

## 平成18年度 学術創成研究費 研究終了報告書（事後評価用）

平成18年3月31日

ふりがな	ながやま くにあき		<b>所属研究機関・ 部局・職</b>	大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授				
<b>研究代表者 氏名</b>	永山 國昭							
<b>研究課題名 (英訳名)</b>	生命1次情報の高速収集とそれに基づく統合バイオサイエンスの展開 Primary Information of Life and Foudation of Integrative Bioscience.							
<b>研究経費</b> (千円未満切捨)	年度	研究経費(千円)		使用内訳(千円)				
		交付額	支出額	設備備品費	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成13年度	70,000	70,007	37,861	19,565	686	0	11,893
	平成14年度	85,000	85,002	30,007	10,358	5,679	540	38,416
	平成15年度	85,000	85,000	19,341	21,643	1,197	1,780	41,037
	平成16年度	70,000	70,000	31,452	/	2,186	36,107	253
	平成17年度	70,000	70,000	15,507	/	876	53,243	372
	総計	380,000	380,009					
<b>研究組織（研究代表者及び研究分担者）</b>								
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）					
永山國昭	大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授	生物物理学	位相差電子顕微鏡をベースとする統合バイオ手法の開発					
森 泰生	京都大学・大学院工学研究科・教授	細胞生理学	カルシウムチャネル局在機能研究					
岡村康司	大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授	電気生理学	チャネル複合体機能研究					
高橋卓也	立命館大学理工学部・化学生物工学科・助教授	計算生物学	チャネル分子シミュレーション（平成13、14年度2年間）					
宇理須恆雄	分子化学研究所・極端紫外光科学研究系・教授	表面化学	蛋白質集積パターン作成技術の開発					
渡辺芳人	名古屋大学大学院・理学研究科・教授	生物無機化学	人工酵素、人工酵素複合体の開発（平成13年度1年間）					
青野重利	大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授	生体物理学	CO信号伝達蛋白質の研究（平成14、15年度2年間）					
計 7 名								

**当初の研究目的**

本研究は2つの柱よりなっている。1つは生物系の構造と情報を高速に収集するイメージング法、特に“生”試料の観察を可能とする新しい電子顕微鏡法の開発と生体分子、細胞への応用。もう1つは分子科学、基礎生物学、生理学における要素研究を新型電子顕微鏡を基軸に統合バイオサイエンスにまとめ上げることである。これは学術創成研究の3つの観点のうち(1)革新的・学際的学問領域を創成することおよび(2)の経済の発展の基盤を形成する先見性・創造性に富む研究を行うことの2つの観点に対応する。すなわち(1)に関しては分子科学と生理学を結ぶ統合バイオサイエンスが革新的学術領域を創成することになり、(2)に関しては新型電子顕微鏡を用いた見えないものを観る手法がイメージング受託サービスという新たなビジネスチャンスを与えることになる。

統合バイオサイエンスの基盤的研究課題を以下に列記する。

- ・ 新型電子顕微鏡による構造・情報生物学：1分子 DNA / RNA の配列直読法の基盤開発、膜蛋白質(特にイオンチャネル分子)の結晶化法と構造解析法の要素技術開発、細胞中の蛋白質高分解能同定法の素基盤開発。
- ・ 筋系、神経系のカルシウム信号調節機能研究：筋系、神経系のカルシウムチャネルの細胞・組織レベルの局在機能の研究。
- ・ 筋系、神経系のチャネル集積機構：筋系細胞、神経系細胞における電位依存性チャネルの局在機能の研究。
- ・ 計算生物学：イオンチャネル分子の機能シミュレーション。
- ・ 蛋白質集積パターン形成と新規バイオエレクトロニクス：シリコンウェア上の蛋白質集積パターン形成と新規バイオエレクトロニクス。
- ・ バイオミメティクス：蛋白質と生物無機化学の融合による人工酵素および人工酵素複合体の構造 / 機能研究。

**研究成果の概要**

研究目的に対する研究成果を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) 生物用位相差電子顕微鏡法の開発**：電子顕微鏡における位相差法は長い研究開発の歴史を持つが、位相板の帯電問題のため満足の行く結果が得られなかった。永山グループはこの困難な問題に取り組み、一応の解決をみた。その結果、云々ゆるゼルニケ位相差法のみならず異なる空間フィルターを用いた各種位相差法を開発でき、生物学への応用範囲が広がった。その結果は手法開発の9報の論文、6種の特許出願(国内5、海外1)そして第51回(2006)日本顕微鏡学会学会賞(瀬藤賞)「位相差電子顕微鏡法の開発と生物学への応用研究」の成果となった。

ゼルニケ位相差法：炭素薄膜でできた $\lambda/4$ ( $\pi/2$ シフト)板の中心に $1\mu\text{m}$ 以下の孔をフォーカスイオンビーム(FIB)装置で開け、ゼルニケ位相板を作製した。これを用い、正焦点条件で画像コントラストが大きく回復できることを、無染色の蛋白質、ウイルス、バクテリア、細胞で確かめた。ヒルベルト微分法：後焦点面の半分を $\pi$ 位相板で覆うと光学顕微鏡の微分干渉法(DIC)と同等の微分効果が生まれることを発見し、無染色の蛋白質、ウイルス、バクテリア、全載細胞、細胞切片に応用し、高コントラスト像を得た。無帯電位相板：上記の位相板は、全て炭素薄膜をFIB加工した単純な構造を持っている。にもかかわらず、60年近い電顕の歴史でこれが正しく作動しなかった理由は、ひとえに位相板の電子線通過時の帯電の故である。この問題を解決するため炭素膜でできた位相板をさらに遮蔽用炭素膜で完全コートすることで帯電に伴う静電ポテンシャルを封じ込める方法を考案した(特許出願)。これにより歩止まりが悪く、運に頼っていた帯電位相板作製が起動に乗った。

**ii) 電顕をベースとしたDNAシーケンサーの基盤開発**：位相差電顕の能力を用いて1分子DNAの塩基配列を直読する手法の基盤を開発した。この研究の最大の課題は、電顕による弁別可能な塩基特異的ラベル法の開発にあったが、共有結合をベースとする画期的方法が見つかり、市販の金クラスターラベルを用いた予備的実験において塩基同定可能なことが実証された。提出済の3種の海外特許を補強するため出願準備をしている。またこの基盤技術を現実のDNAシーケンサー開発につなげるベンチャー「テラベース(株)」を2006年3月に岡崎に立ち上げた。

**iii) 電顕を用いた膜蛋白質構造解析法の基盤開発**：膜蛋白質の2次元結晶法の開発が3年目で頓挫したため、構造解析を単粒子解析法に切り替えた。手法の開発は約1年で終え、構造既知のGroELにつき15分解能の立体構造を位相差法により得た。また新規立体構造としてヘリコバクターピロリ菌毒素VacAの20構造を得た。一方統合バイオサイエンスのターゲットとして森グループからもらったカルシウムチャネルTRPM2遺伝子につきヴァキキュロウイルス感染カイコ系で大量発現し、界面活性剤可溶化状態で単量体構造を得た。しかし、天然構造と異なる試料調整アーティファクトの可能性がある。このためカイコ細胞培養系(SF9)を立ち上げ、他のカルシウムチャネルTRPV4を大量取得した。

## 研究成果の概要 つづき

また岡村グループから得たホヤ由来の新規電位依存性蛋白質遺伝子 (VSP) につきカイコ系での大量発現精製を行っており、宇理須グループににおいて膜蛋白質埋め込み型バイオセンサーへの展開を試みた。

**iv) 電頭による細胞内蛋白質同定の基盤研究**：位相差電頭は氷包埋試料に対し、染色や標識等の試料調整なく約 3nm 分解能の像が取得できるため、細胞内の各種オルガネラを見分けることができる(“生”試料観察)。この利点を最も生かせるのが細胞骨格(アクチン、微小管)の直接観察であり、神経細胞のスパインや成長端のアクチン、微小管、そして植物表層微小管系の新しい研究手法が生まれた。この方向の関連研究は 2 報の論文としてまとめられた。

**v) カルシウムチャネルの局在機能研究**：生命 1 次情報を得るだけでなく、より高次の生体レベルで必要な、構成要素間の相互作用・協働の解明を行った。「細胞死」の制御に關与する、Ca<sup>2+</sup>透過型カチオンチャネル TRPM2 を同定し、その活性機構、すなわち細胞の参加ストレスに伴う TRPM2 の活性化開口が Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup>「細胞死」を仲介することを示した。受容体活性化チャネル TRPC ホモログ群において、TRPC5 が内皮型の一酸化窒素産生酵素 eNOS と機能的複合体を形成し、一酸化窒素(NO)を感知し、活性化開口し、Ca<sup>2+</sup>を流入させ、NO 産生の positive feedback loop を制御することを明らかにした。Ca<sup>2+</sup>シグナルの時空間パターン決定の分子機構解明を目的に、トリ B 細胞 DT40 の TRPC1 欠損株を作製し、TRPC1 の Ca<sup>2+</sup>シグナルのパターン形成における枢要性を明らかにした。TRPC3 チャネルと PLC を中心とした PI 応答/ Ca<sup>2+</sup>シグナルの positive feedback loop も明らかにした。これらは 10 報の論文として報告した。

**vi) 電位依存性チャネルの複合体機能研究**：細胞膜での膜電位信号が細胞内の化学情報に変換される分子メカニズムを一部解明できた。従来知られてきた電位依存性チャネルのうち電位依存性 Nav チャネルについて、細胞内蛋白アンキリン G が共役することを見出し、その分子機構と生理的意義を明らかにした。単一蛋白質で、膜電位—化学シグナル変換を担う新規分子(VSP)の同定を行い、電位センサードメインをもつ二つの膜蛋白を同定した。電位センサーと酵素ドメインを併せ持つ蛋白 Ci-VSP で、これが膜電位依存的に酵素活性を変化させることを見出した(Nature, 2005)。電位センサードメインのみをもつ蛋白であり、これが膜電位と細胞内外 pH を感知して、プロトンイオンを透過させるプロトンチャネルとして機能することを見出した(Science, 2006)。結果を 12 報にまとめた。

**vii) イオンチャネルのシミュレーション研究**：チャネルモデル系について計算シミュレーションを行ったが研究期間が短く 2 報の論文にとどまった。

**viii) 蛋白質集積とバイオエレクトロニクス**の基盤研究：シリコン表面および SiO<sub>2</sub> 表面の各種の自己組織単分子膜による化学修飾技術を開発し、さらにこれらの化学修飾表面を任意の形状にパターン化する技術を開発した。シリコン基板に微細貫通孔を形成する技術を開発し、ここに脂質二重膜/イオンチャネル(グラミシジン)を再構成して単一イオンチャネル電流を計測した。微細孔構造を工夫することで、シリコン基板として世界最小の雑音電流(貫通孔径 50 μm で ~1 pA rms)を得ることが出来た。新規なバイオエレクトロニック素子として、プレーナー型パッチクランプ素子を実現した。Si-SOI 基板の裏面 Si を TMAH エッチングにより除去しマイクロレベルの厚みの単結晶シリコン基板の作製技術を確立した。これらは 10 報の論文としてまとめられた。

**ix) 人工酵素の基盤研究**：酸素貯蔵蛋白質であるミオグロビンのヘム近傍を改変することにより、外来基質の高効率酸化反応を達成するとともに、高い不斉選択性を賦与することに成功した。高難度酸化反応である芳香族の水酸化反応も、基質をヘム近傍に固定することによって達成し、酸素添加酵素の設計指針を確立することが出来た。フェリチンの内部空間を利用するナノ金属クラスターの作成と物質変換反応では、2 ナノメートルの Pd クラスター合成とサイズ選択的なオレフィン類の還元反応に成功した。8 報の論文にまとめた。

各種分光学的な実験手法と遺伝子工学、分子生物学的な実験手法を駆使し、CO センサータンパク質 CooA、および酸素センサータンパク質 HemAT 中に含まれ、センサーの本体でもあるヘムの配位構造、近傍構造を明らかにし、CO、酸素のセンシング機構を解明した。*in vivo* および *in vitro* における活性測定系の構築を行い、系統的なアミノ酸変異を導入した変異体の機能を解析し、CooA、および HemAT による情報伝達機構を分子レベルで明らかにした。5 報の論文にまとめた。

## 特記事項

こ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。

**学術創成**：本研究の成否は位相差電子顕微鏡の见えないものを観る能力にかかっており、永山グループは5年間を通じ顕微鏡開発に全力を投じた。その結果、新しい学術を立ち上げる機関車役として位相差電子顕微鏡にその能力があるとの認識が、学会レベルで広がったように思う。研究最終年に日本顕微鏡学会の第51回（2006）学会賞（瀬藤賞）が「位相差電子顕微鏡法の開発と生物学への応用研究」（永山國昭）に贈られることが決まった。ただしこの賞は装置開発「顕微法基礎部門」において与えられたものであり、生物応用については可能性を示したにとどまった。

学術創成の重要な指標としての社会的展開においては、位相差電子顕微鏡の能力を受託観察サービスという社会活動に還元するベンチャー「テラベース（株）」を2006年3月岡崎の地に立ち上げることができた。

### 個別研究：

i) 位相差電子顕微鏡専用装置：学術創成の研究過程で生まれた特許をベースに、2003～2004年、科学技術振興機構（JST）の委託開発制度のもと専用装置「透過型電子位相顕微鏡（200kV）」を開発することができた。試作機第1号はベンチャー「テラベース（株）」に日本電子から貸与され、事業展開に供されている。

ii) DNAシーケンサー：現在ヒト1人のゲノム配列の読み取りコストは約3,000万円と見積もられており、6年前の最初のドラフト発表時のゲノム解読コストの1000分の1にまで低減した。米国では云々ゆる「1,000ドルゲノム」を目指し、凄まじい開発競争を行われている。しかし世界的に見て、電顕を用いたシーケンサーの開発は本研究の試みが唯一と思われる。5年間の研究で電顕にはDNAシーケンサーとしての十分な能力があると実証されたが、塩基特異的ラベル技術の開発は途上にある。しかし先に述べたように共有結合をベースとする画期的発明があり、十分な開発投資（ヒト、モノ、カネ）さえできれば1,000ドルゲノムの開発競争に一番乗りも可能である。この開発はテラベース（株）に引き継がれた。

iii) 新規電位依存酵素の発見：電位依存的に酵素活性をオン-オフする新規膜蛋白質（VSP）が岡村グループで発見され、各種のジャーナルでニュースとして取り上げられ世界的センセーションをもたらした。論文引用回数も極めて多く、世界の注目度は高い。この酵素自体は分子量が小さく電顕構造解析向きでないが、生体膜上での機能構造は、電顕を用いた機能構造生物学の対象である。またチャンネルのバイオエレクトロニクス利用を試みている宇理須グループにとり最適ターゲットとなっている。VSPの研究では岡村グループの一員、村田喜理に2006年度日本生理学会奨励賞が与えられた。岡村グループの第2のヒットは新規な4回貫通型プロトンチャンネルの発見でScienceに受理され、記事Perspectiveでも大きく取り上げられた。またNature Cell BiologyのNews & Viewsにも載った。

iv) TRPの新規生理機能：森グループはTRPファミリーの1つTRP6がカルシウム流入にとり必須のコンポーネントであることを明らかにし、引用回数150を超える注目を浴びた。

v) バイオエレクトロニクスの基本技術：宇理須グループの研究は生体由来のチャンネル分子を利用しているためバイオエレクトロニクス分野で高い注目を浴び、独自のプロジェクトが立ち上がりつつある。

## 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（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）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、3頁以内に収めて記入してください。

### 原著論文

1. K. Danov, R. Danev and K. Nagayama, “Electric charging of thin films measured using the contrast transfer function”, *Ultramicroscopy* **87** (2001) 45-54.
  2. R. Danev and K. Nagayama, “Complex Observation in Electron Microscopy. II. Direct Visualization of Phases and Amplitudes of Exit Wave Functions”, *J. Phys. Soc. Jpn.* **70** (2001) 696-702.
  3. K. Murata, N. Odahara, A. Kuniyasu, Y. Sato, H. Nakayama and K. Nagayama, “Asymmetric arrangement of auxiliary subunits of skeletal muscle voltage-gated L-type  $Ca^{2+}$  channel”, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **282** (2001) 284-291.
  4. R. Danev and K. Nagayama, “Transmission Electron Microscopy with Zernike Phase Plate”, *Ultramicroscopy* **88** (2001) 243-252.
  5. K. Danov, R. Danev and K. Nagayama, “Reconstruction of the electric charge density in thin films from the contrast transfer function measurements”, *Ultramicroscopy* **90** (2002) 85-95.
  6. S. Sugitani and K. Nagayama, “Complex Observation in Electron Microscopy. III. Inverse Theory of Observation-scheme Dependent Information Transfer”, *J. Phys. Soc. Jpn.* **71** (2002) 744-756.
  7. R. Danev, H. Okawara, N. Usuda, K. Kametani and K. Nagayama, “A Novel Phase-contrast Transmission Electron Microscopy Producing High-contrast Topographic Images of Weak Objects”, *J. Biol. Phys.* **28** (2002) 627-635.
  8. K. Kuwata, T. Matumoto, H. Cheng, K. Nagayama, T. L. James and H. Roder, “NMR-detected hydrogen exchange and molecular dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion fragment 106-126”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003) 14790-14795.
  9. T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama and Y. Watanabe, “Size-Selective Olefin Hydrogenation by a Pb Nanocluster Provided in an Apo-Ferritin Cage”, *J. Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 2527-2530.
  10. R. Danev and K. Nagayama, “Complex Observation in Electron Microscopy. IV. Reconstruction of Complex Object Wave from Conventional and Half Plane Phase Plate Image Pair”, *J. Phys. Soc. Jpn.* **73** (2004) 2718-2724.
  11. K. Nagayama, “Complex Observation in Electron Microscopy. V. Phase Retrieval for Strong Objects with Foucault Knife-edge Scanning”, *J. Phys. Soc. Jpn.* **73** (2004) 2725-2731.
  12. Y. Kaneko, R. Danev, K. Nitta and K. Nagayama, “*In vivo* subcellular ultrastructures recognized with Hilbert-differential-contrast transmission electron microscopy”, *J. Electr. Microsc.* **54**(2005)79-85.
  13. M. Tosaka, R. Danev and K. Nagayama, “Application of Phase Contrast Transmission Microscopic Methods to Polymer Materials” *Macromolecules*, **38** (2005)19, 7884-7886.
  14. K. Nagayama, “Phase Contrast Enhancement with Phase Plates in Electron Microscopy”, *Ad Imaging Electr. Phys.* **138**(2005) 69-146.
  15. Y. Kaneko, R. Danev, K. Nagayama and H. Nakamoto, “Carboxysomes in Living Cyanobacterial Cell Visualized by Hilbert Differential Contrast Transmission Electron Microscopy”, *J. Bacter.* **188**(2006)805-808.
  16. M. Tosaka, M. Tsuji, T. Ogawa, H. Kitano, K. Nakano, S. Kohjiya, R. Danev and K. Nagayama, “Self-assembly of nano-sized arrays on highly oriented thin films of poly”, Poly. tetrafluoroethylene” *Polymer* **47**(2006)951-955.
- 
17. R. Inoue, T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito and Y. Mori, The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha_1$ -adrenoceptor activated  $Ca^{2+}$ -permeable cation channel. *Circ. Res.* **88** (2001) 325-332.
  18. M. Ino, T. Yoshinaga, M. Wakamori, N. Miyamoto, E. Takahashi, J. Sonoda, T. Kagaya, T. Oki, T. Nagasu, Y. Nishizawa, I. Tanaka, K. Imoto, S. Aizawa, S. Koch, A. Schwartz, T. Niidome, K. Sawada and Y. Mori, Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the  $\alpha 1B$  subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98** (2001) 5323-5328.
  19. Y. Hara, M. Wakamori, M. Ishii, E. Maeno, M. Nishida, T. Yoshida, H. Yamada, S. Shimizu, E. Mori, J. Kudoh, N. Shimizu, H. Kurose, Y. Okada, K. Imoto and Y. Mori, LTRPC2  $Ca^{2+}$ -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell* **9** (2002) 163-173.
  20. T. Morii, K. Sugimoto, K. Makino, M. Otsuka, K. Imoto and Y. Mori, A new fluorescent biosensor for inositol trisphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 1138-1139.
  21. Y. Mori, M. Wakamori, T. Miyakawa, M. Hermosura, Y. Hara, M. Nishida, K. Hirose, A. Mizushima, T. Okada, M. Kurosaki, E. Mori, K. Gotoh, A. Fleig, R. Penner, M. Iino and T. Kurosaki, TRP1 regulates capacitative  $Ca^{2+}$  entry and  $Ca^{2+}$  release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **195** (2002) 673-681.
  22. K. Sugimoto, Y. Mori, K. Makino, K. Ohkubo and T. Morii, Functional Reassembly of a Split PH Domain. *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 5000-5004.
  23. M. Nishida, K. Sugimoto, Y. Hara, E. Mori, T. Morii, T. Kurosaki and Y. Mori, Amplification of receptor signaling by  $Ca^{2+}$  entry-mediated translocation and activation of phospholipase  $C\beta 2$  in B lymphocytes. *EMBO J.* **22** (2003) 4677-4688.

**研究成果の発表状況**

24. K. Sugimoto, M. Nishida, M. Otsuka, K. Ohkubo, Y. Mori and T. Morii, Novel real time sensors to quantitatively assess in vivo inositol 1,4,5-trisphosphate production in intact cells. *Chem. Biol.* **11** (2004) 475-485.
25. T. Suzuki, A. V. Delgado-Escueta, K. Aguan, J. Shi, M. E. Alonso, Y. Hara, M. Nishida, T. Numata, T. Takeuchi, R. Morita, M. T. Medina, D. Bai, S. Ganesh, Y. Sugimoto, J. Inazawa, J. N. Bailey, A. Ochoa, A. Jara-Prado, A. Rasmussen, J. Ramos-Peek, S. Cordova, F. Rubio-Donnadieu, Y. Inoue, M. Osawa, S. Kaneko, H. Oguni, Y. Mori and K. Yamakawa, Mutations in *EFHC1* cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* **36** (2004) 842-846.
26. S. Shimizu, T. Yoshida, M. Wakamori, M. Ishii, T. Okada, M. Takahashi, M. Seto, K. Sakurada, Y. Kiuchi and Y. Mori, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent myosin light chain kinase is essential for activation of TRPC5 channels expressed in HEK cells. *J. Physiol.* **570** (2006) 219-235.
27. Y. Katsuyama, J. Matsumoto, T. Okada, Y. Ohtsuka, L. Cheng, H. Okado and Y. Okamura, "Regulation of synaptotagmin gene expression during ascidian embryogenesis." *Develop. Biol.* **244** (2000) 293-304.
28. T. Okada, Y. Katsuyama, F. Ono and Y. Okamura, "The development of three identified motor neurons in ascidian embryo." *Develop. Biol.* **244** (2002):278-92.
29. T. Ebihara, Y. komiya, H. Izumi-Nakaseko, S. Adachi-Akahane, S. Okabe and Y. Okamura, "Coexpression of a Cav1.2 protein lacking an N-terminus and the first domain specifically suppresses L-type calcium channel activity." *FEBS Lett.* **529** (2002) 203.
30. K. Nakajo, Y. Katsuyama, F. Ono, Y. Ohtsuka and Y. Okamura, "Identification, functional characterization and developmental expression of the ascidian Kv4-class potassium channel." *Neurosci. Res.* **45** (2003) 59-70.
31. H. Izumi-Nakaseko, S. Yamaguchi, Y. Ohtsuka, T. Ebihara, S. Adachi-Akahane and Y. Okamura, "DHP-insensitive L-type-like Ca channel of ascidian acquires sensitivity to DHP with single amino acid change in domain III P-region." *FEBS Lett.* **549** (2003) 67-71.
32. K. Nakajo and Y. Okamura, "Development of transient outward currents coupled with Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release mediates oscillatory membrane potential in ascidian muscle." *J. Neurophysiol.* **92** (2004) 1056-1066.
33. Y. Murata, H. Iwasaki, M. Sasaki, K. Inaba and Y. Okamura, "Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor" *Nature* **435** (2005) 1239-1243.
34. Y. Katsuyama, Y. Okada, J. Matsumoto, Y. Ohtsuka, T. Terashima and Y. Okamura, "Early specification of ascidian larval motor neurons" *Dev. Biol.* **278** (2005) 310-322.
35. Y. Okamura, A. Nishino, Y. Murata, K. Nakajo, H. Iwasaki, Y. Ohtsuka, M. Tanaka-Kunishima, N. Takahashi, Y. Hara, T. Yoshida, M. Nishida, H. Okado, H. Watari, I. A. Meinertzhagen, N. Satoh, K. Takahashi, Y. Satou, Y. Okada and Y. Mori, "Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes" *Physiol. Genomics.* **22** (2005) 269-282.
36. E. R. Brown, A. Nishino, Q. Bone, I. A. Meinertzhagen and Y. Okamura, "GABAergic synaptic transmission modulates swimming in the ascidian larva" *Eur. J. Neurosci.* **22** (2005) 2541-2548.
37. T. Miyamoto, K. Morita, D. Takemoto, K. Takeuchi, Y. Kitano, T. Miyakawa, K. Nakayama, Y. Okamura, H. Sasaki, Y. Miyachi, M. Furuse and S. Tsukita, "Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice" *J. Cell. Biol.* **169** (2005) 527-538.
38. M. Sasaki, M. Takagi and Y. Okamura, "A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel", *Science*, in press (2006).
39. T. Takahashi and S. Kuyucak, "Functional Properties of 3-fold and 4-fold Channels in Ferritin deduced from Electrostatic Calculations", *Biophys. J.* **84** (2003) 2256-2263.
40. T. Takahashi, J. Sugiura, and K. Nagayama, "Comparison of all atom, continuum, and linear fitting empirical models for charge screening effect of aqueous medium surrounding a protein molecule", *J.Chem.Phys.* **116** (2002), 8232-8237
41. S. D. More, H. Graaf, M. Baune, C. Wang, and T. Urisu, "Influence of substrate roughness on the formation of aliphatic self-assembled monolayers(SAMs) on silicon (100)", *Jpn. J. Appl. Phys.* **41** (2002) 4390-4394.
42. S. D. More, J. Hudecek and T. Urisu, "Hydrophobic/hydrophilic interactions of cytochrome C with functionalized self-assembled monolayers on silicon", *Surf. Sci.* **532-535** (2003) 993-998.
43. C. Wang, S. D. Moré, Z. Wang, S. Yamamura, Y. Nonogaki and T. Urisu, "Patterning SiO<sub>2</sub> thin films using synchrotron radiation stimulated etching with a Co contact mask", *J. Vac. Sci. Technol.* **B21**, (2003) 818-822.
44. R. Tero, M. Takizawa, Y. J. Li, M. Yamazaki and T. Urisu "Deposition of phospholipid layers on SiO<sub>2</sub> surface modified by hydrophobic SAM islands", *Appl. Surf. Sci.* **238** (2004) 218-222
45. M. Takizawa, Y. H. Kim and T. Urisu, "Deposition of DPPC monolayers by Langmuir-Blodgett method on SiO<sub>2</sub> surfaces covered by octadecyltrichlorosilane self-assembled monolayer islands", *Chem. Phys. Lett.* **385** (2004) 220-224.

**研究成果の発表状況**

46. R. Tero, M. Takizawa, Y. J. Li, M. Yamazaki and T. Urisu, "Lipid membrane formation by vesicle fusion on silicon dioxide surfaces modified with alkyl self-assembled-monolayer -islands", *Langmuir*, **20** (2004) 7526-7531.
47. R. Tero, T. Urisu, H. Okawara and K. Nagayama, "Deposition of lipid bilayers on the OH-density-controlled silicon dioxide surfaces", *J. Vac. Sci. & Technol.* **A23** (2005) 751-754.
48. N. Misawa, S. Yamamura, R. Tero, Y. Nonogaki and T. Urisu, "Orientation of avidin molecules immobilized on COOH-modified SiO<sub>2</sub>/Si(100) surfaces", *Chem. Phys. Lett.* **419** (2005) 86-90.
49. Y. H. Kim, Md. M. Rahman, Z. L. Zhang, R. Tero and T. Urisu, "Supported lipid bilayer formation by the giant vesicle fusion induced by vesicle-surface electrostatic attractive interaction," *Chem. Phys. Lett.* (2005) inpress.
50. T. Urisu, Md. M. Rahman, H. Uno, R. Tero and Y. Nonogaki, "Formation of high resistance supported lipid bilayer on the surface of Si substrate with micro electrodes" *Nanomedicine* **1** (2005) 317-322.
51. I. Hara, T. Ueno, S. Ozaki, S. Itoh, K. Lee, N. Ueyama and Y. Watanabe, "Oxidative Modification of Tryptophan-43 in the Heme Vicinity of the F43W/H64L Myoglobin Mutant" *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 36067-36070.
52. S. Kato, H. Yang, T. Ueno, S. Ozaki, G.N. Phillips, Jr., S. Fukuzumi and Y. Watanabe, "Asymmetric Sulfoxidation and Amine Binding by H64D/V68A and H64D/V68S Mb: Mechanistic Insight into the Chiral Discrimination Step" *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 8506-8507.
53. M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii and Y. Watanabe, "Preparation of Artificial Metalloenzymes by Insertion of Chromium(III)Schiff Base Complexes into Apomyoglobin Mutants" *Angew. Chem. Int. Ed.* **42** (2003) 1005-1008.
54. T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama and Y. Watanabe "Size Selective Olefin Hydrogenation by a Pd Nanocluster Provided in the Apo-Ferritin Cage." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43** (2004) 2527-2530.
55. S. Hirota, H. Okumura, S. Arie, K. Tanaka, M. Shionoya, T. Takabe, N. Funasaki and Y. Watanabe, "Interaction of Plastocyanin with Oligopeptides: Effect of Lysine Distribution within the Peptide," *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 849-855.
56. S. Kato, T. Ueno, S. Fukuzumi and Y. Watanabe, "Catalase Reaction by Myoglobin Mutants and Native Catalase," *J. Biol. Chem.* **279**, 52376-52381 (2004).
57. T.D. Pfister, T. Ohki, T. Ueno, I. Hara, S. Adachi, Y. Makino, N. Ueyama, Y. Lu and Y. Watanabe, "Monooxygenation of an Aromatic Ring by F43W/H64D/V68I Myoglobin Mutant and Hydrogen Peroxide," *J. Biol. Chem.* **280**, 12858-12866 (2005).
58. T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane and Y. Watanabe, "Coordinated Design of Cofactor and Active Site Structures in Development of New Protein Catalysts," *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6556-6562 (2005).
59. S. Aono, T. Kato, M. Matsuki, H. Nakajima, T. Ohta, T. Uchida and T. Kitagawa, "Resonance Raman and ligand binding studies of the oxygen sensing signal transducer protein HemAT from *Bacillus subtilis*" *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 13528-13538.
60. S. Aono, H. Nakajima, T. Ohta and T. Kitagawa, "Resonance Raman and ligand binding analysis of the oxygen-sensing signal transducer protein HemAT from *Bacillus subtilis*" *Methods Enzymol.* **381** (2003) 618-628.
61. S. Aono, "Biochemical and biophysical properties of the CO-sensing transcriptional activator CooA" *Acc. Chem. Res.* **36** (2003) 825-831.
62. H. Sawai, N. Kawada, K. Yoshizato, H. Nakajima, S. Aono and Y. Shiro "Characterization of the heme environmental structure of Cytoglobin, a fourth globin in humans" *Biochem.* **42** (2003) 5133-5142.
63. S. Akiyama, T. Fujisawa, K. Ishimori, I. Morishima and S. Aono, "Activation mechanisms of transcriptional regulator CooA revealed by small-angle X-ray scattering" *J. Mol. Biol.* **341** (2004) 651-668.

**国際シンポジウム開催総数** 3件

**国際学会発表総数** 87件

**国内会議発表総数** 254件

**博士号取得総数** 17件