

# 研究系

## Research Activities of the Institute

### 分子生理研究系

#### DEPARTMENT OF MOLECULAR PHYSIOLOGY

#### 神経機能素子研究部門

##### Division of Biophysics and Neurobiology

#### 職員 (Staff)



#### 教授 久保 義弘

東京大学医学部卒，同医学系研究科博士課程修了，医学博士。カリフォルニア大学サンフランシスコ校・ポスドク，東京都神経科学総合研究所・副参事研究員，東京医科歯科大学医学部・教授を経て，平成15年12月から現職。  
専攻：分子生理学，神経生物学。

#### Professor: KUBO, Yoshihiro, MD, PhD

1985 Graduated from University of Tokyo, Faculty of Medicine. 1989 Completed the doctoral course in Medical Science, University of Tokyo. 1989-2000 Researcher, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience. (1991-1993: Post-doc, University of California, San Francisco). 2000 Professor, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine. 2003 Professor, NIPS.

Specialty: Biophysics, Neurobiology



#### 准教授 立山 充博

東京大学薬学部卒，同大学院修了，薬学博士。順天堂大学助手，米国コロンビア大学博士研究員，CREST 研究員を経て，平成16年6月から現職。  
専攻：薬理学，生理学。

#### Associate Professor: TATEYAMA, Michihiro, PhD

1990 Graduated from University of Tokyo, Faculty of Pharmacology. 1995 Completed the doctoral course in Pharmacology, University of Tokyo. 1995-2000 Assistant Professor, Juntendo University School of Medicine. 2000-2002 Research Fellow, Columbia University. 2002-2004 Research Fellow, CREST. 2004 Associate Professor, NIPS.

Specialty: Pharmacology, Physiology



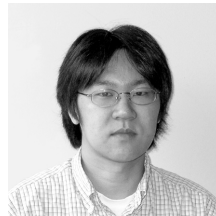
#### 助教 中條 浩一

東京大学教養学部卒，同大学院修了，博士(学術)。井上フェロー，生理学研究所非常勤研究員を経て，平成17年4月から現職。  
専攻：分子生理学，生物物理学。

#### Assistant Professor: NAKAJO, Koichi, PhD

1997 Graduated from University of Tokyo, College of Arts and Sciences.

2002 Completed the doctoral course in Life Science, University of Tokyo Graduate School of Arts and Sciences. 2002 Inoue Research Fellow. 2004 Research Fellow, NIPS. 2005 Assistant Professor, NIPS.  
Specialty: Molecular Physiology, Biophysics



#### 研究員 伊藤 政之

東邦大学理学部卒，同大学院修了。博士(理学)。平成18年4月から現職。  
専攻：分子生物学。

#### Postdoctoral Fellow: ITOH, Masayuki, PhD

2001 Graduated from Toho University, Faculty of Science. 2006 Completed the doctoral course in Science, Toho University. 2006 Research Fellow, NIPS.

Specialty: Molecular biology



#### 研究員 長友 克広

東京薬科大学薬学部卒，東京医科歯科大学大学院修士課程修了，総合研究大学院大学博士後期課程修了。博士(理学)。平成20年4月から現職。  
専攻：分子細胞生理学。

#### Postdoctoral Fellow: NAGATOMO, Katsuhiko, PhD

2002 Graduated from Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, School of Pharmacy. 2005 Completed the master course in Medical Science, Tokyo Medical and Dental University Graduate School. 2008 Completed the doctoral course in Life Science, the Graduate University for Advanced Studies. 2008 Research Fellow, NIPS.

Specialty: Molecular and Cellular Physiology

#### 研究内容

イオンチャネル，受容体，G 蛋白質等の膜関連蛋白質は，神経細胞の興奮性とその調節に重要な役割を果たし，脳機能を支えている。本研究部門では，これらの神経機能素子を対象として，生物物理学的興味から「その精妙な分子機能のメカニズムと動的構造機能連関についての研究」に取り組み，また，神経科学的興味から「各素子の持つ特性の脳神経系における機能的意義を知るための脳スライス・個体レベルでの研究」を目指している。

具体的には，分子生物学的手法により，神経機能素子の遺伝子の単離，変異体の作成，蛍光蛋白やマーカーの付加等を行い，卵母細胞，HEK293 細胞等の遺伝子発現系に再構成し，パッチクランプ等の電気生理学的手法，細胞内  $Ca^{2+}$  イメージング・全反射照明下での FRET 計測等の光生理学的手法，細胞

生物学的研究手法により、その分子機能を解析している。また、外部研究室との連携により、構造生物学的アプローチ、遺伝子改変マウスの作成も現在進行中である。

研究課題は以下の通りである。

- (1) 内向き整流性  $K^+$  チャンネルの構造機能連関
- (2) 代謝型グルタミン酸受容体の、多価陽イオン感知機能の分子基盤と生理的意義、およびマルチパスシグナリングの調節機構
- (3) 膜機能蛋白のサブユニット会合および動的構造変化の FRET 法による光生理学的解析
- (4) KCNE サブユニットの会合による KCNQ1 チャンネル電位センサードメインの動きの変化
- (5) イオンチャンネル型 ATP 受容体  $P2X_2$  の膜電位依存性ゲート機構、および発現密度に依存するポアの変化
- (6) 膜電位-細胞長変換素子プレスチンの機能複合体の分子同定と動的構造変化の解析
- (7) カフェインによるマウス TRPA1 チャンネルの活性化の機能的意義とその分子基盤
- (8) 代謝型グルタミン酸受容体と  $GABA_B$  受容体の分子会合と機能的相互作用
- (9) マウス小脳平行線維刺激に対するプルキンエ細胞の応答の lobule 間での差異
- (10) G 蛋白質調節因子 RGS の機能解析
- (11)  $P2X_2$  チャンネル、およびプレスチンのレコンビナント蛋白の精製と単一粒子構造解析

## Research works

Ion channels, receptors and G proteins play critical roles for the excitability and its regulation of neurons. We focus on these molecules which enable brain function. From the biophysical point of view, we study structure-function relationships, regulation mechanisms and dynamic structural rearrangements of ion channels and receptors. We also study the functional significance of specific features of ion channels and receptors in the brain function by making knock-in mice and by studying their abnormalities in the synaptic transmission and whole animal behavior. Specific themes of research projects currently running are as follows.

- (1) Structure-function relationship of inwardly rectifying  $K^+$  channels.
- (2) Molecular mechanisms and functional significance of the  $Ca^{2+}/Gd^{3+}$  sensing function of the metabotropic glutamate receptor (mGluR1).
- (3) Analysis of the dynamic structural rearrangements of ion channels and receptors by FRET measurement under evanescent field illumination.
- (4) Changes of the movement of S4 domain of KCNQ1 channel by assembly of KCNE subunit.

- (5) Voltage-dependent gating and expression density dependent changes of the pore properties of ATP receptor channel  $P2X_2$ .
- (6) Molecular identification and functional analysis of Prestin complex, a motor protein of the outer hair cell.
- (7) Functional significance and molecular mechanisms of the activation of the mouse TRPA1 channel by caffeine.
- (8) Molecular assembly and functional interaction between mGluR1 and  $GABA_B$  receptor.
- (9) Differences between lobules 9 and 10 of slow PSCs evoked by parallel fiber stimulation in mouse cerebellar Purkinje neurons.
- (10) Functional analysis of RGS family, regulators of G protein signaling.
- (11) Purification of recombinant proteins of  $P2X_2$  channel and Prestin toward single particle structure analysis.

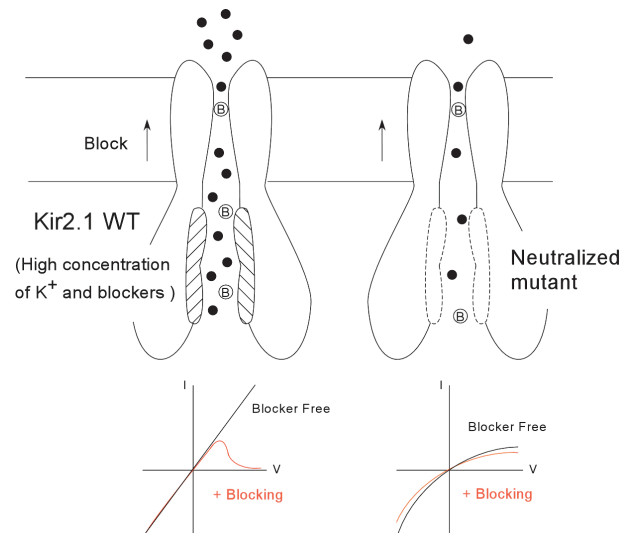


図1 内向き整流性  $K^+$  チャンネルのポア細胞内領域の電荷を帯びたアミノ酸残基の果たす機能的役割

Fig. 1. Functional roles of charged amino acid residues on the wall of the cytoplasmic pore of inward rectifier  $K^+$  channel Kir2.1. (Fujiwara and Kubo, J. Gen. Physiol., 2006)

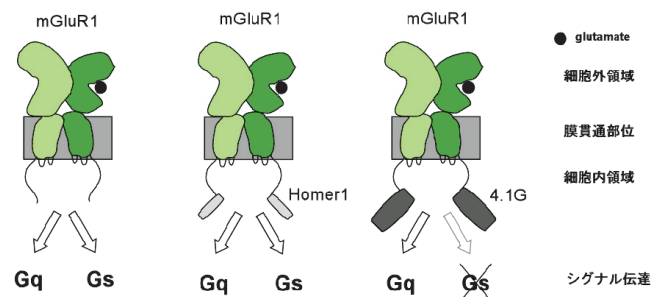


図2 代謝型グルタミン酸受容体の多様なシグナル伝達は Protein 4.1G により制御を受ける。

Fig. 2. Coupling profile of the metabotropic glutamate receptor 1α is regulated by the binding of Protein 4.1G. (Tateyama and Kubo, Mol. Cell. Neurosci., 2007)

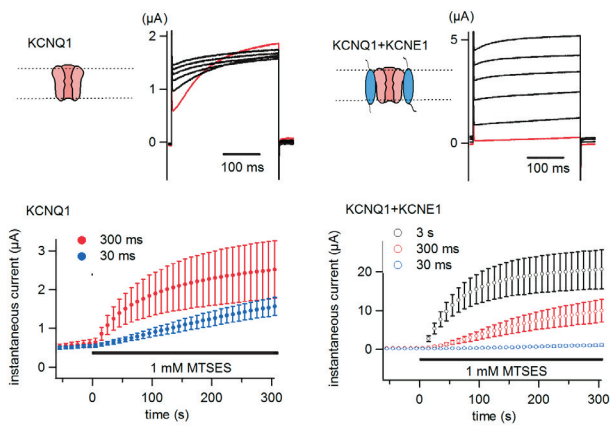


図3 KCNE サブユニット結合による KCNQ1 チャンネル電位センサードメインの動きの制御の MTSES accessibility による解析  
**Fig. 3.** KCNE1 and KCNE3 stabilize and/or slow voltage sensing S4 segment of KCNQ1 channel. (Nakajo and Kubo, *J. Gen. Physiol.*, 2007)

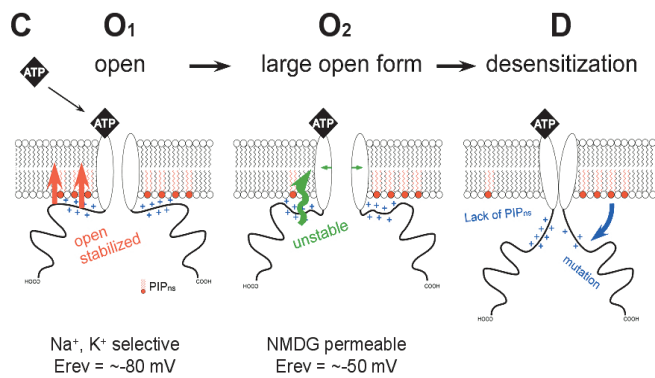


図4 イノシトールリン脂質による ATP 受容体チャネル P2X<sub>2</sub> の脱感作とイオン選択性の調節  
**Fig. 4.** Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATP-gated P2X<sub>2</sub> channels by phosphoinositides. (Fujiwara and Kubo, *J. Physiol.*, 2006)

## 分子神経生理研究部門 Division of Neurobiology and Bioinformatics

### 職員 (Staff)



#### 教授 池中一裕

大阪大学理学部卒，同大学院理学研究科修了，理学博士。大阪大学蛋白質研究所助手，助教授を経て，平成4年11月から現職。  
専攻：分子神経生物学。

#### Professor: IKENAKA, Kazuhiro, PhD

1975 Graduated from Faculty of Science, Osaka University. 1980 Graduated from the doctoral course at Osaka University, PhD. 1980 Instructor at Institute for Protein Research, Osaka University. 1991 Associate Professor at Institute for Protein Research, Osaka University. 1992 Professor, NIPS.  
Specialty: Molecular Neurobiology



#### 准教授 小野勝彦

岡山大学理学部卒，同大学院理学研究科修士課程修了，医学博士。岡山大学医学部助手，講師，米国ケースウェスタンリザーブ大学研究員，島根医科大学助教授を経て，平成15年3月から現職。  
専攻：神経発生学。

#### Associate Professor: ONO, Katsuhiko, PhD

1980 Graduated from Faculty of Science, Okayama University. 1982 Graduated from the master course at Okayama University. 1988 PhD from Okayama University Medical School. 1982 Research Associate at Okayama University Medical School, 1993 Assistant professor at Okayama University Medical School. 1995 Associate professor at Shimane Medical University. 2003 Associate professor at NIPS.  
Specialty: Neural Development



#### 准教授 等 誠司

東京大学医学部卒，臨床研修および神経内科トレーニングの後，同大学院医学系研究科修士課程修了，医学博士。理化学研究所基礎科学特別研究員，カナダ・トロント大学ポスドク，東京大学医学部助手を経て，平成15年9月から現職。  
専攻：神経発生学，臨床神経学。

#### Associate Professor: HITOSHI, Seiji, MD, PhD

1988 Graduated from Faculty of Medicine, University of Tokyo. MD. 1993 Board-certified neurologist by Japanese Society for Neurology. 1997 PhD from Graduate School of Medicine, University of Tokyo. 1997 Special Postdoctoral Researcher at the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN). 1999 Postdoctoral Fellow at University of Toronto. 2003 Assistant Professor at University of Tokyo. 2003 Associate Professor at NIPS.  
Specialty: Developmental Neurobiology, Neurology



#### 助教 竹林浩秀

京都大学医学部卒，同大学院医学研究科修了，医学博士。日本学術振興会特別研究員を経て，平成14年8月から現職。  
専攻：分子神経生物学。

#### Assistant Professor: TAKEBAYASHI, Hirohide, MD, PhD

1995 Graduated from Kyoto University, Faculty of Medicine. 1999 Graduated from Kyoto University, Graduate School of Medicine. 1999 Postdoctoral Fellow, Kyoto University, 2002 Research Associate, NIPS.  
Specialty: Molecular Neurobiology

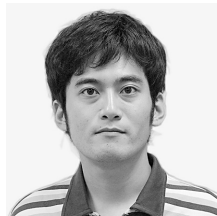


#### 助教 田中謙二

慶応義塾大学医学部卒，同大学病院精神神経科研修医修了，同大学院医学研究科博士課程修了。医学博士。生理学研究所リサーチ・アシソシエイトを経て，平成16年6月から現職。  
専攻：神経生化学，精神神経生物学。

#### Assistant Professor: TANAKA, Kenji, MD, PhD

1997 Graduated from Keio University, School of Medicine. 1997-1999 Resident in Department of Neuropsychiatry, Keio University, School of Medicine. 2003 Completed the doctoral course in Keio University. 2003 Research Associate, NIPS. 2004 Assistant Professor, NIPS.  
Specialty: Neurochemistry, Biological psychiatry

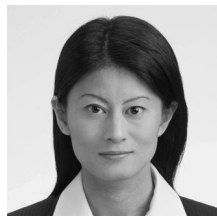


#### 研究員 後藤仁志

神戸大学農学部卒，大阪大学大学院理学研究科修了，理学博士。平成19年4月より現職。  
専攻：分子神経生物学。

#### Postdoctoral Fellow: GOTOH, Hitoshi, PhD

2002 Graduated from Kobe University, Faculty of Agriculture. 2004 Graduated from the master course in Osaka University, Faculty of Science. 2007 Graduated from the doctoral course in Osaka University, Faculty of Science, PhD. 2007 Postdoctoral Fellow, NIPS.  
Specialty: Molecular Neurobiology



#### 研究員 稲村直子

京都工芸繊維大学繊維学部卒，神戸大学自然科学研究科修士課程を経て，大阪大学理学研究科博士課程にて学位取得(理学)。  
平成19年10月より現職。

#### Postdoctoral Fellow: INAMURA, Naoko, PhD

Graduated from Kyoto Institute of Technology, Department of Applied Biology. Graduated from the master course in Kobe University, School of Science and Technology. Graduated from the doctoral course in Osaka University, School of Science, PhD. Postdoctoral Fellow, NIPS.  
Specialty: Neural Development



## 研究内容

(1) 神経系の発生過程において、神経系を構成する多くの細胞は共通の前駆細胞である神経上皮細胞から発生・分化してくる。分子神経生理部門では、神経上皮細胞からどのようにして種々の細胞種への分化決定がなされるのか分子・細胞生物学的に研究している。その中でも、グリア細胞の系譜については、未だ不明の点が多く、遺伝子改変マウスの作製、免疫組織学的手法や *in situ hybridization* 法並びにレトロウイルスによる細胞系譜解析を駆使して解析を進めている。また、再生医療を目指して神経幹細胞移植により脱髄マウスを治療することを試みている。

(2) 神経上皮層で増殖し分化の方向が決まった細胞は、機能する部位に向かって移動することが知られている。神経系で見られる細胞移動は、大脳や小脳の皮質形成過程でみられるニューロンの放射状移動については詳細に調べられているが、比較的長距離を移動する正接方向への移動やグリア前駆細胞の移動に関しては、不明な点が多い。このような細胞の移動様式や制御機構を明らかにするために、発達途上の脳内に様々な遺伝子を導入して、形態学的に解析している。

(3) 神経幹細胞は、脳を構成する全ての神経細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイトの前駆細胞である。発達期の胎仔脳のみならず成体脳にも存在し、成体脳の特定の部位における神経細胞の新生に関与している。神経幹細胞の発生から、増殖・維持・分化さらに老化に至るまでを制御している分子機構を解明し、神経幹細胞の生体内での挙動を明らかにすることを目指している。

(4) 脳の発達段階における糖蛋白質糖鎖構造を独自に開発した方法を用いて解析したところ、個人間で極めてよく保存されていることが明らかとなった。現在、脳の領域化や癌の発生・転移におけるN-結合型糖鎖の重要性について研究している。

(5) 以上の研究において開発した神経系における遺伝子導入技術を利用して遺伝子治療の基礎的研究を行っている。

## Research works

During the course of formation of the mammalian central nervous system, neuroepithelial cells differentiate into various kinds of cells to make a fine three-dimensional network. Our goal is to understand genetic control over these processes. As a first step, we have cloned several genes that are specifically expressed in a certain type of brain cells and are investigating their role on cell fate determination. Neural cells are known to leave the ventricular zone after their commitment, and migrate towards destinations. While radial neuronal migration has been studied extensively in the developing cerebral and cerebellar cortices, mechanisms underlying tangential migration of neuronal and

glial progenitors remains unclear. We are employing *in ovo* or *in utero* electroporation method to introduce exogenous genes in developing central nervous system, and studying mode and mechanisms of neural cell migration.

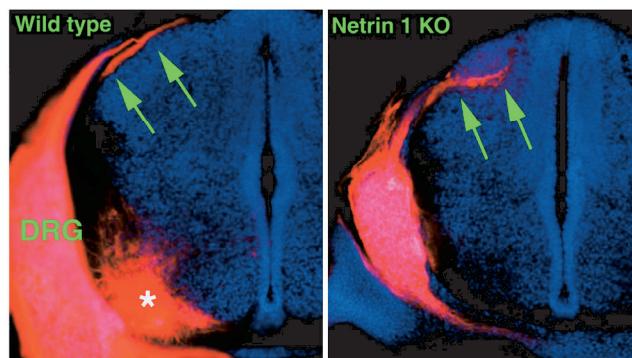
We are making use of hereditary mutant mice that exhibit abnormal development of the nervous system. We also use *in situ* hybridization and immunohistochemical technique to study cell lineages during development of the nervous system.

Neural stem cells, which are ultimate lineage precursors to all neurons and glia in the mammalian brain, are present not only in embryonic but also in adult brains, and contribute to adult neurogenesis. We are investigating molecular mechanisms underlying the generation, proliferation, maintenance, differentiation, and senescence of the neural stem cells, which will clarify their *in vivo* kinetics and function.

An automated system to analyze N-linked sugar chains was developed to study their biological roles during development and tumorigenesis.

New retroviral vectors are also constructed for efficient gene delivery, which will be used for cancer gene therapy.

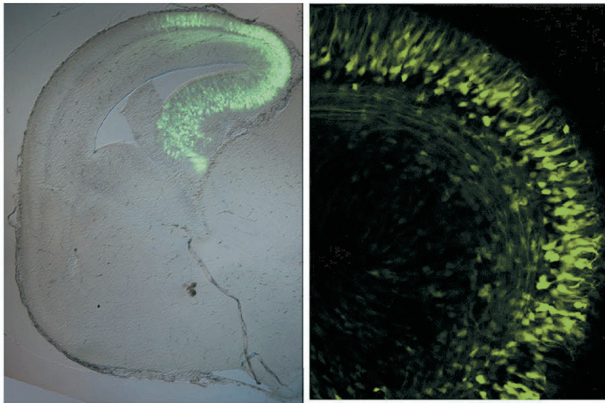
A)



A) Netrin 1 欠損マウス胎仔脊髄で見られる後根神経節(DRG)からの軸索投射の乱れ。DRGに蛍光色素 Dil を適用して DRG 線維を標識している。Wild type(左)では、DRG から脊髄に伸びる線維は脊髄背外側表層部に後索を形成しているが(矢印)、Netrin 1 欠損マウスの DRG 線維は外套層(将来の灰白質)の中で異常な線維束を形成している(右図の矢印)。左図の米印は、逆行性に標識された運動ニューロン(異常ではありません)。

A) Aberrant projection of DRG axons to the dorsal spinal cord in the Netrin 1 deficient mouse. DRG axons are labeled by Dil application to DRG. In the wild type spinal cord, DRG fibers form axon bundle in the dorsolateral superficial part (arrows in left picture). By contrast, DRG axons in the Netrin 1 deficient mouse spinal cord enter the mantle layer directly and form aberrant axon bundle within it (arrows in right picture). Asterisk in left picture indicates motoneurons labeled retrogradely, which is not a defect of Netrin deficiency.

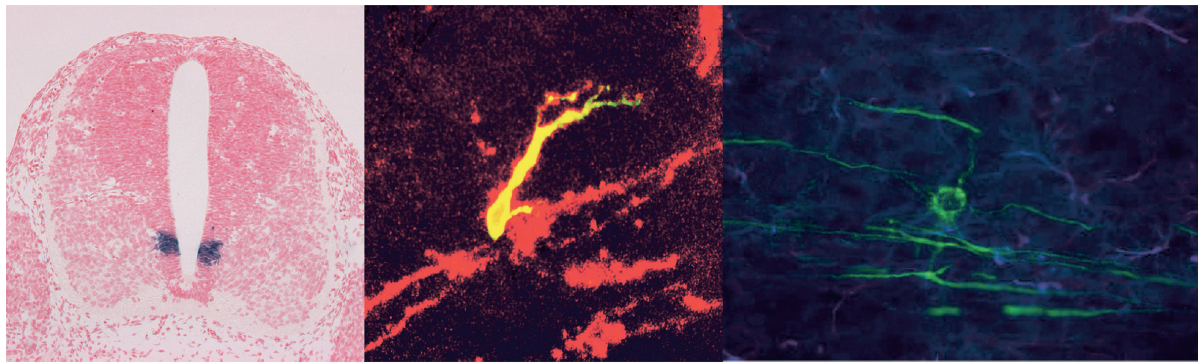
B)



B) エレクトロポレーション法によるマウス胎児脳への遺伝子導入  
マウス脳室内に緑色蛍光遺伝子(GFP)発現ベクターを注入した後、エレクトロポレーションを行った胎児脳の限局した領域に効率よく遺伝子導入できることが分かった。

B) In utero electroporation was carried out for plasmid DNA transfer. Green fluorescent protein (GFP) expression vector was injected into lateral ventricle and electroporated in utero. The cells in the restricted region were observed to express GFP

C)



C) オリゴデンドロサイトの発生 左) オリゴデンドロサイト前駆細胞を生み出す pMN ドメイン。Olig2 遺伝子の in situ hybridization により、マウス胎生 12 日 脊髄腹側の pMN ドメインが青く染色されている。中央) 移動中のオリゴデンドロサイト前駆細胞。GFP(緑)とマーカー抗体の O4(赤)で二重標識されている。右) ミエリンを形成するオリゴデンドロサイト。軸索に複数の突起を伸ばし、ミエリンを形成している成熟オリゴデンドロサイト(緑色)が観察される。

C) Oligodendrocyte development.(Left) pMN domain which is the site of oligodendrogenesis. Expression of Olig2 gene in embryonic day 12 spinal cord. Olig2 (purple) is expressed ventral ventricular zone called pMN domain.(Middle) Migrating oligodendrocyte progenitor. Oligodendrocyte progenitor is double-stained by anti-GFP antibody (green) and O4 antibody (red). O4 is an oligodendrocyte lineage specific marker.(Right) Myelinating oligodendrocyte Mature oligodendrocyte (green) is observed with extending processes toward several axons.

## 細胞内代謝研究部門(客員研究部門) Division of Intracellular Metabolism

### 職員 (Staff)

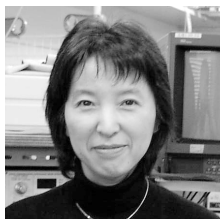


#### 教授 曾我部 正博

大阪大学大学院基礎工学研究科(生物学)博士課程中退, 工学博士。大阪大学人間科学部助手を経て平成4年より名古屋大学医学部教授, 平成15年4月から現職を併任。  
専攻: イオンチャネル, 細胞生物物理学。

#### Professor: SOKABE, Masahiro, PhD

1973 Graduated from Osaka University, Faculty of Engineering Sciences. 1975 Completed a master course in Physics, Osaka University. 1975 Research Associate, Osaka University, Faculty of Human Sciences. 1985 Lecturer. 1987 Associate Professor. 1992 Professor, Nagoya University School of Medicine, Department of Physiology. 1999 Professor, Nagoya University Graduate School of Medicine, Department of Cell Science. 2003 Adjunct Professor, NIPS.  
Specialty: Ion Channel and Cell Biophysics, Neuroscience



#### 准教授 久野 みゆき

大阪市立大学大学院医学研究科博士課程中退, 医学博士。大阪市立大学医学部助教授を経て平成12年度より同大学院医学研究科助教授, 平成16年10月から現職を併任。  
専攻: イオンチャネル, 細胞生理学。

#### Associate Professor: KUNO, Miyuki, PhD

1979 Graduated from Osaka City University School of Medicine. 1981 Research Associate, Osaka City University. 1984 PhD degree in Medicine, Osaka City University. 1986 Lecturer. 1992 Associate Professor. 2000 Associate Professor, Osaka City University Graduate School of Medicine, Department of Molecular and Cellular Physiology. 2004 Adjunct Associate Professor, NIPS.  
Specialty: Ion Channel and Cell Physiology



#### 助教 毛利 達磨

東京工業大学大学院総合理工学研究科博士課程修了, 理学博士。スタンフォード大学ホプキンス海洋研究所, マイアミ大学, カリフォルニア大学デービス校博士後研究員を経て平成8年4月から現職。  
専攻: 細胞生物学, 細胞生理学。

#### Assistant Professor: MOHRI, Tatzuma, PhD

1978 Graduated from Yamaguchi University. 1981 Completed a master course in Physics, Kanazawa University. 1991 Completed a doctoral course in Life Chemistry, Tokyo Institute of Technology. 1991 Jean and Katsuma Dan Fellow, Hopkins Marine Station Stanford University. 1991 Postdoctoral Associate and 1993 Research Associate, University of Miami School of Medicine. 1995 Postdoctoral Researcher, University of California Davis. 1996 Research Associate, NIPS.  
Specialty: Cell Biology, Cell Physiology



#### 研究員 平田 宏聡

東北大学理学部卒, 同大学院理学研究科博士課程修了, 理学博士。科学技術振興事業団技術員を経て平成15年11月から現職。  
専攻: 細胞生物物理学。

#### Postdoctoral Fellow: HIRATA, Hiroaki, PhD

1998 Graduated from Tohoku University, Faculty of Science. 2000 Completed a master course in Physics, Tohoku University. 2003 Completed a doctoral course in Physics, Tohoku University. May 2003 Research Fellow, JST. Nov 2003 Research Fellow, NIPS.  
Specialty: Cell Biophysics

### 研究内容

細胞がエネルギーを消費しながら, 刺激に対して適切に応答する細胞シグナリングこそ命の源であり, そのからくりを究めることが生命科学の最終目標の一つです。本部門では, 電気生理学と先端バイオイメージングを主要な武器にしてイオンチャネルや細胞内シグナル分子の動態を測定し, 細胞応答に至るシグナルネットワークの時空間統御機構の解明を目指しています。具体的には以下の通りです。

#### (1) 機械刺激に対する細胞シグナリング機構:

すべての細胞は事実上何らかの機械刺激に晒されており, これに適切に応答しています。内耳有毛細胞や皮膚機械感受器の電氣的応答をはじめ, 筋・骨の廃用性萎縮・脱灰や内皮細胞の血流依存的 NO 分泌などがその典型例です。しかし機械受容機構が明らかでないためにその分子機構は全く謎です。そこで, 代表的な細胞機械センサーである SA チャネルや細胞骨格/接着斑を対象にして, その構造機能連関や細胞シグナリングとの関わりを色々な機械刺激法を開発して研究しています(図1)。課題の一つとして, 内皮細胞における伸展依存性リモデリング(一軸周期伸展刺激に対して細胞が伸展軸に垂直に伸張する応答)を対象にしています(図2)。この中には, 機械刺激の大きさや方向の感知, シグナリングの時空間分業機構など, 未知で面白そうな問題が詰まっています。この反応の全過程を理解することが当面の目標です。

#### (2) 細胞内 $Ca^{2+}$ のシグナリング:

細胞に, 他の細胞による刺激が加わった時や, 機械刺激や生理活性物質などの刺激が加わった時に, 細胞は細胞内伝達物質としてカルシウムイオン( $Ca^{2+}$ )を増減させ, 様々な細胞機能を制御発現します。このような  $Ca^{2+}$  のシグナリングの機構解明を目指して  $Ca^{2+}$  イメージングをおこなっています。 $Ca^{2+}$  イメージングとは  $Ca^{2+}$  結合性指示薬を用いて細胞内  $Ca^{2+}$  を視覚化することです。さらに顕微操作や電気生理学的手法を加えて, 生きた細胞の経時的, 空間的計測を行います。(1)で述べた機械刺激時や細胞移動時の細胞内  $Ca^{2+}$  イメージング, また受精時の  $Ca^{2+}$  増加や  $Ca^{2+}$  振動機構を通して受精機構, 卵成熟機構の研究を



しています。

### (3) プロトンシグナリング:

水素イオン(プロトン,  $H^+$ )は, pH を決定すると共に, 骨リモデリング・感染初期の自然免疫過程・痛みの発生など多様な機能に関わる重要なシグナルイオンです。 $H^+$ を輸送するトランスポータやチャネルが発達した細胞膜は, 細胞内外の  $H^+$ 動態をダイナミックに調節する現場となります。中でも膜電位依存性  $H^+$ チャネルは, 鋭敏な  $H^+$ センサーと精巧な  $H^+$ シグナル発信器としての役割を兼ね備えるユニークな分子です。現在,  $H^+$ チャネルを手がかりに,  $H^+$ 動態と細胞機能の関わりを明らかにすることを目指しています。

## Research works

Cell signaling that generates proper cell responses to various stimuli is the essence of life. To understand its mechanism is one of the goals of life sciences. This division is aiming to elucidate the spatio-temporal regulation mechanisms underlying cell signaling, focusing on the dynamics of ion channels, cytoskeletons, and adhesion molecules by use of electrophysiological and advanced imaging techniques.

The subjects of research are,

### (1) Cell signaling in response to mechanical stimuli:

Virtually every cell can properly respond to mechanical stimuli, e.g., electrical responses in the inner ear hair cells and cutaneous mechanoreceptors, disuse atrophy in muscle and bone under microgravity, or shear stress induced NO production in endothelial cells. However, its molecular mechanisms are largely unknown due to the ambiguity of the mechanotransduction process in cells. We therefore focus on SA channels and the cytoskeleton/focal adhesion complex as representative cell mechanosensors and investigate their roles in mechanosignaling through the development of innovative light microscopy and micro mechanical manipulation of the cell (Fig.1). A typical subject is stretch-induced shape remodeling, where endothelial cells align their long axis perpendicular to the stretch axis. This response includes many intriguing functions, such as sensation of force direction and spatio-temporal integration of dynamics of stress fibers and focal adhesions during their rearrangement (Fig.2).

### (2) Intracellular $Ca^{2+}$ signaling:

When various mechanical stimuli, such as have induced by cell-cell interaction or stimuli induced by biological activators such as hormones, are given to a cell, the cell exhibits intracellular  $Ca^{2+}$  changes in response to them. The  $Ca^{2+}$  changes are modulated and processed on to the next signal pathways, leading to various significant cell functions. The process called intracellular  $Ca^{2+}$

signaling is one of the most significant and major signal transduction mechanisms in cells of almost all organisms. We use  $Ca^{2+}$  and  $Na^+$  imaging techniques, and electrophysiological methods to perform our experiments in addition to cellular manipulations such as microsurgery and microinjection of materials into cells. We presently focus on the  $Ca^{2+}$  signaling in stretched-induced or migrating cells to investigate the mechanisms aforementioned in (1). We also investigate the mechanisms of fertilization and oocyte maturation in mammals through the study of the  $Ca^{2+}$  oscillations and  $Ca^{2+}$  increase.

### (3) Proton signaling:

Hydrogen ion (proton,  $H^+$ ) is an important signaling ion that determines pH and participates in a variety of biological responses, for instance bone remodeling, natural immunity, and pain sensation.  $H^+$ -transferring molecules at the plasma membrane serve to regulate the pH environment dynamically. Voltage-gated  $H^+$  channels function as sensitive pH monitors and acid-secreting apparatuses, and have been cast as a key player in the processes of  $H^+$  signaling. The primary goal of this study is employing  $H^+$  channels to elucidate the mechanisms underlying  $H^+$  mobilization linked with cellular functions.

### Application of mechanical stresses onto focal adhesion via actin stress fibers

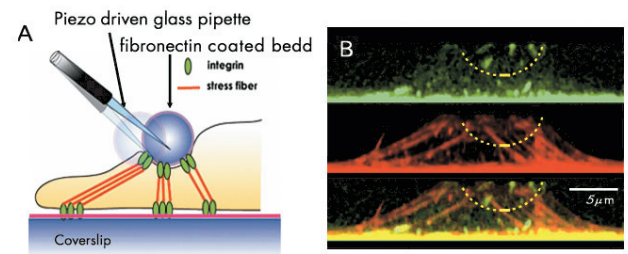


図1: 細胞骨格(ストレスファイバー)を介した局所機械刺激法の模式図(左)。基質(細胞外マトリックス)であるフィブロネクチンをコートしたガラスビーズを細胞上面に付着させると, その接着面に接着斑様構造と, そこから底面の接着斑に連結するストレスファイバーが形成される。このビーズをピエゾ駆動のガラスピペットで動かし, ストレスファイバーを介して底面の接着斑に機械刺激を与えながら, 底面でのインテグリンや  $Ca^{2+}$ の動態を近接場蛍光顕微鏡でリアルタイム測定する。右図は接着斑(上段, 緑色の斑点構造)とストレスファイバー(中段, 赤色の線維構造)とその重ね像(下段)で, 細胞の側面投影蛍光イメージ。

**Fig.1:** Diagram for mechanical stimulation of focal adhesions through stress fibers. Left: A fibronectin-coated glass bead connected to the basal focal adhesions via stress fibers. By displacing the bead, we can apply localized mechanical stimuli onto focal adhesions, while recording the surface dynamics of intracellular calcium and integrin by near field microscopy. Right: Projected side views of focal adhesions (top, green spots), stress fibers (middle, red strands), and their superimposition (bottom) in an endothelial cell.



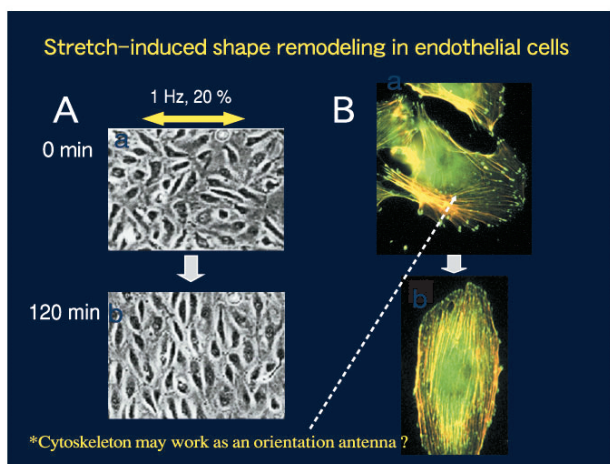


図2: 伸展依存性リモデリング。内皮細胞をシリコン膜上で培養し、周期的に一方方向伸展刺激(ここでは水平方向)を与えると、最初不定形であった細胞が 1-2 時間で伸展軸に垂直に配向し、紡錘形へとリモデリングする(左図)。このとき細胞内のストレスファイバー(オレンジ色の線維状構造)と接着斑(緑色の斑点構造)は右図のように大きく変化する。

Fig. 2: Stretch-induced shape remodeling. Left: When subjected to uniaxial cyclic stretch, endothelial cells cultured on an elastic silicone membrane change their shape from cobble stone-like to spindle-like by aligning their long axis perpendicular to the stretch axis. Right: Dynamic rearrangement of focal adhesions (green spots) and stress fibers (orange strands) before (top) and after (bottom) remodeling.

ナノ形態生理研究部門  
Division of Nano-Structure Physiology

岡崎統合バイオサイエンスセンター  
戦略的方法論研究領域

Department of Strategic Methodology,  
OKAZAKI INSTITUTE FOR  
INTEGRATIVE BIOSCIENCE

兼務

職員 (Staff)



教授 永山 國昭  
(生理学研究所兼務)

東京大学理学部卒, 同大学院修了, 理学博士。日本電子(株)生体計測学研究室長, 科学技術振興事業団プロジェクト総括責任者, 東京大学教養学部教授, 生理学研究所教授を経て平成13年2月から現職。  
専攻: 生物物理学, 電子線構造生物学, 生理現象の熱統計力学。

Professor (concurrent, NIPS): NAGAYAMA, Kuniaki, PhD

1968 Graduated from University of Tokyo. 1973 Completed the doctoral course in Science, University of Tokyo. 1974 Research Associate, University of Tokyo. 1984 Director, Biometrology Lab, JEOL Ltd. 1990 Project Leader, Nagayama Protein Array Project, ERATO, JRDC. 1993 Professor, The University of Tokyo. 1997 Professor, NIPS. 2001 Professor, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (OIB).  
Speciality: Biophysics, Electron Microscopy



准教授 村上 政隆  
(生理学研究所より出向)

京都府立医科大学卒, 医学博士。大阪医科大学助手, 生理学研究所助教授を経て平成15年4月から現職。  
専攻: 分子生理学, 外分泌腺分泌機構とエネルギー供給, 傍細胞輸送。

Associate Professor (NIPS):

MURAKAMI, Masataka, MB, M.D.

1976 Graduated from Kyoto Prefectural University of Medicine. 1976 Research Associate, Osaka Medical College. 1981 Doctor of Medicine in Physiology of Osaka Medical College. 1983 Postdoctoral Fellow, Department of Physiology, University of Sydney. 1985 Associate Professor, NIPS. 2003 Associate Professor, OIB (Seconded from NIPS).

Speciality: Physiology of exocrine glands, Energy metabolism and transport of electrolyte and water, Paracellular Transport



助教 大橋 正人

京都大学理学部卒, 同大学院修了, 理学博士。ドイツ, ハイデルベルク大学研究員, 生理学研究所助手を経て平成15年7月から現職。  
専攻: 細胞生物学。

Assistant Professor: OHASHI, Masato, PhD

1986 Graduated from Kyoto University, Faculty of Science. 1992 Completed the doctoral course in Science, Kyoto University. 1992 Postdoctoral Fellow, Department of Neurobiology, University of Heidelberg. 1996 Assistant Professor, NIPS. 2003 Assistant Professor, OIB.  
Speciality: Cell Biology



助教 ダネフ ラドスチン

ソフィア大学(ブルガリア)物理学部卒, 同大学修士課程修了, 総合研究大学院大学生命科学研究科修了, 理学博士。生理学研究所非常勤研究員, 日本学術振興会特任助教を経て平成20年4月より現職。  
専攻: 電子線構造生物学。

Assistant Professor: DANEV, Radostin, PhD

1997 Graduated from Faculty of Physics, Sofia University, Sofia, Bulgaria. 2001 Completed the doctoral course in Science, The Graduate University for Advanced Studies, NIPS, Okazaki. 2001 Postdoctoral Fellow, NIPS. 2002 Research fellow, OIB. 2006 JST Assistant Professor, OIB. 2008 Assistant Professor, OIB.  
Speciality: Solid State Physics, Electron Microscopy



研究員(科学研究) 重松 秀樹

東京工業大学生命理工学部卒, 東京工業大学大学院生命理工学研究科修了, 博士(工学)。工業技術院, キリンビール(株), 科学技術振興機構, 東京工業大学を経て平成17年1月より現職。  
専攻: 生物工学, タンパク質工学。

Postdoctoral Fellow: SHIGEMATSU, Hideki,

1994 Graduated from Tokyo Institute of Technology. 1999 Completed the doctoral course in Biotechnology, Tokyo Institute of Technology. 1999 Postdoctoral Fellow, NIBH, 2000 Postdoctoral Fellow, Kirin Brewery Co., Ltd., 2002 Postdoctoral Fellow, JST, 2003 Assistant Professor, Tokyo Institute of Technology, 2005 Postdoctoral Fellow, OIB.  
Speciality: Bioengineering, Protein Engineering



非常勤研究員 細木 直樹

神戸大学農学部卒, 同大学院自然科学研究科修了, 博士(学術)。平成20年4月より現職。  
専攻: 植物病理学, 植物細胞生物学。

Postdoctoral Fellow: HOSOGI, Naoki

2003 Graduated from University of Kobe, Faculty of Agriculture. 2008 Completed the doctoral course in Bioresource and Agrobiosciences, University of Kobe. 2008 Postdoctoral Fellow, OIB.  
Speciality: Phytopathology, Plant Cell Biology

## 研究内容

新しい学問領域は、新しい方法論の発見・発明によりスタートすることが多い。例えば、現在医学の診断に幅広く使われている磁気共鳴イメージングは、もともと分光装置として誕生した磁気共鳴 (NMR) から生まれ、近年は機能イメージングとして脳研究にまで利用されている。

このように、各学問分野の急速な発展の裏には新しい方法論の発見がある。その方法論が、新しい分野を生み出すきっかけを与え、それがまた新しい方法論を次々に生む。こうした革新的方法論を戦略的方法論と呼ぶ。

統合バイオサイエンスという新しい学際領域は、領域間の単なる和では確立し得ない困難さを持っている。そこで、領域全体を引っ張る新しい方法論のブレークスルーが必要となる。すなわち、従来の方法では見えなかった1分子レベルの3次元構造解析、分子レベルの機能の入出力解析、細胞系のその場の機能観測などを可能にする戦略的方法論が期待されている。

具体的には、以下の研究を行っている。

- (1) 位相差電子顕微鏡の開発と応用—位相観測を可能とする位相差電子顕微鏡(位相差法, 微分干渉法, 複素観測法)を応用し, 蛋白質, ウィルス, オルガネラなどの *in vitro* 立体構造解析と細胞組織の *in vivo* 構造生物学を行う。特に“生”状態の神経細胞系の高分解能観察を行うため光頭と電頭の有機的統合手法, 光頭—電頭相関法を開発している。
- (2) 物質輸送研究 I—水, イオン, 基質の経細胞及び傍細胞輸送機構, 開口分泌の分子機構とエネルギー供給の分子機構の研究を行う。
- (3) 物質輸送研究 II—エンドサイトーシスはゴルジ体への外向き輸送とリソソームへの内向き輸送間の選別装置として働き, 細胞内膜系の分子の運命を決定する。このエンドサイトーシス経路をめぐる細胞内膜系の選別輸送の分子機構および細胞のシグナル伝達, 極性形成などにおける役割を研究する。

## Research works

A novel methodology, when it is very informative, gives an aid to the opening of a novel scientific field. For example, MRI originally born from NMR in chemistry and primarily developed for diognoses has outgrown to cover almost all medical sciences. We call such a productive innovation, emerged from an old regime but creative to a new field, as a strategic methodology. Integration of biosciences might bring about such a difficulty that a simple sum of constituent disciplines never makes a good start. Fusion of different disciplines can be encouraged by novel breakthroughs in methodology. The expected are new methods for three-dimensional structural analysis of single biological molecules and *in situ* functional observation of complex biological systems.

This laboratory works on methodological themes by relying on the technical breakthrough of imaging methods such as electron microscopy.

(1) Development and application of electron-phase microscopy: Different kinds of phase observation schemes have been developed including the novel optical principle for the reconstruction of complex wavefunctions. They are expected to enhance the contrast of biological samples which is inherently very poor in electron microscopy. Applications are:

- i) direct visualization of protein molecules or cytoskeltons in the *in vivo* state of cells and tissues,
- ii) structural and functional analyses of membrane proteins and viruses with the aid of single particle analysis,
- iii) photon-electron hybrid electron microscopy to visualize intact neurons at a high resolution.

(2) Biological transports: Transcellular and paracellular mechanisms for transport of water, electrolytes, and substrates are investigated by laying much emphasis on molecular mechanism of exocytosis and energy supply for transport in the exocrine glands.

(3) Sorting in the endocytic pathway: The endocytic pathway functions as a sorting station for molecules that are destined either for lysosomes (a degradative pathway) or for recycling pathways, thereby determining the fate of endomembrane molecules. The physiological roles and the mechanisms of sorting in the endocytic pathway are investigated.

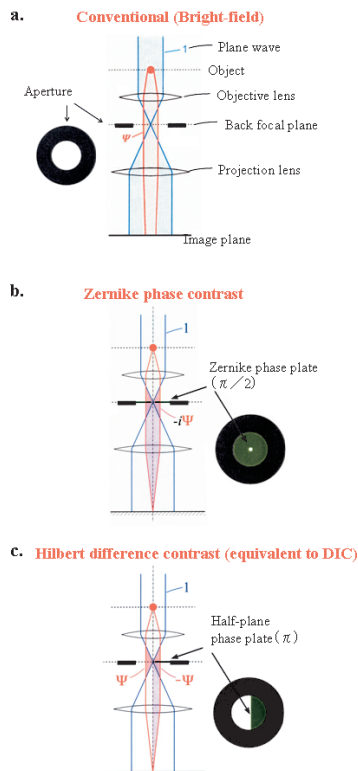


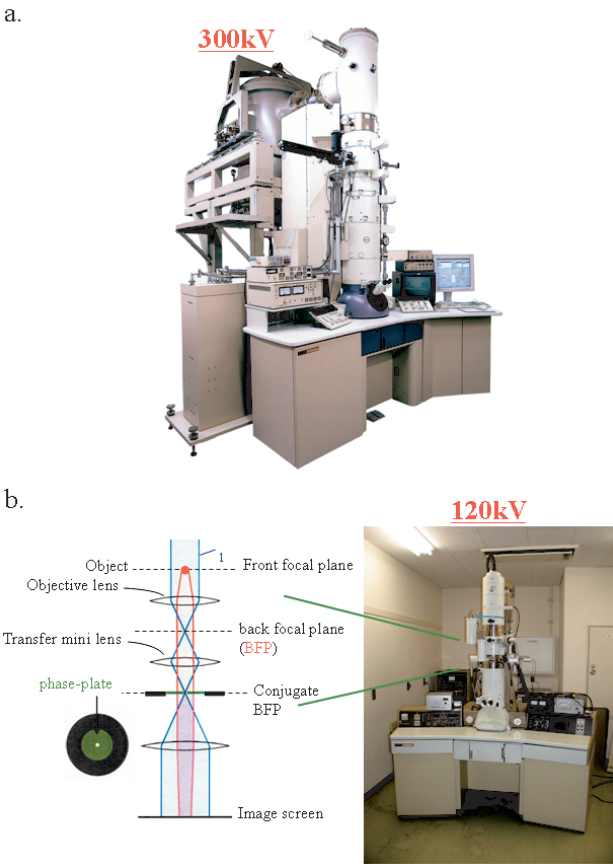
図1. 電子位相顕微鏡法の3種  
a. 焦点はずし(デフォーカス)を導入し, 分解能を犠牲にしてコントラストを向上する通常法(明視野法)。



- b. ゼルニケ(Zernike)位相版( $\pi/2$  シフト)を対物レンズ後焦点面に挿入し、正焦点で高コントラストを回復する Zernike 位相差法。
- c. 半円位相版( $\pi$ シフト)を後焦点面に挿入し、微分干渉光学顕微鏡と同じような地形図の位相像を得るヒルベルト(Hilbert)微分法。

**Fig. 1 Three kinds of schemes for electron-phase microscopy.**

- a. Conventional (bright-field) method to enhance the image contrast at the expense of a deenhancement of the spatial resolution by defocusing.
- b. Zernike phase contrast method to enhance the image contrast under the just focus condition by inserting a Zernike phase plate to the objective back-focal plane.
- c. Hilbert differential method to obtain phase contrast images similar to light-microscopic DIC (Differential-Interference-Contrast) images by inserting a half-plane  $\pi$  phase plate to the objective back-focal plane.

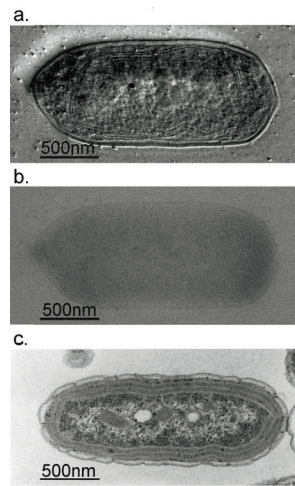


**図2. 2つの電子位相顕微鏡装置**

- a. 300kV 分析型極低温電子顕微鏡(FEG, He-ステージおよび $\omega$ -フィルター搭載)に位相板を挿入。
- b. 120kV 電顕をモデルチェンジし、対物レンズ後方にトランスファーダブレットを付加することで位相板の加熱や精密位置決めを容易にした位相差専用機。

**Fig. 2 Two kinds of electron-phase microscope models.**

- a. 300kV analytical cryo-electron microscope (equipped with a FEG, a He-stage and a  $\omega$ -filter) equipping phase plates at the back-focal plane.
- b. 120kV TEM particularized to the phase contrast observation by furnishing a lens system immediately below the objective and facilitating heating and precise positioning of phase plates.



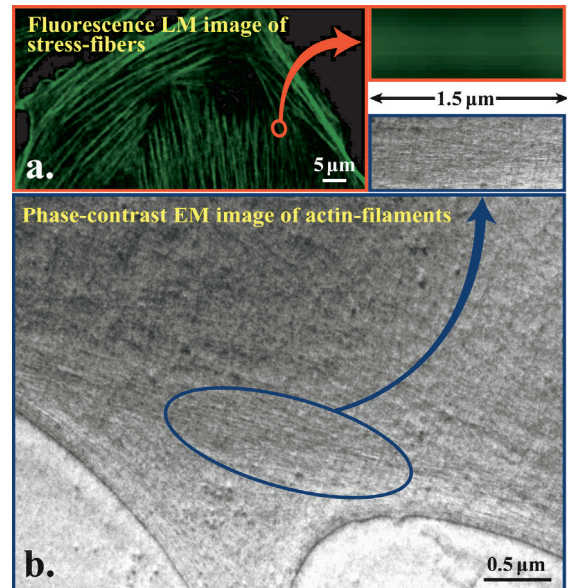
**図3. シアノバクテリアの 300kV 全細胞水包埋像と 100kV プラスチック包埋切片像。**

- a. Hilbert 微分法で観察したシアノバクテリア 300kV 氷包埋像。無染色にもかかわらず細胞内構造が 2nm の分解能で見える。
- b. 通常法で同一サンプルを観察したときのシアノバクテリア 300kV 氷包埋像。コントラストが低いいため内部構造を特定できない。
- c. 固定、脱水、プラスチック包埋、電子染色して得たシアノバクテリアの 100kV 切片像。化学的処理は時間がかかり(~数日)、かつ細胞内構造を破壊する。従って切片像では 10nm 以下の微細構造を議論するのが困難である。

**Fig. 3 Comparison of 300kV and 100kV TEM images for ice-embedded and plastic-embedded cyanobacterial cells.**

- a. A 300kV Hilbert differential image for an ice-embedded cyanobacterial whole cell, which holds a resolution sufficient for the identification of subcellular structures down to 2nm.
- b. A 300kV conventional image shot for just the same sample as shown in a., of which low contrast makes it difficult to identify subcellular structures.
- c. A 100kV conventional image for a plastic-embedded and thin-sectioned cyanobacterial cell, which was prepared with a chemical fixation, dehydration and a heavy metal staining. Due to the harsh and lengthy chemical treatments, subcellular structures are heavily damaged making their morphological preservation hard.

(Kaneko et al., J. Electro. Microsc. 54 (2005) 79)



**図4. 細胞(PtK2)内のアクチン繊維の光顕と電顕の解像度比較。**

- a. ファロイジンで染色したストレスファイバーの蛍光光顕像。
- b. ストレスファイバー内のアクチン繊維を解像する 300kV ヒルベルト微分像。

**Fig. 4 Comparison of image resolving power between fluorescence light microscope and electron-phase microscope for actin filaments.**

- a. Fluorescence microscopic image of phalloidin stained stress fibers.
- b. Hilbert differential TEM image (300kV) of actin filaments, of which bundles correspond to stress fibers.



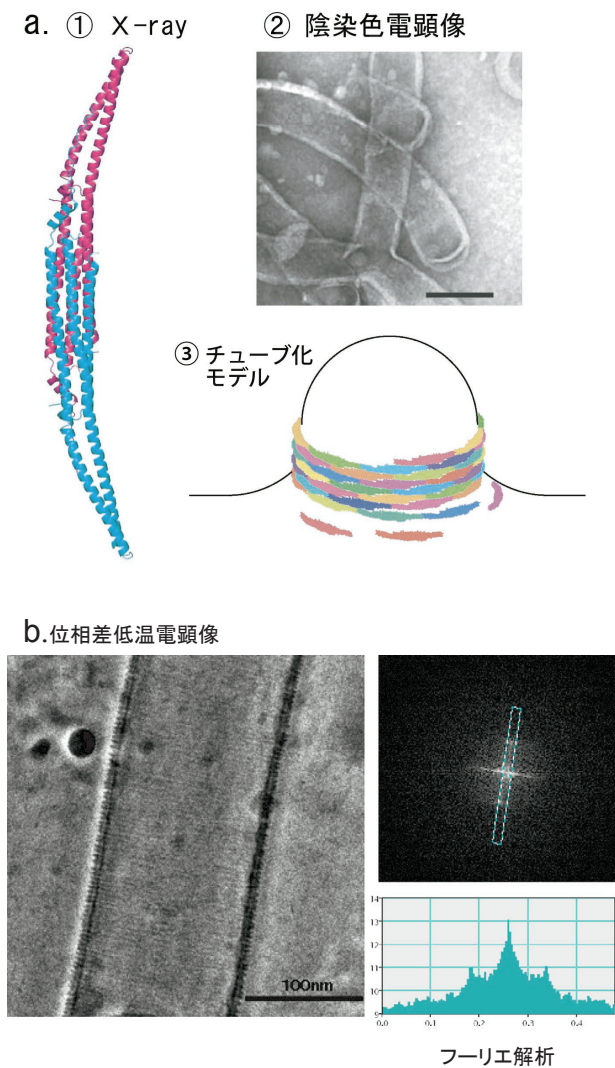


図5. X線結晶解析と通常電顕観察のギャップを埋める位相差低温電顕法

a. 脂質相互作用蛋白質 PCH の EFC ドメイン 2 量体の X 線結晶解析から紐状構造が決定 (①)。PCH が脂質のチューブ化にかかわっていることが、陰染色の電顕観察から判明 (②)。この 2 つの知見をもとにチューブ化機構として③のようなモデルが提出された。

b. このモデルを証明する観察が位相差法の適用で明らかになった (①)。フーリエ変換の解析結果 (②, ③) から脂質に隙間なく巻きついた蛋白質の間隔は、4nm で、これは X 線構造からの推定値と符合した (Shimada et al. Cell, in press)。

Fig. 5 Phase contrast cryo-TEM fills the gap between X-ray crystallography and conventional TEM observation

a. Lipid interacting protein, PCH, has a domain called EFC-domain assumed to be responsible for the liposome tubulation. X-ray crystallography revealed a thread structure (①) and conventional TEM observation with negative staining (②) showed a fixed size tubulation induced by the EFC-domain. From the two results a model as shown in (③) has been proposed.

b. The proposed model has been visually proven with the phase contrast cryo-TEM as shown in (①). The Fourier analysis (②, ③) tells us the spacing of adjacently wound EFC-domain polymers being 4nm, which is just expected from the X-ray structure when modeled (Shimada et al., Cell, in press).