

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14-18年度 総合研究報告書

Vol.1

主任研究者 盛 英三

平成19年 (2007年) 3月

目次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----48
III. 研究成果の刊行物別刷	-----86

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）

総合研究報告書

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：H14-18年度にかけて、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研究項目毎に概説する。

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

血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞の情報伝達系の活性化機構等をイメージングで明らかにする。また、アクトミオシンの科学エネルギー変化と構造変化による力発生機構をイメージングで評価する。

(2) 分子機能イメージング神経系

分子イメージングにより神経機能分子の合成、輸送、および分解の過程を解析し、タンパク質の異常な構造・動態変化の原因を解明する。

(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する。

(4) 分子構造イメージングX線回折

心筋収縮タンパク調節分子、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。

(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）を用いて、受容体タンパク質の構造-機能相関を研究する。
- ② 医用材料の改良を目指して、ナノレベルでの細胞と材料の相互作用検討を試みる。
- ③ 再生医療で使用される新規人工素材を開発する。

B. 研究方法

(1) 分子機能イメージング循環系

FRET技術を応用して、血管内皮細胞で以下のタンパクの活性化を可視化した。【①Ephrin 刺激下の Rap1 の活性化、②創傷治療機転の Rap1 の活性化と微小管の関連、③Rap1 による VE-Cadherin の抑制、④細胞運動時、流れ負荷等の Rho 分子の活性化】

また、ミオシン頭部の構造変化を FRET で検出できることを確認した。

Endophilin の構造と分子機能の関連について分子構造イメージング(盛グループ)と共同研究を行い、Endophilin に特徴的な膜との会合メカニズムを突き止めた。

(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。

(3) 新たなイメージング技術の開発

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。

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。

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

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

ATP 受容体(ラット P2X2 受容体)の cDNA をサブクローニングした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。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、減圧下で乾燥させ、この標本を AMF 観察に供した。

医用グレードで分子量30万のアルギン酸を入手し、このアルギン酸に、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)及びブ

ロリン-ヒスチジン-セリン-アルギニン-アスパラギン (PHSRN) を含むペプチドを化学反応でアルギニン酸に修飾した。RGD 及び PHSRN 修飾アルギニン酸単独、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ニン酸溶液と混合することで、アルギニン酸ゲル内部にそれらの細胞を包含させ、細胞分化に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトやヒトの遺伝子を対象とする研究は行わない。動物実験等に関しては、各施設の実験動物委員会、組み換え DNA 検討委員会等の規則と動物愛護の精神を遵守した。

C. 研究結果

(1) 分子機能イメージング循環系

血管内皮細胞の Ephrin 刺激下で、および単層培養した同細胞の創傷治癒機転として Rap1 の活性化を観察した。創傷治癒機転の Rap1 の活性化は微小管の形成方向と一致し、細胞の運動方向の先端部でみられた。走化性因子(スフィンゴシン 1-リン酸、S1P) 刺激では、遊走先端部で Rap1 が活性化された。Rap1 結合蛋白質である RAPL は微小管に局在した。Rap1-RAPL の結合を阻害する物質の投与で運動の方向性が崩れた。血管内皮細胞に特異的に発現する VE-Cadherin によって形成されるアドヘレンス結合を Rap1 が制御することを明らかにした。細胞運動時に生じる接着斑形成部位で Rho 分子の活性化の活性化がおきることも確認した。流れ負荷時には運動方向の後方で Rho 分子の活性化がおきていた。また、ミオシン頭部の構造変化を FRET で検出できることを確認した。Endophilin の構造と分子機能の関連について分子構造イメージング (盛グループ) と共同研究を行い、Endophilin に特徴的な膜との会合メカニズムを突き止めた。

(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 に関する研究: BDNF はイオンチャンネル型グルタミン酸受容体を神経活動依存的にシナプス部位へ輸送し、サイレントシナプスを活性化することを明らかにした。この他にも、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、その分泌異常がアルツハイマー病と関連していることも明らかにした。

② プリオンタンパク質の細胞内動態の観察: GFP とのキメラタンパク質を用いて、プリオンタンパク質が微小管にそって移動する様子を観察した。プリオンタンパク質 (PrPC) の微小管依存性の細胞内 trafficking を観察し、Kinesin 依存性の順行性輸送と Dynein 依存性の逆行性輸送を明らかにした。電子線トモグラフィーによる細胞膜直下の細胞骨格系の 3次元画像: 本方法によって膜直下の細胞骨格に囲われたナノスケールの構造単位を確認することができた。プリオンタンパク質とクロイ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の解明に重要で、創薬研究にも繋がる。

③ パーキンソン病治療薬の開発: 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。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。in silico のバーチャルスクリーニングを行い、パーキンソン病治療薬のリード候補を 2種類同定した。

(3) 新たなイメージング技術の開発

励起光を必要としない、生物発光及び BRET (Bioluminescent resonance energy transfer) を利用した動物個体での機能イメージング技術開発に

取り組み、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。

次に、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を目指して1分子GFP系蛍光指示薬について、その立体構造データを基にした合理的なバイオセンサー設計を行った。さらに、光照射による生体機能操作法の開発を目指して、CALI (chromophore-assisted laser inactivation) 法を開発した。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等も行った。

(3) 分子構造イメージングX線回折

心筋収縮タンパク調節分子の構造解析として、トロポニン (Tn) のコアドメイン 2 種について、2.6 および 3.3Å 分解能で結晶構造を得た。得られた成果を Nature 誌に発表した。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)。CHP2/NHE1 複合体を 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 (Ben Ammer Y, et al. Embo J)。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。BAR ドメイン構造 (Bin-Amphiphysin-Rvs) を有する Endophilin 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 (Masuda et al. Embo J)。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も、結晶構造を明らかにした。プロスタグランジン関連タンパク FLAP を大腸菌発現系にて発現させて精製し、通常の結晶化を実施した。

(4) ナノ構造に基づく医用材料の開発

ATP 受容体タンパクの発現と精製を行い、水中におけるタンパク質の形状を原子間力顕微鏡観察により解明した。最終年度ではタンパク質の基板上への固定法を検討し、また、作動薬と遮断薬の形状に与える差異を明らかにした。機能ペプチドを導入した材料は、mRNA レベルで細胞機能に影響を与え、細胞分化を促進すること、その細胞機能への影響にはナノレベルの間隔でペプチドが存在することが一因であることを明らかにした。多糖官能基を導入した材料は従来にないメカニズムにおいて mRNA レベルで細胞機能に影響を与えることを明らかにした。再生医療において重要な間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に注目し、ナノレベルのイメージング技術を用いて骨の再生機構を明らかにした。また、この知見に基づき、骨組織再生用の新しいセラミックス無機材料を合成し、骨芽細胞の増殖分化を促進する新規材料を開発し、新規なスキャホールドとしての可能性が示唆された。

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。我々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た。

H18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。この構造的特徴として、① 2 量体の中心に appendage 様構造を持つ、② N 末端に両親

媒性 helix をもつ（世界で始めて構造が見えた。）、③ BAR 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 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た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。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を見出した。これに相関したタンパク質の高次構造変化が見出されたことにより、発症型の構造を正常型あるいは、低発症型に変化させることが創薬の標的になると考え、その薬物候補のスクリーニングした結果、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

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、そのど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。

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。

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

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。

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。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増強され、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。

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。

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。

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。

E. 結論

(1) 分子機能イメージング循環系

FRET 法により情報伝達分子の活性化を可視化することができた。また、ミオシン頭部の構造変化の検出にも有効であった。細胞膜曲率変化を誘導する分子 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

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。

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。

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

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。

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。

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。

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ヒ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, 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.
 21. Setsuie R, Kabuta T, Wada K: Does proteasome inhibition decrease or accelerate toxin-induced dopaminergic neurodegeneration? *J Pharmacol Sci*, 97(3): 457-460, 2005.
 22. Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M: A truncated

- tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci*, 25(6): 1343-1353, 2005.
23. Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, Adalbert R, Wagner D, Grumme D, Osaka H, Conforti L, Arnhold S, Addicks K, Wada K, Ribchester RR, Coleman MP: The slow Wallerian degeneration gene, *Wlds*, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain*, 128(Pt 2): 405-416, 2005.
 24. Manago Y, Kanahorim Y, Shimada A, Sato A, Amano T, Sato-Sano Y, Setsuie R, Sakurai M, Aoki S, Wang Y, Osaka H, Wada K, Noda M: Potentiation of ATP-induced currents due to the activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1. *J Neurochem*, 92(5): 1061-1072, 2005.
 25. Kwon J, Mochida K, Wang YL, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, Wada K: Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol Reprod*, 73(1): 29-35, 2005.
 26. Kusumi A, Suzuki K, Kondo J, Morone N, Umemura Y: Protein-Lipid Interactions in the Formation of Raft Microdomains in Biological Membranes. *Protein Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks* (Ed by Tamm LK), Wiley-VCH, Germany, 2005.
 27. Hachiya NS, Yamada M, Watanabe K, Jozuka A, Ohkubo T, Sano K, Takeuchi Y, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K: Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neurosci Lett*, 374(2): 98-103, 2005.
 28. Hachiya NS, Watanabe K, Kawabata MY, Jozuka A, Kozuka Y, Sakasegawa Y, Kaneko K: Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposits in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 327(3): 894-899, 2005.
 29. Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M: Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell*, 9(3): 389-402, 2005.
 30. Arimura N, Menager C, Kawano Y, Yoshimura T, Kawabata S, Hattori A, Fukata Y, Amano M, Goshima Y, Inagaki M, Morone N, Usukura J, Kaibuchi K: Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol Cell Biol*, 25(22): 9973-9984, 2005.
 31. Wang YL, Takeda A, Osaka H, Hara Y, Furuta A, Setsuie R, Sun YJ, Kwon J, Sato Y, Sakurai M, Noda M, Yoshikawa Y, Wada K: Accumulation of beta- and gamma-synucleins in the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1-deficient gad mouse. *Brain Res*, 1019(1-2): 1-9, 2004.
 32. Tremblay P, Ball HL, Kaneko K, Groth D, Hegde RS, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB, Safar JG: Mutant PrPSc conformers induced by a synthetic peptide and several prion strains. *J Virol*, 78(4): 2088-2099, 2004.
 33. Kwon J, Wang YL, Setsuie R, Sekiguchi S, Sato Y, Sakurai M, Noda M, Aoki S, Yoshikawa Y, Wada K: Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testis. *Am J Pathol*, 165(4): 1367-1374, 2004.
 34. Kwon J, Wang YL, Setsuie R, Sekiguchi S, Sakurai M, Sato Y, Lee WW, Ishii Y, Kyuwa S, Noda M, Wada K, Yoshikawa Y: Developmental regulation

- of ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod*, 71(2): 515-521, 2004.
35. Kishida H, Sakasegawa Y, Watanabe K, Yamakawa Y, Nishijima M, Kuroiwa Y, Hachiya NS, Kaneko K: Non-glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrPSc replication in vitro. *Amyloid*, 11(1): 14-20, 2004.
 36. Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K: Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. *Microbiol Immunol*, 48(12): 985-994, 2004.
 37. Harada T, Harada C, Wang YL, Osaka H, Amanai K, Tanaka K, Takizawa S, Setsuie R, Sakurai M, Sato Y, Noda M, Wada K: Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo. *Am J Pathol*, 164(1): 59-64, 2004.
 38. Hagino Y, Kariura Y, Manago Y, Amano T, Wang B, Sekiguchi M, Nishikawa K, Aoki S, Wada K, Noda M: Heterogeneity and potentiation of AMPA type of glutamate receptors in rat cultured microglia. *Glia*, 47(1): 68-77, 2004.
 39. Hachiya NS, Watanabe K, Yamada M, Sakasegawa Y, Kaneko K: Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(4): 802-807, 2004.
 40. Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Microtubules-associated intracellular localization of the NH₂-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(3): 818-823, 2004.
 41. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 320(4): 1271-1276, 2004.
 42. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Sasaki H, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly folded and misfolded substrates in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(1): 339-344, 2004.
 43. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Jozuka A, Tsukita S, Kaneko K: Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: implication for an alternative function of Dld2p. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(1): 78-82, 2004.
 44. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein J, Lynn BC, Wang YL, Osaka H, Wada K, Butterfield DA: Proteomic analysis of brain proteins in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse, a syndrome that emanates from dysfunctional ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L-1, reveals oxidation of key proteins. *J Neurochem*, 88(6): 1540-1546, 2004.
 45. Bonin M, Poths S, Osaka H, Wang YL, Wada K, Riess O: Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Mol Brain Res*, 126(1): 88-97, 2004.
 46. Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, Yanagisawa T, Kato Y, Sato K, Takano K, Sakasegawa Y, Kaneko K: Stimulation of cellular prion protein expression by TSH in human thyrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 305(4): 1034-1039, 2003.
 47. Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y: Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophys J*, 85(2): 1176-1185, 2003.

48. Sekiguchi S, Yoshikawa Y, Tanaka S, Kwon J, Ishii Y, Kyuwa S, Wada K, Nakamura S, Takahashi K: Immunohistochemical analysis of protein gene product 9.5, a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, during placental and embryonic development in the mouse. *Exp Anim*, 52(4): 365-369, 2003.
49. Sakakibara A, Hattori S, Nakamura S, Katagiri T: A novel hematopoietic adaptor protein, Chat-H, positively regulates T cell receptor-mediated interleukin-2 production by Jurkat cells. *J Biol Chem*, 278(8): 6012-6017, 2003.
50. Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet*, 12(16): 1945-1958, 2003.
51. Ohkubo T, Sakasegawa Y, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Absence of association between codon 129/219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan (reply 555). *Ann Neurol*, 54(4): 553-554, 2003.
52. Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang YL, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K: Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Commun*, 304(1): 176-183, 2003.
53. Michishita M, Nakamura S, Sakakibara I, Ono F, Fujimoto K, Kamiya K, Ishii Y, Hayashi K, Yoshikawa Y, Takahashi K: Spontaneous T-cell-rich B-cell lymphoma in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Exp Anim*, 52(4): 339-344, 2003.
54. Korth C, Kaneko K, Groth D, Heye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB: Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8): 4784-4789, 2003.
55. Kohara K, Kitamura A, Adachi N, Nishida M, Itami C, Nakamura S, Tsumoto T: Inhibitory but not excitatory cortical neurons require presynaptic brain-derived neurotrophic factor for dendritic development, as revealed by chimera cell culture. *J Neurosci*, 23(14): 6123-6131, 2003.
56. Itami C, Kimura F, Kohno T, Matsuoka M, Ichikawa M, Tsumoto T, Nakamura S: Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22): 13069-13074, 2003.
57. Hoshino M, Nakamura S: Small GTPase Rin induces neurite outgrowth through Rac/Cdc42 and calmodulin in PC12 cells. *J Cell Biol*, 163(5): 1067-1076, 2003.
58. Hachiya NS, Sakasegawa Y, Kaneko K: Therapeutic approaches in prion disease (Minireview). *J. Health Sci.*, 49: 267-272, 2003.
59. Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: In situ phage screening. A method for identification of subnanogram tissue components in situ. *J Biol Chem*, 277(33): 30382-30387, 2002.
60. Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC: Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20): 13079-13084, 2002.
61. Ohsaki K, Osumi N, Nakamura S: Altered whisker

- patterns induced by ectopic expression of Shh are topographically represented by barrels. *Dev Brain Res*, 137(2): 159-170, 2002.
62. Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S, Kurihara T: Ceramide activates microglia to enhance the production/secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) without induction of deleterious factors in vitro. *J Neurochem*, 80(4): 697-705, 2002.
63. Koshihara M, Nakamura S, Deng C, Rogers LJ: Light-dependent development of asymmetry in the ipsilateral and contralateral thalamofugal visual projections of the chick. *Neurosci. Lett.*, 336: 81-84, 2002.
64. Koshihara M, Kikuchi T, Yohda M, Nakamura S: Inversion of the anatomical lateralization of chick thalamofugal visual pathway by light experience. *Neurosci. Lett.*, 318: 113-116, 2002.
65. Koizumi S, Saito Y, Nakazawa K, Nakajima K, Sawada JI, Kohsaka S, Illes P, Inoue K: Spatial and temporal aspects of Ca²⁺ signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes. *Life Sci*, 72(4-5): 431-442, 2002.
66. Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y: Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. *J Biol Chem*, 277(22): 20026-20032, 2002.
67. Hoshino M, Nakamura S: The Ras-like small GTP-binding protein Rin is activated by growth factor stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 295(3): 651-656, 2002.
68. Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K: Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci*, 22(21): 9228-9236, 2002.
69. Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: Two-dimensional electrophoresis/phage panning (2D-PP): a novel technology for direct antibody selection on 2-D blots. *J Biochem (Tokyo)*, 132(2): 245-251, 2002.
70. Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB: Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, 412(6848): 739-743, 2001.
71. Laws DD, Bitter HM, Liu K, Ball HL, Kaneko K, Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE: Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20): 11686-11690, 2001.
- 【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」)
- 【原著】
1. Nakada C, Morone N, Kusumi A: [Membrane skeleton: interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 51: 672-682, 2006.
- ② 学会発表

1. 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, 2006.7.19.
2. 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.
3. 大平耕司, 本間光一, 平井啓久, 中村俊:
"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, 2006.7.19-20.
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: "新しい細胞膜構造", 第 15 回日
本バイオイメージング学会学術集会, 盛岡,
2006.
5. Sahara Y, Mori-Kawakami F, Yokosuka M, Kohno T,
Tabira T, Nakamura S: "Human presenilin1 mutant
(L286V) overexpressed transgenic mice show
age-dependent morphological and synaptic changes
in hippocampal CA1 pyramidal neurons", Soc
Neurosci Abstr 30, 2004.
6. Ohira K, Nakamura S: "Dopamine regulates the
differentiation and migration of cortical GABAergic
interneurons", 15th Biennial meeting of the
international society for developmental neuroscience,
Edinburgh, 2004.8.6.
7. Nakata H, Nukada 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.
8. Nakata H, Nakamura S: "Brain-derived neurotrophic
factor regulation of AMPA receptor trafficking",
45th Annual Meeting of the American Society for
Cell Biology, San Francisco USA, 2005.12.
9. Morone N, 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.
10. Morone N, Setou M, Usukura J, Kozuka Y, Yuasa S,
Kusumi A: "Visualization of Cell Membrane
Dynamics by Electron Tomography", The 61st
Annual Meeting of The Japanese Society of
Microscopy, Tsukuba (Japan), 2005.
11. Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai R, Ike H,
Kozuka Y, Yuasa S, Hirata Y, Baba T, Ohno S,
Usukura J, Kusumi A: "Visualization of the Plasma
Membrane Domain by Electron Computed
Tomography", The 50th Symposium of The Japanese
Society of Microscopy, Fukuoka (Japan), 2005.
12. 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,
2006.
13. Morone N, Fujiwara T, Kasai R, Kozuka Y, Yuasa S,
Usukura J, Kusumi A: "Cell Membrane
Compartmentalization as Visualized by
Freeze-Fracture and Deep-Etching Electron
Tomography", 45th Annual Meeting of the American
Society for Cell Biology, San Francisco (USA),
2005.12.
14. Itami C, Nakamura S: "BDNF affects intrinsic
properties of layer 4 neurons in mice barrel cortex

during cortical development", the 2004 Annual Neuroscience Meeting: 836 Neurotrophins and Receptors IV 47, San Diego, 2004.10.23-27.

15. Itami C, Kimura F, Tsumoto T, Nakamura S: "BDNF-dependent unmasking of silent synapses in developing mouse barrel cortex", Society of Neuroscience Meeting, satellite symposium, New Orleans, 2003.11.6.

(2) 新たなイメージング技術の開発

① 論文発表

【原著】

1. 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.
2. Ikeda M, Ikeda-Sagara M, Okada T, Clement P, Urade Y, Nagai T, Sugiyama T, Yoshioka T, Honda K, Inoue S: Brain oxidation is an initial process in sleep induction. *Neuroscience*, 130(4): 1029-1040, 2005.
3. Kohyama J, Tokunaga A, Fujita Y, Miyoshi H, Nagai T, Miyawaki A, Nakao K, Matsuzaki Y, Okano H: Visualization of spatiotemporal activation of Notch signaling: live monitoring and significance in neural development. *Dev Biol*, 286(1): 311-325, 2005.
4. Lin X, Varnai P, Csordas G, Balla A, Nagai T, Miyawaki A, Balla T, Hajnoczky G: Control of calcium signal propagation to the mitochondria by inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins. *J Biol Chem*, 280(13): 12820-12832, 2005.
5. Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H: Genetic Probes for Calcium Dynamics. *Imaging Neurons-A Laboratory Manual* (Ed by Yuste R, et al.), CSHL PRESS, 2005.
6. Takao K, Okamoto K, Nakagawa T, Neve RL, Nagai T, Miyawaki A, Hashikawa T, Kobayashi S, Hayashi Y: Visualization of synaptic Ca²⁺

/calmodulin-dependent protein kinase II activity in living neurons. *J Neurosci*, 25(12): 3107-3112, 2005.

【総説】

1. Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H: *Engineering Fluorescent Proteins, Microscopy Techniques, Adv Biochem Engin / Biotechnology*, (Ed by Rietdorf J), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 95: 1-15, 2005.

(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, 宮脇敦史: GFP を利用した蛍光バイオセンサーの作成法と生体機能の可視化, *遺伝子医学MOOK別冊/分子生物学実験シリーズ*, 図・写真で観るタンパク質構造・機能解析実験実践ガイド, メディカル ドウ: 173-182, 2005.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 永井健治: 電顕に期待するもの . *細胞工学*, 25: 1192-1193, 2006.
6. 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.
7. 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. Nagai T: "Introduction of Nikon imaging center at Hokkaido University", Luncheon seminar of the 7th RIES international symposium on 命, Hokkaido University (Sapporo), 2006.12.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Nagai T: "Development of FRET- and BRET-based functional indicators with expanded dynamic range", The 2nd Sapporo Conference, Sapporo (Japan), 2006.10.
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. Nagai T: "Engineering green fluorescent proteins to visualize biological functions", Symposium on New Frontier in Live Cell Imaging, Yang Ming University (Taipei), 2006.7.
11. Nagai T: "Application of GFP-based indicators to visualize biological functions", Japan-UK Symposium on Promotion of Regional Partnership on Nanotechnology Development, Hokkaido University (Sapporo), 2005.10.
12. Nagai T: "Functional imaging of living cells by the GFP-based indicators", LSM CLUB 2005, China, 2005.9.
13. Nagai T: "Real-time detection of signal transduction pathway in living cells", American Academy of Nanomedicine First Annual Meeting, Johns Hopkins University (USA), 2005.8.
14. Nagai T: "Molecular and cellular imaging of living organisms", 63rd KSBMB Annual Meeting, Seoul (Korea), 2005.5.
15. 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.
16. 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.
17. 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, 「フォトリック結晶の光産業技術への展開」, 仙台, 2006.12.
18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 永井健治: "個体レベルの機能イメージングを目指して", 第111回日本解剖学会層階シンポジウム, 北里大学(相模原), 2006.3.
 26. 永井健治: "形態形成原理の解明を目指して-バイオイメージングによるアプローチ", 第28回日本分子生物学会バイオテクノロジーセミナー, JALリゾートシーホークホテル福岡(福岡), 2005.12.
 27. 永井健治: "Engineering green fluorescent proteins to visualize and manipulate biological functions", 浜松医科大学 COE 国際シンポジウム, 浜松医科大学(浜松), 2005.8.
 28. 永井健治: "ニポウ式共焦点による FRET イメージング", 日本顕微鏡学会, つくば, 2005.6.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 永井健治: "蛍光タンパク質を用いた生体機能イメージングの現状と展望", 日本病理学会, パシフィコ横浜(横浜), 2005.4.
- (3) 分子機能イメージング循環系
・分子構造イメージング×線回折
- ① 論文発表
- 【原著】
1. 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. 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.
 3. Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Oga wa 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.
4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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).
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Fukuhra S, Sakurai A, Yamagishi A, Sako K, Mochizuki N: Vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by a small GTPase, Rap1. J Biochem Mol Biol, 39(2): 132-139, 2006.
 18. 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.
19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. Linghu H, Tsuda M, Makino Y, Sakai M, Watana be T, Ichihara S, Sawa H, Nagashima K, Mochizuki N, Tanaka S: Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS. *Oncogene*, 2006.
 30. Maeng YS, Min JK, Kim JH, Yamagishi A, Mochizuki N, Kwon JY, Park YW, Kim YM, Kwon YG: ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF-kappaB-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. *Cell Signal*, 18(7): 994-1005, 2006.
 31. 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.
 32. Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N: