

をはかる", 生命をはかる研究会, 幕張,  
2006.8.

21. 永井健治: "発光性タンパク質を利用した生理機能の可視化と操作～医療応用を目指して～", 臨床応用を目指した産学連携セミナー 3 分子細胞イメージングと疾患・創薬研究～ライブセルから in vivo への展開, 東京, 2006.5.
22. Nagai T: "Molecular and cellular imaging of living organisms", 63rd KSBMB Annual Meeting, Seoul (Korea), 2005.5.
23. 永井健治: "バイオイメージング技術の現状と展望", 日本生体医工学会北海道支部第 28 回 ME 研究会, 北海道大学 (札幌), 2005.6.
24. 永井健治: "近未来的バイオイメージングの展望", 特定領域研究 2 領域合同公開シンポジウム, 細胞内のダイナミックネットワーク: 前進するオルガネラ研究, 大阪, 2005.6.

#### (4) 分子構造イメージング×線回折 (研究業績「欧文」)

##### 【原 著】

1. Amino M, Yoshioka K, Tanabe T, Tanaka E, Mori H, Furusawa Y, Zareba W, Yamazaki M, Nakagawa H, Honjo H, Yasui K, Kamiya K, Kodama I: Heavy ion radiation up-regulates Cx43 and ameliorates arrhythmogenic substrates in hearts after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 72(3): 412-421, 2006.
2. Ben Ammar Y, Takeda S, Hisamitsu T, Mori H, Wakabayashi S: Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for pH regulation. *Embo J*, 25(11): 2315-2325, 2006.
3. Callegari E, Norata GD, Inoue H, Catapano AL: Oxidized-HDL3 modulates the expression of Cox-2 in human endothelial cells. *Int J Mol Med*, 18(1): 209-213, 2006.
4. Enomoto T, Sato E, Sumiyama Y, Aizawa K, Watanabe M, Tanaka E, Mori H, Kawakami H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S: Enhanced magnification angiography using 20-um-focus tungsten tube. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 45: 8005-8009, 2006.
5. Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, Xu R, Inoue H, Arditi M, Dannenberg AJ, Abreu MT: Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*, 131(3): 862-877, 2006.
6. Fukuyama N, Onuma T, Jujo S, Tamai Y, Suzuki T, Sugio Y, Tabata Y, Ishihara Y, Takano J, Mori H: Efficient preparation of cationized gelatin for gene transduction. *Tokai J Exp Clin Med*, 31(2): 39-42, 2006.
7. Fukuyama N, Tanaka E, Tabata Y, Fujikura H, Hagihara M, Sakamoto H, Ando K, Nakazawa H, Mori H: Intravenous injection of phagocytes transfected ex vivo with FGF4 DNA/biodegradable gelatin complex promotes angiogenesis in a rat myocardial ischemia/reperfusion injury model. *Basic Res Cardiol*, 2006.
8. Goto T, Fukuyama N, Aki A, Kanabuchi K, Kimura K, Taira H, Tanaka E, Wakana N, Mori H, Inoue H: Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse. *Tokai Journal*, 31: 128-132, 2006.
9. Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Myoishi M, Tsukamoto O, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Shiraga M, Kitakaze M, Hori M: Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J Am Coll Cardiol*, 48(1): 176-184, 2006.
10. Hisamitsu T, Ben Ammar Y, Nakamura TY,

- Wakabayashi S: Dimerization is crucial for the function of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE1. *Biochemistry*, 45: 13346-13355, 2006.
11. Igarashi T, Oishi Y, Araki S, Mori H, Takeda S: Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of two vascular apoptosis-inducing proteins (VAPs) from *Crotalus atrox* venom. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 62(Pt 7): 688-691, 2006.
  12. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Uemura K, Kamiya A, Shishido T, Mori H, Sugimachi M: Effects of Ca<sup>2+</sup> channel antagonists on nerve stimulation-induced and ischemia-induced myocardial interstitial acetylcholine release in cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(5): H2187-2191, 2006.
  13. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Li M, Ariumi H, Mori H, Sunagawa K, Sugimachi M: Vagal stimulation suppresses ischemia-induced myocardial interstitial norepinephrine release. *Life Sci*, 78(8): 882-887, 2006.
  14. Kimura K, Goto T, Yagi K, Furuya H, Jujo S, Itoh J, Sawamura S, Koide S, Mori H, Fukuyama N: Biphasic Action of Inducible Nitric Oxide Synthase in a Hindlimb Ischemia Model. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 38(2): 95-102, 2006.
  15. Kimura K, Goto T, Yagi K, Furuya H, Jujo S, Itoh J, Sawamura S, Koide S, Mori H, Fukuyama N: Biphasic of inducible nitric oxide synthase in a hind limb ischemia model. *J.Clin.Biochem.Nutr.*, 38(2): 1-8, 2006.
  16. Kobayashi Y, Katanosaka Y, Iwata Y, Shigekawa M, Wakabayashi S: Identification and characterization of GSRP-56, a novel Golgi-localized spectrin-repeat containing protein. *Exp. Cell Res.*, 312: 3152-3164, 2006.
  17. Kuroko Y, Tokunaga N, Yamazaki T, Akiyama T, Ishino K, Sano S, Mori H: Effect of sustained limb ischemia on norepinephrine release from skeletal muscle sympathetic nerve endings. *Neurochem Int*, 2006.
  18. 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.
  19. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H: Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 12(4): 459-465, 2006.
  20. Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N: Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(4): 1242-1249, 2006.
  21. Nakamura TY, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakabeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J: Novel Role of Neuronal Ca<sup>2+</sup> Sensor-1 as a Survival Factor Up-Regulated in Injured Neurons. *J. Cell Biol.*, 172(7): 1081-1091, 2006.
  22. Park W, Lim W, Cho J, Inoue H, Rhyu MR, Lee Y: Inhibitory effects of ginsenoside-Rb1 on activation of the 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced cyclooxygenase-2 promoter. *Planta Med*, 72(3): 272-275, 2006.
  23. Sato E, Hayashi Y, Germer R, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Onagawa J: X-ray Spectra from Weakly Ionized Linear Copper Plasma. *Japanese Journal of Applied Physics*, 45(6A): 5301-5306, 2006.
  24. Sato E, Hayashi Y, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Ido H: K-edge

- angiography utilizing a tungsten plasma x-ray generator in conjunction with gadolinium-based contrast media. *Rad.Phys.Chem.*, 75: 1841-1849, 2006.
25. Sato E, Hayasi Y, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Onagawa J, Ido H: Preliminary study for producing higher harmonic hard x-rays from weakly ionized nickel plasma. *Rad.Phys.Chem.*, 75: 1812-1818, 2006.
26. Sato E, Sugiyama H, Ando M, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Takayama K, Onagawa J, Ido H: Tunable narrow-photon-energy X-ray generator utilizing a utilizing a tungsten-target tube. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 45: 8005-8009, 2006.
27. Sato E, Sugiyama H, Ando M, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Takayama K, Onagawa J, Ido H: Tunable narrow-photon-energy x-ray generator utilizing a tungsten-target tube. *Rad. Phys. Chem.*, 75: 2008-2013, 2006.
28. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K: Real time magnification radiography utilizing a 100- $\mu$ m-focus x-ray generator. *Proc. of World Congress on Med. Phys. And Biomedical Engineering 2006*, 1415-1418, Souel, 2006.
29. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K: Enhanced magnification angiography utilizing a 100- $\mu$ m-focus tungsten tube in conjunction with gadolinium-based media. *Proc. of World Congress on Med. Phys. And Biomedical Engineering 2006*, 1427-1430, Souel, 2006.
30. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K: Demonstration of enhanced K-edge angiography utilizing a samarium x-ray generator. *Proc. of World Congress on Med. Phys. And Biomedical Engineering 2006*, 1250-1253, Souel, 2006.
31. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Onagawa J: Characteristic X-ray Generator Utilizing Angle Dependence of Bremsstrahlung X-ray Distribution. *Japanese Journal of Applied Physics*, 45(No. 4A): 2845-2849, 2006.
32. Schwenke DO, Pearson JT, Mori H, Shirai M: Long-term monitoring of pulmonary arterial pressure in conscious, unrestrained mice. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 53(3): 277-283, 2006.
33. Schwenke DO, Pearson JT, Mori H, Shirai M: Does central nitric oxide elicit pulmonary hypertension in conscious rats? *Respir Physiol Neurobiol*, 2006.
34. Takahama H, Minamino T, Hirata A, Ogai A, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Tsukamoto O, Okada K, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Mochizuki N, Kitakaze M: Granulocyte colony-stimulating factor mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*, 20(3): 159-165, 2006.
35. Takeda S, Igarashi T, Mori H, Araki S: Crystal structures of VAP1 reveal ADAMS' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *Embo J*, 25(11): 2388-2396, 2006.
36. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Haruna Y, Morita Y, Kashihara N, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiji F: Cardioprotective role of endogenous hydrogen peroxide during ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(3): H1138-1146, 2006.
37. Suenaga M, Kaneko Y, Kadokawa J, Nishikawa T, Mori H, Tabata M: Amphiphilic poly(N-propargylamide) with galactose and lauryloyl

- groups: synthesis and properties. *Macromol Biosci*, 6(12): 1009-1018, 2006.
38. Mishima M, Wakabayashi S, Kojima C: Solution structure of the cytoplasmic region of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 complexed with essential cofactor calcineurin B homologous protein 1. *J. Biol. Chem.*, 2006, in press.
39. Fukuyama N, Jujo S, Ito I, Shizuma T, Myojin K, Ishiwata K, Nagano M, Nakazawa H, Mori H: Kurozu moromimatsu inhibits tumor growth of Lovo cells in a mouse model in vivo. *Nutrition*, 2006, in press.
40. Sagae M, Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T: High-sensitive radiography system utilizing a pulse x-ray generator and a night-vision. *SPIE*, 2006, in press.
41. Sato E, Germer R, Obara H, Tanaka E, Mori H: Enhanced K-edge angiography utilizing a super-fluorescent x-ray generator with a gadolinium tube. *SPIE*, 2006, in press.
42. Sato E, Germer R, Obara H, Tanaka E, Mori H, Kawai T: Characteristics pulse x-ray generator utilizing a hot-cathode triode. *SPIE*, 2006, in press.
43. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K: Characteristics of a super-fluorescent x-ray generator. *SPIE*, 6319, 2006, in press.
44. Obara H, Sato E, Germer R, Tanaka E, Mori H, Kawai T: X-ray spectra from a weakly ionized linear molybdenum plasma. *SPIE*, 2006, in press.
45. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K: Demonstration of enhanced K-edge angiography using a samarium target x-ray generator. *SPIE*, 6319, 2006, in press.
46. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K: Real-time magnification radiography utilizing a 100μm-focus x-ray generator in conjunction with an image intensifier. *SPIE*, 6319, 2006, in press.
47. Myojin K, Taguchi A, Umetani K, Fukushima K, Nishiura N, Matsuyama T, Kimura H, Stern DM, Imai Y, Mori H: Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography. *American journal of neuroradiology (AJNR)*, 2007.

#### 【著書】

- Takeda S: Preparation of protein crystals for X-ray structural study, *Method in Molecular Medicine: Cardiovascular Disease*, (Ed by Wang Q), Humana Press, 129: 291-303, 2006.

#### (研究業績「和文」)

#### 【原著】

1. 井上裕康: PPAR とプロスタグランジン. *医学のあゆみ*, 220(1), 93-98, 2007.
2. 井上裕康, 中田理恵子, 竹内悠, 塚本朋子, 堀田真理子, 名村尚武: 植物性ポリフェノールによる核内受容体 PPAR の活性化. *脂質生化学研究*, 48: 131-134, 2006.

#### 【総説】

1. 菅弘之, 盛英三, 馬場嘉信, 杉町勝. ナノメディシン・プロジェクトー厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクトを中心にしてー. 東京: 先端医学社; 2006.
2. 盛英三, 武田壮一, 五十嵐智子, 柴田洋之: 特発性心筋症の原因解明と治療法開発に向けた構造生物学的アプローチ. *医学のあゆみ*, 217(8): 819-824, 2006.
3. 盛英三, 武田壮一, 若林繁夫, 井上裕康, ユーセフベンアマー, 松原孝宜, 五十嵐智子, 柴田

洋之: 疾患関連蛋白のサブナノ構造イメージングと分子標的薬剤の開発; ナノイメージング構造. 分子心血管病, 先端医学社, 東京, 2006.

4. 盛英三, 望月直樹, 武田壮一, 井上裕康, 中村俊, 土屋利江: 特集: ナノテクノロジーと医療 ナノレベルイメージングによる分子構造と機能の解析. 日本臨床, 64: 358-364, 2006.

#### 【学会発表】

1. Akiyama T, Yamazaki T, Mori H: "Intravenous Mg<sup>2+</sup> infusion inhibits adrenal catecholamine release by acting on both pre- and post-ganglionic sites", 第 83 回日本生理学会大会, S134, 群馬, 2006.3.
2. Nishiura N, Mori H: "The modification of traditional device to record the force and length in small animal's isolated papillary muscle", 第 83 回日本生理学会大会, S134, 群馬, 2006.3.
3. Schwenke DO, Pearson JT, Mori H, Shirai M: "Long-term monitoring of pulmonary arterial pressure in conscious, unrestrained mice", 第 83 回日本生理学会大会, S134, 群馬, 2006.3.
4. Amino M, Yoshioka K, Matsuzaki A, Tanabe T, Mori H, Tanaka E, Furusawa Y, Yamazaki M, Nakagawa H, Honjou H, Lee J-k, Yasui K, Kamiya K, Kodama I: "Heavy Ion Radiation Upregulates Connexin43 and Ameliorates the Substrates for VT/VF in Rabbit Hearts after Myocardial Infarction", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 415, 名古屋, 2006.03.
5. Kataoka M, Nagaya N, Tanaka K, Miyahara Y, Mori H: "Adipose Tissue-derived Endothelial Like Cells for Treatment of Pulmonary Hypertension in Rats", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 279, 名古屋, 2006.03.
6. Kataoka M, Nagaya N, Tanaka K, Miyahara Y, Mori H: "Transplantation of Adipose Tissue-derived Endothelial Like Cells Improves Cardiac Function in Rats with Acute Myocardial Infarction through Angiogenesis and Myogenesis", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 52, 名古屋, 2006.3.
7. Miyahara Y, Nagaya N, Mori H: "Therapeutic Potency of Intramyocardial Sustained Delivery of Insulin-like Growth Factor-1 for Myocardial Infarction", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 315, 名古屋, 2006.03.
8. Miyahara Y, Nagaya N, Mori H: "Insulin-like Growth Factor-1 Enhances Therapeutic Potency of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Myocardial Infarction", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 408, 名古屋, 2006.03.
9. Miyamoto K, Takeshita S, Kasai S, Akutsu K, Hayashi T, Chiku M, Nishigami K, Mori H, Nakatani T, Nonogi H, Tomoike H: "Long-term Results of Autologous Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells for Patients with Thromboangiitis Obliterans", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 630-631, 名古屋, 2006.03.
10. Sukmawan R, Yada T, Toyota E, Kume T, Mori H, Ogasawara Y, Yoshida K: "Scavenging Reactive Oxygen Species by Edaravone Preserves Coronary Microvascular Endothelial Function Myocardial eNOS Expression on Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo Beating Canine Heart", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 52, 名古屋, 2006.03.
11. Tanaka K, Mori H, Nagaya N: "Mesenchymal Stem Cells Not Only Regenerate Functional Cardiomyocytes but Also Have Paracrine Effects on Resident Myocytes in the Infarcted Myocardium", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 558, 名古屋, 2006.03.
12. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: "Crucial Role of Hydrogen Peroxide as an Endogenous EDHF during Pacing-Induced Metabolic Dilatation in

- Canine Coronary Microvessels in Vivo", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 201, 2006.03.
13. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: "Cardioprotective Role of Hydrogen Peroxide as an Endogenous EDHF during Ischemia-reperfusion Injury in Canine Coronary Microvessels in Vivo", 第 70 回日本循環器学会・学術集会, 472, 名古屋, 2006.03.
  14. 小幡裕明, 酒井芳紀, 大西俊介, 竹下聡, 盛英三, 小玉誠, 相澤義房, 永谷憲歳: "長期作用型プロスタサイクリンアゴニストの開発と肺高血圧モデルに対する効果の検討", 第 79 回日本内分泌学会学術総会, 511, 神戸, 2006.05.
  15. 松原孝宜, 竹内悠, 金相佑, 盛英三, 井上裕康: "植物性ポリフェノールと核内受容体 PPAR の相互作用の検討", 日本ビタミン学会第 58 回大会, 246, 2006.05.
  16. 福島和人, 盛英三, 杉村和朗: "脈管画像診断の最近の進歩 放射光微小血管造影装置による諸臓器の微細血管構築の観察", 第 47 回日本脈管学総会, S78, 神戸, 2006.10.21.
  17. 福島和人, 盛英三, 川嶋成乃亮, 杉村和朗: "糖尿病ラットおよび高血圧ラットにおける冠血管機能の評価:放射光単色 X 線微小血管造影法による検討", 第 47 回日本脈管学総会, S122, 神戸, 2006.10.21.
  18. 井上裕康: "植物ポリフェノールによる PPAR 活性化の検討: フレンチパラドックスとの関連", 情報計算化学生物学会 (CBI 学会) 第 270 回研究講演会, 2006.12.
  19. 井上裕康, 竹内悠, 中田理恵子, 松原孝宜, 金相佑, 名村尚武: "フレンチパラドックスと核内受容体 PPAR の新しい接点", 日本栄養食糧学会, 2006.
  20. 井上裕康, 中田理恵子: "植物油による誘導型シクロオキシゲナーゼ発現抑制の検討", 日本家政学会, 2006.
  21. 井上裕康, 中田理恵子, 竹内悠, 塚本朋子, 堀田真理子, 名村尚武: "植物性ポリフェノールによる核内受容体 PPAR の活性化", 日本脂質生化学会, 2006.
  22. 井上裕康, 中田理恵子, 竹内悠, 名村尚武: "赤ワインに含まれるポリフェノール・レスベラトロールの核内受容体 PPAR を介する生活習慣病予防効果", 第 9 回 秋田応用生命科学研究会, 2006.
  23. 金相佑, 田中秀明, 土持裕胤, 盛英三, 井上裕康, 月原富武: "膜貫通型膜蛋白質 5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質の精製と結晶化", 第 6 回蛋白質科学会, 2006.
  24. 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 (ポスター)", 第 4 回ナノテクノロジー総合シンポジウム, 2006.
  25. 松原孝宜, 竹内悠, 金相佑, 盛英三, 井上裕康: "植物性ポリフェノールと核内受容体 PPAR の相互作用の検討", 日本ビタミン学会第 58 回大会, 2006.
  26. Inoue H: "Possible linkage between cyclooxygenase-2 and nuclear receptor PPAR", 第 14 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム, Kyoto (Japan), 2006.4.
  27. 若林繁夫: "Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の調節因子 CHP の構造と pH センシング機構", バイオ分子センサー研究会, 生理学研究所・岡崎バイオサイエンスセンター, 2006.6.
  28. 武田壮一: "蛇毒プロテアーゼの結晶構造", 大阪大学蛋白質研究所セミナー・膜近傍におけるプロテオリシス研究の最先端, 大阪大学蛋白質研究所講堂, 2006.2.
  29. 武田壮一: "タンパク質の形から機能が見えてくる", 第 3 回次世代光源計画ワークショップー先

- 端的リング型光源が開くサイエンスー, 岡崎カ  
ンファレンスセンター, 2006.8.
30. 武田壮一: "蛇毒ホモログの結晶構造から見えてきた ADAM 型膜結合プロテアーゼの基本構造とその作用", 第 5 回ケモゲノミクス研究会, 京都大学薬学部記念講堂, 2006.5.
  31. Mori H: "Structural Biological Approach to Fundamental Protein in Human Diseases Explores Nanophysiology and Nanomedicine", 2nd Annual Meeting of the American Academy of Nanomedicine, Washington DC, 2006.9.
  32. Amino M, Yoshioka K, Matsuzaki A, Tanabe T, Tanaka E, Mori H, Furusawa Y, Zareba W, Honjo H, Yamazaki M, Nakagawa H, Yasui K, Kodama I: "Antiarrhythmic Cx43 up-regulation by radiation in rabbit", Scientific Sessions 2006, Illinois (Chicago), 2006.11.
  33. Obata H, Sakai Y, Ohnishi S, Takeshita S, Mori H, Kodama M, Aizawa Y, Nagaya N: "Single administration of novel sustained-release prostacyclin analogue attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats", Scientific sessions 2006, Illinois (Chicago), 2006.11.
  34. Sukmawan R, Yada T, Toyota E, Neishi Y, Kume T, Haruna Y, Kashihara N, Mori H, Shinozaki Y, Ogasawara Y, Okura H, Yoshida K: "Edaravone preserves coronary microvascular nitric oxide availability and myocardial eNOS on ischemia/reperfusion injury in canine heart", Scientific sessions 2006, Illinois (Chicago), 2006.11.
  35. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: "Crucial role of hydrogen peroxide as an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor during pacing-induced metabolic dilatation in canine coronary microvessels in vivo", Scientific sessions 2006, Illinois (Chicago), 2006.11.
  36. Inoue H: "Relationship between cyclooxygenase-2 and nuclear receptor PPAR as a target against lifestyle-related diseases (Invited speaker)", Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, Tainan (Taiwan), 2006.11.
  37. Inoue H: "Possible linkage between "French Paradox" and PPAR (Poster presentation, selected)", 20th IUBMU 2006, Kyoto (Japan), 2006.6.
  38. Ben Ammar Y, Takeda S, Hisamitsu T, Mori H, Wakabayashi S: "Crystal structure of an essential cofactor CHP2 complexed with the cytosolic region of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB congress, Kyoto Japan, 2006.6.
  39. Ben Ammar Y, Takeda S, Hisamitsu T, Mori H, Wakabayashi S: "Crystal structure reveals the mechanism for high specific interaction between CHP and NHE family and its role in pH regulation", EABS&BSJ(East Asian Biophysics Symposium & Annual Meeting of the Biophysical Society Japan), Okinawa, 2006.11.
  40. Igarashi T, Araki S, Mori H, Takeda S: "ADAMs' architecture revealed by VAPs: Molecular mechanism of ectodomain shedding by ADAMs", EABS&BSJ(East Asian Biophysics Symposium & Annual Meeting of the Biophysical Society Japan), Okinawa, 2006.11.
  41. 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 mechanism", EABS&BSJ(East Asian Biophysics Symposium & Annual Meeting of the Biophysical Society Japan), Okinawa, 2006.11.
  42. Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Kamioka Y,

Mori H, Mochizuki N: "Endophilin BAR domain uses two mechanisms to drive membrane curvature (ポスター)", 20th IUBMU (International Congress of Biochemistry and Molecular Biology), 京都, 2006.6.

43. Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N: "Endophilin-A1 BAR Domain Uses Two Mechanisms to Drive Membrane Curvature (ポスター)", American Society of Cell Biology, San Diego, 2006.12.

#### (5) ナノ構造に基づく医用材料の開発

##### ① 論文発表

(研究業績「欧文」)

##### 【原著】

1. Nakamura N, Nagira T, Tsuchiya T: Remarkable Cytotoxicities and the Suppression of Netin Gene Expression by Biodegradable Oligomers and their Catalysts in Normal Human Astrocytes. Submitting.
2. Li Y, Tsuchiya T, Sawada R, Nagashata-Ishiguro M, Yang J, Ito T, Nagira T: The effect of sulfated hyaluronan on TGF- $\beta$ 2 expression involved in the cardiac tissue development and remodeling. Tissue Engineering, Submitting.
3. Nagira T, Matthew SB, Yamakoshi Y, 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.
4. Nagira T, Nagahata-Ishiguro M, Tsuchiya T: Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression. Biomaterials, 28(5): 844-850, 2007.
5. Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T: Synthesis of novel  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties. J. Artificial organs., 2006 (in press).
6. Usami M, Mitsunaga K, Nakazawa K: Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. Toxicology In Vitro, 2006 (in press).
7. Tamai M, Nakaoka R, Isama K, Tsuchiya T: Novel Calcium Phosphate Ceramics: The Remarkable Promoting Action on the Differentiation of the Normal Human Osteoblasts. Key Engineering Materials, 309-311(1): 97-100, 2006.
8. Nakaoka R, Tsuchiya T: Enhancement of Differentiation and Homeostasis of Human Osteoblasts by Interaction with Hydroxyapatite in Microsphere Form. Key Engineering Materials, 309-31(2): 1293-1296, 2006.
9. Nakaoka R, Hsiung S, DJ. M: Regulation of chondrocyte differentiation via co-culture with osteoblasts. Tissue Engineering, 12(9): 2425-2433, 2006.
10. Li Y, Nagira T, Tsuchiya T: The effect of hyaluronic acid on insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap-junctional intercellular communications. Biomaterials, 27(8): 1437-1443, 2006.
11. Nakazawa K, Ohno Y: Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. Eur J Pharmacol, 2005 (in press).
12. Tamai M, Nakaoka R, 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 Bio Ceramics Research (5th Asian Bio Ceramics Symposium, ABC2005), 5: 158-161, 2005.
13. Nakazawa K, Yamakoshi Y, Tsuchiya T, Ohno Y: Purification and aqueous phase atomic force



- microscopic observatio of recombinant P2X receptor. *Eur J Pharmacol*, 518: 107-110, 2005.
14. Nakazawa K, Ohno Y: Characterization of voltage-dependent gating of P2X2 receptor/channel. *Eur J Pharmacol*, 508(1-3): 23-30, 2005.
  15. Nakaoka R, Ahmed S, Tsuchiya T: Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 74A (2): 181 - 186, 2005.
  16. Nagira T, Matthew SB, Yamakoshi Y, Tsuchiya T: Enhancement of gap junctional intercellular communication of normal human dermal fibroblasts cultured on polystyrene dishes grafted with poly-N-isopropylacrylamide. *Tissue Eng*, 11(9-10): 1392-1397, 2005.
  17. Nagahata M, Nakaoka R, Teramoto A, Abe K, Tsuchiya T: The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*, 26(25): 5138-5144, 2005.
  18. Isama K, Tsuchiya T: Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets. *Key Engineering Materials*, 288-289(9): 409-412, 2005.
  19. 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.
  20. Tsuchiya T: A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *Tissue Engineered Medical Products*: 254-261, 2004.
  21. 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.
  22. 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(1): 29-35, 2004.
  23. Nakazawa K, Ohno Y: Desensitization of P2X2 receptor/channel pore mutants. *Eur J Pharmacol*, 495(1): 27-33, 2004.
  24. Nagahata M, Tsuchiya T, Ishiguro T, Matsuda N, Nakatsuchi Y, Teramoto A, Hachimori A, Abe K: A novel function of N-cadherin and Connexin43: marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed to sulfated hyaluronan. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(3): 603-611, 2004.
  25. Matsuoka A, Tsuchiya T: Gene expression changes in BALB/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane films. *J Biomed Mater Res A*, 68(2): 376-382, 2004.
  26. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, Ito Y: Modulation of voltage-gated Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> current by 4-hydroxynonenal in dentate granule cells. *Biol Pharm Bull*, 27(2): 174-179, 2004.
  27. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, Ito Y: Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci Lett*, 356(1): 25-28, 2004.
  28. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Ohno Y, Ito Y: 4-Hydroxynonenal modulates the long-term potentiation induced by L-type Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> channel activation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett*, 370(2-3): 155-159, 2004.
  29. Ahmed S, 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.
  30. Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T: A novel function of connexin 32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. *Biochem Biophys Res*

Commun, 307(1): 80-85, 2003.

31. 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, 2003.
32. Sumide T, Tsuchiya T: Effects of multipurpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 64B (2): 57-64, 2003.
33. Park JU, Tsuchiya T: Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact lens. *Animal cell Technology*, 13: 505-509, 2003.
34. Nakaoka R, Tsuchiya T, Nakamura A: Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J Biomed Mater Res A*, 64(3): 439-446, 2003.
35. Isama K, Tsuchiya T: Enhancing effect of poly (L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 24(19): 3303-3309, 2003.

(研究業績「和文」)

【原 著】

1. 山越葉子, 中澤憲一, 土屋利江: 原子間力顕微鏡, 特集号 分子イメージングー現状と 展望, 日本臨床, 2006. 印刷中.
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の分子機構. 生体物理刺激と生体反応 (Ed by 大森豊明), フジテクノシステム, 東京, 2004.
4. 土屋利江: バイオマテリアルの安全性について 組織工学用材料を中心として. 日本再生歯科医

学会誌, 2: 1-8, 2004.

【総 説】

1. 山越葉子: 単分子アノマニピュレーションを旨と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, 11(2): 169-177, 2003.

② 学会発表

1. Nakaoka R, Tsuchiya T: "Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form", *Bioceramics* 18, Kyoto, 2005.12.
2. Tamai M, Nakaoka R, Isama K, Tsuchiya T: "Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts", *Bioceramics* 18, Kyoto, 2005.12.
3. Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T: "Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics", *Bioceramics* 18, Kyoto, 2005.12.
4. Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T: "*In vitro* study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs various kinds of calcium phosphate ceramics", *Asian Bioceramics Symposium*, Hokkaido, 2005.10.
5. Nagira T, Nagahata M, Tsuchiya T: "Enhancement of cell differentiation in Normal Human Epidermal Keratinocytes and Human Mesenchymal Stem Cells by the anionic-modified hyaluronan", 第3回ナノテクノロジー総合シンポジウム(JAPAN NANO 2005), 2005.2.
6. Nishikawa K, Tominaga N, Otomo R, Yamakoshi Y: "Polyphosphate Metabolism in *Chlamydomonas acidophila* in Phosphate-limited Conditions under Heavy Metal (Cd) Stress", The 2003 Annual meeting of the American Society of Plant Biologists,

- Honolulu, 2003.7.
7. Nishikawa K, Tominaga N, Yamakoshi Y, Otomo R: "Change of Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in *Chlamydomonas acidophila*", The 10<sup>th</sup> International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas, Vancouver, 2002.6.11-16.
  8. 中岡竜介, Hsiong S, Mooney D, 土屋利江: "骨芽細胞と軟骨細胞との共培養による骨-軟骨複合組織の再生に関する研究", 第9回日本組織工学会, 京都, 2006.9.
  9. 佐藤薫, 大野泰雄, 中澤憲一: "エストロゲンは歯状回顆粒細胞からのBDNF releaseをPKA依存的に促進する", 第79回日本薬理学会年会, 2006.3.
  10. 中澤憲一, 山越葉子, 土屋利江, 大野泰雄: "原子間力顕微鏡観察によるP2X2受容体が孔形成タンパク質であることの確認", 第79回日本薬理学会年会, 2006.3.
  11. 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, 2005.12.
  12. 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, 2005.11.
  13. 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, 2005.3.
  14. 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, 2005.3.
  15. 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, 2005.3.
  16. 山越葉子, 甲斐陽子, 宮島敦子, 土屋利江: "フラレーン(C<sub>60</sub>)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, 2003.3.27-29.
  17. 中岡竜介, Hsiong S, 土屋利江, Mooney DJ: "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, 2004.11.
  18. 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, 2004.11.
  19. 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, 2005.11.
  20. 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, 2005.9.
  21. 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, 2005.3.
  22. 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, 2004.12.
  23. 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, 2004.8.11.
  24. 土屋利江: "医療機器としての人工臓器の開発", みらいせん展健康系イベントシンポジウム, 2004.8.7.
  25. 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, 2004.6.

- |  |   |
|--|---|
| <p>26. 矢上健, 配島由二, 土屋利江, 他: "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, 2003.10.23-25.</p> <p>27. 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, 2004.5.</p> <p>28. 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, 2003.12.16-17.</p> <p>29. 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, 2003.6.12-13.</p> | <p>方法</p> <p>10. Docket No.19296: Materials for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing materials for repairing biological tissues.</p> <p>11. 11・270.081: Materials for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing materials for repairing biological tissues.</p> <p>② 実用新案登録<br/>なし</p> <p>③ その他<br/>なし</p> |
|--|---|

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

盛 英三:

1. 国際特許出願PCT/JP00/07882:核酸含有複合体
2. 特願平11-187091:X線診断システム
3. 特願2005-19802:Mono-layered mesenchymal stem cells

土屋利江:

1. 特願 2001-311484: ギャップ機能亢進剤
2. 特願 2001-311485: ギャップ機能抑制剤
3. 特願 2003-8855: ギャップ機能抑制剤
4. 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
5. 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
6. 特願 2004-330417: 生体組織補填材および生体組織補填体
7. 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
8. 特願 2005-126591: 生体組織補填材の製造方法
9. 特願 2005-294058: 生体組織補填材とその製造

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長 望月直樹

**研究要旨：**血管発生時には、管腔構造を形成しない血管内皮細胞がまず整列しその後内皮細胞内部に管腔構造が形づくられることが報告された。この細胞内の形態変化、細胞膜、細胞内器官膜構造を調節する分子群としてBARドメイン構造を有する分子Endophilinの構造を決定し、血管内皮細胞内でイメージングを行った。Endophilinはこれまで報告されていたBARドメインを有するAmphiphysinと同様二量体になりバナナ様構造をとるが、アミノ末端の両親媒性構造、特異な膜挿入構造、安定したBARドメイン自体の構造をとることで膜変形能あるいは曲率センサーとして機能することがわかった。

#### A. 研究目的

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。構造決定とともに分子を生きた細胞内でイメージングして、機能を検討していくことを本研究の目的とする。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。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。

#### B. 研究方法

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ともにクラボウ社のHumedia-2を用いた。

**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。

**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。

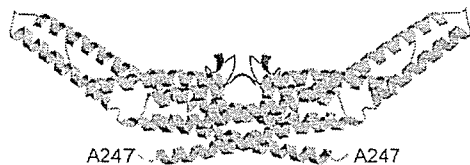
**結晶のX線解析：**Endophilinの結晶はMAD

(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。

## C. 研究結果

### 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BAR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、この部位が脂質二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の構造を延ばした形にすると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起こす

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を延ばした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。

## D. 考察

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索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。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

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)- $\kappa$ 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。

## H. 知的財産権の出願・登録

特になし。

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内カルシウムシグナルの制御を介して引き起こすこと、グリア細胞では、その形態を制御し、スとのコンタクトを増加させることを見出した。2) プロテオソーム経路の制御に重要な役割しているユビキチン水解酵素 UCH-L1 の中性子線解析の結果、このタンパク質が水溶液中で2形成していること、パーキンソン病を引き起こす変異ではこの構造が変化していることを明らかにした。3) これらの神経機能分子が働く細胞の場に関し、より詳細な情報を得るために、電子線ラフィーを用い、細胞膜には細胞膜骨格によって区切られた、分子の移動を制限する 200nm 程小さなコンパートメントが存在することを明らかにした。さらに、免疫ゴールド染色法と組み合りの細胞局在を明らかにした。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。

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複製し、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。



(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 (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うえで、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 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)

#### 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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 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, Bredt 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 36<sup>th</sup> 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