トランスオミクス医学研究センター

Research Center for Transomics Medicine

ゲノミクス分野
Division of Genomics

准　教　授：柴田　弘紀
Associate Professor：Hiroki Shibata, Ph.D.

当研究室では，疾病や適応進化と深い関わりを持つ遺伝的多様性の解析を行うことにより，遺伝情報制御機構や分子進化の観点から生命現象を理解することを目指している．疾患原因遺伝子変異の同定のみならず，発症機序解明を目指した動物モデルによる遺伝子変異機能解析，及び新規診断法・治療法開発を目指したゲノム・エピゲノム疫学研究を展開している.また非モデル生物のゲノム解析として，衛生動物である南西諸島のハブを対象にした研究も進めている．さらに近年は，潰瘍性大腸炎のバイオーム解析や古人骨のゲノム解析にも着手している.

平成30年4月より，システム生命科学府の大学院生として永野明宏が，また平成30年10月より，システム生命科学府の研究生として範駱鳴が参加した.

Ａ．神経疾患の分子基盤の解明

ａ．新規遺伝性遠位運動ニューロパチーの解析

久留米大学において見出された，顔面筋・胸鎖乳突筋の軽度筋力低下と両下肢遠位伸筋の中等度ないし高度の筋力低下，下肢屈筋筋力正常，感覚正常を特徴とする常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性ニューロパチー（distal hereditary motor neuropathy（dHMN））家系の解析を行った．患者の下肢MRIでは大腿四頭筋の萎縮・脂肪化が認められ，前脛骨筋の顕著な萎縮と脂肪化が認められた．腓腹筋頭にも中等度の萎縮と脂肪化が認められ，前脛骨筋に加えて，腓腹筋遠位部・ヒラメ筋にも萎縮と脂肪化が認められた.既知の家族性ニューロパチー責任遺伝子変異として，*MPZ*遺伝子および*PMP22*遺伝子のコピー数異常が知られているが，realtimePCRにより本家系においてこれらの遺伝子のコピー数異常はないことを確認した.続いて，発症者2名のエクソーム解析を行い，のべ16,427個の遺伝子変異を検出した.続く変異の絞り込みにより，*TDRKH*遺伝子内の非同義変異（c.851G>A [p.Arg284His]）を同定した．当該変異は，*TDRKH*内のtudorドメインに存在していた．*TDRKH*と神経疾患との関連はこれまで報告されていなかったが，下位運動ニューロン機能障害を主徴とする類似疾患である脊髄筋萎縮症が，SMN1遺伝子内のtudorドメインの非同義変異によって引き起こされることがよく知られているため，*TDRKH*の当該変異を本疾患家系の責任変異として同定した（Miura et al，印刷中）．Tudorドメインを介してTDRKHと結合する分子としてPIWIL等が知られているため，現在，当該変異による結合への影響を等温滴定型カロリメトリー等で検討している.

ｂ．脊髄小脳失調症家系の解析

波紋筋病脊髄小脳失調症(SCA)は，小脳の萎縮に伴った運動失調症状が特徴づけられる遺伝性疾患である.発端者は 47 歳より構音障害および歩行障害を呈した．まず，既知の 8 つの責任遺伝子（SCA1-3,6-8,12,17）にリピート伸長が無いことをフラグメント解析により確認した．次に，エクソーム解析を行い，検出した計 34,751 個の一塩基変異から SCA 責任遺伝子内に存在する稀少変異を絞り込んだところ，fibroblast growth factor 14 をコードする *FGF14* 遺伝子の第 4 エクソンに新規ナンセンス変異(NM_004115, c.529A>T; Lys177X)を見出した．当該領域は機能に重要な FGF ドメインをコードしており，ナンセンス変異による重大な機能喪失が期待されること，公共データベースには報告が無いことなどから，当該変異が本 SCA 家系の責任変異として報告した（Miura et al, 2019）.

Ｂ．ゲノム・エピゲノム疫学研究

ａ．加齢のエピジェネティックバイオマーカー同定と疾病罹患との関連に関する研究

ヒト一般集団 480 名より得た末梢血由来のゲノム DNA と Illumina メチレーションアレイを用いたエピゲノムワイド関連解析（EWAS）を行ない，年齢と有意に相関してメチレーションレベルの変化する CpG サイトを 22 個同定した．このうち，成人病の疾患感受性遺伝子としても報告のあった 4 遺伝子（*ELOVL2*, *KLF14*, *FHL2*, *TRIM59*）に注目し，マウスを用いてさらに年齢，肥満，糖尿病とメチル化レベルの関係を解析した．4 遺伝子のうち，*Elovl2* と *Klf14* でのみヒトと同様の年齢と相関したメチル化レベルの上昇を，マウスでも確認した．*Klf14* ではさらに，メチル化レベルの上昇にともなって遺伝子発現量が有意に減少することが，脾臓，脂肪組織，抹消血などが観察できた．肥満マウスおよび糖尿病モデルマウスにおいても，同様の *Klf14* のメチル化レベルの有意な上昇が観察された．*Klf14* は転写因子であり，メチル化レベルの上昇にともなって下流の遺伝子群の発現低下と炎症メディエーターの発現上昇を引き起こすことも示された．さらに肥満マウスで観察された *Klf14* のメチル化レベル上昇は，高脂肪食から低脂肪食への食事改善による体重増加の停止に引き続いて，通常レベルまで減少することも示された．本研究で見出された *KLF14* 遺伝子領域における DNA メチル化レベル変化は，抹消血でも検出が可能であるため，加齢や糖尿病さらには脂肪組織の炎症状態を反映するエピジェネティックバイオマーカーとしての可能性が示され，肥満型糖尿病を始めとする生活習慣病とエピゲノム変化との関連を理解するための重要な情報を提供すると考えられた（Iwaya et al, 2018）.

C．毒生物のオミクス解析

生物毒は，生理活性物質の新たな創薬シーズとして，近年大変注目を浴びている．当研究室では，日本独自の創薬シーズ開発を目指して日本固有の毒蛇ハブ（*Protobothrops flavoviridis*）を対象に，全ゲノム解読を含むオミクス解析及び遺伝的多様性の解析を行っている．

a．ハブの全ゲノム配列決定による毒液関連遺伝子群の解析

奄美ハブの全ゲノム配列決定を行い，ゲノムドラフト配列（HabAm1）とその遺伝子モデルを作製した．そこから得られた合計 324 個の毒液関連遺伝子セットは，24 の遺伝子族に分類された．また，アミノ酸配列にもとづいた系統樹解析により，73 個の毒液構成タンパク質遺伝子（SV）と 251 個の非毒型パラログ（NV）に弁別できた．重複遺伝子の構成は遺伝子族間でかなり異なっているが，おおむね以下の 3 つのカテゴリに分類することができた．

カテゴリ I：1 コピーの SV と少数コピーの NV（1〜11）からなる．

カテゴリ II：2-6 コピーの SV と少数コピーの NV（2〜10）からなる．

カテゴリ III：10 コピー以上の SV と多数コピーの NV（31〜59）からなる．

毒液の主要構成成分である金属プロテアーゼ，セリンプロテアーゼ，ホスホリパーゼ A2，C 型レクチンの 4 遺伝子族（= カテゴリ III）は，毒液遺伝子コピーと非毒型パラログともに高度に多重化していた．それ以外の毒液遺伝子では毒型遺伝子 1 コピーと非毒型パラログ 2〜10 コピーであり，脊椎動物の初期進化過程で起きた 2 回のゲノム重複の後に 1 コピーが毒液機能を獲得したことが示唆された．また，遺伝子族ごとに進化速度（厳密にはコピー間の分化の速度の比較）を行なったところ，カテゴリ III の毒液タンパク質遺伝子群（SV）においてのみ顕著な加速的進化が観察された．またカテゴリ II も加速進化の傾向が見られた．それに対してそれぞれの非毒型パラログ群では加速進化は見られなかった．我々はすでにこれまでの解析で，毒液関連遺伝子群が微小染色体に濃縮していることを見出しており，毒液関連遺伝子群の加速進化に，微小染色体の特異な構造が関与している可能性が示唆された（次頁図 1）（Shibata et al，2018）．

b．近縁種ハブの全ゲノム比較解析

以前の行ったミトゲノムの解析（Shibata et al 2016）などから，奄美諸島の個体群と，沖縄諸島の個体群が大きく遺伝的に分化していることがわかっている．これを受けて，沖縄島産ハブおよび近縁種であるトカラハブとサキシマハブの全ゲノム解析を行なっている．まず全ゲノムショットガンにより，沖縄ハブから 363 Gb，トカラハブから 446 Gb，サキシマハブから 417 Gb のショットガンリードを取得した（ゲノムサイズを 1.8 Gb として，それぞれ 202x，248x，232x に相当）（表 1）．また，ゲノムアセンブリの品質を向上させる

ために，上記のゲノム DNA から，さまざまなギャップ長のメイトペアライブラリを作成した．イルミナ HiSeq2500 により取得したメイトペアリードの成績を表 2 に示す．

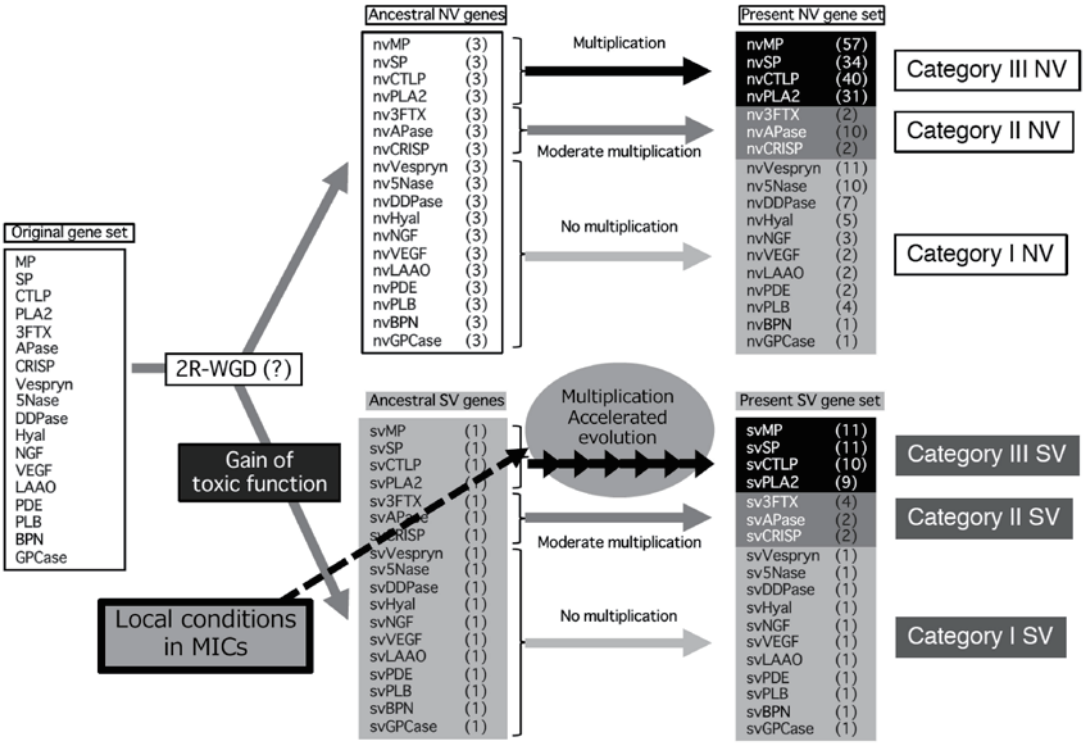

図1: ハブ毒液関連遺伝子群の進化過程

表1: 沖縄ハブおよび近縁2種のコンティグアセンブリの成績

	沖縄ハブ	トカラハブ	サキシマハブ
ショットガンリード	363 Gb	446 Gb	417 Gb
シークエンス深度	202	248	232
アセンブリ全長	1.38 Gb	1.36 Gb	1.40 Gb
平均コンティグ長	17.1 kb	13.8 kb	12.5 kb
N50長	33.8 kb	26.2 kb	23.6 kb

表2: 沖縄ハブおよび近縁2種のメイトペアリード

	沖縄ハブ	トカラハブ	サキシマハブ
3kb メイトペア	22.9 Gb	29.1 Gb	48.9 Gb
5kb メイトペア	24.8 Gb	28.3 Gb	ナシ
8kb メイトペア	26.7 Gb	30.5 Gb	50.7 Gb
10kb メイトペア	27.4 Gb	31.0 Gb	ナシ
12kb メイトペア	26.5 Gb	29.1 Gb	48.5 Gb
15kb メイトペア	24.9 Gb	29.6 Gb	59.9 Gb
計	153 Gb	177 Gb	208 Gb

上記のメイトペアリード情報を追加して，沖縄ハブのゲノムスキャッフォールディングを行ったところ，断片数，N50 長ともに大幅に改善し，アセンブリの向上を図ることができた（次頁の表 3）.それぞれを沖縄ハブゲノムアセンブリ（HabOk1），トカラハブアセンブリ（HabKd1），サキシマハブアセンブリ（HabIr1）とした．BUSCO v2.0 を用いて，構築した近縁種ゲノムアセンブリと構築済みの奄美ハブゲノムアセンブリの品質を比較評価した（表 4）．その結果，既存の奄美ハブアセンブリを凌ぐクオリティで今回の沖縄ハブゲノムアセンブリができあがっていることが確認できた．現在，これらのゲノムドラフトから遺伝子モデルの構築を進めている．

表3: 沖縄ハブと奄美ハブのスキャッフォールディングの成績

種	奄美ハブ（参考）	沖縄ハブ	トカラハブ	サキシマハブ
アセンブリ名	HabAm1	HabOk1	HabKd1	HabIr1
断片数	84,502	2,413	3,905	8,291
アセンブリ全長	1.41 Gb	1.44 Gb	1.40 Gb	1.49 Gb
平均断片長	16.7 kb	596.6 kb	359.2 kb	179.7 kb
N50長	467 kb	5.47 Mb	5.51 Mb	8.58 Mb

表4: ゲノムアセンブリの完全性の評価

BUSCO結果*	奄美ハブ HabAm1	沖縄ハブ HabOk1	トカラハブ HabKd1	サキシマハブ HabIr1
完全に含まれていたコア遺伝子数	216 (92.70%)	223 (95.71%)	222 (95.28%)	225 (96.57%)
部分的に含まれていたコア遺伝子数	226 (97.00%)	230 (98.71%)	229 (98.28%)	229 (98.28%)
見つからなかったコア遺伝子数	7 (3.00%)	3 (1.29%)	4 (1.72%)	4 (1.72%)

*コア遺伝子233個をクエリにした。

業績目録

原著論文

1. Miura S, Kosaka K, Nomura T, Nagata S, Shimojo T, Morikawa T, Fujioka R, Taniwaki T, Shibata H. 2019.
   TDRKH is a candidate gene responsible for an autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy. Eur J Med Genet. In press.
2. Miura S, Kosaka K, Fujioka R, Uchiyama Y, Shimojo T, Morikawa T, Irie A, Takayuki Taniwaki T, Shibata H. 2019.
   Spinocerebellar ataxia 27 with a novel nonsense variant (Lys177X) in *FGF14*.
   Eur J Med Genet. 62: 172-176.
3. Iwanishi S, Zaitsu S, Shibata H, Nitasaka E. 2018.

An albino mutant of the Japanese rat snake (*Elaphe climacophora*) carries a nonsense mutation in the tyrosinase gene.
Genes Genet Syst. 93: 163-167.

4. Shibata H, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Nakamura H, Yamaguchi K, Hattori S, Matsubara K, Matsuda Y, Yamashita A, Isomoto A, Mori K, Tashiro K, Kuhara S, Yamasaki S, Fujie M, Goto H, Koyanagi R, Takeuchi T, Fukumaki Y, Ohno M, Shoguchi E, Hisata K, Satoh N, Ogawa T. 2018.
The habu genome reveals an evolutionary background of venom protein genes.
Sci Rep. 8: 11300.

5. Koganebuchi K, Gakuhari T, Takeshima H, Sato K, Fujii K, Kumabe T, Kasagi S, Sato T, Tajima A, Shibata H, Ogawa M, Oota H. 2018.
A new targeted capture method using bacterial artificial chromosome (BAC) libraries as baits for sequencing relatively large genes.
PLoS One 13(7): e0200170.

6. McColl H, Racimo F, Vinner L, Demeter F, Gakuhari T, Mayar JVM, van Driem G, Wilken UG, Seguin-Orlando A, Castro CF, Wasef S, Shoocongdej R, Souksavatdy V, Sayavongkhamdy T, Saidin MM, Allentoft M, Sato T, Korneliussen T, Prohaska A, Margarayan A, Damgaard PB, Kaewsutthi S, Lertrit P, Nguyen TMH, Hung H, Tran TM, Truong HN, Nguyen GH, Shahidan S, Wiradnyana K, Matsumae H, Shigehara N, Yoneda M, Ishida H, Masuda Y, Yamada Y, Tajima A, Shibata H, Toyoda A, Hanihara T, Nakagome S, Deviese T, Bacon A-M, Duringer P, Ponche J-L, Shackelford L, Patole-Edoumba E, Nguyen AT, Bellina-Pryce B, Galipaud J-C, Kinaston R, Buckley H, Pottier C, Rasmussen S, Higham T, Foley RA, Lahr MM , Orlando L, Sikora M, Ota H, Higham C, Lambert DM, Willerslev E. 2018.
Ancient genomics reveals four prehistoric migration waves into Southeast Asia.
Science 361: 88-92.

7. Iwaya C, Kitajima H, Yamamoto K, Maeda Y, Sonoda Y, Shibata H, Inoguchi T. 2018.
DNA methylation of the *Klf14* gene region on whole blood provide prediction for the chronic inflammation at the adipose tissue.
Biochem Biophys Res Commun. 497: 908-915.

8. Hirano A, Umeno J, Okamoto Y, Shibata H, Ogura Y, Moriyama T, Torisu T, Fujioka S, Fuyuno Y, Kawarabayashi Y, Matsumoto T, Kitazono T, Esaki M. 2018.
A comparison of the microbial community structure between inflamed and non-inflamed sites in patients with ulcerative colitis.
J Gastroenterol Hepatol. 33(9): 1590-1597.

9. Yamaji F, Soeda A, Shibata H, Morikawa T, Suzuki K, Yoshida S, Ogura S. 2018.
A new mutation of congenital methemoglobinemia exacerbated after methylene blue treatment.
Acute Med Surg. 5: 199-201.

著書

1. Ogawa T, Sekikawa A, Sato H, Muramoto K, Shibata H, Hattori S. 2018.
   Proteomic analysis of venomous fang matrix proteins of *Protobothrops flavoviridis* (Habu) snake. In: Biomineralization, edited by Endo K, Kogure T, Nagasawa H., pp.39-54.
   Springer Nature, Singapore (2018).

総説

1. 小川智久, 柴田弘紀. 2019.
   「ベノミクス研究」の最前線：動物毒は, どのように進化してきたのか？
   化学と生物, In press.

学会発表

1. Hirano A, Shibata H, Kakuta Y, Nagasaki M, Tokunaga K, Khor SS, Kawai Y, Umeno J, Torisu T, Kitazono T, Esaki M. (2019, 2/7 - 2/9).
   The association study between HLA genotype and mucosal microbial composition in patients with inflammatory bowel diseases.
   2019 Crohn's and Colitis Congress, Las Vegas, NV.
2. 稲丸賢人, 千々岩崇仁, 竹内亜美, 前田真理恵, 山口和晃, 柴田弘紀, 服部正策, 上田直子, 大野素徳. (2018, 11/28 - 11/30).
   ホンハブの Small Serum Protein（SSP）遺伝子アレイの特異な構造と進化.
   第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜.
3. 森川拓弥, 三浦史郎, 大石裕晃, 小坂健悟, 下條智史, 永野明宏, 鵜木元香, 佐々木裕之, 柴田弘紀. (2018, 11/28 - 11/30).
   CRISPR/Cas9 によって作成した *Ddhd1* ノックアウトマウスの解析.
   第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜.
4. 下條智史, 三浦史郎, 小坂健悟, 青木浩介, 鎌田崇嗣, 柴田弘紀. (2018, 11/28 - 11/30).
   常染色体優性遺伝発作性運動誘発性ジスキネシア家系で同定した *FAT2* 内の新規非同義変異.
   第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜.
5. 小坂健悟, 三浦史郎, 下條智史, 森川拓弥, 内山雄介, 谷脇考恭, 柴田弘紀. (2018, 11/28 - 11/30).
   脊髄小脳失調症 27 型で同定した *FGF14* 内の新規ナンセンス変異.
   第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜.
6. 柴田弘紀, 千々岩崇仁, 小田-上田直子, 服部正策, 松原和純, 松田洋一, 山崎慎一, 藤江学, 後藤大輝, 小柳亮, 竹内猛, 服巻保幸, 大野素徳, 将口栄一, 久田香奈子, 佐藤矩行, 小川智久. (2018, 11/24 - 11/25).
   ハブ（*Protobothrops flavoviridis*）の全ゲノム配列決定から明らかになった毒液関連遺伝子群の多

重化および加速進化と染色体構造との関係.
日本爬虫両棲類学会第 57 回大会, 麻布大学, 相模原.

7. 鎌田崇嗣, 下條智史, 三浦史郎, 小坂健悟, 重藤寛史. (2018, 10/25 - 10/27).
皮質異形成モデルラットのてんかん発症における炎症関連受容体およびグリア細胞の関与の分析.
第 52 回日本てんかん学会学術集会, パシフィコ横浜, 横浜.

8. Miura S, Shimojo T, Kosaka K, Fujioka R, Taniwaki T, Shibata H. (2018, 10/21 - 10/23).
Exome sequencing in sporadic patients with young-onset parkinsonism reveals novel candidates.
2018 American Neurological Association Annual Meeting, Atlanta, GA.

9. 覚張隆史, 中込滋樹, Martin Sikora, Simon Rasmussen, Morten Allentoft, 佐藤丈寛, Thorfinn Korneliussen, Blánaid Ní Chuinneagáin, 松前ひろみ, 小金渕佳江, Ryan Schmidt, 茂原信生, 米田穣, 木村亮介, 石田肇, 増山禎之, 山田康弘, 田嶋敦, 柴田弘紀, 豊田敦, 埴原恒彦, Eske Willerslev, 太田博樹. (2018, 10/19 - 10/22).
伊川津・縄文人ゲノムからみた東アジア人類集団の形成史.
第 72 回日本人類学会大会, 国立遺伝学研究所, 三島.

10. 小坂健悟, 三浦史郎, 下條智史, 森川拓弥, 内山雄介, 谷脇考恭, 柴田弘紀. (2018, 10/10 - 10/13).
脊髄小脳失調症 27 型で同定した *FGF14* 内の新規ナンセンス変異.
日本人類遺伝学会第 63 回大会, パシフィコ横浜, 横浜.

11. 下條智史, 三浦史郎, 小坂健悟, 森川拓弥, 谷脇考恭, 柴田弘紀. (2018, 10/10 - 10/13).
孤発性パーキンソン病における責任遺伝子の探索.
日本人類遺伝学会第 63 回大会, パシフィコ横浜, 横浜.

12. Shibata H, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Yamaguchi K, Hattori S, Matsubara K, Matsuda Y, Isomoto A, Koyanagi R, Hisata K, Fukumaki Y, Ohno M, Shoguchi E, Satoh N, Ogawa T. (2018, 9/22 - 9/26).
Whole genome sequencing of a Japanese endemic pit viper, habu, *Protobothrops flavoviridis* reveals accelerated evolution of venom protein genes enriched in microchromosomal regions.
The International Society of Toxinology 2018 European Section Congress, Yerevan, Armenia.

13. 小坂健悟, 三浦史郎, 下條智史, 森川拓弥, 内山雄介, 谷脇考恭, 柴田弘紀. (2018, 9/19 - 9/22).
エクソーム解析によって *FGF14* 内に新規ナンセンス変異を認めた脊髄小脳失調症 27 型の一例.
日本遺伝学会第 90 回大会, 奈良先端科学技術大学院大学, 奈良.

14. 下條智史, 三浦史郎, 青木浩介, 谷脇孝恭, 柴田弘紀. (2018, 9/19 - 9/22).
常染色体優性遺伝発作性運動誘発性ジスキネシア家系における責任遺伝子の探索.
日本遺伝学会第 90 回大会, 奈良先端科学技術大学院大学, 奈良.

15. 森川拓弥, 三浦史郎, 小坂健悟, 下條智文, 永野明宏, 柴田弘紀. (2018, 9/19 - 9/22).
DDHD1 内の新規変異の同定とノックアウトマウスの作製.
日本遺伝学会第 90 回大会, 奈良先端科学技術大学院大学, 奈良.

16. Koganebuchi K, Gakuhari T, Kasagi S, Sato T, Tajima A, Shibata H, Ogawa M, Oota H. (2018, 9/18 - 9/21).
A new targeted enrichment method, “BAC-double capture,” for ancient DNA analysis.
8th International Symposium on Biomolecular Archaeology ISBA 2018, Jena, Germany.
17. Shibata H, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Yamaguchi K, Hattori S, Matsubara K, Matsuda Y, Koyanagi R, Hisata K, Fukumaki Y, Ohno M, Shoguchi E, Satoh N, Ogawa T. (2018, 7/8 - 7/12).
Whole genome sequencing of a Japanese endemic pit viper, habu, *Protobothrops flavoviridis r*eveals accelerated evolution of venom protein genes enriched in microchromosomal regions.
SMBE 2018, Yokohama, Japan.
18. Koganebuchi K, Gakuhari T, Takeshima H, Kasagi S, Sato T, Tajima A, Shibata H, Ogawa M, Oota H. (2018, 7/8 - 7/12).
A new targeted-capture method using bacterial artificial chromosome (BAC) as baits exclusively developed for sequencing relatively large loci of ancient DNA.
SMBE 2018, Yokohama, Japan.
19. Gakuhari T, Sikora M, Rasmussen S, Allentoft M, Sato T, Korneliussen T, Matsumae M, Shigehara N, Yoneda M, Ishida H, Masuda Y, Yamada Y, Tajima A, Shibata H, Toyoda A, Hanihara T, Nakagome S, Willerslev E, Hiroki Oota H. (2018, 7/8 - 7/12).
Whole genome analysis of the Jomon remain reveals deep lineage of East Eurasian populations.
SMBE 2018, Yokohama, Japan.
20. Miura S, Kosaka K, Fujioka R, Uchiyama Y, Taniwaki T, Shimojo T, Shibata H. (2018, 6/16 - 6/19).
A novel nonsense variant (Lys177X) of *FGF14* in a Japanese patient with autosomal dominant spinocerebellar ataxia.
The European Human Genetics Conference 2018, Milan, Italy.
21. 三浦史郎，小坂健悟，長田周治，野村拓夫，藤岡竜太，下條智史，谷脇考恭，柴田弘紀. (2018, 5/23 - 5/26).
遺伝学的に新規と考えられる常染色体優性遺伝性遠位型運動ニューロパチー.
第 59 回日本神経学会学術大会，ロイトン札幌，札幌.

エピゲノミクス分野

Division of Epigenomics

教　授：佐々木　裕之
Professor：Hiroyuki Sasaki, M.D., Ph.D.

当分野は平成 25 年 4 月に開設された．平成 30 年度もエピゲノム制御学分野の主幹教授・佐々木裕之と特任講師・藤英博が担当教員として兼任し，研究・教育を実施した．

エピゲノミクス分野では疾患における細胞の質的変化をエピゲノムの観点から理解することを目指し，3 台の高速 DNA シーケンサーを用いてエピゲノム解析（WGBS, mRNA-seq, ChIP-seq, small RNA-seq）を行っているほか，国際ヒトエピゲノムコンソーシアム（IHEC）の一員としてエピゲノム解読を進め，進化医学の観点からも研究を展開した．平成 30 年度は競争的資金を利用して最新鋭の次世代 DNA シーケンサー NovaSeq6000 を研究所に設置した．また，学内外の研究室との共同研究を積極的に行い，エピゲノム解析を支援した．最終的に，他のオミクス情報と合わせた横断的・統合的な研究を展開し，様々な病気を克服することを目指している．

具体的な研究成果は，エピゲノム制御学分野のＡ，Ｄ，Ｅを参照．

業績目録

原著論文

1. Matsuda, S., Yasukawa, T., Sakaguchi, Y., Ichiyanagi, K., Unoki, M., Gotoh, K., Fukuda, K., Sasaki, H., Suzuki, T. & Kang, D. 2018.
   Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA.
   Sci. Rep. 8, 5801.
2. Maezawa, S., Hasegawa, K., Yukawa, M., Kubo, N., Sakasita, A., Alabattam, K.G., Sin, H.-S., Kartashov, A.V., Sasaki, H., Barski, A. & Namekawa, S.H. 2018.
   Polycomb protein SCML2 facilitates H3K27me3 to establish bivalent domains in the male germline.
   Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 115, 4957-4962.
3. Yamashiro, C., Sasaki, K., Yabuta, Y., Kojima, Y., Nakamura, T., Okamoto, I., Yokobayashi, S., Murase, Y., Ishikura, I., Shirane, K., Sasaki, H., Yamamoto, T. & Saitou, M. 2018.
   Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro.

Science 362, 356-360.

4. Kubo, N., Harada, T., Shiraishi, Y., Nosaki, K., Nakagaki, N., Takeshita, M., Ouchi, H., Iwama, E., Tanaka, K., Okamoto, I., Sasaki, H. & Nakanishi, Y. 2019.
   Identification of genomic alterations acquired during treatment with EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer.
   Anticancer Res. 39, 671-677.
5. Au Yueng, W.K., Brind'Amour, J., Hatano, Y., Yamagata, K., Feil, R., Lorincz, M.C., Tachibana, M., Shinkai, Y. & Sasaki, H.
   Histone H3K9 methyltransferase G9a in oocytes is essential for preimplantation development but dispensable for CG methylation protection.
   Cell Rep. (in press).

総説

1. 藤英博, 佐々木裕之. 2018.
   エピジェネティクスと国際ヒトエピゲノムコンソーシアム.
   医学のあゆみ　266, 475-478.
2. 阿部周策，佐々木裕之．2018.
   エピジェネティクスと蛋白質生合成の制御.
   医学のあゆみ　267, 893-897.

学会発表（口頭発表）

1. 佐々木裕之 (2018, 6/30). 招待講演
   エピジェネティクスと細胞記憶と疾患
   平成 30 年度日本生化学会九州支部例会，福岡.
2. 佐々木裕之 (2018, 9/6). 招待講演
   エピジェネティクスと細胞記憶と疾患
   第 60 回歯科基礎医学会学術大会，福岡.
3. Au Yeung, W.K., Brind'Amour, J., Hatano, Y., Yamagata, K., Feil, R., Lorincz, M.C., Tachibana, M., Shinkai, Y., Sasaki, H. (2018, 10/27).
   Histone H3K9 methyltransferase G9a in oocyte is essential for preimplantation development but dispensable for CG methylation protection
   International Human Epigenome Consortium Annual Meeting 2018, Hong Kong.
4. 佐々木裕之 (2019, 3/11). 上原賞受賞者記念講演
   エピジェネティクスと細胞記憶と疾患
   上原記念生命科学財団平成 30 年度贈呈式，東京.

トランスクリプトミクス分野

Division of Transcriptomics

教　授：大川　恭行
Professor：Yasuyuki Ohkawa, Ph.D.

当分野は 3 年目を迎え，大川恭行教授，原田哲仁助教，前原一満助教，小松哲郎特任助教 1 名,学術研究員 3 名,博士課程学生 1 名，修士課程学生 2 名，テクニカルスタッフ 2 名，秘書 2 名の計 14 名により研究活動を展開している.

当分野はトランスクリプトミクスにより遺伝子発現を定量，定性の両面から網羅的に解析することで生体防御システムの解明に貢献することを目指している．特に高速シークエンサーを用いた全遺伝子転写量測定，ゲノムワイドなクロマチン解析およびその技術開発を行っている．現在は，骨格筋分化を中心に，遺伝子が転写可能になるクロマチン構造（クロマチンコード）の解明を行っている．本分野は，エピゲノム・トランスクリプトームの測定およびその成立機序を体系的に解析し，他のオミクス解析を取り入れ，遺伝子発現の普遍メカニズムの解明を目指していく.

Ａ．クロマチンコードの解明：コードを形成する分子の網羅的同定とその機能解析

DNA とヒストンの複合体であるヌクレオソームが連なって形成されるクロマチン構造は，ヒストンの翻訳後修飾やヒストンバリアント(ヒストン亜種)の取り込みによる動的な構造変換によって転写因子のプロモーター領域への結合を規定し，分化や発生の局面に応じたゲノム情報の取捨選択，つまり選択的な遺伝子発現の足場となっている．ヒストンの翻訳後修飾が活発に研究されている一方で，ヒストンバリアントの選択機序は未だ明らかとなっていない．その大きな原因はゲノムにコードされているヒストン遺伝子の全容が明らかでなかったことによる．ヒストン遺伝子は，パラログ間の相同性が極めて高く，ヒトゲノム計画が終了し 15 年が経過した現段階においても，いまだ解析が滞っている．我々は 2015 年に，コンピュータを用いた新規手法により未知ヒストンバリアント遺伝子の網羅的探索に成功し，マウスゲノムに存在する未知のヒストン H3 様のバリアント遺伝子を 14 種同定した．以降，新たに同定したヒストン H3 バリアントが構成するクロマチン構造が，遺伝子発現をどのように制御しているのか解明を進めている. 昨年度では精巣特異的ヒストンバリアント H3t の解析を展開し，新規ヒストン H3t は精子形成の特定の時期に発現し，元々ゲノムに取り込まれていた H3 と置き換わり,精子固有のクロマチン構造を形成すること，またこの構造が精子形成に不可欠であること明らかにした. 本年度はさらに,骨格筋幹細胞特異的なヒストン

H3mm7 について解析を行った．1 細胞 RNAseq 技術を用いた解析により H3mm7 は静止期骨格筋サテライト細胞に発現し分化に伴い発現が低下することを発見した．そこで,H3mm7 ノックアウトマウスを作出し，その表現型を解析したところ骨格筋再生不全を示した．そこで，H3mm7 の機能を解析するため各種エピゲノム解析を行った結果,H3mm7 は活性化クロマチン構造形成，とくに弛緩したクロマチン構造形成に寄与していることが明らかとなった．X 線結晶構造解析の結果，この弛緩したクロマチン構造は不安定なヌクレオソームの構造に起因していた．これらの結果から,H3mm7 は骨格筋再生過程において,特定の時期に発現し機能するヒストンであると考えられた(Harada A et al., Nature Commun., 2018)．すなわち,ヒストンバリアントは,各々の組織に特徴的な転写状態をもたらす働きを持つことが示唆された．そこで現在，様々な組織において特異的に機能するヒストンバリアントを継続して解析中である．

B．トランスクリプトミクス解析

各種トランスクリプトミクス解析についても精力的に行っている.共同研究を中心に各種病態解明を行った．本年度も protein coding gene を中心に,特に微量検体を用いたトランスクリプトミクス解析を進めた(Noguchi YT et al., Development, 2019; Shima Y et al., Development, 2018 他 8 報)．今後は，1 細胞レベルの解析がより普及していくことと考えられる．本分野においても Drop-Seq, CEL-Seq2 の既存の手法による解析を行った(Harada A et al., Nature Commun, 2018 他 3 報)．

C．　トランスクリプトミクス技術開発

人体に存在する 30 兆個の細胞は全て同一の遺伝情報を持ち，異なる組織を構成する細胞はそれぞれ特定の遺伝子を選択的に発現し固有の性質を獲得する.現在,次世代シークエンサーによる網羅的に発現する遺伝子をプロファイリングする RNA シークエンス技術の発展により，単一の細胞での遺伝子発現（個々の遺伝子の RNA の存在量）を解析することが可能になっている.しかしながら,遺伝子の発現制御のメカニズムを理解するために不可欠なエピゲノム解析は，従来の手法では少なくとも数千個の細胞を必要としたため，幹細胞など生体内に僅かにしか存在しない細胞への適用は極めて困難であった.

本研究では，極めて少数の細胞を用いてエピゲノム情報を取得できる「クロマチン挿入標識（Chromatin Integration Labeling: ChIL)」法を開発した(Harada A et al., Nature Cell Biol., 2019).本手法は，細胞を破壊することなしに，任意の転写因子やヒストン修飾などが存在する領域の塩基配列を増幅することができるため，高感度で解析ができる.そのため,遺伝子発現を制御する転写因子の結合位置やヒストン修飾を単一の細胞で測定することが世界で初めて可能になった.本研究により開発された手

法は，胚発生や細胞分化の制御機構など生命現象を制御する分子機構の解明に極めて有用であるとともに，がん研究・再生医療などへの応用が広く期待される．またハイスループットな独自解析手法の解析を進めている．現在，今後多様化するトランスクリプトミクスに対応すべく新たな技術開発として，従来の転写因子，クロマチンリモデリング因子に加えて，新たにRNA，DNA等の修飾核酸認識型特異的モノクローナル抗体の作成と単一細胞レベルでのマルチオミクスの開発を進めている．

業績目録

原著論文

1. Kozuka T, Omori Y, Watanabe S, Tarusawa E, Yamamoto H, Chaya T, Furuhashi M1, Morita M, Sato T, Hirose S, Ohkawa Y, Yoshimura Y, Hikida T, Furukawa T. 2019.
   miR-124 dosage regulates prefrontal cortex function by dopaminergic modulation.
   Sci Rep. Mar 9(1):3445.
2. Kobayakawa K, DePetro KA1, Zhong H, Pham B, Hara M, Harada A, Nogami J, Ohkawa Y, Edgerton VR. 2019.
   Locomotor Training Increases Synaptic Structure With High NGL-2 Expression After Spinal Cord Hemisection.
   Neurorehabil Neural Repair. 1545968319829456.
3. Noguchi YT, Nakamura M, Hino N, Nogami J, Tsuji S, Sato T, Zhang L, Tsujikawa K, Tanaka T, Izawa K, Okada Y, Doi T, Kokubo H, Harada A, Uezumi A, Gessler M, Ohkawa Y, Fukada SI. 2019.
   Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites.
   Development. 146(4). pii: dev163618.
4. Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Maeda T, Katoh H, Ohkawa Y, Nakashima Y, Okada S. 2019.
   Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury.
   Mol Brain. 12(1):4.
5. Harada A, Maehara K, Handa T, Arimura Y, Nogami J, Hayashi-Takanaka Y, Shirahige K, Kurumizaka H, Kimura H, *Ohkawa Y. 2018.
   A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input.
   Nat Cell Biol. 21(2):287-296.
6. Shima Y, Miyabayashi K, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Doi M, Okamura H, Suzuki K. 2018.

Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells.
Development. 145(23). pii: dev169136.

7. Matsuda A, Asada Y, Suita N, Iwamoto S, Hirakata T, Yokoi N, Ohkawa Y, Okada Y, Yokomizo T, Ebihara N. 2018.
Transcriptome profiling of refractory atopic keratoconjunctivitis by RNA sequencing.
J Allergy Clin Immunol. pii: S0091-6749(18)31639-7.

8. Katoh-Fukui Y, Baba T, Sato T, Otake H, Nagakui-Noguchi Y, Shindo M, Suyama M, Ohkawa Y, Tsumura H, Morohashi KI, Fukami M. 2018.
Mouse polycomb group gene Cbx2 promotes osteoblastic but suppresses adipogenic differentiation in postnatal long bones.
Bone. 120:219-231.

9. Baba T, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon JY, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Sato R, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi MH, Ohkawa Y, Morohashi KI. 2018.
Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids.
Commun Biol. 1:18.

10. Takashima Y, Horisawa K, Udono M, Ohkawa Y, Suzuki A. 2018.
Prolonged inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation by combinatorial expression of defined transcription factors.
Cancer Sci. 109(11):3543-3553.

11. Arimura Y, Ikura M, Fujita R, Noda M, Kobayashi W, Horikoshi N, Sun J, Shi L, Kusakabe M, Harata M, Ohkawa Y, Tashiro S, Kimura H, Ikura T, Kurumizaka H. 2018.
Cancer-associated mutations of histones H2B, H3.1 and H2A.Z.1 affect the structure and stability of the nucleosome.
Nucleic Acids Res. 46(19):10007-10018.

12. Luo D, Kato D, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Kono H. 2018.
MNase, as a probe to study the sequence-dependent site exposures in the +1 nucleosomes of yeast.
Nucleic Acids Res.

13. Sugimoto N, Maehara K, Yoshida K, Ohkawa Y, Fujita M. 2018.
Genome-wide analysis of the spatiotemporal regulation of firing and dormant replication originsin human cells.
Nucleic Acids Res. 46(13):6683-6696.

14. Kita Y, Katayama Y, Shiraishi T, Oka T, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Miyata K, Oike Y, Shirane M, Nishiyama M, Nakayama KI. 2018.
The Autism-Related Protein CHD8 Cooperates with C/EBPβ to Regulate Adipogenesis.

Cell Rep. 23(7):1988-2000.

15. ✣Harada A, ✣Maehara K, Ono Y, Taguchi H, Yoshioka K, Kitajima Y, Xie Y, Sato Y, Iwasaki T, Nogami J, Okada S, Komatsu T, Semba Y, Takemoto T, Kimura H, Kurumizaka H, *Ohkawa Y. 2018.
Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration.
Nat Commun. 9(1):1400.

学会発表（口頭発表）

1. Akihito Harada (2019, 3/18).
High-Throughput Single Cell Epigenomic Profiling using Chromatin Integration Labeling-Sequence.
3D Genome Gene Regulation and Disease (X6), Canada.
2. 大川恭行 (2019, 3/14). 招待講演
単一細胞レベルのエピゲノム解析技術.
九大発産・学・官交流促進シーズ発表会 2019, 東京.
3. 大川恭行 (2019, 3/2).
骨格筋再生におけるヒストン転換.
第 7 回骨格筋生物学研究会, 愛知.
4. Yasuyuki Ohkawa. (2019, 2/25).
Chromatin Integration Labeling- an Epigenomic Profiling for Single Cell Analysis.
Cell Symposium: Single Cells: Technology to Biology, Singapore.
5. 大川恭行 (2019, 2/15). 招待講演
Transcriptional Plasticity regulated by novel Histone H3 Varigants.
理研連携プロジェクト「エピゲノム操作」招聘セミナー, 埼玉.
6. 大川恭行 (2018, 11/28).
空間トランスクリプトミクスで解明する骨格筋再生.
第 41 回日本分子生物学会年会, 神奈川.
7. 大川恭行 (2018, 11/12).
Histone composition in chromatin regulates skeletal muscle regeneration.
The 6th Society of Skeletal Muscle Cells, 大阪.
8. 大川恭行 (2018, 9/25).
免疫沈降をしない 1 細胞エピゲノム解析技術の開発.
第 91 回日本生化学会学大会, 京都.
9. Yasuyuki Ohkawa (2018, 9/17 - 9/18).
Histone H3.3 sub-variants are required for regulating skeletal muscle differentiation.

2018 Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Italy.

10. 大川恭行 (2018, 8/10).
骨格筋分化・再生司るクロマチン構造制御機構の解明.
日本筋学会第 4 回学術集会, 岡山.

11. Yasuyuki Ohkawa (2018, 7/22 - 7/27).
ChiLT-an Epigenomic Profiling for Single Cell Analysis.
Gordon Research Conference「Chromatin Encounters Shaping Genome Architecture and Function」, USA.

12. 大川恭行 (2018, 7/19). 招待講演
クロマチン組成変化から考える細胞分化能制御～トランスクリプトミクスの新たな展開～.
東京大学理学部研究セミナー, 東京.

13. 大川恭行 (2018, 6/4).
ゲノムワイドな遺伝子発現制御機構を基盤とした神経組織特異的クロマチン構造の解明.
【ゲノム編集】キックオフミーティング, 東京.

14. 大川恭行 (2018, 5/25). 招待講演
1 細胞エピゲノム解析技術の開発.
第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会, 北海道.

15. 大川恭行 (2018, 5/18). 招待講演
遺伝子発現能から迫る骨格筋再生機構の解明～トランスクリプトミクスによるアプローチ～.
NCNP 神経研究所セミナー, 東京.

16. Yasuyuki Ohkawa (2018, 4/22 - 4/27).
Low-input Epigenomic Profiling Technology toward Identifying Myogenic Chomatin Structure.
Muscle Development, Regeneration and Disease 2018, Germany.

プロテオミクス分野

Division of Proteomics

教　授：中山　敬一
Professor：Keiichi Nakayama, M.D., Ph.D.

プロテオミクス分野では，タンパク質の総体であるプロテオームを解析するための技術開発とその応用を目指すと共に，多くの研究者に対して最先端技術の提供を行っている．基本技術としては精密質量分析によるショットガン・プロテオミクス，ターゲット・プロテオミクス，ペプチドマスフィンガープリンティング等を用い，さらにICAT，iTRAQ,SILAC,mTRAQ 等の安定同位体標識を用いた定量情報付加による高度のプロテオミクス技術を擁している．さらに従来個別解析であった MRM 技術を改変して大規模データ取得を目指す次世代プロテオミクス技術(iMPAQT システム)の開発を行い，すでに実用に供している．現在，16 台の質量分析計を有し，幅広いプロテオミクス技術への要請に対応が可能となっている．

プロテオミクス分野は，中山敬一が兼任として教授を務めている．さらに分野専任として松本雅記准教授と学術研究員 1 名（高見知代），テクニカルスタッフ 1 名（中山明日香）に加え，技術室所属の技官 1 名（木庭絵美子）とテクニカルスタッフ 1 名（小田瑞穂），で実際の研究開発及びサービス業務を進めている（2019 年 3 月 31 日現在）．

A．ユビキチンリガーゼ SCF^{Fbxw7} の新規基質としての KLF7 の同定

ユビキチン―プロテアソーム系による選択的タンパク質分解は，基質分子を特異的に分解することでタンパク質の量的制御に重要な役割を果たしている．SCF 複合体型ユビキチンリガーゼにおいては，複合体中の可変サブユニットである F-box タンパク質が基質特異性を担っている．Fbxw7 は F-box タンパク質の 1 つであり，その代表的な基質として c-Myc などが報告されているが，それ以外にも多くの転写調節因子を標的にしていることが知られており，まだ未同定の基質も多数あると推測されている．われわれはディファレンシャルプロテオミクスを用いてユビキチンリガーゼの基質を網羅的に同定する方法として，DiPIUS (Differential Proteomics-based Identification of Ubiquitylation Substrate)を開発したが，今回 DiPIUS 法によって mHepa，Neuro2A，C2C12 細胞から Fbxw7 の新規基質候補として転写因子である KLF7 を新規基質として同定した．われわれは，HEK293 細胞内での共免疫沈降実験により，Fbxw7 と KLF7 が結合することを確認した．また，リン酸化依存的に Fbxw7 により認識される degron 配列（CPD）をアラニンに置換した KLF7 変異体は，Fbxw7 との結合が阻害された．シクロヘキシミド処理を行って分解時間について検討したところ，野生型と比較して KLF7 変異体では分解時間が延長した．さらに，組み換えタンパク質を作製

して *in vitro* ユビキチン化アッセイを行ったところ，KLF7 は Fbxw7 依存的にユビキチン化を受けることが判明した．KLF7 の CPD 配列は GSK-3 によるリン酸化を受ける可能性を考え，GSK-3 阻害剤を加えると KLF7 の安定性が上昇した．以上より，KLF7 は Fbxw7 の基質であることが示唆された．KLF7 のターゲットとして p21 が報告されているが,実際に Neuro2A 細胞に Fbxw7 を過剰発現すると p21 が低下することを確認した．興味深いことに Fbxw7 は KLF6 にも結合するが，KLF6 の CPD と思われる配列に変異を導入しても Fbxw7 との結合には影響はなく，安定性も変化しなかった．このことから Fbxw7 は KLF7 の量的調節を行うことにより，その転写物の量を間接的に制御し，神経分化に関与していることが示唆された．

B．ユビキチンリガーゼ SCF^{Fbxw7} が乳がんの播種性腫瘍細胞（DTC）の維持に関わる効果の研究

播種性腫瘍細胞（DTC, disseminated tumor cells）として知られる静止期細胞は，しばしば乳がん患者の骨髄中に見られ，その存在は再発の一因になっていると考えられている．しかしその長期にわたる静止期維持の仕組みについてはあまり解明されていなかった．われわれは乳がんの DTC の静止期維持に Fbxw7 が不可欠であることを見出した．まず Fbxw7 の遺伝学的な欠損により DTC が静止期から増殖期へ移行することをマウスの移植系モデルで実証した．増殖期に移行した DTC はパクリタキセルによる抗がん剤治療後に有意に減少し，Fbxw7 欠損により DTC を抗がん剤耐性から感受性にできることを見出した．Fbxw7 欠損乳がん細胞を移植後に抗がん剤治療を行ったマウスは，Fbxw7 野生型乳がん細胞株移植後に抗がん剤治療を行ったマウスより生存期間が延長することを確認した．さらに実際の乳がん患者の公共データを使ったバイオインフォマティックス解析から Fbxw7 低発現の患者の方が Fbxw7 高発現の患者に比べて長期的な生存予後が良好であることを明らかにした．これらの結果から，Fbxw7 阻害による DTC の静止期追い出し療法と抗がん剤治療の組み合わせが乳がん患者の予後を改善する可能性が示唆される．

業績目録

原著論文

1. Nakayama, S., Yumimoto, K., Kawamura, A., Nakayama, K. I. 2018.
   Degradation of the endoplasmic reticulum-anchored transcription factor MyRF by the ubiquitin ligase SCF(Fbxw7) in a manner dependent on the kinase GSK-3.
   J. Biol. Chem., 293, 5705-5714.
2. Kita, Y., Katayama, Y., Shiraishi, T., Oka, T., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Miyata, K., Oike,

Y., Shirane, M., Nishiyama, M., Nakayama, K. I. 2018.
The autism-related protein CHD8 cooperates with C/EBPβ to regulate adipogenesis.
Cell Rep., 23, 1988-2000.

3. Sumitomo, A., Saka, A., Ueta, K., Horike, K., Hirai, K., Gamo, N. J., Hikida, T., Nakayama, K. I., Sawa, A., Sakurai, T., Tomoda, T. 2018.
Methylphenidate and guanfacine ameliorate ADHD-like phenotypes in Fez1-deficient mice.
Mol. Neuropsychiatry, 3, 223-233.

4. Hashimoto, Y., Shirane, M., Nakayama, K. I. 2018.
TMEM55B contributes to lysosomal homeostasis and amino acid-induced mTORC1 activation.
Genes Cells, 23, 418-434.

5. Hosokawa, H., Ungerback, J., Wang, X., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Cohen, S. M., Tanaka, T., Rothenberg, E. V. 2018.
Transcription factor PU.1 represses and activates gene expression in early T cells by redirecting partner transcription factor binding.
Immunity, 48, 1119-1134.e1117.

6. Nakatsumi, H., Oka, T., Higa, T., Shirane, M., Nakayama, K. I. 2018.
Nuclear-cytoplasmic shuttling protein $PP2A^{B56}$ contributes to mTORC1-dependent dephosphorylation of FOXK1.
Genes Cells, 23, 599-605.

7. Watanabe, S., Fujiyama, H., Takafuji, T., Kayama, K., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Yoshida, K., Sugimoto, N., Fujita, M. 2018.
GRWD1 regulates ribosomal protein L23 levels via the ubiquitin-proteasome system.
J. Cell Sci., 131, jcs213009.

8. Kawata, K., Hatano, A., Yugi, K., Kubota, H., Sano, T., Fujii, M., Tomizawa, Y., Kokaji, T., Tanaka, K. Y., Uda, S., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Saitoh, K., Kato, K., Ueno, A., Ohishi, M., Hirayama, A., Soga, T., Kuroda, S. 2018.
Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks.
iScience, 7, 212-229.

9. Matsumoto, J., Takada, S., Kinugawa, S., Furihata, T., Nambu, H., Kakutani, N., Tsuda, M., Fukushima, A., Yokota, T., Tanaka, S., Takahashi, H., Watanabe, M., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Otsuka, Y., Sabe, H., Tsutsui, H., Anzai, T. 2018.
Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure.
Circulation, 138, 2064-2066.

10. Hosokawa, H., Romero-Wolf, M., Yui, M. A., Ungerback, J., Quiloan, M. L. G., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Tanaka, T., Rothenberg, E. V. 2018.

Bcl11b sets pro-T cell fate by site-specific cofactor recruitment and by repressing Id2 and Zbtb16.
Nat. Immunol., 19, 1427-1440.

11. Abe, Y., Honsho, M., Itoh, R., Kawaguchi, R., Fujitani, M., Fujiwara, K., Hirokane, M., Matsuzaki, T., Nakayama, K., Ohgi, R., Marutani, T., Nakayama, K. I., Yamashita, T., Fujiki, Y. 2018.
Peroxisome biogenesis deficiency attenuates the BDNF-TrkB pathway-mediated development of the cerebellum.
Life Sci. Alliance, 1, e201800062.

12. Kawata, K., Yugi, K., Hatano, A., Kokaji, T., Tomizawa, Y., Fujii, M., Uda, S., Kubota, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kuroda, S. 2019.
Reconstruction of global regulatory network from signaling to cellular functions using phosphoproteomic data.
Genes Cells, 24, 82-93.

13. Shimizu, H., Takeishi, S., Nakatsumi, H., Nakayama, K. I. 2019.
Prevention of cancer dormancy by Fbxw7 ablation eradicates disseminated tumor cells.
JCI Insight, 4, pii: 125138.

14. Sugiyama, S., Yumimoto, K., Inoue, I., Nakayama, K. I. 2019.
SCF^{Fbxw7} ubiquitylates KLF7 for degradation in a manner dependent on GSK-3-mediated phosphorylation.
Genes Cells, in press.

15. Muto, Y., Moroishi, T., Ichihara, K., Nishiyama, M., Shimizu, H., Eguchi, H., Moriya, K., Koike, K., Mimori, K., Mori, M., Katayama, Y., Nakayama, K. I. 2019.
Disruption of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis promotes liver carcinogenesis.
J. Exp. Med., in press.

総説

1. Matsumoto, A., Nakayama, K. I. 2018.
Hidden peptides encoded by putative noncoding RNAs.
Cell Struct. Funct., 43, 75-83.

2. Hui, K., Katayama, Y., Nakayama, K. I., Nomura, J., Sakurai, T. 2018.
Characterizing vulnerable brain areas and circuits in mouse models of autism: Towards understanding pathogenesis and new therapeutic approaches.
Neurosci. Biobehav. Rev., in press.

3. 中山省悟，中山敬一. 2018.
細胞周期制御のキー蛋白質.
医学のあゆみ「蛋白質代謝医学：構造・機能の研究から臨床応用まで」, 1130-1135.

4. 杉山成明，弓本佳苗，中山敬一. 2018.

がんの浸潤と転移のメカニズム.
日本臨牀（増刊号）, in press.

学会発表

1. 中山敬一. (2018, 9/1).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの謎を解く. (特別講演)
第 11 回シンフォニー研究会, 東京.
2. 中山敬一. (2018, 9/2).
鉄代謝制御を司るユビキチンシステムと疾患. (特別講演)
第 42 回鉄バイオサイエンス学会学術集会, 金沢.
3. 中山敬一. (2018, 9/8).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの謎を解く. (特別講演)
第 6 回ブリストル血液学アカデミー, 福岡.
4. 中山敬一. (2018, 9/24).
グルタミンからの窒素流束の代謝シフトはがん悪性化に必要である：第二のワールブルグ効果の発見. (シンポジウム)
第 91 回日本生化学会大会, 京都.
5. 中山敬一. (2018, 9/27).
人工知能を用いたスコアシステムは乳がん患者の予後を正確に予測する. (シンポジウム)
第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪.
6. 中山敬一. (2018, 9/29).
がん幹細胞における細胞周期制御. (JCA-Mauvernay Awards Session)
第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪.
7. 中山敬一. (2018, 11/9).
転移巣に TAM を呼び寄せるメカニズムとそれを阻害する既存薬. (招待講演)
第 16 回がんとハイポキシア研究会, 千葉.
8. 武藤義治, 中山敬一. (2018, 11/28).
ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御とその破綻. (ワークショップ)
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.
9. 見世慎太朗, 松本有樹修, 清水秀幸, 中山敬一. (2018, 11/28).
精巣特異的に発現する新規ポリペプチドの機能解析.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.
10. 木藤有紀, 松本雅記, 押川清孝, 中山敬一. (2018, 11/28).
細胞がん化は核内プロテアソームの発現量を減弱させる. (ワークショップ)
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.
11. 喜多泰之, 片山雄太, 白石大智, 岡毅寛, 白根道子, 西山正章, 中山敬一. (2018, 11/28).

脂肪分化におけるクロマチンリモデラーCHD8 の genome-wide 解析.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

12. 白石大智, 片山雄太, 喜多泰之, 西山正章, 中山敬一. (2018, 11/28).
CHD8 機能異常による自閉症スペクトラム障害の発症メカニズムの解明.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

13. 天間雄祐, 松本有樹修, 中山敬一. (2018, 11/28).
脳機能を制御する新規ポリペプチドの解析.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

14. 藤沼駿, 中津海洋一, 中山敬一. (2018, 11/29).
mTORC1 下流の転写因子 FOXK1 は NAFLD/NASH および肝がんを促進する.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

15. 中山敬一. (2018, 11/29).
c-Myc によって統合されるがん代謝ネットワークの全貌. (ワークショップ)
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

16. 清水秀幸, 中山敬一. (2018, 11/29).
人工知能を使って乳がん患者の生存予後を正確に予測する.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

17. 弓本佳苗, 中山敬一. (2018, 11/29).
がん細胞が免疫チェックポイント阻害を免れる分子経路のゲノムワイドスクリーニング.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

18. 塚本康寛, 中山敬一, 西山正章. (2018, 11/29).
クロマチンリモデリング因子 CHD8 の動態追跡による自閉症の発症メカニズムの解明.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

19. 川村敦生, 片山雄太, 西山正章, 昌子浩孝, 徳岡広太, 植田禎史, 宮田麻理子, 伊佐正, 宮川剛, 中山敬一. (2018, 11/29).
クロマチンリモデリング因子 CHD8 の変異によるオリゴデンドロサイト機能異常と自閉症発症への関与.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

20. 比嘉綱己, 沖田康孝, 松本有樹修, 武石昭一郎, 中津海洋一, 中山敬一. (2018, 11/29).
p57 陽性細胞の系統追跡により, さまざまな組織の静止幹細胞を同定する.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

21. 仁田暁大, 武藤義治, 片山雄太, 松本有樹修, 西山正章, 中山敬一. (2018, 11/29).
自閉症関連遺伝子 CHD8 は造血幹細胞の分化に関与する.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

22. 山内悠平, 仁田暁大, 中津海洋一, 中山敬一. (2018, 11/29).
Skp2 による細胞周期制御は, 胎盤幹細胞の幹細胞性の維持に重要である.

第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

23. 西山正章, 中山敬一. (2018, 11/29).
クロマチンリモデリング因子 CHD8 の動態追跡による自閉症の発症メカニズムの解明.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

24. 髙橋秀尚, Ranjan, A., Chen, S., 柴田美音, 瀧川一学, 渡部昌, 築山忠維, 藤井聡, 山本淳一, 山口雄輝, 松本雅記, 中山敬一, 鈴木穣, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Conaway, R., Conaway, J., 畠山鎮次. (2018, 11/29).
メディエーター複合体による転写終結制御機構. (ワークショップ)
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

25. 築山忠維, 増田隆昌, Kim, J., Merenda, A., 松本雅記, 寺井小百合, 篠裕輝, 髙橋秀尚, 石谷太, 中山敬一, Koo, B. K., 畠山鎮次. (2018, 11/30).
-伝統的 vs 包括的- RNF43 のリン酸化異常による発がんメカニズムの解明で明らかになったがん研究手法の利点と欠点.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

26. 林直希, 喜多泰之, 中津海洋一, 中山敬一, 白根道子. (2018, 11/30).
プロトルーディン複合体による膜接触部位を介した細胞内カルシウム調節機構.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

27. 松本悠希, 喜多泰之, 中津海洋一, 中山敬一, 白根道子. (2018, 11/30).
モノアミン分泌における細胞内輸送制御分子プロトルーディンの関与.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

28. 國松澪奈, 喜多泰之, 中津海洋一, 中山敬一, 白根道子. (2018, 11/30).
プロトルーディン複合体による膜接触部位の形成機構.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

29. 山畑育子, 喜多泰之, 中津海洋一, 中山敬一, 白根道子. (2018, 11/30).
神経細胞の樹状突起スパイン成熟におけるプロトルーディンの関与と機構.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

30. 立石千瑳, 松本雅記, 中山敬一. (2018, 11/30).
転写因子 c-Myc と相互作用するタンパク質の効果的な同定法の開発.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

31. 市原知哉, 武藤義治, 諸石寿朗, 西山正章, 片山雄太, 中山敬一. (2018, 11/30).
ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御とその上流制御因子の探索.
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

32. 松本有樹修, 中山敬一. (2018, 11/30).
Long non-coding RNA から翻訳される機能性ポリペプチド群の同定. (シンポジウム)
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜.

33. Nakayama, K. I. (2019, 2/10).

Next-generation proteomics unveils a global landscape of cancer metabolism: Discovery of the "second" Warburg effect. (Invited Speaker)
11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine, Maui, HI.

34. 中山敬一. (2019, 3/14).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの謎を解く. (特別講演)
第 92 回日本薬理学会年会, 大阪.

35. 中山敬一. (2019, 3/16).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：代謝パスウェイの全貌解明に向けて. (特別講演)
第 33 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 福岡.

36. 中山敬一. (2019, 3/22).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの謎を解く. (基調講演)
がんの増殖制御拠点シンポジウム, 山口.

メタボロミクス分野

Division of Metabolomics

教授：馬場　健史
Professor: Takeshi Bamba, Ph.D.

当分野では，代謝物の総体であるメタボロームを解析するための技術開発およびメタボロミクスの応用研究に取り組んでいる．メタボローム解析は，ゲノム情報から転写，翻訳過程を経て生成した酵素に基づく低分子化合物の化学変化を包括的に捉えたものであり，ゲノム情報に最も隣接した高解像度表現型解析手段である．すなわち，遺伝子発現変動や生体内外の環境変動などのさまざまな摂動下において，その影響がはっきりと表現型に現れにくい場合であっても，メタボロームデータを活用することで生体内の変化を代謝物の変動，すなわち代謝プロファイルとして詳細に表現することが可能である．そのため，メタボローム解析によってゲノム情報の実行結果や各種摂動の影響を詳細に理解できれば，病気の診断や病態発症メカニズムの解析，医薬品の薬効・毒性評価など，幅広い分野での応用が期待できる．我々は，細胞内の代謝情報を高精度に観測するために，数種のクロマトグラフと 11 台の質量分析計を駆使した高感度かつ定量的なメタボローム分析手法を開発している．さらに，開発した分析手法を用いて疾患と代謝の関連性について基礎から応用までの幅広い研究を展開するとともに，他のオミクスとの統合解析を目指している．

当分野は平成 27 年 3 月に開設され馬場健史が教授として務めている．平成 30 年度は，馬場健史のほか，和泉自泰 (准教授)，相馬悠希 (助教)，原健士 (特任准教授)，学術研究員 5 名，博士課程大学院生 10 名 (うち社会人博士課程学生 6 名)，テクニカルスタッフ 4 名，事務補佐員 2 名の合計 25 名の体制で研究活動を行った．また，戦略的創造研究推進事業 (JST-CREST)，科研費新学術領域研究，革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST)，先端的低炭素化技術開発 (JST-ALCA)，科研費基盤研究 B，科研費若手研究などの補助金による支援を受け研究を実施した．

A．絶対定量メタボローム分析法の開発

メタボロミクスの観測対象となる代謝物は，物理化学的性質の大きく異なる多種多様な低分子化合物の集合であり，個々の化合物は酵素反応によってその存在量と性質が複合的かつ連続的に変化するため，これらの同時一斉分析を実現することは決して容易ではない．また，これまでのメタボローム解析は，主に抽出時に添加する数種類の内部標準物質を指標とした「相対定量」によって実施されてきた．相対定量値によるメタボローム解析によって，サンプル間の代謝プロファイルの違いが明らかとなり，

重要な代謝物や代謝経路の特定に繋がった．しかし，代謝物濃度の定量値が取得できない現状では，メタボローム解析結果を多階層オミクスデータと対応させながら生理学的・生化学的考察を深めることは困難である．さらに，大規模なメタボロームデータを用いて統合解析を実施するためには，異なる時期，異なる施設で取得したデータの定量値を比較できる基盤技術の確立が必要不可欠となる．以上のことから，我々の研究室では，代謝物を包括的かつ定量的に観測していくための方法論の開発を進めている．

ａ．親水性代謝物を対象とした定量メタボローム分析

主幹代謝 (解糖系，ペントースリン酸経路，クエン酸回路，核酸代謝，アミノ酸代謝など) は，生命のエネルギーの生成，細胞の維持ならびに修復プロセスに関わり，また，がんなどの代謝を理解する上でも最も重要な経路である．また，これらの代謝中間体の多くはイオン性高極性物質である．これまで親水性代謝物の測定は，主にキャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS)，イオンペア逆相液体クロマトグラフィー質量分析 (Ion-pair RPLC/MS)，親水性相互作用液体クロマトグラフィー質量分析 (HILIC/MS) によって測定されてきた．しかし，親水性代謝物は極性，電荷特性，分子量といった物性の範囲が幅広いため，包括的かつ実用的な測定には至っておらず，第一選択となる分析法の開発は未だ発展途上の段階である．そこで，我々はイオンクロマトグラフィータンデム質量分析 (IC/MS/MS) あるいは親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析 (HILIC/AEX/MS/MS) による新しい親水性代謝物分析法を提唱し，従来法よりも感度，再現性，網羅性に優れていることを実験的に示した．

また，質量分析計にて代謝物の絶対定量を行うためには，代謝物ごとに安定同位体ラベル化標準品を準備し「安定同位体希釈法」を実施する必要がある．しかし，現状では包括的な代謝物に対して化学合成した安定同位体ラベル化標準品をそれぞれ準備することはコスト・労力的に非現実的である．そのため，絶対定量を実施する際に必要不可欠な「安定同位体ラベル化内部標準群 (SILIS)」を日常的に運用可能なコストで生産・調製するための技術基盤の構築を検討した．具体的には，U-$^{13}C_6$ Glucose を基質として大腸菌を継代培養し，培養条件を最適化することで安価かつ主要な親水性代謝物の ^{13}C ラベル化率 95%以上を担保した SILIS 調製法の開発に成功した．以上の結果から，新規の分析法と大腸菌 SILIS 調製法を組み合わせることで親水性代謝物の絶対定量メタボローム分析が実現可能となった．

ｂ．疎水性代謝物を対象とした定量リピドーム分析

脂質は，生体膜の構成成分，エネルギー貯蔵物質，脂質メディエーター，タンパク質修飾，細胞内や細胞間のシグナル分子として働く重要な分子である．近年の質量分

析および周辺技術の発展によってリピドーム解析技術も進歩し，生体内から多種多様の脂質分子を同時に観測できるようになってきたものの，網羅的かつ定量性に優れたリピドーム解析法は未だ確立できていないのが現状である．そこで，我々は超臨界流体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析 (supercritical fluid chromatography triple-quadrupole mass spectrometer, SFC/QqQMS) と *in silico* 多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) ライブラリーによるワイドターゲット定量リピドーム分析法の開発を行った (原著論文 1).

我々は，質量分析計の最大の弱点である定量性の問題を克服するために次のような方法論を考案した．まず，脂質クラスごとに内部標準物質を設定し，内部標準物質と個々の脂質分子を共溶出させるクロマト分離条件を用いることで，脂質クラス内の個々の脂質分子のマトリクス効果を一斉に標準化する方法論を考案した．具体的には，極性ヘッドグループによる各脂質クラスのクロマト分離を達成できる順相カラムを用いた SFC (normal phase supercritical fluid chromatography, NP-SFC) を選択した．NP-SFC に接続する質量分析には，脂質クラスごとに同時溶出する個々の脂質分子を網羅的かつ高感度分析が可能な三連四重極型質量分析計 (QqQMS) を選択した．各脂質クラス内の構造異性体 (e.g., PC 16:0–20:4 と PC 18:2–18:2) の識別には，脂肪酸側鎖由来の多重反応モニタリング (MRM) トランジションを用いた．一方で，QqQMS による測定法はターゲット分析であるため，事前に測定試料に含まれる脂質分子の情報が必要となる．生体内の脂質を構成する脂肪酸の種類は限られており，ESI-MS/MS でのフラグメンテーションは脂質クラスごとに規則性を有していることから，仮想の MRM トランジションを作成した．そして，各サンプルから等量ずつ混合した Quality control (QC) サンプルのスクリーニング分析を実施し，その結果から測定試料中に存在する脂質分子を選定することで，最終の NP-SFC/MRM メソッドを構築した．以上の方法論にもとづいて NP-SFC/QqQMS 分析条件を検討したところ，エチレン架橋型ハイブリッドシリカ粒子にジエチルアミン (diethylamine, DEA) を修飾したカラムを用いることで，中性脂質から極性脂質までの幅広い脂質クラス 22 種をわずか 20 分で分離分析することに成功した．また，各脂質クラスの代表的な脂質分子を対象として添加回収試験を行ったところ，回収率は 64.9～103.5%であり，当該手法が定量性の高い分析法であることが示された．

さらに，今年度は，構築した本手法を用いて，EPA の投与による血中脂質バランスの改善効果 (原著論文 1)，生活習慣病に対するクルクミンの作用機序と脂質代謝への影響 (原著論文 2)，ショウジョウバエを用いた視覚刺激により誘発される発作 (光感受性てんかん) とスフィンゴ脂質代謝との関連性 (原著論文 4)，家族性高コレステロール血症のモデルウサギ WHHLMI を用いた動脈硬化の進行に対する新規脂質血清マーカーの同定 (原著論文 10) に関する研究を実施した．

Ｂ．高分解能質量分析を基盤とした外因性化学物質に由来する代謝物の探索法の開発

薬物および農薬，環境汚染物質のような外因性化学物質は動物や植物の生体内に取り込まれた後，各種酵素の作用によって代謝され様々な化学物質へと変換される．生体内や環境中で代謝された化学物質の多くは，一般的に代謝される前のものと比較して薬理活性や毒性が低くなると考えられているが，一部の代謝物においては薬理活性や毒性が高くなることが知られている．そのため，安全かつ薬効の高い薬物や農薬をさらに効率よく開発していくためには，外因性化学物質の生体内における代謝経路およびその代謝物の情報を包括的かつ正確に把握することが不可欠である．本研究では，^{13}C および ^{2}H 安定同位体標識体の利用，液体クロマトグラフィー四重極オービトラップ型高分解能質量分析 (LC/HRMS/MS)，データマイニング技術，*in silico* 代謝物予測，代謝物プロファイルの経時的変化を解析することで，外因性化学物質に由来する代謝物を高精度に同定するための新しい方法論を開発した (原著論文 3)．今後，本研究で開発した方法論を応用して，メタボロミクスの課題の一つである未知代謝物の構造推定を展開していく予定である．

Ｃ．１細胞メタボロミクスに向けた要素技術開発

生命の最小単位である細胞は特異的な機能を持つ細胞集団に分類することができるが，近年の研究から同一細胞集団であっても多様性・不均一性を有することが知られている．この多様性が環境適応や疾患発症の過程において極めて重要な役割を担っている．本研究では，一般的な動物細胞 (~20 μm，2 pL) を測定試料として，ナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (nano-LC/MS/MS) を基盤とした代謝物の高感度計測技術および試料調製・試料導入技術を連携・連動させた 1 細胞分子フェノタイプ解析システムの開発に取り組んだ．

1 細胞メタボローム解析に使用する nano-LC カラム担体の選定は，代表的な 45 種の高極性親水性代謝物の保持・分離挙動を指標に実施した．次に，選定した充填粒子を内径 0.1 mm のフューズドシリカキャピラリーに湿式充填することで nano-LC カラムを自作した．開発した nano-LC/MS/MS 分析系は，内径 2.1 mm のセミミクロカラムを用いた汎用 LC/MS/MS 分析系と比べて，約 100 倍の感度向上を達成した．続いて，試料調製を微小空間内で実施するために，倒立型蛍光顕微鏡に低流量で溶液を吐出・吸引可能なナノシリンジポンプを搭載したナノピペットデバイスを試作した．本装置を用いて生細胞をそのままキャピラリーに導入し，細胞の溶解，分析カラムへの導入までを完全インラインで実施することで，HeLa 1 細胞から多くのアミノ酸の検出に成功した．さらに，超高感度分析が期待できるハイブリッド型多孔質シリカ層を有する内径

5 μm のオープンチュブラーカラムの調製法を構築し，その性能評価を行った (原著論文 5)．今後は，オープンチュブラーカラムなどを活用した分析系のさらなる高感度化と微量サンプル調製法の高速化・自動化技術を開発することで，シングルセル分子フェノタイプ解析法の高度化を図る予定である．

D．共同研究

今年度は，開発したメタボロミクス解析プラットフォームを用いて，生体防御医学研究所内や国内外の大学・研究所との共同研究を精力的に行った．また，製薬会社や食品会社, 化学会社, 装置メーカーなどの民間企業との共同研究についても実施した．

業績目録

原著論文

1. Takeda, H., Izumi, Y., Takahashi, M., Paxton, T., Tamura, S., Koike, T., Yu, Y., Kato, N., Nagase, K., Shiomi, M., Bamba, T. 2018.
   Widely-targeted quantitative lipidomics method by supercritical fluid chromatography triple quadrupole mass spectrometry.
   J. Lipid Res., 59(7), 1283-1293.
2. Kobori, M., Takahashi, Y., Takeda, H., Takahashi, M., Izumi, Y., Akimoto, Y., Sakurai, M., Oike, H., Nakagawa, T., Itoh, M., Bamba, T., Kimura, T. 2018.
   Dietary Intake of Curcumin Improves eIF2 Signaling and Reduces Lipid Levels in the White Adipose Tissue of Obese Mice.
   Sci. Rep., 8(1):9081.
3. Takahashi, M., Izumi, Y., Iwahashi, F., Nakayama, Y., Iwakoshi, M., Nakao, M., Yamato, S., Fukusaki, E., Bamba, T. 2018.
   Highly Accurate Detection and Identification Methodology of Xenobiotic Metabolites Using Stable Isotope Labeling, Data Mining Techniques, and Time-Dependent Profiling Based on LC/HRMS/MS.
   Anal. Chem., 90(15), 9068-9076.
4. Kunduri G, Turner-Evans D, Konya Y, Izumi Y, Nagashima K, Lockett S, Holthuis J, Bamba T, Acharya U, Acharya J K. 2018.
   A defective cortex glia plasma membrane structure underlies light-induced epilepsy in cpes mutants.
   Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 115(38), E8919-E8928.

5. Hara, T., Izumi, Y., Nakao, M., Hata, K., Baron, G, V., Bamba, T., Desmet, G. 2018.
Silica-based hybrid porous layers to enhance the retention and efficiency of open tubular capillary columns with a 5 μm inner diameter.
J. Chromatogra. A., 1580, 63-71.
6. Harada, R., Yuzuki, M., Ito, K., Shiga, K., Bamba, T., Fukusaki, E. 2018.
Microbe participation in aroma production during soy sauce fermentation.
J. Biosci. Bioeng., 125, 688-694.
7. Nagao, H., Nishizawa, H., Tanaka, Y., Fukata, T., Mizushima, T., Furuno, M., Bamba, T., Tsushima, Y., Fujishima, Y., Kita, S., Funahashi, T., Maeda, N., Mori, M., Fukusaki, E., Shimomura, I. 2018.
Hypoxanthine Secretion from Human Adipose Tissue and its Increase in Hypoxia.
Obesity, 26, 1168-1178.
8. Putri, S. P., Nakayama, Y., Shen, C., Noguchi, S., Nitta, K., Bamba, T., Pontrelli, S., Liao, J., Fukusaki, E. 2018.
Identifying metabolic elements that contribute to productivity of 1-propanol bioproduction using metabolomic analysis.
Metabolomics, 14, 96.
9. Miyagawa, H., Bamba, T. 2018.
Comparison of sequential derivatization with concurrent methods for GC/MS-based metabolomics.
J. Biosci. Bioeng., 127, 160-168.
10. Shiomi,M., Takeda, H., Irino, Y., Kimura, N., Yamada, S., Kuniyoshi, N., Kikumori, A., Ying, Y., Koike, T., Yoshida, M., Izumi, Y., Shinohara, M., Bamba, T., Ishida,T. 2019.
Identification of novel serum markers for the progression of coronary atherosclerosis in WHHLMI rabbits, an animal model of familial hypercholesterolemia.
Atherosclerosis, 284, 18-23.
11. Sakai, M., Hayakawa, Y., Funada, Y., Ando, T., Fukusaki, E., Bamba, T. 2019.
Development of a practical online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography/mass spectrometry system with an integrated split-flow method.
J. Chromatogra. A., in press.
12. Fukuda, T., Takamatsu, K., Bamba, T., Fukusaki, E. 2019.
Gas chromatography-mass spectrometry metabolomics-based prediction of potato tuber sprouting during long-term storage.
J. Biosci. Bioeng., in press.

学会発表（口頭発表のみ）

1. 馬場健史 (2018, 5/15 - 5/18).
   トランスオミクスに資する次世代メタボローム解析技術の開発.
   日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 合同大会，大阪.
2. 高橋政友，和泉自泰， 岩橋福松， 中山泰宗， 岩越光彦，中尾素直， 大和誠司， 福崎英一郎， 馬場健史 (2018, 5/15 - 5/18).
   高分解能質量分析を基盤とした外因性化学物質に由来する代謝物の探索手法の開発.
   日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 合同大会，大阪.
3. 馬場健史，塩田晃久 (2018, 5/15 - 5/18).
   メタボローム解析における自動サンプル前処理法開発の現状.
   日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 合同大会，大阪.
4. 馬場健史 (2018, 7/19).
   超臨界流体抽出分離技術が拓く次世代食品分析.
   食品成分抽出・分析セミナーin 東北大学 2018，宮城.
5. 竹田浩章，和泉自泰，Thanai Paxton，田村翔平，小池智也，Ying Yu，加藤紀子，長瀬勝敏，塩見雅志，馬場健史 (2018, 7/20).
   第 5 回 日本ウサギバイオサイエンス研究会学術集会・WHHLMI ウサギ研究発表会，兵庫.
6. 馬場健史 (2018, 7/25).
   メタボロミクスにおける超臨界流体クロマトグラフィーの可能性.
   第 13 回 アジレントメタボロミクスセミナー2018，東京.
7. 和泉自泰 (2018, 7/23, 8/3).
   高分解能質量分析と Compound Discoverer を用いた新たな代謝物解析法の提案.
   Thermo Fisher SCIENTIFIC 質量分析フォーラム 2018，大阪，東京.
8. 馬場健史 (2018, 8/6).
   先端分析機器を用いたメタボロミクス解析の展望メタボローム解析の要素技術と効果的な利用法.
   食品・環境分析セミナー，大阪.
9. Takeshi Bamba (2018, 8/27).
   Development of metabolomics methodologies and their applications.
   Workshop on Nature Farming and Organic Agriculture, China.
10. 馬場健史 (2018, 8/31).
    トランスオミクスに向けた定量メタボローム分析技術の開発.
    第 16 回 レドックス・ライフイノベーションシンポジウム，福岡.
11. 馬場健史，和泉自泰 (2018, 9/5 - 9/7).
    細胞培養における代謝解析ツールとしてのメタボロミクス.

第 70 回 日本生物工学会大会, 大阪.

12. 相馬悠希, 篠原玉樹, 藤原由梨, 角田一真, 秦康祐, 和泉自泰, 花井泰三, 馬場健史 (2018, 9/5 - 9/7).
代謝動態制御を介して菌体集団規模を制御する Quorum Sensing 型遺伝子回路の構築とメタボローム解析による機能評価.
第 70 回 日本生物工学会大会, 大阪.

13. 馬場健史 (2018, 9/14).
超臨界流体抽出分離技術が拓く次世代食品分析.
島津最新食品分析セミナー ～次世代食品分析のソリューション提案から異物解析まで～, 長野.

14. 馬場健史 (2018, 9/21 - 9/22).
メタボリックプロファイリングによる化学物質の内分泌かく乱作用 *in vitro* 評価系の開発.
日本農芸化学会西日本支部大会, 熊本.

15. Takeshi Hara, Yoshihiro Izumi, Motonao Nakao, Gino. V. Baron, Takeshi Bamba, Gert Desmet (2018, 9/23 - 9/28).
Investigation of Column performance of Hybrid Silica-based Porous Layered Open Tube Capillary Columns Produced via Sol-Gel Processing.
32th International Symposium on Chromatography, France.

16. Takeshi Bamba (2018, 10/17).
Development of new type online SFE-unified chromatography/MS system.
Shimadzu SFC User Meeting, France.

17. Takeshi Bamba (2018, 10/17 - 10/19).
Potential of supercritical fluid extraction and separation technologies in metabolic profiling.
SFC2018 12th International Conference on Packed-Column SFC, France.

18. 和泉自泰, 原健士, 中谷航太, 秦康祐, 山村昌平, 向紀雄, 松本雅記, 馬場健史 (2018, 10/17 - 10/19).
シングルセル分子フェノタイプ解析に向けた基盤技術開発.
第 12 回 メタボロームシンポジウム, 山形.

19. 和泉自泰 (2018, 10/17 - 10/19).
次世代型 PAL RTC によるメタボロミクス自動前処理システムの開発.
第 12 回 メタボロームシンポジウム, 山形.

20. 和泉自泰 (2018, 10/23, 10/25).
SFC/MS/MS によるワイドターゲット定量リピドミクス分析.
Waters MS フォーラム 2018, 大阪, 東京.

21. 原健士, 和泉自泰, 中尾素直, 秦康祐, Gino. V. Baron, 馬場健史, Gert Desmet (2018, 11/7 -

11/9).
ハイブリッド型多孔質シリカ層を有する内径 5 μm のオープンチュブラーカラムの性能評価.
第 29 回 クロマトグラフィー科学会議, 愛知.

22. 和泉自泰 (2018, 11/15 - 11/16).
技術セミナー：メタボローム解析.
新学術領域研究 代謝統合オミクス 第 1 回若手合宿, 静岡.

23. 馬場健史 (2018, 12/3).
SFC-QqQMS を用いた新規リピドーム解析システム.
第 4 回 SFC 懇話会, 東京.

24. 和泉自泰 (2018, 12/7).
定量における課題について.
メタボロミクスワークショップ, 福岡.

25. 馬場健史 (2019, 1/11).
代謝プロファイリングにおける超臨界流体クロマトグラフィーの可能性.
ダイセルカラム分析スキル向上セミナー, 東京.

26. Takeshi Bamba (2019, 1/22).
Development of next generation metabolome analysis technologies.
OIST seminar, Okinawa.

27. 馬場健史 (2019, 2/12 - 2/14).
メタボローム分析の最新動向と今後の課題.
第 10 回 JBF シンポジウム, 神奈川.

28. 馬場健史 (2019, 2/15).
トランスオミクスに向けた次世代メタボローム分析技術の開発.
第 143 回 臨床化学セミナー, 福岡.

29. 和泉自泰 (2019, 2/21).
メタボローム分析におけるコロナ検出器の活用法.
Thermo Fisher SCIENTIFIC コロナフォーラム, 東京.

30. 馬場健史 (2019, 3/11).
メタボロミクス有効活用のためには.
第 24 回創薬育薬産学官連携セミナー, 福岡.

統合オミクス分野
Division of Integrated Omics

教　授：久保田　浩行
Professor：Hiroyuki Kubota, Ph. D.

統合オミクス分野ではゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームなどのいわゆる「オームデータ」を統合するための手法開発を行うと同時に，個体の応答とそのメカニズムをまるごと理解することを目的としている．解析手法としてはデータベースなどを用いた情報学的手法と統計的手法の開発や，実験手法についてもトランスオミクス測定のための検討を行っている．現在，多階層にまたがるネットワークによって制御されている個体の肥満やインスリン作用に注目して研究を行っている．また，多階層にまたがるネットワークの動的特性を解析するために数理モデルを用いた分子のダイナミクスの解析や，情報理論を用いた解析も行っている．

平成 30 年 4 月に加藤寛彬さんが，平成 30 年 9 月に小島芙沙子さんが参加した．

Ａ．トランスオミクス解析

生命現象は DNA・RNA・タンパク質・代謝物などの各階層にまたがる膨大な数の分子の相互作用，すなわちネットワークによって制御されている．つまり，生命現象全体を俯瞰または理解するには多階層にまたがる複雑なネットワークを同定する必要がある．従来の生物学では，研究者は自分の興味ある数個の分子に注目して研究を行ってきた．これまでの研究により多くの生命現象の理解が進んできたが，これらの研究結果から生命現象全体を俯瞰しようとしても実験条件が異なるために難しい．その一方で，近年の網羅的測定技術の進歩によりエピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームなどの各階層における網羅的データ，いわゆる「オームデータ」が高精度かつ高スループットに取得できるようになってきた．これらの技術により，各階層における全体像を俯瞰することができるようになってきたが，単階層のオームデータから多階層にまたがるネットワークを明らかにすることはできない．近年，われわれのグループを含めて複数の階層を統合することで生命現象を俯瞰しようとする試み，つまりトランスオミクス解析が行われはじめてきた．現在われわれは，トランスオミクス解析を行うための技術開発や，トランスオミクス解析を理解する上で重要な考え方を提唱している．

ａ．インスリン作用の *in vivo* トランスオミクス解析

現在われわれは，個体（マウス）を用いたインスリン作用のトランスオミクス解析

を行っている．われわれは *in vivo* トランスオミクス解析を行うために，生体組織を低温で破砕・均一化し分配することで，同一サンプルから異なるオミクス測定を行える手法を開発した．さらにわれわれはマウスにインスリン刺激を行い，トランスクリプトーム・発現プロテオーム・リン酸化プロテオーム・メタボロームの４階層の網羅的な時系列データを取得することに成功している．現在，微分方程式モデルを用いてこれらのデータから多階層オミクスデータを繋ぐ手法の開発を行っている．

ｂ．肥満進行のトランスオミクス解析

肥満は糖尿病やガンの危険因子であり，健康志向の高まりにも関わらず近年，世界的に増加傾向にある．われわれは肝臓における肥満進行の応答を明らかにするため，エピゲノム・トランスクリプトーム・発現プロテオーム・リン酸化プロテオーム・メタボロームの 5 階層のデータを取得し，その全体像を明らかにすることを目指している．このため，上記手法を用いて新たに同じサンプルからエピゲノムデータ（ヒストン修飾）のデータを取得することにも成功している．

ｃ．トランスオミクスデータの解析手法の開発

トランスオミクス解析の問題点の一つが解析手法である．トランスオミクスデータの解析では，目的や対象とする系に応じて適切な手法を使い分ける必要がある．例えば，重要な役割を果たす分子の目星がついていて分子のネットワーク構造の事前知識が豊富で，系の動的挙動に興味がある場合は微分方程式によるモデルの記述が適している．現在我々は遺伝子発現とタンパク質発現を微分方程式モデルで記載するためのプロトコルを開発している．これは今後の大規模データの統合の指針となると期待される（iScience, 2018, Genes Cells, 2018, Trends Biotechnol., 2016, Cell Rep, 2014）．

一方で，系に対する事前知識が乏しく，興味ある現象に関与する分子が不明な場合は，統計的手法を用いてデータから重要な分子やネットワーク構造などを推定する必要がある．ネットワーク構造の推定では，スパースモデリング，および，エントロピーを用いた解析を行っている（FRUCT, 2017）．特に，ネットワーク構造の 2 郡間比較に重点をおき，既存手法の適用に加えて新たな解析手法の開発も進めている．2 郡間比較では，例えば，健常郡と疾患郡のネットワーク構造の差異を明らかにすることで，生命システムの理解と疾患の理解に繋がることが期待される．

Ｂ．数理モデルを用いた動的特性の解析

われわれは数理モデルを用いて生命現象を表現し，その動的特性やメカニズムを明らかにすることで生命現象を様々な角度から理解しようと試みている．微分方程式モデルは数理モデルの中でも動的特性やメカニズムを理解するのに良く用いられている．

応用においても有用で，任意に入出力を制御できる実験系においては，微分方程式モデルを用いることで出力をある程度任意に制御することができる．

インスリンは血糖値を減少させることのできる唯一のホルモンである．血中インスリンは複数の時間パターンからなることが知られており，これらのパターンが生体内のインスリン応答に重要であることが報告されている．例えば，15 分程度の周期的分泌を模した刺激パターンは一定刺激よりも血糖値の減少の強い効果が報告されている．また，これらの分泌パターンは糖尿病と深く関係があることが知られているが，これらのメカニズムも不明のままである．われわれは血中インスリンの時間パターンの意義を明らかにするため，培養細胞を用いた研究を行ってきた．これまでにわれわれは，インスリンの時間パターン依存的にインスリンシグナル伝達経路分子や代謝分子，そして遺伝子発現を選択的に制御できることを明らかにしてきた（Mol. Cell, 2012, Mol. Syst. Biol., 2013, Sci. Signal., 2016）．

さらにわれわれは本概念を生体における一般的なものとすべく，ラットを用いて検討を行った（Cell Syst. 2018）．実際には①ソマトスタチンを経静脈から一定量投与し，内在性のインスリン分泌を抑制した状態で，②同様に経静脈からグルコースを添加することで血糖値を一定にし，③ラットの門脈から任意のインスリンパターンを投与した．得られた時系列サンプルから，インスリン－AKT 経路分子の挙動（pIR, pAKT, pGSK3β, pFox01, pS6K, *G6Pase*）を測定した．さらに，これらの実験データを再現する微分方程式モデルを過去の知見を基に作成した．実験データと微分方程式モデルを用いた解析により，血中インスリンパターンの情報はインスリンレセプター（IR）を介して AKT まであまり減弱することなく伝達されることが明らかになった．その後，伝達された情報はネットワーク構造やパラメータの違いにより選択的に下流分子へ伝達されていた．これらの結果は，われわれが提唱してきた概念が実際の生体内においても存在していることを示している．本概念の生体内における実証は他のホルモンにも適用でき，今後のホルモン研究に大きな影響を与えることが期待される．

C．相互作用オームデータを用いた解析

分子間の相互作用の網羅的な理解は生物学において重要な知見を与えるが，網羅的な解析を行う場合には擬陽性が大きな問題となる．われわれは愛媛大学プロテオサイエンスセンター澤崎研究室との共同研究において，任意の分子に相互作用する可能性のある分子を網羅的な相互作用の実験データから推定する手法の開発を行った．本手法では公開されているデータベースから得られた様々な細胞種の遺伝子発現パターンのデータを基に，統計的手法を用いて相互作用のオームデータから実際に相互作用していると考えられる分子を推定した．本手法には一般性があり，他の分子においても同様に適用できると期待される．

業績目録

原著論文

1. Kawata K., Yugi K., Hatano A., Kokaji T., Tomizawa Y., Fujii M., Uda S., Kubota H., Matsumoto M., Nakayama K. I., and Kuroda S. 2019.
   Reconstruction of global regulatory network from signaling to cellular functions using phosphoproteomic data.
   Genes Cells., 24: 82-93.
2. Kawata K., Hatano A., Yugi K., Kubota H., Sano T., Fujii M., Tomizawa Y., Kokaji T., Tanaka K. Y., Uda S., Suzuki Y., Matsumoto M., Nakayama K. I., Saitoh K., Kato K., Ueno A., Ohishi M., Hirayama A., Soga T., and Kuroda S. 2018.
   Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks.
   iScience, 7: 212-229.
3. Kubota H., Uda S., Matsuzaki F., Yamauchi Y., and Kuroda S. 2018.
   In vivo decoding mechanisms of the temporal patterns of blood insulin by the insulin-AKT pathway in the liver.
   Cell Syst., 7: 118-128.
4. Maruyama O. and Matsuzaki F. 2018.
   DegSampler: Collapsed Gibbs Sampler for Detecting E3 Binding Sites.
   Proceedings 2018 IEEE 18th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), 1-9.
5. Sakai K., Matsuzaki F., Wise L., Sakai Y., Jindou S., Ichinose H., Takaya N., Kato M., Wariishi H. and Shimizu M. 2018.
   Biochemical Characterization of CYP505D6, a Self-Sufficient Cytochrome P450 from the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*.
   Appl. Environ. Microb., 84, e01091-18.

総説

1. 久保田浩行，黒田真也.　2018.
   血中インスリン濃度パターンによる肝臓シグナル分子の選択的制御
   実験医学，36(18): 3116-3119.
2. 久保田浩行.　2018.
   生物をシステムとして理解する - 細胞とラジオは同じ!? -
   共立スマートセレクション，27 巻.

学会発表（口頭発表のみ）

1. Hiroyuki Kubota (2019, 2/1 - 2/2).　招待講演
   In vivo decoding mechanisms of the temporal patterns of blood insulin by the insulin-AKT pathway in the liver.
   1st international symposium on interdisciplinary approaches to integrative understanding of biological signaling networks, Tokyo.
2. 久保田　浩行 (2018, 11/23).　招待講演
   トランスオミクス解析を用いた生体応答のシステム的理解
   科学技術未来戦略ワークショップ，東京.
3. 久保田　浩行 (2018, 8/31 - 9/2).　招待講演
   単純なネットワーク構造と入力刺激パターンが生み出す生命応答の制御
   数理シグナル第３回若手ワークショップ，大津.
4. 久保田　浩行 (2018, 4/28 - 4/29).　招待講演
   トランスオミクス解析を用いたインスリン作用の理解
   第 22 回日本心血管内分泌代謝学会，宮崎.
5. Maruyama O. and Matsuzaki F. (2018, 10/29).
   DegSampler: Collapsed Gibbs Sampler for Detecting E3 Binding Sites.
   2018 IEEE 18th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), Taiwan.
6. 丸山　修，松崎　芙美子 (2019, 3/9 - 3/10).
   E3 結合部位予測のための崩壊型ギブス・サンプラーDegSampler
   第６８回 人工知能学会 分子生物情報研究会（SIG-MBI），能美.