

## 平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		UMEZAWA YOSHIO					
①研究代表者名氏		梅澤 喜夫		②所属研究機関・部局・職 東京大学・大学院理学系研究科・教授			
③研究課題名	和文	細胞内及び膜界面の分子を可視化する新手法の創案と展開					
	英文	New Analytical Methods for Molecular Imaging in Single Live Cells and Interfacial Molecular Assemblies					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		30,800	16,600	12,500	12,500	8,300	80,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
梅澤 喜夫	東京大学・大学院理学系研究科・教授	分析化学	研究の企画と統括 細胞情報分子可視化プローブの設計、糖・DNA鎖の配列の可視化決定法の研究				
小澤 岳昌	東京大学・大学院理学系研究科・講師	分析化学	細胞内オルガネラ局在蛋白質の可視化検出法の研究				
佐藤 守俊	東京大学・大学院理学系研究科・助手	分析化学	細胞内・細胞間複数種の情報分子の時空間同時可視化検出法の研究				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>生きた細胞内及び膜界面の分子を可視化する新手法の創案と開発を目的とする。ここで分子を可視化（molecular imaging）することは、今まで見るができなかった、生きた細胞内や、膜界面での特定の分子や官能基の位置、濃度を、時間・空間分解して観察できるようにすることである／”Seeing what was unseen”。本申請期間中に次の I, II, III の研究目的を達成する。</p> <p>I. 細胞内・細胞間複数種の情報分子の時空間同時可視化解析  II. 細胞内オルガネラ局在蛋白質の可視化検出法  III. DNA 及び糖鎖配列の可視化決定法</p> <p>心血管系を例に細胞内の化学過程、即ち細胞情報に関与する生体分子種及びそれらの変化・相互作用が細胞内のいつ・どこで・どれほど起きているかを定量的に評価することを目的とし、蛍光顕微鏡下での非破壊的な直接動的状態観測を行うための新しい蛍光蛋白質センサーを多数開発する。</p> <p>細胞内オルガネラ — 核、ミトコンドリア、小胞体、ペルオキシソーム、ゴルジ体、リソソーム — に局在する蛋白質を細胞内で非破壊的に可視化検出するプローブ分子の開発を目的とする。具体的には、分析対象とする蛋白質が標的オルガネラに局在した時に GFP が形成される各オルガネラ局在蛋白質の蛍光可視化プローブ分子を作製する。次に作製するプローブを用いて各々のオルガネラに局在する蛋白質の遺伝子を網羅的に同定する新規方法論を創案する。さらにオルガネラ内外を移行する蛋白質を非破壊的に検出する方法を開発し、生きた動物個体内での蛋白質の動態を可視化検出する応用研究を行う。</p> <p>分子探針（化学修飾 STM 探針）をつくり、それにより糖鎖配列とその構造の直接可視化を行う。即ち、糖鎖に含まれるヒドロキシ基、カルボキシ基、エーテル酸素原子などと水素結合を形成できる分子で修飾した探針を用いて STM により糖鎖を観察する。得られた STM 像から官能基を同定し、その分布パターンから糖鎖配列、構造を決定する。また、DNA 塩基配列の直接可視化検出を行う。即ち、対核酸塩基(A, T, G, C)をそれぞれ修飾した異なる 4 本の化学修飾探針を用い、探針と各塩基特異的な相補的水素結合を経たトンネル電流の促進に基づき、各核酸塩基種の認識、即ち塩基配列の直接可視化決定法を確立する。</p>							

## ⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

### I. 細胞内・細胞間複数種の情報分子の時空間同時可視化解析

細胞内の主要な脂質セカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸(PIP<sub>3</sub>)を、蛍光顕微鏡下の単一細胞で可視化分析するために新規蛍光プローブ分子 (flip: フリップ) を開発した。これにより、I)血小板由来成長因子(PDGF)などのペプチドホルモン刺激により、PIP<sub>3</sub>が細胞膜のみならず小胞体膜やゴルジ体膜などendomembraneで大量に増加することを見いだした。また、II)このendomembraneでのPIP<sub>3</sub>は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたチロシンキナーゼ受容体に刺激されてendomembrane上で生合成されたものであることを明らかにした(*Nature Cell Biol.*, **5**,1016, 2003)。

プロテインキナーゼ Akt の活性化に基づく蛋白質リン酸化を可視化検出する蛍光プローブ (Aktus; アクタス) を開発し、ペプチドホルモンのインスリンは内皮細胞のゴルジ体に Akt を局在化・活性化させるが、女性ホルモンのエストロジェンはゴルジ体のみならずアポトーシス抑制に重要なオルガネラのミトコンドリアにも Akt を局在化させ活性化することを見いだした(*J. Biol. Chem.*, **247**, 30945 (2003))。

細胞内での複数の蛋白質リン酸化を同時にマルチカラーイメージングすべく、一波長励起一波長測光型の蛍光プローブ (cyan-, green-, yellow-sinphos) を開発した (図1) (*Anal. Chem.*, **76**, 6144 (2004))。

核内受容体のアゴニスト及びアンタゴニストを数分以内に簡便にスクリーニング出来る蛍光プローブ(SCCoR)を開発した(*Anal. Chem.*, **76**, 2181 (2004))。

### II. 細胞内オルガネラ局在蛋白質の可視化検出法

細胞内オルガネラ—核、ミトコンドリア、細胞内小胞(ER)—に局在する蛋白質を、生きた細胞内で非破壊的に可視化検出する蛍光・発光プローブを開発した。このプローブを利用して、オルガネラ局在蛋白質を網羅解析する方法、マウス個体内での蛋白質のオルガネラ移行を低侵襲的に検出する方法を開発した。以下その具体的内容を記す。

オルガネラ局在蛋白質の網羅的同定法—蛋白質がサイトゾルから細胞内小胞(ER)への移行を、蛍光シグナルに情報変換するプローブ分子を開発した。プローブを連結した被検タンパク質が ER に輸送されると、ER 内でプロテインスプライシング反応により GFP が形成されることを示した。cDNA ライブラリーにプローブを連結し、ER 移行タンパク質を網羅解析する手法を開発した。1,100 クローンの遺伝子解析を行い、新規 ER 移行蛋白質 39 種類を含む 109 種の ER 移行タンパク質の同定に成功した (*Nucl. Acids Res.*, **33**, e34(2005))。ミトコンドリア膜間腔(IMS)局在シグナル配列を同定した。IMS に局在する Smac タンパク質にランダムにミュレーションを加え、IMS 局在に重要なアミノ酸を同定した。その結果、Smac のミトコンドリアシグナル配列に AVPI4 アミノ酸を付加した配列が、IMS シグナル配列として機能することを明らかにした (投稿準備中)。現在 IMS シグナル配列を利用して、ミトコンドリア IMS 局在蛋白質の網羅解析を行っている。

マウス個体内での蛋白質核内移行検出法—生きたマウス個体内におけるタンパク質の核内移行検出プローブを開発した (図2)。311 アミノ酸からなる *renilla luciferase*(RLuc)のN末から 229 番目で切断すると、split した RLuc がプロテインスプライシングにより効率よく再構成されることを見出した。この split RLuc を用いて、androgen receptor(AR)のサイトゾルから核内への移行を検出するプローブを作製した。このプローブをマウス脳内に移植して、マウス個体内の DHT 検出法を開発した。procymidone や PCB をマウスの腹腔に投与すると、これらが脳血液関門を通過して脳内の AR の働きが抑制されることを明らかにした (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **101**, 11542(2004))。

### III. DNA 及び糖鎖配列の可視化決定法

(1) 分子探針を用いた走査型トンネル顕微鏡(STM)による、DNA 塩基配列の直接可視化決定法を開発した。4 種の核酸塩基の誘導体をそれぞれ分子探針として用い、核酸塩基誘導体の自己組織化単分子膜(SAMs)を観察した。その結果、相補塩基対間の水素結合を通じたトンネル電流の促進に基づき、探針に相補的な核酸塩基の選択識別が可能であることを明らかにした。さらに、ペプチド核酸を核酸塩基探針で観察した。SAM と同様に、探針と相補的な核酸塩基が選択的に観察され、核酸の配列・一塩基多型(SNP)を可視化決定・検出した (図3; 投稿中)。

(2) 糖鎖の配列決定法に関し、糖鎖の基板上への固定法について検討した。天然の糖類とその種々の誘導体を様々な基板上へと固定した。化学的相互作用を介して基板に十分強く吸着させることにより、試料糖鎖を分子分解能で観察することができた。今後さらに高分解能での観察を行い、分子 STM 探針による糖鎖配列の可視化決定法を確立する。

(3) また、分子探針を用いた STM についての基礎研究を行った。これまで、分子探針—試料間の水素結合及び配位結合に基づき化学選択性が得られることが明らかとなっている。これは、化学的相互作用に伴う電子波動関数の重なりを通じてトンネル電流が促進されるためである。探針—試料間に電荷移動相互作用が形成される際にも、同様にトンネル電流が促進されること明らかになった。これにより、電子不足または豊富な  $\pi$  電子系の認識が可能となった (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102**, 5659(2005))。

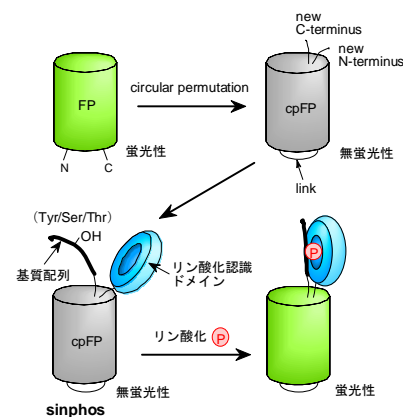


図1 一波長励起一波長測光型の蛋白質リン酸化蛍光プローブ (sinphos: シンフォス)。基質配列とこのリン酸化を認識して結合するドメインをcircular permutationを施した蛍光蛋白質 (cpFP) に繋ぎ、リン酸化によるcpFP部位の構造変化を蛍光強度変化として検出する。

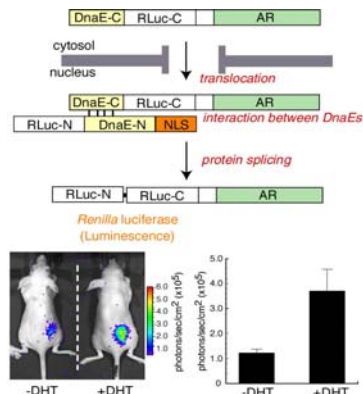


図2. 男性ホルモンリセプター (AR) 核内移行検出プローブの原理。DHT添加によりARがサイトゾルから核内に移行すると、スプライシングタンパク質DnaE間で相互作用が起こる。その結果、二分したrenilla luciferase (RLuc-N, RLuc-C)が連結し、luciferaseの発光能が回復する。下はマウス個体内におけるAR核内移行の低侵襲的イメージング。プローブを導入した細胞をマウスの皮下に移植し、DHT添加・非添加の場合の発光能を高感度冷却CCDカメラで検出した。

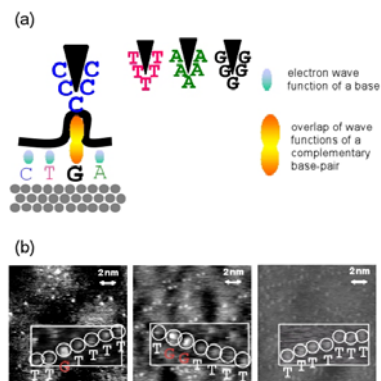


図3. 分子STM探針による配列決定法。(a)4種の核酸塩基探針の模式図。試料と探針分子間との相補塩基対形成に伴い、トンネル電流が促進される。(b)シトシン探針を用いて観察されたペプチド核酸のSTM像。試料には18個のT配列内に左から1, 2, 0個のGが含まれている。各STM像中の矩形内には、配列の一部を拡大して示した。探針との相補塩基対形成によりGのみが選択的に明るく観察された。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

### I. 細胞内・細胞間複数種の情報分子の時空間同時可視化解析

本研究では、生体情報分子の可視化検出プローブを開発し、それらの細胞内での動態を明らかにすべく研究をスタートした。一例として、プログラムされた細胞死(アポトーシス)に重要なキナーゼAktによる蛋白質リン酸化を検出するプローブ(Aktus; アクタス)を開発し、これをゴルジ体膜、ミトコンドリア膜に局在化させ、そのオルガネラ膜でのAktの活性化を可視化した。これにより、血糖降下ホルモンのインスリンはゴルジ体ではAktを活性化するが、アポトーシスに重要なミトコンドリアではAktを活性化しない、しかしながら、アポトーシス抑制効果を持つ女性ホルモンのエストロゲンは、ゴルジ体に加えてミトコンドリアでもAktの活性化を誘起することを見出した。エストロゲンはミトコンドリア上でAktを活性化することによりアポトーシスを抑止していることが本アプローチにより示された。また、このミトコンドリアでのAktの活性化は、ミトコンドリア膜上に生成した脂質セカンドメッセンジャーPIP<sub>3</sub>により制御されていることを、本研究での蛍光プローブ(flip; フリップ)を用いて見出しつつある(投稿準備中)。本アプローチは、AktやPIP<sub>3</sub>のみならず、多くのキナーゼおよび脂質セカンドメッセンジャーに適用でき、それらの時空間動態を明らかにすることにより、生理作用および疾患のメカニズムの理解に繋がると確信している。

### II. 細胞内オルガネラ局在蛋白質の可視化検出法

特定の amino 酸残基で二分して失活させたタンパク質を、プロテインスプライシング反応により再連結し、機能を回復させる新たなレポーター蛋白質の概念を世界に先駆けて創案・開発してきた。このレポーターを基盤技術として、本研究では、細胞内オルガネラに局在する蛋白質の網羅解析法を開発している。これまでのオルガネラ局在蛋白質の同定は、細胞内オルガネラを遠心分離し、蛋白質をクロマトグラフィーや電気泳動により分離し、そして個々の蛋白質を質量分析器で同定する方法が用いられてきた。この方法は、同定する蛋白質の確度が、オルガネラ精製の純度に大きく依存し、また発現量の少ない蛋白質は原理的に同定が困難な問題があった。本研究で開発した方法は、オルガネラの精製を必要とせず、生きた細胞内の生理的条件下で、個々の蛋白質の局在を high-throughput に同定する優れた特徴を有する。開発した方法は、その独創性のみならず、オルガネラプロテオーム解析の基盤技術として国内外から高く評価されている。

また、これまで細胞内分子イメージングは蛍光顕微鏡と蛍光プローブの開発・発展により長足の進歩を遂げているが、動物個体内での分子イメージングは困難であった。我々が示した split luciferase を利用する方法は、動植物個体内での蛋白質の動態や蛋白質の修飾が、低侵襲的にイメージングできることを実証しており、今後新たな分子イメージング技術としての発展と広がりが期待できる。更に、発光を利用したイメージング技術は、fMRI や PET のような大がかりな実験施設及びアイソトープを必要としないため、どこの研究室でも行える一般性のある方法である。従って将来的には基礎生物学、農学、医学、製薬、そしてバイオ産業等で誰にでも容易に活用できる革新的な検出システムとなることが期待できる。

### III. DNA 及び糖鎖配列の可視化決定法

これまで分子 STM 探針の創案および開発を行ってきた。STM では従来、金属探針が用いられているが、一般に化学選択性は得られない。本手法は、金属探針を化学的に修飾し、その探針分子と試料間の電子波動関数の重なりをもたらす相互作用(水素結合、配位結合、および電荷移動相互作用)に基づき特定の官能基・化学種の識別を可能とするものであり、非常に高い独創性を有する。

本研究では、分子 STM 探針を核酸および糖鎖の観察に適用した。核酸塩基探針を用いた核酸塩基配列の直接可視化決定法を確立した。さらに、現在大きな注目を集めている SNP の検出が可能であること示した。糖鎖に対しては、枝分かれなど、糖鎖の有する多様な結合様式を有する構造と共にその配列を直接可視化決定できる。現在、糖鎖の分析には、質量分析法や核磁気共鳴分光法などが用いられているが、いずれも得られたスペクトルの解釈が非常に困難である。本研究を通じ糖鎖の構造・配列決定法を確立することによって、糖鎖生物学に大きく貢献できると期待できる。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

### 1. Original Papers

- ① A Fullerene Molecular Tip Can Detect Localized and Rectified Electron Tunneling within a Single Fullerene-Porphyrin Pair. T. Nishino, T. Ito, and Y. Umezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 5659-5662 (2005).
- (2) A High-Throughput Screening of Genes that Encode Proteins Transported into the Endoplasmic Reticulum in Mammalian Cells, T. Ozawa, K. Nishitani, Y. Sako, Y. Umezawa, *Nuc. Acids Res.*, **33**, e34 (2005).
- ③ High-Throughput Sensing and Noninvasive Imaging of Protein Nuclear Transport by Using Reconstitution of Split *Renilla* Luciferase. S. B. Kim, T. Ozawa, S. Watanabe, Y. Umezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 11542-11547 (2004).
- (4) Single Color Fluorescent Indicators of Protein Phosphorylation for Multicolor Imaging of Intracellular Signal Flow Dynamics. Y. Kawai, M. Sato and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **76**, 6144-6149 (2004).
- (5) A Genetically Encoded Fluorescent Indicator Capable of Discriminating Estrogen Agonists from Antagonists in Living Cells. M. Awais, M. Sato, K. Sasaki and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **76**, No. 8, 2181-2186 (2004).
- ⑥ Production of PtdInsP<sub>3</sub> at endomembranes is triggered by receptor endocytosis. M. Sato, Y. Ueda, T. Takagi, and Y. Umezawa, *Nature Cell Biology*, **5**, 1016-1022 (2003).
- (7) A genetic Approach to Identifying Mitochondrial Proteins. T. Ozawa, Y. Sako, M. Sato, T. Kitamura, and Y. Umezawa, *Nature Biotechnol.*, **21**, 287-293 (2003).
- (8) Fluorescent Indicators for Akt/Protein Kinase B and Dynamics of Akt Activity Visualized in Living Cells. K. Sasaki, M. Sato and Y. Umezawa, *J. Biol. Chem.*, **278**, 30945-30951 (2003).
- (9) Locating a Protein-Protein Interaction in Living Cells via Split Renilla Luciferase Complementation. A. Kaihara, Y. Kawai, M. Sato, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **75**, 4176-4181 (2003).
- (10) Selective Observation of Hydroxy and Carboxylate Moieties by Scanning Tunneling Microscopy Using Chemically Modified Tips with Differing Extent of Hydrogen Bond Acidity or Basicity. T. Nishino, T. Ito, and Y. Umezawa, *J. Electroanal. Chem.*, **550-551**, 125-129 (2003).
- (11) A Screening Method for Estrogens Using an Array-Type DNA Glass Slide. S. B. Kim, T. Ozawa and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **75**, 499-504 (2003).

### 2. Review Articles

- (1) Genetically Encoded Optical Probes for Imaging Cellular Signaling Pathways. Y. Umezawa, *Biosensors and Bioelectronics*, in press.
- (2) Genetically encoded optical probes for molecular processes in living cells. Y. Umezawa, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **24**, No. 2, 138-146 (2005).
- (3) Methods of Analysis for Chemicals that Disrupt Cellular Signaling Pathways: Risk Assessment for Potential Endocrine Disruptors. Y. Umezawa, T. Ozawa, M. Sato, H. Inadera, S. Kaneko, M. Kunimoto and S. Hashimoto, *Environmental Sciences*, **12**, 049-064 (2005).
- (4) Imaging protein phosphorylation by fluorescence in single living cells. M. Sato and Y. Umezawa, *Methods*, **32**, 451-455 (2004).
- (5) Chemically Modified Scanning Tunneling Microscopy Tips for Molecular Imaging. Y. Umezawa and T. Ito, *Electrochemistry*, **71**, 522-529 (2003).
- (6) Seeing What Was Unseen. New Analytical Methods for Molecular Imaging. Y. Umezawa, *The Chemical Record*, **3**, 22-28 (2003).
- (7) 「PIP<sub>3</sub>の可視化動態分析」, 佐藤守俊, 上田善文, 梅澤喜夫, 実験医学, **22**, 2141-2146 (2004).
- (8) 「化学センサー」総論, 梅澤喜夫, 「ぶんせき」(特集)「化学センサー」, **10**, 567-570 (2003).
- (9) 「タンパク質プローブ」, 佐藤守俊, 小澤岳昌, 梅澤喜夫, 現代化学, **383**, 25-31 (2003).
- (10) 「生細胞内情報伝達の蛍光可視化プローブ」, 梅澤喜夫, 佐藤守俊, 小澤岳昌, ぶんせき, **1**, 18-25 (2003).

### 3. Books

- (1) Inteins for split-protein reconstitutions and their applications. T. Ozawa and Y. Umezawa, *Inteins and Homing Endonucleases*, Springer-Verlag, in press.
- (2) FRET-based reporters for intracellular enzyme activity. M. Sato and Y. Umezawa, *Encyclopedia of Proteomics*, John Wiley & Sons, in press.
- (3) Split Luciferase Systems for Detecting Protein-Protein Interactions in Mammalian Cells based on Protein Splicing and Protein Complementation, Y. Umezawa, *Photoproteins in Bioanalysis*, Wiley-VCH, in press.
- (4) Fluorescent Indicators for Imaging Protein Phosphorylation in Single Living Cells. M. Sato and Y. Umezawa, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3<sup>rd</sup> Edition, Elsevier, in press.
- (5) 「化学測定の事典」—確度・精度・感度— 梅澤喜夫 編著, 朝倉書店 (2005).
- (6) 「先端の分析法 — 理工学からナノ・バイオまで」監修 梅澤喜夫, 澤田嗣郎, 寺部 茂, エヌ・ティー・エス (2004).
- (7) 「生きた単一細胞内の化学過程を可視化する蛍光プローブ分子—生命現象を担う細胞情報伝達の動態分析」, 梅澤喜夫共著:「先端化学シリーズ VI-IV ナノ分析」, 日本化学会編, 丸善, 第4編(2004).
- (8) 「分析化学データブック」, “表面・界面分析”梅澤喜夫, 伊藤貴志, 日本分析化学会編, 丸善 (2004).

### 国際会議・学会等 (招待講演のみ)

- (1) Genetically encoded optical indicators for molecular processes in living cells. Y. Umezawa, *MB-ITR2005*, Institute for Molecular Science (2005).
- (2) Genetically Encoded Fluorescent and Bioluminescent Indicators for Cellular Signaling Pathways in Live Cells. (Plenary lecture) Y. Umezawa *ISBC2004*, Yokohama, Japan (2004).
- (3) Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Visualizing Cellular Signaling in Living Cells. M. Sato and Y. Umezawa, *FENS Forum 2004*, Lisbon, Portugal (2004).
- (4) Probing Chemical Processes in Living Cells: Fluorescent Indicators for Imaging Cellular Signaling Pathways. Y. Umezawa, *CIS bio international Symposium. Interactions between biomolecules: from chemistry to biological targets*, Avignon, France (2004).
- (5) Probing Chemical Processes in Living Cells. Fluorescent Indicators for Imaging Cellular signaling Pathways. Y. Umezawa, *227th ACS National Meeting*, Anaheim, CA, USA (2004).
- (6) Reporter protein reconstitution: In vivo sensing of organelle-localized proteins. T. Ozawa, *32nd Annual Meeting of the American Society for Photobiology*, Seattle, USA (2004).
- (7) Chemical biology of protein splicing: Analytical methods for intracellular molecular imaging with novel split-reporter proteins. T. Ozawa, *NTU-SNU-UT Tri-Department Chemistry Symposium 2004*, National Taiwan University, Taiwan, December (2004).
- (8) Seeing What was Unseen: New Analytical Methods for Molecular Imaging. (Keynote Lecture) Y. Umezawa, *Singapore International Chemical Conference-3 (SICC-3)*, Singapore (2003).
- (9) Seeing What Was Unseen: from interfaces to cellular signaling. (Academy guest talk) Y. Umezawa, Technical University of Budapest, Budapest, Hungary (2003).
- (10) Seeing What Was Unseen: from interfaces to cellular signaling. (Academy guest talk) Y. Umezawa, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary (2003).
- (11) Methods of Analysis for Chemicals that Promote/Disrupt Cellular Signaling. (Academy guest talk) Y. Umezawa, Veszprem University, Veszprem, Hungary (2003).
- (12) Assay and Screening Methods for Chemicals that Disrupt Cellular Signaling Pathways: Risk Assessment for Potential Endocrine Disruptors. (Plenary Lecture) Y. Umezawa, *Advanced Analysis — Exploring Biological Systems in Food*, Olsztyn, Poland (2003).
- (13) Probing Chemical Processes in Living Cells: Applications for Assay and Screening of Chemicals that Promote/Disrupt Cellular Signaling. (Keynote Lecture) Y. Umezawa, *The First International Congress on Bio-Nanointerface (ICBN2003 Tokyo)*, Arcadia Ichigaya, Tokyo (2003).
- (14) プロテインスパライシングを利用した新規リポータータンパク質の開発とその応用. 小澤岳昌, 第125年会日本薬学会, 東京 (2005).
- (15) プロテインスパライシングを用いたタンパク質再構成システムについて. 小澤岳昌, 第7回生命化学研究会シンポジウム, 仙台 (2005).
- (16) プロテインスパライシングを用いた新規発光タンパク質の創出とバイオセンシング. 小澤岳昌, 第5回コンビナトリアル・バイオエンジニアリング研究会, 大阪 (2005).

- (17) プロテインプライシングが切り拓く生体分子の機能解析法. 小澤岳昌, 産業技術総合研究所, 大阪, (2005).
- (18) 細胞内オルガネラに局在するタンパク質相互作用検出プローブの開発. 梅澤喜夫, 小澤岳昌, JBiC2004 プロジェクト成果報告会, 都市センター・ホテル, 東京 (2004).
- (19) 分子探針: 分子間トンネル顕微鏡. 西野智昭, 梅澤喜夫, 日本学術振興会創造機能化学第 116 委員会合同分科会, 東京 (2004).
- (20) 生きた単一細胞内の化学過程を可視化する蛍光・発光プローブ分子— 生命現象を担う細胞情報伝達の動態分析 —. 梅澤喜夫, 生物物理・若手の会の夏の学校, 東京 (2004).
- (21) 生きた単一細胞内の分子過程を可視化する蛍光・発光プローブ—生命現象を担う細胞情報伝達の動態分析—. 梅澤喜夫, ハイテク・リサーチ・センタープロジェクト夏期研究発表会, 神奈川 (2004).
- (22) 生きた単一細胞内の分子過程を可視化する蛍光・発光プローブ分子 —生命現象を担う細胞情報伝達の動態分析—. 梅澤喜夫, 東京大学 COE (化学・材料系)「動的分子論に立脚したフロンティア基礎化学」「化学を基礎とするヒューマンマテリアル創成」合同シンポジウム, 東京 (2004) .
- (23) 生細胞中でエストロゲンアゴニスト・アンタゴニストを識別できる融合蛋白質蛍光可視化プローブ. 梅澤喜夫, 日本学術振興会創造機能化学第 116 委員会合同分科会, 東京 (2004).
- (24) 生細胞内における脂質セカンドメッセンジャーホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸の蛍光可視化プローブの開発. 佐藤守俊, 梅澤喜夫, 日本学術振興会創造機能化学第 116 委員会合同分科会, 東京 (2004).
- (25) プロテインプライシングを利用した蛍光・発光プローブの開発とその応用. 小澤岳昌, 第 19 回生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラム, 東京(2004).
- (26) 蛍光・発光タンパク質プローブの新たなデザインと細胞内オルガネラプロテオミクス. 小澤岳昌, 第 65 回分析化学討論会, 沖縄 (2004).
- (27) ステロイド様化学物質の高速細胞情報可視化アッセイ法. 佐藤守俊, 東京コンファレンス 2004「化学センサー講習会」, 千葉 (2004).
- (28) ここまで来た生細胞内シグナル伝達の可視化法. 佐藤守俊, 日本分析化学会第 53 年会, 千葉 (2004).
- (29) 分子 STM 探針と表面分析. 西野智昭, 日本分析化学会第 53 年会, 千葉 (2004).
- (30) 生細胞中のオルガネラ局在蛋白質, 蛋白質—蛋白質相互作用, 蛋白質リン酸化, セカンドメッセンジャー等, 種々の細胞情報伝達の可視化検出法. 梅澤喜夫, 東京大学大学院農学系研究科生命工学・生命化学専修セミナー (2003).
- (31) 生細胞内化学過程を可視化する蛍光プローブ分子 — 細胞情報の増強/抑制物質の高速スクリーニング法 —. 梅澤喜夫, 日本化学会関東支部講習会「生態系の非破壊分析— 単一細胞から人間までの生体情報計測」, 日本化学会, 東京 (2003).
- (32) 分子センサー. 梅澤喜夫, 第 31 回薄膜・表面物理セミナー, 青山学院大学 (2003).
- (33) 生細胞内分子過程を可視化する光プローブ — 細胞情報の増強/抑制物質の高速スクリーニング法 —. (特別講演) 梅澤喜夫, 生物発光化学発光研究会学術講演発表会, 北陸先端科学技術大学院大学, 金沢 (2003).
- (34) 化学修飾探針 STM による膜界面の分子イメージング. 日本学術振興会創造機能化学第 116 委員会合同分科会, 梅澤喜夫, 東京 (2003).
- (35) 単一細胞内の蛍光可視化プローブによる化学物質のアッセイ・スクリーニング法. 梅澤喜夫, 平成 15 年度日本分光学会春季講演会・シンポジウム「環境問題と分光計測」, 東京大学山上会館 (2003).
- (36) 生細胞内分子過程を可視化する光プローブ — 細胞情報の増強/抑制物質の高速スクリーニング法 —. 梅澤喜夫, 第 2 回国際バイオ EXPO, 東京ビッグサイト (2003).
- (37) タンパク質プローブの開発と細胞内シグナルの分析. 小澤岳昌, 第 52 回日本分析化学会, 仙台 (2003).