

201111009A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 星 美奈子

平成24(2012)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 | ----- | 21 |
| 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、昨年、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。さらに、この特異的な立体構造に結合するペプチドを探索し、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。今回、我々は、NMR測定に十分量の安定同位体標識したA β (1-40)/(1-42)を調製することを検討し、これに成功した。さらに、安定同位体標識したA β (1-40)からのASPDの作成を検討し、その収率を上げることができた。また、我々は、ASPDに特異的に結合するペプチドとの相互作用解析を行った。ASPD結合ペプチドのトリプトファンの蛍光を利用した蛍光測定実験により、ASPDとペプチド間のおおよその解離定数を算出することに成功した。

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。また、アミロスフェロイド(ASPD)の病態生理学的意義を明らかにし、アルツハイマー病の早期診断と治療法を開発することを目標として研究を行った。血管内投与により広範な脳領域の神経細胞に遺伝子導入可能なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを開発し、筋肉内注射によっても中枢神経の神経細胞に治療用遺伝子を送達することが可能なことを明らかにした。このベクターを応用してASPDに対する特異的な抗体分子を発現するベクターを作製した。

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透過能を持ち中枢神経細胞に選択的に導入されるRabies virus糖蛋白質由来ペプチドに着目し、そのペプチドを遺伝子工学により融合させた蛋白質の神経細胞選択的導入を行った。さらに、蛋白質化学修飾法とデリバリー法を組み合わせることで、蛋白質と共に小分子プローブを神経細胞に選択的に導入する技術を開発した。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、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(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すA β 集合体は単離されても、今まで神経細胞死を起す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(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。昨年までの、固相及び溶液NMRによる構造解析から、ASPDは既存の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(Ishii *et al.* 投稿準備中、Hiroaki *et al.*, ICMRBS2010)。さらに、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。特異な重合体であるASPDをNMRで解析するためには、¹³C/¹⁵Nなどの安定同位体標識を施すことが必須である。そこで、本年度は(1) NMR測定に十分量の安定同位体標識したA β (1-40)/(1-42)の調製法の確立とそのNMR測定、(2) 安定同位体標識したA β (1-40)/(1-42)から作成するASPDの収量向上の検討、を行った。さらに、ASPDに対する分子標的薬剤の創出に向け、(3) 蛍光測定による、ASPDとそれに特異的に結合するペプチド間の結合解離定数の算出を試みた。

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。

前年度に続き、血管内投与後に脳内へ移行しやすいAAVベクターを開発した。カプシド蛋白のアミノ酸配列を置換し、発現カセットの塩基配列も改変したベクターを作製した。CAGプロモーターあるいは神経細胞特異的Synapsin Iプロモーターの下流にGFPのcDNAを繋ぎ、SV40 poly(A)配列とともに3型AAVのinverted terminal repeats (ITR)配列の間に挿入した。

血管内投与型GFP発現AAVベクターを成体マウスの筋肉内に投与し、脳および脊髄組織を回収し免疫組織化学を行った。

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。昨年、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、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., JBC2011)。この情報を基に適切な安定同位体ラベルを入れNMR解析を行った。

前年度までの実験では、神経細胞導入ペプチドを、化学修飾により、蛋白質表面に結合させていた。本年度では、特異的に小分子プローブを蛋白質に化学修飾するための技術を開発した。さらに、その蛋白質を遺伝子工学により、神経細胞導入ペプチドをつないだ融合蛋白質を作成し、神経細胞に導入されるかを検討した。

蛋白質の特異的修飾を達成するために、特定の分子に特異的部位で結合する蛋白質を用いた蛋白質標識技術を開発した。このために、我々は、Photoactive yellow protein (PYP)と呼ばれる蛋白質に着目した。PYPは、125アミノ酸からなる小蛋白質であり、リガンドである桂皮酸誘導体とCys69の部位で特異的に結合することが知られている。そこで、このリガンドに蛍光色素であるフルオレセインをつないだプローブFCATPを設計した。PYPと神経導入ペプチドを融合させ、この融合蛋白質にFCANBを結合させることで、ペプチド部位への非特異な修飾反応による神経細胞導入効率の低下が起こらないようにした。

次に、プローブのPYPへの結合に関して検討した。プローブとPYPを反応させ、SDS-PAGEにより解析した。また、これらの反応物の蛍光・吸収スペクトルを測定した。

最後に、プローブ分子が結合したペプチド融合PYPタグが、神経細胞に選択的に導入されるかを検討した。この実験は、Neuro-2aとHeLa-S3にそれぞれ蛋白質を添加し、細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより行った。

(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。

上記に加えて以下の成果を得た。

1. ユビキチン-A β (1-40)/(1-42)の融合タンパク質発現系から得られたA β (1-40)/(1-42)に関して、

- 安定同位体標識した試料をNMR測定に十分量得ることができた。
- ユビキチン-A β (1-40)/(1-42)の融合タンパク質発現系から得られたA β (1-40)/(1-42)に関して、それぞれの単量体のNMRスペクトルの測定を行った。
 - 安定同位体標識したA β (1-40)/(1-42)から作成するASPDの収量向上の検討を行い、A β (1-40)のASPDに関して、その収量を上げることができた。
 - ASPDとそれに特異的に結合するペプチドのELISA法を用いた相互作用解析を行い、両者の結合を確認することができたが、結合解離定数を算出することはできなかった。
 - ASPDとアミロスフェロイド結合ペプチド間の結合解離定数を、平衡透析法を用いて算出することを検討したが、この方法では検出できないことが分かった。
 - ASPDにはトリプトファン残基が含まれないことを利用して、ASPD結合ペプチドのトリプトワンの蛍光を利用した蛍光測定実験により、ASPDとペプチド間のおおよその結合解離定数を算出することができた。
 - さらに詳細な結合解離定数を得るために、ASPD結合ペプチドにフルオレセインおよびTAMRAの蛍光標識を導入し、より感度の良い測定方法を検討した。

(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。

カプシド及びゲノム構造を改変し神経細胞特異的プロモーターを搭載した血管内投与型AAVベクターでは、成体マウスへの血管内投与で脳と脊髄の広範な領域で多数の神経細胞にGFPの発現が認められた。さらに下肢筋肉内への投与でも脳と脊髄の神経細胞に遺伝子導入が可能であった。

このベクターを応用して、ASPD特異的抗体のH鎖およびL鎖の各抗原認識部配列を発現するAAVベクターを作製した。

(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.*, JBC2011)。その結果、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。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。PYPと神経細胞導入ペプチドを融合させた蛋白質の遺伝子をクローニングし、大腸菌にて発現させた。精製後、蛋白質の純度をSDS-PAGEにて確認したところ、単一バンドが得られた。

FCATPの合成は、1-bromo-4-(methoxymethoxy)-2-methylbenzeneを出発物質として、6ステップで行い、その構造をNMR及び質量分析によって確認した。神経細胞導入ペプチド融合PYPとFCATPを反応させ、SDS-PAGEで解析したところ、融合蛋白質を示すバンドから蛍光が観測された。また、蛍光スペクトルを測定したところ、FCATPの蛍光は、反応初期において非常に弱く、反応の進行と共に、蛍光強度が上昇することが示された。また、吸収スペクトルを測定したところ、結合に伴いスペクトルのブルーシフトが確認された。

次に、FCATPの結合した融合蛋白質をNeuro-2aに添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、Neuro-2aの細胞内から蛍光が観測された。一方、この蛋白質をHeLa-S3に添加し、共焦点顕微鏡で観察したところ、Neuro-2aの場合とは異なり、細胞内からは蛍光が観測されなかった。また、Neuro-2aに添加する蛋白質の濃度依存性についても検討したところ、5 μ Mでは、主に細胞膜から蛍光が観測され、20 μ Mでは、Neuro-2aの細胞内から蛍光が観測された。

上記の情報を活用し、昨年得られたASPD結合ペプチドをナノセンサ化する準備として、当該ペプチドを血液脳関門透過型に改良した。

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、分子中央の一部分は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。

ユビキチン- 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利用し、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。また、安定同位体標識A β (1-40)/(1-42)から作成するASPDの収量向上の検討を行った。これにより、A β (1-40)由来の安定同位体標識ASPDに関して、化学合成では大量調製が限られていた収量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ASPD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ASPDの調製も限られた研究予算内で可能となった。

一方、ASPDと実験室内進化実験（ファージディスプレイ法）によってすでに得られているASPD結合ペプチドの相互作用解析を行い、両者の結合解離定数の算出を検討した。ELISA法を用いた測定では両者の結合を確認することはできたが、解離定数を算出するには至らなかった。平衡透析法においても、両者の解離定数を算出することを検討したが、ASPDとASPD結合ペプチドを分離可能な適当な排除分子量を持つ透析膜が入手できなかったため、この方法ではKdが測定できないことが分かった。しかし、ASPD結合ペプチドに含まれるトリプトファンの蛍光を利用した蛍光測定実験により、両者のおおよその解離定数を算出することに成功した。このことから、両者の相互作用解析において、蛍光光度計を用いた測定が有用であることがわかった。さらに詳細な数値を得るために、直接結合ペプチドを蛍光ラベル化し、より感度の良い測定方法を検討した。

(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。中枢神経の広範な領域の神経細胞に効率よく治療用遺伝子を導入し長期発現させることが可能な血管内投与型AAVベクターを開発した。ASPDを標的としたアルツハイマー病の新規治療法として、現在、主任研究者によりASPD特異抗体を応用した受動免疫および能動免疫治療の開発研究が推進されているが、今回開発したAAVベクターを利用することにより、抗原認識配列を脳内の神経細胞で直接発現させる治療法も可能となる。

また、ASPDにより引き起こされる神経細胞の変性に関与する病態分子が判明してきているが、血管内投与型ベクターによりこれらの分子の発現を抑制するmiRNAを神経細胞内に送達する治療法も考えられる。

(3) アミロスフェロイドのイメージング

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。神経細胞導入ペプチド融合PYPとFCATPを反応させ、SDS-PAGEにおいて、融合蛋白質を示すバンドから蛍光が観測されたことから、これら二分子は、共有結合することが示された。また、蛍光スペクトルの結果から、遊離の状態ではFCATPの蛍光強度が低く、フルオレセインの蛍光消光が起こっていることが示された。吸収スペクトルがブルーシフトしたことを考慮すると、基底状態でフルオレセインとリガンドである桂皮酸誘導体が会合し、その結果消光していると考えられた。また、FCATPは結合反応の進行に伴い、蛍光強度が上昇したことから、結合により会合の解消が起こったことが示唆された。

Neuro-2aの細胞内部から蛍光が観測されたことから、蛋白質に結合したプローブを神経細胞に導入することが示された。また、HeLa-S3の細胞内からは、蛍光が観測されなかったことから、神経細胞選択性が確認された。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。

さらに、今回、ASPDの検出を可能にするナノセンサの開発に着手した。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。安定同位体標識したA β ペプチドの収量増加を達成した。ASPDとこれに特異的に結合するペプチドの相互作用解析において、蛍光光度計を用いた測定の有用性を証明した。

今年度の成果により、患者脳で起こる神経細胞死のメカニズムを明快に説明することが可能となった。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。

また、アルツハイマー病の新規治療法として ASPD特異的な抗体分子などを中枢神経の広範な領域の神経細胞に送達可能な血管内投与型AAVベクターを開発した。

さらに、神経細胞導入ペプチドを遺伝子工学により融合させた蛋白質を神経細胞に選択的に導入することができることが示された。また、この融合蛋白質を利用することで、小分子プローブを神経細胞内に導入することに成功した。

これら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 ($A\beta$) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology and toxicity analyses** *J. Biol. Chem.* 286, 11555-11562

Sadhu, K. S., Mizukami, S., Lanam, C. R., Kikuchi, K. Sequential ordering among multicolor fluorophores for protein labeling facility via aggregation-elimination based β -lactam probes. *Mol. Biosyst.*, 7, 1766-1772 (2011)

Yoshimura, A., Mizukami, S., Hori, Y., Watanabe, S., Kikuchi, K. Cell-surface protein labeling with luminescent nanoparticles through biotinylation by using mutant β -lactamase-tag technology. *Chembiochem.*, 12, 1031-1034 (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, 1151-1155 (2011)

Sadhu, K. S., Mizukami, S., Hori, Y., Kikuchi, K. Switching Modulation for protein labeling with activatable fluorescent probes. *Chembiochem.*, 12, 1299-1308 (2011)

Watanabe, S., Mizukami, S., Akimoto, Y.,

Hori, Y., Kikuchi, K. Intracellular Protein Labeling with Prodrug-Like Probes Using a Mutant β -Lactamase Tag. *Chem. Eur. J.*, 17, 8342-8349 (2011)

Mizukami, S., Yamamoto, T., Yoshimura, A., Watanabe, S., Kikuchi, K. Covalent Protein Labeling with a Lanthanide Complex and its Application to Photoluminescence Lifetime-based Multicolor. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 8750-8752 (2011)

Kowada, T., Kikuta, J., Kubo, A., Ishii, M., Maeda, H., Mizukami, S., Kikuchi, K. In Vivo Fluorescence Imaging of Bone-Resorbing Osteoclasts. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17772-17776 (2011)

Mizukami, S., Watanabe, S., Akimoto, Y., Kikuchi, K. No-Wash Protein Labeling Designed Fluorogenic Probes and Application to Real-Time Pulse-Chase Analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 1623-1629 (2012)

Okada, S., Mizukami, S., Kikuchi, K. Switchable MRI contrast agents based on morphological changes of pH-responsive polymers. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 769-774 (2012)

Terai, T., Kikuchi, K., Urano, Y., Kojima, H., Nagano, T. A long-lived luminescent probe to sensitively detect arylamine N-acetyltransferase (NAT) activity of cells. *Chem. Commun.*, 48, 2234-2236 (2012)

Sadhu, K., Mizukami, S., Lanam, C. R., Kikuchi, K. Fluorogenic Protein Labeling through Photoinduced Electron Transfer-Based BL-tag Technology. *Chem. Asian. J.*, 7, 272-276 (2012)

Hori, Y., Nakaki, K., Sato, M., Mizukami, S., Kikuchi, K., Development of Protein-Labeling Probes with Redesigned Fluorogenic Switch Based on Intramolecular Association for No-wash Live-cell Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.*, In press (2012)

Tenno, T., Fujiwara, Y., Hamada, D., Ikura, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. Effect of Ca^{2+}

on microtubule severing enzyme katanin p60; insight into the substrate dependent activation mechanism. *FEBS J.*, **279**, (7), 1339-1352. (2012)

Fukuchi, S., Sakamoto, S., Nobe, Y., Murakami, D. S., Amemiya, T., Hosoda, K., Koike, R., Hiroaki, H., Ota, M., IDEAL - Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature. *Nucleic Acids Research (database issue)*, **40** (1):D507-511. (2012)

Hiroaki, H., Umetsu, Y., Hoshi, M., Nabeshima, Y., Kohda, D., A Simplified Recipe for Assigning Amide NMR Signals Using Combinatorial ¹⁴N Amino Acid Inverse-Labeling. *J Structural Functional Genomics.*, **12** (3): 167-174. (2011)

Tsuruta, T., Umetsu, Y., Iwaya, N., Taniguchi, R., Goda, N., Tenno, T., Kuwahara, Y., Hiroaki, H., ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the SPFH domain of human stomatin. *Biomol. NMR Assign*, **6** (1): 23-25 (2011)

Hasegawa, J., Tokuda, E., Tenno, T., Tsujita, K., Sawai, H., Hiroaki, H., Takenawa, T., Itoh, T. SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain. *J Cell Biol* **193** (5):901-916. (2011)

Fujiwara, Y., Fujiwara, K., Goda, N., Iwaya, N., Tenno, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear Valocin containing protein like 2 (NVL2) harboring a nucleolar localization signal. *J Biol Chem* **286** (24):21732-21741. (2011)

Asari S, Fujimoto K, Miyauchi A, Sato T, Nakano I and Muramatsu S: Subregional 6-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine uptake in the striatum in Parkinson's disease. *BMC Neurol*, 11-35, 2011.

Tokuoka H, Muramatsu S, Ichinose C, Sakane H, Kojima M, Aso Y, Nomura T, Metzger D and Ichinose H: Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the

nigrostriatal projection. *J Biol Chem*, 286(50): 43549-43558.

Miyamoto M, Miyamoto T, Iwanami M, Muramatsu S, Asari S, Nakano I and Hirata K: Preclinical substantia nigra dysfunction in rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Sleep Med*, 13(1):102-106, 2011.

Jin D, Muramatsu S, Shimizu N, Yokoyama S, Hirai H, Yamada K, Liu HX, Higashida C, Hashii M, Higashida A, Asano M, Ohkuma S and Higashida H: Dopamine release via the vacuolar ATPase V0 sector c-subunit, confirmed in N18 neuroblastoma cells, results in behavioral recovery in hemiparkinsonian mice. *Neurochem Int*, doi:10.1016/j.neuint. 2011. 12. 021.

2. 学会発表

Hoshi, M., Ohnishi, T., Inoue, M., Hiroaki, H., Nabeshima, Y., Kakita, A. (2011年9月21日) A new toxic target for a high-mass amyloid β -protein assembly with a unique toxic structure "International conference on Alzheimer's disease: Return to the Basics" at Annual meeting for Japanese Biochemical Societies, organized by Professors Iwata and Hoshi
Kyoto (オーガナイザー兼招待講演)

Minako Hoshi (2011年9月22日) Enlightening Protein Assembly Pathways Leading to Alzheimer Disease" IBRI Mini-Workshop on amyloid-beta protein oligomer amyloid-beta protein assembly "Deciphering the mystery of amyloid-beta protein assembly.", organized by Professors Hiroaki and Hoshi Kobe (オーガナイザー、招待講演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of in vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. France-Japan Coordination Chemistry Symposium, Rennes, France, 2011年6月28日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design, Design, Synthesis and Biological Application of in vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Vancouver, Canada, 2011年8月7日 (基調講演)

Kikuchi, K. Development of Molecular Imaging Probes for Protein Labeling with Tunable Chemical Switches. European Science Foundation Workshop, Menaggio, Italy, 2011年10月11日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of in vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches, Asian Conference on Coordination Chemistry, New Delhi, India, 2011年10月17日 (招待講演)

Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of in vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. Asian Conference on Coordination Chemistry, Hanoi, Vietnam, 2012年2月24日 (招待講演)

菊地 和也, 化学スイッチ機能を有した分子イメージプローブの合成と生物学への応用, 日本化学会 第92春季年会, 横浜, 2012年3月27日 (招待講演)

廣明秀一, 蛋白質の溶液 NMR、基礎の基礎 (HSQC の見方), 新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識と機能発現」第二回若手育成講習会, 大阪大学蛋白質研究所, 大阪, 2011/4/26, 招待講演

廣明秀一, タンパク質 ^1H - ^{15}N 二次元 NMR の徹底離開 (理想的でない試料のスペクトルを中心に), 第12回若手 NMR 研究会, 琵琶湖リゾートクラブ, 滋賀, 2011/6/23, 招待講演

廣明秀一, NMR の原理 1D/2D-NMR, 2011年日本分光学会 NMR 講習会, 東京大学薬学部, 東京, 2011/7/20, 招待講演

廣明秀一, NMR Analysis of the Toxic A β High Molecular Weight Oligomer, 先端医療センターアルツハイマー病ミニワークショップ, 神戸臨床情報センター, 神戸, 2011/9/22, 招待講演

廣明秀一, A hypothesis of membrane skeleton: Are SPFH-domain proteins membrane scaffolding proteins?, Kobe University-University of Washington Joint Symposium on Integrative Membrane Biology and Signal Transduction Medicine, 神戸ポートピアホテル, 神戸, 2011/12/13, 招待講演

廣明秀一, 遺伝子修復因子 Hef と核小体タン

パク質ヌクレオリンに含まれる天然変性領域の解析, 新学術領域「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第2回公開シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪, 2012/1/25, 招待講演

廣明秀一, 創薬標的としての AAA-ATPase と NMR 構造生物学, 第一回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム, 岐阜大学, 岐阜, 2012/3/23, 招待講演

Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Strategies for the local production of dopamine. The Federation of European Biochemical Societies 36th FEBS Congress, Jun 30, 2011, Torino.

Muramatsu S: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, 2nd Takara Bio Award Lecture, Jul 15, 2011, Fukuoka. (abstract p102)

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: Four years of follow-up. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Best Presentation, Jul 15, 2011, Fukuoka. (abstract p107)

Muramatsu S: *In vivo* imaging in cell and gene therapy for Parkinson's disease. The 17th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 17, 2011, Fukuoka. (abstract p91)

Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Four years follow-up. The 8th International Symposium, Sep 21, 2011, Nikko. (abstract p20-21)

Muramatsu S: Gene therapy: the state of the art. 6th International Expert Meeting on the Treatment of Parkinson's disease, Oct 30, 2011, Tokyo.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
発明の名称: タンパク質を蛍光標識する方法出願
番号: PCT/JP2012/052227
出願者: 大阪大学
発明者: 菊地和也、水上進、渡辺修司、秋元悠里
出願日: 2012年2月1日

村松慎一: PCT 出願 (PCT/JP2011/075240), 神経系細胞への遺伝子導入のためのアデノ随伴ウイルスベリオン

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 (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ってきた。

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

昨年までの、固相及び溶液NMRによる構造解析から、ASPDは既存の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 (Ishii et al. 投稿準備中、Hiroaki et al., ICMRBS2010)。より完全な構造情報を得るために、引き続き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を調製し固相NMRにより構造解析を行う (イリノイ大との共同研究)。さらに、共同研究者と協力し、大腸菌を用いて安定同位体ラベル化したAβを大量に得る手法の確立を目指した。□

(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。昨年、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で候補分子の目処が立った。本年度はこの分子の機能解析を実施した。

(3) アミロスフェロイドのイメージング

昨年、ASPD形成に重要なアミノ酸残基を明らかにした。この情報を基に適切な安定同位体ラベルを入れNMR解析を行った。また、昨年得られたASPD結合ペプチドをナノセンサ化する準備として、菊地らと協力し当該ペプチドを血液脳関門透過型に改良し

た。

(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Aβ1-42は難合成ペプチドとして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、大腸菌を用いて安定同位体ラベル化したA β を大量に得る手法の確立に貢献した（詳細は廣明博士の報告書を参照）。また、特定のアミノ酸だけを安定同位体標識したA β から調製したASPDの固相NMR解析を実施し、ASPDの構造情報の手がかりを得た（Ishii et al.投稿準備中）。

(2) 標的分子同定と機能解析

昨年、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、候補分子の目処がたった。この分子の機能解析から、ASPDはこの分子の機能を阻害し、細胞に過剰なカルシウムが流入することで神経細胞死が起こることが明らかとなった。また患者脳を用いた病理学的解析においても、上記を支持する結果が得られた。

(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、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。また、昨年得られたASPD結合ペプチドをナノセンサ化する準備として、菊地博士らと協力し当該ペプチドを血液脳関門透過型に改良し正常解析を行うこととした。

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可能性が示唆された (Ishii et al.投稿準備中)。さらに今回確立に成功した大腸菌の系を用いて (詳細は廣明博士の報告書参照)、詳細な溶液NMRの解析が可能となった。

(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を確立しようとしているところである。

(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の検出

を可能にするナノセンサの開発に着手した。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、患者脳で起こる神経細胞死のメカニズムを明快に説明することが可能となった。さらに、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.* 286, 11555-11562

Hiroaki, H., Umetsu, Y., Nabeshima, Y., Hoshi, M., Kohda, D. (2011) A Simplified Recipe For Assigning Amide NMR Signals Using Combinatorial ¹⁴N Amino Acid Inverse-Labeling *J. Struct. Functional Genomics* 12, 167-174

2. 学会発表

Hoshi, M., Ohnishi, T., Inoue, M., Hiroaki, H., Nabeshima, Y., Kakita, A. (2011年9月21日) A new toxic target for a high-mass amyloid β -protein assembly with a unique toxic structure
“International conference on Alzheimer’s disease:

Return to the Basics” at Annual meeting for Japanese Biochemical Societies, organized by Professors Iwata and Hoshi

Kyoto (オーガナイザー兼招待講演)

Minako Hoshi (2011年9月22日) Enlightening Protein Assembly Pathways Leading to Alzheimer Disease” IBRI Mini-Workshop on amyloid-beta protein oligomer amyloid-beta protein assembly “Deciphering the mystery of amyloid-beta protein assembly.”, organized by Professors Hiroaki and Hoshi Kobe

(オーガナイザー、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(Aβ)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Aβ集合体の1つ、ASPDは、極めて強い神経細胞死活性を持つ。本研究では、ASPDによる神経細胞死の誘導機構の解明に向け、ASPD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、ASPDの形成が促進するモデルマウスの構築に向けた検討を行った。

A. 研究目的

アルツハイマー病においてAβの集合体による神経細胞死の誘導は、Aβ集合体の立体構造が重要と考えられている。ASPDにおいても、ASPD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。ASPD特異的に結合する標的分子を同定し、ASPD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ASPD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、ASPD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

ASPD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、ASPD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Aβ等の条件下では結合せず、成熟神経細胞においてASPD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。

ASPD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ASPDの形成が促進しているマウスの探索により行う。また、ASPD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

ASPD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な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ノックアウトマウスの作製に向け、現在、作出した遺伝子改変マウ

スの交配を行っている。また、ASPD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う知見を得ており、その応答の機構を解析した。

ASPD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い、ベクターの構築を行った。

D. 考察

ASPD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を用いた解析、および神経培養細胞を用いた解析を通じて、ASPD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、ASPD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

ASPD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

なし

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

蛋白質を脳内へ選択的に送達する技術は、中枢神経疾患の機構解明、診断・治療のうえで、極めて重要である。本研究では、血液脳関門を通過し中枢神経細胞に選択的に導入される Rabies virus 糖蛋白質由来ペプチドに着目し、そのペプチドを遺伝子工学により融合させた蛋白質の神経細胞選択的導入を行った。さらに、蛋白質化学修飾法とデリバリー法を組み合わせることで、蛋白質と共に小分子プローブを神経細胞に選択的に導入する技術を開発した。

A. 研究目的

抗体をはじめとした蛋白質医薬品が、小分子医薬品では効果のない疾病に対して、顕著な有効性を示すことが明らかとなり、近年、大きな注目を集めている。しかしながら、これらの医薬品は、がんや自己免疫疾患などには臨床応用されているものの中枢神経疾患において、実用化されていない。一方で、アルツハイマー病をはじめとする多くの中枢神経疾患には、有効な早期診断法や治療薬が開発されておらず、蛋白質医薬品の中枢神経疾患への応用は、この状況を打開する大きな可能性を秘めている。中枢神経疾患への蛋白質医薬品の適用時の問題点は、血液脳関門の存在である。血液脳関門は、蛋白質をはじめとする多くの分子の脳内への導入の障壁となっており、脳内への分子デリバリー法の開発が、極めて重要である。これまでに、蛋白質を脳内に導入する多くの方法が開発されてきた。その例として、塩基性に富んだ膜透過ペプチドを用いる方法やトランスフェリンレセプターなどの結合分子を利用する方法が挙げられる。しかしながら、これらの方法は、神経細胞特異性に欠けることが原因で、実用化には至っていない。

我々のグループは、この問題を解決するために、蛋白質の選択的脳内デリバリー法の開発を行ってきた。前年度までの研究において、狂犬病ウイルス糖蛋白質由来のペプチドが血液脳関門を通過し神経細胞に選択的に入る性質を利用して、アデノ随伴ウイルスを脳内神経細胞に導入することに成功している。また、上記のペプチド以外にも、神経細胞に選択的に取り込まれるペプチドを発見し、このペプチドによる蛋白質の化学修飾反応を利用することで、緑色蛍光蛋白質EGFPを神経細胞選択的に導入することに成功した。

本年度は、プローブ分子を蛋白質に化学修飾し、神経細胞に導入する方法に関して検討した。中枢神経疾患の診断には、診断プローブ分子を脳内神経細胞に導入する必要があり、本研究において、蛋白質とともにプローブを神経細胞に導入するための基盤技術の構築を行った。

B. 研究方法

前年度までの実験では、神経細胞導入ペプチドを、化学修飾により、蛋白質表面に結合させていた。本年度では、特異的に小分子プローブを蛋白質に化学修飾するための技術を開発した。さらに、その蛋白質を遺伝子工学により、神経細胞導入ペプチドをつないだ融合蛋白質を作成し、神経細胞に導入されるかを検討した。

蛋白質の特異的化學修飾を達成するために、特定の分子に特異的部位で結合する蛋白質を用いた蛋白質標識技術を開発した。このために、我々は、Photoactive yellow protein (PYP) と呼ばれる蛋白質に着目した。PYPは、125アミノ酸からなる小蛋白質であり、リガンドである桂皮酸誘導体とCys69の部位で特異的に結合することが知られている。そこで、このリガンドに蛍光色素であるフルオレセインをつないだプローブFCATPを設計した。PYPと神経導入ペプチドを融合させ、この融合蛋白質にFCANBを結合させることで、ペプチド部位への非特異的な修飾反応による神経細胞導入効率の低下が起こらないようにした。

次に、プローブのPYPへの結合に関して検討した。プローブとPYPを反応させ、SDS-PAGEにより解析した。また、これらの反応物の蛍光・吸収スペクトルを測定した。

最後に、プローブ分子が結合したペプチド融合PYPタグが、神経細胞に選択的に導入されるかを検討した。この実験は、Neuro-2aとHeLa-S3にそれぞれ蛋白質を添加し、細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより行った。

(倫理面への配慮)

該当する実験はなし。

C. 研究結果

PYPと神経細胞導入ペプチドを融合させた蛋白質の遺伝子をクローニングし、大腸菌にて発現させた。精製後、蛋白質の純度をSDS-PAGEにて確認したところ、単一バンドが得られた。

FCATPの合成は、1-bromo-4-(methoxymethoxy)-2-methylbenzeneを出発物質として、6ステップで行い、その構造をNMR及び質量分析によって確認した。神経細胞導入ペプチド融合PYPとFCATPを反応させ、SDS-PAGEで解析したところ、融合蛋白質を示すバンドから蛍光が観測された。また、蛍光スペクトルを測定したところ、FCATPの蛍光は、反応初期において非常に弱く、反応の進行と共に、蛍光強度が上昇することが示された。また、吸収スペクトルを測定したところ、結合に伴いスペクトルのブルーシフトが確認された。

次に、FCATPの結合した融合蛋白質をNeuro-2aに添加し、共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、Neuro-2aの細胞内から蛍光が観測された。一方、この蛋白質をHeLa-S3に添加し、共焦点顕微鏡で観察したところ、Neuro-2aの場合とは異なり、細胞内からは蛍光が観測されなかった。また、Neuro-2aに添加する蛋白質の濃度依存性についても検討したところ、5 μ Mでは、主に細胞膜から蛍光が観測され、20 μ Mでは、Neuro-2aの細胞内から蛍光が観測された。

D. 考察

神経細胞導入ペプチド融合PYPとFCATPを反応させ、SDS-PAGEにおいて、融合蛋白質を示すバンドから蛍光が観測されたことから、これら二分子は、共有結合することが示された。また、蛍光スペクトルの結果から、遊離の状態ではFCATPの蛍光強度が低く、フルオレセインの蛍光消光が起こっていることが示された。吸収スペクトルがブルーシフトしたことを考慮すると、基底状態でフルオレセイントリガンドである桂皮酸誘導体が会合し、その結果消光していると考えられた。また、FCATPは結合反応の進行に伴い、蛍光強度が上昇したことから、結合により会合の解消が起こったことが示唆された。

Neuro-2aの細胞内部から蛍光が観測されたことから、蛋白質に結合したプローブを神経細胞に導入することができることが示された。また、HeLa-S3の細胞内からは、蛍光が観測されなかったことから、神経細胞選択性が確認された。

E. 結論

神経細胞導入ペプチドを遺伝子工学により融合させた蛋白質を神経細胞に選択的に導入することができることが示された。また、この融合蛋白質を利用することで、小分子プローブを神経細胞内に導入することに成功した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sadhu, K. S., Mizukami, S., Lanam, C. R.,

Kikuchi, K. Sequential ordering among multicolor fluorophores for protein labeling facility via aggregation-elimination based β -lactam probes. *Mol. Biosyst.*, 7, 1766-1772 (2011)

2) Yoshimura, A., Mizukami, S., Hori, Y., Watanabe, S., Kikuchi, K. Cell-surface protein labeling with luminescent nanoparticles through biotinylation by using mutant β -lactamase-tag technology. *Chembiochem.*, 12, 1031-1034 (2011)

3) Mizukami, S., Matsushita, H., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., Kikuchi, K. ¹⁹F MRI detection of β -galactosidase activity for imaging of gene expression. *Chem. Sci.*, 2, 1151-1155 (2011)

4) Sadhu, K. S., Mizukami, S., Hori, Y., Kikuchi, K. Switching Modulation for protein labeling with activatable fluorescent probes. *Chembiochem.*, 12, 1299-1308 (2011)

5) Watanabe, S., Mizukami, S., Akimoto, Y., Hori, Y., Kikuchi, K. Intracellular Protein Labeling with Prodrug-Like Probes Using a Mutant β -Lactamase Tag. *Chem. Eur. J.*, 17, 8342-8349 (2011)

6) Mizukami, S., Yamamoto, T., Yoshimura, A., Watanabe, S., Kikuchi, K. Covalent Protein Labeling with a Lanthanide Complex and its Application to Photoluminescence Lifetime-based Multicolor. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 8750-8752 (2011)

7) Kowada, T., Kikuta, J., Kubo, A., Ishii, M., Maeda, H., Mizukami, S., Kikuchi, K. In Vivo Fluorescence Imaging of Bone-Resorbing Osteoclasts. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17772-17776 (2011)

8) Mizukami, S., Watanabe, S., Akimoto, Y., Kikuchi, K. No-Wash Protein Labeling Designed Fluorogenic Probes and Application to Real-Time Pulse-Chase Analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 1623-1629 (2012)

9) Okada, S., Mizukami, S., Kikuchi, K. Switchable MRI contrast agents based on

morphological changes of pH-responsive polymers. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 769-774 (2012)

10) Terai, T., Kikuchi, K., Urano, Y., Kojima, H., Nagano, T. A long-lived luminescent probe to sensitively detect arylamine N-acetyltransferase (NAT) activity of cells. *Chem. Commun.*, 48, 2234-2236 (2012)

11) Sadhu, K., Mizukami, S., Lanam, C. R., Kikuchi, K. Fluorogenic Protein Labeling through Photoinduced Electron Transfer-Based BL-tag Technology, *Chem. Asian. J.*, 7, 272-276 (2012)

12) Hori, Y., Nakaki, K., Sato, M., Mizukami, S., Kikuchi, K., Development of Protein-Labeling Probes with Redesigned Fluorogenic Switch Based on Intramolecular Association for No-wash Live-cell Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.*, In press (2012)

2. 学会発表

1) Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of in vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. France-Japan Coordination Chemistry Symposium, Rennes, France, 2011年6月28日 (招待講演)

2) Kikuchi, K. Design, Design, Synthesis and Biological Application of in vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Vancouver,

Canada, 2011年8月7日 (基調講演)

3) Kikuchi, K. Development of Molecular Imaging Probes for Protein Labeling with Tunable Chemical Switches. European Science Foundation Workshop, Menaggio, Italy, 2011年10月11日 (招待講演)

4) Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of in vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches, Asian Conference on Coordination Chemistry, New Delhi, India, 2011年10月17日 (招待講演)

5) Kikuchi, K. Design, Synthesis and Biological Application of in vivo Imaging Probes with Tunable Chemical Switches. Asian Conference on Coordination Chemistry, Hanoi, Vietnam, 2012年2月24日 (招待講演)

6) 菊地 和也, 化学スイッチ機能を有した分子イメージプローブの合成と生物学への応用, 日本化学会 第92春季年会, 横浜, 2012年3月27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/JP2012/052227

出願者: 大阪大学

発明者: 菊地和也、水上進、渡辺修司、秋元悠里
出願日: 2012年2月1日

2. 実用新案登録

該当なし

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Aβ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¹³C/¹⁵Nなどの安定同位体標識を施す必要がある。昨年度、我々はユビキチン-Aβ（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た。今回、我々は、NMR測定に十分量の安定同位体標識したAβ（1-40）/（1-42）を調製することを検討し、これに成功した。さらに、安定同位体標識したAβ（1-40）からのASPDの作成を検討し、その収率を上げることができた。また、我々は、ASPDに特異的に結合するペプチドとの相互作用解析を行った。ASPD結合ペプチドのトリプトファンの蛍光を利用した蛍光測定実験により、ASPDとペプチド間のおおよその解離定数を算出することに成功した。

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Aβ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、Aβ約30分子が凝集体を形成し特異な立体構造を取ることで、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）ASPD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ASPDを大量に合成する系を確立すること、（3）また、ASPDとそれに特異的に結合するペプチド間の結合解離定数を算出すること、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、¹³C/¹⁵Nなどの安定同位体標識を施すことが必須である。昨年度、我々はユビキチン-Aβ（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、安定した収量のAβ（1-40）/（1-42）を得ることに成功した。また、ASPDに対する分子標的薬剤の創出に向けて、ファージディスプレイ法を用いてASPDに特異的に結合するペプチド配列を得ることに成功した。そこで、本年度は（1）NMR測定に十分量の安定同位体標識したAβ（1-40）/（1-42）の調製法の確立とそのNMR測定、（2）安定同位体標識し

たAβ（1-40）/（1-42）から作成するASPDの収量向上の検討、を行った。さらに、ASPDに対する分子標的薬剤の創出に向け、（3）蛍光測定による、ASPDとそれに特異的に結合するペプチド間の結合解離定数の算出を試みた。

（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

- ユビキチン-Aβ（1-40）/（1-42）の融合タンパク質発現系から得られたAβ（1-40）/（1-42）に関して、安定同位体標識した試料をNMR測定に十分量得ることができた。
- ユビキチン-Aβ（1-40）/（1-42）の融合タンパク質発現系から得られたAβ（1-40）/（1-42）に関して、それぞれの単量体のNMRスペクトルの測定を行った。
- 安定同位体標識したAβ（1-40）/（1-42）から作成するASPDの収量向上の検討を行い、Aβ（1-40）のASPDに関して、その収量を上げることができた。
- ASPDとそれに特異的に結合するペプチドのELISA法を用いた相互作用解析を行い、両者の結合を確認することができたが、結合解離定数を算出することはできなかった。
- ASPDとアミロスフェロイド結合ペプチド間の結合解離定数を、平衡透析法を用いて算出することを検討したが、この方法では検出できないことが分かった。
- ASPDにはトリプトファン残基が含まれないこ

とを利用して、ASPD結合ペプチドのトリプトファンの蛍光を利用した蛍光測定実験により、ASPDとペプチド間のおおよその結合解離定数を算出することができた。

- さらに詳細な結合解離定数を得るために、ASPD結合ペプチドにフルオレセインおよびTAMRAの蛍光標識を導入し、より感度の良い測定方法を検討した。

D. 考察

ユビキチン- $\text{A}\beta$ (1-40)/(1-42)の融合タンパク質を大腸菌で発現する系を利用し、安定同位体標識を施した $\text{A}\beta$ (1-40)/ $\text{A}\beta$ (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。また、安定同位体標識 $\text{A}\beta$ (1-40) / (1-42)から作成するASPDの収量向上の検討を行った。これにより、 $\text{A}\beta$ (1-40)由来の安定同位体標識ASPDに関して、化学合成では大量調製が限られていた収量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 ^{15}N 標識ASPDから得られた情報を相補するために、コストの高い ^{13}C 標識を施したASPDの調製も限られた研究予算内で可能となった。

一方、ASPDと実験室内進化実験（ファージディスプレイ法）によってすでに得られているASPD結合ペプチドの相互作用解析を行い、両者の結合解離定数の算出を検討した。ELISA法を用いた測定では両者の結合を確認することはできたが、解離定数を算出するには至らなかった。平衡透析法においても、両者の解離定数を算出することを検討したが、ASPDとASPD結合ペプチドを分離可能な適当な排除分子量を持つ透析膜が入手できなかったため、この方法ではKdが測定できないことが分かった。しかし、ASPD結合ペプチドに含まれるトリプトファンの蛍光を利用した蛍光測定実験により、両者のおおよその解離定数を算出することに成功した。このことから、両者の相互作用解析において、蛍光光度計を用いた測定が有用であることがわかった。さらに詳細な数値を得るために、直接結合ペプチドを蛍光ラベル化し、より感度の良い測定方法を検討した。

E. 結論

安定同位体標識した $\text{A}\beta$ ペプチドの収量増加を達成した。ASPDとこれに特異的に結合するペプチドの相互作用解析において、蛍光光度計を用いた測定の有用性を証明した。

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

- Tenno, T., Fujiwara, Y., Hamada, D., Ikura, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. Effect of Ca^{2+} on microtubule severing enzyme katanin p60; insight into the substrate dependent activation mechanism. *FEBS J.*, **279**, (7),

1339-1352. (2012)

- Fukuchi, S., Sakamoto, S., Nobe, Y., Murakami, D. S., Amemiya, T., Hosoda, K., Koike, R., Hiroaki, H., Ota, M., IDEAL - Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature. *Nucleic Acids Research (database issue)*, **40** (1):D507-511. (2012)

- Hiroaki, H., Umetsu, Y., Hoshi, M., Nabeshima, Y., Kohda, D., A Simplified Recipe for Assigning Amide NMR Signals Using Combinatorial ^{14}N Amino Acid Inverse-Labeling. *J Structural Functional Genomics.*, **12** (3): 167-174. (2011)

- Tsuruta, T., Umetsu, Y., Iwaya, N., Taniguchi, R., Goda, N., Tenno, T., Kuwahara, Y., Hiroaki, H., ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignment of the SPFH domain of human stomatin. *Biomol. NMR Assign*, **6** (1): 23-25 (2011)

- Hasegawa, J., Tokuda, E., Tenno, T., Tsujita, K., Sawai, H., Hiroaki, H., Takenawa, T., Itoh, T. SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain. *J Cell Biol* **193** (5):901-916. (2011)

- Fujiwara, Y., Fujiwara, K., Goda, N., Iwaya, N., Tenno, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear Valocin containing protein like 2 (NVL2) harboring a nucleolar localization signal. *J Biol Chem* **286** (24):21732-21741. (2011)

2. 学会発表

(ア) 廣明秀一, 蛋白質の溶液NMR、基礎の基礎 (H SQCの見方), 新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識と機能発現」第二回若手育成講習会, 大阪大学蛋白質研究所, 大阪, 2011/4/26, 招待講演

(イ) 梅津喜崇, 天野剛志, 合田名都子, 白川昌宏, 池上貴久, 廣明秀一, 血管作動性腸管ペプチドVIPの二種類の溶液条件下での構造の比較, 日本ケミカルバイオロジー学会第6回年回, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京, 2011/5/23, ポスター

(ウ) 天野剛志, 合田名都子, 岩谷奈央子, 廣明秀一, 木下賢吾, 太田元規, ヒトタンパク質構造データベースSAHGによるドラッグブルなPDZドメインの探索, 第11回日本蛋白質科学会年会, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪, 2011/6/7+, ポスター

(エ) 梅津喜崇, 天野剛志, 合田名都子, 鍋島陽一, 星美奈子, 廣明秀一, 可溶性Ab集合体アミロスフェロイドのNMRによる構造解析に向けた試料調製, 第11回日本蛋白質科学会年会, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪, 2011/6/7-9, ポ