生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成

平成 25 年度~平成 29 年度

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

研究成果報告書

平成30年5月 学校法人名 昭和薬科大学 大学名 昭和薬科大学 研究組織名 昭和薬科大学大学院薬学研究科 研究代表者 山本恵子 (元ハイテクリサーチセンター長、現学長)

1.はじめに

研究	究什	式表者	香 山本恵子1	
2.研究	成,	果報 ⁻	告書の概要2)
3.主要	な反	戊果		
Ц,	本原	包子	教授(テーマ1)42	1
; EE	村	修	教授(テーマ1)49)
石	戸	聡	教授(テーマ2)57	,
伊	東	進	教授(テーマ2)59)
水	谷显	頂洋	教授(テーマ2)65	,
渡	邊君	扆男	教授(テーマ2)70)
小	椋厚	表光	教授(テーマ3)75	,
濵	本知	印之	教授(テーマ3)80)
ШI	崎沼	告史	教授(テーマ3)86	
4.シン	ポジ	やム	・成果報告会の概要92	,

はじめに

生体内では種々の化学反応が絶え間なく起こり、様々な生体内分子が一過性にコバレント修飾 を受けて生体の恒常性維持に寄与している。例えば、細胞内シグナル伝達カスケードではリン酸 化、アセチル化、SUMO 化、ユビキチン化、ニトロシル化等の迅速なコバレント修飾を利用し ている。このように生体内分子のコバレント修飾は、生命体にとって必須の化学修飾といえる。 また、医薬品の中には、生体内でタンパク質をコバレント修飾することで作用を発現するアスピ リンや PPI などのコバレントモディファイアが知られており、それらの特色は作用が強力で持 続性が高いことである。本プロジェクトは、このような様々な生体内分子のコバレント修飾に関 する研究を多面的に行い、新薬開発や病態解明に繋げることを目的として立案された。幸い、本 プロジェクトは私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「生体分子コバレント修飾の革新的解析拠 点形成」として平成 25 年度に採択され、平成 29 年度までの 5 年間にわたり実施された。

本研究プロジェクトでは昭和薬科大学大学院薬学研究科の特色を活かし、有機化学、分子細胞 生物学、環境毒性学、臨床薬理学、薬物動態学等の分野から成る 3 グループが「コバレント修 飾型医薬品の開発研究」、「生体内コバレント修飾を介したシグナル伝達機構の解明」、「生体 内コバレント修飾に基づく代謝産物の定性的及び定量的解析法の確立と応用」というテーマで多 面的かつ有機的に連携しながら基盤研究を行った。加えて、学内の若手教員を対象に公募研究枠 を設け、挑戦的かつ萌芽性の高い学内共同研究を行った。更に毎年アジア圏より関連する著名な 研究者並びに若手研究者を招いた国際シンポジウムを開催し、コバレント修飾分野における研究 の活性化のみならず、博士課程学生、博士研究員、若手教員を中心とした若手研究者がグローバ ルな観点から研究を行える地盤作りを行った。年度毎の成果報告会ではプロジェクト参画研究者 の発表に加え、若手助成採択研究者や博士課程学生、学部学生によるポスター発表も行うなど、 次世代薬学研究者育成にも注力した。

各テーマの研究は概ね目標通りに進行し5年の研究期間で多くの成果を挙げることができた。 これらは論文や国内外の学会で発表され、「次世代の生体内コバレント修飾研究を社会へ還元す る高度な共同研究の拠点形成」という本プロジェクトの目標を達成できたと考える。

最後に本プロジェクトの遂行にあたり、5年間にわたり外部評価を賜りました4名の外部評価 委員

東京大学大学院薬学研究科 衛生化学講座 新井洋由先生、

千葉大学大学院薬学研究院 分子画像薬品学研究室 荒野泰先生、

独立行政法人産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター 夏目徹先生、

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 生命有機化学分野 細谷孝充先生、

ならびに本プロジェクトに関する数々のご助言を頂いた

前昭和薬科大学学長 西島正弘先生

に深く感謝致します。

生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成

研究代表者 山本 恵子

研究成果報告書の概要

平成 25 年度~平成 29 年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」 研究成果報告書概要

- 1 学校法人名 ____ 昭和薬科大学 _____ 2 大学名 ___ 昭和薬科大学 ____
- 3 研究組織名 大学院薬学研究科
- 4 プロジェクト所在地 東京都町田市東玉川学園 3-3165
- 5 研究プロジェクト名 _ 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成
- 6 研究観点 研究拠点を形成する研究
- 7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
山本 恵子	薬学部	教授

- 8 プロジェクト参加研究者数 9 名
- 9 該当審査区分 理工·情報 | 生物·医歯 | 人文·社会
- 10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属·職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
山本 恵子	医 薬 分 子 化学•教授	コバレント修飾型医薬品の創 製	新規概念の医薬品創製 のパラダイムを提案す る。テーマ1の代表。
田村 修	薬化学・教 授	医薬品代謝産物の抱合体合 成	医薬品のコバレント代謝 産物の一般合成法を確 立できる。
石戸 聡	統免授·我 (現:兵学・教 原学・教 原学・教 です。 を で の で の で の で の で の で の で の で の で の	ユビキチンおよびユビキチン 様分子による翻訳後修飾の 解明	ユビキチン修飾の生理 学的ならびに病理学的 意義を明らかにできる。
伊東進	生化学・教 授	コバレント修飾異常と疾患	生体の恒常性維持に対 するコバレント修飾の重 要性を明らかにできる。 テーマ2の代表。
水谷 顕洋	薬 物 治 療 学•教授	多重コバレント修飾を介した 細胞内環境の統合的調節機 構解明	多重コバレント修飾パタ ーンによる細胞内環境 を明らかにできる。

渡邊 泰男	薬理学・教 授	カルシウム信号系のコバレン ト修飾応答性	カルシウム受容分子の コバレント修飾相互作用 を明らかにする。
小椋 康光	衛研授現: 生室·教 (現:大学予研授) 業、大学予研授)	生体防御における有機金属 コバレント結合の形成・解離 の分子機構の解明	環境汚染・毒性発現のト レードオフから脱却する ための衛生薬学の新知 見を得る。 テーマ3の代表。
濵本 知之	臨床薬学 教育研究 センター・ 応用薬物 治療学部 門・教授	プロテオミクス解析と PK-PD 解析を組み合わせた効果的 な抗菌薬療法の確立	PK-PD 解析による迅速 かつ効果的な抗菌薬の 個別化医療への貢献。
山崎 浩史	薬物動態 学•教授	医薬品から生成するヒト反応 性代謝物の検出と評	ヒトでの医薬品の反応性 代謝物を介する生体成 分修飾に伴う毒性発現 機構の解明。
(共同研究機関等)			

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属·職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
生体防御における有機 金属コバレント結合の 形成・解離の分子機構 の解明	衛 生 化 学 研 究 室·教授	小椋 康光	環境汚染・毒性発現のト レードオフから脱却する ための衛生薬学の新知 見を得る。 テーマ3の代表。

(変更の時期:平成 27年 3月 1日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
薬物動態学研究室▪ 教授	薬物動態学研究室·教授	山崎 浩史	ヒトでの医薬品の反応 性代謝物を介する生 体成分修飾に伴う毒 性発現機構の解明。 テーマ3の代表。

旧

プロジェクトでの研究課題	所属·職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割		
ユビキチンおよびユビ キチン様分子による翻 訳後修飾の解明	統 合 感 染 免 疫 学•教授	石戸 聡	ユビキチン修飾の生理 学的ならびに病理学的 意義を明らかにできる。		
(変更の時期:平成 28 年 6月 1日)					



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割		
_	-	_	-		

旧

IH					
プロジェクトでの研究課題	所属·職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割		
 プロテオミクス解析と PK-PD 解析を組み合 わせた効果的な抗菌薬 療法の確立 	医療薬学教育研 究センター・教授	濵本 知之	PK-PD 解析による迅速 かつ効果的な抗菌薬の 個別化医療への貢献。		
(変更の時期:平成 28 年 4月 1日)					

新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
医療薬学教育研究 センター・教授	臨床薬学教育研究センタ ー・応用薬物治療学部門・ 教授	濵本 知之	PK-PD 解析による迅 速かつ効果的な抗菌 薬の個別化医療への 貢献。

11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

(1)研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

1 研究目的·意義

化学工業・医薬品化学の進歩により、本来自然界に存在しない様々な化合物が合成され、これらの新規化合物 が生体内分子とコバレント修飾することにより、新たな生体内分子とのコバレント化合物が見出されている。加え て生体内では、タンパク質が一過性に様々なコバレント修飾を受けることで細胞内シグナル伝達を行っている。 本研究プロジェクトは、質量分析装置等を用いて、迅速に様々な生体内分子のコバレント修飾を定性・定量分析 できる拠点形成を行う。

2 研究計画·研究方法

疾患ベースとした細胞内分子コバレント結合部位の同定とコバレント修飾によるシグナル伝達に関する研究、血中・尿における医薬品を含めた外来異物と生体内分子間新規コバレント修飾の同定・定量に関する研究、創薬 を視野に入れた生体内タンパク質と人工基質間のコバレント結合に関する研究を行う。加えて、モデル人工基質 から様々な化合物の合成、生体内分子と外来異物の抱合体合成を行い、代謝産物等の質量分析解析法の改 良に繋がる研究を行う。また、毎年アジア圏の研究者と国際交流も行う。 (2)研究組織

研究体制

大学院薬学研究科所属の教授を中心とした計画研究班、若手研究者主体の公募研究班より構成される。計画研究班は、有機化学、分子細胞生物学、環境毒性学、臨床薬理学等、多岐にわたる9名の先端研究を行う教授 陣から成っている。また、アジア圏から毎年本プロジェクトに関連する著名な研究者並びに若手研究者(博士課 程学生含む)を招き、国際シンポジウムを開催する。

(3)研究施設·設備等

【主な研究施設】 ハイテクセンター内生体分子解析室—1及び2、化学系総合研究室—1、組織培養室。機器 分析研究施設、実験動物研究施設

【主な設備】 質量分析装置(qTOF LC/MS システム、アジレント 6550QTOF LC/MS システム)、共焦点顕微鏡 (ニコン、A1RSi)、セルソーター(ソニー、SH800AC)、P2 仕様 SPF 区域設備(FRP バイオ 2000)、オープンフィー ルド行動解析システム【H ハイスル-P】F-LocoScan-H

(4)研究成果の概要 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び*を付すこと。

テーマ1 (1.山本 恵子、2.田村 修)、テーマ2(3.石戸 聡、4.伊東 進、5.水谷 顕洋、6.渡邊 泰男)、テーマ3(7. 小椋 康光、8.濵本 知之、9.山崎 浩史)以下通し番号にて記載。

<優れた成果が上がった点>

1山本 恵子

- 転写因子であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)を蛍光標識するために、共有結合型リ ガンドを in silico 解析を用いて設計し、合成に成功した。*1-①
- ② 合成した共有結合型リガンド候補化合物の PPAR コバレント修飾について質量分析装置を用いて解析した 結果、コバレント修飾するリガンドを見出し、修飾能力についても明らかにした。*1-②
- ③ 共有結合型リガンドによる標的タンパク質(PPAR)の修飾部位を X 線結晶構造解析により明らかにした。* 1-③
- ④ <u>Turn-On 型蛍光プローブを開発し、転写因子であるビタミンD 受容体(VDR)とPPARの標識に成功した。*</u>
 <u>1-④</u>
- VDR の共有結合型リガンドの創製に成功した。*1-5

2田村修

- ① Maremycin 類、特に Michael アクセプターである maremycin D1 の合成を行うことができた。*2-①
- ② Michael アクセプターである phaeosphaeride 類の合成を行うことができた。* 2-②
- ③ non-NMDA グルタミン酸レセプターに結合する neodysiherbaine A の合成を行うことができた。*2-③
- ④ 窒素選択的な活性を有するアシル化剤の開発を行うことができた。

3石戸 聡

- ① <u>胸腺において MHC class II が MARCH-VIII によって制御を受けていることを明らかにした。 *3-①</u>
- ② ユビキチン化が様々な細胞にて MHC II の輸送を制御していることを明らかにした。 *3-②
- ③ MHC II ユビキチン化の抑制によって樹状細胞の機能低下がおこることを明らかにした。 *3-③
- ④ MARCH ユビキチン化酵素は新規の基質認識機構を持っていることを明らかにした。 *3-④

4 伊東 進

- ① <u>TMEPAI ファミリーの C180RF1 が TGF- βシグナルを抑制した。 *4-①</u>
- ② TMEPAI ファミリーが、YAP シグナルを阻害することで、がん細胞増殖抑制する可能性を見出した。*4-②
- ③ TMEPAI 遺伝子欠損マウスが消化管腫瘍自然発症を抑制する可能性を見出した。* 4-③

- ④ <u>TGF-β/Smad3 シグナルが AhR/Arnt 複合体解離を介して、CYP1A1 遺伝子発現を抑制した。*4-④</u>
- 5 <u>TMED10 が TGF-β受容体の複合体形成を阻害することで、TGF-βシグナルを抑制した。 *4-5</u>

5水谷 顕洋

- IRBIT のN末に存在する複数のリン酸化部位は、責任リン酸化酵素とその機能から、3つのグループに分類 された。*5-①
- ② group1: Ser62, Ser64, Ser66 は、AGC kinases によりリン酸化され、IP3R との結合親和性を高めた。*5-②
- group2: Ser68, Ser71, Ser74, Ser77 は、CaMKs+CK1 によりリン酸化され、リン酸化依存的結合を示すいずれ の標的にも必須のリン酸化部位であった。*5-3
- ④ group2: Thr80, Ser82, Ser85 は、CK2 によりリン酸化され、NBCe1 との結合にのみ要求されるリン酸化部位
 であった。*5-④
- ⑤ IRBIT を脱リン酸化する酵素として、カルシニューリン、PGAM5 が候補分子として同定された。

6 渡邊 泰男

- <u>核内に局在するカルモデュリンキナーゼ IV の活性イオウ分子による部位特異的 S-ポリスルフィド化修飾に よって、下流の遺伝子転写活性が抑制されていることを見いだした。さらに、これらの現象が小胞体ストレス</u> 時に作動していることを示唆した。*6-①
- ② 活性イオウ分子のユニークな生理機能の 1 つである細胞内タンパク質の修飾について、これまでのシステ インのチオール基の化学修飾との関連性について述べた。* 6-②
- ③ NO 合成酵素の部位特異的リン酸化の意義が、NO 産生低下に加えて、活性酸素産生増加であることを発 見した。このことが、8-ニトローcGMPの産生を介して神経保護作用に寄与していることを示唆した。*6-③
- ④ 一過性脳虚血モデルをもちいて、歯状回で NO 合成酵素の部位的的リン酸化が発症後うつ状態に関与して いること示唆した。* 6-④
- ⑤ <u>NO 合成酵素による NO 産生がニコチン受容体刺激による細胞内カルシウムイオン流入を増強することを見</u> いだした。*6-⑤
- ⑥ MAP キナーゼの下流で働く p90 リボゾーマルS6キナーゼ1(RSK-1)が、部位特異的コバレント修飾(S-グ ルタチオン化)を受けて活性が阻害されることを発見した。RESK-1 は NO 合成酵素リン酸化により NO 合成 を阻害しているので、MAP キナーゼシグナルによる NO 産生制御を示唆した。*6-⑥

7小椋 康光

- ① 動物や植物体内で生成されるセレン代謝物が植物に再吸収されると、メチルセレノグルタチオンを経てセレ ノアミノ酸に変換されることを示した。
- ② 高等植物がテルル含有アミノ酸、すなわちテルルが炭素との共有結合を有する代謝物を生合成することを 明らかにした。
- ③ 高等植物における類金属の蓄積性の差異を定量的に解析した。
- ④ ICP-MSとESI-Q-TOF-MSとの感度差を克服するため定量的な解析を行い、生体試料の分析に与える影響を明確にした。
- ⑤ 培養細胞内で、亜セレン酸がセレノシアン酸に代謝されることを示し、その生合成に活性シアン種が関与していることを示唆した。

8 濵本 知之

① 供試菌株の 16S リボソーム RNA 遺伝子の可変領域を挟む保存領域に対する、今回用いたプライマーを用いて得られる PCR 産物の約半分の塩基配列数の 1 本鎖 DNA 60 mer およびその相補鎖との混合物、2 本

鎖 DNA 60 bp について、移動相をアセトニトリル:20 mM トリエチルアミン(1:1)として ESI-MS で測定することで、各鎖のほぼ正確な分子量を得ることが出来た。

② 未知の菌株の PCR 産物を ESI-MS で測定して実際に得られた分子量から菌種を同定するためのデータベースを作成し、約 95%をカバーすることが出来た。

9山崎 浩史

- ① <u>ヒト P450 3A 人工染色体を有するマウスにてサリドマイド反応性代謝物コバレント結合由来と考えられる胎</u> <u>児奇形発生を確認した。*9-①</u>
- ② ヒト肝細胞移植マウスを活用し、ヒト型代謝物の生体内生成とコバレント結合についてサリドマイドを例として 明かにした。*9-②
- ③ 低用量の放射標識化合物を投与し、加速器質量分析 (AMS)を用いた高感度分析法で、異なる医薬品由来 の反応性代謝物のヒト肝組織中の個別タンパク質のコバレント結合を、個々の存在濃度と共有結合レベル の逆相関から評価する方法を提唱した。*9-③
- ④ <u>医薬品サリドマイドが核内受容体とのコバレント相互作用を介して反応性代謝物生成に関わるヒト P450 酵素を活性化することを明かにした。*9-④</u>
- ⑤ サリドマイド類縁化合物ポマリドマイドおよびレナリドマイドについてサリドマイドとの構造の僅かな違いによる生体内動態と生体成分とのコバレント結合への影響について検討した。*9-⑤

く課題となった点>

1山本 恵子

・ 細胞内における標的タンパク質のコバレント修飾の検出を試みたが、現時点で成功していない。

2 田村 修

・ 生体分子と結合する候補化合物の合成を行っているが、その結合実験はまだ行えていない。

3 石戸 聡

・ 新たな MHC II のユビキチン化制御の存在、その意義についての知見を得ることはできたが、在職中に自ら が corresponding author として論文を発表することが出来なかった。それに伴い新たな研究費を獲得するこ とが出来なかった。

4 伊東 進

- ・ TMEPAI ファミリーによる YAP シグナル抑制の分子メカニズムまで追求することができなかった。
- ・ TMEPAI 遺伝子欠損マウスが消化管腫瘍形成を抑制したが、その分子機構解明に至らなかった。

5水谷 顕洋

・ IRBIT が細胞内で多重リン酸化されていることは明らかであるが、実際に細胞内で生じているリン酸化パタ ーンを知ることは、技術的に困難であった。

6 渡邊 泰男

カルモデュリンキナーゼが NO や ROS や活性イオウ分子 によってコバレント修飾を受ける概念は提唱できたが、同じシステインチオール基修飾の際の優位性についての検討が必要である。

高等植物の産生する新規テルル代謝物3つのうち、2つは同定したものの、残りひとつが未同定であった。

8 濵本 知之

・ 供試菌株での PCR 産物とほぼ同じ塩基配列数の 1 本鎖 DNA 113 mer およびその相補鎖との混合物、2 本 鎖 DNA 113 bp、供試菌株の PCR 産物については、今回検討した測定条件では正確な分子量は得られな かった。

9 山崎 浩史

- 医薬品を含めて化学物質の生体への影響を検討するために、毒性評価のバイオマーカー開発の必要性が 考えられた。
- ・ ヒト肝移植マウスを用いて、化合物の代謝・消失をより正確に把握するためには、肝で生成する代謝物の 尿中および胆汁中排泄への振り分けの種差を考慮することがポイントであると考えられた。

<自己評価の実施結果と対応状況>

1山本 恵子

- 核内受容体をコバレント修飾するための低分子リガンドを多数合成し、合成リガンドを用いて PPAR 及び VDR のコバレント修飾に成功した。コバレント修飾の確認を ESI 質量分析や X 線結晶構造解析することで 構造生物学的に証明した。独創性の高い研究成果であると自己評価している。
- ・ PPAR の 2 段階修飾による蛍光標識及び VDR と PPAR の Turn-On 型蛍光プローブによる蛍光標識に成功 した。極めて独創性の高い研究成果であると自己評価している。

2 田村修

概ね, 順調に推移した。

3 石戸 聡

 ・ 在職中の研究室にて定期的に研究ミーティングを行い、研究状況に関する議論を行うことによって評価を行 ってきた。その結果を推進体制の修正の参考とした。

4 伊東 進

- ・ C18ORF1 及び TMED10 による TGF- β シグナル抑制機構については、分子機構の解明まで行うことができ、共に J. Biol. Chem.にその成果を報告できた。
- TGF-β/Smad3 シグナルによる CYP1A1 遺伝子発現抑制の分子機構がほぼ解明され、今後専門雑誌に 投稿を予定している。

5水谷 顕洋

研究を遂行する上で、毎週1回研究室内で、2~3ヶ月に1回は複数の研究室間で討論する機会を設け、研究結果の吟味と展開について議論した。それをもとに、逐次方向修正を行った。

6 渡邊 泰男

おおむね順調に進んだ。

概ね当初計画通りの成果が得られた。

8 濵本 知之

・ 年1回開催される成果報告会で進捗状況の報告を行い、それに対する質疑応答を通して、研究推進の参考とした。

9 山崎 浩史

計画通りに進行した。

<外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

1山本 恵子

・「コバレント修飾について、多彩な角度から研究を推進しており、それぞれのテーマで優れた成果を挙げて いる。」との高い評価を得た。一方で、「In vitro において大きな進展が認められる。これまでの結果を踏まえ た in vivo における研究成果が楽しみである。」との期待を寄せられ、細胞内でのコバレント修飾を多様な方 法で試みたが、成功に至っていない。

2 田村修

・ 概ね良い評価であった。

3石戸 聡

毎年外部評価者からは私の研究姿勢に対する良い評価を得ることが出来、研究推進の原動力となった。それをもとに共同研究の維持、自らの研究推進に全力を注いだ。

4 伊東 進

- TMEPAIファミリーによる中皮腫進展阻害機序について: YAPとPYモチーフを介して結合することを見出しているが、詳細な分子機構解明までたどり着くことができなかった。
- PDZK1IP1 による TGF-βシグナル抑制機序について: Smad4 と結合し、Smad4 の核内移行を阻害すること を見出した。
- BMPによる軟骨分化に関わる細胞内分子の詳細な分子機構解明について:私達が同定したリン酸化酵素に様々な変異を導入することで、BMP刺激を介した non-Smad シグナルによるリン酸化酵素を介した軟骨分化機構の一部を解明することができた。
- ・ TMED10によるがん化進展制御機構の解明について:担癌モデルマウスを用いることで、TMEPAIを過剰発 現させるとがん化が抑制され、逆に発現を抑制するとがんの進展が観察された。

5水谷 顕洋

1年に1回、外部評価者を招いた報告会を開催し、貴重な助言をいただいた。それをもとに、研究を展開した。上記成果⑤は、外部評価者の助言がなければ得られない結果であった。

6 渡邊 泰男

 H25年度評価結果:活性イオウ分子の生体への影響についての更なる研究の推進を期待する:活性イオウ 分子産生酵素精製に成功してアッセイ系を確立し、共同研究に資することが出来た。

- ・ H26 年度評価結果:今後新しいタイプのシグナリング機構として、生理的役割が解明される事が期待される:シグナル標的酵素の検索を行い、カルシウム受容酵素群を候補として挙げ、そのうち1つを論文化することが出来た。
- H27 年度評価結果:生理的にも起こっている反応であるかが今後の興味深い点であると思います:活性イオウ分子関連酵素の発現抑制による生理的意義の解明ができて、現在論文作成中である。
- ・ H28 年度評価結果: 生体内におけるチオール化合物の複雑な反応の解明が期待される: イオウ化修飾されるシステインチオール基の酸化修飾を見いだし、現在論文作成中である。

H25

- 技術進歩により新たに環境に拡散される物質、特に金属と生体との相互作用(コバレント結合)の研究は社
 会的にも重要と思われる。
- ・ 有機テルル化合物の生成、生体内動態、そして毒性についての興味深い発表であった。更なる研究の進展 を期待する。
- ・ 植物によるテルルの代謝取り込みを酸化テルルを含むアミノ酸を初めて同定することで示すなど、顕著な成 果を上げている。引き続き、独自性の高い研究が進められると期待される。

H26

- 必須元素セレンの細胞内代謝について積極的に研究を展開され、セレノシアネートという新しい代謝産物を 同定した。さらにセレノシアネートは蛋白質も修飾することを解明した。今後この修飾による蛋白質機能に対 する影響の解明を期待したい。
- 演題変更があり、植物におけるテルル代謝取り込みとその毒性に関する研究成果についての発表があった。本年度は、新規含テルルアミノ酸誘導体の構造同定に成功するなど、順調に成果があがっている。
- ・ 有機テルルの生体内代謝についての有意義な研究である。セレンとの対比から、本元素の毒性に対する新たな知見を期待する。

期待に応えられるよう、継続して研究を進めている。

8 濵本 知之

- 外部評価委員から毎年計 5 回の評価を受け、プロジェクトの推進に役立てた。
- 学外評価委員から、感染症の病原菌を臨床現場で迅速に同定する方法論の確立を目指しているため、感 度の問題も含めて技術的な困難があるかもしれないが、臨床的に重要なテーマであるので根気よく研究を 展開していただきたい旨のコメントをいただき、より感度が高くESI-MS で測定でき正確な分子量が得られる ことを目指して測定法の検討を行った。また、データベース作成の必要性、同定の精度を上げるために 16S リボソーム RNA 遺伝子の他の領域に対するプライマーについても検討する必要性の提言があり、前者につ いては研究期間内で作成することが出来た。

9 山崎 浩史

年度ごとの評価についても良好な評価を受けている。

<研究期間終了後の展望>

1山本 恵子

- 研究①-③の概念は任意の標的分子、任意の機能性分子との組み合わせが可能である。したがって、他の 核内受容体に対してまた必要に応じて蛍光とは異なる機能を有する分子で修飾することができるため、波 及効果が高いと考えられる。
- ・ 研究④の turn-on 型プローブはクマリンの誘導体である。クマリン骨格は医薬品や工業製品にも幅広く使用 され、研究が盛んである事から、様々な分野で応用が期待できる。
- 研究⑤では修飾部位がヒスチジンであることが明らかになった。ヒスチジンを標的として設計した化合物の 共有結合の例はない。X-線結晶構造解析により証明できたため今後、ヒスチジンへの共有結合を狙った医 薬品開発が期待される。

2 田村 修

 ・ 合成した化合物の活性試験を行う。

3石戸 聡

 MHC II のユビキチン化異常が、2 型免疫応答の亢進による疾患(アレルギー)の原因となる可能性を得るに 至った。したがって、その機構の追求、臨床との関連性の探索を行い、アレルギー疾患発症の新たな機構 を提唱することを目指す。

4 伊東 進

- ・ TMEPAI ファミリーによる YAP シグナル抑制の分子メカニズムまで追求する。
- ・ TMEPAI 遺伝子欠損マウスにおける消化管腫瘍形成分子機構の解明を行う。

5 水谷 顕洋

IRBIT の多重リン酸化を生み出すリン酸化酵素群の同定はおおよそ終了したので、今後は、
 (1)これらリン酸化酵素が IRBIT をリン酸化する生理的な局面を追及する。
 (2)上記⑤で候補に挙がった脱リン酸化酵素が機能する生理的な局面を追及する。
 ことを重点に置き、IRBIT の多重リン酸化とその制御機構の生理機能を明らかにしていきたい。

6 渡邊 泰男

- 活性イオウの変動を制御する細胞内シグナルの解析を行う。
- 活性イオウ分子によるミトコンドリア機能制御を解明する。

7小椋 康光

・ 未同定のテルル代謝物の同定を果たしたい。

8 濵本 知之

- 今回の研究期間内では、1本鎖 DNA 113 mer およびその相補鎖との混合物、2本鎖 DNA 113 bp では正確 な分子量が得られなかったので、正確な分子量が得られる測定条件をさらに検討する必要がある。それに よって、実際の菌株の PCR 産物での測定が可能になる。
- ・ また、菌種同定の精度を上げるため、今回用いたプライマーだけでなく、他の 16S リボソーム RNA 遺伝子の 可変領域を挟む保存領域対するプライマーを用いた検討や、さらに薬剤耐性遺伝子に対するプライマーを

用いた検討を行う。

上記が確立次第、感染動物を作成し、その検体からの検出法を確立して、実際の臨床検体での検討を行い、感染症の原因菌の同定と保有する薬剤耐性因子の迅速な診断に貢献したい。

9 山崎 浩史

・ ヒト肝移植マウスを用いた実験結果を原著論文として報告してきたことから、今後はこのヒト化モデルマウ スへの関心が世界的に高まることが期待される。

<研究成果の副次的効果>

1山本 恵子

①②③の研究を通して、査読者からのコメントにリガンドを足がかりに標的タンパク質を修飾した場合、リガンドが残存すると指摘された。そこで、共有結合と同時にリガンドの解離が誘導される新規反応の開発を検討した。その結果、蛍光団のクマリンで修飾できると考えた。副次的効果として研究④を実施することができた。また、研究④の概念はタンパク質との修飾にとどまらず、低分子化合物の合成にも適用可能と考えられる。

2 田村 修

- 金触媒による環化反応も開発できた。
- ・ オキシムの特徴を活かした反応を開発できた。

3石戸 聡

・ MHC II による抗原提示細胞の機能制御の存在が強く示唆される結果を得ることが出来た。

5水谷 顕洋

・ IRBIT がリン酸化依存的に結合する分子を探索していく過程で、ミトコンドリア関連分子を発見し、IRBIT が、 ミトコンドリア機能やオートファジーの制御に関わるという、新たな可能性が見出された。

6 渡邊 泰男

ー 細胞老化研究の基盤形成(活性イオウによるミトコンドリア機能調節)ができた。

7小椋 康光

・ セレンの代謝過程を解明する過程で、新規代謝物を見出し、その生成過程に"活性シアン種"と名付け、毒 性学のパラダイムシフトに繋がる成果を得ることができた。

9 山崎 浩史

- ヒト肝移植マウスを用いて、ヒトへの化学物質曝露時の体内動態を正確に予測することが出来る生理学的 薬物動態モデルの基盤を構築した。本成果は経済産業省の化学物質の毒性評価プロジェクト(生理学的 薬物動態モデルを活用する化学物質の体内動態評価技術の開発)へと発展した。
- ・ ヒト肝移植マウスのみならず、ヒトP450 3A 代謝酵素遺伝子を人工染色体にもつヒト型マウスが共同研究に て確立でき、医薬品開発への応用が期待される。

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

(1)	質量分	析	(2)	タンパク質修飾	(3)_コバ	レントモディファイア
(4)	金属触媒	(5)	有機金属	(6) <u>代謝的活性化</u> (7)_	神経毒性	(8) <u>PK-PD 解析</u>

13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。) 上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには*を付すこと。

<雑誌論文>

		1 山本 恵子
	1.	Kojima H, Itoh T, <u>Yamamoto K</u> . On-site reaction for PPARγ modification using a specific bifunctional ligand. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 25 , 6492 - 6500 (2017). *1-①,②,③
	2.	Kato A, Yamao M, Hashihara Y, Ishida H, Itoh T, <u>Yamamoto K</u> . Vitamin D analogues with a p-hydroxyphenyl
		group at the C25 position: crystal structure of vitamin D receptor ligand-binding domain complexed with
		the ligand explains the mechanism underlying full antagonistic action. <i>J. Med. Chem.</i> 60 , 8394 – 8406 (2017). * 1– (5)
	3.	Egawa D, Itoh T, Kato A, Kataoka S, Anami Y, <u>Yamamoto K.</u> SRC2-3 binds to vitamin D receptor with high
		sensitivity and strong affinity. <i>Bioorg Med Chem.</i> 25, 568–574 (2017). *1–⑤
	4.	Anami Y, Shimizu N, Ekimoto T, Egawa D, Itoh T, Ikeguchi M, <u>Yamamoto K</u> . Apo− and
		Antagonist-Binding Structures of Vitamin D Receptor Ligand-Binding Domain Revealed by Hybrid
		Approach Combining Small-Angle X-ray Scattering and Molecular Dynamics. J. Med. Chem., 59, 7888-7900
		(2016) * 1–5
	5.	Egawa D, Itoh T, Akiyama Y, Saito T, <u>Yamamoto K</u> . 17-oxoDHA is a PPAR•/γ dual covalent modifier and agonist. <i>ACS Chem. Biol.</i> 11, 2447–2455 (2016) *1-①,②,③
	6.	Kato A, Anami Y, Egawa D, Itoh T, <u>Yamamoto K.</u> Helix12-stabilization antagonist of vitamin D receptor.
		<i>Bioconjugate Chem.</i> 27, 1750—1761 (2016). *1–5
	7.	Itoh T, Saito T, Yamamoto Y, Ishida H, Yamamoto K. Gram scale synthesis of specialized pro-resolving
		mediator 17(S)-HDHA using lipoxygenase enhanced by water-soluble reducing agent TCEP. Bioorg Med
		<i>Chem. Lett.</i> 26 , 343–345 (2016). *1– ①
	8.	Anami Y, Sakamaki Y, Itoh T, Inaba Y, Nakabayashi M, Ikura T, Ito N, Yamamoto K. Fine tuning of
		agonistic/antagonistic activity for vitamin D receptor by 22-alkyl chain length of ligands: 22 \mathcal{S} -Hexyl
		compound unexpectedly restored agonistic activity. <i>Bioorganic. Med. Chem.</i> 23, 7274-7281 (2015). *1-(5)
	9.	Egawa D, Itoh T, <u>Yamamoto K</u> . Characterization of covalent bond formation between PPAR γ and oxo-fatty
		acids. <i>Bioconjugate Chem.</i> 26 , 690-698 (2015). *1-①,②,③,④
	10.	Anami Y, Itoh T, Egawa D, Yoshimoto N, Yamamoto K. A mixed population of antagonist and agonist binding
		conformers in a single crystal explains partial agonism against vitamin D receptor: Active vitamin D
		analogues with 22R-alkyl group. <i>J. Med. Chem.</i> 57 , 4351-4367 (2014). *1-5
	11.	Ueda T, Inada M, Morita N, and <u>Tamura O.</u> Total Synthesis of Maremycins A and D ₁ Using Chiral and Cyclic
		Nitrone with (<i>E</i>)-3-Ethylidene-1-Methylindolin-2-one. <i>Heterocycles</i> , 90(2) , 1179-1195 (2015). (Special
I		issue tor Prot. Isao Kuwajima) * 2-(1)
l	12.	Kobayashi K, Kobayashi Y, Nakamura M, <u>Tamura O</u> , Kogen H. Establishment of Relative and Absolute
I		Configurations of Phaeosphaeride A Total Synthesis of <i>ent</i> -Phaeosphaeride A. J. Org. Chem, 80(2),

1243–1248 (2015). *** 2–②**

- Morita N, Kono R, Fukui K, Miyazawa A, Masu H, Azumaya I, Ban S, Hashimoto Y, Okamoto I, <u>Tamura</u> O. BF₃-Mediated *cis*-Selective Cycloaddition of *O*-Silyloxime with Alkenes. *J. Org. Chem*, 80(9), 4797-4802 (2015).
- Morita N, Yasuda A, Shibata M, Ban S, Hashimoto Y, Okamoto I, <u>Tamura O</u>. Gold-Catalyzed Synthesis of Cyclic Ethers; Valency-Controlled Cyclization Modes. *Org. Lett*, **17(11)**, 2668-2671 (2015).
- Morita N, Tsunokake T, Narikiyo Y, Harada M, Tachibana T, Saito Y, Ban S, Hashimoto Y, Okamoto I, <u>Tamura</u> <u>O</u>. Gold(I)/(III)-Catalyzed 2-Substituted Synthesis of Piperidines; Valency-Controlled Cyclization Modes. *Tetrahedron Lett*, **56(45)**, 6269-6272 (2015).
- Yamasaki R, Fujikake S, Ai Ito, Migita K, Morita N, <u>Tamura O</u>, Okamoto I. Acid-induced molecular-structural transformation of N-methyl aromatic oligoamides bearing pyridine-2-carboxamide. *Tetrahedron Lett*, 57(1), 56-59 (2016).
- Morita N, Mashiko R, Hakuta D, Eguchi D, Ban S, Hashimoto Y, Okamoto I, <u>Tamura O.</u> Gold-Catalyzed Dimeric Cyclization of Isoeugenol and Related 1-Phenylpropenes in Ionic Liquid: Environmentally Friendly and Stereoselective Synthesis of 1,2,3-Trisubstituted Dihydro(1*H*)Indenes. *Synthesis*, **48(12)**, 1927-1933 (2016).
- Morita N, Miyamoto M, Yoda A, Yamamoto M, Ban S, Hashimoto Y, <u>Tamura O</u>. Gold-Catalyzed Dehydrative Friedel-Crafts Reaction and Nazarov Cyclization Sequence: An Efficient Synthesis of 1,3-Diarylindenes from Propargylic Alcohols. *Tetrahedron Lett*, **57(40)**, 4460-4463 (2016).
- Morita N, Saito Y, Muraji A, Ban S, Hashimoto Y, Okamoto I, and <u>Tamura O</u>. Gold-catalyzed synthesis of 2-substituted azepanes: strategic use of soft gold(I) and hard gold(III) catalysts. *Synlett*, 27(13), 1936–1940 (2016).
- Morita N, Oguro K, Takahashi S, Kawahara M, Ban S, Hashimoto Y, <u>Tamura O.</u> Gold(III)-catalyzed Synthesis of 2,3,4-Trisubstituted Dihydropyrans from Propargylic Alcohols with 1,3-Dicarbonyl Compounds. *Heterocycles*, **95**, 172-180 (2017). (Special issue for Prof. Masakatsu Shibasaki)
- Hashimoto Y, Ishiwata H, Tachikawa S, Ban S, Morita N, <u>Tamura O.</u> Utilization of electron-donating αβ -unsaturated oximes: Regioselective inverse 1,3-dipolar cycloaddition of nitrones. *Chem. Commun*, 53, 2685-2688 (2017).
- Kobayashi K, Kunimura R, Tanaka III K, <u>Tamura O</u>, Kogen H. Total synthesis of (-)-phaeosphaeride B by a biomimetic conversion from (-)-phaeosphaeride A. *Tetrahedron*, **73**, 2382-2388 (2017). ***2-**
- Shibata N, Tsuchiya T, Hashimoto Y, Morita N, Ban S, <u>Tamura O.</u> Thiyl radical-mediated cyclization of ω -alkynyl *O-tert*-butyldiphenylsilyloximes. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **15**, 3025-3034 (2017).
- 24. Hirai T, Shibata K, Niwano Y, Shiozaki M, Hashimoto Y, Morita N, Ban S, <u>Tamura O.</u> Total synthesis of neodysiherbaine A using 1,3-dipolar cycloaddition of a chiral nitrone template. *Organic Letters*, 19, 6320-6323 (2017). ***2-3**

3石戸 聡

- Ohtake F, Saeki Y, <u>Ishido S</u>, Kanno J, and Tanaka K. The K48–K63 branched ubiquitin chain regulates NF–kB signaling. *Mol. Cell*, 64(2), 251–266 (2016).
- von Rohrscheidt J, Petrozziello E, Nedjic J, Federle C, Krzyzak L, Ploegh HL, <u>Ishido S</u>, Steinkasserer A, and Klein L. Thymic CD4 T cell selection requires attenuation of March8-mediated MHCII turnover in cortical epithelial cells through CD83. *J. Exp. Med*, **213(9)**, 1685–1694 (2016). *** 3–**①
- 27. Liu H, Jain R, Guan J, Vuong V, Ishido S, La Gruta NL, Gray DH, Villadangos JA, and Mintern JD. Ubiquitin

ligase MARCH 8 cooperates with CD83 to control surface MHC II expression in thymic epithelium and CD4 T cell selection. *J. Exp. Med.* **213(9)**, 1695–1703 (2016). *** 3–**①

- Bannard O, McGowan SJ, Ersching J, <u>Ishido S</u>, Victora GD, Shin JS, and Cyster JG. Ubiquitin-mediated fluctuations in MHC class II facilitate efficient germinal center B cell responses. *J. Exp. Med.* 213(6), 993-1009 (2016).
- 29. Mittal SK, Cho KJ, <u>Ishido S.</u> and Roche, PA. IL-10 mediated immunosuppression: March-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. *J Biol Chem.* 290(45), 27158-27167 (2015).
 *3-②
- Cho KJ, Walseng, E, <u>Ishido, S.</u> and Roche PA. Ubiquitination by March-I prevents MHC Class II recycling and promotes MHC Class II turnover in antigen presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 112(33), 10449-10454 (2015). ***3-2**
- Ishikawa R, Kajikawa M, and <u>Ishido S.</u> Loss of MHC II ubiquitination inhibits the activation and differentiation of CD4 T cells. *Int. Immunol.*, (5), 283–289 (2014).
- Li, PC., Miyashita, N., Im, W., <u>Ishido S.</u> and Sugita, Y. Multidimensional umbrella sampling and replica-exchange molecular dynamics simulations for structure prediction of transmembrane helix dimers. *J. Comput. Chem*, **35(4)**, 300–308 (2014).
- Sugiura A, Nagashima S, Tokuyama T, Amo T, Matsuki Y, <u>Ishido S</u>, Kudo Y, McBride HM, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R and Yanagi S. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol. Cell*, 51(1), 20-34 (2013).
- 34. Oh J, Wu N, Baravalle G, Cohn B, Ma J, Lo B, Mellman I, <u>Ishido S</u>, Anderson M, and Shin JS. MARCH1-mediated MHCII ubiquitination promotes dendritic cell selection of natural regulatory T cells. J. Exp. Med, 210(6), 1069-1077 (2013).

4 伊東 進

- 35. 高野 昭人、中根 孝久、伊東 進、Kuber Jung Malla、Gopal Karki. ネパール・Tistung Botanical Garden での薬用植物の試験栽培. 日本植物園協会誌. 52, 103-107(2017).
- Nakano N, Tsuchiya Y, Kako K, Umezaki K, Sano K, Ikeno S, Otsuka E, Shigeta M, Nakagawa A, Sakata N, Itoh F, Nakano Y, Iemura S, van Dinther M, Natsume T, ten Dijke P, <u>Itoh S.</u> TMED10 interferes with TGF-β signaling by disrupting TGF-βreceptor complex formation. J. Biol. Chem, 292, 4099-4112 (2017). *4-5
- Hamidi A, Song J, Thakur N, <u>Itoh S</u>, Marcusson A, Bergh A, Heldin C-H, Landström M. TGF-β promotes PI3K-AKT-signaling and prostate cancer cell migration through the TRAF6-mediated ubiquitylation of p85 α Sci. Signal, 10, eaal4186 (2017).
- Okuhira K, Shoda T, Omura R, Ohoka N, Hattori T, Shibata N, Demizu Y, Sugihara R, Ichino A, Kawahara H, Itoh Y, Ishikawa M, Hashimoto Y, Kurihara M, <u>Itoh S</u>, Saito H, Naito M. Targeted degradation of proteins localized in subcellular compartments by hybrid small molecules. *Mol. Pharmacol*, **91**, 159–166 (2017).
- Nakano N, Kato M, <u>Itoh S.</u> Regulation of the TMEPAI promoter by TCF7L2: the C-terminal tail of TCF7L2 is essential to activate the TMEPAI gene. *J. Biochem*, **159**, 27-30 (2016).
- 40. Furuta C, Miyamoto T, Takagi T, Noguchi Y, Kaneko J, <u>Itoh S</u>, Watanabe T, Itoh F. TGF-β signaling enhancement by long-term exposure to hypoxia in a tumor microenvironment composed of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Sci*, **106**, 1524–1533 (2015).
- Hongu T, Funakoshi Y, Fukuhara S, Suzuki T, Sakimoto S, Takakura N, Ema M, Takahashi S, <u>Itoh S</u>, Kato M, Hasegawa H, Mochizuki N, Kanaho Y. Arf6 regulates tumor angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial βl integrin recycling. *Nat. Commun*, **6**, 7925 (2015).

- Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Vo Nguyen T T, Watanabe Y, Kato M, <u>Itoh S</u>. C18 ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF-β Signaling. *J. Biol. Chem.*, **289**, 12680-12692 (2014). ***4-**①
- Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, <u>Itoh S</u>, Kato M. TMEPAI/PMEPA1enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. *Cancer Sci.*, **105**, 334–341 (2014).

5水谷 顕洋

- Kawaai K, Ando H, Satoh N, Yamada H, Ogawa N, Hirose M, <u>Mizutani A</u>, Bonneau B, Seki G, Mikoshiba K. Splicing variation of Long-IRBIT determines the target selectivity of IRBIT family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **114**, 3921-392 (2017). ***5-**(4)
- Ogra Y, Nagasaki S, Yawata A, Anan Y, Hamada K, <u>Mizutani A</u>. Metallomics approach to changes in element concentration during differentiation from fibroblasts into adipocytes by element array analysis. *J Toxicol Sci.*, **41**, 241–244 (2016). ***5–**②
- Kawaai K, <u>Mizutani A</u>, Shoji H, Ogawa N, Ebisui E, Kuroda Y, Wakana S, Miyakawa T, Hisatsune C, Mikoshiba K. IRBIT regulates CaMKII αactivity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*., **112**, 5515–5520 (2015) ***5-**3
- Park S, Shcheynikov N, Hong JH, Zheng C, Suh SH, Kawaai K, Ando H, <u>Mizutani A</u>, Abe T, Kiyonari H, Seki G, Yule D, Mikoshiba K, Muallem S. IRBIT mediates synergy between Ca2+ and cAMP signaling pathways during epithelial transport in mice. *Gastroenterology.*, **145**, 232–24 (2013). ***5–**①

6 渡邊 泰男

- 48. Masuda K, Tsutsuki H, Kasamatsu S, Ida T, Takata T, Sugiura K, Nishida M, <u>Watanabe Y</u>, Sawa T, Akaike T, Ihara H. Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem Biophys Res Commun.*, **495**, 2165-2170 (2018).
- 49. Akaike T, Ida T, Wei FY, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujii S, <u>Watanabe Y</u>, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto JM, Motohashi H. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun.*, **8**, 1177 (2017).
- Wada K, Osuka K, <u>Watanabe Y</u>, Usuda N, Fukasawa M, Araki Y, Okamoto S, Wakabayashi T. Subarachnoid hemorrhage induces neuronal nitric oxide synthase phosphorylation at Ser1412 in the dentate gyrus of the rat brain. *Nitric Oxide*, S1089-8603, 30163-5 (2017).
- Takata T, Ihara H, Hatano N, Tsuchiya Y, Akaike T, <u>Watanabe Y.</u> Reactive sulfur species inactivate Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase IV via S-polysulfidation of its active-site cysteine residue. *Biochem J.*, 474, 2547-2562 (2017). *6-1
- Ihara H, Kitamura A, Kasamatsu S, Ida T, Kakihana Y, Tsutsuki H, Sawa T, <u>Watanabe Y</u>, Akaike T. Superoxide generation from nNOS splice variants and its potential involvement in redox signal regulation. *Biochem J.*, 474, 1149–1162 (2017).
- 53. Hanaoka K, Sasakura K, Suwanai Y, Toma-Fukai S, Shimamoto K, Takano Y, Shibuya N, Terai T, Komatsu T, Ueno T, Ogasawara Y, Tsuchiya Y, <u>Watanabe Y</u>, Kimura H, Wang C, Uchiyama M, Kojima H, Okabe T, Urano Y, Shimizu T, Nagano T. Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H2S-producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide *Sci. Rep.*, 7, 40227 (2017).

- 54. Abiko Y, Sha L, Shinkai Y, Unoki T, Luong NC, Tsuchiya Y, <u>Watanabe Y</u>, Hirose R, Akaike T, Kumagai Y. 1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides. *Free Radic Biol Med.*, **104**, 118-128 (2017).
- 55. 渡邊泰男. 活性イオウ分子の分子標的. 日本薬理学雑誌. 147, 285-289 (2016). *6-2)
- 56. Abiko Y, Ishii I, Kamata S, Tsuchiya Y, <u>Watanabe Y</u>, Ihara H, Akaike T, Kumagai Y. Formation of sulfur adducts of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: participation of reactive persulfides. *Chem Res Toxicol.*, 28(9):1796–1802 (2015).
- 57. Makino K, Osuka K, <u>Watanabe Y</u>, Usuda N, Hara M, Aoyama M, Takayasu M, Wakabayashi T. Increased ICP promotes CaMKII-mediated phosphorylation of neuronal NOS at Ser847 in the hippocampus immediately after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res.*, **1616**, 19–25 (2015).
- 58. Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, <u>Watanabe Y</u>, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **111**, 7606-7611 (2014).
- Kasamatsu S, <u>Watanabe Y</u>, Sawa T, Akaike T, Ihara H. Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser847 in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem J.*, 459, 251–263 (2014). *6-3
- Osuka K, <u>Watanabe Y</u>, Usuda N, Atsuzawa K, Takayasu M. Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser1412 in the dentate gyrus of rat brain after transient forebrain ischemia. *Neurochem Int.*, 63, 269–274 (2013). * 6-④
- Kajiwara A, Tsuchiya Y, Takata T, Nyunoya M, Nozaki N, Ihara H, <u>Watanabe Y.</u> Nitric oxide enhances increase in cytosolic Ca²⁺ and promotes nicotine-triggered MAPK pathway in PC12 cells. *Nitric Oxide*, 34, 3-9 (2013). *6-5
- Takata T, Tsuchiya Y, <u>Watanabe Y</u>. 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 is inhibited by S-glutathionylation of its active-site cysteine residue during oxidative stress. *FEBS Lett.*, **587**, 1681-1686 (2013). ***6-6**

- Kobayashi H, Suzuki N, and <u>Ogra Y</u>. Mutagenicity comparison of nine bioselenocompounds in three Salmonella typhimurium strains. Toxicol. Rep., 5, 220-223 (2018).
- 64. Paraiso W K D, Tanaka H, Sato Y, Shirane D, Suzuki N, <u>Ogra Y</u>, Tange K, Nakai Y, Yoshioka H, Harashima H, and Akita H. Preparation of envelope-type lipid nanoparticles containing gold nanorods for photothermal cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **160**, 715-723 (2017).
- Bierła K, Suzuki N, <u>Ogra Y</u>, Szpunar J* and Łobiński R. Identification and determination of selenohomolanthionine – the major selenium compound in Torula yeast. *Food Chem.*, **237**, 1196–1201 (2017).
- Takahashi K, Suzuki N, and <u>Ogra Y</u>*: Bioavailability comparison of nine bioselenocompounds *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.* 18(3), 506 (2017).
- Doura T*, Takahashi K, <u>Ogra Y</u>, and Suzuki N*. Combretastatin A4-β-galactosyl conjugates for ovarian cancer prodrug monotherapy. ACS Med. Chem. Lett., 8, 211-214 (2017).
- Ogra Y*, Ogihara Y, and Anan Y. Comparison of metabolism of inorganic and organic selenium species between two selenium accumulator plants, garlic and Indian mustard. *Metallomics*, 9, 61-68 (2017).
- Verdugo M, <u>Ogra Y</u>, and Quiroz W*. Mechanisms underlying the toxic effects of antimony species in human embryonic kidney cells (HEK-293) and their comparison with arsenic species. *J. Toxicol. Sci.*, **41**, 783-792

(2016).

- Ogra Y*, Tejima A, Hatakeyama N, Shiraiwa M, Wu S, Ishikawa T, Yawata A, Anan Y, and Suzuki N. Changes in intracellular copper concentration and copper-regulating gene expression after PC12 differentiation into neurons. *Sci. Rep.*, 6, 33007 (2016).
- Ogra Y, Nagasaki S, Yawata A, Anan Y, Hamada K, and Mizutani A. Metallomics approach to changes in element concentration during differentiation from fibroblasts into adipocytes by element array analysis. J. *Toxicol. Sci.*, 41, 241-244 (2016).
- Anan Y, Kimura M, Hayashi M, Koike R, and <u>Ogra Y.</u> Detoxification of selenite to form selenocyanate in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 28, 1803–1814 (2015).
- 73. <u>Ogra Y</u>, Ogihara Y, and Anan Y. Metabolism of trimethylselenonium ion in selenium accumulator, *Allium* sativum. Fundam. Toxicol. Sci., **2**, 95–99 (2015).
- 74. Anan Y, Nakajima G, and <u>Ogra Y.</u> Complementary use of LC-ICP-MS and LC-ESI-Q-TOF-MS for selenium speciation. *Anal. Sci.*, **31**, 561-564 (2015).
- 75. <u>Ogra Y</u>, Awaya Y, and Anan Y. Comparison of accumulation of four metalloids in *Allium sativum. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **94**, 604–608 (2015).
- Anan Y, Ohbo A, Tani Y, and <u>Ogra Y.</u> Metabolic pathway of inorganic and organic selenocompounds labeled with stable isotope in Japanese quail. *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 7959–7966 (2014).
- Tokumoto M, Kutsukake N, Yamanishi E, Katsuta D, Anan Y, and <u>Ogra Y.</u> Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase is a specific but replaceable factor against arsenic toxicity. *Toxicol. Rep.*, 1, 589-595 (2014).
- Nakamura M, Ochiai T, Noji M, <u>Ogra Y</u>, Suzuki K T, Yoshimoto N, Yamazaki M, and Saito K. An improved tolerance to cadmium by overexpression of two genes for cysteine synthesis in tobacco. *Plant Biotech.*, **31**, 141–147 (2014).

8 濵本 知之

- 79. 荒木良介、計良貴之、加藤加奈恵、菱沼隆一、増田豊、<u>濵本知之</u>、田中恒明、山田英紀. デノスマブによる低カルシウム血症の発現に対するプロトンポンプ阻害薬の影響の検討. 医療薬学. 査読有. 43(7), 381-387 (2017).
- Watanabe K, Doi H, Hirohara M, Ota A, Nakamura M, Kushida K, Takada K, Masuda Y, Kitajima J, Takano A, Ciba R, Toda J, Hagiwara Y, Hamashima H, <u>Hamamoto T</u>, Fukumori R, Horiguchi Y, Yamamoto M, Taguchi K: Hands-on experiential training of self-monitoring of blood glucose and self-injection of insulin, and its learning effects in 4th year pharmacy students. *Journal of Drug Interaction Research (Japan)*. 査読有, **39(1)**, 17-23 (2015).
- 81. 廣原正宜、<u>濵本知之</u>、寺田綾子、千葉良子、澁谷文則、中村美樹、渡部一宏、大澤友二、戸田潤、串田一樹、高野昭人、北島潤一、萩原幸彦、福森隆次、堀口よし江、濱島肇、田口恭治. 昭和薬科大学における バイタルサインチェック・フィジカルアセスメント実習一4年次実務実習事前学習と6年次アドバンスト実習 における評価 –. 医療薬学. 査読有. 40(10), 567-585 (2014).
- 82. <u>**濵本知之</u>、芹澤彩香、大槻佳織、川上準子、佐藤憲一. がん分子標的薬副作用の自己組織化マップ** (SOM)を用いたビジュアル化と解析. YAKUGAKU ZASSHI. 査読有. **134(10)**, 1069-1080 (2014).</u>
- 83. 中村美樹、寺田綾子、渡部一宏、廣原正宜、高野昭人、澁谷文則、田口恭治、<u>濵本知之</u>、堀口よし江、戸田潤.病院実務実習における薬学生の自己評価と指導薬剤師の学生評価の比較による到達度不十分な 実習項目の分析.昭和薬科大学紀要.査読無.48,29-40 (2014).
- 84. 寺田綾子、中村美樹、渡部一宏、廣原正宜、高野昭人、澁谷文則、田口恭治、<u>濵本知之</u>、堀口よし江、戸

田潤.薬局実務実習における薬学生の自己評価と指導薬剤師の学生評価の比較による到達度不十分な 実習項目の分析.昭和薬科大学紀要.査読無.48,17-27 (2014).

 Watanabe K, Chisima M, Agata K, <u>Hamamoto T</u>. Current status of awareness and implementation of the "Yakuzai-Kanri Summary" in community pharmacies prescribing drugs under the health insurance system in Japan. Jpn. *J. Pharm. Health Care Sci.*, **39(6)**, 366-374 (2013).

9 山崎 浩史

- Kazuki Y, Akita M, Kobayashi K, Osaki M, Satoh D, Abe S, Takehara S, Kazuki K, <u>Yamazaki H</u>, Kamataki T, and Oshimura M. Thalidomide-induced limb abnormalities in a humanized CYP3A mouse model. *Sci.Rep.*, 6, 21419 (2016). ***9-**①
- Nishiyama S, Suemizu H, Shibata N, Guengeric, F P, and <u>Yamazaki H</u>. Simulation of human plasma concentrations of thalidomide and primary 5-hydroxylated metabolites explored with pharmacokinetic data in humanized TK-NOG mice. *Chem. Res. Toxicol.*, **28**, 2088–2090, 2015. ***9-**
- Yamazaki H. Species, Ethnic, and Individual Differences in Human Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes. In: *Fifty Years of Cytochrome P450 Research*, edited by H. Yamazaki, Tokyo: Springer, 293-305 (2014). *9-2
- Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Honda T, Tateno C, Oofusa K, Ninomiya S, Ikeda T, Izumi T, and Horie T. Zone analysis by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry of *in vivo* protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicants troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver. *Toxicol.Res.*, 4, 106-111 (2015). *9-3
- 90. <u>Yamazaki H</u>, Suemizu H, Kazuki Y, Oofusa K, Kuribayashi S, Shimizu M, Ninomiya S, Horie T, Shibata N, and Guengerich F P. Assessment of protein binding of 5-hydroxythalidomide bioactivated in humanized mice with human P450 3A-chromosome or hepatocytes by two-dimensional electrophoresis/accelerator mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, **29**, 1279-1281 (2016). ***9-**(3)
- Murayama N, van Beuningen R, Suemizu H, Guguen-Guillouzo C, Shibata N, Yajima K, Utoh M, Shimizu M, Chesne C, Nakamura M, Guengerich F P, Houtman R, and <u>Yamazaki H.</u> Thalidomide increases human hepatic cytochrome P450 3A enzymes by direct activation of pregnane X receptor. *Chem. Res. Toxicol.*, 27, 304-308 (2014). ***9-**
- 92. Yamazaki H, Suemizu H, Murayama N, Utoh M, Shibata N, Nakamura M, and Guengerich F P. In vivo drug interactions of the teratogen thalidomide with midazolam: Heterotropic cooperativity of human cytochrome P450 in humanized TK-NOG mice. Chem.Res.Toxicol., 26, 486-489 (2013). *9-4
- 93. <u>Yamazaki H</u>, Chowdhury G and Guengerich F P. Activation of Thalidomide to Reactive Metabolites by Autoinduced Human Cytochrome P450 3A Enzymes, with Substrate Cooperativity, and Implications for Development of Analogs. In: *Advances in Medicine and Biology*, Vol. 93, Ed. L.V. Berhardt, Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc, 23-30 (2016). ***9-**(4)
- Murayama N, Kazuki Y, Satoh D, Arata K, Harada T, Shibata N, Guengerich F P, and <u>Yamazaki H</u>. Induction of human cytochrome P450 3A enzymes in cultured placental cells by thalidomide and relevance to bioactivation and toxicity. *J. Toxicol. Sci.*, 42, 343–348 (2017). ***9–**(4)
- Wani T H, Chakrabarty A, Shibata N, <u>Yamazaki H</u>, Guengerich F P, and Chowdhury G. The dihydroxy metabolite of the teratogen thalidomide causes oxidative DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.*, **30**, 1622–1628 (2017). ***9-**
- 96. Shimizu M, Suemizu H, Mitsui M, Shibata N, Guengerich F P, and <u>Yamazaki H</u>. Metabolic profiles of pomalidomide in human plasma simulated with pharmacokinetic data in control and humanized-liver mice.

Xenobitica, **47**, 844–848 (2017). ***9–5**

- Higuchi Y, Kawai K, Kanaki T, <u>Yamazaki H</u>, Chesné C, Guguen-Guillouzo C, Suemizu H. Functional polymer-dependent 3D culture accelerates the differentiation of HepaRG cells into mature hepatocytes. *Hepatol Res.*, **46**, 1045-1057 (2016). ***9-**(5)
- 98. Murayama N, Suemizu H, Uehara S, Kusama T, Mitsui M, Kamiya Y, Shimizu M, Guengerich FP, <u>Yamazaki H</u>. Association of pharmacokinetic profiles of lenalidomide in human plasma simulated using pharmacokinetic data in humanized-liver mice with liver toxicity detected by human serum albumin RNA. *J, Toxicol. Science,* in press. ***9-**(5)

く図書>

1 山本 恵子

- ・ 清水伸隆、浴本亨、穴見康昭、伊藤俊将、池口満徳、山本恵子, MD-SAXS 法によるビタミン D 受容体リガンド結合ドメインの不活性型および活性阻害型の溶液構造解析.放射光学会誌. 30, 264 275 (2017).
- Yamamoto K, Anami Y, Itoh T. Development of vitamin D analogues that modulate the pocket structure of vitamin D receptor. Curr. *Top. Med. Chem.* 14, 2378–2387 (2014). *1–5

2田村 修

 <u>Osamu Tamura.</u> Geometry-Controlled Cycloaddition of C-Alkoxycarbonyl Nitrones: Synthetic Studies on Nonproteinogenic Amino Acids. In "*Methods and Applications of Cycloaddition Reactions in Organic Syntheses*" Nagatoshi Nishiwaki Ed, Wiley, (2014).

4 伊東 進

- <u>伊東進</u>. TGF- βングナルを抑制するTMEPAIファミリー. 生化学. 89, 145-153 (2017).
- 金田典雄、伊東進. 薬学のための分子生物学(金田典雄、伊東進編). 廣川書店. (2014).
- 伊東 進、伊東史子.「第7章 遺伝子工学」.薬学のための分子生物学(金田 典雄、伊東 進編).廣川書店. 256-276 (2014).

6 渡邊 泰男

- <u>渡邊泰男</u>、居原秀. 活性イオウとNOシグナル.実験医学増刊 Vol.36 No.5「レドックス疾患学」(赤池孝章,本橋ほづみ,内田浩二,末松 誠/編). 羊土社(東京). 656-662 (2018). * 6-①、②、③、④
- ・ 渡邊泰男、石井 功、蕨 栄治. RSS の生合成系とタンパク質機能制御.細胞工学. Vol.34, No.4「活性イオウ分子種の生理活性にせまる」(赤池孝章 監修).秀潤社(東京). 372-376 (2015). *6-①,②,③,④
- ・ <u>渡邊泰男.</u>薬効の個人差と薬理作用に影響を与える因子. 図解薬理学 (井上和秀、鍋島俊隆 編). 南
 山堂(東京). 71-75 (2015).
- ・ <u>渡邊泰男.</u>末梢神経に作用する薬、中枢神経に作用する薬(1)(2)、循環器系に作用する薬. NHK 出版
 「疾病の回復を促進する薬」(福永浩司、渡邊泰男 編). 放送大学教育振興会(東京). 44-103 (2013).

7 小椋 康光

• <u>Ogra Y</u>. Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. *Metallomics.* **9**, 435-441, (2017).

- 小椋康光. 生体内微量元素解析と機能解明. ぶんせき. 442-445 (2016).
- 小椋康光,生命機能のファインチューナーとして働く生体微量元素研究の新たな動向、ファルマシア、
 52,764-768 (2016).
- 小椋康光.環境毒性学におけるメタロミクス研究の展開. YAKUGAKU ZASSHI. 135, 307-314 (2015).
- ・ 小椋康光. 哺乳類細胞における銅の恒常性維持の分子機構. 日本衛生学会誌. 69, 136-145 (2014).
- <u>Ogra Y</u>. Speciation and identification of chalcogen-containing metabolites. In: *Metallomics Recent* Analytical Techniques and Applications -, <u>Y. Ogra</u> and T. Hirata (eds.), Springer, Tokyo, 43-61 (2017).
- N. Suzuki* and <u>Ogra Y</u>. ⁷⁷Se NMR spectroscopy for speciation analysis of selenium compounds. In: *Metallomics - Recent Analytical Techniques and Applications -*, <u>Y. Ogra</u> and T. Hirata (eds.), Springer, Tokyo, 147-155 (2017).
- <u>Ogra Y</u>. Selenium metabolism. In: *Diversity of Selenium Functions in Health and Disease*, R. Brigelius-Flohé and H. Sies (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 19-30 (2015).
- Ogra Y. Identification of selenometabolites in animals and plants by mass spectrometry. In: Food and Nutritional Components in Focus No. 9, Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects, V.R. Preedy (ed.), The Royal Society of Chemistry, London, 158-172 (2015).
- <u>Ogra Y</u>. Selenohomolanthionine and its potential use in medicine and nutrition. *Food and Nutritional Components in Focus No. 9, Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, V.R. Preedy (ed.), The Royal Society of Chemistry, London, 354-362 (2015).

8 濵本 知之

- <u>濵本知之</u>. 薬物代謝酵素の遺伝子多型と副作用、重金属・金属を用いた医薬品、麻薬取締官、放射線を利用した医薬品、医薬品による光線過敏症、抗がん薬曝露防止、医薬品に使用される水、原因アレルゲンの診断と治療に用いられるアレルゲンエキス製剤、薬剤師と医療廃棄物のかかわり. 衛生薬学 基礎・予防・臨床(今井浩孝、小椋康光編). 査読有. 南江堂(東京). 400-401, 414-417, 439-440, 496-497, 499, 541, 556-557, 615-616, 624 (2016).
- <u>濵本知之</u>. P513 生活環境における消毒の概念について説明できる
 認定指導薬剤師のための「教えにくいLS課題集」改訂第3版 取り組みにくいSBOsをしっかり教えよう 課題と解答例集(東京都薬剤師会 実務実習委員会編)、査読有、東京都薬剤師会(東京). 62-64 (2014).

<学会発表>

	1 山本 恵子
•	Toshimasa Itoh, Tomoko Saito, <u>Keiko Yamamoto</u> : Reducing agent promotes hydroxylation of fatty acid by
	lipoxygenase. The 15th Tetrahedron Symposium(UK)2014 年 6 月 24, 25 日 ★1-①
•	小島拓之、伊藤俊将、江川大地、 <u>山本恵子</u> :生体直交型反応を用いた PPARyの修飾及び修飾体の X 線結
	晶構造解析。第 58 回日本薬学会関東支部大会(東京)2014 年 10 月 4 日 *1-①,②,③,④
•	吉澤麻美、吉本暢子、穴見康昭、江川大地、伊藤俊将、 <u>山本恵子</u> :側鎖に求電子基をもつビタミン D 誘導
	体の設計と合成。第 57 回日本薬学会関東支部大会(東京)2013 年 10 月 \star 1–5
•	小島拓之、伊藤俊将、江川大地、 <u>山本恵子</u> :生体直交型反応を指向した PPARγリガンドの設計と合成。日
	本ケミカルバイオロジー学会第8回年会(東京)2013年6月 *1-①,②
•	江川大地、伊藤俊将、吉本暢子、山本恵子: PPARγと脂肪酸の共有結合に関する研究。日本ケミカルバイ
	オロジー学会第8回年会(東京)2013年6月 *1-①,②,③

Hiroyuki Kojima, Toshimasa Itoh, Daichi Egawa, <u>Keiko Yamamoto</u>: Fluorescent labeling of PPARγ by bioorthogonal reaction, The 16th Tetrahedron Symposium(Germany)2015 年 6 月 18, 19 日 *1-①,②,③

- 小島拓之、伊藤俊将、江川大地、山本恵子:生体直交型反応を利用した PPARγの蛍光標識及び標識体の
 X 線結晶構造解析。第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム(千葉)2015 年 11 月 26 日 *1-①,②,
 ③
- 吉澤麻美、堀竜也、穴見康昭、加藤晃、吉本暢子、伊藤俊将、山本恵子: 側鎖に電子求引基をもつ活性型
 ビタミン D 誘導体の設計と合成。日本薬学会第 136 年会(神奈川)2016 年 3 月 29 日 *1-⑤
- Toshimasa Itoh, Daichi Egawa, Tomoko Saito, <u>Keiko Yamamoto</u>: 17-oxoDHA is a dual agonist for PPARα/γ
 with covalent bond formation. The 17th Tetrahedron Symposium (Spain) 2016 年 6 月 29 日 *1-①,②,③
- Mami Yoshizawa, Tatsuya Hori, Yasuaki Anami, Akira Kato, Nobuko Yoshimoto, Toshimasa Itoh, <u>Keiko</u>
 <u>Yamamoto</u>: Design and synthesis of the active vitamin D analogues with an electrophile at the side chain. The 17th Tetrahedron Symposium(Spain)2016 年 6 月 29 日 *1-⑤
- Toshimasa Itoh, Daichi Egawa, <u>Keiko Yamamoto</u>: 17-oxoDHA is a dual agonist for PPARα/γ with covalent bond formation. 3rd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecules (Japan) 2016 年 9 月 1 日 *1-①,②,③
- Hiroyuki Kojima, Toshimasa Itoh, <u>Keiko Yamamoto</u>: Fluorescent labeling of PPARγ-LBD by bioorthogonal reaction. 3rd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecules (Japan) 2016 年 9 月 1 日 *1-①,②,③
- Mami Yoshizawa, Tatsuya Hori, Yasuaki Anami, Akira Kato, Nobuko Yoshimoto, Toshimasa Itoh, <u>Keiko</u>
 <u>Yamamoto</u>: Design and synthesis of the vitamin D analogues forming covalent bond with vitamin D receptor.
 3rd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in
 Biomolecules (Japan) 2016 年 9 月 1 日 *1-⑤
- ・ 伊藤俊将、江川大地、斉藤智子、秋山悠衣、山本恵子:リポキシゲナーゼを用いた 17-HDHA の合成と
 17-oxoDHA の PPARα/γに対する共有結合形成。第 27 回日本レチノイド研究会学術集会(東京)2016 年
 10 月 22 日 *1-①,②,③
- 吉澤麻美、堀竜也、穴見康昭、加藤晃、吉本暢子、伊藤俊将、山本恵子:ビタミンD受容体と電子求引基を 有するリガンド間の共有結合形成。第27回日本レチノイド研究会学術集会(東京)2016年10月22日 *
 1-⑤
- 吉澤麻美、堀竜也、伊藤俊将、山本恵子:ビタミン D 受容体共有結合型リガンドの創製と結合様式解明。
 2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ(茨城)2017 年 3 月 14 日 *1-⑤
- ・ 小島拓之、伊藤俊将、山本恵子:2 段階の共有結合形成反応を利用した標的タンパク質修飾法の開発研究。第15回 次世代を担う有機化学シンポジウム(東京)2017 年 5 月 26 日 *1-①,②,③,④
- Chiaki Imafuku, Nami Ohashi, Hiroyuki Kojima, Mami Yoshizawa, Makoto Kubo, Yasuaki Anami, Hiroaki Ishida, Toshimasa Itoh, <u>Keiko Yamamoto</u>: Study of the development of noncovalent-type irreversible ligand for vitamin D receptor as a model protein. JSPS Core-to-core Program Symposium (東京) 2018 年 1 月 29 日 *1-5
- 小島拓之、伊藤俊将、竹内涼介、藤田侑希、大橋南美、山本恵子:クマリン型 turn-on 蛍光プローブの開発
 研究。日本薬学会 第 138 年会(金沢)2018 年 3 月 26 日 *1-④
- ・ 吉澤麻美、藤木麻衣花、伊藤俊将、山本恵子:側鎖末端にかさ高い置換基を有する共有結合型 VDR リガンドに関する研究。日本薬学会 第 138 年会(金沢)2018 年 3 月 27 日 *1-⑤

2田村修

 Nobuyoshi Morita, Rina Kono, Kenji Fukui, Asuka Miyazawa, Ryosuke Toyama, Iwao Okamoto, <u>Osamu</u> <u>Tamura</u>: BF₃·OEt₂-Mediated *cis*-Selective Cycloaddition of *O*-Silyloxime. 14th Tetrahedron Symposium (Vienna, Austria) June 25-28, 2013.

- Nobuyoshi Morita, Kie Sato, Arisa Yasuda, Iwao Okamoto, <u>Osamu Tamura</u>: Gold-catalyzed Efficient Synthesis of Cyclic Ethers bearing Acetylenic Moiety. 18th European Symposium on Organic Chemistry (Marseille, France) July 7-12, 2013.
- ・ 竹内祐輝、髙橋和紗、外山亮介、善財さくらこ、森田延嘉、岡本 巌、田村 修: Boc₂O により促進される分 子内オキシムーオレフィン付加環化反応。第43回複素環化学討論会(岐阜)2013年10月17-19日
- ・ 森田延嘉、柴田基拓、安田有沙、佐藤きえ、岡本巌、田村修:金触媒を利用した環状エーテル類の合成。 第 39 回反応と合成の進歩シンポジウム(九州大学)2013 年 11 月 5-6 日
- 小林健一、田村修、古源 寛: Phaeosphaeride A の全合成研究。日本薬学会第 134 年会(熊本)2014 年 3
 月 27-30 日
- Nobuyoshi Morita, Arisa Yasuda, Motohiro Shibata, <u>Osamu Tamura</u>: Gold-catalyzed Efficient Synthesis of Cyclic Ethers bearing carbonyl group via Meyer-Schuster Rearrangment and Oxa-Michael Addition. 5th EuCheMS Chemistry Congress (Istanbul, Turkey) August 31-September 4, 2014.
- Nina Shibata, Takahisa Tsuchiya, Nobuyoshi Morita, <u>Osamu Tamura</u>: Radical Cyclization of-Alkynyl *O-tert*-Butyldiphenylsilyloximes Using 4-*tert*-Butylbenzenethiol. 15th Tetrahedron Symposium Asia Edition (Singapore)October 29-31, 2014.
- Asuka Miyazawa, Yuka Inaba, Saori Hama, Shintaro Ban, Nobuyoshi Morita, <u>Osamu Tamura</u>: A Concise Synthesis of cis-HPA-12 Using Branonitrone species. 15th Tetrahedron Symposium Asia Edition (Singapore) October 29-31, 2014.
- ・ 小林健一、小林夕貴子、田村修、古源 寛: *ent*-Phaeosphaeride Aの全合成、第 58回日本薬学会関東支 部大会(昭和薬科大学)2014年10月4日
- 小林健一、小林夕貴子、中村美里、田村修、古源 寛: Phaeosphaeride A の相対および絶対立体配置の決定、日本薬学会第 135 年会(神戸)2015 年 3 月 25-28 日
- Nobuyoshi Morita, Yukari Saito, Sakurako Zenzai, <u>Osamu Tamura</u>: Stereoselectivity of intramolecular cycloaddition of allenyl nitrones. 16th Tetrahedron Symposium, (Berlin, Germany), June 16–19, 2015.
- ・ 柴田洸希、庭野陽平、汐崎正生、平井俊弘、伴慎太郎、橋本善光、森田延嘉、田村修: Neodysiherbaine A の全合成研究。第59回日本薬学会関東支部大会(日本大学薬学部)2015年9月12日
- ・ 田村修、竹内祐輝、外山亮介、鈴木智行、相良浩人、鈴木良生、森田延嘉、伴慎太郎、橋本善光:アシル 化により促進されるオキシムの分子内付加環化反応。第41回反応と合成の進歩シンポジウム(近畿大学) 平成2015年11月26-27日
- ・ 柴田洸希、庭野陽平、汐崎正生、平井俊弘、伴慎太郎、橋本善光、森田延嘉、田村修: Neodysiherbaine A の全合成。日本薬学会第 136 年会(横浜)2016 年 3 月 26-28 日
- Toshihiro Hirai, Yohei Niwano, Koki Shibata, Masao Shiozaki, Yoshimitsu Hashimoto, Sintaro Ban, Nobuyoshi Morita, <u>Osamu Tamura</u>: Formal total synthesis of neodysiherbaine A using chiral nitrone. 17th Tetrahedron Symposium, (Barcelona, Spain), June 28-July 1, 2016
- 相良浩人、安田雅俊、鈴木良生、鈴木智行、伴慎太郎、橋本善光、森田延嘉、田村修: O-Alkyl S-(pyridin-2-yl)carbonothioates (PySCOORs)を用いるオキシムの分子内付加環化反応、。第60回日本薬 学会関東支部大会(東京) 2016年9月17日
- ・ 橋本善光,石渡啓真,加藤光紀,関野真菜,立川漱子,伴慎太郎,森田延嘉, 田村修:オキシムおよびヒ ドラゾンの電子供与能を活用した逆配向性付加環化反応。第42回反応と合成の進歩シンポジウム(静岡) 2016 年 11 月 7-8 日
- ・ 平井俊弘、柴田洸希、庭野陽平、汐崎正生、橋本善光、伴慎太郎, 森田延嘉、田村 修: ニトロンの立体選 択的付加反応を用いる neodysiherbaine A の全合成研究。第46回複素環化学討論会(金沢)2016年9月 26-28日

 ・ <u>田村 修</u>:機能性ニトロンの化学、日本薬学会東海支部特別講演会(名古屋)平成 2017 年 1 月 17 日

 ・ 橋本善光、柴田洸希、庭野陽平、汐崎正生、平井俊弘、伴慎太郎、森田延嘉、<u>田村 修</u>:環状ニトロンの立体選択的付加環化反応を利用した neodysiherbaine A の不斉全合成。日本薬学会第 137 年会(仙台)2017 年 3 月 24-27 日

3石戸 聡

- <u>Satoshi Ishido</u>, Mizuho Kajikawa, Pai-Chi Li, Yuji Sugita: Recognition mode of viral MIR E3 ubiquitin ligase-mediated targeting. 第 44 回日本免疫学会学術集会(札幌)2015 年 11 月 18-28 日 *3-④
- ・ 梶川瑞穂、Pai-Chi Li、木村美奈子、青木-川住雅美、水戸麻理、宮下尚之、杉田有治、石戸聡: 膜貫通型
 E3 ユビキチンリガーゼ MIR ファミリーによる基質認識。第 37 回日本分子生物学会年会(横浜)、2014 年 11
 月 25-27 日 *3-④
- <u>Satoshi Ishido</u>: Loss of MHC II ubiquitination induces negative consequence to dendritic cells. 8th International Workshop on Antigen Processing & Presentation (Philadelphia), 10-13 June 2014 *3-3
- <u>Satoshi Ishido</u>: Loss of MHC class II ubiquitination negatively regulates dendritic cells TGF- β Family: Signal network and live imaging, (Matsuyama Ehime), October 28, 2013 *** 3-**③
- <u>Satoshi Ishido</u>: Membrane-bound E3 ubiquuitin ligase family for immune regulation 1st Biomolecular Science Meeting (NISEKO Hokkaido), March 17, 2014
- <u>Satoshi Ishido</u>: Loss of MHC class II ubiquitination negatively regulates dendritic cells The ubiquitin-proteasome system: from basic mechanism to pathophysiological roles. THE 35th NAITO CONFERENCE, (Sapporo, Hokkaido), July 10, 2013 ***3-3**
- ・ Pai-Chi L, Kajikawa M, <u>Ishido S</u> and Sugita Y: Palmitoylation of MIR2 enhances the interaction of transmembrane region of MHC I. 第 61 回日本ウイルス学会(神戸)2013 年 11 月 10 日 ***3-④**

4 伊東 進

- 伊東進、中野なおこ、佐野圭吾、中根孝久、岡本巌、内藤幹彦: YAPを標的とした中皮腫進展制御と分子標的薬開発。日本薬学会第138年会(金沢)石川県立音楽堂他2018年3月25-28日
- ・ 伊東進: がん進展を制御するデュアル阻害分子 TMEPAI ファミリーの機能解析。 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成シンポジウム(昭和薬科大学、東京) 2018 年 2 月 15-16 日 *4-2
- ・ 伊東進、中野なおこ、嶋田貴之: BMP (Bone Morphogenetic Protein)シグナルで誘導される軟骨細胞分化 に関与する新規 non-Smad シグナル経路。ConBio2017(神戸)2017 年 12 月 6-9 日
- ・ 稲川 俊彦、齊藤 裕紀、宮本 樹、渡部 琢也、伊東 進、久保田 義顕、伊東 史子:血管・リンパ管内皮細胞の TGF-βファミリーシグナルは成体の生存に必須である。ConBio2017(神戸)2017 年 12 月 6-9 日
- ・ Nakano N<u>, **Itoh S**</u>, Itoh F : TMED10 interfers with TGF-βreceptor complex formation. 第 76 回日本癌学会 学術総会(横浜)2017 年 9 月 28-30 日 *** 4-**⑤
- <u>Susumu Itoh</u>: Requirement of p38-mediated MSK1 activation for chondrocyte differentiation. TGF- β Meeting in Uppsala 2017, (BMC, Uppsala University, Uppsala, Sweden) August 31-September 2, 2017
- Nakano N, Tsuchiya Y, Kako K, Umezaki K, Sano K, Ikeno S, Otsuka E, Nakagawa A, Sakata N, Itoh F, Iemura S, Natsume T, <u>Itoh S</u>: TMED10 as a disrupter between TGF-βtype I and type II receptor complex.
 FASEB SRC TGF-βsuperfamily: signaling in development and disease, (Lisbon, Portugal), July 9-14, 2017
 *4-5
- <u>Itoh S</u>, Nakano N, Sano K, Sakata N, Ikeno S, Sato E, Nochise D, Katsu Y, Takahashi Y, Omura K, Yamaguchi S: TGF-β/Smad signal inhibits benzo(a)pyrene-mediated genetic instability via suppression of CYP1A1 gene. FASEB SRC "TGF-β superfamily: signaling in development and disease, (Lisbon, Portugal), July 9-14,

2017 *4-4

- Sano K, Amano S, Ouchi M, Shibasaki T, Aoki Y, Konishi A, Hiruma M, Obokata S, Sawada Y, Itoh F,
 Watanabe Y, Taketo MM, Kato M, <u>Itoh S</u>: Inhibitory action of TMEPAI in intestinal tumor. FASEB SRC
 "TGF-βsuperfamily: signaling in development and disease, (Lisbon, Portugal), July 9–14, 2017 *4–3
- ・ 石川 遼、河本恵理、福田和男、森彩里穂、岸 福子、正田卓司、小野寺祥子、服部隆行、栗原正明、内藤 幹彦、山崎 龍、中根孝久、岡本 巌、中野なおこ、伊東進:プロテインノックダウン法を利用した YAP シグ ナル阻害剤の開発。平成 29 年度日本生化学会関東支部例会(東京医科歯科大学 M&D タワー)2017 年 6 月 17 日
- 入江美樹、幾田鞠子、中野なおこ、佐野圭吾、伊東進: YAP 阻害剤による抗腫瘍活性を in vivo イメージン グで評価する。平成 29 年度日本生化学会関東支部例会(東京医科歯科大学 M&D タワー)2017 年 6 月 17 日
- ・ 芝崎哲平、佐野圭吾、天野翔瑛、大内舞美、青木佑太郎、小西 愛、比留間美帆、小保方汐里、澤田悠太郎、伊東史子、渡邊 幸秀、武藤 誠、加藤光保、伊東 進:TGF-βシグナル抑制分子欠損によって誘導されるがん抑制機構の解明。平成 29 年度日本生化学会関東支部例会(東京医科歯科大学 M&D タワー)
 2017 年 6 月 17 日 *4-③
- 斎藤裕紀、稲川俊彦、宮本樹、伊東進、Murcus Fruttiger、渡部琢也、伊東史子:血管内皮細胞特異的 TGF-βシグナル欠損が腫瘍形成に与える影響。平成29年度日本生化学会関東支部例会(東京医科歯科 大学 M&D タワー)2017年6月17日
- ・ 岸 福子、河本理恵、石川 遼、小野寺祥子、内藤幹彦、中野なおこ、伊東 進:新規 YAP 阻害剤による悪
 性中皮腫細胞増殖抑制機構。平成 29 年度日本生化学会関東支部例会(東京医科歯科大学 M&D タワー)
 2017 年 6 月 17 日
- ・ 渡橋弘貴、尾嶋千遥、佐野圭吾、渡部琢也、高山健太郎、伊東進、林良雄、伊東史子:ミオスタチン阻害ペプチドを利用した筋委縮改善効果。平成29年度日本生化学会関東支部例会(東京医科歯科大学 M&D タワー)2017年6月17日
- ・ 中野なおこ、土屋祐樹、加古拳朗、梅嵜乾隆、佐野圭吾、池野聡一、重田将史、坂田宜夫、伊東史子、家村修一郎、夏目 徹、伊東 進: TMED10 による TGF-βシグナル伝達抑制機構。平成 29 年度日本生化学会 関東支部例会(東京医科歯科大学 M&D タワー)2017 年 6 月 17 日 *4-⑤
- ・ 中野なおこ、土屋裕樹、加古拳朗、梅嵜乾隆、佐野圭吾、池野聡一、大塚愛理、中川愛、坂田宣夫、伊東 史子、家村俊一郎、夏目 徹、伊東 進: TMED10 は TGF-β受容体複合体形成を抑制し TGF-βシグナル伝 達を阻害する。第 39 回日本分子生物学会年会(横浜)2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 *4-⑤
- ・ 中野なおこ、服部隆行、内藤幹彦、伊東進:転写因子 YAP を標的としたプロテインノックダウン法の確立。 第 75 回日本癌学会学術総会(横浜)2016 年 10 月 6-8 日
- ・ 中野なおこ、正田卓司、服部 隆行、栗原正明、内藤幹彦、伊東 進:がん遺伝子 YAP を標的とした抗がん 剤開発。第 21 回日本癌分子標的治療学会(福岡)2017 年 6 月 14-16 日

5 水谷顕洋

- 長谷川尚美、水谷顕洋、柏木舞、遠山卓、濵田浩一、森滉貴:中枢神経系における NBCe1-C の機能について。第 38 回 日本神経科学大会(神戸)2015 年 7 月 *5-①
- ・ 菅井かれん、<u>水谷顕洋</u>、土居孝平、是永理那、加藤大、大島由規、梶山千英、川添綾華、濵田浩一: ミトコ ンドリアの機能維持における IRBIT の役割。日本薬学会第 136 年(横浜) 2016 年 3 月 *5-②
- Gautam N, Sugai K, Doi K, Korenaga R, Kato D, Oshima Y, Kajiyama C, Kawazoe A, Ino K, Hamada K, <u>Mizutani</u>
 <u>A</u>: The Involvement of IRBIT in Autophagosome Formation. 第 39 回日本分子生物学会年会(横浜)2016
 年 12 月 *5-④

- ・ 長谷川尚美、遠山卓、森滉貴、佐藤沙弥香、竹中遥菜、白鳥瞳、水谷顕洋:アストロサイトにおける脳型 NBCe1の膜局在に関わる結合分子の役割。第39回日本分子生物学会年会(横浜)2016年12月 *5 ④
- ・ 川崎聡子、濵田浩一、伊藤諒、三森皐介、加藤心一郎、五月女諒介、波多野直哉、御子柴克彦、水谷顕

 <u>洋</u>:IRBIT ファミリーと陰イオン交換体 SLC4A2/AE2 の相互作用の解析。日本薬学会第 137 年会(仙台)
 2017 年 3 月 *5-②
- ・ 五月女諒介、濱田浩一、三森皐介、伊藤諒、加藤心一郎、川崎聡子、波多野直哉、御子柴 克彦、水谷顕

 <u>洋</u>:がん細胞における Shroom3 を介した IRBIT ファミリーの機能制御。日本薬学会第 137 年会(仙台)
 2017 年 3 月 *5-③
- 伊藤諒、濵田浩一、川崎聡子、三森皐介、加藤心一郎、五月女諒介、波多野直哉、御子柴克彦、水谷顕
 <u>洋</u>: AE2/SLC4A2を介した IRBIT ファミリーによる細胞内 pH 調節は、細胞移動を制御している。日本薬学会
 第 137 年会(仙台)2017 年 3 月 *5-①
- ・ 遠山卓、古屋裕理、松田真悟、水谷顕洋:恐怖記憶に対する思春期発達依存的な卵巣切除の影響。日本 薬学会第 137 年会(仙台)2017 年 3 月 *5-②
- ・ 長谷川尚美、遠山卓、白鳥瞳、竹中遥菜、森滉貴、佐藤沙弥香、波多野直哉、水谷顕洋:中枢神経系にお ける NBCe1の細胞膜輸送に関わる分子について。日本薬学会第137年会(仙台) 2017年3月 *5-③

6 渡邊 泰男

- ・ <u>渡邊泰男</u>: (シンポ) Redox dependent regulation of CaM-pedendent enzymes and its physiological significance 「Novel regulation of Ca²⁺ signaling in physiology」。第 95 回日本生理学会大会(高松)2018 年 3 月 28-30 日 ***6-①,②,③,④**
- ・ <u>渡邊泰男</u>:(シンポ)レドックス・活性イオウ制御型カルシウムシグナルの新展開「抗酸化レドックスと活性イオウによる解毒代謝機構の新展開」。第 44 回日本毒性学会学術年会(横浜)2017 年 7 月 10-12 日 *
 6-①,②,③,④
- ・ <u>渡邊泰男</u>:(シンポ)カルシウムシグナルのレドックス制御「活性イオウと NO:レドックスシグナル研究の新
 展開」。第17回日本 NO 学会学術集会(徳島)2017年5月19日-20日 *6-①,②,③,④
- ・ 渡邊泰男:カルシウム信号系のレドックス応答性(シンポ)。第 89 回日本生化学会大会(仙台) 2016 年 9
 月 25-27 日 *6-①,②,③,④
- ・ <u>渡邊泰男</u>:レドックスによるリン酸化シグナル制御機構(依頼講演)。生命医用工学の新展開(7)岡山大学
 、大学院自然科学研究科 生命医用工学専攻シンポジウム(岡山) 2016 年 9 月 12 日 * 6-①②③④
- 渡邊泰男:(シンポ)レドックス・活性イオウ制御型リン酸化シグナルの新展開。第 69 回日本酸化ストレス学
 会学術集会 2016 年 8 月 30-31 日 * 6-①,②,③,④
- ・ <u>渡邊泰男</u>:カルモデュリンキナーゼ群のレドックス感受性の相違とその意義。平成 28 年度生理学研究所研究会 オルガネラネットワークの制御機構とその生理的意義(岡崎、生理研)2016 年 7 月 28 日-29 日 *
 6-①,②,③,④
- ・ <u>Watanabe Y</u>: (シンポ) Mutual covalent modifications of NO and persulfide signaling. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide., (Sendai), May 20-22, 2016 *6-①,②,③,④
- ・ <u>渡邊泰男</u>:(シンポ)カルシウム信号系のレドックス応答性とその意義。東北大学脳科学シンポジウム「脳高 次機能とシグナル伝達」2015 年 12 月 5 日 *6-①,②,③,④
- ・ <u>Watanabe Y</u>: Mutual covalent modifications of nitric-oxide and reactive sulfur spice. 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成 第2回国際シンポジウム(昭和薬科大学、東京) 2015 年 8 月 31 日-9 月 1 日 * 6-①,②,③,④

- <u>渡邊泰男</u>:(シンポ)活性イオウ含有分子の分子標的。第88回日本薬理学会年会(名古屋)2015年3月 25-27日 *6-①,②,③、④
- <u>渡邊泰男</u>:(シンポ)活性イオウ含有分子による生体分子のシグナル応答。フォーラム 2014:衛生薬学・環境
 トキシコロジー(筑波)2014 年 9 月 19 日 * 6-①,②,③,④

- <u>Ogra Y</u>: Selenometabolome: The riddles of unique selenometabolites. The 7th Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, (Matsue), November 12-17, 2017
- <u>Ogra Y</u>: Toxicology of tellurium explored by speciation and identification of tellurometabolites. The 6th International Symposium on Metallomics, (Vienna, Austria), August 14–17, 2017
- <u>Ogra Y</u>, Takahashi K, and Suzuki N (invited): Evaluation of naturally occurring selenocompounds on their nutritional availability. The International Selenium Seminar (ISS 2016), (Guangzhou-Shenzhen, China),October 20-23, 2016
- <u>Ogra Y</u> (invited): Biosynthesis and biological role of selenocyanate. The 5th International Selenium Seminar 2015, (Moscow-Yaroslavl, Russia), September 21-25, 2015
- <u>Ogra Y(keynote)</u>: Identification of a novel selenium metabolite and elucidation of its biological and toxicological roles. 5th International Symposium on Metallomics, (Beijing, China), September 9–12, 2015
- <u>Ogra Y</u>(invited): Identification of a novel selenium metabolite in cultured cells and evaluation of its biological function. The International Se Seminar 2014, (Busan, Korea), October 16–18, 2014

8 濵本 知之

- ・ 山本健、宮﨑美子、高田公彦、増田豊、廣澤伊織、森元能仁、<u>濵本知之</u>:模擬患者参加型コミュニケーション実習が薬学生に与える教育効果について。日本薬学会第138年会(金沢)2018年3月
- ・ 新福七海、高木彰紀、増田豊、<u>濱本知之</u>:放射線による脂肪肝の誘発とカロリー制限による抑制。日本薬 学会第 138 年会(金沢)2018 年 3 月
- ・ 荒木良介、計良貴之、加藤加奈恵、菱沼隆一、高木彰紀、増田豊、<u>濵本知之</u>、田中恒明、山田英紀:カルボプラチン・ペメトレキセド併用療法施行患者における重篤な血液毒性の発現に関する危険因子の検討。
 第 26 回日本医療薬学会年会(千葉)2017 年 11 月
- 浅葉みず穂、高木彰紀、宇陀紗奈子、増田豊、鈴木啓司、山下俊一、<u>濵本知之</u>:メトホルミンの甲状腺乳 頭がん細胞株に対する増殖抑制機序に関する検討。第61回日本薬学会関東支部大会(東京)2017年9
 月
- ・ 小林大介、宇山佳奈、<u>濵本知之</u>、増田 豊、川上準子、佐藤憲一:経口抗がん薬副作用の自己組織化マップ(SOM)を用いたビジュアル化と網羅的解析。日本薬学会第 137 年会(仙台)2017 年 3 月
- 福井楓、土肥弘久、萩原幸彦、堀口よし江、増田豊、北島潤一、高野昭人、千葉良子、濱島肇、<u>濵本知</u>
 <u>之</u>、福森隆次、廣原正宣、小野寺敏、渡部一宏、山本美智子:実務実習事前学習における学習者の態度 評価の客観性と自己評価の検討。日本薬学会第 136 年会(横浜)2016 年 3 月
- ・ 綾部秀範、真板桜子、山本健、小林茂樹、福嶋敬宜、<u>濱本知之</u>、キサンチンオキシダーゼ阻害作用を持つ
 既存薬のラット L-アルギニン急性膵炎モデルに対する効果-第2報-。日本薬学会第136年会(横浜)
 2016年3月
- ・ 橋本麻衣子、瀬角りほ、三村享、春日恵理子、松本 剛、本田孝行、<u>濱本知之</u>、山折大、大森栄:ESBL 産 生 E. coliを起因菌とする尿路感染症のリスク因子の探索。第25回日本医療薬学会年会(横浜)2015年11
- ・ 石井恵、浅葉みず穂、鈴木啓司、山下俊一、<u>濵本知之</u>:ビグアナイド系糖尿病治療薬メトホルミンの抗がん 作用機序に関する検討。第59回日本薬学会関東支部大会(千葉)2015年9月

- 真板桜子、綾部秀範、小林茂樹、福嶋敬宜、<u>濵本知之</u>:キサンチンオキシダーゼ阻害作用を持つ既存薬の ラット L−アルギニン急性膵炎モデルに対する効果。第 59 回日本薬学会関東支部大会(千葉)2015 年 9 月. 山口涼、真板桜子、綾部秀範、小林茂樹、福嶋敬宜、<u>濵本知之</u>:キサンチンオキシダーゼ阻害作用を持つ
- 既存薬のラット急性膵炎に対する効果。第58回日本薬学会関東支部大会(東京)2014年10月
 渡部一宏、串田一樹、土肥弘久、千葉良子、廣原正宣、北島潤一、高野昭人、萩原幸彦、濱島肇、<u>濵本知</u>
 <u>之</u>、福森隆次、堀口よし江、山本美智子、田口恭治、戸田潤:薬学部4年生を対象にしたインスリン自己注射針の穿刺及び血糖自己値測定の体験実習とその教育効果。日本薬学会第134年会(熊本)2014年3月
 芹澤彩香、**濵本知之**、大槻佳織、川上準子、佐藤憲一:がん分子標的治療薬副作用のインフォマティクス
- ・ 廣原正宜、渡部一宏、寺田綾子、中村美樹、浜本知之、澁谷文則、戸田潤、大澤友二、薬物治療実践能
 カの伸長 ~問題基盤型学習と実務実習の効果~。第23回日本医療薬学会年会(仙台)2013年9月

9 山崎 浩史

- Yamazaki H:(口頭) "Human drug metabolism in humanized-liver mice and non-human primate models".
 20th International Conference on Cytochrome P450[~]Biochemistry, Biophysics, Biotechnology[~], (Düsseldorf, Germany), August 27-31, 2017 *9-②
- Yamazaki H:(口頭) "Comparison of drug oxidations in humans, primates, and rodents". 2015 JSSX / KAPS Joint Session, 30th JSSX Annual Meeting, (Tokyo), November 12-14, 2015 *9-②
- Yamazaki H: (口頭) "Metabolic Activation of Xenobiotics by Polymorphic Drug-metabolizing Enzymes".
 13th Meeting of the Asia Pacific Federation of Pharmacologists, (Bangkok, Thailand), February 1-3, 2016
 *9-④
- Yamazaki H:(口頭) "Metabolic activation and fate of xenobiotics determined by polymorphic drug-metabolizing enzymes". 19th North American ISSX/ 29th JSSX Annual Meeting, (San Francisco), October 19-23, 2014 *9-④
- Yamazaki H(invited): "Human drug metabolism in humanized-liver mice and non-human primate models",
 20th International Conference on Cytochrome P450, Düsseldorf, 2017 年 8 月 *9-②
- ・ 山崎浩史:(招待講演)「社会に貢献する医療系薬学研究の推進」、日本薬物動態学会の立場から。日本 薬学会第138年会シンポジウム(金沢)、2018年3月 *9-②
- ・ <u>山崎浩史</u>:(招待講演)加速器質量分析(AMS)法を活用するヒト型薬物動態研究。戦略的臨床第 I 相試験の進め方研究会(東京)、2016 年 9 月 *9-③
- ・ 山崎浩史: (招待講演) TK-NOG マウスおよび各種動物モデルを利用した PBPK モデリングによるヒト動態
 予測。第 24 回 HAB 研究機構学術年会(東京)、2017 年 6 月 *9-⑤
- ・ <u>山崎浩史</u>:(招待講演) 薬物酸化酵素による内因性物質代謝と生理機能について。The 31st JSSX
 Annual Meeting, 2017(東京)、2017 年 11 月 * 9-5
- ・ 山崎浩史: (招待講演) 生理学的薬物動態 (PBPK) モデルから見た臓器連関モデルへの期待。細胞アッセ イ技術の現状と将来シンポジウム (つくば)、2018 年 1 月 *9-5
- 山崎浩史:(招待講演)非ヒト霊長類およびヒト肝細胞移植マウスを用いるヒト薬物代謝・動態研究」。平成
 29 年度 薬物動態談話会 1月例会(東京)、2018 年 1月 *9-⑤

<研究成果の公開状況>(上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

<既に実施しているもの>

- ・ 平成 26 年 4 月 3 日 第 7 回ハイテクリサーチセンター成果報告会(於:昭和薬科大学 第一教室)
- ・ 小椋康光、岩下雄二、北口隆、鈴木紀行、鈴木和夫.「セレン含有化合物並びにこれを含有する植物及び 栄養剤」特許権者:昭和薬科大学、特許第 5583401 号(平成 26 年 7 月 25 日)
- ・ 平成 26 年 8 月 28 日、29 日 第 1 回国際シンポジウム(於:昭和薬科大学 第 2 講義棟 202 教室)
- ・ 小椋康光、寺田麻里.「テルルを含む土壌等からテルルを回収する方法」 特許権者:昭和薬科大学、特許第 5660760 号(平成 26 年 12 月 12 日)
- ・ 平成 27 年 4 月 3 日第 8 回ハイテクリサーチセンター成果報告会(於:昭和薬科大学 第 2 講義棟 202 教室)
- · 平成 27 年 8 月 31 日、9 月 1 日 第 2 回国際シンポジウム(於:昭和薬科大学 第 2 講義棟 202 教室)
- ・ 平成28年4月2日第9回ハイテクリサーチセンター成果報告会(於:昭和薬科大学記念講堂)
- · 平成 28 年 8 月 31 日、9 月 1 日 第 3 回国際シンポジウム(於:昭和薬科大学 第 2 講義棟 302 教室)
- · 平成 29 年 4 月 1 日 第 10 回ハイテクリサーチセンター成果報告会(於:昭和薬科大学 記念講堂)
- ・ 平成 30 年 2 月 15 日、16 日 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成シンポジウム(於:昭和薬科 大学 第 2 講義棟 202 教室)

1山本 恵子

日本レチノイド研究会学術集会にて、「水素-重水素交換反応(HDX)を利用した共有結合性化合物」に関する発表を行った。ここでは共有結合型化合物の修飾によるタンパク質のゆらぎの変化について報告した。

4 伊東 進

http://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/seika/teacher/55

6 渡邊 泰男

 研究成果は、当研究室ホームページ*で随時公開している (http://www.shoyaku.ac.jp/laboratory/yakuri.html)。

本学大学広報パンフレットおよび昭和薬科大学ホームページ内研究プロジェクト・コバレント修飾リサーチ専用ホームページ <u>http://www.covalent.hrc.shoyaku.ac.jp/</u>

<これから実施する予定のもの>

1山本 恵子

本課題に則りコバレント修飾リサーチを実施していたところ、共有結合型化合物をスクリーニングするための有 効な手段がないことがわかった。もし、共有結合型化合物ライブラリーに対して効率的なスクリーニング法が確 立できれば、共有結合型医薬品の開発研究に貢献できると考えられた。そこでコバレント修飾リサーチの一環と して予備実験を行ったところ、特異的修飾ならばタンパク質のゆらぎが抑制される点およびそれを水素-重水素 交換反応で検出可能である点が示唆された。今後は本手法の確立をめざし研究を実施する。

14 その他の研究成果等

該当なし

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

く「選定時」に付された留意事項>

研究計画遂行能力にやや不安は有るが、薬学分野に相応しい提案である。ただし、何処が真に新しいか不明な 点もあり、外部評価を最初から実施すべきである。

<「選定時」に付された留意事項への対応>

学外より本プロジェクトの外部評価委員を委嘱し、年度毎の成果報告会等でプロジェクトに対する評価を実施、 概ね良好な評価であった。

【本プロジェクト外部評価委員】

·新井 洋由 先生(東京大学大学院薬学研究科衛生化学講座 教授)

·荒野 泰 先生(千葉大学大学院薬学研究院分子画像薬品学研究室 教授/薬学研究院長)

・夏目 徹 先生(産業技術総合研究所創薬プロファイリング研究センター センター長)

·細谷 孝充 先生(東京医科歯科大学生体材料工学研究所 生命有機化学分野 教授)

<「中間評価時」に付された留意事項> 該当なし。

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

(様式2)

法人番号	131028
プロジェクト番号	S1311012

16

									(千円)
					内	ļ		訳	
年』	度∙区分	支出額	法 人 負 担	私 学 助 成	共同研 究機関 負担	受託 研究等	寄付金	その他()	備考
平	施 設	0							
成 2	装置	0							
5 在	設備	51,870	19,426	32,444					
度	研究費	25,313	14,301	11,012					
平	施設	0							
成 2	装置	0							
- 6 年	設備	12,312	4,338	7,974					
度	研究費	27,196	15,540	11,656					
平	施設	0							
成 2	装置	0							
_ 7 年	設備	0							
+ 度	研究費	38,600	20,923	17,677					
平	施設	0							
成 2	装置	0							
8 年	設備	0							
度	研究費	33,600	19,391	14,209					
平	施設	0							
成 2	装置	0							
9 在	設備	0							
度	研究費	33,600	19,041	14,559					
	施設	0	0	0	0	0	0	0	
総	装置	0	0	0	0	0	0	0	
額	設備	64,182	23,764	40,418	0	0	0	0	
	研究費	158,309	89,196	69,113	0	0	0	0	
彩	8 計	222,491	112,960	109,531	0	0	0	0	

(様式2)

法人番号 131028

17								
	《施 設》(私学助成	<u> </u>	こいないものも含め	り、使用してい	る施設をす	べて記載して	<u>ください。)</u>	(千円)
	施設の名称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体
	ハイテクリサーチセンター	H21	566 m ้	_	48	-	0	
	実験動物研究施設	H2	860m ²	_	26	_	0	
	機器分析研究施設	H2	451 m ²	_	27	-	0	
	RI研究施設	H2	600m ²	_	13	-	0	
	研究棟研究室	H2	4735m ²	_	47	_	0	

※ 私学助成による補助事業として行った新増築により、整備前と比較して増加した面積 0

m

装置・設備の名称 整備年度 型 番 台	
	数 稼働時間数 事業経費 補助金額 補助主体
(研究設備) QTOF LC/MSシステム セルソーター H25 Agilent 6550 13 H26 SH800 13 (情報処理関係設備)	致 核働時间数 事業程貨 補助金額 補助主体 h h h h h h h h h h h h h h h h h h h h h h h h h h 51,870 32,444 私学助成 式 1,464 h 12,312 7,974 私学助成 点 h h h 前 前 h h h 12,312 7,974 私学助成

18 研究費の支出状況

研究費の支出状況	況												(千円)
年度	平成 2	25 年	度	テーマ1										
小 뒤 묘	士山姑					積	算	内	訳					
小件日	又口祖	主	な使	途	金	額			主	な	内	容		
	教	育	研	究	1	経	費	支	L	Ц				
消耗品費	6,811	実験用語	試薬・器	具		6,811								
光熱水費														
通信運搬費	1	外部評価	西者手約	売き郵送		1								
印刷製本費														
旅費交通費														
報酬·委託料	282	HP作成				202	その作	也、塩基	基配列角	₩₩₩₩)			
()														
計	7,094													
	ア	ル	バ	イ	+	関	係	支	出					
人件費支出														
(兼務職員)														
教育研究経費支出														
計	0													
	設備	関係]	を出(1	個又は	1組の	価格が	500万	円未満	あのもの)				
教育研究用機器備品														
図書														
計	0													
	研	究	ス	タッ	, ,	7 関	目 伯	系	支	出				
リサーチ・アシスタント														
ポスト・ドクター														
研究支援推進経費														
計	0													

(様式1)

																/
年度	平成 2	25 年	度	テー	-マ2											
							積	算	内	訳						
小科日	文出祖	主	な	使途	1.17	金	額			-	È	な	内	容		
	教	育		研	究		経	費	支		出					
消耗品費	5.650	実験用	試薬	- 器具			5.650					-				
光教水費			H- 1714			•••••	-,				•••••			•••••	 •••••	
通信運搬費			•••••								•••••			•••••	 ••••••	
印刷製太費			•••••								•••••			•••••	 ••••••	
旅費交通費															 ••••••	
報酬・季託料	1 679	マウス	SPF1	íł.			818	その世	抗体	作塤	等8	61			 ••••••	
()	1,070					•••••	0.0		212014	11 22				•••••	 •••••	
	7 329															
<u>н</u> і	,,220 ד	11.		Ň	1	k	閱	伛	Ŧ		щ					
↓卅弗古山	,	10		/ \	•1	1.	[大]	坏	X		ш					
(••••••	
(本防咽貝) 								 			•••••			•••••	 ••••••	
<u> </u>						•••••		.							 ••••••	
ĒΙ	U ≣л/#	間で	ᆂᅭ		$\nabla I + 1$	留る	ーない。		□≠≒	まの・	± ጥነ					
ᄨᆇᇳᆓᇚᇔᄪᄪᆿ	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□		メゴ		メIよ	ホロック	山竹台/小で 1/11	トート	<u>っ</u> 不に 	שער. ס∨	500	_ <u>+</u>	7 10			
<u>教育研究用機</u> 奋 偏 品	2,988	FRP/ 142	2000-7	1109-1-1	<u>, , , , , , , , , , , , , , , , , , , </u>	Ζ,	141	3-101	/-/B	27-	500-	-10	547		 	
신 좀 신	0.000															
āT	2,988 70	- m	7	6		_	. 86	1 17	-	+		1				
	岍	笂	ス	4	ッ	_	/	1 17	Ŕ	文	日	1				
リサーチ・アシスタント															 	
ポスト・ドクター															 	
研究支援推進経費																
二十	0															
ні ні	0														/ -	
			- œ	_											(=	F円)
年度	平成 2	L 25 年	度	テ-	-マ3		1±			-0					(=	千円)
<u>年</u> 度 小科目	 平成 2 支出額	25 年	度	- - -	- ₹ 3		積	 算	内	訳	<u>+</u>	+>			(7	f円)
 年 度 小科目	· 平成 2 支出額	25 年 上 主	<u>度</u> な	 使 途	- 73	金	<u>積</u> 額	算	内	訳	È	な	内	容	(1	<u> 千円)</u>
年 度 小 八	平成 2 支出額 教	25 年 25 年 主 百	度な	テ- 使 途 研	ーマ3 <u>*</u> 究	金	<u>積</u> 額 経	算 費	内支	訳	È.	な	内	容	F)	F円)
年 度 小 科 川 耗 消 耗	平成 2 支出額 教 7,819	25 年 <u>主</u> 了 実験用	度 な 試薬	テ- 使 途 研 ・器具	ーマ3 <u>*</u> 究	金	<u>積</u> 額 経 7,819	算 費	内 支	訳	主 出	な 	内	容	 F)	千円)
年 度 小 科 消耗品費 光熱水費	平成 2 支出額 3 7,819	25 年 主 育 実験用	度 な 試薬	テ- 使 途 研 	ーマ3 究	金	<u>積</u> 額 経 7,819	算 費	内支	訳	主 出	<u>な</u>	内	容	F)	千円)
年 度 小 科 消 耗 光 熱 水 費	平成 2 支出額 教 7,819	25 年 主 了 育 【実験用	<u>度</u> な 試薬	<u>テ</u> - 使 途 ・器具	ーマ3 究	金	積 額 経 7,819	算 費	内支	訳	主 出	な 	内	容	F)	F円)
年 度 小 科 川 耗 川 耗 北 熱 北 熱 近 一 通信運搬費 1	平成 2 支出額 教 7,819	25 年 主 了 実験用	<u>度</u> な 試薬	<u>テ</u> - 使 遊 ・器具	ーマ3 究	金	積 額 経 7,819	算 費	内支	<u>訳</u>	主 出	な	内	容	F)	F円)
年 度 小 科 消 耗 品 費 光 熱 水 通信運搬費 印刷製本費 旅費 近	平成 2 支出額 教 7,819 74	25 年 主 育 実験用 学会参	<u>度</u> な 試薬 加旅	<u>テ</u> - 使 道 ・器具 費	ーマ3 究	金 	<u>積</u> 額 経 7,819 74	算 費	内 支	<u>訳</u>	È H	な	内	容	(=	6円)
年 度 小 科 目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬:委託料	平成 2 支出額 教 7,819 74	25 年 主 育 実験用 学会参	<u>度</u> な 試薬加加 加旅	<u>テ</u> - 使 遊 : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	-マ3 究		積 額 <u>経</u> 7,819 74	算 費	内支	訳	主 出	な 	内	容	(=	千円)
年 度 小 科 消 耗 消 耗 消 耗 消 耗 消 耗 消 耗 消 耗 加 費 近 査 取 水 費 近 近 査 報酬・委託料 (諸会費)	平成 2 支出額 約 7,819 74 9	25 年 主 育 開 学会参	度 な 薬 加 加 加	テ- 使 遊 で 番 く 器 具	ーマ3 デ	金	<u>積</u> 額 7,819 74 9	算 費	内支	訳 	主 出	<u>な</u>	内	容	(=	千円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計	平成 2 支出額 約 7,819 74 74 9 7,902	25 年 主 育 実験 学会参	度な薬が加たす	テ- 使研 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	-マ3 究	金	<u>積</u> 額 7,819 74 9	算 費	内 支	訳	主 出	<u>な</u>	内	容	F)	千円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計	平成 2 支出額 約 7,819 7,819 74 74 9 7,902 7	25 年 主 育 学 会参 ル	<u>度</u> な 薬 加加加 加	テ- 使 通 子 器 具 ズ	-マ3 究	金 一	<u>積</u> 額 7,819 74 9 関	算 費 係	内支				内	容	 F)	F円)
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計	平成 2 支出額 教 7,819 74 9 7,902	25 年 主 育 家 学 会参 ル	度 な 薬 加 加 加 の	テ- 使 通 ・ 器具 満 バ	-マ3 究 イ	金 一	<u>積</u> 額 7,819 7,819 7,4 9 関	算 費 低	内 支 支			な 	内	容	F)	<u> </u>
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員)	平成 2 支出額 教 7,819 74 74 9 7,902 ア	25 年 主 育 駅 学 会参 ル	度 な 薬 加 加 加	テ- 使 通 ・ 器具 ズ	-マ3 究 イ	金 	<u>積</u> 額 7,819 7,819 7,819 9 関	算 費 係	内 支 支	訳	主 出		内	容	F)	5円)
年 度 小 科 目 川 耗 品 費 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出	平成 2 支出額 教 7,819 74 9 7,902 7	25 年 主 育 実験用 学会参 ル	<u>度</u> 素 素 素 素 素 素 素 素 素 素 素 素 素	テ- 使 遊 研 王·器具 ズ	-マ3 究 イ	金 	<u>積</u> 額 7,819 74 9 関	算 費 係	内支		主 出		内		F)	6円)
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 約 7,819 74 9 7,902 ア 0	25 年 主 育 実験用 学会参 ル	<u>度</u> 素 薬 派 派 一 加 加 一	テ- 使研 で 器・ 器具 バ	-マ3 究 イ		<u>積</u> 額 7,819 74 9 関	算 費 係	内支				内	容	F)	<u>F円</u>)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 約 7,819 74 74 9 7,902 ア 0 設備	25 年 主 育 東験 学 会 参 ル 関係	度 試 加加 加 支	テ- 使 研 ・器具 ズ (1個	-マ3 究 イ て	金 	<u>積</u> 額 7,819 74 9 関	算 費 低 係	内 支 支	<u>訳</u> <u> </u>	主 出 出 もの)		内	容	F)	<u>F円</u>)
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬·委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 約 7,819 74 74 9 7,902 ア 2 ア 0 設備	25 年 主 育 家 学 会参 び 学	度 試 加 加 支 上	テ- 使 通 ・ 器 具 バ	-マ3 究 イ ノ	金 	<u>積</u> 額 7,819 7,819 74 9 関 関	算 費 係 500万	内支	<u>訳</u> <u></u>	主 出 出		内	容	F)	
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 消 耗 品 費 消 耗 品 費 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 新聞 委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計 教育研究用機器備品 図	平成 2 支出額 約 7,819 74 74 9 7,902 7 7 0 設備 0	25 年 主 育 東 学 会 参 ル 関 係	度 な 薬 加加加 カーシュー 支 一	テ- 使 通 :-器具 : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	-マ3 究 イ 又は1	金 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	<u>積</u> 額 経 7,819 74 9 関	算 費 係 500万	内支	<u>訳</u>	主 出 出		内	容	F)	
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (素務職員) 教育研究経費支出 計 計	平成 2 支出額 約 7,819 7,819 74 74 74 9 7,902 7 0 設備 0 設備	25 年 主 育 駅 学 会 参 ル 関係		テ- 使 通 ・ 器具 、 満 、 、 (1個)	-マ3 究 イ 又は1	金 ト 組の(<u>積</u> 額 7,819 74 9 関 西格が5	算 費 係 500万	内支	訳 	主 出 出		内	容	F)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 約 7,819 74 74 9 7,902 7 7 9 7,902 7 0 設備 0 設備 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	25 年 主 育 駅 学 会 参 ル 関 係	度 な 薬 加加加 フレース	テ- 使 び ・ 器具 バ ゴ (1個 タ	-マ3 究 イ イ	金 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	<u>積</u> 額 7,819 7,819 見 関 西格がE	算 費 係 500万	内支	訳	主 出 出 もの)		内	容	F)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究用機器備品 図書 計	平成 2 支出額 約 7,819 74 74 9 7,902 7 0 設備 0 研	25 年 主 育 駅 学 会 彩 で 男 の 、 男 の 、 、 、 、 、 、 、 主 て う 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	度 な 薬	テ- 使研 ・器具 バ ゴ(1個	-マ3 究 イ イ 又は1	金 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	<u>積</u> 額 7,819 7,819 見 関 関	算 費 係 500万	内支	<u>訳</u> <u></u> <u></u> <u></u> <u></u> <u></u> <u></u> <u></u> <u></u> <u></u> <u></u>	主 出 出 もの)		内		F)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 久件費支出 (諸会費) 計 教育研究経費支出 計 初可究用機器備品 図書 計 リサーチ・アシスタント ポスト・ドクター	平成 2 支出額 約 7,819 74 74 9 7,902 ア 0 設備 0 研	25 年 主 育 開 学 会 参 ル 関 係 二	度 な 薬加 加 支 ス	テ- 使研 ・器具 ズ (1個	-マ3 究 イ ノ	金 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	積 額 7,819 7,819 9 関 関	算 費 係 500万	内 支 支 円未湯	(1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	主 出 出 もの)		内		F)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (諸会費) 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計 切一手・アシスタント ポスト・ドクター 研究援推進経費	平成 2 支出額 約 7,819 74 74 9 7,902 7 0 設備 0 日 1 日 1 日	25 年 主 育 開 学会参 ジ 子 会 が り	度 な 薬加 加 支 ス	テ- 使研 ・器具 ズ (1個 タ	-マ3 究 イ イ	金 	<u>積</u> 額 7,819 74 9 関 関	算 費 係 500万	内 支 可未湯	訳	主 出 出 もの)		内 	容		
															(千円)	
---	--	--	--	---	--	---	---------------------	-----------------------	----------------------------------	-------------	----------	---	-------	----------	--------	
年度	平成 2	16 年月	き テ・	-マ1												
비 된 모	士 山 姑					積	算	内	訳							
小科日	又口谻	主	な使き	<u>£</u>	金	額			-	È	な	内	容	l.		
	教	育	研	究	4	経	費	支	٤	L	H					
消耗品費	7,806	実験用詞	【薬·器具			7,806										
光教水費	·····			·		í		•••••								
通信運搬費	40	シンポポ	スター送	付		30	その作	h抄録	送休	† 等1	0					
印刷製太費	248	シンポ抄	録印刷			215	シンホ	ポス	ッ <u>_</u>	17月1	33	•••••	•••••		•••••	
旅費交诵費	1.296	シンポ招・	い講演者	₹ 旅費	•••••	1.139	その俳	h学会	参加	山旅	書等1	157	•••••		••••••	
報酬・季託料	556	シンポ講	演訓金5	名	•••••	256	その什	」,」 りHP者	「「「」	车30 车30	0		•••••		••••••	
(その他)	31	学会参加	1書			23	その作	加宝験	哭旦	10-	。 ト	- 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1			••••••	
	9977	1 4 2 //	- 22			20			111 27	<u> </u>	- ^	.120				
<u>н</u> і	,,,,, ק	11.	バ	1	k	閱	伛	支		用						
↓卅弗支山	70	ノレ シンポジウ	ノン	ゴ	1.	丙 70	水 Q/21_	-0/1	2日	山	征べ	10夕				
(/0		471 <i>///</i>			70	0/ 31	9/ I	21		<u>ر</u>					
(本の) (本の) (本の) (本の) (本の) (本の) (本の) (本の)																
<u> </u>	70								•••••			•••••				
Π	/0	围反士	`山/₁/田	$\nabla l + 1$	名のな	ロセンド		m±:	±Φ	+)					
	設備			メは	市山の加	山口口がい	1007	口不ど	回り	$_{\rm U}$)					
教育研究用機器偏向	492	美体 與 做 與 SMZ	1270 二眼高級2	空回セット		492										
	40.0															
計	492	-						-								
		光	スタ	ッ	フ	民] []	ĸ	文	ļ	Ц					
リサーチ・アシスタン																
ポスト・ドクター																
研究支援推進経費																
=+	0															
Āl	0															
															(千円)	
 年 度	平成 2	6 年度	き テ·	ーマ2											(千円)	
<u>年度</u> 小科日	 平成 2 支出額	26 年度	<u>ま</u> テ・	- ₹ 2		積	 算	内	訳						(千円)	
 年 度 小科目	平成 2 支出額	26 年月 	を す な使き	ーマ2 <u>余</u>	金	<u>積</u> 額	 算	内	訳	È	な	内	容	<u></u>	(千円)	
 年 度 小科目	│ 平成 2 支 出 額 教	26 年月 _ 主; 育	度 テ・ な 使 遂 研	ーマ2 <u>余</u>	金	<u>積</u> 額 経	算 費	内支	訳	È.	な 出	内	容	ł	(千円)	
年度 小科目 消耗品費	平成 2 支出額 教 7,217	26 年月 	<u>また</u> な使き 研 【薬・器具	ーマ2 <u>余</u> 、		<u>積</u> 額 経	算 費	内支	訳 こ	È L	な 出	内	容	!	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 光熱水費	平成 2 支出額 教 7,217	26 年月 主; 育 実験用記	<u>を</u> テ・ な <u>使</u> 途 研 【薬・器具	ーマ2 <u>き</u> 究	金 ;	<u>積</u> 額 経	算 費	内支	<u>訳</u>	È L	な 出	内	容	<u>.</u>	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費	平成 2 支出額 教 7,217 35	26 年月 <u>主</u> ; 育 実験用詞 マウス搬	<u>またす</u> たた で で で で で の で 来・ 器具 に 送	ーマ2 <u>余</u>		<u>積</u> 額 経 35	算 	内支	<u>訳</u> 2	È L	な 出	内	容	Į	(千円)	
日 年 度 小 科 消 耗 消 耗 光 熱 通信運搬費 印刷製本費	平成 2 支出額 教 7,217 35	26 年 <u>月</u> 主; 育 実験用詞 マウス搬	<u>き</u> テ・ な使途 研 【薬・器具 送	ーマ2 <u>ま</u> 究	<u></u>	<u>積</u> 額 経 35	算 費	内支		È L	な 出	内	容		(千円)	
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費	平成 2 支出額 教 7,217 35	26 年 <u>月</u> 主; 育 実験用記 マウス搬	<u>またす</u> な <u>使</u> 途 研 【薬・器具 送	ーマ2 <u>余</u> 究	<u></u>	<u>積</u> 額 経 35	算 	内支		È L	な 出	内	容	!	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬·委託料	平成 2 支出額 教 7,217 35 890	26 年月 主; 育 実験用証 マウス搬 マウス解	<u>ま す で び 研 【薬・器具 氏</u>	ーマ2 <u>余</u> 究	<u></u>	積 額 経 35 890	算 費	内 支	<u>訳</u>	È H		内	容	Į	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()	平成 2 支出額 教 7,217 35 890	26 年月 主; 育 実験用記 マウス搬 マウス解	<u>ま</u> テ・ な <u>使</u> 途 研 【薬・器具 送	ーマ2 <u>ま</u> 究	<u></u>	<u>積</u> 額 経 35 890	算 費	支		È L		内	容	L	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()	平成 2 支出額 教 7,217 35 890 8,142	26 年月 主 ; 育 実験用記 マウス搬 マウス解	度 テ・ な 使 ^逆 研 、 菜・ 器 具 析	ーマ2 途 究	<u></u>	<u>積</u> 額 経 35 890	算 費	内 支		È L		内	容	E	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 洗熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 2 支出額 教 7,217 35 890 890 8,142 7	26 年月 主 ; 育 実験用記 マウス解 レ	度 安 安 安 で で な 使 逆 研 式 業 ・ 器 具 バ	ーマ2 金 究	金 ; 下	<u>積</u> 額 経 35 890	 費 	内 支 支				内	容	Į	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 2 支出額 教 7,217 35 890 8,142	26 年月 主 ; 育 実験用詞 マウス解 レ	度 安 安 安 一 で - な 使 逆 研 - 、 器 具 - - - - - - - - - - - - -	ーマ2 金 究 イ		積 額 35 890 関	算 費 係	内 支 支		主 出		内	容	l	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 2 支出額 教 7,217 35 890 8,142 ア	26 年月 主 ; 育 実験用詞 マウス解 レ	度 安 安 安 一 で - - - - - - - - - - - - -	ーマ2 <u>発</u> イ		積 額 35 890 関	算 費 低	内 支 支		主 出		内	容		(千円)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出	平成 2 支出額 教 7,217 35 890 8,142 7 7	26 年月 主 ; 育 実験用記 マウス解 ル	度 安 一 交 使 逆 研 、 器 具 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	ーマ2 <u>発</u> パ		積 額 35 890 関	算 費 係	内 支 支				内	容	2	(千円)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 教 7,217 35 890 8,142 7 0	26 年月 主; 育 実験用記 マウス搬 マウス解	<u>ま</u> テ・ な <u>使</u> 途 研 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	ーマ2 売 究		<u>積</u> 額 経 35 890 関	算 費 係	内 支 支		主 出		内	容		(千円)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 消耗品費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 教 7,217 35 890 8,142 ア 8,142 ア 8,142 ア 0 設備 0	26 年月 主; 育 東 マウス 解 マウス 解 ル 関 係 支	度 安 一 交 使 逆 研 、 部 、 部 、 部 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	ーマ2 余 究 イ イ 又は1	金 ; , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	<u>積</u> 額 経 35 890 関	算 費 係 係	内 支 支 一		主 上 出		内	容		(千円)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 洗熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 約 7,217 35 890 890 8,142 ア 0 設備	26 年月 主; 育 東 マウス 解 マウス 解 リ レ	度 安 で で で で で で で で で で で で で	ーマ2 途 究 イ イ 又は1	金 ; 	<u>積</u> 額 経 35 890 関	算 費 係 600万	支		主 出 出		内	容		(千円)	
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究用機器備品 図 書	平成 2 支出額 約 7,217 35 890 890 8,142 ア 0 設備	26 年月 主 主 京 実験 アウス解 ル 関 係 支	度 安 一 交 使 逆 研 、 二 二 二 (1 個	ーマ2 発 究 イ スは1	金 ; 	積 額 経 35 890 関	算 費 係 500万	内 支 支 円未	<u>訳</u> え 満の ²	主 出 出		内	容		(千円)	
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究組機器備品 図書	平成 2 支出額 約 7,217 35 890 8,142 ア 0 設備 0 設備 0	C6 年月 主 ; 育 実験用記 マウス解 ル 関係支	度 安 一 交 使 逆 研 、 器 具 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	ーマ2 発 究 イ 又は1	金 ; 	積 額 35 890 関	算 費 係 500万	内 支 丁 丁 天		主 出 出		内	 容			
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究組費支出 計 教育研究用機器備品 図書 計	平成 2 支出額 約 7,217 35 890 890 8,142 ア 0 設備 0 設備	26 年月 主; ? 育 ? 京 ? マウス解	度 安 安 で で で で で で で で で で で で で	ーマ2 <u>ま</u> 究 イ 又は1	金 ・ ・ 組の们	積 額 35 35 890 関	算 費 係 500万	内 支 可 天		主 出 出		内	容			
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究組費 計 教育研究用機器備品 図書 計	平成 2 支出額 約 7,217 35 890 8,142 ア 0 設備 0 0 研	26 年月 主 ? 育 ? 京朝用記 ? マウス解	度 安 安 で で で で で で で で で で で で で	マ2 <u>第</u> 究 イ イ 又は1	金 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	積 額 35 35 890 関 既格がほ	算 費 低 500万	内 支 丁 丁 天		主 出 出		内				
中 年 度 小 科 消 耗 消 耗 二 煮 水 費 通信運搬費 印刷製本費 前 一 報酬・委託料 (() 計 人件費支出 (() 計 教育研究用機器備品 図 計 リサーチ・アシスタン	平成 2 支出額 約 7,217 35 890 8,142 7 7 0 設備 0 研	26 年月 主; 育 東朝用記 マウス解 川 夏(係支) 究;	度 安 で な 使 逆 研 ボ 二 出 (1個 ス タ	ーマ2 <u>ま</u> 究 イ イ 又は1	金 デ ・ ・ 組の値	<u>積</u> 額 35 890 関 転格がで	算 費 係 500万	内 支	<u>訳</u> 素 あの 支	主 上 出		内			(千円)	
中 年 度 小 科 消 耗 消 耗 二 二 消 耗 品 費 通信運搬費 印刷製本費 近 小 項信運搬費 印刷製本費 近 小 報酬・委託料 (() 計 人件費支出 (() 計 教育研究用機器備品 図 計 リサーチ・アシスタン ボウッキ	平成 2 支出額 約 7,217 35 890 8,142 7 7 0 設備 0 研	26 年月 主; 育 東 マウス 解 マウス 解 リ ル 関 係 支	度 安 で で で で で で で で で で で で で	マ2 発 究 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	金 デ ・ ・ 組の値	<u>積</u> 額 35 890 関	算 費 係 500万	内 支 一 支	<u>訳</u> 支			内				
中 年 度 小 科 消 耗 消 耗 消 耗 通信 搬費 通信 一 報酬・委託料 (() 計 人件費 支出 計 教育研究用機器備品 図 計 リサーチ・アシスタン ポスト・ドクター 研究支援推進経費	平成 2 支出額 約 7,217 35 890 890 8,142 7 0 設備 0 研 0 0	26 年月 主; 育 東新 マウス 解 マウス 解 リ 、 マウス 解 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	度 安 で で で で で で で で で で で で で	-マ2 余 究 イ フ 又は1 ・ ・ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	金 デ ・ ・ 組の値	<u>積</u> 額 35 890 関	算 費 係 500万	内 支	<u>訳</u> 支			内			(千円)	

																	(十円)
年	度	平成	26	3 年	度	テ											· · · · · ·
الحقيل	_	+ 11 63	z.						積	算	内	訳					
小科	Ħ	文出發		È	な	使	途	金	額			-	È	な	内	容	
		教		音		研	究		経	書	Ţ	7		1			
消耗品	日書	7.7	93	実験用	試道	5 罢	1		7 793			•					
<u>光</u> 教水	<u>- 克</u> k	.,,,		/////	1-1-7	< нн /	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	.	•••••		•••••			••••••	
通信運輸	、 <u>,</u> 。 船費			•••••						 	•••••		•••••			•••••	
印刷制力	₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩₩	4	29	論文印		§			429	 	•••••		•••••			•••••	
旅費交通	<u></u> 甬春		32	学会参	加旅	、 夜春			32	 	•••••		•••••			•••••	
	手約	2	48	, 二 ~ 雷 子 顕	微鏡	韵観察	3		178	そのも	⊎論文	·掲載	洲	莁⊅	校正	70	
	<u>ロレイコ</u> 歩)	-	13	之,贞	加君		·		13			.101+2		~~			
	R/	8.5	15	. 42		د			10								
н I		0,0	7	Л		バ	1	k	閱	伛	支		щ				
しかます	±ш		Ť	10		/ \			[7]		<u> </u>		ш				
(本 政 碑	× 出																
(水坊戦)	(貝) (弗士山																
致自切九柱	:貝又山	••••••	0							.			•••••				
Ā l		 =几	一借	問反	± ц	H (1 / E		1 組の/	亜攻がの		·m±:	生のF	ŧω)			
	% BB /# D	起	1/用		Хü	Li (I][비오니	「祖のブ	凹俗がく		口不	両りフー	507)			
<u> 秋百饼</u> 5 円 傍	成 奋 俪 品 士							<u> </u>		 							
브	吉		0														
ĒΤ		7Π	U	rin.	-	-			. 86	- /	7.	+		11			
		竔		笂	~	2	<u>ب</u>	/ /] 1	杀	文	Ē	ц Ц			
<u>リサーチ・アシ</u>	ノスタント																
	79-																
研究支援推:	進経費		_														
āT			U														
																	(1 m)
左	н н	고려	07	7 左	Ē	_		1									(千円)
年	度	平成	27	7 年	度	7			1+		-						(千円)
年 小科	度目	平成 支 出 額	27	7 年 _主	度	 			積	算	内	訳	÷	+>		5	(千円)
年 小科	度	平成 支 出 額	27 1	7 年 主	達 て な	テ	-ーマ1 途	金	<u>積</u> 額	算 	内	訳	È	な	内	容	(千円)
年 小科	度目	平成 支出 額 教	27 1	7 年 主 育	度な	テ 使 。 研	・ 一マ1 途 究	金	<u>積</u> 額 経	算 費	内支	訳	È H	な	内	容	(千円)
年 小科 <u>消耗</u> 品	度目	平成 支出 額 11,1	27 1 97	7 年 主 育 実験用	達 な 試薬	テ 使 研 軽・器	・ーマ1 途 乳	金	<u>積</u> 額 経 11,197	算 算 費	内支	訳 三	主 上	な は	内	容	(千円)
年 小科 消耗品 光熱.7	度 目 書 費	平成 支出 額 11,11	27 1 97 5	7 年 主 育 実験用	度な、菜	テ 使 研 軽・器	・ーマ1 途 究	金	積 額 経 11,197	算 費	内支	訳 	È H	な は	内	容	(千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通信運	度 目 品費 K費	平成 支出 額 11,1	27 5 97 36	7 年 主 育 実験用 シンポ	<u>度</u> な 試ポス	テ 使 研 ター追 ター追	・ 一マ1 途 究 見	金	積 額 経 11,197 36	算 費	内支	訳 [[È H	な は	内	容	(千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通信運搬	度 目 費 費 費	平成 支出 額 111,11	27 97 36 76	7 年 主 育 家験 ジンポポ	度 な 菜 ス 録	テ 使 研 タージ タージ	·一マ1 途 究 見		積 額 経 11,197 36 176	算 費	内支		主 上	な は	内	容	(千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通信運搬 印刷製 4	度 目 費 費 費	平成 支出 額 11,11 1 77	27 97 36 36 35 35	7 年 主 育 実験 ジンポポ ジンポポ	度な、薬、ス録しい	テ 使研 い 器 の の 調 演	マ1 途 究 見 (村)	金	積 額 経 11,197 36 176 735	算	内支		È H		内	容	(千円)
年 小科 消耗品 光熱小 通信運製 旅費交通 報酬·委	度 目 査費 費 費 託 業	平成 支出 翱 11,11 1 7 3,11	27 97 36 35 68	7 年 主 育 実験用 ジンポ ジンポ なTOF LC	度 な 菜 ス 録 て MS	テ 使研器 シロ 減システ	マ1 途 究 し 私 伝 で の た の で り の の の の の の の の の の の の の の の の の		積 額 11,197 36 176 735 2,541	算 費 そのf	内 支 也、シン	訳 [こ ンポ諸	主	な は 謝金	<u>内</u>	容	(千円) (千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱 加 通信運 報 酬·委 。	度 目 者費 費費 計)	平成 支出 翻 11,11 1 7 3,11	27 97 36 376 35 35 35 35 10	7 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ ジンポ 乳 マTOF L	度 な 菜 ス録し C/MS	テ 使研 と の の 講 ジステ	・ 一マ1 途 究 見 者 旅費 子	金	積 額 経 11,197 36 176 735 2,541	算 費 そのf	内 支 也、シン	訳 三 ンポ諸	主出	な は 謝金	内 、 、 シン	容	(千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通信運搬 印刷製 旅費交通 報酬·委 (計	度 目 費費 費 計)	平成 支出 翻 11,11 1 7 3,11 15,3	27 97 36 35 568 68 68 12	7 年 主 育 実験用 ジンポ ジンポ 邦 QTOF LC	度 な 菜 ス録へ L S C/MS	テ 使研器 タロ 調ジステ	· ーマ1 途 究 代 者 広保守		積 額 紅11,197 36 176 735 2,541	算 費 そのf	内 支 也、シン		主出	<u>な</u> 」 朝金	内 、シン	容 ポ撮景	(千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱 近信運搬 印刷製ス 旅費交通 報酬・委	度 目 費 費 費 費 料)	平成 支出 翻 <u>教</u> 11,11 1 7 3,11 15,3	27 97 36 36 35 35 68 0 12 70	7 年 主 育 東 シンンポ 和 い か い し い の で し し の の し し の し し し の し の し の し の し の し の し し し し し し し し し し し し し	度 な 菜 ス 録 し い MS	テ 使研器 多印講シ ジ バ	· ーマ1 途 究 者 広保守 イン	金 	<u>積</u> 額 11,197 36 176 735 2,541 関	算 費 そのf	内 支 () () () () () () () () () () () () ()				内 、シン	容 ポ 撮 影	(千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通信運製 和酬・委 (計	度 目 費 費 費 費 出) 出	平成 支出 翻 11,11 1 7 3,11 15,3	27 97 36 35 35 35 35 35 76 35 76 35 77 37 70	7 年 主 育 実 シンポ 和 ポ ポ ポ ポ ポ ポ ポ ポ ポ ポ ジ シンポ シン ル ジ シンポ	度 な 菜 ス録へし SC/MS	テ 使研 を ・ 器 ジ の の 講 ジ ステ バ チ ア	· ーマ1 途 究 者 ば な 保 守 イ イ イ	金 	積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70	算 費 そのf 8/31	内 支 也、シン 支 -9/1		主出調	<u>な</u> 」 第金	内 、シン 10名	容	(千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通信運製 派費 報酬・委 (1 人件費職 (度 目 費 費 費 費 世 出)	平成 支出 翻 <u>教</u> 111,11 1 7 3,11 15,3	27 97 36 76 35 68 68 70 70	7 年 主 育 実 シンポ ポ 沢 ポ ジ シンポ ジ シンポ ジ シンポ ジ シンポ ジ シンポ ジ シンポ ジ シンポ ジ シンポ ジ シンポ ジ シンポ	度 友 菜 ス録し の が 名 の の 、 、	テ 使研 器 ジ の 講 ス ア バ 生 ア	マ1 途 究 【 【 【 】 【 】 【 】 】 】 】 】 】 】 】 】 】 】 】	金 ····································	積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70	算 費 そのf 8/31	内 支 也、シン -9/1		主出調		内 、シン 10名	容ポ撮影	(千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱 信刷 支 派 報酬・ 金 (計 人件務務経 教育研究	度 目 費 費 費 費 大殿費費 出)	平成 支出 額 11,11 1 7 3,11 15,3	27 97 36 376 355 35 68 68 0 12 70 5 70 5	7 年 主 育 東 ジンポポ ATOF LC ル ジンポジ	度 友 菜 ス 録 へ MS ウ ム 単	テ 使研 い 語 次 の 開 演 テ バ 学 エア	·マ1 途 究 【 【 【 】 (付 】 者 、 公 保守 イ ルバイト	金 	<u>積</u> 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70	算 費 その 係 8/31	内 支 也、シン <u>支</u> -9/1	訳 三 て マ マ マ マ コ	主 出 間 五	<u> な</u> 新 正	内 、シン 10名	容	(千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱 通 刷製交 近 報酬・委 (計 人件務職経 教育研究経 計	度 目 費費 費費 支員費 出)	平成 支出 翻 数 11,1 1 7 3,1 15,3	27 97 36 36 35 35 35 35 35 76 12 70 70	7 年 主 育 験 ポポポ ポ ン ポ ポ ジ ン ン ポ ポ ー に ー に ー に ー の ー に ー の ー に ー の ー の ー の	度 武 ポ 妙 招 に / MS ウ ー ・ ・	テ 使研器 使研器 少印講システ バ学生ア/	·マ1 途 究 見 者 ム保守 イ ルバイト	金 	積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70	算 費 そのf 8/31	内 支 也、シン <u>支</u> -9/1		主出調		内 、シン 10名	容	(千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通同刷交通 報酬・委 (計 人件務務経 許職 (計	度 目 費費 費費 出) 支員費	平成 支出 都 教 11,11 1 7 3,11 15,3	27 97 336 76 335 68 12 70 備	7 年 主 育 開 ポポポポポ れ ジンンポ い 関 係	度 友 菜 ス録へし S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	テ 使研器・ 使研器・ 一刷演示 バ学生ア 1(1個)	マ1 途 究 代 者 ム 保 守 イ イ バ イト	 ト 1組の(積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70 五格が5	算 費 そのf 係 8/31	内 支 也、シン -9/1 円未;	訳 三 2日 満の ³	主 出 間 び もの		内 、シン 10名	容	(千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通信製丸 転酬・委 (計 人件費3 (兼務商研究経 計 教育研究用機	度 目 費 費 費 費 費 費 費 費 数 二 数 員 費 量 数 量 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費	平成 支出 翻 約 11,11 1 7 3,11 15,3 15,3	27 97 36 37 35 35 35 5 68 (7 7 7 0 備 (()	7 年 主 育 原 ジンンポ い レ ジ シン 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	度 な 潔 ス 録 し の ム い 一 支 ー し し	テ 使研器 使研器 一別演示 バ学 10	マ1 途 究 代 者 ム 保 マ イ イ い パ ト の の の の の の の の の の の の の の の の の の	金 	<u>積</u> 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70 五格が5	算 費 そのf 8/31	内 支 也、シン ラ9/1	訳 三 マ プ 満の ³	主 出 間 び もの		内 、シン 10名	容ポ撮影	(千円) (千円)
年 小科 消耗品 光熱水 通信週製之 報酬・ 素 報酬・ 子 、 計 人件務 務 で 引 教育研究用機 図 、	度 目 費 費 費 費 費 費 出)支 備	平成 支出 都 <u>教</u> 11,11 1 7 3,10 15,3	27 97 36 37 37 37 37 37 37 37 37 37 37 37 37 37	7 年 主 育 東 シシンポ 和 ジンンポ 単 関 係 一 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	度 友 菜 ス録し C/MS ウム 生	テ 使研 ターの シーの シーの シーの レーの シーの シーの	· ーマ1 途 究 行 旅保守 イイト 国又は	金 	<u>積</u> 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70 西格が5	算 費 そのf 8/31	内 支 し、シン ラク/1	訳 三 ンポ 諸 の ¹	主 出 満 乱 乱 し	<u>な</u> 謝金)	内 、シン 10名	容 ポ撮影	(千円) (千円)
年 小 科 消 耗 消 耗 光 熱信 印 小 小 通信 秋 信 報酬・ ・ (計 人件務 予 人株務 予 人 兼 次 ・ 大 日 大 年 小 ・ 人 年 人 年 小 ・ 人 年 小 ・ 人 年 小 ・ 人 ・ 人 ・ 小 ・ 人 ・ 人 ・ 人 ・ 小 ・ 人 ・ 利 ・ 利 ・ 利 ・ 日 ・ 小 ・ 日 ・ ・	度 目 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費	平成 支出 翻 <u>教</u> 111,11 7 3,11 15,3	27 97 36 376 335 68 0	7 年 主 育 東 シンポポ ATOF L レ レ ン ン ボ ボ ボ ボ ボ ボ ボ ボ ボ ボ ボ ボ ボ	度 武 ポ が 招 C/MS ウ ム ・ 、 支 ・ ・ 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テ 使研 多 の 説 ジ バ ア し (1 個	· ーマ1 途 究 代 者 公 保 イ イ イ イ ト レ バ イト	金 	積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70 西格が5	算 費 その 係 8/31	内 支 他、シン -9/1 円未ジ	訳 <u> </u>	主 出 満 出 間 の		内 、シン 10名	容	(千円) (千円)
年 小 科 消 耗 消 耗 第 売 水 通 小 通 第 売 水 通 小 通 次 通 日 小 近 1 秋 二 (計 人 未 人 未 教育 研 数 百 研 四 計 日	度 目 費費 費費 出) 支備 備品 出) 出	平成 支出 翻 <u>教</u> 11,11 1 7 3,11 15,3 15,3 ひ 設	27 97 36 376 355 68 12 ア 70 備 0	7 车 主 育 用 ポポポポ ル ジ シンポ 男 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	度 友 菜 ス 録 し S S M S	テ 使研器 使研器 ジロ講家テ バ学生ア/ 1(1価)	·マ1 途 究 代 古 ム 保守 イ ルバイト 国 又は	 1組の1	積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70 西格が5	算 費 その 係 8/31 500万	内 支 也、シン <u>支</u> -9/1	訳	主 出 満 し し し		内 、シン 10名	容	(千円)
年 小 科 消 耗 品 光 信刷 取費 (計 人件務院名 人兼務究 計 教育研究用 図 リサーチ・アシ	度 目 費 費 費 費 費 費 費 数 費 費 数 費 数 書 レスタント	平成 支出 翻 教 11,11 1 7 3,11 15,3 15,3 ひ 設	27 97 36 76 35 68 12 ア 70 第 70 第 0	7 车 主 育 開 ポポポポ ルジ ジ ジ ジ ジ ジ ジ ジ ジ ジ ジ ジ ジ ジ	度 ま ポ 妙 招 C/MS ウ ・ 支 ー ス 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テ 使研器 ジンフ ジンフ ビ (1個 タ	マ1 途 究 見 者 仏保守 イ ルバイト 国又は	金 	積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70 西格が5	算 費 その作 8/31 500万	内 支 也、シン <u>支</u> 一9/1 円未;	訳 <u> </u>	主 出 満 し もの こ		内 、シン 10名	容	(千円) (千円)
年 小 科 消 耗 品 光 熱信 小 通 託 一 光 熱信 一 秋 信 小 通 大 株 一 人件務 教育研究 小 りサーチ・アシ ポスト・ドク	度 目 費 費 費 費 費 費 費 費 数 書 スター ント フター	平成 支出 都 教 111,11 1 7 3,11 15,3 15,3 2 2 3 15,3	27 97 36 76 35 68 70 第 70 備 0	7 年 主 育 開 ポポポポポ ルジ ツン 関 究	度 友 菜 ス録へし S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	テ 使研器 シーロ 使研器 シーロ バタロ 1000000000000000000000000000000000000	マ1 途 究 代 ポーマ1 加レバイト 国 マ 1	金 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70 西格がで	算 費 そのf 係 8/31	内 支 し、シン ラ/1 円未	訳 三 2日 支	主 出 満 間 ひ 上		内 、シン 10名	容 ポ撮影	(千円) <u> 、HP維持費</u>
年 小科 消耗品 光熱運線 通刷教交通 報酬・委 (計 人件務究計 教育研究用機 図 計 リサーチ・アシ 研究支援推	度 目 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費 費	平成 支出 翻 教 111,11 7, 3,11 15,3 15,3 設	27 97 36 76 355 68 70 備 0	7 年 主 育 開 ポポポポ ル ジ 、 関 、 究	度 な 菜 ス 録 へ MS ウ ム ・ ・ ・ 支 ・ 、 ス - - - - - - - - - - - - -	テ 使研器・ 使研器・ 一刷演示 バ学 10 10 10	· - マ1 途 究 代 本 イ ルバイト 国 又 は	金 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	積 額 11,197 36 176 735 2,541 関 70 西格が5	算 費 そのf 係 8/31	内 支 し、シン ラ9/1 円未 系	訳 三 2日 支	主 出 満 調 し し		内 、シン 10名	容	(千円) (千円)

																(十円)
年	度	平成 2	27	Ŧ度	テ	- マ2										
الح ال	-	+ 11 #						積	算	内	訳					
小科	Ħ	文出額	È	こな	使i	<u>余</u>	金	額				È	な	内	容	
		教	育		研	_ 究		経	費	支	Z	Ŀ	£			
当耗,	品費	15,799	実験月	目試す	を 器 目	1		15,799			-					
<u></u>	水費	,	2012/07	1 1- 121	<u>с нн 7</u>	`				•••••		•••••				
通信運	小			•••••						•••••		•••••				
印刷製	// <u>///</u> 本書			•••••						•••••		•••••				
旅費交	<u>下路</u> 涌費	49	学会参	\$加扰	裙			49		•••••		•••••			•••••	
	訴約	934	セルソ	ノ <u>ー</u> タ・		2		934		•••••		•••••			•••••	
(諸全費・	。 修繕費)		ピペッ	ト洗き	争機修	理		86	その俳	り. 学:	会参	加書	卦 10			
	岁心 只 /	16 878		1 // 0/	1 1212	-					<u> </u>	771	2.10			
HI		ਾ 7	י ער 1	,	バ	イ	F	塱	係	Ŧ		出				
人仕書	女出	·	1			•						щ				
	2日(11)									•••••		•••••				
教育研究総	₩頁/ 圣書支出								 	•••••		•••••				
		0										•••••				
н і		。	計関 係	년	出(1佰		1 組の(西格が!	500万	田未	茜の	‡ .の)			
教育研究田	機哭備只			\sim			Г Л <u>Ш</u> ФУ Г			1 12/2/	[H] V 7	000	/			
	書									•••••		•••••				
計		0														
н		研	空	ス	4	*		7 陞	6	<u>s</u>	Ŧ	ļ	HI.			
リサーチ・ア・	シスタント	1		~~					, I	N						
<u></u>	<u> ノハノン </u> クター											•••••				
研究支援地												•••••				
		0														
E E		_														
																(千円)
年	度	平成 2	27	王度	テ	- マ3										(千円)
年	度	平成 2	 27	王度	テ	- マ3		積	 算	内	訳					(千円)
年 小 科	度目	平成 2 支 出 額	27	<u>手度</u> E な	テ 使 i	ーマ3 _余	金	 積 額	 算	内	訳	<u>ً</u>	な	内	容	(千円)
年 小科	度	平成 2 支 出 額 教	27	<u>手度</u> E な	テ 使 证 研	ーマ3 <u>余</u> 究	金	<u>積</u> 額 経	算 費	内支	訳	È.	な 出	内	容	(千円)
年 小科 消耗,	度 目	平成 2 支出額 教 6,239	27 4 主 実験用	手度 こな 月試薬	テ 使 i 研 を・器員	ーマ3 金 究	金	<u>積</u> 額 経 6,239	算 費	内支	訳	È.	な 出	内	容	(千円)
年 小科 <u>消耗</u> 光熱;	度 目 品費 水	平成 2 支出額 教 6,239	27 名 育 実験用	<u>手度</u> こな 月試薬	テ 使 可 薬・器	ーマ3 <u>余</u> 乳	金	積 額 経 6,239	算 費	内支	訳	<u>غ</u>	<u>な</u> 出	内	容	(千円)
年 小科 消耗	度 目 品費 搬費	平成 2 支出額 6,239	27 名 	手度 こ な 月試薬	テ 使 び 破・器	ーマ3 金 究	金	<u>積</u> 額 経 6,239	算 	内支	訳	È L	な 出	内	容	(千円)
年 小科 <u>消耗</u> 光熱 通信運 印刷製	度 目 品費 水費 本費	平成 2 支出額 教 6,239	27	<u>手度</u> こな 月試薬	テ 使 可 研 軽・器具	ーマ3 <u>余</u> 究	金	<u>積</u> 額 経 6,239	算 費	内支	訳	± ا	な 出	内	容	(千円)
年 小 科 消 耗 一 一 光 熱 二 一 一 二 一 八 科 二 八 八 科 二 八 八 月 一 一 八 月 二 一 八 月 二 一 八 月 二 一 八 月 二 月 二 一 八 月 二 月 二 一 八 月 二 月 二 一 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二	度 目 <u>君</u> 費 過費	平成 2 支出額 教 6,239	27 <u>4</u> 主 育 実験月	<u>手度</u> こな 月試薬	テ 使 可 研 軽・器具	ーマ3 <u>余</u> 、 、		<u>積</u> 額 6,239	 算 	内支		<u>غ</u>	<u>な</u> 出	内	容	(千円)
年 小 科 消 耗 通 印 費 報 翻·委 報酬·委	度 日 日 費 品 費 過 計	平成 2 支出額 6,239	27 全 主 育 実験月 英文材	王度 111 文閲	テ 使 i 研 v *・器具	ーマ3 金 究	金	<u>積</u> 額 6,239 	算 費	内支		<u>غ</u>	<u>な</u> 出	内	容	(千円)
年 小科 消耗 光通同副費 報酬·委 (度 品 搬本通 日 費費 品 費費 二 1	平成 2 支出額 6,239	27 <u>4</u> 主 育 実験月 英文校	<u> 手度</u> な 目試薬	テ 使 研 軽・器手	ーマ3 金 究	金	<u>積</u> 額 6,239 101	 費	支			<u>な</u> 出	内	容	(千円)
年 小 科 消 耗 、 通 刷 費 ・ 委 (計	度 目 <u>費</u> 費 費 費 業 】)	平成 2 支出額 6,239 101 6,340	27 4 	手度 な 月 試 薬 閲	テ 使 研 研 い 歌 い 器 見	ーマ3 金 究		積 額 6,239 101	算 費	支			<u>な</u> 出	内	容	(千円)
年 小 科 消 税 一 税 一 税 一 代 代 代 代 代 代 代	度 目 <u>費</u> 費 調 業 費 費 二)	平成 2 支出額 6,239 101 6,340 ア	27 主 育 実験月 英文材	<u> 東度</u> な 引 試 薬 の 成 の の の の の の の の の の の の の の の の の	テ 使 i 研 v · お り	ーマ3 金 究 て		<u>積</u> 額 6,239 101	算 費 係	内 支 支				内	容	(千円)
年 小 科 消 光 通 印 旅 酬 ・ 委 (度 日 費 日 費費 費 」 」 」	平成 2 支出額 6,239 101 6,340 ア	27 全 主 音 実験月 英文校	<u> 東度</u> な 東 武 東 、 、	テ 使 研 惑・器 厚 バ	ーマ3 <u>余</u> 究 イ	金 	<u>積</u> 額 6,239 101 関	算 費 係	内 支 支				内	容	(千円)
年 小 科 消 耗 一 二 八 八 料 一 二 八 八 料 一 二 八 八 料 二 八 八 料 二 八 八 料 二 八 八 料 二 八 八 月 二 八 八 月 二 八 八 月 二 八 八 月 二 八 八 八 八	度 日 費費 日 費費 費費 出) 出	平成 2 支出額 6,239 101 6,340 ア	27 全 主 育 実験月 	<u>手度</u> な 調整 支 支 、 、	テ 使 研 速・器具	ーマ3 金 究 イ		<u>積</u> 額 6,239 101 関	算 費 低 係	内 支 支				内	容	(千円)
年 小 消 耗 消 耗 日 前 最后 前 報酬・委 (人 人 教育研究紙 (度 日 査費 日 費費 費費 支員費 上	平成 2 支出額 6,239 101 6,340 ア	27 全 主 育 実験月 一 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	<u> 王</u> 度 支 調 、 、	テ 使 研 軽・器具	ーマ3 金 究 て	金 	<u>積</u> 額 6,239 101 関	算 費 係	内 支 支				内	容	(千円)
年 小 科 消 耗 熱 信 刷 費 酬 · 委 () () () () () () () () () (度 日 費費 日 費費 出) 支貨 上 上	平成 2 支出額 教 6,239 101 6,340 ア 0	27 主 育 実験月 英文材	<u> 東</u> 重 れ 載 の で 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テ 使 研 マ ・ 器 リ バ	マ3 金 究 て	金 	<u>積</u> 額 6,239 101 関	算 費 低 係	内 支 支				内	容	(千円)
年 小 消 耗 消 耗 印 和 第 第 日 小 和 1 第 1 小 1 月 1 第 1 小 1 第 1 1 1	度 日 日 費費 日 費費 出) 支	平成 2 支出額 教 6,239 	27 主 育 実験月 英文材 川 単 二 二 二 二 二 二 一 一 二 二 一 一 二 二 一 一 一 二 二 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一	<u> 東</u> 三 市 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テ 使 可 変・器 川 七 (1個	マ3 金 究 イ イ	<u>金</u> 	<u>積</u> 額 6,239 101 関	算 費 低 係	内 支 支 円未		<u>主</u> 出 もの		内	容	(千円)
年 小 科 川 税 利 川 税 利 川 税 日 日 税 日 日 税 日 日 税 日 日 秋 日 日 人 秋 (日 日	度 日 費費 日 費費 一 支員費 出) 二	平成 2 支出額 教 6,239 101 6,340 ア 0 設備	27 主 育 実験月 英文材 加 単	<u> 王</u> 武 文 支 上	<u>テ</u> 使研 感·器県 バ 出(1個	ーマ3 金 究 イ イ	金 	<u>積</u> 額 6,239 101 関	算 費 低 係	内 支 	訳	<u>主</u> 上 出	<u>な</u> 出	内	容	(千円)
年 小 科 川 耗 第 川 耗 第 日 旅報 1 人 兼研究計 教育研究 教育 日 1	度 品水搬本通託 支減 支 費費費 費費 費費 出)支 備 備 品 日	平成 2 支出額 約 6,239 101 101 6,340 ア 0 設備	27 主 育 実験月 · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	王 一 東 五 支	テ 使 i 研 を・器 り バ 出(1個	マ3 金 究 て イ	金 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	<u>積</u> 額 6,239 101 関 西格が5	算 費 係 500万	内 支 丁 丁 支	また 読 満 の	主 上 出		内	容	(千円)
年 小 科 川 耗 第 川 光 通印 和 規 第 印 根 1 日 旅 福 小 利 月 大 通 日 (1 日	度 品水搬本通訊 支號 日 費費 出) 黄費 出) 支備	平成 2 支出額 教 6,239 101 6,340 ア 0 設備	27 主 育 実験月 英文材 加 単 二 二 二 二 二 二 一 一 二 二 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一 一	王 一 一 一 支 ブ ブ ブ	テ ・ 使研 ・ び ・ バ ・	ーマ3 金 究 て イ	金 ····································	積 額 6,239 101 関 西格が5	算 費 係 500万	内 支 可 下 支				内	容	(千円)
年 小 川 八 川 光 山 前 東京 日 山 前 東京 日 山 小 小 利 月 九 日 前 小 利 1 九 一 十 小 利 1 十 小 利 1 十 日 十 小 1 日 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 <	度 日 五水搬本通訊 支號子 機 一支號子 機	平成 2 支出額 教 6,239 	27 主 育 実験月 英文材 正 東 東 原 原 原 原 原 原 原 原 原 原 原 原 原		テ 使研 感・器 川 山 (1個 タ	マ3 金 究 イ イ	金 	積 額 6,239 101 関 四格が5	算 費 低 500万	内 支 可未 系	また。 訳 	<u>主</u> 出 もの		内	容	(千円)
年 小 科 川 利 耗 川 光 通印 印 税 前 日 市 秋 日 市 秋 日 小 利 日 小 利 日 日 小 日 日 日 日 日 日 日 日 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日 (1 日	度 日 費 日 費費 費費 出) 支員費 器書 スク スク	平成 2 支出額 教 6,239 	27 主 育 実験月 英文村 山 山 東 東 東 泉 泉 泉 泉 泉 泉 泉 泉 泉 泉 泉 泉 泉		テ 使研 変・器 川 山 (1個 タ	マ3 金 究 イ イ	金 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	積 額 6,239 101 関 工格がS	算 費 係 500万	内 支 一 万 天		主 上 出 もの		内	容	(千円)
年 小 科 川 税 利 川 税 利 川 税 税 日 和 税 日 税 日 日 税 日 日 秋 小 日 秋 日 日 日 日 小 利 利 日 日 日	度 日 費 日 費費 費費 日 費費 当 日 費費 当 日 費費 当 日 1 1 <td>平成 2 支出額 教 6,239 </td> <td>27 主 育 実験月 英 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、</td> <td></td> <td><u>テ</u> 使研 軽・器 川 出(1個</td> <td>マ3 金 究 イ イ</td> <td>金 </td> <td>積 額 6,239 101 関 関</td> <td>算 費 子 () () () () () () () () () () () () ()</td> <td>内 支 支 系</td> <td>また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。</td> <td></td> <td></td> <td>内</td> <td>容</td> <td>(千円)</td>	平成 2 支出額 教 6,239 	27 主 育 実験月 英 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、		<u>テ</u> 使研 軽・器 川 出(1個	マ3 金 究 イ イ	金 	積 額 6,239 101 関 関	算 費 子 () () () () () () () () () () () () ()	内 支 支 系	また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。			内	容	(千円)
年 小 科 小 科 八 消光 通印旅 小 第 一 日 日 市 秋 日 小 秋 日 日 小 小 利 利 月 秋 一 日 日 日 小 八 千 日 日 日	度 日 査費 日 費費 出) 支員費 器書 シント 人名 一 日	平成 2 支出額 教 6,239 	27 主 育 実験 が ル の 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、		<u>テ</u> 使研 軽·器 川 出(1個	マ3 金 究 イ 1又は ⁻	金 	<u>積</u> 額 6,239 101 関 工格がS	算 費 係 500万	内 支 一 支 一	また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。	<u>主</u> 上 出		内	容	(千円)

									(千円)
年 度	平成 2	28 年度	テーマ1						
小利日	士山姑			積	算	内 訳			
小科日	又日祖	主 な	:使途	金額		Ē	E な	内	容
	教	育	研 究	、 経	費	支	出		
消耗品費	7,423	実験用試	薬·器具	7,423					
光熱水費									
通信運搬費	34	シンポポス	ター送付	30	その他	! 委嘱状送	付等4		
印刷製本費	160	シンポ抄録	录印刷	127	シンポ	ポスター印]刷33		
旅費交通費	640	シンポ招聘	書旅費	640					
報酬·委託料	3,100	QTOF LC/M	Sシステム保守	2,541	その他、	シンポ講演謝	金、シンポ	撮影、HP維	挂持費、塩基配列解析
(修繕費)	364	照明付インキ	シュベーター修理	303	Bernstead	I 純水装置 0.2	µ m7才□−7フ	ァイバーフィルター	ねじ込み口破損修理61
計	11,721								
	ア	ル	バイ	ト関	係	支	出		
人件費支出	73	シンポジウム	学生アルバイト	73	8/31-	9/1 2日	哥延べ8	8名	
(兼務職員)									
教育研究経費支出									
計	73								
	設備	関係支	出(1個又は	1組の価格が	500万	円未満のも	5の)		
教育研究用機器備品									
図書				1					
計	0								
	研	究ス	タッ	ノ フ 関	月 係	支	出		
リサーチ・アシスタント									
ポスト・ドクター				1					
研究支援推進経費				1					
計	0								
				-	-				(千円)
年 度	平成 2	28 年度	テーマ2	2					
小利日	士山姑			積	算	内 訳			
小科日	又日祖	主 な	:使途	金額		Ē	E な	内	容
	教	育	研 究	。 経	費	支	出		
消耗品費	10,113	実験用試	葉∙器具	10,113					
光熱水費					I				
通信運搬費					Ι				
印刷製本費					1	••••••			

					I								
印刷製本費													
旅費交通費	103	学会参加	吅旅費			103							
報酬·委託料	2,246	セルソー	-ター保 ⁻	守	1,	663	マウスク	フリーン	化 583				
(諸会費・修繕費)	990	LAS 4000	mini カメラダ	を換修理		932	その他、	MVC-	20PS オ-	ーバーホー	ル修理、	、学会参	駗加費
計	13,452												
	ア	ル	バ	イ	ト関		係	支	出				
人件費支出													
(兼務職員)													
教育研究経費支出													
計	0												
	設備	関係す	と出(1	固又は1	1組の価格	がち	500万円]未満の	りもの)				
教育研究用機器備品	4,282	精神疾患モデル	マウスの行動解	释析装置一式	4,282								
図書													
計	4,282												
	研	究	スク	タッ	ィフ	関	[係	支	出				
リサーチ・アシスタント													
ポスト・ドクター													
研究支援推進経費													
計	0												

																	D /
年度	平成 2	8 年	度	テー	-マ3												
心 원 묘	士山姑						積	算	内	訳							
小 14 日	又山窑	Ŧ	な	使途		金	額				È	な	内	容			
	教	育		研	究		経	費	支		H	L L					
消耗品費	4,072	実験用	試薬	҈∙器具			4,072										
光熱水費																	
通信運搬費																	
印刷製本費																	
旅費交通費																	
報酬·委託料																	
(諸会費)																	
計	4,072			~													
	ア	ル		バ	イ	۲-	関	係	支		出						
人件費支出																	
(兼務職員)														•••••			
教育研究経費支出																	
計	0 =n. /#		+ 11			<u>س</u> م ا			<u></u>	#	1 0	、 、					
	設備	筃 係 :	文 廿	1(1個)	又は1	祖の	曲格から	500万	円未満	あの	もの)					
教育研究用機器備品																	
āΤ	U 711	rin .	7	6			. 86		<i>T</i> .	+		11					
	竔	笂	~	9	ッ		/ 医] 1 ;	Ŕ	文	i	ц					
リサーナ・アンスタント											•••••			•••••			•••••
ホスト・トクター											•••••						
<u> </u>	0																
	0																
																(千	田)
年度	平成 2	9 年	度	テ-	-र1											(千	·円)
年度	平成 2	.9 年	度	テー	-71		積	 	内	訳						(千	·円)
年 度 小科目	平成 2 支出額	9 年 主	度な	 使 途	-71	金	 積 額	 算	内	訳	È	な	内	容		(千	·円)
年 度 小科目	平成 2 支出額 教	9 年 主 育	度な	 使 途 研	-マ1 	金	<u>積</u> 額 経	 算 	内支	訳	È	な	内	容		(千	·円)
年 度 小 科 川 科 1 耗 品 費	平成 2 支出額 教 7,773	39 年 主 育 実験用	度な菜菜	テ- 使途 研 :器具	-マ1 究	金	<u>積</u> 額 経 7,773	算 費	内支	訳	È H	な 1	内	容		(千	·円)
年度 小科目 消耗品費 光熱水費	平成 2 支出額 教 7,773	9 年 主 育 実験用	度な菜菜	テ- 使途 研 E·器具	-マ1 究	金	積 額 経 	算 	内支	訳	È H	な	内	容		(千	·円)
年 度 小科目 <u>消耗品費</u> 光熱水費 通信運搬費	平成 2 支出額 教 7,773 32	9 年 主 実験用 シンポ	度 な 試 業	テ- 使途 研 愛・器具 ター送(-マ1 究 寸	金	<u>積</u> 額 経 7,773 32	算 	内支	訳	È H	な 1	内	容		(千	·円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費	平成 2 支出額 教 7,773 32 113	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ	度 な 菜 ズ 録	テー 使途 研 い ター送 印刷	-マ1 究 寸	金	積 額 経 7,773 32 80	算 費 ジンポ	<u>内</u> 支	<u>訳</u> 三 ターF	主日	な ゴ 33	内	容		(千	·円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89	9 年 主 育 実験用 シンポポ ジンポポ	度 な 薬 ス録聘	テー 使 研 疑 の の の の の の の の の の の で 者 の の の の の の の	-マ1 究 寸	金	<u>積</u> 額 経 7,773 32 80 89	算 費 ジンオ	内 支 ポスタ	<u>訳</u> 三	<u>主</u> 日 印刷	な 日 33	内	容		(千	·円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149	9 年 主 育 実験用 シンポ シンポ シンポ シンポ シンポ オ	度 な 試 ポス 録 聘 ン/MS	テー 使 研 編・器具 ター送(印刷 者旅 チュテム	-マ1 究 寸 保守	金 	<u>積</u> 額 2,773 32 80 89 2,541	算 費 シンポ その他	内 支 ポスク 1、シン	訳 三 ター印 ポ講	主 日 印刷 演調	な 1 33	内 HP維持	容費、		(千	(円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()	平成 2 支出額 7,773 32 113 89 3,149	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ ジンポ QTOF LC	度 な 菜 ス 録 聘 S/MS	テー 使研 (学) を を の の の の で の の の で の の の の で の の の の	-マ1 究 寸 保守	金	積 額 7.773 32 80 89 2,541	算 費 シンオ その他	内 支 ポポスグ 2、シン		主出	な 33 対金、「	内 HP維持	容費、	 	(千	(円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156	9 年 主 育 実験用 シンポ シンポ シンポ	度 な 菜 ス 録 聘 S/MS	テー 使研 編・器 ター刷 ぎ ステム	-マ1 究 寸 、保守	金 	<u>積</u> 額 2,7773 32 80 89 2,541	算 費 シンホ その他	内 支 ポスタ 1、シン		主出	な 33 村金、	内 HP維	容	· 	(千	(円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ ジンポ レ	度 な 薬 ス 録 聘 S	テー 使研 器 ター 刷 旅 子 の 別 者 システム	-マ1 究 寸 (保) イ		<u>積</u> 額 7,773 32 80 89 2,541 関	算 費 シンホ その他	内 支 ポスタ 支 支		主出	な 33 1 1 金、	内 HP維打	容	· 塩基	(千 四列)	<u>円)</u> 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 日	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポポ QTOF LC シンポジ	度 な 菜 ス 録 聘 ン MS	テー 使研 器 9 の の の の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 保守 イ	金 	<u>積</u> 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 シンホ その他 <u>条</u> 2/15-	内 支 ポスタ 1、シン 支 -2/16	<u>訳</u> <u>ター</u> 「 水講	主出和願調	<u>な</u> 33 1金、	内 HP維持	容	· 塩基	(千	(円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員)	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ QTOF LC	度 な 菜 ス 録 聘 S ン MS	テー 使研器・ ター刷 者システム バ デ生アルル	-マ1 究 す 保 イバイト	金 	積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 シンホ その他 2/15-	内 支 ポスク 2、シン 支 -2/16	<u>訳</u> ターF ポ講	主出	な 33 4金、	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 前 和酬・委託料 ()) () 計 人件費支出 (兼務職員)) 教育研究経費支出	平成 2 支出額 <u>教</u> 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ シンポジ シンポジ	度 な 菜 ス 録 聘 ス 分 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研 ター刷 数 マー刷 数 ステム バ キ生アル	-マ1 究 ···································	金 	積 額 7.773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 ジンオ その他 2/15-	内 支 ポポスク 2、シン 支 -2/16	<u>訳</u> <u> </u> 文一F ポ講	主 日 (1) (注) (注) (注) (注) (注) (注) (注) (注) (注) (注	な 1 33 延べ	内 HP維打	容		(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポジ シンポジ	度 な 薬 ス 録 勝 S S S S S S S S S S S S S	テー 使研 少一刷旅 ジンテレ バ デー	-マ1 究 す イバイト	金 下	<u>積</u> 額 2,7773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 シンホ その他 2/15-	内 支 ポスタ シン 支 -2/16		主 出 印 演 出 11 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	な は 33 延べ、	内 HP維打	容	、塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 ((教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 7 54 54 設備	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポジ シンポジ 関係	度 な 菜 ス 録 聘 S S S S S S S S S S S S S	テー 使研 録: ター 別 旅 子 の 別 旅 子 一 の の の の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 す イベイト 又は1	金 ト 組の(<u>積</u> 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 シンホ その他 2/15- 500万	内 支 ポスス 1、シン 支 -2/16	訳 マーF こ 2 日 あの	主 当 前 前 もの	な 33 近 べ)	内 HP維持	容	· 生基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 () 計 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 設備	9 年 主 育 実験用 シンポポ QTOF LC シンポジ リ シンポジ	度 な 菜 ス 録 勝 S M S ム サ ゴ 、 し 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研器 ター刷 た ジステム バ 学生アルル コ(1個)	-マ1 究 す 保 イバー 又は1	金 	積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 シンホ その他 2/15- 500万	内 支 ポスク シン 支 -2/16	訳 ヨ マード ポ 講 の:	主	な 33 4金、)	内 HP維打	容 持費、	· 塩基	(千	円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 () 計 教育研究用機器備品 図 書	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54	9 年 主 育 験用 シンポ ジンポ す QTOF LC シンポジ 係	度 な 薬 ス 録 勝 S 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	テー 使研 学 を を の の の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 -マ1 、 保 イ パイト 又は1	金 ト 祖の(積 額 7.773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 ジンホ その他 2/15- 500万	内 支 ポポスグ 2、シン 支 -2/16	訳 三 マーF 満 の	主 日 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二	な は 333 延べ)	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計) 人件費支出 () (兼務職員)) 教育研究経費支出 計 教育研究用機器備品 図 書 計 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 設備	9 年 主 育 実 シンポポ シンポジ り レ ア 第 の て の た に の 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	度 な 薬 ス 録 勝 S 」 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研器・ タ印者システム バキェアル・ ゴ(1個)	-マ1 究 す (保 イ パイト 又 は1	金 ト 組の(積 額 7,773 32 80 2,541 関 54 54	算 費 シンホ その他 2/15-	内 支 ポポスク シン 支 -2/16		主 日 辺 洞 調 目 間	な 33 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	内 HP維打	容	. 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計) 入件費支出 () 計) 教育研究経費支出 計 教育研究用機器備品 図 割)	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 7 54 54 254 254 254 32 備	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポジ マTOF LC	度 な 菜 ス 録 勝 S 	テー 使研 ター 原 ジ バ デー (1面) タ	-マ1 究 す 保 イ バイト 又 は1 ッ	金 ト 組の(積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 シンホ その他 2/15- 500万	内 支 ポポスタ シン 支 -2/16		主 日 前 調 出 1 間 :	な は 33 び金、「	内 HP維打	容	、塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計) 人件費支出 () 計) 教育研究経費支出 計 約育研究用機器備品 図 書 1) ・)	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 設備 0 研	9 年 主 育 験用 シンポポ マ の FLC シンポジ の の 、	度 な 菜 ス 録 開 S 	テー 使研器 タ印者システム バギ生アルル ゴ(10)	-マ1 究 す (保守 イベイト 又は1	金 ト 組の(積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 ジンホ その他 タ/15- 500万	内 支 ポポスタ シン 支 -2/16 系		主 当 前 間 二 し し し し し し し し し し し し し	な 33 33 延べ)	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 7 54 54 54 54 0 研	9 年 主 育 実験用 シンポポ QTOF LC シンポジ 関係 究	度 な 菜 ス 録 開 S 、 、 、 支 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研 の の の の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 す 子 イ パ イト 又 は1	金 	積 額 7.773 32 80 2,541 関 54 54	算 費 ジンオ その他 2/15- 500万	内 支 ポポスグ 2、シン 支 -2/16		主 日 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二	な 333 補金、) 出	内 HP維打	容	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	(千	円)
年 度 小科日 <u>消耗品費</u> 光熱水費 通信運搬費	平成 2 支出額 <u>教</u> 7,773 32	9 年 主 実験用 シンポ	<u>度</u> な 試薬	テ- 使途 研 愛·器具 ター送(-マ1 究 寸	金	<u>積</u> 額 経 7,773 32	算 	内支	訳	È H	な 1	内	容		(千	·円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費	平成 2 支出額 教 7,773 32 113	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ	度 な 菜 ズ 録	テー 使途 研 い 家・器具 ター送 印刷	-マ1 究	金	積 額 経 7,773 32 80	算 費 シンポ	<u>内</u> 支 ポスタ	<u>訳</u> 	主日	な ゴ 33	内	容		(千	円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ ジンポ	度 な 菜 ス 録 聘	テー 使 研 器 ター刷 者 版 費	-マ1 究 寸	金	<u>積</u> 額 経 7,773 32 80 89	算 費 シンホ	内 支 ポスタ	<u>訳</u> 三 夕—F	<u>主</u> 日 印刷	な ゴ 33	内	容		(千	·円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・季託料	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ ジンポ ジンポ ジンポ	度 な 菜 ス 録 聘 S	テー 使研器 の の の の の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 ・ 、 保守	金	<u>積</u> 額 経 7,773 32 80 89 2,541	算 費 ジンホ その他	内 支 ポスタ 2、シン		主日	な は 33	内 HP維持	容		(千	·円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ ジンポ マ ロOF LC	度 な 菜 ス 録 聘 S	テー 使研 く い の で の の の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 寸 保	金	<u>積</u> 額 2,7,773 32 80 89 2,541	算 費 シンホ その他	内 支 ポスク 2、シン		主 日 (1) (注) (注) (注)	な は 33	内 HP維打	容費、		(千	<u>円)</u> 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149	9 年 主 育 実験用 シンポ シンポ シンポ QTOF LC	度 な 菜 ス 録 聘 SZ/MS	テー 使研 疑・器 見 の刷 族 システム	ーマ1 究 寸 保守	<u></u>	<u>積</u> 額 経 7,773 32 80 89 2,541	算 費 シンホ その他	内 支 ポスタ 1、シン		主出	な 33 村金、「	内 HP維打	容費、	 	(千	<u>円)</u> 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポポ QTOF LC	度 な 薬 ス 録 聘 S	テー 使研器 ター刷旅 ター刷 オンステム	-マ1 究 寸 保守	金 	<u>積</u> 額 7,773 32 80 89 2,541	算 費 シンホ その他	内 支 ポスタ 1、シン		主出	な 日 33	内 HP維持	容	· 	(千	(円) 解析
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ れ QTOF LC	<u>度</u> な 菜 ス 録 聘 ス (MS	テー 使研器 ター送 印刷 まシステム	-マ1 究 す 保守 イ	金 	積 額 7,773 32 80 89 2,541 関	算 費 シンホ その他	内 支 ポスク シン 支		主出和調		内 HP維打	容	· 	(千	円)
年 度 小 科 目 消耗品費 洗熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 (計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ QTOF LC レ シンポジr	度 な 菜 ス 録 聘 の ゴ	テー 使研器・ ター刷 者システム バ キ生アル	-マ1 究 す 保 イバイト	金 下	積 額 7.773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 シンオ その他 2/15-	内 支 ポポスグ 2、シン 支 -2/16	<u>訳</u> <u>9</u> —F	主出	<u>な</u> 33 延べ	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員)	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポポ シンポジ シンポジ	度 な 菜 ス 録 聘 S ン MS	テー 使研器: タ印者システム バギェアル	-マ1 究 す (保守 イペイト		<u>積</u> 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 シンホ その他 <u>係</u> 2/15-	内 支 ポスタ ユ、シン 支 -2/16	訳 	主出洞漏	な 33 延べ	内 HP維打 4名	容	· _ 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポポ シンポジ	度 な 菜 ス 録 聘 S	テー 途 の 使研器・ 夕印者システム が生アル・	-マ1 究 -マ1 - 穴 - 穴 - 穴 - 穴 - 穴 - 穴 - 穴 - 穴 - 穴 - 穴		<u>積</u> 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 ジンホ その他 <u>条</u> 2/15-	内 支 ポスタ シン 支 -2/16	<u>訳</u> 字—F	主 出 洞 演調 出 1 間 1	な 33 延べ	内 HP維封	容	· 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポ ジンポ QTOF LC シンポジ「	度 な 菜 ス 録 聘 ス 5 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5	テー 使研器・ ター刷 者システム バ 学生アル	-マ1 究 す 保 イパイト	金 下	積 額 7.773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 ジンオ その他 2/15-	内 支 ポポスグ 2、シン 支 -2/16	<u>訳</u> <u> </u> <u> </u>	主 日 印刷 演調	な は 333 延べ	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 ((教育研究経費支出 三	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポポ シンポジ シンポジ	度 な 薬 ス 録 聘 S S S S S S S S S S S S S	テー 使研 い の の の の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 す (保守 イ パイト		<u>積</u> 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 シンホ その他 2/15-	内 支 ポスタ 1、シン 支 -2/16	<u>訳</u> マーF スト	主 日 印 源 出 1間	な は 33 延べ	内 HP維打	容	[塩基]	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54	9 年 主 育 実験用 シンポ シンポ QTOF LC	度 な 薬 ス 録 勝 S / MS	テー 使研器 ター が 教 アー が アール	-マ1 究 子 (パイト	金 	積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54	算 費 シンホ その他 2/15-	内 支 ポスク ユ、シン 支 -2/16	訳 三 ターF ポ講	主 出 洞 演 出 1 間 : : : : : : : : : : : : : : : : : :	な 1 33 延べ	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円) 解析
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支出 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54	9 年 主 育 実験用 シンポポ マンポポ シンポジ シンポジ	度 な 薬 ス 録 勝 S MS ウ ム サ ム 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研 く の で 来 の の の の で 、 途 の の の の の で の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 す 子 イ パ イト	金 下 日 田 の	積 額 7,773 32 80 89 2,541 閏 54	算 費 シンホ その他 2/15-	内 支 ポスク シン 支 -2/16			<u>な</u> 33 1金、	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円) 解析
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 設備	9 年 主 育 実験用 シンポポ QTOF LC シンポジ シンポジ	度 な 菜 ス 録 聘 S S S S S S S S S S S S S	テー 使研 疑 の の の の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 す 保 イ パ イト 又 は1	金 ト 組の(積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 シンホ その他 2/15- 500万	内 支 ポスク ユ、シン 支 一2/16	訳 マーF ポ 満 こ 2 目 端の:	主	な 33 対金、	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()) 計) 人件費支出 ()) 計) 教育研究経費支出) 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54	9 年 主 育 実験用 シンポポ QTOF LC シンポジ 関係	度 な 菜 ス 録 聘 S S S S S S S S S S S S S	テー 使研器・ ター刷 茶 ジステム バ 学生アルル は(1個)	-マ1 究 す 保 イイト 又は1	金 ト 組の(積 額 7.773 32 80 89 2.541 関 54 54	算 費 シンホ その他 2/15- 500万	内 支 ポポスグ 2、シン 支 -2/16	訳 ヨード ポ 講 の:	主	な 33 33 延べ)	内 HP維打	容	· 塩基	(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 消 耗 品 費 通信運搬費 印刷製本費 筋費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 ((兼務職員) 計 教育研究相機器備品 図 図 書	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 設備	9 年 主 育 実験 ジンンポジ QTOF LC シンポジ 関	度 な 菜 ス 録 勝 S ム サ ム サ ム 、 し 、 し 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研器・ ター刷 教 ジステム バ 学生アル・ 1(1個)	-マ1 究 ···································	金 ト 組の(積 額 7.773 32 80 89 2,541 54 54	算 費 ジンオ その他 2/15-	内 支 ポポスク 2、シン 支 -2/16 円未満	<u>訳</u> シーF ま るの・	主 日 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二	な 33 1金、「	内 HP維打	容	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	〔千	円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計) 入件費支出 () 計) 教育研究経費支出 計 教育研究用機器備品 図 書 計) 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 設備 0 石田	9 年 主 育 実験用 シンポポ シンポジ シンポジ のTOF LC	度 な 菜 ス 録 開 S 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研 ター 検研 メール バ メール (1個)		金 ト 組の(積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 シンホ その他 2/15-	内 支 ポポスタ シン 支 -2/16		主 出 前 調 出 1 間	な は 33 び金、「	内 HP維打	容 考	. 塩基	(千	円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()) 計 日) 計 日) 約育研究経費支出 計 約育研究用機器備品 図 書 計) 1	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 設備 0 研	9 年 主 育 験 ポポポ QTOF LC シンポジ 気	度 な 薬 ス録聘 S 5 5 5 7 ス	テー 使研 好印者システム グロ者システム バギ生アルル 1 1	-マ1 究 す (保守 イベイト 又は1	金 ト 組の(積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 シンホ その他 タ 2/15- 500万	内 支 ポポスタ シン 支 -2/16 系		主 当 前 間 … し もの	な 33 33 延べ)	内 HP維打	容	. 塩基	(千	円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 () 計 教育研究経費支出 計 約育研究用機器備品 図 書 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 設備 0 研	9 年 主 育 験用 シンポポ QTOF LC シンポジ マ	度 な 菜 ス 録 開 S 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研器 ター の 間 格 リ マー の で 来 の の の で 、 金 見 の の の で 、 の の の の の の の の の の の の の の の	-マ1 究 す (保 イバイト 又 は1	金 ト 組の(積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 ジンホ その他 係 2/15- 500万	内 支 ポポスタ シン 支 -2/16 円未滞	<u>訳</u> マーF 講 え	主	な 33 33 近 べ)	内 HP維打	容		(千	円) 解析
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計) 人件費支出 () 計) 教育研究経費支出 計 約育研究用機器備品 図 書 1) 計	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 54 254	9 年 主 育 験用 シンポポ QTOF LC シンポジ マ	度 な 菜 ス 録 開 S 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	テー 使研器 ター刷旅 チー ゴ(1個) タ	-マ1 究 す 子 イ パ イ ト マ し	金 ・ ・ 組の(積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 ジンホ その他 タンホ その他	内 支 ポポスタ シン 支 -2/16 円未満	<u>訳</u> マーF 満 支	主	な 33 33 近 べ)	内 HP維打	容			円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計) 人件費支出 () 計) 教育研究経費支出 計 約育研究用機器備品 図 書 1) サーチ・アシスタント ポスト・ドクター 研究支援推進経費 =	平成 2 支出額 教 7,773 32 113 89 3,149 11,156 ア 54 54 54 54 54	9 年 主 育 験用 シンポポポ QTOF LC シンポジ マ	度 な 菜 ス 録 開 S 	テー 使研器 ク印者システム バギ生アルル ゴ(10) タ	-マ1 究 ···································	金 ・ ・ 組の(積 額 7,773 32 80 89 2,541 関 54 54	算 費 ジンホ その他 <u>係</u> 2/15- 00万	内 支 ポポスタ シン 支 -2/16 系	訳	主	な 33 33 近 べ)	内 HP維打	容			円) 解析

																	(+H)
年度	平成	2	29 :	年度	-	テーマ2											
· · · ·	<u>+</u> ш	索石						積	算	内	訳						
小科日		谻	-	主 な	:使	途	金	額				È	な	内	容		
		教	育		研	究	! •	経	費	支	ξ	Ļ	Ħ				
消耗品費	13	3,451	実験	用試到	薬・器	·具		13,451									
光熱水費																	
通信運搬費																	
印刷製本費																	
旅費交通費		91	学会	参加热	旅費			91									
報酬・委託料	2	2,082	セルン	ノータ	一保	守		1,663	解析								
(諸会費・修繕費	2)	28	学会	参加到	費			15	ネジ穴	破損	ネジド	余去	・加ユ	作業	ピンオ	ジ 再力	口工13
計	15	5,652															
	-	ア	J		バ	イ	<u>۲</u>	関	係	支		出					
人件費支出																	
(兼務職員)																	
教育研究経費支	出																
計		0				·											
		設備	関係	、支	出(1	個又は	1組の	価格が	500万	円未	両の	もの)				
教育研究用機器備	i品								.								
図書	_		<u> </u>						<u> </u>								
計		0								_							
		研	究	ス		タッ	/ .	7 関		系	支		出				
リサーチ・アシスタ	<u>ント</u>																
ポスト・ドクター																	
研究支援推進経	費																
1 1		0															
ні		0															
		0		左亩													(千円)
年度	平成	2	29 :	年度	-	テ ─⋜3	}	1±	<u>/</u>		-0						(千円)
<u>年</u> 度 小科目	平成 支出	2 額	29 :	年度	- -	र—र3 ्रे		積	↓ 算	内	訳	\ \ +	+>	-	应		(千円)
<u>年</u> 度 小科目	平成 支出	2 額	29 :	年度 主 な	使五	テーマ3 途	 金	積 額 级	 算 #	内	訳	、 主	な	内	容		(千円)
年度 小科目	平成 支出	2 額 教3		年度	使研究	テーマ3 途 <u>究</u>	 金 	<u>積</u> 額 経	↓ 算 費	内支	訳	、 主	な 出	内	容		(千円)
年度 小科目 消耗品費	平成 支出	2 額 教 5,297	29 : 育 実験/	年度 主な 用試	· 使 研 案·器	テーマ3 途 <u>究</u>	· 金	<u>積</u> 額 経	算 算 費	内支	訳	、 主 上	な 出	内	容		(千円)
年度 小科目 消耗品費 光熱水費	平成 支出	2 額 教 5,297	29 : 	年度 主 な 用試	: 使 研 薬·器	テーマ3 途 究	▲ 注	<u>積</u> 額 経	 算 費	内支	訳	<u></u>	な 出	内	容		(千円)
年 度 小 科 消 耗 洗 熱 通信運搬費	平成 支出	2 額 教 6,297	29 : 	年度 主 て 用試 認	<u>使</u> 研 薬•器	テーマ3 途 究		<u>積</u> 額 経	算 費	内支		<u></u> 主	<u>な</u> 出	内	容		(千円)
年 度 小 科 消 耗 消 耗 二 八 消 耗 二 二 近 三 近 二 近 </td <td>平成 支出</td> <td>2 額 教 6,297</td> <td>29 : 言 了 【実験】</td> <td>年度 主 な 用試到</td> <td>: 使 研 薬·器</td> <td>テーマ3 途 <u>究</u> 具</td> <td>· 金 ;</td> <td><u>積</u> 額 経</td> <td>↓ 算 費</td> <td>内支</td> <td></td> <td><u>上</u></td> <td><u>な</u> 出</td> <td>内</td> <td>容</td> <td></td> <td>(千円)</td>	平成 支出	2 額 教 6,297	29 : 言 了 【実験】	年度 主 な 用試到	: 使 研 薬·器	テーマ3 途 <u>究</u> 具	· 金 ;	<u>積</u> 額 経	↓ 算 費	内支		<u>上</u>	<u>な</u> 出	内	容		(千円)
年 度 小 科 消 耗 消 耗 消 耗 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 超酬・季託料	平成 支出	2 額 教 5,297	29 : 百 百 百 百 三 百 百 三 三 百 百 三 三 三 三 三 三 三 三 三 三 三 三 三	年度主な	<u>·</u> 使研 葉·器	テーマ3 途 <u>究</u> 具	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	<u>積</u> 額 経	算 費	内支		上 主 上	<u>な</u> 出	内	容		(千円)
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()	平成 支出	2 額 教 6,297 441	29 : 音 実験) 「 塩基間	年度 主な 用試 記列	· 使研 案·器	テーマ3 途 <u>究</u> 具	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	<u>積</u> 額 経 441	算 費	内支		<u>主</u>	<u>な</u> 出	内	容		(千円)
年 度 小 科 川 耗 川 耗 二 八 光 熱 水 費 光 熱 水 費 近 預 近 秋 市 費 近 日 市 市 市 日 秋 サ 市 日 市 日	平成 支出	2 額 約 6,297 441 6,738	29 : 育 実験) 塩基門	年 <u>度</u> 主 な 用試 認 配列	· 使研器· 解析	テーマ3 途 究 具	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	<u>積</u> 額 経 	算 費		訳	<u></u> 主	<u>な</u> 出	内	容		(千円)
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 ()	平成 支出	2 額 約 5,297 441 6,738 ア	29 : 育 実験/		<u>使</u> 研器 一 候 研 器 - - - - - - - - - - - - -	テーマ3 途 <u>究</u> 具	· 金	<u>積</u> 額 経 441	算 費 係	内 支 支			な 出	内	容		(千円)
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 報酬・委託料 () 計	平成 支出	2 額 約 5,297 441 6,738 ア	29 : 育 [実験] 	年度 主な 用試 い	· 使研 葉・器 析	テーマ3 途 <u>究</u> 具	· 金	積 額 経 441 関	 算 費 	内 支 支			<u>な</u> 出	内	容		(千円)
年度 小科目 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 支出	2 額 約 6,297 441 6,738 ア	29 : 育 実験) 塩基門	年 主 て ま な い の 利 の	<u>- 使</u> 葉・ 解析 バ	テーマ3 途 <u>究</u> 具 イ	· 金·	積 額 経 441 関	算 費 費 係	内 支 支				内	容		
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支	平成 支出 ((((((((((((((((((2 額 教 6,297 441 6,738 ア	29 : 育 実験/ 塩基i	年 度 な 用 記 列 が レ		テーマ3 途 <u>究</u> 具 イ	金 · ·	積 額 経 441 関	算 費 	内 支 支				内	容		
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支 計	平成 支出 ・ <	2 額 教 6,297 441 6,738 ア 0	29 : 育 実験) 塩基門	年 度 な 用 記 列 り	<u>:</u> 使研 薬・器 解析	テーマ3 途 究 具 イ	· 金	<u>積</u> 額 経 441 関	算 費 子 係					内	容		(千円)
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計	平成 支出	2 額 教 5,297 441 6,738 ア 0 設備	29 : 言 言 定 第 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二	年 主 な 訳 … … … … … … … … … … … … …	<u>- 使</u> 研 薬・器 バ 11	テーマ3 途 究 県 イ	▲ · · · · · · · · · · · · · · · ·	積 額 経 441 関	算 費 子 係 係	内 支 支 (円未)				内	容		(千円)
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究用機器備	平成 支出 ((((((((((((((((((2 額 約 5,297 441 6,738 ア 0 設備	29 言 言 定 第 第 第 第 第 第 第 第 第 第 第 第 第	年 主 な ま な 、 、 、 、 、	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	テーマ3 途 究 具 イ	▲ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	積 額 経 441 関 価格が	算 費 子 係 係 500万	内 支 支 円未	また 読 満の	<u>!</u> 主 出 もの	<u>な</u> 出	内	容		
年度 小科目 消耗品費 消耗品費 光熱水費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (兼務職員) 教育研究経費支 計 教育研究用機器備 図 書	平成 支出 () () () () () () () () () (2 額 教 6,297 441 6,738 ア 0 韻	29 : 育 実験) ···································	年 主 て ま こ 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	テーマ3 途 究 具 イ 個又は	▲ 金 · · · · · ·	積 額 経 441 関 価格が!	算 費 係 	内 支 支 円未	また 読 満 の	<u>主</u> 上 出		内	容		
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 和酬・委託料 () 計 人件費支出 () 教育研究経費支 計 教育研究用機器備 図 書 計 計	平成 支出 ((((((((((((((((((2 額 約 6,297 441 6,738 ア 0 設備 0	29 : 育 実験/ 塩基/ リ	年 主 て 田 二 一 元 一 、 一 、 、 一 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	テーマ3 途 究 具 イ 何 又は	▲ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	積 額 経 441 関	算 費 	内 支 可未		<u>主</u> 上 出		内	容		
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (教育研究用機器備 図 書 計 計	平成 支出 支出 () <td>2 額 約 6,297 441 6,738 ア 0 0 0 0</td> <td>29 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·</td> <td>年 主 雨 … … … … … … … … … … … … …</td> <td>· 使研 案・器 解析 · ズ</td> <td>テーマ3 途 究 具 イ イ 個又は</td> <td>▲ · · · · · · · · · · · · · · ·</td> <td><u>積</u> 額 経 441 関 価格が!</td> <td>算 費 子 係 500万</td> <td></td> <td>また。 また。 志 で 支</td> <td><u>主</u> 上 もの</td> <td></td> <td>内</td> <td>容</td> <td></td> <td></td>	2 額 約 6,297 441 6,738 ア 0 0 0 0	29 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	年 主 雨 … … … … … … … … … … … … …	· 使研 案・器 解析 · ズ	テーマ3 途 究 具 イ イ 個又は	▲ · · · · · · · · · · · · · · ·	<u>積</u> 額 経 441 関 価格が!	算 費 子 係 500万		また。 また。 志 で 支	<u>主</u> 上 もの		内	容		
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 胃 光 熱 水 費 通信 製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計 人件費支出 (次育研究経費支 計 教育研究用機器備 図 書 計 1 1	平成 支出 支出 () <td>2 額 約 6,297 441 6,738 ア 0 0 研</td> <td>29 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·</td> <td>年 主 田 記 一 レ 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、</td> <td><u>使</u> 研 薬・器 バ 出(1</td> <td>テーマ3 途 究 具 イ の の スは</td> <td>▲ · · · · · · · · · · · · · ·</td> <td>積 額 経 441 関 て ア 関</td> <td>算 費 子 係 係 500万</td> <td>内 支 一 支 一</td> <td>家の支</td> <td><u>主</u> 上 出</td> <td></td> <td>内</td> <td>容</td> <td></td> <td></td>	2 額 約 6,297 441 6,738 ア 0 0 研	29 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	年 主 田 記 一 レ 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	<u>使</u> 研 薬・器 バ 出(1	テーマ3 途 究 具 イ の の スは	▲ · · · · · · · · · · · · · ·	積 額 経 441 関 て ア 関	算 費 子 係 係 500万	内 支 一 支 一	家の支	<u>主</u> 上 出		内	容		
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬者費 旅費、交通費 報酬・委託料 (() 計 人件費支出 () 計 人件費支出 () 教育研究用機器備 図 書 計 1	平成 支出 () () () () () () () () () (2 額 約 5,297 441 6,738 ア 0 設備 0 研	29 言 言 注 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二		· 使 研 案・器 解析 バ	テーマ3 途 究 具 イ イ 個又は	金	積 額 経 441 関 フ 関	算 費 係 係 500万	内 支	また また また また また また また また また また	<u>主</u> 上 出		内	容		
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 消 耗 品 費 消 耗 品 費 通信運搬費 印刷製本費 面信運搬費 和酬・委託料 () 計 人件費支出 (教育研究組織費支 計 教育研究用機器備 図 書 1 1 1 リサーチ・アシスタ ポスト・ドクター 研究支援# 進経	平成 支出 支出 () <td>2 額 約 6,297 441 6,738 ア 0 0 0 0</td> <td>29 言 言 服 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二</td> <td></td> <td>· 使 研 築 ・ 器 · · · · · · · · · · ·</td> <td>テーマ3 途 究 具 イ イ 個又は</td> <td>金 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・</td> <td>積 額 経 441 関 フ 関</td> <td>算 費 係 (500万</td> <td>内 支 (円未)</td> <td>また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。</td> <td></td> <td></td> <td>内</td> <td>容</td> <td></td> <td></td>	2 額 約 6,297 441 6,738 ア 0 0 0 0	29 言 言 服 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二 二		· 使 研 築 ・ 器 · · · · · · · · · · ·	テーマ3 途 究 具 イ イ 個又は	金 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	積 額 経 441 関 フ 関	算 費 係 (500万	内 支 (円未)	また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。 また。			内	容		
年 度 小 科 目 消 耗 品 費 消 耗 品 費 消 耗 品 費 光 熱 水 費 通信運搬費 印刷製本費 旅費交通費 報酬・委託料 () 計) 人件費支出 () 教育研究相機器(四 書 引) 計 以サーチ・アシスタ ポスト・ドクター 研究支援推進経費 計	平成 支出 支出 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2 額 約 6,297 441 6,738 ア 0	29 言 言 意 意 了 二 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、		····································	テーマ3 途 究 県 イ 個又は	▲ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	積 額 経 441 関 フ 関	算 費 係 	内 支 可未注	訳 支	<u>主</u> 上 出		内	容		

主要な成果

テーマ1

核内受容体のコバレント修飾型プローブとリガンドの創製

山本 恵子 (医薬分子化学研究室)

【要約】

共有結合型化合物の特徴である、タンパク質に対する結合能の増大やタンパク質安定性の向上 に着目したコバレント修飾型プローブとリガンドの創製を行った。2 種類のタンパク質コバレン ト修飾法を開発し、核内受容体の蛍光標識に成功した。またビタミンD受容体(VDR)のヒスチ ジンを標的とした共有結合型 VDR アゴニストの合成に成功した。これらの手法やコバレント修 飾型プローブは核内受容体を初めとするタンパク質の機能解析に役立つことが期待できる。

1. 背景·目的

アスピリンやペニシリンなどに代表される共有結合型化合物は古くから知られており、様々な 疾患の治療薬として臨床応用されている¹⁾。しかしながら、その多くは偶然に見出されたもので あり、共有結合型化合物の積極的な開発はほとんど行われて来なかった。原因の一つとして非特 異的なタンパク質との共有結合形成によって、予期せぬ作用を引き起こす可能性があるからであ る²⁾。一方で、共有結合型化合物には作用持続時間の延長や活性の増強、タンパク質安定性の向 上などの利点がある³⁾。そこで、本プロジェクトでは核内受容体の共有結合型化合物の利点を生 かしたコバレント修飾型プローブとリガンドの創製を目的とした。

タンパク質の機能解析法は数多く知られているが、蛍光タンパク質に代表される遺伝子工学的 手法を用いた蛍光イメージングが最も一般的である⁴。一方、蛍光タンパク質に比べて構造が遥 かに小さい低分子化合物を利用したタンパク質修飾法はそれほど多くはない⁵。そこで本研究で はコバレント修飾型プローブに着目し、2 種類のタンパク質修飾法の開発を試みた。一つ目は、 共有結合型リガンドによる共役付加反応によってペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPARy)をコバレント修飾した後、リガンドに付与した反応点と蛍光プローブを反応させること で、PPARyを蛍光標識できると考えた (Figure 1)。二つ目は、求核種の共役付加反応によるアル キンからアルケンへの構造変化を利用することで、求核種応答型の TO 型プローブを開発し、ビ タミンD 受容体 (VDR) と PPARy の標識へ応用できると考えた (Scheme 1)。 また核内受容体において共有結合型リガンドの報告は数例であり、いずれもシステインを標的 としている⁶。そこで、システイン以外の残基と共有結合を形成する特異的リガンドをポケット 構造に基づいて論理的に創製し、共有結合型リガンドの合理的設計の選択肢を増やすことを計画 した。まず VDR のヒスチジンに着目し、イミダゾール基の求核性を利用した共有結合型ビタミ ンD誘導体の合成に着手した。

2. 方法

2段階のコバレント修飾を利用した PPARy の蛍光標識

新たな反応点としてアジド基を付与した共有結合型リガンド1を設計し、11-bromoundecanalを 出発原料として4工程で合成した (Figure 1)。また、蛍光団としてフルオレセインを有するシクロ オクチン誘導体2を設計し、dibenzosuberenone から8工程で合成した。2段階の共有結合形成反 応による PPARy のコバレント修飾は ESI-質量分析とタンパク質 X線結晶構造解析で評価した。 タンパク質の蛍光標識は、破砕した大腸菌中の PPARy を標識後、SDS-PAGE で分離し、蛍光をゲ ル撮影装置で検出した。また、COS-7 細胞に発現させた PPARy を標識後、蛍光顕微鏡で観察し た。

VDR と PPARyの蛍光標識を指向した Turn-On 型蛍光プローブの開発

イノエートを有するクマリン前駆体 3-5 を設計・合成した。クマリン前駆体 3-5 と各種アミノ 酸を反応させ、生じたクマリン誘導体 6-12 の吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。VDR リガンドであるリトコール酸とクマリン前駆体 3-5 を PEG リンカーで連結した VDR 標識用プロ ーブ 13-19 を設計・合成した。リトコール酸誘導体 13-19 でクマリン標識された VDR の吸収スペ クトルと蛍光スペクトル、蛍光量子収率を測定した。タンパク質の蛍光標識は、破砕した大腸菌 中の VDR を標識後、SDS-PAGE で分離し、蛍光をゲル撮影装置で検出した。

PPARγ と相互作用するペプチドとクマリン前駆体 3 を連結した PPARγ 標識用プローブ 20-22 を設計・合成した。PPARγ プローブ 20-22 でクマリン標識された PPARγ の吸収スペクトルと蛍光 スペクトル、蛍光量子収率を測定した。タンパク質の蛍光標識は、破砕した大腸菌中の PPARγ を標識後、SDS-PAGE で分離し、蛍光をゲル撮影装置で検出した。

VDR を標的とした共有結合型リガンドの創製

活性型ビタミンDである 1a, 25-ジヒドロキシビタミン D₃(1,25D₃)はビタミンD 受容体(VDR) に結合する際に6つのアミノ酸残基と水素結合を形成する。我々はそのうちの一つであるヒスチ ジンの求核性を利用して、VDR と共有結合を形成するリガンドを開発することにした。側鎖に電 子吸引基であるエノンあるいはジエノンをもつ化合物 23-26 を設計・合成した(Figure 4)。23-26 に ついて VDR への結合親和性と遺伝子転写活性化能の検討を行った。23-26 の共有結合能を評価す るため ESI-質量分析による結合実験を行った。さらに VDR/23-26 複合体の X 線結晶構造解析に よる結合様式の検討を行った。

3. 結果

2段階のコバレント修飾を利用した PPARy の蛍光標識

PPARy に対する2段階のコバレント修飾をESI-質量分析で検討した結果、PPARy に対する共役 付加反応と Huisgen 環化反応による2段階の共有結合形成が確認できた (Figure 1)。PPARy/1 複合

体のX線結晶構造解析を行った 結果、1が1,6-共役付加によって リガンド結合ポケット表面に位 置するCys285をコバレント修飾 していることが明らかになった。 さらに、PPARγ-1/2複合体の結晶 構造では、アジドとアルキンの 反応で生じたトリアゾール環が 確認でき、Huisgen環化反応がタ ンパク質表面で進行しているこ とが示された。次に、2段階コバ レント修飾法による PPARy の蛍 光標識を試みた結果、大腸菌溶 菌液中に存在する PPARy を選択



的に蛍光標識することができた。一方、 COS-7 細胞内における PPARγ の蛍光標識を試みたが、 現時点で成功していない。以上の結果から、応用範囲に制限があるものの、2 段階コバレント修 飾法を利用したタンパク質蛍光標識を確立した⁷。

VDR と PPARy の蛍光標識を指向した Turn-On 型蛍光プローブ

クマリン前駆体の求核種に対する反応性を評価するため、クマリン前駆体 3-5 と各種アミノ酸 側鎖との反応を水存在下、40°C で検討した (Scheme 1)。その結果、Cys, Lys, His, Tyr, Trp の5 種で 低収率ながら反応が進行し、アミノ酸側鎖が付加したクマリン誘導体 6-12 を同定した。クマリン 誘導体の蛍光特性を評価した結果、アミノ酸の種類によって吸収極大波長と蛍光極大波長、蛍光 量子収率に明らかな違いが認められた (Table 1, 6-10)。また、クマリンの7位置換基の電子供与能



められ、中鎖長のリンカーを有する 15 が最も高い反応性を示した。次に、クマリン修飾された VDR の蛍光特性を評価するため、吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。その結果、7位

45/228

置換基の電子供与能が高いほど、吸収 極大波長と蛍光極大波長が長波長化 し、蛍光量子収率も改善した。また、 VDR 非存在下と存在下において、リ トコール酸誘導体 15, 18-19の蛍光量 子収率が著しく異なることから、これ ら化合物が VDR に対する TO 型プロ ーブであることが示された。 SDE-PAGE で選択性を確認した結果、



大腸菌由来のタンパク質共存下でも、VDR を選択的に蛍光標識できた (Figure 3)。

TO型プローブの汎用性を検証するため、低分子リガンドの代わりにペプチドを用いた PPARy クマリン修飾法の開発に着手した。鎖長の異なる3種類のペプチドに TO型プローブ3を連結し た化合物 20-22 を設計・合成した。ペプチドと PPARy の反応を ESI-質量分析で検討した結果、20, 22 でのみ PPARy のコバレント修飾が進行した。上述の方法と同様に 20, 22 の蛍光特性を評価し た結果、PPARy との反応後に蛍光量子収率が増大したことから、ペプチド 20,22 が PPARy の TO 型プローブであることが明らかになった。また、20, 22 を利用することで、大腸菌溶菌液中の PPARy を選択的に蛍光標識できた。

VDR を標的とした共有結合型リガンドの創製

生物活性の評価を行った 結果、23-26 は VDR への結 合親和性とアゴニスト活性 を示した。ESI-質量分析よ り、時間依存的に VDR と リガンド間に共有結合が形 成されることが示された。 またリガンドの側鎖構造の 違いにより結合の速さに差 が観測され、エノン体が最 も高い反応性を示した。さ



Figure4. X-ray crystal structures of VDR-LBD complexed with 23-26.

らに VDR/リガンド 複合体の X 線結晶構造解析から、23-26 は His301 と 1,4-共役付加により共有 結合を形成していた(Figure 4)。以上より共有結合型 VDR アゴニストの合成に成功した。

4. 考察

本研究では、共有結合型化合物を利用したタンパク質標識法の開発と共有結合型リガンドの開発に成功した。

多くのタンパク質標識法は遺伝子工学的手法を必要とし、目的に応じて機能を変更することは 容易ではない。一方、今回開発した2段階コバレント修飾法は機能性分子を容易に変更すること が可能で、蛍光標識やアフィニティー精製、プロテインノックダウンへ応用できると考えられる。

クマリンは蛍光プローブやレーザー色素、医薬品など様々な分野で利用されている。今回開発 したクマリン合成反応はクマリン誘導体の合成戦略に新たな選択肢を提示するものである。また、 クマリン前駆体プローブは求核種に応答して TO 型の蛍光を示し、タンパク質の選択的標識に成 功した。アルキンからアルケンへの構造変化を利用した TO 型蛍光プローブは報告されておらず、 プローブの分子設計に新たな知見を与えるものである。また、タンパク質に対する TO 型プロー ブは数例しか報告がなく、本プローブは従来法に比べ適用可能なアミノ酸残基を1種類から5種 類に増やすことができた⁸。さらに、本プローブは低分子リガンドだけでなく、ペプチドにも応 用できるため、リガンドが存在しないタンパク質の標識も可能である。

タンパク質中のヒスチジンに共有結合する化合物の報告はほとんどないため、本研究は共有結 合修飾における標的としてのヒスチジンの有用性を示す一例となる。ヒスチジンを標的とした共 有結合リガンドの開発に貢献が期待できる。また一般に、共有結合型化合物は標的酵素に対する 阻害剤または受容体に対するアンタゴニストが大部分である。今回 VDR 共有結合型アゴニスト の開発に成功したことにより、アゴニスト合成の新たなアプローチとして標的タンパク質との共 有結合形成を推奨する。

5. 引用文献

1. Singh J, Petter R C, Baillie T A, Whitty A. The Resurgence of Covalent Drugs. Nat. Rev. Drug Discov.,

10(4), 307-317(2011).

- Douglas S Johnson, Eranthie Weerapana, and B. F. C. Strategies for Discovering and Derisking Covalent, Irreversible Enzyme Inhibitors. *Future Med. Chem.*, 2 (6), 949–964 (2010).
- Potashman M H, Duggan M E. Covalent Modifiers: An Orthogonal Approach to Drug Design. J. Med. Chem., 52 (5), 1231–1246 (2009).
- Wiedenmann J, Oswald F, Nienhaus G U. Fluorescent Proteins for Live Cell Imaging: Opportunities, Limitations, and Challenges. *IUBMB Life*, 61 (11), 1029–1042 (2009).
- Tsukiji S, Miyagawa M, Takaoka Y, Tamura T, Hamachi I. Ligand-Directed Tosyl Chemistry for Protein Labeling in Vivo. *Nat. Chem. Biol.*, 5 (5), 341–343 (2009).
- Swamy N, Xu W, Paz N, Hsieh J C, Haussler M R, Maalouf G J, Mohr S C, Ray R. Molecular Modeling, Affinity Labeling, and Site-Directed Mutagenesis Define the Key Points of Interaction between the Ligand-Binding Domain of the Vitamin D Nuclear Receptor and 1α,25-Dihydroxyvitamin D3. *Biochemistry*, **39** (**40**), 12162–12171 (2000).
- Kojima H, Itoh T, Yamamoto K. On-Site Reaction for PPARγ Modification Using a Specific Bifunctional Ligand. *Bioorganic Med. Chem.*, 25 (24), 6492–6500 (2017).
- Yamaguchi T, Asanuma M, Nakanishi S, Saito Y, Okazaki M, Dodo K, Sodeoka M. Turn-ON Fluorescent Affinity Labeling Using a Small Bifunctional O-Nitrobenzoxadiazole Unit. *Chem. Sci.*, 5 (3), 1021–1029 (2014).

テーマ1

生体分子と結合する低分子の開発と合成

田村 修 (薬化学研究室)

【要約】

生体分子と結合する低分子は医薬品候補となりうる。そこで、① Maremycin 類、特に Michael アクセプターである maremycin D_1 の合成 ② Michael アクセプターである phaeosphaeride 類の合成 ③ non-NMDA グルタミン酸レセプターに結合する neodysiherbaine A の合成 ④ 窒素選択的 な活性を有するアシル化剤の開発 を目的として研究を行った。

① Maremycin 類の合成

1. 背景・目的

Maremycin A(1)¹⁾ や maremycin D₁(2)²⁾ はジケトピペラジン型アルカロイドであり、その構造と

くにメチル基の立体化学は計算化学とスペクトルデ ータから推定されたもので、確定していなかった。 また、2 は Michael アクセプターの構造をもち生体 分子と共有結合を形成することが予測された。以上 の背景を持つにもかかわらず、我々以前には合成研



究が行われていなかった。そこで、これらの構造を確定することと生理活性を明らかにすること を目的として合成に着手した。

2. 方法

3-エチリデンインドリノン 3 と環状ニトロン 4 との 1,3-双極子付加反応により連続する 3 つの 不斉炭素の立体化学を整える。その後、ジケトピペラジンの構築して maremycin A(1)を得、最後 に脱離反応により maremycin D₁(2) とする計画を立てた。

3. 結果

3-エチリデンインドリノン3と環状ニトロン4とをヘキサン中反応させると、望みの構造を有 する付加環化体6とその位置異性体5の混合物が得られた。熱的に5と6の間で平衡が認められ たため、5は6に変換できる。化合物6は立体化学を含めて maremycin 類の左側のアミノ酸の要 素を全て有している。化合物6を示した条件で過水素分解を行い、次いでカルボン酸をメチル化 してエステル7を得た。化合物7のアミノ基に*N*-Boc-S-メチル-D-システインを反応させ、ジペプ



チドとした後、加熱してジケトピペラジン環を構築して maremycin A (1) を得た。さらに、側鎖 を酸化してスルホキシドにした後、脱離させ maremycin D₁(2) へ導いた³⁾。

4. 考察

これまで、maremycin 類の最初の全合成を達成すると共に、推定構造に過ぎなかった maremycin 類の構造を合成化学により確定でした。今後は、maremycin D₁(2)を中心に生物活性を見ていく。

② Phaeosphaer i de 類の合成

1. 背景・目的

Phaeosphaeride A (1)⁴は制がん活性が報告されている天然物である。その構造から、Michael 受 容体であることが予想され、生体分子と共有結合 を形成することが考えられた。Phaeosphaeride A の



提出構造(1)を我々は既に合成していたが、提出構造が誤りであることを見いだしていた⁵。その¹³CNMR スペクトルにおいて C7 位と C15 位のケミカルシフトが合成品と天然物のもので一致しなかったことから、真の構造は C7 位エピマー 2 であると予想し、この化合物を合成標的とすることとした。

2. 方法

アルケンに対する不斉ジヒドロキシル化と分子内アルドール反応を基軸とする合成ルートを 考案した。

3. 結果

下に、示すルートにより目的とする2を合成した。すなわち、(E)-アルケン3を出発原料とし、 AD-mix-βにより、C7位に相当する四置換炭素を含む相対配置を整えた。次いで8工程を掛けて アルデヒド5に導き、これを塩基によりアルドール型閉環反応を行い6を得た。ジエステル6か らマレイミイド7を経て目的とする2を合成した。そのスペクトルデータは天然物のものと一致 しており、比旋光度は天然物のものと逆の符号を示した。従って、天然の phaeosphaeride A は2 のエナンチオマー8であることが分かり、ここにその構造を確定した⁹。

次いで、AD-mix- α を用いて 4 のエナンチオマーを合成し、上と同じ行程で天然型の phaeosphaeride A(8)を合成した。さらに、8 をトリフルオロ酢酸、次いで弱塩基処理により 8 の 6 位を異性化させ、天然型 phaeosphaeride B(9) へ変換することにも成功した⁷。



4. 考察

Phaeosphaeride 類の合成研究は他グループも行っているが⁸⁹、phaeosphaeride A 提出構造 1 の合成、天然型 phaeosphaeride A (8)の構造決定と合成、および天然型 phaeosphaeride B (9)の構造決定と合成の何れも達成できた。

③ Neodysiherbaine Aの合成

1. 背景·目的

Neodysiherbaine A (10)¹⁰ は、糖由来の部分とグルタミン酸部分がアミノ酸4位の四置換炭素で連結された構造をもつ天然アミノ酸である。この化合物はnon-NMDA グルタミン酸受容体の強力なアゴニストである。

CO₂H CO₂H C Ĥ

neodysiherbaine A (10)

従って、まず、10を合成し、その化学変換を行うことにより、共有結合性化合物を創製できると 考えた。

2. 方法

化合物 10 を合成するにあたり、糖由来のアリルアルコール 11 と当研究室で開発しているニトロンの 12⁽¹⁾との MgBr₂存在下の付加環化反応を用いることとした。

3. 結果

D-マンノースより誘導したアリルアルコール11とニトロン12とをMgBr2存在下で反応させる と遷移状態Aを経由して付加環化体13が単一の異性体として得られた。付加体13を過水素分解 に付すと点線で示した結合が還元的に開裂し、窒素原子が保護される。さらに、一級水酸基を保 護し、二級水酸基を脱離基に変換して14とした。次いで、14をLiOHで処理するとラクトンが 加水分解され、生じた三級水酸基が分子内S_N2反応を起こしてテトラヒドロフラン環が構築でき た。さらにカルボン酸を*tert*-ブチルエステル15とした。最後に、TBS基を除去し、一級水酸基 を酸化後全ての保護基を除去して neodysiherbaine A(10)の合成を完了した¹²⁾。



4. 考察

Neodysiherbaine A(10)の合成研究は他グループも行っているが¹³、極めて立体選択性の高い特徴ある合成法となった。付加環化反応の条件を変えると他の異性体の合成も可能であり、有用性が高い。

④ 窒素選択的な活性を有するアシル化剤の開発

1.背景・目的

生体物質は水溶性のものが多く、それに対して反応を行うためにはその反応剤が酸素と反応し ないことが求められる。特にアシル化反応は難しい。そこで、水やアルコール中で使用できるア シル化剤を開発することにした。

2. 方法

酸素はハードな求核剤であることから、カルボニル基をソフトにすることを考えた。そこで、 酸素より電気陰性度の低いイオウを脱離基とするチオエステル誘導体を使用することにした。

3. 結果

向山らが開発し、Corey らにより発展された2-チオピリジル基(SPy)¹⁴⁾を脱離基とするとア シル化剤 17 は、無水物 16 と比較して水に対して極めて安定になり、17 はカラムクロマトグラフ ィー精製可能となる。また、アミノアルコール 18 に対しては、大過剰の 17 を用いてもアミノ基 をアシル化して 19 を与えた。典型例を示す。グルコサミン塩酸塩 20 をメタノールに溶解し、ト リエチルアミンを加え、FmocSPy (21)を加えると、21 は一切メタノールと反応すること無く、 グルコサミンの多数の水酸基とも反応すること無く、アミノ基のみと反応する。反応液を濃縮し、 アセチル化することにより、22 が単離できた。



4. 考察

本反応剤は、水にも耐えると思われる。試薬の水溶性を増した反応剤を開発し、生体分子修飾に利用する。

文献

- 1. Balk-Bindseil W, Helmke E, Weyland H, and Laatsch H, Liebigs Ann. Chem., 1291 (1995).
- 2. Tang Y, Sattler I, Thiericke R, and Grabley S. Eur. J. Org. Chem., 261 (2001).
- Ueda T, Inada M, Okamoto I, Morita N, and Tamura O. Org. Lett., 10, 2043 (2008).; Ueda T, Inada M, Morita N, and Tamura O. Heterocycles, 90, 1179 (2015).
- Maloney K N, Hao W, Xu J, Gibbons J, Hucul J, Roll D, Brady S F, Schroeder F C, Clardy J. Org. Lett., 8, 4067 (2006).
- 5. Kobayashi K, I Okamoto, Morita N, Kiyotani T, Tamura O. Org. Biomol. Chem., 9, 5825 (2011).
- 6. Kobayashi K, Kobayashi Y, Nakamura M, Tamura O, Kogen H. J. Org. Chem., 80, 1243 (2015).
- 7. Kobayashi K, Kunimura R, Tanaka III K, Tamura O, Kogen H. Tetrahedron, 73, 2382 (2017).
- Chatzimpaloglou M P, Yavropoulou K E, Rooij R, Biedermann U, Mueller S, Kaskel V, Sarli. J. Org. Chem., 77, 9659 (2012).
- 9. Chatzimpaloglou A, Kolosov M, Eckols T K, Tweardy D J, Sarli V. J. Org. Chem., 79, 4043 (2014).
- Sakai R, Koike T, Sasaki M, Shimamoto K, Oiwa C, Yano A, Suzuki K, Tachibana K, Kamiya H. *Org. Lett.*, 3, 1479 (2001).
- 11. For a review, Tamura O. J. Synth. Org. Chem., Jpn., 68, 1272 (2010).
- Hirai T, Shibata K, Niwano Y, Shiozaki M, Hashimoto Y, Morita N, Ban S, Tamura O. Org. Lett., 19, 6320 (2017).

- 13. Cachet X, Porée F-H. RSC Adv., 3, 12466 (2013).
- 14. Mukaiyama T, Matueda R, Suzuki M. *Tetrahedron Lett.*, 1901 (1970). ; Corey E J, Nicolau K C. J. Am. *Chem. Soc.*, **96**, 5614 (1974).

テーマ2

胸腺上皮における MHCII の発現制御機構

石戸聡(統合感染免疫学研究室、現兵庫医科大学 病原微生物学講座)

【要約】

MHC class II(MHC II)は胸腺上皮細胞にて CD4 T 細胞の分化を促す重要な分子であるが、その発 現制御機構は不明であった。そこで、胸腺上皮細胞に発現している分子に注目したところ MARCH-I の機能的相同分子である MARCH-VIII が見出された。MARCH-I はすでに MHC II のユ ビキチン化酵素であることから、MARCH-VIII が胸腺上皮にて MHC II のユビキチン化を制御し ていると予想された。そこで、MARCH-VIII の欠損マウスを作成し解析したところ、予想通り胸 腺における MHC II のユビキチン化が抑制され MHC II の安定化が認められた。さらに、CD83 の 欠損によって MARCH-VIII による MHC II のユビキチン化が亢進することが明らかとなった。こ のように、胸腺上皮において MHC II の発現・機能の制御は CD83 と MARCH-VIII によって行わ れていることが明らかとなった。

1. 背景·目的

胸腺は CD8 T 細胞、CD4 T 細胞の分化・制御を行う一次リンパ器官である。その中で、 MHC II は CD4 T 細胞の制御に関わっている。したがって、胸腺における MHC II の制御機構の解明は様々な免疫疾患発症の解明において重要である。すでに、二次リンパ器官である脾臓、体表リンパ節において MHC II は MARCH-VIII にてユビキチン化の制御を受けていることが明らかになっている。そこで、胸腺上皮においても MHC II がユビキチン化の制御を受けていると考えられていた。よって、胸腺上皮における MHC II がユビキチン化されているかを検討し、そのユビキチン化酵素の探索を行い、その制御機構を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

CD83の欠損マウスの胸腺上皮細胞にて MHC II の発現低下が認められるとの報告がすでにあったことから、CD83 欠損では MHC II のユビキチン化が亢進しているとの予測がなされた。そこ

で、MHC II のユビキチン化部位であるリジン残基をアルギニンに置換したマウスとの交配を行い検討した。さらに、MARCH-VIIIの欠損マウスを作成し検討を行った。

3. 結果

CD83 欠損マウスにおける MHC II の発現低下は、MHC II のユビキチン化を抑制することにて 解除された。さらに、MARCH-VIII の欠損にて同様に CD83 欠損による MHC II の発現低下が解 除された。これらに呼応して、CD83 欠損による CD4 T 細胞の選択機構の異常が、MHC II のユ ビキチン化抑制、あるいは MARCH-VIII の欠損にて解除された。

4. 考察

胸腺上皮において MHC II のユビキチン化は MARCH-VIII にて制御されていることが明らかと なった。さらに、その制御は CD83 にて変調を受けることが明らかとなった。すでに、二次リン パ器官において CD83 と MARCH-VIII は MHC II との結合において競合することが明らかにされ ていることから、同様の機構が胸腺上皮細胞においても存在することが強く示唆された。この機 構の異常によって、胸腺の異常に起因する免疫学的疾患が存在すると考えられる。このように、 本研究成果は、自己免疫疾患などの発症解明に繋がるものであると考えられる。

5. 引用文献

- von Rohrscheidt J, Petrozziello E, Nedjic J, Federle C, Krzyzak L, Ploegh, H L, Ishido S, Steinkasserer A and Klein L. Thymic CD4 T cell selection requires attenuation of March8-mediated MHCII turnover in cortical epithelial cells through CD83. *J. Exp. Med.*, 22;213(9), 1685-94 (2016).
- Liu H, Jain R, Guan, J, Vuong V, Ishido S, La Gruta N L, Gray D H, Villadangos J A, and Mintern J D. Ubiquitin ligase MARCH 8 cooperates with CD83 to control surface MHC II expression in thymic epithelium and CD4 T cell selection. *J. Exp. Med.*, 22;213(9), 1695-703 (2016).

C18ORF1によるTGF-βシグナル抑制機構の解明

伊東 進 (生化学研究室)

要約

TMEPAI ファミリーは、TMEPAI と C18ORF1 から成っている。私達は、TMEPAI が TGF-β シグ ナルのネガティブフィードバック機構に関わっていることを見出してきたが、ファミリー分子で ある C18ORF1 の機能については未知であった。今回の助成により、私達は、ゲートキーパーと して C18ORF1 も SIM 領域を介して TMEPAI と同様に恒常的な TGF-β シグナルを抑制すること を明らかにした。

1. 背景·目的

TGF-β はその構造上の特徴から多くのファミリー分子を持ち、ヒトゲノム中に 33 種類の類似 タンパク質が存在しているため、TGF-β ファミリーとよばれている。TGF-β は上皮細胞や血球細 胞に対する細胞増殖抑制能が広く知られている。さらに、血球分化を促進するアクチビン (activin) や骨・軟骨形成に関与する BMP (bone morphogenetic protein) などがファミリー分子であることが 分かり、現在これらは TGF-β ファミリーとして分類されている^{1,2)}。TGF-β は、細胞増殖抑制作用 以外に細胞分化、アポトーシス、遊走能、細胞外マトリックスタンパク質産生、血管新生、免疫 制御、がん化促進など、多様な生理活性を有している。前がん状態において、TGF-β は細胞増殖 抑制作用によりがん細胞の増殖を抑制するが、悪性化したがん細胞では、TGF-β による細胞増殖 抑制作用が消失する一方、細胞運動能亢進や細胞外マトリックス分解酵素誘導などにより、がん 細胞の浸潤能を亢進させる。浸潤能を獲得したがん細胞は、TGF-β を分泌するようになり、オー トクリン及びパラクリン反応により、さらに細胞運動能を活性化する。加えて免疫細胞に属する 細胞傷害性 T 細胞やNK 細胞の増殖を抑制することで耐ん細胞を標的とする免疫監視システムか らがん細胞を回避させ、血管新生を亢進することで酸素や栄養素を獲得できるがん微小環境作り に一役を買っている。したがって TGF-β は、がん化の初期ではがん進展を抑制するが、悪性化し たがん細胞ではがん化を亢進という二面性を有している³⁴。

TGF- β ファミリーには、II型受容体が5種類、I型受容体が7種類存在し、すべての受容体の細胞内領域にはセリン/スレオニンキナーゼドメインが存在している。TGF- β は、2分子のTGF- β I型受容体 (activin receptor-like kinase5 [ALK5]) と2分子のTGF- β II型受容体から成るヘテロ四量体 に結合する。リガンドがTGF- β II型受容体に結合すると、TGF- β II型受容体キナーゼはTGF- β II型受

容体の膜貫通領域直下に存在する GS 領域とよばれるグリシンとセリンに富んだドメインのセリ ンとスレオニン残基をリン酸化し、I型受容体内で不活性化されていたセリン/スレオニンキナー ゼの酵素活性が出現する。TGF-β と同様にアクチビンは、アクチビンII型受容体 (ActRII または ActRIIB) とアクチビンI型受容体 (ALK4) が複合体を形成し、BMP は、BMPII型受容体 (BMPRII) と BMPI型受容体 (ALK2,3,6) が複合体を形成する。活性化したI型受容体キナーゼは R-Smad (receptor-regulated Smad) タンパク質の C 末端に存在する 2 個のセリン残基をリン酸化する。TGFβやアクチビン刺激でリン酸化される R-Smad (Smad2 と Smad3)を AR-Smad (TGF-f)/activin R-Smad)、 BMP 刺激でリン酸化を受ける R-Smad (Smad1, Smad5, Smad8)を BR-Smad (BMP R-Smad)とよぶ。 リン酸化を受けた 2 分子の R-Smad は Smad4 とヘテロ三量体を形成し、核内に移行することで標 的遺伝子の転写を調節する⁴⁵。

細胞は細胞外から核内までのステップで過度の TGF- β シグナルを抑制するシステムを有して おり、このシステムの破綻が疾病と繋がると考えられている。例えば細胞外では TGF- β ファミリ ーであるアクチビンをトラップするに follistatin など、細胞膜ではデコイ受容体である BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog)、細胞質では I-Smad や様々な E3 ユビキチンリ ガーゼ、そして核内において転写抑制共役因子 c-Ski、SnoN、TGIF (TGF- β -induced factor homeobox) である。これらの TGF- β シグナルを抑制する分子の中には、TGF- β シグナルの直接の標的遺伝子 であるものがあり、特に Smad7 や SnoN に加え TMEPAI は TGF- β シグナルの直接の標的遺伝子 として有名であり、これらの分子は TGF- β シグナルのネガティブフィードバックに関与してい る。

本助成金を用いて、TGF-β シグナルを抑制する2つの分子(C18ORF1、TMED10)に関する研 究を行い、すでに雑誌に発表している⁵⁰。

本成果報告では、紙面の関係もあり、現在も研究を続けている私達が新たにクローニングした TMEPAI に類似した構造を持つ C180RF1 の TGF-β シグナル抑制機構について報告する。

2. 方法

(細胞培養) NMuMG、911、Hela 及び COS7 細胞は、DMEM/10% FCS で培養した。HePG2 細胞は、ピルビン酸を含む MEM/10% FCS で培養した。

(ルシフェラーゼ法)遺伝子導入1日前に、10万個のHepG2を12well プレートに播種し、次の日 polyethyleneimine (PEI)を用いて、遺伝子導入を行った。遺伝子導入24時間後に5ng/mLTGF-

βまたは、25 ng/mLBMP-6 で 18 時間刺激を行った。全ての実験において、pCH110 を用いた β ガ ラクトシダーゼを測定し、データを補正した。

(共免疫沈降実験) タンパク質間の結合を検討するために、前日に 50 万個の COS7 細胞を 6 cm ディシュに播種し、次の日 PEI を用いて細胞に遺伝子導入を行った。40時間後、1 x TNE buffer を 500 μL 加えて、氷上で 15~30 分間振盪した。遠心後、上清を新しい 1.5 mL チューブに移し た。その細胞溶解液のうち100 µL をさらに別のチューブに移し、2 x sample buffer を入れ、95℃ で10分加熱し、total lysateとした。残りの細胞溶解液には30 µLの50% Protein G Sepharose 4B Fast Flow を加え、4℃で 30 分間攪拌した。遠心により Protein G Sepharose を除いた後、上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、抗体を加えて 4℃ で 2 時間以上攪拌した。次に、30 µL の 50% Protein G Sepharose 4B Fast Flow を加え、4℃ で 30 分間攪拌した。遠心により Protein G Sepharose を回収し て1x TNE buffer で3回洗浄後、50 µLの2x sample buffer を入れ、95℃ で5 分加熱した。引き続 き、SDS-PAGE により試料を分画後、セミドライウエスタンブロット装置を用いて、ゲル上のタ ンパク質をニトロセルロース膜に転写した。転写後、1xTBSTで洗浄し、4%スキムミルク/TBST で30分間ブロッキングし、1次抗体と4℃一晩反応させた。翌日、1 x TBST で10分、3回洗浄 後、2 次抗体を加え 30 分間常温で反応させた (1 次抗体および 2 次抗体は 4%スキムミルク/1 x TBST で希釈して使用した)。反応後、1x TBST で5分、3回洗浄し、Western Blot Quant HPR Super Signal Substrate (TaKaRa 社)を基質として化学発光させ、LAS4000 (GE Healthcare 社)にて撮影し た。

(RT-PCR) High-Capacity RNA-to-cDNA kit(ライフテクノロジーズ社)を用いて、添付の記載 方法通りに1本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として Go Taq (プロメガ社)を用 いて PCR 法により各種遺伝子を増幅した。PCR に使用したプライマーは以下のとおりである。 マウス TMEPAI 5'- GTGATGATGGTGATGGTGGT-3'/3'-GGTGGTAGAGTGACAGACTA-5' マウ ス C18ORF1 5'-CGCGCAGATCCTTATCATTG-3'/3'-AGTAGGTCTCCCTAGGTAAG-5' マウス β-アクチン 5'-GCTCATAGCTCTTCTCCCAGGG-3'/3'-GTGCCAACCGGAATCCCAAGT-5'。

3. 結果

TMEPAI に類似した遺伝子を探索したところ、C180RF1を見出すことができた(図1)。C180RF1には、6種類の



アイソフォームが存在し、RT-PCR 法により、 C18ORF1a (C18ORF1a1 と C18ORF1a2)の発 現が高いことを見出した(図2)。TMEPAIは、 TGF-β によって誘導されたが、C18ORF1 は TGF-β によって誘導されなかった(図3)。実際 C18ORF1 が TMEPAI と同様に TGF-β シグナル を抑制することをルシフェラーゼ法により見

出した (図4) C18ORF1 による TGFβ シグナル抑制機構について検討した ところ C18ORF1 は TGF-β による Smad2 のリン酸化を抑制することを見 出した (図5)。実際、C18ORF1 は、 TGF-β シグナルに関与する R-Smad で ある Smad2 と Smad3 に結合するが、 BMP シグナルに関与する R-Smad であ

る Smad1 及び Smad5 に結合しなかった(図6)。 C18ORF1 内の Smad2 結合部位を検討したところ(図 7)、Smad interacting motif (SIM)領域に変異を入れた C18ORF1は、Smad2との結合活性を喪失し(図8)、 TGF-β シグナル抑制作用を示さなかった(図9)。興 味深いことに Smad2 を TGF-BI型受容体に提示する

SARA と C18ORF1 は Smad2 結 合に対して競合していることを 見出した(図10)。したがって、 C18ORF1は、SARAとSmad2結 合を競合することにより、TGFβ シグナルを抑制することがわ かった。



y (arbitrary units) 00 00

Luciferase activity

10

0









考察 4.

私達は、TMEPAI に相同性のある 分子である C18ORF1 を同定した。 C18ORF1 と TMEPAI は N 末端側 の細胞外領域は全く相同性を持た ないが、アミノ酸配列で膜貫通領 域は 75%、細胞内領域は 67%の相 同性を持った。C18ORF1はSIM領 域を持つことより、TMEPAI と同様





ルを細胞が受け取ったときに発現が誘導され、C18ORF1

協同して、TGF-βシグナルを抑制する。

C18ORF1α1/V5

Flag-Smad2

GFP

TGF-β シグナルに対するゲートキーパーとして作用すると考 えられる。一方、C18ORF1のみで抑えることができない過度 の TGF-β シグナルを細胞が受け取ると TMEPAI の発現が誘 導され、C18ORF1 と協同して TGF-β シグナルを抑制すると 考えられている(図11)。

5. 引用文献

- Derynck R and Miyazono K. in The TGF-\$ Family (Derynck, R. & Miyazono, K. eds), Cold 1. Spring Harbor Laboratory Press, New York. 29-43 (2008).
- Moses H L, and Roberts A B. in *The TGF-β Family (Derynck, R. & Miyazono, K. eds)*, Cold 2. Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1-28 (2008).
- 3. Bierie B and Moses H L. Tumour microenvironment: TGFB: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nature reviews. Cancer, 6, 506-520 (2006).
- 伊東進. がん増殖と悪性化の分子機構 (宮澤、伊東編)、化学同人. 27-41 (2012). 4.
- Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu, Y, Ikeno S, Togawa Y, 5. Vo Nguyen T T, Watanabe Y, Kato M, Itoh S. C18 ORF1, a novel negative regulator of transforming growth factor-β signaling. J. Biol. Chem., 289, 12680-12692 (2014).
- Nakano N, Tsuchiya Y, Kako K, Umezaki K, Sano K, Ikeno S, Otsuka E, Shigeta M, 6. Nakagawa, A, Sakata, N, Itoh F, Nakano Y, Iemura S, van Dinther M, Natsume T, ten Dijke, P, Itoh S. TMED10 protein interferes with transforming growth factor (TGF)-β signaling by

disrupting TGF-Breceptor complex formation. J. Biol. Chem., 292, 4099-4112(2017).

テーマ2

多重コバレント修飾を介した細胞内環境の統合的調節機構解明

水谷顕洋(薬物治療学研究室)

【要約】

IRBIT は、Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R)の結合蛋白質として発見されたが、その後、NBCe1、NHE3、Fip1R、PIPK1 a 等、細胞内の種々の機能分子に結合し、それらの機能を調節することが明らかになってきた。興味深いことに、IRBIT とこれら標的分子との結合は、いずれも IRBIT のリン酸化依存的であり、特に、Ser68 を Ala に置換した IRBIT はリン酸化レベルが低下すると同時に、標的分子との結合が消失することから、この Ser68 が primary and priming リン酸化部位であることが判明している。しかしながら、IRBIT には、Ser68 以外の複数のリン酸化部位が、N 末部分、特に Ser68 周囲に集中して存在しており、これら複数のリン酸化が引き起こされる細胞内環境と、複数のリン酸化が標的分子との物理的かつ機能的相互作用に及ぼす影響については明らかでない。

本研究では、IRBIT の N 末部分の複数あるリン酸化を引き起こす細胞内環境はどういうもの なのか?そして、そのリン酸化パターンが、細胞内環境の変化を反映するとすれば、個々のパタ ーンによって標的分子との親和性が変化するのか?、を明らかにしようとした。その結果、IRBIT のリン酸化部位は大きく3群に分類される、即ち、Ser62, Ser64, Ser66 のリン酸化 (group1)、 Ser68, Ser71, Ser74, Ser77 (group2)、Thr80, Ser82, Ser85 (group3) である。in vitro リン酸 化実験と Phos-tag SDS-PAGE による解析から、group1 のリン酸化は、主に AGC kinse によっ て、group2 は、Ser68 を CaMK グループのリン酸化が行い、それに引き続いて Ser71, Ser74, Ser77 は CK1 によって、そして、group3 は、CK2 によって、それぞれリン酸化されることが判 明した。また、group2 のリン酸化は、リン酸化依存的な結合を示す標的分子いずれとの結合に も必須であること、group3 のリン酸化は、NBCe1 との結合に必須であるものの、IP3R との結 合には不要であること、group1 のリン酸化は、IP3R との結合親和性を高めることが、それぞれ 判明した。また、細胞内の HCO₃イオンが増加するような環境では、group1 のリン酸化が亢進 することも判明した

以上のことから、IRBIT は細胞内の環境変化を、N 末のリン酸化パターンに"翻訳"し、その リン酸化パターンに応じて標的分子の活性を調節しうることが示された。中でも、細胞内 HCO₃ イオン濃度の変動によって、IP3R との親和性を決定する group1 のリン酸化が増減することから、 細胞内 HCO3 濃度と細胞内 Ca2+イオン濃度の調節は、IRBIT を介した標的分子の連関的相互作 用によりなされている可能性が示された。

1. 背景・目的

細胞は、細胞内外の種々の環境変化に対し、様々なセンサー分子とシグナル経路を配備し、刻々 と変化する環境変化に対応している。しかしながら、このセンサー・シグナル系が個々に独立し て働いているだけでは、1個の細胞としての"調和"的な反応ができるとは限らず、また"不経 済"であり、各センサー・シグナル系を統合するメカニズムの存在が望ましい。シグナル系間の Cross Talk はその一つで、個々のセンサー・シグナル系を縦糸とすると、それらを橋渡しする横 糸に相当し、各シグナル系を結びつける。しかしながら、Cross Talk は、結局、シグナルを単に 拡散、あるいは、収束させることで、細胞の反応多様性を産んだり、反応強度を増加させたりに 寄与するだけの場合が多い。

IRBIT は、リン酸化依存的に IP₃R に結合し、IP₃R の IP₃感受性を低下させることで、細胞内 の Ca²⁺ シグナルを負に制御する分子として発見されたが、NBCe1 にもリン酸化依存的に結合し、 NBCe1 の Na⁺/ HCO₃⁻共輸送活性を亢進せる¹⁾。これ以外にも IRBIT には多くの結合分子にリン 酸化依存的に結合し、それらの活性を調節しうることが判明している²⁾。各標的との相互作用に は、いずれも IRBIT の N 末領域に存在する Ser/Thr に富む領域(43 アミノ酸残基中、Ser:13、 Thr:5。Ser/Thr rich region=STRR) 内の、Ser68, Ser71, Ser74, Ser77 のリン酸化が必須である。 しかしながら、STRR の他の残基のリン酸化が、各標的分子との相互作用に及ぼす影響は不明で ある。

こうした状況から、我々は、Ser68, Ser71, Ser74, Ser77 を含めた複数の残基のリン酸化によって生じるリン酸化パターンが、個々の標的分子との特異的な相互作用を生み出す"コード"として機能する可能性、そして、こうした STRR での多彩なリン酸化パターンは種々の細胞内環境を反映し、そのパターンにより、IRBIT が種々の標的分子活性を統合的に調節しうる分子である可能性を考えるに至った。これらの可能性を探求することを目的とし、1) IRBIT が取りうるリン酸化パターンにはどういうものが存在するのか? 2) それぞれのリン酸化パターン毎に標的分子への親和性は異なるのか? 3) これらリン酸化パターンの形成に関わるリン酸化酵素/脱リン酸化酵素は何のか? を明らかにすることを試みた。

2. 方法

1) IRBIT が取りうるリン酸化パターンについては、細胞を種々の刺激で処理した後、各リン酸 化残基特異的リン酸化抗体による western blotting と、Phos-tag PAGE とによって解析した。

2) リン酸化 IRBIT と標的分子との親和性については、IRBIT と各標的分子とを一過性に発現 させた細胞を種々の刺激処理した後の共免疫沈降実験、あるいは、GST-fusion たんぱく質によ る pull-down 実験にて解析した。また、大腸菌に発現させた IRBIT を、精製タンパク質リン酸 化酵素を用いた in vitro リン酸化反応によってリン酸化させたものを材料とした pull-down 実験 にても解析した。

3) リン酸化/脱リン酸化酵素の同定は、精製酵素を用いた in vitro リン酸化/脱リン酸化反応により解析した。



Fig.1: 高浸透圧処理によって誘導される IRBIT のリン酸化には3段階あり、それぞれ標的分子との親和性が異なる。

3. 結果

Phos-tag PAGE を用いたリン酸化 IRBIT の解析により、IRBIT は、大きく3つのリン酸化 パターンを示すことが判明した。これがもっとも顕著に現れるのが、高浸透圧刺激に曝した細胞 においてである。に示したように、IRBIT は、高浸透圧刺激の時間とともにリン酸化が亢進して いくが、それには3段階のリン酸化が存在した³。また、興味深いことに、IP₃R と高い親和性を 示す IRBIT は、高浸透圧刺激後20分間から現れる第3段階のリン酸化form であるのに対し、 NBCe1 に対しては、第2段階のリン酸化form であれば、すでに高親和性を示すことが判明した。

これらのリン酸化フォームを担うリン酸化酵素、及びそのリン酸化部位を明らかにすべく、in vitro リン酸化反応を行ったところ、第2段階のリン酸化 form には、CaMK group +CK1 によるリン酸化が、第3段階のリン酸化 form には、CaMK group+CK1 によるリン酸化に加えて、AGC kinases によるリン酸化が、それぞれ関与していることが判明した。また、IRBIT は、CK2の良い基質となるが、CK2 でリン酸化されても、第1段階のリン酸化 form にとどまることが判明した。(Fig.2)



Fig.2: 高浸透圧処理で生じる3段階のIRBITリン酸化のinvitroリン酸化で再現。

in vitro リン酸化結合実験の結果から、AGC kinases によるリン酸化は、Ser62, Ser64, Ser66 (group1)、CaMK group + CK1 によるリン酸化は、Ser68, Ser71, Ser74, Ser77 (group2)、 CK2 によるリン酸化は、Thr80, Ser82, Ser85 (group3) であることが判明した。そして、この CK2 によるリン酸化は、IP₃R との結合には必須ではないが、NBCe1 との結合には、必須であ ることが判明した。これらの結果をまとめると、Fig.3 のようになる。



Fig.3: STR 内の IRBIT リン酸化部位の特性

最後に、マウス小脳での IRBIT のリン酸化 form を Phos-tag PAGE で解析したところ、WT のマウスでは、第2段階のリン酸化 form が主であったのに対して、NBCe1 KO マウスでは、第3段階のリン酸化 form が主となっていた。このことは、NBCe1 活性が消失すると、細胞内の HCO3 濃度が増加し、soluble adenylate cyclase の活性化、あるいは、脱リン酸化酵素の不活化、などによって IRBIT が IP₃R 高親和性となり、Ca²⁺動態を負に調節しうる可能性を示唆している。

4. 考察

本研究によって、少なくとも、IP₃R と NBCe1 とを標的分子として考えた場合、それぞれの標 的分子が必要とする IRBIT のリン酸化パターンが異なることが判明した。また、マウス小脳で の IRBIT のリン酸化 form 解析から、IRBIT の第3段階のリン酸化 form は、細胞内の HCO₃ 濃 度の増化に伴い出現し、それにより、IP₃R が阻害される可能性が示唆された。すなわち、細胞内 HCO₃ 濃度と細胞内 Ca2+濃度を IRBIT が統合的に調節している可能性である。現時点では、ま だ IRBIT のリン酸化フォームを Phos-tag PAGE によって分類したのみであり、また、標的分子 との結合も、in vitro 結合実験にて確認しただけである。今後は、生理的な局面で、実際、IRIBT が細胞内 HCO₃ と Ca²⁺とを統合的に調節している現場を捉えていく必要がある。

5. 引用文献

- Park S, Shcheynikov N, Hong JH, Zheng C, Suh SH, Kawaai K, Ando H, Mizutani A, Abe T, Kiyonari H, Seki G, Yule D, Mikoshiba K, Muallem S. IRBIT mediates synergy between Ca2+ and cAMP signaling pathways during epithelial transport in mice. *Gastroenterology*, **145**, 232-241 (2013).
- Kawaai K, <u>Mizutani A</u>, Shoji H, Ogawa N, Ebisui E, Kuroda Y, Wakana S, Miyakawa T, Hisatsune C, Mikoshiba K. IRBIT regulates CaMKIIα activity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **112**, 5515-5520 (2015).
- Kawaai K, Ando H, Satoh N, Yamada H, Ogawa N, Hirose M, <u>Mizutani A</u>, Bonneau B, Seki G, Mikoshiba K. Splicing variation of Long-IRBIT determines the target selectivity of IRBIT family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **114**, 3921-392 (2017).

テーマ2

【要約】

カルシウム信号系のコバレント修飾応答性

渡邊泰男(薬理学研究室)

細胞内カルシウム信号系は、カルシウム受容タンパク質を介して様々な細胞機能調節 に関わっている。一方、タンパク質の構成アミノ酸の特定のシステインチオール基 (Cys-SH)がコバレント修飾(S-ニトロシル化、S-グルタチオン化)されて、そのタン パク質機能制御に関わっていることが知られている。本研究では、カルシウムイオンに よって調節される機能タンパク質が、本来のカルシウム信号系に加えて、活性酸素種 (ROS)、一酸化窒素(NO)、活性イオウ分子(RSS)によってもコントロールされて いることを発見した。

1. 背景・目的

背景: カルシウム/カルモデュリン(Ca²⁺/CaM)によって活性化されるリン酸化酵素、 CaM キナーゼ群は、やはり、Ca²⁺/CaM 信号系によって合成される一酸化窒素(NO)と ともに細胞機能に関わる機能分子である。一方、従来「毒物」とされた活性酸素種(ROS) や一酸化窒素(NO)は、直接、間接的に酸化還元(レドックス)シグナル分子として 機能している。私共はこれまで、NOとキナーゼ信号系を、細胞内情報ネットワークで 理解してきた。そして、CaM キナーゼ群の NO シグナルによるレドックス制御を見い だした¹⁻⁵⁾。また、近年、生体内に豊富に存在する活性イオウ分子種(RSS)がやはりレ ドックス制御因子として注目を浴びている。

目的:これまでの私共の知見を生かして、カルシウム信号系のコバレント修飾応答性について RSS の関与も含めて解明することを目的とした。具体的には、1) NO 信号系による細胞内信号系の調節機能解析 2) RSS の産生とその生理機能の解析 とした。

2. 方法

- 1) NO 信号系による細胞内信号系の調節機能解析
 - 培養細胞を用いた NO 信号系作動によるカルシウム信号系調節の解析
 - ・ 脳梗塞、くも膜下出血モデル作成によるカルシウム信号系の解析
 - ・ コバレント修飾非感受性変異体の作成によるカルシウム信号系の解析
- 2) RSS の産生とその生理機能の解析
 - ・ 組み替え酵素を用いた RSS 産生酵素発現系の確立
 - ・ 培養細胞を用いた RSS 信号系作動によるカルシウム信号系調節の解析
 - ・ 培養細胞を用いた RSS 信号系作動による外因性親電子信号系調節の解析

3. 結果 (図)

- 1) NO 信号系による細胞内信号系の調節機能解析
 - ・ 細胞の生存・増殖を制御する ERK (extracellular signal-regulated kinase) の下流で
働く p90 リボゾーマル S6 キナーゼ 1 (RSK-1) が、NO 信号系によって部位特異 的コバレント修飾によって制御されていることを細胞レベルで明らかにした⁶⁾。

- ニコチンは喫煙の生理薬理の主要な活性物質で、ニコチン性アセチルコリン受容体の刺激を介して細胞にカルシウムを流入させる。NO合成酵素を介した NO 産生によるコバレント修飾が、このカルシウム流入作用を増強することを発見した⁷⁾。
- ニコチン信号系による NO 合成酵素のコバレント(リン酸化)修飾が神経細胞 保護的に作用することを見いだした⁸⁾。
- ・ くも膜下出血による頭蓋内圧亢進により海馬 CA1 領域において NO 合成酵素の 部位特異的リン酸化(Ser847)が生じる。同部位リン酸化は NO 産生阻害につな がるので、このことが、同部位の神経保護作用に関与することを示唆した⁹。
- くも膜下出血による頭蓋内圧亢進により海馬 DG(歯状回)領域において NO 合成酵素の部位特異的リン酸化(Ser1412)が生じる。同部位リン酸化は NO 産生増強につながるので、このことが、くも膜下出血後の認識機能低下に関与することを示唆した¹⁰⁾。
- ・一過性脳虚血によって海馬 DG(歯状回)領域において NO 合成酵素の部位特異 的リン酸化(Ser1412)が生じる。同部位リン酸化は NO 産生増強につながるの で、このことが、くも膜下出血後のうつ病態に関与することを示唆した¹¹⁾。
- NO 合成酵素の ROS 産生能が下流のレドックス信号系を制御していることを細胞レベルで見いだした¹²⁾。
- 2) RSS の産生とその生理機能の解析
 - RSS は、マウスを用いた解析から脳、心臓、肝臓などあらゆる臓器に存在し、 また正常のヒト血液中にも豊富に存在することを見いだした。チオール基側鎖 のイオウ付加はシステインのみならずグルタチオンやタンパク質にも起こるこ とを発見した¹³⁾。
 - アセトアミノフェン代謝物による有毒性親電子物質を RSS が解毒する機構を見いだした¹⁴⁾。
 - ・ 外因性親電子物質による遺伝子の転写翻訳機能が RSS によって阻害される機構 を見いだした¹⁵⁾。
 - 硫化水素産生酵素である 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST)の阻害剤の 創製を行なった¹⁶。
 - 核内に局在する CaMKIV の RSS による部位特異的 S-ポリスルフィド化修飾によって、下流の遺伝子転写活性が抑制されていることを見いだした。さらに、これらの現象が小胞体ストレス時に作動していることを示唆した。つまり、小胞体ストレス時の新規応答システムの1つとして、RSS を介した新規 CaMKIV 活

性阻害による遺伝子転写活性抑制があるのかもしれない¹⁷⁾。

RSS は、システインを基質として、タンパク質翻訳時にシステイニル tRNA 合成酵素が産生し、呼吸鎖を介してミトコンドリア呼吸に関わることを見いだした¹⁸⁾。



4. 考察

RSS が生成されること自体は 30 年以上前に報告されていた。つまり、RSS は最 新の質量分析定量法によって生体内で改めて再発見されたものである¹³)。さらに、 その生物活性として全身で抗酸化力を発揮し、ミトコンドリア呼吸に関わることが 明らかになった¹⁸)。NO や ROS に加えてこの RSS はレドックス制御因子として注目 を浴びている。それらの因子の相互作用解析によって、各レドックス疾患に特化し た情報ネットワークが明らかにされつつある。NO/ROS 代謝物であるパーオキシ ナイトライト (ONOO') や NO/RSS によるニトロソパースルフィド(SSNO-)¹⁹ や ROS/RSS によるパーチオスルフェン酸 (-SSOH)²⁰の直接・間接的な機能解析 は、それぞれの分子の細胞内局在化とあわせて理解されるべきであろう。興味深い ことに、栄養飢餓による細胞ならびに個体長寿には、RSS 産生に関わる酵素による ミトコンドリア呼吸鎖の関与が必要条件であるとされるので²¹⁻²²、RSS 代謝による レドックス制御研究が、長寿や老化防止の予防や治療薬開発に寄与することが期待 できると同時に、NO や ROS シグナルが関与する可能性がある。

5. 引用文献

1. Song T, et al. Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein

kinase II. Biochem J, 412(2), 223-31 (2008).

- 2. Kambe T, et al. Inactivation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase I by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. *FEBS Lett*, **584(11)**, 2478-84(2010).
- 3. Miyamoto Y, et al. Nitric oxide promotes nicotine-triggered ERK signaling via redox reactions in PC12 cells. *Nitric Oxide*, **25**(3), 344-9 (2011).
- 4. Takata T, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide. *Nitric Oxide*, **25**(2), 145-52 (2011).
- Butturini E, et al. Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation. *PLoS One*, 6(5), e20174 (2011).
- Takata T, Tsuchiya Y, and Watanabe Y. 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 is inhibited by S-glutathionylation of its active-site cysteine residue during oxidative stress. *FEBS Lett*, 587(11), 1681-6 (2013).
- Kajiwara A, et al. Nitric oxide enhances increase in cytosolic Ca(2+) and promotes nicotine-triggered MAPK pathway in PC12 cells. *Nitric Oxide*, 34, 3-9 (2013).
- 8. Kasamatsu S, et al. Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser847 in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem J*, **459**(**2**), 251-63 (2014).
- Makino K, et al. Increased ICP promotes CaMKII-mediated phosphorylation of neuronal NOS at Ser(8)(4)(7) in the hippocampus immediately after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*, 1616, 19-25 (2015).
- 10. Wada K, et al. Subarachnoid hemorrhage induces neuronal nitric oxide synthase phosphorylation at Ser(1412) in the dentate gyrus of the rat brain. *Nitric Oxide*, (2017).
- 11. Osuka K, et al. Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser1412 in the dentate gyrus of rat brain after transient forebrain ischemia. *Neurochem Int*, **63(4)**, 269-74 (2013).
- 12. Ihara H, et al. Superoxide generation from nNOS splice variants and its potential involvement in redox signal regulation. *Biochem J*, **474(7)**, 1149-1162 (2017).
- 13. Ida, T, et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111(21)**, 7606-11 (2014).
- Abiko Y, et al. Formation of sulfur adducts of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: participation of reactive persulfides. *Chem Res Toxicol*, 28(9) 1796-802 (2015).
- 15. Abiko Y, et al. 1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides. *Free Radic Biol Med*, **104**, 118-128 (2017).
- 16. Hanaoka K, et al. Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H2S-producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting

Active-site Cysteine Persulfide. Sci Rep, 7, 40227 (2017).

- Takata T, et al. Reactive sulfur species inactivate Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV via S-polysulfidation of its active-site cysteine residue. *Biochem J*, 474(15), 2547-2562 (2017).
- 18. Akaike T, et al. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun*, **8**(1), 1177 (2017).
- Cortese-Krott M M, et al. Key bioactive reaction products of the NO/H2S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112(34**): 4651-60 (2015).
- 20. Heppner D E, et al. Cysteine perthiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol-based redox signaling? *Redox Biol*, **14**, 379-385 (2018).
- 21. Hine C, et al. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell*, **160(1-2)**, 132-44 (2015).
- 22. Hine C, et al. Hypothalamic-Pituitary Axis Regulates Hydrogen Sulfide Production. *Cell Metab*, **25(6)**, 1320-1333.e5 (2017).

テーマ3

金属コバレント修飾の生物学的及び毒性学的意義の解明

小椋康光(衛生化学研究室、現千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学研究室)

【要約】

フッ素や塩素などの17族の元素がハロゲン (halogen) と総称されるように、16族元素の酸素、 硫黄 (S)、セレン (Se) やテルル (Te) などはカルコゲン (chalcogen) と総称される。カルコゲ ンは、他の元素には無いユニークな物理化学的性質を有するため、産業的に有用な元素でもある。 特に Se や Te は典型元素としての性質と金属元素の性質を併有する、いわゆる類金属(半金属) として広く産業利用されている。生物においても、ユニークな代謝経路を経るものと想定されて いる。S は動物及び植物にとって必須元素であるが、Se は動物のみに必須であり、植物にとって は有用であると考えられているものの必須性は認められていない。 また Te は動物にとっても植 物にとっても必須性は認められていない。我々の研究グループでは、SeやTeのメタボローム解 析から、Se や Te の代謝経路の全容を明らかにし、進化の過程で生物はいかに必須元素を取捨選 択するのか、環境の変化が必須元素の進化に影響を与え得るのか、といった疑問に解答を得るこ とを目指している。本研究では、主として以下の成果を得ることができた。すなわち、1) Se は 動物にとって必須であるものの、毒性の高い元素として知られている。培養細胞内における Se の新規代謝物を同定し、その生成機構と生物学的及び毒性学的意義を示唆する成果を得た。2) Te はハイテク材料として我々の身の周りに存在するレアメタルの一種である。また先の東日本大 震災に伴う福島第一原子力発電所において、大量の放射性物質が放出されるという事故が発生し た。放出された核種の中には Te が含まれており、およそ 100 京ベクレルをも放出されたと見積 もられている。これら放射性 Te は半減期が比較的短いとはいえ、放出量も多く、環境中での拡 散と生態系における影響が懸念された。環境からの Te のリスク評価には、直接的な曝露に加え て、食物を介した間接的な曝露も考えられることから、植物における Te 代謝を検討したところ、 高等植物中で新規の Te 代謝物を見出した。

1. 背景・目的

Se は動物にとって必須元素であり、Se タンパク質として利用されるが、摂取から利用、排泄 に至る過程で様々な代謝物に変化することが知られている。一方、Se は植物にとっては非必須元 素であるが、ある種の植物では Se を毒性の低い化学形へ代謝し、高濃度に蓄積することが知ら れている。さらに、既知の Se 代謝物に加えて、未だ同定されていない未知の Se 代謝物が、動植物あるいは微生物に存在していると推定されている。これら未知の Se 代謝物の同定を果たすことにより、生物における Se 代謝や環境における Se 循環の全容を知ることができる。

2011年に発生した東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所の事故により、大気中に大量の放 射性物質が放出された。放出された核種の中には、Te という元素が含まれており、^{127m}Te(半減 期 109 日)、^{129m}Te(半減期 33.6 日)、^{131m}Te(半減期 30 時間)、¹³²Te(半減期 3.204 日)といった 核種が合計でおよそ100京ベクレル(~10¹⁸ Bq)にも達する量が放出されたと見積もられている。 しかし、セシウム (Cs) やヨウ素 (I) に比べて、放射性核種としての Te の生体あるいは環境へ の影響はあまり知られていない。生体に取り込まれた放射性のTeについて考え得る影響として、 ①Te という元素が持つそのものの毒性、②¹²⁷Te や^{129m}Te といった比較的長寿命の核種が示す放 射線の影響、③また短寿命核種であっても¹³²TeのようにIへと壊変し、放射性のIとして起し得 る傷害といった複合的な影響が懸念される。実際に¹³²Teとその放射平衡にある娘核種の¹³²I両核 種は初期被ばくに最も寄与する核種と言われている。 ①や③については Te の動物体内での代謝・ 動態を、②については食物を介した曝露が想定されるため、動物のみならず植物体内における Te の代謝・動態を明らかにすることによって、放射性 Te の生体影響を解き明かす糸口を見いだせ ると考えられるが、未だ十分な研究成果の蓄積はなされていない。Se は硫黄や Te と同族の第16 族元素であり、その代謝過程において、Seと炭素の共有結合を有したいわゆる有機金属代謝物を 生成することが特徴として挙げられる。そのため、代謝物の同定がすなわち代謝経路の解明に繋 がる。

本研究では、動植物における Se と Te の代謝物の同定から、それぞれの元素の未だ未解明な代 謝機構を解明することを目的とした。

2. 方法

化学形態に応じた Se 代謝物の分析は、HPLC と誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を 組み合わせた分析法(LC-ICP-MS)が感度やマトリクス耐性などの観点から、最も利用されてい る。しかし、既知の Se 代謝物の分析については LC-ICP-MS は優れているものの、未知の Se 代 謝物の同定には限界がある。そこで、ESI をイオン源とした LC-ESI-MS-MS の利用が考えられる が、ICP-MS に比べ、ESI 質量分析法は感度において劣り、予期した通りの解析ができないことが 多い。そこで LC-ICP-MS と LC-ESI-MS-MS を相補的に利用し、未知の Se や Te の代謝物の同定 を行うこととした。

3. 結果及び考察

本研究で得られた成果として、培養細胞中に過剰に存在する Se は、細胞内でセレノシアン酸 イオン (SeCN) に変換されていることが明らかとなった¹⁾。これは細胞内で非常に毒性の高い亜 セレン酸イオンを、細胞内で何らかの経路により生成した内在性のシアン化物イオンが反応し、 亜セレン酸やシアン化物よりも毒性の低い、セレノシアン酸へ変換されることを示している。ま さに毒をもって毒を制するという機構であるが、内在性のシアン化物イオンが今後どのように生 成しているのか明らかにする必要がある。今回得られた知見を含めて、Fig. 1 のような代謝マッ プを提唱した²⁾。

Te については、硫黄や Se の代謝能力の高い植物では、新規に3 つの代謝物が生成することを 見出し、そのうちの2 つの同定に成功した³。そのうちの1 つは Te を含みアミノ酸であり、Te 含有アミノ酸が高等生物で生合成されるというユニークな知見を提供することができた。今回得 られた知見を含めて、Fig.2 のような代謝マップを提唱した⁴。

4. 引用文献

- Anan Y, Kimura M, Hayashi M, Koike R, and Ogra Y. Detoxification of selenite to form selenocyanate in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1803–1814 (2015)
- Ogra Y. Speciation and identification of chalcogen-containing metabolites. In: *Metallomics Recent* Analytical Techniques and Applications -, Y. Ogra and T. Hirata (eds.), Springer, Tokyo, 43-61 (2017)
- Anan Y, Yoshida M, Hasegawa S, Katai R, Tokumoto M, Ouerdane L, Łobiński R, and Ogra Y. Speciation and identification of tellurium-containing metabolites in garlic, *Allium sativum. Metallomics* 5, 1215-1224 (2013).
- Ogra Y. Biology and toxicology of tellurium explored by speciation analysis. *Metallomics*, 9, 435-441 (2017).



Fig. 1.



テーマ3

感染症の原因菌の同定と保有する耐性因子を迅速に診断するための PCR と ESI-MS を 組み合わせた検出法に関する研究

濵本知之(応用薬物治療部門)

【要約】

感染症の原因菌を迅速に同定し、早期に適切な抗菌薬治療を開始することが望まれている。そこで、菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子の可変領域を挟む保存領域に対するプライマーによる PCR 産物を、ESI-MS に導入することで分子量を測定する方法である PCR/ESI-MS 法の検討を行った。供試菌株の PCR 産物の分子量を得るためには、測定条件のさらなる検討が必要である。

1. 背景·目的

当初のテーマは「プロテオミクス解析と PK-PD 解析を組み合わせた効果的な抗菌薬療法の確立」 であったが、再検討した結果、感染による宿主側の血中タンパク質の変化をプロテオミクス解析 で捉えることは一般細菌については難しいと判断した。そこで、表題のテーマに変更した。

感染症に対して適切な抗菌薬治療を行うためには、原因菌の同定と薬剤感受性検査が重要とな る。しかし、臨床現場ではそれらの結果が判明するのに数日を要するため、検査結果が判明する 前に経験的治療(Empiric therapy)が行われている¹²⁾。その治療の間には、想定される原因菌を 幅広くカバーするために広域スペクトルの抗菌薬や併用療法が行われる場合が多く²⁾、個々の感 染症に適切な狭域スペクトルの抗菌薬が選択されることが少ない。そのため、耐性菌の菌交代、 耐性化の誘導、副作用発生のリスクや医療費の増大というさまざまなデメリットを生じる²⁾。し たがって、感染症の原因菌を迅速に同定し、早期に適切な抗菌薬治療を開始することが望まれて いる。

原因菌の迅速な同定の手段として、最近、質量分析法(MS)が注目されている。ソフトイオ ン化技術であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)およびエレクトロスプレーイ オン化(ESI)の開発により、中~高分子量の熱不安定性化合物から、気相イオンを発生させる ことが可能となった³⁾。MALDI飛行時間型 MS を用いる方法(MALDI-TOF MS)は、菌体とマ トリックスを混合してレーザー光を照射することでイオン化して質量を測定する方法であり、菌 種によってマススペクトルのパターンが異なることから同定を行うものである⁴⁾。それに対し、 ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)と ESI-MS を組み合わせた方法(PCR/ESI-MS)は、菌の 16S リ ボソーム RNA(16S rRNA)遺伝子の可変領域を挟む保存領域に対するプライマーを用いて PCR で増幅させ、得られた PCR 産物を ESI-MS に導入することで、生成された多価イオンをデコン ボリューション法という計算手法を用いて、分子量を算出する方法である。そして、得られた分 子量をデータベースと比較することで、菌種の同定を行う。

MALDI-TOF MS は、一般的に前培養が必要である⁴のに対し、PCR/ESI-MS は、血液培養液⁵、 関節液⁶、気管支肺胞洗浄液⁷、鼻咽頭吸引液⁸など種々の臨床検体から直接測定でき、原因菌の 同定と同時にそれらが保有する薬剤耐性因子を測定できる。さらに、抗菌薬治療後の検体からの 病原体の検出も可能である⁹など利点が大きい。

そこで、本研究においては、本プロジェクトで新たに購入した ESI-MS である四重極型一飛行時間型ハイブリッド質量分析装置(Agilent G6550A Q-TOF LC/MS)を用いて PCR/ESI-MS による 原因菌の迅速な同定法について検討することとした。

2. 方法

2-1. 用いた材料

- ①供試菌株: Pseudomonas aeruginosa ATCC 17853、Staphylococcus aureus ATCC 25923、Escherichia coli ATCC 25922
- ②16SrRNA 遺伝子の保存領域に対する PCR プライマー: 文献¹⁰に従い、以下を用いた。

Fw. GGATTAGAGACCCTGGTAGTCC、 Rv. GGCCGTACTCCCCAGGCG

- ③1 本鎖 DNA 20 mer 合成品: poly A (Mw. 6202)、Poly T (Mw: 6022)、Poly G (Mw: 6522)、Poly C (Mw: 5722)
- ④1本鎖 DNA 60 mer および2本鎖 DNA 60 bp 合成品: *E. coli* AB035921_1の PCR 産物(113 bp)の約半分の塩基配列数の1本鎖5'-GGA TTA GAG ACC CTG GTA GTC CAC GCC GTA AAC GAT GTC GAC GGC CGT ACT CCC CAG GCG-3'(Mw: 18472)と、その相補鎖5'-CGC CTG GGG AGT ACG GCC GTC GAC ATC GTT TAC GGC GTG GAC TAC CAG GGT CTC TAA TCC-3'(Mw: 18485)、および両鎖を2本鎖処理したもの
- (⑤)1 本鎖 DNA 113 mer および2 本鎖 DNA 113 bp 合成品: *E. coli* AB035921_1 の PCR 産物と同じ配列の1本鎖5'-GGA TTA GAG ACC CTG GTA GTC CAC GCC GTA AAC GAT GTC GAC TTG GAG GTT GTG CCC TTG AGG CGT GGC TTC CGG AGC TAA CGC GTT AAG TCG ACG GCC GTA CTC CCC AGG CG-3'(Mw. 34962)と、その相補鎖5'-CGC CTG GGG AGT ACG GCC GTC GAC TTA ACG CGT TAG CTC CGG AAG CCA CGC CTC AAG GGC ACA ACC TCC AAG TCG ACA TCG TTT ACG GCG TGG ACT ACC AGG GTC TCT AAT CC-3'(Mw. 347489)、および両鎖を2本鎖処理したもの

<u>2-2.</u>供試菌株の PCR

培養後、ボイル法によって DNA を抽出した。その後、2-1.②のプライマーを用いて PCR を行い〔前加温 94℃ 5 分、(熱変性 94℃ 30 秒、アニーリング 55℃ 30 秒、伸長反応 72℃ 10 秒) ×30 サイクル、72℃ 7 分、その後 4℃〕、得られた PCR 産物を精製して MS の測定検体とした。

<u>2-3.MSによる測定</u>

ESI-MS 装置として Agilent G6550A Q-TOF LC/MS (アジレント・テクノロジー)を使用した。 MS の測定条件を表 1 に示す。移動相には酢酸アンモニウム (AMAc; 特級)、アセトニトリル (ACN; LC/MS 用)、メタノール (MeOH; LC/MS 用)、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノー ル (HFIP; LC/MS 用)、水酸化アンモニウム (特級)、ピペリジン (特級)、イミダゾール (バッ

表1 MSの測定条件

①Ionization: ESI-Negative
②Dry Gas: 12 L/min at 280°C
③Capillary Voltage: 3500 V
④Sheath Gas: 12 L/min at 350°C
⑤Nozzle Voltage (NV): 0、500、1500、2000 V
⑥MS Range: 200~3200 m/z 又は100~10000 m/z
⑦試料導入法: Flow Injection (10 µ L/回)
⑧Flow Rate: 0.2 mL/min

ファー用)、トリエチルアミン(TEA;特級)を使用した。

2-5.分子量データベースの作成

EZ BioCloud (https://ezbiocloud.net/)から、16SrRNA 遺伝子をもつ菌の菌コード、菌名、全塩基 配列情報をダウンロードし、Microsoft Excel[®]を用いて 2-1.②の両プライマーとその間に挟まれる 部分の塩基配列を抽出し、合計の分子量を計算してデータベースを作成した。

3. 結果

<u>3-1.1本鎖 DNA 20 mer の測定</u>

供試菌株の PCR 産物を、移動相を5 および 10 mM AMAc: ACN (1:1) として測定したとこ ろ、マススペクトル上、明確な多価イオンのピークは確認されなかったことから、まず1 本鎖 DNA 20 mer を既知の濃度 (10、1、0.1 pmol/ μ L) で測定することとした。その結果、poly A、 poly T、 poly C で多価イオンが検出され、 poly T (10 pmol/ μ L) ではデコンボリューションの結果、 分子量が得られた。次に、供試菌株の PCR 産物を、移動相 10 mM AMAc: ACN (1:1) にて、 MS の Nozzle Voltage (NV) を上げることでイオン化の促進を期待して 0、500、1500、2000 V と して測定したが、NV を上げても多価イオンは検出されなかった。そこで、供試菌株の PCR 産物 の約半分の塩基配列数の DNA 合成品を用いて以後の測定条件の検討を行うこととした。

<u>3-2.1 本鎖 DNA 60 mer とその相補鎖、それらの混合物(60 mer mix)、2 本鎖 DNA 60 bp の測定</u> ①移動相 10 mM AMAc: ACN(1:1)

60 mer mix を測定した結果、10 pmol/µL 、NV 1500 V においてのみ多価イオンが検出されたが、デコンボリューションで正確な分子量は得られなかった。

②移動相 100 mM AMAc: MeOH (1:1)

60 mer mix を測定した結果、1、10 pmol/ µL、 NV0~1500 V (2000 V は試料不足のため不正

確)において、多価イオンは検出されたが、イオン強度は非常に低かった。 ③移動相へのHFIPの添加

プロトンの脱離を促すことでイオン強度の改善を期待して添加し、移動相を 100 mM AMAc: MeOH+200 mM HFIP (1:1)、200 mM AMAc: MeOH+200 mM HFIP (1:1)、40 mM AMAc: MeOH+200 mM HFIP (1:1)、100 mM AMAc: MeOH+400 mM HFIP (1:1) とした。2 本鎖 DNA 60 bp を測定した結果、いずれの移動相においても多価イオンらしきピークは検出されたが、分 子量は得られなかった。

④移動相: 1 M NH_4 OH: 50% MeOH (50 mM piperidine、50 mM imidazole) (1:1)¹¹⁾

まず、2本鎖 DNA 60 bp の測定を行ったところ、多価イオンが検出され、1本鎖 DNA 60 mer の分子量と同じ 18472 のピークが最も高く、次いで 18494 付近のピークが高く、相補鎖の分子量 18485 のピークは低かった。そこで、1本鎖 DNA 60 mer と相補鎖をそれぞれ測定したところ、1 本鎖 DNA 60 mer では 18472 が最も高いピークとして得られたが、相補鎖では 18507 付近のピー クが最も高く 18485 は次いで高いという結果であった。次に、60 mer mix を測定したところ、18472 と 18485 付近が 2 大ピークとして含む結果が得られた。

⑤移動相:1MNH4 OH:70% MeOH (50 mM piperidine、50 mM imidazole) (1:1)¹²⁾

まず、2本鎖 DNA 60 bp の測定を行ったところ、多価イオンが検出され、1本鎖 DNA 60 mer の分子量と同じ 18472 のピークが最も高く、次いで 18494 付近のピークが高く、相補鎖の分子量 18485 のピークは低かった。そこで、60 mer mix を測定したところ、18472 と 18485 を含むピーク が得られたがそれらは 18493 や 18507 付近のピークよりも低かった。

⑥移動相 ACN: 20mM TEA (1:1)

まず、2本鎖 DNA 60 bp の測定を行ったところ、多価イオンが検出され、1本鎖 DNA 60 mer の分子量と同じ 18472 のピークが最も高く、次いで相補鎖の分子量 18485 のピークが高かった。 次に、60 mer mix を測定したところ、18472 付近と 18485 付近のピークのみがシャープな 2 大ピ ークとして得られた。

3-3.1 本鎖 DNA 113 mer とその相補鎖の混合物(113 mer mix)、2 本鎖 DNA 113 bp の測定

3-2.⑥の移動相を用いて、まず、113 mer mix を測定したところ、多価イオンが検出され、1本 鎖 DNA 113 mer の分子量 34749 やその相補鎖の分子量 34962 よりもそれぞれ大きい分子量 (34790 付近、および濃度により異なるが 35005 や 35026 付近)が得られた。次に、2 本鎖 DNA 113 bp を測定したところ、同様にそれぞれ大きい分子量(濃度により異なるが、34895 付近と 35050 付 近、あるいは 34800 付近と 35100 付近)が得られた。

<u>3-4.</u>供試菌株の PCR 産物の測定

3-2.⑥の移動相を用いて、3 菌種の PCR 産物の測定を行ったところ、多価イオンらしきピーク は検出されたが、1 本鎖の分子量(それぞれ 35003、35258、35042)や相補鎖の分子量(それぞ れ34705、35067、34668)は得られなかった。

3-5.脱塩カートリッジを用いた検討

実際の分子量よりも大きい分子量が得られたことから Na⁺付加物となっている可能性を考え、 脱塩カートリッジ (Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジ)を用いて、3-2.⑥の移動相につい てグラジエントで測定した。その結果、60 mer mix では3-2.⑥と同様な結果が得られた。113 mer mix では1 pmol/ μ L、2000 V でのみであるが、カートリッジ非使用よりも、よりはっきりしたピーク で各鎖の分子量に近い値 (34770、34984)が得られた。しかし、2 本鎖 DNA 113 bp では分子量は 得られなかった。

3-6. 分子量データベースの作成

EZ BioCloud からは 63242 個の情報がダウンロードできた。プライマーの塩基配列そのままでは、33387 個しか抽出できなかったため、プライマー領域の変異に対応するための調整を行い、 最終的に 59976 個 (94.84%) の合計分子量を特定することができた。

4. 考察

本研究においては、供試菌株の PCR 産物の分子量が MS で測定できることが前提となるため、 まず MS による測定条件を確立することに注力した。種々の移動相を検討した結果、移動相を ACN: 20mM TEA (1:1) とすることで、60 mer mix、2 本鎖 DNA 60 bp については各鎖のほぼ 正確な分子量を得ることができた。しかし、113 mer mix、2 本鎖 DNA 113 bp、供試菌株の PCR 産物については、正確な分子量は得られなかった。そこで、Na⁺付加物となっている可能性を考 え、脱塩カートリッジを用いたが、113 mer mix のみしか改善は得られなかった。今後、さらなる 測定条件の検討が必要である。分子量データベースについて、分子量を特定できなかった約 5% については臨床的にも分離されない菌種が多く含まれていることが特定できたデータから予測 できるため、実際上は問題ないと考えられる。また、菌種同定の精度を上げるため、今回用いた プライマーだけでなく、他の 16SrRNA 遺伝子の可変領域を挟む保存領域対するプライマーを用 いた検討や、さらに薬剤両性遺伝子に対するプライマーを用いた検討を行う必要がある。

上記が確立次第、感染動物を作成し、その検体からの検出法を確立して、実際の臨床検体での 検討を行い、感染症の原因菌の同定と保有する薬剤耐性因子の迅速な診断に貢献したい。

5. 引用文献

- 日本呼吸器学会市中肺炎診療ガイドライン作成委員会、"成人市中肺炎診療ガイドライン"、 第2版、社団法人日本呼吸器学会、東京、2010、p.14.
- 二木芳人,前田真之,第1章 感染症治療の基本原則1診断から治療までのプロセス、"薬学生・薬剤師レジデントのための感染症学・抗菌薬治療テキスト",石井良和,藤村茂,前田真

之編, じほう, 東京, 2015, pp.3-12.

- 3. Ho YP, Reddy PM, Identification of pathogens by mass spectrometry, *Clin Chem*, 2010, **56** (4), 525-534.
- 4. 大楠清文,知っておきたい質量分析法を用いた細菌の同定,"月刊 Medical Technology 別冊 いま知りたい臨床微生物検査実践ガイド一珍しい細菌の同定・遺伝子検査・質量分析—",医 歯薬出版,東京,2013, pp.100-135.
- Kaleta EJ, Clark AE, Johnson DR, Gamage DC, Wysocki VH, Cherkaoui A, Schrenzel J, Wolk DM., Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles, *J Clin Microbiol*, 2011, 49(1), 345-353.
- Greenwood-Quaintance KE, Uhl JR, Hanssen AD, Sampath R, Mandrekar JN, Patel R, Diagnosis of prosthetic joint infection by use of PCR-electrospray ionization mass spectrometry, *J Clin Microbiol*, 2014, **52** (2), 624-649.
- Ullberg M, Luthje P, Molling P, Stralin K, Ozenci V, Broad-range detection of microorganisms directly from bronchoalveolar lavage specimens by PCR/electrospray ionization mass spectrometry, *PLoS One*, 2017, e0170033.
- 8. Lin Y, Fu Y, Xu M, Su L, Cao L, Xu J, Cheng X, Evaluation of a PCR/ESI-MS platform to identify respiratory viruses from nasopharyngeal aspirates , *J Med Virol*, 2015, **87** (11) , 1867-1870.
- Farrell JJ, Sampath R, Ecker DJ, Bonomo RA, "Salvage microbiology": detection of bacteria directly from clinical specimens following initiation of antimicrobial treatment, *PLoS One*, 2013, 8(6), e66349.
- Wolk DM, Kaleta EJ, Wysocki VH, PCR-electrospray ionization mass spectrometry. The potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories, *J Mol Diagn*, 2012, 14(4), 295-304.
- 11. Jiang Y, Hofstadler SA, A highly efficient and automated method of purifying and desalting PCR products for analysis by electrospray ionization mass spectrometry, *Anal Biochem*, 2003, **316**, 50-57.
- 12. Hofstadlera SA, Sampatha R, Blyna LB, Eshooa MW, Halla TA, Jianga Y, Dradera JJ, Hannisa JC, Lowerya KA, Cumminsa LL, Libbya B, Walcotta JW, Schinka A, Massirea C, Rankena R, Gutierreza J, Manalilia S, Ivya C, Meltona R, Levenea H, Wilta GB, Lia F, Zappa V, Whitea N, Samanta V, McNeila JA, Knizeb D, Robbin D, Rudnick K, Desai A, Moradi E, Eckera DJ, TIGER: the universal biosensor, *Int J Mass Spectrom*, 2005, **242**, 23-41.

テーマ3

生体内コバレント修飾に基づく代謝産物の定性的および定量的解析法の確立と応用

山崎浩史(薬物動態学研究室)

【要約】

質量分析装置を駆使して、生体内で生じる種々のコバレント修飾を、定性的かつ定量的に解析 する手法を生体分析科学的観点から開発し、その手法を毒性学(toxicology)、実験薬理学 (experimental pharmacology)および臨床薬理学分野(clinical pharmacology)へ応用することを目的 とした。米国 FDA の医薬品代謝物の安全性試験に関するガイダンスにおいて、動物よりヒトに おける血漿中濃度が高い代謝物として定義される不均衡性代謝物のうち、サリドマイド水酸化体 を例として取り上げ、各種質量分析法によりヒトにおける医薬品の反応性代謝物を介する生体成 分修飾あるいは相互作用に伴う毒性発現機構解明を目指した。

1. 背景・目的

生体内分子のコバレント修飾部位同定、コバレント修飾の定性および定量分析研究が隆盛となっている。一方、化学工業・医薬品化学の進歩により、本来自然界に存在しない様々な化合物が 合成され、これらの新規化合物が生体内分子とコバレント修飾することにより、新たな生体内分 子とのコバレント化合物が見出されている。これら化合物の生体内分子との結合に関しては、代 謝的活性化機構が重要な役割を担っていることが知られている。一部の化学物質および医薬品で は代謝的活性化のメカニズムや反応性代謝物の同定が行われている。しかし、新規化合物に関し ての情報は少なく、肝障害や医薬品相互作用の新たな危険因子と考えられる。本研究室ではこれ まで、ヒトおよび実験動物のサルおよびマーモセットに関して薬物代謝酵素として重要である肝 チトクロム P450 (P450) の種特異的な代謝特性を踏まえた研究成果を報告してきた。動物種によ る代謝特性の違いを考慮することで、反応性代謝物や活性代謝物の生成を予測することができる。 例として、歴史的に催奇形性が問題となっているサリドマイドについて、その発現メカニズムは 不明であった。しかし、近年当研究室で生体内においては P450 による酸化的に生成するサリド マイド反応性代謝物をグルタチオン抱合体として捕捉できることを明らかにした。そこで、医薬 品であるサリドマイドとその類縁化合物を対象として、代謝物と生体成分とのコバレント結合を 検討する手法を確立し、各種化合物の安全性評価に応用することを目的とした。

2. 方法

サリドマイド類の代謝的活性化酵素と予想されるヒトチトクロム P450 (P450) 3A 酵素に及ぼ す影響を、ヒト肝由来 HepaRG 細胞系で mRNA 量あるいは P450 分子種ごとの指標基質酵素活性 によって評価した。市販のヒト肝細胞あるいは HepaRG 細胞系を免疫不全 NOG マウスに移植し、 医薬品代謝と生体成分との結合をキメラマウスに投与し、血漿中の濃度を LC/MS/MS で解析した。 サリドマイド由来のヒト反応性代謝物の結合タンパク質について、医薬候補品を用いて解析実績 のある 2 次元電気泳動および微量放射能測定方法を組み合わせたプロテオミックス手法にて解析 した。さらにサリドマイド類縁化合物ポマリドマイドおよびレナリドマイドをヒト肝キメラマウ スに投与し、血漿中の親化合物と代謝物濃度を測定し、薬物動態パラメータ値を算出するととも に、ヒト生理学的薬物動態 (PBPK) モデルを構築し、ヒトでの体内動態を外挿予測した。毒性物 質であるヒト尿中ニコチンおよびコチニン濃度測定の分析精度を確保するために国際共同研究 を行った。

3. 結果

サリドマイド類の代謝活性化酵素ヒトP4503A酵素に及ぼす影響

市販ヒト肝由来細胞のHepaRG細胞^{1,2)} は、入手が困難であるヒト初代培養系の代替えとして、 注目されている。そこで肝細胞の機能として重要な薬物代謝活性を、各種指標基質を用いてヒト 初代培養細胞と比較検討した。特に、ヒト肝で多くの薬物の代謝に関与している P450 3A の代謝 活性については、ヒト肝初代培養系よりも HepaRG 細胞は安定的な値を示した。P450 の誘導剤と して知られているリファンピシンに応答し、酵素誘導効果が認められたことから、HepaRG 細胞 はヒト初代培養肝細胞と同等の酵素誘導試験が行えることが確認された。このように外来異物に 対する応答性が認められたことから、サリドマイドを培地に添加し、肝細胞への影響について検 討したところ、HepaRG 細胞の P450 3A の mRNA レベルはサリドマイドの添加濃度に依存して上 昇が認められた。ヒトでの主代謝物である 5-水酸化体を添加した場合には、この誘導効果が認め られなかったことから、サリドマイド母核が直接的に酵素誘導作用を発揮することが示唆され た³⁾。さらに、反応液を液体クロマトグラフ質量分析装置に解析した結果、わずかではあるもの の、再度マイドが酸化的代謝を受けて反応性代謝物に変換された結果であるグルタチオン付加体 が捕捉された。

ヒト肝細胞移植免疫不全マウスでの医薬品代謝と生体成分との結合

ヒト肝 HepaRG 細胞を用いた実験系の有効性が確認でき、サリドマイドの肝直接的な作用について検討することが可能となった。サリドマイドは、その主要代謝物がヒトとげっ歯類とでは異なり、このために安全性評価において種差を考慮する必要があった。そこで、免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したキメラマウスを作成し、ヒト型反応性代謝物の評価への適用について検討したところ、サリドマイドのヒト特有代謝物の生成がヒト化モデル動物にて認められた。酵素活性の促進、すなわち協同性についても検討したところ、サリドマイドとの併用により、指標薬物であるミダゾラムの本ヒト化モデル動物での血漿中濃度は有意に低下していた。

サリドマイド由来のヒト反応性代謝物の結合タンパク質の2次元電気泳動および加速器質量分析 による解析

ヒト型主要代謝物サリドマイド 5-水酸化体は、培養肝細胞系の培地中への添加では、特段の影響を及ぼさなかった。ヒト型代謝に関与している P450 3A クラスタを人工染色体として導入した マウスを作成し、胎児培養系にてサリドマイドの胎児への影響を観察したところ、ヒト P450 3A 人工染色体導入マウス由来胎児培養にて、12 検体中 9 検体に足の部分の奇形が認められた。この ことからサリドマイドの催奇形性は、その酸化的代謝産物に起因する可能性が示唆された。そこ で、¹⁴C 標識 5-水酸化サリドマイド投与後 1 時間のヒト P450 3A 人工染色体導入マウスおよびヒ ト肝細胞移植マウスの肝ミクロゾームと可溶性画分をそれぞれ調製し、2 次元電気泳動を行った スポットから、加速器質量検出器(Accelerator mass spectrometry)を用いて、サリドマイド由来の 生体内分子とのコバレント結合体を解析した⁴⁾。得られた 2 次元スポットのプロテオミックス手 法による解析の結果から、ミクロゾームでは cytochrome c oxidase subunit 6B1 と ATP synthase subunit α と、可溶性画分では retinal dehydrogenase 21 と glutathione transferase A1 との結合が強く、 その他複数のタンパクとの非特異的な結合が多く観察された⁵⁾。

サリドマイド類縁化合物ポマリドマイドおよびレナリドマイドのヒト肝キメラマウスを用いた ヒト体内動態予測

サリドマイド[®]と同様の薬理作用を有する類縁化合物ポマリドマイドとレナリドマイドについ て、ヒト肝移植キメラマウスを用いたヒト体内動態予測を行った。非移植マウスとヒト肝移植キ メラマウスに経口投与後の血漿中薬物濃度を経時的に液体クロマトグラフ質量分析装置で測定 した。ポマリドマイド(100 mg/kg)は、投与後 30 分で血中に認められ、その後の経時的な変化 は非移植マウスとヒト肝移植キメラマウスの間で類似していた⁷。ヒト肝移植マウスでは、ポマ リドマイドは7位水酸化体と5位水酸化体に代謝され、非移植マウスに比べて著しく高い7位水酸化体濃度を示した。5-位水酸化体のグルクロン酸抱合体はヒト肝移植キメラマウスでいずれの 測定時点においても非移植マウスに比べて高い値を示した。一方、グルタチオン抱合体について は検出されなかった。これらの結果から、ヒト体内動態予測モデルを構築し、仮想投与後の血中 濃度推移は、既報のヒト血中ポマリドマイドおよび5-水酸化体濃度を概ね反映していたことから、 ポマリドマイドはヒトでは速やかに7位と5位に水酸化を受けて代謝され、反応性代謝物を生成 しないものと推察された。

レナリドマイドについても、同様にヒト肝移植マウスを用いた検討を行った。レナリドマイド 50 mg/kg 経口投与後 24 時間の血中濃度推移については、非移植マウスに比べヒト肝移植マウス で速やかな消失が認められた。レナリドマイドは非代謝型の薬物として腎臓から排泄される経路 がヒトでは提唱されている。細胞障害性のバイオマーカーについては様々な検討が行われている が、いずれも過度に障害が進行した過程での評価によるものが多かった。本研究において、肝特 異的に発現するアルブミンが肝障害の早い段階で細胞外、ひいては血中に逸脱してくることから、 血漿中ヒトアルブミン mRNA レベルの測定系を確立した。アルブミンの遺伝子配列の中で、ヒ トとマウスとの類似性の低い部分でプライマーを設計し、ヒト肝特異的な障害性の検出について 検討したところ、増幅条件の設定等を考慮することでヒトアルブミン mRNA 特異的な検出が可 能であることが判明した。

タバコに含まれるニコチンの毒性代謝物としても捉えることのできるコチニンは、緩やかにヒ ト尿中に排泄されることから、バイオマーカーのひとつとして注目されている。ニコチンおよび コチニン濃度測定の分析精度を確保するために、6カ国、11研究室がそれぞれ同じサンプルをブ ラインドにて測定し、それらの測定精度を評価するプロジェクトに日本を代表して参加した⁸。 全参加研究室をとおして、ニコチンおよびコチニン測定結果の平均値のばらつきは、それぞれ 3.5%および 1%以下であり、世界を代表する機関ではそれぞれ精度良く、毒性懸念物質の生体忡 濃度を実測できていることが判明した。

4. 考察

ヒト肝でのサリドマイド代謝には、P450 3A が関与していることが明らかとなった。サリドマ イドは、肝に直接作用して自身の代謝酵素でもある P450 3A の誘導効果およびその酵素活性を促 進する協同性を発揮した。さらに、ヒトとげっ歯類では主要代謝経路の違いが認められ、このこ とがヒトの毒性発現に影響したものと考えられた。サリドマイドはヒトで肝薬物代謝酵素 P450 3A により主に代謝されて 5-水酸化体を生成する。この1次代謝物はさらに酸化的代謝を受け反 応性代謝物となるが、通常は生体内グルタチオンに捕捉され、解毒的に排泄される。しかし、過 剰に生成される場合には、この反応性代謝物は、生体内のタンパク質と非選択的にコバレント結 合して付加体を作成し、毒性を発現するものと考えられた。以上のことから、サリドマイド代謝 物は、生体内の多様な分子と非選択的なコバレント修飾により捕捉されることが確認された。サ リドマイドの催奇形性発現には、この酸化的代謝を触媒する肝薬物代謝酵素 P450 3A が関与して いることが強く示唆された。

ヒト肝移植マウスと高性能の加速器質量分析の組合せにより、新規化合物の生体内での共有結 合の探索に貢献する手法を構築することに成功した。サリドマイドの類縁化合物のポマリドマイ ドとレナリドマイドについては、サリドマイドとのわずかな構造の違いによる体内動態を検証し た。両化合物ともに、生体内からの消失は速やかであり、サリドマイドとは異なり反応性代謝物 生成による毒性発現については、その可能性は低いことが示唆された。加えて、化学物質による 肝毒性評価について検討するため、ヒト肝臓特異的に発現するアルブミン mRNA の検出法をレ ナリドマイドを材料に確立した。今後、新規化合物についての反応性代謝物の生成または非生成 に関わらず、一般化学物質曝露時の肝臓への影響について把握する手法を構築した。

5. 引用文献

- Higuchi Y, Kawai K, Yamazaki H., Nakamura M, Françoise Bree, Christiane Guguen-Guillouzo, and Suemizu H, The human hepatic cell line HepaRG as a possible cell source for the generation of humanized liver TK-NOG mice. *Xenobiotica*, 44, 146-153 (2014). PMID: 24066694
- Higuchi Y, Kawai K, Kanaki T, Yamazaki H, Chesné C, Guguen-Guillouzo C, Suemizu H, Functional polymer-dependent 3D culture accelerates the differentiation of HepaRG cells into mature hepatocytes. *Hepatol Res.*, 46, 1045-1057 (2016). PMID: 26724677
- Murayama N, van Beuningen R, Suemizu H, Guillouzo CG, Shibata N, Yajima K1, Utoh M, Shimizu M, Chesné C, Nakamura M, Guengerich FP, Houtman R, Yamazaki H, Thalidomide increases human hepatic cytochrome P450 3A enzymes by direct activation of the pregnane, X receptor. *Chem Res Toxicol.*, 27, 304-308 (2014). PMID: 24460184
- Yamazaki H, Suemizu H, Kazuki Y, Oofusa K, Kuribayashi S, Shimizu M, Ninomiya S, Horie T, Shibata N, Guengerich FP, Assessment of protein binding of 5-hydroxythalidomide bioactivated in

humanized mice with human P450 3A-chromosome or hepatocytes by two-dimensional eelectrophoresis/accelerator mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.*, **29**, 1279-1281 (2016). PMID: 27464947

- Yamazaki H, Suemizu H, Mitsui M, Shimizu M, Guengerich FP, Combining chimeric mice with humanized liver, mass spectrometry, and physiologically-based pharmacokinetic modeling in toxicology. *Chem Res Toxicol*, 29, 1903-1911 (2016). PMID: 27337115
- Nishiyama S, Suemizu H, Shibata N, Guengerich FP, Yamazaki H, Simulation of human plasma concentrations of thalidomide and primary 5-hydroxylated metabolites explored with pharmacokinetic data in humanized TK-NOG Mice. *Chem Res Toxcol.*, 28, 2088-2090 (2015). PMID: 26492539
- Shimizu M, Suemizu H, Mitsui M, Shibata N, Guengerich FP, Yamazaki H. Metabolic profiles of pomalidomide in human plasma simulated with pharmacokinetic data in control and humanized-liver mice. *Xenobiotica*, 47, 844-848 (2017). PMID: 27852146
- 8. Wang L, Bernert JT, Benowitz NL, Feng.J., Jacob III P, McGaheea E, Caudilla SP, Scherer G, Scherer M, Pluym N, Doig MV, Newland K, Murphy SE, Caron NJ, Sander LC, Shimizu M, Yamazaki H, Kim S, Langman LJ, Pritchett JS, Sniegoski LT, Li Y, Blount BC, Pirkle JL, Collaborative method performance study of the measurement of nicotine, its metabolites, and total 3 nicotine equivalents in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev, in press.*

シンポジウム・成果報告会の概要



文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成



第1回国際シンポジウム

"Dysregulation of post-translational modification for signal transducing molecules and diseases"

> 日時:2014年8月28日(木)~29日(金) 場所:昭和薬科大学

Special Lecture

Hiroyuki Arai (Univ. of Tokyo) Jun-ichiro Inoue (Univ. of Tokyo)

Speakers

Chin Ha Chung (Seoul National Univ.) Xin-Hua Feng (Zhejiang Univ.) Satoshi Ishido (Showa Pharmaceutical Univ.) Susumu Itoh (Showa Pharmaceutical Univ.) Hiroyuki Kawahara (Tokyo Metropolitan Univ.) Sheng-Cai Lin (Xiamen Univ.) Keiji Miyazawa (Univ. of Yamanashi) Akihiro Mizutani (Showa Pharmaceutical Univ.) Toshimasa Yamauchi (Univ. of Tokyo)

アルファベット順)

参加費用:無料 参加登録:不要 詳細については右記 URL をご覧下さい

URL : http://www.covalent.hrc.shoyaku.ac.jp



アクセス ・小田急線新宿駅から快速急行、多摩急行または急行で「新百合ヶ丘駅」乗換え
 「玉川学園前駅」まで 30 ~ 40 分、徒歩 15 分

・京浜急行「羽田空港駅」から横浜駅経由で JR 横浜線「成瀬駅」まで1 時間、バス 10 分

・JR 東海道新幹線・横浜線「新横浜駅」から「成瀬駅」まで 18 分、バス 10 分

主催:昭和薬科大学

連絡先 昭和薬科大学 「生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成」プロジェクト事務局 〒194-8543 東京都町田市東玉川学園 3 丁目 3165 番地 E-mail: covalent1@ac.shoyaku.ac.jp



the MEXT Program to Support the Development of a Foundation for Strategic Research at Private Universities



1st Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecules

"Dysregulation of post-translational modification for signal transducing molecules and diseases"



Program & Abstract

Showa Pharmaceutical University (Second lecture building, Room 201) *August 28-29, 2014*

Thursday, 28 August			
14:20-	Registration		
14:50-15:00	Opening Remarks	Masahiro Nishijima (Showa Pharmaceutical University)	
Special Lecture			
		Chair: Satoshi Ishido	
15:00-16:00	Jun-ichiro Inoue	Chair: Satoshi Ishido The University of Tokyo	
15:00-16:00 16:00-17:00	Jun-ichiro Inoue Hiroyuki Arai	Chair: Satoshi IshidoThe University of TokyoThe University of Tokyo	

Friday, 29 August

Session I. Ubiquitin-related signaling		
	Chair:	Hiroyuki Kawahara, Satoshi Ishido
9:00-9:30	Chin Ha Chung	Seoul National University
9:30-10:00	Hiroyuki Kawahara	Tokyo Metropolitan University
10:00-10:30	Satoshi Ishido	Showa Pharmaceutical University
10:30-10:45	Jong Ho Park	Seoul National University
10:45-11:00	Hee Min Yoo	Seoul National University
11:00-11:15	Mizuho Kajikawa	Showa Pharmaceutical University
11:15-12:45	Lunch	

Session II. 7	GF-β signaling	
		Chair: Keiji Miyazawa, Susumu Itoh
12:45-13:15	Xin-Hua Feng	Zhejiang University
13:15-13:45	Keiji Miyazawa	University of Yamanashi
13:45-14:15	Susumu Itoh	Showa Pharmaceutical University
14:15-14:30	Shu-Chen Gu	Zhejiang University
14:30-14:45	Yi Yu	Zhejiang University
14:45-15:00	Naoko Nakano	Showa Pharmaceutical University

15:00-15:30 Coffee Break

Time Table

Session III. Metabolic signaling			
	Chair: Toshi	masa Yamauchi, Akihiro Mizutrani	
15:30-16:00	Sheng-Cai Lin	Xiamen University	
16:00-16:30	Akihiro Mizutrani	Showa Pharmaceutical University	
16:30-16:45	Chen-Song Zhang	Xiamen University	
16:45-17:00	Terytty Yang Li	Xiamen University	
17:00-17:15	Koichi Hamada	Showa Pharmaceutical University	
17:15-17:45	Toshimasa Yamauchi	The University of Tokyo	
		Satashi Ishida	

17:45-17:55Closing RemarksSatoshi Ishido
(Showa Pharmaceutical University)18:00-20:00Farewell Banquet at Rindo

2

Thursday, 28 August	
Registration	
14:20-	
Opening Remarks	
14:50-15:00	Masahiro Nishijima (Showa Pharmaceutical University)
Special Lecture	
	(Chair: Satoshi Ishido)
15:00-16:00	Jun-ichiro Inoue (The University of Tokyo) NF-кB, a key player in breast cancer development
16:00-17:00	Hiroyuki Arai (The University of Tokyo) Emerging role of the fatty acyl chain in membrane phospholipids
Group Photo	
17:00-	
Welcome Party	
18:00-	

Friday, 29 August	
Registration	
8:30-	
Sossion I Ubiquitir	rolated signaling
	(Chair: Hirovuki Kawahara, Satoshi Ishido)
	(enun: miloyuki ikuwunuru, butosin isindo)
9:00-9:30	Chin Ha Chung
	(Seoul National University) UEM1 as a key regulator of EBg positive
	breast cancer development
9:30-10:00	Hiroyuki Kawahara
	(Tokyo Metropolitan University)
	Essential roles of BAG6 complex in
	selective elimination of defective
	transmemorane protein
10:00-10:30	Satoshi Ishido
	(Snowa Pharmaceutical University)
	negatively regulates dendritic cells
10.30 10.45	Jong Ho Park
10.30-10.43	(Seoul National University)
	DBC1 sumoylation is crucial for p53-
	mediated apoptosis
10:45-11:00	Hee Min Yoo
	(Seoul National University)
	Contribution of c-Cbl mutations in
	behavior

11:00-11:15	Mizuho Kajikawa (Showa Pharmaceutical University) Recognition modes by membrane- associated E3 ubiquitin ligases
Lunch	
11:15-12:45	
Session II . TGF-β sig	gnaling
	(Chair: Keiji Miyazawa, Susumu Itoh)
12:45-13:15	Xin-Hua Feng (Zhejiang University) Turning off BMP Signaling: Mechanisms and functions
13:15-13:45	Keiji Miyazawa (University of Yamanashi) Regulation of TGF-β signaling by a peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> -isomerase, Pin1
13:45-14:15	Susumu Itoh (Showa Pharmaceutical University) Fine-tuning of TGF-β signaling
14:15-14:30	Shu-Chen Gu (Zhejiang University) Role of acetylated α-tubulin in

epithelial-mesenchymal transition

14:30-14:45	Yi Yu (Zhejiang University) Regulation of embryonic stemness by smad7
14:45-15:00	Naoko Nakano (Showa Pharmaceutical University) TMEPAI family, a novel negative regulator of TGF-β signaling
Coffee Break	
15:00-15:30	

Session ${\rm I\hspace{-.1em}I}$. Metabolic signaling

	(Chair: Toshimasa Yamauchi, Akihiro Mizutrani)
15:30-16:00	Sheng-Cai Lin (Xiamen University) AMPK activation and switch between catabolism and anabolism
16:00-16:30	Akihiro Mizutrani (Showa Pharmaceutical University) Multisite phosphorylation of IRBIT is central to the regulation of multiple cellular signaling pathways.

16:30-16:45	Chen-Song Zhang (Xiamen University) The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism
16:45-17:00	Terytty Yang Li (Xiamen University) No growth factors? Let's go (GSK3) to (TIP60) autophagy (ATG1/ULK1)
17:00-17:15	Koichi Hamada (Showa Pharmaceutical University) IRBIT plays a critical role in adipocyte differentiation
17:15-17:45	Toshimasa Yamauchi (The University of Tokyo) Development of a small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity
Closing Remarks	
17:45-17:55	Satoshi Ishido (Showa Pharmaceutical University)
Farewell Banquet	
18:00-20:00	Rindo

NF-ĸB, a key player in breast cancer development

Jun-ichiro Inoue

Division of Cellular and Molecular Biology, Department of Cancer Biology Institute of Medical Science, University of Tokyo

The NF- κ B family of transcriptional factors plays a critical role in inflammation, immunoregulation, and cell differentiation. Activation of NF- κ B is tightly regulated in terms of its amplitude and duration by various negative regulatory pathways. Therefore, the persistent or excess activation of NF- κ B causes various inflammatory and autoimmune diseases and promotes cancer development.

Patients with triple-negative breast cancer (TNBC), which lacks expression of the oestrogen receptor, the progesterone receptor and ERBB2, have the highest rates of early relapse when compared with patients with other breast cancer subtypes. The basal-like subtype, a subgroup of TNBC, exhibits a high level of constitutive NF- κ B activation, which led us to hypothesize that NF- κ B may regulate its cancer stem cell (CSC) population. In fact, constitutive and induced NF- κ B activation played a positive role in CSC maintenance. Based on the results obtained from related experiments, we propose a new model, in which the NF- κ B activation in non-CSCs increases expression of soluble or membrane-bound ligands, which act *in trans* to stimulate CSCs leading to expansion of CSC population. Our results strongly suggest that NF- κ B plays a non-cell-autonomous role in regulating CSC populations of basal-like breast cancers by forming intratumoral microenvironments. In addition, involvement of normal cells including inflammatory cells, fibroblasts, mammary epithelial cells and osteoclasts in forming microenvironment for CSC will be also discussed.

Jun-ichiro Inoue, Ph.D.

Professor, Division of Cellular and Molecular Biology, Department of Cancer Biology The Institute of Medical Science, The University of Tokyo



1984	Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,
	Japan
1984	Associate, Department of Viral Oncology, Cancer Institute, Japan
1990	Postdoctoral fellow, Molecular Biology and Virology Laboratory,
	The Salk Institute, USA
1992	Associate, Department of Experimental Pathology, Cancer Institute, Japan
1993	Associate Professor, Department of Oncology,
	The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan
2000	Professor, Department of Applied Chemistry,
	Faculty of Science and Technology, Keio University, Japan
2002	Professor, Division of Cellular and Molecular Biology,
	Department of Cancer Biology, The Institute of Medical Science,
	The University of Tokyo, Japan

Recent selected publications

1. Yamamoto, M., Taguchi, Y., Ito-Kureha, T., Semba, K., Yamaguchi, N. and <u>Inoue J.</u> (2013) NF-κB non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat. Commun.* 4:2299 doi: 10.1038/ncomms3299.

2. Shibata, Y., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Han, X., Tanaka, Y., Gohda, J. and <u>Inoue, J.</u> (2012) p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. *Nat. Commun.* 3:1061 doi:10.1038/ncomms2068.

3. Yamamoto, T., Yokota, Y., Mitsuki, Y., Mizukoshi, F., Tsuchiya, T., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K., and <u>Inoue, J.</u> (2009) Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLos Pathogens* 5(1): e1000279.

4. Yamazaki, K., Gohda, J., Kanayama, A., Miyamoto, Y., Sakurai, H., Yamamoto, M., Akira, S., Hayashi, H., Su, B., and <u>Inoue, J.</u> (2009) Two Mechanistically and Temporally Distinct NF-κB Activation Pathways in IL-1 Signaling. *Sci. Signal.* 2, ra66.

5. Akiyama T., Shimo Y., Yanai H., Qin J., Ohsima, D., Maruyama Y., Asaumi Y., Kitazawa J., Takayanagi H., Penninger JM., Matsumoto M., Nitta T., Takahama Y., and <u>Inoue J.</u> (2008) The Tumor Necrosis Factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* 29, 423-437.

Emerging role of the fatty acyl chain in membrane phospholipids

Hiroyuki Arai

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

Various kinds of fatty acids are distributed in membrane phospholipids in mammalian cells and tissues. In general, saturated fatty acids are esterified at the *sn*-1 position, whereas polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as arachidonic acid, are commonly found at the *sn*-2 position. It has long been assumed that acyltransferases that catalyze the incorporation of PUFAs into membrane phospholipids are responsible for the formation of phospholipid molecular species; however, these enzymes have not been isolated until recently because of their very fragile nature and small quantity in cells. *C. elegans* is a useful model for studying the functions and metabolism of PUFAs, since other simple organisms such *as E. coli*, yeast and *Drosophila* do not possess PUFAs. By using *C. elegans* genetics, we identified genes encoding acyltransferases that incorporate PUFAs into membrane phospholipids. These genes are conserved from *C. elegans* to humans. In this talk, I will summarize our recent study on the physiological significance of various molecular species of membrane phospholipids and the signal transduction upon the disturbance in the fatty acyl chain composition.

Hiroyuki Arai, Ph.D.

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo



1984	Ph.D., Department of Health Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical
	Sciences, University of Tokyo, Japan
1984	Research Associate, Department of Food Science, University of Illinois,
	U.S.A
1986	Research Associate, Department of Physiology, Tufts University, Medical
	School, U.S.A
1988	Assistant Professor, Department of Health Chemistry, Graduate School of
	Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Japan
1994	Associate Professor, Department of Health Chemistry, Graduate School of
	Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Japan
2000	Professor, Department of Health Chemistry, Graduate School of
	Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Japan

Recent selected publications

1. Maekawa M, Terasaka S, Mochizuki Y, Kawai K, Ikeda Y, Araki N, Skolnik EY, Taguchi T, <u>Arai H.</u> (2014) Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides in membrane ruffles is essential for the completion of macropinocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: E978-987.

2. Ohba Y, Sakuragi T, Hara N, Inoue T, Kono N, Otori M, Gengyo AK, Oka T, Mitani S, <u>Arai H.</u> (2013) Mitochondrial GPAT is required for mitochondrial fusion. *EMBO J.*, 32, 1265-1279.

3. Kono N, Ohto U, Hiramatsu T, Urabe M, Uchida Y, Satow Y, <u>Arai H.</u> (2013) Impaired α -TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science*, 31, 1106-1110.

UFM1 as a key regulator of ERa-positive breast cancer development

Chin Ha Chung and Hee Min Yoo

School of Biological Sciences, Seoul National University, Korea

Estrogen receptor- α (ER α), a member of the nuclear receptor superfamily, is prominent in breast cancer. Upon binding of 17 β -estradiol, ER α forms a dimeric complex, translocates to the nucleus, recruits transcriptional co-activators, and binds to the promoters of its target genes for transcriptional activation. Thus, ER α is known as a growth factor that is essential for proliferation of a large subset of breast tumor cells. Activating signal co-integrator 1 (ASC1) is a transcriptional co-activator of ER α and other nuclear receptors. ASC1 has a zinc-finger domain, which serves as a binding site for nuclear receptors, transcriptional co-activators, and basic transcriptional machinery. Thus, ASC1 plays a critical role as a platform that recruits the necessary components for nuclear receptor-mediated transcription.

Ubiquitin-fold modifier 1 (UFM1) is the most recently identified ubiquitin-like protein. Like ubiquitination, protein modification by UFM1 (ufmylation) utilizes a three-step enzyme system: UBA5 as an UFM1-activating E1 enzyme, UFC1 as an UFM1-conjugating E2 enzyme, and UFL1 as an UFM1 E3 ligase. Ufmylation process can be reversed by UFM1-specific proteases (UfSPs). In this study, we show that ASC1 ufmylation is crucial for breast cancer development. In the absence of 17β-estradiol, UfSP2 bound to ASC1 and prevented its ufmylation. In its presence, however, ER α displaced UfSP2 for its interaction with ASC1, leading to ASC1 ufmylation. Poly-UFM1 chains conjugated to ASC1 served as a scaffold that recruits p300, SRC1, and itself to the promoters of ERa target genes for transactivation. ASC1 overexpression or UfSP2 knockdown increased ER α -mediated tumor formation in vivo, and this increase could be abrogated by treatment with tamoxifen, an anti-breast cancer drug. In contrast, expression of the ufmylation-deficient ASC1 mutant or knockdown of UBA5 prevented the tumor growth. These findings establish the role of ASC1 ufmylation in breast cancer development via promotion of ER α transactivation.
Chin Ha Chung, Ph.D.

Professor, School of Biological Sciences, Seoul National University, Korea



1979	Ph.D. Department of Biology, University of Alabama, USA
1979	Post-doc, Department of Physiology, Harvard Medical School, USA
1983	Assistant, Associate Professor, Department of Molecular Biology,
	Seoul National University, Korea
1991	Professor, School of Biological Sciences, Seoul National University, Korea

Recent selected publications

1. Jeon, Y.J., Jo, M.G., Yoo, H.M., Hong, S.H., Park, J.M., Ka, S.H., Oh, K.H., Seol, J.H., Jung, Y.K., and <u>Chung, C.H.</u> (2012) ISG15 modification contributes to chemosensitivity of human epithelial cancers by mediating caspase-2-dependent cleavage of Δ Np63a. J. Clin. *Invest.* 122, 2622-2636

2. Lee, S.W., Lee, M.H., Park, J.H., Kang, S.H., Yoo, H.M., Ka, S.H., Oh, Y.M., Jeon, Y.J., and <u>Chung, C.H.</u> (2012) SUMOylation of hnRNP-K is required for p53-mediated cell-cycle arrest in response to DNA damage. *EMBO J.* 31, 4441-4452

3. Yang, S.W., Oh, K.H., Park, E., Chang, H.M., Park, J.M., Seong, M.W.,Ka, S.H., Song, W.K., Park, D.E., Baas, P.W., Jeon, Y.J., and <u>Chung, C.H.</u> (2013) USP47 and CHIP antagonistically regulate katanin-p60-mediated axonal growth. *J. Neurosci.* 33, 12728-12738 4. Park, J.M., Yang, S.W., Yu, K.R., Ka, S.H., Lee, S.W., Seol, J.H., Jeon, Y.J., and <u>Chung, C.H.</u> (2014) Modification of PCNA by ISG15 plays a crucial role in termination of errorprone translesion DNA synthesis. *Mol. Cell* 54, 626-638

5. Yoo, H.M., Kang, S.H., Kim, J.Y., Lee, J.E., Seong, M.W., Lee, S.W., Ka, S.H., Sou, Y.S., Komatsu, M., Tanaka, K., Lee, S.T., Noh, D.Y., Baek, S.H., Jeon, Y.J., and <u>Chung, C.H.</u> (2014) Modification of ASC1 by ubiquitin-fold modifier 1 (UFM1) is crucial for ER α transactivation and breast cancer development. *Mol. Cell* in press

Essential roles of BAG6 complex in selective elimination of defective transmembrane proteins

Hiroyuki Kawahara

Laboratory of Cell Biology and Biochemistry, Tokyo Metropolitan University

Folding and assembly of newly synthesized transmembrane proteins are supported by a number of molecular chaperones. Despite the presence of many chaperones that assist nascent polypeptides in folding, accumulating evidence suggests that some newly-synthesized transmembrane proteins are produced with aberrant structures so are targeted for degradation immediately after their synthesis. Recognition of aberrant structures should be essential for the rapid elimination of misfolded and/or misassembled proteins. For example, hydrophobic residues that are normally buried in native folded proteins tend to be exposed by protein misfolding/misassembly and act as degradation signals, "degron", delivering the misfolded proteins to the ubiquitin-proteasome system (UPS) for degradation. However, the mechanisms behind this remain elusive.

BAG6/BAT3 was originally identified as a novel gene product encoded within the class III region of the human major histocompatibility complex (MHC). Human BAG6/BAT3 is a large protein of 1,132 residues that contains a ubiquitin-like (UBL) domain at its N-terminus and BAG domain at the C-terminus. BAG6 is thought to participate in a variety of seemingly unrelated physiological and pathological processes, such as apoptosis, antigen presentation, BMP signaling and the T cell response, although the mechanisms of its function remain largely obscure.

We reported that BAG6 physically interacts with MG-132-induced polyubiquitinated polypeptides. Importantly, the BAG6-associated species of polyubiquitinated proteins disappeared when cells were co-treated with a protein synthesis inhibitor, implying that BAG6 targets newly translated defective polypeptides.

In a series of recent studies, unexpected functions of BAG6 in the quality control of newly synthesized transmembrane protein assembly have successively been reported. BAG6 forms a complex comprising with TRC40, TRC35 and Ubl4a, the mammalian homologues of yeast Get3, Get4 and Get5, respectively, that determines the fate of tail-anchored transmembrane proteins. We also identified a number of BAG6-associated proteins that involved in the selective elimination of newly translated defective membrane proteins through ubiquitin-mediated degradation pathway.

In my talk, I will thus summarize the current advances in our understanding of BAG6 and its interacting proteins on the functions mediating the quality control of newly-synthesized and defective transmembrane proteins.

Hiroyuki Kawahara, Ph.D.

Professor,

Laboratory of Cell Biology and Biochemistry, Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University



1989	B.Sc., Faculty of Science, Hokkaido University, Japan
1994	Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,
	Japan
1994	Postdoctoral Fellow, Department of Physiology, University College London,
	UK
1996	Research Associate, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japan
1998	Assistant Professor, The University of Tokyo, IMCB
2002	Associate Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
	Hokkaido University, Japan
2008	Professor, Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University,
	Japan
	1

Recent selected publications

1. <u>Kawahara, H.</u>, Minami, R., and Yokota, N. (2013) *JB Review:* BAG6/BAT3: Emerging roles in quality control for nascent polypeptides. *J. Biochem.* 153, 147-160.

2. Minami, R., Hayakawa, A., Kagawa, H., Yanagi, Y., Yokosawa, H., and <u>Kawahara, H.</u> (2010) BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *J. Cell Biol.* 190, 637-650.

3. Minami, R., Shimada, M., Yokosawa, H. and <u>Kawahara, H.</u> (2007) Scythe/BAG6 regulates apoptosis through modulating ubiquitin-mediated proteolysis of XEF1AO. *Biochem. J.* (*London*) 405, 495-501.

4. Shimada, M., Kanematsu, K., Tanaka, K., Yokosawa, H. and <u>Kawahara, H.</u> (2006) Proteasomal ubiquitin receptor RPN-10 controls sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* 17, 5356-5371.

Loss of MHC class II ubiquitination negatively regulates dendritic cells

Satoshi ishido

Laboratory of Integrative Infection Immunology, Showa Pharmaceutical University

Antigen presentation is a critical process for the initiation of immunity. Proteins derived from the invaded pathogens were phagocytosed, processed and presented through MHC class II (MHC II) by antigen-presenting cells (APCs). MHC II presenting the peptides of invaded pathogens stimulates CD4 T cells through its interaction with T cell receptors. With the maturation signals for APCs, peptidebound MHC II (pMHC II) can initiate immunity against the pathogens. Thus, it is important to reveal how the MHC II-mediated antigen presentation is regulated in vivo. In this regard, we and other groups found that the expression level of pMHC II is regulated on the surface of APCs by ubiquitination. In addition, we found MARCH-I as a physiological E3 ubiquitin ligase for MHC II and CD86 by generating genetically modified mice. To examine the role of MARCH-I-mediated pMHC II ubiquitination, several groups including ours examined how MARCH-I and pMHC II ubiquitation are regulated in the context of immune responses. At present, it is demonstrated that several signals inducing the activation/maturation of dendritic cells (e.g. TLR stimuli) stabilizes the pMHC II though inhibition of pMHC II ubiquitination by down-regulation of MARCH-I. Thus, loss of pMHC II ubiquitination is one of the phenomena for activation of dendritic cells. Based on these findings, most of researches in this field believe that loss of pMHC II promotes immunity against the pathogens through enhancement of antigen-presentation. However, there are no findings supporting such a desirable hypothesis at present. Contrary, we have reported that splenic DCs in the mice whose pMHC II is not ubiquitinated showed impaired the functions, suggesting that loss of pMHC II ubiquitinaiton provides the negative feedback to immune responses. In this paper, we examined how loss of pMHC II ubiquitination influences the function of cDCs in the cell intrinsic manner by using in vitro generating cDCs: bone marrow-derived dendritic cells. We employed the Flt3L as the inducer of cDCs in vitro. MARCH-Ideficient cDCs showed low ability to stimulate naïve CD4 T cells and differentiate into Th1 and Th2 cells. This was due to the stabilization of pMHC II, because cDCs whose pMHC II ubiquitination, but not CD86 ubiquitination, is inhibited showed impaired the ability to stimulate naïve CD4 T cells. In addition, expression of CD18/ integrin beta 2 was drastically downregulated in cDCs whose pMHC II ubiquitination is inhibited. Inhibition by neutralizing-antibody for CD18 or deletion of CD18 impaired cDC-mediated CD4 T cell activation. These results demonstrated that loss of pMHC II ubiquitination inhibits the ability of cDCs to stimulate naïve CD4 T cells by inhibiting integrin signaling. Thus, our results highlighted loss of pMHC II ubiquitination as an inhibitory inducer for cDC-mediated CD4 T cell activation. We would propose that stabilization of pMHC II contribute to negative feedback to CD4 T cell activation/development.

Satoshi Ishido, M.D. Ph.D.

Professor, Laboratory of Integrative Infection Immunology, Showa Pharmaceutical University, Japan



1988	M.D. Kansai Medical University, Japan
1995	Ph.D. Department of Pathology, Kobe University, Japan
1995	Assistant Professor, Department of Microbiology, Kobe University, Japan
1999	Post-doc, Department of Microbiology and Molecular Genetics,
	Harvard Medical School, USA
2001	Associate Professor, Department of Microbiology,
	Kobe University, Japan
2004	Team leader, Laboratory of Infectious Immunity, RIKEN RCAI, Japan
2012	Professor, Laboratory of Integrative Infection Immunity,
	Showa Pharmaceutical University, Japan

Recent selected publications

1. Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Aoki, M., Mito-Yoshida, M., Uematsu, M., Hasegawa, T., Koseki, H., Ohara, O., Nakayama, M., Toyooka, K., Matsuoka, K., Hotta, H., Yamamoto, A. and <u>Ishido, S.</u> (2007) Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J.* 26, 846-54

2. Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Mito-Yoshida, M., Goto, E., Aoki-Kawasumi, M., Nakayama, M., Ohara, O. and <u>Ishido, S.</u> (2009) Cutting edge: Requirement of MARCH-I-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cell. *J. Immunol.* 183, 6893-7

3. <u>Ishido, S.</u>, Goto, E., Matsuki, M. and Ohmura-Hoshino, M. (2009) E3 ubiquitin ligases for MHC molecules. *Current Opinion in Immunology* 21, 78-83

4. Walseng, E., Furuta, K., Bosch, B., Weih, K.A., Matsuki, Y., Bakke, O., <u>Ishido, S.</u> and Roche, P.A. (2010) Ubiquitination Regulates MHC Class II-Peptide Complex Retention and Degradation in Dendritic Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 20465-70.

5. Ishikawa, R., Kajikawa, M. and <u>Ishido, S.</u> (2014) Loss of MHC II ubiquitination inhibits the activation and differentiation of CD4 T cell. *Int. Immunol.* 26, 283-9.

DBC1 sumoylation is crucial for p53-mediated apoptosis

Jong Ho Park and Chin Ha Chung

School of Biological Sciences, Seoul National University, Korea

SIRT1, a mammalian ortholog of yeast silent information regulator 2 (Sir2), is a NAD⁺-dependent deacetylase. SIRT1 deacetylates a variety of cellular proteins, including histones and transcription factors, implicating its important roles in the control of diverse cellular processes, such as gene silencing, stress response, and energy metabolism. DBC1 was initially identified as a putative tumor suppressor, since its gene was found in a region frequently deleted in breast cancers. Intriguingly, DBC1 was later found to be a negative regulator of SIRT1. DBC1-mediated inhibition of SIRT1 leads to an increase in p53 acetylation and thereby the p53-mediated processes, such as apoptosis. On the other hand, down-regulation of DBC1 results in SIRT1-mediated p53 deacetylation and inhibition of stress-induced apoptosis. Moreover, by using DBC1 knockout mice, DBC1 was shown to act as a major regulator of SIRT1 in vivo. Thus, the DBC1-SIRT1 interaction should finely be regulated.

In this study, we show that DBC1 modification by SUMO2/3, but not by SUMO1, is crucial for p53 transactivation under genotoxic stress. Whereas treatment with etoposide or doxorubicin reduced the binding of DBC1 to SENP1 (a SUMO-specific protease), it promoted that to PIAS3 (a SUMO E3 ligase), resulting in a dramatic increase in DBC1 sumoylation. Remarkably, the switching of DBC1 binding partner from SENP1 to PIAS3 was achieved by ATM/ATR-mediated phosphorylation of DBC1. Moreover, DBC1 sumoylation led to a marked increase in the DBC1-SIRT1 interaction, resulting in the release of p53 from SIRT1 for transcriptional activation. Consistently, SENP1 knockdown promoted DNA damage-induced apoptosis, whereas knockdown of PIAS3 or SUMO2/3 and overexpression of sumoylation-deficient DBC1 mutant inhibited it. These results establish the role of DBC1 sumoylation in promotion of p53-mediated apoptosis in response to genotoxic stress.

Contribution of c-Cbl mutations in human glioma and its malignant behavior

Hee Min Yoo, Min Woo Seong, and Chin Ha Chung

School of Biological Sciences, Seoul National University, Korea

Migration and invasion are malignant behaviors of cancer cells. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most invasive and aggressive human brain tumor. Survival of GBM patients is poor even after surgical removal, radiotherapy, and chemotherapy, because of the malignant behaviors of glioma cells. Therefore, unlike for common types of solid cancer, current experimental therapies for GBM are mainly focused on inhibition of invasion. Numerous proteins are involved in invasiveness of glioma cells. They include focal adhesion complex proteins, such as Pix, integrin, and receptor tyrosine kinases, including EGFR. Significantly, α Pix, a potent mediator of cell migration, is expressed only in highly proliferative and mobile cells, including immune cells, and markedly up-regulated in AGS gastric cancer cells and GBM patient tissues, suggesting the involvement of α Pix in their malignant behavior.

c-Cbl, a RING-type ubiquitin E3 ligase, down-regulates receptor tyrosine kinases, including EGF receptor, and inhibits cell proliferation, migration, and invasion. Moreover, c-Cbl point mutations have frequently been found in patients with myeloid neoplasm. Therefore, c-Cbl is known as a tumor suppressor. In this study, we show that a part of the RING domain in c-Cbl is deleted in rat C6 and human A172 glioma cells and brain tissues of several glioblastoma patients. These deletions prevented c-Cbl-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of α Pix, resulting in dramatic accumulation of α Pix. Moreover, the c-Cbl deletion mutations promoted EGF signaling and α Pix-mediated cell migration and invasion. These findings strongly suggest that the deletion mutations in c-Cbl contribute to human glioma and its malignant behavior.

Recognition modes by membrane-associated E3 ubiquitin ligases.

Mizuho Kajikawa, Minako Kimura and Satoshi Ishido

Laboratory of integrative infection immunology, Showa Pharmaceutical University

Ubiquitination is an important posttranscriptional modification that controls protein fate in several cellular events in eukaryote (e.g. cell cycle control, DNA damage repair and receptor endocytosis). E3 ubiquitin ligase selects target protein and catalyzes the formation of covalent isopeptide bond between ubiquitin and lysine on the substrates. Therefore, the recognition of substrate by E3 ubiquitin ligase is a key cellular event to make decision for the fate of proteins.

Recently, we discovered a novel transmembrane-type E3 ubiquitin ligase family, designated as membrane- associated RING-CH (MARCH), in several viruses and mammal. Viral MARCH family members, known as MIR1 and MIR2, and many mammalian MARCH family members (i.e. MARCH1, 4, 8, 9) prefer immunoreceptors involved in antigen presentation as their substrates, and ubiquitination of these receptors triggers their degradation through endocytosis and lysosomal pathway. While viral MIRs plays an important role in immune evasion from the host immune system, mammalian MARCHs are considered as immune regulator.

Most of viral MIRs and mammalian MARCHs have a similar secondary structure; a variant type of RING domain (RINGv) at the N-terminus located in the cytoplasm, two transmembrane (TM) regions connected by a short intertransmembrane (ITM) region located in the extracellular or ER lumen, and a cytoplasmic tail (CYT) region at the C-terminus in the cytoplasm. Conserved region among the family members is the RINGv domain, which recruits E2 ubiquitinconjugating enzymes to catalyze ubiquitination of lysine residues located in the cytoplasmic tail of substrates; however, it remains unclear how MARCHs recognize their substrates.

In this study, we determined the important regions of viral MIRs and human MARCHs and their substrates for the activity of MARCHs. By using regionswapping substrate chimeras between substrate and human CD8α chain (CD8α), which is not a MARCH substrate, we found that TM region of MHC-I is required to be downregulated by viral MIR1, whereas TM and EX region of MHC-I and B7-2 are individually important for viral MIR2. Moreover, EX region, but not TM region, of ICAM1 is required for viral MIR2-mediated downregulation. Thus, viral MIRs take different recognition mode for their different target receptors. In case of mammalian MARCH, we identified TM and EX region of B7-2 as an important region for human MARCH8-mediated downregulation; this is the case in viral MIR2. These findings provide an insight into the molecular basis of recognition mode by MARCH family members.

Turning off BMP Signaling: Mechanisms and Functions

Xin-Hua Feng

Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

BMP and related growth factors activate a broad range of cellular responses and play key roles in the pathogenesis of many diseases especially cancer and skeletal diseases. The activity of the BMP-initiated signaling pathway is tightly controlled, for example, through regulation of the key downstream Smad proteins. In response to BMP, Smad1/5/8 are phosphorylated, which triggers a series of downstream signaling and gene transcriptional events in the nucleus. To maintain proper levels of activated Smad1/5/8, activated Smad1/5/8 in the nucleus are normally dephosphorylated and then transported back into the cytoplasm. We recently discovered two classes of key players: phosphatases that dephosphorylate p-Smads, and nuclear export factors that transport dephosphorylated Smads out of the nucleus. While phosphatases (e.g. PPM1A, PPM1H, SCP4) physically interact with p-Smad1/5/8, RanBP3L directly and specifically recognize dephosphorylated Smads. RanBP3L mediates nuclear export of Smad1/5/8 in a small G protein Randependent manner. As a consequence, Smad phosphatases and RanBP3L coordinately shut down BMP-induced Smad-mediated transcriptional programs, thereby blocking BMP-induced osteoblastic differentiation.

Xin-Hua Feng, Ph.D.

Professor, Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou, China; Professor, Baylor College of Medicine, Houston, USA



1992	Ph.D. University of Maryland – College Park
1993	Postdoctoral fellow, University of California - San Francisco
1997	Assistant Cell Biologist, Department of Growth and Development, University
	of California – San Francisco
1999	Assistant Professor (Tenure-track), Dept of Surgery, and Dept of Molecular &
	Cellular Biology, Baylor College of Medicine (BCM)
2003	Associate Professor (tenured), Dept of Molecular & Cellular Biology, and
	Dept of Surgery, BCM
	Member, Biology of Inflammation Center, BCM
	Member, Dan L. Duncan Cancer Center, BCM
	Member, Stem Cell and Regenerative Medicine (STaR) Center, BCM
2007	Professor (tenured), Dept of Molecular & Cellular Biology, Dept of Surgery,
	and Dept of Molecular Physiology and Biophysics, BCM. (now on sabbatical
	leave and reduced effort)
2009	Professor and Director, Life Sciences Institute, Zhejiang University

Selected publications

Lin X, Duan X, Liang Y, Su Y, Wrighton K, Hu M, Long J, Davis C, Wang J, Brunicardi F, Shi Y, Chen Y, Meng A, **Feng X-H.** (2006). PPM1A functions a Smad phosphatase to terminate TGF- β signaling. *Cell*, 125: 915-928.

Dai F, Shen T, Li Z-Y, Lin X, and **Feng X-H.** (2011). PPM1A dephosphorylates RanBP3 to enable efficient nuclear export of Smad2 and Smad3. *EMBO Rep*, 12: 1175-1181.

Jia S, Dai F, Wu D, Lin X, Xing C, Xue Y, Wang Y, Xiao M, Wu W, **Feng XH***, and Meng AM*. (2012). Protein phosphatase 4 cooperates with Smads to promote BMP signaling in dorsoventral patterning of zebrafish embryos. *Dev Cell*, 22:1065-1078 (*co-corresponding author).

Feng Y, Wu H, Zhang Z, Liu T, Lin X, **Feng X-H.** (2014). Zinc finger protein 451 is a novel Smad corepressor in TGF-β signaling. *J Biol Chem* 289:2072-2083.

Shen T, Sun C, Duan X. **Feng X-H,** Lin X. (2014). Specific control of BMP signaling and mesenchymal differentiation by cytoplasmic phosphatase PPM1H. *Cell Res.* 24:727-741.

Regulation of TGF-β signaling by a peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase, Pin1

Keiji Miyazawa

Department of Biochemistry, University of Yamanashi

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a multifunctional cytokine that regulates a wide variety of cellular responses, such as growth, motility, differentiation, and apoptosis, in various target cells. Aberrant TGF- β signaling often leads to progression of diseases including cancer, allergy, and fibrosis.

TGF- β principally transmits signals through the canonical Smad pathway. In response to ligand stimulation, TGF- β type I receptor phosphorylates cytosolic effector molecules Smad2/3. Phosphrylated Smad2/3 then forms a heterotrimeric complex with Smad4 and translocates into the nucleus. The nuclear Smad complex usually requires DNA-binding transcription factors, so called Smad cofactors, for their successful regulation of target genes. Smad cofactors are involved in specific cellular responses induced by TGF- β . For example, Oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) is a Smad cofactor that mediates TGF- β -induced cell motility.

Here we show that a peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase, Pin1, interacts with Smad2/3. Phosphorylation of Smad2/3 in the linker region is required for the interaction. Pin1 then induces a conformational change of Smad proteins, which facilitates their association with Olig1, thus promoting cell motility. Pin1 also sensitizes Smad2/3 for proteasomal degradation mediated by an E3 ubiquitin ligase Smurf2 that is induced in response to TGF- β stimulation.

Our findings indicate that Pin1 modifies TGF- β signaling depending on cellular contexts. Notably, Pin1 is overexpressed in many cancer tissues. Possible involvement of Pin1 overexpression in cancer malignant phenotypes will be discussed.

Keiji Miyazawa, Ph.D.

Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Yamanashi



1988	Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo,
	Japan
1988	Research Associate, Institute for Liver Research, Kansai Medical University,
	Japan.
1991	Assistant Professor, Kansai Medical University, Japan.
1995	Researcher, Ludwig Institute for Cancer Research (Uppsala Branch), Sweden
1997	Associate Professor, Department of Life Science, Tokyo Institute of
	Technology, Japan
2001	Associate Professor, Graduate School of Medicine, University of Tokyo,
	Japan
2009	Professor, Department of Biochemistry, University of Yamanashi, Japan

Recent selected publications

1. Motizuki, M., Isogaya, K., Ikushima, H., Miyazono, K., Saitoh, M., and <u>Miyazawa, K.</u> (2013) Oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) is a Smad cofactor involved in cell motility induced by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 288, 18911-18922

2. Ishii, R., Seto, A., Isogaya, K., Seto, A., Koinuma, D., Watanabe, Y., Arisaka, F., Yaguchi, S., Ikushima, H., Dohmae, N., Miyazono, K., <u>Miyazawa, K.</u>, Ishitani, R., and Nureki, O. (2012) Structure of dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator HHM representing the autoinhibition state. *EMBO J.* 31, 2541-2552

3. Koinuma, D., Shinozaki, M., Nagano, Y., Ikushima, H., Horiguchi, K., Goto, K., Chano, T., Saitoh, M., Imamura, T., Miyazono, K., and <u>Miyazawa, K.</u> (2011) RB1CC1 positively regulates TGF- β signaling through modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity. *J. Biol. Chem.* 286, 32502-32512.

4. Kamiya, Y., Miyazono, K., and <u>Miyazawa, K.</u> (2010) Smad7 inhibits transforming growth factor- β family type I receptors through two distinct modes of interaction. *J. Biol. Chem.* 285, 30804-30813.

Fine-tuning of TGF-β signaling

Susumu Itoh

Laboratory of Biochemistry, Showa Pharmaceutical University

Transforming growth factor- β (TGF- β) family signaling controls cell growth and differentiation as well as regulation of homeostasis during both embryogenesis and adult life. TGF- β predominantly transduces signals through a receptor complex comprising ALK5 and T β RII to phosphorylate receptor-regulated Smads (R-Smads); *i.e.* Smad2 and Smad3. It is known that aberrant TGF- β family signal transduction is linked to congenital disorders, tumorigenicity, and fibrosis which can be life-threatening. To retain appropriate TGF- β family signaling in cells, the duration and intensity of the TGF- β family signal appear to be elaborated in cells.

In my talk, I show recent progress of importance of TGF- β signaling on tumor blood and lymph angiogenesis using mice which lacks molecule(s) involved in TGF- β signaling. In addition, I am going to talk about a novel negative regulator(s) of TGF- β signaling.

Susumu Itoh, Ph.D.

Professor, Laboratory of Biochemistry, Showa Pharmaceutical University



1990	Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Japan
1990	Research Associate, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
	Hokkaido University, Japan
1994	Research Associate, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
	Japan
1996	Researcher, Ludwig Institute for Cancer Research (Uppsala Branch), Sweden
1999	Researcher, Netherlands Cancer Institute, The Netherlands
2002	Associate Professor, Graduate School of Comprehensive Human Sciences,
	University of Tsukuba, Japan
2010	Professor, Laboratory of Biochemistry, Showa Pharmaceutical University,
	Japan

Recent selected publications

1. Nakano, N., Maeyama, K., Sakata, N., Itoh, F., Akatsu R, Nakat, a M., Katsu, Y., Ikeno, S., Vo Nguyen, T.T., Watanabe, Y., Kato, M., <u>Itoh S.</u> (2014) C18 ORF1: a novel negative regulator of TGF- β signaling. *J. Biol. Chem.*, 289: 12680-12692.

2. Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, <u>Itoh S</u>, Kato M. (2014) TMEPAI/ PMEPA1enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. *Cancer Sci.*, 105: 334-341.

3. Itoh, F., <u>Itoh, S.</u>, Adachi, T., Ichikawa, K., Matsumura, Y., Takagi, T., Festing, M., Watanabe, T., Weinstein, M., Karlsson, S., Kato, M. (2012) Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. *Blood*, 119: 5320-5328.

4. Yang, W., Itoh, F., Ohya, H., Kishimoto, F., Tanaka, A., Nakano, N., <u>Itoh, S.</u>, Kato, M. (2011) Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. *Cancer Sci.*, 102, 1808-1814.

5. Nakano, N, <u>Itoh, S</u>, Watanabe, Y, Maeyama, K, Itoh, F, and Kato, M. (2010) Requirement of TCF7L2 for TGF-β-dependent transcriptional activation of the TMEPAI gene. *J. Biol. Chem.*, 285, 38023-38033.

Role of Acetylated α-Tubulin in Epithelial-Mesenchymal Transition

Shuchen Gu

Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process by which fully differentiated epithelial cells undergo a phenotypic conversion and assume a mesenchymal cell phenotype. During EMT, epithelial cells lose their junctions and polarity, reorganize their cytoskeleton, change the cell shape, reprogram gene expression and increase the motility of individual cells. The mechanism underlying EMT is still unknown, but TGF- β is considered as one of the most important factors to induce EMT. Here we report that acetylated α -tubulin could be a novel protein marker of EMT. Acetylated α -tubulin plays an important role in MT stabilization, cell morphology and migration. We showed that acetylated α -tubulin decreased in TGF- β -induced EMT; while it remained unchanged in TGF- β -stimulated fibroblasts or myoblasts. Acetylated α -tubulin was also decreased in EMT induced by other growth factors. Increase in acetylated α -tubulin could be reversed by small molecule SB431542, paclitaxel and tubacin. Our results identify acetylated α -tubulin as a novel protein marker of EMT. Our finding revealed a potential therapeutic target against pathological EMT and a key event for tumor progression and fibrogenesis.

Regulation of Embryonic Stemness by Smad7

Yi Yu

Life Sciences Institute, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

Smad7 plays an essential role in the negative-feedback regulation of transforming growth factor (TGF- β) and bone morphogenetic protein (BMP) signaling. However, the role of Smad7 in regulation of self-renewal and differentiation of embryonic stem cell (ESC) remains unclear. Here, we report that Smad7 is required for maintaining mouse ESC self-renewal and pluripotency. Increased expression of Smad7 inhibits ESC differentiation, whereas depletion of Smad7 results in loss of self-renewal and differentiation in ESC. Mechanistically, Smad7 upregulates leukemia inhibitory factor (LIF) signaling, which plays a critical role in sustaining ESC pluripotency. Specifically, Smad7 stimulates LIF-induced formation of LIFR-gp130-STAT3 complex and subsequent phosphorylation of STAT3 in a manner independent of TGF- β or BMP signaling. Our studies not only demonstrate an essential role for Smad7 in maintaining mouse ESC self-renewal.

TMEPAI family, a novel negative regulator of TGF-β signaling

Naoko Nakano

Laboratory of Biochemistry, Showa Pharmaceutical University

Transforming growth factor- β (TGF- β) family members are multifunctional cytokines that play key roles in embryogenesis and maintenance of tissue homeostasis. On the other hand, aberrant TGF- β signaling is known to contribute to various diseases including cancer, fibrosis and vascular disorders. Negative regulation of TGF- β signaling has been found at multiple steps in cells to evade excessive TGF- β signaling in cells. We have shown that TMEPAI, a direct target gene of TGF- β signal, specifically restrains TGF- β signaling. When we further tried to identify a molecule(s) similar to TMEPAI, we could find C18ORF1 in which 2 PY motifs and one SIM domain are present like TMEPAI. Expectedly, C18ORF1 could block TGF- β signaling, but not BMP signaling. Like TMEPAI, C18ORF1 bound to Smad2/3 via its Smad interaction motif (SIM) and competes with SARA for Smad2/3 binding. Consequently, C18ORF1 disrupts recruitment of Smad2/3 to the TGF- β type I receptor to inhibit TGF- β signaling. The loos-of-function study for C18ORF1 showed extended duration of TGF-\beta-induced Smad2 phosphorylation and concomitantly enhanced TGF- β -induced expression of JunB, p21 and TMEPAI mRNAs. Furthermore, C18ORF1-knocked-down cells potentiated TGF-\beta-induced EMT compared with control cells. Because C18ORF1 mRNA was not induced upon TGF- β signaling in contrast with TMEPAI, we proposed that C18ORF1 negatively regulates TGF-β signaling in steady-state situation whereas TMEPAI is implicated in a negative feedback loop of TGF- β signaling.

AMPK activation and switch between catabolism and anabolism

Sheng-Cai Lin

School of Life Sciences, Xiamen University, China

AMPK (AMP-activated protein kinase) and mTORC1 play central roles in maintaining cellular energy homeostasis and proliferation. In response to low energy status, AMPK is activated to enhance catabolic activities with concurrent inhibition of anabolic processes such as fatty acid synthesis. In contrast, mTORC1 is activated when nutrients and growth factors are abundant. We have recently discovered the mechanism by which AMP, as a low energy-charge signal, can autonomously initiate the assembly of an activating complex for AMPK in response to starvation. AMP binding causes a higher affinity of AMPK for the scaffold protein AXIN that also binds to LKB1, thereby promoting phosphorylation and activation of AMPK. More recently, we found most surprisingly that the late endosomal/lysosomal protein complex v-ATPase-Ragulator, essential for activation of mTORC1, is also required for AMPK activation. We also uncovered that AMPK is a residential protein of late endosome/lysosome. Under glucose starvation, the v-ATPase-Ragulator complex is accessible to AXIN/LKB1 for AMPK activation. Concurrently, the GEF activity of Ragulator towards RAG is inhibited by AXIN, causing dissociation from endosome and inactivation of mTORC1. We have thus revealed that the v-ATPase-Ragulator complex is also an initiating sensor for energy stress, and meanwhile serves as an endosomal docking site for LKB1-mediated AMPK activation by forming the v-ATPase-Ragulator-AXIN/LKB1-AMPK complex, thereby providing a switch between catabolism and anabolism. Our current study also emphasizes a general role of late endosome/lysosome in controlling metabolic programs.

SHENG-CAI LIN, Ph.D.

Professor, School of Life Sciences, Xiamen University



1991	Ph.D., Biochemistry, University of Texas Southwestern Medical Center at
	Dallas
1991	Associate, Howard Hughes Medical Institute, University of California,
	San Diego
1995	Senior Scientist (Assistant Professor), Institute of Molecular and Cell Biology
	(IMCB), National University of Singapore 2001-2006
	Assistant Professor and Associate Professor (2004, with tenure), Department
	of Biochemistry, Hong Kong University of Science & Technology
	2003-present
	Dean & Professor, School of Life Sciences, Xiamen University

Recent Publications

1. Lin SY, Li TY, Liu Q, Zhang C, Li X, Chen Y, Zhang SM, Lian G, Liu Q, Ruan K, Wang Z, Zhang CS, Chien KY, Wu J, Li Q, Han J, and **Lin SC*.** GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science* 336, 477, 2012

2. Zhang YL, Guo HL, Zhang CS, Lin SY, Li P, Wu JW, and **Lin SC*.** AMP as a low energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. *Cell Metabolism* 18, 546–555, 2013

3. Zhang CS, Jiang B,Li MQ, Zhu MJ, Peng YY, Zhang YL, Wu YQ, Li TY, Liang Y, Lu ZL, Lian GL, Liu Q, Guo HL,Yin ZY, Ye ZY, Han J, Wu JW, Yin HY, Lin SY, **Lin SC*.** The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex is a Common Activator for AMPK and mTORC1 that Constitutes a Switch between Catabolism and Anabolism. *Cell Metabolism*, July 3, 2014

Multisite phosphorylation of IRBIT is central to the regulation of multiple cellular signaling pathways.

Akihiro Mizutani¹, and Katsuhiko Mikoshiba²

¹Department of Pharmacotherapeutics, Showa Pharmaceutical University, Machida, Japan ²Laboratory for Developmental Neurobiology, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, Japan

IRBIT was discovered a decade ago as an inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor (IP₃R) binding protein. IRBIT suppresses the calcium mobilizing activity of IP₃R by competing with IP₃, and multisite phosphorylation of IRBIT is absolutely required for the suppression, implying that IRBIT negatively regulates intracellular Ca²⁺ signals in a context dependent manner.

Subsequent proteomic analysis for searching IRBIT binding partners in various systems revealed that IRBIT interacted with diverse classes of molecules such as p/bNBC1, Fip1L1 and PAP. p/bNBC1 is a key transporter regulating the intracellular concentration of HCO₃⁻. IRBIT binding activates the transporter activity of p/bNBC1, whereas the binding slows down the polyadenylation activity of Fip1L1 and PAP *in vitro*.

Importantly and interestingly, the interaction between IRBIT and its every target requires the multisite phosphorylation of IRBIT. The phosphorylation sites are clustered in the N-terminal region of IRBIT and contains the consensus sites for PKA, Akt, CaMK(s), ATM kinase, CK1, CK2, EKR1/2 and so on, suggesting that phosphorylation patterns of IRBIT in this region reflects the intracellular environment and are involved in the concerted regulation of intracellular Ca²⁺ dynamics and pH homeostasis.

In order to address the possibility and to know the function of IRBIT *in vivo*, we produced IRBIT KO mice. The KO mice grow almost normal and fertile. However, abdominal visceral adipose tissue volume in KO mice was significantly reduced. Now, we are collecting data suggesting the "connection" among IRBIT, phosphorylation, and adipogenesis.

Akihiro Mizutani, Ph.D., M.D.

Professor, Department of Pharmacotherapeutics, Showa Pharmaceutical University



1987	M.D., Faculty of Medicine, Mie University, Japan
1992	Ph.D., Graduate School of Medicine, Nagoya University, Japan
1992	Research Associate, Dept. of Pharmacology, Graduate School of Medicine,
	Nagoya University, Japan
1994	Researcher, Lab. for Developmental Neurobiology, Special Postdoctoral
	Researcher Program, RIKEN, Japan
1997	Researcher, Lab. for Developmental Neurobiology, BSI, RIKEN, Japan
2002	Researcher, International Cooperative Research Project "Calcium Oscillation",
	Japan
2004	Research Associate, The Institute of Medical Science, University of Tokyo,
	Japan
2008	Researcher, Lab. for Developmental Neurobiology, BSI, RIKEN, Japan
2011	Professor, Department of Pharmacotherapeutics, Showa Pharmaceutical
	University, Japan

Recent selected publications

1. Park S, Shcheynikov N, Hong JH, Zheng C, Suh SH, Kawaai K, Ando H, <u>Mizutani A</u>, Abe T, Kiyonari H, Seki G, Yule D, Mikoshiba K, Muallem S. IRBIT mediates synergy between Ca²⁺ and cAMP signaling pathways during epithelial transport in mice. *Gastroenterology.* 145 232-241, 2013

2. Yang D, Li Q, So I, Huang CL, Ando H, <u>Mizutani A</u>, Seki G, Mikoshiba K, Thomas PJ, Muallem S. IRBIT governs epithelial secretion in mice by antagonizing the WNK/SPAK kinase pathway. *J Clin Invest.* 121, 956-965, 2011

3. <u>Mizutani A</u>, Kawaai K, Hisatsune C, Ando H, Michikawa T, Mikoshiba K. Isolation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-Associating Proteins and Selective Knockdown Using RNA Interference. *Methods in Molecular Biology*, 645 133-145, 2010

4. Kiefer H, <u>Mizutani A</u>, Iemura A, Natsume T, Ando H, Kuroda Y, Mikoshiba K. Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor-binding protein released with Inositol 1, 4, 5-triphosphate (IRBIT), associates with components of the mRNA 3' processing machinery in a phosphorylation-dependent manner and inhibits polyadenylation. *J Biol Chem.* 284, 10694-10705, 2009

5. Ando H*, <u>Mizutani A*</u>, Mikoshiba K. An IRBIT homologue lacks binding activity to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor due to the unique N-terminal appendage. *J. Neurochem.* 109, 539-550. 2009 (*equally contributing first authors)

The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common Activator for AMPK and mTORC1, Acting as a Switch between Catabolism and Anabolism

Dr. ChenSong Zhang

School of Life Sciences, Xiamen University, China

Cells can switch metabolic programs between catabolism and anabolism depending on nutrient availability and energy status. AMPK and mTOR play principal roles in governing the metabolic programs; however, the mechanism underlying the coordination of the two inversely regulated kinases remains unclear. We found most surprisingly that the late endosomal/lysosomal protein complex v-ATPase-Ragulator, essential for activation of mTORC1 involved in anabolic pathways, is also required for AMPK activation that promotes catabolic metabolism. We also uncovered that AMPK is a residential protein of late endosome/lysosome. Under glucose starvation, the v-ATPase-Ragulator complex becomes accessible to AXIN/LKB1, and translocates AXIN/LKB1 onto endosome, resulting in phosphorylation at T172 and activation of AMPK by LKB1. Concurrently, upon interaction with AXIN, the GEF activity of Ragulator towards RAG is inhibited, leading to dissociation from endosome and inactivation of mTORC1. We have thus revealed that the v-ATPase-Ragulator complex is also an initiating sensor for energy stress, as in sensing abundant nutrients for mTORC1 activation, and meanwhile serves as an endosomal docking site for LKB1-mediated AMPK activation by forming the v-ATPase-Ragulator-AXIN/LKB1-AMPK complex distinct from that for mTORC1 activation, thereby providing a switch between catabolism and anabolism

No Growth Factors? Let's Go (GSK3) To (TIP60) Autophagy (ATG1/ULK1)

Dr. Terytty Yang Li

School of Life Sciences, Xiamen University, China

In metazoans, cells depend on extracellular growth factors for energy homeostasis. We found that glycogen synthase kinase-3 (GSK3), when deinhibited by default in cells deprived of growth factors, activates acetyltransferase TIP60 through phosphorylating TIP60-Ser86, which directly acetylates and stimulates the protein kinase ULK1, which is required for autophagy. Cells engineered to express TIP60S86A that cannot be phosphorylated by GSK3 could not undergo serum deprivation–induced autophagy. An acetylation-defective mutant of ULK1 failed to rescue autophagy in ULK1–/– mouse embryonic fibroblasts. Cells used signaling from GSK3 to TIP60 and ULK1 to regulate autophagy when deprived of serum but not glucose. These findings uncover an activating pathway that integrates protein phosphorylation and acetylation to connect growth factor deprivation to autophagy.

IRBIT plays a critical role in adipocyte differentiation

Koichi Hamada, Yuri Sugiyama, Seiko Sato, Yukiyasu Takahashi, Akihiro Mizutani Department of Pharmacotherapeutics, Showa Pharmaceutical University

Dysfunction of the adipose tissue leads to the pathology associated with metabolic diseases such as obesity, type 2 diabetes and lipodystrophies. Keeping adipose tissue under control is a great challenge for our health. IRBIT was originally identified as a binding protein of the intracellular Ca²⁺ channel, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor and functions as an inhibitory regulator of this receptor. Unexpectedly, many functions have subsequently been identified for IRBIT including the activation of multiple ion channels and ion transporters implying the involvement of many cellular events. Here, we show that IRBIT acts as a key regulator controlling adipocyte differentiation. During the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, we found that expression of IRBIT protein was upregulated. Short hairpin RNA (shRNA)-mediated reduction of IRBIT expression in the cells significantly attenuated adipocyte differentiation. RT-PCR analysis demonstrated that expressions of C/EBP α and PPAR γ , both of which are well-established transcription factors critical in terminal differentiation of adipocytes, were drastically diminished in IRBIT knockdown cells. On the other hand, expressions of C/EBP δ and C/EBP β , which function in earlier phase of differentiation than C/EBP α and PPARy, were not altered in IRBIT knockdown cells. These data suggest that IRBIT is a key molecule that controls terminal differentiation during adipogenesis through modulating the expression levels of C/EBP α and PPAR γ .

Development of a small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity

Toshimasa Yamauchi

Department of Diabetes and Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo

Adiponectin is an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine, which binds to adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2, and exerts beneficial effects on metabolic syndrome via activation of AMPK/SIRT and PPAR- α pathways, respectively, leading to increased mitochondria as well as decreased ectopic fat accumulation, oxidative stress and inflammation (*Nature* 423:762, 2003; *Nature Med.* 13:332, 2007; *Nature* 464:1313, 2010). Levels of adiponectin in plasma are reduced in obesity, which causes insulin resistance, type 2 diabetes, fatty liver and atherosclerosis (*Nature Med.* 7:941, 2001; *Nature Med.* 8:1288, 2002; *Cell Metab.* 17:185, 2013). Thus, orally active small molecules that bind to and activate AdipoR1 and AdipoR2 could ameliorate obesity-related diseases such as type 2 diabetes, NASH and atherosclerosis.

Here we report the identification of orally active synthetic small-molecule AdipoR agonists (*Nature* 503:493, 2013). One of these compounds, AdipoR agonist (AdipoRon), bound to both AdipoR1 and AdipoR2 in vitro. AdipoRon showed very similar effects to adiponectin in muscle, liver and adipose tissue, such as activation of AMPK and PPAR- α pathways, and increased exercise endurance and energy expenditure, and ameliorated fatty liver, insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet, which was completely obliterated in AdipoR1 and AdipoR2 double-knockout mice. Moreover, AdipoRon ameliorated diabetes of genetically obese rodent model db/db mice, and prolonged the shortened lifespan of db/db mice on a high-fat diet.

Thus, orally active AdipoR agonists such as AdipoRon are a promising therapeutic approach for the treatment of obesity-related diseases such as type 2 diabetes, NASH and atherosclerosis.

Toshimasa Yamauchi, M.D., Ph.D.

Associate Professor, Department of Diabetes and Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo



es,
,
Tokyo
5,

Recent selected publications

1. Okada-Iwabu, M., <u>Yamauchi, T.</u>, et al. : A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503: 493-499, 2013

2. <u>Yamauchi, T.</u>, et al. : A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at *UBE2E2* and *C2CD4A-C2CD4B*. *Nature Genetics* 42: 864-868, 2010

3. Iwabu, M., <u>Yamauchi, T.</u>, et al. : Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* 464:1313-1319, 2010

4. <u>Yamauchi T</u>, et al. : Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature Medicine* 13: 332 - 339, 2007

5. <u>Yamauchi, T.</u>, et al. : Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769, 2003.



文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成



第2回国際シンポジウム

"New Aspects of Covalent Modifications from Small to Large Molecules"

日時:2015年8月31日(月)~9月1日(火) 場所:昭和薬科大学

(アルファベット順)

Plenary Lectures

Takaaki Akaike (Tohoku Univ.) Kohji Fukunaga (Tohoku Univ.)

Symposiasts

Young-Jin Chun (Chung-Ang Univ.) Chulhun Chang (Pusan National Univ. Yangsan Hospital) Tomoyuki Hamamoto (Showa Pharmaceutical Univ.) Yoshikazu Ishii (Toho Univ.) Motohiro Nishida (National Institutes of Natural Sciences)

- Yasumitsu Ogra (Chiba Univ.) Sue Goo Rhee (Yonsei Univ.)
- Yasuo Watanabe (Showa Pharmaceutical Univ.)
- Hiroshi Yamazaki (Showa Pharmaceutical Univ.)

参加費用:無料 参加登録:不要 詳細については右記 URL をご覧下さい

URL : http://www.covalent.hrc.shoyaku.ac.jp



アクセス ・小田急線新宿駅から快速急行、多摩急行または急行で「新百合ヶ丘駅」乗換え 「玉川学園前駅」まで 30 ~ 40 分、徒歩 15 分

- ・京浜急行「羽田空港駅」から横浜駅経由で JR 横浜線「成瀬駅」まで 1 時間、バス 10 分
- ・JR 東海道新幹線・横浜線「新横浜駅」から「成瀬駅」まで 18 分、バス 10 分

主催:昭和薬科大学

連絡先 昭和薬科大学 「生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成」プロジェクト事務局 〒194-8543 東京都町田市東玉川学園 3 丁目 3165 番地 E-mail: covalent1@ac.shoyaku.ac.jp



the MEXT Program to Support the Development of a Foundation for Strategic Research at Private Universities



2nd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecules

"New Aspects of Covalent modifications from Small to Large Molecules"



Program & Abstract

Showa Pharmaceutical University (Lecture hall 2, Room 202) *August 31-September 1, 2015*

Symposium Organization

Organizers

Masahiro Nishijima (President, Showa Pharmaceutical University) Keiko Yamamoto (Project leader, Showa Pharmaceutical University)

Steering Committee

Tomoyuki Hamamoto (Symposium Chair, Showa Pharmaceutical University)

Yasuo Watanabe (Symposium Chair, Showa Pharmaceutical University)

Hiroshi Yamazaki (Symposium Chair, Showa Pharmaceutical University)

Scientific Organizing Committee

Satoshi Ishido (Showa Pharmaceutical University) Susumu Itoh (Showa Pharmaceutical University) Akihiro Mizutani (Showa Pharmaceutical University) Osamu Tamura (Showa Pharmaceutical University)

Scientific Advisory Board

Hiroyuki Arai (The University of Tokyo)
Yasushi Arano (Chiba University)
Tohru Natsume (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)
Takamitsu Hosoya (Tokyo Medical and Dental University)

Secretary

Yuka Yamamoto (Showa Pharmaceutical University)

Floor Plan

SHOWA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY LECTURE HALL 2



Floor Plan

SHOWA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY MAIN BUILDING



Program

Aug 31 - Sep 1, 2015, Showa Pharmaceutical University
[1st DAY] Registration					
0		5			
Opening Remarks Masahiro Nishijima Showa Pharmaceutical University August 31 (Mon) 14:50-15:00 Room 20					
Plena	ry Lectures				
PL1	Reactive Persulfide Species: Its Antioxidant Redox Signaling and Translational Bios	ynthesis			
Chair:	Yasuo Watanabe Showa Pharmaceutical University	August 31 (Mon) 15:00-16:00 Room 202			
	Takaaki Akaike Department of Environmental Health Sciences and Molecular Toxicology, Tohoku University Graduate School	of Medicine, Japan			
PL2	Synaptic Pathology of Mental Retardation through Protein Phosphorylation Modifi	cation			
Chair:	Yasuo Watanabe Showa Pharmaceutical University	August 31 (Mon) 16:00-17:00 Room 202			
	Kohji Fukunaga Department of Pharmacology Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Ja	pan			
Grou	p Photo	August 31 (Mon) 17:00-17:15 Room 202			
Welco	ome Party	August 31 (Mon) 18:00-			
[]nd	DAVI				
	DAI				
Regis	rauon	September 1 (Tue) 8:30-17:00 Room 202			
Symp	osia				
S-1	Biotransformation by enzymes	September 1 (Tue) 9:00-11:15 Room 202			
Chairs:	Yasumitsu Ogra Chiba University				
	Hiroshi Yamazaki Showa Pharmaceutical University				
03.	Human Cytochrome P450 1B1 Revisited: Its Possible Roles during Cancer Progression				
9:00~	Young-Jin Chun College of Pharmacy, Chung-Ang University, Korea				
04.	Identification of a novel selenometabolite and elucidation of its biological and toxicological significance				
9:30~	Yasumitsu Ogra Department of Toxicology and Environmental Health, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan				
05.	Human Drug Metabolism by Cytochrome P450 Enzymes				
10:00~	Hiroshi Yamazaki Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Showa Pharmaceutical University, Japan				
O6.	Induction of integrin signaling by steroid Sulfatase metabolism in HeLa cells				
10:30~	Dong-Jin Ye College of Pharmacy, Chung-Ang University, Korea				
07.	Activation of aerobic glycolysis by steroid sulfatase in HeLa cells				
10:45~	Sangyun Shin College of Pharmacy, Chung-Ang University, Korea				
O8.	Cytochrome P450-dependent xenobiotic metabolism in marmosets				
11:00~	Shotaro Uehara Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Showa Pharmaceutical University, Japan				

September 1(Tue) 11:15-12:45

September 1 (Tue) 14:30-15:00

Lunch

S-2 **Challenge to Infectious Disease** September 1(Tue) 12:45-14:30 Room 202 Chairs: Yoshikazu Ishii Toho University Tomoyuki Hamamoto Showa Pharmaceutical University 09. Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Derived from Mycobacterium tuberculosis 12:45~ Chulhun L. Chang Department of Laboratory Medicine, Pusan National University School of Medicine, Korea 010. Novel Diagnostics Technologies for Infectious Diseases and Detection Methods for Antibiotic Resistant Organisms Yoshikazu Ishii Division of Infection Control and Prevention, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine, Japan 13:15~ 011. **Contribution of Pharmacists to Infection Control in Japan** 13:45~ Tomoyuki Hamamoto Educational and Research Center for Clinical Pharmacy, Showa Pharmaceutical University, Japan **O12**. Evaluation of Dual-Color Fluorescence In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes for Detection of Mycobacterium tuberculosis and Non-Tuberculous Mycobacteria in Clinical Specimens 14:00~ Namhee Kim Department of Laboratory Medicine, Pusan National University School of Medicine, Korea

Coffee Break

S-3 **Coordination of Redox biology** September 1 (Tue) 15:00-17:30 Room 202 Chairs: Motohiro Nishida National Institutes of Natural Scienses Yasuo Watanabe Showa Pharmaceutical University **O13**. Peroxiredoxin as a Regulator and Sensor of Local Hydrogen Peroxide Sue Goo Rhee Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea 15:00~ **O14**. Negative regulation of cardiac remodeling by S-polythiolation of G proteins Motohiro Nishida Division of Cardiocirculatory Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute of Physiological Sciences), National Institutes of 15:45~ Natural Scienses, Japan **O15**. Mutual covalent modifications of nitric-oxide and reactive sulfur species 16:15~ Yasuo Watanabe Laboratory of Pharmacology, Showa Pharmaceutical University, Japan 016. Peroxiredoxin III does not make hyperoxidation-dependent decamer formation Se Kyoung Lee Yonsei University College of Medicine, Korea 16:45~ 017. Circadian Oscillation of Sulfiredoxin in the Mitochondria In Sup Kil Yonsei University College of Medicine, Korea 17:00~ Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV as potential targets of reactive sulfur species 018. Tsuyoshi Takata Laboratory of Pharmacology, Showa Pharmaceutical University, Japan 17:15~

Closing Remarks Yasuo Watanabe Showa Pharmaceutical University

Farewell Banquet

September 1(Tue) 17:30-17:40 Room 202

September 1(Tue) 18:00-20:00 Himawari

Abstracts

Aug 31 - Sep 1, 2015, Showa Pharmaceutical University

Plenary Lectures

PL1 Reactive Persulfide Species: Its Antioxidant Redox Signaling and Translational Biosynthesis

Chair: Yasuo Watanabe (Showa Pharmaceutical University)



Takaaki Akaike

Department of Environmental Health Sciences and Molecular Toxicology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Japan

Prof. Takaaki Akaike graduated from the Kumamoto University Medical School in Japan, and earned his MD, PhD degree from the Graduate School of Medicine,

Kumamoto University in 1991. He then joined the Department of Microbiology at Kumamoto University School of Medicine where he was appointed to several faculty positions and was promoted to Full Professor in 2005. In 2013, he moved to Tohoku University Graduate School of Medicine as Professor & Chairman of the Department of Environmental Health Sciences and Molecular Toxicology. Prof. Akaike held concurrent appointments as Visiting Professors at Thomas Jefferson University (1993) and at University of Alabama at Birmingham (2001), Program Officer at the Ministry of Education, Science, Sports and Culture (MEXT) of Japan (2003-2005), and Vice Dean & Director of Center for Medical Education and Research at Kumamoto University Medical School (2011-2012). He has received the Society for the Free Radical Research Japan Prize (2014) and ASAKAWA Award from the Japanese Society for Bacteriology (2015). Prof. Akaike was the president of the International/Japanese Nitric Oxide Society (~2011). His major research interest is in NO and redox biology, and his group discovered in 2007 a unique second messenger (8-nitro-cGMP) that mediates electrophilic signal transduction during oxidative stress and other cellular redox signaling in general.

Cysteine persulfide has been long time known to be physiologically formed in various organisms including prokaryotes and eukaryotes like mammals as well. Its biosynthesis is effectively catalyzed mainly by two enzymes such as cystathionine γ -lyase (cystathionase, CSE) and cystathionine β -synthase (CBS) by use of cystine (CysSSCys) as a major substrate. We have unequivocally verified generation of appreciable amount of cysteine persulfide, in particular its major derivative glutathione persulfide (GSSH) in cultured cells and tissues in vivo. These reactive sulfur derivatives were potent scavengers of reactive oxygen species, specifically hydrogen peroxide. Indeed, the hydrogen peroxide scavenging property of persulfides was much greater than that of GSH and other Cys-related compounds and H₂S. Persulfides and related species also showed a strong redox signaling regulatory function via electrophile thiolation. A prime example of this is interaction of persulfide species with the endogenously generated electrophile 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. Apart from its high output of biosynthesis and potential antioxidant, redox signaling function, the biological relevance of cysteine persulfides or polysulfides is now increasingly recognized as essential structural residues or prosthetic components of several proteins and enzymes, which may include metal ligands most typically observed with iron sulfur clusters.

Surprisingly, a clear translation-coupled Cys polysulfuration was revealed herein, directly involved in a remarkable translational CysSSH biosynthesis and its incorporation into proteins ubiquitously occurring among different organisms. Therefore, exploring such unique biosynthesis and potential multiple functions of polysulfur proteins may advance a new paradigm of molecular biology and especially cellular translational mechanism, evolving an innovative era of modern redox biology.

Recent selected publications:

- Ida T., et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 7606-7611, 2014
- Ito C., et al. Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. *Mol Cell*, 52, 794-804, 2013
- Nishida M., et al. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chem Biol*, 8, 714-724, 2012
- Sawa T., et al. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chem Biol*, 3, 727-735, 2007
- Akaike T., et al. 8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100, 685-690, 2003

PL2 Synaptic Pathology of Mental Retardation through Protein Phosphorylation Modification

Chair: Yasuo Watanabe (Showa Pharmaceutical University)



Kohji Fukunaga

Department of Pharmacology Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences

Prof. Kohji Fukunaga obtained his B.S./M.S. at Kumamoto University School of Pharmaceutical Sciences and Ph.D. in Pharmacology at Kumamoto University Medical School. He joined Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical

Sciences as Chairman and Professor of the Department of Pharmacology in 2002, after 21 years at Kumamoto University Medical School as Associate Professor in Pharmacology and as Research fellow in Molecular Physiology and Howard Hughes Medical Institute at Vanderbilt University (1988-19990: Prof. TR. Soderling laboratory). Prof. Fukunaga holds concurrent appointments as Visiting Professor in The Open University of Japan, Zhejiang University and Soochow University in China. He is also Editor-in-Chief of Journal of Pharmacological Sciences. His research focuses on medication development for Alzheimer Disease and Mental Retardation.

Understanding of synaptic pathology is central dogma to develop orphan drugs to improve mental retardation. We have defined the molecular mechanism underlying synaptic pathology in mental diseases through phosphoprotein modification in the synapse (1). Dopamine D_2 receptor (D_2R) stimulation activates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) 83, a CaMKII nuclear isoform, thereby increasing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression. We found that CaMKII83 at Ser332 site is dephosphorylated by protein phosphatase-1 (PP1), thereby promoting its nuclear translocation. In neuro-2a cells, the PP1 co-expression with CaMKII83 significantly increased the nuclear CaMKII activity and enhanced BDNF expression. Likewise, chronic administration of dopamine D₂R partial agonist, aripiprazole (APZ) in rats increased the PP1 activity, thereby promoting CaMKII83 translocation into nucleus and BDNF expression in rat substantia nigra. Moreover, APZ treatment enhanced the neurite extension in cultured dopaminergic neurons. The APZ-induced neurite extension was inhibited by knockdown of PP1g1 in cultured dopaminergic neurons. Taken together, CaMKII83 at Ser332 site is dephosphorylated by PP1, resulting in translocation into nucleus. Nuclear translocated CaMKIIδ3 likely accounts for BDNF expression, promoting neurite extension and survival of dopaminergic neurons. We next defined the mechanism of synaptic pathology in mental retardation using ATRX mutant mice (2). Mutations of ATRX, a chromatin remodeling protein of the SNF-2 family, cause several mental retardation disorders, including alpha-thalassemia X-linked (ATR-X) syndrome. We generated ATRX mutant mice lacking exon 2 (ATRX^{AE2} mice), a mutation that mimics exon 2 mutations seen in human patients and associated with milder forms of mental retardation. ATRX^{AE2} mice exhibited abnormal dendritic spine formation in the medial

prefrontal cortex (mPFC) and impaired cognitive function. Consistent with other mouse models of mental retardation, $ATRX^{AE2}$ mice exhibited longer and thinner dendritic spines compared to wild-type mice without changes in spine number. Interestingly, aberrant increased calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity was observed in the mPFC of $ATRX^{AE2}$ mice. The increased CaMKII autophosphorylation and activity were associated with increased phosphorylation of the Rac1-guanine nucleotide exchange factors (GEFs), Tiam1 and Kalirin-7, known substrates of CaMKII. We confirmed increased phosphorylation of p21-activated kinases (PAKs) in mPFC extracts. Furthermore, reduced protein expression and activity of PP1 was evident in the mPFC of $ATRX^{AE2}$ mice. In cultured cortical neurons, PP1 inhibition by okadaic acid increased CaMKII-dependent Tiam1 and Kalirin-7 phosphorylation. Taken together, our data strongly suggest that aberrant CaMKII activation likely mediates abnormal spine formation in the mPFC. Such morphological changes plus elevated Rac1-GEF/PAK signaling seen in $ATRX^{AE2}$ mice likely contribute to mental retardation syndromes seen in human patients. ATRX interacts with transcription cofactor DAXX and elicits ATP-dependent chromatin stabilizing activity via DNA G-quadruplexes. Indeed the administration of stabilizer of G-quadruplexes improves cognitive deficit in $ATRX^{AE2}$ mice. Taken together, dysregulation of CaMKII-dependent phosphorylation is central role in synaptic pathology and orphan drug development in the mental retardation.

- Shioda N., et al. Aberrant hippocampal spine morphology and impaired memory formation in neuronal platelet-derived growth factor beta-receptor lacking mice. *Hippocampus* 22:1371-1378, 2012
- 2. Shioda N., et al. Aberrant calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity is associated with abnormal dendritic spine morphology in the *ATRX* mutant mouse brain. *J. Neurosci.* 31, 346-358, 2011

Recent selected publications:

- 1. Shioda N., et al. FABP3 protein promotes α-synuclein oligomerization associated with 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropiridine (MPTP)-induced neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 289, 18957-18965, 2014
- Tagashira H., et al. Methyl pyruvate rescue mitochondrial damage caused by SIGMAR1 mutation related to amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Acta* 1840, 3320-3334, 2014
- Moriguchi S., et al. Stimulation of sigma-1 receptor ameliorates depression-like behaviors in CaMKIV null mice. *Mol. Neurobiol.* (2014) DOI 10.1007/s12035-014-8923-2
- 4. Shioda N., et al. Expression of truncated form of the endoplasmic reticulum chaperone protein, σ_1 receptor, promotes mitochondrial energy depletion and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287, 23318-23331, 2012
- Moriguchi S., et al. The T-type voltage gated calcium channel as a molecular target of the novel cognitive enhancer ST101: enhancement of long-term potentiation and CaMKII autophosphorylation in rat cortical slices. *J. Neurochem.* 121, 44-53, 2012

Symposia

S-1 Biotransformation by enzymes

Chairs: Yasumitus Ogra (Chiba University)

Hiroshi Yamazaki (Showa Pharmaceutical University)

O3. Human Cytochrome P450 1B1 Revisited: Its Possible Roles during Cancer Progression

Young-Jin Chun

Professor, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, Korea



Young-Jin Chun is a Professor of College of Pharmacy at Chung-Ang University, Seoul, Korea since 2007. He received his BS from College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea and he got his MS and Ph.D. degrees from Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Daejon, Korea. He trained as a post-doctoral fellow at Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA in 1994. He became an Assistant Professor in 1997, Associate Professor in 2002, and Full Professor in 2007 at College of Pharmacy, Chung-Ang University. Currently, he is a President of Korean Society for Alternative to Animal Experiments (KSAAE) and a director of the Consortium of Alternative Methods for Safety Evaluation of Cosmetic (CAMSEC). He also serves as a Secretary-General of Korean Society of Toxicology as well as Asian Society of Toxicology. Professor Chun's research has focused on the cellular functions of steroid metabolizing enzymes including cvtochrome P450 1B1 and steroid sulfatase, mechanisms of apoptosis and cancer development. He is also interested in studying alternative methods for animal experiments.

Human cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) belongs to the CYP1 family and is known as a major enzyme for estradiol 4-hydroxylation. Metabolic activation of 17β -estradiol (E2) to 4-hydroxy E2 by CYP1B1 has been postulated to be an important factor in mammary carcinogenesis. It has been reported that CYP1B1 expression is higher in various tumor tissues, especially in hormone-related cancers such as breast, ovarian and prostate. To explore the role of human CYP1B1 in cancer progression, we investigated CYP1B1 action in cells after overexpression or induction with DMBA, or inhibition with specific CYP1B1 siRNA or TMS, a specific inhibitor and identified that CYP1B1 promotes cell proliferation in human mammary tumor cells. CYP1B1 activates Wnt/β-catenin signaling and induces EMT program via up-regulation of EMT marker proteins and EMT-inducing transcription factors. It postulated that

sp1 transcription factor acts as a key mediator for CYP1B1 action. Taken together, we demonstrated that CYP1B1, a major estradiol 4-hydroxylase, is able to promote cancer cell progression through activation of Wnt/ β -catenin signaling and EMT program and may be regarded as a target enzyme for blocking cancer development.

Recent selected publications:

- Choi, S.et al., Identification of cornifelin and early growth response-1 gene as novel biomarkers for in vitro eye irritation using a 3D reconstructed human cornea model MCTT HCETM. *Arch of Toxicol* in press.
- Han, S. et al., Functional characterization of CYP107W1 from Streptomyces avermitilis and biosynthesis of macrolide oligomycin A. *Arch. Biochem. Biophys.* 575:1-7, 2015.
- 3. Bae, O. N. et al., Chemical allergens stimulate human epidermal keratinocytes to produce lymphangiogenic vascular endothelial growth factor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 283: 147-155, 2015.
- 4. Jeong, J.-J., et al., The role of annexin A5 in cisplatininduced toxicity in renal cells: the molecular mechanism of apoptosis. *J. Biol. Chem*. 289: 2460-2481, 2014.
- 5. So, K. S. et al., Autophagosome-mediated EGFR downregulation induced by the CK2 inhibitor enhances the efficacy of EGFR-TKI on EGFR-mutant lung cancer cells with resistance by T790M. *PLoS One* 9: e114000, 2014.

O4. Identification of a novel selenometabolite and elucidation of its biological and toxicological significance

Yasumitsu Ogra

Professor, Department of Toxicology and Environmental Health, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan



Yasumitsu Ogra is a Professor of Laboratory of Department of Toxicology and Environmental Health,

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan since 2015. After receiving his PhD in Pharmaceutical Sciences from Chiba University in Japan, he trained as a post-doctoral fellow at National Institute of Occupational Health, Kawasaki, Japan. He was recruited as a Research Associate of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan. After an experience of Visiting Fellow at The National Center for Scientific Research, Pau, France, he had a post as Associate Professor of Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan in 2004 and moved to a Professor, Laboratory of Chemical Toxicology and Environmental Health, Showa Pharmaceutical University, Japan in 2009. His research has focused on selenometabolites in chemical toxicology and environmental health for humans.

When human hepatoma HepG2 cells were exposed to sodium selenite, an unknown selenium metabolite was detected in the cytosolic fraction by a hyphenated technique, i.e., HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The unknown selenium metabolite was also detected in the mixture of HepG2 homogenate and sodium selenite in the presence of exogenous glutathione (GSH). The unknown selenium metabolite was concretely identified as selenocyanate by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), ESI quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-Q-TOF-MS) and LC-ICP-MS. Because exogenous cyanide increased the amount of selenocyanate in the mixture, selenocyanate seemed to be formed by the reaction between selenide, the product of the reduction of selenite, and endogenous cyanide. Rhodanase, an enzyme involved in thiocyanate synthesis, was not required for the formation of selenocyanate. Selenocyanate was less toxic to HepG2 cells than selenite or cyanide, suggesting that it was formed to reduce the toxicity of selenite. On the other hand, selenocyanate could be assimilated into selenoproteins and selenometabolites in rats in the same manner as selenite. Consequently, selenite was metabolized to selenocyanate to temporarily ameliorate its toxicity, and selenocyanate acted as an intrinsic selenium pool in cultured cells exposed to surplus selenite. The results also suggest that endogenous cyanide can act to detoxify selenite by directly and non-enzymatically sequestering selenide. I propose that the role of endogenous cyanide is called "reactive cyanogen species, RCNS."

Recent selected publications:

- Y. Ogra, Identification of selenometabolites in animals and plants by mass spectrometry. *Food and Nutritional Components in Focus No. 9, Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, V.R. Preedy (ed.), The Royal Society of Chemistry, London, in press.
- Y. Ogra, Selenium metabolism. *Diversity of Selenium Functions in Health and Disease*, R. Brigelius-Flohé and H. Sies (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, in

press.

- 3. Y. Anan et al., Complementary use of LC-ICP-MS and LC-ESI-Q-TOF-MS for selenium speciation. *Anal. Sci.* in press.
- 4. Y. Ogra et al., Metabolism of trimethylselenonium ion in selenium accumulator, *Allium sativum*. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2, 95-99, 2015
- 5. Y. Ogra et al., Comparison of accumulation of four metalloids in *Allium sativum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 604-608, 2015.

O5. Human Drug Metabolism by Cytochrome P450 Enzymes

Hiroshi Yamazaki

Professor, Lab. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Showa Pharmaceutical University



Hiroshi Yamazaki is a Professor of Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Showa Pharmaceutical University, Tokyo, Japan since 2005. After receiving his BS and MS degrees from Gifu Pharmaceutical University and PhD in Pharmaceutical Sciences from Osaka University in Japan, he trained as a post-doctoral fellow at Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA in 1994. He was recruited as an Associate Professor of Kanazawa University from Osaka Prefectural Institute of Public Health in 1998 and moved to a post as Associate Professor of Hokkaido University Graduate School of Pharmaceutical Sciences in 2001. His research has focused on polymorphic cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase, which are major catalysts involved in drug metabolism in toxicology and pharmacology in humans. He has authored over 310 publications (http://www.researcherid.com/rid/A-6081-2011) and is recognized as a 'Highly Cited Researcher' in Pharmacology by Thomson Reuters.

Cytochrome P450 (P450 or CYP) enzymes are involved in the oxidative metabolism of drugs, toxic chemicals, and endogenous compounds. The Old and New World monkeys such as cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and common marmosets (*Callithrix jacchus*), respectively, are used for preclinical studies to predict the toxicity and pharmacokinetics of drugs due to their genetic similarity to humans. There is renewed interest in both the toxicity and pharmacological mechanisms of thalidomide. Thalidomide has been teratogenic in primates, but not in rodents. The mechanism of action and teratogenicity of thalidomide still remains unclear. Recent findings on the induction of human cytochrome P450 3A enzymes by thalidomide and its P450-mediated bioactivation towards understanding the teratogenic and pharmacological property of thalidomide are summarized. Homotropic and heterotropic cooperativity of human P450 3A4/5 by thalidomide was demonstrated in various in vitro systems and hepatocytes in vivo models with chimeric mice expressing humanized liver cells. Thalidomide also induced human P450 3A enzyme through pregnane X receptor (PXR) and subsequently its hydroxylation by human liver microsomal P450 3A4/5. The second oxidation step in the human P450 3A4/5 pathway generated a reactive intermediate, possibly an arene oxide that could be trapped by glutathione to give adducts, confirmed in mouse models transplanted with human hepatocytes. These results collectively indicate activation of thalidomide to reactive metabolites by autoinduced human cytochrome P450 3A enzymes, with substrate cooperativity, and implications for development of analogs. Screening for avoiding unwanted bioactivation but keeping the immunomodulatory properties is a strategic pathway to new cancer drugs.

Recent selected publications:

- 1. Miyaguchi, T. et al., Human urine and plasma concentrations of bisphenol A extrapolated from pharmacokinetics established in *in vivo* experiments with chimeric mice with humanized liver and semi-physiological pharmacokinetic modeling. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 72, 71-76, 2015.
- 2. Yamazaki, H., et al., Zone analysis by twodimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry of *in vivo* protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicants troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver. *Toxicol. Res.*, 4, 106-111, 2015.
- Murayama, N. et al., Thalidomide increases human hepatic cytochrome P450 3A enzymes by direct activation of pregnane X receptor, *Chem. Res. Toxicol.*, 27, 304-308, 2014.
- 4. Shimizu, M. et al., Qualitative *de novo* analysis of full length cDNA and quantitative analysis of gene expression for common marmoset (*Callithrix jacchus*) transcriptomes using parallel long-read technology and short-read sequencing. *PLoS One*, 9, e100936, 2014
- 5. *Fifty Years of Cytochrome P450 Research*, ed. Hiroshi Yamazaki, Springer, Tokyo, 2014

O6. Induction of integrin signaling by steroid Sulfatase metabolism in HeLa cells

Dong-Jin Ye

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, 156-756,Korea

Steroid sulfatase (STS) is responsible for the hydrolysis of aryl and alkylsteroidsulfates. STS has a pivotal role in regulating the level of estrogen and androgen responsible for growth of hormone-dependent tumors, such as breast or prostate cancer. However, the molecular function for tumor growth of STS is still not clear. To elucidate possible role of STS on cancer cell proliferation, we investigated whether STS is able to regulate integrin signaling pathway. In this study, we observed that overexpression of STS in HeLa cells induces the expression of integrin $\beta 1$ and fibronectin, a ligand of integrin $\alpha 5\beta 1$ at protein and mRNA levels. Dehydroepiandrosterone (DHEA), one of the main metabolite of STS, also induces mRNA and protein level of integrin $\beta 1$ and fibronectin. We found that STS expression and DHEA enhance phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) at tyrosine 925 residue. Moreover, phosphorylation of ERK at threonine 202 and tyrosine 204 residues was also induced, indicating that STS may activate Ras/Raf/MEK signaling pathway. In conclusion, these results suggest that STS expression and DHEA may enhance Ras/Raf/MEK signaling through upregulation of integrin β 1 and activation of FAK.

O7. Activation of aerobic glycolysis by steroid sulfatase in HeLa cells

Sangyun Shin

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Steroid sulfatase (STS) expression has been considered to play a pivotal role in estrogen-dependent cancers. STS is known as a target enzyme for suppressing estrogenmediated carcinogenesis. STS is able to convert estrogen sulfate to estrone form, like dehydroepiandrosterone active sulfate (DHEA-S) to its' form dehydroepiandrosterone (DHEA). Aerobic glycolysis is a hallmark of cancer metabolism. Hypoxia inducing factor 1 subunit HIF1 α is recognized as an important regulator of aerobic glycolysis. To elucidate whether STS is able to regulate cancer metabolism, the effects on aerobic glycolysis were determined. STS overexpression significantly converted DHEA-S to DHEA. STS and the major product DHEA enhanced HIF1a protein, mRNA, promoter activity in HeLa cells. Glycolytic enzymes such as hexokinase 2 (HK-2) and glucose transporter (GLUT) were increased by STS overexpression and DHEA treatment in protein and mRNA levels. When cells were treated with HIF1 α siRNA, all glycolytic enzymes induced by STS and DHEA were down-regulated. Lactic acid production was also increased by STS and DHEA. STX064, a STS specific inhibitor inhibited DHEA formation and lactic acid production in HeLa cells. In conclusion, STS and the major product DHEA may regulate aerobic glycolysis via HIF1a induction.

O8. Cytochrome P450-dependent xenobiotic metabolism in marmosets

Shotaro Uehara

Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Showa Pharmaceutical University

New World primate common marmosets (*Callithrix jacchus*) are potentially useful animal models for preclinical studies because of their benefits such as small body size, ease handling, high fertility, and early sexual maturity. However, cytochrome P450 (P450) enzymes, major xenobiotic-metabolizing enzymes, have not been fully identified and characterized in marmosets. *De novo* assembly and expression analysis of marmoset transcripts with pooled liver, intestine, kidney, and brain samples were showed that 18 P450-like genes displayed the tissue expression pattern and that P450 3A, 2D and 2C enzymes were highly expressed in the liver, similar to that of humans. On the basis of mRNA tissue distribution, novel 8

P450 cDNA were successfully isolated from marmoset tissues. The amino acid sequence deduced from P450 cDNA showed a high sequence identities (>85%). Marmoset liver microsomes efficiently metabolized the human P450 3A, 2D and 2C probe substrates. Indeed, heterologously expressed marmoset P450 3A and 2D enzymes had highly catalytic activities compared with those of humans for metoprolol O-demethylation and midazolam 1'-hydroxylation, respectively. Heterologously expressed marmoset P450 2C19 enzyme catalyzed human P450 2C9 and 2C19 probe substrates and had high V_{max} and low K_m values for S-warfarin 7-hydroxylation comparable to those of marmoset liver microsomes, unlike those of cynomolgus monkeys, indicating similar warfarin stereoselectivity to findings in humans. These results indicated that marmoset P450 enzymes had functional characteristics similar to those of humans, however, they had partially different substrate specificities and catalytic activities. Supported by the Strategic Research Program for Brain Sciences of Japan Agency for Medical Research and Development.

S-2 Challenge to Infectious Disease

Chairs: Yoshikazu Ishii (Toho University)

Tomoyuki Hamamoto (Showa Pharmaceutical University)

O9. Proteomic Analysis of Extracellular Vesicles Derived from *Mycobacterium tuberculosis*

Chulhun L. Chang

Professor, Department of Laboratory Medicine, Pusan National University School of Medicine, Yangsan, Korea



Chulhun L. Chang is a Professor of Department of Laboratory Medicine, Pusan National University School of Medicine, Yangsan in Korea since 2002. He received his M.D. degree from Pusan National University School of Medicine. He became a Visiting Professor at University of Illinois at Chicago, Institute for Tuberculosis Research, Chicago, IL, in USA in 2001. He held concurrent appointments as a Director, Department of Microbiology, Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association, Seoul, in Korea during 2005-2008. His interests and activities focus on clinical microbiology/mycobacteriology, mycobacterial susceptibility testing, drug resistance mechanisms of mycobacteria, and identification of non-tuberculous mycobacteria.

The release of extracellular vesicles, also known as outer membrane vesicles, membrane vesicles, exosomes, and microvesicles, is an evolutionarily conserved phenomenon from bacteria to eukaryotes. It has been reported that Mycobacterium tuberculosis releases extracellular vesicles harboring immunologically active molecules, and these extracellular vesicles have been suggested to be applicable in vaccine development and biomarker discovery. However, the comprehensive proteomic analysis has not been performed for M. tuberculosis extracellular vesicles. In this study, we identified a total of 287 vesicular proteins by four LC-MS/MS analyses with high confidence. In addition, we identified several vesicular proteins associated with the virulence of *M. tuberculosis*. This comprehensive proteome profile will help elucidate the pathogenic mechanism of M. tuberculosis. The data have been deposited to the ProteomeXchange with identifier PXD001160.

Recent selected publications:

- Kim Y.J., et al., Evaluation of propidium monoazide real-time PCR for early detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* in clinical respiratory specimens, *Ann Lab Med*, 34:203-209, 2014
- Choi G.E. et al., Efficient differentiation of *Mycobacterium abscessus* complex isolates to the species level by a novel PCR-based variable-number tandem-repeat assay, *J Clin Microbiol* 49(3):1107-1109, 2011
- 3. Choi G.E., et al., High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates, *J Clin Microbiol* 48(11):3893-3898, 2010
- Kim C.M., et al., Development and evaluation of oligonucleotide chip based on the 16S-23S rRNA gene spacer region for detection of pathogenic microorganisms associated with sepsis, *J Clin Microbiol* 48(5):1578-1583, 2010
- Gill-Han Bai, et al., Proficiency analysis of drug susceptibility testing by the National-Level TB Laboratories from 1995 to 2003, *J Clin Microbiol* 45(11):3626-3630, 2007

O10. Novel Diagnostics Technologies for Infectious Diseases and Detection Methods for Antibiotic Resistant Organisms

Yoshikazu Ishii

Professor, Division of Infection Control and Prevention, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan



Yoshikazu Ishii is a professor of Division of Infection Control and Prevention, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine in Japan since 2013. After receiving his BS degree from Faculty of Pharmaceutical Science, College of Science and Technology, Nihon University in Japan, he pursued a career as pharmacist at Department of Pharmacy, Nagasaki University Hospital in Japan. He became an Assistant Professor at Department of Histology, Nagasaki University School of Dentistry, and moved to a post as Assistant Professor of Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine, Faculty of Medicine. During the post, he experienced a Senior Researcher of Centre for Protein Engineering, University of Liege in Belgium for two years. He became a Lecturer at Department of Microbiology and Infectious Diseases, Toho University School of Medicine, Faculty of Medicine in 2010. His research has focused on construction of the clinical diagnosis for infectious disease by molecular biological techniques. From 1980's, he is continuing research for the antibiotic resistance Gram-negative bacteria.

The gold standard of diagnostics for infectious diseases and detection of antibiotic resistant organisms are culture and antibiotic susceptibility testing respectively. However, diagnosis of infectious diseases is sometimes unsuccessful because patients have been treated with antibiotics or are infected with unculturable microorganisms. The next generation sequencer is a powerful tool for the diagnosis of infectious diseases and enables a comprehensive search for antibiotic resistant genes. Some examples of successful diagnosis and resistance gene detection will be introduced in this presentation. In addition, antigen detection using an imunochromatographical technique is a simple and rapid method for the diagnosis of infectious diseases such as Legionnaires' disease, pneumococcal infection, and Mycoplasma pneumonia. We have also constructed a detection system for carbapenemases from Acinetobacter spp. such as the OXA-23 group, OXA-24/40 group, OXA-51 group and OXA-58 group. In this presentation, I will discuss novel techniques for the diagnosis of infectious diseases and the detection of antibiotic resistant factors.

Recent selected publications:

- Mano Y., et al., Molecular analysis of the integrons of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan, *BMC Microbiol* 15(1): 41, 2015
- 2. Nakano R., et al., Rapid detection of the Klebsiella pneumonia carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) *J Infect Chemother* 21(3): 202-206, 2015
- Nagasawa M., et al., Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria, *J Infect Chemother* 20(10): 635-638, 2014
- Oguri T., et al., Crystal structure of Mox-1, a unique plasmid-mediated class C β-lactamase with hydrolytic activity towards moxalactam, *Antimicrob Agents Chemother* 58(7): 3914-3920, 2014
- Kojima Y., et al., Spread of CTX-M-15 extendedspectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates through household contact and plasmid transfer, *J Clin Microbiol* 52(5): 1783-1785, 2014

O11. Contribution of Pharmacists to Infection Control in Japan

Tomoyuki Hamamoto

Professor, Educational and Research Center for Clinical Pharmacy, Showa Pharmaceutical University



Tomoyuki Hamamoto is a Professor of Educational and Research Center for Clinical Pharmacy in Showa Pharmaceutical University since 2010. After receiving his B.S. degree from Nagasaki University School of Pharmacy and his M.S. degree from Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University in Japan, he pursued a career as staff pharmacist at Department of Pharmacy, Nagasaki University Hospital. He got promoted to a chief pharmacist in 1994, and a vice-director in 2008 at Department of Pharmacy, Nagasaki University Hospital before arriving at Showa Pharmaceutical University. He received his Ph.D. at Graduate School of Science, Kyoto University in Japan in 2009. In this project, his research focuses on the rapid detection method for the identification of the pathogens of infectious disease and their antimicrobial resistance factors using PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry (PCR/ESI-MS).

In Japan, based on the idea that a team-based approach is effective for infection control, an accreditation system for infection control doctors (ICDs) was established in 1999, followed by that for infection control nurses (ICNs) in 2000 and infection control medical technologists (ICMTs) in 2004. As for pharmacists, an accreditation system for Board-Certified Infection Control Pharmacy Specialists (BCICPSs) was established in 2005, followed by that for Board-Certified Pharmacist Infection Control (BCPIC) and Certified Infectious Disease Chemotherapy Pharmacists (IDCPs) in 2008. Pharmacists possessing such credentials have participated as a member of infection control teams (ICTs). As a computational requirement for the additional medical fee for infection control measures in the revised medical fees in FY2012 and thereafter, the pharmacists' participation in ICTs has been stipulated and their involvement in infection control has been promoted.

In Japan, pharmacists in infection control play two major roles in ICT: promotion of appropriate use of disinfectants and that of antimicrobial agents. The former is characterized by their offering advice to healthcare professionals regarding the selection and use of appropriate disinfectants, checking on the use and storage, monitoring consumption, and developing guidelines or manuals. The latter involves developing notification and/or approval systems for anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and broad-spectrum antimicrobials, antibiograms, and guidelines or manuals; monitoring consumption; and implementing therapeutic drug monitoring (TDM) of anti-MRSA antimicrobials, such as vancomycin (VCM), teicoplanin (TEIC), and arbekacin (ABK), aminoglycosides, and voriconazole; as well as educating healthcare professionals. Besides their involvement in regional cooperation, pharmacists in ICT are also involved in antimicrobial stewardship by conducting daily reviews of prescriptions for inpatients who have positive blood culture, those who are receiving anti-MRSA and/or broad-spectrum antimicrobials, and those who are receiving all-intravenous antimicrobials in advanced medical facilities. Aside from their roles in ICT, pharmacists are in charge of the aseptic preparation of parenteral injections, such as total parenteral nutrition (TPN) and anticancer agents.

By fulfilling these roles, pharmacists in Japan contribute to infection control.

Recent selected publications:

- Hamamoto T., et al., Visualization and analysis of adverse reactions of molecularly targeted anticancer agents using the self-organizing map (SOM), *Yakugaku Zasshi* 134(10): 1069-1080, 2014
- Watanabe K., et al., Current status of awareness and implementation of the "Yakuzai-Kanri Summary" in community pharmacies prescribing drugs under the health insurance system in Japan, *Jpn J Pharm Health Care Sci* 39(6): 366-374, 2013
- 3. Watanabe K., et al., Effects and problems of education from first clinical pharmacy training at hospital in the six-year system of pharmaceutical education: questionnaire on students and instructing pharmacists, *Journal of Drug Interaction Research* 35(3): 31-40, 2012

O12. Evaluation of Dual-Color Fluorescence In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Non-Tuberculous Mycobacteria in Clinical Specimens

Namhee Kim

Department of Laboratory Medicine, Pusan National University School of Medicine, Yangsan, Korea

Background: Peptide nucleic acid (PNA) probes are artificial DNA analogues with a hydrophobic nature that can penetrate the mycobacterial cell wall. We evaluated a FISH method for simultaneous detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in clinical respiratory specimens using differentially labeled PNA probes.

Methods: PNA probes targeting the mycobacterial 16S ribosomal RNA were synthesized. The cross-reactivity of MTB- and NTM-specific probes was examined with reference strains and 10 other frequently isolated bacterial

species. A total of 140 sputum specimens were analyzed, comprising 100 MTB-positive specimens, 21 NTM-positive specimens, and 19 MTB/NTM-negative specimens; all of them were previously confirmed by PCR and culture. The PNA FISH test results were graded by using the United States Centers for Disease Control and Prevention-recommended scale and compared with the results from the fluorochrome acid-fast bacterial stain.

Results: The MTB- and NTM-specific PNA probes showed no cross-reactivity with other tested bacterial

species. The test results demonstrated 82.9% agreement with the culture results with diagnostic sensitivity of 80.2% and diagnostic specificity of 100.0% (kappa = 0.52, 95% confidence interval: 0.370 - 0.676).

Conclusion: Dual-color PNA FISH showed high specificity for detecting and identifying mycobacteria in clinical specimens. However, because of its relatively low sensitivity, this method could be more applicable to culture confirmation. In application to direct specimens, the possibility of false-negative results needs to be considered.

S-3 Coordination of Redox biology

Chairs: Motohiro Nishida (National Institutes of Natural Scienses)

Yasuo Watanabe (Showa Pharmaceutical University)

O13. Peroxiredoxin as a Regulator and Sensor of Local Hydrogen Peroxide

Sue Goo Rhee

Distinguished Professor, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea



Sue Goo Rhee is a Distinguished Professor of Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea since 2013, after 9 years at Ewha Womans University, Seoul, Korea as a Distinguished Professor, Division of Molecular Life Science. After receiving his B.S. in Chemistry from Seoul National University, Seoul, Korea, Rhee pursued his Ph.D. in Organic Chemistry at Catholic University of America, Washington, DC. He then joined the Section on Signal Transduction, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), National Institutes of Health (NIH) Bethesda, MD, USA. Rhee was chief of the Section on Signal Transduction and then to chief of the Laboratory of Cell Signaling, NHLBI, NIH. He was also in Senior Biomedical Research Service, NHLBI, NIH. In 2005, he joined Ewha Womans University, Seoul, Korea as Distinguished Professor, Division of Molecular Life Science. Dr. Rhee discovered a novel antioxidant enzyme, which is now known as peroxiredoxin.

Peroxiredoxins (Prxs) represent a superfamily of thioldependent peroxidases that are able to reduce hydrogen peroxide, alkyl hydroperoxides, and peroxynitrite. As documented now by a large body of literature, these

enzymes are highly conserved throughout evolution and are present in all kingdoms of life and almost all organisms. Prxs are highly expressed in virtually all living species and very often detected as major spots in proteomic analyses using two-dimensional gel electrophoresis. Peroxidase activity of peroxiredoxins depends on cysteines (Cys). The presence of a conserved and catalytically essential cysteine residue in the N-terminal domain of all Prxs, termed now the peroxidatic cysteine (C_P). The N-terminal C_P attacks the peroxide and oxidized to a cysteine sulfenic acid (CP-SOH). The reduction of the cysteine sulfenic acid is the second step of the peroxidase reaction and differs according to the type of Prx. Based on the resolution mechanism and the existence or the lack of a resolving cysteine (C_R) localized to the C-terminal region of the enzyme, Prxs were divided into three subgroups referred to as typical 2-Cys, atypical 2-Cys and 1-Cys Prxs. Atypical 2-Cvs Prx can be further divided into two groups according to sequence homology. Mammalian cells express six isoforms of Prx: four 2-Cys Prx isoforms (Prxs I-IV), one atypical 2-Cys Prx isoform (Prx V), and one 1-Cys Prx isoform (Prx VI). These isoforms vary in subcellular localization, with Prx I, II, and VI being localized mainly in the cytosol; Prx III being restricted to mitochondria; Prx IV being found predominantly in the endoplasmic reticulum (ER); and Prx V being present in the cytosol, mitochondria, and peroxisomes. The functions of Prx are regulated through various posttranslational modifications such as phosphorylation, acetylation, or active site cysteine hyperoxidation. Peroxiredoxins not only function as peroxide-eliminating enzymes but also as sensors and regulators of redox signaling pathways. Although not yet fully understood, it appears they can do this by a variety of

mechanisms, including regulating peroxide levels, regulating the reducing capacity of thioredoxin, acting as targets that relay a peroxide signal to a regulatory protein, and protecting cells via chaperone activity. Recent research has assigned conformation- and redox dependent functions to specific Prxs that include site-specific peroxidase activity, role as redox sensor and chaperone, and as binding partner to target proteins.

Recent selected publications:

- Bae, S.H., et al., Sestrins Activate Nrf2 by Promoting p62-Dependent Autophagic Degradation of Keap1 and Prevent Oxidative Damage, *Cell Metabolism*, 17:73-84, 2013
- Koo M.Y. et al., Selective inhibition of the function of tyrosine-phosphorylated STAT3 with a phosphorylation site-specific intrabody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:6269-74, 2014
- Cho C.S., et al., Circadian rhythm of hyperoxidized peroxiredoxin II is determined by hemoglobin autoxidation and the 20S proteasome in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111: 12043–12048, 2014
- Lim J.M., et al., Control of the pericentrosomal H₂O₂ level by peroxiredoxin I is critical for mitotic progression. *J. Cell Biol.* in press
- Kil I.S., et al., Circadian Oscillation of Mitochondrial Sulfiredoxin Is Determined by Its Redox-Dependent Import and Peroxiredoxin III–Regulated Degradation by Lon. *Mol. Cell*, in press

O14. Negative regulation of cardiac remodeling by S-polythiolation of G proteins

Motohiro Nishida

Professor, Division of Cardiocirculatory Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute of Physiological Sciences), National Institutes of Natural Scienses



Motohiro Nishida is a Professor of Division of Cardiocirculatory Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute of Physiological Sciences), National Institutes of Natural Scienses since 2013. He holds concurrent appointments as a JST PRESTO researcher and a Professor of the Department of Translational Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University. After receiving his B.S. at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Nishida pursued his M.S. and Ph.D. at the Department of Pharmacology & Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo. He joined Kyushu University, where he held several positions concluding as Associate Professor (PI) of Department of Drug Discovery & Evolution, Graduate School of Pharmaceutical Sciences after 2 years at the Center for Integrative Bioscience, Okazaki National Research Institutes, Okazaki as an Assistant Professor. His research interest is signaling mechanisms underlying myocardial repair and regeneration.

Structural and morphological changes of the heart (cardiac remodeling) is a major clinical outcome of chronic heart failure. We have previously reported that covalent modification of H-Ras small GTP-binding protein by endogenous electrophiles, such as 8-nitro-guanoshine 3',5'-monophosphate (8-nitro-cGMP), promotes cardiomyocyte senescence in mouse hearts with chronic heart failure. In addition, exogenous treatment with NaHS improved heart failure by eliminating 8-nitro-cGMP accumulation. As reported by Ida et al. (PNAS, 2014), NaHS per se hardly eliminates electrophiles in vitro, and formation of more nucleophilic sulfur species, such as Cys persulfide and polysulfide in proteins, predominatly eliminates endogenous electrophilies in the heart. We here demonstrate that endogenous polysulfides are accumulated in the peri-infarct region of mouse myocardium 1week after myocardial infarction. Using transmission electron microscopy, mitochondrial hyper-fission is caused accompanying induction of hypoxia-inducible factors in the peri-infarcted region. Hypoxic stress or exogenous treatment with an electrophile, such as methylmercury induces mitochondrial hyper-fission (MeHg), via electrophilic modification of rodent dynamin-related protein 1 (Drp1) at Cys-624. Polysulfide detection assay revealed that Cys624 of endogenous Drp1 forms Cys persulfide in rat cardiomyocytes, and persulfide level is dramatically reduced by MeHg exposure. Treatment with NaHS for 24 hrs completely suppresses MeHg-induced modification, activation of Drp1, mitochondrial hyperfission, and mechanical stress-induced cardiac injury. These results strongly suggest that S-polythiolation of G proteins, such as Drp1 and H-Ras, underlies suppression of eletrophiles-mediated cardiac vulnerability to hemodynamic overload.

Recent selected publications:

- 1. Nishida M, et al., Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chem. Biol.* 8: 714-724, 2012
- Nishida M, et al., Heterologous down-regulation of angiotensin type1 receptors by purinergic P2Y₂ receptor stimulation through S-nitrosylation of NF-κB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 6662-6667, 2011
- 3. Nishida M, et al., $G\alpha_i$ and $G\alpha_o$ are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* 408, 492-495, 2000

O15. Mutual covalent modifications of nitricoxide and reactive sulfur species

Yasuo Watanabe

Professor, Laboratory of Pharmacology, Showa Pharmaceutical University



Yasuo Watanabe is a professor of the Laboratory of Pharmacology in Showa Pharmaceutical University since 2006. After receiving his M.D. in Mie University School of Medicine, he pursued his Ph.D. in Neurosurgery at Nagoya University School of Medicine. He then trained as a post-doctoral fellow at Vollum Institute, Oregon Health and Sciences University, USA (Prof. Thomas R. Soderling). He was then recruited as a Research Associate, Assistant Professor in Pharmacology at Nagoya University, School of medicine. He moved Faculty of Medicine, Kagawa University as an Associate Professor in Physiology before arriving at Showa Pharmaceutical University. His reserach focuses on the regulatory mechanism of protein kinases via redox modification.

Intracellular calcium (Ca²⁺) is a major regulator of cellular functions, especially in neural tissues where many of its physiological responses are mediated by the Ca^{2+} binding protein calmodulin (CaM). The actions of CaM are mediated by its association with specific target proteins, some of which are known as CaM-binding proteins, which include kinases such as CaM kinases (CaMKs) and flavoproteins such as the nitric-oxide synthases (NOSs). We have previously reported that mutual covalent modifications of CaMKs and NOSs via site specific Snitrosylation and phosphorylation, respectively, may contribute the pathological phenomena of post-ischemic damage of the brain. Recently, we reported that cysteine hydropersulfide (CysSSH) was generated by cystathionine γ -lyase (CSE), which in turn may contribute to other CysSSH derivatives of peptides/proteins (termed reactive sulfur species), involving in their catalytic activities (PNAS, 2014). Here, we demonstrate that CaMKs and NOSs are candidates of CysSSH derivatives. In vitro incubation of CaMK or NOS either with CysSSH generated by CSE or Na2S4, a reactive sulfur donor, resulted in a dose-dependent inactivation of each enzyme activity. Dithiothreitol, a small molecule reducing reagent, restored the each enzyme activity. Calcium ionophore, A23187 induction of NOS or CaMK enzyme activity in cells was significantly decreased when cells were transfected with CSE cDNA or cells were treated with dimethyl trisulfide, a reactive sulfur donor, respectively. Interestingly, in vitro incubation of CSE with Snitrosocysteine, an NO donor, results in a dose-dependent inactivation of CysSSH-producing CSE enzyme activity. On the basis of the above results, we propose that reactive sulfur and NO signaling are mutually regulated through the CysSSH- and S-nitrosyl- modification of specific proteins.

Recent selected publications:

- Ida T., et al., Reactive cysteine persulfides and Spolythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 7606-7611, 2014
- Kasamatsu S., et al., Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser847 in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem J.* 459, 251-263, 2014
- 3. Osuka K., et al., Expression of suppressor of cytokine signaling 3 in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage *J. Neuroinflamm.* 11, 142, 2014
- Nakagawa A., et al., Toward a new concept of liver surgery: Real-time monitoring of liver damage during ischemia-reperfusion using a nitric oxide-selective sensor in rat liver. *Br. J. Surg.* 99, 1120-1128, 2012
- Nishi A., et al., Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1199-1204, 2005

O16. Peroxiredoxin III does not make hyperoxidation-dependent decamer formation

Se Kyoung Lee

Yonsei University College of Medicine, Korea

Peroxiredoxins (Prxs) are a ubiquitous family of cysteine-based peroxidase. Members of the 2-Cys Prx (Prx I to Prx IV) subfamily of Prxs can be inactivated via hyperoxidation of the active cysteine to sulfinic acid (Cys-SO₂H) during the reduction of peroxides and are reactivated via a reaction catalyzed by sulfiredoxin (Srx) in a process that consumes ATP and cellular thiols. Prx I and Prx III are cytosolic proteins, whereas Prx IV is found in the endoplasmic reticulum and Prx III is present exclusively in mitochondrial matrix. Members of the 2-Cys Prx subfamily exist in an equilibrium of dimers, decamers, and high-molecular-weight complexes. The equilibrium depends on the isoform and the redox state of the catalytic cysteine. The decamer formation of 2-Cys Prxs induces a functional switch of 2-Cys Prxs from a cellular peroxidase to a molecular chaperone.

When cultured cells or organs are exposed to low concentration of H_2O_2 , the sulfinic forms of Prx I, II and III were readily detected, while the sulfinic Prx IV was not. Using gel filtration chromatography, we observed that sulfinic Prx III was associated mainly with the dimeric form, whereas the sulfinic Prx I and II were detected exclusively in with decameric state. These results suggest that the hyperoxidation of Prx III is likely to regulate the extent of H_2O_2 release from mitochondria, not to serve as a chaperone.

O17. Circadian Oscillation of Sulfiredoxin in the Mitochondria

In Sup Kil

Yonsei University College of Medicine, Korea

Hydrogen peroxide (H₂O₂) released from mitochondria regulates various cell signaling pathways. Given that H₂O₂-eliminating enzymes such as peroxiredoxin III (PrxIII) are abundant in mitochondria, however, it has remained unknown how such release can occur. Active undergoes reversible PrxIII-SH inactivation via hyperoxidation to PrxIII-SO₂, which is then reduced by sulfiredoxin. We now show that the amounts of PrxIII-SO₂ and sulfiredoxin undergo antiphasic circadian oscillation in the mitochondria of specific tissues of mice maintained under normal conditions. Cytosolic sulfiredoxin was found to be imported into the mitochondria via a mechanism that requires formation of a disulfide-linked complex with heat shock protein 90, which is promoted by H₂O₂ released from mitochondria. The imported sulfiredoxin is degraded by Lon in a manner dependent on PrxIII hyperoxidation state. The coordinated import and degradation of sulfiredoxin provide the basis for sulfiredoxin oscillation and consequent PrxIII-SO₂ oscillation in mitochondria, and likely result in an oscillatory H₂O₂ release.

O18. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV as potential targets of reactive sulfur species

Tsuyoshi Takata

Laboratory of Pharmacology, Showa Pharmaceutical University

Reactive sulfur species, such as cysteine hydropersulfide (CysSSH) are produced by cystathionine γ -lyase (CSE) using cystine as a substrate within the cell. The chemical reactivity of CysSSH is thought to be involved in the catalytic activity of particular enzymes. Thus, the identification of novel protein-SSH modification has become an emerging theme in the analysis of the biological significance of CysSSH. In this study, we explore the regulatory mechanisms of CysSSH modification of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) IV on its enzyme activity. CaMKIV is activated through the binding of Ca^{2+}/CaM and by the phosphorylation of a crucial activation loop Thr¹⁹⁶ by upstream kinases, CaMKK. In vitro incubation of CaMKIV with CysSSH generated from cystine by CSE resulted in inhibition of the phosphorylation at Thr^{196} by CaMKK and thereby inactivation of the enzyme activity. Dithiothreitol, a small molecule reducing reagent, restored the enzyme activity. Mutated CaMKIV (C198V) was refractory to the CysSSH-induced inhibition of Thr¹⁹⁶ phosphorylation by CaMKK. Furthermore, we could identify an additional mass of 32 Da (-S) at Cys¹⁹⁸-containing peptide of CaMKIV using mass spectrometry. In transfected cells expressing CaMKIV, treatment with dimethyl trisulfide, a reactive sulfur donor, resulted in a decreased of Thr^{196} phosphorylation by Ca^{2+} ionophore. Cells expressing mutant CaMKIV (C198V) proved resistant to dimethyl trisulfide-induced decrease of Thr¹⁹⁶ phosphorylation. Thus, we propose the novel mechanism of CaMKIV regulation, reactive sulfur species-induced inactivation via its CysSSH modification of Cys¹⁹⁸ in cells.



文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成



7アベット頃)

第3回国際シンポジウム

"Chemistry-Natural Product Chemistry, Structural Chemistry, Synthetic Chemistry and Chemical Biology."

> 日時:2016年8月31日(水)~9月1日(木) 場所:昭和薬科大学

Plenary Lectures

ISOBE, Minoru (Chulabhorn Research Institute) IWABUCHI, Yoshiharu (Tohoku Univ.) HOSOYA, Takamitsu (Tokyo Medical and Dental Univ.) OH, Kyungsoo (Chung-Ang Univ.)

Symposiasts

KUBOTA, Takaaki (Showa Pharmaceutical Univ.) LIN, Chun-Cheng (National Tsing Hua Univ.)

SAITO, Naoki (Meiji Pharmaceutical Univ.) TAMURA, Osamu (Showa Pharmaceutical Univ.) UANG, Biling-Jiun (National Tsing Hua Univ.)

参加費用:無料 参加登録:不要 詳細については右記 URL をご覧下さい

URL : http://www.covalent.hrc.shovaku.ac.jp



アクセス ・小田急線新宿駅から快速急行、多摩急行または急行で「新百合ヶ丘駅」乗換え 「玉川学園前駅」まで 30~40分、徒歩 15分

・京浜急行「羽田空港駅」から横浜駅経由で JR 横浜線「成瀬駅」まで1時間、バス 10分

JR東海道新幹線・横浜線「新横浜駅」から「成瀬駅」まで18分、バス10分

主催:昭和薬科大学

連絡先 昭和薬科大学 「生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成」プロジェクト事務局 〒194-8543 東京都町田市東玉川学園 3 丁目 3165 番地 E-mail : covalent1@ac.shoyaku.ac.jp



the MEXT Program to Support the Development of a Foundation for Strategic Research at Private Universities



3rd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecules

"Chemistry-Natural Product Chemistry, Structural Chemistry, Synthetic Chemistry and Chemical Biology"



Program & Abstract

Showa Pharmaceutical University (Lecture hall 2, Room 302) *August 31-September 1, 2016*

Floor Plan

Showa Pharmaceutical University LECTURE HALL 2



Floor Plan

Showa Pharmaceutical University MAIN BUILDING



Program

Aug 31-Sep 1, 2016, Showa Pharmaceutical University

3rd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecules

Time Table

1st day	August 31	start		end	duration
Registration		13:00	-	17:00	
Opening Remarks	Masahiro Nishijima, SPU	13:30	-	13:40	0:10
PL1	Minoru Isobe, Chulabhorn Research Institute	13:40	-	14:40	1:00
	Chair: Yoshiharu Iwabuchi				
01	Kyungsoo Oh, Chung-Ang University	14:40	-	15:10	0:30
	Chair: Nobuyoshi Morita				
Coffee Break & Poster	POSTER	15:10	-	15:50	0:40
O2	Takaaki Kubota, SPU	15:50	-	16:20	0:30
	Chair: Naoki Saito				
O3	Nopporn Thasana, Chulabhorn Research Institute	16:20	-	16:40	0:20
	Chair: Shin-ichiro Kurimoto				
04	Charnsak Thongsornkleeb, Chulabhorn Research Institute	16:40	-	17:00	0:20
	Chair: Jimil George				
O5	Osamu Tamura, SPU	17:00	-	17:30	0:30
	Chair: Biing-Jiun Uang				
Group Photo		17:30	-	17:45	0:15
Welcome Party		18:30	-		

2nd day	September 1	start		end	duration
06	Hun Young Kim, Chung-Ang University	9:00	-	9:20	0:20
	Chair: Nobuyoshi Morita				
07	Jimil George, Chung-Ang University	9:20	-	9:40	0:20
	Chair: Hiroaki Ishida				
O8	Toshimasa Itoh, SPU	9:40	-	10:00	0:20
	Chair: Chun-Cheng Lin				
PL2	Yoshiharu Iwabuchi, Tohoku University	10:00	-	10:45	0:45
	Chair: Takamitsu Hosoya				
Coffee Break		10:45	-	11:15	0:30

09	Shin-ichiro Kurimoto, SPU	11:15		11:30	0:15
	Chair: Nopporn Thasana				
O10	Hiroyuki Kojima, SPU	11:30	-	11:45	0:15
	Chair: Shintaro Ban				
O11	Yoshinori Yamamoto, SPU	11:45	-	12:00	0:15
	Chair: Charnsak Thongsornkleeb				
012	Mami Yoshizawa, SPU	12:00	-	12:15	0:15
	Chair: Yoshimitu Hashimoto				
Lunch		12:15	-	13:15	1:00
013	Biing-Jiun Uang, National Tsing Hua University	13:15	-	13:45	0:30
	Chair: Osamu Tamura				
O14	Nobuyoshi Morita, SPU	13:45	-	14:05	0:20
	Chair: Kyungsoo Oh				
015	Naoki Saito, Meiji Pharmaceutical University	14:05	-	14:35	0:30
	Chair: Osamu Tamura				
O16	Shintaro Ban, SPU	14:35	-	14:50	0:15
	Chair: Kui-Thong Tan				
017	Hiroaki Ishida, SPU	14:50	-	15:05	0:15
	Chair: Naoki Saito				
Coffee Break		15:05	-	15:35	0:30
O18	Yoshimitu Hashimoto, SPU	15:35	-	15:50	0:15
	Chair: Hun Young Kim				
O19	Chun-Cheng Lin, National Tsing Hua University	15:50	-	16:20	0:30
	Chair: Toshimasa Itoh				
O20	Kui-Thong Tan, National Tsing Hua University	16:20	-	16:40	0:20
	Chair: Takaaki Kubota				
PL3	Takamitsu Hosoya, Tokyo Medical and Dental University	16:40	-	17:25	0:45
	Chair: Minoru Isobe				
Closing Remarks	Osamu Tamura, SPU	17:25	-	17:35	0:10
Farewell Banquet		18:00	-		
at Himawari					

[1st DAY] August 31 Registration August 31 (Web 1300-1700 Room 302					
Open	ing Remarks Masahiro Nishijima Showa Pharmaceutical University	August 31 (Wed) 13:30-13:40 Room 302			
		August 31 (Wed) 13:40-17:30 Room 302			
PL1.	Stereocontrol in Natural Product Synthesis - Prostaglandin & Solanoeclepin-				
13:40~	Minoru Isobe Chulabhom Research Institute, Thailand				
01.	Brucine Diol-Catalyzed Stereodivergent Asymmetric Catalysis				
14:40~	Kyungsoo Oh Chung-Ang University, Korea				
Coffe	e Break & Poster	August 31 (Wed) 15:10-15:50 Access Corridor			
O2.	Bioactive Natural Products from Okinawan Marine Organisms				
15:50~	Takaaki Kubota Showa Pharmaceutical University, Japan				
O3 .	Searching for Bioactive Compounds from Thai Club Mosses				
16:20~	Nopporn Thasana Chulabhorn Research Institute, Thailand				
O4 .	Halogenation Reactions for Improving Bioactivities of Medicinal Compounds	1			
16:40~	Charnsak Thongsornkleeb Chulabhorn Research Institute, Thailand				
O5.	Synthetic studies on neodysiherbaine A using chiral nitrone template				
17:00~	Osamu Tamura Showa Pharmaceutical University, Japan				
Group Photo August 31 (Wed) 17:30-17:45 Entrance hall					
Welco	ome Party	August 31 (Wed) 18:30-			

[2nd DAY] September 1

Registration

September 1 (Thu) 8:45-17:00 Room 302

September 1 (Thu) 9:00-17:35 Room 302

O6. Ambivalent Reaction Pathways of β-Chlorovinyl Ketones via Soft β-Vinyl Enolization

9:00~ Hun Young Kim Chung-Ang University, Korea

O7. Regioselective Synthesis of Pyrroles from Alkyne-Isocyanide Click Reactions: An Angle-Strain Induced Bond Migration Approach

9:20- Jimil George Chung-Ang University, Korea

- O8. 17-oxoDHA is a dual agonist for PPARa/y with covalent bond formation
- 9:40~ Toshimasa Itoh Showa Pharmaceutical University, Japan
- PL2. Reversibility of thia-Michael reaction of the cytotoxic C₅-curcuminoid GO-Y030 and structure-activity relationship of the bis-thiol-adducts thereof
- 10:00- Yoshiharu Iwabuchi Tohoku University, Japan

Coffee Break

September 1 (Thu) 10:45-11:15

- O9. Terpenoid constituents from the aerial parts of Scutellaria coleifolia Levl. (Lamiaceae)
- 11:15- Shin-ichiro Kurimoto Showa Pharmaceutical University, Japan
- O10. Fluorescent labeling of PPARy-LBD by bioorthogonal reaction
- 11:30~ Hiroyuki Kojima Showa Pharmaceutical University, Japan
- O11. Synthesis of lysophosphatidic acid containing docosahexaenoic acid and a method for suppression of acyl migration
- 11:45- Yoshinori Yamamoto Showa Pharmaceutical University, Japan
- O12. Design and synthesis of the vitamin D analogues forming covalent bond with vitamin D receptor
- 12:00- Mami Yoshizawa Showa Pharmaceutical University, Japan

Lunch

September 1(Tue) 12:15-13:15

- O13. Enantioselective Synthesis of N-Containing Heterocyclic Natural Products
- 13:15- Biing-Jiun Uang National Tsing Hua University, Taiwan
- O14. Gold(I)/(III)-Catalyzed Synthesis of Piperidines: Valency-Controlled Cyclization Modes
- 13:45~ Nobuyoshi Morita Showa Pharmaceutical University, Japan
- O15. Chemistry of Antitumor Renieramycin Marine Natural Products: Synthetic Studies on a Variety of Renieramycin Derivatives for Evaluate Cytotoxicity Profiles
- 14:05~ Naoki Saito Meiji Pharmaceutical University, Japan
- O16. Structure-based design, synthesis, and nonalcoholic steatohepatitis (NASH)-preventive effect of phenylpropanoic acid peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α-selective agonists
- 14:35- Shintaro Ban Showa Pharmaceutical University, Japan
- O17. Asymmetric total synthesis of (-)-lycoposerramine-R.
- 14:50~ Hiroaki Ishida Showa Pharmaceutical University, Japan

Coffee Break

September 1 (Thu) 15:05-15:35

- O18. Inverse Regioselective Cycloaddition by means of Carbonyl Umpolung
- 15:35- Yoshimitu Hashimoto Showa Pharmaceutical University, Japan
- O19. Design and Synthesis of Carbohydrate-based Probes for Labeling Interacting Proteins and Fabrication of a Lectin probe
- 15:50- Chun-Cheng Lin National Tsing Hua University, Taiwan
- O20. Fluorescent Probe Encapsulated in Protein Cavity to Eliminate Nonspecific Fluorescence and Increase Detection Sensitivity
- 16:20- Kui-Thong Tan National Tsing Hua University, Taiwan
- PL3. Azido-type selective reactions for target identification and probe synthesis
- 16:40- Takamitsu Hosoya Tokyo Medical and Dental University, Japan

Closing Remarks Osamu Tamura Showa Pharmaceutical University

September 1(Thu) 17:25-17:35 Room 302

Farewell Banquet

September 1(Thu) 18:00-20:00 Himawari

Abstracts

Aug 31, 2016, Showa Pharmaceutical University

PL1

Stereocontrol in Natural Product Synthesis - Prostaglandin & Solanoeclepin-



Minoru Isobe Chulabhorn Research Institute Lak Si, Bangkok 10210, Thailand

Solanoeclepin A **1** is a hatching stimulant of potato cyst-nematode. Aiming at its total synthesis, we have successfully synthesized Right Segment **5** and Left Segment **9** from *ent*-HP-ketone **2** and from Diels-Alder product **6**, respectively. The key reactions are [2,3]-Wittig rearrangement, radical cyclization and cobalt-assisted Prins cyclization.



An enantioselective synthesis of prostaglandin E_2 methyl ester has been achieved through a highly stereoselective conjugate addition, cyclopentanone ring cyclization, under anion relay in a one-pot process.

- Tsao, K.-W.; Cheng, C.-Y.; Isobe, M. Org. Letters, 2012, 14, 5274-5277. Chuang, H.-Y.; Isobe, M. Org. Lett. 2014, 16, 4166-4169. Lin, Ya-Ting: Lin, F.-Y.; Isobe, M. Org. Lett. 2014, 16, 5948-5951.
- Huang, K.-H.; Isobe, M. *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 22, 4733-4740. Huang, K.-H.; Huang, C.-C.; Isobe, M. J. Org. Chem. 2016, 81, 1571-1584.

Brucine Diol-Catalyzed Stereodivergent Asymmetric Catalysis



01

Kyungsoo Oh

Center of Metareceptome Research, College of Pharmacy, Chung-Ang University, 84 Heukseok-ro, Dongjak, Seoul Republic of Korea, 156-756

On the basis of the central role of amino alcohol ligands in the transition metal catalysis, we have devised a new asymmetric approach, which potentially allows access to both enantiomers using different metal binding modes of chiral amino alcohol ligands. In this talk, we will present our recent results on the single chiral molecule-based stereodivergent catalytic approaches; 1) that selectively lead to both enantiomeric products using different metal catalysts, 2) that provide multiple forms of chiral products under varied reaction conditions, 3) that lead to diverse molecular structures under different catalyst systems. The key stereocontrol factors of the [3+2] cycloaddition reactions between azomethine yildes and chalcone derivatives will be discussed to shed light on the intricacy of different catalyst species.



References:

1. For a review, see: Kim, H.; Oh, K. Synlett 2015, 26, 2067-2087.

2. Li, J.-Y.; Kim, H.; Oh, K. Adv. Synth. Catal. 2016, 358, 984-993.

02

Bioactive Natural Products from Okinawan Marine Organisms



Takaaki Kubota

Professor, Laboratory of Natural Products Chemistry, Showa Pharmaceutical University

Searching for new bioactive natural products is important as a basic science, since bioactive natural products are promising seeds of new drugs. Marine organisms are one of the most important sources of bioactive natural products with intriguing structure and significant biological activity.

During our search for new bioactive natural products from Okinawan marine organisms, we have isolated many alkaloids from marine sponges. Zamamidines A-C, manzamine-related alkaloids from a sponge *Amphimedon* sp., exhibited antimalarial and antitrypanosomal activities.^{1,2} Zamamiphidin A, an alkaloid with a fascinating structure from a sponge *Amphimedon* sp., showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.³ We also have isolated amphidinolides, a series of cytotoxic macrolides, from marine dinoflagellates *Amphidinium* sp. Amphidinolides and related polyketides are attracting a great deal of attention as new anticancer drug leads.⁴

In this symposium, structure, biological activity, and biosynthesis of several our marine natural products will be described.

- 1. Takahashi, Y.; Kubota, T.; Fromont, J.; Kobayashi, J. Org. Lett. 2009, 11, 21-24.
- Yamada, M.; Takahashi, Y.; Kubota, T.; Fromont, J.; Ishiyama, A.; Otoguro, K.; Yamada, H.; Ōmura, S.; Kobayashi, J. *Tetrahedron* 2009, 65, 2313-2317.
- Kubota, T.; Kamijyo, Y.; Takahashi-Nakaguchi, A.; Fromont, J.; Gonoi, T.; Kobayashi, J. Org. Lett. 2013, 15, 610-612.
- 4. Kubota, T.; Iwai, T.; Sakai, K.; Gonoi, T.; Kobayashi, J. " Org. Lett. 2014, 16, 5624-5627 and references therein.

Searching for Bioactive Compounds from Thai Club Mosses



03

<u>Thasana, N.</u>^{1,2,4*}, Thorroad, S.¹, Wittayalai, S.¹, Nilsu, T.², Pongpamorn, P.², Jumruksa, A.², Worawittayanont, P.², Thaisaeng, W.^{1,3}, Tamnarak, W.^{1,3}, Wan-erlor, S.^{1,3}, Ruchirawat, S.^{1,2,4}

¹Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, Laksi, Bangkok 10210, Thailand ²Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute, Laksi, Bangkok 10210, Thailand ³Royal Project Foundation, Chiang Mai 50200 Thailand ⁴Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology, CHE, Ministry of Education, Bangkok, Thailand.

Lycopodaceae plants (club mosses) have been reported to contain bioactive Serratane terpenoids and Lycopodium alkaloids. Since huperzine A (HupA), a lycopodium alkaloid, was first isolated from a traditional Chinese folk medicine *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis, it has inspired many research groups to study the phytochemical constituents in club mosses. In our group, more than ten club mosses were screened to discover the bioactive Serratane terpenoids and Lycopodium alkaloids for cytotoxicity and acetylcholinesterase (AChE)-inhibiting activities. The acid-base extraction of seven club mosses were studied and led to the isolation more than thirty bioactive Serratane terpenoids and Lycopodium alkaloids. Some of these isolated and semi-synthetic compounds were assayed for cytotoxicity and AChE inhibitory activities.

- Wittayalai, S.; Sathalalai, S.; Thorroad, S.; Worawittayanon, P.; Ruchirawat, S.; Thasana, N. *Phytochemistry* 2012, 76, 117-123.
- Thorroad, S.; Worawittayanon, P.; Khunnawutmanotham, N.; Chimnoi, N.; Jumruksa, A.; Ruchirawat, S.; Thasana, N. *Tetrahedron* 2014, 70, 8017-8022.
- 3. Nilsu, T.; Thorroad, S.; Ruchirawat, S.; Thasana, N. Planta Med. 2016, doi: 10.1055/s-0042-106904.

O4

Halogenation Reactions for Improving Bioactivities of Medicinal Compounds



Aroonkit, P.^{3,4}, <u>Thongsornkleeb, C.^{1,3,4*}</u>, Tummatorn, J.^{2,3,4*}, Krajangsri, S.², Mungthin, M.⁵, Ruchirawat, S.^{2,3,4}

¹Laboratory of Organic Synthesis and ²Laboratory of Medicinal Chemistry, Chulabhorn Research Institute, Laksi, Bangkok 10210, Thailand ³Chemical Biology Program, Chulabhorn Graduate Institute, Laksi, Bangkok 10210, Thailand ⁴Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology, CHE, Ministry of Education, Bangkok, Thailand. ⁵Department of Parasitology, Phramongkutklao College of Medicine, Ratchawithi Road, Bangkok 10400, Thailand

Halogen atoms can often be incorporated into molecules of biological interest in order to alter their properties, including increasing their potency as agents of medicinal values and/or reducing their toxicities. We have been interested in developing reactions for incorporation of halogen atoms to construct a variety of halogenated heterocycles, including dihalogenated furans and 4-haloisoxazoles. In addition, we have developed a convenient protocol for electrophilic aromatic halogenation using only a catalytic amount of chlorotrimethylsilane (TMSCI) as a catalyst. This efficient and metal-free method used to modify the structure of synthetic isocryptolepine, originally isolated from the native West and Central African plant *Cryptolepis sanguinolenta*, which displays a range of therapeutic indications in traditional medicine. We have successfully identified the isocryptolepine analogues that highly potent against four primary cancer cells and four *P. falciparum* strains, with relatively low toxicity against normal lung cell.

- 1. Thongsornkleeb, C.; Rabten, W.; Bunrit, A.; Tummatorn, J.; Ruchirawat, S. Tetrahedron Lett. 2012, 53, 6615–6619.
- 2. Maibunkaew, T.; Thongsornkleeb, C.; Tummatorn, J.; Bunrit, A.; Ruchirawat, S. Synlett 2014, 25, 1769–1775.
- Aroonkit, P.; Thongsornkleeb, C.; Tummatorn, J.; Krajangsri, S.; Mungthin, M.; Ruchirawat, S. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 94, 56–62.
- 4. Kaewsri, W.; Thongsornkleeb, C.; Tummatorn, J.; Ruchirawat, S. RSC Adv. 2016, 6, 48666–48675.

Synthetic studies on neodysiherbaine A using chiral nitrone template



05

Osamu Tamura

Showa Pharmaceutical University

Neodysiherbaine A (1) was isolated from the Micronesian sponge *Dysidea herbacea* and was found to be a neuroexcitatory amino acid that exhibited agonist activities for AMPA-KA type glutamate receptors.¹ This amino acid features a unique *cis*-fused tetrasubstituted hexahydrofuro[3,2-*b*]pyran backbone possessing four contiguous stereocenters (C6–C9), a quaternary stereocenter (C4) and an amino acid appendage (C1). The potent activity and unusual structure have attracted significant interest from synthetic chemists. We would like to present here our synthetic studies on 1 featuring of cycloaddition of chiral cyclic nitrone 4. Thus, reaction of 4 with allyl alcohol 3 derived from *D*-mannose (2) in the presence of MgBr₂•OEt₂ induced chelation-controlled cycloaddition (transition state A)² to afford cycloadduct 5 exclusively in high yield. It should be noted that the cycloadduct 5 was readily elaborated to the key synthetic intermediate 6^3 of neodysiherbaine A (1).



- Sakai, R.; Koike, T.; Sasaki, M; Shimamoto, K.; Oiwa, C.; Yano, A.; Suzuki, K.; Tachibana, K.; Kamiya, H. Org. Lett. 2001, 3, 1479-1482.
- 2. Tamura, O.; Shiro, T.; Ogasawara, M.; Toyao, A.; Ishibashi, H. J. Org. Chem. 2005, 70, 4569-4577.
- 3. Donohoe, T. J.; Winship, P. C. M.; Tatton, M. R.; Szeto, P. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 7604-7606.
Abstracts

Sep 1, 2016, Showa Pharmaceutical University

Ambivalent Reaction Pathways of β-Chlorovinyl Ketones via Soft β-Vinyl Enolization



Hun Young Kim

College of Pharmacy, Chung-Ang University 84 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Republic of Korea

The ability to modulate chemical reactivity by the polarity inversion of a functional group (*i.e.* umpolung method) has significantly broadened the synthetic toolbox that can be utilized in the target-oriented and diversity-oriented synthesis. Catalysts are typically employed to covalently modify functional groups, and the reactivity patterns of such modified species can be readily predicted. Contrarily, the underlining concept of *ambivalent approaches* relies on the generation of multiple intermediate species that can be selectively reacted under varied reaction conditions. While not precedent, such synthetic approaches benefit to the synthetic chemists with the power of *reactivity on demand* where the structurally diverse compounds are readily prepared from common starting materials.

Recently, our research group discovered a soft α -vinyl enolization pathway of β -halovinyl ketones under extremely mild reaction conditions resulting in the formation of allenolate and [3]cumulenolate intermediate species. Our subsequent studies also demonstrated the synthetic utilization of such intermediate species under the theme of *ambivalent approaches*.

In this talk, I will present our recent results on the *ambivalent reactivity approaches* that selectively react with either electrophiles or nucleophiles to provide diverse heterocyclic compounds.

- 1. Kim, H.; Li, J.-Y.; Oh, K. J. Org. Chem. 2012, 77, 11132-11145.
- 2. Kim, H.; Li, J.-Y.; Oh, K. Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 3736-3740.
- 3. Kim, H.; Rooney, E. O.; Meury, R. P.; Oh, K. Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 8026-8030.
- 4. Kim, H.; Oh, K. Org. Lett. 2014, 16, 5934-5936.
- 5. Kim, H.: Lee, S.; Kim, S.; Oh, K. Org. Lett. 2015, 17, 450-453.
- 6. Kim, H.; Oh, K. Org. Lett. 2015, 17, 6254-6257.

Regioselective Synthesis of Pyrroles from Alkyne-Isocyanide Click Reactions: An Angle-Strain Induced Bond Migration Approach



O7

Jimil George, Hun Young Kim* and Kyungsoo Oh* Center of Metareceptome Research, College of Pharmacy, Chung-Ang University,

84 Heukseok-ro, Dongjak, Seoul Republic of Korea, 156-756.

Pyrroles constitute one of the most widely sought after heterocyclic compounds in medicinal and material chemistry. Numerous synthetic methods for pyrroles have been developed over a century with an aim to provide structural diversity, high reaction efficiency, and controlled regioselectivity.¹ Thus, the objectives of "ideal pyrrole synthesis" may require the use of basic chemicals to directly assemble multi-substituted pyrroles in the presence of catalysts. Herein, the first direct regioselective synthesis of highly functionalized pyrroles with two different electron-withdrawing groups has been developed using an angle strain-induced 1,2-shift of an electron-withdrawing group in 2*H*-pyrroles. The preferential migration aptitude of an electron-withdrawing group over alkyl and aryl groups is believed to be the result of the orbital overlap between the $\pi_{c=c}$ bond of internal alkene and the $\pi^*_{c=0}$ bond of electron-withdrawing group. The newly developed regioselective synthesis of pyrroles features a wide substrate scope, simple reaction setup, and high yields (60-82% y), capturing the essence of alkyne-isocyanide "click" reactions.



R¹ = alkyl, aryl groups; R² = ester, tosyl, phophonate; R³ = keto, ester, tosyl, phosphonates, thioester

References:

1. Estévez, N.; Villacampa, V.; Menéndez, C. Chem. Soc. Rev., 2014, 43, 4633-4657.

17-oxoDHA is a dual agonist for PPAR α/γ with covalent bond formation



<u>Toshimasa Itoh</u>, Daichi Egawa, Keiko Yamamoto

Laboratory of Drug Design & Medicinal Chemistry, Showa Pharmaceutical University, Tokyo, Japan

PPAR α and PPAR γ are drug targets for metabolic syndrome. These receptors are thought to be lipid sensor and activated by binding of known or unknown fatty acid. Previously, we have reported that 4-oxoDHA is an agonist for PPAR γ and showed insulin sensitizing activity *in vivo*.¹ PPAR γ forms covalent bond with 4-oxoDHA by conjugation addition reaction of a Cys.²

In this symposium, we present that 17-oxoDHA is a covalent modifier for both PPAR γ and PPAR α . 17-oxoDHA was synthesized via TCEP enhanced enzymatic oxidation.³ Dual luciferase reporter assay revealed that 17-oxoDHA is an agonist for PPAR γ and PPAR α . ESI-mass spectroscopy indicated that 17-oxoDHA makes covalent bond formation with PPAR γ and PPAR α .

To understand the binding modes, we performed co-crystallization for both 17-oxoDHA/PPAR γ and 17-oxoDHA/PPAR α . 17-oxoDHA existed as 1,4-adduct in both PPAR γ and α . However the

binding site, orientation of 17-oxoDHA and interaction mode with helix12 are different. These modes may reflect agonistic activity of 17-oxoDHA for PPAR γ and α . We propose that 17-oxoDHA is dual agonist and dual covalent modifier for PPAR α/γ as a novel class of PPAR targeting ligand.⁴



- 1. Yamamoto K. et al. Bioorg Med Chem Lett. 2005, 26, 517.
- 2. Itoh T. et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2008, 15, 924.
- 3. Itoh T. et al. Bioorg Med Chem. Lett. 2016, 15, 343.
- 4. Egawa D. et al. ACS Chem. Biol. (in press) DOI: 10.1021/acschembio.6b00338

PL2

Reversibility of thia-Michael reaction of the cytotoxic C_5 -curcuminoid GO-Y030 and structure-activity relationship of the bis-thiol-adducts thereof



Yoshiharu Iwabuchi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University 6-3 Aobayama, Sendai 980-8578, Japan email: y-iwabuchi@m.tohoku.ac.jp

Curcumin, the major active constituent of turmeric, attracts considerable attention of the medicinal community because of its promising pharmacological activities such as antiinflammatory, antioxidant, and antitumor activities. We recently encountered an interesting set of C₅-curcuminoid, namely GO-035 and GO-Y949, showing a surprising gap in their cytotoxicity¹, which led us to develop GO-Y030, exhibiting a promising chemopreventive activity².

The intriguing SAR of C₅-curcuminoid urged us to embark on the target identification study, in which we fished up FUBP2/KSRP from HCT-116 colon cancer cell using GO-Y086.³ The close investigation revealed that GO-Y086 covalently attached to the cysteine-500, indicating the reversible Michael reaction. ¹H-NMR spectroscopy method indeed supports the notion.

Taking advantage of the reversible thia-Michael reactivity, GO-Y030-thiol adduct was designed as a prodrug. Most of thiol-adducts synthesized retained cytotoxicity of the parent compound GO-Y030, from which GO-Y140 was found to possess marked water solubility.⁴



References:

- (a) Yamakoshi, H., Iwabuchi, Y., *et al. Bioorg. Med. Chem.* 2010, *18*, 1083. (b) Kohayam, A.; Yamakoshi, H., Iwabuchi, Y. et al. *Molecules* 2015, *20*, 15374.
- 2. Shibata, H., Yamakoshi, H., Iwabuchi, Y., et al. Cancer Sci. 2009, 100, 956.
- 3. Yamakoshi, H., Kanoh, N., Iwabuchi, Y., et al. ACS Med. Chem. Lett. 2010, 1, 273-276.
- 4. Manuscript in preparation.

183/228



Terpenoid constituents from the aerial parts of *Scutellaria coleifolia* Levl. (Lamiaceae)



<u>Shin-ichiro Kurimoto</u>^{1,2} Jian-Xin Pu,³ Han-Dong Sun,³ Yoshihisa Takaishi,² Yoshiki Kashiwada²

¹Laboratory of Natural Products Chemistry, Showa Pharmaceutical University

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University
 ³ Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Botany

[Introduction]

Scutellaria genus, which belongs to Lamiaceae family, contains approximately 350 species and is known as a rich source of terpenoids especially *neo*-clerodane-type diterpenoids possessing various biological activities¹. *Scutellaria coleifolia* Levl. is a herbaceous plant distributing at high altitude regions of Yunnan and Sichuan Provinces. Because of the limitation of distribution, there were no reports of chemical study on this plant. As part of our investigation for searching new drug lead compounds from unexplored resources, we have investigated the constituents of the aerial parts of this plant.

[Extraction and separation]

The aerial parts of *S. coleifolia*, collected in Sichuan Province, were extracted with 70% aqueous acetone three times at room temperature for 72hr each time. The extract was successively partitioned with EtOAc, *n*-BuOH, and H₂O, then the EtOAc-soluble fraction was separated repeatedly by column chromatography.

(Results)

Thirty-one new terpenoids including two manoalide-type sesterterpenoids, three 19-nor-neo-clerodane-type diterpenoids, and twenty-six *neo*-clerodane-type diterpenoids were isolated from *S. coleifolia*. The structures of isolates were elucidated by the extensive spectroscopic analyses. Two sesterterpenoids, coleifolides A and B, were concluded to be partially racemic compounds by the HPLC analysis using a chiral column or chiral derivatizing agents. The absolute configuration of the major isomer of coleifolide B was elucidated by analyses of the CD spectrum as well as NMR data of its (*R*)- and (*S*)-2-NMA derivatives. Though many manoalide-type sesterterpenoids have been isolated form marine sponges, coleifolides A and B were the first manoalide-type sesterterpenoids isolated from higher plants.

Reference:

1. Shang, X.; He, X.; He, X.; Li, M.; Zhang, R.; Fan, P.; Zhang, Q.; Jia, Z. J. Ethnopharmacol. 2010, 128, 279-313.

Fluorescent labeling of PPARy-LBD by bioorthogonal reaction



<u>Hiroyuki Kojima</u>, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto Laboratory of Drug Design & Medicinal Chemistry, Showa Pharmaceutical University, Tokyo, Japan d1401@g.shoyaku.ac.jp

To elucidate the function of proteins is an important subject in biological study, because proteins play crucial roles in biological processes. Since there are numerous biomolecules in cells, it is difficult to selectively label the target protein. Many techniques for genetic encoding are used to solve this problem but expression level and behavior of labeled protein may be different from the native protein. To overcome these problems, we provide new strategy for protein labeling without genetic encoding. We thought that protein labeling could be accomplished using two-step reactions, Michael addition and Hüsgen cycloaddition. We chose PPARy as a model protein.

We designed and synthesized PPAR γ ligand in consideration of the following conditions. 1) Given dienone for covalently coupling to Cys285 of PPAR γ -LBD. 2) Given azide group at ω position for Hüisgen cycloaddition. We confirmed the two-steps covalent modification of PPAR γ -LBD by ESI-MS and X-ray crystallographic analysis. SDS-PAGE electrophoresis experiment showed that PPAR γ -LBD was selectively labeled with fluorescein in lysate of *E.Coli*. We accomplished the modification of PPAR γ -LBD selectively using two-steps reaction.



185/228

Synthesis of lysophosphatidic acid containing docosahexaenoic acid and a method for suppression of acyl migration



Yoshinori Yamamoto, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto

Laboratory of Drug Design & Medicinal Chemistry, Showa Pharmaceutical University, Tokyo, Japan

Lysophosphatidic acid (LPA) is a kind of phospholipid. LPA shows the physiological activity through specific G protein-coupled receptors, but the mechanism of action isn't clear. In addition, synthesis of LPA containing long-chain polyunsaturated fatty acid has not been established. So we tried to establish synthesis of LPA containing docosahexaenoic acid¹⁻³ which is related to acute coronary syndromes.⁴ LPA has a problem of acyl migration.^{5,6} Especially, 2-acyl LPA is easily converted into 1-acyl LPA. It does not depend on an enzyme.^{7,8} In this study, we found that acyl migration was suppressed by 2-acyl LPA of ammonium salt.



- 1. Xu, Y.; Qian, L.; Prestwich, G. D. J. Org. Chem. 2003, 68, 5320-5330.
- 2. Gajewiak, J.; Tsukahara, R.; Fujiwara, Y.; Tigyi, G.; Prestwich, G. D. Org. Lett. 2008, 10, 1111-1114.
- 3. East, J. E.; Macdonald, T. L. Synth. Commun. 2012, 42, 3614-3618.
- Kurano, M.; Suzuki, A.; Inoue, A.; Tokuhara, Y.; Kano, K.; Matsumoto, H.; Igarashi, K.; Ohkawa, R.; Nakamura, K.; Dohi, T.; Miyauchi, K.; Daida, H.; Tsukamoto, K.; Ikeda, H.; Aoki, J.; Yatomi, Y. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2015, 35, 463–470.
- 5. Xu, Y.; Prestwich, G D. J. Org. Chem. 2002, 67, 7158–7161.
- 6. Qian, L.; Xu, Y.; Arai, H.; Aoki, J.; McIntyre, T. M.; Prestwich, G D. Org. Lett. 2003, 5, 4685-4688.
- Okudaira, M.; Inoue, A.; Shuto, A.; Nakanaga, K.; Kano, K.; Makide, K.; Saigusa, D.; Tomioka, Y.; Aoki, J. J. Lipid Res.2014, 55, 2178–2192.
- 8. Chevallier, J.; Sakai, N.; Robert, F.; Kobayashi, T.; Gruenberg, J.; Matile, S. Org. Lett. 2000, 2, 1859–1861.

Design and synthesis of the vitamin D analogues forming covalent bond with vitamin D receptor



<u>Mami Yoshizawa</u>, Tatsuya Hori, Yasuaki Anami, Akira Kato, Nobuko Yoshimoto, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto Showa Pharmaceutical University

 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25D₃) has many biological functions including calcium metabolism, cell differentiation, and immune responses. These functions were shown through gene transcription by binding of 1,25D₃ to vitamin D receptor (VDR). 1,25D₃ anchored by three pincer-type hydrogen bonds in the VDR ligand binding pocket. The 25 hydroxyl group of 1,25D₃ forms hydrogen bonds with His305 and His397. His397 is thought to be essential for the transactivation.

Thus we focused on the nucleophilicity of histidine. We designed vitamin D analogues with electrophiles as covalent modifier for VDR. Novel vitamin D analogues have an electrophilic enone group at the side chain which is expected conjugate addition reaction to critical residue His393 in VDR. The β -carbon of enones introduces to C26 corresponding position to the oxygen atom of the 25 hydroxyl group of 1,25D₃. It was designed that the β -carbon is subject to nucleophilic attack by the nitrogen of histidine.

Compounds were synthesized from coupling of the A-ring with the CD-ring by the Wittig-Horner reaction, followed by side chain modification. Enone compounds were obtained by the Grignard reaction after derivatisation to the Weinreb amide. Dienone compound was synthesized by the Corey-Fuchs alkyne synthesis and selective reduction of a triple bond. The transcriptional activity of synthetic compounds was tested using the luciferase reporter gene assay system in Cos7 cells. All compounds showed agonistic activity. Covalent bond formation of enones with the ligand binding domain (LBD) of rat VDR was evaluated by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). All compounds were shown to bind to VDR-LBD, and the abundances of VDR-LBD corresponding conjugate adduct with the ligand increased with the incubation time. Enone compounds have the higher reactivity than dienone compound. Furthermore, we successfully obtained co-crystals of rat VDR-LBD with analogues. The X-ray crystallographic analysis showed the covalent bond formation with histidines in VDR-LBD. We accomplished the synthesis of VDR analogues that form covalent bond with VDR-LBD.

Enantioselective Synthesis of N-Containing Heterocyclic Natural Products



Chuan-Chung Chung, De-Jhong Liao, Wu-Che Lee, <u>Biing-Jiun</u> <u>Uang</u>

Department of Chemistry, National Tsing Hua University, Taiwan

Optically active pyroglutamates are important in biological systems; they are also found as components of many antibiotics and natural products. Asymmetric enolate alkylation of glycinate derived Schiff base using camphor-based chiral auxiliaries is one of the promising approaches to these compounds.

We have studied the asymmetric synthesis of α -amino acids starting from glycinate employing chiral ketoamide as chiral auxiliary. Treatment of chiral *t*-butyl glycinate 1 with base followed by electrophilic reagent furnished the corresponding α -amino acid derivatives in good yields with high diastereoselectivity. Along this vain, asymmetric Michael addition of glycinate enolate is also a promising approach to α -branched α -amino acids. Treatment of enolate derived from 1 with β -substituted enoates 2 as Michael acceptors gave the corresponding Michael adducts 3 in high diastereoselectivity (up to 99% de). It is noteworthy that the reaction with methyl α -methyl crotonate gave the corresponding Michael adduct in which the set up of three newly formed stereogenic centers could be achieved in very high selectivity (>99% de at α and β positions, 90% de at γ position). Treatment of Michael adducts 5 with hydroxylamine gave the corresponding γ -lactams 4 which could be further elaborated to give proline derivatives. Elaboration of γ -lactams 4 provided optically active *N*-containing heterocyclic natural products.



Gold(I)/(III)-Catalyzed Synthesis of Piperidines: Valency-Controlled Cyclization Modes



Nobuyoshi Morita

Associate Professor, Laboratory of Organic Chemistry, Showa Pharmaceutical University

Gold catalysts were initially recognized as π -acidic catalysts that activate unsaturated bond (alkynes, allenes and alkenes) for nucleophilic

attack to form C-C, C-O, C-N, and C-S bonds. Later, some groups reported the oxophilic character of gold(III) catalysts, which efficiently activate oxygen functionalities even in the presence of an unsaturated bond. We rationalized these observations in terms of the hard and soft acids and bases (HSAB) principle, which states that metal ions in low valence states soft character, whereas metal ions in high positive oxidation states show hard character. Thus, gold(I) catalysts may behave as soft acids and gold(III) catalysts as hard acids. On the basis of this working hypothesis, we developed a syntheic method to obtain two types of cyclic ethers from the same propargylic alcohols by means of valency-controlled gold-catalyzed regiodivergent activation.¹ In order to extend our strategy, we turned our attention to the use of nitrogen nucleophile in place of oxygen nucleophile and explored the synthesis of piperidines from propargylic alcohols bearing nitrogen functionality at the terminal position. Thus, use of hard gold(III) catalyst results in cyclization to furnish piperidines having an acetylenic moiety, due to coordination of hard gold(III) to the oxygen atom at propargylic position. On the other hand, treatment of propargylic alcohols with soft gold(I) catalyst induces Meyer-Schuster rearrangement to afford α , β -unsaturated ketones, which undergo intramolecular aza-Michael addition to give piperidines bearing carbonyl gorup, due to activation of the triple bond by coordination of

gold(I).²

References:

1. Morita, N. et al. Org. Lett. 2015, 17, 2668-2671.

2. Morita, N. et al. Tetrahedron Lett. 2015, 56, 6269-6271.



Chemistry of Antitumor Renieramycin Marine Natural Products: Synthetic Studies on a Variety of Renieramycin Derivatives for Evaluate Cytotoxicity Profiles



Naoki Saito, Ph. D.

Professor, Head of Graduate School of Pharmaceutical Sciences & Chief of MPU Asia/Africa Center for Drug Discovery, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1, Noshio, Kiyose, Tokyo, 204-8588, Japan

Tel & Fax: +81-(0)42-495-8794, e-mail: naoki@my-pharm.ac.jp

Marine species provide enticing sources of potential new pharmaceutical agents. An additional incentive is the lure of fascinating drug targets from marine sources. A high percentage of marine-derived natural products have novel structures and consequently identify new pharmacophores for structure-activity relationship studies (SARs). However, relatively, few marine natural products have reached clinical trials, because the severely marine natural products from marine organisms has far precluded detailed biological evaluation.

As a part of our search for new anticancer metabolites in the isolation and characterization of biological active compounds from Thai marine animals under the control of JSPS "*Asia and Africa Scientific Platform Program*", we have succeeded to develop several marine sources, such as a tunicate *Ecteinascidia thurstoni* and blue sponge *Xestospongia* sp. and evaluated these medicinal chemistry along with total syntheses. In this presentation, I would like to show some of our recent contribution in the chemistry of antitumor renieramycin isoquinoline marine natural products.¹



References:

 Sitimangkalakitti, N.; Chamni, S.; Charupant, K.; Chanvorachote, P.; Mori, N.; Saito, N.; Suwanborirux, K. J. Nat. Prod. in press and references cited theirin.

Structure-based design, synthesis, and nonalcoholic steatohepatitis (NASH)preventive effect of phenylpropanoic acid peroxisome proliferator-activatedreceptor (PPAR) α-selective agonists



Shintaro Ban

Showa Pharmaceutical University

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the human nuclear receptor family, functioning as ligand-dependent transcription factors. These receptors are activated by the binding of various endogenous fatty acids and their metabolites as well as by synthetic ligands. Three subtypes, PPAR α , PPAR δ , and PPAR γ have been isolated to date. Among PPARs, PPAR α regulates genes involved in uptake and oxidation of free fatty acids, triglyceride hydrolysis and up-regulation of reverse cholesterol transport, such as apolipoprotein A-I and A-II. Fibrate-class antihyperlipidemic agents, such as fenofibrate and bezafibrate, which effectively lower elevated serum triglycerides and moderately increase high-density lipoproteins (HDL), can bind and activate PPAR α . However, their affinity is weak even in the high micromolar range, and the subtype selectivity is not high.

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH), consisting of hepatic steatosis accompanied with inflammation and fibrosis, is a progressive liver disorder that occurs in patients without significant alcohol consumption. PPAR α agonists have therapeutic potential for the treatment of NASH.

In the continuous study directed toward the development of subtype-selective PPAR ligand, we would like to report the design and synthesis of phenylpropanoic acid-type PPAR α -selective agonists. We will also be presented the preventive effect of a representative compound against progression of NASH in an animal model.



phenylpropanoic acid-type PPAR agonists

References:

 Ban, S.; Kasuga, J.; Nakagome, I.; Nobusada, H.; Takayama, F.; Hirono, S.; Kawasaki, H.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 3183-3191.

Asymmetric total synthesis of (–)-lycoposerramine-R.



Hiroaki Ishida, Ph.D.

Laboratory of Drug Design and Medicinal Chemistry, Showa Pharmaceutical University, Tokyo, Japan.

Lycopodium alkaloids have unique structures and biological activities, such as acetylcholine esterase (AchE) inhibitory activity, and are anticipated to treat Alzheimer's disease and to improve geriatric memory loss. Because of this, *Lycopodium* alkaloids have continued to attract the attention of researchers in the fields of natural product chemistry, synthetic chemistry, and medicinal chemistry.

In the course of our chemical and synthetic studies on *Lycopodium* alkaloids, we have reported the isolation and structure elucidation of lycoposerramine-R (1) from *Lycopodium serratum* in 2009.¹ Lycoposerramine-R (1) is characterized by a novel skeleton consisting of a fused tetracyclic ring system possessing four asymmetric centers, a pyridone ring, and a *cis*-fused 5/6 ring.

Recently, we have reported the total synthesis of (\pm) -1 via the Diels-Alder reaction, the stereoselective introduction of a methyl group, the regio- and stereoselective reductive amination, and the construction of a pyridone ring.² Moreover, we succeeded the first asymmetric total synthesis of (–)-(1) involving such key steps as the intramolecular aldol cyclization to give a *cis*-fused 5/6 bicycle skeleton, and a newly developed procedure for the construction of a pyridone ring via the aza-Wittig reaction, which confirmed the absolute configuration of the natural product.³



- 1. Katakawa, K.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Takayama, H. Helv. Chim. Acta 2009, 92, 445-452.
- 2. Ishida, H.; Kimura, S.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Takayama, H. Tetrahedron 2015, 71, 51-56.
- 3. Ishida, H.; Kimura, S.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Takayama, H. Org. Biomol. Chem. 2015, 13, 7762-7771.

Inverse Regioselective Cycloaddition by means of Carbonyl Umpolung



Yoshimitsu Hashimoto

Showa Pharmaceutical University

Many regioselective 1,3-dipolar cycloaddition reactions have been developed on the basis of the frontier orbital theory. In general, α , β -

unsaturated carbonyl compounds II having low LUMO levels undergo cycloadditions with 1,3-dipoles, for example nitrones I, to give 4-acyl isoxazolidines III. On the other hand, it is expected that α , β -unsaturated oximes and hydrazones II' have higher HOMO levels than the parent carbonyl compounds II originated from electron donating heteroatoms on imine functionalities. We envisioned to utilize this *umpolung* concept for switching regioselectivity. Thus, HOMOs of α , β -unsaturated oximes and hydrazones II' may interact with LUMOs of nitrones I, and would facilitate the formation of 5-imino isoxazolidines IV. The oxime or hydrazone functionalities of the resulting cycloadducts IV can be hydrolyzed to afford 5-acyl isomers, which are the complementary products to normal cycloadducts III.

Thus, 1,3-dipolar cycloaddition of nitrone 1 to cyclopentenone 2a affords 4-acyl isoxazolidine 3 as a major product, whereas that of cyclopentenone TBDPS oxime 2b tends to give 5-imino isoxazolidine 4. Examples as well as theoretical consideration will also be presented.



Design and Synthesis of Carbohydrate-based Probes for Labeling Interacting Proteins and Fabrication of a Lectin probe



Chun-Cheng Lin

Department of Chemistry, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan 1997 Ph.D. The Scripps Research Institute 1998-2003 Assistant Research Fellow and 2003-2006 Associate Research Fellow, Institute of Chemistry, Academia Sinica 2006-2007 Associate Professor and 20007-current Professor, Department of Chemistry, National Tsing Hua University

The selective isolation of (glyco)proteins from complex biological fluids is of growing importance in clinical diagnosis and glycoproteomics. However, to date, it still remains a great challenge for enrichment of carbohydrate binding proteins or glycoproteins due to their heterogeneous forms, low binding affinity, and low MS response. In this talk, I will discuss our approaches in the use of carbohydrate-based probes for enrichment of interacting proteins and labeling of lectin. All of our designed probes contain a carbohydrate ligand, a reactive group, and a purification tag. For the probe to label interacting proteins, the alkyne-azide click chemistry was used to assemble three saccharides which provide multivalent interaction on the probe. Photo-affinity reagent was used as a reactive group for capturing probes. Biotin serves as the purification tag for purification of captured proteins or labeled proteins. Similar designed probe but with dual photo-active groups was applied to assemble an alkyne at the location nearby carbohydrate binding site. By Cu(I)-catalyzed click chemistry, a desired molecule (fluorescent dye or photo-labeling reagent) was installed to yield a protein probe which can be used for protein-protein interaction studies.



- Chang, T.-C.; Lai, C.-H.; Chien, C.-W.; Liang, C.-F.; Adak, A.; Chuang, Y.-J.; Chen, Y.-J.; Lin, C.-C.* *Bioconj. Chem.* 2013, 24, 1895-1906.
- Chang, T.-C.; Adak, A.; Lin, T.-W.; Li, P.-J.; Chen, Y.-J; Lai, C.-H.; Liang, C.-F.; Chen, Y.-J.; Lin, C.-C.* *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 1216-1224.

O20

Fluorescent Probe Encapsulated in Protein Cavity to Eliminate Nonspecific Fluorescence and Increase Detection Sensitivity



Yan-Syun Zeng, Ruo-Cing Gao, Ting-Wei Wu, Chien Cho and Kui-Thong Tan*

Department of Chemistry, National Tsing Hua University, 101 Sec. 2, Kuang Fu Rd, Hsinchu 30013, Taiwan (ROC)

Despite the promising improvements made recently in fluorescence probes for enzymes and reactive small molecules detection, two fundamental problems remain: weaker fluorescence of many dyes in aqueous buffers and strong nonspecific signals in samples containing high protein levels. In this paper, we introduce a novel fluorescent probe encapsulated in protein cavity (FPEPC) concept as demonstrated by Avidin and SNAP-tag proteins with three environment-sensitive fluorescence probes to overcome these two problems. The FPEPC conjugated probes achieved quantitative nitroreductase and hydrogen sulfide detection in blood plasma, whereas analyte concentrations were overestimated up to 700-fold when bare fluorescent probes were employed for detection. Furthermore, detection sensitivity was increased dramatically as our probes displayed 390-fold fluorescence enhancement upon protein conjugation, in stark contrast to the weak fluorescence of the free probes in aqueous solutions. In contrast to conventional approaches where fluorescent probes are encapsulated into polymers and nanoparticles, our simple and general approach successfully overcome many key issues such as dye leakage, long preparation steps, inconsistent dye-host ratios, difficulty in constructing in situ in a complex medium and limited application to detect only small metabolites.

- 1. Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. Chem. Rev. 2010, 110, 2620.
- 2. Loving, G. S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. Trends Biotechnol. 2010, 28, 73.
- 3. Zeng, Y.-S.; Gao, R.-C.; Wu, T.-W.; Cho, C.; Tan, K.-T. Bioconjugate Chem. 2016, Under Revision

PL3

Azido-type selective reactions for target identification and probe synthesis



Takamitsu Hosoya

Laboratory of Chemical Bioscience Institute of Biomaterials and Bioengineering Tokyo Medical and Dental University

Since the discovery of click reaction, organic azides have been playing important roles for connecting molecules reliably in a broad range of scientific disciplines, including chemical biology. We have found that the reactivity of azides largely depends on their structures and reaction conditions, including the reaction partner, "azidophile." Based on the orthogonal reactivities between different types of azides, we have developed various azido-type selective reactions that enabled efficient conjugation of two or more (bio)molecules and applied them to target identification of drugs¹ and chemical modification of biomolecules.² In particular, the discovery of enhanced clickability of doubly sterically-hindered aromatic azides³ has rendered multifunctional molecules readily accessible via sequential triazole forming reactions. We have also developed a simple method to protect cyclooctynes transiently from cycloaddition with an azide via complexation with a copper(I) salt.⁴ Protection of a cyclooctyne bearing a terminal alkyne with a copper salt enabled selective copper-catalyzed click conjugation with an azide at the terminal alkyne moiety, which facilitated the preparation of cyclooctyne derivatives.

- (a) Hosoya, T.; Hiramatsu, T.; Ikemoto, T.; Nakanishi, M.; Aoyama, H.; Hosoya, A.; Iwata, T.; Maruyama, K.; Endo, M.; Suzuki, M. Org. Biomol. Chem. 2004, 2, 637. (b) Yoshida, S.; Y. Misawa, Hosoya, T. Eur. J. Org. Chem. 2014, 3991.
- Kii, I.; Shiraishi, A.; Hiramatsu, T.; Matsushita, T.; Uekusa, H.; Yoshida, S.; Yamamoto, M.; Kudo, A.; Hagiwara, M.; Hosoya, T. Org. Biomol. Chem. 2010, 8, 4051.
- 3. Yoshida, S.; Shiraishi, A.; Kanno, K.; Matsushita, T.; Johmoto, K.; Uekusa, H.; Hosoya, T. Sci. Rep. 2011, 1, 82.
- 4. Yoshida, S.; Hatakeyama, Y.; Johmoto, K.; Uekusa, H.; Hosoya, T. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 13590.

Poster	3F Access Corridor
P1	Gold-Catalyzed Reaction of Benzyl Alcohols and Styrenes in Ionic Liquid
	Shuhei Nakata, Nobuyoshi Morita, Shintaro Ban, Yoshimitsu Hashimoto, Osamu Tamura
P2	Gold-Catalyzed Synthesis of 1,3-Diarylindenes
	Akiyoshi Yoda, Nobuyoshi Morita, Mari Yamamoto, Masazumi Miyamoto, Shintaro Ban, Yoshimitsu
	Hashimoto, Osamu Tamura
Р3	Gold-Catalyzed Synthesis of Poly-substituted Furans
	Shingo Uchida, Nobuyoshi Morita, Shintaro Ban, Yoshimitsu Hashimoto, Osamu Tamura
P4	Utilization of Electron-donating Ability of Oximes and Hydrazones for Inverse Regioselective Cycloaddition
	Ryo Abe, Yoshimitsu Hashimoto, Hiromasa Ishiwata, Mitsuki Katoh, Soko Tachikawa, Mana Sekino,
	Shintaro Ban, Nobuyoshi Morita, Osamu Tamura
Р5	Synthetic Studies on Negamycin Using N-Boranonitrone Cycloaddition
	Yuki Kajiki, Kazunari Hikosaka, Yoshimitsu Hashimoto, Toshihiro Hirai, Kenji Fukui, Shintaro Ban,
	Nobuyoshi Morita, Osamu Tamura
P6	Design and synthesis of Vitamin D derivatives having long alkyl chain
	Akihiro Matsuoka, Hiroaki Ishida, Yasuaki Anami, Keiko Yamamoto
P7	Synthesis of 17-(S)HpDHA using soybean lipoxygenase enhanced by radical scavenger
	Hideaki Tajima, Yoshinori Yamamoto, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto
P8	Facile screening of ligand binding and whole protein fluctuation using HDX-MS
	Ryota Yanagi, Hiroyuki Kojima, Daichi Egawa, Toshimasa Itoh, Keiko Yamamoto
P9	Construction of co-activator peptide library for nuclear hormone receptors
	Moe Niimura, Toshimasa Itoh, Hiroyuki Kojima, Satoshi Kanamori, Daichi Egawa, Keiko Yamamoto



文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成



生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成 シンポジウム

日時:2018年2月15日(木)~16日(金) 場所:昭和薬科大学



参加費用:無料 参加登録:不要 詳細については右記 URL をご覧下さい URL: http://

URL : http://www.covalent.hrc.shoyaku.ac.jp



アクセス ・小田急線新宿駅から快速急行、多摩急行または急行で「新百合ヶ丘駅」乗換え 「玉川学園前駅」まで 30 ~ 40 分、徒歩 15 分

・京浜急行「羽田空港駅」から横浜駅経由でJR横浜線「成瀬駅」まで1時間、バス10分

・JR 東海道新幹線・横浜線「新横浜駅」から「成瀬駅」まで 18 分、バス 10 分

主催:昭和薬科大学

連絡先 昭和薬科大学 「生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成」プロジェクト事務局 〒194-8543 東京都町田市東玉川学園3丁目3165番地 E-mail:covalent1@ac.shoyaku.ac.jp





the MEXT Program to Support the Development of a Foundation for Strategic Research at Private Universities



生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成 シンポジウム

要旨集



2018年2月15日(木)~16日(金)

主催:昭和薬科大学

フロア案内

第2講義棟

2F









BF



Time Table

1日目 2月15日(木)

		開始		終了	
受付		12:30		17:00	
開会の挨拶	西島 正弘 (昭和薬科大学 学長)	13:00	-	13:10	0:10
01	加藤 恵介(東邦大学薬学部薬化学教室)	13:10	-	13:40	0:30
	座長:田村 修(昭和薬科大学)				
02	田村 修 (薬化学研究室)	13:40	-	14:10	0:30
	座長:山本 恵子 (昭和薬科大学)				
03	伊藤 俊将(医薬分子化学研究室 若手助成)	14:10	-	14:25	0:15
	座長:田村 修(昭和薬科大学)				
04	出水 庸介(国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部)	14:25	-	14:55	0:30
	座長:山本 恵子 (昭和薬科大学)				
休憩		14:55	-	15:20	0:25
PL1	浦野 泰照 (東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室)	15:20	-	16:20	1:00
	座長:山本 恵子 (昭和薬科大学)				
休憩		16:20	-	16:30	0:10
05	林 良雄(東京薬科大学 薬品化学教室)	16:30	-	17:00	0:30
	座長:山本 恵子 (昭和薬科大学)				
06	山本 恵子 (医薬分子化学研究室)	17:00	-	17:30	0:30
	座長:田村 修(昭和薬科大学)				
07	青木 伸(東京理科大学薬学部生命創薬科学科)	17:30	-	18:00	0:30
	座長:田村修(昭和薬科大学)				
情報交換会		18:30	-		

2日目

2月16日(金)

		開始		終了	
08	梶川 瑞穂 (微生物学研究室 若手助成)	9:00	-	9:15	0:15
	座長:石戸 聡 (兵庫医科大学)				

O9	松田 真悟 (薬物治療学研究室 若手助成)	9:15	-	9:30	0:15
	座長:石戸 聡 (兵庫医科大学)				
O10	石戸 聡(兵庫医科大学 病原微生物学講座)	9:30	-	10:00	0:30
	座長:伊東 進(昭和薬科大学)				
011	柳 茂(東京薬科大学 生命科学部 分子生化学研究室)	10:00	-	10:40	0:40
	座長:水谷 顕洋(昭和薬科大学)				
012	三木 裕明(大阪大学微生物病研究所 細胞制御分野)	10:40	-	11:20	0:40
	座長:渡邊泰男(昭和薬科大学)				
013	伊東 進 (生化学研究室)	11:20	-	11:50	0:30
	座長:渡邊泰男(昭和葉科大学)				
O14	水谷 顕洋 (薬物治療学研究室)	11:50	-	12:10	0:20
	座長:渡邊泰男(昭和薬科大学)				
015	渡邊 泰男(薬理学研究室)	12:10	-	12:30	0:20
	座長:水谷 顕洋(昭和薬科大学)				
Lunch		12:30	-	13:30	1:00
PL2	一條 秀憲 (東京大学大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 教授)	13:30	-	14:30	1:00
	座長:伊東進(昭和薬科大学)				
休憩・Photo		14:30	-	15:00	0:30
O16	小椋 康光(千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学研究室)	15:00	-	15:30	0:30
	座長: 濵本 知之 (昭和薬科大学)				
O17	石井 良和 (東邦大学医学部微生物・感染症学講座 感染制御学分野)	15:30	-	16:00	0:30
	座長: 濵本 知之 (昭和薬科大学)				
O18	濵本 知之 (臨床薬学教育研究センター 応用薬物治療部門)	16:00	-	16:30	0:30
	座長:山崎浩史(昭和薬科大学)				
O19	末水 洋志 (公益財団法人実験動物中央研究所 研究部)	16:30	-	17:00	0:30
	座長:山崎浩史(昭和薬科大学)				
O20	山崎 浩史(薬物動態学研究室)	17:00	-	17:30	0:30
	座長: 濵本 知之 (昭和薬科大学)				
閉会の挨拶	山本 恵子 (医薬分子化学研究室・研究代表者)	17:30	-	17:40	0:10

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成シンポジウム プログラム

1日目 2018年2月15日(木)

於: 第二講義棟 202 教室

受付 12:30-13:00

開会の挨拶

13:00-13-10

西島正弘 (昭和薬科大学学長)

- 01. ビスオキサゾリンリガンドの特性を活かした新規連続反応の開発
- 13:10~ 加藤 恵介 東邦大学 薬学部 薬化学教室
- O2. O-Alkyl S-(Pyridin-2-yl)carbonothioates を用いる反応開発
- 13:40~ 田村修 昭和薬科大学 薬化学研究室
- 03. 核内受容体をコバレント修飾するオキソ型脂肪酸と共有結合モディファイアの新規評価法
- 14:10~ 伊藤 俊将 昭和薬科大学 医薬分子化学研究室 若手助成
- 04. タンパク質の寿命を制御できる分子の開発 ~His タグタンパク質を標的とした分解誘導剤の開発~
- 14:25~ 出水 庸介 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部

14:55-15:20 休憩

PL1. 蛍光ライブイメージングに基づく化学の新たな医療応用

1520~ 浦野 泰照 東京大学 大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室

16:20-16:30 休憩

- 05. ホルモンから抗体薬物複合体までのペプチド中分子創薬の展開
- 16:30~ 林良雄東京薬科大学薬学部
- 06. ビタミンD受容体の構造と機能
- 17:00~ 山本 恵子 昭和薬科大学 医薬分子化学研究室
- 07. 異分野連携研究による血液中のがん細胞の検出・捕捉・培養・細胞死誘導法の開発
- 17:30~ 青木 伸 東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科

情報交換会

18:30~

2日目 2018年2月16日(金)

於: 第二講義棟 202 教室

受付 9:00-17:00

- O8. コバレント修飾により宿主免疫を回避するウイルス膜型ユビキチンリガーゼ MIR の阻害法開発
- 9.00~ 梶川 瑞穗 昭和薬科大学 微生物学研究室 若手助成
- 09. 恐怖消去抵抗性の分子機構解明に向けた基盤的研究
- 9:15~ 松田 真悟 昭和薬科大学 薬物治療学研究室 若手助成
- O10. MARCHの発現異常による免疫学的疾患
- 9:30- 石戸 聡 兵庫医科大学 病原微生物学講座
- 011. ミトコンドリアダイナミクスと老化関連疾患
- 10:00~ 柳 茂 東京薬科大学 生命科学部 分子生化学研究室
- O12. PRL/CNNM 複合体による Mg²⁺排出の調節と PRL の Cys リン酸化
- 10:40~ 三木 裕明 大阪大学·微生物病研究所
- O13. がん進展を制御するデュアル阻害分子 TMEPAI ファミリーの機能解析
- 11:20- 伊東進 昭和薬科大学 生化学研究室
- O14. IRBIT, a sensor of intracellular milieu, functions thorough its multisite phosphorylation CODE.
- 11:50~ 水谷 顕洋 昭和薬科大学 薬物治療学研究室
- 015. カルシウム信号系のコバレント修飾応答性とその意義
- 12:10~ 渡邊 泰男 昭和薬科大学 薬理学研究室

12:30-13:30 Lunch

PL2. ストレスシグナルのメカニズム解明から創薬へ

10:00~ 一條 秀憲 東京大学·大学院薬学系研究科·細胞情報学教室

14:30-15:00 集合写真·休憩

- 016. 金属コバレント修飾の生物学的及び毒性学的意義の解明
- 15:00~ 小椋 康光 千葉大学 大学院薬学研究院 予防薬学研究室
- 017. 感染症の迅速診断技術の進歩と今後の方向性
- 15:30~ 石井 良和 東邦大学 医学部 微生物·感染症学講座 感染制御学分野

- O18. 感染症の原因菌の同定と保有する耐性因子を迅速に診断するための PCR と ESI-MS を組み合わせた 検出法に関する研究
- 16:00- 濵本 知之 昭和薬科大学 臨床薬学教育研究センター 応用薬物治療部門
- 019. 基礎医学研究、および、創薬に有用なヒト化マウスの開発
- 16:30~ 末水 洋志 公益財団法人実験動物中央研究所 研究部
- O20. 医薬品・一般化学物質由来のヒト型反応性代謝物の評価
- 17:00~ 山崎 浩史 昭和薬科大学 薬物動態学研究室

閉会の挨拶 17:30-17-40 山本 惠子 (昭和薬科大学 医薬分子化学研究室·研究代表者)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成

シンポジウム

要旨集

於:昭和薬科大学

ビスオキサゾリンリガンドの特性を活かした新規連続反応の開発

加藤 恵介

東邦大学 薬学部

ビスオキサゾリン (box) リガンドは、不斉触媒反応に利用されるポ ピュラーな配位子である。以前、この配位子の有無で生成物が変わる 反応に偶然遭遇したことから、"box リガンドは、2 価パラジウムの π-binding な Lewis 酸性を増大させる"という作業仮説を考えるに至っ た。(Scheme 1) そして、この"box リガンドの特性"に基づいてパラ ジウム触媒下のカルボニル化を基盤とした、アルキン類の連続反応を



開発してきた。このような研究の経緯と 1) 環化 - カルボニル化 - 環化 - カップリング反応と環化 - カルボニル化反応のリガンドによる Switching 2) 環化 - 環化 - 二量化反応 3) アルキンの 分子間メトキシカルボニル化反応と水和反応²⁾について紹介する。(Scheme 2)



Scheme 2 パラジウム触媒による 1 の連続反応

参考文献

- 1) I. Nakamura, T. Sato, Y. Yamamoto, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 4473.
- 2) T. Kusakabe, Y. Ito, M. Kamimura, T. Shirai, K. Takahashi, T. Mochida, K. Kato, Asian J. Org. Chem. 2017, 6, 1086.

O-Alkyl S-(Pyridin-2-yl)carbonothioates を用いる反応開発

田村 修

昭和薬科大学

チオエステル [R-C(O)SR'] は、アセチル CoA に代表されるように主要 なアシル化剤として生体内の共有結合形成反応に寄与している.一方、合 成化学で用いられる 2-ピリジルチオエステル1は、向山らにより開発され、

Corey らにより大環状ラクトン合成にも展開された反応剤である.¹⁾しかし,対応するカルボナートである *O*-alkyl *S*-(pyridin-2-yl) carbonothioates (2) は,DMF 中でアミンの保護基導入剤として報告されているが,²⁾反応剤としての特徴は明らかになっていなかった.その構造からは,通常のカルボナートよりもソフトな求電子部位をもち,

ピリジン窒素は水素結合受容体であり、金属への配位能力も有することが推測された. 我々は、 これらの性質を念頭におき研究を進めた結果、特徴ある反応を開発することが出来た.

1. オキシムの N-選択的アシル化による N-Boc ニトロンの発生法の開発 N-Boc ニトロン5は, 高活性で不安定な 1,3-双極子であり,近年その反応が検討されている.しかし,その発生法は N,S-

アセタール型の3を塩基処理する方法と³*N*-Bocヒドロキ シルアミン4のTEMPO酸化⁴⁾のみであり,何れも*N*-Boc 化された基質を出発物質とするものであった.これに対 して我々は2を用いることにより,オキシムの窒素原子 選択的なアシル化による*N*-Boc ニトロンの発生に成功し,

効率的かつ一般性の高い分子内1,3-双極子付加環化反応を開発することが出来た.

2. アルコール中でのアミンの保護基導入反応 アシ ル化剤 2 はそのソフトな求電子性から窒素選択性が高 く、メタノール中で使用できるアミン選択的保護基導 入剤となることが明らかとなった.

3. Grignard 反応剤からの一工程エステル化反応の開発 一般に、Grignard 反応剤からエステル を合成するには、Grignard 反応剤を二酸化炭素と反応させカルボン酸とした後、エステル化する という2工程が必要である.これに対し、2 を用いると中間体がキレートで安定化されるため、 1工程でエステルが得られることが明らかとなった.この 反応は、アルキル、アルケニル、アルキニル Grignard 反応 剤と反応し、対応するエステルを与える.

HO

H₂N

•HCI

References: 1) Mukaiyama, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1979, *18*, 707. 2) Kim, S.; Lee, J. I.; Yi, K. Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1985, *58*, 3570. 3) (a) Guinchard, X.; Vallée, Y.; Denis, J.-N. *Org. Lett.* 2005, *7*, 5147. (b) Liu, Y.; Ao, J.; Paladhi, S.; Song, C.; Yan, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, *138*, 16486. 4) Gini, A.; Segler, M.; Kellner, D.; Mancheño, O. G *Chem. Eur. J.* 2015, *21*, 12053.



0

NHFmoc

∽OAc

1) **2**, MeOH

2) Ac₂O, py





核内受容体をコバレント修飾するオキソ型脂肪酸と共有結合モディファイアの新規評 価法

伊藤 俊将

昭和薬科大学·医薬分子化学研究室

現在までに我々は核内受容体のPPARとオキソ型脂肪酸の共有結合に着目し、官能基の位置と反応速度の関連性や、サブタイプ選択性について検討してきた。現在までに、6位にカルボニル基を有し



た 6-oxo 型脂肪酸が PPAR γ に対して最も速く共有結合し、PPAR α に対しては 17-oxo 型脂肪酸が 最も速く結合する等の報告を行っている。今回は HNF4 α についての検討をおこなった。その結 果、PPAR γ や α とは異なり 4-oxo 型脂肪酸の共有結合が最も速いことが判明した。さらに、共有 結合モディファイアの新規評価法に関する検討を行った。近年、アファチニブのような共有結合を 積極的に意図して開発した医薬品が上市されるようになってきた。しかし、創薬研究において、共有 結合能を有する化合物のスクリーニングに対する簡便な手法は知られていない。共有結合の形成が非 特異的結合であるのかどうかを判別しなくてはならないことが課題である。もし、タンパク質と共有 結合モディファイアの共有結合を評価するのではなく、複合体になった後の全体構造を評価すれば、 それが意味のある結合か否かを直接判定できるのではないかと考えた。水素-重水素交換反応(HDX) を応用すれば、タンパク質の安定性の指標となる"ゆらぎ"の大きさから判定が可能になると推定し た。タンパク質には PPAR γ と VDR を用い、これらに対して HDX 質量分析を行い共有結合能を有す る化合物のスクリーニングを試みた。その結果、低分子量の化合物であるヨード酢酸をヒット化合物 として見出すことができた。

タンパク質の寿命を制御できる分子の開発 ~His タグタンパク質を標的とした分解誘 導剤の開発~

出水 庸介

国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部

【目的】近年、タンパク質の機能を解明する手段としてユビキチン・ プロテアソーム系(UPS)を用いたプロテインノックダウン法が注目 されている。この手法では、標的タンパク質(POI)リガンドとユビ

キチンリガーゼリガンド (E3 リガンド) をコンジュゲートした分子を用いることで、すでに生産 された細胞内の標的タンパク質を UPS で分解できる^{1,2}。しかしながら、現在の手法では標的タ ンパク質に合わせたリガンドを用いなければならず、広い範囲に適用が困難、リガンドが不明な

a)

タンパク質には適用不可などの問題点が挙 げられる。また UPS を介したタンパク質分 解の適用可能範囲は未解明であり、網羅的に 解析する手法は確立されていない。そこで 我々は、標的タンパク質に融合させた His タ グをターゲットとすることで標的タンパク 質のリガンドを用いないプロテインノック ダウン法の開発を目指した(Figure 1)³。

【結果】 分解誘導分子は、His タグ と相互作用する Ni-NTA、E3 リガン ド (MV1)、さらに CH6 タグのシス テインと共有結合するためのマレイ ミド基 (mal) を導入した分子

(MV1-mal-triNTA)を設計・合成し た。また、キャリアペプチドとして His タグを導入した膜透過ペプチド

(CPP, R10-H4A2) を用いることによ り MV1-mal-triNTA の細胞内への導



 β-actin

 MV1-mal-triNTA

 MV1-mal-triNTA (∞M)
 3

 Ac-YRRRRRRRGHAHAHH-NH2
 MV1-triNTA (∞M)
 3

 R10-H4A2
 R10-H4A2(∞M)
 3
 3

Fig. 2 a) 分解誘導分子, キャリアペプチドの設計, b) Hisタグタンパク質の分解誘導評価

入効率を高めることを計画した(Figure 2a)。標的タンパク質(CRABP-II)のN末端にCH6タグを融合し、HT1080細胞に発現させ、MV1-mal-triNTAによるノックダウンを評価した(Figure 2b)。その結果、MV1-mal-triNTAとR10-H4A2を共投与することで標的タンパク質の分解が誘導された(lane 3)。本シンポジウムでは、分子設計、タンパク質分解メカニズムなどの詳細について発表する。

Maleimide

- 1 C. M. Crews, et al., Science 2017, 355, 1163.
- 2 M. Ishikawa, Y. Hashimoto, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 56, 11530.
- 3 Y. Demizu, M. Naito, et al., J. Med. Chem. in press.



Plenary Lecture 1

蛍光ライブイメージングに基づく化学の新たな医療応用

浦野 泰照

東京大学大学院薬学系研究科・医学系研究科

筆者らはこれまでに、蛍光プローブの論理的精密設計を可能とする全 く新たな分子設計法を確立し、活性酸素種やレポーター酵素、生体関連 物質、酵素活性などを高選択的かつ高感度に検出する蛍光プローブや、 超解像ライブイメージングの達成する世界初の自己明滅型蛍光プロー



ブの開発などに成功してきた。さらに、従来は生細胞観察用途が主であった蛍光プローブの in vivo 応用を目指し、がん選択的に取り込まれる抗体に酸性環境検出蛍光プローブを結合させた activatable 型がんイメージング蛍光プローブを開発し、動物個体内の微小がん部位の高選択的イメージングにも成功してきた。

また近年、外科・内視鏡手術によってがん部位を精確に摘出し、がんの取り残しによる再発を 激減させることを目指し、新たな蛍光プローブの開発を行った。具体的には、多くのがん細胞で その発現が亢進しているとの報告のあるγ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)活性を高感 度に検出する有機小分子蛍光プローブを開発し、これを蛍光内視鏡下でがんモデルマウス体内の がんが疑われる部位に噴霧することで、肉眼では識別困難な1mm以下の微小がん部位を、数十 秒~数分で明確に検出できることを明らかにした。このような迅速酵素活性ライブイメージング は世界初の成果であり、外科手術新鮮臨床検体への適用によるがん部位可視化機能の検証が可能 であることから、多くの外科医と共同研究を開始し、例えばヒト乳がん臨床検体へと本プローブ を局所散布することにより、高い感度、特異度で切除断端遺残微小がんの術中迅速検出が可能で あることなどを明らかとした。

さらに上述の分子設計法に則り、種々のアミノペプチダーゼ活性に対応する数百種類の蛍光プ ローブから成るプローブライブラリーを作製した。このライブラリーを新鮮臨床検体に適用し、 がん部位と非がん部位での活性差を直接ライブイメージングする新たなアプローチにより、例え ば食道がんで DPP4 の活性が顕著に上昇していることが見いだされ、実際 DPP4 プローブの適用 により、ルゴール染色技法と比較して同等以上の正診率でのイメージングが可能であることなど が明らかとなった。

以上のように有機小分子蛍光プローブは、基礎生物学研究から外科・内視鏡治療まで幅広い領域に大きな威力を発揮するものであり、今後もさらに多くの画期的な機能を持つプローブを開発していく所存である。特に後者の医療応用に関しては、国内化学メーカーと VC の支援による非臨床試験が鋭意行われており、早期に医師主導治験を開始すべく積極的に活動をしている。

<References> 1) *Nat. Chem.*, 2017, <u>9</u>, 279. 2) *Nat. Chem.*, 2014, <u>6</u>, 681. 3) *Nat. Med.*, 2009, <u>15</u>, 104.
4) *Sci. Transl. Med.*, 2011, <u>3</u>, 110ra119. 5) *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, <u>135</u>, 409. 5) *Nat. Commun.*, 2015, <u>6</u>, 6463. 7) *Sci. Rep.*, 2015, <u>5</u>, 12080. 8) *Sci. Rep.*, 2016, <u>6</u>, 26399.

ホルモンから抗体薬物複合体までのペプチド中分子創薬の展開

林良雄

東京薬科大学 薬学部

最近「中分子ペプチド創薬」が創薬フロンティアの一つとして注目されて いる。しかし、中分子であるペプチドホルモンに注目すれば、既に100年近 い医薬品の歴史があり、今日、インスリンをはじめ多くのペプチド中分子が 臨床で活躍している。一方、これからのペプチド中分子創薬では、ホルモン



活性のみならずペプチドの多様な機能に着目した創薬展開も重要である。すなわち、ペプチド中分子には低分子医薬品では真似のできない機能が期待される。例えばペプチドは、タンパク質-タンパク質相互作用(PPI)のような分子表面の浅い領域同士での広範な相互作用を阻害できる。

我々の研究室は、ペプチドの化学・創薬を中心とした研究を展開している。実は、スタッフ全員で ペプチド創薬の百貨店になることをめざしている。ペプチド創薬に興味をお持ちの方が取りあえずド アをノックして相談に来てくれる。そんな百貨店である。勿論、ペプチド合成化学もご相談にのる。

今回は、ペプチド創薬に焦点を当てて、このような私達の主なペプチド研究をご紹介したい。実際に は、ペプチドの1)ホルモン作用、2) PPI 阻害、3)特殊な利用の3つの方向に注目して複数のペプ チド創薬研究を展開している。具体的に、1)は、抗肥満剤をめざした受容体選択的ニューロメジン U (NMU)アゴニストの創製である。¹⁾ NMU は、ヒトでは25 残基のペプチドホルモンで抗肥満薬創製 への展開が期待されている。NMU の受容体 (NMUR)には2種類あるが、我々はヒトの各 NMUR に 選択的なペプチド性アゴニストの創製に成功した。2)は、筋萎縮性疾患の治療をめざしたマイオスタ チン阻害ペプチドの創製である。²⁾マイオスタチンは、筋肉量を負に制御するタンパク性因子であるが、 その前駆体配列から得られたマイオスタチンロ害ペプチドの構造活性相関研究から、マイオスタチン とその受容体の結合、すなわちタンパク質-タンパク質相互作用を阻害し、筋肉を増強するペプチド医 薬品の創製を進めている。3)は、抗体 Fc 領域に結合するペプチドを利用したペプチドー抗がん剤架 橋体の合成に基づく質の高い抗体薬物複合体 (ADC)の創製である。³⁾抗体に架橋する薬物としては 自分達が創製した抗チューブリン薬⁴⁾ (Pinabulin, Phase III)を用いている。社会的ニーズの高い疾患領 域を対象としたこれらの創薬基礎研究を通じて、ペプチド創薬の面白さを是非味わっていただきたい。

《参考文献》

- 1. a) Takayama, K. *et al. J. Med. Chem.* 2014, *57*, 6583. b) Takayama, K., *et al. ACS Med. Chem. Lett.* 2015, *6*, 302.
 c) Takayama, K. et al. Biopolymers 2016, *106*, 440. d) Takayama, K. *et al. J. Med. Chem.* 2017, *60*, 5228.
- 2. a) Ohsawa, Y. *et al. PLOS One* **2015**, *10*, e0133713, b) Takayama, K. *et al. J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1544. c) Asari, T. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 113. d) Takayama, K. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 751.
- a) Muguruma, K. *et al. Bioconjugate Chem.* 2016, 27, 1606. b) Taguchi, A. *et al. Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 3186. c) Taguchi, A. *et al. Chem. Eur. J.*, 2017, 23, 8262. d) Rentier, C. *et al. J. Pept. Sci.* 2017, 23, 496.
- 4. a) Yamazaki, Y. *et al. J. Med. Chem.* 2012, *55*, 1056. b) Yakushiji, F. *et al. Chem. Eur. J.* 2011, *17*, 12587. c) Hayashi, Y. *et al. Chem, Pharm. Bull.* 2013, *61*, 889. d) Hayashi, Y. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* 2014, *5*, 1094.

O6

ビタミンD受容体の構造と機能

山本 **恵子** 昭和薬科大学 医薬分子化学研究室



タンパク質の構造解析は、数十年来X線結晶構造解析により目覚ま

しい進歩を遂げてきた。X 線結晶構造解析の有用性については疑いの余地がないが、本法は静的 状態(結晶)の解析法である。近年、電子顕微鏡(EM)法やX 線小角散乱(SAXS)法、核磁 気共鳴(NMR)解析、水素・重水素交換質量分析(HDX-MS)などの溶液中の構造解析法も報告 されるようになってきた。ビタミンD受容体(VDR)においても、リガンド結合領域(LBD) とアゴニストの複合体のX 線結晶構造解析が盛んに行われ、アゴニスト/VDR-LBD 複合体の活 性型構造はよく理解されている。しかし、アンタゴニスト結合による VDR-LBD の不活性化を説 明できる構造は得られていなかった。また、リガンドが結合していないアポ型構造も不明であっ た。そこで、結晶構造解析に加えて SAXS 法や HDX-MS 法も駆使した構造解析を計画し、実験 を行った。その結果、アンタゴニスト結合による不活性化を説明できる構造を明らかにし、アポ 型構造も得ることができたので報告する。¹⁶

- 1. Anami Y. et al. J. Med. Chem. 57, 4351-4367 (2014)
- 2. Yamamoto K. et al. Curr. Top. Med. Chem. 14, 2378–2387 (2014).
- 3. Anami Y. et al. Bioorganic. Med. Chem. 23, 7274–81 (2015)
- 4. Anami Y. et al. J. Med. Chem. 59, 7888–7900 (2016)
- 5. Kato A. et al. Bioconjugate Chem. 27, 1750–1761 (2016).
- 6. Kato A. et al. J. Med. Chem. 60, 8394 8406 (2017).

O7

異分野連携研究による血液中のがん細胞の検出・捕捉・培養・細胞死誘導法の開発

青木 伸^{1,2,3}

- 1東京理科大学薬学部生命創薬科学科
- 2東京理科大学総合研究院医理工連携研究部門
- 3東京理科大学総合研究院イメージングフロンティアセンター



がんの最大の問題は、転移と再発であろう。がん原発巣から血中へ流出したがん細胞は血中循 環がん細胞(Circulating Tumor Cell, CTC)と呼ばれる。血液中における CTC 数は非常に少ないが、 がん転移、悪性化、耐性出現に深く関与していると考えられており、その簡便かつ鋭敏な検出・ 捕捉法が求められている。一方東京理科大学では、文部科学省の私立大学戦略的研究基盤形成支 援事業によって、2009~2014 年に「がん医療基盤科学技術研究センター」が設置された。我々は このプロジェクトで「CTC の検出・分離・培養法の開発」を目的として、分子生物学、機械工学、 免疫学、材料工学、コンピューターサイエンスなどの学内研究者や国立がん研究センター東病院 の医師、鳥取大学の獣医師らとの異分野連携研究を進めてきた。具体的には、1) 細胞の形態・大

きさの違いに基づく CTC 検出・分離・再 培養法の開発¹、2) 発光性金属錯体による がん細胞のイメージングと細胞死誘導²、 3) 金属酵素の化学³と機械学習を基盤と する放射線治療用薬剤の開発⁴、などを行 った。これらの研究は上記研究センター終 了後も継続しており、それらの成果を紹介



したい。

References

[1] (a) Okano, H. et al. Biomed. Microdev. 2015, 17, 59. (b) Babita, S. et al. Submitted for publication.

[2] (a) Hisamatsu, Y. *et al., Bioconjugate Chem.*. **2015**, *26*, 857. (b) Hisamatsu, Y. *et al. Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 507. (c) Yokoi, K. *et al.Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 5295. (d) Masum, A.-A. *et al.* Submitted for publication.

[3] (a) Hanaya, K. *et al. J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 517. (b) Ariyasu, S. *et al. Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 642. (c) Hanaya, K. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 545.

[4] (a) Ariyasu, S. *et al. Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 3891. (b) Morita, A. *et al. Mol. Cancer Ther.* **2017**, *in press.* (c) Matsumoto, A. *et al. Int. J. Machine Learn. Comput.* **2016**, *6*, 145. (d) Tanaka, T. *et al. Chem. Pharm. Bull.* **2017**, 65, 566.
コバレント修飾により宿主免疫を回避するウイルス膜型ユビキチンリガーゼMIRの阻害 法開発

梶川 瑞穂

昭和薬科大学 微生物学研究室

ヘルペスウイルス科に属するカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV)は、健常人には病変を引き起こさずにB細胞に潜伏感染す る。宿主の免疫が著しく低下すると溶解感染に移行して血管内皮細胞



に感染し、悪性のカポジ肉腫を発症させるが、有効な抗KSHV薬は実用化されていない。 KSHVは溶解感染移行時に、感染細胞においてウイルスタンパク質MIR1およびMIR2を発現 する。MIRは免疫の活性化を担う宿主膜タンパク質に、ユビキチン分子をコバレントに連結する

膜貫通型のユビキチンリガーゼである。標的となった膜タンパク質はユビキチン依存的エンドサイトーシスにより細胞表面から消失するため、KSHV 感染細胞は宿主免疫の活性化を誘導できない。そこで我々は MIR の機能阻害が KSHV の治療法開発につながると考え、本研究において MIR による標的認識の阻害法開発を目的とした、MIR と標的との相互作用の分子基盤解明を実施した。

当初、MIR1 および MIR2 による標的膜タンパク質の選別は、MIR の膜貫通領域が標的の膜貫 通領域を認識することにより成立すると考えられていた。そこで我々はジスルフィドスキャニン グ法を用いて、MIR と標的膜タンパク質との膜貫通領域における相互作用部位の特定を試みた。 しかし MIR は化学架橋されると不可逆的に凝集して分析が困難になったことから、本法では MIR と標的との膜貫通領域における直接相互作用部位の検出には至らなかった。

一方、本研究では MIR による標的膜タンパク質の認識領域について、変異解析により再評価した。その結果、MIR1 は既報通り膜貫通領域のみをもって標的膜タンパク質を認識するが、MIR2 は膜貫通領域に加え、細胞外領域を併用して標的膜タンパク質を認識することが明らかになった。 MIR1 および MIR2 は共に抗原提示分子 MHC-I を標的とするが、MIR2 は MHC-I 以外にも補助刺激分子 B7-2 や接着分子 ICAM1 など数多くの分子を基質とする。MIR2 の細胞外領域による付加的な認識の併用は、MIR2 が MIR1 よりも多くの標的を認識できる理由であるかもしれない。また、MIR2 は発現量および活性の両面で MIR1 を大きく上回ることが報告されており、細胞外領域認識を標的とする MIR2 阻害法の開発は、高い免疫回避阻害効果を生み出すものと考えられる。

我々はMIR2の細胞外領域による標的認識の分子基盤について詳細に検討し、標的膜タンパク 質の細胞外領域と膜貫通領域との境目に存在する酸性アミノ酸残基が、MIR2による認識を受け るために重要であることを見出した。この基質の特徴を基に、MIR2の標的となる可能性を有す る宿主膜タンパク質を探索した結果、新たなMIR2の基質候補分子として、炎症反応に関わる宿 主膜タンパク質を見出した。以上のように、本研究で見出されたMIR2による細胞外領域を用い た標的認識は、MIR阻害法の開発のみならず、KSHVの感染病態のさらなる解明にも貢献するも のと期待できる。

恐怖消去抵抗性の分子機構解明に向けた基盤的研究

松田 真悟

昭和薬科大学 薬物治療学研究室

【導入】心的外傷後ストレス障害(PTSD)や恐怖症といった恐怖記憶と 関連のある精神疾患では女性の方が男性に比べて有病率が高いこと が知られている.しかし、有病率の性差に対する脳内分子機構は未解



明なため、性差を考慮した治療法の確立には至っていない. 我々は雌マウスは雄マウスに比べ て恐怖記憶を忘却するためのトレーニング(恐怖消去トレーニング)に抵抗性を示し、そのトレー ニング効果を長期間保つことが出来ないことを報告している. さらに、雌マウスは雄マウスに比 べてトレーニング後にExtracellular signal-regulated kinase (ERK) 2 のリン酸化レベルが高まりにく いことも見出している. これらの結果を基に、我々は『メスにおける恐怖記憶の忘却抵抗性は ERK 活性によって制御される』という仮説を立てた. 本研究では、恐怖記憶の忘却に対する ERK 上流分子の役割解明(研究 1)と特定した分子の発現や活性を人工的に脳内制御するうえで必須の 技術である脳内微量薬物投与系の確立に向けて研究を実施した(研究 2).

【研究 1】成体期の雌マウスに対して恐怖記憶の形成と忘却を調べる課題である文脈的恐怖条件 づけ課題を実施した.また,ERKの上流分子を調べるために,恐怖条件づけ課題時にERKの上流 受容体を標的とした薬物を投与した:チロシンキナーゼ型受容体(TrkB-R)の作動薬 (7,8-dihydroxyflavone; 7,8-DHF, 5 もしくは 25 mg/kg),カンナビノイド受容体(CB-R)の作動薬 (WIN55,212-2; WIN, 0.25 もしくは 0.75 mg/kg),内在性カンナビノイドの代謝酵素阻害剤(URB597; URB, 0.3, 1,もしくは 3 mg/kg),または、グルココルチコイド受容体(GR)の作動薬 (Dexamethasone; DEX, 10 mg/kg).

TrkB-R の作動薬である 7,8-DHF は恐怖記憶の形成および忘却に影響を与えなかった. これに対し, CB-R の作動薬である WIN(0.75 mg/kg)と内在性 CB の代謝酵素阻害剤である URB (3 mg/kg) は恐怖記憶を強めた. 加えて, WIN(0.75 mg/kg)は恐怖消去トレーニングに対する抵抗性も増強させた. 一方, GR の作動薬である DEX は恐怖記憶と恐怖消去トレーニングには影響を与えなかったが, トレーニング効果の持続を低下させた. これらの結果から, 雌マウスにおいて CB システムが恐怖記憶の形成および恐怖消去トレーニング抵抗性に, GR が恐怖消去トレーニング効果の安定化に関与することが示唆された.

【研究 2】脳内微量薬物投与系の確立に向け、恐怖記憶の想起に必須の脳領域である扁桃体中心核(CeA)に興奮毒性を持つイボテン酸(0.1 mg/ml/片側, 100 nL, 100 nL/min)を投与し、文脈的恐怖条件づけ課題を実施した.破壊領域を確認するために、課題終了後の脳を用いてNissl染色を行った.

イボテン酸投与によってマウスの CeA 内神経細胞数が低下し、さらに恐怖記憶が障害された. このことから、脳内微量薬物投与系の確立に成功したと考えられる.

MARCHの発現異常による免疫学的疾患

石戸 聡

兵庫医科大学 病原微生物学講座

我々は、獲得免疫に重要な MHC class II をユビキチン化によっ て制御している E3 ユビキチンリガーゼ MARCH を見出し報告してき た(Embo J 2007, JEM 2016)。MARCH はリンパ器官に発現しており、 感染刺激によってその発現が減少することが明らかとなっている。



従って、MARCHの発現減少による MHC II の安定化が感染免疫応答に重要であると推察されている。 しかしながら、MARCH の発現異常によりどのような疾患が起こりうるのかについては、現在にお いても不明である。従って、我々は MARCH 遺伝子を遺伝学的に操作し、MARCH 機能の変調による 疾患の可能性について検討を行なっている。今回は現在までに得られている免疫学的異常を紹介 し、MARCH 異常による免疫疾患についての仮説を提示する。

References

- von Rohrscheidt, J., Petrozziello, E., Nedjic, J., Federle, C., Krzyzak, L., Ploegh, HL., Ishido, S., Steinkasserer, A. and Klein, L. Thymic CD4 T cell selection requires attenuation of March8-mediated MHCII turnover in cortical epithelial cells through CD83. J. Exp. Med. 2016 Aug 22;213(9):1685-94. doi: 10.1084/jem.20160316. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27503071
- Liu, H., Jain, R., Guan, J., Vuong, V., Ishido, S., La Gruta, NL., Gray, DH., Villadangos, JA. and Mintern JD. Ubiquitin ligase MARCH 8 cooperates with CD83 to control surface MHC II expression in thymic epithelium and CD4 T cell selection. J. Exp. Med. 2016 Aug 22;213(9):1695-703. doi: 10.1084/jem.20160312. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27503069
- Ishikawa, R., Kajikawa, M. and Ishido, S. Loss of MHC II ubiquitination inhibits the activation and differentiation of CD4 T cells. Int. Immunol. 2014 May;26(5):283-9. doi: 10.1093/intimm/dxt066. Epub 2013 Dec 26.
- 4. Ishido, S., Goto, E., Matsuki, M. and Ohmura-Hoshino, M: E3 ubiquitin ligases for MHC molecules, Curr. Opin. Immunol. 2009 Feb;21(1):78-83. Epub 2009 Feb 7.
- Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Aoki, M., Mito-Yoshida, M., Uematsu, M., Hasegawa, T., Koseki, H., Ohara, O., Nakayama, M., Toyooka, K., Matsuoka, K., Hotta, H., Yamamoto, A. and Ishido, S. Novel regulation of MHC class II function in B cells. EMBO J. 2007 Feb 7; 26(3):846-54. Epub. 2007 Jan 25

ミトコンドリアダイナミクスと老化関連疾患

柳茂

東京薬科大学 生命科学部 分子生化学研究室

ミトコンドリアの機能は、融合と分裂による形態変化、微小管上での ミトコンドリアの移動、小胞体など他のオルガネラとの相互作用など ミトコンドリアダイナミクスによって制御されている。ミトコンドリ ア外膜に局在する膜型ユビキチンリガーゼ MITOL (別名: MARCH5)



は、ミトコンドリアの分裂因子である Drp1 を基質にしてミトコンドリアの形態を制御している ことやミトコンドリアの融合因子である Mitofusin-2 を基質にしてミトコンドリアと小胞体の接 着 (MAM)の形成を誘導していることなどが明らかとなっている。このように MITOL は、ミト コンドリアダイナミクスの制御を介してミトコンドリアの品質を管理している。本シンポジウム の前半では、MITOL によるミトコンドリアダイナミクスの制御機構について概説し、種々の臓 器特異的 MITOL 欠損マウスの解析を通して、ミトコンドリアダイナミクスの破綻が老化関連疾 患を引き起こすことを紹介する。さらに MITOL がアンチエイジング創薬の標的になる可能性に 最新の結果をついて言及したい。後半では、近年注目されているミトコンドリア-小胞体間の膜接 触部位 Mitochondira-Associated ER membrane (MAM)の制御機構及び機能に関する研究を紹介す る。さらに MAM において、MITOL の新たな基質が同定し解析した結果、MITOL が MAM を介 して小胞体ストレスを調節しているという新たなメカニズムを見出したので報告したい。

PRL/CNNM 複合体による Mg²⁺排出の調節と PRL の Cys リン酸化

三木 裕明

大阪大学・微生物病研究所

PRL は大腸がんの転移巣などで高発現し、がんの悪性化を促す。 私たちは PRL に直接結合する標的分子として、進化的に高度に保 存され、バクテリアにも相同分子が存在する膜タンパク質 CNNM を見つけた。ヒトなどの哺乳動物で CNNM1-4 の4種が存在してお り、 Mg^{2+} を細胞外に排出して Mg^{2+} 量の調節に機能することを明ら



かにした。また、ファミリー分子の中でも CNNM4 と CNNM2 はそれぞれ腸や腎臓の上皮細胞に 高発現しており、上皮層を介した Mg²⁺のベクトル輸送に寄与することで、食物からの Mg²⁺吸収 や原尿からの Mg²⁺再吸収に重要であることも見つけた。線虫でのオルソログ遺伝子変異体の解析 でも、CNNM ファミリーの Mg²⁺恒常性の維持における重要性が示されている。

培養細胞を用いた解析から、PRL は CNNM に結合して Mg²⁺排出を阻害することが分かった。 実際に PRL を高発現する細胞では細胞内 Mg²⁺量が増加しており、それに伴って Mg²⁺と複合体を 作る ATP 量が増加するなど、エネルギー代謝に大きな影響を与えていた。また、B16 メラノーマ 細胞を用いた肺転移モデル実験で、CNNM に結合できない PRL 変異体はがん悪性化の効果を喪 失していることも分かった。CNNM 自身のがん悪性化における重要性を調べるため、腸で発現す る CNNM4 の遺伝子欠損マウスを作成し、腸で自発的にポリープを形成する APC ヘテロ欠損マ ウスと掛け合わせた。APC ヘテロ欠損マウスの腸ポリープがほぼすべて粘膜層に留まっていたの に対し、CNNM4 も欠損させたマウスではポリープの約半数が筋層に浸潤していた。これらの結 果から、PRL は CNNM の Mg²⁺排出を阻害することでがんを悪性化させることが明らかとなった。

PRL はチロシンホスファターゼドメインを持っており、その活性中心には Cys 残基が保存され ているが、この Cys 側鎖のチオール基 (-SH) がリン酸化されることを見つけた。Ser/Thr や Tyr のリン酸化と比較して、このリン酸化 Cys は化学的に不安定であり、加熱することで解離してし まう。しかし、内在性 PRL タンパク質のリン酸化状態を調べたとこところ、通常の増殖培養条件 下において HEK293 細胞で約半分、HeLa 細胞では大半の PRL がリン酸化された状態で存在して いることが分かった。さらに、リン酸化 PRL は CNNM と結合できなくなり、PRL のリン酸化状 態が培地中の Mg^{2+} 量によってダイナミックに変動することも分かった。つまり、PRL の Cys リ ン酸化状態が環境応答性に変化することで CNNM との複合体形成が制御されており、細胞内 Mg^{2+} 量の維持に機能していることが明らかとなった。

がん進展を制御するデュアル阻害分子 TMEPAI ファミリーの機能解析

伊東 進

昭和薬科大学



私達は、Transforming Growth Factor-β(TGF-β)の直接標的遺伝子として TMEPAI を見出し、TMEPAI が TGF-β受容体と R-Smad (Smad2 及

び Smad3)の結合を妨害することで TGF-βシグナルを抑制することを明らかにしており、TMEPAI が TGF-βシグナルのネガティブフィードバック機構に関与していることを明らかにしてきた。一 方、TMEPAI と相同性の高い C180RF1 も TMEPAI と同様に TGF-βシグナルを抑制することがわ かり、これら 2 つの分子を TMEPAI ファミリーとよんでいる。C180RF1 は、TMEPAI と異なり 恒常的に発現しており、定常状態で TGF-βシグナルに対するゲートキーパーとして作用するが、 C180RF1 のみで抑えることができない過度の TGF-βシグナルを細胞が受け取ると TMEPAI の発 現が誘導され、C180RF1 と協調して TGF-βシグナルを抑制すると考えられている。

私達は、最近 TMEPAI ファミリーが TGF-βのみならず YAP シグナルを阻害することで、がん 進展を抑制することを明らかにした。本講演では、TMEPAI ファミリーによるがん進展制御に関 して、消化器がんおよび中皮腫に着目し、私達の最新データを含めて紹介する。

IRBIT, a sensor of intracellular milieu, functions thorough its multisite phosphorylation CODE.

水谷 顕洋

昭和薬科大学 薬物治療学研究室

IRBITは、**IP**₃**R B**inding protein released with Inositol 1,4,5-Trisphosphate の名前の通り、IP₃R(IP₃受容体)に結合する蛋白質としてマウス脳から精製された分子である。その結合は、i)IRBIT のリン酸化依存的であること、ii)IP₃と競合的に IP₃R の IP₃結合部位に結合すること、が特徴的である。実際、IRBIT は、IP₃R と結合することで IP₃R の IP₃結



に対する域値を調節し、細胞内 Ca^{2+} シグナルの微調整を行っていることが示されている。ところ が、IRBIT が結合する分子は、IP₃R のみならず、細胞内外の pH 調節に関わる NBCe1 (electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1)、NHE3 (Na⁺/H⁺ exchanger 3)、mRNA の poly (A) 付加に関わる分子、 phosphatidylinositol のリン酸化酵素である PIPKI α and II α 、脳の記憶に関わるタンパク質リン酸 化酵素 CaMKII など極めて多岐にわたる。興味深いのは、CaMKII の場合を除いて、IRBIT とこ れら標的分子との結合には、IRBIT のリン酸化、それも多重リン酸化が必須であることである。

IRBIT の多重リン酸化部位は、下図に示したように、Serine/Threonine rich region (STR) に集中 している。このうち、Ser68, 71, 74, 77 のリン酸化は、いずれの標的分子との結合にも必須な"quartet" である。この quartet を含み STR の Ser, Thr 残基は進化的にもよく保存されていることから、STR の多重リン酸は生物学的にも意義あるものと推測される。本研究では、その意義を探る手始めとし て STR の多重リン酸化に関与しうるタンパク質リン酸化酵素の同定を行い、これら多重リン酸化 のパターンが IRBIT の標的分子選別にどう関わるのかについて検討した。その結果、NBCel に結 合する IRBIT の多重リン酸化パターンは、IP₃R に結合する際のそれとは異なっており、IRBIT は、 細胞内の(微小)環境を STR の多重リン酸化パターンに反映させることで、細胞内 Ca²⁺動態と細 胞内 pH 環境とを連動的に調節している可能性が示唆された。



カルシウム信号系のコバレント修飾応答性とその意義

渡邊泰男

昭和薬科大学 薬理学

細胞内セカンドメッセンジャーであるカルシウムイオン (Ca^{2+}) は中 枢から末梢にいたるまで実に多彩な細胞機能調節に関わっている。細胞 内 Ca^{2+} の上昇はカルシウム結合タンパク質によって仲介される。なかで も、カルモデュリン (CaM) は多機能なカルシウム情報伝達を担う分子 であり、 Ca^{2+}/CaM 複合体により活性化されるタンパク質リン酸化酵素



の CaM キナーゼ (CaMK) 群は、記憶・学習における重要性が知られている。一方、タンパク質 のリン酸化・脱リン酸化に依存せず、タンパク質の構成アミノ酸の特定のシステインチオール基 (Cys-SH) が化学修飾 (S-ニトロシル化、S-グルタチオン化) されて、そのタンパク質機能制御 に関わっていることが知られている。近年、システインのチオール基側鎖にイオウ原子が繋がっ たポリスルフィド化システインなどの活性イオウ分子が、外因性親電子物質であるメチル水銀の 代謝 (解毒) や内因性親電子物質である 8-ニトロ-cGMP の代謝のような細胞のレドックス恒常性 の維持に重要な生理活性物質であることが示された。最近、ミトコンドリアでは、含硫アミノ酸 代謝酵素であるシスタチオニン-γ-リアーゼ (CSE)によって産生されたシステインを基質として、 タンパク質翻訳時にシステイニル tRNA 合成酵素が活性イオウ分子を産生し、その代謝物による 電子伝達系を介してエネルギー産生に関与していることが示されたことにより、活性イオウ分子 は老化防止・長寿に大きく寄与していることが示唆されている。注目されるのは、上記のポリス ルフィド化システインはアミノ酸のみならずペプチドやタンパク質の構成アミノ酸のシステイ ン残基にも認められ、それらの生理学的機能を可逆的に制御しているということである。つまり、 ポリスルフィド化システインは、新規のコバレント修飾として生体内で機能していると考えられ る。

このような背景の中、本コバレントプロジェクト研究において我々は、CaMK 群の特定のシス テインのチオール基の可逆的な化学修飾(S-ニトロシル化、S-グルタチオン化、S-ポリスルフィ ド化)が、そのタンパク質の機能制御に関わることが報告してきた。本シンポジウムでは、これ らのカルシウムシグナル分子のレドックス制御についてその生理・病態学的意義について紹介し たい。さらに、ミトコンドリア機能に重要な分子である CSE の酵素活性制御について上記の化学 的修飾に着目した研究についても言及し、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化に依存しないタン パク質の構成アミノ酸の特定のシステインチオール基のコバレント修飾の生理学的意義につい て考えたい。

Plenary Lecture 2

ストレスシグナルのメカニズム解明から創薬へ

一條秀憲

東京大学・大学院薬学系研究科・細胞情報学

ストレス応答は細胞が持つ最も基本的な生命現象のひとつであり、そ の破綻は、がん、神経変性疾患、免疫疾患、代謝性疾患などをはじめ とする多様な疾患の発症要因となります。私たちの研究グループは、 細胞の恒常性維持に深く関わる様々なストレス応答(酸化ストレス、 浸透圧ストレス、小胞体ストレス、ミトコンドリアストレスなど)と、



私たちが世界に先駆けて明らかにしてきたそれらストレスの受容・認識の「鍵となるオリジナル な分子群」に焦点を当てながら、過去約 20 年間に亘り、一貫してストレス受容から細胞応答に 至る一連のストレスシグナル分子機構の解明とそれに基づく創薬基盤の形成を目指してきまし た。

その一例として、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)の治療薬創生にも取り組んできました。ALS は、運動神経細胞が選択的に障害される晩発性・進行性の神経変性疾患であり、その約1割を占める家族性 ALS において高頻度でみられる原因遺伝子が Cu, Zn Superoxide dismutase (SOD1)です。私たちは、家族性 ALS に関連した 100 種類を超える変異型 SOD1 が、小胞体関連分解(ER-associated degradation: ERAD)複合体の重要な構成要素である小胞体膜タンパク質 Derlin-1 に特異的に結合して、ERAD の機能を阻害することで小胞体ストレスを介した運動神経細胞死を誘導することを明らかにし、SOD1-Derlin-1 結合の阻害が ALS 治療薬の開発において魅力的な分子標的であることを示してきました。さらに最近、変異型 SOD1 と Derlin-1の結合を分子標的としたハイスループットスクリーニング系を構築してSOD1-Derlin-1 結合を別ます。

本講演では、このような「オリジナルな基礎研究に基づくアカデミア創薬への挑戦」を一例として、ストレスシグナル研究の面白さをご紹介できればと思います。

金属コバレント修飾の生物学的及び毒性学的意義の解明

小椋 康光

千葉大学大学院薬学研究院 予防薬学研究室

フッ素や塩素などの17族の元素がハロゲン(halogen)と総称されるよう に、16族元素の酸素、硫黄(S)、セレン(Se)やテルル(Te)などはカル コゲン(chalcogen)と総称される。カルコゲンは、他の元素には無ハユニ ークな物理化学的性質を有するため、産業的に有用な元素でもある。特に



Se や Te は典型元素としての性質と金属元素の性質を併有する、いわゆる類金属(半金属)として広く 産業利用されている。生物においても、ユニークな代謝経路を経るものと想定されている。S は動物及 び植物にとって必須元素であるが、Se は動物のみに必須であり、植物にとっては有用であると考えられ ているものの必須性は認められていない。また Te は動物にとっても植物にとっても必須性は認められて いない。我々の研究グループでは、Se や Te のメタボローム解析から、Se や Te の代謝経路の全容を明ら かにし、進化の過程で生物はいかに必須元素を取捨選択するのか、環境の変化が必須元素の進化に影響 を与え得るのか、といった疑問に解答を得ることを目指している。本報告では、「生体分子コバレント修 飾の革新的解析拠点形成」の研究実施期間内に得られた以下の成果について報告する。

1) Se は動物にとって必須であるものの、毒性の高い元素として知られている。培養細胞内における Se の新規代謝物を同定し、その生成機構と生物学的及び毒性学的意義を示唆する成果を得た。

2) Te はハイテク材料として我々の身の周りに存在するレアメタルの一種である。また先の東日本大 震災に伴う福島第一原子力発電所において、大量の放射性物質が放出されるという事故が発生した。 放出された核種の中には Te が含まれており、およそ 100 京ベクレルをも放出されたと見積もられてい る。これら放射性 Te は半減期が比較的短いとはいえ、放出量も多く、環境中での拡散と生態系におけ る影響が懸念された。環境からの Te のリスク評価には、直接的な曝露に加えて、食物を介した間接的 な曝露も考えられることから、植物における Te 代謝を検討したところ、高等植物中で新規の Te 代謝 物を見出した。

本研究は、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成」 の支援を受けて、私の昭和薬科大学在職中に阿南弥寿美博士及び多くの学生さんとの共同研究により 実施したものです。

【研究成果論文】

 Y. Anan, M. Kimura, M. Hayashi, R. Koike and Y. Ogra*: Detoxification of selenite to form selenocyanate in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* (2015) 28, 1803–1814
10.1021/acs.chemrestox.5b00254

• Y. Anan, M. Yoshida, S. Hasegawa, R. Katai, M. Tokumoto, L. Ouerdane, R. Łobiński and Y. Ogra*: Speciation and identification of tellurium-containing metabolites in garlic, *Allium sativum. Metallomics* (2013) **5**, 1215-1224 10.1039/C3MT00108C

感染症の迅速診断技術の進歩と今後の方向性

石井良和

東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座 感染制御学分野

今日、新しい耐性因子の出現と蔓延が世界的な問題となっている。 カルバペネム分解酵素を産生する大腸菌や肺炎桿菌、緑膿菌、アシネ トバクター属菌などの検出が求められているが、その検出は容易では



ない。その理由として、カルバペネム分解酵素産生菌の中にカルバペネム系薬に感性を示す菌株 が少なくないことが挙げられる。したがって、カルバペネム系薬以外の抗菌薬でカルバペネム分 解酵素産生株を検出することが求められる。

最近の診断技術の進歩により、検体を採取して 30 分以内で抗菌薬を処方する前に診断がで きるような技術が普及してきた。肺炎球菌やレジオネラの尿中抗原検査に加えてマイクプラズマ を対象としたイムノクロマトグラフィー法が臨床応用されている。次世代の診断技術として、核 酸増幅技術を用いて 30 分以内に特定菌種と耐性遺伝子を検出する方法も開発されている。これ までの感染症の検査法は、検体採取から診断まで1週間程度要していたため、経験的な抗菌薬投 与が余儀なくされていた。今後は、初診時から、より Specific 且つ Definitive な治療を可能にする 検査技術が開発され、臨床応用されることが期待される。

本発表では、カルバペネム分解酵素産生菌と基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生菌に焦点 を当て、その最新情報を提供するとともに、現在利用できる検査技術を解説するとともに今後の 方向性について考察する。

感染症の原因菌の同定と保有する耐性因子を迅速に診断するための PCR と ESI-MS を組 み合わせた検出法に関する研究

濵本知之

昭和薬科大学

臨床薬学教育研究センター 応用薬物治療部門

感染症に対して適切な抗菌薬治療を行うためには、原因菌の同定と 薬剤感受性検査が重要となる。しかし、臨床現場ではそれらの結果が 判明するのに数日を要するため、検査結果が判明する前に経験的治療



(Empiric therapy)が行われている。その治療の間には、想定される原因菌を幅広くカバーするために広域スペクトルの抗菌薬や併用療法が行われる場合が多く、個々の感染症に適切な狭域スペクトルの抗菌薬が選択されることが少ない。そのため、耐性菌の菌交代、耐性化の誘導、副作用発生のリスクや医療費の増大というさまざまなデメリットを生じる。したがって、感染症の原因菌を迅速に同定し、早期に適切な抗菌薬治療を開始することが望まれている。

そこで、演者らは本プロジェクトで新たに購入したエレクトロスプレーイオン化質量分析計 (ESI-MS)である四重極型一飛行時間型ハイブリッド質量分析装置(Agilent G6550A Q-TOF LC/MS) を用いた方法を検討することとした。すなわち、菌の16SrRNA 遺伝子の可変領域を挟む保存領域に対 するプライマーを用いて PCR で増幅させ、得られた PCR 産物を ESI-MS によって分子量を測定 (PCR/ESI-MS) することで、菌を同定する方法を確立することを目指して研究を行ってきた。

当初、供試菌株の DNA を抽出しプライマー(Fw. GGATTAGAGACCCTGGTAGTCC、Rv. GGCCGTACTCCCCAGGCG)を用いて得られた PCR 産物の測定を行ったところ、多価イオンが検出されなかった。そこで、多価イオンが検出され分子量が算出される測定条件を確立するため に、1 本鎖 DNA 60 mer や、その相補鎖との混合物(60 mer mix)、2 本鎖 DNA 60 bp を用いて検討 を行ったところ、移動相を 1 M NH₄OH:50%MeOH(50 mM ピペリジン+イミダゾール)(1:1)と した場合、供試菌株の PCR 産物の想定される濃度付近でも 60 mer mix、60 bp 共に比較的良好な 分子量ピークが得られた。しかし、他の分子量ピークも得られたことから、移動相をさらにアセ トニトリル:20 mM トリエチルアミン(1:1)としたところ、よりシャープな分子量ピークが得られた。

本発表ではそれらの結果と、他の分子量のピークをさらに低減するために脱塩カートリッジを 用いた結果、供試菌株のPCR 産物に近い113 mer や113 bp を測定した結果についても報告する。 今後、実際の検体でPCR 産物の分子量から菌種の同定を行うためには、データベースが必要であ るため構築する予定である。

基礎医学研究、および、創薬に有用なヒト化マウスの開発

末水 洋志

公益財団法人実験動物中央研究所

実験動物はヒトを対象に直接実施することが困難な in vivo 研究に不可欠である。現在では遺伝子改変技術を駆使し、様々な疾患関連遺伝子を欠損、あるいは変異させたマウスの作製が可能である。しかし、ヒトとヒト以外の種にはしばしば大きな隔たりがあり、同一生体分子であっても量的・質的異常に起因するヒト疾患・病態を的確に再現で



きないことも多い。我々は、このような"動物種差"の影響を最小限に抑えた動物実験モデルと して、異種細胞・組織を拒絶できない免疫不全マウスの生体内に特定のヒト細胞・組織を再構築 した"ヒト化マウス"を開発している。本講演では薬物代謝の主要臓器である肝臓をヒト化した "ヒト化肝臓マウス"を紹介する。1型単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSVtk)遺伝子 を肝臓で発現する Alb-HSVtk-NOG (TK-NOG)マウスは、ガンシクロビル(GCV)投与により肝 障害を発症する。この肝障害マウスに市販の凍結ヒト肝臓細胞を移植すると肝臓に到達・定着し、 爆発的に増殖する。移植したヒト肝細胞の生着はヒトアルブミンの出現やコリンエステラーゼ活 性の上昇として確認することができる。これらの指標は生着したヒト肝細胞量と相関することか ら、現在ではヒト肝細胞による置換率(キメラ率)の推定が可能となっている。我々はマウス体 内に再構築した"ヒト化肝臓"を生化学的、分子生物学的、組織学的に詳しく解析し、薬物代謝酵 素の肝小葉内分布や遺伝子発現が成熟したヒト肝臓のものによく似ていることを確認した。また、 薬物代謝プロフィールがヒトに近似することも最近、確認している。"ヒト化肝臓"は"ヒトの器 官・臓器としての肝臓"と同様の機能を有することから、薬物代謝研究だけでなく、感染症や肝 再生研究、毒性研究など様々な領域において有用な *in vivo* 研究ツールになると思われる。

O20

医薬品・一般化学物質由来のヒト型反応性代謝物の評価

山崎浩史

昭和薬科大学 薬物動態学研究室

医薬品・一般化学物質がヒト生体内で代謝変換を受け、反応性に富 む代謝物となり、種差を伴う毒性発現に至る例が多く研究されている。 ヒト由来の各種臓器細胞をチップ等のデバイス上に搭載すること により、医薬品候補化合物の薬物動態や安全性等が評価可能な新 たな基盤技術を確立することを目指した研究が国内外で活性され



ている。ヒト肝細胞を移植されたマウスは、各種遺伝子改変によって作出された免疫不全マウスと、遺伝子改変に伴う肝障害マウスを掛け合わせ、これら双方の特徴をもつ免疫不全肝機能障害マウスから調製される。ヒトにおける医薬品や化学物質の体内動態を説明しうる高置換率を達成したヒト肝移植マウスを活用し、ヒト特有の代謝物の評価がなされてきた。本発表では、医薬品・一般化学物質由来の反応性代謝物に着目したヒト型薬物動態の研究事例を主に取り上げる¹。

典型的なチトクロム P450 基質を同時単回経口したヒト肝細胞移植マウスの血漿中薬物濃度推移の実測値を基に、生理学的薬物動態モデルを構築したところ、ヒト肝細胞移植マウス-ヒト間において、簡易かつ精度の高いヒト薬物動態の推定が可能であると示唆された。サリドマイドの酸化的代謝にはげっ歯類とヒトで主要代謝部位が異なる種差が観察された。同じく肝代謝型薬物であるサリドマイドにアミノ基を導入した次世代医薬品ポマリドマイドは、げっ歯類とヒトとの薬物血中動態の乖離は小さく、実験動物血中濃度実測データからヒトへの外挿が比較的容易であると推察された。ヒト肝 P450 が触媒するサリドマイドなどのヒト不均衡性代謝物の評価には、¹⁴C標識した基質と、2次元電気泳動と加速器質量分析計を用いる高感度解析手法と組み合わせることで、ヒト肝移植マウスは有用なヒト型モデル動物であると考えられた。

フタル酸ジエステルをヒト肝細胞移植マウスに経口単回投与すると、ヒト型代謝物や胆汁/尿中 排泄のヒト型の排泄経路の振り分けが確認された。フタル酸エステルあるいはビスフェノールA は、ヒト尿中バイオモニタリング結果から、生理学的薬物動態モデルを用いて反復曝露量を逆算 したところ、1日許容数量を下回った。このように、ヒト肝細胞移植キメラマスは、ヒトには投 与し難い化学物質のヒト型代謝と体内動態を加味したリスク評価にも活用できることが推察さ れた。免疫不全マウスの生体を利用して増殖させるヒト肝細胞のヒト型薬物代謝と動態機能 が、医薬品・一般化学物質の反応性代謝物評価に重要なツールとなり、種差を伴う薬物代謝、動 態研究に今後も貢献するものと期待される。

参考文献 1. Yamazaki, H.; Suemizu, H.; Mitsui, M.; Shimizu, M.; Guengerich, F. P. Combining chimeric mice with humanized liver, mass spectrometry, and physiologically-based pharmacokinetic modeling in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 2016, *29*, 1903-1911.