

201011013A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 星 美奈子

平成23（2011）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. 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	----- 12
鍋島 陽一	
3. 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	----- 13
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	----- 16
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	----- 19
村松 慎一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

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 (ASPD) の立体構造を解明し、神経細胞上にある標的分子へのASPD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、ASPD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、安定同位体標識Aβ1-40の調製法を確立し、¹⁵N標識ASPDの溶液NMR測定に成功し、ASPDの表面のアミノ酸配列と球状コアの配列とを解明した(Hiroaki et al., ICMRBS2010)。昨年の固相NMRの結果と併せ、ASPDは他のAβ凝集体とは異なる特異的な立体構造を持つことを示した。この特異的立体構造に結合するペプチドを探索し、特徴的な配列を持つペプチドを得た(廣明・井上・星、未発表データ、知財準備中)。このペプチドによりASPD形成を阻止出来る可能性が示され、「構造情報に基づく分子標的薬剤の設計」に直結する成果を得ることが出来た。

目標(2)については、ASPD標的分子の候補として、成熟神経細胞に特異的に発現するシナプスタンパク質を同定した。この新規標的分子は、成熟神経細胞の生存と機能に極めて重要な役割を果たしていると考えられ、ASPDによりその機能が阻害され細胞死が起きていることが示唆された(大西・井上・星、未発表データ)。この新規標的分子の機能の解明により、成熟神経細胞に起こる死の分子機構が解明出来ると期待される。ヒトの病態をより反映した創薬モデル開発を目指して、神経細胞特異的プロモーターによりSweden型変異を持つアミロイド前駆体蛋白質を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製し、定位脳手術によりカニクイサル(海馬)に投与し、18か月後に投与側の海馬に抗ASPD抗体で陽性となる老人斑の形成を認め、ASPDを形成するモデル動物の作製に成功した。

目標(3)については、プローブの血液脳関門(BBB)透過性が脳のイメージングでは大きな問題となるため、BBB透過能をもつ狂犬病ウイルス糖タンパク質由来ペプチドRVGを化学修飾することにより、血管内投与により上記AAVをマウス脳内中枢神経へ導入することに成功した(堀・村松・菊地、未発表データ)。RVGペプチドに加え、種々のその他のペプチドに神経細胞導入効果があることを見出した。この取り組みにより、治療効果のある抗ASPD抗体あるいはペプチドを神経細胞内で発現することが可能となり、本研究の目的とする構造情報から新たな治療法及び診断方法を開発出来ることが期待出来る。上記のとおり、目標に向けて研究は順調に進行しており、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

鍋島陽一	京都大学大学院医学研究科	名誉教授
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	特命教授
村松慎一	自治医科大学医学部	特命教授

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(Aβ)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Aβ集合体は単離されても、

今まで神経細胞死を起こすAβ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、Aβ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(ASPD)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、ASPD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、ASPD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、廣明秀一博士(神戸大学)によるNMR解析、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ASPDを供給し、自らはASPD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・星)

抗ASPD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ASPDを認識しない。これは、ASPD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)ASPD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(3-1より解明)を局所的に安定同位体標識化したA β からASPD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(Gordon Conference, June 09; イリノイ大Prof. Ishiiとの共同研究)。当初、ASPD

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ASPD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。(1-2)より完全な情報を得るためには溶液NMRでの構造解析は必須である。そこで、神戸大において大腸菌の系を活用し安定同位体標識化したA β を大量に得る方法を開発した。今年度はこの標識A β からASPDを調製しNMRにより溶液における詳細な構造解析を行った。

目標2 標的分子同定と機能解析(星・鍋島・村松・廣明)

ASPD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試みた。また、機能解析を実施した。

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ASPD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、ASPD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(3-1)ASPD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 press)。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。(3-2)今年度は、ASPDの分子構造情報に基づき、ナノセンサ分子を設計する。集合体形成の観測系を使い、抗体とASPDの相互作用を阻止する低分子を探索する。開発したナノセンサ分子を脳内移行させるための技術は大阪大で3-1で開発した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活用する。(3-3)この分子、ないしは抗ASPD抗体そのものをMRIプローブ化することで脳内でのASPD検出の可能性を探る。

(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ASPD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の上で、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)。当初、ASPD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ASPD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。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ASPD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、ASPDの表面のアミノ酸配列と球状コアの配列とを解明した(Hiroaki et al., ICMRBS2010)。

昨年の固相NMRの結果と併せ、ASPDは他のA β 凝集体とは異なる特異的な立体構造を持つことを示した。この特異的な立体構造に結合するペプチドを探索し、特徴的な配列を持つペプチドを得た(廣明・井上・星、未発表データ、知財準備中)。このペプチドによりASPD形成を阻止出来る可能性が示され、「構造情報に基づく分子標的薬剤の設計」に直結する成果を得ることが出来た。

(2) 標的分子同定と機能解析

ASPD標的分子の候補として、成熟神経細胞に特異的に発現するシナプスタンパク質を同定した。この新規標的分子は、成熟神経細胞の生存と機能に極めて重要な役割を果たしていると考えられ、ASPDによりその機能が障害され細胞死が起きていることが示唆された(大西・井上・星、未発表データ)。この新規標的分子の機能の解明により、成熟神経細胞に起こる死の分子機構が解明出来ると期待される。ヒトの病態をより反映した創薬モデル開発を目指して、神経細胞特異的プロモーターによりSweden型変異を持つアミロイド前駆体蛋白質を発現するアデノ随伴ウイルス

(AAV)ベクターを作製し、定位脳手術によりマウス及びカニクイサルの海馬に投与し、18か月後に投与側の海馬に抗ASPD抗体で陽性となる老人斑の形成を認め、ASPDを形成するモデル動物の作製に成功した。

(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 press)。その結果、シナプス毒性を持つ2量体や12量体や、より大きな凝集体である線維などは、全て2量体から凝集が開始するが、ASPDは3量体から形成させることがわかり、凝集の経路がかなり初期から異なることが示された。これをもとに、抗ASPD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、マウス投与実験により、RVG修飾AAVは、血管内投与によりマウス脳内中枢神経へ導入出来ることを示した(堀・村松・菊地、未発表データ)。RVGペプチドに加え、種々のその他のペプチドに神経細胞導入効果があることを見出した。この取り組みにより、治療効果のある抗ASPD抗体あるいはペプチドを神経細胞内で発現することが可能となり、本研究の目的とする構造情報から新たな治療法及び診断方法を開発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

固相NMRおよび溶液NMRによりASPD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 β (1-40)のN末端およそ10残基と、分子中央の一部はASPD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、特異的な立体構造を取っているため、ASPDが高い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いる。今年度、調製方法を確立した、¹³C標識を施したA β (1-40)由来またはA β (1-42)からASPDを順次調製し、NMR観測を行うことでASPDの構造についての理解が深まることが期待出来る。これにより、目的とする構造情報に基づいて分子標的治療薬の基盤が出来ると考えられる。

(2) 標的分子同定と機能解析

今年度の研究により、ASPD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マウスの開発を実施した。この新規標的分子は、成熟神経細胞の生存と機能に極めて重要な役割を果たしていると考えられ、その機能の解明により、成熟神経細胞に起こる死の分子機構が解明出来ると期待される。

(3) アミロスフェロイドのイメージング

凝集過程の観測から、ASPD形成はかなり初期から他の凝集体とは異なることが示された。従って、ASPD形成だけを選択的に抑制することも可能であると考えられた。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、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。今年度の成果より、ASPDないしはその標的分子を標的とすることで、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が可能になる手掛かりが得られた。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

Matsumura, S., Shinoda, K., Yamada, M., Yokojima, S., Inoue, M., Ohnishi, T., Shimada, T., Kikuchi, K., Masui, D., Hashimoto, S., Sato, M., Ito, A., Akioka, M., Takagi, S., Nakamura, Y., Nemoto, K., Hasegawa, Y., Takamoto, H., Inoue, H., Nakamura, S., Nabeshima, Y., Teplow, D.B., Kinjo, M., and Hoshi, M. (2011) **Two distinct amyloid β -PROTEIN (A β) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology and toxicity analyses** *J. Biol. Chem. In press*

Okada, S., Mizukami, S., Kikuchi, K. Application of Stimuli-Responsive Polymer for Development of Novel MRI Probes. *ChemBioChem*. 11, 785-787 (2010)

Watanabe, S., Mizukami, S., Hori, Y., Kikuchi, K. Multicolor Protein Labeling in Living Cells Using Mutant β -Lactamase-tag Technology. *Bioconjugate Chem*. 21, 2320-2326 (2010)

Sadhu, K.K., Mizukami, S., Watanabe, S., Kikuchi, K. Turn-on Fluorescence Switch Involving Aggregation and Elimination Processes for β -Lactamase-Tag, *Chem. Commun.*, 46, 7403-7405 (2010)

Mizukami, S., Hosoda, M., Satake, T., Okada, S., Hori, Y., Furuta, T., Kikuchi, K. Photocontrolled Compound Release System Using Caged Antimicrobial Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9524-9525 (2010)

Yoshimura, A., Mizukami, S., Hori, Y., Watanabe, S., Kikuchi, K. Cell Surface Protein Labeling with Luminescent Nanoparticles via Biotinylation Using Mutant β -Lactamase-tag Technology. *ChemBioChem*. 12,

1031-1034 (2011)

Sadhu, K.K., Mizukami, S., Watanabe, S., Kikuchi, K. Sequential Ordering Among Multicolor Fluorophores for Protein Labeling Facility via Aggregation-elimination Based β -Lactam Probes. *Mol. BioSyst.* 7, 1766-1772 (2011)

Mizukami, S., Matsushita, H., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., Kikuchi, K. ^{19}F MRI Detection of β -Galactosidase Activity for Imaging of Gene Expression. *Chem. Sci.* 2, in press (2011)

Umetsu, Y., Taniguchi, R., Satomura, R., Goda, N., Ikegami, T., Furuse, M., Hiroaki, H. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignment of the first PDZ domain of mouse ZO-1. *Bio mol. NMR Assign.* in press (2011)

Umetsu, Y., Tenno, T., Goda, N., Shirakawa, M., Ikegami, T., and Hiroaki, H. Structural difference of vasoactive intestinal peptide (VIP) in two distinct membrane mimicking conditions. *BBA-Proteins Proteomics* 1814, 724-730, (2011)

Motono, C., Nakata, J., Koike, R., Shimizu, K., Shirota, M., Amemiya, T., Tomii, K., Nagano, N., Sakaya, N., Misoo, K., Sato, M., Kidera, A., Hiroaki, H., Shirai, T., Kinoshita, K., Noguchi, T., Ota, M. S AHG, a comprehensive database of predicted structures of all human proteins. *Nucleic Acids Res.* 39(suppl 1), D487-D493, (2010)

Iwaya, N., Kuwahara, Y., Fujiwara, Y., Goda, N., Tenno, T., Akiyama, K., Mase, S., Tochio, H., Ikegami, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. A common substrate recognition mode conserved between katanin p60 and VPS4 governs microtubule severing and membrane skeleton reorganization. *J Biol. Chem.* 285, 16822-16829 (2010)

Jee, J., Mizuno, T., Kamada, K., Tochio, H., Chiba, Y., Yanagi, K., Yasuda, G., Hiroaki, H., Hanaoka, F., Shirakawa, M. Structure and mutagenesis studies of the C-terminal region of licensing factor Cdt1 enable the identification of key residues for binding to replicative helicase Mcm protein. *J Biol. Chem.* 285, 15931-15940. (2010)

Krzyżosiak A, Szyszka-Niagolov M, Wietrzych M, Gobaille S, Muramatsu S, Krężel W. Retinoid X receptor gamma control of motivated behaviours involves dopaminergic signalling in mice. *Neuron*, 66 (6):908-920, 2010.

Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*, 18(9):1731-1735, 2010.

Muramatsu S, Asari S, Fujimoto K, Ozawa K, Nakano I: Gene therapy for Parkinson's disease. Strategies for the local production of dopamine. *Gene Therapy & Regulation* 5(1):57-65, 2010.

Muramatsu S: The current status of gene therapy for Parkinson's disease, *Ann Neurosci*, 17(2):92-95, 2010.

2. 学会発表

星美奈子 (2010年11月9日)

アルツハイマー病の治療を目指した新規治療法の開発

平成22年度第二回産学情報交流会

京都大学医学領域産学連携推進機構/(社)芝蘭会 (招待講演)

星美奈子 (2010年12月22日)

原因物質を標的にした新たなアルツハイマー病治療法の開発

鍋島陽一先生紫綬褒章受章記念講演会

神戸 (招待講演)

星美奈子 (2011年1月28日)

原因物質を標的にした新たなアルツハイマー病治療法の開発

新潟脳神経研究会特別例会

新潟 (招待講演)

篠田 恵子・横島 智・井上雅文・菊地 和也・

中村 振一郎・金城 政孝・鍋島陽一・星美奈子・(2011年12月9日) FCSを用いたタンパク質凝集過程の定量的解析手法の構築

第32回日本分子生物学会年会 神戸

M. Hoshi, M. Dezawa, S. Muramatsu, Y. Nabeshima, D.B. Teplow, A. Kakita; High-mass amyloid beta-protein assembly with a unique toxic surface from Alzheimer's disease brains;

2010 November, San Diego; Society for Neuroscience 2010

Minako M. Hoshi, Takayuki Ohnishi, Masafumi Inoue, Hidekazu Hiroaki, Yo-ichi Nabeshima, Akiyoshi Kakita: Mechanism of mature neuron-specific toxicity induced by high-mass amyloid β -protein assembly with a unique toxic surface
The 10th international conference on Alzheimer's and Parkinson Diseases
Barcelona, Spain, March 9-13, 2011

Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. *The First Asian Chemical Biology Conference (ACBC)*, Seoul, Korea, 2010年6月25日～27日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. *Symposium for "Chemistry at the Frontiers of Biology and Physics"*, Strasbourg, France, 2010年7月1日～3日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. EMBL Conference Series - Chemical Biology 2010, Heidelberg, Germany, 2010年9月22日～25日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design and Synthesis of Coumarin-based Zn^{2+} Probes for Ratiometric Fluorescence Imaging. The Fujihara Foundation of Science, The 60th Fujihara seminar "Zinc signaling and cellular functions", Osaka, Japan, 2010年10月29日～31日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. The CSI-IFReC Joint Symposium in Immunology, Hangzhou, China, 2010年11月2日～5日 (招待講演)

菊地和也, Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches, BMB2010, 神戸市, 2010年12月7日～10日 (招待講演)

Kikuchi, K. Chemical Probes for *in Vivo* Molecular Imaging. *Pacificchem 2010*, Honolulu, HI, USA, 2010年12月15日～20日 (招待講演)

Kikuchi, K. Development of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches, Which Convert Biological Signals to MRI Contrast Enhancement and Optical Readout. *Sweden-Japan Joint Colloquium, "Direct imaging in Bio/Medical science"*, Lund, Sweden, 2011年1月18日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of Molecular Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. Catalysis and Sensing for Health University of Bath, Bath, UK, 2011年1月31日～2月2日 (招待講演)

廣明秀一, 里村香織, 合田 (天野) 名都子, 間瀬省吾, 池上貴久, 古瀬幹夫, 細胞接着装置タイトジャンクションを制御する化合物探索の試み, 日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス, 横浜, 2010/5/18-19, ポスター

廣明秀一, 藤原芳江, 岩谷奈央子, 合田 (天野) 名都子, 池上貴久, 白川昌宏, メイン構造に基づいたAAA-ATPaseの分類と機能メカニズムの予測, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

本野千恵, 中田淳一, 清水佳奈, 富井健太郎, 長野希美, 野口保, 廣明秀一, 雨宮崇之, 城田松之, 小池亮太郎, 白井剛, 木下賢吾, 太田元規, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

猪俣晃介, 真板綾子, 村山秀平, 磯貝信, 天野

剛志, 二木史朗, 伊藤隆, 廣明秀一, 枋尾豪人, 白川昌宏, In-Cell NMRを用いた蛋白質の相互作用解析に向けて, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

秋吉由佳里, 成田宏隆, 合田(天野)名都子, 里村香織, 藤原芳江, 中川敦史, 鈴木守, 古瀬幹夫, 廣明秀一, 細胞間接着装置の制御に関わるE3酵素LNX1由来PDZドメインのX線構造解析, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

福地佐斗志, 梅寄雅人, 野辺由紀子, 村上聖子, 佐藤智子, 坂本盛宇, 廣明秀一, 太田元規, 天然変性タンパク質データベースの構築, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

秋吉由佳里, 成田宏隆, 合田(天野)名都子, 里村香織, 藤原芳江, 中川敦史, 鈴木守, 古瀬幹夫, 廣明秀一, X-ray crystallography of PDZ domains from LNX1, an E3 ubiquitin ligase regulating intercellular adhesion machinery, 日本生物物理学会第48回年会, 東北大学川内キャンパス, 仙台, 2010/9/20-22, ポスター

岩谷奈央子, 藤原芳江, 合田(天野)名都子, 天野剛志, 白川昌宏, 廣明秀一, 微小管動態を制御する蛋白質katanin p60の構造生物学的研究, 第57回日本生化学会近畿支部例会, 奈良先端科学技術大学院大学ミレニアムホール, 奈良, 2010/7/20, 一般講演

藤原芳江, 合田(天野)名都子, 里村香織, 匂坂敏朗, 鈴木守, 廣明秀一, Extensive search for crystallization condition of afadin PDZ domain, グローバルCOE「統合的膜生物学の国際研究教育拠点」第4回ワークショップ, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路島, 2010/7/15-16, ポスター

廣明秀一, A common mechanism of katanin p60 and Vps4 governs cytoskeleton and membrane skeleton disassembly, グローバルCOE「統合的膜生物学の国際研究教育拠点」第4回ワークショップ, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路島, 2010/7/15-16, 招待講演

廣明秀一, SOFAST-HMQC/BEST-HNCAの理解と蛋

白質NMRのケミカルバイオロジーへの応用, 平成22年度分光学会NMR分光部会シンポジウム, 東大薬学部講堂, 東京, 2010/9/9, 招待講演

廣明秀一, 梅津喜崇, 合田(天野)名都子, 天野剛志, 濱田大三, 鍋島陽一, 星美奈子, NMR study of a highly toxic Ab peptide oligomer (amylospheroid) and other Ab oligomers, ICMRBS, International Conference of Magnetic Resonance in Biological Systems XXIV, Australia, 2010/8/22-27, ポスター

藤原芳江, 里村香織, 廣明秀一, 成田宏隆, 中川敦史, 鈴木守, 細胞接着装置ネクチン・アフアジン複合体の構造解析, 平成22年度ターゲットタンパク研究プログラム成果報告会, 東大医学部鉄門講堂, 東京, 2010/10/18, ポスター
藤原芳江, 藤原健一郎, 合田(天野)名都子, 岩谷奈央子, 天野剛志, 白川昌宏, 廣明秀一, Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear valocine containing protein like 2 (NVL2), 第49回NMR討論会, タワーホール船堀, 東京, 2010/11/15-17, 一般講演

天野剛志, 市川大哉, 池上貴久, 廣明秀一, NF- κ B シグナリングに関わるユビキチン結合型 Zn²⁺フィンガードメインの構造・機能解析, 第49回NMR討論会, タワーホール船堀, 東京, 2010/11/15-17, ポスター

藤原芳江, 合田(天野)名都子, 里村香織, 成田宏隆, 中川敦史, 匂坂敏朗, 鈴木守, 廣明秀一, ネクチン3のC末端配列と結合したアフアジンPDZドメインの構造解析, 第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010), 神戸国際会議場, 神戸, 2010/12/7-10, ポスター

松井郁夫, 桑原陽太, 松井えり子, 廣明秀一, 横山英志, 超好熱菌Pyrococcus horikosiiのSPFHスーパーファミリーに属する膜タンパク質群の機能構造と膜小胞体形成, 第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010), 神戸国際会議場, 神戸, 2010/12/7-10, ポスター

福地佐斗志, 野辺由紀子, 村上聖子, 佐藤智子, 坂本盛宇, 廣明秀一, 太田元規, 天然変性タンパク質データベースの構築, 第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010), 神戸国際会議場, 神戸,

2010/12/7-10, ポスター

秋吉由佳里, 成田宏隆, 中川敦史, 鈴木守, 古瀬幹夫, 廣明秀一, 細胞間接着装置タイトジャンクションの分解因子LNX1のX線結晶構造解析, 平成22年度ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム, 東大安田講堂, 東京, 2010/3/11, ポスター

村松慎一, 浅利さやか, 中村優子, 川上忠孝, 池口邦彦, 藤本健一, 中野今治: AADC遺伝子導入によるL-dopa反応性の変化. 第51回日本神経学会総会, 東京, 2010年5月20日. (プログラム p69)

浅利さやか, 藤本健一, 中野今治, 村松慎一, 齊藤順一, 佐藤俊彦, 宮内昭広: FMT-PETによるパーキンソン病の線条体解析. 第51回日本神経学会総会, 東京, 2010年5月20日. (プログラム p75)

奈良優子, 宮内ひとみ, 綾部啓子, 滝野直美, 中野今治, 村松慎一, 嶋崎久仁子: ALS 遺伝子治療用の血管内投与型AAVベクターの開発. 第51回日本神経学会総会, 東京, 2010年5月22日. (プログラム p136)

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: AADC gene therapy for Parkinson's disease: A phase I study. The Japan society of gene therapy's 16th annual meeting. Utsunomiya, July 1, 2010. (abstract p55)

Asari S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Watanabe E, Sato T, Ozawa K, Nakano I and Muramatsu S : Positron emission tomography assessment of aromatic L-amino acid decarboxylase gene transfer in Parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 16th annual meeting. Utsunomiya, July 1, 2010. (abstract p166)

浅利さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 村松慎一, 中野今治, 齊藤順一, 佐藤俊彦, 宮内昭広 : FMT-PETによるパーキンソン病の病態解析. 第25回日本大脳基底核研究会, 福島, 2010年8月1日.

Tokuoka H, Muramatsu S, and Ichinose H: Compensatory regulation of dopamine content in the nigro-striatal dopaminergic projection. Neuro2010, 神

戸, 2010年9月2日. (神経化学 Vol.49 (No.2,3) p477, 2010)

Asari S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Watanabe E, Sato T, Ozawa K, Nakano I and Muramatsu S : *In vivo* assessment of the aromatic L-amino acid decarboxylase gene expression by positron emission tomography in Parkinson's disease. Neuro2010, 神戸, 2010年9月2日. (神経化学 Vol.49 (No.2,3) p484, 2010)

Popiel H A, Fujita H, Yamamoto K, Fujikake N, Muramatsu S, Toda T, Wada K and Nagai Y : Amelioration of neurological phenotypes and inclusion body formation in polyglutamine disease mice upon AAV5-mediated expression of aggregate inhibitor molecules. Neuro2010, 神戸, 2010年9月3日. (神経化学 Vol.49 (No.2,3) p505, 2010)

村松慎一 : パーキンソン病の遺伝子・細胞治療. 第20回日本保健科学学会学術集会, 東京, 2010年10月9日. (特別講演) (日本保健科学学会誌 Vol.13(1), p18)

浅利さやか, 藤本健一, 池口邦彦, 村松慎一, 中野今治, 齊藤順一, 佐藤俊彦, 宮内昭広 : FMT-PETによるパーキンソン病の病態解析. Movement Disorder Society Japan 第4回学術集会, 京都, 2010年10月9日. (抄録集 p98)

村松慎一 : 神経変性疾患の遺伝子治療～AAVベクターの応用～. 第4回 In vivo 実験医学シンポジウム～「In vivo 実験医学の今後の展望」～, 東京, 2011年2月23日. (招待講演) (プログラム p34-35)

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

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 (ASPD) 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、ASPD 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、候補分子の目処がたち、その分子の機能障害によって神経細胞死が起きることがわかりつつある。

A. 研究目的

本研究ではアミロスフェロイド (ASPD) の立体構造を解明し、神経細胞上にある標的分子への ASPD 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

抗ASPD抗体はAβモノマーや既存のAβ集合体をほとんど認識せず、逆に既存のAβ集合体に対する抗体はASPDを認識しない。これは、ASPD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) ASPD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Aβを除去し、残ったASPDと抗体の複合体を結晶化し構造解析を行う。(1-2) ASPD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AβからASPD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Aβ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

ASPD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、ASPD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

ASPD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、ASPD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ASPD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ASPD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の上で、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。この手法を共同研究者に供与し、溶液NMRの解析を行った結果、ASPDはユニークな表面構造を取っていることが、昨年度の固相NMRの結果に引き続き明らかとなった（詳細は廣明博士の報告書を参照）。

(2) 標的分子同定と機能解析

ASPD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ている（Noguchi *et al.* JBC 2009）。そこで、ラット成熟神経細胞を用いて、ASPD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、候補分子の目処が立ち、この分子の機能を阻害することでASPDは強い毒性を発揮していることが示唆された。

(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 press）。その結果、シナプス毒性を持つ2量体や12量体や、より大きな凝集体である線維などは、全て2量体から凝集が開始するが、ASPDは3量体から形成させることがわかり、凝集の経路がかなり初期から異なることが示された。これを用いてASPD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 press）。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。

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ASPD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ASPD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（詳細は廣明博士の報告書を参照）。今後さらに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

ASPDの標的分子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。現在、ノックアウトマウスの作成中である。

(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、ASPD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、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。今年度の成果により、ASPD及びその標的分子を新たな創薬ターゲットとすることで、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手掛かりを得た。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

1. 論文発表

Matsumura, S., Shinoda, K., Yamada, M., Yokojima, S., Inoue, M., Ohnishi, T., Shimada, T., Kikuchi, K., Masui, D., Hashimoto, S., Sato, M., Ito, A., Akioka, M., Takagi, S., Nakamura, Y., Nemoto, K., Hasegawa, Y., Takamoto, H., Inoue, H., Nakamura, S., Nabeshima, Y., Teplow, D.B., Kinjo, M., and Hoshi, M. (2011)

Two distinct amyloid β -PROTEIN (A β) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology and toxicity analyses *J. Biol. Chem. In press*

2. 学会発表

星美奈子 (2010年11月9日)

アルツハイマー病の治療を目指した新規治療法の開発

平成22年度第二回産学情報交流会
京都大学医学領域産学連携推進機構/ (社) 芝蘭会 (招待講演)

星美奈子 (2010年12月22日)

原因物質を標的にした新たなアルツハイマー病治療法の開発

鍋島陽一先生紫綬褒章受章記念講演会
神戸 (招待講演)

星美奈子 (2011年1月28日)

原因物質を標的にした新たなアルツハイマー病治療法の開発

新潟脳神経研究会特別例会
新潟 (招待講演)

篠田 恵子・横島 智・井上雅文・菊地 和也・中村 振一郎・金城 政孝・鍋島陽一・星美奈子・(2011年12月9日) FCSを用いたタンパク質凝集過程の定量的解析手法の構築
第32回日本分子生物学会年会 神戸

M. Hoshi, M. Dezawa, S. Muramatsu, Y. Nabeshima, D.B. Teplow, A. Kakita; High-mass amyloid beta-protein assembly with a unique toxic surface from Alzheimer's disease brains; 2010 November, San Diego; Society for Neuroscience 2010

Minako M. Hoshi, Takayuki Ohnishi, Masafumi Inoue, Hidekazu Hiroaki, Yo-ichi Nabeshima, Akiyoshi Kakita: Mechanism of mature neuron-specific toxicity induced by high-mass amyloid β -protein assembly with a unique toxic surface

The 10th international conference on Alzheimer's and Parkinson Diseases
Barcelona, Spain, March 9-13, 2011

廣明秀一, 梅津喜崇, 合田(天野)名都子, 天野剛志, 濱田大三, 鍋島陽一, 星美奈子, NMR study of a highly toxic Ab peptide oligomer (amylospheroid) and other Ab oligomers, ICMRBS, International Conference of Magnetic Resonance in Biological Systems XXIV, Australia, 2010/8/22-27, ポスター

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 研究員（名誉教授）

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($A\beta$)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 $A\beta$ 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。本研究では、アミロスフェロイドによる神経細胞死の誘導機構の解明に向け、アミロスフェロイド標的タンパク質を同定し、標的タンパク質のノックアウトマウスの構築、および神経細胞死の際に誘導される応答の解析を行った。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のための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 $A\beta$ の集合体による神経細胞死の誘導は、 $A\beta$ 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。アミロスフェロイド特異的に結合する標的分子を同定し、アミロスフェロイドが神経細胞死を誘導する機構として、その標的分子の機能およびさらに下流の現象を解明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試み、複数の方法により、未成熟神経細胞や単量体 $A\beta$ 等の条件下では結合せず、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同定した。そこで、同定した分子についてノックアウトマウスを作製するとともに、神経培養細胞を用いて、神経細胞死の誘導機構について解析を行う。

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、1つには、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により行う。また、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ため、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の作製によっても行う。

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関与すると期待される標的分子として、1つの分子（知的財産の関係で具体的名称は表記できない）が特定された。この分子の神経特異的のなし

ックアウトマウスの作製に向け、用いるベクターの条件検討と構築を行った。現在、キメラマウスが生まれたところである。また、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導の際に、特異的な応答が起こるといふ知見を得た。

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を入手済みである。トランスジェニックマウスの作成の方は、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

アミロスフェロイドと結合し、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つの分子を特定し、その分子の神経特異的ノックアウトマウスを作製した。また、神経細胞死誘導時に特異的に起こる応答の知見も得た。今後、このノックアウトマウスおよび神経培養細胞を用いて、アミロスフェロイドと標的分子が神経細胞死を誘導する機構の詳細について解析を行う。

また、アミロスフェロイド形成促進マウスの構築においては、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う。

E. 結論

アミロスフェロイド特異的に結合する分子を同定し、その分子の神経特異的ノックアウトマウスの作製を行った。また、アミロスフェロイドによる神経細胞死の誘導に際し、特異的に起こる応答の知見を得た。

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

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

アルツハイマー病をはじめとした中枢神経疾患の診断・治療を行ううえで、中枢神経系への分子デリバリー技術の開発が期待されている。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 ペプチドを利用した蛋白質デリバリー法の開発を行った。また、種々のペプチドを創製し、中枢神経への導入に関して検討し、その導入メカニズムを調べた。

A. 研究目的

アルツハイマー病など多くの中枢神経疾患は、発病にいたるメカニズムが不明なものが多く、有効な早期診断法や治療法が確立されていない。また、中枢神経疾患の研究や医療における大きな問題点として、診断用プローブや医薬品を脳内に送達する有効な技術がないことがあげられる。これまでに、血液脳関門を通過する分子の開発は行われてきたが、中枢神経系選択性や導入効率の観点から実用化レベルには到達していない。このため、基礎研究に加え臨床における医療分野において中枢神経系分子デリバリー技術の開発が期待されている。

これまでの研究で、中枢神経系分子デリバリー技術として、狂犬病ウイルス糖蛋白質由来RVGペプチドに着目して研究を行ってきた。RVGペプチドは、血液脳関門を通過し、中枢神経へ選択的に導入されることが知られている。実際に、昨年度までの研究で、RVGペプチドで化学修飾したアデノ随伴ウイルスベクターの中枢神経系へのデリバリーと発現に成功している。

本研究では、RVGペプチド以外のさらなる中枢神経系分子デリバリーペプチドを見出すため、新たに種々のペプチドを合成し、その中枢神経導入能に関して検討した。さらに、これらのペプチドの導入メカニズムについても検討した。これらの知見をもとに、新規神経細胞キャリアの開発を目指す。

B. 研究方法

蛍光色素であるフルオレセイン誘導体をつないだペプチドをFmoc固相法にて合成した。まず、神経細胞導入能を検討するために、これらのペプチドをヒト子宮頸癌由来細胞HeLa-S3およびマウス

神経芽細胞腫由来細胞Neuro-2aに添加し、共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。また、神経細胞選択性を調べるために、それぞれの細胞にペプチドを添加した後、その蛍光強度をプレートリーダーを用い算出した。これらのペプチドの細胞毒性の有無は、MTTアッセイにより検討した。

次に、合成したペプチドの神経細胞導入メカニズムを明らかにするために、添加するペプチドの細胞導入に対する濃度依存性に関する実験及び各種阻害剤を用いた実験を行った。

最後に、合成したペプチドで修飾した蛋白質が神経細胞へ導入されるかを検討した。用いた蛋白質は、EGFPである。蛋白質表面のアミノ基と

Succinimidyl p-formylbenzoateを反応させ、アルデヒド基を提示させた後、アミノオキシ基をつないだペプチドと反応させることで、EGFPを合成したペプチドで修飾した。これら修飾EGFPをHeLa-S3とNeuro-2aに添加し、共焦点蛍光顕微鏡にて観測した。

（倫理面への配慮）

該当する実験はなし。

C. 研究結果

合成したペプチドをHeLa-S3及び Neuro-2aに添加し観察したところ、全ての細胞においてNeuro-2aのみから蛍光が観測された。また、ペプチド添加後の細胞をトリプシン処理により剥離しプレートリーダーで蛍光強度を観測したところ、全てのペプチドにおいて、Neuro-2aの蛍光強度がHeLa-S3に比べ大きいことが示された。特に、RVGペプチドおよびペプチドXには、他のペプチドに比べ2倍以上のNeuro-2a選択性が確認された。MTTアッセイの結果、どのペプチドにも細胞毒性は確認

されなかった。

ペプチド濃度を5 μ Mもしくは20 μ Mとして、細胞に添加したところ、5 μ Mでは、どのペプチドも細胞膜上もしくは細胞の突起上から蛍光が観測された。一方、ペプチドXとRVGペプチドの場合、20 μ Mでは、細胞の内部から蛍光が観測された。また、ペプチドX添加細胞からは、蛍光が主に細胞内の部分的な凝集体から観測され、RVGペプチド添加細胞からは、均一な蛍光が観測された。

次に、nAChRアンタゴニストである α -ブンガロトキシンを添加し、ペプチドX及びRVGペプチドの導入が阻害されるかどうかを検討した。プレートリーダーにより細胞内導入量を定したところ、 α -ブンガロトキシンの添加により、両ペプチドとも約50%の導入量の低下が観測された。また、マクロピノサイトーシス阻害剤であるサイトカラシンBとクラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤クロルプロマジンを利用し、ペプチドX及び、RVGペプチドの導入メカニズムを検討した。サイトカラシンBを添加した場合は、ペプチドX及びRVGペプチドともにNeuro-2a導入量の低下が確認された。一方、クロルプロマジンを添加した場合、RVGペプチドでは導入量の低下が確認されたものの、ペプチドXからは導入量に変化はなかった。

最後に、ペプチドXもしくはRVGペプチドでEGFPを修飾しNeuro-2aへ導入可能かを検討した。修飾反応は、SDS-PAGEで確認した。修飾EGFPをHeLa-S3もしくはNeuro-2aに添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観測したところ、両修飾EGFPともにHeLa-S3からは蛍光は観測されず、Neuro-2aから選択的に蛍光が観測された。

D. 考察

本研究で合成したペプチドは、すべてNeuro-2aに選択性を示した。特に、ペプチドXは、細胞内部に導入されることが明らかとなった。一方で、その神経細胞内への導入メカニズムは、細胞内蛍光分布の違いからRVGペプチドとは異なることが示唆された。実際に、エンドサイトーシス阻害剤の実験から、RVGペプチドは、クロルプロマジンにより導入量が低下したものの、ペプチドXに対して影響が確認されなかったことから、導入経路に違う部分があると考えられる。また、両ペプチドともに、 α -ブンガロトキシンにより、Neuro-2a導入量の低下が見られたことから、その導入には、nAChRが関与していると考えられた。しかしながら、 α -ブンガロトキシンの濃度を増加させても、完全に導入を阻害することができなかったことから、nAChRとの結合以外の経路でもNeuro-2a

に導入されている可能性が示唆された。

また、ペプチドXを利用して、EGFPをNeuro-2aに選択的に導入することに成功した。このことは、CVS19が新しい神経細胞キャリアとして応用できることを示している。

E. 結論

nAChR結合ペプチドは、神経細胞選択性を有しており、新しい神経細胞キャリアとしての可能性を見出した。また、合成したペプチドのうちペプチドXは神経細胞内部に導入可能であり、RVGペプチドとは、神経細胞導入経路に違う部分があると考えられた。さらに、ペプチドXは、蛋白質の神経細胞選択的な導入能を有している。これらの結果は、蛋白質医薬の神経細胞デリバリー技術の開発に有用な知見を与えると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada, S., Mizukami, S., **Kikuchi, K.** Application of Stimuli-Responsive Polymer for Development of Novel MRI Probes. *ChemBioChem*. 11, 785-787 (2010)
- 2) Watanabe, S., Mizukami, S., Hori, Y., **Kikuchi, K.** Multicolor Protein Labeling in Living Cells Using Mutant β -Lactamase-tag Technology. *Bioconjugate Chem*. 21, 2320-2326 (2010)
- 3) Sadhu, K.K., Mizukami, S., Watanabe, S., **Kikuchi, K.** Turn-on Fluorescence Switch Involving Aggregation and Elimination Processes for β -Lactamase-Tag, *Chem. Commun.*, 46, 7403-7405 (2010)
- 4) Mizukami, S., Hosoda, M., Satake, T., Okada, S., Hori, Y., Furuta, T., **Kikuchi, K.** Photocontrolled Compound Release System Using Caged Antimicrobial Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9524-9525 (2010)
- 5) Yoshimura, A., Mizukami, S., Hori, Y., Watanabe, S., **Kikuchi, K.** Cell Surface Protein Labeling with Luminescent Nanoparticles via Biotinylation Using Mutant β -Lactamase-tag Technology. *ChemBioChem*. 12, 1031-1034 (2011)
- 6) Sadhu, K.K., Mizukami, S., Watanabe, S.,

Kikuchi, K. Sequential Ordering Among Multicolor Fluorophores for Protein Labeling Facility via Aggregation-elimination Based β -Lactam Probes. *Mol. BioSyst.* 7, 1766-1772 (2011)
7) Mizukami, S., Matsushita, H., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., Kikuchi, K. ^{19}F MRI Detection of β -Galactosidase Activity for Imaging of Gene Expression. *Chem. Sci.* 2, in press (2011)

2. 学会発表

- 1) Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. *The First Asian Chemical Biology Conference (ACBC)*, Seoul, Korea, 2010年6月25日～27日(招待講演)
- 2) Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. *Symposium for "Chemistry at the Frontiers of Biology and Physics"*, Strasbourg, France, 2010年7月1日～3日(招待講演)
- 3) Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. EMBL Conference Series - Chemical Biology 2010, Heidelberg, Germany, 2010年9月22日～25日(招待講演)
- 4) Kikuchi, K. Design and Synthesis of Coumarin-based Zn^{2+} Probes for Ratiometric Fluorescence Imaging. The Fujihara Foundation of Science, The60th Fujihara seminar "Zinc signaling and cellular functions", Osaka, Japan, 2010年10月29日～31日(招待講演)
- 5) Kikuchi, K. Design, Synthesis and

Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. The CSI-IFReC Joint Symposium in Immunology, Hangzhou, China, 2010年11月2日～5日(招待講演)

- 6) 菊地和也, Design, Synthesis and Biological Application of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches, BMB2010, 神戸市, 2010年12月7日～10日(招待講演)
- 7) Kikuchi, K. Chemical Probes for *in Vivo* Molecular Imaging. *Pacificchem 2010*. Honolulu, HI, USA, 2010年12月15日～20日(招待講演)
- 8) Kikuchi, K. Development of *in Vivo* Imaging Probes with Tunable Chemical Switches, Which Convert Biological Signals to MRI Contrast Enhancement and Optical Readout. *Sweden-Japan Joint Colloquium, "Direct imaging in Bio/Medical science"*, Lund, Sweden, 2011年1月18日(招待講演)
- 9) Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of Molecular Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. Catalysis and Sensing for Health University of Bath, Bath, UK, 2011年1月31日～2月2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
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

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

研究分担者 廣明 秀一 神戸大学大学院医学研究科特命教授

研究要旨

アルツハイマー病などの認知症の根本的治療法の開発は、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。研究代表者らが発見した、球状のA β 集合体＝アミロスフェロイド（ASPD）は極めて強い神経毒性を持つことが示されている。従って、その形成機序及び神経細胞死機構を解明することは、アルツハイマー病の発症機構の解明につながり、より有効な治療薬開発を可能にすると期待される。我々は、核磁気共鳴法（NMR）を主たる方法論として、ASPDの構造、特に神経細胞と相互作用する部位を解析し、構造情報に基づく分子標的薬剤並びにナノセンサ分子を開発することを計画した。NMRでは、ペプチドおよびペプチド重合体などの高分子を解析するために $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ などの安定同位体標識を施す必要がある。昨年度、我々はマルトース結合タンパク質-TEVプロテアーゼ切断サイト-A β （1-40）/（1-42）の融合タンパク質を大腸菌で発現する系を確立し、得られた ^{15}N -A β （1-40）からASPDを一部含むと思われる重合体のNMRシグナルの観測に成功した。しかし、収量が低く、得られたペプチドのアミロスフェロイド重合効率も低いため、改善が必要であった。今回、我々は、ユビキチン-A β （1-40）/（1-42）の融合タンパク質として大腸菌で発現する系を確立し、アミロイドペプチドの収量を従来 10 倍程度増加させることに成功した。また、アミロスフェロイドと特異的に結合するペプチド配列の探索に成功した。

A. 研究目的

アルツハイマー病などの認知症の根本的治療法の開発は、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解明が必要である。研究代表者らが発見した、球状のA β 集合体＝アミロスフェロイド

（ASPD）は極めて強い神経毒性を持つことが示されている。従って、その形成機序及び神経細胞死機構を解明することは、アルツハイマー病の発症機構の解明につながり、より有効な治療薬開発を可能にすると期待される。特にASPDの特徴は、A β 約30分子が凝集体を形成し特異な立体構造を取ること、成熟神経細胞に選択的に死をもたらすことにある。そのため本研究では（1）アミロスフェロイドのNMR測定を行いそのユニークな構造を解明するための物性データを取得すること、（2）そのために種々の安定同位体標識を施したアミロスフェロイドを大量に合成する系を確立すること、を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

特異な重合体であるASPDをNMRで解析するためには、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ などの安定同位体標識を施すことが必須である。昨年度、我々はマルトース結合タンパク質-TEVプロテアーゼ切断サイト-A β （1-40）/（1-42）の融合タンパク質を大腸菌で発現する系を確立し、得られた ^{15}N -A β （1-40）からアミロスフェロイドを一部含むと思われる重合体のNMR測定から一部のシグナルの観測に成功した。しかし、収量が低く、得られたペプチドのアミロスフェロイド重合効率も低いため、改善が必要であった。そこで、本年度は（1）マルトース結合タンパク質-TEVプロテアーゼ切断サイト-A β （1-40）の融合タンパク質発現系の収量・純度改善のための条件検討、（2）タンパク質Y-A β

（1-40）/（1-42）融合タンパク質を大腸菌で発現する系の確立、を行った。さらに、アミロスフェロイドに対する分子標的薬剤の創出に向け、（3）アミロスフェロイドに特異的に結合するペプチド配列の探索を行なった。

（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。遺伝子組換え実験については、カルタヘナ法ならびに神戸大学の基準を順守して管理区域内で行った。

C. 研究結果

1. マルトース結合タンパク質との融合タンパク質発現系において、低収量の原因はA β -ペプチドが発現・精製時に分解を受けるためであった。
2. タンパク質Y-A β （1-40）/（1-42）の融合タンパク質発現系確立し、収量を従来 10 倍程度増加することができた。
3. A β （1-40）に関しては ^{15}N 標識、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識A β （1-42）に関しては ^{15}N 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、それぞれのA β -ペプチド単量体のNMRスペクトルの測定を行った。
4. 更にA β （1-40）/（1-42）について、アミノ酸特異的逆ラベル法（ ^{15}N 標識のバックグラウンド中で特定のアミノ酸のみ ^{14}N で標識し、シグナルの帰属・観測を容易にする方法）を考案し、その条件の最適化を行った。
5. アミロスフェロイドに特異的に結合する新規の人工配列ペプチドを複数同定し、そのうちのいくつかについて試験管内でA β -ペプチド（モノマー）との相互作用を確認した。
6. pET-TRX-PRESATベクターを用いて、アミロスフ

ェロイド結合ペプチドの大腸菌発現系を確立した。

D. 考察

従来のマルトース結合タンパク質での発現系では、発現・精製過程における分解が低収量の原因の一因であった。タンパク質Yとの融合により分解をぐことに成功し安定同位体標識を施したA β (1-40), A β (1-42)を生物学的生産法により、高収量で得ることができるようになった。これにより、化学合成では大量調製が限られていた安定同位体標識ASPDを実験室スケールで必要十分量得ることができるようになった。また、これまで¹⁵N標識アミロソフェロイドから得られた情報を相補するために、コストの高い¹³C標識を施したA β (1-40)由来またはA β (1-42)由来ASPDの調製も限られた研究予算内で可能となった。今後、¹⁴N-逆ラベル体などの、更に特異性の高い標識を施した試料についても順次調製し、NMR観測を行う。

一方、得られたASPD結合ペプチドの多くが、溶液中の実験でA β モノマーと相互作用することがわかった。これらのうちいくつかは、ASPDに更に強い結合活性を示す可能性が高い。もしこれらのASPD結合ペプチドのどれかが細胞毒性中和能を示すならば、その分子間相互作用の解析から、ASPDの特定の分子構造のうち、特に高神経毒性に関与する部分が明らかになる。従って、ASPD結合ペプチドの相互作用機構と立体構造（特にASPD結合時の活性構造）をNMRにより解明することは、抗ASPD低分子医薬品の開発に直結する基盤的情報となると想定される。ASPD結合ペプチドの大腸菌発現系を確立したことで、ASPD結合ペプチドに安定同位体を導入し、ASPDとASPD結合ペプチドとの相互作用についてNMRで詳細に解析することも可能となった。これら解析は神経細胞死機構の解明につながり、有効な治療薬開発を可能にすることが期待できる。

E. 結論

A β ペプチドの収量増加を達成した。A β ペプチドに特異的な安定同位体標識を導入する方法を確立した。また、ASPD結合ペプチドを同定することができた。

F. 健康危険情報

統括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表

- Umetsu, Y., Taniguchi, R., Satomura, R., Goda, N., Ikegami, T., Furuse, M., Hiroaki, H. 1H, 13C, and 15N resonance assignment of the first PDZ domain of mouse ZO-1. *Biomol. NMR Assign.* in press (2011)
- Umetsu, Y., Tenno, T., Goda, N., Shirakawa, M., Ikegami, T., and Hiroaki, H. Structural difference of vasoactive intestinal peptide (VIP) in two distinct membrane mimicking conditions. *BBA-Proteins Proteomics* **18**

14, 724-730, (2011)

- Motono, C., Nakata, J., Koike, R., Shimizu, K., Shirota, M., Amemiya, T., Tomii, K., Nagano, N., Sakaya, N., Misoo, K., Sato, M., Kidera, A., Hiroaki, H., Shirai, T., Kinoshita, K., Noguchi, T., Ota, M. SAHG, a comprehensive database of predicted structures of all human proteins. *Nucleic Acids Res.* **39**(suppl 1), D487-D493, (2010)
- Iwaya, N., Kuwahara, Y., Fujiwara, Y., Goda, N., Tenno, T., Akiyama, K., Mase, S., Tochio, H., Ikegami, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. A common substrate recognition mode conserved between katanin p60 and VPS4 governs microtubule severing and membrane skeleton reorganization. *J Biol. Chem.* **285**, 16822-16829 (2010)
- Jee, J., Mizuno, T., Kamada, K., Tochio, H., Chiba, Y., Yanagi, K., Yasuda, G., Hiroaki, H., Hanaoka, F., Shirakawa, M. Structure and mutagenesis studies of the C-terminal region of licensing factor Cdt1 enable the identification of key residues for binding to replicative helicase Mcm proteins. *J Biol. Chem.* **285**, 15931-15940. (2010)

2. 学会発表

(ア) 廣明秀一, 里村香織, 合田(天野)名都子, 間瀬省吾, 池上貴久, 古瀬幹夫, 細胞接着装置タイトジャンクションを制御する化合物探索の試み, 日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス, 横浜, 2010/5/18-19, ポスター

(イ) 廣明秀一, 藤原芳江, 岩谷奈央子, 合田(天野)名都子, 池上貴久, 白川昌宏, メイン構造に基づいたAAA-ATPaseの分類と機能メカニズムの予測, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

(ウ) 本野千恵, 中田淳一, 清水佳奈, 富井健太郎, 長野希美, 野口保, 廣明秀一, 雨宮崇之, 城田松之, 小池亮太郎, 白井剛, 木下賢吾, 太田元規, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

(エ) 猪俣晃介, 真板綾子, 村山秀平, 磯貝信, 天野剛志, 二木史朗, 伊藤隆, 廣明秀一, 朽尾豪人, 白川昌宏, In-Cell NMRを用いた蛋白質の相互作用解析に向けて, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

(オ) 秋吉由佳里, 成田宏隆, 合田(天野)名都子, 里村香織, 藤原芳江, 中川敦史, 鈴木守, 古瀬幹夫, 廣明秀一, 細胞間接着装置の制御に関わるE3酵素LNX1由来PDZドメインのX線構造解析, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター

6. 福地佐斗志, 梅寄雅人, 野辺由紀子, 村上聖子, 佐藤智子, 坂本盛宇, 廣明秀一, 太田元規, 天然変性タンパク質データベースの構築, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010/6/16-18, ポスター
7. 秋吉由佳里, 成田宏隆, 合田(天野)名都子, 里村香織, 藤原芳江, 中川敦史, 鈴木守, 古瀬幹夫, 廣明秀一, X-ray crystallography of PDZ domains from LNX1, an E3 ubiquitin ligase regulating intercellular adhesion machinery, 日本生物物理学会第48回年会, 東北大学川内キャンパス, 仙台, 2010/9/20-22, ポスター
8. 岩谷奈央子, 藤原芳江, 合田(天野)名都子, 天野剛志, 白川昌宏, 廣明秀一, 微小管動態を制御する蛋白質katanin p60の構造生物学的研究, 第57回日本生化学会近畿支部例会, 奈良先端科学技術大学院大学ミレニアムホール, 奈良, 2010/7/20, 一般講演
9. 藤原芳江, 合田(天野)名都子, 里村香織, 匂坂敏朗, 鈴木守, 廣明秀一, Extensive search for crystallization condition of afadin PDZ domain, グローバルCOE「統合的膜生物学の国際研究教育拠点」第4回ワークショップ, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路島, 2010/7/15-16, ポスター
10. 廣明秀一, A common mechanism of katanin p60 and Vps4 governs cytoskeleton and membrane skeleton disassembly, グローバルCOE「統合的膜生物学の国際研究教育拠点」第4回ワークショップ, 淡路夢舞台国際会議場, 淡路島, 2010/7/15-16, 招待講演
11. 廣明秀一, SOFAST-HMQC/BEST-HNCAの理解と蛋白質NMRのケミカルバイオロジーへの応用, 平成22年度分光学会NMR分光部会シンポジウム, 東大薬学部講堂, 東京, 2010/9/9, 招待講演
12. 廣明秀一, 梅津喜崇, 合田(天野)名都子, 天野剛志, 濱田大三, 鍋島陽一, 星美奈子, NMR study of a highly toxic Ab peptide oligomer (amylospheroid) and other Ab oligomers, ICMRBS, International Conference of Magnetic Resonance in Biological Systems XXIV, Australia, 2010/8/22-27, ポスター
13. 藤原芳江, 里村香織, 廣明秀一, 成田宏隆, 中川敦史, 鈴木守, 細胞接着装置ネクチン・アフジン複合体の構造解析, 平成22年度ターゲットタンパク研究プログラム成果報告会, 東大医学部鉄門講堂, 東京, 2010/10/18, ポスター
14. 藤原芳江, 藤原健一郎, 合田(天野)名都子, 岩谷奈央子, 天野剛志, 白川昌宏, 廣明秀一, Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear valocine containing protein like 2 (NVL2), 第49回NMR討論会, タワーホール船堀, 東京, 2010/11/15-17, 一般講演
15. 天野剛志, 市川大哉, 池上貴久, 廣明秀一, NF- κ B シグナリングに関わるユビキチン結合型 Zn²⁺フィンガードメインの構造・機能解析, 第49回NMR討論会, タワーホール船堀, 東京, 2010/11/15-17, ポスター
16. 藤原芳江, 合田(天野)名都子, 里村香織, 成田宏隆, 中川敦史, 匂坂敏朗, 鈴木守, 廣明秀一, ネクチン3のC末端配列と結合したアフジンPDZドメインの構造解析, 第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010), 神戸国際会議場, 神戸, 2010/12/7-10, ポスター
17. 松井郁夫, 桑原陽太, 松井えり子, 廣明秀一, 横山英志, 超好熱菌Pyrococcus horikoshiiのSPFHスーパーファミリーに属する膜タンパク質群の機能構造と膜小胞体形成, 第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010), 神戸国際会議場, 神戸, 2010/12/7-10, ポスター
18. 福地佐斗志, 野辺由紀子, 村上聖子, 佐藤智子, 坂本盛宇, 廣明秀一, 太田元規, 天然変性タンパク質データベースの構築, 第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010), 神戸国際会議場, 神戸, 2010/12/7-10, ポスター
19. 秋吉由佳里, 成田宏隆, 中川敦史, 鈴木守, 古瀬幹夫, 廣明秀一, 細胞間接着装置タイトジャンクションの分解因子LNX1のX線結晶構造解析, 平成22年度ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム, 東大安田講堂, 東京, 2010/3/11, ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし