

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と臨床応用に関する研究  
-高等動物モデル構築と生体リアルタイム観測法開発によるアプローチ

平成16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 星 美奈子

平成19（2007）年 4月

1/2 冊

## 目次

### I. 総合研究報告

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と 臨床応用に関する研究 星 美奈子	-----1
--	--------

(資料) 資料名

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----14
--------------------	---------

III. 研究成果の刊行物・別刷り	-----20
-------------------	---------

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総合研究報告書

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と臨床応用に関する研究  
-高等動物モデル構築と生体リアルタイム観測法開発によるアプローチ

主任研究者 星 美奈子 三菱化学生命科学研究所 アルツハイマー病発症機序解明チームリーダー  
東京工業大学 大学院生命理工学研究科 連携助教授

研究要旨

アルツハイマー病における認知症の原因となる、神経脱落を起こす「病的」 $\beta$ アミロイド ( $A\beta$ ) 凝集体の実態は未だ不明である。主任研究者は、「病的」 $A\beta$  凝集体の試験管モデルとして、最も神経毒性が強い新たな構造体「アミロスフェロイド」を同定した。本研究は、アミロスフェロイドを手掛かりに、異分野横断による新たな研究手法開発し、アルツハイマー病病態解明と臨床応用展開を目指す。そのために、倫理面に配慮し（1）アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、（2）脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な  $A\beta$  凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、（3）霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究を行い、以下の結果を得た。

- 1) ウサギ6羽、マウス・ハムスター50匹以上に免疫し、 $A\beta$  モノマーや  $A\beta$  線維に反応しない、アミロスフェロイド特異的抗体を複数種類確立することに成功した。
- 2) 上記抗体は立体構造を認識する抗体であり、ヒトアルツハイマー病脳を特異的にラベルした。さらに、この抗体により神経毒性のあるアミロスフェロイド（類似体）をアルツハイマー病脳から生化学的に単離することに成功した。
- 3) 上記抗体の中には、非常に効果的にアミロスフェロイドの神経細胞死活性を遮断するものがあった。
- 4) 各種標識  $A\beta$  を設計し、合成と精製方法を確立した。これを用いて、 $A\beta$  が凝集しアミロスフェロイドないしは線維を形成するまでの過程をリアルタイムに、かつ今何量体が存在するかを定量的に観測する手法の構築に成功した。
- 5) 剖検脳において、アミロスフェロイドを検出する早期診断系を開発する基礎実験として、まず蛍光相関分光法 (FCS) による抗原抗体反応モデル系として組み換え牛プリオン蛋白質 (rBoPrP) に対する検出限界値を検討した。さらに検出感度を高めるため、2色の蛍光色素を利用する蛍光相互相関分光法 (FCCS) を開発した。また、蛍光色素として、半導体量子ドット (Qdot) をプローブとして用い、組換え牛プリオンタンパク質 (rBoPrP) の検出向上を試みた。その結果、緩衝液中で rBoPrP を 0.029 nM まで検出することが可能であった。
- 6) アミロスフェロイド神経細胞死機構にはカルパインが関わることをラット初代培養神経細胞並びにマウス器官培養を用いて示した。そこで、カルパイン活性によって波長変化を起こす蛍光プローブの開発を行った。特に、細胞膜透過性を確保する分子デザインを行い、合成ステップを確立した。スイッチには Rhodamine のアニリンのアミド型・アミノ型構造変化による、重なり積分変化を用いて蛍光共鳴エネルギー移動速度が酵素反応前後で変化する、レシオ測定カルパインプローブをデザインし合成した。このプローブはカルパインとの反応によりレシオプローブとして機能することが示された。さらに、膜透過性を確保するために、膜透過性ペプチドを伸長する、合成ルートを考案した。
- 7) サル ES ないしはヒト骨髄間質細胞より分化誘導させた神経細胞を用いて、アミロスフェロイドはヒトを含む霊長類神経細胞、中でも成熟神経細胞に対する毒性が強いことを明らかにした。
- 8) アミロスフェロイドの生体内における病態を解析するために、カニクイサルを使用して海馬、被殻、大脳皮質に  $A\beta$ 1-40 または  $A\beta$ 1-42 由来のアミロスフェロイドを注入する実験を行った。また、神経細胞特異的にアミロイド前駆体蛋白を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを作製し、定位脳手術によりカニクイサルの海馬に投与した。アミロスフェロイドの単回注入および若年サルへの AAV 注入では、明らかな細胞死や老人斑の形成は認められなかった。今後、老齢サルでの検証が重要と考えられ、食事回収課題による認知機能評価を行い老齢サルの記憶容量を測定した

分担研究者氏名・所属機関・職名

佐藤一紀 福岡女子大学 人間環境学部 教授  
菊地和也 大阪大学 大学院工学研究科 教授  
金城政孝 北海道大学 電子科学研究所 助教授  
村松慎一 自治医科大学 内科学講座神経内科部門 助教授

A. 研究目的

本研究は、 $A\beta$  に由来する多様な凝集体の中で、非常に強力な神経毒性を持つ新たな球状  $A\beta$  凝集体「アミロスフェロイド」を手がかりに、アルツハイマー病発症の開始点である異常  $A\beta$  凝集体がいかに

形成され、神経細胞死を引き起こすかを解明し、最終的にはそれを阻止しようとするものである。そのために、(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なA $\beta$ 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究を行った。

## B. 研究方法

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和

ウサギ6羽、マウス・ハムスター50匹以上に免疫し、複数のアミロスフェロイド特異的抗体を得た。これを用いて剖検脳の免疫組織化学的解析を行った。さらに、AD脳から生化学的にアミロスフェロイド類似構造体を単離する方法を確立した。アミロスフェロイド神経毒性を抑制する中和抗体、形成を阻害する抗体も確立した。神経毒性は3重染色法

(propidium iodide, calcein-AM、ヘキスト)、またはcell death ELISA (ロッシュ社製の一部手法を改変) でアポトーシスを定量した。また、アミロスフェロイドを高感度に検出する系を固相ELISA並びに液相ELISAにより構築した。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なA $\beta$ 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

a. A $\beta$  及びその部分配列、突然変異体の合成

ペプチドは全てFmoc法により化学合成後、HPLCにより高純度に精製し、構造を質量分析とアミノ酸分析により確認した。A $\beta$ と突然変異体については、最近開発されたシュードプロリンジペプチドを用いたFmoc法を適用した。

b. 蛍光標識A $\beta$ の合成と精製

Fmoc-NH-SAL TentaGelを用いることで、A $\beta$ の適切な部位に、光褪色が小さい色素を導入した蛍光標識A $\beta$ の合成と精製に成功した。これを用いて凝集過程の観測手法の構築を行った。

c. 蛍光相関分光法(FCS)による抗原抗体反応の高感度検出

また、早期診断系の確立のために、上記ELISAに加えて、FCSによる系を検討した。そのため、緑色蛍光タンパク質GFPとGFP抗体をモデルとして、感度の比較を行った。さらに、プリオンタンパク質を用いた蛍光相互相関分光法(FCCS)によってさらなる高感度化を目指した。測定方法はどれもConfoCor2(カールツァイス社製)もしくはFCCS測定には、小型FCCS(浜松ホトニクスと共同開発)を用いた。本装置は、2本のLD励起固体レーザー(473, 635nm)、水浸対物レンズ(U-Apochromat, 40x, 1.15NA, オリンパス)、2つのPMT検出器(H8631-40, 浜松ホトニクス)から

成る。蛍光は570nmのダイクロイックミラーで分離し、495-575nmと650nm以上のフィルターを通した後、2つの検出器で受光した。

(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究

a. アミロスフェロイド神経細胞死機構の解明

ラット初代培養神経細胞並びにマウス(野生型並びにカルpain機能変異マウス)海馬器官培養を用いて神経細胞死過程の解析を行った。

b. 霊長類神経細胞における毒性の検証

カニクイサルのES細胞を使用して、ラットおよびマウス胎児の初代培養グリア細胞の条件培地中で浮遊培養する方法により効率よく大量の神経細胞を分化誘導した。未分化細胞、神経幹細胞、神経細胞の各段階において培地中にアミロスフェロイドを添加し、細胞毒性の有無を検討した。さらに、京都大学出澤先生より骨髄間質細胞より分化誘導した神経細胞の供与を受け、アミロスフェロイド投与実験を行った。

c. 神経細胞特異的遺伝子導入ベクターの開発

神経細胞特異的なプロモーターとしてCaMKあるいはSynIプロモーターによりGFPを発現する各種の血清型のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを複製し、マウス海馬への遺伝子導入を行った。

d. アミロスフェロイドの*in vivo*での毒性

カニクイサルを使用して定位脳手術により海馬、被殻、大脳皮質にA $\beta$ 1-40またはA $\beta$ 1-42由来のアミロスフェロイドを注入する実験を行った。

e. サル脳内へのAPP遺伝子導入

CAGプロモーターあるいは神経細胞特異的SynIプロモーターによりアミロイド前駆体蛋白(APP)を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(AAV-APP)を複製した。カニクイサル3頭の脳内へAAV-APPを定位手術的に注入し、免疫組織化学・生化学的に検索した。

f. 老齢サルの認知機能評価

アミロスフェロイド形成による認知機能の変化を検出する評価法を確立するために、記憶に基づいて9穴から順次リング片を回収するときの誤動作を測定する食事回収課題を老齢サルに施行した。

(倫理面への配慮)

各研究者は、総理府告示「動物の処分法に関する指針」(平成7年第40号)、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、総理府「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、文部省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、所属機関における動物実験指針、ヒトサンプルに関する倫理委員会の承認のもと研究を行っている。さらにインフォームドコンセントに基づいて得られたヒトサンプルのみを解析に供しているが、今後も倫理規定を遵守して研究を行う。

### C. 研究結果

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和

モノマーや線維に反応しない、アミロスフェロイド特異的ポリクローナル抗体を得ることに成功した。これらの抗体は、非常に高い抗体価を持ち、ヒト脳の免疫組織学的解析においても患者脳に特異的染色を示した。このアミロスフェロイド特異的抗体により、ヒトアルツハイマー病脳からアミロスフェロイドを生化学的に単離し、単離したヒトアミロスフェロイドに非常に強い神経毒性があることを示した。ヒトアミロスフェロイドは発症初期から10年程度のアルツハイマー病脳に有意に多く存在していた。

アミロスフェロイド特異的抗体のあるものは、アミロスフェロイドによる神経細胞死を非常に効果的に阻止する効果も持つことが明らかとなった。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な $\text{A}\beta$ 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

#### a. $\text{A}\beta$ 及びその部分配列、突然変異体の合成

最近、開発されたシュードプロリンジペプチドを用いた Fmoc 固相合成法により、 $\text{A}\beta$  と arctic ないしは tottori 突然変異を持つ  $\text{A}\beta$  を合成し、より純度の高い粗ペプチドを得、逆相 HPLC により精製した。これら突然変異  $\text{A}\beta$  も回転攪拌することでアミロスフェロイドを形成することを初めて見出した。

各種溶媒環境におけるアミロスフェロイド形成を検証し、アミロスフェロイドは生理的な溶媒環境下、特にリン酸緩衝液の存在下で回転攪拌することで最も良く形成される一方、線維は緩衝剤の有無を問わず酸性条件、即ちタンパク質の変性条件下で形成されることを明らかにした。従って、アミロスフェロイドは線維の中間体とは考えにくい。さらに、溶媒環境を問わず神経毒性は10-15 nmのアミロスフェロイド形成量とのみ相関していることを明らかにした。

#### b. 蛍光標識 $\text{A}\beta$ の合成と精製

蛍光標識  $\text{A}\beta$  を合成した。Fmoc-NH-SAL TentaGel を担体とし、まず  $\text{A}\beta$  の N 端ないしは C 端に、光褪色が小さい色素を導入し、測定に十分な蛍光量子収率( $\Phi$ )を持つ蛍光標識  $\text{A}\beta$  の合成精製法を確立した。さらに、 $\text{A}\beta$  部分配列で得た知見を基に、アミロスフェロイド形成に直接影響しない部位を蛍光標識した。各種  $\text{A}\beta$  標識体の合成精製方法を確立した。これを用いて  $\text{A}\beta$  が凝集しアミロスフェロイドないしは線維を形成するまでの過程を刻々とリアルタイムに、かつ定量的に今何量体が存在するかを観測する手法の構築に成功した。 $\text{A}\beta$  初期濃度と凝集プロセスの時間経過の関係は、以前、透過型電子顕微鏡観察により得た知見とほぼ相関していた。

#### c. 蛍光相関分光法 (FCS) による抗原抗体反応の高感度検出

アミロスフェロイド特異的抗体による高感度

ELISA 検出系を構築した。しかし、より少量の試料により高感度な検出を可能にするため、GFP と GFP 抗体をモデルに、従来法 (ELISA) と FCS による抗原抗体反応の感度を比較した。さらに、プリオン感染マウスを用いて、FCCS の検出限界値を検討した。検出には、Alexa488 と Alexa647 でそれぞれ蛍光標識した 72 (0.1 nM) と 44B1 (0.09 nM) を用いた。室温での 60 分間の抗原抗体反応の後、FCCS 測定を行った。検出感度は、測定後に得られる相互相関関数の振幅を指標に決定した。ここで相互相関関数の振幅は、PrP と 72-Alexa532、44B1-Alexa647 から成る 3 量体の量に比例する。その結果、FCCS を用いてプリオン感染マウスから 4 の 6 乗倍希釈まで PrP を検出することが可能であった。この検出感度は、フレライザ BSE の検出感度と同程度であった。r BoPrP を用いて 4 の 6 乗倍希釈の試料中の PrP 濃度を算出したところ、0.13 nM であった。この値は、前回報告した緩衝液中および牛脳抽出液中での r BoPrP の検出限界値と一致した。

次に、Qdot をプローブとして用いた場合の FCCS の検出限界値を検討した。検出対象は r BoPrP とし、緩衝液中 (PBS, pH 7.3) での検出を試みた。検出には、44B1-Alexa488 (0.22 nM) と 72-Qdot655 (0.27 nM) の組み合わせを用いた。0.23 nM rBoPrP での相互相関関数の振幅値を比較した場合、プローブとして Qdot を用いた場合は Alexa を用いた場合の約 5 倍の振幅値だった。検出限界値は、Qdot655 を用いた場合  $0.029 \pm 0$  nM ( $n=3$ ) だった。比較のために、44B1-Alexa488 と 72-Alexa647、72-Alexa488 と 4 4B1-Alexa647 を用いて行ったところ、検出感度はそれぞれ  $0.37 \pm 0.49$  nM ( $n=3$ )、 $0.19 \pm 0.23$  nM ( $n=3$ ) だった。

タンパク質の凝集過程を解析するための数理解析手法の構築を目指し、 $\text{A}\beta$  を利用して凝集過程を解析した。時間とともに凝集する過程を分布関数として解析し、表現することができた。また、膜タンパク質の凝集過程も解析を行い、シャペロンの有無により、膜タンパク質が凝集から解離、またはその逆過程を行うこと検出することができた。以上のように、CONTIN を用いた分布解析の方法の確立が行えた。

(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究

#### a. アミロスフェロイド神経細胞死機構の解明

アミロスフェロイド毒性にはカルパインの活性化が関わることを示す証拠を得た。そこで、カルパイン可視化プローブをデザインし合成を行った。酵素反応開始後、各時間にサンプリングしてプローブ濃度が 1.0  $\mu\text{M}$  になるように希釈し、蛍光スペクトルを測定したところ、ドナーである coumarin の励起波長 400 nm で励起したところ coumarin 蛍光を示した。calpain I を添加したところ、coumarin 由来の蛍光が減少し、蛍光波長がシフトしたことから、レシオプローブとして機能することが示された。

さらに、細胞膜透過性を確保するために、2 種類

の合成法を考案した。1つめはプローブのカルボン酸基をアセトキシメチル基で修飾する手法である。この手法を用いればプローブの負電荷をなくして細胞膜内に受動的に取り込まれ、エステラーゼ活性によって加水分解されることで細胞内に留まるプローブを作製できる。2つめは膜透過性ペプチドであるポリアルギニンを基質であるペプチド配列の先に導入するデザインである。このうち、膜透過性ペプチドの導入は、ペプチド合成機を用いた手法を組み込むことで簡便に合成できることが示された。

#### b. 霊長類神経細胞における毒性の検証

カニクイサルの ES 細胞から分化誘導した神経細胞の培地中に 10 $\mu$ M のアミロスフェロイドを添加すると、40 時間後には生存細胞数は 20% にまで減少した。一方、未分化 ES 細胞と Nestin 陽性の神経前駆細胞では、細胞数に変化はなかった。ヒト骨髄間質細胞から分化誘導した神経細胞の場合も、機能的により成熟した神経細胞がより多く神経細胞死を起こすことが明らかになった。従って、アミロスフェロイドはヒトを含む霊長類神経細胞、特に成熟神経細胞に毒性を発揮することが示された。

#### c. 神経細胞特異的遺伝子導入ベクターの開発

各血清型 AAV のうち、AAV-3 ベクターは、培養神経細胞へ効率よく遺伝子導入した。AAV-5 ベクターは、マウスおよびラットの脳内で広範囲の遺伝子導入が可能であった。AAV-8 は、マウスの尾静脈からの注入によって脳内の神経細胞に遺伝子発現が得られた。SynI プロモーターにより、神経細胞選択的な遺伝子発現が得られた。

#### d. アミロスフェロイドの *in vivo* での毒性

15 歳齢のカニクイサルにおいては、海馬、被殻、大脳皮質に A $\beta$ 1-40 または A $\beta$ 1-42 由来のアミロスフェロイドを単回注入した後の組織解析で、明らかな神経細胞死や老人斑の形成は誘発されなかった。

#### e. サル脳内への APP 遺伝子導入

神経細胞特異的 SynI プロモーターにより APP を発現する AAV を海馬と大脳皮質に注入した 2 頭の若年サルでは、6 か月後の組織解析では、明らかな細胞脱落は認められなかった。CAG プロモーターを搭載した AAV ベクターを海馬に注入した老齢サルについては、注入直後の MRI により、海馬の広範な領域にベクターが拡散していることが確認できた。

#### f. 老齢サルの認知機能評価

食事回収課題により老齢サルの記憶容量は連続正ストローク数として測定可能であった。

#### D. 考察

(1) 今回の研究により、患者脳でアミロスフェロイドが存在し、神経毒性があることを実証したことで、アミロスフェロイドは基礎研究のみならず、創薬ターゲットとしても有望であることが示された。実際に、今回、アミロスフェロイド認識抗体

だけでなく、機能的抗体、即ちアミロスフェロイド毒性中和抗体並びに形成阻害抗体も確立したため、今後治療への展開も期待出来る。得られた中和抗体は世界的に見ても非常に低濃度で毒性を中和する抗体である。

(2) 今回の検討から、アミロスフェロイドは病態解明のためのよい入り口であることが改めて示された。なぜなら、A $\beta$  内部配列に変異が生じる家族性アルツハイマー病原因遺伝子 arctic, toffori 変異を持つ A $\beta$  も、アミロスフェロイドを形成し毒性を発揮した。また、アミロスフェロイド形成は生理的環境下で最も促進されるが、その場合も溶媒環境を問わず、毒性は 10-15 nm のアミロスフェロイド存在量と関連していた。従って、アミロスフェロイドの形成機構と毒性発現機序の解明は、疾病への理解を促し、治療・予防などの応用につながるものが期待される。現在進めている、構造変化部位の検証が今後鍵となる。

(3) 現在、タンパク質の自己凝集プロセスを溶液中でそのまま観測する手法は存在しない。今回、適切な部位に標識を入れることで、世界で初めてごく微量の試料を溶液中でそのまま定量的かつ経時的に凝集過程を観測することを可能にした。これにより、アミロスフェロイドに至る凝集過程と線維に至る凝集過程は異なることを明確に示した。さらに、標識部位を変えることで、今まで技術的に困難であった凝集の中間過程も解析することが可能となった。診断並びに治療効果の検定には、非侵襲的画像診断法が非常に重要である。現在存在する A $\beta$  プローブは MPI であれ PET であれ老人斑に含まれる線維の可視化を目的にデザインされており、アミロスフェロイドを初めとする神経細胞死の原因となるより小さい可溶性オリゴマーを可視化出来るものはない。今回、構築したリアルタイム観測手法は新たな非侵襲的画像診断法構築の重要な基盤となる方法であり、これを下にヒト脳でのイメージングに今後取り組む予定である。

(4) 重なり積分変化をスイッチとすることで FRET 型レシオ測定カルバインプローブをデザイン・合成した。さらに、膜透過性プローブ合成法確立を行い、容易に実行可能である生物活性測定実験系を供出できる。このプローブの生細胞内への応用によって、脳神経系におけるカルバイン活性と他のシグナル伝達物質の機能相関を明らかにできると考えられる。

(5) 今回確立したアミロスフェロイド特異的抗体による高感度 ELISA 系を構築した。FCCS 測定では、通常 2 つの波長で 2 つの蛍光分子を励起し、2 つの検出器で受けた 2 つのゆらぎの相互相関を評価する。相互相関関数の振幅は、2 つの蛍光分子の相関に比例するが、2 つの共焦点領域の重なりにも規定される。したがって、2 つのレーザー光の光軸合わせと観察領域を規定するピンホール合わせに気を配り、2 つの共焦点領域を一致させねばなら

ない。今回新たにプローブとして用いた Qdot は、短波長領域に吸収域をもつため、一波長励起多波長発光が可能となる。したがって、今回用いた Qdot655 と Alexa488 の組み合わせに対しても、1つのレーザーのみを用いた一波長励起 (473 nm) が可能となる。これにより、レーザー光の光軸のズレによって生じる相互相関数の振幅の減弱が改善され、S/N が高くなることが期待できる。加えて、Qdot 一分子あたりに多分子の抗体を融合させることが可能となるため、PrP に対する一分子のプローブあたりの親和性が増し、検出感度の向上が期待される。Qdot には Fab が4分子結合していると推測される。したがって、今回の Qdot を用いた場合の検出感度の向上は、PrP に対する一 Qdot あたりの親和性が Alexa を用いた場合よりも高かったためと推測する。Qdot を用いることによって光源を1つにできるため、装置の簡素化・低額化が可能となり、より検査場に適した小型・安価な装置の製造が期待できる。今後は、Qdot への抗体の結合法の検討とプリオン感染牛からの PrP<sup>Sc</sup> 検出を試みたい。また、明らかになった問題点として、分布解析を行う上で、一成分もしくは2成分を固定して解析する必要があることが判明した。これらは本法が細胞内微環境や生体分子間相互作用を解析するためには重要なため来年度も引き続き構築することを目指す必要がある。

(5) アミロスフェロイドがヒトを初めとする霊長類神経細胞に毒性があることがわかった。分化誘導した霊長類神経細胞の系を活用することで、アミロスフェロイド毒性を阻害する低分子薬剤のスクリーニングが可能となる。また、得られた薬剤の安全性についても、ヒトに投与する以前に、ヒト由来神経細胞にて検証することが可能である。

(6) カニクイサルの ES 細胞を応用した実験により、アミロスフェロイドが霊長類の神経細胞において毒性を発揮することが明らかになった。アミロスフェロイドの添加実験では、分化した神経細胞にのみ細胞毒性が認められ、未分化 ES 細胞や神経前駆細胞には明らかな細胞毒性は認められなかった。今後、ヒトの ES 細胞を使用してそれぞれの分化段階の純化した細胞集団から mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイによる解析を行うことにより、毒性発現に関わる分子機構を明らかできると考えられる。

カニクイサルの脳内へのアミロスフェロイドの単回注入では、明らかな毒性は認められなかった。培養細胞と異なり、脳内では手術操作による一時的な炎症とそれによるアミロスフェロイド除去反応が生じる可能性などが考えられるため、持続してアミロスフェロイドを作用させることが望ましい。そのため、AAVベクターにより APP を発現させる方法を開発した。2型あるいは3型 AAV ベクターを使用すれば神経細胞にほぼ選択的に遺伝子導入できるが、SynI プロモーターを使用することで神経細胞特異的に

APP を発現できる。若年サル大脳皮質および海馬への AAV-APP の注入では、明らかな神経細胞死は認めなかったが、若年サルでは、アミロイド分解酵素であるネプリライシンの活性が高いなど、種々の解毒作用が働いている可能性がある。今後、老齢サルの脳組織を詳細に解析することにより、神経細胞死の誘導とアミロスフェロイドが毒性を発揮する局面を捕捉できるものと考えられる。

モデルサルの作製にあたり認知障害の有無やその程度を評価する必要があるが、食事回収課題により高齡ザルの記憶容量について測定できることを明らかにした。

## E. 結論

今年度の検討から、以下の結論が得られた。

(1) 今回、非常にアミロスフェロイド選択性の高い複数の抗体を得ることが出来た。

(2) 上記を用いて世界で初めてヒト患者脳より神経毒性のある A $\beta$  凝集体を単離することに成功した。また、神経毒性を中和する抗体も複数確立することが出来た。

(3) 毒性は常にアミロスフェロイドに相関するため、その形成と毒性発現機序の解明は病態理解に非常に有効であることが示された。形成機構について重要な手がかりが得られた。

(4) アミロスフェロイド形成のリアルタイム観測法構築に成功した。

(5) レシオ測定が可能であるカルパイン活性測定膜透過性蛍光プローブの合成手法を確立した。

(6) プリオンをモデル系に生体内タンパク質高感度検出法を構築した。蛍光相関分光法 (FCS) だけではなく蛍光相互相関分光法を用いた解析において、抗原抗体反応は非常に感度の高い方法である。

(7) 霊長類神経への毒性を検証する過程で、アミロスフェロイドは未分化 ES 細胞や神経前駆細胞には毒性がなく、神経、それもより成熟した神経に対して強い毒性を発揮することを世界で初めて明らかにした。

(8) アルツハイマー病におけるアミロスフェロイドの神経細胞に対する毒性の発現機構の解明を目標として研究を行った。カニクイサル ES 細胞を応用した実験によりアミロスフェロイドは分化した神経細胞に対し選択的な毒性を示すことを明らかにした。アミロイド前駆体蛋白 (APP) を発現する AAV ベクターを作製し、カニクイサルの脳内でのアミロスフェロイドの形成を試みた。老齢サルにおける記憶容量の測定法を検証した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Watanabe, A., Okahata, Y., Furusawa, H., Hoshi, M. and Sakurai, M.: The effect of Trehalose on the aggregation of  $\beta$ -amyloid Cryobiology and Cryotechnology 51, 137-140, 2006

- 2)Noguchi, A., Matsumura, S., Sato, M., Akioka, M., Ito, A., Tada, M., Ideno, S., Noda, M., Muramatsu, S., Itokazu, Y., Sato, K., Takahashi, H., Nabeshima, Y., Dezawa, M., Teplow, D., Kakita, A., Hoshi, M.: Direct identification of neurotoxic, spherical A $\beta$  oligomers (amylospheroids) in Alzheimer's disease brain (submitted to Nature).
- 3) T. Komatsu, K. Kikuchi, H. Takakusa, K. Hanaoka, T. Ueno, M. Kamiya, Y. Urano & T. Nagano. Design and Synthesis of an Enzyme Activity-Based Labeling Molecule with Fluorescence Spectral Change. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15946-15947 (2006)
- 4) T. Terai, K. Kikuchi, S. Iwasawa, T. Kawabe, Y. Hirata, Y. Urano & T. Nagano. Modulation of Luminescence Intensity of Lanthanide Complexes by Photoinduced Electron Transfer and Its Application to a Long-Lived Protease Probe. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6938-6946 (2006)
- 5) A. Minami, N. Sakurada, S. Fuke, K. Kikuchi, T. Nagano, N. Oku & A. Takeda. Inhibition of Presynaptic Activity by Zinc Released From Mossy Terminals During Tetanic Stimulation. *J. Neurosci. Res.*, **83**, 167-176 (2006)
- 6) Konno H, Murakami-Fuse T, Fujii F, Koyama F, Ueoka-Nakanishi H, Pack CG, Kinjo M and Hisabori T. The regulator of the F1 motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F1-ATPase by the epsilon subunit. *EMBO J.* 2006 Oct 4;25(19):4596-4604.
- 7) Jin T, Fujii F, Yamada E, Nodasaka Y and Kinjo M. Control of the optical properties of quantum dots by surface coating with calix[n]arene carboxylic acids. *J Am Chem Soc.* 2006 Jul 26;128(29):9288-9289.
- 8) Shintaro Mikuni, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Letters* 581, 389-393, (2007)
- 9) Rieko Oyama, Hideaki Takashima, Masato Yonezawa, Nobuhide Doi, Etsuko Miyamoto-Sato, Masataka Kinjo and Hiroshi Yanagawa. Protein-protein interaction analysis by C-terminally specific fluorescence labeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, No. 14 e102 (2006)
- 10) Changi Pack, Kenta Saito, Mamoru Tamura, and Masataka Kinjo. Microenvironment and effect of energy depletion in the nucleus analyzed by mobility of multiple oligomeric EGFPs. *Biophys J.* vol 91 3921-3936 (2006)
- 11) Yu Ohsugi, Kenta Saito, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Lateral Mobility of Membrane-Binding Proteins in Living Cells Measured by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys J.* 91, 3456-3464 (2006)
- 12) Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Chan-Gi Pack, Gen Matsumoto, Shoshiro Hirayama, Yasuo Takahashi, Hiroshi Kimura, Masataka Kinjo, Richard I. Morimoto and Kazuhiro Nagata. Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nature Cell Biology* 8(10):1163-1169 (2006)
- 13) Shigecko Kawai-Noma Satoru Ayano, Chan-Gi Pack, Masataka Kinjo, Masasuke Yoshida, Kenji Yasuda and Hideki Taguchi. Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. *Genes to Cells* 11, 1085-1096, (2006)
- 14) Hideki Muto, Issei Nagao, Taku Demura, Hiroo Fukuda, Masataka Kinjo, and Kotaro T. Yamamoto. Fluorescence cross-correlation analyses of molecular interaction between an Aux/IAA protein, MSG2/IAA19, and protein-protein interaction domains of auxin response factors of Arabidopsis expressed in HeLa cells *Plant Cell Physiol.*, 47, 1095-1101 (2006)
- 15) Takako Kogure, Satoshi Karasawa, Toshio Araki, Kenta Saito, Masataka Kinjo, and Atsushi Miyawaki A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Biotechnol* 30, 577-581 (2006).
- 16) Yasutomo Nomura, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura and Masataka Kinjo. Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 350, 196-201 (2006)
- 17) Wakamatsu M, Ishii A, Iwata S, Sakagami J, Ukai Y, Ono M, Kanbe D, Muramatsu S, Kobayashi K, Iwatsubo T, Yoshimoto M: Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human  $\alpha$ -synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, *in press*.
- 18) Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M: Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci Res*, *in press*.
- 19) 村松慎一 : アデノ随伴ウイルスベクターを応用したパーキンソン病の遺伝子治療. *機能的脳神経外科*, 45(2): 148-152, 2006.
- 20) 村松慎一 : ES細胞によるParkinson病の移植治療—臨床応用への課題. *医学のあゆみ*. 217(5): 371-376, 2006.
- 21) 三國新太郎, 金城政孝 : 細胞生物学における蛍光相関分光法と蛍光相互相関分光法. *蛋白質核酸酵素* 51, 1998-2005 (2006)
- 22) Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J. S., Sato, K., and Tytgat, J.: Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to  $\kappa$ -KTx1.3, a non-toxic homologue of  $\kappa$ -hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. *Biochemical Pharmacology*, **69**, 669-678 (2005)
- 23) K. Komatsu, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima & T.



- Nagano. Selective Zinc Sensor Molecules with Various Affinities for  $Zn^{2+}$ , Revealing Dynamics and Regional Distribution of Synaptically Released  $Zn^{2+}$  in Hippocampal Slices. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10197-10204 (2005)
- 24) L.A. van Meeteren, P. Ruurs, E. Christodoulou, J.W. Goding, H. Takakusa, K. Kikuchi, A. Perrakis, T. Nagano & W.H. Moolenaar. Inhibition of Autotaxin by Lysophosphatidic Acid and Sphingosine-1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **280**, 21155-21161 (2005)
- 25) R.A. Colvin, P. Fontaine, D. Thomas, T. Hirano, T. Nagano & K. Kikuchi. Evidence for pH Dependent  $Zn^{2+}$  Influx in K562 Erythroleukemia Cells: Studies Using ZnAF-2F Fluorescence and  $Zn^{65(2+)}$  Uptake. *Arch. Biochem. Biophys.*, **442**, 222-228 (2005)
- 26) Yasutomo Nomura a., Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura, Masataka Kinjo. Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 350 196-201, (2006)
- 27) Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I and Ozawa K: Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Exp Opin Biol Ther*, 5(5):663-671,2005.
- 28) Maruyama M, Higuchi M, Takaki Y, Matsuba Y, Tanji H, Nemoto M, Tomita N, Matsui T, Iwata N, Mizukami H, Muramatsu S, Ozawa K, Saido TC, Arai H and Sasaki H: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 57(6):832-842,2005.
- 29) Liu Y, Okada T, Sheykholeslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K and Ozawa K: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther*,12(4):725-733,2005.
- 30) Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*,13(1):160-166,2006.
- 31) Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K and Hanazono H: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*, *in press*
- 32) Maya Hirose, Hideki Tohda, Yuko Giga-Hama, Reiko Tsushima, Tamotsu Zako, Ryo Iizuka, Changi Pack, Masataka Kinjo, Noriyuki Ishii, and Masafumi Yohda: Interaction of a small heat shock protein of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, with a denatured protein at elevated temperature *J. Biol. Chem*;280, 32586-32593 (2005)
- 33) Takashi Jin, Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo: Amphiphilic p-sulfonatocalix[4]arene-coated CdSe-ZnS quantum dots for the optical detection of the neurotransmitter acetylcholine: *Chem. Commun.* 4300-4302 (2005)
- 34) Yasuo Takahashi, Ryuji Sawada, Kiyochika Ishibashi, Sintarou Mikuni and Masataka Kinjo Analysis of Cellular Functions by Multipoint Fluorescence Correlation Spectroscopy *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6, 159-156 (2005)
- 35) Takashi Jin, Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo Calixarene-coated water-soluble CdSe/ZnS semiconductor quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution, *Chem. Commun.* 2829-2831 (2005)
- 36) 星美奈子: 分子の探索からシステムの解明へーアルツハイマー病研究に想う神経科学の今後への私感 繊維と工業 62, 17-18, 2006
- 37) 中林孝和、飯森俊文、金城政孝、太田信廣 蛍光寿命イメージングシステムの作成と生体試料および高分子試料への応用:分光研究 55、31-39 (2006)
- 38) D. Okada, C.C. Yap, H. Kojima, K. Kikuchi & T. Nagano. Distinct Glutamate Receptors Govern Differential Levels of Nitric Oxide Production in a Layer-specific Manner in the Rat Cerebellar Cortex. *Neuroscience*, **125**, 461-472 (2004)
- 39) K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano. Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12470-12476 (2004)
- 40) Y. Hu, K.N. Houk, K. Kikuchi, K. Hotta, & D. Hilvert. Nonspecific Medium Effects versus Specific Group Positioning in the Antibody and Albumin Catalysis of the Base-Promoted Ring-Opening Reactions of Benzisoxazoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8197-8205 (2004)
- 41) Akiko Masuda, Kiminori Ushida, Goro Nishimura, Masataka Kinjo, and Mamoru Tamura, Hiroyuki Koshino, Koichi Yamashita, and Thomas Kluge Experimental evidence of distance-dependent diffusion coefficients of a globular protein observed in polymer aqueous solution forming a network structure on nanometer scale. *J. Chem. Phys.* 121.10787-10793 (2004)
- 42) Yasutomo Nomura, and Masataka Kinjo Real-time monitoring of in vitro transcriptional RNA using fluorescence correlation spectroscopy. *ChemBioChem* 5, 1701-1703 (2004)
- 43) Kenji Watanabe, Kenta Saito, Masataka Kinjo, Tadashi Matsuda, Mamoru Tamura, Shigeyuki Kon, Toshimitsu Ueda and Tadaaki Miyazaki Molecular dynamics of STAT3 on IL-6 signaling pathway in living cells *Biochem. Biophys. Res. Comm* 324, 1264-1273 (2004)

- 44) Asako Kamada, Hisao Nagaya, Taku Tamura, Masataka Kinjo, Hai-Ying Jin, Toshiharu Yamashita, Kowichi Jimbow, Hideo Kanoh and Ikuo Wada Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum *J Biol Chem* 279, 21533-21542 (2004)
- 45) Kenta Saito; Ikuo Wada; Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Direct detection of caspase-3 activation in single live cells by cross-correlation analysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 324/2 849-854 (2004)
- 46) K. Kikuchi, K. Komatsu & T. Nagano. Zinc Sensing for Cellular Applications. *Curr. Opi. Chem. Biol.*, **8**, 182-191 (2004)
- 47) Lee C.-W., Lee, E.-H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin S.-Y., Kim, D.-H., and Kim, J.-I.: Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. *Biochem. J.*, **377**, 385-394 (2004)
- 78) Manita, S., Kawamura, Y., Sato, K., Inoue, M., Kudo, Y., and Miyakawa, H.: Adenosine A<sub>1</sub>-receptor-mediated tonic inhibition of glutamate release at rat hippocampal Ca<sub>3</sub>-CA1 synapses in primarily due to inhibition of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur. J. Pharmacology*, **499**, 265-274 (2004)
- 49) Nakamura, M., Ishida, Y., Kohno, T., Sato, K., Oba, Y., and Nakamura, H.: Effects of modification at the fifth residue of  $\mu$ -conotoxin GIIIA with bulky tags in the electrically stimulated contraction of the rat diaphragm. *J. Peptide Res.*, **64**, 110-117 (2004)
- 50) Nakai H, Fuess S, Storm T A, Muramatsu S, Nara Y and Kay M A: Unrestricted hepatocyte transduction with AAV serotype 8 vectors in mice. *J Virol*, 79(1):214-224, 2005.
- 51) Thwin M.-M., Douni, E., Aidinis, V., Kollias, G., Kodama, K., Sato, K., Satish, R. L., Mahendran, R., and Gopalakrishnakone, P.: Effect of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitory peptide on inflammatory arthritis in a TNF transgenic mouse model: a time-course ultrastructural study. *Arthritis Research & Therapy*, **6**, 282-294 (2004)
- 52) T. Yogo, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T. Nagano. Modification of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Dynamics by Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Using Membrane-permeant Probes. *Chemistry & Biology*, **11**, 1053-1058 (2004)
- 53) E. Kawabata, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, A. Odani & T. Nagano. Design and Synthesis of Zinc-Selective Chelators for Extracellular Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 818-819 (2005)
- 54) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K and Hanazono Y: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther*, 12(3):203-210, 2005.
- 55) E. Sasaki, H. Kojima, H. Nishimatsu, Y. Urano, K. Kikuchi, Y. Hirata & T. Nagano. Highly Sensitive Near-infrared Fluorescence Probes for Nitric Oxide and Their Application to Isolated Organs. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 3684-3685 (2005)
- 56) Y. Gabe, Y. Urano, K. Kikuchi, H. Kojima & T. Nagano. Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore -Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe-. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3357-3367 (2004)
- 57) T. Ueno, Y. Urano, K. Setsukinai, H. Takakusa, H. Kojima, K. Kikuchi, K. Ohkubo, S. Fukuzumi & T. Nagano. Rational Principles for Modulating Fluorescence Properties of Fluorescein. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14079-14085 (2004)
- 58) H. Koutaka, J. Kosuge, N. Fukasaku, T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima & T. Nagano. A Novel Fluorescent Probe for Zinc Ion Based on Boron Dipyrromethene (BODIPY) Chromophore. *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 700-703 (2004)
- 59) 坂田啓司, 藤井文彦, 田村 守, 金城政孝: 「蛍光相関分光法 (FCS) を用いた抗原抗体反応解析および検体検出」 *バイオインダストリー* **4**, 52-59 (2004)
- 60) 村松慎一: パーキンソン病モデルサルへの ES 細胞由来神経幹細胞の移植: 日本再生医療学会雑誌 **3:39-44**, 2004
- 61) 村松慎一: 遺伝子治療. 特集 パーキンソン病 日本臨床, **62(9): 1648-1652**, 2004.
- 62) 星美奈子: 新規毒性物質「アミロスフェロイド」の形成と神経細胞死 生化学 総説 **76**, 631-639, 2004
- 63) 星美奈子: 「かたち」が制御する神経の死: アミロスフェロイドから病態・老化の暗号を解く 蛋白質核酸酵素 5月号増刊「細胞における蛋白質の一生」生成・成熟・輸送・管理・分解・病態、編集 小椋光・遠藤遠藤斗志也・森正敬・吉田賢右、共立出版、東京
- 64) 星美奈子: 新規球状毒性会合体「アミロスフェロイド」の同定-アルツハイマー病発症に置ける神経細胞死機構の解明に向けて *Dementia Japan* **18**, 19-28, 2004
- 65) 星美奈子:  $\beta$ アミロイド自己組織化による神経毒性の発現-新規毒性物質「アミロスフェロイド」とアルツハイマー病: 化学と工業 第57巻、第5号、519-521, 2004
- 66) 星美奈子: Bioindustry 神経変性疾患研究の最前線 特集号監修: 特集にあたって **21,5-7**: アミロスフェロイド-タンパク質の自己組織化と神経変性疾患 **21**, 67-74, 2004
- 67) 星美奈子: 球状 $\beta$ アミロイド凝集体アミロスフェロイド-蛋白質の自己組織化と神経細胞死 *Cognition and Dementia* **3**, 359-366, 2004

## 2. 学会発表

- 1) Noguchi, A., Sato, M., Sato, K., and Hoshi, M.: Enhanced neurotoxicity of amyloospheroid (ASPD) derived from a pathogenetic form of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ), E22G (Arctic) or D7N (Tottori) (Society for Neuroscience 2006, Oct. Atlanta)
- 2) W.-Z. Xia, T. Matsushita, Y. Nara, N. Takino, H. Nishida, M. Kodera, Y. Sasaki, S. Kikuchi, T. Okada, M. Hoshi, I. Nakano, K. Ozawa, S. Muramatsu: Efficient transduction of oligodendrocytes by AAB8 vectors: The Japan society of gene therapy's 12<sup>th</sup> annual meeting. Tokyo, August 24, 2006. (abstract p24).
- 3) S. Muramatsu, W.-Z. Xia, T. Matsushita, Y. Nara, N. Takino, H. Nishida, M. Kodera, Y. Sasaki, S. Kikuchi, T. Okada, M. Hoshi, I. Nakano, K. Ozawa: Efficient transduction of oligodendrocytes by AAB8 vectors: Parvovirus Workshop 2006 : Swiss: 2006.8.28
- 4) Muramatsu S., Koder a M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells for safer cell therapy. Tenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Kyoto, October 30, Movement Disorders 21(15)s399, 2006.
- 5) Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S., Nakano I, Nagatsu T, Sawada M: Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with MTPT. 8<sup>th</sup> International conference AD/PD.
- 6) Koder a M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Tamura Y, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Nakano I, Muramatsu S. Embryonic stem cells expressing suicide gene reduced risk of teratoma formation. The 29th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Kyoto, July 20, 2006.
- 7) Muramatsu S., Koder a M, Nara Y, Takino N, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells reduces risk of teratoma formation. The Japan society of gene therapy's 12<sup>th</sup> annual meeting. Tokyo, August 26, 2006. (abstract p34).
- 8) 野口彰彦, 佐藤道夫, 佐藤一紀, 星美奈子: 家族性アルツハイマー病原因遺伝子 Arctic, Tottori 変異を持つアミロイド $\beta$ によるアミロスフェロイド形成の検証 (日本化学会第86春季年会、3月、船橋)
- 9) 星美奈子: 「アミロスフェロイド」研究 その後の進展: さきがけ「タイムシグナルと制御」第10回領域会議 2006.1.28 東京
- 10) 星美奈子: 脳の老化とアルツハイマー病: ラーノロジー公開講座 (招待講演): 本郷: 東京 2006.12.4
- 11) 星美奈子: 球状 $\beta$ アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」の同定: 鍋島陽一教授上原受賞記念研究発表会: 京都: 2006.4.15
- 12) 星美奈子: 毒性球状 $\beta$ アミロイド凝集体アミロスフェロイド-特異的抗体によるアルツハイマー病患者脳の検証: 第21回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 (招待講演): 東京: 2006.5.27
- 13) 星美奈子: アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病発症機序解明: 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 許南浩教授主催 (2006年2月) 岡山
- 14) 星美奈子: 大学院特別講義 脳神経科学入門: 基礎からアルツハイマー病まで: 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 菊地和也教授 (2006年5月) 吹田市
- 15) 菊地和也, 千里ライフサイエンスセンターセミナー-ケミカルバイオロジーが拓く21世紀の創薬研究-, 「生命現象を可視化するセンサー分子開発によるケミカルバイオロジー展開」2006年9月29日千里ライフサイエンスセンター, 豊中市
- 16) K. Kikuchi, Zinc Signals 2006, "Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications" 2006年9月16日~21日, シエナ市, イタリア
- 17) 菊地和也, 第58回日本生物工学会大会, 「細胞内イベントを可視化する化学プローブ」2006年9月12日~14日, 大阪大学豊中キャンパス, 豊中市
- 18) 菊地和也, 第12回日本生化学会近畿支部テクニカルセミナー-分子機能の直接解析法に基づく生理機能解明-, 「蛍光プローブのデザイン・合成による機能分子の可視化」2006年9月11日, 大阪大学コンベンションセンター, 大阪大学吹田キャンパス, 吹田市
- 19) K. Kikuchi, International Symposium of Biomolecular Chemistry 2006, "Design Synthesis and Biological Application of Fluorescent Probes Which Convert Biological Responses to Chemical Output" 2006年8月15日~20日, 神戸市
- 20) K. Kikuchi, Japan-UK Joint Symposium on Chemistry of Coordination Space, "Visualization of Cellular Events Using Fluorescent Sensor Molecules" 2006年7月15日~20日, University College London, ロンドン市, 英国
- 21) 分子研シンポジウム-金属機能中心を持つ高性能分子システムの創成, その構造と機能-「錯体化学を応用した生体機能可視化センサー分子のデザイン・合成・応用」2006年6月15日~17日, 分子科学研究所, 岡崎市
- 22) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M and Kinjo M. Detection of prion protein immune complex using Fluorescence Correlation Spectroscopy and Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. 第44回年会日本生物物理学会 第5回東アジア生物物理学シンポジウム合同会議 (2006,11/12, 沖縄県宜野湾市)
- 23) 奈良優子, 村松慎二: 未分化ES細胞同種移植によるサル脳内腫瘍の形成. 第47回日本神経学会

- 総会, 東京, 2006年5月12日.(プログラム P 106)
- 24) 村松慎一:パーキンソン病モデルサルへのヒト ES細胞由来神経幹細胞移植.第47回日本神経学会総会, 東京, 2006年5月12日.(プログラム P 106)
- 25) 村松慎一:遺伝子治療の可能性.第26回日本脳神経外科コンgres,東京,2006年5月14日.(脳神経外科ジャーナル Vol.15 P 37)
- 26) 花園豊, 岸本紀子, 田中裕次郎, 池田たま子, 柴田宏昭, 村松慎一, 揚山直英, 林聡, 北野良博, 阿部朋之, 長尾慶和, 寺尾恵治: ES細胞を利用する移植・再生治療の安全性に関する研究.第4回幹細胞シンポジウム, 東京, 2006年5月19日.(抄録集 p 42)
- 27) 古寺美加, 村松慎一, 奈良優子, 滝野直美, 西田紘子, 奥野剛, 小西奈依, 道端英男, 鈴木豊, 近藤靖, 仁藤新治, 中野今治: 自殺遺伝子を導入したより安全な移植用 ES細胞の開発.第4回幹細胞シンポジウム, 東京, 2006年5月19日.(抄録集 p 42)
- 28) 古寺美加, 山本茂一, 近藤靖, 仁藤新治, 村松慎一: 自殺遺伝子導入による安全な移植用 ES細胞の開発.第46回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2006年9月8~9日.
- 29) 村松慎一: 遺伝子治療.第6回日本再生医療学会総会, 横浜, 2007年3月13日.(再生医療 Vol.6 Suppl 2007 p110)
- 30) Hoshi, M. as organizer and symposist (May 19, 2005): Spherical aggregates of  $\beta$ -amyloid, 'amylospheroid': Formation and suppression of its neurotoxicity: *The 82nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan: Symposium in cooperation with Molecular Biological Society of Japan: Aging Science: understanding the molecular mechanisms of aging and age-related brain dysfunctions: Sendai*
- 31) 星美奈子 (2005年11月): 球状 $\beta$ アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-形成から毒性の阻止まで: 千里ライフサイエンスセミナー「老化」: 神戸
- 32) 野口彰彦・佐藤道夫・佐藤一紀・星美奈子 (2005年12月): 球状 $\beta$ アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」形成に至る凝集経路と神経細胞死: 第28回日本分子生物学会年会ワークショップ蛋白質のフォールディング/プロセッシングによる細胞機能調節とその破綻: 博多
- 33) 星美奈子 (2005年7月): 球状 $\beta$ アミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-形成から毒性の阻止まで: 神奈川大学特別セミナー: 横浜
- 34) Noguchi, A., Sato, M., Ishihara, K., Sato, K. and Hoshi, M.M. (Nov. 2005): Physiological solvent environments promoted A $\beta$  assembly into amylospheroid(ASPD), 10-15-nm spherical A $\beta$  aggregates with potent neurotoxicity: The Society For Neuroscience(2005) 35th Annual Meeting: Washington, D.C.
- 35) Noguchi, A., Sato, M., Ishihara, K., Sato, K. and Hoshi, M.M. (Dec. 2005): Physiological solvent environments promoted A $\beta$  assembly into amylospheroid(ASPD), 10-15-nm spherical A $\beta$  aggregates with potent neurotoxicity: International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2005: Honolulu, Hawaii
- 36) Ishihara, K., Sato, K., Sato, M. and Hoshi, M.M. (Dec. 2005): Production and characterization of gold-A $\beta$  spheres of uniform size as a molecular resemblance of amylospheroid (ASPD), spherical A $\beta$  aggregates with strong neurotoxicity: International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2005: Honolulu, Hawaii
- 37) 野口彰彦, 佐藤道夫, 佐藤一紀, 星美奈子: アミロスフェロイド形成に各種溶媒が及ぼす影響の解 (日本化学会第85春季年会, 3月, 横浜)
- 38) 石原和之, 佐藤一紀, 佐藤道夫, 星美奈子:  $\beta$ アミロイド毒性凝集体アミロスフェロイドの擬似構造体作製の試み (日本化学会第85春季年会, 3月, 横浜)
- 39) 渡邊 亜沙子, 岡畑 恵雄, 古澤 宏幸, 星美奈子, 櫻井 実 (2005年6月):  $\beta$ アミロイド凝集に及ぼすトレハロースの効果: 第51回低温生物工学会年会: 長津田
- 40) 渡邊 亜沙子, 岡畑 恵雄, 古澤 宏幸, 星美奈子, 櫻井 実 (2005年11月):  $\beta$ -アミロイド凝集に及ぼす水代替物質トレハロースの効果: 第43回日本生物物理学会: 札幌
- 41) 菅原由子, 羽生 純, 佐藤一紀, Nirthanan, S., Gopalakrishnakone, P., Pil, J., Tytgat, J.: 東南アジアのサソリから単離されたペプチド毒の構造活性相関 (日本生化学会九州支部例会, 2005年5月, 福岡)
- 42) 吉田恵子, 光岡瑠美, 佐藤一紀, Saminathan, R., Gopalakrishnakone, P.: イモ貝 *Conus amadis* から単離された新規ペプチド毒の合成 (日本生化学会九州支部例会, 2005年5月, 福岡)
- 43) 菅原由子, 羽生 純, Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Gopalakrishnakone, P., Jeremiah S. Joseph, J. S., Tytgat, J. 佐藤一紀: アジア産サソリ *Heterometrus fulvipes* と *Heterometrus spinifer* から単離されたペプチド毒の合成と構造活性相関 (第42回ペプチド討論会, 2005年10月, 大阪)
- 44) K. Kikuchi, Pacificchem 2005, "Visualization of Cellular Events Using Fluorescent Sensor Molecules" 2005年12月15日~20日, Hilton Hawaiian Village Hotel, ホノルル市, ハワイ州, アメリカ合衆国
- 45) 2<sup>nd</sup> Annual Symposium: Japanese-German Frontiers of Science, "Visualization and Manipulation of Cellular Events Using Fluorescence Sensor Molecules" 2005年11月2日~5日, 湘南国際村, 神奈川県葉山町
- 46) 第86日本化学会春季年会・特別企画講演「ダ

- イナミックスピン：動的機能の創製と解析・制御」,  
「スピンドイナミクス制御に基づく生体機能可視化  
センサー分子のデザイン・合成・応用」2006年  
3月27日～30日, 日本大学, 習志野市
- 47) 分子研シンポジウム「生体における金属イオンの  
役割とその利用」, 「錯体化学を応用小用下生体機能  
可視化センサー分子のデザイン・合成・生物応用」  
2006年3月18日～20日, 分子科学研究所,  
岡崎市
- 48) 第79回日本薬理学会年会・シンポジウム「創  
薬の未来を拓くケミカルバイオロジー」, 「細胞機能  
を可視化する化学プローブ」2006年3月8日～  
10日, パシフィコ横浜, 横浜市
- 49) 第二回ケミカルバイオロジーシンポジウム,  
“Design Synthesis and Biological Application of  
Fluorescence Sensor Molecules Which Convert  
Biological Responses to Chemical Output” 2006年  
2月17日, 東京医科歯科大学, 文京区
- 50) 岡崎統合バイオサイエンスセンター5周年記念  
シンポジウム, 「細胞内イベントを可視化する化学プ  
ローブ」2006年2月6日～8日, 岡崎コンフ  
アレンスセンター, 岡崎市
- 51) 理研シンポジウム：第9回生体分子の化学, 「細  
胞機能を可視化するセンサー分子のデザイン・合  
成・生物応用」2006年1月27日, 理化学研究  
所 大河内記念講堂, 和光市
- 52) 理研シンポジウム：モレキュラー・アンサンブル  
2005, 「可視化センサー分子の分子デザインと  
生物応用」2005年11月28日～29日, 理化  
学研究所 大河内記念ホール, 和光市
- 53) 第14回バイオイメージング学会・シンポジウ  
ム, 「新規計測技術によるバイオイメージング」, 「Eu<sup>3+</sup>  
錯体の蛍光強度制御に基づく時間分解蛍光イメー  
ジングシステム」2005年10月26日～28日,  
東京大学一条講堂, 東京都文京区
- 54) 化学工学会・第37回秋季大会・シンポジウム  
講演, 「物質創製アプローチによる可視化センサー分  
子の開発と生物応用」2005年9月15日～16  
日, 岡山大学 キャンパス, 岡山市
- 55) 第11回機能性ホストゲスト化学研究会サマー  
セミナー, 「細胞機能を覗く分子デザイン」2005  
年7月28日～29日, 立山国際ホテル, 富山県上  
新川郡立山町
- 56) 第40回天然物化学談話会, 「物質創製アプ  
ローチによる生きた状態の可視化解析」2005年7  
月13日～15日, 熱川ホテル, 静岡県賀茂郡東伊  
豆町
- 57) 蛋白研セミナー, 「細胞機能を覗く分子デザイ  
ン」2005年6月22日～23日, 大阪大学蛋白  
質研究所
- 58) 日本顕微鏡学会第61回学術講演会—「見る」  
極限への挑戦—シンポジウム「光でみる生命機構」,  
「細胞機能の可視化と不活化のケミカルバイオロ  
ジー」2005年6月1日～3日, つくば国際会議場,  
つくば市
- 59) Changi Pack and Masataka Kinjo : Studying  
dynamics of tandem GFPs at nucleus in living cell by  
fluorescence correlation spectroscopy. Prague Post  
Genome Technology Workshop (PPGT)  
Prague, Czech Republic Monday June 6 - Tuesday June  
7, (2005)
- 60) Masataka Kinjo : Study of Protein Dynamics in  
Living Cell Using Fluorescence Cross Correlation  
Spectroscopy. International Symposium on Molecular  
Nanotechnology Nara : Nov.(2005)
- 61) 村松慎一 : パーキンソン病の遺伝子治療と細胞  
移植. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005年5  
月26日.(プログラム P 34)
- 62) Liu Y, et al.: Protection against  
aminoglycoside-induced ototoxicity by AAV  
vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea.  
The American society of gene therapy's 8<sup>th</sup> annual  
meeting. Minneapolis, June 3, 2005.
- 63) 村松慎一 : パーキンソン病の遺伝子治療. 第2  
3回日本神経治療学会総会, 鳥羽市, 2005年6月9  
日.(プログラム P 10)
- 64) 村松慎一 : AAV ベクターによるパーキンソン病  
の遺伝子治療. (AAV vectors for the treatment of  
Parkinson's disease) 第28回日本神経科学大会, 横  
浜, 2005年7月27日.(プログラム P 57)
- 65) Muramatsu S, et al.: *In vivo* assessment of  
transgene-mediated dopamine synthesis by positron  
emission tomography in a primate model of Parkinson's  
disease. The Japan society of gene therapy's 11<sup>th</sup> annual  
meeting. Tokyo, July 29, 2005. (abstract p23).
- 66) Muramatsu S, et al.: Gene therapy for Parkinson's  
disease : Strategies for clinical applications. The 2<sup>nd</sup>  
Nikko International Symposium 2005. Nikko, September  
30, 2005. (abstract p20-21).
- 67) Sato T, et al. Activity of 6-pyruvoyltetrahydropterin  
synthase, the second enzyme for biosynthesis of  
tetrahydrobiopterin, in the brain. 第78回日本生化学  
会大会, 神戸, 2005年10月22日.
- 68) Muramatsu S, et al.: Viral-mediated temporally  
controlled dopamine production in a rat model of  
Parkinson disease. Society for Neuroscience's 35<sup>th</sup>  
Annual Meeting, Washington, DC, November 14, 2005.
- 69) 村松慎一 他 : 血友病遺伝子治療を目指した遺  
伝子発現制御 AAV ベクターの開発. 第28回血栓止  
血学会学術集会, 福岡, 2005年11月24日.
- 70) 村松慎一 他 : パーキンソン病の遺伝子治療.  
第45回日本定位・機能神経外科学会, 埼玉, 2006  
年1月20日. (プログラム P 69)
- 71) Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Masayoshi Ueno,  
Takayuki Yanagiya, Mamoru Tamura, and Masataka  
Kinjo, International Symposium of Prion Diseases,  
Sendai, JAPAN, October 31 to November 2., 2004  
"Detection of recombinant bovine prion protein by  
fluorescence correlation spectroscopy"

- 72) Gopalakrishnakone, P., Thwin M.-M., and Sato, K.: Anti-inflammatory peptides designed from phospholipase A<sub>2</sub> inhibitory protein from the serum of *Python reticulatus*. International Congress - Natural Peptides to Drugs, Nov.-Dec., 2004, Zermatt, Switzerland.
- 73) Hoshi, M.: Morpho-metabolism of  $\beta$ -amyloid: nano-fibers as natural defense against neurodegenerative diseases: Symposium on Dynamic Bio-Nano-Fibers in the Cells Focusing Human Body: Cells is being organized with nano-fibers, July 13-14, 2004, Tokyo
- 74) Iwata N, et al.: Therapeutic approach for Alzheimer's disease by neprilysin gene transfer, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.
- 75) K. Kikuchi, Gordon Research Conference, Bioanalytical Sensors, "Chemical Sensor Molecules Which Convert Cellular Biological Responses to Chemical Output", 2004年7月4日~9日, クイーンズカレッジ, オックスフォード市, 英国
- 76) Lee C.-W., Lee, E.-H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin S.-Y., Kim, D.-H., and Kim, J.-I.: Molecular basis of the high-affinity activation of skeletal ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup>-release channel by imperatoxin A., 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium, Oct.-Nov., 2004, Fukuoka, Japan.
- 77) Yuhe Liu, et al.: Specific and efficient transduction of the cochlear inner hair cells with recombinant Adeno-Associated virus type 3 vector. The American society of gene therapy's 7<sup>th</sup> annual meeting. Minneapolis, June 6, 2004..
- 78) Muramatsu S et al.: AAV- vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate bilateral model of Parkinson's disease. The American society of gene therapy's 7<sup>th</sup> annual meeting. Minneapolis, June 3, 2004.
- 79) Muramatsu S, et al.: A fail-safe system for gene therapy of Parkinson's disease; Application of removable expression cassette to prevent overproduction of dopamine in a rat model. The American society of gene therapy's 7<sup>th</sup> annual meeting. Minneapolis, June 4, 2004.
- 80) Muramatsu S, et al.: Transplantation of neural stem cells derived from primate ES cells in a primate model of Parkinson's disease. JMS 21st Century COE Program Nikko International Symposium, Nikko, September 25, 2004.
- 81) Muramatsu S, et al.: AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate model of Parkinson's disease. Society for Neuroscience's 34<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, October 23, 2004.
- 82) Muramatsu S, et al.: *In Vivo* monitoring of transgene expression in a primate model of Parkinson's disease; potential application of positron emission tomography in gene therapy, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.
- 83) Nara Y, et al.: Migration into the neurogenic area promotes neuronal differentiation after intraventricular transplantation of neural stem cells derived from embryonic stem cells. Society for Neuroscience's 34<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, October 26, 2004.
- 84) Hiroshi Sakata, Fumihiko Fujii, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo: 7th International Carl Zeiss sponsored Workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and Related Methods; Dresden / Germany, October 5th to 6th 2004, "Antigen-antibody reaction analysis with Fluorescence Correlation Spectroscopy"
- 85) Thwin M.-M., Douni, E., Aidinis, V., Kollias, G., Kodama, K., Sato, K., Satish, R. L., Mahendran, R., and Gopalakrishnakone, P.: Anti-inflammatory peptides designed from phospholipase A<sub>2</sub> inhibitory protein from the serum of *Python reticulatus*. 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium, Oct.-Nov., 2004, Fukuoka, Japan.
- 86) Li Xg, et al.: Inducible reduction of transgene expression as a fail-safe system for gene therapy of neurodegenerative diseases, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.
- 87) K. Kikuchi, COE 国際シンポジウム“Metals in Biology”名古屋大学 COE 拠点, “Zinc Sensing for Cell Biology”2005年 1月11日~12日, 名古屋大学野依記念学術交流館
- 88) 菊地和也, 第78回日本薬理学会年会シンポジウム「ケモゲノミクスの新しい展開とゲノム創薬科学」 「可視化プローブのデザインによるケモゲノミクス」2005年3月22日~24日, パシフィコ横浜, 横浜市
- 89) 菊地和也, 「ナノバイオ基礎から最前線」コース~バイオとナノテクの融合による新技術・新産業の創出~, (財)神奈川科学技術アカデミー, 「細胞を探るナノプローブ」2004年11月25日, かながわサイエンスパーク, 川崎市
- 90) 菊地和也, 京都大学21世紀COEプログラム「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」 「ファーマゲノミクスの新展開:ゲノムとネットワークからケミカルゲノミクスへ」, 「可視化プローブで細胞機能を覗く」2004年10月5日, 京都大学薬学部記念講堂
- 91) 菊地和也, 分子研研究会「生体金属分子科学の展望」 「錯体化学に基づく生体可視化蛍光センサー」2004年10月1日-3日岡崎コンファレンスセンター
- 92) 菊地和也, 第17回生物無機化学夏季セミナー, 「錯体化学に基づく生体可視化蛍光センサー -亜鉛イオンの生細胞内可視化とランタノイド蛍光錯体の蛍光強度制御」2004年8月7日-9日, シャレー中西, 岐阜県大野郡丹生川村

93) 菊地和也, 日本化学会生体機能関連化学部会若手の会サマースクール, 「細胞機能の可視化と不活化のケミカルバイオロジー」, 2004年7月16日-17日, 三河ハイツ, 蒲郡市

94) 菊地和也, 第65回分析化学討論会・シンポジウム「バイオ分析化学の新潮流」, 「細胞機能を覗く分子デザイン」, 2004年5月15日~16日, 琉球大学千原キャンパス, 沖縄県西原町

95) 野口彰彦・佐藤道夫・松本紳一郎・佐藤一紀・星美奈子: 強力な神経毒性を持つ球状βアミロイド合合体「アミロスフェロイド」の同定: 第84回日本化学会春期年会 2004年3月(神戸)

96) 星美奈子 (2004年3月) アミロスフェロイドの発見-「かたち」が制御する神経細胞死: 第6回七隈アルツハイマー病研究会カンファランス: 福岡

97) 星美奈子 (2004年3月) アルツハイマー病とナノファイバー形成-ファイバー形成は生体防御反応か?: 第3回ナノファイバー技術戦略研究会「21世紀を拓くナノファイバーテクノロジー」-ナノファイバーとバイオの未来と新展開する高度ナノ測定技術の実際-: 大岡山(東京工業大学 百周年記念館)

98) 星美奈子 (2004年12月) 球状βアミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-老化に伴うタンパク質の自己組織化と神経細胞死: 第27回日本分子生物学会年会ワークショップ: 老化研究: 新たなパラダイム形成を目指して 神戸

99) 村松慎二, 他: 誘導的に Cre リコンビナーゼを活性化する AAV ベクターを応用したより安全なパーキンソン病の遺伝子治療の開発. 第25回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004年7月13日.

100) 村松慎二: Gene therapy for Parkinson's disease; current strategies and future direction, 第16回機能回復神経学研究会, 2004年8月6日.

101) 村松慎二: パーキンソン病の遺伝子治療. 第1回革新脳科学 COE 国内シンポジウム, 金沢 2005年2月19日.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1) 抗体とその利用  
出願日:  
PCT/JP2005/014735  
発明者: Hoshi, M., Naito, K. & Ideno, S.  
出願人: 三菱化学株式会社

2) アミロスフェロイドにより発生する疾患の予防治療剤  
出願日:  
特願2005-169910  
発明者: 星美奈子  
出願人: 三菱化学株式会社

3) 膜構造を有する生体構造物の膜機能を解析する方法  
出願日: 平成16年2月25日

特願2004-50214 (P2004-50214)

特開2005-241378 (P2005-241378A)

出願日: 平成16年9月22日  
公開日: 平成17年9月8日  
発明者: 高橋 保夫、金城 政孝、田村 守  
出願人: オリパス株式会社

5) 抗体およびその利用  
出願日: 平成16年8月11日  
発明者: 星 美奈子 出願人: 三菱化学株式会社  
特願2004-234857

6) 蛍光相関分光法による抗原の迅速検出及び/又は測定法  
出願日: 平成16年6月3日  
特願2004-166440  
発明者: 金城政孝, 堀内基広, 藤井文彦, 坂田啓司, 田村守, 上野雅由, 柳谷孝幸  
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構 (代表者: 沖村憲樹), 富士レビオ株式会社 (代表者: 鈴木博正)

7) 水溶性蛍光材料およびその製造方法  
出願日: 平成16年9月22日  
出願番号: 特願2004-275675  
発明者: 神 隆, 金城 政孝, 田村 守, 藤井 文彦, 坂田 啓司  
出願人: 独立行政法人 科学技術振興機構 (代表者: 沖村 憲樹)  
国立大学法人 北海道大学 (代表者 (学長): 中村 睦男)

新規3件出願予定 (4月中)

2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
星美奈子	「かたち」が制御する神経の死：アミロスフェロイドから病態・老化の暗号を解く	小椋光・遠藤遠藤斗志也・森正敬・吉田賢右	「細胞における蛋白質の一生」生成・成熟・輸送・管理・分解・病態	共立出版	東京	2004	1098-1100

### 雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌	巻号	ページ	出版年
Wakamatsu M, et al.	Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human $\alpha$ -synuclein in mice.	Neurobiol Aging			In press
Sawada H, et al.	Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.	J Neurosci Res			In press
Watanabe, A., Okahata, Y., Furusawa, H., Hoshi, M. and Sakurai, M.	The effect of Trehalose on the aggregation of $\beta$ -amyloid	Cryobiology and Cryotechnology	51	137-140	2006
T. Komatsu, <u>K. Kikuchi</u> , H. Takakusa, K. Hanaoka, T. Ueno, M. Kamiya, Y. Urano & T. Nagano	Design and Synthesis of an Enzyme Activity-Based Labeling Molecule with Fluorescence Spectral Change	J. Am. Chem. Soc.	128	15946-15947	2006
T. Terai, <u>K. Kikuchi</u> , S. Iwasawa, T. Kawabe, Y. Hirata, Y. Urano & T. Nagano	Modulation of Luminescence Intensity of Lanthanide Complexes by Photoinduced Electron Transfer and Its Application to a Long-Lived Protease Probe	J. Am. Chem. Soc.	128	6938-6946	2006
A. Minami, N. Sakurada, S. Fuke, <u>K. Kikuchi</u> , T. Nagano, N. Oku & A. Takeda	Inhibition of Presynaptic Activity by Zinc Released From Mossy Terminals During Tetanic Stimulation	J. Neurosci. Res	83	167-176	2006
Konno H,	The regulator of the F1 motor: inhibition of	EMBO J.	25(19)	4596-4604	2006



Murakami-Fuse T, Fujii F, Koyama F, Ueoka-Nakanishi H, Pack CG, Kinjo M and Hisabori T.	rotation of cyanobacterial F1-ATPase by the epsilon subunit.				
Jin T, Fujii F, Yamada E, Nodasaka Y and Kinjo M.	Control of the optical properties of quantum dots by surface coating with calix[n]arene carboxylic acids.	J Am Chem Soc.	128(29)	9288-9289	2006
S. Mikuni, M. Tamura and M. Kinjo.	Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy.	FEBS Letters	581	389-393	2007
R. Oyama, H. Takashima, M. Yonezawa, N. Doi, E. Miyamoto-Sato, M. Kinjo and H. Yanagawa.	Protein-protein interaction analysis by C-terminally specific fluorescence labeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy.	Nucleic Acids Research	34(14)	e102	2006
C. Pack, K. Saito, M. Tamura, and M. Kinjo.	Microenvironment and effect of energy depletion in the nucleus analyzed by mobility of multiple oligomeric EGFPs.	Biophys J.	91	3921-3936	2006
Y. Ohsugi, K. Saito, M. Tamura and M. Kinjo.	Lateral Mobility of Membrane-Binding Proteins in Living Cells Measured by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy.	Biophys J.	91	3456-3464	2006
A. Kitamura, H. Kubota, C.-G. Pack, G. Matsumoto, S. Hirayama, Y. Takahashi, H. Kimura, M. Kinjo, R. I. Morimoto and K. Nagata.	Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state.	Nature Cell Biology	8(10)	1163-1169	2006
S. Kawai-Noma, S. Ayano, C.-G. Pack, M. Kinjo, M. Yoshida, K. Yasuda and H. Taguchi.	Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells.	Genes to Cells	11	1085-1096	2006
T. Kogure, S. Karasawa, T. Araki, K. Saito, M. Kinjo, and A. Miyawaki	A. fluorescent variant of a protein from the stony coral Montipora facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy.	Nat Biotechnol	30	577-581	2006
Y. Nomura, H. Fuchigami, H. Kii, Z. Feng, T. Nakamura and M. Kinjo.	Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy.	Analytical Biochemistry	350	196-201	2006
三國新太郎・金城政孝	細胞生物学における蛍光相関分光法と蛍光相互相関分光法	蛋白核酸酵素	51	1998-2005	2006
村松慎一	アデノ随伴ウイルスベクターを応用したパーキンソン病の遺伝子治療.	機能的脳神経外科	45(2)	148-152	2006
村松慎一	ES細胞による Parkinson 病の移植治	医学のあゆみ	217(5)	371-376,	200

	療一臨床応用への課題.		)		6
Muramatsu S, et al.	Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors.	Exp Opin Biol Ther	5(5)	663-671	2005
Maruyama M, et al.	Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease.	Ann Neurol	57(6)	832-842	2005
Liu Y, et al.	Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector.	Mol Ther	12(4)	725-733	2005
Li XG, et al.	Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease.	Mol Ther	13(1)	160-166	2006
Shibata H, et al.	Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting.	Stem Cells			in press
K. Komatsu, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima & T. Nagano	Selective Zinc Sensor Molecules with Various Affinities for Zn <sup>2+</sup> , Revealing Dynamics and Regional Distribution of Synaptically Released Zn <sup>2+</sup> in Hippocampal Slices.	J. Am. Chem. Soc.	127	10197-10204	2005
R.A.Colvin, P. Fontaine, D. Thomas, T. Hirano, T. Nagano & K. Kikuchi	Evidence for pH Dependent Zn <sup>2+</sup> Influx in K562 Erythroleukemia Cells: Studies Using ZnAF-2F Fluorescence and Zn <sup>-65(2+)</sup> Uptake.	Arch. Biochem. Biophys.	442	222-228	2005
L.A. van Meeteren, P. Ruurs, E. Christodoulou, J.W. Goding, H. Takakusa, K. Kikuchi, A. Perrakis, T. Nagano & W.H. Moolenaar	Inhibition of Autotaxin by Lysophosphatidic Acid and Sphingosine-1-phosphate.	J.Biol. Chem.	280	21155-21161	2005
Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J. S., Sato, K., and Tytgat, J.	Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to κ-KTx1.3, a non-toxic homologue of κ-hefutoxin-1, from <i>Heterometrus spinifer</i> venom.	Biochemical Pharmacology	69	669-678	2005
Yasutomo Nomura,, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura , Masataka Kinjo	Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy.	Analytical Biochemistry	350	196-201	2006
Maya Hirose, Hideki Tohda, Yuko Giga-Hama, Reiko Tsushima, Tamotsu Zako, Ryo Iizuka, Changi Pack, Masataka Kinjo, Noriyuki	Interaction of a small heat shock protein of the fission yeast, <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , with a denatured protein at elevated temperature	J. Biol. Chem	280	32586-32593	2005

Ishii, and Masafumi Yohda					
Takashi Jin, Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo	Amphiphilic p-sulfonatocalix[4]arene-coated CdSe-ZnS quantum dots for the optical detection of the neurotransmitter acetylcholine	Chem. Commun		4300-4302	2005
Yasuo Takahashi, Ryuji Sawada, Kiyochika Ishibashi, Sintarou Mikuni and Masataka Kinjo	Analysis of Cellular Functions by Multipoint Fluorescence Correlation Spectroscopy	Current Pharmaceutical Biotechnology	6	159-156	2005
Takashi Jin, Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo	Calixarene-coated water-soluble CdSe/ZnS semiconductor quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution,	Chem. Commun		2829-2831	2005
星美奈子	分子の探索からシステムの解明へーアルツハイマー病研究に想う神経科学の今後への私感	繊維と工業	62	17-18	2006
奈良優子, 村松慎一	パーキンソン病の再生医療. 特集 治療の最前線: 神経疾患の先端的治療	BRAIN MEDICAL	17(3)	41-45	2005
中林孝和、飯森俊文、金城政孝、太田信廣	蛍光寿命イメージングシステムの作成と生体試料および高分子試料への応用	分光研究	55	31-39	2006
D. Okada, C.C. Yap, H. Kojima, K. Kikuchi & T. Nagano	Distinct Glutamate Receptors Govern Differential Levels of Nitric Oxide Production in a Layer-specific Manner in the Rat Cerebellar Cortex	Neuroscience	125	461-472	2004
K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano	Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications	J. Am. Chem. Soc.	126	12470-12476	2004
Y. Hu, K.N. Houk, K. Kikuchi, K. Hotta, & D. Hilvert	Nonspecific Medium Effects versus Specific Group Positioning in the Antibody and Albumin Catalysis of the Base-Promoted Ring-Opening Reactions of Benzisoxazoles	J. Am. Chem. Soc.	126	8197-8205	2004
Asako Kamada, Hisao Nagaya, Taku Tamura, Masataka Kinjo, Hai-Ying Jin, Toshiharu Yamashita, Kowichi Jimbow, Hideo Kanoh and Ikuo Wada	Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum	J Biol Chem	279	21533-21542	2004
Kenta Saito; Ikuo Wada; Mamoru Tamura and Masataka Kinjo	Direct detection of caspase-3 activation in single live cells by cross-correlation analysis	Biochem. Biophys. Res. Comm	324/2	849-854	2004

K. Kikuchi, K. Komatsu & T. Nagano.	Zinc Sensing for Cellular Applications.	<i>Curr. Opin. Chem. Biol.</i> ,	<b>8</b>	182-191	2004
Lee C.-W., Lee, E.-H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin S.-Y., Kim, D.-H., and Kim, J.-I	Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin	A. Biochem. J.,	<b>377</b>	385-394	2004
Manita, S., Kawamura, Y., Sato, K., Inoue, M., Kudo, Y., and Miyakawa, H.:	Adenosine A <sub>1</sub> -receptor-mediated tonic inhibition of glutamate release at rat hippocampal CA3-CA1 synapses in primarily due to inhibition of N-type Ca <sup>2+</sup> channels.	Eur. J. Pharmacology	<b>499</b>	265-274	2004
Nakamura, M., Ishida, Y., Kohno, T., Sato, K., Oba, Y., and Nakamura, H.	Effects of modification at the fifth residue of $\mu$ -conotoxin GIIIA with bulky tags in the electrically stimulated contraction of the rat diaphragm.	J. Peptide Res.,	<b>64</b>	110-117	2004
Nakai H, Fuess S, Storm T A, Muramatsu S, Nara Y and Kay M A	Unrestricted hepatocyte transduction with AAV serotype 8 vectors in mice	J Virol	79(1):	214-224	2004
Thwin M.-M., Douni, E., Aidinis, V., Kollias, G., Kodama, K., Sato, K., Satish, R. L., Mahendran, R., and Gopalakrishnakone, P.:	Effect of phospholipase A <sub>2</sub> inhibitory peptide on inflammatory arthritis in a TNF transgenic mouse model: a time-course ultrastructural study.	Arthritis Research & Therapy	<b>6</b>	282-294	2004
T. Yogo, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T. Nagano	Modification of Intracellular Ca <sup>2+</sup> Dynamics by Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Using Membrane-permeant Probes.	<i>Chemistry &amp; Biology</i>	<b>11</b>	1053-1058	2004
E. Kawabata, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, A. Odani & T. Nagano	Design and Synthesis of Zinc-Selective Chelators for Extracellular Applications	<i>J. Am. Chem. Soc</i>	<b>127</b> ,	818-819	2005
Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K and Hanazono Y	Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved.	Gene Ther,	12(3):	203-210	2004
坂田啓司, 藤井文彦, 田村守, 金城政孝	「蛍光相関分光法 (FCS) を用いた抗原抗体反応解析および検体検出」	バイオインダストリー	4	52-59	2004