



2023 年度

第 1 回 千里 LF 産学学術交流会

資料集

コーディネーター：

審良 静男

千里ライフサイエンス振興財団 理事長

木下 タロウ

大阪大学感染症総合教育研究拠点 特任教授

日 時：2023年12月22日（金）13：30

会 場：千里ライフサイエンスセンタービル6F

千里ルーム A 研究紹介

千里ルーム B ポスター展示、懇親会

主 催：公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団

プログラム

研究紹介 13:30～15:40 @千里ルーム A

13:30～13:35

はじめに 千里ライフサイエンス振興財団 理事長 審良 静男

13:35～13:55

演題1 中枢神経の損傷における神経回路の再編
新潟大学 脳研究所 システム脳病態学分野 教授 上野 将紀

13:55～14:15

演題2 細胞内における自己・非自己認識機構の解明
大阪大学 微生物病研究所 感染病態分野 准教授 笹井 美和

14:15～14:35

演題3 レム睡眠からアプローチする精神・神経疾患の理解とその克服
東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 教授 林 悠

14:35～14:55

演題4 人工細胞で切り拓く生命科学研究の現状と将来展望
理化学研究所 生命機能科学研究センター
構成的細胞生物学研究チーム チームリーダー 宮崎 牧人

14:55～15:15

演題5 高速広視野2光子顕微鏡で拓く脳の新世界
理化学研究所 脳神経科学研究センター
触知覚生理学研究チーム チームリーダー 村山 正宜

15:15～15:35

演題6 一本鎖モネリンを非抗体骨格タンパク質とする人工結合タンパク質の
作製基盤構築
岡山大学学術研究院医歯薬学域（薬学系） 准教授 安井 典久

15:35～15:40

研究紹介の締め 大阪大学感染症総合教育研究拠点 特任教授 木下 タロウ

ポスター展示と懇親会 15:45～17:30 @千里ルーム B

中枢神経の損傷における神経回路の再編

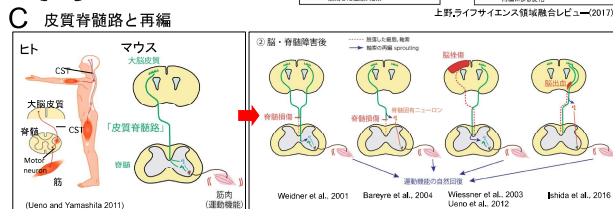
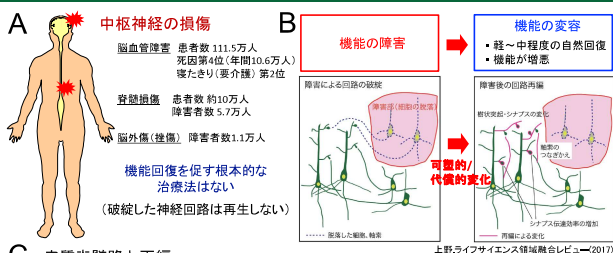
上野 将紀

新潟大学 脳研究所 システム脳病態学



新潟大学脳研究所
BRAIN RESEARCH INSTITUTE, NIIGATA UNIVERSITY

背景

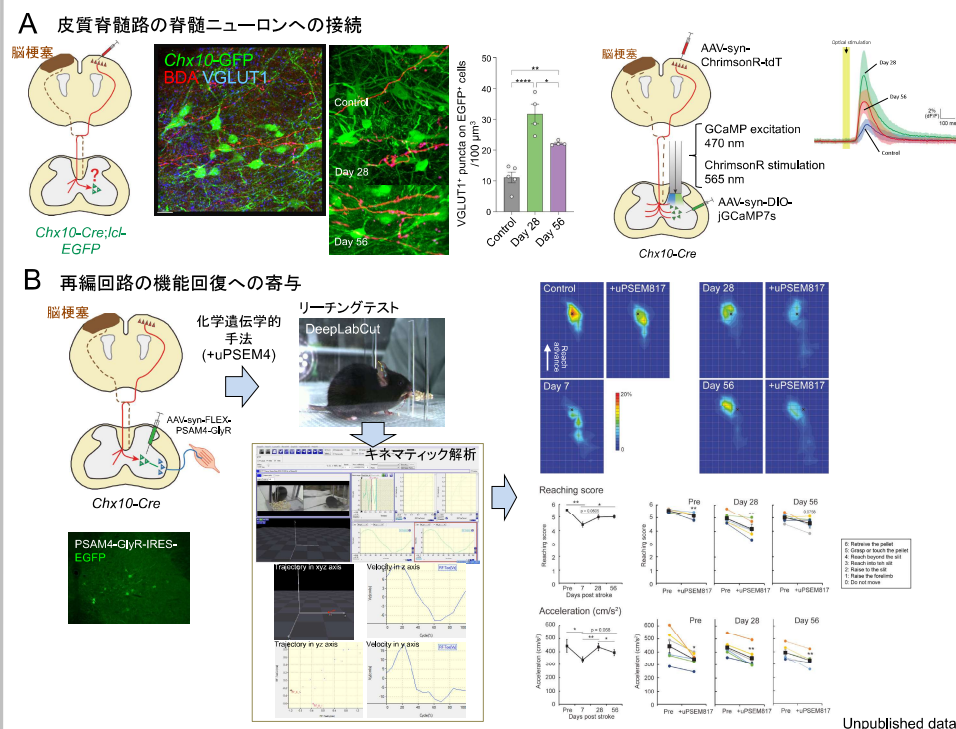


脳卒中や外傷で脳や脊髄を損傷すると、運動をはじめとする神経機能の低下をもたらす。壊れた神経回路を再建し、機能を回復する根本的な治療法は確立されていない。一方、失われた機能は時間を経て回復、増悪するなどしばしば変容することが知られる。この機能の変化は、障害をのり残した神経回路網の代償的な動きや再編により起こることがわかってきている。残存した回路網の活用は、機能回復をもたらす主要な治療標的の1つと期待される。私たちはこれまで、**随意運動をになう皮質脊髄路の神経回路網を中心に、回路が再編する神経、分子機序の研究**を行ってきた。脳や脊髄を損傷したげん歯類のモデルでは、損傷後、残存した皮質脊髄路が代償的に再編し、機能の回復過程に寄与する。通常、再編の度合いは限定的だが、中枢神経の環境中に存在する軸索伸長阻害因子や神経細胞内の軸索成長シグナル、神経活動といった要因を変化させると、回路の再編を促進することができる。また皮質脊髄路は、複数の大脳皮質領域からのび、脊髄ニューロンと多様に接続する回路網と機能を持つことがわかってきた。この回路網は、損傷の位置や大きさにより異なる再編様式を示し、脊髄では固有の接続を作り直し、機能の回復に寄与することがわかってきた。このプロセスでは、神経やグリア細胞で多様な遺伝子の発現変化が起こることがわかってきた。これらの研究より、機能回復の標的とすべき回路網や再編の機序・原理を理解することを目指しており、再編と回復をうながす方法論の発展へつながると期待される。

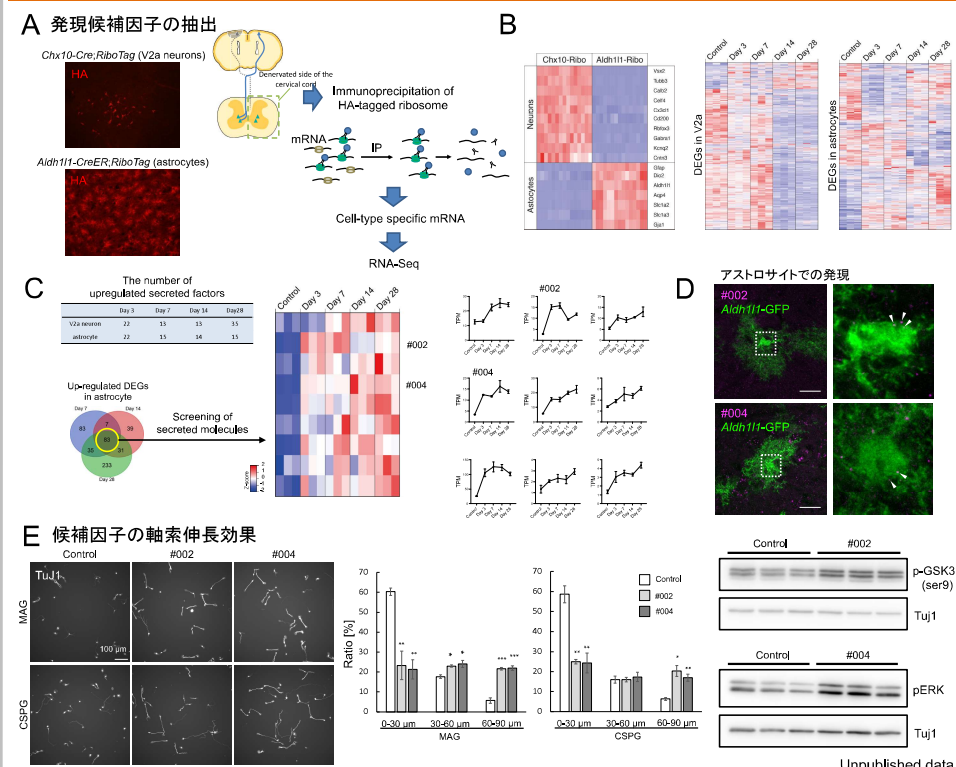
皮質脊髄路の再編

- ① 再編の様式は？
- ② 回路の構造・機能は？
- ③ 再編のメカニズムは？

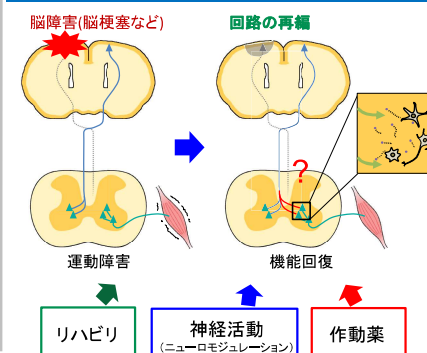
2. 機能回復をもたらす再編回路の構造



3. 再編を誘導する因子の探索



まとめ

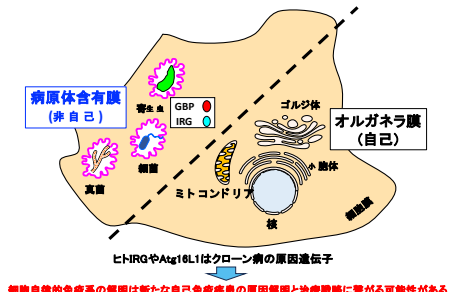


機能的な神経回路を再構築する原理・方法論

- ① 再編回路の実体
・大脳皮質-脊髄の回路
・機能
- ② 再編のメカニズム
・神経・分子メカニズム
・リハビリテーション

- ・機能回復をもたらすメカニズム
- ・リハビリ、ニューロモジュレーションの標的回路
- ・標的回路の可塑性促進法
- ・再編と回復をもたらす分子標的薬



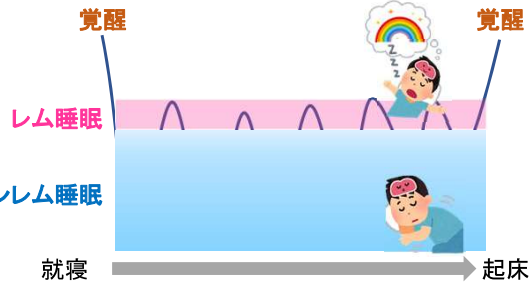




レム睡眠からアプローチする精神・神経疾患の理解とその克服 (進化した睡眠 ～夢の意義から夢の医療へ～)

林 悠(東京大・院理・生物科学専攻、筑波大・国際統合睡眠医科学研究機構)

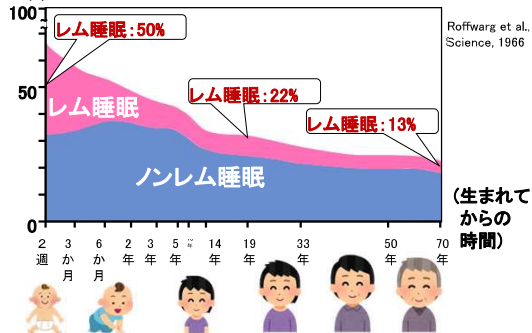
ヒトの睡眠構築



レム睡眠とノンレム睡眠は
ヒトを含む一部の脊椎動物で進化



レム睡眠は乳幼児期に多く、
加齢とともに大きく減少



様々な疾患や障害でレム睡眠が減少

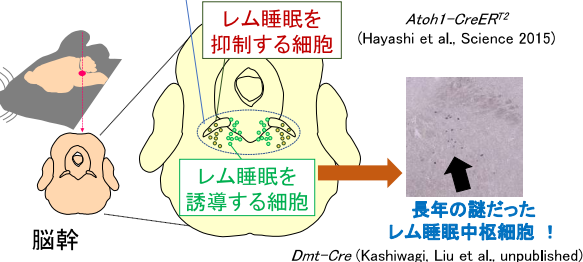
- 例
- ・自閉症スペクトラム障害
- ・認知症
- ・パーキンソン病

レム睡眠は脳の発達や老化に関与？

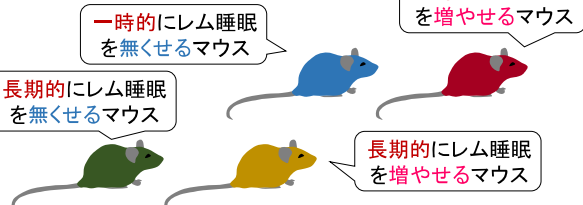
レム睡眠の役割は不明

本研究の戦略：
マウスのレム睡眠中枢細胞を同定し
その機能操作による影響を解明する

脳幹の橋(SLD)
薬理学的・電気生理学的研究からレム睡眠中枢細胞の存在が
強く示唆されてきたが、その実体は長く不明



レム睡眠制御細胞の一過的な活動操作
や遺伝学的破壊



アルツハイマー型認知症(AD)とレム睡眠

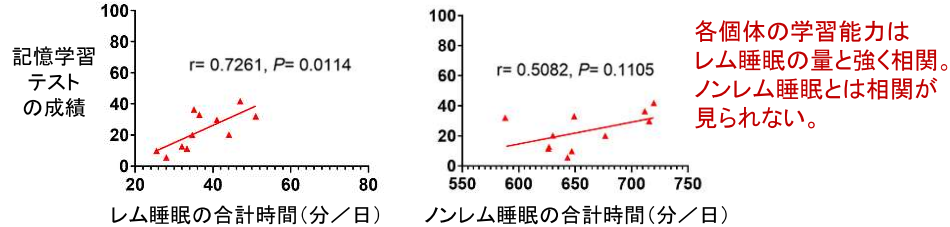
【ヒトでの前向き調査研究】

60歳以上の健康者で、およそ12年後にADまたは認知症になったヒトの睡眠の特徴は何か？

レム睡眠が少ない(ノンレム睡眠の特徴は見出されない) Pase et al. Neurology 89:1244 (2017)
レム睡眠がADの予防治療に有効である可能性

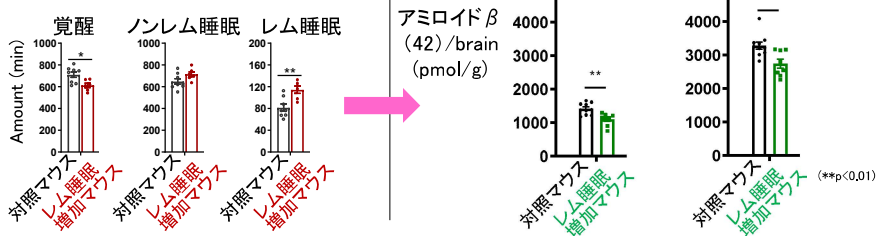
AD動物モデル: App^{NLGF} マウス(家族性アルツハイマー病の家系と同じ遺伝子変異を導入)
(理研の西道隆臣先生、名古屋市立大学の斉藤貴志先生らが開発)

App^{NLGF} マウスの睡眠と記憶学習能力の関係



App^{NLGF} マウスのレム睡眠を増やすとアミロイドβが減少

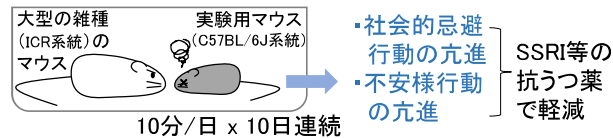
レム睡眠抑制細胞を破壊することで
レム睡眠を長期的に増加



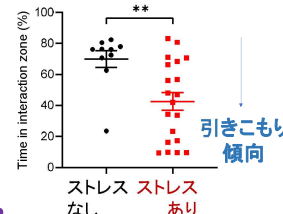
うつ病とレム睡眠

うつ病患者ではレム睡眠が増えていることが多い 悪い作用？良い作用？

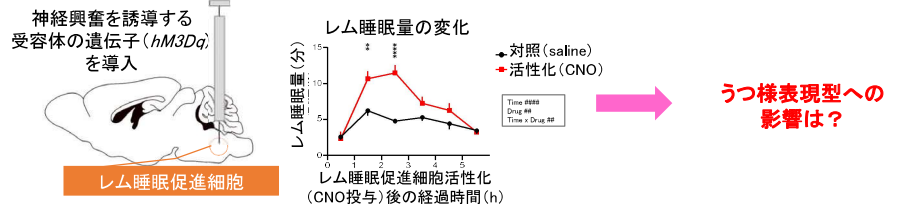
うつ病の動物モデル: 繰り返し社会敗北ストレスモデル



社会相互作用試験の結果

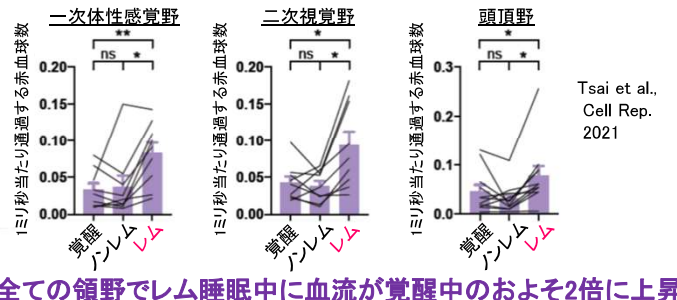
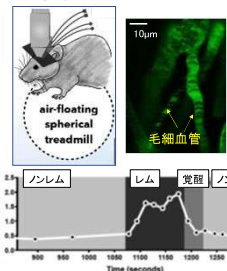


レム睡眠を増やすことの社会的敗北ストレスマウスへの影響は？



レム睡眠中の脳の血液循環の活性化

睡眠中の脳の毛細血管
の観察に成功



加齢・認知症・ストレス → レム睡眠をコントロールする細胞の機能の低下 → レム睡眠の減少・睡眠の質の低下・脳の血流の低下 → メンタルヘルスの悪化・認知機能の低下



人工細胞で切り拓く生命科学研究の現状と将来展望

宮崎 牧人

理化学研究所 生命機能科学研究センター / JSTさきがけ
E-mail: makito.miyazaki@riken.jp

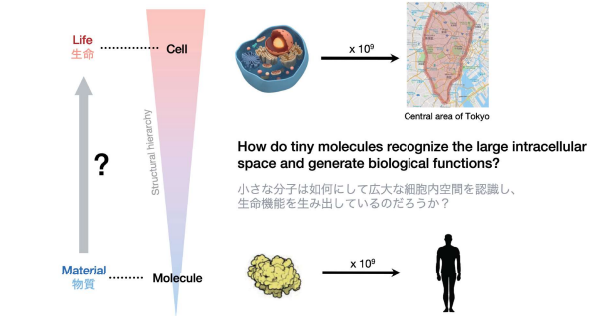
Overview

細胞は、分子から秩序構造を自己組織化する動的システムと捉えることができます。小さな分子はどのような仕組みで、細胞という広大な空間を認識し、適時適所で集合・離散しながら、細胞スケールの動的秩序や生命機能を生み出しているのでしょうか？私たちは、主に細胞骨格をモデル系として用い、**生細胞で観察される動的構造や機能が人工細胞で再現される条件を探る**という構成的手法で、この謎の解明に挑んでいます。分子の局所的な相互作用から、生命が成立する仕組みを紐解くことを目指しています。

Background ～分子から見た細胞内の世界とは？～

細胞の中には固有の機能を持つ様々な秩序構造があり、細胞はそれらの構造を自由自在に作っては壊すことで「生命」を維持しています。例えば、動物細胞はシグナル分子の濃度勾配が作る極性や、細胞骨格タンパク質による収縮ネットワークなどの時空間パターン構造を作っては壊すことで細胞の形を変え、運動や分裂などの機能を生み出していると考えられています。即ち、分子が適切なタイミングと場所で集合・離散しながら、次から次へと高次の動的秩序を生み出す現象こそが、すべての生物に共通する普遍的な特徴であり、生命の本質であると考えています。

細胞を「動かしている」主役は分子であり、分子から見た細胞内の世界は広大です。個々の分子の視点に立って細胞内の世界を想像すると、細胞の中で次々と生じている、分子から細胞スケールの秩序が自己組織化する現象は自明ではありません。なぜなら分子は、我々人間社会と異なり、近接する者同士の物理的接触を通じてしか「コミュニケーション」が取れませんが、それにも関わらず何らかの方法を駆使して広大な空間を認識し、適時適所で、しかもほとんどミスすることなく、自身の数百倍以上もある巨大な動的秩序を組み上げているのです。この何らかの方法とは一体どのようなものなのでしょうか？換言すれば、分子は局所的な相互作用をどのように組み合わせることで、集団として広大な空間を認識し、高次の秩序を生み出しているのでしょうか？この謎に迫ることで、分子という物質的基盤の上に「生命」が成立している仕組みが見えてくるはずです。

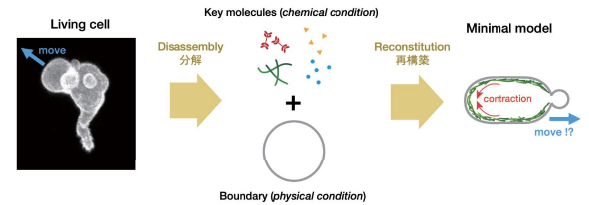


タンパク質 1 分子を人の大きさに例えると、細胞内の世界は巨大都市に匹敵するほど広大である。そんな世界において、分子はどのようにして広大な空間を認識し、細胞スケールの秩序を生み出しているのだろうか？

Our strategy ～分子から細胞を組み立てる、生きている細胞を自在に操る～

これまでの生命科学は、機能発現に関与する分子を特定し、その構造や細胞内での動態を観察することで発展してきました。「知る・見る」ことによって細胞の理解は格段に深まってきましたが、依然として分子から生命が成立する仕組みは大きな謎として残されています。私たちは細胞を「創る・操る」ことが、その謎の解明には欠かせないと考えています。

私たちは、生きている細胞を一旦バラバラに分解した後、これまでの「知る・見る」研究で得られてきた知見をもとに、着目している生命現象に本質的と考えられている「パーツ」を組み合わせ、**生きている細胞で観察される秩序構造や機能が人工細胞で再現される条件を探る**という構成的アプローチで研究を行っています。さらに再構成実験によって明らかになった仕組みが、生きている細胞でも働いていることを確かめるために、**細胞を自在に操る技術の開発を進めています**。人工細胞の構築と生細胞の操作を組み合わせることで、分子から生命が成立する仕組みを紐解きます。

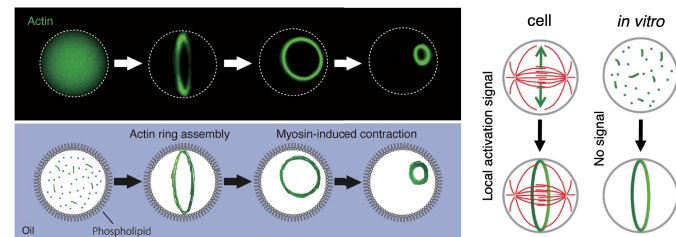


時計が動く仕組みを理解したいと思ったら、一旦バラバラに分解して組み立て直すことで、仕組みがみえてくるはずだ。私たちは同じことを細胞で試したい。

Key achievements

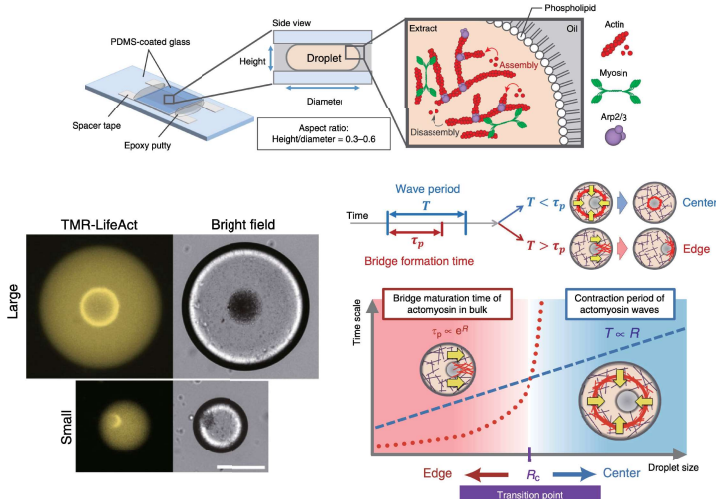
Reconstitution of contractile actomyosin rings

Miyazaki, Chiba, Eguchi, Ohki, Ishiwata, *Nat. Cell Biol.* 17, 480–489 (2015).



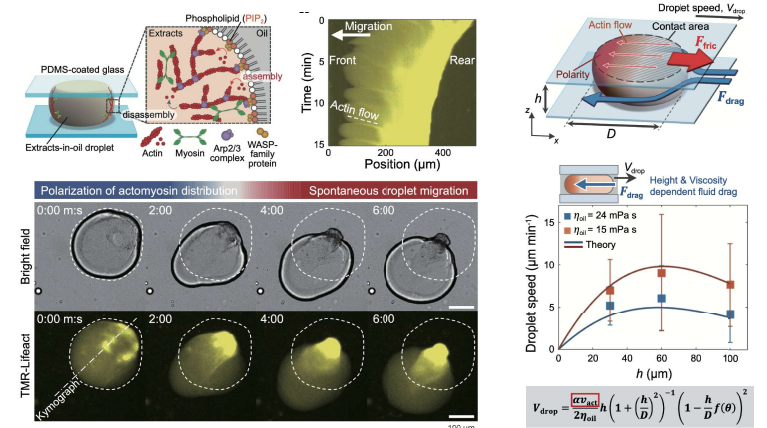
Reconstitution of regulation of intracellular positioning

Sakamoto, Tanabe, Hiraiwa, Suzuki, Ishiwata, Maeda, Miyazaki, *Nat. Commun.* 11, 3063 (2020).



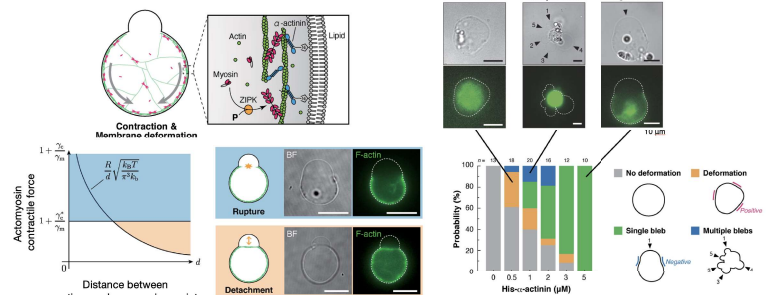
Reconstitution of amoeboid cell migration

Sakamoto, Izri, Shimamoto, Miyazaki, Maeda, *PNAS* 119, e2121147119 (2022).



Reconstitution of active actin cortex

Miyazaki, Laboni, Ichikawa, Kim, *MS in prep*



Future plan

- 細胞骨格が司る様々な細胞機能の制御メカニズムの構成的理解
- 再構成実験の汎用化を目指した基盤技術開発
- 人工細胞の発生生物学研究、組織工学研究への応用 (e.g. 生細胞との共存系の開発、生体組織への埋め込み、人工免疫細胞)



高速広視野 2 光子顕微鏡で拓く脳の新世界

<発表者>

村山 正宜

理化学研究所 脳神経科学研究センター チームリーダー

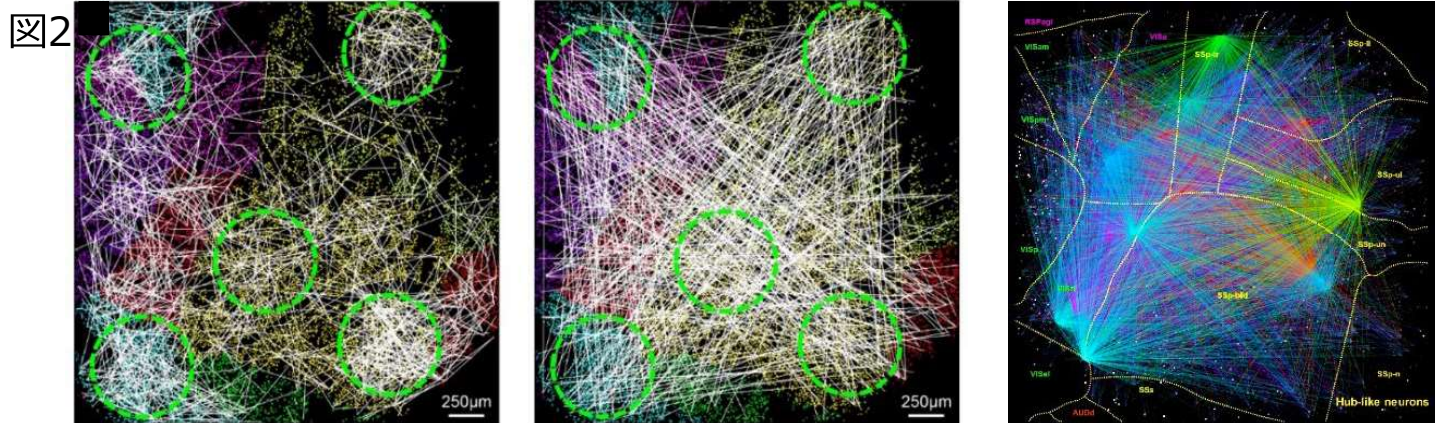


<概要>

脳は宇宙に例えられ、ヒトでは約1000億もの神経細胞が星々のごとく煌めき、無数の相互作用によって知覚、認知、記憶、そして意識が生まれると考えられています。近代天文学の分野では、400年以上前にガリレオが望遠鏡を自作し、宇宙の星々を精密に観測したことから本格的な宇宙の謎解きが始まりました。では、脳の謎解きはどのように行えばよいのでしょうか。今回、我々は生きた脳の広範囲から細胞レベルで神経活動を捉えることができる巨大顕微鏡を開発することに成功したので、その成果をご紹介します。この顕微鏡を用いることで新種細胞の発見や脳ネットワークの構造が明らかになりました。



左,中：低倍率かつ高開口数を実現する巨大レンズと大口径で高感度な光検出器（GaAsP-PMT）を共同開発。
右：従来の顕微鏡では視野が小さすぎて、マウスの脳を用いたとしても1脳領域の一部分しか観察できなかった。



左,中：大脳新皮質は、情報処理にエコなスモールワールドネットワークであった（白線は短・長距離リンクを示す）。
右：所謂、拠点となるようなハブ細胞が存在した（放射線を中心に位置。黄色線は脳領域の境界を示す）。

<研究開発のポイント>

- 巨大レンズを組み込んだ高速・広視野2光子顕微鏡を開発した。
- 従来の36倍に拡大した視野はマウス脳で10以上の脳領域を捉え、16,000個の神経活動を15Hzの高速スピードで撮像することに成功した。
- 大脳新皮質はスモールワールドネットワークであること、機能的に新種となるハブ細胞が存在することを発見した。
- 様々なモデル動物、神経細胞以外にも免疫細胞や皮膚細胞、また、脊髄など様々な臓器、オルガノイド、植物などに利用可能。





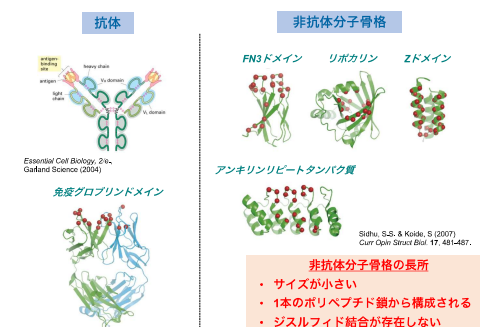
岡山大学
OKAYAMA UNIVERSITY

一本鎖モネリンを非抗体骨格タンパク質とする 人工結合タンパク質の作製基盤構築

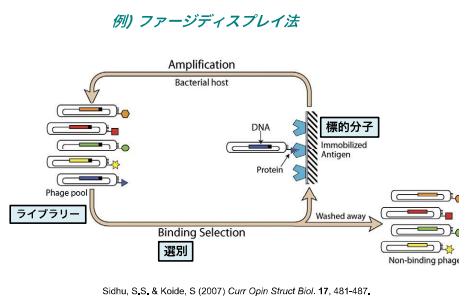
安井 典久 (やすい のりひさ)

岡山大学学術研究院医歯薬学域 (薬学系) ・ 准教授

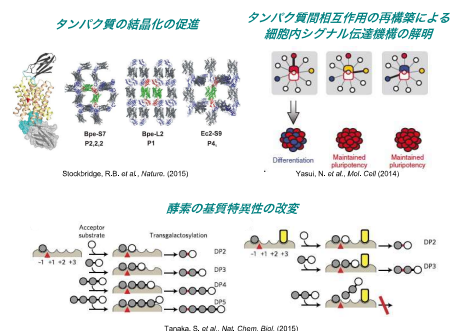
1. 非抗体骨格タンパク質を用いた人工結合タンパク質



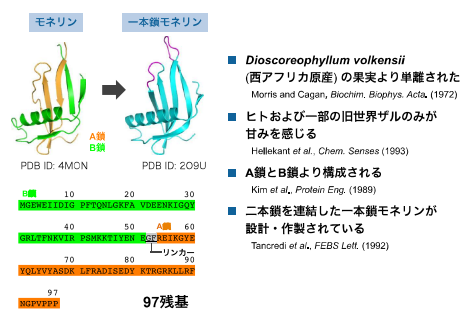
2. コンビナトリアルライブラリーの選別による人工結合タンパク質の作製



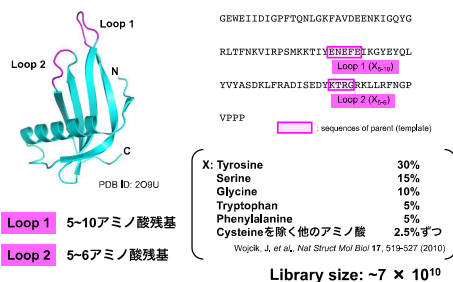
3. 人工結合タンパク質を利用した研究例



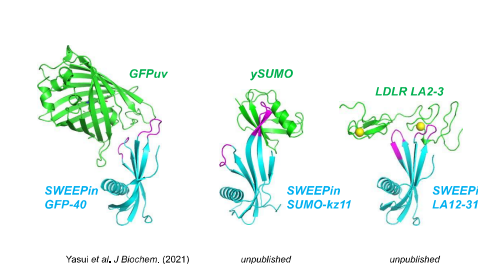
4. 甘味タンパク質モネリンと一本鎖モネリン



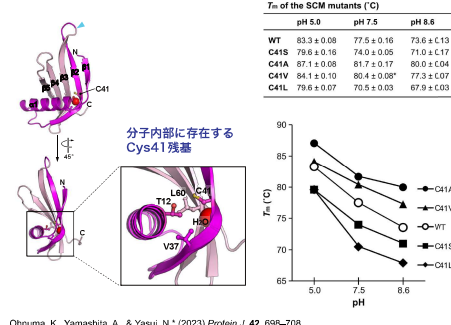
5. 一本鎖モネリンを非抗体骨格タンパク質とするバイアスライブラリーの設計と作製



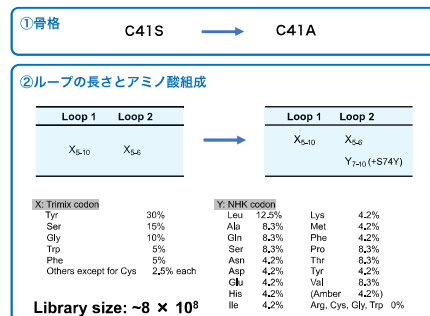
6. 結晶構造解析による人工結合タンパク質の標的タンパク質との結合様式の解明



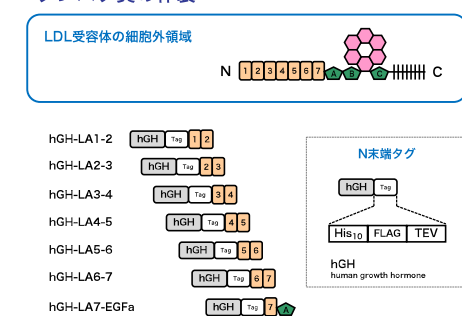
7. 変異導入による一本鎖モネリンの安定化



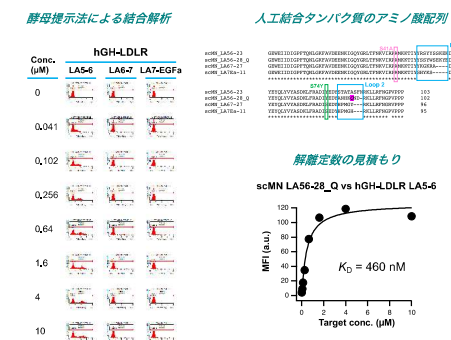
8. 新しいライブラリーの設計と作製



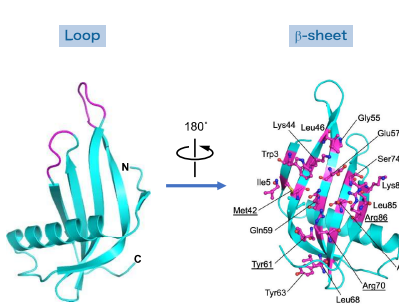
9. LDL受容体の細胞外領域に結合する人工結合タンパク質の作製



10. 新しいライブラリーから得られたLDL受容体に結合する人工結合タンパク質



11. 変異導入箇所を変更したライブラリーの設計



まとめ

- 一本鎖モネリンを非抗体骨格タンパク質とする10⁸~10¹⁰の多様性のファージディスプレイを作製した
- ファージディスプレイライブラリーの選別により様々な標的タンパク質に結合する一本鎖モネリン変異体を得ることができた
- 結晶構造解析などにより一本鎖モネリン変異体と標的タンパク質の相互作用様式の詳細を明らかにした
- 一本鎖モネリンの安定性向上により新しいライブラリーを設計・作製できることを示した
- 一本鎖モネリンを非抗体骨格タンパク質とする人工結合タンパク質を作製する基盤を構築した

参考文献

- Yasui, N., Nakamura, K., & Yamashita, A. (2021). A sweet protein monellin as a non-antibody scaffold for synthetic binding proteins. *Journal of biochemistry*, 169, 585-599.
- Ohnuma, K., Yamashita, A., & Yasui, N. (2023). Investigating the Effect of Substituting a Single Cysteine Residue on the Thermal Stability of an Engineered Sweet Protein, Single-Chain Monellin. *The protein journal*, 42, 698-708.





公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団
〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2
千里ライフサイエンスセンタービル20階
TEL:06-6873-2006 FAX:06-6873-2002
E-mail: smp-2022@senri-life.or.jp
URL: <https://www.senri-life.or.jp/>