

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 盛 英三

平成19年 (2007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-----	31
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-----	34
3. 新たなイメージング技術の開発	
永井 健治-----	40
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-----	48
5. ナノ構造に基づく医用材料の開発	
土屋 利江-----	59
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	70
IV. 研究成果の刊行物別刷-----	80

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：H14-17 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

血管新生、血管再生における細胞膜の接着調節を可視化するべくこれまで、低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化の可視化、あるいは分子の集積の可視化を行ってきた。今年度は、血管形成の新たなメカニズムとして提唱されている、血管内皮細胞内の管腔形成、すなわち細胞内の構造変化に基づく血管構築のメカニズムについて、その調節を行うと予想される分子 BAR ドメインを持つ分子について検討する。

(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することにより、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し、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、さらに光増感タンパク質を利用した、新規機能イメージング法と光照射依存的分子操作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

蛇毒由来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、細胞内情報伝達分子等のタンパクの大量発現、精製、結晶化を行い、放射光 X 線回折法で結晶構造解析を行う。これらは次世代創薬に貢献する基盤情報となる。対象となるタンパク分子ごとにその研究背景と意義を以下に要約する。

① 蛇毒血管内皮細胞アポトーシス誘導因子

近年ハブ等の出血蛇毒には血管内皮細胞特異的にアポトーシスを引き起こす成分が含まれていることが報告されている。この蛇毒成分の構造と機能発現機構を分子・原子レベルで解明する事は、将来の再生医療・がん治療等を目的とした創薬に繋がる可能性があり、その分子構造の全貌解明を目指す。また、これらの出血因子は哺乳動物において各種増殖因子やサイトカインの切断遊離に関与する ADAM ファミリー蛋白質と高い相同性を示すことから、将来的にはこれら ADAM ファミリー蛋白質を標的とした創薬への基盤作りに繋げる事を目的とする。

② イオン交換輸送体調節因子複合体

細胞膜を介する Ca^{2+} 、 H^+ 、 Na^+ などのイオン輸送を担うトランスポーターやチャンネルは循環器系組織に極めて重要で、その異常は重篤な疾患を招く。とりわけ Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE)は虚血性心疾患や慢性心臓疾患に関与するとされる重要なタンパク質である。私達は最近、NHE に結合する Ca^{2+} 結合タンパク質の一つ、カルシニユリン様タンパク質 CHP が NHE の活性制御に重要であることを発見した。また、CHP2アイソフォームは癌細胞特異的に発現し、癌の速い増殖に関与することを示唆した。本研究は、CHP/NHE 複合体の結晶構造ならびに分子の機能を解析し、新しい創薬開発の基盤とすることを目的とする。

③ プロスタグランジン関連タンパク

シクロオキシゲナーゼ(COX)はプロスタグランジン産生の律速酵素で、アスピリンをはじめとする非ステロイド性抗炎症薬の標的分子として広く認められている。COX には現在、COX-1 と COX-2 の 2 種

類のアイソザイムが存在するが、COX-2 に選択的な阻害剤が開発され、COX-1 活性阻害に由来する副作用の少ない新しい抗炎症薬として欧米で広く処方されている。我々は COX-2 にも生理学的役割があることを明らかにしたが、実際 COX-2 選択的阻害剤によっても副作用があることがわかってきた。そこで、新しい創薬の標的として PG 産生に関わる膜結合型グルタチオン S トランスフェラーゼファミリーの蛋白質群を考え、それらの結晶構造を解明し、新しい創薬開発の基盤を作ることを目的とする。

④ 細胞内情報伝達分子

Rho ファミリー低分子 GTP 結合タンパク質はアクチン細胞骨格の制御に中心的な役割を果たしている分子であり、筋収縮を含む細胞運動や細胞接着の制御に深く関わっている。本研究では Rho ファミリー低分子 GTP 結合タンパク質のエフェクター分子である新規アクチン束化タンパク質のアクチン束化や Rac、Cdc42 による制御の分子機構等を明らかにするため、数々の関連タンパク結晶構造の解明を目指す。

(5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

① 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-機能関連の研究の発展を目指した。

② 細胞が材料上に接着する際には、その表面に吸着したタンパク質の構造に影響を受けるため、その構造に応じて生体反応が引き起こされる。材料特性とタンパク質構造変化との関連を見出すこと、さらにはその情報に基づいた医用材料改良手法を生み出すことを目的とする。ここまで、代表的な細胞接着タンパクの機能性配列を修飾しナノレベルでの改質を行った多糖材料を調製し、細胞に与える影響を検討してきた。今年度は、その材料を用いて細胞を 3 次元培養した場合の細胞機能への影響についてを

中心に検討した。これらの検討に加え、昨年度に引き続き、ナノレベルでの細胞と材料の相互作用検討を試みた。

③ 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、間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞の石灰化過程をナノレベルでイメージングし石灰化機構を明らかにし、この石灰化機構に基づいて骨再生用のスキャホールドの開発を試みた。

B. 研究方法

(1) 分子機能イメージング循環系

① 細胞

血管内皮細胞ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に EGFP タグを付加した Endophilin を導入して、蛍光観察をタイムラプスイメージングすることで、Endophilin がどのように細胞膜を変形するかを調べる。HUVEC は Cascaido Biologics 社より購入し使用した。HAEC・HUVEC とともにクラボウ社の Humedia-2 を用いた。

② Endophilin の精製

Endophilin 分子ファミリーとして Endophilin A1 のアミノ末端の 1-247 アミノ酸、Endophilin B1 はアミノ末端 1-246 を GST 融合蛋白質として BL21 細胞から精製した。pGEX6P-3 にそれぞれをコードする cDNA をインサートして、大腸菌にトランスフェクトして、GST-endophilin として発現させ、その後 prescission プロテアーゼで GST との接合部位を切断して Endophilin のみを精製した。CRECLE 法を用いた。

③ Endophilin の結晶化

セレノメチオニンで置換した Endophilin 蛋白質を novagen の自動システムで結晶化した。X 線結晶解析が可能な大きさの結晶をえるために、high salt buffer を用いた。

④ 結晶の X 線解析

Endophilin の結晶は MAD (multiple anomalous methods)を用いた。Spring-8 の beamlineBL44B2 でえられた X 線の回折をもとに、HKL2000 で解析した。最終的には 2.4Å の解像度を得ることができた。また、画像化は TURBO-FURODO, MOLSCRIPT, RASTER3D, GRASP, Pymol を用いた。

(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、イメージング技術を用いて動態を計測した。蛍光分子イメージングは、生きた細胞におけるリアルタイムでの分子動態の解析には適しているが、空間解像度は 250 ナノメートル程度が下限となっている。従って、より微細な細胞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、タンパク質分子が実際に機能している場に関する知見を得るための研究も進めた。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い、創薬の候補分子を探索した。

(3) 新たなイメージング技術の開発

① 励起光源を必要としない生体機能イメージング法である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 (Bioluminescence resonance energy transfer, BRET)を利用して細胞内シグナル伝達において重要な役割を持つカルシウムイオンの指示薬を開発した。

② 細胞内の多機能を安価に共焦点観察する技術を開発するために、高価なレーザー光源ではなく安価な水銀アークランプを光源とする共焦点顕微鏡を開発する

③ 黄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、黄色蛍光タンパク質

円順列変異体の結晶化を行い、X線結晶解析を行った。

④ 細胞内でのタンパク質の拡散やオルガネラの動き、或いは細胞自身の組織の中での動きを観察するために、UV照射によって蛍光色に変換できる新規蛍光タンパク質を開発し細胞生物学的応用を行った

⑤ 遺伝子にコードされたRNA指示薬を開発し、生体内で定量的遺伝子発現解析を行う技術基盤を確立した。

⑥ タンパク質性の光増感分子 KillerRed の波長変異体を開発し、緑色励起だけでなく青色励起による生体分子操作の道を開いた。

(4) 分子構造イメージングX線回折

① 蛇毒由来血管内皮細胞アポトーシス誘導因子

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した。

② 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した。

③ 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した。

④ 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した。

(5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

① 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 Clonotech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。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。

② 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)を含むペプチドをカルボジイミドによる化学反応でアルギン酸に修飾した。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。この際、予め調製しておいたヒト軟骨細胞及び骨芽細胞(BioWhittaker社)の懸濁液を架橋前にアルギン酸溶液と混合することで、アルギン酸ゲル内部にそれらの細胞を包含させた。これらのゲルを2-4週間培養し、MTT試薬によりゲル中に生存している細胞数を見積もった。昨年度と同様に、骨芽細胞への分化はアルカリフォスフォターゼ(ALP)活性及び細胞からのオステオカルシン産生量測定を行い評価した。さらに、得られたゲルをAlizarin Red染色を行い、細胞によるカルシウム沈着を定性的に評価した。軟骨細胞の分化は、EDTA処理によるゲルを溶解後回収した細胞の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は、昨年度同様、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。さらには、細胞接着に関わるタンパク質の発現量変化の検討も試みた。

③ 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、遺伝子発現を網羅的に解析した。

④ ヒト正常間葉系幹細胞(hMSC, Cambrex 社)を 35mm φのスライドガラス付の培養皿に細胞を播種し、骨芽細胞分化誘導培地(10%FCS 含有)で培養した。石灰化によって産生されたリン酸カルシウムはアリザリンレッド染色によって可視化した。アルカリホスファターゼは、PIERCE 社の 1StepNBT/BCIP を用いて染色した。カルシウムイオンはインビトロジェンの Flro-4 を用いて染色した。核は Hoechst33258 を用いて可視化した。カルシウムイオンと核の観察は、蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。蛍光像を得るときは染色液をフェノールレッドフリーの培地に交換して観察した。

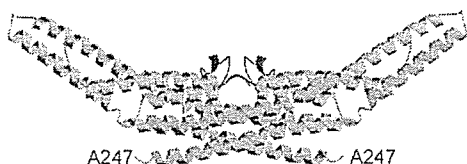
骨再生用スキャホールドは共沈法により合成した。溶液の組成を制御することにより各種の無機イオンの取り込み効果について検討した。得られたセラミックス粒子を成形焼結することによりタブレットを作製し、その上に骨芽細胞を培養することで新規セラミックス材料の骨形成能(増殖能, 分化能)を評価した。

C. 研究結果

(1) 分子機能イメージング循環系

① Endophilin の構造の特徴

これまでに結晶から構造が決定されている BARd ドメイン構造をとる分子である amphiphysin, arfaptin と同様に二量体を形成し、バナナ型をとることがわかった(下図参照)。



バナナ型という共通点を有しているものの Endophilin に特徴的な膜との会合に重要なメカニズムを突き止めた。BAR ドメイン自身は helix 構造が

3 回繰り返す構造であるが、アミノ末端にさらに Helix 構造を認めた。この構造は両親媒性になっていて、脂質二重層への BAR ドメイン分子の接着・会合に重要であることが予想された。N 末端を欠いた BAR ドメイン(delta1-25AA) はリポゾームにも結合不可となり、リポゾームからの管腔形成も起こすことはできなかった。

さらに図中で示す中間部の青、赤に見られるように appendage 様の構造がみられ、この部位は特に Hydrophobicity が高く、この部位の Ala を Ser に変換した変異体は、リポゾームへの結合は保たれているものの、管腔の直径がおおきくなるすなわち膜の曲率の変形能が低下することから、この部位が脂質 2 重層への進入に重要であることがわかった。

また第 2 Helix に 4 アミノ酸を挿入して BAR の構造を伸ばした形にすると BAR が安定せずに Appendage の変異体と同様にリポゾームからの管腔の直径が長くなった。すなわち曲率が変化したことから、BAR ドメインの硬度が脂質二重層の曲率変化に重要であることが明らかになった。

② Endophilin は細胞膜の陥入を生きた細胞でもおこす

Endophilin はアミノ末端に BAR ドメインを持ち、C 末端に Src Homology 3 ドメインを有する分子である。Amphiphysin も同様な構造をとっており、ある種の細胞では T 管系を構成することが示唆されていた。われわれも、Endophilin を血管内皮細胞に GFP-endophilin 発現プラスミドをトランスフェクションして Endophilin による構造を観察した。細胞内に多数の陥入構造がみられた。これが細胞膜であることは、細胞膜を外側からラベルすると細胞膜が巻き込まれることから細胞膜が陥入しているものであることもわかった。結晶による構造解析からわかった様々な変異体(appendage を削除した deltaApp; N 末端を欠失した deltaN; 第二 Helix を伸ばした a4 変異体)に GFP タグを付加して野生型と同様に血管内皮細胞に発現させても、野生型で見られた細胞膜の

陥入構造が見られなくなった。したがって、生体でも BAR ドメイン構造が膜変形能を有し、構造で得られた重要な点が生体でも反映されていることが確認できた。

(2) 分子機能イメージング神経系

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 (PNAS, 2003)。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、培養大脳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 受容体が機能していることを確認した。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、受容体の細胞外ドメインに対する抗体で染色し、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。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。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。(担当中村 俊)

② 脳由来神経栄養因子 BDNF はエピソード記憶の形成、記憶の想起に重要であり、我々は、その分泌異常がアルツハイマー病と相関していることを明らかにしてきた。BDNF の受容体として、チロシンキナーゼをもつタイプの他に、このドメインの代わりに、11 アミノ酸からなる配列をもったタイプ (T1) が知られている。この配列は、マウスからヒトまで種を超えて保存されていることから、我々はこの配列に選択的に結合する分子をスクリーニングしたところ、細胞骨格の制御に重要な Rho-GTPase の調節因子である Rho-GDI が同定された。Rho-GDI は T1 に結合しているが、BDNF が T1 に結合すると細胞質に遊離され、Rho-GTPase を抑制する。T1 はアストログリア細胞に唯一発現している BDNF の受容体であることから、BDNF をグリア細胞に添加すると、Rho-GTPase のうち、Cdc42 あるいは Rac1 を介し、速やかな形態変化を引き起こすことが明らかとなった。さらに、この形態変化は、急性脳切片を用いても示され、このとき、グリア細胞の突起とシナプスとの接触が増加していた。以上のように、BDNF は神経細胞の形態を制御するのみならず、シナプスの機能的成熟にも重要な役割を果たしていること、さらにグリア細胞の形態を変え、神経伝達の調節に関与している可能性を示した。この研究の一部は、アメリカ神経科学会誌に掲載され、Science のシグナル伝達機構解明のトピックスとしても取り上げられた (担当 中村 俊)。

③ 運動神経の軸索変性を引き起こす GAD マウスの遺伝学的解析からその責任遺伝子としてユビキチン水酸化酵素 L1 型 (UCH-L1) を同定した。この遺伝子の点変異 (I93M) はヒトではパーキンソン病の責

任遺伝子として報告されている。我々は、この変異をもつトランスジェニックマウスを作成し、マウスにおいてもパーキンソン病態を示すことを明らかにした。このタンパク質の高次構造を中性子線解析により分析したところ、水溶液中で2量体を形成していること、その構造が正常型、変異型で異なっており、構造変化の程度と発症リスクが相関していることを明らかにした。この構造変化を修飾する薬物を見出すために *in silico* のバーチャルスクリーニングを行い、5万種類の化合物ライブラリーの中から Uch-L1 タンパク質に実際に結合するパーキンソン病治療薬のリード候補を2種類同定することが出来た。(担当 和田 圭司)

④ 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。この研究成果は、米国専門誌 *Journal of Cell Biology* に巻頭画像とともに掲載され、国内でも朝日新聞を始めとする4紙で報道された。細胞膜構造モデルとして実に30年ぶりの変革と期待される。この構造単位は、細胞内情報伝達の足場となるラフトとも密接な関係がある。最近、免疫構造解析の点から明らかにした、プリオンタンパク質とクロツフェルトヤコブ病の診断マーカーである 14-3-3 タンパク質とのミトコンドリア上での複合体形成は、プリオン悪性化メカニズムを解明するうえでも極めて重要であり、創薬研究に繋がると期待できる。(担当 諸根信弘)

(3) 新たなイメージング技術の開発

① 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 CaM-M13 のリンカーでつなぎ、BRET を利用したカルシウム指示薬の開発を行った。これらの蛋白質を大腸菌で合成しカルシウム有り無しで BRET の変化が大きいものをセクションした。これを HeLa 細胞に発現させ、露光時間 5 s で観察し BRET による細胞内カルシウムイメージングに成功した。

② 水銀アークランプを光源とするリアルタイム共焦点顕微鏡の開発

我々は水銀アークランプをマルチモードファイバでスクランブルし CSU10 に導入する事で、これをレーザーの代わりに光源として利用する事に成功した。蛍光ビーズの点像分布関数(PSF)をレーザーの場合と水銀アークランプの場合で XY,XZ 方向に関して観察した所、その半値幅は同程度であった。この光源を用いて HeLa 細胞の蛍光イメージングを行った。

③ 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 ratiometric-pericam の cpYFP 領域のみの結晶に関する X 解回折データを解析した。分子置換により位相決定したモデルについて、さらにモデル構築ソフト Wincoot(Emsley P, Cowtan K., 2004) X 線構造精密化ソフト crystallography and NMR system program (CNS) (Brünger, A. T. et al. 1998)を用いてリファインメントを行い分解能 2.4 Å の最終構造を得た。

④ 新規色変換タンパク質の開発とその応用

色変換蛋白質 Phamret を HeLa 細胞内で発現させ Acceptor photo bleaching 法により、光刺激による色変換が FRET によるものであることを確認した。Phamret をターゲティングシグナル配列と融合させて HeLa 細胞内の核、核小体、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、ゴルジ体、アクチン繊維に局在化させることに成功した。さらに、局在化した場所において光刺激による色変換を起こすことができた。部位特異的に色変換させた局在化 Phamret のタイム

ラプス測定によりミトコンドリアの融合とそれに伴うマトリックス間の物質の移動、細胞分裂の際のクロマチンの分配を観察することができた。

⑤ 遺伝子にコードされた RNA 指示薬の開発

In vitro にて nut RNA に対する FRET の変化率を測定したところ、ECFP と Venus 全長配列を持つものが140%以上の高い変化率を示した。本指示薬を用いて nut RNA に対する特異性を検討したところ、一塩基置換の変異体 nut RNA にはまったく変化せず、高い特異性を有することが明らかとなった。

⑥ 光増感タンパク質 KillerRed の機能改変

従来の KillerRed とはまったく異なる黄色を呈したコロニーを一つ得た。本コロニーを培養し、本変異体タンパク質を精製したところ、447nm に吸収波長ピークを持ち、蛍光波長ピークは531nmを示す新しい変異体であることが分かった。また、Native-PAGEによる解析では、現在までのところ完全にモノマー化を示した変異体は得られていない。最近、KillerRedの立体構造予測により、二量体形成に関与しているアミノ酸部位が推定することに成功している。現在本領域に変異を挿入した KillerRed の構築を行っている。

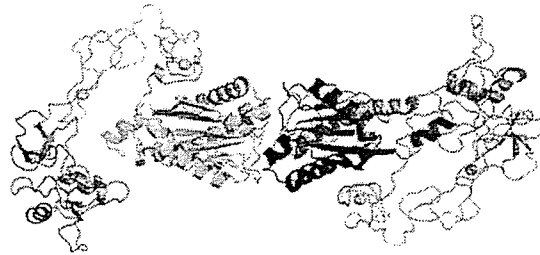
(4) 分子構造イメージング X線回折

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。

① 蛇毒血管内皮細胞アポトーシス誘導因子

ガラガラヘビ毒より抽出したアポトーシス誘導因子 VAP1 の結晶構造を 2.5Å の分解能で明らかにする事に成功し、論文発表を行った(Takeda et al. EMBO J)。VAP1 は哺乳類において重要な働きをしている ADAM 型膜蛋白質ファミリーの細胞外ドメインと相同性が非常に高く、本構造解析により ADAM ファミリー蛋白質全般に共通した基本構造が解明された。現在までに VAP1 以外の蛇毒由来の他の ADAM 型蛋白質 2 種類についてすでに構造決定を行い(論文投稿中)、ADAM ファミリー分子の構造機能相関の解析

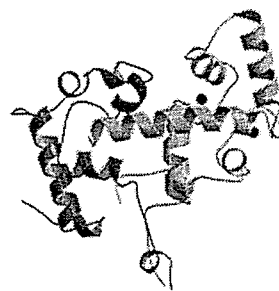
を進めている。



蛇毒出血因子VAP1
ADAMファミリータンパク初の結晶構造
関節リュウマチなど炎症性疾患、がん、
心疾患の創薬標的との類似構造を持つ
Takeda et al. *EMBO Journal* (2006)

② イオン交換輸送体調節因子複合体

CHP2/NHE1 複合体(図左)を Y^{3+} イオンの存在下で結晶化することに成功した。SPring8 のビームラインを用いて 2.7Å の解像度で回折像が得られ、結晶構造を解明した。その結果、CHP2 と NHE は複数の疎水性相互作用と特異的な水素結合を介して、極めて強固に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明らかにした。この研究は 2006 年、EMBO J に発表された。



Na^{2+}/H^{+} 交換輸送体と制御タンパクCHPの複合体
細胞内pH制御機構の一端を解明
心臓病をターゲットとした創薬への応用
Ben Ammar et al. *EMBO Journal* (2006)

③ プロスタグランジン関連タンパク

FLAP について大腸菌発現系にてタンパク質を精製し、通常の結晶化、lipidic cubic phase 法の両方で、結晶を得ているが、構造解析に使用できる結晶では

なく、さらに条件の検討を進めている。一方、COX-2の発現を抑制する作用を持つ resveratrol 及び様々な植物ポリフェノールが PPAR のアゴニストになること、そのうち特定の水酸基が PPAR と相互作用していることを明らかにしてきた。resveratrol については、以前から「フレンチパラドックス」を説明する物質として、さらに、アンチエイジングや生活習慣病予防効果を持つ物質として注目されているが、分子レベルで新しい作用機構の可能性を示した。

④ 細胞内情報伝達分子

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。BARドメインの脂質膜変形能におけるこれら3つの下部構造の役割を明らかにするために、それぞれに変異を導入し、リポソーム結合能やチューブ構造誘導能を調べた。その結果、N末の両親媒性ヘリックスがリポソームとの結合に必須であるのに対し、膜変形能はBARドメイン本体の曲率と付属突起構造の脂質膜への貫入によ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

① 昆虫細胞 Sf9 を用いた系により発現・精製した P2X 受容体タンパク質を、イオン強度を高めた状態で水中にて原子間力顕微鏡観察を行なった。この状態で P2X 受容体タンパク質は劈開雲母上で疑似 2 次元結晶状となり、ナノメートルレベルの分解能の像が得られる。前年度までにこの受容体の内在性作動薬である ATP 存在下において、タンパク質が直径 10 ナノメートルの中央にイオン・チャネル孔を有する円筒状であることが示されている。これに遮断薬で

あるスラミンを添加して観察したところ、疑似 2 次元様のタンパク質の配列は形成されたが、明確な円筒状の構造は認められなかった。このことから、遮断薬は単に ATP の結合を阻害するのではなく、受容体タンパク質の構造を変化させる可能性が示唆された。雲母ではなく、表面加工を施したシリコンウエハー上で観察を行なった場合、アミド結合により受容体タンパク質の高密度な結合が認められたが、シリコンウエハーの凹凸が雲母より大きく、高い解像度は得られなかった。

モデルペプチドを用いた NMR 測定による ATP の分子認識の研究では、アミノ酸の置換によりペプチドとアデニン部分との相互作用が変化することが認められた。NMR シグナルをもとにペプチドとアデニン部分の相互作用をコンピュータ計算により画面表示したところ、アミノ酸置換を加えると、アデニン部分との相互作用の際にペプチドの構造変化が必要となることが判明した。

② 前年度と同様に、RGD と PHSRN が同時に存在しているゲルを用いて軟骨細胞及び骨芽細胞を培養し、その分化に与える影響を検討した。昨年度と異なり、本年度は細胞を立体的に培養しての検討を行い、平面培養との比較も行った。いずれの細胞も、アルギン酸ゲル中に封入して立体的に培養することが可能であることが認められた。しかしながら、未修飾及び PHSRN 修飾アルギン酸ゲル中に封入した細胞の生存率は低くなることが示唆された。一方で、細胞接着性を高めたアルギン酸ゲル中に細胞を封入すると、コントロールである通常の培養皿上での細胞よりも低いものの、ある程度細胞の生存率が改善することが認められた。さらに、それらの細胞を2種類のペプチドが同時に存在するゲル中に培養した場合、軟骨細胞の場合には分化マーカーである type-II 及び aggrecan mRNA の発現が、骨芽細胞の場合には、ALP 活性、カルシウム沈着量、さらにオステオカルシン産生が著しく増強されることが認められた。この増強効果は、ゲル調製時の修飾アルギン酸の RGD と

PHSRN 存在比に大きく影響を受けた。

これら、2種類のペプチドと細胞との相互作用を観察するために、蛍光色素をさらに修飾したアルギン酸を、さらにはそれらからなるゲルを調製して共焦点レーザー顕微鏡により培養した細胞との相互作用観察を行った。その結果、細胞接着部分に修飾ペプチドが集積し、場合によっては2種類のペプチドが非常に近接して存在する像が観察された。

③ 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 Notch1-Wnt3- β catenin の経路を刺激して、分化を促進していると推定される。さらに Wnt3 が特に重要な分化促進の因子であり、Wnt3 は陰イオン修飾の度合いによって発現と活性に影響を受ける。また Wnt4 は Wnt3 の発現を抑制する負の制御因子であると考えられる。このメカニズムは他の細胞においても働いている可能性が示唆される。

④ 本研究の培養条件下では、正常に hMSC から骨芽細胞へ分化誘導されることを確認した。アルカリホスファターゼは培養5日目で細胞膜全体に産生されていた。さらに培養を続け2週間培養すると、石灰化組織が析出していた。析出した石灰化組織は1-50 μ mの球状粒子であった。本研究では特に、この析出した球状粒子の生成機構について検討した。石灰化機構を検討するにあたり、カルシウムイオンの挙動について検討した。共焦点レーザー顕微鏡観察より、細胞内にカルシウムリッチな細胞内小器官(カルシウム小胞体)が存在することを見出した。1週間培養した hMSC の微分干渉像から核の周りから5 μ m程度の球状の析出物がいくつも観察された。

遠心分離によって単離した球状粒子の透過型電子顕微鏡像観察より、この球状の析出物はアモルファスリン酸カルシウム(ACP)であると考えられた。このACPは、カルシウム小胞体が細胞膜から budding し、そこでアルカリホスファターゼ由来の無機リン酸と反応することで形成されると推察された。ACPを産生した後の細胞挙動を培養中の細胞を in situ 観察より、ACPを形成後骨芽細胞は細胞死に至り、ACPを自ら産生した細胞外マトリックスに沈着させることが分かった。

D. 考察

(1) 分子機能イメージング循環系

血管発生時のモデルとして①内皮細胞が徐々に集合していくことで管腔形成が行われる②先に血管内皮細胞が集合して、内皮細胞内部に管腔が形成されるという二つが考えられている。昨年度までわれわれは前者のメカニズムについて低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap1 が重要であることをイメージングを用いて示してきた。

本年度は後者のメカニズムとそと細胞膜あるいは、細胞内小器官の膜変形がどのように行われてひいては血管内皮細胞の管腔形成にいたるかを探る目的で細胞膜変形分子 BAR ドメインを持つ分子 Endophilin に着目して検討した。Endophilin は二量体構造をとる BAR ドメイン分子であり、脂質二重層との結合がおきることがわかった。この構造的な特徴として、①2量体の中心に appendage 様構造を持つ。②N末端に両親媒性 helix を持つ(世界で始めて構造が見えた)。③BAR ドメインの rigidity を突き止めることができた。

生きた細胞を使ったイメージングでも、野生型では細胞膜陥入を誘導できるがこれらの特徴を欠失した変異体ではすべて細胞膜陥入を起こすことはできなかった。したがって、構造から得られる情報とイメージングで得られる情報が一致した。今後も分子の機能をイメージングで探ることと分子の構造から

見える重要な構造的特徴を理解して病態あるいは生理的な意義を突き止めることで治療戦略に結実する確固たる血管新生・再生の分子基盤の解明を継続することが重要であると考えられた。

(2) 分子機能イメージング神経系

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した結果、2種のリード化合物を得、このアプローチの有効性が実証された。

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。

(3) 新たなイメージング技術の開発

① 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 BRET を利用したカルシウム指示薬の実験を通して得られた結果は、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。

② 水銀アークランプを光源とするリアルタイム共焦点顕微鏡の開発

リアルタイム共焦点顕微鏡 (CSU10) は通常はレーザーを光源とするが、多波長での使用やコスト面において不利であった。今回、我々は水銀アークランプを光源とした場合もレーザーを光源とした場合と同程度の画像が得られる事が明らかになった。

③ 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

X線結晶構造解析により得られた分解能 2.4Å の最終構造から、円順列変異によりタンパク質内の N 末端と C 末端の位置をずらし、元の N 末端と C 末端をリンカー配列でつないだのにも関わらず、ratiometric-pericam の cpYFP 部分の主鎖の全体構造は元の YFP の構造からほとんど変化していないことが分かった。決定した立体構造を分子置換の際に用いて ratiometric-pericam 全長の立体構造を決定する。

④ 新規色変換タンパク質の開発とその応用

Phamret を様々な細胞内小器官に局在化させ色変換をさせタイムラプス計測により分子の動態を観察することができた。Phamret は汎用性の高い色変換タンパク質であることが示された。今後、様々なシグナル配列やタンパク質と融合させて特定分子のトレースから新たな生命現象が明らかにされることが期待される。

⑤ 遺伝子にコードされた RNA 指示薬の開発

これまで報告された RNA 指示薬はほとんどが遺

伝子でコードされておらず、生体レベルで RNA の定量を行うことは不可能であった。開発した指示薬は、高い変化率と特異性を有しており、生体レベルでの RNA の定量的動態解析に道を開くものと期待される。

⑥ 光増感タンパク質 KillerRed の機能改変

まったく新しいスペクトル特性を持つ変異体 KillerRed の開発に成功したため、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

① AFM を利用したタンパク質の形状観察では、遮断薬であるスラミン共存下で受容体タンパク質の会合は認められたものの、イオン・チャンネル構造である円筒型の形状は認められなかった。ATP が存在しない状態では、この受容体タンパク質は不揃いであり、一様な会合は見られない。スラミンの共存で認められた会合は、スラミンの遮断作用が単なる ATP 結合阻害ではなく、別のある種の会合状態を導くことを示している。すなわち、基本的な古典薬理学的モデルで仮定される結合-非結合の 2 状態(競合的阻害)とは異なり、少なくとも 1 つの阻害状態が存在することを示唆する。このことはこれまで競合的に作用すると考えられてきたスラミンの作用様式と相反する結果であり、古典的モデルからの推測が必ずしも適切でないことを意味する。このような受容体タンパク質の形状から導かれる推測は、通常のマク

ロスコピックな薬理的作用の定量的解析から得られる情報とは全く異なっており、ナノレベル解析の重要性を示すものと言える。このような方法を用いることにより、ナノの視点から薬理学が進展し、“ナノ薬理学”の誕生も期待される。また、このような受容体単分子の形状変化の同定を目的とし、薬物の作用を“作動型”、“遮断型”に分類すれば、微量のサンプルを短時間でスクリーニングすることも可能となり、並列処理との併用でハイスループット化も可能となるであろう。シリコンウエハー上での観察では高分解能が得られなかった。これは、シリコンウエハーの表面が劈開した雲母に比べて凹凸が大きく、Z 軸方向の解像度が高くないことが原因と考えられる。シリコンウエハー表面は化学加工が可能で魅力的な素材であるが、今後加工が必要な場合には雲母表面上に self-assembled monolayer (SAM) を用いるなどの工夫が必要と思われる。モデルペプチドを用いた NMR 観察では、アデノシンとの会合様式が変異導入により変化することが示された。この変化は結合エネルギーの上昇を意味すると考えられ、変異導入による ATP の薬理作用の低下(あるいは消失)の説明となりうる。このような NMR 解析が今後薬理作用をナノレベルで理解する上で有用となることが期待される。

② 昨年度に引き続き、今年度も、調製した修飾アルギン酸からなるゲルを用いてヒト細胞を培養し、その細胞挙動変化を検討してきた。今年度は、細胞をゲル中に立体培養して検討を行ったが、平面培養時と同様に、修飾されたペプチドの種類とその混合比に応じて細胞分化挙動が影響を受けることが明らかになった。また、その影響を受ける傾向も平面培養と同じであった。すなわち、当初の修飾設計時に想定していたように、RGD とインテグリンとの結合を PHSRN が補助することでその結合が強化され、その結果としてインテグリンから始まるシグナルカスケードが活性化され分化が促進されたものと予想される。そのことを確認する目的で、昨年度に引き続

き、蛍光色素を利用した Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)による細胞と両ペプチドとの相互作用観察を試みたところ、両ペプチドが存在する場合、まれにその相互距離が数 nm と近接しているものが観察された。また、細胞接着下部でそれらのペプチドが局在化していることも見いだした。しかしながら、この観察からはその両ペプチドが近接して存在している度合いと細胞挙動変化との間に関連は見いだせなかった。これは、調製したゲルの蛍光強度が比較的弱かったこと、ゲルの表面の凹凸が大きいためわずかな相互距離変化を観察することが困難であること、などが考えられる。このことは、細胞中のインテグリンから始まるシグナルカスケードの変化を追うことでも確認できると考えられるため、現在、その検討を行っている。

なお、修飾アルギン酸ゲルを用いて立体的に細胞を培養したほうが、分化をより促進する傾向も認められた。このことは、細胞がより生体内に近い状態で培養されたほうが、その phenotype の維持に好ましいことを示唆するものであり、今後、さらなる検討が必要であろう。

③ 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。

④ 本研究の MSC の分化過程のイメージングより石灰化の初期過程についての知見を得た。骨芽細胞へ分化誘導された MSC は、はじめアルカリホスファターゼが細胞膜表面に産生し、細胞内部にカルシウム小胞体が形成される。次いで、このカルシウム小胞体は細胞外へ放出され、この過程で、カルシウム小胞体は無機リン酸が取り込まれ、カルシウムイオンと反応することによって ACP が合成されると考えられた。一方、細胞は ACP を合成したのち、核の消滅そして細胞膜の破裂を伴って細胞死に至る。この過程で、ACP が細胞外マトリックスへ沈着し、

さらに沈着した ACP が HAp へと転化することによって骨が形成されると考えられた。

E. 結論

(1) 分子機能イメージング循環系

細胞膜曲率誘導、感受分子 endophilin の膜変形機構について検討した。構造学的検討と機能イメージングの両者を平行して研究することもできた。

(2) 分子機能イメージング神経系

① ヒトの記憶形成、想起に重要で、アルツハイマー病との相関が示されている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。またグリア細胞においては、その形態を制御し、シナプスの機能を調節している可能性が示された。

② パーキンソン病の病因遺伝子産物である UCH-L1 のタンパク質構造を中性子線解析により解明し、パーキンソン病の発症と相関する構造変化を同定した。この構造変化を正常型に戻す可能性のある薬物を *in silico* で検索し、リード化合物の候補を得た。

③ プリオンタンパク質とクロツフェルトヤコブ病の診断マーカーである 14-3-3 タンパク質とのミトコンドリア上での複合体形成の可能性を免疫ゴールド染色電子顕微鏡法により明らかにし、プリオン悪性化の初期過程の解明に重要な前進があった。

(3) 新たなイメージング技術の開発

① 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

BRET も FRET と同じく、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事を利用し、BRET を利用したカルシウム指示薬を開発した。また、それを用いカルシウムイメージングを

行った。

② 水銀アークランプを光源とするリアルタイム共焦点顕微鏡の開発

水銀アークランプを光源として利用したリアルタイム共焦点顕微鏡を開発し、これが画質としてレーザーと遜色ないことを定量的・定性的に示す事でその有用性を明らかにした。

③ 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

X線結晶構造解析により ratiometric-pericam の cpYFP 部分について分解能 2.4Å の立体構造を決定した。

④ 新規色変換タンパク質の開発とその応用

光刺激により色変換する蛍光タンパク質指示薬 Phamret を作製し生細胞内での色変換とタイムラプス計測を行うことに成功した。

⑤ 遺伝子にコードされた RNA 指示薬の開発

完全に遺伝子でコードされた定量的・特異的な RNA 指示薬の開発に成功した。

⑥ 光増感タンパク質 KillerRed の機能改変

新しいスペクトル特性を持つ KillerRed 変異体の開発に成功した。

(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

① 本年度の研究により、ATP 受容体タンパク質の個々の構造を解明し、中央にイオン・チャンネル孔を有する円筒型の形状は作動薬に特有である可能性を示した。NMR 解析ではモデル・ペプチドとアデニンのとの相互作用は変異導入で変化することが示された。以上の方法はナノレベルの薬理学への新たな進展に寄与するものと考えられる。

② 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、そのゲル中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能の優れた材料開発に繋がると考えられる知見を得た。また、細胞を立体的に培養することでその phenotype の維持、あるいはその分化が促進されるに繋がることが示唆され、材料設計だけでなく用途に応じてその培養方法を改良する必要性も示唆された。

③ 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。

④ 骨芽細胞による骨形成は、アモルファス状のリン酸カルシウムが結晶質のハイドロキシアパタイトに転化によって起こると考えられた。また、この転化反応は新規イオン含有 HAp によって促進されることが明らかとなった。

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

① 論文発表

【原著】

1. Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, Somekawa S, Nakaoka Y, Ogawa M, Adams RH, Okada M, Mochizuki N: Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization. *Circ Res*, 98(7): 897-904, 2006.
2. Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N: Endophilin BAR domain

drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *Embo J*: 1-9, 2006.

3. Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim YM, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG: Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) increases vascular permeability; Impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood*, in press.

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

【原 著】

1. Ohira K, Funatsu N, Homma K, Sahara Y, Hayashi M, Kaneko T, Nakamura S: Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slice. *Eur. J. Neurosci*, 25: 406-416, 2007.
2. Ohira K, Homma K, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M: TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 342: 867-74, 2006.
3. Moritake S, Taira S, Ichiyangi Y, Morone N, Song S-Y, Hatanaka T, Yuasa S, Setou M: Functionalized Nano Magnetic Particles for an in vivo Delivery System. *J. Nanosci. Nanotechnol*, 2006. (in press)
4. Kotani T, Morone N, Yuasa S, Nada S, Okada M: Constitutive activation of neuronal Src causes aberrant dendritic morphogenesis in mouse cerebellar Purkinje cells. *Neurosci. Res*, 2006. (in print)
5. Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai SR, Ike H, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A: Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol*, 174: 851-62, 2006.
6. Setsuie R, Wang Y.L, Mochizuki H, Osaka H, Hayakawa H, Ichihara N, Li H, Furuta A, Sano Y, Sun Y.J, Kwon J, Kabuta T, Yoshimi K, Aoki S, Mizuno Y, Noda M, Wada K: Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochem. Int*, 50: 119- 129, 2007.
7. Sato A, Arimura Y, Manago Y, Nishikawa K, Aoki K, Wada E, Suzuki Y, Osaka H, Setsuie R, Sakurai M, Amano T, Aoki S, Wada K, Noda M: Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. *J. Cell. Physiol*, 209: 172-182, 2006.
8. Yamauchi R, Wada E, Yamada D, Yoshikawa M, Wada K: Effect of beta -lactotensin on acute stress and fear memory. *Peptides*, 27: 3176-3182, 2006.
9. Naito S, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Ikeda S, Adachi T, Shimizu H. M, Suzuki J, Fujiwara S, Okada T, Nishikawa K, Aoki S, Wada K: Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 339: 717 -725, 2006.
10. Yoshida M, Yonetani A, Shirasaki T, Wada K: Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*, 290: R449-R455, 2006.
11. Noda M, Kettenmann H, Wada K: Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system. *Biol. Chem*, 387: 167-171, 2006.
12. Fukazawa N, Ayukawa K, Nishikawa K, Ohashi H, Ichihara N, Hikawa Y, Abe T, Kudo Y, Kiyama H, Wada K, Aoki S: Identification and functional characterization of mouse TPO1 as a myelin

- membrane protein. *Brain Res*, 1070: 1-14, 2006.
13. Amano T, Aoki S, Setsuie R, Sakurai M, Wada K, Noda M: Identification of a novel regulatory mechanism for norepinephrine transporter activity by IP3 receptor. *Eur. J. Pharmacol*, 536: 62-68, 2006.
 14. Tomita S, Sekiguchi M, Wada K, Nicoll R.A, Brecht D.S: Stargazin controls the pharmacology of AMPA receptor potentiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 10064- 10067, 2006.
 15. Sano Y, Furuta A, Setsuie R, Kikuchi H, Wang Y.L, Sakurai M, Kwon J, Noda M, Wada K: Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3-deficient mice. *Am. J. Pathol*, 169: 132-141, 2006.
 16. Sun Y.J, Nishikawa K, Yuda H, Wang Y.L, Osaka H, Fukazawa N, Naito A, Kudo Y, Wada K, Aoki S: Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol*, 26: 6923-6935, 2006.
 17. Kabuta T, Suzuki Y, Wada K: Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem*, 281: 30524 -30533, 2006.
 18. 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.
 19. Sakurai M, Ayukawa K, Setsuie R, Nishikawa K, Hara Y, Ohashi H, Nishimoto M, Abe T, Kudo Y, Sekiguchi M, Sato Y, Aoki S, Noda M, 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.
 20. 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.
- 【著 書】
- Wada K, Yamada K, Santo-Yamada Y, Maeno H, Wada E, Sekiguchi M: Altered emotional behaviors in mammalian bombesin receptor knockout mice: implication for the molecular pathogenesis of stress-induced psychiatric disorders in humans. In *PTSD. Brain Mechanisms and Clinical Implications* (Ed by Kato N, Kawata M, Pitman RK), Springer, Tokyo, 2006.
- (研究業績「和文」)
- 【総 説】
- Nakada C, Morone N, Kusumi A: Membrane skeleton: interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 51: 672-82, 2006.
- ② 学会発表
- 【国際学会】
1. Nakata H, Nakada T, Nakamura S: Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor translocation to postsynaptic site via adenylyl cyclase/protein kinase A and ERK signaling. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, Atlanta, USA [2006/10/16].
 2. Morone N, Satoh J, Wakui F, Yamamura T, Yuasa S. Skeletal architecture and GPI-anchored protein complex in neuronal progenitor cell as revealed by electron structural analysis. 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego USA. (2006)
- 【国内学会】
1. 中田博子, 中村俊: BDNFによるIP3RとTRPCの活性化を介したAMPA受容体のシナプス後

膜への輸送制御. 第 29 回日本神経科学大会、京都 [2006/7/20].

2. 大平耕司, 本間光一, 平井啓久, 中村俊, 林基治: TrkB-T1 Regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. ラットグリオーマ細胞において TrkB-T1 は RhoA シグナリング経路とアクチン細胞骨格を制御する. 第 29 回日本神経科学学会, 京都, 2006 年 7 月 19~21 日
3. Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai R, Ike H, Kozuka Y, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A: Three-dimensional architecture of the cell membrane skeleton by electron tomography. 16th International Microscopy Congress, Sapporo, Japan. (2006)
4. 諸根信弘, 藤原敬宏, 笠井倫志, 白倉治郎, 湯浅茂樹, 楠見明弘. (2006) 新しい細胞膜構造. 15 回日本バイオイメーキング学会学術集会, 盛岡.
5. 櫻井省花子, 圖子田康, 関口正幸, 和田圭司: Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) -L1 欠損 *gad* マウスの行動とシナプス可塑性の異常. Alteration of behavior and impairment of synaptic plasticity in Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) - L1- deficient *gad* mice. 第 29 回日本神経科学学会大会, 京都, 7.19, 2006.

(3) 新たなイメージング技術の開発

① 論文発表

【原著】

- Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozone S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, Kato T: Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. PLoS Genet., 2(8): e128, 2006.

(研究業績「和文」)

【原著】

- 永井健治: 今、蛍光タンパク質で何ができるか?. 生化学, 78: 519-523, 2006.

【総説】

1. 永井健治: 円順列GFP変異体を利用した機能プローブの作製法と2波長励起1波長取得レーザー共焦点イメージング. 実験医学 (別冊) 染色体・バイオイメーキング実験ハンドブック: 210-215, 2006.
2. 永井健治: 生細胞内で働く分子を可視化する. Bionics, 7月号: 30-35, 2006.
3. 永井健治: 序: 組織・個体レベルでの機能イメージングに向けて. 細胞工学, 25: 1010-1013, 2006.
4. 永井健治: 電顕に期待するもの. 細胞工学, 25: 1192-1193, 2006.
5. 永井健治: HaloTagテクノロジーが拓くさまざまな蛍光イメージングの可能性 (総説). バイオテクノロジー, 6: 745-750, 2006.
6. 永井健治: FRETの上手な使い方. 蛋白質核酸酵素 (別冊) 細胞核の世界—ダイナミクスから病態まで, 51: 1989-1997, 2006.

② 学会発表

1. Matsuda T, Miyawaki A, Nagai T: "Phamret: An efficient highlighter protein based on photoconversion-mediated FRET for cell biological studies", International Symposium on Functional Organization of the Nucleus, Awaji (Japan), 2007.1.
2. 永井健治: "蛍光・化学発光タンパク質を利用した生細胞内のリアルタイム機能イメージング", 第 127 回日本薬理学会, 富山, 2007.3.
3. 永井健治: "蛍光・発光タンパク質を利用した生理機能センサーの開発とライブイメージング", 第 96 回日本病理学会, 大阪, 2007.3.

4. Matsuda T, Miyawaki A, Nagai T: "Phamret: An efficient highlighter protein based on photoconversion-mediated FRET for cell biological studies", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan), 2006.11.
5. Nagai T: "Imaging biological functions by using genetically-encoded indicators & a spinning disc confocal system with a mercury arch lamp as a light source", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan), 2006.11.
6. Nagai T: "Development of FRET- and BRET-based functional indicators with expanded dynamic range", The 2nd Sapporo Conference, Sapporo (Japan), 2006.10.
7. Nagai T: "Development of FRET- and BRET-based functional indicators with expanded dynamic range", 16th International Microscopy Congress, Sapporo Convention Center, Sapporo (Japan), 2006.9.
8. Nagai T: "Vivid visualization of biological functions by using DNA-encodable indicators- Toward multifunctional imaging-", 7th Joint Meeting of The Histochemical Society & The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry, Big Island of Hawaii (USA), 2006.8.
9. Nagai T: "Realtime imaging and manipulation of biological functions by fluorescent proteins", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto (Japan), 2006.7.
10. Saito K, Nagai T: "Ca²⁺ imaging of single living cell with bioluminescence resonance energy transfer (BRET)", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan), 2006.11.
11. Takemoto K, Nagai T: "A genetically-encoded indicator for RNA in living cells", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan), 2006.11.
12. Tani T, Saito K, Nagai T: "Single molecule imaging of nerve growth factor receptor trkA expressed in the growth cones of dorsal root ganglion explants", Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Okinawa (Japan), 2006.11.
13. 永井健治: "蛍光・発光タンパク質を利用した生理機能イメージング", 通研共同プロジェクト研究会、「フォトニック結晶の光産業技術への展開」, 仙台, 2006.12.
14. 永井健治: "蛍光・発光タンパク質を用いたバイオセンサーの開発と生理機能のライブイメージング", 第4回分野横断スクール「ナノバイオスクール」ー生体細胞の形態・機能観察から動的診断, 東京, 2006.12.
15. 永井健治: "生きた細胞の中の生理反応をリアルタイムに可視化する技術の開発", 大阪大学蛋白質研究所セミナー ケミカルバイオロジーの進展と生命科学研究の新たな展開 大阪, 2006.11.
16. 永井健治: "近未来的バイオイメージング技術の展望", 第15回バイオイメージング学術集会, 岩手医科大学 60周年記念館, 2006.11.
17. 永井健治: "個体レベルでのニューロン・グリア機能解析に資するイメージング法の開発", 第18回生理研研究会 Neuro-glio-vascular interaction におけるプリン作動性シグナリングの病態生理的機能, 岡崎, 2006.9.
18. 永井健治: "蛍光・化学発光タンパク質を利用した生理機能イメージング", 分子構造討論会 2006, 静岡, 2006.9.
19. 永井健治: "蛍光分子を利用して生体機能と情報をはかる", 生化学会近畿支部, 大阪, 2006.9.
20. 永井健治: "蛍光分子を利用して生体機能と情報