

2008/2014A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 尾藤 晴彦

平成21(2009)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、Ca²⁺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20年度には、平成19年度中に開発を進めたCa²⁺センサーの検定と、動物個体におけるカルシウム計測のための基礎技術の確立を進めた。特にCa²⁺上昇感受性転写エレメントを人工的に作成し、ルシフェラーゼ発光イメージングによりマウス個体でCa²⁺イメージングする手法の原理を確立した。また、生体深部の酵素活性を可視化するためにMRIシグナル強度を制御した新規酵素活性検出MRI造影プローブ開発を一層推進した。今後、これらをさらに有効に活用し、疾病時に起こると考えられるCa²⁺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 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。

平成19年度には、新規の Ca^{2+} センサー分子、 Ca^{2+} 感受性 FRET プローブ、 Ca^{2+} 感受性 MRI 造影剤、 Ca^{2+} 感受性遺伝子リポーターの原理を確立し、具体的な候補分子・センサーを作出した。この成果に基づき平成20年度には、各 Ca^{2+} センサーの検定を済ませ、動物個体におけるカルシウム計測のための基礎イメージング技術を確立する。

最終年度には、これら成果を生きた疾患動物モデルにおける Ca^{2+} 恒常性破綻のナノイメージングに応用する。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：

平成19年度に作出した Ca^{2+} 感受性領域をトロポニンから借りた赤色シフト FRET Ca^{2+} センサーをレンチウィルスベクターに導入し、生きた神経細胞にての定量を開始する。さらに、cameleon型 Ca^{2+} センサーの Ca^{2+} 親和性を低くして細胞内毒性を減らした FRET プローブの赤色化を実施する。

また、分担研究者の奥野と共同で単離同定したCa²⁺感受性転写調節エレメントを利用した、新たなレポーターを作出する。

B-2. オルガネラ局在Ca²⁺シグナルの意義解明：

細胞内オルガネラのCa²⁺プローピングの前提として、各オルガネラの性質について、基礎的検討を実施し、病態と各オルガネラ機能の相関について明らかにする。

B-3. 認知活動依存性プローブの作成と個体計測：

認知活動依存性エレメントSAREの配列基づくCa²⁺応答性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を生きた成体で発現する実験系を構築する。

確立したプローブを、妊娠マウスへの子宮内電気穿孔法、胎仔・成体マウスへのレンチウイルスベクターでの導入、遺伝子改変技術等により、個体へ導入し、in vivoイメージングに結実するパイロット実験を実施する。

B-4. 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造影の手法をβ-galacto-

sidase等について確立する。

また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ールに基づいて実験を行った。

C. 研究結果

C-1. 平成19年度の成果を発展させ、カルモデュリンおよびトロポニン₁のCa²⁺感受性領域を用いたCa²⁺FRETセンサーを、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。これをそれぞれレンチウイルスベクターへ導入し、in vivo動物個体でのイメージング条件を検討する条件を整えた。

C-2. マラリア等寄生病原体による感染症におけるCa²⁺病態理解のため、ミトコンドリアを含む細胞内オルガネラの分子の実態とその生化学的性質の探索を実施した。各オルガネラは宿

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化学療法の重要な標的となる事が明らかになり、疾病時の各オルガネラ内 Ca^{2+} 動態計測の重要性が浮き彫りとなった。

C-3. また分担研究者の奥野と共同で同定した、シナプス活動応答性転写エレメント SARE を含んだ人工プロモーターを作成し、実際に興奮性細胞にて Ca^{2+} 感受性が鋭敏であることを実証した (Kawashima et al. PNAS 2009)。

SARE リポーターを有するレンチウイルスベクターならびに、各種レポーター遺伝子を下流に発現する遺伝子改変マウス個体を多数作出した。特に、ルシフェラーゼ発現マウスについては、予備的検討において、生きた脳からの発光シグナルの同定に成功している。

これらの実験の過程で、蛍光・ルシフェラーゼ発光・透過光の3つのモダリティーを同時に検出可能な光学検出系を作成した。これを元に、現在国内光学メーカーとの連携を視野に検討中である。

C-4. 酵素反応を受けることにより MRI コントラストが増大する機能性プローブの設計・合成を行い、リポーター遺伝子の発現を MRI により検出

するための新規原理を確立した。酵素反応の検出は、 Gd^{3+} 錯体により ^{19}F -MRI のシグナル強度を制御するという原理に基づいている。この原理をリポーター遺伝子である β -gal や β -lactamase の検出に応用し、その酵素活性を ^{19}F -MRI により可視化することに成功した。(Mizukami et al. J. Am. Chem. Soc. 2008, 2009)。

D. 考察

本研究課題では、各種細胞におけるカルシウム情報伝達経路に立脚した新たな原理に基づく新規 Ca^{2+} センサーの創出にすでに成功している。最終年度では、これらプローブを駆使し、蛍光・化学発光・MRI の各種イメージングモダリティーにおいて、 37°C での生きた動物個体に適した実用性の高い新規計測技術とノウハウの開発蓄積を一層推進する。この成果により、 Ca^{2+} 動態を修飾する多くの薬剤のスクリーニングを、疾患動物モデルにて直接実施することが今後可能となることが強く期待される。特に、iPS 等培養細胞によるスクリーニングのみでは見過ごされる副作用を未然に検出し、個体におけるドラッグデリバリーの改良の評価判定などがきわめて容易になることが見込まれる。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つつあり、共同で個体動物で Ca^{2+} 動態を簡便に可視化・定量できる光学技術開発を進めていく。

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複数作出し、個体動物で計測するためのデリバリーの手法を開発した。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となり、オルガネラにおける Ca^{2+} 動態の重要性が示唆された。

E-3.

新たなにシナプス活動応答性転写調節エレメントSAREを発見し、神経活動依存的な遺伝子発現可視化法を確立した。さらにこの手法を個体動物に応用する遺伝子改変マウスや、遺伝子導入ウィルスベクターを樹立し

た。今後、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期待される。

E-4. 動物個体内のリポーター遺伝子発現の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。これを応用し、 β -gal や β -lactamaseなどのMRI測定が原理的に可能となった。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawashima T, **Okuno H.**, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF and **Bito H.** (2009) A synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 316-321.

2. Matsuzaki M., Kuroiwa H., Kuroiwa T., **Kita K.**, Nozaki H. (2008) A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster

- parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Biol. Evolution* 25, 1167-1179
3. Hirai M., Arai M., Mori T., Kawai S., **Kita K.**, Kuroiwa T. and Matsuoka H. (2008) Malaria parasites reproduce with the same manner as flowering plants. *Curr. Biol.* 18, 607-613
4. Niikura M., Kamiya S., **Kita K.** and Kobayashi F. (2008) Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. *J. Immunol.* 180, 6877-6884
5. Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Shimizu, H., Shiba T., Kurisu, G., Nara, T., Aoki, T., **Kita, K.** and Harada, S. (2008) Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry* 47, 10881-10891
6. Shimizu, H., Nihei, C., Inaoka, D. K., Mogi, T., **Kita, K.** and Harada, S. (2008) Screening of detergents for solubilization, purification and crystallization of membrane proteins: a case study on succinate:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica* F64, 858-862
7. Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S. and **Kita, K.** (2009) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 157-161
8. Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and **Kita K.** (2009) Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *J. Biochem.* 145, 229-237
9. Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ōmura, S., Miyoshi, H. and **Kita, K.** (2009) Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases. *Biochim Biophys. Acta* (Bioenergetics) 1787, 129-133
10. Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T., Okumura, M., Inagaki, T., **Kita, K.**, Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T., Hammer, R.

E., Kodama, T., Yanagisawa, M. and Sakai, J. (2009) Fasting induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking Acetyl-CoA Synthetase 2. *Cell Metabolism* 9, 191-202

11. Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and **Kita, K.** (2009) Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263

12. Mizukami, S., Tonai, K., Kaneko, M., **Kikuchi, K.** (2008) Lanthanide-Based Protease Activity Sensors for Time-Resolved Fluorescence Measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 14376-14377.

13. Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., **Kikuchi K.** (2009) Detection of Protease Activity using Dual-Function Fluorescence and ¹⁹F MRI Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, *in press.*

14. Mizukami, S., Watanabe, S., Hori Y., and **Kikuchi, K.** (2009) Covalent Protein Labeling Based on Non-catalytic

β-lactamase and a Designed FRET Substrate. *J. Am. Chem. Soc.*, *in press.*

書籍

1. **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** (2008) シナプス機能とP S D構築を制御する分子機構. *蛋白質核酸酵素* 53, 418-423.

2. **尾藤晴彦**、有賀純 (2008) 神経細胞内ではたらくシグナル伝達. In 「分子・細胞・シナプスからみる脳」(シリーズ脳科学第5巻、東京大学出版会刊、甘利俊一監修、古市貞一編)pp. 131-180.

3. **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), pp.207-217

2. 学会発表

国際学会

1. **Bito H.** Regulation of excitation-morphogenesis coupling by CaMKK/CaMKI cascades. The 3rd International Conference on Neurons and

Brain Diseases. 2008.8.5-8.7., Seoul, Korea.招待講演

2. **Okuno, H.**, Kawashima, T., Adachi-Morishima, A., Okamura, M., Worley, P., **Bito, H.** Critical genomic sequences for synaptic activity-dependent expression of the Arc gene. *Soc. Neurosci. Abstr.* 38.12, 第38回北米神経科学学会年会、2008.11.15-11.19, Washington DC, USA. Poster.

3. Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Adachi-Morishima, A., Nonaka, M., **Okuno, H.**, **Bito H.** Distinct regulation of cortical axonal and dendritic development by two Ca²⁺-CaMKI pathways. *Soc. Neurosci. Abstr.* 38.12, 第38回北米神経科学学会年会、2008.11.15-11.19, Washington DC, USA, 口頭発表

4. **Okuno H.**, Kawashima T, Nonaka M., Takemoto-Kimura S, Fujii H., Chowdhury S., Worley P.F., **Bito H.** Regulation of synaptic localization of Arc protein through interaction with Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II beta. 6th FENS Forum 2008, 2008.7.12-7.16, Geneva, Switzerland, Poster.

5. Kido, K. Sakamoto, S. Fujioka, M. Harada, D. Ohmori, F. Yamakura, H.

Saimoto, Y. Yabu, T. Suzuki, S. Harada, **K. Kita.** Purification and crystallization of drug target trypanosome alternative oxidase (TAO) from *Trypanosoma brucei* Y. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea

6. Morales, J., Sakamoto, K., **Kita, K.** Novel subunit organization of the respiratory Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in *Trypanosoma cruzi* XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea

7. Harada, M., Fujimoto, Y., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Yabu, Y., Suzuki, T., Yoshinari, S., **Kita, K.** Toward anti-cryptosporidial chemotherapy by ascofuranone, specific and potent inhibitor against alternative oxidase (AOX) XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea

8. **Kikuchi, K.** Chemical Sensor Molecules Which Convert Cellular Biological Responses to Chemical Output. (NIPS-JST International Workshop –From Photon to Mind–Advanced Nonlinear Imaging & Fluorescence-based

Biosensors, 4.18-19, 2008, 岡崎) 招待講演

9. **Kikuchi, K.** Chemical Sensor Molecules Which Convert Cellular Biological Responses to Chemical Output. (内藤コンフェレンス (ケミカルバイオロジー), 9.9-12, 2008, 札幌) 招待講演

10. **Kikuchi, K.** Design, Synthesis and Application of Bio-imaging Probes Which Convert Biological Signals to Chemical Output. (ASBIC IV, 濟州島, 韓国, 11.10-13, 2008) 招待講演

11. **Kikuchi, K.** Design, Synthesis and Application of Chemical Sensor Molecules Which Convert Biological Signals to Chemical Output. (Osaka University Forum, San Francisco, U.S.A., 12.8-10, 2008) 招待講演

12. **Kikuchi, K.** Development of Visualization Probes with Tunable Switches for Biological Applications. (G-COE国際シンポジウム, 1.13-14, 2009, 名古屋) 招待講演

13. **Kikuchi, K.** Designed MRI Probes with Enzyme Dependent Relaxation Time Modulatory Switches. (膜インタフェイ

ス, 国際学会, 1.22-23, 2008, 豊中) 招待講演

14. **Kikuchi, K.** Design, Synthesis of Visualization Probes with Tunable Switches for Bio-imaging. (Gordon Research Conference, Metals in Biology, Ventura, U.S.A., 1.25-30, 2009) 招待講演

国内学会

1. 吉田敬一郎、三上太郎、尾野道男、尾藤晴彦、澤田元. Src ファミリーキナーゼ阻害剤 SU6656 による細胞多核化の解析. 第 141 回日本解剖学会総会 2009.3.28-3.30, 岡山、ポスター

2. **Okuno H.**, Kawashima, T., Adachi-Morishima, A., Okamura, M., **Bito, H.** Synaptic activity-dependent regulation of neuronal immediate-early gene Arc/Arg3.1. 第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会 (BMB2008), 2008.12.9-12.12, 神戸、口頭発表およびポスター

3. Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Adachi-Morishima, A., Nonaka, M., **Okuno, H.**, **Bito H.** Differential regulation of cortical dendritic and axonal development via distinct activation of

CaMKK-CaMKI pathways. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 (BMB2008), 2008.12.9-12.12, 神戸、口頭発表およびポスター

4. 奥野 浩行、川島 尚之、安達—森島 亜希、岡村 理子、尾藤 晴彦、可塑性関連遺伝子 Arc の活動依存的発現調節を担うゲノムエレメントの同定.. 第51回日本神経化学会大会, 2008.9.11-9.13, 富山、口頭発表

5. 上田 (石原) 奈津実、竹本—木村 さやか、安達—森島 亜希、野中 美応、奥野 浩行、尾藤 晴彦、異なる CaMKK-CaMKI 経路による軸索/樹状突起の特異的形成制御, 第51回日本神経化学会大会, 2008.9.11-9.13, 富山、口頭発表

6. Kawashima, T., Okuno, H., Okamura, M., Bito, H. A novel synaptic activity-responsive element of the Arc promoter, 第31回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008)、2008.7.9-7.11, 東京、口頭発表

7. Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Adachi-Morishima, A., Nonaka, M., Okuno, H., Bito H. Differential roles of CaMKIgamma; and CaMKIalpha; in cortical dendritic and axonal development.

第31回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008)、2008.7.9-7.11, 東京、口頭発表. Neurosci. Res. 61: S42, 2008

8. 北 潔 寄生虫の生活環におけるダイナミックなエネルギー代謝の変動 第81回日本生化学会大会第・31回日本分子生物学会年会 合同大会 平成20年12月

9. Madhavi Paranagama, Kimitoshi Sakamoto, Kiyoshi Kita *Ascaris suum* quinol fumarate reductase can produce high amount of reactive oxygen species. 第81回日本生化学会大会第・31回日本分子生物学会年会 合同大会平成20年12月

10. 菊地和也。生体機能を可視化する分子プローブのデザイン・合成・生物応用。(日本化学会第89春季年会、「生体模倣触媒」, 3.29, 2009, 船橋) 招待講演。

11. 菊地和也。可視化プローブのデザイン・合成による分子イメージング。(日日本化学会第89春季年会, ノーベル賞記念シンポジウム, 3.28, 2009, 船橋) 招待講演。

12. 菊地和也。緩和時間変化型MRIプローブのデザイン・合成・生物応用。(日本バイオイメーキング学会第1

7回年会, 11.1, 2008, 千葉) 招待講演。

13. 菊地和也。化学プローブのデザイン・合成による生命現象の可視化解析。(高分子談話会, 10.17, 2008, 大阪) 招待講演。

14. 菊地和也。生体内の酵素活性を可視化する分子プローブのデザイン・合成・生物応用。(蛋白研研究会, 9.25, 2008, 吹田) 招待講演。

15. 菊地和也。生体内の酵素活性を可視化する分子プローブのデザイン・合成・生物応用。(第57回高分子討論会, 9.24-26, 2008, 大阪) 招待講演。

16. 菊地和也。錯体化学を応用した緩和時間変化型機能性MRIプローブ。(分子研研究会, 7.18-19, 2008, 岡崎) 招待講演。

17. 菊地和也。化学プローブのデザイン・合成による生体内機能分子の可視化解析。(新素材化学研究会第7回セミナー, 6.6, 2008, 横浜) 招待講演。

18. 菊地和也。*in vivo*イメージングを目指した可視化プローブ開発。(理化学研究所第2回「ケミカルバイオロジー領域」勉強会, 5.23, 2008,) 招

待講演。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

1. 特許取得・申請

1. 発明の名称: タンパク質を蛍光標識する方法, 発明者: 菊地和也, 水上進, 渡辺修司, 出願番号: 特願2008-273182, 出願年月: 2008年10月

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しており、平成20年度には、赤色シフトカルシウムセンサーの改良を行い、ウィルスベクター等による個体発現技術を完成させた。また、奥野と共同で、認知活動感受性Ca²⁺センサーを発現した遺伝子改変マウスを作出し、認知活動（新規環境暴露・視覚刺激等）による、Ca²⁺シグナル応答を定量する技術を確立した。

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. 研究方法

B-1. Ca²⁺プローブ作成：

平成19年度に作出したCa²⁺感受性領域をトロポニンから借りた赤色シフトFRET Ca²⁺センサーをレンチウィルスベクターに導入し、生きた神経細胞にての定量を開始する。さらに、cameleon型Ca²⁺センサーのCa²⁺親和性を低くして細胞内毒性を減らしたFRETプローブの赤色化を実施する。また、分担研究者の奥野と共同で単離同定したCa²⁺感受性転写調節エレメントを利用した、新たなレポーターを作出する。

B-2. 個体計測：

本研究で確立したプローブを、妊娠マウスへの子宮内電気穿孔法、胎仔・成体マウスへのレンチウィルスベクターでの導入、遺伝子改変技術等により、個体へ導入し、*in vivo*イメージングに結実するパイロット実験を実施する。

(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ル

に基づいて実験を行った。

C. 研究結果

C-1. 平成19年度の成果を進展させ、カルモデュリンおよびトロポニンのCa²⁺感受性領域を用いたCa²⁺FRETセンサーを、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。これをそれぞれレンチウィルスベクターへ導入し、*in vivo*動物個体でのイメージング条件を検討する条件を整えた。

また分担研究者の奥野と共同で同定した、シナプス活動応答性転写エレメントSAREを含んだ人工プロモーターを作成し、実際に興奮性細胞にてCa²⁺感受性が鋭敏であることを実証した(Kawashima et al. PNAS 2009)。

C-2:

SAREリポーターを有するレンチウィルスベクターならびに、各種レポーター遺伝子を下流に発現する遺伝子改変マウス個体を多数作出した。特に、ルシフェラーゼ発現マウスについては、予備的検討において、生きた脳からの発光シグナルの同定に成功している。

これらの実験の過程で、蛍光・ルシフェラーゼ発光・透過光の3つのモダリティを同時に検出可能な光学検

出系を作成した。これを元に、現在国内光学メーカーとの連携を視野に検討中である。

D. 考察

本研究では、Ca²⁺シグナリング研究の第一人者であり、医師でもある尾藤を中心に、細胞内エネルギー代謝の病態生化学・薬学を専門とする北、ケミカルセンサー有機合成のエキスパートの菊地、ゲノム情報に基づく分子プローブ作成の専門家である奥野が協働し、医・薬・化・分子生物の各領域の融合的学際的アプローチにより、動物個体に適用可能なカルシウムナノイメージング法の開発を試みている。その結果、当初の2年間の研究により、具体的に、

1) 蛍光共鳴エネルギー遷移 (FRET) 原理を利用した細胞内 Ca²⁺動態の異常を検出するナノセンサーの開発とこれを個体レベルで可視化する技術に関する研究、

2) Ca²⁺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、

の2つで、大きな進展が認められている。また、細胞内 Ca²⁺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菊地と進めているが、実現可能性の検証を越え、個体動物を用いて実証実験へ進むハードルがすでに

ほぼクリアされている。新規ナノセンサーの個体イメージング技術の確立を最終年度に重点的に目指していく。

E. 結論

平成19～20年度にかけて、長波長シフトの新規蛍光Ca²⁺センサー分子を2種類作出し、このセンサー遺伝子のデリバリー技術を併せて開発した。さらに、新たなCa²⁺感受性遺伝子リポーターの原理を確立し、動物個体におけるカルシウム計測のための基礎イメージング法を樹立した。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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF and Bito H. (2009) A synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in

activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 316-321.

- (2) 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 (2008) 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.

書籍等:

- (1) 尾藤晴彦、有賀純 (2008) 神経細胞内ではたらくシグナル伝達. In 「分子・細胞・シナプスからみる脳」(シリーズ脳科学第5巻、東京大学出版会刊、甘利俊一監修、古市貞一編)pp. 131-180.
- (2) 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), pp.207-217

2. 学会発表

招待講演

1. Bito H. Regulation of excitation-morphogenesis coupling by CaMKK/CaMKI cascades. The 3rd International Conference on Neurons and

Brain Diseases. 2008.8.5-8.7., Seoul, Korea.

2. Bito, H., Fujii, H., Takemoto-Kimura, S., Okuno, H. Imaging of biochemical signaling at single synapse resolution. 第 31 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008)、2008.7.9-7.11, 東京. *Neurosci. Res.* 61: S2, 2008

3. 上田 (石原) 奈津実、竹本-木村さやか、野中美応、安達-森島亜希、奥野浩行、尾藤晴彦. New functions for CaM kinases in neurite growth. 第 60 回日本細胞生物学会ミニシンポジウム 2008.6.29 横浜.

国際学会

1. Okuno, H., Kawashima, T., Adachi-Morishima, A., Okamura, M., Worley, P., Bito, H. Critical genomic sequences for synaptic activity-dependent expression of the Arc gene. *Soc. Neurosci. Abstr.* 38.12, 第38回北米神経科学学会年会、2008.11.15-11.19, Washington DC, USA. Poster.

2. Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Adachi-Morishima, A., Nonaka, M., Okuno, H., Bito H. Distinct regulation of cortical axonal and dendritic development by two Ca²⁺-CaMKI pathways. *Soc.*

Neurosci. Abstr. 38.12, 第 38 回北米神経科学学会年会、2008.11.15-11.19, Washington DC, USA, 口頭発表

3.Okuno H., Kawashima T, Nonaka M., Takemoto-Kimura S, Fujii H., Chowdhury S., Worley P.F., Bito H. Regulation of synaptic localization of Arc protein through interaction with Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II beta. 6th FENS Forum 2008, 2008.7.12-7.16, Geneva, Switzerland, Poster.

国内学会

1.吉田敬一郎、三上太郎、尾野道男、尾藤晴彦、澤田元. Src ファミリーキナーゼ阻害剤 SU6656 による細胞多核化の解析. 第 141 回日本解剖学会総会 2009.3.28-3.30、岡山、ポスター

2.Okuno H., Kawashima, T., Adachi-Morishima, A., Okamura, M., Bito, H. Synaptic activity-dependent regulation of neuronal immediate-early gene Arc/Arg3.1. 第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会 (BMB2008), 2008.12.9-12.12, 神戸、口頭発表およびポスター

3.Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Adachi-Morishima, A., Nonaka, M., Okuno, H., Bito H. Differential

regulation of cortical dendritic and axonal development via distinct activation of CaMKK-CaMKI pathways. 第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会 (BMB2008), 2008.12.9-12.12, 神戸、口頭発表およびポスター

4.奥野 浩行、川島 尚之、安達—森島 亜希、岡村 理子、尾藤 晴彦. 可塑性関連遺伝子 Arc の活動依存的発現調節を担うゲノムエレメントの同定.. 第 5 1 回日本神経化学会大会, 2008.9.11-9.13, 富山、口頭発表

5.上田 (石原) 奈津実、竹本—木村 さやか、安達—森島 亜希、野中 美応、奥野 浩行、尾藤 晴彦. 異なる CaMKK-CaMKI 経路による軸索/樹状突起の特異的形成制御, 第 5 1 回日本神経化学会大会, 2008.9.11-9.13, 富山、口頭発表

6.Kawashima, T., Okuno, H., Okamura, M., Bito, H. A novel synaptic activity-responsive element of the Arc promoter, 第 3 1 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2008), 2008.7.9-7.11, 東京、口頭発表

7.Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Adachi-Morishima, A., Nonaka, M., Okuno, H., Bito H. Differential roles of

CaMKIgamma; and CaMKIalpha; in
cortical dendritic and axonal development.

第31回日本神経科学大会

(Neuroscience 2008)、2008.7.9-7.11, 東
京、口頭発表. Neurosci. Res. 61: S42,
2008

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

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

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

研究要旨

マラリア原虫やトリパノソーマ、またクリプトスポリジウムなど寄生原虫のミトコンドリアやアピコプラスト、最近その存在が明らかになって来たマイトソームなどの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化学療法の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原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サ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