

厚生労働科学研究研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ナノイメージングによる分子の機能および  
構造解析に関する研究 (H14-ナノ-001)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 盛 英三

平成15年（2003年）3月

## 目次

### I. 総括研究報告

- ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析  
に関する研究 -----1  
盛 英三

### II. 分担研究報告

1. ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析  
分子機能イメージング(循環系)-----10  
望月直樹
2. 脳神経領域におけるナノレベルイメージングによる分子の機能解析  
に関する研究 -----13  
中村 俊
3. ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析  
分子構造イメージング(循環系)-----15  
盛 英三
4. ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析  
原子間力顕微鏡等を用いた分子の表面構造解析-----19  
土屋利江

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物別刷 (別添)

総括研究報告書

ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析

主任研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所 部長

**研究要旨** 循環器疾患、脳神経疾患等の制圧のためにナノテクノロジーを駆使して、病態の理解、早期診断法の開発、そして治療法の開発を推進することを目的とする。イメージングによる細胞内・組織での分子の機能の理解、分子の構造決定による構造生物学的アプローチによる創薬、さらにはこれらのナノテクノロジーに基づく臨床画像診断技術の開発、新規医用材料の開発を目指して研究を行った。

**分担研究者**

望月直樹 国立循環器病センター研究所 部長  
中村俊 国立精神神経センター 部長  
土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所 部長

カプセルを創製する。組織再生に有用なナノ表面官能基を明らかにし、新規組織工学材料を創製する。更に、材料と接触することで、変動する細胞中のマーカータンパク質群を見だし、その挙動を可視化する。

**A. 研究目的**

**1) 分子機能イメージング循環系**

GTP結合蛋白質Rasファミリー分子は細胞外からの入力を受容体とともに細胞内情報伝達へとスイッチする重要な分子である。また、細胞の運動を制御している細胞骨格系分子であるミオシンは細胞内の器官や蛋白質の輸送にかかわるモーター蛋白質でもある。循環器系の分子機能イメージングプロジェクトでは、分子Rasファミリー分子の活性化のイメージングによる機能解析とミオシン分子の運動調節機構のイメージングによる解析を行う。

**2) 分子機能イメージング神経系**

分子イメージングにより神経機能分子の合成、輸送、および分解の過程を解析し、タンパク質の異常な構造・動態変化の原因を解明することを目的に研究を行う。

**3) 分子構造イメージングx線回折**

心筋収縮タンパク調節分子、イオン交換輸送体調節因子複合体、プロスタグランジン関連タンパク等のタンパクの大量発現、精製、結晶化を行い、放射光x線回折法で結晶構造解析を行う。

**4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析**

原子間力顕微鏡、走査型トンネル顕微鏡による分子表面構造解析の有用性を示す。AFM観察により、水溶液中の生きたタンパク質を個別に観察し、1個の受容体と1分子の薬物との相互作用様式の測定を可能とする。ナノ粒子フレーザーを用いて合成ナノ

**B. 研究方法**

**1) 分子機能イメージング循環系**

**Ras活性化可視化プローブの作製と細胞内への導入方法の確立:** これまでの研究ですでにRas分子とRap1分子の活性化プローブには成功していた。これをpRaichu-RasとpRaichu-Rap1として報告した。さらに、導入可能な細胞を拡大するために、これらをAdenovirusをベクターとするプローブに改変した。Rhoファミリー分子活性化の可視化プローブの作製 - Raichu-Rhoの構造はRaichu-Rasを基本としている。Yellow Fluorescent Protein (YFP)、スパーサー、PKNのRho結合部位、Rho, Cyan Fluorescent Protein (CFP)を発現するキメラ分子である。さらにこの分子にFocal Adhesion Kinaseの接着斑ターゲットシグナルをカルボキシ末端に融合してRaichu-Rho分子を接着斑で発現する分子Raichu-Rho-FATを構築した。

細胞: Ras, Rap1, Rho分子の活性化の可視化には血管内皮細胞を用いた。本年度は細胞の自発的運動(コラーゲン上)とEphチロシンキナーゼ受容体の活性化により検討した。

**Raichu-Ras, Rap1, とRho, Rho-FATを用いたイメージング:** RaichuプローブをHAECにLipofectAMINE2000とLipofectAMINEPlus reagentを用いて導入した。導入後24時間以上経過し多細胞をにイメージングに用いた。CFPからYFPへのFluorescent Resonance Energy Transfer (FRET)の効率の評価はCFPの蛍光とYFPの蛍光を細胞から

同時測定し、その比 (YFP/CFP) をモニターすることで検出した。

**変異ミオシンの作製:** ミオシンの力発生原理を解明するために、特に721番目のフェニルアラニンをアラニンに置換した (F721) 変異ミオシンを作製した。

**ミオシンによるアクチンの滑走作用の測定:** カバーガラス上に固定した野生型ミオシンとY721F変異ミオシンのアクチンの滑走能力を調べた。アクチンはローダミンで染色して、フィラメントが蛍光顕微鏡で可視化した。滑走速度の測定はフィラメントの運動をビデオで撮影することにより可能である。

**変異ミオシンの構造変化を捉えるためのキメラ分子の作製:** ミオシン頭部にYFPを軽鎖にCFPを結合させた分子を作製し、バキュロウイルスによる感染でそれぞれの蛋白質を作製した。これを433nmで励起したときの蛍光を測定することでミオシンの頭部の構造変化を予想した。

## 2) 分子機能イメージング神経系

タンパク質の細胞内での構造・動態を明らかにするために、蛍光性のタグをもった神経機能分子を作製し、全反射型顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡 (1光子および2光子) を用いて解析した。また、in situ hybridization など組織化学的方法を用いて活性化ミクログリアにおいて発現が増強している分子の検索を行った。

## 3) 分子構造イメージングx線回折

### i) 心筋収縮タンパク調節分子

**変異Tn/Tmの調製:** ヒト心筋Tnサブユニット (TnT, TnIおよびTnC)、およびニワトリ及びウサギ骨格筋Tnサブユニットの大腸菌による大量発現系を使用した。これらの発現系を用い、結晶化に適した改変 (不安定な領域の切除、システイン残基のアラニン、セリンへの置換等) を行い、試料の大量調製を行った。

**結晶化:** 分子構造が未知である、TnのTm結合領域 (TnT1) に着目して、TnT1単体、Tm単体、TnT1/Tm複合体、及びTn全体を含むTn/Tm複合体の結晶化に取り組んだ。

**X線回折実験:** 得られた結晶について大型放射光 Spring-8の共用ビームライン (BL41XU) および理研ビームライン (BL45PX) を用いて回折データの収集を行った。

**構造解析:** TnT1単体結晶およびTm単体結晶について多波長異常分散 (MAD) 法による構造解析を進めている。Tn/Tm複合体結晶については分子置換法によ

る解析を進めた。

### ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

#### CHP/NHE複合体の発現:

タンパク質の発現は大腸菌発現ベクターであるpETの系を用いて行った。CHPを組み込んだ大腸菌のコンピタント細胞を調整し、この細胞にカナマイシン耐性pETにNHEのCHP結合部位断片 (アミノ酸503から545) を組み込んだベクターをトランスフォームし、両方のタンパク質を共発現する大腸菌を作成し、大量発現を行った。

### iii) プロスタグランジン関連タンパク

膜結合型PGE合成酵素 (mPGES) がmPGESが新しい薬剤の標的となることが確認された。本研究ではmPGESの大量発現、精製、結晶化を経て放射光x線回折による分子構造解析を目指す。

## 4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

AFMを用いたアルリカツメガエル卵母細胞表面観察では、P2X2プラスミドよりインビトロ合成したRNAを卵母細胞に注入し、18°Cでインキュベートした後AFM観察を行った。

包接化合物のデザインを分子力場計算を用いて行った。

ガラスに金蒸着後、各種チオール類を含むエタノール溶液で、メチル基、アミノ基、カルボキシル基および水酸基をもつ自己組織化膜 (SAM) を調製した。水酸基SAM材料から、Phosphoryl chlorideやDMF-SO3などで、燐酸基および硫酸基を導入し、接触角測定、ESCAによる表面元素解析による表面変化と官能基の確認を行った。

デイファレンシャルディスプレイ法にフォーカストプロテオミクスの概念を組み合わせ、ヒト皮膚繊維芽細胞に発現している膜タンパク質に焦点を当て、プロテオミクス手法で調べた。

## C. 研究結果

### 1) 分子機能イメージング循環系

**Raichu-Ras, Raichu-Rap1によるHAECのephrin刺激依存性活性化の可視化:** HAECを血清飢餓後に刺激すると細胞周辺部位でのラフリングが顕著に引き起こされ、Rap1の活性化がラフリング部位で観察できた。一方、Rasの活性化はephrinA1刺激ではおこらずにむしろ、不活性化されることがわかった。

**Raichi-Rho-FATによる細胞接着斑でのRho分子の活性化の可視化:** Rhoの可視化プローブを改変して接着斑でのみプローブが発現可能であった。エバネッセント顕微鏡を用いて、細胞底面の接着斑のみを可視化できるように工夫をした。Raichi-Rho-FATは細

胞が運動するとともに生じる接着斑の形成部位で活性化がおきることを反映していた。

**変異ミオシンの作製とアクチン滑走能の測定:** バキュロウイルスを用いて作製したミオシンの変異をシークエンスで確認した (F721A変異)。野生型ミオシンはアクチンの滑走能があるが、F721Aミオシンはアクチン滑走能がないことを確認した。

**変異ミオシンと野生型ミオシンのATP依存性頭部の構造変化の予想:** FRET解析から変異F721Aミオシンでは頭部の構造変化がおきていない可能性が強く示唆された。

## 2) 分子機能イメージング神経系

i) 脳由来神経栄養因子BDNFがイオンチャンネル型グルタミン酸受容体を神経活動依存的にシナプス部位へ輸送するために重要であることを見いだした。この輸送過程を可視化するために分子プローブを作製し、全反射型顕微鏡で観察した。

ii) プリオンタンパク質の細胞内動態を観察するために、GFPとのキメラタンパク質を培養細胞に強制発現した。デジタルビジョン蛍光顕微鏡下で、プリオンタンパク質が微小管にそって移動する様子が観察され、プリオン分子と細胞骨格との相互作用がはじめて明らかになった。

iii) ポリペプチド鎖が機能分子へと折り畳まれる過程を視覚化するために、タンパク質導入ペプチド (11残基のアルギニンからなる) を付加した蛍光タンパク質を作製し、変性後、細胞に取り込ませ、再び、蛍光性が回復することを観察することが出来た。

vi) 活性化ミクログリアがGi/o共役型のATP受容体P2Y12を介して走化性を示すことを明らかにした。さらに、この受容体の発現は顔面神経切断により上昇すること、しかし、マクロファージには発現しないことを明らかにした。

## 3) 分子構造イメージングx線回折

### i) 心筋収縮タンパク調節分子

**TnT1単体、Tm単体結晶:** それぞれ良好な回折能を有する結晶 (2-3.5オングストローム分解能) を得ることに成功し、構造解析を開始した。

**TnT1/Tm複合体結晶:** 再現良く結晶が得られたが、分解能7オングストローム程度と、構造解析に十分な回折データは未だ得られておらず、今後の結晶の改善が課題となる。

**Tn/Tm複合体結晶:** 既知のTnコアダメインおよび低分解能のTmの結晶構造をモデル分子として、分子置換法による解析を進めている。

**Tnコアダメイン:** Tnのコアダメイン2種について、

それぞれ2.6および3.3Å分解能で結晶構造を得た。

### ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

動的光散乱装置 (DLS) を用いて検討した結果、精製したサンプルは均一で、凝集もなく、測定された平均分子量 (約35 kD) もCHP/NHE複合体の理論値に近く、結晶化させようとするサンプルとしては極めて質の高いものであることがわかった。タンパク質の結晶化は、結晶化ロボットTERA (理研) を用いて進めている。また、NHEの機能解析においては、NHEのpHセンサーを制御する重要なアミノ酸残基 (Arg440/Gly455/Gly456) を同定した。

### iii) プロスタグランジン関連タンパク: 大腸菌を用いた膜結合型PGE合成酵素 (mPGES) 及びFLAPの遺伝子組換え体による大量発現系構築

① pET系発現ベクター (pET11, pET21a, pCW) の構築。

② 大腸菌で発現させ、ウエスタンブロットで確認。

③ 培養温度条件、IPTGなどの添加剤、シャペロンベクター、抗生物質による誘導など発現を上げる検討を行い、初期に比べると10倍以上の発現増加となった。

④ 上記の条件で、CBB染色で検出できる発現であったが、まだ安定していない。また同時にN末のアミノ酸を置換する変異体も数種類作成したが、発現量の増加は認められなかった。

⑤ mPGESの酵素活性を測定したところ、活性が検出されなかった。

⑥ さらに詳細に検討したところ、現在構築したmPGESには2カ所アミノ置換があることが判明したので、ワイルドタイプのcDNAを現在構築中。なお、FLAPに関しては、アミノ酸配列が完全に一致していることを確認した。

## 4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

i) P2X2受容体を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞の表面をAFMで観察する実験では、乾燥させた表面上に外径20nm、内径10nmほどの環状様の構造が見出された。この構造は密集してクラスターを形成しているように見受けられた。分子生物学的手法を用いたP2X2受容体の変異体作製において、これまでの実験結果から333番目のアスパラギン残基に着目した。その結果、アラニン置換による抑制効果の減弱から、カチオンとの静電的相互作用の減少が考えられた。負の電荷としてアルギニンをアスパラギン酸あるいはグルタミン酸で置換した。アスパラギン酸では、Ca<sup>2+</sup>、La<sup>3+</sup>による抑制効果は増強されたが、グルタミン酸では、殆ど変化しなかった。従って、抑制効果の強弱は、静電的な相互作用だけで

って、抑制効果の強弱は、静電的な相互作用だけではない。次に、333番目に、電気的に中性アミノ酸残基を導入した。その結果Ca<sup>2+</sup>による抑制効果は、グリシン>アラニン=バリン>ロイシン>イソロイシンと側鎖の大きさにほぼ従った。256番目のトリプトファンをロイシンに替えるとATPに対する電流応答は完全に消失した。256番目のトリプトファンはP2X2受容体のチャネル活性に必須であることが判明した。

ii) スイッチング機能を有するフラレンを内包する包接化合物をデザインするために、t-butyl基を有するアゾベンゼンを合成し、走査型トンネル顕微鏡 (STM) による単分子レベルでの構造変化の観察を試みている。

iii) ガラス表面に蒸着した金の厚みが増すほど、接触角が大きくなった。ガラス表面へのメチル基、リン酸基、硫酸基などの導入をESCAで確認した。各官能基を導入した表面の接触角は、ガラス<硫酸基<リン酸基<水酸基<カルボキシル基<アミノ基<メチル基の順に大きくなった。ヒト骨芽細胞をこれらの表面上で培養すると細胞の増殖度及び形態が異なった。培養1日目では、リン酸基表面では、細胞は丸く、硫酸基表面で細胞の伸展がおさえられていた。しかし、骨芽細胞の分化に関しては、アルカリフォスファターゼ活性およびカルシウム沈着量の増大が顕著であった。

vi) ヘパリン誘導体とbFGFの共存下、ヒト皮膚繊維芽細胞を培養し、2次元電気泳動で発現誘導されたスポットのタンパクをIn-gel Digestionし、得られた断片化ペプチドのMALDI-TOF/MSスペクトルをポジティブイオンモードで測定した。得られたデータをMASCOTのペプチドマスフィンガープリントモードに入力し、候補蛋白を検索した結果、Annexin IIが第一候補として出力された。

## D. 考察

### 1) 分子機能イメージング循環系

これまでの我々のデータではEGF刺激によるRap1の活性化は細胞内部でおきることがわかってきたが、本研究ではEphrin-A1による血管内皮細胞の刺激によりRap1が細胞内部で活性化することが明らかになった。このような細胞種・刺激の差異による分子活性化の空間的差異はイメージング技術により始めて明らかにされたものである。また、分子の活性化プローブを細胞内に導入しても細胞の形態や刺激に対する反応に影響を及ぼさないことも、明らかになった。ミオシンIIの力発生機構の解明を開始した。われわれは、変異ミオシンを使用することで、どこが力発生に不可欠かをイメージングで明らかにしようとしている。FRETを用い

たミオシン頭部構造の変化の測定や、アクチン滑走能の測定などを用いることでミオシンの力発生重要な構造機能を明らかにする。本研究ではすでにF721A変異により構造変化も、滑走能も消失することから、Relay loop とconverter部位の結合が力発生に不可欠であることを明らかにできた。今後、アクチンによるミオシンATPase活性の変化がおきていないかどうか、ミオシンのステップサイズの変化がおきていないか、また直接変異ミオシンの力を測定する計画である。

### 2) 分子機能イメージング神経系

1) 神経機能分子と蛍光性タンパク質のキメラタンパク質は機能分子の動態・構造変化をリアルタイムで観察するうえで極めて有効であり、この方法によって従来は見落とされていた現象を明らかにすることが出来た。

2) 神経機能分子を細胞レベルのみならず、個体レベルでも評価することのできる実験系の確立に取り組み、脳内への外来タンパク質の導入法、神経変性過程の生理学的解析法を確立した。

### 3) 分子構造イメージングx線回折

#### i) 心筋収縮タンパク調節分子

筋収縮制御機構については1970年代に提唱された立体障害仮説がいまだに有力であるが、最近それに反する実験データが発表されつつある。Tnコアダメインの結晶構造から導き出されたのはTnへのカルシウム結合が従来の説とは異なるTmの構造変化を誘起する可能性である。本質の解明にはTn/Tm複合体の結晶構造解析が重要であり、各サブドメインの高分解能の結晶構造が必須となる。筋肉の収縮弛緩は細胞内カルシウムイオン濃度により制御されている。その制御機構はカルシウム結合タンパク質トロポニン(Tn)・トロポミオシン(Tm)複合体が本質的な役割を担っている。

#### ii) イオン交換輸送体調節因子複合体:

今年度は結晶化に適したCHP/NHE複合体を大量精製することに成功した。この過程で、CHPを単独で発現させた場合、他の大腸菌のタンパク質との非特異的吸着が起こること、良質のタンパク質を得るためにはCHPとNHE両タンパク質を共発現することが重要であることがわかった。

#### iii) プロスタグランジン関連タンパク

現在の組み換え蛋白質は可溶性膜分画と不溶性画分に蛋白質が蓄積している。そこで可溶性分画を増加させる条件を検討とともに、不溶性画分から可溶性についても検討する。大量発現の確立後、mPGES及びFLAPの組み換え蛋白質の精製条件を決定し、結

晶化に必要な高純度の精製蛋白標品を精製する。

#### 4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

i) 大腸菌を利用したATP受容体タンパク質発現・精製法の検討では、ヒスチジンタグをつけたタンパク質の発現を確認できた。現在アフリカツメガエル卵母細胞を利用した精製法を検討中である。ATP受容体を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の表面観察では、乾燥させた表面上に外径20nmほどの環状様の構造が見いだされた。これはこれまでに報告されているニコチン様アセチルコリン受容体などのチャンネルの外径とほぼ一致している。この程度の大きさの膜タンパク質がAFMで観察可能であることが示された。

ii) 光増感ナノ粒子フラーレンの活性酸素種は、有機溶媒中では、一重項酸素、水溶液中では、還元型活性酸素ラジカル種を生成し、生体内では生体分子に反応性の高い活性酸素種の生成が示唆された。光抗菌活性も確認されたことより、フラーレンが光増感型抗菌医療材料として有用である。

iii) 各種官能基を導入した表面上にヒト正常骨芽細胞を播種し、観察したところメチル基表面では、細胞は付着しにくく凝集した。ヒト骨芽細胞は燐酸基と硫酸基表面で分化を著しく促進した。細胞接着に関わるタンパク質類の表面への接着挙動やその状態を、AFM等を利用した手法を用いてナノレベルで解析し、新規材料を開発する。

vi) ヒト皮膚繊維芽細胞は、あらたな治療効果が期待されるヘパリン誘導体とbFGF共存下において、複数の蛋白質群を発現誘導した。中性から酸性領域の蛋白質の変動は比較的少なく、Annexin IIなどの塩基性蛋白質の発現量が著しく増加した。これらの蛋白質の同定が正しいかどうか、各蛋白質に対する抗体を用いて、ウェスタンブロット法で調べる必要がある。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 結論

##### 1) 分子機能イメージング循環系

情報伝達系分子Rasファミリー分子の活性化の可視化による機能解析を血管内皮細胞で開始し、変異ミオシンを用いて力発に不可欠な構造の一部を明らかにした。

##### 2) 分子機能イメージング神経系

神経機能分子のイメージングにより、プリオンタンパク質が微小管と相互作用して、細胞内を移動することを明らかにした。また、いったん変性したタン

パク質が細胞内でふたたび高次構造を回復する過程を視覚化することにも成功した。これらのタンパク質分子の細胞および、個体レベルでの機能を評価するための実験系の確立にとりくみ、運動神経軸変性過程の電気生理学的解析法および顔面神経切断による細胞の変性・再生モデルなどを確立した。

##### 3) 分子構造イメージングX線回折

心筋収縮タンパク調節分子に関しては、TnとTmの相互作用の詳細、すなわちTn/Tm複合体の結晶構造を解明することで、筋収縮制御機構の本質的な問題に迫れるであろう。

イオン交換輸送体調節因子複合体に関しては結晶構造解析の第一歩として、タンパク質の大量発現・大量精製に成功した。また、また機能解析では、NHEの細胞内pH制御に重要なアミノ酸残基を同定した。

プロスタグランジン関連タンパクに関しては膜結合型PGE合成酵素(mPGES)、5リポキシゲナーゼ活性化蛋白質(FLAP)などいくつかの候補蛋白質のcDNAクローニングを行い、大腸菌で多量に発現させるための系を構築した。現在、X線構造解析にむけて大量発現の条件を検討中である。

##### 4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

AFM観察に必要な構造を有するATP受容体タンパク質を発現/精製するためには、大腸菌発現系の利用は困難であり、真核細胞の利用が望ましい。チャンネル受容体の大きさのタンパク質がAFMで観察可能であること。チャンネル開口部の残基がカルシウム接近の立体障害となること。細胞外領域の保存性の高いトリプトファン残基がチャンネル活性に必須であることが示された。

顕著な微生物成長阻害を示すC60を母核とする新規ナノカプセルを合成中である。

金蒸着表面に自己組織化膜を利用して6種類の官能基を持つ表面を作製した。その表面上で、正常ヒト骨芽細胞を培養した結果、第一に燐酸基表面で、第二に硫酸基表面が著しく骨分化を促進した。

治療効果を期待できる培養条件でAnnexin II等の顕著な発現をプロテオミクス手法で明らかにした。材料開発への応用が期待される。

#### G. 研究発表

##### 1) 分子機能イメージング循環系

###### 1. 論文発表

- ① Nagashima KI, Endo A, Ogita H, Kawana A, Yamagishi A, Kitabatake A, Matsuda M,

Mochizuki N. Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4231-4242, 2002

- ② Onishi H, Ohki T, Mochizuki N, Morales MF Early stages of energy transduction by myosin: roles of Arg in switch I, of Glu in switch II, and of the salt-bridge between them. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15339-15344, 2002

## 2. 学会発表

特になし。

### 2) 分子機能イメージング神経系

#### 1. 論文発表

- ① Katagiri T, Sakakibara A, Takahashi T, Nakamura S, Hattori S: Ack1 upregulates integrin-mediated adhesion of T cells upon TCR stimulation, *J. Biol. Chem.* in press
- ② Koshiba M, Kikuchi T, Yohda M, Nakamura S: Inversion of the anatomical lateralization of chick thalamofugal visual pathway by light experience, *Neurosci. Lett.* 318: 113-118, 2002
- ③ Hoshino M, Nakamura S: The Ras-like small GTP-binding protein Rin is activated by growth factor stimulation, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 295: 651-656, 2002
- ④ Ohsaki K, Osumi N, Nakamura S: Altered whisker patterns induced by ectopic expression of Shh are topographically represented by barrels, *Developmental Brain Res.* 137: 159-170, 2002
- ⑤ Koshiba M, Nakamura S, Deng C, Rogers LJ: Light-dependent development of asymmetry in the ipsilateral and contralateral thalamofugal visual projections of the chick, *Neurosci. Lett.* 336: 81-84, 2002
- ⑥ Korth C, Kaneko K, Groth D, NHeye N, Telling G, Matrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to mice expressing a novel chimeric prion protein transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* in press
- ⑦ Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: Two-Dimensional Electrophoresis/Phage Panning (2D-PP): A Novel Technology for Direct Antibody Selection on 2-D Blots. *J. Biochem (Tokyo).* 132: 245-251, 2002
- ⑧ Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: In Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components in situ. *J. Biol. Chem.* 277: 30382-30387, 2002
- ⑨ Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC: Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 13079-13084, 2002
- ⑩ Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature.* 412: 739-743, 2001
- ⑪ Laws DD, Bitter HM, Liu K, Ball HL, Kaneko K, Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE: Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 11686-11690, 2001
- ⑫ Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T: Ceramide activates microglia to enhance the production / secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) without induction of deleterious factors in vitro. *J. Neurochem.* 80:697-705, 2002
- ⑬ Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y: Macrophage/microglia-specific protein Ibal enhances membrane ruffling and Rac Activation via phospholipase C- $\gamma$ -dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 277:20026-20036, 2002
- ⑭ Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K: Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci.* 22(21):9228-9236, 2002
- ⑮ Koizumi S, Saito Y, Nakazawa K, Nakajima K, Sawada JI, Kohsaka S, Illes P, Inoue K: Spatial and temporal aspects of Ca<sup>2+</sup> signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes. *Life Sci.* 20;72(4-5): 431-442, 2002

## 2. 学会発表

特になし。



### 3) 分子構造イメージングx線回折

#### 1. 論文発表

#### 1. 論文発表

- ① S. Wakabayashi, et al.: Two Fundamental Regulatory Factors of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers: The Proton and CHP. In "The Sodium-Hydrogen Exchange. From Molecule to its Role in Disease" Kluwer Academic Publishers(in press), 2003
- ② S. Wakabayashi, et al.: Evidence for involvement of the putative first extracellular loop in differential volume-sensitivity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers NHE1 and NHE2. *Biochemistry* 42:1086-1094, 2003
- ③ S. Wakabayashi, et al.: Expression of Calcineurin B Homologous Protein 2 Protects Serum Deprivation-Induced Cell Death by Serum-Independent Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Biol. Chem.* 277: 43771-43777, 2002
- ④ S. Wakabayashi, et al.: Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 Oppositely Change pH-Sensing of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE1. *J. Biol. Chem.* 2003, in press.
- ⑤ H. Inoue, Y. Taba, Y. Miwa, C. Yokota, M. Miyagi, T. Sasaguri: Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Fluid Shear Stress in Vascular Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 11415-11450, 2002
- ⑥ B. Glinghammar, H. Inoue, J. J. Rafter: Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1. *Carcinogenesis*, 23:839-845, 2002
- ⑦ S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda, and Y. Maeda: Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca<sup>2+</sup>-saturated form. *Nature In press.*
- ⑧ E. Sato, H. Mori, et al: Quasi-monochromatic parallel radiography achieved with a plane-focus x-ray tube. *SPIE*(in press) 2003
- ⑨ H. Kasahara, H. Mori: Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of FGF4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia. *J. Am. Coll Cardiol*, 41:1056-1062, 2003

- ⑩ E. Sato, H. Mori, et al: Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-x-ray laser generator. *Physics of Medical Imaging* 4682: 538-548, 2002
- ⑪ T. Kawada, H. Mori, et al.: Disruption of vagal efferent axon and nerve terminal function in the postischemic myocardium. *Am J Physiol* 283: H2687-2691, 2002
- ⑫ N. Nagaya, H. Mori, et al.: Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am. J. Physiol* (in press), 2003
- ⑬ T. Pearson, H. Mori, et al: Future Investigations of Micro-Macro Level Cardiac Functions Using X-ray Diffraction. *BME* 16:29-35, 2002

#### 2. 学会発表

- ① S. Takeda, et al: Crystal structure of troponin ternary complex *Biophys. J.* 82: 170a, 2002
- ② 武田壮一: 筋収縮・制御機構の新しい視点ー1 分子生理からシステムへー「ヒト心筋トロポニンの結晶構造」: 第80回日本生理学会、シンポジウム
- ③ 南方志帆、武田壮一、若林克三、前田雄一郎: 「トロポニンT1/トロポミオシン複合体の結晶化」: 第40回日本生物物理学会年会
- ④ 武田壮一、山下敦子、前田佳代、前田雄一郎: 「トロポニン三量体の結晶構造と筋収縮制御機構のモデル」: 第40回日本生物物理学会年会
- ⑤ 井上裕康: 核内受容体PPARを介する誘導型シクロオキシゲナーゼの発現調節に関する研究: 第54回日本ビタミン学会(2002)(学会奨励賞受賞講演)
- ⑥ 井上裕康、田場洋二、三輪宜一、宮城めぐみ、笹栗俊之: 血管内皮細胞における誘導型シクロオキシゲナーゼ発現のずり応力による誘導機構: 第75回日本生化学会(2002)
- ⑦ 井上裕康, Xiao-Fan Jiang, 長田志帆, 梅園和彦, 名村尚武: 赤ワインに含まれるポリフェノール・レスベラトロールはPPARの活性化によって脳卒中から脳を守る: 第25回日本分子生物学会(2002)
- ⑧ 西浦直亀他: 多層心筋モデルのx線回折について: 第80回日本生理学会大会(2003)
- ⑨ J. T. Pearson他: ラット左室心筋におけるクロ

スプリッジ動態のin situ 評価：第80回日本生理学会大会(2003)

- ⑩ 盛 英三他：循環器疾患制圧に向けたナノメダイシンの開発：第26回日本医学会総会学術講演会(シンポジウム：ナノテクノロジーと医療)(2003)

#### 4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

##### 1 論文発表

- ① K. Nakazawa, H. Ojima, Y. Ohno, A highly conserved tryptophane residue indispensable for cloned rat neuronal P2X receptor activation. *Neurosci. Lett.* Elsevier, 324:141-144, 2002
- ② K. Sato, N. Matsuki, Y. Ohno, K. Nakazawa, Effects of 17beta-estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in the organotypic hippocampal culture. *Neuroendocrinology*, 76:223-234, 2002
- ③ K. Nakazawa, H. Sawa, H. Ojima, R. Ishii-Nozaw, aK. Takeuchi, Y. Ohno, Size of side-chain at channel pore mouth affects Ca<sup>2+</sup> block of P2X<sub>2</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 449:207-211, 2002
- ④ Takahashi, T., Yamakoshi, Y., Ge, W.-Y. Sugita, J. Okayama, K. Koizumi, T. High-Pressure Mediated Asymmetric Diels-Alder Reaction of Chiral Sulfinyl Acrylate Derivatives and Its Application to Chiral Synthesis of (-)-COTC and (-)-Gabosine C, *The Japan Institute of Heterocyclic Chemistry*, 56: 209 - 220, 2002
- ⑤ Kai, Y., Komazawa, Y., Miyajima, A.; Miyata, N.; Yamakoshi, Y. \* [60] Fullerenes as a Novel Photoinduced Antibiotic, *Marcel Dekker, Inc.* 11, 79-87, 2003
- ⑥ Nakakoka, R., Tsuchiya, T, Akitada Nakamura, Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films, *J. Biomed. Mater. Res* 62, Inpress.
- ⑦ Nakakoka, R., Tsuchiya T, Biocompatibility of various kinds of polymer microspheres Estimated from their effects on Gap junctional intercellular communication of fibroblasts. *Materials Transactions*, 43, 3122-3127, 2002
- ⑧ Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, Studies on the tumor promoting mechanism of hard and soft segment models of polyetherurethane: Tyr265 phosphorylation of connexin43 is a key step in the GJIC inhibitory reaction induced by polyetherurethane. *J. Biomed Mater Res.* 62:157-162, 2002
- ⑨ Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya: Increase in Gap Junctional Intercellular communication by High Molecular Weight Hyaluronic Acid Associated with FGF-2-and KGF-Production in Normal Human Dermal Fibroblasts. *TISSUE ENGINEERING*, 8:419-427, 2002
- ⑩ Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya Effect of  $\gamma$ -ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 13: 153-166, 2002
- ⑪ Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya Increase in gap-junctional intercellular communications (GJIC) on normal human dermal fibroblasts (NHDF) on surfaces coated with high molecular weight hyaluronic acid (HMWHA) *J. Biomedical Materials Research*, 8, 419-427, 2002
- ⑫ Sumide, T. & Tsuchiya, T. Effects of multi-purpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J. Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 64B, 57-64, 2003
- ⑬ Toshie Tsuchiya, Yuka Itahashi, Studies on the biocompatibility of artificial organs and Tissue engineered products: Embryonic neuronal cell differentiation on the various kinds of biodegradable polymers. *Animal Cell Technology*, 12, 253-256, 2002
- ⑭ Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes. *Animal Cell Technology*, 12: 235-239, 2002
- ⑮ Jeongung Park, and Toshie Tsuchiya, Tumor-Promoting Activity of 48 kDa Molecular Mass Hyaluronic Acid. *Materials Transactions*, 43: 3128-3130, 2002

##### 2 学会発表

- ① 中澤憲一、生島裕恵、野澤玲子、竹内幸一、大野泰雄：P2X<sub>2</sub>受容体細胞外領域の高保存性トリプトファン残基のチャネル活性化における必要性：第76回日本薬理学会年会(2003.3)

- ② 生島裕恵、中澤憲一、野澤（石井）玲子、竹内幸一、大野泰雄： P2X2受容体活性化における細胞外ループ内ジスルフィド結合近隣アミノ酸の役割：第76回日本薬理学会年会（2003.3）
- ③ Nishikawa, K., Tominaga, N., Yamakoshi, Y., Otomo, R. The 10<sup>th</sup> International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. (Vancouver, 11-16, June, 2002) Change of Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in Chlamydomonas acidophila.
- ④ 山越葉子、甲斐陽子、宮島敦子、土屋利江： フラーレン(C<sub>60</sub>)の微生物増殖阻害活性について： 日本薬学会第123年会。（長崎 27-29 March 2003.）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

分担研究者 国立循環器病センター研究所循環器形態部 望月直樹 部長

**研究要旨** 情報伝達系分子と細胞骨格系分子の分子調節メカニズムをイメージング技術により解明することを目的として研究を開始した。特に情報伝達系分子ではRasファミリー分子の活性化の可視化を行った。細胞骨格系ではリコンビナントミオシンを作製し、アクチンのすべり運動について重要な部位決定を行った。

#### A. 研究目的

細胞は分子間の相互作用やリン酸化が精密に情報の交換や運動を制御していると考えられている。特に情報伝達系では分子の活性化メカニズムは複雑にクロストークしているが、重要なことは細胞内のどこでどのくらいの間分子の活性化が起こっているかである。この情報伝達系なかでもGTP結合蛋白質Rasファミリー分子は細胞外からの入力を受容体とともに細胞内情報伝達へとスイッチする重要な分子である。また、細胞の運動を制御している細胞骨格系分子であるミオシンは細胞内の器官や蛋白質の輸送にかかわるモーター蛋白質でもある。本研究では、特にこの二つの分子Rasファミリー分子の活性化のイメージングによる機能解析とミオシン分子の運動調節機構のイメージングによる解析を目的としている。Rasファミリー分子の活性化は癌や心筋肥大の原因とも考えられミオシン分子の収縮以上は心筋症や感覚器異常(難聴)の原因ともなっている。

#### B. 研究方法

**Ras活性化可視化プローブの作製と細胞内への導入方法の確立**—これまでの研究ですでにRas分子とRap1分子の活性化プローブには成功していた。これをpRaichu-RasとpRaichu-Rap1として報告した。このプローブを研究対象とするすべての細胞に導入可能にするためにアデノウイルスを用いて同プローブを発現できるようにした。Adenovirus-Raichu-Ras, Adenovirus-Raichu-Rap1とした。血管内皮細胞は通常プラスミドでの導入効率が悪いためにアデノウイルスを用いた。

**Rhoファミリー分子活性化の可視化プローブの作製**—Raichu-Rhoは構造はRaichu-Rasを基本としている。Yellow Fluorescent Protein (YFP)、スペーサー、PKNのRho結合部位、Rho, Cyan Fluorescent

Protein (CFP)を発現するキメラ分子である。さらにこの分子にFocal Adhesion Kinaseの接着斑ターゲットシグナルをカルボキシ末端に融合することでRaichu-Rho分子を接着斑で発現する分子Raichu-Rho-FATを構築した。Rho分子の活性化プローブの基本骨格は大阪大学微生物病研究所(松田教授)より提供された。

細胞—Ras, Rap1, Rho分子の活性化の可視化には血管内皮細胞を用いた。本年度は細胞の自発的運動(コラーゲン上)とEphチロシンキナーゼ受容体の活性化により検討した。血管内皮細胞はヒト大動脈血管内皮細胞(HAECs)をCascaido Biologics社より購入し使用した。HAECはクラボウ社のHumedia-2を使用した。蛋白質発現の確認のために293T細胞に構築したRaichu-Rho, Raichu-Rho-FATをトランスフェクションして細胞溶解液をイムノプロット(抗GFP抗体)で検出した。293T細胞はBJ. Mayer博士(コネチカット大学)より提供していただいた。抗GFP抗体は松田教授より供与された。

**Raichu-Ras, Rap1, とRho, Rho-FATを用いたイメージング**—RaichuプローブをHAECに

LipofectAMINE2000とLipofectAMINEPlus reagentを用いて導入した。導入後24時間以上経過し多細胞をにイメージングに用いた。オリンパスIX81倒立型蛍光顕微鏡にCoolSNAP HQ CCDカメラと二つのフィルター交換器を装備した装置を用いた。CFPからYFPへのFluorescent Resonance Energy Transfer (FRET)の効率はCFPの蛍光とYFPの蛍光を細胞から同時に測定し、その比(YFP/CFP)をモニターすることで検出した。血清飢餓状態に4時間以上おいて刺激前の細胞でのFRETを測定しEphrin-A1による刺激によるFRETの変化を調べた。また、Raichu-Rho-FATによるRhoの活性化はコラーゲンコ

ートの培養皿上を運動するHAEC内の蛍光(接着斑での)をCFP/YFPをそれぞれ測定することでFRETを調べた。

**変異ミオシンの作製**—ミオシンの力発生原理を解明するためには構造解析から予想されるRelay loopとconverter部位の結合にかかわる分子がATPase分解のエネルギーを物理エネルギーに変換して伝えるのに重要である。このため本年度は特に721番目のフェニルアラニンアラニンに置換した(F721)変異ミオシンを作製した。変異ミオシンはバキュロウイルスを用いてミオシン軽鎖とともにSf-9細胞に発現することで精製した。

**ミオシンによるアクチンの滑走作用の測定**—カバーガラス上に固定した野生型ミオシンとY721F変異ミオシンのアクチンの滑走能力を調べた。アクチンはローダミンで染色して、フィラメントが蛍光顕微鏡で可視化した。滑走速度の測定はフィラメントの運動をビデオで撮影することにより可能である。蛍光顕微鏡はローダミンによる蛍光補足できるフィルターセットにしたオリンパスIX70倒立型顕微鏡を用いた。ミオシンのATPase活性に温度の変化が影響をおきないように顕微鏡は保温箱で25°Cに一定に保った。

**変異ミオシンの構造変化を捉えるためのキメラ分子の作製**—ミオシン頭部にYFPを軽鎖にCFPを結合させた分子を作製し、バキュロウイルスによる感染でそれぞれの蛋白質を作製した。この蛋白質は精製過程とともに精製可能である。これを433nmで励起したときの蛍光を測定することでミオシンの頭部の構造変化を予想した。

### C. 研究結果

**Raichu-Ras, Raichu-Rap1によるHAECのEphrin刺激依存性活性化可視化**: HAECを血清飢餓後に刺激すると細胞周辺部位でのラップリングが顕著に引き起こされた。これはRasの活性化あるいはRap1の活性化のいずれかによるものかを可視化したところ、Rap1の活性化がラップリング部位で観察できた。一方、Rasの活性化はEphrinA1刺激ではおこらずにむしろ、不活性化されることがわかった。また、この不活性化が細胞の内部でおきることが明らかになった。

**Raichi-Rho-FATによる細胞接着斑でのRho分子の活性化の可視化**—Rhoの可視化プローブを改変して接着斑でのみプローブが発現可能であった。またこのプローブはイムノブロットの結果からYFPからFATシグナルまでのキメラを全長発現していることを確認できた。エバネッセント顕微鏡を用いて、細胞

底面の接着斑のみを可視化できるように工夫をした。Raichu-Rho-FATは細胞が運動するとともに生じる接着斑の形成部位で活性化がおきていることを反映していた。これはFRETの測定を行うと同部位での効率が高いことから証明された。

**変異ミオシンの作製とアクチン滑走能の測定**—バキュロウイルスを用いて作製したミオシンの変異は、導入前に作製したウイルス作製前のプラスミドのシーケンスで確認した。F721A変異がおきていることは確認できた。野生型ミオシンはアクチンの滑走能があるが、F721Aミオシンはアクチン滑走能がないことを明らかにした。

**変異ミオシンと野生型ミオシンのATP依存性頭部の構造変化の予想**—YFPタグ付き野生型ミオシンとCFPタグ付きミオシン軽鎖のYFP-CFP間のFRETはATPにより生じるが、YFPタグ付きF721A変異ミオシンとCFPタグ付きミオシン軽鎖のYFP-CFP間のFRETはATP添加によっても起きないことが判明した。このことは変異F721Aミオシンでは頭部の構造変化がおきていない可能性が強く示唆された。

### D. 考察

分子の機能は細胞を溶かして行うことでは予想できないことがある。活性化が細胞のどこで生じようとも、可溶化した標品を用いて調べているかぎりでは空間的情報は得られない。イメージングによる機能解析の有利な点は特にこの点にあると考えている。

これまでの我々のデータではEGF刺激によるRap1の活性化は細胞内部でおきるということがわかっていて、本研究ではEphrin-A1による血管内皮細胞の刺激によりRap1が細胞内部で活性化することが明らかになった。このような細胞種・刺激の差異による分子活性化の空間的差異はイメージング技術により始めて明らかにされたものである。また、分子の活性化プローブを細胞内に導入しても細胞の形態や刺激に対する反応に影響を及ぼさないことも、明らかになったので、今後ともさまざまな分子の活性化の可視化プローブを用いて、情報伝達分子の機能解析を行っていく予定である。

ミオシンはモーター分子としてこれまで10数種のミオシンが明らかにされてきている。本研究ではそのなかでもっとも研究が進んでいるミオシンIIの力発生機構の解明を開始した。特にATP分解による化学エネルギーを力発生という物理エネルギーに変換する機構は解明が待たれている。われわれは、変異ミオシンを使用することで、どこが力発生に不可欠かをイメージングで明らかにしようとしている。FRETを用いたミオシン頭部構造の変化の測定や、アクチン

滑走能の測定などを用いることでミオシンの力発生重要な構造機能を明らかにする。本研究ではすでにF721A変異により構造変化も、滑走能も消失することから、Relay loop とconverter部位の結合が力発生に不可欠であることを明らかにできた。今後、アクチンによるミオシンATPase活性の変化がおきていないかどうか、ミオシンのステップサイズの変化がおきていないか、また直接変異ミオシンの力を測定する計画である。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 結論

情報伝達系分子Rasファミリー分子の活性化の可視化による機能解析を血管内皮細胞で開始し、変異ミオシンを用いて力発に不可欠な構造の一部を明らかにした。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Nagashima KI, Endo A, Ogita H, Kawana A, Yamagishi A, Kitabatake A, Matsuda M, Mochizuki N. Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. **Mol. Biol. Cell.** 13: 4231-4242, 2002

(2) Onishi H, Ohki T, Mochizuki N, Morales MF Early stages of energy transduction by myosin: roles of Arg in switch I, of Glu in switch II, and of the salt-bridge between them. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 15339-15344, 2002

##### 2. 学会発表

特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

脳神経領域におけるナノレベルイメージングによる分子の機能解析に関する研究

分担研究者 中村 俊 国立精神・神経センター 神経研究所診断研究部長

**研究要旨** 神経伝達物質受容体チャンネルおよびプリオンの細胞内輸送を一分子イメージングにより解析した。また、ユビキチンシステムによって分解される蛍光性タンパク質の細胞内における構造変化を視覚化した。さらに、ミクログリアの活性化にともなうアデノシン受容体の発現増加を明らかにした。この研究によって、神経機能分子の合成、輸送、活性化および分解過程の異常によって引き起こされる神経変性疾患の病因解明および診断、治療法の開発が期待される。

#### A. 研究目的

神経変性疾患は神経機能分子の合成、輸送、および分解過程の病変により、タンパク質の異常な蓄積が生ずるために引き起こされると考えられているが、その素過程は不明である。我々は、神経機能分子のイメージングによりこれらの素過程を解析し、タンパク質の異常な構造・動態変化の原因を解明することを目的に研究を行う。この研究により神経変性疾患の病因解明および診断、治療法の開発がすすむものと期待される。

#### B. 研究方法

タンパク質の細胞内での構造・動態を明らかにするために、蛍光性のタグをもった神経機能分子を作製し、全反射型顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡（1光子および2光子）を用いて解析した。また、in situ hybridization など組織化学的方法を用いて活性化ミクログリアにおいて発現が増強している分子の検索を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験はすべて国立精神・神経センターの実験動物倫理規定にもとづいて行われた。

#### C. 研究結果

1) 脳由来神経栄養因子 BDNF がイオンチャンネル型グルタミン酸受容体を神経活動依存的にシナプス部位へ輸送するために重要であることを見いだした。この輸送過程を可視化するために分子プローブを作製し、観察装置としては全反射型顕微鏡をセットアップすることができた。  
2) プリオンタンパク質の細胞内動態を観察するために、GFP とのキメラタンパク質を培養細胞に強制発現した。デジタルビジョン蛍光顕微鏡下で、プリオンタンパク質が微小管にそって移動する様子が観察され、プリオン分子と細胞骨格との相

互作用がはじめて明らかになった。

3) ポリペプチド鎖が機能分子へと折り畳まれる過程を視覚化するために、タンパク質導入ペプチド（11残基のアルギニンからなる）を付加した蛍光タンパク質を作製し、変性後、細胞に取り込ませ、再び、蛍光性が回復することを観察することが出来た。さらに、このタンパク質をマウス腹腔内に投与すると脳内へも移行することが確認された。

4) 活性化ミクログリアが Gi/o 共役型の ATP 受容体 P2Y12 を介して走化性を示すことを明らかにした。さらに、この受容体の発現は顔面神経切断により上昇すること、しかし、マクロファージには発現しないことを明らかにした。従って、この受容体発現はミクログリア活性化の選択的指標として有意義であることが示唆された。

#### D. 考察

1) 神経機能分子と蛍光性タンパク質のキメラタンパク質は機能分子の動態・構造変化をリアルタイムで観察するうえで極めて有効であり、この方法によって従来は見落とされていた現象を明らかにすることが出来た。

2) 神経機能分子を細胞レベルのみならず、個体レベルでも評価することのできる実験系の確立に取り組み、脳内への外来タンパク質の導入法、神経変性過程の生理学的解析法を確立した。

#### E. 結論

神経機能分子のイメージングにより、プリオンタンパク質が微小管と相互作用して、細胞内を移動することを明らかにした。また、いったん変性したタンパク質が細胞内でふたたび高次構造を回復する過程を視覚化することにも成功した。これらのタンパク質分子の細胞および、個体レベルでの機能を評価するための実験系の確立にとりくみ、運動神経軸策変性過程の電気生理学的解析

法および顔面神経切断による細胞の変性・再生モデルなどを確立した。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Katagiri T, Sakakibara A, Takahashi T, Nakamura S, Hattori S: Ack1 upregulates integrin-mediated adhesion of T cells upon TCR stimulation, *J. Biol. Chem.* in press
- ② Koshiha M, Kikuchi T, Yohda M, Nakamura S: Inversion of the anatomical lateralization of chick thalamofugal visual pathway by light experience, *Neurosci. Lett.* 318: 113-116, 2002
- ③ Hoshino M, Nakamura S: The Ras-like small GTP-binding protein Rin is activated by growth factor stimulation, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 295: 651-656, 2002
- ④ Ohsaki K, Osumi N, Nakamura S: Altered whisker patterns induced by ectopic expression of Shh are topographically represented by barrels, *Developmental Brain Res.* 137: 159-170, 2002
- ⑤ Koshiha M, Nakamura S, Deng C, Rogers LJ: Light-dependent development of asymmetry in the ipsilateral and contralateral thalamofugal visual projections of the chick, *Neurosci. Lett.* 336: 81-84, 2002
- ⑥ Korth C, Kaneko K, Groth D, NHeye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to mice expressing a novel chimeric prion protein transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* in press
- ⑦ Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: Two-Dimensional Electrophoresis/Phage Panning (2D-PP): A Novel Technology for Direct Antibody Selection on 2-D Blots. *J. Biochem (Tokyo).* 132: 245-251, 2002
- ⑧ Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: In Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components in situ. *J. Biol. Chem.* 277: 30382-30387, 2002
- ⑨ Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC: Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 13079-13084, 2002
- ⑩ Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature.* 412: 739-743, 2001
- ⑪ Laws DD, Bitter HM, Liu K, Ball HL, Kaneko

K, Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE: Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 11686-11690, 2001

⑫ Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T: Ceramide activates microglia to enhance the production / secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) without induction of deleterious factors in vitro. *J. Neurochem.* 80:697-705, 2002

⑬ Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y: Macrophage/microglia-specific protein Ibal enhances membrane ruffling and rac Activation via phospholipase C-γ-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 277:20026-20036, 2002

⑭ Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K: Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration.

*J. Neurosci.* 22(21):9228-9236, 2002

⑮ Koizumi S, Saito Y, Nakazawa K, Nakajima K, Sawada JI, Kohsaka S, Illes P, Inoue K: Spatial and temporal aspects of Ca<sup>2+</sup> signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes. *Life Sci.* 20;72(4-5): 431-442, 2002

2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



分担研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

**研究要旨** 循環器疾患関連分子の分子構造を放射光x線回折法（Spring8との共同研究）により解明することを目的として研究を開始した。解析の対象とした分子は心筋収縮タンパク調節分子、イオン交換輸送体調節因子複合体、プロスタグランジン関連タンパク、細胞内情報伝達関連タンパクなどである。

（研究協力者：若林繁夫、井上裕康、武田壮一）

## A. 研究目的

以下に構造解析の対象となるタンパク分子ごとにその研究背景と意義を以下に要約する。いずれの構造解析も将来の創薬をにらんだものである。

### 1) 心筋収縮タンパク調節分子

筋肉の収縮弛緩は細胞内カルシウムイオン濃度により制御されている。その制御はカルシウム結合タンパク質トロポニン（Tn）・トロポミオシン（Tm）複合体が本質的な役割を担っており、モータータンパク質ミオシンとアクチン繊維との相互作用、すなわち滑り運動を制御している。本研究ではこの制御機構の分子メカニズム、心筋症の発症原因等を理解するために、Tn/Tm複合体の結晶構造の解明を目指す。

### 2) イオン交換輸送体調節因子複合体

細胞膜を介するCa<sup>2+</sup>、H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>などのイオン輸送を担うトランスポーターやチャンネルは循環器系組織に極めて重要で、その異常は重篤な疾患を招く。とりわけNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体（NHE）は虚血性心疾患や慢性心臓疾患に関与するとされる重要なタンパク質である。私達は最近、NHEに結合するCa<sup>2+</sup>結合タンパク質の一つ、カルシニユリン様タンパク質CHPがNHEの活性制御に重要であることを発見した。CHP/NHE複合体の結晶構造ならびに分子の機能を解析する。

### 3) プロスタグランジン関連タンパク

シクロオキシゲナーゼ（COX）はプロスタグランジン産生の律速酵素で、アスピリンをはじめとする非ステロイド性抗炎症薬の標的分子として広く認められている。COXには現在、COX-1とCOX-2の2種類のアイソザイムが存在するが、COX-2に選択的な阻害剤が開発され、COX-1活性阻害に由来する副作用の少ない新しい抗炎症薬として欧米で広く処方され

ている。我々はCOX-2にも生理学的役割があることを明らかに、我々はCOX-2の発現がPPARによって制御されることを明らかにしてきた。しかしながらその分子機構については、非ステロイド性抗炎症薬の分子機構とともに不明な部分がある。そこで、新しい創薬の標的としてPG産生に関わるグルタチオンSトランスフェラーゼファミリーの蛋白質群を考え、それらの結晶構造を解明し、新しい創薬開発の基盤を作ることを目的とする。

## B. 研究方法

### i) 心筋収縮タンパク調節分子

**変異Tn/Tmの調製**：ヒト心筋Tnサブユニット（TnT, TnI およびTnC）、およびニワトリ及びウサギ骨格筋Tnサブユニットの大腸菌による大量発現系を使用した。これらの発現系を用い、結晶化に適した改変（不安定な領域の切除、システイン残基のアラニン、セリンへの置換等）を行い、試料の大量調製を行った。得られた各サブユニットから試験管内再構成を行い、複合体試料を得た。

**結晶化**：分子構造が未知である、TnのTm結合領域（TnT1）に着目して、TnT1単体、Tm単体、TnT1/Tm複合体、及びTn全体を含むTn/Tm複合体の結晶化に取り組んだ。結晶化条件のスクリーニングは蒸気拡散法により行い、それぞれの試料について約500条件程度の検索を行った。得られた結晶についてさらに結晶化条件の最適化を進め、回折データの収集の行える単結晶を得た。

**X線回折実験**：得られた結晶について大型放射光SPRING-8の共用ビームライン（BL41XU）および理研ビームライン（BL45PX）を用いて回折データの収集を行った。

構造解析: TnT1単体結晶およびTm単体結晶について多波長異常分散 (MAD) 法による構造解析を進めている。Tn/Tm複合体結晶については分子置換法による解析を進めた。

#### ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

**CHP/NHE複合体の発現:** タンパク質の発現は大腸菌発現ベクターであるpETの系を用いて行った。アンピシリン耐性pETにCHPの二つのアイソフォームCHP1とCHP2に対するcDNAを組み込み、常法に従って大腸菌 (BL21-star) にトランスフォームした。これらのCHPにはのちに精製に便利のように6Hisタグを導入しておいた。さらに、CHPを組み込んだ大腸菌のコンピタント細胞を調整し、この細胞にカナマイシン耐性pETにNHEのCHP結合部位断片 (アミノ酸503から545) を組み込んだベクターをトランスフォームし、両方のタンパク質を共発現する大腸菌を作成した。大量発現に関しては、前日培養しておいた大腸菌の懸濁液を大量の培養液 (6L) に移して37°Cで培養したのち、吸光度が0.6-1.0になった時点で18°Cにスイッチした。さらにIPTG (5-10 mM) を加えて15時間以上培養し、大量発現を行った。

**CHP/NHE複合体の精製:** タンパク質を発現している大腸菌を150 mM NaCl, 20 mMリン酸緩衝液に懸濁し、ソニケーションによって細胞を破碎した。遠心によって上清を回収し、Ni<sup>2+</sup>カラムにてCHPタンパク質を低pHバッファーによって良く洗ったのち、500 mM イミダゾールを含むバッファーでタンパク質を回収した。この段階でCHP (CHP1およびCHP2とも) はNHEのペプチド断片とすでに強固に結合することがわかっている。溶出したタンパク質を20 mM TrisCl (pH 8.5), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTTの透析外液に対して4°C、15時間透析した。透析したタンパク質をファルマシアの液体クロマトグラフィシステムFPLCに搭載したDEAE-セファロースカラムにアプライした。カラムに結合したタンパク質を0-0.35 M NaClのグラディエントで溶出し、メインピークであるCHP/NHE複合体を回収して濃縮した。

**NHEの機能解析:** NHEの機能解析については、NHEをコードするcDNAを組み込んだ動物細胞発現ベクターpECEを用いて、PCR法により変異を導入し、NHEを持たない変異繊維芽細胞PS120にトランスフェクトした。安定発現細胞株を樹立したのち、機能解析を行った。

#### iii) プロスタグランジン関連タンパク

膜結合型PGE合成酵素 (mPGES) が新しい創薬の標的となることの確認: 血管内皮細胞でのプロスタサ

イクリン産生にはCOX-1ではなく、COX-2が関与すること、特に流れ刺激下の血管内皮細胞ではCOX-2が構成的な発現を示すことを明らかにした。これらの知見は従来考えられていたプロスタサイクリン産生はCOX-1が担っているという定説をくつがえすものであり、同時に、COX-2選択的阻害剤の副作用報告と密接に関わっていることを示す。

mPGESは血管内皮細胞では発現していないことを明らかにした (未発表)。したがって、mPGESの活性を阻害しても血管内皮細胞には影響を及ぼさないことが示唆され、mPGESが新しい薬剤の標的となることが確認された。本研究ではmPGESの大量発現、精製、結晶化を経て放射光x線回折による分子構造解析を目指す。

### C. 研究結果

#### i) 心筋収縮タンパク調節分

**TnT1単体、Tm単体結晶:** それぞれ良好な回折能を有する結晶 (2-3.5オングストローム分解能) を得ることに成功し、構造解析を開始した。それぞれ分子内の安定な領域にメチオニン残基を有しないことから従来法で重原子置換体の検索を進めている。

**TnT1/Tm複合体結晶:** 再現良く結晶が得られたが、分解能7オングストローム程度と、構造解析に十分な回折データは未だ得られておらず、今後の結晶の改善が課題となる。

**Tn/Tm複合体結晶:** 既知のTnコアドメインおよび低分解能のTmの結晶構造をモデル分子として、分子置換法による解析を進めている。

**Tnコアドメイン:** Tnのコアドメイン2種について、それぞれ2.6および3.3Å分解能で結晶構造を得た。

#### ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

動的光散乱装置 (DLS) を用いて検討した結果、精製したサンプルは均一で、凝集もなく、測定された平均分子量 (約35 kD) もCHP/NHE複合体の理論値に近く、結晶化させようとするサンプルとしては極めて質の高いものであることがわかった。このようなモノモーダル (単一性) なサンプルでは、過去のデータから結晶化成功確率が70%程度あると考えられている。タンパク質の結晶化は、結晶化ロボットTERA (理研) を用いて進めている。また、NHEの機能解析においては、NHEのpHセンサーを制御する重要なアミノ酸残基 (Arg440/Gly455/Gly456) を同定した。

#### iii) プロスタグランジン関連タンパク

大腸菌を用いた膜結合型PGE合成酵素 (mPGES) 及びFLAPの遺伝子組換え体による大量発現系構築

びFLAPの遺伝子組換え体による大量発現系構築

- ① pET系発現ベクター (pET11, pET21a, pCW) の構築。
- ② 大腸菌で発現させ、ウエスタンブロットで確認。
- ③ 培養温度条件、IPTGなどの添加剤、シャペロンベクター、抗生物質による誘導など発現を上げる検討を行い、初期に比べると10倍以上の発現増加となった。ただし、発現増加にともない、膜分画から不溶化分画への蓄積の増加が認められた。
- ④ 上記の条件で、CBB染色で検出できる発現であったが、まだ安定していない。また同時にN末のアミノ酸を置換する変異体も数種類作成したが、発現量の増加は認められなかった。
- ⑤ mPGESの酵素活性を測定したところ、活性が検出されなかった。
- ⑥ さらに詳細に検討したところ、現在構築したmPGESには2カ所アミノ置換があることが判明したので、ワイルドタイプのcDNAを現在構築中。なお、FLAPに関しては、アミノ酸配列が完全に一致していることを確認した。

#### D. 考察

##### i) 筋収縮タンパク調節分子

筋収縮制御機構については1970年代に提唱された立体障害仮説がいまだに有力であるが、最近それに反する実験データが発表されつつある。Tnコアドメインの結晶構造から導き出されたのはTnへのカルシウム結合が従来の説とは異なるTmの構造変化を誘起する可能性である。本質の解明にはTn/Tm複合体の結晶構造解析が重要であり、各サブドメインの高分解能の結晶構造が必須となる。筋肉の収縮弛緩は細胞内カルシウムイオン濃度により制御されている。その制御はカルシウム結合タンパク質トロポニン (Tn) ・トロポミオシン (Tm) 複合体が本質的な役割を担っており、モータータンパク質ミオシンとアクチン繊維との相互作用、すなわち滑り運動を制御している。本研究ではこの制御機構の分子メカニズムの理解を目的として、Tn/Tm複合体の結晶構造の解明を目指す。心筋Tnにおいては遺伝的変異が心筋症の発症原因の一つと考えられ、また創薬の対象としても重要である。

##### ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

タンパク質の結晶構造解析は、分子の機能をナノレベルの構造基盤から理解するうえで重要であると同時に、将来の創薬の基盤情報である。今年度は結晶化に適したCHP/NHE複合体を大量精製することに成功した。この過程で、CHPを単独で発現させた

場合、他の大腸菌のタンパク質との非特異的吸着が起こること、良質のタンパク質を得るためにはCHPとNHE両タンパク質を共発現することが重要であることがわかった。また機能解析では、NHEの5番目の細胞内ループがCHPを含めたC末細胞質ドメインと構造的・機能的にカップルすることによってpHセンサーを制御することがわかった。

##### iii) プロスタグランジン関連タンパク

現在の組み換え蛋白質は可溶性膜分画と不溶性画分に蛋白質が蓄積している。そこで可溶性分画を増加させる条件を検討とともに、不溶性画分から可溶化についても検討する。大量発現の確立後、mPGES及びFLAPの組み換え蛋白質の精製条件を決定し、結晶化に必要な高純度の精製蛋白標品を精製する。さらに結晶が得られれば、結晶の形成・成長条件を検討し、X線構造解析に用いる結晶を作る。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 結論

心筋収縮タンパク調節分子に関しては、TnとTmの相互作用の詳細、すなわちTn/Tm複合体の結晶構造を解明することで、筋収縮制御機構の本質的な問題に迫れるであろう。

イオン交換輸送体調節因子複合体に関しては結晶構造解析の第一歩として、タンパク質の大量発現・大量精製に成功した。また、また機能解析では、NHEの細胞内pH制御に重要なアミノ酸残基を同定した。

プロスタグランジン関連タンパクに関しては膜結合型PGE合成酵素 (mPGES)、5リポキシゲナーゼ活性化蛋白質 (FLAP) などいくつかの候補蛋白質のcDNAクローニングを行い、大腸菌で多量に発現させるための系を構築した。現在、X線構造解析にむけて大量発現の条件を検討中である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① S. Wakabayashi, et al.: Two Fundamental Regulatory Factors of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers: The Proton and CHP. In "The Sodium-Hydrogen Exchange. From Molecule to its Role in Disease" Kluwer Academic Publishers (in press), 2003

- ② S. Wakabayashi, et al. : Evidence for involvement of the putative first extracellular loop in differential volume-sensitivity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers NHE1 and NHE2. *Biochemistry* 42:1086-1094, 2003
- ③ S. Wakabayashi, et al. : Expression of Calcineurin B Homologous Protein 2 Protects Serum Deprivation-Induced Cell Death by Serum-Independent Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Biol. Chem.*, 277: 43771-43777, 2002
- ④ S. Wakabayashi, et al. : Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 Oppositely Change pH-Sensing of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE1. *J. Biol. Chem.* 2003, in press.
- ⑤ H. Inoue, Y. Taba, Y. Miwa, C. Yokota, M. Miyagi, T. Sasaguri : Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Fluid Shear Stress in Vascular Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 11415-11450, 2002
- ⑥ B. Glinghammar, H. Inoue, J. J. Rafter : Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1. *Carcinogenesis*, 23:839-845, 2002
- ⑦ S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda, and Y. Maeda : Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca<sup>2+</sup>-saturated form. *Nature* *In press*.
- ⑧ E. Sato, H. Mori, et al: Quasi-monochromatic parallel radiography achieved with a plane-focus x-ray tube. *SPIE*(in press) 2003
- ⑨ H. Kasahara, H. Mori: Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of FGF4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia. *J. Am. Coll Cardiol*, 41:1056-1062, 2003
- ⑩ E. Sato, H. Mori, et al: Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-x-ray laser generator. *Physics of Medical Imaging* 4682: 538-548, 2002
- ⑪ T. Kawada, H. Mori, et al. : Disruption of vagal efferent axon and nerve terminal function in the postischemic myocardium. *Am J Physiol* 283: H2687-2691, 2002
- ⑫ N. Nagaya, H. Mori, et al. : Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am. J. Physiol* (in press), 2003
- ⑬ T. Pearson, H. Mori, et al: Future Investigations of Micro-Macro Level Cardiac Functions Using X-ray Diffraction. *BME* 16:29-35, 2002
2. 学会発表
- ① S. Takeda, et al: Crystal structure of troponin ternary complex *Biophys. J.* 82: 170a, 2002
- ② 武田壮一: 筋収縮・制御機構の新しい視点-1 分子生理からシステムへ「ヒト心筋トロポニンの結晶構造」: 第80回日本生理学会、シンポジウム
- ③ 南方志帆、武田壮一、若林克三、前田雄一郎: 「トロポニンT1/トロポミオシン複合体の結晶化」: 第40回日本生物物理学会年会
- ④ 武田壮一、山下敦子、前田佳代、前田雄一郎: 「トロポニン三量体の結晶構造と筋収縮制御機構のモデル」: 第40回日本生物物理学会年会
- ⑤ 井上裕康: 核内受容体PPARを介する誘導型シクロオキシゲナーゼの発現調節に関する研究: 第54回日本ビタミン学会(2002) (学会奨励賞受賞講演)
- ⑥ 井上裕康、田場洋二、三輪宜一、宮城めぐみ、笹栗俊之: 血管内皮細胞における誘導型シクロオキシゲナーゼ発現のずり応力による誘導機構: 第75回日本生化学会(2002)
- ⑦ 井上裕康, Xiao-Fan Jiang, 長田志帆, 梅園和彦, 名村尚武: 赤ワインに含まれるポリフェノール・レスベラトロールはPPARの活性化によって脳卒中から脳を守る: 第25回日本分子生物学会(2002)
- ⑧ 西浦直亀他: 多層心筋モデルのx線回折について: 第80回日本生理学会大会(2003)
- ⑨ J. T. Pearson他: ラット左室心筋におけるクロスブリッジ動態のin situ 評価: 第80回日本生理学会大会(2003)
- ⑩ 盛 英三他: 循環器疾患制圧に向けたナノメダイシンの開発: 第26回日本医学会総会学術講演会(シンポジウム: ナノテクノロジーと医療)(2003)
- H 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。