

「内分泌かく乱物質」

平成10年度採択研究代表者

梅澤 喜夫

(東京大学大学院理学系研究科 教授)

「内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング」

1. 研究実施の概要

本研究はEDC暴露による生体侵襲の機序を分子レベルで明らかにし、更に有効で簡便なEDCスクリーニング系を確立することを目的とする。すなわち、生体内ホルモンの合成、分泌、情報伝達に関わる諸過程“遺伝子発現、第二次情報伝達物質、蛋白質リン酸化、蛋白質間相互作用、蛋白質のあるいは他のオルガネラへの移行”を定性・定量評価するための分析手法を開発し、EDCに対する情報伝達諸過程の影響を詳細に解析することを目的とする。この様な情報伝達過程において化学物質をスクリーニングすることにより、膨大な化学物質の中からEDCとなり得る化学物質を限定することが可能となる。この限定された化学物質に対して生物化学的手法、即ちその情報伝達に関わる酵素、転写因子や、遺伝子群等のEDC暴露による酵素活性の変化や発現する塩基配列を詳細に解析することより、内分泌攪乱の原因解明が可能になる。

平成14年度は、蛋白質相互作用検出法については、プロテインスプライシングに基づく蛋白質相互作用の検出法におけるプローブ分子のS/N比の改善を行った。また転写因子を利用した高感度蛋白質相互作用検出プローブの開発を新たに行った。更に細胞内オルガネラ局在蛋白質同定法の原理を考察し、ミトコンドリア局在蛋白質を同定する発現クローニング法を開発を行った。蛋白質リン酸化の蛍光プローブ分子の開発の展開としてエストロゲン作用のnon-genomic pathwayを有機するキナーゼ蛋白質、血管内皮細胞におけるAkt及びヒト乳癌細胞株(MCF-7)におけるSrcの活性化可視化プローブを開発した。蛋白質リン酸化プローブについては上述の二波長蛍光プローブに加えて一波長励起一波長測定型の新しい蛍光プローブ分子の開発も行った。細胞内脂質セカンドメッセンジャーであるフォスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸はステロイドのnon-genomic pathwayを介して産生することが最近示された。その細胞内動態を明らかにする目的でPIP₃の蛍光プローブ分子を開発した。

遺伝子発現に関しては、ヒト乳癌細胞株MCF-7におけるエストロゲン応答遺伝子をSAGE法により系統的に解析し、新規エストロゲン応答遺伝子WISP-2を見出した。平成14年度はリコンビナント蛋白の取得と特異抗体の作成を目的に、バキュロウイルス発現系を用いてWISP-2蛋白を発現することを試みた。化学物質の肝臓への影響を評価するために、種々の

薬物代謝酵素，ダイオキシン応答遺伝子，炎症関連遺伝子等をスポットしたマウス肝臓 cDNAマイクロアレイを作成した．肝臓の炎症モデルを用いて，本アレイの有用性を示した．ダイオキシンによる肝臓遺伝子発現の評価系を構築するため，ヒト正常硬変，肝臓癌組成を用いてSAGEライブラリーを大幅に増加させた．これまでに516,862 tagsを得た．これは世界最大の肝臓における発現遺伝子情報を有することとなった．肝臓のDNAチップ作製については約12,000に及び，肝臓特異的遺伝子群をファイルした．またマウスにTCDD投与し肝臓内の発現遺伝子の解析をSAGE法で行い，薬物代謝に関わる遺伝子だけでなく各種の機能を有する遺伝子が広汎に変動することを明らかにした．ヒト神経芽細胞NB-1細胞については，本年度はフラル酸ジエチルヘキシル，塩化カドミウムに伴って発現が変化する遺伝子の系統的解析を行った．また神経系前駆細胞の分化過程に対するEDCsの影響を解析するため，マウス胎仔より初代培養系を作製することを行った．

2. 研究実施内容

(I) 細胞内情報伝達の諸過程を指標としたEDCスクリーニング

細胞内情報伝達を生き細胞を用いて定性・定量評価するための分析手法を開発し，EDCによる恒常性攪乱を評価することを目的とする．

(A) 蛋白質リン酸化の蛍光プローブ分子

生き細胞内の蛋白質のリン酸化に基づく情報伝達を蛍光顕微鏡で可視化検出するために，蛍光プローブ分子（phocus:フォーカス）を既に開発している．エストロゲン作用のnon-genomic pathwayを誘起するキナーゼ蛋白質として，血管内皮細胞におけるAkt，ヒト乳癌細胞株（MCF-7）におけるSrcが見い出されているが，本年度はこれらキナーゼ蛋白質のステロイド依存的な活性化を，生き単一細胞レベルで可視化検出するために，phocusを基本コンセプトとした新しい蛍光プローブ分子（Akt-phocus（Aktus）およびSrc-phocus（Srcus））を開発した．これら蛍光プローブ分子はすべて蛋白質から成っているので，既知のオルガネラ局在化配列や脂質修飾配列などの特定の細胞内局在化配列を連結すればプローブを自在に細胞内特定局所に配置でき，その場におけるキナーゼ活性をリアルタイムで可視化分析できる．AktusおよびSrcusに関してこれを試み，従来にない，いくつかの新しい知見を得た．Aktに関して，（1）Aktは細胞質ではなく細胞内の膜系に局在化して活性化していること，（2）アゴニストの種類によりAkt活性化の細胞内の場所が違うこと（インシュリンなどのペプチドホルモンおよび 17β -estradiol（E2）はともに血管内皮細胞のゴルジ体ではAktを活性化しているが，ミトコンドリアにおいてはE2はAktを活性化できるがインシュリンはできない）を見いだした．また，エストロゲン様のEDCもE2同様にそれらオルガネラ膜上でAktを活性化することを明らかにした．Srcに関して，（1）E2によるnon-genomic pathwayでのSrcの活性化が，ヒト乳癌細胞株（MCF-7）の細胞膜上のcholesterol-richなマイクロドメイン（Lipid Raft）で起こっていること，（2）エストロゲン受容体は単独ではnon-genomic pathwayでSrcを活性化できず，上皮成長因子受容体（EGFR）の活性化とエストロゲン受容体の活性化がsynchronizeしてSrcが活性化して

いること（一方、アンドロジェン受容体は単独でSrcが活性化する）ことを明らかにした。現在、Srcの活性化におけるEDCの影響を評価している。

上述のphocusおよびそのvariantsは二波長励起一波長測光型の蛍光プローブで、一つのリン酸化現象を可視化検出するのに二色の蛍光蛋白質が必要であった。本年度は一つの細胞内での複数のキナーゼの同時可視化検出のために、一波長励起一波長測光型の新しい蛍光プローブ分子（sinphos：シンフォス）を開発した。このsinphosは蛍光蛋白質を一つ含み、一つのリン酸化現象を一色の蛍光蛋白質で可視化検出する。蛍光蛋白質としてシアニン色-、緑色-、黄色-蛍光蛋白質をそれぞれ用いてcyan-, green-, yellow-sinphosと名付けた。現在、phocusの様に各色sinphosの基質配列部位等を改変し、エストロジェン作用のnon-genomic pathwayを担うAktおよびSrc, EGFRによるリン酸化を選択的に検出するsinphosを開発して、EDCによるこれら複数のリン酸化情報伝達を生きた単一細胞内で評価している。

(B) 脂質メッセンジャー (PIP₃) の蛍光プローブ分子

細胞内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 (PIP₃) はステロイドのnon-genomic pathwayを介して産生されることが最近示されたが、その細胞内動態は明らかでない。本年度はこのPIP₃の生きた単一細胞内での動態分析を目的としてPIP₃の蛍光プローブ分子（flip：フリップ）を開発した。このflipはすべて蛋白質から成っているので、既知のオルガネラ膜局在化配列を連結すればプローブを自在にそのオルガネラ膜に配置でき、その場におけるPIP₃濃度をリアルタイムで可視化分析できる。細胞膜および細胞内膜（小胞体、ゴルジ体膜）のPIP₃に関してこれを試み、

(1) ペプチドホルモン刺激によりPIP₃が細胞膜のみならず細胞内膜にも産生され、その量は細胞膜の3倍にも及ぶこと、(2) この細胞内膜のPIP₃は、細胞膜で活性化されたチロシンキナーゼ型受容体がエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、細胞内膜でフォスファチジルイノシトール-3-キナーゼを活性化して産生されたことなど、従来にない新しい知見を得た。現在、このペプチドホルモンに対してステロイドホルモンによる細胞内PIP₃動態はどのような違いを示すのかを時空間比較すると共に、PIP₃産生におけるEDCの影響を評価している。また、その他の脂質セカンドメッセンジャー（ジアシルグリセロール、フォスファチジルイノシトール-3, 4-二リン酸）についても、flipの脂質結合ドメインを変えて新しい蛍光プローブを開発し、蛍光顕微鏡下で、EDC依存的に産生される脂質セカンドメッセンジャーの可視化分析を行っている。

(C) プロテインスプライシングに基づく蛋白質相互作用の検出法

[プローブ分子のS/N比の改善]

我々はプロテインスプライシング反応を利用することにより、細胞内における蛋白質-蛋白質間相互作用をGFPあるいはluciferaseの形成により検出する新規プローブ分子を開発した。作製したプローブ分子は、原理的にin vitroからin vivoにおける蛋白質間相互作用の評価が可能で一般性を有する。しかし、スプライシング蛋白質であるDnaE間の相互作用が強いため、バックグラウンドが高いという問題点を抱えていた。

平成14年度は、バックグラウンドシグナルを低減しS/N比を向上した更に実用的なプローブ分子の作製を行った。DnaEの新しい切断位置を検討するために、DnaEのN末から27~40番目まで1アミノ酸ずつずらして切断し、スプライシング反応が起きるかどうかを検討した（Circular permutation解析）。その結果、38番目でDnaEを切断するとスプライシング反応が進行することが分かった。次にこの新しい切断位置のDnaE各々にスプリットしたGFPを連結し、相互作用するタンパク質‘leucine zipper’を連結した。Leucine zipperを連結したプローブはGFP形成による蛍光強度の増大が観測された。一方、leucine zipperを連結しないプローブ分子では蛍光は全く観測されなかった。この新しい切断位置で作製したプローブ分子は、DnaE間同士の相互作用が殆どないため、バックグラウンド蛍光を抑制することが可能であることが分かった。現在開発したプローブ分子を利用して、AR-cSrc間相互作用、Ras-Raf1相互作用の検出プローブを開発している。

[転写因子を利用した高感度蛋白質間相互作用検出プローブの開発]

細胞膜上での蛋白質間相互作用を高感度に検出することを目的とした新たなプローブ分子の開発を行った。DnaEのN末にはDNA結合蛋白質であるmodified LexA (mLexA)を、またDnaEのC末には転写活性因子であるVP16を連結し各々をN末とC末のプローブとした

(図1)。もしプローブに連結した蛋白質が相互作用すれば、プロテインスプライシング反応によりmLexA-VP16蛋白質がサイトゾルで切り出され核内に移行する。その結果、luciferaseレポーター遺伝子からluciferase蛋白質が産生され生物発光を定量的に検出することが可能となる。それぞれのプローブに細胞膜上で相互作用するRasおよびRaf-1を連結した。各々の

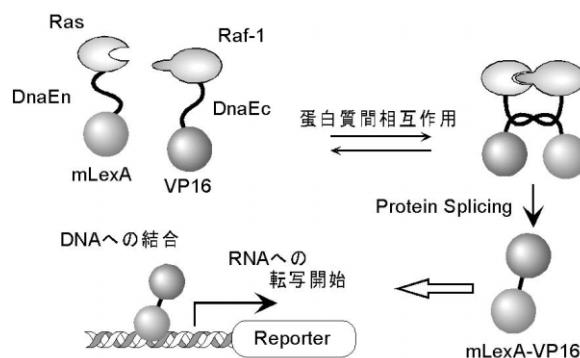


図1 検出法の原理

の遺伝子をluciferaseレポーター遺伝子と共にCOS-7細胞に遺伝子導入した。このCOS-7細胞にEGF刺激したところ、EGFを添加しない細胞に比べて強い生物発光が得られた。これは、EGF刺激によりEGFリセプターからのシグナル伝達下流に位置するRas-Raf1相互作用が起こり、スプライシング反応が起きたことを示している。今後はエストロゲンやアンドロゲン刺激により活性化されるRas-Raf1相互作用を、開発したプローブで検出できることを検証しEDCスクリーニング評価系を確立する予定である。

(D) 細胞内オルガネラ局在タンパク質同定法

[ミトコンドリア局在タンパク質を同定する発現クローニング法の開発]

真核細胞の重要な特色の1つは、膜で囲まれた異なる機能をもつ細胞内小器官（オルガネラ）が存在することである。オルガネラの機能はその膜内に存在する一連のタンパク質により担われており、細胞外環境変化や化学物質刺激によりタンパク質の発現量を調整したりその局在を変化させシグナル伝達を行っている。オルガネラの1つ‘ミトコンドリア’をモデルとして、ミトコンドリアに局在するタンパク質を網羅解析する新しい方法を

開発した.

原理を図2に示した. スプリットしたGFP蛋白質にC末側のDnaE及びミトコンドリア局在配列 (MTS) を連結しミトコンドリア内に局在化させ

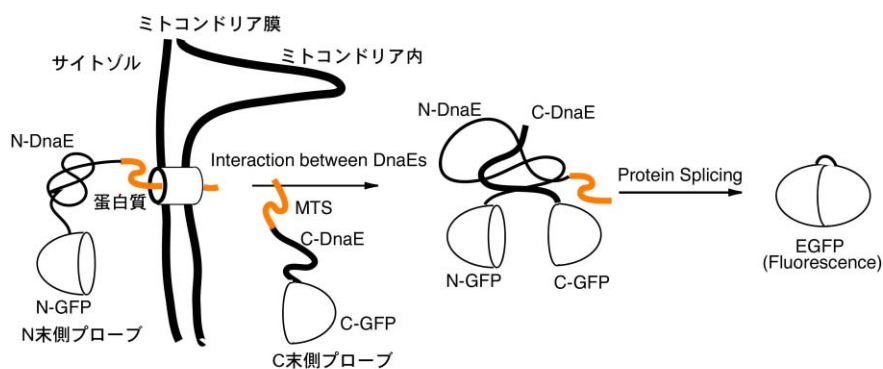


図2. ミトコンドリア局在蛋白質同定法の原理

る. N末側プローブは分析対象とする蛋白質を連結し細胞内で発現させる. この蛋白質がミトコンドリアに輸送されるとプロテインスプライシング反応によりミトコンドリア内でGFPが形成される. 形成されたGFPは510 nmの蛍光極大を有するため, その蛍光強度を測定することによりミトコンドリア蛋白質であるかどうかを評価することが可能となる.

細胞はマウス正常肝細胞 (BNL1ME cells) を用いた. ミトコンドリア内でC末側プローブを恒常的に発現するBNL1ME細胞を作製した. 分析対象とする蛋白質は, MTSおよびサイトゾルに存在するカルモジュリン (CaM) を用いた. MTSあるいはCaMをN末側プローブに連結し, 各々の蛋白質を細胞内で発現させた. 3日後細胞の蛍光強度をフローサイトメーター (FACS) で測定した. その結果, MTSを発現した細胞は強い蛍光を示したが, カルモジュリンを発現した細胞は蛍光を示さなかった (図3). MTSを発現した細胞を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察すると, 形成されたGFPはミトコンドリアに局在していることがわかった.

次に, N末側のプローブにcDNAライブラリーから作製した未知の蛋白質を連結し細胞内で発現させた. 細胞の蛍光強度をFACSを用いて測定し, 蛍光性の細胞を回収した. 回収した細胞258クローンに含まれる未知蛋白質の遺伝子解析を行ったところ, 11種類の既知ミトコンドリア蛋白質に加え, 11種類のマウスミトコンドリア蛋白質を同定した.

また3種類の機能未知の蛋白質がミトコンドリアに局在することを明らかにした. この3種類の新規蛋白質については, その完全長の蛋白質が確かにミトコンドリアに局在していることを検証した.

今後は開発した方法を用いて, ミトコンドリア局在EDC暴露マーカー蛋白質の探索を行い, HTPSの新しい評価系の確立を目指す. また現在, 同様の原理を用いて, 核内外移行タンパク質, ペルオキシソーム局在タンパク質, 細胞内小胞局在タンパク質を同定する発現クローニング法の開発を進めている. これらの方法が各々確立されれば, 肝細胞にTCDD暴露した時や神経細胞にカドミウム暴露した場合など, 細胞外刺激により発現が変動するオ

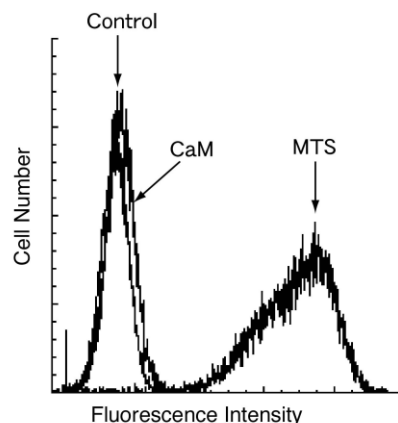


図3. FACSによるBNL1ME細胞の蛍光強度測定

ルガネラ局在蛋白質を同定することが可能となる。

(II) 遺伝子発現の系統的解析

(A) エストロゲン様作用を有するEDCの標的遺伝子の探索とスクリーニング系の確立

ヒト乳癌細胞株にエストロゲンを添加した時に発現が変動する遺伝子群をSAGE法により系統的に解析し、新規エストロゲン応答遺伝子WISP-2を見出した。これまでの研究成果よりWISP-2は分泌蛋白であることが明らかとなり、被験化学物質を乳癌細胞株に添加し、培養上清中のWISP-2蛋白量を定量化することにより、エストロゲン様作用の有無を評価できるものと予想された。そこでWISP-2蛋白を発現し、特異抗体を作成する目的で、バキュロウイルスを用いて昆虫細胞内でWISP-2蛋白を発現することを試みた。ヒトWISP-2 cDNAを組み込んだ発現ベクターを構築し、Sf9細胞での発現を行った。本発現系においては発現したWISP-2蛋白は分解を受け、ほとんどの蛋白は不溶画分に移行した。今後は発現条件の再検討を行ないリコンビナト蛋白の取得をめざす予定である。

これまでエストロゲン応答遺伝子は、エストロゲン非存在下にプロテインキナーゼ系により発現調節を受けることが報告されている。WISP-2は、プロテインキナーゼAの活性化により既知エストロゲン応答遺伝子pS2と同様に発現の上昇がみられた。一方プロテインキナーゼCを活性化するとpS2の発現が上昇することとは異なり、発現が抑制された。

被験化学物質の肝臓への影響を遺伝子発現の変動から評価するためのマウス肝臓cDNAマイクロアレイのプロトタイプを作成した。このアレイにはSAGE法によりマウス肝臓における発現を確認した遺伝子、種々の薬物代謝酵素、ダイオキシン応答遺伝子、炎症関連遺伝子等、計352種類の遺伝子をスポットしてある。平成14年度は肝臓の炎症モデルを用いて、本アレイの有用性を示した。今後はスポットする遺伝子をさらに収集するとともに、種々の環境化学物質による遺伝子の発現変動を解析する予定である。

(B) 内分泌攪乱化学物質投与によりヒト肝臓細胞にて発現が変化する遺伝子の系統解析

生体内におけるタンパクの合成・異化を専門とする臓器である肝臓において、内分泌かく乱化学物質(endocrine disrupting chemicals, EDC)を投与した際に生じる発現遺伝子の変化を統合的に解析するとともに、DNAチップを用いたEDCバイオモニタリングシステムの開発を目的に研究を行っている。

はじめに肝臓における統合的な遺伝子解析を確立するために、正常な肝臓において発現している遺伝子の種類と、それぞれの遺伝子の発現量を知ることから開始した。解析法としてserial analysis of gene expression (SAGE)法を用い、世界で初めて正常肝臓における30,982発現遺伝子(8,596種類)のプロファイルを明らかにした。

このSAGE情報は1例の正常肝臓から得られたものであったため、得られた発現遺伝子の種類および頻度を正常肝臓の代表的な発現遺伝子プロファイルとするには疑問があった。またヒトにおいては3から4万の遺伝子が存在するとされており、得られた遺伝子の種類は8千と十分でないことから、先の正常肝臓から発現頻度の低いものが得られていないことが問題であった。そこで、正常な肝臓の5例を混合し、新たにSAGEライブラリーを作製した。このライブラリーからは97,150遺伝子が得られ、27,622種類の遺伝子が得られた。

発現量の多い遺伝子は、先の1例より得られたSAGEの結果と同様であったものの、発現量の少ないものでは両者のプロファイルに違いが見いだされ、正常の肝臓においても個体差があることがわかった。また今回作製された発現プロファイルを正常肝臓における代表的なプロファイルとして用いることとした。

さらに疾病のある肝臓において遺伝子の発現プロファイルが異なるか否かを検討してきた。正常肝臓の代表的発現遺伝子プロファイルを得たのに続いて、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルス感染肝臓、さらに肝細胞癌組織を用いて、同様に多数例を混合することによって、それら疾病における代表的な発現遺伝子プロファイルを得た。あわせてこれまでに516,862遺伝子を得た。これによって我々は世界最大の肝臓における発現遺伝子情報を有することになった。この情報をもとに肝臓内において発現している遺伝子の種類、およびその頻度を明らかにした。その結果、肝臓の病態変化によって、発現している遺伝子の種類および頻度は大きく変わることが示された。このように、本研究の目的のひとつである統合的な発現遺伝子解析を行うことによって、疾病状態にある肝臓のバイオモニタリングが可能であることが示された。

SAGE法は詳細な発現遺伝子プロファイルの解析が可能であるものの、多数のサンプルを系統的に解析することが困難である。このため内分泌攪乱物質の系統的解析にはDNAチップを使用することを予定している。これまでDNAチップの基礎検討を行って、その手法および解析法を確立するとともに、DNAチップの問題点を明らかにしてきた。さらにSAGE遺伝子情報と肝臓における各種の代謝にかかわる遺伝子情報をもとに、肝臓における統合的な遺伝子解析するためのデータベースを作成した。これまでに約12,000におよぶ肝臓特異的遺伝子群をファイルし、これらの遺伝子を用いた肝臓DNAチップ作製を目指して遺伝子の収集をほぼ終え、遺伝子のバンキングを行った。

マウスに実際にTCDDを投与し、SAGE法を行いTCDD投与による肝臓内の発現遺伝子の変動を解析した。TCDD投与により有意に変動した遺伝子は薬物代謝にかかわる遺伝子だけでなく、各種の機能を有する遺伝子が広汎に変動していた。このようにTCDD投与したマウスの肝臓においてもバイオモニタリングが可能であることが示された。またマウスにおいてもDNAチップ解析を行う目的で、マウスの遺伝子収集を開始した。このようにヒトおよびマウスDNAチップを用いたEDCバイオモニタリングシステムの開発が進められている。

(C) 内分泌攪乱化学物質投与によりヒト神経細胞株で発現が変化する遺伝子の系統的解析

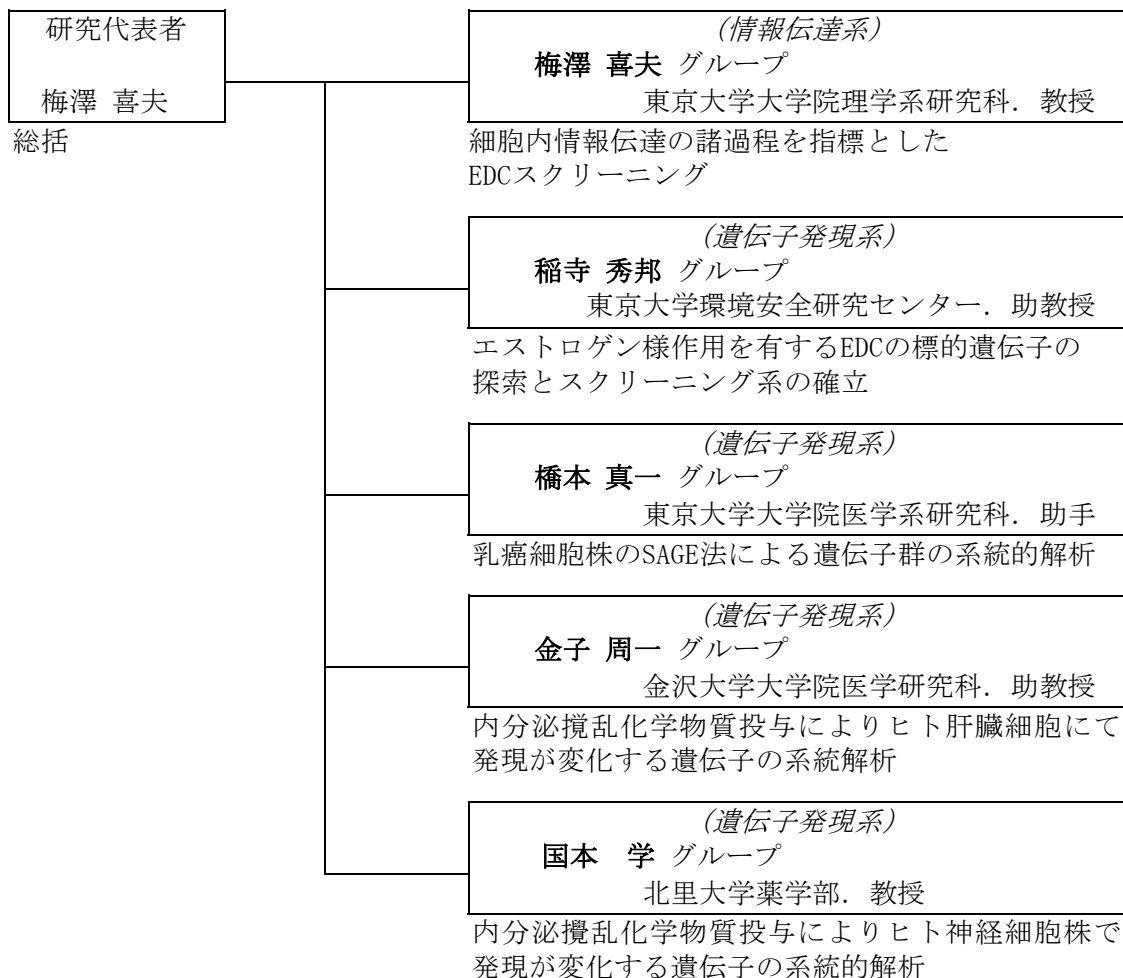
内分泌攪乱物質が、脳神経系の発生・分化に影響を及ぼす可能性が指摘されてきているが、その詳細については不明なところが多い。我々は、ヒト神経芽細胞腫NB-1細胞における神経突起伸展度を指標に、環境での汚染が問題となっている化学物質を中心にスクリーニングを行い、内分泌攪乱性が疑われている化学物質のうち、少なくともフタル酸ジエチルヘキシル、塩化カドミウム、ならびにメチル水銀が、NB-1細胞の突起伸展に有意な影響を与えることを認めている。

本年度は、NB-1細胞へのフタル酸ジエチルヘキシル、塩化カドミウムに伴って発現が

変化する遺伝子の系統的解析をDNAマイクロアレー法 (Atlas Array) により行った。ヒト遺伝子全般を網羅したスライドガラス (約3,800個 ; Atlas™ Glass Human 3.8 I Array; クロンテック社) を用いて検討した。その結果, ともに神経突起伸展を促進する作用を有する両化合物で共通して発現が上昇した遺伝子としてmoesin, voltage-dependent calcium channel (L-type) 等約50種類の遺伝子が, 一方共通して発現が低下する遺伝子としてkeratin 17, c-src tyrosine kinaseなど約30種類の遺伝子が存在することが明らかになった。これらの遺伝子についてRT-PCR法やノーザンブロット法により発現解析を行ったところ, これまでにmoesinの遺伝子発現が上昇することが確認された。moesinは, アクチンの膜結合に関与する蛋白質であり, 神経突起伸展にも関わっていることから, 有用なマーカーとなる可能性が示唆される。

新たに, 神経系前駆細胞の分化過程に対する内分泌攪乱物質の影響を解析するため, マウス胎仔より調製した神経系前駆細胞の初代培養系の確立を試みた。グリア細胞は, 神経細胞の支持や脳の恒常性の維持, 神経伝達など, 神経系において重要な役割を果たす細胞である。オリゴデンドロサイト (OL) とアストロサイトの両方に分化する能力を持つオリゴデンドロサイト前駆細胞 (Oligodendrocyte precursor cells: OPC) 分化のタイミングは, 様々な細胞外因子や細胞内在機構により制御されていることがこれまでの研究で明らかになってきている。我々は, エストロゲン様の活性を持ち, 神経系への影響が懸念されるビスフェノールA (BPA) が, このOPCの分化に与える作用について調べた。マウス胎仔終脳より単離したOPCをBPA存在下で培養したところ, 3日後よりOLマーカーの発現がコントロールと比較して顕著に増加し, 培養6日目には成熟OLの形態を持つ細胞がBPA曝露により多く観察されるようになった。また, 17 β -estradiolによっても同様の効果が観察されたことから, BPAのOL分化の誘導は, エストロゲン受容体 (ER) を介している可能性がある。そこで, 現在はBPAによるOL分化誘導がER阻害剤により抑制されるかを検討中である。さらに, BPA曝露によって, OLとは明らかに違う形態の細胞も観察されたため, 未成熟ニューロンで発現するneuron specific β -tubulin III (β -tub) の遺伝子発現を調べたところ, コントロールと比較して, BPA曝露細胞では β -tubの発現が増加していることが明らかになった。これは, 恐らくOPC単離の段階で混入した神経前駆細胞が神経に分化したと考えられ, BPAはOLとニューロン両方の分化を促進する因子を活性化している可能性を示している。

3. 研究実施体制



4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- A Genetic Approach to Identifying Mitochondrial Proteins. T. Ozawa, Y. Sako, M. Sato, T. Kitamura and Y. Umezawa, Nature Biotech., 21, 287-293 (2003).
- Seeing What Was Unseen. New Analytical Methods for Molecular Imaging. Y. Umezawa, The Chemical Record, 3, 22-28 (2003).
- Noninvasive Imaging of Protein-Protein Interactions in Living Subjects by Reporter Protein Complementation and Reconstitution Strategies. R. Paulmurugan, Y. Umezawa and S. S. Gambhir, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, No. 24, 15608-15613 (2002).
- High Sensitive Ion-Channel Sensors for Detection of Oligonucleotides Using PNA Modified Gold Electrodes. H. Aoki and Y. Umezawa, Electroanalysis, 14, No. 19-20, 1405-1410 (2002).
- Peptide Assemblies in Living Cells. Methods for Detecting Protein-Protein

Interactions. T. Ozawa and Y. Umezawa, special issue of *Supramolecular Chemistry*, 14, No. 2-3, 271-280 (2002).

- Probing Chemical Processes in Living Cells: Application for Assay and Screening of Chemicals that Disrupt Cellular Signaling Pathways. Y. Umezawa, T. Ozawa and M. Sato, *Bull. Chem. Soc. Jpn. (Accounts)*, 75, No.7, 1423-1433 (2002).
- Methods of Analysis for Chemicals that Promote/Disrupt Cellular Signaling. Y. Umezawa, T. Ozawa and M. Sato, *Anal. Sci.*, 18, 503-516 (2002).
- Fluorescent Indicators for Imaging Protein Phosphorylation in Single Living Cells. M. Sato, T. Ozawa, K. Inukai, T. Asano, and Y. Umezawa, *Nature Biotech.*, 20, 287-294 (2002).
- Assay and Screening Methods for Chemicals that Disrupt Cellular Signaling Pathways. Risk Assessment for Potential Endocrine Disruptors. Y. Umezawa, T. Ozawa and M. Sato, *Environmental Sciences*, 9, No. 1, 23-35 (2002).
- Assay and Screening Methods for Bioactive Substances Based on Cellular Signaling Pathways. Y. Umezawa, *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82, 357-370 (2002).
- Inadera H., Dong H-Y., and Matsushima K. WISP-2 is a secreted protein and can be a marker of estrogen-exposure in MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:602-608, 2002.
- Dong H-Y, Toyoda N, Yoneyama H, Kurachi M, Kasahara T, Kobayashi Y, Inadera H, Hashimoto S, and Matsushima K. Gene expression profile analysis of the mouse liver during bacteria-induced fulminant hepatitis by a cDNA microarray system. *Biochem Biophys Res Commun*, 298:675-686, 2002.
- Inadera H., Nagai S., Dong H.-Y., and Matsushima K. Molecular analysis of lipid-depleting factor in a colon-26-inoculated cancer cachexia model. *Int. J. Cancer* 101:37-45, 2002.
- Kurachi M, Hashimoto S, Obata A, Nagai S, Nagahata T, Inadera H, Sone H, Tohyama C, Kaneko S, Kobayashi K, and Matsushima K. Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:368-377, 2002.
- Kazuhiro Kawaguchi, Shuichi Kaneko, Masao Honda, Hiroshi Kawai, Yukihiro Shirota, and Kenichi Kobayashi. Detection of hepatitis B virus DNA in serum from patients with chronic hepatitis B using a DNA microarray method. *Journal of Clinical Microbiology* 41(4): 1701-1704, 2003.
- Makoto Kurachi, Shin-ichi Hashimoto, Aya Obata, Shigenori Nagai, Tomoyuki Nagahata, Hedekuni Inadera, Hideko Sone, Chiharu Yohyama, Shuichi Kaneko,

Ken-ichi Kobayashi, and Kouji Matsushima. Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 292(2): 368-377, 2002.

- Yasunari Nakamoto, Shuichi Kaneko, Hong Fan, Takashi Momoi, Hiroko Tsutsui, Kenji Nakanishi, Kenichi Kobayashi, and Takashi Suda. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. Journal of Experimental Medicine 196(8): 1105-1111, 2002.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：1件（研究期間累積件数：8件）