

# TRANSPORTSOME

特定領域研究:生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能

QUARTERLY  
Spring  
2006

膜輸送分子複合体研究の最前線

## 目 次

|           |            |   |
|-----------|------------|---|
| 領域開始にあたって | 領域代表 金井 好克 | 2 |
|-----------|------------|---|

### 計画研究班員の研究紹介

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| A01班<br>トランスポートソームの構成と機能に関する研究 | 4 |
| 金井 好克・森 泰生・古川 哲史・畑 裕・木下 賢吾     |   |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| A02班<br>トランスポートソームと生体膜の相互作用に関する研究 | 8 |
| 竹島 浩・中西 宏之・日比野 浩・末次 志郎・楠見 明弘      |   |

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| A03班<br>トランスポートソームの生理機能とその破綻による病態に関する研究 | 13 |
| 仁科 博史・根本 知己・宮本 賢一・鈴木 洋史・寺崎 哲也・内田 信一     |    |

|      |    |
|------|----|
| 編集後記 | 19 |
|------|----|

#### 表紙について

トランスポートソームは、駅のプラットフォームと電車にたとえる事が出来るでしょう。プラットフォーム(足場)は電車(トランスポーター・チャンネル)に、人(輸送される分子)を積み込むための場であり、電車の機能に欠かせないものです。

輸送分子を複合体でとらえる「トランスポートソーム」の考え方が、特定領域の中心的概念であることから、このような図案を表紙としました。

写真、文： 加藤 賢太  
瓜生 幸嗣

## 領域開始にあたって

文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」(領域略称:膜輸送複合体)は、5年間の研究期間をもって平成17年度にスタートしました。領域立ち上げに際し多大な御尽力を頂きました常時激励を頂きました多くの方々に厚く御礼申し上げます。

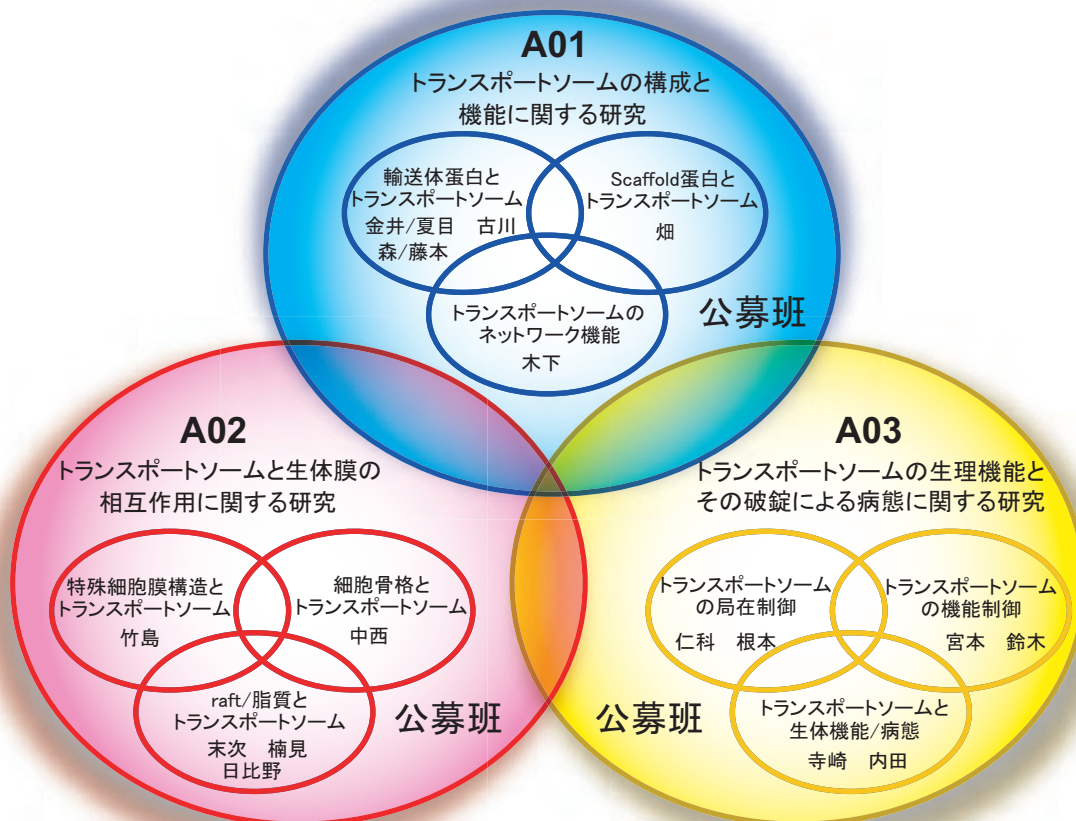
本特定領域は、倉智嘉久先生(大阪大学)を領域代表とする「分子ベクトル輸送」(平成12～16年度)と佐々木成先生(東京医科歯科大学)を領域代表とする「アクアポリン」(平成13～16年度)の2先行領域を発展的に継承し、生体恒常性の基本である生体膜輸送の研究を新たな視点から推し進めようとするものであり、「分子複合体」を念頭において生体膜輸送の研究を展開するところに特徴があります。今まで個別の独立の実体として研究されてきた個々の輸送分子(チャネル、トランスポーター、ポンプ)を、それらがその制御分子や足場タンパク質とともに集積して形成する分子複合体(トランスポートソーム)の一員と見なし、その複合体の成り立ちと機能を研究します。

生体膜輸送の研究は、輸送現象の計測から始まり輸送分子の同定に至り、基本的な輸送機能の理解や遺伝性疾患の病因の解明に大きく貢献しました。しかし、研究がその機能制御の問題に至ると問題設定が単純でなくなり、多くのタンパク質間相互作用やタンパク質脂質相互作用が見え隠れする状況のなかで全体像が曖昧になってしまうことが多々あります。これは、「単一分子」のアプローチがこういった問題に対してすでに限界にきていることを意味し、新たな切り口からの研究が必要とされます。このような背景のもとに本特定領域は、「分子複合体」を生体膜輸送の機能単位と捉え、それがどのように構成さ

れどのようにふるまうか、どのように生体膜環境と相互作用するか、そしてどのようにして他の機能要素と関わり、細胞・組織・個体のなかで位置付けられていくかを研究し、輸送分子が単独で存在するのではなく、分子複合体トランスポートソームの一員として組み込まれて存在することの意義を明らかにすることを目的とします。本領域が、生体恒常性の分子的理解を一段階高めることに貢献できることを期待します。

本領域の平成17年度の活動は、昨年夏からの個々の計画研究の立ち上げ、特に個別の技術と研究材料の適正化に主眼が置かれました。昨年7月末には、生理学研究所研究会「生体膜輸送分子複合体の分子構築と生理機能」に計画班員のほとんどが集い、情報交換とトランスポートソーム研究に向けたディスカッションがなされました。領域としての正式な班会議は、平成17年11月23日に東京医科歯科大学で行われ、領域の研究目標の確認と各計画研究の研究計画の提示と討論が行われました。さらに年度末の平成18年3月25日には、第2回目の班会議が東京大学で開催され、各計画研究の進捗報告がなされました。午前の班会議に引き続き、午後には公開シンポジウムが行われ、多くの領域外の方々にも参加いただき、熱気に満ちた会場で計画研究代表者による7演題の講演が行われました。今回の公開シンポジウムは、機能的な着想からの研究とリアルタイム可視化技術を活かした研究を取り上げ、両者の融合を狙ったテーマ設定でしたが、今後さらにトランスポートソームの実体の把握、調節、局在制御と動態、細胞・組織・個体の機能との関わりなどについての討論の場としていきたいと思えます。





評価委員：藤吉 好則、清野 進、曾我部 正博

さて、平成18年度となり本領域の第2年度の研究が開始されました。本年度は公募研究が加わり、本領域も大所帯となります。関連分野の研究者が集うことで相乗効果を促進することが特定領域研究のミッションの一つですので、本年度は研究班同士の相互作用をより一層強化し、領域内の共同研究、技術連携をより活発にしていく方向で個々の班員の方々に活動いただければと思います。この点に関して、総括班からも種々のお願いをさせていただくことがあるかと思いますが、よろしくお願いします。また、領域の成果を継続的に発展させる次世代を担う研究者の育成も特定領域研究の重要な使命です。本年度より若手によるワークショップ等を企画したいと思いますので、この点についても御協力をお願いします。

本領域は3つの研究項目からなり、A01「トランスポートソームの構成と機能に関する研究」は森泰生先生(京都大学・工学研究科)、A02「トランスポートソームと生体膜の相互作用に関する研究」は竹島浩先生(京都大学・薬学研究科)、A03「トランスポートソームの生理機能とその破綻による病態に関する研究」は鈴木洋史先生(東京大学・医学部附属病院)が、総括を担当します。各班員の方々は、各研究項目の総括と密に連絡をとっていただき、特定領域の利点を十分に活かして大きな成果をあげられることを期待しております。夏に班会議開催の予定ですので、お会いできることを楽しみにしております。

領域代表 金井 好克



## A01班 「トランスポートソームの構成と機能に関する研究」



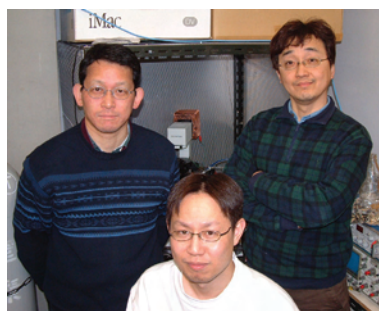
杏林大学・大学院医学研究科  
薬理学教室

教授 金井 好克

当研究室は、過去10年余り、有機溶質トランスポーター(主にアミノ酸、有機酸のトランスポーター)の分子同定に取り組んできました。分子クローニング終了に至り、トランスポートソーム分子複合体を念頭においた、タンパク質間相互作用、シグナル系とのクロストークに関する研究を展開させています。トランスポーターの分子クローニングの時代には、遺伝子組換え技術と輸送活性計測技術のみで乗り切ってきましたが、数年前からタンパク質化学、細胞生物学の技術の導入に努め、他分野の若手研究者も参加してくれるようになり、プロテオミクス技術を基盤とした研究体制の確立を急いでいます。また、哺乳類トランスポートソームの解析を進めるとともに、モデル生物としての線虫を材料とし、ゲノミクスとプロテオミクスをうまく使ってトランスポートソーム研究に貢献できないかと模索しています。

研究室のスタッフは、安西尚彦講師が酵母ツーハイブリッド法を中心としたタンパク質間相互作用の解析、助手の平田拓君が線虫を用いたトランスポーターとトランスポートソームの解析、同じく助手の上野剛君が二次元電気泳動とプロテオミクス技術を用いたトランスポートソームとシグナルの解析を行っています。4月からさらに、LC/MSやピアコアを担当していたポストドクの福富俊之君が助手に就き、Yale大学のポストドクでイオンポンプの機能制御の研究をしている木村徹君が助手として加わります。それぞれ得意技術を活かして、トランスポートソームに挑んでいます。

我々の使命は、トランスポートソームの实在の証明であり、有機溶質トランスポートソームを材料として、複合体を「もの」として捉えることにあります。この目標に向かって残り4年間邁進したく、多くの方々との共同研究、ディスカッション等、よろしくお願いします。



京都大学・大学院工学研究科  
分子生物化学分野

教授 森 泰生

森研究室は工学部が吉田キャンパスから桂キャンパスへ移転を始めた時期に岡崎から京都大学工学部に移り、この春で2年半が過ぎました。現在の教室員は教授(森)、助教授(若森)、助手(清中)、教務職員、ポストドク各1名に大学院博士課程の学生3人、修士課程の学生5人、学部4年生4人、企業の研究員1人と教務補佐員1人の合計19名です。スタッフと博士課程学生の出身大学は北海道から九州にまたがり、工学部以外の出身者も半数を占めています。それぞれのバックグラウンドを生かしながら研究を進めています。

現在の研究テーマは本特定領域の申請テーマである「Ca<sup>2+</sup>チャンネル分子複合体の生体膜集積機構とその生理的意義」を中心に全教室員がTRPチャンネルや電位依存性チャンネルの分子生物学的、生理学的研究を進めています。1980年代に生理学

研究分野に分子生物学的手法が導入され各生理機能を単一のチャンネルタンパク質に帰属させる研究が発展してきました。具体的には遺伝子クローニングによりチャンネルタンパク質の構造決定と機能解析が可能になり、チャンネルの基本的性質は明らかになりました。しかし、複数の因子が協調制御する生体恒常性維持やその破綻としての疾患等は今までの概念や研究手法だけでは解明できません。例えば、同一のチャンネルやシグナルが組織によって異なる生理効果をもたらすこと(多機能性)があり、この多機能性を説明するには関連分子の「集積」と「相互作用」の概念が必須であると思います。森研究室ではCa<sup>2+</sup>チャンネルに「集積」してくる分子を同定し、その分子を含めたCa<sup>2+</sup>チャンネル複合体の形成によるチャンネル機能の修飾様式と複合体の膜集積機構を解明したいと思っています。そして、最終的には

Ca<sup>2+</sup>チャネル複合体の生理的意義の解明を目指しております。そのための研究手法としてはクローニングを中心とした分子生物学的研究手法、fura-2を用いた細胞内カルシウム濃度測定、パッチクランプ法や細胞外多点同時記録法などの電気生理学的手法を用いています。また、Ca<sup>2+</sup>シグナル関連タンパク質の局在変化を検出する目的で共焦点レーザー顕微鏡を用いていますが、電子顕微鏡等で更に微細な研究を進める目的で

名古屋大学医学研究科の藤本豊士先生に研究分担者として本申請研究に加わって頂いています。森研究室の所属が工学研究科合成・生物化学専攻ですので、周りの研究室の助言を頂きながら化合物の合成も行い、薬物の構造活性相関も念頭においた研究も進めています。今後4年間、宜しく願い申し上げます。

(文責 若森)



## 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理分野

教授 古川 哲史

本研究室は、平成15年4月臨床薬理学分野(沢登徹教授)のあとを受け発足しました。教授古川哲史、助手黒川洵子、助手貝原麻美の3名と、大学院生・国内留学生・卒研究生、テクニシャン8名を加えた11名が研究メンバーです。古川は医学部出身、黒川は薬学部出身、貝原が理学部出身であり、大学院生らも医学部出身4名、薬学部出身2名、理学部出身2名とバックグラウンドが多彩なことが特徴です。これを生かして電気生理学的・分子生物学的・光学的な手法を用いたイオンチャネル研究への多角的アプローチに取り組み、イオンチャネル研究に新たな展開をもたらすことを目標としています。

本特定領域班における私たちの研究テーマは、「心血管系特異的イオントランスポートソーム」の解析です。タンパク質翻訳後修飾に基づくシグナル伝達機構として、リン酸化と一酸化窒素(NO)の2つが重要となります。リン酸化に関してはかなり解明が進んでいますが、NOは今まさに解明が進められているシグナル伝達系であり、私達が対象とする循環器系だけでなく免疫系・神経系における重要性も指摘されています。NO下流のシグナル伝達機構として、(1) Cysのチオール基のニトロソ化、(2) Tyr残基のニトロ化、(3) ヘムのニトロソ化の3種類があり、特にCysチオール基のニトロソ化反応が多くのシグナル伝達機構として関与すること、動的なタンパク質相互作用をもたらすことなどが明らかとなってきています。反応性の高いNOが特異性を持ったタンパク質修飾系として機能するためには、NO合成系とターゲットタンパクがパッケージ化(compartmentalization)していることが重要となります。私たちは循環器系細胞においてNO依存的イオンチャネル調節が重要となる細胞調節機構を複数報告しており、本特定領域班ではNO合成系とターゲットとなるチャネルタンパクのパッケージ化によるイオントランスポートソームの構築を研究テーマに設定しています。

現在3つのNOによるイオンチャネル調節システムに注目しています。

(1) Ca<sup>2+</sup>/calmodulinによる心筋I<sub>Ks</sub>チャネル調節

calmodulinがIQモチーフを介してイオンチャネルを調節することは、Ca<sup>2+</sup>チャネルに限らない一般的なシステムである可能性があります。心筋I<sub>Ks</sub>チャネルでは、eNOSとcaveolinからなるシグナル伝達プラットフォームが形成され、NOシグナルとクロストークしているように見えます。

(2) 性ホルモン非ゲノム作用による心筋I<sub>Ks</sub>チャネル・血管平滑筋BKチャネル調節

性ホルモンの遺伝子転写を介さない迅速な作用として、非ゲノム作用が注目されています。非ゲノム経路は複数の分子からなるプラットフォームが形成されており、c-Src、PI3-kinase、Akt、eNOS、caveolinなどが関与していることが示唆されていますが、まだmissing moleculesがあると考えられます。

(3) マクロファージファゴサイトーシス時のK<sup>+</sup>チャネル活性化

マクロファージが大腸菌などを貪食するとき、一過性にK<sup>+</sup>チャネルが活性化され、ファゴソーム内の酵素活性化に必須であり、種々の病態時にこのK<sup>+</sup>チャネル活性化が障害されていることが明らかとなりました。このK<sup>+</sup>チャネル活性化にもNOの関与が示唆され、このシグナル伝達経路に関与するプラットフォームの解析を試みる予定です。

用いている実験方法の中でユニークなものとして、

(a) Cys残基ニトロソ化検出法としてbiotin-switch assay

(b) FRETプローブNOA-1・NOA-2を用いた定量的NO測定

(c) タンパク間相互作用の検討法として、split luciferase complementarization

などがあります。(b)で用いているNOA-1は東京大学理学部梅澤研究室で開発された世界で初めてnMオーダーのNOの検出を可能とした分子プローブであり、感度を意図的に下げたNOA-2と併用することによりnNOS・eNOS由来のNOとiNOS由来のNOを定量的に検討することが可能となります。(c)では従来の蛍光を用いたFRETの代わりにluciferaseを用いることにより、将来的に個体での観察が可能となるメリットを視野に入れています。

この特定領域班において、日本のイオンチャネル研究に貢献

する共同研究サークルを作ることは極めて重要ではないかと考えます。私達の研究室は東京のご真ん中というめぐまれた立地条件にありますので、みなさんが気軽に立ち寄りいただ

る拠点となればと思っています。

(文責 古川)



## 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科 病態代謝解析学分野

教授 畑 裕

私たちは「トランスポートソームにおけるscaffold蛋白の役割の解析」というテーマで、本領域に参加させていただいています。まず、私がscaffold蛋白の研究に関わってきた経緯と、scaffold蛋白の研究の現状についての私なりの理解を記載したいと思います。

哺乳類の中枢神経の主たる興奮性伝達物質はグルタミン酸ですが、私はグルタミン酸受容体の裏打ち構造の分子構築を解析する過程で、接着分子と受容体・チャネルの双方に直接的ないし間接的に結合する一連の蛋白群に遭遇しました。このような蛋白が当時すでにいくつか知られていましたが、いずれも複数の蛋白相互作用モジュールをもち、接着分子・受容体・チャネルなどの膜蛋白以外に、細胞骨格やキナーゼ・ホスファターゼ・低分子量G蛋白制御因子などのシグナル伝達分子と結合します。しかし、それ自体は積極的な活性を持たず、他の機能分子が効率的に活動できるような場を提供することが主たる役割であると解釈され、縁の下の力持ち的存在としてのscaffold蛋白の概念が提唱され始めていました。私自身は神経シナプスからscaffold蛋白の研究に入りましたが、類似のscaffold蛋白は神経細胞のみならず上皮細胞や血球系細胞にも見つかっていましたし、細胞内小器官の膜構造にも見出されています。酵母のMAPキナーゼ系のscaffold蛋白や、ショジョウバエのINAD蛋白の研究が先行例として報告されていたため、神経シナプスや上皮細胞間結合に認められるscaffold蛋白も、シグナル伝達の効率化に関わるはずであると想定され、実際、神経シナプスのPSD-95がErbB4の下流のMAPキナーゼシグナルを効率化する例などの報告もあります。しかしながら、膜蛋白の輸送、局在決定、集積にscaffold蛋白が果たす役割が明瞭に示されているのに比べますと、シグナル伝達の効率化に関わることを示す証拠は未だに少ないように思います。Scaffold蛋白に関する最近のもうひとつの問題は、蛋白分子間相互作用の網羅的な研究が進んだ結果、ほとんどの蛋白が複数の分子と相互作用していることが知られるようになり、scaffold蛋白の概念が微妙に拡散してきていることです。換言すれば、蛋白分子の多重的ネットワークが生命の基本単位である細胞を創発し、生命情報の維持とそのために必要なエネルギーバランスを脂質・糖質・核酸を通じて実現しているという見方をとりますと、どの蛋白分子もある

文脈においてはscaffold蛋白の立場にあるということもできるように思われます。したがって、scaffold蛋白を、当初想定されていたような、それ以外の活発な機能分子に対する活動の場を与える安定で静的な土台として捉えるよりも、もっと動的なものとして捉えるほうがよいのではないかとという立場に、私は最近傾いています。またscaffold蛋白がホモ重合体を形成することは当初からよく知られていましたが、異なるscaffold蛋白同士が重合する例も多く認められるようになり、scaffold蛋白を含む蛋白分子ネットワーク(分子複合体というほうが、ここでのイメージには妥当かもしれません)がひとつの量的な拡がりをもって生命単位としての細胞構築自体(そしてその構築は当然、生命の一部ですから常に流動するものということになります)を形作る様子が益々明らかになって来ているように思います。

さて、このような状況を踏まえて、本特定領域研究においては、まず「古典的」な課題に立ち帰り、受容体・チャネル・トランスポーターが引き起こすシグナル伝達におけるscaffold蛋白の役割を研究対象にしたいと思います。そのためにscaffold蛋白が組み込まれている蛋白分子ネットワークが最も動的に再編されるような場面をなるべくピックアップしたいと計画しています。そうした場面では、受容体・チャネル・トランスポーターを支える地盤が、いわば地殻変動を起こし、そのため、安定で静的な土台としてのscaffold蛋白という概念の中では捉えきれなかった側面が浮かび上がってくるのではないかと期待する次第です。具体的には細胞が細胞分裂を起こしているような場面や、上皮細胞がサイトカインの作用のもとで、あるいは癌やfibrosisのような病理的变化に伴い間葉系の形質を獲得する場面、神経細胞の樹状突起スパインが記憶学習に伴い形態を変化させる場面、などにおいて、scaffold蛋白がどのように挙動するかを明らかにしたいと考えております。私は、いささか気が多いものですが、目的地向かってひたすら進む、あるいは特定の場所に定着して堅牢な成果をあげる、というよりは、何か面白いことはないかと、うろろ、きょろきょろする散策型ないし彷徨型ないし游牧民型研究スタイルをとりがちですが、「トランスポートソーム」と「scaffold蛋白」というキーワードをしっかりと心に留め、まとまりのある成果をあげるべく努力いたしますので、諸先生方のご指導、ご協力、ご助言をよろしくお願い申し上げます。



## 東京大学・大学院医科学研究科 機能解析イン・シリコ分野

助教授 木下 賢吾

今回は最初のニュースレターということですので、自己紹介みたいな物を書かせていただきたいと思います。

最初に私を特徴づけるとすると、計算屋さんであるという点がポイントでしょうか。この特定領域にかかわっている方々を見回しても、どうも唯一ウェットの実験をしない人のようで、その意味ではかなりの異端児のようです。実際に班会議などで皆さんのお話を伺っても、大体はわかってピンと来ない点がままありますし、同様に私が話をさせていただいた時にも伝わっていないような気がするが多々あります。しかし個人的には、この異端児状態は嫌いではありません。

そもそも、私の出身は京大の郷信広先生の研究室です。そこでは多くの人が、タンパク質の基準振動解析や分子動力学シミュレーションに関連した研究をしていました。しかし、ひねくれ者の私はちょっと違うことがしたいというのと、何より俯瞰的な仕事したいという思いが強く、当時も今も計算機能力から個別のタンパク質のみを対象としたシミュレーションをメインの仕事としてやる気になれませんでした。その結果、他にやる人がいなかったということと、多数のタンパク質を相手にして研究ができる、立体構造の博物学を始めました。どうも最初からちょっと異端児という感じです。

最初はタンパク質立体構造の比較法の開発などをやって、その後、リガンドの結合部位の比較・分類を行い、最終的に、構造・機能相関に興味を持つようになり、現在に至っています。この中で、私なりにこだわっていたのは全体を俯瞰する描像を得るということで、個別のケースはあくまでも全体像の中に位置づけることで論じるという点です。言い換えると、いろいろな現象の中から統一的な原理を捜したいということです。しかし、原理というレベルではもちろんのこと、まだまだすっきりとした「落ち」が見つからないことが多く、結局は個別論の積み重ねになっています。そもそも生物学は個別論の積み重ねであり、統一的な原理を捜すことは無謀なのかもしれませんが、いくら生物と言っても物理化学の制約からは逃れられない以上何らかの原理は存在するはずだと信じています。感覚的には、古き良き生物物理学的だと思うので、生物という観点でもちょっと違う感じですか。

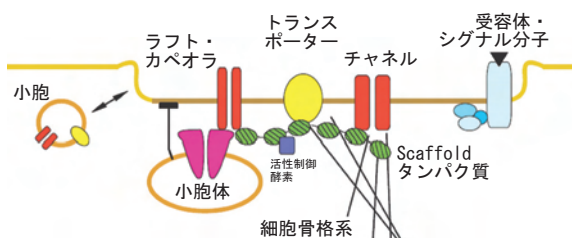
それではいわゆるバイオインフォマティクスかというと、それもちょっと違うような感じがしています。というのも、バイオインフォマティクスでは主に遺伝子、時にはタンパク質すら実体のない記号として扱いますが、タンパク質の立体構造を扱う場合にはその分子の実体を忘れることができないからです。言い換えると、バイオインフォマティクスの基本原理が情報学なのに対して、私の基本的な考え方は物理化学に近いということでしょうか。かといってももちろん、生粋の物理化学の分野から見る

とデータベースを利用した帰納的な仕事はかなり受け入れがたい物だと思います。

このように、どこから見てもちょっとずれているのですが、世界的に見れば近い分野の人はもちろんいます。特に、立体構造のデータベース的な仕事という観点では、イギリスに多くの同業者がいますし、最近ではアメリカにも同業者が多くなってきました。

ということで、研究者人生の最初から道を踏み外し続けた感があるのですが、異端＝世捨て人（他の人の研究にあまり興味をもたない）ということではありません。むしろ私の場合は結構いろいろなことに興味を持つ方だと思います。ただし、物分りが良いかというとそうでもないようですし、実際学生さんなどからは、分りが悪いと言われることもあります。これは単に能力の問題もあるのだと思いますが、私がこだわっていることのひとつとして、分からないことは分からないと言う、ということが原因だと思っています。これはずっと、ちょっとずれたところで生きてきた結果学んだことなのですが、少し違う分野の人とより良いコミュニケーションを取るためには非常に重要なことだと思っていますし、ちょっと時間がかかっても異分野の研究者が良いコミュニケーションを取れた時には良い結果が出ると信じています。

以上長々と書かせていただきましたが、今回この特定領域に加えていただいたことを機会として、皆さまと良いコミュニケーションをして行きたいと思っていますので、計算に関することなら何なりとお気軽にご相談いただければと思います。



## A02班 「トランスポートソームと生体膜の相互作用に関する研究」



京都大学・大学院薬学研究科  
生体分子認識学分野

教授 竹島 浩

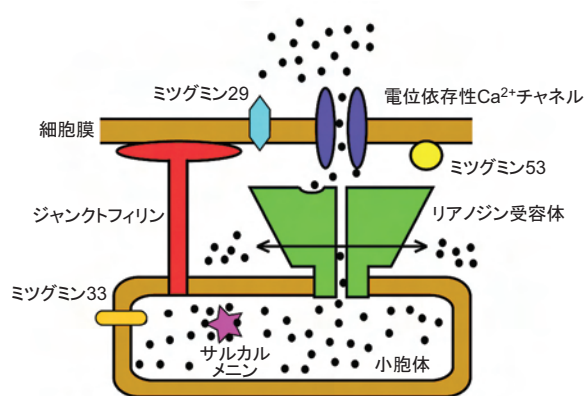
### 結合膜構造とチャネルのマイクロアセンブリ

小胞体は様々な機能を有する細胞内小器官であるが、興奮性細胞におけるシグナル伝達においては細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストアとして機能することが極めて重要であります。特に心筋と骨格筋においては、収縮期の $\text{Ca}^{2+}$ 放出と弛緩期の $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みを小胞体が担当しており、構造的にも機能的にも小胞体が高度に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストアとして特殊化しています。横紋筋細胞における細胞膜の脱分極から細胞質 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に到る過程の分子基盤は近年ほぼ解明された感がありますが、細部には未だに不明な点が多く、今なお興奮収縮連関の研究における主要課題となっています。この情報伝達においては、細胞膜上の電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルと小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネル(リアノジン受容体)が機能的に連絡しており、脱分極シグナルを細胞質 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に変換しています(添付図参照)。両チャネル分子は細胞膜と小胞体膜が約12 nmの間隔で接近している結合膜構造中に局在していることが知られ、我々が発見したジャンクトフィリンは両膜を架橋するタンパク質として結合膜構造を構築し、さらには両チャネルの機能的連絡のための構造基盤を形成する分子として注目されています。類似の情報伝達や結合膜構造は横紋筋細胞のみならず平滑筋や神経細胞においても観察されますし、電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、リアノジン受容体、ジャンクトフィリンのサブタイプは興奮性細胞に広く発現しています。従って、横紋筋細胞で明らかにされた情報伝達と類似の機構は興奮性細胞全般に共有されているとも推定され、我々の遂行中の実験においてもその考えが実証されつつあります。

現在までの研究からの状況証拠から推察しますと、表層膜と小胞体膜のチャネル間の機能共役では、i)両チャネルがそれぞれの機能調節を有するタンパク質複合体を形成し、ii)結合膜構造が反応の場としてのプラットフォームを細胞内に形成し、さらに、iii)チャネル機能複合体が結合膜構造中に集積する、という分子機序が興奮性細胞に内在しているものと考えられます。これらの理解に向けた努力が各段階に行われているものの、今なお全容解明にはほど遠いものと思われます。上記3つの課題に取り組むためのin vitro実験系は乏しく、チャネル間機能共役や結合膜構造構築を有する培養細胞系なども整備されておられません。従って、現状では遺伝子欠損マウスの作製が唯一の信憑性を有する仮説検証系となっています。申請者のグループでは、骨格筋結合膜構造(三つ組構造)に局在する分子を検索しており、それぞれの物性や機能を1つ1つ明らかにする作業を継

続し、図示した分子群の機能解析を手掛けているのが現状です。本特定領域研究においては、主に神経・筋細胞の結合膜構造や両 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルのプラットフォームとしての膜構築の特殊化に着目し、ジャンクトフィリンによる結合構造の生理機能の解明、特殊化した膜構築や小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ ストア機能に寄与すると推定される候補タンパク質分子(ミツグミン53やミツグミン33など)の機能同定を遂行する予定であります。

上述の計画研究を達成するためには、多くの研究者との連携が必要不可欠であることを痛感しております。我々のグループでは分子生物学やタンパク化学の実験手法はほぼ遂行可能ですが、脂質や糖質の生化学、微細形態学さらには電気生理学などの研究手法にはまったく不慣れであります。皆様のご支援を期待させていただくと同時に、我々も共同参画にて本特定班員の方々のご研究に貢献したいと希望しています。最近では作製した変異マウスの異常に対応して、様々なことを教科書にて学習し直したり、共同研究者の方々から教えていただいたりとの連続であります。職業柄、生化学の教科書に目を通すことが多いのですが、20年ほど前にはまったく皆無であった細胞



### 横紋筋の結合膜構造中でのストア関連分子の集積

結合膜構造中での $\text{Ca}^{2+}$ チャネル機能共役への貢献が明らかでない分子または関与が推定される分子を模式的に示している。ジャンクトフィリンは2つの膜系を架橋する分子、ミツグミン29は骨格筋結合膜構造の特殊形態の維持に必須な分子、サルカルメニンは小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 保持に必須な分子であることが明らかにされている。現在、ミツグミン53や33の機能解明を目指した実験を遂行中。

接着や増殖シグナルの伝達経路に関する項目の充実が印象的です。生理・薬理学の教科書においても同様で、平滑筋の収縮調節、上皮細胞系の物質輸送や神経伝達の分子機構などの記述が一新されており驚愕させられます。もともと早くない頭の回転が40歳を過ぎた頃よりさらに鈍化しており、勉強を怠

ると学生から“それについては教科書に書いてありますよ”などと言われることも経験させられます。老害を撒き散らすのを最小限に抑えつつ上記の課題を遂行し、本特定領域研究を中心とする研究者の輪の中で、教科書に書き加えられるような成果を目指したいと思います。宜しく願ひ致します。



## 熊本大学・大学院医学薬学研究部 細胞情報薬理学分野

教授 中西 宏之

私共の研究室は、熊本市本荘にある熊本大学医学部校内の基礎棟の中にあります。この建物は、平成11年に建てられた比較的新しいものであり、天気の良い日には8階にある研究室から阿蘇山系を臨むことができます。医学部校内には、様々な遺伝子改変マウスの供給拠点である生命資源研究・支援センターや、プロテオミクス研究・教育システムの拠点となっている総合研究施設等があり、すばらしい研究環境が整っています。平成14年に私が宮本英七名誉教授より講座を引き継いで現在に至っており、教授、助教授（現助教授は4月より琉球大学教授に赴任）、助手2名という構成になっています。大学院博士課程では、本学の視機能病態学分野、消化器外科学分野、消化器内科学分野、皮膚機能病態学分野の各臨床講座から院生4名が、また、修士課程では、水産学部、薬学部、医学部保健学科卒業の4名が教室と一緒に研究を行っています。全員がそれぞれ違った臨床教室や学部出身者で、特異な分野も異なるためお互いに教え合うことも多く、刺激し合いながら熱心に取り組んでいます。なお、教室の詳細や各人のプロフィール等は、ホームページ(<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/pharmal/pharmal.html>)に掲載してあります。

教室の主要な研究内容は、細胞機能の分子レベルでの理解と、分子を標的とした創薬および診断・治療法の開発に集約されます。特に、細胞の接着、運動、形態形成や極性に関与している未知のタンパク質分子を見いだし、その構造や機能を検討することで、細胞機能の新しい制御機構を明らかにしたいと考えています。現在は、細胞骨格の一つである微小管に関連する分子について集中して研究しています。微小管は細胞の中心から周辺部に向かって放射状に伸びており、細胞の形態を維持したり極性を決定したりする上で重要な役割を有しています。また、細胞分裂や細胞内物質輸送においても必須の役割も果たしています。さらに、微小管は、中心小体や基底小体、さらには線毛や鞭毛などの構造を形成しています。微小管がこのように多様な機能を発揮するためには、微小管と相互作用する様々なタンパク質分子が必要であることが十分に予

想されます。しかし、これまで、微小管機能の制御に関与する分子については、それほど多くの検討はなされておらず、不明な点も多く残されていました。

私共は、脳内に存在する微小管関連タンパク質の中から、プロテオミクスの手法を駆使して、50種類以上の未知の分子を見いだししました。そして、それらの分子の構造と機能について、分子生物学的手法や細胞生物学的手法を用いて様々な角度から検討を行ってきました。そして、私共が見いだした分子が膜輸送分子と関連していることを明らかにしつつあります。一方、微小管機能の異常が、細胞のがん化や浸潤・転移、器官の形成不全、神経疾患など様々な病態の原因となっていることも明らかになってきました。私共が見いだした分子の異常が、それぞれの微小管機能の異常に関連している可能性も充分に考えられ、今後の研究成果が分子を標的とした創薬および診断・治療法の開発に結びつくことを期待しています。





## 大阪大学・大学院医学系研究科 薬理学講座分子細胞薬理学

助手 日比野 浩

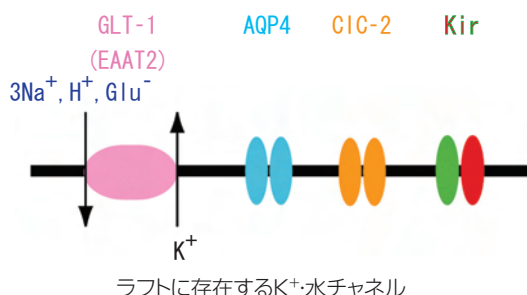
組織におけるイオン・水のベクトル輸送は、細胞内外のイオン環境を維持し臓器・組織機能を正常に保つために不可欠である。上皮細胞や中枢神経系でのグリア細胞等がこの役割を主に担っている。脳では、神経回路を構成する神経をグリア細胞が強固に取り囲んでいる。中でもその一種であるアストロサイトは、その突起でシナプスを包囲すると共に、一方で“終足: endfeet”という突起を血管周囲や脳軟膜直下に延ばしている。アストロサイトは、それら突起を介して、神経細胞の興奮時に細胞外へ放出される $K^+$ を迅速に取込み、血管や脳室方向へ放出する機能を持つ。この $K^+$ のベクトル輸送は、“ $K^+$ -buffering作用”と呼ばれ、神経回路が正常な活動を営むための必須要素の一つである。 $K^+$ の運搬により $Cl^-$ が輸送され、そのために起こる浸透圧変化により水の移動が生じると考えられている。従って、アストロサイトにより、水分子は $K^+$ ・ $Cl^-$ と共にシナプス側から血管・脳室側へと運搬される。この水輸送は、脳容量や脳血流・脳脊髄液循環のホメオスタシスにも深く関わっていると考えられる。

イオンや水がベクトル輸送されるには、それら小分子を運ぶチャネルやトランスポーター等の“輸送装置”が、決まった場所に局在し共役する必要がある。我々は、アストロサイトの $K^+$ -buffering作用においては、内向き整流性 $K^+$ チャネルサブユニットKir4.1・Kir5.1から構成されるKir4.1ホモ複合体チャネル及びKir4.1/5.1ヘテロ複合体チャネルが中心的役割を果たすことを示してきた。一方、アストロサイトの水輸送は水チャネルAQP4が担っていることが報告されている。これら $K^+$ ・水チャネルがシナプス周囲の突起や血管周囲・脳軟膜直下の終足で共存していることも明らかにしてきた。この共存は $K^+$ -buffering作用と水輸送との機能的共役を強く示唆している。即ち、Kirチャネルと水チャネルがアストロサイト細胞膜上の「特定ドメイン」に局在することは、イオン・水のベクトル輸送の基盤となると予想される。しかし、これらの膜ドメイン局在機構は未だ不明である。輸送蛋白質の局在には、結合蛋白質や細胞骨格等と蛋白質-蛋白質相互作用が重要である可能性があると共に、細胞膜脂質-蛋白質相互作用の役割も大切と推定される。このような細胞膜局所の機能的特性の違いが輸送装置などの種々の膜蛋白質のグループ化の基盤を構築していると考えられる。つまり、細胞膜上の“ナノスケール”の特殊な“場”があり、そこで $K^+$ ・水チャネルや他の輸送装置の“機能分子”がある法則に従い整然と集積し、互いに協調している「機能的微小膜プラットフォーム」の存在を我々は想定し、これが、アストロサイトの $K^+$ ・水輸送を支える原理的機構であると推定している。この仮説の証明とプラット

フォームの機能的役割を明らかにすることを目標とする。この特殊な超微小環境を解析しその分子基盤を解明することは、アストロサイトの $K^+$ ・水輸送の統合的理解に不可欠であるのみならず、神経細胞・脳の生理機能との関係や疾患との関連を分析するためにも極めて重要である。しかし、この視点での研究は今まで全くない。

そこで当班では、脳アストロサイトに注目し、最初の未解決問題である①Kir4.1・Kir5.1・AQP4の「特定ドメイン」(シナプス周囲突起や終足)への局在決定機構を解明し、② $K^+$ ・水輸送を担う「機能的微小膜プラットフォーム」の同定とその構成要素の解明、③機能的微小膜プラットフォームの成立機構の解明、④機能的微小膜プラットフォームを介した $K^+$ ・水輸送の可視化、⑤機能的微小膜プラットフォームの破綻による生理機能異常と疾患との関連の解明、⑥In silicoにおけるアストロサイト $K^+$ ・水輸送のシミュレーション、を目的とする。

準備状況として、生化学的実験によって、ある種の界面活性剤に不溶性の“ラフト”と呼ばれる分画に、Kir4.1・Kir5.1・AQP4蛋白が分布していることを見出した。ラフトとは、スフィンゴ糖脂質やコレステロールが凝集している膜成分分画である。神経細胞では、多くのシグナル分子がラフトに集積していることが報告されているが、アストロサイトでは全く不明である。アストロサイトでは、ラフトにおけるチャネル分子の規則だった集積が、 $K^+$ ・水輸送を担う機能的微小膜プラットフォームとして機能している可能性が高い。よって、その解析を一つの核として進めている。現在、ラフトにおけるチャネル局在の機能的意義の解明のため、種々の手法を用いて解析中である。また、シナプス周囲突起におけるチャネル分子の局在決定機構の解析のため、アストロサイトと神経細胞を共培養するモデル系の確立にも最近取り組んでいる。





## 東京大学医科学研究所 腫瘍分子医学研究分野

助手 末次 志郎

細胞は、細胞膜によって外界と仕切られることによって存在しています。トランスポートとはいうまでもなく、脂質二重膜上で起こる現象です。私は、これまで、細胞の内と外を結びトランスポートではなく、細胞の形そのものに注目して研究してきました。我々の体の形はあまり変わりませんが、体を構成する一つ一つの細胞の形はダイナミックに変化し、一つ一つの細胞の機能と密接に関連しています。

細胞の形は、細胞によって様々です。神経細胞や内皮細胞は全く違った機能を持っていますが、形態も全く異なっています。このように形態と細胞機能は密接に関わっていると考えられます。また、細胞の機能発現には細胞形態そのものの変化が重要です。少し例をあげさせていただきますと、例えば、免疫細胞が異物を取り込むとき、異物を包み込んで細胞の中に吸収します。このとき細胞表面が異物を包み込むように形を変化させ、いわば、異物を「食べて」しまうように見えます。いうまでもなく、神経回路は、具体的には神経突起同士のつながりであり、物理的な結合には細胞形態の変化が必要です。死亡原因の上位を占めるガンでは、ガン細胞の転移の有無が治療戦略に重要な役割を持っています。ガン細胞の転移とは、細胞が移動することで、このときガン細胞の細胞形態変化がおこり、転移能を獲得することが知られています。

細胞の形とは何かと考えると、細胞の内と外とを区切るのは脂質二重膜からなる細胞膜です。第一義的には細胞の形というのは細胞膜の形と考えることができます。脂質二重膜は、リン脂質に代表される極性脂質からなります。極性脂質は親水性と疎水性の両方の性質を兼ね備えた両親媒性のため、親水基は極性を持つ水分子と静電的結合あるいは水素結合を作って水側へ配向し、一方、疎水基は水を避けるように配向するため、疎水基同士の凝集が見られ、極性脂質が反対向きに重なった二重膜を形成します。この結果として形成される脂質二重膜は基本的に球体となると考えられ、脂質二重膜だけでは様々な細胞の種類や機能に依存した様々な細胞の形態をとることができません。しかしながら、細胞膜にはさまざまなタンパク質が結合しています。細胞膜画分を分離しそこに含まれるタンパク質を解析すると、アクチンやスペクトリン、ERMファミリータンパク質などが大量に見つかります。

この中で、アクチンは重合と脱重合により、繊維状の構造とバラバラの構造の両方をとることができます。アクチン繊維を壊す化合物を投与すると細胞がそれぞれ特有の形態を保てなくなることも、細胞骨格の細胞形態制御における重要性を示していると考えられます。このため、アクチン繊維は、細胞の形を作る基礎と考えられ、アクチン繊維を含む細胞骨格が、細胞膜の形を支えることが、細胞の形態を決定すると考えられてきました。

私たちは、細胞骨格の変化を研究してきました。アクチン繊維を形成するシグナルを明らかにすることが、細胞の形態を司るメカニズムを明らかにすると考えたのです。この結果、受容体の活性化が低分子量Gタンパク質の活性化を引き起こし、低分子量Gタンパク質がWASP/WAVEファミリータンパク質を活性化し、WASP/WAVEファミリータンパク質が、Arp2/3複合体を活性化し、活性化されたArp2/3複合体が、アクチン繊維の形成そのものを誘導するというシグナル伝達カスケードを明らかにすることができました。このように、細胞骨格を制御するシグナルの一つは明らかになったと考えられます。

細胞骨格の変化が、細胞形態の変化に結びつくためには、細胞骨格の変化が膜の近傍で起こらなければなりません。実際WASP/WAVEなどの細胞骨格制御タンパク質がまたリン脂質と結合することを明らかにしました。また、おもしろいことに脂質二重膜の形態そのものを制御することのできるタンパク質がみいだされ、これらのタンパク質が細胞骨格制御タンパク質に結合することが分かってきました。つまり、細胞の形態は、細胞膜と細胞骨格の両面で、細胞骨格制御タンパク質を中心とするタンパク質複合体によって制御されているのではないかと考えられるようになりました。

私たちは当研究室の教授である竹縄先生を中心として、リン脂質の研究から、リン脂質の修飾および脱修飾酵素の研究、リン脂質の修飾および脱修飾酵素に結合するアダプタータンパク質（シグナル伝達のスキャホールドタンパク質）の研究、アダプタータンパク質に結合する細胞骨格制御タンパク質の研究という流れで進んで参りました。私に加わったのは、細胞骨格制御タンパク質の研究のあたりからですが、このように振り返ってみると、私たちの研究の出発点であるリン脂質の研究に戻って来た訳で、膜の研究は古くて新しいテーマだと思います。いまだ、人工細胞を作ることができない現状を考えると、膜をインターフェイスとする細胞（膜）形態制御は、まだまだたくさんの課題を持っていると感じています。

本特定領域では膜貫通チャネルや膜輸送複合体に関する研究を行ってられるたくさんの先生方が参加されています。脂質二重膜は、内側が疎水性のため、極性を持った物質（水分子、イオンやアミノ酸など）が透過できません。そのため、様々なチャネルを介して細胞（膜）の内と外の間で恒常的な物質のやり取りや、細胞の内や外の様子に依存した物質の輸送が行われています。チャネルを介さないがエンドサイトーシスなどのような形態に依存した輸送もあります。チャネルや各種受容体は細胞表面（膜）に細胞内小胞と細胞膜の融合というかたちで輸送されたり、細胞膜の分裂、小胞形成というかたちで細胞表面から取り込まれていると考えられています。このように膜輸送は、細胞膜の形態制

御と密接に関わっています。しかしながら、具体的な分子的つながりについては全くといっていいほど明らかではありません。いくつかのチャネルや受容体が、細胞膜の裏打ちタンパク質であるスペクトリンやERMファミリータンパク質を介して、細胞骨

格とつながっていることが、わかって来ています。本特定領域では、細胞形態や細胞膜(脂質二重膜)の制御とチャネルやチャネル結合タンパク質の関係にアプローチすることを考えています。



## 京都大学 再生医科学研究所 ナノバイオプロセス研究領域

教授 楠見 明弘

### 1分子ナノバイオテクノロジー 1分子ナノ再生医工学の開拓

私たちは、生きている細胞のナノワールドで、細胞膜上の受容体やシグナル分子を1個ずつ、直接に見たり、引っ張って動かしたりしています。それによって、細胞のシグナル伝達系がシステムとしてどのような機構で働くのか、神経回路網はどのようにして形成されるのか、などの「作動機構」について、本質的な理解に到達したいと考えています。つまり、生物が進化によって獲得してきた、シグナル系や細胞の社会の働き方の「基本的／一般的な戦略」をナノシステムの観点から理解し、ナノ再生医学に応用したいと考えています。

### ナノワールド探索法の開発 1分子を見て動かす

生きている細胞の中で、細胞膜上の受容体やシグナル分子を1個ずつ、直接に見たり、光ピンセットでつまんで動かしたりする技術を開発しています。また、分子間で働く力や、分子を使ってできる構造の構築と力学を理解し、「ナノメートル世界での分子物理を構築する」のも、私たちの重要な研究目的です。



図1 1分子操作装置の例と、研究の概念

### 細胞内のシグナル機構を解く

細胞外からシグナルが来ると、多数の細胞内分子が、急速に、協同的に、シグナル複合体を作ることがわかりました。さらに興味深いことに、この複合体は、1秒以内に分解される、つまり、細胞のシグナルはパルス的で、デジタル式のシグナリングをやっているようです。このような発見は、普通の多数分子観察では不可能で、1分子観察の独壇場です。

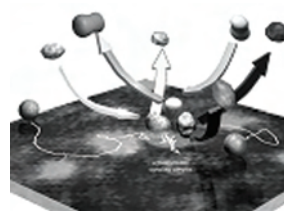


図2 シグナル伝達の図。実際に得られた1分子追跡画像に、様々な分子が集積するモデル図を重ね合わせたもの。

### 細胞膜の理解に、パラダイムシフトを起こす

細胞膜は2次元の液体なのですが、細胞膜には仕切りが入っており、コンパートメントにわかれていることがわかってきました。仕切りはアクチンタンパク質からなる膜骨格が形成しています。このような仕切りのために、シグナル分子複合体が形成されると、そこでシグナルの閉じ込めが起こることも分かってきました。

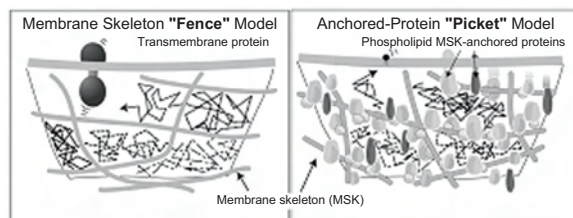


図3 フェンスモデル・ピケットモデル

### 生体ナノシステムにもとづく医工学

生体ナノシステムの理解(ナノバイオロジーとも呼びます)を、将来の医療、たとえば、ナノ再生医学、ナノ医療につなげていく予定です。

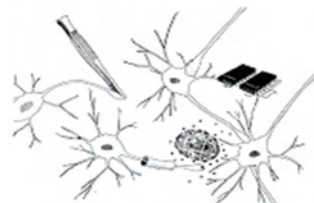


図4 神経回路網の再形成の概念図

## A03班 「トランスポートソームの生理機能とその破綻による病態に関する研究」



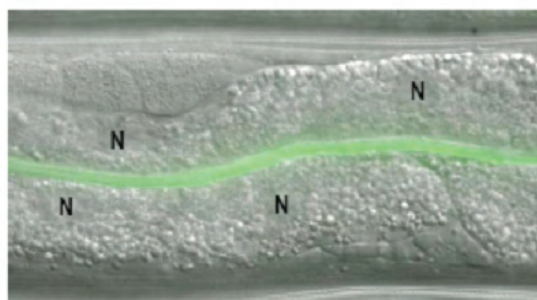
### 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 発生再生生物学分野

教授 仁科 博史

私たちの研究グループは、本特定領域研究の一部である「トランスポートソームの局在制御」を、Gタンパク質やMAPキナーゼシグナル分子の観点から解明することを目的としています。これまでに、小胞輸送に介在する低分子量G蛋白質Rab5とその相互作用分子に関わる解析を進め、Rab5結合分子としてRIN2とRIN3を新たに同定しました。RINファミリーにはRab5を活性化するグアニンヌクレオチド交換(GEF)作用があり、さらにSH2ドメイン、Proに富む配列やRas結合ドメインなどの多くの機能領域が存在します。RINのPro配列には、ダイナミンを細胞膜近辺に集積してクラスリン被覆小胞の陥入に関わるアンフィフィシニンIIが、一方のRas結合領域には、種々のRasメンバーが結合します。すなわち、Rab5-RIN-アンフィフィシニンII間の相互作用は小胞陥入から初期エンドソームへの輸送経路で機能し、RINファミリーが様々な細胞外シグナルを受容するプラットフォーム(足場)の役割を果たす可能性を見出しました。さらに私どもは、新規低分子量G蛋白質を多数同定しました。既に、Rasグループに属しながらGTP結合型のコンホメーションを好む生化学的性状のDi-Ras, RRP22, Rheb, さらに系統樹上全く別種の低分子量G蛋白質サブファミリーを形成すると考えられるGieなどについて解析を進め、いくつか輸送担体の制御に介在するという予備的な知見を得ています。例えば、Rhebの一種は、細胞内において主にGTP結合型で存在し、ヒト脳のグリア細胞等に特異的な発現パターンを示すが、Rhebを動物細胞に過剰発現すると多層の膜構造をもつ巨大な小胞が形成されます。Rhebは栄養状態を感知して細胞の成長や蛋白質合成を促進するmTOR経路の上流に位置すること見出されており、Rhebの不活性化因子(GAP)であるTsc1は、精神遅滞やてんかんを誘発するヒト結節硬化症の原因遺伝子でもあります。さらにTsc1の欠失した(Rhebが活性化状態にあると考えられる)グリア細胞では、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の取込み低下が観察されます。これらの知見は、Rhebがアミノ酸トランスポーターの内在化を制御して神経細胞の保護に寄与することを示唆しています。以上の研究成果は、助手・助教授の8年間お世話になった東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室の堅田利明教授の研究室で行われたものであり、現在も梶保博昭助手を中心とした仲間たちと共同研究として継続・展開しています。

最初のNews letterということで、次に私個人の自己紹介をさせていただきます。細胞レベルの生命現象しか扱ったことのない私は、10年前の留学を機にノックアウトマウスを用いた

個体レベルの研究も開始しました。外部環境の変動にตอบสนองする仕組みを生物は、進化の過程を通じて生存に必須の機構として獲得してきたと考えられます。紫外線によるDNA損傷に対処する修復機構、ウイルスや細菌感染から個体を防御する免疫系、心理的あるいは生理的刺激に対するホルモンによる個体の恒常性を維持する内分泌系などがあげられます。これらストレス応答機構がどのような細胞内シグナル伝達を介して機能するかは不明の点が多く、私は様々なストレスにตอบสนองし活性化するSAPK/JNKシグナル伝達系がこの機能発現の一端を担うと考え、その活性化機構や生理的役割に関する研究をノックアウトマウスの作出を通して行なってきました。トータルノックアウトマウスでは、「空洞化した肝臓」しか形成されないことを見つけ、胎仔肝特異的モノクローナル抗体の作製を通じて、本シグナル系が胚芽細胞の増殖・生存を制御していることを明らかにしました。また数年前から肝形成および肝機能不全変異体を単離するために、小型魚類のメダカやゼブラフィッシュもモデル生物に加えることとなりました。母体内で発生・成長するマウスとは異なり、体外で発生・成長し、しかも透明な小型魚類は「個体レベルで分子の動きを見る」ことが可能な実験系だと考えられます。私は、2005年1月1日付けで東京医科歯科大学難治疾患研究所・発生再生生物学分野の教授として研究室を主催することになりました。できたての研究室です。新天地ではこれまでの研究に加えて、小型魚類を利用して「トランスポートソーム」を個体レベルで可視化することを考えています。水槽を眺めながら、研究もできてしまうなんて素敵だと思いませんか？



腸管細胞の管腔側に発現する  
ABCTransporter PGT-1



## 自然科学研究機構 生理学研究所 脳機能計測センター

助教授 根本 知己

トランスポートソーム小胞輸送における膜融合機能の多光子励起過程を用いた可視化解析というテーマで参加させていただきました根本知己と申します。本年1月1日より5年間、生理学研究所・脳機能計測センター・生体情報解析室・助教授を拝命いたしました。旧所属の生理学研究所・細胞器官研究系・生体膜研究部門(河西春郎教授、現・東大医疾患生命工学センター)に在籍しておりました際には、皆様には大変お世話になりました。

さて、2光子・多光子励起過程を用いた蛍光顕微鏡(以下、2光子顕微鏡)は、特に神経科学の分野において最近非常に多く用いられてきており、スパイン形態の研究は2光子顕微鏡によって加速されたといえます。その理由は、例えば、スライス標本の表層の神経細胞のみならず、生きたまま脳深部にある神経細胞の形態やその変化を断層像として取得できるというような、優れた深部断層性にあります。このような組織透過性の他にも多くの細胞活動の機能解析に適した特徴が2光子顕微鏡にあり、その適応対象も様々な組織や細胞種における細胞内膜系の動態や細胞運動等の機能の解析へと、着実に広がっています。この8年間、河西先生のご指導を賜りつつ、実際の生きた細胞そのもののイメージング機器改良を含む多くの試行錯誤を重ね、多光子励起過程現象を用いた顕微鏡法の構築や運用技術の開発、確立を行って参りました。最初に組織的構造を保持した膵臓外分泌腺・腺房標本に適用し、定量的な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 分布や開口放出の可視化解析を確立いたしました。この消化酵素を製造するペルトコンベア工場ともいべき膵臓外分泌腺における $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の開口放出の研究が新しい細胞機能や考え方や応用可能な技術のノウハウをもたらしたと考えております。

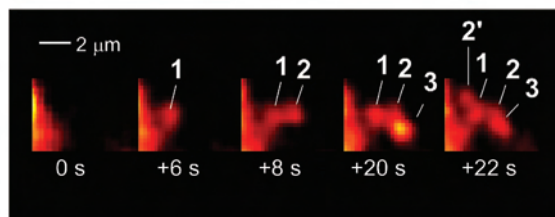
近年の光学顕微鏡の展開について概観するならば、大別して2つの方向性が存在します。第一に、「見えるべきものをより良く見る」という高時空分解能化であり、光学顕微鏡の場合、それはしばしば断層化を意味します。この二十一年間で、この方向性で最大の貢献をした技術が共焦点光学系による蛍光顕微鏡の分解能の向上であることは疑うべきもないものの、いくつかの限界もまた明らかになってきました。最近では、多光子励起、第2高調波発生(SHG)、誘導放出抑制(STED)などの非線型な光学過程を用いた顕微鏡法の技術開発が進展し、時空間分解能や観察対象の限界へと、挑戦がなされています。またもう一つの方向性は、光子の吸収・放出を介さない分子的過程を可視化する、いわば「見えないものを見る」というものです。分子間の距離を可視化する蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)や分子の振動状態を可視化するコヒーレントアンチストークスラマン顕微鏡(CARS)は典型的な例でありましょう。このような中で、2光子顕微鏡は、インタクトに近い組織的標本の深部断層像を、

高い空間分解能で長時間にわたり取得でき、細胞機能解析に適したものの1つであり、加えて、生体組織中でフェムトリットル以下の超微小領域に局限して光化学反応を誘起することが可能という特徴も持ちます。

私は、先のベクトル輸送特定班やJSTさきがけ研究21に参加させていただき、多光子励起過程固有の特徴を生かし、逐次開口放出の立証、バキュオール型開口放出の発見、融合細孔径、輸送小胞径のナノメータオーダーでのダイナミクスの解析といった研究を行って参りました。また、細胞表面のチャネル、受容体機能のマッピング法、多光子励起蛍光寿命イメージング法なども確立しております。これにより開口放出の際の膜融合装置と考えられているSNAREタンパク質の動態や細胞骨格系の関与、さらに急性肺炎、アレルギー性鼻炎などの関係も次第に明らかになりつつあります。

このような今まで築き上げてきた多光子励起法の様々なノウハウを展開させ、トランスポートソーム研究へ繋げていくことが本特定班に参加させていただいた研究テーマの遂行には要となってきます。しかし、自分では、多光子励起用の超短光パルスレーザーを所有しておりませんので、河西研の時のようなわけには参りません。そのため、今後の研究計画の遂行が大変心配ではあったのですが、生理学研究所における当面の任務として、岡田泰伸先生、鍋倉淳一先生から顕微鏡をお預かりし共同利用拠点としての2光子顕微鏡室を立ち上げることとなりました。これらの顕微鏡を貸していただきながら、継続していきたいと思えます。また、特定班内の研究連携という意味では、共同利用施設としての2光子顕微鏡室を利用していただくことは、生理学研究所の使命とも合致しております。また、イメージングに関する知識という形で、皆様の研究にご協力できる点も多少はあるかと存じます。

若輩者ではございますが、今後ともご指導ご鞭撻賜りますよう、こころよりお願い申し上げます。



膵外分泌細胞の「逐次開口放出」機構  
*Nature. Cell. Biol.* (2001)



## 徳島大学・大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 分子栄養学分野

教授 宮本 賢一

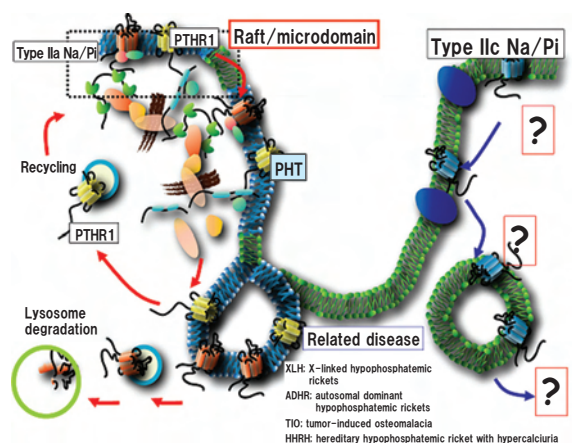
### 無機リン酸トランスポートソームの 機能制御とその破綻

我々のグループは、栄養学を背景として、現代人の食事バランス、とくにカルシウム／リンバランスに注目し、無機リン酸（以下リン）の分子栄養学的な研究を行っている。無機リン酸（リン）は、地球上の最も豊富な元素の一つで、様々な食品に含まれている。一方でリンは、生体の基本的構成成分として骨や軟組織などの、また、細胞膜や核酸成分としてすべての細胞に存在する。生体リンバランスの異常は、腎不全や透析患者に見られる高リン血症に反映されるように、血管石灰化などの様々な異常を呈する。とくに、糖尿病の増加に伴い糖尿病性腎症患者が増加し、その結果、慢性腎不全や透析患者が増大している。これらの患者に見られる高リン血症は、リンが血液透析でも十分除去することができない為、リン代謝異常は栄養学分野の重要な研究課題である。

これまで、生体リン調節機構は、カルシウム代謝の付随的な作用として理解され、独自の調節機構が存在するとは考えられていなかった。しかし、近年、リン代謝に異常をきたす多くの遺伝性疾患の病因解明により、カルシウム代謝とは異なるリン代謝独自の調節系の存在が示唆された。つまり、リン調節は、カルシウム／リン代謝、エネルギー代謝や食欲調節に関与する様々な新規ホルモンを介して、細胞膜上に存在するリントランスポーターの機能変化やその細胞内局在を変化させ、細胞内外のリン恒常性を維持しているものと推察される。これらの因子は、プロテアーゼであるPHEX、ホルモンとしてのFGF23、MEPE、FRP4およびklothoなどであり、骨代謝と腎機能を結び新しいリン代謝系と考えられる。一方で、これらリンホルモンの標的分子の一つは、腎近位尿細管に局在するリントランスポーター（NaPi）である。事実、NaPiノックアウトマウスでは、生体リンプールが枯渇し、リン制限食摂取と同じ病態を呈する。一方で、NaPiはカルシウム調節系やエネルギー代謝と密接にリンクしながら厳密なホルモン調節を受けている。NaPiは、恒常型のtype IIaと誘導型のtype IIcが存在する。これらは、細胞膜上でPDZ蛋白などと相互作用し、副甲状腺ホルモン（PTH）受容体などの信号を受ける事が可能な蛋白複合体を形成している可能性が推察される。

特定研究班研究では、リントランスポーターをモデルとして①トランスポートソームの構成成分の同定、②トランスポートソームの構造とカベオラなどの細胞内局在との関係、③PTHをはじめとする各種ホルモンによる活性調節とトランスポートソームとの関係、④トランスポートソームの破綻とリン代

謝異常症との関係を解明することを目的とする。このように、リン代謝において腎尿細管リントランスポートソームは、その中心的役割を演じており、本プロジェクトの推進は、リンの栄養学的諸問題や各種リン代謝異常症の解明につながるものと考えられる。



### 腎近位尿細管における リントランスポートソームの調節機構

リントランスポートソームは、NaPi(type IIaおよびtype IIc)を中心に構成される。PTHは、PTHrPを介してNaPiの迅速な局在化を制する。各種低リン酸症(XLH, ADHR, HHRH)では、NaPiの低下によりリン再吸収能の抑制が見られる。





## 東京大学医学部附属病院 薬剤部研究室

教授 鈴木 洋史

### 薬剤部研究室の構成

薬剤部研究室は本郷にある東京大学医学部附属病院の一角、管理研究棟の4階にあります。管理研究棟は旧外来棟として使われていたもので、非常に歴史のある重厚な建物です。鈴木が薬剤部教授として2004年6月就任してからまだ年月が浅いこともあり、ここ1年余は教室スタッフの補充、研究室の整備、新人学生の初期教育に充てて参りました。従来薬剤部研究室で行われてきた研究は、薬物代謝酵素の遺伝子多型判定と薬物動態変動の解析が中心であり、いわゆる分子生物学用の実験設備も技術も無い状況でした。就任直後より段階的に大腸菌、酵母培養用のP1スペース、細胞培養用のP2スペースの増設等を行い、周囲のご協力、特に本特定領域研究班の皆様のご支援等によりようやくハード面のセットアップも一段落しつつあります。研究室の構成員としてはスタッフ6名、学生は平成18年度の段階で、東京大学大学院薬学系研究科の修士2年4名、修士1年5名、東京大学薬学部4年生4名で、全体では19名です。薬学部4年生の研究室配属、並びに他大学からの大学院進学希望者など多くの希望者があり、実際にここ数年は新人が4~5人づつ増えている状況です。限られた研究スペースのため段々と手狭になってきているのが今後の問題ですが、その分皆の顔が見渡せて気楽に議論が始まる環境にあり、日々サイエンスに対して厳しい態度を持ちながらも人間関係は和気あいあいとした雰囲気の中で日夜研究に励んでいます。

研究室スタッフ6名のうち鈴木、伊藤、本間、高田の4名は東京大学薬学部の分子薬物動態学教室(杉山雄一教授)出身であり、薬物の体内動態研究、特に薬物輸送体の単離と機能解析、in vitro機能発現系とin vivoにおける機能との間の定量的評価に関する研究を共通の研究背景として持ち合わせております。これら定量的なin vitroからin vivoへの積み上げ研究を行ってきた経験から、どうしても輸送体単独の機能から細胞系、更には個体への外挿に当たってはうまく合わないこともしばしばであり、この分野は今後解決するべき問題が多く残されております。薬学部在籍の頃より肝臓の、特に胆汁排泄側の輸送体の遺伝子単離、機能解析を中心に進めて来ましたが、各輸送体を培養細胞中で単独のものとして評価しても真の生理的な活性を反映してない可能性があり、よりin vivoでの存在状態に近い、例えば膜脂質組成並びに近傍で機能や局在を制御する何らかの補助因子も考慮する必要があるだろうという疑問を持ち続けておりました。そうした折、トランスポートソーム、すなわち輸送体を内包する輸送機能複合体という概念が本特定領域研究として立ち上がった経緯があります。

### 現在の研究テーマ

本特定領域に関連した現在進行中のテーマは、胆汁排泄輸送体群、消化管における脂質輸送蛋白質の活性、局在を制御する因子群の探索とそれらにより構成されるトランスポートソーム機能ユニットの全容解明であり、当面はトランスポートソームの基礎的な理解を行う予定です。将来的には機能ユニットの構造と制御の破綻による先天性/後天性疾患との関連、およびこれら知見に基づく新規な治療法への展開を目指しています。具体的には、肝臓では胆管側膜に発現する有機アニオン性化合物の排泄輸送体ABCC2/MRP2、胆汁酸の排泄輸送体ABCC11/BSEP、リン脂質のフリッパーゼであるABCB4/MDR3、コレステロールの排泄輸送体ABCG5/G8に、消化管ではコレステロール吸収に関与すると考えられるNPC1L1に着目したトランスポートソーム研究を進めています。MRP2はDubin-Johnson症候群、BSEPは進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型(PFIC2)、MDR3はPFIC3、ABCG5/G8は家族性シトステロール血症の原因遺伝子としてそれぞれ医学的に重要な意義を有する輸送体です。特にMRP2、BSEPは一部の薬剤により或いは炎症時に速やかに内在化し、その結果として胆汁うっ滞が誘発されること、またMRP2、BSEP、MDR3がそれぞれゲニピン、ウルソデオキシコール酸、フィブラート系薬剤によって胆管側膜への移行が促進し、機能的な活性上昇が見られることが示されて参りましたが、分子メカニズムがほとんど未解明です。特にこれら輸送体の膜からの内在化、膜への移行促進メカニズムに関して、輸送体の会合因子とそれを取り巻くシグナル伝達因子の研究を進めています。一方で消化管のNPC1L1は比較的新しく同定がなされた蛋白質で、その機能、局在に関する情報も乏しいのが現状です。消化管でのコレステロール吸収を阻害する高コレステロール血症治療薬ezetimibeの薬効標的として注目されている蛋白質ですが、我々は現在NPC1L1の発現系作製、機能解析を進めつつあり、同時に会合因子の探索も並行して進めています。NPC1L1の膜貫通部位にはHMG-CoA還元酵素やSREBPファミリーが共通して有するステロール感受性ドメイン(SSD)があることから、膜内のコレステロール濃度を感知して結合-解離の制御される未知の因子が存在する可能性を考えています。

### 終わりに

鈴木新体制のもと薬剤部での研究がスタートして間もないため、班員の皆様にはいろいろとご教示いただくことも多いか

と思います。これからもどうぞ宜しくお願い致します。また、土地柄、班会議、公開シンポジウム、その他会合で本郷周辺に

らっしゃる機会もあるかと思います。その際は是非とも薬剤部研究室にお立ち寄り頂けるようお願いしております。



## 東北大学・大学院薬学研究科 薬物送達学分野

教授 寺崎 哲也

特定の組織には関門機構が存在し、血液中から組織への薬物の分布を制限している。脳は最も厳密な関門機構（血液脳関門及び血液脳脊髄液関門）を持つ組織である。脳関門は、薬物の脳への移行を防ぐだけでなく、様々な輸送系を発現することによって脳と血液間の選択的な物質交換を積極的に行っている。我々は、脳関門における輸送系とその分子機構を解明することによって、有効な脳へのデリバリーと脳疾患の発症・進行における脳関門輸送機構の関与と重要性を明らかにし、新たな治療薬や治療法への道を開くことを目指している。

血液脳関門には、従来、グルコースなどの栄養物質を脳へ供給する供給輸送系、及び、脳へ進入する薬物を血液側へと排出する薬物排出輸送系が存在することが報告されていた。我々は、これら輸送系に加えて、血液脳関門は脳内で産生・蓄積する代謝物や毒物を脳外へ排出する必要があると考え、新たに脳関門における排出輸送を「中枢解毒機構」として解析を行っている。脳関門排出輸送を解明するために、我々は新たな手法を開発導入した。一つは、in vivoにおいて脳関門を介した排出輸送の速度や阻害剤感受性を解析することができるBrain Efflux Index法である。本方法は、脳内に放射標識化合物をマイクロインジェクションし、一定時間後の脳内残存率を計測する方法である。もう一つは、in vitroにおける様々な分子生物学的手法を活用するための、条件的不活化脳毛細血管内皮細胞の樹立と利用である。本細胞は、東北大加齢研・帯刀教授らにより作成された温度感受性SV40 T抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス・ラットより樹立され、in vivo血液脳関門の輸送機能と輸送活性をよく保持している細胞であり、血液脳関門の輸送担体の同定だけでなくその制御の解明に非常に有用なツールである。これらの系を使うことによって、我々は、血液脳関門に神経伝達物質とその代謝物、神経制御物質、興奮性アミノ酸、脳内ステロイド代謝物等の排出輸送系が存在し、それら排出輸送に関わる分子を同定した。また、同時に、新たな供給輸送系としてエネルギー貯蔵物質であるクレアチンの供給輸送系の存在と関与分子を同定した。これらの知見から、我々は、血液脳関門輸送系は「中枢維持・防御システム」として機能していると考え、さらなる解析を行っている。

以上の解析過程において、血液脳関門輸送系が中枢疾患の病態形成に関わっている可能性が考えられた。血液脳関門輸送

系が「中枢維持・防御システム」として機能するのであれば、血液脳関門輸送系の異常によって中枢機能に異常が生じるはずである。また、中枢疾患時には、中枢機能を正常に保つため、血液脳関門輸送系が制御を受け、積極的に中枢を維持・防御すると思われる。不活化細胞株を用いた脳関門輸送系の制御機構から後者の機構が示唆されている。神経保護作用を発揮するタウリンの輸送系の脳毛細血管内皮細胞における発現と機能は、TNF- $\alpha$ によって制御を受ける。浸透圧制御因子である小型中性アミノ酸の輸送系の脳毛細血管内皮細胞における発現と機能は、浸透圧によって制御を受け、脳浮腫時などに機能していると思われる。また、脳毛細血管内皮細胞におけるシスチン/グルタミン酸交換輸送系は、酸化ストレスによって誘導される。この誘導によってグルタチオンの前駆体であるシスチンが脳に供給され、酸化ストレスに対する防御機構として機能していると思われる。

現在、我々は血液脳関門輸送系と中枢疾患との関係をさらに解析するために、アルツハイマー病に注目している。アミロイド $\beta$ 蛋白が脳内に蓄積することがアルツハイマー病の進行に深く関わっていると考えられている。我々も含めた複数の研究室が血液脳関門にアミロイド $\beta$ 排出輸送系が存在し、アミロイド $\beta$ の脳からの消失機構の一つとして働いていることを報告している。我々は、さらに血液脳脊髄液関門を介したアミロイド $\beta$ 排出輸送系の解析を進行している。アミロイド $\beta$ 排出輸送には受容体を含む複数の分子が関わるトランスポートソームが重要な役割を果たしているのではないかと我々は考えている。また、アルツハイマー病と脳内コレステロールの恒常性は深く関わっている。我々は、コレステロール輸送に関わる輸送担体の解析を行い、複数のコレステロール輸送担体が脳関門に発現、機能していることを明らかにしている。さらに、中枢のコレステロールは24-水酸化体に変換され、脳内から消失する。我々は、この24-水酸化体が初めて脳関門の輸送系によって脳から血中に排出することを明らかにした。これら輸送系が協調して働くことによって脳関門輸送系が中枢のコレステロールの恒常性維持に重要な役割を果たしていると思われる。

トランスポートソームを構成する分子を明らかにするために、プロテオミクスが重要な手法であるが、膜蛋白への応用は遅れている。我々は、現在、この点に関してもLC-MS/MSを用

いた新たな手法の開発を試みている。本特定領域において、血液脳関門トランスポートソームの生理的役割の解明だけではな

く、膜プロテオミクスの技術においても、他研究班との技術における協力によって貢献できると考えている。



## 東京医科歯科大学・大学院 腎臓内科学

助教授 内田 信一

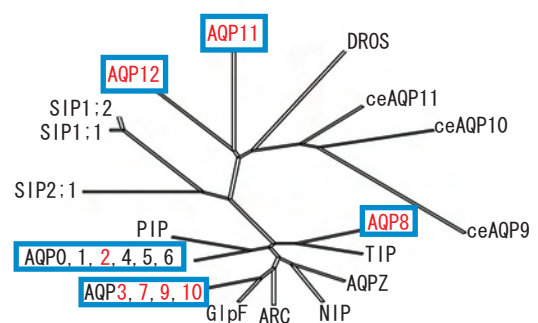
腎臓は体液恒常性を司る重要な臓器であり、このことは水、各種イオンが尿細管各部位において特別な輸送能を持つ輸送体蛋白により、巧みな制御を受けて輸送される事で実現されている。我々は世界に先駆けて、腎臓の水チャンネルAQP2 (Nature 1993)、クロライドチャンネルClC-K1 (JBC 1993) を分子クローニングし、AQP, ClC遺伝子ファミリーを明らかにしてきた。各々の分子の機能解析を進める一方、分子から生体に戻りノックアウトマウス作成(Nature Genet 1999)、ヒト遺伝疾患の解析を通じて、各々の輸送体が細胞内・生体内でどのような役割を担っているのかを明らかにしてきた。さらに最近では病気を引き起こす変異体の機能解析を、培養細胞系さらにはノックインマウスの作成を通して行うことで、真の病態の理解を深め、それに対する治療戦略を生体(マウス)で直接検証することが可能となってきた。

以下に具体的な研究の概要を、最近の事例を呈示することで紹介する。

我々はAQP2水チャンネルの変異により優性遺伝形式の腎性尿崩症が引き起こされることを発見し、その変異分子の機能解析や細胞内局在をXenopus oocytesやMDCK細胞における強制発現系にて検討してきた。しかしながら、優性遺伝形式の病態解析はdominant negative効果を変異体たんに証明する必要がある。特に4量体を形成するAQPの場合、野生型と変異型の発現比は重要な問題であり、培養細胞系で変異体を過剰発現させて見えた効果が、はたして生体内の1対1アレルの発現で効果を持ち、症状発現の原因であるかどうかは明らかでなかった。我々は、この点を克服するには、ヒト患者と全く同じ変異を有するモデルマウスであるノックインマウスの作成が不可欠と考え、変異マウスを作成し、それを材料として使用した真の病態解析、治療法のスクリーニング、さらには病態を引き起こすAQP2関連蛋白の単離の為に材料として使用している。

マウスを作成した結果明らかになった事は、変異型AQP2が基底側ないし細胞内にとどまるミスソーティングをおこし、本来apical側にソーティングされるべき野生型AQP2が4量体結合のため変異型に引きずられapical側に動けないことが病態の本質であること、また、その際理論的にも1/16の確率で

野生型のみで形成される4量体に残り、実際にも免疫染色でapical側に残るAQP2が確認され、このことが優性遺伝形式の尿崩症が、完全なloss-of-functionである劣性遺伝形式の尿崩症より症状が軽度であることと一致していた。また、このわずかな正常4量体をうまく働かせるべく、このマウスを用いて治療法を検討し、スクリーニングの結果有効な薬剤も発見され、トランスレーショナルリサーチの有効な武器としてもモデルマウスの作成は重要な成果と考えられた。また、このマウスを用いて変異体に in vivoで結合しミスソーティングを引き起こす蛋白の単離を現在進めており、培養細胞系での過剰発現系とは異なり、より意味のある蛋白複合体単離が行えることを期待している。



アクアポリンスーパーファミリー

## 編集後記

「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」ニュースレターを担当させていただいている、京都大学森研究室です。創刊号は如何だったでしょうか？

今後、当研究室修士学生が中心になり、ニュースレターを編集してまいります。「編集」は、普段の研究や実験とは違い、研究室としては今回初めての経験ばかりでした。就職活動の最中、まだ肌寒さが残るホームで、外国人旅行者に混じり、「のぞみ500系」の撮影に挑み、チャンピオンデータを要求される中、ロゴをデザインし、先生方の原稿整理のため、朝5時までパソコンに向かってくれた修士学生諸君の協力によって、自己満足ながら、創刊号にふさわしいニュースレターをお届けすることができたと思います。

ニュースレター編集期間中、3月25日に東京大学薬学部講堂で、公開シンポジウムが開催されました。厳しい質問が飛び交い、今後の先生方の研究のご発展が予想され、次回が大いに楽しみであると同時に、各研究室の研究成果も問われるという、厳しさ、激しさをも予感されます。次回は公募研究も加わった班会議が、今夏に開催の予定です。

さて、このように研究成果は無論の上、ニュースレターの出来も評価されることになった森研究室ですが、金井先生の下、特定領域研究発展のため努力して行きたいと思います。

今後、お気づきの点、ご不満な点がございましたら、どうぞご教授お願いいたします。

(文:え)

TRANSPORTSOME

創刊号(2006年4月発行)

編集人:森 泰生

発行人:金井 好克

発行所:特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」事務局

〒181-8611 東京都三鷹市新川16-20-2 杏林大学医学部薬理学教室内

Tel:0422-47-5511 (内線3451) 0422-79-1329(直通)

Fax:0422-79-1321

E-mail: [transportsome@kyorin-u.ac.jp](mailto:transportsome@kyorin-u.ac.jp)

Web: <http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/pharmaco/transportsome/top.html>

印刷:(有)レイ・プリンティング

