ganglionic transmission. American Heart Association (Dallas, Texas, 2005.11)

【国内】

1) 松原孝宜、金相佑、盛　英三、井上裕康: Expression and purification of proteins related to arachidonate cascade for development of novel drugs. 第４回ナノテクノロジー総合シンポジウム（東京、２月）
2) 武田壮一：「バイオシグナルの統合と治療応用に関する研究会」招待講演「構造を放射光で見る」第４４回　日本エム・イー学会大会（日本生体医工学会）、（筑波、４月）
3) Takeda, S., Masuda, M., Sone, M., Kamioka, Y., Ohki, T., Mori1, H., Mochizuki, N.：Crystal structure of Endophilin BAR domain: two mechanisms to drive membrane curvature. 第五回日本蛋白質科学会（福岡市、６月）
4) Ammar, Y.B., Takeda, S., Mori, H., Wakabayashi, S.：Crystal structure of CHP2 complexed with cytoplasmic binding region of Na+/H+ exchenger NHE1. 第五回日本蛋白質科学会（福岡市、６月）
5) Igarashi, T., Takeda, S., Araki, S., Oishi, Y., Mori H.：血管内皮細胞のアポトーシスを誘導するヘビ毒メタロプロテアーゼのＸ線結晶構造解析. 第五回日本蛋白質科学会年会（福岡、６月）
6) 武田壮一、増田道隆、曽根麻奈美、上岡雄治、大木高志、盛英三、望月直樹：エンドフィリン BAR ドメインの結晶構造：脂質二重膜を曲げる二つの機構. 日本生物物理学会第 43 回年会（札幌市、１１月）
7) 五十嵐智子、武田壮一、荒木聡彦、大石裕子、盛英三：血管内皮細胞のアポトーシスを誘導するヘビ毒メタロプロテアーゼのＸ線結晶構造析. 日本生物物理学会第 43 回年会（北海道、１１月）
8) Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Kamioka, Y., Ohki, T., Mori, H., Mochizuki, N.: Endophilin BAR domain uses two mechanisms to drive membrane curvature. 日本細胞生物学会（大宮市、６月）
9) 五十嵐智子、武田壮一、盛英三：Cryetal structure of the N-terminal domain of human cardiac troponin C in complex with a calcium-sensitizer; trifluoperazine. The 22nd Annual Meeting of the Japanese Section of the International Society of Heart Research （大阪、１２月）

H.　知的財産権の出願・登録

出願番号：特願 2005-19802

Mono-layered mesenchymal stem cells

5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

（研究業績「欧文」）

【原著】

1) Yuping Li, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya: The effect of hyaluronic acid and insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap-junctional intercellular communications. Biomaterials, 27, 1437–43,2005.
2) Tsutomu Nagira, Susan Bijoo Matthew, Yoko Yamakoshi and Toshie Tsuchiya: Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communications if Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with poly-*N*-isoproplylacrylamide(PIPAAm). Tissue Engineering, 11, 1392-7, 2005
3) Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y.　Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor.　European Journal of Pharmacology, 518, 107-110, 2005
4) Nakazawa, K. and Ohno, Y.　Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel.　European Journal of Pharmacology 508, 23-30, 2005
5) Okada E, Komazawa Y, Kurihara M, Inoue H, Miyata N, Okuda H, Tsuchiya T, Yamakoshi Y: Synthesis of C60 Derivatives for Photoaffinity

Labeling. Tetrahedron Lett, 45: 527–529, 2004.
6) Nakaoka R, and Tsuchiya T: Enhancement of differentation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microphere form. Key Engineering Mater., 309 - 311, 1239-1296,2006
7) Nakaoka R, Ahmed S, Tsuchiya T: Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45. J Biomed Mater Res: 74A: 181-186, 2005
8) Nagahata M, Nakaoka R, Teramoto A, Abe K, Tsuchiya T: The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. Biomaterials, 26, 5138-5144,2005.
9) Nagira T, S B Matthew, Yamakoshi Y, and Tsuchiya T: Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-*N*-isopropylacrylamide (PIPAAm). Tissue Engineering, Submitted.
10) Isama K, Tsuchiya T : Osteoblast differentiation and apatite formation on gamma-irradiated PLLA sheets. Key Engineering Materials, 288-289, 408-412, 2005.
11) Tsuchiya T: A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. ASTM STP 1452: 254-261, 2004.
12) Nagahata M, Tsuchiya T, et al: A novel function of N-adherin and Connexin 43: Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan. Biochem Biophys Res Commun, 315: 603-611, 2004.
13) Matsuoka A, Tsuchiya T: Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poy(L-lactic acid) or polyurethane film. J Biomed Mater Res, 68A: 376-382, 2004.
14) Ahmed S, and Tsuchiya T: Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid. Animal cell technology, 13: 481-485, 2004.
15) Park J U and Tsuchiya T: Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. Animal cell technology, 13: 5065-509, 2004.
16) Tsuchiya T, Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y: Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. Animal cell technology, 13: 475-479, 2004.
17) Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T: Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. Animal cell technology, 13: 293-297, 2004.
18) Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T: A novel function of connexin32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. Biochem Biophys Res Commun, 307: 80-85, 2003.
19) Nakaoka R, Tsuchiya T, Nakamura A: Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. J Biomed Mater Res, 64A: 439-446, 2003.
20) Isama K, Tsuchiya T: Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-El cells. Biomaterials, 24: 3303-3309, 2003.
21) Sumide T, and Tsuchiya T: Effect of multi-purpose solutions (MPS)for hydrogel contact lenses on gap-junctional interxellular

communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. J Biomedical Materials Research Applied Biomaterials, 64B: 57-64, 2003.

22) Tamai M, Nakaoka R and Tsuchiya T: In vitro study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs of various kinds of calcium phosphate ceramics, Archives of Bioceramics Research, Vol.5, 158-161, 2005

23) Tamai M, Nakaoka R, Isama K and Tsuchiya, Novel calcium phosphate ceramics : The remarkable promoting action on the differentation of the normal human osteoblasts, Key Engineering Mater., 309-311: 97 - 100, 2005.

24) Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T: Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, Key Engineering Mater., 309 - 311, 263 - 266, 2005.

25) Yuping Li, Toshie Tsuchiya, Rumi Sawada, Misao Nagashata-Ishiguro, Jun Yang, Tomomi Ito, Tsutomu Nagira: The effect of sulfated hyaluronan on TGF-β2 expression involved in the cardiac tissue development and remodeling, Tissue Engineering, Submitting.

26) Naohito Nakamura, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya: Remarkable Cytotoxicities and the Suppersion of Netin Gene Expression by Biogefradable Oligomers and their Catalysts in Normal Human Astrocytes, Submitting.

27) Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. European Journal of Pharmacology, 518, 107-110, 2005

28) Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. European Journal of Pharmacology 508, 23-30, 2005

29) Nakazawa K, Ohno Y: Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. Eur J Pharmacol, 2005(in press

30)Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. European Journal of Pharmacology, 518, 107-110, 2005

31) Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. European Journal of Pharmacology 508, 23-30, 2005

32) 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.

33) Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno, Y, Ito Y: Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca2+ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. Neurosci Lett, 356: 25-28, 2004

34) Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, and Ito Y: Modulation of voltage-gated Ca2+ current by 4-hydroxynonenal in dentate granule cells. Biol Pharm Bull, 27: 174-179, 2004.

35) Nakazawa K, Ohno Y: Desensitization of P2X2 receptor/channel pore mutants. Eur J Pharmacol, 495: 27-33, 2004.

36) Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Ohno Y, Ito Y: 4-Hydroxynonenal modulates the long-term potentiation induced by L-type Ca2+ channel activation in the rat dentate gyrus in vitro. Neurosci Lett, 370: 155-159, 2004.

37) Nakazawa K, Ohno Y: Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. Eur J Pharmacol, 2005(in press)

（研究業績「和文」）

【原著】

1) 山越葉子: 単分子アノマニピュレーションを目指した超化学分子とナノテクノロジーを用いた解析．機能性人工レセプターMolecular Gripperの設計合成及び画像化．季刊フラーレン, Vol.11 No.2, 169-177, 2003.
2) 長幡　操、寺本　彰、阿部康次、中岡竜介、土屋利江：ラット頭蓋冠由来骨芽細胞のALPase活性を促進する硫酸化ヒアルロン酸の効果　繊維学会誌、61, 98-102, 2005.
3) 柳楽　勤、土屋利江：メカニカルストレスに対する細胞応答分子機構、「生体物理刺激と生体反応」フジテクノシステム pp.667-677.2004.
4) 土屋利江：バイオマテリアルの安全性について一組織工学用材料を中心として、再生歯誌、2,1-8,2004.

【学会発表】

1) 中澤憲一，生島裕恵，大野泰雄 "P2X2受容体の必須な細胞外ジスルフィド結合の下流領域アミノ酸置換による性質の変化" 第110回日本薬理学会関東部会、2004年6月
2) 中澤憲一，大野泰雄 "P2X受容体チャネル孔変異体に観察される脱感作および不活性化様機構の解析" 第78回日本薬理学会年会、2005年3月
3) 行方衣由紀，田中（飯田）直子，栗原正明，佐藤由紀子，山越葉子，田中光，重信弘毅，中澤憲一 "P2X受容体のATP結合部位の構造解析" 第78回日本薬理学会年会、2005年3月
4) 行方衣由紀，田中（飯田）直子，栗原正明，佐藤由紀子，山越葉子，田中光，重信弘毅，中澤憲一 "NMRと計算によるP2X受容体のATP結合部位の構造解析" 日本薬学会第125年会、2005年3月
5) Nishikawa K, Tominaga N, Otomo R, Yamakoshi Y: Polyphosphate Metabolism in Chramydomonas acidophila in Phosphate-limited Conditions under Heavy Metal (Cd) Stress. The 2003 Annual meeting of the American Society of Plant Biologists. (Honolulu, July, 2003.)
6) 山越葉子，甲斐陽子，宮島敦子，土屋利江：フラーレン (C60) の微生物増殖阻害活性について．日本薬学会第123年会．(長崎, March, 2003.)
7) Nishikawa K, Tominaga N, Yamakoshi Y, Otomo R: Change of the Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in Chlamydomonas acidophilia. The 10th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. (Vancouver, June, 2002.)
8) 矢上　健、配島由二、土屋利江ら、：ラテックスアレルゲンとしてのisoflavone reductase、第５３回日本アレルギー学会総会（23-25、Oct, 2003）
9) 柳楽　勤、土屋利江、阿部康次、長幡　操: 陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進効果，第６回日本組織工学会大会（12-13June,2003）
10) 柳楽　勤、土屋利江、阿部康次、長幡　操，陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進及び細胞間連絡機構亢進効果，第25回日本バイオマテリアル学会，(16-17,Dec.2003)
11) 中岡竜介、土屋利江：軟骨組織再生を目指した新規アルギン酸ゲルのin vitro機能評価、第8回日本組織工学会（東京、2005年9月）
12) 中岡竜介、土屋利江：ナノ蛍光イメージングによる細胞－多糖Scaffold間相互用観察の試み、第27回日本バイオマテリアル学会大会（京都、2005年11月）
13) 賀喜白乙、中岡竜介、土屋利江：外科手術材料の安全性に関する研究（１）：細胞毒性試験による評価、第27回日本バイオマテリアル学会大会（京都、2005年11月）

14) 賀喜白乙、中岡竜介、土屋利江：吸水性局所止血材料と吸水性癒着材料防止材料の安全性に関する研究（１）細胞毒性による評価、第43回日本人工臓器学会（東京、2005年12月）
15) Nakaoka R, Tsuchiya T: Enhancement of differentiationand homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form. Bioceramics 18. (Kyoto, December, 2005)
16) 中岡竜介、長幡操、寺本彰、阿部康次、土屋利江：高分子電解質錯体上での骨芽細胞の機能変化とその安全性の予測、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004（つくば、2004年11月）
17) 中岡竜介、Susan Hsiong、土屋利江、David J. Mooney：細胞接着ペプチド修飾アルギン酸ゲル上での細胞機能変化、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004（つくば、2004年11月）
18) 柳楽　勤、土屋利江、阿部康次、長幡　操，陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞およびヒト間葉系幹細胞の分化促進効果、第3回日本再生医療学会総会，(May.2004)
19) 柳楽　勤、土屋利江、阿部康次、長幡　操，陰イオン修飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の分化促進効果、第26回日本バイオマテリアル学会，(Dec.2004)
20) 柳楽　勤、土屋利江、石黒操、陰イオン修飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の増殖および分化促進効果、第4回日本再生医療学会総会（May, 2005）
21) Nagira T, Nagahata M, Tsuchiya T: Enhancement of cell differentiation in Normal Human Epidermal Keratinocytes and Human Mesenchymal Stem Cells by theanionic-modified hyaluronan. 第3回ナノテクノロジー総合シンポジウム (JAPAN NANO 2005), (Feb, 2005)
22) 土屋利江：再生医療デバイス実用化のために、みらいせん展健康系イベントシンポジウム（11,Aug.2004）
23) 土屋利江：医療機器としての人工臓器の開発、みらいせんい展健康系イベントシンポジウム（7, Aug.,2004）.
24) 柳楽勤、土屋利江、石黒操、陰イオン修飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の増殖および分化促進効果、第4回日本再生医療学会
25) M. Tamai, R. Nakaoka and T. Tsuchiya, "*In vitro* study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs various kinds of calcium phosphate ceramics" Asian Bioceramics Symposium, Hokkaido, Japan, Oct. 2005.
26) M. Tamai, R. Nakaoka, K. Isama and T. Tsuchiya, "Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts" Bioceramics 18, Kyoto, Japan, December 2005.
27) M. Tamai, R Nakaoka and T. Tsuchiya, "Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics" Bioceramics 18, Kyoto, Japan, December 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願2001-311484 ギャップ機能亢進剤

特願2001-311485 ギャップ機能抑制剤

特願2003-8855 ギャップ機能抑制剤

特願 2004－193233 ギャップ機能抑制剤、細胞増殖促進剤および硫酸化ポリフコース

特願 2004－167632 生体吸収性を有する新規材料、その製造方法、及びその用途

特願 2004－330417　生体組織補填材および生体組織補填体

特願 2005－025603　ヒト細胞の培養方法、培養容器および生体組織補填体

特願 2005－126591　生体組織補填材の製造方法

特願 2005－294058　生体組織補填材とその製造方法

Docket No.19296 Materials for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing materials for repairing biological tissues.

11・270.081　Materials for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing materials for repairing biological tissues.

２．実用新案登録

なし

３．その他

なし

厚生科学研究費補助金　（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書
ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析
分子機能イメージング（循環系）

分担研究者 国立循環器病センター研究所循環器形態部　望月直樹　部長

研究要旨　　情報伝達系分子と細胞骨格系分子の分子調節メカニズムをイメージング技術により解明することを目的として研究を遂行した。情報伝達系分子ではRasファミリー分子Rap1による細胞間接着制御機構として、cAMP-Epac (Rap1の活性化因子) -Rap1がカドヘリン依存性の接着を増強することを明らかにした。Rap1分子の活性化が細胞間接着部位で生じていることもイメージングにより明らかになった。ミオシン分子の力発生機構の分子メカニズムの解明を継続した、本年度はミオシンIXの力発生を検討し、単頭でありながらプロセッシブに力を発生することがわかった。

A. 研究目的

細胞は分子間の相互作用や燐酸化が精密に情報の交換や運動を制御していると考えられている。特に情報伝達系は分子の活性化メカニズムと引き続いて生じる細胞の応答機能がイメージングによって得られ情報により解析可能である。細胞の挙動や分子の動態を観察することによって得られる情報を統合することにより、生きた細胞での情報伝達の詳細が解明できる。この情報で重要なのは細胞内の①どこで②どのくらいの間③またどの分子が集積し、また活性化を制御しているかを明らかにすることである。このために、分子をイメージングして、機能を検討していくことが、本研究の目的である。とくに、循環器領域では、血圧調節や血管の新生・再生のための分子の機能の解析が期待されているために、この領域に特化した研究を行う計画である。情報伝達系なかでもGTP結合蛋白質Rasファミリー分子は細胞外からの入力を受容体とともに細胞内情報伝達へとスイッチする重要な分子である。また、細胞の運動を制御している細胞骨格系分子であるミオシンは細胞内の器官や蛋白質の輸送にかかわるモーター蛋白質でもある。本研究では、血管新生や心筋肥大などの病態をイメージングで理解するための研究を展開する。Rasファミリー分子の活性化のイメージングによる機能解析とミオシン分子の運動調節機構のイメージングによる解析をもとに細胞の病態生理から臓器の病態整理の解明をおこなっていくことを目的としている。

B. 研究方法

細胞：低分子量GTP結合蛋白質Rap1分子の活性化の可視化は血管内皮細胞を用いておこなった。平成１７年度は細胞の接着にかかわるRap1分子がの機能解明を目的とした。Rap1の活性化をRaichu-Rap1プローブを用い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)はCascaido Biologics社より購入し使用した。HAEC・HUVECともにクラボウ社のHumedia-2を用いた。HEK293細胞を用いて、Raichu-Rap1を発現するアデノウイルスを作製した。HAEC、HUVECともに感染率が100%近いことを確認した。

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本研究の開始とともに作製していた（pRaichu-Rap1）。このプローブはFluorescnece Resonanace Energy Transfer (FRET)の原理をもとに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。特に血管内皮細胞・心筋細胞はプラスミドでは導入効率が低いために、アデノウイルスが有効であった。

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。光学系の検出システムは昨年度すでに報告しているオリンパスIX８１倒立型蛍光顕微鏡と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 Trasnfer (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（ナノメトリー）： 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。

C. 研究結果

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：
アドレノメデュリンやプロスタサイクリン、イソプロテレノールなど、細胞内cAMPを増加させる刺激は一様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することがわかった。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たところ、プロテインキナーゼA(PKA)が透過性の抑制にはかかわらず、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：
PKAの阻害薬でcAMPの増加による透過性の制御が影響されないためEpac-Rap1系の関与が予想された。実際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の活性化をイメージングで調べた。刺激前には血管内皮細胞間に間隙が認められたが、フォルスコリン刺激によりこの間隙が埋まり、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ることがわかった。

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おり、VE-cadherinの接着の安定もアクチンの重合に依存していると考えられる。そのために、cAMP増加による細胞内のアクチンを共焦点顕微鏡で調べた。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。

考察

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、プロセッ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。

D. 結論

① cAMP-Epac-Rap1により血管内皮細胞の透過性は調節されている。
②ミオシンIXは単頭でありながら、プロセッシブにかつ26 nm という大きなステップを踏むことができた。

F. 健健康危険情報
なし

G. 研究発表
(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 neoformation 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, Yamagisi 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.** 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 siganaling pathway. **Mol. Cell Biol.** 25: 136-146, 2005

2. 学会発表
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

別紙3

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

脳神経領域におけるナノレベルイメージングによる分子の機能解析に関する研究
分子機能イメージング（神経系）

分担研究者　中村　俊　国立精神·神経センター　神経研究所診断研究部長

研究要旨　神経機能分子の細胞微細構造における動態制御機構の解明は神経変性疾患の発症機構を理解し、その予防・治療法を開発するうえで重要な研究課題である。我々は、ナノイメージングの方法を用いて、シナプス、プロテオソーム、およびラフト構造におけるタンパク質の動態およびタンパク質分子の構造を解析した。その結果、1）シナプスでは脳由来神経栄養因子 BDNF がグルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体および TRP カルシウムチャンネルのシナプス膜表面への輸送を細胞内カルシウムシグナルの制御を介して引き起こすこと、2）プロテオソーム経路の制御に重要な役割を果たしているユビキチン水解酵素 UCH-L1 の I94M 変異はパーキンソン病の原因因子であること、さらに中性子線解析の結果、この変異が高次構造の変化をもたらすこと、3）また、ラフトなどのように、細胞膜には膜直下の細胞骨格によって区切られた、分子の移動を制限する 200nm 程度の微小なコンパートメントが存在することが明らかとなった。さらに、免疫ゴールド染色電子顕微鏡法により神経ラフトにプリオンが存在することを明らかにした。これらの成果は、神経変性疾患などの病因解明、および創薬標的を見出す上で具体的な成果につながりうるものである。

A. 研究目的
神経変性疾患は神経機能分子の合成、輸送、および分解過程の病変により、タンパク質の異常な蓄積が生ずるために引き起こされると考えられているが、その素過程は不明である。我々は、神経機能分子のイメージングによりこれらの素過程を解析し、タンパク質の異常な構造・動態変化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。

B. 研究方法
タンパク質の細胞内での構造・動態を明らかにするために、蛍光性のタグをもった神経機能分子を作製し、種々のイメージング技術を用いて動態を計測した。また、分子機能を明らかにするために、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。

(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。また遺伝子組み換え体の取り扱いについてはカタルヘナ条約の規定による施設の規約に従った。

C. 研究結果
1) 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は機能的にサイレントであることを明らかにしてきた。サイレントであるとは、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意味する。今年度、分子イメージングの方法により機能的な応答性と、シナプス後膜における受容体の存在量との関係を明らかにした。具体的には、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。BDNF によってカルシウム濃度の上昇がおこることが確認された部位で、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、細胞を固定後、まず受容体の細胞外ドメインに対する抗体で染色し、ついで膜を表面活性剤により透過性にしたうえで、細胞内の受容体を同じ抗体で染色した。同時にシナプス後膜のマーカーである PSD95 の抗体染色も行い、PSD95 と共存する AMPA 受容体の蛍光量を計量した。この値を、単一スパインの AMPA 受容体の蛍光総量で除し、表面発現率とした。BDNF 投与によりこの表面発現率は４０％程度増加した。次に、この上昇を制御

するカルシウムシグナルの役割を明らかにするために、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。さらに細胞膜上、とくにスパインには細胞内カルシウムストアからの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うえ、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。

2) 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る。ヒト 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から Uch-L1 遺伝子はパーキンソン病感受性遺伝子として知られている。このようなパーキンソン病の発症リスクコントロールに関与する遺伝子は UCH-L1 遺伝子以外にもヒト１番染色体と２番染色体上にそれぞれ１つずつ存在していることが予測されているが、分子的実体が解明されているのは現在のところヒト４番染色体にコードされた UCH-L1 のみである。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・多型に相関した 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 S18YUch-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。

3) フリーズレプリカ電子線トモグラフィーによる３次元高分解能解析により、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しめされた。

4) 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神経難病（パーキンソン病）に対する治療薬候補を探す研究を行っている。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。

D. 考察

1) 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。

2) 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相関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。

3) 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。

E. 結論

1) 脳由来神経栄養因子 BDNF はグルタミン酸受容体のひとつである 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 の作用は AMPA 受容体に選択性があり、NMDA 受容体の動態は変化しないこと、また、細胞体から切り離された局所に存在する AMAP 受容体の輸送を引き起こすことができることが示された。

2) 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。

3) 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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 Proteosome 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, KawanoY, 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】

① 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 50th Symposium of The Japanese Society of Microscopy, Fukuoka Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金　（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

新たなイメージング技術の開発

分担研究者 北海道大学電子科学研究所　永井健治　教授

研究要旨　　個体レベルでの情報伝達メカニズムを解明するための技術として生物発光を利用した機能イメージング法と光照射依存的分子破壊法を開発する研究を開始した。前者は化学発光タンパク質と蛍光タンパク質間のエネルギー移動（CRET）による、高性能機能指示薬開発のための基盤研究、後者は蛍光タンパク質から高効率に活性酸素を産生する光増感物質へのエネルギー移動を利用したCALI（chromophore-assisted light inactivation）法の開発を行なった。

A. 研究目的

病態の理解と診断のためには個体レベルでの生体機能観察が必要となる。その為には蛍光法よりもS/N比の点で優れた発光法の利用が望ましい。本計画では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)を利用し、各種生体機能プローブの開発とそのトランスジェニック動物の作成を行う。本研究を通じて早期診断法の開発が期待される。また個体レベルでの生体機能を光照射依存的に操作(破壊)する遺伝子工学技術の開発を行う。本技術はsiRNAなどのような遺伝子の操作を通じた方法よりも、時間分解能、空間分解能の点で優れており、癌組織の特異的破壊や疾病組織内変異タンパク質の破壊など、より標的を絞った副作用の少ない治療法の開発に貢献することが期待される。

B. 研究方法

遺伝子構築：pcDNA3（Invitrogen）のマルチクローニングサイトのHindIII-BamHIにVenus蛋白質（Stopコドン無し）を挿入した。BamHI-EcoRIにVenusとフレームを合わせてRlucを挿入した。VenusとRlucの間にフレキシブルなリンカーとしてGGSGGのアミノ酸配列を入れた。このコンストラクトをVenus-Rlucとした。Venus蛋白質の50, 157, 173, 195, 229番目のアミノ酸を新たなN末端とする円順列変異Venus（それぞれ、cp50V, cp157V, cp173V, cp195V, cp229V）をVenus-RlucのVenus蛋白質部分と置き換えたコンストラクトを作成した。これらをそれぞれcp50V, cp157V, cp173V, cp195V, cp229V-Rlucとした。
¥

スペクトル測定：トリプシン処理でHeLa細胞を剥がし1.5 mlチューブに回収した。遠心して上清を除き、0.5 mlのLysis Buffer（150 mM NaCl, 50 mM HEPES-KOH, 0.1% Triton-X, pH7.5）に懸濁・溶解し室温で30分置いた。遠心し上清を蛍光スペクトル測定に用いた。蛍光分光光度計 F-2500（Hitachi）を用い、励起波長450 nm、蛍光波長500-700 nmでVenusの蛍光スペクトルを測定した。終濃度25 μMのcoelenterazihe-h（Promega）を加え、励起光無しで400-700 nmの発光（BRET）スペクトルを測定した。

細胞への遺伝子導入：HeLa細胞を70～80%コンフルエントになるように60 mmディッシュ（蛋白質回収用）または35 mmガラスボトムディッシュ（顕微鏡観察用）数枚に撒いた。Venus-Rluc, cp50V-Rluc, cp157V-Rluc, cp173V-Rluc, cp195V-Rluc, cp229V-Rlucを別々のディッシュに撒いた細胞に対しLipofectamine2000（Invitrogen）によりトランスフェクションした。18～24時間後、蛍光顕微鏡でVenusの蛍光を観察し蛋白質発現をチェックし蛋白質抽出または顕微鏡観察に用いた。

顕微鏡観察：顕微鏡観察はNikon TE-2000E 電動顕微鏡、油侵100倍対物レンズNA1.45、冷却CCDカメラカスケードII（Roper）という構成で行った。35 mmガラスボトムディッシュの蓋をはずして顕微鏡ステージ上に置き、YFP用フィルタキューブ（励起波長490-510 nm、ダイクロイックミラー515 nm、蛍光波長520-550 nm）を使いVenusが明るく光っている細胞を眼で探した。終濃度5 μMのcoelenterazine-h（Promega）を加え、励起光無しで画像取得を行った。露光時間は0.03 sec（ビデオレート）から60 secを試した。

タンパク質精製：ratiometric-pericamコードする遺伝子とそのcpYFP部分のみをコードする遺伝子をそれぞれpET28a（Novagen）の*Nde*I、*BamH*Iサイトの間に挿入したプラスミドで大腸菌JM109(DE3)を形質転換して蛋白質を発現させた。培養は23℃で4日間行った。His-tag融合蛋白質をまずNi-NTA Agarose（invitrogen）columnで精製し、

Thrombin protease (Amersham)でHis-Tag部分を切断した。さらに、Benzamidine Sepharose (Amersham) columnによるThrombinの除去とNi-NTA Agarose columnによる切れ残った蛋白質の除去を行った。最終的に20mM Tris-HCl (pH7.3)に対して透析を行い、ratiometric-pericam全長に関しては8mg/ml、cpYFP部分のみに関しては4mg/mlにまで濃縮して結晶化のための精製蛋白質として用いた。また、ratiometric-pericamのCa^{2+}非存在下の条件では EDTAをCa^{2+}存在下の条件では $CaCl_2$をそれぞれ最終濃度が5mM、10mMとなるように添加した。

結晶作成：ratiometric-pericamのCa^{2+}非存在下と存在下、cpYFP部分のみのそれぞれに関して20℃でCrystal Screen Ⅰ、Ⅱ (Hampton Research) とWizard I, II (Emerald BioSystems)を用いてsitting-drop蒸気拡散法によりsparse-matrix screening (Jancarik & Kim, 1991) を行った。各sitting-dropでは0.3 μlの蛋白質溶液のdropに等量のreservoir溶液を混合した。ratiometric-pericam のCa^{2+}存在下で20% PEG8000, 0.1M HEPES pH7.5のreservoir溶液条件で結晶が得られた。cpYFP部分のみでは、30% PEG4000, 0.1M Sodium Acetate pH4.6, 0.2M Ammonium Acetateで結晶が得られた。

X線回折測定：高エネルギー加速器研究機構Photon Factoryの放射光のビームラインBL-5AのQuantum315 CCD detectorを用いてデータコレクションした。結晶はcryo測定中に凍結しないようにするために10-20%になるようにglycerolを加えたreservoir溶液に数秒浸して100Kの窒素ガスで急速に冷やし、測定中はガスで冷却し続けた。回折データはHKL2000プログラム (Otwinowski, Z., and Minor, W. 1997) により解析した。ratiometric-pericamのCa^{2+}存在下の結晶のデータの分解は3.2A 、空間群は C2、Unit cell dimensionは: a=91.679, b=68.814, c=54.067 A、cpYFPのみの結晶に関してはそれぞれ2.4A、$P2_12_12_1$、a=50.922, b=59.650, c=65.040 Aであった。

構造決定とリファインメント

cpYFPの回折データについてcrystallography and NMR system program (CNS) (Brunger, A. T. et al. 1998) を用いて既存のYFPの立体構造座標 (PDB-ID: 1YFP, Wachter, R.M. et al. 1998) を基に分子置換により位相を決定した。分子モデリングプログラムWinCoot (Emsley P, Cowtan K., 2004)を用いてマニュアルでさらにモデル構築を行い、CNSによりリファインメントを行った。

C. 研究結果

生物発光およびBRETによる生理機能のリアルタイム可視化：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。

立体構造情報を利用した蛍光イメージング用バイオセンサー設計法の開発：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、カルシウム存在かでは八面対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。

光照射による生体機能操作法の開発：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。

D. 考察

生物発光およびBRETによる生理機能のリアルタイム可視化：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。

立体構造情報を利用した蛍光イメージング用バ

イオセンサー設計法の開発：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。

光照射による生体機能操作法の開発：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。

E. 結論

生物発光およびBRETによる生理機能のリアルタイム可視化：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。

立体構造情報を利用した蛍光イメージング用バイオセンサー設計法の開発：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、3Åの分解能で結晶構造を解くことが出来た。

光照射による生体機能操作法の開発：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。

F. 健健康危険情報
なし

G. 研究発表
(研究業績「英文」)

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

(2) 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」)

(1) 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 ドゥ、173-182 (2005)

2. 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 7th 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

特願　２００６－０４３２１１　超迅速にDNA塩基配列を決定する方法

厚生科学研究費補助金　(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析
分子構造イメージングx線回折

分担研究者　盛　英三　　国立循環器病センター研究所心臓生理部長

研究要旨　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、治療法の開発を推進することを目的とする。本分担研究では、分子の構造決定に基づく創薬を目指した研究を行っている。本年度の標的タンパクは、蛇毒血管内皮細胞アポトーシス誘導因子、イオン交換輸送体調節因子複合体、プロスタグランジン関連タンパク、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群である。これを、基盤情報として次世代創薬に貢献する。

A. 研究目的

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^+/H^+交換輸送体(NHE)に結合するCa^{2+}結合タンパク質の一つ、カルシニュリン様タンパク質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分子等のタンパク構造

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。

B. 研究方法

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トランスフェラーせ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

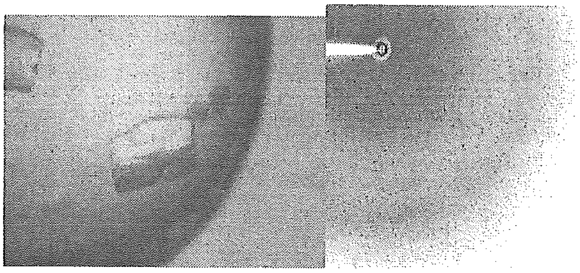
情報伝達分子等のタンパクBARドメイン構造を持つタンパクの結晶を作成し、x線回折法により構造を決定する。

C. 研究結果

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(VAP1)

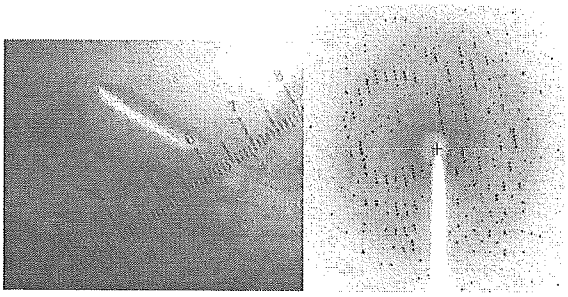
蛇毒由来のアポトーシス誘導因子の結晶解析行い、2.5Å分解能のでの構造決定に成功した。この蛇毒成分は哺乳類において重要な働きをしている膜蛋白質ファミリーに非常に相同性が高いと考えられる。現在論文投稿中である。



VAP1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。



イオン交換輸送体調節因子複合体

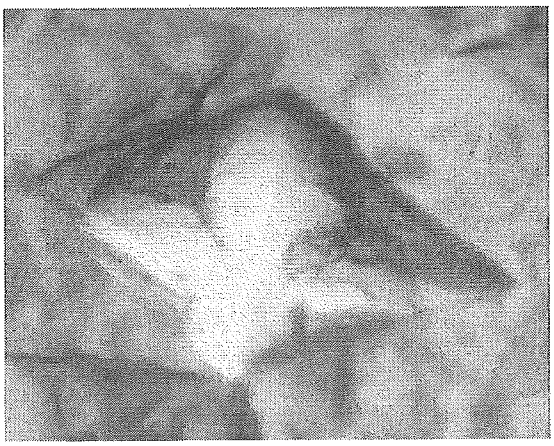
iii. プロスタグランジン関連タンパク

昨年報告した大腸菌発現系以外にpColdIIを用いることで, PPARα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。



エンドフィリンの結晶

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし。

研究協力者：若林繁夫、井上裕康、武田壮一、増田道隆

G. 研究発表

（研究業績「欧文」）

【原　著】

1) Katanosaka Y, Wakabayashi S, et al.: Calcineurin Inhibits Na^+/Ca^{2+} 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^+/H^+ 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^+/H^+ exchanger 1: Tightly bound Ca^{2+} 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-κB 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, Gilchrest BA, Goukassian DA: T-oligo treatment decreases constitutive and UVB-induced COX-2 levels through P53-and NFκB-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, Otaka 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-κB 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-CH3-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 tride. 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.,