

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ジング学会学術集会. 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 回日本神経科学大会, 京都, 7.19, 2006.

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

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) 法の開発などを行なった。

A. 研究目的

(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

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 (Bioluminescence resonance energy transfer, BRET) 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。

(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

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) 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

FRETやタンパク質立体構造変化を利用した蛍光

指示薬開発が細胞生物学研究の有用なツールとして浸透し始めている。しかし、個々の生命現象を観測するための新たな蛍光指示薬を作製するためには変異導入とスクリーニングによる試行錯誤を行わなければならないのが現状である。当研究ではGFP系のタンパク質を用いた蛍光指示薬について立体構造解析を行い、その情報をもとに作動メカニズムの詳細を明らかにして指示薬設計の指針を作製することを目的とした。その指針を基に、効率的により確実に感度の良い蛍光指示薬のバリエーションを増やすことができるようになり、ライブイメージング手法を用いた病理研究に貢献できることが期待される。

(4) 新規色変換タンパク質の開発とその応用

生体内では集団の中の特定の領域にある分子や細胞がどのような挙動をとるかが理解の鍵を握っている現象がある。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ことによってそのような現象の理解に有用な情報を得ることができる。色変換をすることのできる蛍光タンパク質により特定の部位の分子をマーキングする方法が開発されてい

るが、励起の際に2波長を必要とすることや多量体を形成するなど問題点もある。そこで、蛍光タンパク質2分子間のFRETを利用して1波長で励起することができる蛍光タンパク質指示薬を開発し細胞での応用を行った。

(5) 遺伝子にコードされたRNA 指示薬の開発

従来、個体レベルで遺伝子発現量の定量を行うには、ノザン法やin situハイブリダイゼーションなどが用いられてきた。これらの手法では時空間的情報に乏しく、遺伝子発現のダイナミクスを詳細に解析することは不可能であった。また、これまで用いられてきた核酸とペプチド双方を利用した指示薬では、生体内に安定的に導入することさえ困難であった。本研究では、遺伝子でコードされたRNA指示薬を開発し、生体内で定量的遺伝子発現解析を非侵襲的に行う技術基盤の確立を目的とする。

(6) 光増感タンパク質KillerRedの機能改変

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ために、遺伝子でコードされた光増感物質(KillerRed)を利用する。KillerRedは二量体であり、破壊対象となるタンパク質によっては、機能しないことが示唆される。また、現在のところKillerRedは文字通り赤色のみであるが、GFPのように多色化が進めば、イメージングと操作の技術を組み合わせた技術が大きく発展するものと期待できる。本研究では、KillerRedを遺伝子改変スクリーニングにより、モノマー化と多色化を進め、生体レベルでの操作技術の確立を目指す。

B. 研究方法

(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

遺伝子構築:

大腸菌発現用のベクターとして、pRSETb (Invitrogen) のマルチクローニングサイトの

BamHI-KpnIにVenus蛋白質(Stopコドン無し)を挿入した。KpnI-EcoRIにVenusとフレームを合わせてRlucを挿入した。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。pRSETbで構築したVenus-RlucをBamHI-EcoRIで切り出し、pcDNA3 (Invitrogen) のBamHI-EcoRIサイトに移し、HeLa細胞発現用のベクターを構築した。

スペクトル測定:

大腸菌で合成した、Ni-NTAカラムで精製した蛋白質を蛍光スペクトル測定に用いた。蛍光セルに10 nMの蛋白質を入れ、蛍光分光光度計 F-2500 (Hitachi) を用い励起波長480 nm、蛍光波長500-700 nmでVenusの蛍光スペクトルを測定した。同じサンプルで終濃度2 μ Mのcoelenterazine-h (Promega) を加え、今度は励起光無しで400-700 nmの発光(BRET)スペクトルを測定した。BRETを利用したカルシウム指示薬に関しては同じ測定をカルシウム有り、無しで行った。

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顕微鏡観察に用いた。

顕微鏡観察:

発光およびBRETの顕微鏡観察はNikon TE-2000E 電動顕微鏡、油浸60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20 μ M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。BRETを利用したカルシウム指示薬の観察時にはW-View光学系を用い、1つのCCDカメラの上下をRlucとVenusの2チャンネルに分けて観察を行った。

(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：

リアルタイム共焦点での観察は、Nikon TE-2000E 電動顕微鏡、油浸60倍対物レンズNA1.45、CSU10（横河電機）、冷却CCDカメラImagEM（浜松ホトクニス）、フィルタ切替機MAC5000（LUDL）という構成で行った。サンプルはYC3.6、Venus-Tubulin、ECFP-ERを発現したHeLa細胞を用いた。

(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

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) (Brünger, 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。

(4) 新規色変換タンパク質の開発とその応用

pcDNA3 (Invitrogen) のマルチクローニングサイトにBamHI-EcoRIにmseCFP蛋白質 (C末端13残基欠失、Stopコドン無し) とPA-GFP蛋白質 (N末端13残基欠失) をコードする遺伝子をこの順で挿入したpcDNA3-Phamretプラスミドを構築した。また、

N末端 (HindIII-BamHI) 又はC末端 (EcoRI-XhoI) にシグナル配列を付加した局在化Phamretを発現するプラスミドを構築した。

顕微鏡観察：

共焦点レーザー顕微鏡 Olympus FV-1000 (Olympus)、油浸60倍対物レンズNA1.35で観察を行った。458nmのレーザー光で励起し、405nmの刺激光でPA-GFPを活性化してmseCFPからPA-GFPへのFRETにより色変換させた。色変換前のmseCFPの蛍光を460-510nm、色変換後のPA-GFPの蛍光を510-600nmのレンジで取り込んだ。

(5) 遺伝子にコードされたRNA 指示薬の開発

RNA indicatorの発現ベクター構築：

ECFPとVenusの間に入ファージ由来 nut RNA結合配列 (nut peptide) を挿入したindicatorコンストラクトを、大腸菌発現ベクターpRSETbのBamHI-EcoRIサイトに挿入した。また、FRET効率が最も高い指示薬を検討するために、ECFPのC末端11アミノ酸およびVenusのN末端5アミノ酸の欠失変異体ライブラリー発現ベクターも構築した。これらの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、ゲル濾過カラムにてPBSにbuffer交換した。本精製タンパク質に対し、in vitroにてnut RNAを反応させ、FRET変化率の大きいものを検討した。

(6) 光増感タンパク質KillerRedの機能改変

KillerRedに対する部位特異的変異導入：

KillerRedを大腸菌発現ベクターpRSETbのBamHI/HindIIIに挿入した。KillerRedとGFPやDsRedとの配列比較から、KillerRedが二量体形成すると考えられるA/B、A/C界面を推定し、両界面に部位特異的変異を導入した変異体KillerRed発現ベクターを計18種類構築した。本発現ベクターにて大腸菌JM109 (DE3) を形質転換して蛋白質を発現させた。JM109をソニケーターにて破碎後、粗

精製液をNative-PAGEに供した。

KillerRedに対するランダム変異導入：

従来の蛍光タンパク質とのタンパク質一次構造比較から、KillerRedの発色団が推定できた。67-69番目に位置する発色団に対し、一アミノ酸ずつ部位特異的ランダム変異を導入した。変異導入ベクターにて大腸菌JM109 (DE3)を形質転換して蛋白質を発現させた。三種類の変異体に関してそれぞれ約300コロニーが形成され、すべてのコロニーに関してコロニーの色とSafe Imager (Invitrogen)で蛍光色を確認し、赤色以外を呈するコロニーを探索した。

C. 研究結果

(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レクションした。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線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、二量体形成に参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。

D. 考察

(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

全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。

E. 結論

(1) 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

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 2.4 Å 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究発表

① 論文発表

(研究業績「英文」)

- Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozono 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】

1. 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・バイオイメージ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). *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

【学会発表】

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
- 【招待講演】
1. 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.
 2. Nagai T: "Molecular and cellular imaging of living organisms", 63rd KSBMB Annual Meeting, Seoul (Korea), 2005.5.
 3. 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. 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.
 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: "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.
 7. 永井健治: "蛍光分子を利用して生体機能と情報をはかる", 生命をはかる研究会, 幕張, 2006.8.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Nagai T: "Development of FRET- and BRET-based functional indicators with expanded dynamic range", The 2nd Sapporo Conference, Sapporo (Japan), 2006.10.
 13. 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.
 14. 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.

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: "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.
17. 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」－生体細胞の形態・機能観察から動的診断, 東京, 2006.12.
18. 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.
19. 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.

H. 知的財産権の出願・登録

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

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（循環器系）

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

（研究協力者：若林繁夫、井上裕康、武田壮一、増田道隆）

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う。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

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Ca²⁺、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Ca²⁺結合タンパク質の一つ、カルシニューリン様タンパク質CHPがNHEの活性制御に重要であることを発見した。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

拮抗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指す。

(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。

B. 研究方法

(1) 蛇毒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する。

(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する。

(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する。

(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

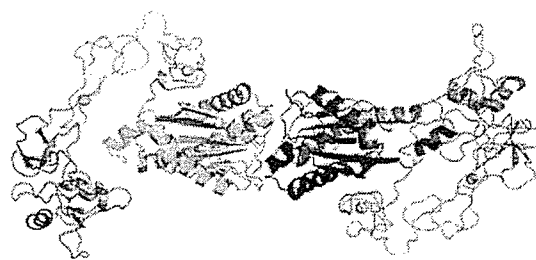
構造を決定する。

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。

(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。



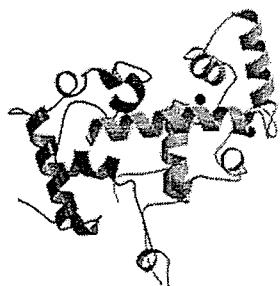
蛇毒出血因子VAP1

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Y³⁺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は複数個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Ca²⁺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。



**Na²⁺/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。

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。

研究協力者：若林繁夫、井上裕康、武田壮一、
増田道隆

F. 研究発表

(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⁺/H⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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, Hayashi 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 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- μ 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- μ 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, Kajiya 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⁺/H⁺ 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 100 μ m-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 Mg²⁺ 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⁺/H⁺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⁺/H⁺ 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.

H. 知的財産権の出願・登録

① 特許取得

②

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

③ 実用新案登録

なし

④ その他

なし