

# TRANSPORTSOME

特定領域研究:生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能

QUARTERLY  
Summer  
2007

平成17～18年度成果特集号2

ワキ役から主役へ:  
調節タンパク質の機能

## 目 次

|                                                                                                      |                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----|
| 研究期間の半ばにあたって                                                                                         | 金井 好克                  | 2  |
| 平成17～18年度成果特集 2                                                                                      |                        |    |
| 小胞体Ca <sup>2+</sup> 放出を支えるTRICチャンネル                                                                  | 竹島 浩                   | 3  |
| シグナル伝達をする瞬間の細胞膜ラフトが見えた！<br>—— BSEやHIV感染、アルツハイマー病発症などの解明に道 ——                                         | 楠見 明弘                  | 8  |
| WNK4 (D561A) ノックインマウスの作成と解析による<br>偽性低アルドステロン症II型の分子病態解析<br>楊 松昇、頼 建光、千賀 宗子、蘇原 英誠、佐々木 成、内田 信一         |                        | 11 |
| 正常眼圧緑内障の発症における<br>グルタミン酸トランスポーターの役割<br>原田 高幸、原田 知加子、柯 漢明、田中 光一                                       |                        | 14 |
| 膵β細胞ATP感受性K <sup>+</sup> チャンネルの機能障害マウスにおける<br>膵β細胞死とその再生                                             | 尾山 和信、南 幸太郎、三木 隆司、清野 進 | 18 |
| 神経伝達物質放出においてRIM1と電位依存性Ca <sup>2+</sup> チャンネル<br>βサブユニットとの結合がもたらす新たな機能<br>清中 茂樹、若森 実、三木 崇史、瓜生 幸嗣、森 泰生 |                        | 22 |
| 中枢支援・防御システムとしての新たな血液脳関門輸送機構の解明<br>東京テクノ・フォーラム21 ゴールド・メダル賞受賞                                          | 大槻 純男                  | 28 |
| 編集後記                                                                                                 |                        | 31 |

### 表紙について

今回の表紙には、京都大学薬学研究科の竹島先生にご提供いただきましたTRICチャンネル欠損心筋細胞の組織学観察結果を、背景に使用させていただいております。竹島先生らは、長年にわたって実体が知られていなかった、小胞体のCa放出に共役するカウンターチャンネルを同定されました。先生らは、自身が発見されたTRICチャンネル分子が、リアノジン受容体のカウンターチャンネルとして機能する(Ca<sup>2+</sup>放出と同調してK<sup>+</sup>を小胞体内腔へ導く)ことをさまざまな実験により証明され、この結果をNatureに報告されました。

また、陸に近づくカーフェリーはシナプス前膜に向かうシナプス小胞を表しています。森研究室では、シナプス小胞のタンパク質であるRIM1がロープとして働き、シナプス前膜に存在するVDCC(杭)とシナプス小胞を繋ぐことで神経伝達物質(自動車)の放出が起こることを明らかにしました。

(文:瓜生)

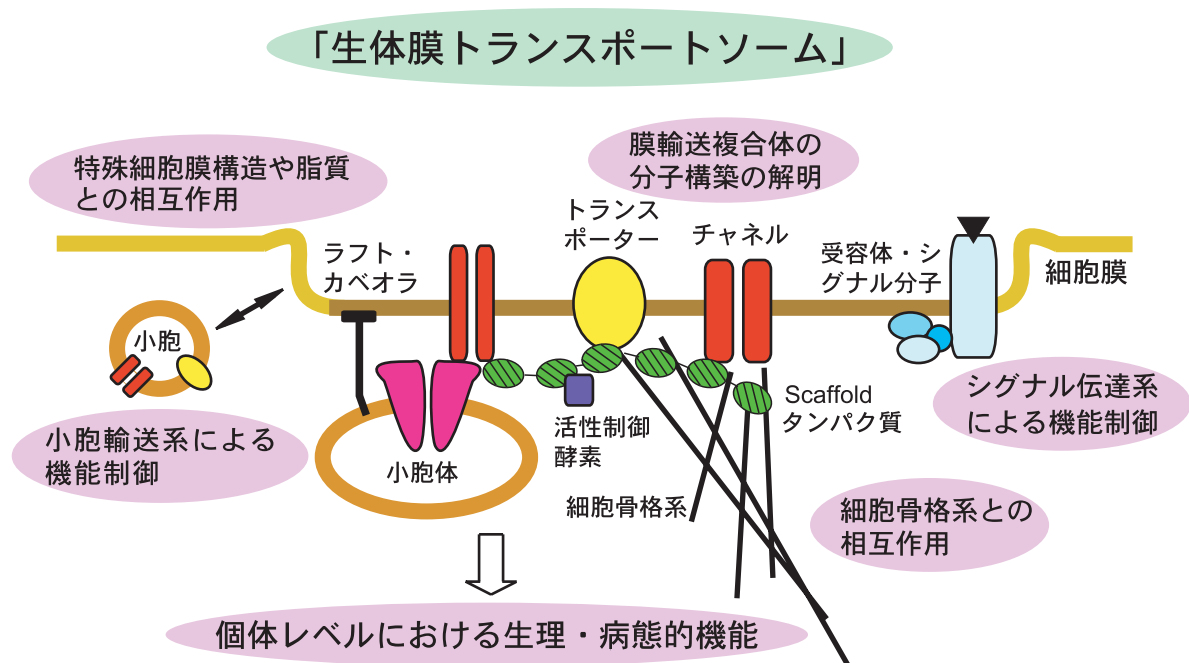
## 研究期間の半ばにあたって

平成17年度に5年間の研究期間をもってスタートした特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」（領域略称：膜輸送複合体）も、3年度目の半ばを向かえ、9月には中間評価が予定されています。これを機にこの正味2年間を振り返り、後半の研究に繋げるべく、ニュースレター「TRANSPORTSOME」では、今回の2007夏号と前回の2007春号において「成果特集号」を組み、特に成果の上がった研究について、各研究代表者に解説記事をお願いしました。今回の特集に成果のまとめが間に合わなかった研究も、今後引き続き紹介していきたいと思ひます。

特定領域研究「膜輸送複合体」は、輸送分子（チャネル、トランスポーター、ポンプ）の分子クローニングの成果に基づいて生理機能を理解しようとする際に遭遇する種々の困難さに端を発し、「単一分子」から「分子複合体」への一種のパラダイムシフトを積極的に実践することを目指して企画されたものです。

今まで個別の独立の実体として研究されてきた個々の輸送分子を、それらがその制御分子や足場蛋白質とともに集積して形成する分子複合体（トランスポートソーム）の一員と見なし、その成り立ちとはたらきを明らかにすることにより、「生体膜輸送の機能ユニット」としてのトランスポートソームの意義を明確にすることを目的としています。昨今の内外の研究で複合体的イメージが随所で強調されるようになってきており、内外の動向が「トランスポートソーム」の概念を益々支持する方向へ向かっていると考えます。研究期間の前半においては、従来型の輸送分子研究の延長上にトランスポートソームを想定したアプローチが多かったと思いますが、後半では、前半の成果のもとに、より直接的に複合体を捉えようとする方向性を明確にしていきたいと考えております。多くの方々からの御意見、御批判を頂ければ幸いです。

領域代表 金井好克



## 小胞体Ca<sup>2+</sup>放出を支えるTRICチャネル

竹島 浩(AO2計画班)

京都大学薬学研究科

### 発表論文：

Yazawa, M., Ferrante, C., Feng, J., Mio, K., Ogura, T., Zhang, M., Lin, P.-H., Pan, Z., Komazaki, S., Kato, K., Nishi, M., Zhao, X., Weisleder, N., Sato, C., Jianjie Ma, J. & Takeshima, H. TRIC channels are essential for Ca<sup>2+</sup> handling in intracellular stores. *Nature* 448, 78-82, 2007.

### 1. はじめに

細胞内オルガネラである小胞体には様々な機能が知られていますが、細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫として必要に応じて細胞質へCa<sup>2+</sup>を放出する機能は最も普遍的な機能の1つです。小胞体Ca<sup>2+</sup>放出チャネルであるリアノジン受容体チャネルに関して、18年ほど前に著者が中心となり遺伝子クローニングを行い、3種のサブタイプを分子同定するとともに、その後、それらのCa<sup>2+</sup>放出が有する生理的役割について解明してきました。良く知られているように、細胞内の主要な無機イオンはNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>であり、Ca<sup>2+</sup>濃度はそれらの1/100程度に過ぎません。主要無機イオンは細胞外と細胞質で異なる分布をしており、興奮細胞では細胞膜におけるそれらの透過率を巧みに変化させることで電気信号を発生させることは周知の事実です。一方、過去に詳細に分析された結果によりますと、小胞体内腔と細胞質の間では主要無機イオンの分布に偏りが認められておりません<sup>1), 2)</sup>。従って、Ca<sup>2+</sup>については約10<sup>4</sup>倍の濃度差があるものの、小胞体内腔と細胞質の間においては極端な電位差や浸透圧は存在しないと考えられています。

Ca<sup>2+</sup>放出チャネルが開くと、小胞体から細胞質に圧倒的な濃度勾配を利用してCa<sup>2+</sup>が放出されます。しかしながら、Ca<sup>2+</sup>はプラス荷電している陽イオンですので、Ca<sup>2+</sup>放出と同時に内腔側がマイナス荷電することになります。Ca<sup>2+</sup>放出領域の内腔側に負の膜電位が発生すると、それ以上のCa<sup>2+</sup>の放出が電気的に妨げられることになります。従って、効率的なCa<sup>2+</sup>放出が成立するためには、膜電位の発生と同時にその中和を行う仕組みが必要であると推論することが可能です。この考察に基づき以前より仮想されたカウンターイオンチャネルは、Ca<sup>2+</sup>放出と同調して陽イオンを内腔へ導く(または陰イオンを細胞質へ導く)チャネルと規定されます<sup>3), 4)</sup>。長い間その実体は不明でしたが、このような議論が記載されている論文を約20年前に目にした筆者の脳裏には、カウンターイオンチャネルはどのようなものなのか?という疑問が消えることはありませんでした。ただ、どのようにして見つけるのか?どのようにして機能に迫るのか?などの具体案についてのアイデアは、当時まったくありませんでした。ただ、その後手掛けた骨格筋小胞体からのミツグミンと命名した分子群の同定や、それらのノックアウトマウスの作製や解析などの実践から、(運が良ければ?)何とかなるようになるようになっていました。

### 2. TRICチャネルの分子同定

筆者の研究室では、小胞体膜に分布してCa<sup>2+</sup>シグナリングに関わると推定される膜タンパク質を、単クローン抗体、シグナル配列トラップ法や密度勾配遠心による膜分画法などを駆使して検索しています。本研究では約300アミノ酸により構成されるTRICチャネル(Trimeric intracellular cation channel;

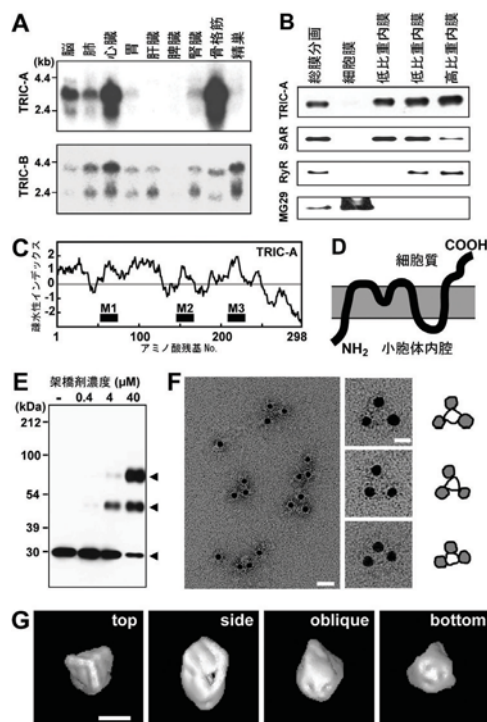


図1 TRICチャネルの生化学解析。マウス組織におけるTRICサブタイプのノーザンブロット実験(A)。骨格筋膜画分におけるTRIC-Aのウエスタンブロット実験(B)。骨格筋より総膜分画を調製後、密度勾配遠心法により、横行管に富む細胞膜、小胞体縦走部に富む低比重内膜や小胞体終末部に富む高比重内膜などに分画して実験に用いた。Kyte-Doolittle法によるTRIC-Aの疎水性プロファイル(C)。膜小胞のタンパク分解酵素による部分消化実験から想定されたTRICチャネルの膜貫通トポロジーモデル(D)。化学架橋試薬(1, 11-bis-maleimidotetraethyleneglycol)によるTRIC-Aチャネルタンパク質の修飾(E)。矢印は単量体、二量体と三量体を示す。金コロイド標識抗体で修飾したTRIC-Aチャネルの電子顕微鏡観察(F)。Scale bars, 200 Å(左パネル) 100 Å(右パネル)。単粒子解析法により推定されたTRIC-Aチャネル構造の外観(G)。Scale bar, 50 Å。

三量体型の細胞内陽イオンチャネル) A型とB型と命名した2つの相同な分子を発見し、その機能解析を行いました。種々のマウス臓器よりmRNAを調製し、ノーザンブロット法によりそれぞれの発現を調べてみますと、A型(当初ミツグミン33と呼んでいた)は神経・筋組織に主に分布し、B型はほぼ全ての組織に発現が確認されました(図1A)。骨格筋細胞の膜画分を生化学的に調製し、特異的抗体によりイムノブロットを行ったところ、予想どおりTRIC-Aは主に小胞体膜に分布していることが示されました(図1B)。この結論は骨格筋組織切片上での蛍光抗体法や免疫電子顕微鏡法によっても再確認されました。疎水性プロット解析からは、TRICチャネルは複数回に渡り小胞体膜を貫通することが推定されました(図1C)。具体的実験データは割愛していますが、TRICチャネルは3本の膜貫通領域を有しており、1つ目と2つ目の間には小胞体膜と相互作用している領域があることが予想されました(図1D)。また、TRICチャネルは分子量3万のタンパク質として検出されますが、化学架橋剤で処理しますとその2量体と3量体が生成します(図1E)。金粒子標識したモノクローナル抗体を用いてTRICチャネルを修飾し、その抗原-抗体複合体を電子顕微鏡で観察しますと、抗原であるTRICチャネル粒子を中心にほぼ正三角形に分布する金粒子が多数観察されました(図1F)。さらに、精製したTRICチャネルの電子顕微鏡写真像を多数取得し、コンピューターによりそのイメージを集積・平均化したところ、弾丸状の三量体構造を有する立体構造が推定されました(図1G)。従って、TRICチャネルは小胞体膜上で3量体を形成して存在しているようです。

### 3. TRICチャネルのイオン透過性

骨格筋よりTRIC-Aタンパク質はモノクローナル抗体を用いて高純度に精製する方法を開発しました。また、単離したTRIC-A cDNAを大腸菌へ導入して、組換えTRIC-Aタンパク質を調製する方法も開発しました。両精製試料を電解質溶液中の脂質二重膜に組み込み、両側の電極に通電しますと、単一TRIC-Aチャネル分子の開閉により発生する約10 pAのイオン電流の変化が観察されました(図2A)。このチャネル電流の大きさを様々な膜電位により測定し、電解質溶液のイオン組成も変化させて測定したところ、TRIC-Aチャネルは一価陽イオン透過性であり、 $K^+ > Na^+ = 1.5$ の選択性を有することが判りました(図2B,C,F)。また、TRIC-Aへのモノクローナル抗体が観察されたイオン電流を強力に阻害することから(図2D,E)、間違いなくTRIC-Aの精製タンパク質によりチャネルが構成されたことが確認されました。細胞内では $K^+$ 濃度は $Na^+$ より約10倍高く、さらに上記のイオン選択性がありますので、TRICチャネルは小胞体上で主に $K^+$ 透過する新規チャネルであると考えられました。以前の研究成果として、デカメサニウム感受性の小胞体 $K^+$ チャネルが報告されています。しかしながら、TRIC-Aチャネルにはその薬物感受性は認められませんでした(図2A右)。

### 4. TRICチャネル欠損マウス

TRICチャネルが生体内でどのような生理機能を担っているのかを解明するために、TRIC-AとTRIC-Bを完全に欠損する

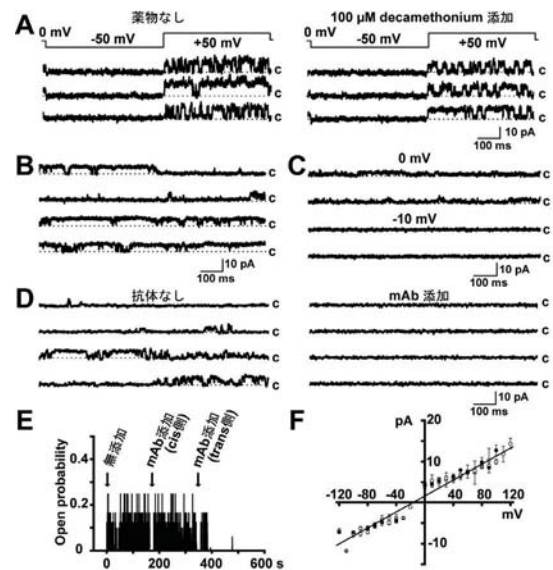


図2 TRIC-Aチャネルの電気生理学解析。ウサギ骨格筋より精製したTRIC-Aチャネルを用いて300:50 mM KCl (*cis:trans*)の条件下で発生した電流記録(A)。TRIC-Aチャネル電流はdecamethonium に非感受性であった。ウサギ骨格筋TRIC-Aの200:50 mM KClの条件下で膜電位0 mV における電流記録(B)。ウサギ骨格筋TRIC-Aの200 mM KCl (*cis*)/200 mM NaCl (*trans*)の条件下では膜電位-10 mV において電流が消失する(C)。大腸菌でのcDNA発現により調製されたTRIC-Aの200:50 mM KClの条件下での電流記録(D)。この実験においては、TRIC-AのC末端を認識する単クローン抗体 MY474の*trans*側溶液への添加でチャネル開口が抑制された(E)。ウサギ骨格筋よりジギトニンまたはドデシルマルトシドを可溶化剤として用いて精製したTRIC-Aチャネルと、大腸菌で作成したTRIC-Aチャネルの200:50 mM KCl条件下での電流-膜電位相関(F)。

変異マウス(TRIC-DKOマウス)を作製しました。TRIC-DKOマウスは受精後10日目程度の胎児期に心拍停止により死亡してしまいます(図3A)。心停止直前時期の胎児を電子顕微鏡観察したところ、TRIC-DKOマウスの心筋細胞での小胞体は異常に膨張しており、小胞体内に過剰に $Ca^{2+}$ が貯留していることが示唆されました(図3B,C)。心筋細胞の収縮は電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルによる $Ca^{2+}$ 流入と、それにより活性化されるリアノジン受容体チャネルによる小胞体 $Ca^{2+}$ 放出により、細胞質内の $Ca^{2+}$ 濃度が上昇することで収縮反応のスイッチが入ります。心筋細胞の細胞質における $Ca^{2+}$ 濃度を経時的に観察したところ、自発心臓拍動に対応する $Ca^{2+}$ シグナル強度が受精後8.5日のTRIC-DKO胎児で極端に減弱しており、その後、心拍停止に向かって $Ca^{2+}$ シグナルが消失することが判明しました(図3D)。高濃度カフェインはリアノジン受容体チャネルを開口させて小胞体 $Ca^{2+}$ 放出を活性化させる作用があります。受精後8.5日のTRIC-DKOマウス心筋細胞では、自発拍動の $Ca^{2+}$ シグナルが衰弱しているのに、リアノジン受容体チャネルを介する小胞体 $Ca^{2+}$ 放出量は増加していました(図3E)。以上の結果を総合すると、TRIC-DKOマウス心筋細胞では小胞体内には $Ca^{2+}$ が大過剰に存在するにもかかわらず、生理的条件下ではリアノジン受容体チャネルが十分に機能せずに小胞体内 $Ca^{2+}$ 放出が抑制されていると考えられます。ただし、カフェインによるリアノジン受容体チャネルの持続的開口状況では、その非特異的な陽イオン透過性により $Ca^{2+}$ 放出とともに、 $K^+$ 流入も活性化されているものと推定しております。

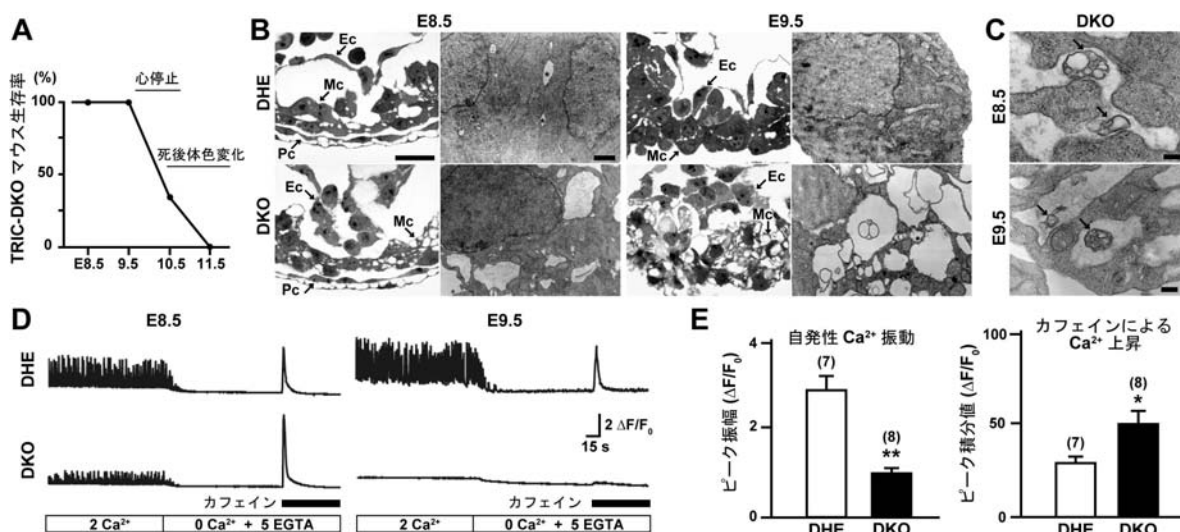


図3 TRIC欠損 (TRIC-DKO) 心筋細胞の生理学的解析。TRIC欠損胎児の致死性 (A)。TRIC欠損心筋の組織学観察 (B左) と電子顕微鏡観察 (B右)。Pc, pericardium; Mc, myocardium; Ec, endocardium; asterisks, intercellular space. Scale bars, 20 (左) and 1  $\mu$ m (右)。TRIC欠損心筋小胞体におけるシユウ酸カルシウムの沈着 (C)。コントロール心筋細胞においては、同条件の実験で沈殿は発生しない。Fluo 4 によるTRIC欠損心筋細胞の $\text{Ca}^{2+}$ イメージング (D,E)。胎生8.5日のTRIC欠損心筋細胞では、自発 $\text{Ca}^{2+}$ 振幅は小さいが、カフェイン誘導のリアノジン受容体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出は顕著に大きい。胎生9.5日のTRIC欠損心筋細胞は自発 $\text{Ca}^{2+}$ 振動も弱まり、まもなく心停止する。

## 5. TRICチャンネル欠乏骨格筋

TRIC-DKOマウスは胎生致死となりますが、TRIC-A (−/−) TRIC-B (+/−) の遺伝型の変異マウス (TRIC-MT) やTRIC-A (−/−) TRIC-B (+/+) は生後生育することが判り、次にそのTRICチャンネルが欠乏している変異骨格筋について分析しました。単離した骨格筋細胞に $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光色素を導入した後、浸透圧変化を与えますと小胞体上のリアノジン受容体が開口して $\text{Ca}^{2+}$ スパークと呼ばれる $\text{Ca}^{2+}$ 放出が発生し、その様子は共焦点顕微鏡にて観察することが可能です。TRIC-MT骨格筋での $\text{Ca}^{2+}$ スパークの強度は減弱しており、リアノジン受容体による $\text{Ca}^{2+}$ 放出が抑制されていることが判りました (図4A,B)。生理的な骨格筋収縮は運動神経による電気情報により発生しますが、この際の機構は心筋細胞と多少異なります。ジヒドロピリジン受容体 (DHPR) が膜電位変化を感知して、その構造変化の情報

$\text{Ca}^{2+}$ 放出が発生することで骨格筋細胞が収縮します。従って、 $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光色素を導入した単離骨格筋細胞に電気刺激しますと小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出が観察されます。TRIC-MT骨格筋では $\text{Ca}^{2+}$ シグナル強度はほぼ正常でしたが、その $\text{Ca}^{2+}$ 上昇速度 ( $\text{Ca}^{2+}$ シグナルのピークに達成するまでの時間経過) が極度に低下していました (図4C,D)。つまり、リアノジン受容体の $\text{Ca}^{2+}$ 放出がTRICチャンネルの欠乏に伴い、抑制されていることが示唆されました。最後に、TRIC-A (−/−) マウス骨格筋から小胞体を生化学的に分離し、電位依存性色素を小胞体膜に導入することにより膜電位を測定しました。ATPと $\text{Ca}^{2+}$ を添加することで小胞体膜上の $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ (SERCA) を稼働させますと、小胞体内腔に $\text{Ca}^{2+}$ が取り込まれるのに伴い、ここでの実験条件下では微弱な膜電位が発生します。この膜電位はバリノマイシン (Val,  $\text{K}^{+}$ イオン透過性チャンネルを形成する低分子化合物) によりほぼ消失し (図4E)、タブシガルギン (TG,  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの阻害する

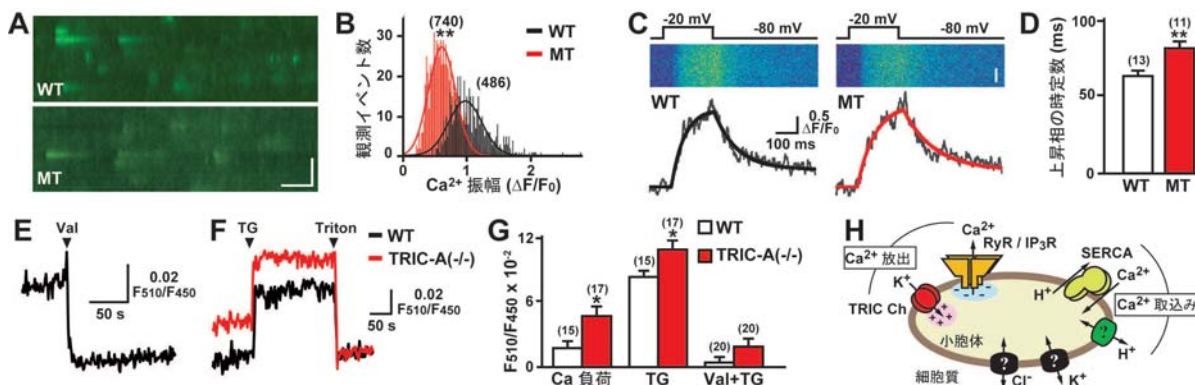


図4 TRIC欠乏骨格筋の生理学的解析。TRIC-MT骨格筋の $\text{Ca}^{2+}$ スパークは減弱している (A,B)。TRIC-MT骨格筋の電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ 放出は減弱している (C,D)。TRIC-A欠損骨格筋から調製した小胞体試料での膜電位測定実験 (E-G)。電位感受性色素di-8-ANEPPQにより、小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 負荷とともに膜電位発生が観察され、 $\text{K}^{+}$ 透過性のバリノマイシンにて膜電位は消失する (E)。 $\text{Ca}^{2+}$ 負荷時とタブシガルギンTGによる $\text{Ca}^{2+}$ リーク時ともにTRIC-A欠損により過剰な膜電位発生するが (F)、バリノマイシンによりその異常は解消するので (G)、 $\text{K}^{+}$ 透過性の減少に起因する異常であると考えられる。TRICチャンネルの想定される生理機能 (H)。RyR, ryanodine receptor; IP<sub>3</sub>R, IP<sub>3</sub> receptor; SERCA, sarco-/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase。

ことで、相対的にリアノジン受容体の $\text{Ca}^{2+}$ 放出を増長させる効果がある)により増強されます(図4F)。TRIC-A(-/-)骨格筋の小胞体においては、 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ稼働時と抑制時ともに過剰な膜電位が観察され、その異常はバリノマイシンにより是正されました。従って、TRICチャンネルの欠乏により小胞体膜の $\text{K}^{+}$ イオン透過率が低下して、過剰な膜電位が生じるものと推定されました(図4G)。

## 6. おわりに

今回の研究で、1) 多彩な細胞系の小胞体に分布する $\text{K}^{+}$ 透過性の三量体TRICチャンネルが見出され、2) その完全欠損により筋細胞の小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出機構が破綻することが判明し、3) その部分欠乏により骨格筋細胞の小胞体にて膜電位異常を伴いながら $\text{Ca}^{2+}$ 放出が障害されることが明らかになりました。これらの結果に基づき、TRICチャンネルは古くから想定されていたカウターイオンチャンネルとして機能していると( $\text{Ca}^{2+}$ 放出と同調して $\text{K}^{+}$ を小胞体内腔へ導く)、結論しました(図4H)。TRICチャンネルはリアノジン受容体 $\text{Ca}^{2+}$ 放出に対応するカウターイオンチャンネルであると、筆者らは少なくとも証明したつもりですが、皆様のご感想はいかがでしょうか。難産の末に本論文が世に出ることになりましたが、 $\text{IP}_3$ 受容体チャンネル $\text{Ca}^{2+}$ 放出におけるTRICチャンネルの対応は?、TRIC-AとBのチャンネル機能の相違性は?、新生期致死性を示すTRIC-B欠損マウスの死因は?、TRICチャンネルの詳細な立体構造は?など多くの課題が山積している現状を何とかしなければなりません。今後も本特定領域の先生方からのご支援・助言を賜りたいと希望しております。

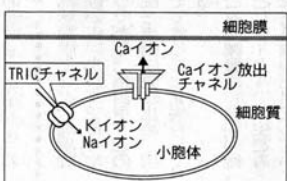
ここで紹介した研究成果は多くの共同研究者の尽力の賜物

です(以下敬称略、現所属)。TRICチャンネル分子同定とノックアウトマウス作製は西 美幸(京大薬)、著者と加藤 量広(東北大病院)が行いました。生化学実験とTRIC欠損心筋解析は矢沢 真幸(東北大国際高等研)とJue Feng(東北大加齢研)、単粒子構造解析は三尾 和弘(産総研)、小椋 俊彦(産総研)と佐藤 主税(産総研)、形態学的解析は駒崎 伸二(埼玉医大)が担当しました。脂質二重膜チャンネル再構成はJanjie Ma (UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School)、矢沢 真幸、Zui Pan (UMDNJ)により、TRIC欠乏骨格筋の解析はChristopher Ferrante (UMDNJ)とPei-Hui Lin (UMDNJ)により遂行されました。論文著者に加えて、研究補助員として長く勤務してくれた亀山 美幸(寿退職)を始め、本国際共同研究に参画・助言いただいた総ての方々に感謝致します。

## 引用文献

- 1) Somlyo, A. V., Shuman, H. & Somlyo, A. P. Composition of sarcoplasmic reticulum in situ by electron probe X-ray microanalysis. *Nature* **268**, 556-558 (1977).
- 2) Jorgensen, A. O., Broderick, R., Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. Two structurally distinct calcium storage sites in rat cardiac sarcoplasmic reticulum: an electron microprobe analysis study. *Circ. Res.* **63**, 1060-1069 (1988)
- 3) Fink, R. H. & Veigel, C. Calcium uptake and release modulated by counter-ion conductances in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **156**, 387-396 (1996).
- 4) Meissner, G. Monovalent ion and calcium ion fluxes in sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.* **55**, 65-82 (1983).

# 細胞「小胞体」にイオン抜け道



**心筋・免疫系  
新薬開発に道**

京大が発見

「小胞体」の存在が指  
摘されていたが、これま  
に無くしたマウスは、  
小胞体の $\text{Ca}^{2+}$ 放出  
の停滞が原因で心筋細  
胞が死に、胎児のまま心  
停止を起こすことも確か  
めた。

竹島教授は「TRIC  
チャンネルをうまく制御で  
きれば、心臓病のほか神  
経や免疫・アレルギー系  
の治療薬開発につながる  
可能性がある」と話して  
いる。

**医療**

ヒトなど動物の細胞の中でカルシウム( $\text{Ca}$ )イオンを貯蔵している小胞体の膜に、カリウム( $\text{K}$ )とナトリウム( $\text{Na}$ )イオンだけを通す「通路」があることを、京都大の竹島浩教授(生化学)らが世界で初めて確認した。 $\text{Ca}^{2+}$ イオンは筋肉の収縮や免疫機能などに密接な関わりがあり、小胞体からの放出が滞ると心筋症など重い病気を引き起こすことがある。通路は $\text{Ca}^{2+}$ イオン放出を助けているため、放出異常の原因が通路にある可能性が浮上。今後、新薬開発などが期待できるといふ。成果は5日、英科学誌「ネイチャー」で発表される。

【奥野敦史】

小胞体は周囲からの刺激で確認されていなかった。竹島教授らは、ウサギの筋肉細胞の小胞体にある未知のたんぱく質を一つずつ調査。陽イオンの持つ陽イオンで、放出される $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ イオンだけを通すの電気的バランスが崩れ、初確認のカウターイオンチャンネルとして「TRICチャンネル」と同時に別の陽イオンを取り込む「カウターイオンTRICチャンネル」を完全



## シグナル伝達をする瞬間の細胞膜ラフトが見えた！ —— BSEやHIV感染、アルツハイマー病発症などの解明に道 ——

楠見 明弘 (AO2計画班)

京都大学大学院再生医科学研究所 科学技術振興機構-ICORP-膜機構プロジェクト

### 発表論文：

Suzuki, K. G. N., Fujiwara, T. K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., & Kusumi, A. GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and Gα for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1. *Journal of Cell Biology*, 177, 717-730, 2007.

Suzuki, K. G. N., Fujiwara, T. K., Edidin, M., & Kusumi, A. Dynamic recruitment of phospholipase Cγ at transiently immobilized GPI-anchored receptor clusters induces IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> signaling: single-molecule tracking study 2. *Journal of Cell Biology*, 177, 731-742, 2007.

### <要旨>

細胞を包んでいる細胞膜上の受容体に、細胞外からやってきたシグナル分子が結合すると、それが細胞内に伝わります。今までは、このようなシグナル変換過程は、受容体などのタンパク質が担うものと考えられてきました。

最近、私たちは、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型受容体において、タンパク質分子だけではなく、受容体分子の周辺の細胞膜構造が局所的に変化して、シグナルが伝わるという事例を、免疫関連の GPI アンカー型受容体 CD59 という受容体で初めて見つけました。細胞膜は液体のような構造を持っていますが、シグナル分子が CD59 に結合すると、CD59 が数個集まって集合体を形成します。すると集合体に、液体の細胞膜の中のコレステロールや糖脂質などが集まり、いわば細胞膜という海の中で、CD59 を中心にしたイカダのような構造 (ラフト) が形成されることがわかりました。さらに、このラフトに多くのシグナルタンパク質が集まってきて、細胞内にシグナルが伝わるということがわかりました。

従来は、ラフトは細胞膜上にいつも存在していると考えられ、その存在を証明するために、世界中の学者が研究していました。私たちの結果は、ラフトは、シグナルがきて初めて、オンデマンド (必要に応じて) で形成されることを示したという点で非常に画期的であり、さらに、細胞内へのシグナル伝達が起こることを初めて証明したという点で、非常に面白いものであると考えています。このような発見が可能になったのは、生細胞中で、複数種のシグナル分子を同時に 1 分子ずつ追跡する技術を開発した研究成果によるものであり、それによって、ラフトが形成され、シグナル分子が集まってくる様子がまさに手に取るように見えてきました。

このような、オンデマンドで形成されるラフトは、牛海綿状脳症 (BSE)、エイズウィルスの感染、アルツハイマー病の発症に関わっていると考えられ、これらの感染や発病過程の解明につながることを期待されます。

### <研究の背景と経緯>

細胞膜上には、ホルモンや成長因子のような細胞外からのシグナル分子を受け取って、細胞内にそのシグナルを伝える受容体分子が存在します。しかし、受容体分子の約 10–20% は、受

容体としては一見、不都合な構造を持っています。たとえば、GPI アンカー型受容体 (glycosylphosphatidylinositol = グリコシル・ホスファチジルイノシトール・アンカー型受容体) と呼ばれる受容体は、細胞膜の外側表面にあり、細胞内に露出しておらず、したがって、この分子だけでは細胞内にシグナルが伝わりません (図 1)。このような受容体が、どのように細胞内にシグナルを伝えるのか、というのはこの 20 年来の大きな疑問でした。

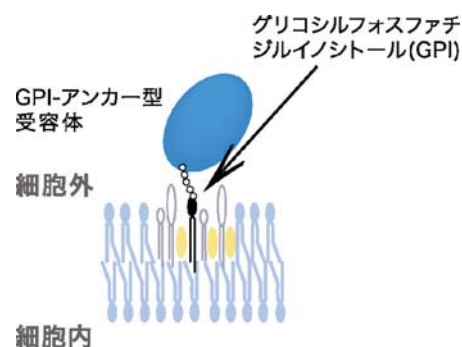


図1 GPI (glycosylphosphatidylinositol = グリコシル・ホスファチジルイノシトール) アンカー型受容体の構造

今までは、細胞膜上に、直径 100～数百 nm 程度の大きさの安定な構造を持つラフトと呼ばれる領域が常に多数存在していて、その構造にいろいろな分子が取り込まれてシグナル伝達が起こるという考えが大勢を占めていました。しかし、そのようなラフトの存在は、多くの研究者の努力にかかわらず実証できませんでした<sup>1)–3)</sup>。

今回の主な発見の一つは、従来の考えは間違っていて、CD59 のような GPI アンカー型タンパク質が細胞外のシグナル分子との結合によってクラスターを作ると、そこに、コレステロールや糖脂質のような特定の脂質が濃縮され、数 nm～数十 nm のラフト構造が誘導されるということです。つまり、シグナルがくると、ラフトは、オンデマンドで形成されるような構造であるということです。

### <研究の内容>

我々は、まず、生きている細胞の細胞膜中で、GPI アンカー型受容体とさまざまなシグナル伝達分子を、複数種同時に 1 分子

追跡する方法を開発しました。これによって、以下のことが、直接に観察できたことで、面白い発見にいたりしました。すなわち、受容体にシグナル分子が結合すると、数個の受容体分子が会合する。そこにコレステロールや糖脂質などの特定の脂質が濃縮されて、直径数nm—数十nmのイカダ(ラフト)構造体を作る。さらにこのラフトに、細胞内のシグナル伝達に関連するタンパク質分子が集まってきて、それらの結合と活性化によって、細胞内のシグナルが誘起される、というものです。具体的には、以下のような研究をおこないました。

(1) GPIアンカー型受容体としては、C8と呼ばれるリガンドに対応するCD59と呼ばれる分子を用いました(図1)。直径40nmの金コロイド粒子、または、直径50nmのポリスチレンビーズなどに抗CD59抗体を結合させ、平均6個のCD59が集まってできる会合体(CD59クラスター)を細胞膜上に作りました(図2)。

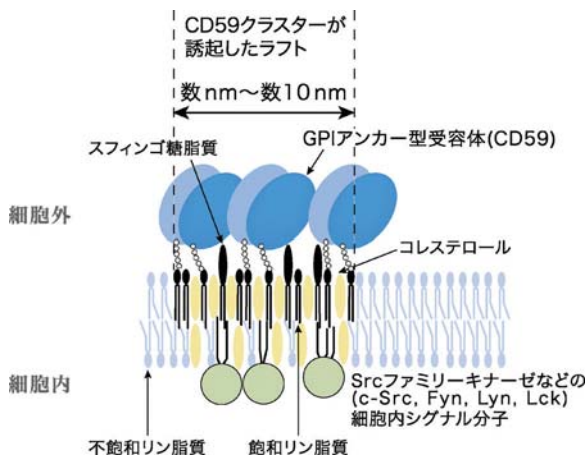


図2 コレステロールなどの集合によりできたラフト構造

(2) CD59クラスターは、クラスター部分の細胞膜に、コレステロールと糖脂質の集積を誘導します。これが、直径、数nm—数十nmのラフトです。周囲の細胞膜は液体状態であるのに対し、ラフトの特徴は、いわば、シャーベット状であることです(正しくは、秩序液晶相と呼ばれる。周辺の海の部分は、単に、液晶相と呼ばれる)。

私たちは、生きている細胞膜中で、複数の分子を1分子ごとに追跡するという技術を開発し、シグナル伝達の仕組みを解明しました。

(3) ビデオレートでの観察によると 刺激前にはCD59は単純拡散運動しか示していませんでしたが、刺激後のCD59クラスターは拡散運動と「STALL (Stimulation-induced Temporary Arrest of Lateral diffusion)」と呼ばれる1回あたり0.5秒程度の一時停止を繰り返していることを観測できました。その原因は、ラフトが形成されたことによって、そこにはシグナル分子であるGaiとLynが集められ、それぞれの分子の活性化が起こることです。Lynが未知のタンパク質Xをリン酸化することによって、STALLが起こったと考えられます(図3)。

一方で、LynがCD59クラスターにリクルートされるための分子間相互作用としてLynのアルキル鎖であるパルミトイル基やミリストイル基とラフトとの相互作用に加えて、Lynのタン

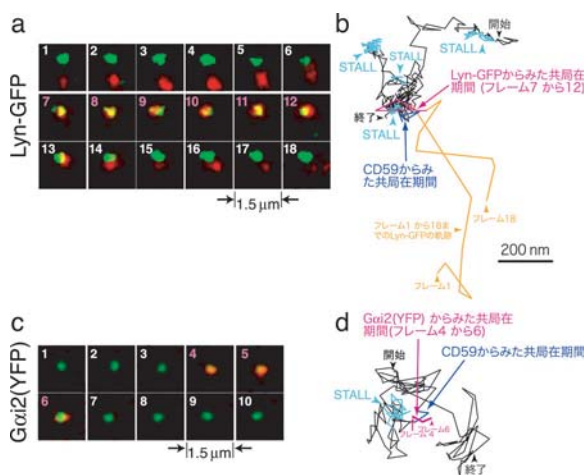


図3 一分子追跡の実験結果。CD59クラスターラフトにLyn(上)とGai(下)がやってくる場所撮影したもの。左の図は、実際のビデオ画像の一部。緑:CD59クラスターラフト。赤:Lyn(上)とGai(下)。右の図は、分子の軌跡。黒:CD59クラスターラフト。青:STALL。オレンジ:Lyn。赤:CD59クラスターラフトに結合した、Lyn(上)とGai(下)

パク質部分とすでにCD59クラスター内にある他のタンパク質との相互作用が重要であることがわかりました。

(4) STALL中のCD59クラスターに、もう一つのシグナル分子であるPLCγが短時間(0.25秒)やってきて、PIP2という分子を加水分解して、IP3とカルシウムのシグナルが引き起こされます。モデル計算によれば、その間に約30個程度のIP3が生成され、細胞内のカルシウムシグナルが発生します。

(5) PLCγやLyn、Gaiなどのタンパク質分子がCD59クラスターラフトに結合している時間は、いずれも0.1~0.25秒ほどの短いものであることが今回の実験でわかりました。一方、それらのシグナルによって引き起こされるIP3シグナルは、細胞内全体で見ると10分程度は継続します。この知見は細胞内シグナルの構成の仕方にも重要な示唆を与えるものです。いまま

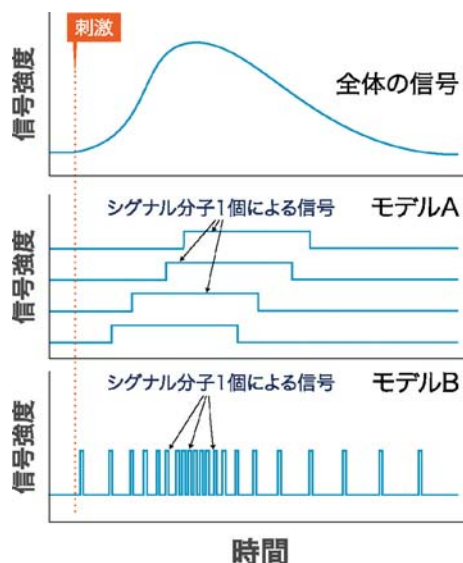


図4 細胞内シグナルの構成の概念図

では、1分子のシグナルの持続時間は細胞全体シグナルの持続時間の1割程度（10分程度に対して1分前後）と考えられてきましたが（図4のモデルA）、本研究によって、1分子レベルでは0.2秒程度しか持続しないことがわかりました。パルス状の短いシグナルをたくさん発症することで、細胞全体のシグナルを組み立てていること（ちょうど、ラジオでいうとAMではなくFMによるシグナル伝送）が分かってきました（図4のモデルB）。

(7) 以上のようなCD59のシグナルプロセスを図5にまとめます。

## ＜今後の展開＞

今後は、上記の未知のタンパク質Xを発見すること、ほかの種類のGPIアンカー型受容体ではXが違うかどうかを解明することが課題です。さらに、GPIアンカー型受容体の会合がラフトを誘導して、シグナル伝達が進むことがわかりましたが、BSEやエイズウィルスの感染、アルツハイマー病の発病でも、細胞膜上でタンパク質の会合が重要であることがわかってきています。このような会合とラフト誘導との関係を理解すること、タンパク質集合の阻害法などの開発が、今後の重要な課題です。

## 引用文献

- 1) Simons, K., Ikonen, E. (1997) *Nature*, 387, 569-572.
- 2) Kusumi, A., Koyama-Honda, I., Suzuki, K. (2004) *Traffic* 5, 213-230.
- 3) Kusumi, A., Suzuki, K. (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* 1746, 243-251.

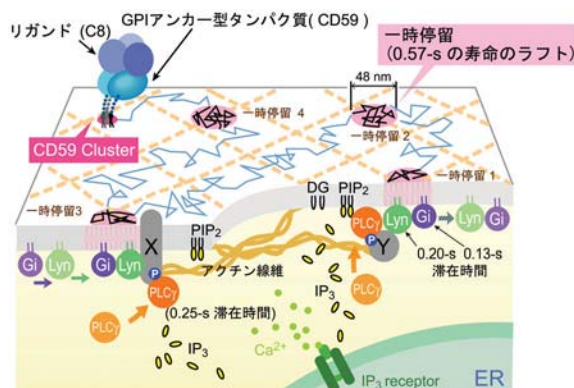
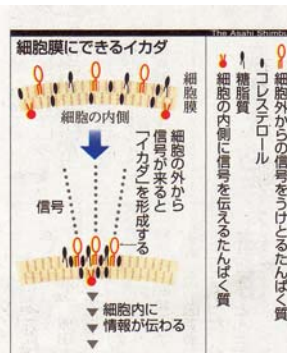


図5 本研究で明らかになったGPIアンカー型タンパク質のシグナル伝達機構



## 京大グループ発見

胞内まで貫通してはいないものがある。これがどうやって外の信号を内側へ伝えているのかよくわかっていなかった。

京都大学再生医科学研究所の鈴鹿一博・特任助教、植見明弘教授らのグループは、ヒトの上皮細胞で複数の種類のたんぱく質一個一個の動きを観察出来る特長を顕る。

送る——ことがわかったとい

植見一博氏は、「IBSやエイズウイルスの感染、アレルギー性疾患の発病などでも、このカギがかかっている」と可能性を語る。

イカダを群を群へ調べれば、発病の仕組みの研究などにも役立つ」と話している。

朝日新聞 平成19年5月28日

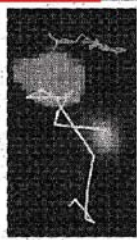
たんぱく質や脂質の「イカダ」

細胞の外から細胞内に情報が伝わるときは、細胞の膜の上にたんぱく質や脂質が集まった「イカダ」のような塊が一時的に作られ、それが橋渡し役となっていることを、京都大学の研究グループが見つけた。牛海綿状脳症(BSE)やエイズの感染の研究などに役立つ可能性があるという。(添田孝史)

観察により、①細胞が外  
部から信号を伝える分子を  
受け取ると、液体状の細胞  
膜という海の中にたんぱく  
質が平均8個集まって、イ  
カダの骨組みを作る②ここ

細胞外から内部にシグナル伝達  
「ラフト」可視化に成功

京都大学生医科学研究所の特任助教授と、細木健一博士防助とが、胸外から細胞内にシグナルを伝達するラフトの可視化に成功した。今までラフトは細胞膜上に常に存在し、さまざまな分子が取り込まれることでシグナルを伝達すると考えられていたが、必要に応じてラフトが形成されることで明らかとなった。エイズウイルス感染やアレルギー



載された。

えることができた。

研究成果は米国科学雑誌「ジャーナル・オブ・セルバイオロジ」に掲載

ていなかった。

生きた細胞の細胞膜中で、受容体とシグナル伝達分子を複数個同時に1分子追跡する手法の開発で、ラフトの動きをより

受容体は細胞膜の外側表面に存在するだけで細胞内に入り込んでいないため、どのようにシグナルを伝達しているか分かつ

細胞膜上にはホルモンのような細胞外からのシグナル分子を受け取り、細胞内に伝える受容体が存在する。しかし、今回

ルツハイマー病発症などへの関連が考えられていたラフトの可視化で、感染や発症過程の解明が期待される。

1

# WNK4 (D561A) ノックインマウスの作成と解析による 偽性低アルドステロン症II型の分子病態解析

楊 松昇、頼 建光、千賀 宗子、蘇原 英誠、佐々木 成、内田 信一 (AO3計画班)

東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科腎臓内科学

## 発表論文：

Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a *Wnk4*<sup>D561A/+</sup> knock-in mouse model. *Cell Metabolism* 5, 331-344, 2007.

Sung-Sen Yang<sup>1</sup>, Tetsuji Morimoto<sup>2</sup>, Tatemitsu Rai<sup>1</sup>, Motoko Chiga<sup>1</sup>, Eisei Sohara<sup>1</sup>, Mayuko Ohno<sup>3</sup>, Keiko Uchida<sup>3</sup>, Shih-Hua Lin<sup>4</sup>, Tetsuo Moriguchi<sup>5</sup>, Hiroshi Shibuya<sup>5</sup>, Yoshiaki Kondo<sup>2</sup>, Sei Sasaki<sup>1</sup>, and Shinichi Uchida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8519, Japan; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Tohoku University, School of Medicine, Japan; <sup>3</sup>Department of Medicine, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawadacho, Shinjuku, Tokyo 162-8666, Japan; <sup>4</sup>Division of Nephrology, Department of Medicine, Tri-Service General Hospital, Taipei 104, Taiwan; and <sup>5</sup>Department of Molecular Cell Biology, Medical Research Institute and School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, and CREST, JST, Chiyoda, Tokyo 101-0062, Japan.

## 1. はじめに

偽性低アルドステロン症II型 (PHAII) は優性遺伝形式をとる高血圧性疾患である。その他、高K血症、アシドーシス、サイアザイド利尿剤感受性などの特徴を有し、臨床的検討から腎臓尿細管でのNaCl再吸収の亢進がその原因とされてきた。同じく腎臓でのNaCl再吸収増加がその原因であったリドル症候群は上皮型ナトリウムチャネルの遺伝子異常が発見されたのに対し、サイアザイド感受性の病気であることからサイアザイド感受性Na-Cl共輸送体 (NCC) の遺伝子異常が検索されたが発見されず、2001年Yale大学のリフトンらのグループが、ポジショナルクローニングでWNK1とWNK4の2つの遺伝子に異常を発見し、責任遺伝子が同定された<sup>1)</sup>。WNKキナーゼは、通常のセリン/スレオニンキナーゼの活性中心に保存されているリジン残基 (K) が保存されていないことより、With No Lysine (K) kinaseと命名された。WNK キナーゼにはWNK1からWNK4まで4種あり、線虫にはそのホモログが存在するものの酵母にはなく、多細胞生物特異的な機能を担っていると推定されていた。当然この上流・下流の分子は明らかでなかった。

WNK1の遺伝子異常はイントロン1の大きな欠損で、この欠損により患者リンパ球を使ったRT-PCRにより、WNK1 mRNA発現が増加するとの報告があり、一方ジーントラップによりWNK1ノックアウトマウスのヘテロマウスは (ホモは致死) 血圧が低いとの報告から、WNK1が発現増加すると高血圧になるという図式が今のところ考えられている。一方、WNK4の変異はすべてミスセンス変異であり、そのうちの3つはコイルドメイン近傍の4アミノ酸に渡るせまい領域中の変異であり、このドメインのWNK4の制御における重要性を物語っていたが、キナーゼドメイン内ではなく、病態との関連は単純に活性の増加ないし減少では説明つくものではなかった。

そこで、アフリカツメガエル卵母細胞や腎臓由来培養細胞 (MDCK cell) にWNKやその標的となりそうな輸送体やチャネルを強制発現させて効果を見る研究が我々を含めて多々報告された<sup>2)-5)</sup>。元々輸送体・チャネル研究者には、輸送体の機能解析において輸送体を過剰発現させても、Vmaxが増えるだけで特性自体は変わらないという認識が根底にはあり、その延

長線上でWNKキナーゼも過剰発現させて、この輸送体もあのチャネルも影響されたという報告が多々なされてしまった。今思えばキナーゼのような蛋白を過剰発現させる事と輸送体自体を過剰発現させることの質的な違いをもっと認識すべきだったように思う。

そこで我々は、このような強制過剰発現系でない生体内において、真の病態は何かを明らかにすべく、ヒトPHAII患者と同じ変異を持つノックインマウスを作成し、病態解析を多角的に行った。

## 2. D561AWN K4ノックインマウスはPHAIIの病態を呈する

表1に示すごとくWNK4ノックインマウスは高血圧、高K血症、アシドーシス、低レニンを呈し、ヒトのPHAIIの病態を再現するモデルマウスの作成が確認された。また、比較的多量のサイアザイド投与でこれらの症状はすべて補正された。

表1

|                                        | wild-type mice | D561A(+/-)WNK4 knock-in mice |
|----------------------------------------|----------------|------------------------------|
| 血圧 (mm Hg)                             | 120/71         | 142/85                       |
| K <sup>+</sup> (mmol/l)                | 4.0±0.3        | 4.9±0.5                      |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/l) | 23.6±1.4       | 19.9±1.5                     |
| レニン活性 (ng/ml/hr)                       | 17.4±7.4       | 5.2±2.3                      |

## 3. WNK4ノックインマウスでは遠位尿細管での管腔側膜へのNCCの発現が増加していた

はじめに、この病気がサイアザイド感受性であることから、NCCの検討を行った。NCC蛋白発現はノックインマウスで有意に増加しており、免疫染色でも管腔側膜の染色性が強いように見え (図1上段)、イムノゴールドラベリングで細胞膜上のNCCの増加が確認された。

#### 4. NCCのリン酸化も著明にノックインマウスでは増加していた。

WNKキナーゼと結合しリン酸化する蛋白としてOSR1/SPAKというSTE20-related kinaseが同定されていた。一方、OSR1/SPAKはやはりin vitroでNCCやNKCC1, NKCC2と言った輸送体のN末の細胞内ドメインに結合し、リン酸化しうることが示されていた。しかしながらWNK4-OSR1/SPAK-NCCと一連のシグナル伝達系は細胞培養系でも証明されていなかった。我々は先ずNCCのOSR1/SPAKによるリン酸化サイトに対するリン酸化NCCを検出できる抗体を数種作成し、これを用いて、ウェスタンと免疫蛍光染色を行った。その結果、トータルのNCCに対する抗体を使用したときよりさらに野生型とヘテロのノックインマウスでのシグナルの差が明瞭で(図1中段・下段)、ノックインマウスではNCCが著明にリン酸化されていることが判明した。当然、その上流のOSR1/SPAKのリン酸化も検討したところ、ノックインマウスではともにリン酸化が増加していた。

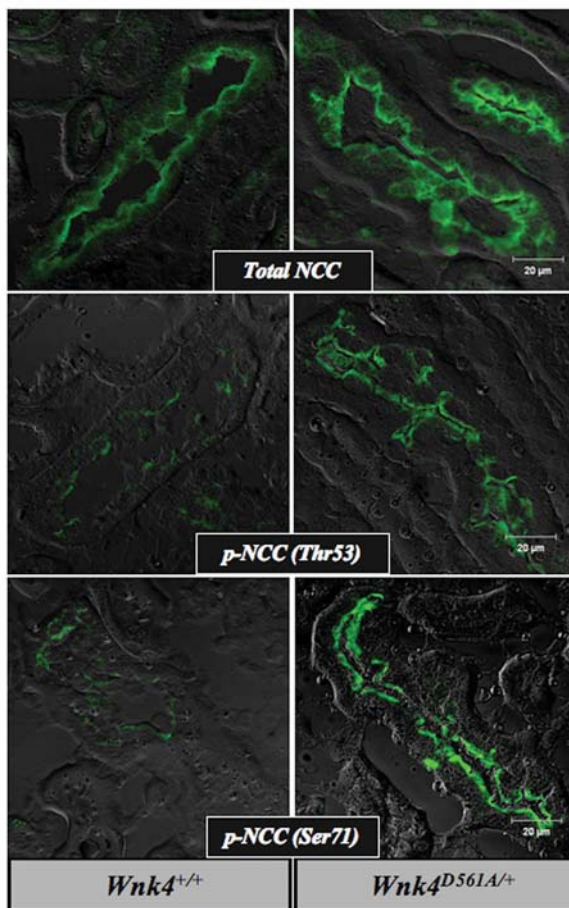


図1 遠位尿細管におけるNCC(上段)とリン酸化NCC(中段, pThr53を認識する抗体; 下段, pSer71を認識する抗体)の免疫蛍光染色。Total NCCもノックインマウスで増加しているが、リン酸化NCCのシグナルは正常マウスでは少ないが、ノックインマウスでは著明に増強している。またリン酸化NCC染色は細胞内には少なく、ほぼ管腔側膜に限局しており、リン酸化がNCCの細胞内輸送に関与することを示している。

#### 5. NCC以外の輸送体・チャネルの関与

NCC以外に高K血症の原因としてROMKチャネルの抑制を、NaCl再吸収の増加の原因として上皮型Naチャネル(ENaC)の活性化を言う研究者もあったが、このモデルではROMKの

抑制は見られず、ENaCの活性化はみられたもののサイアザイドで病態を補正すると消失し(NCCの活性化はサイアザイド投与にても補正されない)、おそらく高Kによる2次性的変化と考えられた。

#### 6. まとめ

WNKと共発現させればどんな輸送体でも制御されるかのように報告され、PHAIIの生体内での病態についての理解に混乱が生じていたが、このノックインマウスの作成によって、変異WNK4によるOSR1/SPAK-NCCリン酸化カスケードの活性化が唯一の原因と判明した。図3にあるごとく、活性化したNCCによる遠位尿細管でのNaCl再吸収亢進が、下流でのENaCの機能低下(チャネル自体は増えているが輸送すべきNaが上流から流れてこない)をもたらし、それがROMKを介したK分泌低下をまねき、高K血症を引き起こす。この際、Kチャネル自体は数としても減っておらず(MaxiKチャネルはむしろ代償的に増加)、機能も低下していないことを、クリアランス検査と尿細管かん流実験で証明した。

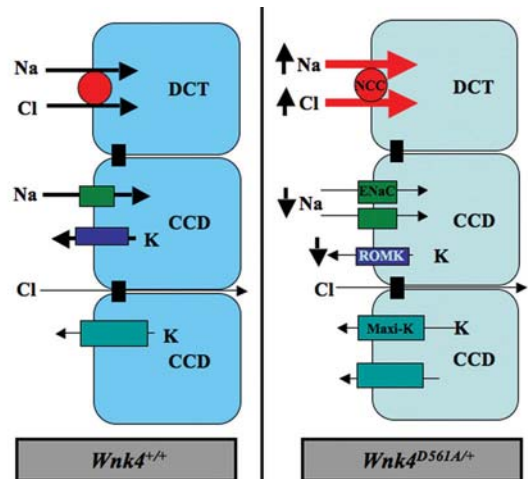


図2 本研究によって明らかにされた遠位部尿細管での電解質輸送。

#### 7. 今後の展望

PHAIIのNCC近傍の分子機序は解明できた。しかしながら、変異WNK4は直接OSR1/SPAKを活性化するのか、または野生型WNK4は別のOSR1/SPAKの活性化因子を通常は抑制し変異が入ることでその抑制がとれるのか、については未だ明らかでない。WNK4ノックアウトマウス作成でその回答を得ることができると思われる。また、ミスセンス変異はコイルドメイン近傍に集中しているため、その部位に結合する蛋白の同定も重要な課題である。さらにWNKキナーゼ自体もしくはそのさらに上流の分子が、細胞内外のNaClをセンスする能力があり、遠位尿細管中のNaCl到達量に応じてlocallに再吸収量を制御している可能性もあり、NaClセンサーとしてのWNKキナーゼの可能性についても今後研究を深める必要がある。

#### 8. おわりに

輸送体制御の新たなシグナル伝達系を病態モデルマウスの作成により明らかにすることができた。このシグナル伝達系は正常マウスを高塩、低塩食で飼育したときにも著明な制御を受



## 正常眼圧緑内障の発症における グルタミン酸トランスポーターの役割

原田 高幸、原田 知加子、柯 漢明、田中 光一 (AO3公募班)

東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所

### 発表論文：

Harada, T., Harada, C., Nakamura, K., Quah, H-M, Okumura, A., Namekata, K., Saeki, T., Aihara, M., Yoshida, H., Mitani, A. & Tanaka, K. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin. Invest.* in press.

### 1. はじめに

緑内障は「眼の成人病」といわれ、40歳以上の日本人における有病率は5.78%であり、中途失明原因の第1位となっている。これまで緑内障の病態は高眼圧による網膜神経節細胞の細胞死と考えられてきた。しかし、特に日本において眼圧が正常範囲を超えることのない正常眼圧緑内障の患者数が緑内障患者数の2/3を占めていることが明らかになった。さらに、高眼圧緑内障においても眼圧下降治療だけでは失明予防に限界がある。従って、眼圧以外の緑内障の危険因子を同定することが、緑内障の新規治療法の開発には必要である<sup>1)</sup>。緑内障とグルタミン酸興奮毒性との関係は、緑内障患者及び高眼圧緑内障モデル動物における硝子体グルタミン酸濃度の上昇、網膜神経節細胞のグルタミン酸興奮毒性に対する脆弱性などから示唆されてきた。しかし、この分野をリードしてきた米国の研究者がデータを捏造していたことが発覚し、その信憑性に疑問が持たれていた<sup>2)</sup>。その後多くの論文が発表されているが、グルタミン酸と緑内障の病態を直接的に証明するデータはない。さらに多くの研究は、高眼圧緑内障とグルタミン酸興奮毒性との関連を調べており、正常眼圧緑内障とグルタミン酸興奮毒性を関連づける研究はない。グルタミン酸トランスポーターは、細胞外グルタミン酸濃度を制御する分子であり、その機能異常は興奮毒性をもたらすと考えられる。網膜神経節細胞周囲に存在するグルタミン酸トランスポーターは、ミュラー細胞に発現するGLAST、双極細胞軸索終末にあるGLT1、網膜神経節細胞に存在するEAAC1の3種類である<sup>3)</sup>。筆者らは欠損マウスを用い、これら3種類のグルタミン酸トランスポーターの網膜神経節細胞変性における病態生理学的役割を解析した。

### 2. GLAST, EAAC1欠損マウスで見られる網膜神経節細胞・視神経の変性

GLAST, EAAC1欠損マウスの網膜は、正常に形成された(図1A)。しかし、8ヶ月齢のGLAST欠損マウスの網膜は変性しており、網膜神経節細胞層にある細胞数は減少していた。マウスの網膜神経節細胞層にある細胞の半分は、異所性アマクリン細胞なので、減少した細胞が神経節細胞であるかどうか、蛍光色素を上丘に注入し神経節細胞を逆行性にラベルし解析した。蛍光色素でラベルされた網膜神経節細胞の数は、8ヶ月齢GLAST欠損マウスで顕著に減少していた(GLAST欠損マウス: 2022±48, n=18, 野生型マウス: 4011±106, n=18, 図1B)。網膜神経節細胞層にある細胞数の減少の程度(49±2%; n=6)は、逆行性ラベルされた網膜神経節細胞の減少の程度

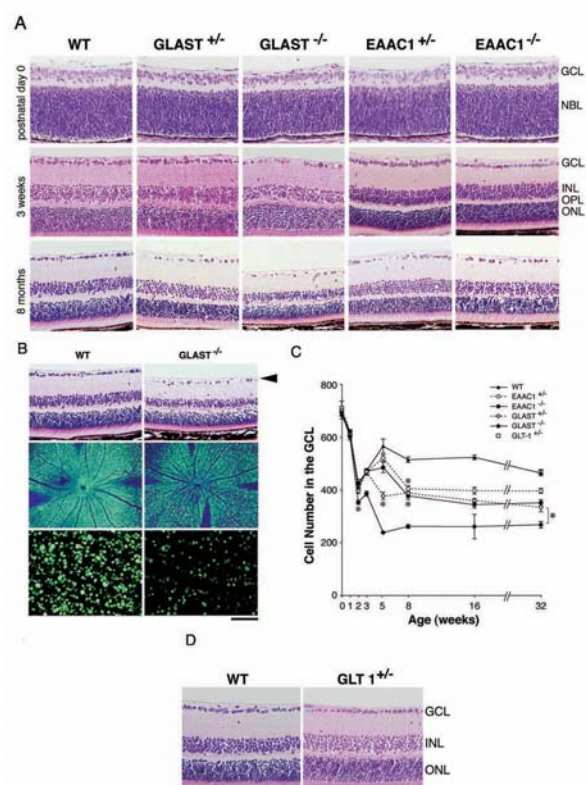


図1 GLAST, EAAC1欠損マウスで観察される網膜の変性

- A 野生型(WT)、GLASTヘテロ(GLAST<sup>+/-</sup>)、GLAST欠損(GLAST<sup>-/-</sup>)、EAAC1ヘテロ(EAAC1<sup>+/-</sup>)、EAAC1欠損(EAAC1<sup>-/-</sup>)マウス網膜のヘマトキシリン-エオジン(HE)染色  
GCL, ganglion cell layer; NBL, neuroblast layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer.
- B GLAST欠損マウスにおける網膜神経節細胞の変性  
上段:8ヶ月齢の野生型及びGLAST欠損マウス網膜のHE染色 矢頭はGCLを表す。中段:8ヶ月齢の野生型及びGLAST欠損マウスの逆行性にラベルされた網膜神経節細胞、下段:中段を拡大した図
- C グルタミン酸トランスポーター欠損マウス及び野生型マウスの網膜神経節細胞層にある細胞数の加齢による変化 \*P<0.01
- D 8ヶ月齢の野生型及びGLT1ヘテロマウス(GLT1<sup>+/-</sup>)網膜のHE染色

(50±1%; n=18)と同じなので、以下の解析では網膜神経節細胞層にある細胞数の数を測定した。2週齢のGLAST欠損マウス(GLAST<sup>-/-</sup>)、5週齢のGLASTヘテロマウス(GLAST<sup>+/-</sup>)、8週齢のEAAC1欠損(EAAC1<sup>-/-</sup>)及びヘテロマウス(EAAC1<sup>+/-</sup>)では、有意な細胞数の減少が観察された(図1A, C)。

GLT1欠損マウスは、3週齢でほとんどのマウスがてんかん発作で死亡するため、3週齢以上のマウスの網膜を解析することはできなかった<sup>4)</sup>。しかし、3週齢までのGLT1欠損マウス及び8ヶ月齢のGLT1ヘテロマウス (GLT1<sup>+/-</sup>) の網膜は正常で、網膜神経節細胞層にある細胞の減少は見られなかった (図1C, D)。GLAST欠損マウスの網膜では、緑内障の特徴的所見である視神経乳頭陥凹の拡大が観察されるが (図2A)、隅角は開いており線維柱帯やシュレム管の形成は正常であった (図2B)。EAAC1欠損マウスも同様な所見が観察された。このような所見は原発開放隅角緑内障と似ているので、トノペンを用いて眼圧を測定した。EAAC1<sup>+/-</sup>、EAAC1<sup>-/-</sup>、GLAST<sup>+/-</sup>、GLAST<sup>-/-</sup>マウスの眼圧は、野生型マウスと差がなく、正常眼圧であった (図2C)。小動物の眼圧測定法としてより信頼性のあるmicroneedle法を用いて眼圧を測定したが<sup>5)</sup>、同様の結果であった。EAAC1<sup>+/-</sup>、EAAC1<sup>-/-</sup>、GLAST<sup>+/-</sup>、GLAST<sup>-/-</sup>マウスは、眼圧は正常であるにも関わらず、網膜神経節細胞が加齢に伴い変性し、視神経乳頭陥凹の拡大が観察された。これらの表現型は、ヒト正常眼圧緑内障の病態に似ており、世界で初めての正常眼圧緑内障のモデル動物である。

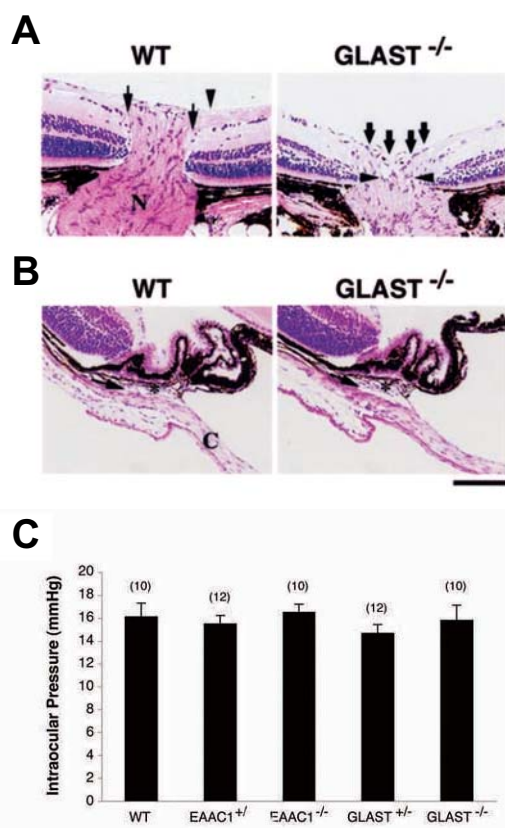


図2 GLAST欠損マウスの緑内障様視神経変性と眼圧

- A 8ヶ月齢GLAST欠損マウスで観察される視神経乳頭陥凹の拡大  
野生型(WT)では、網膜神経節細胞の神経線維 (矢印) は内限界膜 (矢頭) の下にあり、視神経(N)に入っている。GLAST欠損マウスでは、神経線維層がほとんど消失しており、陥凹が拡大している (矢頭)。  
B 8ヶ月齢GLAST欠損マウスの隅角の構造  
GLAST欠損マウスにおける隅角 (角膜(C)と虹彩の合わる部分) は開いており、シュレム管 (矢印)・線維柱帯(\*)の形成も正常である。  
C グルタミン酸トランスポーター欠損マウスの眼圧  
括弧内の数字は例数を表す。

### 3. GLAST欠損マウスの網膜神経節細胞変性におけるグルタミン酸興奮毒性の役割

これらモデル動物の網膜神経節細胞変性におけるグルタミン酸興奮毒性の関与を調べるため、硝子体内のグルタミン酸濃度を測定した。しかし、モデル動物の硝子体におけるグルタミン酸濃度は、増加していなかった (図3)。硝子体の体積を考えると、硝子体のグルタミン酸濃度は網膜のグルタミン酸濃度を正確には反映していない。マイクロダイアリシス法を用いればより正確に網膜のグルタミン酸濃度を測定できるが、マウス眼球にマイクロダイアリシス法を適応することは手技的に困難である。そこで筆者らは、グルタミン酸受容体阻害剤をGLAST欠損マウスに投与し、その保護効果を解析した。GLAST欠損マウスを用いた理由は、GLASTが網膜全体におけるグルタミン酸取り込み活性の大部分を担っているからである<sup>6)</sup>。グルタミン酸受容体の阻害剤であるメマンチンを、GLAST欠損マウスに生後7日から13日まで投与すると、網膜神経節細胞の変性は抑制された (図4)。この結果は、GLAST欠損マウスにおける網膜神経節細胞の変性にはグルタミン酸興奮毒性が関与していることを示している。

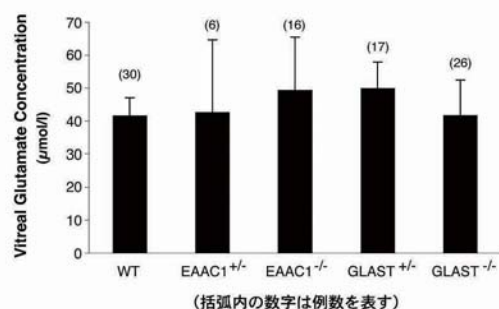


図3 グルタミン酸トランスポーター欠損マウスの硝子体内グルタミン酸濃度

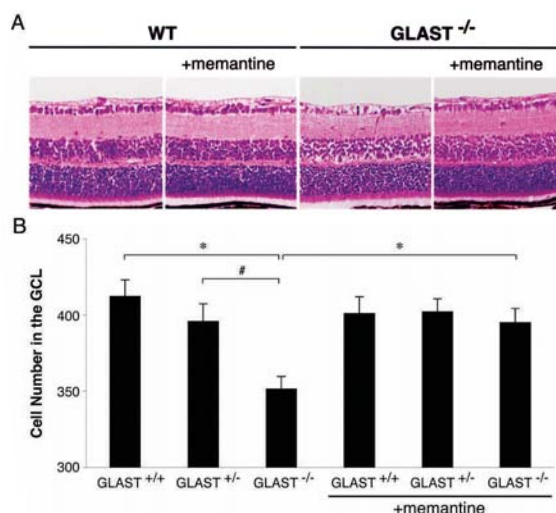


図4 グルタミン酸受容体阻害剤はGLAST欠損マウスで観察される網膜神経節細胞

- A NMDA受容体の阻害剤であるmemantine (10mg/kg) を生後7-13日にかけて腹腔内投与すると、GLAST欠損マウスの網膜神経節細胞の変性は抑制された。  
B memantine投与により、生後14日齢GLAST欠損マウスにおける網膜神経節細胞層にある細胞数の減少は抑制された。  
グラフは6例の平均を表す。#P<0.05, \*P<0.005

#### 4. GLAST欠損マウスの網膜神経節細胞変性における酸化ストレスの役割

フリーラジカルは、眼圧以外の緑内障の危険因子として考えられている。さらに、グルタミン酸トランスポーターは細胞外グルタミン酸濃度の制御だけでなく、抗酸化物質であるグルタチオンの合成にも関与することが示唆されているので、モデル動物の網膜神経節細胞変性における酸化ストレスの関与を調べた。まず、モデル動物網膜における過酸化脂質の量を測定した。GLAST欠損マウス、EAAC1欠損マウスとも過酸化脂質は増加しており、酸化ストレスの亢進が示唆された(図5A)。網膜における主要な抗酸化物質であるグルタチオン(グルタミン酸、グリシン、システインからなるトリペプチド)は、主にミュラー細胞に存在し(図5B)、グルタミン酸トランスポーターにより合成が制御されていることが示唆されている<sup>7)</sup>。従って、GLAST欠損マウスにおける酸化ストレス亢進は、ミュラー細胞のグルタチオン合成の減少による可能性が考えられる。そこで、グルタチオンの量を測定したところ、網膜全体及びミュラー細胞におけるグルタチオンの量は、GLAST欠損マウスで減少していた(図5C)。次に、ミュラー細胞におけるグルタチオンの減少が網膜神経節細胞の酸化ストレスに対する感受性を亢進させるかどうか解析した。GLAST欠損マウスのミュラー細胞と共培養した網膜神経節細胞(野生型マウスから調整)は、野生型マウスのミュラー細胞と共培養した場合より、過酸化水素による細胞死が促進された(図6A)。この結果は、GLAST欠損マウスにおける網膜神経節細胞の変性には、グルタミン酸の興奮毒性の他に、グルタチオンの減少による酸化ストレスの亢進が関与していることを示している。

#### 5. EAAC1欠損マウスの網膜神経節細胞変性における酸化ストレスの役割

EAAC1欠損マウスにおける網膜神経節細胞の変性メカニズムを解析した。網膜神経節細胞に存在するEAAC1はミュラー細胞にあるGLASTに比べ、細胞外グルタミン酸濃度の制御には大きな役割を果たしていない<sup>6), 8)</sup>。その理由は、神経細胞とグリア細胞の細胞内グルタミン酸濃度の違いによる。ミュラー細胞内に取り込まれたグルタミン酸は、グルタミン合成酵素によりグルタミンに変換され、ミュラー細胞内のグルタミン酸濃度は低く保たれるが、神経細胞にはグルタミン合成酵素が存在せず、神経細胞内のグルタミン酸濃度は高く保たれている。それでは、EAAC1の欠損はどのような機序で網膜神経節細胞死をもたらすのか? 最近になり、EAAC1はGLASTに比べ、グルタミン酸の他にシステインを効率的に細胞内に輸送することが示された<sup>9)</sup>。システインはグルタチオンの構成材料であり、システインの輸送は神経細胞におけるグルタチオン合成の律速段階である。従って、EAAC1の欠損によりシステインの取り込みが減少し、網膜神経節細胞内のグルタチオンの合成が減少し、神経節細胞が酸化ストレスにより変性していくと考えた。そこで、EAAC1欠損マウスの網膜におけるグルタチオンの量を調べたが、野生型と差はなかった(図5C)。網膜にあるグルタチオンの大部分はミュラー細胞に存在しているので、網膜全体のグルタチオンを測定したのでは差が検出できない可能性がある。そこで網膜神経節細胞のみのグルタチオン含

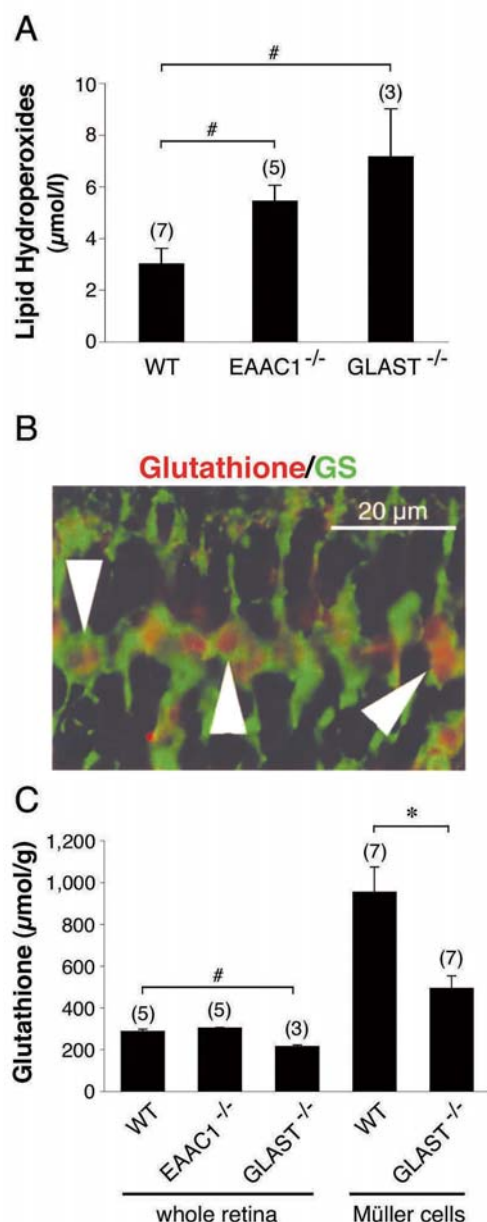


図5 グルタミン酸トランスポーター欠損マウスの網膜神経節細胞変性における酸化ストレスの関与

- A 野生型、EAAC1欠損、GLAST欠損マウス網膜における過酸化脂質の定量 括弧内は例数を示す。#P<0.05  
 B グルタチオンとグルタミン合成酵素(GS)の2重免疫染色 グルタチオンはGSを発現しているミュラー細胞に発現している(矢頭)。  
 C 野生型、EAAC1欠損、GLAST欠損マウス網膜全体(whole retina)のグルタチオン量及び野生型、GLAST欠損マウスミュラー細胞内(Müller cell)のグルタチオン量 括弧内は例数を表す。#P<0.05, \*P<0.005

量を測定したが、量が少なく測定に用いた方法の検出限界以下であった。そのかわり、EAAC1のフリーラジカルに対する神経保護作用を調べた。EAAC1欠損マウスの網膜神経節細胞は、野生型マウスの網膜神経節細胞に比べ、過酸化水素に対する感受性が増加していた(図6B)。この結果は、EAAC1には網膜神経節細胞をフリーラジカルから保護する作用があることを示している(システインを細胞内に輸送し、グルタチオンの合成を

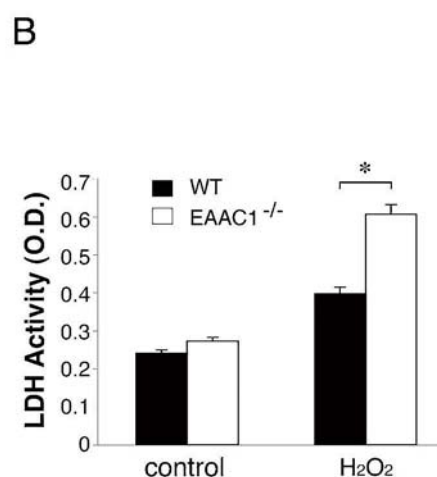
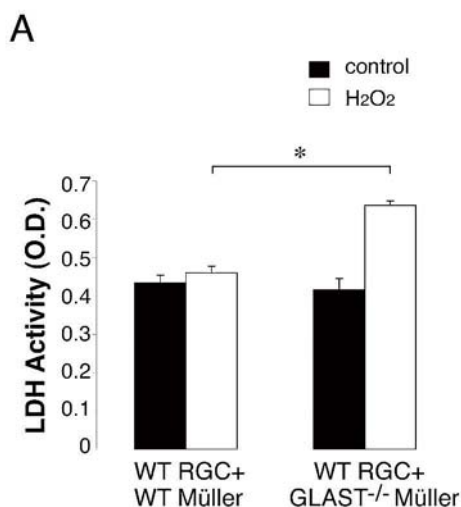


図6 グルタミン酸トランスポーターによる酸化ストレス感受性の制御  
 A 野生型の網膜神経節細胞 (WT RGC) を野生型マウスのミュラー細胞 (WT Müller) あるいはGLAST欠損マウスのミュラー細胞 (GLAST<sup>-/-</sup> Müller) と共培養して、過酸化水素に対する感受性を調べた。RGCの細胞死は、メディアム中のLDHの量を指標にした。  
 \*P<0.01  
 B 野生型、EAAC1欠損マウスから調整した網膜神経節細胞の過酸化水素に対する感受性 \*P<0.01

維持することにより、神経細胞をフリーラジカルから保護していると考えられる)。

## 6. 今後の展望

今回の研究結果は、GLASTあるいはEAAC1欠損マウスが世界で初めての正常眼圧緑内障のモデル動物であり、正常眼圧緑内障の病態解明および治療法の開発に有用であることを示している。また、GLAST、EAAC1の機能異常がヒト正常眼圧緑内障の病因に成り得ることを示している。実際に、ヒト緑内障症例においてGLASTが減少していることが示されている<sup>10)</sup>。さらに最近、アルツハイマー病患者 (GLASTの発現が減少している) において原発開放隅角緑内障が高率に発症していることが報告された<sup>11)、12)</sup>。また、GLAST欠損マウスは、網膜神経節細胞の新規保護因子の解明にも役立つと考えられる。GLAST欠損マウスを作成した当初は(マ

ウス)の遺伝的背景が129sv系統とC57BL/6J系統の混在した状態)、本論文でのべたような網膜神経節細胞の変性は観察されなかった<sup>13)</sup>。しかし、GLAST欠損マウスをC57BL/6J系統に戻し交配する過程で(8世代以上の戻し交配が必要)、網膜神経節細胞の変性が観察されるようになった。このことは、129sv系統には系統特異的な網膜神経節細胞保護遺伝子があることを示しており、今後その遺伝子の検索を行う予定である。

さらに、過剰なグルタミン酸による神経細胞死は、脳虚血、脳外傷、てんかんなどの急性神経疾患のみならず、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、エイズ脳症などの慢性神経疾患でみられる神経細胞死にも関与することが知られている<sup>14)</sup>。本モデル動物を用いて開発される新規神経保護薬は、これらの神経疾患の新規治療薬としても期待される。

## 7. 終わりに

最近、グルタミン酸トランスポーターGLT1とGLASTの欠損は、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させ、胎児期の大脳皮質・海馬・扁桃体・小脳に形成異常をもたらすことを見つけた<sup>15)</sup>。さらに、GLT1<sup>(+/-)</sup> & GLAST<sup>(+/-)</sup> マウスは、自閉症に似た行動異常・脳の形態異常を示すことを発見した。しかも、自閉症患者と同様に雄に行動異常を示す頻度が高かった(♂:♀=5:1)。GLT1、GLASTが脳の発達に重要であり、自閉症は脳の発達障害であることを考慮すると、このマウスは、現存する自閉症のモデル動物の中で、ほぼ完璧に近い病態モデル動物であると考えられる。最近、ヒト自閉症症例において、疾患感受性遺伝子の候補としてGLT1が報告された。このように、グルタミン酸トランスポーターの機能異常は、神経疾患のみならず精神疾患の発症にも関与する可能性があり、今後はグルタミン酸トランスポーターを突破口にし、精神疾患の病態解明、新しい診断法・治療法の開発を目指し研究を行っていく予定である。

## 引用文献

- 1) Weinreb, R. N. *et al.* (2004) *Lancet* 363, 1711-1720.
- 2) Dalton, R. (2001) *Nature* 411, 129-130.
- 3) Rauen, T. (2000) *Amino Acids* 19, 53-62.
- 4) Tanaka, K. *et al.* (1997) *Science* 276, 1699-1702.
- 5) Aihara, M. *et al.* (2002) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 146-150.
- 6) Sarthy, V.P. *et al.* (2005) *Glia* 49, 184-196.
- 7) Huster, D. *et al.* (2000) *Neurochem. Int.* 36, 461-469.
- 8) Peghini, P. *et al.* (1997) *EMBO J.* 16, 3822-3832.
- 9) Aoyama, K. *et al.* (2006) *Nat. Neurosci.* 9, 119-126.
- 10) Gherghel, D. *et al.* (2005) *Vis. Sci.* 46, 877-883.
- 11) Tamura, H. *et al.* (2003) *J. Neurol. Sci.* 246, 79-83.
- 12) Zoia, C. P. *et al.* (2005) *Neurobiol. Aging* 26, 825-832.
- 13) Harada, T. *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 4663-4666.
- 14) Tanaka, K. (2005) *Trends Mol. Med.* 11, 259-262.
- 15) Matsugami, R.T. *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 12161-12166.

## 膵β細胞ATP感受性K<sup>+</sup>チャネルの機能障害マウスにおける膵β細胞死とその再生

尾山 和信<sup>1,2</sup>、南 幸太郎<sup>2</sup>、三木 隆司<sup>1</sup> (A03公募班)、清野 進<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学、<sup>2</sup>京都大学医学部附属病院探索医療センター

### 発表論文：

Oyama K, Minami K, Ishizaki K, Fuse M, Miki T, Seino S. Spontaneous recovery from hyperglycemia by regeneration of pancreatic beta-cells in Kir6.2G132S transgenic mice. *Diabetes* 55, 1930-1938, 2006.

### 1. はじめに

膵β細胞は血中グルコース濃度（血糖値）に応じてインスリン分泌を引き起こすことにより、グルコース恒常性の維持に極めて重要な役割を果たしている。膵β細胞は、様々な刺激に対して複雑な細胞内シグナルを引き起こし、インスリン分泌を制御している。このシグナルの破綻はインスリン分泌制御の異常をきたし、低血糖症や糖尿病といった糖代謝疾患を引き起こす。また膵β細胞の質的な異常に加え、膵β細胞の量の減少も糖尿病の発症させる重要な因子である。膵β細胞の量は、現存する膵β細胞の分裂、あるいは前駆細胞からの新生によって一定に保たれており、これらのメカニズムを解明することは糖尿病の発症機序を明らかにする上で重要である。膵β細胞の新生現象はいくつかの動物モデルで観察されるものの、顕性の糖尿病が発症した後に血糖値が正常レベルまで回復する動物モデルはこれまで報告されていない。

ATP感受性K<sup>+</sup>チャネル (K<sub>ATP</sub>チャネル) は細胞の代謝状態を感知する代謝センサーであり、細胞膜電位を制御することで様々な細胞機能の制御に関与している<sup>1)</sup>。膵β細胞では、K<sub>ATP</sub>チャネルはグルコースによるインスリン分泌に必須の役割を果たす分子である。筆者らは、既にK<sub>ATP</sub>チャネルのポアサブユニットであるKir6.2のドミナントネガティブ変異体であるKir6.2G132Sを膵β細胞に過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製した<sup>2)</sup>。Tgマウスは、出生直後にはインスリン分泌制御異常による低血糖症を示すものの、生後4-6週齢より、膵β細胞のアポトーシスに伴って膵β細胞数が減少し、顕性の糖尿病を発症する。

Tgマウスの解析を進める過程で、筆者らは加齢したTgマウスの血糖が著明に改善していることに気がついた。さらに血清インスリン値も増加していることから、Tgマウスでは加齢とともに膵β細胞が再生しているのではないかと考えた。本研究では、加齢したTgマウスでは血清インスリン値と膵臓のインスリン含量が増加していることを明らかにした。25週齢以上のTgマウスでは膵β細胞の再生が確認され、これらの細胞は発生中の膵臓の導管細胞のマーカーであるレクチンであるDBA (Dolichos biflorus agglutinin) でラベルされることが判明した。これらの結果から、このTgマウスは膵β細胞の再生を研究する上で有用なツールであると考えられた。

### 2. 加齢によるTgマウスの血糖と血清インスリン値の変化

Tgマウスの血糖は既に報告したとおり、4-6週齢で極めて高値を示すようになる(Tgマウス; 22.4 ± 0.7 mmol/l、野生型マ

ウス; 8.1 ± 0.3 mmol/l)。本研究ではTgマウスの随時血糖は加齢とともに次第に低下し、50週齢では野生型マウスと変わらないレベルまで低下(Tgマウス; 10.3 ± 0.8 mmol/l、野生型マウス; 9.1 ± 0.8 mmol/l) することが明らかになった(図1A)。一方、4-6週齢のTgマウスの血清インスリン値は野生型マウスと比較し極めて低値であったが、加齢とともに増加し、50週齢ではほぼ野生型の値と同程度にまで改善した(図1B)。

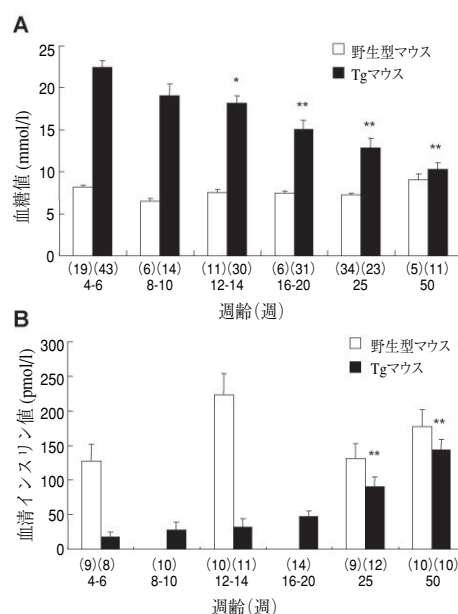


図1 Tgマウスの血糖値および血清インスリン値の改善  
野生型マウス(□)とTgマウス(■)の自由摂食時の血糖値(A)および血清インスリン値(B)を示す。週齢とともにTgマウスの血糖値は低下し、血清インスリン値は増加した。\*P < 0.05, \*\* P < 0.01(Tgマウスの4週齢時の値と比較)括弧内の数字はサンプル数)

### 3. Tgマウスの耐糖能とインスリン分泌

筆者らは既に膵β細胞のK<sub>ATP</sub>チャネル活性が著明に低下しているため、Tgマウスはグルコースに対するインスリン分泌がほとんど消失していることと、8週齢では著明な耐糖能障害を示すことを報告した<sup>2)</sup>。今回の研究では、耐糖能を調べる目的で若齢(4-6週齢)と高週齢(40-60週齢)のTgマウスに経口糖負荷試験を行った(図2A)。若齢Tgマウスも高齢Tgマウスも糖負荷前の血糖値は、以前の報告よりも低値を示し野生型とほぼ同じであったものの、若齢Tgマウスではやはり明らかな耐糖

能障害が認められた。しかしながら、随時血糖が正常化している高週齢Tgマウスにおいても、若齢Tgマウスとほぼ同程度の耐糖能障害が認められた。しかも、若齢Tgマウスと高週齢Tgマウスはいずれにおいても経口糖負荷によるインスリン分泌応答は認められなかった(図2B)。単離膵島のmRNAを用いたRT-PCRでも、若齢Tgマウスと高週齢Tgマウスの両者で変異Kir6.2の転写産物が確認された。これらの結果から、高週齢Tgマウスの血糖の改善は導入した変異Kir6.2の発現が失われたためではないことが明らかになった。

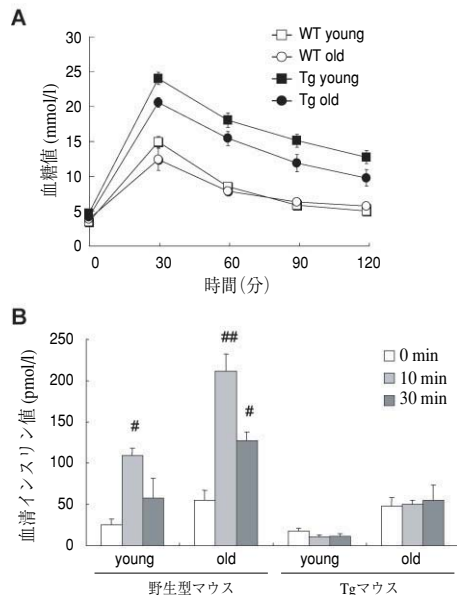


図2 Tgマウスの耐糖能とインスリン分泌応答 (A, B) 低週齢(4-6週)と高週齢(40-60週)の野生型マウスとTgマウスの経口糖負荷試験時の血糖値(A)および血清インスリン値(B)を示す。高週齢のTgマウス(■)では自由摂食時の血糖値は改善していたものの、経口糖負荷試験における耐糖能は改善が見られなかった(A)。さらに高週齢のTgマウス(■)では負荷前の血清インスリン基礎値が上昇していたものの、グルコースに対するインスリン分泌応答は認められなかった(B)。

#### 4. Tgマウスの膵インスリン含量の変化

筆者らは次にTgマウスで見られた血清インスリン値の改善が、膵臓のインスリン含量の増加に伴ったものかどうかを検討した。4週齢のTgマウスの膵インスリン含量は野生型マウスに比較し著明に低下していた(Tgマウス;  $60.6 \pm 19.3$  pmol/pancreas、野生型マウス;  $8.1 \pm 0.3$  mmol/l) (図3)。しかしながら血清インスリン値の改善に伴い、Tgマウスの膵インスリン含量は徐々に増加し、50週齢ではほぼ野生型の値と同程度にまで改善した(Tgマウス;  $2054 \pm 109$  pmol/pancreas、野生型マウス;  $2233 \pm 73$  mmol/l)。これらの結果から、Tgマウスの血清インスリン値の改善は膵臓におけるインスリン産生の増加によるものであると考えられた。

#### 5. Tgマウスの膵臓の形態学的な変化

高週齢Tgマウスの膵臓におけるインスリン産生の増加は、膵β細胞数の増加によるものと考えられた。Tgマウスから単離された膵島は、野生型マウスの膵島と比較し、幾分透明であった。膵切片のヘマトキシリン・エオジン染色では、4週齢のTg

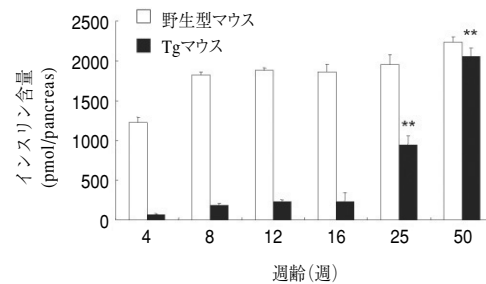


図3 Tgマウスの膵インスリン含量の改善 野生型マウスとTgマウスの膵臓に含まれるインスリンの含有量を示す。Tgマウス(■)では週齢とともに膵インスリン含量は増加した。\*P < 0.05, \*\* P < 0.01 (Tgマウスの4週齢時の値と比較)

マウスの膵島は形がいびつで細胞数も野生型に比較し減少していた(図4A, B)。しかしながら、25週齢ではこれらの変化は認められなくなっていた(図4C, D)。アポトーシス細胞をTUNEL法により検出したところ、4週齢のTgマウスの膵島では高率(87の膵島のうち59膵島)に、膵島内に少なくとも1個のTUNEL陽性細胞が検出された(図4E, F)。一方、25週齢のTgマウスの膵島ではTUNEL陽性細胞はほとんど検出されなかった。これらの結果から、若齢期のアポトーシスによる膵β細胞の細胞死が、Tgマウスの膵β細胞数の減少の主たる原因であり、加齢とともに膵β細胞量が回復したと考えられた。

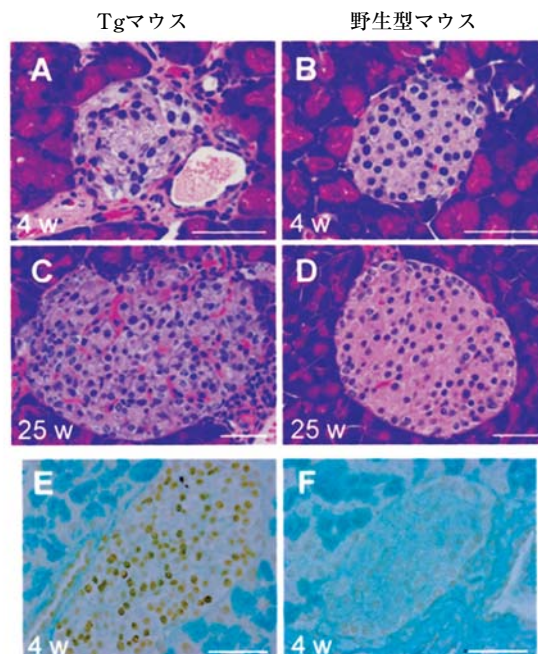


図4 Tgマウスの膵島の組織像とアポトーシス (A-D): 4週齢時(A, B)と25週齢(C, D)時のTgマウス(A, C)と野生型マウス(B, D)のインスリンの膵島のHE染色像を示す。4週齢のTgマウスでは膵島の形態がいびつで細胞数は減少していた(A)が、25週齢では改善していた(C)。 (E, F) 4週齢時のTgマウス(E)と野生型マウス(F)の膵島のTUNEL染色像を示す。TgマウスではTUNEL陽性のアポトーシス細胞が多数認められた。スケールは50μm

次に筆者らはインスリンとPDX1の発現を免疫染色法にて検討した(図5A-L)。4週齢のTgマウスの膵島では、インスリ

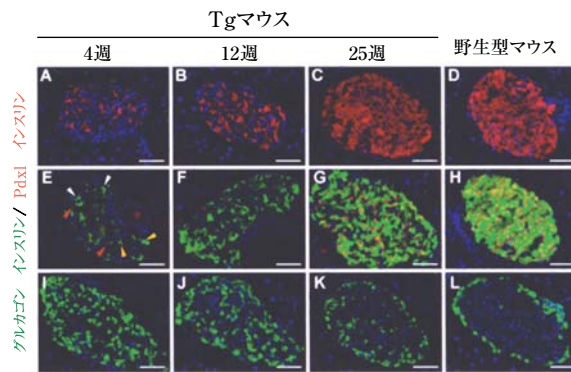


図5 Tgマウスの膵島の免疫組織像  
(A-D): Tgマウス(A-C)と野生型マウス(D)のインスリンの免疫染色像。4週齢のTgマウスでは膵島内のインスリン陽性細胞数は減少し、インスリンの染色性は低下していた(A)。これらの変化は週齢とともに改善した(B,C)。(E-H): Tgマウス(E-G)と野生型マウス(H)のインスリン(緑)とPdx1(赤)の免疫二重染色像。黄色、白、赤の矢印はそれぞれ、インスリン/Pdx1共陽性、インスリン単独陽性、Pdx1単独陽性細胞を示す。スケールは50μm

ン陽性細胞の数は明らかに減少し、インスリンの免疫染色反応は非常に弱かった(図5A-C)。しかしながら、週齢を重ねるにつれインスリン陽性細胞の数は増加し、インスリンの免疫染色反応も増強した(図5A-C)。そして、25週齢のTgマウスの膵島(図5C)は野生型マウス(図5D)とほぼ変わらない形態を示すようになった。また、4週齢のTgマウスでは、膵島内にPDX1陽性細胞はほとんど認められなかった(図5E)が、週齢を重ねるにつれPDX1陽性細胞が出現し、インスリンと共局在するようになった(図5F,G)。定量的な画像解析によってもTgマウスの膵β細胞領域の面積が週齢とともに増加していることが確認された。

さらにTgマウスの膵島における膵β細胞以外の内分泌細胞についても解析を行った。既に報告したとおり、4週齢、12週齢のTgマウスでは、グルカゴン陽性の膵α細胞が膵島の中央に認められた。さらにこれらの若齢マウスではδ細胞やPP細胞の数も増加しており、それらの膵島内での分布も膵α細胞と同様、膵島の中央に認められた。しかしながら、Tgマウスの膵島でのこれらの形態変化は週齢とともに改善傾向を示し、25週齢のTgマウスの膵島はほぼ正常な形態を示すようになった。糖尿病モデルラットの膵再生の実験で、インスリンとソマトスタチンが共発現する細胞が認められたこと<sup>3)</sup>から膵再生時には膵δ細胞から膵β細胞が分化することも報告されているが、Tgマウスの膵島では、このような現象を示唆するインスリン/ソマトスタチン共陽性細胞は認められなかった。

## 6. Tgマウスの膵島でのDBA陽性細胞の出現

膵β細胞が障害された際には、膵臓の導管に存在する前駆細胞から膵β細胞が再生すると考えられている<sup>4)</sup>。そして、N-アセチルガラクトサミン特異的なレクチンとされるDBAは膵臓の導管細胞のマーカーとして用いられている<sup>5)</sup>。筆者らは、Tgマウスの膵β細胞が膵導管の前駆細胞に由来するかどうかを検討するために、Tgマウスとの野生型マウスの膵臓をDBAで染色してみた(図6A-E)。野生型マウスの膵臓では、膵導管細胞のみが染まり、膵島内にはDBA陽性細胞は認められな

った(図6E)。しかしながらTgマウスの膵臓では、膵導管細胞に加えて膵島内にDBA陽性細胞が高頻度に見られた(図6A-D)。DBA陽性細胞の数は週齢とともに減少した。

そこで筆者らは、DBA陽性細胞の出現と膵β細胞数の増加の関連について検討した。4週齢のTgマウスの膵島ではインスリン/DBA共陽性細胞は認められなかった(図7A)ものの、12週齢ではインスリン/DBA共陽性細胞が出現し始め(図7B)、25週齢では膵島内のDBA陽性細胞の約50-60%がインスリン陽性であった(図7C)。さらにTgマウスの膵島内のDBA陽性細胞におけるPDX1の発現を検討した。4週齢のTgマウスの膵島のPDX1陽性細胞数は著明に減少していたが、中にはPDX1/DBA共陽性細胞も散見された(図7D)。25週齢では膵島内のPDX1/DBA共陽性細胞の数は4週齢時よりも増加していた。また、Tgマウスの膵島内のDBA陽性細胞のなかには、細胞分裂のマーカーであるPCNA陽性の細胞が認められた(図7E)。

これらの結果から、膵島内のDBA陽性細胞がTgマウスの膵β細胞の再生に寄与していることが明らかになった。

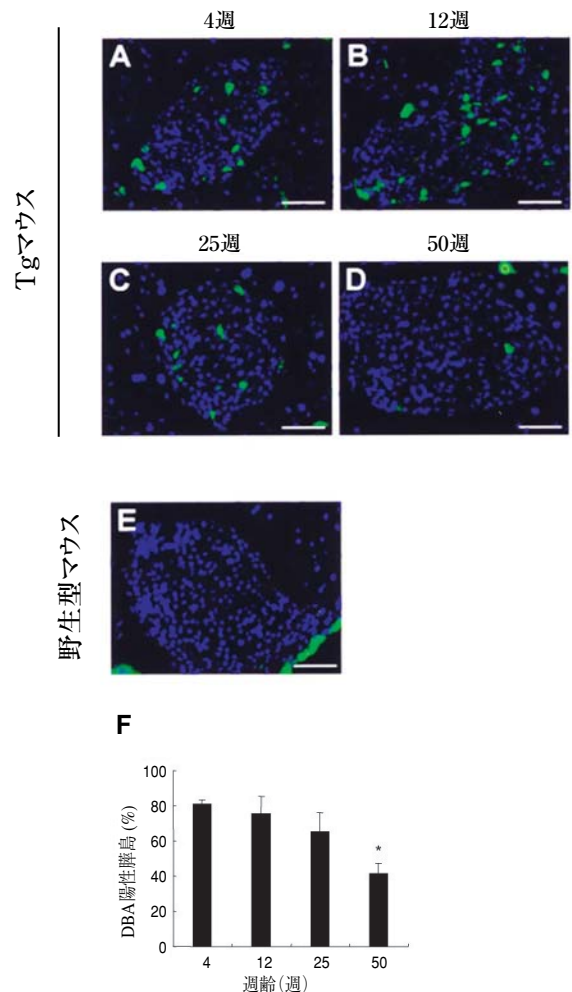


図6 Tgマウスの膵島内のDBA陽性細胞  
(A-D): Tgマウス(A-C)と野生型マウス(D)のDBA染色像を示す。(E): Tgマウスの膵島では膵島内にDBA陽性細胞が認められるが、野生型マウスではほとんど認められない。細胞核を青で示す。(F): TgマウスのDBA陽性細胞を含む膵島の割合。\*P < 0.05 (Tgマウスの4週齢時の値と比較)

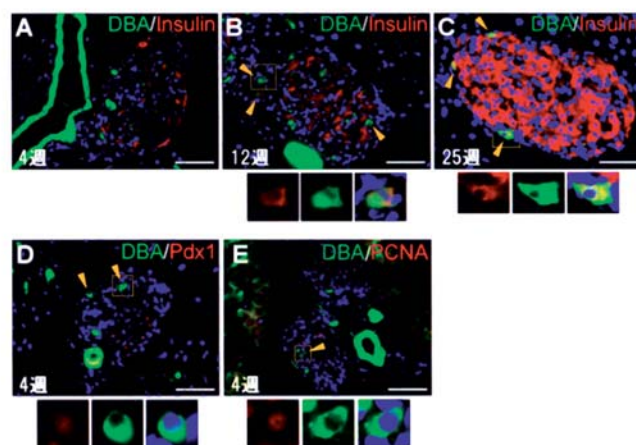


図7 Tgマウスの膵島内のDBA陽性細胞の解析

(A-C): Tgマウスの膵島内のDBA染色(緑)とインスリンの免疫染色(赤)の二重染色像。12週齢(B)、25週齢(C)のTgマウスではDBA陽性細胞がインスリンを発現するようになる。矢印はDBA/インスリンの共陽性細胞を示す。(D): 4週齢のTgマウスの膵島内のDBA染色(緑)とPdx1の免疫染色(赤)の二重染色像。Tgマウスでは週齢に関わらずDBA陽性細胞の多くがPdx1を発現する。(E): 4週齢のTgマウスの膵島内のDBA染色(緑)とPCNAの免疫染色(赤)の二重染色像。DBA陽性細胞の中に増殖能を有する細胞があることを示している。

## 7. 今後の展望

今回の研究から、 $K_{ATP}$ チャネルのポアを構成するKir6.2の変異体を膵β細胞に過剰発現させたTgマウスは、4-6週齢で膵β細胞のアポトーシスによる糖尿病を発症するものの、週齢を重ねるにつれ膵β細胞の再生が起こり高血糖が是正されることが明らかになった。膵β細胞の再生は、いくつかの経路で起こると考えられ、膵管<sup>4)</sup>や膵島内<sup>6)</sup>に存在する前駆細胞からの新生、既存の膵β細胞の分裂による自己複製<sup>5)</sup>、あるいは非膵β細胞からの分化転換<sup>7)</sup>などが関与していると考えられる。しかしながら、膵β細胞の再生を検証するよい動物モデル、あるいは実験手法が確立されていないため、再生機構を詳細に解析することはこれまで困難であった。したがってこのTgマウスは大変貴重なモデル動物であると考えられた。Tgマウスで生じている膵β細胞の再生は、膵島外の膵管や膵外分泌細胞にインスリン要請細胞が認められなかったことから、膵島内で生じていると考えられた。

さらに筆者らは、これまで導管細胞のマーカーと考えられていたDBAが、膵β細胞の再生が盛んに起こっているTgマウスの膵島で認められ、25週齢ではDBA陽性細胞がインスリンやPDX1と共存する細胞が認められることなどから、膵β細胞の前駆細胞のマーカーとして有用であることを見いだした。今後、DBA陽性細胞の特性を詳細に解析することで、膵β細胞の再生のメカニズムが明らかにされるものと期待する。

## 8. 終わりに

今回の研究では $K_{ATP}$ チャネルに機能障害モデルマウスを用いて、膵β細胞の再生の機序についての解析を行った。膵β細胞の再生は新たな糖尿病治療のアプローチとして期待されている。特に、腸管内分泌L細胞から分泌されるglucagon-like peptide-1 (GLP-1)は膵β細胞の再生あるいは生存を促進することが示されており<sup>8)</sup>、その分子メカニズムの解明は重要な課題である。GLP-1は膵β細胞膜上にあるGLP-1受容体と結合し、共役するGsの活性化とcAMP濃度上昇を介し、様々な

作用を発揮する。一方、筆者らはcAMP結合タンパクであるcAMP-GEFIIが $K_{ATP}$ チャネルと相互作用すること、さらに膵β細胞におけるcAMPの作用発現にcAMP-GEFIIが関与することを見いだしている<sup>9)</sup>。本特定領域研究の応募課題で解明を目指している $K_{ATP}$ チャネルとcAMP-GEFIIの相互作用が、インスリン分泌を制御するメカニズムにも関与しているのか、あるいは膵β細胞の再生増殖などのcAMP作用にも寄与しているかどうかについては今後検討してみたい。

## 引用文献

- 1) Ashcroft, F. M. (1988) *Annu Rev Neurosci* 11,97-118.
- 2) Miki T, et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11969-11973.
- 3) Li L, Yi Z, Seno M, Kojima I (2004) *Diabetes* 53, 608-615.
- 4) Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song, K.H., Sharma, A., O'Neil, J.J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7999-8004.
- 5) Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., Melton, D.A. (2004) *Nature* 429, 41-46.
- 6) Guz, Y., Nasir, I., Teitelman, G. (2001) *Endocrinology* 142, 4956-4968.
- 7) Wang, R.N., Kloppel, G., Bouwens, L. (1995) *Diabetologia* 38, 1405-1411.
- 8) Drucker, D.J., Nauck, M.A. (2006) *Lancet* 11;368, 1696-1705.
- 9) Ozaki, N et al. (2000) *Nat Cell Biol* 2, 805-811.

## 神経伝達物質放出においてRIM1と 電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルβサブユニットとの結合がもたらす新たな機能

清中 茂樹、若森 実、三木 崇史、瓜生 幸嗣、森 泰生(AO1計画班)

京都大学大学院工学研究科

### 発表論文：

Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., Beedle, A.M., Mori, E., Hara, Y., De Waard, M., Kanagawa, M., Itakura, M., Takahashi, M., Campbell, K.P. & Mori, Y.  
RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature Neurosci.* 10, 691-701, 2007.

### 1. はじめに

神経伝達においては、前シナプスから放出された神経伝達物質が後シナプスで受容されることで情報が伝達される。記憶、学習、認知といった高次機能は前シナプスからの神経伝達物質放出が厳密に制御されることにより実現される。神経伝達物質の放出は、前シナプスの中でも、アクティブゾーンとよばれる特殊な構造体で起こる<sup>1)</sup>。アクティブゾーンにはシナプス小胞の放出に関わる多くのタンパク質が存在しており、それらの機能は未解明な部分が多いが、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル(VDCC)からのCa<sup>2+</sup>流入を感知して、シナプス小胞が形質膜と融合することで神経伝達物質が放出されるというメカニズムは明らかである。また、VDCCとシナプス小胞の距離の重要性を示す研究が以前から数多く報告されている<sup>2), 3)</sup>が、その分子メカニズムは未だに不明であった。

RIM1はシナプス小胞に存在するRab3に結合するタンパク質として同定された<sup>4)</sup>。アクティブゾーン特異的に存在することが知られ、N末端のRab3結合ドメインのほかにPDZ、C<sub>2</sub>A、C<sub>2</sub>Bドメイン構造を有する(図1a)。Rab3の他にもMunc13、ELKS(CAST)、RIM-BP、liprinなどのタンパク質と結合することが知られ、アクティブゾーンのscaffoldタンパク質だと考えられている。ノックアウトマウスの解析結果からは、シナプス可塑性に重要であることが示唆された<sup>5), 6)</sup>。しかし、RIM1の機能においてはまだまだ未解明な部分が多い。

VDCCは電気生理学的あるいは薬理的な性質から数種類に分類されるが、神経伝達物質においては高電位活性化型のN、P/Q、R、L型が重要な役割を果たす<sup>7)</sup>。VDCCはボアを形成するα<sub>1</sub>サブユニットと副サブユニット(β、α<sub>2</sub>/δ、γサブユニット)とのヘテロな複合体を形成する。唯一細胞質側に存在するβサブユニットは、VDCC複合体を形質膜に輸送するために必須である<sup>8), 9)</sup>。また、βサブユニットは他のタンパク質と相互作用することも報告されている<sup>10), 11)</sup>。我々は、プレシナプスのアクティブゾーンにおいても、βサブユニットが他のタンパク質と相互作用することで、VDCCの輸送や機能修飾に関わるのではないかと考えて研究を展開した。

### 2. βサブユニットはRIM1と直接相互作用する

βサブユニットに対する相互作用タンパク質を探索するために、β<sub>4b</sub>をbaitタンパク質としてマウス脳のcDNAライブラリーを用いた酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。その結果、RIM1のC末端領域(clone no. 2-5)が同定された(図1a)。

β<sub>4b</sub>変異体を用いたβガラクトシダーゼアッセイ結果から、RIM1のC末端領域はSH3ドメインとGKドメインを含むβサブユニットの主要ドメインと相互作用していることがわかった(図1b)。GSTプルダウンアッセイを用いた結果(図1c)と、精製β<sub>4</sub>サブユニットと精製RIM1を用いた結合実験の結果から、RIM1(1079-1257)とRIM1(1258-1463)とが協同的に作用してβサブユニットに結合していることが示唆された。

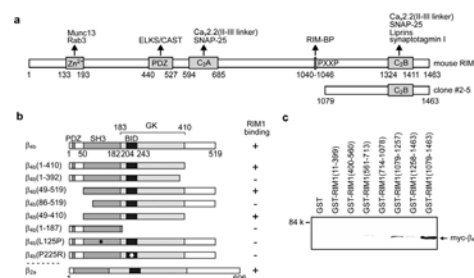


図1 RIM1とVDCCβサブユニットの直接的な相互作用  
(a)RIM1のドメイン構造および相互作用タンパク質。(b)酵母ツーハイブリッドアッセイを用いたβサブユニットにおけるRIM1との相互作用部位の決定。(c)RIM1フラグメント-GSTの融合タンパク質とβ<sub>4b</sub>サブユニットを用いたプルダウンアッセイ結果。

この相互作用が*in vitro*な状況下だけでなく、脳内においても起こっていることは生化学的な手法を用いて確認した<sup>12)</sup>。NativeなVDCC複合体は、マウス脳ミクロソームから、界面活性剤による可溶化、ヘパリンによる粗精製過程を経て得た。スクロース濃度密度勾配分離法により、RIM1の主な成分はCa<sub>v</sub>2.1(α<sub>1</sub>サブユニット)、β<sub>4</sub>サブユニットと共沈降することを確認した(図2a, b)。そのサンプルを用いて免疫沈降実験を行ったところ、RIM1はβ<sub>4</sub>サブユニットにより共免疫沈降された(図2c)。また、RIM1とβ<sub>4</sub>サブユニットとの相互作用を阻害するドミナントネガティブ体BADNを設計した(図3)。BADNはβ<sub>4</sub>サブユニットの全体構造とα<sub>1</sub>サブユニットのβサブユニット相互作用部位(AID)を有する融合タンパク質である。すなわち、β<sub>4</sub>サブユニットの3次構造を保持しながらα<sub>1</sub>サブユニットとは結合しないので、RIM1のようにβサブユニットと相互作用するタンパク質との相互作用を特異的に阻害することが可能である(図3d)。粗精製したVDCC複合体を用いて共免疫沈降を行う際にGST-BADNを過剰に加えると、RIM1とβ<sub>4</sub>サブユニットとの結合が阻害された(図2d)。以上の結果から、脳内においてもRIM1とβ<sub>4</sub>サブユニットが直接相互作用していることを確認できた。

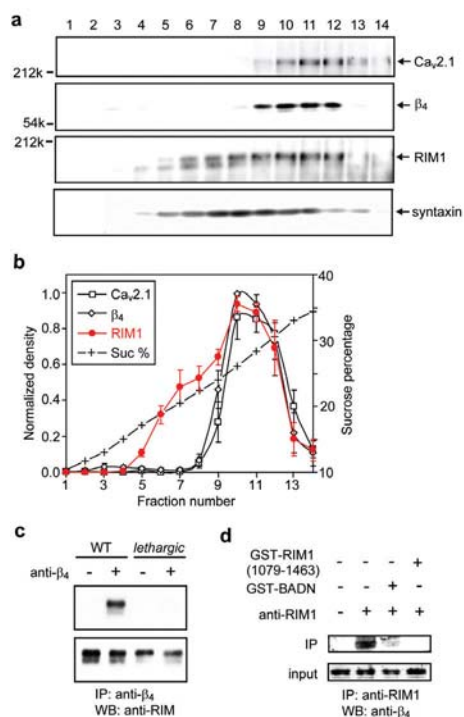


図2 脳内におけるVDCC複合体とRIM1との相互作用  
(a)マウス脳ミクロソームから粗精製したVDCC複合体を用いたスクロース濃度密度勾配分離実験。(b)スクロース濃度密度勾配分離実験結果を用いたCa<sub>v</sub>2.1、β<sub>4</sub>、RIM1の密度解析。(c)粗精製VDCC複合体を用いた共免疫沈降実験。(d)BADNによる共免疫沈降の阻害実験。

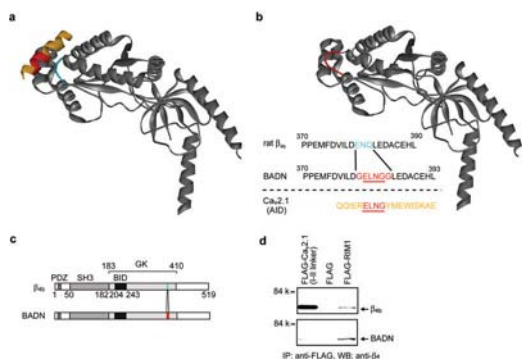


図3 RIM1-β<sub>4</sub>サブユニット相互作用に対するドミナントネガティブ体としてのBADNの設計及び評価。

(a) βサブユニットとAID領域との複合体のX線結晶構造解析結果<sup>16)</sup>。(b)分子モデリングから算出されたBADNの最安定構造。(c) β<sub>4</sub>サブユニットとBADNのドメイン構造の比較。(d) HEK293に発現させたBADNとRIM1との共免疫沈降実験。BADNはCa<sub>v</sub>2.1には結合しないがRIM1に結合する。

### 3. RIM1はβサブユニットを介して細胞膜上のVDCC近傍に固定化される

細胞内におけるRIM1とβサブユニットの局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。HEK293細胞においてRIM1とβ<sub>4</sub>サブユニットを過剰発現させると、両者は共に細胞質に存在したが、α<sub>1</sub>サブユニットを共発現させると両者ともに細胞膜に移行し、BADNによってRIM1の膜移行が選択的に阻害された(図4a)。逆にα<sub>1</sub>サブユニットとRIM1を過剰発現させた場合は、それぞれが異なる局在を示したが、β<sub>4</sub>サブユニットを共発現させると両者が質膜に移行し、BADNによって

RIM1の膜移行が阻害された(図4b)。これらの結果は、RIM1とβサブユニットが結合することで、RIM1が細胞膜上のVDCC近傍に固定化されることを意味する。

このような共局在は海馬培養神経細胞においても確認できた。8 DIV (days in vitro)においてシナプスのマーカーであるsynapsin Iのクラスター化が起こることからシナプス形成は確認できたが、その時点ではRIM1、β<sub>4</sub>サブユニット、α<sub>1</sub>サブユニットいずれもシナプスへの集積は確認できなかった(図4c, d)。一方、23 DIVにおいてはそれらの集積化が確認でき、その輸送はBADNやRIM1(1079-1463)で阻害された。これらの結果から、RIM1、β<sub>4</sub>サブユニット、α<sub>1</sub>サブユニットは、神経細胞において同時期にシナプスに輸送されていることが示唆された。

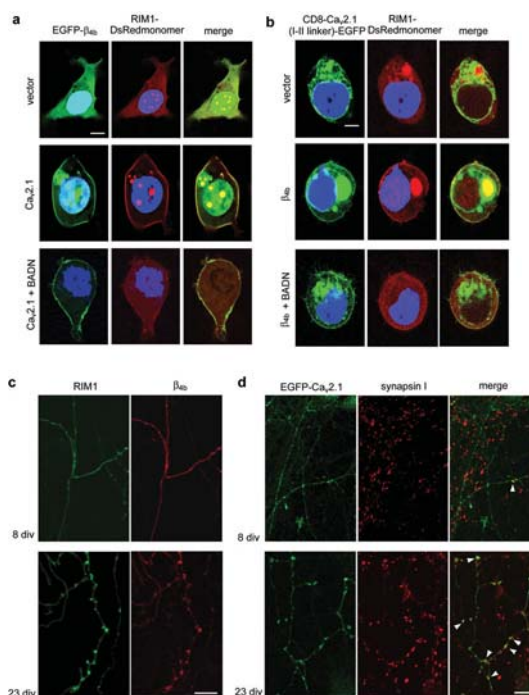


図4 細胞内でRIM1はVDCC近傍に固定化される。

(a, b) β<sub>4</sub>サブユニットとRIM1を発現するHEK293細胞に、Ca<sub>v</sub>2.1およびBADNを共発現させた際の共焦点レーザー顕微鏡観察結果。スケールバー:5mm。(c, d) 海馬培養神経細胞におけるβ<sub>4</sub>サブユニット、RIM1、Ca<sub>v</sub>2.1のシナプスへの輸送に関する評価。スケールバー:10mm

### 4. RIM1はβサブユニットとの相互作用を介して神経伝達物質含有小胞をVDCC近傍に固定化する

RIM1は前述したとおりシナプス小胞タンパク質であるRab3に結合するタンパク質として同定された。そこで、βサブユニットとの結合により細胞膜近傍に固定化されたRIM1の神経伝達物質含有小胞に対する影響についてPC12細胞を用いて検討した。その際にはPC12細胞中のdense-core vesicleを可視化するために、Neuropeptide Y (NPY)と蛍光タンパク質Venusの融合タンパク質NPY-Venusを発現させて、その挙動を観察した。まず、NPY-Venusの挙動がdense-core vesicleの挙動と一致することを確認するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、神経伝達物質放出に必須なタンパク質であるVAMPおよびRIM1との局在を観察した。その結果、NPY-Venusはこれらのタンパク質とは共局在するが、caveolin-1とは共局在しないことから、NPY-Venusは

dense-core vesicleの動きを表すことを確認できた。細胞膜直下のdense-core vesicle (docked vesicle)の密度は、全反射顕微鏡を用いて細胞膜から100nm以下の深さの蛍光を観察することで行った(図5a)。その結果、RIM1のN末端RIM1(11-399)を過剰発現させた際にはvesicle密度にほとんど効果はなかったが、全長のRIM1を発現させた際にvesicle密度が増加した(図5b)。逆に、BADNやRIM1(1079-1463)を発現させる、すなわちPC12に内在する $\beta$ サブユニットとRIM1の結合を阻害するとvesicle密度が減少した。これらの結果から、RIM1と $\beta$ サブユニットの結合により、神経伝達物質含有小胞はVDCC近傍に固定化されることが示された。

##### 5. RIM1と $\beta$ サブユニットの相互作用によってVDCCのチャネル活性が持続する

RIM1と $\beta$ サブユニットの結合によるVDCCのチャネル機能に対する効果は、 $\alpha_1$ 、 $\beta$ 、 $\alpha_2/\delta$ およびRIM1を過剰発現させたBHK細胞の $\text{Ba}^{2+}$ 電流をホールセルモードのパッチクランプ法で評価した。RIM1の効果は、 $\text{Ba}^{2+}$ 電流の不活性化における性質で最も顕著であった。VDCCは細胞膜電位を脱分極側にシフトさせると活性化されるが、RIM1非存在化においては、すばやく不活性化状態に移り、イオン流入が起こらなくなる。しかし、RIM1を共発現させると不活性化状態への移行が阻害されて $\text{Ba}^{2+}$ 流入が持続した(図6a)。その効果は、 $\beta$ サブユニットや $\alpha_1$ サブユニットの種類に依存せずすべての神経系のVDCCにおいて確認できた。電位依存的な不活性化曲線においても同様の効果が確認でき、RIM1が共存することにより不活性化曲線が脱分極側に大きくシフトした(図6b, c)。このような不活性化における効果は、RIM1(1079-1257)では確認できず、RIM1(1258-1463)で確認できた。前述した結合実験の結果とあわせて考えると、RIM1は $\beta$ サブユニットに対して1079-1257の領域で結合し、 $\text{C}_2$ ドメインを含む1258-1463の領域でチャネル機能を修飾することが示唆された。

P/Qタイプチャネルのシングルチャネル電流を測定した際にも、RIM1が共存することによりチャネルの開口が持続した(図6d)。また、プレシナプスにおけるアクションポテンシャルを模倣した100Hzのパルス刺激を与えた際にもRIM1が共存することで活性化が持続した(図6e)。

生理的なイオンキャリアである $\text{Ca}^{2+}$ を用いた際には、VDCCに対してカルモジュリン依存的な不活性化が起こることが知られる<sup>13)</sup>。このような条件化においても、RIM1を共発現させる

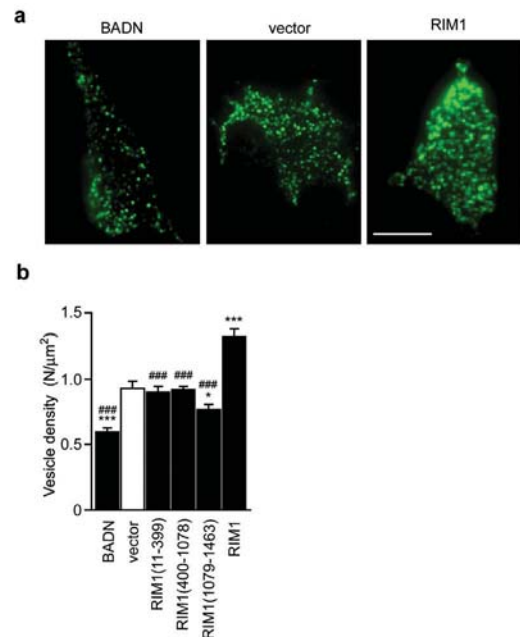


図5 RIM1- $\beta_{4b}$ サブユニット相互作用により神経伝達物質小胞はVDCC近傍に固定化される。

(a) RIM1およびBADNをNPY-Venusと共発現させたPC12細胞の全反射顕微鏡観察結果。スケールバー:10mm。(b) NPY-Venusを含むvesicle密度の評価。\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$  vs vector. ### $P<0.001$  vs RIM1。

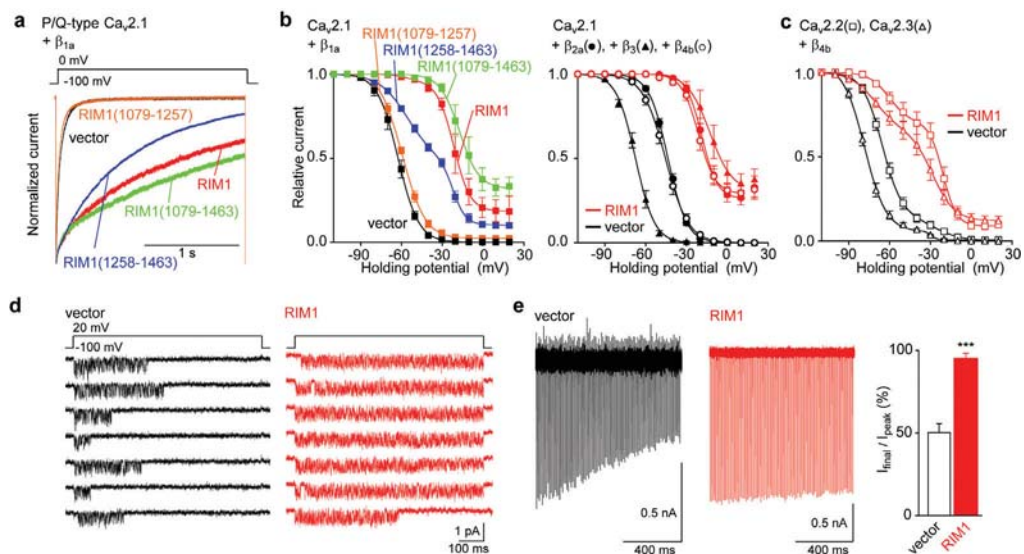


図6 VDCC電流の不活性化特性に関するRIM1の効果

(a)BHK細胞におけるP/Q-type VDCCの $\text{Ba}^{2+}$ 電流 不活性化におけるRIM1の効果。(b)P/Q-type不活性化曲線におけるRIM1の効果。(c)他のVDCCサブタイプの不活性化曲線におけるRIM1の効果。(d)P/Q-type シングルチャネル電流におけるRIM1の効果。(e)アクションポテンシャルを模倣した100Hzのパルス刺激<sup>17)</sup>を1秒間与えた際のRIM1の効果。\*\*\* $P<0.001$ 。

ことでチャンネル活性は持続した(図7a)。また、内在的にVDCCおよびRIM1を発現しているPC12細胞を用いた際にも、RIM1を過剰発現させると不活性化が阻害され、BADNにより不活性化が促進された(図7b)。また、PC12細胞においてRIM1およびRIM2に対するsiRNAを処置したところ、同様に不活性化が促進された(図7c)。以上の電気生理学的な実験結果を総括すると、人工的な発現システムだけでなく、生理的な条件下すなわちプレシナプスのVDCCにおいても、RIM1によってVDCCの不活性化が阻害されて $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの活性が持続すると考えられる。

VDCCの他の機能においてもRIM1の効果は確認できた。電流-電圧(I-V)曲線の解析結果から、 $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q型)、 $\text{Ca}_v2.2$ (N型)においては、RIM1共発現によって電流密度の増加が観測されたが、 $\text{Ca}_v2.3$ (R型)、 $\text{Ca}_v1.2$ (L型)においてはその効果は観測されなかった(図8b, c)。逆に、電位依存性な活性化曲線あるいは活性化パラメーターにおいては、P/Q型、N型ではRIM1の効果は観測されず、R型、L型では活性化曲線が脱分極側にシフトし、活性化速度も遅くなった(図8a)。

## 6. RIM1と $\beta$ サブユニットの相互作用は神経伝達物質放出を増強する

RIM1と $\beta$ サブユニットの相互作用によって、細胞膜のVDCC付近に小胞が固定化される、VDCCのチャンネル活性が持続するという2つの大きな効果が観測されたが、その生理的な意義を評価するために、神経伝達物質の放出におけるRIM1の効果を評価した。

コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)を欠損したPC12細胞は、アセチルコリン(ACh)を合成できない。そこで、RIM1遺伝子とChATを共発現させて、high- $\text{K}^+$ (脱分極)刺激に伴うACh放出におけるRIM1遺伝子の効果を評価した(図9)<sup>14)</sup>。N末端のRIM1(11-399)を共発現させた場合には、これまでの報告<sup>4)</sup>と同様にシナプス小胞タンパク質Rab3と結合す

ることによりACh releaseが増加した。C末端のRIM1(1079-1463)を共発現させた場合にもACh releaseが増加したが、これはVDCCを経由した $\text{Ca}^{2+}$ 流入が増加したことに起因すると考えられる。全長RIM1を発現させた場合には、N末端、C末端を発現させたときよりもACh放出が優位に増加した。これはVDCC近傍へ神経伝達物質小胞が固定化されたことによる効果だと考えている。一方、BADNを過剰発現させるとACh放出は減弱し、ACh放出におけるRIM1- $\beta$ サブユニット相互作用の重要性を確認できた。同様の効果はマウスから単離して培養した小脳顆粒細胞を用いても確認できた。RIM1を過剰発現させた場合には、high- $\text{K}^+$ (脱分極)刺激に伴うグルタミン

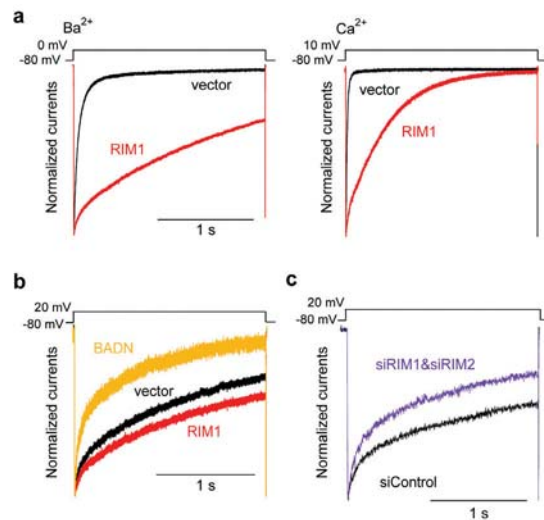


図7 生理的な条件化におけるVDCC不活性化特性に関するRIM1の効果

(a)細胞外液に $\text{Ba}^{2+}$ および $\text{Ca}^{2+}$ を用いた際のP/Q-type VDCC電流の不活性化におけるRIM1の効果。(b)PC12細胞内在性のVDCC不活性化特性に関するRIM1およびBADNの効果。(c) siRNA処置によりPC12細胞内在性のRIM1およびRIM2の発現を抑制した際のVDCC不活性化特性。

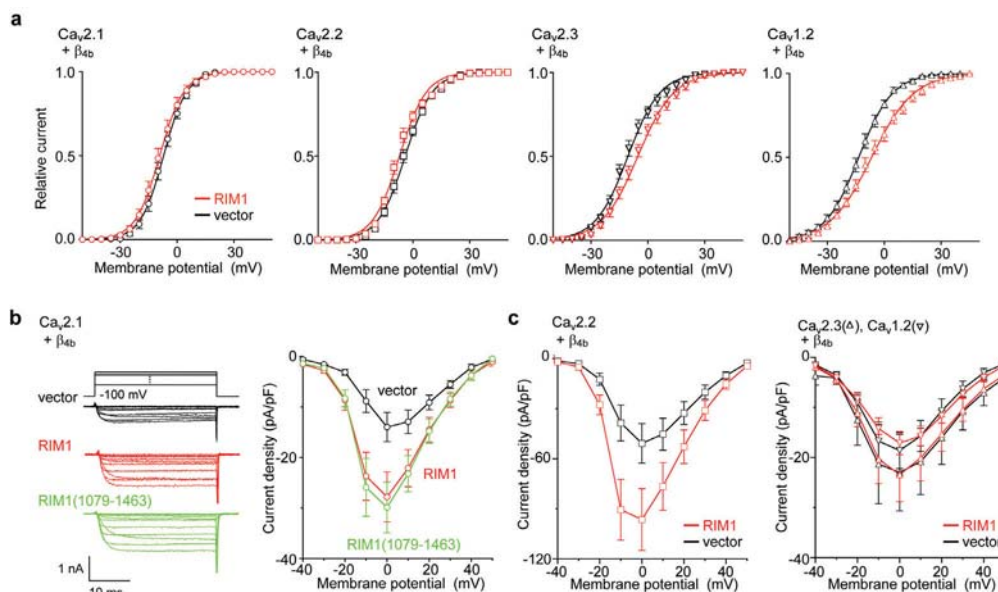


図8 VDCC活性化特性に対するRIM1の効果

(a)各VDCCサブタイプの活性化曲線におけるRIM1の効果。(b)P/Q-typeVDCCにおける $\text{Ba}^{2+}$ 電流およびI-V特性におけるRIM1の効果(c)他のVDCCサブタイプのI-V特性におけるRIM1の効果

酸放出は増強し、逆にBADNを発現させた場合は減少した。

以上の結果から、RIM1と $\beta$ サブユニットとの相互作用は、細胞膜のVDCC付近への小胞の固定化、VDCCの活性化の持続という2つ効果によって、神経伝達物質放出を効率化させていることを明らかにできた(図10)。本研究と同時期に、RIM1とRIM2をダブルノックアウトしたマウスではシナプス構造には異常は観測されないが、脱分極刺激による神経伝達物質が起らないということが報告された<sup>15)</sup>。これらの成果からも、本研究結果の妥当性が伺える。

## 7. 今後の展望

前シナプスのアクティブゾーンはタンパク質密度が非常に高く、タンパク質間の複雑な相互作用によりその構造体が維持されている。その場では、シナプス小胞が接近・融合・解離といった動的な動きが実現されており、タンパク質間相互作用も動的に制御されると考えられるが、未開拓の研究領域である。今回、我々はRIM1とVDCC  $\beta$ サブユニットとの相互作用が神経伝達物質放出に重要であることを示したが、その相互作用の動的な制御機構の解明が今後の課題だと考えている。

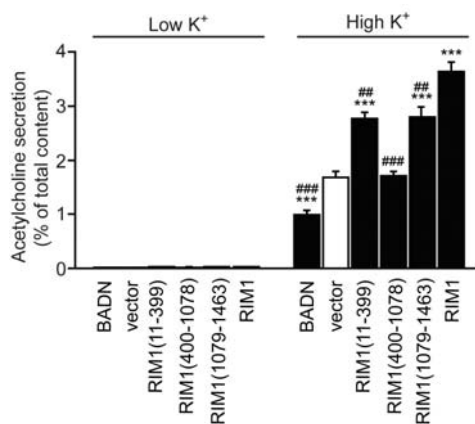


図9 RIM1- $\beta_{4b}$ サブユニット相互作用は神経伝達物質放出を増強する

PC12細胞におけるhigh-K<sup>+</sup>(脱分極)刺激後のACh放出におけるRIM1、BADNの効果。\*\*\*P<0.001 vs vector, ##P<0.01, ###P<0.001 vs RIM1。

## 8. 終わりに

近年、タンパク質間相互作用に基づく複雑な生命現象を解明するには、様々な実験手法が必要になってきました。本研究も例外ではなく、森研究室が得意としていた分子生物学的、電気生理学的なアプローチだけでは、現象を解明するには不十分でした。そのような状況下で、Iowa大学のCampbell, K.P.先生にマウス脳サンプルを用いた生化学実験を教えてください、東京大学の尾藤 晴彦 先生のグループで培養神経細胞を用いたイメージングの実験を行っていただき、北里大学の高橋 正身 先生のグループに神経細胞を用いた神経伝達物質の放出に関する評価方法をご教授いただきました。このような共同研究があったからこそ、この研究を報告できたことは言うまでもなく、この場を借りて深くお礼を申し上げます。また、大阪大学の日比野 浩 先生(AO2計画班)、京都大学の森井 孝 先生、森研究室の他のメンバーのご助言、ご協力でこの研究を行うことができたので、この場を借りてお礼を申し上げます。

## 引用文献

- 1) Zhai, R.G. *et al.* (2004) *Physiology* 19, 262-270.
- 2) Neher, E. (1998) *Neuron* 20, 389-399.
- 3) Wadel, K. *et al.* (2007) *Neuron* 53, 563-575.
- 4) Wang, Y. *et al.* (1998) *Nature* 388, 593-598.
- 5) Schoch, S. *et al.* (2002) *Nature* 415, 321-326.
- 6) Castillo, P. E. *et al.* (2002) *Nature* 415, 327-330.
- 7) Tsien, R.W. *et al.* (1991) *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 349-354.
- 8) Mori, Y. *et al.* (1991) *Nature* 350, 398-402.
- 9) Bichet, D. *et al.* (2000) *Neuron* 25, 177-190.
- 10) Beguin, P. *et al.* (2001) *Nature* 411, 701-706.
- 11) Hibino, H. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 307-312.
- 12) Kang, M.G. *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5561-5566.
- 13) DeMaria, C.D. *et al.* (2001) *Nature* 411, 484-489.

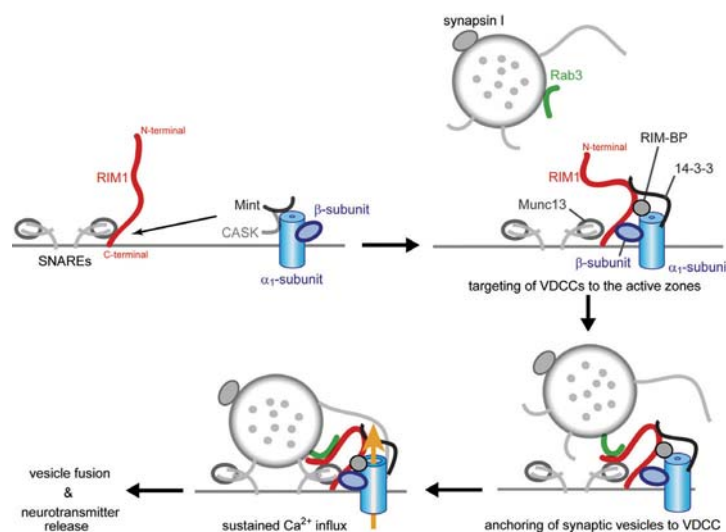


図10 プレシナプスアクティブゾーンにおけるRIM1- $\beta$ サブユニット相互作用の役割の概念図

- 14) Nishiki, T. et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 57-62.
- 15) Schoch, S. et al. (2006) *EMBO J.* 25, 5852-5863.
- 16) Opatowsky, Y. et al. (2004) *Neuron* 42, 387-399.
- 17) Patil, P.G. et al. (1998) *Neuron* 20, 1027-1038.

## 神経伝達助けるタンパク質

脳の神経細胞間の情報伝達で「RIM（リム）」と呼ばれる特殊なタンパク質などが、情報を運ぶ神経伝達物質を引き寄せ、情報伝達を容易にしていることが、京都大学大学院工学研究科の森泰生教授（生物化学）らの研究グループが突き止めた。14日発行の

米科学誌「ネイチャー・ニューロサイエンス」（神経細胞の接合部分の「シナプス」に研究成果が掲載された）で行われている。研究グループは、アルツハイマー病などの神経伝達物質の減少が原因、今回の成果や、神経伝達物質の入るシナプス小胞とつながる物質などの動きを撮

## 認知症改善に期待

その結果、この小胞がシナプスの中で情報伝達が実際に進むと考えられている「アクティブゾーン」と呼ばれる特別な部分で、RIMなどとともに数多く集まっていることが判明。研究グループはRIMなどのタンパク質が小胞をシナプスに引き寄せ、情報伝達を促していることを判断した。

産経新聞 平成19年5月14日 24面

# 神経細胞接点 仕組み解明

脳などの神経細胞の連結部分シナプスで、情報伝達物質を運ぶ船に当たる「シナプス小胞」をつなぎ留める「綱」と「柱」になるタンパク質を、京都大学工学研究科の森泰生教授、清中茂樹助教らのグループが見つけた。認知症など神経疾患の原因究明や治療法の開発につながるという。英科学誌「ネイチャー・ニューロサイエンス」電子版で13日、発表した。

シナプスでは、神経細胞（前シナプス）内でシナプス小胞がアセチルコリンなどの神経伝達物質をため込み、先端に移動して細胞膜と接合している。神経の働きで電気信号が先端に伝わると、小胞が開き、次の神経細胞（後シナプス）に神経伝達物質を放出して、情報が伝わる仕組みだ。これまで、シナプス小胞を細胞膜近くに集める仕組みの詳細が不明だった。森教授らは、細胞先端にたくさんあるタンパク質RIMの機能を調べた。膜には、シナプス小胞の開口に必要なカルシウムイオンを取り込む「カルシウムイオンチャネル」があり、RIMは、チャネルの一部「βサブユニット」とシナプス小胞の双方に結び付き、神経伝達物質の放出を助けていることを、ラットで確かめた。RIMは、神経伝達物質の「運搬船」であるシナプス小胞を、積み荷を降ろすために必要なチャネルの近くに近づき留める「綱」として働いており、βサブユニットは、運搬船を綱で結び付ける「係留柱（ピット）」の役割をしていることが分かった。森教授は「神経伝達物質を放出する準備過程が分かったことで、新しい認知症治療法の開発につながる可能性がある」と話している。

## 京大グループ 認知症治療一助に

森教授は「神経伝達物質の放出量が減少して起きる、アルツハイマー病の症状を改善させる薬剤の開発につながる」と話している。成果は13日、英科学誌「ネイチャー・ニューロサイエンス」電子版に掲載された。【中野彩子】

京都新聞 平成19年5月14日 2面

## 神経細胞伝達 仕組みを解明

京大研究チーム

京都大学大学院の森泰生教授（生物化学）らの研究チームは、記憶情報などの神経伝達物質を取り込んで神経細胞間に伝える「シナプス小胞」が、

放出の仕組み

京大が解明

京都大学の森泰生教授と清中茂樹助教らは、神経細胞同士が神経伝達物質を通じて情報をやりとりする最も基本的な仕組みを明らかにした。伝達物質を出す側の細胞内でRIMというたんぱく質が働いて、細胞外に十分な量の伝達物質が放出されるのが分かった。

認知症では神経伝達物質の放出量が減るのが分かっている。薬剤などでRIMの働きを高められれば、伝達物質の放出が増え、認知症の症状改善につながる可能性もあると研究グループは期待している。

成果は米科学誌「ネイチャー・ニューロサイエンス」（電子版）に14日掲載される。

日本経済新聞 平成19年5月14日 19面

伝達物質を放出する仕組みを解明したと発表した。神経細胞内にある小胞を、細胞膜付近にとめるための「綱」や「柱」を築きつけて細胞膜から離れないようにする「杭」の役割を果たす2種類のたんぱく質が働いていることが分かった。

森教授は「神経伝達物質の放出量が減少して起きる、アルツハイマー病の症状を改善させる薬剤の開発につながる」と話している。成果は13日、英科学誌「ネイチャー・ニューロサイエンス」電子版に掲載された。【中野彩子】

毎日新聞 平成19年5月14日 2面

## 中枢支援・防御システムとしての新たな血液脳関門輸送機構の解明 東京テクノ・フォーラム21 ゴールド・メダル賞受賞

東北大学大学院薬学研究科 准教授 大槻 純男

2007年4月11日に東京テクノ・フォーラム21 ゴールド・メダル賞を「中枢支援・防御システムとしての新たな血液脳関門輸送機構の解明」に対していただく機会を得ました。東京テクノ・フォーラム21 (代表＝滝鼻卓雄・読売新聞東京本社社長・編集主幹; <http://www.techno-forum21.jp/>) は、全国の企業、地方自治体、その他の団体の経営者、研究開発担当者、広報担当者によって構成されます研究交流組織です。ゴールド・メダル賞は、平成7年に日本の科学技術の発展を願い制定され、毎年、科学の進歩発展に向けて、創造的、革新的な研究業績を示しつつある新進気鋭の科学者(3名)に贈られる賞です。これまでに、著名な研究者の方々が受賞されており非常に光栄であり、かつ、受賞の知らせに非常に驚きました。受賞対象は、生命科学だけではなく、材料工学や情報科学なども含めた非常に広範囲な科学領域であり、その中で脳関門及び分子輸送という決して大きくはない領域の研究者の私が受賞したことは、産業界においても本分野の重要性を認めていただけたという意味でうれしく感じております。

1999年に脳関門輸送研究の分野に入った当初は、血液脳関門にはGLUT1、MCT1やLAT1等のエネルギー源や栄養素を供給する輸送系と、薬物を血液側へ排出し脳への薬物移行性を低下させる排出ポンプMDR1が報告されていました。一方で脳はエネルギーを大量に消費する臓器であり、神経活動に伴い様々な代謝物が産生されます。このような代謝物が脳関門を透過しないと脳に蓄積してしまい、その結果、脳機能に影響を与えてしまうと考えられます。そこで、脳関門には脳の「掃除役」として脳から血液へ輸送する排出輸送系が存在すると

考え、分子生物学や神経薬理学の多角的解析手法を導入し解析を行ってきました。その結果、神経伝達物質、神経伝達物質の代謝物、神経制御因子、興奮性アミノ酸、中性アミノ酸などの新たな排出輸送機構と関与するトランスポーターを明らかにしました。また、供給輸送に関してもエネルギー貯蔵物質であるクレアチンの脳への供給機構を明らかにしました。これらを総合して考えると血液脳関門の輸送機構は脳に必要な物質を供給し、脳から不要・毒物を排出し、異物が進入を防ぐように機能しており、まさにトランスポーターが協調してトランスポートソームとして機能することで「中枢維持・防御を行うダイナミックインターフェース」として働いていることが明らかになりました。

現在、血液脳関門で機能するトランスポーターは徐々に明らかになりつつあります。しかし、現時点では輸送への関与は明らかにすることができませんが、どのぐらい関与するか明らかにすることは大変困難です。特に、ABCトランスポーターや有機アニオントランスポーターは、基質認識性が重複しているためそれぞれの輸送への関与の大きさの解明は重要な課題です。この課題に、我々は新たな定量的プロテオミクス技術を開発し解明を目指しています。本技術によって得られる「トランスポーターマップ」は、PharmacogenomicsからPharmacoproteomicsへの展開を可能とする非常に重要な情報と考えております。また、「中枢維持・防御」を行う脳関門輸送機構の異常は中枢環境の異常を誘起し、中枢疾患と結びついていると考えられます。中枢疾患と脳関門輸送機構の異常は今後の重要な課題と考え、現在、アミロイドβペプチドの脳関

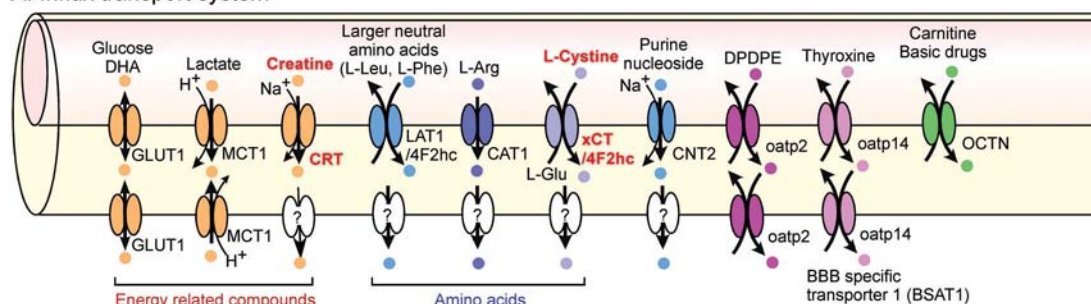


今堀 博・京都大学教授(中央)、山口 茂弘・名古屋大学教授(左)との記念写真  
(東京テクノ・フォーラム21提供)

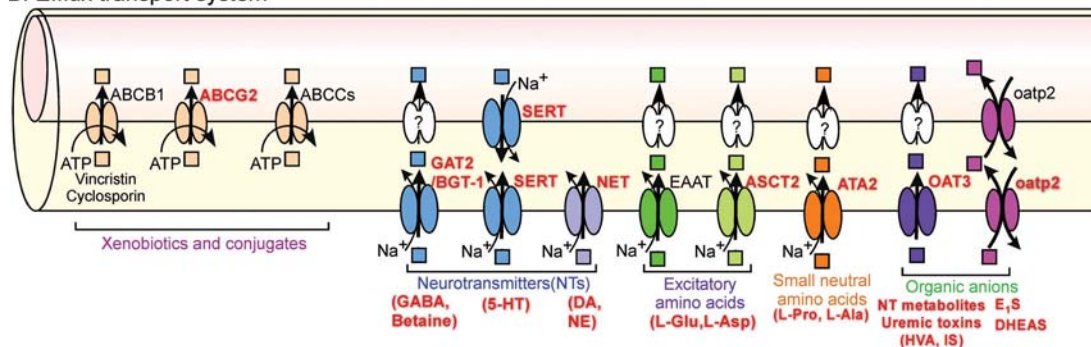
門排出機構を中心として解析を進めています。脳関門輸送機構は、薬理学、脳科学、薬理学など複数の領域に関連しておりそれぞれに興味深い課題がいまだ多く残されています。本特定領域研究において、様々な分野の研究者と共同研究を行うことで、本分野の研究を推進、展開できると期待しています。

最後になりましたが、8年という期間でここまでの成果を出すことができたのは、多くの共同研究者及び学生の惜しみのない尽力と高い技術力に基づく貴重なデータの積み重ねのおかげです。発生生物学という全く異なるフィールドにいた私に脳関門輸送研究という新しい研究の場を与えて下さった寺崎哲也教授、また、指導、協力いただきました細谷健一教授、高長ひとみ博士、堀里子博士、浅島朋子博士、上家潤一博士、そして多くの共同研究者と研究室の皆様がこの場を借りて心より御礼申し上げます。

#### A. Influx transport system



#### B. Efflux transport system



#### 脳関門トランスポートソーム

(A)脳への供給輸送として機能するトランスporter、(B)脳からの排出輸送として機能するトランスporter。赤字は、筆者らの解析によって脳関門での機能、局在が明らかとなった輸送系とトランスporter。

◆「ゴールド・メダル賞」  
授賞式「東京テクノ・フ  
ォーラム21」（代表）滝鼻  
卓雄・読売新聞東京本社代  
表取締役社長・編集主幹）  
が優れた業績を上げた新進  
研究者に贈る「ゴールド・  
メダル賞」の授賞式が11日、  
東京都内で開かれ、今年度  
の受賞者3人に賞状とメダ

ル、副賞が手渡された。  
授賞式後、西沢潤一・首  
都大学東京学長が「科学技  
術立国 日本に欠けている  
こと」と題して講演した。  
受賞者と受賞テーマは次  
の通り。▽山口茂弘・名古屋  
大学教授



山口茂弘 名古屋大学教授



河野 博 京都大学教授



大槻純男 東北大学准教授

▽大槻純男・東北大学准教  
授 同左「中枢支援・防衛  
システムとしての新たな血  
液脳関門輸送機構の解明」  
△研究内容は今月下旬の朝  
刊に掲載する予定です▽

読売新聞 平成19年4月12日掲載記事

おおつき すみ お  
大槻 純男氏

東北大学大学院  
薬学研究科准教授



東京大薬学部卒。1996年、  
同大大学院薬学系研究科博士  
課程修了。米国カリフォルニ  
ア大学パークレー校博士研究  
員などを経て、2003年から東  
北大大学院助教授。38歳。

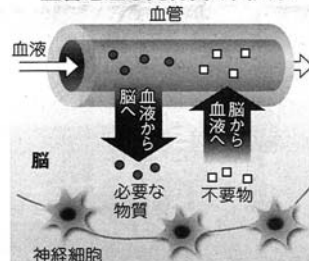
「中枢支援・防衛システムとしての  
新たな血液脳関門輸送機構の解明」

脳は不思議な活動に必  
要なブドウ糖などは血管を  
通して取り込むのに、薬の  
ような異物を血液に乗せて  
脳に送り込むことも、  
血管から脳の内側に入ってい  
かない。特殊な方法で脳に  
薬を届けても、それが不要  
物とみなされて血管内に戻  
ってしまふ。不要物を  
ためない仕組みが、脳のど  
こにある。脳の健康を保  
つこの「掃除機」のような  
役割を担ってい  
るのが、血管そ  
のものであるこ  
とを突き止めた。

## 脳の「掃除役機能」解明

以前から、脳の血管は、  
血液から脳に必要な物しか  
入らないようにする関所の  
機能を持つことが知られて  
いた。その機能を担ってい  
るのは、血管を構成する細  
胞の膜に散らばっている特  
別なたんぱく質だ。そのた  
め、血液に混ざった認知症な  
どの薬は、そのままではは  
じかれてしまふ。  
だが逆に、脳に入れた薬  
がなぜ血管内  
に排出されて  
しまふのか  
が、大きな謎  
として残って  
いた。そこで  
「脳の健康を  
守るため、血  
管の細胞膜に  
は不要物を血  
液に出すたん  
ぱく質も存在する」と仮説  
を立て、そのたんぱく質を  
探す実験を始めた。

### 血管を通した物質の出入り



が血液から材料を取り込ん  
で神経伝達物質を作り、不  
要になった場合は排出する  
循環の仕組みも明らかにな  
った。今後の目標は、排出に  
かかわるたんぱく質すべて  
を知り、逆に排出されない  
薬を創出することだ。  
中学生のころからコン  
ピューターの操作が好き  
だった。計算プログラム  
を作るうちに、プログラ  
ムでは書ききれない複雑  
な機能を持つ人  
の脳に興味を  
持った。大学で  
は薬学部に進学  
したが、研究は生物系を選  
択し、遺伝子操作などを学  
んだ。

及ぼす、ある神経伝達物質  
に目を付けた。マウスを使  
って脳の血管に排出される  
この伝達物質を調べたり、  
2年がかりで培養した細胞  
の中で伝達物質がどう動く  
か試したりした。  
そしてようやく、不要物  
を脳から血液中に排出する  
いくつかのたんぱく質を見  
つけた。さらに、神経細胞

読売新聞 平成19年4月30日掲載記事

## 編集後記

中間審査を目前に控え、「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」2007年夏号の編集を担当しております、森研究室の博士課程1年の加藤です。前号での成果特集に引き続き今号でもすばらしい研究の数々を紹介させていただきました。編集に携わる上で感銘を受けましたのが、仕事の速さです。執筆依頼からわずか数日で原稿を仕上げていただいた内田先生、竹島先生を筆頭に、発行までのわずかな期間で迅速に対応していただいた諸先生に感謝致します。トヨタ自動車株式会社では「カイゼンは巧遅より拙速」と教え込まれるそうですが、「カイゼンは巧速」であると思った次第です。

2007年3月にアメリカ合衆国のBaltimoreで開催されたBiophysical Society 51<sup>st</sup> ANNUAL MEETING に参加してきました。本学会は、竹島先生大活躍のリアノジン受容体学会と呼ぶべきものでした。また、K チャネルがそれ以上と言ってもいいくらい幅を利かせていました。学会の雰囲気として印象深かったのは、ポスターの発表者が定められた時間を越えて熱心に解説し、多くの研究者が一つ、一つを丁寧に理解し、討論していたことです。幸運にも学会期間中に Johns Hopkins 大学を訪問する機会を得ました。最新の測定機器に囲まれた研究室を想像していたのですが、古い機器を工夫して使用されていました。大学のトップ研究室においても必ずしも実験環境に恵まれているわけではなく、研究者の質が優れているのだと分かりました。本特定領域を通じて、研究者として成長していきたいと存じます。

(加藤 賢太)

TRANSPORTSOME

第5号(2007年7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)レイブリンティング

