

にも不可欠であることが示され、脳に特異的な役割を持った特殊化した細胞であると考えられている。本研究によりミクログリアは脳に対する親和性や脳に浸潤できるか否かについてマクロファージとは決定的に異なることがわかった。このミクログリアの性質を利用すると、薬物や生理活性物質、タンパク質、遺伝子などをあらかじめ取り込ませた細胞を末梢血管に注入することによって、脳に特異的に運び込むことが可能になると考えられる。さらに、疾患遺伝子を補償するような遺伝子操作を加えた細胞を血管内に注入することによって脳を標的化した遺伝子治療に応用できると考えられる。

E. 結論

本研究において虚血ストレス負荷によって生じる遅延性神経細胞死で非侵害的脳内導入ミクログリアは神経変性部位に集まりやすく、さらに細胞死から神経を保護するような trophic な作用を持つことがわかった。したがって、ミクログリアを用いることによって脳特異的にさらに変性部位特異的に細胞を導入できるダブルターゲティングが可能となる。今後、そのメカニズムについても検討する必要がある。

本研究はマウス細胞株の脳に侵入するために働くタンパク質を同定してその遺伝子を分離する事を目的としているが、さらに発展させてヒト遺伝子のホモログを単離し、その遺伝子をヒトの細胞、たとえば骨髄細胞または臍帯血細胞に導入して発現させればヒト細胞を脳に特異的に移入できることになる。この場合、人の治療でしばしば問題となる自己非自己の問題も、自己の骨髄細胞または臍帯血細胞培養を用いれば克服できる。十分にヒト疾患の治療に対して応

用できる可能性があると考えている(8,9)。さらに活性ペプチド断片を人工的な担体、たとえばリポソームなどの膜に組み込めば薬物や酵素などのタンパク質も脳に運搬することができると考えられ、脳をターゲティングしたドラッグデリバリーシステムが開発できると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(1) 学会誌等

欧文原著

1. Kenji F. Tanaka, Haruo Kashima, Hiromi Suzuki, Kenji Ono, Makoto Sawada: Existence of functional b₁ - and b₂ - adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci. Res.* 70(2):232-237, 2002.
2. Sawada M, Imai F and Suzuki H. Brain-Specific Migration and Protective Roles in Brain Damage of Microglia. *Advance in Behavioral Biology.* 53:217-20. (2002)
3. Suzuki, H., Imai, F., Kanno, T., Sawada, M.: Preservation of neurotrophin expression in microglia that migrate into the gerbil's brain across the blood brain barrier. *Neurosci. Lett.* 312:95-98, 2001.

邦文総説

- 1 澤田誠、鈴木弘美：新しい局面を迎えた脳と免疫系のクロストーク研究：幹細胞の相互互換性と脳内侵入 脳の科学 23, 997-999, 2001

(2) 口頭発表

[国際学会・会議・シンポジウム・特別講演]

- 1 Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H. (2002) Brain-Specific Migration and Protective Roles in Brain Damage of Microglia;The Third International Symposium on the Study of Brain Function. Fukuoka, May 9-10.
 - 2 Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., Ninomiya, T., Kanno, T. (2002) Development of Brain-Targeted Cell Therapy Using Microglia as a Vehicle. Academia Eurasiana Neurochirurgica London Meeting, June27-29, London.
 - 3 Ninomiya, T., Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., Kanno, T. (2002) A trial study of cell therapy for brain ischemia using microglia as a vehicle. The 4th ASIAN Congress, Nov. 26-30, HongKong.
- H.** 知的財産権の出願・登録情報
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

ストレス応答・細胞死情報伝達過程のイメージング手法の開発

研究協力者：朽津 和幸 東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 助教授
(東京理科大学 ゲノム創薬研究センター 細胞シグナル制御部門 副部門長)

研究要旨： 血管炎・微小循環障害等の組織細胞障害の過程では、血管内で生成される活性酸素分子種が引き金となり、細胞のストレス応答・プログラム細胞死（アポトーシス）情報伝達系を介して誘導されることが明らかとなりつつある。従って、血管炎・微小循環障害等の再生治療手法を開発するためには、細胞障害・細胞死の分子機構の解明が鍵を握ると考えられる。こうしたシグナル分子の時間的、空間的動態を解明するためには、バイオイメージング技術を用いて、シグナル分子を可視化することが必須である。そこで本研究では、感染防御応答・プログラム細胞死に関与する活性酸素などのシグナル分子や細胞内小器官を可視化解析すると共に、ストレス応答に関与するホルモンなどの一次性シグナル伝達分子をビオチン化した誘導体を新規に開発し、受容体分子を可視化解析する手法を開発した。

A. 研究目的

血管炎・微小循環障害等の組織細胞障害の過程では、血管内で生成される活性酸素分子種が引き金となり、細胞のストレス応答・プログラム細胞死（アポトーシス）情報伝達系を介して誘導されることが明らかとなりつつある。従って、血管炎・微小循環障害等の再生治療手法を開発するためには、細胞障害・細胞死の分子機構の解明が鍵を握ると考えられる。こうしたシグナル分子の時間的、空間的動態を解明するためには、バイオイメージング技術を用いて、シグナル分子を可

視化することが必須である。

そこで本研究では、ストレス応答過程における細胞内のシグナル分子の動態を生きたまま可視化する技術を開発することを目標とする。その第一歩として、ホルモン受容体の可視化と、病原微生物に対する植物の生体防御反応としてのプログラム細胞死過程における細胞内小器官（オルガネラ）の動態の可視化を試みる。また可視化用の蛍光プローブの動態を定量的に解析するため、フローサイトメトリ法を応用する新規シグナル伝達解析技術の開発を試みる。

このようにして、一次性シグナル分子受容体の活性化と、二次性シグナル分子の動員をバイオイメージング法を用いて可視化解析する技術を確認することにより、シグナル伝達系における各種細胞ごとの個性や情報の仕分けの分子機構など、従来の方法では解析できなかった、細胞レベルにおける情報処理に関連した高次の生命現象を統合的に解析する。

B. 研究方法

1. 全く未知である、乾燥・低温等の環境ストレス応答に関与するホルモン（アブシジン酸=ABA）の受容体を可視化、探索するため、ビオチン標識化した ABA を化学合成した。さまざまな細胞種のプロトプラストを単離し、ビオチン化プローブと蛍光標識化アビジンを併用することにより、共焦点レーザー顕微鏡、多光子レーザー顕微鏡を用いて、プロトプラスト表面における ABA 結合部を可視化し、その特性を定量的に解析した。

2. 各種プロトプラストやミトコンドリアなどの蛍光量をフローサイトメトリー法で定量的に解析する手法を開発し、ABA 結合部位の特性や細胞障害に伴うオルガネラの動態を定量的に解析した。

3. 特異的蛍光プローブを、モデル培養細胞に導入することにより、感染シグナル誘導性過敏感細胞死シグナル伝達過程における、活性酸素生成、膜電位変化や、ミトコンドリア、核、液胞等の細胞内オルガネラや細胞骨格の動態を可視化解析

した。

C. 研究成果

1. 受容体可視化手法の開発

アブシジン酸(ABA)は、乾燥、低温などの環境ストレスへの適応の鍵を握る重要なホルモンである。しかし、ABA 受容体の分子の実体は解明されておらず、その局在部位も定かではない。ホルモン等の一次性シグナル伝達分子が細胞膜上の受容体で認識された後、細胞内で情報が処理・伝達される機構を解析するためには、特異的な分子プローブを用いて可視化解析を行うことが有効と考えられ、その方法論の開発が重要な課題である。そこで本研究では、ABA をビオチン化した誘導体を合成し、蛍光ラベルされたアビジンを用いて、細胞表層の受容部位を三次元的に可視化することを試みた。

ビオチン化した ABA (bioABA) は、*Vicia faba* 気孔孔辺細胞において ABA と同様の生理活性が認められた。そこでこれを分子プローブとして用いることにより、様々な細胞種の ABA 結合部位の可視化と定量解析を行った。bioABA と蛍光標識化アビジン処理で、孔辺細胞プロトプラスト (GCP) 表層の bioABA 結合部位の可視化が可能となった (図 1)。さらにフローサイトメトリーを用いた実験系を確立し、GCP の蛍光の定量的解析を行った。bioABA の GCP への結合は、無標識の ABA の添加により濃度依存的に阻害され、GCP の事前のプロテアーゼ処

理により抑制された。生理活性のある ABA の構造類縁体は bioABA の結合を阻害したが、活性のない類縁体は阻害しなかった。一方、ABA と共存させることにより ABA 活性を阻害した類縁体は、bioABA の結合を阻害した。これらの結果は、気孔孔辺細胞の細胞表層に ABA 受容部位が存在することを示唆している。

2. 活性酸素誘導性細胞死情報伝達機構の可視化解析

(1) 同調的細胞死誘導系の構築

植物は動物のように移動して不利な環境から逃げることができないため、進化の過程で悪環境や外敵から自分を守る巧みな仕組みを獲得してきた。例えば植物は免疫系を持たないが、病原菌の感染を認識し、生体防御応答を誘導する。この際、感染部位の細胞が自律的な細胞死を起こすと同時に、周辺の組織で迅速な防御遺伝子発現や抗菌性物質の合成などが誘導され、病原体の増殖と拡散を阻止する。この細胞死は、動物のアポトーシスとの類似点や相違点が指摘されているが、その機構は未解明の点が多い。病原菌由来のタンパク質性エリシターを感染シグナルとしてタバコ培養細胞(BY-2)に与えることにより、高度に同調的に自律的な細胞死を誘導でき、可視化解析も容易な新規の実験系の確立に成功した。

(2) 細胞死過程における活性酸素とイオンチャンネルの役割

細胞死の初期過程では、一過性で二相性の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化、持続的な Cl^{-} efflux、早い一過的な変化と持続的な変化の二相性の pH 変化、さらに活性酸素生成が誘導されることが明らかとなり、特徴的なパターンを示すイオンの動員や活性酸素生成が細胞死の制御に関与していると考えられた。陰イオンチャンネルを介した Cl^{-} efflux の誘導に $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化が必要であり、また Cl^{-} efflux に伴う膜電位脱分極が $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化に関与すると考えられた。 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化は活性酸素生成に必要なが、逆に活性酸素生成を阻害しても $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 変化に顕著な変化は見られないことから、 Ca^{2+} が活性酸素生成の制御に重要な役割を担っていると考えられた。

Ca^{2+} 動員の分子機構を明らかにするため、イネ、シロイヌナズナ、タバコにおいて、複数の Ca^{2+} チャンネル候補遺伝子群を探索、同定し、クローニングを行った。その結果、イネの電位依存性 Ca^{2+} チャンネル候補遺伝子を世界で初めて単離し、構造を決定した。DNAプールを用いてイネノックアウトシステムのスクリーニングを行ったところ、エキソン領域に、retrotransposonが挿入された系統を見出し、変異ホモ個体の単離にも成功した。過剰発現体、ノックアウト体の表現型解析の結果、この遺伝子は多くのストレス応答シグナル伝達、とくにエリシター誘導性プログラム細胞死の制御において重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった。

(3) 細胞死過程におけるオルガネラの動態の可視化解析

細胞死誘導過程において、細胞質の凝集、収縮が観察された。そこでオルガネラ特異的なさまざまな分子プローブを用いた非破壊的バイオイメーキング法を確立し、細胞死に伴うオルガネラの動態を観察した。細胞死に先立ち、数時間以内にミトコンドリアの還元酵素活性がほぼ完全に失活すること、ミトコンドリアの膜電位の脱分極が誘導されること、また、こうしたミトコンドリアの変化はイオンチャンネル阻害剤により完全に抑制されることが明らかとなり、ミトコンドリアが細胞死の誘導に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。また液胞や液胞膜の動態を連続観察したところ、細胞死に先立ち、液胞構造の崩壊が誘導されている可能性が示唆された(図3)。

(4) 活性酸素生成の分子機構の解析

活性酸素発生酵素であるヒトのNADPHオキシダーゼNoxの機能的ホモログRbohDをコードする遺伝子をシロイヌナズナよりクローニングし、ヒト培養細胞においてその活性を測定した。RbohD遺伝子をHEK293細胞において一過的に発現させたところ、 Ca^{2+} 依存的な過活性酸素生成が見られ、RbohDが Ca^{2+} とタンパク質リン酸化を介した相乗的な制御を受け活性化されることを明らかにした。

(5) 細胞死における細胞周期制御の役割

の解析

細胞死誘導に伴う細胞周期停止点を明らかにするため、3種類の独立な方法で細胞周期の進行を同調化して、核の形態観察、フローサイトメトリー法、微小管の動態観察による解析を行ったところ、M期、G₁期にエリシター処理した細胞は、G₁期で、S期にエリシター処理した細胞は、G₂期でそれぞれ細胞周期が停止し、その後防御遺伝子の発現や細胞死が誘導された。この結果は、エリシターが二つのチェックポイントの両方で細胞周期を停止させ、細胞の増殖から死への転換の引き金を引く可能性を示すと考えられる。

D. 考察

本研究の結果、ストレス応答を司るホルモン(ABA)の特異的なタンパク質性の結合部位が、気孔孔辺細胞や葉肉細胞などの表面にパッチ状に点在する状態を生きたまま可視化することに成功した(図2)。さまざまなABAの構造類縁体を用いた特性解析の結果、細胞膜上のABA受容体タンパク質を可視化していると考えられる。本研究により開発された方法は、ABAに限らず一般に未知の受容体を可視化解析するために極めて有用と期待される。

ストレス誘導性の活性酸素を介したプログラム細胞死を同調的に誘導できる実験系を開発することに成功した。オルガネラ特異的なさまざまな分子プローブや、活性酸素、膜電位変化特異的のプローブを

用いた非破壊的バイオイメーキング法を確立し、細胞死に伴うオルガネラの動態を観察した。細胞死に先立ち、数時間以内にミトコンドリアの還元酵素活性がほぼ完全に失活すること、ミトコンドリアの膜電位の脱分極が誘導されること、また、こうしたミトコンドリアの変化はイオンチャネル阻害剤により完全に抑制されることが明らかとなり、ミトコンドリアが細胞死の誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。また液胞や液胞膜の動態を連続観察したところ、細胞死に先立ち、液胞構造の崩壊が誘導されている可能性が示唆された。このような生理的条件で同調的に細胞死を誘導できる実験系において、さまざまなシグナル分子の時間的空間的動態を可視化することによって、ストレス誘導性細胞死誘導過程におけるシグナル伝達の特異性決定機構の解明につながることを期待される。

E. 結論

本研究の結果、一次性シグナル分子受容体の活性化と、二次性シグナル分子の動員を局所的にイメージング解析する技術を確立する目処を立てることができた。今後こうした実験手法を応用することにより、シグナル伝達系における各種細胞ごとの個性や情報の仕分けの分子機構など、従来の方法では解析できなかった、細胞レベルにおける情報処理に関連した高次の生命現象を統合的に解析できることが期待され、血管炎・微小循環障害等、

血管内で生成される活性酸素分子種が引き金となり、細胞のストレス応答・プログラム細胞死（アポトーシス）情報伝達系を介して誘導される、組織細胞障害の分子機構の解明や再生治療手法の開発の重要な基礎となると期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuchitsu, K., Ward, J. M., Allen, G. J., Schelle, I., Schroeder, J. I. (2002) Loading acetoxymethyl ester fluorescent dyes into the cytoplasm of *Arabidopsis* and *Commelina* guard cells. *New Phytologist* 153 : 527-533
- 2) Uchimiya, H., Fujii, S., Huang, J., Fushimi, T., Nishioka, M., Kim, K.-M., Kawai, M., Kurusu, T., Kuchitsu, K., Tagawa, M. (2002) Transgenic rice plants conferring increased tolerance to pathogens and multiple environmental stresses. *Molecular Breeding*, 9 : 25-31
- 3) Kwak, J.M., Moon, J.-H., Murata, Y., Kuchitsu, K., Leonhardt, N., DeLong, A., Schroeder, J.I. (2002) Disruption of a Guard Cell-Expressed Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit, *RCN1*, Confers Abscisic Acid Insensitivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 14: 2849-2861
- 4) Yamazaki, D., Yoshida, D., Asami, T.,

Kuchitsu, K. (2003) Visualization of Abscisic Acid Perception Sites on the Plasma Membrane of Stomatal Guard Cells. *The Plant Journal*, accepted after minor revision.

2. 学会発表

- 1) 山崎大樹、青木優和、吉田茂男、浅見忠男、朽津和幸 (2003) ビオチン化プローブを用いたアブシジン酸受容部位のイメージング解析公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」 2003年2月20-21日 東京国際フォーラム
- 2) 郷達明、中村衣里、門田康弘、東克己、朽津和幸 (2003) 植物培養細胞のストレス誘導性プログラム細胞死過程のイメージング 公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」 2003年2月20-21日 東京国際フォーラム
- 3) Ogasawara, Y., Yamagoe, S., Suzuki, K., Kuchitsu, K. (2002) Functions and regulatory mechanisms of the plant NADPH oxidase. The International MPO Meeting. 2002年10月 宮崎
その他多数のため、紙面の都合で省略。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許出願を準備中。



図1 ビオチン化分子プローブを用いた細胞表層の受容体の可視化。

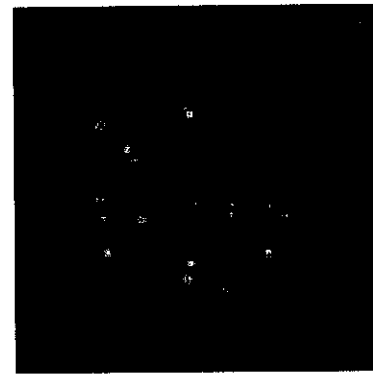


図2 細胞表層の受容体の空間的分布の可視化 (共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡を用いた断層像)

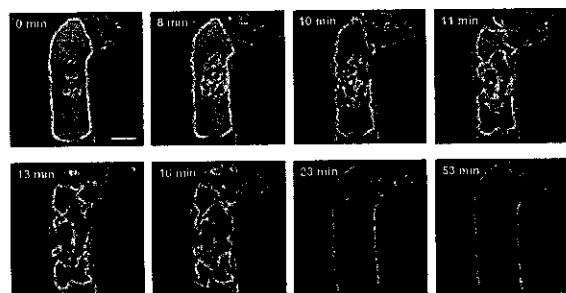


図3 感染シグナル誘導性プログラム細胞死過程におけるオルガネラの動態の可視化。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
船津高志	1分子蛍光イメージング法	御子柴克彦 清水孝雄	感覚器官と脳内情報処理	共立出版	東京	2002	pp.192-199
H.Matsumura K.Furusawa	Aggregation of Liposomes and Effects of Electric Fields on it	A.Delgado	Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis	Marcel Dekker		2002	pp.971-982
K.Furusawa H.Matsumura	Electrokinetic characterization of colloid particles for composite preparation		Encyclopedia of Nano-science and Nano-technology	Marcel Dekker		2003	in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Ishikawa, E. Sekizuka, C. Oshio N. Yamaguchi, K. Tsukada, and H. Minamitani	Platelet adhesion and anterior dilation during photothrombosis -- Observation with rat closed cranial and spinal windows	J. Neurological Sci.	194 (1)	59-69	2002
南谷晴之, 高橋美帆, 今関善晴, 長尾朋和, 関塚永一, 大塩 力	血栓形成過程における白血球動態と活性酸素産生	日本バイオレオロジー学会誌	16 (1)	29-31	2002
T.Nagao, K.Matsuzaki, M.Takahashi, , Y. Imazeki, and H. Minamitani	Quantitative analysis for intracellular distribution of a photosensitizer using confocal laser scanning microscope	IEICE Trans. Information and Systems	85D (1)	152-159	2002
M.Takahashi, T.Nagao, Y. Imazeki, K. Matsuzaki, and H. Minamitani	Fluorescence image analysis for quantification of reactive oxygen species derived from monocytes activated by photochemical reaction	IEICE Trans. Information and Systems	85D (1)	160-166	2002
T.Nagao, K.Matsuzaki, M. Takahashi, Y. Imazeki, and H. Minamitani	Apoptotic signaling cascade of 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy in human promyelocytic leukemia HL-60 cells	J. Photoscience	9 (2)	509-511	2002
M.Takahashi, T.Nagao, K. Matsuzaki, T. Nishimura and H. Minamitani	Photodynamically induced endothelial cell injury and neutrophil-like HL-60 adhesion	J. Photoscience	9 (2)	518-520	2002
南谷晴之, 川村友美, 塚田孝祐, 飯島淳彦, 関塚永一, 大塩 力	原子力間力顕微鏡による赤血球弾性計測	電気学会論文誌C	122-C (9)	1664-1671	2002
塚田孝祐, 酒井修平, 長谷憲太郎, 南谷晴之	医用カテーテル型光学式酸素センサ	医工学治療	14 (3)	163-167	2002
H. Minamitani, K. Tsukada, E. Sekizuka, C. Oshio	Mesurement of blood flow and oxygen tension using fluorescent and phosphorescent probes in organ microcirculation	Microcirculation Annual	18	13-14	2002
K. Tsukada, Y. Ogata, N. Yamaguchi, E. Sekizuka, C. Oshio and H. Minamitani	Blood flow analysis in cerebral microcirculation during exchange blood trasfusion with hemoglobin-encapsulated liposome	Microcirculation Annual	18	41-42	2002
T. Ozawa, E. Sekizuka C. Oshio, K. Tsukada, T. Uchida, H. Nakadate and H. Minamitani	Mechanism of increased platelet aggregation in diabetes mellitus -- Newly-devised investigation with laser scattering platelet aggregometer-	Microcirculation Annual	18	53-54	2002
T. Uchida, E. Sekizuka, C. Oshio K.Tsukada, T. Ozawa, H. Nakadate and H. Minamitani	Investigation on the thrombus formation of diabetes mellitus	Microcirculation Annual	18	67-68	2002
H. Nakadate, E. Sekizuka, C. Oshio K.Tsukada, T. Uchida,, T. Ozawa and H. Minamitani H. Minamitani	Fundamental study of a particle counting method using laser-light scattering in detection of platelet aggregates under diabetes mellitus	Microcirculation Annual	18	129-130	2002
K. Hase, S. Sakai, K. Tsukada, E. Sekizuka, C. Oshio and H. Minamitani	Continuous measurement of blood oxygen pressure using a fiber optic sensor based on phosphorescence quenching	Proc. 2nd Joint EMBS/BMES conf.		1777-1778	2002

K. Tsukada, S. Sakai, K. Hase and H. Minamitani	Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation	Biosensors and Bioelectronics	in press		2003
塚田孝祐, 緒方嘉貴, 辻岡克彦, 南谷晴之	人工酸素運搬体Neo Red Cell交換輸血時の脳微小循環動態および酸素分圧計測	脳循環代謝	in press		2003
A. Iijima, M. Haida, N. Ishikawa, A. Ueno H. Minamitani and Y. Shinohara	Re-evaluation of tropicamide in the papillary response test for Alzheimer's disease	Newrobiol. Aging	in press		2003
M.Takahashi, T.Nagao, Y. Imazeki, K. Matsuzaki, and H. Minamitani	Roles of reactive oxygen species in monocyte activation induced by photochemical reaction during photodynamic therapy	Frontiers of Biomed. Eng.	in press		2003
H. Minamitani, K. Tsukada, E. Sekizuka and C. Oshio .	Imaging and functional analysis of blood flow in organic microcirculation	Jpn. J. Pharmacol.	in press		2003
鈴木和男	SCG/Kj マウスとANCA 関連血管炎--血管炎病態に 関与する好中球機能: 動物モデルを用いた 解析から--	リウマチ科	28	570-577	2002
Y. Aratani, F. Kura, H.Akagawa, Y.Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda and H. Koyama	Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with <i>Candida albicans</i>	J. Infect. Dis.	185	1833-1837	2002
Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe H.Akagawa, Y.Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda and H. Koyama	Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with <i>Candida albicans</i> and <i>Aspergillus fumigatus</i>	Med. Mycol.	40	557-563	2002
Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, DidierTrono and Karl-Heinz Krause	The HIV-1Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation	J. Biol. Chem.	277	42136-43	2002
Koji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kumeoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki,	Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice	Free Radical Research	in press		2003
Mie Ito, Oda, S. Yamagoe, K. Suzuki, M. Tanokura	Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds	Protein Expression Purif	in press		2003
Mami Ishikawa, Ejichi Sekizuka, Boris Krischek, Ulrich Sure, Raif Becker and Helmut Bertalanffy	Role of nitric oxide in the regulation of spinal arteriolar tone	Neurosurgery	50 (2)	371-378	2002

K. Hatanaka, R. Hokari, K. Matsuzaki, S. Kato, A. Kawaguchi, S. Nagao, H. Suzuki, K. Miyazaki, E. Sekizuka, H. Nagata, H. Ishii and S. Miura	Increased expression of mucosal addressin cell adhesionmolecule-1 (MAdCAM- i) and lymphocyte recruitment in murine gastritis induced by Helicobacter pylori	Clin Exp Immunol	130	183-189	2002
山口則之, 小野塚聡, 関塚永一, 赤路和則	糖尿病における脳微小循環障害の特徴と外科的治療 特集 糖尿病と微小循環	Complication	7 (2)	68-74	2002
Hikaru Tanaka, Eichi Ishii, Ryouichi Fujisaki, Yusuke Miyamoto, Yoshio Tanaka, Tokiko Aikawa, Wataru Hirayama, Toru Kawanishi and Koki Shigenobu	Effect of manganese on guinea pig ventricle: Initial depression and late augmentation of contractile force	Biol. Pharm. Bull.	25 (3)	323-326	2002
M. Yamada, K. Takahashi, M. Tsunoda, G. Nishioka, K. Kudo, H. Ohata, K. Kamijima, T. Higuchi and K. Momose	Differential expression of VANP2/synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex	Pharmacogenomics J.	2	377-382	2002
T. Hashimoto, Y. Nakano, M. Yamashita H. Ohata and , K. Momose	Role of Rho-associated protein kinase and histamine in lysophosphatidic acid-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs	Jpn. J. Pharmacol.	88	256-261	2002
Tetsu Kobayashi, Shingo Niimi, Toru Kawanishi, Masamichi Fukuoka and Takao Hayakawa	Changes in peroxisome proliferator-activated receptor γ -regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate	Toxicology Letter	138	215-225	2003
S. Niimi, T. Oshizawa, T. Yamaguchi, M. Harashima, T. Seki, T. Ariga, T. Kawanishi and T. Hayakawa	Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes	Biochem. Biophys. Res. Comm.	300	770-774	2003
百瀬和享, 松田武久, 大池正宏, 小原一男, Ismail Laher, 杉浦 清了, 大幡久之, 中山貢一	メカニカルストレス応答による細胞機能制御 創薬と再生臓器開発への応用	日本薬理学雑誌	121	103-111	2003
T. Hashimoto, M. Yamashita, h. Ohat and Kazutaka Momose	Lysohosphatidic acid enhances in vivo infiltration and activation of guinea pig eosinophils and neutrophils via a Rho/ROCK-mediated pathway	J. Pharmacol. Sci.	91	8-14	2003
Hikaru Tanaka, Kazuide Nishimaru, Ryuji Makuta, Wataru Hirayama, Taro Kamakura, Tomoyuki Matsuda, Yoshio Tanaka, Toru Kawanishi and Koki Shigenobu	Possible Involvement of Prostaglandins F2 and D2 Acetylcholine-Induced Positive Inotropy in Isolated Mouse Left Atria	Pharmacology	in press		2003

Wataru Nishii, Takafumi Maruyama, Rieko Matsuoka, Tomonari Muramatsu and Kenji Takahashi	The unique sites in Sula protein preferentially cleaved by ATP-dependent Lon protease from <i>Escherichia coli</i>	Eur. J. Biochem.	269	451-457	2002
Yoriko Sawano, Tomonari Muramatsu, Ken-ichi Hatano, Koji Nagata and Masaru Tanokura	Characterization of Genomic Sequence Coding for Bromelain Inhibitors in Pineapple and Expression of Its Recombinant Isoform	Journal of Biological Chemistry	Vol.277, No.31	28222-28227	2002
R. Yagi, W. Suzuki, N. Seki, M. Kohyama, T. Inoue, T. Arai and M. Kubo	The IL-4 production capability of different strains of native CD4+ T cells controls the differentiation of the helper T cell response	Int. Immunol.	14	1-11	2002
R. Yagi, H. Nagai, Y. Iigo, T. Akimoto, T. Arai and M. Kubo	Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice	J. Immunol.	168	2020-2027	2002
T. Hashimoto, T. Wakabayashi, A. Watanabe, H. Kowa, R. Hosoda, A. Nakamura, I. Kanazawa, T. Arai, K. Takio, D.M.A. Mann and T. Iwatsubo	CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor	CLAC-P/collagen type XXV. EMBO J.	21	1524-1534	2002
Takashi Ohuchi, Schio Maruoka, Akikazu Sakudo and Takao Arai	Assay-based quantitative analysis of PC12 cell differentiation	Journal of Neuroscience Methods	118	1-8	2002
S. Namekawa, F. Hamada, T. Sawado, S. Ishii, T. Nara, T. Ishizaki, T. Ohuchi, T. Arai and K. Sakaguchi	Dissociation of DNA polymerase α -primase complex during meiosis in <i>Coprinus cinereus</i>	E. J. Biochem.	in press		2003
霜田幸雄, 呉桂栄, 中西敏雄, 重松康秀	肺動脈単離平滑筋におけるCaイオンの動態	日本バイオイメージング学会	第11回 学術集会	171-172	2002
霜田幸雄, 呉桂栄, 中西敏雄, 重松康秀	肺動脈平滑筋におけるCaイオンの動態	日本バイオイメージング学会	第11回 学術集会	173-174	2002
霜田幸雄	膜電位感受性色素による脊椎動物網膜細胞のグルタミン酸応答の記録	日本バイオイメージング学会	第11回 学術集会	181-182	2002
K. Amemiya, H. Takahashi, M. Nakazawa, H. Shimizu, T. Majima, Y. Nakagawa, N. Yasuda, M. Yamamoto, T. Kageji, M. Nakaichi, T. Hasegawa, T. Kobayashi, Y. Sakurai and K. Ogura	Soft X-ray Imaging using CR-39 plastics with AFM readout	Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B	187	361-366	2002
Toshikazu Majima, Tomie Toshihisa and Hideaki Shimizu	Comparative studies of x-ray images and fluorescence images of the same specimens	Journal de Physique IV, Proc. X-ray Microscopy	in press		2003
Takashi Funatsu, Tadayoshi Taniyama, Takashi Tajima, Hisashi Tadakuma and Hideo Namiki	Rapid and Sensitive Detection Method of a Bacterium by using a GFP Reporter Phage	Microbiol. Immunol.	46 (6)	365-369	2002

I. Fujiwara, S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu and S. Ishiwata	Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments	Nature Cell Biol.	4	666-673	2002
Y. Shirasaki, H. Makazu, K. Tashiro, S. Ikeda, T. Sekiguchi, S. Shoji, S. Tsukita and T. Funatsu	A Novel Biomolecule Sorter Using Thermosensitive Hydrogel in Micro Flow System	Micro Total Analysis System	2002	925-927	2002
船津高志	1分子蛍光イメージング技術による生命現象の解析	可視化情報	Vol.22, No.84	18-21	2002
座古保, 船津高志	生体分子の機能を1分子レベルで探る 1分子蛍光イメージング	分光研究	Vol. 51, No.1	3-14	2002
M. Dimitrova, H. Matsumura, N. Terezova and V. Neytchev	Binding of globular proteins to lipid membranes studied by isothermal titration calorimetry and fluorescence	Colloid & Surfaces B	24	53-61	2002
V. Neytchev, N. Terezova, H. Matsumura and T. Tomov	Membrane electropermeabilization effects of frequency and membrane surface order on liposomes leakage	Histol Histopathol	17	649-656	2002
K. Furusawa and H. Matsumura	Electrokinetic characterization of Silica Coated Hematite and Application to the Formation of Composite Particles Including PC Liposomes	J. Colloid Interface Sci.	in press		2003
Bo Yang, Kunio Furusawa and Hideo Matsumura	Adsorption state of PC vesicles on solid colloidal particles and their aggregation behavior induced by the PC vesicle	Langmuir	in press		2003
K. Hanaki, A. Momo, T. Oku, A. Omoto, Y. Yamaguchi and K. Yamamoto	Semiconductor quantum dot/albumin complex Is a long-life and highly photostable endosome marker	B.B.R.C.	in press		2003
J. Kizu, M. Arakawa and K. Yamamoto	Is There Relation between Antiviotic Sensitivity of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus and Consumption of Antibiotics in a Hospital? : A Study in April 1993 - March	Jpn. J. Infect.	55	65-67	2002
F. Takeuchi, Y. Futamura, H. Yoshikura and K. Yamamoto	Statistics of trinucleotides in coding sequences and evolution	J. Theor. Biol.	in press		2003
T. Baba, F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto and K. Hiramatsu	Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA	Lancet	359	1819-1827	2002
Shinpei Tanaka, Mitsuo Ataka, Tomomi Kubota, Tomomi Soga, Kohei Homma, Woo Cheol Lee and Masaru Tanokura	The effect of amphiphilic additives on the growth and morphology of Aspergillus niger acid proteinase A crystals	Journal of Crystal Growth	234	247-254	2002
秦野賢一, 澤野頼子, 田之倉優	パイナップル由来システインプロテアーゼインヒビターの構造と機能	化学と生物	Vol.4, No.5	320-325	2002
Yusuke Kato, Mie Ito, Kunji Kawai, Koji Nagata and Masaru Tanokura	Determinants of Ligand Specificity in Groups I and IV WW Domains as Studied by Plasmon Resonance and Model Building	Journal of Biological Chemistry	Vol.277, No.12	10173-10177	2002

Yoriko Sawano, Tomonari Muramatsu, Ken-ichi Hatano, Koji Nagata and Masaru Tanokura	Characterization of Genomic Sequence Coding for Bromelain Inhibitors in Pineapple and Expression of Its Recombinant Isoform	Journal of Biological Chemistry	Vol.277,No.31	28222-28227	2002
Ken-ichi Hatano, Yoriko Sawano and Masaru Tanokura	Structure-Function Relationship of Bromelain Isoinhibitors from Pineapple Stem	Biol. Chem.	Vol 383	1151-1156	2002
Y. Asami, D.-W. Jia, K. Tatebayashi, K. Yamagata, M. Tanokura and H. Ikeda	Effect of the DNA topoisomerase II inhibitor VP-16 on illegitimate recombination in yeast chromosomes	Gene	291(1-2)	251-257	2002
Mie Ito, K. Nagata, Yusuke Kato., Yoshifumi Oda, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki and Masaru Tanokura	Expression oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16-kDa chemotactic protein with three disulfide bonds	Protein Expression Purification	27	272-278	2003
Wakana Iwasaki, Hiroshi Sakai, Akio Nakamura, Kazuhiro Kohama and Masaru Tanokura	Metal-Free and Ca ²⁺ -Bound Structures of a Multidomain EFHand Protein, CBP40, from the Lower Eukaryote, Physarum polycephalum	Structure	Vol. 11	75-85	2003
Masahiro Maeda, Kayoko Takeuchi, Masaki Kojima, Masaru Tanokura, Kazumoto Kimura, Yoshiyuki Amemiya, Hiroshi Kihara and Kenji Takahashi	Kinetic studies of unfolding process of aspergillopepsin II by pH-jump methods	Biochemical and Biophysical Research Communications	301	745-750	2003
K. Hatano, M. Kojima, M.Tanokura and K. Takahashi	Nuclear magnetic resonance studies on the pKa values and interactions of ionizable groups in bromelain inhibitor VI from pineapple stem	Biol. Chem.	in press		2003
M. Sawada, F. Imai and H. Suzuki	Brain-Specific Migration and Protective Roles in Brain Damage of Microglia	Advance in Behavioral Biology	53	217-220	2002
Kenji F. Tanaka, Haruo Kashima, Hiromi Suzuki, Kenji Ono and Makoto Sawada	Existence of functional 1- and 2-adrenergic receptors on microglia	J. Neurosci. Res.	70 (2)	232-237	2002
澤田誠, 鈴木弘美	新しい局面を迎えた脳と免疫系のクロストーク研究: 幹細胞の相互交換性と脳内侵入	脳の科学	23	997-999	2002
K. Kuchitsu, J.M. Ward, G.J. Allen, I. Schelle and J.I. Schroeder	Loading acetoxymethyl ester fluorescent dyes into the cytoplasm of Arabidopsis and Commelina guard cells	New Phytologist	153	527-533	2002
Hirojumi Uchimiya, Seiichi Fujii, Jirong Huang, Takaomi Fushimi, Maanori Nishioka, Kyung-Min Kim, Maki Kawai Yamada, Takamitsu Kurusu, Kazuyuki Kuchitsu and Michito Tagawa	Transgenic rice plants conferring increased tolerance to rice blast and multiple environmental stresses	Molecular Breeding	9	25-31	2002

J.M. Kwak, J.-H. Moon, Y. Murata, K. Kuchitsu, N. Leonhardt, A. DeLong and J.I. Schroeder	Distruption of a Guard Cell-Expressed Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit, RCN1, Confers Abscisic Acid Insensitivity in Arabidopsis	The Plant Cell	14	2849-2861	2002
D. Yamazaki, D. Yoshida, T. Asami and K. Kuchitsu	Visualization of Abscisic Acid Perception Sites on the Plasma Membrane of Stomatal Guard Cells	The Plant Journal	in press		2003

20020757

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.121- P.128の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。