

「プロセスインテグレーションに向けた高機能ナノ構造体の創出」
平成 20 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

杉山 弘

京都大学大学院理学研究科・教授

生体分子情報－構造－機能統合ナノシステムの構築

§1. 研究実施体制

(1)「杉山」グループ

① 研究代表者: 杉山 弘 (京都大学大学院理学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ 新規 DNA ナノ構造の設計と構築、DNA ナノ構造の選択的な配列と機能化、DNA ナノ構造上での生体分子の 1 分子解析、DNA 認識技術の精密化に向けたポリアミドの開発

(2)「森井」グループ

① 主たる共同研究者: 森井 孝 (京都大学エネルギー理工学研究所、教授)

② 研究項目

- ・ 機能性 RNP の構築、人工光合成デバイスの構築と機能評価、機能性タンパク質の構築、タンパク質センサーの構築、機能性ペプチド組織体の構築と評価

(3)「森」グループ

① 主たる共同研究者: 森 泰生 (京都大学大学院地球環境学学、教授)

② 研究項目

- ・ レセプター・イオンチャネル複合体の高機能化、イオンチャネルの高度集積化の解析、高度集積化ナノデバイスの構築

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1. 光操作による2本鎖DNAの形成と解離のナノ構造内での1分子観察 (A-9)

2本鎖DNAの形成と解離の1分子スイッチングを直接観察するため、光に応答して2本鎖の形成と解離を制御できるアゾベンゼンを導入した光応答性DNAを側鎖として2本鎖に導入し、それらをDNAフレーム構造内に結合した(図1A)。トランス体のアゾベンゼンは2本鎖形成を行うので、DNAフレームに導入した際、形成された光応答性2本鎖DNAが、2本の2本鎖DNAの中央に観察された(図1B)。この状態ではDNAフレーム構造内に導入した2本鎖DNAが中央でコンタクトしているためX字構造として観察される。UV光の照射を行うと、アゾベンゼンはシス体に変換されるため、光応答性DNAの2本鎖は解離する。この際は、DNAフレーム内に2本の離れた2本鎖DNAが観察できた。続けて可視光照射を行うとアゾベンゼンは元のトランス体に変換され、解離した光応答性DNA鎖は再び2本鎖形成をして、X字構造として観察された。次に、この1分子観察システムで光応答性

2本鎖DNAの形成と解離の動的な挙動を観察した。高速AFMを走査しながら光照射を行い、その動きを観察するとUV光と可視光といった光の波長に応じて2本鎖DNAの解離と形成が直接観察できることが示された。また、UV光・可視光・UV光と連続的に照射しても2本鎖の解離と形成の可逆的な動作が見られた(図1C)。このことから、DNAフレーム内の2本の2本鎖の全体的な構造の変化を観察することで、光応答部位の解離と結合を可逆的な機械的スイッチングとして1分子で可視化することが可能となった。

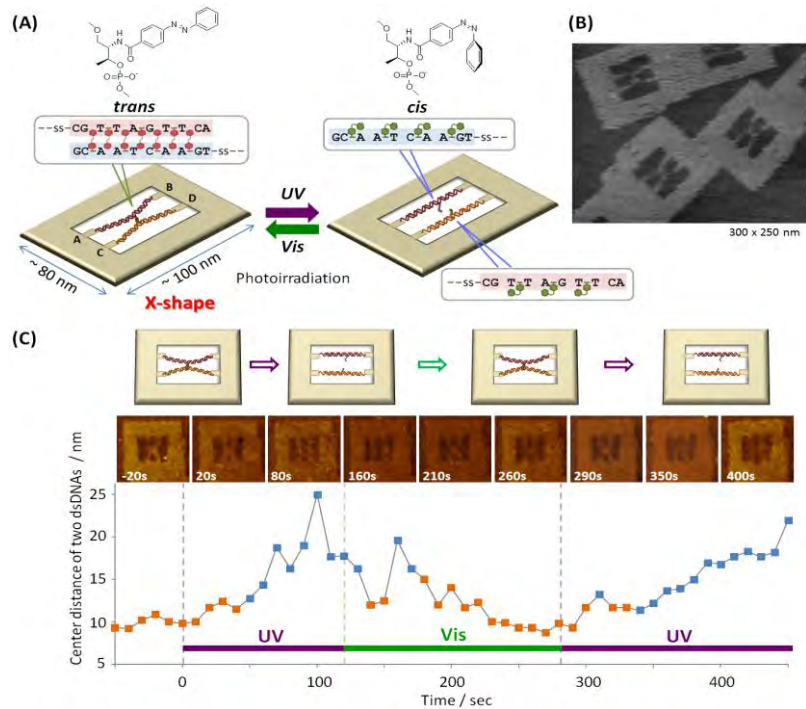


図1. 光応答性DNAによる2本鎖形成と解離の1分子観察。(A)光応答性DNAを2本鎖DNAにそれぞれ組み込みDNAフレーム構造内に導入する。アゾベンゼンの光異性化に対応し、UV光照射で2本鎖は解離し、可視光照射で2本鎖形成する。(B)光応答性DNA導入後のAFMイメージ(X字構造)。(C)UV光と可視光による2本鎖形成と解離の連続的な1分子観察。

2. DNAナノ構造体のプログラム集合体の構築と光照射による集合と解離の操作 (A-15)

光応答性DNAを六角形のDNAナノ構造体に導入し、これらの構造体を2次元の様々な方向に

プログラム通りに配列できる手法を検討した。異なる 6 角形の構造体の辺に光応答性 DNA を配置して混合すると 2 量体に集合し、UV 光照射を行うと解離し、可視光を照射すると再び効率よく 2 量化した。UV 光と可視光を交互に照射することで可逆的に集合体の集合と解離を制御できた。6 角形の構造体を直線的またはカーブして 3 量化でき、さらに多量体に集合させることもできた。より精密に集合体の構造を制御するため、導入する光応答性 DNA の数と位置をコントロールすることで、隣り合う構造体の裏表を制御でき、直線状の安定な集合体構造や 6 個のユニットが集合した環状の集合体構造の構築に成功した。

3. B-Z構造転移のナノ構造内での1分子観察 (A-21)

DNA構造のバリエーションに左巻きらせん構造であるZ型のDNA構造が存在する。CG繰り返し配列の2本鎖DNAは塩濃度によって右巻きらせんのB型DNAから左巻きのZ型のDNA構造をとる。このB-Z転移を可視化するため、(5-methyl-CG)6回繰り返し配列を導入し、可視化のマーカとなる3本の2本鎖DNAが並んだ「旗」となる構造を結合し、DNA フレーム構造内に導入した(図2A)。これらの旗状マーカを持つ2本鎖は上側がB-Z転移を起こせるCG配列を含むもの、下側がコントロールとなる転移しないランダムな配列を持つもので、それらの両側は回転を可能にするため、垂直方向に吊り上げた

新たなDNA フレームを用いた。溶液中のMgイオンの濃度を上昇させていくと、それに伴ってB-Z転移できる配列では旗状マーカが下向きから上向きになる割合が増加した(図2B)。また、Mgイオンの濃度を調節することで、B-Z転移の平衡状態を作り、旗構造が回転の様子を高速AFMによって観察した。その結果、AFMで走査している間に旗状マーカが上下に動く様子が観察され、旗構造のフレーム空間内での位置やその高さを測定することで、B-Z遷移によるらせんの回転に伴って旗構造が回転することが分かった。

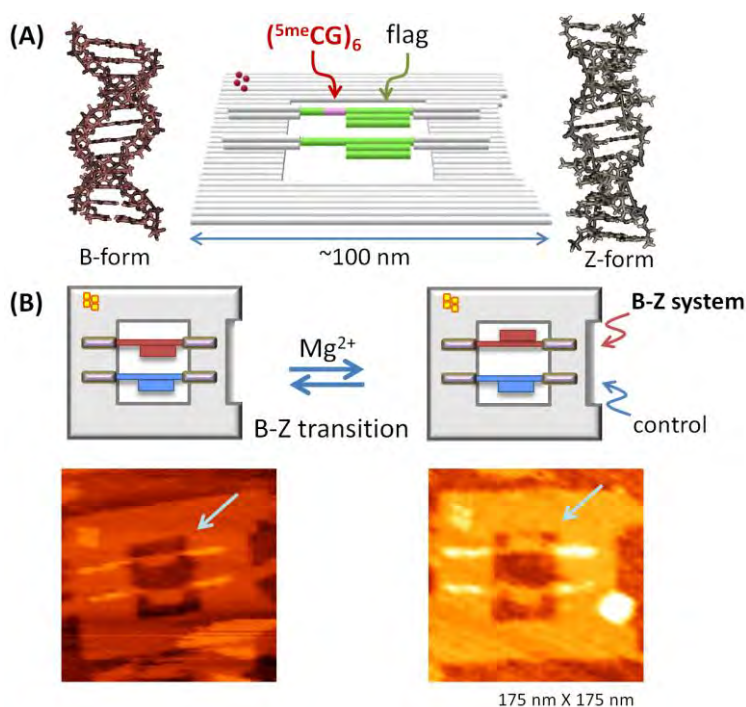


図 2. B-Z 転移の DNA フレーム内での 1 分子観察。(A) B-Z 転移する配列(5meCG)₆と旗状構造(マーカ)を導入した DNA 鎖を DNA フレームに導入する。下の DNA 鎖は特異的な配列のないコントロール。(B) Mg²⁺ による B-Z 転移状態の平衡状態での観察。B-Z 遷移配列を導入した旗構造(矢印)が回転した AFM イメージ

4. DNA ナノ構造体上への機能性分子固定化技術の開発

(*Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 2421-2424, 2012)

DNA ナノ構造体を足場として様々な機能性分子を精微に配置できれば、バルク中や膜上で混合するだけでは達成困難な高効率な物質変換システムの構築や機能評価システムの構築が期待できる。しかしながら、生体内での機能面のほとんどをおこなっている蛋白質を自由自在に DNA ナノ構造体へと配置する技術は乏しく、集積化による効能についても未知数な部分が多い。そこで、我々は、DNA 結合性蛋白質である Zinc Finger 蛋白質を用いた DNA ナノ構造体への機能性蛋白質の配置についてこれまでに検討してきた。Zinc Finger 蛋白質は、DNA と強固に結合することができ、そのアミノ酸配列を変えることで、DNA 配列への選択性を自在に設計することができる。そこで、異なる 2 種類の Zinc Finger 蛋白質(Zif268 と AZP4)を採用し、これらのキメラ蛋白質を作成し、DNA ナノ構造体への結合能を評価した。その結果、それぞれのキメラ蛋白質は、Zinc Finger 蛋白質を介してアドレス(Zinc Finger 認識配列)特異的に結合していることが明らかとなった。また、異なる性質を持つアダプターとして、Leucine Zipper 蛋白質にも着目している。Leucine Zipper 蛋白質は、ホモまたはヘテロな二量体を形成して、特定の認識配列と強固に結合するため、一般的な酵素が取る二量体構造を DNA ナノ構造体上に配置する上で、より適していると考えられる。実際に、

Leucine Zipper 蛋白質と Zinc Finger 蛋白質とは、お互いに競合することなく、同一 DNA ナノ構造体上の異なるアドレスにそれぞれ結合していることが明らかとなった。今後、この知見を活かし、高効率な物質生産システムを DNA ナノ構造体上に構築していく。

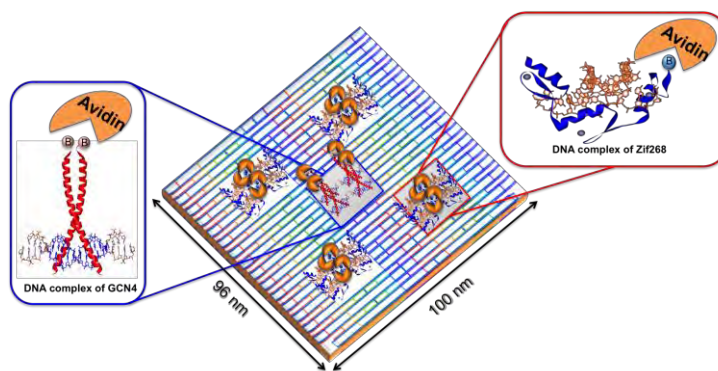


図 3. Zinc Finger 蛋白質と Leucine Zipper 蛋白質を介した DNA ナノ構造体上への機能性タンパク質の固定化技術

5. リボヌクレオチドペプチド蛍光センサーの機能拡張 (B-3)

生命現象の制御に関わる細胞内シグナル伝達を詳細に解析するためには、それに関与する様々な生体内重要物質を網羅的に検出するための技術が必要である。これまでに RNA-ペプチド複合体(RNP)を基盤として、リガンドの認識に伴い蛍光強度が変化する蛍光性 RNP センサーの構築に成功している。^{B-2} 本年度は、より定量性が高い検出法として知られる蛍光レシオ検出が可能なレシオ検出型蛍光性 RNP センサーの開発に成功した。現在これら RNP センサーを含む RNP ライブラリーを DNA ナノ構造体上に配置するための技術開発をおこなっており、良好な結果が得られつつある。

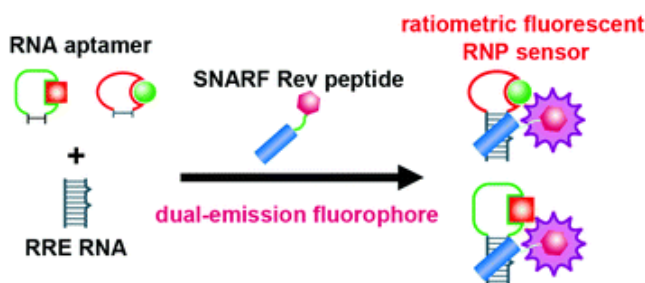


図 4. レシオ検出可能な蛍光性 RNP センサー

6. タウタンパク質由来の凝集性ペプチドのアミロイド線維形成能評価

(*Biochemistry* 51, 1396-1406, 2012)

アルツハイマー病患者の病理学的な特徴の一つとして、脳内に Paired helical filament (PHF)と呼ばれる特徴的な繊維状構造体の沈着が観察される。PHF の主成分は過剰なリン酸化修飾を受けたタウタンパク質である。我々はタウタンパク質の繊維形成におけるリン酸化の役割について明らかにすることを目的とし、モデルペプチドを利用してリン酸化が凝集特性および繊維形状に及ぼす影響の評価を行っている。

これまでに、PHF 配列内の被リン酸化が繊維状構造体の形成を促進する機構が、分子内あるいは繊維間での静電相互作用の形成によるものである事を明らかにしている。本成果においては、被リン酸化部位の周辺残基との位置的バランスが、その凝集特性に大きく影響を与えることを新たに見出した。また興味深いことに、異なる凝集性を持つペプチドが混在した場合、単独のそれとは異なる凝集体形成能を示すことが明らかとなり、その凝集体形成能について研究を展開している。

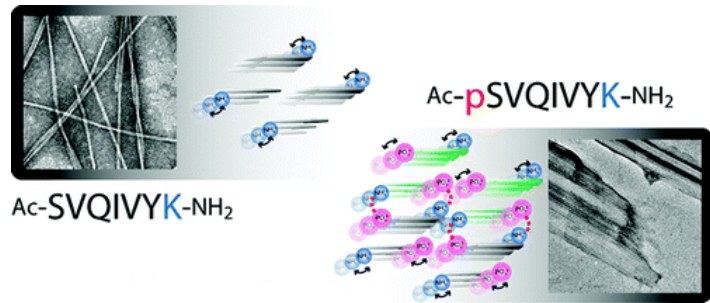


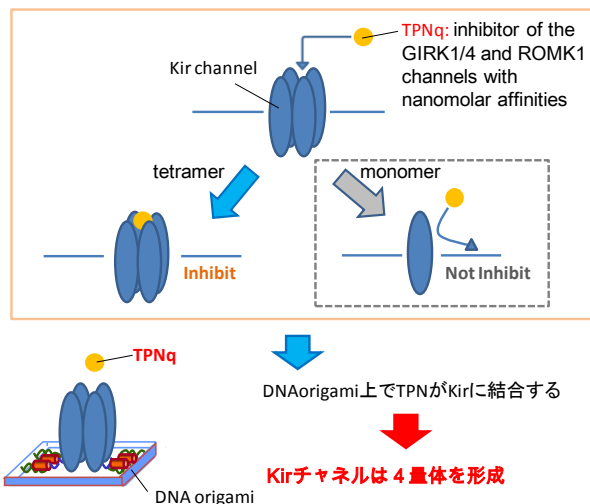
図5. 分子構造の異なる PHF6 誘導体から形成された繊維状構造体

7. イオンチャネル複合体の DNA origami への集積化

ナノデバイス構築を行うためには、リガンド応答を受け取る受容体とその情報を電気応答として読み出すイオンチャネルを、細胞の力に頼らずナノメートルレベルで適切に配置することが必須である。これまでに、Zn²⁺ finger タンパク質を用いることで、イオンチャネルタンパク質 (TRPC3、Kir3.1) を DNA origami 上に配置することに成功した。しかし、イオンチャネルの DNA origami への結合効率が低いことが問題であった。そこで、Kir3.1 において DNA origami 上の Zn²⁺ finger 認識配列の距離をナノメートルレベルで制御することにより、最適な配列の決定を試みた。その結果、DNA origami に結合するイオンチャネルの割合が、5倍程度上昇させることに成功した。

8. DNA origami 上でのイオンチャネル複合体形成

TRPC3 や Kir3.1 などのイオンチャネルは、生体内において 4 量体を形成することで機能することが知られている。しかし、界面活性剤により可溶化した際にはその



4 量体構造が崩れることが多く、イオンチャネルの高機能化の際の問題点とされている。そこで、Kir3.1 において DNA origami 上での機能的な 4 量体形成を確認することを試みた。確認には、蛍光色素である carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) に Kir3.1 の阻害剤である tertiapin (TPNq) を結合させた TAMRA-TPNq を合成し使用した。TAMRA-TPNq を DNA origami 上に配置させた Kir3.1 に作用させると、Kir3.1 への結合が確認出来たことから、Kir3.1 は DNA origami 上で機能的な 4 量体を形成していることが確認出来た。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

A. 杉山グループ

A-1. Ganesh Pandian, N.; Ohtsuki, A.; Bando, T.; Sato, S.; Hashiya, K.; Sugiyama, H. Development of Programmable Small DNA-Binding Molecules with Epigenetic Activity for Induction of Core Pluripotency Genes. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 2656-2660. (doi.org/10.1016/j.bmc.2012.02.032)

A-2. Rajendran, A.; Endo, M.; Sugiyama, H. Structure and Functional Analysis of Proteins by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2012**, 87, 5-55. (doi: 10.1016/B978-0-12-398312-1.00002-0)

A-3. Ganesh Pandian, N.; Sugiyama, H. Programmable Genetic Switches to Control Transcriptional machinery of Pluripotency. *Biotechnol. J.* **2012**, 7, 798-809. (doi: 10.1002/biot.201100361)

A-4. Zhang, H. F.; Wu, Y. L.; Jiang, S. K.; Wang, P.; Sugiyama, H.; Chen, X. L.; Zhang, W.; Ji, Y. J.; Guo, C. X. Recognition of the Nonaromatic and Stereochemical Subunit-Containing Polyamides to the Four Watson-Crick Base Pair in the DNA Minor Groove. *ChemBioChem.*, **2012**, 13, 1366-1374. (doi: 10.1002/cbic.201200137)

A-5. Endo, M.; Tatsumi, K.; Terushima, K.; Katsuda, Y.; Hidaka, K.; Harada, Y.; Sugiyama H. Direct visualization of the behavior of Single T7 RNA Polymerase and the Transcription in a designed DNA Nanostructure. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 8778-8782. (DOI: 10.1002/anie.201201890)

- A-6. Mohri, K.; Nishikawa, M.; Takahashi, N.; Shiomi, T.; Matsuoka, N.; Ogawa, K.; Endo, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H.; Takahashi, Y.; Takakura, Y. Design and Development of Nano-Sized DNA Assemblies in Polyrod-Like Structures as Efficient Vehicles for Immunostimulatory CpG Motifs to Immune Cells. *ACS Nano*, **2012**, 6, 5931-5940. (DOI: 10.1021/nn300727j)
- A-7. Ganesh Pandian, N.; Nakano, Y.; Sato, S.; Morinaga, H.; Bando, T.; Nagase, H.; Sugiyama, H. A Synthetic Small Molecule for Rapid Induction of Multiple Pluripotency Genes in Mouse Embryonic Fibroblast. *Scientific Reports*, **2012**, 2, 544. (doi:10.1038/srep00544)
- A-8. Takagaki, T.; Bando, T.; Sugiyama, H. Synthesis of Pyrrole-Imidazole Polyamide Seco-CBI Conjugates with a Vinyl Linker recognizing 7 bp DNA sequence. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 13074-13081. (DOI: 10.1021/ja3044294)
- A-9. Endo, M.; Yang, Y.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. Single-Molecule Observation of Reversible Mechanical Switching of Photoresponsive Oligonucleotides in the Designed DNA Nanostructure. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 10518-10522. (DOI: 10.1002/anie.201205247)
- A-10. Vijayanthi, T.; Bando, T.; Ganesh Pandian, N.; Sugiyama, H. Progress and Prospects of Pyrrole-Imidazole Polyamide-Fluorophore Conjugate as Sequence-Selective DNA Probes. *ChemBioChem*, **2012**, 13, 2170-2185. (DOI: 10.1002/cbic.201200451)
- A-11. Han, Y-W.; Matsumoto, T.; Yokota, H.; Kashiwazaki, G.; Morinaga, H.; Hashiya, K.; Bando, T.; Harada, Y.; Sugiyama, H. Binding of Hairpin Pyrrole and Imidazole Polyamides to DNA: Relationship between Torsion Angle and Association Rate Constants. *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40, 11510-11517. (doi:10.1093/nar/gks897)
- A-12. Park, S.; Watabe, R.; Ikehata, K.; Hidaka, Y.; Rajendran, A.; Sugiyama, H. Deciphering DNA-Based Asymmetric Catalysis through Intramolecular Friedel-Craft Alkylation. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 10398-10400. (DOI: 10.1039/C2CC35625B)
- A-13. Wu, Y.; Liang, J.; Zhang, W.; Tanaka, Y.; Sugiyama, H. Immunotherapies: The Blockade of Inhibitory Signals. *Intl. J. Biol. Sci.* **2012**, 8, 1420-1430. (doi:10.7150/ijbs.5273)
- A-14. Park, S.; Sugiyama, H. DNA as a Chiral Scaffold for Assymmetric Synthesis. *Molecules*. **2012**, 17, 12792-12803. (DOI: 10.3390/molecules171112792)

- A-15. Yang, Y.; Endo, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. Photocontrollable DNA Origami Nanostructures Assembling into Predesigned Multiorientational Patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 20645-20653. (doi: 10.1021/ja307785r)
- A-16. Dhakal, S.; Mao, H.; Rajendran, A.; Endo, M.; Sugiyama, H. G-Quadruplex Nanostructures Probed at the Single Molecular Level by Force based Methods. *Guanine Quartets: Structure and Application* (Royal Society of Chemistry) **2013**, 73-85. (DOI:10.1039/9781849736954-00073)
- A-17. Morinaga, H.; Kizaki, S.; Takenaka, T.; Kaneshato, S.; Sannohe, Y.; Tashiro, R.; Sugiyama, H. Photoreactivities of 5-Bromouracil-containing RNAs. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 466-469. (doi: 10.1016/j.bmc.2012.11.010)
- A-18. Endo, M.; Yang, Y.; Sugiyama, H. DNA Origami Technology for Biomaterials Applications *Biomaterials Science*. in press. (DOI: 10.1039/c2bm00154c)
- A-19. Rajendran, A.; Endo, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. Control of the Two-dimensional Crystallization of DNA Origami with Various Loop Arrangements. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 686-688. (DOI: 10.1039/C2CC37257F)
- A-20. Miyahara, T.; Nakatsuji, H.; Sugiyama, H. Helical Structure and Circular Dichroism Spectra of DNA: a Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A*, **2013**, 117, 42-55. (DOI: 10.1021/jp3085556)
- A-21. Rajendran, A.; Endo, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. Direct and real-time observation of rotary movement of a DNA nanomechanical device. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1117-1123.. (DOI: 10.1021/ja310454k)
- A-22. Koirala, D.; Ghimire, C.; Bohrer, C.; Sannohe, Y.; Sugiyama, H.; Mao, H. Long-Loop G-Quadruplexes are Misfolded Population Minorities with Fast Transition Kinetics in Human Telomeric Sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 2235-2241. (DOI: 10.1021/ja309668t)
- A-23. Vaijyanthi, T.; Bando, T.; Hashiya, K.; Ganesh Pandian, N.; Sugiyama, H. Design of a New Fluorescent Probe: Pyrrole/Imidazole Hairpin Polyamides with Pyrene Conjugation at their γ -Turn. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 852-855. (doi.org/10.1016/j.bmc.2012.12.018)
- A-24. Ganesh Pandian, N; Sugiyama, H. Strategies to tinker with heritable epigenetic defects in cellular machinery: Lessons from nature. *Pharmaceuticals*. **2013**, 6, 1-24. (doi:10.3390/ph6010001)

A-25. Kunisada, M.; Masaki, T.; Ono, R.; Morinaga, H.; Nakano, E.; Yogiarti, F.; Okunishi, K.; Sugiyama, H.; Nishigori, C. Hydrochlorothiazide Enhances UVA-induced DNA Damage. *Photochemistry and Photobiology* (in press). (DOI: 10.1111/php.12048)

A-26. Morinaga, H.; Takenaka, T.; Hashiya, F.; Hashiya, K.; Kizaki, S.; Bando, T.; Sugiyama, H. Sequence-specific Electron Injection into DNA from an Intermolecular Electron Donor. *Nucleic Acids Res.* (in press)

A-27. Endo, M.; Yamamoto, S.; Tatsumi, K.; Emura, T.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. RNA-templated DNA Origami Structures. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 2879-2881. (DOI: 10.1039/c3cc38804b)

B. 森井グループ

B-1. C. Annoni, E. Nakata, T. Tamura, F.-F. Liew, S. Nakano, M. L. Gelmi, T. Morii, Construction of ratiometric fluorescent sensors by ribonucleopeptides. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 8767-8769. (DOI: 10.1039/c2ob26722e)

B-2. S. Nakano, M. Fukuda, T. Tamura, R. Sakaguchi, E. Nakata, T. Morii, Simultaneous Detection of ATP and GTP by Covalently Linked Fluorescent Ribonucleopeptide Sensors. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 3465-3473. (DOI: 10.1002/ja.3097652)

B-3. K. Matsumoto, E. Nakata, T. Tamura, I. Saito, Y. Aizawa, T. Morii, A Peptide Nucleic Acid (PNA) Heteroduplex Probe Containing an Inosine–Cytosine Base Pair Discriminates a Single-Nucleotide Difference in RNA. *Chem. Eur. J.*, **2013**, (DOI: 10.1002/chem.201204043)

C. 森グループ

C-1. Numata T, Sato K, Christmann J, Marx R, Mori Y, Okada Y, Wehner F. The Δ C splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation. *J. Physiol.*, **590**, 1121-1138 (2012). (DOI: 10.1113/jphysiol.2011.220947.)

C-2. Haraguchi K, Kawamoto A, Isami K, Maeda S, Kusano A, Asakura K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J. Neurosci.*, **32**, 3931-3941 (2012). (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4703-11.2012.)

- C-3. Numata T, Murakami T, Kawashima F, Morone N, Heuser JE, Takano Y, Ohkubo K, Fukuzumi S, Mori Y, Imahori H. Utilization of photoinduced charge-separated state of donor-acceptor-linked molecules for regulation of cell membrane potential and ion transport. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6092-6095 (2012). (DOI: 10.1021/ja3007275.)
- C-4. Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M. Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **109**, 6745-6750 (2012). (DOI: 10.1073/pnas.1114193109).
- C-5. Kiyonaka S, Nakajima H, Takada Y, Hida Y, Yoshioka T, Hagiwara A, Kitajima I, Mori Y, Ohtsuka T. Physical and functional interaction of the active zone protein CAST/ERC2 and the β -subunit of the voltage-dependent Ca^{2+} channel. *J. Biochem.*, **152**, 149-159 (2012). (DOI: 10.1093/jb/mvs054)
- C-6. Nishimune H, Numata T, Chen J, Aoki Y, Wang Y, Starr MP, Mori Y, Stanford JA. Active zone protein bassoon co-localizes with presynaptic calcium channel, modifies channel function, and recovers from aging related loss by exercise. *PLoS One*, **7**, e38029 (2012). (DOI: 10.1371/journal.pone.0038029.)
- C-7. Tadmouri A, Kiyonaka S, Barbado M, Rousset M, Fablet K, Sawamura S, Bahembera E, Pernet-Gallay K, Arnoult C, Miki T, Sadoul K, Gory-Faure S, Lambrecht C, Lesage F, Akiyama S, Khochbin S, Baulande S, Janssens V, Andrieux A, Dolmetsch R, Ronjat M, Mori Y, De Waard M. Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J.*, **31**, 3730-3744 (2012). (DOI: 10.1038/emboj.2012.226.)
- C-8. Hiroi T, Wajima T, Negoro T, Ishii M, Nakano Y, Kiuchi Y, Mori Y, Shimizu S. Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, **97**, 271-281 (2013). (DOI: 10.1093/cvr/cvs332.)
- C-9. Liu X, Cotrim A, Teos L, Zheng C, Swaim W, Mitchell J, Mori Y, Ambudkar I. Loss of TRPM2 function protects against irradiation-induced salivary gland dysfunction. *Nat. Commun.*, **4**, 1515 (2013) (DOI:10.1038/ncomms2526).

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 5 件)