

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
Winter
2006

膜輸送複合体の生理学への広がり

目 次

平成18年度第1回班会議レポート ～新たなコラボレーションとバリューチェーンへのスタート～ 世話人 大槻 純男・上家 潤一・寺崎 哲也	2
A02班公募研究班員の研究紹介 丸山 芳夫・酒井 秀紀・宇治原 徹 酒井 規雄・藤田 英明・今泉 祐治	3
A03班公募研究班員の研究紹介 森口 茂樹・三輪 佳宏・下川 哲昭・薩 秀夫 田中 光一・木下 専・乾 賢一・三木 隆司 杉田 誠・水島 徹・金井 正美・岩本 隆宏	10
トランスポートソームの関連する話題 1	
膜電位センサーをめぐる最近の展開 岩崎 広英・岡村 康司	22
トランスポートソームの関連する話題 2	
人工細胞膜で創る分子システム 佐々木 善浩・菊池 純一	24
編集後記	27

表紙について

今回の表紙には、日比野先生からいただいた凍結切断法による電子顕微鏡写真を使用しました。免疫金染色されたアクアポリン-4(AQP-4)の4量体を表す正方配列(square array)が観察できます。AQP-4は脳内での水のやり取りをつかさどるチャネルとして知られています。運河や河川の水量・水位を調節し、氾濫や逆流を防ぐ機能を持つ水門(チャネルとゲート)のように脳内で働いていると解釈できます。この水門、チャネル・ゲート部分のみならず、上部には人が作業する足場が見られます。TRANSPORTSOMEの重要性を再認識させられます。

(加藤賢太・秋山智志)

平成18年度第1回班会議レポート ～新たなコラボレーションとバリューチェーンへのスタート～

平成18年9月27日から29日にわたる3日間、宮城県松島・ホテル大観荘において平成18年度第1回班会議を開催いたしました。36チームの公募班が加わってから初めての班会議でしたので、公募班の紹介に加え、今後の領域の発展を目指したチーム間の「相互補完的、有機的連携」の構築と強化を目的としたプログラムを企画いたしました。3日間の会議において、延べ150名の研究者の方々に参加していただき、非常に活発な討論と交流をしていただきました。参加者は領域内だけではなく、関連領域で非常に活発に研究を遂行している領域外の6名の研究者の方々に班友として参加していただき、さらに班会議に興味を持っていた12名の研究者の方々に参加いただきました。また、若手研究者、特に大学院生の参加をお願いした結果、39人の学生が出席し、参加者全体の平均年齢も38歳と若手研究者の多い班会議となりました。

初日の午前中は、記録的な大雨に見舞われ、仙台駅から松島海岸駅への仙石線も運休してしまい、無事、班会議を始められるかと心配しておりましたが、お昼過ぎから天候が回復し、定刻の14時から班会議を多くの参加者のもと開始することができました。まず、金井先生に領域全体の基本方針についてお話ししていただいた後に、公募班の研究発表が行われました。公募班の研究発表は初日の午後、2日目と3日目の午前に各チーム20分で集中的に行われました。特に2日目と3日目は朝7:30から開始にもかかわらず、非常に活発な討論が行われました。活発な討論のため、発表時間がかなり後ろにずれてしまい、最終的に、座長の先生方の総合討論の時間を短縮することになってしまいました。また、公募班の領域の広さも本特定領域の特徴であり、この班会議における研究発表がそれぞれの研究を理解し交流する非常にいい場となりました。

2日目の夕方からは、ポスターセッションに続き特別講演が開催され、そして、夕食を挟み、イブニングレクチャーが開催されました。ポスターは、計画班及び班友等の研究発表である33演題に加え、本班会議の目的である「相互補完的、有機的連携」を技術連携として強化することを目指し、「技術情報交換」として11演題、計44演題が発表されました。技術情報交換では、各チーム独自の相互作用解析技術、可視化技術、プロテオミク

ス技術等の最新技術が紹介され、今後の研究の展開への建設的な議論が、予定の1時間のセッションをいっぱい利用し、各ポスターの前で多く行われていました。

特別講演は、大阪大学産業科学研究所の村上聡先生に、「多剤排出トランスポーター・基質複合体の結晶構造に基づく多剤認識機構および、その輸送メカニズムの解明」と題して、ご講演いただきました。結晶構造解析を中心に、薬物が組み込まれた状態のトランスポーターの結晶構造を解かれたNatureの報告も含め、トランスポーターがいかに巧妙な立体構造変化によって基質を輸送するかを明快に説明していただきました。また、イブニングレクチャーは、大阪大学の倉智嘉久先生と東京医科歯科大学の佐々木成先生にご講演いただきました。夕食のお酒も入った後と言うこともあり、リラックスした雰囲気の中、両先生もご自身の経験もふまえて非常に含蓄のあるお話をいただきました。通常の講演会では拝聴することのできないお話を伺うことができ、非常にいい経験となりました。

本班会議は、泊まり込みのため、全ての発表終了後に有意義な研究交流が行われました。初日は、夕食の終了後、A01、A02、A03の各セクションに分かれ、セクション毎に研究者紹介も含めてより密接な意見交換会が行われました。2日目のイブニングレクチャー終了後は、セクションに分かれずに意見交換会が行われました。1日目と比べ2日目は既に交流の基盤ができていたため、非常に活発に意見交換が行われました。意見交換会の会場が閉まった後も、各部屋でさらに意見交換が行われたようです。2日目からは天候に恵まれたこともあり、2日目の自由時間は松島を散策していただき、また、部屋からの松島の眺望、大浴場からの朝日など、非常に密な日程の中でいくらかはリフレッシュしていただけたかと思います。

3日目は公募班の研究発表終了後、金井先生からの講評、および森先生からのシンポジウムの予告の後、班会議を無事終了することができました。この場を借りて、参加して下さった方々に御礼申し上げます。今後も、班会議、そして若手ワークショップがありますので、是非とも積極的な参加をお願い申し上げます。

世話人:大槻 純男、上家 潤一、寺崎 哲也
(東北大学大学院薬学研究科)



A02班公募研究班員の研究紹介



膜小胞の形成制御と細胞情報伝達連関

東北大学大学院医学研究科 細胞生理

丸山 芳夫

外分泌細胞のすべての側面に何らかの形で手を触れたいと思っています。ずいぶん気の長い話になってしまいますが、1980年代初頭から膵腺腺房細胞を素材として、イオンチャンネルと外分泌機能、Ca 信号伝達、膜容量変化としての exocytosis-endocytosis cycle など研究してきました。マウスからの切り出し標本を用い、それを酵素により分散させ、単一細胞にパッチクランプ法を適用し、ということを繰り返しています。現在、膵腺腺房細胞の核膜(nuclear envelope)に興味があります。

膵腺腺房細胞は、消化酵素の開孔放出のみならず等張 NaCl 溶液の分泌を、比較的狭い管腔側膜(全細胞膜の5%前後といわれています)で行っています。分泌顆粒は管腔側膜と核・ゴルジの間の空間に溜め込まれ、細胞質内 Ca 濃度の上昇に応じて開孔放出されます。開孔放出後、分泌顆粒は消費されるわけで、その補充機構は何なのか、その情報伝達ループがあるはずと思っています。この点について、核膜は蛋白生成および分泌小胞の拠点であるので、まず核膜を調べてみることから始めました。核膜に手をつけたのは1995年(Ca^{2+} -activated K^+ -channels in the nuclear envelope isolated from single pancreatic acinar cells. Pflugers Archiv, 430: 148-150(1995))で、以来、折にふれ実験を行ってきたのですが、パッチクランプ法に適した標本の改良に少々時間がかかってしまいました。昨年末から、ルーチンの操作でパッチクランプ法に適した標本を得ることができるようになり、核膜上でのイオンチャンネル同定作業が進みました。現在核膜チャンネル種のカタログ作りに追われています。以下、進行中ですが、1) 200 pS Maxi-K channel、2) 80 pS K-channel、3) 30 pS cation-channel、4) 7 pS Cl-channel、5) 300 pS IP3R-

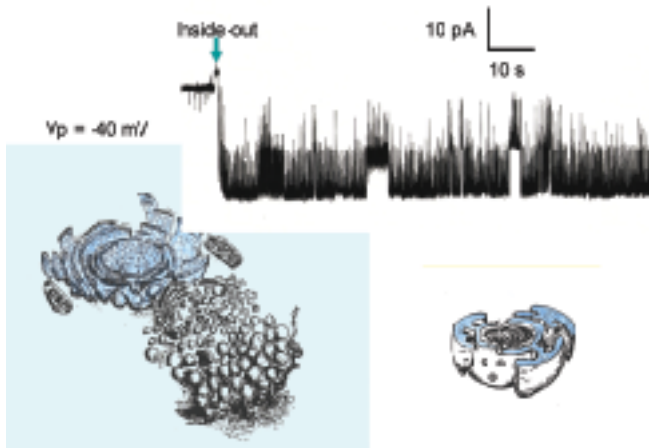
channel(type 3)、6) 55 pS cADPR or NAADP-dependent channel、等、同定できたと思っています。核膜が想像以上に多様な channel 群を抱えていることに驚いています。それぞれについて、何らかの意味と制御機構があるはずですが、そこまでの余裕はまだありません。また、これらのチャンネルの細胞膜上への発現制御はどのようになっているのか、別の意味で興味湧いています(200 pS Maxi-K channel については、発現にマウス週令依存性があり、7週以前には mslo RT-PCR negative であり、細胞膜上での channel 発現は認められませんでした: Delayed expression of large conductance K^+ channels reshaping agonist-induced currents in mouse pancreatic acinar cells. Journal of Physiology, 2005, 563:379-391)。

本特定領域班での最終目的になりますが、以下、申請書から抜粋いたします。

「小体輸送の基本的経路は 1) vesicle budding、2) protein sorting、3) vesicle targeting、4) vesicle fusion、に分けられ議論されている。その基点は核膜小胞体の出芽(vesicle budding)機構にある。出芽機序の物理学的側面は、平坦に近い(曲率の大きい)脂質二重膜が細胞質側に凸に突き出ること(曲率が有限値をとる)を意味しており、膜の微小部位が球形に変異してゆく過程を含んでいる。ここ数年の化学的側面からのアプローチは、上記過程にあずかる基本物質として、Sec23p/Sec24p、Sec13p/Sec31p、Sar1p(Ras-like GTPase)等の COPII 構成蛋白(小胞形成にあずかる蛋白複合体)を細胞質において同定してきている。また、小胞ドノアー(小胞体膜

の特定部位)には、小胞体膜貫通蛋白 Sec12p の存在を認め、輸送すべき小胞体内腔蛋白を含む cargo の選別をそれに課している。COPII coatmer は小胞形成に必要なエネルギーを減少させる要素として働いていると思われる。いっぽう、生理学的側面からのアプローチは、1) 出芽過程を経時的に記録し、解析に附することができるような方法論を確立すること、2) 小胞出芽の開始シグナルを細胞特異的な機能的側面から同定すること、3) 出芽小胞の形態維持に対するイオンチャンネルの役割(水・イオンバランス)をみること、の3点にまとめられるように思われる。この3点を研究の目的としたい。小胞出芽過程にパッチクランプ膜容量計測法を応用することを念頭に置いている。小胞あるいは分泌顆粒の細胞膜への融合は、膜表面積の微小な変化であり膜容量に正

Ion channels in pancreatic nuclear envelope



比例することから、膜容量計測法は分泌細胞における exocytosis/endocytosis cycle の研究に用いられている。この経験を踏まえ、小胞出芽に伴う膜容量の変化を計測・解析

したい。」

以上、少々大げさな言いようになりましたが、初心に帰り、核膜標本の膜容量計測に集中したいと思っています。



胃酸分泌細胞の細管小胞融合における トランスポートソーム機能の解明

富山大学大学院医学薬学研究部 薬物生理学研究室

酒井 秀紀

消化管(胃や腸)は、ストレスや環境変化などの影響がもっとも早く現れる臓器です。消化管疾患の原因の一つとして、イオンの分泌・吸収のバランスが崩れることがあげられます。当研究室では、消化管のイオン輸送蛋白質(イオンチャネル、トランスポーター)が関与する新規病態生理機構の解明を目的とした基礎研究を行っています。このたび「胃酸分泌細胞の細管小胞融合におけるトランスポートソーム機能の解明」という研究課題で、本領域の公募研究班員として参加させていただくことになりました。私たちの課題を採択していただいたことに感謝し、本特定班に貢献できるよう精一杯頑張ります。諸先生方にはいろいろお世話になりますが、ご指導のほどよろしくお願い致します。

本研究は当大学の3名のスタッフで遂行しています。研究代表者の酒井はこれまで、電気生理学的手法、分子生物学的手法等により、胃および大腸のトランスポーター、イオンチャネルの研究を継続して行ってきました。研究分担者の森井助教授は、胃細管小胞膜および骨格筋小胞体膜の生化学的研究や胃プロトンポンプ(H^+ , K^+ -ATPase)の分子動力学的研究等を、田淵助教授(生命科学先端研究センター)は胃プロトンポンプをはじめとする多くの蛋白質の生化学的研究やマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ってきました。本研究では、お互いの協力体制のもと最大限の成果を上げてまいりたいと思います。

私たちが研究対象の一つとしている胃酸分泌細胞は、酸分泌休止状態から刺激状態に移行する際に、分泌側の膜形態が劇的に変化します。酸分泌休止状態では、胃プロ

トンポンプに富む細管小胞は細胞内に存在していますが、刺激に伴い細管小胞は互いに融合し、分泌膜につながります。細管小胞膜上の胃プロトンポンプは融合前には活性化されていませんが、融合により活性化され管腔側へ胃酸が分泌されます。

胃酸分泌休止状態の細管小胞膜上の胃プロトンポンプはなぜ活性化されていないのでしょうか。これまでに細管小胞膜融合に関わる蛋白質の研究報告は断片的になされていますが、その全容については明らかにされていません。胃プロトンポンプが融合に伴い活性化されるメカニズムについても未解明です。

私たちは本研究で、胃プロトンポンプの膜融合に伴う活性化と、ラフトの形成、胃プロトンポンプに付随する蛋白質構成の変化、および膜リン脂質のフリップ・フロップとが関連しているのではないかと仮説を立て、胃酸分泌機構の最終段階におけるトランスポートソームの構成と調節機構を明らかにしたいと考えています。

具体的には、1)胃酸分泌休止時および刺激時における胃細管小胞膜および分泌膜のラフト形成の検討、2)胃プロトンポンプのラフト形成に及ぼす効果の検討、3)ラフトにおいて胃プロトンポンプに付随する蛋白質の探索、4)ラフトにおけるCLC-5およびKCC4の機能の検討、5)膜融合による胃プロトンポンプの活性化機構の解明等を行いたいと考えています。

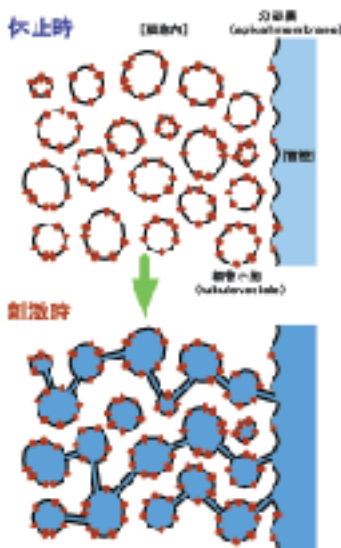


図1 胃酸分泌刺激に伴う細管小胞の融合

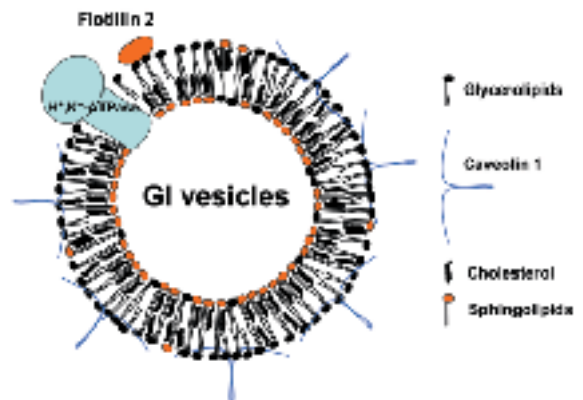


図2 胃細管小胞の構成

1)においては、ウサギ、ラット、ブタの胃粘膜標本より、胃細管小胞に富む膜画分および分泌膜に富む膜画分を調製し、コレステロールおよびスフィンゴミエリン含量の定量やフロチリンの検出などで、ラフト形成の状態を詳細に検討しています。2)においては、胃プロトンポンプが、コレステロールやスフィンゴミエリンを輸送しラフト形成に関わる可能性があるのかについて、胃プロトンポンプの安定発現細胞株等を用いて検討しています。また、酸分泌休止状態と刺激状態の細管小胞および分泌膜のリン脂質の構成比の違いについても調べています。3)においては、酸分泌休止時細管小胞画分と酸分泌刺激時のラフト画分との間で異なる存在パターンを示す蛋白質を探索しています。そして特定した蛋白質がラフト形成に及ぼす役割について検討します。4)においては、私たちが胃酸(塩酸)分泌機構に関

わると考えているCLC-5およびKCC4の局在がラフトに関連しているのかについて、またラフト形成の有無とCLC-5およびKCC4の活性との関連性について検討しています。5)においては以上に述べた研究計画により得られる結果から、胃プロトンポンプが膜融合に伴い活性化される機構に関与すると考えられる事象を培養細胞系に再構築し、活性化機構の全容および胃細管小胞融合におけるトランスポートソーム機能を解明したいと考えています。

先日の仙台での第1回班会議では「トランスポートソーム」とは何かについて深く考える機会をいただきました。本研究において「トランスポートソーム」という言葉とその実体が結びつけられるようにと張り切っています。今後ともどうぞよろしくお願い申し上げます。



人工生体膜における ラフト構造膜内輸送制御システムの提案

名古屋大学大学院工学研究科 結晶材料工学専攻

宇治原 徹

私は「材料研究者」であります。

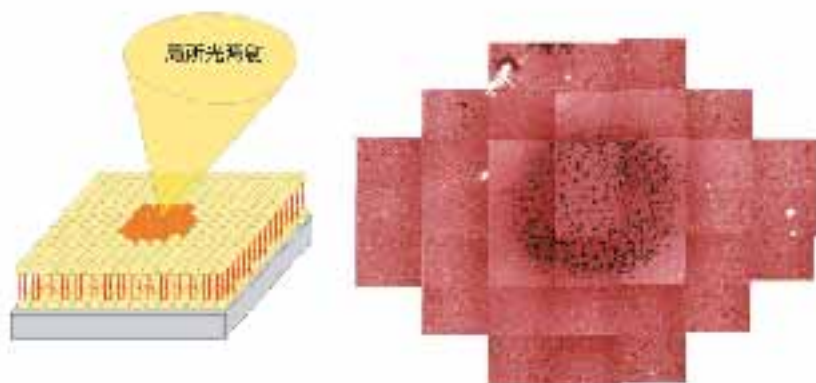
所属する結晶材料工学専攻も、結晶を軸とした様々な無機・有機材料を対象とする専攻でありますし、特に、私の所属する研究室では、「半導体結晶成長」に関する研究を行っております。具体的には、発光ダイオードやレーザーダイオードに用いられるナノサイズで制御された薄膜・量子ドット構造の結晶成長や、次世代電子デバイス用材料として期待されているSiCの大型基板結晶の成長などを行っております。

ところで、このようなバックボーンをもつものが、なぜ人工生体膜の研究をはじめめるに至ったか。そのきっかけは、材料と生体膜の、「ある共通性」に気付いたことにあります。半導体結晶成長の研究を行う以前は、合金の微細組織の形成メカニズムに関する研究を行っておりました。この研究は、要するに「状態図(相図)」と「相分離現象」の研究に、ほかありません。そして、

生体膜においても、リン脂質の「状態図」に従って「相分離現象」を示します。さらに、相分離により形成される構造は、9月の研究会にもご紹介したとおり、極めてよく似ています。私にとって、この類似性は衝撃でありました。それまで、「生物のメカニズムは平衡論では扱うことはできない」といった先入観を持っていましたが、「平衡論で議論される金属材料」との共通性を見出したことで、「生物もやはり平衡に向かって変化している」と、いうことを理解し、その時点から、生体膜は私の研究対象となりました。

現在の研究目標は、人工生体膜において「リアル」な相分離構造を再現し、さらにはその形成のタイミングや位置を完全制御することにあります。具体的には、相分離構造の中でも、膜タンパク質の機能と関連があるラフト構造に注目しています。この研究により、生体膜相分離構造の形成メカニズムや機能を理

解することができ、また、最終的には生体膜を利用した新しいバイオデバイス応用にもつながります。相分離構造の形成には、我々が得意とする材料工学的なアプローチを用います。金属の相分離構造は、材料の特性を決める重要な要素で、金属材料の開発というのは、まさに相分離構造を制御することを意味します。そこで材料研究者は、熱処理、組成制御、歪み印加、最近では磁場・電場・応力場といった外場を駆使して、ナノオーダーに制御された相分離構造を作りこんでいきます。本研究



Si基板上に形成したDOPC-DMPC脂質二重膜の相分離構造。中央部に光を照射したことで、優先的にドメインが形成されているのが確認できる。

でも、このような材料工学的手法により人工生体膜においてラフト構造のサイズや密度、位置などを制御することを目指し、さらにはそれを通じて膜タンパク質の機能を制御するデバイスにまで発展させたいと考えています。

特定領域研究では、その第一歩として、半導体基板上に形成した人工生体膜における相分離構造の形成制御を目的として研究を進めています。これまでに得られた結果としては、Si基板上に形成した DOPC-DMPC 系脂質二重膜において、光照射しながら「熱処理」することで、光照射部に優先的に相分離構造を形成させることに成功しています。これは、蛍光物質を介して、局所的に生体膜を熱膨張させることで、膜内に「歪み

を印加」し、その結果、光照射部とそれ以外の部分で組成の分配が生じたためであると理解しています。まさに、材料プロセッシングです。本結果は、液晶相 - ゲル相相分離構造で実験を行っていますが、現在は、液晶相 - 液晶相相分離構造であるラフト構造で同様の検証を行っております。また、次段階では、膜タンパク質を再構成し、ラフト構造に集中する様子を観察したいと考えています。さらに、基板に私たちの得意とする半導体デバイス構造を結晶成長することで、光やキャリアによる制御の可能性も拓けます。これらが、うまくいったときには、人工生体膜へのトランスポートソームの再構成、さらにはデバイスによる機能制御も可能になる、...かもしれません。



気分障害・不安障害に関与する 因子セロトニントランスポーターの機能調節機構

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 神経・精神薬理教室

酒井 規雄

セロトニントランスポーター(以下 SERT と略させていただきます。)は、中枢神経系ではセロトニン神経終末でセロトニンを前シナプスに回収し、セロトニン神経を終了させる役目を持つ膜蛋白で、分子実体が明らかになる前から抗うつ薬や乱用薬物の作用点として知られてきました。また、プロモーター領域にある遺伝子多型が不安・神経質な性格を相関するという報告¹⁾が出て以来、この遺伝子多型と気分障害などの精神神経疾患やストレス感受性・情動・睡眠障害・呼吸障害などとの関連が指摘され、注目を浴び続けている分子でもあります。

私と SERT との出会いは、約12年前にさかのぼります。大学院を卒業してポスドクを経た後、先輩の斎藤尚亮先生の下、神戸大学バイオシグナル研究センターに新しい研究室を開設することになりました。当時、トランスポーターの研究をされていた斎藤先生が、新しいラボの新しい研究対象として選んだのが SERT でした。私はそれまで、電気生理学の手法を使った研究が主なる仕事で、分子生物学の知識・技術はほとんどありませんでした。ラボが動き出して早速 Dr. Blakely から頂いた cDNA を材料に発現細胞を作ったり、変異を入れたり、SERT を通じて、分子生物学のイロハを学びました。以後、つかず離れず、SERT の研究をしています。5年前に、広島大学に赴任して以後は、SERT は、臨床と基礎の接点になる医学部の薬理学教室で研究するにふさわしい分子と考え、より一層研究に力を入れたいと考えておりました。この度、この特定研究班の公募班員に選んでいただいたことをきっかけに、SERT 研究をさらに展開していきたいと考えております。

私のもう一つの研究対象は、プロテインキナーゼ C (PKC)

です。「二兎を追うものは一兎も得ず。」ということわざもありますが、テーマを2つ持つことは、決して悪いことではないと信じて、両者のバックグラウンドを生かして、研究を進めています。まず、我々は、SERT のリン酸化による制御について興味を持ちました。SERT の細胞内領域には、複数の PKC や PKA による予想リン酸化部位があります。また、PKC の活性化剤であるフォルボールエステルは、SERT の取り込み活性を抑制することがわかりました。そこで、SERT のセロトニン取り込み機能は、リン酸化や脱リン酸化で調節されているのではないかと予想して研究を始めました。結局、私たちの実験結果は、「SERT は PKC の直接のリン酸化で機能調節されるのではない。」というのが結論でした²⁾。しかし、SERT の大御所で cDNA を頂いた Blakely 先生から出てくるデータは、我々とは相反するものでした。彼らは、SERT は PKC で直接リン酸化される基質だと考えて色々な仮説をうち出し

コントロール細胞 (GFPのみ)

SERT発現細胞 (GFP+SERT)

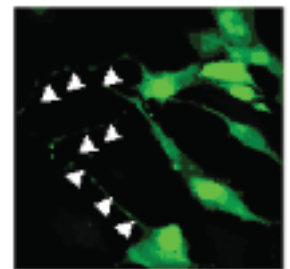
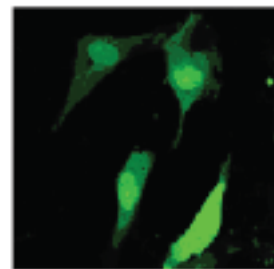


図1 RN46A細胞にアデノウイルスベクターを用いて GFP のみ (コントロール細胞) あるいは SERT と GFP (SERT 発現細胞) を発現させた。SERT 発現細胞ではコントロール細胞に比べ軸索様突起の伸長が見られ、細胞が大型化する。(矢頭)

ています。結局、この見解の差がどこから生まれてくるのかは未だにわかりませんが、我々は我々のデータを信じるしかないと思い、研究を進めておりましたところ、どうもPKCをフォルボールエステルで活性化するとアクチン細胞骨格がほとんど壊れてしまい、その結果として、SERTの取り込み機能が下がるということが、わかってきました。つまり、「SERTの機能はアクチン細胞骨格によって調節されている。」ことがわかりました^{3, 4)}。以後、SERTのアクチン細胞骨格による機能制御という観点から研究を進めています。最近の予備的な研究から、RN46Aというセロトニン神経由来の培養細胞にSERTを過剰発現させると突起が伸長したり、細胞大型化するなどの形態変化が起こることを見つけています(図1)。また、SERTのノックアウトマウスは、感覚野の神経発達が未熟であったり、発達障害(自閉症)が多発する家系からSERTの翻訳領域の変異が見つかったりしています。このようにSERT自身がアクチン細胞骨格に直接相互作用を引き起こし、セロトニン神経の発達・分化・成熟に重要な役割を持つ因子であると予想して研究を進めているところです。

もう一点SERTの機能調節機構に興味を持っているのが、SERTの糖鎖修飾と膜輸送です。SERTをCOS7細胞に発現させwestern blotすると糖鎖修飾の違いから複数のバンドとして認識されます(図2)。これらのうち、60kDa付近のバンドは、high-mannose typeの不完全な糖鎖修飾を受けたものであり、80kDa付近のバンドは、完全糖鎖修飾を受けたものであることが以前の検討でわかりました。おそらく、SERTは小胞体(ER)でまず、high-mannose typeの糖鎖修飾を受け、その後ゴルジ体に輸送されて完全な糖鎖修飾を受けて細胞膜に輸送されるものと考えられます。SERTのC末端を欠損させた変異体は、high-mannose typeの糖鎖修飾しか受けず、ERに留まっているので、SERTの膜輸送と糖鎖修飾には、SERTのC末端が重要であると考えられます。そこで、今度はC末端だけをSERTとともに過剰発現させるとSERTの取り込み活性が上昇し、完全糖鎖修飾を受けたSERTが増加しました(図2)。このことから、SERTのC末端は、SERTの膜輸送に重要なシグナルが含まれていると考え、その分子機構を解明したいと考えています。

SERTは分子クローニングされてから15年以上が経ちますが、まだまだ、その機能調節機構は不明なところが多いと思われます。この機能調節機構を明らかにすることが、SERTに関連する様々な精神神経疾患の病態解明と治療法の開発に繋がることを夢見てSERT研究を今後も続けていきたいと思っております。

文献

- 1) KP Lesch et al. *Science* 274 (1996) 1527 - 1531
- 2) Sakai, N et al. *J. Neurochem.* 68 (1997) 2618 - 2624
- 3) Sakai, N et al. *Neurochem. Int.* 36 (2000) 567 - 579
- 4) Mochizuki, H et al. *Neurochem. Int.* 46 (2005) 93 - 105

SERT C末端ペプチドの過剰発現

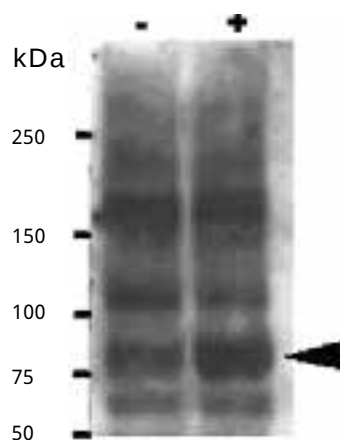


図2 COS7細胞にSERT cDNAを遺伝子導入しSERTを一過性に発現させた。SERTを認識する抗体でウェスタンブロットを行うとSERTは約60、80、120、160、200kDaの複数のバンドとして認識される。約80kDaのSERT(矢印)は、mature-glycosylated typeの糖鎖修飾を受けたものであり、さらに60、120kDaのSERTは、high mannose typeの糖鎖修飾を受けたものである。また、120kDaのものは60kDaのものの2量体であると考えられる。細胞膜に発現し正常に機能しているSERTは80kDaのものであると考えられる。

SERTと共にSERTのC末端ペプチドを過剰発現させると(+)matureな糖鎖修飾を受け、正常に機能する80kDaのSERTが増加していることがわかる(矢印)。このことから、SERTのC末端はSERTの糖鎖修飾調節に何らかの機序で関与していることがわかる。



ユビキチンシグナルによるトランスポーターの細胞内輸送制御機構の解明

九州大学大学院 薬学研究院 細胞生物薬学分野

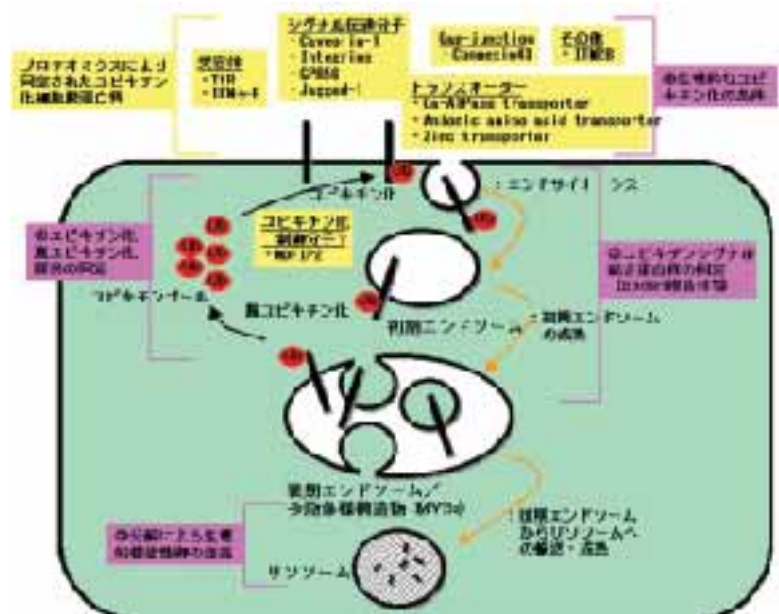
藤田 英明

私達の研究グループはリソソームへの小胞輸送の分子機構解明を目的とした研究を中心に行っています。その中でも私はエンドソームにおける小胞輸送を制御するAAA-ATPase:

SKD1/Vps4Bに注目しています。ATPase活性を失った変異型SKD1(E235Q)の過剰発現により、エンドソームを経由するほぼ全ての小胞輸送が阻害されてしまうことからSKD1

の重要性は明かなのですが、その分子機構については未だ不明な部分が多い分子です。酵母および動物細胞においてユビキチン化された膜蛋白質が液胞・リソソームへと輸送されることが報告されていますが、SKD1(酵母ではVps4)はそのユビキチン化シグナルを認識する複数の蛋白質複合体(ESCRT-I, II, III)および脱ユビキチン化酵素の機能を制御していることが明らかになりつつあります。我々はSKD1(E235Q)の過剰発現により、変型したエンドソームにユビキチン化された膜蛋白質が蓄積することを見出し、さらにそこに蓄積したユビキチン化膜蛋白質の網羅的プロテオミクス解析に成功しました。当初は新奇のリソソーム・エンドソーム膜蛋白質が同定されることを期待していたのですが、予想に反してトランスポーターやチャンネル分子など多くの細胞膜蛋白質が含まれていました。ここで発現の転換というか固まっていた頭を柔らかくすることができました。御存知のように細胞膜表面で機能するトランスポーター・チャンネル・ポンプ等膜輸送分子の中には形質膜上に留まらず、一定の割合でエンドサイトーシスされエンドソームを経由して細胞表面へとリサイクルされ、また必要に応じてリソソームまで運ばれて分解を受けるものがあります。このようなメンブレナダイナミクスにより定常状態における細胞表面の膜輸送分子の数は規定され機能発現が制御されているわけです。したがって本来エンドサイトーシスやリソソームへの輸送のシグナルを持たないこれらの細胞膜蛋白質こそがユビキチン化による細胞内輸送制御を受ける良い基質(?)であるに違いないと考えました。プロテオミクスにより我々が同定した約20種類の膜蛋白質のうち半数近くは実際にユビキチン化されることを明らかにしており、現在いくつかの膜蛋白質の機能発現とユビキチン化の関連について検討しているところであります。本特定領域研究にはこれらの中で特にConnexin43とSLC39A14(Zip14)に着目し、ユビキチン化によるこれら分子の選別輸送機構およびユビキチン化の

生理的意義について明かにすることを目的として参加させていただきました。9月の班会議でも紹介させていただきましたが、現在Connexin43のユビキチン化および分解を制御する新しい分子機構を見い出しつつあるところです。しかしながらプロテオミクスのリストには興味深い・調べてみたい分子がまだまだたくさんあり、(自分の能力を越えて)少しづつ手を広げているところであります。またプロテオミクスでは同定されなかった分子でもSKD1(E235Q)の過剰発現によりユビキチン化が検出できるものがあることも判明しました。SKD1はもとも酵母における K^+ イオン依存性の成長変異株を抑制するマウス遺伝子(Suppressor of K^+ growth Defect)として同定されたものですが、その機能と K^+ イオン(輸送?)との関連についても未だに明らかになっていません。本特定領域研究の班員のみなさまにアドバイスをいただき、共同研究へと広げてゆくことができれば「ユビキチン化によるトランスポーターの細胞内輸送制御機構」とともに「SKD1によるエンドソーム小胞輸送の分子機構」が明らかになってくるのではと期待しています。今後ともよろしく御願ひ致します。



トランスポートソームによる ペースメーカー活動の発生・調節機構

名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野

今泉 祐治

【イオンチャネル標的創薬】

私たちの研究室では、従来から各種臓器の平滑筋において

興奮性と収縮を制御するイオンチャネル・トランスポーターの機能解析と病態での変化という観点から研究してきました。

"headache muscle"(性質のはっきりしない筋)と呼ばれていた平滑筋においても、その興奮・収縮連関機構の分子基盤が近年、かなり解明されてきました。そこで薬学研究科ということもあり、現在は関連した疾患におけるイオンチャネルをターゲットとした創薬に研究の中心を移しつつあります。イオンチャネルのなかでも特に種類が多く、臓器・組織毎にかなり特異的に発現している K^+ チャネルを中心に、チャネル複合体の特定疾患での機能変化・発現変化の解析、そのチャネルを標的とする創薬(リード化合物の探索)および作用機序の解明を重点的に行っています。

分泌・収縮・化学伝達物質遊離などの重要な細胞機能発現でのシグナル伝達では、 Ca^{2+} 濃度上昇が特に重要なステップであり、幾重もの Ca^{2+} 濃度調節機構が存在するため、各種の疾患において様々な細胞内 Ca^{2+} 動態制御不全が病態形成の重要な要因となることはご承知のとおりです。その調節機構の中心的分子として Ca^{2+} 透過チャネルと Ca^{2+} 濃度により活性が制御されるイオンチャネルを挙げることができます。例えば、 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル分子機能解析を基に、その機能変化や遺伝子変異体の機能異常と高血圧・頻尿・癲癇など多くの疾患の関連を探索し、治療薬としてチャネル作用薬の創薬を目指しています。大コンダクタンス Ca^{2+} 依存性 K^+ (BK)チャネルを発現させたHEK293細胞を用いて高効率探索系を開発し、BKチャネル開口作用を有する天然物の検索により樹脂成分のピマル酸を発見し、関連合成化合物も含めて特許出願をしてきました。さらにミトコンドリアBKチャネルの分子実体解明とBKチャネル開口薬による心筋保護作用に関する研究なども行っています。

【可視化による細胞分子機能解析】

先進的可視化技術を駆使して、細胞機能をミリ秒の高速サンプリング画像解析することにより、全く新たな現象として解析することが可能となります。例えば、平滑筋細胞で活動電位が生じている時の細胞内 Ca^{2+} イオン濃度分布をレーザー共焦点蛍光顕微鏡で測定・解析することにより平滑筋細胞の収縮機構の新たな分野が開拓され、病態時の変化の解析とあわせて、その貴重な情報が新薬開発の応用研究に生かされています。さらに最近、全反射蛍光顕微鏡を利用して、生細胞内で機能している分子挙動の一分子可視化解析が可能になってきました。一分子ダイナミズム解析から新たな科学が創生されようとしています。チャネル分子機能解析や創薬科学への応用も待たれるところです。

【間質系ペースメーカー細胞とそのモデル】

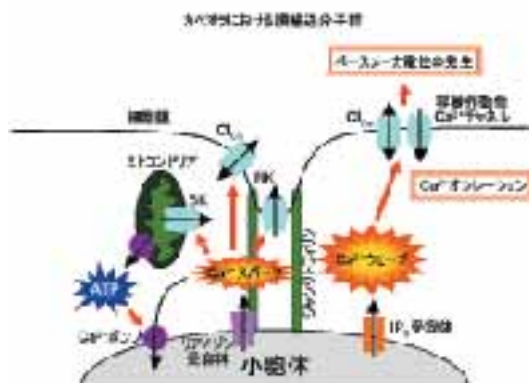
さて、今回の特定研究領域「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」では、トランスポートソームの重要な機能として、ペースメーカー細胞での細胞内 Ca^{2+} オシレーションを発生・制御するトランスポートソーム機能連関こそがペースングの根源であるという新たな可能性を検証することを目的として、公募班に参加させて頂きました。ペースメーカー活動は心臓ではもとより、消化管・門脈・尿管・呼吸中枢など多くの興奮性臓器において、生理機能の発揮・維持に根源的な役割を果たしており、その発生・調律・伝播の異常は心疾患、消化器機能障害、神経疾患、糖尿病と結びついています。平滑筋臓器で

のペースメーカー電位はカハール細胞と呼ばれる間質系細胞群で生じることが近年明らかとなってきました。このペースメーカー電位の形成には細胞膜、小胞体、ミトコンドリアの輸送分子群およびそれらの機能制御分子群が根源的な役割を果たすと推測されます。この分子機構を明確にすることは、自発性活動を有する幅広い臓器群における疾患の病態生理の理解と新たな治療・医薬品の開発に極めて重要な情報を与えると考えられます。ペースメーカー活動の調節に関して膜輸送分子群と機能的分子集積場(ラフト、カベオラ)を標的にした研究は、ほとんどありません。

本研究の目的は、1)電気生理学・画像解析・遺伝子工学の最先端手法を駆使して、臓器・組織を超えてペースメーカーの発生・調節に根源的・本質的に関与している細胞膜、細胞小器官に存在するトランスポートソーム分子群の機能協同機構を明らかにする、2)哺乳類培養細胞株に膜輸送分子複合体を再構築し、生体組織と類似した自発性、周期性のペースメーカー電位や Ca^{2+} オシレーションを発生させ、トランスポートソームによるペースメーカー調節の分子基盤を構築し、創薬スクリーニング系への応用を目指すことであります。

現在までに間質系ペースメーカー細胞が発現しているイオンチャネルの同定などを行い、またHEK293細胞にリアノジン受容体や Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルを形質導入することにより、細胞内 Ca^{2+} オシレーションのペースメーカー電位への変換モデルを構築してきました。これらの研究成果を基盤とし、本研究を展開していきたいと考えております。

最後になりますが、私たちの研究グループは、私の他に大矢進助教授と山村寿男 助手、大学院博士後期課程5名(社会人博士課程1名を含む)、博士前期課程11名、卒業研究生7名、研究員4名の総勢30名が所属する大所帯の研究室です。大きなマンパワーによって、この特定領域研究の発展に貢献したいと思いますので、宜しくお願いします。



A03班公募研究班員の研究紹介

小胞体機能異常による細胞内カルシウムシグナルと記憶学習の障害

東北大学大学院薬学研究科 薬理学分野

森口 茂樹

平成18年度より「小胞体機能異常による細胞内カルシウムシグナルと記憶学習の障害」の研究テーマにて本領域に公募班として参加させて頂いております東北大学大学院薬学研究科薬理学分野の森口茂樹と申します。どうぞ、よろしくお願い致します。東北大学大学院薬学研究科は伊達政宗で有名な杜の都、仙台市にあります。私の所属している研究室(薬理学分野)は、福永浩司教授のもと、講師1名、助手2名で構成されております。研究室は福永教授が2001年に佐藤教授の後任として赴任され、5年が経過致しました。私は2004年より助手として赴任しており、3年目を迎えております。当研究室では、1. 海馬を介する学習・記憶の分子機構、2. 脳保護薬・心筋保護薬の開発(シグナル伝達セラピー)、3. 体内時計のリセット機構、4. 環境ホルモン、環境化学物質の脳発達への影響、5. アルツハイマー病の病態生理と創薬研究、6. カルシウムホメオスタシス異常による精神疾患の発症機序、等の研究テーマで研究を進めております。特に、福永教授が発見された細胞内に局在するカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII(CaMKキナーゼII)は近年、記憶学習機構に重要な役割を果たすことが明らかとなり、私は興味をもっております記憶学習機構に対するCaMKキナーゼIIの役割を明らかにすることを研究のメインテーマと位置付け、研究を行っております。

私自身は、これまでNMDA受容体を介した記憶学習機構に興味を持ち、研究を行って参りました。九州大学大学院に在籍していた時にはグリア細胞の一つであるミクログリアが放出する液性因子がNMDA受容体賦活作用を有することを発見し、NMDA受容体を介した学習記憶機構へ興味を持つに至りました。その後、米国ノースウエスタン大学医学部のProf. Toshio Narahashiの下でNMDA受容体賦活作用を介したアルツハイマー病治療薬の創薬研究を約3年間行いました。その際、現在承認されておりますdonepezil, galantamineがNMDA受容体賦活作用を有していることを見出しました。この時期にカルシウムシグナルを介しているNMDA受容体を活性化することにより、新しい認知症の創薬が可能ではと考えるようになりました。現在、福永教授のもと、カルシウムシグナル活性化を中心に記憶学習機構の研究を行っており、記憶学習機構に対するCaMKキナーゼIIの役割を明らかにすることにより新しい創薬ができるのではと考えております。

また最近、カルシウムシグナルの放出機構の役割を担っている小胞体にも注目し、小胞体機能と記憶学習との関連性について研究を行っております。小胞体はNMDA受容体および電位依存性カルシウムチャンネルより細胞内へ流入するカルシウムの取り込み、貯蔵、リアノジン受容体およびIP₃受容体を介する

放出の役割を担っております。放出されたカルシウムはイオンチャンネルの調節、またカルモデュリンと結合しカルシウム/カルモデュリン依存性酵素を介して生理機能を担うことが考えられております。私たちはこれまで京都大学大学院薬学研究科、竹島浩教授と興奮性細胞における形質膜と小胞体の結合を担うジャンクトフィリンの役割に注目し、細胞膜チャンネルと小胞体のカルシウム放出チャンネルとの共役について共同研究を行って参りました。具体的にはジャンクトフィリンの脳特異的サブタイプであるIII、IVの遺伝子欠損マウスを利用して、電気生理学、免疫組織化学、行動薬理学的手法を用いて記憶学習機構における役割を検討しました。その結果、ジャンクトフィリン欠損マウスには記憶学習の有意な低下が認められ、同時に、海馬CA1領域において長期増強現象(LTP)の有意な減弱が認められました。また免疫プロット法により海馬CA1領域においてCaMKキナーゼIIの活性上昇が認められました。このことは形質膜と小胞体とのカップリング異常がカルシウムシグナル異常を引き起こし、記憶学習障害を惹起したことが考えられます(Moriguchi et al., PNAS, 2006)。

また、本領域研究におきまして、私たちはジャンクトフィリンと同様に小胞体に発現しております脳特異的受容体様タンパク(brain-specific receptor-like protein: BSRP)についてカルシウムシグナル伝達ならびに記憶学習機構との関連性について研究する予定にしております。BSRPには3つのサブタイプA、B、Cが脳に発現しており、既に共同研究により遺伝子欠損マウスの作製は終了しております。BSRPは小胞体のカルシウムシグナルの調節に関与している可能性が考えられますので、現在、BSRP遺伝子欠損マウスを利用して細胞内カルシウムシグナル伝達ならびに記憶学習機構との関連性について検討を行っております。

私たちの最近の研究により、小胞体機能の記憶学習機構への関与が明らかとなり、特に、小胞体より放出されるカルシウムの重要性が示唆されました。本領域研究では、小胞体機能の記憶学習機構への影響について、より詳細な検討を予定しております。私は薬学研究科に所属しておりますので、最終的なゴールは創薬と考えております。本領域研究を是非、創薬研究に繋げていただければと考えております。今後とも諸先生方のご指導、ご鞭撻をよろしくお願い致します。



in vivo イメージングによる トランスポートソーム生理機能の解析

筑波大学 大学院人間総合科学研究科 薬理学研究室

講師 三輪 佳宏

細胞や動物個体の中で起こる分子レベルでの現象を、なるべく生きたままの状態で観察することができれば、一つの細胞や同じ個体を継続して解析することが可能になり、様々な動的な変化を知る事ができます。私共の研究室では、様々な蛍光や発光の技術を応用することで、ライブイメージングのための技術開発を実施し、生化学や分子生物学的な手法では解析の難しい現象などを新しい手法で解析することを目的に研究を進めています。三輪佳宏をリーダーとして、ポスドク、大学院生、卒研生など総勢10名で研究に取り組んでいます。

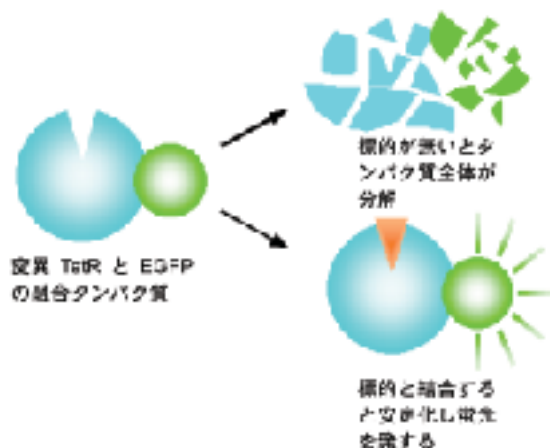
これまでの研究成果の1つが図に示すデグラトンプローブの開発です。「デグラトンプローブ?聞いたことないな?」とほとんどの方が思われたことと思います。なぜなら我々が開発、命名した新技術だからです。この技術はタンパク質分解制御機構に蛍光タンパク質を組み合わせることによって目的物質の有無を蛍光で可視化できるシステムです。私たちの細胞の中には、異種タンパク質や変異タンパク質を見分けて分解系に引き渡す機能が備わっています(詳細な分子実体に関しては解析中です)。そこで、自分が検出したい分子に結合するタンパク質を出発材料としてそこに変異を入れると、本来は安定なタンパク質であっても分解されてしまうものが出てきます。さらに「うまく」変異を導入することができると、単に分解されるだけではなく、検出したい分子との結合によってその分解を免れるという性質を獲得したものが見いだせます。私達はこのような分解制御を受ける性質を獲得した変異タンパク質を「デグラトンタグ」、これを蛍光タンパク質などと融合したものを「デグラトンプローブ」と呼ぶことにしました。

既に開発済みのプローブの1つが、テトラサイクリン系抗生物質のドキシサイクリン(Dox)の有無を検出できるTetデグラトンプローブです。これは、大腸菌タンパク質のテトラサイクリンリプレッサー(TetR)に変異が導入されたデグラトンタグとEGFPの融合タンパク質です。この変異TetRは、「Doxが存在しない時は融合タンパク質全体が分解されてしまうためにほとんど蛍光は得られないが、Doxが存在するとタンパク質が安定化し強い蛍光が得られる」という性質を獲得しているため、DoxをEGFPの蛍光として可視化できるのです。さらに、このTetデグラトンプローブを動物個体に応用し、トランスジェニックマウスを作製しました。Doxが届いた組織だけが蛍光を発するので、生きたままの動物個体で薬物動態を蛍光として解析できるのではないかと考えたためです。トランスジェニックマウスにDox投与すると期待通り強い蛍光が検出されました。こうした方法を使うと、薬物が実際に血中から、周囲の細胞内へ移動しているところを高感度に検出することが可能で、Doxの薬物動態を*in vivo* 蛍光イメージング可能な技術であることが示

唆されました。さらに、蛍光の強度を数値化することで薬物動態の速度論的な解析ができるのではないかと考えています。

私共はこのデグラトンプローブを用いて、本領域において「*In vivo* イメージング技術を応用したトランスポーター機能解析」を遂行したいと考えています。Doxの輸送に関わるトランスポーターのノックアウトマウスと、現在のイメージング用マウスを組み合わせることによって、個々のトランスポーターの変異の影響が、動物個体全体としてどのように発現するかを、イメージングによってトータルに解析したいと考えています。とくに、蛍光量の変化を数値化することでトランスポーターの排出機能とその全体の中での役割やバランスを定量的に評価できるのではないかと考えています。

本研究領域では、トランスポーターに関する研究を展開しておられる諸先生方のご指導、ご助言を頂き、トランスポーター機能解明に少しでも近づける研究を進めてきたいと考えております。どうぞよろしく願いいたします。



デグラトンプローブの作用機序



受容体の膜輸送を制御する 分子複合体構成蛋白質CIN85の役割と 機能欠失の解析

群馬大学大学院医学系研究科 器官機能学分野

下川 哲昭

私は在外研究先のルードビック癌研究所(スウェーデン、ウプサラ市)で受容体型チロシンキナーゼ(Receptor tyrosine kinase; RTK)のダウンレギュレーションの研究を始めました。以来、受容体の膜輸送、特にエンドサイトーシスを制御する adaptor/scaffold proteinであるCIN85(Cbl-interacting protein of 85 kD)の機能に興味を持って研究を進めています。このCIN85は2000年に3つの研究室からRING型のubiquitin ligaseとして機能するCblと相互作用を持つタンパク質として同定され、現在その発現機構や新しい機能が相次いで報告されています。最近ではHSVのgrowthを抑制するとの報告もあり、今後さらにこのタンパク質の機能の広がりが解明されていくと思います。

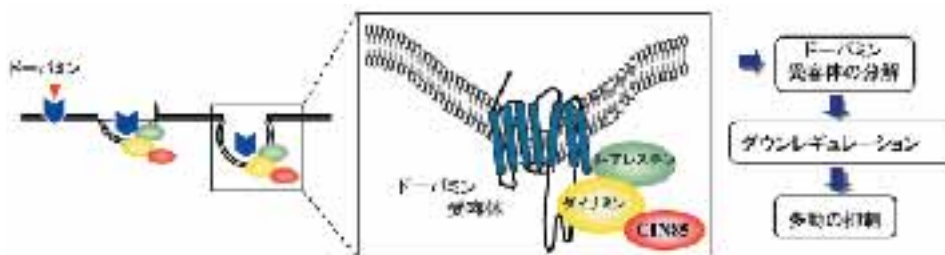
CIN85はEGF刺激によってCblを介して monoubiquitination(モノユビキチン化)されます。モノユビキチン化はエンドゾームへの Sorting signalとして機能しているとされています。モノユビキチン化されたCIN85、ポリユビキチン化されたEGF受容体、さらにCbl、Endophilinの膜輸送に関する分子群が複合体を形成して一緒にエンドゾームに輸送され分解過程へ移行します。これら一連のEGF受容体のエンドサイトーシスと分解にはCIN85のCblとの複合体形成とモノユビキチン化が重要であることを明らかにしました(PNAS, 2002)。

さらにこの機構の個体における意義を明らかにする目的で、CIN85ノックアウトマウスを作製しました。このノックアウトマウスは行動学的解析(総移動量、移動速度、折り返し数、新規環境探索度等)のほぼ全ての項目において、野生型に比べて有意な行動量の上昇を示し表現型が「多動」であると認められました。「多動」の原因としてドーパミン及びその受容体の量的、質的变化が挙げられます。我々は電気化学検出器を備えた

HPLCでノックアウトマウスの線条体ドーパミン含量を測定したところ、野生型に比べて170%高値を示しました。CIN85はドーパミン受容体の膜輸送に関与するダイナミンと結合します。現在私達は、CIN85は膜輸送複合体の構成分子としてドーパミン受容体エンドサイトーシスを促進することでドーパミンシグナルの過剰による「多動」を抑制していると考えています。ドーパミン神経の約75%は、黒質に存在し線条体に投射されています。この黒質-線条体系のドーパミン神経は運動機能に深く関わっています。一方、中脳の腹側被蓋野から辺縁系および前頭皮質に投射するドーパミン神経は、動機づけ行動に関与しています。本研究ではこれらの知見からCIN85ノックアウトマウスにおける脳内ドーパミンおよびドーパミン受容体の動態の解析を行い、受容体のエンドサイトーシス及び膜輸送におけるCIN85の機能と「多動」との関連を解析していくつもりです。

また、1)CIN85遺伝子はX染色体上に存在する、2)CIN85はdendritic spinesに局在する、ことからそれぞれX-linked mental retardationとの関連やdendritic spine morphologyへの関与を明らかにしたいと考えています。

現在、私のグループは6名。中国、コロンビアからの留学生、さらに最近イランからのポストドクが加わり国際色豊かです。英語でコミュニケーションをとっていますが、時より中国語、ポルトガル語、ベルシャ語、群馬弁も飛び交っています。彼等には実験と解析、討論を通じて研究の面白さを胸に刻んでもらいたいと感じています。そして私自身この研究領域に少しでも貢献できるように頑張っていく所存です。研究班の諸先生方には種々ご教示をいただければ有り難く存じます。どうか、宜しくお願いいたします。



CIN85-ダイナミン-アレスコンの膜輸送複合体によってドーパミン受容体がエンドサイトーシスされる。
ドーパミン受容体の分解によってドーパミンシグナルのダウンレギュレーションにより「多動」が抑制されている。

多動制御の機序とドーパミン受容体エンドサイトーシスにおける輸送分子複合体の予想図



食物質による腸管上皮トランスポートソーム制御の機能的解析

東京大学大学院農学生命科学研究科 食糧化学研究室

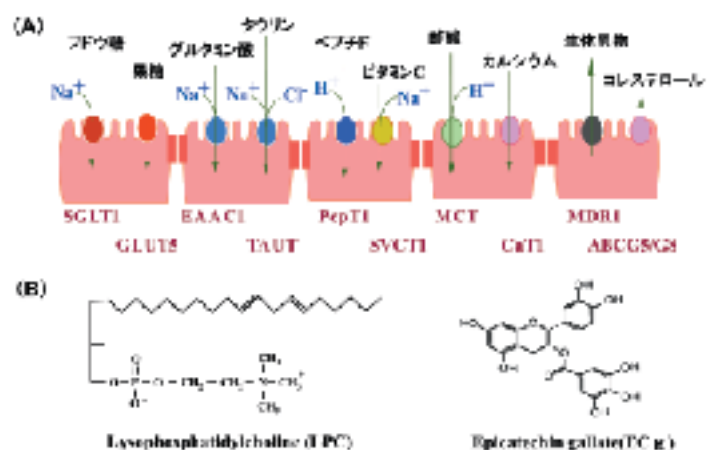
薩 秀夫

今回「食物質による腸管上皮トランスポートソーム制御の機能的解析」という研究課題にて公募研究として本領域に加えて頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食糧化学研究室(教授:清水誠、助教授:戸塚護)の薩秀夫と申します。宜しくお願ひ致します。

私の所属致します食糧化学研究室では、腸管における食品成分の吸収機構及び腸管免疫系や解毒・排出能など腸管機能に対する食品の生理機能、特に炎症性腸疾患をはじめとする消化器疾患に対する食品の予防・改善効果に関する研究をおこなっております。消化管は「内なる外」とも呼ばれ、外界と生体内を隔てる場かつ外界と生体内のやりとりをする場として位置付けられております。腸管はその表面が腸管上皮細胞層に覆われており、腸管上皮細胞は主として3つの機能、すなわち(1)栄養素の吸収機能、(2)生体異物の侵入を妨げるバリアー機能、(3)外来刺激を受容して生体内へ伝達するシグナル変換機能、を有しておりますが、これらの機能の成立には腸管上皮細胞の刷子縁膜側に発現するトランスポートソームの存在が不可欠です。そこで私達の研究グループではこれまで腸管上皮トランスポートソームに注目し、様々な要因によるその機能制御に関する研究をおこなってきました。例えばβ-アミノ酸の一種であるタウリンは多彩な生理機能を有することが知られておりますが、その腸管上皮における吸収にはタウリン輸送担体(TAUT)が関与しております。私達の研究グループではこの腸管上皮TAUTが細胞外タウリン濃度や高浸透圧条件、また炎症性サイトカインの一種であるTNF-αによって制御されることを見出してきました。さらに腸管上皮トランスポートソームは他の組織と異なり食物質などによって最も高頻度かつ高濃度に曝されることから食物質によっても制御を受けることが十分に考えられます。そこで実際に食物質によるTAUT機能制御について検討したところ、黒ゴマのエタノール抽出物中に含まれるリゾフォスファチジルコリンがTAUT活性を特異的に阻害することが明らかとなりました。その他、腸管上皮トランスポートソーム機能が食物質によって制御される例として緑茶中に含まれるカテキン類の一種であるエピカテキンガレートが腸管の糖吸収を司るSGLT1を阻害することも報告しております。

このような背景のもと、本公募研究では腸管上皮トランスポートソームの機能制御、特に食物質による制御について解析を進めることを計画しております。第一の研究計画として、異物排出トランスポートであるMDR1(P糖タンパク質)

の機能を制御する食物質の解析を進めています。MDR1は腸管の管腔側に強く発現がみられ従来は薬剤や食品中に混入する生体異物を排出する作用が知られておりますが、近年ある種のフラボノイドなど機能性食品素材分子もMDR1の基質となることが報告されMDR1は食品の機能性分野においても非常に重要な分子となっております。そこで腸管上皮モデル細胞を用いてMDR1を制御する食物質の探索をおこなったところ、ニガウリの抽出物中にMDR1阻害活性が見出されました。今後さらにニガウリ抽出物によるMDR1活性阻害の特性及びその作用機序の解析を進めるとともにin vivo評価系を用いてその阻害作用を検討する予定です。並行して、MDR1は核内受容体の一種であるPregnane X receptor(PXR)によってその発現が制御されることが知られております。PXRは腸管上皮に発現がみられまた幅広い基質認識部位を持つことから食品由来低分子化合物などもそのリガンドとなりうる事が示唆されております。そこでPXRを制御する食物質を探索し、PXRを介した食物質によるMDR1制御というアプローチも現在進めております。また第二として、分岐鎖アミノ酸(Branched chain amino acid; BCAA)と呼ばれるロイシン、イソロイシン、バリンを基質とする腸管上皮中性アミノ酸トランスポートソームの機能制御の解析を予定しております。分岐鎖アミノ酸は筋肉タンパク質の合成促進をはじめ様々な生理機能が知られまた肝繊維症の治療薬としても用いられておりますが、その腸管における吸収の機構及び制御・調節についてはほとんど明らかになっておりません。本研究では腸管上皮モデル細胞を用いて、ポリフェノールをはじめとする食物質による分岐鎖アミノ酸

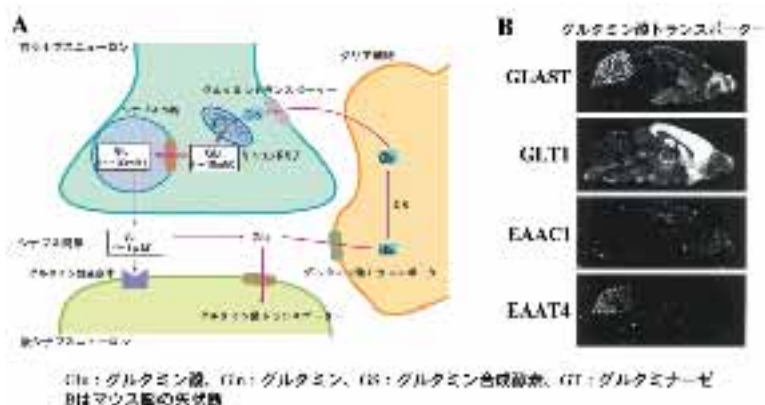


今回は、医学・薬学系をはじめとする最先端の研究者が集う本領域に農学系から加えて頂き誠に感謝致しております。この機会に諸先生方の最先端の研究を学ばせて頂くと同時に、農学系からのアプローチとしてアミノ酸・ペプチド、ポリフェノール、

グルタミン酸トランスポーターの 発現細胞による機能的差異

田中 光一

私自信は、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた expression cloningによりGLASTをクローニングしました。その後、各々のサブタイプの局在・薬理学的特性などを解析し、脳に存在する4種類のグルタミン酸トランスポーター欠損マウスを作成し、各サブタイプの個体レベルでの機能を解析しています。グルタミン酸トランスポーター欠損マウスは、調べれば調べるほど新しい表現型が見つかり、各々のサブタイプがユニークな機能を持っていることがわかってきました。しかし、グルタ



14

ミン酸トランスポーターをCOS細胞に発現させた場合、グルタミン酸輸送活性や薬理学的特性にサブタイプによる大きな違いは見られません。従って、グルタミン酸トランスポーターのサブタイプの持つユニークな機能は、その局在と発現している細胞種などの周囲の環境の違いによるものだと考えられます。このことが、今回、本特定領域に応募するきっかけになりました。具体的な研究成果は、班会議の際に発表します。最近、ある種のグルタミン酸トランスポーター欠損マウスが、自閉症に似た

行動異常・脳発達障害を起こすことを見つけました。また、躁鬱病・統合失調症などの主要な精神疾患でも、グルタミン酸トランスポーター・シナプス伝達の異常が報告されています。このモデルマウスを用いることにより、いままで混沌としていた精神疾患の病態の本質に迫れる可能性ができました。しばらく、グルタミン酸トランスポーター研究から足を抜け出せない状況が続くそうです。



ドパミントランスポーターを支える セプチン・スカフォールドの解析

京都大学大学院医学研究科 先端領域融合医学研究機構
生化学・細胞生物学グループ

助教授・グループリーダー 木下 専

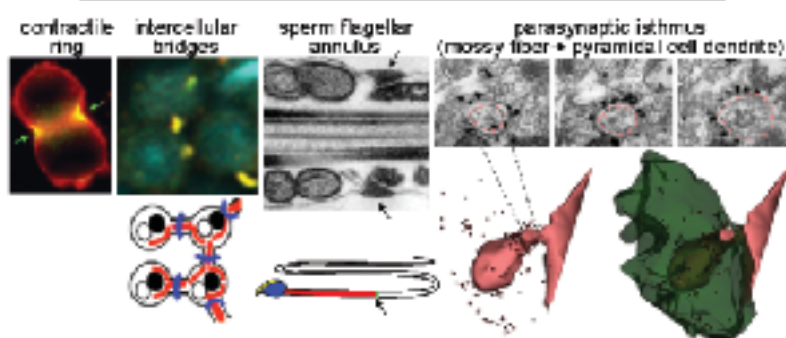
セプチンは、アクチンやチューブリンに次ぐ普遍的なヌクレオチド結合性細胞骨格蛋白質です。しかし、多くの場合アクチン系・微小管系・膜骨格系などに紛れて存在すること、阻害剤がないこと、変異体が致死となるか重複遺伝子によって代償されること、などのために発見と解析が遅れました。また、アクチン・フィラメントが1種類、微小管が2種類のサブユニットの規則正しい重合体であるのに対し、セプチン・フィラメントは3種類以上のサブユニットから成るやや不規則な重合体です。その複雑さの故に、サブユニットの立体構造やフィラメント形成機構も謎に包まれています。

このように扱いにくい研究対象ではありますが、私たちは、ヒトやマウスのセプチン重合体が細胞分裂時に形成される収縮輪や染色体分配装置、アクチンストレスファイバー、精子鞭毛の輪状小体、前シナプス装置など、重要な超分子複合体の構築や安定化のための足場を与えることを、ライブイメージング、電子顕微鏡、再構成系、RNAi、逆遺伝学的手法などによって1つずつ明らかにしてきました。さらに、セプチン集合体の破綻が生殖系疾患(精子無力症)や神経変性疾患(パーキンソン病など)の病態に密接に関わることも見出しました。これらの事例の蓄

積により、セプチン系が単細胞レベルから高次脳機能まで多彩な生命現象を支えていることが認知されつつあります。セプチン系は、アクチン系や微小管系のように細胞全体の形状をglobalに支持・制御する連続的な細胞骨格系ではなく、細胞内の微細構造ないし超分子複合体を支持・安定化するlocalな分散型スカフォールド・システムであると考えられます。

しかし、哺乳類セプチン系の生理的意義に関する理解はまだ断片的であり、多くの課題が残されています。特に脳においてはセプチンが大量に発現し、興味深い細胞内微細構造に集積しているにもかかわらず、その存在意義は長らく不明でした。そこで、ノックアウトマウスによる生体機能探索を行ったところ、脳特異的Sept4サブユニットの欠損がドパミンニューロンのシナプス伝達障害をもたらすことがわかりました。その原因は、前シナプス膜近傍においてドパミンの合成・分泌・再取り込みに必要な機能分子群(チロシン水酸化酵素、シンタキシン、ドパミン輸送体など)の欠乏でした。これらの分子がSept4とともに免疫沈降することや、軸索末端に微細形態学的異常を認めないことから、前シナプス膜近傍のセプチン系は上記機能分子群を組織化・安定化するスカフォールドではないかと考えています。

Submembranous septin assemblies discovered *in vivo*



本特定領域においては、ドパミン輸送体を中心とするトランスポートソームの構成成分/分子間相互作用/微細構造を、質量分析/生化学/形態学的手法で解析して上記仮説を検証しつつ、その中でセプチンが果たす役割を明らかにしたいと思っています。

ドパミン作動性シナプスは、パーキンソン病治療薬や依存性薬物の作用点でもあるため、医学的・社会的に重要です。私たちは京大・順天堂大神経内科の協力を得てパーキンソン病患者死後脳を解析し、本疾患を特徴づけるレビー小体(家族性パーキンソン病の責任蛋白質の1つ α -synucleinを主要構成成分とする凝集体)にSept4サブユニットが特異的に沈着すること、そしておそらくそのためにSept4が枯渇することを見出し

ました。これは、上記トランスポートソームにおけるセプチン・スカフォールドの破綻が神経機能障害に関与することを示唆しています。このように、ドパミン輸送体を中心とするトランスポートソームの病理学的意義も視野に入れ、ヒト脳組織の生化学的解析を進めています。

トランスポーターをはじめとする膜蛋白質の専門家が結集するこの研究班に加えていただき、たいへん光栄に思っております。セプチンに興味を持たれた方には、この機会に研究試料(抗体、発現プラスミド、組み換え蛋白質、ノックアウトマウス等)を提供致しますので、遠慮なくご請求下さい。



ペプチドトランスポートソームの実体解明と 発現・局在調節における生理的意義

京都大学医学部附属病院 薬剤部

乾 賢一

我々の研究室では、「医薬品の体内動態と薬効・毒性に関する基礎と臨床」をテーマとし、腎臓、肝臓、小腸などを中心として薬物トランスポーターの分子レベルでの解析から、テーラーメイド薬物療法の確立に至るまで、系統的な薬物動態研究を展開しています。対象としている薬物トランスポーターとしては、本研究課題のペプチドトランスポーター(PEPT)を始めとして、有機イオントランスポーター(OCT/OAT)、 H^+ /有機カチオンアンチポーター(MATE)、P-糖タンパク質等が挙げられます。このうちPEPT1は、小腸上皮細胞の刷子縁膜に局在し、細胞膜を介した H^+ 勾配を駆動力として、小分子ペプチドやペプチド類似薬物などの膜輸送を媒介しています。小腸PEPT1は薬物送達の標的分子としても注目されており、抗ウイルス薬バラシクロビルや低血圧症治療薬ミドドリンが、難吸収性の親薬物をアミノ酸で修飾することによってPEPT1の基質に変換された薬物であることを明らかにしてきました。

さらに、数値的モデルとコンピュータシミュレーションを活用し、PEPT1の輸送機序解明に取り組みました。詳細は割愛しますが、実験データと文献情報に基づき、 H^+ イオンが H^+ 結合部位だけでなく基質認識部位にも結合し基質の結合に影響を及ぼすこと、またその影響は基質の荷電状態によって異なり、 H^+ /基質共輸送のstoichiometryやpHプロファイルの規定因子になることを盛り込んだ14状態モデルを提唱しました。このモデルに基づいて、荷電

状態の異なる様々な基質の濃度依存性、pH依存性、膜電位依存性などを精度よく再現できたことから、構築したPEPT1輸送メカニズムの妥当性が示されました。

このように、PEPT1の臨床薬物動態学的意義や輸送の分子機序は明らかになりつつありますが、小腸上皮細胞での発現・局在のメカニズムは不明の点が多く残されていました。そこで、本特定領域研究ではペプチドトランスポートソームの発現・局在における生理的意義を解明するため、PEPT1の小腸特異的な発現並びに細胞膜局在化機構にチャレンジすることにしました。現在までに、PEPT1の小腸特異的な発現には転写因子Cdx2が関与していることを明らかにしました。またラット(r)PEPT1のC末端側アミノ酸3残基(TNM)(PDZ-interacting domain)を欠失させた変異体(rPEPT1- Δ TNM)を作成し、細胞膜局在化機構について検討を行ったところ、

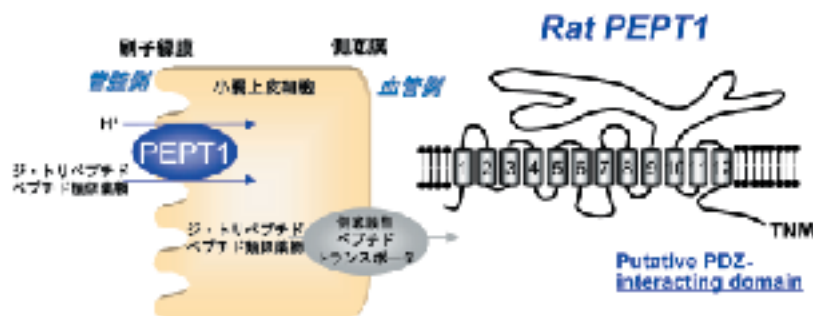


図1 小腸上皮細胞に発現するペプチドトランスポーターとPEPT1の二次構造。PEPT1は刷子縁膜に局在し、 H^+ 勾配を駆動力としてジ・トリペプチドやペプチド類似薬物の細胞内取り込みを媒介している。PEPT1は推定12回膜貫通型トランスポーターであり、C末端に存在するPDZ-interacting domainを介した蛋白質-蛋白質相互作用によって、刷子縁膜に安定に保持されている。

rPEPT1のPDZ-interacting domainを介した蛋白質-蛋白質相互作用によって、PEPT1が頂側膜に安定に保持されることが示されました。今後、PEPT1が機能する場である膜輸送複合体の実体を解明し、PEPT1の細胞膜局在に果たす役割を明らかにするとともに、複合体を構成する因子の発現量と機能の関連について明らかにしていきたいと考えています。

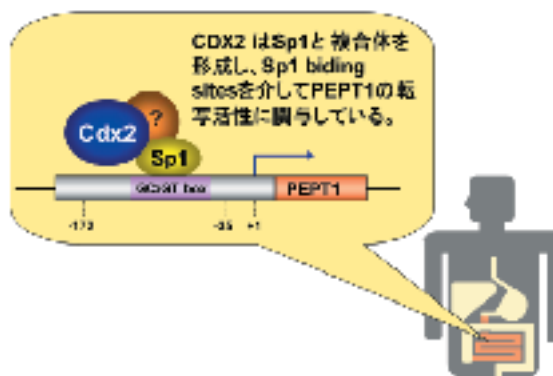


図2 PEPT1の小腸特異的な発現機構。
小腸特異的な転写因子Cdx2が、基礎転写因子Sp1と相互作用しながら、PEPT1の転写活性に関与している。



ATP感受性K⁺チャネル分子集合体の機能とその破綻

神戸大学大学院医学系研究科 細胞分子医学

助教授 三木 隆司

ATP感受性K⁺チャネル(K_{ATP})チャネルは、神経細胞、心筋細胞、膵β細胞、血管平滑筋細胞などの興奮性細胞に広く発現しており、細胞内ATP濃度を指標に細胞内代謝の変化を感知する代謝センサーとして働き、細胞や個体を代謝ストレスから保護する役割を果たしています。その分子構造は約11年前、千葉大学の清野進教授の研究室で同定され、ABCトランスポーターであるスルホニル尿素受容体(SUR)と内向き整流性K⁺チャネルメンバーであるKir6.xの2つのサブユニットから構成されるヘテロ8量体であることが明らかになりました。

Kir6.xサブユニットにはKir6.1とKir6.2の2つのメンバーがあり、SURサブユニットはSUR1とSUR2の2つの遺伝子にコードされ、SUR2遺伝子からはSUR2AとSUR2Bをはじめとするいくつかのスプライシングアイソフォームが作られます。再構成系の電気生理実験から、この2つのサブユニットの異なる組み合わせで、種々の組織で見られる異なった電気特性を有するK_{ATP}チャネルが再構成されることが明らかになりました。我々はこれらのK_{ATP}チャネルの生体での役割を、遺伝子改変マウスを用いて解析してまいりました。その結果、膵β細胞ではK_{ATP}チャネルが細胞の静止膜電位を規定しており、グルコースおよび2型糖尿病治療薬であるスルホニル尿素剤による細胞の興奮とインスリン分泌に不可欠な分子であることが明らかになりました。一方、視床下部のグルコース応答性ニューロンにおいても膵β細胞型のK_{ATP}チャネルがグルコースによる細胞発火を制御し、低血糖の感知し、低血糖時の膵α細胞からのグルカゴン分泌や摂食応答を調節していることが明らかになりました。

種々の細胞のK_{ATP}チャネルは、ATP以外にも、様々なシグナ

ルを受けてそのチャネル活性を調節していると考えられますが、これらの機能の多くはチャネルの調節サブユニットと考えられるSURサブユニットがになっているものと考えられます。我々は約6年前、膵β細胞のK_{ATP}チャネルを構成するSUR1のヌクレオチド結合ドメインと相互作用する分子をyeast-two hybrid法で探索し、SUR1がcAMP-GEFII(低分子量G蛋白質であるRap1をcAMP依存性に活性化するGEF分子)と相互作用することを見いだしました。さらにcAMP-GEFIIがRim2(低分子量G蛋白質であるRabのエフェクター分子であるRim1のイソフォーム)と結合することが示されました。このことから現在我々は、SUR1/cAMP-GEFII/Rim2がK_{ATP}チャネル分子複合体を形成し、機能的なユニットとして機能していると考えております(図)。

我々は細胞レベルでの解析から、cAMP-GEFIIがcAMPによるインスリン分泌増強に関与していることを示してきました。しかしながら、このcAMP-GEFIIの作用がK_{ATP}チャネル機能の修飾を介するのか、あるいはcAMP-GEFIIの分子標的であるRap1の活性化を介するのか、またあるいはRim2の機能変化を介するのかについては、現在のところ全く不明であります。さらに膵β細胞におけるcAMPの作用は多彩であり、SUR1/cAMP-GEFII/Rim2の複合体が、インスリン分泌以外の様々な細胞機能の制御に関与していることも考えられます。本研究では、このK_{ATP}チャネル分子複合体の構成分子間のシグナルクロストークを機能的および形態学的に解析することを目的としております。既にcAMP-GEFIIとRim2のノックアウトマウスを作製しました。今後、これらのマウスやマウスから樹立する遺伝子欠損細胞株を用いて解析を進めていく予定です。

あります。

我々は、これまで主として K_{ATP} チャンネルの遺伝子改変マウスを作製し、解析してまいりました。幸いなことに、 K_{ATP} チャンネルは心筋細胞、血管平滑筋細胞、神経細胞など様々な組織で多種多様な役割を果たしており、我々の研究領域である膵β細胞での機能にとどまらず、多くの分野の先生方が興味を持って解析を進めていただいた結果、次々に新しい K_{ATP} チャンネルの機能が解明されました。異分野の解析では「餅屋は餅屋」の言葉通り、私が自分で悪戦苦闘していることを、専門分野の先生がいとも簡単に解いてしまったりすることも数多くありました。そういった意味で、前回の松島での班会議は大変勉強になりました。諸先生方の奮闘振りが手に取るようにわかったばかりでなく、トランスポートソームを解析する上で非常に有用な知識や技術の宝庫でありました。今後、班員の先生方と様々な交流が始められるのではないかと期待しております。よろしくご指導、ご鞭撻の程よろしくお願いいたします。

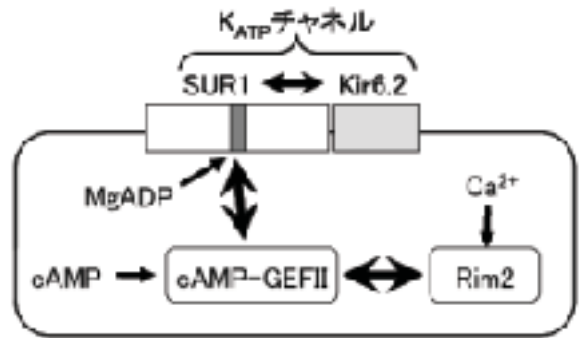


図 K_{ATP} チャンネル分子複合体



ABCトランスポータ(CFTR)の成熟化・分解・形質膜移行を制御する分子複合体

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻病態探究医科学講座

杉田 誠

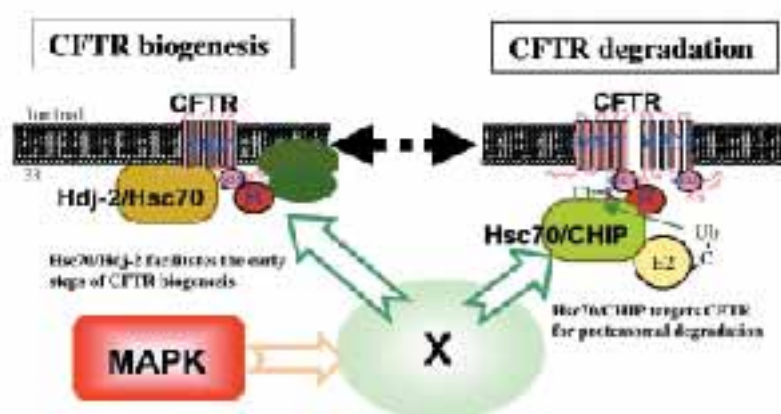
私は「ABCトランスポータ(CFTR)の成熟化・分解・形質膜移行を制御する分子複合体」というテーマで本特定領域研究に参加させていただいております。CFTR(Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)の遺伝的機能不全症(嚢胞性線維症)は、全身性外分泌腺機能障害・呼吸器感染を誘発する致死率の高い疾患です。CFTRはABCトランスポーターに属しますが、AキナーゼによるRドメインのリン酸化と、NBDドメインへのATP結合及びATP加水分解により、開閉が制御される腺腔側膜 Cl^- チャンネルとして働きます。嚢胞性線維症を引き起こすCFTR変異の70%は、508番目のアミノ酸欠損($\Delta F508$)であり、その変異型CFTRを有する患者においては、細胞内のERでCFTRが異常分解され、結果として粘膜上皮細胞の腺腔側細胞膜にCFTR Cl^- チャンネルが存在しないために疾患が誘発されます。ERに存在する $\Delta F508$ -CFTRは、 Cl^- チャンネルとして機能することが証明されており、trafficking mutantである $\Delta F508$ -CFTRをERから形質膜まで輸送させる治療法が開発できれば、嚢胞性線維症の患者を激減させることができます。しかし現在のところ、CFTR蛋白が翻訳後に、ERにおいて、いかにして成熟型の機能的コンフォメーションをとり得るか、Hsc70、Hsp70、Hsp90、calnexin等のシャペロンが、いかに機能し成熟化を制御するか、またCOPII依存的と考えられるERからのエクスポートがいかなる分子間の相互作用によって制御されるか、それらの分子機構に

は不明な点が多く存在します。また正しいコンフォメーションをとることができなかったCFTRをubiquitin化し分解に導く、E3 ubiquitin ligaseも、Hsc70のco-chaperoneであるCHIPや、Skp1-Cullin1-Fbx2-Roc1複合体の関与が報告されていますが、未知の部分が多く、現時点では治療法を開発するための分子標的を選出することが困難な状態です。欧米では、常染色体劣性遺伝を示す致死性の嚢胞性線維症は約2000人に1人の割合で発症するため、治療法の開発は大変精力的に行われており、変異CFTRを有する患者に対し、ウイルスベクターにより正常型CFTRを遺伝子導入する試みもなされていますが、導入効率やウイルスベクターの使用に起因する副作用等、問題点が多く存在します。本研究で、CFTRの成熟化・分解を調節する分子機構が解明できれば、変異CFTRを有する患者に対し、成熟化・分解に関与する分子を標的とした新規治療法を開発することができるのではないかと考えています。

これまでの研究で、成熟型CFTRの生成を制御する分子機構を解明するために、上皮系培養細胞にGFP-CFTRおよびその変異体を遺伝子導入し、発現させ、細胞内情報伝達系阻害剤の投与時や目的遺伝子導入時における、成熟型CFTRの生成量変化および形質膜移行動態を観察しました。嚢胞性線維症の治療薬として用いられるbutyrate誘導体の培養液への添加は、培養細胞での成熟型GFP-CFTRの生成とGFP-CFTRの形質膜移行を顕著に促進しましたが、Rドメインを欠損する

CFTR(GFP-ΔR-CFTR)においては、その効果は微弱でした。butyrateはCFTRのRドメインを介して、成熟型CFTRの生成および形質膜移行を促進し、その促進にはERK/MAPKの活性化が関与します。またbutyrateにより発現制御・機能制御される未知分子が、Rドメインへの結合を介して、CFTRの成熟化と形質膜移行を促進することが示唆されたため、Rドメインに結合しMAPKにより機能制御される分子を抽出し、分子シャペロン複合体、ubiquitin化を行う分子複合体、および形質膜移行を制御する分子群のなかで、その結合分子がMAPK依存

的に機能し、成熟型CFTRの生成・分解および形質膜移行を多元的に制御するか、その分子基盤を解明しています。そして変異CFTRを有する嚢胞性線維症の患者に対し、CFTRの成熟化・分解に関する分子を標的として、その分子機能を低分子化合物等を用いて選択的に調節することで、変異CFTRをERから腺腔側細胞膜に移行させ嚢胞性線維症の症状を改善する新規治療法を考案・開発したいと考えています。本研究班の諸先生方の御感覚からいろいろなご指導、ご助言を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。



NSAIDs排出ポンプTETRANの機能解析と臨床応用

熊本大学大学院医学薬学研究部

水島 徹

非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)はシクロオキシゲナーゼ(COX)の阻害剤であり、COX依存に合成されるプロスタグランジン(PG)を低下させることにより抗炎症作用を発揮する。一方NSAIDsの主な副作用である胃潰瘍(NSAIDs潰瘍)が臨床現場で大きな問題になっている。我々は、NSAIDsがCOX非依存的に直接胃粘膜細胞を傷害すること、及びこれがNSAIDsの膜傷害性(抗炎症作用には必要ない)に起因することを見出した。さらにラットを用いた動物実験により、NSAIDsが胃潰瘍を導くためにはCOXを阻害し胃粘膜でPGを低下させるだけでは不十分で、直接胃粘膜細胞を傷害する必要があることを見出した。以上の結果から、膜傷害性がないNSAIDsを合成すれば、胃潰瘍を起こさない真に安全なNSAIDsが得られることが分かったので、現在その合成を行っている。

NSAIDs潰瘍において特に問題なのが、NSAIDs感受性に関する患者さんの個人差である。即ち、同じ量のNSAIDsを処

方しても、胃潰瘍を発症する人とならない人がいるが、NSAIDs感受性を規定する遺伝子多型(SNP)は全く同定されていない。我々は上述の研究から、細胞をNSAIDsに耐性化する遺伝子の遺伝子多型がNSAIDs感受性を規定していると考え、そのような遺伝子の同定を試み、TETRANというヒト遺伝子を同定した。我々はTETRANが12回貫通型のMFSファミリーに属する薬剤排出ポンプであり、NSAIDsを細胞外へ排出することにより細胞をNSAIDsに耐性化していることを示唆した。ヒト細胞で薬剤排出に関与するMFSファミリーが同定されたこと、及びNSAIDsを排出するポンプが同定されたのはこれが初めてである。

そこで本特定領域研究では、TETRANが確かにNSAIDs排出ポンプであることの証明、排出機構の解明、及びTETRANのSNPとNSAIDs感受性との相関性の同定、以上3点の研究を行っていきたい。



発生過程におけるトランスポートソームの 時間的・空間的分子改編

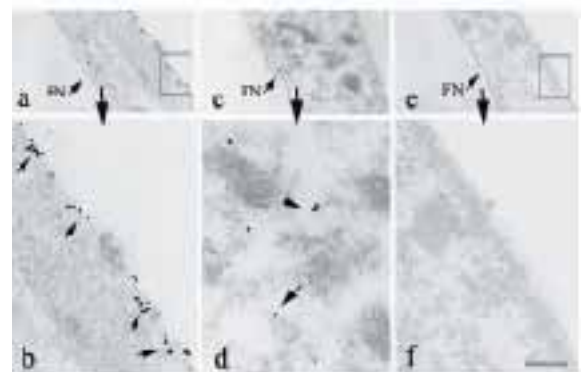
杏林大学医学部 解剖学教室

金井 正美

発生過程におけるトランスポートソームの時間的・空間的分子改編というテーマでA03公募班に採択して頂きました金井正美と申します。私は今まで発生学と言う全く異分野で研究を行って参りましたが、この度採択して頂くに当たり、皆さんと別の切り口で本領域にcontribute出来るように頑張りたいと思っています。宜しく御願い致します。

個体発生において、体を構成する個々の細胞の分化は、原腸陥入の開始に伴い胚葉形成から始まり、分化した細胞の適切な器官形成部位への移動、その後、複数の細胞により器官構築が開始されます。この一連の形態形成過程において、細胞-細胞間の相互作用が極めて重要な役割を担っており、細胞膜の分子複合体がこれら一連の発生過程に少なからず機能していることが容易に推測されます。また羊膜、胎盤は胎子・母体の選択的物質代謝の場ではありますが、その制御機構については不明な点が多く残されています。一方、現在までに多数のアミノ酸トランスポーター関連遺伝子が単離され、個別分子レベルで解析が可能となりましたが、その研究の大部分は、成体腎臓や神経系に限られた一部の細胞系譜の機能に局限しており、個体発生における機能、発現様式、分子複合体のダイナミズムの変遷に関しては未だ不明なままです。本研究では、発生過程におけるトランスポーター複合体の機能、役割がどのように移り変わるか、即ち、発生過程の時間的・空間的制御を担うトランスポートソームの分子構築の変遷を明らかにすることを目的とし、調節機序が明らかになっているヘテロ二量体型アミノ酸トランスポーター(LAT1)を中心とした分子複合体の個体発生過程の特異的役割の解析を試みることを提案致しました。LAT1は補助サブユニットの4F2hcとヘテロ複合体を形成し、この補助サブユニットがインテグリン等を連結し、輸送分子複合体を確立することが知られています。更に、4F2hc過剰発現による不均衡化から組織の過形成が引き起こされ、細胞増殖シグナルが発動されます。本研究期間におきまして、(1) LAT1トランスポートソームの分子構築の変遷の検討として;正常発生ステージ及び組織特異的にLAT1/4F2hc抗体による免疫沈降、蛋白複合体単離、LC/MS/MSを用いた微量蛋白の解析を行い、分子複合体の時空間的な変遷を明確にすること。(2) LAT1ノックアウトマウスの分子複合体変化として;LAT1ノックアウトマウスのsubtraction及び、補助サブユニットの4F2hc抗体免疫沈降法により、複合体の構成変化を検索すること。以上の2点の解明を目指して研究を行っていきたくと思っています。LAT1変異個体を用いることにより、LAT1の組織特異性のみならず、LAT1補助サブユニット(4F2hc)とその足場蛋白であるインテグリン、新たな候補蛋白、あるいはLAT1と同様に二量体形成の主サブユニットを構成するLAT2の複合体構成変

化とその機能を個体レベルで検討し、最終的には発生過程の時間的・空間的制御を担うトランスポートソームの分子改編を明らかにしていきたいと考えております。現在のところ、LAT1の補助サブユニットである4F2hcについて、その発現様式、インテグリン依存性にシグナル伝達因子Racの活性化が促進することを明らかにしつつあります。即ち、FLC4細胞株を用いて4F2hc及びBAT1とのキメラ遺伝子安定株を作製し、RhoA、インテグリンやフィブロネクチンに対する結合能を特異抗体、antisenseオリゴ等を用いて観察し、胎子-母体の着床過程において、それらの因子が重要な役割を果たすことを観察しています。以上のように、アミノ酸トランスポーターと母子栄養交換、並びに胎仔発生の観点から研究をすでに進めていますので今後、LAT1の個体レベルでの解析を効率良く解析出来るものと考えております。



ヒト栄養膜初代培養を用いた免疫電顕;

$\alpha V\beta 3$ (18nm粒子)、4F2hc(12nm粒子)、共発現(矢印)を示す。

(a,b: fibronectin 8時間処理, c,d: 4時間処理, e,f: 免疫電顕陰性コントロール) Scale bar=0.5 μm



Na, Ca膜輸送分子複合体の機能制御とその病態機序の解析

福岡大学医学部薬理学

岩本 隆宏

私たちのグループは、生体膜 Ca^{2+} 輸送を担う重要なトランスポーターである $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の研究を行っています。この輸送体は、通常、細胞膜を介した Na^+ 濃度勾配に依存して細胞内 Ca^{2+} を細胞外へ排出していますが、細胞内 Na^+ が増加する特殊な状況下では逆輸送(Ca^{2+} 取り込み)を行います。古くから、この輸送体の異常が高血圧や心不全に関連することが推察されていますが、その実体はこの輸送体の機能的複雑性(両方向性輸送や基質イオンによる活性制御機構)により未だ明確になっていません。私たちは、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の特異的阻害薬(KB-R7943誘導体)や遺伝子改変マウスを開発することにより、この輸送体の生理機能や病態学的役割を明らかにし、新たな診断・治療法の確立に貢献したいと考えています。

最近、この研究成果として、血管平滑筋の1型輸送体(NCX1)を介する Ca^{2+} 流入が食塩依存性高血圧の発症に重要な役割を果たすことを明らかにしました。この知見は創薬科学への応用が今後期待されますが、この分子メカニズムにはさらに重要な内容が含まれていました。一般的なエネルギー理論として、活動電位を発生しない血管平滑筋では、通常の(“平均値”の)イオン環境下、NCX1を介する Ca^{2+} 流入は起こり得ないとされています。そこで、上記の「血管平滑筋のNCX1を介する Ca^{2+} 流入」が起こるためには、NCX1が Na^+ ポンプや Na^+ 透過性チャネルなどと共に細胞膜特殊領域(マイクロドメイン)に局在し、食塩負荷の刺激下において Na^+ 濃度が局所的に増加することを想定する必要があります。これは、まさに本特定領域で取り上げる膜輸送複合体(transportosome)の存在およびその病態学的な意義を示唆しています。

図に、私たちが想定している食塩負荷から血管トーン亢進(高血圧)への分子機序を示しています。従来から、食塩過剰摂取により内因性 Na^+ ポンプ抑制因子が増加することが知られています(写真右:ヒト血漿から内因性ウアバインを初めて単離したDr. Hamlyn)。この内因性 Na^+ ポンプ抑制因子は血管平滑筋の Na^+ ポンプ($\alpha 2$ サブユニット)を阻害し、細胞膜直下の Na^+ 濃度を増加させると考えられます。この Na^+ ポンプはNCX1と膜輸送複合体を構成しマイクロドメインに局在するため、NCX1を介した Ca^{2+} 流入が引き起こされる。その結果、血管平滑筋細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し、末梢動脈の血管緊張が高まり、高血圧を発症すると考えられます。

最近、私たちは、血管平滑筋をノルアドレナリンで刺激した時にもNCX1を介する Ca^{2+} 流入が誘導されることを見いだしました。この知見は、NCX1が受容体作動性チャネルとも膜輸送複合体を構成している可能性を示唆しています。また、NCX1は PIP_2 により活性制御されることが知られていますが、この制御領域を破壊した変異型NCX1を発現する心臓では、拡張型心筋症を発症し、心不全に陥ることを見いだしました。この結

果は、心筋NCX1がリン脂質情報伝達系の環境下に存在し、生理的に機能制御されることの重要性を示しています。

本特定領域の研究計画では、上記したような研究成果および新たな系口を利用して、心血管系におけるNCX1膜輸送複合体の分子構成、制御機構、生理的機能および病態学的役割について包括的に解析したいと考えています。具体的には、NCX1遺伝子改変マウスおよびNCX1との相互作用が想定される候補蛋白質(Na^+ ポンプ、TRPCチャネル、カベオリン3、アンキリン2など)やリン脂質合成酵素($\text{PIP}5\text{K}$)の遺伝子改変マウスを用いて、血管および心臓のNCX1膜輸送複合体の役割について、生体レベルから分子レベルまで幅広い視点で解析したいと考えています。

最後に、共同研究のお願いをさせていただきます。私たちのグループでは、さまざまな組織特異的にNCX1を高発現させたマウス(血管平滑筋、内皮、心筋、腎尿細管、マクロファージ、全臓器など)を作製しています。これらマウスはNCX1をターゲットにした研究のみならず、細胞内カルシウム依存性蛋白質や細胞内Ca依存性シグナルなどの研究にもツールとして応用可能と思われます。もしご利用されたい先生方が居られましたら、ご一報を頂ければ幸いです。どうぞよろしくお願いいたします。



食塩負荷から血管トーン亢進への機序(Nature Med. 2004)

トランスポートソームの関連する話題1

膜電位センサーをめぐる最近の展開

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 岩崎 広英・岡村 康司

1. はじめに

生体における電気の研究の歴史は古い。そもそも18世紀後半に、イタリアのガルバーニがカエルの筋肉に2種類の金属をつなぐことで電流が流れることを発見し、これが電磁気学の発端となったことを顧みれば、生体における電気の研究の歴史は、電磁気学の研究と端緒を一にするといえる。その後電磁気学が急速に発達したのに比べると、生体における電気の研究の歩みは当初ゆっくりではあったが、後に膜電位固定法などの計測技術の普及に伴いHodgkinとHuxleyによる膜興奮性についてのモデルをはじめとする様々な成果を生み出すようになった。さらに、京都大学の沼研究室をはじめとする先駆的研究により電位依存性チャンネルのクローニングが相次いでなされ、膜興奮性について分子実体の側面から理解することが可能となった。さらに現在では、それらのチャンネルのノックアウトマウスを用いた解析により電位依存性チャンネルの生理学的意義も明らかにされ、またここ数年で結晶化によるタンパク質構造の理解が進みつつある。もはや、電位依存性チャンネルは神経科学の分野でも最も研究が進んでいる分野のひとつと言っても過言ではないかもしれない。これらの一連の研究から得られるコンセンサスは「膜電位変化が細胞に及ぼす生理学的効果は、イオンチャンネルやトランスポーターにより細胞内のイオン濃度を変化させることで細胞内の環境を変えることである」ということになるであろう。しかし、ここ最近になって、膜電位変化が単にイオンの透過を変化させるだけではなく、より多様な細胞機能にも関与していることを示唆する報告が次々となされている。ここでは、膜電位を感知して機能する様々な分子に関して最近報告された、新たな知見について纏めたい。

2. 膜電位感受性酵素Ci-VSP

私達はカタウレイボヤのゲノムを解析する過程で、電位依存性チャンネルの電位センサーと相同性の高い膜貫通領域をもつ分子を見出した¹⁾。特に、4番目の膜貫通領域には正電荷を持ったアミノ酸が周期的に並び、これは電位依存性チャンネルのS4と酷似している。電位依存性チャンネルの場合、S4が膜内を移動することにより「ゲート電流」が生じるが、この分子を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞ではイオンチャンネルにおける「ゲート電流」と類似の電流が観察されることから、電位センサーとして機能することが示唆された。さらに、この分子の細胞質領域はイノシトールリン脂質の一種PIP₃を基質とするホスファターゼPTENと高い相同性を有していることからCi-VSP(*Ciona intestinalis* voltage sensor-containing phosphatase)と命名した。Ci-VSPの細胞質領域はPTENと同様にイノシトールリン脂質のホスファターゼとして働くことが明らかになったが、最近Ci-VSPとPTENでは基質特異性が

異なり、PIP₃のみならずPIP₂も基質となることが分かった。さらに、Ci-VSPの酵素活性は膜電位依存的に変化し、脱分極時に活性化されることが分かった⁷⁾。このように膜電位により活性が調節される酵素は、Ci-VSPが初めての報告である。

3. 代謝型受容体の電位依存性

ヘブライ大学(イスラエル)のHanna Parnasらは、G蛋白質介在型受容体であるムスカリン性アセチルコリン受容体のうちm2Rとm1Rが膜電位依存的にリガンドと結合することを見出した²⁾。彼女らによれば、m2Rのアセチルコリンに対するアフィニティーは脱分極により減少する。ただし、アセチルコリンとの結合以降のステップは膜電位感受性ではない。m1Rの場合はm2Rと逆で、アセチルコリンとの結合は脱分極によりアフィニティーが増加する。さらに彼女らは最近、m2Rやm1Rを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞では、電位依存性チャンネルの場合と同じようにゲート電流が観察されるという驚くべき発見を報告した³⁾。ムスカリン性アセチルコリン受容体には電位依存性チャンネルにおけるS4に相当する構造が見られないことから、このゲート電流がどのようなメカニズムにより生じるのかは不明であるが、この電流の生成には3番目の細胞内ループの部分が重要であり、特にG蛋白質と相互作用するC末端側が重要であることがわかっている。また、アセチルコリン受容体だけでなく、代謝型グルタミン酸受容体であるmGluR3やmGluR1aが膜電位感受性であることも最近明らかにしている⁴⁾。

これまで、膜電位依存性を示すのは電位依存性イオンチャンネルやトランスポーター、或いはNMDA受容体やAMPA受容体などのイオンチャンネル型グルタミン酸受容体であるとされてきたが、上記の発見からは、代謝型受容体においても膜電位が関与していることを示唆している。

4. 転写因子として機能する電位依存性チャンネル

スタンフォード大学のRicardo Dolmetschらは、L型カルシウムチャンネルCav1.2のC末端がチャンネルから切り離されて核へと移行し、様々な遺伝子のプロモーター領域に結合して転写因子として機能することを最近報告した⁵⁾。彼らはこのC末端部分をCAAT(calcium channel associated transcription regulator)と命名しており、CAATの核への移行には細胞内カルシウムイオンや脱分極が関わっていることや、発生段階に伴ってCAATの核への移行が変化すること、さらにCAATが小脳顆粒細胞の神経突起伸長に関わっていることを示している。CAATがどのようなメカニズムでCav1.2から切り離されるのか、そしてどのようにして核に移行するのか、その詳細なメカニズムについては不明である。おそらく、この場合は膜電位変化

だけではなく、カルシウムチャンネルを介して細胞に流入したカルシウムイオンが関与する可能性があると思われるが、チャンネルの一部分が切り出されて、転写因子という全く異なる機能を持つ分子としても働くというのは興味深い。

5. プロトンチャンネルVSOP1/Hv1

2で明らかにしたVSPの解析に伴い、私達の研究室では電位センサー様構造を有する分子がもっと他にもあるのではないかと考え、マウスのゲノム配列を広く探索した。その結果、電位センサーに相当する構造のみを有するがボアに相当する構造を有しない分子を見出し、VSOP1(voltage-sensor only protein 1)と名づけた⁶⁾。VSOP1を哺乳類培養細胞に発現させて電気生理学的解析を試みたところ、ゲート電流様の電流は見られず、意外にもイオン電流が流れることが分かった。様々なpHの溶液を細胞外液または内液に用いて電流を測定するとネルンストの式に応じた反転電位の変化が見られたことから、ここで流れている電流はプロトンによるものであり、したがってVSOP1は、電気生理学的に存在が既に知られていたプロトンチャンネルの分子実体であることが明らかとなった。プロトンチャンネルは亜鉛イオンによって阻害されることが薬理学的に知られていたが、実際、VSOP1を発現させた細胞で観察される電流も亜鉛イオンにより阻害される。また、プロトンチャンネルはマクロファージなどの免疫系の細胞に多く発現していることが電気生理学的に知られていたが VSOP1も免疫系の細胞に著明に発現している。菌などの異物を貪食する際に水から活性酸素を発生させて殺菌するが、その際に細胞内に生じる余分な水素イオンを排出するためにプロトンチャンネルが重要な働きをしていると考えられているため、おそらくVSOP1は異物排除の機構で重要な役割を担っているものと考えられる。

6. 最後に -トランスポートソームとの関連など

以上、最近明らかになった膜電位変化の新たな側面について纏めた。このように、イオンの出入りによる細胞内イオン環境の制御という意味合いとは別に、膜電位はある種の酵素活性や代謝型受容体の制御など、これまでには考えられなかったような局面においても重要な機能を担っていることが分かってきた。また、従来のイオンチャンネルの研究ではボアがないとイオンが流れないと考えられてきたが、新たに発見されたボアを持たないタンパク質VSOP1がプロトンチャンネルの実体であったことも分かった。

おそらく、実際にはもっとより多くの膜電位センサー蛋白質が存在し、より多くの生理現象に膜電位が関与しているのではないかと私達は考えている。実際、VSOP1は電位センサー様構造を持ちながらゲート電流が観察されないし、逆に代謝型受容体のように、膜電位依存性を示しながらも従来の電位センサー様構造が見当たらない分子も存在することから、おそらく電位センサーは現在知られているもの以外にも様々なタイプが他に存在しているのかもしれない。もし電位センサーが従来の構造だけでなく、もっと他にもあるのなら、Ci-VSPが従来の電位センサーの構造との類似性から見出されたように、他の電位センサー構造と類似性を示す新規電位センサー分子が見つかる可能性は十分に考えられるであろう。

本研究領域のターゲットである「トランスポートソーム」の観

点からは、イオンチャンネルやトランスポーターが様々な分子と複合体を形成して生理機能を担っていると考えられる訳であり、それ自身が電位センサーを持たない分子であっても、電位センサーと複合体を形成して機能する分子であれば、間接的に膜電位変化の影響を受ける可能性が考えられる。そうなれば、膜電位変化によって制御されている生命現象の範囲はさらにぐっと広いものとなるであろう。実際、私達は最近、電位センサー様構造を持ちながらボアをもたない分子を新たにマウスゲノム配列より見出しVSOP2と名づけた。VSOP2はボアの代わりに長い細胞質領域を有しているが、この細胞質領域は既知のいかなるタンパク質とも相同性を示さない。そこで、VSOP2の細胞質領域を bait として yeast two hybrid 法で結合タンパク質を解析したところ、複数の分子を同定することができた。VSOP2は中枢神経系、とくに海馬錐体細胞や小脳プルキンエ細胞に発現していることから、おそらくこれらの神経細胞において膜電位変化をその結合分子に伝達して、それらの分子の機能調節を行なっているのではないかと期待して、現在研究を進めている。

膜電位変化は古くから研究されてきたテーマであるが、今なお新しいテーマである。

参考文献

- 1) Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M. et al. (2005) *Nature*, **435**: 1239-1243
- 2) Ben-Chaim, Y. et al. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**: 22482-22491
- 3) Ben-Chaim, Y. et al. (2006) *Nature*, **444**: 106-109
- 4) Ohara, L. et al. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**: 24204-24215
- 5) Gomez-Ospina, N. et al. (2006) *Cell*, **127**: 591-606
- 6) Sasaki, M., et al. (2006) *Science*, **312**: 589-592
- 7) Murata, Y. and Okamura, Y., submitted to *J. Physiol.*

トランスポートソームの関連する話題2

人工細胞膜で創る分子システム

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 佐々木 善浩・菊池 純一

はじめに

この度、輸送分子を中心とする「膜輸送複合体(トランスポートソーム)」を基本ユニットとして捉えてその機能解明を行う興味深い特定領域研究のニュースレターに執筆する機会を頂きありがとうございます。先のニュースレターにも述べられておりますように、このトランスポートソームが集積する「場」としての生体膜及びその構成成分であるリン脂質に着目し、ともすれば一見「脇役」と見られがちな生体膜も含めて膜輸送複合体に迫るアプローチは極めて重要であり、今後もますますその進展が期待されます。我々の研究グループでは、天然のリン脂質のみならず、有機化学的に合成した脂質分子を用いて人工細胞膜を作製し、さらにこの人工細胞膜による新しい機能発現を目指す研究を行っております。本稿では、これら合成脂質分子からなる人工細胞膜リボソームがどのような性質をもつのか?、また人工細胞膜を用いて何ができるのか?、に焦点を絞り、我々の最近の研究成果を中心に紹介させていただきます。

1. 安定な人工細胞膜を創る

脂質及びその関連する両親媒性化合物は生体膜の重要な構成成分です。これまでに、様々な天然由来脂質が単離・精製され、これらの脂質から形成される人工細胞膜としてのリボソームを、薬物運搬体やナノスケールの反応場などとして用いる研究が盛んに行われてきました^{1)・4)}。またごく最近では、この人工細胞膜を次世代の分子デバイスを構築するためのプラットフォームとして用いる研究も活発に展開されています⁵⁾。これらの人工細胞膜を形成するための脂質としては、ホスファチジルコリンに代表される生体由来のリン脂質が一般にはよく用いられています。しかしながら、膜タンパク質などの生体分子との親和性の点ではこれら天然由来脂質が優るものの、その膜構造の安定性は必ずしも満足のゆくものではないケースがしばしば見受けられます。

このような背景のもと、我々の研究グループでは、その膜厚が5 nm程度の脂質二分子膜の表面を、原子厚みのセラミック層で覆った人工細胞膜「セラソーム」の開発を行ってまいりました(図1)^{6)・8)}。セラソームは、リン脂質などが形成するリボソームと類似の構造と膜物性を有していますが、その表面はセラミックスとしての性質も兼ね備えているために、その構造安定性が飛躍的に優れていることが大きな特徴です。この高い構造安定性は、動的光散乱、示差走査熱量分析、走査型電子顕微鏡観察などの測定によって明らかにされております。MALDI-TOF MASSによる分子量測定から見積もったセラソーム表面のシロキサンネットワークの発達度はオリゴマー程度ですが、この状態でもセラソームは十分な構造安定性を有しており、かつ生体膜の特徴である膜流動性も保持しています。また、その

調製法を一般のリボソームの場合に準じて適宜、工夫することで、粒径が数十nmから数mm以上までの、さまざまなサイズのセラソームを容易に作製することもできます⁹⁾。

ここでは、このような安定な人工細胞膜を用いて何ができるのか?の一例として、最近、京都大学大学院工学研究科の青山宏教授との共同研究を通して、遺伝子キャリアーとしてのセラソームの有効性を示した結果^{10)・11)}について簡単に紹介させていただきます。遺伝子の細胞内導入は、遺伝子治療をはじめとする様々な応用が期待されております。この研究分野における未解決の問題点の一つは、有効な遺伝子のキャリアーの開発です。ここで、遺伝子キャリアーとして有望視されているウイルスベクターは潜在的な危険性を有するために、有効な非ウイルスベクターの開発が待ち望まれています。図1に示す合成脂質1から形成されるセラソームは、細胞がエンドサイトーシスでベクターを取り込むのに最適な数十nmの粒径をもち、プラスミドDNAと複合体を形成しても、膜融合による形態変化を起こさないことが特徴です。その結果、HeLa細胞などへの遺伝子導入において、これまでのカチオン性リボソームよりも極めて高い導入効率を得られました。セラソームは細胞毒性も低く、血清存在下でも使用可能であり、細胞にやさしい遺伝子キャリアーとして利用できることが明らかになりました。

2. 人工細胞のソーティング

生体は、天文学的な数にのぼる細胞が回路整然と集積・組織化して多細胞組織体をつくることで、より高次の機能を発現しています。したがって、様々な機能性分子を組み込んだ人工細胞膜を取り扱う際にも、これらの人工細胞膜を自在に集積する

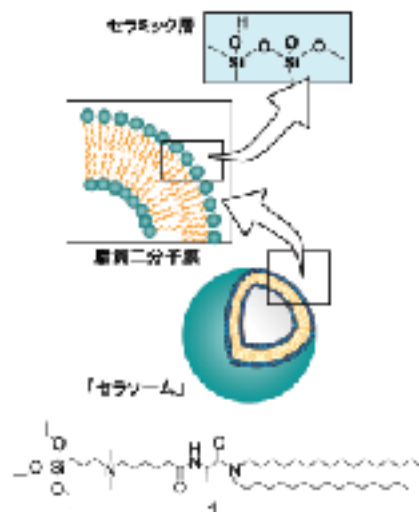


図1 セラソームの構造とセラソーム形成脂質の例

技術を確立することが多彩な人工細胞膜機能を発現させる上でも非常に有用となります。人工細胞膜の水溶液中での集積化については、これまでに、アビジン - ビオチンの相互作用、アデニンとバルビツール酸との水素結合、オリゴヌクレオチド間の相補的塩基対形成、などを利用した系が報告されています¹²⁾。一方、我々の研究グループでは、脂質の極性頭部を機能性のスペーサー部位で連結したジェミニ型のペプチド脂質を用いることで、イオン、光、熱などの外部刺激により人工細胞膜の集積系を構築できることを明らかにしています。

例えば図2に示すジェミニペプチド脂質2を組み込んだリン脂質の人工細胞膜は、 Zn^{2+} イオンのような遷移金属イオンの添加によって、その膜小胞体構造を維持したままで、水中において集積化できることを見出しました¹³⁾⁻¹⁵⁾。また、ここに K^+ イオンのようなアルカリ金属イオンを添加すると、集積化した人工細胞膜を元の分散状態に戻すこともできます。これは、ヒスチジン残基のイミダゾリル基は遷移金属イオンに、スペーサーの擬クラウンエーテル部位はアルカリ金属イオンに選択的な認識能を示すというジェミニペプチド脂質の ditopic なイオン認識特性に由来するものです。また、ジェミニペプチド脂質に導入するアミノ酸残基の種類を変えることで、イオン認識の選択性を制御することもわかりました。例えば、アスパラギン酸残基をもつジェミニペプチド脂質3は Ca^{2+} イオンに対して特異的な認識能を示します。さらに、この脂質とヒスチジン残基をもつジェミニペプチド脂質を別々の人工細胞膜に組み込むと、それぞれのイオン認識能に応じて、人工細胞膜を選別する(ソーティング)こともできます(図3)¹⁶⁾。具体的には、まず、異なるイオン種に対して応答するジェミニペプチド脂質を組み込んだ人工細胞膜を別個に調製し、各々の人工細胞膜を異なる蛍光色素でラベルします。その後、この人工細胞膜を混合することで異なるジェミニペプチド脂質を含む人工細胞膜の混合溶液を得ます。ここに、 Zn^{2+} イオンもしくは Ca^{2+} イオンを添加すると、それぞれのイオン種に応答するジェミニペプチド脂質を含む人工細胞膜のみが基板上に集積されることがわかりました。以上の結果は、人工細胞膜の混合溶液から、外部刺激に応じて特定の人工細胞膜のみをソーティングできることを示しております。これは、人工細胞膜のような脂質一分子に比べて極めて大きいメソスコピックな分子集合体の集積制御を、分子レベルでのホスト - ゲスト相互作用の増幅として達成興味深い手法であるといえます。

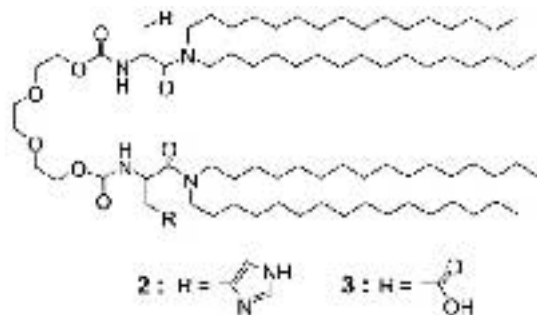


図2 ジェミニペプチド脂質

3. 人工細胞膜上での分子間コミュニケーション

本特定領域研究では、チャネル、トランスポーター、ポンプなどの生体の輸送分子を独立の実体として捉えるのではなく、それら輸送分子とそれ以外の制御分子や足場タンパク質等との相互作用も含めたトランスポートソームとして、その機能解明を行うことを目的としているものと解釈されます。我々の研究グループでは、このような生体膜上における分子間の連係システムを人工系においてシミュレートする研究も行っております。具体的には、この連係システムを、「分子間コミュニケーション」として捉え、人工細胞膜上に比較的単純な分子を自己組織化することで、分子間でのコミュニケーションを実現するシステムを構築してきました。ここでは、その一例として、人工受容体と酵素の機能を連係させた人工シグナル伝達系について、以下に紹介させていただきます。

細胞のシグナル伝達にはいくつかのパターンが存在しますが、その中で我々は生体系に多くみられるG蛋白質介在型のシグナル伝達¹⁷⁾に着目し、これを規範とした人工系での分子間コミュニケーションを実現しました(図4)。その設計指針については以下の通りです。まず、生体膜モデルである脂質膜リボソーム上に、非共有結合的相互作用を介して人工受容体と酵素を固定化します。また、受容体と酵素間のコミュニケーションを介するためのメディエーターとして、G蛋白質の代わりに受容体と酵素の両方に結合能を有し、かつ酵素の活性を制御できる単純な化学種として金属イオンを選択しました。初期状態において、酵素はメディエーターの結合によってその活性が阻害されています(Off状態)。この系に、人工受容体に対する入力信号としての適当なシグナル物質を加えると、このシグナルが受容体によって特異的に認識されて複合体形成が起こります。ここで、受容体とシグナルとの複合体が、メディエーターに対して酵素よりも強い結合サイトを提供できれば、酵素に結合していたメディエーターは受容体側に移動します。その結果として、酵素活性が回復して酵素による触媒作用でシグナルが増幅されることになります(On状態)。例えば、人工受容体4を組み込んだ脂質二分子膜系では、酵素として乳酸脱水素酵素を、

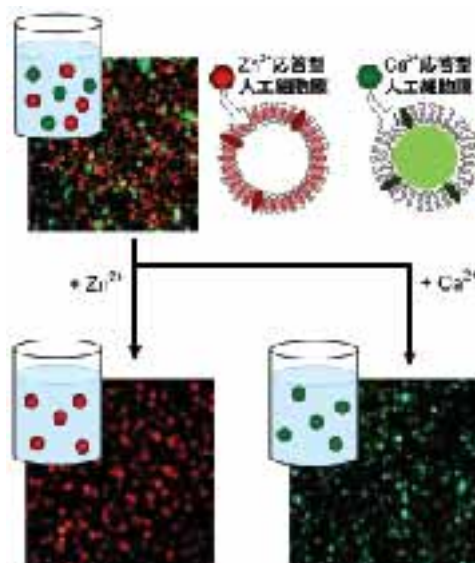


図3 人工細胞膜ソーティングの模式図と各過程における蛍光顕微鏡観察像

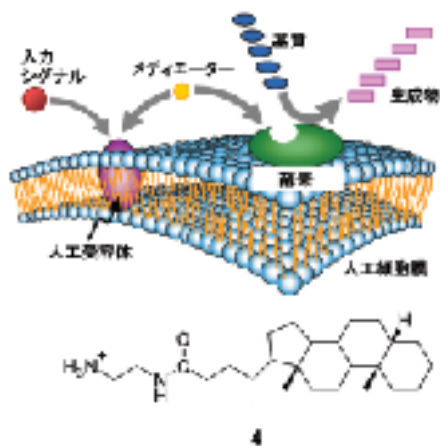


図4 人工細胞膜における分子間コミュニケーションシステムと人工受容体(4)の構造

メディエーターとして Cu^{2+} イオンを用いた場合に、有効なシグナル伝達挙動が観測されました¹⁸⁾。この系においては、顕著なシグナル特異性を発現させることもできます。例えば、脂質1が形成するセラソーム上でピリドキサル 5'-リン酸をシグナルに用いた系では、all-or-noneのスイッチング挙動が観測されました¹⁹⁾。この原理を用いると、人工受容体と外部シグナルの様々な組み合わせによって、多彩な人工シグナル伝達系を構築することも明らかにしております²⁰⁾⁻²³⁾。

おわりに

合成脂質からなる安定な人工細胞膜の作製、また人工多細胞とみなすこともできるこれら人工細胞膜の集積システムの制御、さらに人工細胞膜上に集積した機能分子間のコミュニケーションの実現について我々の最近の研究成果を紹介させていただきました。生体は、長い進化の過程を経て現在の生命体を構築してきました。ここで、生体膜をこの分子集積のための「場」として採用したことには、それなりの意義と必然性があるものと思われます。その中で、細胞が外界との物質や情報のやり取りを行うためのインターフェイスとしての中心的な役割を担っているトランスポートソームの機能を明らかにしていくことは、生命現象を理解するための重要なアプローチの一つであることは言うまでもありません。我々の今後の課題は、これらトランスポートソームをはじめとする生体由来の分子複合体をも組み込んだ融合系に研究を展開していくことです。このような研究を通じて、分子複合体の機能を明らかにするとともに、それらの知見をもとに物質科学的にも有用な人工の分子システムとしての人工細胞を構築したいと考えております。

参考文献

1. V. P. Torchilin and V. Weissig, *Liposomes*, 2nd ed., Oxford Univ. Press: Oxford (2003).
2. Y. Barenholz, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **6**, 66 (2001).
3. T. Lian and R. J. Y. Ho: *J. Pharm. Sci.* **90**, 667 (2001).
4. P.-A. Monnard, *J. Membrane Biol.* **191**, 87 (2003).
5. J. Kikuchi, K. Ariga and Y. Sasaki, *Advances in Supramolecular Chemistry*, G. W. Gokel ed., 8, Cerberus Press: South Miami, p. 131 (2002).

6. K. Katagiri, R. Hamasaki, K. Ariga and J. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7892 (2002).
7. 橋詰峰雄、佐々木善浩、菊池純一、「ナノハイブリッド材料の最新技術」、シーエムシー出版、p. 134 (2005).
8. 菊池純一、佐々木善浩、触媒、**46**, 374 (2004).
9. 菊池純一、佐々木善浩、橋詰峰雄、「バイオミネラリゼーションと応用技術」、シーエムシー出版(2006)印刷中。
10. Y. Sasaki, K. Matsui, Y. Aoyama and J. Kikuchi, *Nature Protocols* **1**, 1227 (2006).
11. K. Matsui, S. Sando, T. Sera, Y. Aoyama, Y. Sasaki, T. Komatsu, T. Terashima and J. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3114 (2006).
12. C. M. Paleos and D. Tsiourvas, *J. Mol. Recognit.* **19**, 60 (2006).
13. S. Iwamoto, M. Otsuki, Y. Sasaki, A. Ikeda and J. Kikuchi, *Tetrahedron* **60**, 9841 (2004).
14. Y. Sasaki, S. Iwamoto, M. Mukai and J. Kikuchi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **183**, 309 (2006).
15. 菊池純一、佐々木善浩、光化学 **36**, 33 (2005).
16. M. Otsuki, Y. Sasaki, S. Iwamoto and J. Kikuchi, *Chem. Lett.* **35**, 206 (2006).
17. J. T. Hancock, *Cell Signaling*, Longman: Harlow (1997).
18. W.-J. Tian, Y. Sasaki, S.-D. Fan and J. Kikuchi, *Supramol. Chem.* **17**, 113 (2005).
19. 佐々木善浩、山田真希、寺島崇、王剣鋒、橋詰峰雄、范聖第、菊池純一、*高分子論文集* **61**, 541 (2004).
20. Y. Sasaki, Y. Shioyama, J. Kikuchi, W.-J. Tian and S.-D. Fan, *Proc. 4th Annu. IEEE Conf. Pervasive Comput. Commun. Workshop*, 543 (2006).
21. W.-J. Tian, Y. Sasaki, A. Ikeda, S.-D. Fan and J. Kikuchi, *Chem. Lett.* **33**, 226 (2004).
22. W.-J. Tian, Y. Sasaki, A. Ikeda, J. Kikuchi, X.-M. Song and S.-D. Fan, *Acta Chim. Sinica* **62**, 1230 (2004).
23. W.-J. Tian, Y. Sasaki, S.-D. Fan and J. Kikuchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**, 715 (2005).

編集後記

新年を迎え、新たな気持ちで、「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」ニュースレターを編集させていただきました。今号は、2006年度の冬号ですが、編集が遅れたため、2007年の発行になりましたことをお詫びさせていただきます。

編集期間中、当特定領域と特定領域研究「植物の養分吸収と循環系」との合同で、初の国際シンポジウム「Membrane Transport as a Universal Biological Mechanism」が開催されました。海外からの招待公演者を含め、両領域から多数のご参加を頂き、幅広い研究に触れる機会を得ることができました。植物における金属イオン取り込み機構から、痛みを伝えるATPの役割まで多岐にわたり知見を深めることができました。中でもZamponi教授は一陣の風を吹き込んでくれたのではないのでしょうか？スピード感ある発表に加え、壇上から飛び降りる座長の姿、やや肌寒い会場での半袖姿、とても新鮮でした。また、国際シンポジウムに先立って行われました平成18年度第2回班会議では、計画班の代表者による研究の進捗状況と次回班会議までの到達目標が掲げられ、本領域の「有機的な連携」による発展を強く意識する場となりました。

さて、今回の表紙の水門は、平安神宮近辺の琵琶湖疏水に建てられているものです。年の瀬の寒さの中、表紙を飾るにふさわしい水門を求めて蹴上のインクラインから鴨川への合流点まで探し歩いて撮影しました。琵琶湖疏水は琵琶湖の湖水を京都に運ぶために作られた水路（canal）であり、水力発電事業・一般電車開業というW日本初により、京都の近代化に貢献した大事業です。本研究領域も琵琶湖疏水のように多領域を結び大きく発展していくことを祈願いたします。

（加藤）

TRANSPORTSOME

第3号（2007年1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6-20-2 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

