

- (5) S. J. Lee¹, S. V. Alworth, C. Huang, S. Oh, H. Watanabe, K. Saito, K. Horikawa, M. Nomura, T. Tani, T. Nagai "Automated Kinetic Characterization of Intracellular Single Molecule Trafficking" 49th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, 2009.12.5-9 (San Diego Convention Center, USA)
- (6) Takeharu Nagai "Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies" BIT's 3rd Annual World Congress of Gene-2009, 2009.12.4 (Foshan Sansui Golden Sun Hotel, China)
- (7) 永井健治 「FRET 指示薬」 第 14 回細胞生物学ワークショップ、2009.11.24 (北海道大学、札幌市)
- (8) 永井健治 「蛍光タンパク質テクノロジー」 第 14 回細胞生物学ワークショップ、2009.11.22 (北海道大学、札幌市)
- (9) 永井健治 「Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies」 2009 年生物物理・生化学・分子生物学会北海道支部会合同年会、2009.11.13 (北海道大学、札幌市)
- (10) Takeharu Nagai "Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies" Molecular Imaging for Systems Biology, 2009.11.6 (Okazaki Conference Center, Okazaki)
- (11) Tomoki Matsuda, Atsushi Miyawaki, Takeharu Nagai "Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a photoconvertible fluorescent protein Phamret" Fluorescent proteins and biological sensors II, 2009.11.1-4 (Jenelia farm/HHMI, Ashburn(USA))
- (12) 永井健治 「蛍光タンパク質を巧妙に用いた生理機能動態の可視化」 第 47 回日本生物物理学会年会、2009.10.30 (アスティ徳島、徳島市)
- (13) 小寺一平、岩崎卓也、今村博臣、野地博行、永井健治 「The effects on the dynamic range of FRET indicators by the mutations in the dimerization interface of fluorescent proteins」 第 47 回日本生物物理学会年会、2009.10.30 (アスティ徳島、徳島市)
- (14) 植松利亮、小寺一平、斎藤健太、初谷紀幸、堀川一樹、永井健治 「Toward long time physiological imaging of plant cells with reduced autofluorescence by using a Ca²⁺ indicator composed of a red-shifted FRET pair」 第 47 回日本生物物理学会年会、2009.10.30-11.1 (アスティ徳島、徳島市)
- (15) 永井大輔、谷知己、永井健治 「Correlation among dipole orientation, FRET efficiency and dynamic range of FRET-based indicators」 第 47 回日本生物物理学会年会、2009.10.30-11.1 (アスティ徳島、徳島市)

- (16) Takeharu Nagai "Toward elucidation of dynamic living system by hierarchical molecular imaging" 82th Annual meeting of JBS, 2009.10.21 (Kobe Convention Center, Kobe)
- (17) Takeharu Nagai "Vivid visualization of biological functions using fluorescent protein-based molecular spies" 91th G-COE seminar, 2009.10.20 (Kyusyu University, Fukuoka)
- (18) Takeharu Nagai "Toward understanding biological enigma by genetically-encoded molecular spies" Hokkaido University-Academia Sinica Joint Symposium, 2009.10.7 (Hokkaido University, Sapporo)
- (19) 永井健治 「GFP は何故光るか？-機能指示薬作成法と生理機能の可視化/フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したバイオセンサー作成法」第5回ライブセルイメージング講習会、2009.10.6 (産業技術総合研究所つくばセンター、つくば市)
- (20) 永井健治 「Visualization of Cellular Functions and Dynamics by the Smart Use of Fluorescent Proteins」30th iCeM Seminer、2009.9.28 (京都大学吉田キャンパス、京都市)
- (21) 永井健治 「新規蛍光タンパク質の開発とバイオイメージングへの応用」BioOpto Japan 2009、2009.9.17 (パシフィコ横浜、横浜市)
- (22) 永井健治 「Vivid visualization of biological functions using fluorescent protein-based molecular spies」非常勤講師、2009.9.16 (熊本大学、熊本市)
- (23) 永井健治 「Deciphering enigma of biological functions by genetically-encoded molecular spies」東大医科研大学院セミナー「分子と生命現象の可視化」、2009.9.14 (東京大学医科学研究所、東京都港区)
- (24) 永井健治 「Toward elucidation of biological enigma by genetically-encoded molecular spies and snipers」第2回 スイス-日本 生命化学シンポジウム、2009.9.12 (東京大学駒場キャンパス、東京都目黒区)
- (25) 永井健治 「Perspective of bioimaging and biomanipulation techniques」International Symposium of post-silicon materials and devices research alliance project International Symposium "Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins"、2009.9.8 (京都大学芝蘭会館、京都市)
- (26) 永井健治 「Molecular Nano-Mechanics & Bio-Mechanics Research Group(G3)」International Symposium of post-silicon materials and devices research alliance project、2009.9.6 (大阪大学銀杏会館、吹田市)
- (27) 永井健治 「革新的蛍光タンパク質技術による生命現象の解明に向けて」非常勤

- 講師、2009.9.3 (東京大学医学部、東京都港区)
- (28) Ippei Kotera, Takeharu Nagai "Utilization of type IIS restriction enzyme for single-molecule DNA sequencing and in vitro DNA recombination" The EMBO Meeting 2009, 2009.8.29-9.1 (Amsterdam RAI, Amsterdam)
- (29) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「蛍光・化学発光タンパク質の基礎と応用」第18回浜松医科大学メディカルホトニクス・コース、2009.8.25 (浜松医科大学、浜松市)
- (30) Takeharu Nagai "Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies" Inviting Talk, 2009.8.19 (NIH, Bethesda(USA))
- (31) Takeharu Nagai "Rational design of photoswitchable fluorescent probes and its use for bioimaging" 238th American Chemical Society Meeting, 2009.8.18 (Washington Convention Center, Washington DC(USA))
- (32) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」光イメージング若手の会「光塾」第1回、2009.8.15-16 (未来 ICT 研究センター、神戸市)
- (33) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」光イメージング若手の会「光塾」第1回、2009.8.15-16 (未来 ICT 研究センター、神戸市)
- (34) Kazuki Horikawa, Takeharu Nagai "Constructive role of noise in self-organized pattern formation in social amoeba" The Third q-bio Conference on Cellular Information Processing, 2009.8.8 (John's College, Santa Fe(USA))
- (35) 永井健治「Deciphering Enigma of Biological Function by Genetically-encoded Molecular Spies」光イメージング国際シンポジウム、2009.8.1 (京王プラザホテル、札幌市)
- (36) 永井健治「蛍光タンパク質テクノロジーの最前線」第34回組織細胞化学会講習会、2009.7.29 (徳島大学長井記念ホール、徳島市)
- (37) 永井健治「レーザーが拓く新たな蛍光タンパク質技術」第2回「レーザーをライフサイエンスに橋渡しする」専門委員会、2009.7.24 (北海道大学、札幌市)
- (38) Kazuki Horikawa, Takeharu Nagai "Ca²⁺ dynamics in large-scale cellular networks visualized by ultra-sensitive Ca²⁺ probe, "cameleon Nano" 2009 Gordon Research Conferences calcium signaling, 2009.7.16 (Il Ciocco Hotel, Lucca(Italy))
- (39) Takeharu Nagai "Tune-up of FRET-based functional indicators for high sensitive bioimaging" Application Trends of

- Live Cell Imaging、2009.7.17 (Ewha Woman University, Soul(Korea))
- (40) Takeharu Nagai “Deciphering enigma of biological function by a genetically-encoded fluorescent indicator” Gordon Research Conferences (Fertilization & Activation Of Development) , 2009.7.13 (the Holderness School in Plymouth, NH(USA) ,Plymouth)
- (41) 永井健治 「階層間分子イメージングによる動的な生命システム解明へのアプローチ」非常勤講師、2009.7.3 (長崎大学医学部良順会館ボードインホール、長崎市)
- (42) 永井健治 「タンパク質でできた分子スパイによる細胞内非平衡現象の可視化」ソフトマター物理第4回領域研究会、2009.7.2 (北海道大学、札幌市)
- (43) 松田知己、宮脇敦史、永井健治 「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」第8回北陸ポストゲノム研究フォーラム、2009.6.11 (金沢大学十全講堂、金沢市)
- (44) 永井健治 「生理機能・動態を計測するための蛍光タンパク質技術」第9回日本蛋白質科学会年会、2009.5.22 (熊本全日空ホテルニュースカイ、熊本市)
- (45) 松田知己、堀川一樹、永井健治 「生体組織内の1細胞レベルでの機能イメージングを可能にする光活性型生理機能プローブ」第9回日本蛋白質科学会年会、2009.5.22 (熊本全日空ホテルニュースカイ、熊本市)
- (46) 堀川一樹 永井健治 「生体内ライブイメージングを可能にするバイオプローブの開発」ナノテクノロジー研究センター、2009.5.21 (北海道大学、札幌市)
- (47) 齊藤健太、小林健太郎、谷知己、永井健治 「A mercury Arc Lamp-Based Multi-Color Confocal Real Time Imaging System for Cellular Structure and Function」第9回 NIBB-EMBL シンポジウム、2009.4.22 (岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)
- (48) 永井健治 「Measurement of Diffusion Coefficient of Biomolecules by Fluorescence Decay After Photostimulation of Photoswitchable Fluorescent Proteins in Living Cells」第9回 NIBB-EMBL シンポジウム、2009.4.21 (岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)
- (49) Takeharu Nagai “Multifunctional imaging by genetically-encoded homo-FRET-based indicator” Focus On Microscopy 2009、2009.4.7 (Jagiellonian University Auditorium Maximum Krakow、Poland) Takeharu. Nagai “Deciphering enigma of biological function by a genetically-encoded molecular spy” The 4th LSW symposium、2009.1 (Hokkaido University, Sapporo)
- (50) Takeharu. Nagai “Engineering fluorescent proteins to visualize and

- manipulate biological functions" The 11th Japan and America Frontier of Science, 2008.12 (Beckman center, Irvine, USA)
- (51) Takeharu. Nagai "Engineering fluorescent proteins to visualize biological functions" The 8th Japan and America Frontier of Engineering, 2008.11 (Kobe convention center, Kobe)
- (52) Takeharu. Nagai "Imaging biological functions by using FRET-based sensor proteins" ICCB2008, 2008.10 (COEX, Seoul, Korea)
- (53) Takeharu. Nagai "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions" NEWroscience2008, 2008.9(de Sao Paulo university, Brazil)
- (54) Takeharu. Nagai "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions" Catolica de Chile, 2008.9(Catolica de Chile university, Chile)
- (55) Takeharu. Nagai "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions" IBRO (I Neurolatam), 2008.9(Buzios, Brazil)
- (56) Takeharu. Nagai "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins for biological research" Institute of Neuroscience, 2008.5(Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China)
- (57) Takeharu. Nagai "Direct measurement of protein dynamics in living cells using a rationally designed photoconvertible fluorescent protein" NIPS-JST international workshop, 2008.4(Okazaki conference center, Okazaki)
- (58) Takeharu. Nagai "Development of a fluorescent protein with deep blue color." FOM2008, 2008.4(Awaji Yume Butai, Osaka)
- (59) 永井健治 「蛍光タンパク質を巧妙に用いた分子機能・動態の可視化」 薬学会関東支部会、2008.11(長井記念館、東京)
- (60) 永井健治 「改変蛍光タンパク質によるタンパク質機能・動態のリアルタイム可視化」 岩手医科大学先端医療研究センター公開シンポジウム「バイオイメージングと分子生物学による脳・血管解明—健康増進に向けた最先端研究」、2008.7(岩手県医師会館ホール、盛岡)
- (61) 永井健治 「Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a rationally designed photoconvertible fluorescent protein？」 第60回日本細胞生物学会大会、2008.6(パシフィコ横浜、横浜)
- (62) Takeharu Nagai "Imaging Biological Events Using FRET-based Sensor Proteins" International Symposium on Advance Techniques for Molecular Imaging, Taichu, Taiwan (2007-12)
- (63) 永井健治 : 「生理機能センサータンパク質によるバイオイメージング」、第3回バイオ機器勉強会、北九州 (2007-12)

- (64) 永井健治：「蛍光イメージングの新たな展開」、第30回日本分子生物学会年会、横浜 (2007-12)
- (65) 永井健治：「合理的に設計した光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質」、光学会、大阪 (2007-11)
- (66) 永井健治：「イメージングの現在と未来」、視る生物学2-イメージングの現在と未来-、奈良 (2007-11)
- (67) Takeharu Nagai: "Imaging biological functions using FRET-based sensor proteins", Frontier Biomedical and Electro-optical Science, Taipei, Taiwan (2007-11)
- (68) Takeharu Nagai: "Perspective of bioimaging using fluorescent and bioluminescent proteins", J Symposium on Promotion of Academic Excellence, Taipei, Taiwan (2007-11)
- (69) Takeharu Nagai: "Engineering fluorescent proteins to visualize biological functions.", Joint Symposium for the Promotion of Academic exchange on Nanotechnology and Nanobiology, Sapporo (2007-11)
- (70) Takeharu Nagai: "Engineering fluorescent and bioluminescent proteins to visualize biological functions", Annual Meeting of Korean Society for Molecular Biology and Biochemistry, Seoul, Korea (2007-10)
- (71) 永井健治：「蛍光顕微鏡の展開—GFPとFRET—」、第3回ライブセルイメージング講習会、つくば (2007-10)
- (72) Takeharu Nagai: "Engineering Fluorescence Proteins", Microscopia de Fluorescencia y Confocal Espectral, Mexico City, Mexico (2007-9)
- (73) Takeharu Nagai: "ENGINEERING FLUORESCENT AND BIOLUMINESCENT PROTEINS TO VISUALIZE BIOLOGICAL FUNCTIONS", The 5th International Forum on Post-Genome Technologies, Shujuo, China (2007-9)
- (74) Takeharu Nagai: "ENGINEERING FLUORESCENT AND BIOLUMINESCENT PROTEINS TO VISUALIZE BIOLOGICAL FUNCTIONS", The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Tokyo (2007-9)
- (75) 永井健治：「バイオイメージング技術に望むもの—「細胞は如何にして外界情報を知覚するか？」の探求—」、平成19年度科研費特定領域研究「細胞感覚」夏の班会議・若手の会、葉山 (2007-8)
- (76) 永井健治：「GFPは何故光る?」、第16回 浜松医科大学メディカルホトニクス・コース、浜松 (2007-7)
- (77) Takeharu Nagai: "Visualization of biological function by using FRET- and BRET-based indicator", APBP2007 3rd Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics & Biophotonics Downunder II, Carns (2007-7)

- (78) 永井健治：「蛍光・化学発光タンパク質を利用して何ができるか?」、生物発光化学発光研究会第25回学術講演会、札幌(2007-6)
- (79) 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」、第一回生体分子イメージングの新たな技術開発に関する研究会、名古屋(2007-6)
- (80) Takeharu Nagai：“Various Applications of Fluorescent Proteins for Cell Biology”, 16th Annual Meeting of the Korean Society for Smooth Muscle Research, Seoul, Korea (2007-6)
- (81) 永井健治：「バイオイメージング技術の展望」、第40回日本発酵生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、福岡(2007-5)
- (82) Takeharu Nagai：“GFP and Quantum Dot”, Advanced Microscopy Course for Bio-Medical Research, Beijing, China (2007-5)
- (83) 友杉亘、松田知己、小寺一平、斉藤健太、永井健治：「群青色蛍光蛋白質の開発」、日本生物物理学会第45回年会、横浜(2007-12)
- (84) 松田知己、宮脇敦史、永井健治：
「Phamret: 光活性化と蛍光エネルギー移動を利用した細胞生物学研究のための効果的な蛍光マーカー蛋白質」、第7回日本蛋白質科学会年会、仙台国際センター、仙台 (2007-5)
- (85) T. Matsuda, A. Miyawaki, T. Nagai : “Phamret: An effective highlighter of fluorescent protein based on photoactivation-mediated resonance energy transfer for cell biological studies”, 3rd Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics & Biophotonics Downunder II, Shangri-La Hotel, Cairns, Australia (2007-7)
- (86) 松田知己、宮脇敦史、永井健治：「新規光色変換蛍光タンパク質による生細胞のタンパク質動態測定」、平成19年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会、北海道大学(2007-12)
- (87) Matsuda, T. Nagai, T. : “Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a rationally designed photo-convertible fluorescent protein”, The 9th RIES-Hokudai International Symposium, Hokkaido University, Sapporo, (2008-1)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(5)

光照射による生体機能操作法の開発に関する研究

G. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

- (1) 特願 2010-22603、光増感性蛍光タンパク質
- (2) 特願 2009-149338、蛍光温度プローブおよびそれを用いた温度測定装置
- (3) 特願 2009-233826、光活性化生理機能センサータンパク質
- (4) 特許出願 2007-215238、組み換え DNA の

調整法

(5) 特許出願 2007-203300、群青色蛍光タンパク質

②実用新案登録

なし

③その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|--|--|---|---|------------------------------|----------|------|----------------------------|
| Kusumi A, Umemura Y, Morone N, 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. | Rainer Klages, Günter Radons, Igor M. Sokolov | Anomalous Transport: Foundations and Applications | WILEY-VCH Verlag GmbH & KCoA | Weinheim | 2008 | 545-574 |
| 諸根信弘 倉治郎 | 急速凍結ディープエッチング法による細胞膜のナノドメイン解析 | 近藤 滋 | 細胞工学 | 秀潤社 | 東京 | 2007 | Vol.26 No.7, 822-826 |
| 諸根信弘 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 | 日本顕微光学会 | 東京 | 2007 | Vol.42 No.3, 150-154 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|------------------|--------|--------------------|------|
| Morone N and Aoyama K | Structural Analysis of Cell Membranes by Small Convergence Angle HAADF-STEM Tomography | Kenbikyō | | | 2009 |
| 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. | Biomacromolecule | 10(8) | 2074-85 | 2009 |
| 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 | 3 (12) | e3822 19048102. | 2008 |
| 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 | 44 | 1-6 | 2009 |

| | | | | | |
|--|--|---------------------------------------|--------|-----------|------|
| 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. | 88 | 207-36 | 2008 |
| 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 | 130(5) | 943-57 | 2007 |
| 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 | 69(10) | 1043-9 | 2007 |
| 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. | 7(3) | 937-44 | 2007 |
| Kunimoto S, Nakamura S, Wada K, Inoue T. | Cronic Stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. | Exp Neurol. | 221 | 175-185 | 2010 |
| Fukumoto N, Takashi F, Kamboh MI, Tsai S-J, Matsushita S, Nacmias B, Comings D, Arboleda H, Inqelsson M, Hyman B, Akatsu H, Nishimura A, Zata M, Mattila K, Goto Y, Asada T, Nakamura S, Kunigi H. | Sexually dimorphic effect of the Val66Met Polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease:new data and meta-analysis. | Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet | 153B | 235-242 | 2010 |
| Kumanogoh H, Asami J, Nakamura S, Inoue T. | Balanced expression of various TrkB receptor isoforms from the Ntrk2 gene locus in the mouse nervous system. | Mol Cell Neurosci. | 39 | 465-477 | 2008 |
| Nakata H, Nakamura S. | Brain-Derived Neurotrophic Factor | FEBS Lett. | 581 | 2047-2054 | 2007 |

| | | | | | |
|--|---|---------------------|-----|-------------|------|
| | regulates AMPA Receptor Trafficking to Postsynaptic Densities via IP3R and TRPC Calcium Signaling. | | | | |
| Itami C, Kimura F, Nakamura S. | Brain-derived neurotrophic factor regulates the maturation of layer 4 fast-spiking cells after the second postnatal week in the developing barrel cortex. | J. Neurosci. | 27 | 2241-2252 | 2007 |
| Ohira K, Funatsu N, Homma KJ, Sahara Y, Hayashi M, Kaneko T, Nakamura S. | Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. | Eur J. Neurosci. | 25 | 406-416 | 2007 |
| Setsuie, R. et al. | Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. | Neurochem. Int. | 50 | 119-129 | 2007 |
| Hirayama, K. et al. | Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. | Bioorgan. Med. Chem | 15 | 6810-6818 | 2007 |
| Kabuta, T. et al. | 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 |
| Kabuta, T. et al. | 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 |
| Kabuta T. et al. | 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 |
| Yasuda, T. et al. | <u>Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression mouse model of Parkinson's disease.</u> | J Neurochem. | 108 | 932-944 | 2009 |
| Goto, A. et al. | Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the | Neurochem. Int. | 54 | 330-338 | 2009 |

| | | | | | |
|---|---|--------------------------------|------|-----------|------|
| | dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse. | | | | |
| Setsuie, R. et al. | Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. | Neurochem. Int. | 54 | 314-321 | 2009 |
| Kabuta, T. et al. | Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 aberrantly interacts with tubulin. | Biochem Biophys Res Commun. | 387 | 121-126 | 2009 |
| Higashi. S. et al. | Abnormal localization of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 to the endosomal-lysosomal compartment in Lewy body disease. | J. Neuropathol. Exp. Neurol. | 68 | 994-1005 | 2009 |
| Kunimoto S. et al. | Chronic Stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. | Exp. Neurol. | 221 | 175-185 | 2010 |
| Nagai, Y. et al. | Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. | Curr. Pharm. Biotechnol. | | | 2010 |
| Yamakawa H, Oyama S, Mitsuhashi H, Sasagawa N, Uchino S, Kohsaka S, Ishiura S. | Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin-g2, and the interactions are affected by autism-related mutations. | Biochem. Biophys. Res. Commun. | 355 | 41-46 | 2007 |
| 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. | 22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A recognizable syndrome? | Am. J. Med. Genet A. | 143A | 2804-2809 | 2007 |
| Maekawa M, Namba T, Suzuki E, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S. | NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus. | Neurosci. Res. | 63 | 259-266 | 2009 |
| Namba T, Maekawa T, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S. | The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in the adult hippocampus. | GLIA | 57 | 1082-1090 | 2009 |
| Namba T, Yabe T, | PEDF up-regulation | Neuroscience | | In press | 2010 |

| | | | | | |
|---|--|-----------------------------|-----|-------------|----------|
| Gonda Y, Ichikawa N, Sanagi T, Hirasawa E, Mochizuki H, Kohsaka S, Uchino S. | induced by memantine, an NMDA receptor antagonist, is involved in the increased proliferation hippocampal progenitor cells. | | | | |
| Saito K, Hatsugai N, Horikawa K, Kobayashi K, Matsu-ura T, Mikoshiba K, Nagai T | Auto-luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca ²⁺ imaging at the single cell level. | PLoS ONE | | | in press |
| 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, Helmchen1 F, Hasan MT | Optical recording of neuronal activity with a genetically-encoded Ca ²⁺ indicator in anesthetized and freely moving mice. | Frontiers in Neural Circuit | | | in press |
| Hong JH, Min CH, Jeong B, Kojiya T, Morioka E, Nagai T, Ikeda M, Lee K | | PLoS ONE | | | in press |
| 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 |
| 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 |
| Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita H, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A, Takayama S | Fine-tuning of the cytoplasmic Ca ²⁺ concentration is essential for pollen tube growth. | Plant Physiology | 150 | 1322-1334 | 2009 |
| 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 |
| 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 |
| 永井健治, 松田知己 | 光スイッチング蛍光タン | 日本組織細胞化 | | 99-105 | 2009 |

| | | | | | |
|---|---|---------------------------|-----|-------------|------|
| | パク質を用いた生細胞内でのタンパク質動態定量法 | 学会編、組織細胞化学 2009 | | | |
| 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 |
| Yamamoto T, Kumagai A, Saito K, Nagai T | Two-photon excitation behavior of thiophene-based oligomers and a polymer. | J Nanosci Nanotechnol. | 9 | 670-672 | 2009 |
| 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 |
| Kotera I, Nagai T | 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 |
| Matsuda T, Miyawaki A, Nagai T | Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. | Nature Methods | 5 | 339-345 | 2008 |
| Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, 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 |
| Takemoto K, Kuranaga E, Tonoki A, Nagai T, 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 |
| Wei C, Nagai T, Wei W, Nemoto T, Awais M, Niwa O, Kurita R, Baba Y | New advances in nanomedicine: diagnosis and preventive medicine. | Med Clin North Am. | 91 | 871-879 | 2007 |
| 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 | 161-165 | 2007 |

小収束角 HAADF-STEM トモグラフィによる細胞膜構造の解析 ～次世代のフリーズエッチトモグラフィの可能性に向けて～

Structural Analysis of Cell Membranes by Small Convergence Angle HAADF-STEM Tomography

諸 根 信 弘^a, 青 山 一 弘^b

Nobuhiro Morone and Kazuhiro Aoyama

^a国立精神・神経センター神経研究所

^b日本エフィー・アイ株式会社アプリケーションラボラトリー

要 旨 細胞膜の細胞質側表面を急速凍結・ディープエッチング像で観察すると、カベオラやクラスリン被覆ピット、アクチン膜骨格のネットワークによってアンジュレーションが激しいことがわかる。本特集では、このように視野全体で大きく焦点距離が異なる構造のプラチナレプリカについて、取差補正付き3コンデンサシステムを持った電子顕微鏡を利用して、従来のTEMトモグラフィと収束角を変化させたSTEMトモグラフィによる3次元再構築像を比較した。小収束角HAADF-STEMトモグラフィによる3次元再構築像では、ミッシングウェッジによる計算上のアーティファクト（ゴースト）がほとんど生じないことが初めて明らかとなった。細胞膜研究の新しいツールとして期待できる。

キーワード：細胞膜、クラスリン被覆ピット、フリーズエッチ、STEM収束角、HAADF-STEMトモグラフィ

1. はじめに：細胞膜構造とSTEMトモグラフィ

細胞膜の厚さは僅か5 nmではあるが、電子顕微鏡で観察すると膜表面のアンジュレーションが激しいことがわかる。特に、細胞質側表面には、クラスリン被覆ピットやカベオラ、アクチン膜骨格などの膜ドメインに関わる構造が構築されているため、通常の2次元透過像で観察される以上に、膜表面の凹凸が著しく、複雑な3次元構造が形成されている。これまでに、私たちは、急速凍結した細胞膜をディープエッチング後にロータリーシャドウウィングしたプラチナレプリカを試料として、電子線トモグラフィによる3次元再構築法（Freeze-etch Tomography：フリーズエッチトモグラフィ）を開発してきた。特に、細胞質側表面から10 nm領域にあるアクチン線維のメッシュワークを「膜骨格」と定義して、このアクチン膜骨格で囲まれたメッシュの大きさを3次元定量解析することに成功した¹⁾。この電子線トモグラフィによる結果は、超高速ビデオカメラによる、生きた細胞膜上での膜分子の1分子運動解析と良い相関性を示すと同時に、膜骨格フェンスモデルの構造的基盤を初めて明らかにした¹⁻⁴⁾。

このようなアンジュレーションの激しい生物試料を、より高い分解能で観察するためには、①厳密には焦点距離の異なる

複数の観察点に対して、より多く焦点を併せることが要求される。併せて、②金属レプリカ試料のプラチナが持つ高いコントラストは、焦点を合わせるうえで有効であると期待できるため、このような元素番号効果を活かした観察法が望まれる。

本特集の別稿で議論されているように、最近、生物分野においてもSTEM (Scanning Transmission Electron Microscope) トモグラフィを用いた三次元構造解析がTEMトモグラフィに対して多くの優位点を持つことが明らかになってきた^{5,6)}。本稿では、既述の課題①②を検討するために、アンジュレーションの激しいプラチナレプリカに対して、STEMトモグラフィを試みた。その結果、小収束角HAADF (High-Angle Annular Dark-Field) モードで、これまで以上に優れた3次元再構築像が得られたので、その実験的試行錯誤を概説したい。

2. STEMトモグラフィとプローブ収束角

青山らの論文⁵⁾でも注目されている、厚みのある試料のSTEMトモグラフィでは、その入射電子線によるプローブの収束角 (Convergence Angle) が得られる3次元再構築像の画質に大きく影響する。簡単な光学的考察から明らかのように (図1)、収束角を小さくすれば被写界深度が深くなり、より広い範囲でフォーカスのあった像を撮ることができるためである。これは、普通の一眼鏡カメラにおける絞りの役割と同じであり、逆に収束角を大きくとることにより極端に

^a〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1

E-mail: morone@ncnp.go.jp

2009年8月29日受付

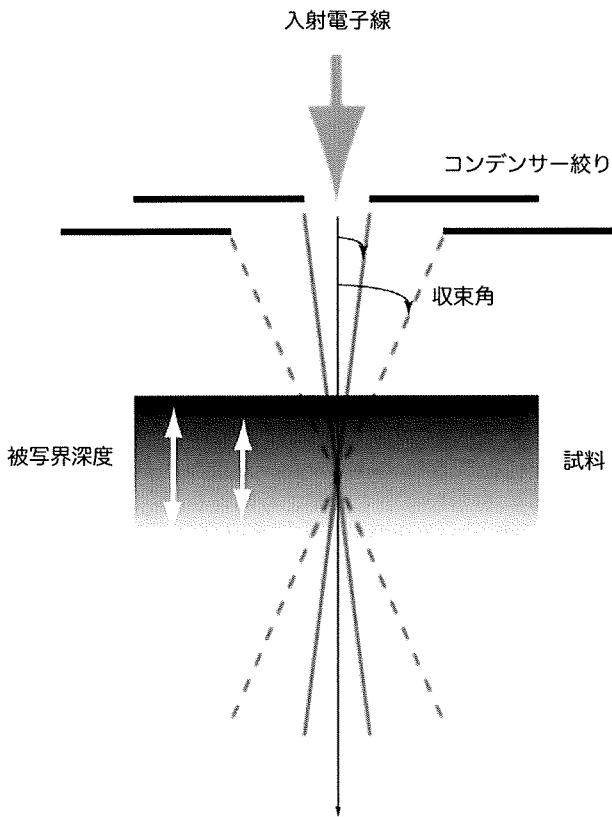


図1 電子線収束角と被写界深度の関係

STEMでは収束した電子線を走査するが、この収束角を変えることにより被写界深度の深さを変えることができる。つまり、小さいコンデンサ絞りを用いて、入射電子線の収束角を小さくすれば、より広い範囲でボケの少ない像を得ることができる。アンジュレーションの激しい試料を観察するためには小さい絞りを使うことが有利である。

浅い被写界深度とすることも可能である。フリーズレプリカを試料とし、高い分解能での構造解析を行おうとした場合、厚み方向の凹凸が問題となる。つまり、飛び出した部分とへこんだ部分の両方にフォーカスをあわせられなければ精密な構造解析はできない。これはトモグラフィのために試料を高傾斜した場合にも要求される。現在の自動化されたトモグラフィデータ取得システムでは、高傾斜時にも全体にフォーカスをあわせ機能(ダイナミックフォーカス)およびオートフォーカス機能が備わっているが、高傾斜した凹凸の多い試料で全視野に対してフォーカスのあった像を撮影するためには被写界深度の深さは非常に重要である。

実際、ディープエッチングされた細胞膜の細胞質側表面には、直径7~9 nmのアクチン線維のネットワークが3次元的に絡んで広がっている。そのなかに、膜陥入構造である直径100~300 nmのクラスリン被覆ピットや直径50~80 nmのカベオラがドメインを形成している(図2)。そのため、試料傾斜角が0度のときでも、同一視野で観察される構造物には、100 nm以上の高低差があることになる。これまで私たちが実施してきたフリーズエッチトモグラフィでは、細胞

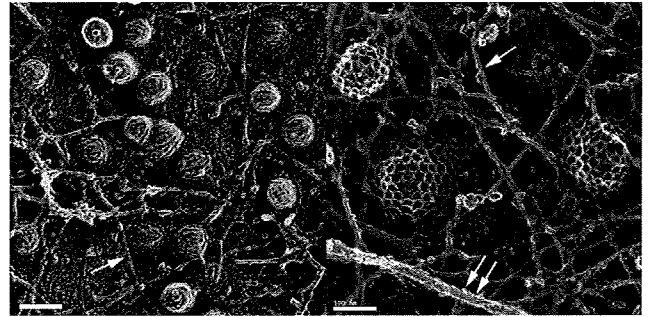


図2 繊維芽細胞の細胞質側表面のディープエッチング像
カベオラ(左図)やクラスリン被覆ピット(右図)の間をアクチン膜骨格のネットワーク(1本矢印)や微小管(2本矢印)が走っている。

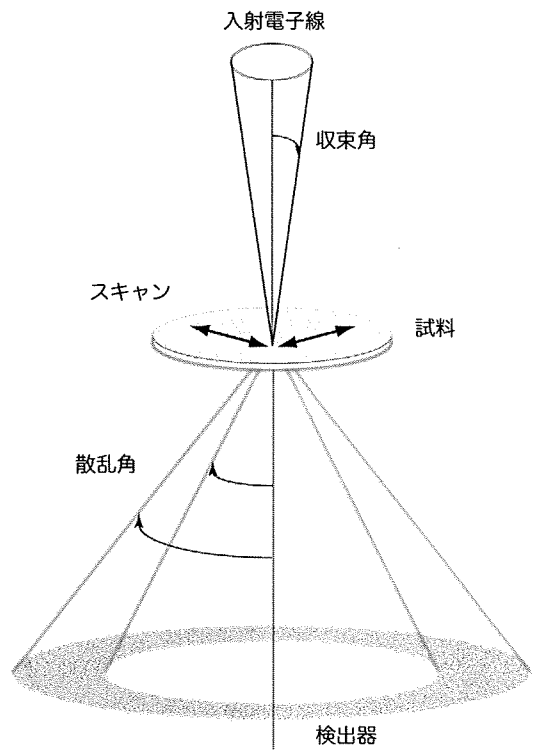


図3 HAADF-STEMと試料の関係

HAADF検出器で検出される電子線の高角散乱強度は、試料に含まれる原子の原子番号の2乗に比例する。本研究で扱うフリーズレプリカ試料は、高い像コントラストが期待できる。

質側表面から10 nmまでに広がるアクチン膜骨格で囲まれる領域が、50~200 nm程度であることを明らかにした。そのため、従来のTEMトモグラフィでも、解像度の面では充分であった。しかし、アクチンフィラメントの5.5 nm間隔のストライプ模様や、カベオラやクラスリン被覆ピットに特徴的な表面模様のような、タンパク質複合体の分子構造を反映した構造を、アンジュレーションの激しい視野で定量評価するためには、小収束角STEMトモグラフィのような次世代の可視化技術が必要である。

3. HAADF-STEM トモグラフィとプラチナレプリカ

本研究で扱った STEM は、高角環状暗視野 (HAADF: High-Angle Annular Dark-Field) モードの特徴を良く生かしている。この方法では、非常に小さく絞った電子線を試料にあてて、プローブの位置を変えてスキャンしながら、散乱強度をマッピングする (図 3)。このとき、電子線の高角散乱強度は、試料に含まれる原子の原子番号の 2 乗に比例する。本研究のフリーズレプリカ試料は、プラチナ (Pt: 原子番号 $Z=78$) で作製されているため、原子番号効果により、高い像コントラストが期待できる⁷⁻⁹⁾。実際、小収束角と HAADF の条件を効果的に調整することで、フリーズレプリカのトモグラムが実現できたので、その詳細を説明したい。

4. 小収束角 HAADF-STEM トモグラフィの実際

これまでの電子顕微鏡では広い範囲で収束角を自由自在に変更することは難しかったが、本研究では、3枚の集束レンズを持つ Titan80-300 (FEI) により、小収束角 HAADF-STEM トモグラフィが可能となった。また、今回使用した装

表 1 本研究で比較された電子線トモグラフィの観察条件

| | 収束角 mrad* | 3次元再構成 |
|----------------------|-----------|--------|
| 小収束角 STEM tomography | 0.5 | SIRT** |
| 大収束角 STEM tomography | 15 | SIRT** |
| TEM tomography | | SIRT** |

mrad*: $2\pi \text{ rad} = 360^\circ$ なので、 $0.5 \text{ mrad} = \text{約 } 0.0285^\circ$

SIRT**: Simultaneous Iterative Reconstruction Tomography

連続傾斜像の取得: Titan80-300 (FEI)

3次元再構築の計算: Inspect3D (FEI) と ResolveRT Amira for microscopy (Mercury computer systems, Inc)

置は集光系の収差補正装置を実装しているので、収束角を非常に小さくしても STEM プローブを充分小さく絞ることが可能であり、分解能低下も問題とならなかった。従来装置 (例えば FEI TECNAI F30ST) でも、極端に小さいコンデンサ絞りを使う場合、小さい収束角を作ること自体は可能ではあるが、このとき極端な電子量の減少と分解能の低下を招くことになり、実用には耐えない。詳細については本稿では触れないが、3枚の集光レンズで構成された集光系により電子線量

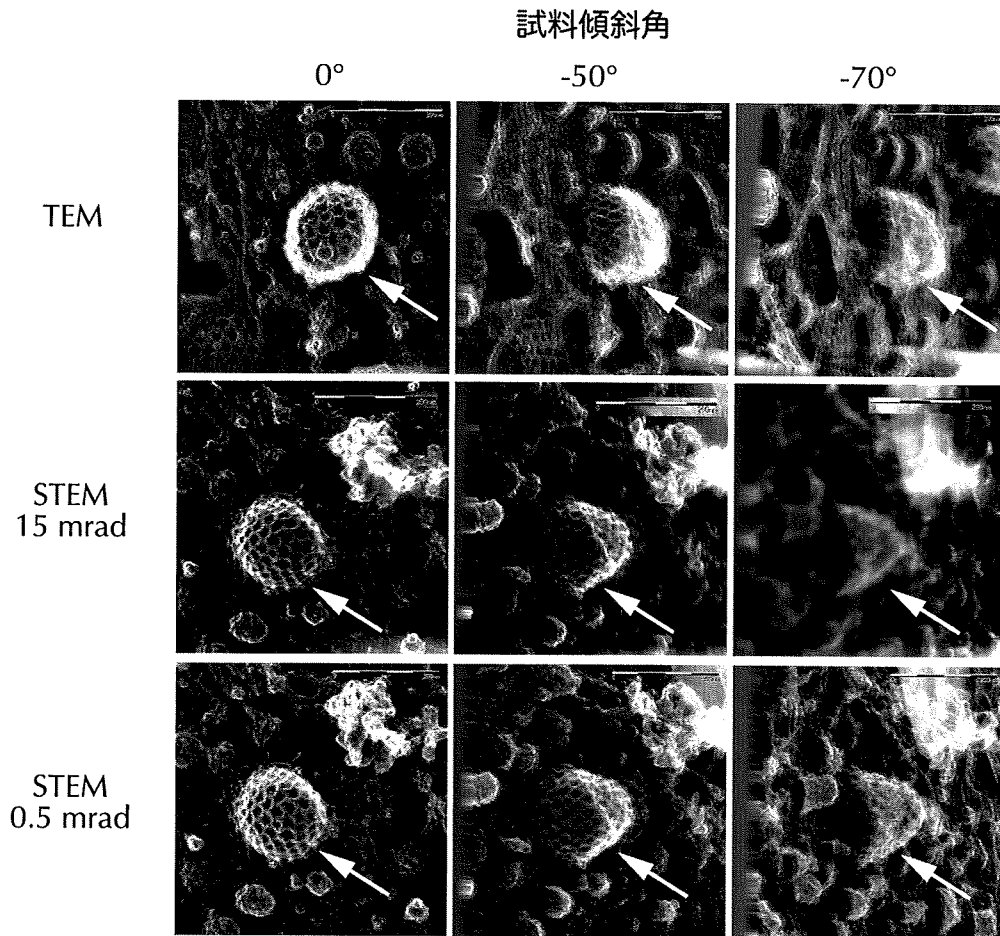


図 4 小収束角 STEM 像では高傾斜角でも視野全体に焦点があっている
従来の TEM に加えて、広収束角 (15 mrad) STEM と小収束角 (0.5 mrad) STEM モードでの観察像を、試料傾斜角 0 度と -50 度 (あるいは -70 度) で比較した。各観察モードで、白い矢印は同一のクラスリン被覆ピットを示している。

は変えずに収束角だけ変化させるということが可能となったことも、明記しておきたい。

本研究では、マウス胎児由来線維芽細胞の細胞質側表面を裸出させ、急速凍結・ディープエッチング・ロータリーシャ

ドーウィングを経て、プラチナ製のフリーズレプリカを調製した。このレプリカ試料を用いて、小収束角STEMトモグラフィ、大収束角のSTEMトモグラフィ、TEMトモグラフィによる3つのデータを比較した。加速電圧は300 kV, STEM

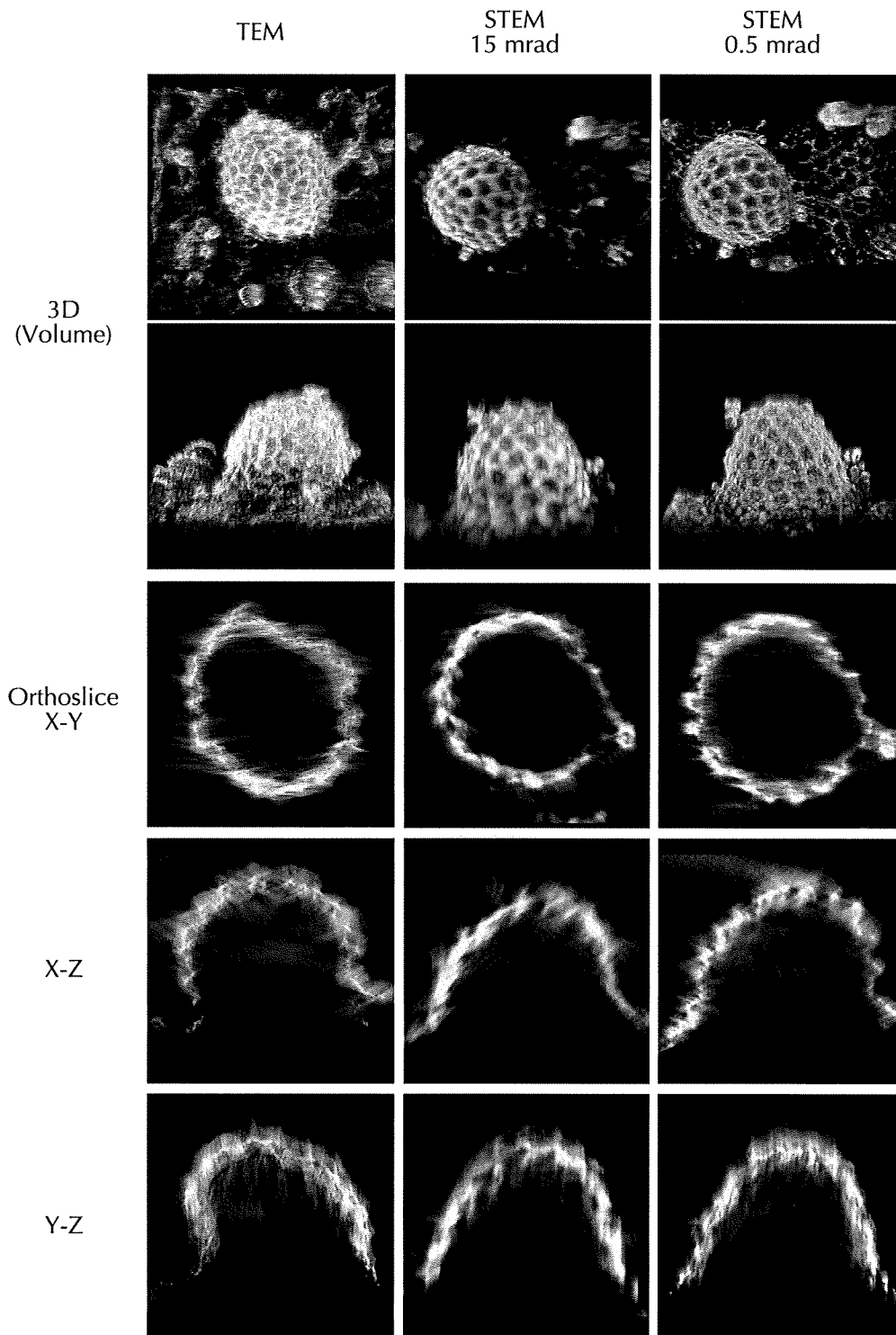


図5 小収束角STEMトモグラフィによる3次元再構築像ではアーティファクトによるゴーストがない。ボリュームレンダリングによる3次元像とオルソスライスによる断面像を利用して、再構築計算で生じるアーティファクトによるゴーストを比較した。

収束角は少収束角で 0.5 mrad, 大収束角で 15 mrad とした (表 1). ちなみに従来装置における STEM (高分解能) 観察時の収束角は 7 mrad 程度の収束角である. なお TEM 像の取得にはガタンエネルギーフィルタによるゼロロス像を用いた.

電子線トモグラフィの第 1 ステップは, 連続傾斜像の取得になる. 各々のデータセットの高傾斜時 (50 ~ 70 度付近) の像を比較してみた. 図 4 のように, 小収束角の STEM トモグラフィで, 直径 150 nm 程度のクラスリン被覆ピット全体に良く焦点があっていることが分かる (白い矢印). このように陥入が進んだピットを観察する場合, TEM モードでは, ピットの辺縁部に焦点が合いにくく, コントラストが白くハレーションすることがある. この傾向は, 高傾斜像で著しくなる. これに対して驚くべきことに, 小収束角の STEM モードでは, -70 度でも, 比較的良く焦点が合っていることがわかる. このような連続傾斜像の 1 枚 1 枚に見られる, 焦点やコントラストによる像質も, 最終的な 3 次元再構築像に影響を及ぼすことが予想される.

本研究では, 1 軸傾斜の SIRT によって, クラスリン被覆ピットの 3 次元再構築の計算をおこなった. 図 5 に, ポリウムレンダリングによる全構築像やオルソスライスによる XY, XZ, YZ 断面像 (中心付近) を示す. TEM トモグラフィによる 3 次元再構築像は, コントラストが低い. クラスリン被覆ピットのようなアンジュレーションの激しい試料では, 視野全体に焦点を合わせることが難しく, 特に高傾斜時の像質の悪化が顕著であるため, 再構築ボリュームに高傾斜データがうまく寄与していない. そのため, 全構築像や断面像でも, トモグラフィのアーティファクトが目立つ. これに対して, 大収束角 STEM トモグラフィによる 3 次元再構築像は, 従来の TEM トモグラフィと比べてコントラストは高い. この理由には, HAADF によるプラチナレプリカに対する元素番号効果も効いていると考えられる. しかし, 収束角が大きいくことで被写界深度が浅くなるため, フォーカスが少しずれると傾斜像において像のボケが顕著になってしまう. そのボケのため再構築ボリュームもボケてしまっている. また, 大きくボケた傾斜像は再構築に使えないため (含めると悪化してしまう), 取得したにもかかわらず再構築時に捨てざるを得なかった角度があり, そのためのアーティファクトの増加を招いている. 本研究で注目した小収束角 STEM トモグラフィでは, もっともコントラスト高く, ゴーストの少ない良質な 3 次元再構築像が得られることが初めてわかった. 試料傾斜角が 75 度付近まで視野全体に焦点があり, ほぼ完璧な連続

傾斜像が取得されているので, いわゆるミッシングウェッジによるアーティファクトもまったく目立たない. 見た目の定性的にも, 非常に美しい再構築ボリュームが得られた. 当然のことだが, ほとんどの傾斜角度の視野全体に焦点があうと, 連続傾斜像取得時の位置補正もスムーズに進むので, 3 次元再構築の精度も向上する.

5. おわりに

本研究により (定性的ではあるが), 小収束角 STEM トモグラフィ, 通常の広収束角 STEM トモグラフィ, 従来の TEM トモグラフィによる 3 次元再構築像について, 初めて比較することができた. 小収束角プローブを用いた STEM が, 少なくともプラチナ製のフリーズレプリカ試料に対しては, 最良であることが明らかとなった. 特に, 細胞膜の細胞質側表面にあるアンジュレーションの激しい構造群 (膜骨格, カベオラ, クラスリン被覆ピット) に対しては非常に有効であり, これまで私たちが提案してきたフリーズエッチトモグラフィの次世代版として大いに期待できる. 収差補正付き 3 コンデンサシステムを持った電子顕微鏡であれば, 入射電子線の収束角を小さく (0.5 mrad 程度まで) 絞ることにより生じるデメリットは何もない. 研究者にとって唯一の難点は, 装置の価格が高価であることであろうか.

文 献

- 1) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, S.R., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 174, 851–862 (2006)
- 2) Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 157, 1071–1081 (2002)
- 3) Kusumi, A., Umemura, Y., Morone, N. and Fujiwara, T.: *Anomalous Transport: Foundations and Applications*, edited by Rainer Klages, Günter Radons, Igor M. Sokolov. 545–574 (2008)
- 4) Morone, N., Nakada, C., Umemura, Y., Usukura, J. and Kusumi, A.: *Methods Cell Biol.*, 88, 207–236 (2008)
- 5) Aoyama, K., Takagi, T., Hirase, A. and Miyazawa, A.: *Ultramicroscopy*, 109, 70–80 (2008)
- 6) Yakushevskaya, A.E., Lebbink, M.N., Geerts, W.J.C., Spek, L., van Donselaar, E.G., Jansen, K.A., Humbel, B.M., Post, J.A., Verkleij, A.J. and Koster, A.J.: *J. Struct. Biol.*, 159, 381–391 (2007)
- 7) Midgley, P.A. and Weyland, M.: *Ultramicroscopy*, 96, 413–431 (2003)
- 8) Kübel, C., Voigt, A., Schoenmakers, R., Otten, M., Su, D., Lee, T.C., Carlsson, A. and Bradley, J.: *Microsc. Microanal.*, 11, 378–400 (2005)
- 9) Friedrich, H., McCartney, M.R. and Buseck, P.R.: *Ultramicroscopy*, 106, 18–27 (2005)

Nitric Oxide Release in Human Aortic Endothelial Cells Mediated by Delivery of Amphiphilic Polysiloxane Nanoparticles to Caveolae

Takehiro Nishikawa,^{*,†} Norio Iwakiri,[‡] Yoshiro Kaneko,[‡] Akihiko Taguchi,[†] Kazuhito Fukushima,[†] Hidezo Mori,[†] Nobuhiro Morone,[§] and Jun-ichi Kadokawa^{*,‡}

National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, National Center of Neurology and Psychiatry, National Institute of Neuroscience, 4-1-1, Ogawahigashimachi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan, and Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan

Received February 1, 2009; Revised Manuscript Received June 8, 2009

Microdomains such as lipid raft and caveolae are organized as functional compartments in plasma membrane of cells. In this study, we note the functional platform of caveolae with dual functions, internalization of external substances and cell signalings leading to nitric oxide release, and hypothesize that the switching of enzyme activity of endothelial nitric oxide synthase can be achieved by targeting caveolae with nanoparticles. We prepared polysiloxane nanoparticles and studied cellular uptake of the nanoparticles and its concomitant influence on the nitric oxide release in human aortic endothelial cells. We found that polysiloxane nanoparticles were endocytosed via caveolae in human aortic endothelial cells and that enhanced nitric oxide release was followed by the cellular uptake of the nanoparticles. Furthermore, we confirmed that endothelial nitric oxide synthase was activated during cellular uptake of the nanoparticles. These findings support our idea that delivery of the polymeric nanoparticles to endothelial cells can lead to the induction of nitric oxide release.

Introduction

With the recent progress in structural biology, it has been revealed that microdomains such as lipid raft and caveolae are organized as functional compartments in plasma membrane of cells.¹ Caveolae in particular are abundant in the plasma membrane of endothelial cells, occupying 15% of total cell volume and function as platforms for signaling and transporting.² In relation with pathology, it is pointed out that a lost function of caveolae is involved in various cardiovascular diseases such as vascular dysfunction, atherosclerosis, and hypertrophy.³ For instance, hypertension is one of the risk factors for various cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischemic heart failure, stroke, and chronic renal failure. Blood pressure is controlled using antihypertensive drugs, which are the major medication for treating hypertension. Nitric oxide (NO) is a key substance in the vasorelaxation process and plays a crucial role in the regulation of blood pressure.⁴ Direct control of nitric oxide (NO) production in vascular endothelium can be a novel strategy of the medication for hypertension and can lead to the improvement of endothelial functions.⁵ NO molecules are released from vascular endothelium, are diffused to media, the outer layer of smooth muscle cells, and trigger the activation of soluble guanylate cyclase that leads to smooth muscle cell relaxation.⁶ NO is synthesized by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) that is embedded in caveolae and is activated by external stimuli such as bioactive substances and dynamic environmental factors.⁷ Caveolae are characteristic flask-shaped

invaginations of plasma membrane with diameters of 50–100 nm and work as functional platforms for internalization of extracellular materials (endocytosis) and cell signalings leading to NO production.³

In the past studies about vascular drug delivery, it was noted that caveolae can provide a possible pathway for drug delivery coupled with caveoli-mediated endocytosis.⁸ To date, nanoparticles as drug carriers have been extensively studied with regards to delivery, drug loading, drug release, in vivo circulation, and toxicological properties.⁹ However, whether such a nanoparticle cause effects on the functions of cells, tissues, and organ remains still unclear. Considering the endocytic pathways of cells, it is known that four basic mechanisms, macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolin-mediated endocytosis, and clathrin- and caveolin-independent endocytosis, are involved in pinocytosis (endocytosis in all mammalian cells).¹⁰ Bioactive substances and serum proteins circulating in bloodstream have been found to be external stimuli for the activation of signal transduction. Although it was reported that artificial nanoparticles could influence a cell function of macrophages upon the association with lipopolysaccharide,¹¹ the artificial nanoparticles have not been considered and discussed in terms of the external stimuli as an input signal at specific membrane microdomain of cells for the activation of signal transduction, so far. Therefore, we have an interest in the influence of cellular uptake of nanoparticles on the signal transductions leading to the expression of cell functions. As the first attempt, we prepared nanoparticles from amphiphilic polysiloxane and studied cellular uptake of the nanoparticles and its concomitant influence on NO release in human aortic endothelial cells.

In this research, we chose polysiloxane as a polymeric material for the preparation of nanoparticles, because siloxane backbone with self-repair property is quite stable in physiological conditions¹² and nanoparticles of polysiloxane are expected

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-6-6833-5012 (T.N.); 81-99-285-7743 (J.-i.K.). Fax: 81-6-6872-7485 (T.N.); 81-99-285-3253 (J.-i.K.). E-mail: tnishi@ri.ncvc.go.jp (T.N.); kadokawa@eng.kagoshima-u.ac.jp (J.-i.K.).

[†] National Cardiovascular Center Research Institute.

[‡] Kagoshima University.

[§] National Center of Neurology and Psychiatry.