

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

神経細胞再生因子の解析

分担研究者 霜田幸雄 東京女子医科大学 総合研究所 研究部

研究要旨

神経系の再生に関して神経幹細胞、胚性幹細胞などの幹細胞あるいは骨髄間質細胞などを用いた再生実験が多くなされている。また、神経軸索の再生についても神経成長因子あるいは神経成長阻害因子などを含めた再生機構の解析がすすめられている。本研究は神経軸索の再生に関与する物質の解析と再生の機構を解析することを目的に行った。昨年度の報告のように、視神経は完全に切断された状態でも形態的には1週間ほどで再生することが認められた。軸索が比較的短時間に再生することから、再生に関して切断部から細胞体に対して「軸索損傷」のシグナルが伝えられていることが考えられる。切断端で生じる最初の現象は損傷電流による脱分極と思われるが、この脱分極が神経の再生に対して影響を及ぼしているとは考えにくい。次に、切断端から何らかの物質が放出あるいは合成され、これが細胞体に運ばれることが考えられる。本研究は、切断後の神経軸索により、このような物質の存在の有無を TOFMAS を用いて検証した。この結果、切断した神経軸索から分子量約 11,800 の物質が検出された。また、この物質は時間と共に細胞体に近い方で検出された。以上のことから、神経軸索の切断端からある物質が細胞体に向かって移動することが示唆された。

A. 研究目的

近年、細胞再生医療の研究が盛んになり多くの臓器で研究、開発が行われている。かつて、カハールは「神経細胞は神経組織が成熟した後には分裂、増殖することはない。」と述べ、それ以来そのように理解されてきた。しかし、現代の再生医療研究から神経細胞も例外

ではなく他の細胞と同様に再生することが示されるようになった。

これらのことは、アルツハイマー病やパーキンソン病などの脳細胞の変性による疾患あるいは脳梗塞による神経細胞の壊死からの回復、さらには脊髄損傷といった外傷からの回復に新たな治

療方法を示すものとなっている。

このような細胞再生医療において基本的なこととなっているのが幹細胞であるといえる。未分化の胚性幹細胞やある程度分化の進んだ神経幹細胞などの細胞を用いて組織を形成させる方法である。一方、魚類や両生類などの比較的下等な動物では神経細胞はそれ自体再生する能力があり、とくに軸索な

B. 研究方法

魚類の眼は視神経の再生を観察するのに有利な形態的特徴を持っている。ほ乳類などでは眼球内を環流する動脈および静脈は視神経束の中を走行しているが魚類では視神経の外側を視神経に平行して走行している。したがって、血管を残し視神経だけを切断することが容易であり、網膜を含めた眼球を損傷させることがない(図1)。

実験には体長 20cm 前後のコイ (*Cyprinus carpio*)を用いた。動物を冷血動物用の麻酔薬 FDA100 (田辺製薬)にて麻酔させ、眼球をわずかに引き出し、眼球から約 4 mm の部位で視神経を切断した。その後、水槽に戻し飼育した。

この実験では切断後の軸索内の物質の同定とその物質の移動を目的としたため術後一定の時間間隔で視神経を摘出して解析を行った。

切断直後の眼球と視神経を摘出し、視神経切断端から約 1mm 毎に切り、それぞれの切片を直ちにマトリックス溶液に浸した。

次に切断 2 時間後の眼球と視神経につ

どの再生は知られていた。本研究の目的は損傷を受けた神経細胞の再生に関与していると考えられる物質を明らかにし、その物質の作用機序を知ることにある。本年度は魚類の視神経を用いて損傷神経の再生を誘引すると考えられる物質を明らかにすることを目的に実験を行った。

いても同様の手順で試料を作成した。

本実験で使用したマトリックス溶液は 1%TFA (トリフルオロ酢酸) 350 μ l と 100%アセトニトリル 150 μ l の混合液に 5mg の DHA (シナピン酸) を溶解したものをを用いた。この溶液 5 μ l をエッペンドルフチューブに取り、この中に切断した神経軸索を入れた。マトリックス溶液は視神経に含まれる体液に比較してはるかに低張であるため、切断した神経軸索の細胞内液はマトリックス溶液中に浸潤すると考えられた。

このようにして得られた試料をステンレスのサンプルプレート上に滴下し、乾燥させ飛行時間型質量分析装置 Maldi-TOFMS (島津製作所) によって解析を行った。

また、切断しない (正常に近い状態) 軸索の解析のために断頭後約 1 時間経ってから摘出した軸索についても同様の方法で試料を作成し、その解析を行った。

C. 研究結果

1) 切断神経におけるマススペクトル

視神経を切断し1時間後に視神経を摘出しマススペクトルを記録した。検出に用いた試料は摘出した視神経全体(長さ約3mm)であった。図2にその1例を示すが、切断というもつとも過激な損傷を受けた視神経では分子量約11,900の物質の存在が確認された。この分子量の物質についてはまだその構造など全く不明ではあるが、損傷(切断)を受け視神経のいずれの標本でも記録することができた。すなわち、損傷という刺激によって発現した物質と考えられた。

2) 物質の移動の経過

次に、損傷によって発現されると考えられるこの物質が損傷後、軸索内を移動するものかどうかを検討した。視神経を切断し2時間後に視神経および眼球を摘出し、視神経を切断端から0.5mmづつの長さに切断しそれぞれの切片をTOFMASにかけマススペクトルを記録した(図3)。図中の模式図は各試料の位置を示している。切断端から0.5mmの部分では分子量が約11,000から13,000の物質の存在が確認された(図3A)。この分子のピークが5,000以下の低分子のピークに比較して低いのは量的な原因も考えられるが、それ以上にイオン化されやすいかどうかという影響が大きいと考えられている。さらに、4,000付近のピークおよび2,000以下のピークはいずれの試料からも検出されるものであり、損傷(切断)という刺激によって発現したものではなく、非特異的なものと考えられる。

同じ視神経の眼球に近い部分からのマススペクトルを示す(図B)。この部位では分子量約11,000の物質のピークが顕著である。このピークは図3Aのものと同様一致しているため同じ物質を含んでいるものと考えられた。すなわち、視神経を切断したあと2時間経過すると、この物質はおよそ0.5mm眼球側、言い換えれば細胞体側に移動したということになる。さらに眼球側に0.5mmだけ近い部分の試料から得られたマススペクトルでは低いピークではあるがやはり11,000の分子量の物質の存在が確認された。これも分子量からだけではあるが、前述の分子量の物質と同じものと考えられる。この物質が切断端で発現したものであるとすると、結果的に、この物質は2時間以内で少なくとも約1mm移動したことになる(図3C)。図には示さないが切断端から2mm以遠の部分の切片からは分子量約11,000のピークは検出されなかった。また、同じ標本の網膜からもこの分子量のピークは検出されなかった(図3D)。以上のことから、視神経の切断によって分子量11,000前後の物質が切断端で出現し、1時間におよそ1mmという速度で細胞体側に移動していることが示唆された。

3) 断頭処置後のマススペクトル

前項で示した物質が損傷によって出現したものかどうかを特定するために、神経には損傷を与えず断頭処理し、前述の実験と同じように1時間後に視神経および網膜を摘出し視神経の各部位と

網膜のマススペクトルを記録した（図4）。実験方法も前項と同様である。切断端から0.5mmの部分からのマススペクトルの記録では分子量11,000付近のピークは全く見られなかった（図4A）。また、分子量5,000以下のものに関しては非特異的なものであってどのような標本でも記録されるものである。つぎに、0.5mmだけ眼球側に近い部分からのマススペクトルを図4Bに示す。この結果も図4Aと同様に分子量11,000付近のピークを記録することはなかった。切断という損傷あるいは刺激を与えた標本

ではこの部分に比較的大きなピークを検出した（図3B参照）に比べて全く異なった結果が得られた。同様の実験を標本を切り取る位置を変えて行った（図4B,C）、結果も同じであり、分子量11,000のピークは検出されなかった。最後に網膜のマススペクトルを記録した。若干の差違はあるが、前項の実験結果と同様に分子量14,000付近のピークが検出された。以上の結果から、すでに死んでしまっている神経からは切断（損傷）による分子量約11,000の物質は出現しないと考えられた。

D. 考察

視神経の再生の時間経過は魚類という動物であることを考慮しても早い時期に起きており、形態的には切断後（損傷後）1週間以内には再生が始まっていることが示されている。この再生が始まる前、すなわち切断後2～3日で神経細胞は変性を起こしている。一旦変性を起こした後に再生が始まるのは損傷を細胞体に伝達する物質的基盤があるのではないかと考えられた。このような物質の存在あるいは軸索内の物質の移動などを検討するために視神経を切断して飼育した魚と死後に摘出した視神経に含まれる物質についてTOFMAS（飛行時間型質量分析器）で分析した。視神経を切断した標本からは分子量11,400から11,800のピークが得られた。一方、死後の視神経から摘出した視神経にはこの大きさの物質は含まれておらず、分子量11,000の物質は損

傷を受けた（切断された）神経から発現されるものと思われた。また、この物質は2時間で少なくとも0.5mmの速度で切断から細胞体側（眼球側）に向かって移動することが示された。

現在のところこの物質がどのようなものかは不明ではあるが、損傷した神経の再生因子の候補の一つとして見られるものである。

昨年度報告したように光刺激が神経再生に影響を与えている点も興味を持たれる。視神経切断後、分子量11,800の出現が促進されるのかあるいは軸索内の移動速度が増加するのか興味のある点である。

さらにこの物質の同定を試みる必要があり、同時に切断から細胞体への移動についても蛍光物質の注入などの方法を用いて計測する必要がある。

E. 結論

1. 魚類の視神経を用いて損傷を受けた神経の再生因子の解析を試みた。視神経を切断した後、飼育したコイの視神経を TOFMS で解析した結果、損傷を受けた部位から分子量約 11,800 の物質が検出された。
2. 切断後 2 時間を経た視神経を切断端から 0.5mm 間隔で切り出し、各部分を質量分析した。切断端で発現した物質は、少なくとも 1 時間で 1.5mm の速度で細胞体側に移動していた。
3. 断頭処理したコイ、すなわち死後摘出された視神経からはこの物質は検出されなかった。分子量約 11,800 の物質は生きている神経が損傷を受けた時にのみ発現した。
4. 少なくともコイとウグイの 2 種類の魚類で概ね同じ大きさの分子を検出することができた。
5. この物質の化学構造などについてはまだ不明であり、現在解析を進めている。

F. 研究発表

1. 網膜神経細胞のグルタミン酸応答の記録—膜電位感受性色素の適用—
霜田幸雄
東京女子医科大学 総合研究所 研究部
日本顕微鏡学会大会 2003 年
2. 肺動脈平滑筋における Ca イオンの動態
霜田幸雄¹⁾、呉桂栄²⁾、中西敏雄²⁾、重松康秀³⁾
1) 東女医大・総研・研究部、2) 東女医大・心研・循環器小児科、
3) 東女医大・総研・技術科
日本顕微鏡学会大会 2003 年

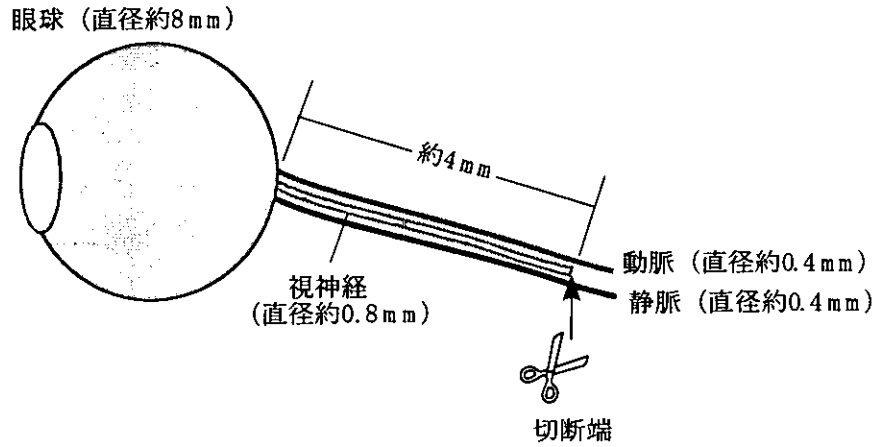


図1 眼球および視神経の模式図

眼球への動脈、静脈は視神経束の外側に存在する。したがって、眼球への血流を途絶させることなく視神経のみを切断することが可能である。

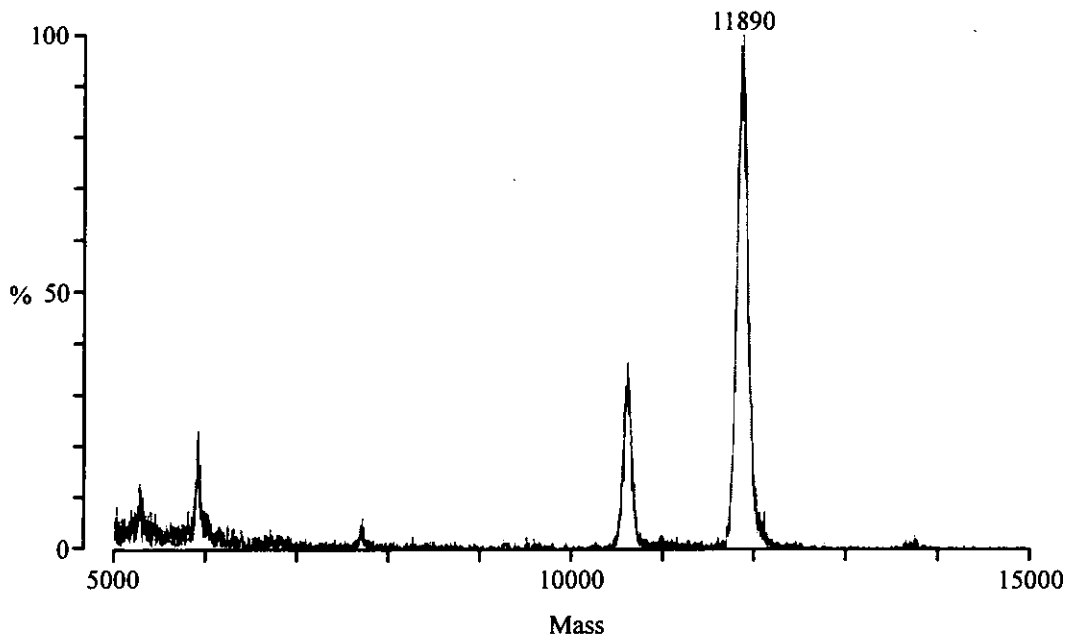


図2 視神経を切断後1時間経過した切断端部のマスペクトル
11890 にピークが検出された。このピークは損傷(切断)された神経にのみ検出されるもので、それ以外のピークはいずれの標本でも検出される非特異的なものである。

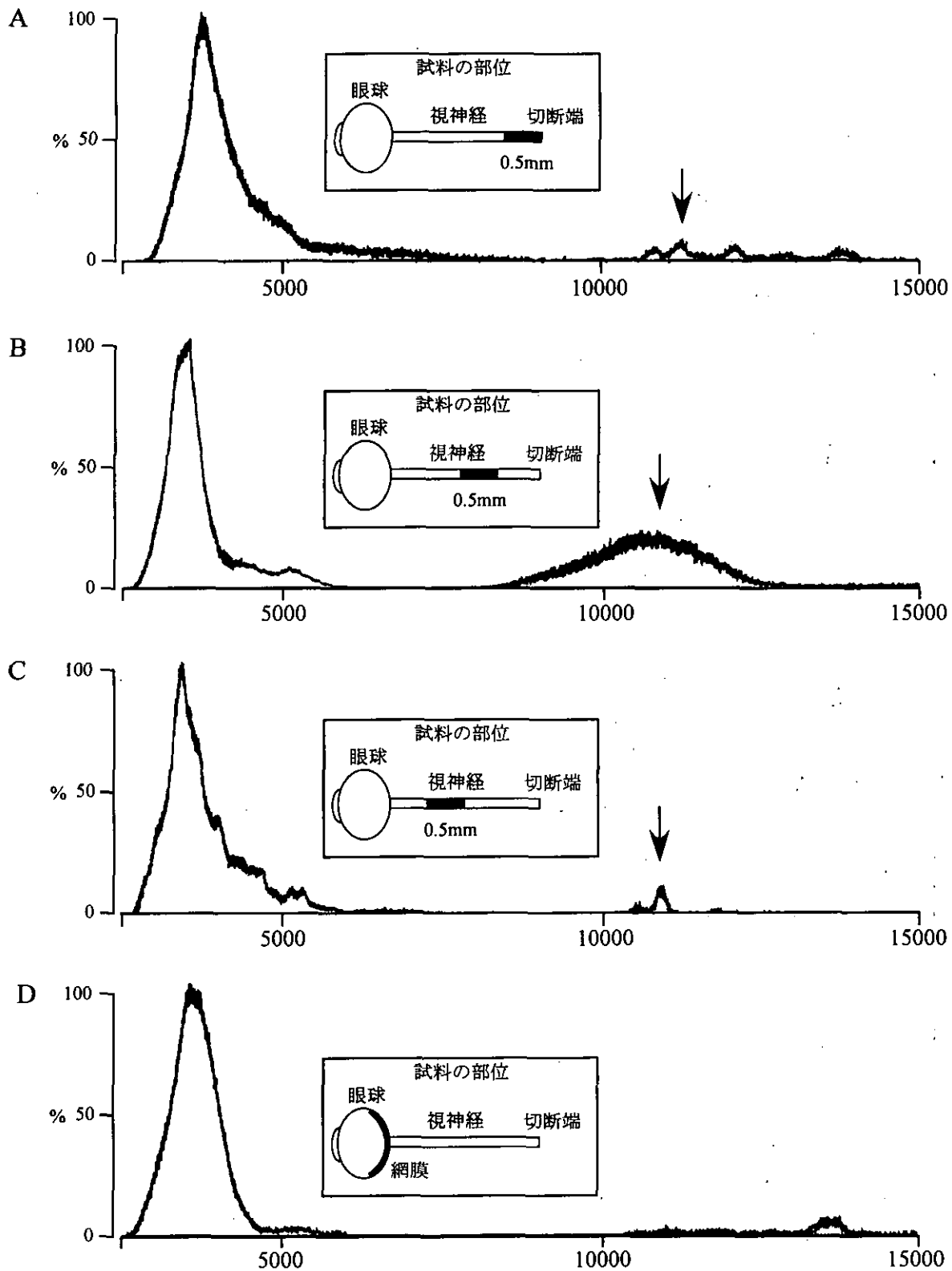


図3 視神経切断後2時間経過したときの視神経および網膜のマススペクトル
 A: 切断短から0.5mmの部位 11400付近にいくつかのピークが見られる(下向き矢印)。
 B: 同じ標本の眼球(細胞体)に近い部位からの記録 11400にピークがある
 比較的広いスペクトルが記録される。
 C: さらに眼球側の部位からの記録、これ以上眼球に近い部位ではこのピークは検出されない。
 D: 同じ標本の網膜からのマススペクトル。11400付近のピークは検出されない。

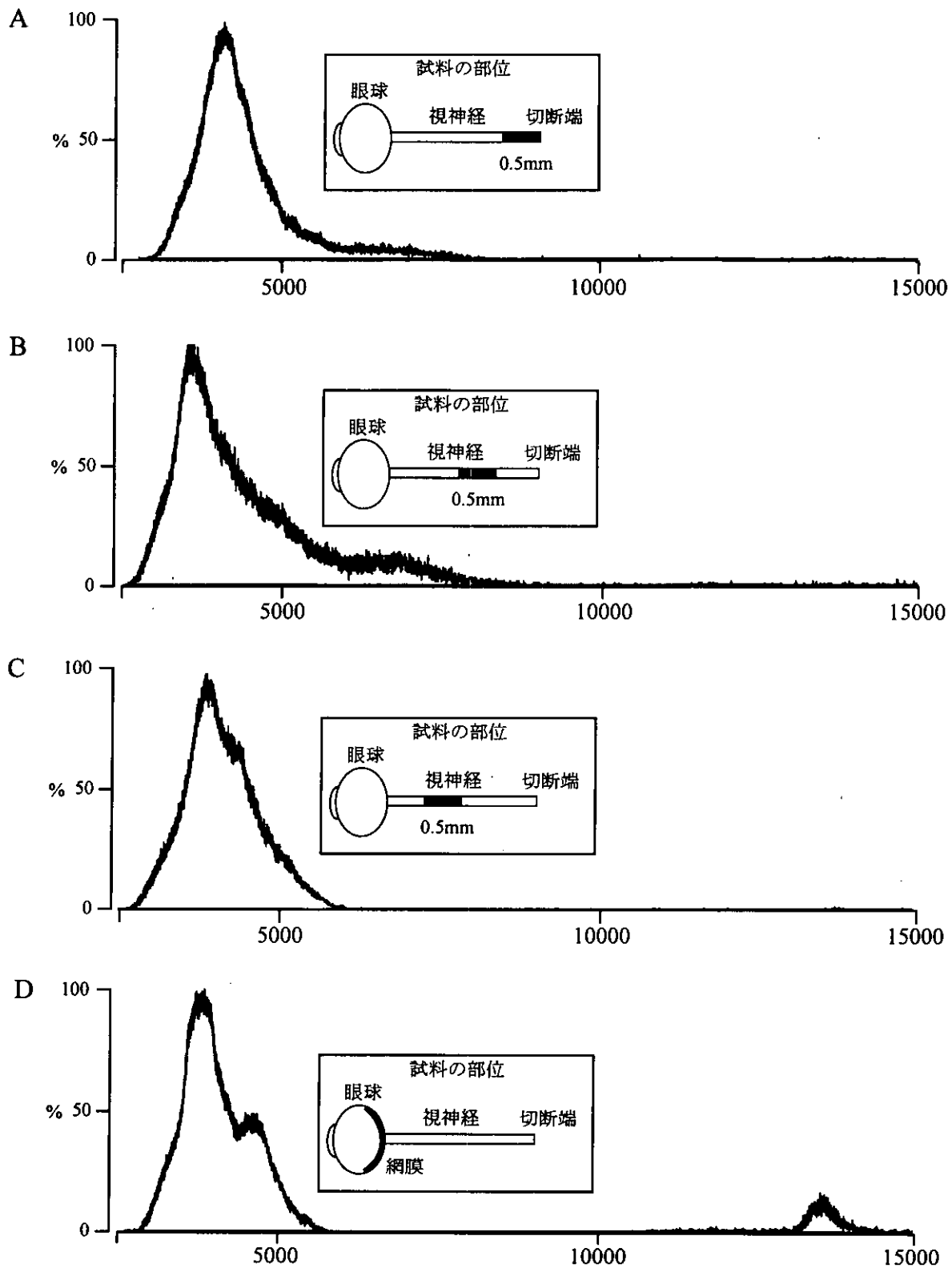


図4 断頭後1時間経過した視神経および網膜のマススペクトル
 A: 切断短から0.5mmの部位 B: 同じ標本の眼球(細胞体)に近い部位からの記録
 C: さらに眼球側の部位からの記録 D: 同じ標本の網膜からの記録
 いずれの標本からも分子量11400に相当するピークは記録されなかった。

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立することにより、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、平成 14 年度に 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に成功した。ビオチン化した ABA (bioABA) は、*Vicia faba* (ソラマメ) 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ので、これを分子プローブとして用いることにより、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、細胞膜上の ABA 受容体タンパク質の可視化が可能となったこと、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。さらに最近この手法を、前ゲノム構造が明らかになっているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やその突然変異株に応用することに成功した。植物ホルモン ABA の特異的なタンパク質性の結合部位が、シロイヌナズナ等さまざまな植物の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が可能となった。

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妙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だが、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、とくに感染シグナル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

動植物の自然免疫システムが同一の起源から進化したことが明らかになりつつある。植物は動物のように移動して不利な環境から逃げるができないため、進化の過程で悪環境や外敵から自分を守る巧妙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。そこで、病原菌由来のタンパク質を感染シグナルとして認識し、高度に同調的に自律的な細胞死が誘導される実験系を構築し、可視化解析によりその分子機構の解明を試みた。

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ジング法を確立し(図1~3)、細胞死に伴うオルガネラの動態を観察した。その結果、細胞死に先立ち短時間でミトコンドリアの還元酵素活性がほぼ完全に失活し、ミトコンドリアの膜電位の脱分極が誘導されること、典型的なアポトーシスとは異なり、細胞核は明確な構造変化を示さず、むしろ細胞死に先立ち微小管(図1)が崩壊し、液胞構造(図2)が大きく変化することが細胞死の制御に重要であることが明らかとなった。

(4) 活性酸素生成の分子機構の解析

細胞死誘導過程における活性酸素発生制御の分子機構を解明するため、植物のNADPHオキシダーゼをコードする遺伝子を単離し、ヒト培養細胞においてその活性を測定した。その結果、単独のサブユニットのみがCa²⁺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という、好中球等のphagocyteとは全く異なる新規な制御機構が存在することが明らかとなった。

(5) 細胞死における細胞周期制御の役割の解析

細胞死誘導と細胞周期との関係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期に感染シグナルを認識した細胞は、細胞死や防御遺伝子の発現に先立ち、それぞれG₁期、G₂期で細胞周期が停止した。Cyclin B-GFP融合タンパク質を用いた可視化解析(図3)の結果、細胞周期の停止に伴い、感染シグナルにより迅速にcyclinが分解されることが明らかとなり、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ことが明らかとなった。

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。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。アブジジン酸受容体分子の可視化法に関する昨年度の本研究の成果の一部を植物科学分野における国際的な一流誌 *The Plant Journal* に technical advance として公表したところ、世界各国から非常に大きな反響があり、国内外の研究機関から共同研究の依頼を受け、着手している。

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、膜電位変化特異的プローブを用いた非破壊的バイオイメージング法を確立し、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下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。生きた植物細胞プロトプラストや、植物の単離ミトコンドリアにフローサイトメトリー法を適用する新規の実験法を開発し、ABA結合部位の特性や、細胞死過程における細胞内小器官(オルガネラ)の動態を定量的に解析した。イネに各種特異的蛍光プローブを細胞内に導入して解析した結果、感染シグナル(タンパク質性エリシター)により誘導される過敏細胞死過程において、短時間のうちにミトコンドリアの膜電位が脱分極し、活性を失う

こと、自律的細胞死の最終段階で液胞の崩壊が誘導されることが明らかとなった。

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) レフェリー付原著論文(英文)

Kadota, Y., Goh, T., Tomatsu, H., Tamauchi, R., Higashi, K., Muto, S. and Kuchitsu, K. (2004) Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of

molecular relationship among cytosolic Ca^{2+} transients, anion efflux and production of reactive oxygen species.

Plant Cell Physiol. 45(2): 160-170

Kuriyama, I., Asano, N., Kato, I., Oshige, M., Sugino, A., Kadota, K., Kuchitsu, K., Yoshida, H., Sakaguchi, K. and Mizushima, Y. (2004)

L-homoserylalminoethanol, a novel dipeptide alcohol inhibitor of eukaryotic DNA polymerase from a plant cultured cells, *Nicotina tabacum* L. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 957-962

Kurusu, K., Sakurai, Y., Miyao, A., Hirochika, H. and Kuchitsu, K. (2004) Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} -permeable channel (OsTPC1) involved in Ca^{2+} influx and regulation of growth and development in rice. *Plant Cell Physiol.* in press.

Kadota, Y., Furuichi, T., Ogasawara, Y., Goh, T., Higashi, K., Muto, S. and Kuchitsu, K. (2004) Identification of putative voltage dependent Ca^{2+} -permeable channels involved in cryptogein-induced Ca^{2+} transients and defense responses in tobacco BY-2 Cells. *Biophys. Biochem. Res. Comm.* in press.

2) 総説

来須孝光、朽津和幸 (2004) アブシジン酸のシグナル伝達とイオンチャネル
新版植物ホルモンのシグナル伝達(植物細胞工学シリーズ20号) 秀潤社 in

press.

2. 学会発表

1)国際学会招待講演（講演要旨）

Kuchitsu, K. (2004) Roles of Ca^{2+} channels
in defense signaling.

NIAS-COE/PROBRAIN/

TOKUTEI Joint International

Symposium on Plant Immunity

-signalings to acquired resistance-

2)その他

郷達明、桧垣匠、中村衣里、朽津和幸
(2003) 植物培養細胞の感染シグナル誘
導性自律的細胞死過程におけるミトコ
ンドリアと液胞の動態の可視化解析。日
本バイオイメージング学会大会。

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。

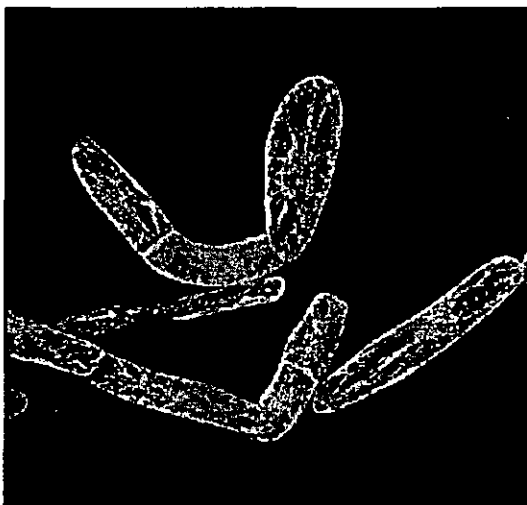


図1 ナノ分子プローブを用いて、細胞骨
格（微小管）を生きたまま非破壊的に
可視化し、プログラム細胞死過程にお

ける動態を追跡した。



図2 ナノ分子プローブを用いて、液胞
膜を生きたまま非破壊的に可視化し、プ
ログラム細胞死過程における動態を追
跡した。（共焦点レーザー走査蛍光顕微
鏡を用いた断層像）

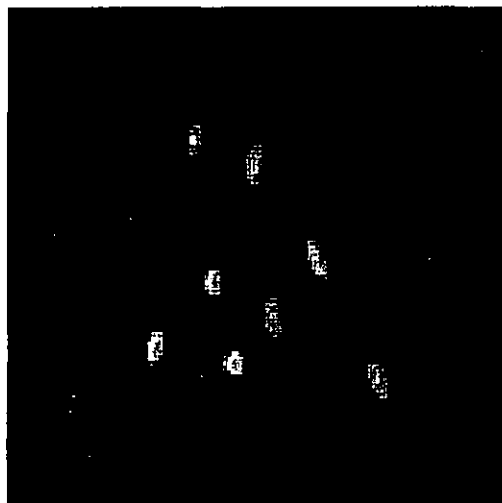


図3 ナノ分子プローブを用いて、細胞
周期制御タンパク質を生きたまま非破
壊的に可視化し、プログラム細胞死過程
における動態、特にタンパク質の特異的
分解過程を追跡した。

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
関塚永一 大塩力、 細田泰雄 宮崎耕司 石井裕正	胃潰瘍または十二指腸潰瘍 診断群別臨床検査のガイド ライン2003～医療の標準化 に向けて～	日本臨床 検査医学会	日常初期診療における 臨床検査の使い方」 小委員会及び診断群分類 を用いた急性期入院医療 の検査ガイドライン策定に 関する研究」研究班編	宇宙堂八木書店	東京	2003	56-61
関塚永一 大塩力、 細田泰雄 宮崎耕司 石井裕正	胃の悪性新生物 診断群別 臨床検査のガイドライン2003 ～医療の標準化に向けて～	日本臨床 検査医学会	日常初期診療における 臨床検査の使い方」 小委員会及び診断群分類 を用いた急性期入院医療 の検査ガイドライン策定に 関する研究」研究班編	宇宙堂八木書店	東京	2003	62-67
細田泰雄 関塚永一 宮崎耕司 長沼誠、 井上 脉 緒方晴彦 岩男泰 日比紀文 石井裕正	潰瘍性大腸炎(手術なし) 診断群別臨床検査のガイド ライン2003～医療の標準化 に向けて～	日本臨床 検査医学会	日常初期診療における 臨床検査の使い方」 小委員会及び診断群分類 を用いた急性期入院医療 の検査ガイドライン策定に 関する研究」研究班編	宇宙堂八木書店	東京	2003	68-71
眞島利和	X線顕微鏡による細胞の 機能イメージング	植田充美	ナノバイオテクノロジー の最前線	シーエムシー出版	東京	2003	407-413
大内 敬 新井孝夫	リポソームを用いたモノ クローナル抗体の生細胞 導入法の開発とその応用	植田充美	ナノバイオテクノロジー の最前線	シーエムシー出版	東京	2003	258-265
多田 隆尚史 船津高志	タンパク質を計測する タンパク質の相互作用と 機能	ナノテクノロジー ハンドブック 編修委員会	ナノテクノロジーハンド ブック	オーム社	東京	2003	94-99

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻・号	ページ	出版年
Nagao, T., Takahashi, M., Matsuzaki, K., and Minamitani, H.,	Application of Bioimaging Techniques to Mechanistic Studies on Photodynamic Therapy	Bioimages	11(2)	53-60	2003
Minamitani, H., Tsukada, K., Sekizuka, E., and Oshio, C.	Optical Bioimaging: From Living Tissue to a Single Molecule: Imaging and Functional Analysis of Blood Flow in Organic Microcirculation	Journal of Pharmacological Sciences	93	227-233	2003
Minamitani, H.	Functional Analysis of Microcirculation Disorder by Using Nano Molecular Probes and Bioimaging Technique	Microcirculation Annual	19	27-28	2003
Arai, T., Tsukada, K., Sekizuka, E., Oshio, C., Terao, S., Hase, K., and Minamitani, H.	RBC Flow Imaging and pO ₂ Measurement in Cerebral Microcirculation: Effect of Hemodilution on Oxygen Supply to Brain Cortical Arterioles	EMBC IEEE		1054-1057	2003
Tsukada, Kosuke Sekizuka, Eiichi Oshio, Chikara Tsujioaka, Katsuhiko Minamitani, Haruyuki	Red blood cell velocity and oxygen tension measurement in cerebral microvessels by double-wavelength photoexcitation	J. Appl. Physiol.	in press		2004
Tsukada, Kosuke Sakai, Shuhei Hase, Kentaro and Minamitani, Haruyuki	Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation	Biosensors and Bioelectronics	18	1439-1445	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	15(4)	196-197	2003
Takahashi M., Nagao T., Imazeki Y., Matsuzaki K., Minamitani H.	Roles of reactive oxygen species in monocyte activation induced by photochemical reactions during photodynamic therapy	Frontiers Med. Biol. Engng.	11(4)	279-294	2002
塚田孝祐、南谷晴之、辻岡克彦	脳皮質酸素代謝の可視化解析——軟膜微小循環血流と局所酸素分圧およびNADH蛍光計測からの検討	第18回生体生理工学シンポジウム論文集	24	381-382	2003
南谷晴之、塚田孝祐、関塚永一、大塩力	臓器血流と酸素代謝の光・イメージング解析	公開シンポジウム「ナノとバイオの融合 学理構築、産業基盤形成」		91-96	2003
南谷晴之	ナノプローブ・イメージングによる細胞・組織障害の機能解析	日本学術振興会「材料の微細組織と機能性第133委員会研究資料	180	7-12	2003
南谷晴之、塚田孝祐、関塚永一、大塩力	生命情報のセンシング—多波長励起フットニックイメージングシステムによる機能解析	平成16年電気学会全国大会論文集	3	S14(1)-4)	2004
Ono, Kenji, Yoshihara, Ken, Suzuki, Hiromi Tanaka, Fkenji, Takii, Takemasa, Onozaki, and Sawada, Makoto	Preservation of Hematopoietic Properties in Transplanted Bone Marrow Cells in the Brain	Journal of Neuroscience Research	72	503-507	2003
今井文博、澤田誠、鈴木弘美	脳疾患治療へのミクログリア応用	脳 21	6(3)	26-30	2003
Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K.	Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body	Biochem. Biophys. Res. Comm.	314	46-53	2004

Ichimori, K., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Aratani, Y., Koyama, H., Takizawa, S., Kameoka, Y., Ishida-Okawara, A., Kohi, F. and Suzuki, K.	Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - Study on Myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice	Free Radical Research	37	481-489	2003
Murata, K., Inami, M., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, K., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S.F. H., and Nakayama, T.	CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type-II collagen antibodies	Int. Immunol.	15	987-992	2003
Nunoi, H., Kohi, F., Kajiwara, H., and Suzuki, K.	Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan	Microbiol. Immunol.	47	527-531	2003
Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya, K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K., and Nakayama, T.	Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T-cells	Bioimages	11	1-8	2003
Suzuki, K.	Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA- related vasculitis	Internal Med.	42	552-553	2003
Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, K., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe, N., Nishimura, K., and Miyaji, M.	The trend of imported mycoses in Japan	J. Infect. Chemother	9	16-20	2003
Ito-Oda, Mie, Yamagoe, S., Suzuki, K., and Tanokura, M.	Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds	Protein Expression Purif.	27	272-278	2003
Hatanaka K., Hokari R., Matsuzaki K., Kato S., Miyazaki K., Sekizuka E Miura S.	Increased expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) and lymphocyte recruitment in murine gastritis induced by <i>Helicobacter pylori</i>	Clin. Exp. Immunol.	130	183-189	2002
Morishita T., Kanazawa H., Sekizuka E., Miyazaki K.	Changes of hepatic microcirculation in cholestasis	Microcircul. Ann.	19	61-62	2003
関塚永一、中橋浩康、廣瀬耕徳、後関治彦、南谷晴之、大塩力	目で見る血液の流れ、血液はさらさらと流れるだろうか、糖尿病における血管障害メカニズム	日本バイオイメージング学会公開シンポジウム「ナノバイオロジーをイメージングする」		S3-S6	2003
関塚永一、中橋浩康、廣瀬耕徳、後関治彦、南谷晴之、大塩力	血液の流れから見る糖尿病における血管障害メカニズム	第10回日本ヘモレオロジー学会要旨集		16-18	2003

Tanaka H., Nishimaru K Makuta R., Hirayama W Kawamura T., Matsuda T., Tanaka Y., Kawanishi T., Shigenobu K.	Possible Involvement of Prostaglandins F2a and D2 in Acetylcholine-Induced Positive Inotropy in Isolated Mouse Left Atria	Pharmacology	67	157-162	2003
Tanaka, Hikaru, Kawanishi, Toru and Shigenobu Koki	Atrio-ventricular difference in myocardial excitation-contraction coupling---Influence of T-tubules and endocardial endothelium	Recent Res. Devel. Physiol.	1	253-262	2003
Tanaka, Hikaru, Kawanishi, Toru and Shigenobu Koki	Optical Bioimaging: From Living Tissue to a Single Molecule: Atrio- Ventricular Difference in Myocardial Excitation-Contraction Coupling --- Sequential Versus Simultaneous Activation of SR Ca2+ Release Units -	Journal of Pharmacological Sciences	93	248-252	2003
Ishii-Watababe A., Uchida E., Iwata A., Nagata R., Satoh K., Fan K., Murata M., Mizuguchi H., Kawasaki N., Kawanishi T., Yamaguchi T., Hayakawa T.	Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity PCR	Molecular Therapy	8(6)	1009-1016	2003
川西徹、松木滋	品質に関わるトピックの動向 -- Q5E: バイオ医薬品のコンパラビリティ	IYAKUHIN KENKYU	34(8)	508-512	2003
Kobayashi, Tetsu, Niimi Shingo, Kawanishi, Toru, Fukuoka, Masamichi, 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 Letters	138	215-225	2003
Niimi S., Oshizawa T., Yamaguchi T., Harashima M., Seki T., Ariga T., Kawanishi T., Hayakawa T.	Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes	Biochemical and Biophysical Research Communications	300	770-774	2003
川西徹、河合洋	イメージングで解き明かす生命機能	実験医学	22(3)	428-429	2004
Ohata, Hisayuki, Yamada, Hideyuki, Niioka, Takeharu, Yamamoto, Masayuki, and Momose, Kazutaka	Optical Bioimaging: From Living Tissue to a Single Molecule: Calcium Imaging in Blood Vessel <i>In Situ</i> Employing Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy	Journal of Pharmacological Sciences	93	242-247	2003
Hashimoto, Terumasa, Yamashita, Miyuki, Ohata, Hisayuki, and Momose, Kazutaka	Lysophosphatidic Acid Enhances In Vivo Infiltration and Activation of Guinea Pig Eosinophils and Neutrophils via a Rho/Rho-Associated Protein Kinase-Mediated Pathway	Journal of Pharmacological Sciences	91	8-14	2003
Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidbre, S., Nakayama, T., Takiguchi, M., Grusby, M.J., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T.	Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity	Nature Medicine	9(5)	582-588	2003

Fukuda, K., Yoshida, H., Sato, T., Furumoto, T., Mizutani-Koseki, Y., Suzuki, Y., Saito, Y., Takemori, T., Kimura, M., Sato, H., Taniguchi, M., Nishikawa, S., Nakayama, T. and Koseki, H.	Mesenchymal expression of Foxl1, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut-associated lymphoid organs	Developmental Biology	255	278-289	2003
Ashcroft, G.S., Mills, S.J., Lei, K., Gibbons, L., Jeong, M.J., Taniguchi, M., Burow, M., Horan, M.A., Wahl, S.M., and Nakayama, T.	Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor	Journal of Clinical Investigation	III (9)	1309-1318	2003
Shirai, T., Magara, K.K., Motohashi, S., Yamashita, M., Kimura M., Suwazono Y., Nogawa K., Kuriyama T., Taniguchi M., Nakayama, T.	TH1-biased immunity induced by exposure to Antarctic winter	Journal of Allergy Clin. Immunol.	III (6)	1353-1360	2003
Nakamura, Y., Yasunami Y., Satoh M., Hirakawa E., Katsuta H. Ono J., Kamada M., Todo S., Nakayama T., Taniguchi M., Ikeda S.	Acceptance of Islet Allografts in the Liver of Mice by Blockade of an Inducible Costimulator	Transplantaion	75(8)	1115-1118	2003
Shimonaka, M., Katagiri K., Nakayama T., Fujita N., Tsuruo T., Yoshie O., Kinashi T.	Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow	The Journal of Cell Biology	161(2)	417-427	2003
Shimizu, T., Abe, R., Nishihira J., Shibaki A., Watanabe H., Nakayama T., Taniguchi M., Ishibashi T., Shimizu, H.	Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory facto-deficient mice	Eur. J. Immunol.	33	1478-1487	2003
Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya K, Hashimoto K Kimura M., Yamashita M Suzuki K., Nakayama T.	Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T-cells	Bioimages	11 (1)	1-8	2003
Zhang G., Nichols R.D., Taniguchi M., Nakayama T., Parmely M.J.	Gamma interferon production by hepatic NK T cells during Escherichia coli Infection is resistant to the inhibitory effects of oxidative stress	Infection and Immunity	71(5)	2468-2477	2003
Omori M., Yamashita M., Inami M., Tadenuma M., Kimura, M., Nigo Y., Hosokawa, H., Hasegawa H., Taniguchi M., Nakayama T.	CD8 T cell-specific downregulation of histone hyperacetylation and gene activation of the IL-4 gene locus by ROG, repressor of GATA	Immunity	19	281-294	2003