

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 諸根 信弘

平成22(2010)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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 諸根 信弘

平成22（2010）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. タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発
に関する研究

中村 俊 25

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 28

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 32

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 37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 46

IV. 研究成果の刊行物・別刷 49

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・分担研究報告書

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 京都大学物質-細胞統合システム拠点 講師

研究要旨：プロトフィブリル化した病因タンパク質の構造や細胞内局在を高分解能かつ定量的に計測する為に、新しい画像解析アルゴリズムである

「Mathematical Morphology（数理形態学）」と呼ばれる画像処理理論を導入した。これにより、神経変性疾患の病態評価や医薬品評価において、これまでにないハイスループット化が将来的に期待できる。実際、画像の類似度に基づくクラスタリング法や、タンパク質の結晶構造情報を用いる解析法から構成される「テンプレートマッチング法」について、細胞内環境のタンパク質1分子レベルで高い精度で適用できることを世界に先駆けて示すことに成功した。併せて、この画像処理技術と連携できる、神経変性疾患等に関わる病因タンパク質の動態解析及び可視化顕微鏡の技術開発を遂行した。

分担研究者

中村 俊
東京農工大学大学院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

病因タンパク質の機能発現に伴う構造変化や、不可逆的な変性状態を呈した凝集過程が直接的に可視化された顕微鏡画像から、有効な構造情報を解析して、最終的な創薬研究の基盤情報へ成熟させるためには、画像情報の精確かつ定量的な評価が必要である。そのためには、プロトフィブリル化などの病態の素過程に関与する病因タンパク質のモノマー・オリゴマーが表現するマイクロ構造や相互作用情報から、より複合化の進行した凝集体の細胞内局在の経時的変化などのマクロな統計量までを対象とした、シームレスな解析手法の開発が必要である。

A. 研究目的

(1)
新しい画像処理プログラムによる神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発(2)

本研究では、筋・神経変性疾患に関わる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、まず、その最も基礎となる新たな画像解析手法の開発を行った。この目的を達成するため、次の2つを開発課題として挙げた。

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

(2)

タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

神経変性疾患の原因遺伝子のひとつであるタウを対象に、タウタンパク質のオリゴマー化の過程を細胞レベルで可視化する方法の開発を行った。アルツハイマー病など神経変性の原因としては、タウタンパク質などのオリゴマー化が重要であるとの認識が広がっている。従って、オリゴマー化を定量する方法の開発が、変性疾患の診断のために必要となっている。試験管内で純化したタンパク質を用いて、そのオリゴマー化の過程を解析する方法の開発は進みつつあるが、細胞内でのタウのオリゴマー化を定量する技術の開発は遅れており、変性疾患の早期発見、治療法の開発のために重要である。

(3)

神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、

ポリグルタミン (PolyQ) 病などの多くの神経変性疾患において異常蛋白質の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。したがって、PolyQ蛋白質の凝集阻害活性を持つ化合物の大規模なスクリーニングが行われているが、異常伸長 PolyQ 鎖に対する結合特異性を持たない非特異的ヒットが問題になっている。そこで本研究では、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて、異常伸長 PolyQ 蛋白質に対する結合特異性・結合親和性を評価し、特異的な PolyQ 凝集阻害化合物のスクリーニング系を樹立することを目的とした。さらに、パーキンソン病やアルツハイマー病に関連するユビキチンプロテアソーム系の構成因子の1つである UCH-L1 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子の1つであるとともに、アルツハイマー病の重要な治療ターゲットでもあることから、コンピュータを利用して化合物と UCH-L1 分子とのドッキングシミュレーションを行うことで UCH-L1 活性中心近傍の仮想ナノ空間においてその酵素活性に影響を及ぼしうる化合物をスクリーニングした。

(4)

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

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RNA干渉法を用いてShank3の発現を抑制させることで、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に関する研究

単量体化 KillerRed の波長変異体開発

光照射により活性酸素を産生する蛍光タン

パク質 KillerRed は二量体を形成することから応用できる対象が限られていた。昨年度までに我々は単量体化 KillerRed (mKillerRed) の開発に成功したものの、産生される一重項酸素量は小分子蛍光化合物に比べて以前少ない。また、波長変異体に関してはこれまで報告はなされていないことから、今年度は単量体 KillerRed (mKillerRed) の波長変異体ならびに一重項酸素増産型変異体を作製することを目的とした。

高性能 FRET プローブの作製法の確立

Aequorea (オワンクラゲ) 由来蛍光タンパク質の二量体化と FRET プローブの性能との関係を明らかにし、FRET 効率やダイナミックレンジを向上させる一般的な開発指針を確立する。

化学発光を原理とする機能プローブの開発

光毒性、光損傷を引き起こす可能性がある励起光照射を必要とせず、かつ十分な発光シグナルを有しリアルタイム観察を可能とする化学発光性機能プローブの開発を行う。

B. 研究の方法

(1)
新しい画像処理プログラムによる神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発(2)

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

これまでの研究で、ノイズやコントラストの不足などによって、ヒトによる視認が困難な画像に対しても、対象の形状などの劣化を防ぎつつ、ノイズなどの要素を解消し、対象領域を明瞭化して提示する画像処理手法を開発した。そしてそれと共に、電子顕微鏡画像の中から特定の情報(タンパク分子の存在領域、形状、あるいは特徴的な構造パターンなど)を特異的に抽出し、定量的な計測・理解につながる画像解析手法を開発した。具体的には、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の開発である。

この画像処理手法は、Mathematical morphology とよばれる数理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。生体イメージングの分野においてモルフォ

ロジはまだ公知ではないが、光学顕微鏡像、電子顕微鏡像、DNA マイクロアレイ画像、さらにマンモグラフィなどの医用画像に対して適用した例がある。いずれも、対象物のセグメンテーションや特徴的な構造の抽出に用いられ、従来法に勝る効果的な処理方法が実現されている。本研究では、この理論をさらに拡張し、目的を達成するために十分な画像処理理論に改良した。

これらの画像処理理論に基づく解析を、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切断した後に、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、分子全体の大きさと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。クラスタ化されたタンパク質像を平均化し、細胞膜に存在するタンパク質の構造(リガンド結合のポアや回転対照性をもつサブドメイン構造など)の詳細を明らかにした。

さらに、細胞膜ドメインの構造の定量的解析として、脂質2分子膜疎水面のフラクチャー像中の膜内粒子の凝集分布構造を調べた。粒子を質点として表現し、点過程解析により、ドメインの大きさを測定した。まず、2体相関関数を用いて、最近隣距離以内に存在する点のクラスタを求めた。次にL関数の値を計測することにより、クラスタの大きさ

を見積もった。

また、上述の画像解析手法を用い、蛍光顕微鏡像中の蛍光輝点の自動検出手法を開発した。本手法を、抗カベオリン-1 抗体による線維芽細胞カベオラ免疫蛍光染色像に適用し、蛍光スポットの自動抽出、スポットの大きさおよび平均輝度値の計測を行った。現在、画像解析理論の詳細および解析結果を論文としてまとめ、BMC Bioinformatics 誌に投稿した。

②複合体を構成する特定のタンパク質分子の同定

本研究プロジェクトで対象とした、プリオン病に代表される、タンパク質のコンフォメーション異常による神経変性疾患は、個々の分子（モノマー）ではなく、複合体の集合様式そのものが病因となっている。また、様々な種類の筋ジストロフィーや、情報伝達系に関する疾患は、関連する蛋白質間の正常な結合様式が保持されないために、機能の低下および、不全が生じている。これらの病因を分子レベルから解明するためには、関係するタンパク質複合体の構造を詳細に解析する必要があった。

そこで、構成タンパク質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線結晶構造解析および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目指した。

また、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、線維状タンパク質であるセプチン（名古屋大学・木下専先生）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。ヒト由来セプチン2タンパク質の結晶構造(2QA5.pdb)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た。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、新たに開発した。

また、電子顕微鏡で捉えられた、Poly-Q鎖の凝集構造の解析も行った。この構造は、複数のPoly-Q鎖が並列に配列する棒状構造をとっていることがわかった。テクスチャ解

析および自己相互相関関数による解析によって微細な構造特徴を定量化した。

(2)

タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

タウタンパク質のオリゴマー化、繊維化の過程を定量するために、ホモフレットに基づく蛍光異方性の解析によってオリゴマー化を定量する方法を選択した。この方法は、タウタンパク質と蛍光タンパク質である GFP を融合したタンパク質(タウ-GFP)が互いに、数ナノメートル以内に隣接することにより、蛍光エネルギーの転移(ホモフレット)が生じ、蛍光異方性が低下することを原理としている。本研究では、タウ-GFP を PC12 細胞に強制発現し、細胞の蛍光異方性を計測した。細胞にタウ-GFP が発現していることは、ウエスタンブロット法で解析した。

(3)

神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

①PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長 PolyQ 鎖結合特異性の SPR 解析

SPR 解析装置 Biacore 1000 を用いて PolyQ 凝集阻害分子と様々な PolyQ 鎖長の Thioredoxin-PolyQ 融合蛋白質 (Thio-Q0、-Q19、-Q62) との分子間相互作用を検討した。その結果、PolyQ 鎖特異的結合ペプチド QBP1 (SNWKWPGIFD) は Thio-Q0/Q19 には有意な結合を認めなかったが、Thio-Q62 に特異的な結合活性 ($K_d = 5.7 \mu\text{M}$) を示すことが明らか

かになった。一方、Congo red は Thio-Q0、-Q19、-Q62 いずれにも非特異的に結合することが明らかになった。以上の結果から、SPR は PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長鎖結合特異性の評価に有用であると考えられた。

②PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長 PolyQ 鎖結合親和性と凝集阻害活性との関連：

次に様々な QBP1 変異体を作製し、Thio-Q62 への結合親和性および凝集阻害活性を検討した。その結果、(QBP1)₂、QBP1-M8 (---WKWPGIF-)、QBP1-N9 (---WKWPGIFD) の順に強い結合親和性を示し ($K_d = 0.6$ 、 4.6 、 $24.0 \mu\text{M}$)、凝集阻害活性も強いことが明らかになった。以上の結果から、Thio-Q62 への結合親和性と凝集阻害活性が有意に相関することが明らかとなった。

③UCH-L1 の構造生物学的機能解析

UCH-L1 タンパク質の結晶構造解析から得られた構成原子の 3 次元座標データを用い、分子力学計算のツールであるディスカバー 3 ならびに CVFF force field を用いて各アミノ酸側鎖に水素原子を付加してエネルギーの最小化を行った。次にタンパク質分子表面に存在するポケット構造を検索するツールであるスフェアジェネレーターによって一定の分子量の化合物が入り込むことが出来るポケット構造を探し出した。それらのポケット構造の中から活性中心部分を含むポケット近傍の仮想ナノ空間に対して ChemBridge 社の化合物バーチャライブラリーを構成する約 30 万個の化合物に対してドッキングシミュレーションツールである

Dock ならびに Gold により結合可能性スコアを計算することでスクリーニングを行った。結合可能性スコア上位計 18 化合物に関して、実際に ChemBridge 社から化合物を入手して、UCH-L1 タンパク質の酵素活性に対する影響をユビキチン-AMC を基質として酵素化学的に解析を行なうことで、UCH-L1 作用薬剤を同定した。その結果、1 種の活性増強薬と 6 種の阻害薬の同定に成功した。

(4)

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

①子宮内電気穿孔法によるマウス胎仔脳への遺伝子導入

ソムノペンチルによる麻酔下、妊娠 15.5 日齢のマウスから子宮を取り出し、ガラスマイクロピペットを用いて約 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シンドビウイルスベクターの作製およびニューロンへの遺伝子導入

標的遺伝子を挿入したベクター pSinEGdsp とヘルパーベクター pDH26S から、各々 *in vitro* にて RNA を合成した。これらの組み換え RNA をエレクトロポレーション法を用いて BHK 細胞に導入し、24~48 時間後の培養

上清をウイルス液とした。初代培養神経細胞への感染は、ウイルス液 (1/1000 量) を培地に添加し 1 時間培養した。その後、培地を全量コンディショナル培地に交換した。脳内へのウイルス感染は、先端にウイルス液を付着させた 29G の注射針を直接脳に刺すことにより行った。

③免疫組織染色法およびウエスタンブロッティング法

免疫組織染色は抗 EGFP 抗体を用いて浮遊法にて行った。ウエスタンブロッティング法は抗 Shank3 抗体を用いて常法に従って行った。

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

mKillerRed に対する部位特異的変異導入

mKillerRed の発色団およびそれを取り巻くアミノ酸残基に変異を導入することで、波長変異体の作製を行った。また、他のグループにより報告された KillerRed の X 線結晶構造情報に基づき、発色団近傍で産生された活性酸素がタンパク質の外に放出されやすくなることが期待されるアミノ酸残基を予想し、それに変異を導入した。得られた変異体を大腸菌に発現させて精製し、試験管内で活性酸素産生活性を評価した後、哺乳類の培養細胞のミトコンドリアに発現させて光照射に伴うアポトーシス誘導の活性を評価した。

高性能 FRET プローブの作製法の確立

代表的な FRET プローブである YC3.60 や

TN-XL に二量体形成を抑制・促進する変異を部位特異的変異導入法により導入し、二量体形成と指示薬の性能との関係を *in vitro* でシステマティックに解析した。また、二量体界面に変異を導入したプローブを生細胞に遺伝子導入し、実際の測定条件下でのプローブの性能を評価した。さらに、こうして得られた知見から帰納的に FRET プローブの設計指針を確立した。

化学発光性 Ca^{2+} 指示薬の開発

FRET を用いた Ca^{2+} プローブである YC3.60 内の CFP を化学発光タンパク質 *Renilla Luciferase* (RLuc) へ置換することで BRET をベースとする化学発光性 Ca^{2+} プローブへと変化させ、そのダイナミックレンジを最大化するために BRET アクセプターである Venus の様々な円順列変異体を導入後、それらの性能を試験管内および細胞内で評価した。

(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。また、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。

C. 研究結果

(1)

新しい画像処理プログラムによる神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発(2)

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: 膜内粒子の解析

フリーズフラクチャーによる細胞膜面の像から、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 δ を計測して、 $3.0 \leq \delta < 5.3$ 、 $5.3 \leq \delta < 7.6$ 、 $7.6 \leq \delta < 12$ (nm) の 3 つのクラスに分類した。次に、中程度の大きさのクラス ($5.3 \leq \delta < 7.6$ nm) 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、電子顕微鏡像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。

また、細胞膜ドメインの構造の定量的解析では、脂質 2 分子膜疎水面のフラクチャー像中の膜内粒子の凝集分布構造(クラスタ)

の大きさを見積もった。L 関数の値を計測すると、クラスタの直径は約 6.75nm と計測された。この膜タンパク質が凝集したクラスタが膜ドメインに対応すると考えられる。

さらに、蛍光顕微鏡像中の蛍光スポットの自動検出を開発し、線維芽細胞カベオラ免疫蛍光染色像を対象に解析を行った。スポットの大きさおよび平均輝度値の計測を行った。本手法によって、細胞(膜)内での特定のタンパク質の局在や発現量を定量化することが可能となった。また、本手法は、互いに近接し一部がオーバーラップしたスポットや背景輝度値が高い領域でのスポットの抽出も可能であった。さらにノイズを付加した SN 比が悪い画像(10 dB 程度)に対するスポット抽出実験でも有効性を示すことができた。これによって、本手法の汎用性、頑健性を確認した。

②複合体を構成する特定のタンパク質分子の同定:セプチン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

ヒト由来セプチン 2 タンパク質の結晶構造(2QA5. pdb)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變化させて、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。これらをテンプレートとして、セプチン線維の実像とのマッチングにより、セプチンの異常凝集・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た。特にアクチンフィラメントと共存す

るセプチンタンパク質の位置と結合様式を決定することができた。

また、poly-Q 鎖の凝集体構造の解析では、棒状構造の微細な特徴パターンの解析を行った。まず、1 本の poly-Q 鎖フィラメント構造の幅は約 5nm であることがわかった。これは、ひとつの凝集体の表面構造のテクスチャパターンの自己相関関数から求められた。すなわち、表面構造の中で同様なテクスチャパターンをもつ領域(自己相関係数の高い領域)を抽出し、それらを平均化することにより、ノイズを除去した周期構造を求めた。さらに、電子線トモグラフィーによる 3 次元再構成像からフィラメントの構造は、単一の球状構造が直列に配置され構成されているということがわかった。この構造に着目すると、筒状の構造は筒の長さ方向に沿って球状構造が約 9nm の間隔で隣り合うらせん構造をとっていることがわかった。現段階では、Poly-Q 鎖どのような重合過程をとり、上述のような構造を構成するのかは不明である。しかし、今後、重合時間をコントロールし、複数の重合段階において、凝集体の電子顕微鏡学的解析を行うことにより、この問題が解決すると考えられる。

(2)

タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

①タウタンパク質の繊維化の過程

PC12 細胞にタウ-GFP を発現させ、80% 以上の細胞が GFP を安定に発現している細

胞株を得た。これを2ヶ月間継代培養したものと、3ヶ月以上培養したものをそれぞれ、中期、後期培養株とし、また、一過的に発現したものを初期培養株とした。それぞれの細胞株について、タウタンパク質をウエスタンブロット法で解析した結果、中期から不溶性となり、疾患関連変異をもつ R406W, P301L では、後期により不溶性となっていた。また、タウの C 末端側 396 番目セリン残基のリン酸化を認識する抗体 (pSer396) では、中期に断片化したリン酸化タウ分子が検出された。これは、繊維化したタウ凝集体には、リン酸化され断片化したタウ分子が含まれていることを示している。

②蛍光異方性の変化

中期の細胞では、異方性は、0.2 から 0.33 となり、ほぼ拘束のない GFP 分子 (0.29) と同程度であった。これに対し、初期および後期では、異方性が低下して (0.16)、ホモフレットが起りやすくなっている状態であると考えられる。

(4)

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

複数のアルゴリズムを用いて作製した 12 種類の SHANK3 shRNA のうち、HEK293 細胞を用いた強制発現系において Shank3 の発現抑制効果が確認された 2 種類の shRNA について、子宮内電気穿孔法を用いて E15.5 のマウス胎仔の脳内に導入後、生後の脳発達過程における Shank3 の発現をウエスタンブロット

法を用いて検討した。その結果、胎仔期での shRNA 導入では、生後の Shank3 の発現を十分抑制できていないことが判明した。そこで、新生児の脳内に shRNA を導入するため、シンドビスウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を検討した。まず、EGFP を発現する組み換えシンドビスウイルスを作製した。このウイルスを用いた場合、初代培養神経細胞においては、1時間のウイルス感染で数時間後から EGFP の発現が確認できた。

そこで、生後1日および7日の新生児の脳内に本ウイルスを接種し、免疫染色法を用いて経時的に EGFP の発現を検討した。その結果、接種1日後のニューロンにおいて EGFP の発現が観察された。EGFP の発現は少なくとも接種2週間後においても確認されたことから、本法は有効であると考えられた。

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

単量体化 KillerRed の波長変異体開発 : mKillerRed の発色団を構成するアミノ酸残基に変異を導入したところ橙色蛍光 (Ex=455nm, Em=544nm) を発する mKiller-0 が得られた。さらに発色団と相互作用するアミノ酸に変異を導入することで、吸収・蛍光極大はさらに短波長側へ移行し、緑色蛍光 (Ex=439nm, Em=496nm) を発する mKiller-G を得ることができた。mKiller-0, mKiller-G はともに一重項酸素放出量が 2-3 倍程度に増加し、FITC に匹敵する光増感活性を有す

ることが明らかになった。mKillerRed または mKiller-G を哺乳類細胞のミトコンドリアに発現させ光照射してからアポトーシスが誘導されるまでの時間を比較したところ、mKillerRed は 120 分以上かかったのに対し、mKiller-G は 10 分以内にアポトーシス様の形態変化が観察された。

高性能 FRET プローブの作製法の確立

蛍光タンパク質の二量体化を抑制・促進する何れの界面変異も、FRET プローブのダイナミックレンジを低下させた。こうした傾向は、今回解析した全ての FRET プローブにおいて見られ、また生細胞内においても *in vitro* の実験結果と同様の結果が得られたことから、FRET プローブの一般的な設計・作成指針となることが明らかとなった。

化学発光を原理とする機能プローブの開発

作成した化学発光性 Ca^{2+} プローブ変異体の中から最も大きなダイナミックレンジ (60%) を持つものを見出し BRAC と名付けた。BRAC の Ca^{2+} 解離定数 (Kd 値) は $1.9 \mu\text{M}$ であり、生理的 pH に対しては安定な応答を示すことが明らかとなった。また、を HeLa 細胞に発現させ、 $10 \mu\text{M}$ のヒスタミン刺激を加えることで、数十秒周期での Ca^{2+} 振動を確認する事に成功した。

D. 考察

(1)

新しい画像処理プログラムによる神経変性

疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発(2)

昨年度より着手した「新しい画像処理アルゴリズム」をより一層発展させ、数学的に充分検討されたアルゴリズムを基盤として、実際に病因タンパク質を細胞内局所で効率的に検出することに成功した。当該年度に開発したタンパク質検出アルゴリズムは、2 次元像に対するものであるが、細胞内環境下で実行された 1 分子レベルのアプローチとしては、世界に先駆けたものである。引き続き今後、解析次元を 3 次元まで拡張することを目指してゆきたい。この際、問題となるのが予想される画像処理演算速度についても、併せて課題として検討してゆきたい。

(2)

タウパッチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

ウエスタンブロットの解析結果は、培養中期の細胞でリン酸化タウの断片が、不溶性分画に存在したことから、リン酸化されて微小管から遊離したタウ分子がオリゴマー化を開始し、それが核となって繊維化の過程が進行し始めたことを示唆している。蛍光異方性の計測でも、培養中期の細胞において、異方性が自由な GFP 分子の値に近いことから、ホモフレットが生じ難い状態に変化していることを示している。

(4)

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

ニューロンにおいて、Shank3は強くユビキチン化されプロテオソーム系の分解を受けやすいため、ターンオーバーが早いことが推定されている。従って、*SHANK3* shRNAの導入が胎生15.5日齢のマウス胎仔では、生後10日以降のシナプス形成期においては十分量のshRNAが存在せず、Shank3の発現を抑制できないと考えられた。一方、ニューロンに親和性の高いシンドビスウイルスを用いたEGFP発現実験から、生後発達過程の脳内へのウイルス接種でニューロンにおいてEGFPの発現が確認できた。ウイルスの脳内接種は生後の様々な時期で可能であることから、今後本ウイルスベクター発現系を用いることで、発達過程の脳における特定のニューロンの可視化ならびにShank3の発現抑制に基づいた構造活性相関の解析が期待できる。

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

単量体化 KillerRed の波長変異体開発

これまでに報告例がない光照射依存的に活性酸素を産生する蛍光タンパク質の緑およびオレンジ蛍光変異体の開発に成功したことで、一つの細胞内における複数種のタンパク質の機能を光照射により不活性化させることが可能になった。これにより動的なタンパク質間ネットワークの機能連関が解析可能になると期待される。

高性能 FRET プローブの作製法の確立

FRET プローブのアクセプターに円順列変異体を用いると FRET 効率が上昇することが従来から知られていたが、この理由として双極子モーメントを回転させることによる方向因子の最適化による影響が考えられていた。しかし、こうした円順列変異体はドナーとアクセプターの位置関係をアンチパラレルにすることと、上記の界面変異の解析結果とから、蛍光タンパク質ドメインの効率的な二量体化が FRET プローブのダイナミックレンジを決定する大きな要因であることが示された。さらに、オワンクラゲ由来以外の蛍光タンパク質において高い FRET 効率を達成出来ていない原因として、これらの蛍光タンパク質の二量体形成が抑制されていることが推測された。

化学発光を原理とする機能プローブの開発

BRACはこれまで開発されてきたFRETを原理とするCa²⁺指示薬(YC3.1等)と同程度のKd値をもち、生理的に安定した応答を示すことから、細胞内や組織内のCa²⁺濃度測定に応用可能であることが示唆された。また、これまで発光性のCa²⁺指示薬はAequorinや分割Rluc、Gluc等があったが、それらは繰り返しのCa²⁺濃度上昇に追従できなかったため、Ca²⁺振動のような長時間に渡る周期的変動を測定するのは困難であった。BRACでは発光性でありながら、数十秒周期のCa²⁺振動を観察することができ、これまでに無い画期的な化学発光

性Ca²⁺プローブとして有用である。特に、自家蛍光が強い植物におけるCa²⁺観察に威力を発揮するものと期待される。

E. 結論

(1)

新しい画像処理プログラムによる神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発(2)

当該年度では、筋・神経変性疾患に関わる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完成させた。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かつ汎用的な画像処理が望まれた。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。

2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法の開発では、まず、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。さらに、培養細胞の蛍光顕微鏡像を対象として蛍光スポットの自動抽出・解析手法を確立し、細胞(膜)内での蛋白質の局在や発現量などを定量的に解析する手法を開発した。

②複合体を構成する特定のタンパク質分子の同定では、セプチン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。また、電子顕微鏡で捉えられた、Poly-Q鎖の凝集構造の解析も行った。

当該年度の研究において、解析の基礎となるアルゴリズムやその実装ツールを確立し、上記の課題を達成することができた。

(2)

タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

タウタンパク質の細胞内におけるオリゴマー化の過程を蛍光異方性の計測によって解析した。その結果、繊維形成に先立ってタウタンパク質が一過的に遊離状態となることが示唆された。これは、タウタンパク質がリン酸化などにより、微小管から遊離し、オリゴマー化を開始した状態を反映しているものと考えられ、本計測法の有効性が示唆された。

(3)

神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

本研究の結果から、表面プラズモン共鳴法を用いて様々なPolyQ凝集阻害分子の異常伸長PolyQ鎖への結合特異性と結合親和性を評価できることが明らかになり、PolyQ病の治療薬開発に向けた有用なスクリーニング法であると結論した。また、UCH-L1について1種の活性増強薬と6種の阻害薬の同定に成功した。

(4)

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

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、子宮内電気穿孔法やシンドビスウイルスベクターを用いて脳発達期の特定のニューロンに EGFP を発現させ、組織レベルでシナプスや神経回路形成の可視化技術を構築した。

(5)
光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

KillerRed の単量体化と生理機能は開放への応用：光照射依存的に活性酸素を産生する光増感型蛍光タンパク質の緑およびオレンジ蛍光変異体の開発に成功した。これらは **mKillerRed** に比べ活性酸素の放出量が 2-3 倍増加しており、細胞内でも強い光毒性を示した。

高性能 FRET プローブの作製法の確立

FRET プローブの高性能化には、ドナー・アクセプタ界面の最適化による適度な二量体化が重要であり、これは FRET プローブの設計・作成において一般的な指針であることが明らかになった。

化学発光を原理とする機能プローブの開発

化学発光性 Ca^{2+} プローブ BRAC を開発した。これにより、自家蛍光を誘発する励起光を照射することなく細胞内の Ca^{2+} 動態を長時間に渡り観察することができるようになった。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

(1)
新しい画像処理プログラムによる神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発(2)

①論文発表

- 1) Morone N, and Aoyama K. Structural Analysis of Cell Membranes by Small Convergence Angle HAADF-STEM Tomography. *Kenbikyō*, 44(4):257-261, 2009.
- 2) Nishikawa T, Iwakiri N, Kaneko Y, Taguchi A, Fukushima K, Mori H, Morone N, Kadokawa J. Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae. *Biomacromolecules*. 2009;10(8):2074-85.
- 3) 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.
- 4) 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.

5) 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. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the interface by freeze-etch electron tomography. Progress Report Symposium of Membrane Mechanism Project (2005-2010), January 29, 2010. ICORP, JST, Kyoto University.

2) Kimori Y and Morone N. Structural analysis for cell membrane domain by electron microscopic image processing. The 13th International Membrane Research Forum The 6th iCeMS International Symposium. January 28, 2010.

3) Morone N. Biological electron microscopy and rapid-freezing. 53rd Symposium of Japanese Society of Microscopy, October 31, 2009. Tokyo Institute of Technology. (invited)

4) Morone N. Freeze-etch Electron Tomography & Mathematical Morphological Analysis for the Plasma Membrane Interface. 21st Annual Meeting of the KSMCB, October 16, 2009. COEX, Seoul Korea. (invited)

5) 木森義隆、諸根信弘. 細胞膜につくられたコンパートメント構造: フリーズフラクチ

ャー解析と画像認識技術による可視化. 日本顕微鏡学会第65回学術講演会. 5. 27. 2009. 仙台.

6) 木森義隆、湯浅茂樹、諸根信弘. 数理形態学に基づいた新しい画像処理理論: 細胞内タンパク質の定量分布解析へ. 日本顕微鏡学会第65回学術講演会. 5. 27. 2009. 仙台.

(2)

タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

①論文発表

1) Chronic Stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. Kunimoto S, Nakamura S, Wada K, Inoue T. *Exp Neurol.* 2010 Jan;221(1):175-185. Epub 2009 Nov4.

2) Sexually dimorphic effect of the Val66Met Polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: new data and meta-analysis. Fukumoto N, Takashi F, Kamboh MI, Tsai S-J, Matsushita S, Nacmias B, Comings D, Arboleda H, Ingelsson M, Hyman B, Akatsu H, Nishimura A, Zata M, Mattila K, Goto Y, Asada T, Nakamura S, Kunigi H. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010 Jan5;153B(1):235-42.

②学会発表

1) PC12 細胞内での tau オリゴマー化過程の定量法開発. 石崎美由紀、山本英明、諸根信弘、小柴満美子、中村俊、1P-0642, p193. 第32回日本分子生物学会年会、12月9日、

2009年、横浜.

(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) Setsuie, R., Sakurai, M., SakagUCHi, Y., Wada, K. Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. **Neurochem. Int.**, 54, 314-321, 2009. 2008 Dec 25. [Epub ahead of print]
- 2) 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.**, 54, 330-338, 2009. 2008 Dec 25. [Epub ahead of print] May 2009
- 3) Kabuta, T., Kinugawa, A., TsUCHIya, Y., Kabuta, C., Setsuie, R., Tateno, M., Araki, T., Wada, K. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 aberrantly interacts with tubulin. **Biochem Biophys Res Commun.** 387, 121-126, 2009.
- 4) Higashi, S., Moore, D.J., Biskup, S., Yamamoto, R., Minegishi, M., Sato, K., Togo, T., Katsuse, O. UCHikada, H., Furukawa, Y., Hino, H., Kosaka, K., Emson, P.C., Wada, K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Arai, H., Iseki, E. Localization of LRRK2 to the endosomal-lysosomal compartment in Lewy body disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 68, 994-1005, 2009. 2009 Aug 12. [Epub

ahead of print]

- 5) Kunimoto S., Nakamura, S., Wada, K. Inoue, T. Chronic Stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. **Exp. Neurol.**, 221, 175-185, 2010. 2009 Nov 4. [Epub ahead of print]
- 6) Nagai, Y., Fujikake, N., Popiel, A., Wada, K. Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. **Curr. Pharm. Biotechnol.** 2010 Feb 16. [Epub ahead of print]

②学会発表

- 1) Nagai Y., Okamoto Y., Fujikake N., Popiel H.A., Inui T., Wada K. Surface plasmon resonance as a useful technique for screening for specific polyglutamine aggregation inhibitors. 5th Gordon Res Conf CAG Triplet Repeat Disorders, Waterville Valley, NH, USA, 5.31, 2009
- 2) 和田圭司: 脱ユビキチン化酵素と axonal dystrophy : *gad* マウス研究からの教訓. 第41回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、神戸、9.4, 2009
- 3) Nagai Y., Fujikake N., Popiel H.A., Okamoto Y., YamagUCHi M., Toda T., Wada K. 17-AAG, an HSF1-activator, suppresses polyglutamine- induced neurodegeneration via induction of molecular chaperones. 4th Int Cong Stress Responses in Biology and Medicine, Sapporo, 10.6, 2009
- 4) 永井義隆、藤掛伸宏、ポピエル明子、岡

本佑馬、山口政光、戸田達史、和田圭司：熱ショック転写因子 (HSF1) 活性剤は分子シャペロン群の発現を誘導し、ポリグルタミン病の神経変性を抑制する。第 52 回日本神経化学会、群馬、6.22, 2009

5) 永井義隆、ポピエル明子、藤掛伸宏、村松慎一、戸田達史、和田圭司：凝集阻害ペプチド QBP1 を用いたポリグルタミン病に対する分子標的治療法の開発。第 54 回日本人類遺伝学会、東京、9.23, 2009

(4)

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

①論文発表

- 1) Maekawa T, Namba T, Suzuki E, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S. (2009) NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production and production of mature granule neurons in the adult hippocampus. *Neurosci.Res.* 63, 259-266.
- 2) Namba T, Maekawa T, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S. (2009) The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in the adult hippocampus. *GLIA* 57, 1082-1090.
- 3) Namba T, Yabe T, Gonda Y, Ichikawa N, Sanagi T, Hirasawa E, Mochizuki H, Kohsaka S, Uchino S. (2010) PEDF up-regulation induced by memantine, an NMDA receptor antagonist, is involved in the increased proliferation hippocampal progenitor cells. *Neuroscience*, in press.

②学会発表

(国内学会)

- 1) 前川素子、難波隆志、内野茂夫、高坂新一、吉川武男：NMDA receptor and schizophrenia - from the prespective of neurogenesis. 第 3 2 回日本神経科学大会シンポジウム、名古屋、9.16.2009.
- 2) 難波隆志、前川素子、矢部武士、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一：メマンチンにより発現が亢進する PEDF は成体海馬神経新生の促進に関与する、第 3 2 回日本神経科学大会、名古屋、9.16.2009.
- 3) 権田祐子、田畑秀典、仲嶋一範、内野茂夫、高坂新一：軸索ガイダンス分子 Robo1 の大脳皮質形成過程における役割、第 3 2 回日本神経科学大会、名古屋、9.16.2009.
- 4) 和賀央子、岡本伸彦、後藤雄一、内野茂夫、高坂新一：重度言語障害を呈する自閉症患者における SHANK3 遺伝子解析、第 5 4 回日本人類遺伝学会、東京、9.26.2009.
- 5) 権田祐子、関口正幸、田畑秀典、和田圭司、仲嶋一範、内野茂夫、高坂新一：大脳皮質錐体細胞の発達段階における Roundabout1 (Robo1) の役割、第 3 2 回日本分子生物学会、横浜、12.9.2009.
- 6) 和賀央子、岡本伸彦、後藤雄一、内野茂夫、高坂新一：自閉症関連遺伝子 SHANK3 のマウス大脳皮質発達過程におけるメチル化動態解析、第 3 2 回日本分子生物学会、横浜、