「生命現象と計測分析」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成20年度終了研究課題－

研究総括 森島 績

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生命現象の解明のために必要な新たな原理や手法に基づく計測・分析の技術に関して個人の独創的な発想に基づく革新技術の芽の創出を目指す研究を対象とするものです。

具体的には、細胞内の種々の化学過程の計測・分析や細胞から個体、生態系などのミクロからマクロに至る多様なスケールでの生命現象を解明するための新規な計測・分析技術等を対象とします。生命系科学技術における斬新な成果の発掘を目指した新たな方法論の創出や技術展開の契機となることが期待される研究を対象とします。また生命現象に関連の深い環境の計測分析も含みます。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1） 選考は「生命現象と計測分析」領域に設けた領域アドバイザー9～10 名、必要に応じて研究総括が委嘱した外部評価者 3～4 名と研究総括で行った。

2） 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とした。

3） 選考に当たっては、募集要項に示した選考基準を基本としたが、以下の点に特に留意した。
生命科学の分野において、構造生物学などの「生体分子の科学」から「生命現象の科学」 への流れが顕在化しつつある点に重点を置き、複雑系の科学である生命現象の本質にかかわる計測・分析技術の飛躍的展開を目指す研究、すなわち細胞間や細胞内での生体分子の動態を捉える新規な測定技法やそれを可能にするプローブの開発を重視した。また、構造生物学分野においても複雑な生体分子間相互作用や既存の方法では観測不可能な動的構造と機能との相関を見いだす新規な手法も選考の対象とした。さらには生物個体、生態レベルで生命現象の本質に関わる計測・分析技術の開発の提案も選考対象として含めた。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	212 名	26 名	12 名

5. 研究実施期間

平成 17 年 10 月～平成 21 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議：7 回
研究報告会：1 回
生命・計測分析合同研究会：3 回
研究総括（または技術参事）の研究実施場所訪問：23 回

研究開始時に研究現場を訪問し、研究環境、設備等や研究費の確認及びヒヤリング、組織責任者への協力依頼を行った。研究期間内で異動した研究者をその都度訪問し、研究環境を確認した上、新組織責任者への協力依頼、研究継続に必要となる支援の決定を行った。訪問には、技術参事が同行した。

研究総括の個別研究指導：11 回

終了年度に、成果達成状況と残された課題の把握・アドバイスを行うため、12名の研究者に対して、第 6 回領域会議終了後（2名）、JST三番町事務所（6名）、領域事務所（3名）で、個別研究指導を行った。なお、1名に

ついては、異動後の研究者訪問時に、個別研究指導を行った。

7．評価の手続き

研究者の研究課題別評価書を基に、領域アドバイザーの意見を参考にして研究総括がおこなった。

（評価の流れ）

平成 20 年 9 月　第 6 回領域会議（総括・アドバイザーによる進捗評価とアドバイスの実施）
平成 20 年 12 月　研究報告会開催（総括・アドバイザーによる評価の実施）
平成 21 年 2 月　研究報告書及び研究課題別評価書提出（研究者作成）
平成 21 年 3 月　研究総括による評価に基づき領域活動・評価報告書提出
平成 21 年 3 月　研究期間終了
平成 21 年 4 月　研究報告書提出

8．評価項目

（1）　研究目標に対する研究課題の達成度
（2）　得られた研究成果の科学技術への貢献（計画外成果も含む）
（3）　外部発表（論文、口頭発表等）、特許出願など研究成果の発信状況
（4）　受賞・招待講演など外部からの評価状況

9．研究結果

まず、大きなタンパク質の単粒子構造解析法新手法の開発、溶液中でのドメイン間変化（形態変化）、さらには多分子間相互作用解析手法や離合集散するタンンパク質の動態計測、などの新しい構造生物学的手法が確立された。1分子・1細胞計測におけるケージド化合物の巧みな利用によるイメージング計測などに大きな成果が得られた。細胞間のネットワーク計測法の開発や神経回路網の計測や神経活動の高速イメージングなどの計測分析など複雑系である生命現象の計測分析にふさわしい研究にかなりの進展が見られた。これらの研究の展開には多岐にわたる分野のアドバイザーからの適切なアドバイスやさきがけ研究者間の協同・協力研究がなされた成果でもある。あと1、2年もすればこれらの成果がさらに完成度高く達成され、公表されるであろう。以下、研究者別にそれらの研究課題と成果ならびに評価を記す。

「時間と共に離合集散を繰り返す分子機械のX線小角散乱・動的構造解析」（秋山修志　研究者）

藻類の生物時計タンパク質(KaiA, KaiB, KaiC)が ATP と反応して概日振動が生ずる構造生物学的研究である。溶液中で離合集散を繰り返すこれらのタンパク質の動態を X 線小角散乱測定によって見事に解析したことは極めて高く評価される。測定技術の工夫、試料の取り扱いはもとよりいろいろなモデル反応系を想定して緻密な解析を行っている。完成度は高いが残された課題もあり更に完成度を高めることを期待したい。

「記憶形成の脳内イメージング」（石本哲也　研究者）

脳内イメージングという大変チャレンジングな研究課題であり、困難な問題に遭遇することが予想された。事実要素技術の一つの達成に難渋し途中で変更を余儀なくされた。しかしながら、イメージング用スプリットルシフェラーゼを用いてシナプス可塑性にかかわる転写因子である CREB の活性化やスパインに集積しているアクチンの重合を計測出来るプローブまでは出来た。目的としていた記憶すると脳が光るマウスの作製にはまだ距離があるが、トランスジェニックマウスの作製に成功することを期待したい。

「生命現象分析のための小分子転写因子創成」（上杉志成　研究者）

本研究者が見いだしたレンチノロールを出発点として分子設計した数多くの有機分子の合成とスクリーニングの末、有効な小分子転写因子を開発したことは極めて高く評価される。しかしながら、細胞膜透過性に難点があり、是非ともこの点を今後の研究で克服してほしい。また、分解性の問題なども課題となろう。大きな目標を持った研究なので本研究者の情熱と執着心をもって目標を達成することを期待したい。

「蛋白質電顕画像を用いた自動 in silico　擬似結晶構造解析法の開発」（小椋俊彦　研究者）

電子顕微鏡画像から3次元構造を求めるための単粒子構造解析法を改良するために、本研究者は3次元画像再構成のための新しいアルゴリズムを考案し、解析時間を大幅に短縮することに成功した。いまだ完全自動化には至っていないが、それに近づいているので早期の達成を望む。この手法により8種類もの膜タンパク質の構造を解析し

ている点も高く評価したい。また、SEM による新しい観測方法は興味深くいち早いユニークな成果を期待したい。

「オンチップ多電極刺激計測系による細胞ネットワークの構成的理解」（金子智行　研究者）
　アガロースマイクロチェンバーネットワークを構築し、心筋細胞の拍動周期や安定性の解析システムを確立した。そして、多電極刺激系計測との組み合わせによって、細胞間コミュニケーションによるコミュニティ効果を明らかにするなど、細胞ネットワークシステムの動態解析への途を開いたことは極めて優れた成果と言えよう。この基礎研究の更なる深化を望む一方、その上にたって薬剤スクリーニングなどへの応用も試みてはいるが実用化されることを期待したい。

「神経活動の　in vivo　高速イメージングと光操作」（喜多村和郎　研究者）
　本研究は生きた動物個体の脳内の特定のニューロンを同定し活動電位の入出力関係を定量的に測定する新しい手法として、蛍光標識を用いない単一ニューロンを可視化すると同時に従来法のパッチクランプ法を結びつけたシャドウパッチング法を開発した。すなわち、2光子励起イメージングとホールセル記録とを組み合わせた新しい手法である。これを用いて覚醒行動中のマウスの脳において、単一ニューロンからのホールセル活動記録が出来るようになったことは、今後の脳機能解析に大きく寄与するであろうと考えられ、極めて優れた成果を挙げていると評価される。今後の展開に期待したい。

「2段階ビオチン化反応を利用したタンパク質解析」（末田慎二　研究者）
　本研究はプロテオーム解析に有用な新規のプロティンタグシステムの開発研究である。本研究者は偶然に古細菌由来のビオチン反応系では固定化酵素 BPL がビオチン化された BCCP タンパク質と極めて高い親和性を示すことを見いだしている。そこで、これを利用して、ビオチン化 BCCP タンパク質をタグとして標的タンパク質の捕捉、蛍光検出することを目的としている。目的はほぼ達成できたと高く評価できる。 BPL と BCCP ならびにビオチン化 BCCP との特異的相互作用の詳細な解析を行い、BPL とビオチン間のみならず BCCP 間とも特異的相互作用を持っていることを示したことは興味深い。BCCP の構造特異性（剛直性など）からタグタンパク質として優れていることも明らかにしている。標的タンパク質の例としてグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)をとりあげ、磁気ビーズ上で大腸菌ライセートからその特異的捕捉にも成功している。BPL に蛍光標識を施してマイクロプレート上での蛍光検出にも成功している。 他の生物学的に重要な標的タンパク質や動物細胞系の検討が期待される。

「超高分子量蛋白質の分子形態変化を観測する NMR 技術」（楯真一　研究者）
　分子量の大きなタンパク質の中には溶液状態でドメイン間での配向状態変化を決めることがしばしば極めて重要であるが、本研究者は新しいNMR手法を開発、確立した。すなわち、異方性圧縮アクリルアミドゲルを用いて磁場に対して弱く配向させ、分子配向依存的に誘導されるTROSYシグナルの変化からドメイン間の配向変化を決定する方法である。各ドメインの構造は前提条件として必要であり、また、いくつかのNMR解析上の仮定は必要とするものの、他に代えがたい手法であり、その有効性もいくつか例示された。NMR技法としては完成度が高く、優れた成果として高く評価したい。生物的に意義のあるタンパク質分子形態変化の事例を増やすことを期待したい。

「生体分子計測用 THz 帯 CARS 分光イメージング装置の開発」（谷正彦　研究者）
　測定法として困難な課題に挑戦しており、技術上の問題点に遭遇しながらも何とか THz 帯 CARS 測定システムを開発出来たことは評価したい。しかしながら、S/N は極めて不十分であり、タンパク質における低波数ラマンシグナルが明確に観測されていないのは残念なところである。目的とするイメージングの達成にはまだ距離があるものの、技術的課題を克服して少なくともいくつかのタンパク質について明瞭なデータが出ることを期待したい。

「細胞内生体分子間ネットワークのリアルタイム検出法の開発と細胞生物学的応用の検討」（寺田純雄　研究者）
　生命現象解析法の未開発の一つとして複雑な生体分子間相互作用を観測する新規多（三）色同時励起蛍光相互相関分光法を試行錯誤の上開発したことは高く評価したい。基質特異性の低いタンパク質群の関わる複合体のインビトロにおける会合・解離についてのいくつかの実験例で検証している。まだ課題名に掲げられたような一般的な応用には多くの課題があるがそれらも解決に向かっている。細胞系や組織系での応用を期待したい。

「時空間を制限した細胞内シグナルの発生とその計測」（中西淳　研究者）
　本研究は光照射に応じて表面の細胞接着性が変化する機能性「ケージド」基板を開発し、基板上の細胞接着を一細胞レベルで制御することによって、細胞移動や細胞増殖を誘導・制御する手法を開発した。また、表面に光分

解性リンカーを介して反応性の官能基を有する金ナノ粒子をケージング担体として開発しその有用性を示した。ケージド化合物の概念を広げた極めて優れた成果が得られている。合成化学、表面化学、細胞生物学、計測技術などを総合させた独創性の高い優れた研究成果として評価したい。応用範囲は広い。特定の細胞の単離増殖の制御などへの応用も期待したい。

「広狭域2重2光子励起顕微鏡による神経回路網の計測」(松崎政紀　研究者)

神経回路網の計測のために3つの光刺激用のレーザー光路と1つのイメージング用の光路をもつ広挟域2重2光子励起顕微鏡システムを構築仕上げた。これによってある平面上に存在するシナプスを2光子イメージングしながら、異なる平面に存在する神経細胞を系統的に光刺激できるようになった。シナプス入力細胞とシナプス入力部位の分布を計測可能になったことは優れた成果として評価できる。また、より効率の高い光刺激用ケージドグルタミン酸も開発している。さらには、チャンネルロドプシンを遺伝子導入によって神経細胞に発現させ、青色光照射でマッピング出来ることを個体動物で示したことはこの分野の発展に大きな寄与をしたと言えるであろう。すばらしい成果を挙げたと評価出来る。今後のさらなる発展を期待したい。

10. 評価者

研究総括　森島　績　立命館大学総合理工学院生命科学部　客員教授
／京都大学大学院工学研究科　名誉教授

領域アドバイザー氏名(五十音順)

石渡　信一	早稲田大学理工学術院　教授
神原　秀記	(株)日立製作所　フェロー
北川　禎三	(財)豊田理化学研究所　フェロー
桐野　豊　*1	徳島文理大学　学長
栗原　和枝	東北大学多元物質研究所　教授
田村　守	北海道大学大学院生命科学院　客員教授
長野　哲雄	東京大学大学院薬学系研究科　教授
難波　啓一	大阪大学大学院生命機能研究科　教授
藤吉　好則	京都大学大学院理学研究科　教授
柳田　敏雄	大阪大学大学院生命機能研究科　教授

＊1　平成 19 年 3 月から参画

(参考)

(1)外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	0	50	50
口　頭	130	71	201
その他	23	3	26
合　計	153	124	277

※平成 21 年 3 月現在

(2)特許出願件数

国　内	国　際	計
14	1	15

※平成 21 年 3 月現在

(3)受賞等

〇秋山修志研究者

・平成 18 年 7 月　XIII　Internatinal Conference on Small-angle Scattering(国際小角散乱学会)
SAS Young Scientist Prize
・平成 19 年 12 月　平成 19 年度日本生物物理学会　若手奨励賞
・平成 20 年 4 月　平成 20 年度文部科学大臣表彰　若手科学者賞

〇上杉志成研究者
・平成 18 年 4 月　平成 18 年度東京テクノ・フォーラム 21 のゴールド・メダル賞

〇喜多村和郎研究者
・平成 20 年 11 月　平成 20 年度武田科学振興財団一般研究奨励

〇寺田純雄研究者
・平成 20 年 3 月　平成 19 年度上原記念生命科学財団研究推進特別奨励金

〇中西　淳研究者
・平成 18 年 9 月　日本分析化学会　第 55 年会　イノベーション賞

(4)招待講演
国際　31 件
国内　55 件
※平成 21 年 3 月現在

別紙

「生命現象と計測分析」領域　研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 （参加形態）	研 究 課 題 名 （研究実施場所）	現 職 （応募時所属）	研究費 （百万円）
秋山 修志 （兼任）	時間と共に離合集散を繰り返す分子機械のX線小角散乱・動的構造解析 （名古屋大学大学院理学研究科）	名古屋大学大学院理学研究科 講師 （理化学研究所播磨研究所 基礎科学特別研究員）	44
石本 哲也 （兼任）	記憶形成の脳内イメージング （富山大学大学院医学薬学研究部）	富山大学大学院医学薬学研究部 助教 （富山医科医薬科大学大学院医学系研究科 助手）	36
上杉 志成 （兼任）	生命現象分析のための小分子転写因子創成 （京都大学 物質－細胞統合システム拠点／化学研究所）	京都大学 物質－細胞統合システム拠点／化学研究所　教授 （京都大学 化学研究所 教授）	46
小椋 俊彦 （兼任）	蛋白質電顕画像を用いた自動in silico擬似結晶構造解析法の開発 （（独）産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門）	（独）産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 主任研究員 （同上 研究員）	43
金子 智行 （兼任）	オンチップ多電極刺激計測系による細胞ネットワークの構成的理解 （東京医科歯科大学 生体材料工学研究所）	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 准教授 （東京大学大学院総合文化研究科 助手）	40
喜多村 和郎 （兼任）	神経活動の in vivo 高速イメージングと光操作 （東京大学大学院医学系研究科）	東京大学大学院医学系研究科 助教 （University College London Senior Research Fellow）	50
末田 慎二 （兼任）	2段階ビオチン化反応を利用したタンパク質解析 （九州工業大学大学院情報工学研究院）	九州工業大学大学院情報工学研究院　准教授 （同上 情報工学部 助手）	36
楯 真一 （兼任）	超高分子量蛋白質の分子形態変化を観測するNMR 技術 （広島大学大学院理学研究科）	広島大学大学院理学研究科 教授 （生物分子工学研究所機能制御研究所 部長 ）	36
谷 正彦 （兼任）	生体分子計測用 THz 帯 CARS 分光イメージング装置の開発 （福井大学遠赤外領域開発研究センター）	福井大学遠赤外領域開発研究センター　教授 （大阪大学レーザーエネルギー学研究センター 助教授）	41
寺田 純雄 （兼任）	細胞内生体分子間ネットワークのリアルタイム検出法の開発と細胞生物学的応用の検討 （東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科　教授 （東京大学大学院医学系研究科 講師）	44

中西　淳 （兼任）	時空間を制限した細胞内シグナルの発生とその計測 （（独）物質・材料研究機構　国際ナノアーキテクトニクス研究拠点）	（独）物質・材料研究機構　国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 独立研究者 （早稲田大学先端科学・健康医療融合研究機構　助手　）	43
松崎　政紀 （兼任）	広狭域２重２光子励起顕微鏡による神経回路網の計測 （東京大学大学院医学系研究科　付属疾患生命工学センター）	東京大学大学院医学系研究科　付属疾患生命工学センター　准教授 （自然科学研究機構生理学研究所　助手）	41

研究課題別評価書

1. 研究課題名
時間と共に離合集散を繰り返す分子機械のX線小角散乱・動的構造解析

2. 氏名
秋山　修志

3. 研究のねらい
本研究課題の目的は、形状・数を変化させながら離合集散する分子機械の研究手法としてX線小角散乱が有用であることを提案し、それを藍藻の生物時計を題材とした研究を通じて実証することである。
藍藻は生物時計を備えた単細胞生物であり、その時計タンパク質（KaiA、KaiB、KaiC）とATPを試験管内で混合すると、KaiC のリン酸化状態が概日周期で振動する。この興味深い生命現象を解明するべく、時計タンパク質の構造生物学的研究が精力的に進められてきた。今日、3種の時計タンパク質についてX線結晶構造が解明されている。しかし、静的な構造情報を個々についてどれほど深めても、それらがどう自己組織化し、概日振動が生み出されるのか解明することはできない。
自律振動の発現には Kai タンパク質複合体の形成が重要であると予測されるが、それらが離合集散するため、複合体の構造や組成については不明である。離合集散系の構造解析はどのようにすれば良いだろうか。離合集散する Kai タンパク質同士の相互作用が本質的に強固とは考えにくく、複合体を結晶化するためには何らかの方法で反応をトラップする必要がある。ダイナミクス計測という点で NMR は魅力的であるが、KaiC は分子量が大きく扱いづらい。
X線小角散乱から得られる情報は低分解能であるが、タンパク質分子の大きさ・形状の時間発展を水溶液中で検証できる。本研究を通じてX線小角散乱の測定・解析技術を向上させ、離合集散系を解明するための計測分析技術として成熟させる。

4. 研究成果
最初に，Kai タンパク質 3 種の離合集散ダイナミクスを丁寧に計測した．KaiA，KaiB，KaiC を ATP と混合して反応を開始させ，各測定時刻に一定量の試料を反応溶液より抽出した．その一部をX線小角散乱測定に，残りを KaiC リン酸化状態の定量に使用した．入射X線と同方向に散乱されたX線の強度 I (0)は，試料の重量平均分子量に比例するため，Kai タンパク質の会合状態や蓄積量の変化に敏感である．I (0)は劇的に変化し，24.4±0.2 h の周期で力強く振動することが明らかとなった(図 1・○)．この結果は，KaiC のリン酸化状態と同様に(図 1・□)，Kai タンパク質間の相互作用もまた概日振動していることを示しており，溶液中でタンパク質が離合集散することを直接的に証明することに成功した．

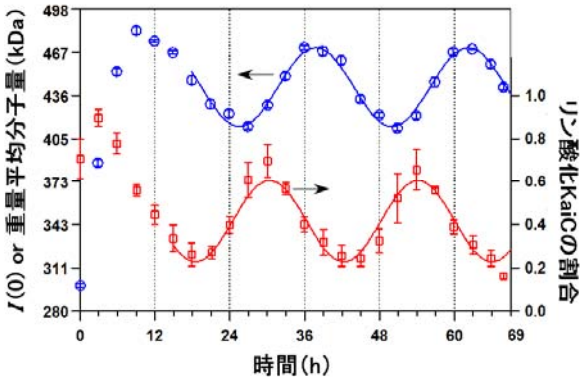


図1　Kai タンパク質の離合集散と KaiC リン酸化状態
KaiA，KaiB，KaiC を混合し，リン酸化 KaiC の割合(□)を SDS-PAGE で，原点散乱強度 I (0)(○)をX線小角散乱で定量した。I (0)は試料の重量平均分子量に比例する。

次に，2 種間相互作用（KaiAC，KaiBC，KaiAB複合体）に焦点を当てた研究を行い，複雑な 3 種間相互作用を解明するためのデータを収集した．一定量のKaiCに様々な量のKaiA（もしくはKaiB）を混合し，30 度で十分に平衡化させた後にX線小角散乱測定を行った．系に加えたKaiA全濃度に対してI (0)をプロットしたところ（図 2A・□），I (0)は初めに急激な増加を示し，そのあと滑らかな曲線を描きつつ緩やかな単調増加へと至った．一方，KaiBとKaiCの組み合わせで

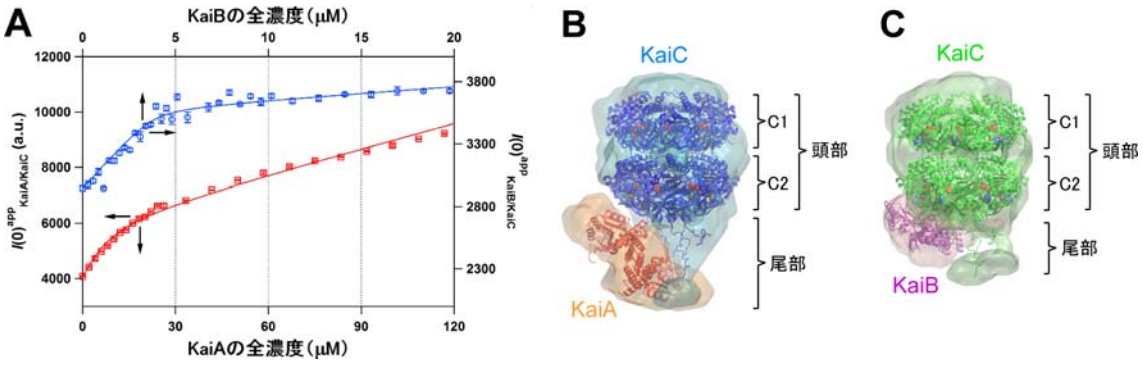


図2　Kai タンパク質複合体のX線小角散乱モデル

A：X線小角散乱を用いた滴定実験。一定量の KaiC に KaiA(□)もしくは KaiB(○)を滴定し，$I(0)$の変化を追跡した。実線は1対1結合モデルの理論曲線を示す。**B**：KaiAC 複合体の低分解能モデル．図中，リボンモデルは小角散乱モデルに当てはめたX線結晶構造を表す。**C**：KaiBC 複合体の小角散乱モデル．

は（図 2A・○），I(0)は急勾配の直線的増加の後，約 4 μM（～1 当量）のKaiB濃度で鋭い屈曲点を生じて飽和に達した．これら滴定曲線の解析から，KaiAとKaiCの解離定数（K_d）が 4.7±0.7 μM，KaiBとKaiCの組み合わせではK_d = 0.12±0.08 μMと求められ，結合比はともに 1 対1となった．以上の結果は，KaiBCの相互作用がKaiACの組み合わせよりも約 40 倍強いことを示す．また，同様の実験をKaiAとKaiBの組み合わせで行い，直接的な 2 者間相互作用がないことを確認した．

1 対1結合モデルとK_dに基づいて複合体の散乱曲線を見積り，各々の散乱曲線を説明する低分解能モデルを構築した．KaiAC複合体は 150 x 150 x 110 Å の大きさからなる．KaiCは全体積の 80%を占め（図 2B・青色），球状の頭部と短い尾部で構成される．興味深いことに，頭部の中央には空洞が観察され，KaiCの結晶構造を一意的にフィットすることができた．KaiCの頭部はC1 とC2 と呼ばれるドメインで構成されており，KaiAに相当する残り20%の電子密度（図 2B・橙色）はC2 ドメインと尾部近傍に局在化していた．KaiBC複合体は 140 x 130 x 100 Å の寸法からなり，KaiAC複合体よりもわずかにコンパクトであった．KaiAC複合体と同様にKaiCに特徴的な電子密度（図 2C・緑色）が確認でき，全体積の 13%にあたるKaiBの電子密度（図 2B・紫色）はC2 ドメインと相互作用していることが示された．

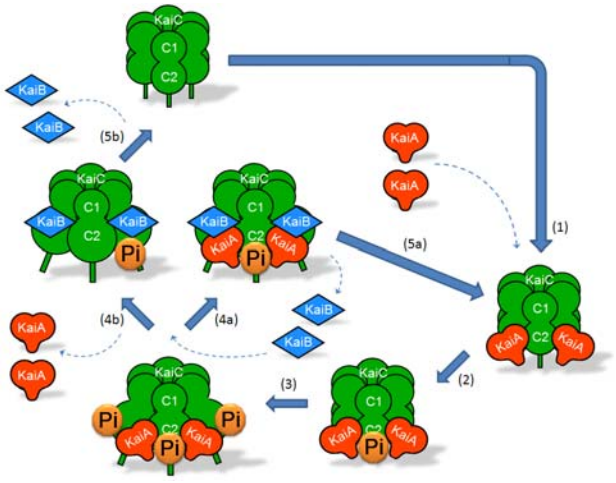


図3　Kai タンパク質の離合集散モデルの概略

(1)脱リン酸化 KaiC へ KaiA が結合する。**(2～3)**KaiC がリン酸化される。**(4a)**KaiAC 複合体に KaiB が結合し，KaiABC 複合体が形成される。**(4b)**KaiAC 複合体に KaiB が接近し，結合していた KaiA と入れ替わって KaiBC 複合体を形成する。**(5a～5b)**KaiC が脱リン酸化された後，KaiB が解離する。

2 種間および 3 種間相互作用の計測データを用い，3 つの歯車が何時どのように噛み合わさって機能するかを詳しく検証した．実験データを最も矛盾なく説明することができたのは，図 3 に示されるような反応サイクルであった．重要な知見の一つは，KaiC と相互作用を形成するタイミングが KaiA と KaiB で大きく異なり，両者の性質がウサギとカメのように対照的である点である．KaiA は勢いよくスタートダッシュを切って KaiC へと結合し，速やかに KaiC をリン酸化するが(図 3-1)，KaiB はリン酸化が終了した頃合に遅れてやってきて KaiC と結合し(図 3-4a,4b)，徐々に脱リン酸化しつつ KaiC より解離する(図 3-5a,5b)．I (0)の位相が KaiC リン酸化状態の位相より 4 分の1周期遅れていた理由は(図 1)，このような対照的な相互作用に起因している．

もう一つの発見は，KaiA と KaiB の切り

替え機構である．最初に KaiAC 複合体が生じ(図 3-1)，KaiC が十分にリン酸化を受けた後に KaiB がやってくるが，X線小角散乱モデルは2通りのシナリオを示唆する．1つは KaiB が KaiA の近傍に結合し（図 3-4a），KaiABC 複合体を形成して KaiA を阻害する場合である．もう一つの可能性は（図 3-4b），KaiB が KaiA を押しのけて入れ替わる可能性である．複合体モデルをよく観察すると，KaiC に対する結合位置が KaiA と KaiB で類似している（図 2B，C）．KaiBC 複合体は KaiAC 複合体よりも安定であるため，図 3-4b の反応は熱力学的に十分可能である．

KaiABC 複合体，KaiB C 複合体の状態では共に KaiA の機能が抑制されている．脱リン酸化が進行した後に KaiB が解離し(図 3-5a,5b)，サイクルは元に戻る．我々の実験データは，反応系路上に枝分かれが存在することを示唆し，KaiBC と KaiABC 複合体が同時期に蓄積するという生化学研究の結果に構造的基盤を与えるものである．

X線小角散乱を用いた本研究により，複合体構造と離合集散ダイナミクスが可視化され，Kai タンパク質が時を刻む機構の一端が明らかとなった．今後，I (0)だけでなく散乱曲線全体を利用した実験と解析を進め，発振機構がより詳細に解明されるよう努めたい．

5．自己評価

本課題には二つの目標がある．一つは，自律振動系に含まれる全化学種の「構造」と「濃度の時間変化」を決定すること，すなわち反応の時間・空間発展を可視化することである．I (0)を通して離合集散ダイナミクスを高精度に記録し，「濃度の時間変化」を解明することに成功した．この点については十分に目的を達成できたと考える．

一方，「構造」については一部の化学種について決定することができなかった．滴定実験を行った平衡状態では KaiA と KaiC，また KaiB と KaiC は 1 対 1 の複合体を形成していた（図 2B，C）．しかし，振動ダイナミクスの実験データは 2 対 1 の高次複合体が関与することを示している．このような理由から，本研究期間中に究極の目的を達成するに至らなかった点が残念である．今後，KaiC のリン酸化状態を調整しつつ，ストップト・フロー等を用いた時間分解 X 線小角散乱を行い，短寿命の高次複合体を補足し構造決定する必要を感じる．

もう一つの目的は，藍藻の生物時計を題材とした研究を通して，X線小角散乱の測定・解析技術を向上させることである．これについては主に二つの進展があった．第一に，長時間にわたる定量的なダイナミクス計測を現実的なものとすることができた．Kai タンパク質の生理的濃度は決して高くなく，合計でも 1 mg/ml を超えない希薄溶液である．放射光を用いた計測でも数 mg/ml の試料を要することを考えれば，測定が容易でないことは明らかである．また，この希薄溶液から発せられる信号の約 6%が時間変化として観察されるわけで，その微弱な揺らぎを数日にわたって安定に計測しなければならない．

この目的を達成する上で，SPring-8 が供給する安定したビームは必要不可欠であった．それに加え，試料調製，ビーム強度補正，検出器選定といった点で試行錯誤があった（BL45XU）．これらの努力と研究成果について，海外の著名な研究者より称賛の言葉を頂き，また国際学会での講演に招待頂けたことは，現在でも大きな励みとなっている．また，この過程で積み重ねた技術基盤は，生物時計に代表される概日性，より長時間にわたるダイナミクス計測に役立つと考える．

第二に，結晶性の良くないタンパク質複合体の構造解析法へ一つの可能性を提示することができた．Kai タンパク質の結晶構造が発表されて 4 年経つが，複合体の結晶構造は未だに報告されていない．本質的に弱く・交換性の高い相互作用を可視化する技術の一つとして，X 線小角散乱が有望であることを示した点は評価に値すると考える．以上を総合すると，想定外の結果や困難も多数あったが，3 年間にわたって独創的なさきがけ研究を展開することができたと考える．

6．研究総括の見解

藻類の生物時計タンパク質(KaiA，KaiB，KaiC)が ATP と反応して概日振動が生ずる構造生物学的研究である。溶液中で離合集散を繰り返すこれらのタンパク質の動態を X 線小角散乱測定によって見事に解析したことは極めて高く評価される。測定技術の工夫、試料の取り扱い

はもとよりいろいろなモデル反応系を想定して緻密な解析を行っている。完成度は高いが残された課題もあり更に完成度を高めていただきたい。本研究者はこの研究で国内外においていくつかの賞を受賞されていることを付け加えておきたい。

7．主な論文等

（A）さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

・S. Yamada, S. Akiyama, H. Sugimoto, H. Kumita, K. Ito, T. Fujisawa, H. Nakamura and Y. Shiro, “The Signaling Pathway in Histidine Kinase and the Response Regulator Complex Revealed by X-ray Crystallography and Solution Scattering”, J. Mol. Biol. 362, 123-139 (2006).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, “Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome”, Molecular Cell, 29, 703-714 (2008).

（2）特許出願　　なし

（3）受賞

・S. Akiyama, XIII International Conference on Small-angle Scattering, 2006 SAS Young Scientist Prize （2006 年 7 月）.

・秋山　修志, 日本生物物理学会　若手奨励賞（2007 年 12 月）.

・秋山　修志, 文部科学大臣表彰　若手科学者賞（2008 年 4 月）.

（4）著書

・秋山　修志, “X線小角散乱でみた蛋白質の構造変化・離合集散”, 生物物理, 47, 133-138 (2007).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, “Real-time Small-angle X-ray Scattering Observation of Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Periodosome”, SPring-8 Research Frontiers 2007, 24-25, (2008).

・秋山　修志, “リアルタイムX線小角散乱で観察した藍藻時計タンパク質の離合集散ダイナミクス”, 放射光, 21, 305-312 (2008).

・秋山　修志, “リアルタイムX線小角散乱でみた藍藻時計タンパク質の離合集散ダイナミクス”, 生物物理, in press (2009).

（5）学会発表

学会発表（国際）

・S. Akiyama, K. Ito, Y. Maéda and T. Kondo, “Small-angle X-ray Scattering Studies on Assembling-Disassembling Complexes of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins”, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006/11/12～16).

・A. Nohara, K. Ito, Y. Maéda, T. Kondo and S. Akiyama, “Real-Time SAXS Observation of Assembling-Disassembling Cycles of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins”, Fifth East

Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006/11/12～16).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, "Real-time SAXS Observation of Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins", The 67th Okazaki Conference (2007/11/10-12).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, "Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome", IUCr2008 Satellite Meeting (2008/8/23-24).

・S. Akiyama, "Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Clock Proteins", 日独先端科学(JGFoS)シンポジウム (2008/10/31-11/2).

学会発表(国内)

・秋山 修志, 野原 淳志, 伊藤 和輝, 前田 雄一郎, "X線小角散乱でみたシアノバクテリア時計タンパク質の離合集散ダイナミクス", 第 34 回 生体分子科学討論会 (2007/6/23).

・野原 淳志, 前田 雄一郎, 伊藤 和輝、西脇 妙子, 景山 伯春, 近藤 孝男, 秋山 修志, "X線小角散乱を用いたシアノバクテリア由来の時計蛋白質KaiCの構造変化", 第45回日本生物物理学会年会 (2007/12/23).

・秋山 修志, 野原 敦志, 伊藤 和輝, 前田 雄一郎, 近藤 孝男, "X線小角散乱計測より推察した藍藻時計タンパク質の構造変化と発振機構", 第 35 回生体分子科学討論会 (2008/6/27).

・秋山 修志, 野原 敦志, 伊藤 和輝, 前田 雄一郎, 近藤 孝男, "リアルタイムX線小角散乱を利用した藍藻時計タンパク質の離合集散計測", 第 15 回日本時間生物学会学術大会 (2008/11/8-9).

・S. Akiyama , A. Nohara ,K. Ito , Y. Maeda , T. Nishiwaki and T. Kondo, "Small-angle X-ray Scattering Study on Cyanobacterial Clock Proteins", 第 46 回日本生物物理学会年会 (2008/12/3).

(6)招待講演

招待講演(国際)

・S. Akiyama, S. Yamada, H. Sugimoto, H. Kumita, K. Ito, T. Fujisawa, H. Nakamura and Y. Shiro, "Signal Transduction Pathway in Histidine Kinase and Response Regulator Complex Revealed by Joint Usage of Crystallography and Small-Angle X-ray Scattering", XIII International Conference on Small-angle Scattering (2006/7/11).

・S. Akiyama, "Real-time SAXS Observation of Assembling-Disassembling Complexes of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins", 9th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation(2007/8/12-16).

・S. Akiyama, "Real-time Small-Angle X-ray Scattering Study of Assembly and Disassembly Cycles of Cyanobacterial Circadian Clock Proteins", American Crystallographic Association 2008 Annual Meeting (2008/6/2).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito and Y. Maéda, "Real-time SAXS Observation of Assembly

and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Clock Proteins", IUCr2008 (2008/8/27).

・S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito, Y. Maeda and T. Kondo, "Real-time SAXS Observation of Assembly and Disassembly Dynamics of Cyanobacterial Clock Proteins", NSRRC Workshop X-ray Crystallography / Spectroscopy (2008/10/9).

招待講演(国内)

・秋山 修志, 野原 淳志, 伊藤 和輝, 前田 雄一郎, "リアルタイムX線小角散乱でみたシアノバクテリア時計蛋白質の離合集散ダイナミクス", 第 45 回日本生物物理学会年会 若手奨励賞講演 (2007/12/21).

・秋山 修志, "時分割X線小角散乱によるシアノバクテリア時計タンパク質の離合集散ダイナミクス計測", ERL サイエンス研究会1 (2008/3/17).

(B)その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・T. Uzawa C. Nishimura, S. Akiyama, K. Ishimori, S. Takahashi, H. J. Dyson and P. E. Wright, "Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultra-fast H/D exchange coupled with 2D NMR", PNAS, 105, 13859-13864 (2008).

・K. Inaba, M. Suzuki, K. Maegawa, S. Akiyama, K. Ito and Y. Akiyama, "A pair of circularly permutated PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of E. coli", J. Biol. Chem., 283, 35042-35052 (2008).

(2)招待講演

招待講演(国内)

・秋山 修志, "蛋白質の構造変化の仕組みを探る ～ X線小角散乱 ～", 大阪大学蛋白質研究所セミナー 「蛋白質の構造変化の仕組みを探る」(2008/3/3).

・秋山 修志, "X線小角散乱に流行の兆し ～ 基礎的な注意点とこれからの展望 ～", 第 21 回生物無機化学夏季セミナー (2008/8/2).

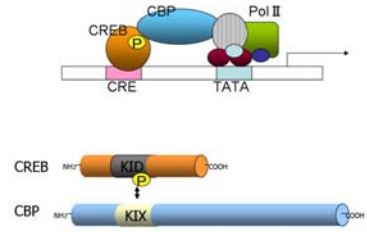
研究課題別評価書

1．研究課題名
　記憶形成の脳内イメージング

2．氏名
　石本　哲也

3．研究のねらい
　記憶の分子メカニズムが、培養神経細胞や脳スライスを用いた実験でだんだん明らかになってきた。しかし神経伝達物質受容体や転写因子など、シナプス可塑性に関連すると考えられる分子の挙動や、それらによって引き起こされる長期増強現象と、個体レベルでの記憶形成の連関が直接証明されているとは言いにくい。その原因は、生きたマウスを用いた実験では、内部の特定の蛋白質の挙動を捕らえることが、今まで不可能だったからである。本構想では神経活動に関係の深い蛋白質の挙動を、生体内で発光を用いて捉えるプローブ蛋白質を開発する。
対象となるのは、神経活動に依存した蛋白質同士の結合や、蛋白質の構造変化などである。プローブ完成後、トランスジェニックマウスを作成する。得られたトランスジェニックマウスを用い、生きたマウスの記憶形成を観察しつつ、同時に脳内の特定の蛋白質の挙動を計測する方法を確立することを目標としている。目標の達成により、記憶のメカニズムの解明に向けた、有用な手段となることが期待される。

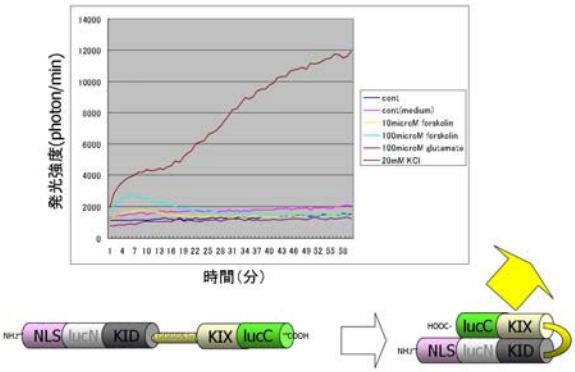
4．研究成果
（1）CREB 活性化を計測するためのプローブ蛋白質作成
　CREB（cAMP response element binding protein）はシナプス可塑性に深く関わっているとされる転写因子である。長期記憶が形成される際には CREB によって、必要な遺伝子の発現が誘導されると考えられている。神経活動など CREB を活性化する刺激は、CREB のリン酸化を誘導し、CBP（CREB binding protein）との結合を介して、CRE 配列の下流の遺伝子発現を増強させる。CREB と CBP の結合ドメインは同定されており、それぞれ KID,KIX ドメインと呼ばれている。
　今回、この CREB の活性化を発光で検知するため、スプリットルシフェラーゼといわれる手法を用いた。ルシフェラーゼはホタルにおいて発現している発光蛋白質であるが、スプリットルシフェラーゼでは、その蛋白質を N 末端側ポリペプチドと C 末端側ポリペプチドに分離させることで発光能をなくしている。これら発光能のないポリペプチドを、あらかじめ結合することがわかっている蛋白質 A, B と融合させ、細胞内に発現させると、蛋白質 A, B の結合依存的に、N 末端と C 末端のスプリットルシフェラーゼが会合し、ルシフェラーゼとしての活性を回復する。



KIDがリン酸化され、KIXに結合し、転写を促進することが知られている。
シナプス可塑性、記憶形成に重要なことが報告されている。

　この原理を、KID ドメインと KIX ドメインの結合の計測に応用することを試みた。今回まず試したのは、N 末端と C 末端のルシフェラーゼの間に KID、KIX のドメインを挿入し、KID、KIX 間をリンカーで接続したものである。KID と KIX の位置関係やリンカー配列など条件を変えつつ、細胞株を用いてスクリーニングを行った。スクリーニングは、細胞内の cAMP 量を上昇させるフォルスコリン添加に対して、発光上昇を示すかどうかを指標とした。その結果、一つのコンストラクトを候補として得た。この融合蛋白質を、培養した海馬神経細胞に発現させ、フォトンカウンターでリアルタイム観察しつつ、培地中へ KCl を添加し、神経細胞を脱分極刺激させることで、発光量が上昇することが観察された。つまり、神経細胞の興奮に応じて発光が上昇する蛋白質を作ることに成功した。

この発光上昇は、KID と KIX が結合することで、ルシフェラーゼの活性が上昇したことによると考えられる。今現在、課題となっているのは、この発光上昇率が安定しないことと、発光量にばらつきがあることである。これは神経細胞に対する遺伝子導入の不安定さが関係していると考えられるので、ウイルスベクターなどの使用することで解決できる可能性がある。また、今回観察された発光上昇は KCl刺激後数十分で観察されたが、これは、刺激後数分で誘導される CREB のリン酸化と数時間かけて誘導される CRE 配列依存的転写との中間に当たり、時間的なつじつまがあう。



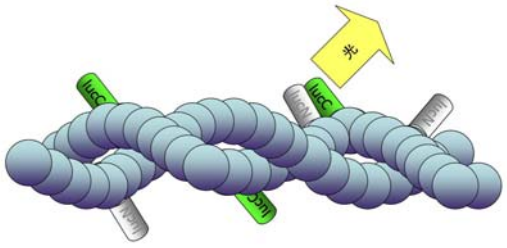
培養神経細胞に対してKCl刺激によって、発光強度が上昇した。

なお、1 分子型のプローブ蛋白質以外に、2分子型スプリットルシフェラーゼも設計し、KID、KIX の結合が発光で計測できることも確認した。この蛋白質では発光量が 1 分子型に比べ少ないため、培養神経細胞で発現させ、リアルタイムで観察することは現時点では困難であるが、HEK293 細胞に発現させた場合、フォルスコリン刺激に対して発光の上昇を示す。

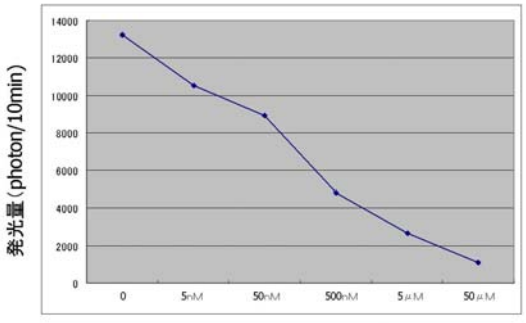
(2)アクチン重合を計測するためのプローブ蛋白質設計

アクチンは細胞骨格を形成する蛋白質で、さまざまな細胞で発現している。神経細胞においては、特にスパインと呼ばれる構造に集積していることが知られ、そこでの重合、脱重合がシナプスの活動に深く関わっていることがわかっている。このアクチンの重合、脱重合を計測することは神経研究のみならず、他の組織や細胞の研究を行ううえでも、有用な実験手法となりうる。今回スプリットルシフェラーゼを用いて、アクチンの重合を計測するプローブ蛋白質の作成を試みた。

アクチンに、ルシフェラーゼの N 末端もしくは C 末端を融合させた蛋白質を設計し、それぞれ異なった組み合わせで HEK293 細胞に遺伝子導入した。内在性のアクチン重合体中に、発現させたスプリットルシフェラーゼとの融合蛋白質が取り込まれる場合、ある確率でスプリットルシフェラーゼの N 末端と C 末端が会合することが起きうると考えられる。すなわちこれらの融合蛋白質が、重合アクチンの中に取り込まれることで、重合の度合いに応じて発光強度が変化することが期待される。それらの細胞の発光強度をフォトンカウンターで計測することで、最も効率よく発光する組み合わせを探索した結果、アクチンの N 末端側に、ルシフェラーゼの N 末端、C 末端をそれぞれ融合させた組み合わせが、最も発光強度が高いことがわかった。また、このプローブ蛋白質を発現させた状態で、アクチンの重合阻害剤であるラトランクリン A を倍地中に添加すると、濃度依存的に発光強度が弱まっていくことが確認された。このことは、今回設計したプローブ蛋白質が アクチンの重合を計測できることを示している。また、ラトランクリン A を培地中に加えることで、単量体のアクチンの量が変化しないことも確かめられている。



アクチン重合を計測するプローブ設計。



ラトランクリンA(アクチン重合阻害剤)濃度

ラトランクリンA投与量依存的に発光強度が減少する。

本構想では、トランスジェニックマウス作成を念頭においており、アクチンに関してもトランスジェニックマウス作成を予定している。その際、2 つのアクチンプローブを同時に発現させる必要があるため、IRES 配列を用いて両者のコーディン

グ領域を接続したプラスミドを構築し、HEK293 細胞で発現させた。発現した蛋白質はプローブとして正常に機能したため、この配列を基にしてトランスジェニック作成用ベクターの構築を行う予定である。

（3）トランスジェニックマウス作成

CREB 活性化計測用のプローブを用いて、トランスジェニックマウス作成を試みたが、現在までにプローブ蛋白質を発現しているマウスは得られていない。サザンブロット法でゲノム DNA を解析すると、トランスジーンがゲノムに挿入されていることは確認できるので、何らかの転写抑制がかかっているものと考えられる。現在、引き続きトランスジェニックマウス作成を行っている。

5．自己評価

当初の目標であったトランスジェニックマウスでの実験を行う段階まではたどり着けなかった。これは最初に要素技術として使用する計画だった、一本鎖可変領域抗体がうまく得られず、プローブ蛋白質の作成が遅れたことが大きな原因の一つである。その後一本鎖可変領域抗体の作成をあきらめ、天然に存在する蛋白質の配列とルシフェラーゼの配列を用いてプローブ蛋白質の開発を行った。その結果、CREB の活性化、アクチン重合を計測できるプローブを作ることができた。ようやく当初の計画の第一段階が終了し、トランスジェニックマウス作成に取り掛かかっている状態である。これは当初の目標と比べて 50%程度の達成率であると判断する。今後特許申請も終えたので、学会発表や論文投稿を積極的に行っていきたい。

6．研究総括の見解

脳内イメージングという大変チャレンジングな研究課題であり、困難な問題に遭遇することが予想された。事実要素技術の一つの達成に難渋し途中で変更を余儀なくされた。しかしながら、イメージング用スプリットルシフェラーゼを用いてシナプス可塑性にかかわる転写因子である CREB の活性化やスパインに集積しているアクチンの重合を計測出来るプローブまでは出来た。目的としていた記憶すると脳が光るマウスの作製にはまだ距離があるが、トランスジェニックマウスの作製に成功していただきたい。今後とも粘り強く頑張っていただきたい。

7．主な論文等

（A）さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表　　なし

（2）特許出願

・発　明　者：石本哲也、森寿、和泉宏謙
発明の名称：記憶形成の神経活動を可視化するプローブ（出願公開前）
出　願　人：富山大学
出　願　日：平成 20 年 8 月 12 日

（3）学会発表

学会発表（国内）

・石本哲也、和泉宏謙、小澤岳昌、森寿、“スプリットルシフェラーゼを用いたアクチン重合の検出”、日本薬理学会第82回年会（2009/3/16-18）

（B）その他の主な成果　　なし

研究課題別評価書

1．研究課題名
　生命現象分析のための小分子転写因子創成

2．氏名
　上杉　志成

3．研究のねらい
　老化、分化、癌化といった多くの生命現象が遺伝子の発現によって調節されており、その遺伝子発現を制御しているのは、転写因子と呼ばれる一群の蛋白質である。本研究の目標は、転写因子を小分子有機化合物で模倣し、生物学の道具とすることである。振りかけるだけで細胞膜を透過し遺伝子の発現を制御したり、動物に投与するだけで生体内で自由自在に遺伝子発現を制御する小分子転写因子を開発したい。小分子転写因子の DNA 結合部位にはヘアピンポリアミド化合物を用い、転写活性化部位としては、私たちが開発したレンチノロールという有機分子を用いる。これまでの予備試験によると、このような小分子転写因子の創成は可能だと考えられる。生物学や医学の研究に実際に用いられる道具を開発するため、この提案では原理を証明する実験を行う。本研究は、小分子化合物の夢と限界に挑戦するものであり、その成果は将来の革新技術の礎となるかもしれない。

4．研究成果

小分子転写因子は合成可能！

　私たちの研究室が見つけ出したレンチノロールという小分子化合物は、転写活性化部位の小分子版ともいえる(JACS, 126, 3461)。この化合物に DNA に結合する小分子化合物を共有結合させれば、転写活性化部位と DNA 結合部位を併せ持った「小分子転写因子」ができあがるはずである。このさきがけ研究開始以前に、私たちの研究室では、試験的に小分子転写因子を合成して原理の証明を行った(JACS, 126, 15940)。

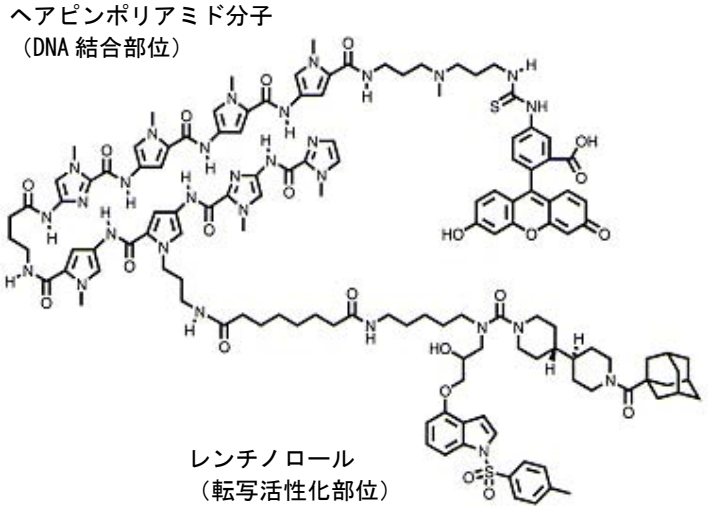


図１　小分子転写因子の化学構造。

　DNA 結合部位として、Dervan らによって開発されたヘアピンポリアミド化合物の一つを利用した（図１）。この化合物は 5’-TGACCAT 配列に特異的にnMオーダーの解離定数で結合する。この DNA 結合分子とレンチノロールを融合させた化合物は、5’-TGACCAT 配列をエンハンサーとしたレポーター遺伝子の転写を活性化するが、エンハンサー配列を変えると転写活性化せず、配列特異的に転写を活性化する。さらに、生化学的な実験から、Sur-2 と RNA ポリメラーゼ II をプロモーターにリクルートすることで転写が活性化されていることも分かった。この融合化合物はまるで転写因子のように振舞う。有機化合物で転写因子ができるということが直接証明された。

　しかしながら、この化合物には二つの問題があった。**（1）レンチノロールの転写活性化能力が天然の転写活性化部位に比べて弱い。（2）小分子転写因子の細胞透過性が低い。**

このさきがけ研究の目的は、この二つの問題を解決することである。

●転写活性化能を向上させたレンチノロール類縁体の探索

分子設計および合成

合成したレンチノロール誘導体を図2に示した。一般的に、転写因子の転写活性化ドメインには疎水性部位と親水性部位が点在していることが言われている。私たちの研究によって、レンチノロールが ESX の転写活性化ドメインの疎水性部位を模倣して、Sur2 と相互作用していることが分かっている。そこで親水性部位も模倣できるように、レンチノロールへ水酸基やカルボキシル基を導入した誘導体の合成を行った(2a～3c)。次に、ビピペリジン部位にベンゼン環を挟むことによってレンチの幅を長くした類縁体(4a)やメタ置換にすることで角度を変えた類縁体(4b, 4c)の合成を行なった。さらに、レンチノロールの骨格をフレキシブルにすることを狙い、ビピペリジン部位を様々な長さのアルキル鎖に置換した類縁体(5a～5c)の合成を行なった。

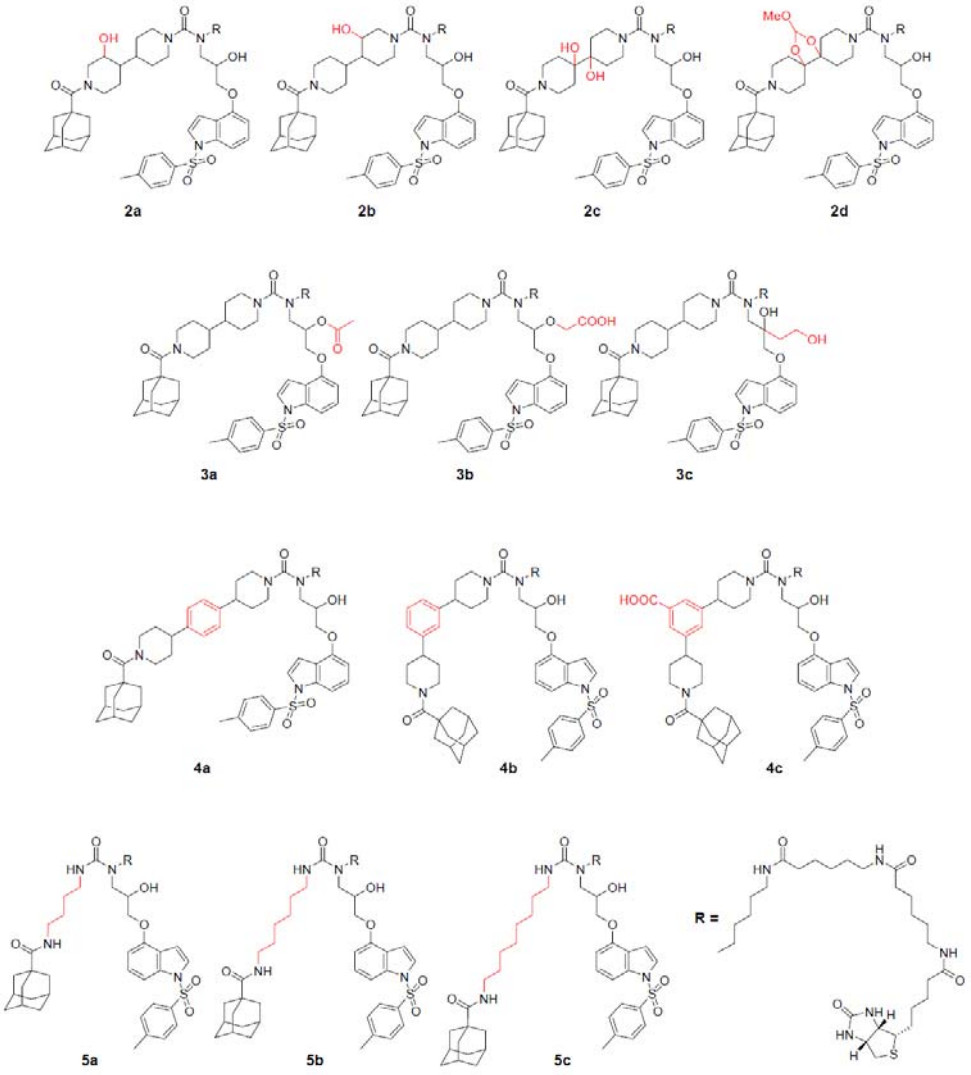


図2 レンチノロール誘導体の化学構造

レンチノロール類縁体の生物学的評価

合成した類縁体の転写活性化能の評価は二種類の方法を用いて行なった。一つ目は *in vitro*

の系でビオチン化類縁体の転写活性化能が高いほど RI ラベルされた mRNA が多く発現するため濃いバンドが見られる(図3A)。次に、*in vitro* 系の評価で成績の良かった 9 個の類縁体を Gal4-SA plasmid および SEAP reporter plasmid を用いた細胞ベースのレポーターアッセイ(図3B)によって評価した。その結果、レンチノロールに比べて約2倍の活性を持つ 2a と約3倍の活性を持つ 4a を見出すことができた。4a の転写活性化能力は天然の転写活性化部位(ESX)に匹敵する。

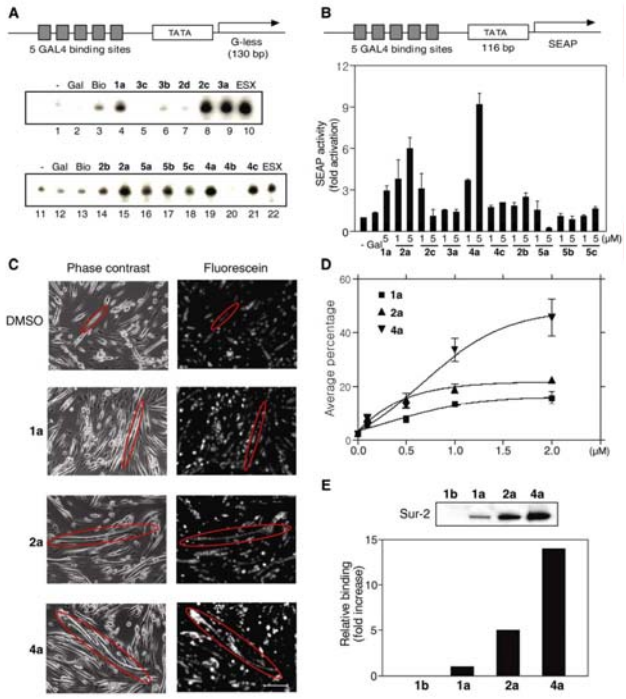


図3 レンチノロール誘導体の転写活性化能の測定

類縁体 4aによる内因性遺伝子の発現

4a の転写活性化能力が強いのであれば、人工的なレポーター遺伝子ではなく、内因性の遺伝子を活性化できるはずである。そこで MyoD 転写因子に着目した。この筋細胞分化のマスター転写因子は、筋肉分化のための遺伝子を活性化し、筋芽細胞から筋細胞への分化を誘導する。この MyoD の転写活性化部位を 4a で置き換えた。

MyoD 遺伝子の DNA 結合ドメインとストレプトアビジンの融合タンパク質(MyoD-SA)を発現するベクターをマウス筋芽細胞(C2C12)に導入し、安定発現株をネオマイシン耐性により選択して樹立した。この細胞株を 2% horse serum を含む培地で培養し、4a(1μM)により一週間処理した。

筋線維は多核の筋細胞によって構成されるが、未分化な段階の筋芽細胞は単核である。すなわち分化の過程で細胞は多核化していくということである。下の写真では、MyoD -SA 発現株をレンチノロール-ビオチン結合化合物で処理し、1週間後に細胞核の核酸塩基に特異的にインターカレートする蛍光色素である Hoechst33342 により染色した結果、筋細胞への分化が顕著に誘導されていることがわかった(図3CD)。

なぜ 4a の活性が強くなったのかを明らかにするためにウエスタンブロット法を用いてレンチノロールおよび 4a と Sur2 の相互作用を評価した(図3E)。その結果、4a はレンチノロールよりも強く Sur2 と結合することが示唆された。さらに 4a と Sur2 の解離定数を蛍光偏光法によって測定した。その結果 4a の解離定数は 0.32 μM でありレンチノロール(0.86 μM)よりも約 2.6 倍の強さで Sur2 と結合していることがわかった。

これらの成果をまとめ、現在論文投稿中である。

5. 自己評価

このさきがけ研究では以下の事項を達成することができた。(1)インビトロで遺伝子を発現する小分子転写因子が合成できた。(2)DNAに結合するヘアピンポリアミド分子を安定供給する化学合成法を開発した。(3)レンチノロールを最適化し、細胞内で強く遺伝子発現を活性化できる小分子化合物を見つけ出した。(4)さまざまなタイプの小分子転写因子を合成した。

現時点での問題点は、小分子転写因子の細胞透過性を上げることが予想以上に困難だったということである。これは比較的分子量の大きな分子には普遍的な問題である。今後も続けて研究を行い、この普遍的な問題に挑戦する。

6．研究総括の見解

本研究者が見いだしたレンチノロールを出発点として分子設計した数多くの有機分子の合成とスクリーニングの末、有効な小分子転写因子を開発したことは極めて高く評価される。しかしながら、細胞膜透過性に難点があり、是非ともこの点を今後の研究で克服してほしい。また、分解性の問題なども課題となろう。大きな目標を持った研究なので本研究者の情熱と執着心をもってすれば必ず達成されるであろう。

7．主な論文等

（A）さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

・Choi, Y., Shimogawa, H., Murakami, K., Ramdas, L., Zhang, W., Qin, J., Uesugi, M. Chemical genetic identification of the IGF-linked pathway that is mediated by STAT6 and MFP2. Chem. Biol. 13, 241-249 (2006).

・Sato, S., Kwon, Y., Kamisuki, S., Srivastava, N., Mao, Q., Kawazoe, Y., Uesugi, M. Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules: Isolation of a new target of indomethacin. J. Am. Chem. Soc. 129(4), 873-880 (2007).

・Jung, D., Shimogawa, H., Kwon, Y., Mao, Q., Sato, S., Kamisuki, S., Kigoshi, H., Uesugi, M. Wrenchnolol Derivative Optimized for Gene Activation in Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 4774-4782 (2009).

（2）特許出願

・発　明　者：上杉志成、山添紗有美
発明の名称：細胞接着促進剤及び細胞の接着を促進させる方法
出　願　人：京都大学
出　願　日：2008 年 6 月 18 日

（3）受賞

・平成 18 年 4 月　東京テクノフォーラム 21　ゴールド・メダル賞

（4）著書

・Jung, D., Choi Y., Uesugi, M. Small organic molecules that modulate gene transcription. Drug Discovery Today 11, 452-457 (2006).

・紙透　伸治，　上杉　志成 「小分子化合物で転写因子をつくる」 化学と生物　Vol.45, No.4 (2007).

・下川浩輝，上杉志成 「小分子有機化合物による転写制御」 化学工業　58(5)　58-66 (2007).

・佐藤綾人，上杉志成 「有機化合物で転写因子をつくる」 Medical Science Digest 34(1) 5-6 (2008).

（5）招待講演

招待講演（国際）

・Uesugi, M. “Chemical biology of gene expression and cell differentiation.” 6th Australian Peptide Conference. 2005, 10.

・Uesugi, M. “Chemical biology of gene expression and cell differentiation.” ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC, International Conference on Biodiversity and Natural Products. 2006, 7.

・Uesugi, M. “Chemical Biology of Gene Expression.” 2006 Japanese-American Kavli Frontiers of Science Symposium. 2006, 12.

・Uesugi, M. “Chemical biology of gene expression.” 19th FAOBMB Seoul Conference. 2007, 5.

・Uesugi, M. “Isolating and identifying the targets of bioactive small molecules.” The 22nd Naito Conference on Chemical Biology. 2008, 9.

(B)その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Henderson, Y. C., Frederick, M. J., Jayakumar, A., Choi, Y., Kang, Y., Spring, P. M., Uesugi, M., and Clayman, G. L. Human LBP-32/MGR is a repressor of the P450scc in human choriocarcinoma cell line JEG-3. Placenta. 28, 152-160 (2006).

研究課題別評価書

1．研究課題名

蛋白質電顕画像を用いた自動 in silico 擬似結晶構造解析法の開発

2．氏名

小椋　俊彦

3．研究のねらい

生物の多様な機能の多くは、その基本コンポーネントであるタンパク質の働きを介して実現されている。個々の蛋白質は、精緻な3次元構造を特異的に形成することで極めて複雑な機能を発現しているため、生体内の生理機能や生化学反応、さらに病理の解明や薬理特性の解析においては、タンパク質の3次元構造を解明することが極めて重要となる。本研究では、こうしたタンパク質の構造解析手法として、電子顕微鏡画像から 3 次元構造を解析する単粒子構造解析法の新規アルゴリズムの開発とこれを用いた膜タンパク質の構造解析を進めた。これと平行して、生物サンプルをダメージ無く高コントラストで観察する新しい実験手法の開発を行った。

4．研究成果

タンパク質粒子の電子顕微鏡画像は極めてノイズが高くコントラストが低いため、この画像から3次元立体構造を構築するにはいくつかの画像情報処理を経る必要がある。まず、電顕画像内に点在するタンパク質粒子部分の画像を選択的に拾い上げる。こうして拾い上げた数千から数万のタンパク質粒子画像の位置や角度を推定し、それぞれに適合した角度や位置で加算平均を掛けることで、バックノイズを減少させる。こうして S/N 比の向上した平均画像を基に3次元構造を再構築する（図 1）。構築される3次元構造の分解能や精度は、解析に用いた粒子画像枚数とその分類精度、さらに平均画像の3次元投射角度の推定精度に依存する。これまでの研究では、この粒子画像の拾い上げに Simulated-Annealing と Neural-Network を用いることでより高精度・高速に粒子画像を拾い上げることを可能とした。粒子平均画像から3次元構造を構築するためには、この平均画像を様々な角度から投射したプロジェクション画像と捉え、そのオイラー角や回転角を推定する必要がある。こうした画像情報のみから角度を推定する方法として、中央断面定理に基づくシノグラム法が従来から用いられてきた。しかし、この方法では、2次元画像を回転させながら 1 次元へと投射するため情報が大幅に減少し極めて精度が悪かった。従って、この方法では、対称性が高く推定角度を大幅に絞り込める粒子に対しては有効であるが、対称の極めて低い粒子に対しては角度推定が困難である。

本研究では、こうした、2次元画像から3次元構造を求める問題を2次元画像の3次元オイラー角への最適配置問題と捉え、Simulated-Annealing アルゴリズムを応用することで自動的に解析する方法を開発した。この方法により、評価曲面内の多くのローカルミニマムから抜け出し、より最適な解を導くことが可能となった。この Simulated-Annealing を用いた3次元モデルの再構成方法の概要を図2に示す。単粒子構造解析の初期に得られるプロジェクションのクラス平均画像は、それぞれ様々な回転角度や位置ずれがあり、その値は未知である。こうした各画像の回転角度、位置、オイラー角を推定し、3次元モデルを再構成する必要がる。本方法では、まず各平均画像のオイラー角をランダムに設定し Back-projection により3次元モデルを作成する(図2左中)。初期のオイラー角は真値とまったく異なっているため、実際の構造から大きくかけ離れている。次に、画像を一枚ランダムに選択し、オイラー角と画像の回転角、中心位置をランダムに変化させる(図

2右上)。そして、この位置で再度 Back-projection を行い3次元モデルの再構成を行う。この再構成画像から全ての平均画像の対応するオイラー角へと再プロジェクションを行い、それぞれの平均画像との相関スコアを計算する(図2右下)。この全体のスコアが、この移動によって向上する場合はこの移動が確定する。もし、低下する場合は、遷移確率P(ΔL)を計算し確立的に移動の可否を確定する。こうした一連のサイクルを繰り返しながら、徐々に温度係数を指数関数的に低下させることで、平均画像と再プロジェクション画像が徐々に類似するよう、回転角と位置が変化していき、それと同時に3次元構造も最適な形へと成長する(図2左下)。

以上の自動拾い上げ方法や角度推定方法を用いて、様々なタンパク質の3次元構造解析を行った(図3)。まず、アルツハイマー病の要因となる膜タンパク質複合体γ-secretase に関して、負染色法による粒子画像により3次元構造解析を行った。この結果、特異的なアームを供えた興味深い構造が示された(図3A)。さらに、温度や化学物質、機械刺激等の外部刺激により、細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの流入を行う TRPC3 チャネルの解析を行い、世界に先駆けて 15 Å分解能で3次元構造を決定した(図3B)。この研究では、氷包埋サンプル画像に対してこれまで開発した自動解析アルゴリズムを駆使することで、粒子画像 14 万枚規模での解析を進めた。これ以外にも、筋細胞等の細胞内膜に存在し、カチオンイオンを透過させる TRIC チャネル(図3C)やTRP-M2(図3D)等の生理学的にも重要なチャネルやレセプタ等の解析構造解析を行い2ヶ月程度で3次元構造を決定することができた。今後は膜タンパク質だけでなく、タンパク質複合体や薬品が結合した状態などの解析にも応用を進める予定である。

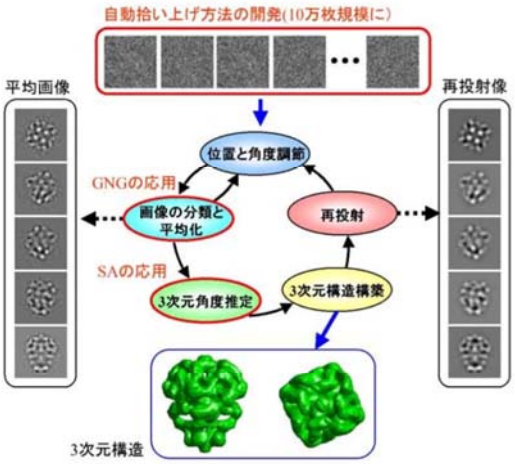


図1 単粒子構造解析の概要、数千から数万枚のタンパク質電顕画像から100クラス程度の平均画像を求め、これから3次元構造を解析する。

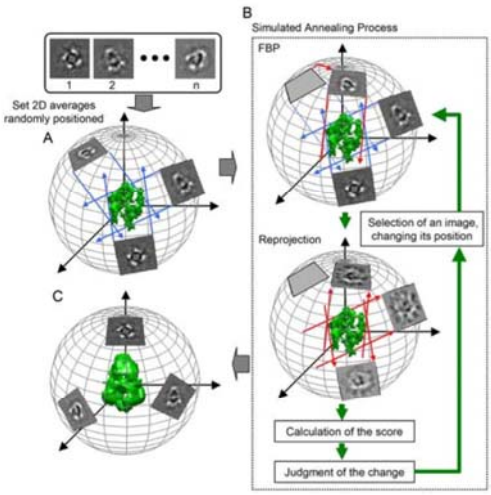


図2 Simulated-Annealingを応用した3次元角度推定方法の概要、数十枚の平均画像のオイラー角を自動的に決定する。

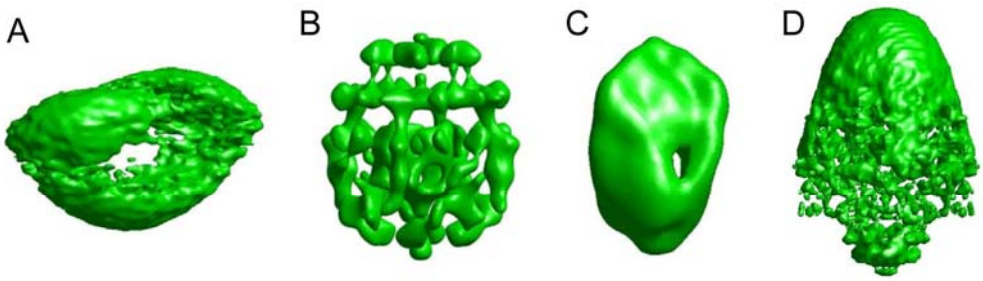


図3 本手法を用いた様々な膜タンパク質の単粒子構造解析の結果、A:アルツハイマー病関連膜タンパク質γセクレターゼの構造、B: TRPC3チャネルの構造, C:筋細胞の細胞内小胞に存在するTRICチャネルの構造、D:TRP-M2チャネルの3次元構造。

今回のさきがけ研究により単粒子構造解析の解析期間は2ヶ月程度まで短縮することができた。しかし、今後より解析速度を向上させ、その場観察・その場3次元構造解析へと到達するためには、よりノイズが少なく高コントラストな新たな計測手法を開発する必要がある。もし観察画像が単粒子の平均画像の S/N 比と同等のレベルに達すれば、多数の画像を拾い上げ、位置を調整し加算平均等の処理の必要が無くなる。すなわち、観察画像から直接3次元構造を求めることが可能となり、大幅な解析期間の短縮に繋がる。こうした観察方法では、タンパク質をダメージ無く非染色で測定する必要があるため、透過型電顕以外の計測手法を検討した。本研究では走査型電子顕微鏡(SEM)による非染色・低ダメージ観察法の開発を進めた。

SEM を用いた生物試料の観測方法では、直接電子線をサンプルに照射するのではなく、間接的に照射することで電子線によるダメージを大幅に低下させ、さらに非染色で極めて高いコントラストでの観察を可能とした。この方法では、薄いサンプル支持膜(カーボン膜)の下部表面にサンプルを付着させ、サンプル支持膜上部より低い加速電圧の電子線を照射する(図4)。電子線はサンプル支持膜の内部で拡散しながら広がり、膜の下面付近に到達する。これにより、サンプル支持膜の下部表面より2次電子が放出される。これが、膜下のサンプルに吸収されることで極めてクリアな画像を得ることができる。2次電子のエネルギーは、数十 eV と極めて弱く、生物サンプルのようなコントラストの付き難い試料においても高いコントラストの画像を得ることが可能であり、かつ電子線を直接試料に照射していないためダメージも極めて少ない。こうした SEM の観察条件及びその画像は、間接2次電子コントラスト(ISEC)条件および ISEC 画像と名づけた。本方法では、ウィルスの非染色観察も容易に可能であり、その分解能はモンテカルロ・シミュレーションにより 1nm 程度まで向上することが示唆された。

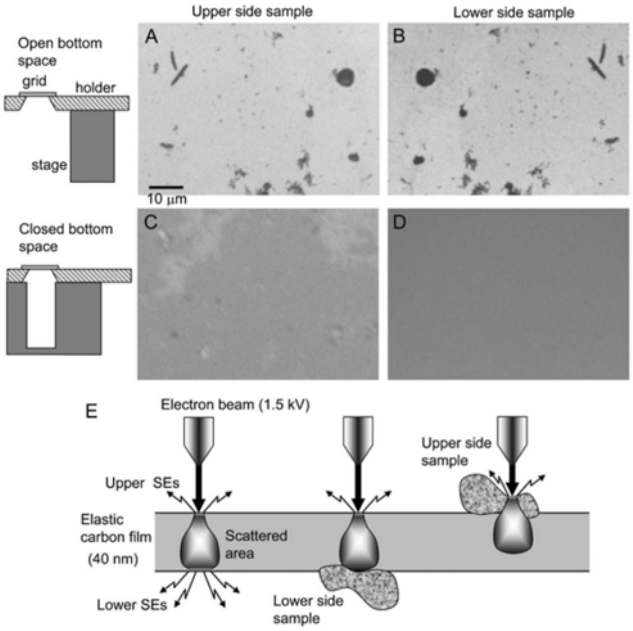


図4 SEMによるカーボン薄膜の非染色バクテリアサンプルの観察画像とISEC条件の概要。A:片持ち状態のカーボン薄膜上の画像。B:カーボン薄膜下の画像。C:アルミチューブ上にカーボン薄膜を設置し、薄膜上にサンプルを固定した時の画像、サンプルのコントラストが消失。D:アルミチューブ上でカーボン膜下のサンプル画像、完全にコントラストが消失。これらの画像は、40nmカーボン膜を用いて1.5kV加速条件で観察した。E:ISEC条件の概念図、40nmカーボン膜に1.5kVの電子線を照射すると、膜内を電子が散乱しカーボン膜内に吸収される。しかし、下部表層に到達した電子により下面より二次電子が放出される。カーボン膜下のサンプルは、この2次電子を吸収することで高いコントラストが生じる。

5. 自己評価

本研究では、タンパク質やウィルス等の生物試料の構造解析方法に関して、電子顕微鏡画像から 3 次元構造を解析する単粒子構造解析法と SEM による方法の開発を進めた。

単粒子構造解析の研究では、新たな 3 次元角度の推定方法を開発し、これまで困難であった非対称タンパク質の 3 次元構造解析の自動化を可能とした。さらに、この方法を用いることで、研究期間中に 8 種類の膜タンパク質の構造解析を行い、それぞれ国際誌に発表している。当初予定していた研究目標をほぼ達成したものと考えるが、まだ解析手法の完全自動化には至っていないため、達成率は 80%程度と捉えている。

SEM を用いた生物サンプルの非染色・極低ダメージの観察方法は、これまでの SEM による観察方法とは異なり、カーボン薄膜下にサンプルを付着させ、間接的に 2 次電子が照射される条件（ISEC 条件）により観察する。このため、従来の観察条件とは異なり、電子線によるダメージが殆んどなく、非染色サンプルを非常に高いコントラストで観察可能である。現在は、この方法によりウィルスを高コントラストで観察可能であり、その分解能もモンテカルロ・シミュレーションにより 1nm 程度まで向上することが示唆されている。この分解能のレベルに達すると、タンパク質やその複合体が非染色でかつ簡単に観察可能となる。本研究は、さきがけ研究と同時に開始したテーマであり、約 3 年の研究期間で新たな物理的観察手法の開発を行ったことは評価に値すると考えている。そのため、当初の目標はほぼ達成することができた。

6. 研究総括の見解

電子顕微鏡画像から3次元構造を求めるための単粒子構造解析法を改良するために、本研究者は3次元画像再構成のための新しいアルゴリズムを考案し、解析時間を大幅に短縮することに成功した。いまだ完全自動化には至っていないが、それに近づいているので早期の達成を望む。この手法により8種類もの膜タンパク質の構造を解析している。高く評価したい。また、SEM による新しい観測方法は興味深くいち早くユニークな成果を期待したい。

7．主な論文等

（A）さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

・Toshihiko Ogura and Cikara Sato, “A fully automatic 3D reconstruction method using simulated annealing enables accurate posterioric angular assignment of protein projections”, J. Struct. Biol., Vol.156, p371-386 (2006)

・Yusuke Maruyama, Toshihiko Ogura, Kazuhiro Mio, Shigeki Kiyonaka, Kenta Kato, Yasuo Mori and Chikara Sato, “Three-dimensional reconstruction using transmission electron microscopy reveals a swollen, Bell-shaped structure of transient receptor potential melastatin type2 cation channel”, J. Biol. Chem., Vol.282, p36961-36970 (2007)

・Kazuhiro Mio, Toshihiko Ogura, Muneyo Mio, Hiroyasu Shimizu, Tzyh-Chang Hwang, Chikara Sato and Yoshiro Sohma, “Three-dimensional reconstruction of human cystic fibrosis transmembrane regulator chloride channel revealed an ellipsoidal structure with orifices beneath the putative transmenbrane domain”, J. Biol. Chem., Vol.283, p30300-30310 (2008)

・Toshihiko Ogura, “A high contrast method of unstained biological samples under a thin carbon film by scanning electron microscopy”, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.377, p79-84 (2008)

・ Toshihiko Ogura, “Analyzing indirect secondary electron contrast of unstained bacteriophage T4 based on SEM images and Monte Carlo simulations”, Biochem. Biophys. Res. Commun., 308,p 254-259 (2009)

（2）特許出願

・発明者： 小椋 俊彦
発明の名称：非接触型走査プローブ顕微鏡
出願人：産業技術総合研究所
出願日：2008 年 4 月 25 日（未公開）

・発明者： 小椋 俊彦
発明の名称：走査型電子顕微鏡およびその使用方法
出願人：産業技術総合研究所
出願日：2008 年 10 月 17 日（未公開）

・発明者： 小椋 俊彦
発明の名称：非接触型走査プローブ顕微鏡
出願人：産業技術総合研究所
出願日：2008 年 12 月 22 日（未公開）

・発明者: 小椋 俊彦
発明の名称:非接触型走査プローブ顕微鏡
出願人:産業技術総合研究所
出願日:2009 年 2 月 16 日(PCT出願、未公開)

その他　国内特許出願　　1 件(未公開)

(3)著書
・三尾和弘、小椋俊彦、佐藤主税、“イオンチャネル・受容体の単粒子構造解析”、細胞工学 Vol.25, No.3 p236-241、2006

(4)学会発表
・小椋 俊彦、“電子顕微鏡画像を用いたタンパク質の自動 3 次元構造解析技術の開発”、第六回産学官連携推進会議、2007/6/16-17

(B)その他の主な成果　　なし

研究課題別評価書

1．研究課題名
オンチップ多電極刺激計測系による細胞ネットワークの構成的理解

2．氏名
金子　智行

3．研究のねらい
近年のゲノム科学の進展と、動物実験廃止の流れの中で、セロミクスの潜在的重要性や、動物実験を代替する細胞レベルでの計測システム開発の必要性が非常に強く指摘されつつある。しかし、従来の細胞株を用いた毒性検査などのスクリーニング技術は問題が多く、未だ創薬段階で効果的に利用されてはいない。これを克服、実現するために、これまで微細加工技術を用いてマイクロチップ上に構成的に「１細胞レベル」で細胞ネットワークを構築して計測する技術の開発・原理検討を行ってきた。その中で、細胞集団の空間配置・種類・数などの「ネットワークパターン」の違いによって細胞集団の応答が大きく異なることなど、単純な細胞レベルの１階層上にある「細胞集団・細胞ネットワーク」が持つ協同現象の重要性を示唆してきた。

そこで本研究では、構成的に構築した心筋細胞集団・細胞ネットワークが環境との相互作用によって獲得、保持、変化、消失する拍動周期情報の機構の解明を通して、細胞集団が持つ集団化効果(コミュニティ・エフェクト)を明らかにし、細胞ネットワークを基盤としたオンチップドラッグスクリーニング技術への発展を目指した。具体的には、アガロースマイクロチャンバーによるネットワークの構築技術の改良と、化学、電気刺激に対する細胞ネットワークの応答反応を計測できるシステムの開発、これらを用いて心筋細胞の拍動の安定性と細胞集団サイズとの関係を計測し、心筋細胞ネットワークの拍動周期を決定する要因を解明する。さらに、既存の多電極アレイを用いた電気計測システムでは組織培養や分散培養に最適化されており、１細胞レベルでの測定は困難であるため、１細胞レベルでの測定に最適化した多電極アレイを新規に設計し、細胞ネットワーク中の１細胞の電気計測を可能にする技術を開発する。この技術をアガロース加工技術と組み合わせることにより、細胞集団・ネットワークを１細胞単位で多電極基板上に配置して培養しながら計測する技術、すなわち、細胞ネットワークを基盤にしたオンチップ多電極刺激計測系を開発し、心筋細胞ネットワークのコミュニティ・エフェクトを解明するのがねらいである。

4．研究成果
（1）心筋細胞ネットワークの空間配置や細胞数による拍動の安定性と電気刺激による応答の測定

心筋細胞のネットワークパターンと細胞数による拍動の安定性を測定するために、環状ネットワークと直線状ネットワークによる拍動周期の安定性をネットワーク中の細胞数を変化させて測定した。その結果、環状、直線状共にネットワークを構成する細胞数の増加に伴って拍動周期が安定することがわかった。しかし、細胞数が１０細胞を超えると逆に拍動周期が不安定になる傾向がでてきたので、さらに６０細胞の直線状ネットワークを作製(図 1)し、測定を行ったが、拍動周期の不安定化は起きなかった。このことから、直線状ネットワークでは伝導遅延やヒステリシスによるゆらぎの増加は見られないことがわかった。また、格子状の９細胞ネットワークの細胞間に線維芽細胞を配置した場合においても、心筋細胞同士は

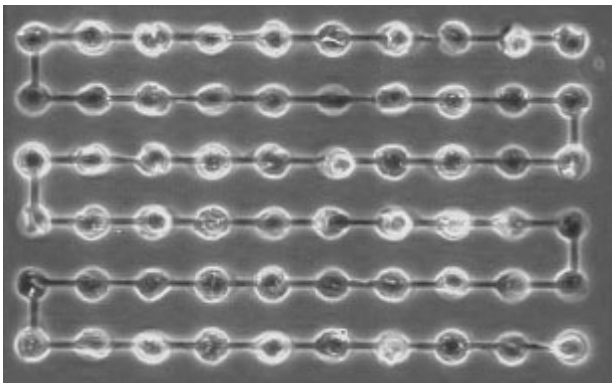


図 1　心筋 60 細胞の直線状ネットワーク

同期して拍動し、拍動周期の安定性は維持された。

心筋細胞ネットワークに対する電気刺激の応答反応を測定するための基礎データを取得するために、アガロースマイクロチャンバーを用いて心筋細胞ネットワークを作製し、外部から電気刺激することにより、心筋 1 細胞や心筋細胞ネットワークの電気刺激応答反応を顕微鏡観察することにより、電気刺激周波数と拍動周期の同調について測定した。電気刺激の強度を固定し、刺激周波数のみを変化させると、心筋1細胞では電気刺激に応答して拍動周期が同調する周波数領域が狭いのに対し、心筋細胞ネットワークでは同調する周波数領域が1細胞に比べて広いことがわかった。このことは、細胞が集団化することによって刺激周波数に応答する領域の許容範囲が広がったことを示唆しており、この許容範囲の拡大は様々な許容範囲を持つ細胞が接触することによる単なる足し合わせ現象では説明のできない、細胞の集団化効果（コミュニティ・エフェクト）による新たな機能の獲得を示唆するものである。

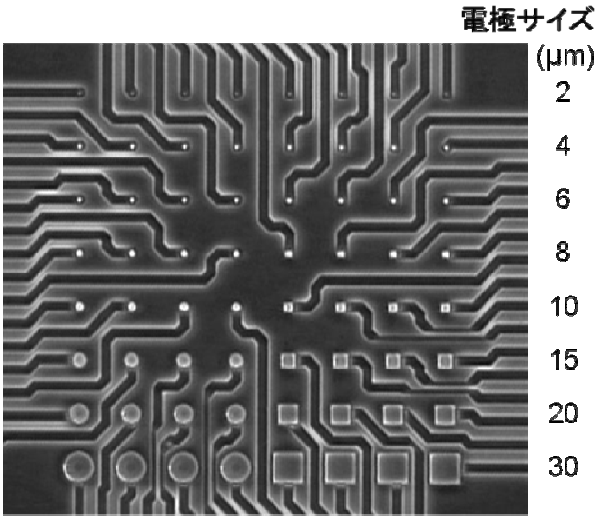


図 2　評価用電極基板

（2）心筋細胞ネットワークを1細胞単位で電気計測可能な電極基板の開発と心筋1細胞単位での細胞外電位変化の測定

既存の多電極基板は最も小さい電極でも大きさが 20μm であり、マウスの心筋細胞を1細胞単位で計測するには大きすぎる。そこで、多電極基板を設計し直すために、まず電極サイズを 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30μm に設計した評価用電極基板(図 2)を作製し、どのサイズの電極サイズまで電気信号が取得できるか測定した。その結果、電極サイズ 10μm までは心筋細胞の細胞外電位変化を観察することが可能であることがわかった。そこで、電極サイズを 10μm にして電極を直線状に4列配置した電極基板を作製した。この電極基板上の内側の2列にアガロースマイクロチャンバーを作製(図 3a)し、心筋1細胞を電極上に配置(図 3b)することにより、1電極に1細胞が対応するように直線状心筋細胞ネットワークを電極基板上に作製(図 3d)し、それぞれの電極から心筋細胞ネットワーク中の1細胞の細胞外電位変化を測定することに成功した。さらに、直線状に配置した心筋細胞ネットワーク中の隣り合う心筋細胞の細胞外電位変化を測定(図 4)することにより、細胞外電位変化が伝播する時間を測定し、その電極間の距離から伝導速度を導き出した。その結果、電極間の距離 50μm を伝播する時間は心筋細胞間の接触状態により変化するが、平均約 0.07ms であ

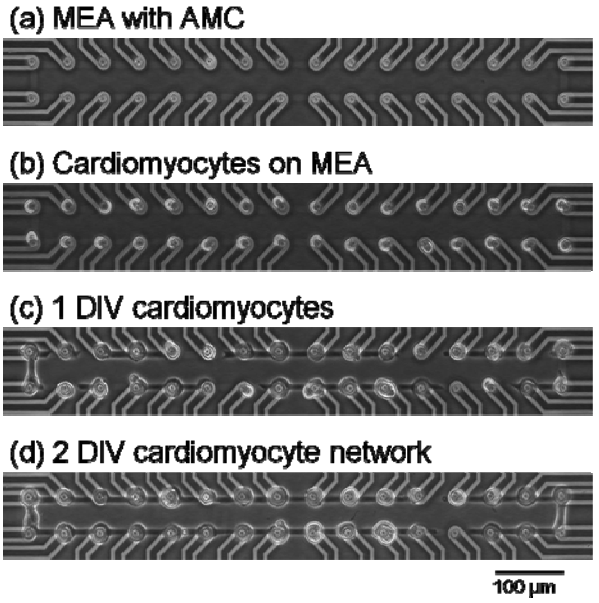


図3　電極基板上での心筋細胞ネットワークの形成　(a)多電極基板上にアガロースマイクロチャンバーを作製、(b)電極上にマウス心臓から単離した心筋細胞を配置、(c)培養後1日目、心筋細胞が成長し隣接する心筋細胞と接触、(d)培養後2日目に形成された心筋細胞ネットワーク

ることから、伝導速度は約 0.7m/s であることがわかった。この伝導速度と比較するために、既に技術が確立されているパッチクランプ法により、心筋2細胞間の活動電位の伝導遅延を測定した。アガロースマイクロチャンバーを用いて心筋2細胞を配置して細い通路によって接触させ、拍動が同期した心筋2細胞に対してダブルパッチクランプを行った(図 5)。その結果、パッチ間の距離 60μm を活動電位が伝播する時間は平均約 0.06ms であることから、伝導速度は約 1m/s であることがわかった。この伝導速度は分散培養で測定されている伝導速度よりも速く、心臓臓器で測定されている伝導速度とほぼ等しかった。これらのことから、多電極電気計測系による細胞外電位の測定結果は、既存のパッチクランプ法による活動電位の測定による結果とほぼ同等であるといえる。この結果から、分散培養では不可能であった心臓臓器の心筋細胞と同様に一定方向に整然と伝導する仕組みが作製でき、多電極電気計測系により培養しながら細胞外電位変化を長時間測定できるシステムの可能性が示された。

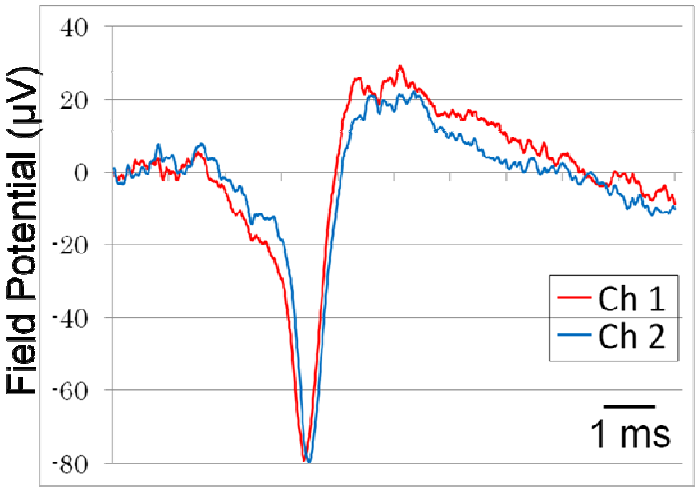


図4　心筋細胞ネットワーク中の隣接する心筋 2 細胞の細胞外電位変化

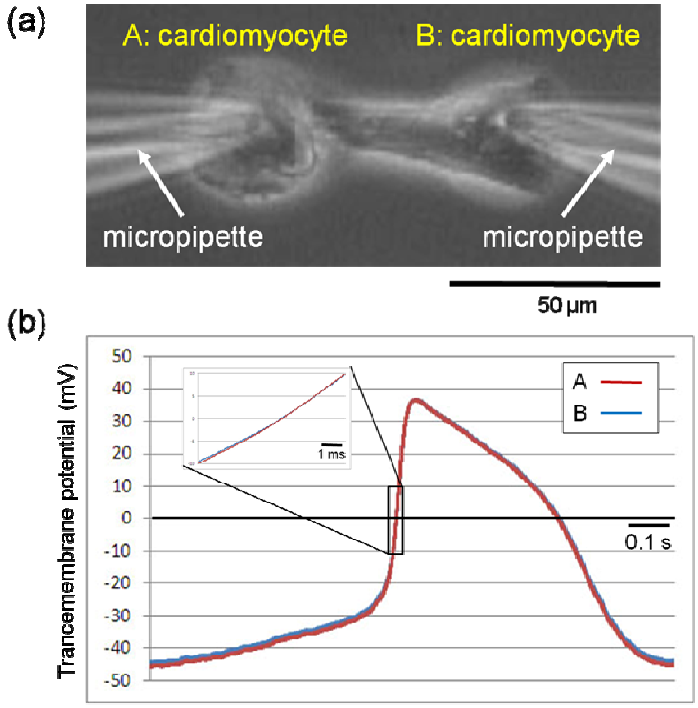


図5　隣接する心筋 2 細胞に対するダブルパッチクランプ
(a)心筋 2 細胞に対してダブルパッチクランプを行っている際の位相差像、(b)心筋 2 細胞の活動電位変化の記録

（3）既存の電極基板を用いた薬剤刺激に対する応答反応の測定

新規の多電極基板を用いる前の基礎データとして、既存の多電極基板を用いて心筋細胞以外の線維芽細胞なども含まれる心筋細胞集団の環状ネットワークを基板上に作製し、薬剤による化学的な刺激による細胞外電位変化の応答反応を測定した。既存の電極基板上にアガロースマイクロチャンバーを作製し、分散培養することにより心筋細胞と線維芽細胞が混合された細胞集団ネットワークが作製可能である。しかし、この細胞集団ネットワークは心筋細胞や線維芽細胞の位置を任意に設定することは不可能であり、ネットワーク内の細胞数、配置、接触状態とも制御されていないが、アガロースマイクロチャンバーを用いることにより、様々なネットワークパターンにすることが可能である。そこで、アガロースマイクロチャンバーを環状に作製することにより、環状心筋細胞集団ネットワークを作製し、細胞外電位変化を長時間測定した。その結果、ある一定の電極から電位変化が起こっていることがわ

かった。これはその電極周囲の心筋細胞がペースメーカーとなり、そこから電位変化が始まって周囲に伝播しているものと思われる。この電位変化の伝播は通常、ペースメーカー領域から発生し、環状ネットワークの両側を伝播し、対極の位置で衝突し消滅する。しかし、偶然片側の伝播が止まる(一方向性伝導ブロックが起きる)と、対極を越えて電位変化が伝播し、さらに片側の伝播が止まったところも逆方向に伝播すると、電位変化がペースメーカー領域に戻ってくる(リエントリー)現象が起きた。このリエントリー現象が起きるとさらに電位変化は伝播し、環状回路上を一定方向に伝播する心臓臓器で起こっている不整脈と同様の現象が観察された。したがって、この様な不整脈と同様の現象を電極基板上に再現し、偶然起こったリエントリー現象を観察することに成功した。また、電極基板上に作製した心筋細胞集団ネットワークに対して、薬剤による応答反応も観察し、カルシウムイオンの流入を遮断する薬剤を加えることにより、カルシウムイオンの流入を示す電気シグナルが減少することも確認した。

5. 自己評価

本研究課題はオンチップ多電極刺激計測系を用いた心筋細胞ネットワークの拍動周期情報の機構等の構成的理解であった。まず、そのために心筋細胞ネットワーク内の1細胞の電気信号の変化を測定するための電極基板の設計を行い、当初の目的通り1細胞単位の細胞外電位変化を測定可能な基板の作製に成功した。さらに、細胞ネットワーク内の細胞外電位変化の伝導速度の計測を既存技術であるパッチクランプと比較することにより、同等の結果を得ることができた。これにより、パッチクランプでは不可能であった長期間の測定を可能にした。しかし、今回開発した電極基板はすべての電極で安定して電気信号が取得できるわけではないので、さらなる改良が必要である。また、当初、既存のオンチップ電気刺激計測系を用いて、電気計測と同時に電気刺激する予定であったが、装置のスペック上不可能であることがわかり、刺激実験を外部から導入する必要性が出てきた。オンチップ電気計測系への外部からの電気刺激系の導入はノイズの増大や刺激時の波形記録の困難さから実現不可能であったが、今後装置の改良等により電気刺激時の同時計測に挑戦していきたいと考えている。このため電気刺激の実験は電気計測系を用いずに顕微鏡観察のみで拍動周期の変化を測定し、1細胞と細胞ネットワークの刺激周波数に対する応答反応から、新たな細胞のコミュニティ・エフェクトを観察することに成功した。さらに、既存の電極基板上に配置した環状ネットワークを用いて、偶然起こったリエントリー現象を観察することに成功した。今後、本研究課題で開発した新規の電極基板を改良し、心筋細胞ネットワークの電位変化を1細胞単位で計測することにより、細胞ネットワークを用いたオンチップドラッグスクリーニングへの応用に向けて、1細胞単位の詳細なデータを取得するための基盤技術となり、ドラッグスクリーニングの標準技術として発展していくことが期待できる。

6. 研究総括の見解

アガロースマイクロチェンバーネットワークを構築し、心筋細胞の拍動周期や安定性の解析システムを確立した。そして、多電極刺激系計測との組み合わせによって、細胞間コミュニケーションによるコミュニティ効果を明らかにするなど、細胞ネットワークシステムの動態解析への途を開いたことは極めて優れた成果と言えよう。この基礎研究の更なる深化を望む一方、その上にたって薬剤スクリーニングなどへの応用も試みてはいるが実用化されることを期待したい。

7. 主な論文等

(A)さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・K. Kojima, T. Kaneko and K. Yasuda, “Role of the community effect of cardiomyocyte in the entrainment and reestablishment of stable beating rhythms,” Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 351, pp. 209-215 (2006)

・T. Kaneko, K. Kojima and K. Yasuda, “Dependence of the community effect of cultured cardiomyocytes on the cell network pattern,” Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 356, pp. 494-498 (2007)

・T. Kaneko, K. Kojima and K. Yasuda, “An on-chip cardiomyocyte cell network assay for stable drug screening regarding community effect of cell network size,” Analyst, Vol. 132, pp. 892-898 (2007)

（2）特許出願　　なし

（3）著書

・T. Kaneko, K. Kojima and K. Yasuda, “Study of community effects of the cardiomyocytes with an agarose microchamber system,” In “Frontiers in Life Sciences,” Edited by Makoto Fujiwara, Shoichi Ishiura, and Naoki Sato, Research Signpost, pp.27-38 (2006)

（4）学会発表

学会発表(国際)

・ Tomoyuki Kaneko, Kensuke Kojima, Ikurou Suzuki, Yoshihiro Sugio, and Kenji Yasuda, “Individual-cell-based measurement of the field potential in a cardiomyocyte by multi-electrode array with agarose microchambers,” Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006

・Tomoyuki Kaneko, Kensuke Kojima, Ikurou Suzuki, Yoshihiro Sugio, and Kenji Yasuda, “Measurement of the field potential in individual cardiomyocytes by multi-electrode array with agarose microchambers,” 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2006

・Tomoyuki Kaneko, Ikurou Suzuki, Kentaro Ando, Fumimasa Nomura, Tetsuo Kitamura, Jyunko Hayashi and Kenji Yasuda, “Delay Time of the Action Potential in Two Cardiomyocytes Connected by Fibroblasts,” 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2007

・Tomoyuki Kaneko, Fumimasa Nomura, Yuki Tomoe, Ikurou Suzuki, Jyunko Hayashi and Kenji Yasuda, “Single-Cell Level Measurement of Conduction Velocity in Cardiomyocytes Network,” 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2008

学会発表(国内)

・金子智行、野村典正、巴悠記、鈴木郁郎、林純子、安田賢二、“細胞ネットワークモデルのための一細胞レベルでの心筋細胞伝導速度の測定”、第 46 回日本生物物理学会年会、2008

（5）招待講演

招待講演(国内)

・金子智行、小島健介、安田賢二、“心筋細胞の拍動同期とその制御” 第 43 回日本生物物理学会年会、2005 年 11 月 24 日

（B）その他の主な成果

（1）特許出願

・発　明　者:安田賢二、金子智行、鈴木郁郎、寺薗英之、服部明弘、福島守

発明の名称:細胞応答計測装置及び方法
出　願　人:東京医科歯科大学
出　願　日:2007.4.20
出願番号:特願 2007-111322

・発　明　者:安田賢二、杉山篤、安東賢太郎、野村典正、寺薗英之、金子智行、福島守
発明の名称:心臓リエントリーモデルチップおよび心臓リエントリーモデルチップによる薬剤の評価装置および方法
出　願　人:東京医科歯科大学、三菱化学安全科学研究所
出　願　日:2007.6.8
出願番号:特願 2007-152692

・発　明　者:安田賢二、杉山篤、安東賢太郎、野村典正、寺薗英之、金子智行、福島守
発明の名称:モデル細胞による薬効評価装置
出　願　人:東京医科歯科大学、三菱化学安全科学研究所
出　願　日:2007.6.8
出願番号:特願 2007-152696

・発　明　者:安田賢二、杉山篤、安東賢太郎、野村典正、寺薗英之、金子智行、福島守
発明の名称:心筋毒性検査装置、心筋毒性検査チップおよび心筋毒性検査方法
出　願　人:東京医科歯科大学、三菱化学安全科学研究所
出　願　日:2007.6.8
出願番号:特願 2007-152711

研究課題別評価書

1．研究課題名
神経活動の *in vivo* 高速イメージングと光操作

2．氏名
喜多村　和郎

3．研究のねらい
脳の情報処理を理解するためには、その構成要素である神経細胞（ニューロン）の機能を生体内で直接計測することが不可欠である。動物の脳内（*in vivo*）において、単一ニューロンが如何にして数千～数万のシナプス入力を統合して活動電位を出力するのか、言い換えれば、単一ニューロンが神経回路の情報処理にどのように関わっているのかを明らかにすることは、脳科学／神経科学における最も重要な研究テーマの1つである。この問題に答えるためには、生きた動物個体の脳内において、特定のニューロンを同定し、その入出力関係を定量的に測定することが必要不可欠である。本研究では、2 光子励起顕微鏡法とパッチクランプ記録法を組み合わせて用いることで、動物個体内で機能している単一ニューロンの入出力活動を直接「その場で」観察することにより、その情報処理を明らかにすることを目的としている。このような、従来の手法では極めて困難であった研究を実現するために、2 光子励起顕微鏡法を用いた新しい単一ニューロンの記録法を開発することを最重要課題とした。

4．研究成果
生きた動物個体の脳内において、特定のニューロンを同定し、その入出力関係を定量的に測定することを可能にする方法として、*in vivo* ホールセルパッチクランプ法が開発され、単一ニューロン機能と神経回路機能の関係について数々の重要な発見がなされてきた。しかしながら、これまでの方法ではニューロンを可視化せずに行うため（ブラインド法）、機能を調べたいニューロンから選択的に記録を行うことは原理的に不可能であり、かつ、細胞内のどの部分から記録を行ったのかを同定することも困難であるため、実験効率は極めて悪い。これらの困難を克服するために、2 光子励起顕微鏡で目的のニューロンを可視化した上で、ホールセル記録を行う方法の開発を行った。

（1）蛍光標識を必要としない単一ニューロンの可視化とシャドウパッチング法
2 光子励起顕微鏡法は、レーザー走査顕微鏡法の一種であり、蛍光顕微鏡に分類される。従って、2 光子励起顕微鏡を用いて脳内のニューロンを可視化するためには、観察したいニューロンの中に、あらかじめ蛍光タンパク質や蛍光物質を何らかの方法で導入するというのが一般的な常識である。ところが、我々は、脳内の細胞外領域に細胞内に取り込まれることのない蛍光色素（例えば Alexa dye など）を注入することで、2 光子励起顕微鏡によりニューロンの「影」を観察することが可能であることを発見した（図1）。通常、パッチクランプ記録を行う際には、記録電極に陽圧をかけておく必要があるので、このとき電極内液に蛍光色素を含めておくだけで、特に前もって色素を注入しておかなくても十分にニューロンを可視化することができる。この方法では、ただ単に細胞外領域に蛍光色素を入れるだけであり、あらかじめニューロン内に蛍光分子を導入する必要が全くなく、「蛍光顕微鏡では、観察対象を光らせなければ観察できない」という、固定観念とは全く逆の発想により、極めて簡便な方法で脳内の単一ニューロンを可視化することを可能にしたのである。

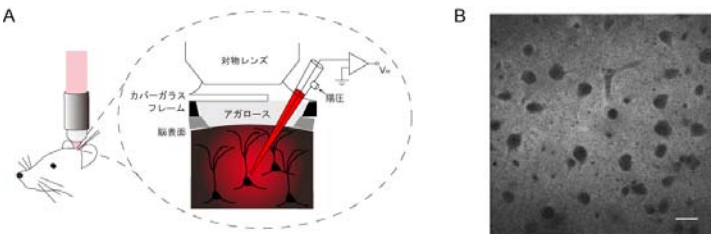


図1．標識されていないニューロンを動物個体脳内で可視化する

ニューロンの「影」を観察することにより、ニューロンの種類を同定することができることも明らかとなった（図 2）。まず、記録をしたいニューロンが存在する脳部位の大まかな位置に電極を刺入する（大脳皮質第 2／3 層であれば脳表面から 200-300 μm、小脳プルキンエ細胞層は 150-200 μm など）。次に、ニューロンの「影」を観察し、細胞体の大きさや形から細胞種を同定する。大脳皮質錐体細胞や小脳プルキンエ細胞などの投射ニューロンの細胞体は直径 20 μm 程度であり、抑制性の介在ニューロンは直径 10 μm の小型のものが多い。また、大型の投射ニューロンは細胞体付近では太い樹状突起を持つため、さらに正確な同定が可能である。小脳皮質における細胞種（プルキンエ細胞、介在ニューロン）の同定率は 100%であり、大脳皮質においては、錐体細胞（87%）、介在ニューロン（56%）であった。これらの値は、脳スライス標本を近赤外微分干渉顕微鏡法で観察した場合とほぼ同様の同定率である。

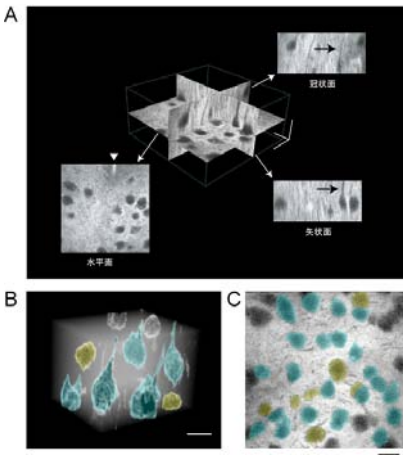


図2. 個体脳内におけるニューロンの可視化と同定。(A)マウス大脳皮質における「影」観察の三次元再構成像。矢じりは記録電極。ニューロンおよび電極先端を同時に可視化することができる。矢状面や冠状面において、錐体細胞の樹状突起が可視化できる（矢印）。(B)細胞種の同定。細胞体の大きさや形、脳表面方向に伸びる太い樹状突起の有無によって、興奮性の錐体細胞（青）か、抑制性の介在ニューロン（黄）かを区別する。(C)一視野の中で同定された細胞の種類。スケールバーは全て 20 μm.

以上のように、脳の細胞外領域に蛍光分子を入れることで、ニューロンの「影」を観察し、そのニューロンを同定することが可能であることがわかった。一方、記録電極は内液の蛍光色素で可視化できるので、目的のニューロンの「影」に記録電極を近づけてパッチクランプ記録を行うことが可能になる（図 3）。ギガオームシールの形成過程を可視化することが安定で良い記録を行うために重要であることが、脳スライス標本におけるホールセルパッチクランプ記録において分かっている。すなわち、ニューロンに対する記録電極の位置や、ギガオームシールを形成するための陰圧をかけるタイミングを最適化することが安定な記録を得るために必要なのである。我々が開発した方法（シャドウパッチング法）では、脳スライス標本で行われている方法を、動物個体の脳内で行うことを可能にしたと言う点で画期的な方法である。

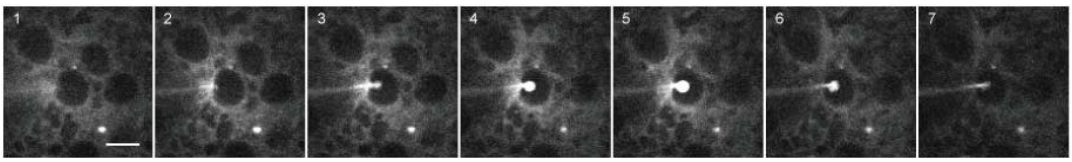


図3. シャドウパッチング法　ギガオームシール形成過程の連続写真（2.5 秒間隔、スケールバー：20 μm）。Alexa 594 を含む記録電極をラット小脳プルキンエ細胞の細胞体に近づけ（1）、細胞膜に対して押し付ける（2, 3）。電極にかけた陽圧による「えくぼ」が観察されたら（4, 5）、陽圧を開放し、陰圧をかける（6）。これにより、ギガオームシールが形成され、同時に細胞外領域の蛍光色素は急速に拡散する（7）。

シャドウパッチング法を用いて、大脳皮質第 2／3 層の錐体細胞（図 4A）や小脳プルキンエ細胞（図 4B）などの投射ニューロンだけでなく、小型の介在ニューロン（図 4C, D）からも選択的にホールセルパッチクランプ記録を行うことが可能であることが示された。「影」観察による細胞種の同定は、記録したニューロンの電気生理学的性質や形態の 2 光子励起観察によって確認された。「影」観察時に必要な細胞外の蛍光分子は、記録中に拡散してなくなるため、記録後は記録電極から細胞内に入った蛍光分子により、ニューロンの形態を高いコントラストで観察することが可能である。「影」観察の条件（2 光子励起レーザーや電極にかける圧力など）を最適化することで、ホールセルパッチクランプ記録を 70%以上の成功率で行うことが可能となった。また、記録の良し悪しの指標である、アクセス抵抗（低いほど電極による電圧降下が少ない）は 20 MΩ 未満であり、脳スライス標本での記録と同程度の良い記録をとることができる。記録は多くの場合 30 分以上行うことが可能で、2 時間以上に渡って記録を維持することも難しくはない。これらの改善された記録

条件は、シャドウパッチ法によるギガオームシール形成の最適化および記録電極位置の精密なコントロールによってもたらされたものである。

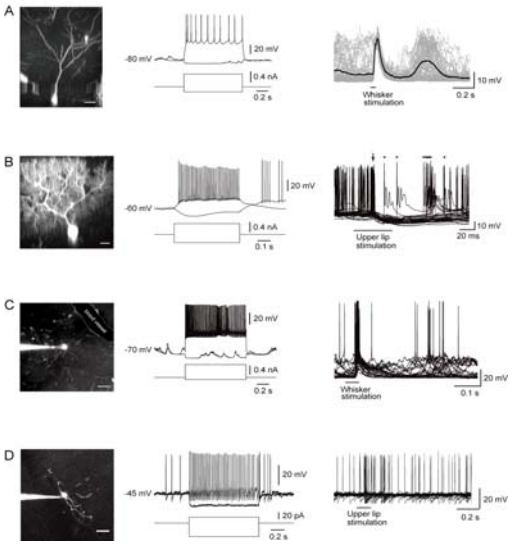


図4. マウス個体脳における大脳皮質、小脳皮質ニューロンのシャドウパッチング
(左)細胞形態の 2 光子励起顕微鏡による観察。スケールバー:20 μm.(中央)電流注入による活動電位の発生。(右)感覚刺激(髭への空気吹き付け刺激)によるニューロンの応答。(A)大脳皮質第 2／3 層錐体細胞。(B)小脳プルキンエ細胞。(C)大脳皮質第 2／3 層介在ニューロン。(D)小脳介在ニューロン。

(2)覚醒個体脳内における単一ニューロンからの選択的ホールセル記録

従来、動物個体におけるホールセル記録や 2 光子励起イメージングによる単一ニューロンの機能解析は主に麻酔下の動物において研究が行われてきたが、麻酔薬が中枢神経系に与える影響を無視することはできず、それゆえ用いる麻酔薬の種類によって得られる結果に矛盾が生じることもしばしば見受けられる。しかしながら、無麻酔覚醒時の動物において、これらの解析を行うことは従来の方法(ブラインド法)では非常に困難で、成功例は世界的に見てもごくまれである。本研究で開発した、シャドウパッチング法により麻酔下の動物においては、飛躍的に実験効率が向上したことから、この方法を覚醒動物に用いることによって、無麻酔の状態でホールセル記録を安定して行うことができると期待された。実際に、無麻酔の動物においてホールセル記録を行った例を図5に示す。麻酔下と比較すると若干実験効率は劣るものの、約50%の成功率で無麻酔のマウスにおいてホールセル記録を行うことが可能となった。今後は、この方法を用いることで本研究の最終目標である、個体脳における単一ニューロンの入出力の定量関係を明らかにして行きたいと考えている。

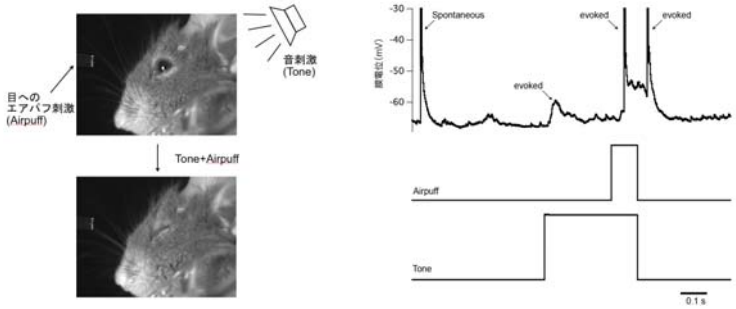


図5. 覚醒マウスにおける音刺激および瞼への刺激に対する、マウスの反応(左)と小脳プルキンエ細胞の応答(右)。刺激に対応した動物の反応(瞬き)をビデオカメラでモニターし、プルキンエ細胞の応答をホールセル記録(右)により測定する。

5. 自己評価

生体内におけるシナプス統合メカニズムを明らかにすることを最終目標として、2 光子励起イメージングとホールセル記録を組合せた、新しい記録法の開発を行った。動物個体内で標識しない神経細胞を可視化・同定して、そのニューロンから選択的に記録を行うというこれまでにない発想に基づく手法である。その結果、従来法では到達不可能であった実験効率と実験精度を達成することができた。さらに、この新規記録法の発展として、研究提案時には予期していなかった、覚醒動物への適用ということにも成功した。これまで動物個体を用いる研究で、必ずといってよいほど問題となっていた麻酔薬の影響を受けることなく、よりインタクトに近い状態での単一ニューロン活動を解析できると言う点で、極めて重要な技術的進歩であると考える。また、感覚刺激による単一

シナプス入力の可視化について、技術的に困難な問題はほぼクリアされ、予備的な実験結果も得ることができた。
本研究課題の最終目標である、動物個体脳内におけるシナプス統合メカニズムの解明については、ようやくその研究の端緒を開いたところであるが、研究目的を達成する上で必要な技術開発は、当初の目標をほぼ達成することができたと考える。

6. 研究総括の見解
本研究は生きた動物個体の脳内の特定のニューロンを同定し活動電位の入出力関係を定量的に測定する新しい手法として、蛍光標識を用いない単一ニューロンの可視化すると同時に従来法のパッチクランプ法を結びつけたシャドウパッチング法を開発した。すなわち、2光子励起イメージングとホールセル記録とを組み合わせた新しい手法である。これを用いて覚醒行動中のマウスの脳において、単一ニューロンからのホールセル活動記録が出来るようになったことは、今後の脳機能解析に大きく寄与するであろう。極めて優れた成果を挙げていると評価される。今後の展開が楽しみである。

7. 主な論文等
(A)さきがけ個人研究者が主導で得られた成果
(1)論文(原著論文)発表
論文(国際)
・Kitamura, K., Judkewitz, B., Kano, M., Denk, W. & Häusser, M.: Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. Nature Methods, 5, 61-67 (2008).

(2)特許出願　　なし

(3)受賞
・平成20年度　武田科学振興財団一般研究奨励(2008 年 11 月)

(4)著書
・喜多村和郎:In vivoにおける神経活動の 2 光子励起観察法. 実験医学増刊, Vol.26, No.12, 157-164 (2008).

・喜多村和郎:2 光子励起顕微鏡法を使った単一ニューロンの機能計測. バイオインダストリー, 2009 年 2 月号.

(5)学会発表
学会発表(国際)
・Kitamura, K., Denk, W. & Häusser, M. Targeted patch-clamp recordings from unlabeled neurons in the mammalian brain, Neuroscience 2006.

学会発表(国内)
・喜多村和郎 Targeted patch-clamp recordings from unlabelled neurons in vivo. 第29回日本神経科学大会, 2006.

(6)招待講演
招待講演(国際)
・Kitamura, K.: Targeted whole-cell recordings from unlabeled neurons in vivo. NIPS-JST国際研究集会「神経科学における非線形イメージングと蛍光バイオセンサーの最前線」、2008.4.18.

招待講演（国内）

・喜多村和郎：単一ニューロンにおけるシナプス統合のin vivoパッチクランプと2光子イメージングによる解析．「統合脳」ワークショップ「樹状突起・スパイン」、2007.8.22.

・喜多村和郎：2光子イメージングを用いた個体脳単一ニューロンからの選択的記録法とその可能性．第31回日本神経科学大会シンポジウム、2008.7.11.

・喜多村和郎、橋爪幹、狩野方伸：小脳皮質における登上線維微小帯域のin vivo2光子イメージングによる解析． 生理学研究所研究会「細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性」、2008.10.2

・喜多村和郎： 動物個体脳における神経活動の多光子励起顕微鏡による観察．光・量子デバイス研究会、2009.2.13

（B）その他の主な成果

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

・Judkewitz, B., Rizzi, M., Kitamura, K. & Häusser, M.: Targeted in vivo single-cell electroporation. Nature Protocols, in press.

・Schultz, S. R., Kitamura, K., Post-Uiterweer, Krupic, J. & Häusser, M.: Spatial pattern coding of sensory information by climbing-fiber evoked calcium signals in cerebellar Purkinje cell dendrites. Journal of Neuroscience, in press.

（2）学会発表

学会発表（国際）

・Y. Kawamura, H. Nakayama, K. Kitamura, M. Kano： Developmental changes in climbing fiber responses of cerebellar Purkinje cells revealed by whole-cell patch-clamp recordings in vivo. Neuroscience 2008.

学会発表（国内）

・河村吉信、中山寿子、喜多村和郎、狩野方伸：発達期小脳プルキンエ細胞のin vivoパッチクランプ法による解析．第31回日本神経科学大会、2008.7.9.

研究課題別評価書

1．研究課題名

2段階ビオチン化反応を利用したタンパク質解析

2．氏名

末田　慎二

3．研究のねらい

ポストゲノム時代を迎えた昨今、生命現象の主要な担い手であるタンパク質を分析対象としたプロテオーム解析が精力的に展開されている。このようなプロテオーム解析に、積極的に活用されている技術にプロテインタグシステムがある。プロテインタグシステムは、分析対象の標的タンパクに対してペプチドやタンパクをタグとして導入して、そのタグの性質を利用して標的タンパクの分離・分析を行う技術である。本研究では特異な酵素反応を利用した新規なプロテインタグシステムの開発を目標に掲げた。本研究で利用した酵素反応はビオチン固定化反応で、ビオチン固定化酵素（BPL）がその基質タンパクであるビオチンカルボキシルキャリアープロテイン（BCCP）にビオチンを固定化する反応である。古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化反応系では、酵素であるBPLが、反応生成物であるビオチン化されたBCCP（Holo BCCP）と極めて安定な複合体を形成するという特異な性質を有している。この *S. tokodaii* の BPL－Holo BCCP 間の安定な複合体形成反応は、新規な高親和性のタンパク質間相互作用と見なすことができ、この性質を利用した新たなプロテインタグシステムの開発が可能ではないかと考えた。すなわち、BCCP 部位をタグとして標的タンパクに導入し、BPL との相互作用を利用して標的タンパクの分離・分析を行うものである。本研究では、このような特異なビオチン化反応を利用したプロテインタグシステムの開発について検討を行った。

4．研究成果

4－1　*S. tokodaii* ビオチン化系の反応特性に関する調査

S. tokodaii のビオチン化反応系を利用したタグシステムの開発にあたり、まず BPL と BCCP 間の反応性及び結合性に関する詳細なデータを取得した。他の生物種の同酵素反応系に関する検討から、BCCP は N 末端と C 末端の2つのドメインから構成され、ビオチン化に必要なのは C 末端側のドメインだけであることがわかっている。*S. tokodaii* 由来の BCCP は 169 残基から構成されるが、そのうち前半の 100 残基が N 末端側のドメインであると推測された（図1）。そこでこの N 末端側の 100 残基を欠損させた BCCP（BCCP⊿100）を作成し、BPL によるビオチン付加反応を行った。その結果、N 末端から 100 残基欠損させてもビオチン付加反応が起こり、BPL の基質として機能し得ることが確認できた。

次に、BPLとBCCP間の結合親和性を表面プラズモン共鳴（SPR）法により定量的に評価した。その結果、BPLとHolo型のBCCP⊿100 間の結合解離定数（K_d値）は 1.2 (nM)で、両タンパク間

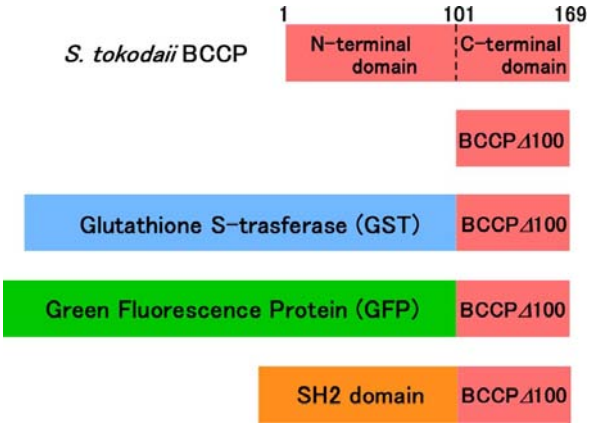


図1　*S. tokodaii* BCCP 及び融合タンパクのドメイン構造

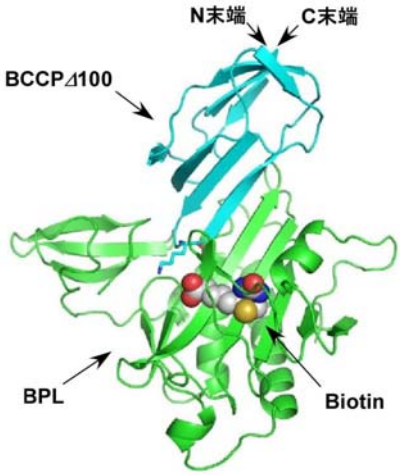


図2　*S. tokodaii* BPL と BCCP（C 末端ドメイン）複合体のモデル構造

の結合親和性は極めて高いことが確認できた。一方でビオチンが付加していないApo型のBCCPΔ100 に関するK_d値は 3.3（μM)であり、ビオチンが付加して初めて高い結合親和性が生じることがわかった。しかしながらApo型のBCCPに関してもマイクロモラーレベルのK_d値が得られたことから、Holo BCCPとBPL間の高い結合親和性が、ビオチンとBPL間の相互作用だけでなく、BCCPとBPLのアミノ酸残基間の相互作用にも基づいていることがわかった。したがって、本タグシステムは原理的に、既存のビオチン－アビジン間の結合を利用したシステムや、抗原－抗体反応を利用したシステムよりも結合特異性が高いと言える。

この BPL と BCCP の複合体をタグシステムとして活用するに当たり、その複合体の立体構造情報が利用できればより利便性が高まるものと考えられる。*S. tokodaii* の BPL と BCCP に関しては立体構造は解明されていないが、アミノ酸配列の相同性の高い、異なる生物種由来の同タンパクに関して、その複合体の立体構造が報告されている。したがって、その複合体の立体構造を鋳型にしてホモロジーモデルを構築した（図2）。得られた構造では、BCCP の C 末側ドメインの N 末端及び C 末端は、ともに BPL との会合部位の反対に位置しており、タグとして理想的な構造を有していることがわかる。つまり、BCCP のどちらの末端に標的タンパクを導入しても、タグを認識する BPL との相互作用を回避できる構造となっている。また BCCP が剛直な構造をしており、タグを認識するする物質と標的タンパクの間に一定の距離を保つことができる点も利点として考えられる。

4－2　固相担体上でのBCCPタグを導入した標的タンパクの捕捉、並びに相互作用解析

標的タンパクとして Glutathione S-transferase（GST）を利用し、その C 末端に BCCP Δ100 を導入した融合タンパク（GST-BCCP Δ100）を構築した（図1）。この融合タンパクが、SPR センサーチップ上に固定化した BPL によって、ビオチン化反応を介して捕捉できるかどうかについて検討を行った。その結果、融合タンパクの添加に伴い急激にレスポンスが増大し、試料の添加を終了してもレスポンスはほとんど低下しなかったことから、期待通りセンサーチップ上でビオチン化反応が起

図3　SPR センサーチップ上での GST-BCCP⊿100 の捕捉、並びに抗 GST 抗体との相互作用

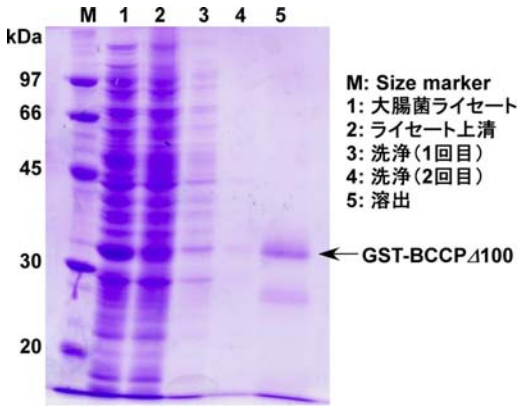


図4　BPL 固定化磁気ビーズを利用した、大腸菌ライセートからの GST-BCCP⊿100 の捕捉

こり、融合タンパクが捕捉できることがわかった(図3)。さらに、このビオチン化反応により固定化した GST が、他のタンパクに対する結合活性を維持しているかどうかについて検証するために、抗 GST 抗体を添加して相互作用解析を行った。その結果、図3に示すように、抗 GST 抗体の添加に伴いレスポンスが増大し、抗体の添加を終了してもレスポンスはほとんど低下しなかった。これより、ビオチン化反応によって固定化した GST は、抗体に対する結合活性を維持していることが確認できた。

また、BPL 固定化磁気ビーズを利用した大腸菌ライセートからの GST 融合タンパクの捕捉についても検討した。その結果、大腸菌ライセート中には様々な生体成分が含まれるにもかかわらず、ビオチン化反応を介して特異的に GST タンパクを捕捉できることがわかった(図4)。また同様に緑色蛍光タンパク(GFP)と BCCP の融合タンパクに関しても(図1)、大腸菌ライセートからの特異的な捕捉に成功した。

4－3　マイクロプレート上でのBCCPタグを導入した標的タンパクの蛍光検出

標的タンパクとして同じく GST を利用し、グルタチオンプレート上に固定化した GST の蛍光検出を行った。この目的のためにまず BPL の蛍光色素による標識化を行った。BPL には活性サイトから離れた部位に3つほどシステイン残基が存在しているため、これらのシステイン残基を有機蛍光色素(Cy3、Cy5 等)のマレイミド体を利用して修飾した。得られた蛍光標識化された BPL はビオチン付加活性を維持していることが確認できたため、プレート上に固定化した GST-BCCP⊿100 の蛍光検出を試みた。その結果、プレート上に添加した GST タンパクの量が増大するにつれて蛍光強度も増大していくことがわかった(図5)。一方で、BCCP タグを有していない GST ではこのような蛍光強度の増大は見られなかったため、GST タンパクをビオチン化反応を介して特異的に蛍光検

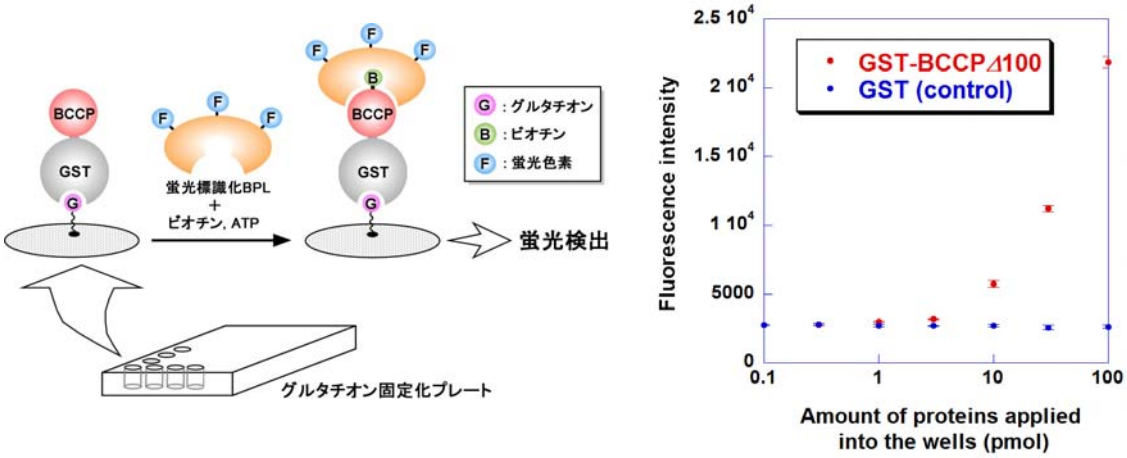


図5　蛍光標識化 BPL を利用したマイクロプレート上での GST タンパクの蛍光検出

出できることがわかった。また Src homology-2 (SH2) domain と BCCP の融合タンパクを構築し(図1)、その融合タンパクとリン酸化ペプチドの相互作用を、蛍光標識化した BPL との反応を利用して、マイクロプレート上で蛍光検出することにも成功した。

5. 自己評価

本研究では特異なビオチン固定化反応を利用した新規なプロテインタグシステムの開発を目標に掲げ、以下の項目に関して検討を行った。詳細は下記に示したが、概ね当初の目標を達成できたものと考えている。

1. *S. tokodaii* ビオチン化系の反応特性に関する調査
2. ビオチン化反応を利用した標的タンパクの捕捉、並びに相互作用解析
3. ビオチン化反応を利用した標的タンパクの蛍光検出

1に関しては、酵素 BPL と基質タンパク BCCP との相互作用をはじめとして、酵素の反応特性に関する詳細なデータを所得することができた。これにより本酵素反応系がタグシステムとして十分活用できるだけでなく、既存のシステムよりも有利な特性を有していることも確認できた。

2に関しては、BCCP 部位を導入した標的タンパクを構築し、その標的タンパクをビオチン化反応を介して特異体に捕捉することに成功した。この系では BPL は、固相担体上に固定化されているが、均一溶液中と同様に迅速に反応が起こり、融合タンパクを捕捉できることがわかった。また、SPR センサーチップ上にビオチン化反応を介して固定化した GST タンパクは、抗 GST 抗体に対する結合活性を維持しており、本タグシステムはタンパク質間相互作用解析にも有効であることを示すことができた。一方で、本タグシステムでは BPL-BCCP 間の結合親和性が高すぎるため、穏和な条件下では標的タンパクを溶出させることができない。そこで BPL あるいは BCCP の特定の残基に変異を導入することにより、結合親和性を適度に下げた系の構築が必要であると考えられる。

3に関しては、蛍光標識化した BPL を利用してビオチン化反応を行うことにより、BCCP 部位を導入した標的タンパクの蛍光検出に成功した。本系を構築するに当たり、まず BPL を蛍光色素で化学修飾する必要があったが、活性部位とは離れた箇所に存在するシステイン残基を修飾することにより、酵素活性を損なうことなく化学修飾することができた。本系は導入する蛍光色素の種類や導入率を改善することにより、蛍光検出感度をさらに向上させることが可能であると考えられる。

6. 研究総括の見解

本研究はプロテオーム解析に有用な新規のプロティンタグシステムの開発研究である。本研究者は偶然に古細菌由来のビオチン反応系では固定化酵素 BPL がビオチン化された BCCP タンパク質と極めて高い親和性を見いだしている。そこで、これを利用して、ビオチン化 BCCP タンパク質をタグとして標的タンパク質の捕捉、蛍光検出することを目的としている。目的はほぼ達成できたと高く評価できる。

BPL と BCCP ならびにビオチン化 BCCP との特異的相互作用の詳細な解析を行い、BPL とビオチン間のみならず BCCP 間とも特異的相互作用を持っていることを示したことは興味深い。BCCP の構造特異性(剛直性など)からタグタンパク質として優れていることも明らかにしている。標的タンパク質の例としてグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)をとりあげ、磁気ビーズ上で大腸菌ライセートからその特異的捕捉にも成功している。BPL に蛍光標識を施してマイクロプレート上での蛍光検出にも成功している。

他の生物学的に重要な標的タンパク質や動物細胞系の検討が期待される。また、他のタグシステムに対する優位性を定量的に比較して提示してほしかった。質の高い国際誌への更なる発表を期待している。

7. 主な論文等

(A)さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Yan-Qiu Li, Shinji Sueda, Hiroki Kondo, Yutaka Kawarabayasi, "A unique biotin carboxyl carrier protein in archaeon Sulfolobus tokodaii", FEBS Letters, 580, 1536-1540 (2006)

・Shinji Sueda, Yan-Qiu Li, Hiroki Kondo, Yutaka Kawarabayasi, "Substrate specificity of archaeon Sulfolobus tokodaii biotin protein ligase", Biochemical and Biophysical Research Communications, 344, 155-159 (2006)

(2)特許出願

・発　明　者:末田慎二、田中一史、近藤寛樹

発明の名称:タンパク等の分離・検出法法

出　願　人:国立大学法人九州工業大学
出　願　日:平成 19 年 3 月 28 日
出願番号:特願 2007-085384

(3)学会発表

口頭発表(国際)

・Shinji Sueda, Yan-Qiu Li, and Hiroki Kondo, "A unique biotinylating system in archaeon Sulfolobus tokodaii", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006

・Hiroki Kondo, Yan-Qiu Li, and Shinji Sueda, "Unusually high stability of an enzyme-product complex in the Sulfolobus tokodaii biotinylation system", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006

・Shinji Sueda, Hitoshi Tanaka, Masanori Yamagishi, Hiroki Kondo, "Development of a new tagging system for immobilization and detection of proteins", The first Japan-Korea joint symposium on bio-microsensing technology, 2008

(5)招待講演

招待講演(国際)

・Shinji SUEDA, "Development of a novel protein tagging system using a unique biotinylation reaction", KETI-RCBT 1st Workshop on Biosensing technology: Integration between dry and wet technology aiming for future biosensor, 2009

招待講演(国内)

・末田　慎二, "古細菌のユニークなビオチン化反応系とその応用", 第 32 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2008

(B)その他の主な成果　　なし

研究課題別評価書

1．研究課題名
超高分子量蛋白質の分子形態変化を観測するNMR技術

2．氏名
楯　真一

3．研究のねらい
蛋白質は，機能を発現する際にドメイン再配向など大きな振幅を持った立体構造変化（分子形態変化）を示すことが多い．蛋白質が示す分子形態変化は，機能制御と密接に関係するものであるが，その実態を正確に観測することは一般的には困難である．結晶構造解析では，もともと柔軟な構造体によって結び付けられているドメイン間の相対配向は，結晶中でのパッキングの影響を受けやすいものであり，ドメイン間の配向の柔軟性が高いほど，すなわち分子形態変化を示す蛋白質であるほど溶液状態における正確な分子形態の観測が困難になる．一方でNMR については，既存の技術では 30kDa 程度の蛋白質までしか高分解能の立体構造解析ができないという構造解析上の分子量限界があるため，本質的に高分子量になる複数のドメインからなる蛋白質の分子形態変化を観測することは困難である．本研究では従来の NMR 計測上の分子量限界を超えて，30kDa を超える高分子量蛋白質を対象としても蛋白質が機能する際に発現する分子形態変化を定量的にかつ原子分解能で観測する NMR 技術を開発することを目的とした．

4．研究成果
研究開発の背景

本開発研究では，ドメイン間相対配向という巨視的な蛋白質構造情報を取得するために蛋白質を磁場に対して弱く配向させることで観測される異方性核スピン相互作用を利用する．蛋白質を磁場配向状態に置くことで観測される残余双極子結合RDC（Residual dipolar coupling）を用いた蛋白質のドメイン相対配向解析は，20kDa以下の低分子量蛋白質ではよく行われてきている．RDCは蛋白質を磁場配向状態に置くことで観測される見かけのスピン結合強度の変化から観測される．例えば，^{15}N核で均一標識した蛋白質の2次元相関スペクトル上では，アミド結合部の^{1}H−^{15}N核スピンの単結合スピン結合定数を1対のシグナル分裂幅として観測することができるが（図 1A），蛋白質を磁場配向状態に置くとこの分裂幅が変調を受け，等方的な溶液状態で観測される分裂幅とは異なる値を示す（図 1A）．この見かけのスピン結合の変調強度が，残余双極子結合RDC値となる．この値は，それぞれの相関シグナルに対応するアミド結合ベクトルの磁場に対する配向角を与える（Tjandra and Bax, Science, 278, 1111 (1997)）．蛋白質の構造が既知である場合，各NH結合ベクトルの磁場に対する配向角情報を集積することで，蛋白質分子全体の磁場に対する配向状態を表す量（配向テンソル：磁場に対する蛋白質分子の配向角と配向強度を表現する量）を求めることができる．蛋白質を構成する各ドメインに対してRDCから磁場配向テンソルを決定し，各ドメインで決定された配向テンソルの主軸が一致するように2つのドメインの座標を回転させることで蛋白質中におけるドメイン相対配向を決定できる．

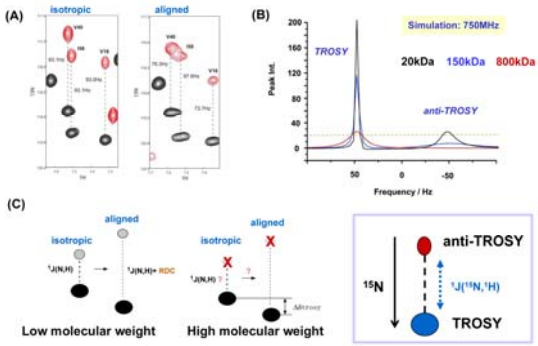


図1：RDC の分子量限界と高分子量蛋白質における Trosy シグナルの耐性

RDC から得られる巨視的な構造パラメータは従来の NMR 構造解析では得られない特徴的な構造情報であるが，RDC 測定における分子量限界は通常の溶液における測定よりもさらに厳

しくなる. 溶解性の良い蛋白質を対象として 20kDa 程度が実際上の分子量限界である. これは, RDC を測定するために用いる2次元相関スペクトル上で観測されるスピン結合で分裂した一対の NMR シグナルのうち高磁場側シグナルの横緩和が低磁場側よりも速いことによる. 加えて, 蛋白質が磁場配向状態に置かれることで核スピン双極子間相互作用が強まることにより, さらに両シグナルの横緩和速度の差が促進されることによる. 図 1B には, 分裂した一対のシグナルの線幅が蛋白質の分子量に応じてどのように変化するかをシミュレーションした結果を示す. 分裂シグナルの高磁場成分である anti-Trosy シグナルは, 100kDa を超えると低磁場側のシグナルである Trosy シグナルの比べて大きく広幅化しておりシグナル強度が極端に低下するため観測できなくなることが分かる. しかし, このシミュレーションから, Trosy シグナルを用いることで 100kDa を超える蛋白質であっても十分な感度でシグナルを観測できることが分かる.

RDC 観測における分子量限界を, 高分子量蛋白質でも高感度で観測できる Trosy シグナルの磁場配向依存的変化から分子配向テンソルを決定する事により克服するというのが本研究で提案する計測技術である. これを DIORITE(Determination of the Induced ORIentation by Trosy experiments)と名づけた.

DIORITE法の着想-高分子量蛋白質の磁場配向テンソルの決定法

DIORITE 法は, 磁場配向状態にある蛋白質のアミド結合で観測される2つの異方性核スピン相互作用(化学シフト異方性, 残余双極子効果)を同時に考慮することで, 磁場配向依存的に誘導される Trosy シグナルのみから蛋白質の磁場配向テンソルを決定する方法である. 図 1B のシミュレーションに示したように Trosy シグナルは 30kDa を超える蛋白質においても高分解能・高感度の NMR シグナルを与えるために, RDC を用いた方法では解析が不可能な 30kDa 以上の高分子量蛋白質を対象として磁場配向テンソルを決定することができる. したがって, 複数のドメインを持つ高分子量蛋白質を対象として分子量の制約なく蛋白質の溶液状態における分子形態変化を観測することができる. 本研究の基盤は, この DIORITE 法とよぶ Trosy シグナルの分子配向依存的な変化量から蛋白質分子の磁場配向テンソルを計算するアルゴリズムの発見にある.

DIORITE法の一般化にむけて-最適な磁場配向条件の実現

本研究では, 独自に着想した DIORITE 法を用いて実際に TROSY スペクトルの変化のみから蛋白質の磁場配向テンソルを正確に決定する一般的な技術を確立し, 実際に複数の高分子量蛋白質の溶液中でのドメイン相対配向を決定することを目的とした. この目的のために, まず克服しなくてはならない問題は, 分子量あるいはサンプルの状態によらず確実に適切な分子配向状態を実現する試料調製技術の確立である. 本研究では, 異方性圧縮アクリルアミドゲルを用いて, 10kDa-50kDa までのさまざまな性質の蛋白質に対して最適な磁場配向状態を作るための実際的なプロトコールを確立した. 高分子量蛋白質になるほど最適な磁場配向性の実現は困難になる. 私たちは, アクリルアミド中に電荷をドープすることにより浸透圧を利用してアクリルアミドの膨張率を調節することで, アクリルアミドの圧縮率を微調整することによりこの問題を解決できることを見出した. アクリルアミドゲル格子の粗さの調整にくらべて, ゲル中への荷電のドーピング量の調節は微調整が容易でありかつ再現性よく行える. 膨大な試行実験から, これまでに 50kDa 程度までの蛋白質に対しては最適なアクリルアミドの化学組成と荷電ドーピング量についての経験的規則を見出しており, DIORITE 法によるドメイン配向解析の汎用化の前提となる試料調製上の基盤は確立できた.

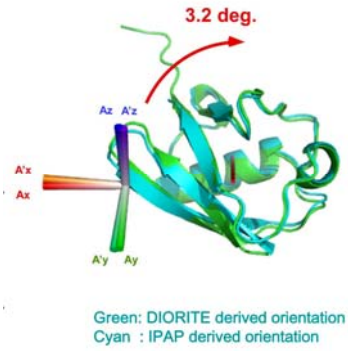
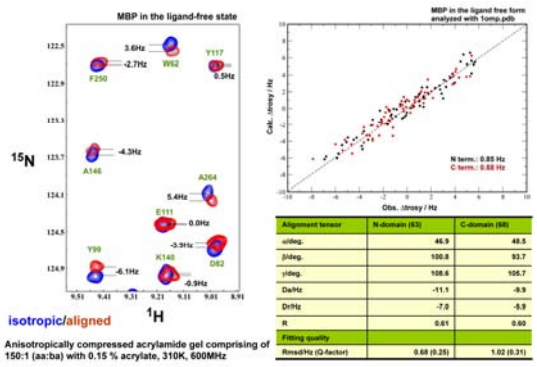


図 2: RDC で決定した分子配向と DIORITE により決定した分子配向の違い(900MHz データによる解析). 600MHz で測定したデータを用いると誤差は 1.2 度

DIORITE法の解析精度の検証

RDCで磁場配向テンソルを決定することができる低分子量蛋白質ユビチキン(8kDa)を対象として，RDCで決定したユビキチンの磁場配向テンソルとDIORITE法で決定した磁場配向テンソルを比較し，DIORITE法により決定される分子配向角の誤差を検証した．その結果，600MHzで測定したデータを用いた解析では，誤差は回転角で 1.2 度であった．蛋白質骨格にある^{15}N核の化学シフト異方性テンソル値を解析上仮定するDIORITE法解析では，高磁場で測定されたデータを用いる場合には分子配向テンソル値の系統誤差が増加する傾向あることが予測される．ユビキチンを用いた実験では，Trosyシグナルがもっとも先鋭になると期待される 900MHzでの測定においても，配向テンソルに含まれる系統誤差は分子回転角として3.2 度にとどまり，実用上十分な解析精度でドメインの相対配向を決定できることが実験的に証明できた（図 2）．



Alignment tensor	N-domain (63)	C-domain (68)
α/deg.	46.9	48.5
β/deg.	100.8	93.7
γ/deg.	108.6	105.7
Da/Hz	-11.1	-9.9
Dr/Hz	-7.0	-5.9
R	0.61	0.60
Fitting quality		
Rmsd/Hz (Q-factor)	0.68 (0.25)	1.02 (0.31)

図3： アポ型 MBP の DIORITE 解析結果

DIORITE法を適用した高分子量蛋白質の分子形態解析

上記の検証実験で DIORITE 法は，実用上十分な精度で蛋白質分子配向を決定できることが分かった．次に，実際に高分子量蛋白質を対象としたドメイン相対配向解析を行った．まずは，複数のリガンド複合体結晶構造が解かれており，その結果リガンドに依存したドメイン相対配向変化が明らかになっているマルトース結合蛋白質(MBP; 42kDa)を対象として DIORITE 法による解析を行った． MBP のアポ型およびマルトース結合型の溶液中でのドメイン相対配向を決定した．図 3 には，解析結果を示す．最適化した分子配向条件により，明瞭なシグナル強度で Trosy シグナル変化を観測できている．観測値と配向テンソルから逆計算した Trosy シグナル変化量は計測誤差の範囲で一致する精度で分子配向を解析できた．解析の結果得られた溶液中でのアポ型 MBP の2つのドメインの相対配向は，結晶構造から8.0 度回転しており，溶液状態と結晶状態とでわずかにドメイン相対配向が変化していることがわかった．

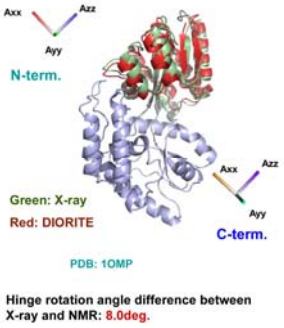
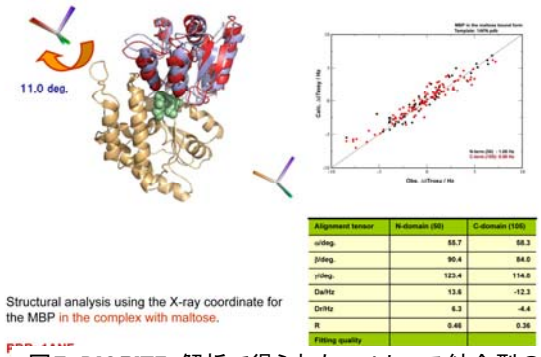


図 4: DIORITE 解析の結果得られたアポ型 MBP の溶液構造

次に，リガンドであるマルトースとの複合体の解析結果を示す．図 5 には，マルトース結合型の MBP 結晶構造を用いた解析例を示すが結晶構造から 11 度 N 末端ドメインが回転した構造が溶液状態での MBP の構造であり，結晶構造とわずかに異なるドメイン配向を持つことがわかった．さらに，同じ観測データを用いてアポ型の結晶構造を用いて解析して得たマルトース結合型の溶液構造は，マルトース結合型の結晶構造から5度の回転角の違いを持つことが分かった．系統誤差や計測誤差を考えれば，異なる結晶構造を用いて解析したマルトース結合型の溶液構造は一致することがわかる．アポ型構造を用いて DIORITE 解析から得たマルトース結合型構造は，アポ型構造から N 末端ドメインが C 末端ドメインに対して 32.9 度ヒンジ回転している．これはアポ型結



Alignment tensor	N-domain (60)	C-domain (106)
α/deg.	88.7	88.3
β/deg.	90.4	84.0
γ/deg.	123.4	114.6
Da/Hz	13.6	-12.3
Dr/Hz	6.3	-4.4
R	0.46	0.36
Fitting quality		

図5：DIORITE 解析で得られたマルトース結合型の MBP の溶液構造

晶構造とマルトース結合型結晶構造から計算された N 末端ドメインのヒンジ回転角 32.5 度と非常に近い値である．この解析例から，アポ型の結晶構造情報がない場合でも DIORITE 解析によりリガンド結合状態の構造を十分な精度で解析可能であることが確認できた(図 6)．つまりリガンドにより誘導される分子形態変化を観測できることが分かった．

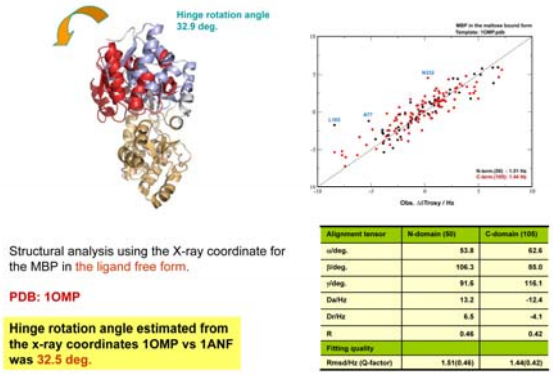


図 6: アポ型の結晶構造を用いて解析したマルトース結合型 MBP

上記の研究から DIORITE 法によりリガンド依存的な分子形態変化を十分な精度で観測することが実際に可能であることを示せたので，次に構造が未知な蛋白質に対して DIORITE 法を適用した． mRNA キャッピング酵素(CE)を対象とした．CE は 38kDa の分子量をもつが，試料の溶解性はきわめて低く室温以下の温度（20° C）で 3%グルセロールを用いた溶液を用いてかろうじて2次元相関スペクトル測定が可能な濃度を維持できる試料である．3%グリセロールを添加することにより溶液の粘性が高くなり，その結果蛋白質の溶液内での回転拡散運動が低下するため，実質的には 50kDa の蛋白質を対象とした場合と同じ測定条件である．CE については GTP 結合型の結晶構造は明らかになっているが，アポ型構造に関する立体構造情報はない． DIORITE 解析の結果，アポ型 CE の構造は，結晶構造中で open 型構造と呼ばれている構造よりもさらに大きく GTP 結合サイトを広げた立体構造を持つことが明らかになった．このことは CE の酵素反応サイクルを理解する上で重要な知見となった(図 7)．

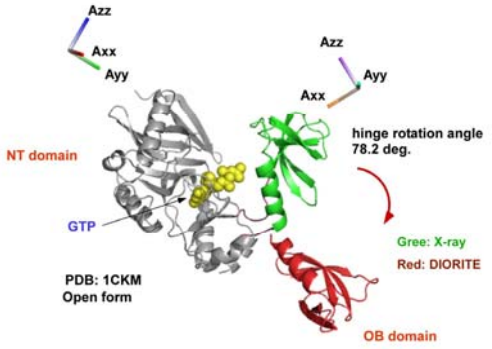


図 7：DIORITE 解析で得られたアポ型 CE の溶液構造

5. 自己評価

従来の NMR 技術では，容易に解析ができない高分子量蛋白質を対象として Trosy スペクトル上のシグナル変化のみから蛋白質のドメイン再配向など分子形態変化を解析する技術を実用上利用可能な技術として確立することができた．また，この方法をいかなる分子量の蛋白質であっても試料の条件（イオン強度，pH，温度）を選ばずに適用できるようにするという汎用化の点においても，異方性圧縮アクリルアミドゲルの圧縮率を化学的に制御するという技術を見出すことで実現できた．応用事例としては現段階では 50kDa 程度までに限られているが，技術的にはこの分子量以上の蛋白質に対しても適用可能であると考えている．以上を踏まえて，計測技術開発という点では成功裏に終わったと自己評価する．

本研究は，前職の研究所が閉鎖しその後処理を進める中で開始し，その後現職に異動後も1年間は大学内での設置場所が定まらないために研究室の NMR 装置を移設できない状況が続いたという事情もあり，集中的に実験研究を進めることができたのは後半の1年半程度であった．ただし，前半の期間は，方法の理論的な検証をもう一度やり直し，解析に必要なソフトウェアを作成するなど後半の研究を効率的に進める上の基礎の整備という意味では重要な時間であった．当初は生化学的に重要な意味を持ち，かつ従来の NMR 技術では解析が困難な膜蛋白質あるいは細胞内受容体蛋白質の分子形態変化観測を実現するところまでを目標と定めていたが，上記の事情も災いし現時点では解析を完了していない．しかし，2つの対象に関してもすでにデータの集積を開始しており一部解析を始めるところまではきているため，研究期間終了後に成果を出して行ける．また，構造解析技術として完全に確立できるまでケーススタディーを繰り返していたため，

まとまった研究成果の論文報告はこれから順次進めることになる．上記をまとめて考えると自己評価は 70 点（良）である．

6．研究総括の見解

分子量の大きなタンパク質の中には溶液状態でドメイン間での配向状態変化を決めることがしばしば極めて重要であるが、本研究者は新しいNMR手法を開発、確立した。すなわち、異方性圧縮アクリルアミドゲルを用いて磁場に対して弱く配向させ、分子配向依存的に誘導されるTROSYシグナルの変化からドメイン間の配向変化を決定する方法である。各ドメインの構造は前提条件として必要であり、また、いくつかのNMR解析上の仮定は必要とするものの、他に代えがたい手法であり、その有効性もいくつか例示された。NMR技法としては完成度が高い。生物的に意義のあるタンパク質分子形態変化の事例を増やしていただきたい。優れた成果として高く評価したい。

7．主な論文等

（A）さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

・Tate,S. Structure and mode of ligand recognition of the oxidized LDL receptor, LOX-1 (review article) in "Functional and structural biology on the lipo-network" Research Signpost, Kerala, India, 179-198 (2006).

・Ishigaki,T., Ohki, I, Naoko Utsunomiya-Tate and *Tate,S. Chimeric structural stabilities in the coiled-coil structure of the NECK domain in human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1), J.Biochem. (Tokyo),141: 855-866 (2007).

・*Tate.S. Oxidized low-density lipoprotein receptor, LOX-1, on the endothelial cell – The receptor structure and functions of LOX-1 in atherogenesis. J.Biomol.Macromol. (review article), J.Biomol.Macromol. 7:11-22 (2007).

・*S.Tate. Anisotropic Nuclear Spin Interactions for the Morphology Analysis of Proteins in Solution by NMR Spectroscopy. Anal. Sci. 24: 39-49 (2008).

（2）特許出願　　なし

（3）著書

・楯　真一　日本化学会　化学実験講座8 NMR・ESR　1.NMRの基礎　1.5節「核スピン系のダイナミクス」p40-69 (2006).

・楯　真一　日本化学会　化学実験講座8 NMR・ESR　3.溶液における各種二次元NMR法　3.2節「異種核相関」p162-192 (2006).

・楯　真一 「タンパク質構造の「揺らぎ」を捉える新しい NMR 構造解析技術」
化学と工業　6, 234-235 (2008)

（4）招待講演

招待講演（国際）

・Shin-ichi Tate
Transient folding of the mediator binding domain of TFIIEb and its functional significance
NMR association for structural biology in Yokohma "Intrinsically disordered proteins"

(2006.11, Yokohama)

・Shin-ichi Tate
Structure and ligand recognition mode of oxidized LDL receptor LOX-1
INPEC2006 (2006.6, Elsinore, Denmark)

・Shin-ichi Tate
Molecular alignment determination only using orientation dependent TROSY shift changes
The international workshop on "Perspectives on stable isotope aided NMR methods for protein structural analysis" (2007.03, Osaka, Japan).

(B)その他の主な成果
(1)論文(原著論文)発表
論文(国際)
・Okuwaki,M., Kato,K., Shimahara,H., Tate,S., and Nagata,K. (2005): Assembly and disassembly of nucleosome core particles containing histone variants by human nucleosome assembly protein-I, Mol. Cell Biol., 25:10639-10651.

・Takeshima,H., Suetake,I., Shimahara,H., Ura,K., Tate,S. and Tajima,S. "Distinct DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards nakded and nucleosomal DNA", J.Biochem. (Tokyo), 173:503-515 (2006).

・Shimahara,H., Yoshida,T., Shibata,Y., Shimizu,M., Kyogoku,Y., Sakiyama,F., Nakazawa,T., Tate,S., Ohki,S., Kato,T., Moriyama,H., Kishida,K.i., Tano,Y., Ohkubo,T., and Kobayashi,Y. Tautomerism of Histidine 64 Associated with Proton Transfer in Catalysis of Carbonic Anhydrase. J. Biol. Chem. 282: 9646-9656 (2007).

(2)著書
・大前英司、村上千穂、楯　真一、月向邦彦、加藤千明「蛋白質に対する圧力の効果」高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー 2巻 (38-44) 2008.

研究課題別評価書

1．研究課題名

生体分子計測用 THz 帯 CARS 分光イメージング装置の開発

2．氏名

谷　正彦

3．研究のねらい

本研究課題ではタンパク質などの生体分子のテラヘルツ領域の分子動力学を探るための新規手法として，フェムト秒レーザーの線形チャープ光を用いたテラヘルツ帯の CARS(Terahertz Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, THz-CARS)分光法を開発することである。またテラヘルツ帯のCARSスペクトルを用いて，生細胞等の生物・生体試料の顕微分光イメージングを目指す。

4．研究成果

＜背景＞

テラヘルツ(THz)帯の振動スペクトルはタンパク質を含む生体分子の機能やダイナミクスを探る上で重要な情報を提供するものと考えられる。しかしタンパク質分子の低振動数モードの研究は実験的にはあまり進んでいない。研究者は近年開発されたTHz領域の赤外吸収分光法であるテラヘルツ時間領域分光法(THz-TDS)を用いてタンパク質などの生体分子のスペクトルを測定し，低振動数モードのダイナミクスを調べる試みを行ってきた。その結果，中性子散乱と同様，振動モードの密度分布を反映した生体分子のスペクトルが得られること，またそれらの振動モードがTHz帯で大きな非調和性を示すことを示唆する結果をタンパク質(乾燥または一部水和状態の試料)の温度依存吸収スペクトルから得ている。これらの結果はTHz帯の吸収スペクトル分光が中性子散乱分光と同様な情報を与えることを示唆している。しかし，THz-TDSのような赤外吸収分光では，より自然状態に近い水溶液中での生体分子の精密な分光は，水の強い吸収のために容易ではない。そこで赤外吸収分光と並ぶもうひとつの振動分光であるラマン分光を水和状態，あるいは水溶液状態の生体分子のTHz帯振動スペクトルの測定に用いることが考えられる。ラマン分光ではプローブとして水に対して吸収のほとんどない可視あるいは近赤外光を用いることができ，また空間分解能も高い（～1μm）。一方，自発ラマン散乱の強度は一般に小さいため，イメージングや迅速性が求められる計測には向かない。コヒーレントラマン散乱を利用すれば，信号強度を飛躍的に高めることができる。そこで研究者はコヒーレントラマン分光法のひとつであるCoherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS)をTHz帯の生体分子計測に適用することで，タンパク質などの生体分子のTHz帯(<6THz=200cm^{-1})の振動モードの観測を通して，生体分子の低振動モードダイナミクスを探り，さらには生体分子の構造と機能との関連を調べることができるのではないかと考えた。また，もしTHz帯で生体分子固有のスペクトルが得られれば，それを利用した生体分子の分光イメージングも可能になるはずである。

＜新規手法の提案＞

CARSでは振動モードをPump光及びStokes光で励起し，波数保存則を満たす方向に放射されるコヒーレントラマン散乱を観測する。(i)通常のラマン散乱より 10^4～10^5倍強い信号が得られる(励起光強度に依存)，(ii) Anti-Stokes光はPump及びStokes光よりも周波数が高いので生体分子特有の蛍光の影響を受けない，などの利点がある。一方で，従来のCARSではPump及びStokes光用に 2 台のレーザーを使用しなければならず必然的に通常のラマン散乱分光よりも装置が大掛かりになるという欠点があった。さらに，サブTHz帯($<30cm^{-1}$)のスペクトルを得るためには励起レーザーの線幅を極力狭くし($<1cm^{-1}$)かつレーリー光の影響を高性能のノッチフィルターで除去する必要があり，高SN比のスペクトルを得るのはそれほど容易ではない。そこでこれらの問題を克服するために，研究者は周波数チャープしたフェムト秒レーザーを用いる以下のような手法を提案した。この手法はCARSのみではなく他のコヒーレントラマン分光にも適用できる。

フェムト秒レーザーのスペクトルはそのパルス幅に応じて，数 THz～数 10THz の帯域を持っている。回折格子対などを用いてフェムト秒レーザーに線形な周波数チャープを加え，2つに分離(Pump1 及び Pump2 とする)したあと，適当な時間差($\Delta\tau$)をつけて再び重ね合わせると，$\Delta\tau$に応じた差周波数($\delta\omega$～数 THz)の光ビートを発生させることができる。この光ビートを試料に入射させると，差周波数$\delta\omega$ だけ Up-shift し，かつ周波数チャープした Coherent-Anti-Stokes 光を得ることができる(図 1 左)。この Coherent-Anti-Stokes 光は$\delta\omega$が小さければ周波数軸上ではスペクトルが Pump1 及び Pump2 と重なるので分離することができないが，それぞれの周波数チャープ光に逆分散を加えることで，もとのフェムト秒のパルスに変換し，時間領域で分離することができる(図 1 右)。時間領域で分離された Coherent-Anti-Stokes 光は Up-conversion などの手法で検出することが可能である。この手法ではフェムト秒レーザーは 1 台でよく，分光器やフィルターを必要としない。さらに，Pump2 の Coherent Stokes 光の検出により Coherent Stokes Raman Spectroscopy (CSRS)を行うことができる。また Pump1 と Pump2 のコヒーレントラマン散乱による強度変調を検出することにより，それぞれ逆ラマン分光 (Inverse Raman Spectroscopy, IRS)，誘導ラマン利得分光 (Stimulated Raman Gain Spectroscopy, SRGS)を行うことができる。

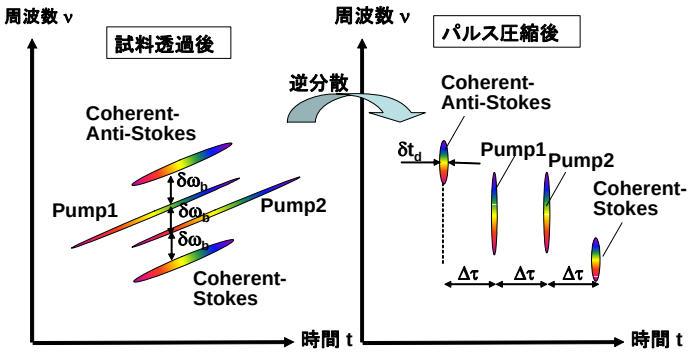


図 1. 周波数チャープした Pump 及び Stokes 光による Anti-Stokes 光の発生(左)および，逆分散を加えることによる周波数-時間軸上での分離の様子。

＜実験装置＞

周波数チャープしたフェムト秒レーザーを用いた THz 帯 CARS 装置の概念図を図2に示す。光源には 1kHz 繰り返しのチタンサファイアレーザー再生増幅器（中心波長約 800nm，パルス幅約 120 フェムト秒）を使用した。フェムト秒レーザーはまず，Pump 光と Probe 光に分けられたあと，Pump 光は Stretcher（回折格子とレンズ対で構成）により正の群速度分散が与えられ，約 20ps 程度にまで延伸した周波数チャープパルスとなる。周波数チャープした Pump 光はマイケルソン型の干渉計により Pump1 と Pump2 に分けられ，相対的な時間遅延$\Delta\tau$が与えられたあと，再び重ね合わせられる。これにより Pump 光は$\Delta\tau$に対応した差周波で光強度が変調される。これはいわゆる「うなり」現象であり，光ビートと呼ばれることもある。この光ビートを試料に入射させたあと，Compressor で，もとのフェムト秒パルスに戻す。CARS 信号は時間領域で Pump1 に対して，Pump2 と反対側の時間領域に$\Delta\tau$だけ離れたところに現れるので，これを非線形光学結晶(BBO 結晶)中で Probe 光との和周波発生(SFG)により波長約 400nm の光に変換する。波長変換された信号光は GaP フォトダイオードまたはフォトマルで検出する。測定の感度を高めるため，Pump1 または Pump2 を光チョッパーで変調し，検出器からの信号をロックイン検波する。逆ラマン信号を検出する場合は，波長変換された Pump1 の Pump2 による強度変化を，Pump2 を変調することで差分検波する。逆ラマン分光では Pump1 を波長変換しなくても原理的には信号検出が可能だが，波長変換により試料による散乱，迷光による背景ノイズを低減することができる。

＜実験結果と考察＞

生体分子を測定するまえに，原理実証と装置特性の評価を行うため，まず特性がよく知られている半導体を試料に用いて測定した。評価用に用いたのは THz 帯に光学フォノンモードが観測されている GaSe 単結晶(c 軸カット，厚さ 1mm)である。CARS スペクトルを測定した結果，0.6THz 付近に GaSe の光学フォノン(c 軸に垂直な面のスライド振動に対応したモード)による共鳴が確認できた。その測定結果から分かったことは (i) 非共鳴 CARS 信号（周波数にほとんど依存せず，電子励起が関与した応答）の寄与が大きい，(ii) 振動モードによる共鳴スペクトルはいわゆる「分散型」，すなわち共鳴周波数を中心に極小と極大を示すということである。これらは従来から知られていたことであるが，本手法においても，振動や緩和モードに対応した CARS スペクトルを得るためには非共鳴信号抑

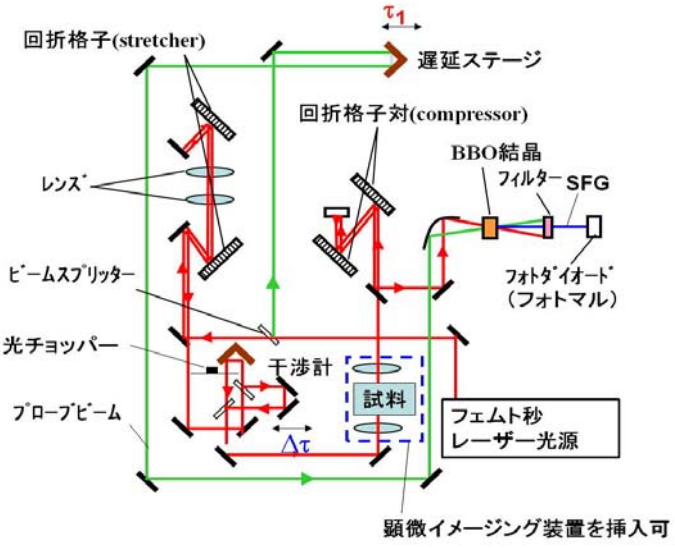


図 2. 周波数チャープしたフェムト秒レーザーを用いた THz 帯 CARS 装置の概念図。

制が重要な技術課題であることが再認識された。

次に逆ラマン分光によりGaSeを測定した。その結果を図 3 に示す。0.6THz付近，および 4THz付近に光学フォノンによる共鳴ピークが観測されていることが分かる。逆ラマン信号はCARS信号よりも約一桁大きく(理由は不明)，CARS測定の場合のようにProbe光の光学遅延τ_1を$\Delta\tau$と同時に走査する必要がないので，CARS測定よりも高いSN比が得られ，かつ簡便である。また，逆ラマン分光では 3 次の非線形感受率の虚部に対応する信号が得られるため，共鳴スペクトルもCARSの場合のように分散型の反対称スペクトルではなく，対称型となる。しかし，非共鳴信号と思われる大きなバックグラウンドがCARS同様支配的になるため，この非共鳴バックグラウンドの抑制が生体分子分光やイメージングを行う際には必要となる。この非共鳴バックグラウンドを抑制するために偏光CARS（p-CARSと略称されることが多い）と呼ばれる手法を試みた。すなわち，Pump1 と Pump2 の相対的な偏光角を制御することで，非共鳴信号の偏光方向と共鳴信号の偏光方向をずらしておき，偏光フィルターで非共鳴信号に対応する偏光成分を除去する。このようにすることで，共鳴信号そのものも強度がいくらか抑制されるが，非共鳴信号の大部分を抑制することができる。そのようにして測定したGaSeの 0.6THz付近の逆ラマンスペクトルを図4に示す。非共鳴成分が抑制された結果，0.6THz付近の光学フォノンによる共鳴ピークが明瞭に測定されていることが分かる。

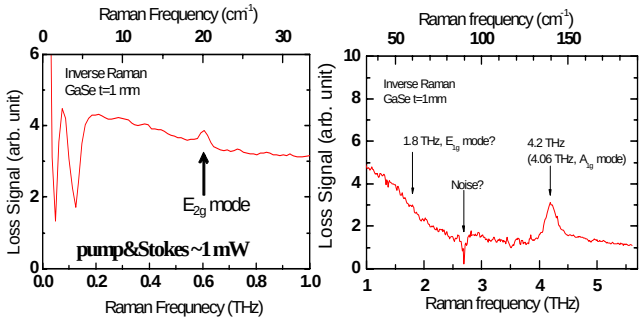


図 3. GaSe の逆ラマンスペクトル

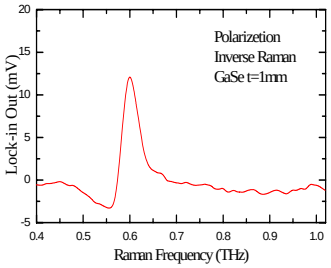


図 4. GaSe の 0.4～1THz 領域の偏光逆ラマンスペクトル

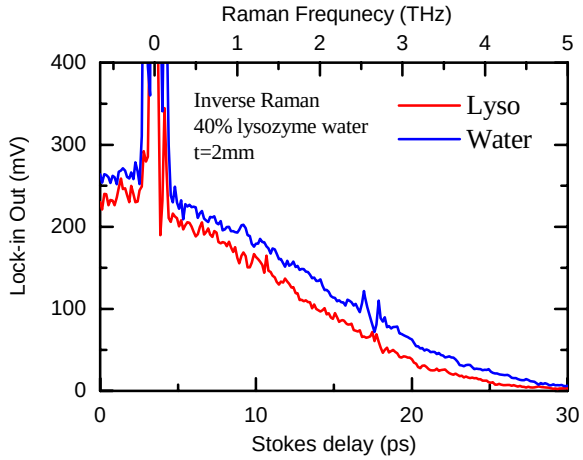


図 5. トリ卵白リゾチーム濃厚水溶液(40 重量%)と水の逆ラマンスペクトル

次にトリ卵白リゾチームの濃厚水溶液(40 重量%)の逆ラマンスペクトルと純水のそれを図 5 に示す。トリ卵白リゾチームについては基準モード計算により蝶番(ちょうつがい)屈曲型の振動モードがTHz周波数域にあることが示されており[1], また実験的には結晶状態で複数の振動モードがラマン分光により確認されている[2-3]。水溶液状態では 2.25THz(75cm^{-1})にバンドが観測されている[2]。図 5 からトリ卵白リゾチーム水溶液と純水の逆ラマンスペクトルの間にはわずかではあるが違いが見て取れる(相対強度は光学系の調整により上下するが, 定数を一方のスペクトルに乗じても他方とは一致しない)。このスペクトルの違いの原因としては, (a) リゾチーム分子の電子的応答(非共鳴信号に相当), (b)バルクの水分子とリゾチーム分子に水和した水分子の緩和時間による違い, (c)リゾチーム分子の骨格的な振動モード, などが考えられる。

タンパク質水溶液のコヒーレントラマンスペクトルを得ることができたが, 明瞭なバンド構造は確認できていない。また信号強度が GaSe などの場合と比べて小さく, まだ定量的な議論をするために必要な SN 比は得られていない。コヒーレントラマン散乱および測定に用いた SFG の効率はそれぞれ励起光強度の 3 乗, 2 乗に比例する。SN 比を今後改善するためには, 励起レーザーの強度揺らぎによる信号の揺らぎ(Noise)を抑制する必要がある。揺らぎを抑制するためにはレーザーパルス強度での規格化, 高繰り返しのフェムト秒レーザーを用いて信号の平均化を行うなどの工夫が必要である。

参考文献

[1] Brooks, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 4995 (1985).

[2] Genzel, *et al.*, Biopolymers, **15**, 219 (1976).

[3] Urabe, *et al.*, Biophysical Journal, **74**, 1533 (1998).

5. 自己評価

THz 帯のコヒーレントラマン測定を分光イメージング等, 生体分子計測に応用するには, 生体分子が固有の THz 帯バンドあるいはスペクトル構造を持つか, 他のタンパク質と信号レベルにおいて明らかな差が見いだされることが必要である。残念ながら測定したトリ卵白リゾチーム水溶液のコヒーレントラマンスペクトルにはリゾチーム固有のバンドやスペクトル構造は確認できなかった。また他のタンパク質分子についても測定を試みているが, 測定の SN 比が十分ではなく, 定量的な比較ができるまでには至っていない。今後は本手法によるコヒーレントラマン測定のレーザーの強度揺らぎによる雑音を抑制するなどして SN 比を改善し, 生体分子間のスペクトル定量比較を行う予定である。当初の目的である生体分子の分光イメージングには, まだまだ解決すべき課題は多い。しかしながら, 本手法で(1)THz 帯のコヒーレントラマンスペクトルが得られることが実証できたこと, (2)タンパク質の水溶液と純水の間に有意なスペクトル差を確認できたこと, は評価に値すると思われる。

6. 研究総括の見解

測定法として困難な課題に挑戦しており、技術上の問題点に遭遇しながらも何とか THz 帯

CARS 測定システムを開発出来たことは評価したい。しかしながら、S/N は極めて不十分であり、タンパク質における低波数ラマンシグナルが明確に観測されていないのは残念なところである。目的とするイメージングの達成にはまだ距離があるものの、技術的課題を克服して少なくともいくつかのタンパク質について明瞭なデータが出ることを期待したい。

7. 主な論文等

(A)さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表　　なし

(2)特許出願　　なし

(3)学会発表

学会発表(国際)

・Masahiko Tani, T. Koizumi, H. Sumikura, M. Yamaguchi, and M. Hangyo: ″Time-domain CARS signal detection for THz vibrational spectroscopy using chirped fs-pulses, ″ pp.275-276, Proceedings of the XXI International Conference on Raman Spectroscopy ICORS 2008 (21st August 2008, Uxbridge, West London, UK)

・Masahiko Tani, Toshiyuki Koizumi, Hisashi Sumikura, Mariko Yamaguchi, and Masanori Hangyo: "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Spectroscopy in Terahertz Region Using Chirped Optical Pulses," The 33rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz 2008), M3B5.1197 (September 15-19, 2008, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA)

学会発表(国内)

・小泉俊幸, 角倉久史, Christopher Que, 谷正彦, 萩行正憲:「テラヘルツ帯の時間領域CARS分光法の開発」応用物理学会テラヘルツ電磁波技術研究会(石川県加賀市, 2007 年 3 月 2 日～3 月 3 日)

・小泉俊幸, ケ・クリストファー, 高野恵介, 谷正彦, 萩行正憲
「周波数チャープパルスを用いた低周波数領域の CARS 信号検出」
日本分光学会テラヘルツ分光部会 シンポジウム「テラヘルツ分光法の最先端 II ～多様化と進歩～」(P-1, IPC 生産性国際交流センター, 神奈川県, 2007 年 11 月 21 日～22 日)

・小泉俊幸, ケ・クリストファー, 高野恵介, 谷正彦, 萩行正憲
「フェムト秒チャープパルスを用いた低周波数 CARS 信号の時間領域検出」
OPJ2007 シンポジウム (大阪大学コンベンションセンター, 2007 年 11 月 26 日)

・小泉俊幸, ケ クリストファー, 高野恵介, 山口真理子, 谷 正彦, 萩行正憲:「フェムト秒チャープパルスを用いたTHz帯CARS信号の検出」 2008 年春季第 55 回応用物理学関係連合

講演会，講演番号 30p-ZH-3（日本大学理工学部　船橋キャンパス，2008 年 3 月 30 日）

・M. Tani, H. Sumikura, T. Nagashima, and M. Hangyo: “Coherent Raman Scattering Spectroscopy in Terahertz Frequency Region Using Chirped Optical Pulses,”平成 20 年度日本分光学会年次講演会，講演番号P30 (Poster)（東北大学片平さくらホール，2008 年 11 月 19 日～21 日）

（4）招待講演

招待講演（国内）

・谷正彦:「生体分子計測用THz 帯CARS 分光イメージング装置の開発」（招待講演）テラヘルツ秋の学校in 信州 2008 / テラヘルツMMT 研究会　合同研究会 （セミナーハウス花村，長野県安曇野市，2008 年 11 月 7 日）

（B）その他の成果　　なし

研究課題別評価書

1．研究課題名
細胞内生体分子間ネットワークのリアルタイム検出法の開発と細胞生物学的応用の検討

2．氏名
寺田　純雄

3．研究のねらい
現代分子生物学において、生体システムはさまざまな機能分子（蛋白質や核酸など）によって構成される分子機械である、と考えられている。ゲノムプロジェクトの一応の終結をみた結果、機能分子群の種類や構成についてはある程度の知見が蓄積した。しかしながら従来の分子生物学的手法のみでは、個々の機能分子群の種類や構成に関するデータから直接生体システムの機能に迫るのは極めて困難である。最大の障害となっているのは、決して一様とはいえない機能分子間相互作用を計測、評価する手法が存在しないことである。

生体機能分子間相互関係には、酵素とその基質との間の相互作用や抗体と抗原との反応のように、特異性の高い強固なものも存在するが、全ての相互関係が、一対一の対応関係や線形結合に限定される訳ではない。シャペロン分子とその基質との相互作用にみられるように、機能分子間の非特異的な“弱い”相互作用が生体システムネットワークにおいてなんらかの機能を果たす可能性は高い。しかしながらこの種の相互作用を検討するには遺伝学的手法を例外として適切な実験手法がほとんど存在しない。

そこで本研究では、まず“弱い”ものから“強い”ものまで様々な分子間相互作用を生体内において観測できる実験系の確立を目指した。さらに次の段階として三者の生体分子の挙動の同時観察系を確立し、生体分子間相互作用ネットワークを測定する新規手法として “蛍光信号強度時系列解析測光法”を開発することを目標とした。これらの実験系を細胞生物学的な応用に展開することが最終的なねらいである。

4．研究成果
生体内における分子間相互作用の観察系として蛍光相互相関分光法について検討を行った。実際に生体内において“弱い”相互作用を検出できるか、基質特異性の低い蛋白質群の関与する複合体の生体内における会合、分離の観測を試みることにより検証した。蛍光相互相関分光法は蛍光信号が同期する頻度の高低を相互相関の程度で評価する手法である（図 1−左側は光路図、中央は照射領域を示す。照射領域中の緑色標識分子と赤色標識分子の信号強度の時系列データ（右側上段）を同時に取得する。それぞれの自己相関を算出する（右側中段）。さらに両者間の相互相関を計算する（右側下段）。相互相関は、緑色標識分子と赤色標識分子の結合の程度を反映する形で現れる。）。細胞内の局所における複数種の蛍光信号強度の同時計測時系列データから、標識分子間の相互作用の有無、強度に関する測定の可能性がある。

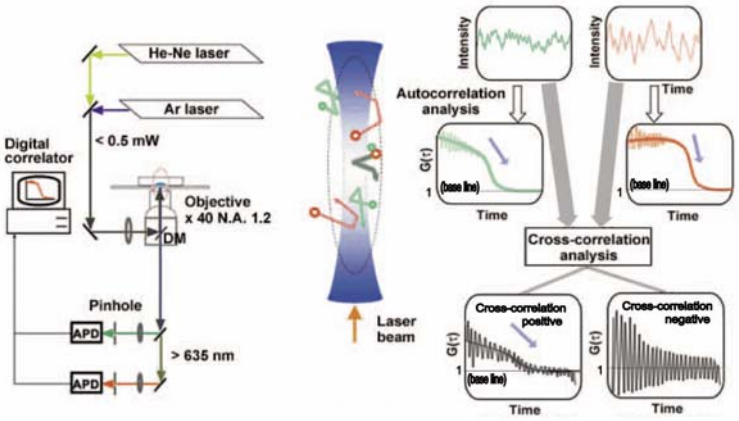


図1

実験系として、イカ巨大軸索中の細胞質性蛋白質輸送の実時間下観測系を利用した。まず、細胞質性蛋白質の軸索内輸送のメカニズムとして、キネシンモーター複合体（キネシン重鎖二量体、軽鎖二量体からなるヘテロ四量体）が、シャペロン分子を介して様々な細胞質性蛋白質群を微小管に沿って輸送するとする仮説を検討した（図 2）。

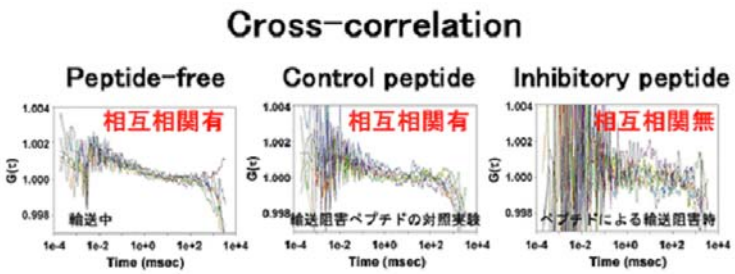


図 2　　図 3

シャペロン分子とキネシンモーター複合体の結合を競合ペプチド断片混入により阻害し、細胞質性蛋白質の輸送を抑制する所見が得られたことが、仮説を支持する根拠である。仮説が正しければ、細胞質性蛋白質が輸送される際にはシャペロン分子と結合しているはずであり、またこの結合は、基質特異性が低いことが予想される。実際にイカ巨大軸索中で細胞質性蛋白質が輸送されている際、シャペロン分子が輸送される細胞質性蛋白質と“弱く”結合しているかどうか、蛍光相互相関分光法により検討した。イカ巨大軸索中で輸送中の細胞質性蛋白質とシャペロン分子を、それぞれ異なる蛍光色素分子で標識し、両者の相互相関を計測したところ、弱いながらも明らかな相互相関信号が観察された。競合ペプチド断片を混入し、輸送を阻害した場合にはこの信号が消失し、シャペロン分子と細胞質性蛋白質との基質特異性の低い結合関係の会合、分離が、軸索内で観測可能であることが明らかとなった（図 3）。シャペロン分子が細胞質性蛋白質の輸送に関与しているとする所見は、トランスジェニックマウスを使った別の分子細胞生物学的実験系においても確認され、さらに研究を進展させて、キネシン複合体とシャペロン分子との結合領域が、膜器官と細胞質性蛋白質の輸送の振り分け機能を担っていることが判明するに至っている（投稿中）。これらの実験結果から、蛍光相互相関分光法は、基質特異性の低い蛋白質群の関与する複合体の生体内における会合、分離の観測に成功していることが明らかになった。この種の生体内計測は、他の手法では実現困難であり、蛍光相互相関分光法測定装置の優れた応用可能性が示唆された重要な所見であると考えている。

生体分子間相互作用ネットワークを動的に測定するためには、三者の生体分子の挙動の同時観察系の確立が必要である。そこで蛍光相互相関分光法のセットアップを拡張する形で、三色の蛍光分子由来の信号の同時観察系の開発を行った。試行錯誤の上、三色同時励起、観察が可能な蛍光信号強度測定システムとして新たな“蛍光信号強度時系列解析測光法”装置が完成した（図 4）。三色同時蛍光相関分光法システムとして使用可能な状態となっている。三種類の分子の会合状態を同時にモニターできる世界的にもユニークな装置であり、共同研究を含めて細胞生物学的実験・測定に進むべく準備中である。現在、同装置を使用し、蛍光相関分光法を発展させた測定が行えないか、検討を続けている。

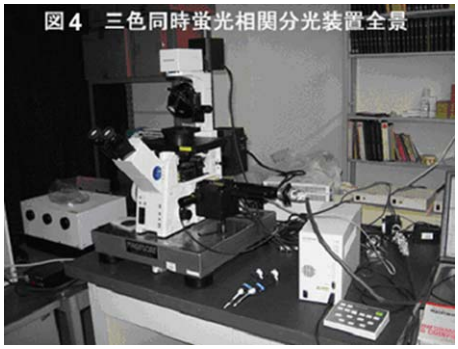


図 4　三色同時蛍光相関分光装置全景

また、この装置を用いて新たな解析法が創出できないかについても検討を続けてきた。一般に蛍光相互相関分光法では蛍光信号のノイズに含まれる生体システムに関する情報を、相互相関関数で評価する際に一部棄却してしまう恐れがある。ノイズには、本来分子間の結合に関する空間的情報の他に分子間ネットワークの上流、下流を分ける時間的情報も含まれており、これを利用することで非特異的生体内分子間相互作用の観測を含めた新たな解析手法が創出できるのではないかと考えた。この装置により得られた三色の蛍光信号強度の同時計測時系列データをもととして、生体分子間相互作用の制御関係の観測可能性を検討するために、まず多変量自己回帰モデルによる分析を行ったが、疎らな離散データを扱う方法としては適当ではないことが判明した。

次に疎らな離散データを扱うのに使用される点過程分析法を適用した。この分析法では、時刻 t_0 で事象(光子)が観測される条件下で、時刻 $t_0 + t$ で事象(光子)が観測される確率(強度)をt の関数として表現する。具体的には光子が n 個観測された際、n x n の組合せで光子の到着時間の差の分布を調べる手法である。拡散の他、能動輸送等の運動、化学反応による増減、三重項等分子状態による蛍光の変化等をモデル化することにより、実際のデータを極めてよく表現することが可能で、商用の一般的な蛍光相互相関分光法装置と比較して、より短い測定時間で同等の測定パラメータを得ることに成功した(投稿準備中)。しかしながら、蛍光相互相関分光法では得られなかった分子間相互作用の制御関係を反映するパラメータは得られていない。このためには、蛍光相互相関分光法や点過程分析法以外に解析手法を考案する必要があり、現在も検討を続けている。

最終的なねらいである細胞生物学的応用については、未だインビトロの実験段階にあり、時計遺伝子産物の反応時におけるパラメータ変化を利用して、上述の解析方法の検討を進めている。細胞内や生体中における応用の検討段階には至っていない。

5. 自己評価

今般我々は、蛍光相互相関分光法により基質特異性の低い蛋白質群の関与する複合体の生体内における会合、分離の観測に成功した。このことから蛍光相互相関分光法が、様々な分子間相互作用を生体内において観測可能な実験系であることが示唆された。次に三者の生体分子の挙動の同時観察系を確立した。装置構成上の問題点を解決し、マルチカラーの蛍光相関分光法装置として完成している。当初の目的は、この装置を利用して生体分子間相互作用ネットワークを測定する新規手法である“蛍光信号強度時系列解析測光法”を開発することであったが、この点に関しては目論見通りにはいかず、現在も検討を続けている。また新規手法が未完成であることから細胞生物学的な応用への展開もこれからの課題である。生体内分子間ネットワークの観測という最終目的に対しては未だ道半ばの状況であるが、観測結果の解析法についてはある程度検討が進んだ状況にあり、近未来的には将来的な方向性について目途がたつ可能性が高い段階にある。研究期間内に当初の目標を達成する成果を得るに至らなかった点は残念であり、目標の達成度としては五、六割との印象をもっているが、できるだけ早期に決着をつけたい。(研究者として独立した時期と重なり、研究室の立ち上げと並行しての研究遂行に苦心した三年間であったが、その中にあって森島研究総括をはじめとする研究領域関係者の方々からのまさに物心両面にわたる御援助によって現在に至ったこと、深謝申し上げます。)

6. 研究総括の見解

生命現象解析法の未開発の一つとして複雑な生体分子間相互作用を観測する新規多(三)色同時励起蛍光相互相関分光法を試行錯誤の上開発したことは高く評価したい。基質特異性の低いタンパク質群の関わる複合体のインビトロにおける会合・解離についてのいくつかの実験例で検証している。まだ課題名に掲げられたような一般的な応用には多くの課題があるがそれらも解決に向かっている。細胞系や組織系での応用が大いに期待される。

7. 主な論文等

（A）さきがけ個人研究者が主導で得られた成果
（1）論文（原著論文）発表　　なし

（2）特許出願　なし

（3）受賞
・平成 19 年度上原記念生命科学財団研究推進特別奨励金受賞（2008 年 3 月）

（4）著書
・寺田純雄、小林靖 「神経解剖学の見方、考え方　神経系とは」 臨床神経科学 Clinical Neuroscience 27（1）: 4-5, 2009

・小林靖、寺田純雄 「神経解剖学の見方、考え方　神経組織とは」 臨床神経科学 Clinical Neuroscience 27(2): 124-125, 2009

・小林靖、寺田純雄 「神経解剖学の見方、考え方　ニューロンーその概念の形成」 臨床神経科学 Clinical Neuroscience 27(3), 2009

（5）学会発表
学会発表（国際）
・Hoshino M, Yamazoe S, Uesugi M, Terada S.　Adhesamine, a newly synthesized chemical compound, is a very useful substrate for culturing mouse primary-cultured hippocampal neurons.　The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, December 13-17, 2008.

学会発表（国内）
・星野光伸、山添紗有美、上杉志成、寺田純雄 「新規有機化合物 adhesamine はマウス海馬神経細胞の初代培養用基質として有用である」 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会　神戸、2008年12月9日から12日

・星野光伸、山添紗有美、上杉志成、寺田純雄 「新規有機化合物 adhesamine はマウス海馬神経細胞の初代培養用基質として有用である」 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会　岡山、2009年3月28日から30日

・寺田純雄、金城政孝、相原一、武井陽介、廣川信隆 「神経細胞における細胞質性蛋白質輸送（遅い軸索輸送）の分子機構」 理化学研究所シンポジウム　蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達（6）　Communication in biosystems as observed by fluorescence correlation spectroscopy (FCS)　Part 6　埼玉、2009年3月27日

（6）招待講演
招待講演（国内）
・神経細胞における細胞質性蛋白質輸送（遅い軸索輸送）の分子機構
防衛医科大学校神経科学懇話会 （2008 年 3 月）

（B）その他の主な成果
（1）論文（原著論文）発表
論文（国際）
・Hori H., Ozeki Y., Terada S., Kunugi H. Functional near-infrared spectroscopy reveals altered hemispheric laterality in relation to schizotypy during verbal fluency task. Prog.

Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 32:1944-1951, 2008.

（2）学会発表

学会発表（国内）

・堀弘明、永岑光恵、曽雌崇弘、岡部繁男、寺田純雄、金吉晴、功刀浩 「統合失調症　型人格傾向と語流暢課題遂行中の前頭前野賦活パターン: NIRSによる検討」第31回日本神経科学大会（Neuro2008） 東京、2008年7月9日から11日

研究課題別評価書

1．研究課題名
　時空間を制限した細胞内シグナルの発生とその計測

2．氏名
　中西　淳

3．研究のねらい
　細胞の内部には，さまざまな細胞外刺激に応じて然るべき応答をするために，シグナル伝達ネットワークが存在する。シグナルの担い手は，タンパク質や低分子化合物であり，これらの濃度や活性が時間・空間的に厳密に制御されることにより，多様な細胞応答が実現されている。この分子機構を解き明かすためには，各種生理活性物質の細胞内動態を計測する技術の開発とともに，細胞に対して時空間を制限した刺激を与える方法の開発が重要である。これらの技術は相補的な関係にあり，両者を駆使することで，より詳細な解析が可能となる。しかしながら，蛍光プローブを用いた細胞内イメージング技術を筆頭に，計測技術の進展が著しいのに対し，細胞の局所に任意の時間に刺激を与える技術については，その報告が限られている。本さきがけ研究では，時空間を制限して細胞に刺激を与えるための新規材料・技術の開発を行った。具体的には，光照射に応じて表面の細胞接着性が変化する機能性基板「ケージド基板」を用い，基板上の細胞接着を操作することによって，細胞移動や細胞増殖を自在に誘導する方法を開発した。また，生理活性物質を一時的に捕捉し，光応答的に放出する金ナノ粒子を合成し，当該物質を光応答的に産生させる方法，すなわちケージド化合物の新規合成原理を開発した。ここで開発した新材料・新技術を多様な計測技術と組み合わせることによって，新たな生命現象の発見への道を切り拓くことが本研究の究極の目標である。

4．研究成果
（1）ケージド基板による細胞移動の時空間制御
　細胞移動は，発達，免疫反応，表皮の再生などの正常な生命現象や，ガン細胞の浸潤・転移などの病態のいずれにも関与する重要な細胞活動である。細胞が周囲の物理的・化学的環境をいかに認識し，移動方向・速度を決定するのか，また，その際，細胞の内部にどのような分子機械が働き，細胞移動を制御しているのか，これらを理解することが，種々の遺伝病や癌の治療に糸口を与えると考えられている。従来の細胞移動の誘導法は，集団としての細胞を対象とするため，細胞同士の相互作用の影響を受け，一細胞の移動挙動のみを正確に評価するのには適していなかった。本研究では，ケージド基板を利用して，基板上にアレイ化した一細胞の移動を光で誘導する手法を開発した（図１）。ケージド基板は，光分解性の 2-ニトロベンジル基を有する化合物を修飾したガラス基板であり（図 1a），基板表面に合成高分子プルロニックなどの細胞接着抑制分子をコートすると，初めは細胞非接着性であるが，光照射により表面親水化が起こり，その結果，細胞接着抑制分子が除去され細胞接着面が形成されるという性質を示す。

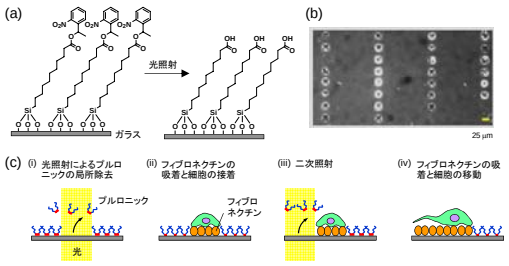


図1．ケージド基板を用いた細胞移動の光誘導法
(a) ケージド基板上の光化学反応．(b)基板上に形成した一細胞アレイ．
(c)細胞移動の誘導法の原理．

　まず，基板を 25 x 25 μm^{2}のスポットを有するアレイ状に光照射してNIH3T3 細胞を一細胞ずつ配置した後，細胞に接する幅 25 μmおよび 5 μmの通路状領域を光照射し，フィブロネクチンを添加した。いずれの場合でも通路幅に沿って細胞が伸展・移動した（図

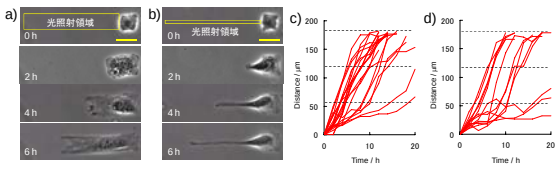


図2．ケージド基板上での細胞移動の誘導．幅25 μm(a,c)，5 μm(b,d)の通路上での一細胞の移動挙動の例(a,b)，および各一細胞の先導端の時間変化．

2a,b)。光照射は，アレイ状に配置した細胞全てを対象に行っているため（図1b），各一細胞の移動挙動を同時に観察することができる。実際に，二種類の通路幅に対する細胞の先導端の移動挙動をまとめたのが図2c，dである。同一通路幅上における細胞の挙動に注目すると，個々の細胞で移動開始のタイミングは異なるもののほぼ一定の移動速度を示すことを見出した。また，二種類の通路間で移動速度を比較したところ，5 μmの通路上より 25 μmの通路上の方が速く細胞が移動することが分かった。この結果は直感とは異なる予想外の結果であるが，おそらく，幅が狭い通路上では細胞骨格の再構築が起こりにくいなど，何かしらの内的な要因が細胞移動に重大な影響を及ぼしていることを示唆している。この点については，細胞骨格系のタンパク質の動態観察などを行うことで詳細な解析が可能であろう。

（2）新規ケージド基板の開発と細胞増殖の光制御

（1）の結果は，ケージド基板によって細胞に時空間を制限した刺激を与えうることを示している。しかしながら，この基板上にパターン化した細胞は，数日の内に初めに指定したパターンから逸脱してしまうため，短時間の観察では支障はないものの，増殖や分化のような比較的長期間の培養を要する研究には適していなかった。この主な原因は，基板表面に物理吸着させたプルロニックが，時間の経過とともに解離することであった。そこでこの点を改善するために，細胞接着抑制性のポリエチレングリコール（PEG）を，共有結合を介して光分解性基に直接連結した新規基板の開発を行った（図3）。

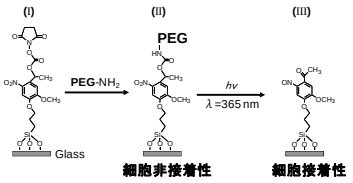


図3. 光解離性PEGに基づくケージド基板

接触角，全反射赤外吸収，エリプソメトリー，AFM の測定を通し，同基板への PEG の固定化および光解離を確認した。次に，作製したケージド基板上の円形領域を光照射し，血清培地で NIH3T3 細胞を播種すると，細胞は光照射領域に選択的に接着した（図4a,b）。この細胞を続けて培養すると，細胞は円形領域内で増殖をしつつも 17 日間以上パターンは維持された（図4c）。また，別途用意した円形の細胞パターンに対して，近接する円形領域を二次照射したところ，細胞は元の領域から新たに光照射された領域に移動しながら増殖し，ダンベル型の細胞パターンを形成してコンフルエントに達した（図4d,e）。以上のように，本基板では， 2 週間以上に渡って細胞のパターンを維持することが可能であり，尚かつ，培養の最中に光照射を行うことで，自在に細胞接着領域を拡張できることが分かり，より広範な用途での実用可能性が示された。また，アレイ中の特定の一細胞の近接領域のみに二次照射を行ったところ，当該細胞が選択的に増殖し，コロニーを形成した（図4f–i）。光照射を行わなかった周囲の他の細胞とは，明らかに増殖速度が異なった。以上より，二次照射による細胞接着領域の拡張を利用して，細胞増殖を光制御できることが示された。形成されたコロニー中の細胞は，全て元の一細胞と同一クローンと考えられるため，この技術は，ヘテロな細胞群から，特定細胞を単離増殖する技術などへの展開も期待できよう。

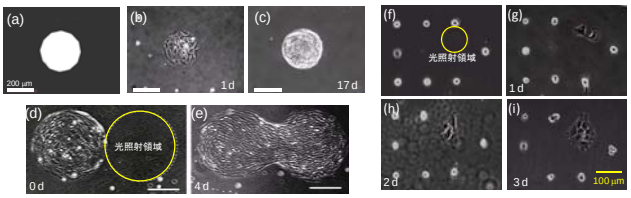


図4. 光分解性PEGに基づくケージド基板上での細胞接着制御. (a)光照射領域. (b)1日後および(c)17日後の細胞の位相差像. (d,e)光照射による細胞移動・増殖の誘導. (f-i)特定一細胞の選択的増殖.

（3）ナノ粒子を基盤としたケージング担体の開発

ケージド化合物は，光分解性保護基の修飾により一時的に活性が抑制された生理活性物質で，保護基の光切除により元の活性を取り戻す。この特徴は，細胞に対して時空間を制限した刺激を与えるのに適しているが，保護基の有無による生理活性の厳密なスイッチングを達成するためには，対象の生理活性物質ごとに精密な分子設計が不可欠であり，さらに合成・精製にも労力を要した。本研究では，表面に光分解性リンカーを介して反応性の官能基を有するナノ粒子を開発し，ケージド化合物合成用の担体（ケージング担体）としての可能性を探った。この設計では，ナノ粒子は，固定化する生理活性物質の活性を抑えるための嵩高いケージ基として機能すると同時に，ナノ粒子自体がケージング用固相担体となり，その合成・精製を容易にすると期待した。このことを念頭に，光分解性基を介してスクシンイミジルエステル基を有する金ナノ粒子を作製した（図5a）。活性エステルであるスクシンイミジルエステル基はアミンと反応するが，近紫外光照射に応じ

てカルバミン酸を放出させる。カルバミン酸は不安定であるため，程なく自発的に脱炭酸反応を受け，元のアミンに戻る。

初めに，粒径 5 nmの金ナノ粒子の表面に前記光応答性分子およびPEGの混合単分子膜を形成し，その赤外吸収測定からナノ粒子へのアミンの固定化と光放出を確認した。また，吸光度・蛍光測定，熱重量分析から，ナノ粒子表面の分子膜の組成および光放出反応の量子効率を求めた。次に生理活性アミンの例として，ヒスタミンのケージド化合物の作製を試みた。光照射に伴いナノ粒子表面から切り離されるヒスタミンを，*o*-フタルアルデヒドと2-メルカプトエタノールとの反応による蛍光誘導体化により評価したところ，確かに光照射時間に依存してヒスタミンが放出されることが分かった（図5b）。最後に，ヒスタミン受容体を発現するHeLa細胞にCa^{2+}蛍光指示薬のFluo 3 を取り込ませた後に，合成したナノ粒子を細胞外に添加した。すると，100 msの光照射により，細胞内Ca^{2+}の増大が見られ（図5c），この応答は光刺激を繰り返しても再現した。一方，ナノ粒子を細胞に振りかけるだけで，光照射を行わなかった場合には，このようなCa^{2+}応答は見られず，このことは，ナノ粒子に固定化されている時点では，ヒスタミンは失活しており，ナノ粒子から切断されることにより，初めて活性を発現する，いわゆるケージドヒスタミンとして機能していることが分かった。このケージドヒスタミンに対する光照射の位置・タイミングを制御することで，細胞間でのCa^{2+}シグナルの伝播に関する詳細な追求が可能であろう。本手法は，種々のペプチドや神経伝達物質，アミンを有する阻害剤などにも応用可能と期待される。また，金ナノ粒子の特徴として，他の修飾基の導入も容易であるため，ドラッグデリバリーシステムで使用される標的化ペプチドを導入することで，特定細胞への選択的な取り込みも実現可能と期待している。

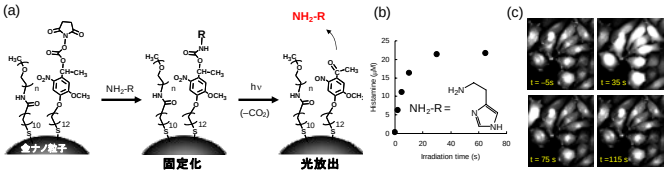


図5. 金ナノ粒子に基づくケージング担体(a)原理. (b)ヒスタミンの光応答的放出. (c)Fluo3-導入HeLa細胞での光照射(t=0, 100 ms)に対するCa^{2+}応答.

5. 自己評価

本さきがけ研究では，①細胞に対して時空間を制限した刺激を与える新規材料・技術を開発する，②それによって誘起された細胞応答を観察し，細胞内シグナル伝達機構を解析する，という二点を目的に研究を行った。三年半の研究期間で，「研究成果」で述べた以外にも多数の光応答性基板（ケージド基板）を開発し，細胞移動，細胞増殖，細胞間相互作用など細胞の基本的な活動を人為的に誘導する技術を確立した。また，光応答性ナノ粒子を合成し，生理活性物質を光応答的に産生させる方法を確立し，ケージドヒスタミンの合成に成功した。また，研究開始時に中心的な課題として掲げていたケージドタンパク質の開発については，詳細は述べないが，核となる材料開発に成功している（特許出願）。この課題については，細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質を対象に，戦略の妥当性を検証する作業が残されている。以上のように，目標とした細胞内シグナルの発生法の開発に関しては，概ね本研究の目標が達成できたと言える。

一方，開発した材料・技術を利用した生命現象の探求については，ケージド基板により周囲の細胞との相互作用を積極的に排除した一細胞の細胞移動を誘導することで，単純な流体とは異なり，細胞内骨格などの内的な要因の関与を示唆する移動挙動を見出すことができた。この観点での主要成果はこれくらいであるが，細胞内シグナルネットワークの解析において，時空間を制限して刺激を細胞に与えることの重要性を支持する重大な結果と考える。蛍光イメージング技術を利用して，細胞骨格に関わる分子群の時空間動態を調べることで，細胞移動の分子機序に関するより詳細な解析が可能となると期待しており，今後の展開が楽しみである。また，当初は予定していなかったが，ケージド基板の細胞クローニング技術への応用可能性を示すことができた。この技術自体は，生命現象の追求という訳ではないが，特定細胞の単離は多くの生物学研究において不可欠のステップであり，その簡便化・効率化を実現する本技術は，それら生物学研究に重要な貢献を果たすと期待している。

ケージド基板に関してはさきがけ研究以前にも取り組んでいたが，研究成果（2）で示した基板の開発により，長期間のパターン維持が可能でありつつも，光照射によって瞬時に細胞接着性が変換可能という，相反する機能を実現できたのは，飛躍的な進歩と言える。基材が通常のカバーガラスである上，細胞接着性の変換が標準的な蛍光顕微鏡の水銀光源による光照射で実施する

ため，本研究で得られた技術革新により，実証した細胞活動に限らず，より広範な生命現象を対象にできると確信している。また，光応答性ナノ粒子については，ケージドヒスタミンの例を示したが，原理的に，他のさまざまな生理活性アミンにも応用可能であると考える。ナノ粒子と対象のアミンを混合し，その後に脱塩や遠心分離処理を行うだけで，簡単に自前で望みのケージド化合物を合成・精製できる点は特筆に値する。多くの生化学・細胞生物学研究者に普及することで，ケージド化合物を利用した研究が見つめ直されるのではないかと思う。

6．研究総括の見解

本研究は光照射に応じて表面の細胞接着性が変化する機能性基板「ケージド」基板を開発し、基板上の細胞接着を一細胞レベルで制御することによって、細胞移動や細胞増殖を誘導・制御する手法を開発した。また、表面に光分解性リンカーを介して反応性の官能基を有する金ナノ粒子をケージング担体として開発しその有用性を示した。ケージド化合物の概念を広げた極めて優れた成果が得られている。合成化学、表面化学、細胞生物学、計測技術などを総合させた独創性の高い優れた研究成果として評価したい。応用範囲は広い。特定の細胞の単離増殖の制御などへの応用も期待される。

7．主な論文等

（A）さきがけ研究者が主導で得られた成果

（1）論文（原著論文）発表

論文（国際）

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, S. Inoue, K. Yamaguchi, T. Takarada, M. Maeda, ″Spatiotemporal Control of Migration of Single Cells on a Photoactivatable Cell-Microarray″, Journal of the American Chemical Society, 129, 6694-6695 (2007)

・J. Nakanishi, T. Takarada, K. Yamaguchi, M. Maeda, ″Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences″, Analytical Sciences, 24, 67-72 (2008)

・Y. Kikuchi, J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, Y. Yoshino, K. Yamaguchi, Y. Yoshida, and Y. Horiike, ″Grafting Poly(ethylene glycol) to a Glass Surface via a Photocleavable Linker for Light-induced Cell Micropatterning and Cell Proliferation Control″, Chemistry Letters, 37, 1062-3 (2008)

・Y. Kikuchi, J. Nakanishi, H. Nakayama, S. Inoue, K. Yamaguchi, H. Iwai, Y. Yoshida, Y. Horiike, T. Takarada, M. Maeda, ″Arraying Heterotypic Single Cells on Photoactivatable Cell-Culturing Substrates″, Langmuir, 24, 13084-95 (2008)

・J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, H. Ishida, Y. Kikuchi, K. Yamaguchi, Y. Horiike, ″Light-Regulated Activation of Cellular Signaling by Gold Nanoparticles That Capture and Release Amines″, Journal of the American Chemical Society, 131, 3822-3823, 2009.

（2）特許出願

・発　明　者：中西　淳，山口和夫
発明の名称：光照射によって細胞付着性を付与可能にする細胞付着・培養用基材
出　願　人：物質・材料研究機構，神奈川大学
出　願　日：2007.9.15（未公開）
出願番号：特願 2007-240292

・発　明　者:中西　淳, 山口和夫
発明の名称:光応答性薬物輸送体及び薬物付き光応答性薬物輸送体
出　願　人:物質・材料研究機構, 神奈川大学
出　願　日:2008.7.15(未公開)
出願番号:特願 2008-184326

(3)受賞
・2006 年 9 月 イノベーション賞(日本分析化学第 55 年会)

(4)著書
・宝田徹, 中西淳, 前田瑞夫,「ケージド細胞培養基板を用いる細胞アレイ作製」, バイオインダストリー, 23, 6-11, 2006.

・中西　淳, 前田瑞夫,「新規細胞アレイ作製法」, 医学のあゆみ, 218, 125-128 (2006)

・中西　淳,「ケージド細胞培養基板を用いた細胞接着制御」, 分子イメージング:蛍光プローブが拓くライフサイエンスの未来(別冊『化学』), 43-47 (2007).

・中西　淳,「ケージド化合物を利用した細胞の微小環境の制御」, 蛋白質核酸酵素, 52 1613-1618 (2007).

・山口和夫, 中西　淳, 中山秀一,「光分解性シランカップリング剤による自己組織化単分子膜のパターニング」, 未来材料, 7, 18-26 (2008).

(5)学会発表
学会発表(国際)
・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, T. Takarada, S. Inoue, K. Yamaguchi, M. Maeda, ″Controlling cell adhesion,migration and protrusion on a　functional cell-culturing substrate″,第20回国際生化学・分子生物学会議, 2006.

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, S. Inoue, K. Yamaguchi, T. Takarada, M. Maeda, ″Spatiotemporal control of cell protrusions and cell migration on a photoactivatable cell-culturing substrate″, Gordon Research Conference -Signal Transduction by Engineered Extracellular Matrices-, 2006.

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, H. Nakayama, T. Shimizu, K. Yamaguchi, T. Takarada, M. Maeda, Y. Horiike, ″Dynamic Cell Patterning on a Glass Functionalized with an Alkylsiloxane Having a Photocleavable Group″, 1st Asian Biomaterial Congress, 2007

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi,　H. Nakayama, T. Shimizu, H. Ishida, K. Yamaguchi, Y. Horiike, ″Dynamic Micropatterning of Biomolecules and Cells Based on Substrates Presenting a Succinimidyl Ester via a Photocleavable Group″, 8th World Biomaterials Congress, 2008

・J. Nakanishi, ″Photoresponsive Biointerfaces for Cell Analysis″, MANA International Symposium, 2009

学会発表(国内)
・中西淳, 菊地由希子, 井上敏, 山口和夫, 宝田徹, 前田瑞夫,「光応答性基板上に形成した一細胞アレイを用いた細胞移動の顕微観察」, 日本分析化学会　第 55 年会, 2006

・J. Nakanishi, Y. Kikuchi, Y. Horiike, S. Inoue, K. Yamaguchi, T. Takarada, M. Maeda, ″Spatiotemporal control of migration of single cells on a photoactivatable cell-microarray″, 第 49 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会 合同大会, 2007

・中西淳, 菊地由希子, 中山秀一, 清水貴弘, 山口和夫, 堀池靖浩, 「光応答性培養基板を用いた細胞クローニング」, 第 69 回日本分析化学討論会, 2008

・中西淳, 中山秀一, 清水貴弘, 石田晴久, 菊地由希子, 山口和夫, 堀池靖浩, 「特定タンパク質を捕捉し光放出する金ナノ粒子」, 第 18 回バイオ・高分子シンポジウム, 2008

・中西淳, 中山秀一, 清水貴弘, 石田晴久, 菊地由希子, 山口和夫, 堀池靖浩, 「光切断できる反応基を提示する金ナノ粒子」, 第 57 回高分子討論会, 2008

（6）招待講演

招待講演（国際）

・J. Nakanishi, ″Dynamic Control of Cellular Microenvironment Based on Caged Compounds″, First International Symposium on Interdisciplinary Materials Science, 2008.

・J. Nakanishi, ″Photo-induced cell patterning technology″, 2nd Int. Symposium on Atomic Technology for Biomaterials Science, 2008.

招待講演（国内）

・中西 淳, 「細胞の光ナビゲーション」, 第1回バイオ医工学シンポジウム, 2006

・中西 淳, 「光機能表面による細胞接着の制御」, 日本薬学会第 127 年会, 2007

・中西 淳, 「光機能基板上での細胞の動的パターニング」, 第 22 回茨城地区「若手の会」交流会, 2007

・中西 淳, 「光応答性基板を用いた細胞の動的パターニング」, ライブセルモデリングシンポジウム, 2008

・中西 淳, 「光応答表面での細胞配置・操作技術」, バイオメカニクス研究会第 126 回研究会, 2008

（B）その他の主な成果　　なし

研究課題別評価書

1．研究課題名
　広狭域2重2光子励起顕微鏡による神経回路網の計測

2．氏名
　松崎　政紀

3．研究のねらい
　脳の基本要素は多数の神経細胞であるが、個々の神経細胞は数千に及ぶ細胞間情報の受け渡しの場であるシナプス部位を保持しており、このシナプスの構造・機能特性が脳機能を大きく規定する。私はこれまで、ケージドグルタミン酸という光活性化型合成小分子を 2 光子励起することで、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を局所投与する方法論を開発し、単一シナプスをグルタミン酸刺激することで、シナプスの構造と機能に強い連関があることを実証してきた。しかし、神経回路網のシナプス結合パターンがあまりに複雑なため、シナプス構造・機能の研究からだけでは、脳機能の作動原理を理解することは難しい。そのためには、どの神経細胞がどの神経細胞にどのシナプスでどのくらいの強さで結合しているかを単一細胞・単一シナプスレベルで、これらの神経細胞群が如何なる脳機能を担っているかを個体レベルで、系統的に明らかにすることが必要である。そこで本研究では、広狭域 2 重 2 光子励起顕微鏡を開発することによって、広域に存在する神経細胞を系統的に 2 光子刺激して活動電位を発生させ、同時に、それらの細胞が出力先の細胞とどのシナプスで結合しているかを、狭域の 2 光子蛍光イメージング法を用いて計測・同定すること、および、広域における神経細胞集団を系統的に光刺激して個体レベルで運動を誘発し、運動制御を支配する神経回路網の分布を計測することを目指した。

4．研究成果
(i) 広狭域 2 重 2 光子励起顕微鏡の開発
　「研究のねらい」にある神経回路網の計測を実現するため、3 つの光刺激用のレーザー光路と 1 つのイメージング用のレーザー光路を持つ広狭域 2 重 2 光子励起顕微鏡システムを新たに構築した（図 1）。これは、微細構造であるシナプスを組織深部まで高空間解像度で観察するため、近赤外超短パルスレーザーを光源とした 2 光子励起顕微鏡が基本となっている。2 光子励起では励起確率が光密度の 2 乗に比例するため、励起領域が焦点領域のみに限られる。このとき、焦点領域の体積は対物レンズの開口数の逆数に依存するため（図 2A）、高い空間解像度を持ったイメージングを行うためには、開口数の高い対物レンズを使用する必要がある。しかし、サブミクロン構造

図1　広狭域2重2光子励起顕微鏡

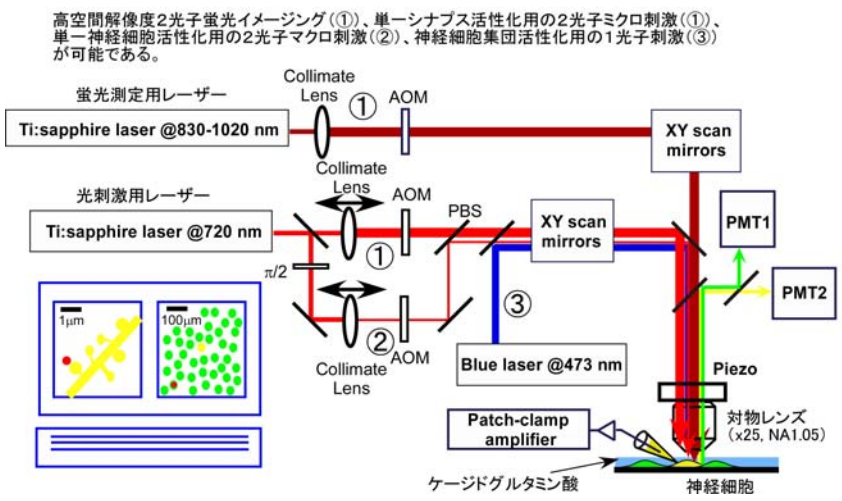
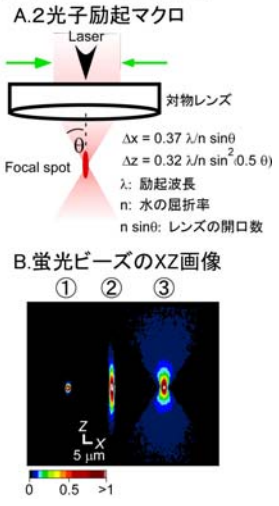


図2　光刺激の空間解像度



の微細なシナプスではなく、より大きい構造である神経細胞（10μm以上）を刺激して活動電位を発生させるためには、より広範囲にケージドグルタミン酸を励起して非常に多数のグルタミン酸受容体を活性化する必要がある。そこで、刺激用の超短パルスレーザーの光路を分割し、それぞれのレーザー径をケプラーレンズを用いて、ひとつは対物レンズ後部口径を満たすように（2 光子ミクロ）、もうひとつは後部口径より細くなる（2 光子マクロ）ように調節した（図 1）。実効の開口数は対物レンズ後部口に導入されるレーザー径に依存するため（図 2A）、前者は従来型の単一シナプスへの刺激を可能にし、後者は、少数の細胞への刺激を可能にする。さらに、より広範囲の多数の神経細胞を 1 光子刺激するために青色レーザーを付加した（後述）。すなわち 3 種類の空間解像度（図 2B）で光刺激が出来る光学系を構築した。また、シナプスの高空間解像度のイメージングを行っている最中に、イメージング領域の焦点面とは異なった焦点面にある神経細胞を刺激できるように、対物レンズ上部に、光軸方向に高速移動が可能なピエゾ素子を導入した。

(ii)ラット大脳皮質スライス標本におけるシナプス入力細胞群の 3 次元マッピング

2 光子マクロ刺激（図 2B②）によって、狙った神経細胞に活動電位を誘発できるようにするため、幼弱ラット大脳皮質視覚野スライス標本を用いて実験条件の設定を行った。その結果、1 回の光刺激によって、刺激後 40 ミリ秒以内に約 6 個の細胞で活動電位が誘発されること、誘発部位から 50μmの 3 次元的精度で、活動電位が誘発された細胞の空間位置を予測できることがわかった。またこの実験条件の設定を行いながら、光刺激の効率を上げるために、より 2 光子励起されやすいケージドグルタミン酸を新たに開発した（*J. Neurosci.* 27. 6601–6604, 2007）。

次に、ラット視覚野の第 2/3 層の錐体細胞に対する入力細胞の 3 次元空間マッピングを行った。マップする領域（約 600μm四方）を 32x32 のピクセルに分割し、それぞれのピクセルで光刺激を行った。光刺激された細胞が、ホールセルパッチクランプ法で記録している細胞（図 3A）にシナプス入力している場合、光刺激後にシナプス電流が計測された。さらに光刺激する領域の焦点面を変えることで 3 次元のマッピングが可能となった（図 3B）。その結果、第 2/3 層と 4 層の入力細胞群の約 2/3 は、出力細胞を中心とした側方半径約 150μmのコラム内に存在し、それ以外はその周りに散在していた（図 3C,D）。また、上位 10%の強いシナプス強度をもつ入力細胞の 85%が半径約 150μmのコラム内に存在することもわかった。この結果は、げっ歯類では視覚野における機能コラムはないにもかかわらず、シナプス結合様式はコラム状であることを示している。(iii) の運動野

図3　第2/3層錐体細胞に入力する興奮性回路のマッピング

(A)記録細胞の2光子蛍光イメージング。橙色の領域で光刺激が行われた。
(B)シナプス電流を誘発する部位の3次元マッピング。シナプス電流の大きさが色コードされている。Zはマップ平面と記録細胞の細胞体との距離を表す。
(C)Bのマップを Z 軸方向にスタックしたもの。
(D)6つの記録細胞のスタック画像を平均化したもの。

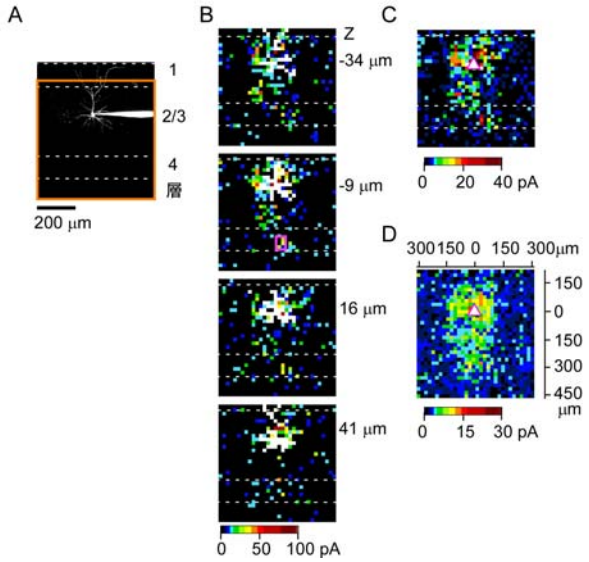
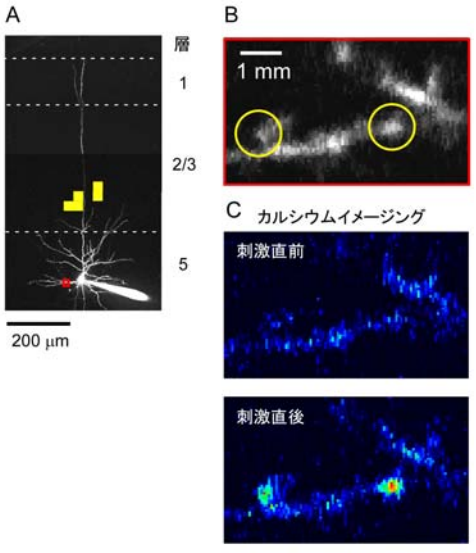


図4　シナプス入力細胞の位置と結合スパインの同定

(A)第5層の記録細胞の2光子蛍光イメージング。黄色の部位を光激するとCの反応が得られた。赤色の領域でイメージングが行われた。
(B)イメージング領域の樹状突起とスパイン形態。黄色丸内のスパインがAの黄色部位刺激で反応した。
(C)黄色部位の刺激前後でのカルシウムイメージングの一例。



での実験結果やこれまでの他の知見とあわせると、このコラム状シナプス結合様式はほぼすべての新皮質に当てはまることが強く示唆された。(*J. Neurophysiol.* 99. 1535-1544, 2008)。

(iii)ラット大脳皮質スライス標本におけるシナプス入力細胞の位置と結合シナプスの同定

局所回路における興奮性入力細胞群の配置のコラム状のパターンが明らかになったが、次はその入力細胞が出力先の細胞と、どのシナプスで結合しているかを理解する必要がある。そこで大脳皮質からの最終出力部位である、運動野の第 2/3 層の錐体細胞から第 5 層の錐体細胞へのシナプス投射に注目し、そのシナプス入力パターンを調べた。ホールセルパッチクランプ法によって第 5 層錐体細胞に蛍光波長の異なる色素とCa^{2+}指示薬を負荷し、その細胞の基底樹状突起の狭い領域(約 50x10μm)を 2 光子蛍光イメージングしながら、(ii) の方法で広域光刺激を行った。シナプス前終末からグルタミン酸が放出されると、シナプス後部スパイン膜上のNMDA受容体が活性化され、Ca^{2+}がスパイン内に流入する。従って、イメージング領域内のシナプスで入力があった場合、これをCa^{2+}指示薬の蛍光上昇として捉えることが出来た(図 4)。これまでに結合シナプス部位が見つかった入力細胞は殆どすべて、記録細胞の尖端樹状突起からの側方距離が約 150μm 以内に存在しており、入力細胞の刺激によってCa^{2+}上昇が検出されたスパインの多くは大きな構造をしていた。細胞外液のCa^{2+}濃度を上げて、シナプス前終末からのグルタミン酸放出確率を増大させた条件にすると、小さいスパインにおいても、入力細胞の刺激によってCa^{2+}上昇が検出された。この結果は、大きいスパインほどシナプス前終末からのグルタミン酸放出確率が高いことを示している。大きいスパインほどグルタミン酸感受性も高いことを考慮すると、本結果は、第 5 層の錐体細胞の直上の領域にある第 2/3 層の細胞からの入力が他に比べて非常に強いことを単一シナプスレベルで示している。入力細胞の広域的な配置と結合スパインの樹状突起上における狭域の配置との関係性をより詳細に明らかにするべく、現在も実験と解析を進めている。

(iv)マウス大脳皮質スライス標本におけるシナプス入力細胞群の 2 次元高速マッピング

上記の実験では、実験中にケージドグルタミン酸を細胞間液に還流する必要があり、個体動物レベルで神経細胞を刺激することは難しい。また運動・認知などの脳機能は多数の神経細胞の活動に依存しているため、脳機能を光を用いて誘発するためには、少数の神経細胞を活性化できる 2 光子マクロ刺激法とは異なった刺激法の開発が必要となる。2003 年に青色光を照射すると活性化されるカチオンチャネルタンパク質、チャネルロドプシン 2(ChR2)が緑藻クラミドモナスから発見された。そこで本研究において、ケージドグルタミン酸に加え、ChR2 にも着目し、ケージドグルタミン酸を用いずに、ChR2 を遺伝子導入によって神経細胞に発現させ、青色光を照射することで、神経細胞群を活性化させることを試みた。まずはこの方法で、(ii)のようなシナプス入力細胞群の分布を計測できるかを検証した。その結果、ChR2 が大脳神経細胞で発現するトランスジェニックマウスの大脳スライス標本を用いると、青色照射によって多数の神経細胞に活動電位を誘発できることがわかった。青色光による 1 光子励起では、図 2B③にあるように光が通るすべての領域で ChR2 の活性化が起こってしまうため、光軸方向の解像がなくなり、3 次元的にマップを取得することはできなかった。しかし、シナプス入力細胞群の低解像度 2 次元空間分布を高速に、約1分で計測することが可能となった(*Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 104. 8143-8148, 2007)。

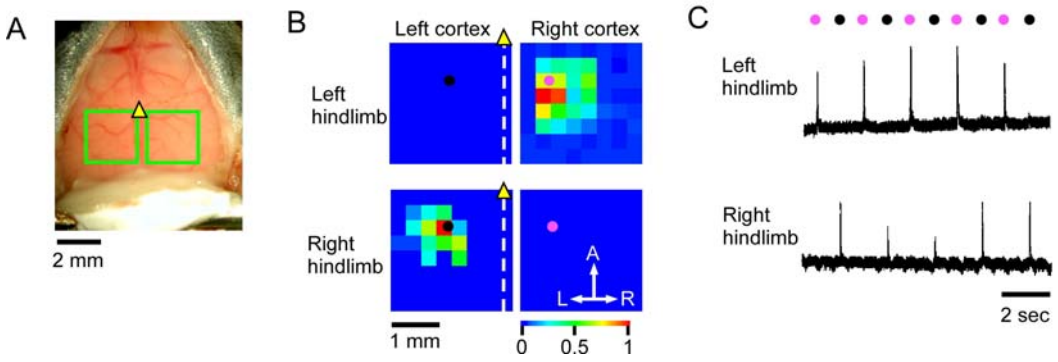
(v)個体マウスの大脳皮質運動野における経頭蓋光機能マッピング

次に、この ChR2 刺激方法を麻酔下の成熟個体 ChR2トランスジェニックマウスに対して適用した。頭蓋骨越しに青色光を皮質運動野に照射することによって、照射領域の ChR2 発現細胞に活動電位を誘発し、任意の肢の運動を 20Hz までの頻度で誘発できることを示し、非侵襲的な経頭蓋光刺激法を世界で初めて確立した(図 5)。これを用いて、四肢の運動を司る広域領域を皮質表面に対して 2 ヶ月間に渉って 2 次元マッピングを行った。機能マッピングの結果、前肢の支配領域はブレグマから約 1mm 外側・0.5mm 前方を中心として存在し、後肢の支配領域はブレグマから約 1mm 外側・1mm 後方にあること、前肢の支配領域は後肢の支配領域より大きいことを見出した。この結果は、従来行われてきた侵襲的な皮質内電気刺激法による機能マッピングによる結果と一致していた。今後この刺激法が、個体レベルでの脳機能を司る神経回路網の計測・制御に重要な

方法論となることが期待される(*J. Neurosci. Methods.* in press)。

図5　個体マウス大脳皮質運動野の光機能マッピング

(A)ChR2マウスの頭皮を剥いで、頭蓋骨越しにみた大脳皮質の画像。緑色の領域でマッピングが行われた。黄色三角印はブレグマを表す。
(B)上は左後肢の支配領域のマッピング、下は右後肢の支配マッピングを表す。それぞれのマッピング領域は8x8に分割され、それぞれのピクセルで光刺激を行った。
(C)Bの紫色の部位と黒の部位を交互に1Hzで光照射した時の左後肢と右後肢の動き。



5. 自己評価

当初の目的のひとつであった広狭域 2 重 2 光子励起顕微鏡の構築は完了でき、またこれを用いたシナプス入力細胞とシナプス入力部位の分布を計測・分析可能であることを示すことが出来た。最終的な目標は、この計測によって、新しい神経回路網の構造・機能連関を見出すことであったが、まだ決定的たる連関は見つかっていない。これは空間的に入力細胞群が隣接しているからといって、入力先のシナプス部位も近接している可能性は低いことを意味している。今後、細胞を機能的に区別した上で、そのシナプス入力部位を同定し、それらの配置の関連を分析することが必要であると思われる。一方で、当初使用想定していたケージドグルタミン酸だけではなく、ChR2の実験系を立ち上げられたこと、さらにこれが個体動物で適用可能であることを示せた点は非常に幸運であった。これらのケミカルバイオロジーと分子生物学の力を借りた進展によって、シナプス—細胞—神経回路の各階層の活性化を自由に光制御できる方法論を開発できたことは、今後の研究の芽として大きな収穫となった。

6. 研究総括の見解

神経回路網の計測のために3つの光刺激用のレーザー光路と1つのイメージング用の光路をもつ広挟域2重2光子励起顕微鏡システムを構築仕上げた。これによってある平面上に存在するシナプスを2光子イメージングしながら、異なる平面に存在する神経細胞を系統的に光刺激できるようになった。シナプス入力細胞とシナプス入力部位の分布を計測可能になったことは優れた成果として評価できる。また、より効率の高い光刺激用ケージドグルタミン酸も開発している。さらには、チャンネルロドプシンを遺伝子導入によって神経細胞に発現させ、青色光照射でマッピング出来ることを個体動物で示したことはこの分野の発展に大きな寄与をしたと言えるであろう。すばらしい成果を挙げたと評価出来る。今後の発展が大いに期待出来る。

7. 主な論文等

(A)さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・*Wang H., *Peca J., *Matsuzaki M., Matsuzaki K., Noguchi J., Qiu L., Wang D., Zhang F., Boyden E., Deisseroth K., Kasai H., Hall W.C., Feng G., Augustine G.J. High-speed mapping of

synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104. 8143-8148, 2007. (* equal contribution)

・ Ellis-Davies G..C.R., Matsuzaki M., Paukert M., Kasai H. and Bergles D.E. 4-carboxymethoxy-5,7-dinitroindolinyl-glu: an improved caged glutamate for expeditious ultraviolet and 2-photon photolysis in brain slices. Journal of Neuroscience 27. 6601-6604, 2007.

・ Matsuzaki M., Ellis-Davies G.C.R. and Kasai H. High-resolution mapping of synaptic connections by two-photon macro photolysis of caged glutamate. Journal of Neurophysiology 99. 1535-1544, 2008.

・ *Tanaka J., *Horiike Y., Matsuzaki M., Miyazaki T., Ellis-Davies G.C.R. and Kasai H. Protein-synthesis and neurotrophin dependent structural plasticity of single dendritic spines. Science 319. 1683-1687, 2008. (* equal contribution)

・ Hira R., Honkura N., Noguchi J., Maruyama Y., Augustine G.J., Kasai H. and Matsuzaki M. Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. Journal of Neuroscience Methods 179,258-263,2009.

(2)特許出願

・発 明 者:河西春郎、松崎政紀、服部敏征、松川康成、上野牧男、中田竜男
発明の名称:走査型顕微鏡及び標本画像取得方法
出 願 人:東京大学、オリンパス株式会社
出 願 日:2007 年 11 月 2 日

(3)著書

・松崎政紀、河西春郎。 2光子励起顕微鏡 細胞工学 vol. 26, 298-302. 2007

(4)学会発表

学会発表(国際)

・37th Annual Meeting of Society for Neuroscience
Matsuzaki M., Ellis-Davies G.C.R. and Kasai H. High-resolution mapping of synaptic connections in rat visual cortex by defocused two-photon uncaging of glutamate. (サンディエゴ、アメリカ、2007 年 11 月)

学会発表(国内)

・第 29 回日本神経科学大会 シンポジウム
Matsuzaki M., Tanaka J., Miyazaki T., Ellis-Davies G.C.R.. Kasai H. Plasticity and stability of single dendritic spines. (京都、2006 年 7 月)

・ 第 30 回日本神経科学大会
松崎政紀、Ellis-Davies Graham C.R.、河西春郎
2 光子励起グルタミン酸活性化法によるラット視覚野錐体細胞に対するシナプス入力細胞のマッピング(京都、2007 年 9 月)

(5)招待講演

招待講演（国際）

・ SSF/JST-PRESTO Joint Symposium

Matsuzaki M. Optical stimulation of synapses, neurons, and the cortex

（ストックホルム、スウェーデン、2008 年 5 月）

（B）その他の主な成果　　なし