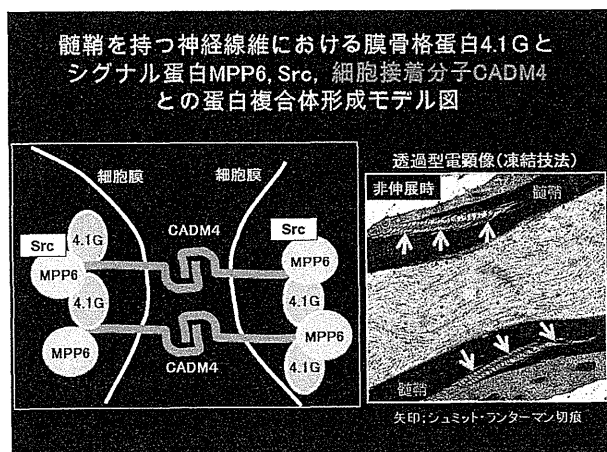


内の給排気口及び排水孔にはマウスが通過できないサイズの金網もしくは排水トラップを装着している。建物は鉄筋コンクリート製の独立棟であり、常時施錠されている。また、飼育室外に出した後は、実験のために速やかに実験に用い処理した。

C. 研究結果

1) 神経系におけるシグナル蛋白と膜骨格蛋白の役割

マウス神経系の髄鞘の構造体であるシュミット・ランターマン切痕 (SLI) における 4.1G を含む蛋白複合体について遺伝子欠損マウスを用いて解析し、シグナル蛋白 MPP6 と接着分子 CADM4 蛋白との結合を見出した。MPP ファミリー蛋白は微小管などの細胞骨格の輸送に関わるシグナル蛋白と考えられているが、4.1G 欠損マウス神経線維では MPP6 が激減していることから、4.1G が MPP6 の局在を規定していた。一方 CADM4 も 4.1G 欠損で消失したことより、4.1G による CADM4 の膜内輸送～局在化の役割が明らかとなった。さらに癌関連遺伝子 Src が MPP6 と結合し、4.1G 欠損では Src リン酸化状態が変化していることが明らかとなった。Src は細胞質や核内蛋白とリン酸化を介したシグナル伝達が知られていることから、膜骨格のシグナル開始の役割が示唆された (下図)。

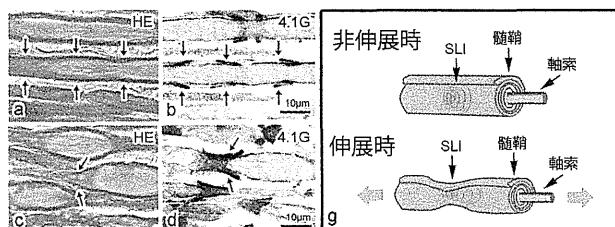


2) 凍結技法を用いた顕微鏡試料作製法

4.1G 欠損の神経線維への表現型として、高月齢

の 4.1G 欠損マウス坐骨神経における SLI 円錐台の高さが、野生型と比較して優位に減少したことより、形態形成に関与することがわかった。赤血球においては、4.1 ファミリー蛋白 4.1R が欠損すると溶血性貧血という病態を起こすことを考慮すると、SLI での 4.1G-MPP6-CADM4 複合体が神経線維にある外力に対する緩衝分子機構であることが示唆された。

この外力による神経線維の変化を明らかにするために、神経線維を伸縮させた状態で直接凍結する生体内凍結技法を行い、SLI の髄鞘における位置と形態変化を検討した。髄鞘を含む神経線維は進展時に数珠状に変化し、その変化に合わせて SLI がバネ状に円錐台の高さが変化していた。このことは前項に述べた赤血球の溶血性貧血のような機械的ストレスへの適応機能と対比させながら、神経疾患が比較的時間をかけて発症していく病態説明の一つになると考えている (下図)。



このように凍結技法を用いた形態や免疫組織化学的な検討に加えて、蛍光消退がきわめて少ないナノ粒子である量子ドットを血管注入し、生体内凍結して切片作製を行うことで、秒単位での血流分布も解析した。可溶性蛋白やこのような比較的低分子の外因性に注入した物質は従来の固定一脱水過程で容易に溶出してしまうが、生体内凍結一凍結置換固定を用いることで組織切片内にそのまま保持して免疫染色や顕微鏡観察によって解析できることを明らかにした。このような凍結技法を用いて、今後も正確な蛋白複合体の構造解析に応用できると考えている。

D. 考察

髄鞘のような神経線維で精密に制御された部位の構成蛋白を同定し、それらの分子複合体を明らかにすることによって、細胞膜間接着の構造さらにシグナル蛋白と連動する膜骨格部位は、細胞膜直下においてシグナルの検知と伝達が行われている細胞膜直下から細胞質における機能現場であることが考えられた。これらの知見はシグナルの検知、伝達、応答の構造的基礎の理解に役立つと思われ、さらに今後これらの蛋白の破綻の検討により、ヒトにおける未知の脱髄神経疾患の解明につながると考えている。

また、この過程でこれらの病変構造体を解析する新しい電子顕微鏡前処理技術の開発にも成功している。

E. 結論

新しい電子顕微鏡技術を用い、髄鞘を構成している膜骨格蛋白は、単に組織構造をもたらすだけでなく、細胞膜間や細胞間接着に関わる情報伝達の役割をもたらすことが判明した。膜内蛋白や細胞内の癌関連蛋白を含むシグナル蛋白と結合するといった分子複合体解析から明らかとなった。このことから、今後のモデルマウスの髄鞘変性疾患の解析に特化した解析技術の確立に向けた研究が進展したと考えている。現在、この応用組織学的研究が進行中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamijo S, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S, Terada N. Immunohistochemical study of mouse sciatic nerves under various stretching conditions with “in vivo cryotechnique” *Journal of Neuroscience Methods*, 227:181-188 2014
- 2) Saitoh Y, Terada N, Ohno N, Hamano A, Okumura N, Jin T, Saiki I, Ohno S. Imaging of

thrombosis and microcirculation in mouse lungs of initial melanoma metastasis with in vivo cryotechnique. *Microvascular Research*, 91:73-83 2014

- 3) Wu B, Ohno N, Saitoh Y, Bai Y, Huang Z, Terada N, Ohno N. Immuno- and Enzyme-histochemistry of HRP for demonstration of blood vessel permeability in mouse thymic tissues by “in vivo cryotechnique”. *Acta Histochem Cytochem*; in press. 2014
 - 4) Terada N, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S. Membrane skeleton in Schmidt-Lanterman incisure in Schwann cells of peripheral nervous system. *Springer, Schwann Cell Development and Pathology*; Eds.Sango K. and Yamauchi J.; p.29-45. 2014
 - 5) Ohno N, Sakoh T, Saitoh Y, Terada N, Ohno S. Schwann cell-Axon interactions: The molecular and metabolic link between Schwann cells and axons..*Springer, Schwann Cell Development and Pathology*; Eds.Sango K. and Yamauchi J.; p.47-67. 2014
 - 6) 齊藤百合花、寺田信生、大野伸彦、大野伸一. 生体内凍結技法による肺組織切片標本上での生体物質分布と血行動態の可視化法. *山梨医学科学雑誌* 29, 11-18, 2014
- ##### 2. 学会発表
- 1) 寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦、上條明生、大野伸一. 生きたマウス末梢神経線維の伸展機能状態下構造とシグナル分子機構の解析. (ワークショップ; 神経の構造と機能をもたらす分子を捉える) 第 55 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 松本 2014 年 9 月
 - 2) 寺田信生. 生きた動物生体内臓器の動的機

能分子形態像の解析. (学会奨励賞受賞講演)
第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集
会. 東京 2014 年 10 月

- 3) 上條明生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一、
寺田信生. マウス坐骨神経における膜骨格
蛋白 4.1G との抗 angiomin 抗体の免疫交差
反応性の検討. 第 74 回日本解剖学会中部支
部学術集会. 金沢 2014 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する研究に向けて
—病態モデルの神経機能評価—

緒方 徹（国立障害者リハビリテーションセンター・スポーツ科学支援センター長）

研究要旨

先天性の神経変性疾患の責任遺伝子とその変異はほぼ明らかになっている今日でさえ、ほとんどの疾患において確立した治療標的分子は確立しておらず、また治療薬も存在しない。本研究では治療の標的分子を明らかにすることを目的とし、病態を再現する培養系のスクリーニングシステムによる探索研究と、それによって単離された標的候補分子の個体レベルの評価を行う動物モデル実験とから構成される。本分担課題においては候補分子をターゲットとした遺伝子改変マウスを解析するシステムを構築し、神経機能の変化を感度よく測定する研究を担当している。今年度は疾患モデル動物に適合するよう、運動試験を評価するための実験系の調節を行った。

A. 研究目的

分子生物学手法の発展により多くの疾患原因遺伝子が同定されている。先天性の神経変性疾患の分野においても同様で、Charcot-Marie-Tooth 病に代表される遺伝性の末梢神経障害も多くの原因遺伝子が同定され、その中での変異部位も整理がなされている。

しかし、これら遺伝子レベルの変異同定は、その変異と臨床像との因果関係という新たな課題を生んでいる。すなわち、多くの遺伝性疾患においては遺伝子上の変異がどのようなメカニズムを介して疾患発症に至っているのか、同じ疾患群の中でも異なる病像を生むのか、といった点が未知である。同時にそのメカニズムに介入して症状改善に導くための治療標的因子も同定されている例は極めて稀なのが実情である。

本分担研究では先天性神経変性疾患をターゲットとして、培養実験の結果から同定された標的遺伝子候補について動物個体レベルでの働きを解析するため、その評価手法を確立する事を企図している。また、実際に候補分子について評価を行うことを目的としている。

B. 研究方法

1) ロータロッド・テスト

ロータロッド・テストは一般的に四肢の協調運動や運動学習を評価する系として利用されている。マウスを回転するロッドの上に静置し、ロッドを低速度から徐々にスピードを上げていく。マウスは転落を避けるためにロッド上を移動していくことになるがスピードが上がるにつれてその難易度が高まり、最終的には落下する。この落下までの時間を定量評価することで、その個体の協調運動能力、四肢の機能レベルを推測することができる。比較的再現性が高く、また落下までの時間という客観的評価が可能である事から行動解析データとしての信頼性は高いと位置付けられている。

2) テイルフリック・テストについて

テイルフリック・テストはマウスの尾部に対して熱源からの熱照射（55-60℃）を行い、逃避行動によって尾部が動くまでの時間とその動き方を計測するものである。

前述のロータロッド・テストが脳機能を含んだ運動経路・感覚経路を統合的に評価しているのに対し、このテイルフリック・テストは主に感覚性の上行路を反映すると考えられる。正確には運動経路も含まれるが、動き自体は脊髄レベルの反射によって制御されることから脊髄以下の経路における神経伝達速度を反映すると想定される。

本研究で扱う遺伝性の脱髄性疾患においては神経軸索を伝わる信号の伝搬速度が低下することが知られていることから、こうした行動観察によってその程度を個体レベルで評価できると考えられる。

(倫理面への配慮)

本分担研究は実験動物を用いた研究となり、その中で動物への負担は比較的軽微なものと考えられる。本研究は実施施設の動物実験委員会の承認をへて実施されている。

C. 研究結果

平成 26 年度は対象とする遺伝性疾患として、先天性神経変性疾患の中でも主要疾患として位置づけられるペリチェウス・メルツバッハ病の類似病態を呈する責任遺伝子として候補に挙げられている HLD5 の変異マウスの解析を念頭に実験条件の検討を行った。ロータロッド・テストにおいてはロッドの初速および加速プログラムのパラメータの選定を行った。テイルフリック・テストについては機器の設定と温度条件の設定を行った。

D. 考察

ペリチェウス・メルツバッハ病の病態解明と標的治療分子の評価・検討をめざし疾患モデルマウスであるペリチェウス・メルツバッハ病類似疾患 5 型 (HLD5) 変異マウスを想定した行動解析実験系の整備を行った。ロータロッド・テストおよびテイルフリック・テストはいずれも利用度の高い評価法であると考えられた。

E. 結論

- 1) ローターロッド・テストの実験条件の調整を行った。
- 2) テイルフリック・テストの測定パラメータを調整した。
- 3) 治療候補分子をターゲットにした遺伝子改変マウスを作製する準備を行っている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T (corresponding), SOX10 Transactivates S100B to Suppress Schwann Cell Proliferation and to Promote Myelination. PLoS ONE 9(12):e115400, 2014

2) Nagao M, Lanjakornsiripan D, Itoh Y, Kishi Y, Ogata T, Gotoh Y, HMGN family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells. Stem Cells 32(11):2983-2989, 2014

2. 学会発表

1) Nagao, M., Darin, Lanjakornsiripan., Itoh, Y., Kishi, Y., Gotoh, Y., Ogata, T. HMGN family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells. Neuroscience2014, Washington DC, USA, 2014/11/15-11/19. Abstract, 2014, 497.14/B43.

2) 緒方徹. 脊髄損傷後のコレステロール代謝阻害剤投与は髄鞘の再生を阻害する. 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会, 東京, 2014-09-27. プログラム集, 2014, p.36.

3) 緒方徹. 慢性病態における軸索損傷マーカー pNF-H の意義, 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会, 東京, 2014-09-27. プログラム集, 2014, p.41.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する研究に向けて
—病態モデルの生化学および分子薬理学的評価—

加藤 稔（田辺三菱製薬株式会社・探索研究所・副主任研究員）

研究要旨

近年、中枢神経系の疾患を標的とする創薬研究は困難化の一途をたどり、創薬標的の枯渇化も叫ばれている。一方で unmet medical needs の高い中枢神経系疾患は年々増えており、治療薬の開発は急務である。従来標的細胞として考えられていた神経細胞に対する創薬の行き詰まり感は、世界中の製薬会社で実感として存在しており、最近ではグリア細胞に着目した創薬が注目されてきている。Pelizaesus-Merzbacher 病および類似の遺伝性脱髄疾患は、中枢性の髄鞘変性が生じることにより神経伝導が障害され、さらに保護機能が失われた神経細胞の変性も生じる疾患であり、髄鞘を形成するグリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトは標的細胞として妥当であると考えられる。そこで、本研究では独自の研究によって標的候補の一つとしてピックアップされたあるプロテアーゼ（プロテアーゼ X）の阻害剤をスクリーニングするハイスループットな評価系構築を目的とし、酵素アッセイ系の構築を行った。至的酵素アッセイ条件を見出すことにより、評価条件を確定させた。さらに本評価系において、プロテアーゼ X に対する既知阻害化合物インヒビター Y の阻害が評価できることが判明したので報告する。今後、本評価系をミニチュアライズしたアッセイ系を構築し、社内外の化合物ライブラリーを対象としたハイスループットスクリーニングを実施することでプロテアーゼ X に対する新規骨格を有する阻害剤を見出し、標的分子としての妥当性を検証しながら化合物の最適化を進め、一日も早く難病で苦しむ患者さんに医薬品としてお届けするための研究開発を進展させる予定である。

A. 研究目的

近年のグリア細胞に対する理解の深化に伴い、従来になかった、グリア細胞を標的とした創薬（グリア創薬）が国内外の製薬企業で活発化している。グリア細胞は大別してアストロサイト・ミクログリア・オリゴデンドロサイトなどが知られており、オリゴデンドロサイトは脳内の神経軸索を髄鞘化することにより神経伝導度を向上させるとともに神経への栄養供給などを通じて神経保護作用も有していることが知られるようになってきた。オリゴデンドロサイトが特異的に障害される疾患として、多発性硬化症、白質ジストロフィ、横断性脊髄炎、

急性散在性脳脊髄炎、中央脳梁ミエリン症や、Pelizaesus-Merzbacher 病のような遺伝性脱髄疾患が挙げられており、これらは全て unmet-medical needs の高い疾患である。免疫性の脱髄疾患の一部は免疫抑制剤の投与により一定の効果があることがわかってきたが、遺伝性脱髄疾患に関しては効果的な治療薬が全く存在せず、この疾患に罹患した患者さんは有効な治療方法もないまま、低い quality of life(QOL) に苦しんでいる。遺伝性脱髄疾患の原因遺伝子は年々同定されており、病態モデル動物の開発も進んできている（山内淳司の報告書参照）が、脱髄を抑制、または再髄鞘化を促進するための

標的分子を含めたアプローチはほとんど存在していない。今回、我々独自の研究により、脱髄に寄与している可能性が高いプロテアーゼ（プロテアーゼ X）を同定した。プロテアーゼ X は、髄鞘化の際に必要なある種の細胞外タンパクを直接的に切断することや、脱髄に関連することが知られている他のプロテアーゼを活性化することにより脱髄の開始・進展に重要な役割を果たしている可能性が見出されている。そこで今回、プロテアーゼ X に対する阻害剤探索のために、本酵素の基質切断活性を指標としたアッセイ系の構築を試みた。さらに、既知阻害化合物であるインヒビター（インヒビター Y）の阻害活性を検証し、評価系としての稼働確認を試みた。今後は系のブラッシュアップとミニチュアライズを進めることによりハイスループットスクリーニング評価系を構築し、化合物ライブラリーから新規骨格を有する阻害剤を見出し、脱髄疾患の治療薬として開発していくことを目標とする。

さらに、脳白質は髄鞘・オリゴデンドロサイトが多く存在する脳内の領域であるが、統合失調症、うつ病、アルツハイマー病、脳梗塞、血管性認知症などのいわゆる common disease においても白質障害が存在するという報告が近年増加しており、プロテアーゼ X 阻害剤を含む、白質、髄鞘、オリゴデンドロサイトに作用する薬剤は、従来にない画期的な治療薬となる可能性も期待される。

B. 研究方法

今回のプロテアーゼ X に対する阻害剤探索評価系の構築に当たっては、市販のプロテアーゼ X および蛍光基質を用いた試験系を採用した。すなわち、市販プロテアーゼ X 酵素を溶媒に溶かし、適切な濃度に希釈して使用した。蛍光基質は溶媒に溶解の後、遮光冷凍保存し使用時に溶解して使用した。酵素および基質を種々のアッセイバッファー中で混和させ、37°C で適切な時間保温して生じた蛍光を、ルミノメータ

ーで測定しデータを取得した。

系構築のため、下記に示す 5 つの検討を実施し、最適条件を見出すとともに評価系としての稼働の確認を行った。

1. 酵素量と反応時間の検討

酵素濃度と反応時間による蛍光強度の増加を経時的に観測することで、至的な酵素量および保温時間を決定した。

2. 酵素の DMSO 耐性試験

一般的な化合物ライブラリーの化合物は Dimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解しており、高濃度の化合物を作用させるときは高い DMSO 濃度により酵素活性に影響が生じる場合がある。さらに、今回使用している基質は DMSO に溶解されているため基本的に 0.5%前後の DMSO が存在していることになる。そこで、0.5%から 10%までの DMSO 存在下での酵素活性を、蛍光基質の分解による蛍光量の増加を経時的に観察することで酵素活性への影響を検証した。

3. 基質飽和曲線の作製

阻害剤のハイスループットスクリーニングにおいては最初から高活性の阻害剤が取得できる確率は低く、低活性 (1~10 μM 程度) の化合物が多く取得される傾向がある。この時、基質が過剰量存在すると阻害剤との競合が生じ、化合物の阻害活性が高くなるため、ファーストスクリーニングにおいては基質飽和曲線を作製し、基質の K_m 値を把握し、 K_m 値よりも低い濃度の基質を使用し、かつアッセイウィンドウが確保できる基質濃度を見極める必要がある。そこで、上述の検討で得られた、酵素活性に影響を及ぼさない最大 DMSO 濃度下における基質濃度を最大として、基質濃度を振った検討を行い、一定時間における蛍光基質分解による蛍光量を観察して基質飽和曲線を作製し、 K_m 値を算出した。

4. アッセイ中に存在する BSA 濃度の検討

タンパク性の酵素アッセイ系においては、チューブやアッセイプレートへ酵素が吸着することによる酵素活性の低下がしばしば観察されることがある。そのような場合は BSA の添加により酵素を安定化させることができる可能性がある。一方、プロテアーゼの場合、高濃度の BSA の存在は BSA が基質として認識される場合、蛍光基質の分解を抑制する現象が観察される。そこで、BSA の添加がプロテアーゼ X の酵素活性に与える影響を、種々濃度の BSA 存在下で蛍光基質の分解による蛍光量の増加を観察することで検証した。

5. インヒビター Y の阻害曲線作成

上述で得られた酵素量、反応時間、Km 値に基づく基質濃度、DMSO 濃度、BSA 濃度を反映させた反応系において、種々濃度のインヒビター Y 共存下におけるプロテアーゼ Y の酵素活性を、一定反応時間における蛍光基質分解による蛍光量を観察して阻害曲線を作製し、インヒビター Y の IC50 を算出した。

尚、酵素アッセイ系の構築においては化合物の分散を補助するために TritonX-100 に代表される界面活性剤を加えることが多く、界面活性剤耐性試験を行うことが一般的であるが、今回はカウンター酵素試験で想定しているアッセイ系で使用されている TritonX-100 濃度が規定されているため、濃度の検討は実施しなかった。

また、バッファの種類や pH が酵素活性に及ぼす影響を検討することも一般的であるが、前述と同様にカウンター酵素試験で使用されているバッファと pH が規定 (pH 7.4) されており、かつ生理的な pH であるため検討は実施しなかった。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験に関しては、田辺三菱製薬株式会社研究所組換え DNA 実験委員会を通して承認を得ており、その規則を遵守し実験を行っている。また、研究分担者は田辺三菱製薬株

式会社の組換え DNA 実験委員会に常にかかわり、会社全体の組換え DNA 実験に関しても慎重に対処している。

一方、実験動物および遺伝子改変動物の取り扱いに関しても承認を得ており、3Rs を遵守し実験を行っている。また、研究分担者は田辺三菱製薬株式会社研究所動物実験委員会にも属し、組換え DNA 実験同様、会社全体の関連実験に関しても慎重に対応している。

C. 研究結果

1. 酵素量と反応時間の検討

酵素量を 0.2~20 ng/ 200 μ L reaction と振り、下記反応液組成下で 37°C 保温、経時的にルミノメーターで蛍光を計測した。

20 mM Heps-NaOH (pH7.4)

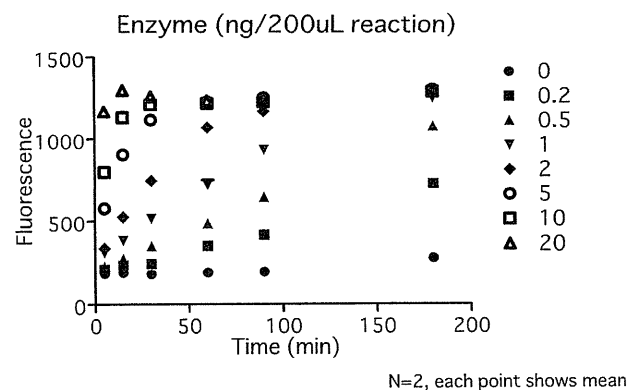
10 mM CaCl₂

0.001% TritonX-100

10 μ M substrate

0.2~20 ng protease X (=27~2680 pM)

In 200 μ L reaction



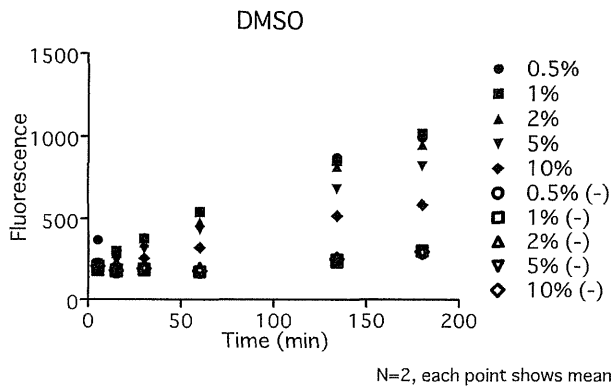
以上の結果より、酵素量は 0.5 ng/ 200 μ L reaction (67 pM)、反応時間 60~120 min において線形性が良好であることが明らかとなった。

この時、基質由来の DMSO が反応系に 0.5% 持ち込まれているため、DMSO 耐性試験を実施した。

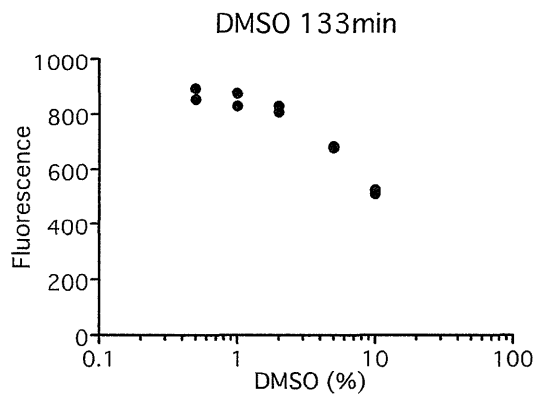
2. 酵素の DMSO 耐性試験

DMSO 濃度を 0.5~10% と振り、酵素濃度は 0.5 ng として経時的な蛍光測定を行った。白抜

きプロットは酵素を入れていないコントロールである。



測定時間 133 分の時における DMSO 濃度と蛍光量の関連を示したグラフを次に示す。

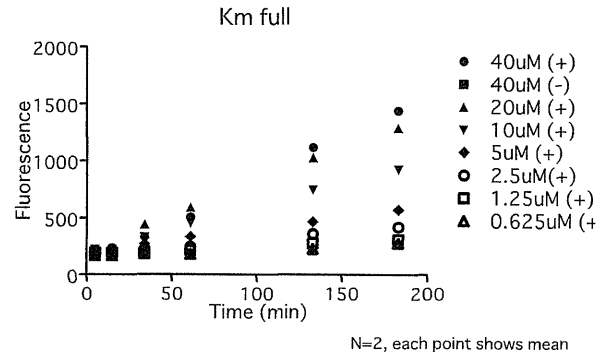


以上の結果より、DMSO 濃度は 2% まで許容されることが明らかとなった。

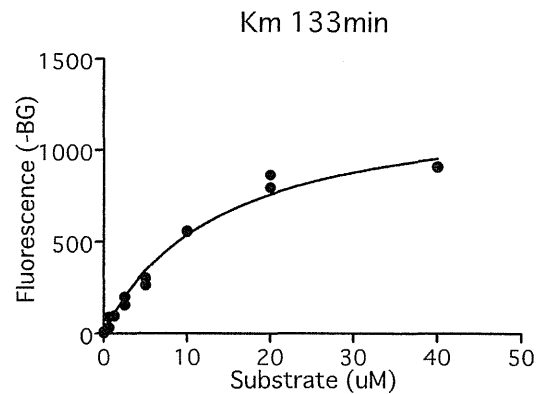
次に、DMSO 濃度 2% となる基質濃度 (40 μM) を最大濃度として、 K_m 値を推定するためのアッセイを実施した。

3. 基質飽和曲線の作製

基質濃度を 0.625~40 μM と振り、経時的に蛍光量を測定した結果を下記に示す。



次に、反応時間 133 分の時の基質濃度と蛍光量の関係を示したミカエリス・メンテンプロットを下記に示す。

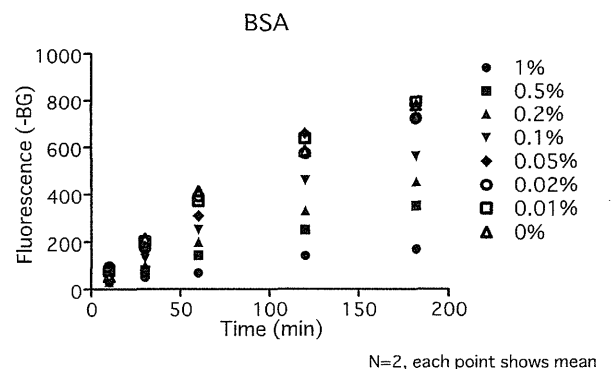


上記の結果、 K_m 値は 14 μM と推定された。よって以下の試験は基質濃度 10 μM で実施することとした。

次に BSA に対する影響を検討した。

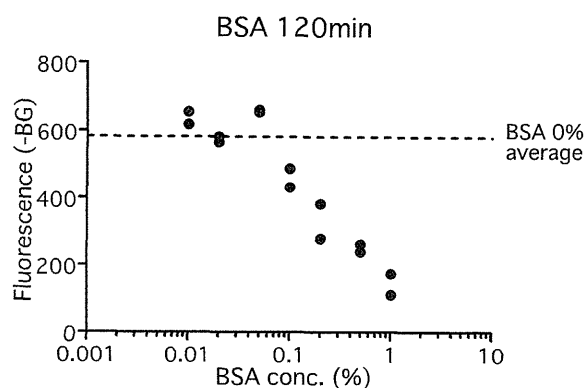
4. アッセイ中に存在する BSA 濃度の検討

BSA 濃度を 0.01~1% と振り、経時的に蛍光量を測定した結果を下記に示す。



次に、反応時間 120 分の時の BSA 濃度と

蛍光量の関係を示したグラフを示す。点線で示すラインは、BSA が 0%の時の蛍光量の値である。



以上の結果より、BSA 濃度 0.05%以下では本条件における thermolysin 酵素活性に影響を及ぼさないことが示された。

最後に、上記で設定した条件下で、特異的阻害剤であるインヒビターYの阻害活性を評価した。

5. インヒビターYの阻害曲線作成

インヒビターY

20 mM Heps-NaOH (pH7.4)

10 mM CaCl₂

0.001% TritonX-100

10 μM substrate

0.5 ng protease X (=67 pM)

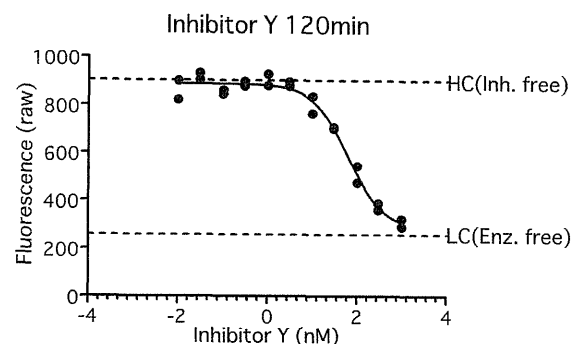
0.05% BSA

0.01~1000 nM inhibitor Y

In 200 μL reaction

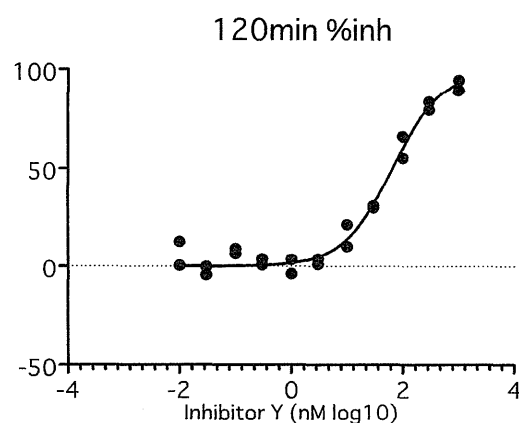
37°C で 120 分間保温し、蛍光量を測定した。

インヒビターYの濃度と蛍光量の関係を示したグラフを次に示す。High control (HC)およびLow control (LC)はそれぞれ、インヒビターYが存在しない時の蛍光量および酵素が存在しない時の蛍光量の平均値である。



この時、Z' factor は 0.797 (N=6)でありアッセイ系としては良好であった。

次に、インヒビターYの濃度と% inhibitionとの関係を示したグラフを示す。



結果、インヒビターYのIC₅₀は約 63~65 nMと計算された。

D. 考察

今回、プロテアーゼ X に対する阻害化合物を評価するための酵素アッセイ系の種々条件を検討した結果、良好なアッセイウィンドウと Z' factor を有する評価系を構築することができたと考えられる。しかしながらアッセイ系のボリュームは 200 μL と多く、96-well plate での対応となる系である。通常のハイスループットスクリーニングでは、1536-well plate または 384-well plate のフォーマットで行われることが多く、系のミニチュアライズに伴う課題（使用プレートの検討、プレート内のバラつきなど）を解決していく必要がある。今後、プロテアーゼ X に対する阻害化合物をハイスループットスクリーニングするために、上記課題を克服し

て遺伝性脱髄疾患を始めとする種々中枢神経疾患に対する医薬品を開発する予定である。

E. 結論

今回設定した条件でプロテアーゼ X に対する阻害化合物を評価することは可能と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

学会等発表実績

委託業務題目「治療薬が現存しない先天性中枢神経脱髄疾患の独自の病態モデルを作成し、その治療標的分子を探索する研究に向けて」

機関名 (独) 国立成育医療研究センター研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所(学会等名)	発表した時期	国内・外の別
New mechanisms of the peripheral nerve development and regeneration by Dook6 (ショートスピーチ)	宮本 幸、鳥居知宏、田上昭人、山内淳司	横浜(日本神経科学会)	2014年9月	国内
In vivo expression of the Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-1 in mice exhibits enhanced myelin thickness in nerves (セッションス)	鳥居知宏、宮本 幸、田上昭人、山内淳司	横浜(日本神経科学会)	2014年9月	国内
ミエリン形成を司る新しい細胞内シグナル・ネットワーク(ワークショップ)	山内淳司	松本(日本組織細胞化学会総会学術集会/日中合同組織細胞化学セミナー)	2014年9月	国内
梢神経の髄鞘発生とオンとオフを制御するスイッチ・シグナル(シンポジウム)	山内淳司	奈良(日本神経化学会)	2014年10月	国内
中枢神経脱髄疾患HLD5変異による異常FAM126A蛋白質は脳梁で凝集し脱髄を誘導する可能性がある(シンポジウム)	宮本 幸、山内淳司	奈良(日本神経化学会)	2014年10月	国内
生きたマウス末梢神経線維の伸展機能状態下構造とシグナル分子機構の解析。(ワークショップ; 神経の構造と機能をもたらす分子を捉える)	寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦、上條明生、大野伸一	第55回日本組織細胞化学会総会・学術集会	2014年9月	国内
生きた動物生体内臓器の動的機能分子形態像の解析。(学会奨励賞受賞講演)	寺田信生	第46回日本臨床分子形態学会総会・学術集会	2014年10月	国内
マウス坐骨神経における膜骨格蛋白4.1Gとの抗angiomin 1抗体の免疫交差反応性の検討。(口頭発表)	上條明生、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一、寺田信生	第74回日本解剖学会中部支部学術集会	2014年10月	国内

HMGN family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells、ポスター	Nagao, M., Darin, Lanjakornsiripann., Itoh, Y., Kishi, Y., Gotoh, Y., Ogata, T.	Washington DC, USA (Neuroscience2014)	2014年11月	国外
脊髄損傷後のコレステロール代謝阻害剤投与は髄鞘の再生を阻害する、口頭	緒方徹	東京 (第33回日本運動器移植・再生医学研究会)	2014年9月	国内
慢性病態における軸索損傷マーカーpNF-Hの意義、口頭	緒方徹	東京 (第33回日本運動器移植・再生医学研究会)	2014年9月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Rab35, acting through ACAP2 switching off Arf6, negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination.	Yuki Miyamoto, Natsuki Yamamori, Tomohiro Torii, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi	Mol. Biol. Cell (米国視細胞生物学会誌) 本論文は表紙を飾った	2014年	国外
Hypomyelinating leukodystrophy-associated missense mutant of FAM126A/hyccin/DRCTNNB1A aggregates in the endoplasmic reticulum.	Yuki Miyamoto, Takahiro Eguchi, Tomohiro Torii, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi	J. Clin. Neurosci.	2014年	国外

In vivo knockdown of ErbB3 in mice inhibits Schwann cell precursor migration.	Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Shuji Takada, Hideki Tsumura, Miyuki Arai, Kazuaki Nakamura, Katsuya Ohbuchi, Masahiro Yamamoto, Akito Tanoue and	Biochem. Biophys. Res. Commun.	2014年	国外
Arf6 guanine-nucleotide exchange factor cytohesin-2 binds to CCDC120 and is transported along neurites to mediate neurite growth.	Tomohiro Torii, Yuki Miyamoto, Kenji Tago, Kazunori Sango, Kazuaki Nakamura, Atsushi Sanbe, Akito Tanoue, and Junji Yamauchi	J. Biol. Chem.	2014年	国外
Immunohistochemical study of mouse sciatic nerves under various stretching conditions with "in vivo cryotechnique"	Kamijo S, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S, Terada N.	Journal of Neuroscience Methods	2014年	国外
Imaging of thrombosis and microcirculation in mouse lungs of initial melanoma metastasis with in vivo cryotechnique.	Saitoh Y, Terada N, Ohno N, Hamano A, Okumura N, Jin T, Saiki I, Ohno S.	Microvascular Research	2014年	国外
Immuno- and Enzyme-histochemistry of HRP for demonstration of blood vessel permeability in mouse thymic tissues by "in vivo cryotechnique".	Wu B, Ohno N, Saitoh Y, Bai Y, Huang Z, Terada N, Ohno N.	Acta Histochem Cytochem	2014年	国外
Membrane skeleton in Schmidt-Lanterman incisure in Schwann cells of peripheral nervous system.	Terada N, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S.	SpringerBOOK, Schwann Cell Development and Pathology; Eds. Sango K. and Yamauchi J	2014年	国外
The molecular and metabolic link between Schwann cells and axons.	Ohno N, Sakoh T, Saitoh Y, Terada N, Ohno S.	SpringerBOOK, Schwann Cell Development and Pathology; Eds. Sango K. and Yamauchi J	2014年	国外

生体内凍結技法による肺組織切片標本上での生体物質分布と血行動態の可視化法	齊藤百合花 寺田信生、大野伸彦、大野伸一	山梨医科学雑誌	2014年	国内
SOX10 Transactivates S100B to Suppress Schwann Cell Proliferation and to Promote Myelination.	Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T	PLoS ONE	2014年	国外
HMGN family proteins promote astrocyte differentiation of neural precursor cells.	Nagao M, Lanjakornsirip an D, Itoh Y, Kishi Y, Ogata T, Gotoh Y	Stem Cells	2014年	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

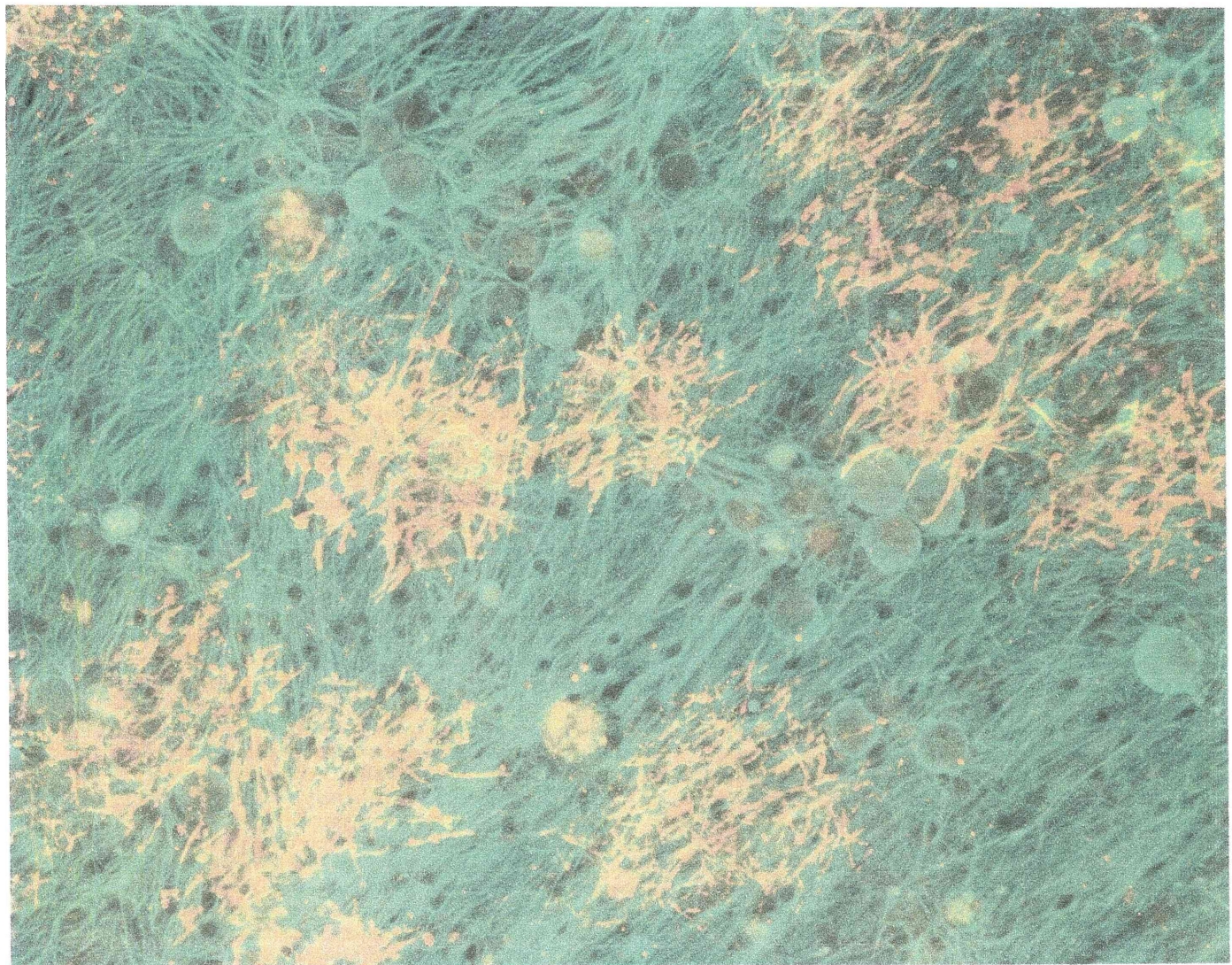
(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

研究成果の刊行物・別刷



MBoC

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL



VOLUME 25 • NUMBER 10 • MAY 15, 2014

MBoC

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL

Published by the American Society for Cell Biology

Volume 25 • Number 10 • May 15, 2014

Myelination of neuronal axons by oligodendrocytes in cocultures of primary rat oligodendrocyte precursor cells with primary rat embryonic dorsal root ganglion neurons. Myelination plays a key role in increasing nerve conduction velocity by insulating axons as well as in protecting axons from physical and biological stresses. Red staining indicates mature myelin sheath positive for a myelin marker protein, myelin basic protein (MBP), along axons (green). Each oligodendrocyte has a number of finger-like processes, which undergo morphological changes and finally produce MBP-positive myelin sheaths to wrap axons. Knockdown of small GTPase Rab35 by retrovirus-encoded small hairpin RNA enhances myelination. Thus Rab35 is a negative regulator for myelination. This coculture system provides a good tool for investigating myelination processes under conditions close to those in vivo. See the article by Miyamoto et al. on p. 1532 of the May 1, 2014, issue of *MBoC*. (Image: Yuki Miyamoto and Junji Yamauchi, National Research Institute for Child Health and Development)



The Philosophy of Molecular Biology of the Cell

Molecular Biology of the Cell (*MBoC*) is published by the nonprofit American Society for Cell Biology (ASCB) and is free from commercial oversight and influence. We believe that the reporting of science is an integral part of research itself and that scientific journals should be instruments in which scientists are at the controls. Hence, *MBoC* serves as an instrument of the ASCB membership and as such advocates the interests of both contributors and readers through fair, prompt, and thorough review coupled with responsible editorial adjudication and thoughtful suggestions for revision and clarification. Our most essential review criterion is that the work significantly advances our knowledge and/or provides new concepts or approaches that extend our understanding. At *MBoC*, active working scientists—true peers of the contributors—render every editorial decision.

The Society and *MBoC* are committed to promoting the concept of open access to the scientific literature. *MBoC* seeks to facilitate communication among scientists by

- publishing original papers that include full documentation of Methods and Results, with Introductions and Discussions that frame questions and interpret findings clearly (even for those outside an immediate circle of experts);
- exploiting technical advances to enable rapid dissemination of articles prior to print publication and transmission and archiving of videos, large datasets, and other materials that enhance understanding; and
- making all content freely accessible via the Internet only 2 months after publication.

Statement of Scope

MBoC publishes studies presenting conceptual advances of broad interest and significance within all areas of cell biology, genetics, and developmental biology. Studies whose scope bridges several areas of cell and developmental biology are particularly encouraged. *MBoC* aims to publish papers describing substantial research progress in full: Papers should include all previously unpublished data and methods essential to support the conclusions drawn. *MBoC* will not, in general, publish papers that are narrow in scope and therefore better suited to more specialized journals, merely confirmatory, preliminary reports of partially completed or incompletely documented research, findings of as yet uncertain significance, or reports simply documenting well-known processes in organisms or cell types not previously studied. Submissions that report novel methodologies are encouraged, particularly when the technology will be widely useful, when it will significantly accelerate progress within the field, or when it reveals a new result of biological significance. Given the scope of *MBoC*, relevant methodologies include (but are not limited to) those based on imaging, biochemistry, computational biology, and recombinant DNA technology.

Note that *MBoC* places a premium on research articles that present conceptual advances of wide interest or deep mechanistic understanding of important cellular processes. As such, articles dealing principally with describing behavior or modification of specific transcription factors, or analysis of the promoter elements through which they interact, will not generally be considered unless accompanied by information supporting in vivo relevance or broad significance.

Rab35, acting through ACAP2 switching off Arf6, negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination

Yuki Miyamoto^{a,b}, Natsuki Yamamori^a, Tomohiro Torii^a, Akito Tanoue^a, and Junji Yamauchi^{a,b,c}

^aDepartment of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan; ^bJapan Human Health Sciences Foundation, Chuo, Tokyo 103-0001, Japan; ^cGraduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo, Tokyo 113-8510, Japan

ABSTRACT Oligodendrocyte precursor cells differentiate to produce myelin sheaths that insulate axons to ensure fast propagation of action potentials. Many aspects of differentiation are regulated by multiple extracellular signals. However, their intracellular signalings remain elusive. We show that Rab35 and its effector, ACAP2, a GTPase-activating protein that switches off Arf6 activity, negatively regulate oligodendrocyte morphological differentiation. Knockdown of Rab35 or ACAP2 with their respective small interfering RNAs promotes differentiation. As differentiation initiates, the activities of Rab35 and ACAP2 are down-regulated. The activity of Arf6, in contrast, is up-regulated. Arf6 knockdown inhibits differentiation, indicating that Rab35 and ACAP2 negatively regulate differentiation by down-regulating Arf6. Importantly, as differentiation proceeds, the activity of cytohesin-2, a guanine nucleotide exchange factor that switches on Arf6 activity, is up-regulated. Pharmacological inhibition of cytohesin-2 inhibits differentiation, suggesting that cytohesin-2 promotes differentiation by activating Arf6. Furthermore, using oligodendrocyte-neuronal cocultures, we find that knockdown of Rab35 or ACAP2 promotes myelination, whereas inhibition of cytohesin-2 or knockdown of Arf6 inhibits myelination. Thus Rab35/ACAP2 and cytohesin-2 antagonistically control oligodendrocyte differentiation and myelination through Arf6 regulation, presenting a unique small GTPase on/off switching mechanism.

Monitoring Editor
Paul Forscher
Yale University

Received: Oct 18, 2013
Revised: Feb 7, 2014
Accepted: Feb 26, 2014

INTRODUCTION

During development of the CNS, oligodendrocyte precursor cells (OPCs) undergo cell division and migrate along axons to their final

destinations, where oligodendrocytes differentiate to wrap axons with myelin sheaths (Miller, 2002; Bradl and Lassman, 2010; Nave, 2010; Simons and Lyons, 2013). The multilayer myelin sheath plays a critical role in insulating axons and thereby markedly increasing their nerve conduction velocity. While the dynamic morphological changes that oligodendrocytes undergo are believed to be achieved by continuous on-and-off reactions of intracellular signals, the whole picture of the relevant mechanisms is still not completely clear. Among a number of signaling components, the signaling network involving small GTPases as guanine nucleotide-dependent molecular switches can regulate continuous morphological changes (Cherfils and Zeghouf, 2013).

It is known that Rac1 and Cdc42, small GTPases of Rho family, act as positive regulators of oligodendrocyte morphological differentiation and are responsible for controlling oligodendrocyte process extension and branching in culture (Liang et al., 2004). Mouse genetic studies indicate that Rac1 and Cdc42 are required for proper axon ensheathment and myelination of axons by oligodendrocytes (Thurnherr et al., 2006); these roles are consistent with their roles as

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E13-10-0600>) on March 5, 2014.

Address correspondence to: Junji Yamauchi (yamauchi-j@ncchd.go.jp).

Abbreviations used: ANOVA, analysis of variance; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DENN, differentially expressed in neoplastic versus normal cells; DRG, dorsal root ganglion; DTT, dithiothreitol; FBS, fetal bovine serum; GAP, GTPase-activating protein; GDI, guanine nucleotide dissociation inhibitor; GEF, guanine nucleotide exchange factor; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; JIP, c-Jun N-terminal kinase-interacting protein; MBP, myelin basic protein; MICAL, molecule interacting with casL; OPC, oligodendrocyte precursor cell; PFA, paraformaldehyde; PLL, poly-L-lysine; PLP1, proteolipid protein 1; PMSE, phenylmethane sulfonyl fluoride; PNS, peripheral nervous system; Q67L, Glu-67-to-Leu; RBD, Rab35•GTP-binding domain; RUSC2, RUN and SH3 domain containing 2; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA; T3, triiodothyronine; T4, thyroxine.

© 2014 Miyamoto et al. This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

"ASCB®," "The American Society for Cell Biology®," and "Molecular Biology of the Cell®" are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.molbiolcell.org/content/suppl/2014/03/03/mbc.E13-10-0600v1.DC1.html>