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も進めている．さらに，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参画している．

令和３年３月に，大学院生の森川拓弥および下條智史がシステム生命科学府博士後期課程を単位取得退学した．同じく令和３年３月に，大学院生の範駱鳴が理学修士号を取得し，学部生の比留木成美が理学部生物学科を卒業した．

Ａ．神経疾患の分子基盤の解明

ａ．神家族性痙性対麻痺のモデルである *Ddhd1* ノックアウトマウスの作製と解析

2016 年に我々は，痙性対麻痺の患者から見出した *DDHD1* 遺伝子内のホモ接合の新規４塩基欠失を責任遺伝子変異として報告し，この患者を SPG28 と分子診断した（Miura et al. 2016）．*DDHD1* がコードする phospholipase A1（PLA1）は，phosphatidylinositpl（PI）を lysophosphatidylinositol（LPI）に代謝する酵素である．SPG28 の発症メカニズムを調べるため，CRISPR/Cas9 を用いて *Ddhd1* ノックアウトマウスを作成した．*Ddhd1* 遺伝子に挿入欠失変異を導入できた４個体から，SPG28 患者で見られた４塩基欠失による翻訳異常終結とほぼ同じ位置に停止コドンを作り出す 5 塩基欠失を持つ個体を戻し交配し，*Ddhd1* ノックアウト（KO）マウス系統として確立した．得られた *Ddhd1*KO マウスでは，PLA1 の発現が消失していることをウェスタンブロッティングで確認した．SPG の表現型を再現する手法として確率されている Foot-Base-Angle（FBA）の計測を行ったところ，生後 24 ヶ月の KO マウスで有意な FBA の減少が見られ，SPG の表現型が再現された．また *Ddhd1*KO マウスの大脳を単離しリピドーム解析をおこなったところ，PLA1 の代謝産物のうち LPI 20:4（sn-2）が KO マウスで特異的に減少していることを見出した．さらに KO マウスの大脳の RNA-Seq を行ったところ，有意な発現変動を示す遺伝子を 22 個同定し，これらにはシナプス伝達や細胞間コミュニケーションに関わる遺伝子が有意に濃縮していることを見出した．LPI の下流シグナルは，軸索伸長や神経回路の形成に関わることが知られているため，今回の結果から LPI 20:4（sn-2）減少に伴うシグナルの減衰が神経回路の形成異常を起こし

ていることが SPG28 の発症機序に強く関わっていることが示された（Morikawa et al. 2021）.

ｂ．発作性運動誘発性ジスキネジアの新規責任遺伝子同定

発作性運動誘発性ジスキネシア（Paroxysmal kinesigenic dyskinesia（PKD））は運動開始時に起こる不随意運動に特徴づけられ，30 歳以上で自然治癒するとされる本体不明の疾患で，罹患率・有病率ともに不明である．久留米大学との共同研究により，2 世代 4 人からなる常染色体優性遺伝を示す PKD 家系を見出した．発端者は，駆けっこのスタートや電話の呼び出し音に反応して受話器を取るなどの動作開始時に短い不随意運動が起こることを 14 歳の頃から経験していた．発端者の母親も同じく高校生の頃に駆けっこのスタートで不随意運動が起きていた．しかし発端者（22 歳時）および母親（46 歳時）に行った神経学的な検査では，顕著な異常は見いだされなかった．本 PKD 家系の責任遺伝子の同定を目指して，2 名の発症者を含む家系全員 4 名のエクソームシーケンスを行い，発症者のみに共通して見られる一塩基変異（SNV）を 6,592 個同定した．このうち，機能的影響が大きいと予測されるアミノ酸置換を起こし，かつ一般集団で極めて頻度が低い SNV を 2 個同定した（遺伝子名は *FAT2* と *NBEA*）．さらに，月齢の異なるラットの大脳サンプルを用いて，これら 2 遺伝子の realtimePCR を行ったところ，*FAT2* はほぼ全ての月齢でほぼ発現していなかったのに対して，*NBEA* は PKD と同様の成長段階に応じた発現レベルの変動を示すことを確認した．以上の結果から，本 PKD 家系の責任遺伝子が *NBEA* である可能性が極めて高いと結論した（Miura et al. in press）.

ｃ．神経因性膀胱と発作性乾性咳嗽を特徴とする新規遺伝性ニューロパチーの解析

久留米大学において見出された，近位筋優位の筋力低下をきたし，常染色体優性遺伝形式をとる運動感覚ニューロパチー家系の解析を行った．患者 9 名を含む 3 世代計 19 名からなる本家系は，神経因性膀胱と発作性乾性咳嗽を特徴とし，新規なニューロパチーであると考えられた．Illumina Infinium SNP ゲノタイピングアレイによる連鎖解析の結果，1q13．3-q23 に最も強い連鎖を見出した（LOD = 2.71）．本領域には常染色体優性の運動感覚ニューロパチーの責任遺伝子として知られている *MPZ* が存在したため，サンガーシークエンスによる全エクソンの変異検索及びリアルタイム PCR によるコピー数異常の検討を行ったが，異常は見られなかった．そこで，5 人の患者と 1 人の非発症血縁者をエクソームシークエンシングにより解析した．その結果，5 人の患者に特異的に共有された SNV を 4,294 個見出した．このうちの 160 個は，これまでに報告のない新規な非同義置換で，さらにそのうちの 16 個を，連鎖領域にヘテロ接合で存在する疾患責任候補 SNV として同定した．さらに，これらの SNV について，家系内の共分離の確認及び，日本人健常者 520 人のスクリーニングによる低頻度正常 SNP の除外を，個別のサンガーシークエンシングによ

り進めたところ，*IQGAP3* を候補責任遺伝子として同定した．当該変異は *IQGAP3* のイントロン 27 のスプライスコンセンサス配列に位置しており，スプライス異常を来すことが期待された．また，患者の全ゲノムシークエンスも行い，連鎖領域に他に共分離する SNV が存在しないことも確認した．さらに，患者および非発症者の腓腹神経の組織染色を行い，患者において IQGAP3 タンパク質の特異的な発現上昇を確認した（Miura et al. 2020）．

B．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．ロングリードシークエンスによるハブゲノムアセンブリーの高精度化

2018 年に論文発表した奄美ハブゲノムドラフト HabAm1（Shibata et al. 2018）のさらなる高精度化を目指して，PacBio シークエンサー（Sequel）によるロングリードショットガンデータを 58 Gb（シークエンス深度 32x に相当）を取得した．ロングリードのみによる新規アセンブリは，Canu，miniasm，wtdbg2，Flye の 4 種のソフトウェアを試した．その結果いずれのソフトウェアにおいても，アセンブリ後の配列数はショートリードのみの HabAm1 に比べて 10 倍以上のアセンブリの向上が見られた．このうち，最も大きな N50 長を達成しており，アセンブリ完全性の評価ツールである BUSCO での成績も非常によかった Flye によるアセンブリを採用して，次のポリッシング（ランダムエラーの修正）に進んだ．PacBio シークエンサの難点である高いランダムエラー率は，同一分子由来の複数リードを比較することで修正を行うことができる．専用修正ソフトウェア Racon で複数回処理して，成績を比較した．当初は Racon をかけるたびにアセンブリが向上していったが，7-8 ラウ

表1: ロングリードによる新規アセンブリの成績

	ロングリードによるアセンブリ（HabAm1）	ロングリードによるアセンブリのみ	ロングリードによる修正後	ショートリードによるさらなる修正後	ハプロタイプ統合後
アセンブリ	なし	Flye	Flye	Flye	Flye
ポリッシング	なし	なし	Racon x8	Racon x8	Racon x8
ロングリードによる修正	なし	なし	なし	Pilon	Pilon
ショートリードによる修正	なし	なし	なし	なし	Purge_haplotigs
アセンブリ後の配列数	84,502	1,964	1,585	1,585	1,104
全長	1,413,202,175	1,454,032,011	1,460,350,907	1,456,535,046	1,427,436,437
最長配列の長さ（bp）	3,826,345	40,390,879	40,565,452	40,480,394	40,480,394
N50長（bp）	467,050	7,556,274	7,581,985	7,569,425	7,894,123
1 kb以上の配列数	15,315 (18.1%)	1,892 (96.3%)	1,582 (99.8%)	1,582 (99.8%)	1,101 (99.7%)
10 kb以上の配列数	6,784 (8.0%)	1,302 (66.3%)	1,288 (81.3%)	1,288 (81.3%)	976 (88.4%)
100 kb以上の配列数	3,080 (3.6%)	827 (42.1%)	833 (52.6%)	830 (52.4%)	755 (68.4%)
1 Mb以上の配列数	206 (0.2%)	233 (11.9%)	236 (14.9%)	235 (14.8%)	235 (21.3%)
10 Mb以上の配列数	0 (0.0%)	37 (1.9%)	37 (2.3%)	37 (2.3%)	37 (3.4%)
1 Mb以上の配列の全長（bp）	206 (0.2%)	1,217,806,281 (83.8%)	1,226,886,186 (84.0%)	1,222,854,643 (84.0%)	1,222,854,643 (85.7%)
10 Mb以上の配列の全長（bp）	0 (0.0%)	618,175,458 (42.5%)	620,968,658 (42.5%)	619,575,307 (42.5%)	619,575,307 (43.4%)
BUSCOによるコア遺伝子の検出 (n = 233)					
完全に検出された遺伝子数	216 (92.70%)	222 (95.28%)	218 (93.56%)	221 (94.85%)	221 (94.85%)
一部でも検出された遺伝子数	226 (97.00%)	229 (98.28%)	229 (98.28%)	228 (97.85%)	228 (97.85%)

ンド以後は徐々にアセンブリが低下しはじめたため，8 ラウンド後の結果を一次修正後のアセンブリとして採用した．さらに，以前に取得していた 10 億本以上のショートリードデータ（計 121 Gbp）を利用して，ランダムエラー修正ソフトウェア Pilon でさらなるエラー修正を行なった．最後に，父方と母方のハプロタイプの統合を行うソフトウェア purge_haplotigs で処理した．以上の結果を表 1 に示す．最終的に，N50 長は 7.89 Mb を達成し，最終的に 1,108 本の配列からなるロングリードアセンブリとして完成させた．

業績目録

原著論文

1. Zeze K., Hirano A., Torisu T., Esaki M., Shibata H., Moriyama T., Umeno J., Fujioka S., Okamoto Y., Fuyuno Y., Matsuno Y., Kitazono T. (2020, Apr)
   Mucosal dysbiosis in patients with gastrointestinal follicular lymphoma.
   Hermatol Oncol. 38(2):181-188.
2. Gakuhari T., Nakagome S., Rasmussen S., Allentoft M., Sato T., Korneliussen T., Chuinneagáin B.N., Matsumae H., Koganebuchi K., Schmidt R., Mizushima S., Kondo O., Shigehara N., Yoneda M., Kimura R., Ishida H., Masuyama T., Yamada Y., Tajima A., Shibata H., Toyoda A., Tsurumoto T., Wakebe T., Shitara H., Hanihara T., Willerslev E., Sikora M., Oota H. (2020, Aug)
   Ancient Jomon genome sequence analysis sheds light on migration patterns of early East Asian populations.
   Commun Biol. 3(1):437.
3. Miura S., Kosaka K., Shimojo T., Matsuura E., Noda K., Fujioka R., Mori S., Umehara F., Iwaki T., Yamamoto K., Saitsu H., Shibata H. (2020, Sep)
   Intronic variant in *IQGAP3* associated with hereditary neuropathy with proximal lower dominancy, urinary disturbance, and paroxysmal dry cough.
   J Hum Genet. 65(9):717-725.
4. Morikawa T., Ohishi H., Kosaka K., Shimojo T., Nagano A., Taniguchi I., Fujioka R., Moriyama K., Unoki M., Takahashi M., Nakao M., Izumi Y., Bamba T., Sasaki H., Miura S., Shibata H. (2021, Feb)
   Ddhd1 knockout mouse as a model for familial spastic paraplegia.
   Biosci Rep. 41(2):BSR20204171.
5. Miura S., Shimojo T., Morikawa T., Kamada T., Uchiyama Y., Kurata S., Fujioka R., Shibata H. (2021, Mar)
   Familial paroxysmal kinesigenic dyskinesia with a novel missense variant (Arg2866Trp) in *NBEA*.
   J Hum Genet. *in press.*
6. Shibata E., Morita K., Kayamori K., Tange S., Shibata H., Harazono Y., Michi Y., Ikeda T., Harada H.,

Imoto I., Yoda T. (2021, Mar)

Detection of novel fusion genes by next generation sequencing-based targeted RNA-sequencing analysis in adenoid cystic carcinoma of head and neck.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. *in press.*

7. Morikawa T., Miura S., Tateishi T., Noda K., Shibata H. (2021, Mar)

   A Japanese hereditary spastic paraplegia family with a rare nonsynonymous variant in the *SPAST* gene.

   Hum Genome Var. *in press.*

総説

1. Ogawa T., Shibata S. (2020, Apr)

   Venomics study of *Protobothrops flavoviridis* snake: Habu snake venomics: How venom proteins have evolved?

   Pinar Erkekoglu (eds) **Medical Toxicology** (ISBN 978-1-83880-278-3).

学会発表

1. Miura S., Shimojo T., Fujioka R., Uchiyama Y., Shibata H. (2020, 6/6-9)

   A nonsense variant in the *ARSD* gene associated with young-onset Parkinson's disease.

   The European Human Genetics Conference 2020, Virtual Conference.

2. 森川 拓弥，三浦 史郎，大石 裕晃，小坂 健悟，下條 智史，永野 明宏，谷口 愛樹，藤岡 竜太，森山 耕成，鵜木 元香，高橋 政友，中尾 素直，和泉 自泰，馬場 健史，佐々木 裕之，柴田 弘紀. (2020, 9/16-18)

   痙性対麻痺 28 型の発症メカニズムの解明とバイオマーカー探索.

   日本遺伝学会第 92 回大会，プログラム・予稿集の出版のみ.

3. Fan L.M., Nagano A., Kosaka K., Shimojo T., Morikawa T., Fujioka R., Miura S., Shibata H. (2020, 9/16-18)

   Functional analysis of a *TDRKH* variant associated with autosomal dominant motor neuropathy.

   日本遺伝学会第 92 回大会，プログラム・予稿集の出版のみ.

4. Morikawa T., Ohishi H., Kosaka K., Shimojo T., Nagano A., Taniguchi I., Fujioka R., Moriyama K., Unoki M., Takahashi M., Nakao M., Izumi Y., Bamba T., Sasaki H., Miura S., Shibata H. (2020, 10/27-31)

   Ddhd1 knockout mouse as a model for familial spastic paraplegia.

   70th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Virtual Meeting.

5. 森川 拓弥，三浦 史郎，大石 裕晃，小坂 健悟，下條 智史，永野 明宏，谷口 愛樹，藤岡 竜太，森山 耕成，鵜木 元香，高橋 政友，中尾 素直，和泉 自泰，馬場 健史，佐々木 裕之，柴田 弘紀. (2020, 12/2-4).

   家族性痙性対麻痺のモデルである *Ddhd1* ノックアウトマウスの解析.

第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン開催.

6. Fan L.M., Kosaka K., Nagano A., Shimojo T., Morikawa T., Fujioka R., Miura S., Shibata H. (2020, 12/2-4)

Functional analysis of *IQGAP3* as a causative gene of autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy.

第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン開催.

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．令和２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，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, 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）の国際科学運営委員としてエピゲノム解読を推進している．また，学内外の研究室との共同研究を積極的に行い，モデル生物であるマウスのエピゲノム解析を支援している．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，Ｂ，Ｃ，Ｄを参照．

業績目録

原著論文

1. Richard Albert J., Au Yeung W.K., Toriyama K., Kobayashi H., Hirasawa R., Brind'Amour J., Bogutz A., Sasaki H. & Lorincz M. (2020, Oct)
   Maternal DNMT3A-dependent de novo methylation of the paternal genome inhibits gene expression in the early embryo.
   Nat Commun. 11:5417.
2. Abe S., Nagatomo H., Sasaki H. & Ishiuchi T. (2020, Nov)
   A histone H3.3K36M mutation in mice causes an imbalance of histone modifications and defects in chondrocyte differentiation.
   Epigenetics. *in press.*
3. Ishiuchi T., Abe S., Inoue K., Au Yeung W.K., Miki Y., Ogura A. & Sasaki H. (2021, Jan)
   Reprogramming of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo.
   Nat Struct Mol Biol. 28:38-49.

著書

1. 鵜木 元香，佐々木 裕之． (2020, Sep)
   もっとよくわかる！エピジェネティクス．
   実験医学別冊，羊土社．

学会発表（口頭発表）

1. Takashi Ishiuchi. (2020, 9/14-16)
   Dynamics of the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo.
   第 93 回日本生化学会，横浜（オンライン）．
2. 佐々木 裕之． (2020, 10/2-4) 特別講演
   ヒトエピゲノム研究の現状と医学応用 (Perspectives of the Human Epigenome Research and Its Application to Medical Sciences).
   第 31 回日本緑内障学会，オンライン．
3. Takashi Ishiuchi. (2020, 12/2-4)
   Reprogramming pf the histone H3.3 landscape in the early mouse embryo.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン．
4. Hiroyuki Sasaki (2020, 12/2-4) 招待講演
   Genomic imprinting as a model to study epigenetic inheritance and reprogramming.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン．
5. 佐々木 裕之． (2020, 12/19) 特別講演
   ヒトエピゲノム研究の現状と医学応用 (Perspectives of the Human Epigenome Research and Its Application to Medical Sciences).
   SPC（Science Pioneers Consortium) 2020，東京．
6. 石内 崇士． (2020, 12/21-23)
   全能性エピゲノムのデコーディングとデザイン．
   『配偶子インテグリティの構築』『全能性プログラム』2020 年度合同公開新シンポジウム，オンライン．
7. Hiroyuki Sasaki. (2021, 2/15-17) 特別講演
   DNA methylation in development and disease.
   Genome Concept Centennial Symposium，オンライン．
8. 石内 崇士． (2021, 3/30-31) 奨励賞受賞講演
   哺乳類の初期発生の基盤となるエピゲノム制御機構．
   第14回エピジェネティクス研究会年会，オンライン．

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6年目を迎え，大川恭行教授，原田哲仁准教授，前原一満助教，富松航佑特任助教，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3名，秘書1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，遺伝子発現の普遍的なメカニズムの解明を目指している．

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18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．2016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．2018年度はさらに，骨格筋幹細胞特異的なヒストンH3㎜7につ

いて解析を行った結果から，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）. 2020 年度はさらに，ヒストンでありながらもクロマチンに取り込まれない性質を持つ新たなヒストンの解析に着手した. 精巣特異的な発現を示す H3mm15，骨格筋前駆細胞に発現が認められる H3mm18 の二つである. 1 細胞 RNAseq 技術を用いた解析により H3mm18 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（Tomimatsu K., bioRxiv., 2021）. そこで，H3mm18 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時の無秩序発現が認められた. そこで，H3mm18 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，H3mm18 は H3.3 依存的なクロマチン構造形成に関与していることが明らかとなった. またクライオ電顕による単粒子解析を東京大学胡桃坂仁志教授との共同研究で行い，DNA との結合能が極端に低い特徴的な構造を明らかにしている. 今後も，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する予定である.

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（Inada H, et al., Nature Commun, 2020, Sakamoto Y, et al., Nature Commun, 2020 他 5 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（Kurihara M., Mol Cell, 2020, Horisawa K., Mol Cell, 2020 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となっている. 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. 昨年度，本分野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 Handa T et al., Nature Protoc., 2020）. 本手法は，細胞を破壊することなく，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となった．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ている．本年度が産学連携の一環として民間企業に技術移転を行い試薬として上市された．また，ChIL-seq を基盤として新たなオミクス解析技術を開発している．特に，ハイスループット化，マルチオミクス化，加えて，これら多次元データに資する独自のデータ解析手法の開発も進めている．特に，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. Wu Q., Fuji T., Harada A., Tomimatsu K., Miyawaki-Kuwakado A., Fujita M., Maehara K., Ohkawa Y. (2021, Jan)
   Genome-wide analysis of chromatin structure changes upon MyoD binding in proliferative myoblasts during the cell cycle.
   J Biochem. mvab001.
2. Tamura I., Maekawa R., Jozaki K., Ohkawa Y., Takagi H., Doi-Tanaka Y., Shirafuta Y., Mihara Y., Taketani T., Sato S., Tamura H., Sugino N. (2021, Jan)
   Transcription factor C/EBPβ induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells.
   Mol Cell Endocrinol. 520:111085.
3. Sakamoto Y., Sato M., Sato Y., Harada A., Suzuki T., Goto C., Tamura K., Toyooka K., Kimura H., Ohkawa Y., Hara-Nishimura I., Takagi S., Matsunaga S. (2020, Nov)
   Subnuclear gene positioning through lamina association affects copper tolerance.
   Nat Commun. 11(1):5914.
4. Inada H., Udono M., Matsuda-Ito K., Horisawa K., Ohkawa Y., Miura S., Goya T., Yamamoto J., Nagasaki M., Ueno K., Saitou D., Suyama M., Maehara Y., Kumamaru W., Ogawa Y., Sekiya S., Suzuki A. (2020, Oct)
   Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor.
   Nat Commun. 11(1):5292.

5. Yuda J., Odawara J., Minami M., Muta T., Kohno K., Tanimoto K., Eto T., Shima T., Kikushige Y., Kato K., Takenaka K., Iwasaki H., Minami Y., Ohkawa Y., Akashi K., Miyamoto T. (2020, Jul)
Tyrosine kinase inhibitors induce alternative spliced BCR-ABL Ins35bp variant via inhibition of RNA polymerase II on genomic BCR-ABL.
Cancer Sci. 111(7):2361-2373.
6. Horisawa K., Udono M., Ueno K., Ohkawa Y., Nagasaki M., Sekiya S., Suzuki A. (2020, Aug)
The Dynamics of Transcriptional Activation by Hepatic Reprogramming Factors.
Mol Cell. 79(4):660-676.e8.
7. Ochiai H., Hayashi T., Umeda M., Yoshimura M., Harada A., Shimizu Y., Nakano K., Saitoh N., Liu Z., Yamamoto T., Okamura T., Ohkawa Y., Kimura H., Nikaido I. (2020, Jun)
Genome-wide kinetic properties of transcriptional bursting in mouse embryonic stem cells.
Sci Adv. 6(25):eaaz6699.
8. Handa T.†, Harada A.†, Maehara M.†, Sato S., Nakao M., Goto N., Kurumizaka H., Ohkawa Y., Kimura H. (†: co-first authors). (2020, Oct)
Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input.
Nat Protoc. 15(10):3334-3360.
9. Kurihara M., Kato K., Sanbo C., Shigenobu S., Ohkawa Y., Fuchigami T., Miyanari Y. (2020, May)
Genomic Profiling by ALaP-Seq Reveals Transcriptional Regulation by PML Bodies Through DNMT3A Exclusion.
Mol Cell. 78(3):493-505.e8.
10. Yuda J., Odawara J., Minami M., Muta T., Kohno K., Tanimoto K., Eto T., Shima T., Kikushige Y., Kato K., Takenaka K., Iwasaki H., Minami Y., Ohkawa Y., Akashi K., Miyamoto T. (2020, Jul)
TKIs Induce Alternative Spliced BCR-ABL Ins35bp Variant via Inhibition of RNA Polymerase II on Genomic BCR-ABL.
Cancer Sci. 111(7):2361-2373.

学会発表（口頭発表）

1. 大川 恭行．(2020, 5/18-5/29. 2020, 8/27-9/10)
単一細胞マルチオミクスに向けたクロマチン挿入標識法の開発．
第 19 回日本再生医療学会総会，WEB 開催．
2. 大川 恭行． (2020, 6/16)
Chromatin integration labeling Technology for expanding multi-omics.
理研エピゲノム操作プロジェクトセミナー，WEB 開催．
3. 大川 恭行． (2020, 12/2-4)
クロマチンダイナミクスの理解に向けた同時マルチオミクスの開発．
第 43 回日本分子生物学会，WEB 開催．

4. 大川 恭行. (2020, 12/21-23)
『配偶子インテグリティの構築』『全能性プログラム』合同公開シンポジウム，WEB 開催.
5. 大川 恭行. (2021, 3/6)
第 8 回骨格筋生物学会，WEB 開催.

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．さらに共同研究員 1 名（高見知代）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（2021 年 3 月 31 日現在)．

Ａ．老化細胞を選択的に除去する GLS１阻害剤が加齢現象・老年病・生活習慣病を改善させることを証明

われわれは，老化細胞の生存に必須な遺伝子群を探索するために，p53 遺伝子を G2 期で活性化させた老化細胞を用いてレンチウイルス shRNA ライブラリースクリーニングにて老化細胞の生存に必須な遺伝子群の探索を行った結果，グルタミン代謝に関与する GLS1 が有力な候補遺伝子として同定された．そこで，老化細胞における GLS1 の発現変化をわれわれの開発した次世代プロテオミクス技術である iMPAQT システムを用いて解析したところ，細胞の種類や老化誘導要因にかかわらず，老化細胞において GLS1 アイソフォームの一つである KGA の発現が顕著に増加していることが判明した．また，ヒトの皮膚においても，KGA の発現と年齢に正の相関があった．さらに正常細胞，および老化細胞の生存に対する GLS1 阻害剤の影響を検討したところ，老化細胞を選択的に死滅させることが確認された．

KGA の発現は細胞内 pH の低下により発現が上昇することが示されていたが，細胞内の pH の調節にはリソソームと呼ばれる細胞内小器官が重要な役割を果たすことから，リソソームの動態について解析を行い，老化細胞においてリソソーム膜に損傷が生じること，その原因が老化細胞のさまざまな遺伝子の過剰発現によるタンパク質凝集体

の形成であることを明らかにした．興味深いことに，老化細胞においてGLS1を阻害すると，細胞内pHが大きく低下することで細胞死が誘導されること，そして細胞培養液のpHを弱塩基性にすることやアンモニアを過剰添加することでGLS1阻害による細胞死が抑制されることも分かった.GLS1は,グルタミンをグルタミン酸へと変換すると，エネルギー代謝に重要な代謝産物とともにアンモニアを産生することは古くから知られていたが，アンモニアの産生はあくまで副産物であると考えられており，その生理・病理的意義については不明であった．本研究で解明された分子メカニズムにより，老化細胞は，細胞内 pH の低下に伴い，GLS1 の量を増加することで過剰なアンモニアを生成し，細胞内pHの恒常性を調節することで生存を維持できることが示唆された．

最後に，加齢現象に対する GLS1 阻害剤の有効性を検証するために，老齢マウスにGLS1阻害剤を投与したところ，さまざまな臓器・組織において老化細胞の除去が確認でき，加齢性変化の特徴として知られている腎臓の糸球体硬化，肺の線維化，さらには肝臓の炎症細胞浸潤といったさまざまな症状が改善することが可能であることが分かった．また，老化に伴う筋量低下による運動能力低下や脂肪組織萎縮による代謝異常も，GLS1阻害剤の投与により抑制された．さらに，さまざまな加齢関連疾患モデルマウスへGLS1阻害剤を投与したところ，肥満性糖尿病，動脈硬化，およびNASHの症状が緩和されることも分かった．

Ｂ．幹細胞におけるクロマチンリモデリング因子 CHD8 の機能解析

CHD8はヒト自閉症患者において最も変異率の高い遺伝子である．野生型のマウスの造血幹細胞とそこから分化した細胞において，各分化段階でCHD8の発現量を比較したところ，CHD8は造血幹細胞で最も高く発現していることが明らかになった．そこで血液細胞特異的に CHD8 を欠損するマウスを作製して解析した結果，CHD8 を欠損した造血幹細胞は異常に増加しており，造血幹細胞から分化した細胞は顕著に減少していることが明らかとなり，さらに，末梢の血液細胞は有意に減少していることから汎血球減少を引き起こしていることが判明した．また，増加した造血幹細胞はその機能が消失していることが明らかとなった．次に，CHD8欠損により造血幹細胞からの血液細胞の供給ができない原因を調べるために，CHD8欠損造血幹細胞をRNAシークエンスで網羅的に遺伝子発現状態を評価すると，がん抑制遺伝子の p53 の下流遺伝子の発現の顕著な上昇が認められた．この結果は，幹細胞において定常状態ではCHD8がp53活性を抑制していることを示唆する．

p53 は細胞増殖や細胞死に深く関与しているため，CHD8 欠損造血幹細胞の細胞周期およびアポトーシスを評価したところ，CHD8欠損造血幹細胞では細胞周期が停止していることが明らかとなり，さらに，これらの細胞周期が停止した造血幹細胞はアポトーシスを引き起こしていることが明らかとなった．したがって，CHD8を欠損した造血幹細胞は p53 活性が上昇することで，造血幹細胞からの分化に障害を来し，下流の血

液細胞が産生できなくなるのと同時に，自己複製能を消失した後，アポトーシスを引き起こしていることが示唆された．

最後に，CHD8 欠損による造血幹細胞の機能の消失が p53 の異常な活性化によるものかを評価するために，血液細胞特異的に CHD8 欠損するマウスに，追加で p53 遺伝子を欠損するマウスを作製しました．その結果，CHD8 を欠損した造血幹細胞に認められた血液細胞の産生能や自己複製能が部分的に回復した．

以上の結果より，造血幹細胞において CHD8 を欠損すると，p53 が異常活性化し，造血幹細胞の多分化能や自己複製能に障害を来すことが明らかとなり，CHD8 遺伝子に変異を持つ自閉症患者の治療を目指す際の重要な知見となることが示唆された．

業績目録

原著論文

1. Wakabayashi Y., Tamura Y., Kouzaki K., Kikuchi N., Hiranuma K., Menuki K., Tajima T., Yamanaka Y., Sakai A., Nakayama K. I., Kawamoto T., Kitagawa K., Nakazato K. (2020, Apr)
   Acetaldehyde dehydrogenase 2 deficiency increases mitochondrial reactive oxygen species emission and induces mitochondrial protease Omi/HtrA2 in skeletal muscle.
   Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 318:R677-r690.
2. Nakagawa T., Hattori S., Nobuta R., Kimura R., Nakagawa M., Matsumoto M., Nagasawa Y., Funayama R., Miyakawa T., Inada T., Osumi N., Nakayama K. I., Nakayama K. (2020, Apr)
   The autism-related protein SETD5 controls neural cell proliferation through epigenetic regulation of rDNA expression.
   iScience. 23:101030.
3. Kito Y., Matsumoto M., Hatano A., Takami T., Oshikawa K., Matsumoto A., Nakayama K. I. (2020, Apr)
   Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin.
   Sci Rep. 10:5801.
4. Kawamura A., Katayama Y., Nishiyama M., Shoji H., Tokuoka K., Ueta Y., Miyata M., Isa T., Miyakawa T., Hayashi-Takagi A., Nakayama K. I. (2020, May)
   Oligodendrocyte dysfunction due to Chd8 mutation gives rise to behavioral deficits in mice.
   Hum Mol Genet. 29:1274-1291.
5. Yamauchi Y., Nita A., Nishiyama M., Muto Y., Shimizu H., Nakatsumi H., Nakayama K. I. (2020, Jun)
   Skp2 contributes to cell cycle progression in trophoblast stem cells and to placental development.
   Genes Cells. 25:427-438.

6. Shirane M., Wada M., Morita K., Hayashi N., Kunimatsu R., Matsumoto Y., Matsuzaki F., Nakatsumi H., Ohta K., Tamura Y., Nakayama K. I. (2020, Sep)
   Protrudin and PDZD8 contribute to neuronal integrity by promoting lipid extraction required for endosome maturation.
   Nat Commun. 11:4576.
7. Tsukiyama T., Zou J., Kim J., Ogamino S., Shino Y., Masuda T., Merenda A., Matsumoto M., Fujioka Y., Hirose T., Terai S., Takahashi H., Ishitani T., Nakayama K. I., Ohba Y., Koo B. K., Hatakeyama S. (2020, Sep)
   A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis.
   Nat Commun. 11:4586.
8. Shirane M., Shoji H., Hashimoto Y., Katagiri H., Kobayashi S., Manabe T., Miyakawa T., Nakayama K. I. (2020, Nov)
   Protrudin-deficient mice manifest depression-like behavior with abnormalities in activity, attention, and cued fear-conditioning.
   Mol Brain. 13:146.
9. Kawamura A., Abe Y., Seki F., Katayama Y., Nishiyama M., Takata N., Tanaka K. F., Okano H., Nakayama K. I. (2020, Nov)
   Chd8 mutation in oligodendrocytes alters microstructure and functional connectivity in the mouse brain.
   Mol Brain. 13:160.
10. Onoyama I., Nakayama S., Shimizu H., Nakayama K. I. (2020, Dec)
    Loss of Fbxw7 Impairs Development of and Induces Heterogeneous Tumor Formation in the Mouse Mammary Gland.
    Cancer Res. 80:5515-5530.
11. Kokaji T., Hatano A., Ito Y., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K. I., Egami R., Terakawa A., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Ikeda K., Arita M., Matsumoto M., Nakayama K. I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S. (2020, Dec)
    Transomics analysis reveals allosteric and gene regulation axes for altered hepatic glucose-responsive metabolism in obesity.
    Sci Signal. 13:eaaz1236.
12. Johmura Y., Yamanaka T., Omori S., Wang T. W., Sugiura Y., Matsumoto M., Suzuki N., Kumamoto S., Yamaguchi K., Hatakeyama S., Takami T., Yamaguchi R., Shimizu E., Ikeda K., Okahashi N., Mikawa R., Suematsu M., Arita M., Sugimoto M., Nakayama K. I., Furukawa Y., Imoto S., Nakanishi M. (2021, Jan)
    Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders.

Science. 371:265-270.

13. Nita A., Muto Y., Katayama Y., Matsumoto A., Nishiyama M., Nakayama K. I. (2021, Feb)
    The autism-related protein CHD8 contributes to the stemness and differentiation of mouse hematopoietic stem cells.
    Cell Rep. 34:108688.
14. Shimizu H., Nakayama K. I. (2021, Feb)
    A universal molecular prognostic score for gastrointestinal tumors.
    NPJ Genom Med. 6:6.
15. Egami R., Kokaji T., Hatano A., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K.-I., Uematsu S., Terakawa A., Bai Y., Pan Y., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Matsumoto M., Nakayama K. I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S. (2021, Feb)
    Trans-omic analysis reveals obesity-associated dysregulation of inter-organ metabolic cycles between the liver and skeletal muscle.
    iScience. 24:102217.
16. Kawamura A., Katayama Y., Kakegawa W., Ino D., Nishiyama M., Yuzaki M., Nakayama K. I. (2021)
    The autism-associated protein CHD8 is required for cerebellar development and motor function.
    Cell Rep. *in press.*

総説

1. Masuda T., Tsuruda Y., Matsumoto Y., Uchida H., Nakayama K. I., Mimori K. (2020, Apr)
    Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan.
    Cancer Sci. 111:1039-1046.
2. Yumimoto K., Yamauchi Y., Nakayama K. I. (2020, May)
    F-box proteins and cancer.
    Cancers. 12:1249-1276.
3. Shimizu H., Nakayama K. I. (2020, May)
    Artificial intelligence in oncology.
    Cancer Sci. 111:1452-1460.
4. Yumimoto K., Nakayama K. I. (2020, Dec)
    Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor.
    Semin Cancer Biol. 67:1-15.
5. Kodama M., Nakayama K. I. (2020, Dec)
    A second Warburg-like effect in cancer metabolism: The metabolic shift of glutamine-derived nitrogen: A shift in glutamine-derived nitrogen metabolism from glutaminolysis to de novo nucleotide biosynthesis contributes to malignant evolution of cancer.

Bioessays. 42:e2000169.

学会発表

1. 中山 敬一. (2020, 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.（基調講演）
   第 9 回生命医薬情報学連合大会，オンライン.
2. 中山 敬一. (2020, 10/1)
   がん幹細胞における細胞周期制御：がん撲滅のための治療標的としての期待.（コアシンポジウム）
   第 79 回日本癌学会学術総会，広島.
3. 中山 敬一. (2020, 10/3)
   グルタミンからの窒素代謝の変化はがんの悪性進化に必須である：”第二のワールブルグ効果”の発見.（シンポジウム）
   第 79 回日本癌学会学術総会，広島.

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 14 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 2015 年 3 月に開設され馬場健史が教授として務めている．2020 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），高橋政友（特任助教），学振特別研究員 1 名，学術研究員 5 名，一貫制博士課程大学院生 7 名（うち社会人博士課程学生 3 名），学部生 1 名，テクニカルスタッフ 4 名の合計 23 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），革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST），研究成果最適展開支援プログラム A-STEP（JST），未来社会創造事業（JST），科研費新学術領域研究，科研費基盤研究 B，科研費基盤研究 C，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．定量メタボロミクスのための安定同位体標識内部標準物質ケミカルライブラリ生産技術の開発

代謝物の包括的な解析を旨とする「メタボロミクス」は，医学・医療分野をはじめ，多様な基礎学術研究・産業分野での有効活用が期待されている．一方で，実情として各代謝物の濃度定量を図る「定量メタボロミクス」は殆ど実施されていない．これは，メタボロミクスの第一義的手法である各種クロマトグラフィー質量分析において，生

体サンプル由来の夾雑物が測定対象化合物のイオン化効率に影響を与える「マトリックス効果」が生じ，定量性が損なわれるためである．現行の相対的メタボロームデータは，分析バッチ間・装置間・施設間での比較・統合が不可能であり，コホート・バイオバンクなど，データの継続的蓄積や分析拠点間のデータ比較・統合が求められる分野において，定量性なく蓄積されていく従来型のメタボロームデータの有用性に疑問が呈されている．唯一，質量分析計で絶対定量を可能とする「安定同位体希釈法」では，内部標準として高価な安定同位体ラベル化標準品を代謝物ごとに用意する必要があるため，メタボローム解析において現状ではコスト・労力的に非現実的である．本研究では，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（stable isotope labeled internal standard mix, 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を構築する．

今年度は U-$^{13}C_6$ Glucose を基質とした大腸菌培養において，培養コストを抑えながら高い ^{13}C ラベル化率を達成するために，数ミリリットルの小スケール培養系における繰り返し継代による SILIS 生産系の構築に取り組んだ．各継代において液体クロマトグラフィー高分解能質量分析（LC-HRMS, IC-HRMS）を用いて ^{13}C ラベル化率を確認した結果，継代回数を増やすごとに各代謝物の ^{13}C ラベル化率の向上が確認され，中央代謝系の 43 代謝物において ^{13}C ラベル化率 95%以上を担保することに成功した．

B．免疫受容体の新規脂質リガンド探索に資する解析プラットフォームの開発

樹状細胞が有する免疫受容体の一つである C 型レクチン受容体（CLRs）は，損傷自己成分や病原性細菌が有する免役賦活脂質を認識し，生体の危機を感知するセンサーとして働いていることが知られている．また，樹状細胞表層に発現している多くの CLRs のリガンドは未だ明らかになっていない．将来の新規感染症治療薬の開発には，CLRs に対する未知のリガンドの構造決定およびそれらの生合成機構の解明が必要である．免疫賦活脂質のような天然化合物の構造解析は，NMR や液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）を併用して実施されている．LC/MS は，生体試料中の夾雑な低分子代謝物を物理化学的性質に基づき LC にて分離することでエレクトロスプレーイオン化でのマトリクス効果が低減され，MS にて多種多様な代謝物情報を高感度かつ定量的に取得できる．そのため，LC/MS は生体試料中の低濃度化合物の構造解析手段として非常に有用である．本研究では，CLRs の新規脂質リガンドの構造を迅速かつ正確に決定するために，液体クロマトグラフィー高分解能タンデム質量分析（LC/HRMS/MS）を基盤とした脂質の分取・分析システムとレポーター細胞アッセイを融合した新規解析プラットフォームの開発を行った．

はじめに，微量の生体試料抽出液（1〜10 mg DW/mL）からの脂質分子の分離・分取・構造解析を同時に達成するための解析システムの設計を行った．NanoMate はナノエレ

クトロスプレーイオン化による微量サンプルの高感度分析が可能で且つ分取機能が備わったロボットイオン源である．そこで，同一の試料からマイクロプレートに微量分取を行うと同時にHRMSおよびHRMS/MSスペクトル情報を取得することができるようにLC/HRMS と NanoMate を組み合わせた LC-NanoMate/HRMS/MS 解析システムを開発した．本システムを用いてマイクロプレートに分取した試料は，レポーター細胞アッセイに供することにより，活性画分の特定に利用することが可能である．次に，「各脂質分子種の MS/MS 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」という特徴に基づき，108 種の脂質クラス，34 種のアシル側鎖脂肪酸を対象に in silico で予想した 10000 万種以上の脂質分子種の保持時間情報，精密質量，フラグメンテーションパターンを格納した in-house リピドミクスデータベースを構築した．リガンド候補化合物の構造推定は，活性画分に該当するHRMSスペクトルおよびHRMS/MSスペクトルと構築した in-house リピドミクスデータベース情報を照合することで実施した．実際に，本解析プラットフォームを用いて抗酸菌抽出液の解析を行ったところ，オーファン CLRs の一種である抑制性受容体に対する新規脂質リガンド分子の同定に成功した．

C．超臨界流体クロマトグラフィーを用いた代謝物分析技術の開発

超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）は，超臨界流体を移動相として用いる分離手段の一つであり，医薬品の光学活性体の分離，精製をはじめ，様々な分野で利用されている．当研究室では，これまで脂質をはじめ様々な代謝物の分離分析における SFC の適用技術の開発に取り組んできている．以下に本年度取り組んだ研究の成果を紹介する．

SFC に通常用いられる超臨界二酸化炭素は疎水性であることから，一般的には疎水性化合物の分離分析に用いられる．しかし，近年移動相に添加する極性溶媒の量を 50%以上に増やすことにより，SFC が親水性成分化合物の分離にも利用できることが示されてきた．そこで，SFC の適用範囲の拡大を目指して，モデル極性代謝物としてアミノ酸を用い，SFC による新たな親水性化合物の分離系の開発に取り組んだ．その結果，0.15%のトリフルオロ酢酸と 3%の水を添加することにより，超臨界二酸化炭素が 70%の高濃度（添加溶媒のメタノールの割合が 30%と低い）状態でも，20 種のタンパク質構成アミノ酸の分離が可能になった．さらに，他の親水性代謝物についても適用性を検証し，100 種の親水性代謝物の一斉分析が可能な分析系の構築に成功した（原著論文 8）．

揮発性化合物は，一般的にガスクロマトグラフィー（GC）を用いて分離分析される．構造解析や機能性を調べる際に対象成分の分取，精製が必要になる場合があるが，GC では負荷量が少ないため対応ができないことがある．また，液体クロマトグラフィー

（LC）などの他の分離手法では揮発性成分の分離が不十分で適用できないため，新たな分離手段の開発が求められている．そこで，疎水性化合物の分離に好適で分取クロマトグラフィーとして実績のある SFC を用いた新たな揮発性化合物の分析系の開発を試みた．一般的に用いられるシリカゲル系のカラムは低分子の揮発性成分は保持が弱いため，SFC でも利用可能な新たなポリマー系カラムの開発についても島津製作所と共同研究で取り組んだ．その結果，高度に架橋したスチレンジビニルベンゼン系のカラムを用いることにより，23 種の揮発性化合物の一斉分析系の構築に成功した（原著論文 5）．

SFC は分取用のクロマトグラフィーとして発展してきたことから，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）のような分離メカニズムに理論構築が不十分である．そこで，我々のグループでは，SFC における分離挙動の解析に取り組み，SFC のさらなる利用を目指した分離予測解析システムの開発を進めている．これまでに，SFC における分離挙動の解析の第一人者であるフランス オルレアン大学 Caroline West 准教授らのグループとの共同研究に取り組んできており，本年度は各種カラムの SFC における分離特性解析に取り組んだ．幅広い性質を有する 160 種類の化合物を用いて 14 種類の順相系，逆相系のカラムについて評価を行った．Linear solvation energy relationships（LSER）による解析を行ったところ，それぞれのカラムにおける分離特性を明らかにすることができた（原著論文 12）．

我々のグループでは，これまでに島津製作所と分析スケールの Nexera UC を開発し上市している．今回，製薬企業等ニーズの高い分取スケール装置について，島津製作所および Enabling Technologies Consortium（ETC．米国における製薬会社やバイオテクノロジー企業がアイデアを話し合い，情報を共有し，新しい実現技術の開発に向けて協力するためのコンソーシアム）と協力して開発に取り組んだ．分取 SFC においてこれまで課題であった回収率の問題を解決する新規気液分離モジュール（ロータスストリーム）の開発に成功し，最大流量 150 mL/min のラージスケールと最大流量 5 mL/min のコベンショナルスケール装置を上市した（原著論文 2）．

D．メタボロミクスを活用した肝細胞における中鎖脂肪酸代謝物解析

炭素鎖が 6-12 の脂肪酸は広義には中鎖脂肪酸（MCFAs）と呼ばれ，ココナッツ油やパーム核油中に，トリアシルグリセロール（TG)の形で主に中鎖脂肪酸油（MCTs）として存在している．MCTs は長鎖脂肪酸油（LCTs）と比較して，物性面に限らず，摂取時の消化・吸収・代謝の面においても大きく異なる性質を持つ．例えば，MCFAs は肝臓にてグルコース代替のエネルギー源となるケトン体を産生すると考えられていることから，様々な臨床研究領域で注目されている．ケトン体産生の場である肝臓を対象とした MCFAs の代謝研究は，主に肝細胞を用いた in vitro で実施されてきた．しかしな

がら，従来の研究では MCFAs の肝代謝の一部についての報告に留まっており，代謝総体の定量的な機能解析はなされておらず，MCFAs 代謝の全容，代謝運命に関しては十分な解明には至っていない．また，個々の鎖長の異なる MCFA の代謝特性についても全てが明らかにされているわけではない．そこで，本研究では，肝細胞である AML12 細胞を用いて，MCFAs および長鎖脂肪酸（LCFAs）で処理した AML12 細胞のメタボローム解析を行った．種々のメタボローム分析技術を駆使したメタボリックプロファイリングおよび安定同位体標識 MCFA を使用した動的メタボローム解析を行うことで MCFAs の代謝特性，代謝運命を明らかにすることを目的とした．

AML12 細胞における MCFA/LCFA 間，MCFA 種間の代謝評価を実施するために，測定対象となる代謝物の物理的特性に応じて，3 種の親水性代謝物分析法と 2 種の疎水性代謝物分析法を用いたワイドターゲットメタボローム分析を実施した．その結果，各脂肪酸処理した AML12 細胞から 183 種の親水性代謝物および 688 種の疎水性代謝物の計 871 種の代謝物を同定，相対定量することに成功した．得られた代謝プロファイルデータから，ラウリン酸（FA 12:0）処理は，オクタン酸（FA 8:0）およびデカン酸（FA 10:0）と比較して代謝プロファイルが大きく異なり，TG，コレステロール（Cholsterol），コレステロールエステル（ChE），ホスファチジルエタノールアミン（PE），リゾホスファチジルエタノールアミン（LPE），リゾホスファチジルコリン（LPC），セラミド（Cer），ヘキソシルセラミド（HexCer）の各脂質量を増加させることを明らかにした．一方，FA 8:0 および FA 10:0 による処理は AML12 細胞のケトン体産生が亢進した．また，FA 8:0 はコントロールと比較して TG 組成を変化させるものの，TG 量並びにその他脂質量においても有意な差は見られなかった．LCFAs に分類されるオレイン酸（FA 18:1）による処理は TG 合成経路に関与するホスファチジン酸（PA），ジアシルグリセロール（DG），TG 量を増加させ，TG 合成の基質として利用されることが示唆された．次に，メタボローム分析技術と安定同位体標識を組み合わせた代謝ターンオーバー解析を活用し，AML12 細胞を $^{13}C_8$-FA 8:0 および $^{13}C_{18}$-FA 18:1 で処理することで FA の代謝動態を観察した．その結果，FA 8:0 はアセチル-CoA に迅速に変換されケトン体，クエン酸回路中間体，一部の糖原生アミノ酸に資化されることを定量的に示した．一方の FA 18:1 は TG 合成の基質として資化されることを TG の ^{13}C 標識率を指標としてはじめて示した．以上の結果より，本研究では，MCFA/LCFA 間，MCFA 種間の包括的かつ定量的な代謝評価によって，肝細胞における MCFAs の代謝特性，代謝運命を明らかにした（原著論文 9）．

E．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および国内の大学との共同研究を精力的に行った（原著論文 1，3，4，6，7，

10，11，12，13，14）．また，製薬会社，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（原著論文 15）についても実施した．

業績目録

原著論文

1. Matsuoka Y., Izumi Y., Takahashi M., Bamba T., Yamada K.I. (2020, May)
   Method for structural determination of lipid-derived radicals.
   Anal Chem. 92(10):6993-7002.
2. Biba M., Wong M., Akin A., Manning E.T., Schaffter L., Miller L., Zhang Y., Farrell W., DaSilva J.O., Nogle L., Hritzko B., Riley F., DePianta R.P., Barry K., Gao D.A., Seest E., Goel M., Chung L., Paulson J., Lee H., Moore D.B., Dong S., Leister W., Fukushima N., Sasaki A., Lee T., Iriki T., Nishimura M., Tomita M., Owa M., Tanaka K., Shagawa T., Moran T.J., Bamba T., Welch C.J. (2020, May)
   Cross-pharma collaboration on the development and evaluation of a new mid-scale preparative supercritical fluid chromatography instrument.
   Org Process Res Dev. 24(7):1271-1280.
3. Katakami N., Omori K., Taya N., Arakawa S., Takahara M., Matsuoka T.A., Tsugawa H., Furuno M., Bamba T., Fukusaki E., Shimomura I. (2020, Jun)
   Plasma metabolites associated with arterial stiffness in patients with type 2 diabetes.
   Cardiovasc Diabetol. 19(1):75.
4. Yamamoto T., Takabatake Y., Minami S., Sakai S., Fujimura R., Takahashi A., Namba-Hamano T., Matsuda J., Kimura T., Matsui I., Kaimori J., Takeda H., Takahashi M., Izumi Y., Bamba T., Matsusaka T., Niimura F., Yanagita M., Isaka Y. (2020, Jun)
   Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux.
   Autophagy. 28:1-14.
5. Fujito Y., Hayakawa Y., Bamba T. (2020, Aug)
   Development of a novel comprehensive analytical method for volatile compounds using supercritical fluid chromatography/mass spectrometry with a highly cross-linked styrene divinylbenzene polymer-based column.
   J Chromatogr A. 1626:461363.
6. Fukuda T., Takamatsu K., Bamba T., Fukusaki E. (2020, Jul)
   Potato tuber metabolomics-based prediction of chip color quality and application using gas chromatography/flame ionization detector.

Biosci Biotechnol Biochem. 84(11):2193-2198.

7. Nojima Y., Takeda Y., Maeda Y., Bamba T., Fukusaki E., Itoh N. M., Mizuguchi K., Kumanogoh A. (2020, Sep)
   Metabolomic analysis of fibrotic mice combined with public RNA-seq human lung data reveal potential diagnostic biomarker candidates for lung fibrosis.
   FEBS Open Bio. 10(11):2427-2436.
8. Konya Y., Izumi Y., Bamba T. (2020, Nov)
   Development of a novel method for polar metabolite profiling by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry.
   J Chromatogr A. 1632:461587.
9. Fushimi T., Izumi Y., Takahashi M., Hata K., Murano Y., Bamba T. (2020, Oct)
   Dynamic Metabolome Analysis Reveals the Metabolic Fate of Medium-Chain Fatty Acids in AML12 Cells.
   J Agric Food Chem. 68(43):11997-12010.
10. Nagata M., Toyonaga K., Ishikawa E., Haji S., Okahashi N., Takahashi M., Izumi Y., Imamura A., Takato K., Ishida H., Nagai S., Illarionov P., Stocker B.L., Timmer M.S.M., Smith D.G.M., Williams S.J., Bamba T., Miyamoto T., Arita M., Appelmelk B.J., Yamasaki S. (2021, Jan) Helicobacter pylori metabolites exacerbate gastritis through C-type lectin receptors.
    J Exp Med. 218(1):e20200815.
11. Tanaka K., Sasayama T., Nagashima H., Irino Y., Takahashi M., Izumi Y., Uno T., Satoh N., Kitta A., Kyotani K., Fujita Y., Hashiguchi M., Nakai T., Kohta M., Uozumi Y., Shinohara M., Hosoda K., Bamba T., Kohmura E. (2021, Jan)
    Glioma cells require one-carbon metabolism to survive glutamine starvation.
    Acta Neuropathol Commun. 9(1):16.
12. Gros Q., Molineau J., Noireau A., Duval J., Bamba T., Lesellier E., West C. (2021, Jan)
    Characterization of stationary phases in supercritical fluid chromatography including exploration of shape selectivity.
    J Chromatogr A. 1639:461923.
13. Morikawa T., Ohishi H., Kosaka K., Shimojo T., Nagano A., Taniguchi I., Fujioka R., Moriyama K., Unoki M., Takahashi M., Nakao M., Izumi Y., Bamba T., Sasaki H., Miura S., Shibata H. (2021, Feb)
    Ddhd1 knockout mouse as a model of locomotive and physiological abnormality in familial spastic paraplegia.
    Biosci Rep. 41(2):BSR20204171.
14. Chen Y.Y., Soma Y., Ishikawa M., Takahashi M., Izumi Y., Bamba T., Hori K. (2021, Jun)

Metabolic alteration of Methylococcus capsulatus str. Bath during a microbial gas-phase reaction. **Bioresour Technol.** 330:125002.

15. Hata K., Soma Y., Yamashita T., Takahashi M., Sugitate K., Serino T., Miyagawa H., Suzuki K., Yamada K., Kawamukai T., Shiota T., Izumi Y., Bamba T. (2021, Mar)
Calibration-curve-locking database for semi-quantitative metabolomics by gas chromatography/mass spectrometry.
Metabolites. 11(4):207.

総説

1. 和泉 自泰，馬場 健史． (2020 年 9 月)
超臨界流体クロマトグラフィー質量分析を基盤とした定量リピドーム分析法の開発．
生物工学会誌．98(9):490-493.
2. 竹田 浩章，和泉 自泰，馬場 健史． (2020 年 10 月)
ω-3 脂肪酸含有脂質を識別する定量リピドーム解析技術．
バイオインダストリー．37(10):32-40.
3. 和泉 自泰． (2020 年 11 月)
アルコール代謝研究の最新動向．
生物工学会誌．98(11):622.
4. Si-Hung L., Bamba T. (2021, Jan)
A review of retention mechanism studies for packed column supercritical fluid chromatography.
Anal Sci Adv. 2:47-67.

著書

1. 松本 雅記，秦 康祐，和泉 自泰，馬場 健史． (2020 年 7 月)
質量分析計を基盤とするシングルセルプロテオミクス．
シングルセル解析でなにがわかるか．109-121，化学同人，京都.
2. 和泉 自泰，馬場 健史． (2021 年 3 月)
1 細胞メタボローム解析の現状．
医学のあゆみ．276(10):927-932，医歯薬出版，東京.

学会発表（口頭発表のみ）

1. 馬場 健史． (2020, 7/27)
超臨界流体クロマトグラフィーって何ができるの？
島津 Webinar，Web 開催.
2. 和泉 自泰． (2020, 8/24)

次世代のメタボローム計測.
生物工学会バイオ計測サイエンス研究部会 2020 シンポジウム，Web 開催.

3. 馬場 健史. (2020, 9/17)
次世代超臨界流体抽出分離装置の開発.
日本農芸化学会 2020 年度 中四国支部大会（第 57 回 講演会）産学連携シンポジウム，Web 開催.

4. 馬場 健史. (2020, 9/23)
メタボロームデータ取得方法の現状と課題.
ゲノム創薬・創発フォーラム 第四回 シンポジウム，Web 開催.

5. 和泉 自泰. (2020, 10/27)
ナノ液体クロマトグラフィー質量分析を基盤としたシングルセル分子フェノタイプ解析.
CBI Annual Meeting 2020, Web 開催.

6. 馬場 健史. (2020, 11/19)
メタボローム分析の最新動向と今後の課題.
第 31 回 クロマトグラフィー科学会議，静岡.

7. 富安 範行，和泉 自泰，髙橋 政友，西村 直矢，豊永 憲司，山崎 晶，馬場 健史. (2020, 11/21)
免疫受容体に対する新規脂質リガンド探索のための解析プラットフォームの開発.
生物工学若手研究者の集い 第三回 オンラインセミナー，Web 開催.

8. 馬場 健史. (2020, 11/24)
メタボロミクスの最新動向.
プラズマバイオコンソーシアム 2020 年度研究会，福岡.

9. 下平 武彦，相馬 悠希，品玉 匠司，大城 真愛，早川 禎宏，和泉 自泰，馬場 健史. (2020, 11/28)
オートサンプラーのニードル内混合機能を活用したアミノ酸の自動蛍光誘導体化分析法の開発.
2020 年度 日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会（第 332 回 講演会），宮崎.

10. 馬場 健史. (2020, 12/21)
定量メタボローム解析の事業化に向けた取り組み.
2020 年度 第 5 回 九州大学ベンチャーエコシステム連絡会，Web 開催.

11. 富安 範行，和泉 自泰，髙橋 政友，西村 直矢，豊永 憲司，山崎 晶，馬場 健史. (2021, 1/27)
高分解能質量分析を基盤とした免疫受容体の新規脂質リガンド探索法の開発.
2020 年度 第 2 回 脂質駆動学術産業創生研究部会講演会，Web 開催.

12. Takeshi Bamba. (2021, 3/1)
    Development of wide-targeted lipidomics system by using SFC-triple quadrupole MS.
    9th International Singapore Lipid Symposium (iSLS 9), Web.
13. 馬場 健史. (2021, 3/11)
    ワイドターゲット定量リピドーム分析システムを用いた馬場メソッド～リピドーム分析の課題を解決！～.
    Waters Webinar, Web 開催.
14. 馬場 健史. (2021, 3/20)
    メタボロミクスを実施する上での重要ポイント.
    日本農芸化学会 2021 年度大会, Web 開催.
15. 和泉 自泰. (2021, 3/20)
    親水性代謝物のワイドターゲットメタボローム分析のプロトコル.
    日本農芸化学会 2021 年度大会, Web 開催.

統合オミクス分野
Division of Integrated Omics

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

生命現象は全てゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームなどと呼ばれる階層によって制御されている．そこで近年，生命現象の全体像を理解する一つのアプローチとして，多階層のオームデータから知識を抽出する「トランスオミクス解析」が注目を浴びている．統合オミクス分野では複数階層のデータ，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事前知識を用いたものや，情報学的手法や統計的手法を用いたデータドリブンな解析，またはその両方を合わせた解析を行っている．生命現象としては，肥満やインスリン作用に注目して研究を行っている．さらに，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．

令和２年４月に劉哲さん，テクニカルスタッフとして奴留由素子さんが，12 月に事務補佐員として小杉穂波さんが参加した．

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，これらのデータだけからでは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，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(Trends Biotechnol. 2016)．

ａ．インスリン作用の *in vivo* トランスオミクス解析

われわれは，個体（マウス）を用いた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(Sci. Signals 2020, iScience, 2021)．これにより，同一個体で比較可能なエピゲノム(メチローム，ヒストン修飾)，トランスクリプトーム，プロテオーム(発現プロテオーム，リン酸化プロテオーム)，メタボローム(親水性，疎水性)データを取得できるようになった．われわれはマウスにインスリン刺激を行い，肝臓の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し，メタレベルでのインスリン作用を明らかにしている．

ｂ．肥満進行のトランスオミクス解析

肥満は糖尿病やがんの危険因子であり，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．これらのデータから肝臓の多階層の応答が肥満進行のある時点を境に急激に変化することを見出しおり，そのネットワークの解明に注力している．

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．われわれ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, Cell Rep, 2014)．また，一つの臓器だけでなく臓器間の関係性にも注目し，肥満における血糖値の一因が筋肉と肝臓の代謝サイクルの破綻であることを見出している（iScience, 2021)．

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，情報量を用いた解析を行っている（FRUCT, 2017)．

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．一方で，トランスオミクスデータは分子種と対応する変数の数が多いのに対して，サンプルサイズは小さく統計学的な観点からは非常にデータ量が少なくなりがちである．サンプルサイズが小さい状況では，ネットワーク構造の推定において信頼性は乏しくなり，ネットワーク構造の比較において局所的なエッジの比較に意味を見出しづらくなる．われわれはエッジにオントロジーを導入することで，ネットワーク構造からエッジに関する統計量を抽出し，局所的なエッジの比較に依らないネットワークの比較方法を開発した．オントロジーの定義次第では，異なる階層間でもエッジに関する統計量を通してネットワークの比較が可能となる利点もある．それぞれ健常マウスと肥満マウスにおいてグルコース応答に対するネットワーク構造の変化をトランスクリプトームとメタボロームの両階層で本手法によって比較した結果，各階層における両者の違いを多様な観点から明らかにすることができた．

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生理的応答の範囲で任意に制御することができる(NPJ Syst. Biol. Appli., 2019)．

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．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，培養細胞を用いて研究を行ってきた．その結果，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，培養細胞や個体の肝臓において選択的に制御できることを明らかにした（Mol. Cell, 2012, Mol. Syst. Biol., 2013, Sci. Signal., 2016, Cell Syst. 2018)．また，作成したモデルを基に，これまで不明であった糖尿病の進行に伴う糖新生活性化の原因を推測している（Cell Syst. 2018)．現在は，肥満におけるインスリンの時間パターン依存的な制御の破綻に注目し，そのメカニズムを生物実験と数理解析を用いて検討を行っている．さらに，Akt アイソフォームに注目して肝臓と筋肉におけるインスリン応答の違いを数理モデルで表現し，肝臓と筋肉における Akt アイソフォームの下流分子に対する意義を推定している．

C．血糖値および心拍間隔時系列データの解析

血糖値は食事などを介した糖の摂取や日常的な消費によって増減する一方，副交感神経を介した制御によっても増減することが示唆されている．特に，低血糖は生命の維持に関わるため回避すべき危険であるが，副交感神経の作用がどのように血糖値に影響するか定量的な知見は今まで得られていない．一方で，近年，１型糖尿病患者へのインスリンポンプ療法が普及し，ペースメーカーと併用することで数日単位での長時間にわたる血糖値および心拍間隔の時系列データが得られるようになった．心拍間隔は主交感神経と副交感神経の活動と密接に関連していることが知られており，心拍間隔から副交感神経の活動を定量的に推定することができる．慶応義塾大学医学部伊藤（裕）研究室との共同研究の下，血糖値および心拍間隔時系列データから，血糖値と副交感神経活動との間に成り立つ定量的関係を調べる解析を行っている．その結果，低血糖に先んじて交感神経の活性によって低血糖を回避，もしくは，緩和するメカニズムの存在が示唆され，これは医師らの経験的知見と合致する．また，交感神経活性化の制御は概日リズムと関連があることも予想され，概日リズムと低血糖制御の間における関連の有無についても解析を行っている．

業績目録

原著論文

1. Wada T., Hironaka K., Wataya M., Fujii M., Eto M., Uda S., Hoshino D., Kunida K., Inoue H., Kubota H., Takizawa T., Karasawa Y., Nakatomi H., Saito N., Hamaguchi H., Furuichi Y., Manabe Y., Fujii N.L. and Kuroda S. (2020, Sep)
   Single-Cell Information Analysis Reveals That Skeletal Muscles Incorporate Cell-to-Cell Variability as Information Not Noise.
   Cell Rep. 32(9):108051.
2. Kokaji T., Hatano A., Ito Y., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K., Egami R., Terakawa A., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Ikeda K., Arita M., Matsumoto M., Nakayama K., Hirayama A., Soga T. and Kuroda S. (2020, Dec)
   Transomics analysis reveals allosteric and gene regulation axes for altered hepatic glucose-responsive metabolism in obesity.
   Sci Signal. 13(660):eaaz1236.
3. Shirane M., Wada M., Morita K., Hayashi N., Kunimatsu R., Matsumoto Y., Matsuzaki F., Nakatsumi H., Ohta K., Tamura Y. and Nakayama K.I. (2020, Sep)
   Protrudin and PDZD8 contribute to neuronal integrity by promoting lipid extraction required for

endosome maturation.

Nat Commun. 11(1):4576.

4. Egami R., Kokaji T., Hatano A., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K.-I., Uematsu S., Terakawa A., Bai Y., Pan Y., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Matsumoto M., Nakayama K.I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S. (2021, Feb)
   Trans-omics analysis reveals obesity-assosiated dysregulation of inter-organ metabolic cycles between the liver and skeltal muscle.
   iScience. 24(3):102217.

学会発表（口頭発表のみ）

1. Hiroyuki Kubota. (2020, 10/26-28) Invited.
   Selective regulation of the Insulin-AKT pathway by simultaneous processing of blood insulin pattern in the liver.
   Fusion of Mathematics and Biology, Online Meeting.
2. Yuki Ito, Shinsuke Uda, Toshiya Kokaji, Akiyoshi Hirayama, Tomoyoshi Soga, Yutaka Suzuki, Shinya Kuroda and Hiroyuki Kubota. (2020, 10/26-28)
   Comparison of hepatic responses to glucose perturbation between normal and obese mice using edge ontology.
   Fusion of Mathematics and Biology, Online Meeting.
3. 久保田 浩行． (2021, 3/11-13) 招待講演
   トランスオミクス解析を用いた疾患の理解.
   第 46 回日本脳卒中学会学術集会，福岡.