戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題
「ナノ・マイクロ超分子複合体による
メカノトランスダクション機構の解明」

研究期間
平成１７年１月１日～平成２２年３月３１日

曽我部 正博
（名古屋大学大学院・教授）

１．研究課題名

ナノ・マイクロ超分子複合体によるメカノトランスダクション機構の解明

２．研究実施の概要

細胞力覚（メカノトランスダクション）は、聴覚や皮膚感覚だけではなく、内皮細胞による血流や血圧の感知と血管径の調節、あるいは細胞の成長、分裂、形態変化、運動の調節などに中心的役割を果たしており、私達の生命維持に無くてはならない根幹機能である。その機能異常は、不整脈、心肥大、心房細動などの深刻な疾病を招来する。我々は、細胞力覚の主役であるメカノセンサーの実体解明を目指した国際共同研究（ICORP）細胞力覚プロジェクトにおいて、高等動物の心臓から初の機械受容（MS）チャネル遺伝子(SAKCA)を同定するとともに､MS チャネル特異的なブロッカーとして天然蜘蛛毒ペプチド(GsMtx-4)の開発等に成功した。その過程で､「細胞力覚は MS チャネル単独ではなく、膜/細胞骨格/接着斑を含む超分子複合体によって実現される」というキーコンセプトを得るに至った。また､細胞は様々な機械刺激に応じるために MS チャネル以外の多様なメカノセンサーを有しているはずであり、その最有力候補は、細胞骨格/接着斑というナノ・マイクロ超分子複合体ではないかという仮説を得るに至った。そこで、本発展研究(SORST)では細胞力覚を担うメカノセンサー複合体の同定とその作動機構を明らかにすることを主目的とした(課題１、課題 2)。また、細胞力覚研究の将来を見据えて、細胞力覚と高次生理機能（乳汁分泌など）あるいは循環器病との関連を探る研究を並行して進めてきた(課題 3)。

具体的な成果としては；

(1)高次構造が判明し､膜張力で活性化することが分かっている細菌 MS チャネルを対象に、点突然変異導入法とパッチクランプ法を組み合わせて、機械刺激感知部位、ゲートの開閉に関与する部位を同定した。この結果を元に、脂質膜と MS チャネルからなるナノ・マイクロ複合体の分子動力学シミュレーションを行い、張力による感知部位の構造変化がどのようにしてチャネルの開口を導くのかという活性化機構を明らかにした。

(2)レーザーピンセットによるナノ操作と超高速イメージング法を用いて、高等生物（血管内皮細胞）の MS チャネルは、細胞骨格/接着斑とナノ・マイクロ複合体を形成し、細胞骨格の張力が主たる活性化の要因であることを確立したが、この過程で、細胞骨格（アクチン線維）そのものが機械センサーとして機能するという、驚くべき事実を見いだした。また細胞におけるストレスファイバー、接着斑の維持、強化には力学的負荷（張力）が必須であることを明らかにしその機序を解明した。

(3)ATP は生体のいたるところで働いている細胞間情報伝達物質であるが、機械刺激等による細胞からの ATP 放出は細胞でのメカノセンシングの一機序と考えられる。その機構を明らかにするために、高精度リアルタイム ATP イメージング法を開発した。また新たな乳腺や小腸絨毛の組織培養系を確立し、機械刺激およびそれによる ATP 放出の生理的意義を明らかにした。

以上の主課題に加えて、(4) 心筋 MS チャネル SAKCA を用いた特異的チャネルブロッカーを開発あるいは探索、および作用機序の解析、(5)新規 MS チャネル遺伝子の探索、(6)血管内皮細胞の MS チャネル遺伝子の同定、さらには神経細胞における細胞力覚の関与を探るシーズ研究として、7) 海馬シナプス可塑性や新生ニューロンのシナプス形成（スパインの変形や新生に力覚が関与すると想定して）における神経ステロイドの促進作用について研究し、多くの興味深い成果を得た。

これらの成果から膜の張力によるチャネルの開口、細胞の力学的負荷に対する応答、といったメカノトランスダクションの根本的な機序とそれらの生理的役割についてかなりはっきりとした形で提示できたのではないかと考えている。

以下でそれぞれの課題の研究展開・結果について概述する。

課題１：機械受容(MS)チャネルの活性化機構の解明

① 研究のねらい：唯一高次構造（閉構造）の分かっている細菌 MS チャネル MscL と MscS

を対象に、活性化機構のサブナノ機構の解明を目指す。
② 研究実施方法:MS チャネルに点突然変異を導入し、パッチクランプ法でアッセイすることで、膜張力の感知部位等を決定し、活性化機構の分子モデル（仮説）を構築する。この仮説を分子動力学(MD)シミュレーションで解析、確認する。
③ 研究結果：MscL と MscS の膜張力感知部位を同定した。MscL の MD 計算は種々の変異体の特性(開きやすさ、開きにくさなど)をよくシミュレーでき、実験値（活性化エネルギーなど）との定量的比較も可能となった。細胞膜が伸展したときの膜内張力は油水界面の近傍に集中する。我々が同定した MS チャネルの張力感知部位はまさにその近くに位置するアミノ酸残基であった。構造が全く違う MscL と MscS においてこのような共通機構の存在を明らかにした意義は大きい。MD 計算の結果も実験的解釈を支持しており、張力感知アミノ酸である F78 が脂質と特異的に強く結合し、張力増加に伴い F78 を含む膜貫通ヘリックス（TM1）が膜面方向に倒されながらチャネルが開口する様子がシミュレートできた。また種々の突然変異体に対する両親媒性薬剤の作用機序からメカノセンサー部位とチャネルゲーティング部位の連関に関する重要な知見が得られた。

課題２：細胞骨格・接着斑と力覚
① 研究のねらい:細胞力覚における細胞骨格と接着斑の役割とメカニズムを明らかにする。
② 研究実施方法：細胞に伸展刺激（持続あるいは周期的）を与えたときのストレスファイバーと接着斑の動態をイメージングし、ストレスファイバーや接着斑の伸展刺激に対する応答機構のモデルを作成する。また細胞膜を可透過性にしたセミインタクト細胞モデルと in-vitro 再構成系を順次構築し、ナノ操作とイメージングを組み合わせて分子物理的機構を調べる。さらにメカノ刺激特異的な結合蛋白の網羅的な解析を行う。
③ 研究結果： a. 細胞骨格：ストレスファイバーが高等生物の MS チャネル活性化における主要な力伝達媒体であることはレーザーピンセットによるナノ操作と超高速イメージング法を用いて既に明らかにしたが、その過程でストレスファイバーを構成するアクチン線維自身がメカノセンサーであるという事実が明らかになった。それは(1)生細胞において、ストレスファイバーは伸展ではなく弛緩で崩壊すること、(2)セミインタクト細胞で、アクチン線維の脱重合因子コフィリンが弛緩したストレスファイバーに選択的に結合してこれを切断すること、(3)in-vitro 再構成したアクチン線維で、レーザーピンセットでナノ操作して張力を発生させながらコフィリンを添加すると、脱重合が遅延すること等によって、アクチン線維自身が内部張力の程度に応じてコフィリン存在化で崩壊するメカノセンサーであることが証明された。一方、ストレスファイバーは、細胞に加えられた伸展刺激により、アクチン線維が束化して形成されることも分かった。こうしたストレスファイバーの性質が細胞の力ベクトル感知機能を担っていると考えられる。

b. 接着斑：生細胞においては、ストレスファイバーは遠く離れた接着斑と両端で結合し、自らの収縮力で常時接着斑を引っ張っている。細胞を弛緩させるとストレスファイバーの消失とともにそこに連結していた接着斑は徐々に消失する（接着斑蛋白質であるインテグリンが細胞内に取り込まれる)。一方細胞を伸展してストレス線維に張力を与えると接着斑が徐々に成長するとともにストレスファイバーも成長し太くなる。すなわち、接着斑もまた機械刺激の変化に応じて自らの動態を変化させるメカノセンサーである。このキーになる分子として zyxin を同定した。zyxin は、伸展刺激で接着斑に集中し、弛緩刺激で拡散する極めて有用な力覚のモニター分子であり、その結合蛋白分子あるいはその分子複合体が細胞におけるメカノセンサーとして機能していることを明らかにした。

課題３：細胞間ＡＴＰシグナリングと力覚
① 研究のねらい：メカノセンシングとしての ATP 放出の機序と働き、その制御機構を明らかにする。
② 研究実施方法：機械刺激に感受性の高い乳腺や小腸の培養細胞を用い、機械刺激によって放出された ATP がそれぞれの組織で重要な生理機能を果たしていることを示唆してきたが、さらに生体に近い組織サンプルを開発しその確証を得る。また我々の構築した

Luciferin-Luciferase による生物発光を用いた ATP のリアルタイム イメージング法をさらに改良し、時間空間分解能上げ、高精度の ATP 観測するとともに ATP 放出のキネティクス解析を行う。
③ 研究結果：より生体内に近い状態にある乳腺の組織サンプルでの ATP シグナリングの様子をリアルタイム ATP イメージングシステムにより観測した。乳腺組織サンプルはタッチやストレッチといった機械刺激に用量依存的に応答し ATP を放出した。その放出濃度をルミネッセンス強度から定量すると数μM 程度であり、パラクラインシグナルとして十分な濃度であった。また射乳ホルモンであるオキシトシンの投与によっても ATP 放出が見られた。これらのことは乳腺においてメカノシグナリングと ATP シグナリングがカップルし乳汁分泌に関与しているという私達の考えを確証した。その放出経路としては同じ乳腺細胞において 3 種類以上が関与していることがキネティクス解析により明らかとなった。また、小腸絨毛上皮下線維芽細胞が機械刺激で ATP を放出するメカノセンサーであることを発見した。食物の通過時に生じる絨毛の変形が上皮下線維芽細胞からの ATP 放出を引き起こし、その ATP が絨毛の運動、吸収能さらには腸の蠕動運動の調節にも関わっていることが示唆された。

課題４：MS チャネルブロッカーの開発・探索と応用
① 研究のねらい：現在 MS チャネル特異的なブロッカーは蜘蛛毒由来のペプチド GsMTx-4 しか知られていない。その作用機序の解明や将来の臨床応用を目指してより簡単な構造のブロッカーを開発し、その作用機序を解析する。また既存の薬物のスクリーニングも行う。
② 研究実施方法：GsMTx-4 の部分構造を模擬したペプチドの合成とパッチクランプによる解析。
③ 研究結果：心筋 MS チャネル SAKCA を材料に、合成したペプチドのスクリーニングを行い、少なくとも数種のペプチドが抑制効果を持つことが判明し、作用機序を解析した。また心房細動が誘発できる灌流心モデルを確立し、スクリーニングを行った。GsMTx-4 と比較しながら抑制効果を解析した結果、ともに MS チャネルのポアをブロックするのではなく、ゲーティング機構を修飾して抑制することが分かった。一方、これらのペプチドの心房細動の抑制効果を調べたが、残念ながら効果はなかった。これはおそらく心房細動には、スクリーニングに使用した SAKCA ではない別の MS チャネル（心筋細胞には少なくとも 5 種類の MS チャネルが発現している）が関与するためと思われた。そこで、開発した還流心モデルを使って、まったく違う手法で薬物スクリーニングを行った。すなわち、これまでの心房細動に関する疫学調査を参考に有望な既存薬物をスクリーニングして、ある種のスタチンが心房細動を急性に抑制することを見いだした。

課題 5：細菌 MS チャネルホモログの同定と機能解析（筑波グループ）
① 研究のねらい：原生動物クラミドモナスの新規 MS チャネル遺伝子を同定する。
② 研究実施方法：細菌 MS チャネル MscS のホモログ遺伝子を釣り上げ、クローニングしたのち、大腸菌に強制異所発現してパッチクランプ法でアッセイする。
③ 研究結果：MSC1、MSC2、MSC3 という３つの MscS ホモログの遺伝子がみつかった。このうち MSC1 の全長配列をクローニングし、大腸菌に発現させたところ、MS チャネルであることが確認された。MscS の機能的ホモログとしては最初の発見である。興味深いことに MSC1 は葉緑体に発現しており細胞内での機械受容という新しい分野へのブレークスルーとなる可能性がある。

課題 6：内皮細胞 MS チャネルの分子同定（岡山グループ）
① 研究のねらい：内皮細胞の伸展依存性 Ca^{2+}上昇（流入）を担う分子実体を同定する。
② 研究実施方法：最も可能性の高い TRPV2 に的を絞って、アンチセンス・モルフォリノオリゴによる KO と TRPV2 遺伝子の異所発現系を用いて Ca^{2+}イメージング法でアッセイする。
③ 研究結果：ヒト血管内皮細胞の初代培養系に TRPV2 のアンチセンス・モルフォリノオリゴを導入した結果、TRPV2 の蛋白質発現量が著しく抑制されるとともに、伸展依存性 Ca^{2+}

上昇がほぼ完全に抑えられた。逆に TRPV2 の導入によって伸展依存性 Ca^{2+} 上昇が回復した。また伸展依存性 Ca^{2+} 上昇を示さない HEK293 細胞に TRPV2 遺伝子を導入した結果、伸展依存性 Ca^{2+} 上昇が見られるようになった。TRPV2 が内皮細胞の伸展依存性 Ca^{2+} 上昇を担う主要な分子であることが示唆された。また最近 TRPV2 の KO マウスの作成に成功し、これを用いて興味深い研究が進行中である。

課題 7：シナプス可塑性に対する神経ステロイドの促進効果の解析（シーズ研究）

① 研究のねらい：シナプス可塑性に急速かつ強力な促進作用を有する神経ステロイドの作用を解析して、細胞力覚との接点を探る足がかりを得る。

② 研究実施方法：可塑性と神経新生の最も盛んな海馬歯状回を対象に、長期増強（LTP）の誘導、あるいは虚血による神経新生/シナプス形成に対する神経ステロイドの促進効果を電気生理と形態/膜電位/Ca^{2+} イメージングで解析する。

③ 研究結果：神経ステロイド PREGS,DHEAS が海馬シナプスに急速かつ強力な LTP を誘導した。現在 GFP 発現動物を用いて微細形態（シナプス、スパイン）の変化を調べている。スパインの形態変化にはアクチンや接着分子の動態が関与することは間違いなく、近い将来細胞力覚との接点を探る足がかりができた。また虚血後に生じる神経新生とシナプス形成にも種々の神経ステロイドが促進作用を持つことを発見し、これも細胞力覚との接点を探るよいモデル系になることが分かった。

３．研究構想

ヒトの五感の中でその受容体(センサー)から脳での情報処理を含めもっとも研究の遅れているのが力覚(触覚、体性感覚)である。それは細胞レベルでも同じで、10 年前の 2000 年に ICOPR としてスタートした細胞力覚プロジェクトはまさにその解明を目指す世界的にも先進的な取り組みであった。当初、細菌 MS チャネル以外の高等生物でのメカノセンサーあるいは MS チャネルの分子実体は、その候補をすでにいくつか持っていたこともありすぐに捕まると予測していた。現在ではさらに TRP チャネルのファミリーが関わっているとの報告(我々も含め)が増えると共にメカノセンサーの研究は急増している。しかし残念ながら未だに consistent な形で MS チャネル分子は明らかにはなっていない。その原因として考えられることの 1 つはすべてに細胞に共通のものではなく細胞の種類ごとに異なっているということで、もう 1 つは細菌の MS チャネルのように分子単独で機能するものではなく超分子複合体として初めて本来の機能が果たせるということである。力覚が細胞分裂や細胞運動といった基本的な機能にまで関わっていることを考えるとこれらのことは当たり前のことかもしれない。

本プロジェクトでは､1 つの課題として構造既知の細菌 MS チャネルを用いた MS チャネル活性化機構の徹底的理解を目指した。この MS チャネルのホモログは高等動物にはないかもしれないが、我々の得た結果はチャネルがどのように機械受容するか、あるいはチャネルがどのように開くかといった根本的な原理を含んでおり、将来明らかとなる MS チャネルの活性化機構の解明に間違いなく生かされと確信を持っている。2 つめの課題である細胞骨格・接着斑の細胞力覚での機能の解明で得られた結果は、まさに上で述べた超分子複合体の必要性とメカノセンシング機序の多様性を明らかに示すもので細胞力覚研究の方向性を明示できた。もう 1 つの主要課題である ATP シグナリングと細胞力覚の結果もメカノセンシング機序の多様性を示す 1 つである。ATP 放出経路はメカノセンサーでありその実体は MS チャネルと同様に細胞ごとにあるいは 1 つの細胞内でも多様であることを示した。また ATP を介したメカノトランスダクションは組織レベルで非常に特徴的であり生理機能に果たす役割の重要性を明示できた。

細胞力覚プロジェクトとこのプロジェクトを通じてチャネル分子から組織レベルまでのメカノセンシング機序を扱えたことは、散漫になったとの評価も一部にあるが、メカノセンシングの多様性という本質を考える上で非常に意義があり、この成果から膜の張力によるチャネルの開口、細胞の力学的負荷に対する応答、といったメカノトランスダクショ

ンの根本的な機序とそれらの生理的役割についてかなりはっきりとした形で提示できたと自負している。

４．研究実施内容

ここでは、概要で述べた７つの課題のうち主要な４つの課題について詳述する。

４．１　機械受容(MS)チャネルの活性化機構の解明（担当：野村、吉村、藤生、澤田、村瀬、町山、曽我部）

(1)実施の内容

Ａ．細菌機械受容チャネル MscS の張力感知部位（メカノセンサー）の同定

大腸菌には MscS(mechanosensitive channel of small conductance)、MscL (mechanosensitive channel of large conductance) と呼ばれる機械受容チャネル(MS チャネル)が内膜(細胞質膜)上に発現している。菌体が真水などの低張な溶液に晒されると細胞が膨張し、閾値の低い MscS から順に開口して水やイオン、浸透圧調節物質などを放出することで細胞の破裂死を防いでいる。

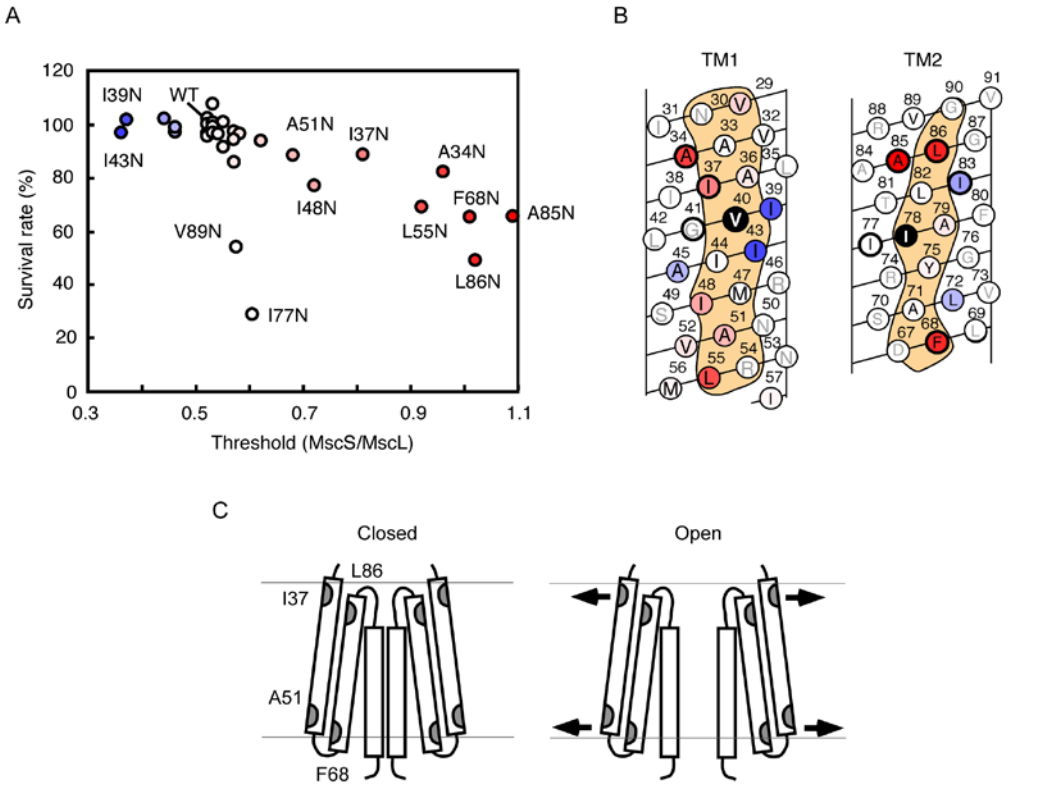


図 4-1-1（A）MscS 突然変異体の生存率と閾値比との関係。生存率が低下するに従い、MscS が開きにくくなり、閾値比が高くなることが分かる。（B）パッチクランプと低浸透圧ショック実験のデータを基に作成した TM1 と TM2 のαヘリックス領域のネットダイアグラム。膜貫通部位の両末端に赤色のアミノ酸残基が多く分布しているのが分かる。中央部には青色のアミノ酸残基が分布しており、この部位は張力が加わった時、陽圧を受けているものと思われる。肌色は脂質膜と接していると思われる領域。（C）膜貫通部位でのチャネルの閉状態（左）と開状態（右）の仮説の模式図。

MscS は MscL と同様、細胞膜からの張力を直接感知することにより活性化され、その高次構造が 2 番目に決定された最も研究が進んでいる機械受容チャネルである（Bass et al., Science, 2002)。MscS は膜 3 回貫通構造を有するサブユニットの同一 7 量体で構成され、ポアを有する膜貫通領域と、フィルターとしての役割を担うと考えられる細胞質領域から成り立っている。本研究では、この機械受容の分子メカニズムが普遍的であるかを調べる目的で、MscL の場合と同様の手法（Yoshimura et al., Biophys J, 2004）を用いて、MscS の膜張力感知部位の同定を試みた。その結果、張力感知部位は細胞膜の細胞外と細胞内に面する 2 箇所の油水界面に位置する疎水性アミノ酸であることが分かった（図 4-1-1)。一般に、膜タンパク質は脂質二重層の膜表面近くにおいて陰圧を受けていることを考えると、この部位で MscS が細胞膜から張力を受け取っていると考えられる。

B．細菌機械受容チャネル MscS の膜貫通領域連結ループと細胞質領域との静電的相互作用によるゲーティングの制御

MscS と MscL には構造上大きな違いがあり、特に MscS は C 末端側に分子量約 17 kDa の大きな cytoplasmic chamber を有している。cytoplasmic chamber の側面には 7 つのサブユニットで構成された直径約 14Å のポアと底面にはβ-barrel で構成された直径 8Å のポアがある。共にイオンを通過させる際の prefilter としての役割を担っているものと考えられている。近年、パッチクランプ法を用いた実験において cytoplasmic chamber はチャネルのゲーティングにも関わっているのではないかとの報告がある（Koprowski and Kubalski, J Biol Chem, 2003; Schumann et al., FEBS lett, 2004; Grajkowski et al., Biophys J, 2005)。さらに、分子動力学シミュレーションの結果によるとチャネルがゲーティングを起こす際、cytoplasmic chamber の上側の表面にある正の電荷を持ったアミノ酸(R128)と TM1-TM2 loop にある負の電荷を持ったアミノ酸（D62）との間で静電的相互作用を形成しているのではないかとの報告もある（Sotomayor and Schulten, Biophys J, 2004)。

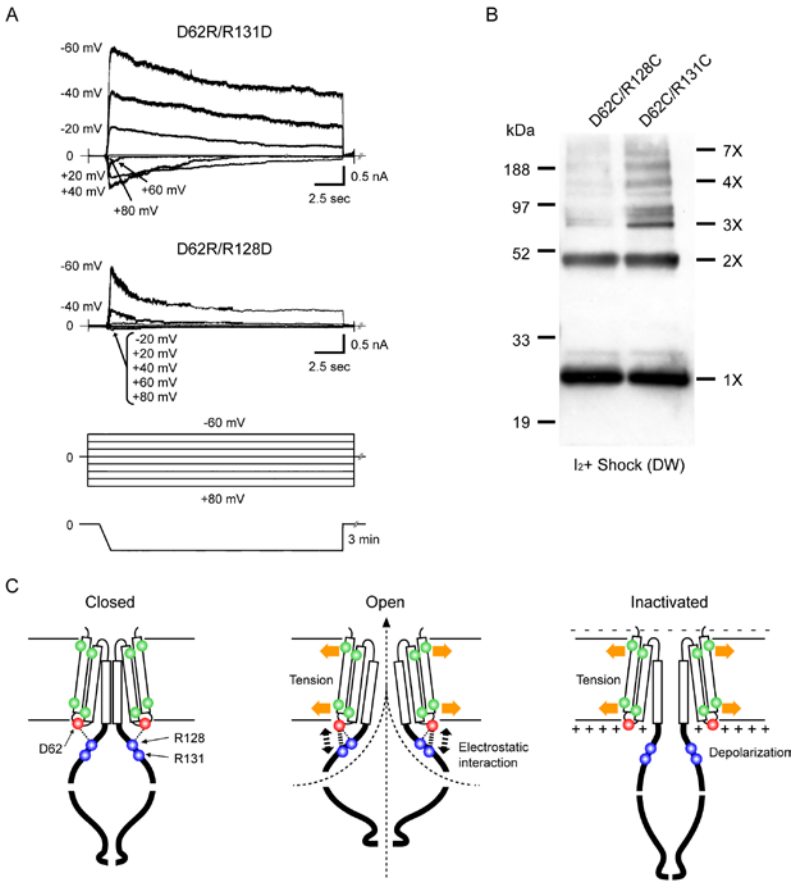


図 4-1-2 D62 と R128、R131 との静電的相互作用。（A）陰圧を一定にし、膜電位を-60 から+80 mV までステップ状に変化させた時の D62R/R131D と D62R/R128D の不活性化のトレース。D62R/R128D では不活性化が速いことが分かる。(B) 低浸透圧ショック実験での D62C/R128C と D62C/R131C の S-S 結合（ジスルフィド結合）による多量体形成のパターン。(C) MscS のゲーティングメカニズムのモデル。閉状態（左）では、D62（赤色）は R128（青色）と静電的相互作用を形成している。開状態（中央）では D62 は R131 と静電的相互作用を形成し、開状態を安定化させる。脱分極時（右）には、細胞内界面に正電荷が蓄積して D62 を電気的に中和することで R128 や R131 との静電的相互作用が解消され、その結果電位依存的不活性化を導くものと想像される。

本研究では、MscS のゲーティングにおける TM1-TM2 loop と cytoplasmic chamber の上側との間での静電的相互作用の役割を明らかにする目的でさまざまな突然変異体の機能を解析した。その結果、MscS のゲーティングには TM1-TM2 loop と cytoplasmic chamber の上側の表面部分との静電的相互作用を通して制御されていることが明らかとなった(図 4-1-2)。おそらく、これらの静電的相互作用が脱分極時における電位依存的な不活性化に関与しているものと考えられる。本研究の結果は、Sotomayor らの仮説（Sotomayor and Schulten, Biophys J, 2004）とほぼ一致したが、D62 は R128 というよりは、むしろ R131 と静電的相互作用を形成している可能性が示唆された。

C．両親媒性物質による細菌機械受容チャネル MscL の活性化機構の解明

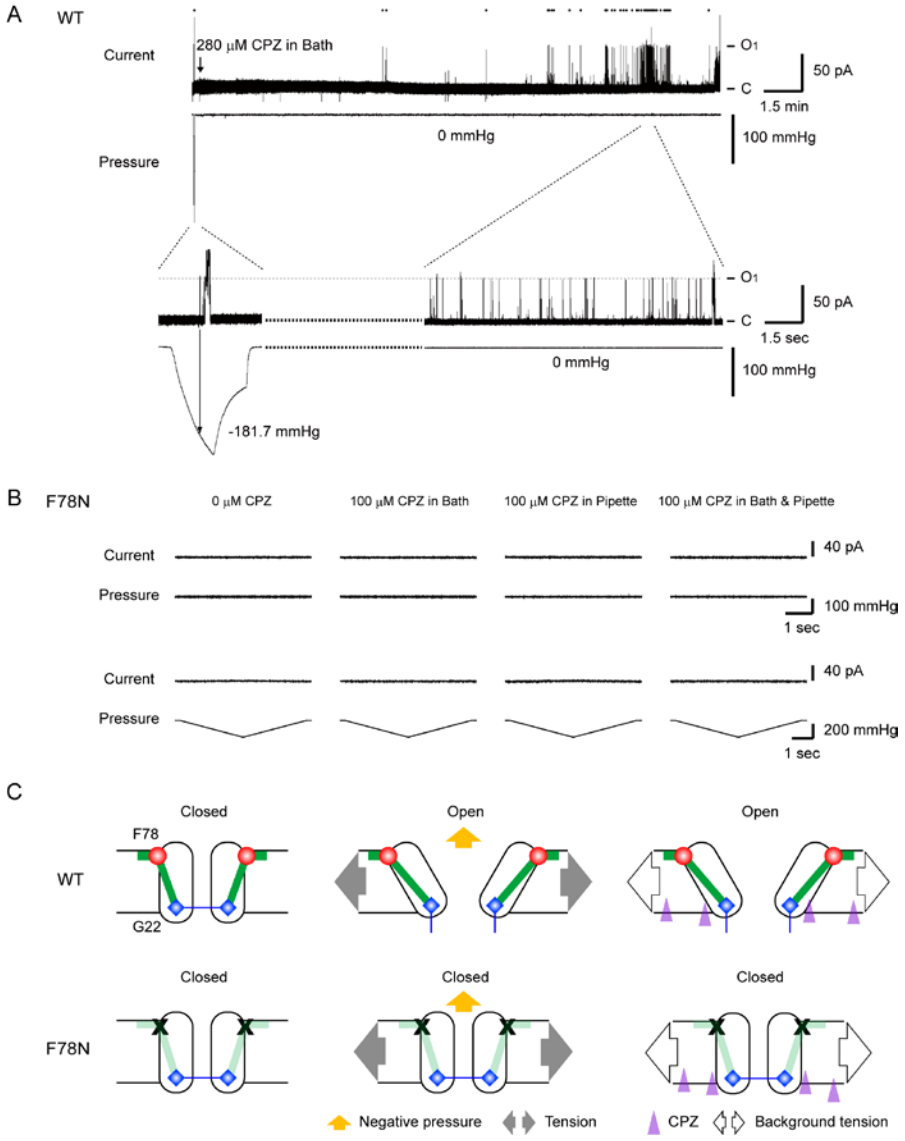


図 4-1-3 （A）野生型 MscL に CPZ を投与する前後のトレース。張力を与え MscL が細胞膜上に存在することを確認した後(下段左拡大図)、張力のない状態で 280 μM の CPZ を Bath 側から投与(矢印)すると、約 5 分後から MscL の自発的な活性（丸印）が観察された(下段右拡大図)。（B）F78N に陰圧を与えてない場合(上段)と与えた場合(下段)で、100 μM の CPZ を Bath 側、Pipette 側、両側からそれぞれ投与した時のトレース。全ての条件においてチャネルの活性は見られなかった。（C）MscL のゲーティングの仮説のモデル。野生型 MscL(上段左、中央)は、細胞膜からの張力をメカノセンサーである F78(赤色)が感知し、構造変化を起こした結果ゲート(G22)が開きイオンを透過させる。さらに、ピペット電極から陰圧を与えなくても Background tension と CPZ でチャネルが開く(上段右)。一方、F78N は脂質膜との相互作用が弱く張力を感知できないため情報をゲートへ伝えることができず、陰圧や CPZ を投与してもチャネルは開かない。

細菌機械受容チャネルMscLは、細胞膜からの張力を直接感知しチャネルを開口へと導く。一般に、メカノセンサー部位であると考えられる F78 が細胞膜からの張力を感知し、膜貫通領域の傾斜と回転によるコンフォメーションの変化が生じることで、ゲートの疎水性ロック（G22）が外れチャネルが開くものと考えられている。一方、パッチクランプ法を用いて疎水性ロックの機能を失った突然変異体（G22N）では、パッチ電極から陰圧を与えなくてもチャネルの自発的活性が見られることが報告されている（Yoshimura et al., Biophys J, 1999)。そこで、本研究では、細胞膜からの張力を感知する能力を失った突然変異体(F78N)と両親媒性物質で機械受容チャネルの活性化剤（Martinac et al., Nature, 1990）であるクロルプロマジン（CPZ: chlorpromazine）を用いて、細胞膜からの張力を感知してチャネルが開く経路（Tension-sensing process）とは別のルートが存在するか否かを検討した。その結果、CPZ の投与により F78N ではチャネルの活性は全く見られなかったが、野生型では濃度依存的、張力依存的にチャネルの活性を修飾した（図 4-1-3)。さらにパッチ電極から陰圧刺激を与えなくてもチャネルの活性が観察された。以上のことから、MscL の活性には Tension-sensing process を介するルート以外は存在せず、CPZ はこの経路に影響を及ぼし機械刺激感受性を修飾している可能性が考えられた。このことは、MscL の開口にはメカノセンサーが必要不可欠であることを示唆している。

D．分子動力学シミュレーションによる MS チャネル(MscL）の開口過程の解析

細菌 MS チャネル MscL は二回膜貫通ヘリックスを持つサブユニットのホモ 5 量体で構成されており，細胞膜の伸展で生じる膜張力を直接感受してゲーティング（開口）する膜蛋白質である。大腸菌 MscL の 3D 構造は，同様の構造を有する結核菌 MscL の結晶解析に基づいて全原子モデルが提案されている。このモデルを使って，分子動力学シミュレーションに基づいたいくつかのゲーティングモデルが提案されている。しかし，これらの先行研究では脂質膜と MscL タンパクとの間の相互作用が考慮されておらず，MscL がどの部位で膜面張力を受容し，それがどのようにゲーティングを導くかは明らかにされていない。そこで本研究では，蛋白質- 脂質膜間の相互作用を考慮したモデルを作成して分子動力学シミュレーションを行い，開口過程の詳細な解析を行った。本モデルでは，脂質二重膜に MscL を埋め込んで平衡化した後，膜面に平行な方向の圧力を下げることで張力を発生させた。その結果，2 ナノ秒程度の計算で，張力による MscL 開口の初期過程をシミュレートすることができた。そのとき，脂質膜に面するアミノ酸残基のうち細胞外面の油水界面近くに位置する phenylalanine 78 (F78)のみが脂質分子と強く相互作用することが判明し，この残基が MscL の張力センサーであることが強く示唆された。

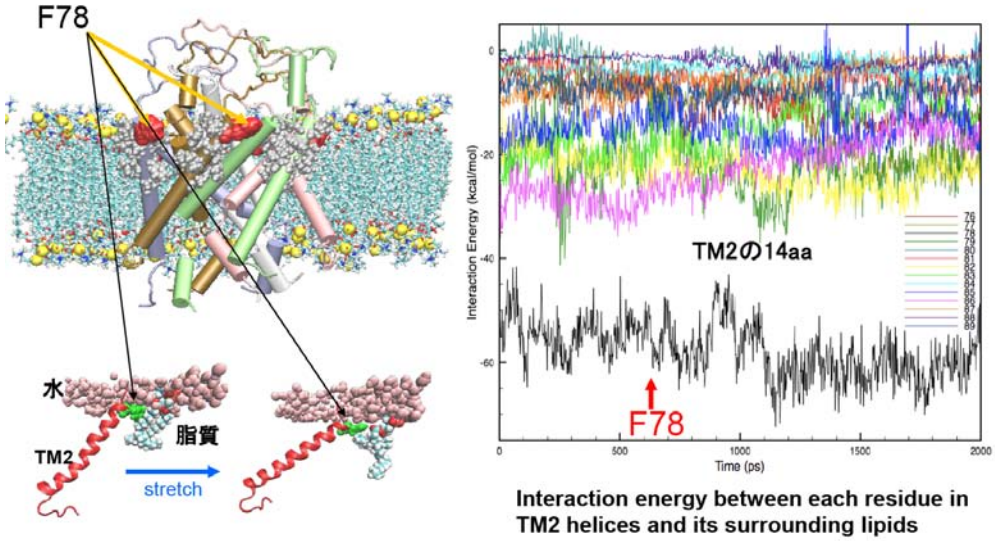


図 4-1-4　膜 2 回貫通型サブユニットのホモ 5 量体からなる MscL を脂質二層膜に埋め込んだ全原子モデルの分子動力学シミュレーション。F78-脂質間相互作用が最も安定。膜伸展で F78(左下の緑色)が脂質に引っ張られて、堅い TM1,2 ヘリックスが引き倒されることによってゲートが開く

本モデルを使い，すでに実験的に明らかになっている開きやすい変異体(G22N)や，開きにくい変異体(F78N)のシミュレーションを行ったところ，実験結果と整合性のある結果が得られた。このことはこのモデルの信頼性を証明するとともにMSチャネルのメカノセンシングからゲーティングにいたる活性化機構の解明の有力な手法となることを示している。

(2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

MscSの突然変異体の解析から、細胞膜の細胞外側と細胞内側の油水界面に位置する疎水性アミノ酸が細胞膜からの張力を感知していることが示唆された。また、MscSの閉状態から開状態に至る過程での膜貫通領域連結ループと細胞質領域との静電的相互作用がゲーティング機構に重要であることを明らかにした。本研究は、イオンチャネルを構成する4つの機能素子（センサー、ゲート、フィルター、ポア）の内の1つ（メカノセンサー）とMscSの開閉機構の一端を明らかにしたもので、MscSのゲーティング機構の全容解明の進展に寄与するものと思われる。

MscLの活性化剤である両親媒性物質のクロルプロマジンを用いることによりMscLのゲーティング機構について検討した結果、MscLの開口にはメカノセンサーが必須であることが示唆された。両親媒性物質とMSチャネルのゲーティング機構について検討した研究はいくつか報告されており、中でも食品、薬品、化粧品等の防腐剤として用いられている両親媒性物質のパラベンはMSチャネルの活性を修飾することが報告されている(Nguyen et al., Eur Biophys J, 2005; Kamaraju and Sukharev, Biochemistry, 2008)。MSチャネルは機械受容を行う感覚細胞だけにとどまらず、ほぼ全ての細胞に普遍的に存在するため、両親媒性物質の作用機序が解明できれば抗菌剤の開発につながる可能性が考えられる。

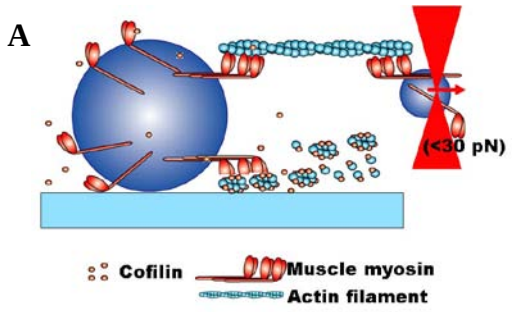
分子動力学シミュレーションは点変異体の挙動をシミュレートできたことからもわかるように現在非常に精度の高いものとなっている。われわれは実際のチャネル実験系も持っており、実験とモデル計算は有機的にリンクしている。単なるシミュレーションだけではなく計算からの予測を確かめることもでき、MSチャネルの活性化機構の解明は急ピッチで進んでいる。またチャネル開閉に対する水分子の役割などチャネル理解の根本に関わることも明らかにしつつある。

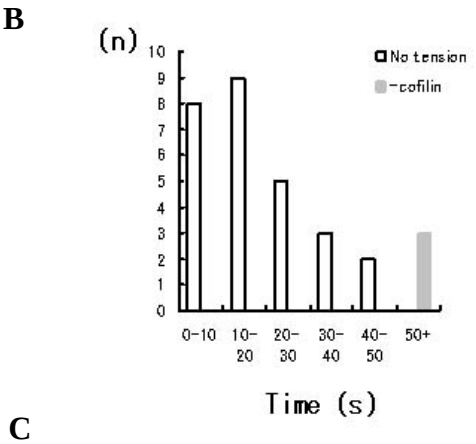
４．２　細胞骨格・接着斑と細胞力覚（早川、平田、辰巳、清島、坂口、岸上、曽我部）

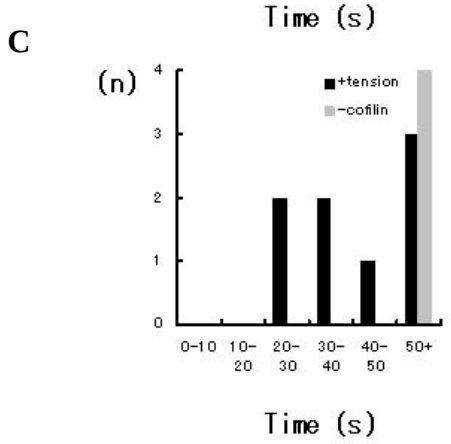
(1)実施の内容

Ａ．アクチンフィラメントの動態が張力により直接制御される分子機構の解析

我々は既に精製タンパク質を用いた in vitro 再構成実験系を用いて、アクチン調節タンパク質コフィリンによるアクチン線維の切断活性が張力によって直接制御される事を明らかにしている(図 4-2-1)。この結果は、タンパク質もしくはタンパク質からなる超分子複合体に“力”そのものを負荷することによりタンパク質相互作用が変化するという、これまでほとんど考えられていなかった概念を提示するものである。次に我々はコフィリンのアクチン線維切断活性の張力による抑制の分子機構を解析しようと考えた。まず、アクチン線維に負荷した張力が、コフィリンのアクチン線維への結合そのものを抑制するのか、アクチン線維の切断を抑制するのかを検討した。細胞膜を透過性にし、可溶性の細胞質成分を洗い流した後、精製したコフィリンを張力存在下もしくは非存在下で添加した後直ちに固定染色し、コフィリンの局在を観察した。ストレスファイバーへ張力負荷されなかった場合にのみコフィリンがストレスファイバーに共局在した事から、ストレスファイバーの張力がコフィリンのストレスファイバーへの結合を抑制することが示唆された(図 4-2-2)。







先行研究により、コフィリンが結合するとアクチン線維の構造変化が起こることが報告されており、この構造変化はアクチン線維に内在的に存在する揺らぎの範囲内で起こると考えられている。これは、アクチン線維のゆらぎによってアクチン線維を構成するアクチンモノマー間の配置がある特定の位置にある時にコフィリンがアクチンフィラメントに結合しやすい事を意味している。このことから我々は、張力によってアクチン線維に発生したストレスがアクチンフィラメントの揺らぎを減少させ、コフィリンがアクチン線維に結合しやすい構造を取りにくくする事によってコフィリンの結合抑制がもたらされるのではないかと考えた。そこで、張力負荷により、アクチン線維の揺らぎレベルが実際に抑制されるかどうか、またアクチン線維に対するストレスがコフィリンの結合と関連するかどうかを直接的に可視化することを試みた。

図 4-2-1 コフィリンによるアクチン線維の切断活性は張力によって制御される。A. 単一アクチン線維に張力を負荷しながらコフィリンを添加する実験の模式図。NEM 処理したミオシンを結合させたビーズ（φ10 μm）にアクチン線維の一端を捕捉し、他端を光ピンセットで操作する NEM ミオシンビーズ（φ3 μm）で捕捉し張力を負荷した。10 μg/ml の濃度の精製φコフィリンを含むバッファーを環流しアクチン線維切断までの時間を計測した。B. 張力負荷していないアクチン線維がコフィリンによって切断されるまでの時間をヒストグラム表示した。張力負荷しない場合、平均 17.3±2.7 秒後にアクチン線維の切断が観察された。C. 光ピンセットにより張力負荷したアクチン線維が切断されるまでの時間。平均 49.0±8.7 秒後に切断が観察された。灰色のバーはコフィリンを含まないバッファーを環流した際の結果で、観察中にはアクチン線維の切断は観察されなかった(b, c)。

先行研究により、コフィリンが結合するとアクチン線維の構造変化が起こることが報告されており、この構造変化はアクチン線維に内在的に存在する揺らぎの範囲内で起こると考えられている。これは、アクチン線維のゆらぎによってアクチン線維を構成するアクチンモノマー間の配置がある特定の位置にある時にコフィリンがアクチンフィラメントに結合しやすい事を意味している。このことから我々は、張力によってアクチン線維に発生したストレスがアクチンフィラメントの揺らぎを減少させ、コフィリンがアクチン線維に結合しやすい構造を取りにくくする事によってコフィリンの結合抑制がもたらされるのではないかと考えた。そこで、張力負荷により、アクチン線維の揺らぎレベルが実際に抑制されるかどうか、またアクチン線維に対するストレスがコフィリンの結合と関連するかどうかを直接的に可視化することを試みた。

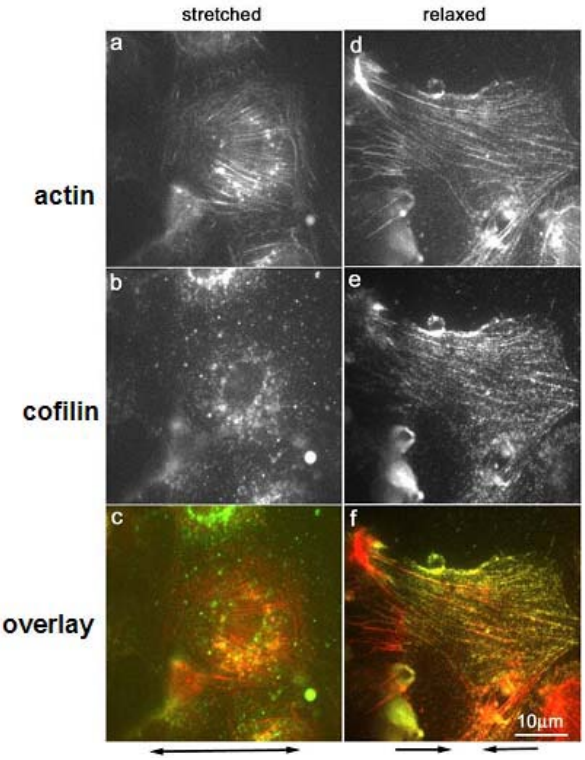


図 4-2-2 ストレスファイバーに対する張力負荷がコフィリン結合に及ぼす影響。上段はアクチンに対する染色、中段はコフィリンに対する染色、下段は重ね合わせ像（緑：コフィリン、赤：アクチン）。伸展したセミインタクト細胞ではコフィリンはストレスファイバーと共局在を示さないが（左）、弛緩させたセミインタクト細胞ではストレスファイバーへの共局在が観察された。

まず、アクチン線維に対するストレスがコフィリン結合におよぼす影響を計測した。10 μg/ml の濃度で NEM-Myosin を吸着させたガラス表面にアクチン線維を捕捉することでアクチン線維にストレスを負荷した。1 μg/ml (50 nM)の fluoresein 標識コフィリンの存在下でガラス上に捕捉されたアクチンメッシュをガラスキャピラリーで切断し、ミオシンとの結合により運動を束縛されていない新たな自由端、すなわちストレスを負荷されていないアクチン線維を出現させることにより（図 4-2-3A）コフィリンの結合が影響を受けるかどうかを調べた。その結果、切断により形成された新たな末端の周辺のアクチン線維ではコフィリンの結合確率が上昇し（図 4-2-3B,C)、新たな自由端から 3 μm 以内にコフィリンが結合する確率は 0.206 ±0.122 event/s/μm2 (n=3)で、それ以外の領域にコフィリンが結合する確率 0.0247 ±0.006 event/s/μm2 (n=3)に対して約 8.3 倍高率だった。また、コフィリンの平均滞在時間は自由端から 3 μm 以内では 91.2 ±101.6 (ms)、それ以外の領域では 41.0 ±25.8 (ms)で、自由断端におけるコフィリンの滞在時間延長が観察された。また、自由端には、非常に長時間（＞300 ms）滞在するコフィリンが約 3.4％の頻度で特異的に観察された。この結果から運動を束縛されていないアクチン線維にはコフィリンの親和性が高いこと、また滞在時間が延長することが示された。（図 4-2-3C)。この結果から、アクチン繊維に対するストレスがコフィリンの結合と、コフィリンのアクチンフィラメントへの結合状態のうちで解離速度の遅い結合状態への遷移を抑制する事が強く示唆された。

さらに我々は張力によるアクチン線維の揺らぎレベルの変化を計測した。まず、単一アクチン線維の一端を固定し、他端にミオシン標識した磁気ビーズを結合させた後、電磁石によってビーズを上方に牽引しアクチン線維に張力を負荷した、ビーズの回転を計測し、張力負荷によりアクチン線維の回転揺らぎが減少するかどうかを確認した。その結果、張力負荷によりアクチン線維の回転揺らぎが減少する事が明らかとなった。このことからアクチン線維に対する張力負荷は、アクチン線維の揺らぎを減少させる事によりコフィリンのアクチン線維への結合を抑制する事が強く示唆された。

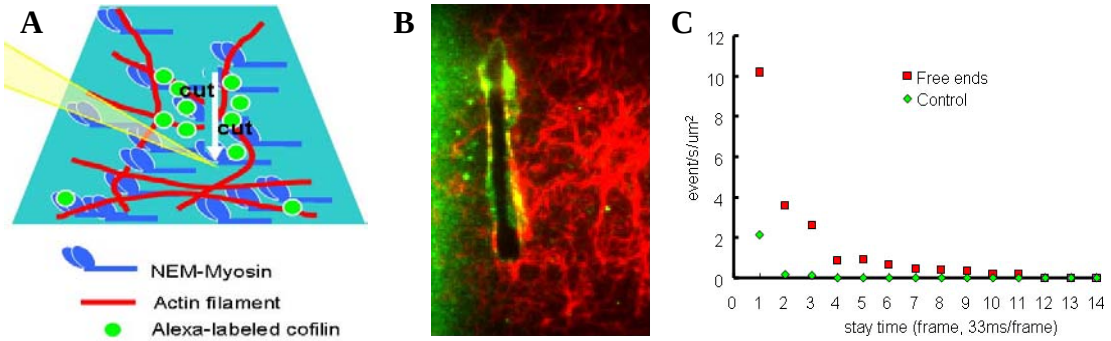


図 4-2-3 コフィリンのアクチン線維自由端への結合。 A.コフィリンのアクチン線維への結合を観察する実験系の模式図。B. アクチン線維のメッシュ（赤）をガラスキャピラリーで切断した後 30 秒間のコフィリンの結合（緑）を平均化した画像。メッシュの切断部位付近でのコフィリンの結合増加が観察された。 C. コフィリンのアクチンメッシュへの結合イベントの出現率と滞在時間を示す。切断部位付近のコフィリンの結合を赤の四角、それ以外の領域の結合を緑のダイヤモンドで示す。横軸は滞在時間、縦軸はその滞在時間の結合イベントが観察された単位面積当たりの確率を示す。

B．細胞接着斑における力学応答の分子基盤としてのアクチン重合調節機構の研究

繊維芽細胞や内皮細胞などの接着性細胞は接着斑と呼ばれる超分子構造を形成し、細胞外基質と接着する。この接着が妨げられた細胞はアポトーシスによる細胞死に至り、癌化した場合にのみ接着に依存せずに生存・増殖できる。このように細胞外基質との接着は細胞の正常な機能発現にとって必須である。接着斑では細胞外基質の受容体であるインテグリンがクラスターを形成し、多様な細胞質タンパク質の集積を介してアクチン骨格と結合している。すなわち、接着斑は細胞内のアクチン骨格系で発生した力を細胞外基質に伝達し、また、細胞外基質からの力学的情報を細胞内に伝える、力学的インターフェースとしての役割を持つ。近年、接着斑におけるインテグリン- アクチン骨格間の結合強度は細胞内外の力学的環境に応じて変化することが明らかにされてきた。接着斑への力学的負荷が大きくなると結合は強化され、逆に力学的負荷が減少すると結合は減弱する。このような力学的負荷に応答しての接着斑のモジュレーションは生体内に生じる多様な力学的揺動に適応して細胞が適切に形態形成や運動を行うのに重要である。しかし、その分子機構はほとんど不明である。

接着斑ではアクチンの重合が盛んであり、接着斑におけるアクチンフィラメント量の調節はインテグリン- アクチン骨格間の結合強度の調節に重要である（Glogauer et al., 1998)。そこで本研究では、力学的負荷が接着斑でのアクチン重合に及ぼす効果について調べることとした。また、接着斑におけるアクチン重合調節の分子機構について調べるためにアクチン重合との関わりが想像されている接着斑タンパク質 zyxin についてその役割りを調べることとした。

細胞外マトリックスであるフィブロネクチン(FN)上に培養した繊維芽細胞について界面活性剤である digitonin と Alexa568 標識アクチン分子との混合物を 1 分間処理すると、蛍光アクチンが接着斑に取り込まれることが確認された。この接着斑への蛍光アクチンの取り込みはアクチン重合の阻害剤である cytochalasin D によって阻害されたことから、アクチン分子の重合によるものであった。このことから接着斑への蛍光アクチンの取り込みを調べることで接着斑におけるアクチン重合活性を評価できることが分かった。

力学的負荷が接着斑でのアクチン重合に及ぼす効果について調べるために、接着斑への力学的負荷を以下の方法により変化させた。細胞のアクトミオシン依存的な収縮力の発生を薬理学的に阻害することにより接着斑への力学的負荷を減少させた。また、細胞をシリコンゴム製の弾性基盤の上に培養し、その基盤を伸展させることで接着斑に外部から力学的負荷を与えた。ミオシン II の特異的阻害剤である blebbistatin を処理することでアクトミオシン依存的な収縮力の発生を阻害すると FN 受容体である α5β1 インテグリンが接着

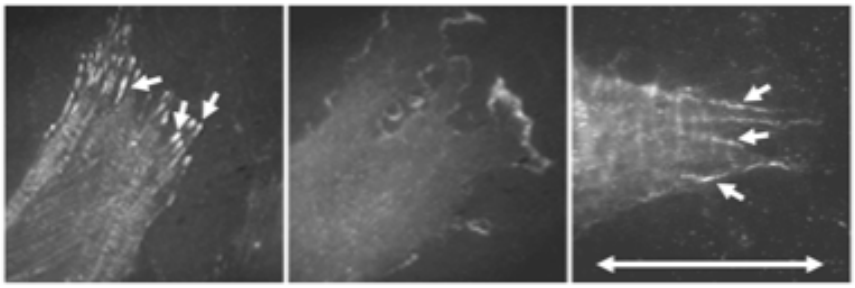


図 4-2-4. 接着斑における力学的負荷に依存したアクチン重合。左: 正常な繊維芽細胞。蛍光アクチンが重合により接着斑に取り込まれる(矢印)。中: ミオシン II を阻害し、収縮力の発生を阻害した細胞。アクチンの接着斑での重合が消失している。右: ミオシン II を阻害した状態で、弾性基盤を両矢印の方向に 50%伸展させた。接着斑でのアクチン重合が回復している(矢印)。

斑を形成しているにも関わらず、接着斑におけるアクチン重合活性は喪失した。ミオシン II を阻害した状態で弾性基盤を 50%､3 分間持続伸展させると接着斑でのアクチン重合活性の回復がみられた。これらのことから接着斑におけるアクチン重合は力学的負荷に依存していることが明らかとなった（図 4-2-4)。

次に、接着斑におけるアクチン重合活性と接着斑タンパク質 zyxin との関わりについて調べた。接着斑でのアクチン重合活性は zyxin が多く集積した接着斑において高かった。また､zyxin のドミナントネガティブ体を発現させた場合の接着斑におけるアクチン重合活性について調べた。zyxin のドミナントネガティブ体として zyxin の接着斑局在化配列(C 端 LIM ドメイン領域)に GFP をつなげたものを作製し、それを細胞内で発現させることにより内在性の zyxin が接着斑へ局在することを競争阻害した。zyxin のドミナントネガティブ体を発現させると接着斑の大きさ・分布に特に変化はみられないものの接着斑におけるアクチン重合活性が顕著に低下した（図 4-2-5)。

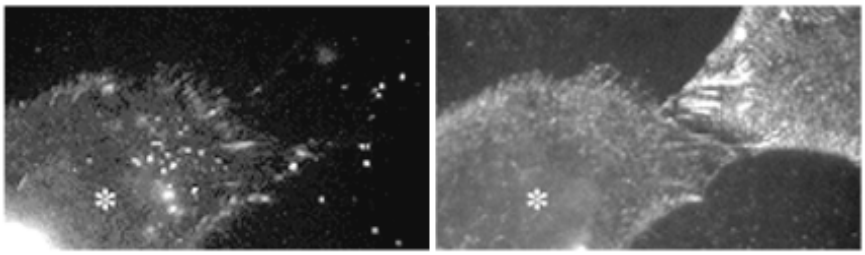


図 4-2-5. zyxin のドミナントネガティブ体の発現による接着斑でのアクチン重合抑制。左: 発現した zyxin のドミナントネガティブ体。＊印の細胞で zyxin ドミナントネガティブ体が発現している。右: 接着斑への蛍光アクチンの重合による取り込みが zyxin ドミナントネガティブ体が発現している細胞(＊印)では大幅に減少している。

この結果は zyxin が接着斑におけるアクチン重合に関わっていることを示す初めての直接的証拠である。更に、zyxin の接着斑への集積もまたミオシン II の阻害で喪失し弾性基盤の伸展で回復した。以上の結果から力学的負荷依存的に zyxin が接着斑に集積しそれによって接着斑におけるアクチン重合が促進されることが示された（図 4-2-6)。

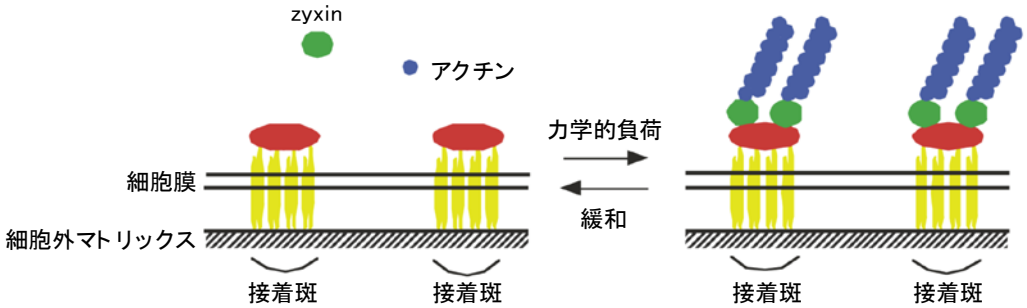


図 4-2-6. 力学的負荷に対する接着斑の応答。接着斑への力学的負荷が小さい時は zyxin は集積せずアクチン重合活性も低い(左)。力学的負荷が大きくなると zyxin が集積しそれによりアクチン重合活性が高まる(右)。両状態は力学的負荷の変化に応答して可逆的に変化する。

zyxin を接着斑へ集積させる分子機構について調べるために、zyxin の接着斑局在化配列(C 端 LIM ドメイン領域)と会合するタンパク質を免疫沈降し、共沈してくるタンパク質について質量分析とデーターベース解析による網羅的同定を試みた。C 端 LIM ドメイン領域に GFP つなげたものもしくは GFP のみを細胞内で発現させ抗 GFP 抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降産物全てをトリプシンで限定分解し、イオントラップ型質量分析機を用いた LC/MS/MS 測定を行い、得られた MS/MS スペクトルについてデーターベース解析した。それにより zyxin の C 端 LIM ドメイン領域と複合体を形成するタンパク質を網羅的に多数(30 種類以上)同定した。

(2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

細胞が移動する際には、固い足場に強く接着した細胞基質間の接着装置が維持され、接着が弱い接着装置や柔らかい足場に接着した接着装置に連結するアクチン細胞骨格は脱集合する。我々の結果はアクチン線維に対する力の付加そのものが、コフィリン-アクチンの結合制御を介して張力依存的なアクチン細胞骨格の動態制御を行っている可能性を示した。

タンパク質に直接“力”を負荷することで生理的に意味のある応答が起こることが示された例はリン酸化酵素の基質タンパク質への張力負荷が基質タンパク質の構造変化を引き起こしリン酸化部位を露出させリン酸化を受けやすくするという報告がわずかに存在するのみである。我々の研究は力が直接タンパク質同士の相互作用に影響を及ぼす事を示した極めて独創的な研究である。最近、アクチン細胞骨格のような超分子複合体の構造／形態がアクチン結合タンパク質の結合に影響を及ぼすことが知られつつあるが、我々の結果から類推してアクチン細胞骨格の変形によるストレスがアクチン結合タンパクの結合に影響するという分子モデルが考え得る。

また、創傷治癒の際に見られる上皮細胞の運動や、ガン細胞などの遊走は力学的な条件により影響を受ける事が知られている。我々の結果はそうした生理的現象の際のアクチン動態制御の分子機構を説明する有力なモデルの一つになると考えられ、創傷治癒やガン細胞転移制御の分子標的を提供し得るかも知れない。

接着斑への力学的負荷は、接着斑の物理的強度を増大させる。接着斑ではアクチンの重合が盛んであることが知られており、また接着斑におけるアクチンフィラメント量の増加は接着斑の強化に関わっている (Glogauer et al., 1998)。しかし、力学的負荷が接着斑でのアクチン重合に及ぼす効果は不明であった。本研究では、接着斑におけるアクチン重合が、力学的負荷により調節されていることを明らかにした。

接着斑タンパク質 zyxin はアクチン重合調節タンパク質である VASP と結合し、VASP を接着斑へ局在させる働きがあることが知られていた。そのため、zyxin は接着斑でのアクチン重合の調節に関与しているものと想像されていたが、実際の機能は不明であった。本研究により zyxin が接着斑でのアクチン重合を促進することが初めて示された。また、zyxin の接着斑への集積自体が力学的負荷により制御されているということを明らかにした。

拍動による血管伸縮や血流といった力学負荷にさらされている血管内皮細胞や創傷治癒など力学バランスが刻一刻変化する際の上皮細胞や繊維芽細胞において力学的負荷による接着斑強度の調節は細胞の適切な運動や形態形成に必須である。また、癌化した細胞は異常な遊走能を示し転移するが、接着部位の力学的負荷への応答性の異常がその一因として考えられている。本研究で得られた成果は力学的負荷による細胞接着調節のメカニズムに重要な知見を与え正常細胞と癌細胞とでの接着部位の力学的負荷応答性の違いの分子的基盤の解明につながることが期待される。特に zyxin は癌細胞において正常細胞よりも発現が 10 倍程度も増加することが報告されている。そして、形質転換時における細胞遊走能の増大には zyxin が関わっている (Mori et al., 2009)。これらのことから接着部位における zyxin を介しての力学的負荷応答の異常が癌細胞の遊走異常に関わっていることが考えられる。本研究で成功した zyxin 結合タンパク質の網羅的解析を正常細胞と癌細胞について行い比較することで癌細胞における zyxin を介した接着制御の異常化のメカニズムを明らかにできるものと考える。

４．３　細胞間ＡＴＰシグナルと力覚（担当：古家、原田、秋田、曽我部）

(1)実施の内容

Ａ．放出 ATP のリアルタイムイメージング法の開発

ATP(ヌクレオチド)は脳、痛覚系、血管、炎症作用、免疫系、膀胱、気道、骨、小腸、乳腺など様々な細胞､組織で働く重要な細胞間情報伝達物質であることが分かってきた｡我々は乳腺細胞、小腸絨毛の線維芽細胞等の研究を通して ATP の生理学的な重要性を明らかにし､ATP 放出が細胞における機械刺激受容の一機序として働いていることを明らかにしてきた。エネルギー共役物質、核酸構成物質として細胞に不可欠な ATP を情報伝達物質として用いることのメリットは、すべての細胞が情報発信源になり得ることであり、またほとんどすべての細胞がなんらかの ATP 受容体 (代謝型 P2Y とイオンチャネル型 P2X ファミリー) を発現しており、情報の受け手にもなり得ることである。ATP シグナリング系の普遍性、重要性はその受容体とともに明らかになってきたが、細胞からの ATP 放出経路は、Ca^{2+}細胞内シグナリング系に置き換えて考えると Ca^{2+}チャネルに相当する情報伝達系における根幹部分であるにもかかわらず、ほとんど分かっていない。Ca^{2+}チャネル同様、ATP 放出経路はおそらく多種類存在し、細胞、状況に応じて使い分けられており、その制御機構も単純ではないと考えられる。

現在、経路としては Cl^-チャネル、Gap 結合のヘミチャネル、TRP チャネル、開口放出、トランスポーター等々が報告されている｡ATP 放出経路の解明にはまず実際に ATP 放出の様子を観察することが大事であると考え、ATP の Luciferin-Luciferase(L-L)反応を用い、その微弱な発光をリアルタイムでイメージングし、赤外光ノマルスキーの同時観察も可能にしたシステムを構築した。図 4-3-1 は機械刺激(タッチおよびストレッチ)によって ATP が出ていく様子を細胞の大きさのレベルでとらえた画像である。現在、時間分解能は 30ms、ATP の感度は 10nM 程度であり、ATP 放出細胞の同定や組織レベルでの ATP 放出のイメージングに威力を発揮する。

この方法は溶液中に L-L 反応液を入れその発光を観察するため、感度は高いが液中に拡散した ATP も光るため空間分解能はあまり高くない。それを改善するため Luciferase を細胞表面に局在化させることにより分解能を上げる方法も開発した。これを用いることによって、東大・医・山本らとの共同研究でシェアーストレスによる血管内皮細胞からの ATP 放出のイメージングに初めて成功した。

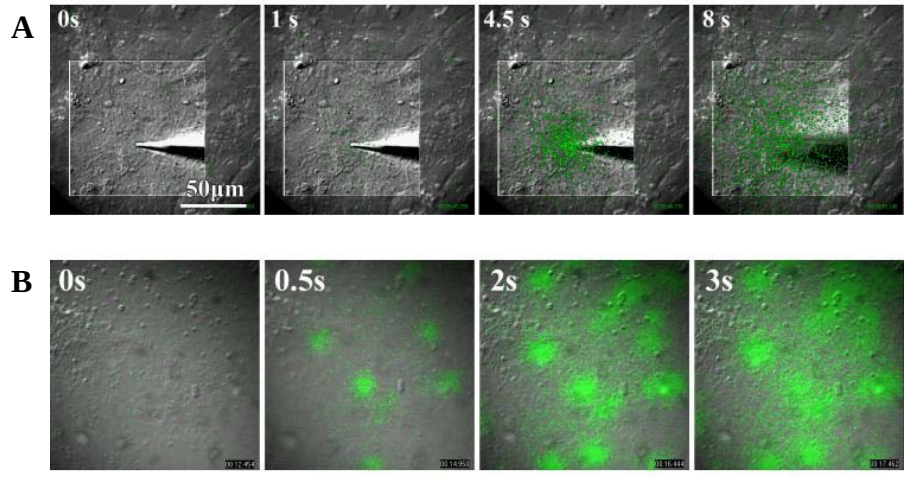


図 4-3-1. 機械刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング。ATP による発光と赤外光ノマルスキー画像の同時観察。ノマルスキー画像上に ATP の発光像（緑）を重ね合わせてある。どちらも培養小腸絨毛上皮下線維芽細胞。A:タッチ刺激による ATP 放出。B:ストレッチ刺激による ATP 放出。0s と 0.5s の間で縦方向に 16%の伸展刺激を与えた。

B．乳腺細胞および組織からの ATP 放出の機序と役割

授乳期の乳腺において乳腺腺胞は、腺胞内のミルクを射出するため下垂体後葉から内分泌されたオキシトシンによって収縮したり、腺胞内に溜まっていくミルクによって膨張したり、外部からの機械刺激を受けるなど、生理的条件下で種々の大きな機械的ストレスを受けている。私たちはマウスの授乳期乳腺の初代培養細胞系を用いて、乳腺細胞がタッチやストレッチといった機械刺激に非常に敏感で刺激によって ATP を放出し、乳腺分泌細胞が持つ P2Y2 や乳腺筋上皮細胞が持つ P2Y1 の活性化を介して Ca^{2+}シグナルが伝播することなどを明らかにし、乳腺腺胞において ATP シグナリング系が乳汁分泌の増強や制御に重要な寄与をしていることを示唆してきた。

今回、より生体内に近い状態にある乳腺の組織サンプルでの ATP シグナリングの様子を、リアルタイム ATP イメージングシステムにより明らかにできた。乳腺組織を数 mm 角程度に細切しコラーゲンゲルに埋め込んだ組織サンプルにタッチ刺激やストレッチ刺激を与えると用量依存的に ATP 放出が見られた(図 4-3-2)。この時の ATP 濃度はまわりの ATP 受容体を活性化するのに十分な数μM 程度と定量された。またオキシトシンの投与による ATP 放出が組織サンプルにおいても見られた。以上のことは乳腺においてメカノシグナリングと ATP シグナリングがカップルし乳汁分泌に関与しているという私達の考えを確証するものであった。

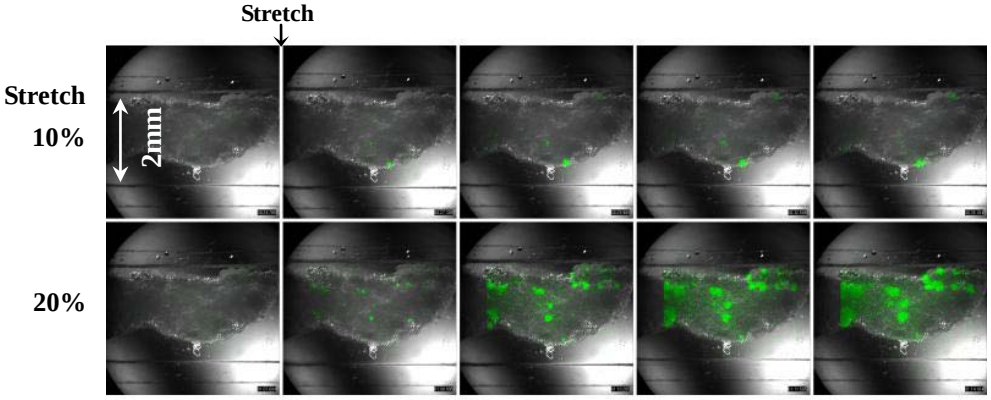


図 4-3-2. 乳腺組織サンプルからのストレッチ機械刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング。ストレッチの用量依存的に ATP 放出する細胞の数が増加した。放出 ATP の濃度は数μM から 10μM と定量された。1s 毎の記録。

ATP 放出（発光）の時間経過を詳しく解析すると放出の濃度、放出持続時間等が分かる。各種刺激による ATP 放出過程を解析した結果、同じ乳腺細胞においてもいくつかの異なる放出経路が存在していることがわかった。

C．小腸絨毛上皮下線維芽細胞は絨毛でのメカノセンサーとして機能する

小腸絨毛下線維芽細胞は絨毛上皮下でネットワークを形成し神経、上皮、血管、平滑筋、免疫細胞と相互作用しており、ATP やエンドセリンなど各種活性物質に反応し、形を変えたり収縮したりするユニークな特性を持ったネットワークであることを明らかにした。その特性により、絨毛の機械的性質や物質の透過性を制御するとともに、機械刺激に応じた ATP 放出によって絨毛におけるメカノセンサーとして機能しうること、また絨毛の柔軟な動きを担っていることなど、小腸絨毛の働きのキーとなるネットワークであることを明らかにした（図 4-3-3)。

小腸絨毛は単に吸収のための表面積を広げるための構造ではなく、入ってきた食べ物や水を感知するメカノ＆ケモセンサーを持ち、自ら動くことによって食べ物をスムーズかつ十分な時間をかけてゆっくりと運ぶことのできる運動器官でもある。このエレガントでフレキシブルな絨毛の機能は絨毛上皮下線維芽細胞ネットワークの局所的なそしてダイナミカルな形態変化によって実現されていると考えられる。

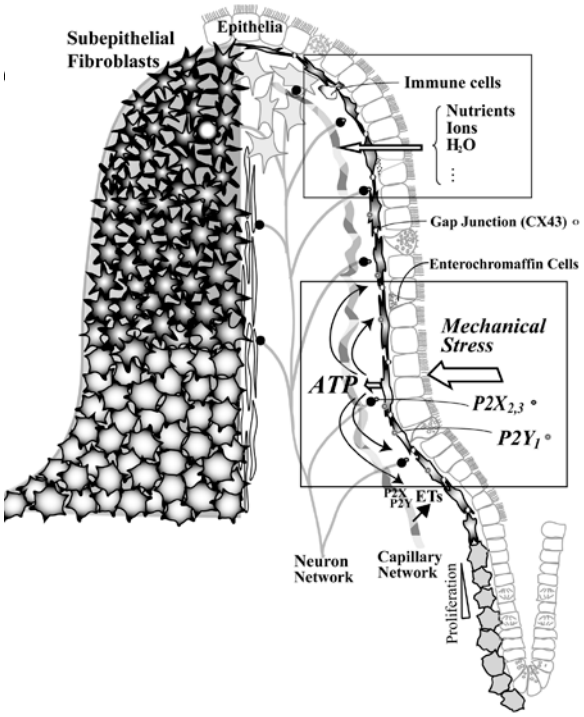


図 4-3-3. 小腸絨毛における絨毛上皮下線維芽細胞ネットワークの働き。上皮下線維芽細胞は上皮の下で細胞ネットワークを形成しており、その細胞は左側の図のように形態をフラット型から星形に cAMP 濃度に応じて短時間に変化し、それに応じて機械刺激に対する感受性も変化する。その働きは A: バリアー/ふるい；自ら細胞の形態変化によって網目の大きさを変えるとともに、TGFβ、TNFα、HGF などのサイトカインを放出し上皮の透過性を変える。B: メカノセンサー；食べ物などによる機械刺激によって ATP を放出、近くにある知覚神経の終末の P2X2,3 型 ATP 受容体を活性化する。また ATP は血管にも作用しその流れを制御する。C: 伸縮性メカニカルフレーム；形態変化及び収縮によって絨毛の自在な動きが実現する。

(2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

ATP リアルタイムイメージング法によって、機械刺激を含めいろいろな刺激により ATP を放出する細胞は特異的ではないが数が限られていること(従来の測定法ではどの細胞が出しているか分からなかった)やその ATP 濃度がμM のオーダーであることが明らかになった。さらにそのキネティクス解析を行うことにより放出のメカニズムの違いも推測される。実際乳腺の細胞には三種類以上のキネティクスの異なった経路が同時に存在することを示した。このようにこの方法は細胞や組織における ATP シグナリングの研究にきわめて有効な方法で、現在海外を含めいくつもの共同研究提案が来ている。特に組織レベルでの測定は ATP の生理的役割の検証に欠かせない。脳スライスにおいても有効であることも確認した。また空間的解像度を上げるいくつかの試みや細胞内 Ca^{2+}との同時測定によって ATP 放出経路の研究も進展すると思われる。ATP 放出の生理的役割に関しては、組織サンプルの開発によってさらに生体に近い条件で検証できるようになった。乳腺におけるメカノシグナリングと ATP シグナリングのカップリングや小腸絨毛上皮下線維芽細胞が ATP 放出を介したメカノセンサーであることなどは我々が明らかにしたユニークな機序であり ATP の働きの一つの典型例ともなる。

４．４　MS チャネルブロッカーの開発・探索と応用（担当：唐キョウヨウ、山本、成瀬、古谷、児玉、曽我部）

(1) 実施の内容

心筋の MS チャネルとして我々がはじめて同定した鶏機械刺激感受性 BK チャネル(SAKCA, Tang, et al.,2003)の構造機能連関の解析を進め(A)、これをアッセイ系として GsMTx-4 の作用機序を解析すると同時に新規 MS チャネルブロッカーを探索し (B)、家兎心房細動モデルを用いて心房細動治療薬の可能性を検討した (C)。

A．心筋 MS チャネル SAKCA の構造機能連関

機械刺激感受性チャネルに対して特異的なブロッカーを開発するには、アッセイ系として用いた SAKCA の基本的性質を明らかにしておく必要がある。そこでまず、SAKCA の機械刺激感知能の責任配列の同定を試みた。種々の突然変異体を用いた解析により、SAKCA の機械刺激感知部位として、C 末の 59 アミノ酸からなる STREX 配列中の 3 残基 ERA が重要であること、この配列を認識して張力を伝える補助膜蛋白質(AP)があることを明らかにした（図 4-4-1)。SAKCA は電位依存的、かつ機械刺激依存的にゲーティング（開閉調節）される複雑な性質を示す。そこで、機械刺激感知配列が存在する C 末とそこに連結する膜貫通ドメイン S6（ゲート）の間に様々な長さのリンカーを挿入して電位依存性と機械刺激依存性を分離して解析することに成功し、両者の関係を示す構造モデルを提出した（図 4-4-2)。

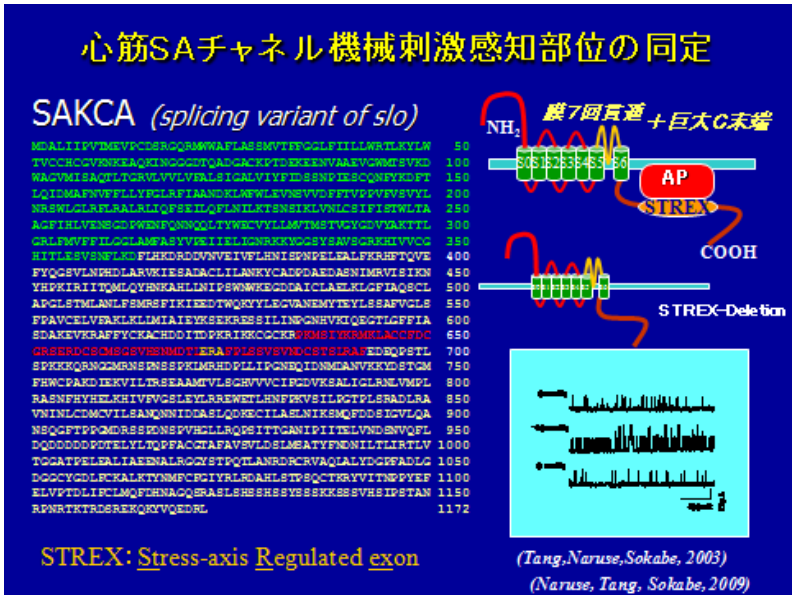


図 4-4-1. トリ心筋 SAKCA のアミノ酸配列。緑字が膜貫通ドメイン、白字が細胞質ドメイン、赤字が STREX 配列を表す。STREX 配列中の ERA が機械感受性に必須である。ERA を含む STREX 配列が補助膜蛋白質(AP)との結合を介して膜張力を感知する。

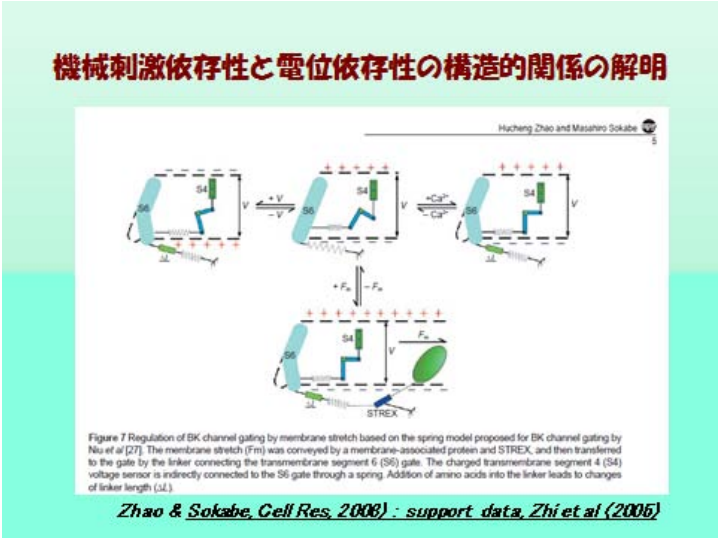


図 4-4-2. SAKCA の電位依存性と機械刺激依存性の構造モデル。SAKCA のゲート(S6)は上流で電位センサー(S4)、下流で STREX を含む C 末と連結しており、電位依存性と機械刺激依存性を示す。

B．SAKCA に対する蜘蛛毒 GsMTx-4 とそのペプチドミメティクスの作用

現在唯一の MS チャネル特異的ブロッカーとして期待されているのは蜘蛛毒ペプチド GsMTx-4（35 アミノ酸）のみである。しかし、これが本当に MS チャネル特異的である証拠は確立していない。そこで SAKCA を対象にその特異性を検討した。その結果、GsMTx-4 はチャネルのポアを塞ぐチャネルブロッカーではなく、電位依存性チャネルである SAKCA の電位感受性曲線を右シフトして、すなわち電位感受性を下げることによって、見かけ上 MS チャネルの活性を抑制するゲーティングモディファイヤーであることが分かった。この抑制（右シフト）は膜伸展刺激(pipette-suction)によって可逆的に解消される（図 4-4-3）。さらにゲーティングキネティクスを詳細に解析して、GsMTx-4 が機械刺激感受性を特異的に抑制することをはじめて明らかにした（論文準備中）。前項の結果とあわせて、GsMTx-4 の作用部位は SAKCA 本体ではなく、補助膜蛋白質(AP)か、SAKCA と AP の結合部位に作用するものと思われた。

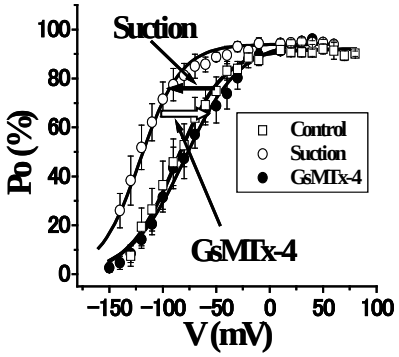


図 4-4-3. GsMTx-4 によるチャネル活性（Po）の抑制と、膜伸展刺激（suction）による拮抗。

GsMTx-4 はラットの伸展誘導性心房細動を有意に抑制することが知られている（Bode, etal, 2002)。そこで、心房細動治療薬の開発を目指して約 20 種類の縮退ペプチドミメティクスを合成し、上記 SAKCA をアッセイ系としてブロッカーとしての機能をスクリーニングした。驚くべきことに、8-10 アミノ酸からなる多くのペプチドミメティクスが抑制活性を示した。その中でも特に活性の強いペプチド（コード名 TVP003）の作用機序を詳しく解析した結果（図 4-4-4)、このペプチドは GsMTx-4 と同様、1)SAKCA のメカノゲーティング機構を特異的に認識して阻害すること（MS 活性を失った SAKCA 変異体には効かない)、2)チャネルのポアを塞ぐチャネルブロッカーではなく、電位依存性チャネルである SAKCA の電位感受性曲線を右シフトさせる、ゲーティングモディファイヤーであることが判明し、今後 MS チャネル解析の有用なツールとして使える可能性を示した。

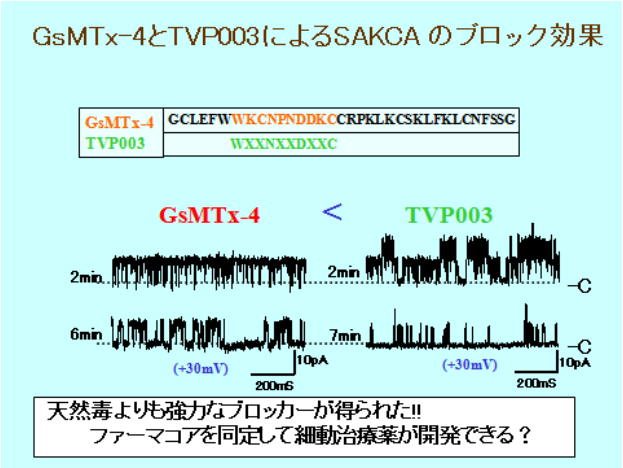


図 4-4-4. GsMTx-4 と TVP003 による SAKCA 単一チャネル電流の抑制。TVP003 がより強く抑制した。トレースの上向きがチャネルの開を示す。

C．灌流心心房細動モデルを用いた既存薬物のスクリーニング

上記の結果を踏まえ、合成したペプチドミメティクスが心房細動の抑制のリード化合物として使えるか否かを検討する目的で、家兎灌流心を用いた伸展誘導性心房細動モデルを開発した。図 4-4-5 に示すように、このモデルは高頻度電気刺激（リエントリーの模擬）後に心房内圧に依存して再現性良く心房細動を発症した。そこで、SAKCA を最も強く抑制した TVP003 を用いて心房細動に対する効果を調べたが、残念なことに抑制効果は認められなかった。これはおそらくスクリーニングに使用した SAKCA ではない別の MS チャネル（心筋細胞には少なくとも 5 種類の MS チャネルが発現している）が関与するためと思われた。まだ試みていない多くのペプチドミメティクスはあるのだが、本実験は大量のペプチドと多大な時間を必要とする実験であるために、実験継続を断念せざるを得ないと判断した。

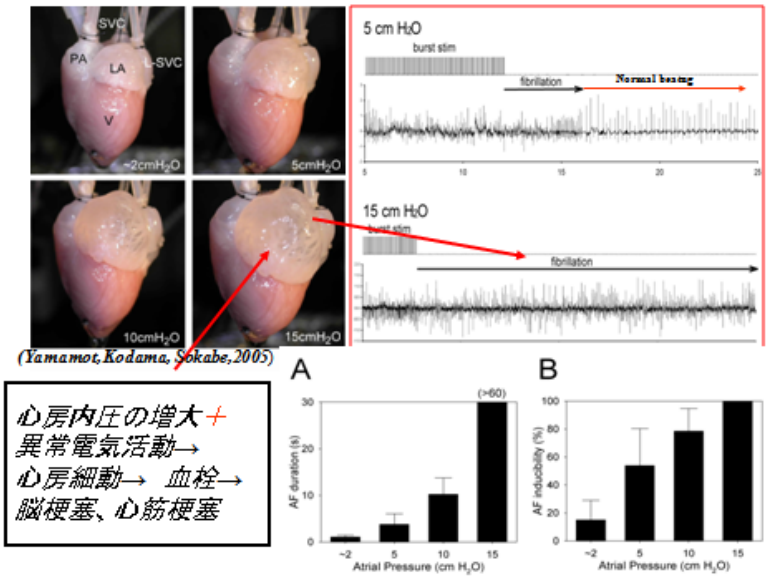


図 4-4-5. 家兎灌流心を用いた伸展依存性心房細動の誘発。心房内圧が低いと高頻度電気刺激停止後すぐに正常拍動を回復するが、内圧が高いと細動が持続する。細動の誘導率と持続時間が内圧に依存している。

そこで、開発した灌流心モデルを使って、まったく違う手法で薬物スクリーニングを行った。すなわち、これまでの心房細動に関する疫学調査を参考に有望な既存薬物を調査した結果、ある種のスタチンが心房細動の発症を抑制する可能性が浮かび上がってきた。これまでに数種類のスタチンを検討したところ、少なくとも２種類（実名は現時点で公表できない）は GsMTx-4 と同等かそれ以上に伸展誘導性心房細動を抑制することを見いだした（図 4-4-6）。

スタチンが HMG-CoA を阻害してコレステロール合成を抑制することはよく知られているが、これがいかようにして心房細動を抑制するのかは現時点では謎である。予備的実験ではスタチンがある種の MS チャネルを抑制するという結果を得ているがそのメカニズムの解明は今後の課題である。一つの可能性として HMG-CoA の下流にある GGPP 産生の抑制を介した Rho 活性の抑制が考えられ、現在検討中である。

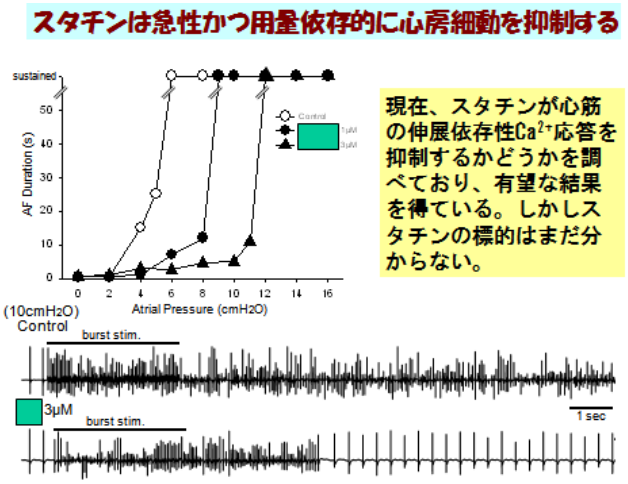


図 4-4-6. ある種のスタチンによる細動持続時間の抑制。比較的低用量で用量依存的に細動を抑制している。

(2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

MS チャネルブロッカーのスクリーニングに用いた SAKCA は我々がクローニングした心筋では唯一の MS チャネルである。実は、高等生物では、ある種の TRP チャネルと 2PK チャネルのみが MS チャネルとして知られているのみで、詳しい構造機能連関はよく分かっていない。その意味で、高等生物では SAKCA が、機械刺激感知の責任配列が同定され、詳しい開閉機構が解析された唯一の MS チャネルであり、さらなる研究によって高等生物 MS チャネルのモデル分子としての地位確立を追求したい。また、SAKCA を用いて GsMTx-4 の MS チャネル特異性を証明したことにより、この分子の利用可能性を拡大できた。更に我々が合成した GsMTx-4 ペプチドミメティクスは GsMTx-4 以外では唯一の MS チャネル阻害剤であり、今後の MS チャネル研究の重要なツールとなることが期待できる。ある種のスタチンの長期投与が心房細動の発症を抑える可能性は指摘されていたが、これを実験的に示したのは我々の研究がはじめてである（論文準備中）。その重要性に鑑みて、是非とも治験移行の可能性を探っていきたい。

５．類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

メカノトランスダクションの研究は、その研究の難しさから長らくマイナーな領域であったが、TRP ファミリーメンバーのいくつかが MS チャネルであるという発見をきっかけに、ここ 5 年ほどの間に多くの研究者が参入してホットな研究領域へと成長しつつある。同時にそれだけ競争も厳しくなってきた。しかし本プロジェクトのように、MS チャネルの活性化機構、非 MS チャネル型の新規メカノセンサーの探索、そしてメカノトランスダクションの生理機能まで視野に入れた総合的研究グループはほかに例を見ない。以下主要課題についてまとめる。

課題 1 MS チャネルの活性化機構の解明:この課題については、我々は後発であり、最も競争が厳しい。しかし、最大の課題である活性化機構について、その出発点ともなるべき MS チャネル（MscL,MscS）の張力感知部位を我々が最初に決定し、それを元に最も先進的で合理的な（脂質膜を伸展して MS チャネルに張力を負荷する）分子動力学シミュレーションによって点変異体の挙動をシミュレートできるなど実験と計算モデルの有機的なリンクによって現時点では最先端に位置している。

課題2 細胞骨格・接着斑と力覚:細胞骨格がメカノセンサーになり得るという発想は我々が初めてではないが、その実験的証拠を得ているのは我々のみで、紛れもなく世界最先端である。接着斑については、Sheetz のグループは接着斑タンパク質 Cas がメカノセンサーになりうるという状況証拠を in-vitro の実験で示している。しかし、その接着斑での役割は不明のままである。我々は、zyxin が接着斑でのアクチン重合を促進することそして zyxin の接着斑への集積自身が力学的負荷によって制御されていることを明らかにした。癌化した細胞の異常な遊走能は接着部位の力学的負荷への応答性の異常が一因と考えられている。本研究の成果は正常細胞と癌細胞とでの接着部位の力学的負荷応答性の違いの分子的基盤の解明につながる。zyxin は癌細胞において正常細胞よりも発現が 10 倍程度も増加すること、形質転換時における細胞遊走能の増大には zyxin が関わっている（Mori et al., 2009）ことなどが報告されている。本研究で成功した、zyxin 結合タンパク質の網羅的解析によって癌細胞における zyxin を介した接着制御の異常化のメカニズムを明らかにできる。

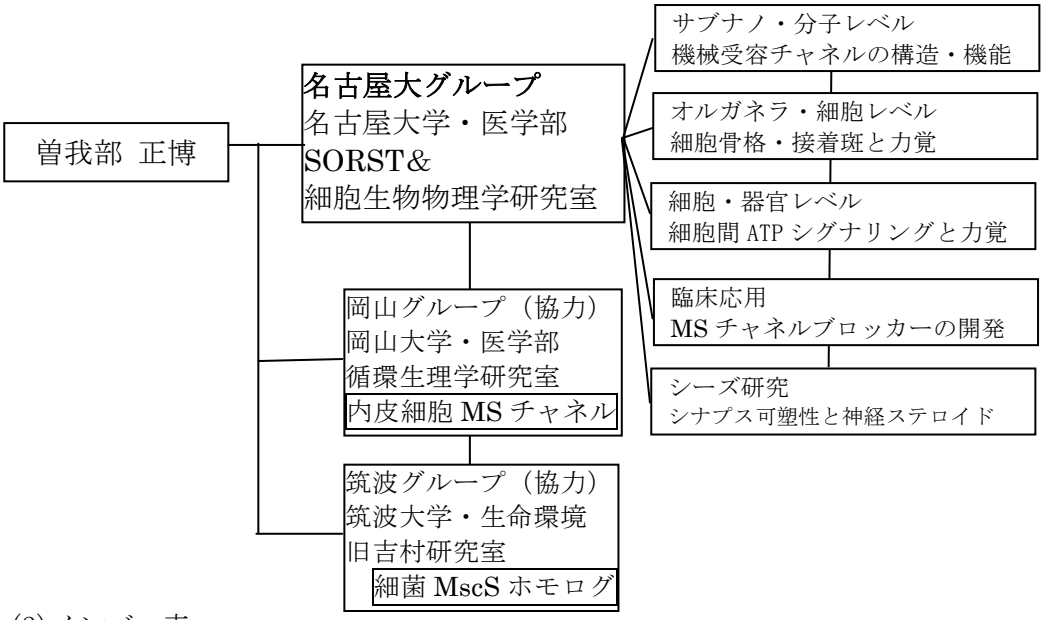
課題 3 細胞間ATPシグナリングと力覚:我々の開発したリアルタイム ATP イメージング法は現在その感度、時間空間分解能ともに世界に並ぶものはなく海外を含めいくつもの共同研究提案が来ている。ATP シグナリング系に関して、その受容体はかなり明らかになっているが放出経路については Cl-チャネル、Gap 結合のヘミチャネル、TRP チャネル、開口放出、トランスポーター等々が報告されてはいるがまだ混沌とした状況である。我々は同じ乳腺細胞にも３種類以上の経路が存在することを示した。おそらく多様なメカニズムが細胞種や刺激、状況に応じて使い分けられていると考えるのが自然であろう。ATP 放出の生理的役割に関しては、組織サンプル等さらに生体に近い条件で検証できるようになり、メカノシグナリングと ATP シグナリングがカップリングすることによっていろいろな生理機能を果たしていることが明らかになってきた。これは我々が明らかにしたユニークな機序であり ATP の働きの一つの典型例を示せたと考えている。

課題４ MS チャネルブロッカーの開発・探索と応用：MS チャネルブロッカーのスクリーニングに用いた SAKCA は我々がクローニングした心筋では唯一の MS チャネルである。高等生物では、ある種の TRP チャネルと K チャネルが機械刺激感受性を有するが、機械刺激感知の責任配列などはまったく分かっていない。その意味で、SAKCA は高等生物の MS チャネルとして唯一それが同定された MS チャネルであり、開閉機構の詳細な解析と合わせて、それ自身が高い学問的価値を有している。また唯一の MS チャネル抑制剤と目されている GsMTx-4 について、SAKCA を用いて MS チャネル特異性を証明したことはこの物質の価値を高めた。更に GsMTx-4 ペプチドミメティクスは GsMTx-4 以外では唯一の MS チャネル阻害剤であり、今後の MS チャネル研究への応用が期待される。ある種のスタチンが心房細動発症を抑制することを実験的に示したことは、潜在的に非常に高い臨床医学的価値を有しているので、今後多方面の協力を仰いで是非とも治験の可能性を探る必要がある。

６．研究実施体制

(1)体制

研究体制は名古屋大学の曽我部グループ１つからなるが、その中でいくつかのサブグループがチームを構成している。サブグループ間および岡山大学、筑波大学のグループとは密接な協力関係で研究を進めた。



(2)メンバー表

氏　名	所　属	役　職	研究項目	参加時期
古家　喜四夫	派遣先	JST 研究員	ATP 放出機構	平成 17 年 1 月～ 平成 22 年 3 月
早川　公英	〃	〃	細胞骨格/接着斑のメカノトランスダクション	〃
野村　健	〃	〃	MscL、MscS のパッチクランプ解析	〃
平田　宏聡	〃	〃	細胞骨格/接着斑のメカノトランスダクション	平成 18 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
原田　京子	〃	JST 研究補助員	ATP 放出機構	平成 19 年 1 月～ 平成 22 年 3 月
田中　基樹	〃	JST 研究員	神経系の機能と細胞力覚の関連	平成 20 年 10 月～ 平成 22 年 3 月
武田　美江	〃	JST 研究補助員	培養細胞維持	平成 21 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
秋田　久美	〃	JST 技術補助員	ATP 放出機構	平成 17 年 1 月～ 平成 17 年 7 月
唐　キョウヨウ	〃	JST 技術員	MSチャネルブロッカーの作用機序	平成 17 年 1 月～ 平成 17 年 9 月
立松　津弥子	〃	JST 技術補助員	内皮細胞の TRPV2 と伸展依存性 Ca^{2+}上昇	平成 17 年 1 月～ 平成 17 年 10 月
Fernando Lopez Redondo	〃	JST 研究員	MSチャネルブロッカーの作用機序	平成 17 年 1 月～ 平成 19 年 3 月
坂口　菜朋子	〃	JST 技術員	重力感知機構	平成 17 年 1 月～ 平成 20 年 6 月
村瀬　雅樹	〃	JST 研究補助員	MscL 分子動力学	平成 17 年 1 月～ 平成 21 年 1 月

藤 生　健 太	〃	JST 研究員	クラミドモナス MscS ホモログ gene のクローニング	平成 17 年 4 月～ 平成 21 年 7 月
木 澤　幸 男	〃	事務参事		平成 17 年 1 月～ 平成 17 年 3 月
坂 神　真 理	〃	事務員		〃
杉 山　　通	〃	事務参事		平成 17 年 4 月～ 平成 22 年 3 月
辰巳　仁志	名古屋大学大学院・医学系研究科	助教授	細胞骨格/接着斑のメカノトランスダクション	随時
高橋　賢	〃	助手	MS チャネルブロッカーの作用機序	〃
澤田　康之	〃	D1	MscL 分子動力学	〃
町山　裕亮	〃	D3	MscS 活性化機構	〃
豊田　正嗣	〃	D3	重力感知機構	〃
徐　玉霞	〃	D3	シナプス可塑性と細胞力覚	〃
清島　大資	〃	D2	細胞骨格/接着斑のメカノトランスダクション	〃
成瀬　恵治	岡山大学	教授	内皮細胞の TRPV2 と伸展依存性 Ca^{2+} 上昇	〃
吉村　建二郎	筑波大学	助教授	クラミドモナス MscS ホモログ gene のクローニング	〃
陳　玲	南京医科大	教授	シナプス可塑性と細胞力覚	〃

7．研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名　　称	場　所	参加人数	概　　要
平成 17 年 1 月 24 日	セミナー 演題: Mechano-chemical feedback In keratocytes movement	名古屋大学医学部特殊診療棟 4 階 PJ 研究室		講演者: Julet　Lee Dpt Molecular and Cell Biology, University Connecticut, Storrs.
平成 17 年 11 月 22 日	セミナー 演題: Biophysics, Physiology and Pharmacology of Mechanotransduction in Bacteria	同　上		講演者: Boris　Martinac クイーンズランド大学生物物理学教室・主任教授
平成 18 年 1 月 16 日	セミナー 演題:ウニ卵表面における力の定量的解析法の開発	同　上		講演者: 三好　洋美 東京工業大学 生命理工学研究科 博士課程 3 年
平成 18 年 4 月 3 日	セミナー 演題: 機械的刺激と心筋細胞カルシウム動態の統合生理	同　上		講演者: 入部　玄太郎 Cardiac Mechano-Electric Feedback Group, Department of Physiology, University of Oxford

平成 18 年 6 月 29 日	セミナー 演題: The Functional Cycle of the Bacterial Mechanosensitive Channel MscS	同　上		講演者: Sukharev Sergri Department of Biology, University of Maryland, USA
平成 18 年 8 月 9 日	セミナー 演題: Rigid-Rod Nano-architecture in Lipid Bilayers: From Porous Sensors to Smart Photosystems	同　上		講演者: Stefan Matile Dept Organic Chemistry, Univ. Geneva, Switzerland
平成 17 年 4 月 3 日	シンポジウムオーガナイザー Structure-Function of Mechano-Gated Ion Channels. at 35th Int Cong Physiol Sci (IUPS 2005)	米国 サンディエゴ	約 80 名	第 35 回国際生理科学会議において採択された、MS チャネルの構造機能連関に関するシンポジウム
平成 17 年 11 月 23 日	シンポジウムオーガナイザー Japan-Australia Joint Symposium on Biophysics at　第 43 回日本生物物理学会大会	札幌国際センター(札幌)	約 100 名	第 43 回日本生物物理学会大会において採択された、MS チャネルと筋肉の生物物理学に関するシンポジウム
平成 17 年 12 月 20 日	シンポジウムオーガナイザー 生体膜を介した情報伝達：受容体複合体の構造と機能 at 日本生体エネルギー研究会・第 31 回討論会「情報とエネルギー」	名古屋大学 (名古屋)	約 80 名	メカノトランスダクションを含む情報変換膜タンパク質のシンポジウム
平成 18 年 11 月 14 日	シンポジウムオーガナイザー Nano-scale Mechanobiology of Cells at. 5th EABS & 44th BSJ 2006	沖縄国際会議場（那覇）	約 80 名	MS チャネル、細胞骨格を中心としたシンポジウム
平成 18 年 3 月 15-16 日	フォーラムオーガナイザー The 9th International Membrane Research Forum.	ホテルフジタ　(京都)	約 100 名	膜タンパク質、細胞骨格を中心テーマにした、国外国内招待者＋一般参加社による講演会と交流会。ICORP 楠見プロジェクトとの共催
平成 19 年 2 月 27 ～3 月 1 日	フォーラムオーガナイザー The 10th International Membrane Research Forum	ホテルフジタ (京都)	約 100 名	膜タンパク質、細胞骨格を中心テーマにした、国外国内招待者＋一般参加社による講演会と交流会。ICORP 楠見プロジェクトとの共催
平成 21 年 7 月 27 日 ～8 月 1 日	シンポジウムオーガナイザー Single molecules Physiology of ion channel and motor proteins. 36th Int Cong Physiol Sci (IUPS 2009)	京都国際会議場	約 120 名	第 36 回国際生理科学会議において採択された、チャネルとモーター蛋白質の 1 分子生理学に関するシンポジウム
平成 22 年 1 月 27 日 ～29 日	シンポジウム The 13th International Membrane Research Forum / "Progress Report Symposium"	ホテルフジタ（京都）	約 100 名	国際シンポジウムの 1 セッションとして終了シンポジウムを実施

＊ 名古屋大学グループは、毎週月曜日、午前 10:00-12:00 にメンバーによる Progress-Report/Journal Club を行っている。

(2)招聘した研究者等

氏　名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Boris Martinac Victor Chang Cardiac Research Institute (VCCRI), Professor	Progress Report Symposium に参加、講演・討論	京都市	平成 22 年 1 月 26 日 ～31 日

８．発展研究による主な研究成果

(1)論文発表（英文論文 55+11 件　　邦文論文 0+18 件）

原著論文

1. Ito S, Kume H, Numaguchi Y, Ishii M, Iwaki M, Kondo M, Naruse K, Hasegawa Y, Sokabe M. Actin cytoskeleton regulates stretch-activated Ca^{2+} influx in human lung microvascular endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* (in press)
2. Li L, Xu B, Zhu Y, Chen L, Sokabe M, Chen L. DHEA prevents Aβ25-35-impaired survival of newborn neurons in the dentate gyrus through protection by PI3K-Akt-mTOR signaling. *Neuropharmacol*, (in press)
3. Zhang Z, Yang R, Cai W, Bai Y, Sokabe M, Chen L. Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia attenuates progenitor cell proliferation but improves newborn neuron survival in adult male mice. *Neuropharmacol*, 58(6): 930-939 (2010)
4. Chen L, Wang H, Zhang Z, Li Z, He D, Sokabe M, Chen L. Anti-amnesic and neuroprotective effects of the alpha7 nicotinic agonist DMXB against beta-amyloid peptide 25-35-induced cognitive deficit. *J Neurosci Res*, 88(8): 1784-1794 (2010)
5. Chen L, Cai W, Chen L, Zhou R, Furuya K, Sokabe M. Modulatory metaplasticity induced by pregnenolone sulfate in the rat hippocampus: a leftward shift in LTP/LTD-frequency curve. *Hippocampus*, 20(4): 499-512 (2010)
6. Zhang Z, Yang R, Zhou R, Li L, Sokabe M, Chen L. Progesterone promotes survival of newly formed neurons in the dentate gyrus of adult male mice. *Hippocampus*, 20(3): 402-412 (2010)
7. Sasai N, Agata N, Inoue-Miyazu M, Kawakami K, Kobayashi K, Sokabe M, Hayakawa K. Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy in primary cultured skeletal myotubes, *Nerve Muscle*, 41(1):100-106. (2010)
8. Oshio R, Tanaka S, Sadato N, Sokabe M, Hanakawa T, Honda M. Differential effect of double-pulse TMS applied to dorsal premotor cortex and precuneus during internal operation of visuospatial information. *Neuroimage*　49(1):1108-15 (2010)
9. Machiyama H, Tatsumi H, Sokabe M. Structural changes in the cytoplasmic domain of the mechanosensitive channel MscS during opening. *Biophys J*, 97:1048-1057 (2009)
10. Naruse K, Tang QY, Sokabe M. Stress-Axis Regulated Exon (STREX) in the C terminus of BKCa channels is responsible for the stretch sensitivity. *Biochem Biophys Res Com*. 385(4):634-639 (2009)
11. Fujiu K, Nakayama Y, Yanagisawa A, Sokabe M, Yoshimura K. Chlamydomonas PPR2 encodes a voltage-dependent calcium channel required for the flagellar waveform conversion. *Curr Biol*, 19(2):133-139 (2009)
12. Agata N, Sasai N, Inoue-Miyazu M, Kawakami K, Hayakawa K, Kobayashi K, Sokabe M. Repetitive stretch suppresses denervation-induced atrophy of soleus muscle in rats. *Muscle Nerve* 39(4):456-462 (2009)
13. Iwaki M, Ito S, Morioka M, Iwata S, Numaguchi Y, Ishii M, Kondo M, Kume H, Naruse K, Sokabe M, Hasegawa Y. Mechanical stretch enhances IL-8 production in pulmonary microvascular endothelial cells. *Biochim Biphys Res Comm*,389(3):531-6　(2009)

14. Iwata S, Ito S, Iwaki M, Kondo M, Sashio T, Takeda N, Sokabe M, Hasegawa Y, Kume H. Regulation of endothelin-1-induced interleukin-6 production by Ca^{2+} influx in human airway smooth muscle cells.*Eur J Pharmacol.* 605(1-3):15-22 (2009)
15. Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. Roles of Disrupted-In-Schizophrenia 1-Interacting Protein Girdin in Postnatal Development of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 63(6): 774-787 (2009)
16. Zhou R, Zhang Z, Zhu Y, Cheng L, Sokabe M, Chen L. Deficits in development of synaptic plasticity in rat dorsal striatum following prenatal and neonatal exposure to low-dose bisphenol A. *Neurosci.* (159(1):161-71 (2009)
17. Li Z, Cu S, Cai W, Xei G, Sokabe M, Chen L, DHEA-neuroprotection and neurotoxicity after transient cerebral ischemia in rats. *J Cerebral Blood Flow Metabol*, 29, 287–296 (2009*)*
18. Cai W, Zhu Y, Furuya K, Li Z, Sokabe M, Chen L. Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. *Neuropharmacol*, 55(2):127-38 (2008)
19. Mohri T, Sokabe M, Kataoka T. Nitric oxide (NO) increase at fertilization in sea urchin eggs upregulates fertilization envelope hardening. *Dev Biol*, 322:251-262(2008)
20. Zhao H, Sokabe M,Tuning Mechanosensitivity of BK Channels by Changing the Linker length. *Cell Res*, 18(8):871-8 (2008)
21. Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. Mechanical Forces Facilitate Actin Polymerization at Focal Adhesions in a Zyxin-Dependent Manner. *J Cell Sci*, 121(17): 2795-2804 (2008)
22. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Stress fiber acts as a force-transmitting and -focusing structure to activate MS channels in endothelial cells. *J Cell Sci*, 121(Pt 4):496-503 (2008)
23. Mizoguchi F, Mizuno A, Hayata T, Nakashima K, Heller S, Ushida T, Sokabe M, Miyasaka N, Suzuki M, Ezura Y, Noda M. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Deficiency Suppresses Unloading-Induced Bone Loss. *J Cell Physiol*, 216(1):47-53 (2008)
24. Ito S, Kume H, Naruse K, Kondo M, Takeda N, Iwata S, Hasegawa Y, Sokabe M. A novel Ca^{2+} influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38: 407–413 (2008）
25. Yoshimura K, Usukura J, Sokabe M. Gating-associated conformational changes in the mechanosensitive channel, MscL. *PNAS,105(10):4033-4038 (2008)*
26. Nomura T, Sokabe M, Yoshimura K. Interaction between the cytoplasmic and transmembrane domains of the mechanosensitive channel, MscS. *Biophys J* 94(5):1638-45 (2008)
27. Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M. Cytoplasmic calcium increases in response to changes in the gravity vector in hypocotyls and petioles of Arabidopsis seedling. *Plant Physiol*. 146(2):505-514 (2008)
28. Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M. Mechano-sensitive Channels regulate the stomatal aperture in Vicia faba. *Biochem Biophys Res Com (BBRC)*, 366(3):758-362 (2008)
29. Hirano Y, Ishiguro N, Sokabe M, Takigawa M, Naruse K. Effects of tensile and compressive strains on response of a chondrocytic cell line embedded in type I collagen gel. *J Biotechnol.* 133(2):245-52 (2008)
30. Chen L, Miyamoto Y, Furuya K, Mori N, Sokabe M. PREGS Induces LTP in the Hippocampal Dentate Gyrus of Adult Rats via the Tyrosine Phosphorylation of NR2B Coupled to ERK/CREB Signaling. *J Neuropysiol*, 98: 1538-1548 (2007)
31. Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M. Hypergravity stimulation induces intracellular calcium transients in Arabidopsis seedlings. *Adv Space Res*, 39(7) : 1190-1197 (2007)
32. Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. Dynamics of Actin Filaments during Tension-Dependent Formation of Actin Bundles *Biochim Biophys Acta*, 1770:1115-1127 (2007)
33. Nakayama Y, Fujiu K, Sokabe M, Yoshimura K. Mechanosensitive channel with a latch mechanism is present in the cytoplasm and chloroplast of Chlamydomonas. *PNAS*, 104 (14) 5883-5888 (2007)

34. Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsum H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Kojima I, Iida K, Terashima A, Ikeda M, Yamanaka T, & Iida H. Stretch-activated calcium channel component required for touch sensing in *Arabidopsis* roots. *PNAS*, 104(9): 3639-3644 (2007)
35. Shi F, Chiu YJ, Cho Y, Sokabe M, Fujiwara K. Down-regulation of ERK- But Not MEK-Phosphorylation in Cultured Endothelial Cells by Repeated Changes in Cyclic Stretch. *Cardiovas Res,* 73(4):813-22 (2007)
36. Dai S, Chen L, Sokabe M. Neurosteroid Estradiol Rescues Ischemia-Induced Deficit in the Long-Term Potentiation in rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacol,* 52:1124-1138 (2007)
37. Miyashita T, Tatsumi H, Hayakawa K, Mori N, Sokabe M. Quantitative estimation of Na^+ K^+ ATPase activity in the Endolymphati Sac Epithelial Cells of Guinea-Pig. *Pflugers Arch-Eur J Physiol,* 453(6):905-13 (2007)
38. Yokoyama S, Yokoyama Y, Kawai T, Kobayashi S, Nagimo M,Oda K, Nimura Y, Sokabe M. Bipahsic activation of liver regeneration associated signals at an eraly stage after potal vein branch ligation. *Biochem Biophys Res Comm.* 349 (2): 732-739 (2006)
39. Nomura T, Yoshimura K, Sokabe M. Lipid-protein interaction of the MscS mechanosensitive channel examined by scanning mutagenesis. *Biophys J*, 91(8):2874-81 (2006)
40. Li Z, Zou1 R, Cui1 S, Xei1 G, Cai1 W, Sokabe M, Chen L. DHEAS prevents LTP impairment following forebrain ischemia in rat hippocampal CA1 by regulating tyrosine phosphorylation of NMDA receptor. *Neuropharmacol*, 51: 958-966 (2006)
41. Chen L, Miyamoto Y, Dai XN, Mori N, Sokabe M. Chronic DHEAS administration facilitates hippocampal long-term potentiation through the Src Family Kinase-Dependent Activation of ERK. *Neuropharmacol* 51(3):659-670 (2006)
42. Kobayashi S, Nagino, M, Yokoyama Y, Nimura T, Sokabe M. Evaluation of hepatic interleukin-6 secretion following portal branch ligation using a minimal surgical stress model. *J Surg Res*, 135(1):27-33 (2006)
43. Kuge T, Van Meerveld GB, Sokabe M. Stress-induced breakdown of intestinal barrier function in the rat: reversal by wood creosote. *Life Sci*. 79(9):913-918 (2006)
44. Takeda H, Komori K, Nishikimi N, Nimura Y, Sokabe M, Naruse K. Bi-pasic activation of eNOS in response to uni-axial cyclic stretch is mediated by differential mechanisms in BAECs. *Life Sci*, 79(3):233-239 (2006)
45. Chen L, Dai XN, Sokabe M. Chronic Application of DHEAS Enhances Long-Term Potentiation in Rat Hippocampal CA1 *via* sigma 1 receptor. *Neuropharmacol,* 50(3):380-92.(2006)
46. Chen L, Yamada K, Nabeshima T, Sokabe M. □α7 nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction inβ-amyloid infused rats. *Neuropharmacol*. 50(2):254-68 (2006)
47. Qi Z, Chi S, Su X, Naruse K, Sokabe M. Mechanosensitive BK Channel Activated by Membrane Stress Created by Amphipaths. *Mol Membr Biol*, 22(6): 519-527 (2005)
48. Ozeki-Miyawaki C, Moriya Y, Tatsumi H, Iida H, Sokabe M. Identification of functional domains of Mid1, a stretch-activated channel component, necessary for localization to the plasma membrane and Ca^{2+} permeation. *Exp Cell Res*, 311(1):84-95 (2005)
49. Chen L, Sokabe M. Pregnenolone sulfate enhances presynaptic glutamate releases in rat hippocampal slices as studied by optical recordings. *J Neurophysiol.* 94(6):4131-4144 (2005)
50. Furuya K, Sokabe M, Furuya S (2005) Characteristics of Subepithelial Fibroblasts as a Mechano-Sensor in the Intestine: Cell-Shape Dependent ATP Release and P2Y1 Signaling. *J Cell Sci* 118(15): 3289-3304 (2005)
51. Amma H, Naruse K, Ishiguro N, Sokabe M. Involvement of reactive oxygen species in cyclic stretch induced NF-κB activation in human fibroblast cells. *Br J Pharmacol.* 145(3):364-73 (2005)
52. Sasamoto A, Nagino M, Kobayashi S, Naruse K, Nimura Y, Sokabe M. Mechanotransduction

by integrin is essential for Interleukin-6 secretion from human umbilical vein endothelial cells in response to uni-axial continuous stretch. *Am J Physiol :Cell Physiol*. 288(5):C1012-22. (2005)

53. Wang JG, Sokabe M, Naruse K. Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway. *Life Sci.* 76(24):2817-25 (2005)
54. Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima N, Pawson T, Sakai R, Mori N. Hippocampal Synaptic Modulation for Learning and Memory by the Phosphotyrosine Adapter Protein ShcC/N-Shc via Interaction with the NMDA Receptor. *J Neurosci.* 25(7):1826-35 (2005)
55. Furuya S, Furuya K, Sokabe M, Hiroe T & Ozaki T. Characteristics of cultured subepithelial fibroblasts in the rat small intestine. II. Localization and functional analysis of endothelin receptors and cell-shape-independent gap junction permeability. *Cell Tissue Res*, 319(1):103-119 (2005)

著書・総説

1. Tatsumi H, Hayakawa K, Sokabe M. Nanotechnology in mechanobiology: mechanical manipulation of cells and organelle while monitoring intracellular signaling." Mechanosensing Biology"(Ed.Noda M) Springer (in press)
2. Yoshimura K, Sokabe M. Mechanosensitivity of ion channels based on protein-lipid interaction. *J Roy Soc Interface*, 7: S307-S320 (2010)
3. Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M (mini-review). Zyxin emerges as a key player in the mechanotransduction at cell adhesive structures. *Communicative & Integrative Biol, 1*(2):1-4 (2008)
4. Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M (mini-review). Critical Consideration on the Relationship between Auxin Transport and Calcium Increase in Gravity Perception of Arabidopsis Seedlings. *Plant Signaling & Behavior*. 3-8:521-524 (2008)
5. Furuichi T, Kawano T, Tatsumi H, Sokabe M. Roles of Ion Channels in Environmental Responses of Plants. *In " Sensing with Ion Channels"* ed. Martinac B. Springer Verlag, pp47-67 (2007)
6. Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. Biophysical mechanisms of tesion-dependent formation of stress fibers from actin meshwork. *In "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels, Volume IV"* ed. Wada H. World Scientific Publishing, pp72-81 (2007)
7. Lim CT, Rajagopal G, Hunziker W, Lane B, Sokabe M. Role of external mechanical forces in cell signal transduction. *In "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels, Volume III"* ed. Wada H. World Scientific Publishing, pp80-104 (2007)
8. Furuya S, Furuya K. Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: Roles in intercellular communication. International Review of Cytology 264: 165-223 (2007)
9. Furuya K, Furuya S, Sokabe M. Mechanosensing in intesitinal villi:ATP signaling in subepithelial fibroblasts network. *In "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels, Volume II"* ed. Wada H. World Scientific Publishing , pp72-84 (2006)
10. Sokabe M. Analysis of micro- and nano-mechanisms in the activation of cell mechanosensors. *In "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels: Introduction of The Project"* (ed. Wada H), Sanko Printing, pp29-34 (2005)
11. Tanaka K, Naruse K, Sokabe M. Effects of mechanical stresses on the migrating behavior of endothelial cells. *In "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels, Volume I"* ed. Wada H. World Scientific Publishing , pp75-87 (2005)
12. 曽我部正博、細胞膜の透過性と物質輸送、In「標準細胞生物学　第2版」(近藤、柴田、藤本、溝口編)、医学書院、pp90−98 (2009)
13. 曽我部正博、動物の思考と意識、In「動物は何を考えているのか？:学習と記憶の比較生物学」曽我部編、共立出版、pp1−15 (2009)
14. 古家喜四夫、曽我部正博、メカニカルストレスと細胞応答:メカノセンサーとメッセンジャー、*Clinical Calcium*, 18(9):63−71 (2008)

15. 曽我部正博、細胞力学研究の最前線;MS チャネルとアクチン線維、*診療と新薬*、45(11):19-22 (2008)
16. 辰巳仁史、早川公英、曽我部正博、細胞科学における光測定の展開:近接場光、光ピンセットを用いた細胞の力応答の研究の紹介、*Otology Japan,* 18 (1): 60－65 (2008)
17. 曽我部正博、イオンチャネル、In「タンパク質の事典」、猪飼・伏見編、朝倉書店、東京、pp134-138 (2008)
18. 吉村健二郎、野村健、曽我部正博、細胞メカノセンサーの実体と機能、*日本物理学会誌*、62(1):9-15 (2007)
19. 曽我部正博、細胞はどのようにして“力”を感じるのか:細胞力覚の多様性、*Medical Bio,* 9:32-39(2007)
20. 曽我部正博、「器官のサイズは力学で決まる？(訳)」＋「細胞のメカノセンサーとメカノバイオロジーの黎明(解説)」 *Parity(パリティ)*, 09:37-41(2007)
21. 曽我部正博、陳玲、シナプス可塑性に対するアミロイドβと神経ステロイドの効果－標的分子と作用機序の解析－*PharmaVISION NEWS* No.10: 6-11 (2007)
22. 曽我部正博、機械刺激受容チャネル、In「 生物物理学ハンドブック」, 石渡他編, 朝倉書店, 東京, pp276-278 (2007)
23. 曽我部正博、イオンチャネル、In「ナノバイオ大辞典」(山根、松永、民谷 監修)、テクノシステム社、pp49-53 (2007)
24. 高橋賢、曽我部正博、カリウムチャネルの比較生物学、生体の科学「生物進化の分子マップ」、57(5): 472-473(2006)
25. 曽我部正博、単一細胞内シグナリングの時空間特性:シナプス可塑性のモデルとしての細胞力覚機構、In「ニューロインフォマティクス」臼井支朗 編、オーム社, pp13-21 (2006)
26. 曽我部正博、細胞重力センサーの探索-見えてきた重力センサーの実体-、*公募地上研究*ニュース(JAXA,JSF)、6:13-14(2006)
27. 曽我部正博、メカノバイオロジーを創る、UNITE(名古屋大学)60-61(2006)
28. 岸上明生、曽我部正博、機械刺激を感知するイオンチャネル:TRP チャネルを中心に、In「イオンチャネルの最前線 update(倉智 編)別冊・*医学のあゆみ*、162-167 (2005)
29. 曽我部正博、イオンチャネル、In「物理学辞典、第3版」、倍風館、pp67-68(2005)

(2)口頭発表

①学会

国内 113 件, 海外 61 件

②その他

国内 5 件, 海外 2 件

(3)特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

1. 細胞培養方法 日本出願番号 特願：2008-026385 平成 20 年 2 月 6 日
2. 細胞培養方法 国際出願番号 PCT/JP2009/051991 平成 21 年 2 月 5 日

	件数
国内出願	1
海外出願	1
計	2

(4)その他特記事項

1. 新聞記事: 謎かがく 「生物の重力センサーは？」 日本経済新聞 8 月 10 日朝刊 (永田好生編集委員)

９．結び

2000 年１月に発足した ICORP「細胞力覚プロジェクト」から数えてほぼ 10 年の歳月が流れた。発足当初たった一人で不動産屋を訪ねて研究場所や事務所を探し回った時が夢のように想いだされる。ICORP では、高等生物の新規 MS チャネル遺伝子の同定と MS チャネル特異的ブロッカーの開発を最大目標とした。幸いその目標は達成され、SORST「ナノ・マイクロ超分子複合体によるメカノトランスダクション機構の解明」へと展開することができた。ここで“ナノ”は接着斑におけるナノスケールの蛋白質集合体、“マイクロ”とは細胞を縦横断するマイクロスケールの細胞骨格を想定していた。この両者が組み合わさることではじめて細胞変形からメカノセンサー分子に向かうメカノトランスダクションという流れと、逆にメカノセンサー分子から細胞応答（形態形成や運動）という双方向の流れが出会い、細胞のメカノバイオロジーという新しい学問領域が生まれることを夢見ていたのである。

本 SORST では前者の流れを実現するメカニズムの解明を目標にした。この報告書に記述されているようにその目論みはほぼ達成され、細菌 MS チャネルにおける MS チャネル/脂質膜・複合体におけるメカノトランスダクションの詳細解明、内皮細胞における MS チャネル/接着斑/細胞骨格・複合体によるメカノトランスダクション機構の発見と解析、さらにはアクチン細胞骨格自身がメカノセンサーとして働くという驚くべき発見などの成果が得られた。メカノセンサーから細胞応答への流れは今後の課題であるが、本 SORST においてもその足がかりが得られた。すなわち、接着斑/細胞骨格・複合体における力依存的アクチン線維の構築、あるいは機械刺激依存的 ATP 放出による超細胞的動員機構に関する基礎的知見が蓄積された。今後は、細胞力覚から細胞分化、細胞運動、細胞増殖への流れ、あるいは発癌/転移機構、創傷治癒、再生医療との関係解明など、面白くて重要な課題が目白押しである。

我々のプロジェクトと並行して、米国を始め多くの国々で力覚研究が盛んになり、mechanosensing という言葉も盛んに使われるようになってきた。メカノバイオロジーという新融合領域が着実に市民権を獲得しつつあるのである。折しもシンガポールではメカノバイオロジーの国家プロジェクトが 2010 年に発足した。やや先を越された感はあるが、我が国でも 2009 年度から科研費の時限つき細目としてメカノバイオロジーが採択された。これらの流れに我々のプロジェクトは少なからず貢献したと自負している。とりわけ研究の質の高さではどこにも負けていないと自信をもって断言できる。本プロジェクトには ICORP 以来、述べ 30 名以上の人材が関わった。すべての成果はこの人たちの努力の賜であり共有財産である。プロジェクト終了後も、そこに関わった経験と自信を基に、各人のメカノバイオロジーを展開されるよう切に願っている。

末筆ながら、長きにわたって本プロジェクトを支援して頂いた科学技術振興機構（JST）と関係者の皆様に心より御礼申し上げたい。世界広しといえど、これほど柔軟で寛容なグラントシステムを私は知らない。そのおかげもあって、例えばシーズ研究として始めた「シナップス可塑性と神経ステロイド」の研究は、近未来のユニークな力覚研究のシーズを与えてくれただけではなく、予想を超えてそれ自体として極めて興味深い重要な成果を生み出しつつある。基礎研究は土木工事のような工程の決まった道を進むのではなく、思いもかけない偶然の展開に巡り会うところに醍醐味がある。そのような自由と体験を存分に味わせて頂いたという意味でも、本プロジェクトは、お世辞ではなく世界最良の研究支援体制に支えられてきたと感じている。心より感謝申し上げます。ありがとうございました。

平成 22 年 3 月 1 日
研究総括　曽我部正博

ICORP 細胞力覚スタート時（2000年）から研究室を見守ってくれていた
ドラセナ(観葉植物)が 10 年目にして初めて見事な花を咲かせた。

名古屋大学グループ： SORST プロジェクトと細胞生物物理学教室のメンバー
（鶴舞公園での恒例のお花見）