

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

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 盛 英三

平成18年 (2006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 5
------------	-----

### 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 8
-----------	-----

### 3. 新たなイメージング技術の開発

永井 健治-----	3 1
------------	-----

### 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：分子構造イメージング x 線回折

盛 英三-----	3 5
-----------	-----

### 5. ナノ構造に基づく医用材料の開発

土屋 利江-----	4 4
------------	-----

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 5 5

## IV. 研究成果の刊行物別刷----- 6 7

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に関する研究

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** H14-16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)

永井健治

(北海道大学電子科学研究所・教授)

#### 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・動態変化と疾患との本質的な関連の解明、さらにその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、予防、および治療法の開発がすすむものと期待される。

##### 3) 新たなイメージング技術の開発

個体レベルにおける分子メカニズムの解明を目指して、蛍光および化学発光タンパク質、さらに光増感化学物質を利用した、新規機能イメージング法と光照射依存的分子破壊法の開発を行なっていくことを目的としている。

##### 4) 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. 蛇毒由来血管内皮細胞アポトーシス誘導因子 (VAP1)

VAP1 は血管内皮細胞のアポトーシスを誘導して出血を引き起こす蛇毒である。このタンパクの構造解析は新たな血管再生医療法の開発に道を拓く可能性がある。また、ADAM ファミリータンパ

クの作用機構の解明の端緒となる。

#### ii. イオン交換輸送体調節因子複合体

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE)に結合する Ca<sup>2+</sup>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。具体的には CHP が結合することで NHE が活性化され、細胞内 pH を上昇させる。ガン細胞に特異的に発現する CHP2 と 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。NHE の活性化による細胞内 pH の上昇は、がん細胞の増殖に関与する。

#### 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細胞内情報伝達因子等のタンパク構造

6本の $\alpha$ -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。

### 5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

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。昨年度多糖材料にペプチドを用いたナノレベルでの改質を行い、その細胞に与える影響を検討したところ、2種類の細胞接着ペプチドを導入した材料を調製することで程度の細胞機能制御が可能なが認められた。今年度も、引き続きナノレベルで細胞接着ペプチドにより改質したアルギン酸を調製し、さらに詳細な細胞機能への影響について検討した。これらの検討に加え、蛍光色素を利用したナノレベルでの細胞と材料、特に導入ペプチドとの相互作用検討も試みた。

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。特に、今年度は、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新規なアパタイトベースの新規セラミックス材料の創製を試み、骨芽細胞との相互作用について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 分子機能イメージング循環系

平成17年度は細胞の接着にかかわる Rap1 分子の機能解明を目的として、Raichu-Rap1 プローブを用いた検討を行った。血管内皮細胞はヒト大動脈血管内皮細胞(HAECs)もしくはヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使用した。HEK293細胞を用いて、Raichu-Rap1 を発現するアデノウイルスベクターを作製した。

**Rap1 活性化可視化プローブ Raichu-Rap1** : Rap1 分子の活性化プローブは、pRaichu-Rap1 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) の原理をもとに我々が作製したプローブである。YFP-Rap1-RafRBD(Raf キナーゼの Rap1 結合ドメイン)-CFP からなるキメラ蛋白質であり、CFP から YFP への FRET を観察することにより、Rap1 の活性化を可視化できるものである。アデノウイルスを用いることにより血管内皮細胞や心筋細胞での発現が可能となった。

**Raichu-Rap1 を用いた Rap1 活性化イメージング** : Raichu プローブを HAEC もしくは HUVEC アデノウ

イルスを用いて導入した。感染後 24 時間経過した細胞をイメージングに使用した。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。

**Vascular Endothelial Cadherin (VE-cadherin) 依存性の細胞接着**：VE-cadherin の細胞外ドメイン (Ext) にイムノグロブリンの Fc 部分を結合させた融合分子を作製した。培養細胞皿に VE-cadherin-Ext-Fc をコートし、このコート培養皿に血管内皮細胞を捲いて、接着を検討することにより VE-cadherin 依存性細胞接着を検討した。

**内皮細胞透過性の検討**：2 層の培養皿の上層に HUVEC を単層培養した。これに FITC ラベルしたデキストランを混ぜ、下層に移動した蛍光を測定することで血管内皮細胞の透過性を調べた。

**ミオシンの精製**：ATP 水解によるミオシン頭部の構造変化の検出を行うために、昨年度のミオシン II と同様にミオシン V, ミオシン IX の精製蛋白質をバキュロウイルスを用いて作製した。共発現したミオシン軽鎖蛋白質とともに Sf-9 細胞から精製した。

**ミオシンのステップサイズの測定 (ナノメートル)**：昨年度レーザーとラップでミオシンの力発生を測定する系ステップサイズを測定する系を確立した。このシステムを用いて、ミオシン IX のステップサイズを精製ミオシン IX を材料に測定した。

## 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、様々な遺伝子改変マウスを作成し行動解析を行って疾病モデルとなることを検証した。細胞のナノレベルでの微細構造を明らかにするために、電子線解析から 3 次元画像を構成した。タンパク質構造の解析のために、中性子線解析を行った。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。

## 3) 新たなイメージング技術の開発

- i. 励起光源を必要としない生体機能イメージング法として発光タンパク質と蛍光タンパク質との間のエネルギー移動 (chemiluminescence resonance energy transfer, CRET) を効果的に利用するために、高効率にエネルギー移動を行なわせる方法を検討した。
- ii. 緑色蛍光タンパク質発色団と周囲のアミノ酸側鎖間の電荷相互作用を理解し、新規バイオセンサーの合理的設計に役立てるため、緑色蛍光タンパク質円順列変異体の結晶化を行なった。
- iii. 従来光増感物質として広く用いられている fluorescein よりも効率よく活性酸素 (一重項酸素) を産生する色素の探索をおこなった。また、緑色蛍光タンパク質 (GFP) のシアン色変異体 (CFP) と光増感分子の間における蛍光エネルギー移動を利用して、光増感物質の最適波長とは異なる波長で励起することにより、活性酸素を産生する技術の開発を試みた。

## 4) 分子構造イメージング X 線回折

- i. 蛇毒由来血管内皮細胞アポトーシス誘導因子 (VAP1)  
プロテアーゼドメイン、disintegrin、システインリッチドメインからなる VAP1 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  
CHP2/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. BAR 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構造  
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。

## 5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

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。受容体の構造・機能相関の研究では, P2X2-BS II にサブクローニングした cDNA を NotI で直鎖化し, RNA をこれを鋳型としてインビトロ合成した。アフリカツメガエル卵母細胞に, 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。NMR 解析では P2X2 受容体のサブクラス間できわめて保存性の高い部分と同じアミノ酸配列を持つ人工ペプチドを作製し, NMR 測定をした。

i. 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, さらに両者を種々の比で混合した溶液から数種類のゲルをカルシウムイオン架橋により調製した。

ヒト軟骨細胞及び骨芽細胞 (BioWhittaker 社) を使用し, 調製したアルギン酸ゲル上で細胞培養を 2-4 週間行った。その後, MTT 試薬によりゲル上に生存している細胞数を見積もった。骨芽細胞への分化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。また, 軟骨細胞の分化を type-II 及び type-X collagen と aggrecan の mRNA 発現量に

より評価した。

細胞とゲルとの相互作用を蛍光色素をラベルした 2 種類のペプチドを共焦点レーザー顕微鏡により追跡する手法で検討した。

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た。高濃度のリン酸イオンは骨芽細胞の分化を阻害することが明らかになったため, HAp のリン酸サイトに異種イオンを導入することを試みた。硫酸イオンおよび骨芽細胞の分化を促進するニオブイオンの HAp 構造中への取り込みについて検討した。骨再生用スキャホールドは共沈法により合成した。溶液の組成を制御することにより各種の無機イオンの取り込み効果について検討した。得られたセラミックス粒子を成形焼結することによりタブレットを作製し, その上に骨芽細胞を培養することで新規セラミックス材料の骨形成能(増殖能, 分化能)を評価した。

## C. 研究結果

### 1) 分子機能イメージング循環系

**cAMP 増加刺激による血管内皮細胞の透過性は抑制効果と VE-cadherin 依存性接着の亢進作用:**

イソプラレノール等の細胞内 cAMP を増加させる刺激は一樣に血管透過性を抑制した。またトロンビンによる透過性の亢進もこれらの刺激で抑制された。同様な刺激で, VE-cadherin 依存性の細胞接着について検討したところ, いずれも接着性を亢進させた。血管透過性抑制のメカニズムとして, VE-cadherin のホモフィリックな結合が亢進していることがわかった。

このため, この機序の解明のために, cAMP の下流で作用する因子について検討し, Epac (Rap1 の活性化因子) が関与することがわかった。

**cAMP-Epac-Rap1 シグナルによる血管透過性の抑制, VE-cadherin 依存性接着の制御:**

Epac を直接活性化する薬剤である 8-CPT-2'-O-Met-cAMP (8CPT) で HUVEC を刺激すると血管透過性の抑制とともに, VE-cadherin 依存性の接着も亢進した。同刺激により Rap1 が活性化することもわかった。したがって, 血管内皮細

胞においては cAMP-Epac-Rap1 が細胞の透過性抑制、VE-cadherin 依存性の接着を増強させていることがわかった。

#### Rap1 の細胞接着部位での活性化：

Rap1 活性化可視化プローブを発現する HUVEC をフォルスコリンで刺激して (cAMP 増加薬)、Rap1 の活性化を可視化した。刺激により、血管内皮細胞の間隙が埋まり細胞間接着部位で Rap1 が活性化していた。つまり、cAMP の増加により、Rap1 が細胞間接着で増強し、VE-cadherin の接着を増強して、透過性を低下させるというシグナル系が重要であった。

#### Rap1 活性化による細胞接着増強のメカニズム：

VE-cadherin は細胞内でアクチン細胞骨格系に強くリンクしている。共焦点顕微鏡下で調べた結果、フォルスコリン刺激により、細胞周囲とくに接着部位でのアクチンの束化が促進されていた。つまり、VE-cadherin を裏打ちするアクチン重合・束化が促進された結果、VE-cadherin の結合が強固になり透過性を低下させたと考えられた。

#### ミオシン IX の力測定とステップサイズの検討：

野生型ミオシン II ではこれまでの報告どおり 6 nm であった。ミオシン IX は単頭で、26nm のステップサイズを示した。これは、双頭のミオシン V の 35nm にも匹敵するほどの大きなサイズであった。しかも、単頭でありながら、プロセッシブにステップを示したことから、どのようにアクチンに結合したままミオシン頭部を動かしているのかが、検討課題として残った。

## 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 のノックアウトマウスの解析から、発達期の興奮性シナプスでは、グルタミン酸受容体のうち、NMDA 受容体は応答性を示すものの、AMPA 型受容体は応答性を示さないことを示した。今年度は、培養皮質錐体細胞の樹状突起とスパインの領域について、FRET 法によってカルシウムイメージングを行い、NMDA 受容体が機能しうる状態であることを確認した。BDNF によっても同様な細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。同部位

で、AMPA 受容体の細胞表面への輸送が上昇するか否かを明らかにするために、単一スパインの AMPA 受容体の蛍光総量で除し、表面発現率を指標とした。BDNF 投与によりこの表面発現率は 40% 程度増加した。次に、BDNF 受容体によって活性化されるホスホリパーゼガンマの阻害剤を投与したところ、細胞内ストアからのカルシウム動員が抑制されるとともに、AMPA 受容体の膜表面への移行も阻害された。さらに、スパインにはカルシウム放出によって活性化される TRP カチオンチャンネルが存在することを抗体染色により明らかにした。このチャンネルの機能を抑制すると AMPA 受容体の膜表面への移行が部分的に抑制された。TRP チャンネル自体、BDNF によってシナプス膜表面に移行することが確認されたが、NMDA 受容体の動態は変化しなかった。

ii. ユビキチン水解酵素 L1 型(Ubiquitin Hydroxylase L1; UCH-L1)はユビキチン-プロテアソーム系の構成要素の一つであり、I93M(Ile→ Met)変位はヒトパーキンソン病の原因となり、S18Y(Ser → Tyr)多型は逆にパーキンソン病のリスク低下を導く。これまでに変異型 UCH-L1 トランスジェニックマウスを作製し、その解析から Uch-L1 の不溶化がパーキンソン病の発症に関与し Uch-L1 の凝集・毒性獲得等の蛋白化学的な性状変化がパーキンソン病の発症に関わることが示唆された。そこで変異・多型に 관련된 Uch-L1 分子の変化を同定するために、I93M 変位型ならびに S18Y 多型ヒト UCH-L1 蛋白質を大量合成し中性子小角散乱法(蛋白質サンプル溶液に冷中性子線を照射してその散乱角における散乱強度を測定する手法)で水溶液中の UCH-L1 蛋白質のナノレベルの分子構造を解析した。その結果 Uch-L1 は二量体構造を呈しており高リスク型の I93M UCH-L1 は扁平な回転楕円体構造を、低リスク型 S18Y Uch-L1 は逆に球体に近い構造を取っていることが明らかになった。

iii. フリーズレプリカ電子線トモグラフィーにより、細胞膜受容体分子の拡散制御を担う細胞

膜骨格ネットワークの存在を明らかにした。このコンパートメントは直径 200nm 程度の大きさであり、先に、光イメージングによって観察された分子拡散制御の領域サイズによく一致していた。さらにプリオン神経ラフト複合体によるドメイン形成を明らかにするために、プリオンタンパク質およびプリオンを悪性型に変換する因子に対する抗体を用いて免疫ゴールド染色電子顕微鏡法を行った。その結果、両者は上記の細胞骨格ネットワークのなかでクラスターを形成している可能性が示された。

iv. 蛋白質立体構造データを利用した *in silico* シミュレーション技術を用いて、数十万個の薬物の中から神経難病（パーキンソン病）関連蛋白質に結合する治療薬候補をドッキングシミュレーションによって探索する基礎技術開発を行い治療への応用研究を進めた。またパーキンソン病の発症リスクと関係が知られる Uch-L1 分子のアミノ酸置換に着目し、中性子散乱法でナノレベルの分子構造解析を行った。その結果パーキンソン病の発症リスクに相関したナノレベルの分子構造変化を見出す事に成功し、発症リスクをコントロールする新薬開発の手掛かりを得た。

### 3) 新たなイメージング技術の開発

i. 化学発光に ATP のエネルギーを必要としない発光基質としてセレンテラジンを持つウミシイタケ由来の化学発光タンパク質（Renilla luciferase、以下 Rluc）を GFP の黄色発光変異体 Venus の様々な円順列変異体と様々なアミノ酸リンカー配列でタンデムにつなぐことにより、ドナーの発光遷移モーメントとアクセプターの吸収遷移モーメントの相対角度の最適化を試みた。その結果、221 番目を新たな N 末にもつ円順列 Venus を GGSGG リンカーで連結することにより、極めて高い BRET 効率を示すコンストラクトを作成することが出来た。本コンストラクトを培養細胞にトランスフェクトし、高開口数の対物レンズにより発光顕微鏡観察を行なったところ、分オーダーの露光時間が必要とされていた従来の

発光観察よりも大幅に短い露光時間（30ms~5s）での画像取得に成功した。

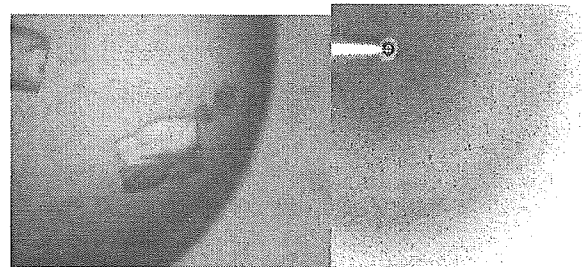
ii. 緑色蛍光タンパク質の円順列変異体を利用したカルシウム指示薬 *ratiometric-pericam* のカルシウム有無における結晶化を行い、カルシウム非存在化では針状の、カルシウム存在化では八面体結晶を得ることが出来た。得られた結晶を高エネルギー物理学研究所のビームラインを利用して X 線回折測定を行なったところ、分解能 3Å の回折像が得られた。

iii. fluorescein よりも 10 倍以上効率よく一重項酸素を産生する色素として *tetrabromofluorescein* を見出した。さらに緑色蛍光タンパク質のシアン色変異体と光増感分子間におけるエネルギー移動を利用して、光増感分子の最適波長とは異なる波長での励起による一重項酸素を産生する技術を開発した。

### 4) 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. 蛇毒由来血管内皮細胞アポトーシス誘導因子 蛇毒由来のアポトーシス誘導因子の結晶解析を行い、2.5Å 分解能での構造決定に成功した。この蛇毒成分は哺乳類において重要な働きをしている膜蛋白質ファミリーに非常に相同性が高いと考えられる。現在論文投稿中である。



VAP 1 の結晶

同 X 線回折像

ii. イオン交換輸送体調節因子複合体

CHP2/NHE ペプチド複合体を大量精製した後、EF ハンド  $Ca^{2+}$  部位を  $Y^{3+}$  イオンで置換することによって結晶化を行い、SPRING8 のビームラインを用いて 2.8Å の解像度で結晶構造を解明した。その結果、CHP2 と NHE が極めて特異的に強く相互作用する分子機構が明らかになった。構造に基づく



機能解析によって CHP が  $\text{Ca}^{2+}$  センサーではなく NHE の pH センサーを制御するユニークな機能を有することが明らかになった。現在、変異 CHP2、CHP3 および NHE の細胞質ドメイン全体の結晶構造解明に向けて研究を進めている。また創薬的観点から、CHP/NHE 相互作用を阻害する薬物の探索を行いたい。

### iii. プロスタグランジン関連タンパク

昨年報告した大腸菌発現系以外に pColdII を用いることで、PPAR $\alpha$  は高効率に可溶性画分に発現した。また、精製過程でのタンパク質性の沈殿が見られないなど、発現系により発現タンパク質の性質が異なっていた。FLAP については昨年報告した大腸菌発現系にてタンパク質を精製し、通常の結晶化とともに新たな方法を用いて結晶化を行った。構造解析用結晶の再生に向けて、さらに条件の検討を進めている。

### iv. BAR 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構造

Endophilin の BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) ドメインの結晶構造を解き、これが3つの下部構造 (BAR ドメイン本体、N 末の両親媒性ヘリックス、および中央部の付属突起構造) からなることを明らかにした。

昨年結晶化に成功した、血管平滑筋に特異的に発現する Rho 活性化分子 VSM-Rho-GEF の GEF 活性ドメインについては、理研播磨・宮野構造生物物理研究室との共同研究により結晶構造を明らかにすることができた。

## 5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

i. 希釈した ATP 受容体 (P2X2) 水溶液を雲母上に滴下し、これを AFM で観察した。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。イオン強度を上げ、ATP を添加した場合、タンパク質が高密度で一様に整列した 2 次元結晶に近い像が得られた。個々のタンパク質は直径約 10 ナノメートルの円筒状であり、中央にイオン・チャンネル孔を有することが確認された。また、ATP を添加しない場合にはこのような整列したタンパク質像は得られな

かった。

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。この電流が持続している間に過分極側 (マイナス側) に矩形波を加えると、約 40 ms の時定数で電流が増大した。このゲートの電位依存性は、開く時と閉じる時では異なっており、単なる開閉の 2 状態では説明できなかった ATP に対する親和性が電位によって変わるという 4 状態のモデルを提案した。このモデルおよび速度論的実験データを用いて計算すると親和性の差は約 3 倍であり、この差は電位依存性分の大きさの ATP 濃度依存性をほぼ過不足なく説明しうるものであった。

P2X2 受容体のモデルペプチドを用いて、水中、メタノール中および DMSO 中でプロトンおよび  $^{13}\text{C}$  の NMR 測定を行なった。最もシグナルが明瞭に検出できたのは、DMSO 中のプロトン・シグナルであった。薬物と受容体の結合は水中ではなくタンパク質中で起こるため、基本的には疎水的環境下である。よって、DMSO 中の測定は結合状態に近いものを反映すると考え、ペプチドに ATP の塩基部分であるアデニンを加えた測定を行なった。

ii. RGD と PHSRN が同時に存在しているゲル上で軟骨細胞を培養すると、type-II 及び aggrecan mRNA の発現が増強した。一方、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った。この増強効果は、ゲル調製時の修飾アルギン酸混合比に影響を受けた。このような、分化に対する RGD と PHSRN 存在比の影響は骨芽細胞系でも認められた。骨芽細胞の場合にも、2 種類のペプチドが同時に存在するゲル上では、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。

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は未分化状態および分化誘導状態のヒト間葉系幹細胞の分化と増殖を促した。さらに、陰イオン修飾ヒアルロン酸は角化細胞の分化に関わる遺伝子である WNT4、MKK6 等の発現を増加させ、そのシグナル伝達の上流に存在する可能性がある細胞膜タンパク質 NOTCH3 の発現を増加させていた。

新規な HAp ナノ粒子の合成に成功した。ニオブイオンが導入された HAp 上で培養された骨芽細胞はアパタイトと比べ約 2 倍のカルシウムの沈着量が多くなっており、骨芽細胞の骨形成能を促進することが明らかとなった。さらに硫酸イオンが導入された HAp は、骨芽細胞の増殖および分化ともに促進し、極めて高い骨形成能を有していることが明らかとなった。

#### D. 考察

##### 1) 分子機能イメージング循環系

血管透過性調節機序として cAMP-Epac-Rap1 系が重要であることを示した。これまで cAMP-PKA 系がこの制御にかかわると考えられたきたが、Epac-Rap1 系が主に機能していることを突き止めた。また、本研究で用いている Rap1 の活性化のイメージング技術により、Rap1 が直接細胞間接着で活性化していることを示したので、ここでの Rap1 の機能を解析する端緒となった。つまり、空間的に Rap1 が活性化する場所と機能している部位が同一であり、イメージングによって得られる位置情報が非常に有用であることを示すことにもつながった。

また Epac を直接活性化して GTP 結合型 Rap1 を増加させる 8CPT は今後血管透過性を押さえる薬剤として使用可能であることを示唆する結果を得た。動物個体で通常 VEGF は血管透過性を亢進させるが、同時に 8CPT を局所投与しておくとう血管の透過性が抑制されるという実験結果も別の研究で得ている。したがって、新たなシグナルの同定により新たな分子標的候補を突き止めたことになると考えた。

ミオシンの力発生とステップサイズの検討を行

ってきている。ミオシン IX が単頭でありながら、大きなステップサイズ (26 nm) を持つことのメカニズムはとても重要である。通常、双頭であれば hand-over hand により、大きなステップサイズであるが、単頭ではミオシン頭部の大きさがそれほどミオシン間で変化がないので、論理的に現段階では説明しがたい。また、プロセシブにアクチンと結合したままで、ステップして如何に進むことができるのかも検討課題である。

##### 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 によってグルタミン酸受容体のひとつである AMPA 受容体がシナプスの後膜に輸送されることが明らかとなった。BDNF はヒトにおいてもエピソード記憶の形成に必要であることが示されており、実際、我々は、BDNF の特定の遺伝子多型性とアルツハイマー病に相関があることを見出している。本研究課題の成果として、以前、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ことを明らかにしたが、BDNF およびプレセニリンはシナプス膜へのグルタミン酸受容体の輸送過程に関与することが示されたことになる。このため、同受容体のシナプス膜への輸送過程を制御する分子機構を解明することにより、創薬の標的を見出すことができると考えられる。

ii. ユビキチン水解酵素 L1 型 (Ubiquitin Hydroxylase L1; UCH-L1) の I93M (Ile → Met) 変位はパーキンソン病の原因となり、S18Y (Ser → Tyr) 多型は逆にパーキンソン病のリスク低下を導く事実に関連したタンパク質の高次構造変化が見出されたことにより、発症型の構造を正常型あるいは、低発症型に変化させることが創薬の標的になると考え、その薬物候補のスクリーニングを始めている。

iii. 厚生労働省の医療政策としても重要である

プリオン対策に関連し、プリオンの悪性化に関わる細胞の微細構造の一端が解明されはじめた

ことは本研究課題の目標を達成するうえで重要な成果である。

### 3) 新たなイメージング技術の開発

i. 化学発光タンパク質から蛍光タンパク質へのエネルギー移動を利用した生理機能指示薬は幾つか報告されているが、その何れもがダイナミックレンジが小さく、実用上問題があった。今回得られた結果は、大きなダイナミックレンジを有する機能指示薬開発に大きな道筋を与える方法になるものと期待される。

ii. 緑色蛍光タンパク質円順列変異体は野生型タンパク質と構造上ほとんど変化がなかったが、吸収スペクトルに大きな違いがあった。このことは発色団近傍のアミノ酸立体配置に僅かな違いが生じただけで、発色団の電荷状態が変化することを示唆している。ただし、新たな機能性指示薬の合理的設計に生かすためには、より分解能の高い回折像を得ることが必要である。

iii. 蛍光タンパク質から光増感分子への高効率エネルギー移動により活性酸素を産生することが可能になったため、発光スペクトルは同じだが、異なる吸光スペクトルを有する蛍光タンパク質を用いることにより、2種類以上の生体分子を異なる波長で独立に破壊する技術への応用が開けた。

### 4) 分子構造イメージング X 線回折

VAP1 の結晶構造は、血管内皮のアポトーシスを抑制する薬剤の開発の基盤情報となる。また、ADAM ファミリー蛋白の構造解明の端緒となる。CHP2/NHE 複合体の構造解析は細胞内イオン環境の調節によりがん細胞の増殖を調節する薬剤の開発と資する。BAR ドメイン構造蛋白群の構造解析は新たな細胞生物学の研究領域の創成に資する。

### 5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

i. AFM を利用した P2X<sub>2</sub> 受容体の高分解能の形状観察に成功した。このような高分解能の AFM 観察は P2X 受容体はもちろん、他のイオン・チャンネル

形成型の神経伝達物質の受容体を含めても初めてのことである。ATP を添加しない場合にはこのような配列は認められなかった。このことは、ATP の結合前の受容体タンパク質が比較的不均一であるのに対し、ATP が結合すると均一化するためであると考えられる。

分子生物学的手法を用いた P2X<sub>2</sub> 受容体タンパク質の電位依存性ゲートの研究では、定量的な解析結果からこのゲート機構が、高親和性の開閉、および低親和性の開閉に4つの状態から成るモデルで説明できることが示された。電位依存性があるということは、タンパク質内で電荷を有するアミノ酸残基が存在し、細胞膜内で電位に応じて移動することを示唆している。電位依存性のスロープはカルシウム・チャンネルなどの電位依存性チャンネルに比べて緩やかであり、これらのチャンネルに5個近くあるとされる電位感受性電荷（ゲード電荷）よりは数は少ないと考えられる。

NMR によるモデル・ペプチドでは DMSO 中でのプロトンのシグナルが明瞭に観察され、以降、疎水環境下での結合を検討するのにふさわしい系となることが示された。

ii. 今年度は、調製したアルギン酸からなるゲル上でヒト細胞を培養し、その細胞挙動変化を検討してきた。ヒト軟骨細胞は2種類のペプチドが存在するゲル上では、軟骨基質関連遺伝子の発現が増強される一方で、肥大軟骨細胞のマーカーである type-X collagen の発現が見られなかったことから、軟骨としての分化状態がより維持されることが示唆された。また、骨芽細胞の場合でも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た。今年度は、RGD と PHSRN の存在比を変化させたゲル上での細胞挙動を検討したが、いずれの細胞においても、その分化マーカーの発現が極大になるような存在比があることが示唆される結果を得た。

この分化促進と材料-細胞間相互作用との関連を検討するため、蛍光色素を用いての観察を行ったところ、細胞接着下部でそのペプチドが局在化していることを見いだした。特に、細胞分化を促進するような条件下では、2種類のペプチドが数

nm の距離で近接して存在するようになり易いことが示唆される観察結果を得た。

iii. 陰イオン修飾ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸への陰イオン修飾が、分化制御遺伝子の発現増加を誘導すると考えられる。その結果、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 は AMPA 型受容体をシナプス膜の表面に輸送することが明らかとなった。この輸送には、細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出と、それに続く、シナプス膜に存在する TRP チャンネルを介したカルシウム流入が必要である。BDNF は AMPA 受容体を変化させない。

ii. パーキンソン病の病因遺伝子産物である I93M 変異型 UCH-L1 のタンパク質構造を中性子線解析によって明らかにした。パーキンソン病の発症に抵抗性の変異 S18YUCH-L のタンパク質構造との比較から、発症に関連のある高次構造を同定することが出来た。

iii. プリオンタンパク質とその悪性化に関与する因子の免疫ゴールド染色電子顕微鏡法により、両者が細胞膜受容体分子の拡散制御を担う細胞膜骨格ネットワークに存在し、クラスターを形成していることを明らかにした。

### 3) 新たなイメージング技術の開発

i. 化学発光タンパク質をエネルギードナーに用いる場合においても蛍光タンパク質をエネルギードナーに用いる場合と同様に、ドナーとアク

セプター間距離と、ドナー発光遷移モーメントとアクセプター吸収遷移モーメント間の相対角度がエネルギー移動効率に大きく影響を与えることが明らかになった。

ii. 緑色蛍光タンパク質円順列変異体を利用したカルシウム指示薬ペリカムのカルシウム有無における結晶を得、3 Å の分解能で結晶構造を解くことが出来た。

iii. 緑色蛍光タンパク質から光増感分子への高効率エネルギー移動により、光増感分子の最適波長とは異なる波長照射による一重項酸素産生を行なう技術を開発した。

### 4) 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質構造決定に成功した。

### 5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

i. ATP 受容体タンパク質は直径約 10 ナノメートルの中央にイオン・チャンネル孔を有する円筒型であることを初めて明らかにした。また、ATP が結合することにより、受容体の構造が均一化することが示唆された。また、ATP 受容体の電位依存ゲートの性質を定量的に解析し、この機構を説明する 4 状態モデルを提唱した。NMR 解析では DMSP 中のプロトン・シグナルがモデル・ペプチドの構造決定に利用可能であることを示した。

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、さらにその存在比を制御することで、ゲル上の細胞の分化が制御できる可能性を見いだした。その制御の仕組みは、細胞とペプチドとの相互作用によるものであり、その相互作用が効率よく起こるように設計することがより組織再生の優れた材料開発に繋がると考えられる知見を得た。

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。

ニオブイオンが導入されたアパタイト (NbHAp)

は骨芽細胞の分化を促進した。

## 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) Linguh H, Tsuda M, Makino Y, Sakai M, Watanabe T, Ichihara S, Sawa H, Nagashima K, Mochizuki N, Tanaka S. Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS. *Oncogene* (in press), 2005
- 2) Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, Mochizuki N. MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of VE-cadherin-mediated cell adhesion. *Mol. Biol. Cell* (in press), 2005
- 3) Somekawa S, Fukuhara S, Fujita H, Masuda M, Saito Y, Mochizuki N. Enhanced functional Gap junction neofunction by PKA-dependent and Epac-Rap1-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 92:655-662, 2005
- 4) Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, Mochizuki N, Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY. Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow. *Circ Res.* 97 : 86-94, 2005
- 5) Maeng YS, Min JK, Kim JH, Yamagishi A, Mochizuki N, Kwon JY, Park YW, Kim YM, Kwon YG.: ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF-kappaB-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. *Cell Signal* (in press) 2005
- 6) 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.* 280: 5022-5031, 2005

- 7) 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.* 25: 136-146, 2005

【学会発表】

大木高志、望月直樹: Single-molecule analysis of the myosin IX by optical trap nanometry. 第4回ナノテクノロジー総合シンポジウム (東京、2月)

### 2) 分子機能イメージング神経系

#### 1. 論文発表

【原著】

- 1) Ohira K, Homma K, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M: Regulation of RhoA signaling pathway and actin cytoskeleton by truncated TrkB-T1 in rat glioma cells. *BBRC*, 2006. (in press)
- 2) Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi H: A truncated TrkB receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDI1. *Abbreviated title: T1 regulates astrocytic morphology. J. Neurosci.* 25:1343-1353, 2005.
- 3) Wang Y.L, Liu W, Sun Y.J, Kwon J, Setsuie R, Osaka H, Noda M, Aoki S, Yoshikawa Y, Wada K: Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 40-49, 2006.
- 4) Sakurai M, Ayukawa K, Setsuie R, Nishikawa K, Hara Y, Ohashi H, Nishimoto M, Abe T, Kudo Y, Sekiguchi M, Sato Y, Aoki S, Wada K: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the

- morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. *J. Cell Sci*, 119(Pt1):162-171, 2006.
- 5) Kwon J, Sekiguchi S, Wang Y.L, Setsuie R, Yoshikawa Y, Wada K: The region- specific functions of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes along the epididymis. *Exp. Anim*, 55(1): 35-43, 2006.
  - 6) Mi W, Beirowski B, Gillingwater T.H, Adalbert R, Wagner D, Grumme D, Osaka H, Conforti L, Arnhold S, Addicks K, Wada K, Ribchester R.R, Coleman M.P: The slow Wallerian degeneration gene, *WldS*, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain*, 128: 405-416, 2005.
  - 7) Manago Y, Kanahori Y, Shimada A, Sato A, Amano T, Sato Y, Setsuie R, Sakurai M, Aoki S, Wang Y.L, Osaka H, Wada K, Noda M: Potentiation of ATP-induced currents due to the activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1. *J. Neurochem*, 92: 1061-1072, 2005.
  - 8) Setsuie R, Kabuta T, Wada K: Does Proteasome Inhibition Decrease or Accelerate Toxin-Induced Dopaminergic Neurodegeneration? *J. Pharmacol. Sci*, 97: 457-460, 2005.
  - 9) Kwon J, Mochida K, Wang Y.L, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, Wada K: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol. Reprod*, 73: 29-35, 2005.
  - 10) Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M: Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Developmental Cell*, 9: 389-402, 2005.
  - 11) Arimura N, Menager C, Kawano Y, Yoshimura T, Kawabata S, Hattori A, Fukata Y, Amano M, Goshima Y, Inagaki M, Morone N, Usukura J, Kaibuchi K: Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol. Cell Biol*, 25: 9973-84, 2005.
- 【総説】
- Kusumi A, Suzuki K, Kondo J, Morone N, Umemura Y: Protein-Lipid interactions in the formation of raft microdomains in biological membranes. "Protein-Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks" edited by Lukas K. Tamm. Wiley-VCH, 307-336, 2005.
2. 学会発表
- 【国際学会】
- 1) H Nakata, S.Nakamura: Brain-derived neurotrophic factor regulation of AMPA receptor trafficking. 45th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco USA, 2005,12.
  - 2) Morone N, Fujiwara T, Kasai R, Kozuka Y, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A. Cell Membrane Compartmentalization as Visualized by Freeze-Fracture and Deep-Etching Electron Tomography. 45th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco USA, 2005.12.
- 【国内学会】
- 1) Morone N, Setou M, Usukura J, Kozuka Y, Yuasa S, Kusumi A. (2005). Visualization of Cell Membrane Dynamics by Electron Tomography. The 61st Annual Meeting of The Japanese Society of Microscopy, Tsukuba Japan.
  - 2) Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai R, Ike H, Kozuka Y, Yuasa S, Hirata Y, Baba T, Ohno S, Usukura J, Kusumi A. (2005). Visualization of the Plasma Membrane Domain by Electron Computed Tomography. The 50<sup>th</sup>

Symposium of The Japanese Society of  
Microscopy, Fukuoka Japan.

### 3) 新たなイメージング技術の開発 (研究業績「英文」)

#### 【原 著】

- 1) J. Kohyama, A. Tokunaga, Y. Fujita, H. Miyoshi, T. Nagai, A. Miyawaki, K. Nakao, Y. Matsuzaki, H. Okano: "Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: Live monitoring and significance in neural development", *Dev. Biol.* 286 : 311-325 (2005)
- 2) K. Takao, K. Okamoto, T. Nakagawa, R.L. Neve, T. Nagai, A. Miyawaki, T. Hashikawa, S. Kobayashi and Y. Hyashi: "Visualization of synaptic Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II activity in living neurons" *J. Neurosci.* 25 : 3107-3112 (2005)
- 3) X. Lin, P. Varnai, G. Csordas, A. Balla, T. Nagai, A. Miyawaki, T. Balla and G. Hajnoczky: "Control of Calcium Signal Propagation to the Mitochondria by Inositol 1,4,5-Trisphosphate-binding Proteins" *J. Biol. Chem.* 280 : 12820-12832 (2005)
- 4) M. Ikeda, M. Ikeda-Sagara, T. Okada, P. Clement, Y. Urade, T. Nagai, T. Sugiyama, T. Yoshioka, K. Honda and S. Ioue: "Brain oxidation is an initial process in sleep induction" *Neuroscience* 130 : 1029-1040 (2005)

#### 【総 説】

A. Miyawaki, T. Nagai and H. Mizuno: "Engineering fluorescent proteins" *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol* 95: 1-15 (2005)

#### 【著 書】

A. Miyawaki, T. Nagai and H. Mizuno: "Genetic Probes for Calcium Dynamics", Yuste et al. eds. *Imaging Neurons-A Laboratory Manual-*, CSHL PRESS (2005)

### (研究業績「和文」)

#### 【原 著】

なし

#### 【総 説】

永井健治、宮脇敦史 「GFP を利用した蛍光バイオセンサーの作成法と生体機能の可視化」 遺伝子医学Mook別冊/分子生物学実験シリーズ 図・写真で観るタンパク質構造・機能解析実験実践ガイド、メディカル ドウ、173-182 (2005)

#### 【著 書】

なし

#### 学会発表 :

- 1) 永井健治:「蛍光タンパク質を用いた生体機能イメージングの現状と展望」、日本病理学会、パシフィコ横浜、横浜(2005-4)
- 2) 永井健治:「蛍光タンパク質を利用した生体機能のライブイメージング」、日本顕微鏡学会、エポカルつくば、つくば(2005-6)
- 3) 永井健治:「ニポウ式共焦点による FRET イメージング」、日本顕微鏡学会、エポカルつくば、つくば(2005-6)
- 4) T. Nagai: "Engineering green fluorescent proteins to visualize biological functions", Symposium on New Frontier in Live Cell Imaging", Yang Ming University, Taipei (2006-7)
- 5) T. Nagai: "Engineering green fluorescent proteins to visualize and manipulate biological functions", Microscopy workshop, National Cheng Kung University, Tainan (2006-7)
- 6) 永井健治: 「Engineering green fluorescent proteins to visualize and manipulate biological functions」、浜松医科大学 COE 国際シンポジウム、浜松医科大学、浜松 (2005-8)
- 7) T. Nagai: "Real-time detection of signal transduction pathway in living cells", American Academy of Nanomedicine First Annual Meeting, Johns Hopkins University, USA (2005-8)
- 8) T. Nagai: "Functional imaging of living cells by the GFP-based indicators", LSM CLUB 2005,

- China (2005-9)
- 9) T. Nagai; "Application of GFP-based indicators to visualize biological functions", The TRF & Microscopy Workshop, Yang Ming University, Taipei (2005-10)
  - 10) T. Nagai: "Application of GFP-based indicators to visualize biological functions", Japan-UK Symposium on Promotion of Regional Partnership on Nanotechnology Development, Hokkaido University, Sapporo (2005-10)
  - 11) T. Nagai: "Introduction of Nikon imaging center at Hokkaido University" Luncheon seminar of the 7<sup>th</sup> RIES international symposium on 命, Hokkaido University, Sapporo (2006-12)
  - 12) 永井健治:「形態形成原理の解明を目指してーバイオイメージングによるアプローチー」、第28回日本分子生物学会バイオテクノロジーセミナー、JALリゾートシーホークホテル福岡、福岡 (2005-12)
  - 13) 永井健治:「個体レベルの機能イメージングを目指して」第79回日本薬理学会シンポジウム、パシフィコ横浜、横浜 (2006-3)
  - 14) 永井健治:「個体レベルの機能イメージングを目指して」第111回日本解剖学会層階シンポジウム、北里大学、相模原 (2006-3)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
特願 2006-043211 超迅速にDNA塩基配列を決定する方法
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし
- 4) 分子構造イメージング x 線回折  
(研究業績「欧文」)  
【原著】
- 1) Katanosaka Y, Wakabayashi S, et al.: Calcineurin Inhibits Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchange in Phenylephrine-treated Hypertrophic Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, 2005
  - 2) Hisamitsu T, Pang T, Shigekawa M, Wakabayashi S: Dimeric Interaction between the Cytoplasmic Domains of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE1 Revealed by Symmetrical Intermolecular Cross-Linking and Selective Co-Immunoprecipitation. *Biochemistry*, 43: 11135-11143, 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1: Tightly bound Ca<sup>2+</sup> ions as important structural elements. *Biochemistry*, 43: 3628-3636, 2004
  - 5) Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Lett.* 579: 705-711, 2005
  - 6) Cherukuri DP, Goulet AC, Inoue H, and Nelson MA: Selenomethionine Regulates cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through NF-κB in Colon Cancer Cells. *Cancer Biol Ther.* 4: 175-180, 2005
  - 7) Jing Chen, Min Zhao, Reena Rao, Hiroyasu Inoue, and Chuan-Ming Hao: C/EBPβ and its binding element are required for NFκB induced COX2 expression following hypertonic stress. *J. Biol. Chem.* 280: 16354-16359, 2005
  - 8) Wu CY, Wang CJ, Tseng CC, Chen HP, Wu MS, Lin JT, Inoue H, Chen GH: Helicobacter pylori



- promote gastric cancer cells invasion through a NF- $\kappa$ B and COX-2-mediated pathway *World J Gastroenterol.* 11: 3197-3203, 2005
- 9) Yokota C, Kuge Y, Inoue H, Tamaki N, Minematsu K: Bilateral induction of the S-100A9 gene in response to spreading depression is modulated by the cyclooxygenase-2 activity. *J Neurol Sci.* 234: 11-16, 2005
  - 10) Park SW, Sung MW, Heo DS, Inoue H, Shim SH, Kim KH: Nitric oxide upregulates the cyclooxygenase-2 expression through the cAMP-response element in its promoter in several cancer cell lines. *Oncogene* 24: 6689-6698, 2005
  - 11) Marwaha V, Chen YH, Helms E, Arad S, Inoue H, Bord E, Kishore R, Der Sarkissian R, Gilchrist BA, Goukassian DA: T-oligo treatment decreases constitutive and UVB-induced COX-2 levels through P53-and NF $\kappa$ B-dependent repression of the COX-2 promoter. *J Biol Chem.* 280: 32379-32388, 2005
  - 12) Komatsu K, Buchanan FG, Katkuri S, Morrow JD, Inoue H, Otake M, Watanabe S, Dubois RN. Oncogenic potential of MEK1 in rat intestinal epithelial cells Is mediated via cyclooxygenase-2. *Gastroenterology* 129: 577-590, 2005
  - 13) Lim WC, Park M, Bahn JJ, Inoue H, Lee YJ: Hypertonic sodium chloride induction of cyclooxygenase-2 occurs independently of NF- $\kappa$ B and is inhibited by the glucocorticoid receptor in A549 cells. *FEBS Lett.* 579, 6279-6287, 2005
  - 14) Okawa T, Naomoto Y, Nobuhisa T, Takaoka M, Motoki T, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Inoue H, Ouchida M, Gunduz M, Nakajima M, Tanaka N: Heparanase is involved in angiogenesis in esophageal cancer through induction of cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res.* 11: 7995-8005, 2005
  - 15) Na HK, Inoue H, Surh YJ: ET-18-O-CH<sub>3</sub>-induced apoptosis is causally linked to COX-2 upregulation in H-ras transformed human breast epithelial cells. *FEBS Lett.* 579: 6279-6287, 2005
  - 16) Sato, E., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H: Quasi-monochromatic cerium flash angiography. *SPIE*, 5580:146-152, 2005
  - 17) Sato, E., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.: Weakly ionized linear plasma x-ray generator with molybdenum-target triode. *SPIE*, 5580:535-542, 2005
  - 18) Sato, E., Sagae, M., Komatsu, M., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.: Monochromatic flash x-ray generator utilizing copper-target diode. *SPIE*, 5580: 579-585, 2005
  - 19) Sagae, M., Sato, E., Obara, H., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.: Intense quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing molybdenum-target diode. *SPIE*, 5580:674-680, 2005
  - 20) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H: Energy selective high-speed radiography utilizing stroboscopic x-ray generator. *SPIE*, 5580:765-771, 2005
  - 21) Sato, E., Sagae, M., Obara, H., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.: Demonstration of flash K-edge angiography utilizing gadolinium-based contrast medium. *SPIE*, 5580:817-823, 2005
  - 22) Obara, H., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.: Superposition of x-ray spectra using a double-target plasma tube. *SPIE*, 5580:824-831, 2005
  - 23) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T.,

- Ichimaru, T., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Compact monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube. *Med. Phys.*, 32:49-54, 2005
- 24) Sagae, M., Sato, E., Tanaka, E., Hayasi, Y., **Mori, H.**, Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Quasi-monochromatic X-ray generator utilizing graphite cathode diode with transmission-type molybdenum target. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 44:446-449, 2005
- 25) Hattan, N., Kawaguchi, H., Ando, K., Kuwabara, E., Fujita, J., Murata, M., Suematsu, M., **Mori, H.**, Fukuda K.: Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc. Res.*, 65:334-344, 2005
- 26) Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Kajita, T., Shigeto, F., Tanaka, E., Shinozaki, Y., **Mori, H.**, Kiyooka, T., Katsura, M., Ohkuma, S., Masami, Goto, Ogasawara, Y., Fumihiko, K.: Beneficial effect of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *JACC*, 45:599-607, 2005
- 27) Fujii, T., Nagaya, N., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Nishigami, K., Ishibashi-Ueda, H., Shirai, M., Itoh, T., Ishino, K., Sano, S., Kangawa, K., **Mori, H.**: Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 288: H1444 - H1450, 2005
- 28) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: High-speed K-edge angiography achieved with tantalum K-series characteristic x rays. *SPIE*, 5745: 810-817, 2005
- 29) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.: High-speed enhanced K-edge angiography utilizing cerium plasma x-ray generator. *Opt.Eng.*, 44:049001(1-6), 2005
- 30) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.: Clean monochromatic x-ray irradiation from weakly ionized linear copper plasma. *Opt.Eng.*, 44:049002(1-6), 2005
- 31) Kawada, T., Yamazaki, T., Akiyama, T., Shishido, T., Mori, H., Sugimachi, M.: Myocardial interstitial choline and glutamate levels during acute myocardial ischemia and local ouabain administration. *Acta.Physiol. Scand.*, 184:187-193, 2005
- 32) Hirata, A., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Fujita, M., Tsukamoto, O.: Erythropoietin just before reperfusion reduces lethal arrhythmias and infarct size via phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc.Drugs.Ther.*, 19:33-34, 2005
- 33) Kitagawa, H., Yamazaki, T., Akiyama, T., Sugimachi, M., Sunagawa, K., Mori, H.: Microdialysis separately monitors myocardial interstitial myoglobin during ischemic and reperfusion. *Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol.*, 289:H924-H930, 2005
- 34) Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Fujii, T., Uematsu, M., Ohgushi, H., Yamagishi, M., Tokudome, T., Mori, H., Miyatake, K., Kitamura, S.: Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 112:1128-1135, 2005
- 35) Kuroko, Y., Fujii, T., Yamazaki, T., Akiyama, T., Ishino, K., Sano, S., Mori H.: Contribution of catechol O-methyltransferase to the removal of accumulated interstitial catecholamines evoked by myocardial ischemia. *Neuroscience Letters*, 388:61-64, 2005
- 36) Ben Ammar, Y., Takeda, S., Sugawara, M., Miyano, M., Mori, H., Wakabayashi, S.: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the human calcineurin homologous protein CHP2 bound to the cytoplasmic region of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1. *Acta Cryst. Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, F61:956-958, 2005

- 37) Sato, E., Yamadera, A., Ichimaru, T., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K.: Conventional Enhanced K-edge angiography Utilizing cerium x-ray generator. 原子核研究, 49:69-74, 2005
- 38) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Preliminary experiment for producing higher harmonic x rays utilizing copper plasma triode. 原子核研究, 49:61-67, 2005
- 39) Ichimaru, T., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.: Quasi-monochromatic fine polycapillary imaging utilizing a computed radiography system. Bull.Health, Sci. Hirosaki, 4:83-91, 2005
- 40) Ichimaru, T., Yamadera, A., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.: Cone-beam K-edge angiography utilizing cerium x-ray tube in conjunction with cerium oxide filter. Bull.Health, Sci. Hirosaki, 4:93-100, 2005
- 41) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ito, F., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.: Variations in cerium x-ray spectra and enhanced K-edge angiography. Jpn.J.Appl.Phys., 44:8204- 8209, 2005
- 42) Sato, E., Hayasi, Y., Kimura, K., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.: Enhanced K-edge angiography utilizing tantalum plasma x-ray generator in conjunction with gadolinium-based contrast media. Jpn.J.Appl.Phys., 44:8716-8721, 2005
- 43) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawakami, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ichimaru, T., Takayama, K., Ido, H.: Enhanced magnification angiography including phase-contrast effect using a 100-um focus x-ray tube. SPIE, 5918:591811;1-9, 2005
- 44) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Ichimaru, T., Takayama, K., Ido, H.: Monochromatic x-ray generator utilizing angle dependence of bremsstrahlung x-ray distribution. SPIE, 5918:591819;1-7, 2005
- 45) Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Kimura, K., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido H.: Energy-selective gadolinium angiography utilizing a stroboscopic x-ray generator. SPIE, 5920:59200V;1-8, 2005
- 46) Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Obara, H., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Preliminary study for producing higher harmonic hard x-rays from weakly ionized copper plasma. SPIE, 5920:59200U;1-7, 2005
- 47) Obara, H., Sato, E., Hayasi, Y., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Takayama, K., Ido, H.: Superposition of x-ray spectra using a brass-target plasma triode. SPIE, 5920:59200W;1-8, 2005
- 48) Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Kimura, K., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Enhanced K-edge plasma angiography achieved with tungsten Karays utilizing gadolinium-based contrast media. SPIE, 5920:592012;1-8, 2005
- 49) Sato, E., Hayashi, Y., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ichimaru, T., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.: Monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode silver tube. Opt.Eng., 44:096501(1-6), 2005
- 50) Sato, E., Yamadera, A., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ito, F., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.: X-ray spectra from cerium target and their application to cone beam K-edge angiography. Opt.Eng., 44:096502(1-6), 2005
- 51) Schwenke, D.O., Pearson, J.T., Tsuchimochi, H., Mori, H., Shirai, M.: Exogenous nitric oxide centrally enhances pulmonary reactivity in the normal and hypertensive rat. Clinical and experimental pharmacology and physiology, 32:952-959, 2005
- 52) Sato, E., Tanaka, T., Mori, H., Kawai, T., Inoue,

T., Ogawa, A., Takahashi, K., Sato, S., Takayama, K.: X-ray spectra from characteristic x-ray generator with a molybdenum tube. Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences, 40:1-7, 2005

- 53) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Takahashi, K., Sato, S., Takayama, K.: Measurement of cerium x-ray spectra using a cerium oxide powder filter and enhanced K-edge angiography. Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences, 40:9-15, 2005
- 54) Takeda, S.: Crystal structure of troponin and the molecular mechanism of muscle regulation. Journal of Electron Microscopy 52(Suppl.1):i-35-41, 2005

#### 【総説】

Nagaya, N., Mori, H., Murakami, S., Kangawa, K., Kitamura, S.: Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. (Invited Review) Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol., 288:R1432-R1437, 2005

#### (研究業績「和文」)

##### 【原著】

佐藤英一、林保臣、小原春雄、田中越郎、盛英三、河合敏昭、井上敬、小川彰、佐藤成大、市丸俊夫、高山和喜、臼杵辰巳、佐藤公悦：シンクロトロンにかわる医用単色X線装置の開発と応用。医学物理, 25:25-38, 2005

##### 【総説】

- 1) 久光隆、若林繁夫：トランスポータ研究のいま— $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体を中心に、化学と生物、44(1): 56-65、2006
- 2) 宮原義典、盛英三、永谷憲歳：特集Ⅱ 第68回日本循環器学会学術集会2. 日本型移植医療をどう作るか—細胞・組織・臓器 心血管疾患における細胞—遺伝子ハイブリッド治療。循環器専門医、13:33-39、2005

- 3) 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
- 4) 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
- 5) 盛英三、望月直樹、武田壮一、井上裕康、中村俊、土屋利江：ナノレベルとイメージングによる分子構造と機能の解析、日本臨床、64巻2号：358-364、2006

#### 学会発表：

##### 【海外】

- 1) Mori, H., Chiku, M., Nishigami, K.: Novel micro-angiography for clinical therapeutic angiogenesis. 2nd World Congress on Regenerative medicine (Leipzig, Germany, 2005.5)
- 2) Sukmawan, R., Yada, T., Neishi, Y., Kume, T., Toyota, E., Shinozaki, Y., Mori, H., Akasaka, T., Ogasawara, Y., Yoshida, K.: Edaravone preserves coronary microvascular endothelial function under ischemia reperfusion injury in vivo beating canine heart by scavenging reactive oxygen species. American Heart Association (Dallas, Texas, 2005.11)
- 3) Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Goto, M., Ogasawara, Y., Kajiya, F., Mori, H., Shinozaki, Y.: Cardioprotective role of hydrogen peroxide as an endogenous EDHF, during ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. American Heart Association (Dallas, Texas, 2005.11)
- 4) Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Goto, M., Ogasawara, Y., Shinozaki, Y., Mori, H.: Role of hydrogen peroxide as an Endogenous EDHF during pacing-induced metabolic dilatation in canine coronary microcirculation in vivo. American Heart Association (Dallas, Texas, 2005.11)
- 5) Akiyama, T., Yamazaki, T., Mori, H.: Large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels regulate the in vivo sympathetic