

# 階層別分子動態可視化のための先端技術開発

実施予定期間：平成 20 年度～平成 22 年度

代表機関：早稲田大学理工学術院

代表者：石渡信一

国内参画機関：

東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター

代表者：秋本崇之

国外参画機関：National University of Singapore (NUS)

代表者：Yixin Lu & Liang Fengyi

国外参画機関：Duke-NUS Graduate Medical School Singapore (Duke-NUS)

代表者：Zhen Yan,

国外参画機関：Waseda Olympus Bioscience Research Institute (WOBRI\*)

代表者：Miwako Ozaki

## I. 概要

細胞内局所環境を可視化するための先端的技術開発を通して、基礎から臨床応用に亘るアジア共同研究ネットワークを構築する。具体的には、標的タンパク質と環境センシング機能を持つ蛍光分子とを結合することにより、分子動態を理解するための各種機能性プローブ群を作成する。このような細胞状態を可視化する新規細胞計測法の開発により、非細胞系から動物個体まで各階層での可視化システム構築を推進する。

### 1. 研究の目的

生物機能は生体分子システムによって動作し、制御されていることから、動作・制御の原理は、システムを構成する生体高分子、特にタンパク質分子の構造の時空間的ダイナミクスと、構造に蓄えられた情報として説明することができる。このような視点において、細胞で観察される多くの生物学的現象は、分子動態として普遍的な解釈を与えることができる。本研究の最終目標は、疾患の発現機構を物質レベルの素過程で理解し、疾患への現在の理解を飛躍的に深め、現存しない新技術に立脚した治療法を開発することにある。

本提案では、特に自発的な収縮振動を繰り返す心筋（細胞）と細胞構造上明確な極性を示しかつ発火振動することを大きな特徴とする神経細胞に着目する。可視化技術開発に焦点を当て、有機合成化学、高分子化学などの工学的手法を融合させ、新規プローブの開発と可視・定量化技術を開発し、細胞内局所環境を選択的に計測・制御する技術の開発を行う。生体分子システムの本質的動作原理を解明するための技術開発は、心筋や神経細胞だけに限らず全ての細胞や生物個体への応用が可能である。

本提案は、新規機能性蛍光プローブの開発から最終的にはヒトへの応用までを目指しているが、本提案採択期間中には、可視化技術の確立として動物個体への応用までを予定しており、基礎研究を進めつつ臨床応用までの道筋をつける準備期間とする。また、提案者らは、すでにシンガポールバイオサイエンス研究特区であるバイオポリスに研究所を構え、異分野融合研究の場、医工連携の場として分野・国境を超えた研究開発を実現しつつある。基礎研究者から臨床家までが場を同じくし研究することにより、効率的かつ加速的に融合

研究を進めている。このような多様で多層的階層からなる集団より、創出と淘汰を繰り返すことにより産み出される基準は一つの国際標準と言える。本提案は、日本とシンガポールの連携を密にとることにより、融合研究をさらに深め、生命現象の基本原理に迫ると同時に応用研究、臨床応用の場として発展させることも目的としている。

更に、本研究内容は要素技術開発から出発するが、汎用性の高い技術となることを目指す。本提案は、技術の応用先である基礎研究・製薬・医療にとどまらず、国際的人材育成や国際標準創出にも効果は波及しうると予想される。最終的には、現存の早稲田シンガポール拠点を技術・国際標準創出の場の成功例として確立する。

### 2. 研究内容

これまで、一般的な分子標識方法の1つとしてヒスチジン (His) 6量体を目的タンパク質に融合させる方法が広く使われてきた。そこで、この標識化合物に直接結合できる修飾剤を開発し、更に修飾剤に環境応答性化合物（細胞内環境をセンシングできる低分子化合物、或は高解像度で可視化できる蛍光分子）を結合させることで、広範に利用可能な様々な機能性プローブを作成することができる。また、高感度の膜電位感受性の蛍光色素も併せて開発することにより、非細胞レベル、細胞レベル、個体レベルそれぞれの階層で計測できる技術を確立する。

本研究は、大きく3つの役割に分けられる。1) His 標識化合物へ選択的に化学結合できる修飾剤と環境応答性色素と修飾剤を結合させた機能性プローブの合成、及び、各種プローブに適した計測技術を確立、2) 個体レベルでのイメージングを目指した高感度膜電位感受性蛍光色素の開発、3) 顕微観察による実用性を吟味して実用化を目指す。

1) His 標識化合物選択的の化学修飾剤の開発では、まず人工分子認識システムに基づく素子を設計、合成する。この素子はヒスチジン数量体 (His-tag) のみを金属イオンを介して選択的に認識し、その後、ヒスチジンの非共有電子対を利用して共有結合させる。近年の遺伝子改変タンパク質生成過程においては、標的タンパク質の機能に影響を与えないように塩基配列上に His-tag を導入したものが広く普及している。ここで作成する素子に多様な機能性分子を結合させることで、細胞内での His-tag タンパク質の位置情報や局所環境情報を可視化することが可能なプローブとなる。はじめに素子と市販の蛍光分子、及び温度応答性高分子との結合が検討される。市販の蛍光分子としては、まずカルシウムイオンを対象とする蛍光色素 (Fluo-4 及び Fura-2) を選び、素子と結合するような修飾を施す。また、上記蛍光分子と高分子の改造を行うことに併せ、標的タンパク質をラベル化する光スイッチ機能を持つ低分子プローブ、及び量子ドット (Q-dot) との組み合わせを図る。以上の有機合成的手法は複数のパイプラインを同時に進める。また、この進行と合わせた非細胞系及び細胞系の顕微観察・計測系を構築する。

2) 膜電位の変化に対して高感度で応答する蛍光色素の開発を行う。現在使われている分子をベースに、第一原理計算 (DFT) を用いて分子シミュレーションを行い、色素団の波長を予測しながら設計を行う。いくつかの

絞られた候補に関して、具体的な合成物の評価・開発を順次行っていく。

- 3) 構築された観察・計測系の下で、非細胞系及び細胞系を用いた新規プローブの適合性を検証し、プローブの新規設計と開発にフィードバックする。例えば、生物学的応用の視点から、i) 分子の挙動を追うための分子の蛍光標識が容易に可能で、かつ光スイッチ系が利用できれば局所的な分子動態を経時的に追うことが可能となる。また、温度感受性色素の場合、細胞内反応状態を2次元、3次元的に理解でき、温度感受性色素と標識された分子動態を同時観察することにより、温度変化の実体把握も可能である（これは神経だけでなく全ての細胞に応用できる）。ii) 膜電位感受性色素の感度が上がり活動パターンを追うことができれば、活動変化を2次元、3次元的に追跡可能であり、これは、心臓、神経疾患の診断・治療に応用できる。最後に、iii) 神経活動と分子の挙動を同時観察することにより、電気信号により制御されている分子動態を知ることができる。その結果、活動電位変化が重要な脳神経疾患では、これまで電気刺激により治療を行ってきた疾患の創薬ターゲット分子や反応状態の同定が可能となる。

### 3. 国外参画機関の参画

イメージング技術開発に当たり、早稲田大学シンガポール拠点を柱に、工学的要素技術および有機合成の特化した技術を National University of Singapore (NUS) およびバイオポリス内研究所と連携することにより強化する。また、新規プローブの細胞への応用と、特に動物個体やヒトへの応用を Waseda Olympus Bioscience Research Institute (WOBRI\*) と Duke-NUS Graduate Medical School Singapore (Duke-NUS) で行う。更なる可視化解析は、バイオポリス共同研究施設や研究所施設を利用し、臨床応用は病院と連携する。

### 4. 政策的ニーズ

シンガポールは産業分野だけでなく、研究・教育分野でも、経済効果を考えた施策を立案し、素早く実行する政策を取ってきた。質の高い人材育成を目指すと共に、バイオハブ、医療ハブとしての世界的地位の確立を目指すといった極めて戦略的な手法をとっている。本提案はシンガポールの政策的ニーズに合致したものであり、提案者らが目指す技術開発は、神経科学や心臓疾患分野だけでなく、シンガポール政府の他の政策的ニーズでもある癌研究や免疫アレルギー関連の研究といった広い分野に応用できる。また、本提案の特徴の1つは、早稲田シンガポール拠点の利用である。現地に拠点を置くことにより、現地の政府関係者、有識者とのコネクション構築ができ、現地研究者や技術者を雇用し共に研究することにより、更なる人脈形成が可能である。多様かつ多層的ネットワークの構築は、研究分野だけではなく、政治、経済、産業と様々な分野の諸問題に対して機動的に対応可能な組織づくりに結びつく。更に、シンガポール政府は、世界頭脳の集中化を継続的に推進しており、選ばれた学術機関の選ばれた研究機関のみが連携できるといった体制が今後強化される。よって、シンガポールは、情報発信基地として将来確実にアジア拠点の核となりうる。長期的な展望に立ち、現地に根付く組織づくりをすることが、1) アジア諸国間との信頼関係の獲得、2) 刻々と変化する情報を正確迅速に収集、3) 研究交流をはじめとする相互連携強化と政策への参入が果たせる最も近道であると考えられる。また、日本国外から日本を見つめることにより、

より客観的に、的確に世界の中、アジアの中における日本の位置（状況）の現状把握と未来予測が立てられる。

提案者らは、シンガポールの利点を利用し、基礎研究から臨床応用までを結びつけることのできる組織づくりを目指しているが、これまで企業以外の科学技術研究分野においてこのような社会的かつ戦略的視点を取り入れた研究戦略が取られた実例はなく、結果に期待が持てる提案と言える。

### 5. 共同研究内容の先端性

His-tag タンパク質を選択的にラベルする方法は、His-tag が標準的に組換えタンパクに利用されていることから、分子生物学分野に携わる研究者にとって汎用性の高いタンパク質標識法といえる。また従来の低分子蛍光色素に代わり、輝度の高さ、幅広い波長を有する点で強い魅力を持つ Q-dot を標的タンパク質へ簡便に結合することができれば、細胞生物学の分野における強力な可視化手法となる。例えば、細胞内カルシウム濃度や pH、NO 濃度、膜電位変化などの細胞内局所環境の変化を捉えるのと同時にタンパク質一分子の挙動が明らかとなれば、神経機能調節を司る電気信号により制御されている一連の分子動態を知ることできる。その結果、これまで電気刺激により治療を行ってきた疾患について、疾患と治療のメカニズムがタンパク質分子レベルで明らかとなり、創薬ターゲット分子の同定、さらには新規治療法の開発へとつながる。

本提案では、異分野の研究グループが綿密にネットワークを作ってこそ、実現可能となる。単に試験管レベルでの His-tag 認識蛍光プローブの創製に留まらず、多くの分子種が存在する環境下で機能する、より実践的なプローブの開発に力点を置いた研究である。

以上のことから、要素技術そのものから応用まで本共同研究の先端性はかなり高いものと思われる。

### 6. 制度の付加価値

これまでの制度では、日本と海外拠点を結びつけ、海外拠点を活用することにより、海外に日本のための国際拠点を形成するためのグラントが十分に整備されていなかった。本制度では、研究と同時に民間ベースでは難しい国際拠点形成等を同時に行うことにより、研究の質の向上と社会的ニーズから逆算して割り出された基礎研究に特化するといったビジネス的視点に基づく基礎研究のあり方を示しつつ、民間で開発するには困難な技術を複数融合させることにより、問題解決を図っており基礎研究の研究支援方法のあり方を示す成功例になる。

また、早稲田大学では、シンガポール各省庁の政府関係者、大学や研究機関関係者、親日派元日本留学経験者を含む幅広い人脈の組織化を行っているが、今後更に強化することにより、何にでも対応できる機動的組織づくりを目指している。社会的位置づけを明確にした研究テーマを提案し、実際に実用化にもっていくといった研究提案を可能にしているという意味でも、本制度の存在価値は大きい。

### 7. 過去の蓄積

早稲田大学は、これまでアジア諸国から多数の留学生を受け入れ、その後留学生らは母国に帰国し、理系、文系を問わず国策に関わる地位を占めるに至り、アジアに於ける早稲田大学への期待度は日本の大学の中でも突出している。そのような背景のもと早稲田大学は、シンガポール拠点整備に向け、全学体制に取り組んでいる。これまで、シンガポールに早稲田渋谷シンガポール校（高等学校）の設置、

1995年にNational University of Singapore (NUS)、2002年にはNanyang Technological University (NTU)と大学間協定を締結、NTUとはビジネススクール(連携大学院)、NUSとは2007年7月にエリート特別養成コースを設置した。2005年より早稲田大学シンガポール拠点の整備がはじまり、現在、オリンパス株式会社援助のもとWaseda Olympus Bioscience Research Institute (WOBRI\*)が設置され、NUSおよびNTUよりポストドクや学生を受け入れ研究分野でも貢献している。WOBRI\*では、神経科学分野、特に精神疾患、神経変性疾患分野に焦点を当て、研究可能な設備を整えるまでに至った。本拠地を通じ、シンガポール内外の研究機関との連携を図ることにより、研究を進展させている。シンガポール政府、教育機関、医療機関、各種学会、民間、各種ソサイアティーと多層的なネットワーク形成を行うことにより、様々な問題点に素早く対処できるような組織づくりを行っている。

シンガポールの大学院教育では、実際の研究現場で研究経験(最低1年間)を積む必要がある。WOBRI\*では、NUS、NTUからの大学院生(博士研究員)を受け入れ、実際に実験指導、研究発表練習、議論の場を設けることにより、大学院生の研究者としての研究指導を行っている。また、シンガポール経済産業省(Economic Developmental Board: EDB)からの研究資金援助も受けている。現在、医工連携、基礎と応用、臨床科学の連携、ビジネスまで考慮に入れ常にアウトプットを意識した研究課題設定を優秀なヒューマンリソースのもとで実現できる研究環境が整備できている。

研究内容としては、主に培養細胞とマウス個体を用いた解析を行い、特に神経細胞間のシグナル伝達に重要なシナプス部位で観察される分子変化を様々な可視化技術を用いることにより観察している。また、動物個体を用い脳の電氣的活動を測定することにより、脳高次機能現象測定を行い、神経活動と行動との関係を解明しようとしている。実際、共同研究の実績として、NUS、Department of AnatomyのDr. Liang Fengyiとは統合失調症リスク遺伝子の解析をリスク遺伝子ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを用いることにより解析を進めている。NUS、Department of Chemistry、Dr. Yixin Luとの共同研究では、His-tagを認識結合する新規蛍光物質の合成に成功しており、現在バイオアッセイを行っている。また、Duke-NUS、Dr. Zhen Yanらとは、変異マウスの行動解析を行い神経、筋肉、代謝異常と行動との関係の解析を行っている。以上のように日本参画機関およびNUS、Duke-NUSとの共同研究により、特に精神神経疾患との関係を明らかにしてきた。現在、特に統合失調症リスク遺伝子の神経活動依存的な機能解析および筋肉系を含む末梢神経系との関係を明らかにしようとしている。

## 8. 研究の背景等

### (1) 国内外の研究状況

蛍光プローブの開発は世界的にみても極めて競争の激しい分野である。蛍光イメージングの主な手法として、1) GFPに代表される分子生物学的手法を用いて塩基配列上のデザインで融合タンパクを作成するか、2) 有機合成化学的手法で、化学結合を用い低分子蛍光化合物を用いるかに大別される。前者の手法は、最近では、DronpaやKAEDEなどの「光で操作できる蛋白」を用いたラベル化法で、複雑な細胞小器官を染め分ける、或いは動的な挙動を観察することが可能になった。しかしながら、これらの融合タンパクを作成する作業にはタンパク動態を妨げないような位置で標識タンパクを融合させるために膨大な時間を必要とす

ることもある。一方で、低分子の化学プローブはそういった欠点が軽減される反面、克服すべき課題は、「標的タンパクを選択的且つ安定にラベル化すること」である。提案者らは、人工分子認識系の知見を活かし、His-tagを特異的に認識し、且つ、その後に化学反応を起こさせ共有結合で強固に結合できるプローブの開発をする。既に、提案者らは、NUSのDr. Yixin Lu(海外参画者)らとの共同研究で、亜鉛イオンとヒスチジンタグとの配位結合を介したプロトタイプ型の蛍光プローブを開発している。また、その合成したプローブをシンガポールバイオポリス内WOBRIの尾崎教授の協力の元に細胞実験を行い、NIH3T3細胞膜表面に発現したHis-tag蛋白を特異的に染めることが出来る事を確認している。シンガポールでは、可視化技術開発研究・臨床応用研究を国策として強化しようとしている。そのために、バイオポリス内だけでも、Clinical Imaging Research Center, Biopolis Imaging Center, Singapore Bioimaging Consortiumとイメージング関連施設が続々と開設されており、そのための技術者や研究者が集められている。よって提案者が融合研究を進める上で好都合である。

### (2) 提案にいたる準備・調査等

[海外連携の準備状況]

過去の蓄積でも述べたように、早稲田大学は、オリンパス株式会社の援助のもとWOBRI\*を設置し、神経科学研究分野で、医療特殊技術や臨床に直結した研究施設の充実に努めてきた。現在、研究所では4つの研究グループが活動し、精神疾患と神経変性疾患の治療に向けての基礎研究と応用研究が行われている。2006年には、文部科学省副大臣、日本政府関係者、各国の視察団等の訪問を受けるなどその存在と重要性が認められるようになってきた。また、2007年12月には、元A\*STAR&EDB長官フィリップ・ヨー氏がWOBRI\*支援を讃えられ日本国より叙勲を受けた。現在、シンガポール側からの援助としてシンガポール政府(EDB)から研究支援と各個別研究に関しては、NUSとの共同研究による資金援助を受けている。また、バイオポリス内共通研究施設の使用、Clinical Imaging Research Center, Biopolis Imaging Center, Singapore Bioimaging Consortium, Institute of Molecular and Cell Biologyの施設の利用、シンガポール政府機関、シンガポール国立大学、Duke-NUS Graduate Medical School Singapore、ナンヤン工科大学との連携による施設の利用と情報交換をはじめ、バイオポリスに参画している世界各国の大学学部・研究所・企業からの情報収集のもと研究を進めることができています。

[各要素技術の準備状況]

本提案の基礎となる研究、プローブ合成技術、温度感受性色素の継体培養細胞への応用、リボソームを用いた細胞内ディリバリーシステムの開発は、科学技術振興調整費『先端科学と健康医療の融合研究拠点の形成』、モータータンパク質の機能や心筋収縮系の自励振動解析は、科研費基盤研究A、特別推進研究の助成を受け、統合失調症リスク遺伝子の解析と変異マウスの解析は、私立大学学術研究高度化推進事業『行動研究フロンティア』の助成を受け研究を行った。

## 9. 生命倫理・安全面への配慮について

国内外を問わず、実施される全ての研究については原則として、研究デザイン策定の段階より、ヘルシンキ宣言及び国内関連省令を遵守し、当該研究に関わる被験者の人としての尊厳および基本的人権の尊重、取得される個人情報の保護、ならびに、十分な説明と同意によるインフォームド・コンセントの徹底をはかるとともに、実験に関わる環

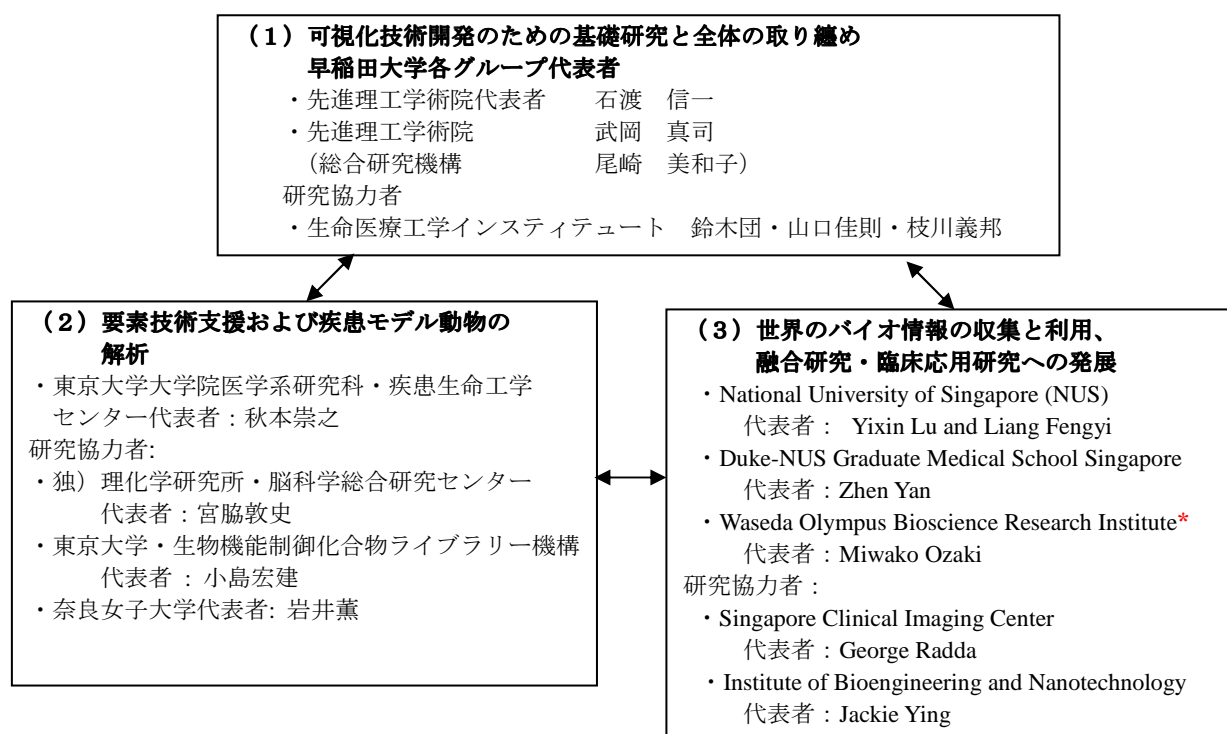
境安全確保のための措置および情報の積極的開示に努める。また、動物実験に関わるバイオハザードに関わる妥当性、および、モラルハザードに関わる倫理的配慮についてもモニタリングを行う。なお、各参画機関で遂行される研究は、各々の箇所ですでに定める研究倫理規程及び動物実験実施規程に則り、各参画機関の倫理審査会および各動物実験委員会による審査手続がなされるが、これに併せて、代表機関に設置される倫理審査会および各動物実験委員会においても、当該研究に関わる申請が行われ参画研究者および関係者間で周知徹底をはかる。

## 10. 実施体制

イメージング技術開発に当たり、早稲田大学研究者を中心とした融合研究を柱に、専門性の高い特殊分野の強化目的で、合成プローブ開発として東京大学・生物機能制御化合物ライブラリー機構と奈良女子大学、蛋白プローブの開発として独) 理化学研究所(理研)・脳科学総合研究センターが参画する。また、工学的要素技術および有機合成の特

化した技術を National University of Singapore (NUS) およびバイオポリス内研究所と連携することにより強化する。新規プローブの細胞への応用と、特に動物個体やヒトへの応用はシンガポールで実現可能な体制を組む。現在、動物への応用は、Waseda Olympus Bioscience Research Institute (WOBRI\*)と Duke-NUS Graduate Medical School Singapore (Duke-NUS) で行い、更なる可視化解析は、バイオポリス共通研究施設や研究所施設を利用することにより行う。また、理研シンガポールオフィスはシンガポールバイオポリス同一建物内に拠点を構えていることもあり、情報収集において理研との連携も容易である。

\*WOBRIは2009年9月14日より早稲田大学バイオサイエンスシンガポール研究所(Waseda Bioscience Research Institute in Singapore(WABIOS))に改組。



氏名	所属部局・職名	提案課題における役割
◎石渡 信一	早稲田大学先進理工学術院教授	研究代表者：全体の取り纏め
○武岡 真司	早稲田大学先進理工学術院教授	高分子化学分野
○秋本 崇之	東京大学医学部/早稲田大学生命医療工学インスティテュート講師/客員研究員	筋肉細胞および動物個体への応用と技術評価
○尾崎 美和子	早稲田大学/早稲田オリンパスバイオサイエンス研究所教授/副所長・リサーチディレクター	日本シンガポール側の取り纏め、神経科学分野への応用と技術評価
Yixin Lu	National University of Singapore, Department of Chemistry Assistant Professor	新規プローブの有機合成とシンガポールでの合成関連の取り纏め
Liang Fengyi	National University of Singapore, Department of Medicine Medical Doctor	変異マウスやヒト脳の組織化学および解剖学的解析と評価、シンガポールでのヒト試料関連の取り纏め
Zhen Yan	Duke-NUS Graduate Medical School	動物個体(特に筋肉系)への応用と技術評価

## 11. 各年度の計画と実績

### a. 平成 20 年度

#### ・計画

NUS と共同で His-tag を特異的に認識できる蛍光プローブのプロトタイプを作成、WOBRI\*にて細胞表面の His-tag 蛋白の染色に適用し評価する。また His-tag 認識素子部について、より認識能の高い素子の候補を質量分析装置スクリーニング法により探索する (武岡 G, NUS)。汎用性蛍光プローブに候補素子を結合させて機能性蛍光プローブが出来次第、非細胞系 (石渡 G) および細胞系 (特に神経細胞, 尾崎 G, WOBRI\*) に適用し顕微観察する。顕微観察は既存の顕微観察系の仕様を改変することから始め、次年度以降に幅広い系へ波及させるための足場を作る (石渡 G, WOBRI\*)。また、細胞骨格様分子で唯一のメカノセンサであると考えられる p130cas に着目し、張力感受性蛍光プローブを遺伝子工学的に開発する (秋本 G) G: グループ

#### ・実績

NUS の Lu 博士の助言を元に His-tag を特異的に認識できる蛍光プローブのプロトタイプを作成し (武岡 G, NUS)、WOBRIにて細胞表面に発現した His-tag 融合タンパク質の染色に適用した (尾崎 G)。また、Lu 博士研究室合成の His-tag 認識色素の生物学的評価も行なった (尾崎 G)。色素の設計、細胞系への適用の一連の流れは構築できたものの、His-tag に対する特異性や輝度の面で不十分であり、質量分析装置を用いたスクリーニング法により、更に認識能の高い分子の探索を開始した (武岡 G)。候補となる分子群の合成経路に関する打ち合わせを NUS のグループで行った (NUS, 武岡 G)。既存の顕微観察系の仕様を改変し、次年度以降に幅広い系へ波及させるための足場となる顕微観察系を構築した (石渡 G, WOBRI\*)。また、細胞骨格様分子で唯一のメカノセンサであると考えられる p130cas に着目、遺伝子工学的手法による張力感受性蛍光プローブの開発に着手した (秋本 G)。

### b. 平成 21 年度

#### ・計画

前年度のスクリーニング法を繰り返し His-tag 認識素子の候補群から更に認識能の高い候補を絞り込む (武岡 G)。これを、各種機能性蛍光色素に結合し、His-tag 発現系に適用して各種機能を評価する (武岡 G, WOBRI\*, NUS)。具体的には、モータータンパク質や細胞骨格系タンパク質を利用し、新規に合成された機能性蛍光プローブの有用性を顕微評価する (武岡 G, 石渡 G, NUS)。併せて、各蛍光プローブに適した顕微計測系を開発する (石渡 G, Duke-NUS)。精神疾患リスク遺伝子の膜電位変化依存的な機能変化を細胞レベルで観察し、疾患モデルマウスの解析と併せてヒト疾患との相違を明らかにする。その過程で、機能性蛍光プローブの応用における課題点を明らかにする (尾崎 G, WOBRI\*, NUS, Duke-NUS)。p130cas 張力感受性蛍光プローブの機能評価のための実験系をセットアップするとともに、メカニカルストレス負荷中の張力測定を試みる (秋本 G, Duke-NUS)。第一原理 (DFT) 計算を用いて、心筋や神経細胞関連研究に望まれていた高感度膜電位感受性の蛍光色素の設計を行う

(武岡 G)。

#### ・実績

前年度のスクリーニング法を繰り返し His-tag 認識素子の候補群から更に認識能の高い候補を絞り込んだ (武岡 G)。これを、各種機能性蛍光色素に結合し、His-tag 発現系に適用して各種機能を評価した (武岡 G, 石渡 G, 尾崎 G)。具体的には、モータータンパク質や細胞骨格系タンパク質を利用し、新規に合成された機能性蛍光プローブの有用性を顕微評価した (武岡 G, 石渡 G, NUS)。併せて、各蛍光プローブに適した顕微計測系を開発した (石渡 G, Duke-NUS)。更に、His-tag に標識用蛍光色素を結合させた光スイッチの系を細胞レベルで確立し COS 細胞を用いて生物学的評価を行った (尾崎 G, WABIOS, NUS)。精神疾患リスク遺伝子の膜電位依存的な機能変化をカルシウムの細胞内変化として観察し (尾崎 G, WABIOS)、ニーズに合った細胞内カルシウム変動を局所的に計測できる機能性プローブ合成をスタートさせた (武岡 G)。動物個体を用いた精神疾患発症機構の解析に関しては、精神疾患リスク遺伝子変異マウス (病態モデル動物) の解析 (尾崎 G, WABIOS, NUS) と Optogenetical マウス (尾崎 G, WABIOS, Duke-NUS) の解析を行った。p130cas 張力感受性蛍光プローブをいくつか試作した。また、p130cas 張力感受性蛍光プローブの機能評価のために、メカニカルストレス負荷中の細胞を観察する実験系のセットアップを試みた (秋本 G, Duke-NUS)。

### c. 平成 22 年度

#### ・計画

His-tag 蛋白を、開発した His-tag 認識機能性蛍光プローブでラベルし、細胞内での様々な環境変化を検出する蛍光プローブであることを検証する (武岡 G, 石渡 G, 尾崎 G, WABIOS, NUS)。また細胞に His-tag タンパク質を予め発現させ、標的タンパク質のみがラベルされることを検証し (石渡 G, 武岡 G, 尾崎 G, WABIOS, NUS)、プローブに適した計測技術の確立を目指す (石渡 G, NUS)。本システムを利用し、精神疾患リスク遺伝子の蛋白切断と分泌機構を明らかにする (尾崎 G, WABIOS, NUS)。実際に病態モデル動物、蛍光標識変異マウス、精神疾患患者サンプルを用い発病と蛋白分泌量との関係を明らかにする (尾崎 G)。筋関連疾患への応用として、p130cas 張力感受性蛍光プローブをマウスに導入し、組織レベル、in vivo レベルで細胞内の力学的局所環境の観察を試みる (秋本 G, Duke-NUS)。神経活動変化を計測する標識化合物についても具体的な合成物の評価・開発を順次行い (温度感受性色素や細胞内カルシウム計測色素)、高感度を追求する (武岡 G, 石渡 G, 尾崎 G, 秋本 G, WABIOS, NUS, Duke-NUS)。最終的には動物実験で明らかになった現象を疾患診断治療に応用可能かどうかを検討し (石渡 G, 尾崎 G, WABIOS, NUS, Duke-NUS)、融合的技術開発や臨床応用研究の場を創成するためのネットワークを構築していく (WABIOS, Duke-NUS, NUS, A\*STAR 研究所、病院)。シンガポール機関との共同研究開発も進みつつあるため、知的財産管理や契約等の環境整備を行う。

12. 年次計画

研 究 項 目	1 年 度 目	2 年 度 目	3 年 度 目
<p><b>(1) 可視化技術開発のための基礎研究と全体の取り纏め</b></p> <p>・ 早稲田大学</p>	<p>His-tag 認識素子によるタンパク質ラベル化法の決定</p> <p>←→</p> <p>計測系の開発</p> <p>非細胞系への応用</p> <p>←→</p>	<p>各種プローブと His-tag 認識素子とを結合させた、各種機能性プローブのタンパク質へのラベルと機能の検証</p>	<p>細胞系への応用</p> <p>←→</p>
<p><b>(2) 要素技術支援および疾患モデル動物の解析</b></p> <p>・ 東京大学医学系大学院・疾患生命工学センター</p>		<p>筋細胞への応用</p> <p>←→</p>	<p>動物個体筋肉系への応用</p> <p>←→</p>
<p><b>(3) 世界のバイオ情報の収集と利用、融合研究・臨床応用研究への発展</b></p> <p>・ Waseda Olympus Bioscience Research Institute*</p> <p>・ National University of Singapore</p> <p>・ Duke-NUS</p>	<p>新規プローブの評価&amp;神経細胞への応用</p> <p>←→</p> <p>低分子プローブの合成</p> <p>←→</p> <p>動物個体心筋への応用</p> <p>←→</p>	<p>脳神経系マウスへの応用</p> <p>←→</p> <p>←→</p> <p>←→</p> <p>←→</p>	<p>←→</p> <p>←→</p> <p>脳神経系ヒトへの応用の道を探る</p> <p>←→</p> <p>心疾患への応用の道を探る</p> <p>←→</p>