

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 盛 英三

平成16年 (2004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	
盛 英三-----	1
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)	
望月直樹-----	1 3
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	
中村 俊-----	1 6
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)	
盛 英三-----	1 8
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	
土屋利江-----	2 4
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	3 7
IV. 研究成果の刊行物別刷-----	4 9

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 H14年度に引き続き、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して研究を行った。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た研究について以下に概説する。

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

A. 研究目的

1) 分子機能イメージング循環系

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もとに細胞の病態生理の可視化を目的とする。

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、細胞内情報伝達分子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

AFM観察により、タンパク質の会合状態や薬物処置時の形状変化を探求し、受容体と薬物との相互作用を測定する。ナノ粒子フレーザーの合成を行う。AFM探針先端を修飾する有機分子の設計・合成を行う。組織再生に有用なナノ表面官能基を有する新規組織工学材料を創製する。

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: Ras分子とRap1分子の活性化プローブを血管内皮細胞でも発現できるようにした

(Adenovirus-Raichu-Ras, Adenovirus-Raichu-Rap1)。Rhoファミリー分子活性化の可視化プローブを作製する(Raichu-Rho)。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。15年度にはこのRaichu-Rhoを高効率に細胞に導入するべくアデノウイルスRaichu-Rhoを作製した。

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。平成15年度は細胞の極性に関してRho, Rap1分子がどのように関与するかを検討した。一層の培養細胞でスクラッチで傷をつけると細胞は傷に向かって遊走する。このとき発生する細胞の前方・後方の極性にRap1が関与するか否かを検討した。アデノウイルスで作製したRaichuプローブが細胞で正しく発現することを293T細胞を用いて確認した。さらに血管内皮細胞は流れ刺激によって細胞の形態を整えるがその際のRho分子の活性化もイメージングで検討した。

Raichu-Ras, Rap1, とRho, Rho-FATを用いたイメージング: 光学系の検出システムはオリンパス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。この比をRoper Scientific社のMetaMorph Ver5.0で解析し画像化した。スクラッチによる細胞遊走時、流れ負荷時のそれぞれRap1, Rhoモニターリング分子のFRET効率をもとに活性化を可視化した。

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、15年度は721番目のフェニルアラニンアラニンをアラニンに置換した(F721A)変異ミオシンに加えて775のフェニルアラニンをアラニンに置換した(F775A)も作製した。蛋白質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変異ミオシンとF775A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:それぞれの変異ミオシンのミオシン頭部に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。ATP添加時のCFPからYFPへのFRETを検出することでミオシン頭部の構造変化の有無を検討することを試みた。433nmで励起したときのYFPの蛍光(530nm)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。

ミオシンのステップサイズの測定(ナノメートル):変異ミオシンでのステップサイズをナノメートル計測システムで測定した。一分子のミオシンの動きをみるためにエバネッセント顕微鏡システムをレーザートラップシステムを活用して、サイズを測定した。

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、種々のイメージング技術を用いて動態を計測した。また、分子機能を明らかにするために、ノックアウトマウスを導入し、急性脳切片を用いたイメージングおよび電気生理学的解析を行った。さらに、*in silico*でタンパク質の予測構造にもとづく、特異的なリガンドのスクリーニングを行った。

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)の大腸菌による大量発現系を使用した。また、TnIのPKAリン酸化型変異体(S23D, S24D)の調製を行った。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:TmのTn結合部とTn全体を含むTn/Tm複合体の結晶化に取り組んだ。また、ヒト心筋TnIリン酸化型変異体を含むTn三量体を調製し、結晶化を行った。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複合体の発現および精製: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。大腸菌をソニケーションによって破碎し、CHP/NHE複合体をNi²⁺カラム、イオン交換、ゲルろ過カラムによって精製した。

NHEの結晶化と構造解析:精製したタンパク質について、1000を超える結晶化条件のスクリーニングを蒸気拡散法により行った。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。

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。

iv) 細胞内情報伝達分子

新規アクチン束化タンパク質ファミリーに属するBAIAP2(Brain angiogenesis inhibitor 1 associated protein 2)やMIM(Missing in metastasis protein)の全長および部分について大腸菌による大量発現をpGEX6Pベクターを用いて行い、単離・精製した。BAIAP2のアクチン束化・低分子GTP結合タンパク質結合ドメインの結晶化に成功し、SPring-8のビームラインを用いて回折データの収集を行った。重金属置換法により構造解析を行った。

4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

AFMを用いてP2X受容体を観察した。ヒスチジンタグを付けた受容体を昆虫由来細胞に発現させ、精製し、AFM観察を行った。

光ラベル化剤として分子内にアジドフェニル基およびジアジリン基を有するC60誘導体の合成を行った。

AFM探針修飾用の分子としてはリジッドかつ鋭利なアセチレン骨格を分子内に有する有機化合物をデザインした。

ポリカチオンとしてキトサン、ポリアニオンとしてカルボキシル基、硫酸基およびリン酸基を導入したキチンあるいはヒアルロン酸からなる高分子電解質複合体フィルムを用い、その上でのヒト骨芽細胞の各種機能に与える影響を検討した。

ヒト皮膚繊維芽細胞に発現している可溶性リン酸化タンパク質をプロテオミクス手法で調べた。天然ゴムラテックスから抽出したタンパク質を、等電点電気泳動に続くSDS-PAGEで2次元に展開した。次にタンパク質を膜上に転写した後、ラテックスアレルギー血清を用いてIgE-immunoblottingを行った。続いてIgE結合性と判断されたタンパク質のスポットをゲルから切りだし、トリプシンを用いてタンパク質を消化後、断片化ペプチド群をMALDI-TOF/MSスペクトルおよびMS/MSスペクトルを測定した。質量分析の結果を元に、データベース検索により、IgE結合性タンパク質の同定をおこなった。

C. 研究結果

1) 分子機能イメージング循環系

HAEC極性形成時のRap1活性化の可視化： 単層培養したHAECにスクラッチで傷をつけると傷に向かって細胞が運動していく。この際に細胞内におけるRap1の活性化プローブRaichu-Rap1の発現を可視化できた。細胞は、創傷に向かって極性を形成するがこれは微小管の形成方向と一致していた。Rap1の活性化は細胞の運動方向の先端部でみられた。

Raichu-Rhoによる流れ負荷時のRhoの活性化の可視化： 血管内皮細胞は流れ負荷時のRaichu-Rhoを発現する細胞のFRET比を見ると運動方向の後方でRho分子の活性化がおきていた。

変異ミオシンの作製とアクチン滑走能の測定： 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。興味あることにF775F変異ミオシンでも弱いながらもアクチンを動かすことができることがわ

かった。このことからF775Aでも構造変化を起こしていることが予想できた。

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： 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示唆された。F775AでもATP依存性のFRETが観察できた。

ミオシンのステップサイズの測定： 野生型ミオシンではこれまでの方向どおり6 nmであった。また、F721A変異体はステップが踏めなかった。これに対して、F775Aは野生型と同程度の張力では力発生が観察できなかったが、弱い張力ではアクチンを引っ張ることができたので、力を発生できる変異であると結論できた。また、そのステップサイズは野生型と同じ6 nmであった。

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が発達期の初期にみられるサイレントシナプスの活性化に必須であることを明らかにした。この成果は米国科学アカデミー紀要に掲載され、日刊工業新聞、日本工業新聞、および化学工業新聞がその結果を報道した。
ii) プリオンタンパク質(PrPC)の微小管依存性の細胞内traffickingを観察した。その結果、Kinesin依存性の順行性輸送(140-180 nm/sec)が関与)とDynein依存性の逆行性輸送(1-1.2 μ m/sec)が関与)を初めて明らかにすることが出来た。
iii) パーキンソン病の新規モデルマウスを用いて遺伝子発現の網羅的解析から神経変性極初期における変動分子群を同定した。その中から加齢依存的な神経変性への関与が疑われているPTENの蛋白質立体構造を標的に蛋白質-リガンドスクリーニングツールGOLDを用いてin silicoの結合化学化合物スクリーニングを行った。その結果、PTENの活性阻害効果が期待できる候補化合物を同定することができた。

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
Tn/Tm複合体： 結晶化試料のデザインと発現系の改良を行なった。今後は新たな試料を用いての結晶化条件の検索を進めることと、理研播磨研究所と共同で部位限定的なNMRによる構造解析も視野に入れて研究を進める予定である。

心筋Tnリン酸化型変異体： PKAによるリン酸化状態を模する変異体TnI (S23D, S24D) を調製し、TnT/TnC/TnI三量体として再構成した試料の結晶化条件のスクリーニングを行ない、再現良く結晶が得られつつある。今後、SPRING-8でのデータ収集を行い、構造解析を進める予定である。

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3.3 Å分解能で結晶構造を得た。得られた成果がNature誌にArticleとして掲載された。

ii) イオン交換輸送体調節因子複合体

CHP/NHE複合体を大量精製し、良質の結晶(3.5 Å分解能)を作成することに成功した。また機能解析では、NHEには輸送部位とは異なるpHセンサーが存在すること、そのセンサーの制御に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制御されることを明らかにした。

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) : pET系発現ベクターを種々検討したところ、N末にHis-tagを持つpET14bにより大量発現できることがわかった。この場合は膜タンパク質に対するプロテアーゼ欠損の大腸菌を用いて、最も効率の良い発現が可能であることがわかった。

FLAP: pET系発現ベクターを種々検討したところ、C末にHis-tagを持つpET21aを用いることで大量発現できることがわかった。この場合も膜タンパク質に対するプロテアーゼ欠損の大腸菌によって最も効率の良い発現が認められた。

核内受容体PPAR α : 上記、mPGESおよびFLAP両方の標準的な阻害剤としてMK-886が同定されているが、このMK-886は同時に核内PPAR α のアンタゴニストであることが報告された。また一方で赤ワインに含まれるポリフェノール/レスベラトロールが1) PPAR α を選択的に活性化すること、2) 脳保護効果をPPAR α を介して持つことを明らかにした。PPAR α に関しても大腸菌での発現系を構築し、大量発現、精製、結晶化、構造解析を目指す。

iv) 細胞内情報伝達分子

BAIAP2のアクチン束化・低分子GTP結合タンパク質結合ドメインの分子構造を2 Å分解能で明らかにした。BAIAP2とRacの複合体の結晶化に成功した。

4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

i) 精製したP2X2受容体をAFMで観察する実験では、大気中において径20 nmほどの個々のタンパク質像が得られた。また、大量のタンパク質が会合した像も認められた。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、細胞内にある2つのシステイン残基の役割を検討した。ii) C60誘導体の合成に関して、数種のフレロピロリジンを原料として光ラベル化剤の合成を試みたところ、反応性および溶解性の点で優れていたジメチルフレロピロリジンを原料とすることにした。アジドフェニル誘導体の合成においては酸クロライドとの反応で目的物質を得たが、ジアジリン誘導体と合成においてはヤマグチ試薬との反応が必要であった。いずれの誘導体も合成後、カラムクロマトグラフィーにより、cis/transの分離が可能であった。AFM探針修飾用分子として分子内に探針結合部位およびアセチレン骨格を有する分子をデザインした10数ステップのスキームのうち、目的化合物の数ステップ手前まで到着した。

iii) リン酸基を骨格内に持つ材料では、細胞増殖の亢進が確認された。リン酸基同様、硫酸基を骨格内に含む材料では、骨分化の促進が見られなかったが、細胞機能はコントロールと比較して、他の材料ほどの影響を受けなかった。また、基本骨格である多糖の違いにより、細胞機能への影響も異なることが認められた。カルボキシル基では、分化機能は促進されたものの細胞増殖が著しく阻害された。

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リン酸化タンパクのスポットの各タンパクを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のペプチドマスマ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、細胞骨格調節タンパク質が同定された。ラテックスアレルゲンプロテオミクス手法で解析した結果、ラテックスアレルゲンとして報告されているHev b9やHev b7、等がIgE結合性タンパク質として同定された。そのほかにも、今まで知られていなかったタンパク質がIgE抗体により特異的に認識されることも明らかになった。

D. 考察

1) 分子機能イメージング循環系

- ①細胞運動時の極性形成にRap1が運動方向の先端部位で活性化し、
- ②Rhoが細胞運動の後方で活性化することが明らかになった。

本研究成果はRaichuという活性化可視化プローブがあつて始めてもたらされる成果であり、今後も分子活性化のイメージングを病態生理の理解に役立てていくことが必要と考えた。

ミオシンの力発生に関して、F 7 2 1 A 変異と

F775A変異の両方を野生型と比較することでこの化学変化—構造変化の重要な部位を決定することができた。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を組みあわせることでミオシン頭部の構造変化が力発生に不可欠であることを示した。

ミオシンのステップサイズは野生型でもF775A変異ミオシンでも6nmと変わらないことがわかった。ミオシンの構造変化で引き起こされるミオシンのステップは6nmであり、その力の強弱にはF775周囲のアミノ酸との結合が関与することが予想された。

2) 分子機能イメージング神経系

i) 脳の発達初期に見られるサイレントシナプスの成熟にBDNFおよび神経活動が相乗的に作用するという知見は、発達障害の克服や早期の教育的働きかけにも重要な示唆をあたえるものである。

ii) 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、プリオン蛋白質の順行性並びに逆行性輸送の詳細を明らかにすることが出来た。

iii) *in silico*で効率よく標的タンパク質に対するリガンドをスクリーニングする方法を開発し、変性疾患に関与する可能性のあるタンパク質に対する化合物候補を得た。この知見は神経変性の極初期の可視化や標的分子特異的治療技術の開発に繋がると考えられる。

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

筋肉の収縮弛緩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。心筋TnにおいてはPKAによるTnIリン酸化が重要な生理機能を担うこと、Tn遺伝的変異が心筋症の発症原因の一つと考えられることなどから、これらの点に着目して構造研究を進める。これらは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:

今年度はCHP/NHE複合体を大量精製し、かなり良質の結晶(3.5オングストローム分解能)を作成することに成功した。また機能解析では、NHEには輸送部位とは異なるpHセンサーが存在すること、そのセンサーの制御に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制御されることを明らかにした。

iii) プロスタグランジン関連タンパク

大量発現系の構築が難しいとされる膜タンパク質mPGES, FLAPについて、結晶化を目指した大量発現系の構築に成功した。現在の結晶化に向けて、その条件検討に入ったが、同時に阻害剤との結合など、その生化学的な性質、発現ベクターの微調節などを検討する。

iv) 細胞内情報伝達分子

内皮細胞の新規流れ応答遺伝子MIMはBAIAP2などと進化的に保存されたドメインを共有する、新規アクチン束化たんぱく質ファミリーをなしており、今後これらの活性調節、機能、病態との関連を明らかにする必要がある。結晶解析で得られたBAIAP2のアクチン束化・低分子GTP結合タンパク質結合ドメインの分子構造から、これらのアクチン束化タンパク質がダイマーとして存在することが明らかとなった。

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、昆虫細胞発現系の利用が適していることが示された。そして、ATP受容体タンパク質のAFM観察像を初めて得ることができた。また、ATP受容体の構造-機能相関の研究では、細胞内にある9番目のシステイン残基が酸化状態にあり、正常なATP応答性に関与すること、および、細胞外のイオン・チャネル活性に必須なジスルフィド結合の下流領域がβシート構造を取ることが示された。

酵素阻害活性を有するナノ粒子C60の光ラベル化誘導体を合成したがこの誘導体により酵素中のC60結合部位など阻害メカニズムの解明、および、活性の向上が期待され、医薬品候補化合物となる可能性が示された。

鋭利な有機化合物によるAFM探針先端の修飾によりタンパク質等非電導性サンプルのイメージングにおける解像度の向上が見込まれる。

種々の官能基を持つ多糖からなる材料を用いて細胞への影響を検討したことで、単に単一の官能基を導入するだけでは不十分であることが示された。増殖因子などとの複合化がより迅速な骨組織再生のための材料に必要であり、そのような材料の開発を試みる。

プロテオミクスの手法により、リン酸化タンパク質およびタンパク質抗原を迅速に検出・同定できる

ことが明らかになった。

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

i) 脳の発達初期に存在するサイレントシナプスの成熟に脳由来神経栄養因子, BDNFが必須であることを明らかにした。ii) 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。

iii) *in silico*で、三量体Gタンパク質共役型受容体に特異的に結合する化合物を効率よくスクリーニングする方法を開発した。

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・大量精製と一部結晶化に成功した。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)、およびそれらのタンパク質と関連する核内受容体PPAR α に関して大量発現させることに成功した。現在、結晶化に向けて条件などを検討中である。

細胞内情報伝達分子に関しては、低分子GTP結合タンパク質との複合体や全長の結晶構造を明らかにすることにより、その活性調節機構を明らかにすることが期待される。また、F-アクチン結合体の電子顕微鏡観察により、アクチン束化の分子機構を明らかにすることが期待される。

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、第一にリン酸基表面で、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) Kogata N, Masuda M, Kamioka Y, Yamagishi A, Endo A, Okada M, Mochizuki N. : Identification of fer tyrosine kinase localized on molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell*, 14: 3553-3564, 2003.
- 2) Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Masuda M, Mochizuki N. : EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 93: 23-31, 2003.
- 3) Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N., Nagashima K, Matsuda M. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.*, 162: 1-10, 2003.
- 4) Endo A, Fukuhara S, Masuda M, Ohmori T., Mochizuki N. : Selective inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2) identifies a central role for VEGFR-2 in human aortic endothelial cell responses to VEGF. *J. Receptor Signal Transduction.*, 23: 239-254, 2003

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) Hoshino M, Nakamura S: Small GTPase Rin Induces Neurite Outgrowth through Rac/Cdc42 and Calmodulin in PC12 Cells. *J. Cell Biol*, 163: 1067-1076, 2003.
- 2) Kohara K, Kitamura A, Adachi N, Mishida M, Itami C, Nakamura S, Tsumoto T: Inhibitory but not excitatory cortical neurons require presynaptic Brain-derived neurotrophic factor for dendritic development, as revealed by chimera cell culture. *J. Neurosci*, 23: 6123-6131, 2003. selected as This Week in The Journal.
- 3) Itami C, Kimura F, Kohno T, Matsuoka M, Ichikawa M, Tsumoto T, Nakamura S: Brain - derived neurotrophic factor -dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 13069-13074, 2003.
- 4) Harada T, Harada C, Wang Y.L, Osaka H, Amanai K, Tanaka K, Takizawa K, Setsuie R, Sakurai M, Sato M, Noda M, Wada K: Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo. *Am. J. Pathol*, 164: 59-64, 2004.
- 5) Amada K, Santo-Yamada Y, Wada K: Stress - induced impairment of inhibitory avoidance learning in female neuromedin B receptor - deficient mice. *Physiol. Behav*, 78: 303-309, 2003.
- 6) Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang Y.L, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K: Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 304: 176-183, 2003.
- 7) Osaka H, Wang Y.L, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun Y.J, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum. Mol. Genet*, 12: 1945-1958, 2003.
- 8) Sekiguchi S, Yoshikawa Y, Tanaka S, Kwon J, Ishii Y, Kyuwa S, Wada K, Nakamura S, Takahashi K: Immunohistochemical analysis of protein gene product 9.5, a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, during placental and embryonic development in the mouse. *Exp. Anim*, 52: 365-369, 2003.
- 9) Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya

NS, Kaneko K: Non-glycosylphosphatidy inositol(GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. *Amyloid*. in press.

- 10) Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Microtubules - associated intracellular localization of the NH2 - terminal cellular prion protein fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 313: 818-823, 2004.
- 11) Korth C, Kaneko K, Groth D, Heye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene. *PNAS*, 100: 4784-4789, 2003.
- 12) Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Stimulation of cellular prion protein expression by TSH in human thyrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 305: 1034-1039, 2003.
- 13) Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y: Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophys. J*, 85: 1176-1185, 2003.
- 14) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Absence of association between codon 129/219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan. *Ann. Neurol*, 54: 553-554, 2003.
- 15) Hachiya NS, Sakasegawa Y, Kaneko K: Therapeutic approaches in prion disease. *J. Health Sci*. 49: 267-272, 2003.

2.学会発表

Itami C, Kimura F, Tsumoto T, and Nakamura S. BDNF-dependent unmasking of silent synapses in developing mouse barrel cortex, Society of Neuroscience Meeting, satellite symposium, Nov. 6, 2003, New Orleans

3) 分子構造イメージングx線回折

1. 論文発表

(研究業績「欧文」)

【原著】

- 1) T. Pang, H. Mori, S. Wakabayashi et al. : Role of Calcineurin B Homologous Protein in pH Regulation by the Na⁺/H⁺ Exchanger 1: Tightly Bound Ca²⁺ Ions as Important

- Structural Elements. *Biochemistry*, 2004 (in press).
- 2) S. Wakabayashi, et al.: Kinetic dissection of two distinct proton binding sites in Na⁺/H⁺ exchangers by measurement of reverse mode reaction. *J. Biol. Chem.* 43580-43585, 2003.
 - 3) S. Wakabayashi, et al.: Evidence for involvement of the putative first extracellular loop in differential volume-sensitivity of the Na⁺/H⁺ exchangers NHE1 and NHE2. *Biochemistry* 42: 1086-1094, 2003.
 - 4) S. Wakabayashi, et al.: Expression of Calcineurin B Homologous Protein 2 Protects Serum Deprivation-Induced Cell Death by Serum-Independent Activation of Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 277: 43771-43777, 2002.
 - 5) S. Wakabayashi, et al.: Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 Oppositely Change pH-Sensing of Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1. *J. Biol. Chem.* 2003 (in press).
 - 6) H. Inoue, Y. Taba, Y. Miwa, C. Yokota, M. Miyagi, T. Sasaguri: Induction of cyclooxygenase-2 expression by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Adv Exp Med Biol.* 525: 141-144, 2003.
 - 7) C. Yokota, Y. Kuge, H. Inoue, M. Tagaya, G. Kito, T. Susumu, N. Tamaki, K. Minematsu: Post-ischemic cyclooxygenase-2 expression is regulated by the extent of cerebral blood flow reduction in non-human primates. *Neurosci. Lett.* 341: 37-40, 2003.
 - 8) Y. Taba, M. Miyagi M, Y. Miwa, H. Inoue, F. Takahashi-Yanaga, S. Morimoto, T. Sasaguri: 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J2 and laminar shear stress stabilize c-IAP1 in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285: H38-H46, 2003.
 - 9) C. Yokota C, H. Inoue, Y. Kuge, T. Abumiya M. Tagaya, Y. Hasegawa, N. Ejima, N. Tamaki, K. Minematsu: Cyclooxygenase-2 expression associated with spreading depression in a primate model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23: 395-398, 2003.
 - 10) S. Han, H. Inoue, L.C. Flowers, N. Sidell: Control of COX-2 gene expression through peroxisome proliferator-activated receptor γ in human cervical cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 9: 4627-4635, 2003.
 - 11) H. Inoue, X. Jiang, T. Katayama, S. Osada, K. Umesono, S. Namura: Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor α in mice. *Neurosci. Lett.* 352: 203-206, 2003.
 - 12) S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda, and Y. Maeda: Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form. *Nature*, 424: 35-41, 2003.
 - 13) Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Masuda M, Mochizuki N.: EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 93:23-31, 2003.
 - 14) Kogata N, Masuda M, Kamioka Y, Yamagishi A, Endo A, Okada M, Mochizuki N.: Identification of Fer tyrosine kinase localized on microtubules as a platelet endothelial cell adhesion molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 14:3553-64, 2003.
 - 15) Yamagishi A, Masuda M, Ohki T, Onishi H, Mochizuki N.: A novel actin-bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem*, 2004 Jan 29 (Epub ahead of print).
 - 16) H. Kitagawa, T. Yamazaki, T. Akiyama H. Mori, K. Sunagawa: Effects of ketamine on exocytotic and non-exocytotic noradrenaline release. *Neurochemistry International*, 42: 261-267, 2003.
 - 17) H. Kasahara, E. Tanaka, N. Fukuyama, E. Sato, --H. Mori: Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of FGF4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia. *JACC*, 41: 1056-1062, 2003.
 - 18) N. Nagaya, M. Kanda, M. Uematsu, N. Fukuyama, T. Horio, --- H. Mori: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*, 108: 889-895, 2003.
 - 19) T. Akiyama, T. Yamazaki, H. Mori, K. Sunagawa: Inhibition of cholinesterase elicits muscarinic receptor-mediated synaptic transmission in the rat adrenal medulla. *Auton Neurosci*, Sep30:107(2): 65-73, 2003.
 - 20) E. Sato, Y. Hayashi, R. Gerner, E. Tanaka, H. Mori, et al.: Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma and

applications. Jpn J Med Imag Inform Sci, 20: 154-161, 2003.

- 21) E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, H.Mori: Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma. Jpn J Med Phys, 23(2): 123-131, 2003.
- 22) N.Tokunaga, T.Yamazaki, T.Akiyama, S.Sano, H.Mori: In vivo monitoring of norepinephrine and its metabolites in skeletal muscle. Neurochemistry International. 43: 573-580, 2003.
- 23) M.Shirai, J.T.Pearson, A.Shimouchi, N.Nagaya, H.Tsuchimochi, I. Ninomiya and H. Mori: Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries. Brit J Pharmacol. 139: 899-910, 2003.
- 24) N.Nagaya, H.Okumura, M.Uematsu, W.Shimizu, F.Ono, M.Shirai, H.Mori, et al. : Repeated inhalation adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. Am J Physiol Heart circ Physiol. 54(5): 2125-2131, 2003.
- 25) N.Tokunaga, T.Yamazaki, T.Akiyama, H.Mori: Detection of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in rabbit skeletal muscle microdialysate. J Chromatogr, 798:163-166, 2003.
- 26) E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, H.Mori, et al.: Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma. Rev.Sci.Instrum. 74: 5236-5240. 2003.
- 27) N.Tokunaga, T.Yamazaki, T.Akiyama, S.Sano, H.Mori: Acute limb ischemia does not facilitate but inhibits norepinephrine release from muscle sympathetic nerve endings in anesthetized rabbit. J.Cardiovasc Pharmacol. 42(Suppl.1): S7-S10, 2003.

【総説】

なし

【著書】

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

(研究業績「和文」)

【原著】

- 1) 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. ビタミン, 77: 449-458, 2003.
- 2) 増田道隆: ざり応力センサー分子としての PECAM-1. 血管医学, 4:259-266, 2003.

【総説】

- 1) 武田壮一: 筋収縮・弛緩を調節するタンパク質トロポニンの結晶構造. メディカルドゥ Bio Medical Quick Review Net, No.008, 2003.
- 1) 前田雄一郎, 武田壮一, 森本幸生, 大槻馨男: トロポニンの結晶構造とカルシウム調節のメカニズム. 蛋白質・核酸・酵素, Vol. 48 No. 14:1877-1889, 2003.
- 2) 武田壮一, 前田雄一郎: トロポニンの結晶構造と筋収縮調節機構. 生化学, ミニレビュー 第 75 卷 第 12 号: 1540-1545. 2003.
- 3) 武田壮一, 前田雄一郎: ヒト心筋トロポニンの結晶構造. SPring-8 利用者情報 最近の研究から, Vol.8 No.5: 348-352, 2003.
- 4) 河合敏昭, 鈴木克彦, 高瀬欣治, 川上博己, 望月亮, 山口孝一, 田中越郎, 笠原啓史, 福山直人, 篠崎芳郎, 盛英三, 東将浩, 西上和宏, 田中良一, 内藤博昭: 微小血管撮影装置開発と再生血管の可視化. RADIOISOTOPES, 52 : 53-56, 2003.
- 5) 秋山剛, 山崎登自, 盛英三: 虚血部心臓交感神経週末におけるノイエピネフリン動態. 医学書院呼吸と循環, 3 : 269-275, 2003.

【著書】

- 1) 知久正明, 西上和宏, 佐藤英一, 盛英三: 放射光および普及型X線源を用いた微小血管造影による再生血管の評価. 機能代謝画像診断法と分子画像, 西村恒彦編, 南山堂: 177-186, 2003.
- 2) 藤井隆文, 永谷憲歳, 盛英三: ゼラチンによる遺伝子の徐放化と細胞-遺伝子ハイブリッド治療への応用. 遺伝子医学別冊・ドラッグデリバリーシステムDDS技術の新たな展開とその活用法, 田畑泰彦編, メディカルドゥ: 194-199, 2003
- 3) 國本聡, 笠原啓史, 福山直人, 田中越郎, 知久正明, 永谷憲歳, 西上和宏, 岩畔英樹, 増田治史, 浅

原孝之、盛英三：遺伝子による血管新生。ここまで進んだ再生医療の実際、田畑泰彦編、羊土社：116-123、2003

2. 学会発表

- ① S. Wakabayashi, T. Pang, T. Hisamitsu, Y. Ben Ammar, M. Shigekawa: Intracellular pH Regulation by the Na^+/H^+ Exchanger: Calcineurin Homologous Protein 2 as a Potential Target for Anticancer Therapy: 第76回日本生化学会、シンポジウム、2003年10月、パシフィコ横浜
- ② T. Pang, T. Hisamitsu, M. Shigekawa, S. Wakabayashi: Role of Calcineurin B Homologous Protein in pH Regulation by the Na^+/H^+ Exchanger: 第76回日本生化学会大会、2003年10月、パシフィコ横浜
- ③ T. Hisamitsu, T. Pang, M. Shigekawa, S. Wakabayashi: Homodimer of the Na^+/H^+ Exchanger Detected by Symmetric Cross-linking at the Extracellular Sites: 第76回日本生化学会大会、2003年10月、パシフィコ横浜
- ④ 若林繁夫、久光隆、パン・テンシヤン、ヨセフ・ベンアマー：動物細胞 Na^+/H^+ exchangerのpHセンシング機構、第29回生体エネルギー研究会：2003年12月、東工大
- ⑤ 久光 隆、パン・テンシヤン、若林繁夫：動物細胞 Na^+/H^+ exchangerのオリゴマー形成と活性調節：第29回生体エネルギー研究会、2003年12月、東工大
- ⑥ 若林 繁夫：イオントランスポータの最前線： Na^+/H^+ アンチポータを中心に：第22回聴覚生理研究会、2003年10月、幕張メッセ
- ⑦ Shigeo Wakabayashi: Structure, Function and Regulation of the Na^+/H^+ Exchanger: Role of Interacting Proteins: the 9th Southeast Asian-Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists (第9回東南アジア - 西太平洋地域・薬理学会)、2003年8月、韓国釜山
- ⑧ 武田壮一、山下敦子、前田佳代、前田雄一郎：「トロポニンの結晶構造と筋収縮制御の分子機構」：第3回日本蛋白質科学会年会(2003)
- ⑨ 前田雄一郎、武田壮一、小田俊郎「原子構造から見たアクチンフィラメントの柔らかさ」第41回生物物理学会年会シンポジウム、2003
- ⑩ 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41回日本生物物理学会年会、2003

- ⑪ 松原孝宜、五十嵐智子、武田壮一、前田雄一郎、盛 英三「心筋トロポニンのリン酸化型変異体の結晶構造解析」第41回日本生物物理学会年会、2003
- ⑫ 武田壮一、前田雄一郎：「トロポニンの結晶構造と筋収縮制御機構」：日本結晶学会年会(2003)
- ⑬ Soichi Takeda “Crystal structure of troponin and the molecular mechanism of muscle regulation” International Symposium on the creation of novel nanomaterials(ISCNN),2004, Osaka (invited lecture).
- ⑭ 盛 英三他：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：ナノメディシンフォーラム2004
- ⑮ 盛 英三他：第68回日本循環器学会総会プレナリーセッション日本型移植医療をどう作るか -細胞・組織・臓器-(2004)

H 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

4)原子間力顕微鏡等による分子構造解析

1 論文発表

(研究業績「欧文」)

【原著】

- 1) Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y. and Nakazawa, K.: Estrogens inhibit L-glutamate uptake activity of astrocytes via membrane estrogen receptor α . J. Neurochem, 86: 1498-1505, 2003.
- 2) Nakazawa, K., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K. and Ohno, Y.: Intracellular disulfide bond that affects ATP responsiveness of P2X2 receptor/channel. Eur. J. Pharmacol, 474: 205-208, 2003.
- 3) Nakazawa, K. and Ohno, Y. Block by phytoestrogens of recombinant human neuronal nicotinic receptors. J. Pharmacol. Sci., 93: 118-121, 2003.
- 4) Nakazawa, K., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R.,

- Takeuchi, K. and Ohno, Y. Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation. *Eur. J. Pharmacol*, 2003, in press.
- 5) Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y., and Ito, Y.: Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca²⁺ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci. Lett.*, 2003, in press.
 - 6) Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y., and Ito, Y.: Modulation of voltage-gated Ca²⁺ current by 4-hydroxynonenal in dentate granule cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, in press.
 - 7) Okada E, Komazawa Y, Kurihara M, Inoue H, Miyata N, Okuda H, Tsuchiya T, Yamakoshi Y: Synthesis of C60 Derivatives for Photoaffinity Labeling. *Tetrahedron Lett.*, 45: 527 – 529, 2004.
 - 8) Azov V A, Skinner P J, Yamakoshi Y, Seiler P, Gramlich V, Diederich F: Functionalized and Partially or Differentially Bridged Resorcine[4]arene Cavitands. *Helv. Chim. Acta*, 86: 3648 – 3670, 2003.
 - 9) Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T: Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene (C60) as Potential Medicines, *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 12803 – 12809, 2003.
 - 10) Nishikawa K, Yamakoshi Y, Uemura I, Tominaga N: Ultrastructural Changes in *Chlamidomonas acidophila* (Chlorophyta) Induced by Heavy Metals and Polyphosphate Metabolism. *FEMS Microbiol Ecology*, 44: 253-259, 2003.
 - 11) Kai Y, Komazawa Y, Miyajima A, Miyata N, Yamakoshi Y.: [60]Fullerenes as a Novel Photoinduced Antibiotic. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 11: 79-87, 2003.
 - 12) Tsuchiya, T.: A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *ASTM*, in press.
 - 13) Nagahata M., Tsuchiya T., et al. : A novel function of N-adherin and Connexin 43: Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan. *Biochem, Biophys. Res. Commun* accepted.
 - 14) Matsuoka A., Tsuchiya T.: Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane film. *J. Biomed. Mater. Res.*, in press.
 - 15) Ahmed, S. and Tsuchiya, T.: Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid. *Animal cell technology*, accepted.
 - 16) Park, J. U. and Tsuchiya, T.: Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. *Animal cell technology*, accepted.
 - 17) Tsuchiya T, Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y.: Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. *Animal cell technology*, in press.
 - 18) Yang, J., Ichikawa, A., Tsuchiya, T.: Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. *Animal cell technology*, in press.
 - 19) Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya, T.: A novel function of connexin32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. *Biochem, Biophys. Res. Commun*, 307: 80-85, 2003.
 - 20) Nakaoka R., Tsuchiya T., Nakamura A.: Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J Biomed Mater Res*, 64A: 439-446, 2003.
 - 21) Isama K, Tsuchiya, T.: Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 24: 3303-3309, 2003.
 - 22) Sumide, T., and Tsuchiya, T.: Effect of multi-purpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J. Biomedical Materials Research Applied Biomaterials*, 64B: 57-64, 2003.
- (研究業績「和文」)
【原著】
山越葉子: 単分子アノマニピュレーションを旨とした超化学分子とナノテクノロジーを用いた解析. 機能性人工レセプターMolecular Gripper の

設計合成及び画像化. 季刊フラーレン, Vol.11
No.2, 169-177, 2003.

2 学会発表

- 1) 中澤憲一, 山越葉子, 生島裕恵, 土屋利江, 大野泰雄 “P2X2受容体タンパク質の調製および原子間力顕微鏡による観察” 第77回日本薬理学会年会 2004年3月
- 2) 佐藤薫, 中澤憲一, 松木則夫, 大野泰雄 “アストロサイトにおけるエストロゲンのグルタミン酸取り込み機構に対する抑制” 第77回日本薬理学会年会 2004年3月
- 3) 生島裕恵, 中澤憲一, 野澤(石井)玲子, 竹内幸一, 大野泰雄 “P2X2受容体のATP反応性に対する細胞内システイン残基の役割” 第77回日本薬理学会年会 2004年3月
- 4) 赤石樹泰, 中澤憲一, 佐藤薫, 齋藤洋, 大野泰雄, 伊藤芳久 “脂質過酸化由来物質 4-hydroxynonenalがラット歯状回顆粒細胞のホールセルCa²⁺電流に及ぼす影響” 第77回日本薬理学会年会 2004年3月
- 5) Nishikawa, K.; Tominaga, N.; Otomo, R.; Yamakoshi, Y.: Polyphosphate Metabolism in *Chlamydomonas acidophila* in Phosphate-limited Conditions under Heavy Metal (Cd) Stress. The 2003 Annual meeting of the American Society of Plant Biologists. (Honolulu, July, 2003.)
- 6) 山越葉子, 甲斐陽子, 宮島敦子, 土屋利江: フラーレン (C60) 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, March, 2003.)
- 7) Nishikawa, K.; Tominaga, N.; Yamakoshi, Y.; Otomo, R.: Change of the Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in *Chlamydomonas acidophila*. The 10th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. (Vancouver, June, 2002.)
- 8) 矢上 健、配島由二、土屋利江ら、: ラテックスアレルギーとしてのisoflavone reductase 第53回日本アレルギー学会総会 (23-25, Oct, 2003)
- 9) 柳楽 勤、土屋利江、阿部康次、長幡 操: 陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進効果, 第6回日本組織工学会大会 (12-13June,2003)
- 10) 柳楽 勤、土屋利江、阿部康次、長幡 操、陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進及び細胞間連絡機構亢進効果, 第25回日本バイオマテリアル学会, (16-17,Dec.2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願2001-311484ギャップ機能亢進剤

特願2001-311485ギャップ機能抑制剤

特願2003-8855ギャップ機能抑制剤

厚生科学研究費補助金 (萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

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)

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(Rap1, Rho)の細胞極性発生時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バキュロウイルス-昆虫細胞系で作製し、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、血管新生や心筋肥大などの病態をイメージングで理解するための研究を展開する。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もとに細胞の病態生理から臓器の病態整理の解明をおこなっていくことを目的としている。

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— 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-Rap1as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。15年度にはこの

Raichu-Rhoを高効率に細胞に導入するべくアデノウイルスRaichu-Rhoを作製した。

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。平成15年度は細胞の極性に関してRho, Rap1分子がどのように関与するかを検討した。一層の培養細胞でスクラッチで傷をつけると細胞は傷に向かって遊走する。このとき発生する細胞の前方・後方の極性にRap1が関与するか否かを検討した。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。アデノウイルスで作製したRaichu プローブが細胞で正しく発現することを293T細胞を用いて確認した。この検出には抗GFP抗体(大阪大学 微生物病研究所 松田道行 教授より供与)を用いた。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。さらに血管内皮細胞は流れ刺激によって細胞の形態を整えるがその際のRho分子の活性化もイメージングで検討した。

Raichu- Rap1, とRho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時間以上経過した細胞をイメージングに用いた。アデノウイルスRaichuプローブは適当なMOIのアデノウイルスを培養細胞に感染させるだけで100%近い細胞で発現をさせることが可能であった。光学系の検出システムはオリンパス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。この比をRoper Scientific社のMetaMorph Ver5.0で解析し画像化した。スクラッチによる細胞遊走時、流れ負荷時のそれぞれRap1, Rhoモニターリング分子のFRET効率をもとに活性化を可視化した。

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 15 年度は 721 番目のフェニルアラニンのアラニンに置換した (F721A) 変異ミオシンに加えて 775 のフェニルアラニンのアラニンに置換した (F775A) も作製した。蛋白質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 変異ミオシンと F775A 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。

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—それぞれの変異ミオシンのミオシン頭部に 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。ATP 添加時の CFP から YFP への FRET を検出することでミオシン頭部の構造変化の有無を検討することを試みた。433 nm で励起したときの YFP の蛍光 (530 nm) 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。

ミオシンのステップサイズの測定 (ナノメートル)

野生型ミオシンは 6 nm のステップでアクチン上を動くことが証明されているが、変異ミオシンでのステップサイズをナノメートル計測システムで測定した。一分子のミオシンの動きをみるためにエバネッセント顕微鏡システムをレーザートラップシステムを活用して、サイズを測定した。

C. 研究結果

HAEC の極性形成時の Rap1 の活性化の可視化：単層培養した HAEC は増殖を停止するが、この過増殖状態でスクラッチで傷をつけると傷に向かって細胞が運動していく。この際に細胞が Rap1 の活性化プローブ Raichu-Rap1 を発現しているために細胞運動のときの Rap1 の活性化を可視化できた。細胞は、創傷に向かって極性を形成するがこれは微小管の形成方向と一致していた。Rap1 の活性化は細胞の運動方向の先端部で見られ、後方では見られなかった。

Raichu-Rho による流れ負荷時の Rho の活性化の可視化：

血管内皮細胞は流れ負荷時にはじめは流れに対して向かう方向に細胞が運動することを明らかにした。このときに Raichu-Rho を発現する細胞の FRET 比を見ると運動方向の後方で Rho 分子の活性化がおきていることがわかった。

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、F775A の変異がおきていることを確認した。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。興味あることに F775F 変異ミオシンでも弱いながらもアクチンを動かすことができることがわかった。このことから F775A でも構造変化を起こしていることが予想できた。

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。アクチンの滑走の予想できたように、F775A でも ATP 依存性の FRET が観察できたことから F775A でも構造変化がおきることが判明した。

ミオシンのステップサイズ

野生型ミオシンではこれまでの報告どおり 6 nm であった。また、F721A 変異体はステップが踏めなかった。これに対して、F775A は野生型と同程度の張力では力発生が観察できなかったが、弱い張力ではアクチンを引っ張ることができたので、力を発生できる変異であると結論できた。また、そのステップサイズは野生型と同じ 6 nm であった。

D. 考察

本年度

- i) 細胞運動時の極性形成に Rap1 が運動方向の先端部位で活性化し
- ii) Rho が細胞運動の後方で活性化することが明らかになった。

これまで増殖因子刺激 (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たが、今年度の研究成果は昨年度の ephrin-A1 刺激と同様に、Rap1 が細胞の運動先端で活性化するという結果と矛盾しない結果をえた。本研究成果は Raichu という活性化可視化プロ

ープがあって始めてもたらされる成果であり、今後も分子活性化のイメージングを病態生理の理解に役立てていくことが必要と考えた。特に情報伝達分子はダイナミックに細胞内で場所を変えるだけでなく、その活性化が重要であることから、今後も本研究の継続が必要である。

ミオシンの力発生にはATP加水分解による構造変化が不可欠と考えられている。本年度F721A変異とF775A変異の両方を野生型と比較することでこの化学変化—構造変化の重要な部位を決定することができた。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を組みあわせることで構造変化と力発生が相関することからもミオシン頭部の構造変化が力発生に不可欠であることを支持した。

ミオシンのステップサイズは野生型でもF775A変異ミオシンでも6nmと変わらないことがわかった。ミオシンの構造変化で引き起こされるミオシンのステップは6nmであり、その力の強弱にはF775周囲のアミノ酸との結合が関与することが予想された。アクチン結合によるATPase活性の変化がおきていないかどうかは今後の検討課題である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

情報伝達系分子Rap1の活性化が細胞極性前方で、Rhoが運動の後方で活性化することを明らかにした。変異ミオシンを用いて力発に不可欠な構造F721を明らかにした。

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

- 1) Kogata N, Masuda M, Kamioka Y, Yamagishi A, Endo A, Okada M, Mochizuki N. : Identification of fer tyrosine kinase localized on molecule-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells. **Mol. Biol. Cell**, 14: 3553-3564, 2003.
- 2) Ogita H, Kunimoto S, Kamioka Y, Sawa H, Masuda M, Mochizuki N. : EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, 93: 23-31, 2003.
- 3) Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N., Nagashima K, Matsuda M. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. **J. Cell Biol.**, 162: 1-10, 2003.

- 4) Endo A, Fukuhara S, Masuda M, Ohmori T, Mochizuki N. : Selective inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2) identifies a central role for VEGFR-2 in human aortic endothelial cell responses to VEGF. **J. Receptor Signal Transduction.** ,23: 239-254, 2003

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の機能発達、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、創薬にむけ、神経変性のごく初期に変動する蛋白質分子の立体構造に基づく *in silico* の結合化合物スクリーニング法を開発した。この研究によって、神経機能分子の細胞内トラフィッキングの詳細が明らかにされつつあり、神経変性疾患などの病因解明、創薬にむけての研究の発展が期待される。

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、種々のイメージング技術を用いて動態を計測した。また、分子機能を明らかにするために、ノックアウトマウスを導入し、急性脳切片を用いた、イメージングおよび電気生理学的解析を行った。さらに、*in silico* でタンパク質の予測構造にもとづく、特異的なリガンドのスクリーニングを行った。

(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 が発達期の初期にみられるサイレントシナプスの活性化に必須であることを明らかにした。この成果は米国科学アカデミー紀要、2003年、10月28日号に掲載され、15年10月28日、文部科学省において CREST との共同で記者発表された(中村俊)。また、日刊工業新聞、日本工業新聞、および化学工業新聞がその結果を報道した。
- 2) プリオンタンパク質 (PrP^C) と GFP とのキメラタンパク質を培養細胞に強制発現し、デジタルビジョン蛍光顕微鏡により PrP^C の微小管依存性の細胞内 trafficking を観察した。その結果、

Kinesin 依存性の順行性輸送 (140-180 nm/sec, PrP(53-91)が関与) と Dynein 依存性の逆行性輸送 (1-1.2 μ m/sec, PrP(23-33)が関与) を初めて明らかにすることが出来た。

- 3) 神経変性極初期変動分子の蛋白質立体構造化に基づく *in silico* の結合化学化合物スクリーニング。パーキンソン病の病因遺伝子産物である I93M 変異型 UCH-L1 を利用して加齢依存性的かつ DA ニューロン特異的な神経変性を発症する新規モデルマウスを用いて遺伝子発現の網羅的解析から神経変性極初期における変動分子群を同定した。これら極初期変動分子群の中には熱ショック蛋白質や物質輸送に関わる分子、脂質代謝、ガン抑制遺伝子産物 PTEN などが含まれていた。その中から加齢依存的な神経変性への関与が疑われている PTEN の蛋白質立体構造を標的に蛋白質-リガンドスクリーニングツール GOLD を用いて *in silico* の結合化学化合物スクリーニングを行った。その結果、PTEN の活性阻害効果が期待できる候補化合物を同定することができた。

D. 考察

- 1) 脳の発達初期に見られるサイレントシナプスの成熟に BDNF および神経活動が相乗的に作用するという知見は、発達障害の克服や早期の教育的働きかけにも重要な示唆をあたえるものである。
- 2) 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として、プリオン蛋白質の順行性並びに逆行性輸送の詳細を明らかにすることが出来た。
- 3) *in silico* で効率よく標的タンパク質に対するリガンドをスクリーニングする方法を開発し、変性疾患に関与する可能性のあるタンパク質に対する化合物候補を得た。この知見は神経変性の極初期の可視化や標的分子特異的治療技術の開発に繋がると考えられる。

E. 結論

- 1) 脳の発達初期に存在するサイレントシナプスの成熟に脳由来神経栄養因子, BDNF が必須であることを明らかにした。この成熟過程はグルタミン酸受容体のうち AMPA 受容体のシナプスへの輸送過程が鍵となっていることを示すことができた。
- 2) 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。
- 3) *in silico* で、三量体 G タンパク質共役型受容体に特異的に結合する化合物を効率よくスクリーニングする方法を開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Hoshino M, Nakamura S: Small GTPase Rin Induces Neurite Outgrowth through Rac/Cdc42 and Calmodulin in PC12 Cells. *J. Cell Biol*, 163: 1067-1076, 2003.
- ② Kohara K, Kitamura A, Adachi N, Mishida M, Itami C, Nakamura S, Tsumoto T: Inhibitory but not excitatory cortical neurons require presynaptic Brain-derived neurotrophic factor for dendritic development, as revealed by chimera cell culture. *J. Neurosci*, 23: 6123-6131, 2003. selected as This Week in The Journal.
- ③ Itami C, Kimura F, Kohno T, Matsuoka M, Ichikawa M, Tsumoto T, Nakamura S: Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 13069-13074, 2003.
- ④ Harada T, Harada C, Wang Y.L, Osaka H, Amanai K, Tanaka K, Takizawa K, Setsuie R, Sakurai M, Sato M, Noda M, Wada K: Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury *in vivo*. *Am. J. Pathol*, 164: 59-64, 2004.
- ⑤ Amada K, Santo-Yamada Y, Wada K: Stress-induced impairment of inhibitory avoidance learning in female neuromedin B receptor-deficient mice. *Physiol. Behav*, 78: 303-309, 2003.
- ⑥ Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang Y.L, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K: Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 304: 176-183, 2003.
- ⑦ Osaka H, Wang Y.L, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun Y.J, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum. Mol. Genet*, 12: 1945-1958, 2003.
- ⑧ Sekiguchi S, Yoshikawa Y, Tanaka S, Kwon J, Ishii Y, Kyuwa S, Wada K, Nakamura S,

Takahashi K: Immunohistochemical analysis of protein gene product 9.5, a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, during placental and embryonic development in the mouse. *Exp. Anim*, 52: 365-369, 2003.

- ⑨ Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Non-glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. *Amyloid*. in press.
- ⑩ Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Microtubules - associated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 313: 818-823, 2004.
- ⑪ Korth C, Kaneko K, Groth D, Heye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene. *PNAS*, 100: 4784-4789, 2003.
- ⑫ Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Stimulation of cellular prion protein expression by TSH in human thyrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 305: 1034-1039, 2003.
- ⑬ Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y: Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophys. J*, 85: 1176-1185, 2003.
- ⑭ Ohkubo T, Sakasegawa Y, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Absence of association between codon 129/219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan. *Ann. Neurol*, 54: 553-554, 2003.
- ⑮ Hachiya NS, Sakasegawa Y, Kaneko K: Therapeutic approaches in prion disease. *J. Health Sci*. 49: 267-272, 2003.

2. 学会発表

Itami C, Kimura F, Tsumoto T, and Nakamura S. BDNF-dependent unmasking of silent synapses in developing mouse barrel cortex, Society of Neuroscience Meeting, satellite symposium, Nov. 6, 2003, New Orleans

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 H14年度に引き続き、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) を用いて解析した。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、アクチン束化タンパクを含めた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、増田道隆)

A. 研究目的

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要約する。

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Ca²⁺、H⁺、Na⁺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⁺/H⁺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Ca²⁺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

にしたが、実際COX-2選択的阻害剤によっても副作用があることがわかってきた。そこで、新しい創薬の標的としてPG産生に関わる膜結合型グルタチオン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。

4) 細胞内情報伝達分子

Rhoファミリー低分子GTP結合タンパク質はアクチン細胞骨格の制御に中心的な役割を果たしている分子であり、筋収縮を含む細胞運動や細胞接着の制御に深く関わっている。低分子GTP結合タンパク質は種々多様なエフェクター分子の活性を制御することによりその機能を発揮しているが、近年、Rhoキナーゼ阻害剤が臨床応用されたように創薬ターゲットとして注目されている。本研究ではRhoファミリー低分子GTP結合タンパク質のエフェクター分子である新規アクチン束化タンパク質のアクチン束化やRac、Cdc42による制御の分子機構を明らかにするため、結晶構造の解明を目指す。

B. 研究方法

構造解析の対象となるタンパク分子ごとにその研究方法を要約する。

i) 心筋収縮タンパク調節分子

変異TnおよびTmの調製: ヒト心筋Tnサブユニット (TnI, TnIおよびTnC) 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。また、TnIのPKAリン酸化型変異体 (S23D, S24D) の調製を行った。得られた各サブユニ