

原著論文

1. **Baba T.T.** Restoration of mineral depositions by dexamethasone in the matrix of nonmineralizing osteoblastic cells subcloned from MC3T3-E1 cells. *Calcified Tissue International* 67, 416-421 (2000)
2. **Nemoto T. K., Ono T., Kobayakawa T., Tanaka E., Baba T. T., Tanaka K., Takagi T., Gotoh T.** Domain-domain interactions of HtpG, an *Escherichia coli* homologue of eukaryotic HSP90 molecular chaperone. *European Journal of Biochemistry* 268 (20), 5258-5269 (2001)

Hsp90 ホモログである大腸菌 HtpG を発現してそのドメイン構造を解析した .HtpG は 3 つのドメイン構造を持ダイマー形成において N 末ドメインとミドルドメインが相互作用し , さらにミドルドメインと C 末ドメインが相互作用することを明らかにした .

3. **Tanaka E., Nemoto T. K., Ono T.** Liberation of the intramolecular interaction as the mechanism of heat-induced activation of HSP90 molecular chaperone. *European Journal of Biochemistry* 268 (20), 5270-5277 (2001)

Hsp90 のクライアント結合能はストレス条件で獲得されることが知られている .本研究ではこの活性化機構について検討した . Hsp90 の N 末ドメインの C 末側に位置するクライアント結合部位は通常はミドルドメインによって覆われているが , 熱ショック時にはミドルドメインから解離しクライアント結合部位が露出するというモデルを提案した .

4. **Nemoto T. K., Ono T., Tanaka K.** Substrate-binding characteristics of proteins in the HSP90-family. *Biochemical Journal* 354, 663-670 (2001)
5. **Ohba S., Baba T. T., Nemoto T. K., Inokuchi T.** Expression of Hsp47 in fibroblasts derived from fetal and neonatal rat tongues. *Japanese Journal of Oral Biology* 44 (6) 151-158 (2002)
6. **Matsumoto S., Tanaka E., Nemoto T. K., Ono T., Takagi T., Imai J., Kimura Y., Yahara I., Kobayakawa T., Ayuse T., Oi K., Mizuno A.** Interaction between the N-terminal and middle regions is essential for the in vivo function of HSP90 molecular chaperone. *Journal of Biological Chemistry* 277, 34959-34966 (2002)

Hsp90 の N 末ドメイン(1-400)とミドルドメイン(401 - 618)の重要性について検討した . アミノ酸置換 E517A/L592A を持つミドルドメインは低温条件では N 末ドメインと結合したが , 高温条件 (37) では結合能を失った . これに呼応して , この変異を導入した Hsp90 (yHsc82) のみを発現する酵母は , 低温条件では生育可能だったが , 高温では生育できなかった .

7. **Wang, Z.-L., Inokuchi, T., Ikeda, H., Baba T. T., Uehara M., Kamasaki, N., Sano K., Nemoto T. K., Taguchi T.** Collagen-binding molecular chaperone HSP47 expression during healing of fetal skin wounds. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 31, 179-184 (2002)
8. **Wang, Z.-L., Inokuchi T., Nemoto T. K., and Uehara M., Baba T. T.** Antisense oligonucleotide against collagen-specific molecular chaperone HSP47 suppresses scar formation in rat wound. *Plastic and Reconstructive Surgery* 111 (6), 1980-1987 (2003)
9. **Yamada S., Ono T., Mizuno A., Nemoto T. K.** Hydrophobic segment within the C-terminal domain is essential for both client-binding and dimer formation of HSP90 molecular chaperone. *European Journal of Biochemistry* 270 (1), 146-154 (2003)

Hsp90 は N 末側に加えて C 末側にもクライアント結合部位があり，さらに C 末側ドメインはダイマー形成能も有する．本研究ではこれらの異なる機能の関連について検討した．その結果，ヒト Hsp90 α では 2 つの機能ドメインは，ほぼ一致したアミノ酸配列に局在した．疎水性領域 662-678 において，疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸へ置換すると，2 つの機能はともに消失した．従って，C 末側のクライアント結合は Hsp90 のダイマー形成を検出している可能性がある．

10. **Ohba S., Wang Z.-L., Baba T.T., Nemoto T. K., Inokuchi T.** Antisense oligonucleotide against 47-kDa heat shock protein (hsp47) inhibits wound-induced enhancement of collagen production. *Archives of Oral Biology* 44 (6), 541-548 (2003)

ラット舌に作った傷から得た線維芽細胞のコラーゲン合成は亢進していたが，この亢進は Hsp47 アンチセンスオリゴによって抑制できる．旧 口腔外科学第二講座との共同研究．

11. **Ishiwatari-Hayasaka H., Maruya M., Sreedhar A. S., Nemoto T. K., Csermely P., Yahara I.** Interaction of neuropeptide Y and Hsp90 through a novel peptide binding region. *Biochemistry* 44 (42), 12972-12980 (2003)

矢原研（都立臨床研）との共同研究

12. **Nemoto T. K., Fukuma Y., Yamada S., Kobayakawa T., Ono T., Ohara-Nemoto Y.** The region, adjacent to the highly immunogenic site and shielded by the middle domain, is responsible for self-oligomerization/client binding of HSP90 molecular chaperone. *Biochemistry* 43 (23), 7628-7636 (2004)

ヒト Hsp90 α の高抗原性領域 (291-299)近くで、ミドルドメインによってシールドされる領域が Hsp90 の自己重合とクライアント結合に必須である。この領域でクリティカルな部位はアミノ酸 340-350 である。

13. **Kawano T., Kobayakawa T., Fukuma Y., Yukitake H., Kikuchi Y., Shoji M., Nakayama K., Mizuno A., Nemoto T. K.** A comprehensive study on their immunological reactivity of Hsp90 molecular chaperone. *Journal of Biochemistry* 136, 711-722 (2004)

ヒト (4 種類のアイソフォーム)、酵母、大腸菌、歯周病菌 *P. gingivalis* の Hsp90 の抗原性を比較した。原核生物の Hsp90 (HtpG) と哺乳類の Hsp90 は交差性を示さなかった。意外にも *P. gingivalis* htpG 遺伝子の破壊はその成長やストレス応答性に何の影響も与えなかった。

14. **Ono T., Nemoto T. K.** Two forms of apatite deposited during mineralization of the hen tendon. *Matrix Biology* 24, 239-244 (2005)

加齢ニワトリ足の腱に生じる異所性石灰化機構について検討した。主な石灰化物はコラーゲン線維に沿って形成され針状の結晶構造を示した。しかし、腱細胞が存在していたスペースには、それとは異なり、鱗片上の形態をもつ二種類のミネラルが検出された。その構造は人工的に作成したヒドロキシアパタイトに酷似していた。

15. **Kishimoto J., Fukuma Y., Mizuno A., Nemoto T. K.** Identification of the penta-peptide constituting a dominant epitope common to all eukaryotic Hsp90 molecular chaperone. *Cell Stress and Chaperones* 10 (4), 296-311 (2005)

33 種類の抗 Hsp90 モノクローナル抗体のうち、19 モノクローナル抗体のエピトープを大腸菌ディスプレイ法で決定した。その結果、Hsp90 の高抗原性領域の一つ (サイト Ic と命名されている) は事実上すべての真核生物で共通の抗原性を有することが判明した。つまりこの部位を認識するモノクローナル抗体のうち 2 つ (K41110 と K41116C) は検討した全ての真核生物由来 Hsp90 を認識した。

16. **Nemoto T. K., Fukuma Y., Itoh H., Takagi T., Ono T.** A disulfide bridge mediated at cysteine 574 is formed in the dimer of the 70-kDa heat shock protein. *Journal of Biochemistry* 139 (4), 677-687 (2006)

Hsp70 は通常モノマーで機能するが、一部はダイマーになる。本研究では Hsp70 のダイマーサブユニット構造について検索した。その結果、Hsp70 の C 末側のクライアント結合ドメインがダイマーになることを確認した。さらに C 末の 20 アミノ酸残基を欠失するとダイマー

になりやすくなること ,またその際に Cys574 を介したジスルフィド結合が形成されることを明らかにした .

17. **Tomita T., Ohara-Nemoto Y., Moriyama H., Ozawa A., Takeda Y., Kikuchi K.** : A novel in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model based on two-compartment open model used to simulate serum drug concentration-time profiles. *Microbiol. Immunol* 51(5), 567-575 (2007)

2 コンパートメントモデルで近似される血中薬剤濃度変化を再現する灌流モデルを開発した . このモデルを使うことにより , 抗菌薬や抗ガン薬の作用効果をよりの確に評価できる .

18. **Kimura S., Ohara-Nemoto Y.** : Early childhood caries and childhood periodontal diseases. In *Pediatric Infection Diseases Revisited*. pp 175-191. ed H. Schroten and S. Wirth, Birkhauser Verlag, Barsel Switzeland (2007)

小児での齲蝕と歯周病に関する総説

19. **Ohara-Nemoto Y. , Haraga H., Kimura S., Nemoto T.K.** : Occurrence of staphylococci in oral cavities of healthy adults and nasal-oral trafficking of the bacteria. *J. Med Microbiol.* 57, 95-99.(2008)

ブドウ球菌 , 特に *Staphylococcus aureus* は細菌性心内膜炎の起炎菌として高頻度で分解されるが , 多くの症例で感染経路は明らかでない . 本研究では , 口腔経由の感染経路を想定し , 口腔ブドウ球菌属菌の菌種とそれらの分解頻度を検討した . その結果 , 健康成人の口腔では 80% 以上の検体からブドウ球菌が分離され , 9 菌種が同定されたことから , 口腔経由の感染経路が示唆された .

20. **Nemoto T.K., Ohara-Nemoto Y., Ono T., Kobayakawa T., Shimoyama Y., Kimura S., Takagi T.** : Characterization of the glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus aureus* expressed in *Escherichia coli*. *FEBS J.* 275, 573-587 (2008)

黄色ブドウ球菌のグルタミン酸特異的プロテアーゼ , いわゆる V8 プロテアーゼは , プロテオーム解析に汎用されるプロテアーゼであるが , これまで本酵素を大腸菌で大量発現する効果的な方法がなかった . 本報告では , V8 プロテアーゼのプロペプチドにアミノ酸置換法を導入したり , 近縁種である表皮ブドウ球菌同酵素のプロペプチドとキメラ分子を作成することで V8 プロテアーゼの効果的な発現法を開発すると共に , アミノ酸置換法によって活性に重要なアミノ酸の役割を調べた .

21. **Ohara-Nemoto Y., Ono T., Shimoyama Y., Kimura S., Nemoto T.K.** : Homologous and heterologous expression and maturation processing of extracellular glutamyl endopeptidase of *Staphylococcus epidermidis*. Biol. Chem. 389, 1209-1217 (2008)

表皮ブドウ球菌の原因因子の1つとして菌体外に産生されるグルタミン酸特異的プロテアーゼ(GluSE)がある。本研究では、GluSEプロ配列の部分切断によって3種類のプロフォームが生じることを2D-PAGEとMALDI TOF-MSで同定した。また、リコンビナントプロテアーゼの解析から、そのうち2種類のプロ酵素は自己消化により生じること、プロ配列中の部分配列(11残基)により酵素活性の完全な抑制が可能であることを明らかにした。

22. **Ono T., Nemoto T.K., Shimoyama Y., Kimura S., Ohara-Nemoto Y.** : An *Escherichia coli* expression system for glutamyl endopeptidases optimized by complete suppression of autodegradation. Anal. Biochem. 381, 74-80 (2008)

Glu V8の高効率大腸菌発現法を確立した。さらに類縁種である*Staphylococcus warneri*の酵素(GluSWと命名)に関しても同様のアイデアで発現系を確率しこの方法がグルタミン酸特異的プロテアーゼに普遍的に応用できることを示した。以前のYokoiらの報告(2001)で、E63-R64の自己分解によって生じるR64ANLPNN---分子が、活性を有する成熟GluSWであると報告されていたが、本報告により、R64をN末とするGluSWは活性をもたないこと、N66-V67の切断によって初めて活性分子が生じることが明らかになった。

23. **Kobayakawa T., Yamada S., Mizuno A., Nemoto T.K.** : Substitution of only two residues of human Hsp90 α causes impeded dimerization of Hsp90 β . Cell Stress and Chaperones 13, 97-104 (2008)

哺乳類のHsp90には異なる遺伝子にコードされる2つのHsp90アイソフォームHsp90 α とHsp90 β が存在する。そのアミノ酸配列は85%相同であり、物理化学的性質も似ている。しかし、Hsp90 β のダイマー形成能はHsp90 α よりも劣ることが知られている。本報告では、バクテリア2-ハイブリッド法を用いて、主に2つのアミノ酸の置換によって、Hsp90 β のダイマー形成能が変化していることを明らかにした。

24. **Baba T.T., Nemoto T.K., Miyazaki T., Oida S.**: Simvastatin suppresses the differentiation of C2C12 myoblast cells via a Rac pathway. J Muscle Res Cell Motil 29, 127-134 (2008)

25. **Nemoto, T., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., Ohara-Nemoto, Y.**: Alteration of proteolytic activities of glutamic acid-specific endopeptidases from staphylococci is defined by 3 amino acid

substitutions. Biol. Chem., 390, 277-285 (2009)

3 種の Staphylococci 属のグルタミン酸特異的プロテアーゼの大きな活性差を起こすアミノ酸がたった 3 アミノ酸に違いによることを示した .

26. **Kobayakawa T., Yamada S., Mizuno A., Ohara-Nemoto Y., Baba T.T., Nemoto T.**: Single nucleotide polymorphism that accompanies a Missense mutation (Gln488His) impedes the dimerization of Hsp90. Protein J 28, 24-28 (2009)

27. **Kishi, M., Abe, A., Kishi, K., Ohara-Nemoto, Y., Kimura, S., Yonemitsu, M.**: The relationship of the salivary quantitative levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to the caries status and the colonization in plaque of mutans streptococci in their 2.5-year-old children. Comm Dent Oral Epidemiol 37, 241-249 (2009)

幼児口腔へのミュータンスレンサ球菌(MS)の定着と齲蝕発症に関与する因子として , 母親唾液中のMS数の定量解析を行った . その結果 , 母親の唾液中MS数は2.5歳時の子供のプラークへの菌の定着と齲蝕発症に対して強い相関があることが明らかになった .

28. **Ichinohe, N., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T.K., Kimura, S., Ichinohe, S.**: Influences of fosfomycin on Shiga toxin gene expression from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Med Microbiol 58, 971-973 (2009)

志賀毒素(Stx1, Stx2)産生性大腸菌(STEC)感染時の抗菌薬投与は , 溶血性尿毒症症候群(HUS)の発症率が上昇するとして推奨されていない . 抗菌薬処理による Stxs 遺伝子と mRNA レベルの変化を定量的に検討した結果 ,NFLX は Stxs DNA 及び mRNA の劇的な上昇をもたらした一方 , DNA ジャイレース阻害薬 FOM, PAPM は両レベルを速やかに低下させた . 従って , STEC 感染初期での FOS 投与は有効である可能性が示唆された .