

2009/2004A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 尾藤 晴彦

平成22(2010)年 5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 尾藤晴彦	----- 1
-----------------------------------	---------

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 尾藤晴彦	----- 15
2. ミトコンドリア機能低下の病態生化学的解析 北潔	----- 21
3. リポーター遺伝子可視化プローブの開発 菊地和也	----- 27
4. 認知活動感受性プロモーターの開発 奥野浩行	----- 31

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 35
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 41
-----------------	----------

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

研究代表者 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した。本年度は、これまでに開発を進めた 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完了した。さらに FRET に基づく Ca²⁺センサーを効果的に high throughput で可視化する技術を開発した。昨年度同定した Ca²⁺上昇感受性転写エレメントを徹底的に強化するとともに、ルシフェラーゼ発光イメージングにより脳表近くの大脳皮質において、感覚入力特異的に生じる神経活動上昇を in vivo にて可視化することに成功した。また、生体深部の酵素活性を可視化するために新規 MRI 造影プローブ開発を推進し、脳実質におけるシグナル検出の条件整備を推進した。

研究組織

研究代表者

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 Ca^{2+} ナノセンサーを発現する技術の開発、 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。

この実現のため、これまでに新規の 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等の原理を確立し、具体的な候補分子・センサーを作出してきた。この成果に基づき本年度は、各 Ca^{2+} センサーの検定を完了し、動物個体におけるカルシウムシグナル計測の実践を試みる。またこれら成果を、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可能か検討する。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20年度までに作出した 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イルスベクターに導入し、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験系における測定を実施する。また、分担研究者の奥野と共同で単離同定した Ca^{2+} 感受性転写調節エレメントを利用した、新規レポーターの開発を続行する。

B-2. オルガネラ局在Ca²⁺シグナルの意義解明と応用：

尾藤らの開発したカルシウムセンサーをオルガネラで発現させ解析する系の確立するため、細胞質で合成されたタンパク質をそれぞれのオルガネラに局在させるための特異的ペプチドの配列の同定をめざす。そのために、高純度のオルガネラの分離法を開発する。

B-3. 認知活動依存性プローブの作成と個体計測：

本研究で確立したプローブを、Tgマウスで発現し、そのレポーター性能の評価を行う。また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*イメージング実験を実施する。さらにAAVウイルスベクターによる神経系遺伝子導入の条件検討を実施する。

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、β-ガラクトシダーゼ等の活性検出¹⁹F MRIプローブを用いて、細胞内遺伝子発現の可視化を試みる。

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20年度までに、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、これをそれぞれレンチウイルスベクターへ導入する条件を整えた。本年度は、これらを*in vitro*実験条件下にて、海馬神経細胞にてカルシウム動態の可視化に有用であることを確認した。さらに、*in vivo*動物個体でのイメージング条件を具体的に検討した。この過程で、*In vitro*におけるカルシウムナノシグナルを特にhigh throughputにて検出するための光学検出系のプロトタイプを開発した。

平成20年度までに解析を深めたシナプス活動応答性転写エレメント

SARE については、これを改変して感受性を高めた人工プロモーターを作成し、カルシウムシグナル亢進の可視化に極めて有効であることを確認した。

また、SARE を中心に enhancerRNA という新たな種の non-coding RNA が転写されることをハーバード大学 Greenberg 研究室と共同で発見した (Kim et al. Nature 2010)。また、SARE 等の神経活動依存的遺伝子発現が記憶の長期に不可欠な分子メカニズムの一つであることを実証した (Redondo et al. J. Neurosci. 2010)。

C-2. マラリア原虫のミトコンドリアやアピコプラストはこの原虫の生存と増殖に必須のオルガネラである。その中で重要な役割を果たしているカルシウム動態を解析するためには、赤色シフト型 FRET 型カルシウムセンサーの導入系が必要である。本研究では、オルガネラ特異的局在を規定するシグナル配列に関する情報を得る事が可能な高純度のオルガネラ分離法を確立し、さらにゲノム解析から酸化リン酸化に関わるミトコンドリアタンパク質の膜アンカー部分の候補を見出した。この2種の情報および分離したオルガネラの実際のペプチド解析からオルガネラへの局在に関わる特異的配列を明らかにし、これを用いてカルシウムセンサーを導入する道

筋を開く事ができた。

C-3. 今年度の Tg マウスを用いた個体発光イメージング実験等によって、痙攣刺激などの非生理的な強い刺激にのみ応答する Tg マウスラインや、生理的刺激である感覚刺激や探索行動などの認知活動に応答する Tg ラインが選定された。このことは、カルシウムシグナル破綻の様々な段階に応じた異なるレポーターシステムとしてこれらの Tg マウスを有効に利用できる可能性があることを意味する。

カルシウムセンサー分子を脳実質へ導入するための方法論として、子宮内電気穿孔法を確立し、脳発達期におけるカルシウムシグナルの細胞移動に対する影響の可視化を試みた。この過程で、脳発達期におけるカルシウムシグナルが軸索伸展・回路形成に不可欠であることを発見した (Ageta-Ishihara et al. J. Neurosci. 2009; Takemoto-Kimura et al. Eur. J. Neurosci. 2010)。

成体脳でのカルシウムシグナル可視化のため、脳実質へのレンチウイルスベクターならびに、AAV ベクターによるリポーター分子導入を試みた。特に、これらの実験の過程で、ルシフェラーゼ発光による in vivo イメージング技術を確立した。

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の樹立を推進した。これを元に、現在国内光学メーカーとの連携を引き続き検討中である。

C-4. Gd-DFP-galの細胞膜透過性について検討した結果、細胞膜透過性を有していないことが明らかになった。そこで、細胞を固定化して、細胞膜透過性を高めプローブの導入を行ったところ、細胞内の β -ガラクトシダーゼ活性すなわち遺伝子発現の ^{19}F MRIによる可視化に成功した。また、固定脳を用いた実験では、MRIシグナルの増大は観察されたものの、脳内遺伝子発現の部位の特定までは至っていない。

次に、 β -ラクタマーゼ活性検出プローブGd-FC-lacを合成し、緩和時間測定を行ったところ、 β -ラクタマーゼの存在下において、短縮していた緩和時間の増大が見られた。また、 ^{19}F NMRスペクトルに関してもピークのシャープ化および強度増大が観察された。このプローブを用いて、細胞膜上に発現させた β -ラクタマーゼ活性の ^{19}F NMRによる検出に成功した。

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した。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。多重蛍光イメージング法については、さらなる改良が進めば、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にも応用可能で、high throughputな定量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、今後共同で、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. 長波長シフトの新規蛍光 Ca^{2+} 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完成させた。さらに、新たな Ca^{2+} 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シグナリング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完了した。

E-2. マラリア原虫のミトコンドリアとアピコプラストに関し、それぞれのオルガネラのみを含む画分を得る事ができた。これにより、各オルガネラに含まれるタンパク質のアミノ酸配列の詳細な解析が可能となり、各オルガネラへの局在に必要なシグナル配列の性質に関する最終的結論を得る事ができると考えられる。

E-3.
本研究によって樹立された神経活動依存な遺伝子発現の可視化法は、カルシウムシグナル破綻をきたした脳または神経細胞において可視化し、非・低侵襲的に調べることが可能な技術であり、このような測定法の確立は認知症をはじめとする神経疾患の病態の解明のための極めて有効なツールとなる可能性が高い。

E-4. 常磁性相互作用を利用することにより、リポーター遺伝子産物である・-ガラクトシダーゼおよびβ-ラク

タマーゼの活性を検出するプローブ Gd-DFP-gal および Gd-FC-lac の開発に成功した。これらのプローブを用いることで細胞レベルにおいて遺伝子発現を¹⁹F MRIによって可視化することに成功した。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, **Bito H.** Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca²⁺/calmodulin- dependent protein kinase cascade. *J. Neurosci.* 29:13720-13729, 2009.

Redondo, R., **Okuno, H.**, Spooner, PA., Frenguelli, BG, **Bito, H.**, and Morris, RGM. Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.* 30: 4981-4989, 2010.

Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M,

- Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, **Bito H**, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*. 465: 182-187, 2010.
- Inoue, M., Yagishita-Kyo, N., Nonaka, M., Kawashima, T., **Okuno, H.**, and **Bito, H.** Synaptic Activity Responsive Element (SARE): a unique genomic structure with an unusual sensitivity to neuronal activity. *Commun. Integr. Biol.* in press.
- Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamiyo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okuno H, **Bito H**. Differential roles for CaM kinases in mediating excitation- morphogenesis coupling during formation and maturation of neuronal circuits. *Eur. J. Neurosci.* in press.
- Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S. and **Kita, K.** Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). (2009) **FEMS Microbiol. Lett.** 291, 157-161
- Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and **Kita K.** Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. (2009) **J. Biochem.** 145, 229-237
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and **Kita, K.** Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. (2009) **J. Biol. Chem.** 284, 7255-7263
- Osanai, A., Harada, S., Sakamoto, K., Shimizu, H., Inaoka, D. K., and **Kita, K.** Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with specific inhibitor, flutolanil. (2009) **Acta Crystallographica**, F65, 941-944
- Mogi, T. and **Kita, K.** Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits *a* and *b* in *Plasmodium* spp. (2009) **Mitochondrion**, 9, 443-453
- Matoba, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Inaoka, D.K., **Kita, K.** and Harada, S. Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. (2009) **Acta Crystallographica**, F65, 933-936
- Maréchal, A., Kido, Y., **Kita, K.** Moore, A. and Rich, P. Three redox states of *Trypanosoma brucei* alternative oxidase identified by infrared

- spectroscopy and electrochemistry. (2009) **J. Biol. Chem.** 284, 31827-31833
- Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki, S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., **Kita, K.**, Sato, S. The *Plasmodium* HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival. (2009) **FEBS Lett.** 583, 1446-1450
- Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and **Kita, K.** Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. (2010) **Acta Crystallographica F66**, 275-278
- Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and **Kita, K.** Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. (2010) **Acta Crystallographica F66**, 304-308
- Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and **Kita, K.** Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. (2010) **Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)** 1797, 443-450
- Paranagama, M. P., Sakamoto, K., Amino, H., Awano, M., Miyoshi, H. and **Kita, K.** Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species (ROS) from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. (2010) **Mitochondrion**, 10, 158-165
- Mogi, T. and **Kita, K.** Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. **Parasitol. Int.** in press
- Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y., **Kikuchi, K.** Covalent protein labeling based on noncatalytic β -lactamase and a designed FRET substrate. **J. Am. Chem. Soc.**, 131, 5016-5017, 2009.
- Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., **Kikuchi, K.** Dual-function probe to detect protease activity for fluorescence measurement and ^{19}F MRI. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 48, 3641-3643, 2009.
- Mizukami, S., Watanabe, S., **Kikuchi, K.**

Development of ratiometric fluorescent probes for phosphatases by using a pK_a switching mechanism. **ChemBiochem.**, 10, 1465-1468, 2009.

Yamaguchi, S., Miura, C., **Kikuchi, K.**, Celino, F. T., Agusa, T., Tanabe, S., Miura, T. Zinc is an Essential Trace Element for Spermatogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 106, 10859-10864, 2009.

Kikuchi, K., Hashimoto, S., Mizukami, S., Nagano, T. Anion sensor-based ratiometric peptide probe for protein kinase activity. **Org. Lett.**, 11, 2732-2735, 2009.

Mizukami, S., Okada, S., Kimura, S., **Kikuchi, K.** Design and synthesis of coumarin-based Zn²⁺ probes for ratiometric fluorescence imaging. **Inorg. Chem.**, 48, 7630-7638, 2009.

Hori, Y., Ueno, H., Mizukami, S., **Kikuchi, K.** Photoactive yellow protein-based protein labeling system with turn-on fluorescence intensity. **J. Am. Chem. Soc.**, 131, 16610-16611, 2009.

Hori, Y., Egashira, Y., Kamiura, R., **Kikuchi, K.** Noncovalent- Interaction-Promoted Ligation for Protein Labeling. **ChemBiochem.**, 11, 646-648, 2010.

竹本-木村さやか、上田（石原）奈津実、

布施俊光、上條論志、**尾藤晴彦**。神経疾患と細胞骨格。 **分子細胞治療**。 8: 243-248, 2009.

奥野浩行、川島尚之、野中美応、**尾藤晴彦**。シナプスから核へのシグナリング：シナプス可塑性を長期化する分子機構。 **細胞工学**, 28, 894-899, 2009.

井上昌俊、川島尚之、野中美応、竹本-木村さやか、**奥野浩行**、**尾藤晴彦**。シナプス長期可塑性の分子基盤。 **Cognition and Dementia**, 8, 117-182, 2009.

奥野浩行。シナプスから核へのシグナリングとシナプス活動依存的遺伝子発現：前初期遺伝子 *Arc* の発現制御メカニズムを中心に。 **生化学**, *in press*, 2010.

2. 学会発表

国際学会

Morris RGM, **Bito H**, Bonhoeffer T, Van Rossum M. Protein synthesis-dependent synaptic potentiation: a multidisciplinary analysis of the ‘synaptic tagging and capture’ theory Ninth HFSP Awardees Meeting and 20th Anniversary Celebration. Tokyo, Japan, 1-4 June 2009. (発表日 2009.6.3)

Bito H. Synaptic Activity-dependent Regulation of Plasticity-related Gene Arc. The

4th International conference of Neurons and Brain Diseases, 2009. 7.21-7.23, Toronto, Canada.(発表日 2009.7.23)

Bito H. CaM kinase signaling in neuronal microdomains. The 13th International Membrane Research Forum/ The 6th iCeMS International Symposium Featuring Nano-Meso Membrane Mechanisms. 2010. 1.27-1. 29, Kyoto, Japan(発表日 2010.1.27)

Kikuchi, K. Development of Imaging Probes with Tunable Switches for Biological Applications. (The 238th ACS National Meeting, Washington, DC, USA., 8.19, 2009) 招待講演

Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in Vivo* Imaging. (The 13th Asian Chemical Congress, Shanghai, China., 9.15, 2009) 招待講演

Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in vivo* Imaging. (International Symposium on Molecular Sensing and Fluorescent Imaging, Dalian, China., 9.18-20, 2009) 招待講演

Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in vivo* Imaging. (2nd Asian Conference on Coordination Chemistry, Nanjing, China., 11.1, 2009) 招待講演

Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes

for *in Vivo* Imaging. (Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry(SABIC-2009) ., Mumbai, India, 11.6, 2009) 招待講演

Okuno, H. Activity-dependent gene regulation and nucleus-to-synapse signaling for synaptic plasticity. メキシコ国立自治大学神経生物研究所シンポジウム "Learning and Memory", 2009.11.12-13, Juriquilla, Mexico, 招待講演 (発表日 : 2009.11.12)

Fuse T, **Bito H.** Input-specific remodeling of postsynaptic density (PSD) proteins in Purkinje cell spines. Soc. Neurosci. Abstr. 697.5, 2009. 第39回北米神経科学学会年会, 2009.10.17-10.21, Chicago, USA. Nanosymposium speaker. (発表日 : 2009.10.21)

Takemoto-Kimura S, Adachi- Morishima A, Ageta-Ishihara N, Suzuki K, Nonaka M, Okamura M, Nishimura VY, Kawauchi T, Nakajima K, Okuno H, **Bito H.** A pivotal role of a CaMKK-Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I cascade in the radial migration of layer 2/3 cortical pyramidal neurons. Soc. Neurosci. Abstr. 409.13, 2009. 第39回北米神経科学学会年会, 2009.10.17-10.21, Chicago, USA. Poster. (発表日 : 2009.10.19)

Mizukami, S., **Kikuchi, K.** Development of MRI Probes for Detecting Biological Signals. (Gordon Research Conference-Bioorganic Chemistry, Andover, NH, USA., 6.14-19, 2009)

口頭発表。

Tanaka, M., Tonai, K., Mizukami, S., **Kikuchi, K.**
A LUMINESCENT LANTHANIDE PROBE
FOR PROTEASE ACTIVITIES. (14th
International Conference on Biological
Inorganic Chemistry, 7.26-28, 2009, 名古屋)
ポスター発表

Redondo, R.L., **Okuno, H.**, Spooner, P.A.,
Frenguelli, B.G., **Bito, H.**, and Morris, R.G.M.
Differential role of distinct calcium-calmodulin
kinases in protein synthesis-dependent
long-term potentiation. *Soc. Neurosci. Abstr.*
235.3, 2009. 第39回北米神経科学学会年会,
2009.10.17-10.21, Chicago, USA. Poster (発表
日: 2009.10.18)

Okuno, H., Kawashima, T., Nonaka, M., Kyo,
N., **Bito, H.** A Critical genomic element for
synaptic activity-dependent expression of
Arc/Arg3.1. *J. Physiol. Sci.* **59 Suppl.1, 182**. 第
36回国際生理学会世界大会(IUPS2009),
2009.7.27-8.1, Kyoto, Japan. Poster (発表日:
2009.7.28)

国内学会

北 潔 「低酸素適応におけるミトコンド
リアの役割」第82回日本生化学会大会 平
成21年10月

菊地和也。生体イメージングプローブ開発

による金属イオン機能及び遺伝子発現解析。
(日本微量元素学会年会, 7.2-3, 2009, 東
京) 招待講演。

菊地和也。光で見る生きた状態の分子の動
き。(日本バイオイメージング学会第18回
年会, 9.5, 2009, 岡山) 招待講演。

菊地和也。生体イメージングプローブ開発
による金属イオン機能及び遺伝子発現解析。
(日本磁気共鳴医学会年会, 10.2, 2009,
横浜) 招待講演。

菊地和也。in vivoイメージングを可能とす
る化学プローブ開発。(日本化学会フォー
ラム, 10.21, 2009, 大阪) 招待講演。

菊地和也。物理化学原理に基づくプラズモ
ニクスの高感度分子イメージングへの応用。
(大阪大学フォトンクス先端融合研究セン
ター第3回シンポジウム, 11.18, 2009, 東
京) 招待講演。

菊地和也。in vivoイメージングを目指した
分子プローブのデザイン・合成・生物応用。
(理研シンポジウム「第10回分析・解析技
術と化学の最先端」, 12.10, 2009, 和光)
招待講演。

布施 俊光, **尾藤 晴彦**. Input-specific
remodeling of postsynaptic density (PSD)
proteins in Purkinje cell spines. 第32回日本

分子生物学会年会 2009.12.9-12.12, 2P-0686.
横浜パシフィコ, poster (ポスター発表
日: 2009.12.10)

上田 (石原) 奈津美、竹本一木村さやか、
野中美応、安達一森島亜希、水野秀信、平
野丈夫、田川義晃、奥野浩行、尾藤晴彦.
Control of cortical axon elongation by a
GABA-driven Ca^{2+} /calmodulin-dependent
protein kinase cascade. 第 82 回日本生化学大
会, 2009.10.21-10.24, 4P-413 (4T10p-3). 神戸
ポートアイランド, Oral and Poster (口演・発
表日:2009.10.24).優秀プレゼンテーション
賞

安達一森島亜希、竹本一木村さやか、鈴木
敢三、上田 (石原) 奈津美、野中美応、岡
村理子、西村嘉晃、川内健史、仲嶋一範、
奥野浩行、尾藤晴彦. 大脳皮質 2/3 層錐体
細胞の放射状移動を制御する新たなカルシ
ウムエフェクターCaMKIalpha の機能解明
(Identification of Ca^{2+} /calmodulin-dependent
protein kinase Ialpha as a novel Ca^{2+} effector
that regulates radial migration of layer 2/3
cortical pyramidal neurons). 第 82 回日本生化学
大会, 2009.10.21-10.24, 4P-419. 神戸ポー
トアイランド, Poster (発表日:2009.10.24).

Fujii H, Inoue M, Ishii Y, Okuno H, Bito H.
Single spine dual FRET imaging to better
understanding synaptic biochemical network.
Neurosci. Res. 65 Suppl.1: S26, SY3-A1-2.
2009. 第 32 回日本神経科学大会,

2009.9.16-18. 名古屋国際会議場,
Symposium (講演日:2009.9.18).

Fuse T, Bito H. Input-specific remodeling of
postsynaptic density (PSD) proteins in Purkinje
cell spines.

Neurosci. Res. 65 Suppl.1: S143, P2-b13. 2009.
第 32 回日本神経科学大会, 2009.9.16-18. 名
古屋国際会議場, Poster (発表日:2009.9.17)

Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka
M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Bito H.
Activity-dependent regulation of dendritic
growth. Neurosci. Res. 65 Suppl.1: S5,
SY1-B2-2, 2009. 第 32 回日本神経科学大会,
2009.9.16-18. 名古屋国際会議場,
Symposium (講演日:2009.9.16).

川島尚之, 奥野浩行, 尾藤晴彦. Multiple
regulatory elements in the Arc/Arg3.1 promoter
essential for synaptic activity-responsive gene
expression in activated neurons. 第 32 回日本
分子生物学会年会 2009.12.9-12.12, 4P-0215.
横浜パシフィコ横浜, poster (発表日:
2009.12.12)

原田倫世、城戸康年、坂元君年、松崎素道、
藪義貞、鈴木高史、笹原武史、中井裕、北
潔 「ミトコンドリア」を持たない寄生原
虫・クリプトスポリジウム: マイトソーム
の生化学解析に向けた実験系の確立 第
69 回日本寄生虫学会東日本支部大会 平成
21 年 10 月

原田倫世、藤本陽子、城戸康年、坂元君年、松崎素道、藪義貞、鈴木高史、笹原武史、中井裕、北潔 「ミトコンドリア」を持たない寄生原虫・クリプトスポリジウムにおける呼吸鎖の生化学的解析 第82回日本生化学会大会 平成21年10月

原田倫世、松崎素道、城戸康年、坂元君年、藪義貞、中井裕、北潔 *Cryptosporidium parvum* マイトソームの調製法の確立とシアン耐性酸化酵素(AOX)の解析 第8回感染症沖縄ワークショップ 平成22年2月

水上進、松下尚嗣、滝川利佳、菊地和也。レポーター酵素活性を検出する¹⁹F MRIプローブ。(第4回日本分子イメージング学会、5.14-15, 2009 東京) 口頭発表。

堀雄一郎、芝田茜、菊地和也。小分子化合物を用いた膜蛋白質の分解法研究。(日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、5.18-19, 2009 神戸) 口頭発表。

堀雄一郎、上野秀樹、菊地和也。Photoactive Yellow Proteinをタグ蛋白質とした蛍光強度増大型ラベル化法の開発。(第24回生体機能関連化学シンポジウム、9.13-15, 2009, 福岡) 口頭発表。

岡田智、水上進、菊地和也。Gd³⁺錯体と刺激応答性ポリマーを応用した新規MRIプ

ローブの開発。(第59回錯体化学討論会、9.25-27, 2009, 長崎) ポスター発表。

松下尚嗣、水上進、杉原文徳、白川昌宏、菊地和也。遺伝子発現を可視化するβ-ラクタマーゼ活性検出用¹⁹F MRI プローブの開発。(日本化学会日本化学会第90春季年会、3.26-29, 2010, 大阪) 口頭発表。

堀雄一郎、上野秀樹、中木恭兵、菊地和也。Photoactive Yellow Proteinをタグ蛋白質とした蛍光強度増大型蛋白質ラベル化法の開発。(日本薬学会第130年会、3.28-30, 2010, 岡山) ポスター発表。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得・申請

発明の名称：タンパク質を蛍光標識する方法

出願番号：PCT/JP2010/054024

出願者：大阪大学

発明者：菊地和也、堀雄一郎、上野秀樹

出願日：2010年3月10日

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

Ca²⁺応答性ナノセンサー開発と動物モデルにおける応用

研究代表者 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⁺、ならびにその下流のシグナル応答を定量的に測定することを実現する新規技術の開発を目標としている。平成21年度には、Ca²⁺センサー分子の個体臓器デリバリー技術を完成させた。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シグナリング計測のための基礎イメージング法を樹立した。

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20年度までに作出した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イルスベクターに導入し、in vitro ならびにin vivo実験系における測定を実施する。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、新規レポーターの開発を続行する。

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。さらにAAVウイルスベクターによる神経系遺伝子導入の条件検討を実施する

(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ールに基づいて実験を行った。

C. 研究結果

C-1. 平成20年度までに、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、これをそれぞれレンチウイルスベクターへ導入する条件を整えた。本年度は、これらをin vitro 実験条件下にて、海馬神経細胞

にてカルシウム動態の可視化に有用であることを確認した。さらに、in vivo 動物個体でのイメージング条件を具体的に検討した。この過程で、In vitro におけるカルシウムナノシグナルを特に high throughput にて検出するための光学検出系のプロトタイプを開発した。

平成20年度までに解析を深めたシナプス活動応答性転写エレメントSAREについては、これを改変して感受性を高めた人工プロモーターを作成し、カルシウムシグナル亢進の可視化に極めて有効であることを確認した。

また、SAREを中心に enhancerRNA という新たな種の non-coding RNA が転写されることをハーバード大学Greenberg 研究室と共同で発見した (Kim et al. Nature 2010)。また、SARE 等の神経活動依存的遺伝子発現が記憶の長期に不可欠な分子メカニズムの一つであることを実証した (Redondo et al. J. Neurosci. 2010)。

C-2:

カルシウムセンサー分子を脳実質へ導入するための方法論として、子宮内電気穿孔法を確立し、脳発達期におけるカルシウムシグナルの細胞移動に対する影響の可視化を試みた。この過程で、脳発達期におけるカルシウムシグナルが軸索伸展・回路形成に不可欠であることを発見した (Ageta-Ishihara et al. J. Neurosci. 2009; Takemoto-Kimura et al. Eur. J. Neurosci. 2010)。

同様の検討を菊地らが開発した MRI 感受性プローブについても実施し、シグナル検出に成功している。

成体脳でのカルシウムシグナル可視化のため、脳実質へのレンチウィルスベクターならびに、AAV ベクターによるリポーター分子導入を試みた。特に、これらの実験の過程で、ルシフェラーゼ発光による *in vivo* イメージング技術を確立した。

D. 考察

本研究では、医師・生化学者である尾藤を中心に、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、この3年間の研究により、

1) 蛍光共鳴エネルギー遷移 (FRET) 原理を利用した細胞内 Ca^{2+} 動態の異常を検出するナノセンサー

2) 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を世界に先駆けて同定し、その活性化機構を解明し、その活性化原理の理解に基づく感受性改良などの応用研究を完了した。

これらの過程で開発したプローブ

デリバリー技術を応用して、細胞内 Ca^{2+} シグナル活性化を MRI により脳実質にて検出する新規技術に関する研究も大いに進展した。

これらイメージング技術を用い、現在いくつかの病態モデルにおけるカルシウムシグナル破綻を検証しており、予備的であるが、極めて興味深いデータを取得しつつある。

E. 結論

平成19～21年度にかけて、長波長シフトの新規蛍光 Ca^{2+} 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完成させた。さらに、新たな Ca^{2+} 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シグナリング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完了した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, **Bito H**. Control of cortical axon elongation by

a GABA-driven Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J. Neurosci.* 29:13720-13729, 2009.

Redondo, R., **Okuno, H.**, Spooner, PA., Frenguelli, BG., **Bito, H.**, and Morris, RGM. Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.* 30: 4981-4989, 2010.

Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, **Bito H**, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature.* 465: 182-187, 2010.

Inoue, M., Yagishita-Kyo, N., Nonaka, M., Kawashima, T., **Okuno, H.**, and **Bito, H.** Synaptic Activity Responsive Element (SARE): a unique genomic structure with an unusual sensitivity to neuronal activity. *Commun. Integr. Biol. in press.*

Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okuno H, **Bito H**. Differential roles for CaM kinases in mediating excitation-morphogenesis coupling during

formation and maturation of neuronal circuits. *Eur. J. Neurosci.* in press.

竹本一木村さやか、上田(石原)奈津実、布施俊光、上條諭志、尾藤晴彦. 神経疾患と細胞骨格. *分子細胞治療*. 8: 243-248, 2009.

2. 招待講演

Morris RGM, **Bito H**, Bonhoeffer T, Van Rossum M. Protein synthesis-dependent synaptic potentiation: a multidisciplinary analysis of the 'synaptic tagging and capture' theory Ninth HFSP Awardees Meeting and 20th Anniversary Celebration. Tokyo, Japan, 1-4 June 2009. (発表日 2009.6.3)

Bito H. Synaptic Activity-dependent Regulation of Plasticity-related Gene Arc. The 4th International conference of Neurons and Brain Diseases, 2009. 7.21-7.23, Toronto, Canada.(発表日 2009.7.23)

Bito H. CaM kinase signaling in neuronal microdomains. The 13th International Membrane Research Forum/ The 6th iCeMS International Symposium Featuring Nano-Meso Membrane Mechanisms. 2010. 1.27-1.29, Kyoto, Japan(発表日 2010.1.27)

3. 国際学会

Fuse T, **Bito H.** Input-specific remodeling of postsynaptic density (PSD) proteins in Purkinje cell spines. Soc. Neurosci. Abstr. 697.5, 2009. 第39回北米神経科学学会年会, 2009.10.17-10.21, Chicago, USA. Nanosymposium speaker. (発表日: 2009.10.21)

Takemoto-Kimura S, Adachi-Morishima A, Ageta-Ishihara N, Suzuki K, Nonaka M, Okamura M, Nishimura VY, Kawauchi T, Nakajima K, Okuno H, **Bito H.** A pivotal role of a CaMKK-Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I cascade in the radial migration of layer 2/3 cortical pyramidal neurons. Soc. Neurosci. Abstr. 409.13, 2009. 第39回北米神経科学学会年会, 2009.10.17-10.21, Chicago, USA. Poster. (発表日: 2009.10.19)

4. 国内学会

布施 俊光, **尾藤 晴彦.** Input-specific remodeling of postsynaptic density (PSD) proteins in Purkinje cell spines. 第32回日本分子生物学会年会 2009.12.9-12.12, 2P-0686. 横浜パシフィコ, poster (ポスター発表日: 2009.12.10)

上田(石原)奈津美、竹本一木村さやか、野中美応、安達一森島亜希、水野秀信、

平野丈夫、田川義晃、奥野浩行、**尾藤 晴彦.** Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. 第82回日本生化学大会, 2009.10.21-10.24, 4P-413 (4T10p-3). 神戸ポートアイランド, Oral and Poster (口演・発表日:2009.10.24). 優秀プレゼンテーション賞

安達一森島亜希、竹本一木村さやか、鈴木敢三、上田(石原)奈津美、野中美応、岡村理子、西村嘉晃、川内健史、仲嶋一範、奥野浩行、**尾藤 晴彦.** 大脳皮質 2/3 層錐体細胞の放射状移動を制御する新たなカルシウムエフェクター CaMKIalpha の機能解明(Identification of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Ialpha as a novel Ca²⁺ effector that regulates radial migration of layer 2/3 cortical pyramidal neurons). 第82回日本生化学大会, 2009.10.21-10.24, 4P-419. 神戸ポートアイランド, Poster (発表日:2009.10.24).

Fujii H, Inoue M, Ishii Y, Okuno H, **Bito H.** Single spine dual FRET imaging to better understanding synaptic biochemical network. Neurosci. Res. 65 Suppl.1: S26, SY3-A1-2. 2009. 第32回日本神経科学大会, 2009.9.16-18. 名古屋国際会議場, Symposium (講演日:2009.9.18).

Fuse T, **Bito H.** Input-specific