

2007(2030A)

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

カルシウム恒常性破綻のナノイメージング
に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 尾藤 晴彦

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

カルシウム恒常性破綻のナノイメージングに関する研究	1
尾藤晴彦	

II. 分担研究報告

1. Ca^{2+} 応答性ナノセンサー開発と動物モデルにおける応用	13
尾藤晴彦	
2. ミトコンドリア機能低下の病態生化学的解析	19
北 潔	
3. リポーター遺伝子可視化プローブの開発	25
菊地和也	
4. 認知活動感受性プロモーターの開発	29
奥野浩行	

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	39
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

カルシウム恒常性破綻のナノイメージングに関する研究

主任研究者 尾藤 晴彦 東京大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨

本研究では、 Ca^{2+} 恒常性破綻のナノイメージングを可能にする融合的学際的研究を実施する。平成19年度においては、新規カルシウムセンサープローブや認知活動依存的プローブの作出と個体動物への導入、新規オルガネラ局在化シグナルの同定、ならびに新規MRIプローブ技術の開発を行った。今後、これらを有効に活用し、疾病時に起こると考えられる Ca^{2+} シグナリングの様々なレベルでの破綻を疾患動物モデルにおいて計測する基盤技術を開発し、さらに新たな光工学的技術開発に向けた産学連携の基礎を築いていく。

研究組織

主任研究者

尾藤晴彦

東京大学大学院医学系研究科 准教授

分担研究者

北潔

東京大学大学院医学系研究科 教授

分担研究者

菊地和也

大阪大学大学院工学系研究科 教授

分担研究者

奥野浩行

東京大学大学院医学系研究科 助教

A. 研究目的

生体において細胞内カルシウム Ca^{2+} イオンは、心筋収縮から神経可塑性に至るまで、種々の細胞機能を制御する重要なセカンドメッセンジャー活性を有する。一方 Ca^{2+} 恒常性破綻は、多くの疾患の病因であり、その是正のために、 Ca^{2+} 拮抗剤が広く高血圧や不整脈・心筋収縮異常等の治療に適用されている。また、高齢人口に高い発症を示すアルツハイマー病やハンチントン病などの神経変性疾患においても細胞内 Ca^{2+} 恒常性の破綻が伴うことが最近示唆されている。さらに、骨粗鬆症のメカニズムの一部にも Ca^{2+} シグナル異常の関与が提唱されて

いる。

にもかかわらず、これまで、生きた個体の疾患動物モデルにおいて、病態時の Ca^{2+} 動態異常が計測されたことは皆無である。これは、これまで開発されてきた Ca^{2+} 指示薬のほとんどが培養細胞でのみ有効な化学特性を有していたからであり、多くの疾患の病因病態を解明するためにも、生きた個体での Ca^{2+} 測定を可能にする新規技術の開発が待たれるところである。

そこで、本研究では、 Ca^{2+} シグナリングの様々なレベルでの破綻を可視化可能な新規プローブのデザイン、開発、応用のための基盤技術を実現するための基礎研究を行う。さらに、ミトコンドリア等細胞内オルガネラにおける Ca^{2+} 動態の異常を検出するナノセンサーの開発、 Ca^{2+} 恒常性によって制御される認知活動に感受性の高い遺伝子プロモーターの同定と応用研究、細胞内 Ca^{2+} シグナル活性化を MRI により検出する新規技術に関する研究を実施する。

このような総合的研究の結果、 Ca^{2+} 動態を修飾する多くの薬剤の有効性スクリーニングが疾患動物モデルにて今後実施可能となり、また、培養細胞にて見過ごされた副作用の検出や、ドラッグデリバリーの改良の判定などが容易になることが期待される。

初年度の平成 19 年度においては、各種新規 Ca^{2+} センサーに関する基礎検討を済ませ、 37°C 計測における実用性の高い蛍光プローブ候補の創出を完了する。得られた新規可視化技術に関する仕様はオリンパス社等国内光学機器メーカーに開示し、個体動

物で Ca^{2+} 動態を簡便に可視化・定量できる光学技術開発の可能性を具体化し始める。

B. 研究方法

B-1. Ca^{2+} プローブ作成 :

予備的検討に基づき、1) Ca^{2+} 感受性領域を、カルモデュリン、トロポニン、ホスホジエステラーゼなどの Ca^{2+} 感受性蛋白の中から選択し、2) Ca^{2+} 依存的蛋白構造変化を長波長領域の GFP 蛍光変異体間の FRET を指標とし検出し、さらに 3) もっともシグナル/ノイズ比の高いセンサー分子をスクリーニングする。その他、カルシウムシグナリング活性化を可視化するプローブも随時作成する。

B-2. オルガネラ局在シグナルの同定 :

細胞内オルガネラの Ca^{2+} 濃度は高いと考えられるため、低親和性 Ca^{2+} 感受性領域を有する FRET プローブにミトコンドリア・ER 局在配列を付与し、ER ストレスやエネルギー代謝が阻害される条件下での Ca^{2+} 動態変化が計測可能な配列を選択する。

B-3. 認知活動依存性プローブ作成 :

認知活動依存性エレメントを同定し、さらにその下流で可視化リポーターを発現するプローブを開発し、さらにこのプローブの評価を個体レベルで行う。

B-4. 個体計測 :

本研究で確立したプローブを、(レンチ

・シンドビス) ウィルスベクターにて個体へ導入する方法論の確立を図る。また、遺伝子改変マウス作成などの手法で目的器官に発現する手段を考案する。

B-5. MRIプローブ技術開発：

Ca²⁺感受性リポーターの個体での可視化を視野に、新規原理に基づく機能性MRI造影の手法の基盤を確立する。

先行データと当年度の成果に基づき、国内光学機器メーカーと協議し、技術共同開発の可能性を検討する。

(倫理面への配慮)

DNA組換え実験ならびに動物実験に関しては、東京大学ならびに大阪大学の該当委員会に申請を行い、認められたプロトコルに基づいて実験を行った。

C. 研究結果

C-1. カルモデュリン、トロポニン、ホスホジエステラーゼなどの Ca²⁺感受性蛋白の Ca²⁺感受性領域を比較し、FRET イメージングに適したドメインを決定した。これに基づき、従来の FRET よりさらに長波長側へシフトした Ca²⁺感受性プローブを作成した。カルシウムナノイメージングのための光学検出系をさらに開発し、実際にプローブの感度を検証したところ、in vitro では、単一シナプス応答を十分可視化可能である

ことを確認した。

同様のプローブをさらに複数種デザインし、検証中である。

これらのプローブ開発の途上で、細胞膜上のナノドメインの一つである脂質ラフト内で、種々の分子間の FRET 計測を定量的に実施する技術も開発し、発表した (Takemoto-Kimura et al. Neuron 2007)。

開発した新たな光学検出系については、カルシウム動態を簡便に可視化定量できる光学技術の開発を視野に、現在国内光学メーカーとの連携を検討中である。

C-2. 熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアおよびアピコプラストに局在すると予想される熱ショックタンパク質およびアシルキャリアータンパク質のターゲットシグナルを付加した GFP がそれぞれに特異的にミトコンドリアとアピコプラストに局在する事を確認した。

C-3. 培養神経細胞を用いた系を用いて詳細な *Arc* 遺伝子の発現機構解析を行った結果、神経特異性および活動依存性を規定するプロモーター領域の同定に成功した。このプロモーター制御下に蛍光蛋白およびルシフェラーゼをもつレポーター遺伝子を作成した。

C-4. これら新規開発プローブを個体計測に応用するための手段としてシンドビス・ウィルスベクターならびにレンチウィルスベクターを立ち上げ、スライス標本における注入実験にてその有効性を実証した。現

在、in vivo injection 実験を開始しつつある。

また遺伝子改変マウスの作成も準備中である。

C-5. 酵素反応によって常磁性金属イオンと観測核種の距離を離し、常磁性効果を解消することができれば、MRI シグナル強度の増大を観測できるはずである。この原理に基づきプローブデザインを行った。またMRI の観測核種としては、生体バックグラウンドシグナルが極めて小さい ^{19}F を選択した (Mizukami et al. J. Am. Chem. Soc. 2008)。

D. 考察

細胞は試験管とは異なり、化学反応が局所的におこる。すなわち数十 nm 四方の「ナノドメイン」に濃縮された関連分子の間で効率よくシグナルが共役・伝達されている。たとえば、脳高次機能と呼ばれる意識、情動、記憶、意欲、注意などの機能は、容積 1 femtoliter 以下の樹状突起スパイン構造、そしてその周辺に位置する樹状突起内反応空間の中で生じる酵素反応および蛋白・蛋白、蛋白・膜、蛋白・細胞骨格相互作用が支配していると言っても過言ではない。このナノドメインの中の Ca^{2+} シグナルの恒常性の破綻が種々の神経・精神疾患の発端あるいは増悪要因として、最近注目されている。同様の Ca^{2+} ナノドメインは、免疫細胞や平滑筋細胞においても報告されている。

本研究で開発された種々のカルシウムセンサープローブは、病態モデルにおける Ca^{2+} ナノドメイン測定に極めて有効な示唆を与えるものと期待される。

E. 結論

E-1. 従来のカルシウムセンサー分子より個体計測に向いている長波長シフトの蛍光プローブを開発した。また、カルシウムナノイメージングのための光学検出系のプロトタイプを開発した。この技術を元にした産学連携の可能性を検討中である。

E-2. 寄生虫原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになるとともに、新たなミトコンドリアターゲティングシグナルを同定した。

E-3. 神経活動依存的な遺伝子発現可視化法を樹立した。この手法を改善していけば、認知症をはじめとする神経疾患の病態の解明のための有用なツールとなるポテンシャルがある。

E-4. lentivirusベクターのin vivoでの有用性を確認するとともに、遺伝子プローブのいくつかについては、遺伝子改変マウスを作成した。

E-5. 動物個体内の酵素活性可視化を目標として、緩和時間変化型の機能性MRIプローブの設計原理を確立した。この原理を用いて、調べたい生体内分子との反応によってコントラストが変化するプローブ分子を作製できることが期待できる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, **Okuno H**, **Bito H**. Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMK1 gamma. *Neuron* 54: 755-770, 2007.

2. Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, **Bito H**, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori, Y. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca^{2+} channels. *Nature Neurosci.* 10: 691-701, 2007

3. Fuse T, Ohmae S, Takemoto-Kimura S, **Bito H**. DCLK1. *UCSD/Nature Molecule Pages*,

doi:10.1038/mp.a003011.01, 2007.

4. **尾藤晴彦**, 野中美応, 布施俊光, 藤井哉, 竹本-木村さやか, **奥野浩行**. シナプス機能と PSD 構築を制御する分子機構。 *蛋白質核酸酵素* 53: 418-423, 2008

5. Kobayashi T., Sato, S., Takamiya, S., Komaki-Yasuda, K., Yano, K., Hirata, A., Onitsuka, I., Hata, M., Mi-ichi, F., Tanaka, T., Hase, T., Miyajima, A., Kawazu, S., Watanabe, Y., **Kita, K.** Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*: behaviour on subcellular fractionation and the implication. *Mitochondrion* 7, 125-132 (2007)

6. Mita, T., Tanabe, K., Takahashi, N., Tsukahara, T., Eto, H., Dysoley, L., Ohmae, H., **Kita, K.**, Krudsood, S., Looareesuwan, S., Kaneko, A., Bjokman, A., and Kobayakawa, T. Independent evolution of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Melanesia. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51, 1071-1077 (2007)

7. **Kita, K.**, Shiomi K., and Ōmura, S. Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitol.* 23, 223-229 (2007)

8. Shinjyo N., and **Kita K.** Relationship between reactive oxygen species and heme metabolism during the differentiation of

- Neuro2a cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 130-135 (2007)
9. Shiomi K., Hatano H., Morimoto H., Ui H., Sakamoto K., **Kita K.**, Tomoda H., Lee E. W., Heo T. W., Kawagishi H., and Omura S. Decursin and decursinol angelate selectively inhibits NADH-fumarate reductase of *Ascaris suum*. *Planta Medica* 73, 1748-1481 (2007)
10. Iwata F., Shinjyo N., Amino H., Sakamoto K., Islam M. K., Tsuji N. and **Kita K.** Change of subunit composition of mitochondrial complex II (Succinate-ubiquinone reductase/Quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host. *Parasitol. Int.* 57, 54-61 (2008)
11. Matsumoto J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., **Kita K.** and Oku Y. Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52, 164-170 (2008)
12. Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, **Kita K.**, and Marzuki S. Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo₂) of the cytochrome *b* gene. *Parasitol. Int.* 57, 229-232 (2008).
13. K. Hanaoaka, **K. Kikuchi**, S. Kobayashi, T. Nagano, A Time-resolved Long-lived Luminescence Imaging Method Employing Luminescent Lanthanide Probes with a New Microscopy System, *J. Am. Chem. Soc.* 129: 13502-13509, 2007.
14. K. Hanaoaka, **K. Kikuchi**, T. Terai, T. Komatsu, T. Nagano, A Gd³⁺-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Sensitive to beta-Galactosidase Activity Utilizing a Receptor-Induced Magnetization Enhancement (RIME) Phenomenon. *Chem. Eur. J.*,14: 987-995, 2008.
15. T. Yogo, Y. Urano, A. Mizushima, H. Sunahara, T. Inoue, K. Hirose, M. Iino, **K. Kikuchi**, T. Nagano, Selective Photoinactivation of Protein Function through Environment- sensitive Switching of Singlet Oxygen Generation by Photosensitizer. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 28-32, 2008.
16. R.A. Colvin, A.L. Bush, I Volitakis, C.P. Fontaine, D. Thomas, **K. Kikuchi**, W.R.Holmes, Insights into Zn²⁺ Homeostasis in Neurons from Experimental and Modeling Studies. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 294: C726-C742, 2008.

17. S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, Y. Hori, H. Tochio, M. Wälchli, M. Shirakawa, **K. Kikuchi**. Paramagnetic Relaxation-based ^{19}F MRI Probe to Detect Protease Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 794-795, 2008

書籍

1. **Bito, H.**, Takemoto-Kimura, S., & **Okuno, H.** Activity-dependent gene regulation: How do synapses talk to the nucleus and fine-tune neuronal outputs? in *Molecular Pain* (M. Zhuo Ed.), Springer, New York, in press.

2. **奥野浩行**、**藤井哉**、**尾藤晴彦**: 情報素子としてのシナプス-構造・機能ならびに新たな疾患制御標的としての意義-. p220-233, in *ナノメディシン 宇宙* 理須恒雄 編、オーム社、東京 (2008).

2. 学会発表

国際学会

1. **Bito H.** Elucidating the critical role of CaMKK/CaMKI pathways in neuronal morphogenesis. US-Japan Brain Research Collaborative Program “Workshop on Receptor Trafficking and Cell Biology of Neurons: Physiology and Disease” February 24-27, 2008,

Asilomar Conference Center, Pacific Grove, California, USA.

2. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, **Okuno H**, **Bito H**. Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI $\tilde{\gamma}$ 2nd International Conference of Neurons and Brain Disease, 2007.8.29-8.31, Toronto, Canada.

3. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okamura M, **Okuno H**, **Bito H**. Molecular biology and neuronal functions of CaMK family genes. International Symposium on Advanced Functional Genomics. 2007.10.11-10.12, Kazusa, Chiba, Japan.

4. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Fujii H, **Okuno H**, **Bito H**. Differential control of cortical axonogenesis and dendritogenesis by alternate activation of CaMKI α and γ . *Soc. Neurosci. Abstr.* 114.3, 2007. 第 37 回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. Oral.

5. **Okuno H**, Naruse H, Kawashima T, Fujii H, Nonaka M, Chowdhury S., Worley P, **Bito H**. Synaptic targeting of Arc via high affinity interaction with Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II beta. *Soc. Neurosci. Abstr.* 221.3. 第 37 回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. Oral.

6. Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, **Bito H**, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y. The active zone protein RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. Soc. Neurosci. Abstr. 853.5. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. Oral.
7. Fuse T, **Bito H**. Actin-dependent regulation of Shank dynamics in Purkinje cell dendrites. Soc. Neurosci. Abstr. 45.8, 2007. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. poster
8. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, **Okuno H**, **Bito H**. Requirement for palmitoylation and raft insertion of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ during cortical dendritogenesis. Soc. Neurosci. Abstr. 240.13. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. poster
9. Morinobu S, Takahashi T, Iwamoto Y, Kawano K-I, Yamawaki S, **Okuno H**, **Bito H**. Neonatal isolation induces susceptibility to learned helplessness through the decrease in LIMK1 in the adult rat hippocampus. Soc. Neurosci. Abstr. 501.2. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA.
10. Suematsu A, Sato K, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Yamaguchi A, Chatila TA, **Bito H**, Takayanagi H. The CaMK-CREB pathway regulates osteoclast differentiation and function J. Bone Min. Res. 22: S98-S99, 2007.第29回アメリカ骨代謝学会年会、2007.9.16-9.19, Honolulu, Hawaii, USA.
11. **Okuno H**, Fujii H, Naruse H, Kawashima T, Worley P, **Bito H**. Regulation of Arc/Arg3.1 localization in dendritic spines via interaction with Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II. 7th HFSP Awardee Meeting. 2007. 7.18-7.21, Brisbane, Australia. poster
12. **Okuno H**, Naruse H, **Bito H**. Optical analysis of activity-dependent protein synthesis in dendritic regions of neurons. 2nd International workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2007.9.6-9.7, Tokyo, Japan. Poster.
13. **Kita, K**. Parasite mitochondria as a target of chemotherapy VIII Central American and Caribbean Congress of Parasitology and Tropical Medicine 2007 Dec, Habana, Cuba
14. **Kita, K**. Diversity of parasite mitochondria: as a target of chemotherapy 10 IUBMB Conference and 36a. Annual Meeting of SBBq

2007 June Salvador, Brazil.

15. **Kikuchi K.** Fluorescent Sensor Molecules with Tunable Fluorescence Switches for Cellular Imaging. The 6th JSPS Forum in France : "Chemical and physical nanobiology for medicine" JSPS-University of Strasbourg, 2007 November.

16. **Okuno, H.** Visualization of activity-dependent protein synthesis in dendritic regions of neurons.

ISNM2007/MB-ITR2007, 2007.4.20-22,

Okazaki, Japan. シンポジウム、口頭発表

国内学会

1. **Okuno H.** Fujii H, Nonaka M, Ageta-Ishihara N, Fuse T, Takemoto-Kimura S, **Bito H.** Quantitative imaging for elucidating neuronal signal transduction mechanisms. 第 30 回日本分子生物年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会 BMB2007, 2007.12.11-15, 横浜. Zeiss Luncheon symposium

2. **Okuno H.** Fujii H, Fuse T, Nonaka M, Takemoto-Kimura S, **Bito H.** Regulation of PSD complex by neuronal activity. 第 30 回日本分子生物年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会 BMB2007, 2007.12.11-15, 横浜. symposium.

3. Takemoto-Kimura S, Ishihara-Ageta N,

Nonaka M, **Okuno H.** **Bito, H.** Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI gamma. Neurosci. Res. 58 Suppl.1: S20, 2007. 第 30 回日本神経科学大会、2007.9.10-12, 横浜. symposium.

4. 竹本 さやか、上田 (石原) 奈津実、野中美応、**奥野 浩行**、**尾藤 晴彦**. CaMキナーゼカスケードによる大脳皮質神経軸索・樹状突起の選択的制御. O2G3-3. 第81回日本薬理学会年会、2008.3.17-3.19, 横浜、口頭

5. 竹本-木村さやか、上田(石原)奈津実、野中美応、**奥野浩行**、**尾藤晴彦**. ラフト膜アンカー型 CaM キナーゼ CLICK-III による樹状突起形成制御. 第 117 回日本薬理学会関東部会、2007.10.6, 東京、口演

6. **Okuno H.** Naruse H, Kawashima T, Fujii H, Chowdhury S, Worley P, **Bito, H.** Regulation of Arc localization at synapses via interaction with CaMKII beta. Neurosci. Res. 58 Suppl.1: S43, 2007. 第 30 回日本神経科学大会、2007.9.10-12, 横浜. 口演

7. Fuse T, **Bito H.** Actin-dependent regulation of Shank1 dynamics in Purkinje cell dendrites. Neurosci. Res. 58 Suppl.1: S129, 2007. 第 30 回日本神経科学大会、2007.9.10-12, 横浜. poster

8. Kiyonaka S, Miki T, Nonaka M, Uriu Y, Wakamori M, Mori E, Hara Y, De Waard M, Itakura M, Takahashi M, Bito H, Campbell K, Mori Y. Active zone protein RIM1 functionally associates with presynaptic VDCCs. *Neurosci. Res.* 58 Suppl.1: S188, 2007. 第30回日本神経科学大会、2007.9.10-12, 横浜. poster
9. Kiyonaka S, Miki T, Nonaka M, Uriu Y, Wakamori M, Mori E, Hara Y, De Waard M, Itakura M, Takahashi M, Bito H, Campbell KP, Mori Y. An active zone scaffolding protein functionally associates with presynaptic calcium channels *J. Pharmacol. Sci.* 103 Suppl. 1: 128P, 2007. 第80回日本薬理学会年会、2007.3.14-3.16, 名古屋、poster
10. 城戸康年、坂元君年、藪 義貞、鈴木高史、齋本博之、北 潔 薬剤標的としての Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) の生化学的解析とその特異的阻害剤 Ascofuranone(AF)の実用化に向けて 第80回日本生化学会大会第・30回日本分子生物学会年会 合同大会平成19年12月
11. 河原賢治、小林環、田中健、畑昌幸、北 潔 ネズミマラリア原虫ミトコンドリア調製法の検討 第75回日本寄生虫学会総会 第80回日本生化学会大会第・30回日本分子生物学会年会 合同大会平成19年12月
12. 藤岡 直、中村公亮、城戸康年、坂元君年、藪 義貞、鈴木高史、齋本博之、北 潔 アフリカトリパノソーマへのアスコフラノン/グリセロール in vitro 殺原虫併用効果におけるグリセロールの標的 第80回日本生化学会大会第・30回日本分子生物学会年会 合同大会平成19年12月
13. 畑 昌幸、小林 環、田中 健、河原賢治、北 潔 熱帯熱マラリア原虫からのミトコンドリア調製法の検討 第80回日本生化学会大会第・30回日本分子生物学会年会 合同大会 平成19年12月
14. 栗野 睦美、網野比左子、石井直明、北 潔 線虫短寿命変異株 *mev-1* コハク酸一ユビキノン還元酵素 複合体 II の生化学的解析 第80回日本生化学会大会第・30回日本分子生物学会年会 合同大会平成19年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：「MRI用プローブ」、発明者：菊地和也，水上進，滝川利佳，白川昌宏，出願番号：特願2007-68753，出願月日：2007年9月12日。

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

Ca²⁺応答性ナノセンサー開発と動物モデルにおける応用

主任研究者 尾藤 晴彦 東京大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨

Ca²⁺恒常性破綻は、多くの疾患の病因である。しかし、実際の疾病時におけるCa²⁺動態異常についての研究はまだ少ない。本研究において、我々は、生きた個体でのCa²⁺測定を可能にする新規技術の開発を目標に、今年度は、①従来のカルシウムセンサーより長波長シフトしたカルシウム感受性プローブの開発、②カルシウムナノイメージングを実行するための新たな光学検出系の開発、③これらプローブを個体動物で発現するだけの基礎技術の検討を行った。

A. 研究目的

生体において細胞内カルシウム Ca²⁺イオンは、心筋収縮から神経可塑性に至るまで、種々の細胞機能を制御する重要なセカンドメッセンジャー活性を有する。一方Ca²⁺恒常性破綻は、多くの疾患の病因であり、その是正のために、Ca²⁺拮抗剤が広く高血圧や不整脈・心筋収縮異常等の治療に適用されている。また、高齢人口に高い発症を示すアルツハイマー病やハンチントン病などの神経変性疾患においても細胞内Ca²⁺恒常性の破綻が伴うことが最近示唆されている。さらに、骨粗鬆症のメカニズムの一部にもCa²⁺シグナル異常の関与が提唱されている。

にもかかわらず、これまで、生きた個体の疾患動物モデルにおいて、病態時のCa²⁺動態異常が計測されたことは皆無である。これは、これまで開発されてきたCa²⁺指示薬のほとんどが培養細胞でのみ有効な化学特性を有していたからであり、多くの疾患の病因病態を解明するためにも、生きた個体でのCa²⁺測定を可能にする新規技術の開発が待たれるところである。

そこで、本研究では、Ca²⁺シグナリングの様々なレベルでの破綻を可視化可能な新規プローブのデザイン、開発、応用のための基盤技術を実現するための基礎研究を行う。また、動物個体におけるシグナル可視化の基礎検討を行う。

B. B-1. Ca²⁺プローブ作成：

予備的検討に基づき、1) Ca²⁺感受性領域を、カルモデュリン、トロポニン、ホスホジエステラーゼなどのCa²⁺感受性蛋白の中から選択し、2) Ca²⁺依存的蛋白構造変化を長波長領域のGFP蛍光変異体間のFRETを指標とし検出し、さらに3) もっともシグナル/ノイズ比の高いセンサー分子をスクリーニングする。その他、カルシウムシグナリング活性化を可視化するプローブも随時作成する。

B-2. 個体計測：

本研究で確立したプローブを、(レンチ・シンドピス) ウィルスベクターにて個体へ導入する方法論の確立を図る。また、遺伝子改変マウス作成などの手法で目的器官に発現する手段を考案する。

(倫理面への配慮)

DNA組換え実験ならびに動物実験に関しては、東京大学の該当委員会に申請を行い、認められたプロトコールに基づいて実験を行った。

C. 研究結果

C-1. カルモデュリン、トロポニン、ホスホジエステラーゼなどのCa²⁺感受性蛋白のCa²⁺感受性領域を比較し、FRET イメージングに適したドメインを決定した。これに基

づき、従来のCyanからYellow領域へのFRETよりさらに長波長側へシフトしたCa²⁺感受性プローブを作成した。カルシウムナノイメージングのための光学検出系をさらに開発し、実際にプローブの感度を検証したところ、in vitroでは、単一シナプス応答を十分可視化可能であることを確認した。

同様のプローブをさらに複数種デザインし、検証中である。

これらのプローブ開発の途上で、細胞膜上のナノドメインの一つである脂質ラフト内で、種々の分子間のFRET計測を定量的に実施する技術も開発し、発表した(Takemoto-Kimura et al. Neuron 2007)。

開発した新たな光学検出系については、カルシウム動態を簡便に可視化定量できる光学技術の開発を視野に、現在国内光学メーカーとの連携を検討中である。

C-2. これらプローブを個体計測に応用するための手段としてシンドピス・ウィルスベクターならびにレンチウィルスベクターを立ち上げ、スライス標本における注入実験にてその有効性を実証した。現在、in vivo injection 実験を開始しつつある。

また遺伝子改変マウスの作成も準備中である。

D. 考察

細胞は試験管とは異なり、化学反応が局所的におこる。すなわち数十nm四方の「ナノドメイン」に濃縮された関連分子の間で

効率よくシグナルが共役・伝達されている。たとえば、脳高次機能と呼ばれる意識、情動、記憶、意欲、注意などの機能は、容積 1 femtoliter 以下の樹状突起スパイン構造、そしてその周辺に位置する樹状突起内反応空間の中で生じる酵素反応および蛋白・蛋白、蛋白・膜、蛋白・細胞骨格相互作用が支配していると言っても過言ではない。このナノドメインの中の Ca^{2+} シグナルの恒常性の破綻が種々の神経・精神疾患の発端あるいは増悪要因として、最近注目されている。同様の Ca^{2+} ナノドメインは、免疫細胞や平滑筋細胞においても報告されている。

本研究で開発された種々のカルシウムセンサープローブは、病態モデルにおける Ca^{2+} ナノドメイン測定に極めて有効な示唆を与えるものと期待される。

E. 結論

E-1. 従来のカルシウムセンサー分子より個体計測に向いている長波長シフトの蛍光プローブを開発した。また、カルシウムナノイメージングのための光学検出系のプロトタイプを開発した。この技術を元にした産学連携の可能性を検討中である。

E-2. sindbis virus ベクター、lentivirus ベクターの in vivoでの有用性を確認するとともに、遺伝子プローブのいくつかについては、遺伝子改変マウス作成の準備を行っている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, Okuno H, **Bito H**. Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI gamma. *Neuron* 54: 755-770, 2007.
2. Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, **Bito H**, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori, Y. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca^{2+} channels. *Nature Neurosci.* 10: 691-701, 2007
3. Fuse T, Ohmae S, Takemoto-Kimura S, **Bito H**. DCLK1. *UCSD/Nature Molecule Pages*, doi:10.1038/mp.a003011.01, 2007.
4. 尾藤晴彦、野中美応、布施俊光、藤井哉、竹本-木村さやか、奥野浩行。シナプス機能と PSD 構築を制御する分子機構。蛋白質核酸酵素 53: 418-423, 2008

書籍等:

1. **Bito H**, Takemoto-Kimura S, Okuno H. Activity-dependent gene regulation: How do synapses talk to the nucleus and fine-tune neuronal outputs? in “**Molecular Pain**“(M. Zhuo ed. Springer), 2007.

2. 奥野浩行、藤井哉、**尾藤晴彦**: 情報素子としてのシナプス-構造・機能ならびに新たな疾患制御標的としての意義-. p220-233, in ナノメディシン 宇理須恒雄 編、オーム社、東京 (2008).

2. 学会発表

国際学会

1. **Bito H**. Elucidating the critical role of CaMKK/CaMKI pathways in neuronal morphogenesis. US-Japan Brain Research Collaborative Program “Workshop on Receptor Trafficking and Cell Biology of Neurons: Physiology and Disease” February 24-27, 2008, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, California, USA.

2. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Okuno H, **Bito H**. Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ 2nd International Conference of Neurons and Brain Disease, 2007.8.29-8.31, Toronto, Canada.

3. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okamura M, Okuno H, **Bito H**. Molecular biology and neuronal functions of CaMK family genes. International Symposium on Advanced Functional Genomics. 2007.10.11-10.12, Kazusa, Chiba, Japan.

4. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Fujii H, Okuno H, **Bito H**. Differential control of cortical axonogenesis and dendritogenesis by alternate activation of CaMKI α and γ . Soc. Neurosci. Abstr. 114.3, 2007. 第 37 回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. Oral.

5. Okuno H, Naruse H, Kawashima T, Fujii H, Nonaka M, Chowdhury S., Worley P, **Bito H**. Synaptic targeting of Arc via high affinity interaction with Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II beta. Soc. Neurosci. Abstr. 221.3. 第 37 回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. Oral.

6. Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, **Bito H**, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y. The active zone protein RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca^{2+} channels. Soc. Neurosci. Abstr. 853.5. 第 37 回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. Oral.

7. Fuse T, **Bito H**. Actin-dependent regulation of Shank dynamics in Purkinje cell dendrites. Soc. Neurosci. Abstr. 45.8, 2007. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. poster

8. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Okuno H, **Bito H**. Requirement for palmitoylation and raft insertion of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ during cortical dendritogenesis. Soc. Neurosci. Abstr. 240.13. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. poster

9. Morinobu S, Takahashi T, Iwamoto Y, Kawano K-I, Yamawaki S, Okuno H, **Bito H**. Neonatal isolation induces susceptibility to learned helplessness through the decrease in LIMK1 in the adult rat hippocampus. Soc. Neurosci. Abstr. 501.2. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA. poster

10. Suematsu A, Sato K, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Yamaguchi A, Chatila TA, **Bito H**, Takayanagi H. The CaMK-CREB pathway regulates osteoclast differentiation and function J. Bone Min. Res. 22: S98-S99, 2007. 第29回アメリカ骨代謝学会年会、2007.9.16-9.19, Honolulu, Hawaii, USA.

11. Okuno H, Fujii H, Naruse H, Kawashima T, Worley P, **Bito H**. Regulation of Arc/Arg3.1 localization in dendritic spines via interaction with Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II. 7th HFSP Awardee Meeting. 2007. 7.18-7.21, Brisbane, Australia. poster

12. Okuno H, Naruse H, **Bito H**. Optical analysis of activity-dependent protein synthesis in dendritic regions of neurons. 2nd International workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2007.9.6-9.7, Tokyo, Japan. Poster.

国内学会

1. Okuno H, Fujii H, Nonaka M, Ageta-Ishihara N, Fuse T, Takemoto-Kimura S, **Bito H**. Quantitative imaging for elucidating neuronal signal transduction mechanisms. 第30回日本分子生物年会・第80回日本生化学会大会・合同大会 BMB2007, 2007.12.11-15, 横浜. Zeiss Luncheon symposium

2. Okuno H, Fujii H, Fuse T, Nonaka M, Takemoto-Kimura S, **Bito H**. Regulation of PSD complex by neuronal activity. 第30回日本分子生物年会・第80回日本生化学会大会・合同大会 BMB2007, 2007.12.11-15, 横浜. symposium.

3. Takemoto-Kimura S, Ishihara-Ageta N, Nonaka M, Okuno H, **Bito, H**. Regulation of

dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI gamma. *Neurosci. Res.* 58 Suppl.1: S20, 2007. 第30回日本神経科学大会、2007.9.10-12, 横浜.symposium.

4. 竹本 さやか、上田 (石原) 奈津実、野中 美応、奥野 浩行、**尾藤 晴彦**. CaMキナーゼカスケードによる大脳皮質神経軸索・樹状突起の選択的制御. O2G3-3. 第81回日本薬理学会年会、2008.3.17-3.19, 横浜、口頭

5. 竹本-木村さやか、上田(石原)奈津実、野中美応、奥野浩行、**尾藤晴彦**. ラフト膜アンカー型 CaM キナーゼ CLICK-III による樹状突起形成制御. 第 117 回日本薬理学会関東部会、2007.10.6, 東京、口演

6. Okuno H, Naruse H, Kawashima T, Fujii H, Chowdhury S, Worley P, **Bito, H.** Regulation of Arc localization at synapses via interaction with CaMKII beta. *Neurosci. Res.* 58 Suppl.1: S43, 2007. 第 30 回日本神経科学大会、2007.9.10-12, 横浜. 口演

7. Fuse T, **Bito H.** Actin-dependent regulation of Shank1 dynamics in Purkinje cell dendrites. *Neurosci. Res.* 58 Suppl.1: S129, 2007. 第30回日本神経科学大会、2007.9.10-12, 横浜. poster

8. Kiyonaka S, Miki T, Nonaka M, Uriu Y,

Wakamori M, Mori E, Hara Y, De Waard M, Itakura M, Takahashi M, **Bito H.** Campbell K, Mori Y. Active zone protein RIM1 functionally associates with presynaptic VDCCs. *Neurosci. Res.* 58 Suppl.1: S188, 2007. 第30回日本神経科学大会、2007.9.10-12, 横浜. poster

9. Kiyonaka S, Miki T, Nonaka M, Uriu Y, Wakamori M, Mori E, Hara Y, De Waard M, Itakura M, Takahashi M, **Bito H.** Campbell KP, Mori Y. An active zone scaffolding protein functionally associates with presynaptic calcium channels. *J. Pharmacol. Sci.* 103 Suppl. 1: 128P, 2007. 第 80 回日本薬理学会年会、2007.3.14-3.16, 名古屋、poster

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

ミトコンドリア機能低下の病態生化学的解析

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリアをはじめとするオルガネラは宿主哺乳類のそれと大きく異なった性質を持ち、その機能低下を通して重要な標的となる事が明らかになった。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、ミトコンドリアをはじめとする寄生虫のオルガネラが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させることによって宿主内の環境に適応していることを明らかにしてきた。この成果をふまえマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析することにより、最終的に化学療法の標的として捉えたいと考えている (Kita et al., *Trend. Parasitol.*, 2007)。そこで、熱帯熱マラリア原虫におけるエネルギー代謝系を先端的なエネルギー転換系研究の視点から追求し、さらにクリプトスポリジウムなど他の寄生原虫も含め寄生現象全般に共通する適応戦略の分子基盤とその多様性を明らかにする事を目的として研究を進めている。

B. 研究方法

マラリア原虫を代表とするアピコンプレックス門の原虫は増殖や宿主細胞への侵入に不可欠な種々のオルガネラを備えている。これらの機能に関する情報は主に細胞生物学的な方向から進められて来た。最近の研究から、マラリア原虫においてミトコンドリアが細胞質のカルシウムイオンのセンサーとして機能し、その増殖に重要な役割を果たしている事が判って来た (Gazarini et al., *BBRC*, 2004)。そこで、本研究ではそれぞれのオルガネラにおけるカルシウムや ATP 合成に必要な水素イオンの役割を明らかにし、最終的にこれら寄生虫のオルガネラ機能を標的とする抗マラリア薬を開発する第一段階として、各オルガネラの分離を試みた。

赤血球内型マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は化学療法剤の標的として期待されている。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたもの