

(第 36 回)
公益財団法人 篷庵社
研究助成発表会
講演要旨集

平成 29 年 7 月 28 日 (金)

於 塩野義製薬株式会社 医薬研究センター

プ ロ グ ラ ム

日 時 :平成 29 年 7 月 28 日(金) 13 時 00 分から 17 時 20 分まで

場 所 :塩野義製薬株式会社医薬研究センター オーデトリウム

* 所属は講演当時のもの

13:00-13:05	ご挨拶 公益財団法人蓬庵社 理事長 武田 禮二	
	<u>演題および演者(講演 25 分、討論 15 分)</u>	<u>座 長</u>
13:05-13:45	1. 不活性結合活性化を伴うリフルオロメチル化反応の開発 柴田 哲男 先生 (名古屋工業大学大学院工学研究科)	(蓬庵社理事) 北 泰行 先生
13:45-14:25	2. 動的活性制御を指向した環境応答型 新規 N-アルキル芳香族アミドの創製 岡本 巖 先生 (昭和薬科大学 薬品化学研究室)	(蓬庵社元理事) 首藤 紘一 先生 代理 大和田 智彦 先生
14:25-15:05	3. 「大学の企業化」による医薬研究開発に対する影響の分析 柴山 創太郎 先生 (Lund University School of Economics and Management)	(蓬庵社理事) 桐野 豊 先生
15:05-15:20	休 憩	
15:20-16:00	4. 筋ジストロフィー、多発性硬化症などの神経疾患に関与する O-マンノース型糖鎖修飾の合成化学的機能解明 比能 洋 先生 (北海道大学大学院 先端生命科学研究院)	(蓬庵社評議員) 西村 紳一郎 先生
16:00-16:40	5. 加齢・生活習慣要因による視床下部機能の変調に関わる 分子機序の解明 香月 博志 先生 (熊本大学大学院生命科学研究部 薬物活性学分野)	(蓬庵社理事) 佐藤 公道 先生
16:40-17:20	6. 《特別研究助成》 蛋白質工学的手法によるサイトカイン-レセプター相互作用の 複雑性の理解とその制御による革新的創薬 角田 慎一 先生 (神戸学院大学薬学部 生体機能制御学研究室)	(塩野義製薬(株) 創薬疾患研究所) 形山 和史 氏

目 次

1.	柴田 哲男	
	「不活性結合活性化を伴うトリフルオロメチル化反応の開発」	1
2.	岡本 巖	
	「動的活性制御を指向した環境応答型 新規 N-アルキル芳香族アミドの創製」	13
3.	柴山 創太郎	
	「「大学の企業化」による医薬研究開発に対する影響の分析」	21
4.	比能 洋	
	「筋ジストロフィー、多発性硬化症などの神経疾患に関与する O-マンノース型糖鎖修飾の合成化学的機能解明」	31
5.	香月 博志	
	「加齢・生活習慣要因による視床下部機能の変調に関わる 分子機序の解明」	42
6.	角田 慎一	
	「蛋白質工学的手法によるサイトカイン－レセプター相互作用の 複雑性の理解とその制御による革新的創薬」	52

不活性結合活性化を伴うトリフルオロメチル化反応の開発

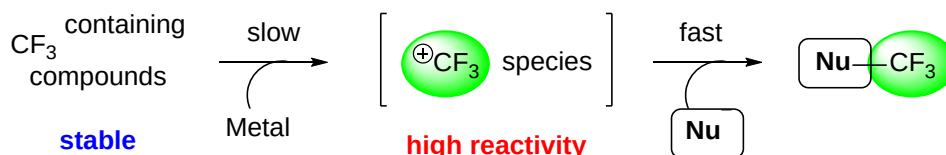
名古屋工業大学大学院工学研究科 柴田哲男

はじめに

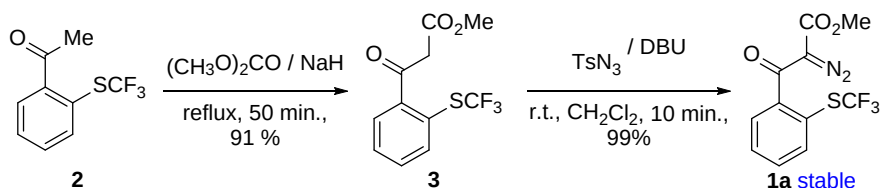
含フッ素有機化合物は、自然界にはほとんど存在しないにも関わらず、医農薬品あるいは液晶化合物などを取り上げた場合その数は極めて多い。現在市場に出ている医薬品の約 30% が含フッ素化合物であると言われていることから、医薬品開発においては、含フッ素有機化合物はなくてはならない存在といえる。しかしその入手法を考えた場合、フッ素化合物の源を天然物に求めるには限度があるため、効率よく人工合成する手法の開発が必然的に強く望まれる。含フッ素有機化合物の合成法の一つとして、入手容易な含フッ素化合物を出発原料としたビルディングブロック法が挙げられる。しかし、フッ素原子のもつ特異な性質から、含フッ素化合物はしばしば通常の有機化合物とは異なる反応性を示し、目的化合物の合成に困難を生じる場合が多い。そこで標的化合物の合成後半において、化合物のねらった箇所に直接的に含フッ素官能基化を行えば、ビルディングブロック法に比べ遙かに効率的で有用であるといえる。本研究では、医農薬分野において特に有用性の高いフルオロメチル基に焦点を当て、新規フルオロメチル化試薬の開発を行った。

1. アリルフルオロメチルチオ化合物による分子間及び分子内フルオロメチル化¹⁾

トリフルオロメチル (CF_3) 化試薬において「安定である」とことと「反応活性が高い」とことは相反する性質であり、これらの両立はしばしば難題とされる。



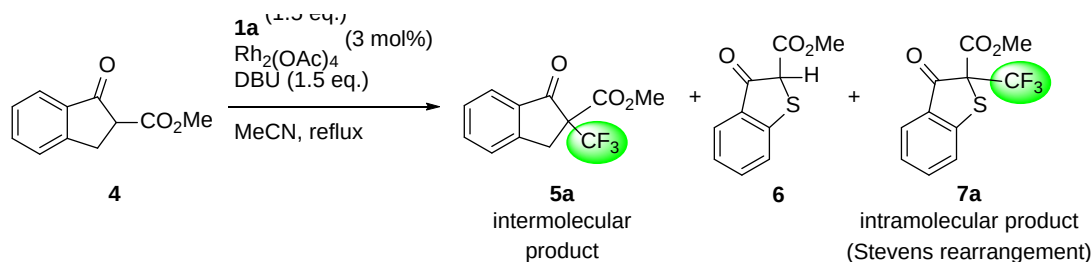
今回我々は安定で取扱い易く、反応性の高い CF_3 化試薬 **1a** を開発した。本試薬は活性の高い CF_3 カチオンを反応系中で発生させることにより、安定貯蔵と反応性を両立させることを見込んで設計したものである。即ちトリフルオロメチルチオ (SCF_3) 基の近傍にカルベノイドを発生させる置換基を導入することで、カルベンの発生をトリガーとして CF_3 基を活性化する。本試薬は、入手容易な含 SCF_3 芳香族化合物 **2** を炭酸ジメチルで処理し、*p*-トルエンスルホン酸を用いアジド化することにより高い収率で合成することが可能である (Scheme 1)。また本試薬は非常に安定であり、室温条件下のみならず、アセトニトリル中で 24 時間還流しても分解を示さない。



Scheme 1

次に本試薬を用いて炭素求核剤に対する CF_3 化反応を試みた。 β -ケトエステルに対し本試

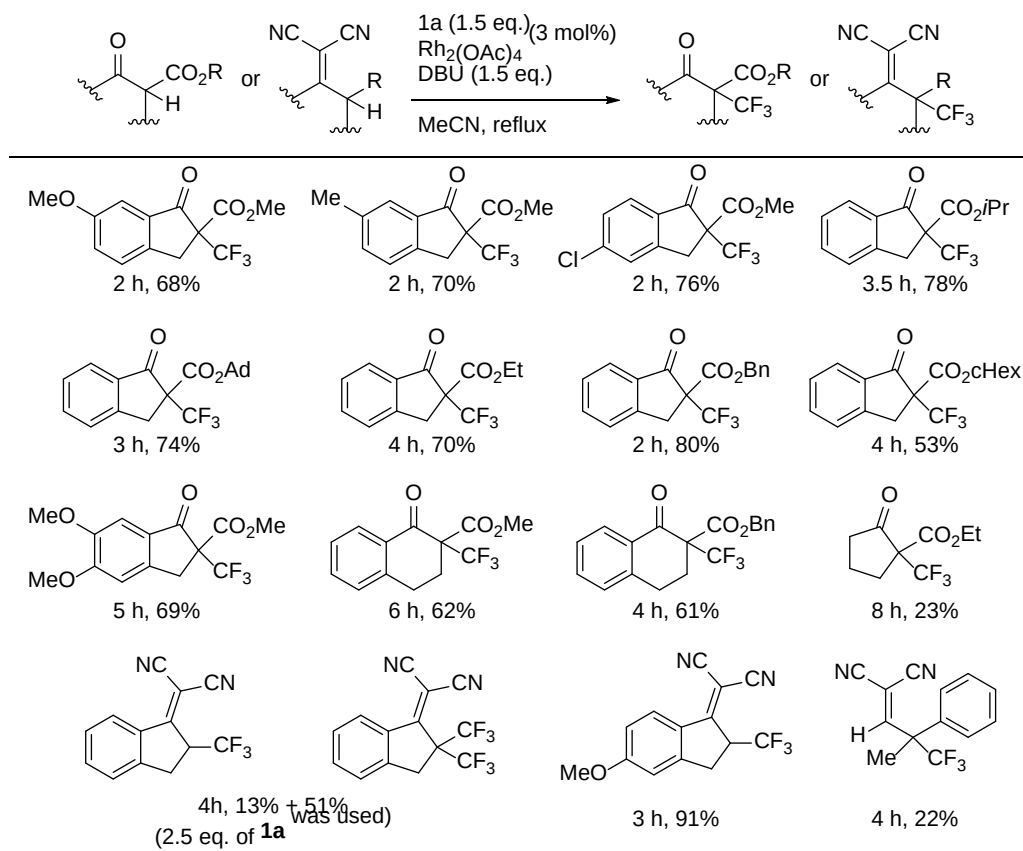
薬と触媒量の $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ を添加することにより、想定通り目的とする CF_3 付加体へと変換された。



Scheme 2

反応条件を詳細に検討した結果、 β -ケトエステル **4** に対し **1a** と DBU を 1.5 等量加え、3 mol% の $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ 存在下アセトニトリル中で還流することにより 84% 収率で目的の CF_3 化体 **5a** を得ることに成功した。また反応の副生成物として 3-オキソベンゾチオフェン化合物 **6** と微量の Stevens 転移反応によって生じる分子内 CF_3 転移体 **7a** が得られた (**Scheme 2**)。なお $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4/\text{DBU}$ 非存在下において **1a** は一切の反応性を示さずそのまま回収された。また β -ケトエステルだけでなくジシアノアルキリデンやシリルエノールエーテルに対しても効率的な CF_3 化反応が進行することが明らかとなった (**Table 1**)。

Table 1



本試薬を用いた CF_3 化反応の推定反応機構を示す (**Figure 1**)。まず **1a** は $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ と反応してロジウムカルベン **A** を生成し、分子内環化により反応性の高いスルホニウム塩中間体

B を形成する。この時の硫黄上の CF_3 基はスルホニウム塩の強力な電子求引作用により電子が欠乏し、カチオン等価体として見なすことができる。ここに求核剤が作用することにより CF_3 化反応が進行する。一方で求核剤と反応せず Stevens 転移反応が生じた場合 **7a** が生成するが、本試薬において Stevens 転移反応はほとんど起こらなかった。

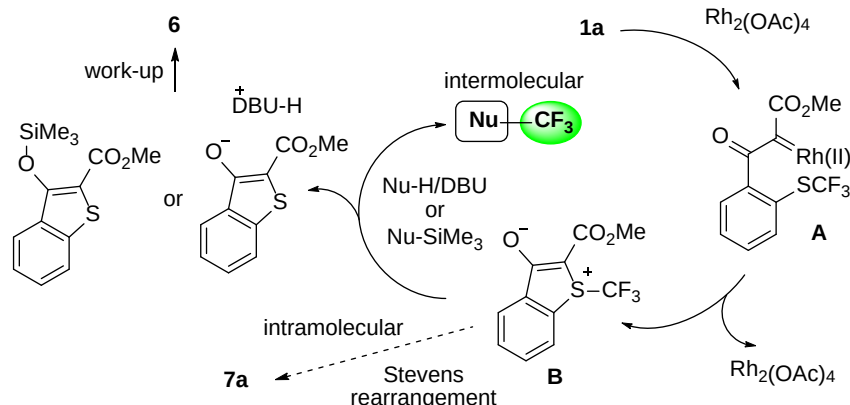
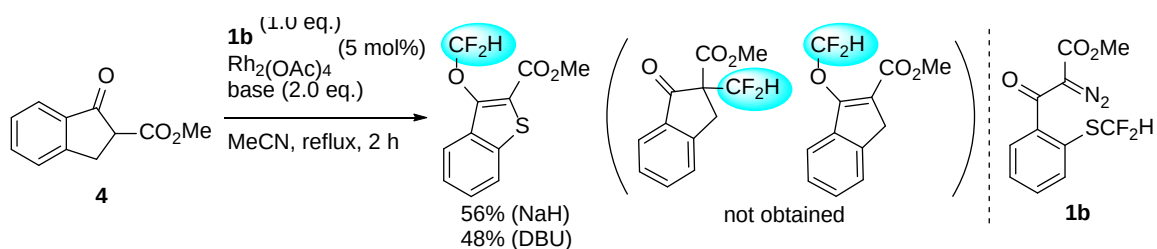


Figure 1

本試薬が Stevens 転移反応を示さないことは非常に興味深い結果である。求電子的 CF_3 化反応は CF_3 カチオンを経由する場合と CF_3 ラジカルを経由する場合があると考えられる。一般的にアンモニウムイリド及びスルホニウムイリドの Stevens 1,2-転移反応の反応機構はホモリシス解離機構であることが知られている。もしこの系において CF_3 化反応がラジカルプロセスを経由している場合、分子間の求電子的 CF_3 化反応よりも Stevens 1,2-転移反応が優先すると考えられる。即ち本試薬を用いた求電子的 CF_3 化反応は CF_3 カチオンを経由すると示唆される。次に我々は同様のコンセプトの下、ジフルオロメチル (CF_2H) 化試薬 **1b** の開発を行った。興味深いことに、**1b** の反応性は **1a** と大きく異なり、分子間 CF_2H 化反応は一切起こらず、分子内反応によって生じた O- CF_2H 環化体 **8** が得られた。また **7a** のような C- CF_2H 環化体も観察されなかった。



Scheme 3

C- CF_2H 環化体でなく O- CF_2H 環化体を得られたことは、特筆すべき差異であり、両者の反応機構が異なることを示唆する。反応機構としては CF_2 カルベンを経由する機構と Stevens 転移反応によるホモリシス解離機構が予測される。以前当研究室では 1,3-ジケトンと CF_2 カルベンを反応させることにより、O-選択的 CF_2H 化体が選択的に得られることを見出している²⁾。もう一つの予想機構はホモリシス解離によって生じた CF_2H ラジカルと酸素ラジカルとの

再結合であるが、O-フルオロメチル化反応がラジカル機構を経て進行する実験結果も得られている^{3,4)}。いずれにせよ論は尽きておらず、さらなる検討が必要である。

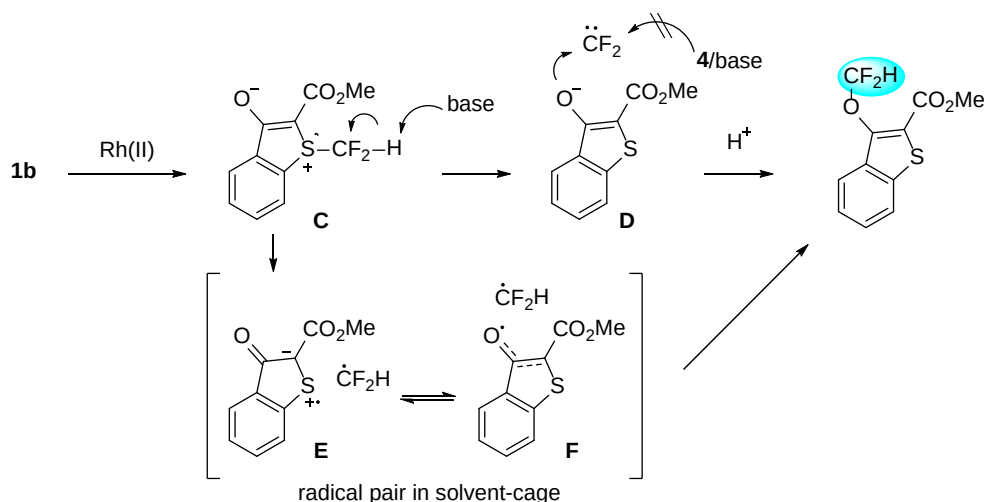
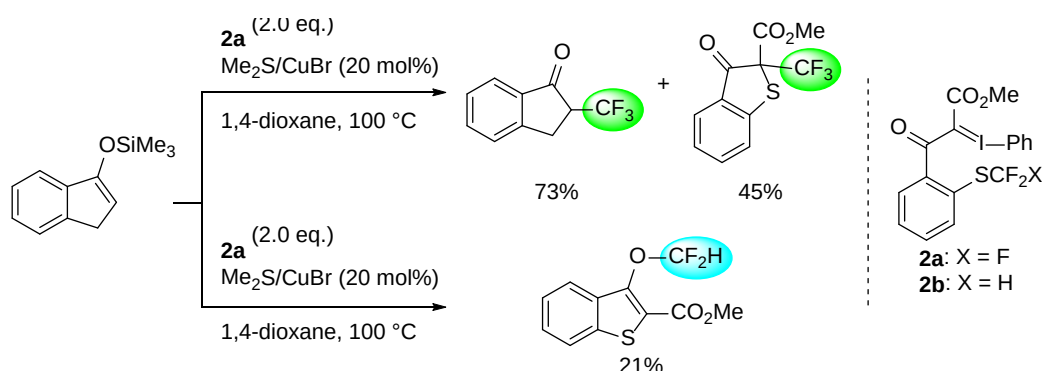


Figure 2

2. ヨードイリド型フルオロメチル化試薬の開発⁵⁾

さらに我々は今回開発したフルオロメチル化試薬 **1a**, **b** の改良を行った。**1a**, **b** はフルオロメチル基を活性化させるため非常に高価なロジウム触媒を用いる必要がある。そこで安価な銅触媒でカルベノイドを発生させることが可能なヨードイリド骨格を有する試薬 **2a**, **b** を開発した。



Scheme 4

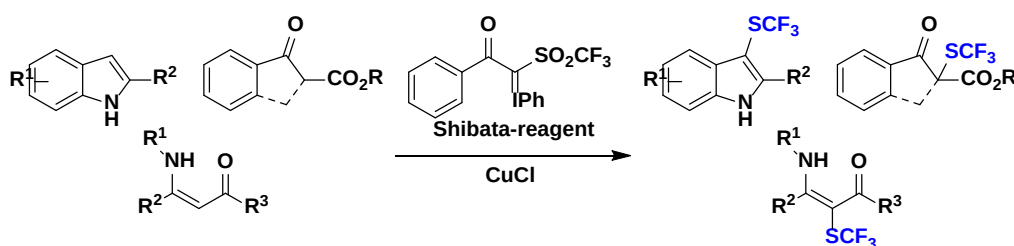
本試薬 **2a** は銅触媒を添加することにより、**1a** と同様にカルベノイド中間体となり、SCF₃基の分子内活性化によって高活性な CF₃ カチオン等価体が発生すると予想される。実際にシリルエノールエーテルを求核剤とし、**2a** と触媒量の臭化銅-硫酸ジメチル存在下 1,4-ジオキサン中で加熱することにより目的とする CF₃ 化反応が進行した。しかしながら **2a** の反応性は低く、効率的に反応を進行させるために 2 等量の試薬を要した。また **1a** の時と同様 Stevens 転移反応によって生じる分子内 CF₃ 転移体が副生成物として観察され、試薬の等量数増加に伴い本副生成物も増加することが確認された。一方で CF₂H 基を有する **2b** は **1b** を用いた場合と同様に分子内反応が優先して進行した (Scheme 4)。反応機構等については **1a** の時と同

様であると予想される。

3. 超原子価ヨードイリド型ジフルオロメチルチオ化試薬の開発⁶⁾

フッ素原子 (F) 及び硫黄原子 (S) は、過去数十年にわたって生理活性化合物の重要な構成要素と認識されてきた。さらに、最近ではトリフルオロメチル基 (CF_3) を含む医薬品、農薬品が増えてきている。これらの事実から、フッ素原子と硫黄原子を同一官能基内に有するトリフルオロメチルチオ基 (SCF_3) が、医農薬品開発において重要な構成要素になると考えられ、様々な導入法が開発されてきた。これに関連して、数年前から、同様に含フッ素硫黄置換基であるジフルオロメチルチオ基 (SCF_2H) が、新たな可能性を有する官能基として注目されるようになった。ジフルオロメチルチオ基は、トリフルオロメチルチオ基に比べて脂溶性が低く、水素原子が弱い水素結合を形成するため、適切な親油性と親水性のバランスを保つことができ、新しい医農薬品開発において大きく寄与することが期待できる置換基である。現在、ジフルオロメチルチオ基の直接的な導入反応は、数例報告されているが、ジフルオロメチルチオ化体の合成の幅を広げるために、新たな試薬、反応の開発が求められる。

我々の研究室では、2013 年に超原子価ヨードイリド型のトリフルオロメチルチオ化試薬の開発に成功しており、エナミン、インドール、 β -ケトエステル、といった様々な求核種への効率的なトリフルオロメチルチオ基の導入に成功している⁷⁾ (Scheme 5)。



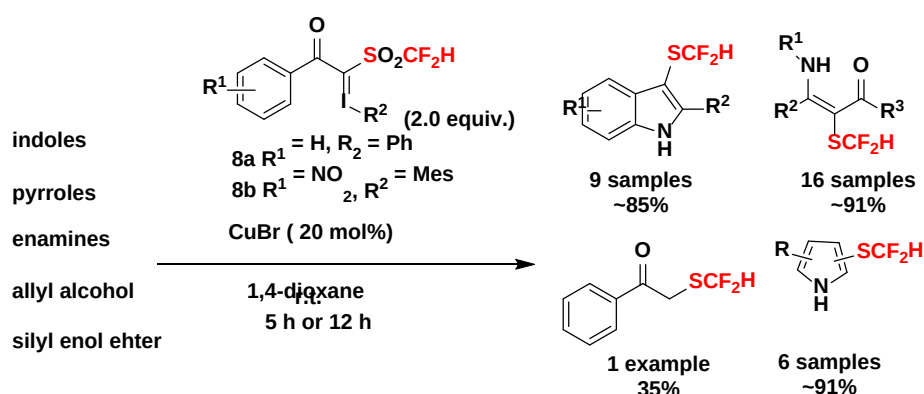
Scheme 5

また、さらなる検討を行い、アミン類、ピロール、アリルシラン、シリルエノールエーテル、アリルアルコール、ボロン酸へと適用範囲を拡大させてきた⁸⁻¹¹⁾。この試薬は、構造中の SO_2CF_3 基が分子内で還元を起こすことで SCF_3 活性種を生成する非常にユニークな反応機構で進行する。この知見をもとに、我々は、 SO_2CF_3 基を $\text{SO}_2\text{CF}_2\text{H}$ 基に変換した試薬を開発することができれば、同様に様々な求核剤に対する直接的な SCF_2H 化試薬の合成が行えると考え、研究を行った。

まず我々は、トリフルオロメチルチオ化試薬に対する知見を利用し、超原子価ヨードイリド型のジフルオロメチルチオ化試薬の合成を行い、実際に試薬 **8a** の合成に成功した。次に、我々は、開発した試薬の反応性を確認するために、エナミン類をモデル化合物として、トリフルオロメチルチオ化試薬に対する知見を利用し、反応条件の最適化を行った。結果、銅触媒として臭化銅(I)，溶媒として 1,4-ジオキサンを用い、室温条件下で効率的にジフルオロメチルチオ化体が得られることを見出した。この条件の下、エナミン類に対して基質一般性

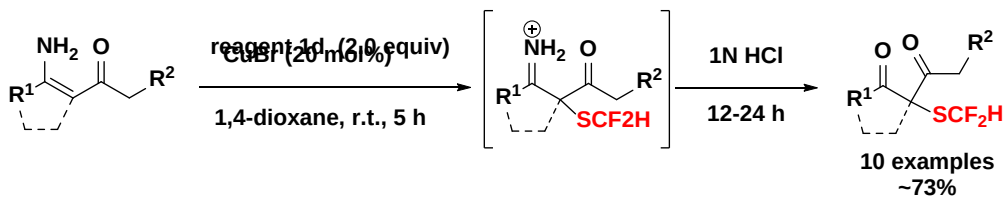
の検討を行ったところ、様々な基質に対して高収率でジフルオロメチルチオ化に成功した。

さらに、我々はピロール類及びインドール類に対しても同様に反応を行った。その結果、インドール類の一部の基質とピロール類において満足のいく収率が得られなかった。この原因が試薬の安定性に起因する可能性が示唆されたため、より安定な試薬 **8b** を合成し、同様に反応を行った。その結果、収率の向上に成功し、また、試薬 **8b** を用いることでシリルエノールエーテルに対しても本試薬が適用可能であることを見出した。さらに我々は、2015 年に発表した、アリルアルコール類へのトリフルオロメチルチオ化反応を参考に、フッ化銅(II)を触媒とし、DMAc 溶媒条件下でジフルオロメチルチオ化試薬とアリルアルコールとを反応させる事で、[2,3]シグマトロピー転移により、ジフルオロメチルスルフィニル化合物の合成に成功した (Scheme 6)。



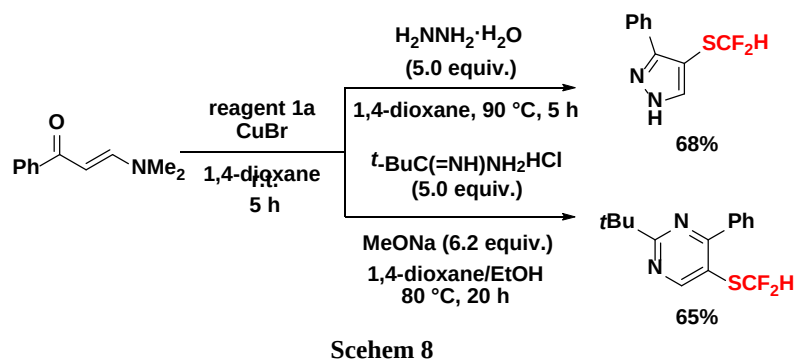
Scheme 6

我々は次に、本試薬がエナミン類に対して高い有用性を示した結果から、エナミン類に対してジフルオロメチルチオ化を行った後に、塩酸で加水分解を行う事で、 α -SCF₂H- β -ケトエステルの合成が効率的に行えるのではないかと考え、実際に反応を行った。結果、ワンポットで高収率に目的化合物の合成に成功した。本手法（エナミン法）は、直接的に β -ケトエステルに対してジフルオロメチルチオ化を行う場合に比べて高い収率で目的化合物を合成することに成功している。加えて、一般的に環状の β -ケトエステルに対して、鎖状の β -ケトエステルは反応性が低いため、これまでに報告されてきた方法では、鎖状の β -ケトエステルへのジフルオロメチルチオ化は報告されていなかったが、本反応を用いることで初めての鎖状 β -ケトエステルへの効率的なジフルオロメチルチオ化を達成した (Scheme 7)。



Scheme 7

さらに、このエナミン法を用いることで、生理活性化合物探索において重要なピラゾール及び、ピリミジン骨格へのジフルオロメチルチオ基の導入を行った。その結果、図のようなエナミンに対してジフルオロメチルチオ化反応を行っ



た後、図中の反応を経由することにより、ワンポットで目的とする化合物の合成に成功した (Scheme 8)。

本試薬を用いたジフルオロメチルチオ化反応の推定反応機構を図に示す。反応機構はトリフルオロメチルチオ化反応と同様の過程を経て進行すると考えており、まず、銅触媒によるカルベン A の生成から開始する。次に、中間体 B,C を経由し、最終的に反応活性種が求核剤と反応することで目的とするジフルオロメチルチオ化体が得られると考えている。SO₂CF₂H 基が、分子内で SCF₂H にまで還元されることで反応活性種を生成するユニークで独自性の高い試薬である (Figure 4)。今後は分子軌道計算を用いることで、さらに詳しく反応機構を解析していく必要がある。

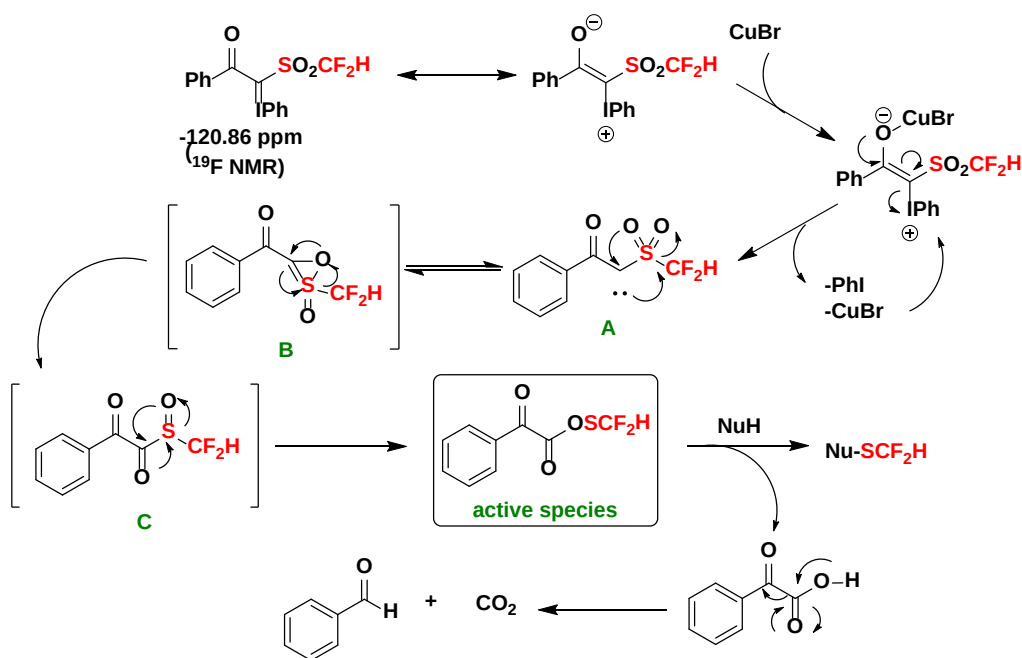


Figure 4

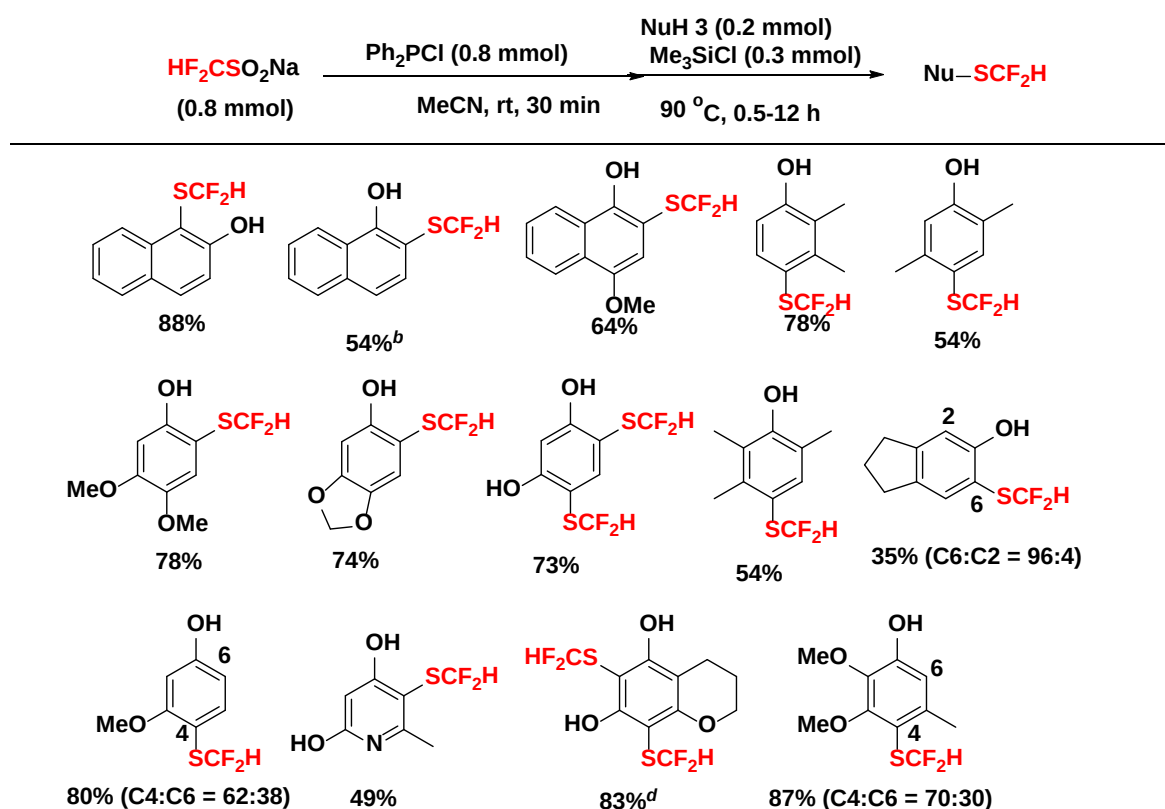
4. フェノール類及び関連化合物へのジフルオロメチルチオ化反応¹²⁾

我々研究室を含め、様々な直接的ジフルオロメチルチオ化試薬が開発され今まで困難であった化合物に対するジフルオロメチルチオ化が達成されてきた。しかし、生理活性物質や天然物中によくみられる、フェノール類及び、ナフトール類に対するジフルオロメチルチオ化の報告例はこれまでになかった。そのうえ、報告されている試薬の合成には多段階の合成ステ

ップが必要である。そこで我々は、容易に合成可能なジフルオロメタンスルフィン酸ナトリウム (NaOSOCF₂H) に注目をした。すなわち、反応系中で転移と還元を起こすことにより、SCF₂H 活性種を発生させ、ジフルオロメチルチオ化を起こす方法である。そこで我々は、還元剤としてホスフィン試薬を用いることで、フェノール類、ナフトール類、その他求核剤に対する高効率なジフルオロメチルチオ化を目指し研究を行った。

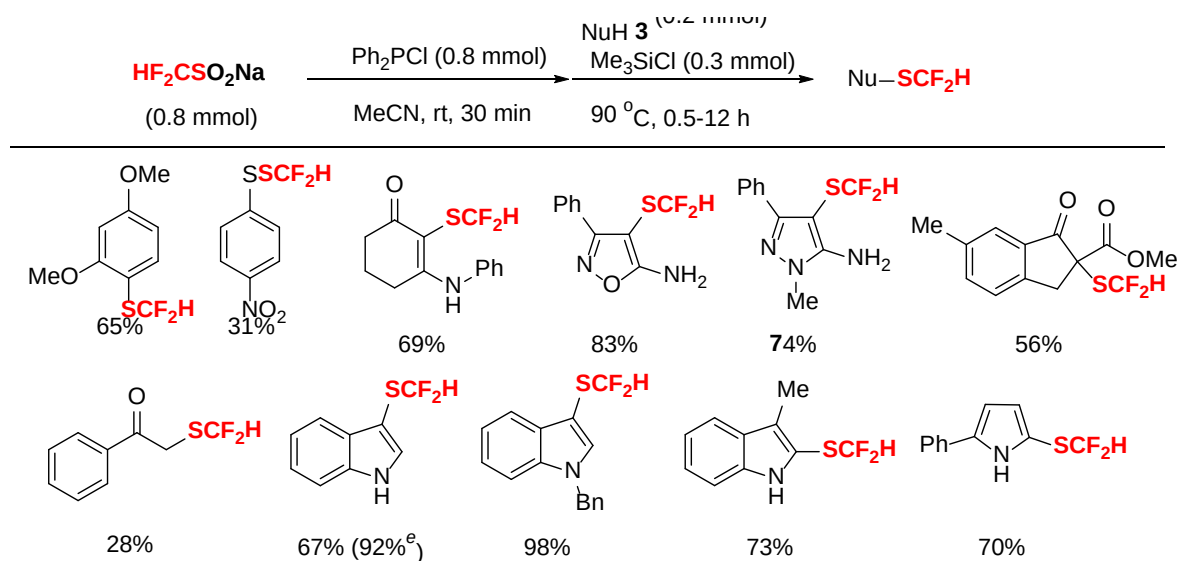
我々はまず、ホスフィン試薬、溶媒、添加剤を種々検討し、最適条件を模索した。その結果、ジフェニルホスフィノクロライド、アセトニトリル、トリメチルシリルクロライドを用いる条件が最適であることを見出した。この条件の下、右図に示すように、フェノール類、ナフトール類に対して基質一般性の検討を行った。結果、様々な基質に対して高収率で反応が進行し、今まで報告例のなかったフェノール、ナフトール類に対して直接的なジフルオロメチルチオ化に成功した (Table 2)。

Table 2



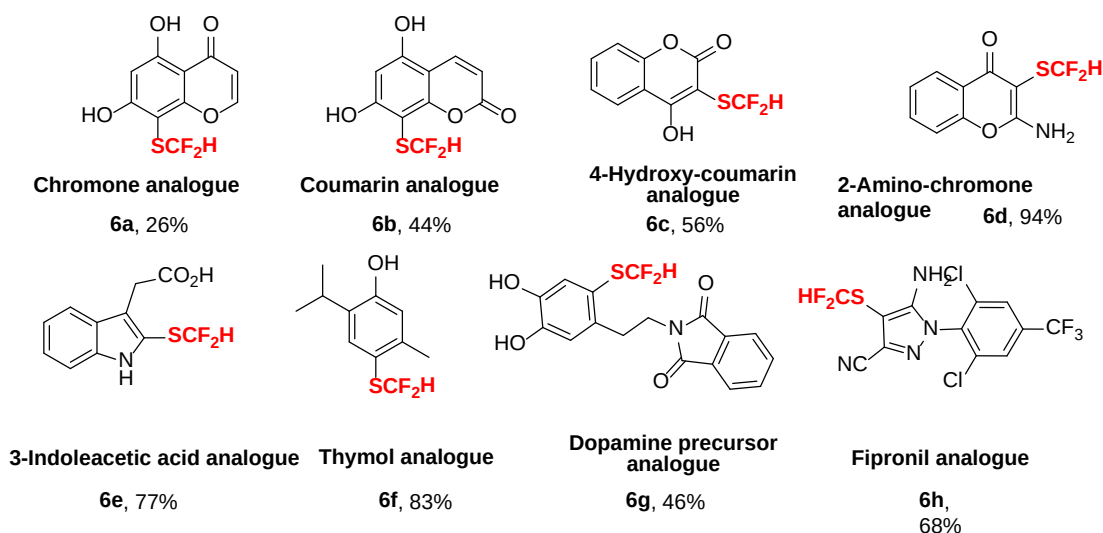
さらに、この反応をベンゼンチオール、1,3-ジメトキシベンゼン、エナミン、5-アミノイソザゾール、5-アミノピラゾール、β-ケトエステル、ケトン類、インドール類、ピロール類といったその他の求核剤に対して行った結果、良好な収率で対応するジフルオロメチルチオ化体の合成に成功した (Table 3)。

Table 3



ジフルオロメチルチオ基は化合物の生理活性を大きく変化させることが期待できる置換基であるため、天然物や薬学的に有用な化合物への直接的ジフルオロメチルチオ化は、重要な分子修飾であると考えられる。そこで、我々は様々な天然物に対して本反応を適用した。その結果、クロモン類、クマリン類、3-インドール酢酸だけでなく、抗真菌活性を示すチモール、ドーパミン誘導体、農薬のフィプロニルに対して直接的かつ効率的にジフルオロメチルチオ化を達成した (Table 4)。

Table 4



現在までに本反応の反応機構は完全に明らかになっていないが、GCMS, LCMS, NMR の測定結果から、右図に示す反応機構を提唱している。反応の始段階はまず、ジフェニルホスフィノクロライド (Ph_2PCI) と、スルフィン酸ナトリウムが反応することによって中間体 A を生成する。次に、分子内転移反応により中間体 B を生成し、 Ph_2PCI によるさらなる還元を受けたのちに反応活性種 C を生成する。この反応活性種が求核種と反応することで、目的物が

得られると考えている (Figure 5)。

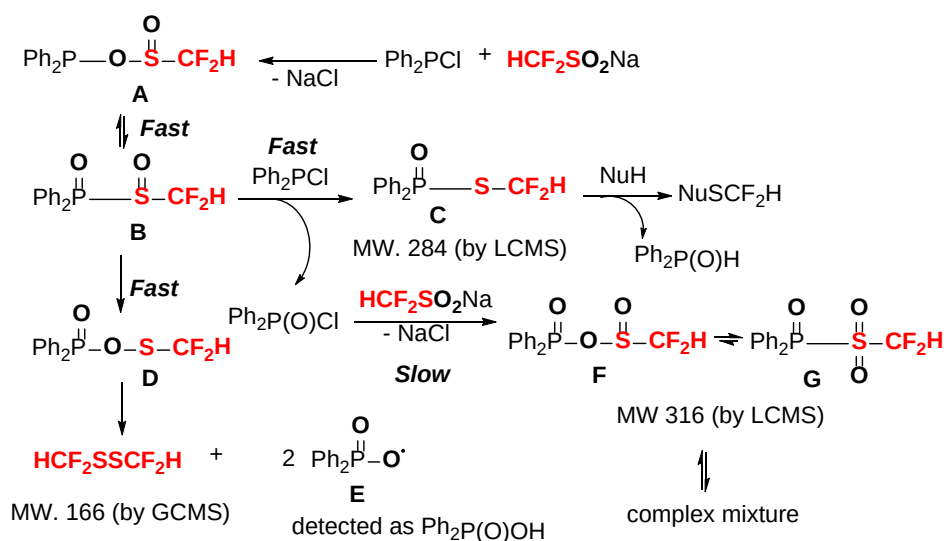


Figure 5

今回報告する二つの研究は、生理活性化合物探索に大きく寄与すると考えられるが、困難であった直接的ジフルオロメチルチオ化を達成しており、非常に有益な成果である。また、天然物への直接的ジフルオロメチルチオ化に成功しており、これからの医農薬品開発において重要な役割を果たすことが期待される。

5. ジアゾニウム型トリフルオロメチルチオ化試薬の応用¹³⁾

最近ジフルオロメチルチオ基に大きな注目が集まっている一方で、依然としてトリフルオロメチルチオ化反応も、トリフルオロメチル基の有用性から注目されている。例えば、トリフルオロメチル基とトリフルオロメチルチオ基は同等の電子求引性を有するが、その脂溶性ははるかにトリフルオロメチルチオ基が大きい。したがって、トリフルオロメチル基をトリフルオロメチルチオ基に変換することで、さらなる活性の向上が期待できる。このような背景から、依然としてトリフルオロメチルチオ化反応の探索は重要なテーマである。

上で述べたように、我々は2013年に超原子価ヨードイリド型のトリフルオロメチルチオ化試薬を報告している。これに関連して、2015年に我々は、試薬の超原子価ヨウ素部位をジアゾニウムに変換した化合物を合成し、金属触媒を用いず、熱によるカルベン生成を行う事で、wolff 転移による SO_2CF_3 を有する β ラクタムの合成に成功している¹⁴⁾。そこで我々は、本反応がジアゾニウムからのカルベン生成を起点としていることから、条件を整えることで、トリフルオロメチルチオ化試薬としても働き得るのではないかと考えた。実際に、金属触媒を用いて反応を行った結果、図のような条件の下、エナミン、インドール、ピロール、ヨードベンゼン類に対して効率的にトリフルオロメチルチオ化を起こすことに成功した (Figure 6)。

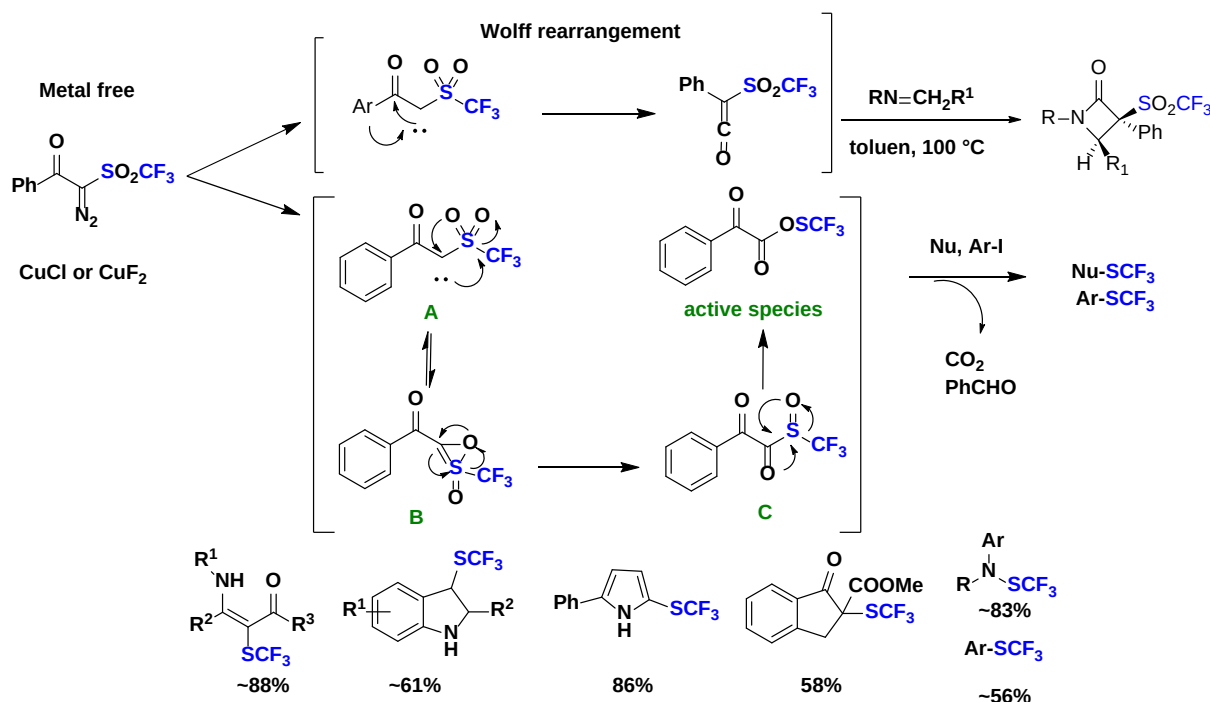


Figure 6

この試薬は、温度、その他条件により、一方ではβラクタムビルディングブロックとして、他方では求電子的トリフルオロメチルチオ化試薬として働く二つの側面を持つユニークな試薬である。現在本試薬のさらなる有用性について調査中である。

7. 参考文献

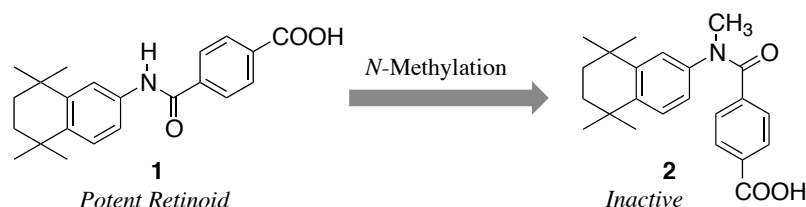
- 1) Saidalimu, I. Tokunaga, E. Shibata, N. *ACS Catal.* **2015**, 5, 4668.
- 2) N. Shibata *et al.*, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 1044.
- 3) N. Shibata *et al.*, *ChemistryOpen*, **2012**, 1, 221
- 4) N. Shibata *et al.*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2014**, 35, 1851.
- 5) N. Shibata *et al.*, *Chin. J. Chem.* **2016**, 34, 485.
- 6) N. Shibata *et al.*, *R. Soc. open sci.* **2016**, 3: 160102.
- 7) N. Shibata *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 8782.
- 8) N. Shibata *et al.*, *Org. Lett.* **2015**, 17, 1094.
- 9) N. Shibata *et al.*, *Asian J. Org. Chem.* **2015**, 4, 525.
- 10) Arimori, S. Takada, M. Shibata, N. *Dalton trans.* **2015**, 44, 19456.
- 11) Arimori, S. Takada, M. Shibata, N. *Org. Lett.* **2015**, 17, 1063.
- 12) N. Shibata *et al.*, *Org. Lett.* **2017**, 19, 934.
- 13) N. Shibata *et al.*, *ChemistryOpen*. **2016**, 5, 188.
- 14) N. Shibata *et al.*, *Org. Lett.* **2015**, 17, 5610.

8. 発表論文

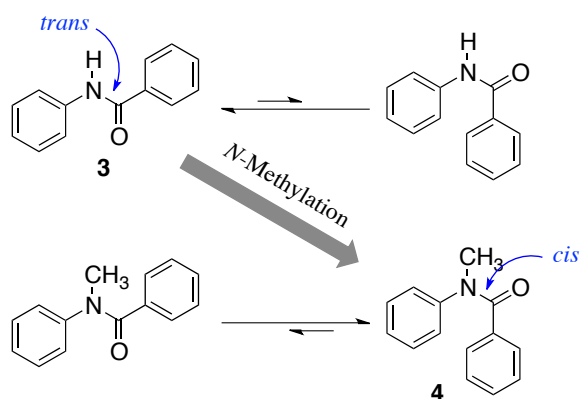
1. Z. Huang, O. Matsubara, S. Jia, E. Tokunaga, N. Shibata, "Difluoromethylthiolation of Phenols and Related Compounds with a $\text{HF}_2\text{CSO}_2\text{Na}/\text{Ph}_2\text{PCI}/\text{Me}_3\text{SiCl}$ System" *Org. Lett.*, **2017**, 19(4), 934-937 (DOI: 10.1021/acs.orglett.7b00113)
2. N. Shibata, "Development of Shelf-Stable Reagents for Fluoro-Functionalization Reactions" *Bull. Chem. Soc. Japan*, **2016**, 89(11), 1307-1320 (DOI: 10.1246/bcsj.20160223)
3. S. Arimori, O. Matsubara, M. Takada, M. Shiro, N. Shibata, "Difluoromethanesulfonyl hypervalent iodonium ylides for electrophilic difluoromethylthiolation reactions under copper catalysis" *R. Soc. Open Sci.*, **2016**, 3(5), 160102 (DOI: 10.1098/rsos.160102)
4. I. Saidalimu, S. Suzuki, E. Tokunaga, N. Shibata, "Activation of Trifluoromethylthio Moiety by Appending Iodonium Ylide under Copper Catalysis for Electrophilic Trifluoromethylation Reaction" *Chin. J. Chem.*, **2016**, 34(5), 485-489 (DOI:10.1002/cjoc.201600029)
5. K. Fukushi, E. Tokunaga, Y. Sumii, T. Kagawa, N. Nagasaki, N. Shibata, "Lewis Acid-Catalyzed Selective Mono-fluorination of Malonates Using Me-NFSI" *Fluorine notes*, **2016**, 2(105) (DOI:10.17677/fn20714807.2016.02.02)
6. Z. Huang, K. Okuyama, C. Wang, E. Tokunaga, X. Li, N. Shibata, "2-Diazo-1-phenyl-2-((trifluoromethyl)sulfonyl)ethan-1-one: Another Utility for Electrophilic Trifluoromethylthiolation Reactions" *ChemistryOpen*, **2016**, 5(3), 188-191 (DOI: 10.1002/open.201500225)
7. S. Okusu, E. Tokunaga, N. Shibata, "Difluoromethylation of Terminal Alkynes by Fluoroform" *Org. Lett.*, **2015**, 17(15), 3802-3805 (DOI: 10.1021/acs.orglett.5b01778)
8. I. Saidalimu, E. Tokunaga, N. Shibata, "Carbene-Induced Intra- vs Intermolecular Transfer-Fluoromethylation of Aryl Fluoromethylthio Compounds under Rhodium Catalysis" *ACS Catal.*, **2015**, 5(8), 4668-4672 (DOI: 10.1021/acscatal.5b00853)
9. K. Matsuzaki, K. Okuyama, E. Tokunaga, N. Saito, M. Shiro, N. Shibata, "Synthesis of Diaryliodonium Salts Having Pentafluorosulfonylarenes and Their Application to Electrophilic Pentafluorosulfonylarylation of C-, O-, N-, and S-Nucleophiles" *Org. Lett.*, **2015**, 17(12), 3038-3041 (DOI:10.1021/acs.orglett.5b01323)
10. S. Arimori, N. Shibata, "Catalytic Trifluoromethylation of Aryl- and Vinylboronic Acids by 2-Cyclopropyl-1-(trifluoromethyl)benzo[b]thiophenium Triflate" *Org. Lett.*, **2015**, 17(7), 1632-1635 (DOI: 10.1021/acs.orglett.5b00164)

1. はじめに

分子スイッチと総称される機能性分子は、外的環境の変化に伴って機能の発現を示し、多くの場合構造変換によってそれを実現している。即ち外的環境の変化によって生じる構造変換は、機能性分子の創製につながる重要な現象である。通常この分子スイッチと呼ばれる化合物では十分なエネルギー障壁を持つ構造変換を用いており、外からの刺激によって初めて構造を変化させる。しかし生体内においては、元々相互平衡にあるコンフォメーションの偏りが外部環境の変化に伴って逆になり、それによって機能のスイッチとしての役割を果たす場合がある。



レチノイン酸様の活性を有する合成レチノイドの開発過程で、アミド結合を有する強力な活性物質 **1** が、アミドの *N*-メチル化という修飾によって活性を失うことが見いだされた (**2**)。これは後に、これはレセプター内部における水素結合能の変化ではなく、*trans* 型構造から *cis* 型構造へという優先コンフォメーションの変換が原因であることが明らかとなった。即ち、常温下では *trans* 型構造と *cis* 型構造とは平衡状態となっており、*N*-メチル化することにより変化するのはその存在比であるが、それによって活性が大きく制御されていた。またこの構造変換は、ベンズアニリド **3** と *N*-メチルベンズアニリド **4** をはじめとする芳香族アミドにおいて一般的な現象であることが明らかとなり、芳香環が近接する独特の立体環境を有する種々の *N*-メチルアミド化合物群が見出された。

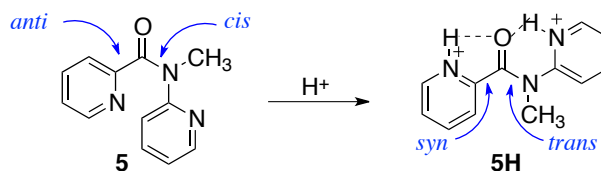


このような立体的に有利なはずの *trans* 型から *cis* 型構造へという変換を、化学修飾という合成的手段で行うだけでなく、周囲の環境変化に対応して引き起こすことができれば、環境変化によって分子の機能制御を動的に行うことができるようになる。このことを目的と

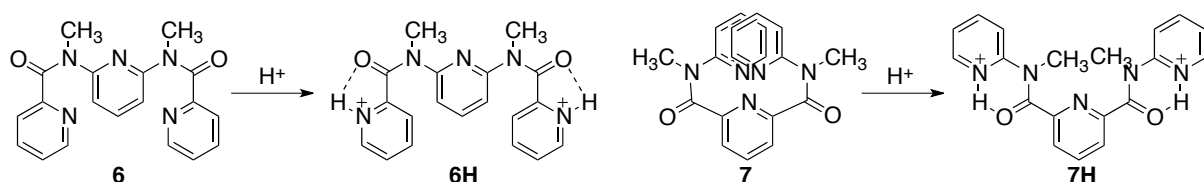
し、環境応答型新規 *N*-アルキル芳香族アミドの創製を目指した。本研究においては、環境応答のトリガーとなり得るピリジンを始めとした種々の芳香環を有する *N*-アルキルアミドを取りあげている。

2. 含ピリジル型 *N*-メチルアミドの構造変換

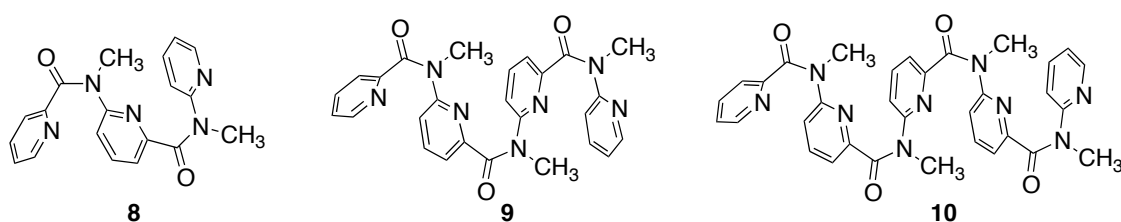
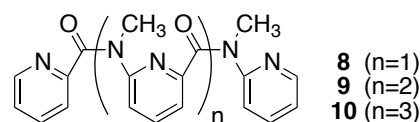
これまでに我々は、芳香環としてピリジン環を有する *N*-メチルアミド化合物が特徴的



な *cis* 型優先構造を示すこと、及び酸によってプロトン化を受ける際に示す基本的な構造変換を見出している¹⁾。即ちピリジルアミド 5 は、ピリジンカルボン酸部分は *anti* 型構造を持ち、アミド結合部分は *cis* 型構造を有する。プロトン化されると (5H) 分子内水素結合を形成するために、*anti* 型構造は *syn* 型へと、また *cis* 型構造から *trans* 型構造へ変換される。ピリジン環の 2,6-位で構造を伸張した場合、末端のピリジンにプロトン化されることで、末端部分の構造がまず変換され、酸度を高くすることで更に構造変換が進む。

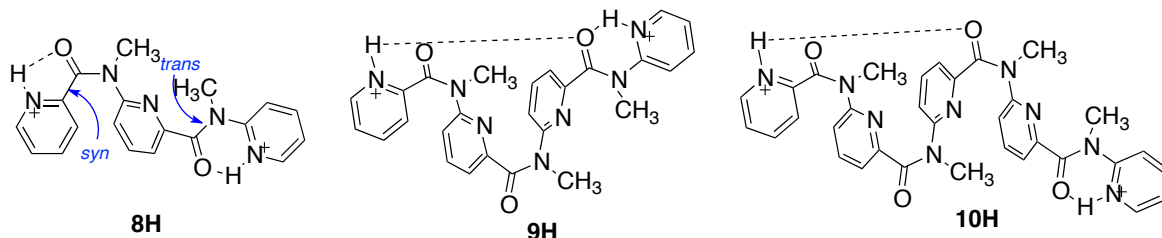


このように基本的な構造単位の手動が明らかな場合にも、大きな構造へと伸張した場合に新たな挙動を示すことがあり²⁾、head-to-tail 型に伸張したピリジルアミド化合物 8-10 を合成し、その構造変換を検討した³⁾。



立体構造を解析したところ、これらは特徴的な *cis* 型構造をとり、分子全体をみるとジグザグ型のコンフォメーションをとっていることが分かった。ここにトリフルオロ酢酸 (TFA) を添加することで、酸性条件にした場合の構造変換を見ることができる。どの長さの場合にも、両末端のピリジン環にプロトン化されており、長さが短い 8H の場合には、それぞれのアミド結合周辺でピリジルアミド特有の構造変換を生じることのみが確認された。長さを伸張した 9H, 10H の場合には、この構造変換に加えて分子内で水素結合を形成することによるフォールディングが確認された。ピリジンを有するオリゴアミドのフォールディングは一般

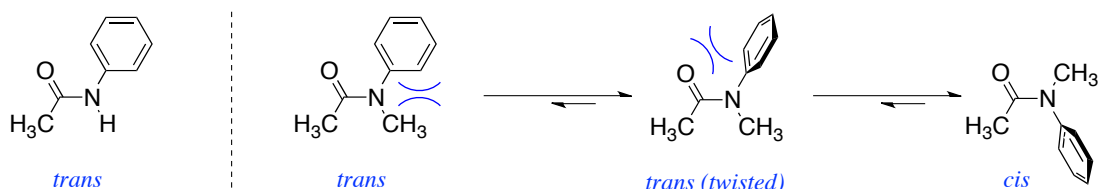
的に取り上げられることが多いが、ほとんどの場合にはアミド *N*-H とピリジン N との間で形成する水素結合が主体であり、このような形でフォールディングを示す例はあまり見られない。



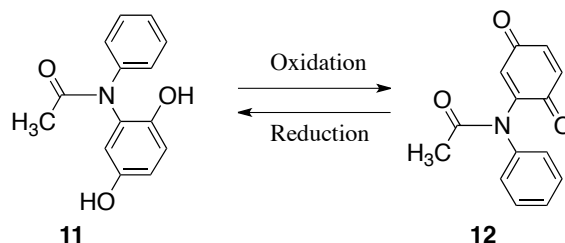
このように、オリゴマーとして分子構造を大きくしていくことで、基本構造単位的环境応答に加え、ある程度の大きさになってはじめて発現する大きな動きを作り出すことができる。

3. *N,N*-ジアリール型アミドによる分子スイッチ

そもそも *N*-メチルアミドが *cis* 型構造を示す要因としては、次のように考えられる。



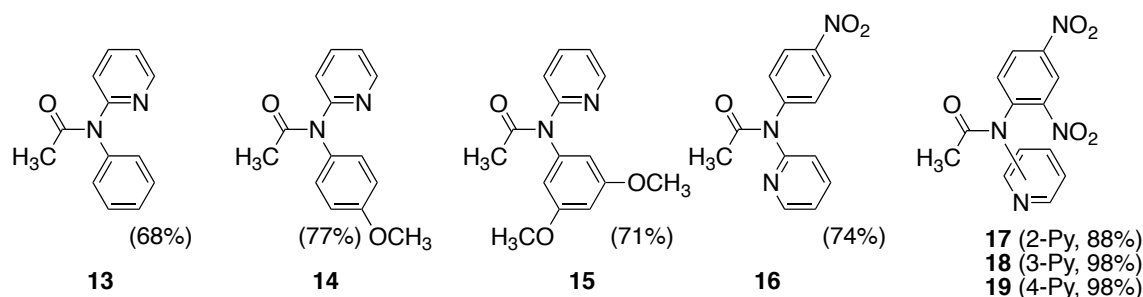
N-H 型の芳香族アミドでは、アミド結合と芳香環との平面性を保ちつつ立体的に有利な *trans* 型構造が優先されることは当然のこととして理解されるが、*N*-メチル化することによりこの *N*-芳香環部分の平面性が崩れ、カルボニル酸素と芳香環 π 電子との反発が無視できなくなってくる。その結果、芳香環が酸素と反対側を向いた *cis* 型構造が有利であると理解できる。このことを基に、我々は以下のような *N,N*-ジアリール型アミドの構造変換をこれまでに見出している⁴⁾。即ち酸化還元反応によって可逆的に相互変換可能な **11**, **12** は、アミド窒素上にある2つの芳香環の相対的な電子密度が逆転していると考えられる。結果として周辺の酸化状態を変化させることで可逆的に構造変換を行うことが確認できた。この一般化を目指し、*N,N*-ジアリール型アミドの構造展開を行った。



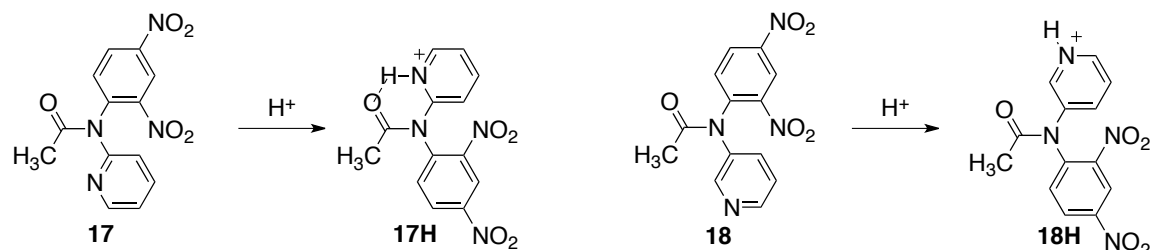
3.1 *N*-アリール-*N*-ピリジル型アミド

まず始めに、芳香環として環境応答部分となりうるピリジンを直接導入した、*N*-アリール-*N*-ピリジル型アミドをデザインした⁵⁾。これらのアミド **13**-**16** は低温にて ^1H NMR 測定を行うことにより溶液中でのコンフォーマー比が求められた。

13 において2つの芳香環であるピリジンとベンゼンとに着目すると、ピリジンがカルボニル酸素と近い側に位置しているものが68%、逆向きが32%であった (CD_2Cl_2 , -90°C 、以下同条件下における存在比を示す)。ベンゼン環にメトキシ基を導入して電子豊富な状態にした場合、同様のコンフォマーの増加が認められ、ニトロ基を導入するとベンゼン環がカルボニル側へと反転した。これらの知見を基に、ベンゼン環がカルボニル側に位置する 2,4-ジニトロ体 17-19 を合成したところ、これらは全てピリジン環がカルボニル酸素と反対側にあるものが優先コンフォマーであることが確認された。



これらのアミドに酸として TFA を添加した。2-ピリジルアミド 17 および 3-ピリジルアミド 18 は共に反転してピリジン環がカルボニル側に位置するコンフォメーションをとる。2-ピリジル体 17 の場合には分子内水素結合を形成することが考えられ、従来の酸による反転と同様の動きであると考えられる。一方で 3-ピリジル体 18 ではピリジン環の電子状態が変化することにより、ジニトロベンゼンよりもピリジン環がカルボニル基に近い方が有利になるためと考えられる。

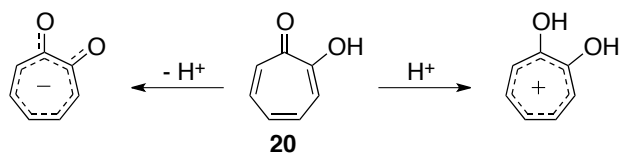


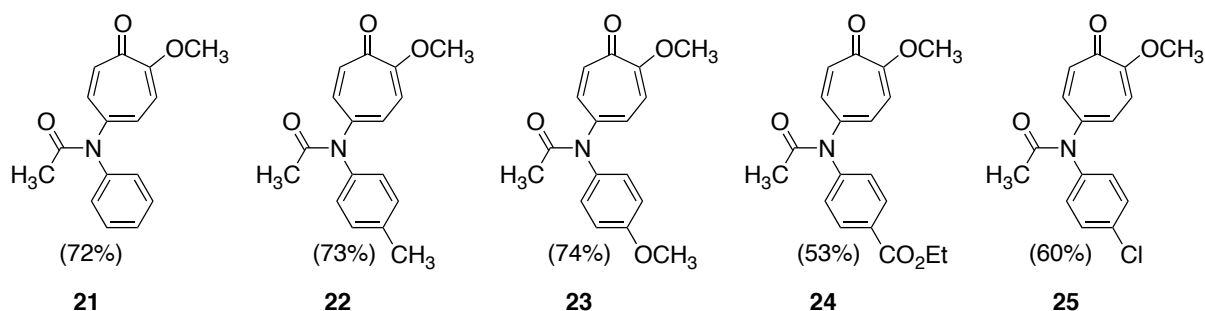
このようにピリジン環は直接的に酸との反応因子として応答するため、対になる芳香環を適切に選択することで、その構造変換を効率よく行うことが可能である。

3.2 *N*-アリアル-*N*-トロポニル型アミド

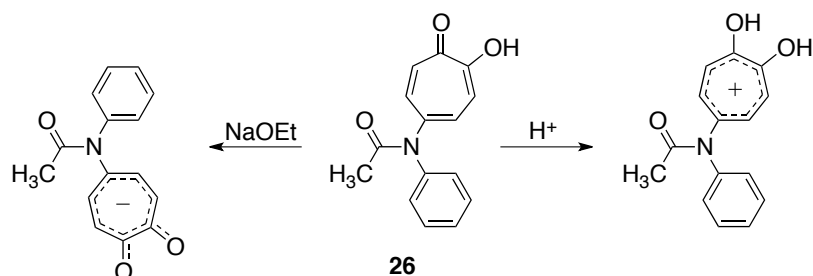
次に酸及び塩基によってコントロールできると考えられる、トロポロン 20 をアミド

窒素上に導入したジアリアル型アミドについて検討した⁶⁾。トロポロンは Brønsted 酸に対しては塩基として、また一般的な塩基に対しては酸として働くために、環境応答部分構造として期待される。





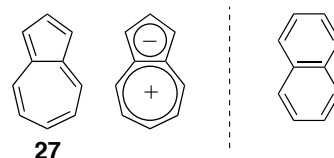
ベンゼンと *O*-メチルトロポロンを窒素上に導入した **21** では、トロポロンがカルボニル側に位置するコンフォメーションとなった。ベンゼン環に置換基を種々導入した場合、その置換基に応じた存在比の増減を示し、芳香環の電子状態に応じて立体構造が決まっていることが示唆された。



N-アリール-*N*-トロポニル型アミド **26** に塩基を加えると、立体構造が反転し、トロポロンがカルボニルと反対側に位置する構造となった。この時点でトロポロン部分は酸塩基反応によりアニオンとなり、その為 **26** と比べて電子豊富になっている。その結果としてこのような構造となったと考えられる。一方で酸を添加した場合には、トロポロン環は更に電子不足となり、優先コンフォメーションはそのままで存在比が増加するという結果になった。ここでも酸性度を連続的に変化させることでの構造変換が可能であること、及びアミド **26** へ適切に選択した置換基を導入することで、更に構造を制御できる可能性を示した。

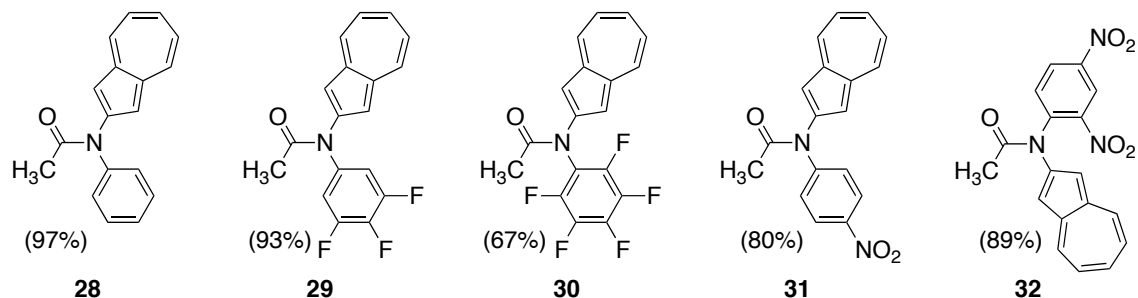
3.3 *N*-アリール-*N*-アズレニル型アミド

芳香環であり、その電子状態が興味深い例として、アズレンを取り上げた。アズレン **27** はナフタレンの構造異性体である芳香族化合物であるが、分子内に極性があることが大きく異なり、5員環側が負の、7員環側が正の性質を持っていると考えられる。

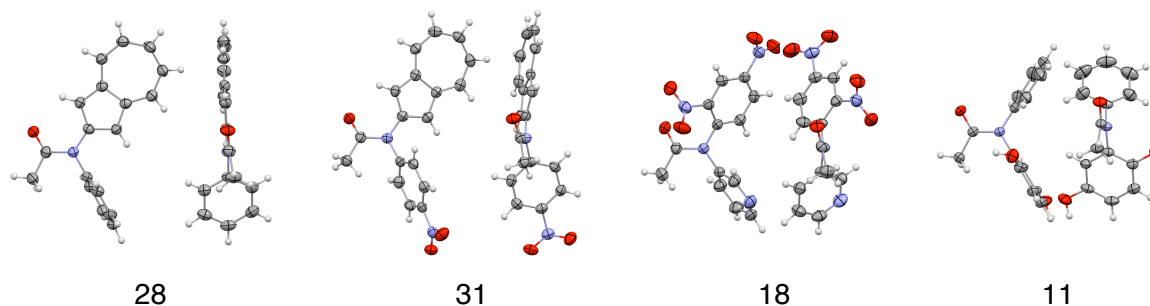


実際に構造を調べてみると、ベンゼンとアズレン2位とが置換した **28** において、アズレンがカルボニルと同じ側の位置をとっている構造がほとんどであった。ベンゼン環に電子吸引性の置換基を導入するとその存在比は徐々に減少するが、2,4-ジニトロ体 **32** となって初めてベンゼン環がカルボニルの側に位置する。芳香環の電子状態だけ考えると、これらは他の

ジアリール型アミドの一般的な傾向とは異なる結果となった。即ち、マイナスに帯びていると考えられるアズレン5員環が、カルボニル酸素と近い位置をとるコンフォメーションが優先されている。



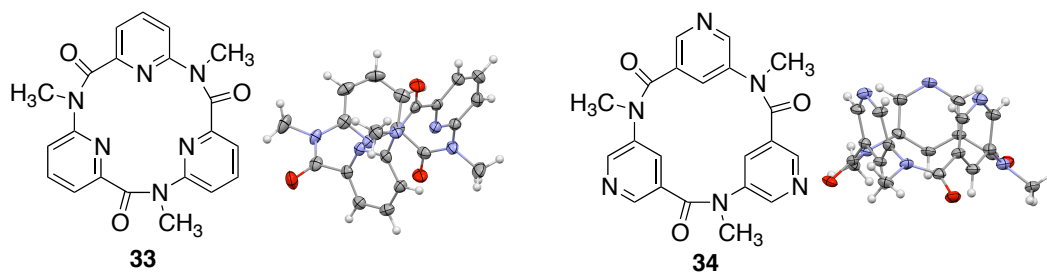
この傾向の主たる要因は、*N*-アズレンの立体的特徴にあると考えられる。28 および 31 の結晶構造は以下に示したとおりで、溶液中における構造と同様にアズレンがカルボニルと同じ側を向いた構造をとっている。しかし 18 等の結晶構造と大きく異なる傾向が見られる。即ち、アズレン部分がアミド平面とほぼ同一の平面上にある構造を有している。これはジフェニル型のアミドの一般的な立体構造とは異なるものであり、これによってカルボニル酸素と芳香環 π 電子との反発が有効に作用していないことが考えられる。しかしベンゼン環は通常と同じようにアミド平面からずれた立体構造をとっているため、ジニトロ体となった時点で立体構造が反転している。



アズレンを有するアミドの立体化学は更に検討中であるが、このように特徴的な立体構造特性を示し、他の芳香環とは異なる挙動を示すという結果が得られている。

4. 大環状含ピリジル型 *N*-アルキルアミドの構築

芳香環が近づいた構造をとる *cis*型アミド化合物は、その折り返した構造単位を利用して、らせん状分子や大環状分子の構築に適している。我々はこれを利用し、含ピリジル型大環状アミドをデザインした。



最小単位となる3量体の合成を行うと、2,6-置換ピリジン誘導体 **33** と 3,5-置換ピリジン誘導体 **34** とで異なる立体構造を示した。即ち 2,6-置換型大環状アミドでは芳香環が上下を向いた alternate 構造をとっている一方で、3,5-置換型大環状アミドでは、芳香環が全て同じ方を向いた cone 構造をとっている。

このように、同じ構造の繰り返しで作り上げている分子であるが、大環状とした場合にはその環の種類によって全く異なる挙動を示している。

5. おわりに

特徴的な *cis* 型構造を有する *N*-アルキル芳香族アミドにおいて、芳香環をトリガーとした環境応答型分子の創製を目指して種々の化合物の立体構造を検討してきた。ピリジンカルボン酸をはじめとするアミド構造を基本構造単位とすることで、より大きな分子の可動部分として有効に作用させることができる、という一連の結果を示した。また一方で分子構造が大きくなって初めて発現する特性も認められ、芳香族アミド化合物が創り出す立体構造が興味深いものであることが分かる。これらは更なる分子や超分子への発展が期待されるものである。

謝辞

本研究の一部は、公益財団法人蓬庵社研究助成によるものであり、ここに厚く御礼申し上げます。またご推薦を賜りました首藤紘一先生に心より感謝申し上げます。

これらの研究成果は昭和薬科大学 山崎龍准教授および伊藤愛助教との共同研究であり、また一部のX線結晶構造解析は東邦大学薬学部 東屋功教授、千葉大学共用機器センター 榎飛雄真准教授との共同研究であり、ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Okamoto, I.; Terashima, M.; Masu, H.; Nabeta, M.; Ono, K.; Morita, N.; Katagiri, K.; Azumaya, I.; Tamura, O. *Tetrahedron* **2011**, 67, 8536-8543.
- 2) Okamoto, I.; Nabeta, M.; Hayakawa, Y.; Morita, N.; Takeya, T.; Masu, H.; Azumaya, I.; Tamura, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1892-1893.
- 3) Yamasaki, R.; Fujikake, S.; Ito, A.; Migita, K.; Morita, N.; Tamura, O.; Okamoto, I. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 56-59.
- 4) Okamoto, I.; Takahashi, Y.; Sawamura, M.; Matsumura, M.; Masu, H.; Katagiri, K.; Azumaya, I.; Nishino, M.; Kohama, Y.; Morita, N.; Tamura, O.; Kagechika, H.; Tanatani, A. *Tetrahedron* **2012**, 68, 5346-5355.
- 5) Ito, A.; Fujino, H.; Ushiyama, K.; Yamanaka, E.; Yamasaki, R.; Okamoto, I. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 4737-4741.
- 6) Ito, A.; Sato, M.; Yamasaki, R.; Okamoto, I. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 438-441.

「大学の企業化」による医薬研究開発に対する影響の分析

東京大学大学院薬学系研究科 柴山 創太郎

1. はじめに

医薬品研究開発においては従来より「産」・「学」の連携が強固なことが知られている。一般的に大学の機能は研究と教育に分けて考えることができるが、医薬品企業は大学の生み出す「知識・技術」そして「研究者人材」の移転を通じて両機能に強く依存している。

直接的社会貢献、説明責任の明確化を念頭に置いた近年の科学技術・学術政策は、この連携を更に強化し、学から産への技術・人材の移転の一層の促進を目指すものであり、医薬品産業の振興に資すべきものであるが、現実には各種政策が十分な効果を齎しているとは言えず、むしろ副作用が指摘されるケースも存在する[1]。とりわけ「大学の企業化」と呼ばれるトレンドに見られる応用研究の偏重、商業活動への積極的関与、外形的指標に基づく評価制度や競争環境の激化は、従来の学術規範との対立を招く可能性や、近視眼的な研究を助長する可能性が指摘されている[2, 3]。

かかる現状を踏まえ、本研究では医薬分野を含む生命科学分野の実証データを用いて、産学間の関係を取り巻く政策・環境変化の影響を、特に①知識・技術的側面(研究)と②人的側面(教育)の両面から分析し、将来的な科学技術・学術政策の検討材料とすることを目的とした。具体的に①については、知識・技術の共有様式や大学教員の意識に生じた変化を、②については、大学院教育における研究者養成の様式、輩出される研究者人材に生じた質的变化を分析する。

2. 方法・データ

本研究では、各種二次データに加えて、著者らが独自に実施したフィールド調査データを使用した。フィールド調査では、日本の主要研究大学 50 大学の薬学系及び生命科学系大学院に所属する教員を対象として4回の質問表調査を実施し[4, 5]、合計約 2000 名の教員から回答を得た。二次データとしては、論文書誌情報(Web of Science・SCOPUS)、科学研究費助成事業(国立情報学研究所)、Researchmap(科学技術振興機構)、博士論文書誌情報(国会図書館・各大学)等の各種データベースから必要データを取得し、質問表調査データと接続して独自データベースを構築した[6]。また一部分析においては比較のために米国データを用いた。

3. 大学の企業化と大学研究を取り巻く環境変化

近年の大学を取り巻くマクロ環境を見ると、1995 年施行の科学技術基本法に始まり、大学等技術移転促進法(1998 年)、産業活力再生特別措置法(日本版バイドール法・1999 年)、知的財産基本法(2003 年)等、法制面の整備が急速に進んだ。これらと合わせて国立大学法人化(2004 年)、大学評価の本格化、競争的研究資金への財源の移行等も進展し、大学のガバナンスは転換期を迎え、大学教員を取り巻く環境は重大な変化を見た。

産学連携強化の政策目標と整合する形で、1990 年代より大学による特許出願やライセンス活動の増加が報告されている[7]。学術研究の内容を見れば、このトレンドと合わせて基礎研究から応用研究へのシフトが起きていることが分かる(図 1)。

大学教員個人のレベルで見ても 2009 年時点で 4 割前後の教員が商業的活動、民間からの研究費獲得、特許出願に関与している(図 2a)[8]。これは 2003 年時点の米国と同程度の水準にある[3]。また、産学連携・商業的活動への関与の程度は研究分野間で異なり、特に薬学分野では半数程度の大学教員が何らかの方法で産業と連携している(図 2b)。さらに最近 10 年程度の間産学連携活動に関与する教員の比率が増加していることも確認できる(図 2c)。

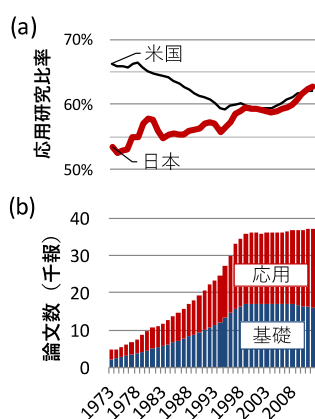


図1. 学術論文に占める応用研究
(a) 応用研究比率(日本vs.米国). (b) 日本の出版論文に占める応用・基礎研究論文数の推移. Web of Scienceより生命科学分野の論文を取得し、著者所属組織の所在国及び雑誌分類(Subject category)を元に論文を分類した。

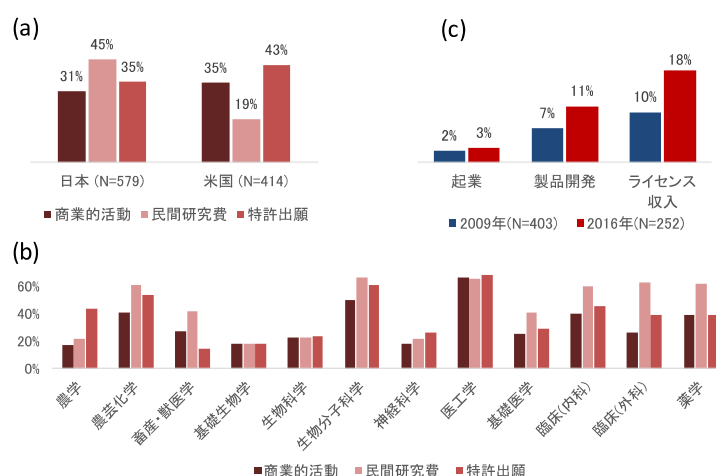
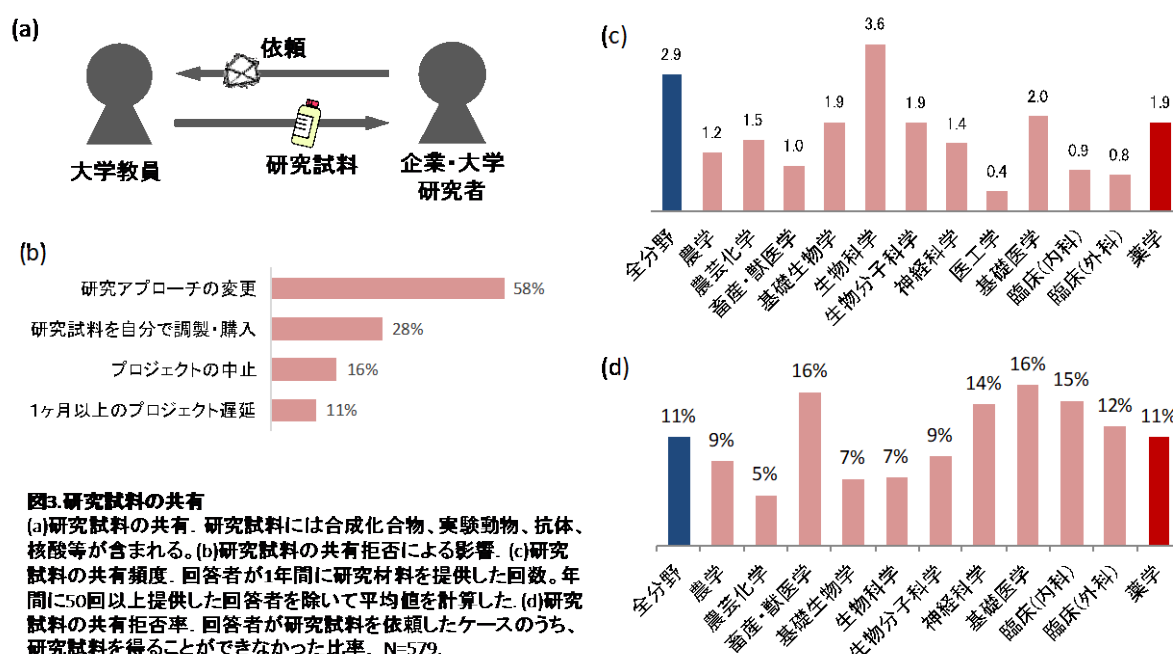


図2. 産学連携・商業的活動に関与する大学教員
(a)生命科学分野全体(日米比較). 米国データはWalsh et al.(2007)に基づく. 日本:2009年、米国:2003年データ. 商業的活動は起業、製品開発、ライセンス収入、ビジネスプラン作成等を含む. (b)分野比較(日本). 分野は科研費2桁コードに基づく. (c)経時変化(生命科学全体・日本). **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

4. 知識・技術の共有(技術的側面)に対する影響の分析

4.1. 研究試料の共有

前項で述べた環境変化が大学教員の知識・技術移転に関する意識・行動に与えた影響を分析する目的で、本項では知識・技術移転の代表的形態である「研究試料の提供(マテリアル・トランスファー)」に着目した。生命科学分野では、研究室間あるいは産学間で様々な研究リソースが共有されており、研究開発の迅速化に貢献している(図 3a)。中でも化合物、核酸、抗体などの「研究試料」は 1 研究者あたり年間 3 回程度の頻度で共有されている。薬学分野でも年間 2 回程度と生命科学分野内では中程度の頻度で共有が行われている(図 3c)。大学研究の公的位置付けを反映して、研究試料の依頼が拒否されることは頻繁ではないが、11%のケースで研究試料の提供依頼が拒否されていることが確認された(図 3d)。提供の拒否は様々な形で研究の進行に影響を及ぼし、プロジェクトの中止や大幅な遅延を余儀なくされる場合もある(図 3b)。



米国における類似統計と比較したところ、提供頻度に関して大きな差異は見出されず、また拒否率に関しても 20 年前の時点と同水準にあることが分かった[3]。米国ではその後 5 年間に拒否率が 10% から 20%弱にまで有意に増加しており、この時期は米国において大学の企業化が進展した時期と重なることから、その副作用が疑われる契機となった。実際、商業的活動に関与する大学教員とそれ以外の教員を比較すると、前者において有意に試料共有の拒否率が高いことが複数の研究により指摘されている[3]。

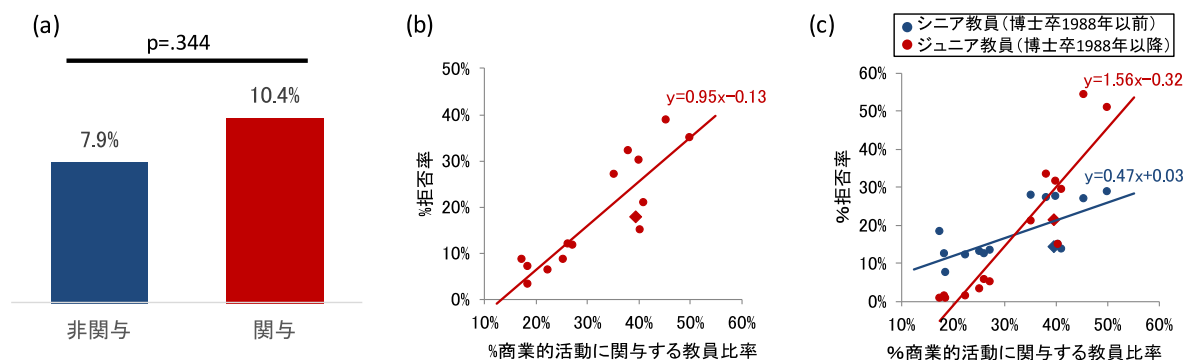


図4. 研究試料の共有拒否

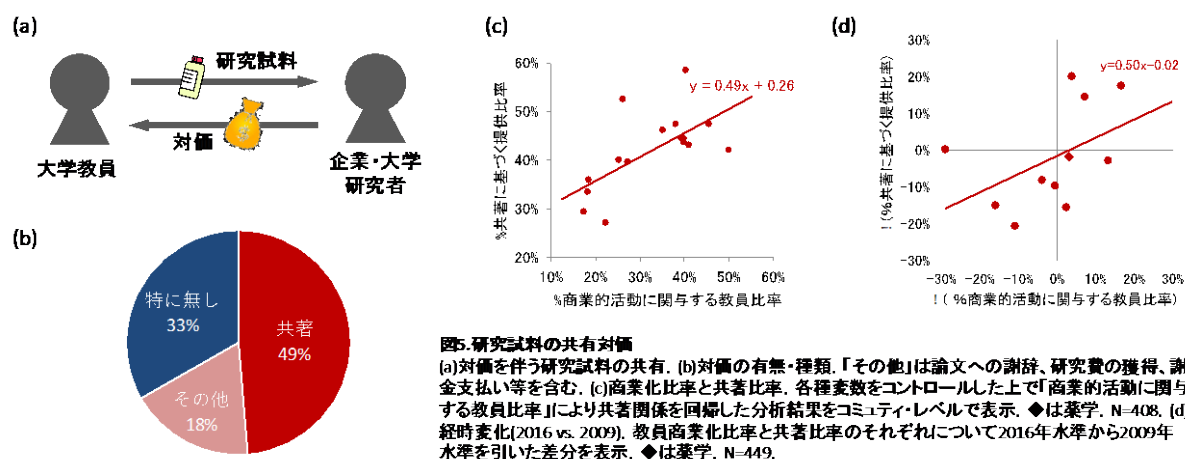
(a) 商業的活動による直接的影響. 商業的活動への関与している教員群と関与していない教員群により研究試料の共有拒否確率を比較した. (b) コミュニティ(研究分野)レベルでの商業的活動の影響. 各種変数をコントロールした上で「商業的活動に関与する教員比率」により共有拒否を回帰した分析結果をコミュニティ・レベルで表示. ◆は薬学. (c) 世代間比較. シニア教員群とジュニア教員群の2群に分けて(b)同様の分析を行った. ◆は薬学. N=412.

日本においても同様の問題が懸念されたが、現時点では統計的に有意な影響を観察することはできていない(図 4a)。しかし、生命科学内の研究分野を比較すると、拒否率に大きな差異が存在していることから(図 3d)、研究者個人による商業的活動への直接的関与の有無に関わらず、研究コミュニティ内での商業的活動の活性化が研究者の行動規範に影響している可能性が考えられた[2, 5, 9]。そこで商業的活動の活発な分野と低調な分野を比較してみると、商業化率の高い分野において拒否率が有意に高いことが確認された(図 4b)。さらに、この観察の背景にあるメカニズムを理解するために、サンプルを二分割して、大学企業化政策の導入前に学位を取得した教員群(シニア教員)と導入後に学位を取得した教員群(ジュニア教員)を比較した。その結果、商業化率と拒否率の相関は、ジュニア教員群において有意に高いことが確認された(図 4c)。薬学分野ではシニア教員の拒否率は 10%程度であるが、ジュニア教員の拒否率は 22%に上る。ジュニア教員の方が最近の環境変化に対する感受性が高い可能性を鑑みれば、この結果は大学企業化が拒否率を上昇させた可能性と整合するものである。

4.2. 研究試料共有の対価

研究試料の共有プロセスを更に詳細に観察すると、約 1/3 のケースでは無条件に共有が行われるものの、残りのケースでは何らかの対価が存在しており、特に約半数のケースでは「論文の共著関係」を前提として研究試料が共有されていることが確認された(図 5ab)。研究試料の多くは高度な知的財産を含むことを考えれば対価の存在は当然と言える。しかし、分野レベルでの傾向を見てみると、商業化率の低い分野では共著を伴わない共有がより一般的であり、商業化率の高い分野では共著を前提にした共有が高い傾向が観察された(図 5c)。薬学分野では共著を前提とする研究試料共有が 35%を占めている。この観察は各分野の特性を反映したものと考えられるが、更に 2009 年と 2016 年の経時変化を分

析したところ、商業化率が上昇した研究分野では共著比率も増加し、商業化率が低下した分野では共著比率も低下する傾向が確認された(図 5d)。この結果は、コミュニティ・レベルでの企業化の進展が直接的報酬への誘因を強めた可能性を示唆するものである。



4.3.小括

以上の結果は、従来の個人レベルでの非公式な関係を通じた無償での知識・技術移転が減少し、逆に直接的利益を前提にした技術移転が優先される状況が生まれている可能性を示唆している。意識レベルの調査によっても、商業化率の高い分野ほど研究試料の無償共有に対する態度が消極的になる傾向が確認されている。これらの変化の説明として、大学の企業化に伴う諸環境変化は整合的である。従って、最近の政策がライセンス収入増等の公式ルートを通じた知識・技術移転を促進した一方で、比較的非公式のルートを通じた移転が阻害されている可能性が懸念される。

5. 研究者人材の育成・移転(人的側面)に対する影響の分析

5.1. 研究者人材育成を取り巻く課題

続いて産学連携の人的側面に対する影響を検討する。薬学系を代表とする生命科学系大学院は医薬品産業を牽引する研究者人材の重要なソースとなっている。最近では博士号取得者の雇用も増加傾向にあり、大学院における研究者人材養成への期待は高い。しかしながら、大学院教育(特に博士課程)に対する評価は一般的に厳しく、研究室レベルでのトレーニングについても品質のばらつきがたびたび指摘されてきた。とりわけ自律的に研究を主導するスキルの不足や専門外の研究遂行力の不足は産・学両関係者によって認識されている課題である[1]。

5.2.大学院学生の研究指導体制

そこで本項ではまず研究室内部における大学院生の研究指導体制を把握する目的で、指導教員と博士課程学生との間の研究上の役割分担を分析した[10]。研究プロセスを6工程に分類した上で各工程における両者の役割を分析したところ、一般的な認識と整合する形で、指導教員は上流工程(テーマ設定～実験計画)において、学生は下流工程(実験・分析)において主たる役割を担うことが確認された(図6a)。学生の実験段階への深い関与は技術的能力のトレーニングが重視されていることを反映していると考えられる。一方、若手の長期的な研究能力、特に自律性醸成の観点からは、上流工程への関与も重要な意味を持つと考えられる。

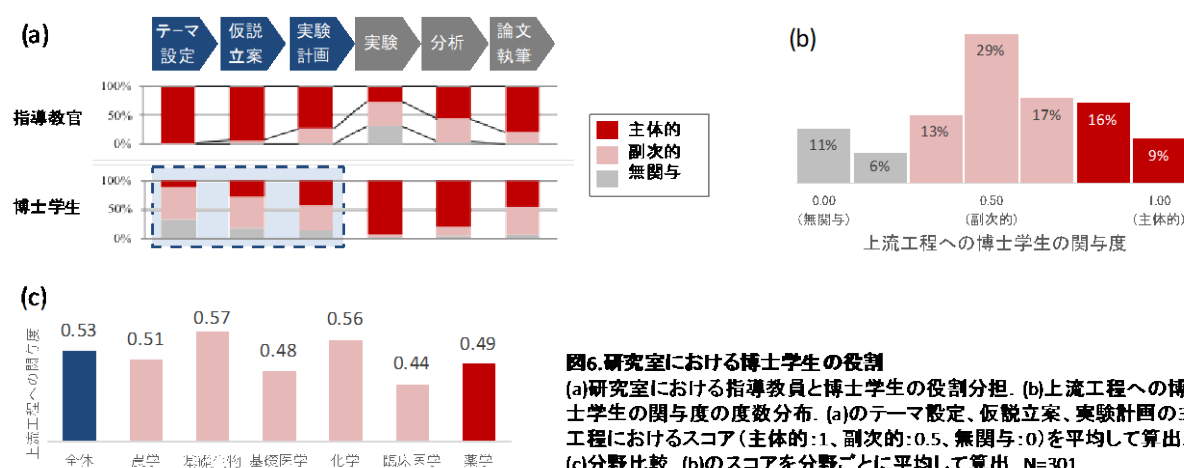


図6. 研究室における博士学生の役割

(a) 研究室における指導教員と博士学生の役割分担. (b) 上流工程への博士学生の関与度の度数分布. (a)のテーマ設定、仮説立案、実験計画の3工程におけるスコア(主体的:1、副次的:0.5、無関与:0)を平均して算出. (c) 分野比較. (b)のスコアを分野ごとに平均して算出. N=301.

そこで上流3工程(テーマ設定・仮説立案・実験計画)に対する学生の関与度を数値化し、以降の分析に用いた。約25%の研究室では学生が上流工程においても主体的な役割を果たしているが、20%弱の研究室では学生は上流工程に殆ど関与しないことが確認できる(図6b)。即ち、上流工程への学生の関与には研究室間で相当の差異が存在し、その一部は分野間の差異として説明される(図6c)。

次にこのような研究指導体制の相違が学生の生産性に及ぼす影響を、出版論文数に基づいて評価する。なお産業におけるキャリアを選択した学生に関してはデータ取得が困難なため、本項では主にアカデミック・キャリアを選択した学生について分析を行う。但し、研究者としての自律性の一般的重要性を鑑みれば、以下で得られる結果は産業キャリアを選択した学生にも当て嵌るものと推察される。

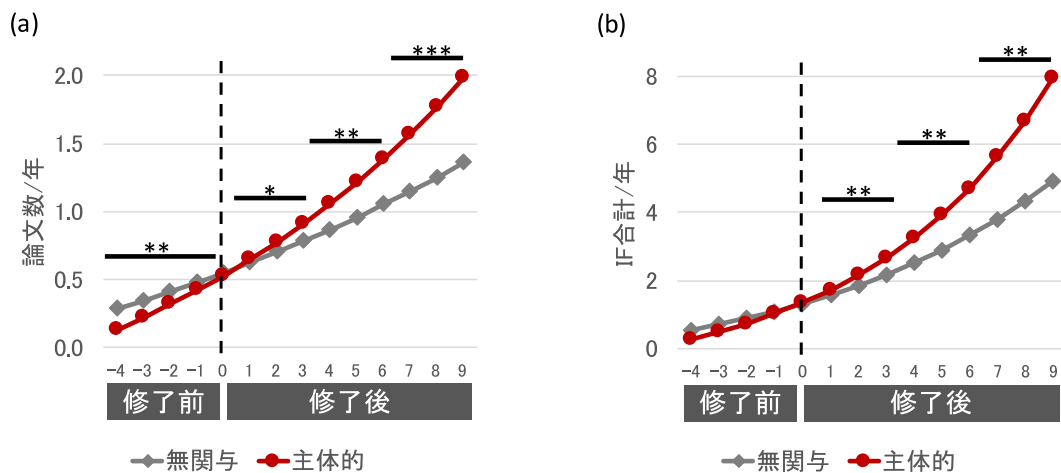


図7.学生の上流工程への関与と論文生産性

(a)論文数の推移. 各種変数をコントロールした上で、学生の論文数を「上流工程への学生の関与度」で回帰するモデルを構築. 同モデルを用いて、上流工程への関与が全く無い学生（灰色）と上流工程に主体的に関与した学生（赤色）について論文数推移を予測して示した. さらに博士課程修了までの5年間、修了後1-3年、4-6年、7-9年の各期間において、上流工程への関与が及ぼす影響を検定した（* $p<0.1$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$ ）. (b)論文発表誌のインパクト・ファクター合計推移. 出版論文の質を考慮に入れる目的で、各論文が出版された雑誌のインパクト・ファクターの合計値を用いた. $N=791$ （観測数:8,174）.

学生の内在的能力が指導体制に影響している可能性を考慮するために各種変数をコントロールした上で、出版論文数の推移を上流工程への学生の関与度で回帰した(図 7)。その結果、短期的には、上流工程への学生の関与は論文生産性を低下させることが示された。指導教員の視点からすると、短期的に論文生産性を向上させるためには、学生の上流工程への関与を最低限に留めて、下流工程の技術的作業に注力させる誘因が働くことが示唆される。一方、上流工程への学生の関与は長期的には論文生産性を向上させることが確認され、技術的作業だけではなく計画段階においても経験を積むことの重要性が示唆された。この結果は、大学院生と教員の間に利害対立が存在することを意味する。

この結果から上流工程への関与が学生の研究能力向上に資する可能性が確認されたため、次に上流工程への関与の説明因子を検討した。その結果、まず大学ランクと研究内容の基礎/応用性向による差異が確認された(図 8a)。基礎研究を行う研究室では、上流工程への学生関与は大学ランクに応じて高くなることが示唆されたが、応用研究を行う研究室では大学ランクに関わらずほぼ一定であった。高ランク大学に限定すると、研究内容の応用性向は上流工程への学生関与と負に相関することが分かる。

次に指導教員の世代を見ると、上流工程への学生関与は、中堅教員(現 50 代)で最大であり、ジュニア教員(現 40 代)では若干低く、シニア教員(現 60 代)で最低であった(図 8B)。ジュニア教員指導下の学生が上流工程に関与しない傾向は、若手教員の方が競争圧力を受け易いことを鑑みるに、そのような環境の中で短期的生産性を追求せざるを得ない可能性を示唆するものである。

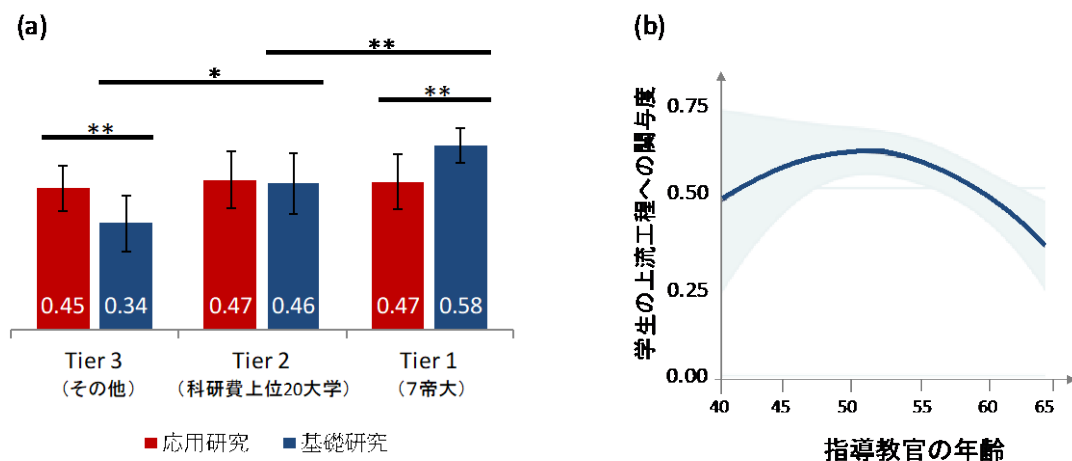


図8. 上流工程への学生関与の説明因子

(a)研究応用性向と大学群. 研究室ごとに研究内容の基礎/応用性向を評価し2群に分割し、さらに大学ランクに基づき3分割した。その上で各群における上流工程への学生の関与度を比較した(* $p<0.1$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$). 平均±標準偏差. (b)指導教官の年齢と上流工程への学生関与度. 各種変数をコントロールした上で、上流工程への学生関与度を指導教官の年齢で回帰するモデルを構築。同モデルの予測値を95%信頼区間と共に表示した. $N=301$.

5.3.大学院学生の研究テーマ

続いて、「博士号取得者の専門分野の狭窄」という課題について議論する。研究室の過去の研究テーマの変遷を把握した上で、各学生の研究テーマの位置付けを分析したところ(図 9a)、大多数の学生は研究室の従来から延長線上の研究テーマに携わる一方、少数の学生は従来テーマとは異なるテーマに取り組んでいることが確認された(図 9b)。

学生が従来テーマと異なるテーマに取り組む背景には様々な要因が存在し得るが、学生の専門分野を拡張するという意味において一定の効果を示す可能性が予想された[11]。実際、従来テーマと異なるテーマに取り組む学生はアカデミック・キャリアに残った場合、長期的にも新規性の高いテーマに取り組み、高い生産性を上げることが示唆された。一方、研究室の従来テーマと類似したテーマに取り組んだ学生は、長期的にも元指導教員と近いテーマに取り組むことが示唆された。後者の状況においては、指導教員は元学生による論文引用や元学生との共著関係から長期的に便益を受ける傾向があることも確認された。

最後に、博士研究テーマと従来テーマの距離に対する説明因子を検討したところ、指導教員の年齢との関連性が示唆された。同距離は、中堅教員(現 50 代)で最大であり、ジュニア教員(現 40 代)およびシニア教員(現 60 代)では低いことが示唆された(図 9c)。ジュニア教員指導下の学生が教員と類似研究に取り組む傾向は、前述した便益に対する誘因が最近の競争環境の中で増強されている可能性と整合するものである。この結果もまた大学院生と教員の間に利害対立が存在することを意味している。

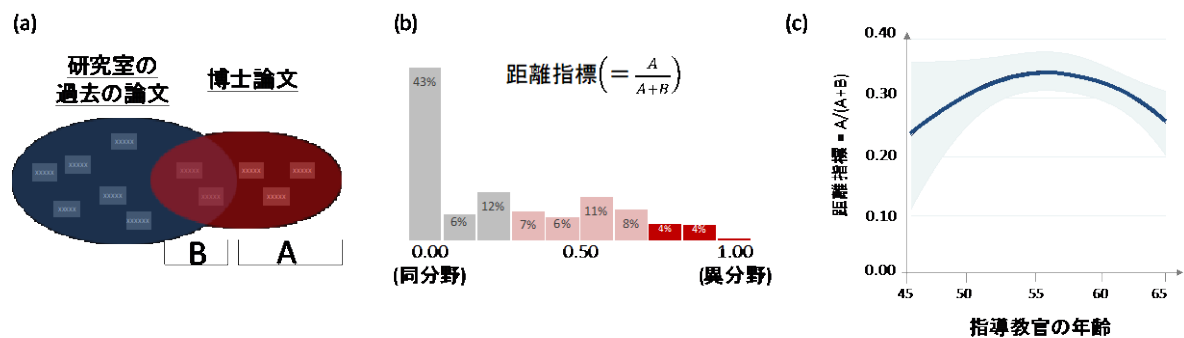


図9. 博士研究テーマの研究室従来テーマからの距離

(a) 距離指標の構築。各研究室で過去(当該大学院生の入学前)に出版された論文に紐づくMeSHキーワード群(青色)と当該学生の在学期間中の出版論文に紐づくMeSHキーワード群(赤色)をそれぞれ同定し、非共通部分(A)の比率を距離指標として用いる。(b) 距離指標の分布。(c) 指導教官の年齢と距離指標。距離指標を指導教官の年齢で回帰するモデルを構築し、同モデルの予測値を95%信頼区間と共に表示した。N=316。

5.4. 小括

以上の結果は、前述した人材育成の課題(自律性、研究応用力の不足)に対する構造的要因を提示するものであり、特に学術研究の応用志向、短期的評価、競争の激化は、これらの問題点を悪化させる可能性が示唆された。これらの状況を解決するための試みも幾つか進められており、例えば最近増えている複数教員による博士論文指導体制は、研究の視野の多様化を始めとした効果を介して長期的生産性向上に資することが示唆されている[12]。

6. おわりに

本研究では「大学の企業化」を中心とした近年の科学技術・学術政策が産学連携に及ぼす影響を知識・技術的側面と人的側面から考察した。1990～2010年にかけての政策変革期を経て、政策評価に関する知見は、本研究成果を含め一定の蓄積を見ている。これらの知見が科学技術・学術政策策定のインプットとなり、大学における研究および研究者人材育成の活性化、そして、医薬品産業振興への寄与に繋がることを期待して本稿の結びとする。

謝辞

本研究の一部は公益社団法人蓬庵社の研究助成を受けて実施されたものであり、そのご厚意に深く感謝申し上げます。また、ご推薦を賜りました徳島文理大学 桐野豊先生に心より感謝致します。インタビューにご協力頂いた塩野義製薬および関係者の皆様、また質問表調査にご協力頂いた多数の大学教員の皆様、そして共同研究者の方々に感謝申し上げます。

参考文献

1. NISTEP (2016), 科学技術の状況に係る総合的意識調査データ集. 文部科学省 科学技術・学術政策研究所.
2. Shibayama, S. (2012), Conflict between entrepreneurship and open science, and the transition of scientific norms. *Journal of Technology Transfer*, 37: p. 508–531.
3. Walsh, J.P., W.M. Cohen, and C. Cho (2007), Where excludability matters: Material versus intellectual property in academic biomedical research. *Research Policy*, 36(8): p. 1184–1203.
4. Shibayama, S. and Y. Baba (2015), Impact-Oriented Science Policies and Scientific Publication Practices: The Case of Life Sciences in Japan. *Research Policy*, 44(4): p. 936–950.
5. Shibayama, S., J.P. Walsh, and Y. Baba (2012), Academic Entrepreneurship and Exchange of Scientific Resources: Material Transfer in Life Sciences and Materials Science in Japanese Universities. *American Sociological Review*, 77(5): p. 804–830.
6. Morichika, N. and S. Shibayama (2016), Use of dissertation data in science policy research. *Scientometrics*, 108(1): p. 221–241.
7. Shibayama, S. and A. Saka (2010), Academic Entrepreneurship in Japanese Universities: Effects of University Interventions on Entrepreneurial and Academic Activities, in NISTEP Working Paper, NISTEP: Tokyo, Japan.
8. Shibayama, S. and Y. Baba (2011), Sharing research tools in academia: the case of Japan. *Science and Public Policy*, 38(8): p. 649–659.
9. Shibayama, S. (2015), Academic commercialization and changing nature of academic cooperation. *Journal of Evolutionary Economics*, 25(2): p. 513–532.
10. Shibayama, S., Y. Baba, and J.P. Walsh (2015), Organizational Design of University Laboratories: Task Allocation and Lab Performance in Japanese Bioscience Laboratories. *Research Policy*, 44(3): p. 610–622.
11. Morichika, N. and S. Shibayama (2015), Impact of Inbreeding on Scientific Productivity: a Case Study of a Japanese University Department. *Research Evaluation*, 24(2): p. 146–157.
12. Shibayama, S. and Y. Kobayashi (2017), Impact of PhD Instruction System: A comprehensive analysis based on Japan Doctoral Human Resource Profiling, JD-Pro. 2017, NISTEP: Tokyo.

筋ジストロフィー、多発性硬化症などの神経疾患に関与する O-マンノース型糖鎖修飾の合成化学的機能解明

北海道大学 先端生命科学研究院 新薬探索研究分野

比能 洋

1. はじめに

糖鎖による翻訳後修飾は生体分子構造および物性に大きな多様性をもたらし、タンパク質間相互作用や細胞間相互作用などに正負両面で大きく影響を与えることが知られている。しかし、その糖鎖による多様性は糖タンパク質（および糖脂質などの複合糖質）として発揮されるため、特定の糖タンパク質の構造活性相関研究を行う際には糖鎖単独ではなく、その糖タンパク質またはその部分構造を使用することが望ましい。

O-マンノース型糖鎖は α -ジストログリカン上の翻訳後修飾として 1997 年に遠藤らにより [Sia α (2 $\rightarrow$ 3)Gal β (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc β (1 $\rightarrow$ 2)Man α (1 $\rightarrow$)]Ser/Thr という 4 糖構造として発見され¹⁾、シアル酸との競合実験からラミニンを介した細胞外マトリックスと細胞の相互作用にこの O-マンノース型糖鎖が必要であることが示された。その後、この O-マンノース型糖鎖の生合成に関わる 15 以上の遺伝子群が筋ジストロフィー症の原因遺伝子となることが次々と報告された²⁾。これらの O-マンノース型糖鎖生合成に関わる遺伝子群の変異による筋ジストロフィー症はジストログリカノパチー(dystroglycanopathy)と呼ばれている。O-マンノース型糖鎖はマンノースに結合する N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の結合様式により 3 種のコア構造に分類されており、1997 年に見出された GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 2 結合体は Core M1 型、Core M1 糖鎖に GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6 結合が加わったものを Core M2 型、GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4 結合を有する 2 糖構造は Core M3 型と分類されている。

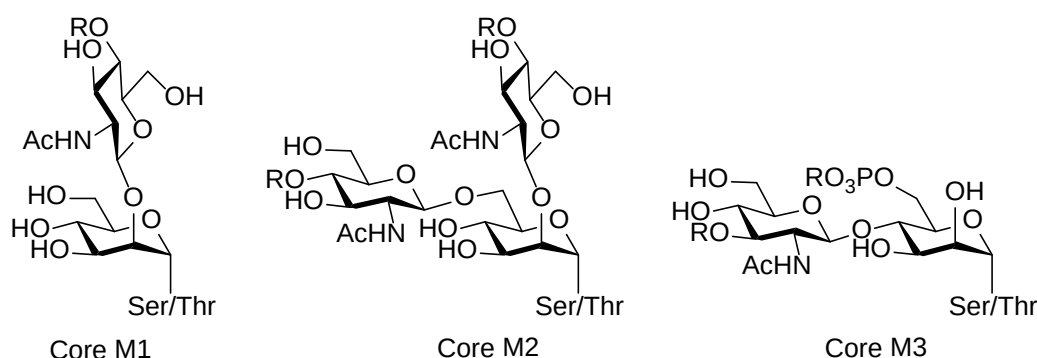


図 1 O-マンノース型糖鎖のコア構造

大変興味深いことに、ジストログリカノパチー関連遺伝子は Core M1 合成酵素である protein O-linked mannose β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase1 (POMGnT1)を除いてすべて最初のマンノース残基または Core M3 関連糖鎖構造の合成に関わっており、Core M2 合成酵素は含まれていない。この Core M1 糖鎖合成酵素 (POMGnT1) 遺伝子は 2001 年に同定されており³⁾、欧州で比較的で患者数の多い筋ジストロフィーである muscle-eye-brain disease (MEB 病) の原因遺伝子であることが知られている。しかし、この POMGnT1 の変異が MEB 病を引き起こすメカニズムはいまだ不明であるが、POMGnT1 の変異に伴い Core M3 型糖鎖の生合成異常が生じることが示唆されている。近年、ラミニンとの相互作用には Core M3 のみに関与しているとみなされているが、Core M1 型糖鎖がラミニンとの相互作用に関与しないとされる根拠はシアリダーゼ、ガラクトシダーゼ、およびヘキソサミニダーゼ処理後もその相互作用が失われない、という間接的実験によるものであった。

2. O-マンノース型糖ペプチドライブラリ合成

そこで我々が糖鎖自動合成法とペプチド自動合成法の融合により開発した化学—酵素法による糖ペプチド迅速合成システム^{4,6)}を活用し、O-マンノース型糖ペプチドライブラリを作成し、糖ペプチドライブラリを提示したマイクロアレイによりラミニンとの相互作用解析を実施することとした。また、標的ペプチド配列は Core M3 型糖鎖の存在が初めて報告されたスレオニン残基(Thr379)⁷⁾を含む α -ジストログリカンのムチン様ドメイン(372-TRGAIITPTLGPIQPTRV-390)を選択し、Thr379、Thr381、および Thr388 に Core M1 型糖鎖を系統的に配置したライブラリ (図 2、化合物 2-22) を作成することとした。

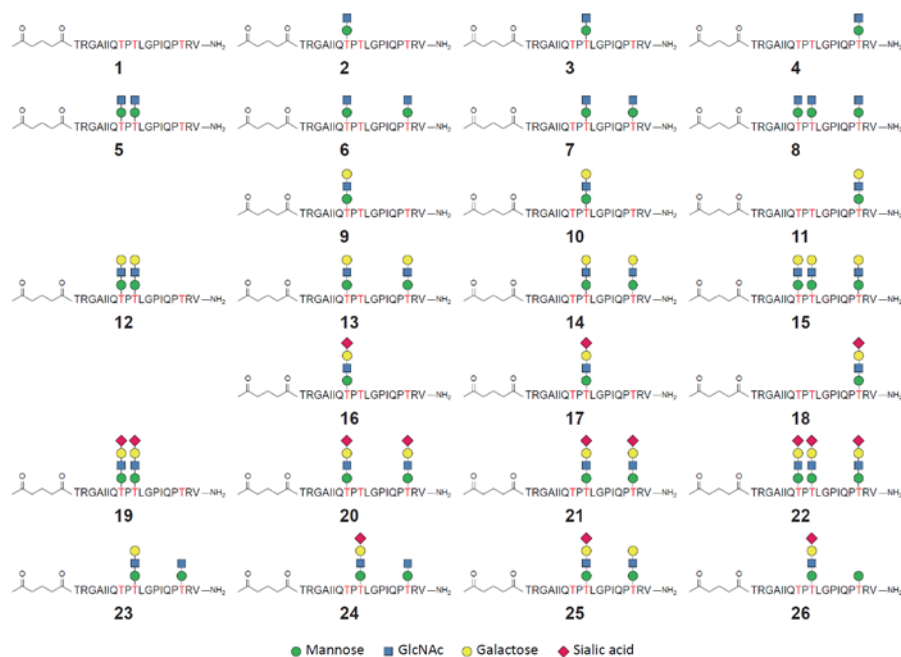


図2 マイクロアレイ用糖ペプチドライブラリ

まず、O-アセチル保護した Core M1 型糖アミノ酸を合成し、マイクロ波照射下におけるペプチド迅速固相合成法^{8,9)}により小過剰 (1.2 等量) の糖アミノ酸のみを用いて糖ペプチド骨格を合成した。ペプチド 19 残基の伸長後、N 末端のキャッピング反応として 5-oxohexanoic acid を導入し、固相から切り出しおよび脱保護を順次行うことによりコアペプチド **1** および Core M1 型二糖を配置した糖ペプチド **2-8** を得た。この **2-8** に対し、 β 1,4-ガラクトース転移酵素を用いてガラクトース残基を伸長した糖ペプチド **9-15** を、さらに α 2,3-シアル酸転移酵素を用いてシアル酸残基を伸長した糖ペプチド **16-22** を得た。この糖ペプチド **16-22** は遠藤らが初めて α -ジストログリカンから単離した O-マンノース型糖鎖と同一の 4 糖配列 [Sia α (2 $\rightarrow$ 3)Gal β (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc β (1 $\rightarrow$ 2)Man α (1 $\rightarrow$] を有している。

3. マイクロアレイによるラミニンとの相互作用解析

続いて、合成した糖ペプチドライブラリ **1-22** を住友ベークライト社と開発した glycoblotting 型マイクロアレイ¹⁰⁾上に配置した。このマイクロアレイ上にはアミノオキシ基が提示されており、糖ペプチドの弱酸性 (pH 5) 水溶液をスポットするのみで、その N 末端に導入したケトン基とのオキシム形成による糖ペプチドの固定化が完了する。

ムチン型糖ペプチド-抗体間のマイクロアレイによる相互作用解析実験¹⁰⁾で最適化した条件下でラミニン **1** との相互作用解析を実施し、共焦点蛍光スキャナで観察したところ、極めて微弱であるが、化合物 **21** が陽性となった。この化合物 **21** は Core M3 型糖鎖が結合していない Thr381、および Thr388 に相当する位置に Core M1 型四糖を有している。しかし、その相互作用が極めて弱く、再現性が低かったため、さらにその検証実験を実施した。

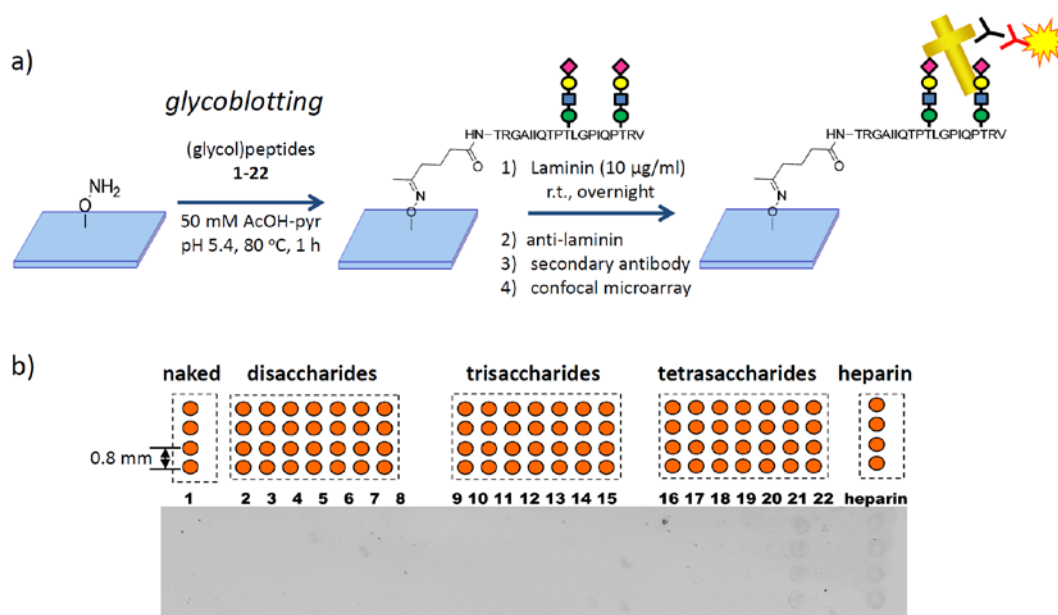


図3 a) glycoblotting 法を応用したマイクロアレイ作成法

b) 共焦点型マイクロアレイによるラミニンとの相互作用解析

共焦点型スキャナによるマイクロアレイ解析の問題点はマイクロアレイ相互作用解析の過程で洗浄、乾燥操作が入っており、それに伴う非特異吸着によるものであると思われた。そこで、レクチンマイクロアレイ用の全反射型マイクロアレイスキャナ (GlycoStation)¹¹⁾ を用いた相互作用解析を行うこととした。この測定法ではマイクロアレイスライドを導波管とし、側面からの照射光の全反射に伴いマイクロアレイ表面から 100 nm 程度漏れ出すエバネッセント光を励起光として相互作用解析を行うため、標識タンパク質の洗浄を必要とせず、洗浄過程で解離する可能性がある弱い相互作用を検出可能である。実際にムチン型糖ペプチドを提示したマイクロアレイに対し、共焦点スキャナでは再現性が乏しかったガレクチンとの弱い相互作用の比較解析に成功している¹²⁾。そこで、ラミニン1、ラミニン2、およびラミニンと同様にヘパリンと相互作用することが知られているラクトフェリンをそれぞれ Cy3 標識体として調製した。さらに、市販のビオチン化レクチン 3 種 *Agaricus bisporus* agglutinin (ABA), *Sambucus sieboldiana* agglutinin (SSA), Wheat germ agglutinin (WGA) との相互作用を、Cy3 ラベル化ストレプトアビジンにより検出した。また、化合物 **21** 上の 2 本の O-マンノース型糖鎖の影響をより細かく調査するため、この 2 カ所に構造の異なる糖鎖を有する糖ペプチド **23-26** を別途調製し、さらにヘパリンをポジティブ・コントロールとしたマイクロアレイを作成し、相互作用の比較解析を行った。また、マイクロアレイ間の差異を低減するため、1 枚のマイクロアレイ上に化合物 **1-26** およびヘパリンを 0.3 mm 間隔で 4 点ずつスポットしたものを 2 列作成し、さらにこれを 9 mm 間隔で 6 回繰り返すことにより、6 つの反応槽で並行して相互作用実験が可能な高密度糖ペプチドマイクロアレイを作製した。また溶液取り扱いを両末端に設け、観察領域を常にカバーガラスで覆うことにより、乾燥や埃などによる影響を最小限とすると共に流路深さを 100 μm に統一し、1 実験当たりのタンパク質溶液量 12 μL のみで相互作用実験を可能とした。(図 4)

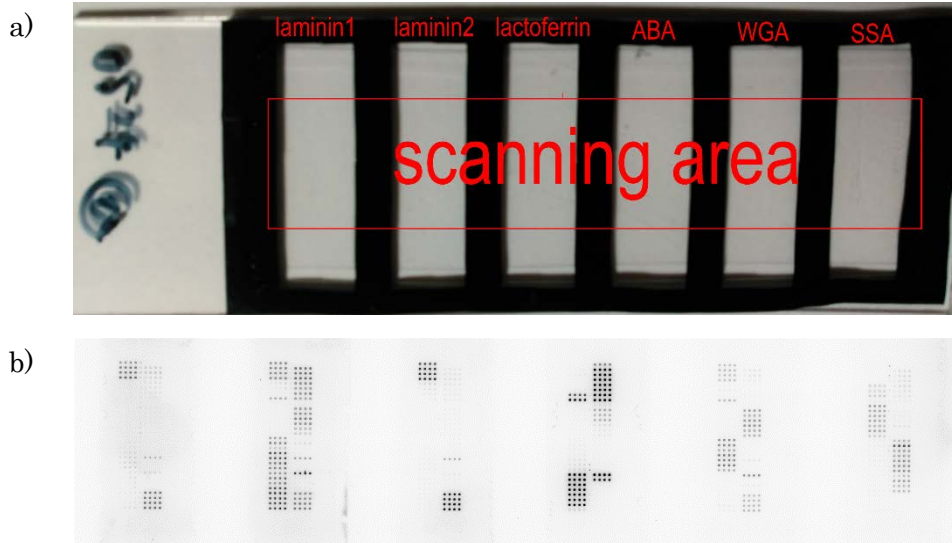


図4 a) 全反射観察用マイクロアレイ、b) 全反射系における観察領域の蛍光パターン例

GlycoStation による全反射型観察場とμ流路系型マイクロアレイの組み合わせによる観察結果を図5に示した。まず50 mM Tris buffer (pH 7.4)中に各たんぱく質を溶解し、このマイクロアレイシステムで観察した結果、レクチン類は糖残基の末端構造を鋭敏に反映した認識パターンを示したが、ラミニン2およびラクトフェリンからはポジティブコントロールであるヘパリンを含め相互作用が検出されなかった。また、ラミニン1はGlcNAc末端を有する糖ペプチドと弱い相互作用を示した。ラクトフェリンは塩基性領域ではヘパリンとの相互作用が消失することが報告されていることから、50 mM MES buffer (pH 5.6) 中に各たんぱく質を溶解し、相互作用を調べたところ、ラミニン類、ラクトフェリン、およびSSAとヘパリンの相互作用が観察された。また、ラミニン1がシアル酸を有さない糖ペプチドおよびペプチド骨格と相互作用を示した。しかし、共焦点型ス

キャナにより弱く観察された糖ペプチド21とラミニン1との相互作用はこの実験系では観察されなかった。レクチン類がCy3標識ストレプトアビジンとの置換処理を経て検出されていることから、糖ペプチド21とラミニン1との相互作用は存在したとしても本質的に弱いレクチン-糖鎖相互作用よりも優位に弱いことが確認された。弱酸性条件下でラミニン1がアシアロ糖鎖を有する糖ペプチドおよびペプチド骨格と相互作用を示したことは、ラミニン1とαジストログリカンの相互作用実験においてシアリダーゼを作用させると相互作用がむしろ向上したとする報告¹⁵⁾と同様の結果である。一方、ペプチド骨格とも強く相互作用していることから、ペプチド骨格との非特異的な相互作用を観察している可能性が

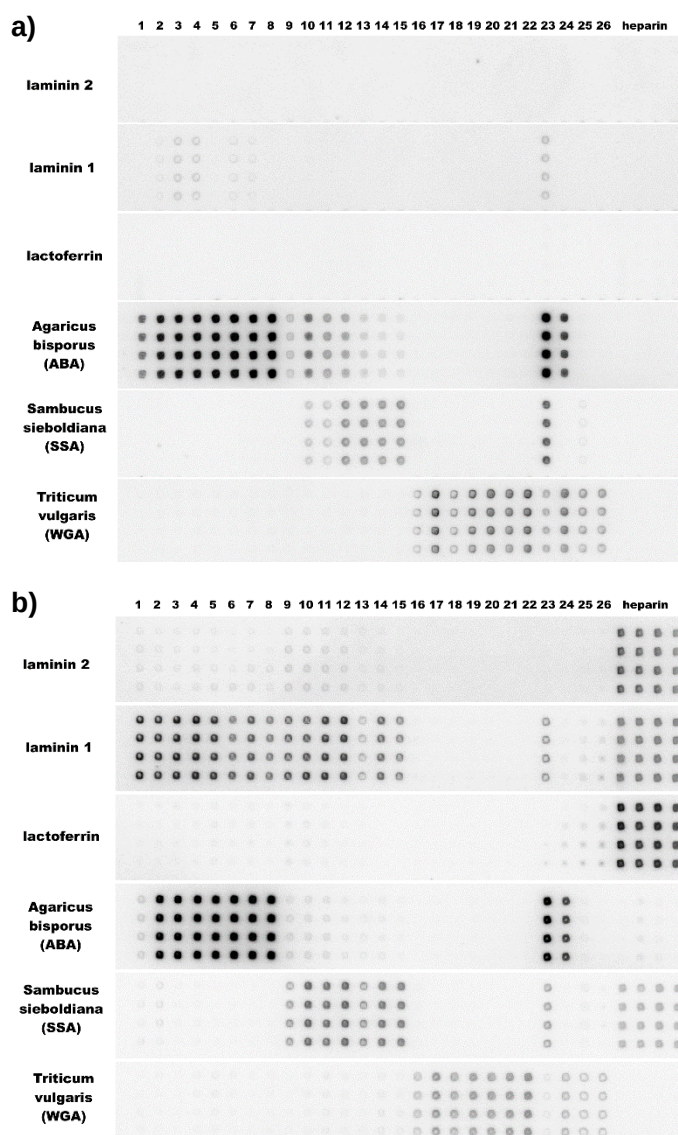


図5 GlycoStation で検出された蛍光パターン
a) Tris buffer (pH7.4), b) MES buffer (pH 5.6).

考えられる。大変興味深いのはレクチン類の相互作用である。ABA は N-アセチルヘキソサミンと β ガラクトシド末端双方を認識するレクチンとして知られており、特に core1 [Gal β (1 $\rightarrow$ 3)GalNAc α (1 $\rightarrow$)] と呼ばれるムチン型糖鎖構造と特に強く結合し、ガラクトース末端の 3 位にシアル酸を伸長してもその相互作用が維持されることが報告されている。しかし、本実験では GlcNAc 末端を有する Core M1 型糖鎖と極めて強く相互作用し、 β ガラクトシドを伸長するとその相互作用が弱まり、そのガラクトース末端の 3 位にシアル酸を伸長すると相互作用が完全に検出されなくなった。SSA はガラクトースまたは N-アセチルガラクトサミンの 6 位にシアル酸が結合した構造を識別することで知られているレクチンであるが、本実験ではガラクトース末端を有する Core M1 型 3 糖を有する糖ペプチドと選択的に相互作用し、ガラクトース末端の 3 位にシアル酸を伸長するとその相互作用が失われた。WGA は GlcNAc 末端を有する糖鎖や N-アセチルヘキソサミンの繰り返し構造を認識することで知られているが、Core M1 型糖鎖ではシアル酸末端を有する糖ペプチドを選択的に認識することが示された。すなわち、Core M1 型糖鎖ではレクチンの認識パターンが他の糖鎖とは大きく異なっている。これは Core M1 型糖鎖に特徴的な糖鎖の配座、または糖ペプチド単位での配座が存在することを示唆している。

4. NMR による Core M1 型糖ペプチドの解析

我々はムチン (O-GalNAc) 型糖鎖¹⁴⁻¹⁶、O-フコース型糖鎖^{17,18}、および C-マンノース型糖鎖¹⁹を有する糖タンパク質の糖ペプチド断片の NMR 解析を通じ、糖鎖修飾がペプチド配座に与える影響について報告してきた。ペプチド配座の変化はペプチドのアミドプロトンのケミカルシフト変化を伴うことが知られているが、O-マンノース型糖鎖に関しては 1 残基目の O-マンノース残基²⁰および Core M3 型糖鎖²¹による修飾ではこのアミドプロトンのケミカルシフト変化が観察されないため、O-マンノース型糖鎖修飾はペプチド配座に影響を与えない糖鎖修飾であると考えられている。しかし、Core M11 型糖鎖とペプチド配座の関係についての報告例はない。そこで、マイクロアレイで調査した 19 残基のペプチドを用い、Core M1 糖鎖が存在すると予想される 11 番目および 17 番目の Thr 残基上に Core M1 関連糖鎖を導入した糖ペプチド(図 5a、**27-31**: Ac-TRGAIITP^{I¹⁴}LGPIQP^{I¹⁷}RV-NH₂)を合成し、NMR アミド領域に着目したケミカルシフトの比較解析を実施した。図 5b に示す通り、Live らが 2008 年に報告²⁰した通り、ペプチドと 1 残基目の O-マンノース修飾の間では顕著なケミカルシフト変化は観察されなかった。一方、POMGnT1 によって構築される Core M1 型 2 糖を有する糖ペプチド **28** では C 末端側の隣接アミノ酸(図 6b、L11 および R18)のアミドプロトンの顕著な高磁場シフトが観察され、さらにガラクトースおよびシアル酸を伸長した誘導体(**30** および **31**)においても高磁場シフトした状態が保持されていることが明らかとなった。この結果は POMGnT1 によって隣接アミノ酸の配座変化が誘起され、その構造が更なる糖鎖伸長を経ても維持されていることを示唆している。そこで、NOESY 解析によりこの糖鎖伸長に伴うペプチド間および糖残基間の NOE シグナルの変化について調査したとこ

ろ、POMGnT1 に相当する糖鎖伸長に伴い、導入された N-アセチルグルコサミン残基 1 位プロトンとマンノース残基 1 位プロトン間に強い NOE シグナルが観察されると共に、スレオニン残基側鎖の顕著な回転抑制が観察され、さらにトレオニン残基と隣接するロイシン残基のアミドプロトン間にも NOE シグナルが生じた。(図 5c)

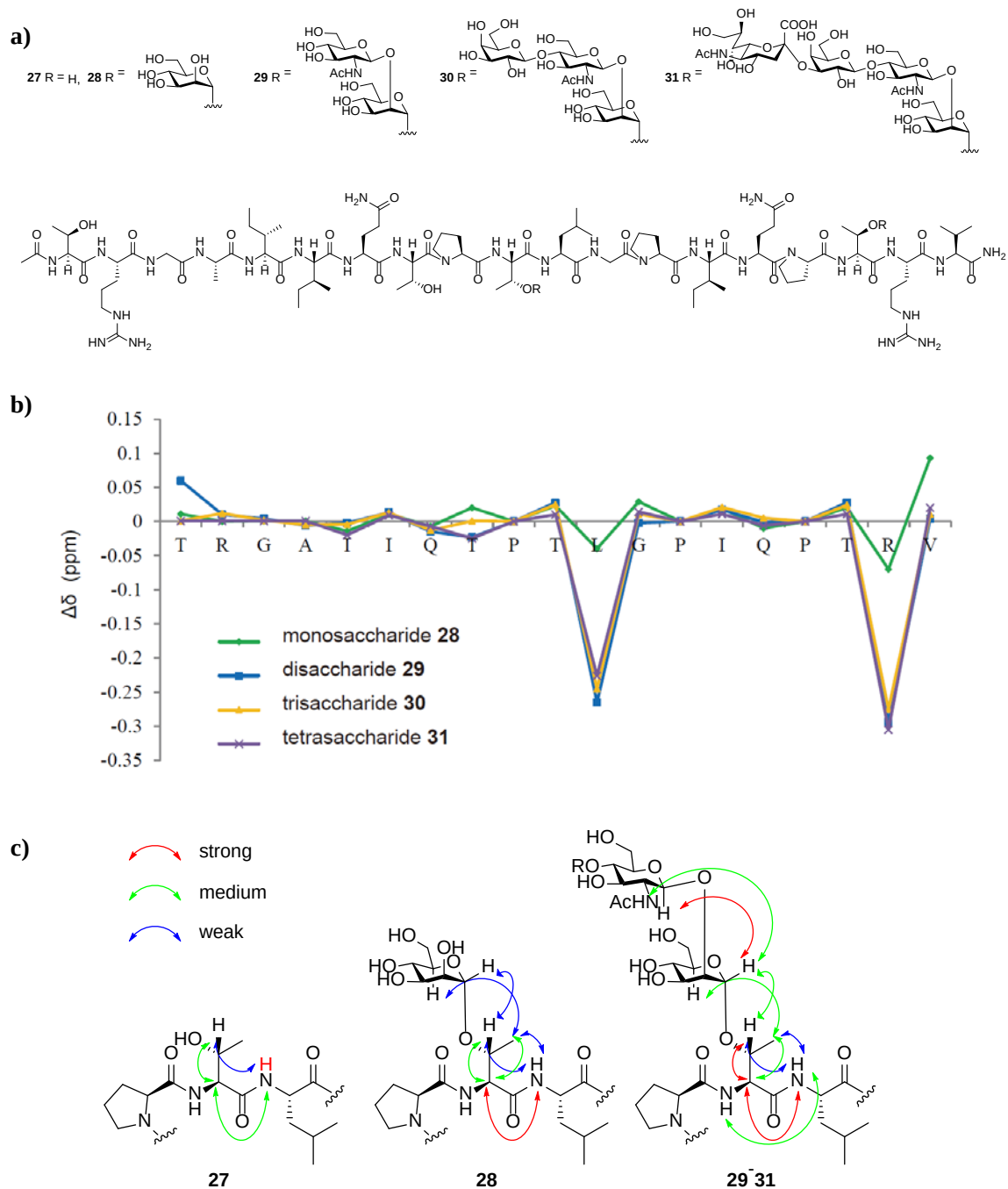


図6 a) NMR 解析に使用した糖ペプチド **27-31**, b) 各アミノ酸残基におけるアミドプロトンの相対的ケミカルシフト変化量、c) 裸ペプチド(**27**)と 4 糖修飾体(**31**)のケミカルシフト比較

そこで、NOESY に加え DQF-COSY 測定により得たプロトン間距離束縛情報および二面角束縛情報に基づき構造計算を実施した。得られたペプチド **27** および糖ペプチド **28-31** の安定配座 30 構造の比較を実施したところ、Core M1 型糖鎖を有する糖ペプチド **29-31** において糖鎖を有するスレオニン残基周辺構造が収束していることが確認された。また、 $^9\text{Pro-Thr-Leu}^{11}$ および $^{16}\text{Pro-Thr-Arg}^{18}$ トリペプチド領域の最安定配座をそれぞれ比較したところ、アミドプロトンのケミカルシフトが観察された Leu および Arg 残基において Core M1 型糖鎖形成に伴いランダムコイル様の伸びた構造からターン様構造への配座変化が確認された(図 7b, 7c)。さらに、この 2 カ所のトリペプチド領域 30 構造の平均二乗偏差(RMSD) 距離を比較した結果、Core M1 型糖鎖形成に伴い形成された配座は揺らぎが小さく、安定に存在していることが示された。(表 1)

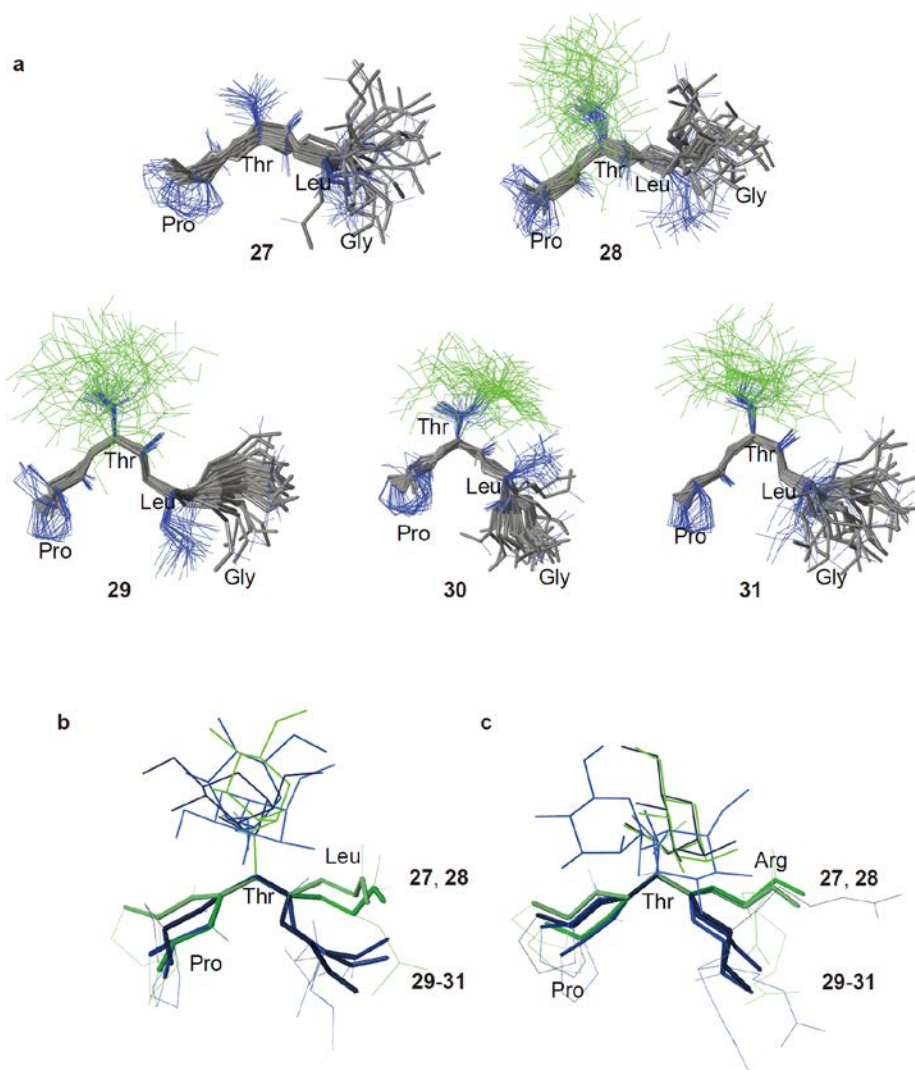


図7 a) 化合物 **27-31** における $^9\text{Pro-Thr-Leu}^{11}$ トリペプチド領域安定 30 構造、b) 化合物 **27-31** における $^9\text{Pro-Thr-Leu}^{11}$ トリペプチド領域の最安定配座重ね合わせ図、c) 化合物 **27-31** における $^{16}\text{Pro-Thr-Arg}^{18}$ トリペプチド領域の最安定配座重ね合わせ図

表1 化合物 **27-31** における $^9\text{Pro-Thr-Leu}^{11}$ 、 $^{16}\text{Pro-Thr-Arg}^{18}$ 領域の RMSD 値(Å)

	27	28	29	30	31
$^9\text{PTL}^{11}$	0.69 ± 0.31	0.58 ± 0.19	0.39 ± 0.22	0.41 ± 0.19	0.42 ± 0.21
$^{16}\text{PTR}^{18}$	0.68 ± 0.22	0.63 ± 0.27	0.43 ± 0.19	0.43 ± 0.23	0.33 ± 0.16

4. POMGnT1 および Core M1 型糖鎖修飾の機能に関する考察

以上の結果から、POMGnT1 により形成される Core M1 型糖鎖はラミニンなどの細胞外マトリックスとの相互作用に直接関与せず、結合しているポリペプチド骨格の蝶番型配座変化を誘起するスイッチのような役割を有していることが示された。この配座変化が Core M3 型糖鎖形成およびその細胞外マトリックスとの相互作用に影響を与えるため、POMGnT1 の変異が MEB 病の原因となっているのであろう。実際に、Core M3 型糖鎖合成に関与することが明らかとなった福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子 Fuktin と POMGnT1 が複合体を形成することが示唆されており²²⁾、その活性を制御していることが予想される。また、桑原²³⁾らは POMGnT1 の触媒ドメインと膜貫通ドメインをつないでいるステム領域がレクチン様活性を有していることを見出し、このレクチン様活性により Fuktin を Core M3 糖鎖付近にリクルートしその糖鎖伸長を促していると予想している。本研究で明らかとなった Core M1 型糖鎖形成に伴うターン様構造への配座変化が Fuktin 等による Core M3 糖鎖の成熟を促していることが予想される。一方、MEB 病の原因遺伝子である POMGnT1 と福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子である Fuktin、および Walker-Warburg syndrome (WWS) の原因遺伝子であるその他の Core M3 関連遺伝子群では病態が異なっている。Core M1 型糖鎖は E-カドヘリンなど α -ジストログリカン以外の神経系タンパク質においても豊富に存在し、その機能に影響を与えることが報告されている²⁴⁾。本研究で見出された Core M1 型糖鎖形成に伴うペプチドの配座変化がその病態の解明に少しでも貢献できれば幸いである。

謝辞

菊地星矢修士および多くの共同研究者の皆様に感謝申し上げます。本研究の一部は、公益社団法人 蓬庵社の研究助成によるものであり、厚く御礼を申し上げます。また、ご推薦を賜りました西村紳一郎先生に深謝いたします。

参考文献

1) A. Chiba, K. Matsumura, H. Yamada, T. Inazu, T. Shimizu, S. Kusunoki, I. Kanazawa, A. Kobata, T. Endo, *J. Biol. Chem.* **272**, 2156-2162 (1997).

- 2) M. Kanagawa, *Trends Glycosci. Glycotech.* **26**, 41-57 (2014).
- 3) A. Yoshida, K. Kobayashi, H. Manya, K. Taniguchi, H. Kano, M. Mizuno, T. Inazu, H. Mitsunashi, S. Takahashi, M. Takeuchi, R. Herrmann, V. Straub, B. Talim, T. Voit, H. Topaloglu, T. Toda, T. Endo, *Dev. Cell* **1**, 717-724 (2001).
- 4) M. Fumoto, H. Hinou, T. Ohta, T. Ito, K. Yamada, A. Takimoto, H. Kondo, H. Shimizu, T. Inazu, Y. Nakahara, S.-I. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11804-11818 (2005).
- 5) M. Fumoto, H. Hinou, T. Matsushita, M. Kurogochi, T. Ohta, T. Ito, K. Yamada, A. Takimoto, H. Kondo, T. Inazu, S.-I. Nishimura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 2534-2538 (2005).
- 6) T. Matsushita, I. Nagashima, M. Fumoto, T. Ohta, K. Yamada, H. Shimizu, H. Hinou, K. Naruchi, T. Ito, H. Kondo, S.-I. Nishimura *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 16651-16656 (2010).
- 7) T. Yoshida-Moriguchi, L. P. Yu, S. H. Stalnakar, S. Davis, S. Kunz, M. Madson, M. B. A. Oldstone, H. Schachter, L. Wells, K. P. Campbell, *Science* **327**, 88-92, (2010).
- 8) T. Matsushita, H. Hinou, M. Kurogochi, H. Shimizu, S.-I. Nishimura, *Org. Lett.* **7**, 877-880 (2005).
- 9) F. Garcia-Martin, H. Hinou, T. Matsushita, S. Hayakawa, S.-I. Nishimura, *Org. Biomol. Chem.* **10**, 1612-1617 (2012).
- 10) T. Matsushita, W. Takada, K. Igarashi, K. Naruchi, F. Garcia-Martin, M. Amano, H. Hinou, S.-I. Nishimura, *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**, 1105-1116 (2014).
- 11) A. Kuno, N. Uchiyama, S. Koseki-Kuno, Y. Ebe, S. Takashima, M. Yamada and J. Hirabayashi, *Nat. Methods* **2**, 851-856 (2005).
- 12) G. Artigas, H. Hinou, F. Garcia-Martin, H. J. Gabius, S.-I. Nishimura, *Chem. Asian J.* **12**, 159-167 (2017).
- 13) A. C. Combs and J. M. Ervasti, *Biochem. J.* **390**, 303-309 (2005).
- 14) R. Hashimoto, N. Fujitani, Y. Takegawa, M. Kurogochi, T. Matsushita, K. Naruchi, N. Ohyabu, H. Hinou, X. D. Gao, N. Manri, H. Satake, A. Kaneko, T. Sakamoto, S.-I. Nishimura, *Chem. Eur. J.* **17**, 2393-2404 (2011).
- 15) T. Matsushita, N. Ohyabu, N. Fujitani, K. Naruchi, H. Shimizu, H. Hinou, S.-I. Nishimura, *Biochemistry* **52**, 402-414 (2013).
- 16) S. Rangappa, G. Artigas, R. Miyoshi, Y. Yokoi, S. Hayakawa, F. Garcia-Martin, H. Hinou, S.-I. Nishimura, *Med. Chem. Comm.* **7**, 1102-1122 (2016).
- 17) K. Hiruma-Shimizu, K. Hosoguchi, Y. Liu, N. Fujitani, T. Ohta, H. Hinou, T. Matsushita, H. Shimizu, T. Feizi, S.-I. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 14857-14865 (2010).
- 18) S. Hayakawa, R. Koide, H. Hinou, S.-I. Nishimura, *Biochemistry* **55**, 776-787 (2016).
- 19) H. Hinou, Y. Abe, S. Hayakawa, K. Naruchi, N. Fujitani, S.-I. Nishimura, *Tetrahedron Lett.* **57**, 791-795 (2016).
- 20) M. Liu, A. Borgert, G. Barany, D. Live, *Biopolymers* **90**, 358-368 (2008).
- 21) K. F. Mo, T. Fang, S. H. Stalnakar, P. S. Kirby, M. Liu, L. Wells, M. Pierce, D. H. Live, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14418-14430 (2011).
- 22) H. Xiong, K. Kobayashi, M. Tachikawa, H. Manya, S. Takeda, T. Chiyonobu, N. Fujikake, F. Wang, A. Nishimoto, G.E. Morris, Y. Nagai, T. Endo, T. Toda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 935-941 (2006).
- 23) N. Kuwabara, H. Manya, T. Yamada, H. Tateno, M. Kanagawa, K. Kobayashi, K. Akasaka-Manya, Y. Hirose, M. Mizuno, M. Ikeguchi, T. Toda, J. Hirabayashi, t. Senda, T. Endo, R. Kato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 9280-9285 (2016).
- 24) M. Lommel, P.R. Winterhalter, T. Willer, M. Dahlhoff, M.R. Schneider, M.F. Bartels, I. Renner-Muller, T. Ruppert, E. Wolf, S. Strahi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**,

21024-21029 (2013).

加齢・生活習慣要因による視床下部機能の変調に関わる分子機序の解明

熊本大学大学院生命科学研究部 薬物活性学分野 香月 博志

1. はじめに

間脳の一部を構成する視床下部は、自律神経系や神経内分泌系の機能統括をはじめとする多様な機能を担っており、生体恒常性の維持において重要な役割を果たす脳部位である。視床下部には神経ペプチドを伝達物質として含有する種々のニューロンが分布しているが、なかでも 1998 年に新たに同定されたオレキシンは、多様な生理機能を制御する神経ペプチドとして注目される。

オレキシンには、33 アミノ酸残基より構成されるオレキシン-A と 28 アミノ酸残基より成るオレキシン-B の 2 種のアイソフォームが存在し、これらは共通の前駆体ペプチドである[プレ]プロオレキシンから生成する (図 1)。オレキシン産生ニューロンは、視床下部外側部および脳弓周囲領域を中心とする領域に局在しており、中枢神経系の広範な領域に投射を形成している。オレキシンの名は当初その摂食促進作用に基づいて付けられたものであるが、研究が進むにつれてこの神経ペプチドは睡眠・覚醒の調節、自律神経系の機能調節、報酬系への関与などさまざまな生理作用を有することが明らかになった¹⁾。特に、睡眠・覚醒障害を呈するナルコレプシーの患者の脳においてオレキシンニューロンが選択的に減少していることなどが示され、ナルコレプシーの主因はオレキシンニューロンの変性・脱落であることが判明している²⁾。

ナルコレプシー患者においてオレキシンニューロンが変性を起こす原因として、自己免疫応答の関与を示唆する知見がいくつか報告されている³⁾。しかし、免疫応答とは直接関連しない外傷などの要因がナルコレプシーの発症の引き金となる事例があり、オレキシンニューロンの変性誘導にはさまざまな要因が関与しうると考えられる。また、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、うつ病、拒食症といった種々の精神神経系疾患において脳脊髄液中のオレキシン濃度の低下やオレキシンニューロンの減少が生じることが明らかとなっている^{4,5)}。老化に伴ってオレキシンニューロンが減少するとの報告もある⁶⁾。

我々は、ラット新生仔脳由来の培養視床下部組織切片を用いて、神経変性と関連するオレキシンニューロン特有の性質の解析を進めてきた。その結果これまでに、①神経活動を持続的に変調させるとオレキシンが速やかに枯渇することなどから、オレキシンは他の神経ペプチドと比較して代謝回転速度が大であると考えられること^{7,8)}、②オレキシンニューロンは他のペプチド作動性ニューロンと比べて小胞体ストレスに対して脆弱であること⁹⁾を示した。

本研究ではこれらの知見を背景として、*in vivo* においてオレキシンニューロンに病理変化をもたらす要因の解析を進めた。特に、種々の病態生理学的状況下において視床下部局所での産生量

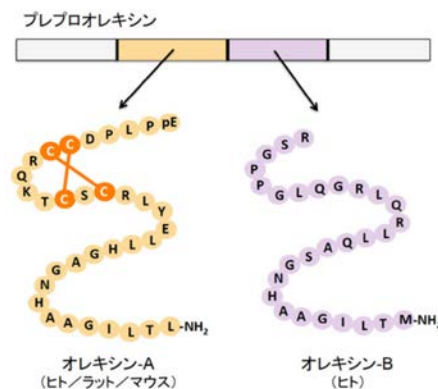


図1 オレキシンの構造

共通の前駆ペプチドであるプレプロオレキシンから、成熟ペプチドであるオレキシン-A とオレキシン-B が生成する。分子内に 2 対のジスルフィド結合を有するオレキシン-A の一次構造は、動物種を超えて広く保存されている。

が変動すると考えられる一酸化窒素(NO)の役割に焦点を当て、オレキシンニューロンの病理と生活習慣要因との関連性を明らかにすることを目的とした。

2. 外因性の NO によって惹起されるオレキシンニューロン選択的な病理変化

NO は、シナプス伝達効率の可塑的变化を介する脳の高次機能調節等において重要な役割を果たす生理活性物質であるが、何らかの原因により過剰に産生されると、細胞・組織傷害性に働くことで種々の脳病態に関わる。NO と $O_2^{\cdot-}$ との反応により生じた $ONOO^{\cdot-}$ がヒドロキシルラジカルの産生を伴って細胞の機能分子群を傷害するという機

序が、脳虚血などの急性病態においては重要と考えられている。他方、緩徐に病態の進行する中枢神経変性疾患の場合、種々の機能タンパク質の持つシステイン残基の NO による修飾 (S-ニトロソ化) が細胞機能に与える影響が注目されている¹⁰⁾。

ここで我々は、オレキシンの構造の特徴に注目した。すなわち、オレキシン-A 分子内には 2 対のジスルフィド結合が極めて近接した位置に存在している

(図 1)。また先述の通り、オレキシンの代謝回転が他の神経ペプチドと比較して速いこともあり、オレキシン-A の成熟ペプチドが生成する過程においてジスルフィド結合の組合せの過誤が高頻度で生じるものと推測された。通常、組み間違えたジスルフィド結合は、プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)等の酵素群によって正しく組み直されるが、PDI が十分に働かない状況下では、組合せの過誤を起こしたペプチドが処理できなくなる。重要なことに、PDI

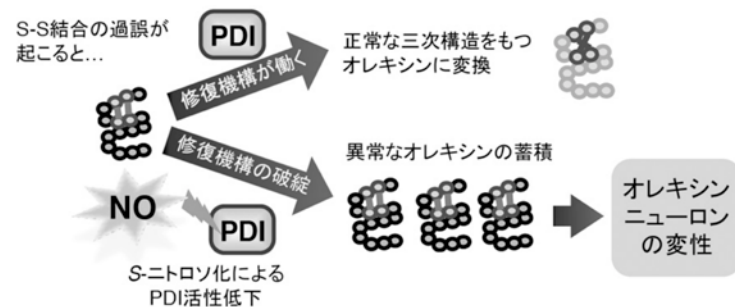


図2 オレキシンニューロン選択的な病理変化誘導機序についての仮説
分子内ジスルフィド結合の形成過誤を起こしたオレキシン-A は通常プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)によって修復されるが、NOによってPDIが不活性化されると、異常なオレキシシンが細胞内に蓄積し、ニューロン変性を促すものと推測される。

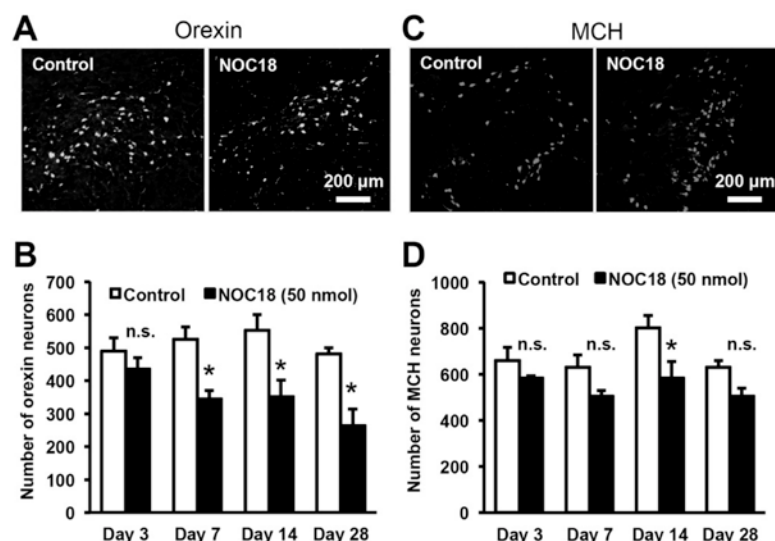


図3 NOにより惹起されるオレキシンニューロンの減少 (論文 12 より改変)

A: 第三脳室への溶媒(control)および NOC18 (50 nmol)投与 7 日後のオレキシン-A 免疫組織化学の典型例。

B: NOC18 (50 nmol)投与によるオレキシン-A 含有ニューロン数の経日変化。 $n = 4 \sim 7$. * $p < 0.05$ vs. control; n.s., not significant.

C: 溶媒(control)および NOC18 (50 nmol)投与 7 日後の MCH 免疫組織化学の典型例。

D: NOC18 (50 nmol)投与による MCH 含有ニューロン数の経日変化。 $n = 4 \sim 7$. * $p < 0.05$ vs. control; n.s., not significant.

は NO によって分子内のシステイン残基が S-ニトロソ化修飾を受けるとその酵素活性が阻害され、これがタンパク質折りたたみ異常を伴うアルツハイマー病やパーキンソン病といった中枢神経変性疾患の病理形成に関与することが報告されている¹¹⁾。そこで我々は、オレキシニューロンの選択的変性にも NO 産生や PDI 機能不全が関与しているのではないかと仮説を立てた (図 2)。

まず、雄性 C57BL/6 マウスの第三脳室内に NO ドナーである NOC18 (50 nmol) を単回投与し、その後経日的に視床下部の組織化学的検討を行ったところ、7 日後以降にオレキシニューロンの有意な減少が認められた (図 3)。この減少は NOC18 投与後 8 週間以上持続して見られ、また NOC18 投与 7 日後においてオレキシニューロンにカスパーゼ-3 の活性化が認められたことから、アポトーシス性細胞死が誘導されていることが示唆された。一方、オレキシニューロンの近傍に分布するメラニン凝集ホルモン (MCH) 含有ニューロンについては、細胞数の若干の減少は認められるものの、オレキシニューロンほど顕著な変化ではなかった。

同実験条件下で NOC18 投与後の視床下部の組織化学像を詳細に観察したところ、一部のオレキシニューロンの細胞内にオレキシニン-A 免疫反応陽性の凝集体が形成されていることを見出した (図 4)。非還元条件下での western blot 解析により、成熟オレキシニンや[プレ]プロオレキシニンとはサイズの異なる高分子量複合体が形成されていることが確認された。細胞内凝集体の形成がオレキシニューロンの減少に先行して見られたこと、および凝集体を含有するオレキシニューロンではカスパーゼ-3 の活性化が認められたことから、凝集体形成と細胞死誘導とが密接に関連しているものと考えられた。比較対象である MCH ニューロンでは、MCH 免疫反応陽性凝集体の形成はほとんど見られなかった。

さらに、小胞体ストレスセンサーである BiP の発現量が NOC18 投与 3 時間後の視床下部において増加していること、小胞体ストレス誘導薬のツニカマイシン (0.5 μ g) を第三脳室に投与することによってもオレ

キシニューロンの減少に先行してオレキシニン-A 免疫反応陽性凝集体の形成が誘導されたことから、一連の事象への小胞体ストレスの関与が示唆された。加えて、NOC18 による細胞内凝集体の形成亢進とオレキシニューロンの減少は、小胞体ストレス緩和作用を有

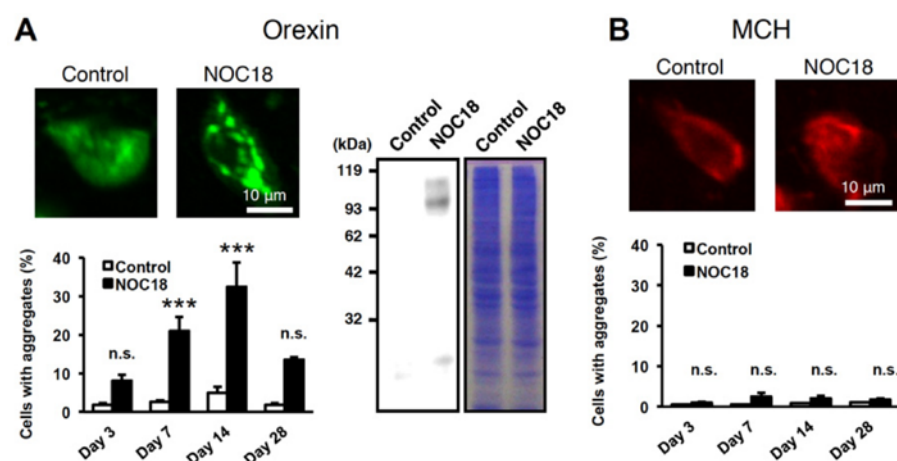


図4 NOにより惹起されるオレキシニューロン内の凝集体形成 (論文 12 より改変)

A: マウス第三脳室への NOC18 (50 nmol) の投与によるオレキシニン-A 免疫反応陽性凝集体の形成。画像は NOC18 投与 14 日後のオレキシニン免疫反応性の典型例を、グラフは凝集体を含有するニューロンの割合の経日的変化を示す。n = 4~7. *** $p < 0.001$ vs. control; n.s., not significant. また、NOC18 投与 7 日後の視床下部組織の western blot (非還元条件下) の結果、オレキシニン免疫反応陽性の高分子量複合体の形成が確認された。

B: MCH ニューロンには、NOC18 投与による凝集体形成はほとんど見られなかった。n = 4~7. n.s., not significant.

するタウロウルソデオキシコール酸(2 μ g)によって著明に抑制された。

NOC18 投与後の視床下部組織を回収してビオチンスイッチアッセイを行った結果、PDI の S-ニトロ化修飾レベルの増大が投与 3 日後まで持続していることが示された。組織内の PDI の酵素活性レベルも NOC18 投与後に速やかに低下しており、有意な低下が 3 日後まで持続することを確認した。また、PDI 阻害作用を有することが知られる薬物であるシスタミン(50 μ g)あるいはセクリニン(50 μ g)をマウスの第三脳室内に投与すると、NOC18 を投与した場合と同様にオレキシニューロン選択的な細胞内凝集体の形成と細胞数の減少が誘導された。さらに、PDI siRNA を視床下部組織内に適用すると、siRNA の導入されたオレキシニューロンでは細胞内凝集体の形成が著明に促進された。

以上の結果から、外因性に NO を適用した条件において、視床下部組織内で PDI の S-ニトロ化修飾と酵素活性の低下が生じ、これがオレキシニン-A を含む異常な細胞内凝集体の蓄積と小胞体ストレスの亢進を伴ってオレキシニューロンの変性・細胞死を誘導することが示唆された。

3. 断眠負荷時の内因性 NO に依存したオレキシニューロンの病理変化

神経伝達物質としての NO は睡眠促進作用を有すると考えられており、実験動物に断眠負荷を

かけると大脳皮質、前脳基底部、視床下部外側部等の脳領域で NO の産生が増大することも知られている¹³⁾。そこで、脳組織内で内因性に産生された NO によってオレキシニューロンに病理変化が生じるか検討するため、マウスに対して明期の 12 時間 (8:00~20:00) に軽度のハンドリングを 3 時間おきに各 5 分間行うことで断眠負荷をかけた。12 時間の断眠負荷後、視床下部組織内の PDI の

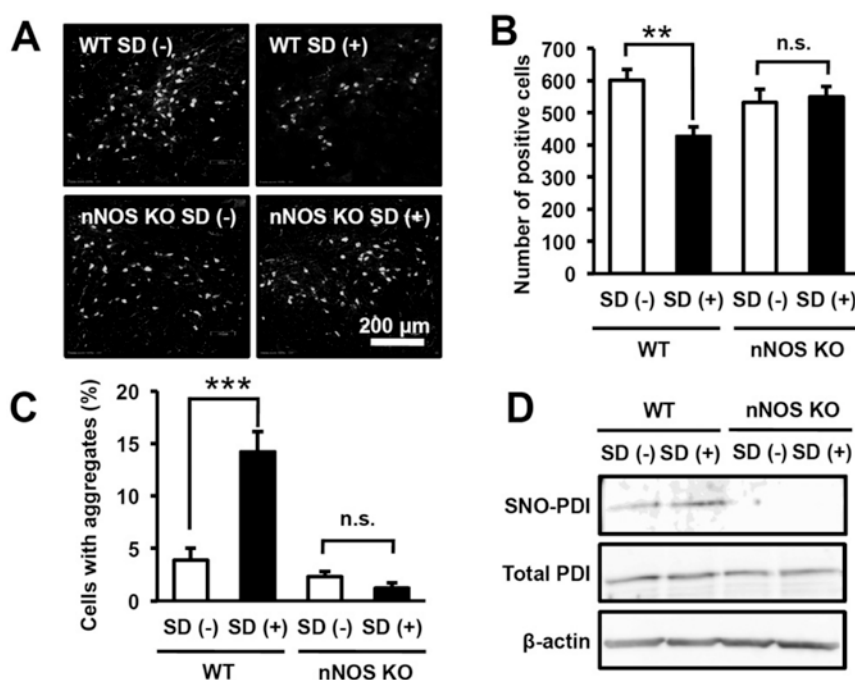


図5 断眠負荷はnNOS 依存的にオレキシニューロン選択的な病理変化を誘導する (論文12より改変)

A: 7日間の断眠負荷(SD)有り・無しの条件下での野生型(WT)マウスおよびnNOS欠損(KO)マウス視床下部のオレキシニン-A免疫組織化学の結果の典型例。

B: 7日間の断眠負荷による野生型マウスおよびnNOS欠損マウスのオレキシニューロン数の変化。n=5~6. ** $p < 0.01$; n.s., not significant.

C: 野生型マウスおよびnNOS欠損マウスにおける断眠負荷によるオレキシニューロン内の凝集体の形成率の変化。n=5~6. *** $p < 0.001$; n.s., not significant.

D: ビオチンスイッチアッセイによるプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)のS-ニトロ化レベルの評価結果。12時間の断眠負荷によるS-ニトロ化PDIの増加は、nNOS欠損マウスでは認められなかった。

S-ニトロソ化レベルは増大しており、内因性の NO 産生が亢進していることが示唆された。また断眠負荷を 7 日間連続して行ったマウスでは、オレキシンニューロンの細胞内凝集体の形成が亢進しており、オレキシンニューロン数の減少とカスパーゼ-3 の活性化も認められた。比較対象である MCH ニューロンでの病理変化は軽度であり、断眠の及ぼす効果はオレキシンニューロンに選択的であることが示唆された。

オレキシンニューロン自体は神経型 NO 合成酵素(nNOS)を発現していないものの、オレキシンニューロンの周囲には nNOS を含有するニューロンが多数存在することが、ラットを用いた他グループの研究において示されている¹⁴⁾。実際、我々も免疫組織化学により、マウス視床下部のオレキシンニューロンの近傍に nNOS 含有ニューロンが分布していることを確認した。加えて、神経活動のマーカーである c-Fos に対する免疫組織化学を実施した結果、これら nNOS 含有ニューロンの神経活動が 12 時間の断眠負荷後に亢進することが分かった。さらに、nNOS 欠損マウスを用いた検討を行い、断眠負荷によって野生型マウスの視床下部に誘導される PDI の S-ニトロソ化、オレキシン-A 免疫反応陽性凝集体の形成、およびオレキシンニューロンの減少が、nNOS 欠損マウスでは認められなくなることを明らかにした (図 5)。

大脳皮質において、断眠負荷による NO 産生亢進に誘導型 NO 合成酵素(iNOS)が寄与するとの報告もあるため、視床下部の病理変化への iNOS の関与についても検討した。12 時間の断眠負荷後のマウス視床下部では、主にアストロサイトにおいて iNOS 発現の軽度の亢進が認められた。しかし、断眠負荷に伴って生じる PDI の S-ニトロソ化亢進、オレキシン-A 免疫反応陽性凝集体の形成およびオレキシンニューロンの減少は、iNOS 欠損マウスにおいても野生型マウスの場合と同様に認められた。したがって、断眠負荷により生じるオレキシンニューロンの病理変化には、主として nNOS によって産生される NO が関与するものと結論された¹²⁾。

4. 高脂肪食負荷時の内因性 NO に依存したオレキシンニューロンの病理変化

次に、内因性の NO が断眠 (睡眠不足) 以外の生活習慣と関連した状況においてもオレキシンニューロンの変性に関与するか検討した。摂食制御に関わる視床下部亜核群の役割の詳細が近年明らかになりつつあり、視床下部弓状核に局在するプロオピオメラノコルチン(POMC)ニューロンおよびニューロペプチド Y (NPY)/アグーチ関連ペプチド(AgRP)ニューロンが一次情報処理を担うことが広く知られている。視床下部外側部のオレキシンニューロンは、これら弓状核ニューロンからの情報を受け取る二次ニューロンとして、摂食行動の制御に関与するとされている。また、高脂肪食を長期的に摂取させた実験動物では、弓状核を中心に生じた局所的炎症応答が摂食行動の制御異常や肥満の成立をもたらすことが示唆されている¹⁵⁾。この応答においては、TNF α 等の炎症性サイトカインが主要なメディエーターとして働くと考えられているが、iNOS の発現が局所で亢進しているとの報告もある。そこで我々は、高脂肪食摂餌によってオレキシンニューロンに病理変化が誘導されるか検討した¹⁶⁾。

総カロリーの 60%を脂肪分として含有する高脂肪食を、雄性 C57BL/6 マウスに 4 週齢時より 8 週間自由摂取させた。通常餌を摂取させた対照マウスと比較して、高脂肪食摂取マウスは体重および血糖値の有意な増加を呈した。8 週間の摂餌期間終了後 (12 週齢時) の視床下部組織につい

て免疫組織化学的評価を行ったところ、高脂肪食摂取マウスではオレキシンニューロンの有意な減少が認められた。一方で MCH ニューロン数には有意な変化は認められなかった。また、NO ドナー適用時や断眠負荷時と同様の細胞内異常凝集体の形成が高脂肪食摂取マウスの視床下部オレキシンニューロンの一部に観察され、非還元条件下での western blotting によってオレキシン免疫反応陽性の高分子量複合体が形成されていることも確認された。

NADPH ジアホラーゼ染色により視床下部組織内の NOS 活性の局在を調べたところ、オレキシンニューロンの分布する視床下部外側部では高脂肪食摂取の影響はほとんど認められなかったが、弓状核近傍において NOS 活性陽性細胞の増加が観察された。弓状核近傍において増加した NOS 活性陽性細胞の多くはミクログリアのマーカータンパク質である Iba-1 に対する免疫反応性を示した。また、8 週間の高脂肪食摂取後のマウス視床下部組織において iNOS タンパク質の発現が増大していることも確認された。さらに、iNOS 欠損マウスに対して高脂肪食摂取を 8 週間行った後に解析したところ、野生型マウスに見られるオレキシンニューロンの減少やオレキシンニューロン内の異常凝集体形成はほとんど認められなかった (図 6)。したがって、高脂肪食摂取の場合には断眠負荷時と同様の病理変化が NO 依存的にオレキシンニューロンに誘導されるものの、断眠負荷時とは異なり、iNOS 由来の NO が病理変化の誘導に重要な役割を担うことが示唆された。

高脂肪食による炎症応答は弓状核を中心に観察されるが、既報^{17,18)}によれば弓状核に位置する POMC ニューロンは 16~20 週間の高脂肪食摂取では減少せず、また NPY/AgRP ニューロンは 10 週間の高脂肪食摂取の後 POMC ニューロンへの線維投射が逆に増加する。すなわち、視床下部外側部のオレキシンニューロンは、炎症応答の中心から離れた位置に存在するにも拘らず、炎症応答中心部に位置するニューロン群と比較しても高脂肪食負荷に対して脆弱であることが示唆された。ただし、高脂肪食負荷の場合は、断眠負荷時に見られた小胞体ストレスの増大やカスパーゼ-3 の活性化等は著明ではなかった。高脂肪食負荷の期間は断眠負荷の期間に比べて長期にわたっており、細胞死の誘導に直接つながる事象が散発的に生じているために、通常の組織化学的手法では変化を十分に捉えられなかった可能性が考えられる。一方で、高脂肪食負荷時に観察された病理像が可逆的なも

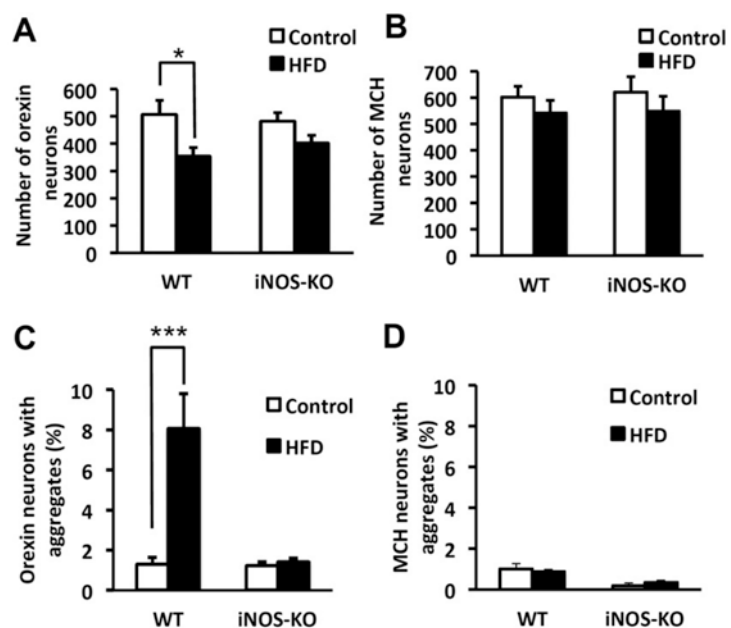


図6 高脂肪食負荷はiNOS 依存的にオレキシンニューロン選択的病理変化を誘導する (論文 16 より改変)

A: 高脂肪食(HFD)を 4 週齢時から 8 週間摂餌した野生型マウスおよび iNOS 欠損マウスの視床下部オレキシンニューロンの計数結果。n=5~6. *p<0.05。

B: A と同条件下での MCH ニューロンの計数結果。n=5~6。

C: 野生型マウスおよび iNOS 欠損マウスのオレキシンニューロンにおける細胞内凝集体の形成率。n=5~6. ***p<0.001。

D: MCH ニューロンにおける細胞内凝集体の形成率。n=5~6。

のであり、細胞死を伴っていない可能性も残されており、この点については今後検討が必要である。いずれにしても、オレキシニューロンに誘導される病理変化は、高脂肪食摂取時に認められる日中の傾眠、摂食行動の日周リズムの乱れ、あるいは報酬系の機能不全などに関係する可能性があり、興味深い知見と言える。

5. 加齢に伴うオレキシニューロンの病理変化

加齢は、中枢神経変性疾患の多くに共通して関与する主要な危険因子として認識されている。老齢ラットにおいて視床下部オレキシニューロンが減少しているとの報告もあるが⁶⁾、病理変化についての詳細な検討は行われていない。そこで老齢（90 週齢）C57BL/6 マウスを用い、視床下部の組織化学的・生化学的指標について若齢（10 週齢）マウスとの比較を行った（図 7）。その結果、老齢マウス視床下部では若齢マウス視床下部と比較してオレキシニューロンが有意に減少していることが分かった。一方で MCH ニューロン数には両者に差が認められなかった。また細胞内凝集体の形成については、オレキシニューロンと MCH ニューロンのいずれについても加齢による有意な亢進が認められたが、オレキシニューロンにおける変化がより著明であった。さらに、PDI の S-ニトロソ化レベルが老齢マウスの視床下部組織において増大していた。これらの結果は、視床下部内での NO 産生亢進に基づく PDI の不活性化とオレキシニューロンの病理変化が加齢によっても誘導されることを示唆する。

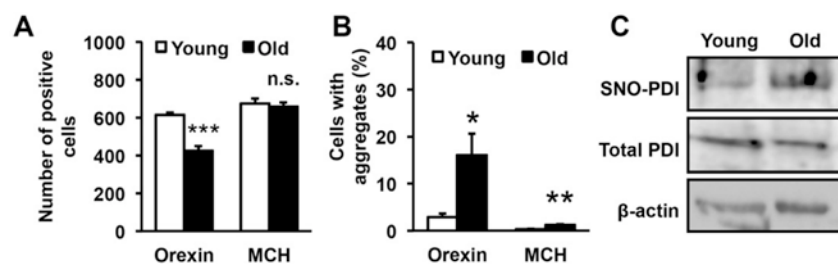


図7 加齢はオレキシニューロン選択的病理変化を誘導する

A: 若齢(10週齢)マウスと老齢(90週齢)マウスの視床下部におけるオレキシニューロンおよびMCHニューロンの計数結果。n=5. *** $p < 0.001$ vs. Young; n.s., not significant.

B: 若齢(10週齢)マウスと老齢(90週齢)マウスのオレキシニューロンおよびMCHニューロンにおける細胞内凝集体の形成率。n=5. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Young.

C: ビオチンスイッチアッセイによるPDIのS-ニトロソ化レベルの評価結果。

6. オレキシニューロンの病理変化と機能異常との関係

ここまでの結果は、睡眠不足、高脂肪食摂取、加齢といった多様な要因がいずれも脳内の視床下部局所において NO 依存的に PDI の機能不全を誘導し、これがオレキシを含む細胞内異常凝集体の形成を伴ってオレキシニューロンの変性を招くことを示唆している。しかし、細胞内凝集体の形成がニューロン変性・細胞死誘導に積極的に関わる事象なのか、あるいは単なる付随的事象でしかないのかは不明である。そこで、オレキシ免疫反応陽性凝集体形成の病態生理学的意義についていくつかの検証を行った。

まず、異常凝集体の細胞内での局在を調べるため、オルガネラ特異的マーカーとオレキシ-Aとの蛍光二重免疫染色を試みた。PDI 阻害薬であるシスタミン(50 μ g)あるいは 16F16 (5 μ g)を視床下部に投与したマウスにおいて、オレキシニューロン内に形成されるオレキシ-A 免疫反応陽性凝集体は、主としてゴルジ体特異的なマーカーである GM130 と共局在した。新生仔ラット脳

より調製した培養視床下部組織切片にシスタミン(100 µg/ml)を 24 時間適用した場合にも、オレキシニューロンの細胞体において GM130 と共局在するオレキシ-A 陽性凝集体の形成が確認された。これらのことから、凝集体が主に蓄積するのは当初予想された小胞体ではなく、ゴルジ体であることが示唆された。

次に、凝集体形成がオレキシンの細胞外への遊離に及ぼす影響について、human プレプロオレキシ cDNA を一過性に発現させた AD293 細胞を用いて検討した。cDNA の導入 24 時間後より細胞にシスタミン(100 µg/ml)を 24 時間処置し、オレキシ-A の免疫細胞化学と ELISA による細胞外遊離量定量を行ったところ、シスタミンがオレキシ-A 免疫反応性の細胞内凝集体形成を促進するとともに、オレキシ-A の細胞外遊離量を著明に減少させることが明らかになった。神経ペプチドは一般に、生合成された後にゴルジ体を経て分泌小胞に取り込まれる。この分泌小胞が軸索輸送によって神経終末に移行した後に、オレキシは伝達物質として細胞外に遊離されると考えられる。シスタミンによる PDI 阻害下においてゴルジ体に集積した異常凝集体としてのオレキシは、おそらく分泌小胞への取込みおよびそれ以降の過程への移行ができないため、細胞外への遊離が抑制されるものと思われる。

そこで、PDI の機能不全が神経伝達物質としてのオレキシンの遊離を阻害する可能性について、in vivo での検証を行った。オレキシニューロンは脳内においてセロトニンニューロンやノルアドレナリンニューロンなどのモノアミン作動性ニューロンに投射し、それらの神経活動を促進的に調節している。また逆に、モノアミン作動性ニューロンもオレキシニューロンに投射を

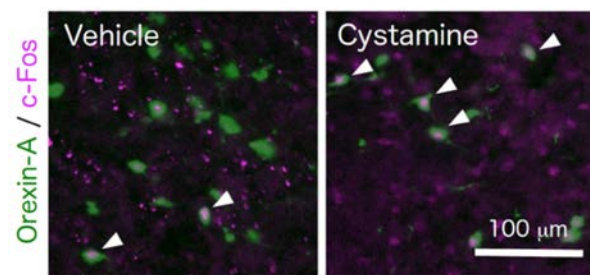


図8 PDI 阻害によるオレキシニューロン活動の亢進
溶媒(vehicle)あるいはシスタミン(50 nmol)の視床下部内投与7日後のオレキシ-A(緑)およびc-Fos(マゼンタ)の免疫組織化学の結果の典型例。矢頭は二重陽性細胞を示す。

形成しており、オレキシニューロンの活動に対して負のフィードバック制御を行っている¹⁾。オレキシンの遊離が低下した状況下では、このフィードバック制御が解除されることによってオレキシニューロンの神経活動は亢進するものと予想される。そこで、マウスに種々の処置を行った際のオレキシニューロンの活動の変化について、c-Fos の発現を指標として検証した。シスタミン(50 µg)を視床下部内に投与したマウスでは、投与 1 ～ 7 日後において溶媒投与群と比較して c-Fos 陽性反応を示すオレキシニューロンの割合が著明に増加していた(図8)。興味深いことに、12 時間の断眠負荷あるいは 8 週間の高脂肪食摂餌を行ったマウスにおいても同様に、全オレキシニューロンに占める c-Fos 陽性オレキシニューロンの割合は著明に増加していた。なお、c-Fos 陽性オレキシニューロンの割合の増加は、セロトニン 5-HT_{1A} 受容体遮断薬である WAY100135 (2 mg/kg)をマウスの腹腔内に投与した場合にも観察された。これらの結果は、PDI の阻害下でオレキシ遊離が低下すると、セロトニンニューロンなどによる負のフィードバック機構が解除されることによって、オレキシニューロンの興奮性が増大するという見解を支持するものである。

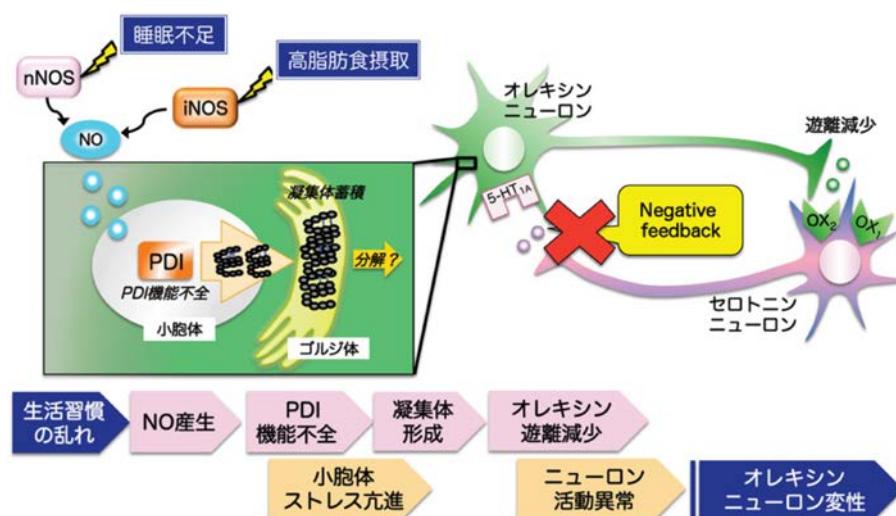


図9 想定されるオレキシニューロンの選択的変性誘導機序

慢性的な睡眠不足や高脂肪食摂取等の生活習慣の乱れは、視床下部において局所的にNOの産生を促す。産生されたNOは近傍のオレキシニューロンに到達し、PDIをS-ニトロソ化することでその酵素活性を低下させる。その結果、ジスルフィド結合の組合せの過誤を起こしたオレキシニン-A（もしくはプロオレキシニン）が細胞内に凝集体として蓄積する。凝集体は小胞体ストレス亢進の原因となる他、ゴルジ体に蓄積・滞留することにより神経終末からのオレキシニンの遊離量を減少させる。オレキシニン遊離の減少は、セロトニンニューロン等のモノアミンニューロンの興奮性を低下させるため、負のフィードバック制御が解除されることによりオレキシニューロンの神経活動は亢進する。神経活動の過剰亢進が持続することによってオレキシニューロンの変性が促進される。

7. おわりに

以上の一連の研究で得られた知見により、視床下部オレキシニューロンの病理変化の誘導においてNOが重要な役割を担うことが明らかとなった。視床下部組織内では、睡眠不足・高脂肪食摂取といった生活習慣や加齢などのさまざまな要因によって局所的にNOの産生量が増大する。産生されたNOは、オレキシニューロンのもつPDIを不活性化するため、折りたたみ不全を起こしたオレキシニン-A（もしくはプロオレキシニン）が異常凝集体として細胞内に蓄積する。このような異常オレキシニンペプチドは、一つには小胞体ストレスを増大させることでオレキシニューロンの変性を促進する要因となると考えられる。また併せて、オレキシニンが異常凝集体としてゴルジ体に蓄積・滞留することで神経終末部のオレキシニンが枯渇し、遊離が減少する結果、オレキシニューロンへの負のフィードバック制御が解除されることによって神経活動が異常に亢進することもオレキシニューロンの変性を促す要因となるものと考えられる（図9）。

アルツハイマー病におけるアミロイド前駆タンパク質、家族性パーキンソン病における α -シヌクレインなど、タンパク質の折りたたみ異常が中枢神経変性疾患の病理形成に関与する例は多数知られているが、神経ペプチドの折りたたみ異常が病理形成に関わるとする事例は我々の知見が初めてである。オレキシニンの減少はナルコレプシーをはじめとする多様な精神神経系疾患の患者に認められる現象であり、本研究で明らかにした病理形成機構はさまざまな精神神経病態の理解に貢献するものと考えられる。一方で、NOによってS-ニトロソ化修飾を受けるタンパク質はPDI以外にも数多く知られており¹⁰⁾、それらがオレキシニューロンの病理にどのように寄与しているのかについても今後検討すべき課題と言える。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、筆者の所属研究室メンバーの多大な努力・協力に支えられて得られたものです。また、研究遂行にあたってご支援をいただきました公益財団法人篷庵社の関係者の皆様、研究助成へのご推薦を賜りました佐藤公道先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Tsujino N, Sakurai T. *Pharmacol. Rev.* 61:162-176, 2009.
- 2) Zeitzer JM, Nishino S, Mignot E. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:368-374, 2006.
- 3) Kornum BR, Faraco J, Mignot E. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21:897-903, 2011.
- 4) Thannickal TC, Lai YY, Siegel JM. *Brain* 130: 1586-1595, 2007.
- 5) Janas-Kozik M, Stachowicz M, Krupka-Matuszczyk I, Szymaszal J, Krysta K, Janas A, Rybakowski JK. *Regul. Pept.* 168:5-9, 2011.
- 6) Kessler BA, Stanley EM, Frederick-Duus D, Fadel J. *Neuroscience* 178:82-88, 2011.
- 7) Michinaga S, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. *J. Neurosci. Res.* 88:214-221, 2010.
- 8) Katsuki H, Kurosu S, Michinaga S, Hisatsune A, Isohama Y, Izumi Y, Kume T, Akaike A. *Peptides* 31:1131-1138, 2010.
- 9) Michinaga S, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. *Neuroscience* 190:289-300, 2011.
- 10) Nakamura T, Tu S, Akhtar MW, Sunico CR, Okamoto S, Lipton SA. *Neuron*, 78:596-611, 2013.
- 11) Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. *Nature* 441:513-517, 2006.
- 12) Obukuro K, Nobunaga M, Takigawa M, Morioka H, Hisatsune A, Isohama Y, Shimokawa H, Tsutsui M, Katsuki H. *J. Neurosci.* 33:12557-12568, 2013.
- 13) Kostin A, Rai S, Kumar S, Szymusiak R, McGinty D, Alam MN. *Neuroscience* 179:159-169, 2011.
- 14) Cutler DJ, Morris R, Evans ML, Leslie RA, Arch JR, Williams G. *Peptides* 22:123-128, 2001.
- 15) White CL, Pistell PJ, Purpera MN, Gupta S, Fernandez-Kim SO, Hise TL, Keller JN, Ingram DK, Morrison CD, Bruce-Keller AJ. *Neurobiol Dis.* 35:3-13, 2009.
- 16) Nobunaga M, Obukuro K, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Tsutsui M, Katsuki H. *Neurochem Int.* 78:61-66, 2014.
- 17) Berkseth KE, Guyenet SJ, Melhorn SJ, Lee D, Thaler JP, Schur EA, Schwartz MW. *Endocrinology* 155:2858-2867, 2014.
- 18) Newton AJ, Hess S, Paeger L, Vogt MC, Fleming Lascano J, Nillni EA, Brüning JC, Kloppenburg P, Xu AW. *Endocrinology* 154:172-183, 2013.

課題名： 蛋白質工学的手法によるサイトカイン－レセプター相互作用の複雑性の理解とその制御による革新的創薬

研究代表者： 神戸学院大学薬学部 生体機能制御学研究室／国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 バイオ創薬プロジェクト 角田 慎一

はじめに

サイトカインとそのレセプターを介するシグナルは、生体の免疫応答制御の中心を担うことから、自己免疫疾患をはじめ、種々の疾患に対する創薬標的として大きく期待されている。従来、サイトカイン－レセプターの相互作用は、一般に、リガンドがレセプターに結合して濃度依存的に細胞内にシグナル伝達を生じるという、単純な相互作用様式で捉えられてきた。しかし、細胞や生体においては、必ずしも単純な相互作用様式では説明できない生物応答・生命現象がある。例えば、腫瘍壊死因子 $\text{TNF-}\alpha$ のレセプター (TNFR) には TNFR1 と TNFR2 の二つのサブタイプが存在する。ある種の細胞では、それらのうち一方のみを介して、あるいは両レセプターを介して、さらにそれらが異なるバランスで細胞に作用する結果、最終的に細胞死 (アポトーシス) を誘導するか、あるいは細胞の活性化 ($\text{NF-}\kappa\text{B}$ 経路の活性化) を誘導するかといった異なる応答を示す。また、単純に TNF を阻害する既存の治療薬では、投与によって逆に病態が悪化する病態 (多発性硬化症は TNF が病態に関連するが、抗体 TNF 抗体を投与すると脱髄症状が悪化する) が存在することは、単純な相互作用では捉えられないことを示唆している。また TNF に関しては、神経や心筋において保護作用を発揮することなどが報告され、TNFR2 の制御 (活性化) が、一部の自己免疫疾患に対する全く新たな治療戦略になる可能性を示している。しかし、TNFR2 のシグナル、機能や病態との連関に関しては未だ不明な点が多い。

申請者はこれまでに、サイトカインシグナルと細胞応答の複雑性を解析するために、ファージ表面提示法を駆使することで、様々な結合様式を有するサイトカイン改変体を創製する技術 (機能性人工タンパク質創製技術) を確立してきた (図表 1) (Shibata H, Tsunoda S, J Biol Chem 2008)。特に TNF と TNFR1/R2 の相互作用にフォーカスし、TNFR1 あるいは TNFR2 指向性の TNF 改変体や、アゴニストあるいはアンタゴニストとして作用する TNF 改変体など、多様なサイトカイン改変体の創製に成功している (図表 2) (Abe H, Tsunoda S, Biomaterials 2011 ほか)。これら多様なサイトカイン改変体を機能解析ツールとして活用すれば、複雑なサイトカイン－レセプターの相互作用の仕組みの解明につながるものと考えられる。

以上の研究背景と先行研究を基に、本助成研究では、独自の機能性人工タンパク質創製技術を有効活用し、種々のサイトカイン改変体の創製及びサイトカイン－レセプター相互作用の解析を通じて、革新的なバイオ医薬の創製に展開することを目的とした。特に創薬標的として未開発の TNFR2 にフォーカスして、相互作用、シグナル伝達の解析及びその制

御薬の開発を試みた。

TNFR2 の制御性 T 細胞における発現と機能

TNF は炎症性サイトカインとして知られ、免疫応答の活性化に関与する。2 種類の TNF レセプターサブタイプのうち、TNFR1 は炎症を惹起するシグナルに関わるが、TNFR2 のシグナルは炎症抑制に関わることが示唆されている。そこで TNFR2 が免疫の抑制機構として機能するリンパ球、制御性 T 細胞 (Treg) の機能に関連しているかどうか、そして TNFR2 が Treg の機能をコントロールする創薬標的としての可能性について検討した。

Treg (CD4⁺, CD25⁺) および Conventional T cells (Tconv; CD4⁺, CD25⁻, Treg 以外の Th1, Th2, Th17 などのエフェクター T 細胞全般) の各 TNF 受容体 (TNFR1 および TNFR2) の発現を確認するために、マウスから摘出した脾臓、鼠径部リンパ節、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節および末梢血単核球を FCM によって解析した。Figure 1 には、脾臓での解析結果を例示した。TNFR2 は Treg において 43% に発現していたのに対して、Tconv では 5.5% と低値を示した。一方、TNFR1 は Treg および Tconv とともに低値 (5% 以下) を示した。また、その他の 2 次リンパ組織においても同様の傾向が示され、TNFR2 は Treg の約 40% に発現していたが、Tconv では 10% 以下と低値であった一方、TNFR1 は Treg および Tconv とともに低値であった。従って、TNFR2 は Tconv と比較して、Treg に高頻度かつ高レベルに発現することが示された。

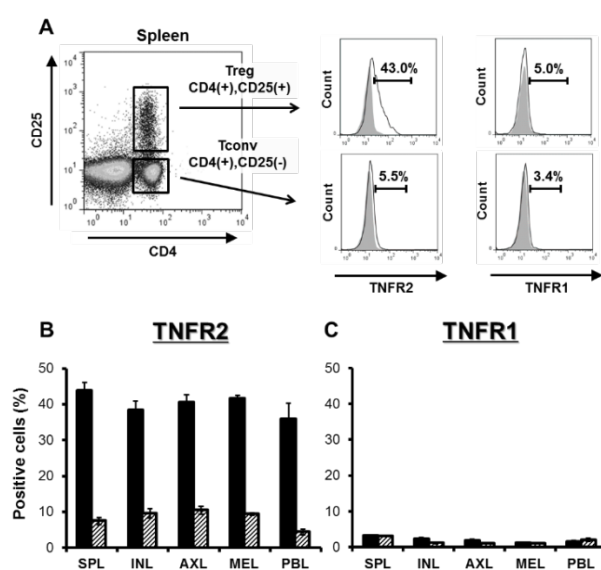


Figure 1 Expression levels of TNFR2 and TNFR1 in Treg and Tconv cells.

Freshly isolated mouse lymphocytes were stained for CD4, CD25, TNFR2 and TNFR1. CD4 positive cells were analyzed by FACS gating on lymphocytes via their FSC and SSC properties and CD4 staining. (A) TNFR2 and TNFR1 expression on Tregs (CD4⁺, CD25⁺ cells) and Tconvs (CD4⁺, CD25⁻ cells) in splenocytes were analyzed using an mTNFR2-specific mAb and mTNFR1-specific mAb (open histograms) or isotype control mAb (shaded histograms). (B) Percentage of TNFR2-expressing cells in Tregs and Tconvs. (C) Percentage of TNFR1-expressing cells in Tregs and Tconvs. In (B) and (C): black bars, Tregs (CD4⁺, CD25⁺ cells); hatched bars, Tconvs (CD4⁺, CD25⁻ cells). SPL: splenocytes, INL: inguinal lymphocytes, AXL: axillary lymphocytes, MEL: mesenteric lymphocytes, PBL: peripheral blood lymphocytes. Each bar represents the mean $\pm$ SEM (n=3).

Treg の細胞増殖における TNFR2 の関与

Treg における TNFR2 の機能を明らかにするために、細胞増殖性に着目し検討を行った。精製した Treg の T 細胞抗原受容体 (TCR) の刺激と TNFR2 のリガンドである TNF の刺激による細胞増殖応答を、CFSE アッセイによって解析した。抗マウス CD3 抗体および抗マウス CD28 抗体によって抗原非特異的に TCR を刺激した条件では、分裂した細胞の割合が 7.6%であったのに対して、Treg の増殖作用が知られる IL-2 刺激では 20.2%に増加した (Figure 2)。TNF を作用させて場合、IL-2 刺激と同様に Treg の分裂細胞の割合が 13.5%に増加した。さらに、TNF と IL-2 の共刺激では 55.2%と、各単独刺激群と比較して顕著に Treg の細胞増殖が亢進していた。したがって、TNFR2 を介するシグナルによって、Treg の細胞増殖が促進されることが示唆された。

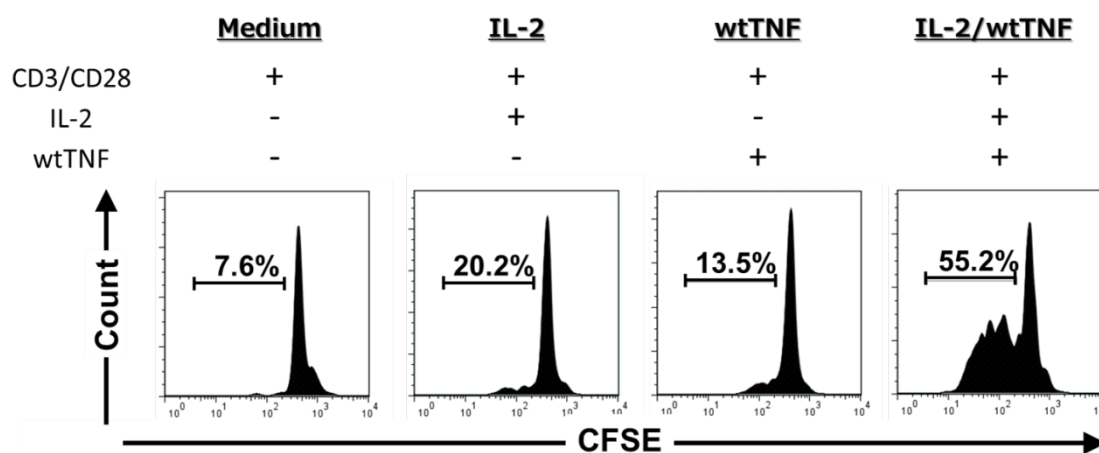


Figure 2 Effect of TNF and IL-2 on the Treg proliferation monitored using CFSE labeling.

CFSE labeled Tregs (5×10^4 cells/well) were stimulated with anti-CD3 mAb (0.5 μ g/ml) and anti-CD28 mAb (0.25 μ g/ml) in the presence of IL-2 (100 units/ml), wild-type (wt) mouse TNF (10 ng/ml), IL-2 and wt mouse TNF (10 ng/ml). After 3 days, cells were analyzed by FACS. Target cells were gated by FSC and SSC plots (lymphocyte gate). Values shown are the percentage of expanded cells.

TNF/TNFR2 複合体の構造解析

TNFR2 の機能とシグナル伝達の仕組みを解析するため、構造生物学的解析を試みた。TNFR1 の立体構造は解読されているが TNFR2 の構造は未解読であった。そこで大阪大学薬学研究所 向洋平博士、熊本大学薬学教育部 中村照也博士の協力により、SPRING8TNF/TNFR2 の結晶構造を解析した。TNF/TNFR2 の細胞外ドメインは Figure 3 に示す構造をとっていることを明らかとした。また、細胞に発現する TNFR2 タンパク質複合体の電気泳動解析等を合わせて構造シミュレーションを行った結果、TNF が TNFR2 に結合する際には細胞膜上でクラスタリングを生じ、それがシグナルのイニシエーションを誘導しているものと考えられた。

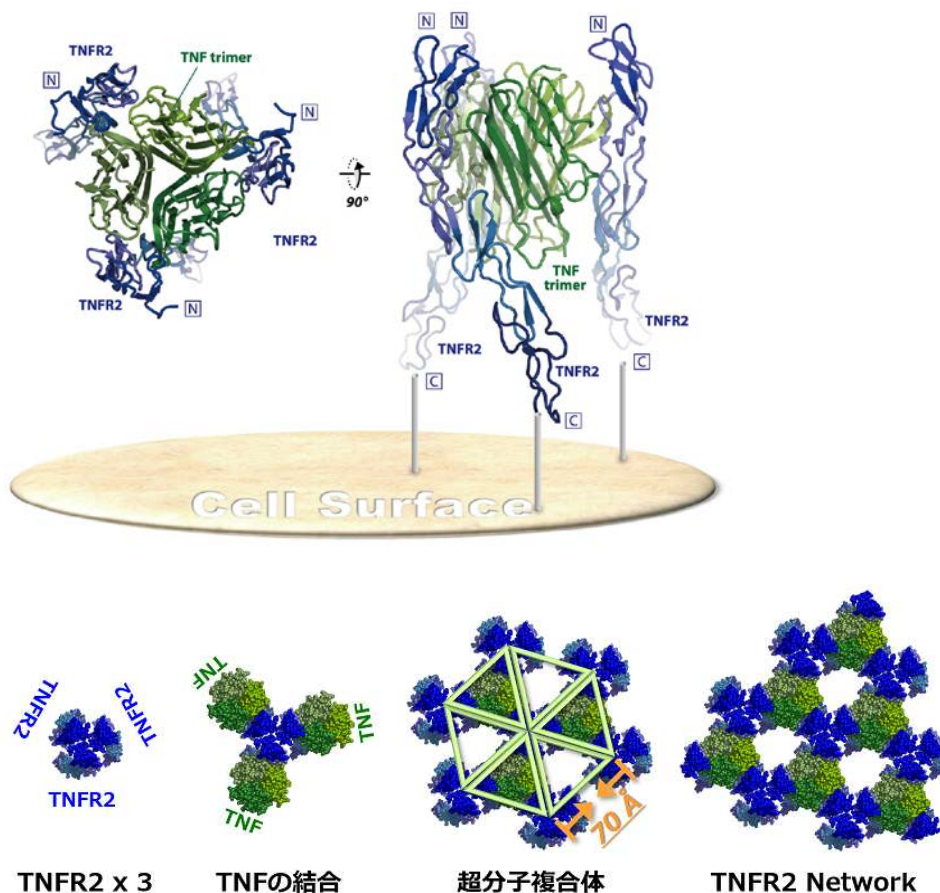


Figure 3 Structure of extracellular domain of TNF/TNFR2 complex and predicted signal initiation model on the cell surface

(Upper) Crystal structure analysis was performed using SPring8 beam line.

(Lower) Predicted signal initiation model on cell surface via TNF/TNFR2 cluster formation.

TNFR2 特異的細胞内シグナルの探索

一方で、TNFR2 シグナル伝達機構の詳細を解明のため、TNFR2 シグナルに関わる細胞内タンパク質の探索を試みた。TNFR2 に結合するタンパク質を TNFR2 シグナル複合体として得るために、リガンドとして独自に作製したヒト TNFR2 指向性アゴニスティック TNF 変異体 (R2-7) をヒト TNFR2 発現 HEK293 細胞に作用させ、免疫沈降により TNFR2 の細胞内複合体を濃縮した。

次に、免疫沈降で得られた複合体に含まれるタンパク質を、LC-MS/MS によるショットガンプロテオミクスにより網羅的に解析した。その結果、TNFR2 複合体に結合すると考えられる数十種類の候補タンパク質を同定することができた (Table 1)。これら候補タンパク質について、シグナル伝達時における TNFR2 への結合を精査した結果、TNFR2 の新たなアダプター分子の候補として、アミノペプチダーゼ P3 (APP3) を見出した。

Table 1. List of proteins identified in the R2-7/TNFR2 complex by shotgun MS analysis.

A HEK293T-TNFR2 cells

Accession	Protein name	Protein score	Coverage (%)	Mw (kDa)
P20333	Tumor necrosis factor receptor type II (TNFR2)	1324.76	34.06	48.3
Q12933	TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)	916.79	36.93	55.8
Q9NQH7	Aminopeptidase P3 (APP3)	868.20	31.95	57.0
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	491.72	6.88	121.3
O43464	Serine protease HTRA2, mitochondrial	312.19	13.97	48.8
P01764	Ig heavy chain V-III region VH26	261.56	16.24	12.6
O75190	DnaJ homolog subfamily B member 6	202.75	11.35	36.1
P33778	Histone H2B type 1-B	199.04	18.25	13.9
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	154.54	2.85	52.9
P01375	Tumor necrosis factor (TNF)	142.65	5.15	25.6
Q969P6	DNA topoisomerase I, mitochondrial	141.54	4.99	69.8
Q9UGV6	High mobility group protein 1-like 10	137.28	16.11	24.2
P61257	60S ribosomal protein L26	133.64	22.76	17.2
P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	132.52	12.79	10.1
Q8NFH4	Nucleoporin Nup37	129.94	4.91	36.7
Q13490	Inhibitor of apoptosis protein 2 (IAP1)	129.19	9.06	69.9
Q71UM5	40S ribosomal protein S27-like protein	127.66	15.48	9.5
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19	126.62	11.31	55.1
Q9NR28	Diablo homolog, mitochondrial (DIABLO)	125.61	11.3	27.1
P32119	Peroxiredoxin-2	121.88	14.65	21.9
P40429	60S ribosomal protein L13a	117.41	18.23	23.6
Q6P5R6	60S ribosomal protein L22-like 1	102.65	19.67	14.6

B Jurkat-TNFR2 cells

Accession	Protein name	Protein score	Coverage (%)	Mw (kDa)
Q562R1	Beta-actin-like protein 2	494.55	14.10	42.0
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like	374.37	9.20	70.3
P20333	Tumor necrosis factor receptor type II (TNFR2)	202.74	13.23	48.3
P01375	Tumor necrosis factor (TNF)	116.85	5.15	25.6

‘Accession’ is the identifier used for UniProt; ‘Protein score’ is the identification score obtained with Mascot software; ‘Coverage’ is the percentage of sequence coverage obtained with identified peptides; ‘Mr’ is the theoretical molecular masses of the proteins. Proteins indicated in bold are known to be included in the TNFR2 signaling complex.

これまでに、APP3 と TNFR2 との関連について報告はなく、TNFR2 シグナルにおける APP3 の機能については不明であった。そこで、APP3 が TNFR2 シグナルにおいて、どのような機能を担うのか、さらなる解析を試みた。

まず、in vitro における APP3 と TNFR2 の結合について解析した。その結果、ミトコンドリアに局在する APP3m だけが TNFR2 へ結合することが判明し、細胞質に発現する APP3c は TNFR2 シグナルへは関与していないと考えられた (Figure 4)。APP3m と APP3c は、N 末端の 79 アミノ酸を除いて全く同じ配列である。従って、この領域に TNFR2 と相互作用する配列が含まれており、両 APP3 の結合様式に違いが生じていると考えられた。

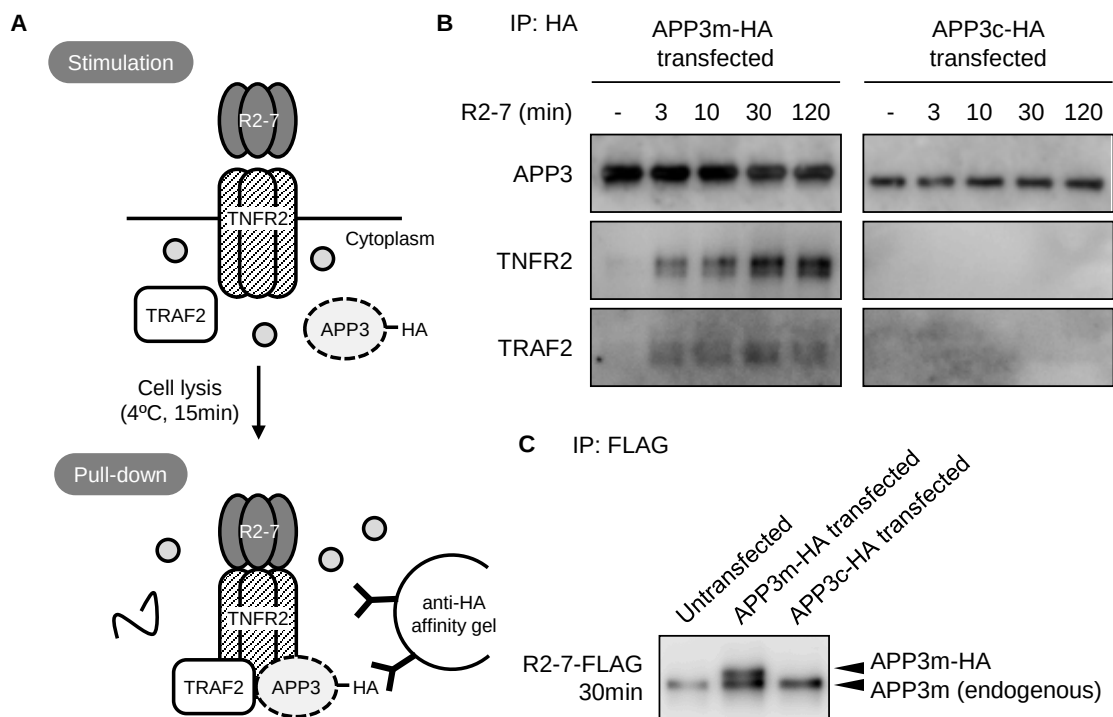


Figure 4 APP3m, but not APP3c binds to TNFR2

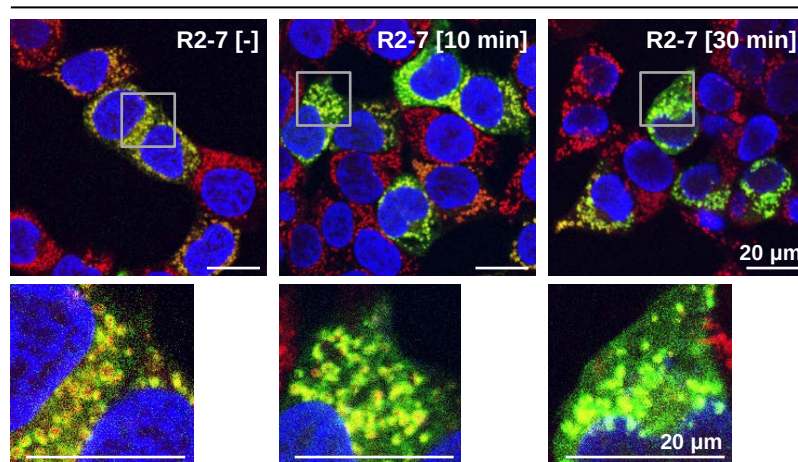
(A) Scheme of TNFR2 signaling complex purification by HA-tag. In APP3m-HA transfected cells, APP3m-HA is recruited to intracellular domain of TNFR2 by R2-7 stimulation. After cell lysis, the TNFR2 signaling complex is pulled down using an anti-HA affinity gel. The complex is eluted by competition with an HA peptide. (B) HA-tagged APP3m (APP3m-HA) or APP3c-HA was transiently expressed in HEK293T-TNFR2 cells. R2-7 (100 ng/ml) stimulation followed by anti-HA immunoprecipitation was performed to determine the time-dependent manner of APP3m or APP3c recruitment to the TNFR2 signaling complex. (C) Anti-FLAG immunoprecipitation was performed using APP3-transfected HEK293T-TNFR2 after R2-7-FLAG (100 ng/ml) stimulation. Western blotting confirmed that endogenous APP3m was detected in cells transfected with both APP3m-HA and APP3c-HA. However, transfected APP3 was detected only in the APP3m-HA transfectant.

APP3 を介する TNFR2 からの細胞内シグナル伝達機構

APP3 の機能とシグナル伝達メカニズムを解析するため、両 APP3 の細胞内局在を蛍光イメージングにより検討した。その結果、TNFR2 シグナルにより、APP3m がミトコンドリアから

細胞質へ移行することが明らかになった (Figure 5)。TNFR2 の活性化により、APP3m がミトコンドリアから細胞質に移動するメカニズムについては不明であり、さらなる解析が必要である。

A HEK293T-TNFR2-APP3m



B HEK293T-TNFR2-APP3c

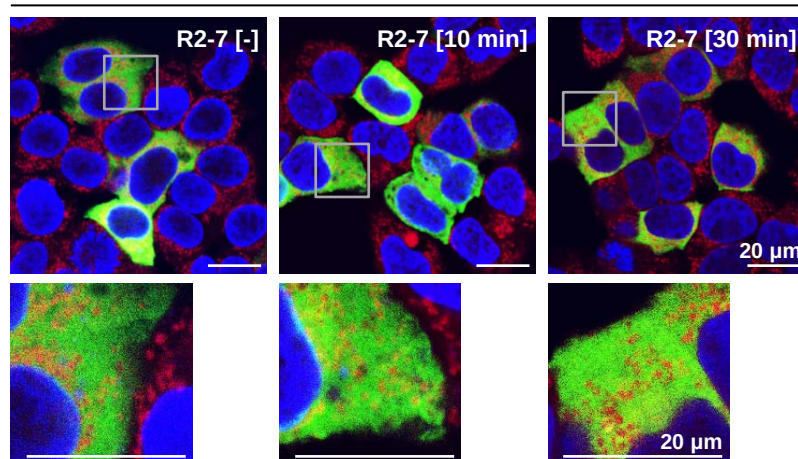


Figure 5 Alteration of APP3 localization by TNF stimulation

HEK293T-TNFR2 cells transiently expressing APP3m-Venus (A) or APP3c-Venus (B) were stained with 200 nM MitoTracker Red CMXRos for 30 min. The cells were then cultured with or without R2-7 (100 ng/mL) for 10 or 30 minutes, and fixed with 4% PFA. Cellular nuclei were stained with DAPI. Localization of APP3m and APP3c (green), mitochondria (red) and nuclei (blue) were visualized using a confocal laser scanning microscope (bar = 20 μ m).

次に、APP3 が細胞内のどのようなシグナル経路に関与するか検討した (Figure 6)。APP3m を一過性に発現させた HEK293T-TNFR2 細胞、あるいはノックダウンした HEK293T-TNFR2 細胞、及び遺伝子導入していない HEK293T-TNFR2 細胞を R2-7 で刺激した後、TNFR2 のシグナル経路として報告されている MAPK、NF- κ B、Akt のリン酸化状態の変化を Western blotting にて解析した。その結果、MAPK 経路の JNK のリン酸化において影響が認められた (data not

shown)。JNK のリン酸化を誘導する具体的なシグナル経路については不明であるため、さらに詳細な解析が必要ではあるが、TNFR2 がリガンドの刺激を受けると、ミトコンドリアに局在する APP3m が細胞質へと移行し、アダプター分子として TNFR2 に結合することで、TNFR2 下流の JNK シグナルを活性化させるという、新たな TNFR2 シグナル伝達制御機構の存在が示された。

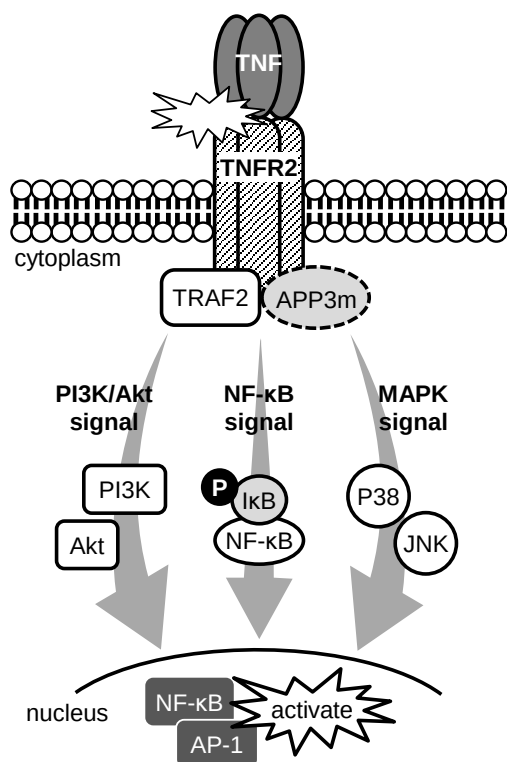


Figure 6 TNFR2 signaling pathway

TNFR2 induces the activation of the transcription factor such as NF-κB and AP-1 through various intracellular signaling pathways (e.g. MAP kinase pathway, NF-κB pathway and PI3k/Akt pathway).

おわりに

本助成研究では、複雑な生理作用や病態との関わりを示すサイトカインシグナルのメカニズムとその制御による創薬を念頭に、免疫抑制に関わることが明らかになりつつある TNF/TNFR2 のシグナルに着目し、その構造・機能・メカニズム等の解析を試みた。

本研究では、まず TNFR2 と Treg の関連を解析し、TNFR2 が Treg に特異性高く発現すること、また、その細胞増殖に関与することを明らかとした。マウスとヒトで Treg のフェノタイプに差異があることが知られているが、ヒトリンパ球のエフェクター Treg 分画においても TNFR2 の特異的発現は確認できている。よって、TNFR2 は Treg の機能をコントロールする創薬標的になりうると考えられる。

一方で、TNFR2 のシグナル機構の解明のため、TNF/TNFR2 複合体の構造解析、さらに細胞

内シグナル関連分子の探索を試みた。我々が解読した TNF/TNFR2 結晶構造のデータ、および、結晶構造のデータに基づくシミュレーションにより見出した、TNF/TNFR2 が細胞表面でクラスターを形成し、それによってシグナルイニシエーションが生じているという知見は、TNFR2 とそのシグナルを標的とする創薬研究等に有用な情報を提供するものと期待される。

また一方で、ファージ表面提示法を駆使して独自に開発した TNFR2 指向性 TNF 構造変異体 (R2-7) を用い、TNFR2 の新たなアダプター分子の探索を試みた。その結果、TNFR2 シグナル特異的なシグナル伝達候補分子として APP3 を見出した。TNFR2-APP3 を介する細胞内シグナル伝達経路は、TNFR2 特異的な低シグナル制御薬の開発等につながるものと期待される。

以上、TNFR2 とそのシグナルは免疫抑制に関わる Treg の機能調節に関与することが明らかとなった。TNFR2 のシグナルを特異的に活性化し、Treg 機能を正にコントロールすることができれば、各種免疫疾患の治療につながるものと期待される。また、TNFR2 のシグナルを特異的に阻害し、Treg 機能を負に制御することができれば、がんにおける免疫抑制状態を解除するがん免疫療法につながるものと期待される。TNFR2 のシグナルに関してはまだ不明な点も多く残されているが、今後、本研究成果を足がかりとして、免疫疾患やがんなどに対する革新的な治療法・治療薬の開発に貢献したいと願っている。

謝辞

本研究のご支援いただきました公益財団法人篷庵社に謝意を表します。また、本研究遂行にあたり種々御協力賜りました大阪大学薬学研究科薬剤学分野、同毒性学分野、熊本大学薬学教育部機能分子構造解析学分野、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所バイオ創薬プロジェクト、神戸学院大学薬学部生体機能制御学研究室の先生方、学生の皆様に感謝申し上げます。

参考論文

- Mukai Y, Tsunoda S, et al. Sci Signal, 3:ra83, 2010.
Abe Y, Tsunoda S, et al, Biomaterials, 32:5498-504, 2011.
Inoue M, Tsunoda S, et al, J Cell Sci, 128:656-669, 2015.
Ando D, Tsunoda S, et al. Biochem Biophys Rep, 7:309-315, 2016.
Inoue M, Tsunoda S, et al, J Biol Chem, 292:6438-6451, 2017.