

2008/2011A

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づく
効率的な医薬品評価系の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 諸 根 信 弘

平成21年（2009年）3月

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づく
効率的な医薬品評価系の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 諸根 信弘

平成21 (2009) 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
イメージングに基づ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 18

2. 神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析に関する研究

和田 圭司 20

3. 神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関に関する研究

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 28

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 34

IV. 研究成果の刊行物・別刷 38

厚生労働科学研究費補助金(医療機器開発推進研究事業ナノメディシン研究)

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
基づく効率的な医薬品評価系の開発に関する研究

研究代表者 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、ポリグルタミン病のような神経変性疾患の病態メカニズムのなかで、正常タンパク質のコンフォメーション異常による機能変性からプロトフィブリル(オリゴマー)が形成される「病態極初期」は、機能不全の状態であり、適切に介入できれば治療が可能であると、私たちは考えている。この病態極初期の「タンパク質の病理学的蓄積とプロトフィブリル化」について、透過型蛍光異方性顕微鏡や電子顕微鏡のような超微細画像技術(ナノテクノロジー)を相補的に駆使して、高い時間・空間分解能で定量評価できるシステムをつくってきた。最終的には、インシリコ等々による薬剤候補分子をもとに、病原性プロトフィブリルの進行を抑制する環境を構築したい。これらの統合的なプロトフィブリル検出システム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を判断基準として、新しい診断・治療法に繋がる効率的な医薬品評価系の開発を目指している。

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
北海道大学電子科学研究所・教授

トフィブリル化タンパク質複合体は、高い視認性のもとでは充分観察されていない。そのため、私たちは、プロトフィブリルのような微小な構造物に対して、高い空間分解能で定量的に構造解析するシステムを構築するために、電子顕微鏡像に適用できる新しい画像処理アルゴリズムを開発した。これにより、フィブリル化タンパク質のモノマーやオリゴマーの識別が可能となり、これらの構造や相互作用を解析できるようになると期待できる。本研究では、この最も基礎となる新たな画像処理アルゴリズムによる解析法を、以下の3つの課題により実行した。

A. 研究目的

(1)新しい画像処理アルゴリズムによるフィブリル化タンパク質複合体の高分解能電子線構造解析

神経変性疾患の病態極初期に想定されるプロ

① 細胞局所構造を捉えた電子顕微鏡像に適した画像処理法の開発

② 複合体を構成する特定のタンパク質分子の同定法の開発

③ 細胞骨格の形態変化(分岐度の複雑さ)の定量的解析

(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

前頭側頭型認知症では、原因遺伝子であるタウの遺伝子産物がフィブリル化することにより、神経細胞の変性が開始されると考えられている。そこで、タウタンパク質のフィブリル化を細胞レベルで可視化することによって、フィブリル化を抑制する薬物をスクリーニングする方法を開発する。

(3)神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

本研究では、PolyQ病を引き起こす異常伸長PolyQ蛋白質について、その構造異常・毒性構造体を解明し、PolyQ病の治療標的を特定することを目的として、PolyQ蛋白質の構造生物学的解析およびFCS解析を行った。さらに、パーキンソン病やアルツハイマー病の発症機序についてUCH-L1の構造生物学的特性を明らかにした。

(4)神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関

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

①KillerRedの単量体化と生理機能破壊法への応用

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。そこで、本年度はKillerRedの遺伝子改変による単量体化とその性能評価を行った。

②群青色蛍光タンパク質の開発とその応用

Aequorea(オワンクラゲ)由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)及び、その波長変異体を細胞内の目的タンパク質と融合させ、可視化する技術は細胞生

物学において必要不可欠な技術になっている。現在、長波長の蛍光をもつ蛍光タンパク質の種類は豊富である一方で、短波長の蛍光を発する変異体の種類は少ない。そこで本研究では、短波長の蛍光を発する蛍光タンパク質を開発し、それを用いて画期的なバイオイメージングを行うことを目標とした。

③Dual FRETによる多機能イメージング法の開発

FRETを用いた機能イメージングは現在広く用いられている。しかしながら、異なる蛍光色間のエネルギー移動を原理とするため、1つの現象を可視化するためには広い波長域の利用がひつようとなる。従って、FRETによる多機能観察は困難であった。この問題を解決するため、本年度は同一波長で励起が可能で、かつ発光波長が十分に分離可能な蛍光タンパク質ペアを探索し、それらを用いる事で、1波長励起4波長測光によるDual FRETイメージング法の確立を試みた。

B. 研究方法

(1)新しい画像処理アルゴリズムによるフィブリル化タンパク質複合体の高分解能電子線構造解析

①細胞局所構造を捉えた電子顕微鏡像に適した画像処理アルゴリズムの開発

神経変性疾患に関わるプロフィブリル化は、高度に複雑化した組織・細胞環境で生じる。そのため、複雑な背景画像の中から、特定の領域(病因タンパク質分子の存在している領域)の自動抽出と画像間の類似度に基づくクラスタリング手法を開発した。

この画像処理は、Mathematical morphologyとよ

ばれる数理論に基づいている。Mathematical morphologyは、集合論を基盤に、様々な画像処理を一貫した理論体系のもとで表現し実行する数理論体系である。ヒトが直感的に判断、理解してきた画像処理に対し、物体の“かたち”をexplicitに表現できるため、一定の論理的根拠を備えた定量的な解釈が可能となる。“丸い”、“線維状の”などのかたちの表現形式をそのまま処理に取り込み定量的に評価できる。これは、従来の輝度分布に基づく画像処理や、Fourier変換に基づく周波数選択型の処理にはないユニークな特性である。また、全ての演算は、Minkowsky和と差という単純な2項演算を基本とするため、計算機での実装が容易である。これらの画像処理理論に基づく解析法を、神経系にも普遍的な細胞膜構造の電子顕微鏡画像に適用した。試料としては、急速凍結した細胞膜を割断した後、プラチナで蒸着したフリーズレプリカを使用した。膜面(P面)のフラクチャー像から、膜タンパク質が表現する膜内粒子を自動抽出し、分子全体の大きさや表面構造の形状パターンによるクラスタ解析を行った。分類には、Maximum-likelihood multi-reference refinement(最尤推定に基づく手法)を用いた。現在、より詳細な解析を3次元に拡張している。

②タンパク質複合体の構成分子の同定法の開発

フィブリル化タンパク質複合体中の構成分子の同定と結合様式を解析する手法を開発した。対象タンパク質の全部、もしくは部分の3次元構造がX線結晶構造解析及びNMRで解かれている場合は、それをテンプレートとして用いた電子顕微鏡像に対するマッチング手法を開発した。すなわち、電

子顕微鏡で捉えられたタンパク質複合体に3次元構造から得られたデータをマッチングさせ、最も相関の高い領域を選び出す。これによりタンパク質の位置を同定し結合様式を明らかにすることを旨とする。

結晶構造などが全く得られていない場合に対しては、タンパク質複合体像の平均化とクラスター解析により構成蛋白質の結合様式を解析する手法も開発した。これは、膜チャネルの立体構造解析などに使われる単粒子解析法を拡張するものであるが、特別な調製法が不要でかつ微量のサンプルで解析が可能のため、様々な条件下におけるタンパク質複合体の立体構造とその変化を実験的に解明できると考えられる。

これまで、パーキンソン病に関連性のある線維状タンパク質の電子顕微鏡画像を解析するためのテンプレートの作成を行った。このタンパク質の結晶構造を用いて、電子顕微鏡像シミュレーション(2次元透過像シミュレーション)を行い、実像と同様な画像データを持つテンプレート画像を作成した。そのテンプレートと実像のマッチング手法も開発している。マッチングは、分子の輪郭形状と表面構造の輝度分布の類似度に基づいて行う。類似度は相互相関係数によって計測するが、そのための特徴量の抽出手法についても、新たに開発する予定である。

③細胞骨格の分岐度の定量的解析

Mathematical morphology を用いた新規フィルタにより、不均一な輝度変化や複雑な構造物を含む背景の中から、細胞骨格のフィラメントのみを良好にセグメンテーションする手法を確立した。また、

細胞骨格のフラクタル解析を行うことにより、分化に伴って発現する細胞小器官の増加に従い、細胞骨格の分岐の複雑度が有意に減少することがわかった。これは、アクチンフィラメントの束化や特定方向への配列などの影響を反映しているものと推測され、細胞の特定機能発現のための骨格構造の形態変化を捉えているものと考えられる。

(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

ヒトタウタンパク質とGFPタンパク質を融合タンパク質として培養神経細胞に発現させ、神経突起の伸展を蛍光顕微鏡で計測する。家族性タウ変性疾患で見出されたタウ遺伝子の突然変異体を同様に発現させ、突起伸展反応に対する効果を検討する。この時、酸化ストレス、あるいはA β オリゴマーの添加により、突起伸展がどのように影響されるかを調べ、ストレスとタウ変性との関係を解析する。突起伸展を定量化するために、表面加工技術によりナノパターンを形成したガラス基板上に細胞を蒔種したものを用いる。

(4)神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関

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

ソムノベ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4 μ lのプラスミドDNA(5 μ g/ μ l)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シナプス形成および神経回路構築の可視化

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50 μ mの脳切片を作製した。免疫組織染色法は常法に従いラビットポリクローナル抗EGFP抗体を用いて浮遊法にて行った。

③電子顕微鏡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/0.5%ピクリン酸にて還流固定し脳を摘出後、常法に従い脳切片を作製しラビットポリクローナル抗EGFP抗体を用いてEGFP陽性細胞を標識した。EGFPシグナルはBADにて発色した。

(5) 光照射による生体機能操作法の開発

①KillerRed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砕後、粗精製液をNative-PAGEに供した。

②KillerRed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。

③改変KillerRedの性能評価

得られた変異導入タンパク質を限外濾過および光散乱法により分子量測定を行った。また、活性酸素指示薬ADPAを用いて強光照射依存的な十項酸素賛成量の定量化を行った。また、ミトコンドリア移行シグナル、核移行シグナル、ペルオキシソーム移行シグナル、細胞膜移行シグナルを融合したmKillerRedをpcDNA3ベクターにサブクローニングした。各プラスミドをHeLa細胞にトランスフェクションしてmKillerRedを細胞内コンパートメントに発現させ、強光照射による細胞機能変化を顕微鏡下で観察した。

④遺伝子改変による群青色蛍光タンパク質の開発

mSECFPの66番目のチロシンをトリプトファンに置換したものmSECFP-W66Fを作成し、これをスタート物質として部位特異的アミノ酸変異およびタンパク質全長に渡るランダム変異導入を行った。前者はQuik Change法で、後者はエラー誘発PCR法により行った。変異導入後は大腸菌に発現させ、コロニーを紫外線励起した時の青色蛍光の強度を基準にスクリーニングを行った。

⑤群青色蛍光タンパク質の物理化学特性評価

大腸菌に発現させた群青色蛍光タンパク質を精製し、プロテインアッセイ法によってタンパク質濃度を決定した。一定濃度の群青色蛍光タンパク質を吸光分光光度計にて測定し、モル吸光係数を

得た。蛍光量子収率は積分球型絶対測定法により測定した。pH滴定はpH3からpH9までのpH緩衝液を作成してそこに群青色蛍光タンパク質を溶解し、蛍光高度計により蛍光強度を測定した。光安定性は群青色蛍光タンパク質をHeLa細胞に発現させ、顕微鏡下で375nmの強光($>10\text{W}/\text{cm}^2$)を照射し、蛍光強度の減衰曲線を得た。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。

⑥群青色蛍光タンパク質を利用した貪食過程の観察

群青色蛍光タンパク質および緑色蛍光タンパク質を大腸菌に発現させ、細胞性粘菌の餌として与え、貪食される様子を780nmの2光子励起により観察した。

⑦Dual FRETによる多機能イメージング

Sirius-mseCFP および Sapphire-dsRed の両FRETペアを用いてそれぞれカスパーゼ3およびCa²⁺の動態を観察した。励起は380nmで行い、420、480、510、580nmの蛍光を観察した。

(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)新しい画像処理アルゴリズムによるフィブリル化タンパク質複合体の高分解能電子線構造解析

①細胞局所構造を捉えた電子顕微鏡像に適した画像処理アルゴリズムの開発

細胞膜面の電子顕微鏡像から、タンパク質粒子のみをmathematical morphologyに基づくフィルタにより自動抽出し(100nm四方に約500粒子程度)、まず、分子全体の大きさで分類した。分子形状を円状に近似し、その直径を計測して、3つのクラスに分類した。次に、中程度の大きさのクラスに対し、分子形状(表面構造)の違いによるクラスタ解析を行った。その結果、これまでのところ、10程度のクラスに分類でき、各々のクラス平均像を求めると、オリゴマーの構造や、チャンネルポアと考えられる孔の構造など、これまで詳細に観察されてこなかった分子構造が見えてきた。特定の領域の抽出と画像間の類似度に基づくクラスタ解析手法は、電子顕微鏡画像解析の基本的な技術要素である。画像処理にmathematical morphologyを用いるため、従来手法と比べてより効果的で汎用的な解析が可能となった。今後は、細胞局所場に存在する様々なタンパク質分子を対象として本手法を適用し、解析を進めていく。

②タンパク質複合体の構成分子の同定法の開発

パーキンソン病に関連性のあるタンパク質の電子顕微鏡シミュレーション像の作成とマッチング手法を開発した。その結晶構造を用いて、モノマー、ダイマー、オリゴマーなど分子の重合状態を自由に变化させて、電子顕微鏡のシミュレーション像を作成できる手法を開発した。今後はこれらをテンプレートとして、タンパク質線維の実像とのマッチングにより、これらのタンパク質の異常凝集・沈着を起こす機構について、低重合状態の構造を同定していくことにより、線維全体の解析を行っていく。

③細胞骨格の分岐度の定量的解析

Mathematical morphology を用いた新規フィルタにより、不均一な輝度変化や複雑な構造物を含む背景の中から、細胞内環境で細胞骨格のフィラメントのみを効率的にセグメンテーションする手法を確立した。フィブリル化タンパク質と構造が似ている、細胞骨格構造のフラクタル解析を行うことにより、細胞局所場の細胞小器官の増加に従って、細胞骨格の分岐の複雑度が有意に減少することがわかった。これは、フィラメントの束化や特定方向への配列などの影響を反映しているものと考えられ、細胞の特定機能発現のための骨格構造の形態変化を捉えているものと考えられる。病因タンパク質のフィブリル化の複雑性について、個の手法で評価できると考えられる。

(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ヒトタウ遺伝子は多型であるが、本研究ではチューブリンと相互作用する部位を4つもち、N 末端にある2個の代替性エクソンを一つ持つ型(4R1N)の野生型および、家族性タウ変性疾患変異体 P301L、R406W と GFP の融合タンパク質を PC12 細胞に一過的に発現させた。PC12 細胞は神経栄養因子 NGF を添加すると神経突起を伸ばす。しかし、NGF を添加した状態で、これらの遺伝子を発現した細胞の突起進展に差異が認められなかった。

②タウのフィブリル化を計測するための方法として、表面加工技術を用いてガラス基板上にナノパターンを形成した。それを用いて PC12 細胞を培養し、ナノパターンにそって神経突起を伸張する条件を

開発した。

(4)神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関

妊娠15.5日齢のマウス胎仔の脳内に子宮内電気穿孔法を用いてEGFP発現ベクターを導入し、生後14日齢および30日齢のマウス大脳皮質におけるEGFP陽性細胞を観察した。その結果、特定のニューロンにおけるシナプスならび樹状突起・軸索の伸長を確認した。さらに、30日齢のマウスにおいて電子顕微鏡によりEGFPシグナルを有する細胞体、神経突起、およびシナプスの微細構造が観察された。以上のことから、本法の有効性が示された。

(5)光照射による生体機能操作法の開発

①KillerRedの単量体化と生理機能破壊法への応用

単量体化に伴いモル吸光係数が減少することが観察された。そこで、より赤く呈色するコロニーをピックアップすることで吸収特性の良い単量体化KillerRedのスクリーニングを試みた。その結果、昨年度得られた単量体化KillerRed変異体よりも、モル吸光係数の大きなmKillerRedを得ることに成功した。光増刊活性の低下も認められず、HeLa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。また、興味深いことにクロマチンにmKillerRedを発現させて緑色光を照射した場合もアポトーシスを誘導するが、光照射から細胞死までの時間がミトコンドリアの場合と異なるらしいことが分かった。

②群青色蛍光タンパク質の開発とその応用

mSECFP-W66Fに対する4回に及ぶ変異導入の結果、元のY66F変異体と比較して80倍の明るさで群青色の蛍光を発する蛍光タンパク質を得ることに成功した。本タンパク質を37°Cで培養した大腸菌内で発現させるとEBFP比で2倍明るい蛍光を放つことから、夜空で最も明るい青色の恒星にちなみ、Siriusと命名した。Siriusの吸収および蛍光極大はそれぞれ355nmおよび424nmで、EBFPの380nmおよび448nmよりもさらに短波長であり、今までに報告された蛍光タンパク質変異体の中で最も短波長の吸収・蛍光極大を有する。驚くべきことにSiriusは、光褪色に非常に強い耐性(EBFPの60倍)を持ち、プロトンに対する感受性(pH感受性)が全く無く、極めて安定な蛍光を発することが明らかとなった。

③Dual FRETによる多機能イメージング法の開発

Siriusの蛍光スペクトルはCFPの吸収スペクトルと完全にオーバーラップすることから、SiriusはCFPをアクセプターとする理想的なFRETドナーであることが判明した。また、UV領域で励起可能であり、緑色の蛍光を発するSapphireと呼ばれるGFP変異体と、Siriusは、同じ波長で同時に励起することが可能であることが分かった。こうした知見を踏まえて、SiriusとCFPのFRETペアに加え、SapphireとDsRedのFRETペアを併用することで、1波長励起4波長測光によるDual FRETを試みた。その結果、HeLa細胞のアポトーシス過程におけるCa²⁺の上昇とカスパーゼ-3の活性化を同時に可視化することに成功した。

D. 考察

(1)新しい画像処理アルゴリズムによるフィブリル化タンパク質複合体の高分解能電子線構造解析

当該年度に開発した「新しい画像処理アルゴリズム」が、細胞膜上のひとつひとつのモノマー・タンパク質や、フィブリル化したタンパク質複合体中でのモノマー・オリゴマーの検出、線維状の細胞骨格構造の分岐の定量解析にも有効であることが分かった。特に、パーキンソン病に関わるタンパク質の細胞内構造解析では、十分な解像度と精度があることが分かったため、プロフィブリルを高い空間分解能で可視化するシステムは、ほぼ整ったと考えられる。解析次元を3次元まで広げることで、対応できる病因タンパク質の種類を増大させてゆきたい。

(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

野生型、変異型のタウタンパク質を神経様細胞に発現させたが、NGF添加により神経突起を分化させても形態に差異が認められなかった。今後、酸化ストレスやA β オリゴマーなどを添加することにより、形態変化を誘導することを試みる。また、ナノパターンニング技術を用いて神経突起の形態変化を定量化する方法の開発を進めている。

(3)神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

①異常伸長PolyQ蛋白質の構造異常

Thio-redoxin-PolyQ蛋白質(Thio-PolyQ)について、円偏光二色性分散、ゲルろ過クロマトグラフィー、超遠心分析、電子/原子間力顕微鏡などの解析の結果、異常鎖長のThio-Q62モノマーは経時的に α ヘリックス構造から β シート構造への異常

コンフォメーション変移を生じて、アミロイド線維状凝集体を形成することが明らかになった。

②異常伸長PolyQ蛋白質の毒性構造体

Thio-Q62の様々な構造体をCOS-7細胞へマイクローインジェクションした結果、アミロイド線維状凝集体のみならずβシートモノマーも濃度依存的に細胞毒性を発揮することを見出した。

③FCSによる細胞内のPolyQ蛋白質オリゴマーの検出

PolyQ-GFP融合蛋白質を発現するCOS-7細胞の溶解液を用いてFCS解析を行った結果、異常鎖長のQ45/Q81-GFPでは経時的かつPolyQ鎖長依存的に拡散時間の遅延、1粒子あたりの蛍光強度の増強を認め、細胞内でのオリゴマー形成が明らかになった。

④QBP1による異常伸長PolyQ蛋白質の毒性βシート変移・オリゴマー形成の阻害

異常伸長PolyQ鎖特異的結合ペプチドQBP1 (SNWKWW-PGIFD) について、異常伸長PolyQ蛋白質の構造異常に与える影響を検討した結果、QBP1はThio-Q62の毒性βシート変移・アミロイド線維状凝集体形成を阻害し、細胞内でのPolyQ-GFPのオリゴマー形成を抑制することが示された。

⑤UCH-L1の構造生物学的機能解析

家族性パーキンソン病PARK5の原因であるUCH-L1のI93M変異がもたらす構造生物学的特性の変動について生化学的解析を加えたところ、I93M UCH-L1変異体自身の不溶性亢進に加えて、他蛋白質との結合性亢進が認められた。さらに結合が亢進する蛋白質として、LAMP2、tubulinの同定に成功した。LAMP2はchaperone介在型オ

ートファージの重要な構成因子であり、tubulinは神経細胞の生存に必須な蛋白質である。これら蛋白質とI93M UCH-L1との凝集性亢進はこれら蛋白質がもつ本来の細胞内機能に障害が生じる可能性がある。

(4)神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関

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。既に我々は、生後経時的に脳を摘出し、樹状突起・軸索の伸長、シナプス形成過程を観察している。さらに、本年度、生後30日齢のマウスにおいて、電子顕微鏡を用いてシナプスの微細構造を確認した。今後、組織レベルでのシナプス機能分子の動態解析が期待できる。

(5)光照射による生体機能操作法の開発

①KillerRedの単量体化と生理機能破壊法への応用

ミトコンドリアや核にmKillerRedを発現させ、強光を照射するとアポトーシスを誘導することはできた。しかしながら、例えばPKC-gと融合して発現させると、凝集等は見られず正しい部位に局在したものの、光照射に伴う機能破壊を行うことができなかった。このことから、mKillerRedは従来型の小分子化合物性光増感剤であるフルオレセインなどよりも一重項酸素産生能が低いと考えられ、さらなる改良が必要であることが明らかとなった。

②群青色蛍光タンパク質の開発とその応用

これまで困難を極めた産生条件下での安定な蛍光観察を行うことがSiriusによって初めて実現し

た。今回観察を行ったファゴソームのみならず、リソソーム、ゴルジ体、分泌顆粒内で働くタンパク質の動態をSiriusと融合させることで観察が行えると期待される。但し、Siriusの蛍光強度はGFPやYFPに比べると以前低いため、アミノ酸置換によるさらなる改善が必要である。

③Dual FRETによる多機能イメージング法の開発

Dual FRETの手法を用いることにより、生細胞内の同箇所で行われる複数の生理現象をリアルタイムで観察することが可能になると期待される。しかし、今回の技術は2つの現象を可視化するのが限界であり、3つ以上の生理機能を同時に可視化するためにはさらなる技術改変或いは新技術の創出が必要である。

E. 結論

(1)新しい画像処理アルゴリズムによるフィブリル化タンパク質複合体の高分解能電子線構造解析

当該年度では、神経変性疾患に関わる病因タンパク質の細胞内局所での構造解析を行うことを目的とし、画像解析アルゴリズムの開発を行ってきた。画像データの定量的解析のためには、様々な画像について頑強でかつ汎用的な画像処理が望まれる。このため、mathematical morphology理論を拡張した画像処理理論を用いて解析アルゴリズムを構築した。

3つの課題のうち、①細胞局所構造を捉えた電子顕微鏡像に適した画像処理アルゴリズムの開発では、フリーズフラクチャーによる膜内粒子の電子顕微鏡解析を行った。また、②タンパク質複合体の構成分子の同定法の開発では、パーキンソン

病に関わる線維性タンパク質の電子顕微鏡シミュレーション像の作成とマッチング手法の開発を行った。さらに③細胞骨格の分岐度の定量的解析では、分化に伴うフィラメント構造の形態変化を定量的に解析する手法を開発した。

これまでの研究開発で、目的を達成するための基礎となる画像解析ツールの開発はほぼ終了している。今後は、アルツハイマー病に関わるタウタンパク質やポリグルタミンタンパク質を包含して、プロフィブリルを細胞局所場で検出・解析すると同時に、迅速かつ簡便な構造解析システムとして、新しい医薬品評価系へ発展させてゆきたい。

(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

野生型、変異型のタウタンパク質を神経様細胞に発現させ神経突起の形態変化を蛍光顕微鏡により計測した。

(3)神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

①異常伸長PolyQ蛋白質は、モノマーレベルでβシート構造への異常コンフォメーション変移を生じて、アミロイド線維状凝集体を形成する。

②異常伸長PolyQ蛋白質モノマーは、βシート構造への異常コンフォメーション変移を経て細胞毒性を獲得する。

③FCSは、細胞内での異常伸長PolyQ蛋白質のオリゴマー形成の検出に有用である。

④QBPIは異常伸長PolyQ蛋白質の毒性βシート変移・オリゴマー形成を阻害して神経変性を抑制する。

⑤家族性パーキンソン病PARK5の発症に

UCH-L1構造変化がもたらす他蛋白質との凝集性亢進が関わる可能性を示した。

(4) 神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関

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の神経回路、シナプスの可視化、また、電子顕微鏡を用いたシナプスの微細構造解析法を構築した。さらに、この技術を用いて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を特定のニューロンで欠損させることにより、神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関に関する研究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

① KillerRedの単量体化と生理機能は開放への応用

ランダム変異導入および部位特異的変異導入により、完全単量体した。また、その完全単量体化KillerRedをミトコンドリアに発現させた細胞を光照射依存的にアポトーシスさせることに成功した。

② 群青色蛍光タンパク質の開発とその応用

オワンクラゲGFPを遺伝子改変することで、これまでに報告がない424nmに蛍光極大を有する群青色蛍光タンパク質の開発に成功した。

③ Dual FRETによる多機能イメージング法の開発

Sirius-CFP および Sapphire-dsRed の 2 つの FRET ペアを用いる事で、2 つの生理機能を同一の細胞内で観察する手法を開発した。

F. 健康危険情報

特に、ありません。

G. 研究発表

(1) 新しい画像処理アルゴリズムによるフィブリル化タンパク質複合体の高分解能電子線構造解析

① 論文発表

- 1) Kobayashi T, Morone N, Kashiya T, Oyamada H, Kurebayashi N, Murayama T. Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research. PLoS ONE. 2008 ;3 (12):e3822 19048102.
- 2) 木森義隆, 諸根信弘, 片山栄作. Mathematical morphologyに基づくバイオイメージからの構造情報の抽出と解析. 顕微鏡. 第44巻. 2008; 1-6.
- 3) Kusumi A, Umemura Y, Morone N, and Fujiwara T. Paradigm Shift of the Molecular Dynamics Concept in the Cell Membrane: High-Speed Single-Molecule Tracking Revealed the Partitioning of the Cell Membrane. (Anomalous Transport: Foundations and Applications, edited by Rainer Klages, Günter Radons, Igor M. Sokolov). 2008; 545-574.
- 4) Morone N, Nakada C, Umemura Y, Usukura J, Kusumi A. Three-dimensional molecular architecture of the plasma-membrane-associated cytoskeleton as reconstructed by freeze-etch electron tomography. Methods Cell Biol. 2008; 88 :207-36.

②学会発表

- 1) Morone N, Fujiwara TK, Kasai RS, Yuasa S, Usukura J and Kusumi A. Electron Freeze-Replica Tomography for the Plasma Membrane Interface. The Asia-Pacific Microscopy Congress, Jeju Korea 2008. 招待講演
- 2) 諸根信弘. カベオラ・膜骨格の相互作用解析: フリーズエッチ電子線トモグラフィ. 日本顕微鏡学会第52回シンポジウム, 千葉大学2008. 招待講演
- 3) Morone N, Wakui F, Kohno T, Yamamura T, Satoh J, and Yuasa S. GPI-Anchored Protein And Membrane Structure Inside Human Neural Progenitors. The 5th international Forum on Oxidative Stress and Aging. Ancona Italy 2008. 招待講演
- 4) 諸根信弘. Freeze-etch electron tomographyによる細胞膜骨格の3次元構造解析—新しい細胞膜構造モデル—東京農工大学.2008. 招待講演
- 5) 諸根信弘. 細胞膜直下から可視化された「新しい細胞膜構造」: Freeze-etch electron tomographyによる膜骨格の3次元構造. 第4回認定特定非営利活動法人IIRS(総合画像研究支援)セミナー. 日本女子大学.2008. 招待講演
- 6) Morone N. Electron freeze-replica tomography correlated with a single-molecule imaging: a structural analysis for the plasma membrane. The First iCeMS International Symposium/The Eleventh MEMBRANE RESEARCHFORUM. Kyoto Japan, 2008. 招待講演
- 7) Morone N, Wakui F, Kohno T, Yamamura T, Satoh J, and Yuasa S. (2008) GPI-Anchored Protein And Membrane Structure Inside Human Neural Progenitors. *The 5th international Forum on Oxidative Stress and Aging*. Ancona Italy. 招待講演
- 8) Usukura J, Watanabe T, Morone N, and Kaibuchi K. (2008) 3D architecture of membrane undercoat and spatial specificity of actin binding proteins revealed by immuno-freeze-etching and cryo-electron microscopy. *XIII international congress of histochemistry and cytochemistry (ICHC 2008) "Imaging of cell dynamics"* Gdansk Poland. 招待講演
- 9) Morone N. (2008) Analysis of interaction between caveolae and membrane skeleton: electron freeze-etch tomography. The 52nd symposium of the Japanese Society of Microscopy, Chiba Japan. 招待講演
- 10) Morone N, Fujiwara TK, Kasai RS, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A. (2008) Three dimensional interplay of the membrane skeleton with the plasma membrane as visualized by freeze-etch electron tomography. *The 46th annual meeting of the Biophysical Society of Japan*, Fukuoka Japan. 招待講演
- 11) Morone N, Wakui F, Kohno T, Kimori Y, Yuasa S. (2008) GPI-anchored Protein's complex and membrane skeleton in human neural progenitors as revealed by electron microscopy. The 48th annual

meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco USA.

- 12) High-density caveolar formation just beneath the plasma membrane of the fully differentiated adipocyte as revealed the freeze-etch electron microscopy. (2008) The 48th annual meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco USA.
- 13) Morone N, Fujiwara TK, Kasai RS, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A. (2009) Asia-pacific congress on electron tomography. Brisbane Qld, Australia.

(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) Kumanogoh H, Asami J, Nakamura S, Inoue T: Balanced expression of various TrkB receptor isoforms from the Ntrk2 gene locus in the mouse nervous system, *Mol Cell Neurosci*, 39, 465-77, 2008

②学会発表

【国内学会】

- 1) 有機シラン自己組織化単分子膜上での PC12 細胞のパターニング、山本英明, 別府佑一, 佐々木康祐, 谷井孝至, 渡邊孝信, 大泊巖, 中村俊、応用物理学会、筑波、(3月31日2009年)

(3)神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

①論文発表

- 1) Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., Wada, K. Aberrant molecular properties shared by

familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 1482-1496, 2008.

- 2) Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K. Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.*, 283 23731-23738 2008.
- 3) Kabuta T. Wada, K. Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 4, 827-829, 2008.
- 4) Yasuda, T., Nihira, T., Ren, Y.R., Cao, X.Q., Wada, K., Setsuie, R., Kabuta, T., Wada, K., Hattori, N., Mizuno, Y., Mochizuki, H. Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 108, 932-944, 2009.
- 5) Goto, A., Wang, Y.L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., Wada, K. Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (*gad*) mouse. *Neurochem. Int.*, 2008 Dec 25. [Epub ahead of print]
- 6) Setsuie, R., Sakurai, M., Sakaguchi, Y., Wada, K. Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. *Neurochem. Int.*, 2008 Dec 25. [Epub ahead of print]

②学会発表

【特別講演・シンポジウム】

1) 節家理恵子、古田晶子、和田圭司: ユビキチン C 末端加水分解酵素の機能. 神経組織の成長・再生・移植研究会第 23 学術集会. 千葉, 5.17, 2008

【一般学会】

1) 安田徹¹、和田圭司²、服部信孝¹、水野美邦¹、望月秀樹¹(¹順天堂大学、²国立精神・神経センター神経研究所): α -synuclein のドパミン神経毒性に対する UCH-L1 の効果. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7.9, 2008

2) 株田智弘¹、節家理恵子¹、三井丈史^{1,2}、衣川亜衣子¹、櫻井省花子¹、青木俊介¹、内田健康²、和田圭司¹(¹国立精神・神経センター神経研究所、早稲田大学理工学部電気・情報生命工学): カルボニル化 UCH-L1 とパーキンソン病関連変異型 I93M UCH-L1 に共通した異常な分子の性質. 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 7.9, 2008.

3) Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K.: Aberrant interaction between familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9.11, 2008.

4) Konya, C., Kabuta, T., Kinugawa, A., Wada, K.: Decreased secretion of UCH-L1 and SOD1 by the mutations associated with neurodegenerative diseases. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9.11, 2008.

5) Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K.: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. 第51回日本神経化学

大会, 富山, 9.11, 2008

6) Suzuki, M., Setsuie, R., Wada, K.: Regulation of energy homeostasis by UCH-L1 and UCH-L3. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 9.11, 2008.

7) Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K.: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. BMB2008, 兵庫, 12.10, 2008.

8) 三井丈史、株田智弘、株田千華、内田健康、和田圭司: UCH-L1 による細胞増殖促進. BMB2008, 兵庫, 12.11, 2008.

(4) 神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関

①学会発表

【国内学会】

1) 岡本伸彦、内野茂夫: SHANK3 異常症例の臨床的検討. 第50回日本小児神経学会、東京、5.29. 2008.

2) 難波隆志、前川素子、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一: NMDA 受容体阻害剤の成体海馬神経新生に対する影響. 第23回神経組織の成長・再生・移植研究会、幕張、5.17. 2008.

3) 難波隆志、前川素子、鈴木恵里、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一: NMDA 受容体阻害剤の成体海馬神経新生に対する影響. 第31回日本神経科学学会、東京、7.10. 2008.

4) 伊藤雅之、井出秀平、相馬美歩、湯浅茂樹、和賀央子、内野茂夫、高森一乗: MECP2 欠損マウス研究の現状と課題. 第3回メチレーションと小児神経学研究会、東京、8.24. 2008.

5) 難波隆志、石龍徳、内野茂夫、高坂新一:

FACS を用いた成体海馬におけるニューロン新生の検出方法の開発、第51回日本神経化学会」、富山、9. 11. 2008.

- 6) 権田祐子、田畑秀典、中嶋一範、内野茂夫、高坂新一: マウス前脳における Robo1 の発現様式、第51回日本神経化学会、富山、9. 13. 2008.
- 7) 内野茂夫、和賀央子、岡本伸彦、高坂新一: 自閉症患者におけるシナプス機能分子 SHANK3 の遺伝子解析、第51回日本神経化学会、シンポジウム「発達障害の神経化学、富山、9. 14. 2008.
- 8) 権田祐子、田畑秀典、中嶋一範、内野茂夫、高坂新一: 脳発達期のマウス前脳における Robo1 の発現分布様式、第81回日本生化学大会・第31回日本分子生物学会年会、神戸、12. 10. 2008.
- 9) 和賀央子、岡本伸彦、後藤雄一、内野茂夫、高坂新一: 自閉症患者におけるシナプス機能分子 SHANK3 の遺伝子解析、第81回日本生化学大会・第31回日本分子生物学会年会、神戸、1. 2. 11. 2008.
- 10) 難波隆志、前川素子、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一: アルツハイマー病治療薬 Memantine が海馬 Adult neurogenesis に与える2つの影響、第3回神経発生討論会、岡崎、3. 12. 2009.
- 11) 難波隆志、前川素子、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一: アルツハイマー病治療薬 Memantine の海馬神経前駆細胞に与える影響、第30回神経組織培養研究会、湯河原、3. 15. 2009.

(5) 光照射による生体機能操作法の開発

①論文発表

- (1) Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K, Nagai T. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature Methods*, in press.
- (2) Yamamoto T, Kumagai A, Saito K & Nagai T. Two-photon excitation behavior of thiophene-based oligomer and a polymer. *J Nanosci Nanotechnol.* 9: 670-672, 2009.
- (3) Saito K, Kobayashi K, Tani T & Nagai T. A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time imaging system for cellular structure and function. *Cell Struct Funct.* 33: 133-141, 2008.
- (4) Kotera I & Nagai T. A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme. *J. Biotechnol.* 137: 1-7, 2008.
- (5) Matsuda T, Miyawaki A & Nagai T. Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. *Nature Methods* 5:339-345, 2008.
- (6) Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, Matsuzaki Y, Miyata T & Okano H. Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J Cell Sci.* 121:1204-1212, 2008.
- (7) 永井健治「蛍光タンパク質開発秘話 -Pericam-」蛋白質 核酸 酵素53:

1858-1864, 2008.

- (8) 永井健治、松田知己「光変換蛍光タンパク質を用いた生体分子の動態解析法」**実験医学**、26:156-162、2008.
- (9) 松田知己、永井健治「新規の光変換蛍光蛋白質プローブを用いた生体イメージングと動態解析」**蛋白質 核酸 酵素**、53:1858-1864、2008.
- (10) 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.

②学会発表

- (1) Takeharu Nagai "Deciphering enigma of biological function by a genetically-encoded molecular spy" The 4th LSW symposium, 2009.1 (Hokkaido University, Sapporo)
- (2) Takeharu Nagai "Engineering fluorescent proteins to visualize and manipulate biological functions" The 11th Japan and America Frontier of Science, 2008.12 (Beckman center, Irvine, USA)
- (3) Takeharu Nagai "Engineering fluorescent proteins to visualize biological functions" The 8th Japan and America Frontier of Engineering, 2008.11 (Kobe convention center, Kobe)
- (4) Takeharu Nagai "Imaging biological functions by using FRET-based sensor proteins" ICCB2008, 2008.10 (COEX, Seoul, Korea)
- (5) Takeharu Nagai "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions" NEWscience2008, 2008.9(de Sao Paulo university, Brazil)
- (6) Takeharu Nagai "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions" Catolica de Chile, 2008.9(Catolica de Chile university, Chile)
- (7) Takeharu Nagai "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions" IBRO (I Neurolatam), 2008.9(Buzios, Brazil)
- (8) Takeharu Nagai "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins for biological research" Institute of Neuroscience, 2008.5(Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China)
- (9) Takeharu Nagai "Direct measurement of protein dynamics in living cells using a rationally designed photoconvertible fluorescent protein" NIPS-JST international workshop、2008.4(Okazaki conference center, Okazaki)
- (10) Takeharu Nagai "Development of a fluorescent protein with deep blue color." FOM2008, 2008.4(Awaji Yume Butai, Osaka)
- (11) 永井健治「蛍光タンパク質を巧妙に用いた分子機能・動態の可視化」薬学会関東支部会、2008.11(長井記念館、東京)
- (12) 永井健治「改変蛍光タンパク質によるタンパク質機能・動態のリアルタイム可視化」岩手医科大学先端医療研究センター公開シンポジウム「バイオイメージングと分子生物学に

よる脳・血管解明—健康増進に向けた最先
端研究」、2008.7(岩手県医師会館ホール、
盛岡)

- (13) 永井健治「Direct measurement of
protein dynamics in single living cells
using a rationally designed
photoconvertible fluorescent protein?」
第60回日本細胞生物学会大会、2008.6(パ
シフィコ横浜、横浜)

H. 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

なし