

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

分担研究報告書

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

分担研究者 和田圭司 国立精神・神経センター神経研究所 部長

**研究要旨:** パーキンソン病ならびにアルツハイマー病などの難治性神経変性疾患の発症に関与し、それら疾患の重要な薬物治療ターゲットであるUch-L1を標的としたin silicoでの創薬研究を行った。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実行する事でUch-L1活性中心近傍の仮想ナノ空間においてUch-L1の酵素活性に影響を及ぼしうる化合物を約3万個の化合物ライブラリーの中から探し出した。候補化合物のUch-L1活性に対する薬理作用を酵素化学的に解析したところ、その活性を20%程度増強する新規の化合物が2種類同定できた。Uch-L1の脳での機能増強実験で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改善が報告されていたが、これまでにUch-L1活性促進薬剤は同定されていなかった。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。

#### A. 研究目的

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。

#### B. 研究方法

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。

#### (倫理面への配慮)

本研究ではヒトサンプル等は取り扱っておらず倫理上問題となる事項は無い。

### C. 研究結果

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段階のチェーン・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チェー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  $\mu$ 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ト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。

### D. 考察

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事から、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。

#### D. 結論

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。

#### F. 研究発表

##### 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, Itoharu 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).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

シナプス機能分子の動態解析に関する研究に関する研究

分担研究者 内野茂夫 国立精神・神経センター神経研究所 室長

**研究要旨:** 記憶や学習をはじめとする高次脳機能を司る神経回路網はシナプスを基盤として情報伝達を行っている。これまでに、可塑性をはじめとするシナプスの活性に関わる分子は多数同定されているものの、シナプスの活性と構造との相関研究はほとんどなされていない。本研究では、神経回路網を維持した組織レベルでシナプスの構造活性相関の研究を遂行するため、組織内のシナプスを可視化する技術を開発する。本年度、電気穿孔法を用いてマウス胎仔の脳内に EGFP を発現するベクターを導入し、生後のシナプス形成期における大脳皮質での EGFP シグナルを観察することで、特定のニューロンが形成する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。

#### A. 研究目的

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。

#### B. 研究方法

##### 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。

### (倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所小型動物実験倫理問題検討委員会の承認を得た上で動物愛護の観点に配慮して行った。

## C. 研究結果

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 のシグナルが大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。

## D. 考察

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。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 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.

なし

## 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.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他



光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

分担研究者 永井健治 北海道大学電子科学研究所 教授

**研究要旨:** 生体分子の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単量体型光増感物質を作成する。また、光照射による生体機能操作によって生じる生体分子動態の変化を可視化する技術の開発も行う。これらの技術を組み合わせることで、細胞内に蓄積したフィブリル化タンパク質を光照射依存的に破壊する技術へ結びつけ、フィブリル化タンパク質の細胞内含量を任意に変化させた時の細胞機能を可視化解析することで、フィブリル化タンパク質によって引き起こされる疾病の発症メカニズムの解明を目指す。

**A. 研究目的**

**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、単量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る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

**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  $\gamma$  を付加した Phamret を発現するプラスミド pCDNA3-Phamret-PP2C  $\gamma$  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  $\gamma$  を Superfect Transfection Reagent (QIAGEN) でHeLa細胞にトランスフェクションした。CO<sub>2</sub>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mseCFPからPA-GFPへのFRETにより光変換させた。光変換前のmseCFP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  $\gamma$  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ャンで測定した。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。

## C. 研究結果

**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  $\gamma$ 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

**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  $\gamma$ 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

**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. 研究発表

### 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—最近の進歩: 回折限界の壁を越える工夫—」 *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」、実験が上手くいく蛍光・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」、実験が上手くいく蛍光・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」、実験が上手くいく蛍光・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

1. Takeharu Nagai: "Imaging Biological Events Using FRET-based Sensor Proteins", *International Symposium on Advance Techniques for Molecular Imaging*, Taichu, Taiwan (2007-12)
2. 永井健治: 「生理機能センサー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, Shujou, 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, Carns (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)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(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

## 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
諸根信弘 臼倉治郎	急速凍結ディープ エッチング法による 細胞膜のナドメイ ン解析	近藤 滋	細胞工学	秀潤社	東京	2007	Vol.26 No.7, 822-826
諸根信弘 臼倉治郎 楠見明弘	電子線くフリーズ 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	日本顕微 光学会	東京	2007	Vol.42 No.3, 150-154
永井健治	改変型蛍光タンパ ク質の利用	原口徳子 木村宏 平岡泰	講義と実習 生細胞蛍光イ メージング	共立出版		2007	67-78
永井健治 小寺一平	共鳴エネルギー移 動(FRET)の基礎	原口徳子 木村宏 平岡泰	講義と実習 生細胞蛍光イ メージング	共立出版		2007	110-117
永井健治 齊藤健太	FRETの測定法と 評価	原口徳子 木村宏 平岡泰	講義と実習 生細胞蛍光イ メージング	共立出版		2007	118-128
齊藤健太 松田知己 原口徳子 永井健治	FRET	原口徳子 木村宏 平岡泰	講義と実習 生細胞蛍光イ メージング	共立出版		2007	268-277
小寺一平 谷知己 永井健治	全反射顕微鏡	原口徳子 木村宏 平岡泰	講義と実習 生細胞蛍光イ メージング	共立出版		2007	291-297
竹本研 永井健治 宮脇敦史 三浦正幸	アポトーシスの検 出	三輪佳宏	実験が上手く いく 蛍光・発 光試薬の選び 方と使い方	羊土社		2007	143-146
谷知己 永井健治	スパイはひとりで充 分	三輪佳宏	実験が上手く いく 蛍光・発 光試薬の選び 方と使い方	羊土社		2007	147
小寺一平 永井健治	FRETプローブ	三輪佳宏	実験が上手く いく 蛍光・発 光試薬の選び 方と使い方	羊土社		2007	158-162

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Sato S, Hatanaka K, Fukuda Y, Chiba T, <u>Morone N</u> , 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	130(5)	943-57	2007
Kawahara G, Okada M, <u>Morone N</u> , Ibarra CA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I.	Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease	Neurology	69(10)	1043-9	2007
Moritake S, Taira S, Ichiyangi Y, <u>Morone N</u> , Song SY, Hatanaka T, Yuasa S, Setou M.	Functionalized nano-magnetic particles for an in vivo delivery system	J Nanosci Nanotechnol.	7(3)	937-44	2007
Ohira K, Funatsu N, Homma K, Sahara Y, Hayashi M, Kaneko T, <u>Nakamura S.</u>	Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices	Eur. J. Neurosci.	25	406-416	2007
Itami C, Kimura F, <u>Nakamura S.</u>	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
Nakata H. and <u>Nakamura S.</u>	Brain-Derived Neurotrophic Factor regulates AMPA Receptor Trafficking to Postsynaptic Densities via IP3R and TRPC Calcium Signaling	FEBS Letters	581	2047-2054	2007



Setsuie, R.	Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant.	Neurochem Int.	50	119-129	2007
Nishimoto, M.	PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells.	Glia	55	317-327	2007
Ohashi, H.	Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells.	Eur. J. Pharmacol.	573	20-28	2007
Zushida, K.	Facilitation of extinction learning for contextual fear memory by PEPA: A potentiator of AMPA receptors.	J Neurosci.	27	158-166	2007
Tanabe, K.	Melanocortin receptor 4 is induced in nerve-injured motor and sensory neurons of mouse.	J. Neurochem.	101	1145-1152	2007
Hattori, S.	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
Aiba A.	Mouse liaison for integrative brain research.	Neurosci Res.	58	103-104	2007
Ohinata, K.	beta-Lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from bovine beta-lactoglobulin, enhances memory consolidation in mice.	Peptides.	28	1470-1474	2007
Hirayama, K.	Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening.	Bioorgan. Med. Chem.	15	6810-6818	2007

Yamakawa H. Oyama S. Mitsuhashi H. Sasagawa N. <u>Uchino S.</u> Kohsaka S. Ishiura S.	Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin-g2, and the interactions are affected by autism-related mutations.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	355	41-46	2007
Okamoto N. Kubota T. Nakamura Y. Murakami R. Nishikubo T. Tanaka I. Takahashi Y. Hayashi S. Imoto I. Inazawa J. Hosokai N. Kohsaka S. <u>Uchino S.</u>	22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A recognizable syndrome?	Am. J. Med. Genet A.	143A	2804-2809	2007
Matsuda T., Miyawaki A. Nagai T.	Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein	Nature Methods	In press		2008
Yamamoto T, Kumagai A, Saito K, Nagai T	Two-photon excitation behavior of thiophene-based oligomers and a polymer	J Nanosci Nanotechnol.	In press		2008
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	21-26	2008
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. US A	104	13367-13372	2007
Wei C, <u>Nagai T</u> Wei W, Nemoto T, Awais M, Niwa O, Kurita R Baba Y	New advances in nanomedicine: diagnosis and preventive medicine.	Med Clin North Am.	91	871-879	2007

永井健治	蛍光イメージング-最近の進歩: 解説限界の壁を越える工夫-	病理と臨床	25	414-519	2007
齊藤健太、 谷知己、 小林健太郎、 永井健治	大口径ファイバー白色光源を用いた高速共焦点顕微鏡の開発と評価	顕微鏡	42	161-165	2007

## 電子線〈フリーズレプリカ〉トモグラフィ法による 細胞膜骨格の3次元イメージング

諸根 信弘<sup>a</sup>, 白倉 治郎<sup>b</sup>, 楠見 明弘<sup>c</sup>

<sup>a</sup>国立精神・神経センター神経研究所, <sup>b</sup>名古屋大学エコトピア研究所, <sup>c</sup>京都大学再生医科学研究所

キーワード: 細胞膜, 膜骨格, フリーズレプリカ, 電子線トモグラフィ

### 1. はじめに: 細胞膜の構造

細胞膜の厚さは、わずかに約5 nm。このため、多くの場合、細胞膜は2次元の構造と考えられている。さらに、この構造は液体の性質を持ち、細胞膜の構成分子は、細胞膜の中でブラウン運動している。このような運動ができるからこそ、例えば、シグナル分子はお互いに衝突し、シグナルを伝えることができると考えられている。このような細胞膜の動的構造は、シンガー・ニコルソンの流動モザイクモデル(1972)として教科書に掲載され、細胞膜の基本概念となっている<sup>1)</sup>。その後、膜分子の運動解析・シミュレーションにより、細胞膜には、仕切りが入っていて<sup>2-6)</sup>、細胞膜における分子運動は流動モザイクモデルだけでは説明できないことが明らかになってきた。細胞膜の仕切りは、細胞膜の細胞質側表面を覆っているアクチン線維のネットワーク、「膜骨格(membrane skeleton)」でできていることが提案されている<sup>7,8)</sup>。

赤血球の膜骨格については、古くから構造解析が進められてきた。これは細胞質を除いたゴースト膜が簡単に単離できるため、膜骨格の生化学的・構造的な研究が簡単だったためである。この赤血球の膜骨格は、他の細胞のそれとは大きく異なっている。アクチンは、トロポミオシンに結合して、12~18個のGアクチンからなる40 nm程度の長さの短い線維を作り、これが細胞膜上に杭のように結合している。結合先は、膜貫通型タンパク質のグリコフォリンCとバンド4.1複合体である。この短いアクチン線維の杭の間をスペクトリンという鎖状分子の四量体が繋いでいる。すなわち、短いアク

チン線維の杭が、スペクトリン四量体をメッシュワーク状に組み立てて膜骨格を構築し<sup>9-14)</sup>、それが赤血球に柔軟性と剛性を与えている。

リンパ球では、細胞膜の直下から厚さ2~3 μmにわたってアクチン線維のネットワークがびっしりと存在している。これは「皮質アクチン(cortical actin)」と呼ばれている<sup>15)</sup>。これらのアクチンフィラメントは赤血球の40 nm程度の短い線維ではなく、マイクロメートルの桁の長さになっている。非常に多くのアクチン結合タンパク質が、これらのアクチンの側面どうしをつないで、アクチンフィラメントを束化したり、70°の角度で分岐させたり、直角に結合させたりしている。このようなアクチンフィラメントのネットワークが赤血球と異なって細胞膜の細胞質側表面から細胞質へと3次元に広がっている。この皮質アクチンが、リンパ球に、変形能や血管での耐力性を与えていると考えられる。血小板の膜骨格は、細胞膜上の糖タンパク質複合体やゲルゾリンの皮質アクチンへの結合を媒介していると考えられ、主成分はスペクトリンだと考えられているが、スペクトリンの分布はまだ観察されていない<sup>16,17)</sup>。

非血球系では、小腸上皮組織の細胞膜直下に形成された膜骨格が、広川・Heuserグループによって、急速凍結・ディーブエッチング・白金レプリカ法を用いて、膜骨格研究の非常に初期に明らかにされ、有名である<sup>18,19)</sup>。細胞膜表面の微繊毛の内部には、アクチンフィラメントの束が構築されていて、その先端部が、微繊毛の先に結合し、根元では「terminal web」と呼ばれる構造に結合して、そこから、アクチン、ミオシン、中間径フィラメントからなる細胞骨格に繋がっている。これは、違う種類のフィラメントの微細構造の特徴や特異的ラベリング法により同定されて明らかになった。

哺乳動物の通常の培養細胞では、1980年代から膜直下の細胞質側表面に線維が存在することが分かっていた。しかし、線維の細胞膜上での分布、その主成分、線維の作る構造の特徴などはほとんど分かっていなかった。これを明らかにするためには、細胞膜を広く剥離して、その細胞質側表面を露出させる

Nobuhiro Morone, Jiro Usukura and Akihiro Kusumi: Three dimensional imaging of the plasma membrane skeleton as revealed by freeze-replica and electron tomography

<sup>a</sup> 〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1

E-mail: morone@ncnp.go.jp

<sup>b</sup> 〒464-8603 名古屋市長種区不老町1-1

E-mail: usukuraj@esi.nagoya-u.ac.jp

<sup>c</sup> 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町

E-mail: akusumi@frontier.kyoto-u.ac.jp

2007年10月4日受付