

200912001B

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19～21年度 総合研究報告書

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19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 諸根 信弘

平成22（2010）年 3月

# 目次

## I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 46

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 52

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）  
総合研究報告書

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：神経変性疾患（プリオン病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、アルツハイマー病）の病態極初期にみられる「病因タンパク質のプロトフィブリル化の生成・解離の仕組み」を、超微細画像技術（ナノテクノロジー）を基盤とする複合的な可視化技術により解明することを目的とした。これにより、効率的な医薬品評価系の開発を目指してきた。平成20年度までに、病因タンパク質の新規動態解析に加えて、フィブリル化タンパク質の細胞内3次元構造解析法（Morone et al., J Cell Biol. 2006; Morone et al., Methods Cell Biol. 2008）、フォトニック結晶を組込んだ蛍光偏光解消顕微鏡法や光活性化・光変換タンパク質を用いた細胞内分子拡散定量法などの蛍光イメージング法（Matsuda et al., Nature Methods 2008; Tomosugi et al., Nature Methods 2009）を開発してきた。その発展系として、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

## 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

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变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。

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

③細胞骨格の形態変化(分岐度の複雑さ)の定量的解析

### (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。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、タウタンパク質が繊維化する中間段階として、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た。しかし、細胞のどの部位で、この変化が生じているかについては、不明で、装置面でのさらなる改良が必要である。

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。タウタンパク質は、微小管の重合を促進する他、アクチンとも相互作用することが知られており、細胞内輸送や細胞の応答性など様々な生理機能に関連している。また、病理学的には、アルツハイマー型痴呆の病理学的診断マーカーの一つである神経原繊維変化の主要な構成タンパク質で

あり、前頭型痴呆症の原因遺伝子でもある (M Goedert and M G Spillantini, *Science* 314 (2006) 777-781)。しかし、神経原繊維変化などは、細胞変性の最終局面であり、繊維化をとまわずに神経細胞死に至る場合もあることなどから、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 (R Resende et al., *Neuroscience* 18 (1998) 7061-7074, C Kelvin et al., *Biochemistry* 46 (2007) 12522-12529)。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。試験管内での純粋なタンパク質を対象とした計測法は開発されつつあるが (H Aoyagi et al., *JBC* 282 (2007) 20309-20318, C Kelvin et al., *Biochemistry* 46 (2007) 12522-12529, T J van Ham et al., *JMB* 395 (2010) 627-642)、細胞内での計測法の開発はほとんど行われていない。細胞内では、タウタンパク質は様々なタンパク質と相互作用を行って、リン酸化をはじめとする化学修飾を受け、またタンパク質分解酵素などによっても切断を受ける。その結果、多様な集合状態をとるものと考えられる。したがって、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、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、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、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、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 193M 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。さらに、UCH-L1 を標的にした in silico drug screening により 1 種の活性増強薬と 6 種の阻害薬を同定した。

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。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。また、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。しかしこれまでに UCH-L1 の活性を促進するような薬剤は見つかっていない。そこで、本研究では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

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、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た EGFP の発現系により、組織内の特定のシナプスの可視化を行った。さらに、EGFP の発現を指標に、電子顕微鏡を用いてシナプスにおける微細構造解析技術を開発した。

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

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mKillerRedならびにその波長変異体

mKiller-O、mKiller-Gの開発を行った。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として、紫外光のパルス照射により蛍光波長が変化する1波長励起2波長測光型の光変換蛍光タンパク質Phamretの開発に成功した。さらに、光変換蛍光タンパク質を融合したタンパク質の細胞内における拡散係数を簡便・短時間に計測することが可能なFDAP法を確立し、生体分子の動態変化を定量的に解析する道を切り開いた。一方、世界最短波長の蛍光を発する群青色蛍光タンパク質Siriusの開発にも成功し、多色観察のためのレパートリーを増やしただけでなく、Siriusを用いる事で2つの生理機能を同一細胞内で観察できるDual FRET法を確立した。さらに、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した。このような技術を化学発光タンパク質と蛍光タンパク質間のエネルギー移動へも応用し、世界で始めてレシオメトリックな観察が可能な化学発光性のCaa2+プローブBRACの開発に漕ぎ着けた。これら全ての基盤技術は細胞内に蓄積した変性タンパク質の光照射による破壊とそれに伴う細胞機能の変化を可視化解析する研究を実現し、変性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加速すると期待される。

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。そこで、KillerRed 界面のアミノ酸に変異を導入することで、単量体化を行うことを第一の目的とし、その後、発色団を形成するアミノ酸或いは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・発光波長の異なり、かつ活性酸素産生量が増加する変異体の開発を目指した。

#### 光変換タンパク質 Phamret の開発

細胞内でのタンパク質の拡散やオルガネラの動き、或いは細胞自身の組織の中での動きを観察することによって疾病発症の理解に有用な情報を得ることができる。これまでも光刺激により光変換をすることのできる蛍光タンパク質により特定の部位の分子をマーキングする方法が開発されているが、励起の際に 2 波長を必要とすることや多量体を形成するなど問題点があった。そこで、蛍光タンパク質 2 分子間の FRET を利用して 1 波長の励起で光変換前と変換後の両方の状態の蛍光色を同時に観察することができる蛍光タンパク質を開発し細胞内でのタンパク質動態解析を行うことができる技術の開発を目指した。

#### 細胞内生体分子の拡散係数測定法 FDAP の開発

従来、限られた領域の蛍光タンパク質のみを褪色 (bleaching) させた後に分子の流入による蛍光の回復を測定する fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) や微小領域の蛍光強度の揺らぎを検出する

fluorescence correlation spectroscopy (FCS) がタンパク質拡散定数の決定に主に用いられている。FRAP は速い拡散、FCS は遅い拡散の測定に不向きであるためそれらは相補的に用いられており、またそれぞれに特有の問題点も抱えている。そこで本研究では、FRAP 測定法をベースにして光刺激により蛍光色を変化させる光変換蛍光タンパク質を用いて広域の速度レンジの拡散を解析できる測定法 fluorescent decay after photoactivation (FDAP) の開発を目的とした。

#### 群青色蛍光タンパク質 Sirius の開発

*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、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目指した。

### 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ことを目的とした。

### 化学発光性 $Ca^{2+}$ 指示薬 BRAC 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目指した。

## 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

#### 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、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

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

これまで、線維状タンパク質であるセプチン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。

### ③細胞骨格の分岐度の定量的解析

細胞膜の裏打ち構造としての細胞骨格(主としてアクチンフィラメント)は細胞の形態

を維持し、細胞分裂、筋収縮など細胞の動的な機能を保障する重要な細胞小器官である。また、細胞の分化に伴って発現する細胞小器官との相互作用により、細胞骨格の網目構造が変化することが顕微鏡学的に観察されている。本課題では、このような細胞骨格の形態変化を“フィラメントの分岐の複雑さ”としてとらえ、それを定量的に解析した。

まず、細胞直下のフリーズレプリカ電子顕微鏡画像からフィラメントの領域のみをセグメンテーションした。この処理には、mathematical morphology に基づく新規のフィルタを設計した。次にそのフィラメントの分岐の複雑さをフラクタル次元解析し、定量化した。一般的に、解析対象の構造が複雑になるほど、フラクタル次元は小さくなくなることが知られている。

本手法を分化する細胞に適用して、分化の過程でのフィラメント構造の変化をフラクタル次元の変化として計測した。

### (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方法には様々なものがある。光散乱、蛍光物質の挿入による蛍光強度変化、電気泳動による分析、蛍光偏光法などがあげられる。我々は、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（ホモフレッツ）が生じ、蛍光異方性が低下することを原理としている。もし、タウ-GFP が隣接しなければ、異方性は生じない。この場合、FITC のような低分子の蛍光物質とはことなり、蛍光寿命が分子の回転拡散時間より短いため、ホモフレッツが生じない限り、異方性は生じないと考えられる（Principles of fluorescence spectroscopy, J R Lkowitz, 3<sup>rd</sup> ed, 2006）。異方性は以下の式で与えられる。

$$r = D / S \\ = (I_V - I_H) / (I_V + 2I_H)$$

ここで、 $I_H$ ,  $I_V$  はそれぞれ、入射偏光に対して平行および垂直な蛍光偏光成分である。この式で、もし、水平成分と垂直成分が同じであれば異方性は0となる。GFP 分子は、分子量が26 kDa 程度であり、水溶液中で、自由に動いていて相互作用がない場合は、異方性は0.29 程度になることが知られている。したがって、もし相互作用が存在して偏光面の回転が起これば、異方性は0.29 よりも小さくなるものと考えられる。

事実、パーキンソン病の原因遺伝子であるシヌクレインの場合、そのタンパク質の繊維化にともなって、蛍光異方性が低下することが知られている（TJ van Ham et al., JMB 395 (2010) 627-642）。

本研究では、ヒトのタウタンパク質と

GFP を融合したタンパク質を神経細胞のモデルであるラット副腎褐色細胞腫由来のPC12 細胞に強制発現し、細胞の蛍光異方性を計測した。融合タンパク質の遺伝子は、ヒト前頭型痴呆の原因となる変異が導入されたもの2種（P301L, R406W）と野生型の計3種である（都立精神研、長谷川勝人博士供与）。

細胞にタウ-GFP が発現していることは、低張溶液で細胞を破碎し、その抽出物を可溶性分画と不溶性分画に分け、それぞれをSDS-page で分離し、タウやGFP に対する抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。タウ-GFP を安定に発現した細胞株を単離するためには、選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を共発現させ、G418 を培地に添加することによって目的の細胞を濃縮した。また、必要に応じて、cell sorter を用いて、GFP 陽性細胞を濃縮した（ベックマン社）。

### (3)

#### 神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

##### ①異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常

Thio-redoxin-PolyQ 蛋白質 (Thio-PolyQ) について、円偏光二色性分散、ゲルろ過クロマトグラフィー、超遠心分析、電子/原子間力顕微鏡などの解析の結果、異常鎖長の Thio-Q62 モノマーは経時的に  $\alpha$  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。

### ⑤PolyQ 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

(SNWKWWPGIFD) 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。

### ⑥PolyQ 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)<sub>2</sub>、QBP1-M8 (---WKWWPGIF-)、QBP1-N9 (---WKWWPGIFD) 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。

### ⑦UCH-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。

### ⑧UCH-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。

### (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 $\mu$ 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。脳内へのウイルスの感染は、先端にウイルス液を付着させた 29G の注射針を脳に直接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トティング法

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抗 EGFP 抗体を用いて浮遊法にて行った。ウエスタンブロットティング法は抗 Shank3 抗体を用いて常法に従い行った。

#### ④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抗EGFP抗体を用いてEGFP陽性細胞を標識した。EGFPシグナルはBADにて発色した。

#### (5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究  
光増感タンパク質KillerRedの単量体化および波長変異体の開発

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。  
光変換タンパク質Phamretの開発

シアン蛍光タンパク質の1つであるmSECFP (monomeric super enhanced cyan fluorescent protein) をFRETドナーとしてPA-GFPとタンデムに連結することでPhamretを構築した。光刺激によって大きく蛍光色に変化するようにするため、

mSECFPから活性化型PA-GFPへのFRETが効率良く起こるように、mSECFPのC末端11アミノ酸PA-GFPのN末端3アミノ酸を削って連結した。Phamretを試験管内、細胞内で光刺激し、蛍光色の変化が起こるかどうかを評価した。また、核内タンパク質であるH2BとPP2C-gにPhamretを連結して細胞に発現させ、光刺激によって細胞内の一部の融合タンパク質をハイライトし、その動態の違いを比較した。

細胞内生体分子の拡散係数測定法FDAPの開発

共焦点レーザー顕微鏡Olympus FV-1000 (Olympus)、油浸60倍対物レンズNA1.35で測定を行った。488nmの励起光を用い、405nmの刺激光で光変換を行った。刺激光は0.25msecの間ポイントで与え、4200Hzの往復のラインスキヤニングで測定した。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Sirius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。



## Dual FRET による多機能イメージング法の開発

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  $\text{Ca}^{2+}$  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。

## 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 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬 BRAC の開発

FRET を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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り、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

#### 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  $\delta$  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变化させて、電子顕微鏡のシミュレーション像を作成できる手法を開発した。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。

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わからない。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。

### ③細胞骨格の分岐度の定量的解析

Mathematical morphology を用いた新規フィルタにより、不均一な輝度変化や複雑な構造物を含む背景の中から、細胞骨格のフィラメントのみを良好にセグメンテーションする手法を確立した。また、細胞骨格のフラクタル解析を行うことにより、分化に伴って発現する細胞小器官の増加に従い、細胞骨格の分岐の複雑度が有意に減少することがわかった。これは、アクチンフィラメントの束化や特定方向への配列などの影響を反映しているものと思われ、細胞の特定機能発現のための骨格構造の形態変化を捉えているものと考えられる。

本手法は、様々な細胞の膜直下の電子顕微鏡画像に適用可能である。特定の細胞小器官の形成を阻害したうえで、分岐構造を調べるなど、細胞骨格との相互作用をより詳細に考察していくうえで有用なツールと成り得ると考えられる。

## (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(図1)。低張液で破碎した細胞の抽出物は、可溶性分画と不溶性分画に分けて、電気泳動した。タウタンパク質は繊維化すると不溶性になる。オリゴマーの状態では、可溶性分画に回収される。GFP 抗体を用いたウエスタンブロットでは、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。タウの N 末端を認識する抗体 (Ntau) に対しても中期から後期にかけて不溶性タウが検出された。この抗体は、PC12 細胞に内在しているタウタンパク質も認識するため、ヒトタウタンパク質の発現によって、不溶性タウの形成が促進されている可能性が考えられる。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。一方、後期には、これが認められないことから、繊維化の進行とともに、断片化がさらにすすみ、検出されなくなったか、脱リン酸化された可能性が考えられる。

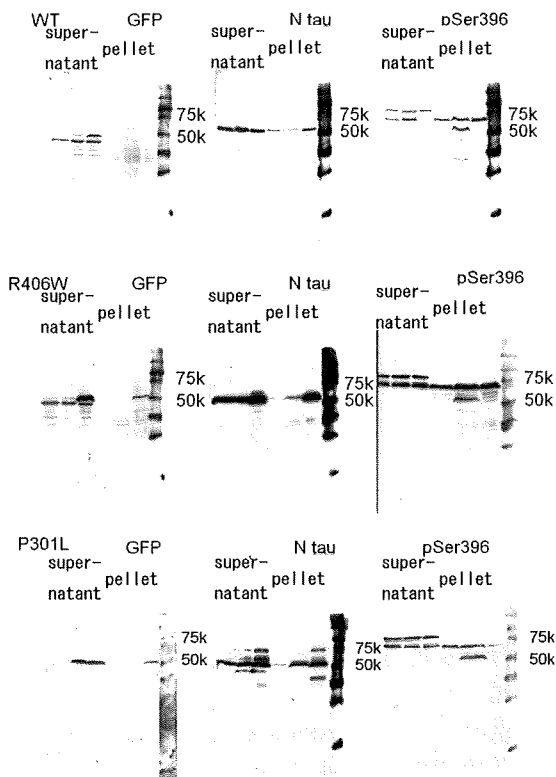


図1. 3種の細胞株におけるタウタンパク質の発現解析。上段は、野生型タウを発現した細胞株。中段は、ヒト疾患関連変異 R406Wを発現した細胞株。下段は、同様に P301L変異を発現した細胞株。各段の3枚のプロットは、それぞれ左から、GFP抗体、タウ N末抗体、306 セリン残基のリン酸化を認識する抗体を用いたウエスタンブロットの結果である。各プロットの右側には分子量が示されていて、タウ-GFP は 50kDa 近辺に検出されている。

## ② 蛍光異方性の変化

まず、細胞をリン酸緩衝生理食塩水にけん濁して、蛍光偏光を計測した。対照として、蛍光異方性は、研究方法で述べた式にしたがって算出するため、蛍光物質の濃度に依存しない。したがって、細胞ごとのタウ-GFPの発現量や、細胞濃度の差異は問題にならないというメリットがある。対照として、FITC (フェニルイソチオシアネート)、および

EGFP を用いた (各  $1 \mu\text{M}$ )。計測の結果、異方性は、それぞれ 0.021, 0.290 となった。FITC は低分子であり、蛍光寿命と分子の回転拡散緩和時間が同程度であるため、分子運動による偏光の解消が効いてしまい、異方性が 0 に近くなっている。一方 GFP は分子量が 26 kDa と大きいいため、蛍光寿命は相対的に短くなり、GFP 分子が分子間相互作用を持たない状態での異方性が計測されたと考えられる。タウ-GFP を発現した細胞株での計測結果は、図2のグラフのようになった。すなわち、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、異方性は低下していて、ホモプ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。

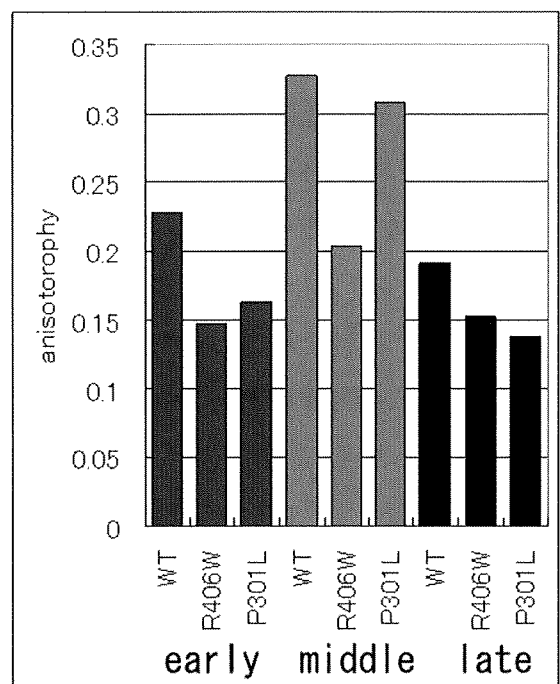


図2. 細胞を用いた蛍光異方性の計測結果。左より、3つ組みで、それぞれ培養初期、中