

TRANSPORTSOME

特定領域研究:生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能

QUARTERLY
Spring
2007

平成17~18年度成果特集号1

目次

| | | |
|---|-------------------------|----|
| 第一回国際シンポジウム | 森 泰生、金井 好克 | 2 |
| 第一回若手ワークショップ | 安西 尚彦、日比野 浩 | 3 |
| 平成17～18年度成果特集1 | | |
| 心筋NOシグナル：性ホルモン非ゲノム作用による 心筋イオンチャネル調節 | 古川 哲史、黒川 洵子、貝原 麻美 | 5 |
| 一酸化窒素によるシステインS-ニトロシル化を介した TRPチャネルの活性化 | 吉田 卓史、山本 伸一郎、高橋 重成、森 泰生 | 10 |
| 共発現データベースCOXPRESの構築と利用法 | 大林 武、木下 賢吾 | 16 |
| 神経細胞におけるチャネル機能複合体マイクロアセンブリによる 後過分極の形成 | 竹島 浩、森口 茂樹、柿澤 昌 | 21 |
| 2光子顕微鏡による開口放出の可視化解析と バイオ分子イメージングの展開 | 根本 知己 | 27 |
| パーキンソン病におけるセプチン・スカフォールドの破綻と ドパミンニューロンの障害 | 木下 専、萩原 明 | 32 |
| 編集後記 | | 35 |

表紙について

今回の表紙は手前味噌ではありますが、小脳プルキンエ細胞のチャネル機能共役に関する電子顕微鏡と蛍光抗体イメージを利用させていただきました。神経細胞においては、古くから "subsurface cistern" と呼ばれる細胞膜に小胞体が近接した結合膜構造が観察されており(中央部の電子顕微鏡像)、その独特な構成から細胞表層膜チャネルと細胞内チャネルの機能共役の場ではないかと推定されてきました。ジャンクトフィリンと命名した膜タンパク質により構築されると考えられるその構造中には、細胞膜側に低コンダクタンスCa²⁺依存性K⁺チャネル(蛍光像の赤シグナル)が、小胞体膜側にリアノジン受容体Ca²⁺放出チャネル(蛍光像の緑シグナル)が集積しており、Ca²⁺が仲介するチャネル間機能共役を構成し、興奮後に生じる後過分極相を形成することが明らかになりました。チャネル共役の舞台、舞台といえば東山清水。

(竹島)

第一回国際シンポジウム

2007年1月13、14日の2日間にわたり、京都大学100周年記念ホールにおいて、私たちの特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」と特定領域研究「植物の養分吸収と循環系」（西澤直子代表）との合同で、国際シンポジウム「Membrane Transport as a Universal Biological System」が開催された。名前のとおり、幅広く動物から植物の分野まで、膜輸送体を対象に研究している研究者が一堂に集まったシンポジウムである。外国からの演者はアメリカ合衆国、カナダ、オーストラリア、ドイツ、フランス等から参加し、チャンネルの分子生理学の大阪大学、倉智嘉久教授と、チャンネルの構造生物学の京都大学、藤吉好則教授をKeynoteシンポジストにむかえ、新年の京都を彩るにふさわしい、Scientificにも十分に華やかな国際シンポとなった。

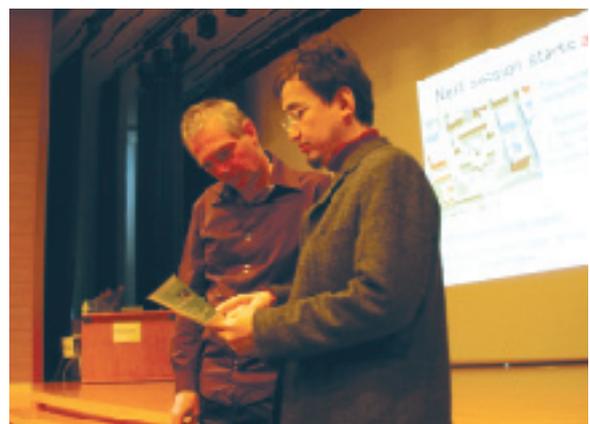
大きな運動能を有する動物における「植物的な」生理機能解明を主要課題の一つとしている私たちの特定領域にとってみると、まさに植物の膜輸送は一種の「規範」である。適した

環境を探し、あるいはいやな環境を避けるために、動物のように「移動」をすることが、植物にはできないことから、否応なく特定の場所に物理・化学的適応をすることが要求される。そのために必要な物質を最大限摂取・産生し、不必要な有害物質を分解・排泄をする高い能力を有すると思われる。まさに、「植物的な」機能が際立っているのである。そういうことで、私たちにはとても勉強になったが、植物領域の研究者にどう思っていたのかは定かではない。が、チャンネル・トランスポーター・ポンプ研究が興奮性組織を中心に爆発的に発展した歴史があるので、今回もよかったと思って頂いたのを祈る限りである（多分大丈夫でしょう）。

お話いただいた演者、参加を頂いた班員、一般聴衆の方々に感謝いたします。主催者達にとっては非常に充実した2日間でした。

世話人：森 泰生¹、金井 好克²

(¹京都大学大学院工学研究科、²杏林大学医学部)



第一回若手ワークショップ

本特定領域主催の「第一回若手ワークショップ」が、平成19年1月27日から29日の2泊3日の日程で、「富士ハイツ」（静岡県富士市）にて行われました。今回は、安西（代表世話人）、若森（京都大）、大槻（東北大）、竹谷（徳島大）、日比野が世話人として、会の企画・運営を担当しました。富士山の麓、天気にもますます恵まれて、3日間の日程は参加者の熱気の中、あっという間に消化されました。

ワークショップの目的は、生体膜輸送研究あるいはその関連分野の研究に携わる若手が集い、自分の研究を発表し、他人の研究を知り、お互いが知り合いになり、一緒に膜輸送研究の（自分達の）将来について考える機会を持ち、運命共同体(?)ともいえる同分野で頑張る同世代の繋がりを作っていくことでした。

2週間前に開催された国際シンポジウムと日程的に近かったため、参加者が集まるかどうか懸念されましたが、77名もの大勢の方々に参加いただき、初回の若手ワークショップとしては上々の滑り出しでした。そのうち、大学院生が23人、ポスドクが6人、それ以外は助手以上となり、大学院生の参加がすこし少なめかと思いましたが、今回は学位論文の発表や審査の時期と重なってしまい、大学院生が参加しにくい時期だったかと思ひ、この点次回からの開催時期の決定の際に考慮が必要と思ひます。それでも20代のパワーが十分に発揮された会となり、初期の目的も十分に達せられたと感じています。

今回は、47題の演題を発表いただきましたが、全てを口頭発表とし、シンポジウムを5つ、一般口演セッションを6つ企画しました。発表内容によって発表時間は変え、質疑を含めて12分から25分の時間を設定しましたが、1会場でこの演題数を全て割り振るのはかなり難しく、発表時間が短くなってしまい、時間オーバーする演題も続出しました。各演題の内容はさることながら、質疑応答も非常に活発で、殆ど全ての演題に会場から質問が出て、質問者が一部のメンバーに偏ることもなく、大学院生

まで含めてかなり積極的に質問をしていました。3日目になっても疲れて質問が減ることもなく、むしろ前半とは違った人たちが討論に参加してくるようになり、3日の間にすでに若手ワークショップの効果が現れてきていました。

本ワークショップでは、「生体膜輸送研究あるいはその関連分野の次世代研究者の集まりの場」を意識して、班員以外の方々にも参加を呼びかけ、領域外から23人の方々に参加いただきました。そのため、普段の班会議より広い分野からの参加者となり、特に、工学や臨床医学分野の研究者と、近い距離で議論することができたことは、大きな収穫だったと思ひます。一方で、今回はチャネル関連の演題が少なめで、将来の展望という点から、今後チャネル研究者の参加を促す必要があると感じました。

今回の企画の目玉のひとつとして、5つのナイトレクチャーを設定しました。まず、分野を第一線でリードする4人の先生（酒井規雄先生・広島大、竹島浩先生・京都大、久保義弘先生・生理研、金井好克先生・杏林大）に、ご自身の経験・人生観や研究に対する姿勢など、できるだけ肩が凝らない形式で、ご講演を御願ひしました。何故、科学を志したか、学生時代や留学時代の体験、現在の本音など、若手のみならず、中堅にも大変役立つお話となりました。終了時のアンケートにおいても好評で、この話に刺激を受けた人もかなりいると聞いています。更に、2日目の夕方には、世話人の「留学体験談」のセッションを企画しました。特に留学を考えている若い研究者にとって、少しでも参考になればと、留学の良かった点、問題点など、ざっくばらんに披露しました。若手ワークショップならではのとも言えるこのようなナイトレクチャーは、若手の参加者にインパクトを与えたように思われます。

また、当日の全ての発表演題に対して、より詳しく議論するために、夕食後、「ナイトディスカッション」の時間を設けました。懇親会を兼ねていたもので、ただの談話会になるのではと心配



していましたが、予想に反し議論は白熱し、随所で活発なディスカッションが行われていました。今回は、予算の関係でポスターボードを使用できず、各自のコンピューターを机の上に置いて発表スライドを提示する形で行いましたが、やはりポスターの方が分かり易いとの意見も多く聞かれました。

今回参加いただいたナイトレクチャーの講師の先生方や世話人である我々も含めた中堅以上の人々は、懇親会などを通じて、出来るだけ若手とのふれあいに努めたつもりではありましたが、やはりより若い世代から見ると、年齢・ポジションの差は予想外に大きかったらしく、コミュニケーションが取りにくいとのコメントも見受けられました。特に、上の世代と若手を繋ぐ役割である我々中堅は、自身が大学院生の頃を振り返り、より積極的に若手と触れあったり、真摯に彼らの意見を聞いたりしなければならぬと感じました。これは、本ワークショップのみならず、領域の他の活動の際にも当てはまることと思います。

2日目の晩、全てのセッション終了後に世話人用の大部屋

に30名を越える参加者が集い、深夜2時まで宴が行われました。これにより参加者同士の距離が縮まったように思われ、合宿形式でやるメリットを確認することができたと思います。

以上、若手ワークショップの報告を列挙してきましたが、初回にしては、大盛況のうちに終えることができたと思います。このような若手を中心とした活動が、トランスポートソーム研究のプラットフォームとなり、当領域の発展のみならず、異分野間の融合や、新しい方向性へのチャレンジへと結びつくように期待したいと思いますし、また今後も我々はそのために努力しなければならぬことは言うまでもありません。最後に、お忙しいところ参加して頂いた先生方、若手を派遣して下さった各教室、会場係をして頂いた杏林大と阪大のメンバー、そして何よりも参加して頂いた方々に厚く御礼申し上げます。

安西 尚彦¹、日比野 浩²

(¹杏林大学医学部、²大阪大学大学院医学系研究科)



心筋NOシグナル：性ホルモン非ゲノム作用による 心筋イオンチャネル調節

古川 哲史(AO1計画班)、黒川 洵子、貝原 麻美

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理分野

発表論文：

Bai, C.X., Namekata, I., Kurokawa, J., Tanaka, H., Shigenobu, K., & Furukawa, T. Role of nitric oxide in Ca^{2+} -sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K^+ current in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 96, 64-72, 2005.
Bai, C.X., Kurokawa, J., Tamagawa, M., Nakaya, H., & Furukawa, T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation* 112, 1701-1710, 2005.
Furukawa, T., Bai, C.X., Kaihara, A., Ozaki, E., Kawano, T., Nakaya, Y., Awais, M., Sato, M., Umezawa, Y., & Kurokawa, J. Ginsenoside Re, a mian phytosterol of Panax ginseng, activates cardiac potassium channels via a nongenomic pathway of sex hormones. *Mol. Pharmacol.* 70, 1916-1924, 2006.
Furukawa, T. & Kurokawa, J. Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: Implication for gender-difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol. Therapeut.* 2007 (in press).

1. はじめに

一酸化窒素(nitric oxide, NO)は、もともと内皮細胞由来弛緩因子EDRFとして同定され、この発見が端緒となり1998年Furchgott博士、Murad博士、Ignarro博士3名のノーベル賞医学生理学賞受賞につながった。Furchgott博士はひも状血管標本にアセチルコリンを投与すると血管は収縮するが、助手がリング血管標本でアセチルコリンを投与すると逆に血管が弛緩することにヒントを得て、血管内皮細胞からNOがアセチルコリンにより産生・放出されることを明らかにした¹⁾。この逸話は生命科学におけるセレンディピティの重要性を示すエピソードの一つとして有名である。

その後の展開として、NOはガス状シグナル伝達物質であり、神経系ではlong-term potentiation (LTP)、マクロファージではseptic shockに関与すること、など多くの生命現象に関わることが明らかとなってきた。我々は心臓不整脈の研究を行っている過程で、心筋イオンチャネルがNOによる制御を受けること、これが不整脈リスクの男女差に関与することなどが明らかとなってきた。そこで、本特定領域班ではNOによるイオンチャネル制御の基盤となるイオントランスポートソームを明らかにすることを目的として研究に取り組んでいる。本ミニレビューでは、NOが重要な役割を演じる性ホルモン非ゲノム作用による心筋イオンチャネル調節機構に関して概要する。

2. 不整脈の性差

病気の罹患率・薬物に対する反応性の男女差を考慮した医療 "gender-specific medicine (GSM)" の重要性が最近国内外で注目されている。不整脈にも特徴的な男女差が存在している。体表面心電図のQT間隔延長を特徴とするQT延長症候群は、運動(特に水泳が多い)中にtorsadedepointes (TdP)と呼ばれる特徴的な波形の不整脈を来たし学童児などの若年者がしばしば突然死を来たす不整脈症候群であり、その不整脈

発症頻度は女性で有意に高い²⁾。一方、Brugada 症候群は就寝中の突然死を特徴とする致死的不整脈症候群であり、従来“ポックリ病”と呼ばれていたが、ほとんどの症例が男性で起こる³⁾。特に後天性QT延長症候群では、多くの薬物の副作用として致死性不整脈TdPが生じ、薬物の市場からの撤退・開発途上での中止の単独の原因として最も頻度の高いものとなっており、製薬業界では“QT延長問題”と呼ばれ緊急の解決課題とされている。この薬物誘発性不整脈も男性に比べて女性で2倍以上の頻度に達する⁴⁾。

心電図QT間隔にも男女差があり、女性で数msec長いことが知られているが、この男女差が思春期になって初めて顕著となること⁵⁾、またQT延長症候群に伴うTdP頻度の男女差も思春期から顕著になること⁶⁾、から性ホルモンの関与が疑われている。

女性の中でも性周期や妊娠によりQT間隔、TdPリスクがダイナミックに変動する。QT間隔は卵胞期に比べて黄体期に短く⁷⁾、QT延長薬 ibutilideによるQT延長の程度も黄体期では排卵期・月経期に比べて小さい⁸⁾。また、QT延長症候群患者の妊娠期における不整脈発作を注意深くモニターするとプロゲステロンの濃度の低下する出産後に急増し⁹⁾、閉経後女性でホルモン補充療法を行うと、エストロゲン単独療法ではQT間隔が延長し、エストロゲン・プロゲステン併用療法では逆に短縮する¹⁰⁾。以上の臨床データから性ホルモンが心筋再分極に関わるイオンチャネルを制御することが示唆されるが、その詳細は不明であり我々の研究対象となった。

3. 性ホルモンのゲノム作用・非ゲノム作用

性ホルモンは脂溶性のステロイドホルモンであり、その受容体は細胞質内に存在する。古典的な性ホルモン作用においては、細胞膜を透過したリガンドが細胞質内性ホルモン受容体に結合すると、受容体/リガンド複合体が核内移行し、性ホルモン応

答領域を有する遺伝子プロモーター領域に結合し、さらにコアクチベーターをリクルートし遺伝子転写制御をもたらす¹¹⁾。この作用はゲノム作用(別名nuclear action・transcriptional action)と呼ばれ、遺伝子転写・タンパク翻訳を介するため数時間~数日かかる比較的緩徐な反応である(図1)。

最近、性ホルモンには数秒~数分で現れるゲノム作用では説明できない迅速な作用があることが分かり、非ゲノム作用(別名non-nuclear action・non-transcriptional action)として神経系・心血管系などでその重要性が注目されている(図1)¹²⁾。そのメカニズムは未だ不明な部分も多く残されており、特に非ゲノム作用に関わる性ホルモン受容体がゲノム作用に関する受容体と同一なものであるか、特異的な受容体が存在するのかが重要な疑問点として残されている。中では比較的良く理解されている非ゲノム経路のシグナル伝達としては、MAP-kinase系のERKを活性化する経路¹³⁾とeNOSを活性化する経路¹⁴⁾の2つがある。性ホルモンは後者のeNOSを介する経路でNOを産生し、心筋イオンチャンネルを制御する。

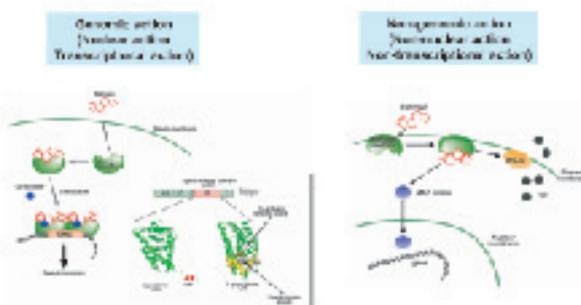


図1 エストロゲンのゲノム作用と非ゲノム作用

左図、エストロゲンは細胞質内受容体に結合すると、核内移行しコアクチベーターをリクルートし、エストロゲン応答領域(ERE)を持つ遺伝子の転写を活性化する(ゲノム作用)。
右図、細胞膜局在受容体に結合すると、MAP kinaseあるいはeNOSを活性化する(非ゲノム作用)。

4. 性ホルモン非ゲノム経路による心筋イオンチャンネル制御

主要な性ホルモンのテストステロン(DHT)、エストラジオール(E2)、プロゲステロン(P4)の心室筋活動電位に対する作用を見ると、DHT・P4は濃度依存性に活動電位幅(APD)を短縮する¹⁵⁾。E2の作用は複雑であり、低濃度(0.1 nM-1 nM)ではAPDを約10%程度延長し、逆に比較的高濃度(10 nM-100 nM)では短縮する。低濃度E2によるAPD延長作用はQT延長症候群の男女差を理解する上で極めて重要となるが¹⁶⁾、NOを介さない反応であり、本ミニレビューの目的から外れるので省略する。

DHT・P4、および高濃度E2によるAPD短縮は、性ホルモン投与開始5分以内から出現し、10分程度で定常状態に達することから、急性の効果すなわち非ゲノム作用と考えられる。NOスカベンジャーであるcarboxy-PTIO・L-NAC、eNOSの阻害剤L-NIOにより消失することから、非ゲノム作用のうちeNOSを介する反応と考えられる。

APD短縮のイオンメカニズムを検討すると、緩徐活性型遅延整流性K⁺チャンネル電流I_{Ks}とL型Ca²⁺チャンネル電流I_{CaL}が性ホルモンの主要なターゲットであった。コントロール状態ではDHT、E2、P4は濃度依存性にI_{Ks}を活性化し、EC₅₀は各性ホルモンにおいて5 nM前後であり、これら性ホルモンの臨床血中レベル

内で作用する(図2)。一方、I_{CaL}に対してはコントロール状態ではほとんど作用が見られないが、cAMP刺激により増大したI_{CaL}に対しては明らかな抑制作用を示す(図3)。そのIC₅₀はP4において求められているが30 nM前後であり、これはP4濃度が上昇する黄体期の臨床血中濃度に相当する。つまり、臨床血中濃度あるいは性周期で変動する血中濃度範囲で性ホルモンは心筋再分極時間に影響することになる。

5. NOによるI_{Ks}・I_{CaL}調節メカニズム

性ホルモンはコントロール状態ではI_{Ks}を活性化し、cAMP刺激時にはI_{CaL}を抑制するが、これらの作用はいずれもNOスカベンジャーで消失することから、NOによるものと考えられる。

NO産生の上流経路と産生されたNOによる作用メカニズム、すなわちNO下流経路の2点が次の疑問点として浮かび上がってくる。まず下流経路であるNOの作用メカニズムを見ていくと、良く知られているのがsoluble guanylate cyclase (sGC)のヘム鉄にNOが結合しこれを活性化し、産生されるcGMPがcGMP-dependent protein kinase (PKG)やcGMP-dependent phosphodiesterase (PDE)を活性化するsGC/cGMP経路である。Furchgott博士が見つけたアセチルコリンによる血管弛緩反応もsGC/cGMP経路を介する作用である。一方、最近注目されているのがタンパクCys残基の

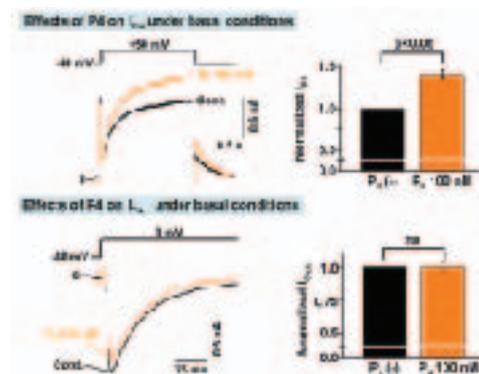


図2 コントロール状態でのプロゲステロン(P4)の作用

上段、コントロール状態ではP4はI_{Ks}を活性化する。
下段、コントロール状態ではP4はI_{CaL}に対して有意な作用を示さない。

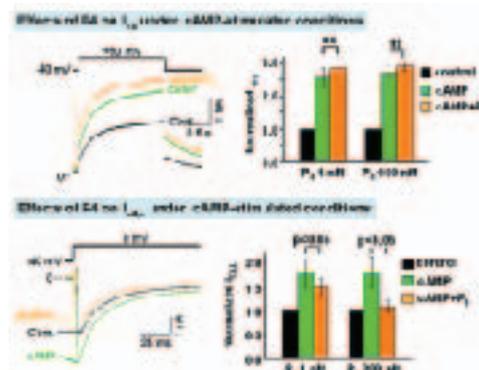


図3 cAMP刺激状態でのプロゲステロン(P4)の作用

上段、I_{Ks}は細胞内cAMPにより増大するが、更にP4を加えても有意な変化を示さない。
下段、I_{CaL}は細胞内cAMPにより増大し、更にP4を加えると元のレベルまで減少する。

チオール基を直接ニトロソ化するs-nitrosylation経路である¹⁷⁾。sGC/cGMP経路はsGC阻害薬ODQにより抑制することができる。一方、s-nitrosylation経路は酵素反応を介さない経路であり特異的な阻害薬が存在しない。アルキル化剤NEMや還元剤DTTが非特異的ではあるがタンパクニトロソ化反応を阻害する。性ホルモンの I_{K_S} ・ $I_{Ca,L}$ に対する作用メカニズムを見てみると、 I_{K_S} 活性化はODQ非感受性でありNEM・DTT感受性であることからs-nitrosylation経路を介することが示唆される(図4)。 I_{K_S} チャンネルは α -subunitのKCNQ1と β -subunitのKCNE1のヘテロ複合体から構成されるが、予備実験の結果ではKCNQ1チャンネルのCys残基がニトロソ化されるという結果を得ている。一方cAMPにより増強された $I_{Ca,L}$ の抑制は、ODQ感受性、NEM・DTT非感受性であり、sGC/cGMP経路を介するものと考えられる(図4)。 $I_{Ca,L}$ に対するcAMP-dependent protein kinase (PKA)作用とcGMPが拮抗することは以前から知られた事実である。これには種・組織特異性がありモルモット・ラット心筋筋細胞ではPKAによるリン酸化をPKGによるリン酸化が拮抗的に働くこと、カエル・ウサギ心筋筋細胞ではcGMPがPDE2を活性化しcAMP濃度を低下さ

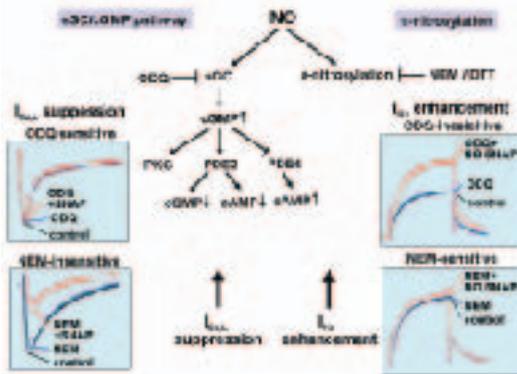


図4 NOの作用メカニズム

NOはsoluble guanylate cyclase (sGC)を活性化し、産生されたcGMPがPKGあるいはPDE2を活性化、あるいはPDE4を抑制する(sGC/cGMP経路)。NOはまたタンパクCys残基のチオール基を直接ニトロソ化する(s-nitrosylation)。sGCはODQによりブロックされ、s-nitrosylationは非特異的ではあるがNEMあるいはDTTによりブロックされる。NOドナー-SNAPによる $I_{Ca,L}$ 抑制はODQにより抑制されることから、sGC/cGMP経路を介するものと考えられる。SNAPによる I_{K_S} 増大はNEMによりブロックされることから、s-nitrosylationによるものと考えられる。

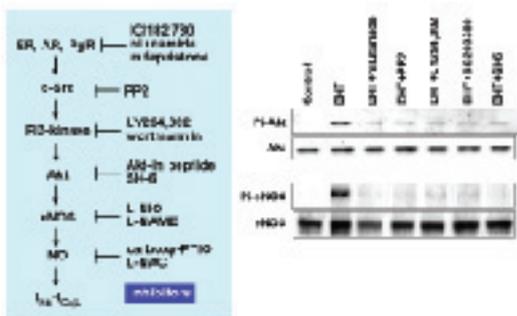


図5 性ホルモンによるNO産生のシグナル伝達経路

左図、性ホルモンによる I_{K_S} ・ $I_{Ca,L}$ 修飾は、ブロッカーを用いた検討から、c-Src、PI3-kinase、Akt、eNOSを介して産生されるNOによる考えられる。右図、DHTによりAkt・eNOSのリン酸化が誘導され、受容体拮抗薬・c-Src・PI3-kinase・Akt阻害薬によりリン酸化が抑制される。

せることがPKA拮抗作用のメカニズムと考えられている¹⁸⁾。

NO合成酵素には3種類(nNOS・iNOS・eNOS)が存在するが、このいずれか1つ以上をほとんどの細胞が有しており、またほとんどのタンパク質が少なくとも1つのCys残基を有している。例えば $I_{Ca,L}$ チャンネルにもCys残基は複数存在するのに、性ホルモン非ゲノム経路により産生されるNOが何故KCNQ1を特異的にニトロソ化するのは不思議である。ニトロソ化が特異的なシグナル伝達システムとして機能するための何らかのメカニズムが存在することが想定され、今後明らかにすべき疑問点と考えている。

6. シグナル伝達経路

次にNO産生の上流経路に目を向けると、性ホルモンにより I_{K_S} 増大作用・ $I_{Ca,L}$ 抑制作用は通常の性ホルモン受容体阻害薬、c-SRC阻害薬、PI3-kinase阻害薬、Akt阻害薬、eNOS阻害薬で消失すること、性ホルモン投与により約10分程度でAkt・eNOSがリン酸化されることから、性ホルモン受容体→c-Src→PI3-kinase→PIP₃(3,4,5)→Akt→eNOS→NOという経路でNOが産生させると考えられる(図5)。

次に、これらの分子の細胞内局在をスクロース密度勾配遠心分画法を用いて検討すると、我々の実験条件では fraction 5にcaveolaeマーカーであるcaveolin-3・flotillin-1が移動することからfraction 5がcaveolae分画と考えられる(図6)。KCNQ1、eNOSも主としてfraction 5に移動することからcaveolae分画に局在することが分かる(図6)¹⁹⁾。KCNE1、 $I_{Ca,L}$ チャンネル α -subunit $Ca_v1.2$ 、c-Src、PI3-kinaseの調節サブユニットp85、Aktはfraction 4-11および細胞質分画に比較的広く分布しているが、少なくともかなりの割合がfraction 5に存在する(図6)。以上の電気生理学実験・生化学実験から、心筋細胞ではカベオラにNOにより心筋イオンチャンネルを調節するイオントランスポートソームが形成されていることが明らかとなりつつある。今後はこのトランスポートソームの動態、すなわち性ホルモン刺激が加わった時、これらの細胞内局在の変化、タンパク-タンパク相互作用の変化、などを検討していく必要があると考えている。

スクロース密度勾配遠心分画実験で得られた興味深い知見として、estrogen receptor (ER)、androgen receptor (AR)、progesterone receptor (PR)のいずれにおいてもC末端抗体では認識されるがN末端抗体では認識されない、すなわちN末端の短縮したアイソフォームがfraction 5に局在している。ERに関してはまだ議論の余地は残されているものの、こ



図6 非ゲノム作用シグナル分子の細胞内分布

スクロース密度勾配分画法を用いて実験では、caveolin-3・flotillin-1がfraction 5 (F5)に局在することからF5がcaveolae分画と考えられる。KCNQ1・eNOS・ER・AR・PgRもF5に局在する。Cav1.2・KCNE1・c-Src・p85・AktはF4-F11および細胞質分画に広く分布するが、少なくともそのかなりの部分がF5に分布する。

のアイソフォームER46が血管内皮細胞において非ゲノム経路を担う受容体であることが報告されている²⁰⁾。ところがAR・PRに関してはこのような報告はなされておらず、今後N末端短縮型性ホルモン受容体アイソフォームが非ゲノム経路に関連する受容体であるか否か、同アイソフォームがcaveolaeに局在する分子メカニズム、など極めて興味深い疑問点を解明する必要があると思われる。

7. 臨床的意義

本研究はQT延長症候群の男女差の機序解明がきっかけとなっており、基礎研究で得られたデータをどれだけ臨床問題にフィードバックできるかが問われることとなる。QT延長症候群の男女差に関してはE2の作用が重要になると考えており、これに関してはNOを介さない別のメカニズムと考えている。女性においてもTdPのリスクは大きな変動を示し、P4濃度の高くなる黄体期・妊娠中・エストロゲン/プロゲステロン併用ホルモン治療ではTdPのリスクが減少することからP4がTdPのリスク軽減に寄与することが強く示唆されている⁷⁾⁻¹⁰⁾。我々の基礎データは女性における性周期など比較的短時間で起こる性ホルモン依存性TdPリスク変動を説明するものと考えられる。

そこで、計算科学的解析を用いてこの仮説の検証を試みることにした。P4の I_{Ks} ・ I_{CaL} に対する作用をLuo-Rudyモデル²¹⁾に当てはめることによりP4により I_{Ks} が増強、cAMPにより増強した I_{CaL} が抑制されるモデルを構築した。これを用いてP4の活動電位に対する作用を見てみると、P4 40.6 nM(黄体期の血中濃度に相当)によりコントロール状態でAPDが6.6%短縮するものと予測された(図7)。これはパッチクランプ実験で得られた6.3%短縮と極めて近い値が得られていることから、このモデルは実際の実験データを高い精度で再現するモデルと言うことができる¹⁹⁾。計算科学的解析の鍵を握るのは、再現性 reproducibilityと予測性 predictabilityの2点であり、このうち前者はクリアされたことになる。そこで後者を検討する目的でこのモデルを利用して、先天性QT延長症候群におけるcAMP誘発不整脈、薬剤誘発不整脈に対する作用を予測してみると、いずれもP4 2.5 nM(卵胞期の血中濃度に相当)では

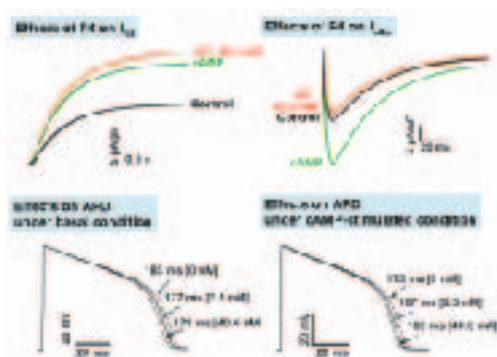


図7 I_{Ks} ・ I_{CaL} action potentialに対するP4作用のコンピューターシミュレーション

上段、cAMPおよびP4の I_{Ks} ・ I_{CaL} 作用のシミュレーション結果。パッチクランプ実験結果(図3)を良く再現している。

下段、コントロール状態(左図)・cAMP刺激状態(右図)のaction potential に対する作用のシミュレーション結果。P4は濃度依存性にAPDを短縮し、その程度はコントロール状態で6.6%であり、パッチクランプ実験(6.3%)と定量的にも極めて近い結果が得られた。

部分的に改善し、P4 40.6 nM(黄体期の血中濃度に相当)ではほぼ完全に不整脈を予防することが予測された(図8)¹⁹⁾。これは、女性において血中P4濃度が高い時にTdPが起こりにくいことに一致している。

女性において血中ホルモン濃度はダイナミックな変動を示す。また、QT延長症候群における不整脈は、遺伝子異常・自律神経・心拍数・薬剤など多くの因子の影響を受ける。このような複雑な状態における不整脈リスクを予測するには計算科学的手法は極めて有効な手段である。性差を考慮した心臓活動電位モデルとして、Oxford大学Noble博士らのモデルがあり、薬剤誘発性TdPを予測することに限定してFDAで臨床応用が認められている。ただこのモデルは性周期などの複雑な事象までは考慮しておらず、我々はE2のNOを介さない作用などを組み込み、更に精度の高いモデルを構築することにより、本モデルの臨床応用への道が開けるのではないかと期待している。

8. おわりに

筆者がタンパク-タンパク相互作用によるイオンチャネル制御の研究を始めたのは1995年にさかのぼる。Yeast 2-hybrid systemというエレガントな手法が世に出るとほぼ同時にこれに興味を持ち、テクニシャンと自分の2人だけという少人数にも関わらずイオンチャネルに結合するタンパクを網羅的に探索するという無謀な計画を立ててしまった。イオンチャネルに結合するタンパクを数多く同定することは出来たが、その機能解析をする段階で2人だけではとても手におえる代物でないことが分かり、3つのタンパク-タンパク相互作用について何とかまとめることが出来ただけにとどまった。折角捕まえた多くのタンパク-タンパク相互作用が今でも宙に浮いたままとなっており、なんとも効率の悪いプロジェクトとなってしまった。

今回の研究はもともとモンゴルからの留学生が朝鮮人参の心血管作用を検討していた時に、朝鮮人参の主成分である植物エストロゲンがNOを産生し心筋イオンチャネルを制御する

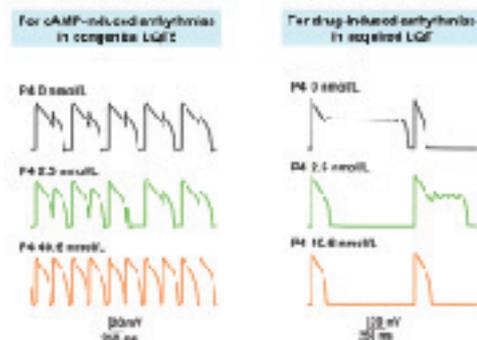


図8 不整脈に対するP4作用のコンピューターシミュレーションによる予測

APDに対する作用を極めて正確に予測することの出来たモデルを用いて不整脈に対する作用を予測してみた。

左図、LQT5はcAMP刺激により不整脈を来しやすいことが知られている。そこでLQT5でも特にcAMPに感受性の高い遺伝子変異KCNE1 D76N変異モデルを用いて、cAMP刺激を加えるとAPDが一拍ごとに変動する交互現象alternanceが見られる。これにP4の作用を加えると濃度依存性にaction potential alternanceを改善する。右図、薬剤誘発性モデルとして、 I_{Kr} 100%ブロックモデル心拍数30 bpmの徐脈を加えると、顕著なEADが見られる。これにP4作用を加えていくと、濃度依存性にEADの改善が見られる。

ことにヒントを得て開始したものである²²⁾。実験結果というエビデンスに基づいたプロジェクトであったので、3年という比較的短期間に思った以上の進展が得られ、evidence-based research (researchは全てevidence-basedじゃないかとお叱りを受けそうであるが)の威力を改めて痛感した次第です。最後になりましたが、ここで紹介させていただいた研究成果は、多くの共同研究者の方々の惜しみのない尽力と高い技術力に支えられて得られた貴重な実験データの積み重ねであり、共同研究者の方々に心より御礼申し上げる次第です。

引用文献

- 1) Furchgott, R.F. & Zawadski, J.V. (1980) *Nature* 288, 373-376.
- 2) Priori, S.G. *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348, 1866-1874.
- 3) Antzelevitch, C. *et al.* (2002) *Circ. Res.* 91, 1114-1118.
- 4) Makkar, R.R. *et al.* (1993) *JAMA* 270, 2590-2597.
- 5) Rautaharju, P.M. *et al.* (1992) *Can. J. Cardiol.* 8, 690-692.
- 6) Locati, E.H. *et al.* (1998) *Circulation* 97, 2237-2244.
- 7) Nakagawa, M. *et al.* (2006) *PACE* 29, 607-613.

- 8) Roderiguez, I. *et al.* (2001) *JAMA* 285, 1322-1326.
- 9) Rashba, E.J. *et al.* (1998) *Circulation* 97, 451-456.
- 10) Kadish, A.H. *et al.* (2004) *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 9, 366-374.
- 11) Beato, M. & Klug, J. (2000) *Hum. Reprod. Update* 6, 225-236.
- 12) Levin, E.R. (2002) *Steroids* 67, 471-475.
- 13) Endoh, H. *et al.* (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 99-102.
- 14) Simoncini, T. *et al.* (2000) *Nature* 407, 538-541
- 15) Bai, C.X. *et al.* (2005) *Circulation* 112, 1701-1710.
- 16) Kurokawa, J. *et al.* (2007) *submitted*
- 17) Hess, D.T. *et al.* (2001) *Nat. Cell Biol.* 3, E46-E49.
- 18) Fishmeister, R. *et al.* (2005) *Comp. Biochem. Physiol.* 142, 136-143.
- 19) Nakamura, H. *et al.* (2007) *submitted*.
- 20) Kim, K.H. & Bender, J.R. (2005) *Science STKE* 288, pe28.
- 21) Luo, C.H. & Rudy, Y. (1994) *Circ. Res.* 74, 1097-1113.
- 22) Furukawa, T. *et al.* (2006) *Mol. Pharmacol.* 70, 1916-1924.

心電図の波形と心臓細胞へのイオンの出入

① ナトリウムイオン(Na+)が細胞内へ流入する(心房の活動がある(心房活動))
 ② カルシウムイオン(Ca²⁺)の流入が細胞が維持される
 ③ カリウムイオン(K+)が流出して細胞が回復される(心臓)

不整脈「QT延長症候群」 性ホルモンが関与

東京医科大学

「QT延長症候群」は、心臓の電気活動が正常に保たれていない状態を指し、突然死の原因となることがあります。この症候群は、女性ホルモンの減少と関連が深いことが明らかになりました。本研究では、女性ホルモンの減少がQT延長症候群の発症に関与していることを示しています。

心臓の電気活動は、心臓細胞の活動によって保たれています。この活動は、心臓細胞の膜電位によって維持されています。QT延長症候群は、この膜電位の回復が遅くなることで起こります。これは、心臓細胞の膜電位の回復が遅くなることで起こります。

本研究では、女性ホルモンの減少がQT延長症候群の発症に関与していることを示しています。これは、女性ホルモンの減少が心臓細胞の膜電位の回復を遅くする可能性があることを示しています。

この研究の結果は、QT延長症候群の発症に関与している可能性があることを示しています。これは、女性ホルモンの減少が心臓細胞の膜電位の回復を遅くする可能性があることを示しています。

朝日新聞
平成19年2月6日

予防的治療に
興味深い研究

不整脈(症候)に詳しい

橋本野郎、長崎大学公衆衛生学教授(橋本野郎)の研究は、女性ホルモンの減少がQT延長症候群の発症に関与していることを示しています。これは、女性ホルモンの減少が心臓細胞の膜電位の回復を遅くする可能性があることを示しています。

一酸化窒素によるシステインS-ニトロシル化を介したTRPチャネルの活性化

吉田 卓史、山本 伸一郎、高橋 重成、森 泰生 (AO1計画班)

京都大学大学院工学研究科

発表論文:

Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y. & Mori, Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chem. Biol.* 2,596-607, 2006.

1. はじめに

生体内においてCa²⁺はバクテリアから脊椎動物まで最も共通したシグナル伝達物質である¹⁾。Ca²⁺は2つの経路を介して細胞内に導入される。1つ目は形質膜に存在するCa²⁺透過性チャネルを介する経路であり、2つ目は細胞内の小胞体からの放出の経路である。形質膜越えのCa²⁺流入を担うチャネルのひとつとしてTransient receptor potential (TRP)蛋白質が知られている。これらは*Drosophila Melanogaster* TRP蛋白とそのホモログであり、6回膜貫通ドメインを有し、4量体によりチャネルを形成する。哺乳類ではTRPチャネルは6つのサブファミリーに分類されている。すなわちTRPC、TRPV、TRPM、TRPA、TRPP、TRPMLである²⁾。

TRPチャネルは受容体刺激、熱、酸、浸透圧変化、機械的刺激、酸化ストレスといった様々な外的環境や、細胞内の刺激により活性化することが知られている。中でもTRPCサブファミリーは受容体活性化Ca²⁺透過性カチオンチャネル(RACC)として知られ、phospholipase C (PLC)がphosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2)の加水分解を促してinositol-1,4,5-trisphosphate (IP3)とdiacylglycerolを産生するイノシトール代謝回転と連関した受容体刺激により活性化³⁾。RACCの中にはIP3によるCa²⁺放出と小胞体Ca²⁺ストアの枯渇により活性化するstore-operated channels (SOCs)が含まれている。TRPC1からTRPC7の7つのTRPCチャネルの中ではTRPC1、TRPC3、TRPC4がSOCを形成するといわれている。一方TRPVは熱センサー蛋白質として知られ²⁾、熱により活性化する。例えばTRPV1は43℃以上、TRPV2は52℃以上、TRPV3は31℃もしくは39℃以上、TRPV4は27℃以上の熱で活性化することが知られている。

また一酸化窒素(NO)ももうひとつの重要なシグナル伝達物質である。NOは主に一酸化窒素合成酵素(NOS)により産生される⁴⁾。内皮で産生されたNOはcGMP依存的に血管拡張作用を示すことが以前から知られている。近年はさらにNOが蛋白質のニトロシル化を行い、まるでリン酸化を介したシグナル伝達経路のようにNOシグナルとして働いていることが明らかとなってきた⁵⁾。NOSには内皮型NOS (eNOS)、神経型NOS (nNOS)、誘導型NOS (iNOS)の3種類が知られているがeNOSとnNOSは細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)上昇がその活性化に必要である⁴⁾。神経においてはNMDA受容体、筋組織では

電位依存性L-type Ca²⁺チャネルを介したCa²⁺流入がnNOSを活性化していることが知られている⁶⁾が内皮においてはeNOSを活性化するのに必要なCa²⁺動員機構はいまだ明らかとなっていない。またCa²⁺シグナル経路に対するNOの作用についてもNMDA受容体やリアノジン受容体がニトロシル化を受けて活性が制御されていることが報告されている⁷⁾がNOシグナルの普遍性に比べると発現分布や生理的機能が制限されている。故にNOとCa²⁺の生体内において重要な2つのシグナル経路を結び普遍的な分子機構を理解するためにはCa²⁺を透過させる普遍的なイオンチャネルの中で、ニトロシル化される蛋白質の同定が必要であり、様々な刺激を感知するセンサーとして働くTRPチャネルは十分にその候補と考えられる。

2. NOによるTRPC5チャネルの活性化

HEK293細胞にTRPC5を一過的に発現させ、NOドナーであるS-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP)を処置すると大きな細胞内のカルシウム濃度([Ca²⁺]_i)上昇が確認された(図1)。同様の[Ca²⁺]_i上昇はTRPC3、TRPC7、そしてredox状態を感知するCa²⁺透過性カチオンチャネルTRPM2においても確認されたがTRPC5においては10 μMの低濃度のSNAPから活性化し始め、最もSNAPに対して感度が高かった。

NOによるTRPC5を介したCa²⁺応答はguanylate cyclaseの阻害剤である1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)により抑制されなかったことから

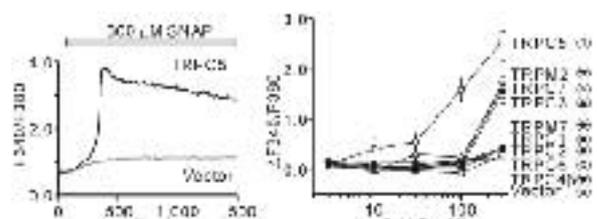


図1 NOにより活性化したTRPC5のCa²⁺応答

HEK293細胞に一過的にTRPC5を発現させてFura-2を用いて細胞のCa²⁺応答を調べた。そうするとTRPC5発現細胞ではSNAP (300 μM)を適用すると時間とともに細胞内のCa²⁺濃度上昇(340:380 nmの蛍光量の比:F340/F380)が見られた。高濃度のSNAP適用ではTRPC3、TRPC7、TRPM2でも活性が見られたがTRPC5は最も低濃度のSNAP (10 μM)からCa²⁺濃度上昇が見られる。

NOはcGMP非依存的なpathway、すなわちシステイン残基のsulfhydryl基をニトロシル化していることが示唆された。実際、選択的にsulfhydryl基を酸化修飾する反応性ジスルフィドである2,2'-dithiobis (5-nitropyridine) (5-nitro-2-PDS)をTRPC5に適用するとNOと同様に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすことが確認された(図2)。また単独ではTRPC5を活性化できないような低濃度のSNAPと5-nitro-2-PDSを同時に処置するとTRPC5の活性が引き起こされることからNOの作用部位と5-nitro-2-PDSの作用部位が同一のsulfhydryl基であることが強く示唆され、5-nitro-2-PDSがTRPC5におけるNOの作用部位を調べるためのよいtoolであると考えられた。一方、還元剤であるアスコルビン酸やDTTをSNAPにより活性化しているTRPC5に適用すると $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制された(図3)。

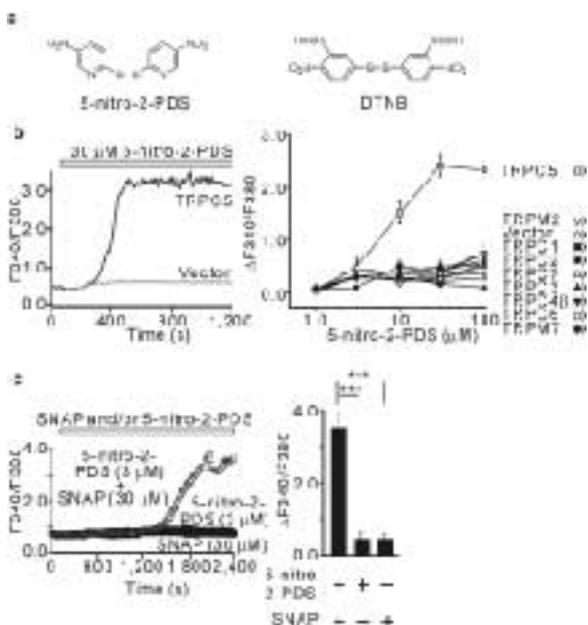


図2 反応性ジスルフィド化合物によるTRPC5チャンネルの活性化 (a) 膜透過型活性化ジスルフィドである5-nitro-2-PDSと膜非透過型活性化ジスルフィドDTNBの化学構造式。(b) HEK293細胞に一過的に発現させたTRPC5チャンネルの5-nitro-2-PDS (30 μM) に対する Ca^{2+} 応答の時間経過と種類のTRPチャンネルの5-nitro-2-PDSに対する容量反応関係。TRPC5のみが5-nitro-2-PDSに対して応答を示した。(c) 単独ではTRPC5を活性化できない低濃度のSNAP (30 μM) と5-nitro-2-PDS (3 μM) を同時にTRPC5に処置するとTRPC5の活性が引き起こされた。これはNOと活性化ジスルフィドの作用点が同一であることを示していると思われる。

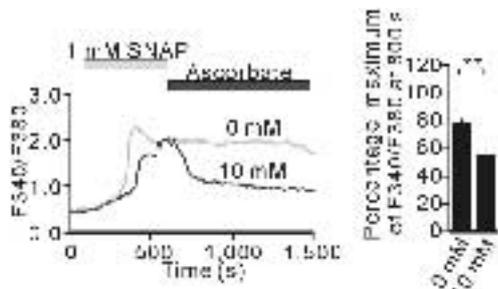


図3 TRPC5のNOによる活性はアスコルビン酸の適用により抑制される

TRPC5に1 mMのSNAPを適用して活性化させた後アスコルビン酸を適用したところ10 mMのアスコルビン酸でTRPC5の活性が抑制された(黒線)。実験開始より800秒の時点でアスコルビン酸処置の有無により細胞内 Ca^{2+} の濃度に有意な差異が見られた。

これはnitrosothiolが還元されてフリーのthiolになったことを意味する。

3. TRPC5におけるシステイン修飾部位の同定

TRPC5を一過的にHEK細胞に発現させた系において膜非透過型の活性化ジスルフィドであるDTNBは細胞外からの適用ではTRPC5を活性化することはできなかったがwhole cell patch clamp法を用いて細胞内に導入するとTRPC5の活性を引き起こすことができた。このことから酸化修飾を受けるシステイン残基は細胞の内側から接触できる位置にあることが推定された。TRPC5は受容体刺激により活性化するチャンネルであるということを我々の研究室で報告していた⁸⁾ことからフォスファチジルイノシトール代謝経路に存在する蛋白質が酸化されることによりシグナルが伝わりTRPC5が活性化されることも考えられたが様々な阻害剤等を用いた実験からその可能性は否定された。そこでTRPC5チャンネル蛋白質そのものが酸化修飾を受けて活性化されているのではないかと考え、パッチクランプの手法の一つであるinside-out法を用いてTRPC5発現細胞の膜だけを切り取り活性化ジスルフィドの5-nitro-2-PDSを適用したところTRPC5特有のsingle channel conductanceが観察された。このことから酸化修飾によるTRPC5の活性化には形質膜とそれに付随しているコンポーネントにaction siteが存在すると仮定された。より直接的にTRPC5蛋白質が酸化修飾を受けているかを明らかにしたいと考え、我々は化学的アプローチを試みた。すなわち活性化ジスルフィドにリンカーを介して二つのビオチンを導入したDTNB-2Bioという化合物を合成した(図4a)。これをTRPC5発現細胞に適用したのち細胞を可溶化、lysateをアビジンによりプルダウンして、ウエスタンブロッティングを行ったところDTNB-2Bioが取り込まれたTRPC5のバンドが確認された。このことは活性化ジスルフィドが直接TRPC5蛋白質に結合していることを意味する。さらにDTNB-2Bioの適用時に競合阻害としてSNAPを同時適用するとプルダウンされるTRPC5の蛋白量が減少したことからNOと活性化ジスルフィドはTRPC5チャンネル蛋白質の同一のサイトを酸化修飾していると考えられた(図4b)。

我々はさらにTRPC5上に存在するターゲットシステインを同定するためにシステイン残基をひとつずつセリン残基に置換した変異体を作成し、これらの5-nitro-2-PDSとNOに対する応答を検討したところ553番目と558番目のシステイン残基をセリン残基に置換した変異体(C553S, C558S)において有意にその活性が减弱していることを見出した。また、DTNB-2Bioを用いたプルダウンアッセイを行ったところC553SにおいてDTNB-2BioのTRPC5への取り込みが抑制された(図4c)。また、Snyder SH5により提唱されたニトロシル化蛋白の同定法⁵⁾を用いても変異体C553Sにおいてニトロシル化が减弱していることがわかった。これらのことから553番目のシステイン残基が主たるニトロシル化サイトであると考えられた。

4. NOに対するTRPチャンネルに保存されたシステインの反応性

TRPスーパーファミリーの中でTRPC5のCys553とCys558に相当するシステイン残基を持つものを一次アミノ酸配列のアライメントを行うことで探してみるとTRPC1, TRPC4,

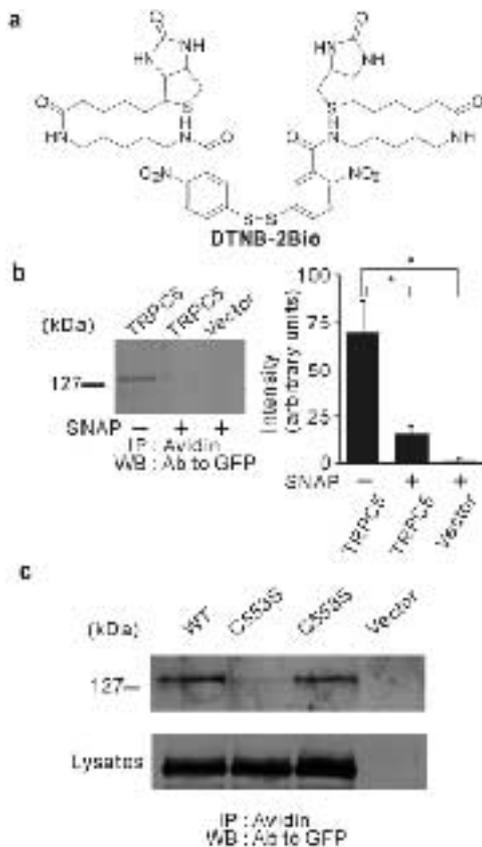


図4 NO、活性化ジスルフィドはTRPC5のシステイン残基を酸化修飾する

(a) 活性化ジスルフィドDTNBにリンカーを介してビオチンを導入したDTNB-2Bioの化学構造式。(b) TRPC5のC末端に蛍光蛋白質GFPをタンデムに融合したもの(TRPC5-GFP)を発現させたHEK細胞にDTNB-2Bioを100 μ Mの濃度で適用したのち細胞を可溶化し、アビジンビーズでプルダウンを行った。ウェスタンブロッティング法により抗GFP抗体で標識するとTRPC5-GFPのバンドが確認された。これは活性化ジスルフィドがジスルフィド交換反応によりTRPC5蛋白質に共有結合したことを意味する。またこの反応においてDTNB-2Bioを適用中に5 mMのSNAPを加えるとTRPC5-GFPのバンドが減弱したことからNOによる競合阻害が起きたと考えられ、NOと活性化ジスルフィドの反応サイトが等しいと考えられる。(c) TRPC5に含まれる553番目のシステインと558番目のシステインをセリンに置換した変異体(C553S、C558S)を発現させてDTNB-2Bioの取り込み実験を行った。C553Sを用いたときのみDTNB-2Bioの取り込みが見られなかったことから主要な標的システインは553番目のシステインであることが明らかとなった。



図5 TRP蛋白質のチャネルポア近傍で保存されたシステイン残基TRPC5において同定された酸化修飾を受けるシステイン残基はTRPC1、TRPC4、TRPV1、TRPV3、TRPV4において保存されている。

それに熱感知チャネルであるTRPV1、TRPV3、TRPV4が相当するシステイン残基を持つことがわかった(図5)。これらのシステイン残基は第5、第6膜貫通領域の間に存在するチャネルポアを形成すると見られるH7領域のN末端側に存在する。これらTRPチャネルのSNAPやH₂O₂に対する応答を調べた。TRPC1、TRPC4を単独で発現させた場合有意差はなかったがコントロール細胞の応答に比べ若干大きな応答を示す細胞が存在した。一方TRPC4とTRPC5、TRPC1とTRPC5を共発現した細胞ではSNAPに対する応答はTRPC5単独発現の細胞と同程度であった。しかしH₂O₂に対する応答はどちらの共発現でも有意に抑制された。これらのことはTRPC1とTRPC5、TRPC4とTRPC5の組み合わせのヘテロマルチマーではNOに対する感受性があるがH₂O₂に対しては抵抗性があり、TRPC5のホモマルチマーではNO、H₂O₂のどちらにも反応性があることを示している。またTRPVの反応性を調べたところ保存されたシステインを持つTRPV1、TRPV3、TRPV4はNOに対して反応性を示した(図6)。これらのことはニトロシル化によるチャネル活性制御がいくつかのTRP蛋白質の中で保存されていることを示している。

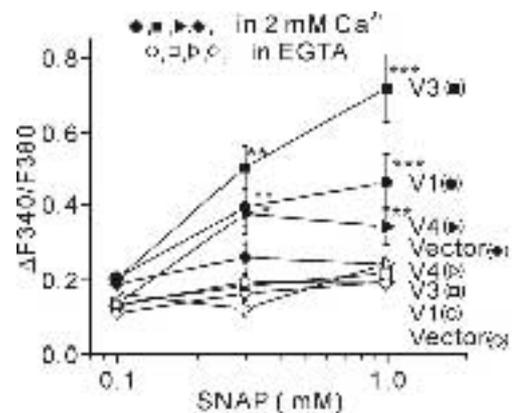


図6 TRPVチャネルのニトロシル化による活性制御TRPV1、TRPV3、TRPV4チャネルのSNAPに対する容量反応関係。TRPV1、TRPV3、TRPV4がSNAPにより有意に活性化されている。細胞外のCa²⁺を除去した系では細胞内Ca²⁺上昇が見られないことからTRPVチャネルを介したCa²⁺流入がNOにより引き起こされていると考えられる。

5. 内皮細胞における内在TRPチャネルのNOによる活性化

牛大動脈内皮細胞ではすでに報告されている^{9),10)}ようにリチノイン酸誘導をかけるとTRPC5の発現が誘導される。そこで我々は血管内皮細胞の、NOによるCa²⁺流入におけるTRPチャネルの役割を明らかにすることを試みた。内皮細胞においてSNAPを適用するとCa²⁺流入が引き起こされたが、NOにより引き起こされるCa²⁺流入がTRPC5を介して起こっているかどうかを明らかにするためにTRPC5に対するsmall interference RNA (siTRPC5)を作成し、内皮細胞に適用してNOによるCa²⁺流入に対する影響を調べたところ[Ca²⁺]_i上昇が有意に抑制された(図7a)。またTRPC5のdominant negative (TRPC5-DN)¹¹⁾を導入した内皮細胞においてもNOによるCa²⁺流入は有意に抑制された。一方H₂O₂を内皮細胞に対して適用してもほとんど[Ca²⁺]_i上昇は見られず、これはTRPC5とTRPC4、TRPC1とTRPC5のヘテロマルチマー

一の応答性とよく似ている。実際、牛大動脈内皮由来細胞の形質膜においてTRPC5とTRPC1、TRPC4が共局在していることが共焦点顕微鏡を用いた観察より確認された。これらのことより内皮細胞におけるNOによるCa²⁺流入経路にはTRPC5とTRPC1、TRPC5とTRPC4のヘテロマルチマーが関与しているのではないかと考えられる。

次に、より生理的な刺激において産生されたNOが内皮細胞においてCa²⁺流入を引き起こすかどうかを調べるためにATP刺激を用いた。ATPはG蛋白質に連関した受容体を活性化させることにより内皮特異的NOS (eNOS) を活性化しNOを産生させることが知られている¹²⁾。内皮細胞にATPを適用するとCa²⁺流入が見られた。この反応にNOSの阻害剤であるN^ω-nitro-L-arginine (L-NAME) を適用するとCa²⁺流入とNO産生が有意に抑制された。また、eNOSに対するsiRNAを適用しても同様の結果が得られたことから内皮細胞においてATPによるCa²⁺流入経路にeNOSから産生されるNOが重要な役割を果たしていることが示された。さらにTRPC5に対するsiRNA (siTRPC5) を適用するとCa²⁺流入がより抑制されたことから受容体刺激においてNO産生から引き起こされるCa²⁺流入経路にTRPC5が重要であることが明らかとなった(図7b)。さらに内皮細胞のATPによる受容体刺激において内在的に発現しているTRPC5蛋白質がニトロシル化修飾を受けていることがニトロシル化蛋白質同定法により確認された(図8)。これらのことから内皮細胞においてATP受容体刺激時にeNOSを介したNO産生により内在的なTRPC5蛋白質

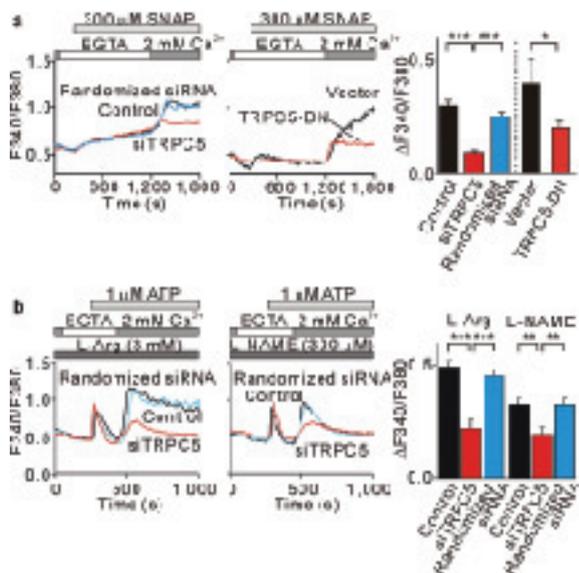


図7 内皮細胞におけるNOによるCa²⁺流入には内在的なTRPC5が関与している。

(a)牛大動脈内皮培養細胞にレチニン酸による誘導をかけたのち300 μMのSNAPを適用すると細胞内へのCa²⁺流入が見られた。TRPC5に対するsiRNAを適用するとこのCa²⁺流入は減弱した。また培養内皮細胞にTRPC5のdominant negativeを導入しても同様の抑制が見られた。このことから培養内皮細胞においてNOにより引き起こされるCa²⁺流入に内在的なTRPC5が関与していると思われる。(b)生理的な受容体刺激である1 μMのATP刺激においてCa²⁺流入が観察されるがTRPC5に対するsiRNAを適用するとこのCa²⁺流入が減弱した。またeNOSの阻害剤であるL-NAMEを300 μM適用してもCa²⁺流入が減弱した。これらのことから受容体刺激によるCa²⁺流入にはTRPC5とeNOSが関与していることが強く示唆された。

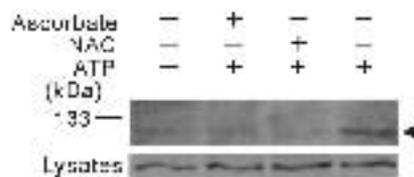


図8 生理的な受容体刺激で内在的なTRPC5はS-ニトロシル化される

培養内皮細胞の内在的なTRPC5がATP刺激によりニトロシル化されるかをニトロシル化蛋白質同定法により調べた結果、受容体刺激においてもTRPC5がニトロシル化されることが明らかとなった。またこのニトロシル化はNOの消去剤であるNAC、還元剤であるアスコルビン酸の適用により抑制されることが明らかとなった。

のニトロシル化反応が起こり、TRPC5が活性化、細胞内へCa²⁺を流入させているということが明らかとなった。

6. NOによるTRPC5の活性化機構

NOによるTRPC5の活性化はCys553とCys558が重要であることが今回示された。特にDTNB-2Bioの取り込み実験からCys553が重要であると考えられる。高いNO感受性を示す蛋白質の研究からニトロシル化されるシステイン残基は酸性、塩基性のアミノ酸が近傍に存在し、sulfhydryl基の吸核性が高められているとする説が提唱されている⁷⁾。Cys553、Cys558もこの概念に従い、近傍の電荷を持ったアミノ酸により反応性が上がっているのかも知れない。以上のことから次のようなNOによるTRPC5の活性化機構が考えられる。すなわちTRPC5のS5-S6リンカーはShaker電位依存性K⁺チャンネルなどのそれに比べて長いために細胞膜に埋め込まれているのではないかと考えられる(図9)。Cys553はここに含まれ、細胞質側よりNOによりニトロシル化を受け、その結果S6により構成されている活性化ゲートを開口状態にするのではないかと考えられる。また一方ニトロシル化されたCys553に対してフリーのCys558が吸核的に攻撃しジスルフィド結合を形成し、チャンネルを開口状態で安定化している可能性も考えられる。

7. 今後の展望

今回の研究でNOによるシステイン残基の酸化修飾によるTRPチャンネルの活性化という新たな制御機構を明らかにすることができた。これは今まで別のサブファミリーに分類されてきたTRPC、TRPVを横断して存在し、新たな枠組みを提唱するものである。またシステイン残基の酸化によりTRPチャンネルが活性化されるという制御機構は最近もTRPA1において報告されている¹³⁾。今後は受容体刺激により活性化するTRPCチャンネルだけではなく、熱や酸を感知するTRPVのチャンネルにおいてNOによるニトロシル化がどのようにその活性を制御しているかということも興味深い問題である。また、内皮細胞においてはTRPC5が受容体刺激により産生されたNOにより活性化され、細胞内にCa²⁺を流入させ、更なるNO産生を引き起こす正のフィードバック機構の存在が伺える。このようなシグナルを効率よく伝えるためには関連する蛋白質がひとつ所に集積する、シグナルソームを形成していることが考えられ、これら蛋白質の同定、物理的相互作用の解析が期待される。これらの

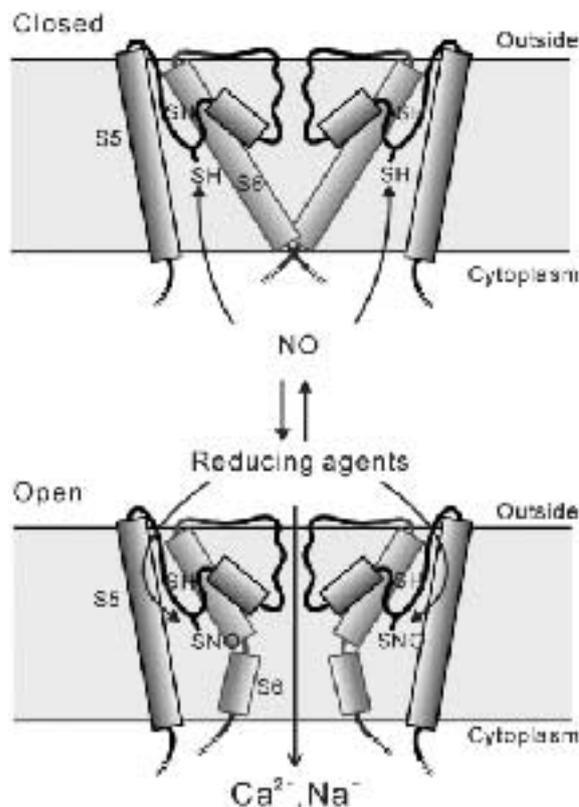


図9 NOや活性化ジスルフィドによるTRPチャネル活性化のモデル
活性化因子であるNOが細胞質側からフリーの553番目のシステインに近づきニトロシル化が起こる。このthiolの直接修飾がチャネルの細胞質側のゲートを構成するS6リンカーを折り曲げ、それがチャネルの開口を引き起こす。システイン残基の修飾は還元剤であるDTTやアスコルビン酸により還元される。

ことからさらには血管の発生、血管新生の新たなメカニズムが明らかにできれば非常に興味深いと思われる。

8. 終わりに

近年の研究の動向を鑑みると実験手法、研究手法において非常に専門性が高くなると同時に多面的な解析が要求されることが多くなってきているように思われる。すでに多くの先生方が行っておられるように生化学的な実験、電気生理学を用いた解析手法を組合すことなどはごく当たり前のように行われている。複数の実験手法を組み合わせることは負担が増えることもあるがそれを補って余りある新しい知見を与えてくれることは事実である。今回の研究ではごく簡単ではあるが化学的な手法を取り入れることにより、より多面的な検討ができたのではないかと考えている。生物の研究に化学的手法を取り入れることは次第に行われてきてはいるがまだ大きな流れにはなっていないところがある。だが今後うまく研究に取り入れることにより新たな突破口を見つけられたり、研究の別の側面を見せてくれる大きな可能性があると思われる。そのためにも普段なじみの薄い研究領域の方との積極的な議論や共同研究を心がけるようにしたいと常々考えている。もちろんこの研究においても共著者の方々のご協力がなければ成り立たず、この場を借りて心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Berridge, M. J. *et al.* (1998) *Nature* 395, 645-648.
- 2) Clapham, D.E. *et al.* (2005) *Pharmacol. Rev.* 57, 427-450.
- 3) Zhu, X. *et al.* (1996) *Cell* 85, 661-671.
- 4) Moncada, S. *et al.* (1997) *Pharmacol. Rev.* 49, 137-142.
- 5) Jaffrey, S.R. *et al.* (2001) *Nat. cell. Bio.* 3, 193-197.
- 6) Mungrue, I.N. *et al.* (2004) *J. Cell Sci.* 117, 2627-2629.
- 7) Hess, D.T. *et al.* (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 150-166.
- 8) Okada, T. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10279-10287.
- 9) Yao, X. *et al.* (2005) *Circ. Res.* 97, 853-863.
- 10) Chang, A.S. *et al.* (1997) *FEBS lett.* 415, 335-340.
- 11) Greka, A. *et al.* (2003) *Nat. Neurosci.* 6, 837-845.
- 12) Koyama, T. *et al.* (2002) *Life Sci.* 72, 511-520.
- 13) Macpherson, L.J. *et al.* (2007) *Nature* 445, 541-545.

共発現データベースCOXPRESの構築と利用法

大林 武、木下 賢吾 (AO1計画班)

東京大学医科学研究所

ヒト、マウスにおいて、協調的に機能する遺伝子群を検索するためのデータベース。

主なコンテンツ

- ・共発現遺伝子
- ・各遺伝子の機能アノテーション

URL: <http://coxpres.hgc.jp/>
e-mail: coxpres@hgc.jp



1. 背景

1995年にマイクロアレイ技術が世に発表されて以来¹⁾、この分野の技術革新は著しい。集積化により遺伝子の網羅性は上がり、ノイズの抑制によって感度や再現性が向上した。大量生産によって価格も低下したことから、現在多くの研究現場で日常的に用いられるようになってきている。そして、それらのデータを蓄積する公共のデータベースも整備されつつある。遺伝子発現データを登録する為のデータベースは複数存在しており、種を限定しない広範なものではGene Expression Omnibus (GEO)²⁾、ArrayExpress³⁾、CIBEX⁴⁾が主たる一次データベースである。エントリー数は、例えばGEOに登録されているAffymetrix社の主要型のGeneChipに限っても、2005年以降は安定して一月に1000枚以上の結果が登録され続けており、累積枚数は40000枚を越えている(2007年3月現在)。GEOにはAffymetrix社以外のアレイやSAGE等アレイ以外の技術を用いた大規模遺伝子発現データも集積されており、今後も続くであろうマイクロアレイ技術の改良に伴い、益々データの蓄積が進むと考えられる。

これらの公開遺伝子発現データからは有用な情報を得ることができる。最も単純に得られる情報は遺伝子の発現パターンである。また、小脳特異的遺伝子群、腎臓特異的遺伝子と言った具合に、特定の組織で発現をする遺伝子を収集することも可能である。さらに共発現遺伝子(全てのサンプルで同じように誘導、抑制される遺伝子)の収集も可能で、これらの遺伝子は細胞内で協調的に働くと期待される為、遺伝子機能の予測に用いることが可能である。実際、共発現遺伝子群から実験ターゲットを絞り、遺伝子破壊等で機能同定を行うアプローチも増えつつある(5-8)。また、この共発現遺伝子群のプロモータから時期特異的、組織特異的な発現に関与するシス配列の予測を行うことも可能である。

ところで、実験によって機能が特定されていない遺伝子は数多く存在している。通常、このような機能未知遺伝子の機能の推測にはBLASTによる配列相同性検索が利用され、配列相同な機能既知のタンパク質の情報から、そのタンパク質の分子機能が予測される。例えば、アクアポリンと配列相同な遺伝子であれば、水を通す機能を有すると推測することができる。しかしこの場合、どういった生理的な目的で水を通すのかは予測できない。これに対して、発現パターンの類似性検索では、同じ細胞機能の為に働く遺伝子群が検索されるので、例えば、唾液の分泌に関わるといった生理的役割を予測できる。この様に発現パターンの情報は、配列情報とは別の情報を有するので、これら2つを組み合わせることでより多くの知見を得ることが可能となる。

この様に遺伝子発現データは非常に有用であるにも関わらず、現状では配列データベースの様には一般的に利用されていない。この理由の一つとしては、配列データベースにはBLASTと言う良く知られたツールが存在するのに対し、遺伝子発現データベースにはそのようなものが存在していないことが考えられる。例えば、ヒトの小脳特異的遺伝子を検索するには、多少手間の掛かる以下の手順を踏むことになる。まず、NCBIのEntrezを用いて"GEO DataSets"に対し"human [organism] AND cerebellum"と検索を実行する。40セットのデータが該当するので、そのデータをダウンロードし、例えばR(統計処理言語でマイクロアレイ解析にも良く用いられる)を用いて数行のコマンドを実行すると、コントロールに対して有意に発現変化をしている遺伝子群を得ることが出来る。しかし共発現遺伝子の導出となると大量の計算能力を要する為、普通のパソコンで行うことは計算時間の点からほぼ不可能である。遺伝子発現データは、非常に大規模である為、扱い慣れた研究者なら問題無く利用できるものの、実験をメインにしている研究者にとってはその扱いは容易なものではない。

この問題に対して、モデル植物のシロイヌナズナでは一次リソースとしての遺伝子発現情報から、より使いやすい二次データベースが構築されている⁹⁾⁻¹¹⁾。我々もATTED-IIと名付けたデータベースを作成しており、そこで公開されている共発現情報や予測シス配列はシロイヌナズナ研究者に広く利用されている¹²⁾。それに対して、ヒトやマウスの遺伝子発現データについては、この様な大規模の二次データベースは存在していない。そこで、GEOの遺伝子発現データを大型計算機を用いて加工し、遺伝子間の共発現関係を表示するデータベースとして公開を始めたのが、COXPRES (<http://coxpres.hgc.jp/>) である。

2. COXPRESの内容

COXPRESは、ヒト、マウスについて以下の情報を提供するデータベースである。(A)共発現遺伝子リスト及びネットワーク、(B)公共のアノテーション、(C)遺伝子の発現パターン、(D)予測される細胞内局在。(但し2007年3月現在C, Dは構築中。)

AとDは遺伝子発現データに基づくものであり、ヒトの19777遺伝子については1311枚のGeneChipデータを、マウスの21036遺伝子については1058枚のデータを用いている。また、共発現遺伝子リストからより重要な遺伝子を見つける為に、有用な公共のアノテーション(B)や予測細胞内局在(D)も同時に提示している。さらに共発現遺伝子の情報を有効利用する為に、任意の遺伝子群からの統合共発現リスト及びネットワークの作成が可能である。

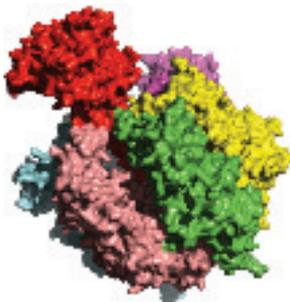
ネットワーク表現からは非常に多くの情報を得ることができる。例としてマウスのClcn1の共発現ネットワークを見てみると(図2)、4つの遺伝子と特に強く共発現していることや、少し離れたところに別のグループがあることが分かる。その為、通常のアレイ解析で用いられるクラスタリング(例えば階層的クラスタリング)とは異なり、これらのグループの繋がり方(どの遺伝子がハブになっているのか)まで理解することができる。

3. どんな実験のどの段階で使うのか

共発現遺伝子リストには、細胞内で協調的に機能する遺伝子が含まれており、その中には複合体の様に強固に結合する関係の遺伝子もあれば、代謝系の一連の酵素の様に、直接は結合しないが同一の生理機能を担う遺伝子もある。以下に共発現情報の典型的な利用例を挙げる。

3.1 複合体のサブユニットを探す場合

複合体では全てのサブユニットが存在して初めて機能が発現する為、一般に共発現の度合いが高い。既知のサブユニット群をクエリに共発現遺伝子リストを作成し、その中で細胞内局在が同じ遺伝子に注目する。



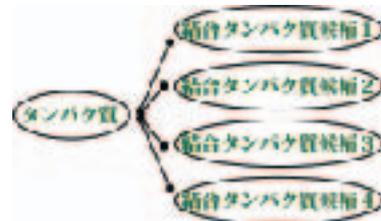
3.2 代謝経路の未同定ステップの酵素を探す場合¹³⁾

酵素遺伝子が未同定であっても、触媒反応は予測できている場合が多い。例えば、グルコシル基転移酵素であると予測できれば、ゲノム中に存在するグルコシル基転移酵素群の中で、その代謝経路内の他の酵素と共発現している遺伝子に注目する。



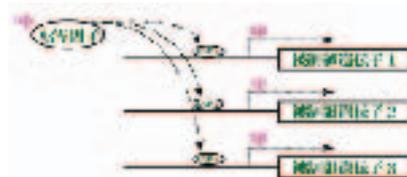
3.3 Y2Hの結果得られた結合候補遺伝子群に優先順位を付ける場合

直接結合するタンパク質間では、基本的に共発現すると期待できるので、Y2Hの基となった遺伝子からの共発現度で優先順位を付けることが出来る。



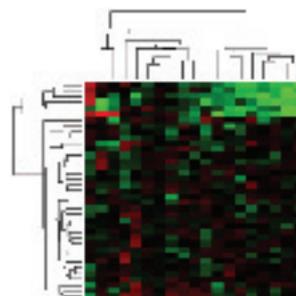
3.4 協調的に働く遺伝子群を制御している転写因子を探す場合¹⁴⁾

共発現している遺伝子群のプロモータからシス配列が予測できると、そのシス配列から転写因子のファミリーが推測可能であることがある。共発現している被遺伝子群を問い合わせ配列にして、それらと共発現する転写因子をリストにし、その中で予測される転写因子のファミリーに注目する。



3.5 自前のマイクロアレイデータを分類する場合

COXPRESでは薄く広く網羅的遺伝子発現を扱っているのので、個別研究の中で収集されたマイクロアレイデータと組み合わせることで、具体的なターゲットを意識した解析が可能になる。自前のマイクロアレイ解析により、誘導された遺伝子群の共発現関係を作成することで、遺伝子の生理的役割による分類が可能になる。



4. 使用方法

COXPRESのメインのページは共発現遺伝子情報が表示される locusのページであり、3通りの方法でこのページを検索できる(図1)。locusのページには機能アノテーションと共に共発現遺伝子情報が表示され、注目している遺伝子と協調的に働くことが期待される周辺遺伝子群を見ることができる(図2)。このlocusのページは、単独の遺伝子からの視点だが、任意の遺伝子群の共発現ネットワークの描写、及びそれらの遺伝子群からの共発現遺伝子リストを作成することも可能である(図3)。

5. LabATTED

最近では個別研究を中心としている研究室であっても、マイクロアレイデータやY2Hのデータ等網羅的データが生成されることが珍しくない。これらの網羅的データから隠れているストーリーを見つけ出すのは統計ツールでは無く、ターゲットを深く理解する研究者である。ラボのボスが見ることはもちろんのこと、それぞれの視点を持つ研究員がその網羅的データにアクセスできることが重要であり、さらに各研究員がそのデータを見て何を連想したかを共有することが望ましい。ところが、実際には研究室内の様々なデータを横断的に見ることは難しく、往々にして実験を担当した研究員とボスのみがデータを見ている状態では無いだろうか。場合によっては、ボスが見るのは最終的な結果だけかもしれない。

この問題に対応する為に、研究室の情報をCOXPRESと共に表示する為の環境 LabATTEDを開発した(図4)。研究室内のMacOSXに必要なファイルを設置し、そのMacOSXを研究室の各パソコンのWebブラウザから見る(例えば <http://192.168.1.3/cgi-bin/labatted.cgi> といったアドレスにアクセスする)ことで、研究室情報とCOXPRESの情報を並列して見ることができる。詳しい設定方法はLabATTEDのページに記載してある(<http://coxpres.hgc.jp/labatted/>)。

1.1 キーワードから検索
 キーワードの検索は、検索欄にキーワードを入力し、検索ボタンをクリックすることで実行されます。検索結果は、遺伝子名、機能アノテーション、共発現遺伝子群などが表示されます。

1.2 配列から検索
 Search AreaのFAST検索機能を使用します。FAST形式の配列データを貼り付け、検索ボタンをクリックすると、FAST形式の配列データと一致する遺伝子群が検索されます。

1.3 遺伝子IDからまとめて検索
 Search AreaのGene ID検索機能を使用します。遺伝子IDを入力し、検索ボタンをクリックすると、指定された遺伝子群の共発現遺伝子群が検索されます。

図1 COXPRESの使い方: locusの検索方法

2. locusのページ (COXPRESのメインのページ)

このページは、遺伝子IDを入力して検索された遺伝子の詳細情報を表示します。機能アノテーション、共発現遺伝子群、および関連する遺伝子群がネットワーク図として表示されます。

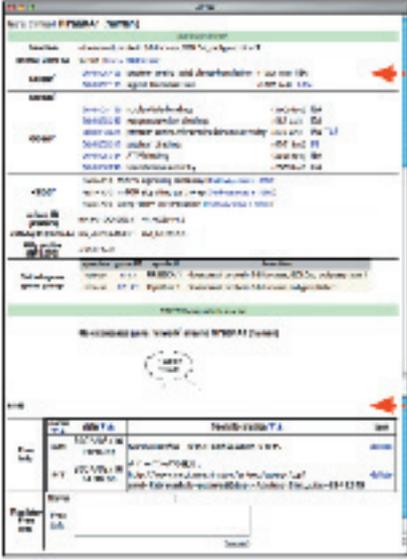
このページには、遺伝子IDを入力して検索された遺伝子の詳細情報が表示されます。機能アノテーション、共発現遺伝子群、および関連する遺伝子群がネットワーク図として表示されます。

このページには、遺伝子IDを入力して検索された遺伝子の詳細情報が表示されます。機能アノテーション、共発現遺伝子群、および関連する遺伝子群がネットワーク図として表示されます。

図2 COXPRESの使い方: locusのページ

4. LabATTEDによる研究室内情報の表示

4.1 LabATTED から見る locus ページ



ページの上部には、COXPRESホームページを表示させる。右側のメニューが表示されているので、ボタンメニューに移動していることが分かる。

ページの下部には、研究室内の情報を表示する。また、追加の操作方法は、各 locus のページで研究室内で行うことができるコメントを付けること、等が、簡単な論文へのリンクや実験のやりかたなどの情報の提供や問い合わせることができる。また、少し高度な分野では、研究者が取得したマイクロアレイやRNAseqの解析結果をアップロードすることもできる。

4.2 LabATTED に登録したコメントの一覧



このページでは、コメントの 一覧が表示されている。右側のメニューからある locus ページへの入口が分かる。

図4 LabATTED

引用文献

- 1) Schena M. *et al.* (1995) *Science*, 270, 467-470.
- 2) Barret, T. *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, D562-566.
- 3) Parkinson, H. *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, D553-555.
- 4) Ikeo, K. *et al.* (2003) *Physiol. Rev.* 77, 699-729.
- 5) Lisso, J. *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33, 2685-2696.
- 6) Persson, S. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 8633-8638.
- 7) Rautengarten, C. *et al.* (2005) *PLoS Comput. Biol.* 1, e40.
- 8) Gachon, C. M. *et al.* (2005) *Plant Mol. Biol.* 58, 229-245.
- 9) Steinjauser, D. *et al.* (2004) *Bioinformatics.* 20, 3647-3651.
- 10) Toufighi, K. *et al.* (2005) *Plant J.* 43, 153-163.
- 11) Manfield, I.W. *et al.* (2006) *Nucleic Acids Res.*, 34, W504-509.
- 12) Obayashi, T. *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res.* 35, D863-869.
- 13) Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M611498200
- 14) Hirai, Y. M. *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* in press.

神経細胞におけるチャネル機能複合体マイクロアセンブリによる後過分極の形成

竹島 浩¹ (A02計画班)、森口 茂樹² (A03公募班)、柿澤 昌³

¹京都大学大学院薬学研究科、²東北大学大学院薬学研究科、³東京大学大学院医学研究科

発表論文：

Moriguchi, S., Nishi, M., Komazaki, S., Sakagami, H., Miyazaki, T., Masumiya, H., Saito, S., Watanabe, M., Kondo, H., Yawo, H., Fukunaga, K. & Takeshima, H. Functional uncoupling between Ca^{2+} release and afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 10811-10816, 2006.

Kakizawa, S., Kishimoto, Y., Hashimoto, K., Miyazaki, T., Furutani, K., Shimizu, H., Fukaya, M., Nishi, M., Sakagami, H., Ikeda, A., Kondo, H., Kano, M., Watanabe, M., Iino, M. & Takeshima, H. Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. *EMBO J.* in press.

1. はじめに

神経・筋の興奮性細胞において、細胞表層膜と小胞体膜が近接した結合膜構造が存在することは古くから知られている¹⁾。骨格筋細胞におけるtriad junction、心筋細胞でのdiad、平滑筋や分化途中の横紋筋細胞でのperipheral coupling、さらに神経細胞ではsubsurface cisternなどと形態学的な名称は異なるものの、これらの結合膜構造は極めて類似した特徴を有しており、共通の分子的機序により構築されることが示唆される。骨格筋興奮収縮連関においては、細胞膜上の電位依存性 Ca^{2+} チャネルであるジヒドロピリジン受容体 (DHPR) と、小胞体膜上の Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体 (RyR) が直接タンパク質間相互作用で共役することにより、脱分極にตอบสนองした小胞体から Ca^{2+} 放出を引き起こし筋収縮反応を導く²⁾。異なる二つの膜系に存在するチャネル分子が直接の相互作用により共役するためには、上述の結合膜構造が形成されて、その構造中に両チャネルがリクルートされ、さらに機能的アセンブリが完成させられなければならないことは容易に想像される。

興奮収縮連関のチャネル間情報伝達の場合である骨格筋triad junctionには、確かに大量のDHPRとRyRが共局在している。小胞体膜を貫通するRyR分子は巨大な細胞質領域を有しており、電子顕微鏡解析では細胞膜と小胞体膜を橋渡しするように分布していることが観察される³⁾。従って、RyRの有

するDHPRとの結合能、または細胞膜上分子との相互作用によって、結合膜形成が成立すると思われた。骨格筋においてRyRを欠損する変異マウスの骨格筋細胞を観察したところ、当然形成されないはずと予想したtriad junctionが実は存在したのである^{4,5)}。この観察結果は、疑いなくRyR以外の分子機構により結合膜構造が構築されることを示していた。月日の流れは早いもので今を去ること約13年前のことである(図1)。

2. 筋細胞におけるジャンクトフィリン(JP)の機能

結合膜構造の形成に寄与する分子は、確実に骨格筋triad junctionに分布する分子群の中に含まれるはずである。そこに局在する分子群のスクリーニングにおいて、新規小胞体膜タンパク質として同定されたジャンクトフィリン(JP)は様々な実験結果から、結合膜構造を形成する分子であることが示された⁶⁾。すなわち、JPは小胞体膜を貫通しており、しかも特殊な細胞質領域の繰り返し配列(MORN motifと命名)により細胞膜にも直接結合することによって、両膜を架橋する生理的機能を有する。骨格筋型サブタイプ(JP1)の欠損マウスは新生致死性を示し、triad junction形成不全によるRyRの Ca^{2+} 放出の減少に起因する骨格筋の収縮不良が観察される⁷⁾。心筋型サブタイプ(JP2)の欠損マウスは胎生致死性を示し、peripheral coupling形成不全により発生する胎児心筋細胞内RyRの機能異常により心不全となる^{6,8)}。逆に、心筋細胞特異的プロモーターによるJP発現マウスにおいては、その心筋細胞内に結合膜構造の過剰形成が観察される⁹⁾。従って、筋細胞において得られた実験結果は、JPによる結合膜形成はRyRの生理機能の発揮と密接に関連することが示された。図2では、心筋興奮収縮連関におけるJPの役割を示している。心筋細胞の膜興奮はDHPRの活性化による細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こし、流入した Ca^{2+} の一部が小胞体上のRyRに結合し、そのチャネル開口を誘導して小胞体からの大量の Ca^{2+} 放出を引き起こす。この機構は Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR)と呼ばれ、ラット心筋収縮に必須な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇においては、90%程度は小胞体 Ca^{2+} 放出の貢献による。JPによる結合膜構造が形成されなければ、DHPRとRyRの近接した共局在が成立せず、細胞質の強力な Ca^{2+} 緩衝作用により、流

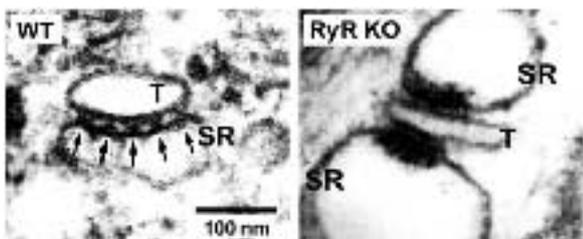


図1 RyR欠損骨格筋におけるtriad junctionの形成

骨格筋細胞では、細胞膜が内部に陥入した横行管(T)が両側より筋小胞体(SR)により挟まれた結合膜構造triadが形成され、興奮収縮連関の情報伝達機構を内在するようになる。矢印は両膜間にRyRチャネルが粒子状に観察される様子を示している。RyR欠損骨格筋細胞においても、 Ca^{2+} 過剰負荷に起因する小胞体の膨潤化に伴うものの、triad形成は保持される。

入Ca²⁺がRyRに辿りつく頻度は極度に低下し、効率的なCICR機構の構築は不可能となる。

3. 中枢特異的JPサブタイプJP3とJP4

脳特異的な発現を示すJPサブタイプとして、JP3とJP4をcDNAクローニングにより分子同定した。両者はほぼ全ての神経細胞に共発現していることが、in situハイブリダイゼーション解析から示された。従って、同様の細胞生物学的機能を有する場合には、お互いに強い機能的な補完作用が示唆される¹⁰⁾。事実、単独ノックアウトマウスには顕著な行動学的異常は観察されなかった¹¹⁾。一方、ハンチントン舞踏病と極めて類似した臨床症状を示すヒト遺伝性疾患HDL2の原因がJP3遺伝子へのtriplet repeat伸長・挿入変異であることが報告されている¹²⁾。HDL2家系の遺伝子異常を解析した結果によると、triplet repeatの挿入によりJP3遺伝子破壊を引き起こしている事例も複数家系で見出されている。従って、JP3欠損に加えて、加齢なども含めた外的因子がさらに加算されることにより、様々な神経機能異常が発生することも推定される。

中枢系でのJP機能を明らかにするために、JP3とJP4欠損マウスの交配により、両者を同時欠損するマウス (JP-DKO) の作製を行った。作製されたJP-DKOマウスは通常飼育条件下では離乳時期に死亡する¹³⁾。この致死性からペレット状通常餌を食べられないことを予見して、ペースト状の練り餌飼育に切り替えたところ、致死性がほぼ回避された (図3)。JP-DKOマウスがなぜ通常餌を食べられないのかは不明であるが、唾液分泌に関わる反射経路形成の異常などが考えられる。練り餌飼育が必須であるが、JP-DKOマウスは多少の発達遅延はあるものの、その後はほぼ健康に発育する。しかしながら、尻尾を持ち上げた際に起こる下肢反射の異常が認められる (図3)。正常マウスは下肢が開くのにに対して、JP-DKOマウスでは下肢を結びしぐさを呈する。この異常反射は、foot-clasping reflexと称されており、ハンチントン舞踏病モデルマウスにも観察される異常であり¹⁶⁾、JP-DKOマウスの

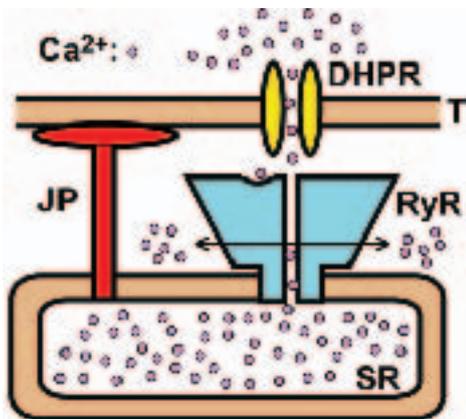


図2 JPIによるdiad形成と心筋興奮収縮連関

心筋細胞では、脱分極による横管 (T) 膜上DHPRチャネルの活性化により流入したCa²⁺が、小胞体 (SR) 膜上のRyRに結合し、チャネル活性化によるCa²⁺放出を引き起こす。このCICRと呼ばれるCa²⁺シグナルの増幅機序により、十分な細胞内Ca²⁺濃度上昇が起こり、筋収縮反応の引き金となる。効率的なCICRを可能とするためには、JPIにより成立した結合膜構造diad内にDHPRとRyRが共局在することが必須と考えられる。

HDL2モデルとしての有用性を示唆している (このphenotypeはケージ交換の際に見出したもので、ネズミの飼育などとバカにせず様々に観察することが研究の基本である!)。これらの観察結果は、JP-DKOマウスが多彩な中枢機能の異常を有することを示唆している。

4. JP欠損による記憶学習と海馬長期増強の異常

まず、JP-DKOマウスをY迷路で試験したところ、顕著な短期記憶の低下が示唆された。次いで行われた受動回避試験においても、顕著な長期記憶の低下が示された。前者は前頭葉依存性、後者は扁桃体依存性試験であるものの、両試験での極度の能力低下は電気生理学的解析が進んでいる海馬領域の機能異常も示唆する結果でもある。この考察に従い、海馬CA3-CA1のシナプス伝達に着目した実験を行った¹³⁾。フィールド刺激により誘導したシナプス伝達を細胞外記録法により記録したところ、AMPA型とNMDA型グルタミン酸受容体の活性化により引き起こされる脱分極性の興奮性シナプス後電位 (EPSP) に引き続き発生する過分極性の電位変化が、JP-DKOマウスにて欠失していることが見出された。この過分極は後過分極 (afterhyperpolarization, AHP) に起因すると考えられ、実際、パッチクランプによるCA1錐体細胞の電流固定測定においても、本来存在すべき脱分極後のAHP相がJP-DKOマウス由来のCA1細胞では欠失していた (図4)。様々な薬物を用いた実験において、NMDA受容体阻害薬APV、

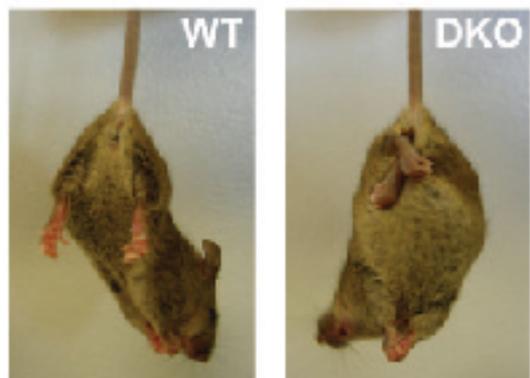
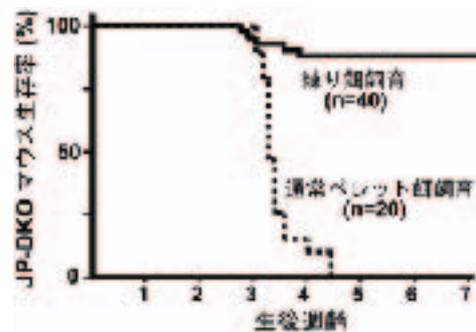


図3 JP-DKOマウスの致死性と下肢反射異常

JP-DKOマウスは通常のペレット餌飼育では離乳時期に死亡するが、練り餌飼育に切り替えることで致死性を回避することができる (上段グラフ)。尻尾を持ち上げた状態にすると、通常マウスでは下肢が開いているが、JP-DKOマウスでは足組みする (下段写真)。この下肢反射異常はfoot-clasping reflexと呼ばれ、神経機能異常を共有する数種の変異マウスで報告されている。

RyRによる小胞体Ca²⁺放出の阻害薬リアノジンやCPA、さらにはsmall-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ (SK) チャンネル阻害薬apaminがAHP形成を抑制することが明らかになった。この結果は、CA3終末からのグルタミン酸放出→NMDA受容体によるCa²⁺流入→CICR機構によるRyRの活性化→小胞体から放出されたCa²⁺によるSKチャンネルの開口→K⁺流出によるAHP相の形成、というシグナル伝達機構がCA1細胞に備えられていることを強く示唆する。これらの薬物に関して、JP-DKO CA1細胞の活動電位波形とその後の電位変化への効果がまったく認められないことから、JP3とJP4は共同してNMDA受容体、RyRおよびSKチャンネルが形成するCa²⁺が仲介する情報伝達を構造的に支えていることが想定された。

海馬CA1可塑性である長期増強(LTP)が記憶学習と強く関連することは様々な状況証拠から確立している。そこで、記憶学習能力の低下が観察されたJP-DKOマウスのCA3繊維の高頻度刺激により誘起されるCA1 LTPについて海馬スライスにおいて検討した(図5)。JP-DKOマウスにおいては、高頻度刺激直後のEPSP増強の異常亢進に引き続き、予想されたように、CA1 LTPの著しい減弱が観察された。CA1 LTPはNMDA受容体によるCa²⁺流入が、リン酸化酵素を含めて様々なCa²⁺依存性反応を活性化することにより確立されるものと考えられており、Ca²⁺-カルモジュリン依存性キナーゼII(CaMKII)の重要性が既に確立している。海馬スライスからCA1領域を切り出し、抗リン酸化ペプチド抗体によるイムノブロットを行ったところ、JP-DKO CA1にて高頻度刺激を与える前の状態で既にCaMKII自己リン酸化の顕著な亢進が観察された。推定されるCaMKIIの恒常的活性化は、リン酸化基質であるAMPA型受容体GluR1 S831のリン酸化レベルの亢進においても確認された。従って、JP-DKO海馬可塑性異常は、少なくとも一部はCaMKIIの活性化異常に起因すると考えられる。

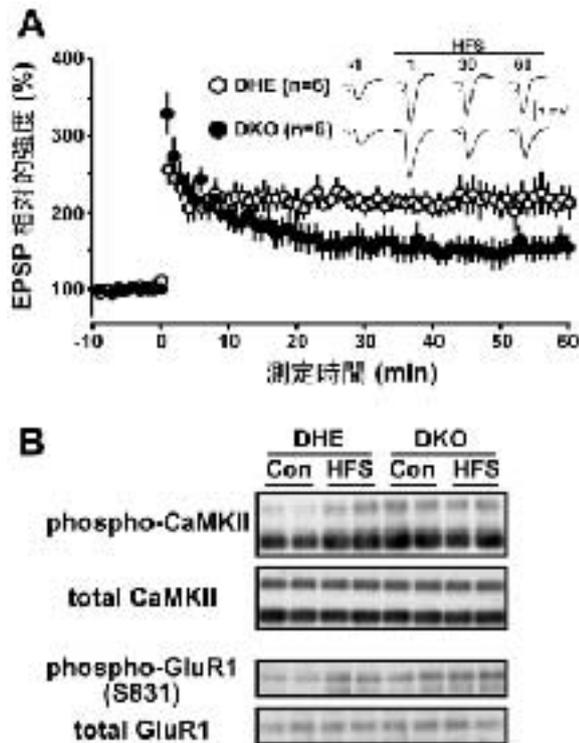


図5 JP-DKOマウス海馬CA1 LTPの異常とCaMKIIの恒常的活性化

コントロールマウス(JP-DHE)とJP-DKOマウス海馬スライス標本を用いたCA1細胞におけるLTP誘導実験(A)。時間0において高頻度電気刺激(HFS)をCA3繊維に負荷し、細胞外記録による興奮性シナプス後電位(EPSP)強度を相対的値としてプロットした。各時間経過でのサンプルトレースを添付してある。抗リン酸化抗体によるイムノブロット実験(B)。高頻度電気刺激前(Con)と負荷後(HFS)の海馬スライスよりCA1領域を切り出し、SDS電気泳動後に抗体の反応性を検討した。CaMKIIとAMPA型グルタミン酸サブユニット(GluR1)のタンパク含量に変化はないが、JP-DHEではHFS後にリン酸化レベルの上昇が観察されるが、JP-DKOではHFSを負荷する前より既にリン酸化レベルが上昇している。

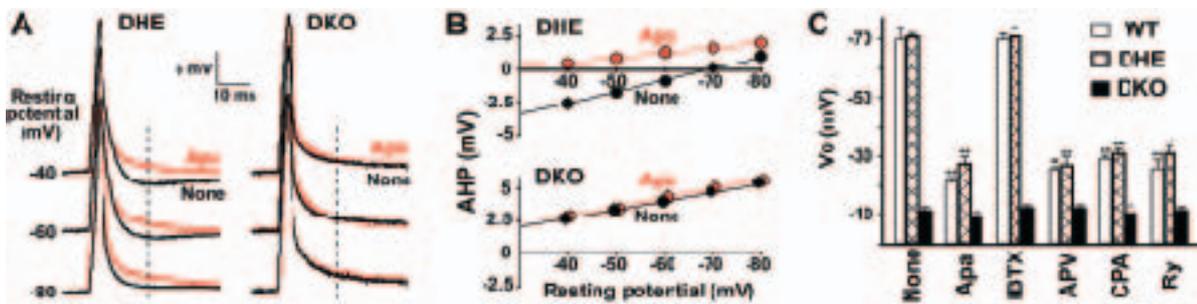


図4 海馬CA1細胞AHPのRyRによるCa²⁺放出要求性とJP-DKOマウスにおけるAHP欠損

コントロールマウス(JP-DHE)とJP-DKOマウス由来のCA1細胞における活動電位波形の比較(A)。脱分極性電流負荷により誘発した活動電位変化を電流固定モードのパッチクランプ法にて記録すると、通常観察されるはずのSKチャンネル開口によるAHPがJP-DKOマウスで発生しない。海馬スライス内には遊離グルタミン酸が存在し、グルタミン酸高親和性のNMDA受容体に結合しているが、静止電位においてはMg²⁺ブロックにより開口状態にはないが、脱分極性電流負荷とそれに伴う膜興奮でMg²⁺ブロックが解除されるとNMDA感受性のCa²⁺流入が生じる。各静止膜電位におけるAHP電位のプロット(B)。正常CA1細胞のAHPはK⁺の逆転電位と対応し、SKチャンネル阻害薬apamin(Apa)で抑制される。脱分極刺激後15ms後(Aのトレースにおける破線に相当する)の値をAHP電位として作図した。JP-DKOではAHP相は形成されず、apaminの薬理作用も認められない。AHPに対する種々の薬物の効果のまとめ(C)。Iberiotoxin(IBTX, large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺チャンネル阻害薬); APV(NMDA-typeグルタミン受容体チャンネル阻害薬); cyclopiazonic acid(CPA, SR/ER Ca²⁺ ATPase阻害薬); ryanodine(Rya, リアノジン受容体チャンネルの開口固定薬)。

った(図8)。JP, RyRさらにはSKチャネルは多様な神経細胞群で共発現しているため、海馬CA1と小脳PCで確認されたチャネル機能共役と類似の機構は、広く中枢系に共有されていることが推論される。一方で、我々の結果は単に神経興奮性の制御に寄与すると考えられていたAHPが、可塑性形成に密接に関係していることも強く示唆している。今後も、JP-DKOマウスはチャネル機能共役の解明、RyRの中枢生理機能、AHPと可塑性の関連などの研究に貢献する優れたモデル系となることが期待される。また、その研究の進展により、ヒト遺伝子疾患HDL2の病因解明や治療法の確立に向けた成果が得られれば幸いである。

筋細胞のみならず、中枢神経細胞においてもJPはRyRの生理的Ca²⁺放出を支持する役割を有しているようだ。横紋筋細胞においてはRyRのCa²⁺放出は細胞内Ca²⁺シグナルを増幅する役割を有しているのに対し、神経細胞では脱分極に伴う細胞内Ca²⁺シグナルの再利用より膜興奮の抑制に利用されている点が興味深い。自動車で例えるならば、強力なブレーキとなる抑制性入力とは異なり、小胞体Ca²⁺放出がエンジンブレーキのように自己の細胞内に在する興奮抑制機構となっている。また、SKチャネルの開口機構のCa²⁺センサーは実はチャネルサブユニットに結合しているカルモジュリンである。心筋・骨格筋の収縮反応を制御するCa²⁺センサーであるトロポニンCは分子進化的にはカルモジュリンに由来する。ということは、RyRによるCa²⁺放出は興奮性細胞において、カルモジュリンの活性化スイッチと

して進化してきたものではないか?というようなちよっとおしゃれな推論も成立するように思える。

7. 終わりに

筋細胞におけるRyRの生理機能は、KOマウスを作製することにより比較的簡単に解くことが可能であった^{15,16)}。これは、既に蓄積されていた生理学や薬理学の成果を、単に変異マウスを利用して検証しただけであったためである。しかしながら、詳細には触れていないが、RyRにも3種のサブタイプが存在し、中枢系にはRyR1~3の全てがそれぞれ独特な様式で発現しているため、それらの中枢生理機能を明確することは容易ではなかった。例えば、海馬CA1ではRyR2とRyR3が共発現しており、小脳PCではRyR1が支配的に発現しているが、RyR1とRyR2のKOマウスは新生および胎生致死性を示し中枢機能解析が不可能という具合である。RyR機能の研究に没頭していた頃に、神経細胞においてRyRはいったい何をしているのか?という質問を幾度となく受けて、明快な回答を用意出来ずに悔しさのみが思い出になった。ここに解説したデータを携えて、10年ほど前からの学会、人事面接、研究費ヒアリングの会場へ駆け戻りたい気持ちでいることが、実は妙に切ない(もしもそれが可能であれば、もう少し祝福された人生となったのではあるまいか?)。特に、RyR3欠損マウスが記憶学習に劣り、CA1 LTPで特徴的な異常(JP-DKOと酷似している)を示すことはかなり以前より判っていたのに¹⁷⁾⁻¹⁹⁾、多少の悪戦苦闘はしたものの、ここで解説したチャネル機能共役まで当時辿り着けなかったことには悔いが残る。しかしながら一方で、喉の奥につかえていた魚の小骨がようやく取り除けたような、ささやかではあるが達成感?に現在浸っているのも事実ではある。

最後になりましたが、ここで紹介させていただいた研究成果は、多くの共著者の方々の惜しみのない尽力と高い技術力に支えられて得られた貴重な実験データの積み重ねであり、共同研究者の方々に心より御礼申し上げる次第です。

引用文献

- 1) Flucher, B. E. (1992) Dev. Biol. 154, 245-260.
- 2) Endo, M. (2006) J. Pharmacol. Sci. 100, 519-524.
- 3) Franzini-Armstrong, C. & Protasi, F. (1997) Physiol. Rev. 77, 699-729.
- 4) Takekura, H. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 3381-3385.
- 5) Ikemoto, T. et al. (1997) J. Physiol. 501, 305-312.
- 6) Takeshima, H. et al. (2000) Mol. Cell 6, 11-22.
- 7) Ito, K. et al. (2001) J. Cell Biol. 154, 1059-1067.
- 8) Uehara, A. et al. (2002) Cell Calcium 31, 89-96.
- 9) Komazaki, S. et al. (2003) FEBS Lett. 542, 69-73.
- 10) Nishi, M. et al. (2003) Mol. Brain Res. 110, 102-110.
- 11) Nishi, M. et al. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 292, 318-324.
- 12) Holmes, S. E. et al. (2001) Nat. Genet. 29, 377-378.
- 13) Moriguchi, S. et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 10811-10816.

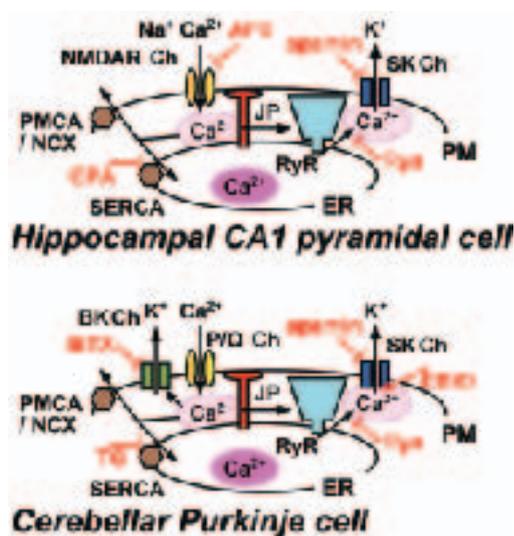


図8 海馬CA1錐体細胞と小脳プルキンエ細胞でのJPにより成立するCa²⁺依存性チャネル機能共役

JP-DKOマウス海馬および小脳における研究遂行にて明らかにされたJPによる結合膜構造中で構築されるCa²⁺依存性チャネル機能共役を模式的に図示した。PM, 細胞表層膜; ER, 小胞体; NMDAR Ch, NMDA型グルタミン酸受容体チャネル; JP, ジャンクトフィリン; RyR, リアノジン受容体; SK Ch, 低コンダクタンスCa²⁺-dependent K⁺チャネル; PMCA, 細胞膜型Ca²⁺ポンプ; NCX, Na⁺-Ca²⁺交換機構; SERCA, 小胞体Ca²⁺ポンプ; BK Ch, 高コンダクタンスCa²⁺-dependent K⁺チャネル; P/Q Ch, P/Q型電位依存性Ca²⁺チャネル; CPA & TG, 小胞体Ca²⁺ポンプ阻害薬; Rya, リアノジン受容体開口固定薬; IBTX, BK Ch阻害薬; Apa, Sk Ch阻害薬; EBIO, Sk Ch活性化薬。

- 14) Kakizawa, S. et al. (2007) EMBO J. in press.
- 15) Takeshima, H. et al. (1994) Nature 369, 556-559.
- 16) Takeshima, H. et al. (1998) EMBO J. 17, 3309-3316.
- 17) Takeshima, H. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 19649-19652.
- 18) Kouzu, Y. et al. (2000) Mol. Brain Res. 76, 142-150.
- 19) Shimuta, M. et al. (2001) Mol. Cell. Neurosci. 17, 921-930.

週刊 朝日 (朝刊) 2005年6月27日 月曜日

「脳神経」

記憶学習に 安息期必要

タンパク質を分解

記憶の形成には、脳内のタンパク質が重要な役割を果たしている。その中でも、シナプス可塑性に関与するタンパク質の分解と再合成のバランスが、記憶の学習と定着に大きく影響している。最新の研究では、学習後に適切な休息をとることが、記憶の長期保持に不可欠であることが明らかになった。これは、脳内のタンパク質が分解され、新しいタンパク質が合成されることで、記憶のネットワークが再構築されるためである。休息不足は、このプロセスを妨げ、記憶の定着を妨げる可能性がある。したがって、学習後は十分な休息をとることが、記憶の学習に重要な役割を果たすことが示唆されている。

京都新聞
平成17年6月27日夕刊

記憶に必須タンパク質を解明

記憶の形成には、脳内のタンパク質が重要な役割を果たしている。その中でも、シナプス可塑性に関与するタンパク質の分解と再合成のバランスが、記憶の学習と定着に大きく影響している。最新の研究では、学習後に適切な休息をとることが、記憶の長期保持に不可欠であることが明らかになった。これは、脳内のタンパク質が分解され、新しいタンパク質が合成されることで、記憶のネットワークが再構築されるためである。休息不足は、このプロセスを妨げ、記憶の定着を妨げる可能性がある。したがって、学習後は十分な休息をとることが、記憶の学習に重要な役割を果たすことが示唆されている。

産経新聞
平成17年6月27日夕刊

日本経済新聞
平成17年6月27日夕刊

記憶に重要な働き たんばく質を発見

記憶の形成には、脳内のタンパク質が重要な役割を果たしている。その中でも、シナプス可塑性に関与するタンパク質の分解と再合成のバランスが、記憶の学習と定着に大きく影響している。最新の研究では、学習後に適切な休息をとることが、記憶の長期保持に不可欠であることが明らかになった。これは、脳内のタンパク質が分解され、新しいタンパク質が合成されることで、記憶のネットワークが再構築されるためである。休息不足は、このプロセスを妨げ、記憶の定着を妨げる可能性がある。したがって、学習後は十分な休息をとることが、記憶の学習に重要な役割を果たすことが示唆されている。

毎日新聞
平成17年6月27日夕刊

記憶に重要な役割

記憶の形成には、脳内のタンパク質が重要な役割を果たしている。その中でも、シナプス可塑性に関与するタンパク質の分解と再合成のバランスが、記憶の学習と定着に大きく影響している。最新の研究では、学習後に適切な休息をとることが、記憶の長期保持に不可欠であることが明らかになった。これは、脳内のタンパク質が分解され、新しいタンパク質が合成されることで、記憶のネットワークが再構築されるためである。休息不足は、このプロセスを妨げ、記憶の定着を妨げる可能性がある。したがって、学習後は十分な休息をとることが、記憶の学習に重要な役割を果たすことが示唆されている。

記憶のコツは休息

記憶の形成には、脳内のタンパク質が重要な役割を果たしている。その中でも、シナプス可塑性に関与するタンパク質の分解と再合成のバランスが、記憶の学習と定着に大きく影響している。最新の研究では、学習後に適切な休息をとることが、記憶の長期保持に不可欠であることが明らかになった。これは、脳内のタンパク質が分解され、新しいタンパク質が合成されることで、記憶のネットワークが再構築されるためである。休息不足は、このプロセスを妨げ、記憶の定着を妨げる可能性がある。したがって、学習後は十分な休息をとることが、記憶の学習に重要な役割を果たすことが示唆されている。

読売新聞
平成17年6月27日夕刊

脳細胞の働きが 壊れると物忘れ

記憶の形成には、脳内のタンパク質が重要な役割を果たしている。その中でも、シナプス可塑性に関与するタンパク質の分解と再合成のバランスが、記憶の学習と定着に大きく影響している。最新の研究では、学習後に適切な休息をとることが、記憶の長期保持に不可欠であることが明らかになった。これは、脳内のタンパク質が分解され、新しいタンパク質が合成されることで、記憶のネットワークが再構築されるためである。休息不足は、このプロセスを妨げ、記憶の定着を妨げる可能性がある。したがって、学習後は十分な休息をとることが、記憶の学習に重要な役割を果たすことが示唆されている。

朝日新聞
平成17年6月27日夕刊

2光子顕微鏡による開口放出の可視化解析と バイオ分子イメージングの展開

根本 知己(AO3計画班)

自然科学研究機構・生理学研究所・脳機能計測センター

発表論文：

Oshima, A., Kojima, T., Dejima, K., Hisa, Y., Kasai, H. & Nemoto, T. Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands. *Cell Calcium* 37, 349-357, 2005.

Kishimoto, T., Kimura, R., Liu, T.T., Nemoto, T., Takahashi, N. & Kasai, H. "Vacuolar sequential exocytosis of large dense-core vesicles in adrenal medulla", *EMBO J*, 25, 673-682, 2006.

Kasai, H., Kishimoto, T., Nemoto, T., Hatakeyama, H., Liu, T.T. & Takahashi, N. "Two-photon excitation imaging of exocytosis and endocytosis and their spatial organizations" *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 850-877, 2006.

1. はじめに

多光子励起を用いた蛍光顕微鏡法(2光子顕微鏡)は、インタクトに近い組織的標本の深部断層像を、高い空間分解能で長時間にわたって取得することができるため、細胞機能解析に最適なものの1つであり、特に神経科学の領域で広く使われ始めてきた¹⁾⁻³⁾。多光子励起過程は1931年という量子力学の黎明期に、後にノーベル物理学賞を受賞するMaria Göpert-Mayerによって既に理論的に予言されていた。その生物学的応用は1990年のWebbのグループの報告以降全世界的に注目を浴びることとなった¹⁾。筆者が2光子顕微鏡を本格的に構築したのは、今から約8年前、東京大学医学部第一生理学教室の河西春郎助教授(現、東京大学医学部疾患生命工学センター教授)の未来開拓学術振興事業のプロジェクトに参加した時である。この時は12月1日に辞令を受けたのであるが、2月のCREST研究成果報告会に間に合うよう直ちに2光子顕微鏡で成果を出さねばならないという切迫した状況であり、恐ろしい限りであった。この時は膵臓ランゲルハンス島の初代培養標本を用いて、NADHの自家蛍光によるミトコンドリアの活性状態の断層イメージングに成功した。この時のデータはお蔵入りとなってしまった。その後、我々が生理学研究所に移った後に米国のグループが同様の結果を出版した際には⁴⁾、自分たちの方が何年も前に出していたのにと悔しい思いもした。今となっては良い思い出である。この事例もまた、とりまなおさず、2光子顕微鏡というものは当時から現在もその可能性を展開し続けている新しいイメージング手法であることの証左といえよう。

生理学研究所に移ってからは次第に当時扱っていた様々な標本へ適用を広げ、膵臓外分泌腺から副腎髄質細胞のような内分泌腺、さらに神経細胞樹状突起スパインといった様々な標本において、開口放出、小胞動態、微小形態の変化や生理活性物質の可視化解析に我々は成功した⁵⁾⁻¹²⁾。本稿では、前掲発表論文や最近得られたデータに基づき、大脳新皮質や開口放出現象の2光子顕微鏡in vivoイメージングの特徴や将来について簡単にレビューを行いたい。

2. 「2光子顕微鏡」とは何か?

第一電子励起状態への励起が複数個の光子の同時吸収によ

る多光子励起過程は量子力学的に極めて実現される確率の低い過程である(図1)。この確率が極めて低いことにより蛍光の発生がレンズの焦点に局限され、断層イメージングが可能となる。この過程の物理、化学的特徴から、2光子顕微鏡には、①深部到達性・低障害性、②自己遮蔽効果の回避・褪色の補償、③多彩かつ厳密な同時多重染色イメージング、④紫外励起共焦点顕微鏡、⑤局所的光化学反応の誘起というような性質がもたらされている(図2)。

このうち、①深部到達性・低障害性は最も重要な特徴である

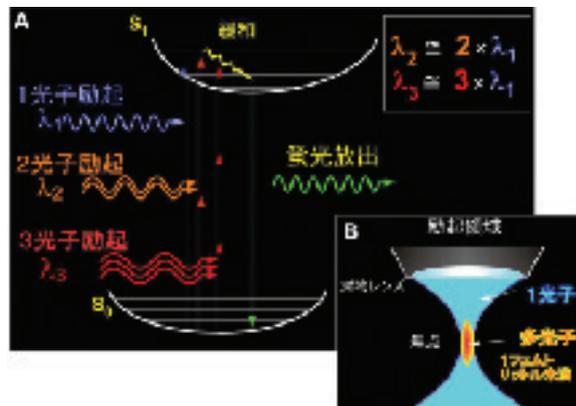


図1 多光子励起過程
A) 多光子励起過程のエネルギーダイアグラム
B) 対物レンズ後の励起領域の違い

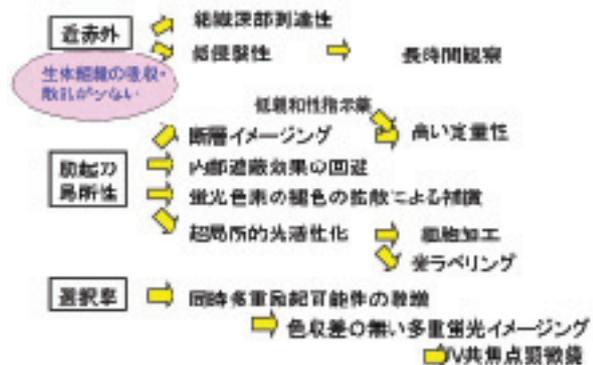


図2 2光子顕微鏡の特徴

が、励起光が近赤外の領域にあり、生体組織に対して低吸収、低散乱であるためである。さらに、このことは標本に対する侵襲性が低いことをも意味し、長時間に渡って安定的な蛍光観察を可能としている。この特徴は、後述の *in vivo* イメージングにおいて特に重要になってくる。

また、③多彩かつ厳密な同時多重染色イメージングは、吸収スペクトルの重なりが少なく同時に1光子励起が困難な複数の色素も、2光子励起では同時に励起可能になることによる。これは2光子励起スペクトルが理論的に予想されるよりも広がっているためである(図3)¹³⁾。従って、2光子顕微鏡は断層化のためには共焦点ピンホールを用いていないため、原理的にほとんど色収差、視差の無い同時多重断層イメージングが可能になる¹⁴⁾。

この特徴は、*in vitro* 的な薄い標本、培養細胞でも有効であり、2光子顕微鏡の最も重要な特徴のひとつである。さらに④紫外励起共焦点顕微鏡という特徴を加味すれば、例えば、最もスタンダードなCa²⁺指示薬であるUV励起のfura-2と他の蛍光色素の同時観察が可能であるので、Ca²⁺依存性細胞機能の解析に強力なツールになる。例えば、我々はNADHの青色自家蛍光像を同時にイメージングし、培養中枢神経細胞におけるCa²⁺動態とミトコンドリアの活性状態の関係を検討した⁹⁾。また、UV自家蛍光を利用して、生体組織を無染色のままモノアミンニューロンや分泌顆粒を可視化することにも成功している⁵⁾。

また我々は⑤ケージド試薬の局所的な光活性化により、細胞膜上のチャネル・受容体の機能マッピングにも成功し、グルタミン酸受容体の分布とスパイン形態の関係を明らかにすることに成功した⁶⁾。カルシウム依存性水・電解質輸送の可視化に成功している⁸⁾。その他の応用例としては、多光子励起用レーザーがパルスレーザーであることを利用して、蛍光寿命を可視化することができた¹⁵⁾。この手法は細胞内小器官内部の局所的分子環境の評価、蛍光エネルギー共鳴移動法(FRET)などへの応用が可能である。

3. 「逐次開口放出」現象の普遍性

我々が第一にCa²⁺イメージングの対象とし、多くの基礎的データを与えてくれた標本は膵臓外分泌腺腺房である。膵臓外分泌腺腺房を構成する細胞は極性の明確な上皮細胞であり、

その細胞極性や1μmもの大きな分泌顆粒のため、生合成、Ca²⁺シグナリング、開口放出、小胞輸送などのモデルとして広く用いられてきた¹⁶⁾。膵臓外分泌腺腺房細胞は、腺房内に終端する腺管末部である腺腔に向かって生成した酵素を分泌する。真の生理的な開口放出を捉えるためには、組織的な構造を保ったまま深部断層を得る必要があった。しかし旧来の共焦点顕微鏡では高屈折率の分泌顆粒に散乱され蛍光シグナルを得られなかったが、2光子顕微鏡の①深部到達性・低障害性により、腺腔の真の構造を高い分解能で可視化できた。さらに、②自己遮蔽効果の回避・褪色の補償の性質が、水溶性蛍光色素によるΩ構造の発生の検出を可能とし、我々は開口放出現象の素過程の可視化に成功した。その結果、世界に先駆けて、我々は膵臓外分泌腺細胞では「逐次開口放出」という新しい分泌様式を用いていることを実証した⁵⁾(図4)。即ち、細胞膜と小胞の膜融合が生じると、その一体化した小胞膜を新たに、細胞の内側にある小胞と膜融合することが可能になる。従って、数珠のように次々と連なって小胞が開口放出していくという形式である。

このような細胞膜から連なって連続化している小胞群は、1960年代に既に電子顕微鏡によって撮影されていたが¹⁷⁾、

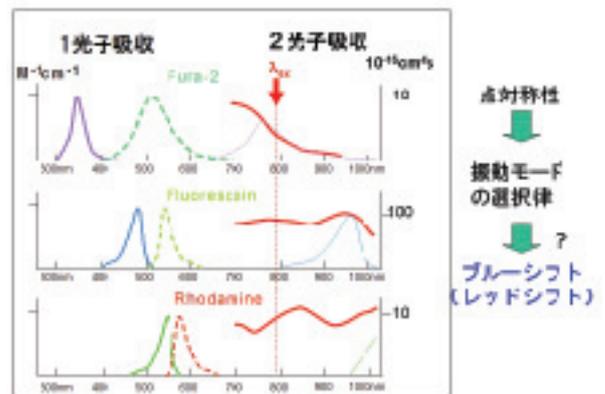


図3 同時励起可能性の増大

1光子励起過程では同時に励起できない fura-2, fluorescein, Rhodamineも2光子励起過程を利用すれば、励起スペクトラムの予想外の広がりやシフト(ブルーシフト、レッドシフト)のため、単一のレーザー波長で励起可能である。これにより原理的にほとんど色収差、視差の無い深部断層イメージングが可能である。励起スペクトラムが1光子励起スペクトラムの波長を2倍に伸ばしたものではない理由は、蛍光分子の対称性に原因すると言われているが、分子毎に変化量などは異なっており、予想することは困難である。

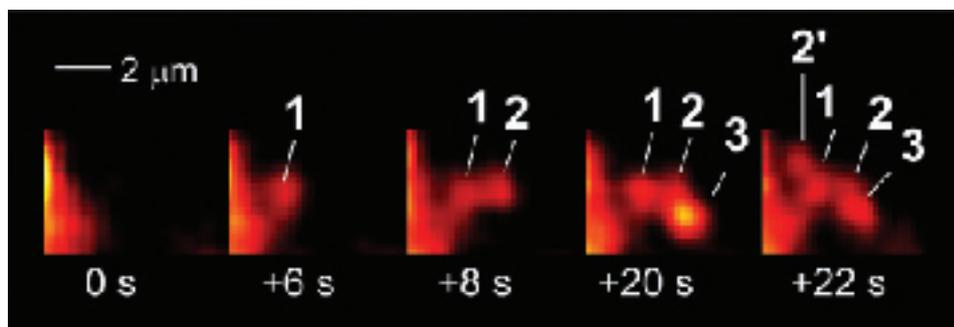


図4 逐次開口放出

細胞外液に高濃度の水溶性蛍光色素を入れておく。分泌刺激を加えると、細胞膜に接した分泌小胞が開口放出し、細胞外部の蛍光色素が拡散により小胞内部に充満することで、融合細孔形成の瞬間が捉えられる。驚くべきことに、この細胞膜と融合した分泌小胞膜は、細胞深部の小胞膜に対して融合する能力を獲得した。この膜の能力獲得は、我々は細胞膜に局在するt-SNAREと呼ばれる分子が小胞膜上へ側方拡散することによってなされているとモデルを提唱している。

これが真に逐次開口放出かどうか、証明は困難であった。即ち、予め、細胞内で膜融合を起こした小胞群が、最後に細胞膜と融合している可能性を固定した細胞では否定できない為である。このような古典的な命題を新たな観察法が解決していくことはしばしば生じる²³⁾。また我々を含め内外の研究者により逐次開口放出はPC12細胞、膵β細胞、好酸球等でも追認されており、細胞にとっては一般的な様式である可能性が高い^{10), 12)-19)}。

さらに最近、我々は副腎髄質クロマフィン細胞において、「ヴァキュオール型」逐次開口放出という様式が存在することを世界に先駆けて実証報告した(図5)¹²⁾。分泌小胞内容物が融合細孔形成後に膨潤することによりΩ構造がヴァキュオール様に激しく拡張していく(図6)。この膨潤が細胞深部の分泌小胞の分泌への動員を加速しており、細胞を破壊することなく、短時間で大量の生理的な分泌を可能とする機構であると推定された。このような劇的ともいえる細胞内微細構造変化が我々の体内で生理的に生じている可能性があるということは、極めて驚異的であり、2光子顕微鏡法をもってして初めて明らかになった事実である。

ではこれら逐次開口放出はどのような分子機構によって実現されているのであろうか?我々はSNARE仮説に基づきこのメカニズムを推定した。シナプス前終末における神経分泌はもとより、大型有芯小胞の開口放出や細胞分画間の小胞輸送における生体膜融合過程は、酵母から哺乳動物まで広く進化上保存されている可溶性N-エチルマレミド感受性因子(NSF)結合タンパク質受容体(SNARE)連関タンパク質の一群によって引き起こされると考えられている。特に、開口放出の初期に小胞膜と細胞膜を結ぶ融合細孔が形成されるが、この融合細孔形成には、対面する2膜に存在するSNAREタンパク質分子(小胞膜:v-SNARE(VAMP2)、細胞膜:t-SNARE(SNAP25, syntaxin))が熱力学的に安定な4重αヘリックス構造を形成し、SNAREコア複合体となる必要かつ十分であると提唱されてきている(SNARE仮説)(図7)²⁰⁾⁻²²⁾。

従って、我々は腺腔膜に局在するt-SNARE分子が、連続化した小胞膜を側方拡散し、隣接した小胞の近くに来ることで、

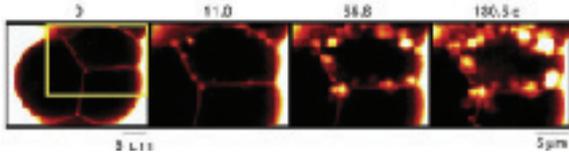


図5 「ヴァキュオール型」逐次開口放出

副腎髄質クロマフィン細胞初代培養クラスター標本において世界で初めて可視化された。

その小胞膜のVAMP2とSNARE複合体を形成し、最終的に2次的な開口放出を起こすと考えた^{25), 22)}。この場合、1次的開口放出においても、SNARE複合体の形成は、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇後生じると推定される²⁴⁾。我々は副腎髄質クロマフィン細胞、PC12細胞、膵β細胞の逐次開口放出融合した小胞膜へのt-SNARE SNAP25の側方拡散が先行することがあることを示した^{12), 24)}。膵外分泌腺においても、このt-SNAREの側方拡散モデルを支持する組織化学的結果を、t-SNAREタンパク質syntaxin-2の抗体を用いたケンブリッジ大グループが提出した²⁵⁾。一方、我々はアデノウィルスによって、安定なSNAREコア複合体の4重αヘリックス構造の形成に必須なsyntaxin2の226番目のグルタミンをアラニンに置換しその変異体を膵臓外分泌腺初代培養標本に強制発現させたところΩ構造発生が完全に阻害されていた。野生型を過剰発現した細胞では盛んに逐次開口放出が観察されたことから、SNAREコア複合体形成が融合細孔形成に必須であることが確認された(未発表)。また現在ではSNAP23-EGFPを用いて、SNAP23は腺腔膜に局在することや融合した分泌小胞膜上へ拡散することなどが明らかになりつつある(未発表)。

このように新規的な様式である逐次開口放出は様々な分泌細胞において一般的な小胞膜輸送の様式であり、その機能は重要な研究対象となりつつある。また Ca^{2+} 依存性開口放出の様式の多様性とその生理的な意義の解明には、融合細孔自身の安定性とSNAREコア複合体の関係性をその分子機構の

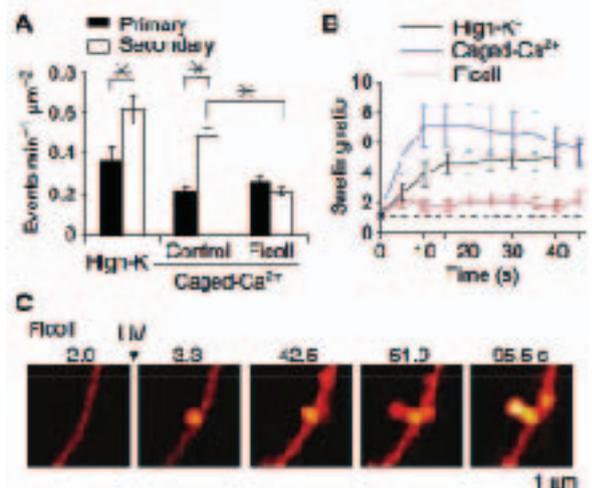


図6 ゲル浸透圧の増加によるバキュオール形成の抑制と開口放出数の減少

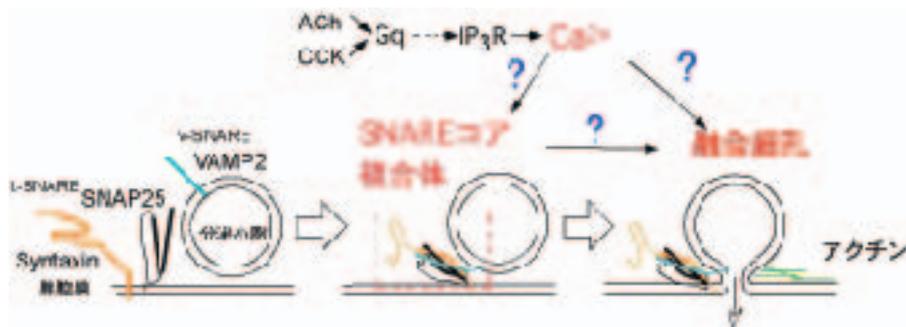


図7 SNARE仮説

小胞膜状のvSNARE分子(VAMP2)と2種類の細胞膜上のt-SNARE分子(syntaxin-2, SNAP25(23))が熱力学的に極めて安定である4重αヘリックス複合体を形成する(SNAREコア複合体)が膜融合を引き起こすと考えられている。

レベルで理解することが重要である(図8)。今後、神経分泌への適用可能性が重要な局面になるであろう。

4. *in vivo* イメージングの確立へ向けて

河西教授が東京大学へ戻られたのを期に、筆者は2006年1月から脳機能計測センター・生体情報解析室の施設系独立助教授に昇任し、生理学研究所の2光子顕微鏡室を担当することとなった。機能協同研究部門・岡田泰伸教授や生体恒常機能発達機構研究部門・鍋倉淳一教授、バイオ分子センサープロジェクトの協力を得、超短光パルスレーザー3台と、*in vivo* イメージング用正立、1台、イメージング用倒立型1台、光機能性分子活性化用倒立型1台の、計3台の顕微鏡からなる2光子顕微鏡システムを4カ月ほどで立ち上げることができた(図9)。

特に、鍋倉研究室と協力し、①深部到達性・低障害性を最大限に利用した、個体用“*in vivo*”2光子顕微鏡システムを構築した。これにより麻酔下のマウス個体の大脳皮質深部の神経細胞のイメージングに成功した(図10)。現在、皮質表面から0.9mm以上の深部で神経細胞を観察することが可能である。これは大脳皮質に立体的に広く枝を張る神経細胞の全体像を生きた動物中で捕らえることができたということの意味するのみならず、樹状突起スパインや軸索終末の構造を高い空間分解能で観察できているので、長期間にわたり一動物中で生じる神経細胞ネットワークの変化を追跡することを可能になる方法論を手にしたことを意味する。実際、我々のシステムは他研究グループの1/10程度のレーザー量で十分に観察できており、極めて侵襲性が低い。ある光学顕微鏡メーカーからは、このような高い深部到達性と分解能を両立できたのは、世界で唯一であるとの評価を受けた。現在、我々はこの個体用 *in vivo* 2光子顕微鏡を用いることで、神経細胞やグリア細胞の動態を調べている。まだ準備的な段階ではあるが、生きた個体中では、今までのスライス標本の報告とは、非常に異なっていることが次第に明らかになってきた。また分解能に関して、新たな光学系を設計、導入し、不可能であった第V層のsomatic dendriteの *in vivo* イメージングに世界でさきかけて成功した(特許出願準備中)。この分野の研究は、今、大きなターニン

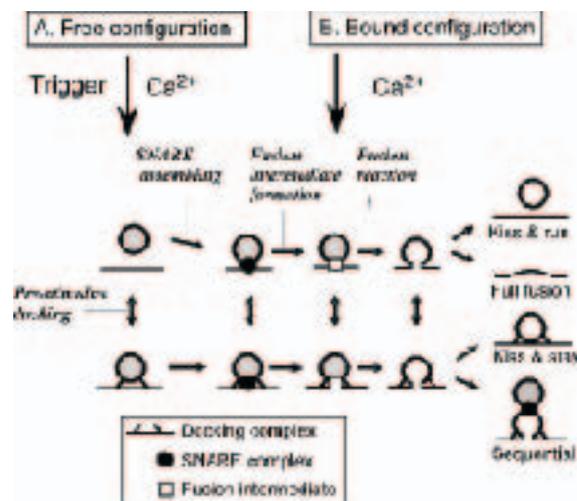


図8 分泌小胞の分泌へ向けた分子的準備状態と開口放出の“モード”融合小胞自身の安定性とSNAREコア複合体の関係性は Ca^{2+} 依存性開口放出の様子の多様性と生理学的意義を考える上で重要なポイントになる。

グポイントを迎えているのではないかと、我々はひしひしと感じている。

さて、このような優れた深部観察が可能となった理由としては、以下のようなものが考えられる。まず、目的を *in vivo* イメージングに目的を絞った非常にシンプルな光学系を構成したことが考えられる。これにより特定の対物レンズに対して、深部到達性と確保しつつ焦点位置のビーム径を最小にするように調整が出来る。またMaiTaiHP (SpectraPhysics社) という、ほぼ全自動で操作可能で、900nmを越える長波長域で安定して高い出力の得られるレーザーを用いたということも原因と考えている。蛍光画像のS/Nの問題を考えれば、今後、北大・永井健治教授らの開発したvenus²⁶⁾のように、EGFPよりも明るく長波長蛍光のGFP改変蛍光タンパク質の利用が進むと考えられるので²⁷⁾、このようなレーザーそのものの技術革新は、本質的に2光子顕微鏡によるイメージングを改善して行

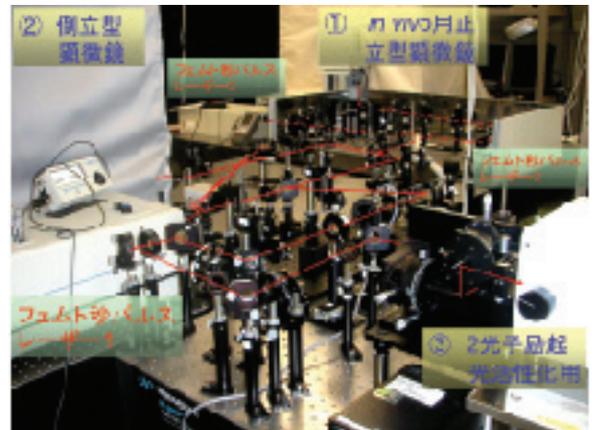


図9 新2光子顕微鏡システム

現在、我々は2台の倒立型と1台の正立顕微鏡、及び発振特性の異なる3台の近赤外フェムト秒パルスレーザーから、2光子顕微鏡システムを構築している。正立顕微鏡は主として *in vivo* イメージングに用いている。倒立顕微鏡のうち1台は光機能性分子の光活性化を行うことが出来るように設計している。

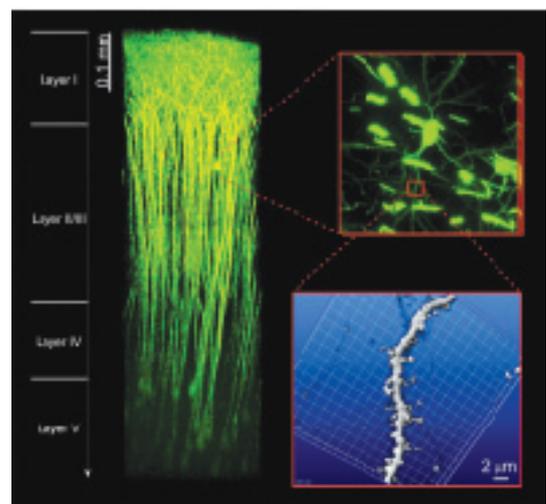


図10 生きているマウス大脳皮質のGFP発現神経細胞群の3次元再構築

2光子顕微鏡の優れた深部到達性は、生体深部の微小細胞形態や活動を観察することを可能とする。新たに構築した“*in vivo*”2光子顕微鏡は、大脳表面から0.9mm以上の深部を観察することが可能であり、マウス個体を生かしたまま大脳皮質全体を可視化し得る世界トップクラスの顕微鏡である。(生理研・鍋倉淳一教授との共同研究)

くであろう。最後に、マウスを手術し顕微鏡のステージに固定するための一連の特殊なアダプターの開発に成功したことが、長時間に渡って良好なイメージングをし続けることを可能している(特許出願準備中)。これらは鍋倉研究室の和気弘明先生の優れたアイデアと非常に根気よく観察した成果であり、見ると信じることの強さを改めて気づかされた。

5. バイオイメージングの今後の課題

近年の光学顕微鏡技術の展開は2つの方向性に大別できる。第一に、「見えるべきものをより良く見る」という高時空分解能化であり、光学顕微鏡の場合、それはしばしば断層化するなわち光軸方向の分解能の向上を意味する。もうひとつの方向性は、単純な光子の吸収・放出という形を介さない物理量の変化や反応過程自体を可視化するという、いわば「見えないものを見る」方向性である。さらに最近では、超短光パルスレーザーを用いて、顕微鏡下で任意の細胞に遺伝子導入を行うような細胞操作技術も生まれている。

この数十年の間に、前者の方向性で最も生物顕微鏡に貢献した技術が共焦点光学系であることは疑うべくもないが、いくつかの限界、問題点もまた明らかになってきた。そのため、以上説明してきたような多光子励起過程の他にも、第2高調波発生(SHG)、Stimulated Emission Depletion (STED)などの非線形光学過程を用いた新たな顕微鏡法が、医学生物学研究の場へも登場している^{28), 29)}。

本稿で説明したような特徴から、今後、2光子顕微鏡はさらに様々な生物学や医学の分野で広く使われていくことになるだろう。実際、我々は発生生物学への応用を試みており、胚分化の細胞生物学に新しい知見を得つつある。また技術面からも、新たに数100nmの超広帯域フェムト秒パルスレーザー光の発生の成功とその2光子顕微鏡への応用が報告されており、2光子顕微鏡の利用可能な観察対象は著しく広がる可能性がある³⁰⁾。また、MEMS加工技術によるレーザーミラーのマイクロ化により³¹⁾、覚醒した小動物のin vivoイメージングに成功したという報告もなされた。

しかし、2光子顕微鏡を普通に使えるようになるには、まだ改良の余地は残っている。例えば、ほぼ全自動の超短光パルスレーザーであっても、我々は朝立ち上げた際には微調整を必ず行っている。このような問題が解決されるためには、レーザーメーカーと顕微鏡メーカーが本腰を入れる必要がある。しかし、それを待っている間に日本の研究は遅れてしまっているかもしれない。生理学研究所は大学共同利用機関法人として、日本国内に広く門戸を開けており共同研究を推進している。また生理学研究所サマートレーニングコースでは、光学顕微鏡の基礎や2光子顕微鏡システムを使ったイメージングをレクチャーしている。もしこの拙文をお読みになった方でご関心を抱いた方がおられれば、ご連絡いただければ幸いです。

謝辞

逐次開口放出に関する研究は河西研究室にて開始された。ご指導をいただいた河西春彦教授とスタッフの方々にはこの場をかりて感謝いたします。また、本特定班領域に参加させていただいたこと、そして岡田泰伸教授、鍋倉淳一教授をはじめとする生理研の諸先生方のサポートがなければ、独立後わずか

4カ月で2光子顕微鏡室が立ち上がり、世界トップクラスのスペックを達成することは不可能でした。この場をかりて心より感謝の意を表したく存じます。

引用文献

- 1) Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. (1990) *Science*, 248, 73-76.
- 2) Denk, W. & Svoboda, K. (1997) *Neuron*, 18, 351-357.
- 3) Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R. & Kasai, H. (2004) *Nature*, 429, 761.
- 4) Patterson, G. H., et al. (2000) *Proc. Nat. Acc. Sci.*, 97, 5203-5207.
- 5) Nemoto, T., et al. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3, 253-258.
- 6) Matsuzaki, M., et al. (2001) *Nat Neurosci*, 4, 1086-1092.
- 7) Takahashi, N., et al. (2002) *Science*, 297, 1349-1352.
- 8) Oshima, A., et al. (2005) *Cell Calcium*, 37, 359-370, 2005.
- 9) Hayakawa, Y., Nemoto, T., Iino, M. & Kasai, H. (2005) *Cell Calcium*, 37, 359-370.
- 10) Kishimoto, T., et al. (2005) *J Physiol*, 568, 905-915.
- 11) Liu, T.-T., et al. (2005) *J Physiol*, 568, 917-929.
- 12) Kishimoto, T., et al. (2006) *EMBO J*, 25, 673-682.
- 13) Xu, C., et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 10763-10768.
- 14) Nemoto, T., et al. (2004) *J Biol Chem*, 279, 37544-37550.
- 15) 根本, 河西 (2002) 公開特許「多光子励起蛍光寿命画像化システム」特開2002-039943.
- 16) Johnson, L. R., Barrett, K. E. & Ghishan, F. K. (2006) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 4th ed. (Academic Press)
- 17) Ichikawa, A. J. (1965) *Cell Biol.*, 24, 369-385.
- 18) Leung, Y. M., et al. (2002) *Biochem Biophys Res Com*, 292, 980-986.
- 19) Hafez, I., Stolpe, A. & Lindau, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 44921-44928.
- 20) Jahn, R., Lang, T. & Sudhof, T. C. (2003) *Cell*, 112, 519-533.
- 21) Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. & Brunger, A. T. (1998) *Nature*, 395, 347-353.
- 22) Rothman, J. E. (1994) *Nature*, 372, 55-63.
- 23) Pickett, J. A. & Edwardson, J. M. (2006) *Traffic*, 7, 109-116.
- 24) Kasai, H. et. Al. (2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 850-77, 2006.
- 25) Pickett, J. A., Thorn, P. & Edwardson, J. M. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 1506-1511.
- 26) Nagai, T., et al. (2002) *Nat Biotechnol*, 20, 87-90.
- 27) Miyawaki, A., Nagai, T. & Mizuno, H. (2005) *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 95, 1-15.
- 28) Campagnola, P. J. & Loew, L. M. (2003) *Nat Biotechnol*, 21, 1356-1360.
- 29) Willig, K.I., et al. (2006) *Nat Methods*, 3, 721-723.
- 30) 加藤, 濱口 (2006) *生物物理*, 46, 349-352.
- 31) Piyawattanametha, W., et. al. (2006) *Opt. Lett.* 31, 2018-2020.

パーキンソン病におけるセプチン・スカフォールドの破綻と ドパミンニューロンの障害

木下 専 (A03公募班)、萩原 明

京都大学大学院医学研究科 先端領域融合医学研究機構
(19年度より京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット)

発表論文：

Ihara, M., Yamasaki, N., Hagiwara, A., Tomimoto, H., Kitano, A., Tanigaki, A., Hikawa, E., Noda, M., Takanashi, M., Mori, H., Hattori, N., Miyakawa, T. & Kinoshita, M. Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of α -synuclein neurotoxicity. *Neuron* 53, 519-533, 2007.

1. はじめに

セプチン (Sept1-12) はコピキタスな重合性GTP結合蛋白質ファミリーであり (図1)、アクチンやチューブリンと同様にヌクレオチド結合性細胞骨格蛋白質に分類される。アクチン系では1種類、微小管系では2種類のサブユニットが規則正しく高次集合するのにに対し、セプチン系では3種類以上のサブユニットが多様な高次集合体を構成し、主に細胞膜直下やアクチン線維束上に集積する。セプチンは細胞分裂関連蛋白質として認識されている一方、生体内では非分裂組織である脳に最も多く発現する。しかし、シナプス膜やグリア膜の直下に大量に集積するセプチンの生理機能は全く不明であった。

2. 神経系セプチンの生理的意義の探索

脳でよく発達したセプチン系の生理的意義を個体レベルで探索するため、成熟脳特異的サブユニットSept4に着目して逆遺伝学的手法による探索を行った。Sept4が脳の広い領域に発現することや、他の研究グループが作製した *Sept3,5,6* 欠損マウスでは類似遺伝子による代償が著しいことを考慮して、

Sept4欠損マウスの神経機能障害を系統的かつ網羅的に探索した。その結果、唯一の行動学的異常として過剰な聴覚性ブレパルス抑制が認められた。この異常はドパミン伝達系の機能低下を示唆するため、ドパミン受容体作動薬やドパミントランスポーター (DAT) 阻害薬を用いた行動薬理学的解析によって検証した。さらに黒質から線条体に投射するドパミンニューロンを生化学的に詳細に解析したところ、ドパミン合成系の律速酵素 (TH)、小胞分泌装置 (tSNAREs)、ドパミン再取り込み系の12回膜貫通型蛋白質であるDAT、DATと相互作用することが既に知られている α -シヌクレインが前シナプス終末において種々の程度に欠乏していたが、他のシナプス蛋白質は保持されていた。また、Sept4が前シナプス終末でDAT、tSNAREs、 α -シヌクレインなどと共局在し、免疫共沈することは、これらの分子群を構成成分とする超分子複合体の存在を示唆している。また、シナプスの微細形態は電子顕微鏡レベルでも正常であった。すなわち、ここでのセプチン集合体の役割は軸索末端の形状を維持するための細胞骨格的なものではなく、ドパミン小胞分泌・再取り込み機構をシナプス膜直下に係留ないし組織化するスカフォールドと考えられる (図2)。

3. 神経系セプチンの病的意義の探索

ドパミン伝達系はパーキンソン病などの神経変性疾患、統合失調症などの精神疾患、物質依存などの場であることから、医学的・社会的にも重要なシステムである。パーキンソン病で変

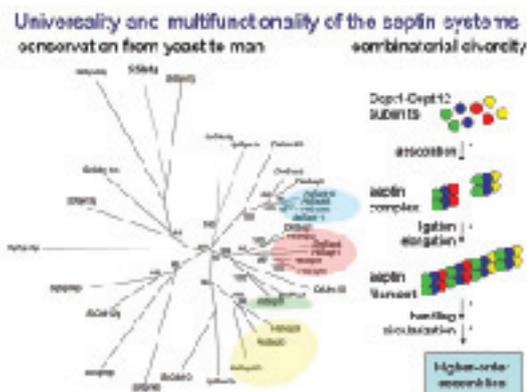


図1 セプチン系の普遍性と多様性

(左) 酵母からヒトまで保存されたセプチンファミリーの分子系統樹。ヒトやマウスのゲノムに存在する *Sept1-12* 遺伝子 (サブファミリーごとに色分けした) から30種類余のポリペプチドが産生される。(右) GTP結合領域を保持した大多数ポリペプチドのほとんどは一定の規則に従って桿状複合体 (六量体以上のオリゴマー) を形成する。桿状複合体は生理的条件下で長軸方向に連結して直径8nm前後のフィラメントを形成する。フィラメントはさらに伸張しつつ短軸方向にも集積し (束化)、固有の曲率で環状化・螺旋化する。

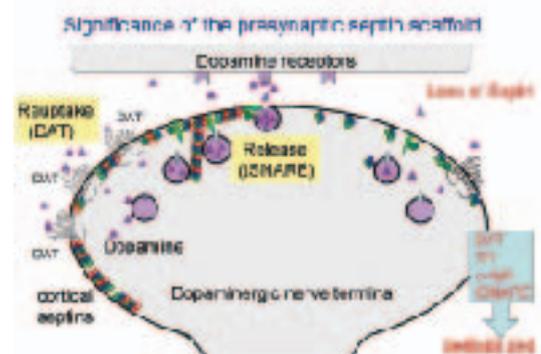


図2 セプチン系の生理機能の1例:前シナプス膜直下のスカフォールド (本文参照)

性した神経細胞においては、責任蛋白質 α -シヌクレインが凝集してレビー小体を形成する。当グループは、 α -シヌクレインがミスフォールドし、アミロイド化してレビー小体を形成する際にSept4がレビー小体に巻き込まれて共凝集することを発見したが、病態におけるこの現象の意義は不明であった。一方、複数のグループが「ユビキチンリガーゼparkinの機能喪失により、その基質であるSept4やSept5がドパミンニューロン内に蓄積することが(特に若年性)パーキンソン病の増悪因子である」という悪玉説を提唱しているが、検証は不十分であった。生理的条件下でSept4が欠損するだけではドパミン神経に神経病理学的変化を引き起こさない。しかし、Sept4はドパミン伝達系の恒常性に必須なスカフォールド系の構成要素であることから、パーキンソン病で変性しつつあるドパミン神経においてはSept4の機能喪失が重大な影響を与える可能性がある。そこで、Sept4のloss of functionがパーキンソン病において果たす役割を検討するため、家族性パーキンソン病モデルの1つ、変異型ヒト α -シヌクレイン過剰発現マウスにおいてSept4を欠損させた。すると驚くべきことに、これらのマウスでは神経症状が早期発症し、アミロイド化したリン酸化 α -シヌクレインが神経組織に高度に蓄積していた。このマウスモデルの病態を詳細に検討し、臨床検体、生化学的手法を用いた検討を重ねたところ、少なくともパーキンソン病の大多数を占める孤発例においてはSept4が蓄積している症例が見つからないだけでなく、多くの例で減少していた。以上を総合すると、孤発性パーキンソン病においてSept4はむしろ脆弱性因子ないし感受性因子(善玉)とみなすべきことがわかった。そこで、「Sept4がレビー小体へと隔離され、シナプス膜から枯渇することがドパミン神経伝達障害を引き起こすとともに、 α -シヌクレインの凝集・変性を加速する」という独自の病態モデルを提案した(図3)。

4. 今後の展望

DAT/ α -シヌクレイン/Sept4を含む上記の超分子複合体が、ドパミン神経軸索末端において生理的・病的に重要なトランスポートソームの分子実体であることが本研究で明らかになった。現在、その構成成分を質量分析的手法で分析し、培養神経細胞でDATトランスポートソームを再構成することにより、その中でセプチンが果たす役割とその分子機構を検討しつつある。DATトランスポートソームの動態と、その不安定化要因を知ることは、パーキンソン病におけるドパミン伝達障害に対する治療戦略をデザインするためにも重要であろう。



図3 セプチン系の病理的意義の1例:「孤発性パーキンソン病の脆弱性因子」仮説(本文参照)

謝辞

この場をお借りしてこれまでにお世話になった共同研究者、研究協力者、特定領域研究班の皆様には厚く御礼申し上げます。

参考論文

- 1) Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F., & Mitchison, T. J. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. *Developmental Cell* 3, 791-802, 2002
- 2) Ihara, M., Tomimoto, H., Kitayama, H., Morioka, Y., Akiguchi, I., Shibasaki, H., Noda, M. & Kinoshita, M. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry* 278, 24095-24102, 2003.
- 3) Ihara, M., Kinoshita, A., Yamada, S., Tanaka, H., Tanigaki, A., Kitano, A., Goto, M., Okubo, K., Nishiyama, H., Ogawa, O., Takahashi, C., Itohara, S., Nishimune, Y., Noda, M. & Kinoshita, M. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Developmental Cell* 8, 343-352, 2005.
- 4) Spiliotis, E. T., Kinoshita, M. & Nelson, W. J. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. *Science* 307, 1781-1785, 2005.
- 5) Kinoshita, M. Diversity of septin scaffolds. (*In* Cell structure and Dynamics Review Series; eds. V. Small and M. Glotzer) *Current Opinion in Cell Biology* 18, 54-60, 2006.

「悪玉」凝集で抑制



パーキンソン病
タンパク質の凝集を抑制

悪玉タンパク質の凝集を抑制

京都府立医科大学の山本浩二教授らの研究グループが、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する薬剤を開発した。この薬剤は、タンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

京都新聞H19.2.16(30面)

朝日新聞H19.2.16(3西)

パーキンソン病 根本治療に道?

「悪玉抑えるたんぱく質解明」
足元の悪玉たんぱく質の凝集が、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

京都新聞H19.2.16(25面)

「悪玉抑えるたんぱく質解明」
足元の悪玉たんぱく質の凝集が、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

「悪玉抑えるたんぱく質解明」
足元の悪玉たんぱく質の凝集が、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

パーキンソン病発症特性 抑制たんぱく質

「悪玉抑えるたんぱく質解明」
足元の悪玉たんぱく質の凝集が、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

読売新聞H19.2.16(2面)

「悪玉抑えるたんぱく質解明」
足元の悪玉たんぱく質の凝集が、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

パーキンソン病 悪化をストップ

「悪玉抑えるたんぱく質解明」
足元の悪玉たんぱく質の凝集が、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

中日新聞H19.2.16(29面)

パーキンソン病治療に光明 因子のタンパク質発見

「悪玉抑えるたんぱく質解明」
足元の悪玉たんぱく質の凝集が、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

産経新聞H19.2.16(25面)

日本経済新聞H19.2.16(30面)

「悪玉抑えるたんぱく質解明」
足元の悪玉たんぱく質の凝集が、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される。山本教授は「この薬剤は、パーキンソン病の原因となるタンパク質の凝集を抑制する働きがあり、パーキンソン病の症状を軽減する効果が期待される」と述べている。

編集後記

年度末を迎えた中で、「平成17～18年度成果特集号1」と題した本ニュースレターの編集を行っております。大学年中行事は全て年度単位で計画されるので、年度末に特徴的に山積してくる業務に対して、様々に難儀さや理不尽さを抱えながら淡々とこなせることも教員としての大事な資質であるかもしれません。具体的には、研究費の端数までぴったりと合わせる使い切り、試験や出席評価を何やら複雑怪奇に組み合わせた単位認定、神経症になるほど気を使う入試関連業務、不確定な中で次年度シラバスの提出などです。大学法人化がなされれば教員の事務負担が軽減されるはずだったので(?)、懐疑的な中でも改悪だけではなからうと法人化への歓迎ムードが拡がった当時は懐かしく、恨めしく思い出します。しかしながら、中期目標や年次自己評価、学内外で搾取された交付金を取り返すために日常化した申請書の作成、過剰とも思える接客姿勢が要求される学生への対応などに疲弊し、定削で減少した教員の悲鳴は大学法人内では絶えない現状となっております。さらに、月に2度の教授会を業務簡素化を目的に1度に減らしたのは良いが、上記の業務への協議で年度末のこの時期に臨時教授会が月に3度も開催される始末では、どのような改善策があるのか見当も付かない状況です。年末の雑務からやや開放されつつある本日本土曜日(3/10)は、学部入試の発表日でもあります。合格者の受験番号リストが掲示されると、真剣な表情の受験生のみならず、付き添いの両親、さらにはサークル勧誘の学生も入り乱れて、ざわめきが始まる。少し離れた場所には、受験生と父兄に近寄る住宅斡旋業者も待ち構えている。これら受験生が新入生として間もなく入学するこの時期、フレッシュマンによる新年度の研究室の発展を祈念する教員も多いことだろう。花見や新歓イベントでの若者の笑顔が、年度末業務での疲弊状態から脱却するための最も効果的な回復薬ともなる。

(竹島)

TRANSPORTSOME

第4号(2007年4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