

2009(203)A

厚生労働科学研究研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

構造生物学的アプローチによる
アルツハイマー病の病態解明と分子標的治療の開発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 星 美奈子

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
構造生物学的アプローチによるアルツハイマー病の病態解明と 分子標的治療の開発に関する研究	----- 1
星 美奈子	
II. 分担研究報告	
1. アミロスフェロイド分子構造解析、標的分子の同定と 機能的解析、イメージングに関する研究	----- 9
星 美奈子	
2. 構造解析・局在解析・高分解能光学顕微鏡観察に関する研究	----- 12
藤吉 好則	
3. アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導機構に関する研究	----- 14
鍋島 陽一	
4. ペプチド化学修飾による蛋白質デリバリー法に関する研究	----- 16
菊地 和也	
5. アミロスフェロイドの分子構造解析による神経毒性の 発現機構解析に関する研究	----- 19
廣明 秀一	
6. ウィルスベクターを用いたアミロスフェロイドの機能解析に関する研究	- 22
村松 慎一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 28

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

構造生物学的アプローチによるアルツハイマー病の病態解明と分子標的治療の開発に関する研究

研究代表者 星 美奈子 京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 特定准教授

研究要旨

本研究ではアミロスフェロイドの立体構造を解明し、神経細胞上にある標的分子へのアミロスフェロイドの結合を阻止することで安全で効果的な新規分子標的治療法の開発に結びつけようとするものである。そのため、倫理面に配慮し、アミロスフェロイドの（１）分子構造解析、（２）標的分子の同定と機能解析、（３）非侵襲的観測法の構築を目標として研究を遂行し以下の結果を得た。

目標（１）については、安定同位体で標識したA β 1-42の効率的合成法を確立し固相NMRによりアミロスフェロイド立体構造の一部解明に成功し、今まで報告されたことがない新規な立体構造であることを構造情報からも確認した（Gordon Conference; June 09:イリノイ大との共同研究）。正しい構造情報の解明により、原因分子のみを標的とした安全で、かつ抗体よりも安価に調製出来る低分子化合物による治療法開発が期待出来る。完全な構造情報を得るため、大量の標識A β を得ることを目標に大腸菌において融合タンパク質として発現する系の構築を行った。

目標（２）については、アミロスフェロイド標的分子がプレシナプスにあることを初めて報告した（Noguchi *et al.* JBC 2009）。これは全く新しい神経細胞死のメカニズムであることを意味する。標的分子Xをほぼ同定したので、この機能を解析し制御することで、よりヒトの病気を反映した創薬モデルを開発可能と考えている。モデル動物開発に向けた準備段階として新たなウィルスベクター開発を行った（Kadkhodaei *et al.*, *J Neurosci*; Fukushima *et al.*, *PLoS One*2009）。

目標（３）については、凝集過程の観測は非常に困難とされるが、初めて形成過程の観測に成功した（Matsumura *et al.* in submission）。これをもとに、抗アミロスフェロイド抗体あるいは認識配列をMRIプローブ化しナノセンサ分子を開発する。開発するナノセンサ分子を脳内移行させるために、血液脳関門通過能をもつ狂犬病ウイルス由来ペプチドRVGを用いた化学修飾法を開発した。これらの取り組みにより、現在では全くわからない原因物質が脳内で出来てくる過程を解明出来ることが期待出来る。

上記のとおり、初年度の研究は予定通り順調に進めることが出来た。アルツハイマー病の初期段階モデルにあたる齧歯類疾患モデルを基に開発された複数の薬剤が、いずれも患者に対する臨床治験で成果を上げられていない現状では、ヒト脳における神経細胞死のメカニズムの解明こそが、根本的治療法構築への道筋を立てるために必要である。従って、本研究で、アミロスフェロイドないしはその標的分子の構造を解明することで、原因物質と神経細胞上の標的分子の相互作用を阻止するあるいは原因物質の形成を抑制することによる新たな、そして安全な分子標的医療を可能にする。これにより全く新しい切り口の診断と治療方法を開発する基盤を産業界に提供できるのではないかと考えている。

分担研究者氏名・所属機関・職名

藤吉好則	京都大学大学院理学研究科	教授
鍋島陽一	京都大学大学院医学研究科	教授
菊地和也	大阪大学大学院工学研究科	教授
廣明秀一	神戸大学大学院医学研究科	特任教授
村松慎一	自治医科大学医学部	特任教授

A. 研究目的

アルツハイマー病などの認知症は、高齢化している我が国が、率先して取り組むべき課題である。その原因は、脳内で β アミロイド（A β ）が集合体を作り、神経のシナプスを侵し、最終的に細胞

が脱落するからとされてきた。しかしながら、シナプス変性だけを起こすA β 集合体は単離されても、今まで神経細胞死を起こすA β 集合体は患者から単離されたことはなかった。また、齧歯類疾患モデルでは、A β 集合体は充分量存在するが、脳の障害はシナプス変性までで神経細胞は脱落

せず、認知障害も軽症である。このアルツハイマー病初期段階モデルである既存の齧歯類モデルを基に開発された複数の薬剤は、いずれも臨床治験では認知症の改善に至っていない。従って、治療のためには、本研究が目的とする、シナプス変性以降に起きる神経細胞死の分子機構のヒト脳における解明が必要である。

研究代表者は、患者脳より初めて、齧歯類モデルには存在しない、極めて強い神経毒性を持つ球状のA β 集合体＝アミロスフェロイドの単離に成功した (Noguchi *et al.* 2009)。この患者特異的A β 集合体の構造は他とは異なり、その結果として異なる神経細胞死機構を持つ。従って、アミロスフェロイドのユニークな分子構造を解明し、その神経細胞死機構と形成機序を解明することは、現状では未解明のシナプス変性以降のアルツハイマー病発症の過程を明らかにし、より有効な治療法開発を可能にすると期待される。

そこで、代表者の総括の下、各研究分担者のこれまでの実験的蓄積を生かした異分野融合研究により、構造生物学という新たな切り口から、アミロスフェロイドのユニークな分子構造と神経毒性の関係を解明し、構造情報に基づく分子標的治療を目指す。

倫理問題に配慮し、しかるべき手続きを経てその範囲で以下を実施する。

B. 研究方法

以下の目標の達成により、疾病の理解と臨床応用を図る。本研究の目標達成には、藤吉好則博士 (京都大学) のオリジナルな顕微鏡による構造解析、形態観察、X線結晶学と廣明秀一博士 (神戸大学) によるNMR解析の組み合わせ、鍋島陽一博士 (京都大学) の病態モデル動物作製と解析の実験的蓄積、村松慎一博士 (自治医科大学) のパーキンソン病における遺伝子治療の実験的並びに臨床的経験、そして菊地和也博士 (大阪大学) のナノセンサ開発の実験的蓄積が必須であり、代表者の総括の下、協力体制を引く。代表者は全体の有機的結びつきが円滑に行われるよう配慮するとともに、それぞれに適宜アミロスフェロイドを供給し、自らはアミロスフェロイド標的分子の同定とその生化学的並びに細胞生物学的解析を行う。

【研究計画】

目標1 アミロスフェロイド分子構造解析(廣明・藤吉・星)

アミロスフェロイド抗体はA β モノマーや既存のA β 集合体をほとんど認識せず、逆に既存のA β 集合体に対する抗体はアミロスフェロイドを認識しない。これは、アミロスフェロイドが特異的な構造を持つことを示唆している。このユニークな分子構造を解明するために (1-1) アミロスフェロイドと抗体の複合体を適切なクロスリンカーを用いて化学的に架橋し安定化させ、次に適切な界面活性剤にて抗体と相互作用している部位以外のA β を除去し、残ったアミロスフェロイドと抗体の複合体を結晶化し構造解析を行う。(1-2) アミロスフェロイド形成に重要な役割を果たすことが明らかになっているアミノ酸残基を局所的に安定同位体ラベル化したA β からアミロスフェロイドを調製しNMRにより構造解析を行う。

目標2 標的分子同定と機能解析(星・鍋島・村松・廣明・藤吉)

アミロスフェロイドは、成熟神経細胞に選択的に結合し、それによって神経細胞死を誘導している。ラット成熟神経細胞を用いて、アミロスフェロイドと結合する標的タンパク質を生化学的に単離し、質量分析により同定する。

目標3 アミロスフェロイドのイメージング(菊地・星・村松)

アルツハイマー病の発症を考える上では、なぜアミロスフェロイドのような構造を持った集合体が形成されてくるのかを解明することは重要である。申請者らは、アミロスフェロイド形成経路を検証するため、蛍光相関分光法理論を基に、定量的かつリアルタイムに集合体形成過程を追跡できる系を構築している。これを用いてアミロスフェロイド形成に重要なアミノ酸残基を明らかにする。この情報を基に適切な安定同位体ラベルを入れNMR解析を行う。

(倫理面への配慮)

【ヒト由来試料の取り扱い】

ヒト由来試料からアミロスフェロイドを調製して用いる場合は、剖検脳を新潟大学脳研究所ないしは鳥取大学医学部より供与を受ける。これについては、既に科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会「機関内倫理審査委員会の在り方に関する

る報告書」（平成15年3月20日）に従い、各機関内倫理・安全委員会の審査を受け、承認を受けている。実験に際しては、ご遺族の承諾を得てその範囲を守り、連結可能匿名化により個人情報を保護した上で、所定の設備の整った実験室にて安全に配慮して行う。

【動物実験】

機能解析は主にラット初代培養神経を用いて行い、個体解析はマウス、必要に応じてサルなどを用いる。総理府告示「動物の処分法に関する指針」（平成7年第40号）に従い、麻酔下で苦痛を与えないよう処置を行う。サル個体を用いる必要が生じた場合、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、内閣府「実験動物の飼育及び保管に関する基準」、文部科学省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守する。動物実験についても、各機関内の倫理委員会の審査を受け、その規定のもとに実験を実施する。

C. 研究結果

(1) アミロスフェロイド分子構造解析

安定同位体で標識したA β 1-42の効率的合成法を確立し固相NMRによりアミロスフェロイド立体構造の一部解明に成功し、今まで報告されなかった新規な立体構造であることを構造情報からも確認した（Gordon Conference; June 09;イリノイ大との共同研究）。当初、アミロスフェロイドと抗体の複合体を適切なクロスリンカーを用いて化学的に架橋し安定化させる予定であったが、化学的架橋剤によりアミロスフェロイドの構造が破壊されることがわかったため固相及び溶液NMRにより構造の解明を目指すこととした。これにより構造情報からもアミロスフェロイドはこれまでに報告されていない新規な構造を取っていることが明らかとなりつつある（Gordon Conference, June 09）。今後さらに異なるアミノ酸残基に標識を入れ詳細な構造情報を得る予定である。完全な構造情報を得るため、大量の標識A β を得ることを目標に大腸菌において融合タンパク質として発現する系の構築を行った。その結果、まずはA β (1-40)に関して、¹⁵N標識を施した試料を大腸菌から組換え蛋白質として生産することができ、¹⁵N-A β (1-40)から調製したアミロスフェロイドを一部含むと思われる凝集体のNMR測定に成功し、一部のシグナルが観測で

きた。

(2) 標的分子同定と機能解析

アミロスフェロイド標的分子がプレシナプスにあることを初めて報告した（Noguchi *et al.*, JBC 2009）。これは全く新しい神経細胞死のメカニズムであることを意味する。標的分子Xをほぼ同定したので、この機能を解析し制御することで、よりヒトの病気を反映した創薬モデルを開発可能と考えている。モデル動物開発に向けた準備段階として新たなウイルスベクター開発を行った（Kadkhodaei *et al.*, *J Neurosci*; Fukushima *et al.*, *PLoS One* 2009）。これまでの研究で、カニクイサルの脳内へのアミロスフェロイドの単回注入では、明らかな毒性は認められなかった。培養細胞と異なり、脳内では手術操作による一時的な炎症とそれによるアミロスフェロイド除去反応が生じる可能性などが考えられるため、持続してアミロスフェロイドを作用させることが望ましい。そのため、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによりAPPを発現させる方法を開発した。AAVベクターは脳内の神経細胞に効率よく遺伝子を導入し、炎症・免疫反応をほとんど惹起することなく長期発現させることが可能である。2型あるいは3型AAVベクターを使用すれば神経細胞にほぼ選択的に遺伝子導入できるが、SynIプロモーターを使用することで神経細胞特異的にAPPを発現できる。予備的に行った若年サル大脳皮質および海馬への注入では、明らかな神経細胞死は見いだせなかったが、若年サルでは、アミロイド分解酵素であるネプリライシンの活性が高いなど、種々の解毒作用が働いている可能性がある。今後、老齢サルの脳組織を詳細に解析することにより、神経細胞死の誘導とアミロスフェロイドが毒性を発揮する局面を捕捉できるものと考えられる。

(3) アミロスフェロイドのイメージング

凝集過程の観測は非常に困難とされるが、初めて形成過程の観測に成功した（Matsumura *et al.* in submission）。これをもとに、抗アミロスフェロイド抗体あるいは認識配列をMRIプローブ化しナノセンサ分子を開発する。開発するナノセンサ分子を脳内移行させるために、血液脳関門通過能をもつ狂犬病ウイルス由来ペプチドRVGを用いた化学修飾法を開発した。その結果、RVG修飾により選択的にEGFPが神経細胞に導入出来ることを確認した。また、マウス投与実験の結果から、RVG修飾AAVは、末梢から中枢神経系への導入が可能であることが示された。修飾AAVは、神経細胞において選択的に遺伝子発現し、非修飾AAVでは、非神経細胞

で選択的に遺伝子発現したことから、RVG修飾により、中枢神経系での感染細胞に選択性が生じたと考えられる。これらの取り組みにより、現在では全くわからない原因物質が脳内で出来てくる過程を解明出来ることが期待出来る。

D. 考察

(1) アミロスフェロイド分子構造解析

正しい構造情報の解明により、原因分子のみを標的とした安全で、かつ抗体よりも安価に調製出来る低分子化合物による治療法開発が期待出来る。今回、固相NMRおよび溶液NMRによりアミロスフェロイドの構造情報について手掛かりが得られた。溶液NMRの結果からは、 $A\beta(1-40)$ のN末端およそ10残基と、分子中央の一部分はアミロスフェロイド球状構造から露出し、分子表面でフレキシブルな構造をとっていると考えられる。また、この部分が、受容体と作用してアミロスフェロイドの高毒性を発揮すると考えられた。この結果は、抗体のエピトープ解析で得られた結果と良く合致しており。今後、 ^{15}N 標識アミロスフェロイドから得られる情報を相補するために、 ^{13}C 標識を施した $A\beta(1-40)$ 由来または $A\beta(1-42)$ 由来アミロスフェロイドを順次調製し、NMR観測を行うことでアミロスフェロイドの構造についての理解が深まることが期待出来る。

(2) 標的分子同定と機能解析

今年度の研究によりアミロスフェロイド標的分子をほぼ同定するに至った。また、その機能的解析のためにconditional knock-outマウスの開発に着手した。また、その一方で、本来アミロスフェロイド毒性に感受性を示さない細胞（ヒト胎児由来腎臓細胞あるいは未成熟神経細胞）に標的分子を発現させることで毒性に感受性を示すようになるかどうかを検証する予定である。これらの解析のより神経細胞死の分子機構が解明出来ること期待出来る。

(3) アミロスフェロイドのイメージング

凝集過程の観測からは、現在では全くわからない原因物質が脳内で出来てくる過程を解明出来ることが期待出来る。また、RVG修飾により、蛋白質導入の中枢神経細胞選択性が確認されたことから、本技術は、中枢神経への蛋白質デリバリーのための極めて強力な手法として活用できることが期待出来る。

E. 結論

上記のとおり、初年度の研究は予定通り順調に

進めることが出来た。アルツハイマー病の初期段階モデルにあたる齧歯類疾患モデルを基に開発された複数の薬剤が、いずれも患者に対する臨床試験で成果を上げられていない現状では、ヒト脳における神経細胞死のメカニズムの解明こそが、根本的治療法構築への道筋を立てるために必要である。従って、本研究で、アミロスフェロイドないしはその標的分子の構造を解明することで、原因物質と神経細胞上の標的分子の相互作用を阻止するあるいは原因物質の形成を抑制することによる新たな、そして安全な分子標的医療を可能にする。これにより全く新しい切り口の診断と治療方法を開発する基盤を産業界に提供できるのではないかと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Roychoudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M.M., and Teplow, D.B. (2009)

Amyloid β -protein assembly and Alzheimer disease

J. Biol. Chem. 284, 4749-4753

Noguchi, A., Matsumura, S., Dezawa, M., Tada, M., Yanazawa, M., Ito, A., Akioka, M., Kikuchi, S., Sato, M., Ideno, S., Noda, M., Fukunari, A., Muramatsu, S., Itokazu, Y., Sato, K., Takahashi, H., Teplow, D.B., Nabeshima, Y., Kakita, A., Imahori, K., and *Hoshi, M. (2009)

Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high-mass amyloid β -protein ($A\beta$) assembly from Alzheimer's disease brains

J. Biol. Chem. 284, 32895-32905

Kitamura, Y., Yanazawa, M., Sato, M., Ito, A., and Hoshi, M.M. (2009)

Identification of amylospheroid-binding proteins from mature neurons as a molecular target of neurotoxicity induced by nonfibrillar $A\beta$ assemblies
Alzheimer's and Dementia 5, S1, 222-223

K. Noma, K. Kimura, K. Minatohara, H. Nakashima, Y. Nagao, A. Mizoguchi and Y. Fujiyoshi; Triple N-Glycosylation in the Long S5-P Loop Regulates the Activation and Trafficking of the Kv12.2 Potassium Channel. *J. Biol. Chem.*, 28., 33139-33150 (2009).

- A. Inutsuka, M. Goda and Y. Fujiyoshi; Calyculin A-induced neurite retraction is critically dependent on actomyosin activation but not on polymerization state of microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 1160-1166 (2009).
- K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi; Structural and functional characterization of H⁺,K⁺-ATPase with bound fluorinated phosphate analogs. *J. Struct. Biol.*, **170**, 60-68 (2010).
- K. Irie, K. Kitagawa, H. Nagura, T. Imai, T. Shimomura and Y. Fujiyoshi; Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels. *J. Biol. Chem.*, **285**, 3685-3694 (2010).
- 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 ¹⁹F MRI. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 3641-3543 (2009)
- Mizukami, S., Watanabe, S., Kikuchi, K. Development of ratiometric fluorescent probes for phosphatases by using a pK_a switching mechanism. *Chembiochem* **48**, 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**, 16610-16111 (2009)
- Hori, Y., Egashira, Y., Kamiura, R., Kikuchi, K. Noncovalent-Interaction-Promoted Ligation for Protein Labeling. *Chembiochem* **11**, 646-648 (2010)
- Fukushima F, Nakao K, Shinoe T, Fukaya M, Muramatsu S, Sakimura K, Kataoka H, Mori H, Watanabe M, Manabe M, Mishima M : Ablation of NMDA receptors enhances the excitability of hippocampal CA3 neurons. *PLoS ONE*, **4**(1):e3993, 2009.
- Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu S, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K, Takano M : The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. *Cardiovasc Res*, **83**(4):682-687, 2009.
- Muramatsu, S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y and Tsukada H: Multi-tracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson' s disease. *Synapse*, **63**:541-548, 2009.
- Tanaka Y, Ikeda T, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Iwanaka T, Muramatsu S, Kondo Y, Takahashi K, Yamanaka S and Hanazono Y : ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. *Cell Transplant*, **18**(4):381-389, 2009.
- Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, **4**:e6318, 2009.
- Ito T, Yamamoto S, Hayashi T, Kodera M, Mizukami H, Ozawa K, Muramatsu S: A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adenovirus neutralising antibodies. *Ann Clin Biochem*, **46**(Pt 6):508-510, 2009.
- Kadkhodaei, B, Ito, T, Joodmardi, E, Mattsson, B, Rouillard, C, Carta, M, Muramatsu, S, Ichinose, C, Nomura, T, Chambon, P, Metzger, D, Larsson, N, Lindqvist, E, Olson, L, Bjorklund, A, Ichinose, H: Nurr1 is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci*, **29**(50):15923-15932, 2009.

廣明秀一：NMRの原理 核磁気共鳴分光法
(分光測定入門シリーズ8) p1-32, 日本分光
学会編、講談社サイエンティフィク(2009)

2. 学会発表

Hoshi, M. (2009年10月30日)
High-mass amyloid beta-protein assembly with a
unique toxic surface from Alzheimer's disease
brains
*The 47th Annual Meeting of the Biophysiological
Society of Japan*
BSJ&ABA Joint International Symposium
"Prion and Virus Infections", organized by Drs.
Nagayama, Sokabe and Kataoka
Tokushima
(シンポジウム・招待講演)

星美奈子 (2009年3月)
アミロスフェロイド：Alzheimer 病の病態解
明と臨床応用を目指して
三菱化学生命科学研究所公開シンポジウム
東京
(招待講演)

松村聡子・山田真由美・篠田恵子・菊地和也・
横島智・中村振一郎・金城政孝・星美奈子 (2009
年3月)
FCSを用いた集合体形成過程の定量的解析手
法の構築
シンポジウム：蛍光相関分光で見る生体系の情
報伝達(6)
独立行政法人理化学研究所
和光
(招待講演)

松村聡子・山田真由美・篠田恵子・菊地和也・
横島智・中村振一郎・金城政孝・星美奈子 (2009
年8月12日)
FCSを用いた集合体形成過程の定量的解析手
法の構築
特定領域「分子脳科学」班会議
札幌

Identification of amylospheroid-binding proteins
from mature neurons as a molecular target of
neurotoxicity induced by nonfibrillar A β
assemblies
Y. Kitamura, M. Yanazawa, M. Sato, A. Ito, M.
Hoshi

ICAD 2009
2009.7.12
Vienna

Isolation and characterization of high-mass amyloid
beta-protein assembly with a unique toxic surface
from Alzheimer's disease brains
第32回日本分子生物学会年会日本分子生物学
会
2009年12月9日(水) 横浜
M. Hoshi, Y. Matsumoto, Y. Nabeshima

Y. Fujiyoshi; Structural physiology of
multifunctional channels (Special Lecture),
IUPS2009, Kyoto, July 30, 2009

Y. Fujiyoshi; Recent advancements in structural
analysis of AQP4 water channels and Cx26 gap
junction channels, CMBN guest lecture, Oslo,
September 24, 2009

Y. Fujiyoshi; Structural physiology based on
electron crystallography (Plenary
Lecture), AsCA'09, Beijing, October 25, 2009

藤吉好則；脳の代表的水チャネル：アクアポ
リン-4の構造と機能，第39回慶應ニューロサ
イエンス研究会，東京，2009年10月31日

藤吉好則；多機能性チャネルの構造生理学，
第14回ハイテク・リサーチセンター研究発表
会，神奈川，2009年11月17日

Y. Fujiyoshi; Structural and functional study of
membrane proteins by Cryo-electron microscopy,
JEOL/CURIE institute Meeting, Orsay, November
25, 2009

Y. Fujiyoshi; Structural Physiology Based on
Electron Crystallography, International
Symposium Fifty Years of Biophysics Research at
Nagoya University, Nagoya, March 12, 2010

Kikuchi, K. Development of Imaging Probes with
Tunable Switches for Biological Applications. The
238th ACS National Meeting,
Washington, DC, USA, 2009年8月19日 (招待講
演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for
in Vivo Imaging. The 13th Asian Chemical
Congress, Shanghai, China, 2009年9月15日 (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, 2009年9月18日～20日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in Vivo* Imaging. 2nd Asian Conference on Coordination Chemistry, Nanjing, China, 2009年11月1日 (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, 2009年11月6日 (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, 日本微量元素学会年会, 東京, 2009年7月2日～3日 (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, 岡山, 2009年9月5日 (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, 横浜, 2009年10月2日 (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, 大阪, 2009年10月21日 (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, 東京, 2009年11月18日 (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」, 和光, 2009年12月10日 (招待講演)

廣明秀一, P. horikoshiiのStomatinPH0470のSPFHドメインオリゴマーの特異な熱解離,

JST-CNRS合同「マリーングノム・バイオ分野」セミナー新規ウイルス様膜小胞体の発見と超好熱性古細菌での機能解明に向けて, 筑波研究支援センター, 筑波, 2009/10/30, 招待講演

合田(天野)名都子, 清水佳奈, 桑原陽太, 野口保, 池上貴久, 太田元規, 廣明秀一, NMRによる天然変性タンパク質配列の網羅的検証法, 日本生物物理学会第47回年会, アステイトくしま, 徳島, 2009/10/30-11/1, 一般講演

廣明秀一, 基礎から理解する溶液NMRの最新技術, 第48回NMR討論会-チュートリアルコース, 九州大学馬出病院キャンパスコラポステーションI, 福岡, 2009/11/9, 招待講演

廣明秀一, NMRの原理, 分光学会第45回夏期セミナー, 幕張メッセ国際会議場, 東京, 2009/9/3, 招待講演

桑原陽太, 雲財悟, 永田崇, 池上貴久, 廣明秀一, 熱により不可逆的に解離するPH0470由来のSPFHドメイン多量体, 第9回日本蛋白質科学会年会, 熊本全日空ホテルニュースカイ, 熊本, 2009/5/20-22, ポスター

天野剛志, 合田(天野)名都子, 廣明秀一, LBT/PTD-Dual-Tag蛋白質発現ベクターの開発とPTD配列の細胞内取り込み機構の解析, C R E S T「生命現象」平成21年度中間報告会・終了報告会, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪, 2009/11/24-25, ポスター

藤原芳江, 合田(天野)名都子, 岩谷奈央子, 白川昌宏, 廣明秀一, Innovative Nanoscience of Supramolecular Motor Proteins Working in Biomembranes, 京都大学芝蘭会館, 京都, 2009/9/8-10, ポスター

藤原芳江, 岩谷奈央子, 藤原健一朗, 白川昌宏, 廣明秀一, 核に存在するVCP様タンパク質, NVL2のN末端ドメインの解析, 第56回日本生化学会近畿支部例会, 大阪医科大学, 大阪, 2009/7/11, 一般講演

藤原芳江, 岩谷奈央子, 藤原健一朗, 白川

昌宏, 廣明秀一, 核に存在するVCP様蛋白質 NVL2のN末端ドメインの解析, 第9回日本蛋白質科学会年会, 熊本全日空ホテルニュースカイ, 熊本, 2009/5/20-22, ポスター

藤原芳江, 藤原健一朗, 合田(天野)名都子, 岩谷奈央子, 天野剛志, 白川昌宏, 廣明秀一, 核に存在するVCP様蛋白質, NVL2のN末端ドメインの構造・機能解析, 第2回神戸大学バイオサイエンス・若手研究者交流会, 兵庫, 2010/2, ポスター

合田(天野)名都子, 清水佳奈, 桑原陽太, 天野剛志, 池上貴久, 太田元規, 廣明秀一, PRESAT-vectorを用いた天然変性タンパク質配列の網羅的検証系の確立, 第32回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2009/12/9-12, ポスター

廣明秀一, ドメイン構造から理解するAAA-ATPaseの機能分担, 京都大学低温物質科学研究センター第8回講演会・研究交流会「構造生物学の現状と未来」, 京都大学百年記念講堂, 京都, 2010/3/15, 招待講演

村松慎一: パーキンソン病の再生医学. 第50回日本神経学会総会, 仙台, 2009年5月22日. (プログラム p45)

浅利さやか, 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療のPET解析. 第50回日本神経学会総会, 仙台, 2009年5月22日. (プログラム p121)

Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: "Aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease: results from an open-label, phase I trial", The American society of gene therapy (ASGT)'s 12th annual meeting, San Diego, May 29, 2009.

伊藤哲男, 林司, 古寺美加, 水上浩明, 小澤敬也, 三室淳, 坂田洋一, 村松慎一: 中和抗体法と相関性のある抗 AAV2 抗体検出試薬の開発. 第32回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2009年6月5日. (日本血栓止血学会誌 20(2), p204)

Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I: Phase I trial of AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase for parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 15th annual meeting, Osaka, July 11, 2009.

村松慎一, 一瀬宏: 線条体のドパミン代謝: 新たな視点と治療. 第32回日本神経科学大会, 名古屋, 2009年9月17日. (プログラム p84)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

星美奈子 (2009. 5. 19)

神経細胞死抑制作用を有する薬剤及びそのスクリーニング方法

星美奈子・佐藤道夫・佐藤一紀 (2009. 5. 19)

自己会合型アミロイドβ蛋白質

日本特許第4, 317, 317号

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

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）
分担研究報告書

アミロスフェロイド分子構造解析、標的分子の同定と機能的解析、イメージングに関する研究

研究分担者 星 美奈子 京都大学医学系研究科 特定准教授

研究要旨

アミロスフェロイドは、成熟神経細胞に選択的に結合し、それによって神経細胞死を誘導している。ラット成熟神経細胞を用いて、アミロスフェロイドと結合する標的タンパク質を生化学的に単離し、質量分析により同定することを目指した。その結果、標的分子Xの単離に成功した。今後、機能的解析を進めることで、神経細胞死の分子機構解明が出来ると期待される。

A. 研究目的

本研究ではアミロスフェロイドの立体構造を解明し、神経細胞上にある標的分子へのアミロスフェロイドの結合を阻止することで安全で効果的な新規分子標的治療法の開発に結びつけようとするものである。そのため、倫理面に配慮し、(1) アミロスフェロイド分子構造解析、(2) 標的分子同定と機能解析、(3) アミロスフェロイドのイメージング、を目的とした研究を展開した。

B. 研究方法

(1) アミロスフェロイド分子構造解析

アミロスフェロイド抗体はA β モノマーや既存のA β 集合体をほとんど認識せず、逆に既存のA β 集合体に対する抗体はアミロスフェロイドを認識しない。これは、アミロスフェロイドが特異的な構造を持つことを示唆している。この特異的な分子構造を解明するために(1-1)アミロスフェロイドと抗体の複合体を適切なクロスリンカーを用いて化学的に架橋し安定化させ、次に適切な界面活性剤にて抗体と相互作用している部位以外のA β を除去し、残ったアミロスフェロイドと抗体の複合体を結晶化し構造解析を行う。(1-2)アミロスフェロイド形成に重要な役割を果たすことが明らかになっているアミノ酸残基を局所的に安定同位体ラベル化したA β からアミロスフェロイドを調製しNMRにより構造解析を行う。この2点を試みた。そのために必要なA β を大量に調製し精製する手法を確立する。

(2) 標的分子同定と機能解析

アミロスフェロイドは、成熟神経細胞に選択的に結合し、それによって神経細胞死を誘導している。そこで、ラット成熟神経細胞を用いて、アミロスフェロイドと結合する標的タンパク質を生化学的に単離し、質量分析により同定する。

(3) アミロスフェロイドのイメージング

アルツハイマー病の発症を考える上では、なぜアミロスフェロイドのような構造を持った集合体が形成されてくるのかを解明することは重要である。申請者らは、アミロスフェロイド形成経路を検証するため、蛍光相関分光法理論を基に、定量的かつリアルタイムに集合体形成過程を追跡できる系を構築している。これを用いてアミロスフェロイド形成に重要なアミノ酸残基を明らかにする。この情報を基に適切な安定同位体ラベルを入れNMR解析を行う。

(倫理面への配慮)

【ヒト由来試料の取り扱い】

ヒト由来試料からアミロスフェロイドを調製して用いる場合は、剖検脳を新潟大学脳研究所ないしは鳥取大学医学部より供与を受ける。これについては、既に科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会「機関内倫理審査委員会の在り方に関する報告書」（平成15年3月20日）に従い、各機関内倫理・安全委員会の審査を受け、承認を受けている。実験に際しては、ご遺族の承諾を得てその範囲を守り、連結可能匿名化により個人情報保護した上で、所定の設備の整った実験室にて安全に配慮して行う。

【動物実験】

機能解析は主にラット初代培養神経を用いて行い、個体解析はマウス、必要に応じてサルなどを用いる。総理府告示「動物の処分法に関する指針」（平成7年第40号）に従い、麻酔下で苦痛を与えないよう処置を行う。サル個体を用いる必要が生じた場合、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、内閣府「実験動物の飼育及び

保管に関する基準」、文部科学省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守する。動物実験についても、各機関内の倫理委員会の審査を受け、その規定のもとに実験を実施する。

C. 研究結果

(1) アミロスフェロイド分子構造解析

疎水性アミノ酸残基が連続しているA β 1-42の固相合成は難しいことが知られている。我々は固相合成からその後の切り出し、HPLCによる精製の全てのプロセスを見直し、非常に安定的に大量のA β 1-42を得る手法を確立した。この手法は共同研究者間で共有し常に安定した品質のA β 1-42を出発材料として用いることが出来るようになった。この合成手法を活用してアミロスフェロイド形成に重要な役割を果たすことが明らかになっているアミノ酸残基（(3)より解明）を局所的に安定同位体標識化したA β からアミロスフェロイドを化学的に合成し固相NMRにより部分構造解明を実施した（結果については藤吉博士の報告書を参照）。

(2) 標的分子同定と機能解析

アミロスフェロイドは、成熟神経細胞に濃度依存的に結合し、その結合部位はプレシナプスであることがわかった（Noguchi *et al.* JBC 2009）。そこで、ラット成熟神経細胞を用いて、アミロスフェロイドと結合する標的タンパク質を生化学的に単離し、質量分析により同定した結果、標的分子Xを単離することに成功した。

(3) アミロスフェロイドのイメージング

タンパク質の凝集過程の観測は非常に困難とされるが、初めて形成過程の観測に成功した（Matsumura *et al.* in submission）。これを用いてアミロスフェロイド形成に重要なアミノ酸残基を明らかにすることに成功した（Matsumura *et al.*, in submission）。この情報は安定同位体ラベルを入れたA β 合成に活用した（藤吉博士報告書参照）。

D. 考察

(1) アミロスフェロイド分子構造解析

抗体への反応性の違いからアミロスフェロイドは他のA β 凝集体とは異なることが強く示唆されていた（Noguchi *et al.* JBC 2009）。今回の結果から、構造情報からもアミロスフェロイドはこれまでに報告されていない新規な構造を取っているこ

とが明らかとなった（Gordon Conference, June 09）。今後さらに異なるアミノ酸残基に標識を入れ詳細な構造情報を得る予定である。

(2) 標的分子同定と機能解析

今回の結果、アミロスフェロイド標的分子がプレシナプスにあることを初めて報告した（Noguchi *et al.* JBC 2009）。これは全く新しい神経細胞死のメカニズムであることを意味する。標的分子Xをほぼ同定したので、この機能を解析し制御することで、よりヒトの病気を反映した創薬モデルを開発可能と考えている。モデル動物開発に向けた準備段階として新たなウィルスベクター開発を行った（村松博士報告書参照；Kadkhodaei *et al.*, *J Neurosci*; Fukushima *et al.*, *PLoS One*2009）。

(3) アミロスフェロイドのイメージング

診断並びに治療効果の検定には、非侵襲的画像診断法が非常に重要である。今回、アミロスフェロイド並びに線維の形成をリアルタイムに定量可能な手法を構築した。これは、新たな非侵襲的画像診断法の開拓基盤となる。

E. 結論

上記のとおり、初年度の研究は予定通り順調に進めることが出来た。アルツハイマー病の初期段階モデルにあたる齧歯類疾患モデルを基に開発された複数の薬剤が、いずれも患者に対する臨床試験で成果を上げられていない現状では、ヒト脳における神経細胞死のメカニズムの解明こそが、根本的治療法構築への道筋を立てるために必要である。従って、本研究で、アミロスフェロイドないしはその標的分子の構造を解明することで、原因物質と神経細胞上の標的分子の相互作用を阻止するあるいは原因物質の形成を抑制することによる新たな、そして安全な分子標的医療を可能にする。これにより全く新しい切り口の診断と治療方法を開発する基盤を産業界に提供できるのではないかと考えている。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表

Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M.M., and Teplow, D.B. (2009)

Amyloid β -protein assembly and Alzheimer disease
J. Biol. Chem. 284, 4749-4753

Noguchi, A., Matsumura, S., Dezawa, M., Tada, M., Yanazawa, M., Ito, A., Akioka, M., Kikuchi, S., Sato, M., Ideno, S., Noda, M., Fukunari, A., Muramatsu, S., Itokazu, Y., Sato, K., Takahashi, H., Teplow, D.B., Nabeshima, Y., Kakita, A., Imahori, K., and *Hoshi, M. (2009)

Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high-mass amyloid β -protein ($A\beta$) assembly from Alzheimer's disease brains

J. Biol. Chem. 284, 32895-32905

Kitamura, Y., Yanazawa, M., Sato, M., Ito, A., and Hoshi, M.M. (2009)

Identification of amylospheroid-binding proteins from mature neurons as a molecular target of neurotoxicity induced by nonfibrillar $A\beta$ assemblies

Alzheimer's and Dementia 5, S1, 222-223

2. 学会発表

Hoshi, M. (2009年10月30日)

High-mass amyloid beta-protein assembly with a unique toxic surface from Alzheimer's disease brains
The 47th Annual Meeting of the Biophysiological Society of Japan

BSJ&ABA Joint International Symposium
"Prion and Virus Infections", organized by Drs. Nagayama, Sokabe and Kataoka
Tokushima
(シンポジウム・招待講演)

星美奈子 (2009年3月)

アミロスフェロイド: Alzheimer 病の病態解明と臨床応用を目指して
三菱化学生命科学研究所公開シンポジウム
東京
(招待講演)

松村聡子・山田真由美・篠田恵子・菊地和也・横島智・中村振一郎・金城政孝・星美奈子 (2009年3月)

FCSを用いた集合体形成過程の定量的解析手法の構築

シンポジウム: 蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達 (6)

独立行政法人理化学研究所
和光
(招待講演)

松村聡子・山田真由美・篠田恵子・菊地和也・横島智・中村振一郎・金城政孝・星美奈子 (2009年8月12日)

FCSを用いた集合体形成過程の定量的解析手法の構築

特定領域「分子脳科学」班会議
札幌

Identification of amylospheroid-binding proteins from mature neurons as a molecular target of neurotoxicity induced by nonfibrillar $A\beta$ assemblies

Y. Kitamura, M. Yanazawa, M. Sato, A. Ito, M. Hoshi
ICAD 2009
2009.7.12
Vienna

Isolation and characterization of high-mass amyloid beta-protein assembly with a unique toxic surface from Alzheimer's disease brains

第32回日本分子生物学会年会日本分子生物学会
2009年12月9日(水) 横浜
M. Hoshi, Y. Matsumoto, Y. Nabeshima

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

星美奈子 (2009.5.19)
神経細胞死抑制作用を有する薬剤及びそのスクリーニング方法
日本特許第4, 317, 310号

星美奈子・佐藤道夫・佐藤一紀 (2009.5.19)
自己会合型アミロイド β 蛋白質
日本特許第4, 317, 317号

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）
分担研究報告書

構造解析・局在解析・高分解能光学顕微鏡観察に関する研究

研究分担者 藤吉 好則 京都大学大学院理学研究科 教授

研究要旨

タンパク質の生理的機能は立体構造に依存し、構造異常は機能異常に繋がる。アルツハイマー病などの神経変性疾患の本態は、タンパク質が集合し構造異常を起こし、異常機能を獲得した結果である。しかし、これらの疾患を構造生物学的に解明する試みはほとんどされていない。本研究ではアミロスフェロイドの立体構造を解明し、神経細胞上にある標的分子へのアミロスフェロイドの結合を阻止することで安全で効果的な新規分子標的治療法の開発に結びつけようとするものである。そのため、アミロスフェロイド分子構造解析、を目的とした研究を展開した。その結果、安定同位体で標識したA β 1-42を用いた固相NMRによりアミロスフェロイド立体構造の一部解明に成功し、今まで報告されたことがない新規な立体構造であることを構造情報からも確認した。

A. 研究目的

タンパク質の生理的機能は立体構造に依存し、構造異常は機能異常に繋がる。アルツハイマー病などの神経変性疾患の本態は、タンパク質が集合し構造異常を起こし、異常機能を獲得した結果である。しかし、これらの疾患を構造生物学的に解明する試みはほとんどされていない。本研究ではアミロスフェロイドの立体構造を解明し、神経細胞上にある標的分子へのアミロスフェロイドの結合を阻止することで安全で効果的な新規分子標的治療法の開発に結びつけようとするものである。そのため、アミロスフェロイド分子構造解析、を目的とした研究を展開した。

B. 研究方法

アミロスフェロイド抗体はA β モノマーや既存のA β 集合体をほとんど認識せず、逆に既存のA β 集合体に対する抗体はアミロスフェロイドを認識しない。これは、アミロスフェロイドが特異的な構造を持つことを示唆している。このユニークな分子構造を解明するために(1-1)アミロスフェロイドと抗体の複合体を適切なクロスリンカーを用いて化学的に架橋し安定化させ、次に適切な界面活性剤にて抗体と相互作用している部位以外のA β を除去し、残ったアミロスフェロイドと抗体の複合体を結晶化し構造解析を行う。(1-2)アミロスフェロイド形成に重要な役割を果たすことが明らかになっているアミノ酸残基を局所的に安定同位体ラベル化したA β からアミロスフェロイドを調製しNMRにより構造解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトに対する研究を含まず、倫理面への配慮には該当しない。

C. 研究結果

当初、アミロスフェロイドと抗体の複合体を適切なクロスリンカーを用いて化学的に架橋し安定化させる予定であったが、化学的架橋剤によりアミロスフェロイドの構造が破壊されることがわかった。そのため、項目(3)より明らかとなったアミロスフェロイド形成に関与すると考えられるアミノ酸残基を安定同位体で標識したA β 1-42を化学合成し、固相及び溶液NMRにより構造の解明を目指すこととした(溶液NMRの結果は廣明博士の報告書を参照のこと)。

安定同位体で標識したA β 1-42を用いた固相NMRによりアミロスフェロイド立体構造の一部解明に成功し、今まで報告されたことがない新規な立体構造であることを構造情報からも確認した

(Gordon Conference; June 09:イリノイ大との共同研究)。

D. 考察

これにより構造情報からもアミロスフェロイドはこれまでに報告されていない新規な構造を取っていることが明らかとなりつつある(Gordon Conference, June 09)。同様の結果は溶液NMRの結果からも得られつつあり、今後さらに異なるアミノ酸残基に標識を入れ詳細な構造情報を得る予

定である。

E. 結論

安定同位体で標識したAβ1-42の効率的合成法を確立し固相NMRによりASPD立体構造の一部解明に成功し、今まで報告されることがない新規な立体構造であることを構造情報からも確認した

(Gordon Conference; June 09:イリノイ大との共同研究)。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表

K. Noma, K. Kimura, K. Minatohara, H. Nakashima, Y. Nagao, A. Mizoguchi and Y. Fujiyoshi; Triple N-Glycosylation in the Long S5-P Loop Regulates the Activation and Trafficking of the Kv12.2 Potassium Channel. *J. Biol. Chem.*, **28.**, 33139-33150 (2009).

A. Inutsuka, M. Goda and Y. Fujiyoshi; Calyculin A-induced neurite retraction is critically dependent on actomyosin activation but not on polymerization state of microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 1160-1166 (2009).

K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi; Structural and functional characterization of H⁺,K⁺-ATPase with bound fluorinated phosphate analogs. *J. Struct. Biol.*, **170**, 60-68 (2010).

K. Irie, K. Kitagawa, H. Nagura, T. Imai, T. Shimomura and Y. Fujiyoshi; Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels. *J. Biol. Chem.*, **285**, 3685-3694 (2010).

2. 学会発表

Y. Fujiyoshi; Structural physiology of

multifunctional channels (Special Lecture), IUPS2009, Kyoto, July 30, 2009

Y. Fujiyoshi; Recent advancements in structural analysis of AQP4 water channels and Cx26 gap junction channels, CMBN guest lecture, Oslo, September 24, 2009

Y. Fujiyoshi; Structural physiology based on electron crystallography (Plenary Lecture), AsCA' 09, Beijing, October 25, 2009

藤吉好則; 脳の代表的水チャネル: アクアポリン-4の構造と機能, 第39回慶應ニューロサイエンス研究会, 東京, 2009年10月31日

藤吉好則; 多機能性チャネルの構造生理学, 第14回ハイテク・リサーチセンター研究発表会, 神奈川, 2009年11月17日

Y. Fujiyoshi; Structural and functional study of membrane proteins by Cryo-electron microscopy, JEOL/CURIE institute Meeting, Orsay, November 25, 2009

Y. Fujiyoshi; Structural Physiology Based on Electron Crystallography, International Symposium Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University, Nagoya, March 12, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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）
分担研究報告書

アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導機構に関する研究

研究分担者 鍋島 陽一 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

アルツハイマー病の原因は、脳内に β アミロイド(A β)が蓄積し、神経シナプスを侵し、最終的に細胞が脱落するからとされる。患者脳内から単離されたA β 集合体の1つ、アミロスフェロイドは、極めて強い神経細胞死活性を持つ。本研究において、アミロスフェロイドによる神経細胞死の誘導に關与すると期待される、アミロスフェロイド標的タンパク質を同定した。また、アミロスフェロイドの形成が促進するモデルマウスの構築に向けて、探索および検討を行った。

A. 研究目的

アルツハイマー病においてA β の集合体による神経細胞死の誘導は、A β 集合体の立体構造が重要と考えられている。アミロスフェロイドにおいても、アミロスフェロイドが特徴的な構造を持っていることから、その立体構造が神経細胞死活性に非常に重要であると考えられる。神経細胞死を誘導する候補分子として、神経細胞死を誘導する条件においてアミロスフェロイド特異的に結合する標的分子を同定することが本研究の1つ目の目的である。また、げっ歯類においてはアミロスフェロイドの形成が起こりにくいため、げっ歯類を用いた解析を行いにくかった。そこで、アミロスフェロイドの形成が促進したモデルマウスの構築が2つ目の目的である。

B. 研究方法

アミロスフェロイド特異的かつ神経細胞死が誘導される成熟神経細胞選択的に、アミロスフェロイドに結合する標的分子の同定を行った。具体的には、成熟神経細胞において、アミロスフェロイドに結合する分子を、ファーウェスタン法により、および、ビオチン化アミロスフェロイドを用いた結合相手の沈降により探索し、未成熟神経細胞や単量体Ab等の条件下では結合しない分子を同定した。同定された結合分子を質量分析により特定した。

アミロスフェロイドの形成が促進したモデルマウスの構築は、アルツハイマー病モデルマウスの中からアミロスフェロイドの形成が促進しているマウスの探索およびアミロスフェロイドの形成が促進すると期待されるトランスジェニックマウスの作成により行う。後者について具体的

には、アミロスフェロイドは、ある特定の構造を持つ分子との相互作用により形成が促進されることが分かっているので、その特定の構造を持つ分子を脳内に発現するトランスジェニックマウスを作成する。

C. 研究結果

アミロスフェロイドに結合し、神経細胞死の誘導に關与すると期待される標的分子として、どの方法においても、1つの分子（知的財産の関係で具体的な名称は表記できない）が特定された。

アミロスフェロイドの形成が促進されたモデルマウスの構築については、一部のアルツハイマー病モデルマウスは入手済みである。トランスジェニックマウスの作成の方については、組み込むベクターに用いるプロモーターの検討、導入タンパク質とマーカーの発現の検討を行った。

D. 考察

今回、アミロスフェロイドに結合し、神経細胞死を誘導すると考えられる候補標的分子として、複数の方法において1つの分子を特定することができた。今後、その分子の神経細胞死への関与について、その分子をshRNAにより発現抑制する等して確定し、アミロスフェロイドによる神経細胞死の誘導機構を解明してゆく。

アミロスフェロイド形成促進マウスの構築については、アルツハイマー病モデルマウスからの探索およびトランスジェニックマウスの作成に向けたベクターの構築を引き続き行っていく。

E. 結論

アミロスフェロイドによる神経細胞死の誘導機

構解明に向け、細胞死が起こる成熟神経細胞選択的に、アミロスフェロイドに特異的に結合する分子の単離を試み、条件に合致する分子を実際に特定することができた。

F. 健康危険情報
総括研究報告書を参照

G. 研究発表
なし

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）
分担研究報告書

ペプチド化学修飾による蛋白質デリバリー法に関する研究

研究分担者 菊地和也 大阪大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

アルツハイマー病の発症に関わる分子を検出する分子を開発する上で、中枢神経系へのデリバリー技術は不可欠である。本研究では、血液脳関門を通過し中枢神経に導入されることの知られている狂犬病ウイルス糖蛋白質由来RVGペプチドを用いた蛋白質デリバリー法の開発を行った。まず、緑色蛍光蛋白質EGFPを用いて化学修飾法を確立し、遺伝子発現用ベクターであるAAVのRVGペプチドによる修飾を行った。さらに、RVG修飾AAVを脳内へ送達し、中枢神経においてAAVの遺伝子を発現させることに成功した。

A. 研究目的

アルツハイマー病の原因分子を検出する分子の開発は、発症メカニズムを解明する上で極めて重要であると同時に、疾患の初期診断や治療のうえで有用である。また、遺伝子発現ベクターを中枢神経系へ導入し、特定の遺伝子を発現させることにより、疾患の原因分子を解明するアプローチは、今後益々重要になると考えられる。

中枢神経への遺伝子発現ベクターの導入の研究は、これまでに多くなされているが、血管内投与後、血液脳関門を通過し、安全かつ効率的に中枢神経細胞内で遺伝子発現させることのできる実用的なベクターは、報告されていない。現在報告されているウイルスベクターの多くは、毒性・安全性・効率の点で問題があることが知られている。これに対し、アデノ随伴ウイルスAAVは、非病原性であり安全性が高く、非分裂細胞である神経細胞へ効率的に導入させることができることから、中枢神経系の機能の解明や神経難病の遺伝子治療のためのベクターとしての応用が期待されている。これまでに、AAVベクターのうち、AAV9は血液脳関門を透過し、グリア細胞にて遺伝子発現することが報告されている。一方、新生児マウスではAAV9により脊髄神経細胞へ導入例はあるものの、AAVベクターを成体動物の血管内に投与し、血液脳関門を通過させ神経細胞に高効率に導入することに成功した例は未だ報告されていない。このため、AAVベクターを中枢神経に効率よく導入するには、直接脳内にベクターを注入する必要があるため、侵襲性の高さが問題となっている。

そこで、末梢からベクターを中枢神経系へ送達する技術を開発するうえで、血液脳関門を通過し、

神経細胞に特異的に導入されることが知られているRabies virus糖蛋白質由来RVGペプチドに着目した。本研究では、このRVGペプチドでAAVのカプシドを化学修飾することにより、中枢神経系へ送達可能な機能性ベクターの開発を行った。

B. 研究方法

まず、モデル蛋白質を緑色蛍光蛋白質EGFPとして、RVGペプチドによる修飾および、神経細胞への導入に関して検討した。RVGペプチドをFmoc固相法にて合成し、アルデヒド基と結合するアミノオキシ基をペプチド末端につないだ。また、Succinimidyl *p*-folmylbenzoate (SFB)とEGFP表面のLys残基及びN末端アミノ基を反応させることにより、アルデヒド基を蛋白質表面に提示した。その後、ペプチドとEGFPを反応させ、SDS-PAGEを行い修飾反応の確認を行った。次に、RVG修飾EGFPを種々の培養細胞（マウス神経芽細胞腫由来細胞Neuro2a、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞CHO-K1、ヒト胎児腎由来細胞HEK293T、ヒト子宮頸癌由来細胞HeLa-S3）に添加し、細胞に対する導入選択性を検討した。

AAVの化学修飾に関しても同様の操作を行った。用いるAAVをAAV9とし、その発現遺伝子を緑色蛍光蛋白質の一種であるAcGFPとした。まず、AAVをSFBで修飾後、RVGペプチドと反応させ、ウェスタンブロットにより修飾反応を確認した。修飾AAVを培養細胞に添加し、細胞に対する感染能が維持されているかを検討した。最後に、RVG修飾AAVもしくは非修飾AAVをマウスの心腔内に投与し、マウスの脳内の神経細胞において、AAVのコードするAcGFPが発現するかどうかを確認した。

(倫理面への配慮)

動物個体での実験手法は、他の研究分担者である村松（自治医科大学）との共同研究で行っており、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、総理府「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、文部省通知「大学等における動物実験について」を遵守し、自治医科大学のガイドラインに従って行っている。

C. 研究結果

EGFPをRVGペプチドで修飾し、SDS-PAGEで確認したところ、修飾反応を示す蛍光バンドが観測された。修飾されたペプチド当量数は、EGFP1分子あたり1～3であった。1分子以上修飾されたEGFPの割合は、蛍光バンドの強度から見積もったところ、全体のEGFPの67%であった。マウス神経芽細胞腫由来細胞Neuro2aを含む4種類の培養細胞にRVG修飾EGFPと非修飾EGFPを添加したところ、RVG修飾EGFPを添加したNeuro2aからのみ蛍光が観測された。

次に、AAV9とRVGペプチドの修飾反応を行い、ウェスタンブロットにより、修飾反応を確認したところ、カプシドを構成する三種類のサブユニットのうち、VP1とVP2では1分子、VP3では1～2分子のRVGペプチド修飾が確認された。バンド強度比から修飾AAVの割合は、39%であった。この修飾AAVを培養細胞に感染させたところ、AcEGFPの蛍光が確認された。さらに、修飾・非修飾AAVをそれぞれマウス心腔内に投与した後、脳内におけるAcEGFPの発現を確認したところ、RVG修飾AAVの場合は、神経細胞に選択的にAcEGFPの発現が確認された。これに対し、非修飾AAVの場合は、非神経細胞であるグリア細胞に対し優先的にAcEGFPの発現が確認された。

D. 考察

RVG修飾EGFPをNeuro2aに添加した場合、蛍光が細胞から観測され、非修飾EGFPの場合は、蛍光が観測されなかったことから、RVG修飾の結果、Neuro2aに対する細胞導入が可能になったと考えられる。また、その他の非神経細胞からは、蛍光が観測されなかったことから、RVG修飾により神経由来細胞への選択的な導入ができたと考えられる。

RVG修飾AAVに関して、培養細胞において、コードした遺伝子であるAcGFPの発現が確認されたことから、修飾反応後も細胞感染能・遺伝子発現能を維持していることが明らかとなった。また、マウス投与実験の結果から、RVG修飾AAVは、末梢から中枢神経系への導入が可能であることが示され

た。修飾AAVは、神経細胞において選択的に遺伝子発現し、非修飾AAVでは、非神経細胞で選択的に遺伝子発現したことから、RVG修飾により、中枢神経系での感染細胞に選択性が生じたと考えられる。

E. 結論

RVG修飾により、蛋白質導入の中枢神経細胞選択性が確認されたことから、本技術は、中枢神経への蛋白質デリバリーのための極めて強力な手法である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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**, 3641-3543 (2009)
- 3) Mizukami, S., Watanabe, S., Kikuchi, K. Development of ratiometric fluorescent probes for phosphatases by using a pK_a switching mechanism. *Chembiochem* **48**, 1465-1468 (2009)
- 4) 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)
- 5) Kikuchi, K., Hashimoto, S., Mizukami, S., Nagano, T. Anion sensor-based ratiometric peptide probe for protein kinase activity. *Org. Lett.* **11**, 2732-2735 (2009)
- 6) Mizukami, S., Okada, S., Kimura, S., Kikuchi, K. Design and synthesis of coumarin-based Zn^{2+} probes for ratiometric fluorescence imaging. *Inorg. Chem.* **48**, 7630-7638 (2009)
- 7) 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, 16610-16111 (2009)

8) Hori, Y., Egashira, Y., Kamiura, R., Kikuchi, K.

Noncovalent-Interaction-Promoted Ligation for Protein Labeling. *ChemBiochem* 11, 646-648 (2010)

2. 学会発表

1) Kikuchi, K. Development of Imaging Probes with Tunable Switches for Biological Applications. The 238th ACS National Meeting, Washington, DC, USA, 2009年8月19日 (招待講演)

2) Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in Vivo* Imaging. The 13th Asian Chemical Congress, Shanghai, China, 2009年9月15日 (招待講演)

3) Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in Vivo* Imaging. International Symposium on Molecular Sensing and Fluorescent Imaging Dalian, China, 2009年9月18日～20日 (招待講演)

4) Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in Vivo* Imaging. 2nd Asian Conference on Coordination Chemistry, Nanjing, China, 2009年11月1日 (招待講演)

5) Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in Vivo* Imaging. Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (SABIC-2009) Mumbai, India, 2009年11月6日 (招待講演)

6) 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, 東京, 2009年7月2日～3日 (招待講演)

7) 菊地 和也, 光で視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, 岡山, 2009年9月5日 (招待講演)

8) 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, 横浜, 2009年10月2日 (招待講演)

9) 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, 大阪, 2009年10月21日 (招待講演)

10) 菊地 和也, 物理化学原理に基づくプラズマモニクスの高感度分子イメージングへの応用, 大阪大学フォトニクス先端融合研究センター第3回シンポジウム, 東京, 2009年11月18日 (招待講演)

11) 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」, 和光, 2009年12月10日 (招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

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

該当なし