

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 (H14-ナノ-001)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 盛 英三

平成17年 (2005年) 3月

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 盛 英三

平成17年 (2005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-----	2 2
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 (分子機能イメージング神経系)	
中村 俊-----	2 5
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 X 線回折)	
盛 英三-----	2 8
4. 原子間力顕微鏡等を用いたナノレベルイメージングによる分子の構造	
解析	
土屋利江-----	3 3
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	4 3
IV. 研究成果の刊行物別刷-----	5 4

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)

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年度及び15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。

2) 分子機能イメージング神経系

神経機能分子のイメージングにより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。

3) 分子構造イメージング X線回折

以下のタンパク分子を標的として、構造解析を行い、創薬のための基盤情報とする。

i. 心筋収縮タンパク調節分子

筋収縮弛緩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。

ii. イオン交換輸送体調節因子複合体

Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE)に結合する Ca²⁺結合タンパク質の一つ、カルシニューリン様タンパク質 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の解析を目的とする。

iii. 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ある。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、抗炎症薬として欧米で広く処方されている。しかし、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。

iv. BAR ドメイン構造を有する蛋白質群

6本の α -ヘリックスから構成されるBARドメイン構造を有する蛋白質群の新規アクチン束化タンパク質等の結晶構造を解明し、その機能と作用機序を明らかにする。

4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

i. 原子間力顕微鏡 (AFM) は、1分子レベルの“ナノ”の視点を導入することにより、医薬品開発に新たな視界を与える。本年度は、受容体タンパク質試料の水中 AFM 観察を初めて試みるとともに、分子生物学的手法を用いた受容体タンパク質の構造-機能相関の研究の発展を目指した。

ii. 生体内の細胞は、材料表面に吸着したタンパク質の構造を認識して生体反応を行う。材料特性とタンパク質構造変化との関連を見出し、医用材料を改良する手段を生み出すことが目的である。昨年度材料に硫酸基およびリン酸基を導入することで骨分化の促進が認められたものの更なる改良が必要であることが明らかとなった。そこで、ペプチドを用いた改質の影響を検討した。材料は、昨年度と同じ多糖類であるが構造の異なるアルギン酸を採用し、ナノレベルでその改質を試み細胞機能への影響について検討した。

iii. 再生医療で使用される生体由来材料の感染リスク軽減化のために、人工素材を開発する。細胞内分子挙動を制御し、効率的に組織再生を行う機能性物質の開発も目的とする。有機、無機の相互の特性を活かした骨再生用スキャホールドの開発を目指し、ナノテクノロジーを駆使して層状複水酸化物 (Layered double Hydroxide :LDH) のナノメートルオーダーの層状空間へのアミノ酸の取り込みについて検討した。

B. 研究方法

1) 分子機能イメージング循環系

細胞-Rap1 分子の活性化の可視化には血管内皮細胞を用いた。平成16年度は細胞の極性に関して Rap1 分子がどのように関与するかを検討した。培養血管内皮細胞をマイクロピペットから、sフィンゴシン1-リン酸 (S1P) で刺激すると S1P へむかう一方向性の走化を観察可能である。このときの Rap1 の活性化を Raichu-Rap1 プローブを用いて調べた。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。

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- Rap1 分子の活性化プローブは既に作製していた (pRaichu-Rap1)。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。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。

Raichu-Rap1 を用いた Rap1 活性化イメージング 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。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。S1P 刺激による Rap1 の活性化の可視化を行った。

変異ミオシンの作製- ATP 水解による化学エネルギーから頭部の構造変化からなる力発生のための物理エネルギーへの変換メカニズムを調べた。この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メカニズムを決定することが重要であると考へた。このため 15-16 年度にバキュロウイルスを用いて作製した F721A, F775A 変異体を用いて検討した。蛋白質は共発現したミオシン軽鎖とともに Sf-9 細胞から精製した。

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。滑走速度はフィラメントの運動をビデオで撮影することにより測定した。

ミオシンのステップサイズの測定 (ナノメートル) レーザーとラップの power を変化させることで変異ミオシンの力発生を測定した。また、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。

変異ミオシンの構造変化を捉えるためのキメラ分子の作製-ミオシン分子の頭部の構造変化を捉えるために FRET の有無で、検出することを行った。F721A 変異、F775A 変異体のそれぞれのミオシン頭部に 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キメラ蛋白質を作製した。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。

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、様々な遺伝子改変マウスを作成し、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、アミノ酸置換による構造予測を行った。

(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。

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

TnC 薬物複合体や、Tn/Tm 複合体の結晶を作成し、放射光 x 線回折法で構造を解明する。

ii. イオン交換輸送体調節因子複合体

CHP/NHE 複合体の結晶と BAR ドメイン構造を持つタンパクの結晶を作成し、x 線回折法により構造を決定する。

iii. プロスタグランジン関連タンパク

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の結晶を作成し、放射光 x 線回折法で構造を決定する。

iv. 共通のドメイン構造を有する細胞内

情報伝達分子等のタンパク BAR ドメイン構造を持つタンパクの結晶を作成し、x 線回折法により構造を決定する。

4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

i. ATP 受容体 (ラット P2X2 受容体) の cDNA は米国の研究者より入手し、pVL-1393 ウイルスベクター (BD Bioscience Clontech 社) にサブクローニングした。この再構築ウイルスを昆虫由来細胞株 Sf9 に感染させ、受容体タンパク質の存在を得た。AFM 観察のために精製したタンパク質溶液を水で適切な濃度に希釈し、劈開した雲母表面上に滴下した。滴下溶液を減圧下で乾燥させ、

この標本を観察に供した。観察は Digital Instruments 社の MultiMode Nanoscope III, および Asylum Research 社の MFP-3D を用いて、タッピング・モードおよび AC モードで行なった。分子生物学的手法を用いた受容体の構造・機能に関する研究では、P2X2-BS II を用いて変異導入（アミノ酸残基置換）をクイック・チェンジ部位特異的変異導入キットまたはエクサイト部位特異的変異導入キット（いずれも Stratagene 社）を用いて PCR 法で行なった。変異導入の成否は塩基配列解析で確認した。野生型、変異型受容体の RNA はそれぞれのプラスミドを Not I で直鎖化し、これを鋳型としてインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、RNA を注入し、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。

ii. アルギン酸は、医用グレードで分子量 30 万のものを入手し用いた。このアルギン酸に、フィブロネクチン中に存在する細胞接着関連配列であるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 及びプロリン-ヒスチジン-セリン-アルギニン-アスパラギン (PHSRN) を含むペプチドを共有結合でアルギン酸に修飾した。得られたアルギン酸の水溶液から、RGD 及び PHSRN 修飾アルギン酸単独、さらに両者を 1 対 1 で混合した溶液から 3 種類のゲルをカルシウムイオン架橋により調製した。

細胞には、仔牛より単離した軟骨細胞、ラット頭蓋骨骨芽細胞、さらには市販の正常ヒト軟骨細胞及び骨芽細胞 (BioWhittaker 社) を使用した。なお、実験にはそれぞれの細胞の継代数が 6 代目までのものを用いた。調製したアルギン酸ゲル上で、これらの細胞の培養を 2-4 週間行った。各材料上での細胞接着状態を経時的に位相差顕微鏡で観察し、必要に応じて写真撮影等を行った。

骨芽細胞分化への影響をアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性評価により行った。加えて、細胞からのオステオカルシン産生量を ELISA 法により評価した。

軟骨細胞の分化への影響は、Real Time PCR により、軟骨の分化マーカーである type-II 及び type-X collagen と aggrecan の mRNA 発現量を評価した。

iii. 陰イオン修飾ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュ上で正常ヒト表皮角化細胞を培養し、細胞を精密に制御する技術の開発を試みる。また、機能性物質の開発の一環として、LDH のナノ層状空間へ種々のアミノ酸の導入 (インターカレーション) を試みた。検討したアミノ酸は、グリシン、アラニン、リシンそしてアスパラギン酸の 4 種である。

C. 研究結果

1) 分子機能イメージング循環系

走化性因子誘導による細胞運動時の極性形成における Rap1 の活性化の可視化：

S1P 刺激により HAEC 細胞は、誘導方向にむかい遊走した。Raichu-Rap1 を発現する細胞も S1P に反応して、遊走す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、S1P 刺激に向かい盛んに膜進展とラフリング形成部位で Rap1 がさかんに活性化していることが判明した。微小管の形成方向と一致していた。Rap1 の水解促進因子を発現する細胞では、S1P 刺激に反応が低下して、膜の伸展も見られなかった。

Rap1 の効果器分子 RAPL の機能：

血球系細胞では RAPL 分子が特異的に活性型 Rap1 と結合して、インテグリン依存性の細胞-基質接着を促進させるが、血管内皮細胞では RAPL が微小管に局在した。さらに、興味深いことに、S1P 刺激による HAEC 細胞の遊走時には S1P に向かって、RAPL の局在する微小管が伸展していくことが

わかった。

変異ミオシンの作製とアクチン滑走能の測定：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-7A721F 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。このことから 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。アクチンの滑一方、F775A では ATP 依存性の FRET が観察できたことから F775A では野生型と同様にミオシン頭部の構造変化がおきることが判明した。

ミオシンの力測定とステップサイズの検討：

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。F721A 変異体はステップが踏めなかった。また、興味深いことに 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（ミオシンを繋げたビーズのトラップ力を弱める）ではアクチンを引っ張ることができた。つまり、弱いながら構造変化を起こすとともに力を発生できる変異であると結論できた。この弱い力発生においても、野生型と同様にステップサイズは 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 の受容体のうち、細胞内のチロシンキナーゼを欠いた分子種 (T1) に選択的に結合するタンパク質として、低分子量 G タンパク質の抑制因子 RhoGDI を同定した。受容体に BDNF が結合すると RhoGDI1 は受容体から乖

離し細胞質移行する。その結果、RhoGTPase が抑制され、BDNF 受容体のうちで T1 受容体を選択的に発現しているアストログリア細胞の形態が 30 分以内に著しく変化した。さらに、RhoGTPase のうちとくに Cdc42, Rac1 がこの変化に関与していることが示された。

ii. 若年性家族性アルツハイマー病の原因遺伝子のひとつである、プレセニリンの過剰発現マウスを用いた解析により、神経細胞死が起こるよりもはるかに先立って、海馬錐体細胞のシナプス機能に異常が生ずることを明らかにした。変異型プレセニリンの病態として、グルタミン酸受容体の細胞内輸送異常という可能性が示された。

iii. その結果、プリオンタンパク質は N 末端と C 末端では細胞内局在が異なっていることを見出した。これは、プリオンタンパク質が合成後、タンパク質分解酵素により、二つの断片に切断されるためであることをつきとめた。この切断部位は、プリオンタンパク質が悪性化する際に、悪性型プリオンと相互作用する部位であるため、この分解酵素をつきとめることは、その発症を防止することにつながる可能性がある。

iv. 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のかつ 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開発した。この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するとともに、アミノ酸置換がどのような構造変化をもたらすかについて、立体構造の予測をおこなった。さらに、培養細胞を用いて、UCH-L1 タンパク質自身が細胞内で不溶化すること、これに対応にマウスの脳内においてもその不溶化にもとづく、異常な小胞の誘導を確認することができた。

3) 分子構造イメージング X 線回折

構造解析の対象となるタンパク分子ごとにその

研究結果を要約する。

i. 心筋収縮タンパク調節分子

トロポミオシン：トロポミオシン (Tm) の Tn 結合部位を含む断片から、3Å分解能の回折能を有する新規の結晶を得て構造解析を開始した。

TnC 薬物複合体：TnC に直接作用し、心筋のカルシウム感受性を亢進する作用のある薬物（カルシウムセンシタイザー）の一つと心筋 TnC との新規の複合体結晶を作成し、その結合構造を 2.1Åの分解能で決定した。現在論文投稿中である。また、他の2つの薬物と TnC の複合体についても結晶を得て構造解析を進行中である。

ii. イオン交換輸送体調節因子複合体

いくつかの結晶化候補タンパク質のうち、CHP2/NHE1 複合体に関しては、ある種の金属イオンが結晶化に極めて有効であることを発見した。SPring8 のビームラインを用いて 2.8Åの解像度で回折像が得られた。現在、構造決定を進めるとともに、構造に基づく機能解析にも着手している。また、NHE の機能解析においては、輸送体のダイマー形成の役割について明らかにした。

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)、FLAP、核内受容体 PPAR α ： 昨年報告した大腸菌発現系を用いて蛋白質の大量発現、精製法を確立し、現在、結晶化条件の検討を行っている。また結晶化のための精製ステップの変更、発現ベクター上での変位の導入を行うとともに、生化学的活性のアッセイ系の確立を検討している。

iv. BAR ドメイン構造を有する蛋白質群

BAIAP2 (Brain angiogenesis inhibitor 1 associated protein 2) 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 と同属の分子であり、発生期の心筋で高発現が認められる分子 MIM についても結晶構造解析に成功し、これらが変形した BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) ドメインで

あることを明らかにした。さらに Endophilin の BAR ドメインの構造も明らかにし、BAR ドメインの基本骨格や個性について総合的に議論できる道筋をつけた。

4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

i. 希釈した水溶液を雲母上に滴下し、これを AFM で観察したところ、見かけ上の直径が約 20 nm 程度の均一な粒子が散在する像が得られた。粒子の高さは約 3 nm であった。この形状は前年度に観察した同タンパク質の大気中での AFM 像と同様であり、P2X2 受容体の個々のタンパク質の像であると考えられた。散在する粒子像に加え、三個のタンパク質が会合した像も得られた。

野生型の P2X2 受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、ATP を投与した場合、ナトリウムおよびカルシウムの透過による内向き電流が惹起された。この電流は持続性であり、ATP 投与中は維持された。一方、チャンネル孔のアミノ酸を置換した変異型では、ATP の投与中であっても電流は減衰し、一過性であった。この“脱感作”の時間経過は一次の速度式で近似された。一旦、脱感作された変異型受容体の活性は直ちには回復せず、もとの電流値が得られるまで5分程度の時間を要した。この回復過程には初期にラグタイムのような遅れが認められ、三次の速度式で近似された。

ii. 細胞接着性配列 RGD を含むペプチドのアルギン酸分子中への導入反応を行った結果、いずれの細胞においても、その接着性は未反応のゲルに比較して著しく改善された。

接着において差が見られたものの、ラット骨芽細胞及びウシ軟骨細胞の場合には細胞増殖速度にゲルの種類による差は見られず、さらには通常の細胞培養用ディッシュ上の速度とも大きな差は見られなかった。

RGD と PHSRN が同時に存在しているゲル上の細胞

は、ペプチドそれぞれが単独で存在しているゲルとは異なる分化挙動を示す結果を得た。まず、軟骨細胞に関しては、ウシ軟骨細胞は両ペプチドが存在するゲル上で培養することで、type-II 及び type-X collagen mRNA の発現が増強され、特に後者ではディッシュ上のものと比較して約50倍に増強していた。それに対して、分化マーカーの一つである aggrecan の発現は抑制されていることが認められ、このゲル上では軟骨細胞が肥大軟骨細胞へと分化することが示唆された。これに対して、ヒト軟骨細胞では、type-X の発現は認められず、関節由来の軟骨細胞としての分化状態がより維持された状態であることが示唆され、ヒトとウシの細胞では反応が異なることが明らかとなった。このような、分化に対する反応の種差は骨芽細胞系でも認められた。ラット骨芽細胞では、細胞接着が改良されていない PHSRN 修飾ゲルで RCO の分化が促進されるような結果を得たが、この場合には両ペプチドによる協同作用は見られなかった。それに対して、ヒト骨芽細胞の場合には PHSRN による分化の増強は全く見られず、RGD による接着細胞数、ALP 活性、さらにオステオカルシン産生の増加が認められた。さらに、2種類のペプチドが同時に存在するゲル上では、これらの値がさらに増加する結果が得られた。

iii. 陰イオン修飾ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュは、正常ヒト表皮角化細胞の複数の分化マーカーの発現を亢進して分化を著しく促進し、増殖を抑制していた。細胞は、ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュには接着しない。陰イオン修飾ヒアルロン酸はさらに細胞間連絡機構を亢進した。また、陰イオン修飾ヒアルロン酸を添加することで未分化状態および分化誘導状態のヒト間葉系幹細胞の増殖が促進され、さらに骨芽細胞分化誘導培地に添加することで、ヒト間葉系幹細胞の分化および増殖を著しく促進した。

LDH のナノ層状空間へのアミノ酸の取り込み(インターカレーション)について検討した。共沈法(pH=10、室温)により得られた各種アミノ酸-LDH 複合体のX線回折パターンは、Gly, Ala, Lys-LDH 複合体についてはインターカレーション前とほぼ同じ構造パターンを示した。しかしながら、Asp-LDH 複合体については、LDH の積層構造に起因する回折ピークが低角度側にシフトし、層の間隔が7.6Åから12.6Åに拡張していることが分かった。

D. 考察

1) 分子機能イメージング循環系

本年度

- ① 細胞運動時特に S1P 誘導性の走化における極性形成に Rap1 が重要であることを明らかにした。
- ② Rap1-RAPL シグナルが走化性に重要であることをイメージングを駆使して明らかにした。

本研究成果は Raichu という活性化可視化プローブ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。

昨年も極性形成に Rap1 が重要であることを証明したが、本年はさらに微小管に局在する Rap1 のエフェクター分子 RAPL がこの機能にかかわることを示した。細胞の運動というダイナミズムと情報伝達の可視化はイメージング技術を駆使して今後も行っていくべきだと考えた。血管新生や心臓の発生などには細胞の移動・動員と情報伝達の解析が不可欠であるからである。

Phe721 を Ala に置換した変異体の FRET 効率は ATP を加えても全く変化せず、レバーアームをスイングする能力も消失していることがわかった。また、この変異体ではアクチンとの相互作用で力

を生じることは全く無かった。一方、Phe775 を Ala に置換した変異体では野生型ミオシンとほぼ同じ FRET の変化を観察した。しかし、この蛋白質の発生する力は極めて弱く、弱い負荷がかかると力は観察されなくなった。この結果から、コンバーターにある二つの Phe は力の伝達と変換に極めて重要な位置にあるが、その役割は異なることが予想された。

さらに、ミオシン三次元構造の検討から、Gly720-Phe721-Pro722 はモータードメインとコンバーターを連結するフレキシブルジョイントであり、コンバーター回転の基点に当たること、Phe775 もモータードメインとコンバーターの境界領域にあるが、こちらはモータードメインからコンバーターに突き出したヘリックスと接触していることが明らかになった。これらの結果から、我々はモータードメインからレバーアームに分子内の力の伝達と変換が効率良く起こるためにコンバーター領域の1つの Gly と2つの Phe の限定された部分が正常に保たれていることが必要であると結論した。

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 の受容体でチロシンキナーゼを欠いた分子種の全く新しい機能を見出した。これはグリア細胞を介した神経機能制御について新しい視点を提供するとともに、癲癇などの発症機構の解明にも貢献しうる知見である。

ii. 若年発症型家族性アルツハイマー病の原因遺伝子のひとつであるプレセニリンはグルタミン酸受容体をシナプス部位に運び込む過程で異常をきたしている可能性がある。

iii. プリオンタンパク質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、この方法によってプリオンタンパク質を切断す

る酵素の存在を明らかにすることが出来た。

iv. *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。またパーキンソン病の原因遺伝子のひとつである UCH-L1 の点変異による立体構造変化を予測した。

3) 分子構造イメージング X 線回折

トロポニン C-薬物複合体の結晶構造は、より特異性の高い新たなカルシウムセンシタイザー開発のための基盤情報となる。イオン交換輸送対の構造決定も新たな BAR ドメイン構造蛋白群の同定は、新研究領域の創成を予感させる。

4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

i. AFM を利用したタンパク質の形状観察では、ATP 受容体タンパク質の水中における状態を初めて観察することができ、その高さが 3 nm であることが示された。また、ゲル上の電気泳動あるいは変異導入による機能の変化より予測されていた三量体構造を AFM より直接的に観察することに成功した。ATP 存在下ではタンパク質の会合が増大した。このことから、タンパク質の構造が ATP の結合により変化すると推察される。すなわち、ATP の結合によりタンパク質が会合しやすい構造を取るという可能性である。このような会合状態の変化は ATP 受容体が発現している細胞でも認められており、“clustering” 現象として知られている。

分子生物学的手法を用いた P2X2 受容体タンパク質の細胞内システイン残基の役割を検討する研究では、チャンネル孔を形成するアミノ酸残基の置換により脱感作が観察された。改変を加えた 5 つのアミノ酸のいずれの場合でも脱感作が観察されたことから、この現象がチャンネルの開口機構に関連している可能性が考えられる。ATP への感

受性の変化は結合部位の変化と捉えるのが基本的な考え方である。しかし、今回改変した部位は ATP の結合には直接的には関与しないと考えられている。脱感作の進行過程は一次の速度式に従い、一方、回復過程は三次の速度式に従った。今回の AFM 観察でも示されたように、ATP 受容体は三量体構造を取る可能性が高い。三量体モデルで今回の脱感作現象を考えた場合、“開”状態の 3 つのタンパク質（サブユニット）のうちの 1 つが“脱感作”状態に移行することでチャンネルは閉じる。よって、脱感作の進行は一次となる。また、3 つのサブユニットがすべて“脱感作”状態にある場合、3 つすべてがこの状態を脱しないと、再び“開”状態に移行することはない。よって回復過程は三次となる。

ii. 本年度はカルシウムイオンで架橋されゲルを形成するアルギン酸分子を用い、分子修飾による官能基などの影響を検討することにした。しかしながら、アルギン酸ゲルは細胞接着性に乏しく、まずその改質を行わなければならない。そこで、細胞接着性ペプチドの RGD が結合する細胞膜タンパク質、インテグリンからのシグナル伝達は細胞機能に大きな影響をもたらすが、フィブロネクチン中の RGD 配列だけでなく PHSRN 配列もそのインテグリンとの結合に重要であることが報告されている。よって、本研究では、これら 2 種類のペプチドを材料に修飾させて、新たな機能性材料を開発することを試みた。

接着では、PHSRN の効果は見られなかったものの、細胞の分化においては RGD と共存することでその挙動を制御できる可能性を示した。ウシ軟骨細胞は、両ペプチドが存在することで肥大軟骨細胞へ分化することが示唆された。この肥大軟骨細胞は軟骨組織と骨組織の間に存在することが知られており、このようなゲルを再生骨組織と軟骨組織の間に使うことで、従来問題となっている両組織の接着ができる可能性を見いだしたことに

なる。それに対して、ヒト軟骨細胞では軟骨としての分化状態がより維持され肥大化しないことが示唆された。また、ラット細胞と異なり、ヒト骨芽細胞の場合には両ペプチドの存在による接着細胞数の増加と分化の促進が認められ、ヒトと動物由来の細胞とでは分化に対する反応までも異なることが明らかとなった。今回のヒト細胞での結果から、両ペプチドのアルギン酸への導入でその接着性改良と分化状態が維持、あるいは増強されることが認められ、この材料が骨及び軟骨再生用の材料として有望であることが示唆された。

iii. 陰イオン修飾ヒアルロン酸は、異なる細胞種の分化を促進し、さらに組織再生において重要な細胞間連絡機構を賦活する機能性物質であり、再生医療において重要な働きをする有望な機能性物質であると考えられる。

Gly, Ala, Lys-LDH 複合体についてはインターカレーション前とほぼ同じ構造パターンであったが Asp-LDH 複合体については、LDH の積層構造に起因する回折ピークが低角度側にシフトすることが明らかとなった。層状空間の拡大は Asp が層間内に取り込まれたことに起因すると考えられた。したがって、ジカルボン酸構造を有するアミノ酸が層間へインターカレーション可能であると考えられた。このときアミノ酸は、層間内でピラーのように LDH ホストに対して垂直に存在していることから、無機材料表面にアミノ基が露出されていると推察される。

E. 結論

1) 分子機能イメージング循環系

- ①情報伝達系分子 Rap1 が細胞運動の際の極性形成に重要であること
- ②ミオシンの力発にはコンバーター領域の F721 が重要であることをイメージングで明らかにした。

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 の受容体のうち、チロシンキナーゼを欠いた分子種 (T1) の細胞内ドメインに選択的に結合する因子として、低分子量 G タンパク質の抑制因子 RhoGDI1 を同定した。この分子は、BDNF がその受容体に結合すると、受容体から遊離し、細胞質へ移行する。その結果、RhoGTPase が抑制される。T1 受容体を発現しているアストログリア細胞は、このシグナル伝達経路により細胞の形態を速やかに変化させることが明らかとなった。

ii. 若年性家族性アルツハイマー病の原因遺伝子のひとつである、プレセニリンの過剰発現マウスを用いた解析により、神経細胞死が起こるよりもはるかに先立って、海馬錐体細胞のシナプス機能に異常が生ずることを明らかにした。この異常はグルタミン酸受容体のシナプス部位での発現低下に基づくものと考えられ、変異型プレセニリンの病態として、グルタミン酸受容体の細胞内輸送異常という可能性が示された。

iii. プリオンタンパク質の悪性化に関与するドメインを選択的に切断するタンパク質分解酵素の存在をつきとめた。この知見は、悪性化の防止につながるもので重要である。

iv. パーキンソン病の病因遺伝子産物である I93M 変異型 UCH-L1 のトランスジェニックマウスを作成し、加齢依存的な発症モデルの開発に成功した。このマウスの脳内に UCH-L1 の不溶化による異常な小胞が形成されることを明らかにした。

3) 分子構造イメージング x 線回折

創薬や新研究領域の創成につながる複数のタンパク構造決定に成功した。

4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析

i. 本年度の研究により、ATP 受容体タンパク質の水中における状態を初めて観察することがで

き、その高さが 3 nm であることが示された。また、ゲル上の電気泳動あるいは変異導入による機能の変化より予測されていた三量体構造を AFM より直接的に観察することに成功した。また、分子生物学的手法を用いた ATP 受容体の構造-機能相関の研究では、チャンネル孔を形成するアミノ酸残基の置換により脱感作が観察された。その進行過程および回復過程の解析の結果は、受容体タンパク質の三量体構造モデルで説明することが可能であり、この構造は機能的側面からも支持された。

ii. 多糖骨格に導入し機能性部位となった細胞接着ペプチドの種類と組み合わせを制御することで、ゲル上の細胞の分化が制御できる可能性を見いだした。また、細胞の由来に応じてゲル上での挙動が異なることも見だし、開発された材料の安全性や機能性評価のために重要な知見を得た。

iii. 陰イオン修飾ヒアルロン酸は、異なる細胞種の分化を促進し、さらに組織再生において重要な細胞間連絡機構を賦活する機能性物質であり、再生医療において重要な働きをする有望な機能性物質であると考えられる。

ジカルボン酸構造を有するアミノ酸がナノ層状空間へ導入可能であることが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 分子機能イメージング循環系

(研究業績「英文」)

【原著】

- (1) Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kmioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N. Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on

- which RAPL, a Rap1-associating molecule, localizes. **J. Biol. Chem.** (in press)
- (2) Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway. **Mol. Cell. Biol.** (in press)
- (3) Endo A, Surks HK, Mochizuki S, Mochizuki N. Mendelsohn ME. Identification and characterization of zipper-interacting protein kinase as the unique vascular smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. **J. Biol. Chem.** 279; 42055-42061, 2004
- (4) Ohki T, Mikhailenko SV, Morales MF, Onishi H, Mochizuki N. Transmission of force and displacement within the myosin molecule. **Biochemistry** 43; 13707-13714, 2004
- (5) Kamioka Y, Fukuhara S, Hirofumi S, Nagashima K, Masuda M, Matsuda M, Mochizuki N. A novel dynamin-associating molecule, forming-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. **J. Biol. Chem.** 279;40091-40099, 2004
- (6) Yoshizaki H, Ohba Y, Parrini MC, Dulyaninova NG, Bresnick AR, Mochizuki N. Matsuda M. Cell Type-specific Regulation of RhoA Activity during Cytokinesis. **J. Biol. Chem.** 279; 44756-44762, 2004
- (7) Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N. Fukamizu A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. **J. Biol. Chem.** 279: 26274-26279, 2004
- (8) Onishi H, Mochizuki N, Morales MF. On the myosin catalysis of ATP hydrolysis. **Biochemistry** 43;3757-3763, 2004
- (9) 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.** 279; 14929-14936, 2004
- (10) Akazawa H, Kudoh S, Mochizuki N. Takekoshi N, Takano H, Nagai T, Komuro I. A novel LIM protein Cal promotes cardiac differentiation by association with CSX/Nkx2.5. **J. Cell Biol.** 164: 395-405, 2004
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 Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S. Hayashi M: A truncated tropo-myosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. **J. Neurosci.** 25: 1343-1353, 2005.
- ② Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S. Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K: Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. **Microbiol. Immunol.** 48: 985-994, 2004.
- ③ 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.
- ④ Castegna A, Thongboonkerd V, Klein J, Lynn B, Wang Y.L, Osaka H, Wada K, Butterfield D.A: Proteomic analysis of brain proteins in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse, a syndrome that emanates from dysfunctional ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L-1, reveals oxidation of key proteins. *J. Neurochem*, 88: 1540-1546, 2004.
- ⑤ Hagino Y, Kariura Y, Manago Y, Amano T, Wang B, Sekiguchi M, Nishikawa K, Aoki S, Wada K, Noda M: Heterogeneity and potentiation of AMPA-type of glutamate receptors in rat cultured microglia. *Glia*, 47: 68-77, 2004.
- ⑥ Bonin M, Poths S, Osaka H, Wang Y.L, Wada K, Riess O: Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Mol. Brain Res*, 126: 88-97, 2004.
- ⑦ Kwon J, Wang Y.L, Setsuie R, Sekiguchi S, Sakurai M, Sato Y, Lee W.W, Ishii Y, Kyuwa S, Noda M, Wada K, Yoshikawa Y: Developmental regulation of ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod*, 71: 515-521, 2004.
- ⑧ Wang Y.L, Takeda A, Osaka H, Hara Y, Furuta A, Setsuie R, Sun Y.J, Kwon J, Sato Y, Sakurai M, Noda M, Yoshikawa Y, Wada K: Accumulation of β - and γ -synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 deficient gad mouse. *Brain Res*, 1019: 1-9, 2004.
- ⑨ Kwon J, Wang Y.L, Setsuie R, Sekiguchi S, Sato Y, Sakurai M, Noda M, Aoki S, Yoshikawa Y, Wada K: Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testis. *Am. J. Pathol*, 165: 1367-1374, 2004.
- ⑩ Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K: Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. *Neurosci. Lett*, 374: 98-103, 2005.
- ⑪ Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Ohkubo T, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K: Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 327: 894-899, 2005.
- ⑫ 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.
- ⑬ Tremblay P, Ball HL, Kaneko K, Groth D, Hegde RS, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Safar SJ: Mutant PrP^{Sc} Conformers Induced by a Synthetic Peptide and Several Prion Strains. *J. Virol*, 78: 2088-2099, 2004.
- ⑭ Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K: Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun, 315: 802-807, 2004.

- ⑮ 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*, 11: 14-20, 2004.
- ⑯ Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: Implication for an alternative function of Dld2p. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 319: 78-82, 2004.
- ⑰ Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 320: 1271-1276, 2004.
- ⑱ Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly-folded and misfolded substrates *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 323: 339-344, 2004.

2. 学会発表

- ① C.Itami, S.Nakamura: BDNF affects intrinsic properties of layer 4 neurons in mice barrel cortex during cortical development. 836 Neurotrophins and Receptors IV 47. 2004/10/23-27 the 2004 Annual Neuroscience Meeting (San Diego)
- ② Sahara Y, Mori-Kawakami F, Yokosuka M, Kohno T, Tabira T, Nakamura S: Human

presenilin1 mutant (L286V) overexpressed transgenic mice show age-dependent morphological and synaptic changes in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 30 (2004)

- ③ K Ohira, S Nakamura: Dopamine regulates the differentiation and migration of cortical GABAergic interneurons, 15th Biennial meeting of the international society for developmental neuroscience, August 6, 2004, Edinburgh

3) 分子構造イメージング x 線回折

【原著】

- 1) Hisamitsu T, Pang T, Shigekawa M, Wakabayashi S: Dimeric Interaction between the Cytoplasmic Domains of the Na⁺/H⁺ Exchanger NHE1 Revealed by Symmetrical Intermolecular Cross-Linking and Selective Co-Immunoprecipitation. *Biochemistry*, 43: 11135-11143, 2004.
- 2) Katanosaka Y, Wakabayashi S, et al.: Calcineurin Inhibits Na⁺/Ca²⁺ Exchange in Phenylephrine-treated Hypertrophic Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem*, 2004.
- 3) Kokubo Y, Inamoto N, Tomoike H, Kamide K, Takiguchi S, Kawano Y, Tanaka C, Katanosaka Y, Wakabayashi S, Shigekawa M, Hishikawa O: Association of Genetic Polymorphisms of Sodium-Calcium Exchanger 1, NCX1, with Hypertension in a Japanese General Population. *Hypertens Res*, 27; 10: 697-702, 2004.
- 4) Pang T, Hisamitsu T, Wakabayashi S, Mori H, 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*, 43: 3628-3636, 2004.

- 5) Nishimori T, Inoue H, Hirata Y: Involvement of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 gene in its post-transcriptional regulation through the glucocorticoid receptor. *Life Sciences*, 74: 2505-2513, 2004.
- 6) Kaji T, Kuge Y, Yokota C, Tagaya M, Inoue H, Shiga T, Minematsu K, Tamaki N: Characterisation of [¹²³I]iomazenil distribution in a rat model of focal cerebral ischaemia in relation to histopathological findings. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31: 64-70, 2004.
- 7) Norata GD, E Callegari, Inoue H: HDL₃ Induces Cyclooxygenase-2 Expression and Prostacyclin Release in Human Endothelial Cells Via a p38 MAPK/CRE-Dependent Pathway: Effects on COX-2/PGI-Synthase Coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24: 871-877, 2004.
- 8) Norata GD, Pirillo A, Pellegatta F, Inoue H, Catapano AL: Native LDL and oxidized LDL modulate cyclooxygenase-2 expression in HUVECs through a p38-MAPK, NF-kappaB, CRE dependent pathway and affect PGE2 synthesis. *Int J Mol Med*, 14: 353-359, 2004.
- 9) Nakatani K, Yamakuni T, Kondo N, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Inoue H, Ohizumi Y: γ -Mangostin Inhibits Inhibitor- κ B Kinase Activity and Decreases Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Gene Expression in C6 Rat Glioma Cells. *Mol Pharmacol*. 66: 667-674, 2004.
- 10) Chen BC, Yu CC, Lei HC, Chang MS, Hsu MJ, Huang CL, Chen MC, Sheu JR, Chen TF, Chen TL, Inoue H, Lin CH: Bradykinin B2 Receptor Mediates NF- κ B Activation and Cyclooxygenase-2 Expression via the Ras/Raf-1/ERK Pathway in Human Airway Epithelial cells. *J Immunol*, 173: 5219-5228, 2004
- 11) Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H, Chen CC: Induction of Cyclooxygenase-2 Overexpression in Human Gastric Epithelial Cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-Dependent Nuclear Factor- κ B activation. *Mol Pharmacol*. 66: 1465-1477, 2004
- 12) Yokota C, Kaji T, Kuge Y, Inoue H, Tamaki N, Minematsu K: Temporal and topographic profiles of cyclooxygenase-2 expression during 24 h of focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 357: 219-222, 2004
- 13) Yokota C, Kuge Y, Hasegawa Y, Inoue H, Tagaya M, Abumiya T, Kito G, Tamaki N, Minematsu K: Neuronal cyclooxygenase-2 induction associated with spreading depression and focal brain ischemia in primates. *International Congress series*, 1264: 191-196, 2004
- 14) Yokota C, Kuge Y, Hasegawa Y, Inoue H, Tagaya M, Abumiya T, Kito G, Nagara T, Minematsu K: Neuronal cyclooxygenase-2 expression during spreading depression and focal brain ischemia, *脳循環代謝*, 16; 2: 89-95, 2004
- 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*. 279:14929-36, 2004
- 16) Kamioka Y, Fukuhara S, Sawa H, Nagashima K, Masuda M, Matsuda M, Mochizuki N: A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane

- invaginations and participates in endocytosis. *J Biol Chem.* 279:40091-9, 2004
- 17) Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kamioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N: Local Activation of Rap1 Contributes to Directional Vascular Endothelial Cell Migration Accompanied by Extension of Microtubules on Which RAPL, a Rap1-associating Molecule, Localizes. *J Biol Chem.* 11; 280: 5022-31, 2005
- 18) 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,* 279:14929-36, 2004
- 19) Kamioka Y, Fukuhara S, Sawa H, Nagashima K, Masuda M, Matsuda M, Mochizuki N: A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J Biol Chem.* 279:40091-9, 2004
- 20) Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kamioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N: Local Activation of Rap1 Contributes to Directional Vascular Endothelial Cell Migration Accompanied by Extension of Microtubules on Which RAPL, a Rap1-associating Molecule, Localizes. *J Biol Chem.* 11; 280: 5022-31, 2005
- 21) Sato E, Hayasi Y, Gemer R, Murakami K, Kooriyama Y, Tanaka E, Mori H, et al: Weakly ionized plasma flash x-ray generator and its distinctive characteristics. *SPIE,* 5196: 383-392, 2004
- 22) Sato E, Hayasi Y, Tanaka E, Mori H, Kawai T, et al: Quasi-monochromatic polycapillary imaging utilizing a computed radiography system. *SPIE,* 5196: 412-420, 2004
- 23) Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H, Mori H, et al: Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation,* 109: 351-356, 2004
- 24) Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Mori H: Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia - Benefits of nonviral vector, gelatin. *Circulation,* 109: 526-531, 2004
- 25) Akiyama T, Yamazaki T, Mori H, Sunagawa K: Simultaneous monitoring of acetylcholine and catecholamine release in the in vivo rat adrenal medulla. *Neurochemistry International,* 44: 497-503, 2004
- 26) Fujii T, Yamazaki T, Akiyama T, Sano S, Mori H: In vivo assessment of catechol O-methyltransferase activity in rabbit skeletal muscle. *Auton Neurosci,* 30; 111(2): 140-143, 2004
- 27) Akiyama T, Yamazaki T, Mori H, Sunagawa K: Effects of Ca²⁺ channel antagonists on acetylcholine and catecholamine releases in the in vivo rat adrenal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,* 287(1): R161-166, 2004
- 28) Sato E, Hayasi Y, Gemer R, Tanaka E, Mori H, et al: Portable x-ray generator utilizing a cerium-target radiation tube for Angiography. *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena,* 137-140: 699-704, 2004
- 29) Sato E, Hayasi Y, Gemer R, Tanaka E, Mori H, et al.: Quasi-monochromatic parallel radiography utilizing a computed radiography system. *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena,* 137-140: 705-711, 2004

- 30) Sato E, Hayasi Y, R.Gemer, Tanaka E, Mori H, et al: Sharp characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma, *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 137-140: 713-720, 2004
- 31) Pearson JT, Shirai M, Ito H, Tokunaga N, Tsuchimochi H,.....Mori H, et al: In Situ Measurements of Crossbridge Dynamics and Lattice Spacing in Rat Hearts by X-Ray Diffraction. Sensitivity to Regional Ischemia. *Circulation*, 109: 2976-2979, 2004
- 32) Fujii T, Yamazaki T, Akiyama T, Sano S, Mori H: Extraneuronal enzymatic degradation of myocardial interstitial norepinephrine in the ischemic region. *Cardiovasc Res*, 64: 125-131, 2004
- 33) Asanuma H, Minamino T, Sanada S, Takashima S, Ogita H,.....Mori H, et al: Beta-adrenoceptor blocker carvedilol provides cardioprotection via an adenosine-dependent mechanism in ischemic canine hearts. *Circulation*, 8; 109(22): 2773-2779, 2004
- 34) Asanuma H, Sanada S, Ogai A, Minamino T, Takashima S,.....Mori H, et al: Methotrexate and MX-68, a new derivative of methotrexate, limit infarct size via adenosine-dependent mechanisms in canine hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 43(4): 574-579, 2004
- 35) Sato E, Sagae M, Tanaka E, Hayashi Y, Germer R, Mori H, et al: Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing disk-cathode molybdenum tube. *Jpn J Appl Phys*, 43: 7324-7328, 2004
- 36) Sagae M, Sato E, Hayasi Y, Tanaka E, Mori H, et al: Monochromatic polycapillary imaging utilizing a computed radiography system. *Jpn J Med Phys*, 24: 78-85, 2004
- 37) Sanada S, Asanuma H, Minamino T, Node K, Takashima S,.....Mori H, et al: Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation*, 110: 2143-2149, 2004
- 38) Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T,.....Mori H, et al: Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2670-H2676, 2004
- 39) Sato E, ...Mori H, et al: Demonstration of enhanced K-edge angiography using a cerium target x-ray generator. *Med. Phys*, 31(11): 3017-3021, 2004
- 40) Sato E, Germer R, Hayasi Y, Kooriyama Y, Murakami K, Tanaka E, Mori H, et al: Weakly ionized cerium plasma radiography. *SPIE*, 5210: 12-21, 2004
- 41) E.Sato, et al.: Intense monochromatic x-ray irradiation from weakly ionized linear copper plasma, *SPIE*, 2004 (accept)

【総説】

なし

【著書】

Mori H, Matsuda H: *Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches*. Springer, 2005

(研究業績「和文」)

【原著】

なし

【総 説】

- 1) 井上裕康: 赤ワインに含まれるポリフェノール・レスベラトロールに関する最近の話題, *ビタミン*, 78: 621-623, 2004
- 2) 増田道隆, 小形尚子, 望月直樹: PECAM-1を介した血管内皮細胞のメカノセンシング. *日薬理誌*, 124 : 311-318, 2004

【著 書】

なし

学会発表:

海外:

1. Fujii T, Nagaya N, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Iwase T, Ito T, Yutani C, Sano S, Mori H, Adrenomedullin Enhances Therapeutic Potency of Bone Marrow Transplantation for Acute Myocardial Infarction in Rats, The Annual Scientific Section 2004, American College of Cardiology (New Orleans, USA), 2004.3
2. Chiku M, Nishigami K, Mori H, Development of In-house Micro-angiographic System for Visualizing Collateral Micro-vessels Induced by Regeneration Therapy, The Annual Scientific Section 2004, American College of Cardiology (New Orleans, USA), 2004.3
3. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ito T, Murakami S, Uematsu M, Mori H, Kanngawa K, Intravenous Administration of Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension in Rats, American College of Heart Association (New Orleans, USA), 2004.11
4. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Goto Masami, Tanaka E, Mori H, Kajiya F, Beneficial Effects of Hydorxyfasudil, a Specific Rho-kinase Inhibitor, on Ischemia-Reperfusion Injury in Canine Coronary Microcirculation in Vivo,

American College of Heart Association (New Orleans, USA), 2004.11

5. Mori H, Chiku M, Nishibami K., Tanaka E, Kimura K, Kawai T, Suzuki K, Mochizuki R, Okawa Y, Micro-angiographic system using synchrotron radiation and conventional x-ray source for visualizing angiogenic vessels induced by cardiovascular regeneration therapy, 7th International School and Symposium on Synchrotron Radiation in Natural Science 2004 (Zakopane, Poland), 2004.6

国内:

1. Mori H, Nagaya N, Kangawa K, Tabata Y, Special Program: Plenary Session; Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells, 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会 (東京), 2004.3
2. Chiku M, Sato E, Tanaka E, Nishigami K, Mori H, Special Program: Plenary Session; The evaluation of micro-coronary vessels using a plasma X-ray angiographic system for better management and cost/ effectiveness to ischemic heart disease, 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会 (東京), 2004.3

4) 原子間力顕微鏡等による分子構造解析 (研究業績「欧文」)

【原著】

- 1) Nakazawa K, Ojima H, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K, Ohno, Y: Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation. *Eur J Pharmacol*, 483: 29-35, 2004.
- 2) Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno,