
3. プレスリリース

2019年5月17日 岩崎プロジェクト

丈夫かつ開閉可能なタンパク質ケージを開発
～特異な形状と性質を有する網かご状ナノ粒子～

2019年5月17日 小林プロジェクト

生殖細胞が作られる過程では、体を作る細胞の生成が抑制される
～次世代の生命を生み出すしくみ～

2019年5月30日 渋谷プロジェクト

細胞が自らのアレルギーの発症を抑える仕組みを発見

2019年8月29日 野村 ERATO プロジェクト

多数の細胞の性質を非破壊で同時に分析する手法を開発

2019年10月24日 深水プロジェクト

受容体間の機能的相互作用による血管収縮機構を解明

2019年11月8日 林センター長研究グループ

老化を誘発する仕組みを解明
～グリシン摂取が老化の緩和に有効である可能性～

2019年12月4日 渋谷プロジェクト

薬剤性急性肝障害を予防する新しい細胞の働きを発見

2019年12月7日 渋谷プロジェクト

ダニによるアトピー性皮膚炎を抑制する分子の発見

2019年12月9日 野村 ERATO プロジェクト

微生物が狭い空間でも集団を拡張する仕組み
～ナノ繊維の分泌により細胞フィラメントの伸長を制御し、環境に適応する～

2020年1月27日 深水プロジェクト

ヒスタミン受容体アゴニストが心腎連関障害を改善する
～心腎不全モデルマウスの遺伝情報解析による抗炎症作用の同定～

2020年3月10日 岩崎プロジェクト

細菌毒素タンパク質の膜透過機構の一端を解明

2020年3月12日 小林プロジェクト

生殖細胞が作られる過程で細胞分裂サイクルが停止する機構を解明

2020年4月7日 野村 ERATO プロジェクト (論文掲載日 2020年3月23日)

ナノサイズの細胞外膜小胞の物性イメージングに成功

～細菌は不均一な性質の膜小胞を放出する～

2019年5月17日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学
国立大学法人 大阪大学
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

丈夫かつ開閉可能なタンパク質ケージを開発
～特異な形状と性質を有する網かご状ナノ粒子～

研究成果のポイント

1. 新規網かご状タンパク質を開発し、その構造が特異な正多面体形状であることを明らかにしました。
2. この網かご状タンパク質は、丈夫で安定でありながら、閉じたり開いたりすることが可能です。
3. この化合物には2種類の鏡像関係にある会合様式があり、1:1の割合で生成することがわかりました。

国立大学法人筑波大学生存ダイナミクス研究センター (TARA) 岩崎憲治教授、宮崎直幸助教 (研究当時、大阪大学蛋白質研究所)、ヤギェウォ大学 (ポーランド) Jonathan G. Heddle 教授らの研究グループは、新たに開発した網かご状タンパク質について、最新鋭のクライオ電子顕微鏡^{※1)}を用いた単粒子解析^{※2)}により、その構造を明らかにしました。

TRAPと呼ばれる11量体のタンパク質に変異を入れ、金誘導体を加えたところ、非常に特異な、閉じた網かご状の正多面体 (ケージ) の形成に成功しました。このケージは、加熱や変性剤にも強い反面、還元剤を加えるとバラバラになります。このように丈夫で安定な上に、閉じたり開いたりできるケージは、これまでありませんでした。さらに、このケージには鏡像の関係にある2種類の会合様式が存在し、それらが1:1の割合で溶液中に作られることもわかりました。本化合物を使って、薬剤の輸送などの応用が期待されます。

本研究の成果は、2019年5月9日付 英国科学誌「Nature」でオンライン公開されました。

* 本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) の創業等支援技術基盤プラットフォーム事業 (PDIS) 「創業等支援のためのタンパク質立体構造解析総合技術基盤プラットフォームによる支援と高度化」 (研究期間: 2012～2016年度) 及び創業等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (BINDS) 「創業等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 (創業等ライフサイエンス研究のための多階層構造生命科学解析技術の支援と高度化)」 (研究期間: 2017～2021年度) の支援によって実施されました。

研究の背景

タンパク質からなる、天然には存在しない閉じた網かご状の構造（ケージ）を人工的に作る試みは、これまで研究者の興味をかき立ててきました。しかし、ここには2つ問題がありました。一つは、閉じた集合体を作るための幾何学的要件を満たしたタンパク質がなかなか存在しないこと、もう一つは、ケージを作る多くのタンパク質が、複雑な化学結合のネットワークを形成するため、その構造を予測したり、シミュレーションすることが困難なことです。そのため、ケージのデザイン自体が非常に難しくなります。

本研究グループは、これら2つの問題をクリアしたケージの開発に成功し、その構造を、最新のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって明らかにし、ケージがもつ類い希なる特性の仕組みを明らかにしました。

研究内容と成果

本研究グループは、金原子1個を「ホッチキス」として使うことで、タンパク質ケージ開発の問題を克服しました。リング状の11量体を形成するTRAPと呼ばれるタンパク質のブロックを、ホッチキスで留めることで直径22nmという非常に小さなケージを作製しました（図1）。このケージについて、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を行ったところ、非常に特異な、11回対称をした形状の正多面体を形成していることがわかりました。しかも、解析を進めていくと、ケージ構造が鏡像対称の関係にある、2種類の会合様式があることが判明し、双方の構造解析にも成功しました（図2）。さらに、このケージは、「閉じたり、開いたりの操作が可能」という特徴的な性質を持っていることが明らかとなりました。すなわち、いったんケージができれば、95°Cで3時間加熱しても壊れず、通常のタンパク質では変成してしまう7Mの尿素条件にも耐える類い希な安定性も有する一方で、還元剤を加えるとバラバラになってしまいます。このような、タンパク質でできたナノ粒子の開発は、世界で初めてです。

今後の展開

このようなケージは、薬剤の輸送など、ナノサイズのオープン・クローズが必要なカプセル開発の基盤となる技術です。正多面体を形成しないと考えられていた形状のタンパク質を使って、ケージ作製に成功したということは、これまで検討されなかったタンパク質もケージを構成できる可能性があり、さらに薬剤輸送などに適したケージの開発が期待されます。

参考図

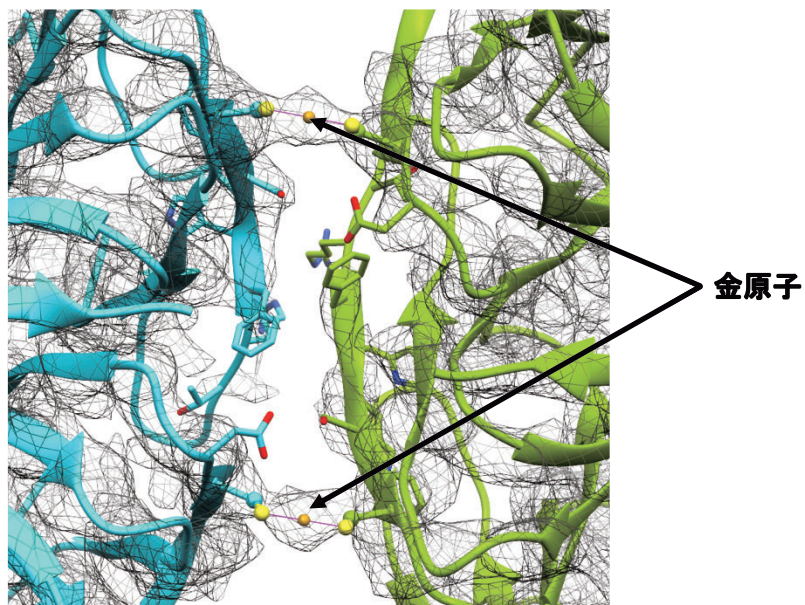


図1 金原子によるホッチキス
青と黄緑は隣接する TRAP11 量体リングの一部

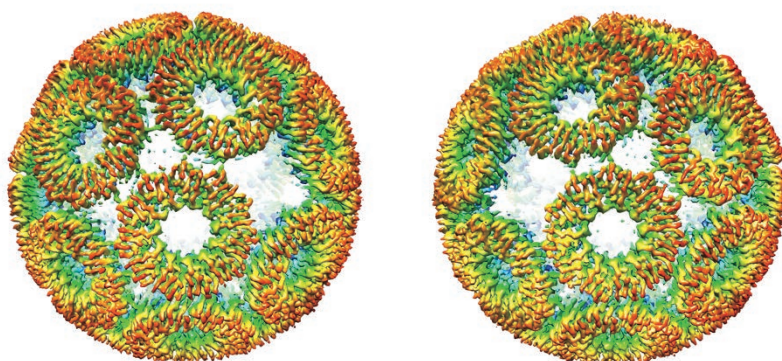


図2 鏡像対称のケージ
同一試料溶液中にほぼ 1:1 の割合で形成される。

用語解説

注1) クライオ電子顕微鏡

ガラス状の氷に固定した試料を冷却したまま透過型電子顕微鏡で撮影する技法。

注2) 単粒子解析

精製した生体分子を透過型電子顕微鏡で撮影し、その画像（投影像）から元の分子構造を再構築する技法。数千から 100 万枚を超える多数の分子投影像を扱う。

掲載論文

【題名】 An ultra-stable gold-coordinated protein cage displaying reversible assembly
(可逆的に集合可能な金でつなぎとめられた超安定タンパク質ケージ)

【著者名】 Ali D. Malay, Naoyuki Miyazaki, Artur Biela, Soumyananda Chakraborti, Karolina Majsterkiewicz, Izabela Stupka, Craig S. Kaplan, Agnieszka Kowalczyk, Bernard M. A. G. Piette, Georg K. A. Hochberg, Di Wu, Tomasz P. Wrobel, Adam Fineberg, Manish S. Kushwah, Mitja Kelemen, Primož Vavpetič, Primož Pelicon, Philipp Kukura, Justin L. P. Benesch, Kenji Iwasaki & Jonathan G. Heddle

【掲載誌】 Nature (DOI: 10.1038/s41586-019-1185-4)

問い合わせ先

岩崎 憲治 (いわさき けんじ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター (TARA) 教授

(AMED 事業について)

日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬戦略部 医薬品研究課

E-mail: 20-DDLSG-16@amed.go.jp

Tel: 03-6870-2219

生殖細胞が作られる過程では、体を作る細胞の生成が抑制される
～次世代の生命を生み出すしくみ～

研究成果のポイント

1. 卵や精子などの生殖細胞が作られる過程で、nanos（ナノス）と呼ばれる遺伝子が、体を作るために働く遺伝子（体細胞性遺伝子）を抑制する機構を初めて明らかにしました。
2. nanosに加えて、pgcと呼ばれる遺伝子も体細胞性遺伝子を抑制しており、生殖細胞形成過程で体細胞性遺伝子が発現しないように、nanosとpgcが強固に二重のロックをかけていることを発見しました。
3. nanosは、多くの動物の生殖細胞形成過程で働くことが知られており、これが体細胞性遺伝子の抑制に関わることがショウジョウバエで明らかになったことから、他の動物でも同様の機構が機能するか、すなわち、生殖細胞を生み出す共通原理を知る第一歩となると期待されます。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター（TARA）浅岡美穂研究員および小林悟教授は、熊本大学 羽生-中村賀津子研究員、中村輝教授と共同で、生殖細胞の形成過程において体細胞性遺伝子がnanos遺伝子により抑制される機構を明らかにしました。

「生殖細胞」は、生物個体の体を作る「体細胞」と呼ばれる細胞とは異なり、次世代を生み出すことができる唯一の細胞です。生殖細胞から次世代の個体ができる過程で、再び生殖細胞が作られ、さらに次世代が生み出される。この過程が連続と繰り返されることにより、生物種の存続が初めて可能になります。すなわち、体細胞が個体の死と共に消滅するのに対して、生殖細胞には次世代を生み出す特殊な能力が備わっているのです。この違いを生み出す機構に関して、生殖細胞が作られる過程で、体を作るために働く遺伝子（体細胞性遺伝子）の機能が抑制されていることが多くの動物で知られていました。また、生殖細胞形成過程においてnanosと呼ばれる遺伝子が発現することも報告されてきました。さらにショウジョウバエでは、nanosの機能が喪失すると、生殖細胞が、その形成途中で体細胞になってしまうことも明らかとなっていました。

本研究では、生殖細胞形成過程において、nanosとともにPgcと呼ばれる遺伝子が共同して、体細胞性遺伝子を抑制する、つまり、生殖細胞の形成過程で体細胞性遺伝子が発現しないように、強固に二重のロックをかけていることが明らかとなりました。nanos遺伝子は動物種間で保存されていることから、この発見は、多くの動物の生殖細胞形成に共通する体細胞性遺伝子の抑制機構の存在を示唆しており、生殖細胞形成の共通原理を導く第一歩になると期待されます。

本研究の成果は、2019年5月15日付「PLOS Genetics」で公開されました。

- * 本研究は、科学研究費補助金 新学術領域研究 「配偶子産生制御」（研究期間：平成25～29年度）および「配偶子インテグリティの構築」（研究期間：平成30～24年度）によって実施されました。

研究の背景

卵や精子である生殖細胞は、生き物が生存する上で活躍することはありません。もしも体のパーツがなくなったらとても不便ですが、生殖細胞がなくても支障なく生きることができます。体を作る細胞は「体細胞」と呼ばれており、個体の最期とともに死を迎えます。一方、生殖細胞は次の世代を生み出すことができます。生殖細胞から次世代の個体が出来る過程で、再び生殖細胞が作られ、さらに次世代が生み出される。この過程が連綿と繰り返されることにより、生き物は絶えることなく世代交代を続けてきました。すなわち、体を作る体細胞とは異なり、生殖細胞には次世代を生み出せる特殊な能力が備わっているのです。この違いを生み出す機構はどのようなもののでしょうか？多くの動物において、生殖細胞が作られる過程で、体を作るために働く遺伝子（体細胞性遺伝子）の発現が抑制されていることが知られていました。また、ショウジョウバエの生殖細胞の形成にnanosと呼ばれる遺伝子が関わる事を報告した本研究グループの論文を皮切りに（参考文献1）、多くの動物の生殖細胞形成過程においてnanosが発現することも報告されてきました。さらに、nanosの機能が失われると、生殖細胞はその形成途中で体細胞になってしまう事も明らかにしています（参考文献2）。これらのことから、本研究グループは、nanosが体細胞性遺伝子の抑制に関わるのでは、という考えに至りました。

研究内容と成果

本研究では、以下の諸点を明らかにしました。

- ① 細胞は、遺伝子が含まれる「核」とそれを取り巻く「細胞質」で構成されています。本研究グループは、nanosが、フシタラズ (ftz) と呼ばれる体細胞性遺伝子の転写 (mRNA の合成) に必要なタンパク質 (転写因子) を細胞質から核へ移送する働きを抑制することを発見しました。nanos 遺伝子から作られる Nanos タンパク質が、この転写因子の核への移送に関わるインポーチン (Importin- α 2) タンパク質の合成を妨げていたことがわかりました。
- ② nanos の機能を失わせると、生殖細胞の形成過程で体細胞性遺伝子 ftz が発現すると予想されます。しかし実際には、nanos の機能を失わせただけでは、体細胞性遺伝子 ftz は完全に発現はしませんでした。そこで注目したのは、生殖細胞形成過程において、遺伝子の転写に関わる RNA ポリメラーゼ II の活性を低く抑える働きを持つ Pgc と呼ばれるタンパク質です (参考文献3)。このタンパク質の働きを失わせても、体細胞性遺伝子 ftz は発現しませんが、同時に nanos の機能も失わせると、体細胞性遺伝子 ftz が生殖細胞形成過程で発現することを見出しました。

以上のことから、生殖細胞形成過程における体細胞性遺伝子の抑制に nanos が関わること、さらに、そこには nanos だけでなく Pgc も関わっており、体細胞性遺伝子が発現しないよう、二重のロックがかけていることが明らかになりました (図)。

今後の展開

生殖細胞形成過程における体細胞性遺伝子の抑制に、動物種間で保存されている nanos 遺伝子が関わることで、ショウジョウバエで発見されたことは、他の動物における生殖細胞形成に共通する、体細胞性遺伝子抑制機構の存在を示唆します。今後、他の動物についても nanos の働きを明らかにすることにより、生殖細胞形成の共通原理があぶり出されるものと期待されます。

参考図

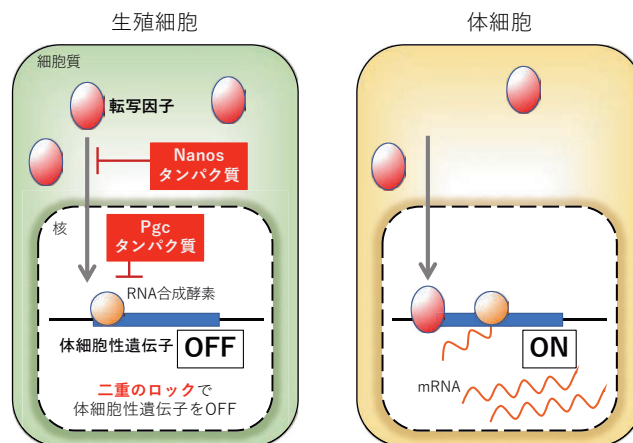


図 生殖細胞における Nanos および Pgc の役割

Nanos は、体細胞性遺伝子（青丸）の転写に必要な転写因子（赤丸）の細胞質から核への移送を抑制し、Pgc は、RNA 合成酵素（オレンジ丸）の働きを抑制する。このような二重のロックにより体細胞性遺伝子の発現が強固に抑制される。一方、体細胞では、Nanos および Pgc による抑制がないため、転写因子が体細胞性遺伝子上流に結合し、RNA 合成酵素が mRNA（赤波線）を転写する（体細胞性遺伝子の活性化）。

参考文献

1. S. Kobayashi, M. Yamada, M. Asaoka and T. Kitamura (1996) Essential role of the posterior morphogen nanos for germline Development in *Drosophila*. **Nature**, 380, 708-711.
2. Y. Hayashi, M. Hayashi and S. Kobayashi (2004) Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germline. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 101, 10338-10342.
3. K. Hanyu-Nakamura, H. Sonobe-Nojima, A. Tanigawa, P. Lasko and A. Nakamura (2008) *Drosophila* Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells. **Nature**, 451, 730-733.

掲載論文

- 【題名】 Maternal Nanos inhibits Importin- α 2/Pendulin-dependent nuclear import to prevent somatic gene expression in the *Drosophila* germline
(ショウジョウバエ生殖系列において、母性ナノス・タンパク質は、インポートイン α 2に依存した核移行を抑制することで体細胞性遺伝子の発現を抑制している)
- 【著者名】 Miho Asaoka, Kazuko Hanyu-Nakamura, Akira Nakamura and Satoru Kobayashi
- 【掲載誌】 PLoS Genetics (DOI: 10.1371/journal.pgen.1008090)

問い合わせ先

小林 悟 (こばやし さとる)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

細胞が自らアレルギーの発症を抑える仕組みを発見

研究成果のポイント

1. 死細胞に特徴的なフォスファチジルセリンの細胞膜上の発現が、生きた肥満細胞でも見られるという常識を破る現象を発見しました。
2. 生きた肥満細胞膜上に発現するフォスファチジルセリンは、肥満細胞自身の活性化を抑制し、アレルギー症状を早く軽快させることを見出しました。
3. 新しい発想の革新的なアレルギー治療法の開発が期待されます。

国立大学法人筑波大学生存ダイナミクス研究センター（TARA） 渋谷 彰教授、医学医療系小田 ちぐさ助教らの研究グループは、アレルギー発症の原因となる肥満細胞の活性化を肥満細胞が自ら抑制し、アレルギーを抑える仕組みがあることを世界で初めて発見しました。

アレルギー反応は、アレルギーの原因となる抗原とIgEと呼ばれる抗体が体内で結合し、これらが全身に分布するマスト細胞上のIgE受容体に結合することによって引き起こされます。肥満細胞上のIgE受容体に抗原とIgE抗体が結合すると、肥満細胞が活性化し、ヒスタミンを代表とする種々の化学物質が肥満細胞から放出され、アレルギー症状が出現します。これは、どのアレルギー疾患の発症にも共通の基本的なメカニズムです。これまでアレルギーに対しては、ヒスタミンの働きを抑える薬剤を中心とする治療がなされてきましたが、対症療法の域を出ないため効果も限定されていました。

本研究では、はじめに、死細胞に特徴的なフォスファチジルセリンというリン脂質の細胞膜上への出現が、アレルギー発症の原因となる生きている肥満細胞でも見られるという、これまでの常識を覆す現象を発見しました。また、フォスファチジルセリンが、肥満細胞の細胞膜上にあるCD300aというタンパク分子と結合し、肥満細胞からのアレルギーを誘導する化学物質の放出を抑えることを見出しました。さらに、重篤な全身性アレルギーの一種であるアナフィラキシーを、フォスファチジルセリンと結合したCD300aが抑制することがわかりました。

これらの結果から、CD300aの働きを増強する薬剤の開発が、これらのアレルギー疾患の革新的な治療につながると期待されます。

本研究成果は、2019年5月30日付米国科学誌「*Journal of Allergy and Clinical Immunology*」のオンライン速報版で公開されます。

研究の背景

花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどをはじめとするアレルギー性疾患は、近年、日本のみならず世界的にも増加の一途を辿っており、世界中のおよそ25%以上の人々が何らかのアレルギー性疾患に罹患しているとされています。これらの患者は、慢性的なアレルギー症状に悩まされるばかりでなく、生命の危機にさえさらされることも稀ではありません。また花粉症をひとつとってみても、これによる医療費や労働効率の低下による経済的損失は、本邦では年間3,000億円にも昇ると試算されています。

アレルギー反応は、アレルギーの原因となる抗原とIgEと呼ばれる抗体が体内で結合し、これらが全身に分布する肥満細胞上のIgE受容体に結合することによって引き起こされます。肥満細胞上のIgE受容体に抗原とIgE抗体が結合すると、肥満細胞が活性化し、炎症反応を誘導するヒスタミンを代表とする種々の化学物質が肥満細胞から放出され、アレルギー症状が出現します。これは、どのアレルギー疾患にも共通するアレルギー発症の基本的なメカニズムです。これまでアレルギーに対しては、ヒスタミンの働きを抑える薬剤を中心として治療がなされてきましたが、対症療法の域を出ないため効果も限定され、より根本的な治療法の開発が望まれていました。

研究内容と成果

リン脂質であるフォスファチジルセリン(PS)は、細胞膜の内側に局在する細胞膜構成成分で、いったん細胞が死ぬと細胞膜外側に表出してくることが知られており、死細胞の特異的なマーカーとして考えられてきました(図1)。しかし今回、アレルギー抗原と結合し活性化した肥満細胞では、活性化後10分程度経過すると、生きている状態でもフォスファチジルセリンが細胞膜外に現れてくるという、これまでの常識を覆す現象を初めて見出しました(図2)。

本研究グループは、以前に肥満細胞などの細胞膜上に発現する蛋白分子であるCD300aを世界に先駆けて発見しています(参考文献1)。さらにCD300aはPSと結合することを見出していました(参考文献2、3)。そこで、肥満細胞上のCD300aが、活性化した後に細胞膜外に出てくるPSと結合する可能性を検討するために、アレルギー抗原で活性化させた肥満細胞について、FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer、蛍光共鳴エネルギー移動)を用いて解析しました。その結果、肥満細胞において、CD300aとPSが結合することを示す証拠が得られました(図3)。

肥満細胞は、アレルギー抗原で活性化すると、アレルギーの直接の原因となるヒスタミンなどの化学物質を含む顆粒を放出します(図4)。この際、PSと結合したCD300aは、それらの化学物質の放出を減少させました(図5)。さらに、マウス生体内において、CD300aは肥満細胞膜上のPSと結合し、アナフィラキシーを軽快させました(図6)。

今後の展開

以上の結果から、アレルギーの原因細胞である肥満細胞は自らを制御し、アレルギーを抑える仕組みを持っていることを明らかにしました(図7)。今後、CD300aの働きを增強する薬剤を開発することで、これらのアレルギー疾患の革新的な治療につながると期待されます。

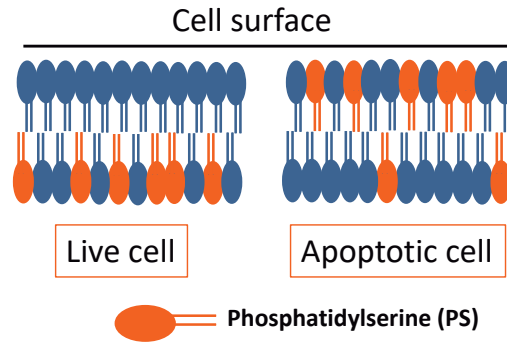


図1. フォスファチジルセリン(PS)は、細胞膜構成成分であるリン脂質である。生細胞(Live Cell)では、細胞膜の内側に局在するが、いったん細胞が死ぬと細胞膜外側に表出してくることが知られ、死細胞(Apoptotic cell)の特異的なマーカーとして考えられてきた。

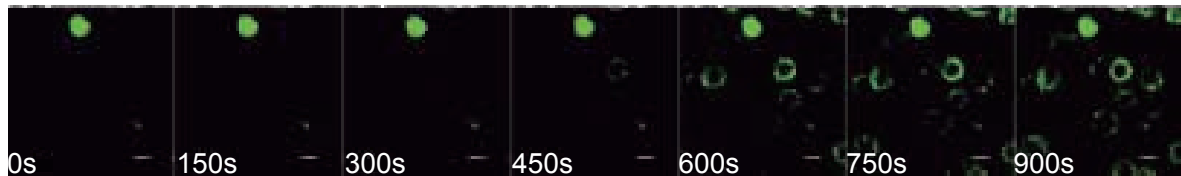


図2. アレルギー抗原と結合し活性化した肥満細胞では、活性化後 10 分(600s)程度経過すると、生きている状態でもフォスファチジルセリン(緑色に標識)が細胞膜外に現れてきた。

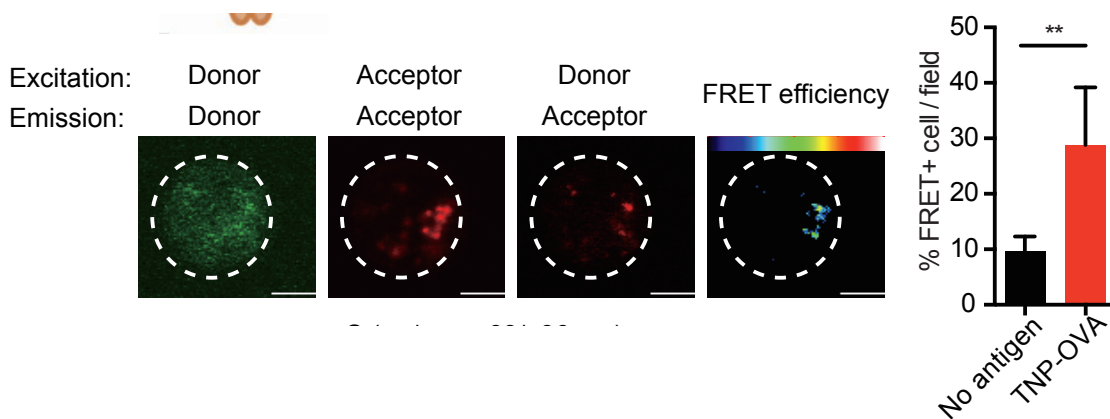


図3. 肥満細胞をアレルギー抗原で活性化させ、FRET を用いて解析した。その結果、CD300a(緑色標識)と PS(赤色標識)は結合すること(緑色と赤色が重なり、青色に変化)が示された(左)。肥満細胞のおよそ 30%でこのような現象が見られた(右)。

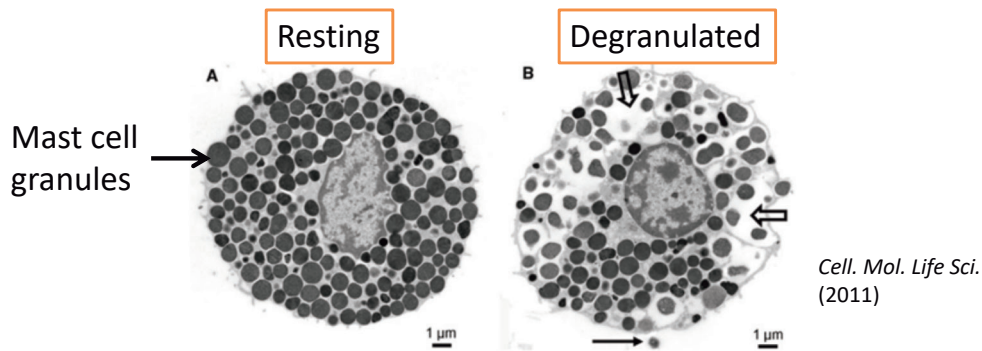


図4. 肥満細胞は細胞質内に多数の大きな顆粒（アレルギーの直接の原因となる化学物質が含まれている）が充満した細胞であることから、肥満細胞と呼ばれている（左）。アレルギーの原因となる抗原が結合すると、顆粒が放出され（右）、アレルギーが発症する。

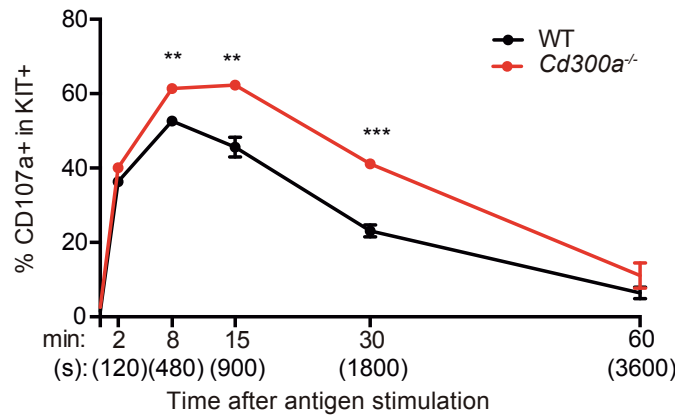


図5. 肥満細胞にアレルギーの原因となる抗原が結合すると、野生型の肥満細胞(黒線)から顆粒(CD107aで標識)が放出されはじめ8分程度でピークを示した(縦軸は顆粒を放出する肥満細胞の割合)。CD300aを欠損する肥満細胞(赤線)では、8分ごろからさらに多くの肥満細胞が顆粒を放出した。この結果は、PSと結合したCD300aは顆粒の放出を抑制したことを示す。

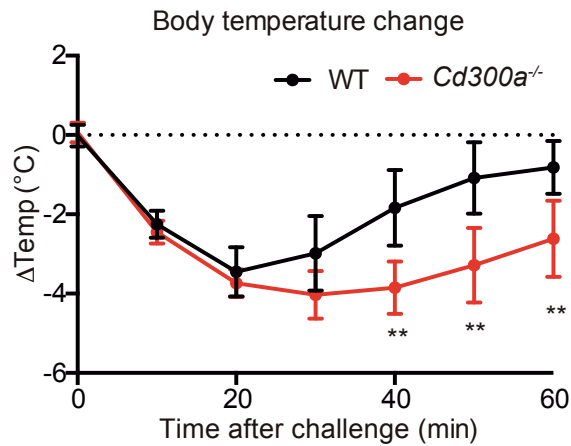


図 6. 重篤な全身性アレルギーであるアナフィラキシーが発症すると、野生型のマウス（黒線）では、体温（直腸温）が急激に低下し、発症後 20 分ごろにピークに達した。CD300a を欠損したマウス（赤線）では、体温低下の回復が著明に遅れた。この結果は、CD300a がアナフィラキシーの症状から早期に回復させていることを示す。

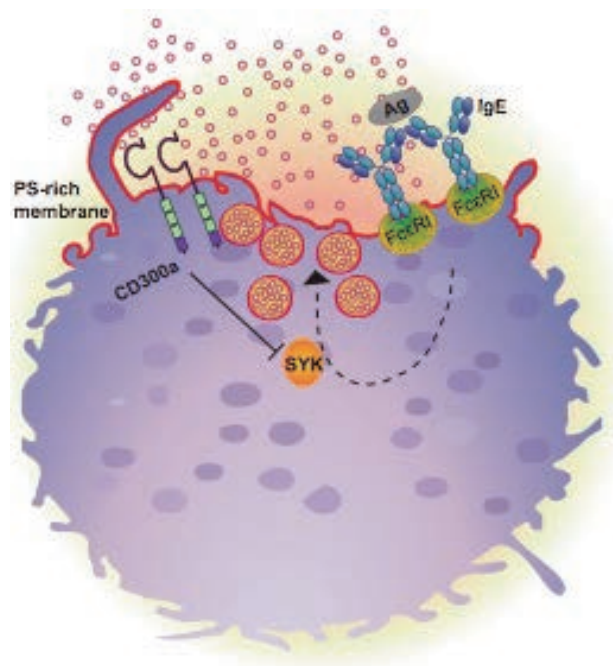


図 7. まとめ

肥満細胞がアレルギー抗原(Ag)と結合すると活性化し顆粒を放出する。この際、細胞表面に PS が出現し CD300a と結合する。PS と結合した CD300a は顆粒を放出させる細胞内シグナル (SYK) に働き、これを抑制することで、顆粒の放出を抑え、アレルギー症状を軽快させる。これは肥満細胞が自律的に顆粒の放出を抑制し、アレルギー症状を終結させる仕組みと言える。

参考文献

1. Yotsumoto, K. Okoshi, Y. Shibuya, K. Yamazaki, S. Tahara-Hanaoka, S. Honda, S. Osawa, M. Kuroiwa, A. Matsuda, Y. Tenen, D. G. Iwama, A. Nakauchi, H. Shibuya, A. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation. **J Exp Med**, 198(2):223-233, 2003
2. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. **J Exp Med**, 209(8):1493-1503, 2012
3. Nakahashi-Oda C, Udayanga KGS, Nakamura Y, Nakazawa Y, Miki H, Iino S, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces. **Nature Immunol**, 17(4):441-450, 2016

掲載論文

- 【題名】 Autonomous regulation of immunoglobulin E-mediated mast cell degranulation and immediate hypersensitivity reaction by an inhibitory receptor CD300a
(CD300a による IgE 誘導性マスト細胞脱顆粒と即時型アレルギーの自己調節機構)
- 【著者名】 Wang Y, Nakahashi-Oda C, Okayama Y, Shibuya A.
- 【掲載誌】 *Journal of Allergy and Clinical Immunology*

問い合わせ先

渋谷 彰 (シブヤ アキラ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター (TARA) 教授

多数の細胞の性質を非破壊で同時に分析する手法を開発

研究成果のポイント

1. 全ての細胞には先天的な蛍光(自家蛍光^{註1)})があります。本研究では、多数の細胞の自家蛍光を同時に解析するテクノロジー CRIF (confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence analysis、共焦点顕微鏡による一細胞内在性蛍光分析法)を開発しました。
2. 自家蛍光の情報から AI(機械学習モデル)で一細胞の性質や種類が予測できることが分かりました。また従来の手法では一度に少数のデータしか得られませんでした。CRIFでは「自家蛍光ビッグデータ」が得られます。
3. 本技術は、細胞にダメージを与えずにその性質を分析できることから、細胞の品質管理技術などに応用されることが期待されます。

国立大学法人筑波大学 生命環境系 八幡穰助教、野村暢彦教授らの研究グループは、多数の細胞の自家蛍光を同時に解析するテクノロジー CRIF (Confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence analysis、共焦点顕微鏡による一細胞内在性蛍光分析法)を開発しました。

ほぼ全ての細胞は自家蛍光を持っており、後天的な蛍光標識を施さなくても、励起光を当てることで蛍光を放ちます。こうした自家蛍光は、それぞれの細胞内の多様なコンポーネントや代謝産物が放つ特徴的な特性をもった蛍光の集合体であり、その特徴(自家蛍光シグネチャー)は、細胞の種類や生理状態を敏感に反映します。そのため、細胞の自家蛍光シグネチャー解析は、細胞の分析を非破壊、非侵襲、無処理で行える手段として広い分野で注目を集めつつあります。

しかしながら、これまでの自家蛍光シグネチャー解析は、細菌コロニーや培養液などの蛍光を、蛍光分光器などで測定する形で行われており、多数の細胞からなる細胞集団の平均値のみに着目していたことから、一度に少数のデータしか得ることができませんでした。

本研究では、形態と位置情報を認識する共焦点反射顕微鏡技術 COCRM (Continuous-optimizing confocal reflection microscopy)と、超高感度蛍光スペクトル共焦点顕微鏡技術、画像処理技術を組み合わせることで、多数の細胞の自家蛍光を同時に解析し、「自家蛍光ビッグデータ」を生成することが可能になりました。さらに、その情報から AI(機械学習モデル)を利用して、個々の細胞の性質や種類が予測できることが分かりました。

本技術は、細胞にダメージを与えずにその性質を分析できることから、細胞の品質管理技術などに応用されることが期待されます。

本研究の成果は2019年8月29日付「Applied and Environmental Microbiology」誌で公開される予定です。また、成果の一部について、特許「データ作成方法及びデータの使用方法」(JPWO2018117273A1)を取得済みです。

* 本研究は、卓越研究員事業(八幡)、科研費新学術領域研究(八幡)、科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 ERATO(野村)の助成によって実施されました。

研究の背景

微生物(細菌、カビ、酵母など)の細胞には、様々な種類や生理状態のものがあります。こうした細胞の性質を見分けたり分析したりする技術は、微生物の有効利用や制御、あるいは生態の解明を行う上で非常に重要です。細胞の分析技術は、たとえば、有用な物質を生産する能力が高い細胞を選抜したり、発酵に用いられる細胞の健康状態を診断したりするなどの場面で必須となってきます。これまで、こうした細胞の分析は、主に培養によって増殖された多数の細胞を破碎し、その内容物(DNAや代謝産物など)を分析することで行われてきました。一方で、微生物の細胞は非常に小さいことから、細胞ごとにその性質を分析したり、細胞が生きたままその性質を分析することは難しいとされてきました。

細胞の性質の一つに「自家蛍光」があります。自家蛍光とは、ほぼ全ての細胞が生まれつき持っている発光性(蛍光)で、それぞれの細胞内の多様なコンポーネントや代謝産物が放つ、特徴的な特性をもった蛍光の集合体であり、そのため細胞自家蛍光の特徴(自家蛍光シグネチャー)は、細胞の種類や生理状態を敏感に反映します。こうした特徴から、細胞の自家蛍光シグネチャー解析は、細胞の分析を非破壊、非侵襲、無処理で行える手段として広い分野で注目を集めつつあります。

しかしながら、これまでの自家蛍光シグネチャー解析は、細菌コロニーや培養液などの蛍光を蛍光分光器などで測定する形で行われており、多数の細胞からなる細胞集団の平均値のみに着目していたことから、一度に少数のデータしか得ることができませんでした。

研究内容と成果

本研究グループは、一細胞が持つ自家蛍光に着目し、生きたまま、その種類や生理状態を予測することができる技術 CRIF (Confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence analysis、共焦点顕微鏡による一細胞内在性蛍光分析法)を開発しました。

CRIFは、形態と位置情報を認識する共焦点反射顕微鏡技術と、超高感度蛍光スペクトル共焦点顕微鏡技術、画像処理技術を組み合わせることで、多数の細胞の自家蛍光を同時に解析し、「自家蛍光ビッグデータ」を生成することを可能にするものです(図1)。複数の波長(色)のレーザーによる励起と、放出される蛍光の波長特性(スペクトル)の分析を組み合わせ、細胞が放出する様々な種類の自家蛍光を網羅的に取得します。細胞集団を顕微鏡で立体スキャンすることで、どのような自家蛍光シグネチャーを持った細胞が、3次元空間のどの座標に存在するかをデータベース化することができます(図2)。

本研究ではさらに、自家蛍光の情報から AI(機械学習モデル)を利用して、細胞の性質や種類が予測できることが分かりました(図3)。これにより、細胞の種の分類や、生理状態(増殖段階)の識別が、95%以上の高い精度で予測可能なことが示されました。

今後の展開

本技術は、1)細胞が生きたまま分析できる、2)一細胞ごとに分析できるので細胞を大量培養する必要が無い、といった特徴があります。この特徴を生かして、有用な物質を生産する能力が高い細胞を素早く選抜したり、発酵に用いられる細胞の健康状態を生きたまま診断したりする新しい技術に発展することが期待されます。

参考図

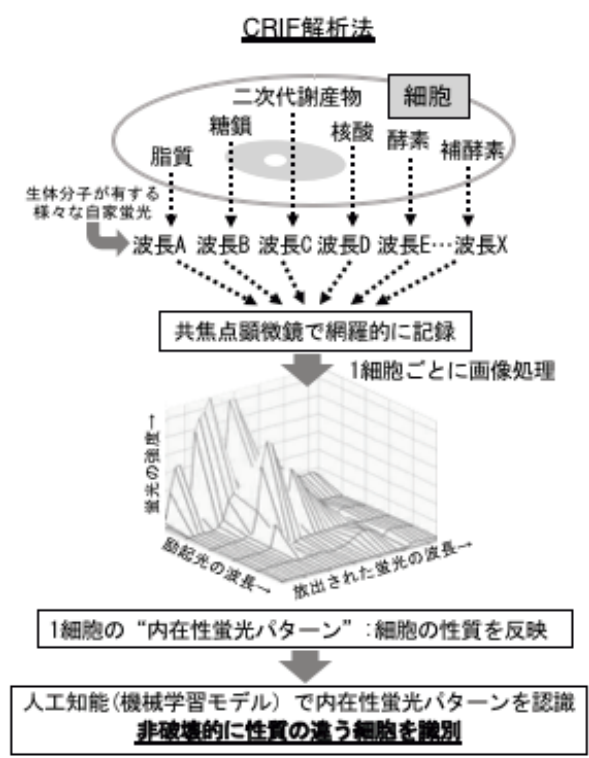


図1 CRIF 法の概念図。個々の細胞から自家蛍光を網羅的に取得し、細胞の性質を分析するフローを示す。

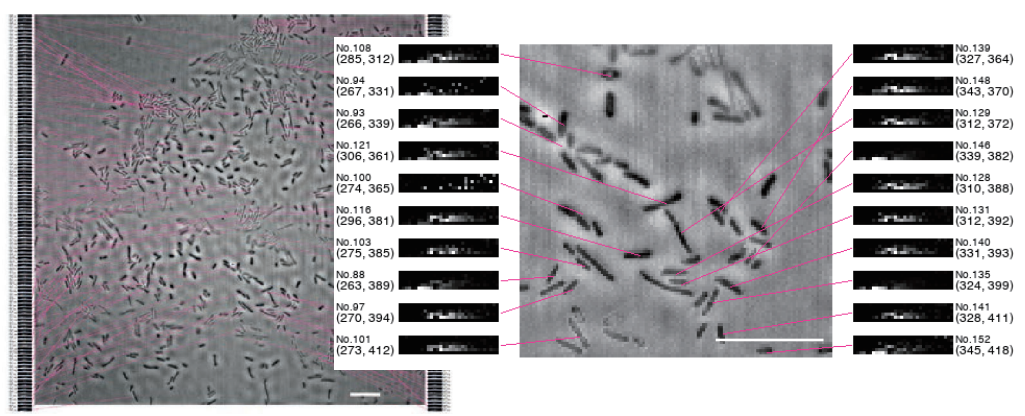


図2 CRIF で得られたデータ(細胞の位置・形態情報とリンクした自家蛍光ハイパースペクトル情報)を可視化した例。
 図左：細菌集団の個々の細胞(黒い部分)に紐付けられた自家蛍光ハイパースペクトルを表示した画像。図右：左パネルの部分拡大図。個々の細胞に番号が振られ、各細胞の座標情報と自家蛍光ハイパースペクトル情報(二次元バーコード状のもの)が紐付けられている様子を示す。自家蛍光ハイパースペクトルは、縦軸に励起波長、横軸に放出波長、グレイスケールが相対強度を示している。

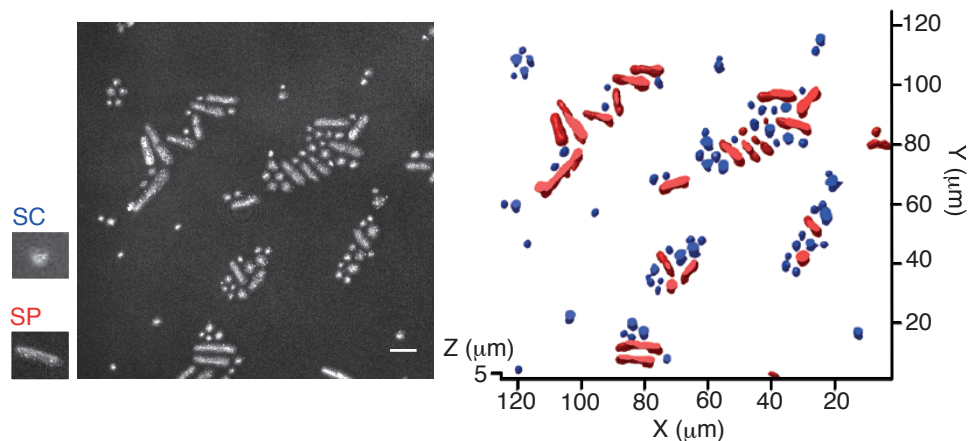


図3 CRIF の応用例(自家蛍光に基づいた Tag-less 細胞種アノテーション)。図左:形態の異なる二種類の酵母の共焦点反射顕微鏡画像。図右:取得した自家蛍光シグネチャーに基づく細胞種の予測。赤と青の色分けが予測の結果。形態の違いと色分けの結果がほぼ一致している。

用語解説

注1) 自家蛍光

後天的な蛍光(例:細胞に対する蛍光タンパク導入、蛍光染色)に対比して、細胞や物質が先天的にもっている蛍光を自家蛍光と呼ぶ。

掲載論文

【題名】 Intra and inter species variability of single-cell innate fluorescence signature of microbial cell
(一細胞自家蛍光の不均一性)

【著者名】 Yawata Y., T. Kiyokawa, Y. Kawamura, T. Hirayama, K. Takabe, N. Nomura.

【掲載誌】 Applied and Environmental Microbiology, Volume 85, Issue 18 (DOI: 10.1128/AEM.00608-19)

問合わせ先

八幡 穰(やわた ゆたか)

筑波大学 生命環境系 助教

野村 暢彦(のむら のぶひこ)

筑波大学 生命環境系 教授

受容体間の機能的相互作用による血管収縮機構を解明

研究成果のポイント

1. ホルモン受容体 APJによる血管収縮には、 $\alpha 1A$ アドレナリン受容体との機能的な協調作用が重要であることが明らかとなりました。
2. 血管平滑筋でAPJを過剰発現するマウス(SMA-APJマウス)の解析から、APJは $\alpha 1A$ アドレナリン受容体との同時刺激で、血管平滑筋の強い収縮を誘導させることを発見しました。
3. 本研究で開発したSMA-APJマウスは、高血圧や血管攣縮の発症メカニズムを理解するための、有用なツールとなることが期待されます。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA)の深水昭吉教授らの研究グループは、ホルモン受容体APJ^{注1)}による血管収縮には $\alpha 1A$ アドレナリン受容体^{注2)}との機能的な協調作用が重要であることを明らかにしました。

ホルモン受容体APJは、血管組織で内皮細胞と平滑筋細胞の両者に発現し、内皮細胞のAPJは血管を拡張し血圧を下げることで知られています^{参考文献1)}。一方、APJは血管を収縮させる作用も示唆されています^{参考文献2, 3)}、その詳細な機構は不明でした。

本研究グループは、血管平滑筋細胞にてAPJ遺伝子を過剰発現するマウス(SMA-APJマウス)を作製し、その機能を解析したところ、本マウスはAPJリガンドであるアペリン^{注1)}の刺激によって血圧が上昇すること、体内で血管を収縮させること、APJと $\alpha 1A$ アドレナリン受容体の同時刺激で単離血管を強力に収縮することを見出しました。また、APJと $\alpha 1A$ アドレナリン受容体がヘテロダイマー(二量体)を形成することを突き止め、これまで知られていなかった、APJと $\alpha 1A$ アドレナリン受容体による血管平滑筋の収縮機構を発見しました。

著しい血管平滑筋の収縮は、血管の狭窄を引き起こし、虚血性心疾患や脳梗塞などのリスクを高めます。従って、本研究で開発したSMA-APJマウスは、正常な血管収縮性制御や血管狭窄の発症メカニズムを探るための有用なツールになると期待されます。

本研究の成果は、2019年9月3日付「*The Journal of Biochemistry*」でオンライン先行公開され、同誌2019年11月号の表紙に選ばれました。

*本研究は、公益財団法人高輝度光科学研究センター(JASRI:課題番号 2012A1631、SPring-8 ビームライン BL28B2、実験責任者 深水昭吉)、国立循環器病センター研究所、千葉大学大学院医学研究院、横浜市立大学医学研究科、聖マリアンナ医科大学腎臓高血圧内科、東京高輪病院との共同研究、そして、豪州モナシュ大学(Biomedicine Discovery Institute and Department of Physiology)との国際共同研究により実施されました。また、日本学術振興会の科学研究費補助金(科研費):基盤研究(A)「アルギニンメチル化酵素と栄養補給路の機能的ネットワークの解明」(25252062:深水昭吉)、基盤研究(C)「受容体間相互作用を介した血管平滑筋APJ受容体による血管狭窄メカニズムの解明」(26430086:石田純治)によって実施されました。

研究の背景

血圧の維持には、血管平滑筋細胞と血管内皮細胞による血管の収縮と弛緩の調節が重要です。本研究グループは、血管組織の平滑筋細胞と内皮細胞の両者に発現するホルモン受容体APJについて、APJが一酸化窒素の産生を介して血管を弛緩することを明らかにしてきました。一方で、APJは血管を収縮させることが示唆されていましたが、その作用の詳細については、明らかになっていませんでした。

研究内容と成果

本研究では、血管平滑筋細胞にてAPJ遺伝子を過剰発現するマウス(SMA-APJマウス)を作製し、血管の収縮機能の解析を行いました。その結果、APJリガンドのアペリン(ペプチド)の刺激によってSMA-APJマウスの血圧が上昇すること、また、SPring-8での*in vivo*(生体内)血管イメージング解析から、アペリン刺激がSMA-APJの血管を収縮させることを明らかにしました。さらに、SMA-APJマウスからの単離血管を用いた解析により、APJは α 1Aアドレナリン受容体との同時刺激で、血管を強力に収縮すること(図1)、および、APJと α 1Aアドレナリン受容体がヘテロダイマーを形成することを突き止め、これまで知られていなかったAPJと α 1Aアドレナリン受容体による血管平滑筋の収縮機構を明らかにしました。以上の結果は、ホルモン受容体APJによる血管収縮には、 α 1Aアドレナリン受容体との機能的な協調作用が重要であることを示しています(図2)。

今後の展開

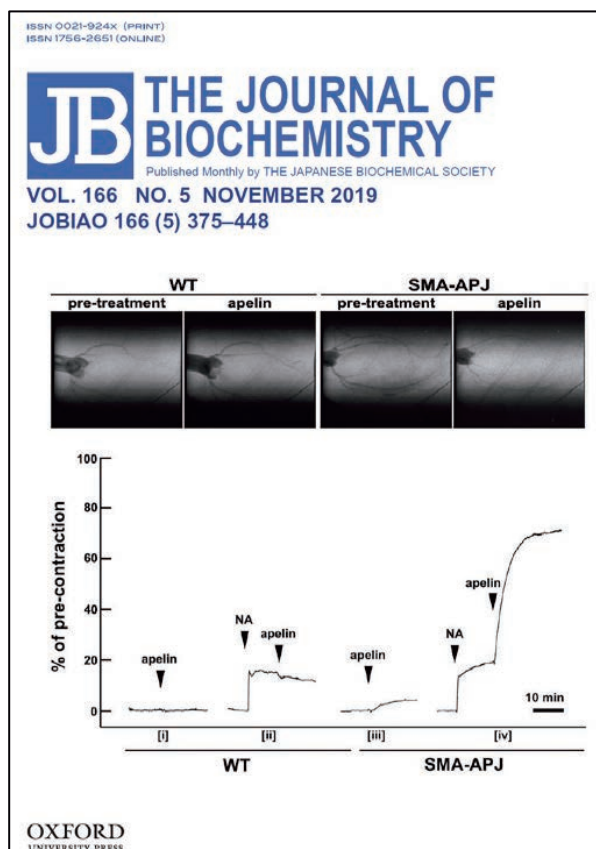
血管平滑筋の著しい収縮は、血管の狭窄の原因となり、虚血性心疾患や脳梗塞など、心血管疾患のリスクを高めますが、血管収縮の詳細な制御機構の解明は途上です。本研究で開発したSMA-APJマウスは、正常な血管の収縮の制御の仕組みや、血管狭窄の発症メカニズムを探るための有用なモデル動物になると期待されます。

参考図

図1: The Journal of Biochemistry 掲載号表紙

【表紙: 上パネル】 高輝度光科学研究センターSPring-8施設を用いた*in vivo*血管造影: SMA-APJマウスへのAPJ受容体リガンド(apelin)の投与で、心臓冠動脈血管が収縮し、一部の走行血管が消失しました。

【表紙: 下パネル】 リガンド刺激による単離血管の収縮解析: 野生型マウス(WT)の血管では、apelin刺激で血管が弛緩したのに対し(i および ii)、SMA-APJマウスの血管では、apelinで収縮を認め(iii)、ノルアドレナリン(NA)とapelinとの同時刺激で、より強い血管の収縮が観察されました(iv)。



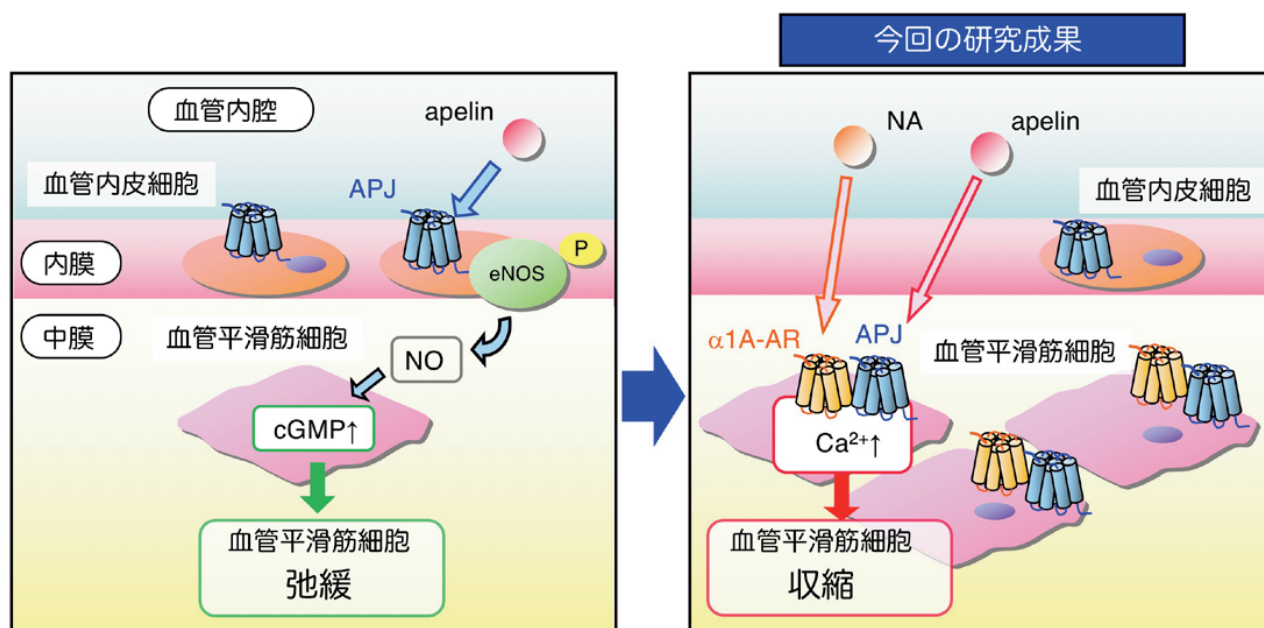


図2: 血管組織での APJ を介した血管収縮の調節

血管の内膜には内皮細胞が、中膜には平滑筋細胞が存在します。血管内皮細胞の APJ は、リガンドである apelin 刺激で一酸化窒素合成酵素(eNOS)によって NO が産生され、cGMP を介して血管を弛緩させることがこれまで分かっていました(上図:左)。今回の研究から、血管平滑筋細胞の APJ が、 $\alpha 1A$ -アドレナリン受容体($\alpha 1A$ -AR)と相互作用することで、協調的な血管収縮の調節に重要であることが明らかになりました(上図:右)。

用語解説

注1) ホルモン受容体 APJ (apelin-APJ 系)

APJ は、血圧制御に重要なアンジオテンシン I 型受容体(AT1)と高い相同性を有する 7 回膜貫通型受容体で、リガンドとして apelin ペプチドが同定されています。APJ は血管や心臓などの循環器系で高く発現し、血管の収縮や血圧の調節に加え、心臓の機能制御にも重要なホルモン受容体系です。

注2) $\alpha 1A$ アドレナリン受容体

アドレナリン受容体は、アドレナリン、ノルアドレナリン(NA)を始めとするカテコールアミン類によって活性化される 7 回膜貫通型受容体で、 $\alpha 1A$ アドレナリン受容体は、主に血管平滑筋に存在し、リガンド刺激により細胞内の Ca^{2+} 流入量の増加を介した血管の収縮制御や前立腺の収縮などに関わっています。

参考文献

- 1) Ishida J, *et al.* J. Biol. Chem. 279: 26274–26279 (2004)
- 2) Hashimoto T, *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 6: 1267–1272 (2006)
- 3) Nagano K, *et al.*, Mol. Med. Rep. 5: 1371–1375 (2013)

掲載論文

【題名】 Cooperative action of APJ and $\alpha 1A$ -adrenergic receptor in vascular smooth muscle cells induces vasoconstriction
(血管平滑筋細胞 APJ は $\alpha 1A$ アドレナリン受容体との協調作用により血管収縮を誘発する)

【著者名】 Katsumasa Nagano[†], Chulwon Kwon[†], Junji Ishida, Tatsuo Hashimoto, Jun-Dal Kim, Nana Kishikawa, Mei Murao, Kenjiro Kimura, Yoshitoshi Kasuya, Sadao Kimura, Yi-Ching Chen, Hirotsugu Tsuchimochi, Mikiyasu Shirai, James T. Pearson, and Akiyoshi Fukamizu

† These two authors contributed equally to this work

【掲載誌】 *The Journal of Biochemistry* (2019) (DOI: 10.1093/jb/mvz071)

問合わせ先

深水 昭吉(ふかみず あきよし)

筑波大学生存ダイナミクス研究センター(TARA) 教授

老化を誘発する仕組みを解明
～グリシン摂取が老化の緩和に有効である可能性～

研究成果のポイント

1. ヒトの老化に伴うエネルギー欠乏が誘発される仕組みを、*Shmt2*^{※1)}遺伝子破壊マウスで明らかにしました。
2. *Shmt2*破壊は、マウス胎児肝臓に「エネルギー欠乏による細胞分化^{※2)}遅延」を誘発するだけでなく、「核酸欠乏による細胞分裂遅延」も誘発することがわかりました。
3. 細胞分化遅延は、*Shmt2*破壊に伴い、グリシン^{※3)}の枯渇によるタウリン^{※4)}枯渇がエネルギー欠乏を誘発したために、また細胞分裂遅延は、グリシン枯渇によるヌクレオチド^{※5)}枯渇が核酸欠乏を誘発したために生じ、いずれもが胎児貧血の原因となりました。
4. ヒトの老化症状の一つであるエネルギー欠乏に加え、細胞分裂遅延にも *SHMT2* 遺伝子が関係し、これらの老化症状の改善にはグリシン摂取が有効である可能性が示唆されました。

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA)の林 純一名誉教授らの研究グループは、ヒトの老化に伴うエネルギー欠乏に、核遺伝子 *SHMT2* が関係していることに注目し、その仕組みを *Shmt2* 遺伝子破壊マウスを用いて解明しました。

本研究グループは、*Shmt2* 遺伝子破壊マウスが13.5日胚で貧血を起こし、その後胚致死になることに着目し、以下の2点を明らかにしました。

(1) *Shmt2* 遺伝子破壊により、主に胎児肝臓で細胞分化遅延と細胞分裂遅延が誘発され、胎児肝臓の85%を構成する造血細胞が枯渇し、貧血になること。

(2) この時、胎児肝臓ではグリシンが枯渇し、これがタウリン枯渇とヌクレオチド枯渇を誘発すること、そしてタウリン枯渇はエネルギー欠乏による細胞分化遅延を、ヌクレオチド枯渇は核酸枯渇による細胞分裂遅延を誘発すること。

この結果は、ヒトの老化に伴うエネルギー欠乏のみならず、老化に伴う細胞分裂遅延の回復にも、グリシン摂取が有効である可能性を示唆しています。

本研究の成果は2019年11月5日付「Scientific Reports 電子版」に掲載されました。

* 本研究は、筑波大学とフィンランド・ヘルシンキ大学との国際共同研究によって行われたもので、一部は日本学術振興会の科学研究費補助金(基盤研究A課題番号16H02463;基盤研究B課題番号19H03141、研究代表者 林 純一)などの支援により実施されました。

研究の背景

ヒトは老化に伴いエネルギー欠乏になりますが、その原因については様々な仮説が提出されています。本研究グループはこれまでに、「ヒトの老化に伴うエネルギー欠乏の原因が、突然変異ではなくゲノム修飾^{注6)}による可逆的な遺伝子発現の変化であり、特に *SHMT2* 遺伝子の発現低下が重要である」という新仮説を提出し^{文献1)}、この遺伝子を破壊したマウスに、胎児貧血と胚致死が誘発されることも明らかにしました^{文献2)}。そして今回、*Shmt2* 遺伝子破壊マウスの胎児組織を用いた質量分析等により、この新仮説の一部を検証しました(図1)。

研究内容と成果

上述の進化説のうち、「ヒトの老化に伴うエネルギー欠乏の原因として、*SHMT2* 遺伝子の発現量低下が重要である」という部分を検証するため、まず *Shmt2* 遺伝子破壊マウスを用いて、胚致死前(13.5 日胚)の肝臓と脳のエネルギー産生能を調べたところ、確かに、肝臓で著しいエネルギー欠乏が生じていました。

エネルギー欠乏は成体の造血組織である骨髄の造血細胞分化を抑制することから、胎児の造血組織である肝臓の造血細胞分化を調べたところ、*Shmt2* 遺伝子破壊マウスの細胞分化も抑制されていました。さらに肝臓の重量も低下しており、肝臓内にある造血細胞の細胞分裂遅延も明らかになりました。マウス 13.5 日胚の肝臓は 85%が造血細胞で構成されていることから、これらの結果は、エネルギー欠乏による造血細胞分化遅延と、造血細胞の分裂遅延が原因で、胎児貧血が誘発されたことを示しています(図2)。

また、*Shmt2* 遺伝子破壊によりどのような仕組みでエネルギー欠乏と細胞分裂阻害になるのかを質量分析等で調べた結果、グリシン枯渇のみならずタウリン枯渇とヌクレオチド枯渇も誘発されていました。タウリンはエネルギー産生に、ヌクレオチドは核酸合成に必須であるため、両者の枯渇が、それぞれエネルギー欠乏と細胞分裂遅延につながったと考えられます(図2)。

Shmt2 遺伝子の働きはセリンからグリシンへの変換であるため(図2)、*Shmt2* 破壊による胎児肝臓でのグリシン枯渇は予想通りでしたが、脳ではグリシン欠乏が見られません。これは *Shmt2* 遺伝子とは別の遺伝子(*Gcat* 等)を使ってスレオニンからグリシンを得ているためです(図3)。一方、この時期の肝臓は、活発な細胞分裂と細胞分化で大量の血球を作るために *Shmt2* 遺伝子の発現を高めており、これが原因で *Shmt2* 遺伝子破壊が胎児貧血を誘発したと思われます。

今後の展開

ヒト *SHMT2* 遺伝子の異常が原因の胎児貧血は、妊婦がグリシンを摂取することで緩和される可能性があります。これについて、*Shmt2* 遺伝子破壊マウスで検証していきます。

また本研究により、ヒト *SHMT2* 遺伝子の発現低下が「ヒトの老化に伴うエネルギー欠乏」のみならず、「ヒトの老化に伴う細胞分裂遅延」の原因である可能性が示唆されました。従って、グリシン摂取がこの両方を緩和することが期待されます。

一方、*SHMT2* 遺伝子の発現抑制はがん細胞の分裂速度も抑制されるという報告もあります。そうだとすれば、ヒトの老化に伴う *SHMT2* 遺伝子の発現抑制は、エネルギー欠乏と細胞分裂遅延を来すという負の側面と同時に、老化とともに発症頻度が高まるがん細胞の増殖(細胞分裂)を抑制し、逆に健全な老化(長寿)に貢献している、つまり老化を促進することでがん化を抑制するという別の側面もあります。グリシン摂取については、今後さらに、がん細胞の増殖を促進する可能性を考慮した研究が必要です。

る。これらが胎児貧血の原因となる。このことは妊婦のグリシン摂取が胎児貧血を改善する可能性を示唆している。

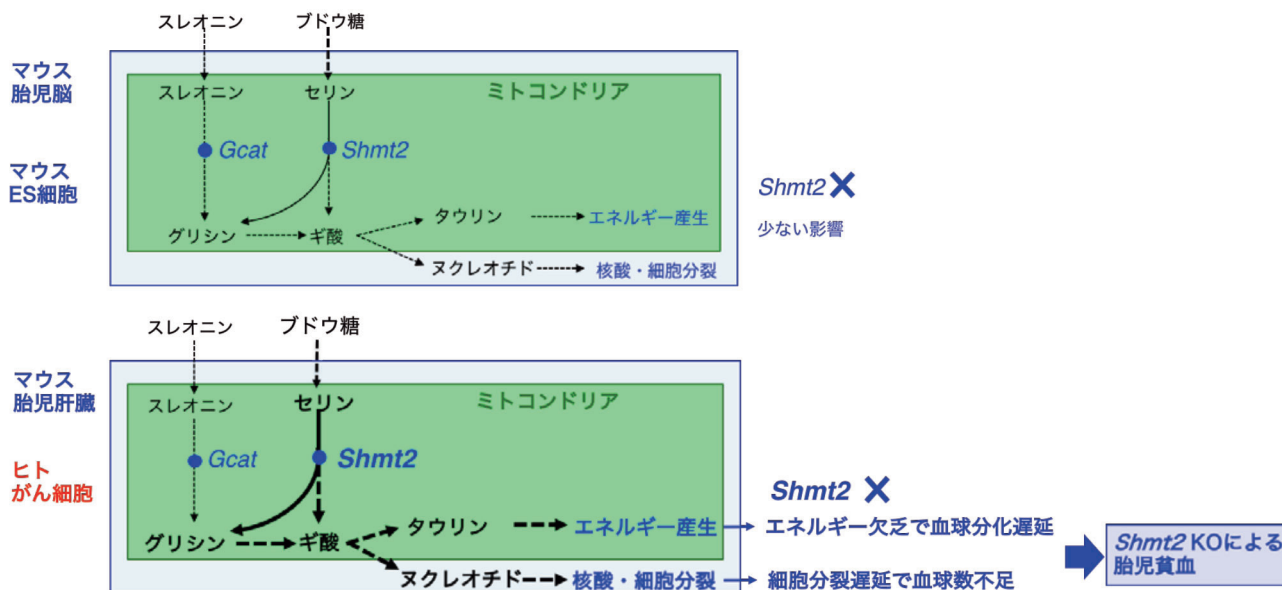


図3 マウス胎児肝臓特異的に代謝異常が発現する仕組み

Shmt2 遺伝子の働きはセリンからグリシンへの変換であるため、*Shmt2* 遺伝子破壊による胎児肝臓でのグリシン欠乏は予想通りだが、胎児脳ではグリシン欠乏が見られない。これは胎児の脳では *Shmt2* 遺伝子とは別の遺伝子を使ってスレオニンからグリシンを得ているためである。胎児肝臓でもこの経路は使われているが、ここではさらに活発な細胞分裂と細胞分化で大量の血球を作るために *Shmt2* 遺伝子の発現を高めており、これが原因で *Shmt2* 遺伝子破壊が胎児貧血を誘発した。

用語解説

注1) *SHMT2*

アミノ酸の一種であるセリンをグリシンに可逆的に変換(図2)する酵素をコードする遺伝子。遺伝子名はイタリック表記し、ヒトの遺伝子でのみ全て大文字表記(ヒト *SHMT2* 遺伝子、マウス *Shmt2* 遺伝子)。

注2) 細胞分化

未分化な幹細胞が何らかの生理機能を獲得する過程のこと。

注3) グリシン

アミノ酸の一種。今回の研究では、核遺伝子 *Shmt2* を破壊するとグリシン枯渇が誘発され、グリシン枯渇はタウリン枯渇とヌクレオチド枯渇を誘発し、タウリン枯渇はエネルギー欠乏を、ヌクレオチド枯渇は核酸欠乏による細胞分裂遅延を引き起こすことが判明した。従ってグリシン摂取はヒト老化に関連したエネルギー欠乏と細胞分裂遅延を改善する可能性がある。

注4) タウリン

ミトコンドリア内のタンパク質合成に必須なアミノ酸で、これが枯渇するとミトコンドリア呼吸酵素複合体が枯渇し、エネルギー欠乏を誘発する。

注5) ヌクレオチド

核酸(DNA と RNA)の構成成分で、これが枯渇すると核酸欠乏になるため、DNA 複製とその後の細胞分裂が遅延する。

注6) ゲノム修飾

遺伝子の転写調節領域等が修飾(メチル化等)されることで、遺伝子発現が制御される。突然変異と異なる

り、ゲノム修飾は修飾が外れる(脱メチル化される)ことで元に戻すこと(初期化)ができる可逆的現象である。

参考文献

文献1) Hashizume, O. et al. Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects. *Sci. Rep.* 5, 10434, 10.1038/srep10434 (2015).

文献2) Tani, H. et al. Mice deficient in the Shmt2 gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal. *Sci. Rep.* 8, 425, 10.1038/s41598-017-18828-3 (2018).

掲載論文

【題名】 Disruption of the mouse Shmt2 gene confers embryonic anaemia via foetal liver-specific metabolomic disorders

(Shmt2 遺伝子破壊はマウス胎児肝臓に特異的な代謝系異常に起因する胎児性貧血を誘発する)

【著者名】 Haruna Tani, Takayuki Mito, Vidya Velagapudi, Kaori Ishikawa, Moe Umehara, Kazuto Nakada, Anu Suomalainen, Jun-Ichi Hayashi

谷 春菜、石川 香、梅原 萌、中田 和人、林 純一(筑波大学);三藤 崇行、Vidya Velagapudi、Anu Suomalainen(ヘルシンキ大学)

【掲載誌】 *Scientific Reports* (DOI: 10.1038/s41598-019-52372-6)

問い合わせ先

林 純一(はやし じゅんいち)

筑波大学名誉教授

生存ダイナミクス研究センター長

2019年12月4日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学

薬剤性急性肝障害を予防する新しい細胞の働きを発見

研究成果のポイント

1. 肝臓に存在する1型自然リンパ球という極めて少数の細胞が、薬剤による急性肝障害を抑制することを世界で初めて発見しました。
2. 1型自然リンパ球が産生する免疫活性化因子インターフェロン γ ^{注1)}が、肝細胞の死を抑制することを見出しました。
3. 薬剤の副作用による急性肝障害に対する新しい予防法の開発が期待されます。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 渋谷彰教授、鍋倉宰助教らは、薬剤の副作用による急性肝障害を抑制する新しい細胞の働きを世界で初めて発見しました。

総合感冒薬（風邪薬）、解熱鎮痛薬、抗生物質、抗がん剤、漢方薬など、普段使われる多くの薬剤の副作用で最も多いものの一つとして、急性肝障害が知られています。重篤になると死亡するケースも見られることから、早期発見、早期対策が重要です。しかし、薬剤の副作用による急性肝障害がどのように発症するかについては未解明の点が多く、またそれを予防する方法は現在のところありません。

本研究では、肝臓に存在する1型自然リンパ球という極めて少数の特殊な細胞が、薬剤による急性肝障害を抑制することを、世界で初めて発見しました。薬剤により肝細胞に障害が起きると1型自然リンパ球が活性化し、インターフェロン γ が産生され、これが肝細胞の死を抑制することを証明しました。

1型自然リンパ球の活性化を亢進する薬剤を開発することで、急性肝障害の予防が可能になると期待されます。

本研究成果は、2019年12月3日付で米国科学誌「Immunity」のオンライン速報版で公開されました。

研究の背景

肝臓は生命維持に必要なさまざまな働きをする大切な臓器です。薬剤の代謝（化学変化）は肝臓で行なわれることが多く、さまざまな代謝産物が肝臓に出現するため、副作用として肝障害が多いと考えられています。実際に、総合感冒薬（風邪薬）、解熱鎮痛薬、抗生物質、抗がん剤、漢方薬など、普段使われる多くの薬剤の副作用の中で、急性肝障害は最も多いものの一つです。重篤なものでは死亡するケースも見られることから、早期発見、早期対策が重要です。しかし、薬剤の副作用による急性肝障害がどのように発症するかについては未解明の点が多く、またそれを予防する方法は現在のところありません。

一方、最近、肝臓内に1型自然リンパ球と呼ばれる特殊な細胞が存在することがわかってきました。しかし、その数は肝臓に存在する免疫細胞のおよそ2%前後で（図1）、肝臓を構成する肝細胞のわずかに200分の1程度しかありません。しかも、1型自然リンパ球の肝臓における働きはほとんどわかっていませんでした。

研究内容と成果

本研究では、薬物の副作用による急性肝障害の発症の仕組みを明らかにする目的で、1型自然リンパ球（ILC1）に着目しました。急性肝障害を誘導する薬物として四塩化炭素（CCl₄）を用いました。CCl₄を投与した野生型マウスでは、投与前と比べてILC1の割合に変化はありませんでした（図1）。

また、CCl₄を投与した野生型マウスでは、肝障害のマーカーである酵素のALTが上昇しましたが、肝臓でILC1が激減しているマウス（*Zfp683*^{-/-}）では、野生型マウスの4倍ほど高いALT値を示し、急性肝障害が顕著に悪化しました（図2）。この結果は、ILC1が薬剤性急性肝障害を抑制することを示しています。

次に、ILC1が薬剤性急性肝障害を抑制するメカニズムを解明するために、ILC1が産生するインターフェロン γ に着目しました。薬剤投与後、活性化したILC1は、徐々にインターフェロン γ の産生を増加させました（図3A）。一方、インターフェロン γ を欠損するマウスでは、野生型マウスに比べて、肝障害がより悪化し（図3B）、同時に、細胞死抑制分子であるBcl-xLの発現も低下しました（図3C）。これらの結果から、ILC1はインターフェロン γ を産生し、肝細胞のBcl-xLの発現を亢進させることで、肝障害を抑制していることが示唆されました。

ILC1が薬剤性急性肝障害を抑制することをさらに確認するために、ILC1が存在しないマウス（*Rag2*^{-/-}/*Il2rg*^{-/-}）に薬剤を投与したところ、重篤な肝障害が出現しましたが、このマウスの肝臓の静脈にILC1を移入し、肝臓にILC1を定着させると、薬剤を投与しても肝障害はほとんど起きませんでした（図4）。

以上の結果から、ILC1は薬剤により肝障害が発生するとインターフェロン γ を産生し、肝細胞内で細胞死抑制分子であるBcl-xLの発現を増加させ、肝細胞死を低下させることで肝障害を抑制することが明らかとなりました。

今後の展開

本研究は、これまで不明であった肝臓内のILC1の機能、および薬剤性急性肝障害の発症をILC1が抑制することの2点を世界で初めて明らかにしたことで、高い意義があります。今後、ILC1の機能を亢進させる薬剤を開発することにより、薬剤性急性肝障害の予防法の開発につながることを期待されます。

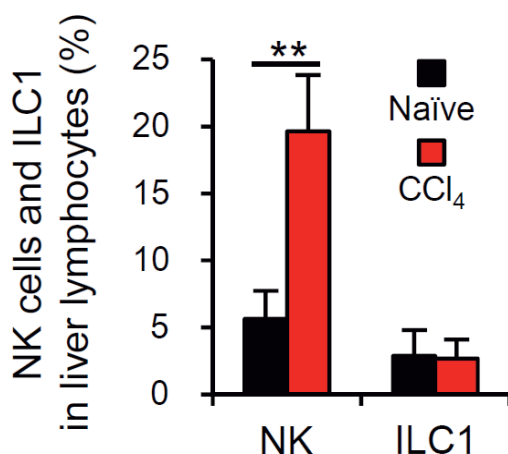


図 1. 肝臓における 1 型自然リンパ球(ILC1)の割合

肝臓に存在する、インターフェロン γ を産生できる NK 細胞^{注2)}と ILC1 の全免疫細胞における割合をフローサイトメーターで解析した。NK 細胞は薬剤 (CCl₄) の投与後に増加したが、ILC1 は変化せず、およそ 2%前後で極めて少数であった。

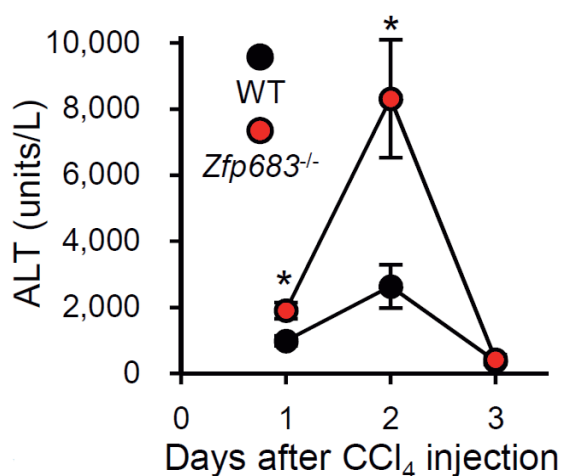


図 2. 薬剤 (CCl₄) 投与後の肝障害の出現

野生型マウスと肝臓で ILC1 が激減しているマウス (*Zfp683*^{-/-}) に薬物を投与し、経時的に肝障害の程度を観察した。野生型マウスでは投与 2 日目に肝障害により ALT が増加した。しかし、*Zfp683*^{-/-}マウスでは、野生型マウスと比較し、そのおよそ 4 倍も上昇した。このことから、ILC1 は薬剤による肝障害を抑制することが明らかとなった。

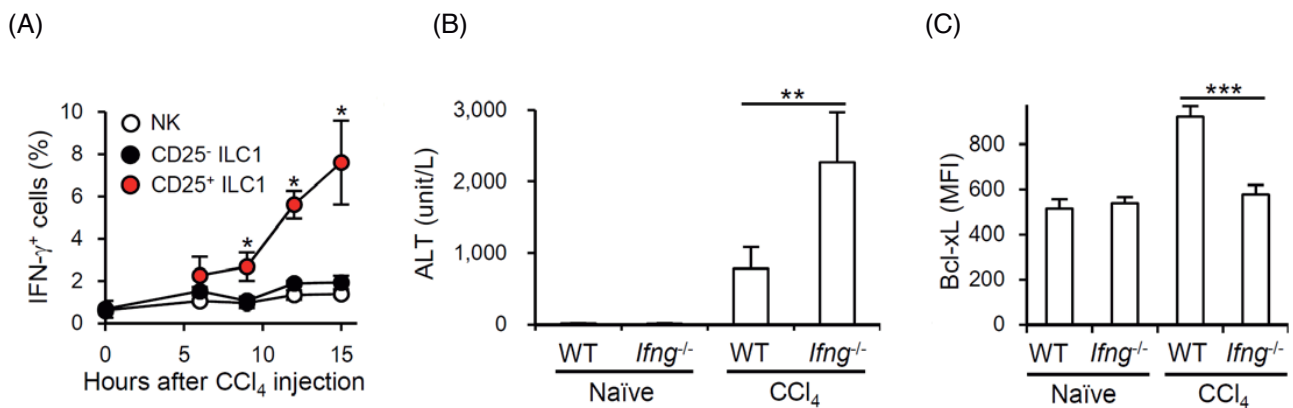


図 3. ILC1 はインターフェロン γ を産生し、肝細胞の Bcl-xL の発現を亢進させる。

- (A) 薬剤 (CCl₄) 投与後にインターフェロン γ を産生する肝臓内の ILC1 および NK 細胞の割合を経時的に解析した。活性化した ILC1 (CD25⁺ ILC1) では時間を追ってインターフェロン γ を産生する細胞が増加したが、非活性 ILC1 (CD25⁻ ILC1) および NK 細胞では増加しなかった。
- (B) 野生型(WT)マウスおよびインターフェロン γ 遺伝子欠損 (*Ifng*^{-/-}) マウスに薬剤 (CCl₄) を投与し、肝障害の程度を解析した。*Ifng*^{-/-}マウスは野生型マウスに比較し、著明に肝障害が増悪した。
- (C) 野生型(WT)マウスおよびインターフェロン γ 遺伝子欠損 (*Ifng*^{-/-}) マウスに薬剤 (CCl₄) を投与し、肝細胞の細胞死抑制分子である Bcl-xL の発現を解析した。*Ifng*^{-/-}マウスは野生型マウスに比較し、有意に Bcl-xL の発現が低下した。

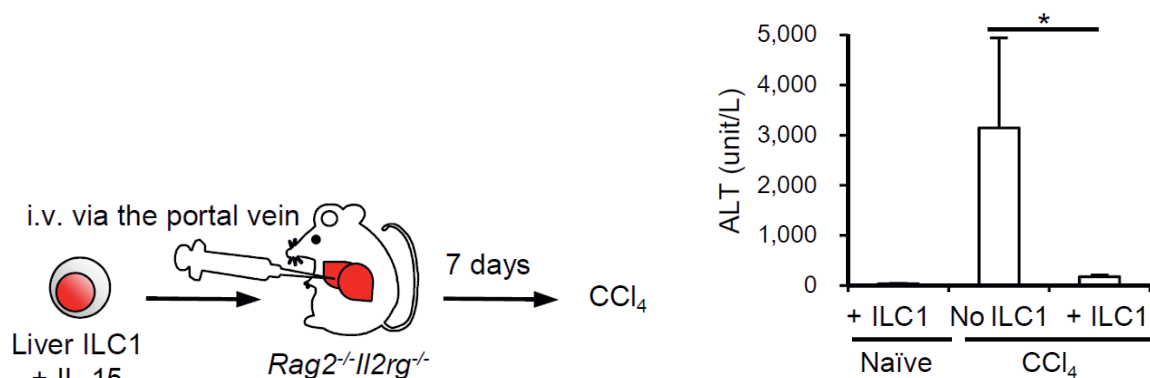


図 4. ILC1 は薬剤による肝障害を抑制する。

ILC1 が存在しないマウス (*Rag2*^{-/-} *Il2rg*^{-/-}) に薬剤 (CCl₄) を投与すると ALT が顕著に上昇し、重篤な肝障害が見られたが、このマウスの肝臓の静脈に ILC1 を移入し、肝臓に ILC1 を定着させると、薬剤 (CCl₄) を投与しても肝障害がほとんど起きなかった。

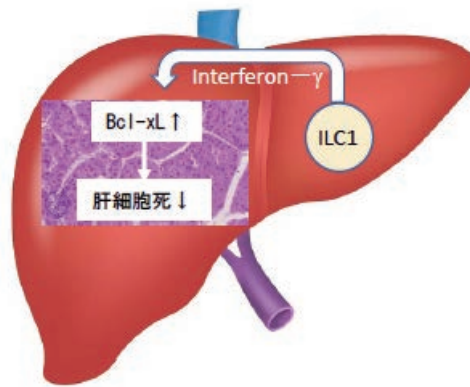


図 4. 本研究のまとめ

ILC1 は薬剤の投与によって活性化するとインターフェロン γ を産生し、肝細胞内で細胞死抑制分子である Bcl-xL の発現を増加させ、薬剤による肝細胞死を低下させることで肝障害を抑制する。

用語解説

注1) インターフェロン γ

リンパ球が産生し、ほぼ全ての炎症反応や免疫応答に関与する免疫活性化因子

注2) NK 細胞

T 細胞や B 細胞などと並ぶ代表的なリンパ球の一つ。がん細胞やウイルス感染細胞などを殺す働きを持つ。

掲載論文

【題名】 Type 1 innate lymphoid cells protect mice from acute liver injury via interferon- γ secretion for upregulating Bcl-xL expression in hepatocytes

(1型自然リンパ球はインターフェロン γ の産生により肝細胞の Bcl-xL の発現を上昇させ、急性肝障害からマウスを防御する)

【著者名】 Tsukasa Nabekura, Luke Riggan, Andrew D. Hildreth, Timothy E. O'Sullivan, and Akira Shibuya

【掲載誌】 Immunity (DOI: 10.1016/j.immuni.2019.11.004)

問合わせ先

渋谷 彰 (シブヤ アキラ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター、革新的創薬開発研究センター、医学医療系 教授

ダニによるアトピー性皮膚炎を抑制する分子の発見

研究成果のポイント

1. アトピー性皮膚炎を自然発症するマウスの原因遺伝子として、Clec10a（ヒトではAsgr1）を発見しました。
2. Clec10a は皮膚のマクロファージに発現し、ダニによるアトピー性皮膚炎を抑制することを明らかにしました。
3. Clec10a と結合するダニの成分がムチン様分子^{注1)}であることを同定し、これを塗布すると、アトピー性皮膚炎が軽快することを示しました。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 渋谷彰教授と医学医療系 金丸和正助教らは、産業技術総合研究所 館野浩章上級主任研究員と共同で、ダニが引き起こすアトピー性皮膚炎を抑制する分子を世界で初めて発見しました。

我が国でのアトピー性皮膚炎の患者数は、およそ50万人と推定されていますが、その数は年々増加し、25年前と比べると倍増しています。特に小児においては、10%以上がアトピー性皮膚炎に罹患しているとされています。アトピー性皮膚炎を含めた通年性アレルギー性疾患の原因として、ダニがおよそ8割を占めるとされていますが、ダニによるアトピー性皮膚炎の発症のメカニズムは不明の点も多く、また従来薬剤では効果がない難治性患者も数多くいます。

本研究では、ダニによるアトピー性皮膚炎を自然発症するNC/Ngaと呼ばれるマウスのゲノム遺伝子を解析し、7万個余りの遺伝子変異を見出しました。さらに、その中から皮膚のマクロファージに発現するClec10a（ヒトではAsgr1）という遺伝子の変異が、ダニによるアトピー性皮膚炎の原因遺伝子であることを突き止めました。そこで、Clec10aを欠損するマウスを解析したところ、このマウスは、野生型マウスと比べて、ダニによるアトピー性皮膚炎が発症しやすいことから、Clec10aがダニによるアトピー性皮膚炎を抑制することが明らかになりました。驚くべきことに、ダニの成分には、アトピー性皮膚炎を誘導する分子の他に、Clec10aと結合するムチン様分子が含まれており、これをダニから抽出し、アトピー性皮膚炎に直接塗布すると、症状が軽快することがわかりました。

以上の結果から、ダニが原因となるアトピー性皮膚炎の新しい治療薬の開発が可能となり、従来薬剤で効果がなかった患者にも、新たな治療薬の選択肢を提供できることが期待されます。

本研究成果は、2019年12月6日付で米国科学誌「Science Immunology」のオンライン速報版で公開されました。

研究の背景

我が国でのアトピー性皮膚炎の患者数は、およそ50万人と推定されていますが、その数は年々増加し、25年前と比べると倍増しています。特に小児においては、10%以上がアトピー性皮膚炎に罹患しているとされています。アトピー性皮膚炎を含めた通年性アレルギー性疾患の原因として、ダニがおよそ8割を占めるとされています。しかし、ダニによるアトピー性皮膚炎の発症のメカニズムは充分解明されていません。

アトピー性皮膚炎の治療には、副腎皮質ホルモン（ステロイド）の外用や内服、また免疫抑制剤等が使われています。しかしながら、免疫抑制による感染症や局所の皮膚萎縮などの副作用があることや、これらの薬剤が効かない難治性アトピー性皮膚炎の患者が数多くいることが大きな問題となっており、副作用が少なく、より効果的な治療法の開発が待たれています。

研究内容と成果

NC/Ngaマウスは、通常環境下で、アトピー性皮膚炎を自然発症することが知られている、我が国で樹立された近郊系マウス^{注2)}です(図1A)。また、病原体フリーの環境下でハウスダストマイト(チリダニ)抽出液(HDM)を皮膚に塗布すると、他マウス系統に比べて皮膚炎が著明に悪化することが知られています。しかし、NC/Ngaマウスのアトピー性皮膚炎の発症機構は、長らく謎でした。

本研究グループは、NC/Ngaマウスの全エクソーム遺伝子解析^{注3)}を行い、7万個余りの遺伝子変異を見出しました。またその中から、皮膚のマクロファージに発現するClec10a(ヒトではAsgr1)という遺伝子の変異が、ダニによるアトピー性皮膚炎発症の原因遺伝子であることを突き止めました(図1B, C)。

Clec10aを欠損するマウスを解析したところ、このマウスは、野生型マウスと比べて、ダニによるアトピー性皮膚炎が発症しやすいことから、Clec10aがダニによるアトピー性皮膚炎を抑制することが明らかになりました(図2)。

驚くべきことに、ダニの成分には、アトピー性皮膚炎を誘導する分子の他に、Clec10aと結合するムチン様分子が存在しており、これをダニから抽出し、アトピー性皮膚炎に直接塗布すると、症状が軽快することを見出しました(図3)。

さらに詳細な解析を行い、ダニにはアトピー性皮膚炎を誘導する分子として、LPS(エンドトキシン)と、これを抑制するムチン様分子が含まれており、LPSが皮膚のマクロファージを活性化し、アトピー症状を引き起こすのに対して、ムチン様分子がClec10a(Asgr1)を介して、これを抑制していることがわかりました(図4)。

今後の展開

Clec10a(Asgr1)が結合するムチン様分子は、これまでにない新しいコンセプトのアトピー性皮膚炎の治療薬として有望です。今後、最も効果的なムチン様分子をスクリーニングし、これを製剤化することで、従来の薬剤で効果がなかった患者にも、新たな治療薬の選択肢を提供できることが期待されます。

参考図

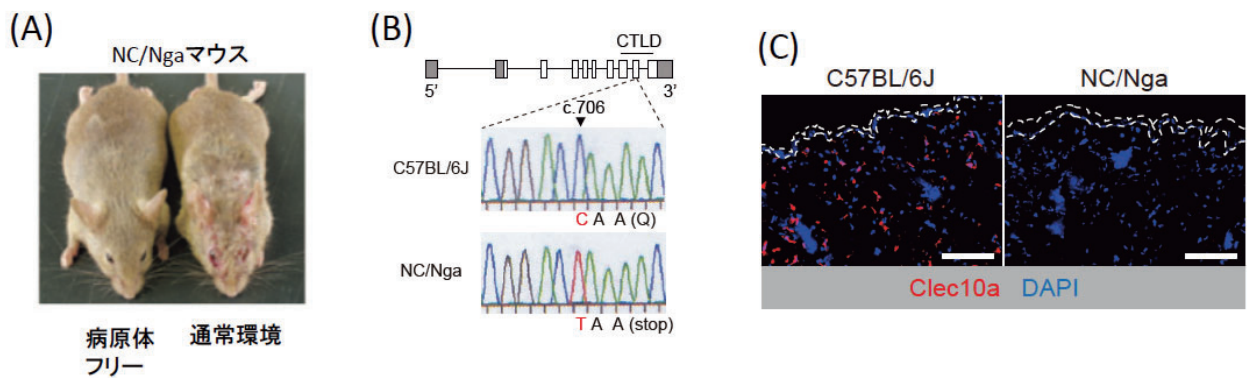


図1. NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎の原因遺伝子

- (A) NC/Nga マウスは、病原体フリーの環境下では正常であるが、通常環境下ではアトピー性皮膚炎を自然発症する。
- (B) NC/Nga マウスにおいて Clec10a をコードする遺伝子の変異を認めた (C57BL/6J マウスの遺伝子を対照とした)。
- (C) C/Nga マウスの皮膚のマクロファージでは Clec10a (赤のシグナル) を発現していなかった (C57BL/6J マウスを対照とした)。

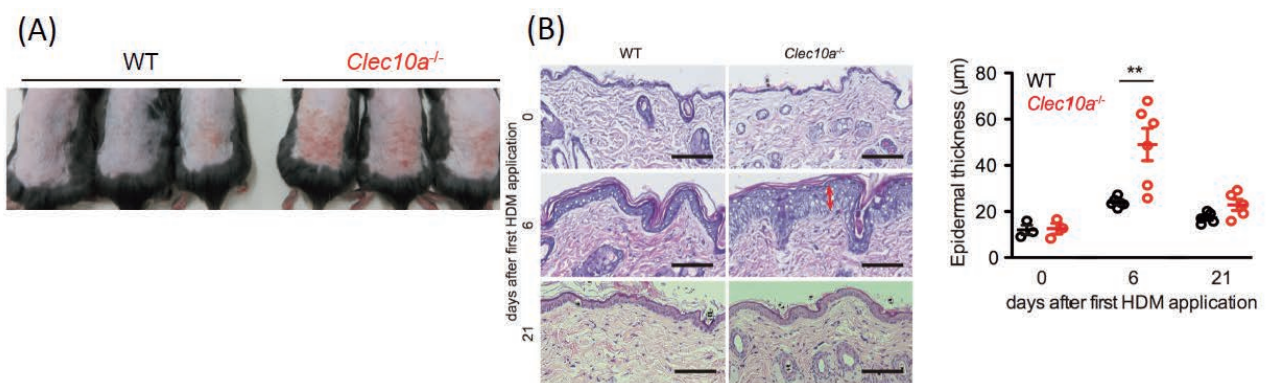
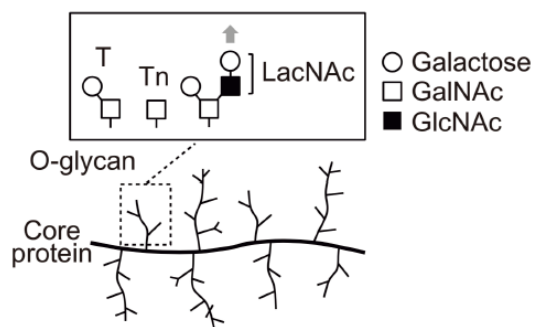


図2. チリダニ抽出液塗布後の観察結果

- (A) 野生型マウス(WT)と *Clec10a* 遺伝子欠損マウス(*Clec10a^{-/-}*)の皮膚に、ハウスダストマイト(チリダニ)抽出液 (HDM) を塗布し、6 日後に皮膚を観察したところ、WT ではわずかな皮膚の炎症が見られたのみであったが、*Clec10a^{-/-}*では強い炎症が観察された。
- (B) 同様に、塗布 6 日後には、*Clec10a^{-/-}*で表皮の強い肥厚が見られたが、WT では軽度であった。

(A)



(B)

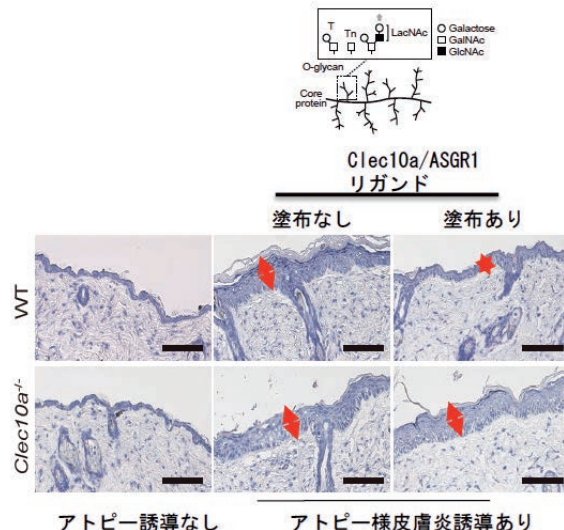


図3. Clec10a が結合するムチン様分子がアトピー性皮膚炎を改善する

(A) ハウスダストマイト(チリダニ)抽出液 (HDM) から、Clec10a が結合する分子として、ムチン様分子を同定した。

(B) 抽出したムチン様分子を、アトピー性皮膚炎を誘導した野生型マウス (WT) に塗布すると、表皮の肥厚が軽減した。しかし、Clec10a 遺伝子欠損マウス(Clec10a^{-/-})の皮膚では変化がなかった。以上の結果から、ムチン様分子が Clec10a を介して、アトピー性皮膚炎を抑制したことが明らかとなった。

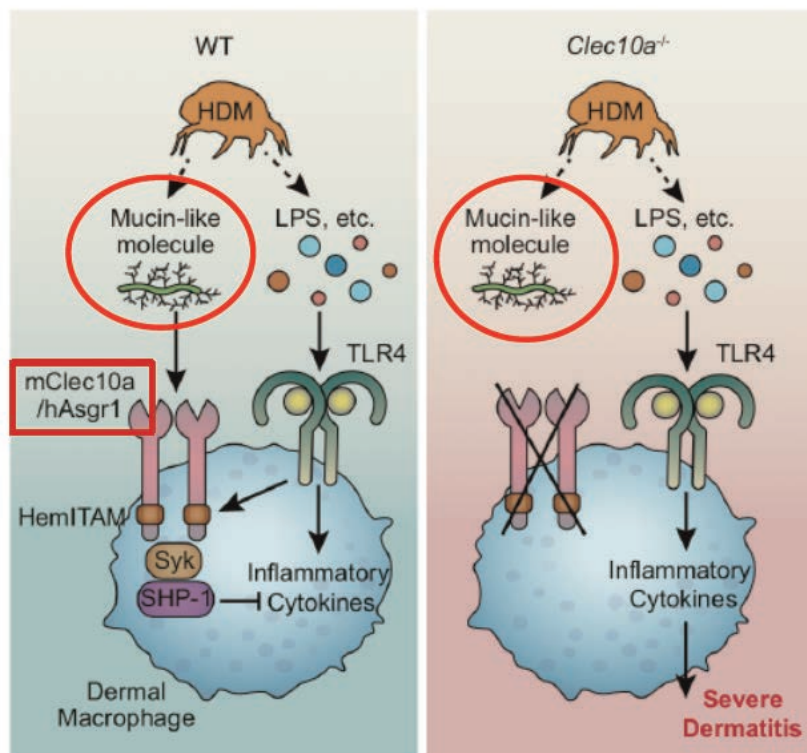


図4. 本研究のまとめ

野生型マウス(WT)では、ダニの成分である LPS (エンドトキシン) が皮膚のマクロファージを刺激し、アトピー性皮膚炎を誘導するのに対し、別のダニの成分であるムチン様分子が Clec10a(Asgr1)を介して、これを抑制している (左)。NC/Nga マウスや Clec10 遺伝子欠損マウス(Clec10a^{-/-})では、Clec10a の発現がないために、LPS の刺激に対する抑制が効かず、アトピー性皮膚炎の症状が強く起きる (右)。

用語解説

注1) ムチン様分子

分子量 100 万～1000 万の、糖を多量に含む大分子量の糖タンパク質（粘液糖タンパク質）の総称。

注2) 近交系マウス

実験動物において個体差を少なくするために用いられる。近親交配を 20 世代以上繰り返しているために、遺伝的にはほぼ同一の個体。

注3) 全エクソーム解析

全ゲノムのうちタンパク質をコードする全てのエクソン領域（エクソーム）のみを抽出し、次世代シーケンサーを用いて解読する技術。

掲載論文

【題名】 Clec10a regulates mite-induced dermatitis.

(Clec10a はダニによる皮膚炎を抑制する)

【著者名】 Kazumasa Kanemaru, Emiko Noguchi, Satoko Tahara-Hanaoka, Seiya Mizuno, Hiroaki Tateno, Kaori Denda-Nagai, Tatsuro Irimura, Hiroshi Matsuda, Fumihiko Sugiyama, Satoru Takahashi, Kazuko Shibuya, Akira Shibuya

【掲載誌】 Science Immunology

問合わせ先

渋谷 彰 (シブヤ アキラ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター、革新的創薬開発研究センター、医学医療系 教授



2019年12月9日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学

東京慈恵会医科大学

国立研究開発法人 科学技術振興機構(JST)

微生物が狭い空間でも集団を拡張する仕組み
～ナノ繊維の分泌により細胞フィラメントの伸長を制御し、環境に適応する～

研究成果のポイント

1. 微細加工技術を駆使して作製したマイクロ流路デバイス^{注1)}を用い、二次元空間における鉄酸化細菌^{注2)} *Leptothrix* 属の細胞フィラメント形成のリアルタイム観察に成功しました。
2. *Leptothrix* 属細菌の分泌ナノ繊維は、デバイス表面への接着に関与し、細胞フィラメントの伸長開始および伸長方向決定に重要であることが分かりました。
3. 細胞フィラメントの伸長プロセスのシミュレーションにより、分泌ナノ繊維が伸長を適切に制御し、それにより *Leptothrix* 属細菌は環境に適応していることが示唆されました。

国立大学法人筑波大学生命環境系 久能樹准教授、Utada S. Andrew准教授、野村暢彦教授らの研究グループは、東京慈恵会医科大学 杉本真也准教授、筑波大学生存ダイナミクス研究センター 岩崎憲治教授との共同研究により、鉄酸化細菌 *Leptothrix* 属が分泌するナノ繊維が、表面接着、および細胞フィラメントの伸長や方向を制御することを明らかにしました。

Leptothrix 属細菌は、ナノ繊維を分泌することで細胞フィラメントを覆うチューブ原基を形成します。これが酸化鉄粒子に覆われたチューブとなり、集団(バイオマツ)を構築して生息しています。しかしながら、なぜナノ繊維を分泌するかは、不明なままでした。本研究では、特殊なマイクロ流路デバイスを用いることで、細胞フィラメント形成初期段階のリアルタイム観察に成功し、分泌ナノ繊維の新たな機能を発見しました。これらは、細胞フィラメントや酸化鉄チューブ形成に対する重要な基礎的知見を提供するものであると同時に、顔料、電極、触媒、農業など、*Leptothrix* 属細菌のつくるチューブの応用利用に向けた、材料特性の向上に役立つと期待されます。

本研究の成果は、2019年12月5日付「ACS Nano」でオンライン公開されました。

* 本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)の戦略的創造研究推進事業 ERATO「野村集団微生物制御プロジェクト」およびCREST「元素戦略を基軸とする物質・材料の革新的機能の創出」の一環で行われました。また科学研究費補助金、筑波大学生存ダイナミクス研究センター共同利用・共同研究の助成を受けています。

研究の背景

鉄分の豊富な天然の湧き水や沼沢地には、鉄細菌の仲間がバイオマットを形成して生息しています。鉄酸化細菌 *Leptothrix* 属は、酸化鉄粒子で覆われたマイクロチューブから成るバイオマットを構築します。フィラメント状(細かい糸状)に分裂した *Leptothrix* 属細菌は、菌体表面から無数のナノ繊維を分泌し、これら繊維が絡まったチューブ原基の外側に酸化鉄粒子が沈着することで、マイクロチューブを形成します。しかしながら、ナノ繊維の分泌やチューブ原基を形成する生物学的意義は明らかになっておらず、細胞フィラメント形成過程におけるナノ繊維の分泌のダイナミクスをリアルタイムに観察する必要性がありました。

研究内容と成果

本研究では、細胞フィラメントが絡まり凝集するのを防ぎながら、各々の細胞分裂およびナノ繊維の分泌を観察するため、微細加工技術を駆使し、高さを1.3 μm に制限したチャンバーを持つマイクロ流路デバイスを開発しました(図1)。このデバイスを用い、二次元空間における鉄酸化細菌の増殖のリアルタイム観察に成功しました。その様子を野生型株とナノ繊維非分泌株で比較したところ、野生型株は、デバイス表面に接着後に細胞フィラメント形成を開始する一方、ナノ繊維非分泌株は、表面接着ができずほとんど増殖しませんでした。このことから、ナノ繊維を介した表面接着が細胞フィラメントの伸長の鍵であることが分かりました。ナノ繊維の骨格である糖鎖のアミノ基を蛍光染色した結果、表面接着直後の菌体周囲の蛍光シグナルに偏りがあり、細胞フィラメントの伸長方向にはシグナルが検出されないことから、ナノ繊維の分泌が細胞フィラメントの伸長方向決定にも関与することが明らかとなりました(図2)。

分泌ナノ繊維をサブミクロンレベルで観察するには、電子顕微鏡が必要ですが、一般的なサンプル調製では、乾燥のプロセスでナノ繊維の分解や凝集が起きて、ノイズを観察してしまう問題がありました。そこで本研究では、サンプルを乾燥させず、溶液中で観察可能な大気圧走査電子顕微鏡^{注3)}を用いることで、分泌ナノ繊維の分布を観察することに成功しました。ここでも蛍光染色の場合と同様に、表面接着直後の細胞ではナノ繊維の分泌に偏りがありました(図3)。

狭いチャンバー空間で伸長する細胞フィラメントは、チャンバー壁に衝突しても「屈曲」または「反転」して伸長を継続しました。分泌ナノ繊維による表面接着力と衝突による反発力を考慮した数式を作成し、シミュレーションすることで、低角度の衝突では「屈曲」、逆に高角度の衝突では「反転」する頻度が高くなることを証明しました(図4)。これらの結果は、狭い空間内でも継続的にフィラメントを形成する能力を示しています。以上の結果より、*Leptothrix* 属細菌は、分泌ナノ繊維を介して細胞フィラメントの伸長を適切に制御することで、環境に適応し、流れのある環境水中で優位にバイオマットを形成する戦略を持つと考えられます。

今後の展開

Leptothrix 属細菌のつくるチューブ原基は、鉄、マンガンを始めとするさまざまな金属イオンを吸着するため、水処理施設で低コストな金属除去システムとして利用されています。また、鉄を吸着したチューブは、顔料、電極、触媒、農薬など多くの利用方法が研究されています。本研究の成果は、これらの応用にフィードバック可能であり、水処理能力の向上やチューブの材料特性の改良に貢献することが期待されます。

参考図

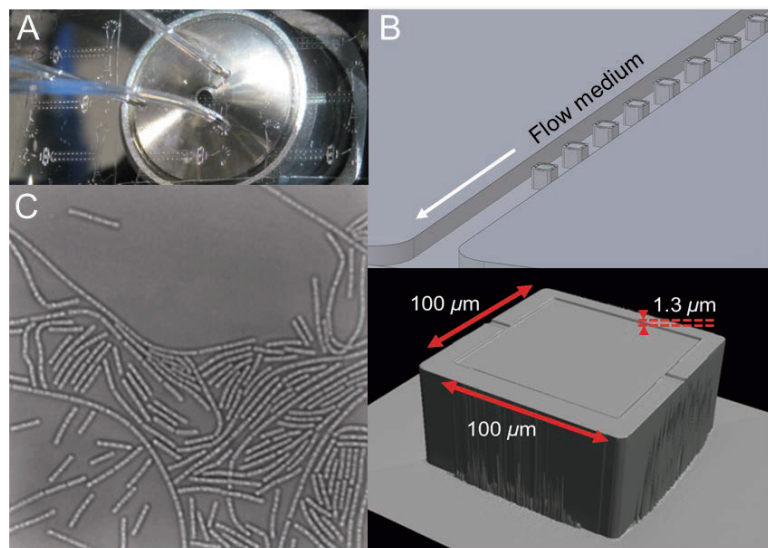


図1. 高さを $1.3 \mu\text{m}$ に制限したチャンバーを持つマイクロ流路デバイス。(A) 顕微鏡に設置した様子。(B) 流路に並ぶチャンバー(上)は、縦 x 横 x 高さがそれぞれ $100 \times 100 \times 1.3 \mu\text{m}$ の空間である(下)。(C) 鉄酸化細菌を培養した様子。スケールバー = $5 \mu\text{m}$

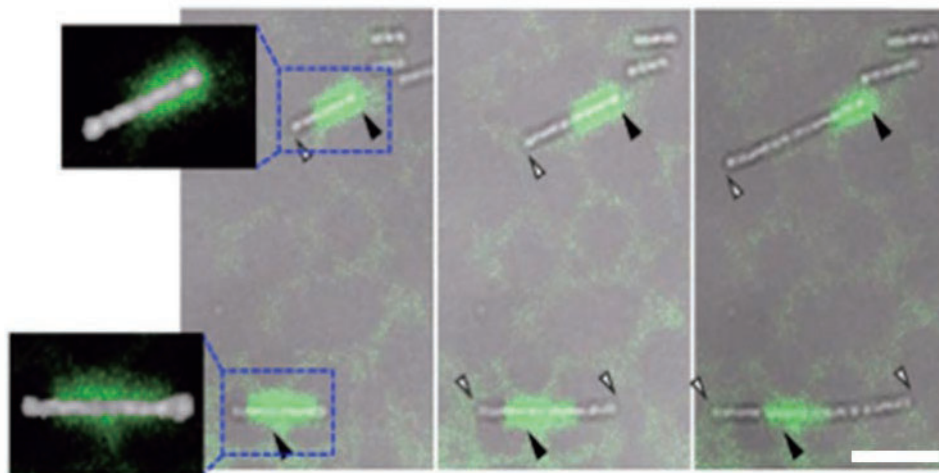


図2. 鉄酸化細菌が表面接着後、細胞フィラメント伸長を開始した時点で分泌ナノ繊維を蛍光ラベルした結果、片側・両側に伸長する場合に異なる分泌ナノ繊維の分布を示す。矢印は伸長端(白)、固定部分(黒)を示す。スケールバー = $5 \mu\text{m}$

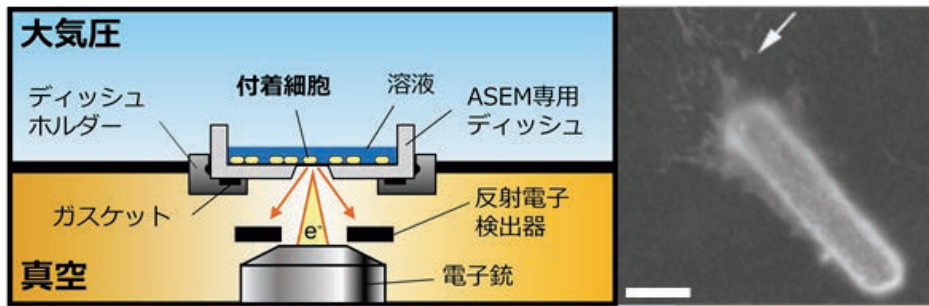


図3. 大気圧走査型電子顕微鏡のイメージ図(左)と鉄酸化細菌の細胞の電子顕微鏡像(右)。矢印は金コロイドでラベルした分泌ナノ繊維を示す。スケールバー = $1\mu\text{m}$

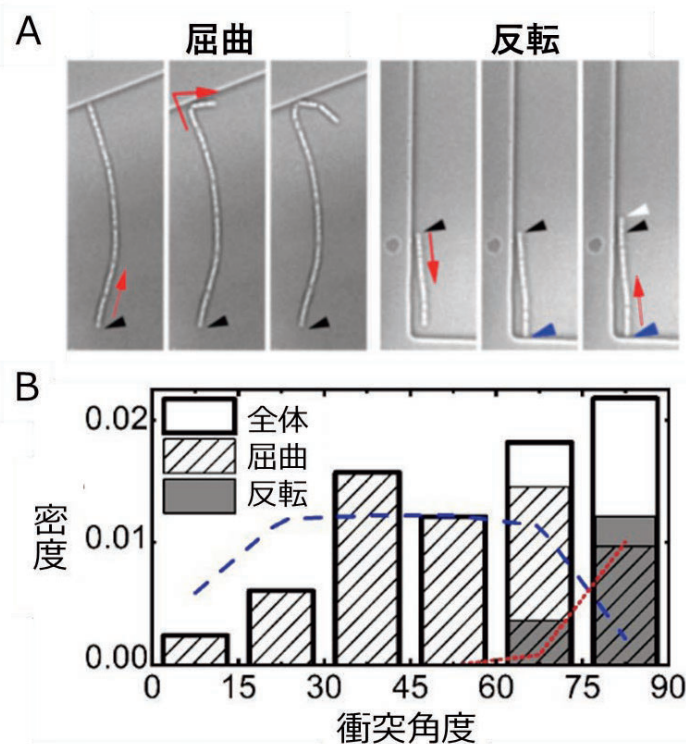


図4. (A)チャンバー壁に衝突後「屈曲」(左)または「反転」(右)して伸長する細胞フィラメントを示す。矢印は固定端(黒)、衝突後の固定端(青)、伸長端(白)を示す。スケールバー = $5\mu\text{m}$ (B) 実際の出現頻度(斜線: 屈曲、グレー: 反転)とシミュレーションによる出現頻度(青線: 屈曲、赤線: 反転)のグラフ。

用語解説

注1) マイクロ流路デバイス

基板にエッチング、微細切削加工、成形などの方法で作製した流路を形成した持つデバイス。

注2) 鉄酸化細菌

水溶性の二価の鉄イオンや二価のマンガンイオンを酸化する細菌の仲間。

注3) 大気圧走査電子顕微鏡

細胞を乾燥させることなく、大気圧で直接観察できる倒立型走査電子顕微鏡。

掲載論文

【題名】Polyfunctional Nanofibril Appendages Mediate Attachment, Filamentation, and Filament Adaptability in *Leptothrix cholodnii*.

(鉄酸化細菌 *Leptothrix cholodnii* の多機能性分泌ナノ繊維は、接着、フィラメント化、フィラメント適応性を仲介する)

【著者名】 Tatsuki Kunoh, Kana Morinaga, Shinya Sugimoto, Shun Miyazaki, Masanori Toyofuku, Kenji Iwasaki, Nobuhiko Nomura, Andrew S. Utada.

【掲載誌】 ACS Nano (DOI:10.1021/acsnano.9b04663)

問い合わせ先

<研究に関すること>

久能 樹 (クノウ タツキ)

筑波大学 生命環境系 准教授

Utada S. Andrew (ウタダ アンドリュウ)

筑波大学 生命環境系 准教授

野村 暢彦 (ノムラ ノブヒコ)

筑波大学 生命環境系 教授

杉本 真也 (スギモト シンヤ)

東京慈恵会医科大学 医学科 細菌学講座 准教授

<JSTの事業に関すること>

内田 信裕 (ウチダ ノブヒコ)

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学

ヒスタミン受容体アゴニストが心腎連関障害を改善する
- 心腎不全モデルマウスの遺伝情報解析による抗炎症作用の同定 -

研究成果のポイント

1. 認知機能障害やてんかん発作を標的として開発されたヒスタミン受容体のアゴニスト^{注1)}(イメトリジン:Imm^{注2)})が、心腎連関の病態に保護的に作用することがわかりました。
2. 心不全モデルの ANS マウス^{注3)}では、腎臓の機能が障害されており、心腎連関の病態モデルとなることが明らかになりました。
3. ANS マウスの血液中では、アレルギーや炎症反応に関与するヒスタミンが増加していることを発見しました。また、遺伝的にヒスタミンを産生できない ANS マウスでは、心腎障害が悪化しました。
4. 遺伝子発現パターンの網羅的解析から、Imm が抗炎症作用を有することが判明しました。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA) 深水昭吉教授、医学医療系 山縣邦弘教授らの研究グループは、認知機能障害やてんかん発作を標的として開発された、ヒスタミン H3 受容体アゴニストの Imm^{参考文献 1)}が、心腎連関の病態を改善することを明らかにしました。

「心腎連関」^{参考文献 2)}は、心臓と腎臓それぞれの障害が相互作用し、両臓器の機能が障害されることに由来する概念です(図1)。しかし、腎臓の機能低下が心臓血管病発症リスク増加に寄与する、あるいは心臓血管病患者が高率に腎機能障害を引き起こす機序の詳細は未解明です。本研究グループは、血圧上昇ホルモンであるアンジオテンシン II 投与、片腎摘出、食塩水負荷により心不全を誘導するマウス(ANS マウス)^{参考文献 3)}を用い、ANS マウスが心不全に加え、腎臓の糸球体濾過機能の低下や構造変化、タンパク尿や尿管障害による円柱の形成など、慢性腎臓病様の病態を示すことを見出しました。

また本研究の重要な知見として、ANS マウスの血中で低分子アミンであるヒスタミンが増加していることを明らかにしました。また、ANS マウスへのヒスタミン受容体阻害剤の投与や、遺伝的にヒスタミンを産生できない ANS マウスでは、心腎障害が悪化したのに対し、Imm は ANS マウスの心腎連関障害に保護的に作用することを見出しました。

さらに、RNA シークエンスによる網羅的な解析の結果、ANS マウスの腎臓では、炎症関連遺伝子の発現が有意に亢進しており、ANS マウスで実際に急性期炎症が生じていることを突き止めました。これらの変化は、Imm の投与で軽減したことから、Imm が抗炎症作用を有することが判明しました。

このように、当初の開発対象を超えた効果を有する Imm を活用したアプローチは、心腎連関の発症メカニズムの理解や、炎症性臓器障害を示す他のモデル動物を利用した研究への応用につながることを期待されます。

本研究の成果は、2020年1月27日付「*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*」で公開される予定です。

* 本研究は、日本学術振興会の科学研究費補助金(科研費):基盤研究(A)(25252062:深水昭吉)、基盤研究(C)(17K07131:石田純治、26350957:加香孝一郎)、および、日本医療健康開発機構(17ek0310005h0003:山縣邦弘)によって実施されました。

研究の背景

心不全などの心血管疾患や、慢性腎臓病による腎不全は主要な死因の一つです。「心腎連関」(図1)は、心臓血管病患者では高率に腎機能障害を併発し、心臓血管病患者にとって慢性腎臓病併発が最も強力な予後不良因子であることが疫学的に認められたこと、また慢性腎臓病患者は心不全に代表される心臓血管病を高率に合併することなど、心臓血管病と腎臓病は密接に関与して相互に影響しあうことから認識された概念です。治療へのアプローチや心腎病態のメカニズムを理解する要素として、レニン・アンジオテンシン系、交感神経系、酸化ストレスや炎症などが挙げられていますが、有用な病態モデル動物の開発や創薬標的の検証が進展していなかったため、心腎連関の根底にある分子の仕組みは明らかになっていませんでした。

研究内容と成果

本研究ではまず、アンジオテンシン II(血圧上昇ホルモン)投与、片腎摘出、食塩水負荷によって心機能低下や心肥大といった心不全を呈するマウス(ANS マウス)について、腎臓の機能変化について解析しました。その結果、ANS マウスには心不全に加え、腎尿細管障害(図2)や糸球体の構造異常(図3)が認められ、タンパク尿(図4a)を伴う慢性腎臓病の所見を示したことから、ANS マウスが心腎連関病態を解析する上で有用なモデルであることを明らかにしました。

次いで、ANS マウスの血中成分を質量分析で解析したところ、有意な増加を示した低分子アミンとしてヒスタミンを同定しました。ヒスタミンはアレルギーや炎症反応に関与することで知られていますが、心腎連関での役割は未解明です。そこで、ANS マウスへのヒスタミン受容体の阻害剤投与や、遺伝的にヒスタミンを合成できないノックアウトマウスを利用して ANS モデルを作出したところ、心腎病態が悪化することが分かりました。一方で、ヒスタミン H3 受容体のアゴニスト(Imm)の投与で心臓と腎臓(図4b)の病態が改善したことから、Imm が ANS マウスの心臓と腎臓の機能障害に保護的に作用することを見出しました。

さらに、次世代シーケンサーを用いた腎臓の網羅的遺伝子発現解析から、ANS マウスで炎症関連遺伝子群の発現亢進を認め、実際に ANS マウスの血液中で炎症マーカータンパク質が増加していることを確認しました。それらは Imm で抑制されたことから(図5)、Imm は ANS マウスに対して抗炎症作用を発揮することが明らかになりました。ANS マウスと Imm を用いた本研究の結果は、心腎連関仲介因子としてのヒスタミンの役割や、Imm の抗炎症作用による心腎病態改善の可能性を示しています。

今後の展開

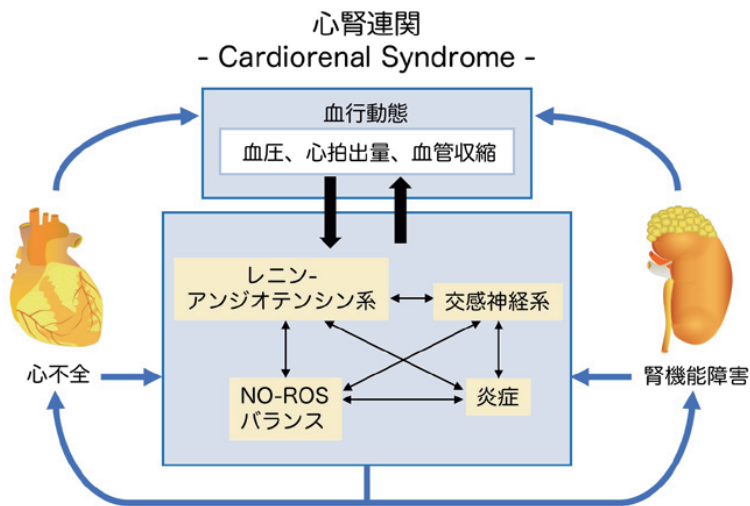
心腎病態の悪化は、虚血性心疾患や脳梗塞、腎不全などの疾患リスクを高めますが、心腎連関の詳細な発症・制御機構の解明は途上です。①病態モデル動物の作製と評価、②生理活性物質の分析探索、および ③遺伝情報解析 を組合せる本研究のアプローチにより、

* 炎症性臓器障害を示す他のモデル動物への Imm 改善効果の検証

* 抗炎症作用をもつ薬剤の心腎連関モデル動物への応用 など、

心腎連関の発症メカニズムの理解や、それに基づく薬剤の開発につながる波及効果が期待されます。

参考図



「心腎連関」とは、心臓と腎臓のそれぞれの障害が相互作用し、両臓器の機能が障害されることに由来する概念です。腎機能障害に代表される慢性腎臓病では、心血管病(狭心症・心筋梗塞・心不全・脳卒中など)の発症リスクが極めて高いことや、心血管病患者では高頻度に慢性腎臓病を併発して有意に生命予後が不良であることが明らかとなっていますが、心腎連関病態の形成メカニズムの詳細は不明です。
 NO:一酸化窒素
 ROS:活性酸素種

図1:心腎連関の概念図

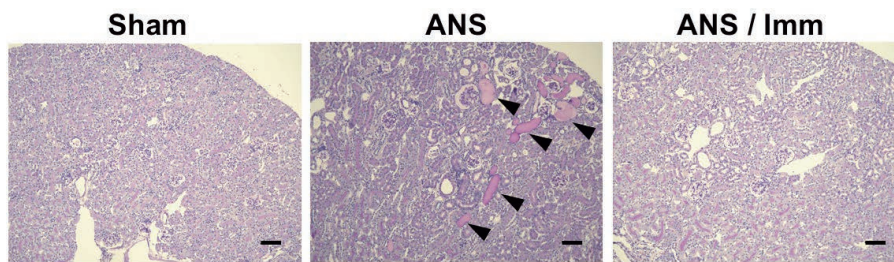


図2:ANS マウスの腎臓尿細管障害(腎臓のPAS 染色像。掲載論文から引用)

ANS マウスの腎臓皮質では、糸球体の拡大と、尿細管障害の指標であるタンパク円柱(矢頭)が観察され(中央)、これらは、Imm 投与で改善しました(右)。左(Sham)はコントロール群。スケールバー: 200 μ m。

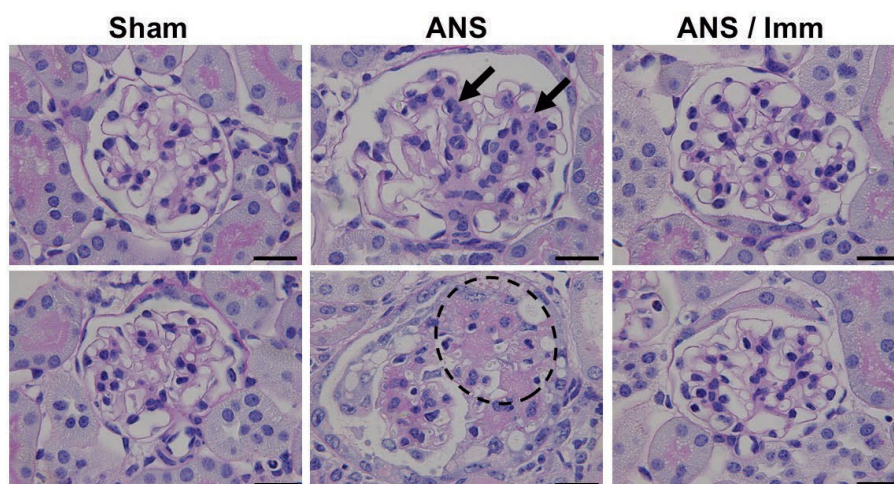
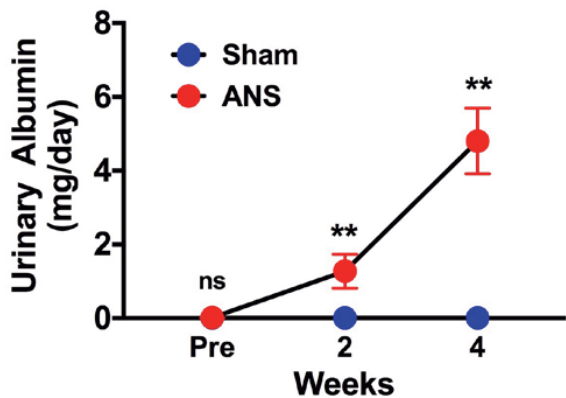


図3:ANS マウスの腎臓糸球体病態(掲載論文から引用)

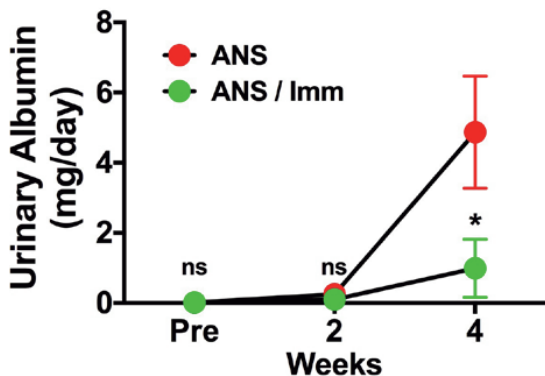
【上段】ANS マウスの糸球体では、糸球体障害の指標であるメサンギウム細胞のびまん性増生(矢印)を認め、Imm 投与により改善しました。スケールバー: 50 μ m。

【下段】ANS マウスの糸球体では、分節性糸球体硬化(点線囲い)が観察され、Imm 投与で改善しました。スケールバー: 50 μ m。



ANS マウスでは、コントロール群(Sham)と比較して、ANS 処置後2週間より尿中へのアルブミン排泄量が有意に増加し、著しいタンパク尿を呈しました。

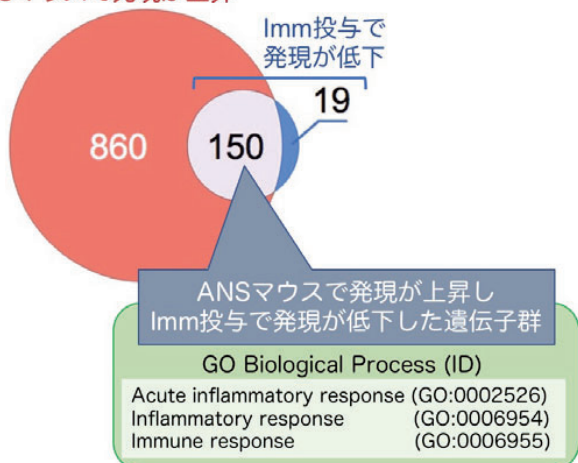
図4a: ANS マウスの腎臓機能障害: タンパク尿の出現 (掲載論文に使用したものを一部改変)



ANS マウスへの Imm 投与により、ANS 処置後4週間での尿中アルブミン排泄量が有意に低下し、タンパク尿が改善しました。

図4b: Imm 投与による ANS マウスのタンパク尿の改善 (掲載論文に使用したものを一部改変)

Shamマウスと比較して
ANSマウスで発現が上昇



ANS マウスの腎臓を用いた網羅的遺伝子発現解析から、ANS マウスの腎臓で発現上昇した遺伝子群(赤大円:1010 遺伝子)を同定しました。これらの中で、150の遺伝子(重複領域)がヒスタミン H3 受容体アゴニストである Imm の投与による発現低下を認めました。これら Imm 投与で発現抑制された 150 遺伝子に対する遺伝子オントロジー解析から、炎症関連の経路が同定されたことから、Imm は抗炎症作用をもち、ANS マウスの心腎病態に対して保護的に作用していることを明らかにしました。

ANSマウスで発現上昇した炎症関連遺伝子群がImmの投与で抑制

図5: ANS マウス腎臓のトランスクリプトーム解析による、Imm の抗炎症作用の同定

用語解説

注1) アゴニスト

受容体と結合して、ホルモンや神経伝達物質と同様に、細胞を活性化させる作用を有する物質です。

注2) イメトリジン (Immethridine dihydrobromide: Imm)

イメトリジンは、主に神経細胞で発現しているヒスタミン H3 受容体に対する、高親和性・高選択的なアゴニストです。認知機能障害やてんかん発作への作用を期待されて開発されました。

注3) ANS マウス

血圧上昇ホルモン・アンジオテンシン II (Ang) の投与 (A)、片腎摘出 (N)、食塩水負荷 (S) により、心機能低下や心肥大といった心不全を呈するマウスです。本研究では、ANS マウスが心不全に加えて、蛋白尿や腎機能低下など慢性腎臓病様の病態も呈することを見出しました。

参考文献

- 1) Kitbunnadaj, R., *et al.* J. Med. Chem. 47: 2414–2417 (2004)
- 2) Bongartz, L. G. *et al.* Hypertens. 43: e14 (2004)
- 3) Tsukamoto, Y. *et al.* Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 305: H1658–667 (2013)

掲載論文

- 【題名】 Histamine receptor agonist alleviates severe cardiorenal damages by eliciting anti-inflammatory programming
(ヒスタミン受容体アゴニストは抗炎症プログラミングを誘導して心腎連関を緩和する)
- 【著者名】 Kazuyuki Noguchi, Junji Ishida, Jun-Dal Kim, Naoto Muromachi, Koichiro Kako, Hayase Mizukami, Weizhe Lu, Tomohiro Ishimaru, Shohei Kawasaki, Shuzo Kaneko, Joichi Usui, Hiroshi Ohtsu, Kunihiro Yamagata, and Akiyoshi Fukamizu
- 【掲載誌】 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
(DOI: 10.1073/pnas.1909124117)

問合わせ先

深水 昭吉 (ふかみず あきよし)

筑波大学生存ダイナミクス研究センター (TARA) 教授

2020年3月10日

報道関係各位

京都産業大学
大阪大学
筑波大学

細菌毒素タンパク質の膜透過機構の一端を解明

■本件のポイント

- ・細菌毒素タンパク質が三次元構造をアンフォールディングさせ、膜透過するメカニズムを原子レベルで解明。
- ・毒素タンパク質と透過装置（膜孔）の複合体構造は構造が不安定で結晶化が難しかったが、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を用いることで、高分解能で複合体構造の構造解析に成功した。
- ・本成果より、細菌毒素の膜透過を阻害する新規創薬の開発につながることを期待される。

■概要

タンパク質は20種類のアミノ酸からなる1本の紐ですが、これが規則的に α ヘリックス、 β シートと呼ばれる二次構造を取り、さらに折れ畳んで立体的な三次構造を形成することで初めて機能します。そのため、通常一度折れ畳んだ（フォールディングした）タンパク質は構造を失って、機能を持たない1本の紐にもどる（アンフォールディングする）必要はありません。しかし、ある種の細菌は、タンパク質毒素をアンフォールディングさせ、さらに膜透過をさせてホストの細胞内に入れる装置を持っています。

ウェルシュ菌などの細菌が産生する二成分毒素は毒素タンパク質（酵素成分）とこれを宿主の細胞に入れるための透過装置（膜孔）から構成されています。透過装置（膜孔）によって形成される膜孔径はとても小さいため、酵素成分がこのトンネルを通過する際には、一度形成された三次構造が解かれなければいけません。しかしながら、それがどのようにして起きるのかは明らかにされてきませんでした。

今回、本研究グループはウェルシュ菌タイプEが産生する、アクチンをADPリボシル化する酵素Iaと、Iaを細胞内へ輸送するIb膜孔で構成されるイオタ毒素の複合体の構造を明らかにすることに成功しました。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析によって、Ib膜孔とIaが結合したIb膜孔の複合体を2.8²2.9オングストロームという高い分解能で構造決定をしました。

■背景

ウェルシュ菌タイプEが産生するイオタ毒素はアクチンをADPリボシル化する酵素成分IaとIaを細胞内へ輸送するIb膜孔からなります。Ibは単量体として産生され、プロテアーゼによる分解、7量体化やエンドソームへの取り込みを経て細胞膜に孔を開ける膜孔を形成します。Iaはエンドソームと細胞質のpH差によって生じるエネルギーを利用して、Ib膜孔の中を透過していくと考えられています（図1）。

同じく二成分毒素である、炭疽菌毒素PA（Protective Antigen）もIbと同様な膜孔を形成することが知られています。PA膜孔は構造が明らかにされており、酵素成分が通過する狭窄部位（ ϕ クランプ）は、構造を持たない、ひも状のタンパク質しか通れないほど狭い（6Å）ことが報告されています。しかしながら、酵素成分がどのようにして構造を失うのかは明らかにされていませんでした。

■研究成果

本研究グループは、クライオ電子顕微鏡を用いてIb膜孔とIaが結合したIb膜孔の複合体（2種類：膜に埋まるステムが形成する前のshort stemとステムが完全に形成したlong stem）の構造解析に成功しました（図2）。本研究では試験管内の条件で効率的に7量体のIb膜孔を調製する方法を見出し、Ib膜孔の構造解析への道を拓くことができました。さらに調製したIb膜孔に過剰量のIaを添加することでIa-Ib膜孔複合体の構造解析にも成功しました。

この解析から、①Ib膜孔もPA膜孔のようにひも状のタンパク質しか通れない、狭窄部位（ ϕ クランプ）を有すること、②IaがどのようにしてIb膜孔に結合するのか、③IaのN末端がIb膜孔の中で空間的な制約によって構造を失い、ひも状になっている様子を明らかにしました（図3）。

これらの結果から、膜孔への結合が酵素成分の透過に不可欠な構造変化を引き起こすということがわかりました。

■今後の展開

二成分毒素はウェルシュ菌の Ib と炭疽菌の持つ PA と大きく分けると二種類が知られています。どちらも膜孔の構造は似ていますが、膜孔を透過する毒素は前者ではアクチンを ADP リボシル化する Ia であり、後者の LF/EF とはその機能も構造も大きく異なっています。後者では、LF の 3 分子が PA 膜孔に結合するモデルが提唱されており、生化学実験の結果を合わせて、その膜透過機構が論じられてきました。

これらの構造を比較すると、Ib 膜孔/Ia ではそのストイキオメトリー、結合モードも大きく異なることがわかりました (図4)。また、Ia が結合した Ib 膜孔の複合体構造から、Ia のアンフォールディングと膜透過の機構を提唱しました—すなわち「三次構造をとっているタンパク質がどのように解けて膜孔を透過するか」というタンパク質膜透過機構の一端の解明につながりました (図5)。すでに似た構造を持つ膜孔がナノポアセンサーとして DNA シーケンスで用いられるようになっていきます。応用として、将来は、この膜孔装置を生かしたタンパク質のアミノ酸シーケンスも可能になると考えています。

■論文情報

タイトル	Cryo-EM structures reveal translocational unfolding in the clostridial binary iota toxin complex (クライオ電子顕微鏡により明らかにした細菌毒素タンパク質の膜透過機構)
著者 (¹ 筆頭・ ² 責任著者) 【所属：研究当時】	山田等仁 ¹ 、吉田徹 ¹ 、津下英明 ² (京都産業大学) 川本晃大 ¹ 、光岡薫 (大阪大学) 岩崎憲治 (筑波大学)
雑誌	英国科学誌「Nature Structural & Molecular Biology」オンライン版
発行年月	2020年3月3日1:00 (日本時間) [オンライン]
DOI (英語)	10. 1038/s41594-020-0388-6

■用語・事項の解説

1 アンフォールディング

タンパク質は 20 種のアミノ酸が数十から数千つながってできたポリペプチド鎖からなり、これが折れ畳んで機能する構造となる。この折れ畳みをフォールディングという。

一方、アンフォールディングはこの折れ畳みが解けることを表す。一般的に、フォールディングしたタンパクは自然にはアンフォールディングせず、アンフォールディングさせるには何らかの機構が必要となる。二成分毒素では、酵素成分 (A 成分) をアンフォールディングさせた後、膜孔透過装置 (B 成分) を透過させ、さらにフォールディングさせるという、調整を行っている。

2 クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析

ガラス状氷に凍結した試料を液体窒素温度下で、電子線を照射し、生体分子を染色することなく電子顕微鏡で観察する (クライオ電子顕微鏡法)。従来、タンパク質の構造決定は X 線結晶構造解析により行われてきた。しかし近年電子線直接検知型・超高速 CMOS カメラの開発と、単粒子解析法ソフトウェアの発展により、結晶化しない生体試料でも高い分解能の構造を決定することができるようになった。これにより、結晶化が難しい試料、巨大分子や複数の構造が共存する試料の解析も可能になった。2017 年に、その開発に貢献した研究者 3 名がノーベル化学賞を受賞している。

3 二成分毒素

イオタ毒素に代表される二成分毒素は、アクチンを ADP リボシル化する A 成分とエンドサイトーシスを介して、A 成分を細胞内へ透過する B 成分からなる。この仲間には、ヒト感染性のディフィシル菌が持つ CDTa/CDTb があり、ToxA、ToxB に続く第 3 の毒素として注目されている。また異なるグループの二成分毒素には、炭疽菌の二成分毒素があり、機能も構造もイオタ毒素とは異なる A 成分 LF/EF と A 成分を細胞内へ透過する膜孔 B 成分 PA を持つ。

■添付資料

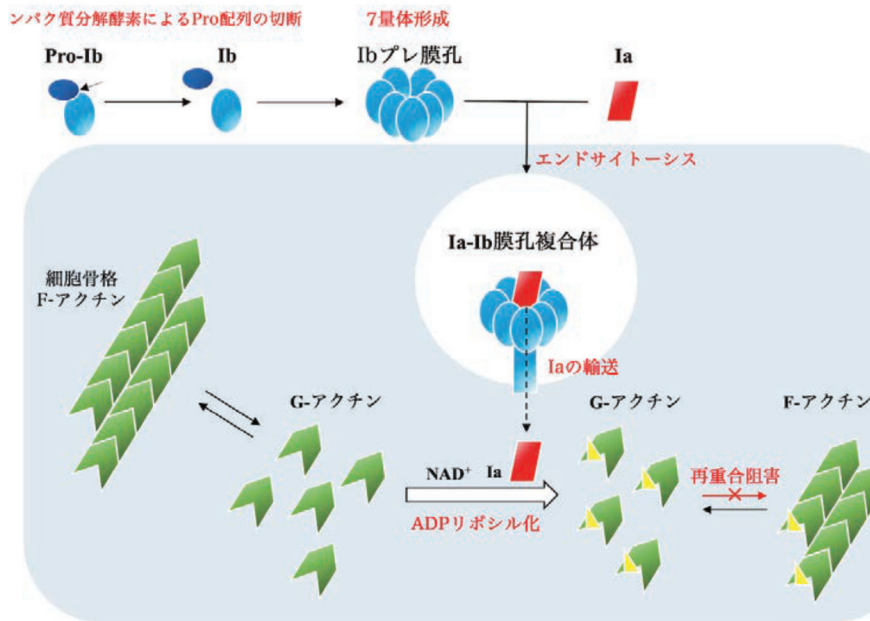


図1. イオタ毒素の細胞侵入機構

ウェルシュ菌から産生された膜結合成分 Ib は膜孔を形成し、酵素成分 Ia を細胞内に輸送する。Ia は細胞内に侵入すると細胞骨格を形成するアクチンを ADP リボシル化し、アクチンの再重合を阻害する。

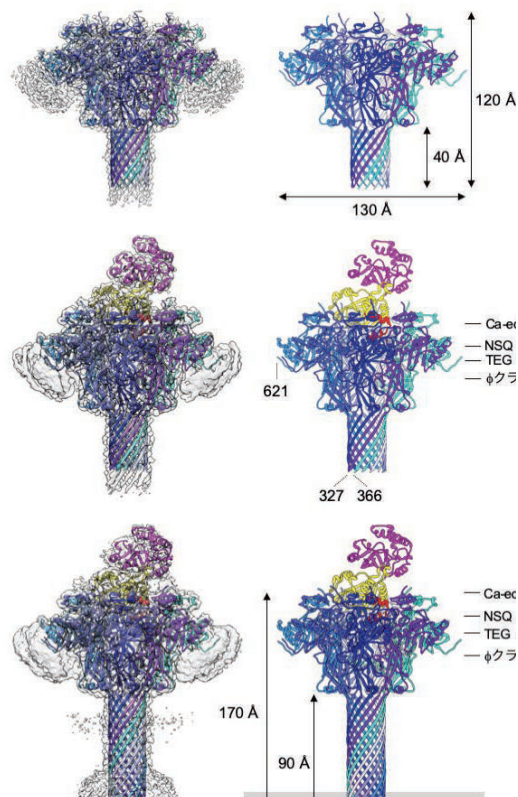


図2. 本研究によって明らかにしたイオタ毒素の構造

電子顕微鏡によって得られた密度マップおよび、これをもとに作成したモデルを表示している。
上: Ib 膜孔 中: Ia が結合した Ib 膜孔 (short stem) 下: Ia が結合した Ib 膜孔 (long stem)

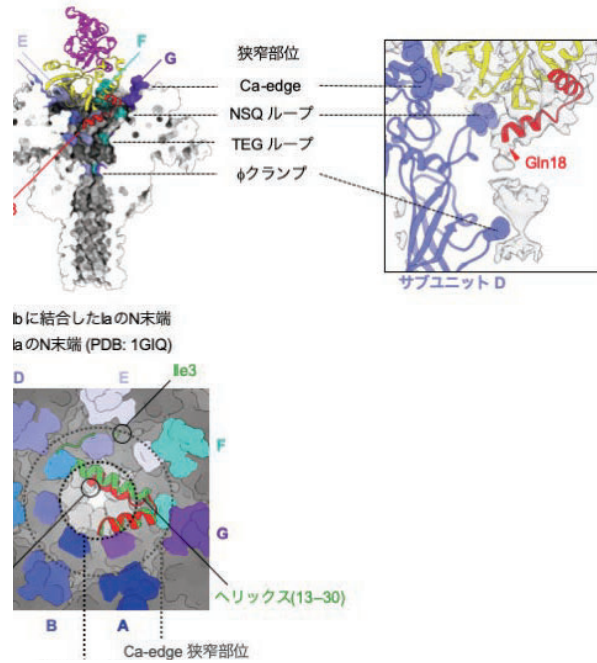


図3. IaのN末端の構造変化

IaはIb膜孔への結合によって膜孔内部のNSQループと呼ばれる狭窄部位で二次構造である α -ヘリックスが失われる。解けたN末端は膜孔の更に深部にある ϕ クランプへ続いている。

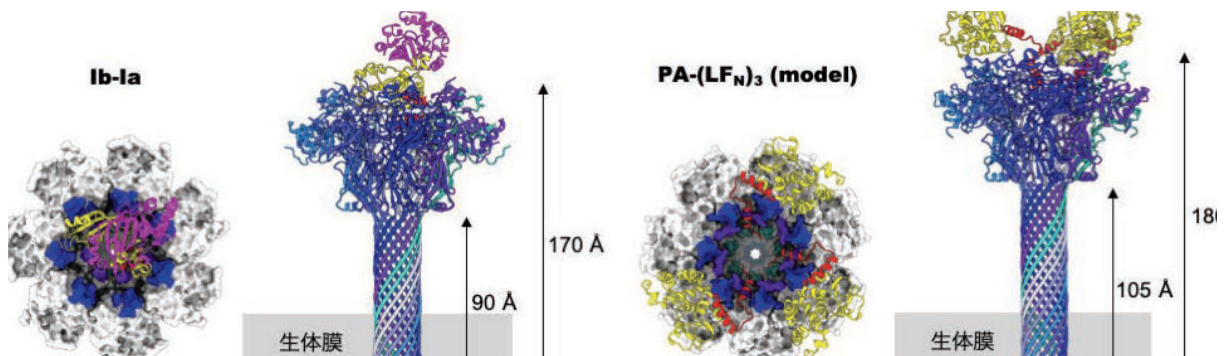


図4. ウェルシュ菌毒素と炭疽菌毒素の比較

ウェルシュ菌 二成分毒素複合体(Ib-Ia)と炭疽菌 二成分毒素複合体 (PA-3LFN)の構造の比較。炭疽菌は先行研究をもとに予想したモデルである。両者でIaとLFNの結合の仕方が大きく異なることがわかる。

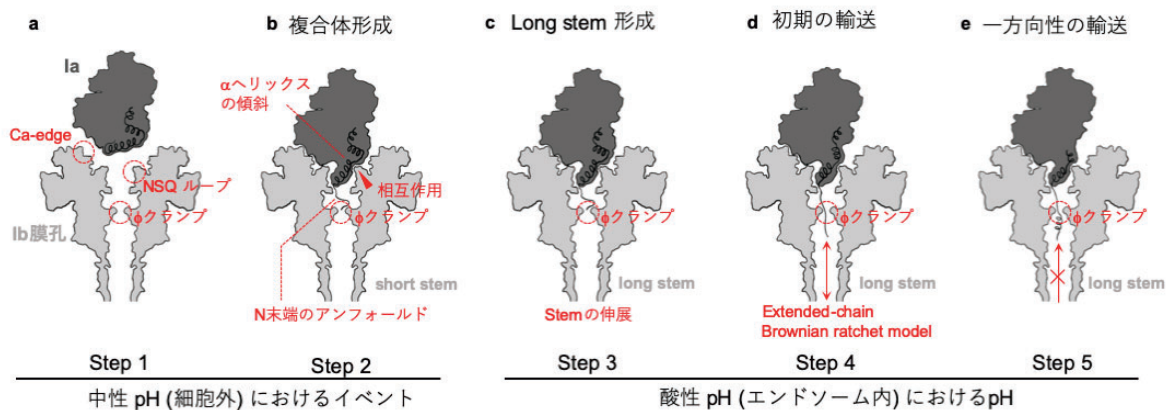


図5. 本研究をもとに提唱する輸送モデル

a. 一つの Ia が Ib 膜孔に結合する (short stem)。b. Ia は Ib 膜孔への結合によって N 末端の構造が失われる。エンドソーム中での酸性 pH によって c. Ib 膜孔の β バレルが完全に形成される (long stem)。d. 構造を失った Ia の N 末端が狭い ϕ クランプを透過する。e. Ia の N 末端が再び構造を取り戻し、狭い ϕ クランプによって逆行輸送が制限される。

【研究に関する問い合わせ】

京都産業大学大学院 生命科学研究科 津下 英明教授 (つげ ひであき)

TEL : 075-705-3117

E-mail: tsuge@cc.kyoto-su.ac.jp

大阪大学 蛋白質研究所 川本 晃大助教 (かわもと あきひろ)

TEL : 06-6879-8605

E-mail: kawamoto@protein.osaka-u.ac.jp

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 岩崎憲治教授 (いわさき けんじ)

TEL: 029-853-6045

E-mail: ikenji@tara.tsukuba.ac.jp

■謝辞

この研究は、JSPS 科研費 (18K06170, 17K15095), 「文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム」の支援を受けて実施されました。また、本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の課題番号 JP19am0101072 の支援を受けました (支援番号 1232)。

【報道に関する問い合わせ】

京都産業大学 広報部

TEL : 075-705-1411

E-mail : kouhou-bu@star.kyoto-su.ac.jp

以上

生殖細胞が作られる過程で細胞分裂サイクルが停止する機構を解明

研究成果のポイント

1. 生殖細胞(卵や精子)が形成される過程において、細胞分裂サイクルの進行を停止させる機構を明らかにしました。
2. この停止機構を解除すると、生殖細胞形成が正常に進行しないことを発見しました。
3. 細胞分裂サイクルの停止は多くの動物の生殖細胞形成過程で観察されることから、本研究成果は、他の動物における同様の機構や、その意義を明らかにする研究の基盤になると考えられます。

国立大学法人筑波大学 生存ダイナミクス研究センター(TARA) 森田俊平 研究員(研究当時、現 米国ブラウン大学・博士研究員)、太田龍馬 研究員、林 誠 助教および小林 悟 教授は、生殖細胞の形成過程において細胞分裂サイクルを停止させる機構を明らかにしました。

生殖細胞(卵や精子)は、発生初期に形成される始原生殖細胞に由来します。ショウジョウバエの始原生殖細胞は、その細胞分裂サイクルを停止していることが知られていますが、その詳細な機構はわかっていませんでした。本研究では、形成直後の始原生殖細胞において、miR-10404と呼ばれるマイクロRNA^{※1)}の合成が抑えられ、それにより、始原生殖細胞の細胞分裂サイクルを停止させる働きを持つ、dacapo (dap)と呼ばれる遺伝子が活性化していることを明らかにしました。さらに、始原生殖細胞の細胞分裂サイクルを強制的に開始させると、生殖細胞形成過程が正常に進行できなくなることも発見しました。このことは、細胞分裂サイクルの停止が、ショウジョウバエの生殖細胞形成過程において重要な役割を果たしていることを示しています。細胞分裂サイクル停止は多くの動物に共通する生殖細胞形成過程の特徴の1つであり、本研究の成果は、他の動物においても同様の機構を明らかにする糸口となることが期待されます。

本研究の成果は、2020年2月28日付「iScience」でオンライン先行公開されました。

* 本研究は、日本学術振興会が助成する科学研究費補助事業 新学術領域研究「PGCの形成を制御する遺伝子ネットワークの解明」(研究期間:平成25~29年度)、「生殖細胞発生過程における選択機構の解明」(研究期間:平成30~34年度)によって実施されました。

研究の背景

ショウジョウバエの生殖細胞(卵や精子)は、卵の後端に形成される始原生殖細胞に由来します。始原生殖細胞は、卵の後端から卵巣や精巣(生殖巣)へ移動し、生殖巣中で卵や精子を生み出します。この生殖巣への移動過程において、始原生殖細胞の細胞分裂サイクルは停止しています。

細胞分裂サイクルは、以下の4つのステップから成っています。それらは、①DNA(デオキシリボ核酸)に書き込まれている遺伝子情報のセットをコピー(複製)する「DNA複製期」(S期)、②分裂準備期(G2期)、③遺伝情報をそれぞれ1セット持つ2つの細胞を分裂により生み出す「細胞分裂期」(M期)、④複製準備期(G1期)です(参考図)。始原生殖細胞では、G2期からM期への移行とG1期からS期への移行が抑制されています。このうちG2期からM期への移行は、始原生殖細胞に取り込まれるnanos (nos)と呼ばれる遺伝子の産物(Nanosタンパク質)により抑制されていることが明らかになっていました^{参考文献1)}。さらに、この抑制を解除しても、細胞分裂サイクルはG1期で停止してしまうことから、Nanosタンパク質は、G1期からS期への移行も抑制していると考えられてきました。しかし、その制御機構は長い間不明でした。そこで本研究では、このG1期からS期への移行を抑える機構を明らかにし、細胞分裂サイクルの停止が生殖細胞形成過程に果たす役割の解明を目指しました。

研究内容と成果

本研究では、以下の点について明らかにしました。

(1) 細胞の中には、「核小体」と呼ばれる領域が存在します。核小体では、リボソーム DNA からリボソーム RNA が合成されます。しかし、形成直後の始原生殖細胞中には、この核小体が観察されません。本研究グループは、この核小体の形成が、始原生殖細胞に取り込まれる Polar granule component (Pgc)タンパク質をコードする pgc 遺伝子により抑制されていることを明らかにしました。さらに、pgc 遺伝子は、リボソーム RNA だけでなく、リボソーム DNA にコードされる miR-10404 と呼ばれるマイクロ RNA ^{参考文献2)}の合成を抑制することもわかりました。

(2) miR-10404 は、dacapo (dap)と呼ばれる遺伝子の働きを抑えることを明らかにしました。dap 遺伝子は、細胞分裂サイクルのG1期からS期への移行を妨げます。すなわち、始原生殖細胞では、miR-10404の合成が抑えられ、dap 遺伝子が働くことにより、G1期からS期への移行が抑制されていることを見出しました。

(3) pgc 遺伝子は nos 遺伝子が働くために必要であることがわかっています。従って、pgc 遺伝子の機能を欠く始原生殖細胞では、nos 遺伝子の働きにより抑制されるはずの G2 期から M 期への移行が進行してしまうと考えられます。それと同時に、miR-10404 が合成され、dap 遺伝子を抑制することで、G1 期から S 期への移行阻害が解除されます。実際に、pgc 遺伝子の機能を欠く始原生殖細胞では、G2 期から M 期への移行阻害と G1 期から S 期への移行阻害が同時に解除されることを明らかにしました(参考図)。

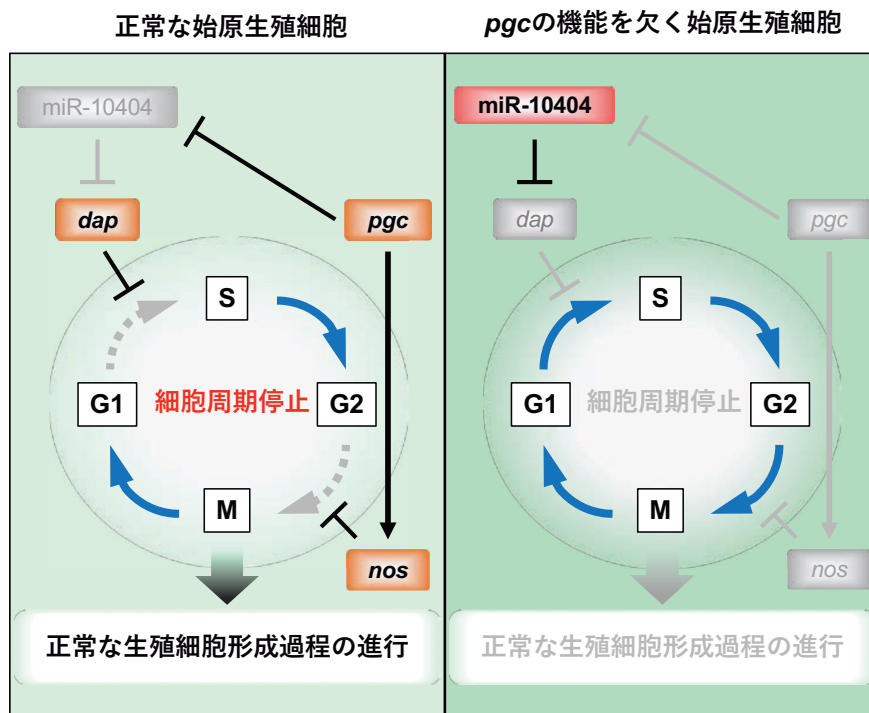
(4)始原生殖細胞の細胞分裂サイクルにおいて、阻害されるべき、G2 期から M 期、および、G1 期から S 期への移行を強制的に開始させると、始原生殖細胞数が減少したり、生殖巣へと正常に移動できなくなるなどの異常が観察されました。

以上の成果から、ショウジョウバエ始原生殖細胞における細胞分裂サイクルの停止機構の全貌が明らかとなりました。また、この細胞分裂サイクルの停止が、ショウジョウバエの生殖細胞形成過程において重要な役割を果たしていることがわかりました。

今後の展開

細胞分裂サイクル停止は多くの動物に共通する生殖細胞形成過程の特徴の1つであり、今後、他の動物においても同様の機構を解析する上での重要な基盤となることが期待されます。

参考図



始原生殖細胞の細胞分裂サイクルにおける pgc 遺伝子の働き

(左図) pgc 遺伝子が働いていると、nos 遺伝子の活性化と、miR-10404 合成抑制に伴う dap 遺伝子の活性化により、細胞分裂サイクルのうち、G2 期から M 期、および G1 期から S 期への移行が阻害され、細胞分裂サイクルが停止する。

(右図) pgc 遺伝子の機能を欠くと、nos 遺伝子が働かず、また、miR-10404 が合成されて dap 遺伝子を抑制するため、細胞分裂サイクルが停止せず、生殖細胞形成に異常が生じる。

用語解説

注1) マイクロ RNA

20~25 塩基長の極小 RNA であり、他の遺伝子の働きを抑制することができる。

参考文献

- (1) Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K., and Kobayashi, S. (1999). Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nat. Cell Biol.* 1, 431–437.
- (2) Chak, L., Mohammed, J., Lai, E.C., Tucker-Kellogg, G., and Okamura, K. (2015). A deeply conserved, non-canonical miRNA hosted by ribosomal DNA. *RNA* 21, 375–384.

掲載論文

【題名】 Repression of G1/S transition by transient inhibition of miR-10404 expression in *Drosophila* primordial germ cells

(ショウジョウバエ始原生殖細胞における一過的な miR-10404 の発現抑制による G1/S 移行の停止)

【著者名】 Shumpei Morita, Ryoma Ota, Makoto Hayashi and Satoru Kobayashi

【掲載誌】 iScience (DOI: 10.1016/j.isci.2020.100950)

問合わせ先

小林 悟(こばやし さとる)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

News Release



令和2年4月7日

各報道機関文教担当記者 殿

ナノサイズの細胞外膜小胞の物性イメージングに成功 ～細菌は不均一な性質の膜小胞を放出する～

金沢大学理工研究域生命理工学系／ナノ生命科学研究所の田岡東准教授らと筑波大学生命環境系および微生物サステナビリティ研究センターの野村暢彦教授らの共同研究グループは、細菌が環境中に放出する微小な袋状の膜構造体（メンブレンベシクル：MV（※1））の物理的性質を原子間力顕微鏡（※2）と呼ばれる顕微鏡技術を用いて調べる方法を開発しました。

近年の国内外の研究で、MVは、細菌間の情報伝達やタンパク質の輸送、遺伝子の水平伝播に関与し、抗生物質やファージ（※3）への「おとり」として働いて細菌の生存を助けるなど、細菌の生存戦略に深く関わる重要な因子であることが報告されています。しかし、細菌が放出するMVの大きさは直径20～400ナノメートル（nm、※4）程度と極めて小さいだけでなく、リン脂質膜（※5）という非常に柔らかくもろい構造でつくられていることから、MV粒子一つ一つの性質を個別に調べる方法は開発されておらず、MVの詳しい実態はこれまで明らかにされていませんでした。

本共同研究グループは、溶液中でMV 1粒子の物理的性質を定量的に調べる方法を開発し、4種類の細菌が放出したMVの性質を比較しました。その結果、1種類の細菌が物理的性質の異なる多様な性質のMVを放出すること、また細菌種ごとに放出するMVに種特異的な性質の違いがあることを見いだしました。

MV 1粒子の解析を可能にした本手法は、MVの実態解明や、MVを介した生命現象のメカニズムの解明に貢献することが期待されます。

本研究の成果は、2020年3月23日に国際学術雑誌『Nanoscale』のオンライン版に掲載されました。

【研究の背景】

細菌は、細胞膜で構成された微小な袋状の膜構造体であるMVを環境中に放出します。このMVは、細菌の生存のためのさまざまな役割を持つことが、近年の研究により明らかになりました（図1）。例えば、MVは、情報伝達分子や遺伝物質を含み、細菌の細胞と細胞との間での情報伝達や遺伝子の伝播を仲介します。また、細菌による感染では、毒素因子の運搬や病巣でのバイオフィルムの形成など、細菌の病原性にも関わっています。さらに、抗生物質やファージへの「おとり」として細菌が生き抜くための防御に働くことが知られています。このようにMVは、細菌の生存戦略のための多様な役割を果たしています。また、細菌がMVを形成するメカニズムに、複数の経路が存在することが分かり、MVの機能や性質に多様性があるのではないかとという仮説が提唱されました。

細菌の放出するMVの分子レベルの実態は不明な点が多く、MVが多様な機能を担う仕組みや、一つ一つのMVの性質については、よく分かっていません。MVは、直径200～400 nm程度と非常に小さく、また壊れやすい細胞膜でできているため、MV1粒子の性質を生理的環境下で詳細に調べることが困難でした。そのため、MVの性質を生理的環境に近い溶液中でナノメートルレベルの分解能で解析することができる新しい手法の開発が求められていました。

【研究成果の概要】

本共同研究グループは、原子間力顕微鏡の位相イメージング（※6）を用いて、MV1粒子の物理的な性質を測定する手法を開発しました（図2）。原子間力顕微鏡の位相イメージングは、表面化学やマテリアルサイエンスの分野で、主に無機物の物性測定に用いられる方法です。本研究では、その手法を生体試料の観察に応用しました。しかし、従来の原子間力顕微鏡は、試料に与える力が強く、柔らかく壊れやすいMVを観察することは困難です。そこで、本研究では、タンパク質分子や細胞などの壊れやすい生体物質を生理的な溶液中で観察することに特化した高速原子間力顕微鏡（金沢大学ナノ生命科学研究所の安藤敏夫特任教授らが開発）を用いることで、ナノメートルサイズの小さかつ柔らかく壊れやすいMV1粒子の物理的性質の測定に成功しました（図3）。

この高速原子間力顕微鏡の位相イメージングにより、3種類のグラム陰性細菌と1種類のグラム陽性細菌が放出したMVの物性分布を調べて比較しました。その結果、これらの細菌は、物性の異なる複数のタイプのMVを放出することを初めて実験的に確かめることができました。さらに、細菌が環境中に放つMVの物理的特性には細菌種ごとに特異性があることが明らかになりました。このようなMVの不均一性は、MVの形状や構造ではなく、MVを構成する物質組成に起因することが示唆されました。本研究により、MVの性質に多様性があることが初めて示されました。

【今後の展開】

本研究でMVの不均一性が実験的に確かめられたことは、MVの機能多様性やMVによる種特異的な情報伝達のメカニズムを検証するために重要な知見と考えられます。細胞外に膜小胞を放出する現象は、細菌だけでなく、動物やヒトの組織でもよく知られて

います。本研究で開発された1粒子の膜小胞の物性解析法は、多様な細胞外膜小胞の研究への応用が期待できます。

本研究は、科学技術振興機構（JST）の戦略的創造研究推進事業ERATO「野村集団微生物制御プロジェクト」（研究総括：野村暢彦）および文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム（WPI）の支援を受けて実施されました。

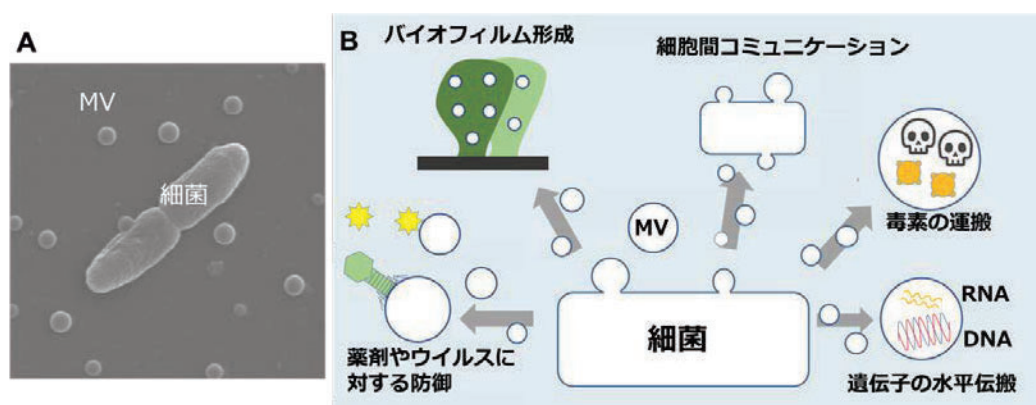


図1. メンブレンベシクル（MV）の多様な役割

MVは、細菌が細胞外に放出する細胞膜で構成された膜小胞である（A）。細菌が放出するMVにはさまざまな役割がある（B）。例えば、MVは、細菌をターゲットとする薬剤やウイルスから細菌を防御するおとりとしての役割や、バイオフィームと呼ばれる細菌集団が作るスライム状の構造体の材料を提供する。また、シグナル分子を介した細胞間コミュニケーション、毒素の運搬、さらに新しい形質を獲得するための遺伝子の水平伝播など物質の運び手として働く。

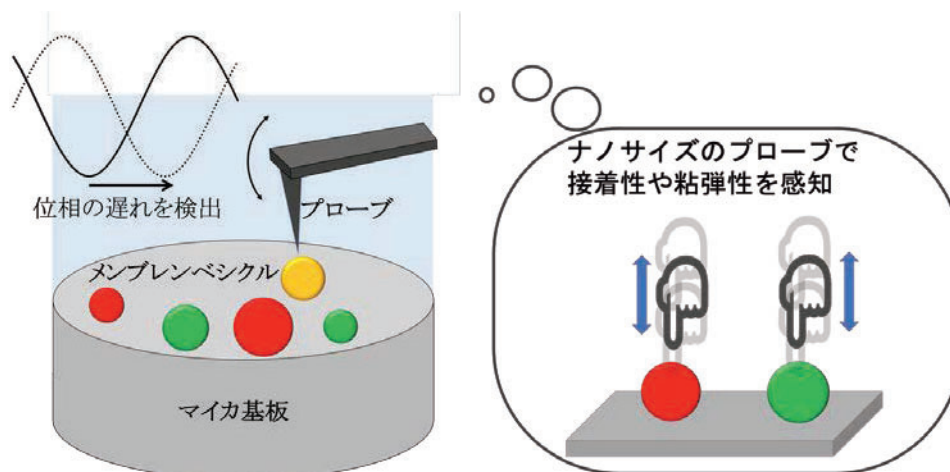


図2. 高速原子間力顕微鏡による位相イメージングの概要図

高速原子間力顕微鏡は、マイカ基板の上に固定された試料のイメージングを行う。プローブと呼ばれる非常に鋭い針が、振動しながら試料の上をなぞることで、試料の形を画像化する。このイメージング中に位相の遅れと呼ばれるプローブ振動の変化を検出し、位相遅れを画像化するのが位相イメージングである。この位相の遅れは、プローブがなぞっている試料表面の接着性や粘弾性などの物理的性質に依存する。本研究グループは、個々のMV粒子の物理的性質を、位相イメージングによって見える化した。

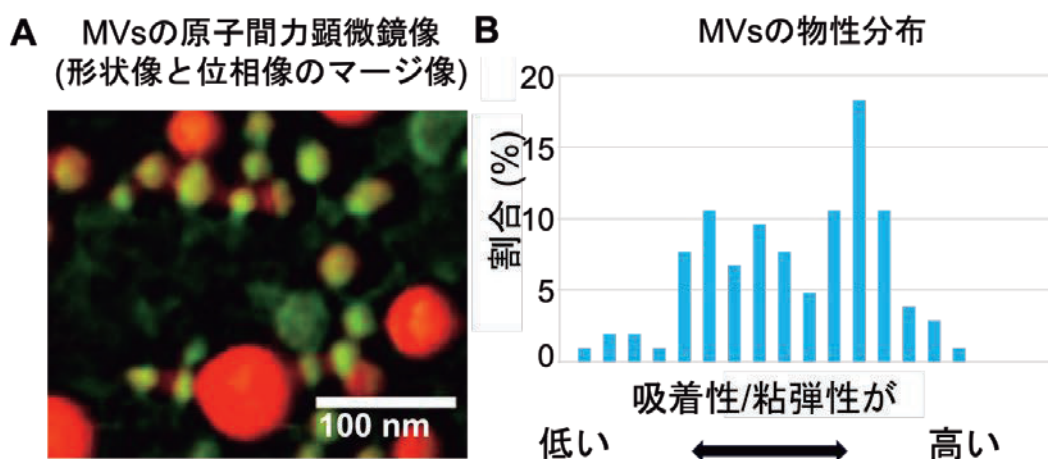


図3. 高速原子間力顕微鏡によるMV粒子の位相イメージング結果

高速原子間力顕微鏡の位相イメージングによって見える化された1種類の細菌から放出されたMV粒子の表面物性 (A)。位相イメージングでは、MV粒子ごとの物理的性質の違いが色で示される。赤いMV粒子は吸着性や粘弾性が低く、MV粒子の色がオレンジから黄色、緑となるにつれて吸着性や粘弾性が高いことを表す。このような高速原子間力顕微鏡像から、MVの物性分布を定量的に解析した (B)。その結果、1種類の細菌が分泌したMVは、物理的な性質が異なる粒子の集団であることが明らかになった。

【掲載論文】

雑誌名 : Nanoscale

論文名 : Diversity of physical properties of bacterial extracellular membrane vesicles revealed through atomic force microscopy phase imaging

(原子間力顕微鏡の位相イメージングによって明らかになった細菌の細胞外膜小胞の物性多様性)

著者名 : Yousuke Kikuchi, Nozomu Obana, Masanori Toyofuku, Noriyuki Kodera, Takamitsu Soma, Toshio Ando, Yoshihiro Fukumori, Nobuhiko Nomura*, Azuma Taoka*

(* equal contribution)

(菊池 洋輔, 尾花 望, 豊福 雅典, 古寺 哲幸, 相馬 隆光, 安藤 敏夫, 福森 義宏, 野村 暢彦*, 田岡 東*) (*同等貢献)

掲載日時 : 2020 年 3 月 23 日にオンライン版に掲載

DOI : 10.1039/C9NR10850E

【用語解説】

※1 メンブレンベシクル : MV

細菌が環境中に放出する細胞膜によって構成される直径 20 ~ 400 nm の微小粒子のこと。ほとんどの細菌が MV を形成し、環境中の物質循環や生態系に大きな影響を及ぼすと考えられている。

※2 原子間力顕微鏡

走査型プローブ顕微鏡の一種であり、先端が極めて鋭い探針が試料表面を走査しながら試料の表面の凹凸の計測を行う。

※3 ファージ

細菌に感染するウイルスの総称。ファージが細胞膜に結合することで細菌は感染する。

※4 ナノメートル (nm)

長さの単位で 100 万分の 1 ミリメートル。

※5 リン脂質膜

親水性と親油性を併せ持つリン脂質が二層になった膜。生物の細胞膜を構成する基本構造として利用されている。

※6 位相イメージング

原子間力顕微鏡の測定モードの一つ。試料表面の物理的性質（吸着性や粘弾性など）がプローブ振動の位相遅れと呼ばれる物理量に影響を与える。位相イメージングは、この位相遅れを利用して、試料表面の物理的性質の違いを可視化する。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学理工研究域生命理工学系／ナノ生命科学研究所 准教授

田岡 東（たおか あずま）

TEL：076-264-6234

E-mail：aztaoka@staff.kanazawa-u.ac.jp

筑波大学生命環境系／微生物サステナビリティ研究センター 教授

JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 研究総括

野村 暢彦（のむら のぶひこ）

TEL：029-853-6627

E-mail：nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp

■広報担当

金沢大学総務部広報室広報係

上沼 孝平（かみぬま たかひら）

TEL：076-264-5024

E-mail：koho@adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

米田 洋恵（よねだ ひろえ）

TEL：076-234-4556

E-mail：nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp

筑波大学広報室

TEL：029-853-2040

E-mail：kohositu@un.tsukuba.ac.jp

