

期、および後期細胞株を示している。それぞれに時期では、左から野生株、R406W 変異株、P301L 変異株である。図の縦軸は、異方性を示している。中期細胞の異方性は、拘束のない GFP 分子の異方性 0.29 に近い値を示している。

(4) 神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関に関する研究

胎生 15.5 日齢のマウス胎仔の脳内に子宮内電気穿孔法を用いて EGFP 発現ベクターを導入し、生後 14 日齢および 30 日齢のマウス大脳皮質における EGFP 陽性ニューロンを観察した。その結果、特定のニューロンにおけるシナプスならび樹状突起・軸索の伸長を確認した。さらに、30 日齢のマウスにおいて電子顕微鏡により EGFP シグナルを有する細胞体、神経突起、およびシナプスの微細構造が観察された。以上のことから、本法の有効性が示された。

次にシナプスの構造活性相関を解析するため、シナプス機能分子である Shank3 の発現を RNA 干渉法を用いて抑制し、シナプス形成についてコントロールとの比較検討を試みた。HEK293 細胞を用いた強制発現系において Shank3 の発現抑制効果が確認された 2 種類の shRNA を子宮内電気穿孔法を用いて胎生 15.5 日齢のマウス胎仔の脳内に導入後、生後の脳発達過程における Shank3 の発現をウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果、胎仔期での shRNA 導入では、生後の Shank3 の発現を十分抑制できていないことが判明した。そこで、新生児の脳内に shRNA

を導入するため、シンドビスウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を検討した。生後 1 日および 7 日の新生児の脳内に EGFP を発現する組み換えシンドビスウイルスを接種し、免疫染色法を用いて経時的に EGFP の発現を検討した。その結果、接種 1 日後のニューロンにおいて EGFP の発現が観察された。EGFP の発現は少なくとも接種 2 週間後においても確認された。

(5) 光照射による生体機能操作法の開発に関する研究 光増感タンパク質 KillerRed の単量体化および波長変異体の開発

野生型 KillerRed のタンパク質界面に複数のアミノ酸変異を導入することで単量体化 KillerRed (mKillerRed) を開発することに成功した。さらに、mKillerRed の発色団を構成するアミノ酸残基に変異を導入したところ橙色蛍光 (Ex=455nm, Em=544nm) を発する mKiller-0 が得られた。さらに発色団と相互作用するアミノ酸に変異を導入することで、吸収・蛍光極大はさらに短波長側へ移行し、緑色蛍光 (Ex=439nm, Em=496nm) を発する mKiller-G を得ることができた。mKiller-0, mKiller-G はともに一重項酸素放出量が 2-3 倍程度に増加し、FITC に匹敵する光増感活性を有することが明らかになった。mKillerRed または mKiller-G を哺乳類細胞のミトコンドリアに発現させ光照射してからアポトーシスが誘導されるまでの時間を

比較したところ、mKillerRed は 120 分以上かかったのに対し、mKiller-G は 10 分以内にアポトーシス様の形態変化が観察された。

光変換タンパク質 Phamret の開発

Phamret は試験管内において光刺激前後で 458 nm 励起による蛍光色がシアン色から緑色へと変化した。Phamret を哺乳類培養細胞に発現させると細胞質と核に凝集塊をつくることなく均一に分布し 405 nm の光刺激によって蛍光色が変化した。さらに、Phamret の C 末端側にクロマチン構成タンパク質の 1 つである Histone2B を融合 (H2B-Phamret) させて HeLa 細胞内で発現させ、核内に発現した H2B-Phamret を細胞分裂前に半円状に光変換させてタイムラプスイメージングを行ったところ、分裂後においても核の半分の領域に光変換した H2B-Phamret が分布しているパターンが保存される様子を観察することができた。

細胞内生体分子の拡散係数測定法 FDAP の開発

光活性化の過程は非常に速く起こるためこれまでに用いられていた光褪色を利用した FRAP 法での刺激時間の 1/100 以下である 0.25 msec という短い時間で刺激を行うことができる。その結果、刺激中の分子の拡散による影響が少なく従来法で信頼できる範囲とされていた $10 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ を超える溶液中での速い拡散 Phamret の速い拡散 ($49.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{sec}$) について正確に拡散定数を求めることができた。また、生細胞内で発現する Phamret の細胞内での拡散について細胞周

期の各段階で拡散定数を求めてその違いを明らかにすることができた。

群青色蛍光タンパク質 Sirius の開発

mSECFP-W66F に対する 4 回に及ぶ変異導入の結果、元の Y66F 変異体と比較して 80 倍の明るさで群青色の蛍光を発する蛍光タンパク質を得ることに成功した。本タンパク質を 37°C で培養した大腸菌内で発現させると EBFP 比で 2 倍明るい蛍光を放つことから、夜空で最も明るい青色の恒星にちなみ、Sirius と命名した。Sirius の吸収および蛍光極大はそれぞれ 355nm および 424nm で、EBFP の 380nm および 448nm よりもさらに短波長であり、今までに報告された蛍光タンパク質変異体の中で最も短波長の吸収・蛍光極大を有する。驚くべきことに Sirius は、光褪色に非常に強い耐性 (EBFP の 60 倍) を持ち、プロトンに対する感受性 (pH 感受性) が全く無く、極めて安定な蛍光を発することが明らかとなった。

Dual FRET による多機能イメージング法の開発

Sirius の蛍光スペクトルは CFP の吸収スペクトルと完全にオーバーラップすることから、Sirius は CFP をアクセプターとする理想的な FRET ドナーであることが判明した。また、UV 領域で励起可能であり、緑色の蛍光を発する Sapphire と呼ばれる GFP 変異体と、Sirius は、同じ波長で同時に励起することが可能であることが分かった。こうした知見を踏まえて、Sirius と CFP の FRET ペアに加え、Sapphire と DsRed の FRET ペア

を併用することで、1 波長励起 4 波長測光による Dual FRET を試みた。その結果、HeLa 細胞のアポトーシス過程における Ca^{2+} の上昇とカスパーゼ-3 の活性化を同時に可視化することに成功した。

高性能 FRET プロブの作製法の確立

蛍光タンパク質の二量体化を抑制・促進する何れの界面変異も、FRET プロブのダイナミックレンジを低下させた。こうした傾向は、今回解析した全ての FRET プロブにおいて見られ、また生細胞内においても *in vitro* の実験結果と同様の結果が得られたことから、FRET プロブの一般的な設計・作成指針となることが明らかとなった。

化学発光性 Ca^{2+} 指示薬 BRAC の開発

作成した化学発光性 Ca^{2+} プロブ変異体の中から最も大きなダイナミックレンジ (60%) を持つものを見出し BRAC と名付けた。BRAC の Ca^{2+} 解離定数 (Kd 値) は $1.9 \mu\text{M}$ であり、生理的 pH に対しては安定な応答を示すことが明らかとなった。また、を HeLa 細胞に発現させ、 $10 \mu\text{M}$ のヒスタミン刺激を加えることで、数十秒周期での Ca^{2+} 振動を確認する事に成功した。

D. 考察

(1)
新しい画像処理プログラムによる神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発(2)

結論と併せて記述した。

(2)

タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

ウエスタンブロットの解析結果は、培養中期の細胞でリン酸化タウの断片が、不溶性分画に存在したことから、リン酸化されて微小管から遊離したタウ分子がオリゴマー化を開始し、それが核となって繊維化の過程が進行し始めたことを示唆している。これに対応して可溶性分画においても初期あるいは中期にタウの断片化が認められる。蛍光異方性の計測でも、培養中期の細胞において、異方性が自由な GFP 分子の値に近いことから、ホモフレットが生じ難い状態に変化していることを示している。初期には、不溶性のタウが検出されていないため、初期に異方性が低いのは、微小管に正常な形で結合しているものを考えられる。一方、後期では、不溶性のタウが検出されているため、微小管から遊離したタウが凝集し、繊維化の過程が進行しているものと思われる。これを裏付けるためには、免疫電子顕微鏡などによって、タウの集合状態を解析する必要がある。また、今回、細胞の局所における蛍光異方性の解析には成功していないが、顕微鏡の改良を行って、細胞の部位ごとの異方性を計測することにより、フィブリル化の初期過程の細胞内制御機構に関する有意義な知見が得られるものと期待される。

(4)
神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関に関する研究

ニューロンにおいて、Shank3は強くユビキチン化されプロテオソーム系の分解を受けやすいため、ターンオーバーが早いことが推定されている。従って、SHANK3 shRNAの導入が胎生15.5日齢のマウス胎仔では、生後10日以降のシナプス形成期においては十分量のshRNAが存在せず、Shank3の発現を抑制できないと考えられた。一方、ニューロンに親和性の高いシンドビスウイルスを用いたEGFP発現実験から、生後発達過程の脳内へのウイルス接種でニューロンにおいてEGFPの発現が確認できた。ウイルスの脳内接種は生後の様々な時期で可能であることから、今後本ウイルスベクター発現系を用いることで、発達過程の脳における特定のニューロンの可視化ならびにShank3の発現抑制に基づいた構造活性相関の解析が期待できる。

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究
光増感タンパク質 KillerRed の単量体化および波長変異体の開発

これまでに報告例がない光照射依存的に活性酸素を産生する蛍光タンパク質の緑およびオレンジ蛍光変異体の開発に成功したことで、一つの細胞内における複数種のタンパク質の機能を光照射により不活性化させることが可能になった。これにより動的なタンパク質間ネットワークの機能連関が解析可能になると期待される。

光変換タンパク質 Phamret の開発

動かない分子から極めて速く拡散する分子まで広範な動態解析が可能になった。一方で、Phamret の分子量は 60,000 もあることから、融合したタンパク質の動態が定量化されたとしても、慎重な議論が必要になる。このような条件を十分考慮に入れたとしても、様々なシグナル配列やタンパク質と融合させて動態解析を行うことにより、多くの生命現象 *g* あをタンパク質の動態という観点から理解されるようになると期待される。

細胞内生体分子の拡散係数測定法 FDAP の開発

FDAP 法を用いた解析により従来 FCS 法で行われてきた速い動きから FRAP 法で行われてきた遅い動きまで幅広い速度領域の拡散を精度良く解析することができた。FDAP の測定系には FCS で用いるような特別な装置を必要としないので本法は通常の細胞観察の顕微鏡システムを用いて FCS レベルに至る速い拡散を調べることができる新しいツールとしてタンパク質動態解析の研究に貢献することが期待される。

群青色蛍光タンパク質 Sirius の開発

これまで困難を極めた産生条件下での安定な蛍光観察を行うことが Sirius によって初めて実現した。今回観察を行ったファゴソームのみならず、リソソーム、ゴルジ体、分泌顆粒内で働くタンパク質の動態を Sirius と融合させることで観察が行えると期待される。但し、Sirius の蛍光強度は GFP や YFP に比べると以前低いため、アミノ酸置換によるさらなる改善が必要である。

Dual FRET による多機能イメージング法の開発

Dual FRET の手法を用いることにより、生細胞内の同箇所で行われる複数の生理現象をリアルタイムで観察することが可能になると期待される。しかし、今回の技術は2つの現象を可視化するのが限界であり、3つ以上の生理機能を同時に可視化するためにはさらなる技術改変或いは新技術の創出が必要である。

高性能 FRET プローブの作製法の確立

FRET プローブのアクセプターに円順列変異体を用いると FRET 効率が上昇することが従来から知られていたが、この理由として双極子モーメントを回転させることによる方向因子の最適化が考えられていた。しかし、こうした円順列変異体はドナーとアクセプターの位置関係をアンチパラレルにすることと、上記の界面変異の解析結果とから、蛍光タンパク質ドメインの効率的な二量体化が指示薬のダイナミックレンジを決定する大きな要因であることが示された。さらに、オワンクラゲ由来以外の蛍光タンパク質において高い FRET 効率を達成出来ていない原因として、これらの蛍光タンパク質の二量体形成が抑制されていることが上げられる。

化学発光性 Ca^{2+} 指示薬 BRAC の開発

FRET を用いた Ca^{2+} プローブである YC3.60 内の CFP を化学発光タンパク質 *Renilla Luciferase* (RLuc) へ置換することで BRET をベースとする化学発光性 Ca^{2+} プローブへと変化させ、そのダイナミックレンジを最大

化するために BRET アクセプターである Venus の様々な円順列変異体を導入後、それらの性能を試験管内および細胞内で評価した。

高性能 FRET プローブの作製法の確立

FRET プローブのアクセプターに円順列変異体を用いると FRET 効率が上昇することが従来から知られていたが、この理由として双極子モーメントを回転させることによる方向因子の最適化による影響が考えられていた。しかし、こうした円順列変異体はドナーとアクセプターの位置関係をアンチパラレルにすることと、上記の界面変異の解析結果とから、蛍光タンパク質ドメインの効率的な二量体化が FRET プローブのダイナミックレンジを決定する大きな要因であることが示された。さらに、オワンクラゲ由来以外の蛍光タンパク質において高い FRET 効率を達成出来ていない原因として、これらの蛍光タンパク質の二量体形成が抑制されていることが推測された。

化学発光を原理とする機能プローブの開発

BRACはこれまで開発されてきたFRETを原理とする Ca^{2+} 指示薬(YC3.1等)と同程度の K_d 値をもち、生理的に安定した応答を示すことから、細胞内や組織内の Ca^{2+} 濃度測定に応用可能であることが示唆された。また、これまで発光性の Ca^{2+} 指示薬はAequorinや分割Rluc、Gluc等があったが、それらは繰り返しの Ca^{2+} 濃度上昇に追従できなかったため、 Ca^{2+} 振動のような長時間に渡る周期的変動を測定す

るのは困難であった。BRACでは発光性でありながら、数十秒周期の Ca^{2+} 振動を観察することができ、これまでに無い画期的な化学発光性 Ca^{2+} プローブとして有用である。特に、自家蛍光が強い植物における Ca^{2+} 観察に威力を発揮するものと期待される。

E. 結論

(1)

新しい画像処理プログラムによる神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発(2)

当該年度では、筋・神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所での構造解析を行うことを目的とし、画像解析アルゴリズムの開発を完成させた。画像データの定量的解析のためには、様々な画像について頑強でかつ汎用的な画像処理が望まれた。このため、mathematical morphology理論を拡張した画像処理理論を用いて解析アルゴリズムを構築した。

2つの課題のうち、①細胞局所構造を捉えた電子顕微鏡像に適した画像処理法の開発では、まず、フリーズフラクチャーによる膜内粒子の電子顕微鏡解析を行った。さらに、培養細胞の蛍光顕微鏡像を対象として蛍光スポットの自動抽出・解析手法を確立し、細胞(膜)内での蛋白質の局在や発現量などを定量的に解析する手法を開発した。

さらに、②複合体を構成する特定のタンパク質分子の同定では、セプチンタンパク質の電子顕微鏡シミュレーション像の作成と

マッチング手法の開発を行った。また、電子顕微鏡で捉えられた、Poly-Q鎖の凝集構造の解析も行った。さらに③細胞骨格の分岐度の定量的解析では、細胞分化に伴う細胞骨格の形態変化を定量的に解析する手法を開発した。

これまでの研究において、解析の基礎となるアルゴリズムやその実装ツールを確立し、上記の課題を達成することができた。本研究で開発してきた画像解析手法は任意の試料や画像データに対して適用が可能である。タンパク質の細胞内局所構造を多角的に解析することを可能にする、有用な手法であると考えられる。

(2)

タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

タウタンパク質の細胞内におけるオリゴマー化の過程を蛍光異方性の計測によって解析し、繊維形成に先立ってタウタンパク質が一過的に遊離状態となることが示唆された。これは、タウタンパク質がリン酸化などにより、微小管から遊離し、オリゴマー化を開始した状態を反映しているものと考えられ、本計測法の有効性が示唆された。

(3)

神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

1) 異常伸長 PolyQ 蛋白質は、モノマーレベルで β シート構造への異常コンフォメーシ

オン変移を生じて、アミロイド線維状凝集体を形成する。

2) 異常伸長 PolyQ 蛋白質モノマーは、 β シート構造への異常コンフォメーション変移を経て細胞毒性を獲得する。

3) FCS は、細胞内での異常伸長 PolyQ 蛋白質のオリゴマー形成の検出に有用である。

4) QBP1 は異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート変移・オリゴマー形成を阻害して神経変性を抑制する。

5) 表面プラズモン共鳴法は様々な PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長 PolyQ 鎖への結合特異性と結合親和性を評価でき、PolyQ 病の治療薬開発に向けた有用なスクリーニング法である。

6) 家族性パーキンソン病 PARK5 の発症に UCH-L1 構造変化がもたらす他蛋白質との凝集性亢進に関わる可能性を示した。

7) UCH-L1 について 1 種の活性増強薬と 6 種の阻害薬の同定に成功した。

(4)

神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関に関する研究

神経回路網構築の基盤となるシナプスの構造活性相関を解析するため、子宮内電気穿孔法やシンドビスウイルスベクター発現系を用いて脳発達期の特定のニューロンに EGFP を発現させ、組織レベルでシナプスや神経回路形成の可視化技術を構築した。さらに、電子顕微鏡を用いて、EGFP 発現を指標に可視化した特定ニューロンのシ

ナプスの微細構造の解析に成功した。

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

光増感タンパク質 KillerRed の単量体化および波長変異体の開発

光照射依存的に活性酸素を産生する単量体型増感型蛍光タンパク質 mKillerRed およびその緑およびオレンジ蛍光変異体の開発に成功した。これらは mKillerRed に比べ活性酸素の放出量が 2-3 倍増加しており、細胞内でも強い光毒性を示した。

光変換タンパク質 Phamret の開発

光刺激により蛍光波長が長波長シフトする蛍光タンパク質 Phamret により 1 波長励起 2 波長測光で生細胞内での光変換と速い動きをする分子のタイムラプス計測を行うことに成功した。

細胞内生体分子の拡散係数測定法 FDAP の開発

光変換タンパク質を用いて速い動きから遅い動きまで幅広い速度レンジの拡散を測定することのできる FDAP 法を開発した。

群青色蛍光タンパク質 Sirius の開発

オワンクラゲ GFP を遺伝子改変することで、これまでに報告がない 424nm に蛍光極大を有する群青色蛍光タンパク質の開発に成功した。

Dual FRET による多機能イメージング法の開発

Sirius-CFP および Sapphire-dsRed の 2 つの FRET ペアを用いる事で、2 つの生理機能

を同一の細胞内で観察する手法を開発した。

高性能 FRET プローブの作製法の確立

FRET プローブの高性能化には、ドナー・アクセプタ界面の最適化による適度な二量体化が重要であり、これは FRET プローブの設計・作成において一般的な指針であることが明らかになった。

化学発光性 Ca²⁺指示薬 BRAC の開発

化学発光性 Ca²⁺プローブ BRAC を開発した。これにより、自家蛍光を誘発する励起光を照射することなく細胞内の Ca²⁺動態を長時間に渡り観察することができるようになった。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

(1)

新しい画像処理プログラムによる神経変性疾患に関わるタンパク質の細胞内局所構造解析法の開発

①論文発表

- 1) Morone N, and Aoyama K. Structural Analysis of Cell Membranes by Small Convergence Angle HAADF-STEM Tomography. *Kenbikyō*, 44(4):257-261, 2009.
- 2) Nishikawa T, Iwakiri N, Kaneko Y, Taguchi A, Fukushima K, Mori H, Morone N, Kadokawa J. Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae. *Biomacromolecules*. 2009;10(8):2074-85.
- 3) Kobayashi T, Morone N, Kashiya T,

Oyamada H, Kurebayashi N, Murayama T. Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research. *PLoS ONE*. 2008;3(12):e3822 19048102.

4) Kusumi A, Umemura Y, Morone N, and Fujiwara T. Paradigm Shift of the Molecular Dynamics Concept in the Cell Membrane: High-Speed Single-Molecule Tracking Revealed the Partitioning of the Cell Membrane. (Anomalous Transport: Foundations and Applications, edited by Rainer Klages, Günter Radons, Igor M. Sokolov). 2008; 545-574.

5) Morone N, Nakada C, Umemura Y, Usukura J, Kusumi A. Three-dimensional molecular architecture of the plasma-membrane-associated cytoskeleton as reconstructed by freeze-etch electron tomography. *Methods Cell Biol*. 2008; 88 :207-36.

6) 木森義隆、諸根信弘、片山栄作. *Mathematical morphology*に基づくバイオイメージからの構造情報の抽出と解析. *顕微鏡*. 第44巻. 2008; 1-6.

7) Yao I, Takagi H, Ageta H, Kahyo T, Sato S, Hatanaka K, Fukuda Y, Chiba T, Morone N, Yuasa S, Inokuchi K, Ohtsuka T, Macgregor GR, Tanaka K, Setou M. SCRAPPER-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):943-57.

- 8) Kawahara G, Okada M, Morone N, Ibarra CA, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I. Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease. *Neurology*. 2007 Sep 4;69(10):1043-9.
- 9) Moritake S, Taira S, Ichiyanagi Y, Morone N, Song SY, Hatanaka T, Yuasa S, Setou M. Functionalized nano-magnetic particles for an in vivo delivery system. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007 Mar;7(3):937-44.
- 10) 諸根信弘, 臼倉治郎. 急速凍結デープエッチング法による細胞膜のナノドメイン解析. *細胞工学* 2007. Vol.26 No.7, 822-826.
- 11) 諸根信弘, 臼倉治郎, 楠見明弘. 電子線<フリーズレプリカ>トモグラフィー法による細胞膜骨格の3次元イメージング. *顕微鏡* 2007. Vol.42 No.3, 150-154.

②学会発表

- 1) Morone N. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the interface by freeze-etch electron tomography. Progress Report Symposium of Membrane Mechanism Project (2005-2010), January 29, 2010. ICORP, JST, Kyoto University.
- 2) Kimori Y and Morone N. Structural analysis for cell membrane domain by electron microscopic image processing. The 13th International Membrane Research Forum The 6th iCeMS International Symposium. January 28, 2010.
- 3) Morone N. Biological electron microscopy and rapid-freezing. 53rd Symposium of Japanese Society of Microscopy, October 31, 2009. Tokyo Institute of Technology. (invited)
- 4) Morone N. Freeze-etch Electron Tomography & Mathematical Morphological Analysis for the Plasma Membrane Interface. 21st Annual Meeting of the KSMCB, October 16, 2009. COEX, Seoul Korea. (invited)
- 5) 木森義隆、諸根信弘. 細胞膜につくられたコンパートメント構造：フリーズフラクチャー解析と画像認識技術による可視化. 日本顕微鏡学会第65回学術講演会. 5. 27. 2009. 仙台.
- 6) 木森義隆、湯浅茂樹、諸根信弘. 数理形態学に基づいた新しい画像処理理論：細胞内タンパク質の定量分布解析へ. 日本顕微鏡学会第65回学術講演会. 5. 27. 2009. 仙台.
- 7) Morone N, Fujiwara TK, Kasai RS, Yuasa S, Usukura J and Kusumi A. Electron Freeze-Replica Tomography for the Plasma Membrane Interface. The Asia-Pacific Microscopy Congress, Jeju Korea 2008. 招待講演
- 8) 諸根信弘. カベオラ・膜骨格の相互作用解析：フリーズエッチ電子線トモグラフィー. 日本顕微鏡学会第52回シンポジウム, 千葉大学2008. 招待講演
- 9) Morone N, Wakui F, Kohno T, Yamamura T, Satoh J, and Yuasa S. GPI-Anchored Protein And Membrane Structure Inside Human Neural Progenitors. The 5th International Forum on Oxidative Stress an

d Aging. Ancona Italy 2008. 招待講演

10) 諸根信弘. Freeze-etch electron tomographyによる細胞膜骨格の3次元構造解析～新しい細胞膜構造モデル～東京農工大学.2008. 招待講演

11) 諸根信弘. 細胞膜直下から可視化された「新しい細胞膜構造」: Freeze-etch electron tomographyによる膜骨格の3次元構造. 第4回認定特定非営利活動法人IIRS(総合画像研究支援)セミナー. 日本女子大学.2008. 招待講演

12) Morone N. Electron freeze-replica tomography correlated with a single-molecule imaging: a structural analysis for the plasma membrane. The First iCeMS International Symposium/The Eleventh MEMBRANE RESEARCHFORUM. Kyoto Japan, 2008. 招待講演

13) Morone N, Wakui F, Kohno T, Yamamura T, Satoh J, and Yuasa S. (2008) GPI-Anchored Protein And Membrane Structure Inside Human Neural Progenitors. *The 5th international Forum on Oxidative Stress and Aging.* Ancona Italy. 招待講演

14) Usukura J, Watanabe T, Morone N, and Kaibuchi K. (2008) 3D architecture of membrane undercoat and spatial specificity of actin binding proteins revealed by immuno-freeze-etching and cryo-electron microscopy. *XIII international congress of histochemistry and cytochemistry (IHC 2008)* "Imaging of cell dynamics" Gdansk Poland

d. 招待講演

15) Morone N. (2008) Analysis of interaction between caveolae and membrane skeleton: electron freeze-etch tomography. The 52nd symposium of the Japanese Society of Microscopy, Chiba Japan. 招待講演

16) Morone N, Fujiwara TK, Kasai RS, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A. (2008) Three dimensional interplay of the membrane skeleton with the plasma membrane as visualized by freeze-etch electron tomography. *The 46th annual meeting of the Biophysical Society of Japan,* Fukuoka Japan. 招待講演

17) Morone N, Wakui F, Kohno T, Kimori Y, Yuasa S. (2008) GPI-anchored Protein's complex and membrane skeleton in human neural progenitors as revealed by electron microscopy. The 48th annual meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco USA.

18) High-density caveolar formation just beneath the plasma membrane of the fully differentiated adipocyte as revealed the freeze-etch electron microscopy. (2008) The 48th annual meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco USA.

19) Morone N, Fujiwara TK, Kasai RS, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A. (2009) Asia-pacific congress on electron tomography. Brisbane Qld, Australia.

20) N. Morone, T. K. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, and A. Kusumi. Electron tomography reve

als the plasma membrane compartmentalization as its three dimensional interplay between membrane and cytoskeletal systems.

The American Society for Cell Biology a& European Cytoskeleton Forum "Dynamic interplay between cytoskeletal and membrane systems", Dijon France, June 28, 2007.

21) N. Morone, J. Satoh, F. Wakui, T. Yamamura, S. Yuasa. GPI-anchored protein localizes with 14-3-3 and HSP60 on the mitochondria in human neural progenitors. American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting, Washington DC, December 5, 2007.

22) N. Morone. Caveolae and actin-based membrane skeleton in adipocyte differentiation of the mouse embryonic fibroblast The First iCeMS International Symposium/The Eleventh MEMBRANE RESEARCH FORUM. Kyoto Japan, February 22, 2008.

23) N. Morone. The structural interplay between the plasma membrane and cytoskeletons in neural systems: a deep-etch EM research. The 38th Seiriken/Sokendai International Conference, "Stock and flow of functional molecules in synapse" Okazaki Japan, March 19, Japan.

24) N. Morone, T. K. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, and A. Kusumi. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton just beneath the plasma membrane by electron tomography. *Biochemistry and Molecular Bio*

logy 2007, Yokohama Japan, December 11, 2007.

25) 諸根信弘. 細胞膜インターフェイスの構造組織化. 日本顕微鏡学会生体構造解析分科会2007年度研究討論会VII. 独立行政法人産業技術総合研究所 臨海副都心センター. 晴海 東京. 2007.12.20.

26) 諸根信弘. 電子線<フリーズレプリカ>トモグラフィ法で細胞膜構造を3次元解析する. 日本顕微鏡学会関東支部講演会. 東京. 2008.03.08.

27) 和久井文、湯浅茂樹、諸根信弘. ディープエッチング法による内分泌細胞膜のカベオラドメイン解析. 日本顕微鏡学会関東支部講演会. 東京. 2008.03.08.

(2)

タウパチーにおける細胞レベルでのオリゴマー可視化法の開発

①論文発表

1) Chronic Stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. Kunimoto S, Nakamura S, Wada K, Inoue T. *Exp Neurol*. 2010 Jan;221(1):175-185. Epub 2009 Nov4.

2) Sexually dimorphic effect of the Val66Met Polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: new data and meta-analysis.

Fukumoto N, Takashi F, Kamboh MI, Tsai S-J, Matsushita S, Nacmias B, Comings D, Arboleda H, Ingelsson M, Hyman B, Akatsu

H, Nishimura A, Zata M, Mattila K, Goto Y, Asada T, Nakamura S, Kunigi H. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan5;153B(1):235-42.

3) Balanced expression of various TrkB receptor isoforms from the Ntrk2 gene locus in the mouse nervous system. Kumanogoh H, Asami J, Nakamura S, Inoue T. Mol Cell Neurosci. 2008 Nov;39(3):465-77. Epub 2008 Aug 9.

4) Brain-Derived Neurotrophic Factor regulates AMPA Receptor Trafficking to Postsynaptic Densities via IP3R and TRPC Calcium Signaling. Nakata H, Nakamura S. FEBS Lett. 2007 May 15;581(10):2047-2054. Epub 2007 Apr 25.

5) Brain-derived neurotrophic factor regulates the maturation of layer 4 fast-spiking cells after the second postnatal week in the developing barrel cortex. Itami C, Kimura F, Nakamura S. J. Neurosci. 2007 Feb 28;27(9):2241-52.

6) Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. Ohira K, Funatsu N, Homma KJ, Sahara Y, Hayashi M, Kaneko T, Nakamura S. Eur J. Neurosci. 2007 Jan;25(2):406-16.

②学会発表

PC12細胞内でのtauオリゴマー化過程の定量法開発. 石崎美由紀、山本英明、諸根信弘、小柴満美子、中村俊、1P-0642, p193. 第32回日本分子生物学会年会、12月9日、2

009年、横浜。

(3)

神経変性疾患病因関連蛋白質の細胞内構造・機能解析

①論文発表

1) 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).

2) Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., Wada, K. Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. Bioorgan. Med. Chem 15, 6810-6818, (2007)

3) Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., Wada, K. Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. **Hum. Mol. Genet.**, 17, 1482-1496, 2008.

4) Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K. Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. **J. Biol. Chem.**, 283 23731-23738 2008

5) Kabuta T. Wada, K. Insights into links between familial and sporadic Parkinson's

disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. **Autophagy**, 4, 827-829, 2008

6) Yasuda, T., Nihira, T., Ren, Y.R., Cao, X.Q., Wada, K., Setsuie, R., Kabuta, T., Wada, K., Hattori, N., Mizuno, Y., Mochizuki, H. Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression mouse model of Parkinson's disease. **J Neurochem.** 108, 932-944, 2009

7) Setsuie, R., Sakurai, M., SakagUCHi, Y., Wada, K. Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. **Neurochem. Int.**, 54, 314-321, 2009. 2008 Dec 25. [Epub ahead of print]

8) Goto, A., Wang, Y.L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., Wada, K. Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (*gad*) mouse. **Neurochem. Int.**, 54, 330-338, 2009. 2008 Dec 25. [Epub ahead of print] May 2009

9) Kabuta, T., Kinugawa, A., TsUCHiya, Y., Kabuta, C., Setsuie, R., Tateno, M., Araki, T., Wada, K. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 aberrantly interacts with tubulin. **Biochem Biophys Res Commun.** 387, 121-126, 2009.

10) Higashi, S., Moore, D.J., Biskup, S., Yamamoto, R., Minegishi, M., Sato, K., Togo, T., Katsuse, O. UCHikada, H., Furukawa, Y., Hino, H., Kosaka, K., Emson, P.C., Wada, K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Arai, H., Iseki, E.

Localization of LRRK2 to the endosomal-lysosomal compartment in Lewy body disease. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 68, 994-1005, 2009. 2009 Aug 12. [Epub ahead of print]

11) Kunimoto S., Nakamura, S., Wada, K. Inoue, T. Chronic Stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. **Exp. Neurol.**, 221, 175-185, 2010. 2009 Nov 4. [Epub ahead of print]

12) Nagai, Y., Fujikake, N., Popiel, A., Wada, K. Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. **Curr. Pharm. Biotechnol.** 2010 Feb 16. [Epub ahead of print]

②学会発表

1) Kimiwada, T., Sakurai, M., Ohashi, H., Aoki, S., Tominaga, T., Wada, K. Clock genes regulate neurogenic transcription factors and the neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells, Neuro2007, Yokohama, 11 Sep. (2007).

2) Kazunori Hirayama, Shunsuke Aoki, Kaori Nishikawa, Takashi Matsumoto, Keiji Wada. Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds by in silico drug screening. Neuro2007, Yokohama, 11 Sep. (2007)

3) 節家理恵子、古田晶子、和田圭司：ユビキチンC末端加水分解酵素の機能。神経組織の成長・再生・移植研究会第23学術集会。千葉，5.17，2008

- 4) 安田徹¹、和田圭司²、服部信孝¹、水野美邦¹、望月秀樹¹ (¹順天堂大学、²国立精神・神経センター神経研究所) : α -synuclein のドパミン神経毒性に対する UCH-L1 の効果. 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 7. 9, 2008
- 5) 株田智弘¹、節家理恵子¹、三井丈史^{1,2}、衣川亜衣子¹、櫻井省花子¹、青木俊介¹、内田健康²、和田圭司¹ (¹国立精神・神経センター神経研究所、早稲田大学理工学部電気・情報生命工学) : カルボニル化 UCH-L1 とパーキンソン病関連変異型 I93M UCH-L1 に共通した異常な分子的性質. 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 7. 9, 2008
- 6) Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K: Aberrant interaction between familial Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. 第 5 1 回日本神経化学学会大会, 富山, 9. 11, 2008
- 7) Konya, C., Kabuta, T., Kinugawa, A., Wada, K: Decreased secretion of UCH-L1 and SOD1 by the mutations associated with neurodegenerative diseases. 第 5 1 回日本神経化学学会大会, 富山, 9. 11, 2008
- 8) Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid poroxidation. 第 5 1 回日本神経化学学会大会, 富山, 9. 11, 2008
- 9) Suzuki, M., Setsuie, R., Wada, K: Regulation of energy homeostasis by UCH-L1 and UCH-L3. 第 5 1 回日本神経化学学会大会, 富山, 9. 11, 2008
- 10) Nagamine, S., Kabuta, T., Yamamoto, K., Takahashi, A., Wada, K: The de-ubiquitinating enzyme, UCH-L1, and lipid peroxidation. BMB2008, 兵庫, 12. 10, 2008
- 三井丈史、株田智弘、株田千華、内田健康、和田圭司 : UCH-L1 による細胞増殖促進. BMB2008, 兵庫, 12. 11, 2008
- 11) Nagai Y., Okamoto Y., Fujikake N., Popiel H.A., Inui T., Wada K. Surface plasmon resonance as a useful technique for screening for specific polyglutamine aggregation inhibitors. 5th Gordon Res Conf CAG Triplet Repeat Disorders, Waterville Valley, NH, USA, 5.31, 2009
- 12) 和田圭司: 脱ユビキチン化酵素と axonal dystrophy : gad マウス研究からの教訓. 第 41 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、神戸、9. 4, 2009
- 13) Nagai Y., Fujikake N., Popiel H.A., Okamoto Y., Yamaguchi M., Toda T., Wada K. 17-AAG, an HSF1-activator, suppresses polyglutamine- induced neurodegeneration via induction of molecular chaperones. 4th Int Cong Stress Responses in Biology and Medicine, Sapporo, 10.6, 2009
- 14) 永井義隆、藤掛伸宏、ポピエル明子、岡本佑馬、山口政光、戸田達史、和田圭司 : 熱ショック転写因子 (HSF1) 活性剤は分子シャペロン群の発現を誘導し、ポリグルタミン病の神経変性を抑制する. 第 52 回日本神経化

学会，群馬，6. 22，2009

15) 永井義隆、ポピエル明子、藤掛伸宏、村松慎一、戸田達史、和田圭司：凝集阻害ペプチド QBP1 を用いたポリグルタミン病に対する分子標的治療法の開発。第 54 回日本人類遺伝学会，東京，9. 23，2009

(4)

神経回路網構築時のシナプスの構造活性相関に関する研究

1. 論文発表

1) Yamakawa H, Oyama S, Mitsunashi H, Sasagawa N, Uchino S, Kohsaka S, Ishiura S.

(2007) Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin-g2, and the interactions are affected by autism-related mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 41-46.

2) Okamoto N, Kubota T, Nakamura Y, Murakami R, Nishikubo T, Tanaka I, Takahashi Y, Hayashi S, Imoto I, Inazawa J, Hosokai N, Kohsaka S, Uchino S. (2007) 22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A recognizable syndrome?. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 2804-2809.

3) Maekawa T, Namba T, Suzuki E, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S. (2009) NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus. *Neurosci. Res.* 63, 259-266.

4) Namba T, Maekawa T, Yuasa S, Kohsaka S,

Uchino S. (2009) The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in the adult hippocampus. *GLIA* 57, 1082-1090.

5) Namba T, Yabe T, Gonda Y, Ichikawa N, Sanagi T, Hirasawa E, Mochizuki H, Kohsaka S, Uchino S. (2010) PEDF up-regulation induced by memantine, an NMDA receptor antagonist, is involved in the increased proliferation hippocampal progenitor cells. *Neuroscience*, in press.

2. 学会発表

(国内学会)

1) 内野茂夫、福村玲子、田畑秀典、平澤孝枝、服部功太郎、湯浅茂樹、仲嶋一範、高坂新一：大脳皮質形成過程における NMDA 受容体を介した細胞移動の分子基盤、第 30 回日本神経科学学会・第 50 回日本神経化学学会・第 17 回日本神経回路学会 合同大会、横浜、9. 10. 2007.

2) 服部功太郎、内野茂夫、伊早坂智子、高坂新一、八木健、湯浅茂樹：Fyn チロシンキナーゼ活性化を介する抗精神病薬作用機序の解析、第 30 回日本神経科学学会・第 50 回日本神経化学学会・第 17 回日本神経回路学会 合同大会、横浜、9. 10. 2007.

3) 岡村敏行、片山貴博、松田知己、永井健治、木村宏、内野茂夫、高坂新一、南雅文：リアルタイムイメージングを用いた培養海馬切片組織切片におけるミクログリア活性化機構の解析、第 30 回日本神経科学学会・第

- 50回日本神経化学会・第17回日本神経回路学会 合同大会、横浜、9. 10. 2007.
- 4) 岡本伸彦、久保田健夫、細貝昇、内野茂夫：自閉症と SHANK3 異常の関連、第52回日本人類遺伝学会、東京、9. 15. 2007.
- 5) 岡本伸彦、内野茂夫：SHANK3 異常症例の臨床的検討、第50回日本小児神経学会、東京、5. 29. 2008.
- 6) 難波隆志、前川素子、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一：NMDA 受容体阻害剤の成体海馬神経新生に対する影響、第23回神経組織の成長・再生・移植研究会、幕張、5. 17. 2008.
- 7) 難波隆志、前川素子、鈴木恵里、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一：NMDA 受容体阻害剤の成体海馬神経新生に対する影響、第31回日本神経科学会、東京、7. 10. 2008.
- 8) 伊藤雅之、井出秀平、相馬美歩、湯浅茂樹、和賀央子、内野茂夫、高森一乗：MECP2 欠損マウス研究の現状と課題、第3回メチレーションと小児神経学研究会、東京、8. 24. 2008.
- 9) 難波隆志、石龍徳、内野茂夫、高坂新一：FACS を用いた成体海馬におけるニューロン新生の検出方法の開発、第51回日本神経化学会」、富山、9. 11. 2008.
- 10) 権田祐子、田畑秀典、中嶋一範、内野茂夫、高坂新一：マウス前脳における Robo1 の発現様式、第51回日本神経化学会、富山、9. 13. 2008.
- 11) 内野茂夫、和賀央子、岡本伸彦、高坂新一：自閉症患者におけるシナプス機能分子 SHANK3 の遺伝子解析、第51回日本神経化学会、シンポジウム「発達障害の神経化学」、富山、9. 14. 2008.
- 12) 権田祐子、田畑秀典、中嶋一範、内野茂夫、高坂新一：脳発達期のマウス前脳における Robo1 の発現分布様式、第81回日本生化学会・第31回日本分子生物学会年会、神戸、12. 10. 2008.
- 13) 和賀央子、岡本伸彦、後藤雄一、内野茂夫、高坂新一：自閉症患者におけるシナプス機能分子 SHANK3 の遺伝子解析、第81回日本生化学会・第31回日本分子生物学会年会、神戸、12. 11. 2008.
- 14) 難波隆志、前川素子、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一：アルツハイマー病治療薬 Memantine が海馬 Adult neurogenesis に与える2つの影響、第3回神経発生討論会、岡崎、3. 12. 2009.
- 15) 難波隆志、前川素子、湯浅茂樹、内野茂夫、高坂新一：アルツハイマー病治療薬 Memantine の海馬神経前駆細胞に与える影響、第30回神経組織培養研究会、湯河原、3. 15. 2009.
- 16) 前川素子、難波隆志、内野茂夫、高坂新一、吉川武男：NMDA receptor and schizophrenia – from the prespective of

neurogenesis. 第32回日本神経科学大会
シンポジウム、名古屋、9. 16. 2009
17) 難波隆志、前川素子、矢部武士、湯浅茂
樹、内野茂夫、高坂新一：メマンチンにより
発現が亢進する PEDF は成体海馬神経新生の
促進に関与する、第32回日本神経科学大会、
名古屋、9. 16. 2009.

18) 権田祐子、田畑秀典、仲嶋一範、内野茂
夫、高坂新一：軸索ガイダンス分子 Robo1
の脳皮質形成過程における役割、第32回
日本神経科学大会、名古屋、9. 16. 20
09.

19) 和賀央子、岡本伸彦、後藤雄一、内野茂
夫、高坂新一：重度言語障害を呈する自閉症
患者における SHANK3 遺伝子解析、第54回
日本人類遺伝学会、東京、9. 26. 200
9.

20) 権田祐子、関口正幸、田畑秀典、和田圭
司、仲嶋一範、内野茂夫、高坂新一：大脳皮
質錐体細胞の発達段階における
Roundabout1 (Robo1) の役割、第32回日本
分子生物学会、横浜、12. 9. 2009.

21) 和賀央子、岡本伸彦、後藤雄一、内野茂
夫、高坂新一：自閉症関連遺伝子 SHANK3 の
マウス大脳皮質発達過程におけるメチル化
動態解析、第32回日本分子生物学会、横浜、
12. 11. 2009.

22) 難波隆志、服部功太郎、功刀浩、貝渕弘
三、高坂新一、内野茂夫：NMDA 受容体阻害
剤投与による成体海馬での統合失調症脆弱
性因子 DISC1 の発現低下と新生ニューロン

の移動異常、第4回神経発生討論会、岡崎、
3. 19. 2010.

23) 権田祐子、関口正幸、田畑秀典、和田圭
司、仲嶋一範、内野茂夫、高坂新一：大脳皮
質錐体細胞における軸索ガイダンス分子
Roundabout1 (Robo1) の役割、第4回神経発
生討論会、岡崎、3. 19. 2010.

(国際学会)

1) Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Uchino
S., Kohsaka S.: Alzheimer's disease drug
"memantine" promotes neurogenesis and
expansion of progenitor cell pool in adult
mouse hippocampus. Crest Neuroscience
International Symposium. Hippocampal
Neurogenesis: its implication in neural
functions and mental disease. Hyogo, Japan,
6. 2. 2009.

2) Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Uchino
S., Kohsaka S.: Alzheimer's disease drug
"memantine" promotes neurogenesis and
progenitor cell self-renewing in adult mouse
hippocampus. The 22nd Biennial Meeting of
the International Society for
Neurochemistry/Asian Pacific Society for
Neurochemistry joint meeting. Busan, Korea,
8. 24. 2009.

3) Uchino S., Waga C., Okamoto N., Goto Y.,
Kohsaka S.: Novel Mutations in the SHANK3
gene in autistic patients with severe delayed
speech development. The 22nd Biennial
Meeting of the International Society for
Neurochemistry/Asian Pacific Society for

Neurochemistry joint meeting. Busan, Korea,
8. 27. 2009.

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

1. 論文発表

- (1) Saito K, Hatsugai N, Horikawa K, Kobayashi K, Matsu-ura T, Mikoshiba K, Nagai T. Auto-luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca²⁺ imaging at the single cell level. *PLoS ONE*, in press
- (2) Lütcke H, Murayama M, Hahn T, Margolis DJ, Astori S, Borgloh SMzA, Göbel W, Yang Y, Tang W, Kügler S, Sprengel R, Nagai T, Miyawaki A, Larkum ME, Helmchen F, Hasan MT. Optical recording of neuronal activity with a genetically-encoded Ca²⁺ indicator in anesthetized and freely moving mice. *Frontiers in Neural Circuit*, in press
- (3) Hong JH, Min CH, Jeong B, Kojiya T, Morioka E, Nagai T, Ikeda M, Lee K. Intracellular calcium spikes in rat suprachiasmatic nucleus neurons induced by BAPTA-based calcium dyes. *PLoS ONE*, in press
- (4) Kotera I, Iwasaki T, Imamura H, Noji H, Nagai T. Reversible dimerization of *Aequorea victoria* fluorescent proteins increases the dynamic range of FRET-based indicators. *ACS Chem Biol*. 5:215-222, 2010
- (5) Imamura H, Nhat KPH, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl, Acad, Sci. USA* 106:15651-15656, 2009
- (6) Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita H, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A and Takayama S. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiology*, 150: 1322-1334, 2009
- (7) Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K & Nagai T. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature Methods* 6: 351-353, 2009
- (8) 永井健治、小林健太郎「1波長励起 Dual FRETによる生細胞内における複数現象の可視化」*実験医学*、28: 589-598, 2010
- (9) 野地博行、永井健治 生命システムの階層間をまたぐイメージング技術 *蛋白質核酸 酵素*、54 : 1913-1917, 2009
- (10) 堀川一樹、永井健治 細胞結合振動システムを対象にした超高感度大規模イメージング *蛋白質 核酸 酵素*、54 : 1945-1951, 2009
- (11) 永井健治、松田知己 生細胞内でのタンパク質動態測定とその意義 *生物物理*、

- 49 : 181-186, 2009
- (12) 永井健治、松田知己 光スイッチング蛍光タンパク質を用いた生細胞内でのタンパク質動態定量法 日本組織細胞化学会編、組織細胞化学 **2009**, 99-105、2009
- (13) 小寺一平、永井健治 ワンステップ全自動プラスミド構築方法 細胞工学、28 : 402-407, 2009
- (14) 永井健治 光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像観察法 分光研究、58 : 7-9, 2009
- (15) Yamamoto T, Kumagai A, Saito K & Nagai I. Two-photon excitation behavior of thiophene-based oligomers and a polymer. *J Nanosci Nanotechnol.* 9: 670-672, 2009
- (16) Saito K, Kobayashi K, Tani T & Nagai T. A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time imaging system for cellular structure and function. *Cell Struct Funct.* 33: 133-141, 2008
- (17) Kotera I & Nagai I. A high-throughput and single-tube recombination of crude PCR products using a DNA polymerase inhibitor and type IIS restriction enzyme. *J. Biotechnol.* 137: 1-7, 2008
- (18) Matsuda T, Miyawaki A & Nagai I. Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. *Nature Methods* 5:339-345, 2008
- (19) Sunabori T, Tokunaga A, Nagai I, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, Matsuzaki Y, Miyata T & Okano H. Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J Cell Sci.* 121:1204-1212, 2008
- (20) 永井健治 「蛍光タンパク質開発秘話 -Pericam-」 蛋白質 核酸 酵素 53 : 1858-1864、2008
- (21) 永井健治、松田知己 「光変換蛍光タンパク質を用いた生体分子の動態解析法」 実験医学、26 : 156-162、2008
- (22) 松田知己、永井健治 「新規の光変換蛍光蛋白質プローブを用いた生体イメージングと動態解析」 蛋白質 核酸 酵素、53 : 1858-1864、2008
- (23) 松田知己、永井健治 「光活性化・光変換蛍光タンパク質を用いたタンパク質動態解析」 バイオインダストリー、25 : 21-26、2008
- (24) Takemoto K, Kuranaga E, Tonoki A, Nagai I, Miyawaki A, Miura M. Local initiation of caspase activation in Drosophila salivary gland programmed cell death in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 13367-13372, 2007
- (25) Wei C, Nagai I, Wei W, Nemoto T, Awais M, Niwa O, Kurita R and Baba Y. New advances in nanomedicine: diagnosis and preventive medicine. *Med Clin North Am.*, 91, 871-879, 2007
- (26) 永井健治 : 「蛍光イメージング—最近の進

- 歩：回折限界の壁を越える工夫― 病理と臨床、25(6)、p414-519 (2007)
- (27)永井健治：「改変型蛍光タンパク質の利用」、講義と実習 生細胞蛍光イメージング、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、67-78、共立出版、2007
- (28)永井健治、小寺一平：「共鳴エネルギー移動 (FRET) の利用」、講義と実習 生細胞蛍光イメージング、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、110-117、共立出版、2007
- (29)永井健治、齊藤健太：「FRETの測定法と評価」、講義と実習 生細胞蛍光イメージング、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、118-128、共立出版、2007
- (30)齊藤健太、松田知己、原口徳子、永井健治：「FRET」、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、268-277、共立出版、2007
- (31)小寺一平、谷知己、永井健治：「全反射顕微鏡」、講義と実習 生細胞蛍光イメージング、原口徳子、木村宏、平岡泰 編、291-297、共立出版、2007
- (32)竹本研、永井健治、宮脇敦史、三浦正幸：「アポトーシスの検出」、実験が上手くいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方、三輪佳宏編、143-146、羊土社、2007
- (33)谷知己、永井健治：「スパイはひとりで十分」、実験が上手くいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方、三輪佳宏編、147、羊土社、2007
- (34)小寺一平、永井健治：「FRETプローブ」、実験が上手くいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方、三輪佳宏編、158-162、羊土社、2007
- (35)齊藤健太、谷知己、小林健太郎、永井健治：「大口径ファイバー白色光源を用いた高速共焦点顕微鏡の開発と評価」 顕微鏡、(42)、p161-165、2007

2. 学会発表

- (1) Nagai T. "Toward elucidation of biological enigma by genetically-encoded molecular spies" International Symposium on Watching Biomolecules in Action, 2009.12.16 (Senri Life Science Center, Osaka)
- (2) 永井健治 「蛍光タンパク質テクノロジーの展望 ―観て触って探る生命の不思議―」平成 21 年度生理学研究所シナプス研究会「シナプス機能と病態」、2009.12.14 (生理学研究所、岡崎市)
- (3) 小寺一平、岩崎卓也、今村博臣、野地博行、永井健治 「A new way to make your FRET-based indicator more efficient: dimerization interface engineering of fluorescent protein」 第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.9 (パシフィコ横浜、横浜市)
- (4) 永井健治 「蛍光タンパク質性機能プローブの精密設計とバイオイメージングへの応用」 第 7 回脳科学研究教育センターシンポジウム、2009.12.9 (北海道大学、札幌市)