

201111009B

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21～23年度 総合研究報告書

研究代表者 星 美奈子

平成24（2012）年 5月

## 目 次

I. 総合研究報告		
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	27

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
総合研究報告書

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、固相及び溶液NMRの構造解析を実施し、ASPDは既存のA $\beta$ 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。上記を達成するためには、難合成ペプチドとして知られているA $\beta$ の安定同位体標識体を大量に得る必要があるが、そのためにユビキチン-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確立し、安定同位体標識を施したA $\beta$  (1-40)/(1-42)を高収量で得る方法を確立した。さらに、ASPDとこれに特異的に結合するペプチドに関して、蛍光光度計を用いた相互作用解析を行い、両者のおおよその結合解離定数を算出することができた。

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)。これにより、初めて患者脳で起こる神経細胞死の機構に明快な説明が可能となった。また、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。発達過程の影響を受けない新規のモデル動物を作製するためアデノ随伴ウイルス(AAV)を応用した.AAVのカプシド蛋白およびゲノム配列を改変し、広範な脳領域の神経細胞特異的にアミロイド前駆体蛋白質遺伝子を発現可能な血管内投与型AAVベクターを開発した。Sweden型変異を持つアミロイド前駆体蛋白質を発現するAAVベクターを脳内に投与したサルでは注入部位付近の扁桃体にASPD陽性の老人斑を認めた。このベクターを応用してASPDに対する特異的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狂犬病ウイルスRabies virus糖蛋白質由来ペプチドに着目し、蛋白質デリバリー法の開発を行った。また、nAChR結合ペプチドの中から新規神経細胞導入ペプチドを見出した。これらのペプチドを利用して、遺伝子発現ウイルスベクターAAVの脳内神経細胞における発現に成功し、蛋白質及び小分子プローブを神経細胞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、将来的に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 (H21年度)
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 $\beta$ アミロイド ( $A\beta$ ) 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 $A\beta$ 集合体は単離されても、今まで神経細胞死を起こす $A\beta$ 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、 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ モノマーや既存の $A\beta$ 集合体をほとんど認識せず、逆に既存の $A\beta$ 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)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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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。そのために、安定同位体標識した $A\beta$ の大腸菌発現系を用いた大量調製方法を確立した。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の探索を行った。さらに、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。

血管内投与後に脳内へ移行しやすいAAVベクターを見出すため各種の型の capsid 蛋白を持ち、蛍光蛋白質GFPを発現する pseudotype AAVベクターを作製した。一部の型では、capsid 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。

アミロイド前駆体蛋白(APP)蛋白を発現する

AAVベクターを作製した。APPは野生型に加え、家族性アルツハイマー病のSweden型変異(Lys<sup>670</sup>→Asn<sup>670</sup>, Met<sup>671</sup>→Leu<sup>671</sup>)およびE693Δ型についてもベクターを作製した。

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。

2008年9月にSweden型変異APPを発現するAAV8ベクター(AAV8-SynI-APPsw)を定位脳手術で投与したカンクイサルの脳組織を18か月後に還流固定しASPD抗体による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。

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、疾患の診断・治療のための有効な診断用プローブや医薬品が開発されていないことに加え、これらの分子を脳内に送達する有効な技術がないことがあげられる。

近年、小分子医薬品では効果のない疾病に対して遺伝子治療用ベクターや蛋白質医薬が、近年大きな注目を集めている。これらの生物医薬は、特異性や副作用の低さなどの利点があり、がんや自己免疫疾患等に臨床応用されている。しかしながら、中枢神経疾患では、血液脳関門の障壁により生物医薬を脳内へ送達できないため、実用化には至っていない。一方で、その医療効果の高さから中枢神経疾患への応用の期待が高まっている。

これまでに、膜透過ペプチドなどを利用して血液脳関門を通過する分子が開発されてきたが、神経細胞選択性が低いことが問題であった。そこで、本研究では、この問題を解決することを目的として、選択的な神経細胞デリバリー技術の開発を行った。

この目的を達成するうえで、我々は、血液脳関門を通過し、神経細胞に選択的に導入されることが知られている狂犬病ウイルス糖蛋白質由来RVGペプチドに着目した。本研究では、このペプチドにより蛋白質や遺伝子治療ウイルスベクターAAVの表面を化学修飾し、その修飾分子の神経細胞選択性や脳内発現に関して検討した。また、RVGペプチドがnAChRに結合することに着目し、種々のnAChR結合ペプチドの神経細胞導入能や細胞選択性に関して明らかにするとともに、これらのペプチドにより蛋白質を神経細胞に導入可能かを検討した。最後に、分子プローブを神経細胞に導入するために、特異的蛋白質修飾技術を開発した。この技術を用いて、蛋白質の特異的部位に分子プローブを導入し、神経細胞導入ペプチドによるデリバリー法と組み合わせて、蛋白質とともに分子プローブを神経細胞に導入する方法に関して検討した。

#### 1. RVGペプチド修飾AAVベクターの開発と脳内神経細胞発現

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ぐ。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Neuro-2a、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。

#### 2. 新規神経細胞導入ペプチドの開発と神経細胞導入メカニズムの解析

蛍光色素であるフルオレセイン誘導体をつなぐ新規nAChR結合ペプチドを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、nAChR結合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。

更に、nAChR結合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nAChR結合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。

### 3. 小分子プローブ結合蛋白質の神経細胞導入

蛋白質の小分子による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)。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Aβ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Aβ(1-40)に関して、<sup>15</sup>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、<sup>15</sup>N-Aβ(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。

上記に加えて以下の成果を得た。

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-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が、収量が低く、その原因はAβペプチドが発現・精製時に分解を受けるためであった。
2. ユビキチン-Aβ(1-40)/(1-42)の融合タンパク質発現系を確立し、収量を従来の10倍程度増加することができた。

- 安定同位体標識したA $\beta$ (1-40)/(1-42)をNMR測定に十分量得ることができ、それぞれの単量体のNMRスペクトルの測定を行った。
- <sup>15</sup>N-A $\beta$ (1-40)から作成したアミロスフェロイドのNMR測定に成功し、一部のシグナルが観測できた。
- A $\beta$ (1-40)/(1-42)について、アミノ酸特異的逆ラベル法(<sup>15</sup>N標識のバックグラウンド中で特定のアミノ酸のみ<sup>14</sup>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完了した。
- 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 $\beta$ ペプチド(モノマー)との相互作用を確認した。
- pET-TRX-PRESATベクターを用いて、ASPD結合ペプチドの大腸菌発現系を確立した。
- 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結合解離定数を算出することができた。
- ASPDとASPD結合ペプチドの詳細な結合解離定数を得るために、ペプチドに直接蛍光ラベルを導入し、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。

野生型カプシドを持つAAV8、AAV9ベクターでは、脳内の少数の神経細胞およびグリア細胞にGFPの発現が認められた。

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新規開発の血管内投与型AAVベクターでは、脳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。

APP遺伝子(野生型, Sweden型, E693  $\Delta$ 型)を搭載した血管内投与型ベクターでは、*in vitro*でAPPの発現を確認した。

AAV8-SynI-APPswを投与したサルでは、注入部位付近の扁桃体にASPD陽性の老人斑を認めた。

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 $\beta$ 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。以下の結果を得た。

### 1. RVGペプチド修飾AAVベクターの開発と脳内神経細胞発現

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Neuro-2a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Neuro-2a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。

### 2. 新規神経細胞導入ペプチドの開発と神経細胞導入メカニズムの解析

合成した新規nAChR結合ペプチドを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ペプチドおよび新規19アミノ酸ペプチドには、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  $\mu$ Mもしくは20  $\mu$ Mとして、細胞に添加したところ、5  $\mu$ 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、19アミノ酸ペプチドとRVGペプチドの場合、20  $\mu$ Mでは、細胞の内部から蛍光が観測された。また、新規ペプチド添加細胞からは、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 $\alpha$ -ブンガロトキシンを添加し、新規ペプチド及び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、 $\alpha$ -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、新規ペプチド及び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を添加した場合には、新規ペプチド及び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、新規ペプチドからは導入量に変化はなかった。

更に、新規ペプチドもしくは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。

### 3. 小分子プローブ結合蛋白質の神経細胞導入

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 $\mu$ Mでは、主に細胞膜から蛍光が観測され、20 $\mu$ 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 $\beta$ (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、<sup>13</sup>C標識を施したA $\beta$ (1-40)由来またはA $\beta$ (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。

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。ユビキチンとの融合により分解を防ぐことに成功し安定同位体標識を施したA $\beta$ (1-40)/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。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<sup>15</sup>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<sup>13</sup>C標識を施したA $\beta$ (1-40)由来またはA $\beta$ (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。

一方、実験室内進化実験（ファージディスプレイ法）によるスクリーニングによって得られたASPD結合ペプチドの多くが、溶液中の実験でA $\beta$ 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の明らかになる。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。

さらに、ASPDとファージディスプレイ法によって得られた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、この方法では検出できないことが分かった。しかし、ASPD結合ペプチド配列のトリプトファン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。

ASPDの病態解明と治療法の開発には、脳内に ASPDを生じる適切なモデル動物が必要となる。ASPD自体を定位脳手術で注入する場合は、注入針の刺入に伴う急性の炎症とそれによるASPDの除去反応が生じる可能性が考えられる。そのため、AAVベクターにより持続的にAPPを発現させることにした。定位脳手術によるサル脳内へのAAVベクターの投与では、注入部位付近でASPD抗体陽性の老人斑が認められ、ベクター未投与の対側では見られないことから、APP持続発現によりASPDが形成されたと考えられる。

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。血液脳関門を通過する詳細な機序は不明であるが、炎症反応や組織破壊は認めていない。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

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。

脳内デリバリーについては以下の考察を得た。

### 1. RVGペプチド修飾AAVベクターの開発と脳内神経細胞発現

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。

### 2. 新規神経細胞導入ペプチドの開発と神経細胞導入メカニズムの解析

本研究で合成したnAChR結合ペプチドは、すべてNeuro-2aに選択性を示した。特に、そのうちの一つである19アミノ酸からなるペプチドは、細胞内部に導入されることが明らかとなった。一方で、その新規ペプチド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、クロロプロマジンにより導入量が低下したものの、新規ペプチド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、 $\alpha$ -ブングアロトキシンにより、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、 $\alpha$ -ブングア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、新規ペプチドを利用して、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、新規nAChR結合ペプチド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。

### 3. 小分子プローブ結合蛋白質の神経細胞導入

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

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 $\beta$ 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。

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。

また、アルツハイマー病のモデル動物作製と遺伝子治療に応用可能な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。

Rabies virus糖蛋白質由来RVGペプチドを利用することで、蛋白質の神経細胞導入が可能となった。さらに、このペプチドを用いる遺伝子発現ベクターであるAAVを脳内神経細胞に感染させ、遺伝子発現させることに成功した。

また、nAChR結合ペプチドを合成・解析することにより、新規神経細胞導入ペプチドを見出した。これらのペプチドが神経細胞に導入されるメカニズムについて知見を得るとともに、蛋白質導入のためのツールとなることを示した。

最後に、特異的蛋白質修飾技術を利用して、小分子プローブを蛋白質とともに神経細胞に導入する技術の開発に成功した。

以上のように本研究で開発した技術は、中枢神経系疾患の診断・治療のための小分子プローブや蛋白質医薬品、遺伝子治療ベクターを脳内神経細胞に導入するための有用なツールとなることが期待される。

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

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

**Amyloid  $\beta$ -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  $\beta$ -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 amylophero-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

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  $\beta$ -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

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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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  $\beta$ -lactamase and a designed FRET substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5016-5017 (2009)

Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., Kikuchi, K. Dual-function probe to detect protease activity for fluorescence measurement and  $^{19}\text{F}$  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  $\text{Zn}^{2+}$  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)

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  $\beta$ -Lactamase-tag Technology. *Bioconjug. Chem.* **21**, 2320-2326 (2010)

Sadhu, K. K., Mizukami, S., Watanabe, S., Kikuchi, K. Turn-on Fluorescence Switch Involving Aggregation and Elimination Processes for  $\beta$ -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)

Sadhu, K. K., Mizukami, S., Lanam, C. R., Kikuchi, K. Sequential ordering among multicolor fluorophores for protein labeling facility via aggregation-elimination based  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase-tag technology. *Chembiochem.*, **12**, 1031-1034 (2011)

Mizukami, S., Matsushita, H., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., Kikuchi, K.  $^{19}\text{F}$  MRI detection of  $\beta$ -galactosidase activity for imaging of gene expression. *Chem. Sci.*, **2**, 1151-1155 (2011)

Sadhu, K. K., 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  $\beta$ -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)
- Umetsu, Y., Taniguchi, R., Satomura, R., Goda, N., Ikegami, T., Furuse, M., Hiroaki, H. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N 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* **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. 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)
- Iwaya, N., Akiyama, K., Goda, N., Tenno, T., Fujiwara, Y., Hamada, D., Ikura, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. Effect of Ca<sup>2+</sup> 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 <sup>14</sup>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., <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>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)
- Fukushima F, Nakao K, Shinoe T, Fukaya M, Muramatsu S, Sakimura K, Kataoka H, Mori H, Watanabe M, Manabe M and 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 and 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(7):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 and Inoue N : Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 4(7):e6318,2009.
- E. Ito T, Yamamoto S, Hayashi T, Kodera M, Mizukami H, Ozawa K and 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 and Perlmann T: Nurr1 is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons. *J Neurosci*, 29(50):15923-15932,2009.
- Krzyżosiak A, Szyszka-Niagolov M, Wietrzych M, Gobaille S, Muramatsu S and 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 and 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 and 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.
- Asari S, Fujimoto K, Miyauchi A, Sato T, Nakano I and Muramatsu S: Subregional 6-[<sup>18</sup>F]fluoro-L-m-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. (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

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  $\beta$ -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)

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  $\beta$ -protein assembly with a unique toxic surface  
The 10<sup>th</sup> international conference on Alzheimer's and Parkinson Diseases  
Barcelona, Spain, March 9-13, 2011

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 238<sup>th</sup> 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 13<sup>th</sup> 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. 2<sup>nd</sup> 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, 日本バイオイメーキング学会第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)

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)

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<sup>2+</sup> Probes for

Ratiometric Fluorescence Imaging. The Fujihara Foundation of Science, The 60<sup>th</sup> 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)

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, 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, 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<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>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 $\beta$ 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

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, 2009 年 5 月 22 日, 仙台. (臨床神経学, 49 : 890-892, 2009)

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 12th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, May 29, 2009, San Diego.

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 15th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 11, 2009, Osaka.

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 16th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Jul 1, 2010, Utsunomiya. (abstract p55)

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, 2010 年 10 月 9 日, 東京. (特別講演) (日本保健科学学会誌 Vol.13(1), p18)

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」～, 2011 年 2 月 23 日, 東京. (プログラム p34-35)

Muramatsu S: Gene therapy for Parkinson's disease: Strategies for the local production of dopamine. The Federation of European Biochemical Societies 36<sup>th</sup> 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, 2<sup>nd</sup> Takara Bio Award Lecture, Jul 15, 2011, Fukuoka. (abstract p102)

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. 6<sup>th</sup> 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

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, 3 1 7, 3 1 7 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

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

登録番号: US Patent No. 8, 168, 188; 発明者: Hoshi, M., Naito, K., Ideno, S.

発明の名称: 抗体及びその利用; 権利者: TAO ヘルスライフファーマ株式会社

国際出願日: 2005年08月11日

2. 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

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

出願番号：US 61/581,267；発明者：Hoshi, M.  
発明の名称：アミロスフェロイドが結合して成熟神経細胞死を誘発する標的分子、アミロスフェロイドが誘導する神経細胞死を抑制する方法及び物質、及びそれらの利用  
出願人：TAOヘルスライフファーマ株式会社；出願日：2011年12月29日

出願番号：特願 2011-281845；発明者：星美奈子；  
発明の名称：合成アミロスフェロイドの製造方法  
出願人：TAOヘルスライフファーマ株式会社；出願日：2011年12月22日

出願番号：特願 2012- 2448；発明者：星美奈子  
発明の名称：アミロスフェロイドが結合して成熟神経細胞死を誘発する標的分子、アミロスフェロイドが誘導する神経細胞死を抑制する方法及び物質、及びそれらの利用  
出願人：TAOヘルスライフファーマ株式会社；出願日：2012年01月10日

2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水上 進, 松下 尚嗣 菊地 和也	金属イオンプローブを用いた生体機能イメージング	二木史朗	生命現象を理解する分子ツール—イメージングから生体機能解	化学同人	東京	20010	15-24
水上進 , 菊地 和也	機能性分子設計に基づく蛋白質の 蛍光ラベル化	菊地和也	蛍光イメージング/MRIプローブの開発	シーエムシー出版	東京	2011	79-88
水上 進, 菊地 和也	酵素活性を検出する19F MRI プローブの開発	菊地和也	蛍光イメージング/MRIプローブの開発	シーエムシー出版	東京	2011	97-103
廣明秀一	NMRの原理	日本分光学会	核磁気共鳴分光法 (分光測	講談社	日本	2009	1-31

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M.M., and Teplow, D.B.	<b>Amyloid <math>\beta</math>-protein assembly and Alzheimer disease</b>	<i>J. Biol. Chem.</i>	284	4749-4753	2009
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,	<b>Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high-mass amyloid <math>\beta</math>-protein (<math>A\beta</math>) assembly from Alzheimer's disease brains</b>	<i>J. Biol. Chem.</i>	284	32895-32905	2009

K., and *Hoshi, M.					
Kitamura, Y., Yanazawa, M., Sato, M., Ito, A., and <u>Hoshi, M.M.</u>	<b>Identification of amyloospheroid-b proteins from mature neurons as molecular target of neurotoxicity by nonfibrillar A<math>\beta</math> assemblies</b>	<b>Alzheimer's and Dementia</b>	5	222-223	2009
Matsumura, S., Shinoda, K., Yamada, M., Yokojima, S., Inoue, M., Ohnishi, T., Shimada, T., <u>Kikuchi, K.</u> , Masui, D., Hashimoto, S., Sato, M., Ito, A., Akioka, M., Takagi, S., Nakamura, Y., Nemoto, K., Hasegawa, Y., Takamoto, H., Inoue, H., Nakamura, S., <u>Nabeshima, Y.</u> , Teplow, D.B., Kinjo, M., and <u>Hoshi, M.</u>	<b>Two distinct amyloid <math>\beta</math>-PROTEIN (A<math>\beta</math>) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology and toxicity analyses</b>	<i>J. Biol. Chem.</i>	286	11555-11562	2011
K. Noma, K. Kimura, K. Minatohara, H. Nakashima, Y. Nagao, A. Mizoguchi and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Triple N-Glycosylation in the Long S5-P Loop Regulates the Activation and Trafficking of the Kv12.2 Potassium Channel	<i>J. Biol. Chem</i>	284	33139-33150	2009
A. Inutsuka, M. Goda and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Calyculin A-induced neurite retraction is critically dependent on actomyosin activation but not on polymerization state of microtubules	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun</i>	390	1160-1166	2009
K. Abe, K. Tani and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Structural and functional characterization of H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase with bound fluorinated phosphate analogs	<i>J. Struct. Biol</i>	170	60-68	2010
K. Irie, K. Kitagawa, H. Nagura, T. Imai, T. Shimomura and <u>Y. Fujiyoshi</u>	Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels.	<i>J. Biol. Chem</i>	285	3685-3694	2010
Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y., <u>Kikuchi, K.</u>	Covalent protein labeling based on noncatalytic $\beta$ -lactamase and a designed FRET substrate.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	131	5016-5017	2009
Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., <u>Kikuchi, K.</u>	Dual-function probe to detect protease activity for fluorescence measurement and <sup>19</sup> F MRI.	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i>	48	3641-3543	2009