

12. 11. 2009.

7) 灘波隆志、服部功太郎、功刀浩、貝瀬弘三、高坂新一、内野茂夫: NMDA 受容体阻害剤投与による成体海馬での統合失調症脆弱性因子 DISC1 の発現低下と新生ニューロンの移動異常、第4回神経発生討論会、岡崎、3. 19. 2010.

8) 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: 大脳皮質錐体細胞における軸索ガイダンス分子 Roundabout1 (Robo1) の役割、第4回神経発生討論会、岡崎、3. 19. 2010.

(国際学会)

1) Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Uchino S., Kohsaka S.: Alzheimer's disease drug "memantine" promotes neurogenesis and expansion of progenitor cell pool in adult mouse hippocampus. Crest Neuroscience International Symposium. Hippocampal Neurogenesis: its implication in neural functions and mental disease. Hyogo, Japan, 6. 2. 2009.

2) Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Uchino S., Kohsaka S.: Alzheimer's disease drug "memantine" promotes neurogenesis and progenitor cell self-renewing in adult mouse hippocampus. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry/Asian Pacific Society for Neurochemistry joint meeting. Busan, Korea, 8. 24. 2009.

3) Uchino S., Waga C., Okamoto N., Goto Y., Kohsaka S.: Novel Mutations in the SHANK3 gene in autistic patients with severe delayed speech development. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry/Asian Pacific Society for Neurochemistry joint meeting. Busan, Korea, 8. 27. 2009.

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

1. 論文発表

- (1) Saito K, Hatsugai N, Horikawa K, Kobayashi K, Matsu-ura T, Mikoshiba K, Nagai T. Auto-luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca²⁺ imaging at the single cell level. ***PLoS ONE***, in press
- (2) Lütcke H, Murayama M, Hahn T, Margolis DJ, Astori S, Borgloh SMzA, Göbel W, Yang Y, Tang W, Kügler S, Sprengel R, Nagai T. Miyawaki A, Larkum ME, Helmchen F, Hasan MT. Optical recording of neuronal activity with a genetically-encoded Ca²⁺ indicator in anesthetized and freely moving mice. ***Frontiers in Neural Circuit***, in press
- (3) Hong JH, Min CH, Jeong B, Kojiya T, Morioka E, Nagai T. Ikeda M. Lee K, ***PLoS ONE***, in press
- (4) Kotera I, Iwasaki T, Imamura H, Noji H, Nagai T. Reversible dimerization of *Aequorea victoria* fluorescent proteins

- increases the dynamic range of FRET-based indicators. *ACS Chem Biol.* 5:215-222, 2010
- (5) Imamura H, Nhat KPH, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl, Acad, Sci. USA* 106:15651-15656, 2009
- (6) Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita H, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A and Takayama S. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiology*, 150: 1322-1334, 2009
- (7) 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* 6: 351-353, 2009
- (8) 永井健治、小林健太郎
1 波長励起 Dual FRET による生細胞内における複数現象の可視化
実験医学、28: 589-598, 2010
- (9) 野地博行、永井健治 生命システムの階層間をまたぐイメージング技術 蛋白質核酸 酵素、54 : 1913-1917, 2009
- (10) 堀川一樹、永井健治 細胞結合振動システムを対象にした超高感度大規模イメージング 蛋白質 核酸 酵素、54 : 1945-1951, 2009
- (11) 永井健治、松田知己 生細胞内でのタンパク質動態測定とその意義 生物物理、49 : 181-186, 2009
- (12) 永井健治、松田知己 光スイッチング蛍光タンパク質を用いた生細胞内でのタンパク質動態定量法 日本組織細胞化学会編、組織細胞化学 2009, 99-105、2009
- (13) 小寺一平、永井健治 ワンステップ全自動プラスミド構築方法 細胞工学、28 : 402-407, 2009
- (14) 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、58 : 7-9, 2009

2. 学会発表

- (1) Nagai T. "Toward elucidation of biological enigma by genetically-encoded molecular spies" International Symposium on Watching Biomolecules in Action, 2009.12.16 (Senri Life Science Center, Osaka)
- (2) 永井健治 「蛍光タンパク質テクノロジーの展望 -観て触って探る生命の不思議-」平成 21 年度生理学研究所シナプス研究会「シナプス機能と病態」、2009.12.14 (生理学研究所、岡崎市)
- (3) 小寺一平, 岩崎卓也, 今村博臣, 野地博行, 永井健治 「A new way to make your FRET-based indicator more efficient:

- dimerization interface engineering of fluorescent protein」第32回日本分子生物学会年会、2009.12.9（パシフィコ横浜、横浜市）
- (4) 永井健治「蛍光タンパク質性機能プローブの精密設計とバイオイメージングへの応用」第7回脳科学研究教育センターシンポジウム、2009.12.9（北海道大学、札幌市）
- (5) S. J. Lee¹, S. V. Alworth, C. Huang, S. Oh, H. Watanabe, K. Saito, K. Horikawa, M. Nomura, T. Tani, T. Nagai “Automated Kinetic Characterization of Intracellular Single Molecule Trafficking” 49th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, 2009.12.5-9 (San Diego Convention Center, USA)
- (6) Takeharu Nagai “Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies” BIT’s 3rd Annual World Congress of Gene-2009, 2009.12.4 (Foshan Sansui Golden Sun Hotel, China)
- (7) 永井健治「FRET指示薬」第14回細胞生物学ワークショップ、2009.11.24（北海道大学、札幌市）
- (8) 永井健治「蛍光タンパク質テクノロジー」第14回細胞生物学ワークショップ、2009.11.22（北海道大学、札幌市）
- (9) 永井健治「Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies」2009年生物物理・生化学・分子生物学会北海道支部会合同年会、2009.11.13（北海道大学、札幌市）
- (10) Takeharu Nagai “Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies” Molecular Imaging for Systems Biology, 2009.11.6 (Okazaki Conference Center, Okazaki)
- (11) Tomoki Matsuda, Atsushi Miyawaki, Takeharu Nagai “Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a photoconvertible fluorescent protein Phamret” Fluorescent proteins and biological sensors II, 2009.11.1-4 (Jenelia farm/HHMI, Ashburn(USA))
- (12) 永井健治「蛍光タンパク質を巧妙に用いた生理機能動態の可視化」第47回日本生物物理学会年会、2009.10.30（アスティ徳島、徳島市）
- (13) 小寺一平、岩崎卓也、今村博臣、野地博行、永井健治「The effects on the dynamic range of FRET indicators by the mutations in the dimerization interface of fluorescent proteins」第47回日本生物物理学会年会、2009.10.30（アスティ徳島、徳島市）
- (14) 植松利亮、小寺一平、斎藤健太、初谷紀幸、堀川一樹、永井健治「Toward long time physiological imaging of plant cells with reduced autofluorescence by using a Ca²⁺ indicator composed of a red-shifted FRET pair」第47回日本生物物理学会年

- 会、2009.10.30-11.1 (アスティ徳島、徳島市)
- (15) 永井大輔、谷知己、永井健治
「Correlation among dipole orientation, FRET efficiency and dynamic range of FRET-based indicators」第47回日本生物物理学会年会、2009.10.30-11.1 (アスティ徳島、徳島市)
- (16) Takeharu Nagai "Toward elucidation of dynamic living system by hierarchical molecular imaging" 82th Annual meeting of JBS, 2009.10.21 (Kobe Convention Center, Kobe)
- (17) Takeharu Nagai "Vivid visualization of biological functions using fluorescent protein-based molecular spies" 91th G-COE seminar, 2009.10.20 (Kyusyu University, Fukuoka)
- (18) Takeharu Nagai "Toward understanding biological enigma by genetically-encoded molecular spies" Hokkaido University-Academia Sinica Joint Symposium, 2009.10.7 (Hokkaido University, Sapporo)
- (19) 永井健治 「GFPは何故光るか? -機能指示薬作成法と生理機能の可視化/フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したバイオセンサー作成法」第5回ライブセルイメージング講習会、2009.10.6 (産業技術総合研究所つくばセンター、つくば市)
- (20) 永井健治 「Visualization of Cellular Functions and Dynamics by the Smart Use of Fluorescent Proteins」30th iCeM Seminar、2009.9.28 (京都大学吉田キャンパス、京都市)
- (21) 永井健治 「新規蛍光タンパク質の開発とバイオイメージングへの応用」BioOpto Japan 2009、2009.9.17 (パシフィコ横浜、横浜市)
- (22) 永井健治 「Vivid visualization of biological functions using fluorescent protein-based molecular spies」非常勤講師、2009.9.16 (熊本大学、熊本市)
- (23) 永井健治 「Deciphering enigma of biological functions by genetically-encoded molecular spies」東大医科研大学院セミナー「分子と生命現象の可視化」、2009.9.14 (東京大学医科学研究所、東京都港区)
- (24) 永井健治 「Toward elucidation of biological enigma by genetically-encoded molecular spies and snipers」第2回 スイス-日本 生命化学シンポジウム、2009.9.12 (東京大学駒場キャンパス、東京都目黒区)
- (25) 永井健治 「Perspective of bioimaging and biomanipulation techniques」International Symposium of post-silicon materials and devices research alliance projecInternational Symposium "Innovative Nanoscience of

- Supermolecular Motor Proteins",
2009.9.8 (京都大学芝蘭会館、京都市)
- (26) 永井健治「Molecular Nano-Mechanics & Bio-Mechanics Research Group(G3) International Symposium of post-silicon materials and devices research alliance project、2009.9.6 (大阪大学銀杏会館、吹田市)
- (27) 永井健治「革新的蛍光タンパク質技術による生命現象の解明に向けて」非常勤講師、2009.9.3 (東京大学医学部、東京都港区)
- (28) Ippei Kotera, Takeharu Nagai "Utilization of type IIS restriction enzyme for single-molecule DNA sequencing and in vitro DNA recombination " The EMBO Meeting2009、2009.8.29-9.1 (Amsterdam RAI、Amsterdam)
- (29) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「蛍光・化学発光タンパク質の基礎と応用」第18回浜松医科大学メディカルホトニクス・コース、2009.8.25 (浜松医科大学、浜松市)
- (30) Takeharu Nagai "Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies " Inviting Talk, 2009.8.19 (NIH, Bethesda(USA))
- (31) Takeharu Nagai "Rational design of photoswitchable fluorescent probes and its use for bioimaging" 238th American Chemical Society Meeting, 2009.8.18 (Washington Convention Center, Washington DC(USA))
- (32) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」光イメージング若手の会「光塾」第1回、2009.8.15-16 (未来 ICT 研究センター、神戸市)
- (33) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」光イメージング若手の会「光塾」第1回、2009.8.15-16 (未来 ICT 研究センター、神戸市)
- (34) Kazuki Horikawa, Takeharu Nagai "Constructive role of noise in self-organized pattern formation in social amoeba "The Third q-bio Conference on Cellular Information Processing, 2009.8.8 (John's College ,Santa Fe(USA))
- (35) 永井健治「Deciphering Enigma of Biological Function by Genetically-encoded Molecular Spies」光イメージング国際シンポジウム、2009.8.1 (京王プラザホテル、札幌市)
- (36) 永井健治「蛍光タンパク質テクノロジーの最前線」第34回組織細胞化学会講習会、2009.7.29 (徳島大学長井記念ホール、徳島市)
- (37) 永井健治「レーザーが拓く新たな蛍光タンパク質技術」第2回「レーザーをライフサイエンスに橋渡しする」専門委員会、2009.7.24 (北海道大学、札幌市)

- (38) Kazuki Horikawa, Takeharu Nagai
 “Ca²⁺ dynamics in large-scale cellular networks visualized by ultra-sensitive Ca²⁺ probe, “cameleon Nano” 2009 Gordon Research Conferences calcium signaling, 2009.7.16 (Il Ciocco Hotel ,Lucca(Italy))
- (39) Takeharu Nagai “Tune-up of FRET-based functional indicators for high sensitive bioimaging” Application Trends of Live Cell Imaging, 2009.7.17 (Ewha Woman University, Soul(Korea))
- (40) Takeharu Nagai “Deciphering enigma of biological function by a genetically-encoded fluorescent indicator” Gordon Research Conferences (Fertilization & Activation Of Development) , 2009.7.13 (the Holderness School in Plymouth, NH(USA) ,Plymouth)
- (41) 永井健治 「階層間分子イメージングによる動的生命システム解明へのアプローチ」非常勤講師、2009.7.3 (長崎大学医学部良順会館ボードインホール、長崎市)
- (42) 永井健治 「タンパク質でできた分子スパイによる細胞内非平衡現象の可視化」ソフトマター物理第4回領域研究会、2009.7.2 (北海道大学、札幌市)
- (43) 松田知己、宮脇敦史、永井健治 「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」第8回北陸ポストゲノム研究フォーラム、2009.6.11 (金沢大学十全講堂、金沢市)
- (44) 永井健治 「生理機能・動態を計測するための蛍光タンパク質技術」第9回日本蛋白質科学会年会、2009.5.22 (熊本全日空ホテルニュースカイ、熊本市)
- (45) 松田知己、堀川一樹、永井健治 「生体組織内の1細胞レベルでの機能イメージングを可能にする光活性型生理機能プローブ」第9回日本蛋白質科学会年会、2009.5.22 (熊本全日空ホテルニュースカイ、熊本市)
- (46) 堀川一樹 永井健治 「生体内ライブイメージングを可能にするバイオプローブの開発」ナノテクノロジー研究センター、2009.5.21 (北海道大学、札幌市)
- (47) 齊藤健太、小林健太郎、谷知己、永井健治 「A mercury Arc Lamp-Based Multi-Color Confocal Real Time Imaging System for Cellular Structure and Function」第9回 NIBB-EMBL シンポジウム、2009.4.22 (岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)
- (48) 永井健治 「Measurement of Diffusion Coefficient of Biomolecules by Fluorescence Decay After Photostimulation of Photoswitchable Fluorescent Proteins in Living Cells」第9回 NIBB-EMBL シンポジウム、2009.4.21 (岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)
- (49) Takeharu Nagai “Multifunctional imaging by genetically-encoded

homo-FRET-based indicator” Focus On
Microscopy 2009、2009.4.7 (Jagiellonian
University Auditorium Maximum
Krakow、Poland)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

①特許取得

- (1) 特願 2010-22603、光増感性蛍光タンパク質
- (2) 特願 2009-149338、蛍光温度プローブおよびそれを用いた温度測定装置
- (3) 特願 2009-233826、光活性化生理機能センサータンパク質

②実用新案登録

なし

③その他

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ナノメディシン研究）
分担研究報告書

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

研究分担者 中村俊 国立大学法人東京農工大学

研究要旨：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。タウタンパク質のオリゴマー化の過程を解析するために蛍光異方性計測を行い、繊維化の中間段階として、蛍光異方性が一過的に変化することを見出した。この変化は、タウタンパク質が微小管から遊離する状態を反映するものと考えられ、本アプローチの有効性が示された。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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、ウエスタブロット法で解析した。

C. 研究結果

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)、ホモフレットが起こりやすくなっている状態であると考えられる。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

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。

G. 知的所有権の取得状況

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ナノメディシン研究）
分担研究報告書

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）

研究要旨：近年、ポリグルタミン（PolyQ）病など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。本研究では、PolyQ 凝集阻害化合物の異常伸長 PolyQ 蛋白質に対する結合特異性・親和性の評価系樹立を目的とし、表面プラズモン共鳴法（SPR）を用いた解析を行った。その結果、QBP1 は Thio-Q62 に特異的に結合（ $K_d = 5.7 \mu\text{M}$ ）し、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。さらに、様々な QBP1 変異体を用いた解析から、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。以上の結果から、SPR は PolyQ 病の治療薬開発に向けた PolyQ 凝集阻害化合物の結合特異性・親和性の評価に有用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、一昨年度の活性増強剤に続いて、今年度は阻害剤を *in silico* drug screening により同定した。

A. 研究目的

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。

B & C & D. 研究方法、研究結果および考察

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ル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。

(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

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。

G. 研究発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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ナノメディシン研究）
分担研究報告書

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

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、これまでに確立した子宮内電気穿孔法に加え、シンドビスウイルスを用いたニューロンの可視化技術を確立した。

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 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。

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い

行った。

(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

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。

D. 考察

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。

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、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。

G. 研究発表

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32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32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32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54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32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32回日本分子生物学会、横浜、12. 11. 2009.

7) 灘波隆志、服部功太郎、功刀浩、貝瀬弘三、高坂新一、内野茂夫：NMDA 受容体阻害剤投与による成体海馬での統合失調症脆弱性因子 DISC1 の発現低下と新生ニューロンの移動異常、第4回神経発生討論会、岡崎、3. 19. 2010.

8) 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：大脳皮質錐体細胞における軸索ガイダンス分子

Roundabout1 (Robo1) の役割、第4回神経発生討論会、岡崎、3. 19. 2010.

(国際学会)

- 1) Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Uchino S., Kohsaka S.: Alzheimer's disease drug "memantine" promotes neurogenesis and expansion of progenitor cell pool in adult mouse hippocampus. Crest Neuroscience International Symposium. Hippocampal Neurogenesis: its implication in neural functions and mental disease. Hyogo, Japan, 6. 2. 2009.
- 2) Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Uchino S., Kohsaka S.: Alzheimer's disease drug "memantine" promotes neurogenesis and progenitor cell self-renewing in adult mouse hippocampus. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry/Asian Pacific Society for Neurochemistry joint meeting. Busan, Korea, 8. 24. 2009.
- 3) Uchino S., Waga C., Okamoto N., Goto Y., Kohsaka S.: Novel Mutations in the SHANK3 gene in autistic patients with severe delayed speech development. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry/Asian Pacific Society for Neurochemistry joint meeting. Busan, Korea, 8. 27. 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

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）
分担研究報告書

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

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

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. 研究方法

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