

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

Summer
Autumn
2006

膜輸送分子複合体と生体膜

目次

公募班を迎えて	領域代表 金井 好克	2
A01班の研究について	A01班統括 森 泰生	2
A01班公募研究班員の研究紹介		3
神谷 温之・小倉 武彦・楠原 洋之・広瀬 茂久・大塚 稔久 赤塚 結子・横井 峰人・王子田 彰夫・金澤 浩・児島 長次郎 大塚 正人・吉浦 孝一郎・山崎 純・久保 義弘・岩崎 広英 若林 繁夫・後藤 聡		
トランスポートソームの関連する話題 1		
タンパク質による生体膜の形態制御機構	末次 志郎	20
トランスポートソームの関連する話題 2		
生体膜におけるリン脂質分子の動態とその制御タンパク質	梅田 真郷	23
編集後記		27

表紙について

今回のニューズレターでは、末次先生と梅田先生より生体膜・リン脂質に関する最近のトピックスを解説いただきました。お忙しい中、本特定領域研究のために出筆いただきまして、心より御礼申し上げます。近年の研究発展で、生体膜やリン脂質のイメージが「静」から「動」へ益々加速している様子が実感していただけるものと思います。膜輸送複合体が集積・機能する“場”である生体膜やその構成成分であるリン脂質は、まさに緻密に演出されるドラマの「舞台」のイメージです。前回の表紙では、京都駅の新幹線とプラットホームでした。今回の表紙では、さらに京都らしく清水の舞台をアレンジさせていただきました。多少自覚しておりますので、“図案に凝る時間を研究の立案へでも廻せ”とお叱りはご遠慮願います。

公募班を迎えて

本特定領域研究「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、膜輸送研究が現在直面している「単一分子」からのアプローチの限界を克服し生体恒常性の分子的理解を一段階高めるために、輸送分子（イオンチャンネル、トランスポーター、ポンプ）を中心とする「分子複合体（トランスポートソーム）」を実証し、その生体膜輸送の機能ユニットとして位置付けを確立することを目的としています。具体的には、トランスポートソーム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明らかにする研究に取り組みます。本領域は、平成17年度に計画研究16班をもって立ち上がりましたが、本年度より公募研究36班が加わり、それぞれが独自の研究材料、研究手法を用いて、目的の達成に向けて研究を開始しています。

公募に際しては多くのご応募を頂き非常に厳しい競争となり、素晴らしい提案でありながら採択に至らなかった研究課題も多く、新たな展開をもって来年秋の次回公募にお願い致したいと思います。今回の公募においては、従来型の輸送分子研究の延長上にトランスポートソーム解析を開始しようとする提案が目立ちましたが、次回には、研究の進展に伴い、より直接的に複合体を捉えようとする方向性が明確となっていくものと期待します。また、新たな解析技術の開発を目指した研究や、本特定領域研究の後半で革新的な推進力となる可能性を秘めた萌芽的研究も有り、エキサイティングな研究が展開されるものと思います。個々の研究者の個性が活かされ、また情報交換・技術連携・共同研究等を通じた相乗効果により特定領域研究の利点が十分に活かされ、大きな成果をあげられることを期待いたします。

領域代表 金井 好克

A01班の研究について

本特定領域研究A01班においては、「トランスポートソームの構成と機能に関する研究」を展開します。膜輸送分子はscaffoldタンパク質を仲介として、局在・集積・活性制御に関与する分子群を包含する膜輸送複合体トランスポートソームを形成すると考えられます。そこで、まず、トランスポートソームの分子構成を明らかにし、それぞれの構成分子の機能を解明するという還元主義的なアプローチを採ります。さらに、「生物体」や「細胞」という全体の中における、トランスポートソームの意義付けを目指します。即ち、細胞生理・細胞生物学実験に相互作用ネットワークの *in silico* シミュレーション解析を組み合わせ、膜輸送機能の制御における複合体形成の機能的役割の探究も行います。従って、研究班員はそれぞれのトラン

スポートソーム研究や scaffold 研究分野での生化学、分子生物学、細胞生理学者と、コンピュータシミュレーション研究者により構成されることになります。計画班に加えて、今年度より本ニュースレターで紹介される公募班が加わりますので、是非とも領域内での有機的な共同研究を活発に進めていただき、優れた成果が得られることを期待致します。将来的には、本特定領域の中心であります上皮細胞系から出発し、「トランスポートソーム」が免疫系や神経系も包含するような大きな研究分野になるように発展していくと同時に、A01班の研究が次代の若手研究者の育成にもつながればと祈念してやみません。

A01班統括 森 泰生

AO1班公募研究班員の研究紹介



光不活性化法による グルタミン酸受容体トラフィックのリアルタイム解析

北海道大学大学院医学研究科 分子解剖学分野

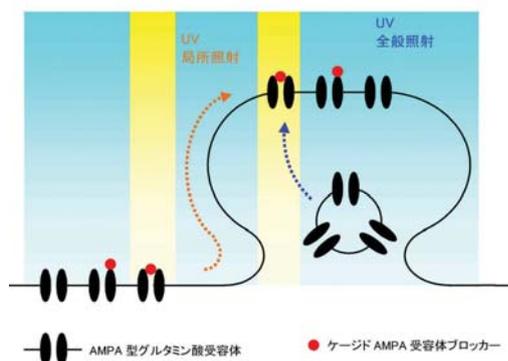
神谷 温之

柔らかな脳の仕組み、すなわち可塑性のメカニズムを理解したいという動機で神経生理学の世界に足を踏み入れてやがて20年になります。一昨年に北海道大学医学部に赴任して神経解剖学の教育を担当することになり、これまでと全く異なる角度から脳について学び直すことになりました。正直なところ、生理学者である私が解剖学を担当することになり、えらいことになったと思いましたが、学生時代以来およそ20年ぶりに「ヒトの脳」に触れ、あらためてその美しさにとりつかれています。医学生時代には幾何学模様にしが見えなかった脳の構造が、生理学者の視点から見直してみると、如何に精緻なデザインに従って創られているか、驚きの念を禁じえません。新たなフィールドに飛び込む際には多くのエネルギーを必要としますが、同時に大きな可能性を秘めていることを改めて感じた経験でした。新研究室では、これまでの研究スタイルに固執することなく、広い視点から柔軟に研究を進めていきたいと考えています。ようやく研究室も整備され、北大での研究結果もまともになりました。また、今年からグルタミン酸受容体研究の若手のトップサイエンティストである谷助手が研究に参加してくれています。このような中、研究班に参加させていただく機会をいただいたのは、まさしく絶好のタイミングでした。ぜひこの機を活かして、研究を新たな方向に進展させたいと願っています。

「光不活性化法によるグルタミン酸受容体トラフィックのリアルタイム解析」という今回の研究提案について簡単に紹介いたします。私たちのグループでは、脳の情報伝達を担う最重要分子であるグルタミン酸受容体に焦点をあてた研究を行っています。脳のほとんどの興奮性シナプスではAMPA型グルタミン酸受容体がシナプス伝達を担っていますが、このAMPA受容体のシナプス局在が極めて動的に制御されていることが明らかになり注目を集めています。代表的なシナプス可塑性である海馬シナプスの長期増強の誘導に伴い、細胞内プールやシナプス外

のAMPA受容体がシナプス直下に集積するという「AMPA受容体トラフィック仮説」は大きな話題を集め、様々な実験がこの仮説を支持しています。最も重要な実験結果として、培養スライスを用いた強制発現系でAMPA受容体サブユニット(GluR1~4)をGFPで標識し、GFP蛍光がシナプス活動に伴いシナプス部に集積することを示した研究があげられます。しかしながら、この実験では強制発現をした「外来性」のGFP標識AMPA受容体の挙動を観察しているため、本来の「内在性」AMPA受容体の動態を反映しているかは不明です。そこで、分子タグをつけていない native な内在性AMPA受容体のトラフィックについて検証しようというのが今回の私たちの研究提案です。このために、ごく最近開発された caged 化合物であるANQXの光分解実験を計画しています。内在性のAMPA受容体のシナプス発現はパッチクランプ法によりシナプス応答(EPSC)を測定してモニターします。上述したANQXは、代表的なAMPA受容体ブロッカーであるDNQXに光反応性の azido 基を導入した化合物であり、紫外線の照射によりAMPA受容体の阻害剤としての活性を示すようになる、いわゆる「caged AMPA受容体ブロッカー」として作用します。すなわち紫外線照射部位とタイミングを制御することで、時間的・空間的にコントロールされたAMPA受容体の機能阻害を行うことができます。この性質を利用して、局所的ないし全般的な光照射により細胞膜上のAMPA受容体をブロックし、応答が回復する時間経過を観察することで、細胞内プールから細胞膜上への移行過程や、シナプス外からシナプス直下への移行過程をリアルタイムで計測しようと計画しています。

今回の研究は、紫外線照射による uncaging 手法とパッチクランプ法を組み合わせ、受容体トラフィックの速度論的解析をしようというものです。この方向の視野にある研究展開として、「シナプス機能の光操作法」の開発を夢見ています。シナプスの分子機能解析にはノックアウトマウスを用いたアプローチが行われてきましたが、重要な機能分子を欠損させると致死となり、成体脳でのシナプス機能解析が困難であることがしばしばでした。そこで、次世代のアプローチとして、任意の分子を光照射で不活化する「光不活性化法」をシナプス研究に応用したいと考えています。私は根っからの電気生理学者ですので、電氣的測定の感度や時間解像度に絶大な魅力を感じてきました。しかしながら、この電気生理学という「gold standard」だけに執着せず、新たな手法を取り入れ、あるいは融合させて、シナプス研究のブレークスルーを目指したいと思っています。本研究班の諸先生方には、ご指導のほどどうぞよろしくお願い申し上げます。





細胞運動に関与するイオン輸送分子複合体の解析

千葉大学大学院医学研究科 病態制御治療学講座薬理学

小倉 武彦

私たちのグループは「細胞運動に関与するイオン輸送分子複合体の解析」という課題で、本領域に参加させていただくことになりました。私と研究分担者の中谷晴昭で研究を遂行いたします。

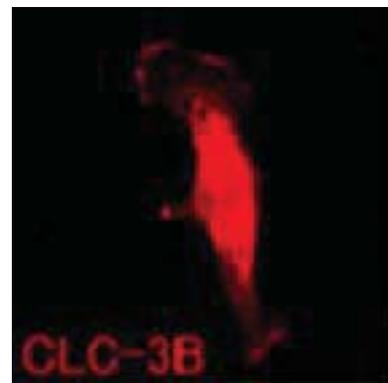
私たちは電位依存性Cl⁻チャンネルCIC-3 (CIC-3A) のスプライシングバリエーション、CIC-3Bを単離し、その機能解析を続けています。CIC-3Aは以前、培養細胞を用いた発現実験の結果から細胞膜上の細胞容積調節性Cl⁻チャンネルとして報告されましたが、現在ではノックアウトマウスの解析結果などからエンドソームの酸性化に関与する細胞内のCl⁻チャンネルと考えられています。CIC-3Bはスプライシングの違いからCIC-3Aと比べてC端のアミノ酸配列のみが異なっています。これまでの研究により、CIC-3BはCIC-3A同様ほとんどすべての細胞に発現していること、CICチャンネルファミリーの中で唯一PDZドメイン結合モチーフを有しており、PDZ蛋白であるEBP50と結合すること、CIC-3Bは単独で培養細胞に発現させると細胞内領域に分布するが、EBP50と共発現させると membrane ruffle (early pseudopod) あるいは pseudopod の leading edge に強く発現するようになること、同時にその領域の細胞膜に局限してCl⁻チャンネル活性が上昇することなどがわかりました。EBP50はMERM (merlin and ezrin/radixin/moesin) 蛋白を介してアクチンと結合することから、leading edge においてCIC-3B-EBP50-MERM 蛋白-アクチンという蛋白-蛋白結合が形成されていると予想されます。

pseudopod の leading edge は細胞が移動する際の先頭部分ですが、ここではアクチンの重合、MT1-MMPなどのメタロプロテアーゼによる細胞外基質あるいは膜蛋白の分解、インテグリンやCD44などの接着因子による細胞外基質への接着などの反応が協調して起こります。これまでの報告から、MT1-MMPとCD44の直接結合、CD44のMERM蛋白を介したアクチンフィラメントとの結合、MT1-MMPとインテグリンβ3鎖の結合などが明らかとなっており、これらの分子群が全体としてひとつの機能的蛋白複合体を形成していると考えられます。一方、細胞が組織内を遊走あるいは浸潤する際、その形態や容積がダイナミックに変化します。一般に、細胞容積の調節には細胞容積調節性のK⁺チャンネルあるいはCl⁻チャンネルなどが関与することが知られていますが、これらのチャンネルに対する阻害剤により癌細胞の遊走が抑制されるという報告があります。また、細胞容積調節性Cl⁻チャンネルの制御蛋白として知られるP-Glycoprotein とCD44との結合が癌細胞の浸潤能にとって重要であることを示す報告もあります。これらのことから、細胞の移動においてイオンチャンネルを介した細胞容積の調節機構もまた重要な役割を担っていることが示唆されるとともに、これらのイオンチャンネルの活性制御機構が細胞骨格系や接着因

子系からのシグナルとクロストークする必要があることも予測されます。

私たちは、CIC-3BがEBP50と結合することにより leading edge に発現し、MERM 蛋白やアクチン、さらにはMT1-MMP、CD44、インテグリンなども蛋白複合体を形成する可能性があること、EBP50が pseudopod 形成に必要であるとする報告があることなどから、CIC-3Bが細胞運動における細胞容積調節性Cl⁻チャンネルとして機能するとすれば都合が良いのではないかと単純に考えました。予備実験として、HeLa細胞にCIC-3Bを過剰発現させ、transwellを用いたtransmigration assay を行なったところ、CIC-3Bを過剰発現させた細胞では対照の細胞に比べて transwell を通過する細胞の数が増加していました。Jurkat 細胞を用いた実験でも同様の結果が得られました。また、Matrigelを用いたinvasion assayでも、CIC-3Bを過剰発現させたHeLa細胞では対照の細胞に比べて浸潤能が亢進していました。これらの結果から、CIC-3Bが細胞容積を調節しているか否かは別として、少なくともその活性が細胞の運動に影響を与える因子であると考えられます。そこで本研究課題では、CIC-3Bを含むイオン輸送複合体が、細胞運動の過程の中で時間的空間的にどこに位置するのかを解析し、その制御機構を解明したいと思っています。

今回、多彩な分野の、様々なアプローチ方法をお持ちの先生方がお集まりになる本領域に参加させていただくことになり、幸いに思っております。今後、いろいろご教示いただくことも多いと存じますが、よろしく願いたします。



CIC-3Bの細胞内局在
CIC-3Bは、EBP50と結合することにより membrane ruffle や pseudopod の leading edge に発現する。



トランスポーターの機能制御による医薬品体内動態の制御

東京大学 大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室

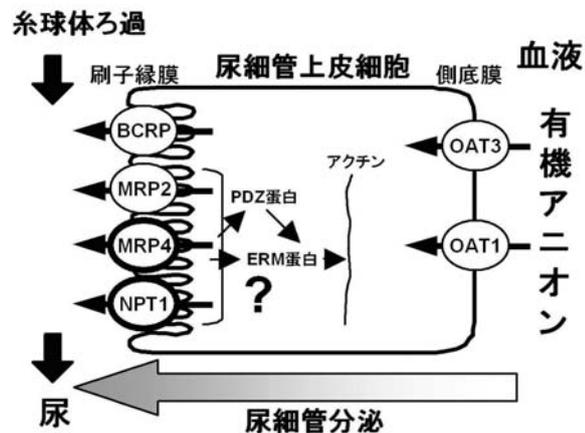
楠原 洋之

医薬品の薬効発現には、薬理メカニズムのほか、薬効標的臓器への暴露量や暴露時間を決定づける体内動態も重要な要因となる。生体内における主要な医薬品の排泄臓器は肝臓や腎臓であり、肝臓では胆汁排泄により、腎臓では近位尿細管における尿細管分泌により、血液から胆汁、尿への排泄が行われる。この上皮細胞を介した経細胞輸送は、基質選択性の重複したトランスポーターが非対称的に分布することで、効率的な方向性輸送（バクトル輸送）が達成されている。分子内に負電荷を有する化合物群（有機アニオン）の場合、肝胆系輸送では取り込み過程にOATP1B1/1B3による二次性能動輸送が、胆管側膜における排出過程ではMRP2他、複数のABCTランスポーターによる一次性能動輸送が関与していることが明らかにされている。これに対して、腎近位尿細管における分泌過程では、側底膜における取り込み過程ではOAT1/OAT3が同定されており、両トランスポーターにより広く有機アニオンの取り込みを説明できることが報告されているものの、刷子縁膜における排泄側ではABCTランスポーターMRP2、BCRP（マウス腎のみ）、MRP4やCl⁻との交換輸送、あるいは膜電位依存型輸送を行うNPT1が発現していることが報告されているにとどまり、これらトランスポーターが医薬品の分泌過程に関与していることを積極的に支持する結果は得られていない。β-lactam系抗生物質や抗ウィルス薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬やHMG-CoA還元酵素阻害剤の一部は腎排泄型の薬剤であり、その血中動態はもとより、医薬品のクリアランスメカニズムの肝腎振り分けや、薬物間相互作用メカニズムの解析、腎クリアランスの個人差の遺伝的要因などを考える上で刷子縁膜側の排出メカニズムの解明は重要である。

MRP2は肝胆管側膜にも局在し主に脂溶性の高い両親媒性の有機アニオンの分泌に働くこと、BCRPは一部の化合物の尿細管分泌に関与しているが、ヒト腎臓での発現はみられないことから、本研究では、MRP4とNPT1に焦点をあて、これらのトランスポーターが医薬品の腎排泄機構を構成するトランスポートソームの構成蛋白として働く可能性を検討することを目的とした。MRP4とNPT1はともに、腎有機アニオン輸送機構の解析に用いられてきた典型的な化合物p-アミノ馬尿酸ほか、非常に広範な化合物群を基質とする。排泄側の解析に用いられてきた腎刷子縁膜小胞は大部分が right side の配向性をとり、細胞質側にヌクレオチド結合ドメイン(ATP binding cassette)を持つABCTランスポーターの機能解析に適さないこと、また輸送駆動力の有無によりトランスポーターの寄与率が影響を受けること、排出側のみを選択的にする特異的な阻害剤が確立されていないことから、遺伝子ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験を計画した。MRP4ノックアウトマウスは Dr. Schuetz により作出されたマウスであり、生理的パラメー

ターの異常は報告されていない。血液脳脊髄液関門（脈絡叢）ではMRP4の欠損に伴う排出能力の低下により、抗がん剤 topotecan の脳脊髄液中濃度が顕著に増加することが報告されているが、腎薬物輸送に与える影響は検討されていない。NPT1ノックアウトマウスの作出は現在までに報告されておらず、初めての取り組みである。

肝胆管側膜に発現するMRP2の場合、アクチン結合蛋白質である radixin がその肝胆管側膜への局在に必須であることが既に明らかにされている。Radixinを欠損したマウスでは、MRP2の総蛋白量は変わらないものの、胆管側膜への発現は著明に低下し、MRP2の内因性基質である bilirubin glucuronide の蓄積により黄疸が観察される。Radixin は ezrin や moesin とともに ERM family を構成しており、腎臓では radixin の発現は低く、ezrin が腎尿細管上皮細胞や消化管上皮細胞の刷子縁膜に濃縮されている。腎刷子縁膜に局在するトランスポーターのC末側には、EBP50を始めとする足場蛋白であるPDZ蛋白との相互作用に必要な配列がみられ、PDZ蛋白との相互作用や、直接・間接的なERM蛋白との相互作用が医薬品の排泄に関わるトランスポーターの機能発現においても必須と考えられる。本研究で取り上げたMRP4やNPT1のC末側にも、PDZ蛋白との相互作用に必要なコンセンサス配列がみられることから、足場蛋白やアクチン結合蛋白との相互作用が、そのトランスポートソーム形成に必要であることが予想される。そこで、MRP4のC末側を bait として相互作用蛋白の同定するとともに、radixin や ezrin の遺伝子ノックアウトマウスを用いて、トランスポートソーム形成に影響を与えるトランスポーターの探索を行うことを計画した。





ゼブラフィッシュの変異体を用いた トランスポートソームの解析

東京工業大学大学院生命理工学研究科 生体システム専攻

広瀬 茂久

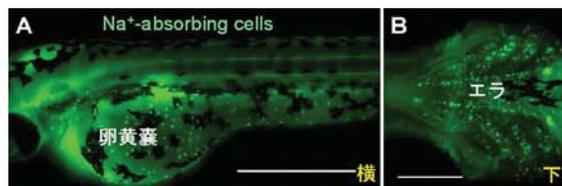
これまで私たちのグループは、「特殊機能を発達させた生物に学ぶ」を合言葉に、pH3.5の恐山湖（青森県下北半島にある硫酸酸性湖）にすむグイの酸性適応機構や淡水と海水の両方に適応できるウナギの体液浸透圧の調節機構を明らかにし、その過程で H^+ 、 HCO_3^- 、 SO_4^{2-} 、新規尿素輸送体、及びアンモニア輸送体などが特殊環境への適応に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。これら輸送体の多くはタンパク質相互作用にかかわると予想されるPDZやSTASドメインを有し、イオン輸送複合体の形成機構の研究に有用と考えられる。

本研究では、これら従来からの研究を進展させると共に、トランスポートソームの視点から生物学上の大問題、すなわち淡水魚の生存戦略にも迫りたい。こういふと驚かれるに違いないが、実は、魚がどうして池や川の淡水中で生きていけるのか分かっていないのである。淡水中では塩分が失われるゆえ、それを何とか補わないと生きていけない。つまり塩分を取り込む仕組みが必要なわけだが、淡水魚がどのようにして塩分を取り込んでいるかが不明なのである。この問題を20世紀中に解決したいと、私たちを含め世界中の多くの研究者が努力したが、残念ながら21世紀に持ち越された。

ゼブラフィッシュとその変異体の活用: 最近私たちは、蛍光色素を用いて Na^+ 取り込み細胞を可視化することに成功した。この細胞を単離し、そこで働くイオン輸送体とその複合体を同定できれば、上記問題の解決につながると期待される。蛍光色素による標識では Na^+ を取り込んでいる時のみ光るゆえ、単離には適さないが、幸運なことに、エンハンサートラップ法で作製したGFP/ゼブラフィッシュ変異体の中に、全く同じように光る一群がいることを見つけ、G9変異体と命名した。 Na^+ 取り込み細胞では、Carbonic anhydrase (CA: $H_2O + CO_2 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$) が多量に発現していることを見出ししているが、G9細胞にも多量のCAが含まれていることを確かめている。したがってG9細胞を単離しそこで働くイオン輸送体、とくに Apical 側に存在するトランスポートソームを同定できれば、淡水適応戦略を分子レベルで説明できるようになる。ゼブラフィッシュではモルフォオリノアンチセンス法によって特定の遺伝子発現を抑えることが出来るので、トランスポートソームの機能解析に威力を発揮する。もう一つ注目すべきは、 Na^+ 取り込みにかかわるG9細胞のApical側にはピットと呼ばれる窪みがあり、この部分がコンカナバリンA(ConA)で特異的に標識される点である。このことは、Apical側のトランスポートソームの構成成分のいくつかはConAポジティブであることを示唆する。実際 ConA 処理により Na^+ 取り込み能は低下する。ConA との相互作用を利用して、目的のトランスポートソームを部分精製し、性質を調べることも可能かもしれない。

広塩性メフグの活用: 海水魚の場合は、海水の浸透圧が体液

の浸透圧より3倍も高いので、水分が失われる。それを補うために、海水を飲み、余分のNaClはエラの塩類細胞から捨て結果的に水を得るという戦略をとっているが、海水中に多い Ca^{2+} は、血中濃度を比較的低めにかつ厳密に一定に保つ必要性から、吸収されず、腸管内で濃縮されていき、その浸透圧のために水分の吸収が阻害される。これを避けるために、 HCO_3^- を利用して不溶性の $CaCO_3$ 沈殿として排泄する戦略をとっている。現在、この HCO_3^- 輸送にかかわる候補分子群の同定に成功しつつある。いずれもPDZやSTASドメインを有し興味深い。トランスポートソームとしての機能と機能制御機構を明らかにし動物生理学のよりよい理解に貢献したい。



蛍光色素で可視化した Na^+ 取り込み細胞(ゼブラフィッシュ幼生)

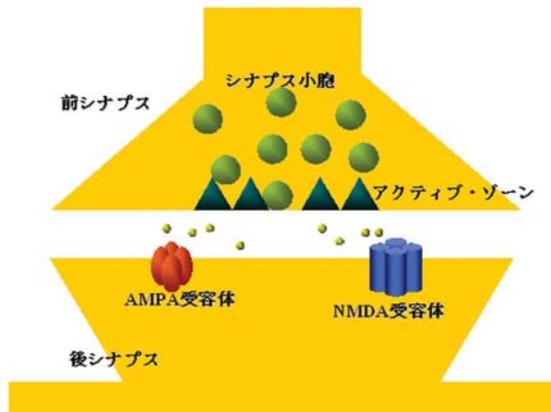


プレシナプスカルシウムチャンネルと 細胞膜裏打ち蛋白質群の複合体の機能解析

富山大学 医学薬学研究部 臨床分子病態検査学講座

大塚 稔久

アクティブ・ゾーン(Active Zone:AZ)は、神経終末形質膜直下に存在する比較的電子密度の高い特殊な構造体で、神経伝達物質放出のための“特異的な場”であると考えられています(図)。しかし、神経回路網の基盤をなすシナプスの形成において、AZがどのような役割を担っているのかは、現在においてもほとんど明らかになっていません。私たちの研究室では、数年前にAZ特異的なタンパク質CASTおよびELKSを同定し、それらの機能解析を行ってきました。CASTはELKSと一緒に、他のAZタンパク質 Bassoon、Piccolo、RIM1、Munc13-1と巨大なタンパク質複合体を形成しており、AZの構造維持と機能発現において極めて重要な役割を担っていることが示唆されます。私たちは、神経終末の形質膜直下に存在するCASTを介した巨大な分子複合体が、比較的電子密度の高いAZの分子基盤ではないかと考えています。

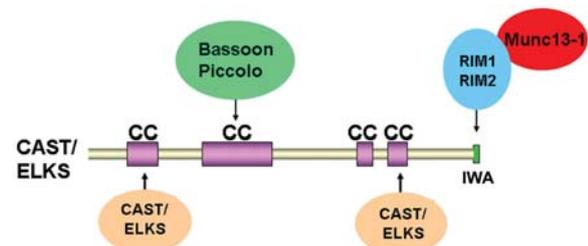


本研究計画では、AZにおいて最も重要な機能分子の一つであるカルシウムチャンネルとAZとの構造機能関連について解析を進める予定です。AZにおけるカルシウムチャンネルの局在化のメカニズムについては依然不明な点が多く、未解決の問題が数多く残されています。最近、DrosophilaのCASTホモログの遺伝子(Bruchpilot)が同定され、CASTホモログがカルシウムチャンネルの集積に関与しているとの報告が、Science 誌およびNeuron 誌に掲載されました。この表現型は線虫の表現型とは異なっており、マウスなどの高等動物にも同じように当てはめることは出来ませんが、私たちはCASTが直接もしくは間接的にカルシウムチャンネルの局在とその機能調節に関与しているのではないかと仮説をたてています。現在、ノックアウトマウスも作成中で、将来的にはCASTとカルシウムチャンネルの関連を個体レベルで明らかにしていきたいと考えています。

私は大阪大学で大学院生およびポスドクとして6年を過ごし、2000年の春からカン研究所(京都)のグループリーダーとして神経科学分野の研究を開始しました。それまでは、低分子量G

タンパク質の生化学が中心でしたので、戸惑うことも多かったのですが、運よく新規のAZタンパク質CASTを見つけることに成功し、少なからずこの分野の発展に貢献することが出来ました。その後、5年間過ごした古都京都を離れ、昨年4月より、立山を望む富山大学にて新たに研究をスタートさせました。ラボのメンバーは現在、大学院生と私の4名の小さなラボです(ホームページ:<http://www.toyama-mpu.ac.jp/md/clm/cerebro.index.htm>)。“お金は大事だよ〜”というCMもありますが、やはり大事なのは人ですから、少ない人数でいかにフォーカスしてよいサイエンスを展開するか、日々葛藤の毎日です(しんどいですが、これがサイエンスの醍醐味のひとつでしょうか)。また、講義などで興味を持ってくれた医学部の学部学生が8名ほど放課後や休みを利用して研究に参加してくれています。私以外はみな20代の平均年齢の低い研究室です。経験も浅いのですが、物怖じすることなく、神経科学の諸問題について果敢にチャレンジしていきたいと思っています。

本特定研究領域には、神経分野以外の様々な分野の先生方が集結しておられ、分野を超えたつながりが出来ることを楽しみにしております。その中で、魅力ある共同研究などを展開させていただくことが出来れば望外の喜びです。それでは、これからどうぞよろしくお願い致します。



アクティブ・ゾーンタンパク質の分子間相互作用

CAST/ELKSは複数のコイルドコイル(CC)領域とC末端にPDZドメインへの結合に必要なアミノ酸配列(IWA)を有する。アクティブ・ゾーンタンパク質 Bassoon/Piccoloは2番目のCC領域に、RIM1/RIM2はIWAに特異的に結合する。1,4番目のCC領域はCAST/ELKSのオリゴマー形成に必須の領域である。さらに、Munc13-1はRIMsを介してCAST/ELKSに結合する。



新規トランスポートソームを形成して細胞容積調節能を発揮する蛋白質群の分子同定

三重大学大学院医学系研究科 再生統御医学

赤塚 結子

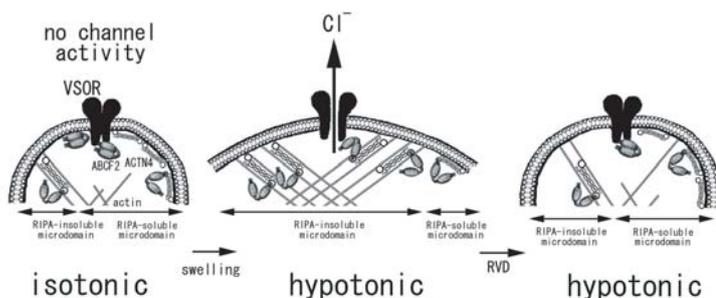
私は「新規トランスポートソームを形成して細胞容積調節能を発揮する蛋白質群の分子同定」というテーマの公募研究で参加させていただくことになりました三重大学大学院医学系研究科再生統御医学(旧生理学第一講座)の赤塚結子です。本公募研究の遂行にあたり、生理学研究所の岡田泰伸先生に研究分担者として加わっていただいております。以下に、私たちの研究内容を紹介させていただきます。

細胞外及び細胞内の浸透圧変化に対応して自らの体積を一定に保とうとする働きは、動物細胞が生命を維持する上で必要不可欠な機能であり、細胞は低浸透圧刺激に曝された際に上昇した細胞容積を調節性容積減少(Regulatory Volume Decrease: RVD)によって元に戻す能力を備えています。このRVDの過程では、細胞の容積が上昇した時のみ開口するCl⁻チャンネルである容積感受性外向整流性Cl⁻チャンネル(VSOR)が開口し、イオンの流出が駆動力となって細胞内の余分な水が排出されることがわかっておりますが、このチャンネル分子の実体が不明であるため、わからない点も多くあります。VSORの開口に細胞骨格が関与するという報告が多数ありますので、私は細胞骨格と膜蛋白質との関係に注目してVSORの分子同定を試みてきました。

一般的に細胞骨格と強くリンクした膜蛋白質あるいは細胞膜裏打ち蛋白質は界面活性剤に溶けにくくなる性質があるので、等浸透圧下と低浸透圧下において細胞膜画分を分離し、界面活性剤(RIPA)に対する溶解性が変化する蛋白質を探しました。その結果、低浸透圧刺激を加えた時にアクチニン-4がRIPA不溶の画分に多くなることがわかりました。実際にアクチニン-4の大量発現系ではRVDが亢進し、siRNAでアクチニン-4の発現を抑制するとRVDが抑制されたので、アクチニン-4がRVDの過程で何らかの働きを持つことが示唆されました。このアクチニン-4の結合蛋白質として次に同定したのがABCF2です。岡田先生との共同研究によってABCF2を大量発現させた

HEK293T細胞ではVSOR電流が著明に抑制されること、それに一致してRVDも著明にブロックされることがわかりました。また、siRNAでABCF2の発現を抑制すると、RVDは更新しました。つまり、ABCF2はVSORを負に制御する調節因子であり、アクチニン-4はその抑制を解除する方向に働くことが考えられました。以上の結果を添付図にまとめましたが、等浸透圧下ではABCF2はVSORに結合して抑制しています。この時、ABCF2のアクチニン-4との結合部位はABCF2の分子内結合によってマスクされていることがわかっています。低浸透圧刺激を受けると、このABCF2の分子内結合は解消されアクチニン-4との結合部位が露出し、アクチニン-4と結合したABCF2がRIPA不溶の微小領域にもって行かれることによって、VSORの抑制はなくなり、チャンネルが活性化されます。RVDが始まると、ABCF2はアクチニン-4から離れ再びVSORに結合することが予想されます。この時点でVSORそのものはまだ不明であるものの、それを取り巻く分子群が徐々に明らかになってきて、トランスポートソームを形成することが明らかとなりました。さらに、ABCF2の結合蛋白質として、核と細胞質及び細胞膜間をシャトルするヌクレオリンが同定されており、本トランスポートソームが外界の浸透圧変化の情報を核へ伝達する働きをもつ可能性も出てきました。

VSORは本来、低浸透圧刺激をうけて細胞が膨らんだ時のみ開口するチャンネルですが、最近ではアポトーシス刺激によって等浸透圧下でも開口することが証明され、アポトーシスに深く関わっていることがわかってきたため、その点からも非常に注目されています。この特定領域研究では、VSORをはじめとする本トランスポートソーム構成分子群をできるだけ多く同定することを目的としておりまして、それによって本トランスポートソームの実態解明を目指しております。どうぞよろしくお願いたします。



アクチニン-4とABCF2の協同作用に基づくVSOR制御機構の予想図

等浸透圧下ではABCF2は、RIPA可溶の微小領域に存在すると予想されるVSORに結合し抑制している。この時、ABCF2のアクチニン-4との結合部位はABCF2の分子内結合によってマスクされていると考えられる。低浸透圧刺激を受けると、このABCF2の分子内結合は解消されアクチニン-4との結合部位が露出し、アクチニン-4と結合したABCF2がRIPA不溶の微小領域にもって行かれることによって、VSORの抑制はなくなり、チャンネルが活性化されると考えられる。RVDが始まると、ABCF2はアクチニン-4から離れ再びVSORに結合することが予想される。



神経細胞樹状突起へのトランスポートを誘導する アミノ酸候補配列の遺伝学的検証

京都大学大学院医学研究科 先端領域融合医学研究機構 分子神経遺伝学グループ

横井 峰人

私たちの研究グループは、神経系を対象にマウス遺伝学を用いた神経回路の可視化とその機能解析を行っています。

神経細胞は、極性を持つ細胞のなかでも、極めて高度に極性化した細胞です。遠くまで広がる軸索と細かく張り巡らされた樹状突起網によって、神経細胞は複雑な回路を形成し、生物機能の根幹となる情報の認識・貯蔵・伝達を担っています。神経細胞は、多様な形を呈しますが、単純化してしまえば、ほとんどの細胞は軸索(axon)と細胞体樹状突起(somatodendrite)の大きな2つのコンパートメントを持ち、前者が情報の出力側、後者が情報の入力側を担当します。軸索と樹状突起を形態学的多様性という視点から考えると、軸索に比して樹状突起は非常に多様な形態を示すとともに、機能的に異なったサブコンパートメントを持つことが多い。たとえば、嗅球の主要神経細胞である Mitral/tufted cell は、嗅球糸球体を形成し嗅神経細胞からの入力を受ける一次樹状突起と、顆粒細胞と相互シナプスを作る二次樹状突起という、全く異なった形態と機能を有する2種の樹状突起を持っています。また、嗅結節の投射神経細胞、梨状皮質の錐体細胞、海馬の錐体細胞、小脳のプルキンエ細胞などは、1種類の樹状突起であるが遠位部と近位部とで異なった領域からの入力を受けるといった機能的コンパートメントを持っています。これらの機能的コンパートメントには、それぞれに機能の特異性を実現する分子群が存在しており、これらの分子が“どのようにしてふるい分けられ、運ばれるか?”のメカニズムは、神経科学のうえでも細胞生物学のうえでも非常に興味深い問題です。

これまで、培養神経細胞を用いた研究により、トランスフェリン受容体のN末フラグメントを代表としていくつかのタンパクフラグメントが somatodendrite へのソーティングシグナルを持つことが示されています。しかしながら、これら in vitro でのソーティングシグナルが、in vivo で機能しうかどうかについての報告は無く、さらにそれぞれが細胞体樹状突起コンパートメントのなかで機能的サブコンパートメントへのソーティングを誘導するかどうかについても全く明らかにされていません。

本申請課題は、培養神経細胞での解析で somatodendrite へのソーティングシグナルを持つことが示されているフラグメントが in vivo において、somatodendrite へのソーティングシグナルとして機能するか?さらには樹状突起内サブコンパートメントへのソーティングを誘導するかどうか?を、検証することが目的です。

神経系を対象にした研究においては、特定の神経細胞に外来遺伝子を発現させることが極めて非効率的でありましたが、私たちはテトラサイクリン依存性転写制御システムを利用することにより、この困難さを克服し、比較的容易に効率よく、特定

の神経細胞に様々な外来遺伝子を発現させることを可能にできました。すなわち、テトラサイクリン制御性トランスアクティベーター (tTA) を線条体投射神経細胞にて発現する tTA-driver マウスライン、及び、テトラサイクリン依存性プロモーター (tetO) 下に種々のレポーター遺伝子を導入した tetO-responder マウスラインを作成しました。この tTA-driver マウスラインと tetO-responder マウスラインの交配による複合トランスジェニックマウスでは種々のレポーター分子を線条体投射神経細胞で発現させることができます。

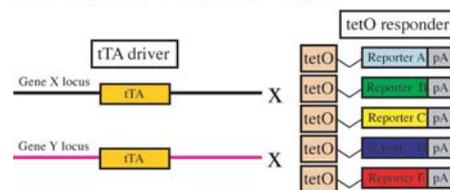
当研究では、tetO-responder マウスラインとして、somatodendrite へのソーティングシグナルアミノ酸候補配列に蛍光レポーター分子を融合させたハイブリッド遺伝子を tetO の下流に導入し、トランスジェニックマウスラインを作成します。線条体投射神経細胞で tTA を発現する tTA-driver マウスラインとの交配により、線条体投射神経細胞に上記のハイブリッド分子を発現させ、somatodendrite へのソーティングシグナルとして機能するかどうかを検証いたします。

この研究班に参加させていただくことにより、somatodendrite へのソーティングシグナルアミノ酸候補配列についてのアイデアをひろげ、個体での検証をすすめたいと考えています。

膜輸送分子複合体トランスポートソームについては全くの門外漢ですが、この研究班に入れていただいたことをきっかけに、新たな研究の局面をひらくことができることを期待しております。

どうぞ、よろしくお願いいたします。

テトラサイクリン依存性転写制御システムを利用した、特定の神経細胞への外来遺伝子の発現。



線条体投射神経細胞への外来遺伝子の発現例
(軸索終末へ選択的に運ばれている)





タグー小分子プローブペアによる タンパク質複合体形成の可視化

京都大学大学院工学研究科 生物有機化学分野

王子田 彰夫

私は「タグー小分子プローブペアによるタンパク質複合体形成の可視化」というテーマで本領域に参加させていただいております。私たちの研究室では、タンパク質を化学的視点から捉えた研究を展開しています。もう少し具体的には、新しくデザインし化学合成した小分子プローブによりタンパク質を認識したり蛍光ラベル化したりして、タンパク質の機能を解析したり、制御したりする手法の開発が研究の大きな柱の一つです。最近、ケミカルバイオロジーという言葉が聞かれる方が多いと思われませんが、私もその分野の端くれの研究者だと考えていただければと思います。ですから本領域に参加している多くの方々とは多少研究の畑が違うケミストリー色の濃い部分で今まで仕事をしてきたことになりませんが、本領域で「生命の機能と本質を知りたい」という志を同じくする多くの方々に出会えるものと期待しております。そして、これまでに私があまり交流する機会がなかった様々な分野の先生方から、私の研究に対していろいろなお意見やご助言をいただければと考えております。どうぞよろしくお願いいたします。

本研究では、細胞内タンパク質の可視化、すなわち蛍光バイオイメージングに適した新しい分子ツールの開発を目指しています。この新しい分子ツールとは、目的タンパク質に導入するペプチドタグ配列と、これと特異的に結合する小分子蛍光プローブを組み合わせた「タグー小分子プローブペア」であります。近年、顕微鏡技術の進歩と様々な蛍光性GFP (Green fluorescent protein) 類縁体の開発によりバイオイメージングによる細胞内タンパク質の可視化技術は多岐に進展したといえます。しかし比較的大きなGFP類縁体 (27kDa) を目的のタンパク質へヒュージョンした場合、しばしば目的タンパク質の機能阻害が生じます。特に複数のタンパク質集積の場であるタンパク質複合体では、複合体形成自体が阻害されるような致命的な機能障害が生じるために正しい解析が不可能になることが考えられます。これまでに私たちは、このような主に「大きさ」に由来したタンパク質機能阻害をもたらすことのないバイオイメージングシステムとして目的タンパク質に対する影響を最小限に抑えるペプチドタグ配列-小分子プローブペアの開発を行ってきました。すなわち、可視化したい目的タンパク質を短いタグ配列を付けた形で発現させ、これを細胞外から導入した蛍光プローブにより特異的にラベル化しバイオイメージングを行うとする技術です。このような小分子プローブを用いる可視化システムは、1) 異なる蛍光波長を持つ小分子プローブによるタンパク質の染め分け、2) 任意のタイミングでの可視化が可能、3) 他のタンパク質蛍光ラベル化法とのコンビネーションが容易でありFRETを用いたタンパク質間相互作用解析などタンパク質複合体が関わる細胞機能の解明に最適な新しい分子ツールとなり得ると我々は考えています。

これまでに私たちは、「タグー小分子プローブペア」としてオリゴアスパラギン酸配列 (D4タグと呼んでいます) と、これと選択的に強く相互作用する多核亜鉛錯体 (Zn(II)-DpaTyr) を全く新規に見出すことに成功しました。そしてこのペアを用いて細胞膜上の受容体タンパク質を選択的に蛍光ラベル化できることを示しました。バイオイメージングとは何ぞや? という知識のほとんど無い段階から研究を始めて数年になりますが、ようやく一つのペアを世の中に出すことができたことになりました。本研究の今後の展開としては、我々のすでに見出したD4タグ-Zn(II)-DpaTyr ペアにさらに改良を加え細胞内外の様々なタンパク質のバイオイメージングに適したペアへと磨きをかけていくこと、そしてもう一つはD4タグ-Zn(II)-DpaTyr ペア以外の新しいペアを創出することです。タンパク質複合体に含まれる複数のタンパク質の機能解析には、お互いに干渉しあわない複数のペアの開発が必須となります。このような新しいペアの創出は、基礎的な分子認識化学から始まる泥臭い地道な検討が必要なのですが、この初期の創製の段階がケミストとしてのセンスと感性が問われる重要な部分であり、腕のみせどころでもあります。以上、長々と書いて参りましたが、これらの「分子ツール創製」の研究を通して化学のサイドから生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能の解明に貢献することを目指したいと考えています。どうぞよろしくお願い申し上げます。



D4タグを付加した発現タンパク質の低分子プローブによる蛍光ラベル化

亜鉛錯体型の低分子蛍光プローブは、タンパク質に導入した連続アスパラギン酸のタグ配列 (D4×3タグ) と特異的に相互作用してタンパク質のバイオイメージングを可能とする。



Na⁺,K⁺/H⁺交換輸送トランスポートソームの構造に基づく機能制御機構の解明

大阪大学大学院理学研究科 生体膜機能学研究室

金澤 浩

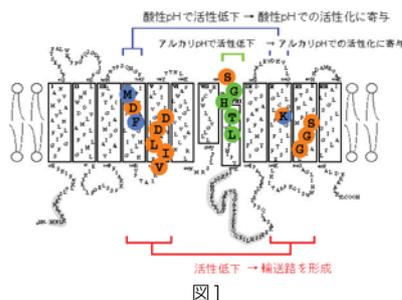
研究の背景と目的

細胞内のpH, Na⁺, 浸透圧の制御は、生命維持の基本的要件であり、ほ乳動物細胞では、細胞の増殖の基盤となっている。このイオンや浸透圧の制御は、細胞質膜や細胞内小胞膜に存在するNa⁺,K⁺/H⁺交換輸送蛋白質(NhaAまたはNHE)によって主として行われている。このように細胞内Na⁺とH⁺の環境制御において中心的役割を果たすNa⁺,K⁺/H⁺アンチポーターは、細菌、酵母からヒト細胞に至るまで生物界に広く存在し、遺伝子も広範な種にわたり取り出されている。1次構造の比較から、生物種毎に多様な一次構造をもっていること、また、同一種の中でも異なる1次構造をもつ数種のアイソフォームの存在が明らかになりつつある。一方、現在まで膜輸送トランスポートソームとしてこのアンチポーターのイオン輸送とエネルギー共役の仕組み(作動機構)、およびその制御機構に関しては不明な点が多く残されている。また、見かけの構造的多様性に対応する種毎に異なる作動機構や制御の分子機構が存在するか否かは不明である。さらに、アンチポーターと相互作用したトランスポートソームを形成する因子や、それらによる制御の全貌も明らかではない。本研究では、細菌からヒトに至るまでのNa⁺,K⁺/H⁺交換輸送トランスポートソームを研究対象とし、以下の点を明らかにすることを旨とする。(1)最も本質的な問題であり未だ未解明な交換輸送の仕組み、(2)申請者等が明らかにしたこの輸送体に結合し機能を制御する膜結合性の蛋白質因子(Cos3, CHP)の機能、(3)このトランスポートソームの形成と細胞内局在化に必至な仕組み。次に、これまでの成果の要点を記す。

(1) 細菌において最も重要なアンチポーターNhaAのイオン輸送・pHセンサー機構の解明

大腸菌およびピロリ菌NhaA(HP NhaA)を材料としイオン輸送および輸送のpH依存の制御に必至な膜内性部分を遺伝学的に解析した。その結果、4つの膜貫通ドメイン(TM4、5、10、11)にイオン輸送に必至な残基(図1)が集中しイオン透過経路を形成し、アルカリ条件下の活性化調節には第7ループとTM8の残基が(図1)関与することを明らかにした(5)。

さらにHP NhaAのTM 4、5、10、11のすべてのアミノ酸残基



をCysに置換し機能の変換とCysに対する修飾剤の結合性を指標に、各残基の膜内での親水環境を調べた。この一連の実験結果からイオン輸送に必至なAsp残基を含む必須残基とイオン結合部位の空間的配置を明らかにした(図2)(10)。さらにイオン輸送に伴いNhaAに起きる構造変化を捉える実験系としてFRET法を検討し、新規な方法を確立できた(14)。

(2) 酵母の細胞膜アンチポーター Nha1のイオン輸送と制御の機構

数種の酵母のNha1をクローン化し構造を決定した。その結果、一次構造は異なるにも関わらず、細胞内ドメインに加えて長大な細胞質ドメインをいずれも有しており、この点でほ乳類のものと同様の構造を持つことが明らかになった(2)。細胞質ドメインは種間での相同性が低いが一部に6カ所の保存された領域(C1-C6)があることを明らかにした(8)。これらのドメインのうち、もっとも細胞膜に近接したC1部分16残基(図3赤色表示)は、Nha1の細胞膜局在化に必須な部分とイオン輸送機能に必須な部分で構成されること(8)またC2部分に結合しイオン輸送を正に制御する新規膜蛋白COS3(図3)が存在することを明らかにした(9)。

さらにアンチポート活性を生化学的に測定することを目的にNha1pを含む細胞内小胞を取り出すのに成功した(12)。Nha1p2量体で機能することを明確に示すことができた(15)。これより、2量体が機能ユニットである点は、種を超えて普遍的なものであると考えられる。現在、精製蛋白質を再構成する系を構築中である。

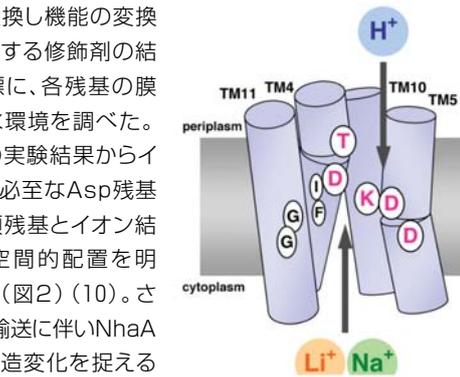
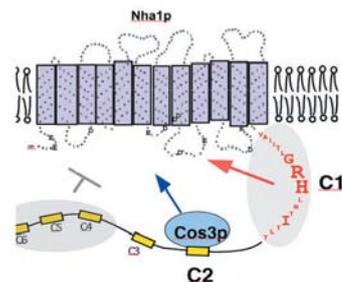


図2 イオン輸送に関わるTM4、5、10、11とイオン結合と輸送に関わる重要な残基の膜内での配置



酵母のNha1pの細胞質ドメインC1,C2とC2に結合する機能促進因子COS3p

図3 酵母Nha1pの細胞質ドメインと結合因子Cos3p

(3) ほ乳類アンチポーターの新規アイソフォームNHE8,9の発見とNHE1-5に結合するCHP蛋白質の構造と機能解析

これまでアイソフォームNHE8,9を新規に見出すとともに、機能が不明であったNHE6と7を含めて細胞内小胞にいずれも存在し、 K^+/H^+ 交換機能をもち小胞内のpH制御に重要な働きをすると推定した(11)。われわれはほ乳類NHEに結合する新規蛋白CHPを発見し報告したが、その後CHPはNHEの機能必須因子であることが示された。われわれは、この蛋白質がカルシニューリン(CN)との相同性を有することからCNと同様に多機能性蛋白質であることを予測し、CHPの結合蛋白を網羅的に解析した。その結果、新規の細胞内モーター蛋白質キネシン、およびアポトーシス誘導性蛋白キナーゼDRAK2を発見した(1, 3, 7, 16)(図4)。

これらの蛋白質との相互作用を解析し、その機能的役割の一端を明らかにしている。また、CHPのアイソフォームであるCHP2を発見し、腸における高度の発現を見だし、その生理的役割を予測した(4)。CHPの遺伝子欠失細胞を樹立することに最近成功し、CHPはNHEの構造を安定化し、細胞膜への局在や機能発現に必至なNHEの構造形成に必至な因子と考えられる結果を得ている。

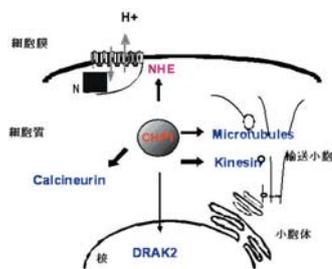


図4 CHPの多様な役割

関連発表論文

1. Matsumoto, M., Miyake, Y., Nagita, M., Inoue, H., Shitakubo, D., Takemoto, K., Ohtsuka, C., Nakamura, N., and Kanazawa, H. J. Biochem (2001)130, 217-225
2. Kamauchi, S., Mitsui, K., Ujike, S., Haga, M., Nakamura, N., Inoue, H., Sakajo, S., Ueda, M., Tanaka, A., and Kanazawa, H. J. Biochem. (2002) 131, 821-831
3. N. Nakamura, Y. Miyake, M. Matsushita, S. Tanaka, H. Inoue, and H. Kanazawa J. Biochem. (2002), 132, 483 - 491
4. H. Inoue, Y. Nakamura, M. Nagita, T. Takai, M. Masuda, N. Nakamura and H. Kanazawa Bull. Pharm. Bull. (2003) 26, 148-155
5. Yumi Tsuboi, Hiroki Inoue, Norihiro Nakamura, and Hiroshi Kanazawa J. Biol. Chem., (2003) 278, 21467-21473
6. Hiroshi Kuwahara, Junichi Kamei, Norihiro Nakamura, Miho Matsumoto, Hiroki Inoue, and Hiroshi Kanazawa J. Biochem. (2003) 134, 245-250
7. Masafumi Matsushita, Shingo Tanaka, Norihiro Nakamura, Hiroki Inoue and Hiroshi Kanazawa Traffic (2004) 5, 140-151
8. Keiji Mitsui, Shinya Kamauchi, Norihiro Nakamura, Hiroki Inoue, and Hiroshi Kanazawa J. Biochem. (2004) 135, 139-148.
9. Keiji Mitsui, Fumihiro Ochi, Norihiro Nakamura, Yoshihide Doi, Hiroki Inoue, and Hiroshi Kanazawa J. Biol. Chem. (2004) 279, 12438-12447.
10. Naoyuki Kuwabara, Hiroki Inoue, Yumi Tsuboi, Norihiro Nakamura and Hiroshi Kanazawa J. Biol. Chem. (2004) 279, 40567-40575.
11. Norihiro Nakamura, Shingo Tanaka, Yoshinori Teko, and Hiroshi Kanazawa J. Biol. Chem. (2005) 280,1561-1572.
12. Ryuichi Ohgaki, Norihiro Nakamura, Keiji Mitsui and Hiroshi Kanazawa Biochem. Biophys. Act Biomembrane (2005) 1712, 185-196
13. Youichi Naoe, Kyouhei Arita, Hiroshi Hashimoto, Hiroshi Kanazawa, Mamoru Sato, and Toshiyuki Shimizu J. Biol. Chem., (2005) 280, 32372 - 32378
14. Akira Karasawa, Yumi Tsuboi, Hiroki Inoue, Rie Kinoshita, Norihiro Nakamura, and Hiroshi Kanazawa J. Biol. Chem. (2005) 280, 41900-41911
15. Keiji Mitsui, Hidetomo Yasui, Norihiro Nakamura, Hiroshi Kanazawa Biophys Biochim Act. Biomembrane (2005) 1720, 125-136.
16. Hiroshi Kuwahara, Norihiro Nakamura, and Hiroshi Kanazawa Biol. Pharm. Bullt. (2006) 29, 225-233.



Na⁺/H⁺交換輸送体複合体の構造と細胞膜・細胞骨格との相互作用

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

児嶋 長次郎

研究グループ:

我々の研究グループは膜近傍におけるシグナル伝達機構の解明を目指した構造生物学研究を推進しており、NMRを中心とする研究代表者の児嶋とX線を中心とする研究分担者の箱嶋からなる。我々の研究グループはそれぞれ奈良先端大のバイオサイエンス研究科と情報科学研究科に所属している。児嶋の研究グループは、助教授1名、助手1名、ポスドク1名、技術員2名、大学院学生6名からなる比較的小さなグループである。

また箱嶋のグループは、教授1名、助手1名、ポスドク4名、技術員2名、大学院生5名からなる。我々のグループは約10年前に日本で初めてNMRとX線の両者を用いる構造生物学研究を開始した研究室としても有名である。我々のグループの研究課題は「Na⁺/H⁺交換輸送体複合体の構造と細胞膜・細胞骨格との相互作用」であり、NMRやX線によるNa⁺/H⁺交換輸送体およびその複合体の構造生物学的研究を推進する。本特定研究においては構造生物学的な観点から積極的な貢献を行ってゆき

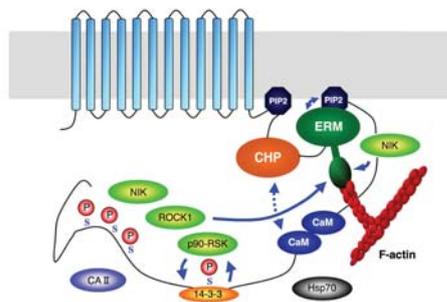
たいと考えており、構造生物学研究を通じた新たな共同研究の芽が生まれることを期待している。

研究内容:

動物細胞のNa⁺/H⁺交換輸送体NHE1はあらゆる組織に普遍的に存在し、Na⁺濃度勾配をエネルギーとしてH⁺を排出する二次性能動輸送体であり、増殖因子や浸透圧変化など多様な刺激に応答して活性調節を受け、細胞内pHや細胞容積などの調節を行う。NHE1欠損マウスは成長速度が遅いだけでなく、運動失調やてんかん発作などにより約90%が致死で、NHE1が高次の生理機能に重要な役割を果たしていることを示唆している。NHE1の活性はC末端細胞質ドメインと制御因子群からなるシグナル伝達複合体により複雑に制御されている。またNHE1はC末端細胞質ドメインにおいてアクチン結合蛋白質であるERM蛋白質と結合することが知られ、この結合はNHE1の適切な局在と細胞骨格系の制御に必須である。そこで本研究ではNHE1のC末端細胞質ドメインと様々な制御因子群からなる膜輸送分子複合体の立体構造をNMRおよびX線によって決定し、NHE1の活性化と細胞骨格系の制御機構に構造的な基盤を与えることを目指す。また上皮細胞においてNHE3膜輸送分子複

合体形成を担うNa⁺/H⁺交換輸送体制御因子NHERFについてもその複合体の構造生物学研究を行う。

本研究課題で取扱うNHE1やNHE3は膜輸送分子複合体の好例であり、その構造生物学的なアプローチはこれら複合体の分子機能の理解に大きく貢献できる。申請者らは構造生物学を専門としており、生化学的・生理学的な解析を進める当該領域の研究者に立体構造を提示することで、新しい概念や実験の提案を触発できると考える。また本研究は他の膜輸送複合体の理解、特に細胞骨格系との関係において有益な示唆を与えることが期待される。



薬物排出の最終段階を担う 新規有機カチオン輸送体の構造と機能及び相互作用

岡山大学自然生命科学研究支援センター ゲノムプロテオーム解析部門

大塚 正人

研究の目的:

生体内に存在する様々な有機化合物は高度に発達した器官である腎臓や肝臓により体外に排出される。この排出を担うのは種々の有機化合物トランスポーターである。ここ10年で、これらのトランスポーターの大部分の分子実体は同定されてきた。しかし、排泄の最終段階を担うOC (organic cation) /H⁺交換輸送系に関しては20年程前からその存在は知られていたが、いまだにその実体は解明されていなかった。最近申請者はこのトランスポーターのヒト及びマウスにおける分子実体を明らかにすることに成功した (PNAS, 2005.)。そのトランスポーターはバクテリアでは多剤耐性に寄与しているMATE (multidrug and toxin extrusion)ファミリーの輸送体のorthologueであり、このトランスポーターをMATE1と名付けた。申請者の研究目的はMATE1トランスポーターの機能と構造の決定及びその輸送メカニズムの解明である。また、MATE1と相互作用し、その輸送活性を調節するような機能タンパク質を探索する。

本年度の研究実施計画:

MATE1分子の構造と機能の解明

図1にMATE1のアミノ酸配列より推定される2次構造を示す。ハイドロパシー解析によると、MATE1は12回膜貫通型の膜タンパク質であり、膜貫通領域にはいくつかの極性アミノ酸残基が存在している。当研究室は現在までにMATE1と同じMATEファミリーに属するトランスポーターで最初に報告されたMATEトランスポーターのプロトタイプである *Vibrio Parahaemolyticus* 由来のNorMに関して機能性アミノ酸残基を同定している (*J Bacteriol*, 2005)。NorMの薬物輸送に関与する機能性アミノ酸残基は、膜貫通領域に存在している酸性アミノ酸残基であった。MATEトランスポーターのプロトタイプであるバクテリア由来のNorMは、ヒトMATE1とタンパク質レベルで23.6%の相同性しかないが、これらの酸性アミノ酸残基のうち2つはヒト及びマウスのMATE1及びMATE2で保存されていた。以上のことから、哺乳類のMATEにおいても膜貫通領域に存在するこれらの酸性アミノ酸残基を含む極性アミノ酸残基が、MATEの基質認識機構や、プロトンとの交換輸送機構に直接関係していることが予想される。これらの事実を基にMATE1の点変異体を複数作製し(図1に示す極性残基部分)、HEK293細胞に発現させ、MATE1の基質であるTEA(テトラエチルアンモニウム)の取り込み活性に与える影響をRITレーサ

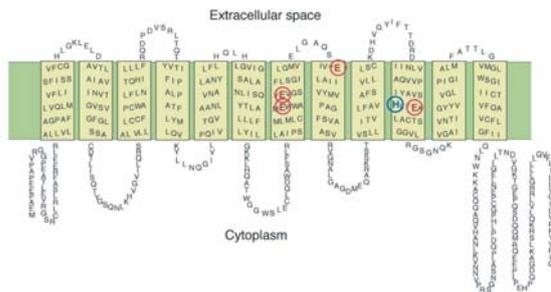


図1 MATE1のアミノ酸配列より推定される2次構造:
膜貫通領域にある極性アミノ酸を色を付けて示してある。

一実験により調べる。この結果より輸送活性及び機能性アミノ酸残基を決定する。また、MATE1変異体の基質特異性や、輸送活性に及ぼすpHの影響に対する変化についても詳細に解析を行うことによって、OC/H⁺交換輸送における基質認識機構や、プロトンとの交換輸送機構を解明する。

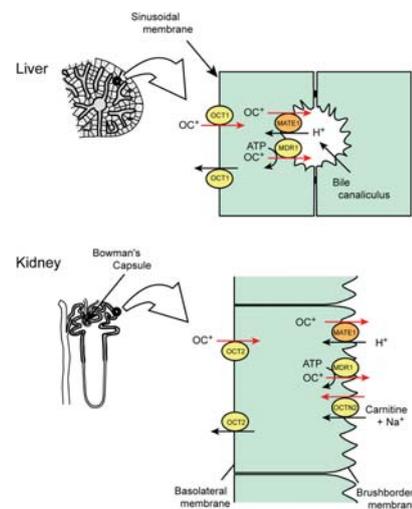
また、MATE1の機能と構造を理解する上でその分子単体に注目し、大量発現・精製及びそのリポソームへの再構成系を確立する。大量発現系は、昆虫細胞を用いた発現系を用いる。申請者の研究室ではすでに、哺乳類の小脳型グルタミン酸トランスポーターについて、昆虫細胞を用いた発現系を用い大量発現に成功している。また、大量発現したタンパク質を精製・リポソームに再構成し、活性の測定を行う系を既に構築済みである。こうした技術をMATEタンパク質の機能解析に応用し、多剤排出タンパク質としてのMATEの輸送機構の全貌解明に活用する。

研究開始状況

MATE1の点変異体を複数作製し(図1に示す極性残基部分)、

HEK293細胞に発現させ、MATE1の基質であるTEA(テトラエチルアンモニウム)の取り込み活性に与える影響をRITレーザー実験により調べるために、現在点変異体を複数作成中である。この結果より輸送活性及び機能性アミノ酸残基を決定する。また、MATE1変異体の基質特異性や、輸送活性に及ぼすpHの影響に対する変化についても詳細に解析を行うことによって、OC/H⁺交換輸送における基質認識機構や、プロトンとの交換輸送機構を解明する予定である。

また、MATE1の機能と構造を理解する上でその分子単体に注目し、大量発現・精製及びそのリポソームへの再構成系を確立しつつある。現在、昆虫細胞発現系を構築中である。昆虫細胞発現系を構築した後、大量発現・精製へと進めていく予定である。



耳垢決定遺伝子ABCC11は膜輸送分子複合体形成の基盤遺伝子か?

長崎大学原爆後障害医療研究施設 人類遺伝学研究分野

吉浦 孝一郎

今年、平成18年度に特定領域研究「膜輸送複合体」の研究グループに加えていただきました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科原爆後障害医療研究施設(原研)人類遺伝学研究分野(略称:原研遺伝)の吉浦孝一郎です。教室は教授1名、助教授1名、助手1名の構成で運営されております。教室の名前が示すように私たちの研究室は、ヒトの病気に関連する遺伝子の同定を行うことを、教室の主たる研究目標としております。“肉体派”の研究室として活動しております。今回このグループに加えていただきましたのは、こういうと領域の諸先生に対して失礼かもしれないのですが、偶然の要素が強いのです。先日、同定いたしました耳垢型決定遺伝子がABCC11というATP結合カセット型トランスポーターであったことからです。難しい総合的な内容は、計画班の先生方にお任せして、私たちは、このABCC11

遺伝子の機能解析に特化して解析していきたい、と思っています。

ABCC11遺伝子は、ゲノム情報の増大によって比較的最近、見出された遺伝子です。別名が、MRP8(multi-drug resistant protein 8)とよばれるように、細胞系を用いた解析で、薬剤耐性をもたらすと報告されています。ここまできると話は単純で(遺伝分野の人は単純にしか考えられません)、ABCC11遺伝子は、膜蛋白質として細胞膜に発現していて、薬剤などの基質の細胞内外の輸送に関わるのであろう、また、耳垢型は、その機能が端的に現れていて、細胞からの分泌物が耳垢として観察されるのだらうと思っていますし、その上の想像・空想で、耳垢型で薬剤耐性が決まる?などと考えておりました。しかし、私たちの最近の解析データから考えると、それほど単純な話ではないようです。細胞膜に発現しているという前提自

体から、再確認の必要があります。わりに、気軽に応募して、簡単にできるだろうと思う内容を考えていたのですが、長くなりそうな予感がします。

特定領域研究で、生化学的な内容としてはABCC11遺伝子の機能解析に関して、①ABCC11蛋白質の局在を明らかにする、②輸送される基質の同定、③ABCC11蛋白質の構成成分の同定、④代謝に関係する薬物の同定、を行っていきたいと思っています。特に、ABCC11蛋白質の構成成分の同定に関しては、LC-MS/MSの活用が不可欠と思われませんが、私たちのグループ自体それほど経験があるわけでないので、この研究班の研究者に助けをいただくこともあるかと思えます。

「膜輸送複合体」という領域からのイメージは、生化学的な仕事だと思えますが、私たちの教室の紹介共々遺伝的な内容も紹介したいと思えます。ABCC11遺伝子は、遺伝的に不思議な遺伝子でマウスには、ありません。進化の過程でマウスからは無くなっています。ヒトの耳垢型(乾型・湿型)も自然選択圧がかかっており、ABCC11蛋白質の生化学的な機能が明らかに

されることで自然選択圧の本体がわかることを期待しています。ゲノム進化の研究内容をこの領域で行うほど余裕はないのですが、おもしろい研究対象です。耳垢ごときが自然選択圧を受けるような、重大なことか不思議でなりません。また昔から湿型の耳垢型は、腋下臭症との関連が常識となっています。しかし、科学的なデータがなく、この関連性の確認も必要な状況です。ABCC11蛋白質の輸送基質となっている「何か」が腋下臭症の基となっている可能性が高いのです。

以上のように、ABCC11蛋白質の機能解析に特化して解析させて頂きたいと最初に述べましたが、元々の出発点が「ABCC11遺伝子が耳垢型の遺伝子である」ことですので、最近の遺伝学に良くある、始まり(遺伝子)と終わり(表現型)は分かっているのです。その間の、内容を生化学的につめていきたいと思っています。ABCC11蛋白質の基礎的・生化学的な解析は、遺伝的・薬剤の投与など様々に関わってくる可能性があり、おもしろい広がりを感じています。



Ca²⁺活性化Cl⁻輸送に働くトランスポートソームの分子構成と生理機能

福岡歯科大学 細胞分子生物学講座

山崎 純

私たちのグループは、薬理学、生化学、病理学に属する研究者からなっています。私(山崎)はもともと心臓や血管平滑筋の電気生理学(パッチクランプ法)をやっておりましたが、Cl⁻輸送に携わる因子に新規に着目しようとして分子生物学や生化学の領域へ入り込んだ人間です。しかしながら一人でできることには限界がありますので、あたくも多分子が複合体を形成して機能するかのように、他分野の研究者(岡村和彦、石橋一成)と共同することによって視野を大きく広げて研究の展開を図ろうとしています。

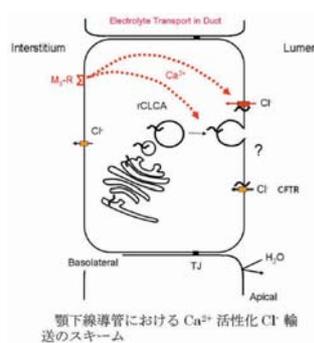
哺乳細胞の細胞膜上には陰イオン輸送体があり、細胞膜の興奮性や細胞容積などの調節によって細胞の恒常性の維持に寄与しています。また、陰イオン輸送は外分泌腺上皮細胞での水分分泌に重要な役割を担っています。近年私たちは、Ca²⁺活性化Cl⁻チャネル関連分子rCLCAのcDNAをクローニングして、その遺伝子が唾液腺や膵臓に発現し、Ca²⁺活性化Cl⁻輸送に関連することを明らかにしてまいりました。

私たちがラット小腸から全長をクローニングしたrCLCA(903aa)は、マウスCLCA群と比較してアミノ酸配列の相同性が77~83%でした。RT-PCRによって、小腸のほかにはrCLCA mRNAが唾液腺、肺、腎臓に存在していることが確かめられました。特に顎下腺では、導管先端面の細胞膜やその直下の細胞質部分にCLCAタンパクの局在が見られました(図)。そこで、リコンビナント系にてCl⁻輸送能を測定する実験を行いました。rCLCAをHEK293細胞に一過性に発現させると、

Caイオノフォアが膜電流を増加させ、その電流はCl⁻依存性ならびにniflumic acidやDIDS感受性でありました。さらにrCLCA分子の特性を検討する為に、rCLCA cDNA導入細胞並びにラット顎下腺から膜画分を調製して、イムノプロットによって翻訳後修飾を

検討しました。それによると、約120-kDa(全長)と翻訳後修飾による約86-kDa断片が産生されることと、両タンパク質にはN型糖鎖が付加されていることが明らかになりました。唾液腺のrCLCA遺伝子をsiRNAでノックダウンすると、M₃受容体刺激による分泌唾液中のCl⁻濃度が増加することから、この分子がCl⁻イオンの再吸収に関与していると考えられました。

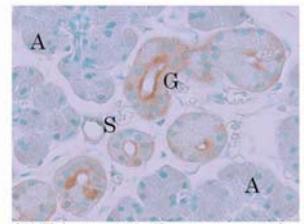
そもそもCLCAは1995年にCunninghamらによってウシ気管から最初に遺伝子クローニングがなされたものですが、このチャネルの単一コンダクタンス、陰イオン選択性、そしてニフルム酸による抑制がないことなどから同一のものとは考えられませんでした。以後、いくつかの関連タンパクが大きな遺伝子ファミリーを形成することが示され、ウシからはbCLCA2、マウスからはmCLCA1-6、ヒトからはhCLCA1-4がクローニング



されました。たとえば、mCLCA1は唾液腺を含む種々の組織から得られておりネイティブ組織のCa²⁺活性化Cl⁻チャンネルとかなり類似の特性をもつと思われましたが、後に異なる電気的特性を有していることが示されました。近年では、CLCA自体がCl⁻チャンネルポアを直接形成しないと考えられています。私たちのこれまでの研究によると、強制発現細胞でのrCLCAによるCl⁻電流増加には数分の遅延が見られ、細胞内局在は管腔側細胞膜からその近傍の細胞質に観察されました。この空間的・時間的不均一性は、rCLCA分子が分泌小胞上で膜チャンネル分子複合体を形成して、細胞膜への運搬・融合による開口分泌の過程で説明できるのではないかと考えました(図)。そこで、トランスポートソームという概念を結び付けて、(1)唾液腺分泌小胞におけるrCLCAの局在と細胞内シグナルによる膜移行、(2)膜チャンネル分子複合体の形成とCa²⁺活性化Cl⁻輸送機能の関連について検討してみることにしました。

ラット顎下腺導管におけるM₃受容体刺激によるCl⁻輸送は細胞内Ca²⁺上昇に伴う現象です。もし私たちの仮説が正しければ、これが引き金になってrCLCAタンパクの細胞内局在の変化を

起こす可能性があります。この仮説を明らかにする目的で、M₃受容体刺激によるラット顎下腺組織でのrCLCAタンパクの局在変化を免疫組織染色法で調べ、さらに不連続密度勾配を用いて導管の豊富な分画を調製し、生化学的に局在変化を検討すること



無刺激時のラット顎下腺でのrCLCAの局在。
S: 線条部導管細胞, G: 顆粒管細胞, A: 腺房細胞

にしました。予備的な検討によりますと、この分画には導管特有の形態を保ったままの細胞集合体が含まれ、このホモジェネートを連続密度勾配にかけることで、トリプシン活性の豊富な分泌小胞分画を得ることができました。現在、抗 rCLCA 抗体陽性分画の量的・質的变化を検討しているところです。今後、rCLCAが生理的機能を果たすためには他のイオン輸送体と形質膜上や分泌顆粒膜上で集積するのではないかと考えながら研究を進めていきたいと思ひます。



膜電位—細胞長変換素子プレスチンの分子構築と動的構造変化

自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子研究部門

久保 義弘

我々の研究グループは、これまで、内向き整流性K⁺チャンネル Kir2.1、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1、ATP 受容体チャンネルP2X₂等を主たる対象とし、これらの神経機能素子の極めて精妙にできた分子機能のメカニズム、構造機能連関、動的構造変化等を知ることを目的として、電気生理、光生理、分子生物の研究手法を用いて研究を進めてきました。今回、精巧な分子機能を持つ興味深い分子プレスチンを対象とした研究課題で、本特定領域に参加させていただくことになりました。以下、その計画の概略を紹介します。

内耳の外有毛細胞は、膜電位変化に伴い伸縮しその細胞長を変えることが知られています。10kHz 超という驚異的に高速の膜電位変化にまで細胞長伸縮が追従するため、その機構は長く関心の的でした。2000年に、膜電位を細胞長に変換する分子としてプレスチンが同定され、さらに、プレスチン内部に抱え込まれたCl⁻が膜電位依存的にプレスチン分子内を translocate して分子の“カサ”が変化することが細胞長の変化を引き起こすという下図のような分子機構が提唱されました。しかし、「外有毛細胞における膜電位-細胞長変換機構」についての真の理解にはまだほど遠い状態です。すなわち、プレスチンの動的構造変化の実態に関する知見は得られておらず、また機能発揮に必要とされるパートナー分子群の同定はなされていません。プレスチンは、ペンドリンと一次構造上の類似性を示し、陰イオントランスポーターSLC26ファミリーに属します。通常の陰イオ

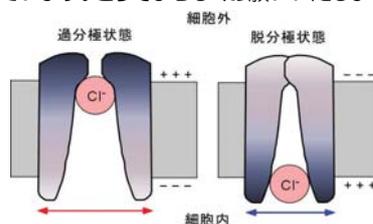
ントランスポーターが、陰イオン輸送を役割としているのに対し、プレスチンは、陰イオンを分子内に抱え込み膜電位センサーとして利用している特殊な分子で、輸送(透過)に至らないだけで、陰イオンの認識、中途までの移動、トランスポートソームによる制御等の機構には、共通点があると予想されます。

本研究における我々のゴールは、プレスチンによる膜電位-細胞長変換機構とその生理的意義を明らかにすることです。そのゴールに向け、以下の4点を specific aims して、研究を進めることを計画しています。(1)「膜伸縮はプレスチン単独の動きによるものではなく、プレスチンの変化を細胞全体に伝える他の蛋白質が存在する。」という仮説に基づき、プレスチンと複合体を形成する蛋白を yeast two hybrid 法により同定します。機能的再構成の実験を行うことにより、トランスポートソームの機能的意義を明らかにします。(2)プレスチン分子自体や結合蛋白に、蛍光蛋白を遺伝子工学的に付加したものを発現させ、膜電位固定下でのFRET解析により、膜電位とCl⁻の存在に依存するプレスチン分子の動的構造変化や、結合蛋白との結合の動的変化に迫ります。(3)Baculo virus - Sf9 細胞発現系により、Cl⁻存在下、非存在下における、プレスチンの recombinant 蛋白の精製を行います。これを用いて、精製蛋白の多数の電子顕微鏡像を基に画像解析により構造に迫る、単粒子構造解析に進みます。(4)イオンチャンネルポアが柔軟性を持つという最近の知見を考慮すると、プレスチンの構造変化は直接的にもしくは細胞膜

の伸縮を通じて、同じ細胞膜上に発現するイオンチャンネルに影響を及ぼす可能性が考えられます。そこで、共発現させたプレスチンによりイオンチャンネルが機能修飾を受けるか否かを検証します。

我々は、プレスチンを対象とした研究については、まだ発表論文等の実績を持たず、本研究は新しく立ち上げたものです。このような状況であるにもかかわらず、本特定領域に参加させていただけることに心より感謝しています。この機会を活かし、トランスポートソーム研究の専門家の方々から、有益なご助言や情

報をいただきつつ、研究を進めていきたいと考えています。また、班会議等で、様々な興味深い研究発表を拝聴できることを楽しみにしています。どうぞよろしくお願いいたします。



新規電位センサータンパク質VSOP2複合体とその生理的役割

岡崎統合バイオサイエンスセンター 神経分化研究室

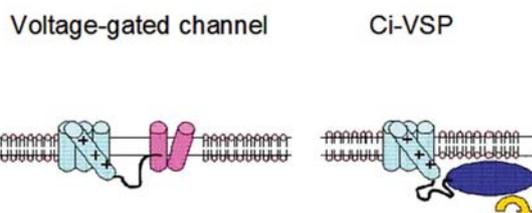
岩崎 広英

自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化研究室(教授:岡村康司、助教授:東島眞一)で助手としております岩崎広英と申します。私達の研究室は、統合バイオサイエンスセンターが発足したのに伴い新たにできた研究室で、今年で5年目を迎えました。現在、研究室では岡村教授率いるグループが電位センサータンパク質の研究を、東島助教授率いるグループがゼブラフィッシュのロコモーションに関わる神経回路の研究をそれぞれ進めております。私自身は統合バイオの研究室発足と同時に研究室に参入致しましたが、岡崎に移る前から岡村研究室では尾索動物の一種であるホヤを用いて神経細胞の分化や膜興奮性の獲得に関する研究が行なわれておりました。現在はマウスや他の生物も用いておりますが、並行してユウレイボヤを実験に用いております。実験動物としてのホヤの利点は、進化的に脊椎動物に極めて近い動物でありながら線虫のようにオタマジャクシまでの細胞系譜が完全に明らかにされていることで、細胞の発生・分化の研究には大変適しています。加えて2002年にユウレイボヤの全ドラフトゲノムが明らかにされたため、遺伝子の単離から解析までを極めて容易に行なえるようになりました。なお、ユウレイボヤは私の所属する研究所から車でわずか30分の蒲郡の海にもたくさん生息しております。ビニール製の植木鉢に穴を開け、ロープを結び付けて海に吊るしておきますと、2ヶ月もすると植木鉢の内側にびっしりとホヤが固着するほどです(ただしシーズンものなので、シーズンオフには動物が手に入らないというデメリットもあります)。

上述しましたように、私達は神経細胞の分化と膜興奮性に興味を持っていたため、ユウレイボヤのゲノムにどのようなイオンチャンネルが存在するのかについて明らかにしたいと考え、複数の研究室にご協力いただいてアノテーション作業を行ないました。その過程で、私達は奇妙な分子 Ci-VSP に行き当たりました。Ci-VSP は電位依存性イオンチャンネルの電位センサーに相当する構造を持っておりますが、イオンを通す孔(ポア)に相当する構造を持っておらず、代わりに長い細胞質領域を持っておりました。

さらに細胞質領域を調べたところ、PTEN と呼ばれるイノシトールリン脂質のホスファターゼと高い相同性を持つことが分かりました。解析の結果、Ci-VSPはイノシトールリン脂質のホスファターゼとしての活性を持っており、その酵素活性は膜電位によって調節されるということを見出しました。さらに、Ci-VSPのように電位センサーを持ちながらポアを持たない分子は他にもあるのではないかと考え、ユウレイボヤおよびマウス、ヒトなどのゲノムを解析したところ、そうした構造をもつ分子が複数見つかりました。そのうち一つであるVSOP1は、細胞に発現させるとポアを持たないにも関わらずイオン電流が観察され、電気生理学的・薬理的解析の結果、この分子はプロトンチャンネル(またはその構成要素)であることが分かりました。

これまで、膜電位を感知して動くタンパク質はイオンチャンネルしか知られておらず、膜電位変化はイオンの透過性を変えることで細胞の生理機能に影響を及ぼすと考えられてきました。しかし、このように電位センサーのみを持つ分子が存在することは、膜電位がもっと広汎な生理現象にも関わっている可能性を示唆しているといえます。こうした観点から、私達は電位センサーのみを有するタンパク質に注目し、それらの生理機能に迫りたいと考えています。特に本研究領域では、脳神経系に特異的に発現している新規電位センサータンパク質 VSOP2に焦点を当てて研究を進めて参りたいと考えております。これらの電位センサータンパク質は、それ自身が単独で機能を有する可能性も考えられますが、他のタンパク質と複合体を形成して、膜電位変化をそれらの複合体形成タンパク質に伝えている可



能性も充分に考えられます。さらに上記のCi-VSPについては、膜電位変化がどのように酵素活性を調節しているのかという重要な問題が残っております。この問題に取り組むには、基質となるイノシトールリン脂質が形質膜の構成成分でもありますので、脂質とタンパク質との相互作用について考察する必要があります

そこで本研究領域では、特にそうしたタンパク質複合体あるいは脂質-タンパク質複合体といった観点から研究を展開したいと考えております。諸先生方のご指導、ご協力、ご助言を頂ければ大変幸いです。どうぞ宜しくお願い致します。



Na⁺/H⁺アンチポータの機能制御複合体を構成する新規タンパク質の探索

国立循環器病センター研究所 循環分子生理部

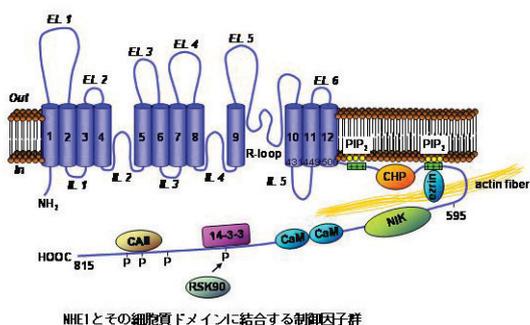
若林 繁夫

国立循環器病センター研究所では、医化学・分子生物学・工学などあらゆる分野の専門家が集まり、「循環器病の制圧」という共通の目標に向かって研究を進めています。そんな中で、私たちの研究室は基礎研究にかなりのウエイトを置いている部門と言えるかもしれません。遺伝子およびタンパク質分子の生理機能が破綻することで疾患につながるわけですが、私はいつもこの「分子⇔疾患」を双方向からアプローチする視点が大切だろうと考えています。特定のタンパク質の詳細な研究から疾患が見えてくるし、逆に特定の疾患に執着して研究することで新たな分子が見えてきたりします。そんなわけで、私たちの研究室では「分子」としては主としてイオントランスポータを、「疾患」としては心筋症や筋ジストロフィー症といった筋変性疾患を取り上げ、「分子⇔疾患」双方向の連携を保ちながら研究を行っています。

初めてのニュースレターということで私自身の研究歴なるものを若干紹介することになります。私は研究の物心がついたころから、いつも「イオントランスポータ」と一緒に暮らしてきました。最初に取り組んだのは心筋のNa⁺/Ca²⁺交換輸送体でした。1970年代後半というところの心臓や心筋組織レベルでの研究しかなかったのですが、初めて培養心筋細胞を用いて活性測定を行い、この輸送体が心筋の細胞膜に高密度で存在するであろうことを当時確信しました。数年のち、筋小胞体Ca²⁺ポンプの研究に着手しました。Ca²⁺ポンプATPaseの詳細な反応機構を約7年にわたって主としてEnzymologyの手法によって解析しました。およそ20年の歳月を経て、これら二つのCa²⁺トランスポータの研究は眼を見張るような進歩を遂げたのは周知の通りです。最近の10数年間にわたって力を入れて取り組んで

きたのは今回の特定公募の研究テーマでもあるNa⁺/H⁺交換輸送体(NHE)で、あらゆる生物のすべての細胞においてpHや細胞容積の調節に重要な役割を果たすトランスポータです。これらの研究を行うなかで、1)イオンはどのようにして輸送されるのか、2)輸送はどのようにして制御されるのか、という疑問は常に頭を離れませんでした。2003年を皮切りに細菌のトランスポータの結晶構造が相次いで明らかにされたことにより、少なくとも第一の謎に対してはかなり見通しがよくなりました。しかし、動物細胞のトランスポータは単一ポリペプチドで機能することはほとんどなく、さまざまな活性制御因子の結合やリン酸化などの修飾がなされ、輸送とその制御の分子機構も巨大なタンパク質分子複合体の機能として理解されるべきという思いがずっとありました。

さて、私たちの体を構成するあらゆる細胞において、細胞質のpHはおよそ7.2付近に厳格に固定されています。pH制御は主として細胞膜に存在するNHE、Na⁺/HCO₃⁻共輸送体、Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送体などのトランスポータの共同作業によって行われますが、NHEはとりわけ細胞内が酸性化したときに中性に戻す acid extruder として機能しています。NHEは増殖因子、ホルモンなどの化学物質に加えて、高浸透圧、ストレッチなど機械的刺激を含むあらゆる種類の細胞外シグナルによって活性化を受ける点で制御システムの発達したまことに興味深いトランスポータファミリーです。また、NHEの活性化は心疾患や癌におけるリスクファクターになる可能性も指摘されており、カリポライドなどのNHE特異的阻害剤は心疾患の病態を改善したり癌の成長を抑制したりすることが知られています。NHEの制御機構はC末細胞質ドメインに集約されています。私たちの研究を含めて膨大な研究の蓄積によって、普遍型NHE1の細胞質ドメインにはさまざまな制御分子群が結合し、シグナルを集積する一つの機能制御複合体を形成することが明らかになりつつあります。NHEはまたアクチンファイバーに連結し、おそらく他の膜タンパク質とともに限定された膜コンパートメントに集積する可能性も指摘されています。NHEはまさにトランスポートソームの格好のモデルであると思います。私たちは最近、制御因子のなかでカルシニューリンB様タンパク(CHP)は極めて重要で、細胞質ドメインのα-helixに結合する



ことがNHEの活性を発揮させるうえで必須であることを見出し、私たちは活性に必須なタンパク質因子はCHP以外にも存在し、膜直下で大きな機能制御複合体を形成するであろうと予想しています。特定公募の萌芽的研究に参

加させていただき、皆様の力をお借りしながら、将来のNHE複合体超分子の原子構造と機能の解明の大きな夢に向かって、是非重要なone stepを踏み出せたらと願っています。



糖-核酸トランスポーターの細胞内局在と機能

三菱化学生命科学研究所

後藤 聡

今回、公募研究として採択していただいた三菱化学生命科学研究所の後藤聡と申します。よろしくお願いたします。

私達の研究室では、糖修飾に必須な役割を果たす「糖-核酸輸送体」に着目して研究を行っております。糖-核酸輸送体とは、ゴルジ体や小胞体の膜上に存在し、細胞質で合成された糖-核酸をゴルジ体や小胞体の内腔に輸送する蛋白質のことです。輸送された糖-核酸は、糖修飾の基質として用いられます。私達がショウジョウバエで同定した新規の糖-核酸輸送体 Fringe connection (FRC) は、様々な種類の糖-核酸を輸送することがわかりましたので、その変異体では多くの糖蛋白質の糖修飾に異常が生じると考えられました。しかし、実際に調べてみると、一部の蛋白質の糖修飾にしか異常が認められませんでした。さらにFRC蛋白質の局在を調べてみると、一部のゴルジ体にしか局在しないことがわかりました。これらの結果を基に解析を進めたところ、ショウジョウバエの細胞内に散在するゴルジ体は一種類でなく、複数の機能的に異なるゴルジ体から成り立っていることがわかりました(図1)。つまり、異なるゴルジ体には異なるセットの糖修飾分子群が局在しており、それぞれ異なるゴルジ体では異なる糖修飾が行われている可能性を見いだしました。糖修飾過程は複雑であることがわかっていますが、それを制御するメカニズムの多くは現在でも未知のままです。私達の結果は、この糖修飾制御の重要なメカニズムのひとつを明らかにしたと考えています。

では、機能的に異なるゴルジ体にはいくつの種類があるので

しょうか?それを明らかにするために、本研究では「糖-核酸輸送体」に着目して解析することになりました。ショウジョウバエのゲノムデータベースを検索し、10種類の「糖-核酸輸送体」候補遺伝子を見いだしました。それらの分子の局在を、タグ付加した「糖-核酸輸送体」を発現させて検討します。それら「糖-核酸輸送体」の局在パターンを基に何種類のゴルジ体があるかを明らかにする予定です。さらには、それぞれの「糖-核酸輸送体」の変異体の表現型を検討することによって、異なるゴルジ体の機能的な違いについて解析する予定にしています。本研究によって、ゴルジ体の機能分化といった新たな概念が提出できるのではないかと考えています。

さて、私達が所属する三菱化学生命科学研究所は、東京都の郊外にある町田市の、その郊外にある自然林も豊かな「かしの木山自然公園」という小高い丘の一隅に建っております。遠くから望むと、まるで森の中に隠された秘密基地のようです。しかも、その中ではネズミやハエを相手に一喜一憂している、ちょっと変わった人々が働いています。周辺住民は、そんな研究員を、「かしの木山ヒルズ族」と噂しているのかもしれませんが。セブな研究員の中にあって、私達は、「RNAiハエライブラリー」というスペシャルなショウジョウバエ達と一緒に研究を行っています。どこがスペシャルかというと、このライブラリーを用いると、ショウジョウバエのほとんどの遺伝子をRNAi法によってノックダウンできるからです。さすが、五分の魂を持つ奴らです!?! しかも、このライブラリーは、三菱化学生命研と国立遺伝研(三島)で共同作成しているものなので、ちょっと他にはない「レアもの」です。私達は、このライブラリーを最大限に活用して、糖修飾に関わる遺伝子の網羅的スクリーニングを行っています。このようなスクリーニングは世界的にみても大変ユニークなので、どのような遺伝子がとれるか、とてもわくわくしています。研究生活は楽しいのですが、「かしの木山ヒルズ」は、やっぱりアーバンな「六本木ヒルズ」とは違います。コンビニがそばにありません。「かしの木山」には、たくさんのドングリがありますが、「現代人」に属する私の消化器官には、ややハードです。せめて「かきの木山」だったら良かったのに、と思ってしまう。このようなストイックな環境ですが、心と頭は豊かにして研究を楽しんでいきたいと考えています。

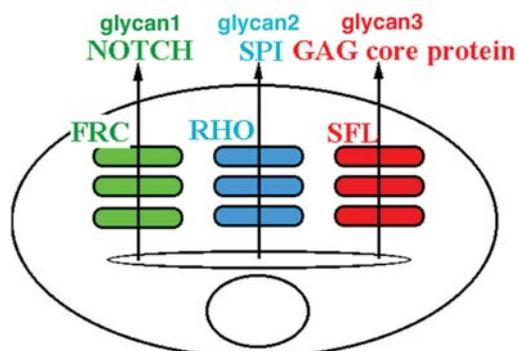


図1

トランスポートソームの関連する話題1

タンパク質による生体膜の形態制御機構

東京大学医科学研究所 腫瘍分子医学分野 末次 志郎

はじめに

本特定領域の研究課題は膜輸送複合体の作用機序を理解することにある。膜輸送複合体(transportosome)は、私の理解では、膜貫通タンパク質であるイオンチャンネルや受容体など、膜を介しておこなう物質輸送を担うタンパク質が構成する複合体であり、細胞膜を介した物質輸送の制御に重要であると考えられる。従って、膜輸送複合体の構成因子の同定、その作用機序の理解は非常に重要な課題であると考えている。いうまでもなく、これらのチャンネルや受容体はたくさんのタンパク質と相互作用し、輸送のオン/オフが制御されていると考えられる。しかし、その全貌はほとんど明らかでない。

1. T-tubule

古くから研究されてきたチャンネルを介した物質輸送として重要なものにはカルシウムトランスポートがある。カルシウムはよく知られているように細胞内のシグナルを制御し、細胞機能に重要な役割を果たしている。カルシウムチャンネルにはIP3受容体を兼ねるものや電位依存型など様々なタイプのものが知られている。電位依存型L型カルシウムチャンネルは筋肉で見られる特殊な形をした膜構造であるT-tubuleに特に濃縮して局在していることが知られており、これらの受容体の機能と局在の重要な相関を示している(1)。

T-tubuleは筋肉の筋原繊維(図1)を取り囲むような膜構造を作っている(2)。非常に興味深いことに、T-tubuleは細胞膜が陥入して出来る構造体である。T-tubule形成の分子機構として、caveolin-3の関与が最初に指摘されている。Caveolinはcaveolaを構成するタンパク質である。Caveolaは細胞膜のくぼみであり、陥入して、小胞となって、細胞内に輸送される

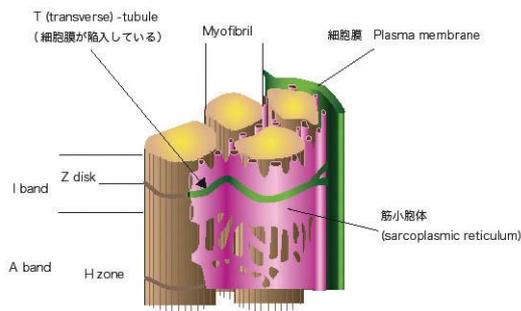


図1 T-tubule

筋肉のT-tubuleの模式図。細胞膜が陥入した構造であるT-tubuleは筋小胞体(サルコメア)と近接していて、筋肉の活動におけるカルシウムシグナルの形成に重要な役割を果たしている。

ことで、細胞外の液体を細胞内に輸送する役割を持つと考えられる。Caveolin-3は筋ジストロフィーの原因遺伝子の一つとして知られていて、caveolin-3の欠損マウスではT-tubuleの形態に顕著な障害がみられることが知られている(3,4)。

しかしながら、caveolin-3欠損マウスにおいても、形態的におかしいながらもT-tubuleは形成されることから、ほかの機構がT-tubule形成に関わっていることが示唆されていた。Amphiphysinは脳において高発現する分子であるが、横紋筋においても強い発現がみられる。ショウジョウバエの遺伝学的解析から、AmphiphysinがショウジョウバエのT-tubule形成に必要であることが示唆されていた(5)。

2. BARドメインの発見

AmphiphysinはN末端にBin-Amphiphysin-Rvs167 (BAR)ドメイン、C末端にSH3ドメインを持つアダプター分子である。BARドメインは脂質結合ドメインであり、SH3はタンパク質-タンパク質相互作用を担うドメインである。興味深いことにBARドメインは *in vitro* で人工脂質二重膜を変形し、tubuleを作ることができる(図2)。つまり、caveolaによる膜の陥入の誘導とAmphiphysinのBARドメインによる膜のtubule化がT-tubule形成に関わっていると示唆される(6)。

BARドメインの立体構造が明らかにされた。興味深いことにBARドメインはバナナ型の構造をとるダイマーであった(図3)(7)。変異体の解析の結果、バナナ型のカーブの内側の正電荷

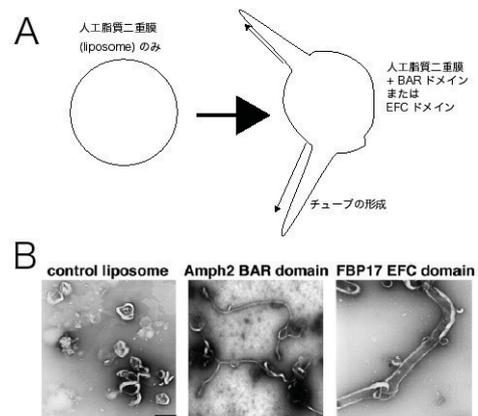


図2 BARドメインやEFCドメインによる人工脂質二重膜(liposome)の変形

人工脂質二重膜を形成し、人工脂質二重膜の外にBARやEFCドメインの精製タンパク質を加えると、球状の人工脂質二重膜の変形(tubulation)が見られる。

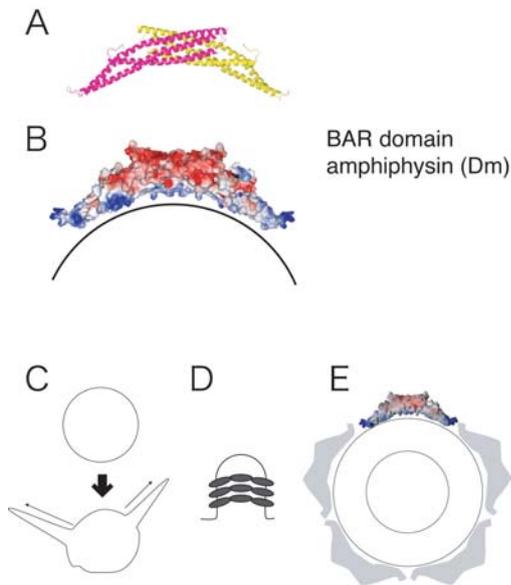


図3 BARドメインの立体構造

- A. BARドメインの立体構造を示す模式図。ダイマーで合計6本の α ヘリックスからなる。
 B. 表面電化を示す。赤が負電荷で、青が正電荷を示す。細胞膜は基本的に負に帯電しているため、正に帯電した凹面が膜と相互作用すると考えられる。
 C. BARドメインによる人工脂質二重膜変形の模式図。
 D. 凹面が膜と相互作用するので、チューブ状の膜をBARドメインが取り囲んでいるのではないかと考えられている。E. BARドメインがチューブを取り囲むと仮定した場合の模式図。

と細胞膜の負電荷が相互作用し、膜を変形してtubuleを作ると推察された。

Tubule形成の詳しいメカニズムは不明であるが、バナナ型のBARドメインの内側に膜が結合することから、BARドメインが、膜に巻き付くことで、tubuleを形成するのではないかと考えられている。興味深いことに、立体構造から予想されるバナナ型のカーブの内側の半径と、in vitroでみられるtubuleの半径はだいたい相関していると考えられている。

筋肉以外の細胞においてはAmphiphysinはエンドサイトーシスに関わっているといわれている。ほ乳動物の細胞や酵母を用いた解析からAmphiphysinのSH3ドメインは多数のタンパク質と結合する。その中で、量的に多く含まれるタンパク質はdynaminとN-WASPである(8, 9)。DynaminはGTP依存的に膜を切断する酵素である。N-WASPはアクチン集合を誘導するタンパク質である。つまりAmphiphysinによって特定の曲率を持つ膜にこれらのN-WASPやdynaminが呼び寄せられ、アクチン重合が誘導されたり、dynaminが活性化することがエンドサイトーシスにおける小胞の切断あるいはその後の小胞輸送に必要であると考えられている。

3. BARドメインスーパーファミリーに属するEFC/F-BARドメインとRCB/IMDドメインの発見

BARドメインは多数のタンパク質に見いだされる。BARドメインに弱い相同性を持つドメインとして、EFC (Extended FCH)あるいはF-BARドメインが見いだされた(図4)。FCHドメインは、微小管結合ドメインとして見いだされたが、タンパク質ファミリー間の保存領域はFCHドメイン直後に共通して見いだされるCoiled-coil領域を含むことがわかった。この

FCH+Coiled-coil領域は、BARドメインと同じく、膜結合活性および膜変形(tubule形成)活性を持っていた(図2)。従って、この領域全体で、EFC/F-BARドメインと名付けられた。しかしながら、膜変形の結果生じるtubuleの半径は異なっていて、BARとEFCドメインは異なる膜形態に準拠して機能すると考えられる(10, 11)。

興味深いことにEFCおよびBARドメインを持つタンパク質はほとんどがSH3ドメインを持ち、Amphiphysinと同じようなドメイン構造を持っている(図4)。SH3ドメインもまたAmphiphysinのSH3ドメインとおなじように、dynaminとN-WASPに結合する。EFCドメインを持つタンパク質のうちFBP17やCIP4はEFCドメインとSH3ドメインを持ち、エンドサイトーシスに関わっている(10, 11)。しかしながら、関わっているプロセスはAmphiphysinとは異なるようである。また、NwkはEFCドメインと2つのSH3ドメインを持ち、その変異体では神経筋接合部の軸索末端(Synaptic bouton)の形態異常が報告されている(12)。

Rac-binding (RCB)/IRSp53-Mim-homology domain (IMD)ドメインは、IRSp53を含むタンパク質のN末に見いだされるドメインで、やはりC末にSH3ドメインを持つ(図4)。RCB/IMDドメインは、BARやEFCと同じく α ヘリックスで構成されるダイマーを形成するが、形はバナナ型でなく、直線上で非常に興味深い(13)。RCB/IMDドメインもまた膜に結合する(14)。

BARドメインやEFCドメインを持つタンパク質は進化的に保存されていて、多数のタンパク質からなる大きなファミリーを形成している(図4)(15, 16)。BARドメインやEFCドメインを持つタンパク質は特定の形態を持つ膜と、N-WASPやdynaminなどのアクチン細胞骨格制御因子や膜切断酵素を結びつけ、膜の形態を制御していると考えられる。

4. 膜形態形成機構の4つのメカニズム

そもそも膜を形成する脂質二重膜を構成する脂質は相互に連結しておらず、常にランダムに運動している。つまり、脂質二重膜は二次元液体と考えることができる。脂質により構成される膜は、それ自体では特定の形をとることができ

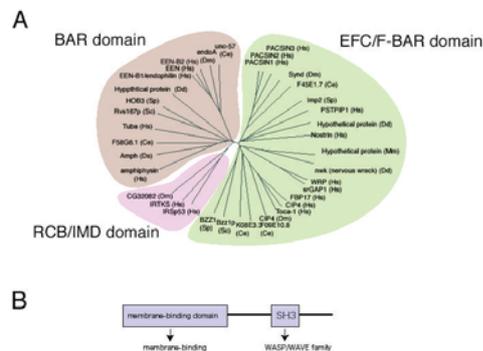


図4 BARドメインとEFCドメインの系統樹

- A. BARドメイン、EFCドメインおよび近縁のRCB/IMDドメインの系統樹を示す。
 B. Aで示すタンパク質の多くに見られるドメイン構造。膜結合ドメインとSH3ドメインからなり、SH3ドメインに結合するタンパク質を特定の膜に局在させ、制御するアダプター分子と考えることが出来る。中にはRhoGAPドメインなどを持つものもある。

脂質二重膜の形態形成に関するモデル

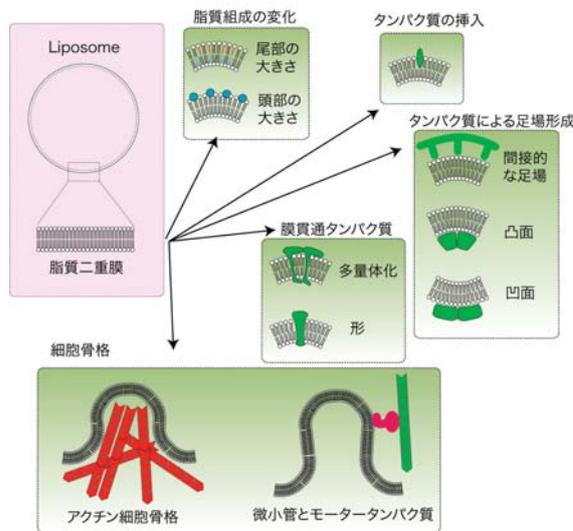


図5 膜変形の分子機構

脂質二重膜の形態制御機構として概念的に考えられているものを示す。脂質組成の変更によるものと、タンパク質によるものに大別され、タンパク質によるものではタンパク質が膜に挿入されるものと、タンパク質がガイドとなって膜の形態を決定するものに大別できる。AmphiphysinのBARドメインは足場形成モデルに基本的によっているが、EndophilinのBARドメインは足場形成とタンパク質の膜への挿入を同時に用いている。また、BARドメインやEFCDドメインはSH3ドメインを伴っており、アクチン細胞骨格などを同時に制御することが出来る。従って、これらのメカニズムは、様々に組み合わせられて用いられる。文献(17)より改変。

きない。したがって、細胞膜だけでは基本的に球状の形態をとる(図5)。もちろん脂質二重膜のそれぞれの層が異なる脂質組成を持つことで、膜形態をコントロールすることは可能である(図5)が、基本的には細胞膜は別のもの(基本的にはタンパク質と考えられる)によって支えられることで様々な細胞や細胞小器官特有の形態を作っている。

膜形態をタンパク質依存的に制御する機構としては基本的に4種類が考えられている(17)。一つは、AmphiphysinのBARドメインやおそらくEFCDドメインのようにタンパク質の形が静電的相互作用によって膜の決定を決める機構である(図5)。静電的相互作用ではなくて、タンパク質の疎水性アミノ酸側鎖が膜に埋め込まれることで、二重膜の内膜と外膜の曲率を変えて、膜の形態を変化させること機構も知られている(図5)。EndophilinのBARドメインは、静電的相互作用のみならず、膜に挿入される突起も持っていることが知られている(18, 19)。膜貫通タンパク質が細胞膜の形を決めることもあり得る。もう一つの機構は以前からいわれていたように細胞骨格の変化に従って、細胞膜の形が変わるというものである(図5)。

興味深いことに、BARドメインやEFCDドメインを持つタンパク質の多くは細胞骨格制御タンパク質と結びついている。したがって、これらの膜形態制御機構は相互に関連していると考えられる。

終わりに

ここで述べたような細胞膜形態制御機構と、チャネルや受容体の局在機能制御機構がどのように結びついているか今のところ明らかではない。しかし、チャネルや受容体は明らかに細胞

膜の特定の膜構造に濃縮している。したがって、これらの膜形態決定機構とチャネルや受容体の機能制御には何らかの相関があると考えられる。この課題は本特定領域研究で明らかにしていきたいと考えている。

参考文献

- Flucher, B. E., Andrews, S. B., Fleischer, S., Marks, A. R., Caswell, A., and Powell, J. A. (1993) *J Cell Biol* **123**, 1161-1174
- Ishikawa, H. (1968) *J Cell Biol* **38**, 51-66
- Galbiati, F., Engelman, J. A., Volonte, D., Zhang, X. L., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Edelmann, W., and Lisanti, M. P. (2001) *J Biol Chem* **276**, 21425-21433
- Galbiati, F., Razani, B., and Lisanti, M. P. (2001) *Trends Mol Med* **7**, 435-441
- Razzaq, A., Robinson, I. M., McMahon, H. T., Skepper, J. N., Su, Y., Zehlf, A. C., Jackson, A. P., Gay, N. J., and O'Kane, C. J. (2001) *Genes Dev* **15**, 2967-2979
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O. A., Ochoa, G. C., Farsad, K., Wenk, M. R., and De Camilli, P. (2002) *Science* **297**, 1193-1196
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2004) *Science* **303**, 495-499
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V., and De Camilli, P. (1999) *Nat Cell Biol* **1**, 33-39
- Colwill, K., Field, D., Moore, L., Friesen, J., and Andrews, B. (1999) *Genetics* **152**, 881-893
- Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005) *Dev Cell* **9**, 791-804
- Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., and Takenawa, T. (2006) *J Cell Biol* **172**, 269-279
- Coyle, I. P., Koh, Y. H., Lee, W. C., Slind, J., Fergestad, T., Littleton, J. T., and Ganetzky, B. (2004) *Neuron* **41**, 521-534
- Millard, T. H., Bompard, G., Heung, M. Y., Dafforn, T. R., Scott, D. J., Machesky, L. M., and Futterer, K. (2005) *Embo J* **24**, 240-250
- Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006) *J Cell Biol* **173**, 571-585
- Gundelfinger, E. D., Kessels, M. M., and Qualmann, B. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 127-139
- Habermann, B. (2004) *EMBO Rep* **5**, 250-255
- McMahon, H. T., and Gallop, J. L. (2005) *Nature* **438**, 590-596
- Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y., and Mochizuki, N. (2006) *Embo J* **25**, 2889-2897
- Gallop, J. L., Jao, C. C., Kent, H. M., Butler, P. J., Evans, P. R., Langen, R., and McMahon, H. T. (2006) *Embo J* **25**, 2898-2910

生体膜におけるリン脂質分子の動態とその制御タンパク質

京都大学化学研究所 超分子生物学研究領域 梅田 真郷

1. はじめに

最近の分子生物学をはじめとする様々な生物学研究の方法論の進歩により、生物を構成するタンパク質分子ならびに遺伝子群に関する情報が飛躍的に増加しております。一方、生物の主要な構成成分である脂質や糖鎖につきましても、これらの分子が遺伝子により一義的に規定されていないこと、分子の集合体を形成することにより機能していること、また分子種が極めて多様であること等の理由により、遺伝子操作の手法を駆使した研究が困難であり、その生物機能の研究は立ち後れた状況にあります。

このような状況のもとで、私共はこの十数年来、生体膜の基本構造をなす個々のリン脂質分子の動きと機能を探るための新たなプローブの開発を進めてきました。これまでに、リン脂質特異的モノクローナル抗体群を樹立し、特定のリン脂質に結合する放線菌の産生する環状ペプチドやミズズのタンパク質を見出し、生体膜におけるリン脂質分子の局在やその機能を解析するプローブ群を作製いたしました。これらリン脂質プローブを用いましてリン脂質分子の生物機能の探索を行って参りましたが、私にとって最初の新鮮な驚きは、一分子としては明らかな機能の見出せない、いわゆる生体膜の構築材料と考えられていた不活性なリン脂質が、分子の集団として挙動した時に初めて新たな機能を発揮することでした。具体的には、膜リン脂質の一つのホスファチジルエタノールアミンの局所的な配向性の変化が、細胞骨格系の再編を引き起こす引き金となり、細胞分裂や細胞の運動・形態形成に重要な役割を果たしていることを見出したことでした^{1)~4)} (図1)。

さらに研究が進んで、全ての生体膜系において、各々のリン脂質分子が脂質二分子膜内外で活発にとんぼ返り運動(フリップ・フロップ)を繰り返し、また膜面上では脂質分子が離合集散する

ことにより、様々な機能ドメインが形成されていることが明らかになりつつあります。私共は、このような脂質分子の作るドメインが細胞膜中に存在するタンパク質の機能を制御する「脂質場」を形作ると共に、細胞は膜脂質の分子運動を探ることにより、様々な生物活動を成し遂げているのではないかと考えております。少々前置きが長くなってしまいましたが、このニュースレターでは、生体膜におけるリン脂質の分子運動と局在について概説し、さらに最近明らかになってきた脂質二分子膜内外でのリン脂質輸送に関わるタンパク質群について紹介することにします。

2. 生体膜リン脂質の非対称構造とダイナミズム

生体膜は、脂質二分子膜を基本構造とするきわめてソフトな分子集合体であり、その中では脂質分子の活発な熱運動と分子集合体の構造変化が繰り返されています。膜中での脂質分子の運動をまとめると、回転運動(rotational diffusion)、側方拡散(lateral diffusion)、上下運動(protrusion)、脂肪酸鎖の振動と屈曲運動(bond oscillations, gauche-trans isomerization)、二分子膜内外の移行(flip-flop)、さらに膜間での脂質分子の移行・交換が、さまざまなタイムスケールで繰り返されています(図2)。この様な脂質分子の運動がいわゆる膜流動性の実体となっているわけですが、生体膜中での脂質分子運動はすべてランダムに起こっているのではなく、細胞は脂質分子の運動をうまく操っているのではないかと考えられています。これら脂質分子運動の中で、私共は脂質二分子膜内外での脂質分子のとんぼ返り運動、いわゆるフリップ・フロップに注目して研究を進めて参りました。

細胞の内外、あるいは細胞内オルガネラの細胞質側と間腔側と膜の両面は異なった環境にさらされています。したがって生体膜の内外の面が機能的に分化することにより、各面と相互作用

リン脂質分布の局所的な変化が細胞骨格再編のスイッチとなる

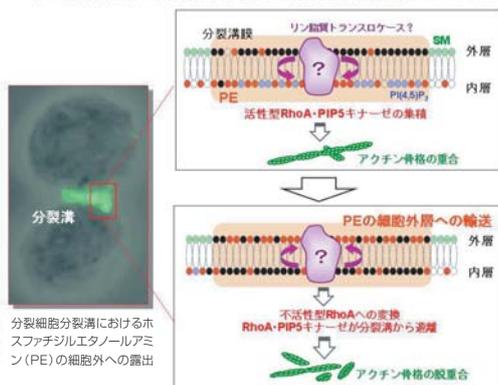
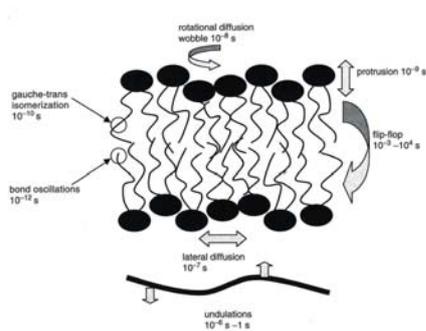


図1

生体膜中での脂質分子の運動とその凡の相関時間



(The structure of biological membranes, CRC press, 2005)

図2

用する分子の活性発現に至適な条件を提供していることは想像に難くありません。実際に、生体膜を構成する脂質二分子膜の内外においてもリン脂質分子が非対称に分布することが細菌、酵母から哺乳動物に至るまでのすべての細胞で普遍的に観察されています。動物細胞膜でなされた解析をまとめると、形質膜において極性頭部にコリン基をもつホスファチジルコリン(PC)やスフィンゴミエリン(SM)は脂質二重層の外層に偏って存在し、アミノ基を有するホスファチジルエタノールアミン(PE)やホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)は内層(細胞質側)に局在します。またリン脂質の細胞内局在についても研究がなされ、オルガネラ膜においてはPE・PSは細胞質側、PC・SMは間腔側に局在することが示唆されています。

このような膜リン脂質の非対称分布はどのような機構で成り立っているのでしょうか。膜タンパク質の膜内でのトポロジーはその合成と膜への挿入の段階で一義的に決定されていますが、リン脂質の非対称分布は各々の脂質が合成される部位により決定されてはなりません。先に述べたように、脂質分子は脂質二分子膜の内層と外層の間をフリップ・フロップ運動により移動することができます。一般に、フリップとは脂質分子が外層から内層へと移行することを指し、逆に内層から外層に移行することはフロップと呼ばれます。ジアシルグリセロール、セラミド、コレステロールなどの分子中で極性基の占める割合の小さい脂質は、人工膜中でも非常に速さ(ハーフタイム15秒以下)で移行します。一方、リン脂質分子がフリップ・フロップするためには親水性の極性頭部が疎水生領域を通過する必要があり、大きなエネルギーを必要とします。そのため、脂質のみで作られた人工膜においては、リン脂質分子のフリップ・フロップのハーフタイムは数日以上に及ぶ場合もあり、グリセロール基の2位に不飽和脂肪酸を有するPCの場合にはハーフタイムが数時間のオーダーで人工膜中でフリップ・フロップします。しかし、生体膜においては数分から数十分のハーフタイムでリン脂質のフリップ・フロップが観察されます。また細胞内の各々の膜系によって脂質分子のフリップ・フロップの速度が違い、同一の膜中でもリン脂質の種類によって、また移行する方向によってもその速度が大きく異なっています⁵⁾。この違いは、

定されています(図3)。

3. リン脂質フリッパーゼとして働くP型ATPase

多くの動物細胞の形質膜外層に蛍光標識したPS,PEなどのアミノ基を極性頭部に有するリン脂質を添加すると、ハーフタイム数分という速度で内層へと輸送されるのに対して、PC, SM等の中性のリン脂質は大部分が外層に留まっていることから、アミノリン脂質に対して特異性の高い輸送体が形質膜上に存在することが示唆されていました。一方、膜の内層から外層へと脂質分子を輸送するフロッパーゼ活性についても様々なリン脂質を用いて測定されましたが、いずれの脂質もゆっくりと輸送され、

膜リン脂質のフリップ・フロップを制御するタンパク質

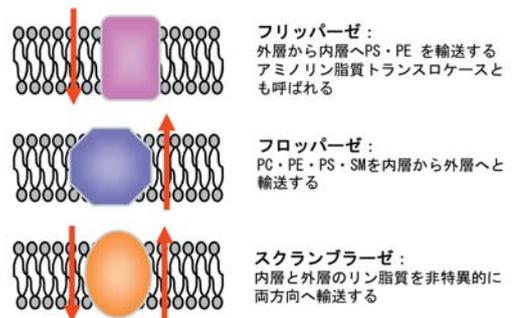
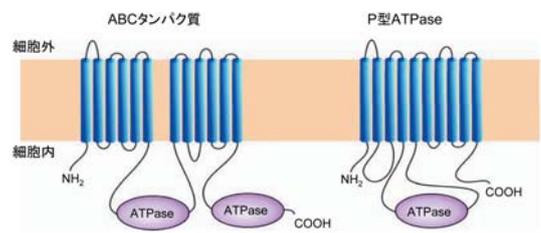


図3

ABCタンパク質とP型ATPaseの構造模式図



Type-4 P型ATPaseは10回の膜貫通領域と1つのATPase領域からなる。ABCタンパク質は、通常6つの膜貫通領域と1つのATPase領域を有する基本骨格の2回繰り返し構造からなる。

図4

表1 脂質フリップ・フロップを促進するタンパク質

分子	由来	細胞内局在	基質
P型ATPase			
ATPasell	(ATP8A1)	ウシ、マウス、ヒト	形質膜
Drs2p	(ATP8A1/2)	酵母	トランスゴルジネットワーク
Dnf1p	(ATP8B1/2/3/4)	酵母	形質膜
Dnf2p	(ATP8B1/2/3/4)	酵母	形質膜
FIC1	(ATP8B1)	ヒト	胆汁酸
SAPLT	(ATP8B3)	マウス	PS?
ALA1	(ATP10A/B/D)	シロイヌナズナ	PS, PE
LdMT	(ATP8A1/2)	リーシュマニア	PS, PE, PC, ミルテフォシン
ABC輸送体 (ヒトABC蛋白質は表2参照)			
Pat1p/Pxa2p (ABC1/2)	出芽酵母		長鎖脂肪酸
Pat2p/Pxa1p (ABC1/2)	出芽酵母		長鎖脂肪酸
CDR1	カンジダ		PS, PE, PC
CDR2	カンジダ		PS, PE, PC
CDR3	カンジダ		PS, PE, PC
スクランブラーゼ			
PLSCR1	ヒト		
その他の脂質フリッパーゼ			
Rft1	酵母	小胞体	Man5GlcNAc2-PP-Dol
Lec35	CHO-K1細胞	小胞体	Man-P-Dol
Wz xE	大腸菌	内膜	lipid III
Rsb1p	酵母	形質膜、小胞体	フィトスフィンゴシン

そのハーフタイムは約1.5時間とされています。これまで、特定のリン脂質がスペクトリン等の細胞骨格系タンパク質と相互作用することにより内層に留まっている可能性も示されていましたが、現在はリン脂質のフリッパーゼとフロッパーゼの活性とリン脂質特異性の違いにより膜リン脂質の非対称分布が維持されているのではないかと考えられています。このフリッパーゼ活性はATP依存的であり、さまざまな阻害剤に対する感受性からP型

表2 脂質フリッパー・フロップに関わるヒトABCタンパク質と病態

遺伝子	基質	関連病態
ABCA1	コレステロール、リン脂質	タンジール病
ABCA3	コレステロール、リン脂質	新生児肺サーファクタント欠損症
ABCA4	N-retinylidene-PE	黄斑部変性症
ABCA7	コレステロール、リン脂質	シェグレン症候群の自己抗原と高い相同性
ABCA12	スフィンゴ糖脂質?	まだら色魚鱗癬
ABCB1	PS, PE, PC, SM, GlcCer, PAF, ステロイド、コレステロール	癌細胞の多剤耐性
ABCB4	PC	肝内胆汁うっ滞症
ABCB11	胆汁酸	肝内胆汁うっ滞症
ABCC1	PS, PC	癌細胞の多剤耐性
ABCD1	極長鎖脂肪酸	副腎白質ジストロフィー
ABCG1	SM, リン脂質 (PC?), コレステロール	コレステロール代謝異常
ABCG5	ステロイド、コレステロール、植物ステロール	高シトステロール血症
ABCG8	ステロイド、コレステロール、植物ステロール	高シトステロール血症

ATPaseであることが予想されていました。近年になり、リン脂質のフリッパー・フロップに関わるP型ATPaseの実体が明らかになって参りました(表1)(図4)。

P型ATPaseは様々なイオンを輸送するポンプとしてバクテリアから哺乳動物まで広く分布し、その構造と機能について精力的に研究が進められています。1957年Skouらにより最初のP型ATPase活性 (Na⁺/K⁺-ATPase) が同定され、その後様々な基質特異性を有するP型ATPaseが同定されることとなり、1997年にSkouらの研究業績に対してノーベル化学賞が授与されました。P型ATPaseの主な活性は膜内外でのカチオン勾配を形成することであり、神経興奮、筋収縮、細胞内pHの調節、細胞容積の調節、胃での胃酸分泌、重金属イオンの輸送、細胞の情報伝達など、多岐にわたる幅広い生理機能に関わっております⁶⁾。

P型ATPaseは5つのサブファミリーに大別されますが、このうちType-4 P型ATPaseがPSやホスファチジルエタノールアミンなどを膜内外で輸送するアミノリン脂質のフリッパーゼとして働くことが明らかにされつつあります⁷⁾。1984年にヒト赤血球を用いた実験によりアミノリン脂質を形質膜外層から内層へ能動的に輸送するフリッパーゼ活性を有するタンパク質の存在が示唆されて以来、1996年牛クロマフィン顆粒から115-120kDaのP型ATPase (ATPase II) が精製・クローニングされ、その酵母ホモログDrs2pを欠損した酵母細胞ではNBD標識したPSの取り込みが阻害されることが観察されました。現在では、Drs2pはトランスゴルジネットワーク (TGN) でATP依存的にPSを輸送することが示唆され、形質膜で機能するType4P型ATPaseには同じサブファミリーに属するDnf1pとDnf2pが同定されています⁸⁾。私共は、PEの膜配向性に異常を来した酵母変異株の作製とその原因遺伝子の解析からPEのフリッパーを制御するタンパク質Ros3p/Lem3pを同定いたしました⁹⁾。その後、Ros3p/Lem3pや同じファミリーに属するCdc50pが上記のDnf1pやDrs2pのP型ATPaseにそれぞれ結合することが示されました¹⁰⁾。

P型ATPaseの機能については、リン脂質を局所的に反転させ膜の曲率を変化させることにより、エンドサイトーシスや小胞輸送のドライビングフォースとして機能していることが示唆されています¹¹⁾。一方、<はじめに>の項で紹介しましたように、細胞膜上でのリン脂質の局所的な配向性の変化がアクチン骨格の制御を介して様々な細胞機能に関わることを示してきておりますが、この際のリン脂質輸送に関わる分子は依然として明らかにはなっておりません。また、上記の酵母の膜リン脂質の配向性を制御するタンパク質として同定したRos3plは、ほとんどの多細胞生

物において保存されておりまして、ショウジョウバエでの相同分子の発現をRNAi法により抑制しますと、極端な細胞サイズの減少が観察されました。また同タンパク質がDNA複製にも関与する可能性も見出しまして、現在ショウジョウバエを用いて、膜系と細胞サイズ制御、DNA複製との関連について研究を進めております。

4. 脂質フロッパーゼとして働くABCタンパク質

ABC(ATP-Binding Cassette)タンパク質は、よく保存されたATP結合ドメインを1機能分子あたり2個有し、ATPのエネルギーを利用して物質を輸送する一群の膜輸送タンパク質であり、脂質を内層から外層へと輸送するフロッパーゼとして働くことが示されて来ています¹²⁾。よく知られているABCタンパク質としては、抗がん剤を細胞外へと排出し多剤耐性に関わるMDR(multidrug resistance)タンパク質とその関連タンパク質MRP(MDR-associated protein)があります。ABCタンパク質の起源は極めて古く、細胞進化のかなり初期から認められます。おそらく、細胞の外に存在する様々な疎水性物質は自由に膜を通過することが出来るので、細胞自身にとって有害となる疎水性物質を細胞外へと汲み出すシステムは細胞の生存にとって必須のものだったと考えられます。

ABCタンパク質が膜リン脂質の輸送に関わるのが最初に示されたのは、ABCB4(以前は、ヒトではMDR3、マウスではMdr2と呼ばれていました)遺伝子を破壊したマウスで肝傷害が引き起こされ、その原因が胆汁中にホスファチジルコリン(PC)が全く分泌されないことが観察されたことでした¹³⁾。実際に、ABCB4は肝臓の胆細管に主に存在し、ヒトにおいてもABCB4遺伝子に異常があると胆汁中からPCがなくなり、肝内胆汁うっ滞が引き起こされることが示されました。その後の一連の実験によりABCB4が脂質二分子膜の内層から外層へとPCをフロップすることが明らかになりました。現在、一群のABCタンパク質が膜脂質の輸送に関わるということが示唆されていますが、そのほとんどが様々な遺伝性疾患の解析を契機に研究が進められています(表2)。ここでは、ABCA1の発見とその機能解析の経緯について簡単に紹介することになります。

タンジール病(Tangiern disease)は、1961年Fredricksonらによってアメリカ・バージニア州のChesapeake Bayにあるタンジール島で最初の家系が発見されたことからこの名称がつけられました。この疾患は常染色体劣性遺伝をとるきわめてまれな疾患で、ホモ接合体は高密度リポ蛋白質(HDL)を欠損し、細網内皮系に多量のコレステロールエステルの沈着が認められ、オレンジ色の扁桃肥大や脾腫、反復性の末梢神経炎をきたす原因

不明の疾患でありました。この疾患の原因遺伝子として ABCA1 が1999年に同定されました¹⁴⁾。ヒト ABCA1 を安定発現させた培養細胞の培養液に脂質の結合していないアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) を加えると、apoA-I にリン脂質とコレステロールが結合した HDL が培地中に出現することが観察されました。その後の様々な解析を考え合わせると、ABCA1 の作用メカニズムとして、ABCA1 は ATP 結合/加水分解によって構造変化し apoA-I のレセプターとなると同時に、PC を外側のリーフレットに移動させ、結合している apoA-I に PC およびコレステロールを受け渡し、HDL を新生させるといふモデルが提唱されました。一方、ヨーロッパの研究グループはまったく異なるメカニズムを提唱しています。それによると ABCA1 が移動させるのはホスファチジルセリン (PS) であり、PS を外側のリーフレットへと移動させ、それによって細部表面へ露出した PS が apoA-I の細胞への結合を引き起こすことにより HDL の新生がなされるとされています¹⁵⁾。

5. その他のリン脂質フリップ・フロップを促進するタンパク質

これまでで紹介した、P型 ATPase ならびに ABC タンパク質はともに ATP 依存的にリン脂質のフリップ・フロップを促進するタンパク質です。この他に、ATP に依存しない幾つかの脂質輸送タンパク質が同定、あるいはその存在が予測されていますので、ここでは簡単に紹介することにします (表1)。

1) スクランプラーゼ¹⁶⁾

血小板の活性化やアポトーシスなど細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇をとまなう局面では、リン脂質の非対称性が失われ ATP 非依存的に PS、PE が形質膜外層に表出することが知られています。この Ca^{2+} 依存的なリン脂質の動きは基質特異性が低いが、ATP 加水分解を必要としないプロテアーゼ感受性な反応であることから、リン脂質を二方向にランダムに輸送するタンパク質 (スクランプレーゼ) の存在が示唆されてきました。1997年ヒト赤血球膜から PLSCR1 (Phospholipid Scramblase 1) が精製・クローニングされ、その後ヒトでは4つのホモログ PLSCR1~4 が同定されました。リン脂質輸送との関与が示されているのは PLSCR1 のみですが、PLSCR1 ノックアウトマウスの赤血球ではリン脂質の動きに異常は見られないことや、スクランプレーゼ活性を欠損したスコット症候群患者のBリンパ球でも PLSCR1 が正常に発現していること、細胞内のスクランプレーゼ活性と再構成した PLSCR1 ではフリップ・フロップ速度が異なることなどから、この分子以外にスクランプレーゼ活性をもつ分子が存在する可能性も含め、今後の検討が必要とされています。

2) 小胞体フリッパーゼ¹⁷⁾

多くのグリセロリン脂質は小胞体上の細胞質側で合成されることから、膜がバランスよく増加するには、新たに合成されたリン脂質分子がただちに二層間で再分配される必要があります。小胞体におけるリン脂質のフリップ・フロップ速度は非常に速く、タンパク質を介して行われていることが示唆されていますが、これまでのところ分子の同定には至っておりません。精製したミクロソーム画分の再構成系を用いて、ERフリッパーゼは ATP 非依存的でリン脂質特異性が低く、内外両方向の輸送に関与することが示唆されています。

3) その他の脂質フリッパーゼ¹⁸⁾

リン脂質のほかにも、糖脂質合成の過程でグルコシルセラミド

がゴルジ体の細胞質側から内腔側へ、また GPI アンカー合成過程ではその前駆体が ER 細胞質側から内腔側へフリップ・フロップすることが知られていますが、これらを制御する分子はまだ同定されていません。糖脂質の合成過程に関わるものでは、スフィンゴシンのフリップ・フロップに関与する分子 Rsb1p が酵母で同定され、その他、N型糖鎖合成におけるドリコールリン酸糖の輸送に関わるタンパク質も同定されています。

6. 終わりに

Pollack G.H. の著書 (Cells, Gels and the Engine of Life, Ebner & Sons Publishers, 2001) は、私のような素人にとっては示唆に富む読み物でしたが、その中で、様々なポンプが働くことによって生体内のイオン勾配を保っていると仮定すると、明らかにエネルギーの枯渇を招くのではないか、という問題についての議論が紹介されていました。今回紹介しましたリン脂質のフリップ・フロップを制御する P型 ATPase も ABC タンパク質もいずれも ATP 依存型の輸送体であり、細胞は膨大なエネルギーを費やして絶えず高速度でリン脂質分子を膜の内外両方向に動かし続けていることとなります。このエネルギー収支については今後の解析を待たねばなりません。生物は膜中の脂質分子集団の運動や分布を自由に操ることにより、膜局所の物理的な相転移と共に機能の相転移をも引き起こすことにより、ダイナミックな生命活動を繰り広げているのかもしれない。膜脂質分子の動きについての研究は、まだその緒についたばかりですが、生体膜の複雑なシステムの基盤となる脂質分子集団の動きと秩序を制御するなんらかの基本的なパラメーターを把握することが出来れば、より一層生命現象の理解が深まるのではないかと期待して研究を進めております。

参考文献

- Emoto, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:12867-12872 (1996)
- Emoto, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12400-12405 (1999)
- Emoto, K. and Umeda, M.: *J. Cell. Biol.* **149**:1215-1224 (2000)
- Emoto, K. et al.: *J. Biol. Chem.* **280**:37901-37907 (2005)
- 加藤詩子、稲留弘乃、梅田真郷:「リポソーム応用の新展開～人工細胞の開発に向けて」(秋吉一成、辻井薫/監修) NTS, 190-203 (2005)
- Kuhlbrandt, W.: *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**:282-295 (2004)
- Paulusma, C.C. and Elferink, R.P.J.O.: *Biochim. Biophys. Acta* **1741**:11-24 (2005)
- Holthuis, J. C., Levine, T. P.: *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:209-220 (2005)
- Kato, U. et al.: *J Biol Chem* **277**:37855-37862 (2002)
- Saito, K. et al.: *Mol. Biol. Cell* **15**:3418-3432 (2004)
- Graham, T.R.: *Trends Cell Biol.* **14**:670-677 (2004)
- Borst, P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta* **1486**:128-144 (2000)
- Smit, J.J.M. et al.: *Cell* **75**:451-462 (1993)
- Brooks-Wilson, A. et al.: *Nature Genetics* **22**:336-345 (1999)
- Hamon, Y. et al.: *Nat Cell Biol.* **2**:399-406 (2000)
- Zwaal, R.F.A. et al.: *Cell. Mol. Life Sci.* **62**:971-988 (2005)
- Matthijs, A. et al.: *Biochemistry* **43**:2674-2681 (2004)
- Helenius A, Aebi M.: *Annu. Rev. Biochem.* **73**:1019-1049 (2004)

編集後記

平成18年度より公募研究の先生方の参加も賜りまして、「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」も特定領域研究らしい陣容となり、様々な研究班の役割担当などが決まりつつあります。本ニュースレターにおいても、「トランスポートソームに関連する話題」を班員や関連研究者よりご提供いただきまして、トランスポートソーム研究の多面性をご理解いただくとともに、班員による優れた研究成果や共同研究の取り組みも紹介することになりました。平成18-19年度のニュースレターの編集につきましては、森泰生と竹島浩が分担致しますので、取り上げるべき話題などありましたらお知らせいただければと存じます。

梅雨後半を迎え、京都は祇園祭りのお囃子につつまれた中、本ニュースレターを編集しております。其の最中、江橋節郎先生(東京大学名誉教授・生理学研究所名誉所長)の訃報が飛び込んできました。筋生理学の巨人である江橋先生はトロポニンを介した Ca^{2+} による筋収縮制御機構の発見で有名ですが、その研究に先立ち、弛緩因子の発見も手掛けられております。すなわち、筋細胞においては、ある種のオルガネラが細胞質の Ca^{2+} をATP依存的に取り除くことにより、弛緩反応が生じることを見い出されたのです。現在では、収縮期には小胞体からリアノジン受容体を介して Ca^{2+} が細胞質に放出され、弛緩期には Ca^{2+} -ATPaseを介して Ca^{2+} が小胞体に回収されることが明らかになっております。この弛緩因子に関する業績は、まさに我が国のトランスポートソームの研究の黎明期における最も先駆的成果でもあります。また、江橋教室とその関連研究室は、トランスポートソームの研究の一線で活躍中の多数の英才を輩出しております。偉人の業績を偲びつつ、合掌!。

TRANSPORTSOME

第2号(2006年9月発行)

編集人:竹島 浩

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

URL: <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

