えられる、TASK チャンネルを標的とした低酸素応答の本態を理解することを目指した。

<研究の成果>

(1) 低酸素応答シグナル伝達系による TASK チャンネル機能制御の評価

TASK チャンネルの分子制御機構は依然よく理解されていない。そこで、各種低酸素関連物質の TASK チャンネルへの直接作用を解析するため、単離したアフリカツメガエル卵母細胞にヒトもしくはマウスの TASK1 および TASK3 cRNA を注入し、発現した TASK チャンネルの活性を電気生理学的に測定した。薬物の各サブユニットのホモ二量体への効果の評価には TASK1 もしくは TASK3 cRNA を単独で注入した卵母細胞を用い、TASK1/3 ヘテロ二量体へ効果の評価には TASK1 および TASK3 を cRNA 濃度レベルで等量注入した卵母細胞も解析に用いた。対照には cRNA の代わりに vehicle として水を注入した卵母細胞を用いて評価した。細胞外酸素濃度は、酸素電極を用いて電気化学的に計測した。

アフリカツメガエル卵母細胞を再構成系として用いた時、上述した TASK1 および TASK3 からなる TASK チャンネルのいずれの群においても、低酸素応答性を示さなかった。このことから TASK チャンネル自体には低酸素応答性機構はなく、その他の分子との相互作用によって低酸素応答性が発揮されていると考えられた。低酸素応答を仲介する分子として、過去のグロムス細胞を用いた研究から、NADPH oxidase (NOX) によって産生される過酸化水素 (H_2O_2) が TASK チャンネルを抑制する可能性が考えられた。そこで、 H_2O_2 の TASK チャンネルに対する効果を調べた。結果として、10 mM H_2O_2 は抑制作用を示さなかった。また、一酸化窒素 (NO) の関与も示唆されているが、NO 供与体 100 μ M Nitroprusside Na も有意な効果を示さなかった。これらの結果から、 H_2O_2 や NO は酸素応答機構に関わっていたとしても TASK チャンネルに対する直接作用ではなく、別の分子を介した作用であると考えられた。

次に、TASK チャンネルに低酸素応答性を与える細胞内シグナル伝達蛋白質の候補として、過去の知見から AMP 活性化蛋白質キナーゼ (AMPK)、NADPH オキシダーゼ 4 (NOX4)、Heme オキシゲナーゼ 2 (HO2) に着目した。アフリカツメガエル卵母細胞に TASK チャンネルとこれらのシグナル蛋白質をコードする cRNA を同時に注入し、発現を待って、TASK チャンネルを流れる電流を電気生理学的に測定して低酸素応答性を評価した。結果として、いずれの組み合わせでも、低酸素に応じる TASK 電流の現象は観察されなかった。また、それらの活性化薬や阻害薬の効果を試したが、それでも有意な TASK 電流の増減は認められなかった。従って、酸素感受性カリウムチャンネルの分子機構における有力な仮説となっている AMPK、NOX4、HO2 は、TASK チャンネルと機能共役していないか、あるいは、アフリカツメガエル卵母細胞において機能共役するためにはその他の因子がさらに必要である可能性がある。

一方、グアニル酸シクラーゼ (GC) -protein kinase G (PKG) が低酸素応答に関わるという報告がある。そこで GC-PKG 系による TASK チャンネル制御の解析をおこなった。結果として、TASK3 を含む TASK チャンネル活性は GC-PKG シグナル伝達系の亢進で抑

制されることが明らかとなった。TASK チャンネルは細胞外 pH の低下によって制御されることが知られているが、GC-PKG シグナル伝達系による TASK3 チャンネルの制御は、その細胞外 pH 感受性とは独立した制御であることを見出した。

(2)一酸化窒素による TASK チャンネル制御の神経興奮性制御における役割 (論文 2)

(1) の研究において、GC-PKG 系による TASK チャンネル制御を評価した。GC-PKG 系の活性化により、TASK1 チャンネル機能は亢進し、一方 TASK3 チャンネル機能は抑制される。咀嚼運動を制御する三叉神経運動神経は、投射先の咀嚼筋のタイプ毎に、発現する TASK チャンネルの種類が異なり、電気生理学的な特性が異なることが示唆されていた。我々は TASK チャンネルと細胞興奮性、シグナル伝達による制御を評価し、大きな細胞体 (>35 μm) を持つ三叉神経運動神経は、TASK1 と TASK3 を共に多く発現しており、細胞体のサイズが小さくなると共に、TASK3 に対する TASK1 の比率が増加することを示した。NO 供与体 100 μM Nitroprusside Na を投与すると、TASK チャンネルの機能抑制もしくは亢進により、細胞体の大きな運動神経の興奮性は高まり、一方小さな細胞体の興奮性は低下する。つまり、三叉神経節の運動神経の電気生理学的特性が細胞体のサイズの大小に関連して、差がつけられる。このような運動神経の TASK チャンネルに依存した電気生理学的特性の違いは、咀嚼筋のタイプ依存的な制御に関わっていると考えられた。

<研究の意義・展望>

本研究で得られた成果は、低酸素応答機構を理解する上で、新たな分子制御機構の基盤となると考えられる。TASK チャンネルの制御に関する新しい知見は、TASK チャンネルの未解明な生理機能の理解にも繋がる。

<主な研究発表>

- 1) Funato Y, Furutani K, Kurachi Y, Miki H. CrossTalk proposal: CNNM proteins are $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchangers playing a central role in transepithelial Mg^{2+} (re)absorption. *J Physiol* 596, 743-746, 2018.
- 2) Okamoto K, Emura N, Sato H, Fukatsu Y, Saito M, Tanaka C, Morita Y, Nishimura K, Kuramoto E, Xu Yin D, Furutani K, Okazawa M, Kurachi Y, Kaneko T, Maeda Y, Yamashiro T, Takada K, Toyoda H, Kang Y. The Possible Role of TASK Channels in Rank-Ordered Recruitment of Motoneurons in the Dorsolateral Part of the Trigeminal Motor Nucleus. *eNeuro* 3(3). ENEURO.0138-16.2016, 2016.

研究課題名： 骨髄内酸素環境が及ぼす破骨細胞動態の in vivo 解析
Investigation of hypoxic effect on osteoclast dynamics

研究期間： 平成 27 年度～平成 30 年度

研究課題番号： 15H01405, 17H05530

研究代表者名： 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)

<研究の目的>

エリスロポエチン(Epo)は赤血球以外に様々な生理作用をもつことが知られており、その一つに骨代謝を制御する役割がある。Epo による骨代謝制御は、破骨細胞による骨破壊の促進を伴う。しかしながら、破骨細胞自身は、Epo の受容体を発現しておらず、その作用は間接的と不明な点が多い。本研究では、Epo による破骨細胞制御の実体を、個体及び細胞レベルで明らかにすることに公募研究の前半で取り組んだ。

公募研究の後半では、生体組織内局所の酸素分圧と細胞内のエネルギー代謝を定量的に観察することが可能な二光子励起顕微鏡による生体イメージング法を開発することで、生きたマウスの骨組織内で破骨細胞がどのような酸素環境に晒され、その酸素環境が破骨細胞内のエネルギー代謝にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることに取り組んだ。

<研究の成果>

(1) 破骨細胞形成に対する Epo の役割の解明

Epo による破骨細胞形成への影響を生体レベルで明らかにするために、Epo 投与マウスを用いた gain of function 並びに遺伝性超貧血マウス(ISAM)を用いた loss of function 解析を試みた。その結果、Epo 投与マウスは破骨細胞数の増加とともに骨量減少を、一方 ISAM は破骨細胞数の減少並びに骨量増加を呈することを見出した。以上の結果は、Epo が破骨細胞形成を促進する作用があることを示唆する。次に、Epo が骨髄内の酸素環境に及ぼす影響を解析した。即ち、ピモニダゾールを投与したマウスから骨を単離し、whole mount 免疫染色と組織の透明化を併用することで、骨髄内酸素の 3 次元分布を評価した。その結果、Epo 投与マウスでは、骨髄内の低酸素領域が減少することが判明した。以上の結果から、Epo が骨髄内酸素環境を変える効果をもつことが示唆された。近年の我々の研究成果によると、破骨細胞制御に好氣的代謝が関与することが明らかにされていることから、Epo による破骨細胞形成促進には、Epo の骨髄内の酸素リモデリングが関係することが考えられる。

(2) 二光子励起顕微鏡法を用いた骨髄内酸素イメージングの研究 1

Epo 投与によって破骨細胞内の酸素濃度がどのように変化するかを解析するために、二光子励起顕微鏡を用いた酸素イメージングに取り組んだ。酸素の可視化プローブであるイリジウム錯体(BTPDM1)を投与したマウスを麻酔下で生かしたまま頭蓋骨内を観察し、リン光を 12 時間以上連続観察する実験系を新規に立ち上げた。実際に、マウスが吸入する酸素濃度を 20%から 95%へ変動させた場合、骨髄内の赤血球系列細胞からのリン光強度が顕著に低下することを観察した。

(3) 二光子励起顕微鏡法を用いた骨髄内酸素イメージングの研究 2

破骨細胞が晒されている酸素環境を明らかにするために、破骨細胞を蛍光蛋白質 EGFP で標識したマウスに BTPDM1 を投与することで、生きたマウスの骨組織内の破骨細胞からのリン光観察を行った。さらに、時間相関単一光子計数法によって破骨細胞のリン光寿命を測定した。そして、破骨細胞の初代培養を活用することで酸素分圧とリン

光寿命との関係を示す検量線を作成することで、生きたマウスの骨組織内で破骨細胞が晒されている酸素分圧を絶対定量することに成功した。さらに、マウスに低酸素暴露を行うことで、破骨細胞が晒されている酸素分圧の生体内での変化を定量的に明らかにした。

(4) 破骨細胞のエネルギー代謝の生体イメージング法の確立と酸素環境と代謝の関係性の解析

ATP に対する FRET 型バイオセンサーGOATeam を破骨細胞系列で発現するマウスのシステムを作出し、時間相関単一光子計数法による二光子蛍光寿命イメージングを活用することで、生きたマウスの骨組織内の破骨細胞で生じる代謝変化を定量解析する実験系を確立した。本法を用いることで、低酸素暴露を行ったマウスにおいて、生体内の破骨細胞のエネルギー代謝がどのような影響を受けるかの検討を行った。その結果、生体内で破骨細胞が晒されている酸素環境が変化するにもかかわらず、破骨細胞内の ATP 量は影響を受けないことが明らかとなった。次に、NAD(P)H を対象にした自家蛍光寿命イメージングを活用することで、生きたマウスの骨組織内の破骨細胞で生じる解糖系の変化を定量解析する実験系を確立した。GOATeam の研究結果同様、低酸素暴露したマウスにおいては、破骨細胞が晒されている酸素環境が変化するにもかかわらず、破骨細胞内の解糖系は影響を受けないことが明らかとなった。

(5) 破骨細胞の酸素環境と細胞動態との関係性の解析

破骨細胞を蛍光標識したマウスを用いて、破骨細胞の動きの長時間観察を行った。この際、マウスに様々な酸素濃度を吸気させることで、破骨細胞の動きに及ぼす影響を解析した。マウスに高酸素暴露を行った場合、破骨細胞の動きには変化が見られないことが明らかとなった。

<研究の意義・展望>

生体組織内で細胞が晒されている酸素分圧がどの程度変動するのかを 1 細胞レベルで解析することに成功した本成果は、従来研究で曖昧とされていた酸素環境の実体を明らかにすることで、定量的に低酸素応答を理解する研究の基盤となることが考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Sakaguchi Y, Nishikawa K, Seno S, Matsuda H, Takayanagi H and Ishii M, Roles of enhancer RNAs in RANKL-induced osteoclast differentiation identified by genome wide cap analysis of gene expression using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports* 14, 7504, 2018.
- 2) Baba M, Endoh M, Ma W, Toyama H, Hirayama A, Nishikawa K, Takubo K, Hano H, Hasumi H, Umemoto T, Hashimoto M, Irie N, Esumi C, Kataoka M, Nakagata N, Soga T, Yao M, Kamba T, Minami T, Ishii M and Suda T, Foliculin regulates osteoclastogenesis through metabolic regulation. *Journal Bone and Mineral Research* 33, 1785-98, 2018.
- 3) Iwamoto Y, Nishikawa K, Imai R, Furuya M, Uenaka M, Ohta Y, Morihana T, Itoi-Ochi S, Penninger JM, Katayama I, Inohara H and Ishii M, Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction. *Molecular and Cellular Biology* 36, 1610-20, 2016.
- 4) Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H and Ishii M, Dnmt3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosyl methionine-producing metabolic pathway. *Nature Medicine* 21, 281-7, 2015.

研究課題名： 水酸化プロテオーム解析を基軸とした酸素応答システムの統合的理解
Hydroxy proteome-based study on oxygen response system
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
Trans-omics analysis to study hypoxia response system
研究期間： 平成27年度～平成30年度
研究課題番号： 15H01407, 17H05534
研究代表者名： 松本 雅記 (九州大学 生体防御医学研究所 准教授)

<研究の目的>

本研究は先端的なプロテオーム解析を用いて酸素応答システムの全貌解明を目指したものである。酸素応答は生命システムにおいて最も重要な環境適応機構の一つである。これまで、脊椎動物における低酸素応答の分子機構はそのマスター転写因子である Hypoxia inducible factor (HIF-) を中心に研究が展開されてきた。その一方で、酸素応答がすべて HIF-の制御のみで説明できないことや、酸素分子に関わる生命現象の多様性から、酸素応答に関わる生命システムには未知の領域が多く残されていることが明らかになっており、より包括的な酸素応答機構の探索とその理解が重要な課題となっている。本研究課題では、申請者ら独自に考案した次世代型プロテオミクスのプラットフォームである iMPAQT 法を構築し、これを利用してプロテオームレベルで低酸素応答の包括的解析を行う。さらに、タンパク質水酸化のシステムマティックな同定法を構築し、酸素応答に重要な役割を担っているタンパク質水酸化の同定を試みる。これに加えて、酸素応答が代謝システムに与える影響をプロテオーム・メタボロームの並列計測とその統合解析であるトランスオミクスの手法を確立し、低酸素応答に応用することで、酸素応答の全体像を浮き彫りにする。

<研究の成果>

(1) 次世代定量プロテオミクス技術基盤の確立 (論文 1, 8, 13, 18)

ヒト組換えタンパク質ライブラリーを用いてターゲットプロテオミクスに重要な事前情報をゲノムワイドに取得したデータベースを作成し、これを用いて大規模にタンパク質の絶対定量を実施できる iMPAQT 法を構築した。iMPAQT 法を用いて、がん細胞における代謝状態をタンパク質レベルで精密かつ迅速に計測することに成功した。この手法を用いて低酸素や低栄養状態に置かれた複数の細胞株の代謝プロテオームの網羅的計測に成功した。

(2) 水酸化プロテオミクスの技術基盤の開発 (論文 16)

モチーフ解析より予測された水酸化タンパク質の cDNA を網羅的に取得し、細胞に発現させた後、自動的かつ高精度に免疫沈降を実施する手法を確立した。本方法で精製したタンパク質の水酸化を質量分析計で同定を試みたが、タンパク質の水酸化は質量分析では酸素付加と同様の質量シフトを示すため、試料調製プロセスで生じる人工的な酸化反応にその同定が著しく阻まれることが明らかとなった。そのため、酸化反応の抑制法や質量分析インフォマティクスによる同定結果の精査法の開発などを行った。

(3) トランスオミクス計測基盤の確立 (論文 1, 10, 15)

発現プロテオーム、翻訳後修飾プロテオーム、トランスクリプトーム、メタボロームなどの分子計測データを高精度で取得し、これらを統合するトランスオミクスの手法の確立に成功した。

(4) タンパク質間相互作用解析によるプロリン水酸化酵素の標的分子探索法の確立

PHD2 などのプロリン水酸化酵素の基質（標的）分子の探索のため、いくつかのタンパク質間相互作用解析法の確立を試みた。通常の FLAG プルダウン法で既知の基質である HIF1 の結合を検出することができなかったが、ホルマリンクロスリンクの導入や BioID (水酸化酵素に特異性を欠失したビオチン化酵素変異体を融合させ、近傍に存在するタンパク質をビオチン化させる方法) によって HIF1 を同定することに成功した。

<研究の意義・展望>

本研究で得られた成果は、プロテオームレベルでの酸素応答の計測を可能にし、生命システムの酸素濃度順応機構の全貌解明のツールを提供できると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Kodama M, Oshikawa K, Shimizu H, Yoshioka S, Takahashi M, Izumi Y, Bamba T, Tomonaga T, Matsumoto M, Keiichi I, Nakayama K.I. A shift in glutamine nitrogen metabolism contributes to malignant progression of cancer. *Nat. Commun.* (accepted)
- 2) Oshikawa K, Matsumoto M (Corresponding author), Kodama M, Shimizu H, Nakayama KI. A fail-safe system to prevent oncogenesis by senescence is targeted by SV40 small T antigen. *Oncogene* in press
- 3) Takii R, Fujimoto M, Matsumoto M, Srivastava P, Katiyar A, Nakayama KI, Nakai A. The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment. *EMBO J.* in press
- 4) Hada K, Hirota K, Inanobe A, Kako K, Miyata M, Araoi S, Matsumoto M, Ohta R, Arisawa M, Daitoku H, Hanada T, Fukamizu A. Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 294, 3091-3099, 2019.
- 5) Fujimoto T, Nakamura O, Saito M, Tsuru A, Matsumoto M, Kohno K, Inaba K, Kadokura H. Identification of the physiological substrates of PDip, a pancreas-specific protein-disulfide isomerase family member. *J. Biol. Chem.* 293, 18421-18433, 2018.
- 6) Hosokawa H, Romero-Wolf M, Yui MA, Ungerbäck J, Quiloan MLG, Matsumoto M, Nakayama KI, Tanaka T, Rothenberg EV. Bcl11b sets pro-T cell fate by site-specific cofactor recruitment and by repressing Id2 and Zbtb16. *Nat. Immunol.* 19, 1427-1440, 2018.
- 7) Hosokawa H, Ungerbäck J, Wang X, Matsumoto M, Nakayama KI, Cohen SM, Tanaka T, Rothenberg EV. Transcription factor PU.1 represses and activates gene expression in early T cells by redirecting partner transcription factor binding. *Immunity* 48, 1119-1134, 2018.
- 8) Matsumoto M, Nakayama KI. The promise of targeted proteomics for quantitative network biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 54, 88-97, 2018.
- 9) Moriya Y, Kawano S, Okuda S, Watanabe Y, Matsumoto M, Takami T, Kobayashi D, Yamanouchi Y, Araki N, Yoshizawa AC, Tabata T, Iwasaki M, Sugiyama N, Tanaka S, Goto S, Ishihama Y. The jPOST environment: an integrated proteomics data repository and database. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1), D1218-1224, 2018.
- 10) Kawata K, Hatano A, Yugi K, Kubota H, Sano T, Fujii M, Tomizawa Y, Kokaji T, Tanaka KY, Uda S, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Saitoh K, Kato K, Ueno A, Ohishi M, Hirayama A, Soga T, Kuroda S. Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks *iScience* 7, 212-229, 2018.
- 11) Watanabe S, Fujiyama H, Takafuji T, Kayama K, Matsumoto M, Nakayama KI, Yoshida K, Sugimoto N, Fujita M. GRWD1 regulates ribosomal protein L23 levels via the ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* 131, pii: jcs213009, 2018.
- 12) Tognon CE, Rafn B, Cetinbas NM, Kamura T, Trigo G, Rotblat B, Okumura F, Matsumoto M, Chow C, Davare M, Pollak M, Mayor T, Sorensen PH. Insulin-like growth factor 1 receptor stabilizes the ETV6-NTRK3 chimeric oncoprotein by blocking its KPC1/Rnf123-mediated

- proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 293, 12502-12515, 2018.
- 13) Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N. PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell* 33, 355-367.e7, 2018.
 - 14) Matsumoto J, Takada S, Kinugawa S, Furihata T, Nambu H, Kakutani N, Tsuda M, Fukushima A, Yokota T, Tanaka S, Takahashi H, Watanabe M, Hatakeyama S, Matsumoto M, Nakayama KI, Otsuka Y, Sabe H, Tsutsui H, Anzai T. Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure. *Circulation* 138, 2064-2066, 2018.
 - 15) Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama KI. Noncanonical pathway for regulation of CCL2 expression by an mTORC1-FOXK1 axis promotes recruitment of tumor-associated macrophages. *Cell Rep.* 21, 2471-2486, 2017.
 - 16) Yachie N; Robotic Biology Consortium (Inc. Matsumoto M), Natsume T. Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. *Nat. Biotechnol.* 35, 310-312, 2017.
 - 17) Cui L, Nakano K, Obchoei S, Setoguchi K, Matsumoto M, Yamamoto T, Obika S, Shimada K, Hiraoka N. Small nucleolar noncoding RNA SNORA23, up-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinoma, regulates expression of spectrin repeat-containing nuclear envelope 2 to promote growth and metastasis of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology* 153, 292-306.e2, 2017.
 - 18) 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. *Nat. Methods* 14, 251-258, 2017.
 - 19) Matsumoto A, Pasut A, Matsumoto M, Yamashita R, Fung J, Monteleone E, Saghatelian A, Nakayama KI, Clohessy JG, Pandolfi PP. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. *Nature* 541, 228-232, 2017.
 - 20) Okuda S, Watanabe Y, Moriya Y, Kawano S, Yamamoto T, Matsumoto M, Takami T, Kobayashi D, Araki N, Yoshizawa AC, Tabata T, Sugiyama N, Goto S, Ishihama Y. jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes. *Nucleic Acids Res.* 45(D1), D1107-1111, 2017.
 - 21) Kayama K, Watanabe S, Takafuji T, Tsuji T, Hironaka K, Matsumoto M, Nakayama KI, Enari M, Kohno T, Shiraishi K, Kiyono T, Yoshida K, Sugimoto N, Fujita M. GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. *EMBO Rep.* 18, 123-37, 2017.

研究課題名： 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
Role of TRPA1 in oxygen sensing and remodeling
研究期間： 平成 29 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 17H05536
研究代表者名： 桑木 共之（鹿児島大学 医歯学総合研究科 教授）
連携研究者名： 柏谷 英樹（鹿児島大学 医歯学総合研究科 講師）（29-30 年度）

<研究の目的>

酸素の不足も過剰も共に好気性生物の生存を脅かすので、酸素の需要と供給のバランスは個体、組織、細胞のあらゆるレベルで何重にも制御されている。このような制御を実行可能にするには、生体に酸素センサーが存在しなければならない。末梢神経（特に鼻腔から肺までの気道に分布する神経）に存在する TRPA1 が酸素センサーとしての役割を果たしている可能性を検証し、また、長期間の低酸素・高酸素曝露による酸素リモデリングとその破綻・逸脱における TRPA1 の役割を解明することが本研究の目的とした。

<研究の成果>

(1) 環境低酸素を検出して呼吸を増強させる反射に TRPA1 が重要であることの発見（論文執筆中）

自由行動下のマウスの呼吸を測定し、酸素濃度-呼吸出力関係を調べた。TRPA1 欠損マウスは軽度低酸素による呼吸増強反応が減弱していた。重度低酸素と二酸化炭素吸入による呼吸増強は正常であった。TRPA1 は仮説通り個体レベルの酸素センサーとして働いているが、低酸素が重度になると血中酸素濃度の減少にトリガーされた頸動脈小体の活性化による呼吸増強反応に隠れてその役割が見え難くなるものと推測された。

(2) 環境低酸素を検出して覚醒・忌避行動を誘発するのに TRPA1 が必要であることの発見（論文執筆中）

TRPA1 欠損マウスでは軽度低酸素環境への忌避行動が減弱していた。また、低酸素による睡眠からの覚醒時間も延長していた。重度低酸素環境への忌避行動・覚醒は正常であり、上述の呼吸増強反応と良く一致した結果であった。

(3) 環境酸素濃度変化を検出して生体リモデリングを引き起こすのに TRPA1 が重要であることの発見（論文執筆中）

マウスを低または高酸素環境で長期間飼育した。これらによる肺の血管、心臓、血液（赤血球数）などのリモデリングを観察したところ、TRPA1 欠損マウスでは低酸素による肺高血圧と高酸素による炎症性肺障害が共に増悪していた。すなわち、酸素リモデリングにも必須の分子であることが明らかになった。

(4) 生体内局所低酸素を検出して炎症・治癒等の生体反応を誘発するのに TRPA1 が重要であることの発見（論文 1）

TRPA1 欠損マウスでは外科的侵襲による局所低酸素をトリガーとした炎症反応の進展が遅延していることが明らかになった。すなわち、局所レベルでも TRPA1 は酸素濃度検出に重要であった。

<研究の意義・展望>

本研究では酸素センシングと酸素リモデリングにおける TRPA1 の意義が明らかになった。この成果は、酸素センシングと酸素リモデリングを担う生体分子の更なる研究の基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) M. Hasegawa-Moriyama, K. Mukaihara, T. Yamada, T. Kuwaki, Y. Kanmura: Transient receptor potential ankyrin 1 ion channel facilitates acute inflammation induced by surgical incision in mice. *Open J. Anesth.* 7, 134-145, 2017.
- 2) K. Inui, CP. Chen, J. Pauli, C. Kuroki, S. Tashiro, Y. Kanmura, H. Kashiwadani, T. Kuwaki: Nasal TRPA1 mediates irritant-induced bradypnea in mice. *Physiol. Rep.* 4, e13098, 2016.
- 3) T. Futatsuki, A. Yamashita, K. Novita Ikbar, A. Yamanaka, K. Arita, Y. Kakihana, T. Kuwaki: Involvement of orexin neurons in fasting- and central adenosine-induced hypothermia. *Sci. Rep.* 8, 2717, 2018.
- 4) Y. Ikoma, I. Kusumoto-Yoshida, A. Yamanaka, Y. Ootsuka, T. Kuwaki: Inactivation of serotonergic neurons in the rostral medullary raphé attenuates stress-induced tachypnea and tachycardia in mice. *Front. Physiol.* 9, 832, 2018.
- 5) S. Moriya, A. Yamashita, S. Kawashima, R. Nishi, A. Yamanaka, T. Kuwaki: Acute aversive stimuli rapidly increase the activity of ventral tegmental area dopamine neurons in awake mice. *Neuroscience* 386, 16-23, 2018.
- 6) H. Harada, H. Kashiwadani, Y. Kanmura, T. Kuwaki: Linalool odor-induced anxiolytic effects in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 241, 2018.
- 7) K. Nomura, T.Y. Hiyama, H. Sakuta, T. Matsuda, C.H. Lin, K. Kobayashi, K. Kobayashi, T. Kuwaki, K. Takahashi, S. Matsui, M. Noda: $[Na^+]$ increases in body fluids sensed by central Nax induce sympathetically mediated blood pressure elevations via H⁺-dependent activation of ASIC1a. *Neuron* 101, 60-75, 2018.
- 8) S. Iwakawa, Y. Kanmura, T. Kuwaki: Orexin receptor blockade-induced sleep preserves the ability to wake in the presence of threat in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 327, 2019.
- 9) S. Moriya, A. Yamashita, R. Nishi, Y. Ikoma, A. Yamanaka, T. Kuwaki: Acute nociceptive stimuli rapidly induce the activity of serotonin and noradrenalin neurons in the brain stem of awake mice. *IBRO Rep.* 7, 1-9, 2019.

研究課題名： 中枢性低酸素換気応答機構の全容解明
Elucidation of central hypoxia sensing mechanism for respiratory responses
研究期間： 平成 29 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 17H05540
研究代表者名： 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）
連携研究者名： 横田 茂文（島根大学 医学部神経解剖学 准教授）（29-30 年度）

<研究の目的>

本研究は、中枢性低酸素換気応答機構の全容を解明することを目的とした。体内酸素レベルの恒常性を維持することは、ヒトを含めた哺乳類の生命維持に不可欠である。この体内の酸素レベルの恒常性維持には、呼吸による調節、特に生体が低酸素状態になった時の呼吸増強応答（低酸素換気応答）が、最も重要な役割を果たしている。低酸素換気応答の機序について、従来、末梢化学受容体が唯一の低酸素受容体であると考えられていた。すなわち、生体が低酸素に曝露すると、頸動脈小体などの末梢化学受容体はその情報を感知し、そこからの求心性インパルスが増加し、延髄孤束核を介し下部脳幹部の呼吸神経回路網の活動を増強させて呼吸神経出力が増大し、換気量が増加すると考えられていた。しかし、末梢化学受容体を持たない *in vitro* の摘出脳幹脊髄標本においても、また、末梢化学受容体からの求心性神経を切断した動物においても覚醒時には、比較的弱い低酸素負荷は呼吸増強性応答を惹起することが知られている。そこで、研究代表者は、脳内低酸素受容体の存在を想定し、以下の仮説を提唱した。

(1)末梢化学受容体とは別に、脳内にも換気増強応答を惹起する低酸素受容体が存在している。(2)その低酸素センサー細胞は、ニューロン and/or アストロサイトである。(3)低酸素センサー細胞における低酸素感受は、各種のイオンチャネルの開閉による。本研究では、これらの仮説の妥当性を実験的に検証することにより、中枢性低酸素換気応答機構の全容を解明することを目的とした。

<研究の成果>

(1) 低酸素誘発性痙攣の発症機構の解明（論文 1）

生体は、強い低酸素に曝露すると痙攣発作を起こし、さらに痙攣後に起こる呼吸抑制により死に至ることがある。本研究では、低酸素による痙攣と呼吸抑制の発症機構を解析した。その結果、強い酸素は、一時的に呼吸を増強させるが、その後に痙攣発作を起こさせ呼吸を減弱・停止させることを観察するとともに、低酸素呼吸増強および低酸素誘発性痙攣発作の惹起の両方にアストロサイトが能動的な働きをしていることを解明した。さらに、アストロサイトの活性化阻害は低酸素誘発性痙攣の治療に応用できる可能性を提唱した。

(2) 間歇的低酸素負荷が生体のエネルギー消費におよぼす影響の解明（論文 2）

睡眠時無呼吸は肥満患者に多い。その原因として、睡眠時無呼吸に伴う生体への間歇的低酸素負荷は、生体のエネルギー消費量を減少させるという仮説が提唱されているが、その妥当性は十分には検討されていない。本研究では、マウスに間歇的低酸素負荷を行い、そのエネルギー消費量への影響を解析した。その結果、間歇的低酸素負荷は必ずしもエネルギー消費量を減少させないことが明らかとなった。すなわち、睡眠時無呼吸症患者における体重増加には間歇的低酸素負荷以外の要因が大きく関与していることが明らかとなった。

(3) 低酸素呼吸増強応答における低酸素感受および低酸素に伴う呼吸困難感知覚における視床下部の重要性 (論文 3,4)

生体が低酸素に曝露すると呼吸増強応答が起こるが、その際の低酸素感受の一部は視床下部においてなされていること、および低酸素に伴う呼吸困難感の知覚およびそれによって惹起される呼吸増強応答においては視床下部が重要な役割を演じていることを文献的に考察し報告した。

(4) 呼吸神経出力をつかさどる横隔神経運動ニューロン群の形態と機能の解析 (論文 5)

生体は低酸素に対し換気量を増加させる。これは、生体が低酸素を感知し、脳幹部呼吸神経回路網が活性化し、最終的に脊髄の横隔神経運動ニューロンからの呼吸神経出力が増大することによる。しかしこの横隔神経運動ニューロン群の形態と機能は十分には解明されていない。本研究では、解剖学的手法および動的イメージング法により横隔神経運動ニューロン群の形態と機能の詳細を解明し報告した。

(5) 低酸素で開口するカリウムチャネル Kir6.2 の新しい生理学的役割の探索 (論文 6)

研究代表者はこれまで、低酸素に対して感受性を有する ATP 感受性カリウムチャネル Kir6.2 は低酸素状態で開口し低酸素呼吸抑制を惹起することに関与していることを報告してきたが、Kir6.2 が有するその他の機能については、まだ十分には解明されていない。本研究では、Kir6.2 遺伝子欠損マウス (Kir6.2^{-/-}) の行動を観察し、Kir6.2 の欠損は、歩行などの運動能力の低下、不安感増強などの情動の異常を呈することを明らかにした。すなわち低酸素感受性カリウムチャネルである Kir6.2 は、低酸素換気応答以外にも、正常な運動機能や情動の維持に重要な働きをしていることを明らかにした。

<研究の意義・展望>

本研究で得られた成果は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの呼吸器疾患やその他の病態に伴う低酸素状態に対する生体の応答機構を理解し、それら低酸素状態を改善するための新しい治療法を開発するにあたっての新たな基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Fukushi I, Takeda K, Uchiyama M, Kurita Y, Pokorski M, Yokota S, Okazaki S, Horiuchi J, Mori Y, Okada Y. Blockade of astrocytic activation delays the occurrence of severe hypoxia-induced seizure and respiratory arrest in mice. *Journal of Comparative Neurology* (in press)
- 2) Akira Umeda, Kazuya Miyagawa, Atsumi Mochida, Hiroshi Takeda, Kotaro Takeda, Yasumasa Okada, David Gozal. Intermittent hypoxia, energy expenditure, and visceral adipocyte recovery. *Respiratory Physiology & Neurobiology* (in press)
- 3) Fukushi I, Okada Y. Mechanism of dyspnea sensation. *Journal of Rehabilitation Neurosciences* (in press)
- 4) Fukushi I, Yokota S, Okada Y. The role of the hypothalamus in modulation of respiration. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 265, 172-179, 2019.
- 5) 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 Structure & Function* 224, 57-72, 2019.
- 6) Saito A, Miyagawa K, Miyagishi H, Kurokawa K, Umeda A, Okada Y, Tsuji M, Takeda H. Possible involvement of monoamine neurons in the emotional abnormality in Kir6.2-deficient mice. *Physiology & Behavior* 188, 251-261, 2018.

研究課題名： 活性酸素センサー分子とそのシグナル伝達
Molecules sensing reactive oxygen species and their signal transduction
研究期間： 平成 26 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 26111007
研究代表者名： 三木 裕明 (大阪大学 微生物病研究所 教授)
研究分担者名： 関根 史織 (東京大学 薬学研究科 助教) (26-27 年度)
服部 一輝 (東京大学 薬学研究科 助教) (28-29 年度)
藤澤 貴央 (東京大学 薬学研究科 助教) (30 年度)
連携研究者名： 山崎 大輔 (大阪大学 微生物病研究所 准教授) (26-30 年度)
船戸 洋佑 (大阪大学 微生物病研究所 助教) (26-30 年度)

<研究の目的>

活性酸素は長らく生体を障害する毒物として認識されてきた。その一方で、NOX/DUOX など活性酸素産生酵素の機能解析が進むにつれて、生理的な細胞応答を調節するシグナル因子としての役割が明らかにされつつある。細胞内には活性酸素を敏感にセンスして、シグナル応答を惹起する「レドックスセンサー分子」が存在している。本研究ではこのようなレドックスセンサー分子に着目して、それが活性酸素に応答する仕組みや、どのようにして下流にシグナルが伝達されるのかについて追究した。研究代表者のグループではこれまでレドックスセンサー分子 PRL の機能解析を進め、Mg²⁺トランスポーターCNNM にレドックス状態応答性に結合・解離することを見つけた。PRL は大腸がんの転移巣で高発現しており、がんの悪性化を起こす働きがあることが知られている。また、研究分担者のグループではストレス応答性の細胞死に重要な役割を果たすことが知られるキナーゼ ASK1 が KLHDC10 を介してレドックス応答することを見つけている。本研究ではこれら PRL/CNNM や KLHDC10/ASK1 などのレドックスセンサー分子のシグナル伝達複合体の機能解析を行い、活性酸素によってどのような化学修飾が各レドックスセンサー分子に起こってタンパク質機能が調節されるのか詳細に検討すると共に、これらの遺伝子をノックアウトしたマウスの作成やその表現型解析を通して、レドックスセンサー分子のマクロなレベルでの医学生物学的重要性の解明にも取り組む。特にこれらの分子との関連が強く示唆されている、血圧調節や発がん、炎症性疾患等の病態との関連について調べる。

<研究の成果>

(1)PRL の活性酸素センサー、発がん因子としての役割の解明 (論文 1、論文 8)

PRL の結合タンパク質分子として Mg²⁺トランスポーターCNNM を同定した。この CNNM が細胞外に Mg²⁺を排出する機能を持つことや、PRL がそれに結合して機能阻害することを明らかにした。さらにこの CNNM の遺伝子改変マウスでの解析から、PRL/CNNM ががん浸潤などの悪性化に関わっていることも明らかにした。PRL 自身にはチロシンホスファターゼドメイン内に活性中心 Cys があり、それが過酸化水素等の活性酸素に応答して酸化され分子内ジスルフィドを作ることが知られていたが、この酸化型 PRL は CNNM から解離しており、両者の結合による機能制御がレドックス応答性であることも見つけた。PRL の活性酸素センサーとして細胞内 Mg²⁺量の調節に関わることや、その医学生物学的重要性を明確に位置付けることができた。

(2)PRL のシステインリン酸化の発見 (論文 5)

PRL のチロシンホスファターゼの活性中心 Cys 残基は反応性が高く、活性酸素によって容易に酸化され分子内ジスルフィドを作ることを見つけていたが (論文 8)、この Cys

チオール基 (-SH) がリン酸化されていることを見つけた。また、リン酸化型 PRL は CNNM と結合できなくなっており、CNNM の活性調節に関わっていることも明らかとなった。実際に培養系の細胞を用いて、内在性 PRL タンパク質のリン酸化状態を調べたところ、さまざまな細胞でかなりの割合の PRL がリン酸化された状態で存在しており、さらにそのリン酸化量が培養液中の Mg^{2+} 量を変えることで大きく変化した。PRL が Mg^{2+} トランスポーターの CNNM の機能調節をしていることを考えると、 Mg^{2+} の必要性に応じて Cys リン酸化レベルがダイナミックに調節されていることを示している。タンパク質の Cys リン酸化はこれまでバクテリアで一つの事例の報告があるのみで、哺乳動物系でのレドックス応答性 Cys リン酸化は非常にユニークな化学修飾であり、Cys 残基の特殊な化学反応性を基盤とした機能調節機構として興味深い。

(3) 過酸化脂質による細胞死における ASK1 経路の重要性の発見 (論文 4)

細胞はさまざまなプログラム細胞死メカニズムを持つことが最近の研究から明らかになってきた。特に脂質の過酸化によって引き起こされる鉄イオン依存性の細胞死としてフェロトーシスが強く注目されている。細胞を低温環境下に置くと細胞死が起こることが見付き、さらにその細胞死が典型的なフェロトーシスであることが明らかになった。さらにこのプロセスに細胞死制御に重要なキナーゼ ASK1 が必須の役割を果たしていることも明らかとなった。フェロトーシスは神経変性疾患などのさまざまなヒト疾患の発症に関わることがよく知られており、ASK1 経路がそのシグナル伝達を担う中核的な役割を果たしていることの解明は医学生物学的に非常に重要な意義を持つ発見と言える。

<研究の意義・展望>

本研究では活性酸素に応答するレドックスセンサー分子として PRL/CNNM と KLHDC10/ASK1 にフォーカスしてその機能解析をさまざまなレベルで進めた。特に PRL に関しては、分子内ジスルフィド結合を作って直接かつ可逆的に活性酸素に応答することを明確に示すことができただけでなく、反応性の高い Cys が細胞内でリン酸化を受けており、それがダイナミックに調節されているという意外な事実も明らかにできた。Cys がその側鎖チオール基の特殊な化学反応性に基づいてポリサルファを形成することもこの新学術領域研究の中で明らかにされており、Cys を標的としたタンパク質翻訳後修飾の多様性やその生物学的重要性に関する新たな研究分野の開拓にもつながる成果と考えられる。また、これらレドックスセンサー分子やその関連遺伝子のノックアウトマウスを用いた解析から、がんや炎症、血圧調節など生物個体のマクロなレベルでのさまざまな生命現象における重要性が明確に示された。活性酸素シグナルの医学生物学的重要性を明確に立証し、広くその理解や対処への分子的基盤を与える成果としても評価できる。

<主な研究発表>

- 1) Yamazaki D, Hasegawa A, Funato Y, Tran HN, Mori MX, Mori Y, Sato T, Miki H. Cnnm4 deficiency suppresses Ca^{2+} signaling and promotes cell proliferation in the colon epithelia. *Oncogene* 38, 3962-3969, 2019.
- 2) 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.
- 3) Funato Y, Yamazaki D, Miki H. Renal function of cyclin M2 Mg^{2+} transporter maintains blood pressure. *J. Hypertens.* 35, 585-592, 2017.

- 4) Hattori K, Ishikawa H, Sakauchi C, Takayanagi S, Naguro I, Ichijo H. Cold stress-induced ferroptosis involves the ASK1-p38 pathway. *EMBO Rep.* 18, 2067-2078, 2017.
- 5) 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.
- 6) Ishii T, Funato Y, Hashizume O, Yamazaki D, Hirata Y, Nishiwaki K, Kono N, Arai H, Miki H. Mg²⁺ Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 12, e1006276, 2016.
- 7) Hattori K, Naguro I, Okabe K, Funatsu T, Furutani S, Takeda K, Ichijo H. ASK1 signaling regulates brown and beige adipocyte function. *Nat. Commun.* 7, 11158, 2016.
- 8) Funato Y, Yamazaki D, Mizukami S, Du L, Kikuchi K, Miki H. Membrane protein CNNM4-dependent Mg²⁺ efflux suppresses tumor progression. *J. Clin. Invest.* 124, 5398-5410, 2014.

研究課題名： 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
Polysulfur metabolome and regulation of anti-oxidative stress responses
研究期間： 平成 26 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 26111008
研究代表者名： 赤池孝章(東北大学 医学系研究科 教授)
研究分担者名： 渡邊泰男(昭和薬科大学 薬学部 教授) (26-30 年度)
澤 智裕(熊本大学 大学院生命科学研究部(医) 教授) (26-30 年度)
朽津和幸(東京理科大学 理工学部応用生物科学科 教授) (26-30 年度)

<研究の目的>

酸化ストレスが活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) によるシグナル制御異常として理解されるようになってきた。最近我々は、ROS シグナルのセカンドメッセンジャーである 8-ニトロ-cGMP の代謝制御に、システインパースルフィドなどの活性硫黄代謝物分子種(ポリサルファ代謝物)が関わることを、統合硫黄メタボローム解析手法を駆使して明らかにした。本研究では、次世代型チオールバイオロジーの新しい原理と方法論を駆使し、ポリサルファ代謝系の生理機能を抗酸化ストレス応答とその制御という視点から解析し、ROS・活性硫黄分子種を基盤とした酸素リモデリングの制御機構の全貌の解明を目指した。

<研究の成果>

(1) 活性硫黄分子種の生体内生成の同定と抗酸化活性の解明(論文 23)

高感度 LC-MS/MS を用いた統合硫黄メタボローム解析システムを確立し、培養細胞や各種組織、血液(ヒトおよびマウス)中に各種活性硫黄分子種が高濃度(100 μ M 以上)かつ様々なレベルで存在することが分かった。活性硫黄分子種と過酸化水素の反応を解析した結果、強力な抗酸化活性を有することが示された。また、活性硫黄分子種は細胞内において 8-ニトロ-cGMP を 8-SH-cGMP へと代謝分解することにより、活性酸素シグナルの制御因子であることが明らかになった。

(2) 活性硫黄分子種の蛍光イメージング法の開発(論文 21,23)

特異的蛍光プローブ(SSP2およびSSP4)を用いた細胞内活性硫黄分子イメージング解析により、ヒト肺がん A549 細胞をはじめとする各種細胞において、上記 LC-MS/MS 解析で測定された細胞内ポリスルフィドレベルとの相関が確認され、ポリサルファ代謝系解析における本イメージング解析法の有用性が示された。

(3) リン酸化シグナルと活性酸素・活性硫黄シグナルの生物学的接点の発見(論文 10,11,19,20)

NO 合成酵素のリン酸化修飾を介した新規レドックス応答性の発見とその意義解明ならびに、活性酸素種と活性硫黄の標的分子(カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ I, II, IV; CaMKI, II, IV)の同定に成功し、その生物学的意義について解明した。

(4) 植物の活性酸素種生成酵素 NADPH oxidase の植物の受精への関与の発見(論文 22)

シロイヌナズナに 10 種ある活性酸素種生成酵素 NADPH oxidase のうち AtRbohH, AtRbohJ が花粉管の先端部において活性酸素種を積極的に生成しており、そのことが花粉管の先端成長と受精に必要であることを発見した。

(5) 哺乳類・ヒトにおける硫黄呼吸の発見(論文 15)

活性硫黄分子種の主要な生体内産生系として、システイン-tRNA 合成酵素(CARS)を同定し、moonlight 機能としてシステインパースルフィド合成酵素(CPERS)活性を有することを明らかにした。CARS/CPERS は、システインを基質としてタンパク質翻訳と共役して新生タンパク質をポリスルフィド化していることを見出した。さらに、CARS/CPERS 由来の活性硫黄分子種がミトコンドリア電子伝達系に関わることを発見した。

(6) 安定同位体標識システインの合成法の開発(論文 18)

ポリサルファ代謝系のメタボローム解析の鍵となる技術として、システインのチオール基への安定同位体標識法を確立した。この方法を質量分析と組み合わせることで、細胞内でシステインのチオール基がパースルフィドへと代謝されること、さらにグルタチオンパースルフィドへと変換されることを、定量的に追跡することに成功した。

(7) チロシンおよびヒドロキシフェニル基含有化合物による活性硫黄種の安定化機構とイオウ

メタボロームへの応用についての研究(論文 8)

活性硫黄は各種イオウ化合物と平衡状態にあり、アルカリ条件下において加水分解を受け、親電子性物質によって分解促進されることに加えて、チロシンおよびヒドロキシフェニル基含有化合物による活性硫黄の保護効果を世界に先駆けて明らかにした。これにより、検出性能が世界トップレベルまで飛躍的に向上した、高感度かつ高精度の活性硫黄分子種の統合イオウメタボローム系の確立に成功した。

(8) 活性硫黄の新規ドナーの開発と抗炎症作用の解明(論文 7)

新規な活性硫黄ドナーとして、*N*-アセチルシステインで安定化させた NAC ポリスルフィドを合成・開発した。Toll 様受容体を介する炎症応答誘導において、特にグラム陰性細菌の外膜成分であるリポ多糖刺激では NF- κ B 経路および IRF3-STAT1 経路が NAC ポリスルフィドによって強く抑制されることを見出した。さらに、致死性のエンドトキシンショックに対して NAC ポリスルフィドが優れた治療効果を示すことがわかった。

(9) 肺 PKGI α の酸化を介した肺高血圧症への内因性順応の研究(論文 6)

低酸素暴露により惹起される肺高血圧症における PKGI α の酸化還元状態の役割を解析・解明した。慢性的な酸素欠乏による肺高血圧症に対して、活性酸素種(ROS)による PKGI α の酸化および、肺血管の拡張反応を介して内因性に適応すること、さらに、ポリスルフィド投与治療による肺高血圧症病態の軽減効果を見出し、活性硫黄分子種の新規生理機能とその分子機構を示した。

(10) 喘息-慢性閉塞性肺疾患(COPD)オーバーラップ症候群(ACO)におけるニトロソ化ストレスの研究(論文 5)

重症度が比較的高い呼吸器疾患である、喘息-COPD オーバーラップ症候群(ACO)について、ニトロソ化ストレスによる病因論を提唱した。喘息患者と比較して ACO 患者において、炎症病態の増悪に伴い、3-ニトロチロシンの産生を指標としたニトロソ化ストレスが亢進する一方、活性硫黄分子種生成の減少を見出し、レドックス状態の不均衡が ACO 病態形成に関与する分子機構を示した。

(11) 硫化水素(H₂S)特異的な除去剤(スカベンジャー)の開発(論文 4)

その生理機能についての議論が深まっている硫化水素(H₂S)について、特異的な除去剤を開発し、その有用性を評価した。本除去剤は、スルフォニルアジド化合物(R-SO₂-N₃)を基本構造として合成され、水溶液中の硫化水素イオン(HS⁻)を選択的に除去し、硫化水素による細胞毒性やマウス生存率の低下に対して顕著な軽減作用を認めた。

(12) 活性硫黄によるタンパク質中チオール基の可逆性を担保する分子機構の解明(論文 1)

通常は不可逆的な酸化修飾であるシステインスルフィン酸(Cys-SO₂H)やスルホン酸(Cys-SO₃H)に対して、活性硫黄によってタンパク質チオール基がパースルフィド化したシステインパーチオスルフィン酸(Cys-SSO₂H)やパーチオスルホン酸(Cys-SSO₃H)は、可逆的な還元解離によって修復され、過度な酸化ストレスを免れていることを見出した。

(13) Sulfide:quinone oxidoreductase を介した硫黄依存型エネルギー代謝機構の解明

CARS/CPRES による硫黄代謝プロファイルを詳細に解析した結果、CARS/CPRES 由来の活性硫黄分子種が、硫化水素代謝酵素として知られる SQR (sulfide:quinone oxidoreductase)によって代謝されることを見出した。ミトコンドリア機能と寿命解析により、活性硫黄分子種による SQR 依存的な膜電位形成や、酵母における寿命延長作用も認められた。従って、ミトコンドリアの電子伝達系およびエネルギー産生における活性硫黄分子種の新規機能が示唆された(論文投稿中)。

<研究の意義・展望>

以上より、生体内で産生される活性硫黄分子種は、主要な細胞内抗酸化因子として機能するとともに細胞機能変化および機能維持に重要な役割を果たしていることが示された。また、ヒト疾患におけるポリスルフィドレベルの変化も分かかってきており(論文 5,17,18 他)、本研究の成果は、酸化ストレスに関連した各種疾患の予防・治療法開発の基盤となることが期待される。

<主な研究発表>

- 1) Dóka É, Akaike T, et al. Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci Adv* (2020) in press.
- 2) Takahashi D, Akaike T, et al. AUTACs: Cargo-specific degraders using selective autophagy. *Mol Cell* 76:797-810.e10 (2019).
- 3) Chen W, Akaike T, et al. Rational design of a dual-reactivity-based fluorescent probe for visualizing intracellular HSNO. *Angew Chem Int Ed Engl* 58:16067-16070 (2019).
- 4) Yang CT, Akaike T, et al. Data-driven identification of hydrogen sulfide scavengers. *Angew Chem Int Ed Engl* 58:10898-10902 (2019).
- 5) Kyogoku Y, Akaike T, et al. Nitrosative stress in patients with asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap. *J Allergy Clin Immunol* 144:972-983.e14 (2019).
- 6) Rudyk O, Akaike T, et al. Oxidation of PKG α mediates an endogenous adaptation to pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:13016-13025 (2019).
- 7) Zhang T, Akaike T, Sawa T, et al. Enhanced cellular polysulfides negatively regulate TLR4 signaling and mitigate lethal endotoxin shock. *Cell Chem Biol* 26:686-698.e4 (2019).
- 8) Hamid HA, Sawa T, Akaike T, et al. Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis. *Redox Biol* 21:101096 (2019).
- 9) Bogdándi V, Akaike T, et al. Speciation of reactive sulfur species and their reactions with alkylating agents: do we have any clue about what is present inside the cell? *Br J Pharmacol* 176:646-670 (2019).
- 10) Araki S, Watanabe Y, et al. Reactive sulfur species impair Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II via polysulfidation. *Biochem Biophys Res Commun* 508:550-555 (2019).
- 11) Takata T, Watanabe Y, et al. Redox regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV via oxidation of its active-site cysteine residue. *Free Radic Biol Med* 130:99-106 (2019).
- 12) Bianco CL, Akaike T, et al. The reaction of hydrogen sulfide with disulfides: formation of a stable trisulfide and implications for biological systems. *Br J Pharmacol* 176:671-683 (2019).
- 13) Khan S, Sawa T, Akaike T, et al. Reactive persulfides from *Salmonella* Typhimurium downregulate autophagy-mediated innate immunity in macrophages by inhibiting electrophilic signaling. *Cell Chem Biol* 25:1403-1413.e4 (2018).
- 14) Heppner DE, Akaike T, et al. Cysteine perthiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol-based redox signaling? *Redox Biol* 14:379-385 (2018).
- 15) Akaike T, Sawa T, Watanabe Y, et al. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8:1177 (2017).
- 16) Kunikata H, Sawa T, Akaike T, et al. Metabolomic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. *Sci Rep* 7:41984 (2017).
- 17) Numakura T, Akaike T, et al. Production of reactive persulfide species in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 72:1074-1083 (2017).
- 18) Ono K, Akaike T, Sawa T, et al. Synthesis of L-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome. *Free Radic Biol Med* 106:69-79 (2017).
- 19) Takata T, Akaike T, Watanabe Y, et al. Reactive sulfur species inactivate Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV via S-polysulfidation of its active-site cysteine residue. *Biochem J* 474:2547-2562 (2017).
- 20) Ihara H, Sawa T, Watanabe Y, Akaike T, et al. Superoxide generation from nNOS splice variants and its potential involvement in redox signal regulation. *Biochem J* 474:1149-1162 (2017).
- 21) Chen W, Akaike T, et al. The development of fluorescent probes for visualizing intracellular hydrogen polysulfides. *Angew Chem Int Ed Engl* 54:13961-13965 (2015).
- 22) Kaya H, Kuchitsu K, et al. Ca²⁺-activated ROS production by Arabidopsis RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell* 26:1069-1080 (2014).
- 23) Ida T, Sawa T, Watanabe Y, Akaike T, et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:7606-7611 (2014).

研究課題名： 活性酸素生成の時空間的制御と細胞機能調節
Spatiotemporal control of reactive oxygen formation and its mediated regulation of cell function
研究期間： 平成26年度～平成30年度
研究課題番号： 26111009
研究代表者名： 住本 英樹（九州大学 医学研究院 教授）
研究分担者名： 高木 博史（奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 教授）（26-30年度）

<研究の目的>

哺乳類から微生物に至るまで、酸素分子に由来する活性酸素は細胞内外のシグナル分子として機能するが、活性酸素の生成制御や活性酸素センサー分子とのカップリング機構には不明な点が多い。活性酸素の生成制御には、刺激応答性に酸素から活性酸素を生成する酵素 Nox が重要であるが、Nox の細胞内局所での制御機構や、哺乳類細胞の機能調節と Nox のカップル等についても多くが不明である。微生物においても活性酸素はストレス耐性等に関与するが、その生成制御機構は明らかでない。本研究は、活性酸素が仲介する酸素によるシグナル制御の観点から、住本(研究代表者)は、刺激応答型活性酸素生成酵素 Nox の時空間的制御機構、および Nox 活性化とカップルした哺乳類細胞の機能調節を、また高木(研究分担者)は、微生物の活性酸素に焦点をあて酵母の NO 合成制御や大腸菌のイオウ同化制御の分子機構を解析し、酸素リモデリングにおける活性酸素生成制御と生体機能調節の全体像の解明を目指した。

<研究の成果>

(1) 刺激応答型活性酸素生成酵素 Nox の時空間的制御機構

活性酸素生成の細胞内部位特異的検出を行うために、新規な蛍光プローブ NBzF-BG を用いた過酸化水素（活性酸素の1つ）の測定法を開発した（論文15）。

アラキドン酸は最も強力な Nox2 活性化作用を持つことが知られていたが、その作用機構は不明であった。今回、アラキドン酸が、強い低分子量 G タンパク質 Rac の活性化作用を持つことを示すとともに、活性化型 Rac が結合した p67^{phox}（Nox2 活性化タンパク質）と Nox2 の直接相互作用し ROS 生成を誘導することを明らかにした（論文1, 14）。

Nox2 および Nox3 は膜タンパク質 p22^{phox} と 2 量体を形成して安定化され細胞膜に輸送されるが、一方 Nox5 は p22^{phox} とは相互作用しない。p22^{phox} との 2 量体形成に必要な Nox2 の領域を決定し、その領域のアミノ酸変異により引き起こされる慢性肉芽腫症（Nox2 の欠損により起こる遺伝性疾患）のメカニズムを明らかにした。さらに、Nox5 の安定化に重要な Nox5 内の領域を同定している（論文投稿中）。

Nox1、Nox2、および Nox5 は細胞膜に移行してそこで ROS 生成を行うが、それぞれの輸送経路については殆ど知られていなかった。Nox2 は小胞体で合成された後で従来型の経路によりゴルジ体を経て細胞膜に、一方 Nox5 は小胞体からゴルジ体を経ない新規な経路で細胞膜に輸送されることを示し、Nox1 の細胞膜への輸送は両者の経路を用いることを明らかにした（論文2）。

上皮細胞においては、Nox1、Nox2、Duox1、Duox2 は apical 側の細胞膜に局在する。このそれぞれの apical 膜局在に必要な領域とそれに必要な相互作用するタンパク質を同定し、その分子機構を明らかにした（論文投稿中）。

(2) Nox 活性化とカップルした哺乳類細胞の機能調節

細胞内において Nox4 は主として小胞体に局在するが、この小胞体局在のメカニズム

を明らかにするとともに、Nox4 が小胞体におけるタンパク質の酸化付加反応において重要なことを示した（論文投稿中）。

(3) 酵母の NO 合成制御

Dre2 が Tah18 依存的な NO 合成酵素活性を阻害すること、酸化ストレス（過酸化水素、高温など）に応答し、Tah18-Dre2 複合体が解離することから、新規な NO 合成制御機構を提唱した（論文 12）。

NO 合成に必要な NADPH の生成酵素を同定し、Tah18-Dre2 複合体による NO 合成制御機構への関与について解析を進め、さらに哺乳類オルソログ（Ndor1, Ciapin1）の機能解析を行い、酵母の NO 合成制御機構が哺乳類にも保存されている可能性を見出した（論文投稿中）。

NO の生理的役割として、高温・酸化ストレスから酵母を保護すること、高濃度の過酸化水素処理条件で合成される過剰量の NO は細胞死を誘導することを示し、酵母における NO の正負二面性を明らかにした（論文 12）。過酸化水素処理条件においては、酵母メタカスパーゼ Mca1 が Dre2 を分解し、細胞死を誘導する可能性を示した（論文 5, 11）。

<研究の意義・展望>

本研究で得られた成果は、酸素リモデリングにおける活性酸素生成制御と生体機能調節の全体像を理解のための新たな基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Sumimoto H, Minakami R, Miyano K. Soluble regulatory proteins for activation of NOX family NADPH oxidases. *Methods Mol. Biol.* 1982, 121–137, 2019.
- 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) Matsuyama S, Kage Y, Fujimoto N, Ushijima T, Tsuruda T, Kitamura K, Shiose S, Asada Y, Sumimoto H, Takeya R. Interaction between cardiac myosin-binding protein C and formin Fhod3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E4386–E4395, 2018.
- 4) Ushijima T, Fujimoto N, Matsuyama S, Kan-o M, Kiyonari H, Shioi G, Kage Y, Yamasaki S, Takeya R, Sumimoto H. The actin-organizing formin protein Fhod3 is required for postnatal development and functional maintenance of the adult heart in mice. *J. Biol. Chem.* 293, 148–162, 2018.
- 5) Astuti RI, Nasuno R, Takagi, H. Nitric oxide signaling in yeast. *Adv. Microb. Physiol.* 72, 29–63, 2018.
- 6) 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, e93358, 2017
- 7) Yamazaki S, Tanaka Y, Araki H, Kohda A, Sanematsu F, Arasaki T, Duan X, Miura F, Katagiri T, Shindo R, Nakano H, Ito T, Fukui Y, Endo S, Sumimoto H. The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci. Rep.* 7, 17402, 2017.
- 8) Numaga-Tomita T, Kitajima N, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto, H, Mori Y, Nishida M. Microtubule-localized TRPC3-GEF-H1 axis underlies pressure overload-induced cardiac fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 39383, 2016.
- 9) Kohda A, Yamazaki S, Sumimoto H. The nuclear protein IκBζ forms a transcriptionally

- active complex with nuclear factor- κ B (NF- κ B) p50 and *Lcn2* promoter via the N- and C-terminal ankyrin repeat motifs. *J. Biol. Chem.* 291, 20739–20752, 2016.
- 10) 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.
 - 11) Astuti RI, Nasuno R, Takagi H. Nitric oxide signaling in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9483-9497, 2016.
 - 12) 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.
 - 13) Yuzawa S, Kamakura S, Hayase J, Sumimoto H. Structural basis of cofactor-mediated stabilization and substrate recognition of the α -tubulin acetyltransferase α TAT1. *Biochem. J.* 467, 103–113, 2015.
 - 14) Matono R, Miyano K, Kiyohara T, Sumimoto H. Arachidonic acid induces direct interaction of the p67^{phox}-Rac complex with the phagocyte oxidase Nox2, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.* 289, 24874–24884, 2014.
 - 15) 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.

研究課題名： 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

Elucidation of redox regulatory mechanisms by transcription factor network

研究期間： 平成26年度～平成30年度

研究課題番号： 10323289

研究代表者名： 伊東 健（弘前大学 医学研究科 教授）

研究分担者名： 鈴木 隆史（東北大学 医学研究科 助教）（26-30年度）

濱崎 純（東京大学 薬学研究科 助教）（26-30年度）

<研究の目的>

本研究では、Keap1-Nrf2経路を中心とした核内転写調節機構がミトコンドリアやプロテオソームとクロストークする様子を解析し、酸素ストレスに応答した細胞内環境リモデリング機構を解明することを目指した。

<研究の成果>

(1) Nrf2 経路と ATF4 経路のクロストーク機構の解明（論文3、論文11）

酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより Nrf2 が ATF4 と相互作用することを見出しその役割を解析したところ、プロテアソーム阻害により活性化された Nrf2 と ATF4 がシスチントランスポーターである xCT 遺伝子の発現調節に協調的に関わること、この協調機構はプロテアソーム阻害剤に対してがん細胞が耐性を獲得するメカニズムの1つであることを明らかにした（論文3）。また、ローズマリーに含まれるカルノシン酸が、神経グリア細胞株において ATF4 と Nrf2 を同時に活性化し神経栄養因子(NGF)、グルタチオン合成酵素、xCT などの遺伝子発現を協調的に制御することを見出した（論文11）。

(2) Nrf2 結合因子 GCN1L1 の個体レベルでの機能解明（論文1）

Nrf2 のプルダウン解析から、ATF4 の上流活性化因子である GCN1L1 を Nrf2 結合因子として見出した。そこで2つの GCN1 変異マウス（GCN1^{Null}（完全欠失）と GCN1L1^{□RWDBD}マウス（RWD ドメイン結合ドメイン（RWDBD）欠失変異体マウス）を作成し機能を解析した。その結果、GCN1^{Null} は胎生早期に致死であること、GCN1L1^{□RWDBD}マウスは胎児期成長遅延を呈して出生直後に死亡することを明らかにした。GCN2 と同様に RWD を有する DRG2/DFRP2 複合体の発現低下細胞は p21 の発現誘導を伴う G2/M arrest を起こすことが報告されているが、GCN1L1^{□RWDBD}マウス由来の胎児期繊維芽細胞（GCN1L1^{□RWDBD}MEF）は DRG2 の発現低下細胞とよく似た p21 の発現増加を伴う G2/M arrest を起こすことを明らかにした。

(3) Keap1-Nrf2 経路によるストレス感知機構の同定（論文2、論文6）

Keap1-Nrf2 システムは様々な親電性物質や活性酸素種に応答して一群の生体防御遺伝子群を活性化する。Keap1 の3つのシステイン残基 C151、C273、C288 は親電子性物質に対する反応性が高く、ストレスセンサーとして働くと考えられていたが、その機能的検証は十分に行われていなかった。そこで、これらの反応性システイン残基について各種変異体を作成し、様々な Nrf2 誘導剤に対する応答性を検証した。その結果、Nrf2 誘導剤は標的システイン残基の違いから、少なくとも以下の4つのグループに分類できることがわかった。すなわち、1) C151 依存型、2) C288 依存型、3) C151/C273/C288 相補型、4) C151/C273/C288 非依存型誘導剤に分類された。本研究により、Keap1 は複数のストレス感知機構を備え持つことが機能的にはじめて実証された（論文2）。また、

これまで長く謎であった過酸化水素に対する Keap1 センサーシステイン残基を明らかにした (論文 6)。

(4) Nrf2 による新たな生体防御機構の解明 (論文 4、論文 5)

Nrf2 が IL-6 や IL- α のプロモーターに存在する抗酸化剤応答配列に直接結合して、転写を抑制し、抗炎症的に働く分子機構を発見した (論文 4)。また、Nrf2 慢性的な活性化はマウス胎児期に作用して尿崩症を招くことを明らかにした (論文 5)。

(5) プロテアソームとレドックス制御のクロストーク解明 (論文 7、論文 8、論文 9)

脱アセチル化酵素 Sirt1 が、タンパク質品質管理機構に関与していることを明らかにした (論文 7)。一方で、26S プロテアソームの新規ユビキチン受容体サブユニット Rpn13 が実際にマウス生体内において既存のユビキチン受容体サブユニット Rpn10 と協調して働き、細胞恒常性維持に働くことを遺伝学的に示した。研究の進んでいる酵母では Rpn10, Rpn13 両者が欠損してもマイルドな表現型を示すのに比べ、哺乳類では両者の働きが必須であることを示した (論文 8)。また、プロテアソーム機能低下時のプロテアソーム遺伝子発現亢進を担う Nrf1 の活性化因子として DDI2 を同定した (論文 9)。

<研究の意義・展望>

本研究により Nrf2 と ATF4 の相互作用を見出し、その役割の一端を明らかにした。ATF4 と Nrf2 はストレス応答機構の鍵となる因子であり、その相互作用より得られる遺伝子発現のアウトプットは、種々の病態理解に重要であると考えられる。特に ATF4 はミトコンドリア機能異常により活性化されるので、ミトコンドリア病などでの ATF4 と Nrf2 の相互作用の意義を解明することは今後の重要な課題である。また、リボソーム結合タンパク質 GCN1L1 が従来の GCN2-ATF4 経路によるアミノ酸飢餓応答に必須であるばかりではなく、細胞周期や細胞増殖を制御する重要な因子であることを解明した。GCN1L1 は細胞の栄養状態と増殖を統合制御する鍵因子であると考えられ、多くの生命現象の理解につながると考えられる。一方、Keap1 の詳細な酸化物センシング機構や Nrf2 による新たな炎症抑制機構を解明し、酸化ストレス応答の新たな分子基盤を構築した。さらにタンパク質恒常性維持機構とレドックス制御のクロストークについての新知見は細胞老化制御機構の新たな分子基盤になると考えられ、健康増進戦略への応用へつながるものと考えられた。

<主な研究発表>

- 1) Yamazaki H, Kasai S, Mimura J, Ye P, Inose-Maruyama A, Tanji K, Wakabayashi K, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Sato T, Ozaki T, Cavener DR, Yamamoto M, Itoh, K. Ribosome binding protein GCN1L1 regulates the cell cycle and cell proliferation and is essential for the embryonic development of mice. *PLoS Genetics*, in revision.
- 2) Suzuki T, Muramatsu A, Saito R, Iso T, Shibata T, Kuwata K, Kawaguchi SI, Iwawaki T, Adachi S, Suda H, Morita M, Uchida K, Baird L, Yamamoto M. Molecular Mechanism of Cellular Oxidative Stress Sensing by Keap1. *Cell Rep.* 28, 746-758.e4, 2019.
- 3) Concomitant Nrf2- and ATF4-activation by Carnosic Acid Cooperatively Induces Expression of Cytoprotective Genes. Mimura J, Inose-Maruyama A, Taniuchi S, Kosaka K, Yoshida H, Yamazaki H, Kasai S, Harada N, Kaufman RJ, Oyadomari S, Itoh K. *Int J Mol Sci.* 20, 2019.
- 4) Suzuki T, Seki S, Hiramoto K, Naganuma E, Kobayashi HE, Yamaoka A, Baird L, Takahashi N, Sato H and Yamamoto M. Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. *Nature Communications.* 8, 14577, 2017.
- 5) 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 Communications*. 7, 11624, 2016.
- 6) Saito R, Suzuki T, 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.
 - 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) Hamazaki J, Hirayama S, Murata S. Redundant roles of Rpn10 and Rpn13 in recognition of ubiquitinated proteins and cellular homeostasis. *PLoS Genet*. 11, e1005401, 2015.
 - 9) Tomita T, Hamazaki J, Hirayama S, McBurney MW, Yashiroda H, Murata S. Sirt1-deficiency causes defective protein quality control. *Sci Rep*. 5, 12613, 2015.
 - 10) Maruyama A, Mimura J, Itoh K. Non-coding RNA derived from the region adjacent to the human HO-1 E2 enhancer selectively regulates HO-1 gene induction by modulating Pol II binding. *Nucleic Acids Res*. 42, 13599-13614, 2014.
 - 11) 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.

研究課題名： 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
Elucidation of ubiquitination-mediated regulation of ROS signaling and
stress response system
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
Elucidation of novel regulatory mechanisms of ROS signaling and stress
response system by various post-translational modifications

研究期間： 平成 27 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 15H01391, 17H05518
研究代表者名： 松沢 厚（東北大学 大学院薬学研究科 教授）

<研究の目的>

好気性生物は酸素利用によるエネルギー効率化と引き替えに、活性酸素（ROS）の毒性に曝されることになり、ROS 感知機構を発達させると共に、シグナルメディエーターとしての ROS によるシグナル伝達の仕組みを独自に進化させてきた。我々は以前、ROS がストレス応答キナーゼ ASK1 を介して、細胞死のみでなく、免疫応答を活性化することを見出した（Matsuzawa, *Nature Immunology*, 2005）。おそらく感染の程度に応じて、ASK1 活性化が厳密に制御され、感染が過剰ならば細胞死により感染細胞を排除し、感染が弱ければ免疫を賦活化して感染拡大を阻止する、といった異なる応答が誘導されると考えられるが、その仕組みは良く分かっていない。最近我々は、ASK1 活性化の持続時間・強度が、ユビキチン化関連酵素群 Roquin-2 や USP9X、TRIM48 によって厳密に制御されることを明らかにした（Nagai, *Molecular Cell*, 2009; Maruyama, *Science Signaling*, 2014）。特に TRIM48 が ASK1 阻害分子である PRMT1 メチル化酵素のユビキチン化分解を介して ASK1 の ROS 感受性を増強することや、新たな細胞死パターナトスがユビキチン化や酸化修飾を介して誘導されることなど、多様な翻訳後修飾による ROS シグナルの新たな制御機構を見出した。本研究では、多様なキナーゼ制御分子やユビキチン化等の翻訳後修飾が、ROS の強度に応じて ASK1 などのシグナル分子の活性化のバランス制御を介して、細胞死や免疫応答といった異なるストレス応答を適切に誘導できる仕組みを分子レベルで解明し、それら制御分子を標的として、その異常が原因の免疫疾患や癌の新たな治療戦略開発に繋げることを目的とした。

<研究の成果>

(1-1) レドックスシグナルを介した適切な応答誘導において多様な翻訳後修飾関連酵素群とレドックス関連分子を介した微調整の重要性を解明（論文 5）

ストレス応答キナーゼ ASK1 は、活性酸素刺激依存的な活性化に伴い、ユビキチン化酵素 Roquin-2 によってユビキチン化分解され、不活性化されること、逆に脱ユビキチン化酵素 USP9X で脱ユビキチン化され、分解が抑制されて持続的に活性化することを我々は見出した。さらに、別のユビキチン化酵素 TRIM48 が、その結合分子として同定した ASK1 阻害分子 PRMT1 をユビキチン化分解することを発見した。この PRMT1 はアルギニンメチル化酵素であり、ASK1 のメチル化を介して、ASK1 阻害因子でレドックス応答分子であるチオレドキシニン (Trx) と ASK1 の結合を強固にして、間接的に ASK1 阻害分子として働き、酸化ストレス誘導性の ASK1 活性化や細胞死を抑制した。このようにレドックスシグナルは、ユビキチン化やメチル化、リン酸化など多様な翻訳後修飾の相互作用を介して厳密に制御・微調整されており、このクロストークの仕組みが、細胞死・生存といった細胞応答のバランス制御や、酸化ストレス刺激の程度に応じた適切

な生理応答の誘導に重要な役割を果たしており、これら翻訳後修飾に関わる分子群は、癌や免疫疾患などの新たな創薬標的の重要な候補である。

(1-2) 癌や免疫疾患に対する新たなレドックス関連の分子標的および治療戦略の発見 (論文 5)

TRIM48 を過剰発現させた癌細胞を用いて、*in vivo* での癌細胞のマウス皮下移植実験を行ったところ、TRIM48 は ASK1 活性化を介した細胞死 (アポトーシス) を促進することによって、腫瘍形成を阻害することが分かった。従って、TRIM48 ならびに TRIM48 の過剰発現は、癌に対する新たな分子標的および治療戦略になり得ると考えられる。また ASK1 は免疫応答にも不可欠なキナーゼであるため、TRIM48 およびその標的である PRMT1 やレドックス応答分子 Trx、さらに USP9X や Roquin-2 などの ASK1 翻訳後修飾に関わる分子群は、癌や免疫疾患などの新たな創薬標的の重要な候補であることを本研究成果として示した。

(2-1) 酸化ストレス誘導性細胞死 (パータナトス) の実行メカニズムにおけるシグナル制御分子 p62 の酸化修飾の必要性を解明 (論文 3)

セファロsporin系抗菌薬であるセフォタキシムによって薬剤性急性尿細管壊死などの副作用が惹起される原因を解明する過程で、セフォタキシムが酸化ストレスを介して、細胞死のバランス制御因子 PARP-1 に依存的な新たな形態の細胞死であるパータナトス (神経変性疾患や癌など様々な疾患の発症原因や増悪化の要素) を誘導することを我々は見出した。実際、セフォタキシム誘導性のパータナトスは、低濃度の過酸化水素刺激、即ち微弱で持続的な酸化ストレスで代償できた。さらに、その誘導には多様なシグナル制御を行う多機能分子 p62 依存的な ALIS (aggresome-like induced structures; ユビキチン化タンパク質の凝集体) の形成と核への蓄積が必須であることを明らかにした。

最近、p62 の分子内システインに酸化修飾を受けて分子間ジスルフィド結合を形成し、酸化ストレスセンサーとして働く可能性が指摘されている。実際に p62 分子内のシステインをアラニンに置換した、酸化修飾を受けない p62 変異体では、ALIS 形成および核蓄積が顕著に抑制されたことから、p62 の酸化修飾が酸化ストレス誘導性細胞死 (パータナトス) の実行メカニズムに必須であることが分かった。

(2-2) 酸化ストレス誘導性パータナトスを制御する分子標的としての酸化修飾 p62 の同定 (論文 3)

我々は実際に、p62 欠損細胞が酸化ストレス誘導性パータナトスに対して顕著な抵抗性を示すことも証明した。この p62 欠損細胞に、野生型 p62 を戻して再構築するとパータナトスは起こるが、前述の酸化修飾を受けない p62 変異体ではパータナトスは誘導されず、酸化修飾 p62 がパータナトス誘導に必須であることが判明した。酸化ストレスが生じると、酸化修飾 p62 を介して核内にユビキチン化タンパク質凝集体である ALIS が形成され、この形成が酸化ストレス刺激によるパータナトス (PARP-1 依存的細胞死) を誘導しているものと考えられる。従って、酸化修飾 p62 は神経変性疾患や癌など様々な疾患の重要な治療標的候補である。

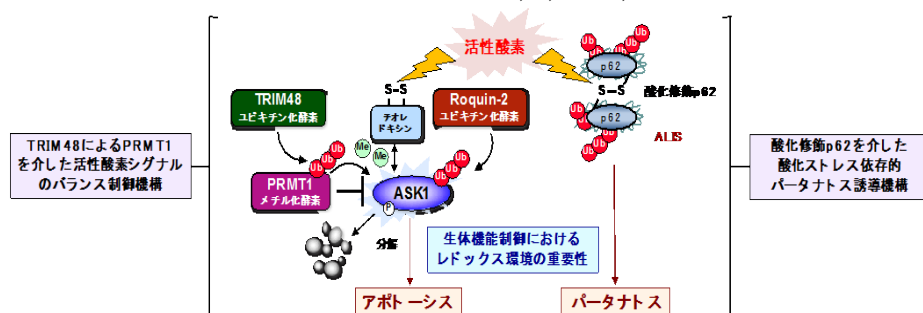
<研究の意義・展望>

活性酸素を含む酸化ストレスが、ストレス応答キナーゼ ASK1 やその活性制御因子など様々なシグナル分子を介して、特殊な形態の細胞死や免疫応答など高次生命機能の調節を担っていることを我々は実証してきた。例えば、病原体感染についてはその程度に応じて、シグナル分子の活性化が厳密に制御され、細胞死や炎症誘導といった異なる応答が誘導されるが、その仕組みは良く分かっていなかった。本研究では、ASK1 などのキナーゼやシグナル分子の活性化の持続時間・強度が、酸化ストレスの強さや長さに応じて、幾つかのユビキチン化やメチル化等の翻訳後修飾酵素群による修飾を介して厳密

にストレス応答シグナルのバランスが制御され、癌や神経変性疾患の原因となるアポトーシスや非典型的なパータナトスなどの細胞死、あるいは免疫応答といった異なるストレス応答を適切に誘導できる仕組みを分子レベルで解明した。本研究成果は、それらのシグナル分子やその翻訳後修飾酵素を標的とした免疫疾患や癌、神経変性疾患の新たな治療戦略開発の基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Yokosawa, T., Yamada, M., Noguchi, T., Suzuki, S., Hirata, Y., Matsuzawa, A. Pro-caspase-3 protects cells from polymyxin B-induced cytotoxicity by preventing ROS accumulation. *J. Antibiotics*, 72, 848-852, 2019.
- 2) Sekiguchi, Y., Yamada, M., Noguchi, T., Noomote, C., Tsuchida, M., Kudoh, Y., Hirata, Y., Matsuzawa, A. The anti-cancer drug gefitinib accelerates Fas-mediated apoptosis by enhancing caspase-8 activation in cancer cells. *J. Toxicol. Sci.*, 44, 435-440, 2019.
- 3) Noguchi, T., Suzuki, M., Mutoh, N., Hirata, Y., Tsuchida, M., Miyagawa, S., Hwang, G. W., Aoki, J., Matsuzawa, A. Nuclear-accumulated SQSTM1/p62-based ALIS act as microdomains sensing cellular stresses and triggering oxidative stress-induced parthanatos. *Cell Death Dis.*, 9, 1193, 2018.
- 4) Kudo, Y., Noguchi, T., Ishii, C., Maeda, K., Nishidate, A., Hirata, Y., Matsuzawa, A. Antibiotic vancomycin promotes the gene expression of NOD-Like receptor families in macrophages. *BPB Rep.*, 1, 6-10, 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) Hirata, Y., Takahashi, M., Kudoh, Y., Kano, K., Kawana, H., Makide, K., Shinoda, Y., Yabuki, Y., Fukunaga, K., Aoki, J., Noguchi, T., Matsuzawa, A. Trans-fatty acids promote proinflammatory signaling and cell death by stimulating the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway. *J. Biol. Chem.*, 292, 8174-8185, 2017.
- 7) Matsuzawa, A. Physiological roles of ASK family members in innate immunity and their involvement in pathogenesis of immune diseases. *Adv. Biol. Regul.*, 66, 46-53, 2017.
- 8) Hirata, Y., Takahashi, M., Morishita, T., Noguchi, T., Matsuzawa, A. Post-translational modifications of the TAK1-TAB complex. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, E205, 2017.
- 9) Matsuzawa, A. Thioredoxin and redox signaling: Roles of the thioredoxin system in control of cell fate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 617, 101-105, 2017.
- 10) Noguchi, T., Tsuchida, M., Kogue, Y., Spadini, C., Hirata, Y., Matsuzawa, A. Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange factor 1 (BIG1) governs the recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) signaling complexes. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, E1869, 2016.
- 11) Miyakawa, K., Matsunaga, S., Kanou, K., Matsuzawa, A., Morishita, R., Kudoh, A., Shindo, K., Yokoyama, M., Sato, H., Kimura, H., Tamura, T., Yamamoto, N., Ichijo, H., Takaori-Kondo, A., Ryo, A. ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. *Nat. Commun.*, 6, 6945, 2015.



【研究成果】本研究では、ユビキチン化やメチル化などの多様な翻訳後修飾を介した強つかの翻訳後修飾酵素群による活性酸素シグナルのバランス制御機構や、酸化修飾p62を介した酸化ストレス依存的パータナトス誘導機構を解明し、これらの主な成果を基に、生体機能制御における生体内のレドックス環境の重要性を示した。

研究課題名： 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
Role of reactive sulfur species in the reversibility of cellular redox signaling
電子伝達系におけるユビキノンと活性イオウ分子のレドックスカップル
Redox couple of ubiquinone and reactive sulfur species in electron transfer system

研究期間： 平成 27 年度～平成 30 年度

研究課題番号： 15H01392、17H05519

研究代表者名： 熊谷嘉人（筑波大学医学医療系 教授）（27-30 年度）

連携研究者名： 安孫子ユミ（筑波大学医学医療系 助教）（27-30 年度）

<研究の目的>

本研究では、過酸化水素ならびに良好な電子受容体である 9,10-フェナントラキノン (9,10-PQ) の細胞内酸素および活性イオウ分子 (RSS) 濃度を低下させ、かつ活性酸素種 (ROS) を増加させる化学的特性を利用して、レドックスシグナル伝達の可逆性担保における RSS の重要性を明らかにすることを目的とした。また、内因性電子供与体であり、RSS の一つであるパースルフィドが内因性電子受容体とレドックスカップルして、電子伝達系担体となるか否かを、9,10-PQ と関連キノン系化合物を用いて検討することを目的とした。

<研究の成果>

(1) レドックスシグナル可逆性のための PTP1B SSOH の同定 (論文 1)

ヒトプロテインチロシンフォスファターゼ 1B (PTP1B) をパースルフィドに曝露すると、本脱リン酸化活性は顕著に低下したが、DTT により殆ど回復した。パースルフィドおよび過酸化水素を処理すると本酵素活性は消失したが、DTT 添加によりパースルフィドを最初に処理すると酵素活性の回復が見られた。LC-MS 解析により、活性部位である Cys215 がパースルフィドで SSH 基、過酸化水素を共存すると SSOH 基がそれぞれ生成し、DTT 処理で SH 基へ還元されることが明らかとなった (なお、PTP1B の SSOH 基の産生はジメドン添加による LC/MS/MS 解析より支持された)。さらに、DTT の代わりにチオレドキシシン (Trx) とその関連タンパク質を使用すると、Trx1 および TRP14 に有意な酵素の活性回復効果が観察された。このことは、細胞内で生じた SSOH 基が Trx1 および TRP14 で還元される可能性を示唆している。一連の結果はレドックスサイクルを介してスーパーオキシドや過酸化水素を産生する電子受容体 9,10-PQ でも同様な現象が認められた。

DCP-Biol1 をプローブとして用い、細胞内タンパク質の SOH 基および SSOH 基について検討した。興味深いことに、PTP1B を含む A431 細胞中タンパク質のいくつかは定常レベルで SOH 基および SSOH 基の形で存在していた。このことは、タンパク質のシステイン残基の一部がチオレートイオン (S⁻基) 化しており、また一部は RSS により既に SSH 基修飾を受けており、生理的 pH で SS⁻基として存在し、両者は細胞内で生じた過酸化水素により容易に酸化されていることを示唆している。また、A431 細胞を過酸化水素に曝露すると、タンパク質 SOH 基の生成は有意に増加した。さらに、レドックスシグナル伝達のセンサータンパク質 (分子内にチオレートイオン化したシステイン残基を有し、酸化修飾を受けやすいタンパク質) として知られている PTEN、HSP90 および Keap1 も分子内に定常時において、SOH 基および SSOH 基が存在し、過酸化水素の曝露により細胞内 PTP1B、PTEN および HSP90 の SOH 基は有意に増加した。

(2) パースルフィドとキノン系化合物のレドックスカップル

パースルフィドと電子受容体との 1 電子酸化還元反応を介したレドックス反応を調べた。ESR での検討により、高い 1 電子還元ポテンシャル値を有する 9,10-PQ とパースルフィド (Na_2S_2) およびポリスルフィド (Na_2S_3 および Na_2S_4) を反応すると、イオウの数に応じて反応液中の溶存酸素は時間と共に減少したが、GSH や Na_2S では消費は見られなかった。ESR での検討により、9,10-PQ はそのセミキノンラジカル体および Na_2S_2 はパースルフィドラジカル体にそれぞれ変換されることが明らかとなった。驚くことに、生じたパースルフィドラジカル体は好氣的条件下でかなり安定であった。同様の知見はキノン骨格を有するビタミン K_3 やピロロキノリンだけでなく、ユビキノンのような内因性キノン系化合物でも認められた。一方、 Na_2S_2 の代わりに内因性パースルフィドであるシステインパースルフィドの前駆体として用いた MCPD と 9,10-PQ の反応において、MCPD のパースルフィドラジカル体は迅速な二量体化のために検出できなかったが、1 電子還元反応で生じたセミキノンラジカル体は観察された。また、A431 細胞を 9,10-PQ に曝露すると、曝露 30 分後に用量依存的に細胞内システインパースルフィドおよび GSH パースルフィド濃度は有意に減少したが、時間と共に定常レベルに回復する傾向が見られた。一連の結果は、種々のキノン由来電子受容体とパースルフィドは 1 電子酸化還元反応に起因するレドックスカップルを生じることを示唆している一方で、9,10-PQ の高用量ではパースルフィドを基盤としたレドックスホメオスタシスが破綻する可能性も考えられた。

<研究の意義・展望>

第 1 期課題の研究において、ROS と RSS の協調的な働きにより、細胞内でタンパク質 SSOH が反応中間体となり、酸化ストレスで生じたタンパク質 SSO₂H や SSO₃H は、Trx1 および TRP14 の働きにより S-S 切断反応を介してタンパク質 SH に変換されることが示唆された。また、レドックスシグナルのセンサータンパク質として知られている PTP1B、PTEN、HSP90 および Keap1 も細胞内でタンパク質 SSOH の形で存在している可能センサータンパク質も示され、このことがレドックスシグナルの可逆性の担保として重要であることが示唆された。同様なシステムは酸化ストレス（正確には ROS ストレス）だけでなく、親電子ストレスにも適用される可能性が考えられるので、親電子物質によるレドックスシグナル伝達の可逆性担保の研究にも発展されることが期待される。

第 2 期課題の研究において、内因性 RSS であるパースルフィドが種々のキノン系化合物とレドックスカップルすることが示された。生じた 1 電子酸化体であるパースルフィドラジカルは比較的安定であり、生体内でのレドックスカップルの可能性も考えられた。特にユビキノンとパースルフィドとのレドックスカップルは、ミトコンドリアでの電子伝達系に一部寄与しているかもしれない。一方、細胞を 9,10-PQ に曝露すると内因性 RSS の濃度が有意に低下することが観察されたことから、9,10-PQ のような外因性電子受容体の細胞毒性の一因に 9,10-PQ と RSS のレドックスサイクルを介したレドックスホメオスタシスの破綻が示唆された。

<主な研究発表>

- 1) Doka E, Ida T, Dagnell M, Abiko Y, Cong NL, Balog N, Takata T, Espinosa B, Nishimura A, Cheng Q, Funato Y, Miki H, Fukuto JM, Prigge JR, Schmidt EE, Arner ESJ, Kumagai Y, Akaike T, Nagy P. Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci. Adv.* in press, 2019.
- 2) Nishimura A, Shimoda K, Tanaka T, Toyama T, Nishimura K, Shinkai Y, Numaga-Tomita T, Yamazaki D, Kanda Y, Akaike T, Kumagai Y, Nishida M. Depolysulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic

- overload. *Sci. Signal.* 12, eaaw 1920, 2019.
- 3) Akiyama M, Unoki T, Shinkai Y, Ishii I, Ida T, Akaike T, Yamamoto M, Kumagai Y. Environmental electrophile-mediated toxicity in mice lacking Nrf2, CSE, or both. *Environ. Health Perspect.* 127, 67002, 2019.
 - 4) Abiko Y, Nakai Y, Luong NC, Bianco CL, Fukuto JM, Kumagai Y. Interaction of quinone-related electron acceptors with hydropersulfide Na₂S₂: Evidence for one-electron reduction reaction. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 551-556, 2019.
 - 5) Lin J, Akiyama M, Bica I, Long F, Henderson C, Goddu R, Suarez V, Baker B, Ida T, Shinkai Y, Nagy P, Akaike T, Fukuto J, Kumagai Y. The Uptake and Release of Polysulfur Cysteine Species by Cells: Physiological and Toxicological Implications. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 447-455, 2019.
 - 6) Bianco CL, Akaike T, Ida T, Nagy P, Bogdandi V, Toscano JP, Kumagai Y, Henderson CF, Goddu RN, Lin J, Fukuto JM. The Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfides: Formation of a Stable Trisulfide and Implications to Biological Systems. *Br. J. Pharmacol* 176, 671-683, 2019.
 - 7) Shinkai Y, Kumagai Y. Sulfane Sulfur in Toxicology: A Novel Defense System Against Electrophilic Stress. *Toxicol. Sci.* 170, 3-9, 2019.
 - 8) Kumagai Y, Akiyama M, Unoki T. Adaptive responses to electrophilic stress and reactive sulfur species as their regulator molecules. *Toxicol. Res.* 35, 303-310, 2019.
 - 9) 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 Lett.* 592, 2140-2152, 2018.
 - 10) Unoki T, Akiyama M, Kumagai Y, Goncalves FM, Farina M, Telxelra Da Rocha JB, Ashner M. Molecular pathways associated with methylmercury-induced Nrf2 modulation. *Fron. Gene.* 9, 373, 2018.
 - 11) Akiyama M, Shinkai Y, Unoki T, Shim I, Ishii I, Kumagai Y. Capture of cadmium by reactive polysulfides attenuates cadmium-induced adaptive response and hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 2209-2217, 2017.
 - 12) Akaike T, Ida T, Fan-Yan Wei FY, 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.
 - 13) Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A, Nishimura A, Tsutsuki H, Ida T, Ishizaki K, Toyama T, Yoshida E, Abdul Hamid, H, Jung M, Matsunaga T, Fujii S, Sawa T, Nishida M, Kumagai Y, Akaike T. Exposure to Electrophiles Impairs Reactive Persulfide-dependent Redox Signaling in Neuronal Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1673-1684, 2017.
 - 14) Abiko Y, Shinkai Y, Unoki T, Hirose R, Uehara T, Kumagai Y. Polysulfide Na₂S₄ regulates the activation of PTEN/Akt/CREB signaling and cytotoxicity mediated by 1,4-naphthoquinone through formation of sulfur adducts. *Sci. Rep.* 7, 4814, 2017.
 - 15) Shinkai Y, Masuda A, Akiyama M, Xian M, Kumagai Y. Cadmium-mediated activation of the HSP90/HSF1 pathway regulated by reactive persulfides/polysulfides. *Toxicol. Sci.* 156, 412-421, 2017.
 - 16) Abiko Y, Sha L, Shinkai Y, Unoki T, Luong NC Tsuchiya Y, Watanabe Y, Hirose R, Akaike T, Kumagai Y. 1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides. *Free Radic. Biol. Med.* 104, 118-128, 2017.
 - 17) Unoki T, Abiko Y, Toyama T, Uehara T, Tsuboi K, Nishida M, Kaji T, Kumagai Y. Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells. *Sci. Rep.* 6, 28944, 2016.

- 18) Millikin R, Bianco CL, White C, Saund SS, Henriquez S, Sosa V, Akaike T, **Kumagai Y**, Soeda S, Toscano JP, Lin J, Fukuto JM. The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation. *Free Radic. Biol. Med.* 97, 136-147, 2016.
- 19) Shinkai Y, Kimura T, Itagaki A, Yamamoto C, Taguchi K, Yamamoto M, Kumagai Y, Kaji T. Partial contribution of the Keap1-Nrf2 system to cadmium-mediated metallothionein expression in vascular endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 295, 37-46, 2016.

研究課題名： 酸素を基軸とする生物リズムの分子基盤に迫る
Molecular mechanism of circadian clockwork based on “Oxygen biology”
研究期間： 平成 27 年度～平成 28 年度
研究課題番号： 15H01395
研究代表者名： 吉種 光（東京大学 理学系研究科 助教）
連携研究者名： 深田 吉孝（東京大学 理学系研究科 教授）（27-28 年度）

<研究の目的>

約 24 時間周期の概日時計は転写フィードバック制御を基本骨格とするが、分子振動や外来刺激への応答には、時計タンパク質の翻訳後修飾が極めて重要な役割を果たす。この時刻情報を伝えるシグナル因子として、活性酸素種 (ROS)、親電子分子種、pH 変化、浸透圧などが機能することを見出しており、酸素呼吸の副産物として生じる ROS を時刻情報として利用し、これをリズムに不活化することが細胞内レドックス環境の恒常性維持に重要であったと推察される。このように現在、生物リズムと酸素生物学の研究分野は互いに融合しつつある状況であり、本研究はこの両研究分野にまたがる重要な位置を占める。本研究では、時計タンパク質の翻訳後修飾とその細胞内シグナルを切り口に酸素生物学に新たな意義を書き加えると共に、生物リズムの振動原理や制御機構に迫る事で生物リズムの破綻に伴う多くの疾病に対する根本的な治療コンセプトを与える。

<研究の成果>

(1) 酸素シグナルを概日時計に伝達する鍵分子 ASK キナーゼの発見 (論文 2)

概日時計の自律的な発振や外界シグナルへの時刻同調メカニズムにおいて、時計タンパク質の翻訳後修飾は極めて重要な役割を果たす。我々は、時計タンパク質 CLOCK と BMAL1 が時刻依存的なリン酸化制御を受け、DNA 結合能や安定性が巧妙に制御されていることを明らかにした。最近では、CLOCK-BMAL1 複合体をリン酸化するキナーゼとして JNK と CaMKII を同定し、いずれも概日時計の環境適応に必須なシグナルセンサーとして働く可能性を報告した。本研究では MAPK シグナルの上流因子 ASK ファミリーに着目した研究を展開した。ASK1-3 遺伝子の 3 重欠損マウス(TKO)の輪回し行動測定を行い、夜間の光照射に対する行動リズムの位相や周期の制御に異常が見られることを報告した。さらに、ASK を介した細胞内シグナルは生物時計に強い影響を与える可能性が考えられたため、ASK-TKO マウス由来のマウス線維芽細胞を樹立した。この実験では、細胞リズムの可視化を目的として時計タンパク質 PER2 にルシフェラーゼが融合した PER2::Luc マウスを利用し、このマウスと ASK-TKO マウスとを交配して細胞を樹立した。ASK の活性変化が実際に培養細胞の時計振動に対して強い影響を与えるか否かを観察した。まず、レドックス状態の変化を模倣して培養培地の浸透圧を変化させると、ASK 活性の上昇または下降に伴って、細胞時計のリズム位相が変化した。さらに、ASK 活性を恒常的に上昇または下降させると、細胞時計のリズム周期が短周期化または長周期化することが判明した。実際に、細胞のレドックス状態を変化させた場合にも同様な時計の周期と位相の変化が観察された。さらに重要なことに、これらの刺激に伴う細胞時計への影響は、ASK-TKO 細胞では見られなくなることを示した。

(2) 時計遺伝子 E4bp4 の時計入力と時計出力における役割を同定 (論文 1)

概日時計の位相調節メカニズムは培養細胞にも存在し、例えば pH 7.0 から 7.4 への培地の僅かなアルカリ化が TGFβ を活性化し、ALK5-SMAD3/4-DEC1 経路を介して細胞時計をリセットすることを当研究室で明らかにした。これに対し、pH 7.0 から 6.6 への僅かな酸性化は、アルカリ化の場合とちょうど逆の位相に細胞時計をリセットするが、こ

の分子基盤は不明であった。本研究では、培地の酸性化が時計遺伝子 E4bp4 を誘導することを発見した。重要なことに酸素シグナルである ASK キナーゼの活性化でも E4bp4 の急速な誘導が見られることから、培地の酸性化と酸素シグナルは一部共通の経路を介して時計へと入力している可能性が示唆された。さらに重要なことに、E4bp4 を欠損した繊維芽細胞において酸性化リセットが完全に阻害されることを見出した。つまり E4bp4 遺伝子の存在が酸性化リセットの必要条件であることが分かった。さらに、E4BP4 抗体を作製して ChIP-Seq 解析を行い、E4BP4 が結合するゲノム領域とその DNA 結合配列の嗜好性を同定した。また、E4bp4 欠損マウスにおいて、リズム的な時計出力が大きく乱れることが明らかになった。

(3) A-to-I RNA 編集リズムの発見 (論文 3)

我々のゲノムに書き込まれた遺伝情報は、RNA にコピーされ、その情報を元に多様なタンパク質が創り出されている。概日時計のリズムが、睡眠覚醒や代謝などの生理機能リズムへと出力されるためには、RNA 分子のリズム制御が重要である。本研究では、RNA のアデノシン (A) が時刻依存的にイノシン (I) へと RNA 編集されていることを発見した。イノシンは遺伝情報としてはグアノシン (G) として振る舞うため、アミノ酸配列などの遺伝情報が時刻依存的に使い分けられていることになる。分子メカニズムとしては、A-to-I RNA 編集酵素である ADAR2 がリズム的に転写制御されることが重要で、ADAR2 欠損マウスにおいては、A-to-I RNA 編集リズムが停止していた。さらに興味深いことに、RNA の量のリズムも一部消失しており、その結果として血中の脂肪酸量や高脂肪食を食べた時の体重増加に異常が見られることを明らかにした。一方、ADAR2 の欠損によって CRY2 の翻訳抑制が解除され、概日時計の周期が短くなることを見出した。

<研究の意義・展望>

本研究で得られた成果は、酸素生物学の研究領域において、研究する時刻の重要性を示した。また、概日時計によって、細胞内の酸化還元状態にリズム性がもたらされ、その酸素シグナルが時刻情報として逆に概日時計をコントロールするという画期的なコンセプトを提案した。今後、時計と酸素の融合という新たな研究領域の基盤となる。

<主な研究発表>

- 1) Hikari Yoshitane, Yoshimasa Asano, Aya Sagami, Seinosuke Sakai, Yutaka Suzuki, Hitoshi Okamura, Wataru Iwasaki, Haruka Ozaki, and Yoshitaka Fukada, Functional D-box sequences reset the circadian clock and drive mRNA rhythms. *Communications Biology* 2, 300, 2019.
- 2) Kiyomichi Imamura, Hikari Yoshitane, Kazuki Hattori, Mitsuo Yamaguchi, Kento Yoshida, Isao Naguro, Hidenori Ichijo and Yoshitaka Fukada, ASK family kinases mediate cellular stress and redox signaling to circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 3646-3651, 2018.
- 3) Hideki Terajima, Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Yutaka Suzuki, Shigeki Shimba, Shinya Kuroda, Wataru Iwasaki, and Yoshitaka Fukada, ADAR1 catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm. *Nature Genetics*, 49, 146-151, 2017.
- 4) Arisa Hirano, Tomoki Nakagawa, Hikari Yoshitane, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Darin Lanjakornsiripan, and Yoshitaka Fukada, USP7 and TDP-43: Pleiotropic Regulation of Cryptochrome Protein Stability Paces the Oscillation of the Mammalian Circadian Clock. *PLoS One*, 11(4), e0154263, 2016.
- 5) Michal Dudek, Nicole Gossan, Nan Yang, Hee-Jeong Im, Jayalath PD Ruckshanthi, Hikari Yoshitane, Xin Li, Ding Jin, Ping Wang, Maya Boudiffa, Ilaria Bellantuono, Yoshitaka Fukada, Ray P. Boot-Handford, and Qing-Jun Meng, The chondrocyte clock gene *Bmal1* controls cartilage homeostasis and integrity. *The Journal of Clinical Investigation*, 126, 365-376, 2016.

研究課題名： NADPH オキシダーゼ活性の時空間的定量法の確立
Spatiotemporal studies of plant NADPH oxidase activity
葉緑体で発生する活性酸素シグナルの調節機構
Regulatory mechanisms of ROS signaling in chloroplasts

研究期間： 平成 27 年度～平成 30 年度

研究課題番号： 15H01398, 17H03772

研究代表者名： 吉岡 博文 (名古屋大学 生命農学研究科 准教授)

<研究の目的>

・ NADPH オキシダーゼ活性の時空間的定量法の確立

植物は、病原菌の攻撃に応答して急激な活性酸素種 (ROS) の生成を引き起こす。この応答反応は ROS バーストと呼ばれ、植物免疫において重要な役割を果たすことが知られている。ROS バーストは、主に NADPH オキシダーゼである RBOH (respiratory burst oxidase homolog) によって引き起こされる。これまでに、RBOH の N 末端側が、カルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK) により直接リン酸化されて活性化されることを見出した。本研究では、RBOH のリン酸化状態の動態を可視化するバイオセンサー (RBOH センサー) を作製し、病原菌が感染した細胞で RBOH 活性を時空間的に観察することで、ROS の新たなシグナルネットワークの発掘を可能にする先駆的モデルを提示することを目的とした。

・ 葉緑体で発生する活性酸素シグナルの調節機構

植物免疫には、病原菌の構成成分である分子パターンとパターン認識受容体との相互作用で引き起こされる PTI (pattern-triggered immunity) と、病原菌のエフェクターを抵抗性タンパク質が認識することで細胞死が誘導される ETI (effector-triggered immunity) とが存在する。PTI、ETI のいずれにおいても、急激な ROS の生成が引き起こされる。激しい ETI-ROS 生産が MAPK の介在によって葉緑体で誘導されることが見いだされた。さらに、この過程には CO₂ を還元してグルコースを生産するカルビン回路が MAPK によって抑制され、ドナーである NADPH が過剰となることが原因であることがわかってきた。本研究では、葉緑体における ROS センサーを探索することによって、植物が光エネルギーを利用して生体防御反応を駆動する機構を解明することを目的とする。

<研究の成果>

- (1) WRKY8 による NADPH オキシダーゼ遺伝子の調節機構を解明 (論文 16)
- (2) WRKY8 が病原菌に抵抗性を賦与することを発見 (論文 8)
- (3) MAP キナーゼバイオセンサーの特許申請 (論文 6)
- (4) MAP キナーゼバイオセンサーによる植物免疫賦与剤の開発 (論文 3)

<研究の意義・展望>

・ NADPH オキシダーゼ活性の時空間的定量法の確立

RBOH センサーは、CDPK による RBOH タンパク質のリン酸化に応答し、2 種の隣接した蛍光タンパク質間で蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こるように構成されている。蛍光タンパク質である YFP と CFP による FRET の強度は、YFP と CFP 間の距離と角度が重要であり、RBOH のリン酸化に依存して生体内で理想的な配置をとる構造を模索する必要がある。しかしながら、観察に十分な FRET 蛍光強度を示す RBOH センサーは得られなかった。そこで、RBOH 遺伝子の転写を制御する WRKY8 転写因子を同定した。この転写因子をリン酸化して活性化する MAPK 活性を可視化する FRET-MAPK

バイオセンサーの開発に成功した。このセンサー遺伝子をベンサムアタバコに一過的に導入した結果、病原菌の感染シグナルに応答した FRET 蛍光が観察された。本研究で得られた成果は、新たな植物免疫シグナルの発掘に貢献するものと考えられる。

・葉緑体で発生する活性酸素シグナルの調節機構

植物の免疫応答では、葉緑体における ROS の生成が誘導されることが知られている。葉緑体においては、光化学系 II (PSII) では一重項酸素が、PSI では O₂ が生成される。これらの ROS は、免疫応答における HR 細胞死をはじめとする様々な応答へ貢献しているものと考えられている。また、レトログレードシグナルとして、O₂ から派生した H₂O₂ が葉緑体から核へ直接送り込まれる可能性が示されている。葉緑体の H₂O₂ は、葉緑体または核で ROS センサー分子に受容されると予想される。ROS を介した主なシグナル伝達は、センサー分子のシステイン残基が H₂O₂ と反応してスルフェン酸を形成し、スルフェン酸が修飾を受けることでシグナルが誘導される。スルフェン酸と反応してシグナル伝達を阻害する YAP1 を葉緑体に発現させたところ、INF1 タンパク質による免疫細胞死が抑制された。また、ROS を可視化するバイオセンサーある HyPer を用いて核の ROS を検出したところ、INF1 処理によって ROS の存在を示す蛍光が観察された。また、核における ROS 蓄積が PSII 以降の電子伝達系を阻害する DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) 処理によって抑制されたことから、核の ROS 蓄積は PSI に依存することが示された。さらに、YAP1 を核に発現させたところ、MAPK 誘導による細胞死が抑制された。以上の結果より、葉緑体の ROS シグナルは葉緑体や核で受容され、最終的には細胞死を誘導する複雑なネットワークを形成しているものと思われた。本研究で得られた成果は、新たなレトログレードシグナル研究の基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Hyodo A, Kobayashi Y, Mashiyama S, Ogihara T, Long HH, Yoshioka H, Matsuura H, Masuta C, Takeshita M. Role of salicylic acid glucosyltransferase in balancing growth and defence for optimum plant fitness. *Mol. Plant Pathol.* (in press) 2019.
- 2) Yoshioka M, Adachi I, Sato Y, Doke N, Kondo T, Yoshioka H. RNAi of sesquiterpene cyclase gene for phytoalexin production impairs in pre- and postinvasive resistance to potato blight pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 20, 907-922, 2019.
- 3) 鳴坂義弘・鳴坂真理・吉岡博文・吉岡美樹・谷口伸治・石川美友紀・紀岡雄三・野口勝憲 植物を元気にして病気を防ぐ—植物活力剤によるイチゴの病害抑制技術—, *植物防疫*, 日本植物防疫協会, 東京, 73(11), 684-688, 2019.
- 4) Yamauchi 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.
- 5) 安達広明・吉岡博文 植物免疫における活性酸素生成誘導のしくみ—植物はいかにして病原菌から身を守るのか? 化学と生物, 日本農芸化学会, 学会出版センター, 東京, 55(9), 590-592, 2017.
- 6) 「MAP キナーゼバイオセンサー」吉岡博文, 国立大学法人名古屋大学, 日本, 特願 2017-038994, 出願日 2017 年 3 月 2 日
- 7) Ichimura K, Shinzato T, Edaki M, Yoshioka H, Shirasu K. SGT1 contributes to maintaining protein levels of MEK2^{DD} to facilitate hypersensitive response-like cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 94, 47-52, 2016.
- 8) Adachi H, Ishihama N, Nakano T, Yoshioka M, Yoshioka H. *Nicotiana benthamiana* MAPK-WRKY pathway confers resistance to a necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Plant Signal. Behav.* 11(6), e1183085, 2016.

- 9) Yoshioka H, Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Asai S, Yoshioka M. Hierarchical regulation of NADPH oxidase by protein kinases in plant immunity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 95, 20-26, 2016.
- 10) Yoshioka H, Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Asai S, Yoshioka M. Hierarchical regulation of NADPH oxidase by protein kinases in plant immunity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 95, 20-26, 2016.
- 11) 吉岡博文・安達広明・石濱伸明・中野孝明・白石佑太郎・宮川典子・野村裕也・吉岡美樹・浅井秀太 リン酸化反応が制御する ROS バーストの分子機構. 日本植物病理学会報, 81, 1-8, 2015.
- 12) Adachi H, Yoshioka H. Kinase-mediated orchestration of NADPH oxidase in plant immunity. *Brief. Funct. Genomics* 14, 253-259, 2015.
- 13) Le Roux C, Huet G, Jauneau A, Camborde L, Trémousaygue D, Kraut A, Zhou B, Levaillant M, Adachi H, Yoshioka H, Raffaele S, Berthomé R, Couté Y, Parker JE, Deslandes L. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* 161, 1074-1088, 2015.
- 14) Nakano M, Yoshioka H, Ohnishi K, Hikichi Y, Kiba A. Cell death-inducing stresses are required for defense activation in DS1-phosphatidic acid phosphatase-silenced *Nicotiana benthamiana*. *J. Plant Physiol.* 184, 15-19, 2015.
- 15) Sugiyama A, Fukuda S, Takanashi K, Yoshioka M, Yoshioka H, Narusaka Y, Narusaka M, Kojima M, Sakakibara H, Shitan N, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M, Yazaki K. Molecular characterization of *LjABCG1*, an ATP-binding cassette protein in *Lotus japonicus*. *PLoS ONE* 10, e0139127, 2015.
- 16) 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.
- 17) 吉岡博文, 安達広明, 石濱伸明, 中野孝明, 白石佑太郎, 宮川典子, 野村裕也, 吉岡美樹, 浅井秀太 リン酸化反応が制御する ROS バーストの分子機構 日本植物病理学会報, 81, 1-8, 2015.
- 18) Adachi H, Yoshioka H. Kinase-mediated orchestration of NADPH oxidase in plant immunity. *Brief. Funct. Genomics* 14, 253-259, 2015.

研究課題名： 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
Signaling system of inflammation and carcinogenesis by reactive oxygen species produced by Tumor Necrosis Factor

研究期間： 平成 27 年度～平成 28 年度

研究課題番号： 15H01406

研究代表者名： 鎌田英明（広島大学大学院医系科学研究科 准教授）

研究分担者名： 土谷佳宏（広島女学院大学 准教授）（26-27 年度）

<研究の目的>

本研究は腫瘍壊死因子(TNF α)により産生された活性酸素種(ROS)が駆動する細胞内シグナル伝達系が炎症と発癌を制御する機構の解明を目指した。TNF α はアポトーシスやネクロトーシスなどの制御された細胞死機構を駆動するが、これにともない細胞内では ROS の産生が誘導される。TNF α により活性化された IKK β /NF- κ B などのシグナル系は抗酸化系遺伝子やミトコンドリアの制御を介して ROS の産生を制御する。我々は細胞質と核内の IKK β や MKP などのシグナル伝達系が炎症と発がんを制御することを見いだしてきたが、この分子機構を解明するためにモデルマウスを用いた炎症と発癌の解析をおこなうとともに、細胞レベルでのシグナル伝達系の解析を行った。

<研究の成果>

(1)ネクロトーシスにおけるミトコンドリア代謝系と ROS の役割の解明

カスパーゼ阻害剤存在下でマウス RelA 欠損細胞に対して TNF α 刺激を負荷したり、マウス線維芽細胞に対して IAP 阻害剤と TNF α 刺激を負荷するとネクロトーシスが誘導される。このときに RIPK1/RIPK3/MLKL 依存性に産生されたミトコンドリア由来の ROS を介して MAP キナーゼカスケードが駆動されて種々のサイトカインの発現が誘導されることが見いだされた。さらに DSS 誘導性腸炎モデルマウスを用いた解析から、ROS を介したサイトカイン遺伝子発現が炎症にともなう組織修復系で機能することを見いだした。ミトコンドリアの代謝系は ROS 産生によりネクロトーシスを制御するのみならず、その代謝産物を介したシグナル因子の修飾により炎症応答を制御する可能性を見いだした。

(2)慢性炎症における ROS の肝細胞死と発癌における機能の解明

核内にキナーゼ欠損型 IKK β を発現する IKK β 遺伝子改変(*Tg-NLS-IKK β KN IKK β Δ^{hep}*)マウスでは出生直後から肝臓に広範なネクローシスが誘導されて肝線維化が進展するにもかかわらず、肝細胞がん(HCC)は抑制されるという驚くべき表現型を示す。このマウスを用いて炎症における ROS の役割と発癌制御機構を解析したところ、ROS は組織修復系の遺伝子発現を介して組織防御的に機能することが判明した。さらに炎症は代償性細胞増殖を介して HCC を促進する一方で、細胞死による肝機能障害が Cyp2E1 による発癌物質の活性化を減弱させることにより HCC の化学発癌を抑制することも判明した。

(3)レドックス制御系と炎症シグナルのクロストーク機構の解明 (論文 1)

Keap1/Nrf2 による抗酸化系遺伝子の発現制御機構は細胞内レドックス状態の維持に重要な役割をになうが、この機構は炎症の中核で機能する IKK β /NF- κ B シグナル系とクロストークを行うことが知られてきた。一方、IKK β が正常に機能するためには HSP90 をはじめとしたシャペロン系などを介したタンパク質恒常性維持が必須である。HSP90 の阻害により構造的に不安定化した IKK β では、Keap1 との会合の亢進を介してオートファジーによる分解を受容することが判明した。タンパク質の品質管理機構が

Keap1/Nrf2系と IKK β /NF- κ B系の相互連関を介して炎症を制御する分子機構の一端が解明された。

(4)炎症シグナルの PP2A ホスファターゼによるネガティブ制御機構の解明 (論文 2)

炎症にともなう ROS 産生において IKK β /NF- κ B シグナル系は抑制的な機能を有するが、この機構は複数のサブユニットから構成される PP2A をはじめとしたホスファターゼによるネガティブ制御を受容する。PP2A によるネガティブ制御機構を解析したところ、IKK β と I κ B と RelA の各リン酸化のステップが異なるサブユニットから構成される PP2A による制御を受容することが見いだされ、炎症シグナルが多重的に制御を受容することを解明した。

<研究の意義・展望>

従来は ROS は細胞死を亢進して炎症の増悪化で機能すると考えられてきたが、本研究では遺伝子発現系を介して組織修復に機能することにより組織防御に機能することが見いだされた。レドックス制御とタンパク質の品質管理の分子機構の解明により慢性炎症の分子機構の解明に道を開くことができると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Kanamoto M, Tsuchiya Y, Nakao Y, Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M, Kamata H. Structural instability of I κ B kinase β promotes autophagic degradation through enhancement of Keap1 binding. *PLoS One*. 13, e0203978, 2018.
- 2) Tsuchiya Y, Osaki K, Kanamoto M, Nakao Y, Takahashi E, Higuchi T, Kamata H. Distinct B subunits of PP2A regulate the NF- κ B signalling pathway through dephosphorylation of IKK β , I κ B α and RelA. *FEBS Lett*. 591, 4083-4094, 2017.
- 3) Okubo H, Kushiyama A, Sakoda H, Nakatsu Y, Iizuka M, Taki N, Fujishiro M, Fukushima T, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Asahara T, Yoshida Y, Chonan O, Encinas J, Asano T. Involvement of resistin-like molecule β in the development of methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep*. 28, 20157, 2016.
- 4) Fukushima T, Yoshihara H, Furuta H, Hakuno F, Iemura SI, Natsume T, Nakatsu Y, Kamata H, Asano T, Komada M, Takahashi SI. USP15 attenuates IGF-I signaling by antagonizing Nedd4-induced IRS-2 ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*. 484, 522-528, 2017.
- 5) Otaki Y, Takahashi H, Watanabe T, Funayama A, Netsu S, Honda Y, Narumi T, Kadowaki S, Hasegawa H, Honda S, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Kamata H, Nakajima O, Kubota I. HECT-Type Ubiquitin E3 Ligase ITCH Interacts With Thioredoxin-Interacting Protein and Ameliorates Reactive Oxygen Species-Induced Cardiotoxicity. *J Am Heart Assoc*. 5, pii: e002485, 2016.
- 6) Qiang S, Nakatsu Y, Seno Y, Fujishiro M, Sakoda H, Kushiyama A, Mori K, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Kamata H, Asano T. Treatment with the SGLT2 inhibitor luseogliflozin improves nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model with diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 7, 104, 2015.
- 7) Nakatsu Y, Iwashita M, Sakoda H, Ono H, Nagata K, Matsunaga Y, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiyama A, Kamata H, Takahashi S, Katagiri H, Honda H, Kiyonari H, Uchida T, Asano T. Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates AMP-activated protein kinase (AMPK) by associating with the CBS domain in the γ subunit. *J Biol Chem*. 290, 24255-66, 2015.
- 8) Matsunaga Y, Nakatsu Y, Fukushima T, Okubo H, Iwashita M, Sakoda H, Fujishiro M, Yamamotoya T, Kushiyama A, Takahashi S, Tsuchiya Y, Kamata H, Tokunaga F, Iwai K, Asano T. LUBAC Formation Is Impaired in the Livers of Mice with MCD-Dependent Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mediators Inflamm*. 2015, 125380, 2015.
- 9) Kanaoka R, Kushiyama A, Seno Y, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Fukushima T, Tsuchiya Y, Sakoda

- H, Fujishiro M, Yamamotoya T, Kamata H, Matsubara A, Asano T. Pin1 Inhibitor Juglone Exerts Anti-Oncogenic Effects on LNCaP and DU145 Cells despite the Patterns of Gene Regulation by Pin1 Differing between These Cell Lines. *PLoS One*. 10, e0127467, 2015.
- 10) Shinjo T, Nakatsu Y, Iwashita M, Sano T, Sakoda H, Ishihara H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Asano T. DPP-IV inhibitor anagliptin exerts anti-inflammatory effects on macrophages, adipocytes, and mouse livers by suppressing NF- κ B activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 309, E214-23, 2015.
 - 11) Nakatsu Y, Seno Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Katasako A, Mori K, Matsunaga Y, Fukushima T, Kanaoka R, Yamamotoya T, Kamata H, Asano T. The xanthine oxidase inhibitor febuxostat suppresses development of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 309, G42-51. 2015.
 - 12) Fukushima T, Yoshihara H, Furuta H, Kamei H, Hakuno F, Luan J, Duan C, Saeki Y, Tanaka K, Iemura S, Natsume T, Chida K, Nakatsu Y, Kamata H, Asano T, Takahashi S. Nedd4-induced monoubiquitination of IRS-2 enhances IGF signaling and mitogenic activity. *Nat Commun*. 6, 6780, 2015.
 - 13) Okubo H, Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Matsunaga Y, Ohno H, Yoneda M, Kamata H, Shinjo T, Iwashita M, Nishimura F, Asano T. Mosapride citrate improves nonalcoholic steatohepatitis with increased fecal lactic acid bacteria and plasma glucagon-like peptide-1 level in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 308, G151-8, 2015.

研究課題名： 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ジン機能の解明 (27-28 年度)

Physiological functions of mitofusins on the regulation of mitochondrial oxygen and calcium

ミトフュージン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 (29-30 年度)

Regulation of cytosolic oxygen and calcium by mitofusins

研究期間： 平成 27 年度～平成 30 年度

研究課題番号： 15H01408, 17H05537

研究代表者名： 今泉 祐治 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授) (27-28 年度)

山村 寿男 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授) (29-30 年度)

連携研究者名： 山村 寿男 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 准教授) (27-28 年度)

今泉 祐治 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授) (29-30 年度)

鈴木 良明 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 講師) (27-30 年度)

<研究の目的>

細胞内情報伝達の要となる細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は、細胞膜上の Ca^{2+} 感受性イオンチャネルおよび細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位であるミトコンドリアと小胞体により緻密に制御されている。 Ca^{2+} シグナルが発生する細胞内微小空間 (Ca^{2+} マイクロドメイン) では、各種機能分子が物理的相互作用および共役し、極めて効率的に生理機能を発揮していると考えられている。本研究課題では、 Ca^{2+} マイクロドメインの「構造的な場 (分子基盤)」および「機能的な場 (機能連関)」の形成を担う分子群、特に、ミトコンドリア-小胞体の近接構造を担うミトフュージン (mitofusin) に着目し、細胞内 Ca^{2+} ・酸素・エネルギー (ATP) 制御機構におけるミトフュージンの生理的意義と病態における機能変化を解明した。

<研究の成果>

(1) 平滑筋 Ca^{2+} マイクロドメインの分子基盤と機能連関 (論文 2, 3, 5, 6, 10, 12)

各種平滑筋細胞において、活動電位発生時のような生理的条件下でも、ミトコンドリア Ca^{2+} 取り込み機能が促進され、筋小胞体が Ca^{2+} を再充填するために必要な ATP を産生することを画像解析した。平滑筋 Ca^{2+} マイクロドメインにおいて、ミトコンドリアと筋小胞体が Ca^{2+} と ATP を介して機能連関していることが明らかとなった。

(2) 平滑筋 Ca^{2+} シグナルにおけるミトフュージンの生理的意義の解明 (論文 7)

大動脈平滑筋細胞において、ミトフュージン 2 はミトコンドリアと筋小胞体を近接させ、細胞質とオルガネラ間の Ca^{2+} シグナルを活性化させた結果、ATP 産生と細胞増殖を促進させることが示唆された。ミトフュージン 2 が平滑筋 Ca^{2+} マイクロドメインの形成に関与し、血管平滑筋機能に重要であることが分かった。

(3) 低酸素ストレスによるイオンチャネルの発現機能解析 (論文 1, 4, 11, 13)

脳虚血などの低酸素ストレス環境下の脳微小血管内皮細胞において、HIF-1 α -ダイナミン 2-Kir2.1 チャネル経路を介した細胞内 Ca^{2+} 流入の促進が、脳微小血管内皮細胞の異常な増殖に関与することが明らかとなった。また、酸化ストレス環境下の脳微小血管内皮細胞では、Orai1 を介した細胞内 Ca^{2+} 流入が減少するため、酸化ストレスによる細胞死の亢進が起こることが分かった。

(4) 血管系難病における Ca^{2+} シグナル機能解析 (論文 8, 9)

血管系難病である特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) や特発性門脈圧亢進症の患者由来細胞やモデル動物由来細胞では、細胞内 Ca^{2+} 動態を制御するミトコンドリアシグナルやミトフュージン発現が変化していることを見出した。

<研究の意義・展望>

ミトコンドリアー小胞体の構造的基盤 (platform) および機能連関 (functional coupling) が形成する Ca^{2+} マイクロドメインを構造・分子・機能レベルで明らかにしたことは、細胞生理学の発展につながると考えられる。特に、ミトコンドリアー小胞体をつなぐミトフュージン2の生理的意義の解明は、生体の酸素リモデリング機構を解明する端緒を築くと考えられる。さらに、ミトフュージン2の病態生理的意義の解明は、血管系難病に対する新規治療薬の創薬標的につながると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Yamamura H, Suzuki Y, Asai K, Imaizumi Y, Yamamura H. Oxidative stress facilitates cell death by inhibiting Orail-mediated Ca^{2+} entry in brain capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press (doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.035).
- 2) Saeki T, Suzuki Y, Yamamura H, Takeshima H, Imaizumi Y. A junctophilin-caveolin interaction enables efficient coupling between ryanodine receptors and BK_{Ca} channels in the Ca^{2+} microdomain of vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 294, 13093-13105, 2019.
- 3) Kawasaki K, Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Rapid Na^+ accumulation by a sustained action potential impairs mitochondria function and induces apoptosis in HEK293 cells expressing non-inactivating Na^+ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513, 269-274, 2019.
- 4) Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura H, Asai K, Giles W, Imaizumi Y. Hypoxic stress upregulates Kir2.1 expression by a pathway including hypoxic-inducible factor-1 α and dynamin2 in brain capillary endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 315, C202-C213, 2018.
- 5) Matsuki K, Kato D, Takemoto M, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Takeshima H, Imaizumi Y. Negative regulation of cellular Ca^{2+} mobilization by ryanodine receptor type 3 in mouse mesenteric artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 315, C1-C9, 2018.
- 6) Yamamura H, Kawasaki K, Inagaki S, Suzuki Y, Imaizumi Y. Local Ca^{2+} 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.
- 7) 山村寿男, 鈴木良明, 今泉祐治. 平滑筋 Ca^{2+} シグナルにおけるミトコンドリアとミトフュージンの生理的意義. *日薬理誌* 149, 260-263, 2017.
- 8) Yamamura A, Fujitomi E, Ohara N, Tsukamoto K, Sato M, Yamamura H. Tadalafil induces antiproliferation, apoptosis, and phosphodiesterase type 5 downregulation in idiopathic pulmonary arterial hypertension *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 810, 44-50, 2017.
- 9) Kim YM, Kim SJ, Tatsunami R, Yamamura H, Fukai T, Ushio-Fukai M. ROS-induced ROS release orchestrated by Nox4, Nox2, and mitochondria in VEGF signaling and angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 312, C749-C764, 2017.
- 10) Matsuki K, Takemoto M, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Takeshima H, Imaizumi Y. Ryanodine receptor type 3 does not contribute to contractions in the mouse myometrium regardless of pregnancy. *Pflügers Arch.* 469, 313-326, 2017.
- 11) 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.
- 12) Hirata T, Terai T, Yamamura H, Shimonishi M, Komatsu T, Hanaoka K, Ueno T, Imaizumi Y, Nagano T, Urano Y. Protein-coupled fluorescent probe to visualize potassium ion transition on cellular membranes. *Anal Chem.* 88, 2693-2700, 2016.
- 13) Kito H, Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Asai K, Imaizumi Y. Regulation of

store-operated Ca^{2+} entry activity by cell cycle dependent up-regulation of Orai2 in brain capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459, 457-462, 2015.

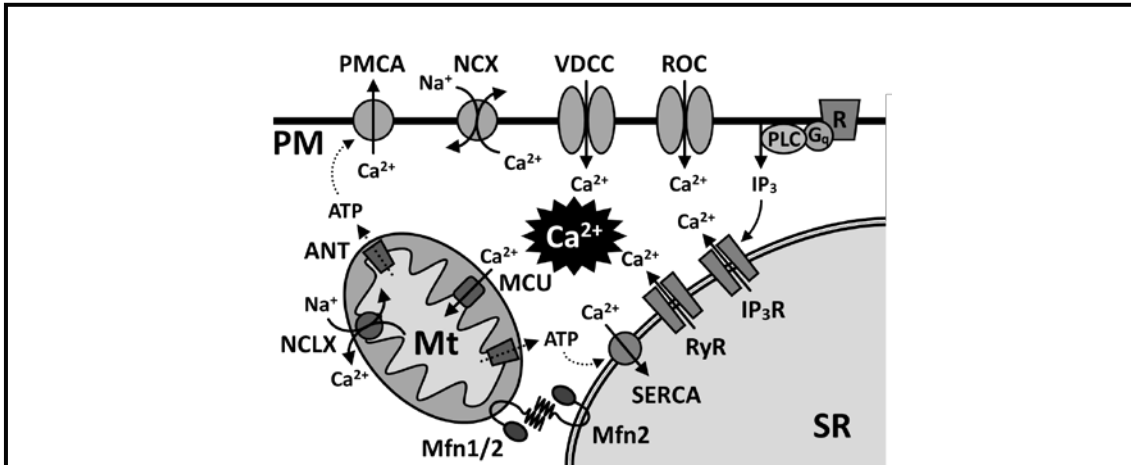


図1 Ca^{2+} マイクロドメインにおけるミトコンドリアと筋小胞体の構造的および機能的連関

局所的な Ca^{2+} 濃度の上昇により、ミトコンドリア Ca^{2+} ユニポーター (MCU) の Ca^{2+} 取り込みが促進し、酸素を消費してエネルギー (ATP) 産生が促進される。産生された ATP は、特に Ca^{2+} を供給した筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} ポンプ (SERCA) を活性化するために用いられる。すなわち、ミトコンドリア (Mt) と SR の間で、 Ca^{2+} と ATP を介した機能連関が行われていることが想定される。この機能連関を支える構造的分子基盤としてミトフュージン (Mfn) が同定されている。ANT、アデニンヌクレオチド交換輸送体；Gq、Gq タンパク質受容体；IP₃、イノシトール 1,4,5-三リン酸；IP₃R、イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体；NCLX、ミトコンドリア Na⁺/Ca²⁺交換体；NCX、Na⁺/Ca²⁺交換体；PM、細胞膜；PMCA、細胞膜 Ca^{2+} ポンプ；PLC、ホスホリパーゼ C；R、受容体；ROC チャンネル、受容体作動性 Ca^{2+} チャンネル；RyR、リアノジン受容体；VDCC、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル。【論文7より引用】

研究課題名： 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
Role of hypoxia- and reactive oxygen species-sensitive TRP channels in tumor-related macrophage

研究期間： 平成 27 年度～平成 28 年度

研究課題番号： 15H01409

研究代表者名： 清水 俊一（帝京平成大学 薬学部 教授）（27-28 年度）

<研究の目的>

本研究は、マクロファージにおける酸素分圧及び活性酸素感受性 TRP チャンネル発現を明らかにすること、さらに腫瘍環境内の条件を *in vitro* で再現し、マクロファージの M2 マクロファージへの極化の実験系確立し、マクロファージの M2 マクロファージへの極化における低酸素感受性及び活性酸素感受性 TRP チャンネルの役割を明らかにすることを旨とした。その結果、マクロファージには主に TRPM2 が発現していることを明らかにできた。また、低酸素や活性酸素暴露など腫瘍環境内の条件でマクロファージの M2 マクロファージへ極化させる実験系は確立することができた。しかしながら、マクロファージの M2 マクロファージへの極化における TRP チャンネルの関与を明らかにすることはできなかった。

そこで、研究の目的を修正し、活性酸素感受性 TRPM2 チャンネルの機能解析に有用である TRPM2 チャンネル阻害物質の探索と応用を目指した。

<研究の成果>

(1) 抗うつ薬であるデュロキセチンによる活性酸素感受性 Ca^{2+} 透過性チャンネル TRPM2 活性化抑制と脳虚血後再灌流傷害の抑制（論文 1）

本研究において、7 種類の抗うつ薬について活性酸素感受性 Ca^{2+} 透過性チャンネル TRPM2 の阻害活性を調べたところ、選択的ノルアドレナリン、セロトニン再取り込み阻害薬であるデュロキセチンが、過酸化水素刺激による TRPM2 活性化を強く抑制することを見出した。ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的検討により、デュロキセチンは open-channel blocking 様式により TRPM2 チャンネルを抑制することが明らかとなった。

不明な点が多いが、脳の虚血後再灌流傷害には、活性酸素が深く関わっていることが明らかにされている。マウス脳虚血後再灌流傷害モデルにおいて、TRPM2 欠損マウスでは野生型マウスと比較して脳虚血後再灌流傷害が軽減された。さらにデュロキセチンの投与は、野生型マウスの脳虚血後再灌流傷害を軽減したが、TRPM2 欠損マウスでは効果が認められなかった。以上の結果より、デュロキセチンは TRPM2 チャンネルを阻害することにより脳虚血後再灌流傷害を軽減することが明らかとなった。

(2) 活性酸素感受性 Ca^{2+} 透過性チャンネル TRPM2 阻害剤としての tyrphostin AG 関連化合物の発見（論文 2, 3）

我々は、Jak2 阻害剤として知られている tyrphostin AG490 がヒドロキシラジカルの消去を介して過酸化水素誘発 TRPM2 活性化を阻害することを見出していた。本研究では、さらに強い TRPM2 チャンネル阻害物質を見出すために、AG490 の構造類似体の TRPM2 阻害活性を検討した。その結果、AG555 及び AG556 に AG490 よりも強い TRPM2 阻害活性のあることが明らかとなった。さらに、これらの化合物は、単球系細胞株である U937 において、過酸化水素刺激による TRPM2 活性化を介したサイトカイン分泌を抑

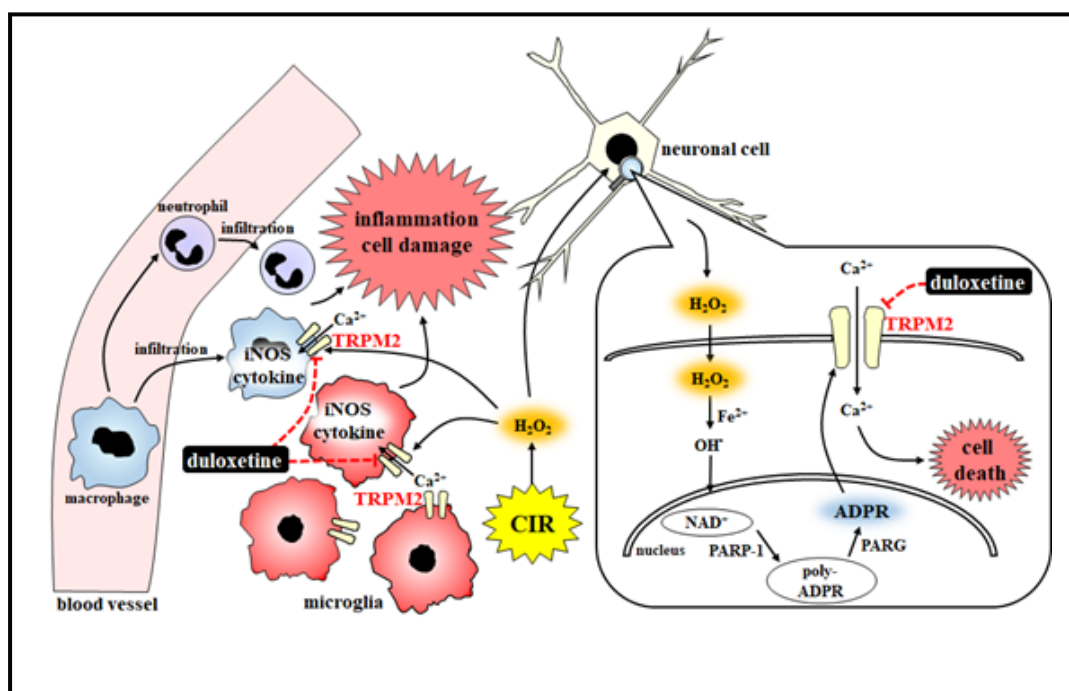
制することを明らかにした。

<研究の意義・展望>

活性酸素は、様々な臓器の虚血後再灌流傷害、炎症性疾患、癌など様々な疾患に関わっていることが明らかにされている。これまで、活性酸素は脂質過酸化やタンパク質の酸化変性などを介して細胞を傷害すると考えられていたが、近年は本研究でターゲットとした活性酸素感受性チャネルなどを介して細胞応答を引き起こすことが明らかにされつつある。本研究で得られた成果は、活性酸素関連疾患の新たな治療薬の開発に重要な情報を提供できたと考えている。

<主な研究発表>

- 1) 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.
- 2) Yamamoto S, Toda T, Yonezawa R, Negoro T, Shimizu S. Tyrphostin AG-related compounds attenuate H₂O₂-induced TRPM2-dependent and -independent cellular responses. *J. Pharmacol. Sci.* 134, 68-74, 2017.
- 3) Toda T, Yamamoto S, Yonezawa R, Mori Y, Shimizu S. Inhibitory effects of Tyrphostin AG-related compounds on oxidative stress-sensitive transient receptor potential channel activation. *Eur. J. Pharmacol.* 786, 19-28, 2016.



推定されるデュロキセチンによる TRPM2 チャネル阻害を介した脳虚血後再灌流障害の抑制機構

研究課題名： 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
Regulation of anoxygenic photosynthesis by the persulfide-responsive transcriptional repressor
研究期間： 平成 29 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 17H05524
研究代表者名： 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)

<研究の目的>

本研究の目的は、申請者らがミトコンドリアの祖先菌と同種の紅色細菌から同定した活性イオウ分子種応答性転写因子 SqrR に着目し、硫化水素に依存して光合成遺伝子の発現が調節される仕組みを解析することで、紅色細菌・ミトコンドリアが行う硫化水素・活性イオウ分子種依存的なシグナル伝達の素過程を解明することである。

<研究の成果>

(1) テトラスルフィド結合形成様式の解明 (論文 1)

紅色細菌の硫化水素依存の光合成遺伝子発現を制御する SqrR は、活性イオウ分子種に反応して 2 つのシステイン残基 (Cys41, Cys107) 間に分子内テトラスルフィド結合を形成することで自身の DNA 結合能を変化させる。この二つのシステインをそれぞれセリンに変えた変異型 SqrR の生化学的解析を行ない、活性イオウ分子種からの修飾を直接受けるのは Cys107 であることを明らかにした。このことから、テトラスルフィド結合ができる際、Cys107 と Cys41 はそれぞれ、Attacking Cys および Resolving Cys として機能することがわかった。

(2) 活性イオウ分種インジケータの作成

蛍光タンパク質と SqrR を組み合わせ、リアルタイムイメージングを見据えた活性イオウ分子種インジケータタンパク質の開発を進めた。これまでに、CFP と YFP を融合させた FRET ベースのインジケータタンパク質の構築に成功した。その効率は in vivo での使用に耐えうるものではなかったが、改良を進める素地はできた。

(3) 活性イオウ分種の代謝解析

紅色細菌内での硫化水素代謝の詳細を、本研究領域の計画班である東北大学赤池研究室と共同で解析した。硫化水素を、野生型、硫化水素酸化酵素 SQR の変異体、および内在性の SQR をマウスの SQR と入れ替えた株に投与し、時間を追って細胞内の活性イオウ代謝物の変動を解析した。その結果、SQR を起点としたポリスルフィド代謝パスウェイがおぼろげながら確認することができた。

<研究の意義・展望>

本研究により、1) 細菌が外界の硫化水素濃度を感知する仕組み、2) 細胞が活性イオウ分子種を認識する仕組み、に関する新たな情報を得ることができた。遺伝子導入やサプレッサー変異体単離など遺伝学的解析が容易な紅色細菌をプラットフォームとすることで、初期型光合成の制御機構のみならず、ミトコンドリアの硫化水素呼吸の可能性の検証、活性イオウ分子種の代謝過程の詳細を今後調べることができると期待される。

<主な研究発表>

- 1) Shimizu, T. and Masuda, S. Characterization of redox-active cysteine residues of persulfide-responsive transcriptional repressor SqrR. *Commun. Integr. Biol.* 10, e1329786, 2017.

- 2) Fujisawa, T. and Masuda, S. Light-induced chromophore and protein responses and mechanical signal transduction of BLUF proteins. *Biophys. Rev.* 10, 327-337, 2018.
- 3) 増田真二、清水隆之
システインのポリスルフィド化による硫化水素・活性硫黄分子種の細胞内認識
生物物理 58, 163-164, 2018.
- 4) 清水隆之、増田真二
硫化水素に応答した遺伝子発現制御
バイオサイエンスとインダストリー 75, 516-517, 2017.
- 5) 清水隆之、増田真二
硫化水素依存的に光合成を行う細菌から発見された新規パースルフィド応答性転写因子 SqrR を介した遺伝子発現の分子機構
硫酸と工業 7月号 95-102, 2018.

研究課題名： 1分子運動解析によるレドックス感受性 TRP の分子運動基盤
研究期間： 平成 29 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 17H05539
研究代表者名： 三尾和弘（産業技術総合研究所先端オペランド計測技術 チーム長）
連携研究者名： 佐々木裕次（東京大学 新領域創成科学研究科 教授）（29-30 年度）

<研究の目的>

10 nm 程度の微小なタンパク質の運動を、高速かつ正確に測定することは、極めてチャレンジングである。我々は、原子サイズ 1/100 のピコメートル精度でリアルタイム計測できる X 線 1 分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) を用いて、タンパク質内部動態の研究を行っている。そこでは金 (Au) ナノ結晶をタンパク質の特定部位に結合し、放射光を照射した際の回折点 (diffraction spot) を追跡することで、タンパク質内部の運動を解析する。現在の 1 分子計測技術の中で最も高い時空間分解能を持つ。さらに 1 分子内部の個別領域の運動計測も可能である。

本研究では DXT 技術を用いてレドックス感受性 TRP タンパク質の作動機序を、多階層 (精製タンパク質から生きている細胞に至るまで) で解析する。マルチモーダルな活性機構を持つ TRP チャンネルの実作動環境下の解析を通じて、アロステリック制御に基づくレドックス分子機構の解明と創薬基盤構築に繋げる。

<研究の成果>

(1) 単色 X 線光源を用いた 1 分子動態計測技術の開発 (論文 3)

我々が従来用いてきた X 線 1 分子追跡法 (DXT: Diffracted X-ray Tracking) では Spring-8 等での白色 X 線光源が必須であり、使用できるビームラインも限られていた。我々は実験室装置での分子運動解析を目的に、ピクセル輝度の自己相関係数から分子揺らぎを導出する、単色 X 線輝点明滅法 (Lab-DXB: 輝点明滅法) を開発した。現在 100 ms 程度のデータ取得まで可能で、細胞表面分子の計測も可能なため、新しい創薬スクリーニング装置としても期待できる。Lab-DXB を用いて、一過性発現させた TRPV1 のカプサイシン応答データの取得にも成功した。

(2) X 線 1 分子追跡法による TRPV1 内部分子運動解析 (論文 4)

レドックス感受性を持つ TRPV1 の作動機構解明を目的に、白色 X 線を用いた X 線 1 分子追跡法で 1 分子動態解明を行なった。DXT ではタンパク質を金ナノ結晶で標識し、回折スポットの運動を 3 次元 (傾斜(θ)、回転(χ)、時間(t)) リアルタイム分析を行った。カプサイシンと温度刺激による応答計測を行なった。 χ 軸ブラウン運動は、カプサイシン用量依存的に増強され、回転方向については異方性回転運動として検出された。熱刺激に関しては、野生型 (WT) と熱応答性を欠損したトリプルミュータント (TRI: N629K/N653T/Y654T) の運動比較の結果、WT の χ 値は TRI と比較して有意に高いことが確認できた。

<研究の意義・展望>

本研究はタンパク分子が機能する際、最も根源的な仕組みを分子・原子レベルでかつ、動的に解き明かすものである。得られる結果は、レドックス感受システムの理解にとどまらず、それぞれのチャンネルに関する慢性疼痛や炎症性腸疾患などの疾病の治療法開発にも役立つ。また他のタンパク質の機能解明にも広く応用可能な技術である。

<主な研究発表>

- 1) Kuramochi M, Takanashi C, Yamauchi A, Doi M, Mio K, Tsuda S, Sasaki YC. Expression of Ice-Binding Proteins in *Caenorhabditis elegans* Improves the Survival Rate upon Cold Shock and during Freezing. *Sci. Rep.* 9, 6246, 2019.
- 2) Mio M, Sugiki T, Matsuda C, Mitsunashi H, Kojima C, Chan SY, Hayashi YK, Mio K. Structural instability of lamin A tail domain modulates its assembly and higher order function in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 512, 22-28, 2019.
- 3) Sekiguchi H, Kuramochi M, Ikezaki K, Okamura Y, Yoshimura K, Matsubara K, Chang JW, Ohta N, Kubo T, Mio K, Suzuki Y, Chavas LMG, Sasaki YC. Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions. *Sci. Rep.* 8, 17090, 2018.
- 4) Mio K, Kuramochi M, Matsubara K, Ikezaki K, Mio M, Sekiguchi H, Kubo T, Sasaki YC. Rotational Brownian Motion of TRPV1 Channel Observed by Synchrotron Diffracted X-Ray Tracking and Laboratory X-Ray Blinking Analysis. *Biophysical J.*, 114, 481, 2018.
- 5) Takada R, Mii Y, Krayukhina E, Maruyama Y, Mio K, Sasaki Y, Shinkawa T, Pack C, Sako Y, Sato C, Uchiyama, Takada S. Assembly of protein complexes restricts diffusion of Wnt3a proteins. *Communications Biology*, 1, 165, 2018.
- 6) Sawazaki R, Imai S, Yokogawa M, Hosoda N, Hoshino S, Mio M, Mio K, Shimada I, Osawa M. Characterization of the multimeric structure of poly(A)-binding protein on a poly(A) tail. *Sci. Rep.* 8, 1455, 2018.
- 7) Mio K, Sato C. Lipid environment of membrane proteins in cryo-EM based structural analysis. *Biophysical Reviews*, 10, 307-316, 2017.

研究課題名： 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

Development of imaging probes and caged compounds for oxygen biology researches

研究期間： 平成 26 年度～平成 30 年度

研究課題番号： 26111012

研究代表者名： 浦野 泰照（東京大学 大学院薬学系研究科 教授）

研究分担者名： 飛田 成史（群馬大学 理工学府 教授）（26-30 年度）

中川 秀彦（名古屋市立大学 薬学研究科 教授）（26-30 年度）

<研究の目的>

本新学術領域の酸素リモデリング研究を強力に推進させるためには、生細胞内や *in vivo* 局所における (1)酸素分圧の正確なライブ評価、(2)ROS・活性イオウ分子種・親電子分子種などの酸素関連活性分子群の生成と、これらの作用による各種細胞応答の詳細な時空間動態解析、(3)酸素関連活性分子群を瞬時に特定の場所に負荷させる摂動系の実現による応答の実証が求められている。そこで A03 班では、蛍光・生物発光プローブ、リン光プローブ、ケージド化合物開発で世界的に大きなアドバンテージを持つ 3 名の研究者が、それぞれのプローブ開発技術を駆使して、酸素リモデリング研究に資する化学プローブや摂動分子を開発し、従来は不可能であった上記観測、摂動を実現させることを目指した。

より具体的には、着目する酸素関連活性分子や酵素群、また酸素分圧やレドックス環境を、時空間分解能高く、生細胞系や *in vivo* モデル動物系で可視化する蛍光・生物発光・りん光プローブを開発する。酸素化状態のモニタリングに資する酸素プローブとしては、りん光寿命変化を原理とする新規イリジウム錯体と生物発光の強度変化を原理とするルシフェリン型生物発光プローブを開発する。前者は正確な酸素分圧の測定を、後者は *in vivo* 動物個体内の特定臓器内の酸素分圧変化を、非侵襲的にリアルタイム観測することを可能とさせるものであり、本学術領域研究の根幹をなす測定系となる。さらに生細胞内での各種酸素関連活性分子の特異的検出を可能とする蛍光プローブ、およびターゲット蛋白質の選択的修飾を可視化すべく、タグ化タンパク質との組み合わせによる局在化能を持つ蛍光プローブ群を開発し、酸素リモデリングによる各種活性種の生成、消去の詳細な時空間動態解析を実現させる。摂動プローブとしては、*in vivo* での使用を指向した近赤外 2 光子励起を利用した NO・H₂S 発生ケージド化合物を開発する。さらに酸素リモデリングによる酸素分圧の変動が及ぼす効果を実験的に検証することを狙い、*in vivo* で局所酸素濃度を高い時間分解能で自在に変化させることが可能なケージド O₂ 消去剤も開発する。

<研究の成果>

(1) 各種 ROS 選択的蛍光・生物発光プローブの開発と応用（論文 14, 16, 18）

研究代表者ら独自に開発した過酸化水素応答性プローブを SNAP 基質化し、細胞内での過酸化水素の生成を時空間分解能高く可視化するプローブの開発を行い、住本班と協同して様々なアプリケーションを行い、これを論文公表した。さらに独自に確立した消光原理(BioLeT と細胞膜透過性の制御)に基づいて開発した hROS 検出生物発光プローブによる、*in vivo* 急性炎症イメージング手法の評価を行い、近赤外蛍光イメージングと比較して圧倒的に高い S/N でのライブイメージングが可能であることが証明され、これらの成果を 2 報の論文としてまとめた。

(2) 細胞内 GSH 濃度の可逆的リアルタイム定量可視化蛍光プローブの開発 (論文 7)

Si ロードミンへの分子間求核付加を活用した細胞内含イオウ生理活性物質を可視化する蛍光プローブの開発を行った。具体的には、グルタチオン(GSH)濃度の可逆的検出蛍光プローブの開発に向け、蛍光団の LUMO 及びベンゼン環 2 位に種々の置換基を導入したパイロット化合物群の合成し、その GSH 応答特性を詳細に検証した結果、GSH との可逆的かつ即時的な応答が達成可能であることが明らかとなった。そこで本母核に通常の蛍光団を結合させた FRET 型プローブを設計・開発したところ、従来のプローブでは不可能であった秒オーダーの時間分解能での細胞内 GSH 検出が可能であり、さらにはその濃度の定量も可能であることが明らかとなった。

(3) 細胞内サルフェンサルファー、ヒドロパーサルファイドの可逆的リアルタイム定量可視化蛍光プローブの開発 (論文 2, 3, 8)

チオール基の分子内スピロ環化反応を活用し、新規可逆的サルフェンサルファープローブを開発し、生細胞で可逆的なサルフェンサルファー検出が可能であること、また薬剤処理によるアストロサイト初代培養系でのサルフェンサルファー濃度とカルシウム応答の同時イメージングを達成し、これを論文公表した。さらに本プローブを活用して、独国との国際共同研究を遂行して論文を公表した。

さらに分子間求核付加反応を鍵反応として、各種含イオウ化合物との反応性を精査することで、GSH とはほとんど反応しない一方で、サルフェンサルファーの中でもヒドロパーサルファイト(RSSH)と選択的かつ可逆的に反応する新規蛍光骨格の開発に成功した。本プローブも前項で紹介したプローブと同様に FRET を原理とする ratiometric プローブであることから、生細胞内 RSSH 濃度のリアルタイム定量が可能であり、実際各種刺激に応じて細胞内の RSSH 濃度が変化する様子を可視化定量することにも成功した。

(4) 細胞内酸素プローブ BTPDM1 の開発とマウスの腎組織の酸素レベル計測への応用 (論文 15, 17)

細胞内への取り込み能が非常に高い Ir(III)錯体 BTPDM1 を開発した。BTPDM1 を取り込んだ培養細胞を用いてりん光寿命の検量線を作成することにより、単層培養細胞中に作成した酸素濃度勾配を定量できること、担癌マウス中の腫瘍組織内の酸素分圧が正常組織に比べて低下していることを明らかにした。また生きているマウスの腎動脈の結紮、吸気中の酸素濃度の低下、さらには急性貧血マウス、腎臓病病態マウスにおいて顕著な寿命の増加が見られ、腎臓が低酸素状態に陥っていることが分かり、本法を用いると臓器の酸素レベルをリアルタイムで計測可能であることを示した。

(5) マウスの腎組織の酸素化状態の高分解能イメージング (論文 4)

BTPDM1 を投与したマウスを開腹し、りん光寿命イメージング顕微鏡法 (PLIM 法) を用いて腎臓の顕微りん光寿命画像を取得することにより、生きたマウスの腎臓の酸素化状態を細胞レベルの高分解能でイメージングすることに世界で初めて成功した。本法を用いると、15%酸素吸入による軽微な低酸素血症による酸素状態の変化も鋭敏に、尿細管サブグループごとに描出可能であることを示した。

(6) マウスの眼底組織の酸素イメージング (論文 7)

新たに設計・合成した水溶性 Ir(III)錯体をマウスに投与し、ゲート付き CCD カメラを使って眼底の発光寿命画像を測定した。マウスの吸気中の酸素濃度を 21% から 12.5% に低下させるとりん光寿命が増加し、りん光寿命変化から眼底組織内の酸素濃度変化を検

出できることを示した。

(7)多様な光波長による光制御 NO 放出剤の開発 (論文 11, 12)

一酸化窒素 (NO) の放出を光照射により制御できる化合物 (光制御 NO 放出剤) を開発した。従来知られていた技術としては金属 NO 配位の光開裂や自発的 NO 放出剤の光解除性保護基による保護などがあるが、これらとは異なる NO 発生機構として光誘起電子移動を利用し、新規な光制御 NO 放出剤の開発に成功した。光誘起電子移動を利用することにより、用いる光の波長を比較的自由に變更でき、実際に青色光、黄緑色光、により NO 放出可能な化合物を開発した。これらの化合物は培養細胞系に適用可能であることを示すとともに、*ex vivo* におけるラット大動脈切片の弛緩反応の光制御さらにラット陰茎組織血流の光制御が行えることを示した。

(8)光制御 HNO 放出剤の開発 (論文 5)

NO の類縁化学種であり、一酸化窒素自身とは異なる生物活性を有する HNO について、光制御放出剤を開発した。開発した放出剤は培養細胞系に適用可能であることを示した。

(9)光・酵素二重制御型 NO 放出剤の開発 (論文 1)

光誘起電子移動反応を利用した一酸化窒素放出剤を開発した。独自に開発した分子内光誘起を原理とする光制御 NO 放出剤について反応性解析を詳細に行うことで、分子内フェノール構造の NO 放出反応における重要性を見出した。これに基づいて、緑黄色光制御 NO 放出剤の構造を修飾することで、 β -グリコシダーゼ代謝に応答する仕組みを加えた酵素活性/光制御ダブルロック式化合物の開発に成功した。

<研究の意義・展望>

本研究で開発された各種蛍光プローブ、発光プローブ、りん光プローブは、*in vivo* での ROS、含イオウ活性種、酸素濃度の定量的ライブイメージングを可能とする技術であり、また各種ケージド放出剤は生体内の酸素と NO などの超低分子情報伝達分子との連関を研究する新たなツールであり、酸素が関与する様々な生命現象・病態の解明や新たな治療法の確立などに大きく貢献すると考えられる。

<主な研究発表>

- 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) Ezerin D, Takano Y, Hanaoka K, Urano Y, Dick TP. N-Acetyl Cysteine Functions as a Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H₂S and Sulfane Sulfur Production. *Cell Chem. Biol.*, 25, 447-459.e4, 2018.
- 3) Umezawa K, Kamiya M, Urano Y. A reversible fluorescent probe for real-time live-cell imaging and quantification of endogenous hydropolysulfides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 9346-9350, 2018.
- 4) 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 hypoxia. *Kidney International*, 93, 1483-1489, 2018.
- 5) Kawaguchi M, Tani T, Hombu R, Ieda N, Nakagawa H. Development and Cellular Application of Visible-Light-Controllable HNO Releasers Based on Caged Piloty's Acid. *Chem. Commun.*, 54, 10371-10374, 2018.
- 6) Yoshihara T, Hirakawa Y, Hosaka M, Nangaku M, Tobita S. Oxygen Imaging of Living Cells

- and Tissues Using Luminescent Molecular Probes. *J. Photochem. Photobiol. C. Photochem. Rev.* 30, 71-95, 2017.
- 7) Umezawa K, Yoshida M, Kamiya M, Yamasoba T, Urano Y. Rational design of reversible fluorescent probes for live-cell imaging and quantification of fast glutathione dynamics. *Nat. Chem.* 9, 279-286, 2017.
 - 8) Takano Y, Hanaoka K, Shimamoto K, Miyamoto R, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Kimura H, Nagano T, Urano Y. Development of a Reversible Fluorescent Probe for Reactive Sulfur Species, Sulfane Sulfur, and its Biological Application. *Chem. Commun.*, 53, 1064-1067, 2017.
 - 9) Hanaoka K, Sasakura K, Suwanai Y, Toma-Fukai S, Shimamoto K, Takano Y, Shibuya N, Terai T, Komatsu T, Ueno T, Ogasawara Y, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kimura H, Wang C, Uchiyama M, Kojima H, Okabe T, Urano Y, Shimizu T, Nagano T. Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H₂S-producing Enzyme, 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide. *Sci. Rep.*, 7, 40227, 2017.
 - 10) Doura T, Kamiya M, Obata F, Yamaguchi Y, Hiyama TY, Matsuda T, Fukamizu A, Noda M, Miura M, Urano Y. Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 9620-9624, 2016.
 - 11) Hotta Y, Ieda N, Fukumoto A, Kataoka T, Kawade Y, Maeda Y, Nakagawa H, Kimura K. Light-controlled relaxation of the rat penile corpus cavernosum using NOBL-1, a novel nitric oxide releaser. *Investig. Clin. Urol.*, 57, 215-220, 2016.
 - 12) 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.
 - 13) Asanuma D, Sakabe M, Kamiya M, Yamamoto K, Hiratake J, Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Nagano T, Kobayashi H, Urano Y. Sensitive β -Galactosidase-Targeting Fluorescence Probe for Visualizing Small Peritoneal Metastatic Tumors In Vivo. *Nat. Commun.*, 6, 6463, 2015.
 - 14) Takakura H, Kojima R, Kamiya M, Kobayashi E, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Hanaoka K, Nagano T, Urano Y. New Class of Bioluminogenic Probe Based on Bioluminescent Enzyme-induced Electron Transfer, BioLeT. *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 4010-4013, 2015.
 - 15) 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, 2015.
 - 16) Kojima R, Takakura H, Kamiya M, Kobayashi E, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Hanaoka K, Nagano T, Urano Y. Development of a Sensitive Bioluminogenic Probe for Imaging Highly Reactive Oxygen Species in Living Rats. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 14768-14771, 2015.
 - 17) Yoshihara T, Hosaka M, Terata M, Ichikawa K, Murayama S, Tanaka A, Mori M, Itabashi H, Takeuchi T, Tobita S. Intracellular and in Vivo Oxygen Sensing Using Phosphorescent Ir(III) Complexes with a Modified Acetylacetonato Ligand. *Anal. Chem.*, 87, 2710-2717, 2015.
 - 18) 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.
 - 19) Uno SN, Kamiya M, Yoshihara T, Sugawara K, Okabe K, Tarhan MC, Fujita H, Funatsu T, Okada Y, Tobita S, Urano Y. A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nat. Chem.*, 6, 681-689, 2014.

研究課題名： 遺伝子コードされた FRET 型酸素バイオセンサーの開発
Development of genetically encoded FRET-based biosensor for oxygen
研究期間： 平成 27 年度～平成 28 年度
研究課題番号： 15H01401
研究代表者名： 今村 博臣（京都大学 生命科学研究所 准教授）

<研究の目的>

本研究は、生細胞内の酸素濃度をイメージングする技術の開発を目指した。生体内の酸素分布を計測する方法として、血中の酸化ヘモグロビンレベルを測定する fMRI が近年多用されている。特に、活動の盛んな脳の部位を特定することが可能であることから、fMRI は脳科学分野において非常に強力なツールとなっている。しかし、血管が発達していない組織の酸素レベル、あるいはそもそもヘモグロビンが存在しない細胞内部の酸素レベルを fMRI によって知ることは不可能である。このような技術的境界のため、生体内および細胞内における酸素の分布や変動についてはほとんど理解が進んでいない。生体内の酸素動態について深く理解するためには、酸素分圧を計測するための新たな方法が必要である。有力な候補のひとつがフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) 型バイオセンサーを用いたイメージングである。近年、カルシウムイオンやグルコースの濃度、キナーゼ活性等を測定するためのさまざまな FRET 型バイオセンサーが開発されており、生体内の情報を測定するための有用なツールとなっている。こうした FRET 型バイオセンサーの大部分はリガンド等の結合によって構造変化を起こすタンパク質と蛍光タンパク質のペア (例えば CFP と YFP) を融合させ、タンパク質の活性が変化する際の構造変化や相互作用の変化を FRET 効率の変化として検出できるように設計されている。そのため、FRET バイオセンサー開発には、用いるタンパク質自身が大きな構造変化を示す、あるいはリン酸化などの修飾によって別のタンパク質との相互作用が変化するという条件を満たす必要がある。しかし、多くのタンパク質は単独で働き、かつ構造変化は小さいため、任意の FRET 型バイオセンサーを創出することはこれまで非常に困難であった。FixL などの酸素を結合するタンパク質も酸素結合による構造変化が小さい。そのため、これまで酸素に対する FRET 型バイオセンサーは報告されていない。本研究課題では、酸素結合に伴うタンパク質の微小な構造変化を識別する一本鎖抗体 (scFv) を用いることでタンパク質構造変化を増幅し、FRET の変化として十分観測可能な FRET 型酸素バイオセンサーを開発することを目指した。

<研究の成果>

まず、酸素結合タンパク質である FixL の大腸菌における発現条件の最適化をおこなった。FixL の発現量とヘム含量が高くなる大腸菌株、培養温度、培地組成を決定した。大腸菌で発現させたのち精製した FixL は、ほぼ全てが過酸化状態であった。そこで、還元剤およびグルコースオキシダーゼをもちいることで、過酸化状態を酸素結合状態および酸素非結合状態に変換する条件を確立した。続いて、市販の非免疫 scFv および sdAb のライブラリーから、酸素結合状態の FixL を特異的に認識する抗体のスクリーニングをファージディスプレイ法を用いておこなった。まず、常法通り、FixL をプラスチックチューブ表面に固定した状態でスクリーニングをおこなった。固定した FixL を抗体が提示されたファージと反応させ、結合しないファージを洗浄除去したのちに溶液中の酸素分圧を低下させ、溶出されるファージを得た。このサイクルを繰り返すことで濃縮される scFv のファージクローンの配列を解析したのち、それぞれについて精製 FixL との結合を調べた。しかし、この方法では酸素依存的に FixL に結合する、特異的な一本鎖抗体を得ることはできなかった。プラスチック表面に固定された FixL が変

性したために、酸素結合による構造変化が生じなかった可能性が考えられた。そこで、酸素結合タンパク質 FixL をビオチンを介してストレプトアビジンコートした磁気ビーズ上に固定することで、タンパク質の変性を防いだ状態でファージディスプレイをおこなった。しかし、この方法で得られた scFv クローンも、FixL タンパク質との間に酸素依存的な相互作用を確認することはできなかった。

<研究の意義・展望>

本研究では、期待していたような一本鎖抗体を得ることができず、目指していた FRET 型酸素バイオセンサーの開発までは至らなかった。特異的な一本鎖抗体が得られなかった原因としては、第一にそもそも利用したライブラリーに期待されるような性質を持った抗体クローンが含まれていなかった可能性が挙げられる。今回の研究には非免疫のライブラリーを用いたが、FixL で免疫した動物からライブラリーを作製することで FixL を認識する多数のクローンが含まれるライブラリーが得られると期待される。また、mRNA ディスプレイ等のファージディスプレイ以外の手法を用いることで、効率的に目的となる抗体を得られる可能性がある。構造認識抗体断片を用いたバイオセンサーは今後有用な研究ツールになると考えられ、そのためにも目的となる構造認識抗体断片を効率的に得るための手法の確立が求められる。

<主な研究発表>

- 1) Yoshida T, Alfaqaan S, Sasaoka N, Imamura H. Application of FRET-based biosensor “ATeam” for visualization of ATP levels in the mitochondrial matrix of living mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 1567, 231-43, 2017.
- 2) Tsuyama T, Tsubouchi A, Usui T, Imamura H, Uemura T. Mitochondrial dysfunction induces dendritic loss via eIF2 α phosphorylation. *J Cell Biol*, 216, 815-34, 2017.
- 3) 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.
- 4) Hidaka M, Gotoh A, Shimizu T, Minamisawa K, Imamura H, Uchida T. Visualization of NO³⁻/NO²⁻ 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.
- 5) Ozawa S, Ueda S, Imamura H, Mori K, Asanuma K, Yanagita M, Nakagawa T. Glycolysis, but not mitochondria, responsible for intracellular ATP distribution in cortical area of podocytes. *Sci Rep*, 5, 18575, 2015.
- 6) Groen J, Foschepoth D, Te Brinke E, Boersma AJ, Imamura H, Rivas G, Heus HA, Huck WT. Associative interactions in crowded solutions of biopolymers counteract depletion effects. *J Am Chem Soc*, 137, 13041-13048, 2015.

研究課題名： 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
Fluorescent biosensors for detecting the post-transcriptional modification of proteins by reactive oxygen species
研究期間： 平成 27 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 15H01402, 17H05529
研究代表者名： 森井 孝 (京都大学 エネルギー理工学研究所 教授)

<研究の目的>

本研究は、酸化活性種による翻訳後修飾過程を可視化する蛍光バイオセンサーの構築を目指した。特に、タンパク質チオール基の翻訳後修飾に関与する主たる酸化活性種である一酸化窒素 (NO) に注目して、細胞内で利用可能な蛍光 NO バイオセンサーの構築を試みた。これまでに、NO により翻訳後修飾を受けることが知られている TRPC5 (Nat. Chem. Biol., 2006) の構造変化メカニズムに着目し、NO により構造変化を誘起される部分構造を NO 反応モジュールとして採用し、申請者らがこれまでに培ったバイオセンサー構築戦略 (Bioorg. Med. Chem. 2009 など) を応用した NO センサーを設計し、その機能評価をおこなった。

分割型 GFP を基本骨格として用いた NO センサーでは、試験管内において NO の存在により、有意な蛍光変化を観測することができた。しかしながら、蛍光強度変化の S/N 比は十分なものではなく、細胞内において NO を検出するためには、より大きなダイナミックレンジで NO を検出することができる NO センサーであることが望まれる。それと同時に、例えば過酸化水素など他の酸化活性種との選択性も重要になる。そこで、より大きなダイナミックレンジで NO を検出できるよう分割型 GFP に導入するリンカーを含んだ NO 反応モジュールの最適化をおこなったところ、当初の 5 倍の蛍光強度変化を誘起できる NO センサーが得られた。さらに、他の酸化活性種との選択性も評価し、高選択的に NO を検出可能な NO センサー構造を最適化した。試験管内にて最適化をおこなったうえで、細胞内での機能評価をすすめる。

<研究の成果>

(1) 蛍光タンパク質を利用した NO センサーの構築 (学会発表 1-4)

蛍光タンパク質に TRPC5 の NO と反応する部分構造を導入した NO センサー (NOP-sp-C49S/C71V) を構築した。NO と反応させた NOP-sp-C49S/C71V に対してアスコルビン酸による選択的なニトロソ基還元反応を行った結果、蛍光変化はチオール基のニトロソ化ではなくジスルフィド結合形成に対応することがかかった。また、NOP-sp-C49S/C71V は NO とも過酸化水素とも反応し、蛍光変化を誘起した。

NO ドナーからの NO 産生評価に成功している HEK 細胞 (Nat. Chem. Biol. 2006) を使用し、NOP-sp-C49S/C71V を哺乳類細胞で発現させた。HEK 細胞内に、センサーの遺伝子を組み込んだベクターを導入し、細胞内で NO センサーが発現することを確認した。NO ドナーを細胞内に導入したが、有為な GFP 蛍光の変化は観測されなかった。

(2) NO センサー変異体の機能評価 (未発表)

構造変化モジュールのアミノ酸配列を N 末端もしくは C 末端から欠損させ、NO 反応部位である 2 つのシステイン残基がジスルフィド結合形成前後それぞれの構造を分子モデリングにより最適化、比較した。それらの中から、ジスルフィド結合形成により発色団近辺に大きな構造変化が見られた変異体を 7 種類選出し、大腸菌内で発現させた。変異体を発現した大腸菌破砕液を用いて、NO 存在下での蛍光挙動を評価した。最初に構築した NO センサー (NOP-sp-C49S/C71V) では、NO との反応による 395 nm と 466 nm

での励起による蛍光強度比の変化は 0.006 であったが、蛍光強度比の変化が 0.011、0.033 に向上した 2 種類の変異体が得られた。今後、これらの変異体 NO センサー (NOp) の細胞内での NO 検出について評価する。

<研究の意義・展望>

生体内でセンサーを使用する場合、他の細胞内物質による影響を検討することが重要であるため、大腸菌破碎液での蛍光挙動は細胞内でのセンサー性能評価の良い指標となる。本年度得たより大きな蛍光挙動変化を示す NOp 変異体の細胞内での NO に対する挙動に興味を持たれる。

また、上述以外の大きな構造変化を得られると予測された構造変化モジュールを実際に蛍光タンパク質に導入し、NO の存在下・非存在下における蛍光強度の経時変化を評価することにより、さらに機能が向上した蛍光センサーによる NO 検出が期待出来る。本研究で得られた成果は、新たな細胞内 NO 可視化技術の基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

1) 田嶋 竣介, 森井 孝

蛍光タンパク質を用いた一酸化窒素センサーの作製

生体機能関連化学部会若手の会 第 30 回サマースクール

2018.8.2-3

2) 田嶋 竣介, 坂口 怜子, 才村 正幸, 中田 栄司, 森 泰生, 森井 孝

蛍光タンパク質を用いた一酸化窒素センサーの機能評価

第 12 回バイオ関連化学シンポジウム

2018.9.9-11

3) Shunsuke Tajima, Eiji Nakata, Reiko Sakaguchi, Masayuki Saimura, Yasuo Mori, Takashi Morii.

"Construction of nitric oxide sensor based on fluorescent protein."

1st Japan-India Bilateral Symposium on Energy and Environmental Science

2018.12.2-5 (Indian Institute of Science, Bangalore, India)

4) Shunsuke Tajima, Eiji Nakata, Reiko Sakaguchi, Masayuki Saimura, Yasuo Mori, Takashi Morii.

Design of fluorescent sensor detecting nitric oxide using autofluorescent protein.

日本化学会第 99 春季年会, 2019.3.16-9

研究課題名： 低酸素・活性酸素種・レドックス活性を捉える *in vivo* 可視化プローブの創製
Development of *in vivo* imaging probes for visualization of hypoxia environment, reactive oxygen species, and redox activity

研究期間： 平成 27 年度～平成 30 年度

研究課題番号： 15H01403, 17H05528

研究代表者名： 近藤 輝幸（京都大学 工学研究科 教授）

連携研究者名： 山田 久嗣（徳島大学 社会産業理工学部 講師）（平成 27～30 年度）

<研究の目的>

本研究は、生体内酸素濃度変動に鋭敏に応答する新しい酸素濃度センサープローブの開発と機能評価を目指した。

酸素は、生体が生命活動を維持するために必要なエネルギーの産生に不可欠な分子であり、その消費は様々な生命機能と深く関わっている。例えば、成長過程など細胞が活発に活動する際にはエネルギーの産生が必要であり、酸素の消費量が増大する。一方、酸化ストレス等により細胞内ミトコンドリアに異常が起これば、酸素の消費量は大きく低下する。すなわち、酸素と生命機能との間には強い相関関係にあることから、生体内および細胞内での酸素濃度変動をリアルタイムに可視化する新しい分子プローブの開発が求められている。

また、固形癌などの腫瘍組織では、癌細胞の急速な増殖に対し、血管新生が追いつかず、酸素や栄養分が不足した低酸素環境が存在する。一方、脳梗塞や心筋梗塞では、梗塞を起こした血管の下流域に低酸素領域が存在することから、疾患と酸素濃度変動および低酸素環境についても、密接な相関関係がある。従って、生体内の酸素濃度変動をリアルタイムに可視化する新しい概念に基づく酸素濃度センサープローブの開発は、疾患の基礎研究と早期画像診断に不可欠な研究であるとともに、化学が医療に貢献する重要な研究である。

上記の背景の下、本研究では、生体内酸素濃度変動に鋭敏に応答する 4 種類の新しい酸素濃度センサープローブの設計、合成および機能評価に成功した。

<研究の成果>

(1) メソ孔シリカナノ粒子 (MSN) を用いる新しい化学発光プローブの開発 (論文 1)

細孔内にアミノ基を有する MSN に、ナフタレンエンドパーオキシド (NEP) を固定した新しい化学発光プローブ (MSN-NEP) を開発した。すなわち、MSN-NEP では、MSN の細孔内でのみ NEP から一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が発生すること、および MSN の細孔内でのみ 3-ビニルフェノール類と $^1\text{O}_2$ との [2 + 2] 付加環化反応が進行することにより生成した 1,2-ジオキセタンによる化学発光が起こることを明らかにした。

(2) Hoechst 33258 複合化新規りん光発光性ルテニウム錯体プローブの開発 (論文 2)

細胞核内の酸素濃度の変動を可視化することを目的とし、細胞核染色剤である Hoechst 33258 を複合化した新規りん光発光性ルテニウム錯体プローブ (Ru-Hoechst) を開発した。Hoechst 分子とルテニウム錯体とを繋ぐメチレン基の数は 6 つが最適であり、細胞核内の酸素濃度の変動に鋭敏に応答することを明らかにした。

(3) 毒性のない新しいりん光発光性ルテニウム錯体ナノ粒子プローブの開発 (論文 3)

MSN の細孔内にりん光発光性ルテニウム錯体を固定した新規りん光発光性ルテニウム錯体ナノ粒子プローブ (MSN-Ru) を開発した。MSN-Ru では、生体高分子は細孔

内に侵入できず、細孔内に固定したルテニウム錯体、および細孔内でのみ発生・失活する $^1\text{O}_2$ との相互作用が起こらず、細胞毒性を完全に抑制した。マウスの左足皮下に MSN-Ru を局所注射し、脚部を結紮して急性低酸素状態にすると、MSN-Ru プローブ由来のりん光発光強度が顕著に増大することを明らかにした。

(4) 光音響イメージングに有効な 2-ニトロイミダゾール複合化金ナノロッドプローブの開発 (論文 4)

低酸素環境で過剰発現しているニトロ基還元酵素を利用し、ニトロ基のアミノ基への還元により、低酸素細胞に蓄積する 2-ニトロイミダゾール誘導体と蛍光色素を同時に修飾した金ナノロッドプローブ (NI-GNR) を開発し、光音響イメージング (PAI) に有効であることを見出した。NI-GNR は、通常の酸素濃度 (20% O_2) で培養した細胞より、低酸素濃度 (0.3% O_2) で培養した細胞に取り込まれ易い (約 2 倍に増大) ことが明らかになった。

<研究の意義・展望>

本研究で得られた成果は、生体内および疾患部位での酸素濃度の定量的可視化を実現する新たなレシオメトリック型酸素濃度センサープローブを開発する基盤となると考えられる。

<主な研究発表>

- 1) Umehara Y, Son A, Kondo T, Tanabe K. Dioxetane formation and chemiluminescent emission upon the combination of a vinylphenol derivative with naphthalene endoperoxide. *RSC Adv.* 7, 9472-9475, 2017.
- 2) 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. *ChemBioChem* 19, 956-962, 2018.
- 3) Kitajima, N. Umehara, Y. Son, A. Kondo, T. Tanabe, K. Confinement of singlet oxygen generated from ruthenium complex-based oxygen sensor in the pores of mesoporous silica nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* 29, 4168-4175, 2018.
- 4) Asahi, W. Kurihara, R. Takeyama, K. Umehara, Y. Kimura, Y. Kondo, T. Tanabe, Kazuhito. Aggregate Formation of BODIPY-Tethered Oligonucleotides That Led to Efficient Intracellular Penetration and Gene Regulation. *ACS Appl. Bio Mater.* 2, 4456-4463, 2019.

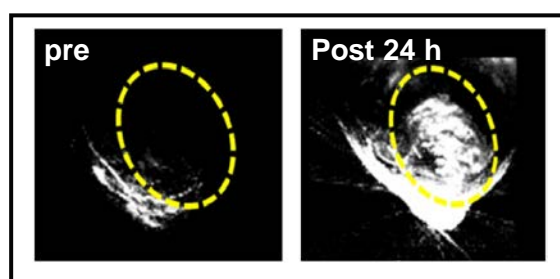


図. NI-GNR プローブによる腫瘍低酸素部位の光音響イメージング画像.

腫瘍低酸素領域で過剰発現しているニトロ基還元酵素により、2-ニトロイミダゾール修飾金ナノロッドプローブ (NI-GDR) のニトロ基がアミノ基に還元されることで腫瘍低酸素領域に蓄積すること、およびその光音響イメージングが可能であることが分かった。

研究課題名： MRIによる in vivo 酸素環境測定手法の開発
Development of in vivo oxygen environment analysis by using MRI
研究期間： 平成 29 年度～平成 30 年度
研究課題番号： 17H05531
研究代表者名： 杉原文徳（大阪大学 微生物病研究所 助教）

<研究の目的>

研究開始前までの検討から呼気酸素濃度の変化による酸素増感(Oxygen Enhancement)OE-MRI と ^{13}C 標識グルコースの代謝 MRI により酸素分布とグルコース代謝を同時に測定することを可能としてきた。Warburg 効果とされる腫瘍での低酸素領域と糖代謝を同時に観測できる手法として基礎研究のみでなく臨床研究への応用も考えられることから、本手法により新たな酸素-代謝研究方法の展開が可能となったと考えられた。本研究では OE-MRI の信号変化が生体中のどのような因子に由来するかを ^{13}C グルコース代謝 MRI や組織学、生化学的手法と合わせて明らかにすることを目的とし、腫瘍においては細胞種の違いや抗がん剤投与による信号変化を解析することで MRI による新たな診断手法として用いることができるか検証することを目的とした。また、低酸素状態は免疫疾患でも起きていることから、OE-MRI 法と代謝 MRI 法による炎症状態の新たな可視化手法の開発を目指した。

<研究の成果>

初年度はマウス皮下移植腫瘍モデルを作成し、呼気酸素濃度の変化による MRI 信号をとらえる OE-MRI の測定手法と代謝 MRI で用いる ^{13}C グルコースの導入方法を最適化し手法の確立を試みた。MRI の測定パラメーターと呼気酸素濃度を切り替えるタイミングを調性し、5 分間隔での酸素 ON/OFF のインターバルによる撮像および解析方法を設定した。また、同時に本研究課題で調達した酸素濃度計を皮下と校正用に空気中で計測できるように設置し、呼気酸素濃度と生体中での酸素濃度の変化をリアルタイムに計測できるようにした。このことにより、マウスの口を覆う呼吸マスクのゆるみから生じていた呼気酸素の漏れが原因と考えられる OE-MRI コントラストのブレが明らかとなり、実験系の改善が図られた。また、酸素以外のガス吸入で酸素濃度を低下させることでコントラストの変化がおきることも見出された。この酸素濃度の異なる画像の差分から血管造影による比較的太い血管以外にも微細な血管分布を示すような画像が得られることが分かった。 ^{13}C グルコースがラクトースへ代謝される過程を生体中でモニターできる代謝 MRI の検討では投与するグルコース濃度と得られるコントラストが皮下移植の腫瘍の成長段階、腫瘍細胞の由来により大きくことなることから一概に投与量を決めることができなかつた。これは腫瘍細胞の性質が大きく異なることに起因していると考えられ、OE-MRI でも腫瘍の大きさ、細胞種により得られるコントラストが異なることから、系統立てた解析により腫瘍の状態や性格を OE-MRI と代謝イメージングで示せることが考えられた。

代謝 MRI 方法と OE-MRI を組み合わせることで、in vivo での相関性をガン組織中で測定し、その組織部位ごとでのコントラストの相関性のある因子を同定することを試みた。性質の異なる細胞の皮下腫瘍を形成させ MRI 撮像し、血管走行を観察するために蛍光デキストランを用いた組織切片を作成していった。しかし、蛍光により血管分布を MRI で観察した視野と比較するには想定以上に時間がかかり、3 次元的な分布を再構築

することは困難であると判断した。代謝 MRI と OE-MRI の相関性については細胞種によっても異なるのみでなく、腫瘍内部の状況によってもばらつきがあり、解析例数を増やした検証が必要と考えられた。

脳血管梗塞による炎症モデルを用いた評価では、急性期には酸素の造影効果がみられたが、時間経過によりその効果は見られなくなることを見出した。一方、自己抗体産生による慢性的な炎症では、ガドリニウム造影による血管閉塞の破綻は観察されるが、酸素造影では同様の効果は得られなかった。これらの結果から、急性的な炎症状態であるかどうかを評価する方法の一つとして OE-MRI を用いることが可能であると考えられた。

吸入させる酸素濃度を一時的とはいえ 100%濃度にして投与することから酸素毒性についての検証を検討していたが、通常飼育下のマウスや担癌マウスではその影響を見出すことは困難に思われた。しかし、脳血管梗塞モデルでは OE-MRI を実施後に生存率が顕著に下がる傾向があり、酸素毒性によるとみられる影響が初めて見いだされた。この影響が投与した酸素による影響かどうかを検討すべく新たな課題を得ることができた。

<研究の意義・展望>

酸素投与による OE-MRI のコントラスト因子の同定は想定以上に困難であることが明らかとなり、さらなる検討が必要であることが分かった。¹³C を用いた代謝 MRI と OE-MRI により Warburg 効果を生体中で可視化することが可能となったと当初は考えられたが、癌の状態や癌腫により想定されるコントラストが得られなかったことから、さらに複雑なコントラスト因子が関わっていることが考えられた。本研究を通して、さらに多くの課題を見出すことができ、酸素を軸としたさまざまな研究手法を用いた検討が必要であると考えられる。

<主な研究発表>

投稿準備中

研究領域に対する評価

中間評価および事後評価

<中間評価>

科学技術・学術審議会学術分科会科学研究費補助金審査部会（以下「審査部会」という。）は、平成26年度に発足した新学術領域研究（研究領域提案型）の研究領域について、領域代表者からの報告を基に、『科学研究費助成事業「新学術領域研究（研究領域提案型）」の評価要綱』（平成22年5月13日審査部会決定）の規定に基づき、中間評価を行った。平成28年12月22日に開催した審査部会で審議した各研究領域の評価は以下のとおりである。

審査部会における所見

A（研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの進展が認められる）

本研究領域の設定目的に向かい、低酸素環境における生体応答と、酸素および酸素由来の活性酸素種（ROS）・親電子分子のもつシグナル分子としての役割の解明、さらにはこれら分子種の可視化技術の開発のための研究は全般に着実に進展しており、特にTRPチャネルや赤血球産生制御系の研究、局所酸素濃度の可視化技術の開発等、期待以上の発見や進展も見られる等、低酸素とROSを軸にケミカルバイオロジーの手法を活用しながら酸素生物学という領域を創成しようとする狙いは順調に達成されつつあると評価できる。一方、本研究領域の目標達成のためには、組織内酸素濃度を正しく測定し、酸素濃度の生体への影響を定量的に解析することが必要である。本研究領域で導入した装置の積極的な活用を図るとともに、公募研究との連携を深め、研究領域全体として世界をリードする新しい概念の確立に向けた研究が展開されることを今後期待する。

<事後評価>

令和元年11月29日付で審査部会が審議・決定した評価結果は以下のとおりである。

審査部会における所見

A（研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの成果があった）

本研究領域では、細胞は自らにとって最適の酸素濃度を積極的に構築するという「酸素リモデリング」という基本概念を設定し、新しい「酸素生物学」の確立を目指した研究が行われた。領域代表者の強いリーダーシップのもと、生体内における低酸素環境の形成機構とその生理的役割の解明（第一の視点）、活性酸素種（ROS）などの分子状酸素を起源とする分子種が担うシグナル伝達経路の実態解明（第二の視点）が課題としての確に整理され、さらには生体内酸素環境の新規定量化技術の開発に成功した結果、生物が低酸素条件を積極的に利用していることを証明する十全な成果を上げるに至った。また、従来別個の研究分野として認識されていた低酸素環境研究とROSシグナリング研究の有機的連携を土台に、学術専門誌の特集企画や国際会議開催を通じた国際的な成果発信や、若手教育による領域研究人材育成など、酸素生物学が新学術領域として成立する要件を満たす活動内容の充実が評価に値する。上述のとおり全体として想定通りの成果が上がっている一方で、幅広い生物種に渡った普遍的な「酸素生物学」の統合的理解としては道半ばの印象である。特に酸素リモデリング概念の理解によって何が明らかとなるのか、現時点では明示されておらず、今後の継続的研究進展による導出に期待したい。

領域評価者による評価

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使い、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。