

第 73 回 日本電気泳動学会シンポジウム
～ マルチオミックス関連技術が拓く新たな世界 ～

日時： 2023 年 12 月 21 日（木） 13:30～17:00

会場：オンライン開催（Zoom）

参加費：無料（事前参加登録が必要です）

主催：日本電気泳動学会

世話人：木村弥生（横浜市立大学）



13:30 開会の言葉

ワークショップ 1 座長；西山 晃 先生（横浜市立大学）

13:40～14:10

高橋 秀尚 先生（横浜市立大学）

「抗体を用いた *in situ* ビオチン標識法による核内構造体構成因子のマルチオミックス解析」

14:10～14:40

二村 圭祐 先生（群馬大学/大阪大学）

「腫瘍の制御を目指した遺伝子発現制御機構の解明」

14:40～15:10

幸谷 愛 先生（東海大学/大阪大学）

「脂質解析が暴いた細胞外小胞の新機能」

15:10～15:20 休憩

ワークショップ 2 座長；平野 久 先生（横浜市立大学）

15:20～15:50

武森 信暁 先生（愛媛大学）

「ゲル電気泳動が可能にする高深度プロテオフォーム解析」

15:50～16:20

梁 明秀 先生（国立感染症研究所）

「宿主細胞の細胞内免疫機構に着目した抗ウイルス戦略の創出」

16:20～16:50

小原 收 先生（かずさ DNA 研究所）

「プロテオゲノミクス研究の現状と将来展望」

16:50 閉会の言葉

後援：・横浜市立大学先端医科学研究センター

“マルチオミックスによる遺伝子発現制御の先端的医学共同研究拠点”

・日本プロテオーム学会

ワークショップ 1-1

抗体を用いた *in situ* ビオチン標識法による核内構造体構成因子のマルチオミクス解析

The multi-omics analysis of the components of nuclear bodies using antibody-based *in situ* biotinylation technique.

野口 慶介¹⁾, 鈴木 秀文¹⁾, 阿部 竜太¹⁾, 堀内 恵子¹⁾, 秋山 智彦¹⁾, 池 陽子¹⁾, 井野 洋子²⁾, 木村 弥生²⁾, 梁 明秀^{3,4)}, 山口 雄輝⁵⁾, ○高橋 秀尚¹⁾

1) 横浜市立大学 医学部 分子生物学教室、2) 横浜市立大学 先端医科学研究センター、3) 横浜市立大学 医学部 微生物学教室、4) 国立感染症研究所 ウイルス第三部、5) 東京工業大学 生命理工学院

液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation) によって形成される核内構造体は、様々な細胞機能を制御することが知られている。近年、液-液相分離の破綻による核内構造体の形成破綻が神経変性疾患を含む様々な疾患の発症に繋がることが明らかとなってきた。われわれは核内構造体の機能を解明するために、抗体を用いた新規のビオチン化標識法を確立し、様々な核内構造体の構成因子 (タンパク質、DNA、RNA) の網羅的同定を行った。さらに公共データベースも駆使して、同定されたタンパク質-ゲノム DNA-RNA 間のインタラクトームを明らかとした。すると、核内構造体の形成には液-液相分離に加えて、新規に転写合成された RNA と RNA 結合タンパク質との相互作用が重要な役割を果たす可能性が明らかとなってきた。本研究によって核内構造体の形成機構とその破綻による疾患発症メカニズムの一端が解明されることを期待する。

なお、本研究に関して開示すべき利益相反状態は無い。

Keywords : Liquid-liquid phase separation, Nuclear bodies, Biotinylation

ワークショップ 1-2

腫瘍の制御を目指した遺伝子発現制御機構の解明

Understanding the mechanisms of gene expression regulation to control tumor progression

○二村圭祐¹⁾

1) 群馬大学未来先端研究機構/大阪大学大学院医学系研究科

私は一貫して遺伝子発現制御機構の解明を目指し、特に転写制御因子が形成する複合体の遺伝子発現に及ぼす影響に焦点を当ててきた。転写制御因子複合体はダイナミックなクロマチン高次構造変換とそれに伴う遺伝子発現様式の変化によって、細胞の形質を柔軟に変化させる。遺伝子発現制御機構の破綻は異常な遺伝子発現を誘導し、様々な疾患の原因となる。従って、遺伝子発現制御機構の理解は疾患の原因究明とその治療法開発において必須である。私はこれまでに、次世代シーケンシングや質量分析計などのオミックス解析手法を用いた様々な解析手法を開発・導入することで、遺伝子発現制御の破綻による疾患発症メカニズムについて明らかにしてきた。

これまでの研究から、転写因子とヒストン修飾酵素、RNA 代謝酵素による精緻な遺伝子発現制御機構とその破綻による疾患発症機序を明らかにしてきた (*Nature* 2009、*PLoS One* 2014、*eLife* 2016、*Mol. Cell* 2017)。また癌において、腫瘍を増悪化する RNA スプライシング因子の探索と機序解明と、その制御法開発を行った (*Cancer Res.* 2019、*Tetrahedron Letters* 2019、*ACS Medicinal Chemistry Letters* 2020、*Cell & Bioscience* 2022)。DNA バーコードと Cas9/self-target gRNA を組み合わせた遺伝子発現記録法を用いて、癌細胞集団中における癌幹細胞の出現機序を明らかにした (*Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022)。本講演では現在進行中のプロジェクトも含めてシーケンシング解析技術の側面も合わせてご紹介したい。

なお、本研究に関して開示すべき利益相反状態は無い。

Keywords : Gene expression, Sequencing, DNA barcode, Cancer

ワークショップ 1-3

脂質解析が暴いた細胞外小胞の新機能

New mechanism of extracellular vesicles revealed by lipidomics

○幸谷 愛¹⁾²⁾、工藤 海³⁾ 中山駿矢⁴⁾ 紙屋光佑¹⁾ 村上 誠⁵⁾

1) 東海大学医学部、2) 大阪大学微生物病研究所、3) AIM 研究所、4) 日本大学獣医学部、
5) 東京大学医学研究科

エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) は、タンパク質やマイクロ RNA を輸送することにより、細胞間コミュニケーターとして機能する。我々は、エプスタイン・バーウイルス (EBV) リンパ腫において、腫瘍細胞から分泌される EV がマクロファージに取り込まれることによって、それらを腫瘍随伴マクロファージ (Tumor associated macrophage; TAM) に変化させることが腫瘍微小環境の形成に必須であることを示した(1)。さらに、リンパ腫由来の EV の腫瘍促進作用が分泌型リン脂質加水分解酵素であるホスホリパーゼ A2 (sPLA2) によって引き起こされる脂質代謝を介して増強されることを明らかにした。sPLA2 による EV 膜リン脂質の加水分解は、脂肪酸、リゾリン脂質、およびそれらの代謝産物の産生を増加させ、EV は小さく、自己凝集し、マクロファージでの取り込みを促進し、TAM のサイトカイン発現と脂質メディエーターシグナル伝達を増加させた。加えて、EV は T 細胞など EV を取り込まない細胞においても、細胞表面の GPCR を活性化した。内因性 sPLA2 を薬理的に阻害すると、EBV 感染ヒト化マウスにおけるリンパ腫の増殖が抑制されたが、sPLA2 処理 EV を投与すると、リンパ腫の増殖が回復した。さらに、EBV 感染の有無に関わらずヒトびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における sPLA2 発現は、患者の生存期間と逆相関していた。以上から、sPLA2 を介した EV の修飾は腫瘍の発生を促進し、ヒトでも同様のシステムが駆動していることが示唆された。重要なことに標的細胞以外の細胞に対しても接着によって生理的な機能を示すという新しい作用機序が示された(2)。

最後に、この EV の新機能を応用し、あらゆる炎症疾患に高い治療効果を示す組織保護能の高い EV の作成を試みた。その機能の詳細な解析から、今後も発生しうる新興感染症に備える従来にない技術開発をおこなった (Nakayama et al manuscript in preparation)。

なお、本研究に関して開示すべき利益相反状態は無い。

1. Higuchi H, Yamakawa N, et al Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma, **BLOOD**, 2018, 131, 2552-2567.

2. Kudo K, et al Secreted phospholipase A2 modifies extracellular vesicles and accelerates B cell lymphoma. **Cell Metab**, 2022, 34, 615-633.e8.

Keywords : extracellular vesicles, Epstein Barr virus, lymphoma, cytokine storm, sPLA2

ワークショップ 2-1

ゲル電気泳動が可能にする高深度プロテオフォーム解析

In-Depth Proteoform Analysis Enabled by Gel Electrophoresis

○武森信暁

愛媛大学 先端研究・学術推進機構 学術支援センター

プロテオフォームとは、生体内で1遺伝子からつくられるタンパク質の多様な化学構造を表す用語である。プロテオフォームの存在はタンパク質の生理機能に多様性をもたらすことから、細胞内におけるプロテオフォーム解析の重要性が近年ますます認識されるようになってきた。しかしヒトでは数百万種類と推定される膨大な数のプロテオフォームを網羅的に検出することは技術的に極めて困難な課題である。

これまでに我々は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、逆相液体クロマトグラフィ (RPLC)、および Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry (FAIMS) という異なる原理のタンパク質分離手法を組み合わせた画期的な多次元プロテオーム分画ワークフロー「GeLC-FAIMS-MS」を開発することにより、世界最高レベルの高深度なプロテオフォーム解析を実現している (文献 1-3)。本講演では、GeLC-FAIMS-MS の原理や微量生体サンプルを対象としたトップダウン・ミドルダウンプロテオミクスへの活用例を解説し、さらに現在取り組んでいるゲル電気泳動を基盤とするヒトプロテオフォームアトラス構築に向けた取り組みについて紹介する。

1. Takemori A, Kaulich PT, Konno R, Kawashima Y, Hamazaki Y, Hoshino A, Tholey A, Takemori N. GeLC-FAIMS-MS Workflow for In-Depth Middle-Down Proteomics. *Proteomics*, e2200431 (2023)
2. Takemori A, Kaulich PT, Cassidy L, Takemori N, Tholey A. Size-Based Proteome Fractionation through Polyacrylamide Gel Electrophoresis Combined with LC-FAIMS-MS for In-Depth Top-Down Proteomics. *Anal. Chem.*, 94, 12815-12821 (2022)
3. Takemori A, Butcher DS, Harman VM, Brownridge P, Shima K, Higo D, Ishizaki J, Hasegawa H, Suzuki J, Yamashita M, Loo JA, Loo RRO, Beynon RJ, Anderson LC, Takemori N. PEPPI-MS: Polyacrylamide-Gel-Based Prefractionation for Analysis of Intact Proteoforms and Protein Complexes by Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.*, 19, 3779-3791 (2020)

Keywords : Proteoforms, Top-Down Proteomics, Middle-Down Proteomics, GeLC-FAIMS-MS, PEPPI-MS

ワークショップ 2-2

宿主細胞の細胞内免疫機構に着目した抗ウイルス戦略の創出

Development of antiviral strategies focusing on host cell antiviral factors

○梁 明秀¹⁾、宮川 敬²⁾

1) 国立感染症研究所ウイルス第三部所属、2) 国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター

ウイルス感染の成立には、宿主細胞内におけるウイルス分子と宿主因子との物理的・機能的相互作用が必須であり、また、そのものがウイルスの増殖、生活環、および病原性発現に重要な役割を果たす。一方、細胞内ウイルスタンパク質に対する宿主の免疫応答機構の1つとして、内因性抗ウイルス因子群によるウイルス複製阻止およびウイルスによる回避システムが注目されている。このようにウイルスを排除しようとする「負」の宿主因子群に対するウイルス側の拮抗作用が明らかになれば、それらを阻止できる新たな創薬ターゲットを見出すことができる。また、これらはウイルス疾患に対する革新的な治療法や副作用の少ない薬剤の開発につながる可能性がある。このような背景から、マルチオミクス時代に適応した包括的戦略のひとつとして、われわれはヒト完全長 cDNA ライブラリーを取り揃え、宿主細胞がコードするほぼすべてのタンパク質を用いて、ウイルス-宿主タンパク質間相互作用ネットワークの解明を目指した研究を進めている。特に、機能別完全長ヒトタンパク質発現ライブラリーを低レベルで細胞に発現させることで、細胞生理を反映したウイルス-宿主相互作用の探索及びモニタリング法の開発を行ってきた。これらの技術を用いて、宿主因子によるウイルスタンパク質のリン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾解析、インタラクトーム解析、オートファジーなどのスクリーニング等、網羅的なタンパク質機能解析を短時間で簡便に行うことができるようになった。各スクリーニング系において同定された宿主因子については、細胞レベルでウイルス複製や病原性発現への影響や機能を解析することで、包括的な宿主-ウイルスタンパク質相互作用ネットワークの構築が可能であると考えられる。本講演では無細胞タンパク質合成系および NanoBRET を活用した包括的プロテオミクスを適用したいくつかの解析例を紹介しつつ、細胞内抗ウイルス因子に着目した新たな抗ウイルス戦略の開発や今後の展開について議論する。本研究に関して開示すべき利益相反状態は無い。

- 1) Miyakawa K, Nishi M, Ogawa M, Matsunaga S, Sugiyama M, Nishitsuji H, Kimura H, Ohnishi M, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Ryo A. Galectin-9 restricts hepatitis B virus replication via p62/SQSTM1-mediated selective autophagy of viral core proteins. *Nat Commun.* 13(1):531,2022.
- 2) Miyakawa K, Machida M, Kawasaki T, Nishi M, Akutsu H, Ryo A. Reduced Replication Efficacy of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant in "Mini-gut" Organoids. *Gastroenterology.* 163(2):514-516,2022.
- 3) Miyakawa K, Matsunaga S, Yokoyama M, Nomaguchi M, Kimura Y, Nishi M, Kimura H, Sato H, Hirano H, Tamura T, Akari H, Miura T, Adachi A, Sawasaki T, Yamamoto N, Ryo A. PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD1 restriction via Vpx phosphorylation. *Nat Commun.* 10(1):1844,2019.

ワークショップ 2-3

プロテオゲノミクス研究の現状と将来展望

Current Status and Future Prospects of Proteogenomics Research

○小原 収

ゲノム事業推進部、かずさ DNA 研究所

21 世紀に入ってゲノム解析が次世代シーケンサーの登場で急速な進歩を見せ、その成果は医療の分野にも及んでいる。しかし、こうしたゲノム情報が容易に入手可能となった現実には、同時にそれが読み解かれて実現されている生体システムの理解の深化を要求し、その基本となるのがタンパク質レベルでのシステム理解である。近年の網羅的なタンパク質解析技術の進歩には目を見張るべきものがあるが、それだけに依存することなく、必要に応じて転写産物や代謝産物のノンターゲット分析と組み合わせて複雑なシステムの状態を記述しようとするマルチオミクス解析も一般的なアプローチとなってきた。しかし残念なことに、近年の LC-MS 技術の進歩がプロテオーム解析の分析深度を転写産物の分析深度と近いレベルにまで押し上げてあげていることや単なるペプチド量の記述だけに留まらないプロテオフォーム解析方法の開発が進んでいることはまだ専門家以外には十分には認知されていないように感じている。実際、演者が近年関わっている難病の遺伝学的検査においても、未だにゲノム解析が診断分野では主役であり、こうしたマルチオミクスあるいはプロテオゲノミクス解析の診断応用への取り組みはまだ極めて限定的である。

本講演では、演者のグループが展開しているタンパク質と mRNA に注目したプロテオゲノミクスプロファイリングの現状を紹介した上で、これからの展開が期待されているプロテオゲノミクス解析の難病診断への展開の可能性、そしてそれよりも更に将来に期待される技術的な展望について話題提供させていただきたい。かなり個人的な視点からの話題提供になってしまう可能性が高いが、我が国のこうした研究コミュニティでの議論の活性化の一助となってくれることを期待したい。

なお、本研究に関して開示すべき利益相反状態は無い。

Keywords : Genome, Proteome, Omics, Proteogenomics