トランスオミクス医学研究センター

Research Center for Transomics Medicine

ゲノミクス分野
Division of Genomics

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

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

令和２年３月に，大学院生の小坂健悟がシステム生命科学府博士後期課程を，同じく大学院生の永野明宏が博士前期課程を単位取得退学した．さらに令和２年３月に，学部生の佐藤弓佳が理学部生物学科を卒業した．

Ａ．神経疾患の分子基盤の解明

ａ．神経因性膀胱と発作性乾性咳嗽を特徴とする新規遺伝性ニューロパチーの解析

久留米大学において見出された，近位筋優位の筋力低下をきたし，常染色体優性遺伝形式をとる運動感覚ニューロパチー家系の解析を行った．患者９名を含む３世代計19名からなる本家系は，神経因性膀胱と発作性乾性咳嗽を特徴とし，新規なニューロパチーであると考えられた．Illumina Infinium SNP ゲノタイピングアレイによる連鎖解析の結果，1q13.3-q23 に最も強い連鎖を見出した（LOD = 2.71）．本領域には常染色体優性の運動感覚ニューロパチーの責任遺伝子として知られている *MPZ* が存在したため，サンガーシークエンスによる全エクソンの変異検索及びリアルタイム PCR によるコピー数異常の検討を行ったが，異常は見られなかった．そこで，５人の患者と１人の非発症血縁者をエクソームシークエンシングにより解析した．その結果，５人の患者に特異的に共有された SNV を 4，294 個見出した．このうちの 160 個は，これまでに報告のない新規な非同義置換で，さらにそのうちの 16 個を，連鎖領域にヘテロ接合で存在する疾患責任候補 SNV として同定した．さらに，これらの SNV について，家系内の共分離の確認及び，日本人健常者 520 人のスクリーニングによる低頻度正常 SNP の除外を，個別のサンガーシークエンシングにより進めたところ，*IQGAP3* を候補責任遺伝子として同定した．当該変異は *IQGAP3* のイントロン 27 のスプライスコンセンサス配列に位置しており，スプライス異常を来すことが期待された．また，患者の全ゲノムシークエンスも行い，連鎖領域に他に共分離する SNV が存在しないことも確認した．さらに，患者および非発症者の腓腹神経の組織染色を行い，患者におい

て IQGAP3 タンパク質の特異的な発現上昇を確認した（Miura et al. in press）.

ｂ．新規遺伝性遠位運動ニューロパチーの解析

久留米大学において見出された，顔面筋・胸鎖乳突筋の軽度筋力低下と両下肢遠位伸筋の中等度ないし高度の筋力低下，下肢屈筋筋力正常，感覚正常を特徴とする常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性ニューロパチー（distal hereditary motor neuropathy（dHMN））家系の解析を行った．患者の下肢 MRI では大腿四頭筋の萎縮・脂肪化が認められ，前脛骨筋の顕著な萎縮と脂肪化が認められた．腓腹筋頭にも中等度の萎縮と脂肪化が認められ，前脛骨筋に加えて，腓腹筋遠位部・ヒラメ筋にも萎縮と脂肪化が認められた．既知の家族性ニューロパチー責任遺伝子変異として，*MPZ* 遺伝子および *PMP22* 遺伝子のコピー数異常が知られているが，realtimePCR により本家系においてこれらの遺伝子のコピー数異常はないことを確認した．続いて，発症者 2 名のエクソーム解析を行い，のべ 16,427 個の遺伝子変異を検出した．続く変異の絞り込みにより，*TDRKH* 遺伝子内の非同義変異（c.851G>A [p.Arg284His]）を同定した．当該変異は，*TDRKH* 内の Tudor ドメインに存在していた．*TDRKH* と神経疾患との関連はこれまで報告されていなかったが，下位運動ニューロン機能障害を主徴とする類似疾患である脊髄筋萎縮症が，SMN1 遺伝子内の Tudor ドメインの非同義変異によって引き起こされることがよく知られているため，*TDRKH* の当該変異を本疾患家系の責任変異として同定した（Miura et al. 2019）．さらに，当該変異を導入した *TDRKH* を発現させた PC12 細胞では，NGF 刺激後の軸索伸長が著しく阻害されることも確認している．また，Tudor ドメインを介して *TDRKH* と結合する分子として PIWIL 等複数が知られているため，当該変異による結合への影響の検討も進めている．

Ｂ．毒生物のオミクス解析

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

ａ．ハブの毒液遺伝子の転写産物アイソフォームの解析

ハブの毒液に含まれる毒液タンパク質の多様性をもたらす機構解明のために，奄美ハブの毒腺から RNA を単離し，PacBio によるロングリードシークエンスを行い，転写産物アイソフォームの解析を行った．その結果，3 つの毒液遺伝子族（金属プロテアーゼ（MP），セリンプロテアーゼ（SP），血管内皮増殖因子（VEGF））においては，選択的スプライシングにより非常に多様な転写産物が発現されていることを見出した．MP 遺伝子 11 個，SP 遺伝子 11 個および VEGF 遺伝子 1 個からはそれぞれ，81 種，61 種，8 種の異なった転写産物ア

イソフォームが発現していた．特にMPは，そのドメイン構成により，プロテアーゼドメインのみからなるI型,その後にdisintegrinドメインを持つII型,さらにその後にCys-richドメインを持つIII型の生理活性の3つのタイプに分類されるが，ハブ毒腺では，選択的スプライシングにより複数の異なった型のプロテアーゼが単一の MP 遺伝子から産生されていることが多いことがわかった（図1）．さらに，ゲノム上でクラスターを形成しているSP遺伝子群については，隣り合った複数の遺伝子をまたいで転写産物が産生される「トランススプライシング」が一定の頻度で起きていることも観察した．以上の解析から，既に報告していたゲノムレベルの多様性（多数に重複した遺伝子コピー）（Shibata et al. 2018）に加えて，転写レベルの多様性（選択的スプライシングとトランススプライシング）が，毒液タンパク質の多様性を生み出す重要な機構であることがわかった（Ogawa et al. 2019）．

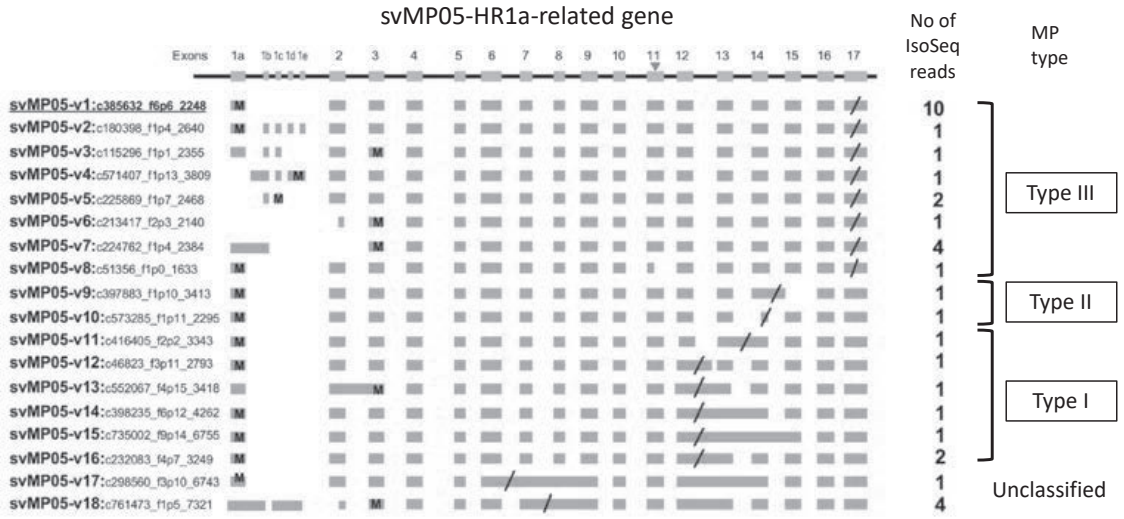

図1: ハブ毒液中に発現する金属プロテアーゼの選択的スプライシングの例

b．近縁種ハブの全ゲノム比較解析

以前の行ったミトゲノムの解析（Shibata et al. 2016）などから，奄美諸島の個体群と，沖縄諸島の個体群が大きく遺伝的に分化していることがわかっている． これを受けて，沖縄島産ハブおよび近縁種であるトカラハブとサキシマハブの全ゲノム解析を行なっている．昨年度までに構築済みであった，沖縄ハブゲノムアセンブリ（HabOk1），トカラハブアセンブリ（HabKd1），サキシマハブアセンブリ（HabIr1）について，遺伝子モデルの構築を行った．その際，奄美ハブの転写物配列情報から抽出したエクソンおよびイントロンのヒントファイルを投入して，遺伝子予測の精度の向上を図った．さらにその結果得られるタンパク質をコードする遺伝子についてアミノ酸配列の相同性検索を行い，既知のタンパク質との関連性からアノテーション（機能的注釈付け）を行った（次頁表1）．その結果いずれの種においても，7割以上の遺伝子について注釈付けができていることを確認できた．

表1: 奄美ハブと近縁種ハブのゲノムアセンブリと遺伝子モデル構築				
種	奄美ハブ（参考）	沖縄ハブ	トカラハブ	サキシマハブ
アセンブリ名	HabAm1	HabOk1	HabKd1	HabIr1
断片数	84,502	2,413	3,905	8,291
アセンブリ全長	1.41 Gb	1.44 Gb	1.40 Gb	1.49 Gb
平均断片長	16.7 kb	596.6 kb	359.2 kb	179.7 kb
N50長	467 kb	5.47 Mb	5.51 Mb	8.58 Mb
見出した遺伝子数	25,134	20,613	20,840	25,218
アノテーション できた遺伝子数	20,540 (81.7%)	16,986 (82.4%)	15,207 (73.0%)	19,922 (79.0%)

合わせて，奄美ハブゲノムドラフトのさらなる高精度化を目指して，PacBio シークエンサーによるロングリードショットガンデータを 58 Gb（シークエンス深度 32x に相当）を取得済みで，アセンブリを進めている．

業績目録

原著論文

1. Miura S, Kosaka K, Fujioka R, Uchiyama Y, Shimojo T, Morikawa T, Irie A, Takayuki Taniwaki T, Shibata H. (2019, Mar).
   Spinocerebellar ataxia 27 with a novel nonsense variant (Lys177X) in *FGF14*.
   Eur J Med Genet. 62(3), 172-176.
2. Chijiwa T, Inamaru K, Takeuchi A, Maeda M, Yamaguchi K, Shibata H, Hattori S, Oda-Ueda N, Ohno M. (2019, Jul).
   Unique structure (construction and configuration) and evolution of the array of small serum protein genes of *Protobothrops flavoviridis* snake.
   Biosci Rep. 39(7), BSR20190560.
3. Ogawa T, Oda-Ueda N, Hisata K, Nakamura H, Chijiwa T, Hattori S, Isomoto A, Yugeta H, Yamasaki S, Fukumaki Y, Ohno M, Satoh N, Shibata H. (2019, Oct).
   Alternative mRNA splicing in three venom families underlying a possible production of divergent venom proteins of the Habu snake, *Protobothrops flavoviridis*.
   Toxins 11(10), 581.
4. Miura S, Kosaka K, Nomura T, Nagata S, Shimojo T, Morikawa T, Fujioka R, Taniwaki T, Shibata H. (2019, Dec).
   TDRKH is a candidate gene responsible for an autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy.
   Eur J Med. 62(12), 103594.

5. Suryamohan K, Krishnankutty SP, Guillory J, Jevit M, Schroeder M, Wu M, Kuriakose B, Perumal RC, Koludarov I, Mathew OK, Goldstein LD, Senger K, Vargas D, Chaudhuri S, Muraleedharan M, Goel R, Chen YJJ, Ratan A, Liu P, Faherty B, Shibata H, Baca M, Sagolla M, Ziai J, Wright GA, Stinson J, Kirkpatrick DS, Hannoush RN, Durinck S, Modrusan Z, Stawiski EW, Wiley K, Raudsepp T, Kini RM, Zachariah A, Seshagiri S. (2020, Jan).
   The Indian cobra genome and transcriptome enables comprehensive identification of venom toxins.
   Nat Genet. 52(1), 106-117.
6. Zeze K, Hirano A, Torisu T, Esaki M, Shibata H, Moriyama T, Umeno J, Fujioka S, Okamoto Y, Fuyuno Y, Matsuno Y, Kitazono T. (2020, Apr).
   Mucosal dysbiosis in patients with gastrointestinal follicular lymphoma.
   Hermatol Oncol. 38(2), 181-188.
7. Inamaru K, Takeuchi A, Maeda M, Shibata H, Fukumaki Y, Oda-Ueda N, Hattori S, Ohno M, Chijiwa T. (2020, Mar).
   Discovery of the gene encoding novel Small Serum Protein (SSP), SSP-6, of *Protobothrops flavoviridis* snake and evolutionary pathway of SSPs.
   Toxins 12(3), 177.
8. Miura S, Kosaka K, Shimojo T, Matsuura E, Noda K, Fujioka R, Mori S, Umehara F, Iwaki T, Yamamoto K, Saitsu H, Shibata H. (2020).
   Intronic variant in *IQGAP3* associated with hereditary neuropathy with proximal lower dominancy, urinary disturbance, and paroxysmal dry cough.
   J Hum Genet. In press.
9. Fujioka R, Nagai J, Yamanishi Y, Shibata H. (2019, Feb).
   Correlation analysis between thyroid-related hormones and the plasma concentration of amino acids.
   Bulletin of Bepppu University Junior College 38, 17-23.

著書

1. 田原義太慶, 柴田弘紀, 友永達也. (2020, Feb).
   毒ヘビ全書.
   グラフィック社. (ISBN 978-4-76613-313-4).
2. Ogawa T, Shibata S. (2020).
   Venomics study of *Protobothrops flavoviridis* snake: Habu snake venomics: How venom proteins have evolved? In: Medical Toxicology edited by Pinar Erkekoglu. In press (ISBN 978-1-83880-278-3).

総説

1. 小川智久，柴田弘紀．(2019, May).
「ベノミクス研究」の最前線：動物毒は，どのように進化してきたのか？
化学と生物 57(5), 289-295.

学会発表

1. Shibata H. (2019, 06/04-06). 招待講演
Whole genome sequencing of a Japanese endemic pit viper, habu, *Protobothrops flavoviridis* reveals accelerated evolution of venom protein genes enriched in microchromosomal regions.
Integrative Organismal Biology Symposium: Integrating Structural Biology with 'Omics in Asia-Pacific', National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan.
2. Morikawa T, Miura S, Ohishi H, Kosaka K, Shimojo T, Nagano A, Fujioka R, Moriyama K, Unoki M, Takahashi M, Nakao M, Izumi Y, Bamba T, Sasaki H, Shibata H. (2019, 06/15-18).
Ddhd1 knockout mouse as a model for familial spastic paraplegia.
The European Human Genetics Conference 2019, Gothenburg, Sweden.
3. Miura S, Kosaka K, Fujioka R, Taniwaki T, Shibata H. (2019, 06/15-18).
Genetic analysis of autosomal dominant motor and sensory neuropathy with proximal dominancy in the lower extremities, urinary disturbance, and paroxysmal dry cough.
The European Human Genetics Conference 2019, Gothenburg, Sweden.
4. Isomoto A, Hisata K, Inoue J, Shoguchi E, Satoh N, Ogawa T, Shibata H. (2019, 09/08-13). 招待講演
Identification of non-venom protein genes highly expressed in the venom gland of habu (*Protobothrops flavoviridis*) and their potential contribution to the quality control of venom proteins.
20th World Congress of the International Society of Toxinology, Buenos Aires, Argentina.
5. 森川拓弥，三浦史郎，大石裕晃，小坂健悟，下條智史，永野明宏，藤岡竜太，森山耕成，鵜木元香，高橋政友，中尾素直，和泉自泰，馬場健史，佐々木裕之，柴田弘紀．(2019, 09/11-14).
家族性痙性対麻痺のモデルである *Ddhd1* ノックアウトマウスの解析.
日本遺伝学会第 91 回大会，福井大学文京キャンパス，福井.
6. 下條智史，三浦史郎，小坂健悟，佐野謙，藤岡竜太，才津浩智，谷脇孝恭，山本健，柴田弘紀. (2019, 09/11-14).
新規ニューロパチー家系で同定した新規 *IQGAP3* 内変異の遺伝学的解析.
日本遺伝学会第 91 回大会，福井大学文京キャンパス，福井.
7. Shibata H, Oda-Ueda N, Chijiwa T, Nakamura H, Yamaguchi K, Hattori S, Matsubara K, Matsuda Y, Koyanagi R, Fukumaki Y, Ohno M, Shoguchi E, Satoh N, Ogawa T. (2019, 09/29-10/02).
Habu snake (*Protobothrops flavoviridis*) genome study: Genomic architecture implicated in the multiplication and accelerated evolution of venom protein.

EMBO/EMBL Symposium: Systems Genetics: From Genomes to Complex Traits, Heidelberg, Germany.

8. Miura S, Shimojo T, Kamada T, Shibata H. (2019, 10/13-15).
Exome sequencing in familial paroxysmal kinesigenic dyskinesia reveals novel candidates.
American Neurological Association Annual Meeting, St. Louis, MO.

9. Shimojo T, Miura S, Kosaka K, Morikawa T, Aoki K, Kamada T, Shibata H. (2019, 10/15-19).
Genetic analysis of autosomal dominant paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD).
69th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Houston, TX.

10. Shibata H. (2019, 10/31). 招待講演
Diversity and evolution of venom protein genes of a Japanese endemic pit viper, habu, *Protobothrops flavoviridis*.
The 1st NUS-FU-KU Joint Symposium on Biochemistry in FUKUOKA, Fukuoka University, Fukuoka, Japan.

11. Shimojo T, Miura S, Kosaka K, Morikawa T, Aoki K, Kamada T, Shibata H. (2019, 11/07-09).
Genetic analysis of autosomal dominant paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD).
日本人類遺伝学会第 64 回大会，長崎ブリックホール，長崎.

12. Morikawa T, Miura S, Ohishi H, Kosaka K, Shimojo T, Nagano A, Fujioka R, Moriyama K, Unoki M, Takahashi M, Nakao M, Izumi Y, Bamba T, Sasaki H, Shibata H. (2019, 11/07-09).
Ddhd1 knockout mice as a model for familial spastic paraplegia.
日本人類遺伝学会第 64 回大会，長崎ブリックホール，長崎.

13. 稲丸賢人，竹内亜美，前田真理恵，柴田弘紀，服巻保幸，上田直子，服部正策，大野素徳，千々岩崇仁. (2019, 11/23-24).
ハホンハブの SSP 遺伝子アレイの決定と獲得過程.
日本爬虫両棲類学会第 58 回大会，岡山理科大学，岡山.

14. 小川智久，上田直子，千々岩崇仁，佐藤矩行，柴田弘紀. (2019, 12/03-06).
ハブベノミクス研究：多様な毒タンパク質は、どのように生み出されるのか？
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡国際会議場，福岡.

15. 稲丸賢人，竹内亜美，前田真理恵，柴田弘紀，服巻保幸，上田直子，服部正策，大野素徳，千々岩崇仁. (2019, 12/03-06).
ハホンハブの SSP 遺伝子アレイの決定と獲得過程.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡国際会議場，福岡.

16. 森川拓弥，三浦史郎，大石裕晃，小坂健悟，下條智史，永野明宏，藤岡竜太，森山耕成，鵜木元香，高橋政友，中尾素直，和泉自泰，馬場健史，佐々木裕之，柴田弘紀. (2019, 12/03-06).
家族性痙性対麻痺のモデルである *Ddhd1* ノックアウトマウスの解析.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡国際会議場，福岡.

17. 下條智史，三浦史郎，小坂健悟，松浦英治，野田和人，藤岡竜太，森慎一郎，梅原藤雄，岩城徹，山本健，才津浩智，柴田弘紀．(2019, 12/03-06).
新規ニューロパチー家系で同定した新規 *IQGAP3* 内変異の遺伝学的解析.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡国際会議場，福岡.
18. Nagano A, Kosaka K, Miura S, Shimojo T, Nagata S, Morikawa T, Fujioka R, Nomura T, Taniwaki T, Shibata H. (2019, 12/03-06).
Functional analysis of *TDRKH* variants associated with autosomal dominant motor neuropathy.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡国際会議場，福岡.

エピゲノミクス分野

Division of Epigenomics

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

当分野は平成 25 年 4 月に開設された．平成 31（令和元）年度もエピゲノム制御学分野の主幹教授・佐々木裕之と特任講師・藤英博が担当教員として兼任し，研究・教育を実施した．

エピゲノミクス分野では疾患における細胞の質的変化をエピゲノムの観点から理解することを目指し，3 台の高速 DNA シーケンサーを用いてエピゲノム解析（WGBS，mRNA-seq，ChIP-seq，RNA-seq）を行っているほか，国際ヒトエピゲノムコンソーシアム（IHEC）の国際科学運営委員としてエピゲノム解読を進めている．また，学内外の研究室との共同研究を積極的に行い，モデル生物であるマウスのエピゲノム解析を支援している．最終的に，他のオミクス情報と合わせた横断的・統合的な研究を展開し，様々な病気を克服することを目指している．

具体的な研究成果は，エピゲノム制御学分野のＡ，Ｂ，Ｃ，Ｅを参照．

業績目録

原著論文

1. Au Yueng, W.K., Brind'Amour, J., Hatano, Y., Yamagata, K., Feil, R., Lorincz, M.C., Tachibana, M., Shinkai, Y. & Sasaki, H. (2019, Apr).
   Histone H3K9 methyltransferase G9a in oocytes is essential for preimplantation development but dispensable for CG methylation protection.
   Cell Rep. 27, 282-293.
2. Ishiuchi, T., Ohishi, H., Sato, T., Kamimura, S., Yorino, M., Abe, S., Suzuki, A., Wakayama, T., Suyama, M. & Sasaki, H. (2019, May).
   Zfp281 shapes the transcriptome of trophoblast stem cells and is essential for placental development.
   Cell Rep. 27, 1742-1754.
3. Inoguchi, Y., Ichiyanagi, K., Ohishi, H., Maeda, Y., Sonoda, N., Ogawa, Y., Inoguchi, T. & Sasaki, H. (2019, Jul).
   Poorly controlled diabetes during pregnancy and lactation activates the Foxo1 pathway and causes glucose intolerance in adult offspring.

Sci. Rep. 9, 10181.

4. Kanatsu-Shinohara, M., Yamamoto, T., Toh, H., Kazuki, Y., Imoto, J., Ikeo, K., Oshima, M., Shirahige, K., Iwama, A., Nabeshima, Y., Sasaki, H. & Shinohara, T. (2019, Aug).
   Aging of spermatogonial stem cells by Jnk-mediated glycolysis activation.
   Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116, 16404-16409.
5. Yamanaka, S., Nishihara, H., Toh, H., Nagai, L.A.E., Hashimoto, K., Park, S.J., Shibuya, A., Suzuki, A.M., Tanaka, Y., Nakai, K., Carninci, P., Sasaki, H. & Siomi, H. (2019, Oct).
   Broad heterochromatic domains open in gonocyte development prior to de novo DNA methylation.
   Dev. Cell 51, 21-34.
6. Ohishi, H.*, Au Yeung, W.K.*, Unoki, M., Ichiyanagi, K., Fukuda, K., Maenohara, S., Shirane, K., Chiba, H., Sado, T. & Sasaki, H. (*These authors equally contributed to the work.) (2020, Jan).
   Characterization of genetic-origin-dependent monoallelic expression in mouse embryonic stem cells.
   Genes Cells 25, 54-64.
7. Hiramoto, T., Tahara, M., Liao, J., Soda, Y., Miura, Y., Kurita, R., Hamana, H., Inoue K., Kohara, H., Hijikata, Y., Okano, S., Yamaguchi, Y., Oda, Y., Ichiyanagi, K., Toh, H., Sasaki, H., Kishi, H., Ryo, A., Muraguchi, A., Takeda, M. & Tani, K. (2020, Jan).
   Non-transmissible MV vector with segmented RNA genome establishes different types of iPSCs from hematopoietic cells.
   Mol. Ther. 28, 129-141.
8. Du, Z., Zheng, H., Kawamura, Y.K., Zhang, K., Gassler, J., Powell, S., Xu, Q., Lin, Z., Xu, K., Zhou, Q., Ozonov, E.A., Veron, N., Huang, B., Li, L., Yu, G., Liu, L., Au Yeung, W.K., Wang, P., Chang, L., Wang, Q., He, A., Sun, Y., Na, J., Sun, Q., Sasaki, H., Tachibana, K., Peters, A.H.F.M. & Xie, W. (2020, Feb).
   Polycomb group proteins regulate chromatin architecture in mouse oocytes and early embryos.
   Mol. Cell 77, 825-839.

総説

1. 石内崇士，榊原祐樹，佐々木裕之．(2019, Sep).
   Low-input ChlP-seq の現状.
   臨床免疫・アレルギー科 72, 283-286.

学会発表（口頭発表）

1. Sasaki, H. (2019, 5/28). 特別講演
   Molecular network regulation the epigenetic programs of mammalian oocytes.

第 13 回日本エピジェネティクス研究会年会，横浜.

2. 佐々木裕之．(2019, 6/5-6). 招待講演
マウス卵子のエピゲノム制御ネットワーク.
2019 遺伝研研究会，三島.

3. 佐々木裕之．(2019, 9/28). 招待講演
DNA メチル化と疾患（DNA methylation in health and disease）.
第 78 回日本癌学会学術総会，京都.

4. Hiroyuki Sasaki. (2019, 11/26). 招待講演
Epigenetic program of mammalian oocytes.
理化学研究所エピゲノム操作プロジェクトセミナー，埼玉.

5. 石内崇士，阿部周作，Wan Kin Au Yeung，佐々木裕之．(2019, 12/3-6).
初期胚発生におけるエピゲノム動態.
第 42 回分子生物学会年会，福岡.

6. 佐々木裕之．(2019, 12/20). 招待講演
エピジェネティクスと細胞記憶と疾患.
大阪大学微生物病研究所セミナー学術講演会，大阪.

トランスクリプトミクス分野

Division of Transcriptomics

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

当分野は5年目を迎え，大川恭行教授，原田哲仁助教，前原一満助教，小松哲郎特任助教,富松航佑特任助教,学術研究員3名,博士課程学生1名,修士課程学生1名,研究生1名,テクニカルスタッフ3名，秘書1名の計15名により研究活動を展開している.

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

Ａ．クロマチンコードの解明： コードを形成する分子の網羅的同定とその機能解析

DNAとヒストンの複合体であるヌクレオソームが連なって形成されるクロマチン構造は,ヒストンの翻訳後修飾やヒストンバリアント(ヒストン亜種)の取り込みによる動的な構造変換によって転写因子のプロモーター領域への結合を規定し,分化や発生の局面に応じたゲノム情報の取捨選択，つまり選択的な遺伝子発現の足場となっている．ヒストンの翻訳後修飾が活発に研究されている一方で,ヒストンバリアントの選択機序は未だ明らかとなっていない.その大きな原因はゲノムにコードされているヒストン遺伝子の全容が明らかでなかったことによる．ヒストン遺伝子は，パラログ間の相同性が極めて高く，ヒトゲノム計画が終了し15年が経過した現段階においても，いまだ解析が滞っている．我々は2015年に，コンピュータを用いた新規手法により未知ヒストンバリアント遺伝子の網羅的探索に成功し，マウスゲノムに存在する未知のヒストンH3様のバリアント遺伝子を14種同定した．以降，新たに同定したヒストンH3バリアントが構成するクロマチン構造が,遺伝子発現をどのように制御しているのか解明を進めている.2016年度では精巣特異的ヒストンバリアントH3tの解析を展開し,新規ヒストンH3tは精子形成の特定の時期に発現し,元々ゲノムに取り込まれていたH3と置き換わり,精子固有のクロマチン構造を形成すること,またこの構造が精子形成に不可欠であること明らかにした．2018年度はさらに,骨格筋幹細胞特異的なヒストンH3mm7について解析を

行った結果から,H3mm7は骨格筋再生過程において,特定の時期に発現し機能するヒストンであると考えられた(Harada A et al., Nature Commun., 2018). 2019年度はさらに,ヒストンでありながらもクロマチンに取り込まれない性質を持つ新たなヒストンの解析に着手した.精巣特異的な発現を示す H3mm15,骨格筋前駆細胞に発現が認められるH3mm18の二つである.1細胞RNAseq技術を用いた解析によりH3mm18は静止期骨格筋サテライト細胞に発現し分化に伴い発現が低下することを発見した. そこで,H3mm18ノックアウトマウスを作出し,その表現型を解析したところ骨格筋再生時の無秩序発現が認められた. そこで, H3mm18 の機能を解析するため各種エピゲノム解析を行った結果,H3mm18はH3.3依存的なクロマチン構造形成に関与していることが明らかとなった.現在,分子機序の解明を進めている.また,H3mm15も同様の解析を行っており発表準備を進めている.今後も,様々な組織において特異的に機能するヒストンバリアントを継続して解析する予定である.

B. トランスクリプトミクス解析

各種トランスクリプトミクス解析についても精力的に行っている.共同研究を中心に各種病態解明を行った. 本年度もprotein coding geneを中心に,特に微量検体を用いたトランスクリプトミクス解析を進めた(Oka M., eLife, 2019; Abdalla MOA., et al., Nature Commun, 2019他8報). 今後は, 1細胞レベルの解析がより普及していくことと考えられる. 本分野においてもDrop-Seq, CEL-Seq2の既存の手法による解析を行った(Akieda Y., Nature Commun, 2020他3報).

C. トランスクリプトミクス技術開発

人体に存在する30兆個の細胞は全て同一の遺伝情報を持ち, 異なる組織を構成する細胞はそれぞれ特定の遺伝子を選択的に発現し固有の性質を獲得する.現在, 次世代シークエンサーによる網羅的に発現する遺伝子をプロファイリングする RNA シークエンス技術の発展により, 単一の細胞での遺伝子発現（個々の遺伝子のRNAの存在量）を解析することが可能となっている.しかしながら, 遺伝子の発現制御のメカニズムを理解するために不可欠なエピゲノム解析は,従来の手法では少なくとも数千個の細胞を必要としたため,幹細胞など生体内に僅かにしか存在しない細胞への適用は極めて困難であった.昨年度,本分野では極めて少数の細胞を用いてエピゲノム情報を取得できる「クロマチン挿入標識（Chromatin Integration Labeling: ChIL)」法を開発した(Harada A et al., Nature Cell Biol., 2019).本手法は, 細胞を破壊することなく, 任意の転写因子やヒストン修飾などが存在する領域の塩基配列を増幅することができるため,高感度で解析ができる.そのため, 遺伝子発現を制御する転写因子の結合位置やヒストン修飾を単一の細胞で測定することが世界で初めて可能となった.本研究により開発された手法

は, 胚発生や細胞分化の制御機構など生命現象を制御する分子機構の解明に極めて有用であるとともに，がん研究・再生医療などへの応用が広く期待されている. 本年度が産学連携の一環として民間企業に技術移転を行い 2 件のライセンシングを行った. まもなく試薬として上市予定である. また, ChILSeq を基盤として新たなオミクス解析技術を開発している. 特に, ハイスループット化, マルチオミクス化, 加えて, これら多次元データに資する独自のデータ解析手法の開発も進めている. 特に，今後多様化するトランスクリプトミクスに対応すべく新たな技術開発として，従来の転写因子，クロマチンリモデリング因子に加えて，新たに RNA，DNA 等の修飾核酸認識型特異的モノクローナル抗体の作成と単一細胞レベルでのマルチオミクスの開発を進めている.

業績目録

原著論文

1. Oka M, Mura S, Otani M, Miyamoto Y, Nogami J, Maehara K, Harada A, Tachibana T, Yoneda Y, Ohkawa Y. (2019, Nov).
   Chromatin-bound CRM1 recruits SET-Nup214 and NPM1c onto HOX clusters causing aberrant HOX expression in leukemia cells.
   Elife 8. pii: e46667.
2. Yamaguchi T, Ikeda Y, Tashiro K, Ohkawa Y, Kawabata K. (2020, Jan).
   The role of galanin in the differentiation of mucosal mast cells in mice.
   Eur J Immunol. 50(1):110-118.
3. Akieda Y, Ogamino S, Furuie H, Ishitani S, Akiyoshi R, Nogami J, Masuda T, Shimizu N, Ohkawa Y, Ishitani T. (2019, Oct).
   Cell competition corrects noisy Wnt morphogen gradients to achieve robust patterning in the zebrafish embryo.
   Nat Commun. 10(1):4710.
4. Fukuda S, Kaneshige A, Kaji T, Noguchi YT, Takemoto Y, Zhang L, Tsujikawa K, Kokubo H, Uezumi A, Maehara K, Harada A, Ohkawa Y, Fukada SI. (2019, Sep).
   Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle.
   Elife 8. pii: e48284.
5. Abdalla MOA, Yamamoto T, Maehara K, Nogami J, Ohkawa Y, Miura H, Poonperm R, Hiratani I, Nakayama H, Nakao M, Saitoh N. (2019, Aug).
   The Eleanor ncRNAs activate the topological domain of the ESR1 locus to balance against apoptosis.
   Nat Commun. 10(1):3778.

6. Sato S, Arimura Y, Kujirai T, Harada A, Maehara K, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H. (2019, Aug).
Biochemical analysis of nucleosome targeting by Tn5 transposase.
Open Biol. 9(8):190116.
7. Konno D, Kishida C, Maehara K, Ohkawa Y, Kiyonari H, Okada S, Matsuzaki F. (2019, Aug).
Dmrt factors determine the positional information of cerebral cortical progenitors via differential suppression of homeobox genes.
Development 146(15). pii: dev174243.
8. Witwicka H, Nogami J, Syed SA, Maehara K, Padilla-Benavides T, Ohkawa Y, Imbalzano AN. (2019, Sep).
Calcineurin Broadly Regulates the Initiation of Skeletal Muscle-Specific Gene Expression by Binding Target Promoters and Facilitating the Interaction of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Enzyme.
Mol Cell Biol. 39(19). pii: e00063-19.
9. Sorida M, Hirauchi T, Ishizaki H, Kaito W, Shimada A, Mori C, Chikashige Y, Hiraoka Y, Suzuki Y, Ohkawa Y, Kato H, Takahata S, Murakami Y. (2019, Jun).
Regulation of ectopic heterochromatin-mediated epigenetic diversification by the JmjC family protein Epe1.
PLoS Genet. 15(6):e1008129.
10. Araki M, Kurihara M, Kinoshita S, Awane R, Sato T, Ohkawa Y, Inoue YH. (2019, Jun).
Anti-tumour effects of antimicrobial peptides, components of the innate immune system, against haematopoietic tumours in Drosophila mxc mutants.
Dis Model Mech. 12(6). pii: dmm037721.
11. Miki M, Oono T, Fujimori N, Takaoka T, Kawabe K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Saito D, Nakamura M, Ohkawa Y, Oda Y, Suyama M, Ito T, Ogawa Y. (2019, Jul).
CLEC3A, MMP7, and LCN2 as novel markers for predicting recurrence in resected G1 and G2 pancreatic neuroendocrine tumors.
Cancer Med. 8(8):3748-3760.
12. Kobayakawa K, Ohkawa Y, Yoshizaki S, Tamaru T, Saito T, Kijima K, Yokota K, Hara M, Kubota K, Matsumoto Y, Harimaya K, Ozato K, Masuda T, Tsuda M, Tamura T, Inoue K, Edgerton VR, Iwamoto Y, Nakashima Y, Okada S. (2019, May).
Macrophage centripetal migration drives spontaneous healing process after spinal cord injury.
Sci Adv. 5(5):eaav5086.

学会発表（口頭発表）

1. 原田哲仁，前原一満，田中かおり，半田哲也，木村宏，大川恭行. (2020, 3/28).
   組織切片を用いたエピゲノム解析.
   日本農芸化学会 2020 年度大会，福岡.
2. 大川恭行. (2019, 12/6).
   遺伝子の発現されやすさはどのように決まるのか？～クロマチンが規定する遺伝子発現制御能力～.
   第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.
3. 大川恭行. (2019, 12/5).
   Development of chromatin integration labeling technology for single cell multiomics.
   第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.
4. Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa (2019, 12/4).
   Towards extracting chromatin dynamics from single-cell measurements.
   第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.
5. 大川恭行. (2019, 11/7).
   クロマチン挿入法による単一細胞エピゲノム解析.
   日本人類遺伝学会第 64 回大会，長崎.
6. Yasuyuki Ohkawa. (2019, 9/11).
   Chromatin integration labelling Technology for expanding multi-omics.
   EMBO Symposia: Multi-Omics, Germany.
7. Yasuyuki Ohkawa. (2019, 9/11).
   Modification-Specific Intracellular Antibodies for Monitoring Histone Modification and Transcription In Vivo.
   Epibio2019, Spain.
8. 大川恭行. (2019, 6/25).
   Chromatin integration labelling technology for expanding multi-omics.
   第 13 回国際ゲノム会議，東京.
9. 前原一満. (2019, 6/24).
   クロマチン挿入標識（ChIL）法による空間エピゲノム解析.
   第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会 合同年次大会，兵庫.

プロテオミクス分野

Division of Proteomics

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

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

プロテオミクス分野は，中山敬一が兼任として教授を務めている．さらに分野専任として松本雅記准教授（新潟大学医歯学系教授と兼任クロスアポイントメント）と共同研究員 1 名（高見知代）に加え，技術室所属の技官 1 名（木庭絵美子）とテクニカルスタッフ 1 名（小田瑞穂），で実際の研究開発及びサービス業務を進めている（2020 年 3 月 31 日現在）．

Ａ．SV40 small T 抗原による細胞老化の回避機構の研究

正常細胞において，がん原遺伝子の活性化が引き起こす細胞老化（OIS: oncogene-induced senescence)はがん化に対する防御機構として注目されている．ここにSimian virus 40 (SV40)由来の large T antigen (LT)を導入すると，p53 と pRb が不活性化されて OIS は回避され，がん化が誘導されることは有名であるが，実際に多くの実験で使用されているのはLTそのものではなく，SV40 early region (ER)である.SV40-ER は選択的スプライシングによりLT と small T antigen (ST)を生じるので，上記の OIS 回避現象は，実はLT+ST の作用を見ていることになる.そこでわれわれは，ヒト正常細胞に Tet-On 制御下で活性化 Ras (H-Ras^{G12V})を発現する細胞株（TO-Ras)を樹立し,OISに対するLTとSTの役割を別々に解析することにした.TO-Rasでは H-Ras^{G12V} の発現誘導後 12 日で OIS を引き起こすが，LT+ST 存在下では OIS は回避され，細胞はトランスフォームする．しかし，LT のみを導入した細胞では OIS 回避が効率よく起こらず，トランスフォームの遅延が観測された．これらの結果から，ST が効率的に OIS を回避する機構に寄与していることが示された．OIS 時には IL-6 などの senescence-associated secretory phonotype (SASP)因子が誘導されるが，LT はむし

ろこれを著しく促進した．一方，ST は LT による SASP 因子誘導を顕著に抑制した．この ST による SASP 因子抑制機構には，B-cell translocation gene 2 (BTG2)の関与が疑われた．BTG2 は OIS 時における SASP 因子の上昇を阻害する．実際，ST は p53 非依存的に BTG2 の発現を誘導し，BTG2 の過剰発現およびノックダウン実験から BTG2 は ST の機能を代償することが示された．BTG2 の発現上昇には，HP1BP3 という microRNA 生成を制御するタンパク質が関与しており，これに ST が結合することによって HP1BP3 機能が抑制され，その結果として BTG2 の発現量が増えるメカニズムが明らかとなった．以上より，ST が HP1BP3/BTG2 を介して SASP 因子を抑制することで，LT による OIS を効率良く回避する事実が判明し，LT と ST が協調して細胞がん化に寄与しているメカニズムが明らかとなった．

Ｂ．細胞周期依存的な核内プロテアソームのクロマチン結合に関する研究

転写をはじめとする核内イベントと細胞がん化の関連は古くから注目されてきた．がん化過程で生じる核内イベント制御の理解には，それらを直接的に実行・制御する核内タンパク質の動態を包括的かつ定量的に計測することが重要であるが，核内タンパク質の発現量が一般に低いことなどから十分な解析が進んでいない．本研究では，単離した細胞核に核酸分解酵素処理や強イオン強度処理をすることで，段階的に核タンパク質を抽出すると共に，各分画に対し定量的プロテオミクスである iMPAQT 法 (Matsumoto M et al., Nat. Methods, 2017) を実施することで，細胞がん化に伴い変化する核タンパク質の動態を網羅的に解析することを目的とした．がん化モデル細胞として，ヒト正常線維芽細胞 TIG-3 細胞に hTert および SV40 を発現させた細胞株を使用した．その結果，細胞がん化に伴い転写関連タンパク質の核内存在量の増減も観察されたが，意外なことにユビキチン化タンパク質の分解を担う巨大なタンパク質複合体であるプロテアソームのほぼ全てのサブユニットの核内存在量が，SV40 によるトランスフォームで著しく減弱することが判明した．一方，細胞周期を抑制すると核内プロテアソーム量が増加したことから，この結果は細胞周期依存的に起きることを見出した．さらにプロテアソームがクロマチンに結合しているか検証するため，ChEP (chromatin enrichment for proteomics) を行なったところ，核内プロテアソームは細胞周期依存的にクロマチンに結合することが明らかになった．今回，われわれの解析により核内プロテアソームはクロマチン上で転写制御機構の一つとして働き，細胞周期制御やがん初期過程において何かしらの重要な役割を担っている可能性が示された．

業績目録

原著論文

1. Muto, Y., Moroishi, T., Ichihara, K., Nishiyama, M., Shimizu, H., Eguchi, H., Moriya, K., Koike, K., Mimori, K., Mori, M., Katayama, Y., Nakayama, K. I. (2019, Apr).
   Disruption of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis promotes liver carcinogenesis.
   J. Exp. Med., 216, 950-965.
2. Sugiyama, S., Yumimoto, K., Inoue, I., Nakayama, K. I. (2019, May).
   SCF^{Fbxw7} ubiquitylates KLF7 for degradation in a manner dependent on GSK-3-mediated phosphorylation.
   Genes Cells, 24, 354-365.
3. Shimizu, H., Nakayama, K. I. (2019, Aug).
   A 23 gene-based molecular prognostic score precisely predicts overall survival of breast cancer patients.
   EBioMedicine, 46, 150-159.
4. Honda, H., Matsumoto, M., Shijo, M., Hamasaki, H., Sadashima, S., Suzuki, S. O., Aishima, S., Kai, K., Nakayama, K. I., Sasagasako, N., Iwaki, T. (2019, Oct).
   Frequent detection of pituitary-derived PrPres in human prion diseases.
   J. Neuropathol. Exp. Neurol., 78, 922-929.
5. Takii, R., Fujimoto, M., Matsumoto, M., Srivastava, P., Katiyar, A., Nakayama, K. I., Nakai, A. (2019, Dec).
   The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment.
   EMBO J., 38, e102566.
6. Matsuhisa, K., Saito, A., Cai, L., Kaneko, M., Okamoto, T., Sakaue, F., Asada, R., Urano, F., Yanagida, K., Okochi, M., Kudo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Imaizumi, K. (2020, Jan).
   Production of BBF2H7-derived small peptide fragments via endoplasmic reticulum stress-dependent regulated intramembrane proteolysis.
   FASEB J., 34, 865-880.
7. Laukoter, S., Beattie, R., Pauler, F. M., Amberg, N., Nakayama, K. I., Hippenmeyer, S. (2020, Jan).
   Imprinted Cdkn1c genomic locus cell-autonomously promotes cell survival in cerebral cortex development.
   Nat. Commun., 11, 195.
8. Takahashi, H., Ranjan, A., Chen, S., Suzuki, H., Shibata, M., Hirose, T., Hirose, H., Sasaki, K., Abe, R., Chen, K., He, Y., Zhang, Y., Takigawa, I., Tsukiyama, T., Watanabe, M., Fujii, S., Iida,

M., Yamamoto, J., Yamaguchi, Y., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Washburn, M. P., Saraf, A., Florens, L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Hatakeyama, S. (2020, Feb).
The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination.
Nat. Commun., 11, 1063.

9. Kodama, M., Oshikawa, K., Shimizu, H., Yoshioka, S., Takahashi, M., Izumi, Y., Bamba, T., Tateishi, C., Tomonaga, T., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2020, Mar).
A shift in glutamine nitrogen metabolism contributes to the malignant progression of cancer.
Nat Commun., 11, 1320. doi: 1310.1038/s41467-41020-15136-41469.

10. Oshikawa, K., Matsumoto, M., Kodama, M., Shimizu, H., Nakayama, K. I. (2020, Mar).
A fail-safe system to prevent oncogenesis by senescence is targeted by SV40 small T antigen.
Oncogene, 39, 2170-2186.

11. Masuda, T., Noda, M., Kogawa, T., Kitagawa, D., Hayashi, N., Jomori, T., Nakanishi, Y., Nakayama, K. I., Ohno, S., Mimori, K. (2020, Mar).
Phase I dose-escalation trial to repurpose propagermanium, an oral CCL2 inhibitor, in patients with breast cancer.
Cancer Sci., 111, 924-931.

12. Wakabayashi, Y., Tamura, Y., Kouzaki, K., Kikuchi, N., Hiranuma, K., Menuki, K., Tajima, T., Yamanaka, Y., Sakai, A., Nakayama, K. I., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakazato, K. (2020, Apr).
Acetaldehyde dehydrogenase 2 deficiency increases mitochondrial ROS emission and induces mitochondrial protease Omi/HtrA2 in skeletal muscle.
Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 318, R677-R690.

13. Kawamura, A., Katayama, Y., Nishiyama, M., Shoji, H., Tokuoka, K., Ueta, Y., Miyata, M., Isa, T., Miyakawa, T., Hayashi-Takagi, A., Nakayama, K. I. (2020).
Oligodendrocyte dysfunction due to Chd8 mutation gives rise to behavioral deficits in mice.
Hum. Mol. Genet., in press.

14. Kito, Y., Matsumoto, M., Hatano, A., Takami, T., Oshikawa, K., Matsumoto, A., Nakayama, K. I. (2020).
Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin.
Sci. Rep., in press.

15. Nakagawa, T., Hattori, S., Nobuta, R., Kimura, R., Nakagawa, M., Matsumoto, M., Nagasawa, Y., Funayama, R., Miyakawa, T., Inada, T., Osumi, N., Nakayama, K. I., Nakayama, K. (2020).
The autism-related protein SETD5 controls neural cell proliferation through epigenetic regulation of rDNA expression.
iScience, in press.

総説

1. Yumimoto, K., Sugiyama, S., Mimori, K., Nakayama, K. I. (2019, Jul).
   Potentials of C-C motif chemokine 2-C-C chemokine receptor type 2 blockers including propagermanium as anticancer agents.
   Cancer Sci., 110, 2090-2099.
2. Nakagawa, T., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2020).
   Knockout Mouse Models Provide Insight into the Biological Functions of CRL1 Components.
   Adv. Exp. Med. Biol., 1217, 147-171.
3. Masuda, T., Tsuruda, Y., Matsumoto, Y., Uchida, H., Nakayama, K. I., Mimori, K. (2020, Jan).
   Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan.
   Cancer Sci., 19, 14318.
4. Yumimoto, K., Nakayama, K. I. (2020, Feb).
   Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor.
   Semin. Cancer Biol., 27, 017.
5. Hui, K., Katayama, Y., Nakayama, K. I., Nomura, J., Sakurai, T. (2020, Mar).
   Characterizing vulnerable brain areas and circuits in mouse models of autism: Towards understanding pathogenesis and new therapeutic approaches.
   Neurosci. Biobehav. Rev., 110:77-91.
6. Shimizu, H., Nakayama, K. I. (2020).
   Artificial intelligence in oncology.
   Cancer Sci., in press.

学会発表

1. 中山敬一．(2019, 8/1).
   がん代謝における窒素利用シフト：第二のワールブルグ効果の発見．（招待講演）
   第 7 回がんと代謝研究会，仙台.
2. Nakayama, K. I. (2019, 9/16).
   Next-generation proteomics unveils a global landscape of cancer metabolism: Discovery of the "second" Warburg effect. (Invited Speaker)
   RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology 7th Symposium, Kreuth, Germany.
3. 中山敬一．(2019, 9/27).
   近未来のがん研究：オミクスと人工知能によるデータドリブン科学の時代．（パネルディスカッション）
   第 78 回日本癌学会学術総会，京都.
4. 中山敬一．(2019, 9/28).

次世代プロテオミクスが拓くがん研究の新時代：第二のワールブルグ効果の発見.（モーニングレクチャー）
第 78 回日本癌学会学術総会，京都.

5. Nakayama, K. I., Kodama, M., Matsumoto, M. (2019, 11/19).
A metabolic shift in nitrogen flux from glutamine contributes to malignant progression of cancer: Discovery of the SECOND Warburg effect.
Cell Symposia: Hallmarks of Cancer, Seattle, WA.

6. Oka, T., Higa, T., Nakayama, K. I. (2019, 11/19).
p57 identifies quiescent cancer stem cells in intestinal tumor: Towards development of an eradicative strategy to cancer treatment.
Cell Symposia: Hallmarks of Cancer, Seattle, WA.

7. Sugiyama, S., Yumimoto, K., Nakayama, K. I. (2019, 11/19).
Formation of a lymphocyte-independent anti-metastatic environment in the lung.
Cell Symposia: Hallmarks of Cancer, Seattle, WA.

8. 中山敬一．(2019, 11/22).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの謎を解く.（特別講演）
Hepato-Diabetology Conference，東京.

9. 仁田暁大，武藤義治，片山雄太，松本有樹修，西山正章，中山敬一．(2019, 12/3).
自閉症関連遺伝子 CHD8 は造血幹細胞の分化に寄与する.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

10. 片山雄太，川村敦生，中山敬一．(2019, 12/3).
CHD8 変異マウスを用いた自閉症発症メカニズムの解明.（ワークショップ）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

11. 澤田高志，清水秀幸，山内悠平，中山敬一．(2019, 12/3).
腫瘍進展を抑制し予後に関わるマイクロ RNA miR-139 の同定.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

12. 松崎芙美子，宇田新介，山内幸代，松本雅記，曽我朋義，前原一満，大川恭行，中山敬一，黒田真也，久保田浩行．(2019, 12/3).
時系列トランスオミクス解析.（ワークショップ）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

13. 小玉学，押川清孝，清水秀幸，吉岡進，高橋政友，和泉自泰，馬場健史，朝長毅，松本雅記，中山敬一．(2019, 12/3).
核酸合成経路へのグルタミン代謝シフトはヒトがんの悪性化を可能とする.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

14. 和田玲緒名，弓本佳苗，中山敬一．(2019, 12/4).
がん細胞由来の液性因子はマウス胎仔線維芽細胞からの G-CSF 産生を上昇させる.

第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

15. 比嘉綱己，沖田康孝，松本有樹修，中山省悟，武石昭一郎，中津海洋一，中山敬一．(2019, 12/4).
p57 陽性細胞の追跡により明らかとなった消化管上皮の非職業的幹細胞.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

16. 木藤有紀，松本雅記，幡野敦，押川清孝，松本有樹修，中山敬一．(2019, 12/4).
プロテアソームは細胞周期依存的にクロマチンに結合する．（ワークショップ）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

17. 松本有樹修，見世慎太朗，仁田暁大，中山敬一．(2019, 12/4).
Long non-coding RNA の解析から明らかとなったポリペプチドワールド．（ワークショップ）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

18. 塚本康寛，古寺哲幸，福間剛士，中山敬一，西山正章．(2019, 12/4).
クロマチンリモデリング因子 CHD8 の動態追跡による自閉症の発症メカニズムの解明.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

19. 山内悠平，仁田暁大，西山正章，武藤義治，清水秀幸，中津海洋一，中山敬一．(2019, 12/4).
Skp2 は胎盤幹細胞の細胞周期を制御する.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

20. 清水秀幸，中山敬一．(2019, 12/4).
機械学習の医療および生命科学への活用．（シンポジウム）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

21. 弓本佳苗，中山敬一．(2019, 12/4).
がん細胞が抗 PD-1/PD-L1 免疫治療を免れるための分子経路の探索.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

22. 中山敬一．(2019, 12/5).
次世代プロテオミクスによって明らかとなったがん代謝ダイナミクス：第二のワールブルグ効果の発見．（シンポジウム）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

23. 藤沼駿，中津海洋一，中山敬一．(2019, 12/5).
mTORC1 下流の転写因子 FOXK1 は脂肪肝炎の病態を制御する．（ワークショップ）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

24. 中津海洋一，白根道子，中山敬一．(2019, 12/5).
PP2AB56 は核内転写因子 FOXK1 の mTORC1 依存的脱リン酸化に寄与する.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

25. 岡毅寛，比嘉綱己，沖田康孝，中山敬一．(2019, 12/5).
p57 は正常腸管・腸管腫瘍において静止状態幹細胞を特定する.

第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

26. 見世慎太朗，松本有樹修，市原知哉，清水秀幸，高橋政友，和泉自泰，馬場健史，宮田治彦，嶋田圭祐，伊川正人，中山敬一．(2019, 12/5).
精子特異的な2つの新規ポリペプチドはVDACの機能と精子ミトコンドリアの形態形成を制御する．（ワークショップ）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

27. 立石千瑳，松本雅記，中山敬一．(2019, 12/6).
転写因子 c-Myc と相互作用するタンパク質の効果的な同定法の開発.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

28. 高橋秀尚，Ranjan, A.，鈴木秀文，阿部竜太，廣瀬智威，佐々木和教，山口雄輝，中山敬一，Conaway, J.，Conaway, R.，畠山鎮次．(2019, 12/6).
メディエーター複合体による転写終結制御機構の解明．（ワークショップ）
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

29. 唐栄浩，松本有樹修，中山敬一．(2019, 12/6).
脳特異的に発現する新規ポリペプチドによる HDAC3 複合体と社会的行動の調節.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

30. 白石大智，片山雄太，西山正章，真柳浩太，神田大輔，浦聖恵，鯨井智也，胡桃坂仁志，中山敬一．(2019, 12/6).
クロマチンリモデリング因子 CHD8 の機能異常による ASD 発症の分子基盤の解明.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

31. 川村敦生，片山雄太，西山正章，昌子浩孝，阿部欣史，関布美子，高田則雄，田中謙二，徳岡広太，植田禎史，宮田麻理子，伊佐正，岡野栄之，宮川剛，林朗子，中山敬一．(2019, 12/6).
クロマチンリモデリング因子CHD8の変異によるオリゴデンドロサイト機能異常と自閉症発症への関与.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

32. 中山敬一．(2020, 2/7).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの謎を解く．（特別講演）
第 13 回つくばがん研究会，つくば市.

33. 中山敬一．(2020, 2/13).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの謎を解く．（招待講演）
「マルチオミックスによる遺伝子発現制御の先端的共同研究拠点」シンポジウム，横浜市.

34. 中山敬一．(2020, 2/20).
次世代プロテオミクスが拓くライフサイエンスの新地平：ヒトタンパク質の完全定量技術（IMPAQT 法）の実践とその応用．（招待講演）
第 7 回九州大学日本橋サテライトセミナー，東京都.

メタボロミクス分野

Division of Metabolomics

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

当分野では，代謝物の総体であるメタボロームを解析するための技術開発およびメタボロミクスの応用研究に取り組んでいる．メタボローム解析は，ゲノム情報から転写，翻訳過程を経て生成した酵素に基づく低分子化合物の化学変化を包括的に捉えたものであり，ゲノム情報に最も隣接した高解像度表現型解析手段である．すなわち，遺伝子発現変動や生体内外の環境変動などのさまざまな摂動下において，その影響がはっきりと表現型に現れにくい場合であっても，メタボロームデータを活用することで生体内の変化を代謝物の変動，すなわち代謝プロファイルとして詳細に表現することが可能である．そのため，メタボローム解析によってゲノム情報の実行結果や各種摂動の影響を詳細に理解できれば，病気の診断や病態発症メカニズムの解析，医薬品の薬効・毒性評価など，幅広い分野での応用が期待できる．我々は，細胞内の代謝情報を高精度に観測するために，数種のクロマトグラフと 13 台の質量分析計を駆使した高感度かつ定量的なメタボローム分析手法を開発している．さらに，開発した分析手法を用いて疾患と代謝の関連性について基礎から応用までの幅広い研究を展開するとともに，他のオミクスとの統合解析を目指している．

当分野は 2015 年 3 月に開設され馬場健史が教授として務めている．2019 年度は，馬場健史のほか，和泉自泰（准教授），相馬悠希（助教），原健士（特任准教授），高橋政友（特任助教），学術研究員 4 名，一貫制博士課程大学院生 10 名（うち社会人博士課程学生 6 名），テクニカルスタッフ 4 名，事務補佐員 2 名の合計 25 名の体制で研究活動を行った．また，戦略的創造研究推進事業（JST-CREST），科研費新学術領域研究，革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST），科研費基盤研究 B，科研費基盤研究 C，科研費若手研究などの補助金による支援を受け研究を実施した．

Ａ．メタボロミクスデータ統合に向けた代謝物相対定量値の実験室間比較

近年の人工知能技術の発展に伴い，ライフサイエンス分野においても各種オミクスの大規模データの活用が注目されている．しかし，メタボロームデータを用いて統合解析を実施するためには，異なる時期，異なる実験室，異なる分析法で取得したメタボロームデータの定量値を比較可能とする基盤技術の確立が必要となる．その端緒として，我々のグループは 2014 年にアメリカ国立標準技術研究所（national institute of standards and technology, NIST）が中心となって企画した「世界の 31 研究機関

におけるリピドミクスデータの施設間比較研究」に参加した．当該研究の目的は，同一の血漿試料を各施設に配布し血漿中の脂質分子の定性情報を整理するとともに定量値がどの程度一致するかを検証することであった．全ての研究機関で取得したリピドームデータを統合したところ，1,500 種の膨大な脂質分子が同定された．定量値の評価は 5 つの研究機関以上で検出された 339 種の脂質分子を対象に行った．その結果，およそ 3 分の 1 の脂質分子の定量値が施設間で大きく異なった．この主な要因として，各機器分析法の定量精度の違い，適切な内部標準物質が整備できていないことが挙げられた．

一方，日本国内においても 2017 年から「メタボロミクスデータ統合に向けた代謝物相対定量値の実験室間比較」を過去 2 回実施した（Japan Metabolome Technical Challenge Consortium, JMTC）．JMTC II では 2 種類のヒト培養細胞株（HT29 および AsPc1）から抽出したサンプル中の各代謝物に対して 12 の研究施設の異なるメタボローム分析法が同じ相対定量能力を持つかについて検討した．各実験室で前処理を行い，CE-MS，GC-MS，LC-MS，IC-MS，SFC-MS などの分析法で脂質，アミノ酸，有機酸，糖リン酸，補酵素などをターゲットとしたメタボローム分析を行った．得られた結果を解析したところ，206 種類の親水性代謝物，584 種類の疎水性代謝物が HT29 あるいは AsPc1 細胞抽出液から検出された．さらに，2 つの分析手法以上で HT29 と AsPc1 の両方から検出できた親水性代謝物は 148 種，疎水性代謝物は 285 種であった．これらの代謝物の相対定量値（AsPc1/HT29）に対して majority rule により異常値を排除したデータセットを用いて one-way ANOVA（α=0.05）解析を実施したところ，66%の親水性代謝物および 57%の疎水性代謝物の相対定量値が施設間で一致した（原著論文 4）．

代謝物の相対定量値の実験室間比較は，現在各研究施設で使用している分析法の妥当性を客観的に評価できる有効な手段である．一方で，NIST および JMTC の検証結果を踏まえると，まだ多くの代謝物の定量結果が施設間で大きく異なっているといえる．この要因は，サンプル前処理法の違い，各機器分析におけるマトリクス効果の違い，データ処理法の違いや誤同定など多岐に渡ると考えられる．今後，当分野では定量メタボローム分析法の開発を進めるとともに（原著論文 2），標準作業手順書（standard operating procedures, SOP）を考案し，メタボロミクスデータ統合の実用化に向けた検証を進めていく予定である．

B．高分解能質量分析を基盤とした化学物質に由来する代謝物探索法の開発

薬物のような外因性化学物質は動物の生体内に取り込まれた後，各種酵素の作用によって代謝され様々な化学物質へと変換される．生体内で代謝された化学物質の多くは，一般的に代謝される前のものと比較して薬理活性や毒性が低くなると考えられている．そのため，安全かつ薬効の高い薬物をさらに効率よく開発していくためには，

外因性化学物質の生体内における代謝経路およびその代謝物の情報を包括的かつ正確に把握することが不可欠である．昨年我々は，^{13}C および ^{2}H 安定同位体標識体の利用，液体クロマトグラフィー四重極オービトラップ型高分解能質量分析（LC/HRMS/MS），データマイニング技術，*in silico* 代謝物予測，代謝物プロファイルの経時的変化を解析することで，外因性化学物質に由来する代謝物を高精度に同定するための新しい方法論の開発に成功した．そこで，今年度は本解析法を用いてコーヒー中のアクリルアミド代謝物の同定を試みた．

食品中のアクリルアミド（AA）は，アスパラギンと還元糖を含む食品の加熱中にメイラード反応副産物として生成すると考えられており，神経系タンパク質あるいはDNAへの結合によって毒性を示すことが報告されている．コーヒー飲料では，原料生豆の焙煎工程時に AA が生成しており，工程上加熱の最適化や食品添加物の使用は難しい．一方，コーヒー飲料保存中に何らかの物質との付加反応による AA の減少が示唆されているが，その全貌は明らかになっていない．コーヒー飲料中の AA との反応物質が特定できれば，コーヒー飲料での AA 低減の戦略を立案できる可能性がある．コーヒー中に含まれる 5000 種以上の化合物ピークの中から，AA と $^{13}C_3$-AA の精密質量差（$\Delta m/z$ = 3.0102）および保持時間の一致度をもとに AA 付加体候補化合物の絞込みを行い，最終的に 4 種の AA 付加体を形成していることを明らかにした（原著論文 3，12）．特に，タンパク質中の Lys と Cys が AA 減少に大きく寄与しており，タンパク質と AA との反応性を利用することで AA を低減した食品開発への応用が期待される．

C．シングルセル分子フェノタイプ解析法の開発

従来のメタボロームおよびプロテオーム解析は，技術的限界から，細胞集団（10^5-10^7 cells）ごとの分析が主であり「時間および空間で平均した細胞の応答」を観測してきた．近年，次世代シーケンサーの技術革新に伴い，1 細胞レベルでゲノム，エピゲノムおよびトランスクリプトーム情報の取得が可能となり，生命システムには多種多様な個性を持つ細胞が不均一に存在することが明らかになってきた．また，がんにおいては，血液中に存在する循環腫瘍細胞（circulating tumor cell，CTC）が転移に，組織中のがん幹細胞（cancer stem cell，CSC）は，治療耐性および薬剤耐性に関連していると考えられている．このような特徴ある細胞は，存在量がわずかであるため，血液や腫瘍組織のバルク分析では CTC や CSC と他のがん細胞との違いを明らかにできない．そのため，単一細胞解析は，がんの転移メカニズムの解明や新しい治療戦略の開発への応用が期待されている．一方，メタボロミクスおよびプロテオミクスは質量分析の技術革新の恩恵を受け発展してきた学問領域である．タンパク質および代謝物は，生命システムを理解するための重要分子であると同時にゲノム情報の実行の結果，すなわち高解像度のフェノタイプとしても捉えることができる．しかし，メタボロー

ムおよびプロテオーム分析は，PCR のような観測対象物の増幅操作ができないため，細胞内に存在する膨大な種類の分子種をそのまま検出する必要がある．そのため，1 細胞中のメタボロームおよびプロテオーム情報を取得するためには，分析システムのさらなる高感度化および周辺技術の発展が必要不可欠である．

我々はこれまで一般的な動物 1 細胞からのメタボロームおよびプロテオーム解析を可能にするために，(1) 顕微鏡下で標的とする細胞を迅速に単離する技術，(2) サンプルロスを低減させるための微小空間内での前処理技術，(3) ナノフロー液体クロマトグラフィータンデム質量分析（Nano-LC/MS/MS）による高感度分析，(4) 微量試料を分析系に導入する技術の開発を行ってきた．今年度は開発した 1 細胞メタボローム分析法を用いて，HeLa 細胞の不均一性を評価した．22 個の単一 HeLa 細胞のメタボローム分析を実施したところ，18 種の親水性代謝物の検出に成功した．さらに，得られた代謝物ピークエリアを用いて階層的クラスター分析を行った結果，細胞の間に，代謝レベルで一定の類似度を示すサブクラスが複数存在することを示した（原著論文 10）．

さらに，1 細胞ショットガンプロテオーム分析を行うために，プロテオミクス分野と連携して試料調製中の損失が低く，消化効率の高い前処理法（in-line sample preparation for efficient cellular proteomics, ISPEC）を開発した．当該手法は，顕微鏡下で特定の細胞をフューズドシリカキャピラリー内に回収し，可溶化，タンパク質抽出，変性までの処理を行うことができるだけではなく，固相化トリプシンカラムを用いることで迅速かつ高効率でペプチド消化が可能であった．最終的に，試料調製用キャピラリー，固相化トリプシンカラムおよび nano-LC カラムを 2 つのゼロデッドボリュームユニオンを介して連結させ，超純水等を送液することで変性したタンパク質のペプチドへの消化と分析カラムへのロード，カラム先端での消化ペプチドの濃縮を連続的かつインラインで処理できることを確認した．ISPEC 法を少数の動物細胞（1000 個の HeLa 細胞）に適応した結果，チューブ内で前処理操作を実施する従来法と比較して，ISPEC 法は試料吸着が抑制された試料損失の少ない微量試料のプロテオーム解析に資する前処理法であることが示された．さらに，ISPEC は，より少数の細胞（100，10，1 細胞）への適応も可能であり，単一 HeLa から 60 個のタンパク質の同定に成功した（原著論文 8）．以上の結果から，ISPEC 法は 1 細胞ショットガンプロテオーム解析において試料損失が少なく，高い消化効率を有する新たな試料調製法であることが示された．

また，超高感度分析が期待できる多孔質シリカ層を有する内径 50μm 以下のモノリスシリカキャピラリーカラムの調製法を構築し，その性能評価を行った（原著論文 13）．今後は，モノリスシリカキャピラリーカラムなどを活用した分析系のさらなる高感度化と微量サンプル調製法の高速化・自動化技術を開発することで，シングルセル分子フェノタイプ解析法の高度化を図る予定である．

Ｄ．共同研究

今年度は，開発したメタボロミクス解析プラットフォームを用いて，生体防御医学研究所内および国内の大学との共同研究を精力的に行った（原著論文 5，6，7，9，11，14，15）．また，製薬会社や食品会社，化学会社，装置メーカーなどの民間企業との共同研究についても実施した（原著論文 1）．

業績目録

原著論文

1. Hirose, T., Keck, D., Izumi, Y., Bamba, T. (2019, Jul).
   Comparison of Retention Behavior between Supercritical Fluid Chromatography and Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Various Stationary Phases.
   Molecules, 24(13), 2425.
2. Takeda, H., Takahashi, M., Hara, T., Izumi, Y., Bamba, T. (2019, Aug).
   Improved quantitation of lipid classes using supercritical fluid chromatography with a charged aerosol detector.
   J. Lipid Res., 60(8), 1465-1474.
3. Yoshioka, T., Izumi, Y., Nagatomi, Y., Miyamoto, Y., Suzuki, K., Bamba, T. (2019, Oct).
   A highly sensitive determination method for acrylamide in beverages, grains, and confectioneries by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry.
   Food Chem., 294, 486-492.
4. Izumi, Y., Matsuda, F., Hirayama, A., Ikeda, K., Kita, Y., Horie, K., Saigusa, D., Saito, K., Sawada, Y., Nakanishi, H., Okahashi, N., Takahashi, M., Nakao, M., Hata, K., Hoshi, Y., Morihara, M., Tanabe, K., Bamba, T., Oda, Y. (2019, Oct).
   Inter-laboratory comparison of metabolite measurements for metabolomics data integration.
   Metabolites, 9(11), 257.
5. Nishiumi, S., Izumi, Y., Kobayashi, T., Yoshida, M. (2019, Dec).
   A pilot study: Effects of Kombu intake on lifestyle-related diseases, Possibility that an intake of Kombu is effective for the subjects with abnormally high serum triglyceride levels.
   Food Sci. Technol. Res., 25(6), 827-834.
6. Matsuda, J., Takahashi, A., Takabatake, Y., Sakai, S., Minami, S., Yamamoto, T., Fujimura, R., Namba-Hamano, T., Yonishi, H., Nakamura, J., Kimura, T., Kaimori, JY., Matsui, I., Takahashi,

M., Nakao, M., Izumi, Y., Bamba, T., Matsusaka, T., Niimura, F., Yanagita, M., Yoshimori, T., Isaka, Y. (2020, Jan).
Metabolic effects of RUBCN/Rubicon deficiency in kidney proximal tubular epithelial cells.
Autophagy, 16, 1-16.

7. Nishida-Aoki, N., Izumi, Y., Takeda, H., Takahashi, M., Ochiya, T., Bamba, T. (2020, Feb).
Lipidomic analysis of cells and extracellular vesicles from high- and low-metastatic triple-negative breast cancer.
Metabolites, 10(2), 67.

8. Hata, K., Izumi, Y., Hara, T., Matsumoto, M., Bamba, T. (2020, Feb).
In-line sample processing system with an immobilized trypsin-packed fused-silica capillary tube for proteomic analysis of a small number of mammalian cells.
Anal. Chem., 92(4), 2997-3005.

9. Takeda, H., Izumi, Y., Tamura, S., Koike, T., Koike, Y., Shiomi, M., Bamba, T. (2020, Mar).
Lipid profiling of serum and lipoprotein fractions in response to pitavastatin using an animal model of familial hypercholesterolemia.
J Proteome Res., 19(3), 1100-1108.

10. Nakatani, K., Izumi, Y., Hata, K., Bamba, T. (2020, Mar).
An analytical system for single-cell metabolomics of typical mammalian cells based on highly sensitive nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry.
Mass Spectrometry, 9(1), A0080.

11. Kodama, M., Oshikawa, K., Shimizu, H., Yoshioka, S., Takahashi, M., Izumi, Y., Bamba, T., Tateishi, C., Tomonaga, T., Matsumoto, M., Nakayama, KI. (2020, Mar).
A shift in glutamine nitrogen metabolism contributes to the malignant progression of cancer.
Nat. Commun., 11, 1320.

12. Yoshioka, T., Izumi, Y., Takahashi, M., Suzuki, K., Miyamoto, Y., Nagatomi, Y., Bamba, T. (2020, Mar).
Identification of Acrylamide Adducts Generated During Storage of Canned Milk Coffee.
J. Agric. Food Chem., 68, 3859-3867.

13. Hara, T., Izumi, Y., Hata, K., Baron, G, V., Bamba, T., Desmet, G. (2020).
Performance of small-domain monolithic silica columns in nano-liquid chromatography and comparison with commercial packed bed columns with 2 μm particles.
J. Chromatogr. A, in press.

14. Nishiumi, S., Izumi, Y., Kobayashi, T., Yoshida, M. (2020).
Possible involvement of lipids in the effectiveness of Kombu in individuals with abnormally high serum triglyceride levels.

J. Nutr. Sci. Vitaminol., in press.

15. Omori, K., Katakami, N., Arakawa, S., Yamamoto, Y., Ninomiya, H., Takahara, M., Matsuoka, TA., Tsugawa, H., Furuno, M., Bamba, T., Fukusaki, E., Shimomura, I. (2020).
Identification of Plasma Inositol and Indoxyl Sulfate as Novel Biomarker Candidates for Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes. -Findings from Metabolome Analysis Using GC/MS.
J. Atheroscler. Thromb., in press.

総説

1. 藤戸由佳，馬場健史．(2019 年 8 月).
進歩総説　超臨界流体技術を用いた分離分析法.
ぶんせき 8, 344-350.
2. 和泉自泰，中谷航太，秦康祐，原健士，松本雅記，馬場健史．(2020 年)
ナノ液体クロマトグラフィー質量分析を基盤としたシングルセル分子フェノタイプ解析
J. Mass. Spectrom. Soc. Jpn., in press.

著書

1. 池田和貴，馬場健史．(2019 年 9 月).
質量分析.
脂質解析ハンドブック～脂質分子の正しい理解と取扱い・データ取得の技術，196-200，羊土社，東京.
2. 池田和貴，馬場健史．(2019 年 9 月).
クロマトグラフィー① GC，SFC，LC，IMS.
脂質解析ハンドブック～脂質分子の正しい理解と取扱い・データ取得の技術，211-230，羊土社，東京.

学会発表（口頭発表のみ）

1. 松岡悠太，和泉自泰，高橋政友，馬場健史，山田健一．(2019, 5/15 - 17).
脂質由来ラジカル種の構造解析法.
第 67 回 質量分析総合討論会，茨城.
2. 中谷航太，和泉自泰，高橋政友，櫻井恵太，佛願道男，馬場健史．(2019, 5/15 - 17).
親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析による次世代メタボローム分析法の開発.
第 67 回 質量分析総合討論会，茨城.
3. Takeshi Bamba. (2019, 5/20 - 5/22).

Metabolic profiling by supercritical fluid extraction and separation.
SFC/SFE China 2019, China.

4. 和泉自泰．(2019, 7/8 - 7/10).
メタボロームデータの施設間比較の現状と今後の課題.
第 46 回 BMS コンファレンス，北海道.

5. 和泉自泰，松本雅記，山村昌平，馬場健史．(2019, 7/24 - 26).
シングルセル分子フェノタイプ解析に向けた基盤技術の創生.
日本プロテオーム学会 2019 年大会 第 70 回 日本電気泳動学会総会，宮崎.

6. 中谷航太，和泉自泰，高橋政友，櫻井恵太，佛願道男，馬場健史．(2019, 7/24 - 26).
次世代メタボローム分析法：親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析の開発.
日本プロテオーム学会 2019 年大会 第 70 回 日本電気泳動学会総会，宮崎.

7. 馬場健史，和泉自泰．(2019, 8/1).
1 細胞マルチ分子フェノタイピング技術の開発.
京都バイオ計測センター・京都大学ナノハブ拠点連携シンポジウム，京都.

8. 馬場健史．(2019, 8/2).
超臨界流体クロマトグラフィーの基礎.
第 19 回 SFC 研究会，大阪.

9. Takeshi Bamba. (2019, 8/26 - 27).
Basic Understanding SFC and SFE.
Food Analysis Workshop 2019, Singapore.

10. Takeshi Bamba. (2019, 8/26 - 27).
Development of metabolomics technologies by using SFC and SFE.
Food Analysis Workshop 2019, Singapore.

11. 馬場健史．(2019, 9/4 - 6).
超臨界流体の利用によって広がる新たな分離分析技術の可能性.
JASIS 2019，千葉.

12. 和泉自泰．(2019, 9/4 - 6).
次世代メタボロミクスに向けた技術開発.
JASIS 2019，千葉.

13. 波多野成児，森谷開，和泉自泰，馬場健史．(2019, 9/11 - 13).
超臨界流体クロマトグラフィーによる高分離度分析.
日本分析化学会 第 68 年会，千葉.

14. 岩崎建史朗，本庄宏，相馬悠希，鶴野圭悟，盧鎮栄，濱田浩幸，花井泰三．(2019, 9/16 - 18).
異なる人工遺伝子回路持つ二つの大腸菌による共培養系の構築.

第 71 回 日本生物工学会大会，岡山.

15. 和泉自泰，馬場健史．(2019, 9/16 - 18).
質量分析を基盤としたシングルセル分子フェノタイプ解析.
第 71 回 日本生物工学会大会，岡山.

16. 中谷航太，和泉自泰，高橋政友，櫻井恵太，佛願道男，馬場健史．(2019, 9/16 - 18).
親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析による親水性代謝物の一斉分析法の開発.
第 71 回 日本生物工学会大会，岡山.

17. 相馬悠希，藤原由梨，高橋政友，後藤麻衣子，下平武彦，池田明夏里，寺内勉，和泉自泰，馬場健史．(2019, 9/16 - 18).
次世代定量メタボローム解析に資する安定同位体標識内部標準品群調製法の開発.
第 71 回 日本生物工学会大会，岡山.

18. 馬場健史．(2019, 9/20).
Single cell analysis, いま・これから.
Single Cellome Co-Innovators'Consortium 第 1 回 オープンフォーラム，神奈川.

19. 和泉自泰，馬場健史．(2019, 9/20).
1 細胞分子フェノタイプ解析に向けた基盤技術の創生.
Single Cellome Co-Innovators'Consortium 第 1 回 オープンフォーラム，神奈川.

20. Takeshi Bamba. (2019, 9/24 - 26).
Development of next generation metabolome analytical technologies for trans-omics.
The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Miyazaki, Japan.

21. Q. Gros, J. Molineau, A. Noireau, T. Bamba, J.Duval, E. Lesellier, C. West. (2019, 9/30 - 10/1).
Characterization of 14 SFC stationary phases and application for the separation of pharmaceutics and natural compounds.
SFC 2019, USA.

22. Yutaka Konya, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba. (2019, 9/30 - 10/1).
Development of polar metabolite profiling method by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry.
SFC 2019, USA.

23. Takeshi Bamba. (2019, 10/2).
Development of next generation metabolome analysis technologies.
Cancer and Developmental Biology Laboratory Seminar, USA.

24. 馬場健史．(2019, 10/30).
トランスオミクスに向けた定量メタボローム分析技術の開発.
第 180 回 東京脂質談話会，東京.

25. 馬場健史．(2019, 11/8).
最新の分離分析技術とその有効活用－分析をうまく使いこなすためにはー.
株式会社久留米科学機器 新技術説明会，福岡.
26. 馬場健史．(2019, 11/11 - 12).
メタボロミクスの技術.
第 44 回 質量分析講習会，大阪.
27. 馬場健史．(2019, 11/14 - 15).
超臨界流体を用いた脂質プロファイリング.
第 19 回 基準油脂分析試験法セミナー，東京.
28. Yoshihiro Izumi. (2019, 11/14 - 15).
Next-generation metabolomics: Technological development and medical application.
The 4th Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine, Tokushima, Japan.
29. Takeshi Bamba. (2019, 11/22).
Development of metabolic profiling methodologies by supercritical fluid technologies.
Okinawa Analytical Instrument Network Meeting 2019, Okinawa, Japan.
30. Takeshi Hara, Kosuke Hata, Yoshihiro Izumi, Gino.V. Baron, Takeshi Bamba and Gert Desmet. (2019, 12/1 - 12/5).
Exploring column performance of monolithic silica capillary columns and its application in nano-LC.
HPLC 2019 Kyoto, Kyoto, Japan.
31. 馬場健史．(2019, 12/3 - 6).
これからはじめるメタボロミクス～メタボロミクス解析を有効活用するためには.
第 42 回 日本分子生物学会，福岡.
32. Takeshi Bamba. (2019, 12/3 - 6).
Development of single-cell molecular phenotyping technologies based on mass spectrometry.
The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Japan.
33. 和泉自泰，中谷航太，高橋政友，櫻井恵太，佛願道男，馬場健史．(2019, 12/5 - 7).
Unified HILIC/AEX/MS/MS による次世代メタボローム分析法の開発.
第 30 回 クロマトグラフィー科学会議，京都.
34. Kohta Nakatani, Yoshihiro Izumi, Masatomo Takahashi, Keita Sakurai, Michio Butsugan, Takeshi Bamba. (2020, 1/5 - 7).
Single-run comprehensive hydrophilic metabolome analysis by unified hydrophilic-interaction/anion-exchange liquid chromatography mass spectrometry.
AOMSC 2020, Macau, China.

35. 馬場健史．(2020, 1/14).
SFC の未来.
Nexera UC Prep 発売記念セミナー，東京.
36. 松田史生，馬場健史．(2020, 1/25).
学がこれまで行ってきた取り組みと、社会実装への展望.
第 165 回 質量分析関西談話会，大阪.
37. 藤戸由佳，早川禎宏，馬場健史．(2020, 1/30).
SFC による揮発性成分の分析.
第 5 回 食品 SFC 懇談会，東京.
38. 藤戸由佳，早川禎宏，馬場健史．(2020, 1/31).
SFC による揮発性成分の分析.
第 20 回 SFC 研究会，東京.
39. Yoshihiro Izumi. (2020, 2/6 - 7).
Inter-laboratory comparison of metabolite measurements for metabolomics data integration.
The 29th Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka, Japan.
40. Takeshi Bamba. (2020, 2/6 - 7).
Development of single-cell molecular phenotyping technologies based on mass spectrometry.
The 29th Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka, Japan.
41. 和泉自泰，馬場健史．(2020, 3/25 - 28).
質量分析で 1 細胞中の代謝物とタンパク質を解析する.
日本農芸化学会 2020 年度大会，福岡.
42. 前田聡史，手塚武揚，和泉自泰，高橋政友，馬場健史，大西康夫．(2020, 3/25 - 28).
Actinoplanes missouriensis の胞子嚢膜を構成する脂質のリピドーム解析.
日本農芸化学会 2020 年度大会，福岡.
43. 島田良美，下平武彦，相馬悠希，和泉自泰，安藤晃規，岸野重信，阪本鷹行，馬場健史，小川順，櫻谷英治．(2020, 3/25 - 28).
油糧糸状菌 *Mortierella alpina* の分子育種による遊離脂肪酸生産株のリピドーム解析.
日本農芸化学会 2020 年度大会，福岡.

統合オミクス分野
Division of Integrated Omics

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

生命現象は全てゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームなどと呼ばれる階層によって制御されている．そこで近年，生命現象の全体像を理解する一つのアプローチとして，多階層のデータを統合し多階層ネットワークを同定する「トランスオミクス解析」が注目を浴びている．統合オミクス分野では複数階層のデータ, いわゆる「オームデータ」を統合するための手法開発を行うと同時に, 個体の応答とそのメカニズムをまるごと理解することを目的としている．解析手法としてはデータベースなどを用いた情報学的手法と統計的手法の開発や，実験手法についてもトランスオミクス測定のための検討を行っている．現在，多階層にまたがるネットワークによって制御されている個体の肥満やインスリン作用に注目して研究を行っている．また，多階層にまたがるネットワークの動的特性を解析するために数理モデルを用いた分子のダイナミクスの解析や，情報理論を用いた解析も行っている．

平成 31 年 4 月に難波里子さんが参加した．

Ａ．トランスオミクス解析

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

ａ．インスリン作用の *in vivo* トランスオミクス解析

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

ｂ．肥満進行のトランスオミクス解析

肥満は糖尿病やガンの危険因子であり，健康志向の高まりにも関わらず近年，世界的に増加傾向にある．われわれは肝臓における肥満進行の応答を明らかにするため，エピゲノム・トランスクリプトーム・発現プロテオーム・リン酸化プロテオーム・メタボロームの 5 階層のデータを取得し，その全体像を明らかにすることを目指している．このため，上記手法を用いて新たに同じサンプルからエピゲノムデータ（ヒストン修飾）のデータを取得することにも成功している．これらのデータから肝臓の多階層の応答がある肥満進行のある時点を境に急激に変化することを見出しおり，そのネットワークの解明に注力している．

ｃ．トランスオミクスデータの解析手法の開発

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

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

B．数理モデルを用いた動的特性の解析

われわれは数理モデルを用いて生命現象を表現し，その動的特性やメカニズムを明らかにすることで生命現象を様々な角度から理解しようと試みている．微分方程式モデルは数理モデルの中でも動的特性やメカニズムを理解するのに良く用いられている．応用においても有用で，任意に入出力を制御できる実験系においては，微分方程式モデルを用いることで出力を生理的応答の範囲で任意に制御することができる．

インスリンは血糖値を減少させることのできる唯一のホルモンである．血中インスリンは複数の時間パターンからなることが知られており，これらのパターンが生体内のインスリン応答に重要であることが報告されている．例えば，15 分程度の周期的分泌を模した刺激パターンは一定刺激よりも血糖値の減少の強い効果が報告されている．また，これらの分泌パターンは糖尿病と深く関係があることが知られているが，これらのメカニズムも不明のままである．われわれは血中インスリンの時間パターンの意義を明らかにするため，培養細胞を用いた研究を行ってきた．これまでにわれわれは，インスリンの時間パターン依存的にインスリンシグナル伝達経路分子や代謝分子，そして遺伝子発現を，培養細胞や個体の肝臓において選択的に制御できることを明らかにしてきた（Mol. Cell, 2012, Mol. Syst. Biol., 2013, Sci. Signal., 2016, Cell Syst. 2018）．また，作成したモデルを基に，これまで不明であった糖尿病の進行に伴う糖新生活性化の原因を推測している（Cell Syst. 2018）．現在，インスリンの時間パターンに対する肝臓と筋肉の応答の違いや，肥満状態におけるインスリン応答不全に注目し，そのメカニズムを生物実験と数理解析を用いて検討を行っている．

C．血糖値および心拍間隔時系列データの解析

血糖値は食事などを介した糖の摂取や日常的な消費によって増減する一方，副交感神経を介した制御によっても増減することが示唆されている．しかし，副交感神経の作用がどのように血糖値に影響するか定量的な知見は今まで得られていない．一方で，近年，１型糖尿病患者へのインスリンポンプ療法が普及し，ペースメーカーと併用することで数日単位での長時間にわたる血糖値および心拍間隔の時系列データが得られるようになった．心拍間隔は主交感神経と副交感神経の活動と密接に関連していることが知られており，心拍間隔から副交感神経の活動を定量的に推定することができる．慶応義塾大学医学部伊藤（裕）研究室との共同研究の下，血糖値および心拍間隔時系列データから，血糖値と副交感神経活動との間に成り立つ定量的関係を調べる解析を進めている．両者の関係を明らかにすることは，１型糖尿病患者にとって危険な低血糖の予測や血糖値制御メカニズムの解明に役立つと期待される．

業績目録

原著論文

1. Kawata K., Yugi K., Hatano A., Kokaji T., Tomizawa Y., Fujii M., Uda S., Kubota H., Matsumoto M., Nakayama K. I. and Kuroda S. (2019, Jan).
   Reconstruction of global regulatory network from signaling to cellular functions using phosphoproteomic data.
   Genes Cells 24, 82-93.
2. Fujii M., Murakami Y., Karasawa Y., Sumitomo Y., Fujita S., Koyama M., Uda, S., Kubota H., Inoue H., Konishi K., Oba S., Ishii S. and Kuroda, S. (2019, Sep).
   Logical design of oral glucose ingestion pattern minimizing blood glucose in human.
   NPJ Syst. Biol. Appl., 5, 31.
3. Ohigashi I.,Tanaka Y., Kondo K., Fujimori S., Kondo H., Palin AC., Hoffmann V., Kozai M., Matsushita Y., Uda, S., Motosugi, R., Hamazaki J., Kubota, H., Murata S., Tanaka K., Katagiri T., Kosako H. and Takahama Y. (2019, Nov).
   Trans-omics Impact of Thymoproteasome in Cortical Thymic Epithelial Cells.
   Cell Rep., 29(9), 2901-2916.
4. Maruyama O. and Matsuzaki F. (2019, Oct).
   DegSampler3: Pairwise Dependency Model in Degradation Motif Site Prediction of Substrate Protein Sequences.
   Proceedings 2019 IEEE 19th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), 11-17.

総説

1. Akiyama R., Annaka M., Kohda D., Kubota H., Maeda Y., Matsumori N., Mizuno D. and Yoshida N. (2020, Feb).
   Biophysics at Kyushu University. Biophys. Rev.

学会発表（口頭発表のみ）

1. Hiroyuki Kubota. (2020, 3/27). 招待講演
   Selective regulation of the Insulin-AKT pathway by simultaneous processing of blood insulin pattern in the liver.
   Establishing International Research Network of Mathematical Oncology, Ohsaka.
2. Matsuzaki F., Uda S., Yamauchi Y., Matsumoto M., Soga T., Maehara K., Ohkawa Y., Nakayama K. I., Kuroda S., Kubota H. (2020, 2/6-7).

Integrated analysis through multiple molecular layers: transomic network dynamics.
The 29th Hot Spring Harbor International Symposium, Cutting Edge of Technical Innovations in Trans-Omics. Fukuoka, Japan.

3. 松崎芙美子，宇田新介，山内幸代，松本雅記，曽我朋義，前原一満，大川恭行，中山敬一，黒田真也，久保田浩行．(2019, 12/3-6). 口頭発表
時系列トランスオミクス解析.
第 42 回日本分子生物学会年会．福岡.

4. Shinsuke Uda. (2019, 9/23-26). 招待講演
Network structure inference by conditional independence.
第 57 回日本生物物理学会．Miyazaki.

5. 久保田浩行．(2019, 12/7-8). 招待講演
血中インスリンパターンによる生体応答の制御.
生物物理リズム若手研究会.

6. 加藤寛彬，宇田新介，松崎芙美子，久保田浩行．(2019, 9/1-3). 口頭発表
肝臓と筋肉における Akt 経路の定量的な比較.
新学術若手ワークショップ．愛媛.

7. Maruyama O. and Matsuzaki F. (2019, 10/28-30).
DegSampler3: Pairwise Dependency Model in Degradation Motif Site Prediction of Substrate Protein Sequences.
2019 IEEE 19th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE). Athens, Greece.

8. Maruyama. O. and Matsuzaki F. (2019, 9/9-11).
DegSampler2: an improved Gibbs sampling strategy for predicting E3 binding sites.
第 8 回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2019). 東京.

9. Hiroyuki Kubota. (2019, 9/13). 招待講演
Regulation of insulin action by temporal patterns of insulin.
iTHEMS セミナー. Saitama.

10. Hiroyuki Kubota. (2019, 9/14-16). 招待講演
Regulation of insulin action by temporal patterns of insulin.
JSMB2019 Conference. Tokyo.