

研 究 推 進 ユ ニ ッ ト
R e s e a r c h P r o m o t i o n U n i t

先端研究開発室（ゲノミクスグループ）

Advanced Research Initiative

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。

A. 神経疾患の分子基盤の解明

a. 脊髄小脳変性症 36 型の分子診断と遺伝子発現解析

脊髄小脳変性症は運動失調を主な症状とし、多くの遺伝子が責任遺伝子として知られている heterogeneity の高い遺伝性神経疾患である。脊髄小脳変性症 36 型はリボソーム構築を担う *NOP56* 遺伝子の第一イントロンに存在する GGCCTG の 6 塩基リピートが異常伸長することによって引き起こされる。久留米大学で見出された脊髄小脳変性症を疑われる患者家系に対して、当研究室で責任遺伝子のスクリーニングを行ったところ、*NOP56* 遺伝子の第一イントロン内のリピート拡大をサザンブロット法および repeat primed PCR により同定し、患者を脊髄小脳変性症 36 型であると分子診断した。患者末梢血を用いて RNA sequencing を行い、得られた発現変動遺伝子に対して GO (gene ontology) 解析および pathway 解析を行ったところ、タンパク質翻訳やリボソーム構築に関わる遺伝子の発現が有意に変化していることが明らかになった。さらに、これらの機能を持つ遺伝子は発現低下を示した遺伝子群の中に有意に偏って存在していた。これらの結果から、脊髄小脳変性症 36 型はタンパク質翻訳やリボソームの構成不全によるタンパク質合成能の低下が発症に関与する可能性を示唆した (Morikawa et al. *J Hum Genet.* 2024)。

b. 痙性対麻痺 10 型の分子診断と遺伝子発現解析

愛媛大学で見出された痙性対麻痺の家系に対して、エクソームシーケンシングにより、責任変異の同定を行った。常染色体優性遺伝を想定して、発端者からヘテロ接合の非同義 SNV (Single Nucleotide Variant) を約 2 万個同定した。これまでに知られていた家族性痙性対麻痺の既知責任遺伝子セット 17 個を探索した結果、*KIF5A* 遺伝子の第 24 エクソンにナンセンス変異 (NM_004984.4:c.2590C>T; p.Arg864Ter) を見出した。この変異はこれ

までに、ギリシアの1家系でのみみつかっていた。当該患者の末梢血のRNA シークエンスで、KIF5A の遺伝子発現が有意に減少していることも確認し、本家系の痙性対麻痺の責任遺伝子変異と結論した（論文投稿中）。

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、オミクス解析及び遺伝的多様性の解析を行っている。

a. HiC とロングリードシーケ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、昨年度までにロングリードシーケンスデータとHiCデータを追加し、N50長188Mbの456本の高精度アセンブリーを構築済みであった。ここから、近縁種の配列を参照にマニュアルキュレーションを行い、7対全ての常染色体、性染色体Zおよび、10対の微小染色体（サイズ順にm1-10と名付けた）について染色体スケールのアセンブリーが完成した。AUGUSTUSとBRAKER3によりアノテーションを行い、30,659個のprotein coding gene からなる遺伝子モデルを作成した。さらに主要な毒タンパク質遺伝子ファミリーについてゲノム構造を確認したところ、いずれも微小染色体上に遺伝子クラスターとして位置していることを確認した。9個の遺伝子からなるホスホリパーゼA2遺伝子クラスターはm9に（図1）、10個の遺伝子からなる金属プロテアーゼ遺伝子クラスターはm2に、9個の遺伝子からなるセリンプロテアーゼ遺伝子クラスターはm1に、それぞれ局在していた。

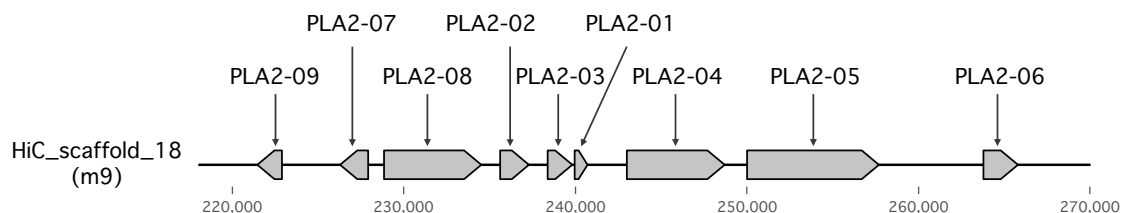


図1: ハブ毒液中に発現するホスホリパーゼA2遺伝子は微小染色体m9上でクラスターを形成している

業績目録

原著論文

1. Morikawa T., Miura S., Uchiyama Y., Hiruki S., Sun Y., Fujioka R., Shibata H. (May 2024)
Hexanucleotide repeat expansion in SCA36 reduces expression of genes involved in ribosome biosynthesis and protein translation.

J Hum Genet. 69: 411–416.

2. Ozaki K., Kato R., Yasuhara T., Uchihara Y., Hirakawa M., Abe Y., Shibata H., Kawabata-Iwakawa R., Shakayeva A., Kot P., Miyagawa K., Suzuki K., Matsuda N., Shibata A., Yamauchi M. (Aug 2024)
Involvement of the splicing factor SART1 in the BRCA1-dependent homologous recombination repair of DNA double-strand breaks.
Sci Rep. 14: 18455.
3. Miura S., Suenaga S., Goto H., Wang Z., Makino A., Fan L., Senzaki K., Ochi M., Ohyagi Y., Shibata H.
A Japanese hereditary spastic paraplegia patient with a rare *KIF5A* nonsense variant.
Hum Genome Var. In press.

学会発表

1. 三浦 史郎, 藤下 幸穂, 比留木 成美, 別所 建一郎, 吉田 和樹, 海老原 るい, 千崎 健佑, 越智 雅之, 越智 博文, 大八木 保政, 柴田弘紀. (2024/5/29-6/1)
網膜色素変性症に筋萎縮を伴う autosomal recessive の日本人 1 家系. (ポスター発表)
第 65 回日本神経学会学術大会, 東京国際フォーラム
2. Zhaonan Wang, Yinrui Sun, Hitomi Nakamura, Naoko Oda-Ueda, Hiroki Shibata. (2024/8/11-16)
Comparative study of transactivational effects by epithelium specific ETS transcription factors on venom protein genes from the Habu snake (*Protobothrops flavoviridis*). (ポスター発表)
Gordon Research Conference on Venom Evolution, Function and Biomedical Applications, Gordon Research Conference, U. of Southern Maine, Portland, ME.
3. Zhaonan Wang, Yinrui Sun, Hitomi Nakamura, Naoko Oda-Ueda, Hiroki Shibata. (2024/8/30-31)
Comparative study of transactivational effects by epithelium specific ETS transcription factors on venom protein genes from the Habu snake (*Protobothrops flavoviridis*). (口頭発表)
第 70 回トキシシンポジウム, 京都産業大学, 琵琶湖グランドホテル 京近江
4. 孫 峯瑞, 山口 和晃, 上田 直子, 柴田 弘紀. 孫 峯瑞, 山口 和晃, 上田 直子, 工樂 樹洋, 小川 智久, 柴田 弘紀 (2024/8/30-31)
ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の染色体スケールのゲノムアセンブリ. (口頭発表)
第 70 回トキシシンポジウム, 京都産業大学, 琵琶湖グランドホテル 京近江
5. 孫 峯瑞, 森川 拓弥, 三浦 史郎, 内山 雄介, 比留木 成美, 藤岡 竜太, 柴田 弘紀. (2024/11/27-29)
脊髄小脳変性症 16 型の病的リピート増幅による, リボゾーム生合成関連およびタンパク質翻訳関連遺伝子の発現減少. (ポスター発表)
第 47 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場
6. 汪 趙楠, 孫 峯瑞, 中村 仁美, 上田 直子, 柴田 弘紀. (2024/11/27-29)
ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の毒タンパク質遺伝子に対する上皮細胞特異的転写因子 ETS

の転写活性化

第 47 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場

先端研究開発室（構造生物学グループ）

Advanced Research Initiative

准 教 授：嶋田 睦

Associate Professor : Atsushi Shimada, Ph.D.

エンドサイトーシスや細胞遊走などの生命現象は細胞膜の変形や細胞骨格の再編成を伴うダイナミックな生命現象であり、外界からの刺激を細胞の形態変化につなげるシグナル伝達経路によって制御されている。本研究室ではこれまで X 線結晶構造解析や生化学的手法を用いて経路の構成タンパク質の構造や機能を解明することで、真核細胞の活動を支えるこれらの生命現象の巧妙な仕組みの理解を目指して研究を進めてきた。最近では、電子顕微鏡を用いた脂質二重膜中の膜タンパク質の新規イメージング/構造解析技術も開発し、創薬標的を含む様々な膜タンパク質への応用を進めている。

2024 年度は嶋田睦と湯通堂紀子（特任助教）の 2 名で研究を推進した。また大学初ベンチャー事業シーズ育成支援プログラム（九大ステップファンド）、令和 6 年度橋渡し研究プログラム シーズ H、大学初新産業創出基金事業 スタートアップ・エコシステム共創プログラム「PARKS スタートアップ創出プログラム ステップ 2-1」、2024 年度福岡バイオ産業創出事業（可能性試験事業）などの支援を受け研究を推進した。

A. 膜タンパク質からの新規の構造情報取得技術の開発

これまでに脂質二重膜中で膜タンパク質を電子顕微鏡により簡便にイメージング/構造情報の取得が可能な手法を開発し、その技術開発と種々の膜タンパク質への応用を進めてきた。この手法は試料への要求性が低く、低濃度、少量の膜タンパク質試料についても簡便にイメージング/構造情報を取得できるという利点がある。この手法は昨年度までに日本、韓国、オーストラリアで特許登録を行ったが、今年度はさらに米国と中国でも特許登録を行なった。また昨年度までにこの手法を 1 社の企業に技術移転し、当該企業でデータ取得を進められる体制を整えていたが、今年度はさらにもう 1 社の企業への技術移転にも成功した。これにより、より多くのデータの取得が可能になったとともに、データの再現性をさらに担保できた。この新たな技術移転先企業はクライオ電子顕微鏡による高分解能解析を行う能力も有するため、モデル膜タンパク質を用いたクライオ電子顕微鏡による高分解能解析もこの企業と進めている。順調に進めば今後それほど時間を置かずに高分解能構造解析に成功できるものと期待している。アカデミア研究機関との共同研究による高分解能構造解析も進捗しているが、1 つの研究機関では技術移転に遅れが見られているため、今後技術移転先企業の支援も受けながら技術移転を成功させる予定である。今後本技術を用いた高分解能構造解析の

可能な体制を速やかに確立し、生物学上、また創薬上重要な膜タンパク質についての構造解析を推進予定である。

B. 血清アルブミンと新規化合物のドッキングシミュレーション

九州大学大学院工学研究院応用化学部門の片山佳樹教授、森健准教授との共同研究として、片山教授、森准教授らが設計した新規化合物と、ヒト血清アルブミン (HSA) とのドッキングシミュレーションを行なった。この化合物は、そのアルキル基が HSA の疎水性ポケットに結合し、そのチオール基が HSA の Cys34 とジスルフィド結合を形成することによって、これまでよりも強く HSA に結合することで、血中半減期が増加することを期待して設計された。ドッキングシミュレーションには AutoDock Vina v1.2.5 を使用し、分子ドッキング後には COOT 0.9.8.95 を用いて座標の微調整を行った。その結果、化合物のアルキル基部分が想定通り HSA の疎水性ポケットに結合し、その状態でこの化合物のチオール基が同時に HSA の Cys34 とジスルフィド結合を形成できることを支持する結果を得た。これによりこの化合物が目的とする機能を果たすために適切に設計されていることを確認できた (原著論文 1)。

業績目録

原著論文

1. Qi S., Liu Z., Suyama K., Tsuchiya Y., Canarejo J., Phan K.Q., Yutsudo N., Shimada A., Hirota T., Ieiri I., Kishimura A., Muraoka T., Nose T., Mori T., Katayama Y. (Dec 2024)
Ligand Design with Accelerated Disulfide Formation with Serum Albumin to Extend Blood Retention.
ACS Med. Chem. Lett. 16:144-148.

学会発表

1. 嶋田 睦. (2024/6/27)
脂質二重膜中の膜タンパク質の迅速高分解能イメージング技術. (口頭発表)
ファーマラボ EXPO アカデミックフォーラム, 東京.
2. 嶋田 睦. (2024/6/26-28)
脂質二重膜中の膜タンパク質の迅速高分解能イメージング技術. (ポスター発表)
ファーマラボ EXPO アカデミックフォーラム, 東京.
3. 嶋田 睦, 湯通堂 紀子. (2024/10/17)

脂質二重膜中の膜タンパク質の迅速高分解能イメージング/構造解析パイプラインの開発.
(ポスター発表)

第12回 TR 推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会, 福岡.

先端研究開発室（脳機能制御学グループ）

Advanced Research Initiative

助 教：土本 大介

Assistant Professor : Daisuke Tsuchimoto, Ph.D.

生物の遺伝情報はゲノム DNA が保持し、遺伝情報発現のために RNA が合成される。この DNA や RNA、およびその前駆体であるヌクレオチドは、酸素呼吸の過程で必然的に発生する活性酸素や生体防御のために生体が能動的に産生する活性酸素などによって損傷を受ける危険に常に曝されている。損傷を受けた核酸やヌクレオチドは修復、除去されないと突然変異誘導や正常な核酸/ヌクレオチドの機能阻害を引き起こすことでさまざまな疾患の原因となる。

本グループでは、核酸やヌクレオチドの損傷体が引き起こす障害とその防御機構について研究している。

A. イノシン三リン酸分解酵素蓄積による細胞増殖抑制に関わる遺伝子の同定

イノシン三リン酸分解酵素 (ITPA) の欠損は非正規ヌクレオチドであるイノシン三リン酸 (ITP) の蓄積によるヒト発達性てんかん性脳症 35 (DEE35) 発症の原因となる。DEE35 はてんかん発作や小頭症、発達遅延を伴う重篤な脳症であり、拡張型心筋症を伴うこともある。DEE35 患者のほとんどは生後数年以内に死亡する。

我々は今までにマウスモデルを用いて、ITPA 欠損により蓄積した ITP がミオシンと ATP の結合を競合阻害することで拡張型心筋症を引き起こし、脳神経では神経細胞の膜電位を脱分極させることでてんかん発作を引き起こすことを明らかにしてきた。今年度はマウス神経芽腫由来細胞 Neuro2a *Itpa* 遺伝子欠損株を用い、ITP 過剰蓄積により細胞増殖がほとんど停止する培養条件を見出した。更にこの増殖抑制に関わる遺伝子の探索を目的として、マウス遺伝子に対する shRNA レンチウイルスベクターライブラリーを導入し ITP 過剰蓄積条件下で増殖が回復した細胞を回収、ゲノム DNA に挿入された shRNA コード配列を解析した。その結果、最も濃縮された shRNA コード配列が標的とする遺伝子 X を同定した。このマウス遺伝子 X に対する shRNA を発現するプラスミドを Neuro2a *Itpa* 遺伝子欠損株に導入したところ ITPA 欠損にも関わらず ITP が蓄積しなかった。続いてこの *Itpa* 遺伝子欠損/X 遺伝子ノックダウン細胞にヒト遺伝子 X を強制発現させたところ細胞中 ITP の顕著な蓄積を認めた、さらに組換え X タンパク質を調製、解析したところ、ITP 生成に必須と考えられる反応を触媒することが確認できた。以上より遺伝子 X の抑制が DEE35 患者の治療につながる可能性が示された。現在 DEE35 モデルマウスを用いて X 遺伝子産物の抑制による治療効果を確認する準備を進めている。

B. DNA, RNA, 遊離ヌクレオシドに対する X 線照射によって生じる修飾プリン塩基の解析

電離放射線照射の核酸に対する影響を網羅的に解析するために、単離 DNA, RNA, および遊離ヌクレオシドに X 線を照射し、プリン塩基部分における修飾産物を中心に HPLC-PDA および LC-MS/MS を用いて定量的に解析した。その結果、プリン塩基損傷が主に水分子への照射で生じる活性酸素との反応が原因と考えられることや、塩基によって DNA 中, RNA 中, 遊離ヌクレオシドで反応性が変わるものと変わらないものがあることがわかった。また産物によっては更に X 線照射による影響を受けて分解してしまうため、比較的安定な産物の方が照射の影響のモニタリングに適していることが明らかとなった。

業績目録

学会発表

1. 土本 大介, 瀧口 友香, 中別府 雄作. (2024/11/29)
イノシン三リン酸生合成経路の解明 (ポスター発表)
第 47 回日本分子生物学会年会, 福岡.