

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
2008

$$EP = V_{Syn} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{i(Syn)}}{aK^+_{IS}} \right) + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{EL}}{aK^+_{IS}} \right)$$

$$+ \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{i(Syn)}}{aK^+_{IS}} \right)$$

平成19年度成果特集号

目 次

平成19年度公開シンポジウムの報告	2
伊藤 晃成、鈴木 洋史	
特定領域研究「G蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」 合同若手ワークショップ2008	4
末次 志郎、黒川 洵子、高田 龍平、日比野 浩、大槻 純男、竹谷 豊 首藤 剛、福原 茂朋、西田 基宏、梶保 博昭、紺谷 圈二	
内耳における蝸牛内高電位(Endocochlear potential:EP)の 成立機構の解明	6
日比野 浩、任 書晃、土井 勝美、鈴木 敏弘、久 育男、倉智 嘉久	
コネキシンのチャネル活性と遺伝子の発現制御 ——筋原繊維が平行に並ぶ仕組み解明の糸口——	10
広瀬 茂久	
新規NSAIDs輸送タンパク質、TETRANの機能解析	14
水島 徹、牛島 弘雅	
編集後記	19

平成19年度公開シンポジウムの報告

2008年3月22日(土)を一日利用し、東京大学理学部小柴ホールにおいて、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」の公開シンポジウムが開催されました。年度末で前後に年会等が予定されている大変忙しい時期にも関わらず、領域内外から総勢100名を超える参加者を得、熱気にあふれるシンポジウムとなりました。本小柴ホールはその名の通り2002年にノーベル賞物理学賞を受賞された小柴昌俊博士(東京大学特別栄誉教授)にちなんだホールですが、ゆったりとした会場で、発表者・聴講者に対して共に好評であったと思います。

今回は特別講演2題、一般講演8題の計10演題で内容を組ませていただきました。特別講演として領域外より、東京大学医学系研究科の飯野正光先生と大阪大学臨床医工学融合研究教育センターの野村泰伸先生をお招きいたしました。飯野先生には種々 Ca^{2+} 蛍光イメージング法の確立と、それを応用した脳機能の解析に関する研究を分かりやすくお話いただくとともに、まだまだ未知の部分の多い中枢神経系機能に関して、 Ca^{2+} シグナル研究の切り口からその全容を明らかにする最先端の研究についてご紹介いただきました。また、野村先生にはフィジオーム・システムバイオロジーというコンセプトの元で、個々の分子レベル、細胞レベルの基礎研究結果をいかに高次臓器、更には生体レベルまで積み上げて全体の理解につなげていくかという、今後の重要な課題に対する取り組み、特に生体を階層構造として捉え、各階層の特定の数理的に記述するモデルをオープンに収集し、それを研究者間で相互利用できるプラットフォーム提供を意図した今後のビジョンについてお話いただきました。

一般講演では計画班より6名、公募班より2名の先生をお招きし、ご講演いただきました。内容的にはチャンネルに関するものが半数程度、更には細胞膜の変形や小胞輸送に関わる蛋白質、またスカフォールド蛋白質として最近注目を集めているセプチンに関するお話など、膜蛋白質のみならず、それらを取り巻くことで膜輸送複合体の形成や維持、制御に関わる因子を広く扱ったもの、更には複合体を形成する新規候補因子を検



索するためのデータベース構築に関する演題が並び、本特定領域研究におけるキーコンセプトである「複数の輸送分子がその調節分子とともに集積して形成する分子複合体」を研究し、発展・応用へと導く上で必要となる情報が盛り込まれた、大変興味深い構成になっていたのではないかと思います。

会終了後には懇親会が執り行われ、ここにも50名近い多くの方々にご参集いただきました。シンポジウムの延長で熱心にディスカッションをする先生方、また班内外の研究者間での交流を深める場としても大変に盛り上がったのではないかと思います。

最後になりますが、お忙しい中ご講演下さいました先生方、ならびにご参集下さいました皆様方にこの場を借りて感謝申し上げます。

—ご講演いただいた先生方と演題名—

特別講演

飯野 正光

(東京大学大学院医学系研究科 細胞分子薬理学)

「 Ca^{2+} 関連シグナルイメージングによる中枢神経系機能解析」

野村 泰伸

(大阪大学臨床医工学融合研究教育センター)

「生体機能のマルチレベル・マルチスケールデータベースとシミュレータの開発」



一般講演

清中 茂樹

(京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻)
「神経伝達物質放出におけるカルシウムチャネル複合体形成の生理的意義」

大塚 稔久

(富山大学大学院医学系研究科)
「神経終末アクティブゾーンの分子解剖学」

日比野 浩、倉智 嘉久

(大阪大学大学院医学系研究科)
「脳グリア細胞の K^+ ・水輸送を担う膜マイクロドメインの同定と解析」

末次 志郎

(東京大学分子細胞生物学研究所)
「細胞膜曲率によるシグナル伝達制御の可能性」

中西 宏之

(熊本大学大学院医学薬学研究部 細胞情報薬理学)
「新しいリン脂質結合タンパク質によるエンドサイトーシスの制御機構」

木下 専

(京都大学大学院医学研究科 生化学・細胞生物学グループ)
「膜蛋白質の拡散障壁としての細胞膜直下セプチン重合体」



内田 信一

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 腎臓内科学)
「腎臓における新たな体液容量調節系を形成するトランスポートソームの発見」

木下 賢吾、大林 武

(東京大学医科学研究所)
「ヒト・マウス遺伝子の共発現データベースCOXPRESdb」

伊藤 晃成、鈴木 洋史
(東京大学医学部附属病院薬剤部)

特定領域研究「G蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」 合同若手ワークショップ2008

昨年度、杏林大学の安西先生らのご尽力によりまして特定領域の若手を盛り上げるべく若手ワークショップが開催されました。本年もその流れを引き継ぎ、若手ワークショップを開催させていただきました。今年度の若手ワークショップは昨年と同様に1月26日から28日にかけて神奈川県箱根町に位置しますホテル箱根アカデミーにて開催しました。約150名の参加を頂きまして誠にありがとうございました。



本年度の若手ワークショップの大きな特色は、比較的近い研究領域である特定領域研究「Gタンパク質シグナル」の全面的な協力を得て、「Gタンパク質シグナル」と合同で開催することができたことです。Gタンパク質シグナル側では、東京大学薬学系研究科の紺谷先生に中心に成っていただき、円滑に準備を進めることが出来ました。

もう一つの特色は、口頭発表中心のプログラムを組み、なおかつ、口頭発表は、大学院生および助教未満の若手研究者に限るワークショップを中心として行ったことにあると思います。ワークショップに加えて特定領域としての研究の特徴を打ち出したシンポジウムも行いました。最近特に分子生物学会や生化学会などの大型の学会はますます大型化し口頭発表の機会は若手研究者を中心に減少しています。従いまして、学位をとるまでに口頭発表を外部で行った経験がないという事態も珍しくないと考えます。この事態はあまりいいこととは思えません。特定領域の研究の進展にはいい人材を育てなければならず、特定領域として、若手研究者に発表の機会を与えることは大変有意義だと思います。

大学院生には研究人生がどのようなものか見えにくいという問題点が指摘されています。そこで、著名な先生方4名(堅田利明先生(東京大)、森泰生先生(京都大)、宮本賢一先生(徳島大)、野村泰伸先生(大阪大))には、今後の研究の方向性や、先生方がどのように考えて研究を進めてこられたかについて貴重なお話を頂きました。先生方の講演が、この若手ワークショップの一つの目玉であったと考えます。また、中堅クラスの先生方4名(黒川洵子先生(東京医科歯科大)、福原茂朋先生(国立循環器病センター)、渡邊直樹先生(京都大)、横井峰人先生(京都大))に留学体験記を語っていただきました。ご講演頂いた先生方にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

最後に、ワークショップ遂行に当たりましてご尽力いただきました先生方およびご参加いただきました方々に厚く御礼申し上げます。特に事務方を引き受けていただいた東大薬学、梶保先生、紺谷先生、堅田研の学生たち、東大病院、高田先生および鈴木先生の学生たち、東京医科歯科大、黒川先生および古川先生の学生たち、熊本大、首藤先生と首藤先生の学生たち、および東大分生研の浜田さんに感謝したいと思います。

ワークショップ表彰

ワークショップは大学院生および助教未満の方達に限られますので、これらの方々の発表に対してのみ投票を行っていただきました。41名の発表の中から、最優秀賞に、東京医科歯科大難治疾患研(古川研)の大学院生、浅田健さん、優秀賞に京都大工学研究科(森研)の大学院生、高橋重成さん、東京大分生研(末次研)のポスドク、堀越洋輔さんが選ばれました。選ばれなかった人もそれぞれ得票得ておられましたので全体として大変レベルの高い発表であったと思います。得票結果はHPに掲載しています。

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/suetsugu/ws2008/index.html>

ワークショップ表彰を取られた方々には一文を寄せていただきました。

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理学分野 浅田健と申します。この度は多くの皆様方のご好意により「G蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ2008に参加することができました。過去に二回ワークショップに参加させて頂きましたが、それとなく宴会要員との風評が立ちつつある昨今、今回は学生に発表の機会を与えるとの趣旨の元、これはイメージを払拭せねば、と熱い使命感を持って発



表に望みました。もともと好感度アップの為の発表だったのですが、思いもかけずに名誉ある賞を頂く事ができまして、驚きつつも素直に喜んでます。

古川研では不整脈の性差、遺伝多型と不整脈、マクロファージと心房細動と、一貫して心疾患に関わる研究をしています。その中で、近年翻訳後修飾として注目されつつあるタンパク質ニトロソ化(システインニトロソ化)が、性ホルモンにより非ゲノム作用によってNO合成酵素を活性化し、NOが放出され、IKsチャネルを活性化するという新規制御機構を見出し、今回発表させて頂きました。今後はこの活性化メカニズムを詳細に検討する予定です。

最後になりましたが、このような機会を与えて下さった世話人の末次先生、紺谷先生をはじめ、多くの先生方に厚く御礼申し上げます。また皆様にお目にかかれる日を心から楽しみにしています。

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻森研究室の高橋重成と申します。この度、特定領域研究「G蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ口頭発表優秀賞を頂き、誠に光栄です。

TRPA1はマスタードオイルの成分であるAllyl isothiocyanate 等により活性化されるCa²⁺透過性陽イオンチャネルであり、末梢神経における侵害受容器として機能しているだけでなく、病態時における炎症性疼痛にも関与していることが示唆されています。しかしながら、TRPA1の内因性アゴニストに関してはほとんど見つかっていません。今回、我々は15-deoxy-Δ12,14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ2)、一酸化窒素(NO)、H₂O₂、及び酸(H⁺)等の炎症関連メディエーターがTRPA1を活性化することを見出しました。またTRPA1システイン点変異体を用いた実験の結果、15d-PGJ2、NO、及びH₂O₂による活性化に重要なシステイン残基を同定しました。今後はマウスを用いた in vivo 実験により、これらの化合物によるTRPA1の活性化が炎症・傷害部位でどのような役割を演じているのか検討していく予定です。

今回の受賞を励みに更に研究に没頭していきたいと思います。末筆になりましたが、共同研究者の皆様には感謝申し上げます。

東京大学分子細胞生物学研究所・若手フロンティア研究プログラム(末次研究室)ポスドクの堀越洋輔です。今回、特定領域「G蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ2008で口頭発表の機会を頂き、また、口頭発表優秀賞を頂いた事を大変、光栄に感じております。今回のワークショップでは、大学院生を中心に口頭発表が行われるという事もあり、ポスドクの身である私は非常に緊張し当日を迎えた事を今でも忘れません。

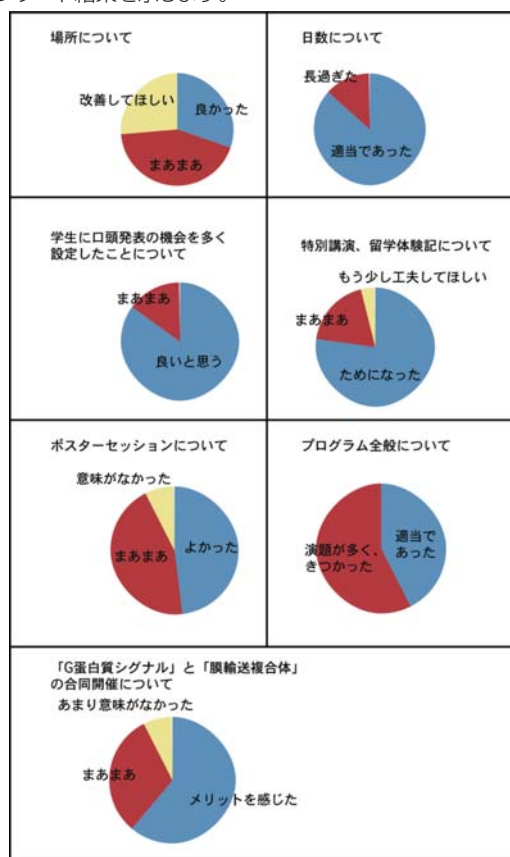
細胞極性(細胞を構成する蛋白質やリン脂質を秩序だって配置させる事)の制御は、組織の形態形成や個体の発生に重要であります。今回、私は、細胞極性の制御分子であるPAR-3が、aPKC/PAR-6と動的な三者複合体を形成する事が極性化した上皮細胞の形態形成に必須である事を明らかにしました。興味深い点は、PAR-3の発現抑制した細胞では、細胞内にアピカルタンパク質を含む小胞が蓄積し、上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成が遅れ、さらには、異常なアピカル膜ドメインを形成してしまう事です。これらの結果から、膜輸送複合体の制御に、細胞極性を制御する分子群が機能を果たしている事が示唆され、

今後、さらなる検討を行う予定です。

最後に、今回の発表の場を与えて頂きました先生方に厚く御礼申し上げます。また、今回、参加された皆様とは学会等でお会いする事があると思います。その時は気軽に声をかけて頂けると幸いです。

アンケート結果

今回は次回以降に役立てるためにアンケートを行いました。日数(会期)、学生に口頭発表の機会を多く設定したこと、特別講演や留学体験記、G蛋白質シグナルとの合同開催については高い評価を頂きました。しかしながらプログラムがきついという指摘がございました。プログラムのきつさは演題数を増やす上ではさけて通れなかったものであり私としては仕方がないと思いますが、次回以降休憩の入れ方などで改善できればいいかもしれません。ポスターセッションの評価も低いですが、ポスターセッションと懇親会を続けてやったことに問題があったのかもしれませんが、箱根を選んだ理由は費用的な面が大きいです。あまり評価が高くありません。次回に期待したい所です。アンケート結果を示します。



末次 志郎¹(A02計画班)、黒川 洵子²(A01計画班)、高田 龍平³、日比野 浩⁴(A02計画班)、大槻 純男⁵(A03計画班)、竹谷 豊⁶(A03計画班)、首藤 剛⁷、福原 茂朋⁸、西田 基宏⁹、梶保 博昭¹⁰、紺谷 園二¹⁰
⁽¹⁾東京大学分子細胞生物学研究所、⁽²⁾東京医科歯科大学難治疾患研究所、⁽³⁾東京大学医学部附属病院薬剤部⁽⁴⁾大阪大学大学院医学研究科、⁽⁵⁾東北大学大学院薬学研究科、⁽⁶⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部、⁽⁷⁾熊本大学大学院医学薬学研究部、⁽⁸⁾国立循環器病センター研究所、⁽⁹⁾九州大学大学院薬学研究院、⁽¹⁰⁾東京大学大学院薬学系研究科)

内耳における蝸牛内高電位 (Endocochlear potential:EP) の成立機構の解明

日比野 浩¹(AO2計画班)、任 書晃^{1,2}、土井 勝美³、鈴木 敏弘²、久 育男²、倉智 嘉久¹(AO2計画班)

大阪大学大学院医学系研究科¹薬理学講座分子細胞薬理学、³耳鼻咽喉科、²京都府立医科大学耳鼻咽喉科

発表論文：

Nin F*, Hibino H*, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y (2008). The endocochlear potential depends on two K⁺ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(5):1751-1756. [* : equal contribution]

1. はじめに

聴覚は動物に不可欠な感覚であり、内耳蝸牛という末梢器官で受容される。現在、日本には約600万人もの内耳性難聴患者が存在し、病態の解明と治療法の開発が急務である。しかし、基盤となる内耳の基礎研究と共に、それらは殆ど進んでいない。

音の一次受容器である蝸牛の有毛細胞は、頂上膜に感覚毛を持つ。感覚毛は、**内リンパ液**という特殊な液体に触れている。この液は細胞外液でありながら、150mMの**カリウムイオン (K⁺)**を含み、通常の細胞外液と同じイオン組成をもつ蝸牛の**外リンパ液**や血液に比べて約+80mVの高電位を帯びる(図1)。後者は**蝸牛内高電位 (EP:Endocochlear Potential)**と呼ばれる¹⁾。これらの環境は、蝸牛内リンパ液に特異的である。内リンパ液のK⁺は、音刺激により、感覚毛の頂部に局在する機械刺激感受性チャンネルを介して、有毛細胞へ流入しそれを興奮させる。これが音伝達の第一ステップとなり音は中枢へ伝わる。有毛細胞の細胞体は、低K⁺濃度の外リンパ液に浸されており、静止膜電位は-60mVである。内リンパ液の高電位EPは、有毛細胞へのK⁺流入の駆動力を増大し、聴覚の音に対する高い感受性の成立に大きく貢献しているため、音受容を増幅する「**生体電池**」のような役割を果たす。よって、内リンパ液が高電位・高K⁺であることは、聴覚に必須であり、その破綻が難聴の病因の一つであると指摘されている。

以前より、EPの成立には、**蝸牛側壁の線維細胞群 (螺旋靱帯)・上皮細胞群 (血管条)**を介した、内リンパ液から外リンパ液、そして内リンパ液への**K⁺循環**が大きく寄与し、特に**血管条**がその中心的役割を果たすとされてきた(図1)。また、その循環には、蝸牛側壁に分布する種々のK⁺輸送装置が深く関与すると考えられており、近年、その分子実体が徐々に判明してきた。我々は、内向整流性K⁺チャンネルKir4.1・胃プロトンポンプが血管条に分布し、EPの成立に重要であること^{2,3)}、また別のK⁺チャンネルKir5.1が螺旋靱帯に発現し、K⁺循環を負に制御する可能性⁴⁾を、世界に先駆けて報告してきた。特にKir4.1はKOマウスで高電位が欠如することから⁵⁾、K⁺循環を支える根源的分子と考えられる。しかし、EPの成立機構は、未だ十分に理解されていないため、我々はその解明を課題としている。

2. 血管条の特徴とEP成立機構の仮説

血管条は、**辺縁細胞・中間細胞・基底細胞**という3種の細胞で構成される(図1)。解剖学的特徴として、①**辺縁細胞・基底細胞・血管条内の血管の内皮細胞はタイトジャンクションで繋がれた単層を形成し、血管条内部を内・外リンパ液と血液から物理的に隔離する**、②**中間・基底細胞とその外側の線維細胞はギャップ結合で一体化しており、合胞体を作る**、③**辺縁細胞の基底側膜と中間細胞の頂上膜はひだ状で互いに絡み合っているため、それらに挟まれた**血管条細胞外空間 (IS:Intrastrial Space)**の間隔は15nmと狭い、という点が挙げられる⁶⁾。このISを満たす液は、通常の細胞外液と同じく低K⁺(5mM以下)であるが、約+90mVの高電位を示す(図1)^{7,8)}。この電位は **Intrastrial Potential:ISP**と呼ばれ、EPの起源とされている⁷⁾。現在までに、①Na⁺,K⁺,2Cl⁻共輸送体・Na⁺,K⁺-ATPaseが辺縁細胞の基底側膜に強く発現していること、②中間細胞を含む合胞体の電位は、約-5mVであること、③K⁺チャンネルKir4.1が中間細胞の頂上膜に豊富に分布すること、が明らかとなっている^{6,9)}。従って、①のK⁺輸送体によって保たれていると予想されるISの低K⁺と中間細胞内との間に大きなK⁺の濃度差が存在し、Kir4.1により中間細胞頂上膜を介して生ずる90mV以上のK⁺拡散電位が、中間細胞が-5mVに固定されているため(上記②)そのままISPの高電位として反映するという仮説がSaltらにより提唱された⁷⁾(図1)。実際、Na⁺,K⁺,2Cl⁻共輸送体・Na⁺,K⁺-ATPaseのアンタゴニストのフロセミド・ウアバインや、K⁺チャンネル阻害剤であるBa²⁺を血管条に投与するとEPが大きく低下する^{10,11)}。この+90mVのISPが、辺縁細胞で約10mV低下して(成因は不明)、最終的に+80mVのEPを示すと考えられてきた。**

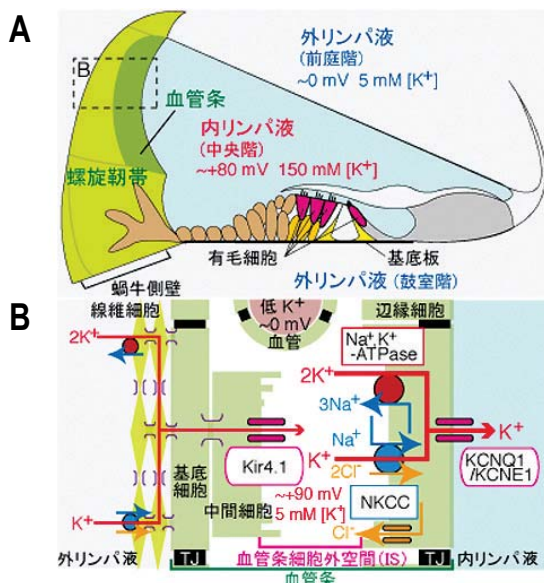


図1 内耳蝸牛(A)と側壁(B)の構造とイオン輸送装置
NKCC:Na⁺,K⁺,2Cl⁻共輸送体, TJ:タイトジャンクション

しかし、血管条のK⁺輸送装置を阻害した際に、EPとISPが実際に呼応して変化するか、中間細胞を含む合胞体の電位は種々の条件下で一定であるか等の、仮説の直接的な実証は、阻害薬を還流しつつ15nmと狭いISや合胞体に電極を留置することが困難なため、行われなかった。また、動物を無酸素状態に曝すと、EPは-10mVまで減少するが、血管条の内部は+14mVまでしか低下せず¹²⁾、この現象はISPとEPがほぼ同等のものとするSaltの仮説のみでは説明できない。我々は、仮説の妥当性を検討し、EP成立に必要な他の要素を見出すため、K⁺選択的イオン電極（二連管）をモルモットの蝸牛側壁に進めることで、血管条の細胞内外の微小コンポーネントのK⁺濃度・電位を種々の条件下で測定し、同時に別の電極でEPの変化を観察した。

3. K⁺輸送装置阻害下におけるIS環境とEPの変化

図2Aの上段は、K⁺選択的イオン電極を蝸牛の外リンパ液側から螺旋靱帯・血管条・内リンパ液へと進めた際の、電位（赤）とK⁺濃度（青：活量で示す）の変化を表し、下段は、通常の電極で内リンパ液の電位、即ちEPを経時的に観察したものである。また、血管条に薬剤を投与するため、血管条毛細血管の源流である椎骨動脈にカテーテルを留置した。外リンパ液（0mV・低K⁺）よりイオン電極を進めると、最初にK⁺濃度が65~85mMと高く、電位が+2~3mVと軽度正の値を示す地点（黒矢印）を見出した。解剖学的に（図1）、これは中間・基底・線維細胞から成る合胞体の内部を観察していると考えられた。電位は-5mVという過去の報告⁷⁾とは異なっていた訳である。更に電極を進めると、電位が+70mVと高く、K⁺濃度が4mMと低いISを認めた（白矢印）。ここに電極を留置して、無酸素負荷により血管条のNa⁺・K⁺-ATPaseを阻害したところ、IS電位（ISP）は+70mVから+22mVへと下降して3mVだけ上昇し、K⁺濃度は4mMから28mMへと上昇して2mMのみ下降する、二層性変化を認めた（図2A点線四角と図2C）。これらに呼応して、EPは-14mVの負の値まで下降し（図2A下段）、正の値で留まったISPとの差が認められた（白矢頭）。無酸素を解除すると、ISP・ISのK⁺濃度・EPの3つの値は全て元に戻った。

イオン電極をISに留めたまま、次にK⁺チャネル阻害薬Ba²⁺を血管条へ投与した。ISPは+23mVまで減少し、同時にEPの低下も認めたが、無酸素負荷の場合と異なり、ISのK⁺濃度は殆ど変わらなかった（図2A黒矢頭）。

これらの結果、特に無酸素負荷時のISPとISのK⁺濃度の鏡像反応は、中間細胞頂上膜のBa²⁺感受性K⁺チャネルKir4.1を介して発生するK⁺拡散電位がISPの主要素であることを強く示唆する。一方で、中間細胞にはCl⁻やNa⁺の電流が殆ど認められないことより¹³⁾、ISPは以下のように簡略化した式で求められる。

$$ISP = V_{Syn} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{i(Syn)}}{aK^+_{IS}} \right) \text{-----(a)}$$

V_{Syn}は合胞体の電位、aK⁺_{i(Syn)}とaK⁺_{IS}は合胞体とISのK⁺濃度（活量）である。我々はまた、合胞体の電位とK⁺濃度は、無酸素負荷によって殆ど影響されないことを見出した（図2B）。よって、V_{Syn}とaK⁺_{i(Syn)}は一定で、図2A上段の実測値（黒矢印）を代入できる。更に（a）の式へ、無酸素時におけるISのK⁺濃度変化の実測値（図2A上段点線四角と図2C下段青）を代入して、ISPの予想値（図2C下段緑）を求め、ISPの実測値（赤）と比較した。

両者はよく一致した（図2C上段）。故に、ISPは主に中間細胞のKir4.1を介したK⁺拡散電位によって成立していることが実証された。Na⁺・K⁺・2Cl⁻共輸送体の阻害薬であるブメタニドも、無酸素負荷時と同じ効果を示した（データ示さず）。

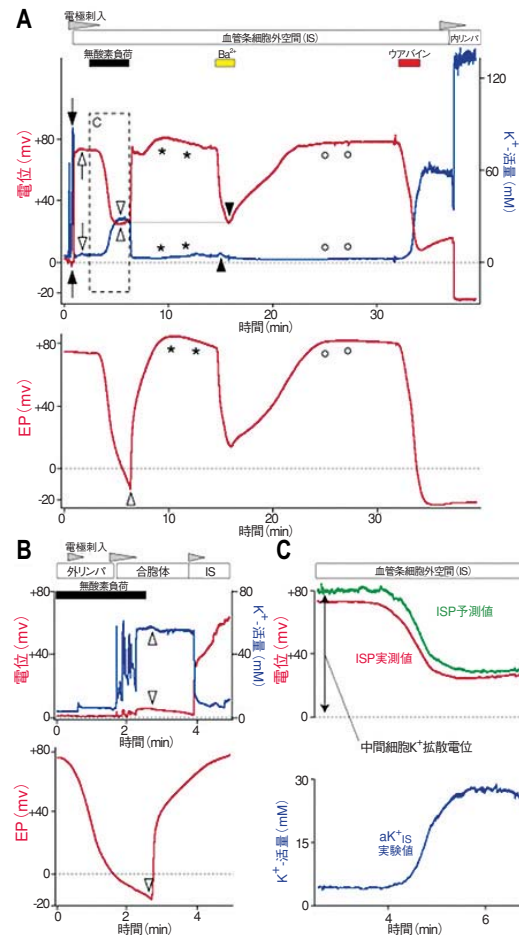


図2 Na⁺・K⁺-ATaseとK⁺チャネル阻害の効果。赤：電位、青：K⁺活量。(A) 上段：イオン電極による蝸牛側壁のK⁺と電位の測定。下段：別電極によるEPの経時変化。(B) 無酸素状態下で、イオン電極を合胞体に留め、その後負荷を解除した（上段）。K⁺活量と電位に変化はなかった。下段はEPの変化を示す。(C) 無酸素下でのISのK⁺活量の変化（Aの点線四角のデータ）からISPの予想値（緑）を求め、ISPの実測値（赤：A点線四角の赤線と同じ）と比較した。

4. EP成立における辺縁細胞の役割

図2Aの無酸素負荷時に認められたISP値とEP値との差（白矢印）から、EPの成立にはISP以外の要素に関わることが予想され、次にその同定を目指した。Ba²⁺投与の後、引き続きイオン電極をISに留め、Na⁺・K⁺-ATPase阻害薬のウアバインを血管還流した（図2A）。無酸素時と同様に、ISP・EPの低下と軽度回復、ISのK⁺濃度の上昇と軽度回復という二層性変化を認めたが、ISPが負値を示さなかったのに対し、EPは約-20mVまで降下した。そこで、イオン電極をISから内リンパ液へ進めると、K⁺濃度は100mM以上に上昇すると共に、電位は更に降下し、EP値とほぼ同じとなった。故に、ISPとEPの差は、辺縁細胞層で生じていることが判明した。

この電位差に辺縁細胞のどのコンパートメントが関与するかを検討するため、別個体の蝸牛へ、同じくK⁺選択的イオン電極と通常の電極を挿入した。後者では持続的にEPを測定した。

イオン電極を外リンパ液から進めていくと(図3A上段)、僅かに正電位かつ高 K^+ 濃度を示す合胞体(黒矢印)、高電位かつ低 K^+ 濃度を示すIS(黒矢頭)を認めた。更に電極を進めると、電位は高いままで K^+ 濃度が急に約80mMと高くなる部分を見出した(白矢印)。内リンパ液の K^+ 濃度は100mM以上であるため(図2A)、これは辺縁細胞の内部であることが考えられる。ここに電極を留置し、無酸素を負荷したところ、電位は+74mVから+27mVへ大きく下降した後、+52mVへ回復したが、 K^+ 濃度はS字状に低下した(図3A上段点線四角)。この辺縁細胞の電位変化は、無酸素時・ウアバイン投与時のISPの二層性変化に類似している(図2A)。一方、EPIは低下し続け、-40mVの負値を示した。更にイオン電極を辺縁細胞内から内リンパ液へと進めると、 K^+ 濃度は約100mMへ上昇すると同時に、電位は大きく低下してEPとほぼ同じ負値を示した(図3A白矢頭)。従って、図2Aで観察されたISPとEPの差は、辺縁細胞の頂上膜で生じていたことになる。

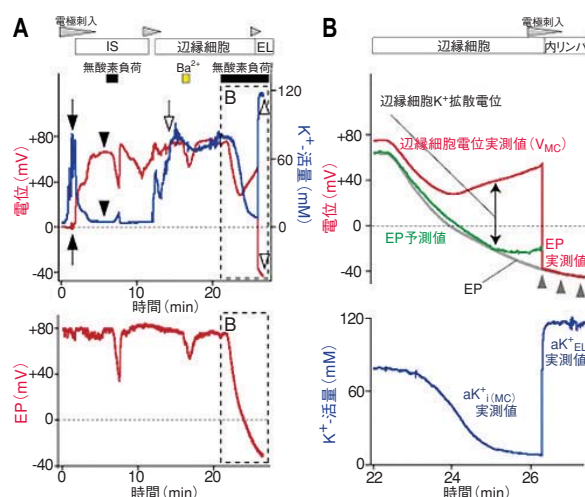


図3 辺縁細胞の解析。赤:電位、青: K^+ 活量。(A) 上段:イオン電極による測定。合胞体(黒矢印)、IS(黒矢頭)を通過後、高電位・高 K^+ の辺縁細胞内(白矢印)に到達。無酸素負荷の後、内リンパ液(EL)へ挿入した。下段:EPの変化。(B) 無酸素による K^+ 濃度の実測値(下段青:Aの点線四角と同じ)から辺縁細胞頂上膜の K^+ 拡散電位を求め、辺縁細胞電位の実測値との和をEPの予想値(緑)として示した。更にEPの実測値(灰色:A下段点線四角)を重ねた。

辺縁細胞の基底側膜には K^+ 電流が認められないが、頂上膜には電位依存性 K^+ チャネルKCNQ1/KCNE1が分布する(図1B)。故に、図3A上段の如く辺縁細胞内の K^+ 濃度が低下すると、頂上膜における K^+ 拡散電位が増大し、EPと辺縁細胞との電位の差が拡大する。辺縁細胞頂上膜の K^+ 透過性は Na^+ や Cl^- よりもかなり大きい(14)、EPは単純に辺縁細胞の電位と頂上膜の K^+ 平衡電位の和として以下のように計算できる。

$$EP = V_{MC} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{i(MC)}}{aK^+_{EL}} \right) \text{-----(b)}$$

$V_{MC} \cdot aK^+_{MC}$ はそれぞれ辺縁細胞の電位・ K^+ 活量である。内リンパ液の K^+ 濃度(aK^+_{EL})は無酸素負荷により変化しないため(15)、一定である。(b)式へ、無酸素による辺縁細胞の電位変化と K^+ 濃度変化の実測値(図3A上段点線四角)を代入し、EPの予想値を求め、図3B上段に緑で示した。この予想値は、実際に観察されたEP変化の実測値(図3A下段点線四角と図3B灰色線)とよく一致した。従って、無酸素負荷時に拡大する辺縁

細胞頂上膜を介した電位差は、主に K^+ 拡散に依存していることが明らかとなった。

5. 血管条の電気的隔絶

EP成立に必須であるISPが高く保たれるためには、隣接する内・外リンパ液や血液から、ISが電気的に隔絶されている必要がある。それを証明するため、我々は、 K^+ 選択的イオン電極に通電することで、組織のinput resistance(入力抵抗)を測定する実験を試みた(図4)。一般に抵抗が上昇すると、通電に対応する電位変化が増大する。通電しながらイオン電極を外リンパ液から蝸牛側壁へ挿入していくと、高電位(+64mV)・低 K^+ 濃度(3mM)のISを認めた(黒矢印)。同時に外リンパ液(白矢頭a, d)では殆ど認められなかった通電に対応する電位変化が、ISでは極度に増大した(黒矢印、白矢頭b)。ISで電極を止め、確認のために無酸素を負荷すると、図2と同じく電位は下降し K^+ 濃度は上昇した。更に、電極を高電位・高 K^+ の内リンパ液(白矢印)へと進めると、通電に呼応した電位変化は縮小し(白矢頭c)、ほぼ外リンパ液のレベルに戻った。よって、ISは高い抵抗値を示すこと、即ち隣接する細胞外液から電気的に隔離されていることが判明した。

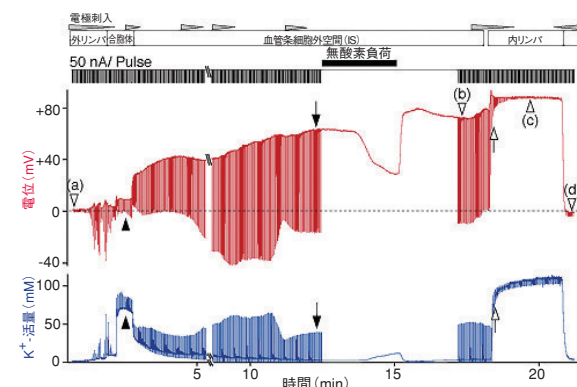


図4 蝸牛側壁のinput resistance。(A) 上段:イオン電極に50nA・200msのパルスを持続的に通電し、側壁の電位(赤)と K^+ 活量(青)を観察しつつ組織抵抗を測定した。上段赤の下向きトレースは、パルスに対応した電位変化、即ち抵抗値を表す。合胞体(矢頭)を通過後、IS(矢印)を認めた。ISの抵抗は高いことに注目。パルスに対応する下段の変化はアーチファクトである。

6. 結果のまとめとディスカッション

今回我々は、以前に報告のあった血管条内のISの存在とその特異的な環境(高電位・低 K^+)を確認した。更に、 Na^+ 、 K^+ -ATPaseとKir4.1の阻害によってISP・EPが共に低下するが、それは各々異なったメカニズム~ISの K^+ 濃度の上昇による K^+ 拡散電位の減少と中間細胞頂上膜の K^+ チャネルを介した K^+ 拡散の阻害~によることを示した(図2)。これらは、EPの主な起源がISPであること、中間細胞頂上膜を介した電位差は大部分が K^+ 拡散電位であり且つISPの主成因であることを示しており、Saltらが提唱した仮説(7)をはじめて直接的な実験で証明したものである。

また、我々は新たにEP成立に必須な3つの要素を同定した。一つ目は、ISが隣接する細胞外液から電気的に隔絶されていることである。これはISが+90mVの高電位ISPを維持するためには不可欠な環境である。基底・辺縁・血管内皮細胞層の3つの層が絶縁体となり、ISを各々外リンパ液・内リンパ液・血液から

隔離していると予想される(図1)。実際、基底・内皮細胞層のタイトジャンクションの崩壊が見られるclaudin-11・connexin30のKOマウスでは、大きなEPの低下が見られる¹⁶⁻¹⁸⁾。第二の要素は、中間細胞を含む合胞体の電位が、いかなる条件下においても、固定されていることである(図2B)。図2B及び他の個体を使った検討によって、この電位は過去の報告⁷⁾と異なり、0~+4mVであることが判明した。ギャップ結合によって繋がれた多くの線維・基底・中間細胞からなる合胞体の膜容量は、非常に大きくなっている。よって、蝸牛側壁を介したK⁺循環の量が変化しても、合胞体の電位は殆ど変わらないと予想される。この性質のため、中間細胞の頂上膜を介したK⁺拡散電位が、ほぼそのままISPとして反映される。

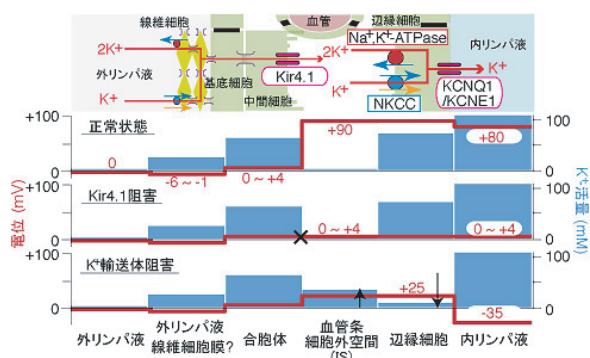


図5 正常時と負荷時における蝸牛側壁の電位・イオン環境。

第三の要素は、辺縁細胞頂上膜を介したK⁺拡散である。辺縁細胞のNa⁺, K⁺-ATPaseを阻害した際に、中間細胞頂上膜でのK⁺平衡電位の変化の予想値はISPの実測変化値によく相関したが、EPの変化値との間に差が見られた(図2)。この差は、辺縁細胞内のK⁺濃度の低下によって拡大する辺縁細胞頂上膜のK⁺拡散電位によって説明できた(図3)。また辺縁細胞の基底側膜にはK⁺チャネルが殆ど存在しないので¹⁹⁾、辺縁細胞の電位はISのK⁺濃度変化の影響を受けず、ほぼISPと同値と考えられる。よって、EPの値は、(a) (b) より以下の如く単純な一つの式で求められる。

$$EP = V_{syn} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{i(syn)}}{aK^+_{IS}} \right) + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{i(MC)}}{aK^+_{EL}} \right) \text{-----}(c)$$

生理的条件下において、辺縁細胞と内リンパ液のK⁺濃度は、活量で各々約80mMと100mM以上であるため、辺縁細胞の電位とEPとの約10mVの差は、主にK⁺拡散電位によるものと考えられる。種々の条件下における蝸牛側壁の各コンパートメントのK⁺濃度・電位の関係を図5に示す。

7. 将来の展望

本研究で、EPの成立機構はほぼ理解できたと考えられる。今後は、得られた実験結果や過去の文献データを用いて、蝸牛のK⁺循環をコンピューターでモデル化し、EPの成立機序をより詳しく説明することを目標とする。中間・辺縁細胞の膜のひだ状構造やISの狭さ等の解剖学的特徴の重要性も明らかにしたい。また、K⁺循環に関わる機能分子を *in silico* で破綻させて惹起する病態を予測し、原因不明の聴覚疾患の病因究明や診断・治療法の開発、薬剤の効果や副作用の評価を可能にするシステムの構築も目指す。

8. 終わりに

20年前に発表されたEPの成立機序についての仮説⁷⁾は大筋において正しかったことは残念(?)ではあるが、技術的な困難を克服し、仮説の実証と、新たに3つの必須要素を見出したことは、大きな進歩である。超マイナー領域である内耳研究であるが、蝸牛はいわば「トランスポートソームの塊」であり、今後とも「number oneよりonly one」をモットーに研究・営業活動を行って行きたい。

尚、本実験は全て任書晃先生(京都府立医科大学から出向)によって行われた。論文作成にあたり、A.J. Hudspeth先生(Rockefeller大)、I. Findlay先生(Tours大)、阿部登先生(京都府)の貴重なご助言に深く感謝したい。

引用文献

- 1) Bekesy (1952) *J Acoust Soc Am* **24**, No1, 72-76.
- 2) Hibino, H., et al. (1997) *J Neurosci* **17**, 4711-21.
- 3) Shibata, T., et al. (2006) *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C1038-48.
- 4) Hibino, H., et al. (2004) *Eur J Neurosci* **19**, 76-84.
- 5) Marcus, D. C., et al. (2002) *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C403-7.
- 6) Hibino, H. & Kurachi, Y. (2006) *Physiology (Bethesda)* **21**, 336-45.
- 7) Salt, A. N., et al. (1987) *Laryngoscope* **97**, 984-91.
- 8) Ikeda, K. & Morizono, T. (1989) *Hear Res* **39**, 279-86.
- 9) Ando, M. & Takeuchi, S. (1999) *Cell Tissue Res* **298**, 179-83.
- 10) Marcus, D. C., et al. (1985) *Hear Res* **17**, 79-86.
- 11) Kusakari, J., et al. (1978) *Laryngoscope* **88**, 12-37.
- 12) Melichar, I. & Syka, J. (1987) *Hear Res* **25**, 35-43.
- 13) Takeuchi, S. & Ando, M. (1998) *Neurosci Lett* **247**, 175-8.
- 14) Shen, Z. & Marcus, D. C. (1998) *Hear Res* **123**, 157-67.
- 15) Melichar, I. & Syka, J. (1977) *Pflugers Arch* **372**, 207-13.
- 16) Kitajiri, S., et al. (2004) *J Cell Sci* **117**, 5087-96.
- 17) Gow, A., et al. (2004) *J Neurosci* **24**, 7051-62.
- 18) Cohen-Salmon, M., et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6229-6234.
- 19) Takeuchi, S., et al. (1995) *Hear Res* **83**, 89-100.



中部経済新聞 H20.01.23



京都新聞 H20.01.23

コネキシンのチャネル活性と遺伝子の発現制御 ——筋原繊維が平行に並ぶ仕組み解明の糸口——

広瀬 茂久 (A01公募班, H18-H19年度)

東京工業大学大学院生命理工学研究科生体システム専攻

発表論文：

Sultana N, Nag K, Hoshijima K, Laird DW, Kawakami A, Hirose S. Zebrafish early cardiac connexin, Cx36.7/Ecx, regulates myofibril orientation and heart morphogenesis by establishing Nkx2.5 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105, 4763-4768, 2008.

1. はじめに

心臓に異常を有するゼブラフィッシュ変異体 *ftk* の解析から、コネキシンによって構成されるチャネル（ギャップジャンクション又はヘミチャネル）が、心筋細胞の筋原繊維の向きを決めるのに必須であるという興味深い現象を見出したので、研究の舞台裏を交えながら紹介したい。学術的な内容の詳細は、論文¹⁾をご覧ください。

2. コネキシンの紹介

ギャップジャンクション (Gap junction, GJ) は名前のとおり、隣接する2つの細胞をつなぐ連絡通路で、低分子を通すチャネルとして働いている。選択性は低く、分子量1000以下のイオンや栄養分子の他にプロスタグランジンやcAMPなどの情報伝達分子を通す。GJを構成する基本分子がコネキシン (Connexin, Cx) で、膜4回貫通型のタンパク質である。Cxが

6個集まってコネクソン (Connexon) というヘミチャネル (hemichannel) を作り、さらにヘミチャネル2個が合体してGJとなる (図1)。ヘミチャネルはそれ自体としても機能するが、この場合は細胞間ではなく、細胞とそれをとりまく細胞外液との間で物質交換を行なう。

20種類を超えるコネキシンが知られており、それらは分子サイズによって区別され、大きさが36.7kDaならばCx36.7とよぶことになっている。そうすると同じコネキシンでも種によってアミノ酸配列が少し違うために分子量も微妙に異なり、違う数字で標記されるので注意を要する。種類が多いということは、それだけ多くの仕事をこなしていると期待されるが、個々のコネキシンのチャネル特性についてはよく分かっておらず、親水性分子をよく通す細管構造を作るものや疎水性分子の通路となるものなどに大別されているに過ぎない。

コネキシン無しには細胞の世界は成り立たない。また二つの

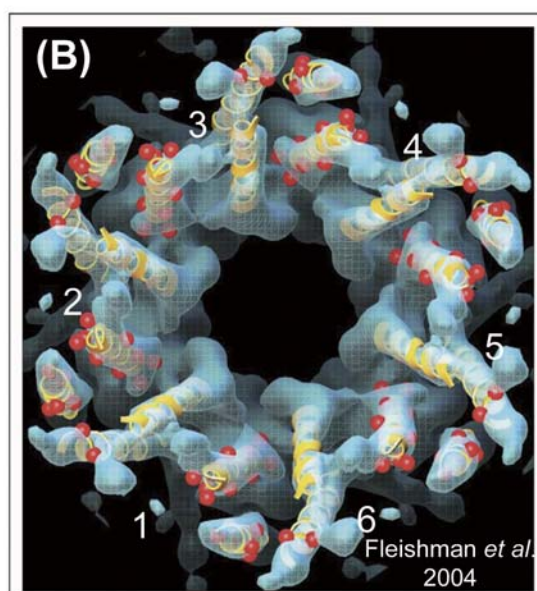
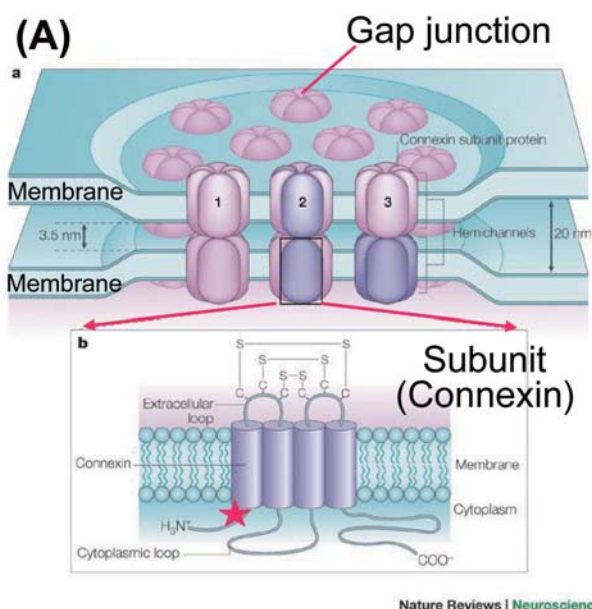


図1 ギャップジャンクション (GJ) とそのサブユニット構成。

(A) コネキシンが6個集まってコネクソンとよばれるヘミチャネルを作り、それがさらに2つ合体して細胞間チャネル (GJ) を作る (文献2から改変)。コネキシンは膜4回貫通型の膜タンパク質であるが、変異体 *ftk* では、12番目のアミノ酸に変異がみられた。(B) GJのポアの立体イメージ (文献3から改変)。

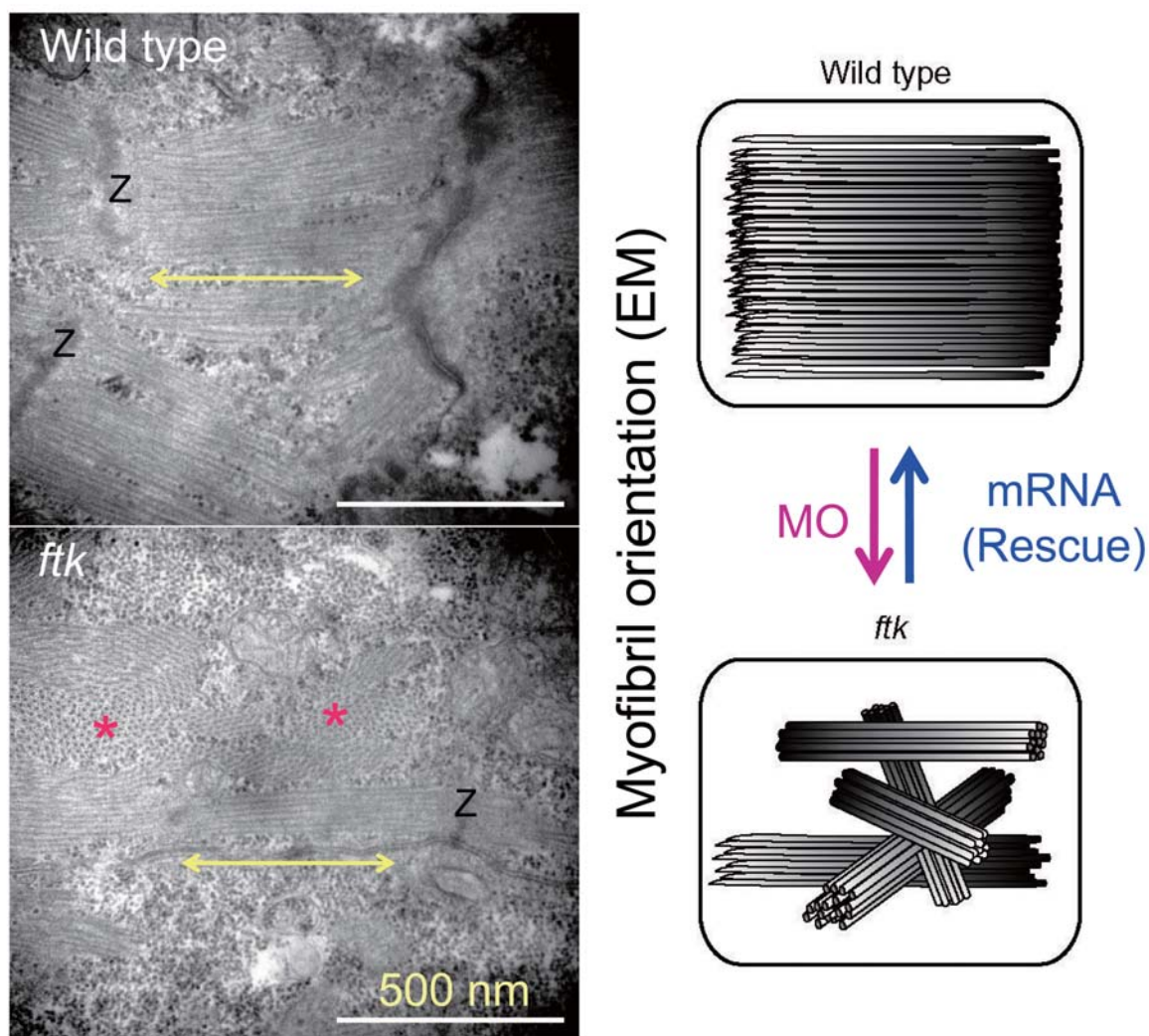


図2 ゼブラフィッシュ変異体 ftk の心臓の電顕写真。
 (左) 心筋細胞の一部。野生型では筋原繊維の向きは揃っているが、変異体 ftk ではランダムである。黄色矢印は紙面に平行で、赤印は鉛直に近い向きの筋原繊維を示す。
 (右) アンチセンスモルフォリノMOによるノックダウンと正常mRNA導入によるレスキュー実験。

細胞にまたがるという魅力的な構造ゆえに多くの構造生物学者をひきつけてきた。コネキシンの異常に起因する病気も数多く知られている。従ってオリジナル論文はもとより、総説²⁻⁴⁾も多数書かれている。普通はこのような領域で新しいプロジェクトを立ち上げることはしない。私たちも2年前まではコネキシンはもはや教科書の世界の話で、コネキシンを主題とする論文を書くとは思ひもなかった。

3. ゼブラフィッシュ変異体 ftk との出会い

私たちが ftk と名づけたゼブラフィッシュの変異体は、ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea; アルキル化剤の一種で、ゲノム上に高頻度で点突然変異を誘発する尿素誘導体) 処理によって得たもので、胸部に浮腫を生じる。一般的に浮腫を生じる変異体は、解析が困難なせいか、捨てられる運命にある。私たちの場合は、循環系の恒常性、とくにイオンホメオスタシスに興味があったので浮腫変異体は魅力的だった。淡水中では浮腫を生じるが、

生理食塩水中ではそれが回復するような変異体が見つければ面白い仕事ができるに違いない。こう考えた星島一幸は、小魚研究会のメンバー宛に「ゼブラフィッシュの浮腫変異体を求む」と広告を出した。東大、筑波大、遺伝研などから声がかかり数匹の候補が手に入った。その中で最も生理食塩水による回復がよいものについて先ず解析することにした。生みの親は東大の川上厚志(現在は東工大)で、ポジショナルクローニングの専門家でもあったので、手ほどきを受けながら変異遺伝子の特定にとりかかった。SSCP (single-strand conformation polymorphism) 分析の繰り返しで単調な日々が延々と続いた。うまくいけば半年といって、バングラデシュからの留学生 Naznin Sultana にやってもらうことにしたが、ゼブラフィッシュのゲノムデータに不正確なところがあり予想以上に時間がかかった。私の一番の貢献は、途中でやめたいという彼女を上手に説得して、最終的には2年がかりで変異遺伝子の特定にこぎつけたことである。

4. *ftk*の表現形

Naznin Sultanaの夫Kakon Nagも私たちの研究室に私費留学生として来ていた。彼はバングラデシュ代表の水泳選手だっただけあって強靱な肉体と精神の持ち主で、驚異的な量の実験をこなした。早々と博士論文相当の仕事を仕上げたところで、妻の実験を時々わきで見ながら手伝っていた。そんなある日、2人して「先生大変です。すぐ来てください」と私を呼びにきた。日曜日の昼近くだったので今でもよく覚えている。彼らがBloodlessと興奮しているように、確かに、浮腫を起こしている幼生には赤血球が無いものが混じっている。浮腫に気をとられて、主研究者であるNaznin Sultanaや私には周りが見えなくなっていたのである。脇で見ていたKakon Nagだからこそ気づくことができた。岡目八目とはこのことだと痛感したが、嬉しい発見であった。この発見以来、Kakon Nagも*ftk*の研究に本格的に取り組むことになり、強力な研究チームが出来上がった。*ftk*という名前も彼らが母国語のfutka（水膨れをしたフグのような形）にちなんで名づけたものである。

赤血球が消失するところをとらえたいと、受精後2日から3日にかけて丁寧に観察を続けたところ、心房から赤血球が漏れ出し、浮腫部に溜まる現場を捉えることに成功した。浮腫部に溜まった赤血球はしばらくすると見えなくなった。細かくは追及していないが、浸透圧の関係で溶血するのかも知れない。

心臓に異常があるらしいことがわかったので、心臓の切片を作って調べることにした。といっても、ゼブラフィッシュの幼生自体が5mm程度しかなく、心臓となると点の大きさで、心臓を含む組織切片を作ること自体が難作業であったが何とか観察に成功した。予想通り、*ftk*の心臓は、正常なものに比べ筋肉層が極端に薄かった；圧がかかると穴があき、そこから血球が漏れることも説明できる。しかも拡張しており、先天性心疾患でよくみられる形態とそっくりだった。普通はこの光学顕微鏡観察でよしとするところだが、2人の留学生は電子顕微鏡にも興味があるので試しに自分たちのサンプルでトライしたいという。私たちの研究室には、当時、電顕が得意な技術職員（山本洋子）がいたので、さっそく協力してもらうことにした。結果は予想外で驚くべきものだった（図2）。*ftk*の心臓では、本来心筋細胞の長軸方向に平行に揃っているはずの筋原繊維の向きがバラバラなのである。一枚の電顕写真を見てすぐにこの異常に気付いた点で私も指導教員に値する仕事が出来たようだ。これでトップジャーナルを狙えるといったら、2人とも飛び上がって喜んでいて。

*ftk*の心臓（1心房1心室）では、calcium waveが正常に伝わるにも関わらず、心房と心室の収縮が同期せず、時々血液の逆流が起きるが、この現象も筋原繊維の向きがランダムなために心筋の運動がうまく制御できない結果と考えられる。

5. 原因遺伝子 connexin 36.7 (cx36.7) の同定

*ftk*の表現形の解析と並んで、いやむしろ優先させるかたちで、進めていたポジショナルクローニングによる変異遺伝子の同定も2年近く経過したところで山場を迎えていた。候補領域を0.2cM（～200kb）まで絞り込み、そこには6個の遺伝子の存在が予測された。連鎖解析から最も可能性の高いのが*ftk*（=cx36.7）となったが、念のため6個すべてをクローニングし塩基配列を決定し変異の有無を調べることにした。幸い

cx36.7にのみ変異が認められ、原因遺伝子はコネキシンcx36.7と推定された。変位部位はN末端に近く、12番目のAspがValに変わっていた（D12V）。

原因遺伝子を確定するためには、（1）正常個体において、その遺伝子の発現を抑えたと同じ表現形が生じ、逆に（2）変異体に正常遺伝子あるいはmRNAを導入するとレスキューされ表現形が回復することを示さなければならない（図2右）。モルフォリノ（MO）とよばれるアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いると発生4日目までならば特定の遺伝子発現をノックダウンできるのでこれを利用することにした。正常な受精卵にcx36.7のMOを注入し発生させると、*ftk*と同じ表現形を示した。筋原繊維の配向もランダムになっていることが電顕観察で確かめられた。逆に、変異体*ftk*の受精卵に正常なcx36.7 mRNAを導入した場合は、レスキューされ正常に発生した。これらの実験によりcx36.7遺伝子の異常が原因で上述の興味深い表現形が現れていることが確定した。確かめの実験だったとはいえ、結果が出るまでは落ち着いた毎日であった。

6. 下流分子の同定

コネキシンの働きを知ろうと思うと、私たちが見つけたCx36.7がギャップジャンクションとして働いているのか、それともヘミチャネルとして働いているのかを明らかにしなければならない。そこで「突然のメールですみませんが、...」といってカナダの西オンタリオ大学のGJの専門家D. Lairdに共同研究を打診し、快諾してもらった。先方に任せておくと時間がかかりすぎるといことで、Naznin SultanaとKakon Nagの2人がカナダに行き直接実験してもらうことにした。学振とグローバルCOEの支援で、6週間ならば何とか費用を工面できた。実際には4週間でデータを取り終え、5週目には帰ってきた。帰り際には「2人一緒に面倒を見るからポストドクに来ないか」と誘われたのだからたいしたものだ。

培養細胞にCx36.7を強制発現させた後、1つの細胞に蛍光色素を注入して、隣の細胞への移動をみるとGJ活性があるか否かがわかる。一方、培養液に蛍光色素を添加して、その細胞内への取り込みを調べるとヘミチャネル活性の有無を知ることが出来る。蛍光色素も親水性のものや疎水性のものをい用いるとチャネルの特性がある程度わかる。その結果、Cx36.7は親水性分子も疎水性分子も通し、GJとしてもヘミチャネルとしても働くことが明らかになった。GJ及びヘミチャネルの両方として働くコネキシンはめずらしい。

7. 心臓で有名な転写因子Nkx2.5の登場

Cx36.7の役割を明らかにするためには、コネキシンと相互作用する分子あるいは下流で働いている分子を同定する必要がある。そのためには、（1）変異体と正常個体からmRNAを単離し、マイクロアレイで発現量に大きな差のあるものを同定する方法と（2）これまでに心臓で発現していることが知られているマーカー分子を網羅的に調べる方法が考えられた。前者はオーソドックスで有力かつ魅力的なアプローチであったが材料となるゼブラフィッシュの心臓はあまりにも小さく諦めた。結局、後者の道を選び、*in situ hybridization*によって、変異体で発現量が激減しているmRNAを丁寧に探したところ、有名な転写因子Nkx2.5の発現がほぼ完全に抑制されていることが明に

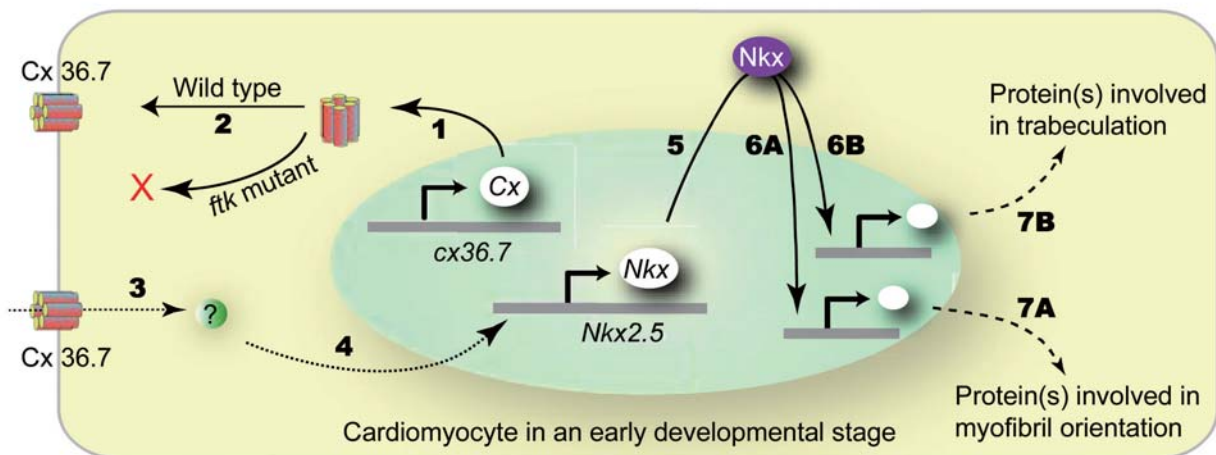


図3 コネキシンCx36.7による心筋特異的転写因子Nkx2.5の発現制御
Cx36.7によって未知の因子が発現初期の心筋細胞に取り込まれると、Nkx2.5遺伝子が活性化され、それ以降の心臓発生の引き金が引かれると考えられる。Nkx2.5の下流にある遺伝子の1つが筋原繊維の配向に関わっている(本文では触れなかったが、Nkx2.5をMOでノックダウンすると、筋原繊維がftkと同じようにバラバラになることが確かめられた)。

なった。Nkx2.5はホメオボックス型転写因子でCsx/Nkx2-5とも略記される^{5,6)}。Nkx2.5は心臓前駆細胞の最も早い段階で発現する転写因子として知られている。Cx36.7がその上流に位置することは、心臓発生の発生過程を理解する上でも大変興味深い。私たちの現在の作業仮説を図3に示す。Cx36.7の発現が心臓発生のごく初期に一過性にみられるのも際立った特徴である。興味深いことにその発現は心臓が鼓動を始めると同時に消失した。

8. おわりに

今後は、(1) cx36.7遺伝子のプロモーター解析による心臓特異的な発現機構の解析、(2) Cx36.7とNkx2.5の間をつなぐ未知分子の同定、(3) Cx36.7と相互作用する分子の同定(トランスポートソーム)とリン酸化等による活性制御機構、及び(4) 筋原繊維の向きを決めている仕組みを明らかにしたい。発生の特定の段階で、特殊なコネキシン複合体を膜上に配置することによって、発生のシグナル分子を細胞内に取り込み、発生のカスケードの引き金を引くという仕組みは興味深い。仕事をした後は短時間で消失してしまう点でも、成熟細胞で定常的に発現し機能し続ける一般的なトランスポートソームとは対照

的である。トランスポートソームの一過性発現による遺伝子の発現制御機構の存在を読者の方々にアピールできたとすれば幸である。

本稿の副題に示した筋原繊維の配向に関しては、心筋の機械的刺激が大きな役割を果たしていることが明らかにされている。しかし心臓が鼓動を始める前から筋原繊維は一定の向きに規則正しく並んでいなければならないことを考えると、初期ではここで紹介したCx36.7の系が働いているのは理にかなっている。

引用文献

- 1) Sultana, N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 4763-4768, 2008
- 2) Söhl, G. et al.: Nat. Rev. Neurosci. 6, 191-200, 2005
- 3) Yeager, M. & Harris, A.L.: Curr. Opin. Cell Biol. 19, 521-528, 2007
- 4) Kardami, E. et al.: Prog. Biophys. Mol. Biol. 94, 245-64, 2007
- 5) Komuro, I. & Izumo, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8145-8149, 1993
- 6) Lints, T.J. et al.: Development 119: 419-431, 1993

新規NSAIDs輸送タンパク質、TETRANの機能解析

水島 徹¹(AO4公募班)、牛島 弘雅¹¹ 熊本大学大学院医学薬学研究部

発表論文：

Mima, S., Ushijima, H., Hwang, H., Tsutsumi, S., Makise, M., Yamaguchi, Y., Tsutiya, T., Mizushima, H. & Mizushima, T. Identification of the TPO1 gene in yeast, and its human orthologue TETRAN, which cause resistance to NSAIDs. *FEBS Letters*. 581, 1457-1463, 2007.(1)
 Ushijima, H., Hiasa, M., Namba, Y., Hwang, H., Hoshino, T., Mima, S., Tsutiya, T., Moriyama, Y., & Mizushima, T. Expression and function of TETRAN, a new type of membrane transporter for NSAIDs and other organic anions. Submitted

1. NSAIDsについて

非ステロイド系抗炎症薬 (Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; NSAIDs) は、アスピリンやインドメタシンに代表される優れた解熱・鎮痛・抗炎症薬であり、世界中で最も使用される医薬品の一つである。近年、疫学調査の結果からNSAIDsの長期使用によって消化器系の癌、及びアルツハイマー病の発症リスクが減少することが報告されており、NSAIDsは新しい抗癌薬、アルツハイマー病治療薬としても注目されている。

しかしながら、NSAIDsの使用にあたって、その副作用である胃潰瘍や腎機能障害が大きな問題になっている。NSAIDsはcyclooxygenase (COX) を阻害しprostaglandins (PGs) の産生を低下することにより抗炎症作用を発揮すると考えられている。PGsは炎症部位において炎症増悪因子として働く一方で、胃粘膜部位においては胃粘膜保護因子として働いており、NSAIDsはPGsを低下することにより胃潰瘍を導くとこれまでに考えられてきた (図1)。しかしながら、胃潰瘍の発症頻度と胃粘膜部位におけるPGs量との間には相関が無いことが報告されており、NSAIDsによる胃潰瘍の発症にはCOX阻害作用以外の機構が関与することが考えられていた。最近我々は、胃粘膜部位におけるPGsの減少に加えて、COX非依存的な作

用である、NSAIDsによる直接細胞傷害作用 (胃粘膜細胞死) が胃潰瘍の原因であることを見出した²⁻⁴⁾ (図1)。一方NSAIDsによる腎機能障害の発症機構は、COX阻害によりPGs量が低下し、腎血流量が減少することが原因であると考えられているが、NSAIDsが直接尿管細胞を傷害することが原因であるという考え方も提唱されており、その詳細な機構はわかっていない。

2. 薬物トランスポーター

体内に投与された薬物は、吸収され、様々な臓器に運ばれ、最終的には尿中などに排出される。このすべての過程において薬物トランスポーターが重要な役割を果たしている。しかしながら、NSAIDsの膜透過に与る薬物トランスポーターは同定されていない。従って、NSAIDsの膜輸送に関わるタンパク質を同定することは、NSAIDsの作用・副作用の解明、及びそれらに対する患者の感受性の予測に大変重要である。

3. NSAIDs耐性化遺伝子の探索

これまでに我々はNSAIDsに関する網羅的な解析を行ってきた。例えばNSAIDsによって誘導される遺伝子をDNA microarrayにより解析を行い、NSAIDsがタイトジャンクション関連遺伝子を誘導し、癌の転移を抑制すること、及びNSAIDsが小胞体ストレス応答を誘導し、アポトーシスを誘導することなどを報告してきた^{4,5)}。また別の網羅的解析のアプローチとして、細胞をNSAIDs耐性化する遺伝子の探索を行った。これまでにいずれの生物種においても、NSAIDs耐性遺伝子は報告されていない。我々は、遺伝学的解析が比較的容易な酵母を用いて、過剰発現させたときに細胞をNSAIDs耐性化する遺伝子を探索し、さらにその遺伝子配列、及びそのヒトゲノム情報からヒトホモログを検索し、その機能解析を行うという研究戦略をとった。

酵母を用いてNSAIDs耐性化遺伝子の探索を行った結果、我々は酵母においてポリアミンの輸送に与ることが報告されていたTPO1を同定した⁶⁾。TPO1はプロトン駆動力を利用するmajor facilitator superfamily (MFS) に属するトランスポーターであり、ポリアミンだけでなく、フェノキシ酢酸、ミコフェノール酸などを排出し、酵母をこれらの薬剤に耐性化することが報告されていた⁷⁻¹⁰⁾。そこでTPO1を過剰発現させた酵母を用いて、NSAIDs含

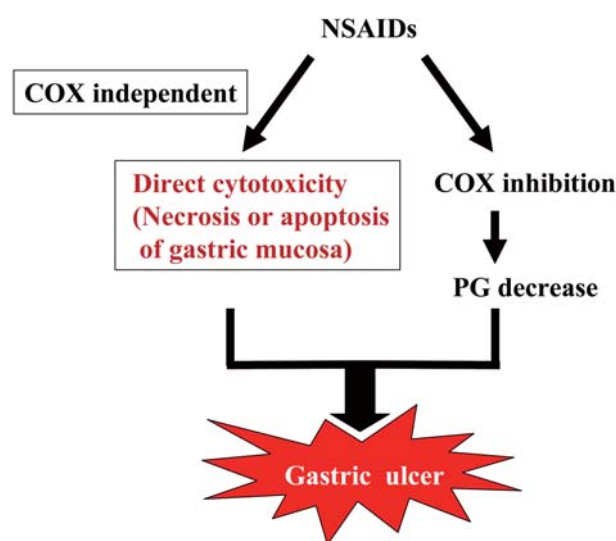


図1 Mechanism for NSAID-induced gastric ulcers

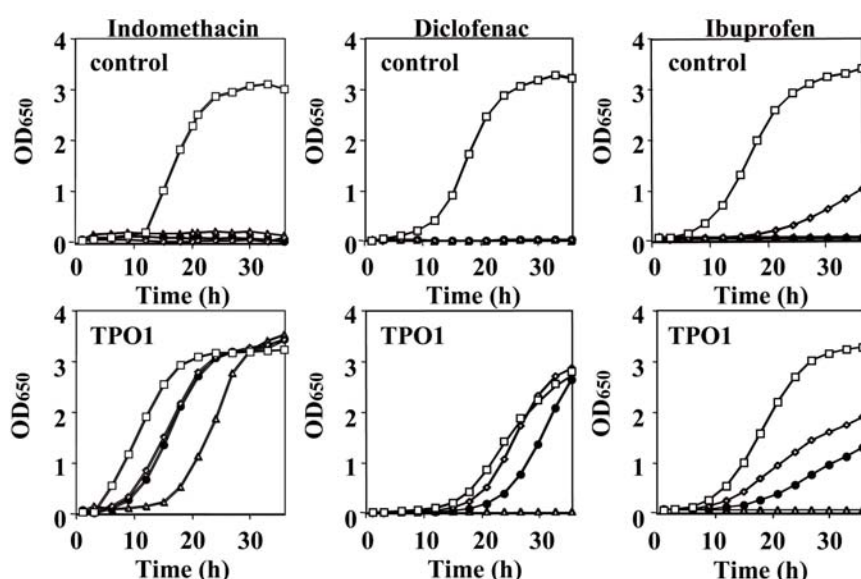


図2 Growth of yeast cells over-expressing *TPO1* in the presence of NSAIDs.

Full growth suspensions of W303-1/pHW99 or W303-1/pYES2 were 1/50 diluted and cultured at 30°C in the presence of 0 (open square), 0.3 (open diamond), 0.6 (closed circle), and 1.2 (open triangle) mM indomethacin; 0 (open square), 0.1 (open diamond), 0.2 (closed circle), and 0.4 (open triangle) mM diclofenac; 0 (open square), 0.1 (open diamond), 0.2 (closed circle), and 0.4 (open triangle) mM ibuprofen; 0 (open square). The OD at 650 nm was monitored.

有培地中で細胞を培養することによりNSAIDs耐性化の有無を検討した結果、TPO1発現細胞がインドメタシンに耐性を示すことが分かった(図2)。さらに同様の実験をインドメタシン以外のNSAIDsを用いて行った結果、ジクロフェナクやイブプロフェンに対しても耐性化すること(図2)、アスピリンに対しては耐性化しないことなどが明らかになった。このように細胞をNSAIDs耐性化する遺伝子、またNSAIDsを排出する蛋白質が示唆されたのはTPO1が初めてである。

4. TPO1 human homologue, TETRANの探索

次に我々は、TPO1の遺伝子配列、及びヒトゲノム情報から、TPO1のヒトホモログとして tetracyclin transporter-like protein (TETRAN)を同定した。

TETRANはその遺伝子配列のみが報告されているタンパク質であり、そのアミノ酸配列の相同性、及び hydropathy plot から11~12回膜貫通型のMFSに属するトランスポーターであることが予想されていた¹¹⁾。我々はホモロジー解析を行い、TETRANがこれまでに報告されているヒトのトランスポーターとは相同性を持たないことを見出した。TETRANの機能や発現に関しては何も分かっていなかったのが本研究において我々は、TETRANの発現、機能解析を行った。具体的には、TETRANがどのような臓器で発現しているのか、また細胞内のどの部位に局在しているのかについて解析を行った。さらに、TETRANがどのような分子を基質とするのかについても解析を行った。

5. TETRANの組織分布、及び細胞内局在

まず始めにヒト組織において、TETRANの組織発現をNorthern blot法により解析した(図3)。TETRANは胃や小腸などの消化器をはじめ、様々な器官に発現し

ていることがわかった。中でも特に強い発現が見られたのは、腎臓、心臓、前立腺であった。

次に細胞内におけるTETRANの局在について解析を行った(図4)。細胞にGFP融合型TETRANを発現させ、その局在を蛍光顕微鏡により検出した。その結果、GFP単独で発現させた場合と比べると、GFP融合型TETRANが細胞質膜側に局在している傾向が見られた(図4)。また、細胞免疫染色法によりTETRANの細胞内局在を検討したところ、細胞質膜に局在していることが確認できた(図4)。さらに細胞分画法を用いて検討を行ったところ同様の結果が得られた。これらの結果から、TETRANは細胞質膜における物質の輸送を担っていると考えられた。

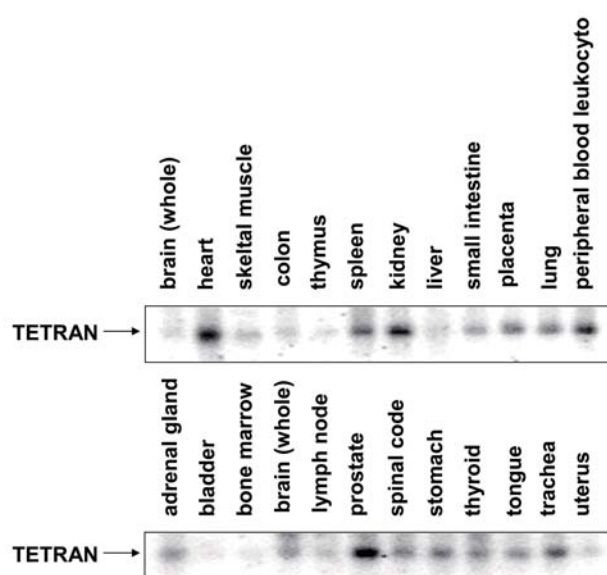


図3 mRNA expression of TETRAN in various human tissues.

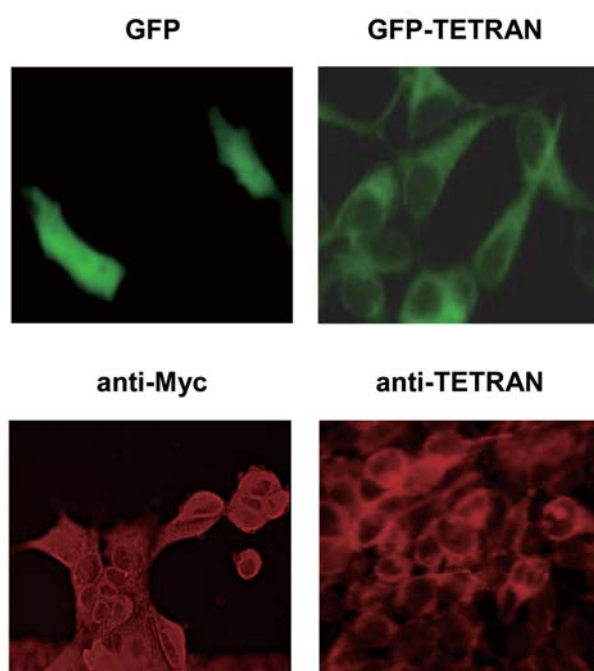


図4 Expression of TETTRAN and its subcellular localization. HEK293 cells stably expressing GFP or GFP-tagged TETTRAN or Myc-tagged TETTRAN were cultured. Localization of GFP was monitored using fluorescence microscopy. Localization of TETTRAN was monitored by indirect immunofluorescence assay with an antibody against Myc or TETTRAN.

6. TETTRANの輸送活性

TETTRANの輸送活性を解析する目的で、HEK293細胞にTETTRANを過剰発現させ、accumulation assayによりその活性を解析した。前述したようにTETTRANがどのような基質を輸送するのかに関して、全く手がかりが無かったので、まずアニオン性、カチオン性の代表的な蛍光物質であるフルオレセイン、及びローダミン123を基質に用いて実験を行った。

ン、及びローダミン123を基質に用いて実験を行った。

その結果、フルオレセインを用いた場合には、TETTRAN発現細胞での時間依存的、濃度依存的なフルオレセインの細胞内への取り込み促進(コントロール細胞に対して)が確認できた(図5)。一方、ローダミン123を基質に用いた場合には、TETTRAN発現による細胞内取り込みの促進は見られなかった。以上の結果から、TETTRANはアニオン性物質のトランスポーターであることが示唆された。

TETTRANのアミノ酸配列から、TETTRANはMFS familyのトランスポーターであり、輸送エネルギー源はATPではなく、プロトン駆動力であることが考えられた。そこでTETTRAN依存のフルオレセインの輸送に対してプロトン駆動力を消失させる薬剤の効果を調べる実験などを行った。その結果、TETTRANはプロトン駆動力を利用して輸送を行うことが明らかになった。また、 Na^+ 、 K^+ は輸送活性に影響を与えないこと、酸性条件下では輸送活性が促進することがわかった。さらに、その程度は弱いものの、TETTRANには細胞外へアニオン性物質を排出する活性があることがわかった。

7. TETTRANによるNSAIDs輸送

次に、代表的なNSAIDsであるインドメタシンを用いて、TETTRANの輸送実験を行った(図6)。その結果、フルオレセインを用いた場合と同様、TETTRANがインドメタシンを輸送することがわかった。このようにインドメタシンを直接輸送することが示されたトランスポーターはTETTRANが初めてである。また、種々のNSAIDsを用いて競合阻害実験を行ったところ、TETTRANはインドメタシンのみならず、ジクロフェナクやメフェナム酸などのNSAIDsも基質とすることが示唆された。

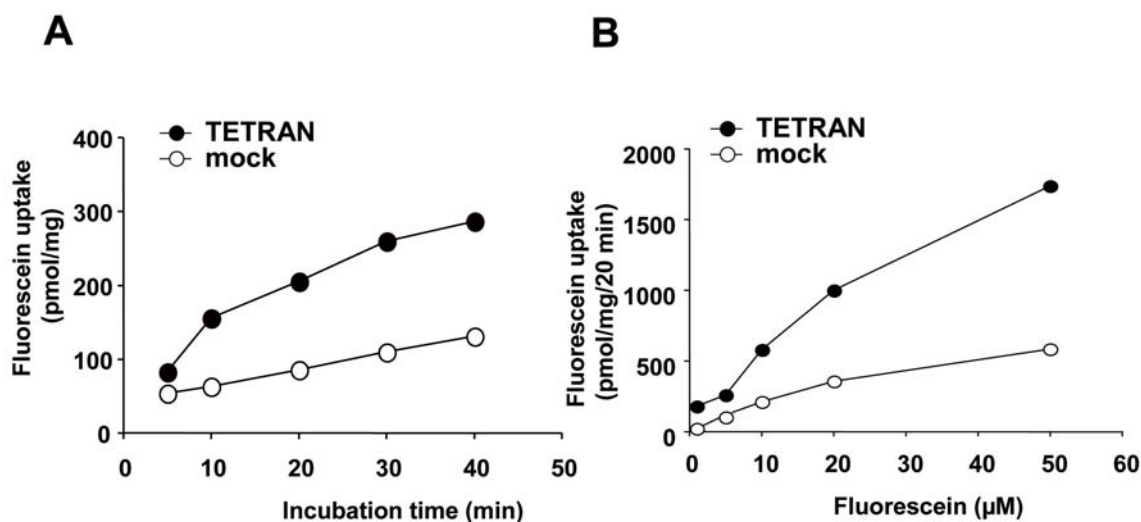


図5 TETTRAN-dependent uptake of fluorescein. HEK293 cells stably expressing Myc-tagged TETTRAN or mock control cells were cultured in the presence of 1 μM (A) or the indicated concentrations (B) of fluorescein for the indicated periods (A) or 20 min (B). The amounts of fluorescein incorporated into cells were determined by fluorometer.

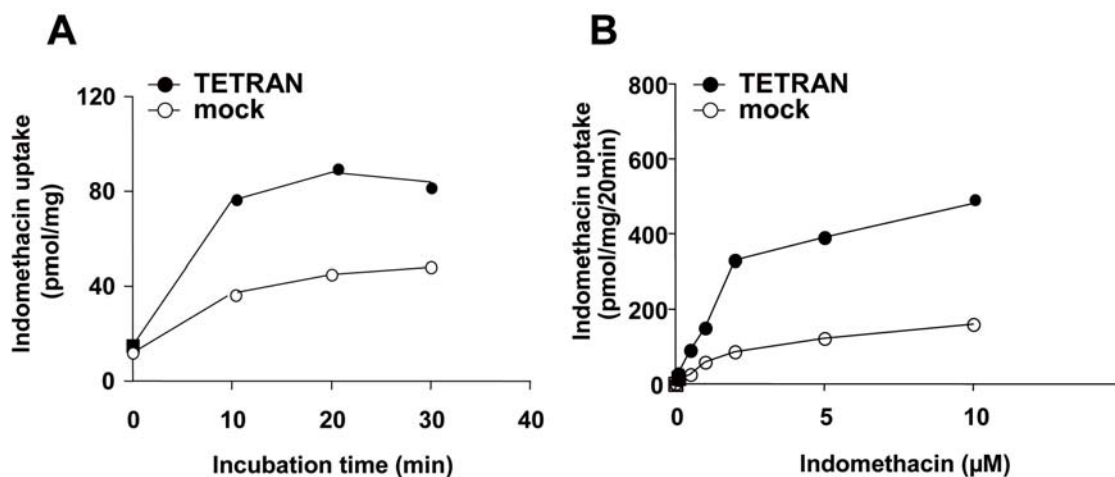


図6 TETRA-dependent uptake of indomethacin.

Uptake of indomethacin was examined using radiolabeled indomethacin in a similar way as in Fig. 5 by use of a liquid scintillation counter.

8. 終わりに

本研究において我々は、酵母TPO1ヒトホモログであるTETRAのトランスポート活性について種々の検討を行った。その結果、TETRAはヒト組織において腎臓、心臓、前立腺などに発現していることを示した。また、輸送活性の解析の結果、TETRAはNSAIDsを含む種々のアニオン性物質の輸送に与る薬物トランスポーターであることがわかった。以上の結果から、TETRAはこれまでに報告されていない新しいタイプのorganic anion transporterであることが明らかになった。

これまでに、NSAIDsの膜体内動態に関与する薬物トランスポーターは報告されていなかった。本研究においてTETRAがNSAIDs輸送を行うことが示されたことから、TETRAの活性や発現量の違いによってNSAIDsの感受性(患者の個人差)や体内動態が変化する可能性が考えられる。

NSAIDsの副作用のうち、胃潰瘍に次いで頻度が高いのが腎機能障害である。ヒト組織における発現解析の結果、TETRAが腎臓で多く発現していることが明らかになったので、TETRAがこのNSAIDs依存の腎機能障害に関与している可能性がある。

今後は、TETRAのトランスジェニックマウスあるいはノックアウトマウスなどを用いて、NSAIDsを初めアニオン性薬物の動態におけるTETRAの役割を明らかにする。またNSAIDsの様々な作用・副作用におけるNSAIDsの役割も明らかにしたい。

最後になりましたが、本研究は、森山芳則先生(岡山大・薬)、日浅未来さん(岡山大・薬)との共同研究であります。両氏、及びこの共同研究を可能にして下さった本特定領域研究に深く致します。また班会議等で、多くの先生に御助言、ご指導を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Mima, S., Ushijima, H., Hwang, H. J., Tsutsumi, S., Makise, M., Yamaguchi, Y., Tsuchiya, T., Mizushima, H., and Mizushima, T. (2007) *FEBS Lett* **581**, 1457-1463
- 2) Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H. J., Mio, M., Tsuchiya, T., and Mizushima, T. (2004) *Biochem Pharmacol* **67**, 575-585
- 3) Tanaka, K., Tomisato, W., Hoshino, T., Ishihara, T., Namba, T., Aburaya, M., Katsu, T., Suzuki, K., Tsutsumi, S., and Mizushima, T. (2005) *J Biol Chem* **280**, 31059-31067
- 4) Tsutsumi, S., Gotoh, T., Tomisato, W., Mima, S., Hoshino, T., Hwang, H. J., Takenaka, H., Tsuchiya, T., Mori, M., and Mizushima, T. (2004) *Cell Death Differ* **11**, 1009-1016
- 5) Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, K., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T., and Mizushima, T. (2005) *Cancer Res* **65**, 1868-1876
- 6) Tomitori, H., Kashiwagi, K., Asakawa, T., Kakinuma, Y., Michael, A. J., and Igarashi, K. (2001) *Biochem J* **353**, 681-688
- 7) Teixeira, M. C., and Sa-Correia, I. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 530-537
- 8) do Valle Matta, M. A., Jonniaux, J. L., Balzi, E., Goffeau, A., and van den Hazel, B. (2001) *Gene* **272**, 111-119
- 9) Desmoucelles, C., Pinson, B., Saint-Marc, C., and Daignan-Fornier, B. (2002) *J Biol Chem* **277**, 27036-27044
- 10) Delling, U., Raymond, M., and Schurr, E. (1998) *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1034-1041
- 11) Duyao, M. P., Taylor, S. A., Buckler, A. J., Ambrose, C. M., Lin, C., Groot, N., Church, D., Barnes, G., Wasmuth, J. J., Housman, D. E., and et al. (1993) *Hum Mol Genet* **2**, 673-676

編集後記

平成17年にスタートした本特定領域研究は前半3年間が無事終了し、後半2年間の仕上げの時期へと移行しました。ニュースレター“TRANSPORTSOME”の編集部も京都大学工学部の森研究室と薬学部の竹島研究室から、東京医科歯科大学難治疾患研究所の仁科研究室、古川研究室、医学部の畑研究室へと場所を移しました。京都から東京へと良き伝統を引き継ぐのがこの国の習わしであり、我々医科歯科編集部も「班員間の相互理解や共同研究促進」に貢献してきた本ニュースレターの使命を引き続き担う覚悟であります。本号では、平成19年度のユニークなイベントとして、関連する特定領域研究2つの若手が協力して開催した合同ワークショップの盛況ぶりを末次先生に紹介して頂きました。また、本務である公開シンポジウムと特筆する研究成果を紹介し、読者の皆様に刺激的な話題を提供できればと期待しています。

慣れない編集部ではありますが、皆様のご意見やご要望を頂戴しながら、情報発信の使命を全うしたいと思います。どうぞご教授宜しくお願い申し上げます。

TRANSPORTSOME

第7号(2008年7月発行)

編集人:仁科 博史、古川 哲史、畑 裕

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

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学教室内

Tel:06-6879-3521

Fax:06-6879-3529

E-mail: transportsome@pharma1.med.osaka-u.ac.jp

URL: <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/pharma1/transportsome/top.html>

印刷:(有)レイ・プリンティング

