

バイオアーキテクト研究 Bioarchitect Research

代表研究者 中野明彦

NAKANO, Akihiko

(中野生体膜研究室)

(Molecular Membrane Biology Laboratory)

1. 細胞を作るものチーム

(1) 細胞内小器官酸性化の細胞内小胞輸送における機能の解析

研究担当者：平田，中野（中野生体膜研究室）

液胞型 ATPase はゴルジ体，エンドソーム，リソソームなどの内腔を酸性化する。出芽酵母 V-ATPase 変異株の解析により，その活性が細胞膜などへのタンパク質輸送に重要であることを明らかにしてきたが，ゴルジ体で機能する膜タンパク質の局在維持にも必要であることを示唆する結果を得た。また，多細胞生物で V-ATPase の活性発現に必要なと思われる遺伝子を同定した。

(2) ゴルジ体からの小胞形成，積み荷選別の分子機構の解明

研究担当者：川崎^{*1}（中野生体膜研究室）

ゴルジ体からの小胞形成，選別輸送に必須な分子装置の *in vivo* の動態を高速高感度共焦点顕微鏡により解き明かすことを計画した。本年度は特に Ypt31p/Ypt32p, Sec7p, Sec4p, Rcy1p に着目し，イメージングを実現した。

(3) 出芽酵母を用いた小胞輸送のFRETイメージング

研究担当者：黒川（中野生体膜研究室）

本研究では，FRET イメージングによる小胞輸送に関与する低分子量 GTPase の時空間情報解析を目指している。本年度では FRET イメージングにより生きた出芽酵母で Ypt31p と Sec2p が芽の先端及び，分裂隔壁でのみ結合することを可視化した。また，Ypt31p/32p が Sec4p の芽への輸送には関与しないが，芽の先端への集積に働くことを明らかにした。

(4) 高等植物の維管束形成に関わる小胞輸送制御機構

研究担当者：井藤^{*2}，上田，中野（中野生体膜研究室）

維管束形成における極性の形成・維持機構を明らかにするため，Rab7 および Rab11 GTPase の変異体の解析を行った。また，Rab7 の活性を制御する因子の候補として AtVAM6 に着目し，その変異体の解析及び生化学的な解析に着手した。

(5) イメージングによる出芽酵母ゴルジ体ダイナミクスの解析

研究担当者：時田（松浦）^{*1}，中野（中野生体膜研究室）

個々のゴルジ槽が細胞質中に散在している *S. cerevisiae* ではこれまで明確な ERES 構造は存在しないと考えられてきた。本研究では COPII 小胞形成に関わる因子の可視化から，この問題を検証することを目的とした。その結果 *S. cerevisiae* にも他の生物とは構造が異なるものの ERES としての機能を担うと思われる構造があることが示唆された。さらに，この構造はゴルジ体の形態形成にも重要な役割を果たすと考えられた。

(6) 細胞膜脂質二重層内外層間での脂質の分布とコミュニケーションの解析

研究担当者：小林，村手^{*2}（小林脂質生物学研究室）

細胞膜脂質二重層の内層と外層での脂質の分布を電子顕微鏡により解析した。その結果培養繊維芽細胞ではスフィンゴミエリンは形質膜内層にも存在すること，またコレステロールの分布は赤血球と繊維芽細胞では異なり，繊維芽細胞では主として形質膜内層に存在することが明らかになった。

(7) マイクロドメイン形成に関わる因子の解析

研究担当者：石塚（小林脂質生物学研究室）

スフィンゴミエリンは，細胞膜上でマイクロドメインを形成して存在する。マイクロドメインの形成機構を明らかにすることを目的とし，スフィンゴミエリンドメインのプロープ・ライセニンを用いたスクリーニングを行った。マイクロドメイン形成が異常な細胞の候補として，複数のライセニン耐性細胞を得た。

(8) 脂質ドメインカオスによるアクチン骨格制御機構

研究担当者：村瀬^{*1}，小林（小林脂質生物学研究室）

細胞膜上のコレステロールに富んだ脂質ドメインが，多くのシグナル伝達の鍵を握るはたらきをしていると考えられている。しかし，生きた細胞膜上の脂質ドメインを可視化するための有効な手段がほとんどなく，その詳細は不明であった。本研究では，脂質ドメイン特異的なプロープθ毒素を用いて，高コレステロールの脂質ドメイン“カオス”の細胞膜上の分布を明らかにした。また，カオスがアクチンの再構築に関与していることを示した。

(9) 細胞内における脂質の局在化機構に関わるタンパク質の同定

研究担当者：阿部，小林（小林脂質生物学研究室）

細胞内において，一部の脂質は，特定のオルガネラや特定のマイクロドメインにしか局在しない。脂質の不均一な局在にはタンパク質が関与していることが予想されているが，実際にはほとんど同定されていない。脂質の局在を規定するタンパク質を同定するために，細胞内で不均一に局在する脂質と直接相互作用するタンパク質の探索を行った。

(10) ゴルジ体における膜脂質の非対称分布形成機構の解明

研究担当者：稲留^{*1} (小林脂質生物学研究室)

細胞内の脂質局在におけるゴルジ体の機能を解明することを目的として、ゴルジ体の脂質組成をサブコンパートメントに分けて解析する方法の確立を行った。

(11) ミトコンドリア - 小胞体間の PE 輸送の分子機構解析

研究担当者：岩本^{*1} (小林脂質生物学研究室)

細胞に必要な不可欠な脂質分子であるホスファチジルエタノールアミン (PE) は、ミトコンドリア内で合成された後、小胞体と相互作用する領域を経由して小胞体や細胞膜へと効率的に輸送される。本研究では、この PE の細胞内非小胞輸送の分子機構を解明することを目的としている。本年度は、関連する因子のスクリーニングに用いる PE 結合性抗生物質の物性の詳細を明らかにし、スクリーニングの条件検討を行った。

(12) ゴルジ体からの膜輸送におけるジアシルグリセロールの役割の解析

研究担当者：上田^{*3}, 小林 (小林脂質生物学研究室)

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を原理とした DAG を検出するためのプローブ分子(Daglas-lum)を開発した。このプローブを用いて、細胞表面に産生した DAG が細胞質を経由せずに、小胞体ゴルジ体のルーメン側に流入することを明らかにした。

(13) FRET を用いたヒストンアセチル化検出蛍光プローブの作製とそれを用いたヒストンアセチル化の動態解析

研究担当者：吉田, 伊藤^{*4} (吉田化学遺伝学研究室)

生細胞内におけるヒストンアセチル化の動態解析を目的として、FRET を用いたヒストンアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発を行った。BRDT のプロモドメインとヒストン H4 との分子間相互作用に着目し、両者を柔軟なリンカーで結合し両端に Venus, CFP を連結することによりヒストン H4 のアセチル化を検出するプローブを開発した。本プローブは内在性ヒストン H4 と同様の挙動を示し、プローブのアセチル化に対する応答は蛍光強度比の増加として検出可能であることがわかった。

(14) NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT によるミトコンドリアの機能制御

研究担当者：伊藤, 吉田 (吉田化学遺伝学研究室)

ミトコンドリアにおける主要な脱アセチル化酵素である SIRT3 の機能を明らかにする目的で、SIRT3 の基質となるアセチル化タンパク質の探索を行った。その結果、複数のアセチル化タンパク質の同定に成功し、その多くはエネルギー代謝に関わる酵素であったことから、SIRT3 はエネルギー代謝に関与することが示唆された。

(15) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による転写抑制機構の解明

研究担当者：古米^{*1}, 吉田 (吉田化学遺伝学研究室)

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA による炎症性遺伝子の発現誘導抑制機構の解明を目的とし、ChIP によってプロモーター解析を行った。その結果、TSA 存在下で RNA polymerase II のリクルートが大幅に阻害されており、このときプロモーター領域のヒストン H4 のアセチル化の亢進が抑制されていることが分かった。

(16) 分裂酵母の核-細胞質間タンパク質輸送

研究担当者：八代田 (吉田化学遺伝学研究室)

我々は、分裂酵母の核外輸送因子 spMsn5 の機能解析を行った。spmsn5 遺伝子破壊株は様々なストレス感受性を示し、spMsn5 過剰発現株は形態異常を示した。spMsn5 の基質タンパク質を同定するため、分裂酵母の YFP 融合型遺伝子コレクションのうち主に細胞質に局在する 561 クローンを選択し、spmsn5 破壊株に導入、発現させ、細胞内局在の可視化スクリーニングを行い、野生型株と異なる局在を示す 24 個のタンパク質を同定した。

(17) リバースプロテオミクスを用いたヒストンの翻訳後修飾に至るシグナル伝達経路の網羅的解析

研究担当者：前田^{*1}, 吉田, 松山, 白井^{*2}, 橋本^{*5}, 河村^{*2} (吉田化学遺伝学研究室)

本研究では分裂酵母の全遺伝子 (約 5,000 個の open reading frame) を個々に過剰発現させることが可能なコレクションを用いてリバースアレイを作製し、ヒストンの翻訳後修飾に影響を及ぼす因子を検討することで、翻訳後修飾に至るシグナル経路を明らかにする。本年度はリバースアレイを作製し、H3 Lys9 のアセチル化の検討を行い、H3 Lys9 のアセチル化レベルに影響を及ぼす上流因子を明らかにした。

(18) ミトコンドリアゲノムの遺伝的均一化に関する動態解析

研究担当者：凌楓, 吉田 (吉田化学遺伝学研究室)

多コピーで存在する mtDNA が全て同じ塩基配列をもつホモプラスミーの状態が基本であるが、変異によるヘテロプラスミー化からの成立機構は不明であった。DNA 損傷で誘導される Din7 はホモプラスミーの形成に必要なコンカテマーの合成を促進する。我々は、DIN7 が DNA 損傷チェックポイント因子の働きによって発現調節されることと、mtDNA の組換えがエキソヌクレアーゼ活性を有する Din7 の過剰量による呼吸欠損変異の生成を防ぐことを見出した。

(19) 分裂酵母における核-細胞質間輸送を介した微小管構造変化の調節

研究担当者：荒井^{*2}, 吉田 (吉田化学遺伝学研究室)

分裂酵母の微小管制御機構における核-細胞質間輸送の関与について検討した結果、核外輸送担体 Crm1 の阻害剤であるレプトマイシン B の作用により、間期であるにも関わらず細胞質微小管の脱重合および核内へのチューブリンの蓄積が生じ、さらに間期 SPB (spindle pole body, 動物細胞の中心体に相当) 依存的に核内微小管が異常形成されてしまうことが分かった。

(20) タンパク質修飾の補因子であるアセチル CoA などの代謝小分子の細胞内の挙動の解析

研究担当者：高橋^{*1}, 白井^{*2}, 松山, 吉田 (吉田化学遺伝学研究室)

分裂酵母でアセチル化されるミトコンドリア局在タンパク質の同定を行った。その結果、Superoxide dismutase(SOD)などがアセチル

化されていることを確認した。次に、SOD のアセチル化部位を質量分析およびウエスタンブロットによって決定した。そして、SOD のアセチル化されるリジン残基の置換酵母株を作成したが、酸化ストレス応答などに変化は見られなかった。

(21) 分裂酵母全タンパク質の翻訳後修飾分子の網羅的解析

研究担当者：松山、白井*2、橋本*5、河村*2、吉田（吉田化学遺伝学研究室）

タンパク質に起こる翻訳後修飾を網羅的に理解するために、約 5,000 株に及ぶ分裂酵母の全遺伝子過剰発現株から個々の His タグ融合タンパク質を精製し、複数の翻訳後修飾を同時に検出できる実験系の確立をおこなった。これまでに確立していたタンパク質のハイスループットな精製法におけるタンパク質の精製度や収量、プロテインアレイを用いたシグナルの検出法などをさらに改良し、これまでをはるかに凌ぐ感度で翻訳後修飾の検出が可能になった。

(22) 分裂酵母温度感受性変異株ライブラリーによるタンパク質アセチル化の包括的機能解析

研究担当者：松村*1、吉田（吉田化学遺伝学研究室）

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤である Trichostatin A (TSA) で温度感受性が抑制される 45 株の分裂酵母変異株を用いて、アセチル化の新たな役割を同定することを目的に研究を行った。TSA による温度感受性抑制の機構を明らかにするために、変異タンパク質の安定性や局在に TSA が与える影響の検証や、変異タンパク質の機能に関わる HDAC の同定を試みた。

(23) mRNA の細胞内動態と活性調節

研究担当者：松本（辻本細胞生化学研究室）

アフリカツメガエル卵母細胞の mRNA 構成因子の同定をすすめて、卵母細胞の細胞質に存在する P100 が RNA に結合する mRNA 構成因子であることをみいだした。P100 は卵母細胞のグローバルな蛋白質合成は抑制しないものの、mRNA 選択的に翻訳を抑制すると考えられる。

(24) 生体膜脂質の非対称分布を制御するフリップ・フロップの分子機構および生理的意義の解析

研究担当者：山路 長谷川、辻本（辻本細胞生化学研究室）

形質膜におけるリン脂質の非対称分布を制御するフリップ フロップの分子機構を解明する目的で、ホスファチジルセリン耐性株の解析を行った。耐性株における欠損因子を同定するために、親株と耐性株とで発現量の異なる mRNA をサブトラクション法によりスクリーニングし、その全長 cDNA を作製して耐性株に導入し、蛍光標識脂質の動態解析などを行った。

(25) 超高分解能 1 分子可視化技術の開発と細胞膜受容体の階層的会合体形成の研究

研究担当者：佐甲、廣島*2（佐甲細胞情報研究室）

上皮成長因子受容体の会合体構造と機能を詳細に計測するため、超高分解能顕微鏡技術を開発し、細胞内 1 分子計測技術によって受容体の生理機能を計測した。逆畳込みによる画像処理法により、空間分解能が従来の 1.4 倍に上昇した。また、受容体分子の構造ダイナミクスにより、分子認識反応の複雑性が生じている可能性を示唆する結果を得た。

(26) 情報伝達蛋白質 Raf1 の分子内構造変化の 1 分子可視化解析

研究担当者：日比野*2（佐甲細胞情報研究室）

細胞の増殖や分化や形態制御において重要な役割を果たす情報伝達タンパク質 Raf の構造変化を、生きた細胞内において反応している最中に、1 分子毎に可視化解析する事に成功した。この実験系の他の情報伝達タンパク質への応用が期待される。

(27) 人工脂質平面膜を用いた輸送小胞形成のダイナミクス解析

研究担当者：佐藤（東京大学大学院総合文化研究科）

COPII 小胞形成の分子メカニズム解明のため、顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜を用いて、COPII 小胞形成過程における輸送基質タンパク質の挙動を観察・計測した。COPII 因子の添加にともなう膜上での蛍光標識した輸送基質タンパク質の集合の過程を詳細に解析した結果、輸送基質タンパク質の COPII 小胞への取り込みは、Sar1p の GTP 加水分解サイクルによって行われているということが明らかとなった。

(28) ゲノム損傷修復因子の *in vivo* ダイナミクスとその制御機構

研究担当者：菅澤、西（神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター）

in vivo におけるヌクレオチド除去修復の制御機構の理解を目指し、紫外線照射に伴う GFP 融合修復タンパク質の細胞内易動度変化を FRAP 法によって詳細に解析した。XPC の動態が UV-DDB に依存することに加え、複数の修復因子の動態の比較から新たな修復制御機構の存在が示唆された。

(29) 微小管ダイナミクスを制御する低分子化合物の機構解析

研究担当者：白井（筑波大学・大学院生命環境科学研究科）

AG1 は微小管ダイナミクスを阻害する低分子化合物であるが、その標的蛋白質や作用機構は不明である。そこで本年度は AG1 結合蛋白質・結合部位の同定、及び抗腫瘍活性について検討した。*In vitro* 系を用いた結果、標的分子は MAP ではなくチューブリンであることが強く示唆された。また、ヒトグリオーマ細胞を用いたマウス *in vivo* 試験において、AG1 は重篤な副作用無しに抗腫瘍活性を示した。

*1 基礎科学特別研究員、*2 協力研究員、*3 日本学術振興会特別研究員、*4 研修生、*5 研究補助員

2. 細胞が作るものチーム

(1) 高等植物液胞内のサブ領域“bulb”の新機能の発見を目指して

研究担当者：齊藤（中野生体膜研究室）

高等植物の液胞膜上のサブ領域様構造 bulb の機能を探るために、変異体スクリーニングをすることにした。そこで液胞膜タンパク質の適正な発現で bulb を可視化した形質転換シロイヌナズナに EMS を用いて変異を誘発し、独立の M14000 個体から種子を獲得した。M1 世代で既に巨視的な変異が認められる (=優性変異の可能性のある) ものを少なくとも 240 個体得た。

(2) 高等植物における液胞形成とその制御機構の研究

研究担当者：安部，齊藤，中野（中野生体膜研究室）

液胞形成の分子機構を調べるために，出芽酵母の液胞形成に関与する *VAM6* 遺伝子のシロイヌナズナホモログ *AtVAM6* の解析を行った。大腸菌のタンパク質発現系を用い，一連の様々な *AtVam6* 断片の発現，精製を行い，いくつかの融合タンパク質を可溶性分画から精製することができた。

(3) オルガネラから発信されるシグナルによる細胞分化の制御

研究担当者：森島（中野生体膜研究室）

生理的条件下で分化に伴って起こっているアポトーシスの制御機構及びアポトーシスと分化過程とが協調的に制御されている仕組みを理解することを目的とする。オルガネラの果たす役割に注目して解析を行っている。筋分化過程における細胞の生死が，細胞が分泌する成長因子及び細胞内の抗アポトーシスタンパク質の量によって制御されることを示唆する結果を得た。

(4) 核・細胞質間輸送システムの新たな作用点：分裂期染色体構築への寄与

研究担当者：田原清志，高木昌俊，小瀬真吾，今本尚子（今本細胞核機能研究室）

細胞分裂間期で機能する核・細胞質間輸送システムが，核膜のない細胞分裂期で分裂期染色体の構築と機能制御に寄与することを明らかにした。

(5) 核・細胞質間分子輸送経路網解析：情報整備と輸送制御機構の解析

研究担当者：小瀬，土屋，今本（今本細胞核機能研究室）

核・細胞質間分子流通の大部分は，運搬体 Importin b ファミリー分子によって担われる。しかし，個々の運搬体分子の輸送基質はごく少数しか明らかになっていない。本研究では，輸送基質同定のための新しい解析システムの構築を進め，さらにこの系を利用して，分子シャペロン hsc70 の核内移行解析を行った。その結果，hsc70 の核内移行は，Ran GTP により阻害されるにも関わらず，Importin b ファミリー分子非依存的であることを示唆する結果を得た。このような輸送経路は未だ報告がなく，運搬体分子の同定を進めている。

(6) 分裂期染色体動態を制御する新たな分子機構

研究担当者：高木，今本（今本細胞核機能研究室）

分裂期染色体を包み込むように局在するタンパク質（クマドリン）の解析を端緒に，分裂期染色体動態を制御する未知の機構を明らかにすることを目的とする。今年度までの研究で，クマドリン複合体が特定の mRNA 分子の分裂期細胞における代謝を制御することを介して分裂期染色体の動態制御に与るといふ新しい可能性を示した。

(7) 細胞核膜上の核膜孔複合体形成の可視化と形成メカニズムの解析

研究担当者：前島，飯野，渡辺，日原，船越，今本（今本細胞核機能研究室），中臣，端川（BSI）

今回，私たちは蛍光ラベルした核膜孔の構成蛋白質を発現する安定発現細胞を用いて，細胞間期の核膜孔の新生を可視化できるシステムを構築した。この系をもちいて，間期の核膜孔形成が，細胞周期によって厳密にコントロールされていることが示された。

(8) 染色体 DNA 複製装置の分子構築と制御機構の解明

研究担当者：水野（武），今本，水野（恵），柳（今本細胞核機能研究室）

高等真核生物の複製装置複合体の分子構築を明らかにするために，複製装置を構成する基本因子の性状解析を進めた。マウス ORC 複合体の解析から，複製前複合体，Pre-initiation complex 形成に必要なタンパク質間相互作用とリン酸化を同定した。さらに，DNA ポリメラーゼ の品質管理機構の存在を示唆する知見を得た。

(9) 大腸ガンにおける LAP2 (lamina-associated polypeptide 2) の過剰発現およびガン化との関連性

研究担当者：大木本，前島，今本（今本細胞核機能研究室）

本研究では，ガン組織およびガン細胞において LAP2 の発現が非常に増幅していることを示した。さらに，ガン細胞におけるこの LAP2 の Knock Down は，細胞増殖を抑制することを示した。また，これらの LAP2 の発現を抑制した細胞の核では核の矮小化がみられた。同時に，多核化した細胞もみられた。

(10) 染色体複製開始の *in vitro* 再構成系の開発

研究担当者：柳，今本，水野（武），水野（恵）（今本細胞核機能研究室）

染色体複製開始において，ORC，Cdc6，Cdt1，MCM からなる複製前複合体の形成は必須の過程である。複製前複合体の分子構築を明らかにするために，個々の因子の分子間相互作用について解析した。ゲルシフトによる解析の結果，マウス ORC は ATP に依存して二本鎖 DNA に結合した。さらに DNA 上に ORC，Cdc6，Cdt1 からなる複合体の形成を確認した。

(11) 核内における DNA Polymerase の品質管理機構の解明

研究担当者：水野（恵），水野（武），今本（今本細胞核機能研究室）

点変異 Pol p180 サブユニットの Halo-Tag 融合タンパク質を作製し，非許容温度下における核からの消失の挙動を詳細に検討することにより，変成 p180 の核からの排除機構の解明を目指す。p180^{tsFT20}-HT の作製に成功し，培養細胞に高発現した p180^{tsFT20}-HT が，tsFT20 細胞内在性 p180^{tsFT20} と同様の挙動を示すことを確認した。

(12) 細胞分裂終期における核膜・核膜孔複合体の構築機構の解析

研究担当者：船越，今本（今本細胞核機能研究室）

当研究室で見いだされた 2 つの異なる核膜サブドメイン構成タンパク質群と核膜孔複合体(NPC)膜タンパク質を指標に 核膜構築機構の解明に向け，核膜前駆体小胞の性状解析と構成因子の同定を目指した。核膜サブドメイン形成は，既に分裂初期から制御され中期では異なった膜構造体に分配され，その一方は NPC 膜タンパク質 Pom121 と局在が類似している。核膜再構成実験系樹立を検討し，間期と分

裂期細胞質の異なる性質を反映した観察結果を得た。NPC 構築における Pom121 の重要性についてまとめ誌上報告した。

(13) カイコガフェロモン腺細胞における Live Cell Science

研究担当者：松本，大西*2，Hull*2（松本分子昆虫学研究室）

神経ホルモンPBAN刺激に伴うカイコガフェロモン腺細胞での細胞内シグナル伝達系の解析を行い，PBAN刺激がPBANRで受容されたのち，Gq PLC IP₃ 小胞体Ca²⁺ストアの枯渇というカノニカル経路でSOCのCa²⁺チャンネルに伝達されることが示唆された。

(14) バキュロウイルスによる宿主細胞機能制御

研究担当者：姜（松本分子昆虫学研究室）

カイコ多角体病ウイルスの増殖場所に局在する ORF8 と相互作用する宿主側のパートナーとして，総7つのクローンが得られた。遺伝子配列からの特徴やウエスタン解析より，細胞間のシグナルに関わるタンパク質である可能性が示唆された。そこで，阻害剤処理や RNAi によりそれぞれの宿主因子の発現抑制を施すと，ウイルスの侵入が影響を受けることがわかった。

(15) ウイルスによる細胞核の壊廃と再構築

研究担当者：永峰（松本分子昆虫学研究室）

バキュロウイルス誘導核ドメインの形成が宿主細胞の核構造にどのような影響を与えるのかを調べるために感染細胞内のクロマチンの動態を解析した結果，宿主クロマチンは2つのウイルス誘導核ドメイン，virogenic stroma と peristromal region から排除されることによって核周縁部へ移動させられていることが明らかとなった。

(16) 無脊椎動物を利用してわかる性分化機構の進化

研究担当者：鈴木，松本（松本分子昆虫学研究室）

カイコの性決定遺伝子 *Bmdsx* のオス型のスプライシングに必要なシス因子 CE1 に結合するタンパク質として同定された BmPSI は，*Bmdsx* のオス特異的なスプライシングに必要である。今年度の研究により，BmPSI がメス特異的にリン酸化されることが明らかとなった。また，CE1 に結合するタンパク質として，BmPSI 以外にオス特異的に存在するタンパク質を新たに見出すことが出来た。

(17) 昆虫性フェロモン産生系における脂質動態の分子メカニズムに関する研究

研究担当者：本，松本（松本分子昆虫学研究室）

ガ類昆虫の性フェロモン産生に関わる機能分子を解明するため，標的遺伝子をカイコガ個体レベルで解析できる実験系を構築した。また，新規フェロモン産生関連遺伝子を単離するため，新たにアワヨトウフェロモン腺のノーマライズド cDNA ライブラリーを作製した。

(18) *Drosophila nucleolar GTP binding protein 1(dngbp1)*の機能解析

研究担当者：常泉，一瀬，松尾，伊藤（松本分子昆虫学研究室）

本研究により，ショウジョウバエ PP2A 関連タンパク質群と DNGBP1 との結合は検出されず，*dngbp1* 変異による細胞死では，脊椎動物と異なるショウジョウバエ独自の機構により制御されることが示唆された。*dngbp1* 変異による細胞死に JNK 活性の亢進が必須条件であるかの検討でも，必須ではないことが判明し，*dngbp1* 変異による細胞死は apoptosis 非依存型であり，新規細胞死機構の存在が示唆された。

(19) 植物細胞オルガネラ・葉緑体と細胞核および細胞膜のブラシノステロイド情報伝達因子による生体イメージングと分子動態の解明

研究担当者：中野（辻本細胞生化学研究室），浅見（東京大学）

植物ステロイドホルモンであるブラシノステロイドの情報伝達機構を明らかにすることを目的として，ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz を用いた化学遺伝学的解析により，アラビドプシス突然変異体を単離した。これらの変異体の原因遺伝子として新規な膜貫通型タンパク質 bil4 を単離し，細胞内においては後期エンドソームおよび液胞膜上に局在することを明らかにした。

(20) 原生動物とその細胞内・表層細菌の共生機構の解明

研究担当者：大熊（工藤環境分子生物学研究室）

シロアリ腸内の共生原生動物のヒドロゲナーゼを解析し，高い水素生成能を見出した。また，原生動物の Bacteroidales 目の細胞内共生細菌に水素取込み型のヒドロゲナーゼ活性を検出し，水素を積極的に利用することにより原生動物のセルロース分解を促進する共生関係と考えられた。

(21) 細菌のpH及びNa⁺恒常性を支配するSha輸送体の構造と機能

研究担当者：古園，小田，梶山，工藤俊章（工藤環境分子生物学研究室）

Sha 輸送体が緑膿菌の病原性に関与するメカニズムを明らかにするため，定常期転写に注目して，Sha 輸送体欠損変異が与える影響を検討した。Sha 欠損株では定常期への移行期に NaCl が存在すると，定常期の転写誘導に必須な RpoS やクオラムセンシングの活性化が顕著に阻害され，それらの制御下にある病原性遺伝子の発現が抑制されることを明らかにした。緑膿菌 Sha 輸送複合体を大腸菌において大量発現・精製を行い，複合体の分子量について検討した。

(22) 原始真核細胞の細胞内膜系の記述 -そのマシナリーの実体把握および進化過程の追跡-

真核生物の非常に複雑な細胞体制の構築原理を解明するために，シロアリ共生性の Parabasalids および Oxymonads 原生動物の細胞内膜系の可視化とその機能的多様性の解明を試みている。本年度は，培養条件を検討し，これまで培養困難であったこれらの原生動物を in vitro で維持する条件を設定することに成功し，現在その条件を用いて形質転換系の構築を行っている。

(23) コンデンシン複合体の生化学的解析

研究担当者：鎌田，平野（平野染色体ダイナミクス研究室）

コンデンシン複合体の分子メカニズムを理解する目的で，枯草菌のサブユニット単独およびそれらの複合体の大量発現系を構築した。これまでに，SepA-SepB-SMC ヘッド複合体の精製に成功し，その生化学的性状を解析することができた。今後，発現系のさらなる改良と

精製蛋白質の結晶化を実現することにより、コンデンシン複合体の構造決定を試みたい。

(24) p38MAP キナーゼの細胞内動態と生理機能の解

研究担当者：須藤，長田，河合（長田抗生物質研究室）

非リン酸化型とリン酸化型 p38 とを区別するために、リン酸化される TGY モチーフを含む短いペプチドを用いた抗非リン酸化型ポリクローナル抗体作製を継続した。個体レベルでは、p38 発現抑制がてんかん発作を抑制することを明らかにした。

(25) タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼを介する細胞死の制御

研究担当者：小嶋，辰川^{*5}，深谷^{*5} (分子細胞病態学研究ユニット)

アルコール性障害肝と抗癌剤による肝癌細胞死では、タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ(TGase)の発現と核局在が高まり、転写因子 Sp1 の架橋不活性化が起こり、下流の増殖因子受容体の発現が低下し、一連の肝障害経路と細胞死経路が活性化されることがわかった。

(26) ADLib システムを用いた新規特異抗体プローブのデザイン

研究担当者：太田（柴田上席研究員研究室）

ニフトリ B 細胞を用いた生体外抗体作製法である ADLib システムを用いて、脂質分子やリン酸化部位を識別する高機能抗体を獲得する方法を開発している。現在までに、脂質抗原の ELISA アッセイ条件の検討や、磁気ビーズ固定法の検討などで有用な知見を得ているが、具体的な成功例は今後の課題である。リン酸化を認識する抗原については、さらなる系の改良が必要である。

(27) 核小体の構築メカニズムと再構築

研究担当者：永田，奥脇（筑波大学・大学院人間総合科学研究科）

核小体の構成因子の一つである RNA 結合因子 B23 は、4 箇所の cdc2 リン酸化部位がすべてリン酸化されることにより、RNA 結合領域である C 末端の 35 アミノ酸からなる領域の構造変化を起こし、RNA 結合活性を失うことが明らかとなった。また、リボソーム遺伝子の特異的な転写因子 UBF が PNB と結合することを明らかにし、UBF の RNA 結合活性を持つ HMG ドメインが結合に重要であることを示した。

(28) 生体における細胞死ダイナミクスと生理機能の遺伝学的解析

研究担当者：三浦（東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室）

生体でおこる細胞死に伴ったカスパーゼの活性化を生きた個体の中で初めて可視化することに成功した。ショウジョウバエ変態期の唾液腺退縮時には、カスパーゼの活性化はその前後軸にそったパターンで前側から後方へと伝播していった。このカスパーゼ活性化パターン形成には前側からのエクジソンサージが関与することが示唆された。

(29) シロイヌナズナの重力感受に必要な液胞膜動態及び小胞輸送の制御機構

研究担当者：森田（寺尾）(奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・形質発現植物学)，中野（中野生体膜研究室）

重力屈性変異体の原因遺伝子である *SGR2, SGR8, SGR9* は、重力感受細胞内の液胞動態やアミロプラスト動態の制御に関与し、重力感受という高次機能に重要な働きを担う。これら遺伝子産物がどのようにオルガネラ動態を制御し、重力感受を可能にしているかを理解することを目的としている。本年度は *SGR9* がアミロプラスト上に存在し、アクチンリモデリングを介してアミロプラストの重力方向への沈降に関わる可能性を示唆した。

(30) 酵母の輸送系オルガネラ構築に関わる膜タンパク質の解析

研究担当者：依田，野田（東京大学・大学院農学生命科学研究科・応用生命工学専攻・分子生命工学研究室）

精製ゴルジ体から発見した新規タンパク質 Svp26 がゴルジ体の一群の糖転移酵素の局在に関与していること、機能未知で生育に必須な小胞体膜タンパク質 *Keg1* が *Kre6* と結合し細胞壁 β -1,6-グルカン合成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

(31) 線虫 *C.elegans* におけるメンブレントラフィックの分子機構～分子から高次機能解明にむけて～

研究担当者：佐藤健，佐藤美由紀（群馬大学 生体調節研究所）

C. elegans の腸細胞において極性輸送されるマーカータンパク質を構築し、RNAi 法による遺伝子ノックダウンによって極性輸送関連因子の探索を行った。その結果、低分子量 GTPase *Rab8* が腸上皮細胞において頂端面タンパク質の正しい局在化に働き、その役割は線虫からヒトまで高度に保存されていることが明らかとなった。

(32) 細胞極性に基づく組織構築機構の解析

研究担当者：松崎，今野，塩井（発生・再生科学総合研究センター 非対称細胞分裂研究グループ）

哺乳類神経幹細胞から神経細胞が形成される仕組みを明らかにする目的で、LGN 遺伝子のノックアウトマウスの作成等を行い、分裂軸の役割を解析した。その結果、(1) 分裂軸が上面と並行な方向に制御されることが、神経幹細胞である上皮細胞の維持に必要であること、(2) しかしながら、全体として神経形成の速度には影響を与えない、というこれまでの理解とはおおき異なる結論に至った。

(33) ナノテクノロジーを利用した組織形成装置の開発とこれを用いた肝幹細胞からの肝組織形成ならびに肝がん細胞からの腫瘍組織形成

研究担当者：松下，上岡（崇城大学生物生命学部応用生命科学科医用生体工学講座），藤井（東京大学生産技術研究所）

ナノテクノロジーを利用した組織形成装置を用いて、肝がん細胞集塊内部に超低流量の液流れを形成し、せん断応力を抑えながら、物質移動を促進することで、がん組織をこれまでの生体外での限界値であった直径 100 μ m から、直径約 840 μ m にまで成長させることに成功した。また組織短径とポンプ流量の間には相関関係が見出され、その関係は、生体の肝臓の体積と血流量の関係と一致するものであった。

*¹基礎科学特別研究員, *²協力研究員, *³日本学術振興会特別研究員, *⁴ジュニア・リサーチ・アソシエイト, *⁵研修生, *⁶人材派遣社員, *⁷パートタイマー

1. “What make cells?” Research Team

(1) Role of organelle acidification in protein trafficking in yeast

We identified genes predicted to be required for the assembly of animal and plant V-ATPases.

(2) Visualization of the TGN dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*

In order to understand the molecular mechanisms of TGN dynamics, I carried out the imaging of the GFP- and mRFP- fusion proteins. Especially I focused on TGN proteins and proteins located on secretory vesicles.

(3) FRET imaging of vesicular transport in living budding yeast

By using FRET imaging system, we visualized that the interaction between Ypt31p and Sec2p was restricted only at the tip of the bud during the bud emerging and the bud growth. We also demonstrated that Ypt31p/32p was not required for Sec4p moving into the bud, but for it accumulating at the bud tip.

(4) Regulatory mechanism of vesicular traffic involved in vascular system formation in higher plants

We carried out the genetic analysis of endocytic Rab GTPases (Rab7 and Rab11 GTPases). In addition, we started to analyze AtVAM6 as a candidate for Rab7 GEF.

(5) Live imaging of the Golgi cisternae dynamics in *S. cerevisiae*

From live imaging analysis, we suggested the existence of the structure that is equivalent to the ER exit sites in *S. cerevisiae*.

(6) Transbilayer distribution and communication of lipids in biomembranes

We examined the transbilayer lipid distribution by SDS-FRL method. Our results revealed asymmetric cholesterol distribution in cultured fibroblasts.

(7) Analysis of microdomain formation in cellular membranes

To identify molecules involved in sphingomyelin domain formation, we screened RNAi-induced cells for lysenin-resistant cells.

(8) Control of actin reorganization by lipid domain “Chaos”

The cholesterol-rich lipid domain “chaos” is selectively labeled with cholesterol-specific θ -toxin. θ -toxin revealed that the chaos domain plays an important role in Src/EGF receptor-dependent actin reorganization.

(9) Identification of proteins involved in lipid localization

We identified proteins interacting with a specific lipid.

(10) Analysis of asymmetric distribution formation mechanism of membrane lipids in Golgi sub-compartments

To reveal the function of Golgi apparatus in the lipid localization, we established the method of analyzing the lipid composition of Golgi sub-compartments.

(11) Analysis of molecular mechanisms of phosphatidylethanolamine transport between mitochondria and endoplasmic reticulum

We clarified properties of duramycin, which specifically binds to ethanolamine phospholipids.

(12) Elucidation of role of DAG in vesicle transport from Golgi apparatus

We newly developed FRET-based probe to detect DAG at the luminal side of endomembrane.

(13) Development new fluorescent probes for visualizing histone acetylation by using FRET and kinetic analysis of histone acetylation

We developed a new fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe for detecting acetylation at histone H4K5 and K8 in living cells by coupling histone H4 with the bromodomain of BRDT and two fluorescent proteins Venus and CFP.

(14) Regulation of the mitochondria by NAD-dependent deacetylases, SIRT3

To elucidate the function of a major mitochondrial deacetylase, SIRT3, several novel acetylated proteins in the mitochondria were identified as substrates of SIRT3. Most of these acetylated proteins are involved in an energy metabolism, suggesting that SIRT3 may play important roles in an energy metabolism.

(15) Study on the mechanism of transcriptional repression by histone deacetylase inhibitors

ChIP analysis revealed that TSA impairs the recruitment of Pol II and the induced acetylation of histone H4 at the promoter region of inflammatory genes.

(16) Nucleo-cytoplasmic protein transport in fission yeast

We are studying the function of the fission yeast exportin spMsn5. Disruption of *spmsn5* caused sensitivity to various stresses and overexpression of *spmsn5* affected cell morphology. Based on the microscopic visual screening, we identified 24 candidate cargo proteins for spMsn5.

(17) Reverse proteomics analysis for understanding signaling pathways of histone modification

We made reverse array and identified several upstream factors regulating the acetylation level of histone H3 Lys9 in *Schizosaccharomyces pombe*.

(18) Dynamic analysis for establishment of mitochondrial genomic homoplasmy

Our studies revealed that the expression of *DIN7* is regulated at a transcriptional level in response to DNA damages. Furthermore, Mhr1-dependent recombination suppresses the increased petite formation caused by an excessive amount of Din7.

(19) Regulatory role of nucleo-cytoplasmic transport in organizing microtubule structure in fission yeast

In fission yeast, inhibition of nuclear protein export induced tubulin accumulation within the nucleus and nucleation of an intranuclear microtubule bundle in an interphase SPB-dependent manner.

(20) Subcellular compartmentation of small metabolic molecules such as acetyl-CoA, the cofactors for protein modification

We have identified mitochondrially-localized acetylated proteins in fission yeast.

(21) Global analysis of protein post-translational modifications in fission yeast

We have established a methodology for high-throughput identification of protein post-translational modifications.

(22) Comprehensive analysis of protein acetylations using a fission yeast temperature sensitive mutants library

Identification of novel roles for protein acetylation was tried by using the fission yeast mutant strains whose temperature sensitivities

were suppressed by Trichostatin A.

(23) Regulation of mRNP

We identified an RNA-binding component of cytoplasmic mRNPs which functions as a translational repressor.

(24) Analysis of the molecular mechanism of flip-flop that regulates asymmetric distribution of lipids in biological membranes

To elucidate the molecular mechanism of flip-flop, the defective genes in phosphatidylserine-resistant CHO-K1 mutant cells were analyzed.

(25) Development of super-resolution single-molecule imaging microscopy and its application to the detection of higher-ordered clustering of membrane receptors

Spatial resolution of single-molecule imaging was improved by applying digital deconvolution to TIRF microscopy by a factor of 1.4. This technique will be used to detect dynamics in EGFR clusters that is most likely the reason of complex reactions of EGFR found in single-molecules.

(26) Single-molecule imaging analysis of conformational changes of signalling molecule Raf1 in living cells

Here we report a measurement system for conformational changes of individual signaling molecules in living cells using single-molecule imaging. This measurement system (a combination of single-molecule kinetic analysis and single-molecule FRET detection) will be useful for studies on other signaling molecules.

(27) Analysis of cargo dynamics during COPII vesicle formation in an artificial planar lipid membrane

We developed a method for single cargo molecule imaging for direct observation of cargo dynamics during COPII vesicle formation.

(28) *In vivo* dynamics and regulation of genome damage repair factors

In vivo dynamics of GFP-tagged nucleotide excision repair factors revealed the presence of a novel regulatory mechanism.

(29) Analysis of inhibitory mechanism of bioprobe interfering microtubule dynamics

AG1 is a novel microtubule inhibitor, but its molecular target was unknown. *In vitro* experiment suggested that molecular target of AG1 is tubulin.

2. "What cells make?" Research Team

(1) Search of unknown function of "bulb", a putative subregion in plant vacuolar membrane

To screen bulbless mutants, we generated the mutant pool from bulb-visualized Arabidopsis GFP marker line by EMS mutagenesis.

(2) Studies on vacuolar biogenesis and its regulatory mechanisms in higher plants

GST-tagged various fragments of AtVam6 were expressed in *E. coli* and some of these fusion proteins could purify from soluble fractions.

(3) Control of cell differentiation by organelles

Apoptosis of myoblasts during myoblast differentiation is regulated by an autocrine factor and an anti-apoptotic protein.

(4) A novel mitotic role of importin b and small GTPase Ran

We found that the association of importins-b and -a with hKid triggers the initial targeting of hKid to mitotic chromosomes and that local Ran-GTP-mediated "cargo-release" promotes the accumulation of hKid on chromosomes. This study demonstrates a novel nucleocytoplasmic transport factor-mediated mechanism for targeting proteins to mitotic chromosomes.

(5) Analysis of nucleocytoplasmic transport mediated by Importin b family molecules

We developed the new system for identification of substrates of importin b family molecules. Utilizing this system, we showed that nuclear import of hsc70 is likely to be dependent of Ran, but not Importins.

(6) Analysis of a novel mechanism regulating the behavior of mitotic chromosomes

We showed a novel possibility that chmadrin complex might contribute to the behavior of mitotic chromosomes via regulating the metabolism of certain specific mRNAs.

(7) Mechanism of nuclear pore assembly during interphase

Nuclear pores, sophisticated gateways between cytoplasm and nucleoplasm, are the most notable structures on the nuclear membrane. Currently, we are examining how the nuclei and nuclear pores are assembled and regulated during cell proliferation and differentiation.

(8) Molecular mechanism of assembly and regulation of chromosomal DNA replication apparatus

Orc1 is phosphorylated by CDK/cyclin A through Cy motif, which is masked by amino-terminal BAH domain on chromatin through interaction with HP1 or CDC45.

(9) Correlation between Protein Level of LAP2 α (lamina-associated polypeptide 2 α) and Cancer Proliferation.

We examined components of nuclear envelope in clinical colorectal cancer tissues. Interestingly, LAP2 α was found to be strongly overexpressed among the proteins examined in all cases. LAP2 α -knockdown significantly reduced the growth rates of several cancer cell lines. LAP2 α -depleted cells showed abnormal nuclear shape and increased number of multinucleated cells.

(10) *in vitro* reconstitution of mammalian prereplicative complex

The DNA-binding activity of mouse ORC1-5 is stimulated by ATP. In addition, the sequential assembly of Orc1-5, Cdc6 and Cdt1 onto DNA was reconstituted.

(11) Nuclear quality control mechanism for DNA polymerase

We analyzed the quality control mechanism that prevents the nuclear expression of aberrant DNA polymerase alpha using Halo-Tag system.

(12) Mechanism of nuclear membrane and nuclear pore complex assembly at mitosis.

We have report about two distinct subdomains on the nuclear surface. Each of membrane-protein classified to the two subdomains in earl G1 shows different localization in anaphase. At the period, a protein of the one class and Pom121 were detected at almost the same compartment, which is neither the ER nor the Golgi. We reported on a paper about human Pom121 importance for NPC assembly.

(13) Live cell science in the silkworm pheromone gland

Experiments using fluorescent Ca²⁺ imaging techniques revealed that sex pheromone production in the silkworm, *Bombyx mori*, is mediated by store-operated Ca²⁺ channels.

(14) Analysis of baculoviral regulation on host cellular function.

We identified several BmNPV ORF8 interacting host factors that are either membrane bound proteins or secreted proteins. Further analysis using RNAi and inhibitor for Notch suggested that these host factors may be involved in entry of BmNPV.

(15) Nuclear architecture in baculovirus-infected cells

Our analysis of chromatin dynamics in baculovirus-infected cells demonstrated that host cell chromatin is relocated to the nuclear periphery in association with expansion of two discrete virus-induced subnuclear compartments.

(16) Evolutionary analysis of sex determination mechanisms using invertebrates.

We revealed that BmPSI is female-specifically phosphorylated and also found a male-specific protein that binds to the *cis*-acting element on *Bmdsx* exon 4.

(17) Molecular mechanisms of lipid dynamics in insect sex pheromone production.

We established the *in vivo* gene analysis system in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*, by using the transgenic system and the *desat1* promoter. To isolate novel sex pheromone-related genes, we prepared normalized cDNA library of the pheromone gland of the armyworm, *Pseudaletia separata*.

(18) The analysis of *Drosophila nucleolar GTP binding protein 1(dngbp1)*.

The cell death, depended on a decreased level of *dngbp1*, is caused by unknown mechanism different from apoptosis.

(19) Analysis of brassinosteroid signaling factors by imaging of plant organelle

Brassinosteroid signaling genes *bil* were identified and these intercellular functions were tried to characterize.

(20) Study on cellular symbioses of protists and their associated bacteria

Strong hydrogen producing ability of termite-gut protists and considerable hydrogen uptake activity of the endosymbiotic bacteria suggest that the hydrogen transfer enhances cellulose fermentation in the gut.

(21) Analyses of structure and function of multigene-encoded Na⁺/H⁺ antiporter system

We performed transcriptome analysis to show that transcription of many virulence genes, mostly RpoS and quorum sensing-dependent ones, was decreased in a NaCl-dependent manner in a Sha antiporter-deficient mutant, which may cause the attenuated virulence of the mutant.

(22) We established cultivation system of not-yet-cultivated protists, Parabasalids and Oxymonads and trying to construct real time fluorescent observation system to analyze such the "primitive" eukaryotic endo-membrane systems.

(23) Biochemical and structural analyses of the condensin complex

To make protein crystals of the *Bacillus subtilis* condensin complex, we have established an expression system in which parts of its three subunits are co-expressed and co-purified from bacterial cells..

(24) Monitoring the dynamic changes of p38 MAP kinase

To develop the method (s) to distinguish non-phosphorylated p38 from that of phosphorylated one, we have continued to generate anti-non-phosphorylated p38 antibody with different peptide antigens, immunizing schedules and purification schemes. Moreover, we showed that p38 plays a critical role in mouse epileptic seizure and excitotoxicity.

(25) Regulation of the transglutaminase-mediated apoptosis

Crosslinking inactivation of Sp1 by TGase causes reduced expression of growth factor receptors, leading to hepatic apoptosis.

(26) Design of novel antibody-based probes by ADLib system

We are in the process of developing a new ADLib-based method to prepare monoclonal antibodies against various antigens including lipids and phosphorylation epitopes.

(27) Reconstitution of nucleolus based on the molecular mechanism of nucleolar assembly and disassembly

We found that *cdc2*-mediated phosphorylation of B23, one of the nucleolar components, induces the structural change of the C-terminal region, and impairs its RNA binding activity. UBF was shown to bind to PNB, and the HMG domain of UBF is involved in the binding.

(28) We have visualized a process of cell death in living organisms.

(29) Regulatory mechanism of vacuolar membrane dynamics and vesicle trafficking required for gravity perception of gravitropism in Arabidopsis.

Our results suggest that SGR9 localized to amyloplasts may regulates amyloplasts sedimentation to the direction of gravity via remodeling of actin filaments.

(30) Characterization of the membrane proteins of vesicular transport compartments in *Saccharomyces cerevisiae*

We found that the early Golgi membrane protein Svp26 plays a role in localizing several Golgi mannosyltransferases and so affects N-glycosylation. We characterized a previously uncharacterized ER membrane protein Keg1 as a novel Kre6-binding protein responsible for the cell wall beta-1,6-glucan synthesis.

(31) Molecular mechanisms of Membrane Traffic in *C.elegans*

We showed that Rab8 is responsible for the localization of apical proteins in intestinal epithelial cells both in worms and mice.

(32) Study on mechanisms of cell polarity underlying tissue organization

We analyzed roles of mitotic spindle orientation in mammalian neural stem cells by making LGN-KO mouse, and discovered that divisions orthogonal to the apico-basal axis are necessary to maintain the population of neuroepithelial progenitors but not the overall neural production.

(33) Development of tissue formation device including nanotechnology and formation of liver lobule tissue from hepatic stem cells and hepatoma tissue from hepatic tumor cells using its device.

Hepatic tumor cells (HepG2) proliferated and form a hepatoma tissue like cell aggregate (840 μm in diameter) in the artificial tissue formation device including nanotechnology to control ultra low flow rate of medium. A relation between short diameter of the artificial tissue and flow rate is consistent with the relation between the diameter of liver tissue and blood flow rate