

3. プレスリリース

2021年4月19日 岩崎プロジェクト

タンパク質の抗体ラベリング技術を改良し、構造解析をアシスト
～電子顕微鏡やX線結晶解析による構造決定を加速化～

2021年4月22日 柳沢プロジェクト

血管障害後の新生内膜形成に関わる細胞の役割を解明

2021年4月30日 柳沢プロジェクト

ラマン分光法における大動脈瘤の診断マーカースペクトルを同定

2021年6月11日 柳沢プロジェクト

難治性筋原線維性ミオパチーの病態メカニズムを解明

2021年8月18日 丹羽プロジェクト

昆虫がヒトと同様の腸ホルモンによる代謝調節の仕組みを持つことを発見

2021年10月7日 柳沢プロジェクト

骨修復において幹細胞が動くメカニズムを解明

2021年10月11日 小林プロジェクト

ショウジョウバエ系統の凍結保存法を開発

2021年11月2日 小林プロジェクト

ショウジョウバエ始原生殖細胞におけるタンパク質の合成活性の性差を発見

2022年2月16日 丹羽プロジェクト

昆虫ホルモンの生合成を攪乱する蚊の発育阻害剤の発見
～環境に優しい農薬の開発に向けて～

2022年3月24日 岩崎プロジェクト

クライオ電子顕微鏡によりビフィズス菌酵素の微小構造を発見

2021年4月19日
横浜市立大学
筑波大学
大阪大学
京都大学
東北大学
日本医療研究開発機構

タンパク質の抗体ラベリング技術を改良し、構造解析をアシスト ～電子顕微鏡やX線結晶解析による構造決定を加速化～

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科の禾 晃和准教授らは、筑波大学、大阪大学蛋白質研究所、京都大学、東北大学との共同研究で、タンパク質に外来の抗原配列を移植して抗体を結合させる技術を開発しました。本技術によって、これまで直接結合する抗体がなかったタンパク質に抗体を結合させることが可能になり、X線結晶解析^{*1}や電子顕微鏡単粒子解析^{*2}で立体構造情報が明らかになる可能性があります。

本研究成果は、科学誌「Acta Crystallographica Section D, Structural Biology」に掲載されます。(英国夏時間 2021年4月19日午前9時掲載)

研究成果のポイント

- 標的タンパク質の立体構造を壊さずに抗原配列を移植し、抗体を結合させてラベリングできる技術を開発した
- 抗体ラベリング^{*3}の適用拡大で、電子顕微鏡やX線結晶解析による構造決定の可能性も広がった

研究背景

タンパク質の立体構造解析は、生命現象の解明だけでなく、創薬においても非常に重要な研究手法です。その解析において、抗体は有用な実験ツールとして用いられてきました。特にタンパク質の抗体によるラベリングは、X線結晶解析では、結晶になりにくいタンパク質の結晶化を促進させる効果があり、電子顕微鏡解析では、コントラストが低い画像から標的タンパク質を見つけ出す目印として役立ちます。しかしながら、抗体でラベリングを行うには、標的タンパク質を直接認識する抗体があることが前提で、適用範囲は限られていました。

この課題に対し、禾准教授らは新たな抗体ラベリング技術の開発に取り組んできました。これまでに、「PA タグ」と呼ばれる12残基のアミノ酸配列を標的タンパク質に移植し、このPA タグと強固に結合するNZ-1抗体でラベリングする技術を開発しました(図1)。このPA タグの移植部位を最適化することで、標的タンパク質にNZ-1抗体が安定に結合することが示されましたが、PA タグの移植やそのNZ-1抗体との結合によって標的タンパク質の一部の構造が変化してしまうことも明らかになっていました。

研究内容

そこで今回の研究では、タグの長さを伸ばすことで移植した際の標的タンパク質の構造変化を抑えることを試みました。その結果、PA タグの N 末端側にアミノ酸残基を 2 つ付け加えた PA14 タグでは、標的タンパク質を天然の構造に近い状態に維持できることが示されました。

標的タンパク質に PA14 タグを移植して X 線結晶解析を行ったところ (図 2)、PA14 タグは NZ-1 抗体と結合すると末端同士が近づいてリング状の構造をとること (図 3)、そして NZ-1 抗体が結合しても標的タンパク質の立体構造がほとんど壊れないことが確かめられました (図 4)。さらに分子動力学シミュレーション⁴からも、PA14 タグを移植した標的タンパク質の構造が安定に維持されることを確認しました。そして、PA14 タグを細胞膜の中で働くタンパク質に移植し、NZ-1 抗体を結合させて負染色電子顕微鏡解析⁵を行うことで、標的タンパク質の構造情報を取得することにも成功しました (図 5)。

今後の展開

今回の研究から、PA14 タグは標的タンパク質に移植して抗体を結合させるのに適した配列であることが確かめられましたが、その一方で、標的タンパク質に結合した NZ-1 抗体の向きが完全には固定されず、揺らぐ場合があることも分かりました。今後、標的タンパク質の構造は壊さずに抗体の向きを固定できるようになれば、クライオ電子顕微鏡などを用いて精密に立体構造を調べることが可能になると期待されます。

論文情報

タイトル : **Moving toward generalizable NZ-1 labeling for 3D structure determination with optimized epitope tag insertion**

著者 : Risako Tamura-Sakaguchi, Rie Aruga, Mika Hirose, Toru Ekimoto, Takuya Miyake, Yohei Hizukuri, Rika Oi, Mika K. Kaneko, Yukinari Kato, Yoshinori Akiyama, Mitsunori Ikeguchi, Kenji Iwasaki, Terukazu Nogi

掲載雑誌 : Acta Crystallographica Section D, Structural Biology

DOI : <https://doi.org/10.1107/S2059798321002527>

研究費

※本研究は、日本学術振興会科研費、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 (BINDS)、横浜市立大学 学術的研究推進事業 研究奨励プロジェクトの助成を受けて実施されました。

お問い合わせ先

< 研究成果に関する窓口 >

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科

准教授 禾 晃和

Tel : 045-508-7226 E-mail : nogi@yokohama-cu.ac.jp

< 取材対応に関する窓口 >

横浜市立大学 広報室

担当課長 上村 一太郎

Tel : 045-787-2414 E-mail : koho@yokohama-cu.ac.jp

筑波大学 広報室 報道担当

Tel : 029-853-2040

京都大学 総務部広報課国際広報室

Tel : 075-753-5729 Fax : 075-753-2094

E-mail : comms@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

大阪大学 蛋白質研究所 広報室

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

東北大学 大学院医学系研究科・医学部広報室

Tel : 022-717-8032 E-mail : press@pr.med.tohoku.ac.jp

< AMED事業に関すること >

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 (BINDS)

創薬事業部 医薬品研究開発課

Tel : 03-6870-2219 E-mail : 20-DDLSG-16"AT"amed.go.jp

**SUSTAINABLE
DEVELOPMENT
GOALS** 横浜市立大学は、
様々な取り組みを
通じてSDGsの達
成を目指します。



参 考

用語説明

*1 X線結晶解析：

結晶化した物質に X 線を照射して回折パターンを解析し、立体構造情報を取得する研究手法。タンパク質のような巨大な分子でも結晶化すれば、解析が可能になる。

*2 電子顕微鏡単粒子解析：

タンパク質試料に電子線を照射して撮影した透過像から立体構造情報を取得する技術。重金属塩を満たしてタンパク質に浸潤させ形状を解析する負染色電子顕微鏡法^{*5}とタンパク質を薄い氷の中に閉じ込めて構造を解析するクライオ電子顕微鏡法が代表的な解析手法である。

*3 抗体ラベリング：

標的となるタンパク質に抗体を結合させる技術。立体構造解析で利用する際は、抗原結合部位を含む抗体の一部を結合させる場合が多い。

*4 分子動力学シミュレーション：

計算機シミュレーションの1つで、分子を構成する各原子の運動を解析する研究手法。実験的に観測が難しい、分子の動的な性質を解析することが可能となる。

*5 負染色電子顕微鏡解析

タンパク質などの生体試料を重金属塩で染色すると、試料の隙間や周囲に重金属塩が浸潤する。染色後の試料に電子線を照射すると、主に電子散乱能の大きい重金属塩が形成するコントラストにより間接的にタンパク質など生体試料の形状を観察できる。透過像で実際に観察しているのは重金属塩の分布であることから負染色と呼ばれる。

図、画像、表

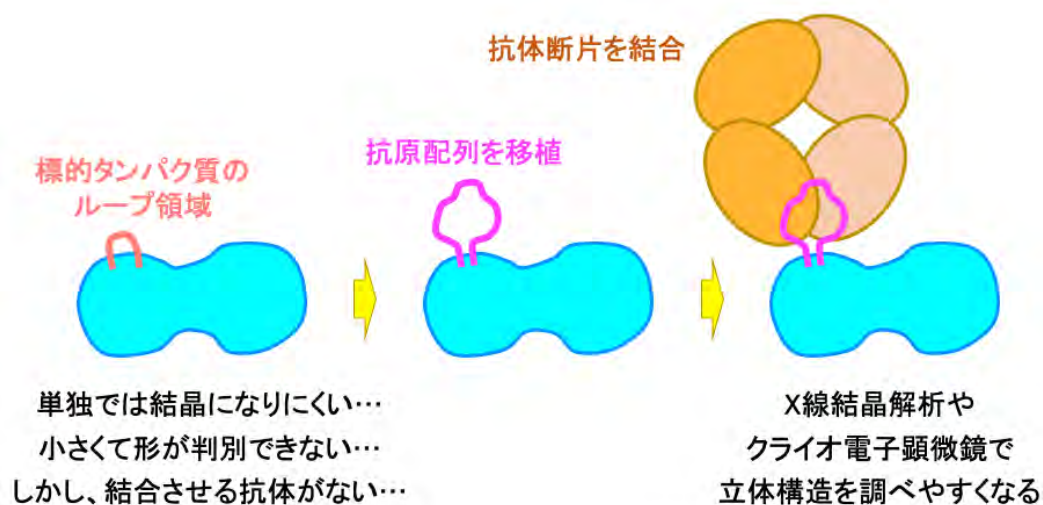


図1 外来の抗原配列を利用した抗体ラベリング法

標的タンパク質のループ領域に、外来の抗原配列を移植し、これを認識する抗体の断片を結合させることで、特異的に結合する抗体がない標的タンパク質にも抗体ラベリング法を用いることが可能になる。抗体ラベリング法は、X線結晶解析では結晶化を促進させる効果があり、クライオ電子顕微鏡でも小さくて判別が難しいタンパク質を画像の中から見つけ出すのに役立つことから、立体構造解析での有用なツールとなっている。

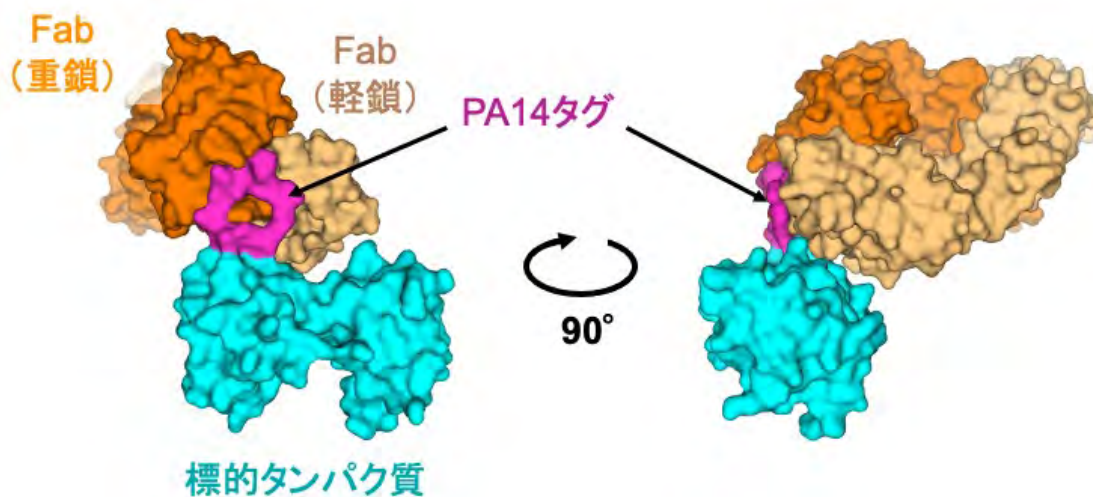


図2 PA14 タグの移植によって作製した抗体断片と標的タンパク質の複合体

水溶性のタンパク質を標的タンパク質として用いて、PA14 タグの挿入と抗体断片の結合が可能かどうかを調べた。水色の標的タンパク質の表面からマゼンタ色の PA14 タグが突き出し、濃淡2色のオレンジ色で示した抗体の Fab 断片が結合している様子が、X線結晶解析で明らかになった。

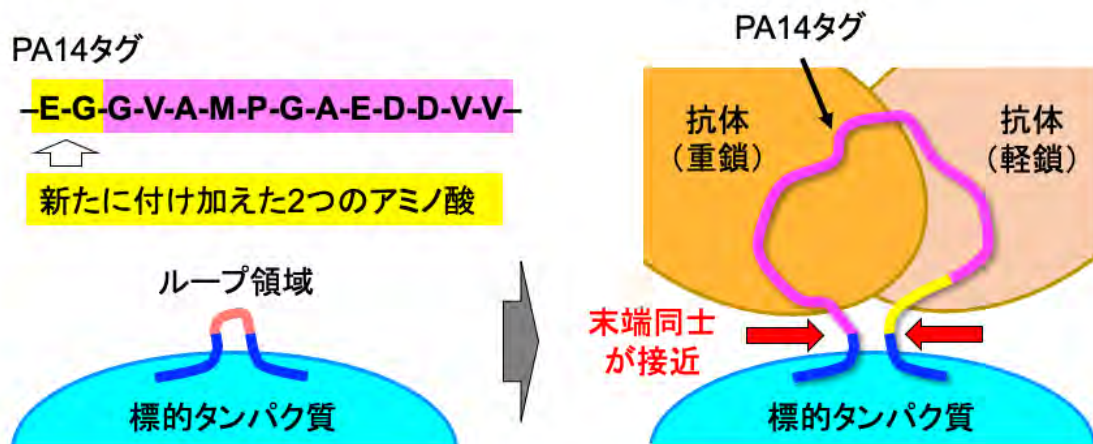


図3 PA14 タグの配列と抗体との結合状態

PA14 タグは、12個のアミノ酸からなるPA12 タグの先頭にE（グルタミン酸）とG（グリシン）の2つのアミノ酸を付け加えたものである。新たに付け加えた2つのアミノ酸によって、抗体と結合した時のPA14 タグは、最初と最後のアミノ酸が接近することが可能になり、全体では閉じたリング状の形をとる。このような性質があることで、分子表面から飛び出していないループ領域にもPA14 タグを移植して抗体を結合させられることが、今回の研究でも確かめられた。

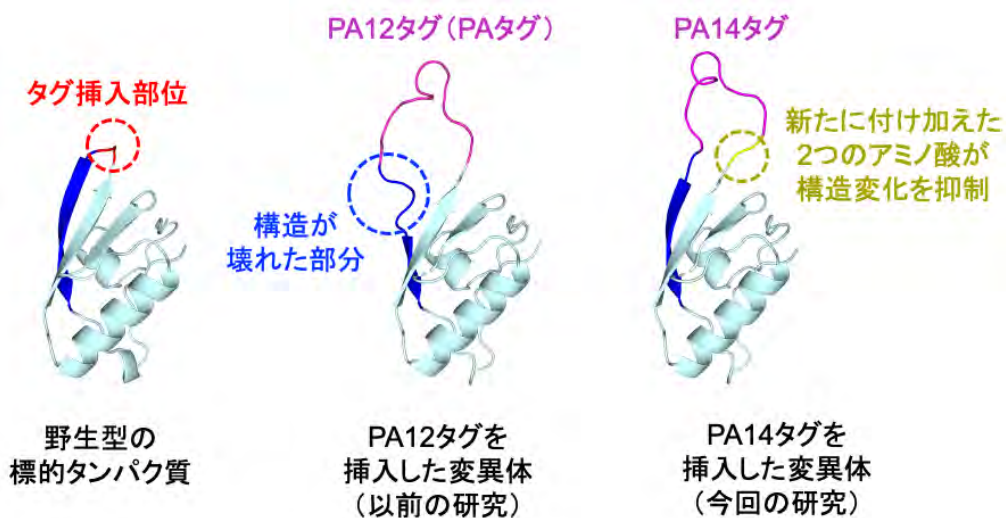


図4 タグの移植と抗体の結合によって生じる標的タンパク質の構造変化

以前の研究と今回の研究では、いずれも標的タンパク質の β -ヘアピン領域の先端に抗原配列を移植した（左の図）。以前の研究で、PA12 タグ（一般的には、PA タグと呼ぶ）を移植して抗体を結合させた時は、青色で示した β -ストランド構造が壊れてしまう問題が起きた（真ん中の図）。今回、黄色色の2つのアミノ酸を付け加えたPA14 タグを移植して抗体断片を結合させたところ、青色の β -ストランド構造は、タグを挿入していない野生型とよく似た状態に保たれることがわかった（右の図）。

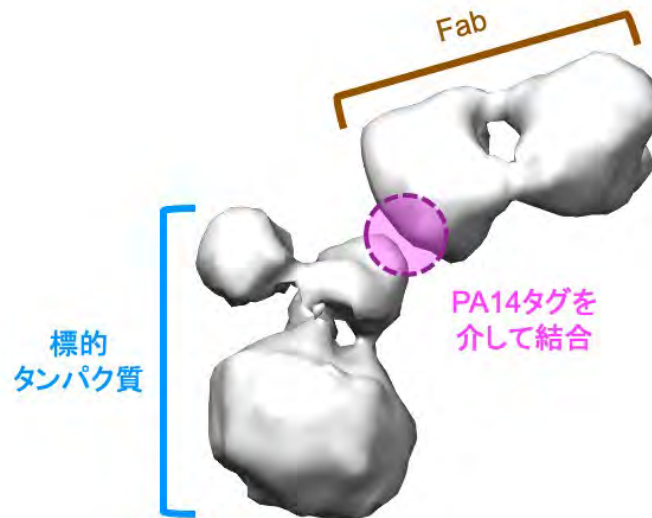


図5 PA14 タグによる抗体ラベリング法の電子顕微鏡解析での応用

PA14 タグを膜タンパク質(膜に埋もれた状態ではたらくタンパク質)に移植し、抗体ラベリングを行った。この膜タンパク質の水溶性の領域にあるループに PA14 タグを移植した変異体を細胞の中で発現させてから、界面活性剤で膜から溶かし出し、抗体断片を結合させた。この膜タンパク質と抗体断片の複合体に重金属溶液を添加し、負染色電子顕微鏡単粒子解析によって概形を調べた。抗体断片や膜タンパク質の水溶性ドメインの形状がはっきりとわかるデータが得られた。

研究体制

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科

准教授 禾 晃和

教授 池口 満徳

助教 浴本 亨

筑波大学生存ダイナミクス研究センター

教授 岩崎 憲治

大阪大学 蛋白質研究所

特任研究員(常勤) 廣瀬 未果

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

教授 秋山 芳展

助教 檜作 洋平

東北大学未来科学技術共同研究センター / 大学院医学系研究科

教授 加藤 幸成

参考文献

PA タグを利用した抗体ラベリング技術の開発の先行研究に関する論文

タイトル：**Application of the NZ-1 Fab as a crystallization chaperone for PA tag-inserted target proteins**

著者：Risako Tamura, Rika Oi, Satoko Akashi, Mika K. Kaneko, Yukinari Kato, Terukazu Nogi

掲載雑誌：Protein Science (2019) **28**, 823-836

DOI：10.1002/pro.3580

2021年4月22日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学

国立大学法人熊本大学

血管障害後の新生内膜形成に関わる細胞の役割を解明

アテローム性動脈硬化症は、令和元年の日本人の死因第2位である心疾患や脳血管疾患の原因となる病態です。アテローム性動脈硬化症による冠動脈狭窄症や頸動脈狭窄症と、それらに対するバルーン付きカテーテル操作やステント挿入後に生じる再狭窄などの血管疾患では、血管の内側の層が厚くなる新生内膜形成を伴うことが分かっています。血管疾患を理解するためには、この新生内膜形成のメカニズム解明が重要な鍵となります。

これまでの研究で、新生内膜の形成には血管中膜に存在する細胞や血管外膜に存在する細胞が関与していることが知られていましたが、新生内膜形成に関わる細胞の詳しい性質は明らかになっていませんでした。そこで本研究では、血管壁に存在する細胞の挙動を追跡し、新生内膜形成に関わる細胞の動態の一端を明らかにしました。

血管壁を構成する細胞では、血小板由来成長因子受容体アルファ（PDGFRa）が発現していることをヒントに、PDGFRaを発現する細胞を蛍光タンパク質で標識できるマウスを用いて、病状の異なる3種類の血管障害モデルを作製し、標識細胞が新生内膜形成にどのように関わるかを追跡しました。その結果、血管損傷の程度によって新生内膜を構成する細胞の種類が異なること、さらに、PDGFRa陽性細胞の血管障害に対する応答性が異なることを見いだしました。

本研究により、新生内膜形成機構におけるPDGFRa陽性細胞の役割が明らかとなり、動脈硬化をはじめとした血管疾患治療のターゲットになり得ることが期待されます。

研究代表者

筑波大学生存ダイナミクス研究センター

木村 健一 助教

柳沢 裕美 教授

熊本大学国際先端医学研究機構

佐田 亜衣子 特任准教授

研究の背景

アテローム性動脈硬化症^{注1)}や冠動脈形成術後は、血管の内側の層が厚くなる新生内膜形成を伴い、血管狭窄を引き起こすことが知られています。この新生内膜がどのようにしてできるのかについての研究は、血管疾患を理解するための重要な鍵であると、長い間考えられてきました。動脈は、内膜、中膜、外膜の三層からなり、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞などにより構成されています。また外膜には血管の幹細胞が存在することも報告されています。これまでの研究で、血管外膜細胞や中膜平滑筋細胞が新生内膜形成に関わっていることが分かっていますが、その詳しい細胞の種類や動態については明らかになっていません。

研究内容と成果

本研究では、血管壁を構成する細胞において、血小板由来成長因子受容体アルファ (PDGFRa)^{注2)}が発現していることをヒントに、PDGFRaを発現する細胞を蛍光タンパク質によって標識したマウスを用いて、細胞系譜解析を行いました。これによって、この標識細胞が血管壁のどこに存在し、血管障害による新生内膜形成にどのように関わるかを追跡することができます。

まず、PDGFRaを発現する細胞が、動脈の恒常性維持にどのように働いているか解析したところ、2年間の長期にわたって血管外膜および中膜に維持されていることが分かりました。このマウスを用いて、頸動脈結紮(けっさつ)モデル、頸動脈ワイヤー障害モデル、横大動脈縮窄モデル、の3種類の病状の異なる血管障害モデルを作製し、それぞれのPDGFRa陽性細胞について、血管損傷に対する応答性の違いを解析しました。

その結果、頸動脈結紮モデルでは、PDGFRa陽性細胞はゆっくりと内膜へと移動し、術後8週間かけて未熟平滑筋細胞へと分化して新生内膜形成およびリモデリングに関わることが分かりました(図1A)。一方で、頸動脈ワイヤー障害モデルにおいてPDGFRa陽性細胞は、外膜より内膜へと速やかに遊走し、成熟平滑筋細胞へと分化して新生内膜形成に関与します。また、外膜に存在するPDGFRa陽性細胞は、横大動脈縮窄モデルによる圧負荷に応答して増殖し、外膜肥厚にも積極的に関与していました。

これらの結果から、血管障害の程度、つまり内皮細胞が保持されている頸動脈結紮モデル、内皮細胞を物理的に剥がす頸動脈ワイヤー障害モデルといった障害の違いや損傷後の時期によって新生内膜を形成する細胞の応答性が異なること(図1B)、さらに、新生内膜形成に、PDGFRa陽性細胞由来の細胞が重要な役割を担うことが明らかになりました。

今後の展開

本研究成果に基づき、今後は、PDGFRa陽性細胞がどのような血管壁の損傷刺激に応答して細胞増殖、分化、移動を起こして新生内膜の形成に関与するかの分子メカニズムを解明していきます。

血管障害の種類に応じてPDGFRa陽性細胞を標的にすることが可能になると、新生内膜の形成を効率よく阻害する治療法の開発につながると考えられます。さらに、血管壁細胞の多様性を探ることで、血管の恒常性維持や障害におけるそれぞれの細胞の役割が明らかになり、新たな血管疾患治療法の開発のための基盤構築が期待されます。

参考図

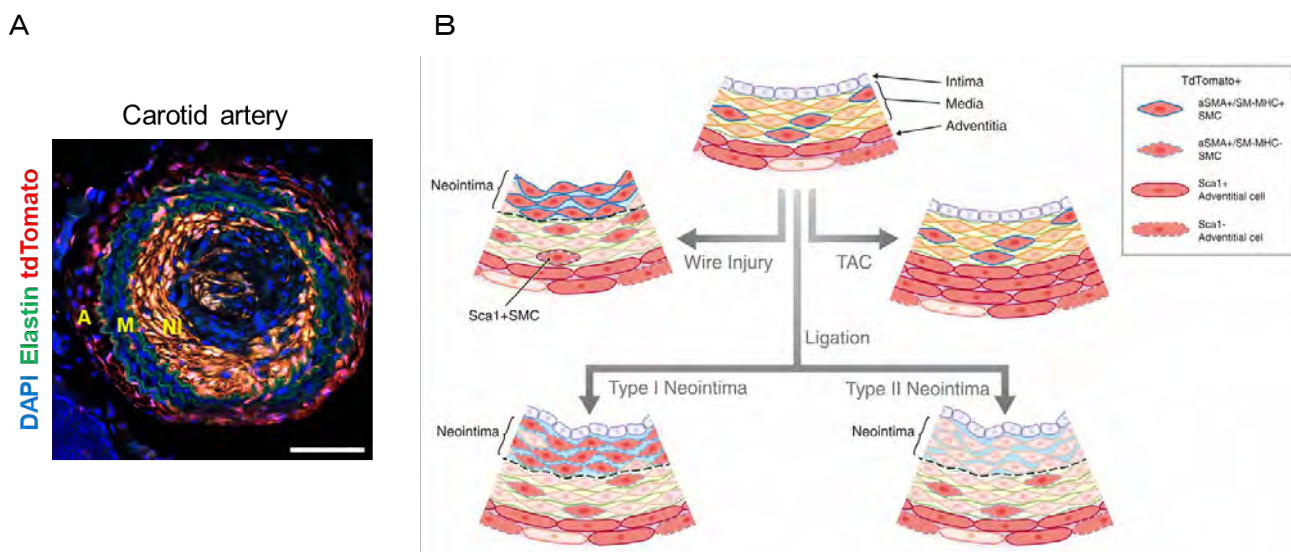


図1 血管障害における PDGFR α 陽性細胞の応答性の違い

A) 頸動脈結紮モデルにおける血管断面像。血管外膜 (A) にある PDGFR α 陽性細胞 (赤色) が内膜へと遊走し、新生内膜 (NI) の形成に関わっている。A: 血管外膜、M: 血管中膜、NI: 新生内膜、スケールバー: 100 μ m。

B) 血管障害モデルによる PDGFR α 陽性細胞の応答性の違い。血管障害の違いによって新生内膜 (Neointima) を構成する細胞種が異なり、PDGFR α 陽性細胞 (赤色) の応答性も異なることが明らかとなった。Wire Injury: 頸動脈ワイヤー障害モデル、TAC: 横大動脈縮窄モデル、Ligation: 頸動脈結紮モデル。

用語解説

注1) アテローム性動脈硬化

大動脈や冠動脈、脳動脈などの動脈の内膜にコレステロールなどが溜まり、アテローム (粥状硬化病変) ができて、内膜の肥厚が起こる疾患。

注2) 血小板由来成長因子受容体アルファ (PDGFR α)

血小板由来成長因子のチロシン関連型受容体で、幹細胞、前駆細胞および血管周皮細胞のマーカーとして知られる膜タンパク質。

研究資金

本研究は、科研費、内藤記念科学振興財団、先進医薬研究財団、日本心臓財団の研究プロジェクトの一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Contribution of PDGFR α -positive cells in maintenance and injury responses in mouse large vessels.

(マウス大血管の恒常性維持と損傷反応における PDGFR α 陽性細胞の関与について)

【著者名】 Kenichi Kimura^{1†}, Karina Ramirez^{1,2†}, Tram Anh Vu Nguyen^{1,2}, Yoshito Yamashiro¹, Aiko Sada^{1,3} and Hiromi Yanagisawa^{1,4}

¹ Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba, Tsukuba, Japan. ² Ph.D. Program in Human Biology, School of

Integrative and Global Majors, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan. ³ International Research Center for Medical Sciences (IRCMS), Kumamoto University, Kumamoto, Japan

⁴ Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.

† These authors contributed equally.

【掲載誌】 Scientific Reports

【掲載日】 2021年4月21日

【DOI】 10.1038/s41598-021-88126-6

問合わせ先

【研究に関すること】

柳沢 裕美 (やなぎさわ ひろみ)

筑波大学生存ダイナミクス研究センター 教授

TEL: 029-853-7318

Email: hkyanagisawa@tara.tsukuba.ac.jp

URL: <http://saggymouse.tara.tsukuba.ac.jp/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

熊本大学総務部総務課広報戦略室

TEL: 096-342-3269

Email: sos-koho@jim.kumamoto-u.ac.jp

2021年4月30日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
学校法人早稲田大学

ラマン分光法における大動脈瘤の診断マーカースペクトルを同定

大動脈瘤は、血管が瘤（こぶ）のように異常に拡張する疾患で、無症状に経過することが多く、瘤が成長して破裂すると死に至る、大変危険な疾患です。しかしながら、大動脈瘤の発症と瘤の成長を根本的に阻止する薬剤や大動脈瘤形成を予測できるバイオマーカーがなく、治療法としては、超音波検査やCT検査などで血管径をモニターし、瘤径が一定基準以上になると手術を行うしかないのが現状です。

血管壁を構成する成分として、コラーゲンなどの膠原線維や、エラスチンなどの弾性線維という細胞外マトリクスが知られており、その異常が大動脈瘤形成に関わることが報告されています。従って、細胞外マトリクスの変化を臨床的に観察することができれば、大動脈瘤形成の診断マーカーとなり得ると考えられます。

近年、非侵襲的に生体分子構造情報を取得する方法として、分光学的手法が注目されています。その一つであるラマン分光法は、物質に光を当てた際に生じる、入射光とは異なるエネルギーを持つ散乱光（ラマン散乱）から、分子の振動などの分子構造情報を得るもので、医学分野への応用が進んでいます。

本研究では、ラマン分光法と多変量解析を組み合わせたアプローチにより、マウスとヒトの大動脈瘤に特異的な、新規マーカースペクトル成分を同定するとともに、大動脈瘤の有無により、弾性線維および膠原線維の構造が異なっていることを解明しました。このような、分光学的手法により非侵襲的に病状を観察する方法は、さまざまな疾患への応用が期待されます。

研究代表者

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター

柳沢 裕美 教授

早稲田大学 理工学術院総合研究所

杉山 夏緒里 次席研究員（研究院講師）

研究の背景

大動脈瘤は、大動脈径が通常の1.5倍以上に拡張し、破裂により死に至る疾患で、患者数は年々増加傾向にあります。しかしながら、大動脈瘤破裂の予兆は少なく、根本的な治療薬もありません。そのため臨床においては、超音波検査やCT検査で大動脈径の拡張をモニターし、既定の瘤径以上になると外科的修復を行います。しかし、基礎疾患を抱えた患者や高齢者への適応は限定的であり、バイオマーカーなどを用いた病状の追跡方法や、病態に応じた治療法の開発が求められています。

大動脈には、心拍出に伴う血流によって生じるメカニカルストレスに耐えられる伸縮性と硬さが必要です。血管壁を構成する主要成分として、伸び縮みを司る弾性線維や、硬さの保持に資する膠原線維などの細胞外マトリクス^{注1}が存在します。弾性線維形成に必要なタンパク質として、フィブリン4やフィブリン5が知られています。本研究グループは、これまでに、マウスの平滑筋細胞特異的フィブリン4の欠損が大動脈瘤をもたらすことや、フィブリン5欠損マウスでは大動脈瘤は形成されないものの、大動脈の蛇行と伸長を引き起こすことを見出しています。これらのマウスでは、大動脈瘤の有無に関わらず、弾性線維の異常が認められています。そこで、「瘤がある大動脈」と「ない大動脈」における血管壁の分子構造の詳細な違いを調べるために、近年、医学分野での活用が進んでいるラマン分光法^{注2}を用いて、解析を行いました。

研究内容と成果

本研究では、マウスとヒトの大動脈瘤において、ラマン分光法と多変量解析を組み合わせることで、この疾患に特異的な弾性線維と膠原線維由来のラマンマーカースペクトル成分の同定を試みました（参考図）。具体的には、野生型マウス、大動脈瘤マウス（平滑筋細胞特異的フィブリン4欠損マウス）、大動脈瘤を伴わない大動脈蛇行マウス（フィブリン5欠損マウス）、およびヒトの大動脈凍結組織の切片をスライドガラス上に作成し、染色等を行うことなく、洗浄後ラマン顕微鏡でラマン分光測定を行います。そのデータを3種類の多変量データ解析^{注3}手法（True Component Analysis; TCA、主成分分析、多変量スペクトル分解）を用いて解析しました。

まず、得られたラマン分光スペクトルから、細胞外マトリクスである弾性線維、膠原線維、アグリカンやバーシカンなどのプロテオグリカン^{注4}および、細胞核、脂質、その他のマトリクス成分のスペクトルをそれぞれ抽出し、TCA解析によりラベルフリーイメージング^{注5}を作製しました（参考図左下）。続いて、その中から弾性線維と膠原線維の主成分分析を行ったところ、血管壁におけるこれらのクラスター分布が、野生型と大動脈瘤マウスとで異なっていることを見出しました（参考図中下）。さらに、弾性線維と膠原線維由来の成分に対して、多変量スペクトル分解を行い、マウスにおける大動脈瘤部位に特異的なマーカースペクトル成分を同定しました（参考図右下）。ヒト大動脈瘤患者の大動脈切片に対して同様の解析を行ったところ、マウスと同じ結果が得られました。ことから、このスペクトル成分が、マウス大動脈瘤とヒト大動脈瘤にのみ存在する、新たな大動脈瘤の診断マーカーとなり得ることが分かりました。

今後の展開

本研究により同定された大動脈瘤特異的マーカースペクトル成分は、大動脈瘤の発症や経過の予測に有用だと考えられます。このような、ラマン分光法を用いた診断スペクトルとして活用する手法は、従来の組織学では診断が難しい疾患への診断や、処置後の患部の治癒経過の評価、さらに将来的には、疾患予防へも応用可能になることが期待されます。

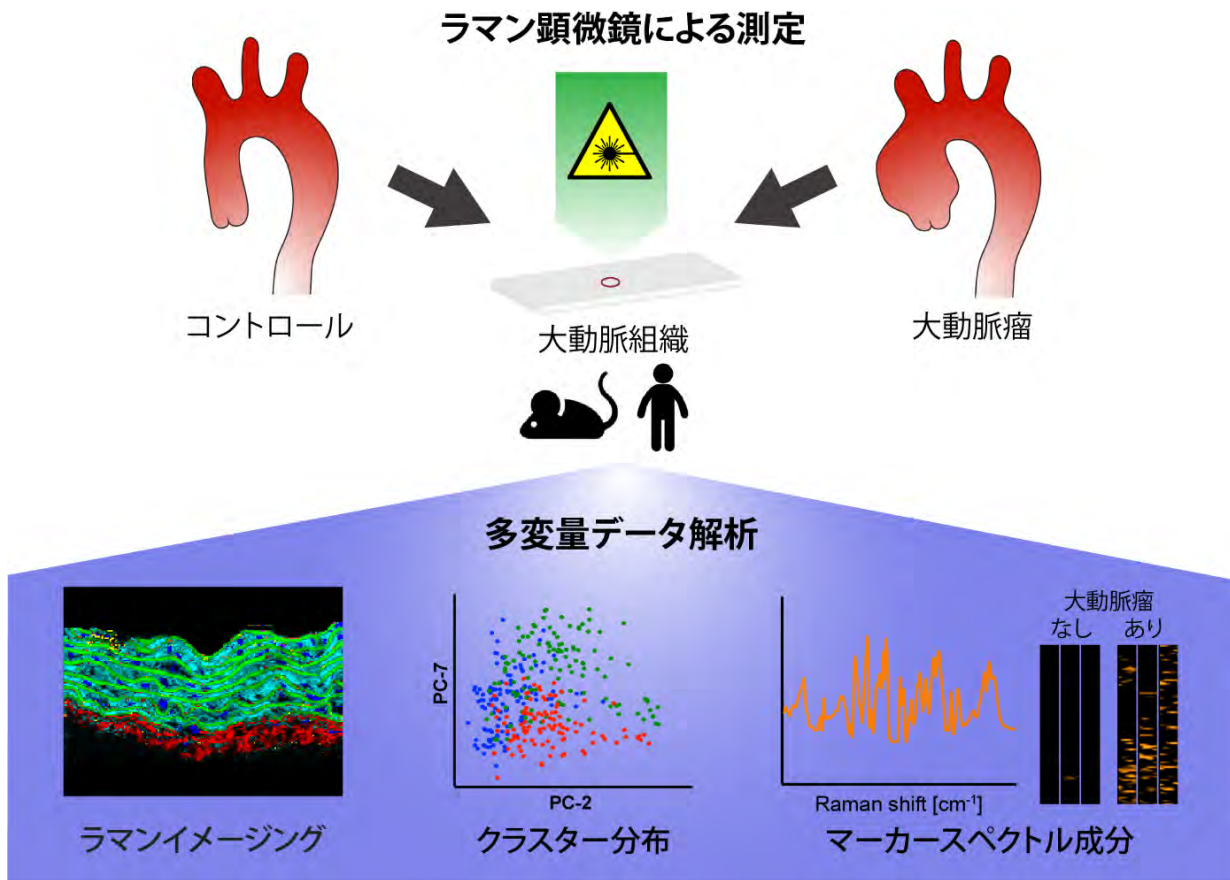


図 本研究に用いた実験手法と結果

マウスとヒトの、コントロール（野生型）と大動脈瘤組織において、染色等の前処理を行わずにラマン顕微鏡による測定を行いました。得られたデータの多変量データ解析から、血管壁におけるラマンイメージングの作製、細胞外マトリクス成分の大動脈瘤の有無によるクラスター分布の特定、大動脈瘤に特異的なマーカースペクトル成分の同定を行いました。

用語解説

注1) 細胞外マトリクス

生体の臓器や組織は、細胞と非細胞物質で構成されており、非細胞性物質の主要な構成成分を細胞外マトリクスという。細胞を支える足場や組織の形成や分化、細胞接着を担っており、主に、線維状タンパク質とプロテオグリカンの高分子から成る。

注2) ラマン分光法

物質に光を当てると散乱光が生じ、そのうち、入射光とは異なるエネルギーを持つものをラマン散乱という。このラマン散乱を利用し、分子構造の情報を得る手法をラマン分光法という。非侵襲的に物質の構造情報が得られるため、分子の指紋とも呼ばれる。

注3) 多変量データ解析

複数の変数に関わる大量のデータに対して、変数間の相互関係を分析する統計的手法を、多変量データ解析という。変数を数学的に変換したり、行列因子分解したりすることで、結果が可視化される。

注4) プロテオグリカン

コアタンパク質に、原則としてウロン酸とアミノ糖の2糖の繰り返し構造からなる直鎖状糖鎖が結合したものの。

注5) ラベルフリーイメージング

染色等の前処理を行わず、ありのままの細胞や組織を非標識で画像化する手法。

研究資金

本研究は、科研費、JST 戦略的創造研究推進事業（さきがけ）、先進医薬研究振興財団、他の研究プロジェクトの一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Raman microspectroscopy and Raman imaging reveal biomarkers specific for thoracic aortic aneurysms

(胸部大動脈瘤におけるラマン顕微鏡とイメージングによるバイオマーカーの同定)

【著者名】 Kaori Sugiyama[†], Julia Marzi[†], Julia Alber, Eva M. Brauchle, Masahiro Ando, Yoshito Yamashiro, Bhama Ramkhelawon, Katja Schenke-Layland*, Hiromi Yanagisawa*.

[†] Co-first authors, * Co-corresponding authors

本研究は、筑波大学、早稲田大学、Eberhard Karls University Tübingen（ドイツ）、New York University Langone Health（アメリカ）との国際共同研究によって行われました。

【掲載誌】 Cell Reports Medicine

【掲載日】 2021年4月28日

【DOI】 10.2139/ssrn.3606775

問い合わせ先

【研究に関すること】

柳沢 裕美（やなぎさわ ひろみ）

筑波大学生存ダイナミクス研究センター 教授

TEL: 029-853-7318

Email: hkyanagisawa@tara.tsukuba.ac.jp

URL: <http://saggymouse.tara.tsukuba.ac.jp/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

早稲田大学広報室広報課

TEL: 03-3202-5454

E-mail: koho@list.waseda.jp

難治性筋原線維性ミオパチーの病態メカニズムを解明

筋原線維性ミオパチーは、筋原線維のZ帯と呼ばれる部位に存在するタンパク質の異常によって起こる疾患で、全身の筋力の低下し、心電動障害、心筋症、呼吸障害を併発しますが、有効な治療法はありません。一方、心筋細胞や骨格筋細胞のZ帯に多く存在するタンパク質 BAG3 は、機械的ストレスに反応して、タンパク質の合成と分解を調節しています。ヒトでは、この BAG3 に1塩基の変異があると、小児期の重篤な拘束型心筋症、筋ジストロフィー、呼吸不全、末梢神経障害などを引き起こし、発症から10年以内に高い致死率を持つことが知られています。しかし、筋原線維性ミオパチーについては、発症や進行のメカニズムはよく分かっていませんでした。

本研究では、新たにヒト BAG3 点変異遺伝子を過剰発現するマウスを作製し、ヒト患者の典型的な特徴を示すマウスモデルを樹立することに、世界で初めて成功しました。また、このマウスを用いて、BAG3 変異による筋原線維性ミオパチーの病態メカニズムを解明しました。

このマウスを調べたところ、筋細胞のZ帯が崩壊し、細胞内にタンパク質の凝集体が見られました。その結果、大規模な線維化が起こり、早期に重度の拘束型心筋症を発症することが分かりました。また心筋細胞では、タンパク質が変異し、細胞内を正常に保つためのオートファジー関連因子の増加・蓄積が生じていました。さらに、この変異タンパク質の発現を制限すると、正常な心機能を維持できることを明らかにしました。このような病態メカニズムの解明は、新たな治療法の開発につながると期待されます。

研究代表者

筑波大学生存ダイナミクス研究センター（研究当時はドイツ ボン大学）

木村 健一 助教



研究の背景

筋原線維性ミオパチー^{注1)}は、筋原線維のZ帯と呼ばれる部位に存在するタンパク質の異常によって引き起こされ、全身の筋力の低下、さらには心電動障害、心筋症、呼吸障害を合併する疾患です。一方、心筋細胞や骨格筋細胞のZ帯に多く存在するシャペロン分子^{注2)} Bcl2-associated athanogene 3 (BAG3)は、心臓の拍動や運動による機械的ストレスに反応して、細胞内のタンパク質の合成と分解を調節する働きがあります。このBAG3遺伝子に1塩基の変異(点変異)が生じると、アミノ酸が置換され、小児期の重篤な拘束型心筋症、筋ジストロフィー、呼吸不全、末梢神経障害を引き起こし、発症から10年以内に高い致死率を有することが知られています。しかしながら、筋原線維性ミオパチーの病態メカニズムについては不明な点が多く、心臓移植や対症療法による治療が行われるに留まり、根本的な治療法は確立されていません。生体内での病態進行のメカニズムを解析するため、これまでにいくつかのマウスモデルが報告されていますが、ヒト患者の表現型を再現したモデルはなく、その全容は未だ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、ヒト BAG3 変異遺伝子を過剰発現する新しいマウスを作製し、ヒトの筋原線維性ミオパチー患者に典型的な特徴を示すマウスモデルを世界で初めて樹立しました。BAG3 タンパク質は、心筋や骨格筋に特徴的なサルコメア構造^{注3)}のZ帯に存在しており、運動や負荷によってダメージを受けた筋内のタンパク質を還元する機構の一翼を担っています。まず、BAG3 遺伝子の点変異によって、心筋細胞がどのような影響を受けるかを調べました。このマウスでは、生後2週間からサルコメア構造の崩壊が観察され、細胞内にタンパク質凝集体を形成し、この凝集体は週齢を重ねるごとに心筋細胞内に蓄積していました(図1、2)。このような異常な心筋細胞は、タンパク質の凝集によって、細胞質および核が肥大化し、さらにはアポトーシスによって細胞死を起こした結果、免疫細胞の心臓組織への侵入と大規模な線維化を生じることが分かりました。また、このマウスの心機能を調べるため、心エコーによる解析を行ったところ、BAG3 変異遺伝子を持つヒト患者と同様に、早期に重度な拘束型心筋症を発症することが明らかとなりました。次に、この病態メカニズムを明らかにするため、RNA シークエンスおよびプロテオミクス解析により、遺伝子発現とタンパク質発現を網羅的に解析したところ、ヒト BAG3 変異遺伝子を発現させたマウスの心筋細胞では、タンパク質の機能を維持するシステムに変化が生じ、細胞内を正常に保つためのオートファジー関連タンパク質の増加・蓄積が生じていました。この、ヒト BAG3 変異タンパク質は、変異によって生体内で溶解しにくくなり、正常なマウス内在性 BAG3 タンパク質を巻き込んで凝集体を形成しており、これによって、異常なタンパク質を排除する機構が破綻し、さらなる凝集体の形成と心筋細胞の崩壊を促し、拘束型心筋症による心不全によって早期死亡に至るといった病態メカニズムが明らかとなりました。さらに、アデノ随伴ウィルスベクターを用いて、心筋細胞でこのヒト BAG3 変異遺伝子の発現を低下させると、心筋内のタンパク質凝集が抑えられ、正常な心機能を維持できることが分かりました(図3)。

今後の展開

今回の研究により、BAG3 が筋骨格のタンパク質の恒常性を維持する上で、必須かつ多面的な役割を果たしていることが明らかとなりました。今後、BAG3 の骨格筋における表現型の解析や、運動などの筋負荷による影響などを調べていく予定です。また、アデノ随伴ウィルスベクターによる治療効果が示されたことで、筋原線維性ミオパチーに対する新たな治療法の開発が期待されます。

参考図

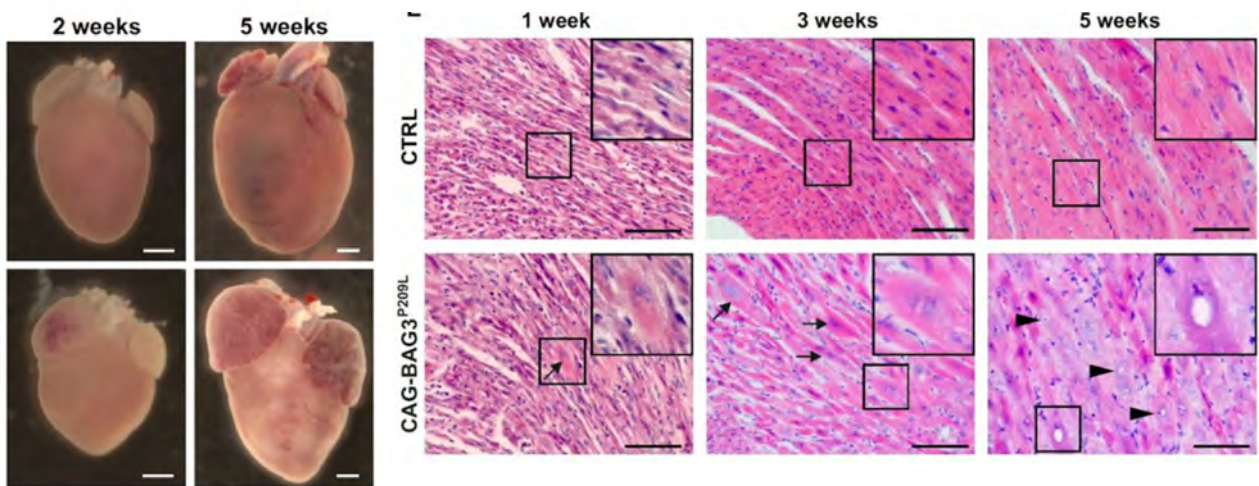


図1 ヒト BAG3 変異遺伝子を過剰発現したマウスの心臓の観察

左図：生後2週間および5週間のマウス心臓の様子。ヒト BAG3 変異遺伝子を発現するマウスの心臓（下段）は、野生型的心臓（上段）に比べ、大きさに差異は見られないが、心臓弁の異常と線維化により心房の肥大化が見られる。

右図：心臓の組織切片の様子。ヒト BAG3 変異遺伝子を発現するマウス（下段）では、心筋細胞におけるタンパク質の凝集により、細胞質および核が肥大化し、週齢に伴い異常な心筋細胞が増加している。

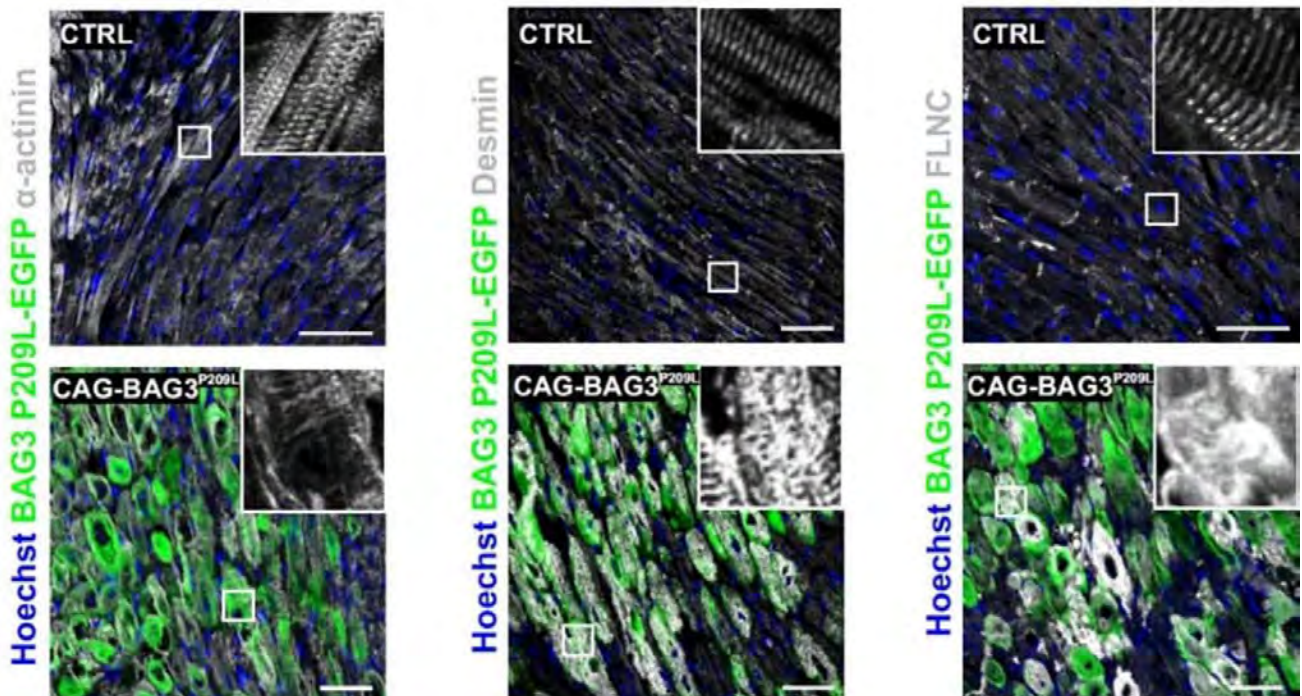


図2 マウスの心筋細胞におけるサルコメア構造の変化

ヒト BAG3 変異遺伝子を発現するマウスの心筋細胞（下段、緑色）では、サルコメア構造の崩壊が生じ、Z帯に発現するタンパク質である α -actinin（左図）、Desmin（中図）、Filamin-C(FLNC)（右図）の消失や蓄積が見られる（下段、灰色）。

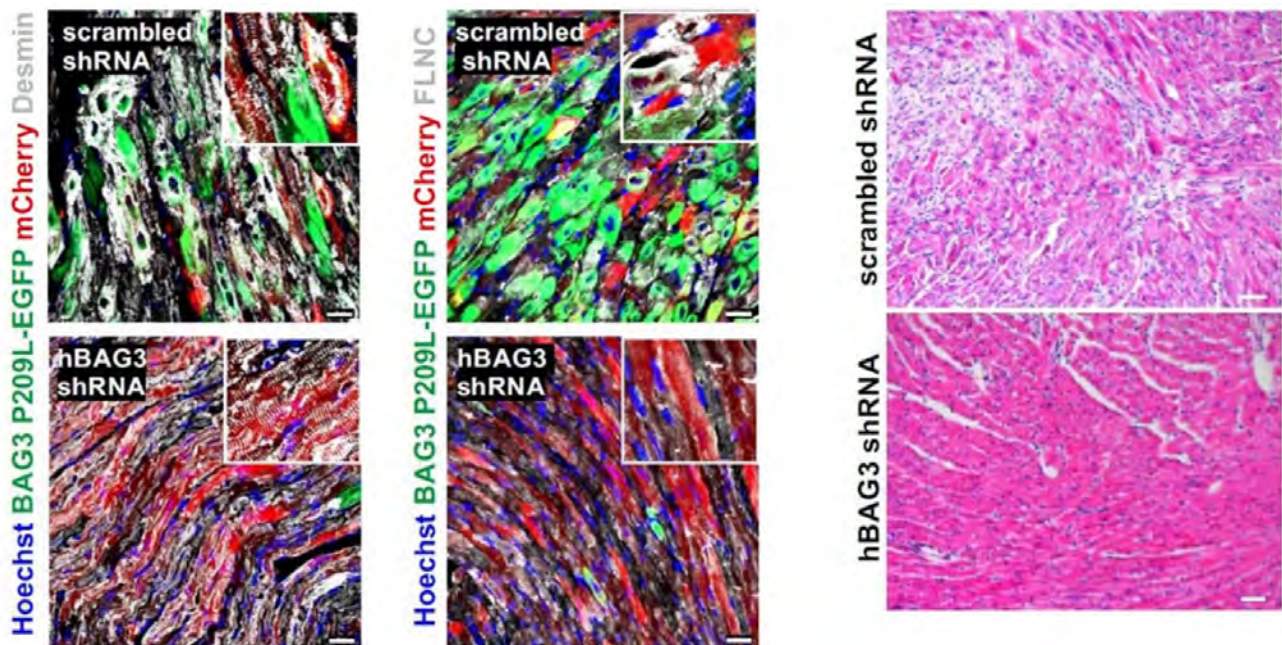


図3 アデノ随伴ウィルスベクターを用いたマウスの遺伝子治療

左図：ヒト BAG3 変異遺伝子の発現を、アデノ随伴ウィルスベクターにより低下させると、異常な心筋細胞（上図、緑色）が消失し、多くが正常な心筋細胞となる（下図）。

右図：治療の結果、心臓の線維化（上図、白色の部分）が抑えられ、正常な心組織が維持される（下図）。

用語解説

注1) 筋原線維性ミオパチー

筋原線維のZ帯に存在するタンパク質の遺伝子変異により引き起こされる疾患。全身の筋力低下がみられ、心疾患、呼吸障害を合併することが多い。

注2) シャペロン分子

タンパク質の折りたたみや安定性を制御するタンパク質。細胞内におけるタンパク質の恒常性の維持に重要な働きを持っている。

注3) サルコメア構造

筋原線維の構成単位であり、Z帯から次のZ帯までの間を指す。

研究資金

本研究は、the German Research Foundation、the Seventh Framework Program for Research and Technological Development of the EU、他の研究プロジェクトの一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Overexpression of human BAG3^{P209L} in mice causes restrictive cardiomyopathy due to sarcomere disruption and protein aggregate formation.

(ヒト BAG3^{P209L} をマウスで過剰発現させると、サルコメアの破壊とタンパク質凝集体の形成により、拘束性心筋症を引き起こす。)

【著者名】 Kenichi Kimura, Astrid Ooms, Kathrin Graf-Riesen, Maithreyan Kuppusamy, Andreas Unger, Julia Schuld, Jan Daerr, Achim Lothar, Caroline Geisen, Lutz Hein, Satoru Takahashi, Guang Li, Wilhelm Röhl, Wilhelm Bloch, Peter F.M. van der Ven, Wolfgang A.

Linke, Sean M. Wu, Pitter F. Huesgen, Jörg Höhfeld, Dieter O. Fürst, Bernd K. Fleischmann,
Michael Hesse

【掲載誌】 Nature Communications

【掲載日】 2020年6月11日

【DOI】 10.1038/s41467-021-23858-7

問合わせ先

【研究に関すること】

木村 健一（きむら けんいち）

筑波大学生存ダイナミクス研究センター 助教

URL: <https://www.saggymousehkytsukuba.com/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

2021年8月18日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立研究開発法人日本医療研究開発機構

昆虫がヒトと同様の腸ホルモンによる代謝調節の仕組みを持つことを発見

多くの生物で、代謝は食餌中の栄養に応じて綿密に制御されています。ヒトなどの脊椎動物では、インスリンとグルカゴンというホルモンが、糖からのエネルギー産生や脂肪への変換によるエネルギー蓄積を制御しており、その分泌調節には腸から分泌されるホルモンが作用しています。昆虫などの無脊椎動物にもインスリン様ホルモンとグルカゴン様ホルモンが存在し、エネルギー代謝に必須であることが知られていますが、その際の腸ホルモンの役割はよく分かっていませんでした。本研究は、キイロショウジョウバエにおいて、腸内分泌ホルモンのニューロペプチド F（腸 NPF）が、食餌中の栄養素に応じてエネルギー産生を調節していることを初めて明らかにしました。

腸 NPF は食餌中の糖に反応して血リンパ液へ分泌され、グルカゴン様ホルモンを産生する内分泌器官と、インスリン様ホルモンを産生する神経の双方を刺激することを見いだしました。また腸 NPF は、インスリン様ホルモンの分泌は促進的に、グルカゴン様ホルモンの分泌は抑制的に調節することが判明しました。さらに、腸 NPF を喪失させると、貯蔵脂肪の減少、過食、血糖値低下などの代謝異常が生じることから、昆虫の腸ホルモンも、ヒトなどと同様の働きをもつことが分かりました。

エネルギー代謝の制御は生活習慣病の発症に深く関連しており、本研究成果は、そのメカニズム追究における昆虫の有用性を示すものです。また、腸 NPF は多くの昆虫に存在しており、農業害虫や衛生害虫のエネルギー代謝を攪乱する新たな技術開発にも資する可能性があります。

研究代表者

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター
丹羽 隆介 教授



研究の背景

生き物の多くは、食べ物の栄養分を消化吸収することにより、生存のためのエネルギーを得ています。栄養素の量や質に応じて適切にエネルギー産生を制御するためには、膵臓から分泌されるインスリン^{注1)}やグルカゴン^{注2)}といったホルモンの量を調節する必要があります。脊椎動物においては、栄養の情報を読み取り、膵臓へと情報を伝達するホルモンとして、インクレチン^{注3)}と呼ばれる腸内分泌ホルモンが知られており、糖尿病や肥満といった生活習慣病治療のターゲットとしても注目されています(参考図下)。しかし、このインクレチンの報告はヒトなどの哺乳動物を含む脊椎動物の系に限られており、昆虫などの無脊椎動物にも同様の機能をもつホルモンが存在するの否かは分かっていませんでした。

本研究グループは2018年に、雌キイロショウジョウバエにおいて、腸内で分泌されるホルモンであるニューロペプチドF (Neuropeptide F; NPF)^{注4)}が生殖に重要な役割を持つことを見いだしています。NPFは脳と腸の両方で産生され、脳において産生されるNPF(脳NPF)は摂食を制御することが知られていますが、腸で産生されるNPF(腸NPF)の生殖以外の生命現象への役割は未解明でした。そこで本研究グループは、腸NPFが何らかの栄養依存的な現象に関わると予想し、キイロショウジョウバエを用いて、腸NPFがインクレチン様の機能を持つかどうかを調べました。

研究内容と成果

まず、キイロショウジョウバエをさまざまな栄養条件の餌を用いて飼育し、腸NPFの分泌が、食餌中の糖によって調節されていることが明らかになりました。腸NPFの産生を阻害したところ、キイロショウジョウバエは貯蔵脂肪の減少、摂食量の増加、血糖値の減少といった代謝異常を示したことから、腸NPFは食餌中の糖を感知して、代謝を調節していることが分かりました。

次に、腸NPFは腸内分泌細胞から放出される神経伝達物質であることから、血リンパ液^{注5)}へと分泌された後、NPF受容体(NPF receptor: NPFR)^{注6)}を発現する組織によって受け取られると予想されました。そこで、キイロショウジョウバエにおいてNPFRを発現する組織を調べたところ、インスリン様の働きをするホルモンを産生する神経細胞、およびグルカゴン様の働きをするホルモンを産生する内分泌細胞でNPFRが発現していました。さらに、インスリン様ホルモン産生細胞においてNPFRの機能を阻害したところ、インスリン様ホルモンの産生が抑えられました。一方、グルカゴン様ホルモン産生細胞におけるNPFRの阻害は、グルカゴン様ホルモンの分泌を促進しました。また、これらのホルモン産生細胞でNPFRの機能を阻害すると、腸NPFを阻害した際と同様に、貯蔵脂肪の減少といった代謝異常が生じました。これらのことから、腸NPFは、栄養の情報をインスリン様ホルモン産生神経、グルカゴン様ホルモン産生細胞といった内分泌器官へと伝達し、NPFRを介して食餌中の栄養素に応じた代謝調節を行っていることが明らかになりました(参考図上)。

これまで、昆虫を含む無脊椎動物に関して、脊椎動物における腸内分泌ホルモンのインクレチンに相当する機能を持つ分子の報告はありませんでした。本研究は、無脊椎動物においてインクレチン様腸ホルモンの存在を示す初めての成果です。

今後の展開

本研究により、無脊椎動物において、腸NPFが、食餌に応じた代謝調節に重要であることが分かりました。食餌中の糖に反応した腸ホルモンを介したエネルギー代謝の制御は、人の生活習慣病の発症に深く関連することが知られていますが、その全容はまだまだ解明されていません。本研究成果は、こうした未解明のメカニズムの追究における昆虫の有用性を示すものです。今後は、腸NPFと栄養、生殖の三者の関係を明らかにするとともに、腸NPFの持つ他の役割や、腸NPFの分泌がどのように制御されているの

か、さらに若年期に摂取した栄養の履歴に伴う後期ライフステージでのエネルギー代謝の変化に腸 NPF がどのような影響をもたらすかを明らかにしていきます。これにより、ヒトをはじめとする脊椎動物や昆虫に共通する腸ホルモンによる代謝調節系の包括的理解につながると考えられます。さらに、NPF の存在は他の昆虫にも広く見られることから、農業害虫や衛生害虫のエネルギー代謝を攪乱する新たな技術開発の標的になる可能性があります。例えば、蚊をはじめとする吸血性昆虫の吸血・摂食行動の制御にも腸 NPF が関わるのであれば、NPF と NPFR が昆虫の吸血行動によって媒介される病原体の蔓延を防ぐためのターゲットになり得ます。

参考図

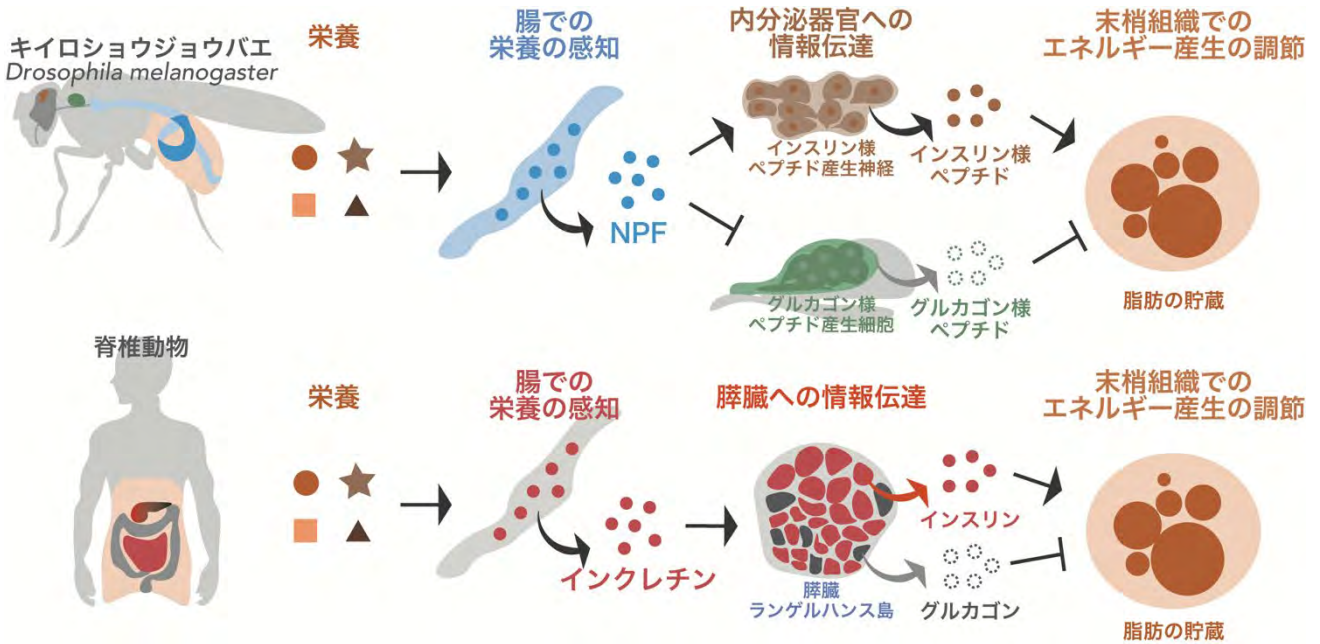


図 本研究で明らかになったキイロショウジョウバエの腸ホルモン NPF の役割

(上図) キイロショウジョウバエの腸内分泌ホルモン NPF は、インスリン様ホルモンやグルカゴン様ホルモンの量を調節する役割がある。また、腸 NPF が食餌中の栄養に応じて内分泌器官への情報伝達を行うことにより、末梢組織でのエネルギー産生が適切に制御される。

(下図) キイロショウジョウバエの腸 NPF の役割は、脊椎動物においてインクレチンとして知られる腸ホルモンと同様であると考えられる。

用語解説

注1) インスリン

膵臓のランゲルハンス島と呼ばれる組織の中に存在するβ細胞(膵β細胞)から分泌されるホルモン。各組織へと働きかけ、血中の糖の取り込みや脂肪の貯蔵を促進する役割を持つ。

注2) グルカゴン

膵臓ランゲルハンス島α細胞(膵α細胞)から分泌されるホルモン。インスリンと拮抗した役割を持ち、各組織へと働きかけることで脂肪の分解や血糖値の上昇を促す。

注3) インクレチン

栄養に応答して腸内分泌細胞から放出され、膵臓ランゲルハンス島β細胞へと働きかけることでインスリンの分泌を促すホルモンの総称。脊椎動物においては、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) や Gastric inhibitory polypeptide (GIP) が知られている。

注4) ニューロペプチド F (Neuropeptide F; NPF)

無脊椎動物の神経伝達物質として同定されたペプチドホルモン。キイロショウジョウバエにおいては脳や腸で産生され、摂食行動や交尾行動、攻撃的行動などに関わる。脊椎動物の Neuropeptide Y の類縁分子。

注5) 血リンパ液

昆虫をはじめとする節足動物の体内を循環している体液。

注6) ニューロペプチド F 受容体 (NPFR)

NPF を受容するグアニンヌクレオチド結合タンパク質共役型受容体。

研究資金

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST) 「全ライフコースを対象とした個体の機能低下機構の解明」研究開発領域における研究開発課題「成長期の栄養履歴が後期ライフステージに与える機能低下のメカニズム」(研究期間：平成 29 年度～令和 4 年度、研究開発代表者：上村匡、研究開発分担者：丹羽隆介)、日本学術振興会科学研究費助成事業 基盤研究 (A) (研究期間：平成 26～28 年度、平成 29 年度～令和元年度)、基盤研究 (B) (研究期間：令和元年度～令和 3 年度)、および特別研究員奨励費 (研究期間：平成 30 年度～令和 2 年度) の支援により実施されました。

掲載論文

【題名】 The sugar-responsive enteroendocrine neuropeptide F regulates lipid metabolism through glucagon-like and insulin-like hormones in *Drosophila melanogaster*

(キイロショウジョウバエにおいて、糖応答性の腸内分泌ホルモン Neuropeptide F はグルカゴン様およびインスリン様ホルモンを介して脂肪代謝を制御する)

【著者名】 Yuto Yoshinari (吉成 祐人 筑波大学生存ダイナミクス研究センター 研究員)、Hina Kosakamoto (小坂元 陽奈 東京大学大学院薬学系研究科博士後期課程 3 年生・日本学術振興会特別研究員 DC2)、Takumi Kamiyama (上山拓巳 筑波大学大学院生命環境科学研究科・博士後期課程 3 年生・日本学術振興会特別研究員 DC2)、Ryo Hoshino (星野 涼 筑波大学大学院理工情報生命学術院生命地球科学研究群・日本学術振興会特別研究員 DC1)、Rena Matsuoka (松岡怜奈 筑波大学大学院生命環境科学研究科 (当時))、Shu Kondo (近藤 周 国立遺伝学研究所 助教 (当時))、Hiromu Tanimoto (谷本 拓 東北大学大学院生命科学研究科 教授)、Akira Nakamura (中村 輝 熊本大学薬学部 教授) Fumiaki Obata (小幡 史明 理化学研究所生命機能科学研究センター チームリーダー)、Ryusuke Niwa (丹羽 隆介 筑波大学生存ダイナミクス研究センター 教授)

【掲載誌】 Nature Communications

【掲載日】 2021 年 8 月 10 日

【DOI】 10.1038/s41467-021-25146-w

問合わせ先

【研究に関すること】

丹羽隆介（にわ りゅうすけ）

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

Tel: 029-853-7342

E-mail: ryusuke-niwa@umin.ac.jp

URL: <https://sites.google.com/view/niwa-lab-tsukuba/home>

【取材・報道に関すること】

国立大学法人筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

【AMEDに関すること】

国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）

シーズ開発・研究基盤事業部 革新的先端研究開発課

TEL：03-6870-2224

E-mail：kenkyuk-ask@amed.go.jp

骨修復において幹細胞が働くメカニズムを解明

間葉系幹細胞（MSCs）は、骨髄、脂肪細胞、歯髄などに存在しており、骨、軟骨、脂肪組織などの細胞に分化する組織幹細胞の一つです。その多分化能や組織再生能から、再生医療のツールとして注目されていますが、MSCs の生体内での動態や分化能については未だ不明な点が多く、治療の有効性や作用機序が不明確なまま、臨床応用が先行しているケースもあります。より安全で効果的な再生医療の実現のためには、組織修復・再生における生体内での MSCs の動態の解明が望まれています。

本研究グループは、これまでに、MSCs に強く発現する酵素分子 CD73 に着目し、CD73 発現細胞を蛍光標識したマウスを作製しています。今回さらに、骨髄中で幹細胞を維持する微小環境（ニッチ）が再構築される際のメカニズムを明らかにしました。

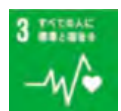
このマウスから CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を単離し、性質を比較したところ、CD73 陽性 MSCs は、生体外において高い増殖能と骨・軟骨細胞への分化能を持つことが分かりました。また、マウス大腿部に骨折を作製し、骨修復における CD73 陽性 MSCs の動態解析より、CD73 陽性 MSCs は骨折部位に遊走し、骨芽細胞や軟骨細胞に分化し、積極的に組織修復に関わっていることが判明しました。一方、CD73 陽性血管内皮細胞は、骨修復中期に骨折部位に観察され、周囲には造血幹前駆細胞が集積し、ニッチの再構築に働いていました。以上のことから、CD73 発現細胞はニッチの再構築に重要な役割を示すことが明らかとなりました。

本研究成果は、CD73 陽性 MSCs を標的とした骨疾患への新たな治療法の開発につながると期待されます。

研究代表者

筑波大学生存ダイナミクス研究センター

木村 健一 助教



研究の背景

間葉系幹細胞（MSCs）は、骨髄、脂肪細胞、歯髄などに存在しており、骨、軟骨、脂肪組織などの細胞に分化することができる組織幹細胞の一つです。近年、MSCs は、その多分化能や組織再生能から再生医療のツールとして注目され、虚血性疾患、脊髄損傷、骨疾患治療への実用化に向けて研究が進んでいます。しかし、組織修復・再生における MSCs の動態や分化能については未だ不明な点が多く、治療の有効性や作用機序が不明確なまま、臨床応用が先行しているケースも少なくありません。そのため、より安全で効果的な再生医療の実現のため、MSCs の生体内での動態の解明が望まれています。

MSCs は生体内で特殊な微小環境（ニッチ）によって保持されています。その一つとして知られる骨髄ニッチは、類洞血管内皮細胞、造血細胞、周皮細胞などにより形成され、さまざまな液性因子、サイトカイン、細胞間接着により緻密に制御されています。本研究チームはこれまでに、MSCs に強く発現する酵素分子 CD73 に着目し、CD73 発現細胞を蛍光標識したマウスを作製しました。このマウスは、骨髄ニッチにおいて MSCs のみならず、ニッチの中心を成す類洞血管内皮細胞を選択的に標識しますが、これらの CD73 発現細胞がどのように組織障害に応答し、ニッチの再構築に関わるか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、このマウスから CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を単離し、性質を比較しました。細胞表面マーカーの発現を調べると、これらはいずれも MSCs に特徴的なマーカーを発現しており、大きな差は見られませんでした。一方、細胞増殖や分化能を解析すると、CD73 陽性 MSCs は CD73 陰性 MSCs と比較して、生体外における高い増殖能と骨・軟骨細胞への分化能を持つことが分かりました（図 1）。次に、このマウスの大腿部に骨折を作製し、骨修復における CD73 陽性 MSCs の動態を解析しました。術後 4 日目には、骨折部位に遊走した CD73 陽性 MSCs が多数観察され、その後、この細胞は骨芽細胞や軟骨細胞に分化し、積極的に組織修復に関わっていました（図 2 左）。また、CD73 陽性血管内皮細胞は、骨修復中期になると骨折部位において観察され、周囲には造血幹前駆細胞が集積し、ニッチの再構築に働いていました（図 2 右）。さらに、CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を野生型マウスの骨折部位に移植し、組織再生能を評価したところ、移植された CD73 陽性 MSCs は骨折部位で骨・軟骨へと分化し、骨修復を促進することが分かりました（図 3）。以上のことから、CD73 発現細胞は、骨損傷時のニッチの再構築に重要な役割を果たすことが明らかとなりました。

今後の展開

今回の研究成果に基づき、今後は、MSCs や類洞血管内皮細胞において、どのような機序で CD73 発現が細胞の生理機能に影響を与えているかについて調べていく予定です。また、CD73 はヒト MSCs にも発現しており、今後、ヒト CD73 陽性 MSCs を用いた骨疾患への新たな治療法の開発が期待されます。

参考図

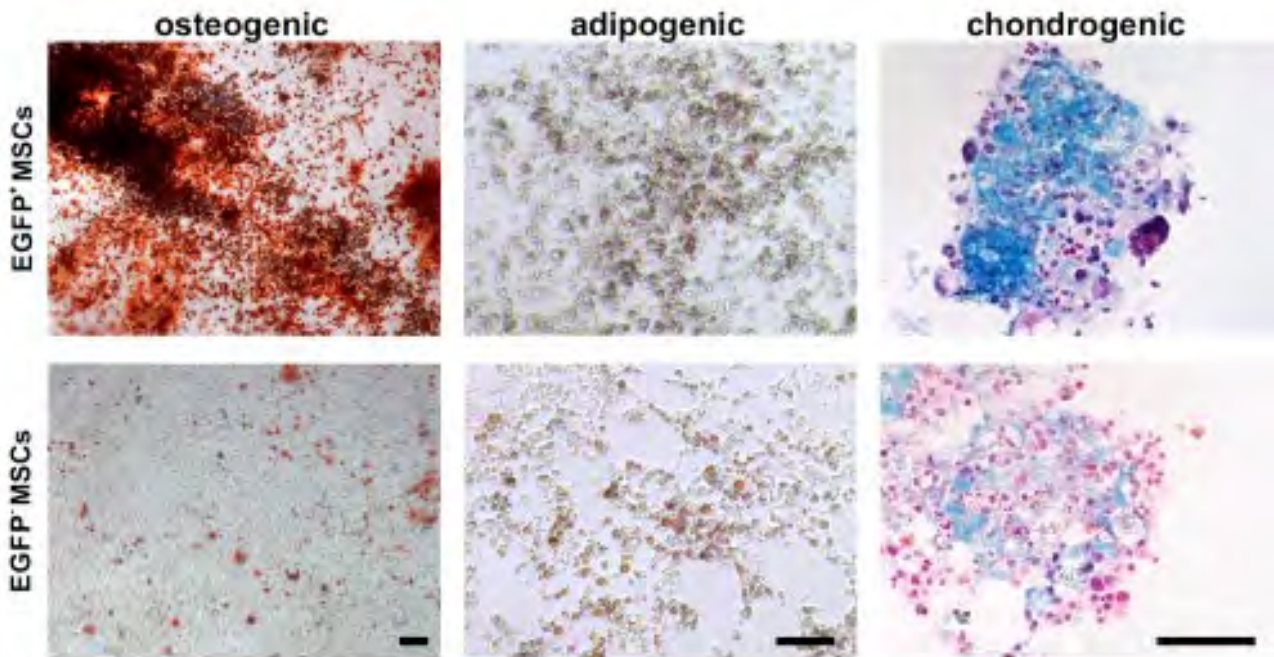


図1 CD73 陽性・陰性 MSCs の分化能の比較

CD73 陽性 MSCs (上段) は CD73 陰性 MSCs (下段) に比べ、脂肪細胞への分化能に差異は見られないが (中列)、骨分化能 (左列、赤色が骨芽細胞) および軟骨分化能 (右列、青色が軟骨細胞) が高い。(スケールバー: 100 μm)

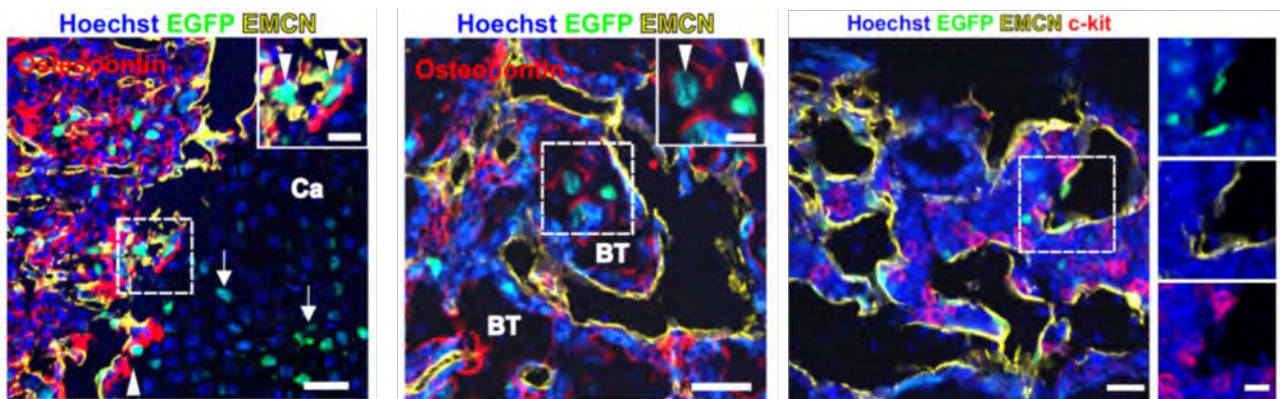


図2 マウス骨折モデルを用いた CD73 発現細胞の骨修復への寄与の評価

術後 7 日目の骨折部位の様子 (左図)。CD73 陽性 MSCs は骨折部位の新生軟骨 (Ca) 周囲に遊走し (左図、矢頭)、一部の細胞は軟骨細胞へと分化し、新生軟骨形成に寄与している (左図、矢印)。術後 14 日目の骨折部位の様子 (中図)。CD73 陽性 MSCs は骨修復中期に見られる海綿骨 (BT) の形成に寄与している (中図、矢頭)。一方、術後 14 日目の仮骨の一部には新生骨髄が形成されており (右図)、新生骨髄内には CD73 を発現する血管が観察され (右図、緑色)、周囲には造血幹前駆細胞が集積し (右図、赤色)、骨髄ニッチの再構築が行われている。(スケールバー: 25 μm 、拡大図: 10 μm)

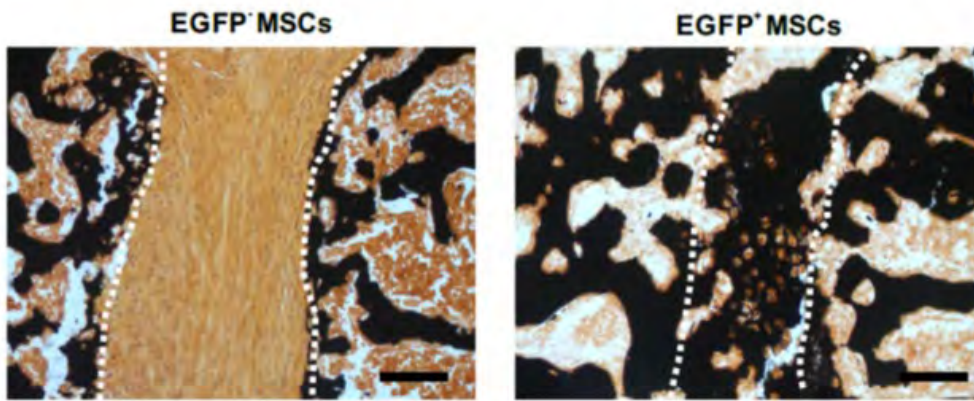


図3 移植された CD73 陽性 MSCs の骨修復能の評価

細胞移植後 28 日目の骨折部位 (点線に挟まれた部分) の様子。骨折部位に移植された CD73 陽性 MSCs 群 (右図) は CD73 陰性 MSCs 群 (左図) に比べ、骨折部位における新生骨の形成が進んでいる (黒色部分)。(スケールバー : 100 μ m)

研究資金

本研究は、The German Research Foundation、上原記念生命科学財団、先進医薬研究振興財団、テルモ生命科学振興財団、他の研究プロジェクトの一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Bone marrow CD73+ mesenchymal stem cells display increased stemness in vitro and promote fracture healing in vivo

(骨髄由来 CD73 陽性間葉系幹細胞は高い幹細胞性を有し、骨修復に寄与する)

【著者名】 Kenichi Kimura, Martin Breitbach, Frank A. Schildberg, Michael Hesse, Bernd K. Fleischmann

【掲載誌】 Bone Reports

【掲載日】 2021 年 9 月 29 日

【DOI】 10.1016/j.bonr.2021.101133

問い合わせ先

【研究に関すること】

木村 健一 (きむら けんいち)

筑波大学生存ダイナミクス研究センター 助教

TEL: 029-853-7323

Email: kkimura@tara.tsukuba.ac.jp

URL: <https://www.saggymousehkytsukuba.com/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

2021年10月11日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）
国立大学法人京都工芸繊維大学

ショウジョウバエ系統の凍結保存法を開発

ショウジョウバエは、生命科学研究におけるモデル生物として、多くの突然変異系統が作出され、さまざまな生命現象における遺伝子機能の解明に役立っています。また、ヒト疾病モデルとして、医学や創薬の分野においても頻繁に利用されています。しかし、ショウジョウバエ系統は継代飼育によって維持されており、時間と共にゲノムに変異が蓄積し、系統が変化してしまうため、研究に使えなくなることがありました。このリスクを回避するため、系統を長期間保存できる凍結保存法の確立が待ち望まれていました。

本研究では、卵や精子の元となる始原生殖細胞を、保存したい系統の卵（胚）から、ガラス針を用いて集め、液体窒素中で凍結保存する方法を開発し、ショウジョウバエ系統を凍結保存することに世界で初めて成功しました。凍結保存した始原生殖細胞は、融解した後、妊性のない別の胚に移植すると正常な卵や精子に分化し、それらを受精させると、もとの系統と全く同じ子が得られます。この技術は、京都ショウジョウバエストックセンターに技術移転され、ショウジョウバエ系統の凍結保存の実用化が、世界に先駆けて開始されています。この技術開発により、生命科学および医療・創薬分野の研究の持続的な発展を担保することができるようになることが期待されます。

研究代表者

筑波大学生存ダイナミクス研究センター

小林 悟 教授

農研機構

田中 大介 上級研究員

京都工芸繊維大学

高野 敏行 教授



研究の背景

ショウジョウバエは、世代が短く、飼育が簡単で、遺伝子の機能を欠失させたり改変するのが容易なため、多くの突然変異系統が作出され、さまざまな生命現象における遺伝子機能の解明に役立ってきました。さらに近年、ヒト疾病の原因遺伝子の60%がショウジョウバエで保存されていることが発見され、ヒト疾病モデルとして医療や創薬の分野でも頻繁に利用されています。現在、16万種類を超えるショウジョウバエ系統がありますが、これらの系統は、継代飼育、すなわち成虫から次世代の子を、その子から次世代の子をとったように、世代交代をさせながら飼育することによって維持されています。しかしながら、この方法では、飼育コストがかかる上、自然に誘発された突然変異などがゲノムに蓄積することによって、系統が変化してしまうリスクがあります。このようなリスクを避けるため、マウスや線虫などのモデル生物と同様に、ショウジョウバエにおいても凍結保存法の確立が長く望まれてきました。これまでに、卵巣や胚を凍結する試みがありましたが、いずれも再現性が低く、実用化されていません。そこで本研究では、卵巣や胚の代わりに、卵や精子の元となる始原生殖細胞を凍結保存し、そこから機能的な卵や精子を作り、子孫を得て、系統を復活させることを試みました。

研究内容と成果

ショウジョウバエの初期胚から始原生殖細胞をガラス針を用いて集め、液体窒素中で凍結保存し、融解後に、別の胚（ホスト胚）に移植したところ、移植された始原生殖細胞は、卵または精子に分化し、子を産生できることを見いだしました（参考図）。また、卵や精子を作ることができない不妊のホスト胚を用いると、ホストが産生する卵や精子は全て移植した始原生殖細胞に由来し、雌雄のホストを交配することで簡単に元の系統を復活できることが分かりました。さらに、凍結した始原生殖細胞から元の系統を復活させるために必要な移植の効率（元の系統を復活させるために必要な移植ホスト数は約15）は、凍結保存期間の長さ（0–400日間）や系統の種類（6種類）に依存しないことが明らかとなりました。

今後の展開

本研究で開発した始原生殖細胞の凍結保存の方法および移植により系統を復活させる技術は、世界にあるショウジョウバエの3大ストックセンターの一つである京都ストックセンターに技術移転され、実用化されつつあります。これは、世界で初めての試みであり、生命科学および医療・創薬分野の研究の持続的な発展を担保することができるようになると期待されます。今後、凍結保存された細胞が10年、20年後も変わらず同じ能力を持ち続けているか、保存期間中にゲノムが損傷を受けないか、について詳細に調べ、この技術の安全性を示していくことが必要です。

参考図

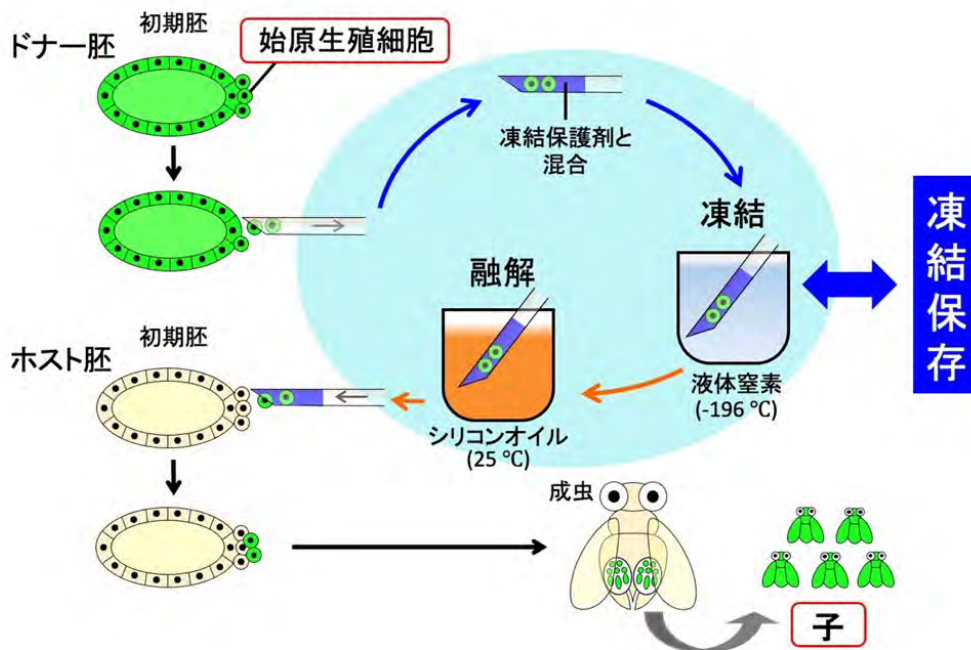


図 本研究で開発したショウジョウバエ系統の凍結保存法

保存したい系統の初期胚（緑）の後極からガラス針を用いて始原生殖細胞を吸い出し、氷晶の形成を抑え、細胞が破壊されるのを防ぐための凍結保護剤と混合して、ガラス針ごと液体窒素に浸けて凍結し、そのまま液体窒素中で保存する。系統を復活させるには、室温程度に温めたシリコンオイル中で始原生殖細胞を融解し、ホスト胚の後極に移植する。移植した胚を親まで育て、雄と雌を交配して子を得る。ホスト胚に、ホストの始原生殖細胞（淡黄色）が致死となる不妊の胚を用いると、成虫が形成する卵や精子は全て移植した始原生殖細胞（緑）由来となり、生まれる子は全てとドナーと同じ遺伝型（緑）になる。

研究資金

本研究は、科学研究費補助金新学術領域研究「配偶子インテグリティの構築」（研究期間：平成 30～令和 4 年度）、挑戦的萌芽「ショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存と個体再生法の開発」（研究期間：平成 27～平成 28 年度）および日本医療研究開発機構（AMED）ナショナルバイオリソースプロジェクト（研究期間：平成 28～令和 3 年度）によって実施されました。

掲載論文

- 【題名】 Offspring production from cryopreserved primordial germ cells in *Drosophila*
(ショウジョウバエにおける凍結保存した始原生殖細胞からの子孫の産出)
- 【著者名】 Miho Asaoka, Yurina Sakamaki, Tatsuya Fukumoto, Kaori Nishimura, Masatoshi Tomaru, Toshiyuki Takano-Shimizu, Daisuke Tanaka and Satoru Kobayashi
- 【掲載誌】 Communications Biology
- 【掲載日】 2021 年 10 月 7 日
- 【DOI】 10.1038/s42003-021-02692-z

問合わせ先

【研究に関すること】

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

TEL: 029-853-5881

Email: skob@tara.tsukuba.ac.jp

URL: <http://skob.tara.tsukuba.ac.jp/Top/index.html>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

農研機構 基盤技術研究本部 研究推進室

TEL: 029-838-6859

E-mail: Kiban_suishin@ml.affrc.go.jp

京都工芸繊維大学総務企画課広報係

TEL: 075-724-7016

E-mail: kit-kisya@jim.kit.ac.jp

ショウジョウバエ始原生殖細胞におけるタンパク質の合成活性の性差を発見

有性生殖を行う生物には、メスとオスの二つの性があり、それぞれ生殖細胞である卵と精子をつくります。ショウジョウバエでは、始原生殖細胞（生殖細胞のもとになる細胞）の性は、受精した卵（胚）の発生過程で決まり、卵や精子への性分化を開始します。しかし、始原生殖細胞の性が決まり性分化する機構の詳細は未だ明らかにはなっていません。本研究グループは、これを明らかにするために、メスとオスの始原生殖細胞の間で差異を示す現象の探索を行ってきました。

その結果、ショウジョウバエの始原生殖細胞が、卵や精子への性分化を開始する時期（孵化間近の後期胚）において、①蛍光タンパク質を発現させると、発現したタンパク質の量がメスに比べてオスの始原生殖細胞で高くなること、②メスと比較してオスの始原生殖細胞で発現量が多い遺伝子には、翻訳活性の制御に関わる遺伝子が多く含まれること、③メスと比較してオスの始原生殖細胞でタンパク質の合成活性が高いこと、を見いだしました。これらのことから、性分化を開始している始原生殖細胞において、タンパク質合成活性、すなわちメッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳活性が、メスに比べてオスの始原生殖細胞で高いことが明らかになりました。この翻訳活性の差異により、始原生殖細胞において発現する遺伝子に差異が生じ、異なる性分化が引き起こされると考えられます。

タンパク質を合成する活性がメスとオスの始原生殖細胞で異なるという報告はこれまでになく、本研究成果は、性分化機構を明らかにする上で重要な発見です。

研究代表者

筑波大学生存ダイナミクス研究センター

小林 悟 教授



研究の背景

多くの有性生殖を行う生物には、メスとオスの二つの性があり、それぞれ卵と精子を形成します。これら卵と精子は、生殖細胞のもととなる始原生殖細胞からつくられます。ショウジョウバエでは、受精卵（胚）の後極に形成された始原生殖細胞は、胚発生過程においてメスあるいはオスに性が決まり、その性に従って、それぞれ卵や精子に分化（性分化^{注1)}します。しかし、ショウジョウバエを含む多くの動物において、始原生殖細胞の性が決まり性分化する機構の詳細は未だ明らかにはなっていません。この機構を明らかにするためには、メスとオスの始原生殖細胞の間で差異を示す現象を探索し、その差異が生まれる機構や、その差異と性分化との関連を明らかにすることが重要です。

研究内容と成果

本研究グループは、ショウジョウバエを用いて、Gal4-UASシステム^{注2)}と呼ばれる遺伝子の発現ツールが、始原生殖細胞でも機能するかどうかを調べる過程で、始原生殖細胞が性分化を開始する時期の胚（後期胚）において、このシステムにより発現させた蛍光タンパク質の量が、メスに比べてオスで高くなる現象を発見しました。しかし、蛍光タンパク質のメッセンジャーRNA（mRNA）の量にはこのような差異がありません。このことは、mRNAが合成されたのちに性差が生じることを示唆しています。そこで、後期胚の始原生殖細胞における遺伝子の発現データを解析したところ、メスに比べてオスの始原生殖細胞において、翻訳活性^{注3)}に関わる遺伝子が高発現していることが分かりました。さらに、後期胚において、メスと比較してオスの始原生殖細胞において、タンパク質の合成活性が高いことも見いだしました。

以上の結果から、性分化を開始した始原生殖細胞において、メスに比べてオスでは、タンパク質の合成、すなわちmRNAの翻訳活性が高いことが明らかになりました（参考図）。タンパク質を合成する活性がメスとオスの始原生殖細胞で異なるという報告はこれまでになく、この成果は、性分化機構を明らかにする上で重要な発見であると考えられます。

今後の展開

本研究結果は、翻訳活性の違いにより、始原生殖細胞において発現する遺伝子に差異が生じ、メスあるいはオスの性分化が引き起こされることを示唆しています。今後、この翻訳活性の違いが、始原生殖細胞でどのように生じるのか、始原生殖細胞の性分化に関わっているのか、などを解析し、始原生殖細胞の性分化機構の解明を進める予定です。

参考図

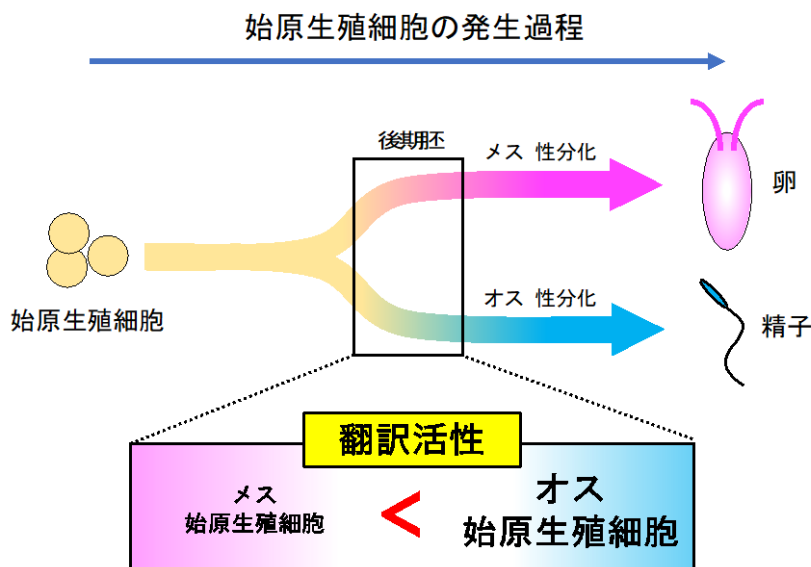


図 ショウジョウバエ始原生殖細胞における翻訳活性の性差

用語解説

注1) 性分化

決定された性に基づき、メスあるいはオスに特化した機能を持つ細胞へ分化する現象。ショウジョウバエの始原生殖細胞では、決定した性に基づいて卵や精子へと分化する。

注2) Gal4-UAS システム

酵母由来の転写を促進する Gal4 タンパク質を、特定の細胞で人為的に発現させ、UAS と呼ばれる DNA 配列を有する融合遺伝子を発現させる方法。ショウジョウバエの研究において広く用いられている。

注3) 翻訳活性

遺伝子発現の過程において、mRNA をタンパク質へ翻訳する活性のこと。翻訳活性が高くなると、翻訳が活発に行われ、タンパク質の合成量が多くなる。

研究資金

本研究は、科学研究費補助金 新学術領域研究「配偶子インテグリティの構築」(研究期間：平成 30～令和 4 年度) および筑波大学 TARA プロジェクト (学外) によって実施されました。

掲載論文

【題 名】 Male-biased protein expression in primordial germ cells, identified through a comparative study of UAS vectors in *Drosophila*.

(UAS ベクターの比較解析において見出されたショウジョウバエ始原生殖細胞におけるオスに偏ったタンパク質発現)

【著者名】 Masaki Masukawa, Yuki Ishizaki, Hiroki Miura, Makoto Hayashi, Ryoma Ota and Satoru Kobayashi

【掲載誌】 Scientific Reports

【掲載日】 2021 年 11 月 2 日

【DOI】 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00729-1>

問合わせ先

【研究に関すること】

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

TEL: 029-853-5881

Email: skob@tara.tsukuba.ac.jp

URL: <https://skob.tara.tsukuba.ac.jp/Top/index.html>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

2022年2月16日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学
学校法人東京薬科大学
国立研究開発法人理化学研究所
国立研究開発法人日本医療研究開発機構

昆虫ホルモンの生合成を攪乱する蚊の発育阻害剤の発見 ～環境に優しい農薬の開発に向けて～

地球上で最も多くのヒトを殺す生物は、蚊です。現在、マラリアやデング熱など、蚊が媒介する重篤な感染症による死者は、世界中で年間70万人にも上ります。これらの感染症に対する防衛策として、蚊を殺したり、あるいは蚊の成長を阻害する薬剤の使用は欠かせません。しかしながら、既存の殺蚊剤に対して抵抗性を示す蚊の出現が確認されています。そのため、単一の薬剤に過剰に頼るのではなく、作用機序の異なる複数の薬剤をローテーションして使用することで、薬剤抵抗性の出現を回避する戦略が不可欠です。

害虫に対する高い殺虫能や成長阻害能を示しながら、昆虫以外の生物に対する作用がない薬剤として、昆虫特有の生命現象を攪乱する「昆虫成長制御剤」があります。その一つとして、昆虫の脱皮と変態を司る昆虫ステロイドホルモン「エクジステロイド」の働きを攪乱する薬剤が注目されています。

本研究チームは、エクジステロイド生合成に必要な酵素「Noppera-bo」に焦点を当て、デング熱、黄熱、ジカウイルス感染症を媒介するネッタイシマカ由来のNoppera-boの活性を阻害する薬剤を探索しました。その結果、植物の二次代謝物としてよく知られるフラボノイド化合物であるデスメチルグリシテインが極めて有効であることを発見し、さらにX線結晶構造解析によって分子レベルでの作用機序の解明に成功しました。加えて、デスメチルグリシテインが、ネッタイシマカ幼虫の発育を阻害することも見いだしました。

今回の研究成果により、環境負荷が少なく効果の高い殺蚊剤の開発が期待されます。

研究代表者

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター

丹羽 隆介 教授

東京薬科大学 生命科学部

藤川 雄太 助教

理化学研究所 生命機能科学研究センター 制御分子設計研究チーム

本間 光貴 チームリーダー



研究の背景

国際保健機関（WHO）や国連教育科学文化機関（UNESCO）の推計によると、マラリアやデング熱など、蚊が媒介する重篤な感染症による死者は世界中で年間 70 万人にも上ります。

蚊によって媒介される感染症に対する防衛策の一つは、殺虫剤の使用です。しかしながら、既存殺虫剤に対して抵抗性を示す蚊の出現が確認されており、その有効性は永続的ではありません。そのため、単一の薬剤に過剰に頼るのではなく、作用機序の異なる複数の薬剤をローテーションして使用することで、薬剤抵抗性の出現を回避する戦略が不可欠です。それには、化学構造や作用機序が異なる薬剤を、継続的に開発することが求められます。

害虫に対する高い殺虫能や成長阻害能を示しつつ、昆虫以外の生物に対する副作用がない薬剤として、昆虫特有の生命現象を攪乱する「昆虫成長制御剤」があります。その一つとして、昆虫の脱皮と変態を司る昆虫ステロイドホルモン「エクジステロイド」の働きを攪乱する薬剤が古くから注目されています。エクジステロイドの生合成を阻害する方法も考えられますが、その実現のためにはエクジステロイド生合成酵素^{注1)}の同定が必要です。

本研究チームでは、これまでに、Noppera-bo（略称 Nobo）^{注2)}と名づけられた生合成酵素（タンパク質）を同定しています（参考図 A）。Nobo は、進化的に、蚊を含むハエ目昆虫とチョウ目昆虫のみに保存されており、特定の昆虫のみに殺虫効果を示す選択的殺虫剤への応用にも好適と考えられることから、その酵素活性を阻害する薬剤の探索を進めてきました。また、これに伴い、1 万種類の化合物を 1 日で探索できる技術を確立しています。

研究内容と成果

本研究では、デング熱、黄熱、ジカウイルス感染症などを媒介するネッタイシマカの Nobo（以下 AeNobo）を阻害する化合物を探索しました。上述の探索技術を活用し、東京大学創薬機構が保有する 9,600 種類の化合物ライブラリーの中から AeNobo 阻害活性を網羅的に探索し、植物の二次代謝産物^{注3)}としてよく知られているフラボノイド化合物を同定しました。また、市販品として容易に入手できた複数のフラボノイド化合物についても検討したところ、試験した半数以上のフラボノイド化合物に AeNobo 阻害活性が認められました。

次に、高エネルギー加速器研究機構の放射光実験施設フォトンファクトリーを使用した X 線結晶構造解析^{注4)}によって、AeNobo タンパク質とフラボノイド化合物が分子レベルでどのように相互作用するかを検討しました。その結果、試験したフラボノイド化合物のうち、ゲニステイン（genistein）とダイゼイン（daidzein）という 2 種類について、AeNobo とのタンパク質-分子複合体構造を解明することに成功しました。そして、それらのいずれについても、AeNobo タンパク質を構成するアミノ酸のうち、113 番目のアスパラギン酸残基との間で形成される水素結合や、39 番目のフェニルアラニン残基との間で形成される分子間の引力が、フラボノイド化合物の阻害活性の発揮に重要であることを見いだしました。これらの相互作用様式は、分子動力学シミュレーション^{注5)}による計算科学手法によっても支持されました。

さらに、AeNobo との水素結合や引力をより強めることができるフラボノイド化合物を探索したところ、デスメチルグリシテイン（正式名称 4',6,7-トリヒドロキシイソフラボン）という化合物が、非常に強い AeNobo 阻害活性を持つことが明らかになりました（参考図 B）。これを用いてネッタイシマカの若齢幼虫を処理したところ、0.001%程度という低い濃度でも、幼虫発育を顕著に阻害できる活性があることが分かりました。

ゲニステインやダイゼインに蚊の幼虫に対する発育阻害効果があることは、以前から知られていましたが、その阻害効果がどのような分子メカニズムによってもたらされているのかは、分かっていませんでした。本研究により、その作用機序の一端が初めて解明されました。

なお、ゲニステインやダイゼインは、哺乳類の女性ホルモン様の活性を持っています。女性ホルモン様活性物質は内分泌攪乱物質（いわゆる「環境ホルモン」）になる可能性があるため、殺幼虫活性があったとしても野外に散布することはできません。その点、デスメチルグリシテインは女性ホルモン様活性を持たず、環境調和型昆虫成長制御剤として優れているといえます。

今後の展開

今回、エクジステロイド生合成を阻害する化合物が、ネッタイシマカの幼虫発育を阻害する昆虫成長制御剤となり得ることが初めて示されました。一方で、これらの化合物の活性は、すでに用いられている昆虫成長制御剤や殺蚊剤と比べるとまだ低く、デスメチルグリシテインをベースに、より高い活性を有する化合物の開発や、別の化学構造を持つ高活性化合物の探索を継続する必要があります。本研究チームでは、今後、こうした化合物についても、今回と同様の手法を用いた研究を進める予定であり、これにより、実用的な昆虫成長制御剤の開発につながることを期待されます。

参考図

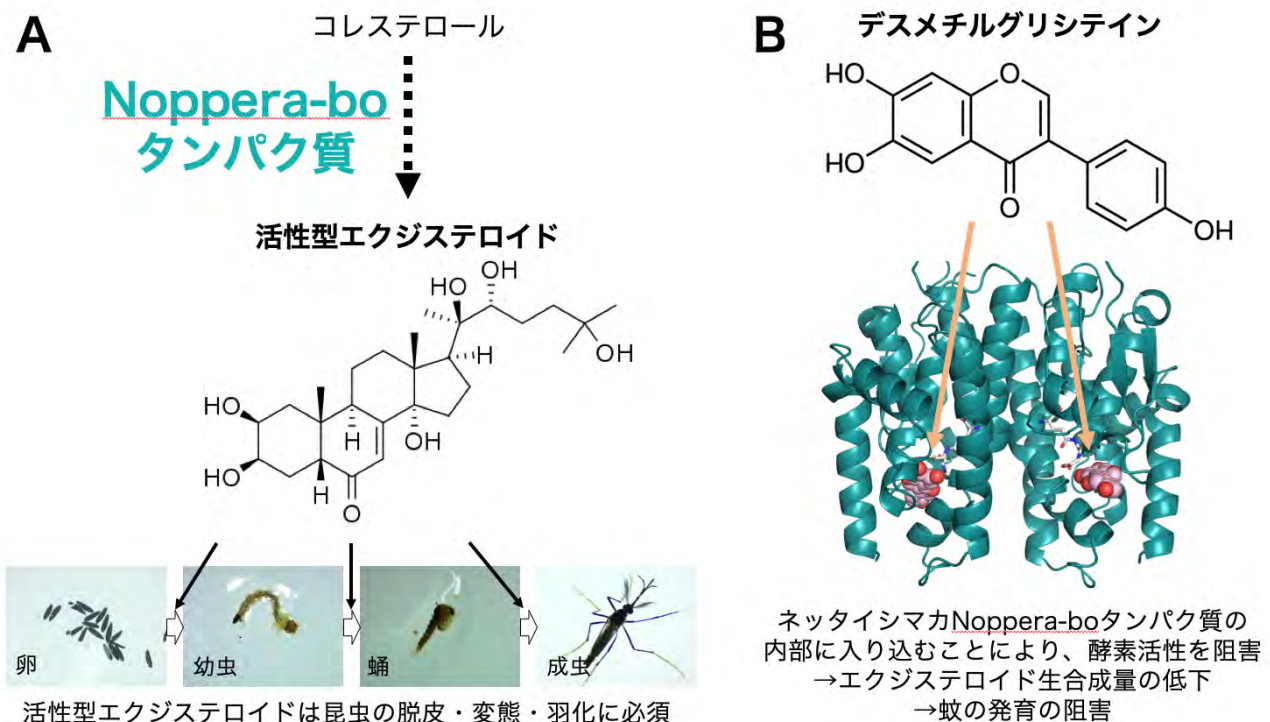


図 Noppera-bo の機能とデスメチルグリシテインの作用の模式図

(A) Noppera-bo は、食餌から摂取したコレステロールからエクジステロイドを生合成する過程に関与する。活性型のエクジステロイドや、昆虫の脱皮や変態、そして羽化に必須である。(B) 本研究で見出したデスメチルグリシテインというフラボノイド化合物は、ネッタイシマカ Noppera-bo タンパク質の内部に入り込み、酵素活性を阻害する。その結果、エクジステロイド生合成量が低下し、蚊の発育が阻害されると考えられる。

用語解説

注1) 生合成酵素

生物が、その構成成分となる生体分子を、食物などから得た原材料を元に作り出す過程を「生合成」といい、生合成酵素は、生合成に必要な化学反応を触媒するタンパク質を指す。コレステロールから活性型エクジステロイドを生合成するためには、少なくとも9種類の酵素が必要であると考えられている。

注2) Noppera-bo

ハエ目昆虫とチョウ目昆虫で必須の役割を果たすエクジステロイド生合成酵素の一つ。グルタチオンS-転移酵素と呼ばれる一群のタンパク質ファミリーに属する。Noppera-boの名前の由来は、このタンパク質の機能が完全に失われたショウジョウバエでは、本来胚で発達すべき表皮の構造が形成されずに「ツルツル」の見た目になるため。

注3) 二次代謝産物

生物の体に存在する物質は、さまざまな化学反応を経て多様な物質へと変化する。この変化の過程を代謝という。生体内の代謝された物質のうち、生物体を構成維持する上で必要な物質を一次代謝産物、生存に必ずしも必須ではない物質を二次代謝産物と呼ぶ。微生物や植物は多様な二次代謝産物を産生することが知られており、これらの中には医薬品をはじめ有益な物質が多くある。

注4) X線結晶構造解析

結晶中の原子および分子の配置を決定する解析のこと。結晶にX線ビームを当てた際に生じる回折の情報に基づいて、結晶の構造を決定することができる。生命科学においては、結晶化させたタンパク質をX線結晶構造解析に用いることで、タンパク質の3次元の形状や、タンパク質と低分子化合物との相互作用を分子レベルで解明することができる。

注5) 分子動力学シミュレーション

原子ならびに分子の物理的な動きのコンピューターシミュレーション手法。原子や分子の相互作用を古典力学におけるニュートンの運動方程式を数値的に解析することにより、空間中における原子や分子の位置の時間的変化（動的変化）をシミュレーションすることができる。

研究資金

本研究は、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（BINDS）（課題番号 JP21am0101071、JP21am0101086、JP21am0101113、JP21am0101114；支援番号 1290、2145、2528、2966）、日本学術振興会科学研究費助成事業 挑戦的萌芽研究「エクジステロイド生合成に関わる新規酵素に着目した昆虫発育制御剤スクリーニング戦略」（研究費番号 15K14719、研究期間：2015～2017年度）、挑戦的研究（萌芽）「構造生物学的着想に基づく昆虫グルタチオンS-転移酵素 Nobo の内在性基質の同定」（研究費番号 18K19163、研究期間 2018～2019年度）、基盤研究（A）「微生物を介した植物の間接誘導防衛機構の解明にもとづく次世代昆虫制御物質の創出」（研究費番号 17H01472、研究機関 2017～2020年度）、令和3年度群馬大学生体調節研究所・内分泌・代謝学共同研究拠点、文部科学省私立大学研究ブランディング事業、および高エネルギー加速器研究機構大学院生研究フェローシップ（研究期間：2018～2020年度）の支援により実施されました。

掲載論文

【題名】 Molecular action of larvicidal flavonoids on ecdysteroidogenic glutathione S-transferase Noppera-bo in *Aedes aegypti*

(ネッタイシマカのエクジステロイド生合成に関与するグルタチオン S-転移酵素 Noppera-bo に作用するフラボノイドの殺幼虫活性の分子作用)

【著者名】 Kazue Inaba (稲葉 和恵、筑波大学 大学院生命環境科学研究科 博士後期課程 (当時))、Kana Ebihara (海老原 佳奈、筑波大学 大学院理工情報生命学術院 博士後期課程)、Miki Senda (千田 美紀、高エネルギー加速器研究機構物質科学研究所 助教)、Ryunosuke Yoshino (吉野 龍ノ介、筑波大学 医学医療系 助教)、Chisako Sakuma (佐久間知佐子、東京慈恵会医科大学 医学部 助教)、Kotaro Koiwai (小祝 孝太郎、高エネルギー加速器研究機構物質科学研究所 研究員 (当時))、Daisuke Takaya (高谷 大輔、理化学研究所 生命機能科学研究センター 研究員)、Chiduru Watanabe (渡邊 千鶴、理化学研究所 生命機能科学研究センター 研究員)、Akira Watanabe (渡邊 瑛、筑波大学 大学院理工情報生命学術院 修士課程)、Yusuke Kawashima (川嶋 裕介、星薬科大学 薬学部 特任助手 (当時))、Kaori Fukuzawa (福澤 薫、星薬科大学 薬学部 准教授)、Riyo Imamura (今村 理世、東京大学 創薬機構 特任講師)、Hirotatsu Kojima (小島 宏建、東京大学 創薬機構 特任教授)、Takayoshi Okabe (岡部 隆義、東京大学 創薬機構 特任教授)、Nozomi Uemura (上村 望、国立感染症研究所 昆虫医科学部 研究員)、Shinji Kasai (葛西 真治、国立感染症研究所 昆虫医科学部 部長)、Hiroataka Kanuka (嘉糠 洋陸、東京慈恵会医科大学 医学部 教授)、Takashi Nishimura (西村 隆史、群馬大学 生体調節研究所 教授)、Kodai Watanabe (渡邊 幸大、東京薬科大学 生命科学部 修士課程 (当時))、Hideshi Inoue (井上 英史、東京薬科大学 生命科学部 教授)、Yuuta Fujikawa (藤川 雄太、東京薬科大学 生命科学部 助教)、Teruki Honma (本間 光貴、理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー)、Takatsugu Hirokawa (広川 貴次、筑波大学 医学医療系 教授)、Toshiya Senda (千田 俊哉、高エネルギー加速器研究機構物質科学研究所 教授)、Ryusuke Niwa (丹羽 隆介、筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授、高エネルギー加速器研究機構 物質科学研究所 客員教授)

【掲載誌】 BMC Biology

【掲載日】 2022年2月17日

【DOI】 10.1186/s12915-022-01233-2

問い合わせ先

【研究に関すること】

丹羽 隆介 (にわ りゅうすけ)

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

Tel: 029-853-7342

E-mail: ryusuke-niwa@umin.ac.jp

URL: <https://sites.google.com/view/niwa-lab-tsukuba/home>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

東京薬科大学広報課

TEL: 042-676-6711

E-mail: kouhouka@toyaku.ac.jp

理化学研究所広報室 報道担当

E-mail: ex-press@riken.jp

【AMED事業に関すること】

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 (BINDS)

創薬事業部 医薬品研究開発課

TEL : 03-6870-2219

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

クライオ電子顕微鏡によりビフィズス菌酵素の微小構造を発見

ビフィズス菌では、ホスホケトラーゼ (PKT) という酵素が、単糖類の発酵において重要な役割を担っています。酵素の能力はその形状 (立体構造) に依存しており、産業利用などで酵素を高機能化するためには、立体構造情報は大変重要です。通常、酵素の立体構造は、X線結晶構造解析などを用いて解析しますが、今回、クライオ電子顕微鏡を用いて、ビフィズス菌 PKT の立体構造を決定しました。その結果、X線結晶構造解析では観測することができなかった、アミノ酸結合の微小な構造を捉えることに成功しました。

特に、基質結合ポケットの入り口に位置する QN ループと名付けた、四つのアミノ酸から構成されるループにおける微小構造の発見は、重要な知見です。この微小構造が、酵素の基質取り込みに関係していることが分かりました。QN ループには二つのコンフォメーションがあり、一つは基質のない状態で報告された X線結晶構造解析の結果と類似しており、もう一つはクライオ電子顕微鏡で初めて捉えられたものです。本研究では、これらを同時に観察することができました。このような QN ループの微細構造は、基質が結合した大腸菌の酵素と、対応するループのコンフォメーションがとても似ていることから、酵素の基質取り込みに関係していると考えられます。

研究代表者

筑波大学生存ダイナミクス研究センター

岩崎 憲治 教授



研究の背景

生物が生きる上で不可欠な代謝や免疫応答などの生命現象は、酵素と呼ばれるタンパク質に支えられています。ヒトの体内には1万種類を超える酵素が存在し、これらが特定の物質を別の物質に変換して、互いに提供しあいながらさまざまな物質やエネルギーを合成し、複雑な生命現象を維持します。酵素の中には産業上の有用物質を安価に合成できるものもあり、工業生産への応用が期待されます。しかしながら、天然に存在する酵素をそのまま利用できるとは限らず、酵素を高機能化する必要性がしばしば生じます。酵素の能力はその形状（立体構造）に依存するため、高機能化酵素を設計する上で立体構造情報は大変重要です。一般に、酵素の立体構造は、X線結晶構造解析法（XRD）や核磁気共鳴法（NMR）で詳細に調べることができますが、比較的多くの試料や結晶化が必要になるなど、必ずしも解析は容易ではありません。一方、2017年にノーベル化学賞受賞で話題になったクライオ電子顕微鏡^{注1)}は、少ない試料で結晶化せずに立体構造情報を取得できる画期的な手法です。そこで今回、クライオ電子顕微鏡を使い、ピフィズス菌における発酵生産で重要な役割を果たす酵素、ホスホケトラゼ（PKT）^{注2)}の立体構造を解析しました。

研究内容と成果

本研究チームは、最新のクライオ電子顕微鏡を使い、PKTの立体構造を観察しました。その結果、PKTは、同一の分子二つが互い違いに密着したユニットが四つ円環状に連なった「四つ葉のクローバー」のような形であることが明らかになりました。このPKT分子をさらに原子レベルで観察すると、酵素（タンパク質）を構成するアミノ酸の鎖状の連なり（主鎖）と主鎖から分かれた側鎖が明瞭に観測されました。また、この立体構造を、従来のXRDで得られた立体構造と比較したところ、四つ葉のクローバー状の全体構造を含め、原子レベルでも、主鎖・側鎖の構造は、両者でほぼ一致していたことから、クライオ電子顕微鏡とXRDは、同等の解析精度を持つことが示されました。

一方、XRDとクライオ電子顕微鏡のそれぞれで得られた立体構造を詳細に比較すると、基質が結合するポケットの入り口付近に位置するループ（QNループ：四つのアミノ酸から構成されるループ）に微細構造の違いが見られました。クライオ電子顕微鏡では、QNループの二つの立体配座（コンフォメーション）を同時に捉えることができました。一つは基質結合部位の入り口を狭めにし(closed form)、もう一つは逆に入り口を開けていました(open form)。closed formコンフォメーションは、基質のない状態で観察したXRDのコンフォメーションと類似していますが、open formコンフォメーションは、クライオ電子顕微鏡で初めて捉えられたものです（参考図）。このコンフォメーションは、基質が結合した大腸菌の酵素トランスケトラゼのそれと極めてよく似ていることから、QNループの微細構造は、酵素の基質取り込みに関係していることが推定されます。このように、クライオ電子顕微鏡を用いた解析によって、PKTが、基質が触媒部位にアクセスできるようになっている「開いた」構造と、その逆の「閉じた」構造の両方を持っていることが分かりました。

今後の展開

本研究を通じ、クライオ電子顕微鏡を用いた酵素の構造解析により、酵素高機能化の設計に有用な情報がより多く得られる可能性が示され、酵素の産業利用に役立つと期待されます。今後は、より精緻な高機能化設計に向け、酵素-基質複合体の構造の解析にも取り組む予定です。

参考図

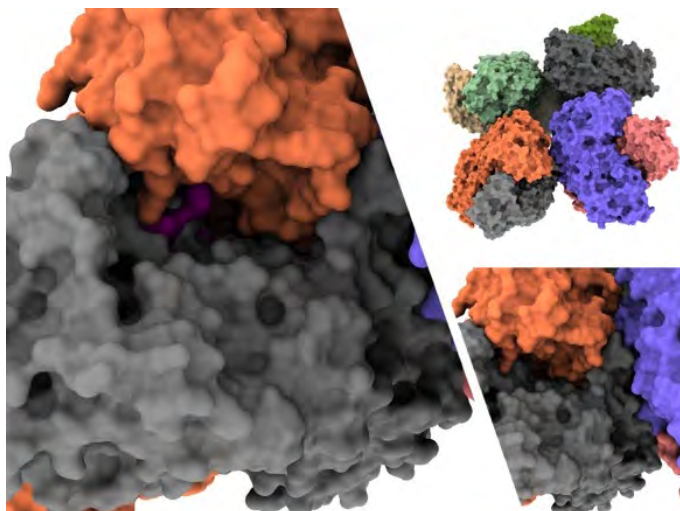


図 本研究で明らかになった PKT の立体構造

各色はすべて同一の分子であり、2分子が互い違いに密着してユニットを作り、これが連なって PKT を形成する。クライオ電子顕微鏡による解析では、四つのユニットが四つ葉のクローバー状の概形（右上）を持つことが分かった。また、XRD 構造で観測された closed form（左）に加え、open form（右下）も観測された。

用語解説

注1) ホスホケトラーゼ (PKT)

チアミンリン酸を補酵素とする酵素。基質にリン酸を付加する。基質としては、フルクトース-6-リン酸とキシルロース 5-リン酸の二種類がある。

注2) クライオ電子顕微鏡

透過型電子顕微鏡の一種で、極低温下で試料を凍結して観察する。サンプルの結晶化が不要なため、タンパク質などの生体分子の構造解析に適している。

研究資金

本研究は、日本医療研究開発機構 AMED の BINDS 事業として実施されました。また、本研究で使用したホスホケトラーゼは、味の素株式会社より提供を受けました。

掲載論文

【題名】 High-resolution structure of phosphoketolase from *Bifidobacterium longum* determined by cryo-EM single-particle analysis.

(クライオ電子顕微鏡単粒子解析によって決定されたビィフィドバクテリウム・ロンガム由来ホスホケトラーゼの高分解能構造)

【著者名】 Kunio Nakata, Naoyuki Miyazaki, Hiroki Yamaguchi, Mika Hirose, Tatsuki Kashiwagi, Nidamarthi H.V. Kutumbarao, Osamu Miyashita, Florence Tama, Hiroshi Miyano, Toshimi Mizukoshi, Kenji Iwasaki

【掲載誌】 Journal of Structural Biology

【掲載日】 2021年2月15日

【DOI】 10.1016/j.jsb.2022.107842

問合わせ先

【研究に関すること】

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 教授

TEL: 029-853-6045

Email: ikenji@tara.tsukuba.ac.jp

URL: <https://r.goope.jp/tsukuiwaken>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp