

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

神経変性タンパク質の細胞局所場に於ける動態・フィブリル化
のイメージングに基く効率的な医薬品評価系の開発
に関する研究(H19-ナノ一般-001)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 諸根 信弘

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

神経変性タンパク質の細胞局所場に於ける動態・フィブリル化の
イメージングに基く効率的な医薬品評価系の開発に関する研究

諸根 信弘 ----- 1

II. 分担研究報告

1. アルツハイマー病モデルに於けるシナプス分子の輸送制御機構解析に関する研究

中村俊 ----- 16

2. パーキンソン病モデルに於けるユビキチン・プロテオソームシステムの制御機構解析
に関する研究

和田圭司 ----- 20

3. シナプス機能分子の動態解析に関する研究

内野茂夫 ----- 24

4. 光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

永井健治 ----- 27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 38

総括研究報告書

神経変性タンパク質の細胞局所場に於ける動態・フィブリル化のイメージングに
基く効率的な医薬品評価系の開発に関する研究

主任研究者 諸根 信弘 国立精神・神経センター神経研究所 室長

研究要旨: プリオン病、アルツハイマー病、パーキンソン病のような神経変性疾患の病態極初期に深く関わる「タンパク質の病理学的蓄積とフィブリル化初期過程」に焦点をあて、超微細画像技術（ナノテクノロジー）を基盤とする複合的な可視化技術を相補的に併用して、高い時間・空間分解能で定量評価できるシステムをつくる。これにより解明が期待される、神経変性疾患の細胞局所場に於ける素過程に基づいて、効率的な医薬品評価系の開発を目指した研究について概説する。

分担研究者

中村 俊
東京農工大学工学府共生科学技術研究院・教授

和田圭司
国立精神・神経センター神経研究所・部長

内野茂夫
国立精神・神経センター神経研究所・室長

永井健治
北海大学電子科学研究所・教授

A. 研究目的

(1) プリオン動態の電子線高分解能構造解析

神経変性疾患の原因となるタンパク質は、細胞膜のラフトと呼ばれる細胞内情報伝達を行う場、細胞骨格、さらにミトコンドリアなどの細胞内小器官など細胞の局所場において、様々なタンパク質と相互作用を行い、生理機能を遂行している。プリオン病では、悪性化のメカニズムに対して、それを誘起する分子や場所があまり良く理解されていない。我々は、正常プリオンタンパク質に注目して、細胞内での動態、すな

わち、どこでどのようなタンパク質と複合体形成を行うのか等を電子顕微鏡レベルの分解能で検討した。

(2) アルツハイマー病モデルに於けるシナプス分子の輸送制御機構解析

神経変性疾患は神経機能分子の合成、輸送、および分解過程の病変により、タンパク質の異常な蓄積が生ずるために引き起こされと考えられているが、その素過程は不明である。とくに神経変性を発症する過程で鍵となるのは、原因タンパク質がモノマーの状態からオリゴマーの状態に移行することにより、高度の繊維化（フィブリル化）が促進され、機能的にも細胞毒性を発揮するようになることであると考えられている。我々は、神経機能分子のイメージングによりこれらの素過程を解析することにより、タンパク質の異常な構造・動態変化の原因を解明し、さらにその変化と疾患との本質的な関連を解明することを目的に研究を行う。この研究により神経変性疾患の病因解明および診断、予防、および治療法の開発がすすむものと期待される。

(3) パーキンソン病モデルに於けるユビキチン・プロテアソームシステムの制御機構解析

パーキンソン病やアルツハイマー病は中枢神経系の変性をもたらす根本的治療法の無い難治性神経疾患である。細胞内タンパク質分解に重要な役割を担うユビキチンプロテアソーム系の構成因子の1つであるUch-L1は家族性パーキンソン病の原因遺伝子の1つであると共に、アルツハイマー病の重要な治療ターゲットでもある。アルツハイマー病モデルマウスの脳内へ細胞内移行シグナル配列を付加したUch-L1タンパク質を導入する実験が行われた結果、Uch-L1タンパク質の脳内での機能増強はアルツハイマー病におけるシナプス機能低下と記憶力の低下を著しく改善する事が報告された。しかしながら、これまでにUch-L1の活性を促進するような薬剤は見つかっていない。そこで、本研究ではコンピュータを利用して化合物とUch-L1分子とのドッキングシミュレーションを行うことでUch-L1活性中心近傍の仮想ナノ空間においてその酵素活性に影響を及ぼしうる化合物をスクリーニングした。

(4) シナプス機能分子の動態解析

神経変性疾患や脳血管障害において、神経細胞の変性脱落は神経回路網の機能不全を誘発し、記憶・学習等の高次脳機能の破綻を生じさせる。また、近年、自閉症をはじめとする発達障害においても、神経細胞の成熟や神経回路形成の不全が病因のひとつと考えられている。神経回路網を構築する神経細胞同士の情報伝達は、シナプスを介して行われている。従って、神経回路網構築の基盤となるシナプスの構造活性相関の詳細な研究は、現在十分な治療法が確立されていない神経変性疾患や発達障害の病態、病因の解明に新たな知見をもたらすと考えられる。しかしながら、シナプスにおける構造活性相関

の解析は、げっ歯類の胎仔脳より調製した初代培養細胞を用いた研究が一般的であり、神経回路を維持した組織レベルでの解析は十分になされていない。そこで、本研究では、神経回路構築時のシナプスを組織レベルで可視化する技術を確立し、特定の神経細胞が形成するシナプスの構造活性相関を解析することを目的とする。そのため、重度の言語障害を主徴とする自閉症(22q13.3欠失症候群)の責任遺伝子がコードするシナプス機能分子Shank3に着目し、可視化した特定のシナプスでShank3分子を欠損させることで、シナプスの構造活性相関を解析する。

(5) 光照射による生体機能操作法の開発

KillerRedの機能改変: 個体レベルでの生体機能を光照射依存的に操作(破壊)する遺伝子工学技術の開発を行うために、遺伝子にコードされた光増感物質(KillerRed)を利用する。KillerRedは二量体であり、破壊対象となるタンパク質によっては、機能しないことが示唆される。また、現在のところKillerRedは文字通り赤色のみであるが、GFPのように多色化が進めば、イメージングと操作の技術を組み合わせた技術が大きく発展するものと期待できる。本研究では、KillerRedを遺伝子改変スクリーニングにより、単良体化と多色化を進め、生体レベルでの操作技術の確立を目指す。

新規光変換タンパク質の開発とその応用: 生体内では集団の中の特定の領域にある分子や細胞がどのような挙動をとるかが理解の鍵を握っている現象がある。細胞内でのタンパク質の拡散やオルガネラの動き、或いは細胞自身の組織の中での動きを観察することによってそのような現象の理解に有用な情報を得ることができる。これまでにも光刺激により光変換をすることのできる蛍光タンパク質により特定の部位の分

子をマーキングする方法が開発されているが、励起の際に2波長を必要とすることや多量体を形成するなど問題点もある。そこで、蛍光タンパク質2分子間のFRETを利用して1波長の励起で光変換前と変換後の両方の状態の蛍光色を同時に観察することができ、蛍光タンパク質指示薬を開発し細胞内でのタンパク質動態解析を行った。

光変換タンパク質を用いた拡散係数測定法の開発：
現在、限られた領域の蛍光タンパク質のみを褪色(bleaching)させた後に分子の流入による蛍光の回復を測定する fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) や微小領域の蛍光強度の揺らぎを検出する fluorescence correlation spectroscopy (FCS) がタンパク質拡散定数の決定に主に用いられている。FRAPは速い拡散、FCSは遅い拡散の測定に不向きであるためそれらは相補的に用いられており、またそれぞれに特有の問題点も抱えている。そこで本研究では、FRAP測定法をベースにして光刺激により色を変化させる蛍光タンパク質光変換タンパク質をタグとして用いて広域の速度レンジの拡散を解析できる測定法 fluorescent decay after photoactivation (FDAP) を開発した。

B. 研究方法

(1) プリオン動態の電子線高分解能構造解析

ヒト由来の神経前駆細胞等に発現している正常プリオンタンパク質を対象にした。非常に高い時間分解能を持つヘリウム冷却仕様純銅圧着型の急速凍結法により、生きた状態の細胞まるごとひとつを物理的に固定した。これらを電子顕微鏡の出発試料として、細胞質内部には樹脂包埋ブロックの超薄切片や、細胞膜直下にはプラチナ炭素のフリーズレプリカを作成して、構造解析を行った。さらに、複数種のタンパ

ク質に対する抗体を用いた免疫染色により、正常プリオンタンパク質との複合体形成の候補分子群を探索した。

(2) アルツハイマー病モデルに於けるシナプス分子の輸送制御機構解析

タンパク質の細胞内での構造・動態を明らかにするために、蛍光性のタグをもった神経機能分子を作製し、イメージング技術を用いて動態を計測する。蛍光分子イメージングは、生きた細胞におけるリアルタイムでの分子動態の解析に適している。本研究では、神経機能に重要なイオンチャンネルの動態解析、及びタウ型変性疾患の原因遺伝子であるタウのモノマーからオリゴマーへの変換過程を蛍光偏光消光法によって定量化する。溶液中での計測について、生細胞でのオリゴマー化を偏光蛍光顕微鏡(本研究班の班員である北海道大学永井教授との共同研究)により定量解析する。

光学的解析は、動態解析には適しているが、空間解像度は250ナノメートル程度が下限となっている。従って、より微細な細胞構造を明らかにするために、電子線解析から3次元画像を構成し、タンパク質分子が実際に機能している場に関する知見を得るための研究を進める。

(3) パーキンソン病モデルに於けるユビキチン・プロテオソームシステムの制御機構解析

Uch-L1タンパク質の結晶構造解析から得られた構成原子の3次元座標データを用い、分子力学計算のツールであるディスカバー3ならびにAmber9を用いて各アミノ酸側鎖に水素原子を付加してエネルギーの最小化を行った。次にタンパク質分子表面に存在するポケット構造を検索するツールであるスフェアジェネレーターによって一定の分子量の化合物が入り

込むことが出来るポケット構造を探し出した。それらのポケット構造の中から活性中心部分を含むポケット近傍の仮想ナノ空間に対してChemBridge社の化合物バーチャルライブラリーを構成する約3万個の化合物に対してドッキングシミュレーションツールであるDockならびにGoldにより結合可能性スコアを計算することでスクリーニングを行った。結合可能性スコア上位5化合物に関して、実際にChemBridge社から化合物を入手して、Uch-L1タンパク質の酵素活性に対する影響をユビキチン-AMCを基質として酵素化学的に解析を行なうことで、Uch-L1作用薬剤を同定した。

(4) シナプス機能分子の動態解析

1. 子宮内電気穿孔法によるマウス胎仔脳への遺伝子導入

ソムノペンチルによる麻酔下、妊娠15.5日齢のマウスから子宮を取り出し、ガラスマイクロピペットを用いて約4mlのプラスミドDNA (5mg/ml) を子宮の上から胎仔の脳室内に注入後、40mV、70-80mAで4回のパルス電流を流し、脳室帯の細胞にプラスミドDNAを導入した。その後、子宮を母親マウスの腹腔内に戻し一定期間飼育後、遺伝子を導入した新生児の脳を免疫組織染色法により解析した。

2. 免疫組織染色法による特定シナプスの解析

ジエチルエーテルによる深麻酔下、新生児の脳を4%パラホルムアルデヒドにて還流固定し脳を摘出後、クリオスタットを用いて50mmの脳切片を作製した。免疫組織染色法は常法に従いラットモノクローナル抗EGFP抗体およびラビットポリクローナル抗DsRed抗体を用いて浮遊法にて行った。

(5) 光照射による生体機能操作法の開発

KillerRedに対する部位特異的変異導入: KillerRedを大腸菌発現ベクターpRSETbのBamHI/HindIIIに挿入

した。KillerRedとGFPやDsRedとの配列比較から、KillerRedが二量体形成すると考えられるA/B、A/C界面を推定し、両界面に部位特異的変異を導入した変異体KillerRed発現ベクターを計18種類構築した。本発現ベクターにて大腸菌JM109 (DE3)を形質転換して蛋白質を発現させた。JM109をソニケーターにて破碎後、粗精製液をNative-PAGEに供した。

KillerRedに対するランダム変異導入: 従来の蛍光タンパク質とのタンパク質一次構造比較から、KillerRedの発色団が推定できた。67-69番目に位置する発色団に対し、一アミノ酸ずつ部位特異的ランダム変異を導入した。変異導入ベクターにて大腸菌JM109 (DE3)を形質転換して蛋白質を発現させた。三種類の変異体に関してそれぞれ約300コロニーが形成され、すべてのコロニーに関してコロニーの色とSafe Imager (Invitrogen)で蛍光色を確認し、赤色以外を呈するコロニーを探索した。

新規光変換タンパク質の遺伝子構築: pcDNA3 (Invitrogen) のマルチクローニングサイトのに BamHI-EcoRIにmseCFP蛋白質 (C末端13残基欠失、Stopコドン無し) とPA-GFP蛋白質 (N末端13残基欠失) をコードする遺伝子をこの順で挿入した pCDNA3-Phamret プラスミドを構築した。また、C末端 (EcoRI-XhoI) に核局在化を示す転写因子PP2C γ を付加した Phamret を発現するプラスミド pCDNA3-Phamret-PP2C γ を構築した。

新規光変換タンパク質の細胞への遺伝子導入: HeLa細胞を70~80%コンフルエントになるようにまたは35 mm ガラスボトムディッシュに撒いた。pCDNA3-Phamret プラスミド又は pCDNA3-Phamret-PP2C γ をSuperfect Transfection Reagent (QIAGEN) でHeLa細胞にトランスフェクションした。CO₂インキュベーターで18~24時間培養後、

顕微鏡観察を行った。

新規光変換タンパク質の顕微鏡観察: 共焦点レーザー顕微鏡Olympus FV-1000 (Olympus)、油浸60倍対物レンズNA1.35で観察を行った。458nmのレーザー光で励起し、405nmの刺激光でPA-GFP部分を活性化してmsecCFPからPA-GFPへのFRETにより光変換させた。光変換前のmsecCFPの蛍光を460-510nm、光変換後のPA-GFPの蛍光を510-600nmのレンジで取り込んだ。PP2C γ の観察では25msecで刺激を行い1フレーム当たり26msecでスキャンした。

新規光変換タンパク質の拡散係数測定: 共焦点レーザー顕微鏡Olympus FV-1000 (Olympus)、油浸60倍対物レンズNA1.35で測定を行った。488nmの励起光を用い、405nmの刺激光で光変換を行った。刺激光は0.25msecの間ポイントで与え、4200Hzの往復のラインスキニングで測定した。測定データのカーブフィッティングによる解析は数値解析ソフトOrigin (OriginLab)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究課題に関わるヒトゲノム・遺伝子解析研究および実験動物への動物愛護上の配慮は、国立精神・神経センター神経研究所および北海道大学、東京農工大学の運営指針に関する規則に従い遵守され、倫理的かつ科学的に達成された。

C. 研究結果

(1) プリオン動態の電子線高分解能構造解析

液化ヘリウム冷却仕様の純銅圧着急速凍結法により、正常プリオンタンパク質に関係すると考えられる、2つの構造を明らかにした。フリーズレプリカ法との併用により、神経前駆細胞の細胞膜直下全体にわたって、クラスリン被覆ピットやアクチンフィラメントで構築され

る膜骨格のネットワークを電子顕微鏡レベルの分解能で可視化した。凍結置換・超薄切片法との併用により、正常プリオンタンパク質がシャペロンや14-3-3タンパク質とで見せる、ミトコンドリア上で複合体形成が、膜中のコレステロールやアクチンフィラメントの重合状態により影響をうけることを示した。この小さな分子複合体の構造的特徴について、2次元透過像では不充分であることがわかったため、現在、3次元レベルの構造解析を進めている。

(2) アルツハイマー病モデルに於けるシナプス分子の輸送制御機構解析

- 1) 我々はこれまで、脳由来神経栄養因子 BDNF のノックアウトマウスの解析から、発達期の興奮性シナプスは機能的にサイレントであることを明らかにしてきた(PNAS, 2003)。サイレントであるとは、グルタミン酸受容体のうち、NMDA 受容体は応答性を示すものの、AMPA 型受容体は応答性を示さないことを意味する。今年度、大脳皮質の抑制性ニューロンのBDNFによる機能発達に関して詳細な解析をおこない、電気生理学的機能とカルシウムタンパク質(パルプアルブミン、カルレチニン)の発現との関連を明らかにした(原著(2)参照)。
- 2) 分子イメージングの方法により BDNF がシナプス後膜における AMPA 受容体の量を増加させることを明らかにした。具体的には、培養大脳皮質錐体細胞の樹状突起とスパインの領域について、FRET 法によってカルシウムイメージングを行い、グルタミン酸の光活性化化合物(caged compound)及び、NMDA 受容体の選択的な抑制剤を用い、NMDA 受容体が機能していることを確認した。ついで、BDNF によっても同様な細胞内

カルシウム濃度の上昇を確認した。BDNF によるカルシウム濃度の上昇がおこることが確認された部位で、AMPA 受容体の細胞表面への移行が増加するか否かを明らかにするために、細胞を固定後、受容体の細胞外ドメインに対する抗体で染色し、同時にシナプス後膜のマーカーである PSD95 の抗体染色を行い、PSD95 と重なる AMPA 受容体の蛍光量を計量した。BDNF 投与によりこの表面発現率は40%程度増加した。次に、この上昇を制御するカルシウムシグナルを明らかにするために、BDNF 受容体によって活性化されるホスホリパーゼの阻害剤を投与したところ、細胞内ストアからのカルシウム動員が抑制されるとともに、AMPA 受容体の膜表面への移行も阻害された。さらに細胞膜やスパインには細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出によって活性化される TRP カチオンチャンネルが存在することを抗体染色により明らかにしたうえ、このチャンネルの機能を抑制すると AMPA 受容体の膜表面への移行が部分的に抑制されることを示した。TRP チャンネル自体、BDNF によってシナプス膜表面に移行することが確認されたが、NMDA 受容体の動態は変化しなかった(原著(3)参照)。

- 3) 脳由来神経栄養因子 BDNF はエピソード記憶の形成、記憶の想起に重要であり、我々は、その分泌異常がアルツハイマー病と相関していることを SNP 解析により明らかにしてきた(投稿準備中)。BDNF の受容体として、チロシンキナーゼをもつタイプとチロシンキナーゼを持たず代わりに、11 アミノ酸からなる配列をもつタイプ(T1)が知られている。この配列は、マウスからヒトまで種を超えて保存されていることから、我々はこの配列に選択的に結合する分子をスクリーニングしたとこ

ろ、細胞骨格の制御に重要な Rho-GTPase の調節因子である Rho-GDI が同定された。Rho-GDI は T1 に結合しているが、BDNF が T1 に結合すると細胞質に遊離され、Rho-GTPase を抑制する。T1 はアストログリア細胞に唯一発現している BDNF の受容体であることから、BDNF をグリア細胞に添加すると、Rho-GTPase のうち、Cdc42 あるいは Rac1 を介し、速やかな形態変化を引き起こすことが明らかとなった。さらに、この形態変化は、急性脳切片を用いても示され、このとき、グリア細胞の突起とシナプスとの接触が増加していた。以上のように、BDNF は神経細胞の形態を制御するのみならず、シナプスの機能的成熟にも重要な役割を果たしていること、さらにグリア細胞の形態を変え、神経伝達の調節に関与している可能性を示した(原著(1)参照)。

(3)パーキンソン病モデルに於けるユビキチン・プロテソームシステムの制御機構解析

Uch-L1の作用薬剤の同定を目指した本研究では DockならびにGoldの2種類のin silicoドッキングシミュレーションのテクノロジーを組み合わせで用いた。Dockはタンパク質ポケットの構造と化合物構成原子のファンデルワールス半径から導き出される形状の相補性を計算で求める手法で主として分子のナノレベルの形に着目した化合物スクリーニング手法である。一方、Goldはタンパク質を構成するアミノ酸残基と化合物との水素結合ならびに疎水性相互作用からなる自由エネルギーを計算して結合可能性を解析するスクリーニング手法である。本研究では最初、化合物が標的ポケットに入り込めるかに関してDockによって調べた後に、Goldで分子間結合ならびに相互作用を調べるという2段階のチェイン・スクリーニングの新しい手法を確立した。一方、化合物ライブラリーに

関してはChemBridge社の脳内移行性が高いと予想されるCNSセット化合物ライブラリーを潜在的毒性化合物をADME/TOXフィルターによって排除して利用した。Dock/Goldチェインスクリーニングによって約3万個の化合物をスクリーニングした結果、最終的なGOLDスコアが60を超える様な10~100 μ M程度の結合親和性が予測される化合物が5種類見つかった。これらの化合物に関して次にユビキチンを基質とした酵素化学的な手法による解析をおこなった。ユビキチン・プロテアソーム系においてUch-L1は余分なアミノ酸等が付加されたユビキチンから付加物を除去することでユビキチンの細胞内でのリサイクリングに働いていると考えられている。そこでユビキチンに蛍光分子である7-アミノ-4-メチルクマリリン(AMC)が付加された人工基質であるユビキチンAMCを用いてUch-L1による経時的なAMC切断に対する各化合物の効果を検討した。その結果5化合物中2種類の化合物がUch-L1によるユビキチンAMC切断活性を上昇させる事が明らかになった。さらに、酵素活性促進を定量的に解析し統計学的に検証するためにユビキチンAMC切断の初速度を求めDunnettテストを行った。その結果、2種類の化合物はUch-L1の酵素活性を有意に約20%上昇させる事が確かめられた。これらUch-L1活性促進化合物はメチルフェニルもしくはメキシフェニルを主骨格とする構造上似通った化合物であり、何れもUch-L1の16番目のメチオニン残基ならびに90番目のシステイン残基と水素結合を形成して作用することがより詳細なドッキング解析より明らかになった。

(4) シナプス機能分子の動態解析

DsRedをShank3のN末側に融合したDsRed-Shank3をCMV-IEエンハンサー/chicken b-actinプロモータ

ーを有する発現ベクターpCAGGSに導入し、pCAGGS-DsRed-Shank3を構築した。プラスミドpCAGGS-DsRed-Shank3およびpCAGGS-EGFPを9:1 (4.5mg/ml:0.5mg/ml)に混合し、電気穿孔法を用いて15.5日齢のマウス胎仔脳の脳室内に導入した。その結果、生後1日目の新生児の脳において、EGFPおよびDsRedのシグナルが脳皮質表層側で観察された。また、生後15日目の新生児の脳において、EGFPシグナルを有する神経細胞でスパインの形成が観察され、さらに、そのスパインにおいてDsRedの強いシグナルが観察された。

(5) 光照射による生体機能操作法の開発

KillerRedの機能改変: 従来のKillerRedとはまったく異なる黄色を呈したコロニーを得た。本コロニーを培養し、本変異体タンパク質を精製したところ、447nmに吸収波長ピークを持ち、蛍光波長ピークは531nmを示す新しい変異体であることが分かった。また、単良体化したKillerRed変異体(mKillerRed)の作成にも成功した。単良体化に伴う光増刊活性の低下は認められなかった。これを裏付ける結果として、ヒト培養細胞のミトコンドリアにmKillerRedを発現させ、緑色光を短時間照射すると、ほぼ100%の効率でアポトーシスを誘導することができた。

新規光変換タンパク質の開発とその応用: 転写因子PP2C γ を付加した光変換蛍光タンパク質PhamretをHeLa細胞内で発現させ核内動態観察を行った。微小なスポットで光刺激を行いタイムラプスイメージング観察した。刺激を行った位置から離れた場所において刺激後3フレーム目のイメージで色変換された分子の移動による色変換後の色の蛍光強度の増大と色変換前の色の蛍光の強度の減少を同時に観察することができた。4フレーム目ではいずれの蛍光も強度

が定常状態に緩和しており、1波長励起での同時観察が動きの速い分子の観察において有効であることを示すことができた。

光変換タンパク質を用いた拡散係数測定法の開発：
光活性化の過程は非常に速く起こるためこれまでに用いられていた光褪色を利用したFRAP法での刺激時間の1/100以下である0.25 msecという短い時間で刺激を行うことができる。その結果、刺激中の分子の拡散による影響が少なく従来法で信頼できる範囲とされていた $10 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ を超える溶液中での速い拡散Phamretの速い拡散($49.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{sec}$)について正確に拡散定数を求めることができた。また、生細胞内で発現するPhamretの細胞内での拡散について細胞周期の各段階で拡散定数を求めてその違いを明らかにすることができた。

D. 考察

(1) プリオン動態の電子線高分解能構造解析

GPI構造を持つ正常プリオンタンパク質の細胞膜表面での動態に深く関わると予想されていた、アクチン膜骨格が初めて可視化されたことの意義は大きい。細胞膜上に局在すると考えられたプリオンタンパク質が、ミトコンドリア膜上でタンパク質の高次構造制御に深く関わるシャペロンやクロイツフェルトヤコブ病の診断マーカーと相互作用する事実も、プリオンの悪性化を理解するうえで、無視できない。厚生労働省の医療政策としても、非常に重要であるプリオン病対策に関連して、プリオンタンパク質の悪性化に関わる、細胞局所場の構造情報の1端が、より詳細に解明され始めたことは、重要な成果である。

(2) アルツハイマー病モデルに於けるシナプス分子の輸送制御機構解析

1) 脳由来神経栄養因子 BDNF によってグルタミン

酸受容体のひとつである AMPA 受容体のシナプスの後膜における発現量が増加することが明らかとなった。シナプス後膜における発現量を増加させる仕組みとしては、シナプス膜への移行を増加させるか、シナプス膜から細胞質への移行の抑制が考えられる。この増加には、細胞内外のカルシウムシグナルが重要な役割を果たしていることも示されたため、さらにカルシウムシグナルの下流で、どのような情報伝達機構が働いているかに関してさらに解析をおこない、膜への移行、膜からの除去のいずれの過程が BDNF によって制御されているかを明らかにしたい。この問題の解決のためには、live imaging の方法が必要で、これについても引き続き取り組む。

- 2) BDNF が RhoGTPase の抑制を介してグリア細胞の形態を制御し、グリアとニューロンの接触を制御する可能性が示された。グリア細胞には、GFAP と呼ばれる骨格タンパク質が存在しているため、BDNF がどのようなシグナル伝達機構で、グリア細胞の骨格系を制御しているかを明らかにすることは重要な課題である。
- 3) BDNF はヒトにおいてもエピソード記憶の形成に必要であることが示されており、実際、我々は、BDNF のシナプス終末部からの分泌に異常をもつ遺伝子多型とアルツハイマー病の発症に相関があることを見出している。このため、BDNF の下流でどのような因子がシナプス機能の調節に関与しているかを明らかにすることは、創薬の標的を定めるためにも必要である。

(3) パーキンソン病モデルに於けるユビキチン・プロテオソームシステムの制御機構解析

これまでにUch-L1の活性を促進するような薬剤は見つかっていないことから、本研究でUch-L1活性促進

剤を同定したことの意義は大きいと考えられた。本研究で見いだされたUch-L1活性促進薬剤はUch-L1に対する親和性は実用レベルには至らないものの、今後、Uch-L1活性促進によるアルツハイマー病治療薬開発のためのリード化合物となる事が期待される。

(4) シナプス機能分子の動態解析

これまでの研究から、15.5日齢のマウス胎仔の脳室帯からは大脳皮質第III層を形成するニューロンが誕生すると考えられている。生後1日目の大脳皮質において、EGFP陽性およびDsRed陽性細胞が表層側に位置していたことから、両発現ベクターは側脳室の神経幹細胞に導入された後各々の蛋白質が発現され、さらに、これら遺伝子が導入された神経幹細胞は正常にニューロンに分化、移動したと考えられる。また、生後15日齢の新生児の大脳皮質では、シナプスの形成がさかんに行われている。スパインにおいてDsRedの強いシグナルが観察されたことは、組織レベルでスパインの可視化技術の構築を示すとともに、シナプス機能分子の動態解析が可能であることを示唆している。

(5) 光照射による生体機能操作法の開発

新規光変換タンパク質の開発とその応用: 核内で速く動く分子であるPP2C γ を付加したPhamretの光刺激後のタイムラプスイメージングにより1波長励起2波長測光が連続画像取り込みを行うイメージングの際に蛍光色の変化した分子の流入と変化する前の分子の流出を同時に観察することができた。そして、高い時間分解能が要求される速い動きをする分子のイメージングの際に、2つの励起光を用いて交互に測定する場合に比べて有利であることが示された。今後、様々なシグナル配列やタンパク質と融合させて動態解析から新たな生命現象が明らかにされること

が期待される。

光変換タンパク質を用いた拡散係数測定法の開発:

FDAP法を用いた解析により従来FCS法で行われてきた速い動きからFRAP法で行われてきた遅い動きまで幅広い速度領域の拡散を精度良く解析することができた。FDAPの測定系にはFCSで用いるような特別な装置を必要としないので本法は通常の細胞観察の顕微鏡システムを用いてFCSレベルに至る速い拡散を調べることができる新しいツールとしてタンパク質動態解析の研究に貢献することが期待される。

E. 結論

(1) プリオン動態の電子線高分解能構造解析

正常プリオンタンパク質の細胞局所場での電子線構造解析により明らかにされた、神経細胞膜骨格とミトコンドリア膜は、プリオン悪性化の極初期過程を解明するうえで、重要な構造であると考えられる。

(2) アルツハイマー病モデルに於けるシナプス分子の輸送制御機構解析

- 1) ヒトの記憶形成、想起に重要で、アルツハイマー病との相関が示されている脳由来神経栄養因子BDNFはカルシウムシグナルを制御することにより、グルタミン酸受容体のひとつであるAMPA型受容体をシナプス膜の表面における発現量を増加させることが明らかとなった。
- 2) BDNFはグリア細胞においては、その形態を制御し、シナプスの機能を調節している可能性が示された。

(3) パーキンソン病モデルに於けるユビキチン・プロテオソームシステムの制御機構解析

コンピュータによるUch-L1分子を標的とした創薬手法によりアルツハイマー病治療薬開発のためのリード化合物候補を2種類同定した。

(4) シナプス機能分子の動態解析

神経回路網構築の基盤となるシナプスの構造活性相関を解析するため、電気穿孔法を用いて特定のニューロンにEGFPを発現させ組織レベルでシナプスを可視化する技術を構築した。さらに、この技術を重度の言語障害を主徴とする自閉症(22q13.3欠失症候群)の責任遺伝子がコードするシナプス機能分子Shank3に適応することにより、神経回路網構築時のシナプス機能分子の動態解析が可能であることを示した。

(5) 光照射による生体機能操作法の開発

新規光変換タンパク質の開発とその応用: 光刺激により光変換する蛍光タンパク質指示薬Phamretにより1波長励起2波長測光で生細胞内での光変換と速い動きをする分子のタイムラプス計測を行うことに成功した。

光変換タンパク質を用いた拡散係数測定法の開発: 光変換タンパク質を用いて速い動きから遅い動きまで幅広い速度レンジの拡散を測定することのできるFDAP法を開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) プリオン動態の電子線高分解能構造解析

① 論文発表

(研究業績「欧文」)

【原著】

1. Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Sato S, Hatanaka K, Fukuda Y, Chiba T, Morone N, Yuasa S, Inokuchi K, Ohtsuka T, Macgregor GR, Tanaka K, Setou M.

SCRAPPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):943-57.

2. Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra CA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I. Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease. *Neurology*. 2007 Sep 4;69(10):1043-9.
3. Moritake S, Taira S, Ichiyanagi Y, Morone N, Song SY, Hatanaka T, Yuasa S, Setou M. Functionalized nano-magnetic particles for an in vivo delivery system. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007 Mar;7(3):937-44.

(研究業績「和文」)

【総説】

1. 諸根信弘, 臼倉治郎. 急速凍結ディーブエッチング法による細胞膜のナドメイン解析. *細胞工学* 2007. Vol.26 No.7, 822-826.
2. 諸根信弘, 臼倉治郎, 楠見明弘. 電子線<フリーズレプリカ>トモグラフィー法による細胞膜骨格の3次元イメージング. *顕微鏡* 2007. Vol.42 No.3, 150-154.

② 学会発表

【国際学会】

1. N. Morone, T. K. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, and A. Kusumi. Electron tomography reveals the plasma membrane compartmentalization as its three dimensional interplay between membrane and cytoskeletal systems. The American Society for Cell Biology a& European Cytoskeleton Forum "Dynamic interplay between cytoskeletal and membrane systems", Dijon France, June 28, 2007.
2. N. Morone, J. Satoh, F. Wakui, T. Yamamura, S. Yuasa. GPI-anchored protein localizes with 14-3-3 and HSP60 on the mitochondria in human neural progenitors. American Society

for Cell Biology 47th Annual Meeting,
Washington DC, December 5, 2007.

3. N. Morone. Caveolae and actin-based membrane skeleton in adipocyte differentiation of the mouse embryonic fibroblast The First iCeMS International Symposium/The Eleventh MEMBRANE RESEARCH FORUM. Kyoto Japan, February 22, 2008.
4. N. Morone. The structural interplay between the plasma membrane and cytoskeletons in neural systems: a deep-etch EM research. The 38th Seiriken/Sokendai International Conference, "Stock and flow of functional molecules in synapse" Okazaki Japan, March 19, Japan.

【国内学会】

1. N. Morone, T. K. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, and A. Kusumi. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton just beneath the plasma membrane by electron tomography. Biochemistry and Molecular Biology 2007, Yokohama Japan, December 11, 2007.
2. 諸根信弘. 細胞膜インターフェイスの構造組織化. 日本顕微鏡学会生体構造解析分科会 2007年度研究討論会VII. 独立行政法人産業技術総合研究所 臨海副都心センター. 晴海 東京. 2007.12.20.
3. 諸根信弘. 電子線<フリーズレプリカ>トモグラフィ法で細胞膜構造を3次元解析する. 日本顕微鏡学会関東支部講演会. 東京. 2008.03.08.
4. 和久井文、湯浅茂樹、諸根信弘. ディープエッチング法による内分泌細胞膜のカベオラドメイン解析. 日本顕微鏡学会関東支部講演会. 東京. 2008.03.08.

(2)アルツハイマー病モデルに於けるシナプス分子の輸

送制御機構解析

①論文発表

【原著】

- 1) Ohira K, Funatsu N, Homma K, Sahara Y, Hayashi M, Kaneko T, Nakamura S: Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. Eur J. Neurosci, 25: 406-416, 2007.
- 2) Itami C, Kimura F, Nakamura S: BDNF regulates the maturation of layer 4 fast spiking cells after the 2nd postnatal week in the developing barrel cortex. J. Neuroscience, 27: 2241-2252, 2007.
- 3) Nakata H. and Nakamura S: Brain-Derived Neurotrophic Factor regulates AMPA Receptor Trafficking to Postsynaptic Densities via IP3R and TRPC Calcium Signaling. FEBS Letters, 581: 2047-2054, 2007.

②学会発表

【国際学会】

- 1) Itami C., Kimura F. and Nakamura S: BDNF regulates the maturation of layer 4 fast spiking cells after the 2nd postnatal week in the developing barrel cortex, IBRO World Congress of Neuroscience, July 12-17, 2007, Melbourne Australia
- 2) Itami C, Kumanogoh H, S. Masuda S, Takeda S, Obata K, Yanagawa Y, Watanabe S, Nakamura S: Gene expression analysis of inhibitory cells derived from developing barrel cortex in BDNF knockout mice, Neuroscience 2007, the 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 3 to 7, San Diego.

【国内学会】

- 1) Nakata H, Nakamura S: The specific role of second messengers in AMPA receptor translocation to postsynaptic sites by BDNF 第30回日本神経科学会、2007年、9月12日、横浜

(3) パーキンソン病モデルに於けるユビキチン・プロテオソームシステムの制御機構解析

①論文発表

(研究業績「英文」)

1. Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., Wada, K. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem Int.* 50, 119-129 (2007).
2. Nishimoto, M., Furuta, A., Aoki, S., Kudo, Y., Miyakawa, H. and Wada, K. PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia.* 55, 317-27 (2007).
3. Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., Wada, K. Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.* 573, 20-28 (2007).
4. Zushida, K., Sakurai, M., Wada, K., Sekiguchi, M. Facilitation of extinction learning for contextual fear memory by PEPA: A potentiator of AMPA receptors. *J Neurosci.* 27(1): 158-166. (2007).
5. Tanabe, K., Gamo, K., Aoki, S., Wada, K., Kiyama, H. Melanocortin receptor 4 is induced in nerve-injured motor and sensory neurons of mouse. *J. Neurochem.* 101, 1145-1152, (2007).
6. Hattori, S., Hashimoto, R., Miyakawa, T., Yamanaka, H., Maeno, H., Wada, K. Kunugi, H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behav. Brain Res.*, 80, 69-76, (2007).
7. Aiba A, Inokuchi K, Ishida Y, Itohara S, Kobayashi K, Masu M, Mishina M, Miyakawa T, Mori H, Nakao K, Obata Y, Sakimura K, Shiroishi T, Wada, K., Yagi T. Mouse liaison for integrative brain research. *Neurosci Res.* 58, 103-104, (2007).
8. Ohinata, K., Sonoda, S., Inoue, N., Yamauchi, R., Wada, K., Yoshikawa, M. beta-Lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from bovine beta-lactoglobulin, enhances memory consolidation in mice. *Peptides.* 28, 1470-1474, (2007).
9. Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., Wada, K. Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. *Bioorgan. Med. Chem* 15, 6810-6818, (2007)

②学会発表

1. Kimiwada, T., Sakurai, M., Ohashi, H., Aoki, S., Tominaga, T., Wada, K. Clock genes regulate neurogenic transcription factors and the neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells, Neuro2007, Yokohama, 11 Sep. (2007).
2. Kazunori Hirayama, Shunsuke Aoki, Kaori Nishikawa, Takashi Matsumoto, Keiji Wada. Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds by in silico drug screening. Neuro2007, Yokohama, 11 Sep. (2007).

(4) シナプス機能分子の動態解析

①論文発表

- 1 Yamakawa H., Oyama S., Mitsuhashi H., Sasagawa N., Uchino S., Kohsaka S., Ishiura S. (2007) Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin-g2, and the interactions are affected by autism-related mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 41-46.
- 2 Okamoto N., Kubota T., Nakamura Y., Murakami R., Nishikubo T., Tanaka I., Takahashi Y., Hayashi S., Imoto I., Inazawa J., Hosokai N., Kohsaka S., Uchino S. (2007) 22q13 microduplication in two patients with common

clinical manifestations: A recognizable syndrome?. Am. J. Med. Genet. A. 143A, 2804-2809.

②学会発表

(国内学会)

- 1 内野茂夫、福村玲子、田畑秀典、平澤孝枝、服部功太郎、湯浅茂樹、仲嶋一範、高坂新一: 大脳皮質形成過程における NMDA 受容体を介した細胞移動の分子基盤、第30回日本神経科学会・第50回日本神経化学会・第17回日本神経回路学会 合同大会、横浜、9.10.2007.
- 2 服部功太郎、内野茂夫、伊早坂智子、高坂新一、八木健、湯浅茂樹: Fyn チロシンキナーゼ活性化を介する抗精神病薬作用機序の解析、第30回日本神経科学会・第50回日本神経化学会・第17回日本神経回路学会 合同大会、横浜、9.10.2007.
- 3 岡村敏行、片山貴博、松田知己、永井健治、木村宏、内野茂夫、高坂新一、南雅文: リアルタイムイメージングを用いた培養海馬切片組織切片におけるミクログリア活性化機構の解析、第30回日本神経科学会・第50回日本神経化学会・第17回日本神経回路学会 合同大会、横浜、9.10.2007.
- 4 岡本伸彦、久保田健夫、細貝昇、内野茂夫: 自閉症と SHANK3 異常の関連、第52回日本人類遺伝学会、東京、9.15.2007.

(5) 光照射による生体機能操作法の開発

①論文発表

(研究業績「英文」)

1. T. Matsuda, A. Miyawaki and T. Nagai: "Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a rationally designed photo-convertible fluorescent protein" *Nature Methods* in press

2. Yamamoto T, Kumagai A, Saito K, Nadai T, Two-photon excitation behavior of thiophene-based oligomers and a polymer. *J Nanosci Nanotechnol.* in press
3. Takemoto K, Kuranaga E, Tonoki A, Nagai T, Miyawaki A, Miura M. Local initiation of caspase activation in *Drosophila* salivary gland programmed cell death in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 13367-13372, 2007
4. Wei C, Nagai T, Wei W, Nemoto T, Awais M, Niwa O, Kurita R and Baba Y. New advances in nanomedicine: diagnosis and preventive medicine. *Med Clin North Am.*, 91, 871-879, 2007

(研究業績「和文」)

1. 松田 知己, 永井 健治: 「光活性化・光変換蛍光タンパク質を用いたタンパク質動態解析」 *バイオインダストリー* 25(2): 21-26 (2008)
2. 永井健治: 「蛍光イメージングー最近の進歩: 回折限界の壁を越える工夫ー」 *病理と臨床*, 25(6), p414-519 (2007)
3. 永井健治: 「改変型蛍光タンパク質の利用」、講義と実習 生細胞蛍光イメージング、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、67-78、共立出版、2007
4. 永井健治、小寺一平: 「共鳴エネルギー移動(FRET)の利用」、講義と実習 生細胞蛍光イメージング、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、110-117、共立出版、2007
5. 永井健治、斉藤健太: 「FRETの測定法と評価」、講義と実習 生細胞蛍光イメージング、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、118-128、共立出版、2007
6. 斉藤健太、松田知己、原口徳子、永井健治: 「FRET」、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、268-277、共立出版、2007
7. 小寺一平、谷知己、永井健治: 「全反射顕微鏡」、講義と実習 生細胞蛍光イメージング、原口徳子、

- 木村宏、平岡泰 編、291-297、共立出版、2007
8. 竹本研、永井健治、宮脇敦史、三浦正幸:「アポトーシスの検出」、実験が上手いく蛍光・発光試薬の選び方と使い方、三輪佳宏編、143-146、羊土社、2007
 9. 谷知己、永井健治:「スパイはひとりで十分」、実験が上手いく蛍光・発光試薬の選び方と使い方、三輪佳宏編、147、羊土社、2007
 10. 小寺一平、永井健治:「FRETプローブ」、実験が上手いく蛍光・発光試薬の選び方と使い方、三輪佳宏編、158-162、羊土社、2007

②学会発表

3. Takeharu Nagai: "Imaging Biological Events Using FRET-based Sensor Proteins", International Symposium on Advance Techniques for Molecular Imaging, Taichu, Taiwan (2007-12)
4. 永井健治:「生理機能センサタンパク質によるバイオイメージング」、第3回バイオ機器勉強会、北九州 (2007-12)
3. 永井健治:「蛍光イメージングの新たな展開」、第30回日本分子生物学会年会、横浜 (2007-12)
4. 永井健治:「合理的に設計した光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質」、光学会、大阪 (2007-11)
5. 永井健治:「イメージングの現在と未来」、視る生物学2-イメージングの現在と未来-、奈良 (2007-11)
6. Takeharu Nagai: "Imaging biological functions using FRET-based sensor proteins", Frontier Biomedical and Electro-optical Science, Taipei, Taiwan (2007-11)
7. Takeharu Nagai: "Perspective of bioimaging using fluorescent and bioluminescent proteins", J Symposium on Promotion of Academic Excellence, Taipei, Taiwan (2007-11)
8. Takeharu Nagai: "Engineering fluorescent proteins to visualize biological functions.", Joint Symposium for the Promotion of Academic exchange on Nanotechnology and Nanobiology, Sapporo (2007-11)
9. Takeharu Nagai: "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions", Annual Meeting of Korean Society for Molecular Biology and Biochemistry, Seoul, Korea (2007-10)
10. 永井健治:「蛍光顕微鏡の展開 —GFPとFRET—」、第3回ライブセルイメージング講習会、つくば (2007-10)
11. Takeharu Nagai: "Engineering Fluorescence Proteins", Microscopia de Fluorescencia y Confocal Espectral, Mexico City, Mexico (2007-9)
12. Takeharu Nagai: "ENGINEERING FLUORESCENT AND BIOLUMINESCENT PROTEINS TO VISUALIZE BIOLOGICAL FUNCTIONS", The 5th International Forum on Post-Genome Technologies, Shujuo, China (2007-9)
13. Takeharu Nagai: "ENGINEERING FLUORESCENT AND BIOLUMINESCENT PROTEINS TO VISUALIZE BIOLOGICAL FUNCTIONS", The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Tokyo (2007-9)
14. 永井健治:「バイオイメージング技術に望むもの —「細胞は如何にして外界情報を知覚するか?」の探求—」、平成19年度科研費特定領域研究「細胞感覚」夏の班会議・若手の会、葉山 (2007-8)
15. 永井健治:「GFPは何故光る?」、第16回 浜松医科大学メディカルホトニクス・コース、浜松

(2007-7)

16. Takeharu Nagai: "Visualization of biological function by using FRET- and BRET-based indicator", APBP2007 3rd Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics & Biophotonics Downunder II, Cairns (2007-7)
17. 永井健治:「蛍光・化学発光タンパク質を利用して何ができるか?」、生物発光化学発光研究会第25回学術講演会、札幌(2007-6)
18. 永井健治:「蛍光・発光タンパク質を利用した生理機能センサーの開発とライブイメージング」、第一回生体分子イメージングの新たな技術開発に関する研究会、名古屋(2007-6)
19. Takeharu Nagai: "Various Applications of Fluorescent Proteins for Cell Biology", 16th Annual Meeting of the Korean Society for Smooth Muscle Research, Seoul, Korea (2007-6)
20. 永井健治:「バイオイメージング技術の展望」、第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、福岡 (2007-5)
21. Takeharu Nagai: "GFP and Quantum Dot", Advanced Microscopy Course for Bio-Medical Research, Beijing, China (2007-5)
22. 友杉亘、松田知己、小寺一平、斉藤健太、永井健治:「群青色蛍光蛋白質の開発」、日本生物物理学会第45回年会、横浜 (2007-12)
23. 松田知己、宮脇敦史、永井健治:「Phamret: 光活性化と蛍光エネルギー移動を利用した細胞生物学研究のための効果的な蛍光マーカー蛋白質」、第7回日本蛋白質科学会年会、仙台国際センター、仙台 (2007-5)
24. T. Matsuda, A. Miyawaki, T. Nagai: "Phamret: An effective highlighter of fluorescent protein based on photoactivation-mediated resonance energy transfer for cell biological studies", 3rd

Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics & Biophotonics Downunder II, Shangri-La Hotel, Cairns, Australia (2007-7)

25. 松田知己、宮脇敦史、永井健治:「新規光色変換蛍光タンパク質による生細胞のタンパク質動態測定」、平成19年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会、北海道大学(2007-12)
26. T. Matsuda, T. Nagai: "Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a rationally designed photo-convertible fluorescent protein", The 9th RIES-Hokudai International Symposium, Hokkaido University, Sapporo, (2008-1)

H. 知的財産権の出願・登録状況

永井健治

① 特許取得

1) 出願番号: 特許出願 2007-215238

発明者: 永井健治、小寺一平

発明の名称: 組み換えDNAの調整法

出願人: 北海道大学

出願日: 平成19年8月21日

2) 出願番号: 特許出願 2007-203300

発明者: 永井健治、友杉亘、松田知己

発明の名称: 群青色蛍光タンパク質

出願人: 北海道大学

出願日: 平成19年8月3日

② 実用新案登録

なし

③ その他

なし

分担研究報告書

アルツハイマー病モデルに於けるシナプス分子の輸送制御機構解析

分担研究者 中村 俊 東京農工大学工学府共生科学技術研究院 教授

研究要旨:神経機能分子の細胞微細構造における動態制御機構の解明は神経変性疾患の発症機構を理解し、その予防・治療法を開発するうえで重要な研究課題である。我々は、分子イメージングの方法を用いて、シナプス構造におけるタンパク質の動態およびそれに伴う細胞機能の変化について解析した。その結果、脳由来神経栄養因子 BDNF が、大脳皮質ニューロンでは細胞内カルシウムシグナルの制御を介して、グルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体、及びカルシウムチャンネル TRP のシナプス膜表面発現量を増加させること、グリア細胞では、その形態を制御し、シナプスとのコンタクトを増加させることを見出した。

A. 研究目的

神経変性疾患は神経機能分子の合成、輸送、および分解過程の病変により、タンパク質の異常な蓄積が生ずるために引き起こされると考えられているが、その素過程は不明である。とくに神経変性を発症する過程で鍵となるのは、原因タンパク質がモノマーの状態からオリゴマーの状態に移行することにより、高度の繊維化（フィブリル化）が促進され、機能的にも細胞毒性を発揮するようになることであると考えられている。我々は、神経機能分子のイメージングによりこれらの素過程を解析することにより、タンパク質の異常な構造・動態変化の原因を解明し、さらにその変化と疾患との本質的な関連を解明することを目的に研究を行う。この研究により神経変性疾患の病因解明および診断、予防、および治療法の開発がすすむものと期待される。

B. 研究方法

タンパク質の細胞内での構造・動態を明らかにする

ために、蛍光性のタグをもった神経機能分子を作製し、イメージング技術を用いて動態を計測する。蛍光分子イメージングは、生きた細胞におけるリアルタイムでの分子動態の解析に適している。本研究では、神経機能に重要なイオンチャンネルの動態解析、及びタウ型変性疾患の原因遺伝子であるタウのモノマーからオリゴマーへの変換過程を蛍光偏光消光法によって定量化する。溶液中での計測について、生細胞でのオリゴマー化を偏光蛍光顕微鏡（本研究班の班員である北海道大学永井教授との共同研究）により定量解析する。

光学的解析は、動態解析には適しているが、空間解像度は250ナノメートル程度が下限となっている。従って、より微細な細胞構造を明らかにするために、電子線解析から3次元画像を構成し、タンパク質分子が実際に機能している場に関する知見を得るための研究を進める。

（倫理面への配慮）

動物実験はすべて東京農工大学の実験動物倫理規定にもとづいて行われた。また遺伝子組み換え体の取り扱いについてはカルタヘナ条約の規定による施設の規約に従った。

C. 研究結果

1) 我々はこれまで、脳由来神経栄養因子 BDNF のノックアウトマウスの解析から、発達期の興奮性シナプスは機能的にサイレントであることを明らかにしてきた(PNAS, 2003)。サイレントであるとは、グルタミン酸受容体のうち、NMDA 受容体は応答性を示すものの、AMPA 型受容体は応答性を示さないことを意味する。今年度、大脳皮質の抑制性ニューロンの BDNF による機能発達に関して詳細な解析をおこない、電気生理学的機能とカルシウムタンパク質(パルブアルブミン、カルレチニン)の発現との関連を明らかにした(原著(2)参照)。

2) 分子イメージングの方法により BDNF がシナプス後膜における AMPA 受容体の量を増加させることを明らかにした。具体的には、培養大脳皮質錐体細胞の樹状突起とスパインの領域について、FRET 法によってカルシウムイメージングを行い、グルタミン酸の光活性化化合物(caged compound)及び、NMDA 受容体の選択的な抑制剤を用い、NMDA 受容体が機能していることを確認した。ついで、BDNF によっても同様な細胞内カルシウム濃度の上昇を確認した。BDNF によるカルシウム濃度の上昇がおこることが確認された部位で、AMPA 受容体の細胞表面への移行が増加するか否かを明らかにするために、細胞を固定後、受容体の細胞外ドメインに対する抗体で染色し、同時にシナプス後膜のマーカーである

PSD95 の抗体染色を行い、PSD95 と重なる AMPA 受容体の蛍光量を計量した。BDNF 投与によりこの表面発現率は40%程度増加した。次に、この上昇を制御するカルシウムシグナルを明らかにするために、BDNF 受容体によって活性化されるホスホリパーゼの阻害剤を投与したところ、細胞内ストアからのカルシウム動員が抑制されるとともに、AMPA 受容体の膜表面への移行も阻害された。さらに細胞膜やスパインには細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出によって活性化される TRP カチオンチャンネルが存在することを抗体染色により明らかにしたうえ、このチャンネルの機能を抑制すると AMPA 受容体の膜表面への移行が部分的に抑制されることを示した。TRP チャンネル自体、BDNF によってシナプス膜表面に移行することが確認されたが、NMDA 受容体の動態は変化しなかった(原著(3)参照)。

3) 脳由来神経栄養因子 BDNF はエピソード記憶の形成、記憶の想起に重要であり、我々は、その分泌異常がアルツハイマー病と関連していることを SNP 解析により明らかにしてきた(投稿準備中)。BDNF の受容体として、チロシンキナーゼをもつタイプとチロシンキナーゼを持たず代わりに、11 アミノ酸からなる配列をもったタイプ(T1)が知られている。この配列は、マウスからヒトまで種を超えて保存されていることから、我々はこの配列に選択的に結合する分子をスクリーニングしたところ、細胞骨格の制御に重要な Rho-GTPase の調節因子である Rho-GDI が同定された。Rho-GDI は T1 に結合しているが、BDNF が T1 に結合すると細胞質に遊離され、Rho-GTPase を抑制する。T1 はアストログリア細胞に唯一発現している BDNF の受容体であることから、BDNF をグリア細胞に添

加すると、Rho-GTPase のうち、Cdc42 あるいは Rac1 を介し、速やかな形態変化を引き起こすことが明らかとなった。さらに、この形態変化は、急性脳切片を用いても示され、このとき、グリア細胞の突起とシナプスとの接触が増加していた。以上のように、BDNF は神経細胞の形態を制御するのみならず、シナプスの機能的成熟にも重要な役割を果たしていること、さらにグリア細胞の形態を変え、神経伝達の調節に関与している可能性を示した(原著(1)参照)。

D. 考察

- 1) 脳由来神経栄養因子 BDNF によってグルタミン酸受容体のひとつである AMPA 受容体のシナプスの後膜における発現量が増加することが明らかとなった。シナプス後膜における発現量を増加させる仕組みとしては、シナプス膜への移行を増加させるか、シナプス膜から細胞質への移行の抑制が考えられる。この増加には、細胞内外のカルシウムシグナルが重要な役割を果たしていることも示されたため、さらにカルシウムシグナルの下流で、どのような情報伝達機構が働いているかに関してさらに解析をおこない、膜への移行、膜からの除去のいずれの過程が BDNF によって制御されているかを明らかにしたい。この問題の解決のためには、live imaging の方法が必要で、これについても引き続き取り組む。
- 2) BDNF が RhoGTPase の抑制を介してグリア細胞の形態を制御し、グリアとニューロンの接触を制御する可能性が示された。グリア細胞には、GFAP と呼ばれる骨格タンパク質が存在しているため、BDNF がどのようなシグナル伝達機構で、グリア細胞の骨格系を制御しているかを明らかに

することは重要な課題である。

- 3) BDNF はヒトにおいてもエピソード記憶の形成に必要であることが示されており、実際、我々は、BDNF のシナプス終末部からの分泌に異常をもつ遺伝子多型とアルツハイマー病の発症に相関があることを見出している。このため、BDNF の下流でどのような因子がシナプス機能の調節に関与しているかを明らかにすることは、創薬の標的を定めるためにも必要である。

E. 結論

- 1) ヒトの記憶形成、想起に重要で、アルツハイマー病との相関が示されている脳由来神経栄養因子 BDNF はカルシウムシグナルを制御することにより、グルタミン酸受容体のひとつである AMPA 型受容体をシナプス膜の表面における発現量を増加させることが明らかとなった。
- 2) BDNF はグリア細胞においては、その形態を制御し、シナプスの機能を調節している可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

【原著】

- 1) Ohira K, Funatsu N, Homma K, Sahara Y, Hayashi M, Kaneko T, Nakamura S: Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. Eur J. Neurosci, 25: 406-416, 2007.
- 2) Itami C, Kimura F, Nakamura S: BDNF regulates the maturation of layer 4 fast spiking cells after the 2nd postnatal week in the developing barrel cortex. J. Neuroscience, 27: 2241-2252, 2007.
- 3) Nakata H. and Nakamura S: Brain-Derived