

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 教授

**研究要旨:** 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、シナプス分子の輸送が抑制されるなどして、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。

#### A. 研究目的

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。

#### B. 研究方法

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 $\beta$ 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

のをを用いる。

#### (倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組み換え実験を含むため、東京農工大学の安全管理基準にのっとり実験を行う。

#### C. 研究結果

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

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。

#### D. 考察

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 $\beta$ 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。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

##### 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 細胞のパターンニング、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)

#### 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

神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

**分担研究者** 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部 部長  
**研究協力者** 永井 義隆、株田智弘(国立精神・神経センター)、乾 隆(大阪府立大学)、  
後藤 祐児(大阪大学)、内木 宏延(福井大学)、高橋 保夫(オリンパス)、  
金城 政孝(北海道大学)、戸田 達史(大阪大学)

**研究要旨:**近年、ポリグルタミン(PolyQ)病を含む多くの神経変性疾患において異常蛋白質ミスフォールディング・凝集が共通に神経変性を引き起こすと考えられている。本研究ではまず PolyQ 蛋白質の構造生物学的解析を行った結果、異常伸長 PolyQ 蛋白質はモノマーレベルで  $\beta$  シート構造への異常コンフォメーション変移を生じ、アミロイド線維状凝集体を形成すること、また  $\beta$  シートモノマーが細胞毒性を発揮することを見出した。蛍光相関分光法(FCS)解析により、細胞内での異常伸長 PolyQ 蛋白質オリゴマー形成を検出することにも成功し、さらに異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 は、異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性  $\beta$  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ことが明らかになった。その結果、毒性  $\beta$  シート変移・オリゴマー形成が治療標的として重要であると考えられた。また、昨年度に継続してパーキンソン病やアルツハイマー病の発症に関与し、それら疾患の重要な薬物治療ターゲットである UCH-L1 の研究を実施し、病因である I93M 変異による gain of toxicity の機序として他蛋白質との凝集性亢進を明らかにした。

**A. 研究目的**

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。

**B & C & D. 研究方法、研究結果および考察**

**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  $\alpha$  ヘリックス構造から  $\beta$  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  $\beta$  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 $\beta$ 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  $\beta$  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。

## (倫理面への配慮)

本研究ではヒトを直接対象とした研究および動物実験は行っておらず、特記すべきことはない。

## E. 結論

①異常伸長 PolyQ 蛋白質は、モノマーレベルで  $\beta$  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、 $\beta$  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。

④QBP1 は異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性  $\beta$  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。

## G. 研究発表

### 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<sup>1</sup>、和田圭司<sup>2</sup>、服部信孝<sup>1</sup>、水野美邦<sup>1</sup>、望月秀樹<sup>1</sup>(<sup>1</sup>順天堂大学、<sup>2</sup>国立精神・神経センター神経研究所):  $\alpha$ -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<sup>1</sup>、節家理恵子<sup>1</sup>、三井丈史<sup>1,2</sup>、衣川亜衣子<sup>1</sup>、櫻井省花子<sup>1</sup>、青木俊介<sup>1</sup>、内田健康<sup>2</sup>、和田圭司<sup>1</sup>(<sup>1</sup>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回日本神経化学学会大会, 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関

分担研究者 内野茂夫 国立精神・神経センター神経研究所代謝研究部 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、組織内の特定のシナプスの可視化ならびに微細構造解析技術を開発する。本年度、昨年に引き続き子宮内電気穿孔法を用いて特定のニューロンにEGFPを発現させ、電子顕微鏡を用いてEGFP陽性ニューロンのシナプスを観察した。

**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

ビベットを用いて約 4 $\mu$ l のプラスミド DNA (5 $\mu$ g/ $\mu$ 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 $\mu$ 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。

## (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

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。

## 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。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。

## 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。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 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、12. 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.

## 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

光照射による生体機能操作法の開発

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。

**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。

**Dual 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

**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。

#### 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法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。

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。

#### 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(>10W/cm<sup>2</sup>)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。

#### 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。

#### Dual 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Ca<sup>2+</sup>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。

### C. 研究結果

#### KillerRed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。

#### 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。

#### Dual 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Ca<sup>2+</sup>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

#### E. KillerRed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。

#### 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。

#### Dual 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。

#### F. 結論

##### 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。

##### 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。

##### 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

なし

#### G. 研究発表

##### 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 oligomers 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  
4<sup>th</sup> LSW symposium, 2009.1 (Hokkaido  
University, Sapporo)
- (2) Takeharu Nagai " Engineering  
fluorescent proteins to visualize and  
manipulate biological functions" The 11<sup>th</sup>  
Japan and America Frontier of Science,  
2008.12 (Beckman center, Irvine, USA)
- (3) Takeharu Nagai " Engineering  
fluorescent proteins to visualize  
biological functions" The 8<sup>th</sup> 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" NEWroscience2008,  
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jing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. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 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
Kusumi A, Umemura Y, Morone N, 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.	Rainer Klages, Günter Radons, Igor M. Sokolov	Anomalous Transport: Foundations and Applications	WILEY- VCH Verlag GmbH & KCaA	Weinhei m	2008	545-574
永井健治	蛍光プローブ開発 秘話-Pericam-		蛋白質・核酸 ・酵素	共立出版	東京	2009	86-92
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	羊土者	東京	2008	156-162
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	共立出版	東京	2008	1858- 1864
永井健治	光スイッチング蛍 光タンパク質を用 いた超解像観察 法		分光研究	日本分光 学会	東京	2009	7-9

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
Kobayashi T, <u>Morone N</u> , Kashiyama T, Oyamada H, Kurebayashi N, Murayama T.	Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research.	<b>PLoS ONE</b>	3 (12)	e3822 19048102.	2008
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	44	1-6	2009
<u>Morone N</u> , 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.	<b>Methods Cell Biol.</b>	88	207-36	2008
Kumanogoh H, Asami J, <u>Nakamura S</u> , Inoue T	Balanced expression of various TrkB receptor isoforms from the Ntrk2 gene locus in the mouse nervous system	<b>Mol Cell Neurosci</b>	39	465-77	2008
Kabuta, T. Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., <u>Wada, K.</u>	Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1.	<b>Hum. Mol. Genet.</b>	17	1482-1496	2008
Kabuta, T. Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., <u>Wada, K.</u>	Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and	<b>J. Biol. Chem.</b>	283	23731-23738	2008

	the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy.				
Kabuta T. <u>Wada, K.</u>	Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy.	<b>Autophagy</b>	4	827-829	2008
Yasuda, T., Nihira, T., Ren, Y.R., Cao, X.Q., Wada, K., Setsuie, R., Kabuta, T., <u>Wada,</u> <u>K.</u> , Hattori, N., Mizuno, Y., Mochizuki, H.	Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression mouse model of Parkinson's disease.	<b>J Neurochem.</b>	108	932-944	2009
Goto, A., Wang, Y.L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., <u>Wada, K.</u>	Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy ( <i>gad</i> ) mouse.	<b>Neurochem. Int.</b>	In press		2009
Setsuie, R., Sakurai, M., Sakaguchi, Y., <u>Wada, K.</u>	Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3.	<b>Neurochem. Int.</b>	In press		2009
Yamamoto T, Kumagai A, Saito K & <u>Nagai T.</u>	Two-photon excitation behavior of thiophene-based oligomers and a polymer.	<b>J Nanosci Nanotechnol.</b>	9	670-672	2009
Saito K, Kobayashi K, Tani T & <u>Nagai T.</u>	A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time	<b>Cell Struct Funct.</b>	33	133-141	2008

	imaging system for cellular structure and function.				
Kotera I & <u>Nagai T.</u>	A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme.	<i>J. Biotechnol.</i>	137	1-7	2008
Matsuda T, Miyawaki A & <u>Nagai T.</u>	Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein.	<i>Nature Methods</i>	5	339-345	2008
Sunabori T, Tokunaga A, <u>Nagai T.</u> 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.	<i>J Cell Sci.</i>	121	1204-1212	2008