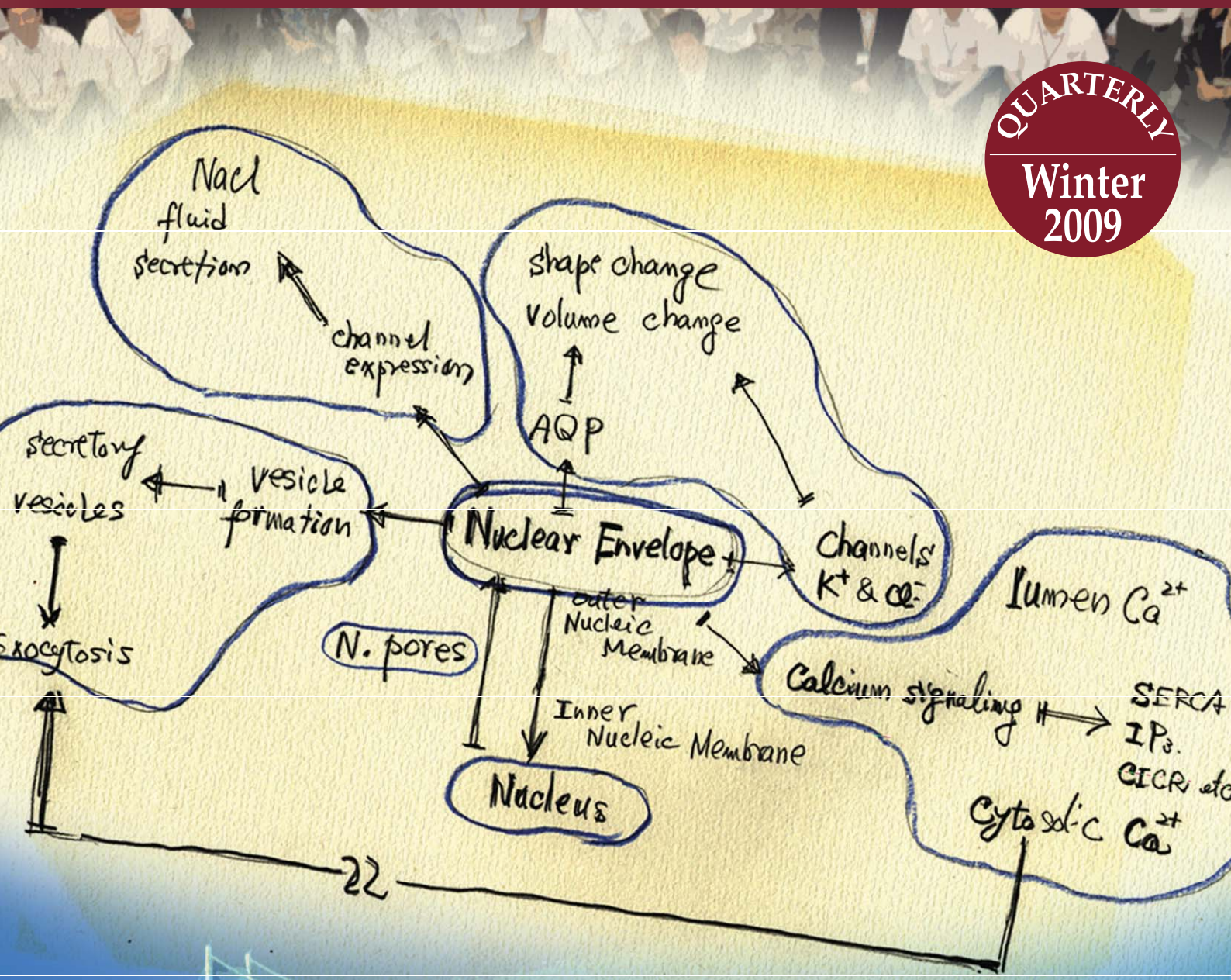
TRANSPORTSOME

特定領域研究:生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能

QUARTERLY
Winter
2009



平成20年度第1回班会議と新公募班紹介

目　次

ニュースレター特定班会議　平成20年度第一回班会議報告
～国生みの国､淡路島からのメッセージ～ 2
宮本　賢一、竹谷　豊、伊藤　美紀子

A01班公募研究班員の研究紹介 4
山田　勝也、楠原　洋之･林　久允、高森　茂雄、大塚　稔久
森島　繁、王子田　彰夫、月田　早智子、上山　健彦、森山　芳則

A02班公募研究班員の研究紹介 13
若森　実、丸山　芳夫、酒井　秀紀、宇治原　徹、梅田　真郷
松尾　道憲、今泉　祐治、赤羽　悟美、岩本　隆宏

A03班公募研究班員の研究紹介 22
下川　哲昭、清水　誠、柿澤　昌、洪　　繁、木下　専
乾　賢一、金川　基、永井　義隆、三木　隆司、水島　徹
首藤　剛、佐竹　伸一郎、馬場　義裕

編集後記 35

表紙について

今回の表紙には公募班の方々から送られてきた研究に関する図の中から､圧倒的な個性を発揮している東北大学の丸山先生の図を使わせていただきました｡トランスポートソームでは複数の分子が複雑に相互作用しているので､このように連携を図示することは有効な手段と思われます｡これまでご指導いただいた先生たちはみな分かりやすいスキームを書いて説明してくださり､最近店頭で良く目にする“マインドマップ”を自然に実践しているのだなと感心させられます｡

ニュースレター特定班会議　平成20年度第一回班会議報告
～国生みの国、淡路島からのメッセージ～

平成20年9月24日から26日まで、兵庫県淡路市「淡路夢舞台国際会議場」において「生体膜トランスポートソーム」の平成20年度第１回班会議を開催した。淡路夢舞台国際会議場は隣接するウエスチンホテル淡路とは回廊で結ばれ、長期滞在型の学術会議を開催するのに非常に適している。また、淡路夢舞台展望テラスレストラン街にあるイタリアン、中華、和食、洋食レストランでの食事がおいしいので、今回の会議に使用させていただいた。

班会議への参加者は144名、ハイライトレクチャー4演題、トピックス1演題、研究進捗報告57演題、ポスター64演題の発表が3日間にわたり行われた。参加者の多くが、神戸から1時間のバスを利用し、淡路国際会議場に到着後、直ちに班会議が開催された。金井好克代表による、「領域の目標と展望」と題した挨拶により、研究領域の概要と設定目的が述べられた。本班会議は、計画班と公募班から構成され、初日はA01班「トランスポートソームの構成と機能に関する研究」の研究発表が行われた。新しく公募班に加わったメンバーの魅力ある研究発表が印象に残った。後半のハイライトレクチャーでは、藤本豊士先生（名古屋大学）が、膜脂質ドメインの形態学的解析について講演された。急速凍結法と凍結割断レプリカ法の組合せによる「物理学的固定」という手法が、ラフトの研究に非常に極めて有効であるデータを示された。また、日比野浩先生（大阪大学）は、内耳蝸牛における、カリウムイオン循環の分子機序を解明し「内耳蝸牛内高電位（EP)の成立機構の解析と in silicoモデル化」というタイトルで、最新のデータを紹介した。内耳蝸牛の解剖的なイメージが、カリウムイオンの循環を考える上で見事に解説され、輸送体の機能が定性的かつ定量的に示された。2日目は　A02班「トランスポートソームと生体膜の相互作用に関する研究」の発表が行われた。　A02班は計画、公募班とも卓越した成果を出しており、トランスポートソームの多様性を示した成果が目立った。竹島浩先生（京都大学）のA02班の総括は毎回すばらしく「なんでもあり」という一言に深い感銘を受けた。また、夕食後のハイライトレクチャー、今村健先生（財団法人癌研究所）「インビボ分子生物学」、楠見明弘先生（京都大学）「1分子追跡」とも、興味深い内容であった。今村先生からは、生きているマウスのがんの増殖と転移、およびがん細胞内のシグナル伝達系のモニタリング、がんの血管新生、リンパ管の新生などが、鮮明な画像で紹介された。がんという病態における細胞機能と生体環境のイメージが印象的であった。楠見先生の講演は、いつものように1分子科学の集大成のようなインパクトを受けた。最終日は、A03班「トランスポートソームの生理機能とその破綻による病態に関する研究」の発表が行われた。また、トピックスレクチャーでは、前田裕輔先生が　Golgi装置の新規アニオンチャネルの発見について講演が行われた。また、ポスター発表では、質の深い質疑応答が長時間続いた。一方、意見交換会では、大学院生や若手の先生方により、トランスポートソームに対する熱い思いが語られた。金井は講評を行い、「残り2年間班員が一丸となって目標を達成することが望まれると」と3日間の最後を締めくくった。

淡路島に3日間滞在し、大いに心のリフレッシュができた。

また、淡路島は自然にめぐまれ、会議場からのオーシャンビューはすばらしかった。「古事記」「日本書紀」によると、「いざなぎのみこと」・「いざなみのみこと」の二神が天上の「天の浮橋」に立って、「天の沼矛（ぬぼこ）」をもって青海原をかきまわし、その矛を引き上げたときに、矛の先から滴り落ちる潮（しお）が凝り固まって一つの島となった。これが「おのころ島」で、二神は、その島に降りて、夫婦の契りを結んで国生みをされた。初めに造られたのが淡路島で、その後次々に島を生み、日本の国を造られたとある。つまり、淡路島は国生みの最初の一滴として誕生した。本班会議が、新しい領域開拓の最初の一滴となることを期待して筆を終える。

宮本　賢一、竹谷　豊、伊藤　美紀子
（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

A01班公募研究班員の研究紹介

トランスポーターの輸送動態解析法に関する研究

弘前大学大学院医学研究科　統合機能生理学講座

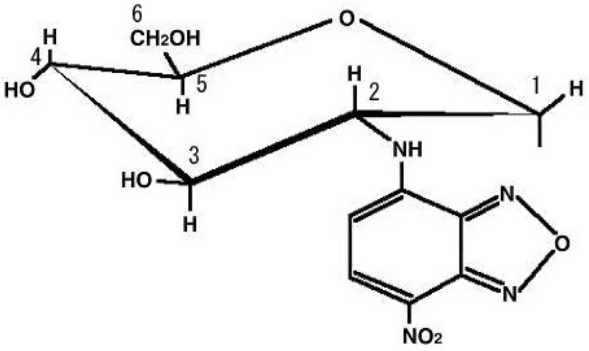
山田　勝也

ATP生成の起点となるグルコースの細胞内への取り込みの様子はこれまで専ら放射性トレーサーを用いて研究されてきました。しかし多様なグルコーストランスポーター(GLUTなど)が細胞部位特異的な分布を示し、細胞質をトランスロケートするといった状況では、グルコースの挙動を放射性トレーサー法の時間・空間分解能で、単一細胞レベルで解析するには困難があります。実際グルコースを唯一のエネルギー源とする脳においても、複雑で多様な細胞構成のため、神経細胞が直接グルコースを取り込んでいるかについてさえ未だ大きな議論が続いています。そこで光学的手法によりグルコースの取り込みをリアルタイムに解析できないかと考え、蛍光指示グルコース誘導体2-NBDGを中心とした新しい方法を開発しています（Yamamoto *et al*, submitted; 山田他, 特願2008-205708）。

2-NBDGは1996年、大腸菌の生死を簡便に計数する目的で東京農工大学の松岡英明らにより初めて合成された分子で、グルコースの第二位にNBDという蛍光置換基を有し、550nm付近に極大のある緑色の蛍光を発します（図参照）。2-NBDGは2-デオキシグルコース(2-DG)の蛍光版とも言えますが、私達が1997年に松岡と研究を開始した当初は、NBDのような蛍光置換基がついたグルコースがGLUTを特異的に通過するか不明でした。しかしGLUT2の過剰発現実験、特異的阻害剤の効果、キネティクス解析等から、2-NBDGはGLUT2を時間、濃度、温度依存的に通過すること、また予想に反しグルコースと非常に類似したキネティクスで生きた単一哺乳動物細胞内に取り込まれる可能性が示されました（Yamada *et al*, ***J Biol Chem*** 2000）。同時に膵ラ氏島でのFura-2による細胞内カルシウム濃度の計測と2-NBDG取り込み計測の結果、2-NBDGがヘテロな細胞集団中の個々の細胞のグルコース取り込みの違いを調べる上でも非常に有用であることがわかりました。その後2-NBDGは心臓、血管、腸、膵臓、筋肉、血球、脳神経系、植物に至るまで多様な細胞に応用されて上記結果が確認され、脳ではグルコースによるアストロサイトのギャップジャンクション通過や、カルシウムウェーブと同期しないグルコースウェーブもしくはメタボリックウェーブの発見につながり（Yamada *et al*, ***Nature Protocols*** 2007）、腫瘍悪性度評価の可能性（US Patent 2006）も報告されました。

しかし2-NBDGは連続的に細胞内に取り込まれ続け、分解され、退色し、細胞内外を移動するため、特にGLUT1やGLUT3などのKm値の低いトランスポーターを発現するネイティブな細胞での2-NBDG取り込みのキネティクスは慎重に調べる必要があります。また標準的な2-NBDG法では投与前後の蛍光強度の変化という照射光強度と検出器感度に依存する相対値を比較するので、細胞膜への一過性吸着の程度を正しく評価し、長時間投与時や細胞状態悪化時の非特異的膜通過の可能性を排除することも重要です。逆にこうした問題を解決すれば、脳におけるグルコース利用といった長年未解決の課題を解決できる可能性もあります。

光学的手法を進めることで動態解析にどの程度踏み込めるか、始めてみると考えている時とは異なり新規分子合成、検出装置、検出アルゴリズムが互いに密接に関わり、未知（無知）故、わくわくしたりびっくりしたりどっきりしたり悩んだりと醍醐味があります。応用面を考えた研究は別個に推進し、本特定領域研究では電荷を持たない分子であるグルコースがトランスポーターを特異的に通過する様子を捉えられるかどうか原理的な面をできるだけ深く探りたいと考えています。皆様に幅広い観点からご指導やご助言をいただければ幸いです。



2-NBDG

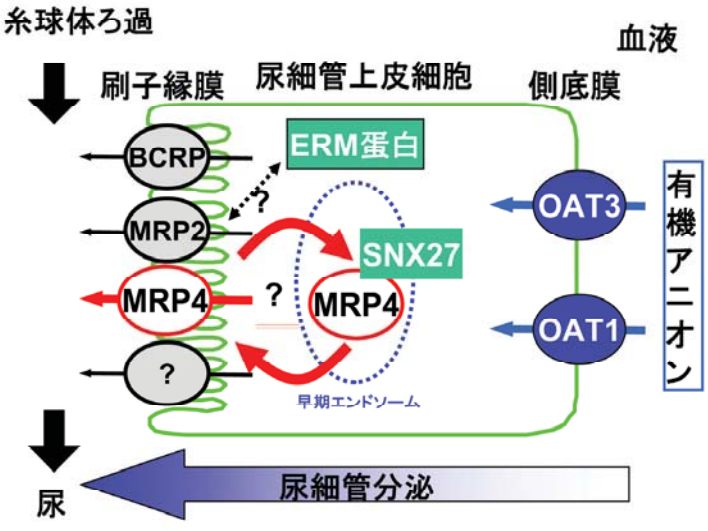
トランスポーターの機能制御による医薬品体内動態の制御

東京大学　大学院薬学系研究科

楠原　洋之、林　久允

医薬品の薬効発現には薬効・副作用標的との相互作用の他、薬効標的臓器への暴露を決定づける体内動態特性も重要な要因となることから、私たちの研究室では、医薬品体内動態を支配するトランスポーターとして、特に生体内における主要な医薬品の排泄臓器である肝臓や腎臓で異物排泄に働くトランスポーター群を研究しています。異物排泄に働くトランスポーターは多様な構造的特徴を持つ天然・合成化合物を基質とする点が特徴であり、これらのトランスポーターの輸送活性により、生体内での医薬品の組織分布や排泄経路が決定されます。カルボン酸等生理的なpHで負電荷となる官能基を持つ化合物群（有機アニオン）の場合、肝細胞や腎近位尿細管上皮細胞等極性細胞での取り込み・排泄両輸送過程に、基質選択性が重複し、かつ輸送駆動力の異なるトランスポーターが非対称的に配置されることで、効率的な一方向性の輸送を達成しています。肝胆系輸送では、SLCトランスポーターであるOATP1B1やOATP1B3により能動的に取り込み、MRP2を始めとする複数のABCトランスポーターにより胆管側膜での排泄が行われます。これに対して、腎近位尿細管における尿細管分泌では、側底膜における取り込み過程ではOAT1やOAT3による能動輸送により広く有機アニオンの取り込みを説明することができます。一方、出口側にあたる刷子縁膜側で尿中への医薬品排出に働くトランスポーターは、まったく明らかにされていませんでした。私たちは遺伝子改変動物を用いたin vivo体内動態試験を行い、この刷子縁膜側の医薬品排出にABCトランスポーターMRP4が関与していることを見いだしました。MRP4ノックアウトマウスでは、b-lactam系抗生物質、抗ウィルス薬や利尿剤が野生型マウスに比べて腎臓内に蓄積するものの、これらの医薬品の尿細管分泌は依然として観察されることから、MRP4だけではなく、複数のトランスポーターが医薬品の排泄に働いているものと考えられます。

肝胆管側膜に発現するMRP2の場合、アクチン結合蛋白質であるradixinがその肝胆管側膜への局在に必須であり、Radixinノックアウトマウスでは、MRP2の総蛋白量は変わらないものの、胆管側膜への発現は著名に低下し、MRP2の内因性基質であるbilirubin glucuronideの蓄積により黄疸を呈します。腎刷子縁膜に局在するトランスポーターのC末側には、PDZK1やEBP50を始めとする足場蛋白であるPDZ蛋白との相互作用に必要な配列がみられ、PDZ蛋白との相互作用や、直接・間接的なERM蛋白との相互作用が医薬品の排泄に関わるトランスポーターの機能発現においても必須となる例が報告されています。先に紹介した管腔側排出トランスポーターMRP4のC末側にも、PDZ蛋白との相互作用に必要なコンセンサス配列がみられることから、足場蛋白や他の蛋白との相互作用がMRP4の発現量・局在にの制御を通じて機能発現に必要であると考えました。MRP4のC末端アミノ酸55個のGST融合タンパク質を用いてGST pull-down assay法を行い、相互作用分子についてLC/MS/MSによる同定を行った結果、GST-MRP4とSNX27の相互作用が確認されました。SNX27はSNXファミリーに属するタンパク質であり、他のSNXファミリーのメンバーと同様にPXドメインを持つことから、このドメインを介して早期エンドソームに豊富に存在するイノシトールリン脂質（PI3P）と結合し、早期エンドソームに局在していると予想しています。これまで、SNX27は5-HT4a受容体やDGKζ、Kir3チャネルと相互作用することが報告されており、特にKir3チャネルに対してはSNX27が分解を促進し、膜発現量を減少させることが明らかにされています。SNXファミリーの中で、SNX27は唯一PDZドメインを含むことから、MRP4のPDZ結合モチーフと早期エンドソームにおいて相互作用することで、MRP4の分解あるいはサイクリング経路への選別を行うことによってMRP4の細胞膜発現量に影響を与えるものと期待しています。免疫染色法の結果、SNX27はHEK293細胞において早期エンドソームマーカーであるEEA1、リサイクリングエンドソームマーカーであるTransferrin Receptorと共局在することが明らかとなっています。現在、SNX27がMRP4の細胞内局在移行に与える影響についてより詳細な解析を進めています。



シナプス小胞トランスポートソームの生理機能

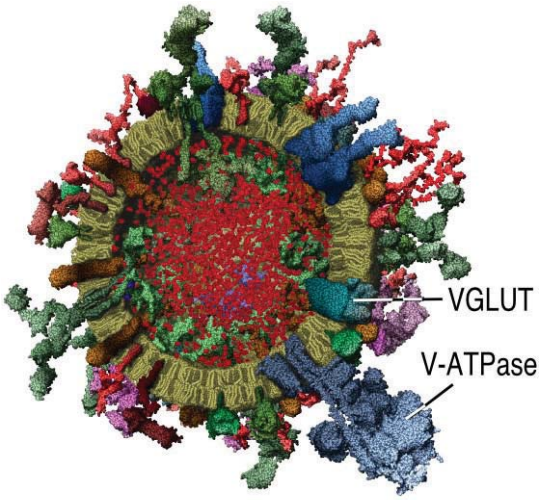
東京医科歯科大学　脳統合機能研究センター
高森　茂雄

神経間あるいは神経ー効果器間のシグナル伝達は、シナプスと呼ばれる特徴的な構造体を介して行われます。シナプス終末からの神経伝達物質の放出過程において、重要な働きをするのがシナプス小胞と呼ばれる直径約40ナノメートル程の球状のオルガネラです。シナプス小胞は、神経伝達物質を内腔に貯蔵するシステムを持っているだけでなく、神経終末に到達した電気的シグナルに応じて、形質膜との高速膜融合を媒介する分子システムを内含しております。これらの分子メカニズムの詳細を理解することは、脳内のシグナル伝達の素過程の理解のみならず、神経間シグナル伝達の特徴である「可塑性」の本質を知るきっかけとなることが期待されております。

本研究課題にある「シナプス小胞トランスポートソーム」という造語には、2つの異なる意味が込められています。1つ目は、前述したような神経伝達物質のシナプス小胞内腔への輸送(transport)に関わるトランスポートソームです。シナプス小胞膜に存在する物質輸送システムは、液胞型プロトンATPaseを駆動力とする二次輸送体ですが、輸送活性は、プロトン駆動力に影響を及ぼすCl^-チャネル活性に強く依存すると考えられてきました。神経伝達物質輸送体·プロトンポンプ·Cl^-チャネル等が、シナプス小胞膜上で直接複合体を形成している証拠は皆無ですが、これらのコンポーネントが機能的に協調していることは疑いようもありません。当グループでは、これらのタンパク質群が、如何にして小胞内腔への物質輸送を体現しているのかを詳細に理解したいと思っています。

もう1つのトランスポートソームは、上記タンパク質群をシナプス終末へ輸送(traffick)する複合体です。シナプス小胞の構成タンパク質が細胞体で合成された後、選択的に軸索の方向に輸送され、最終的に軸索末端部に局在するシナプス小胞に組み込まれる分子メカニズムは、意外なことにいまだによく分かっていません。神経伝達物質トランスポーターが機能を発揮するためには、シナプス小胞に他の必須成分と一緒に挿入される必要があります。当グループは、シナプス小胞タンパク質の軸索末端への輸送に関わる分子メカニズムに興味を持っております。個別の小胞タンパク質の輸送機構に関する知見が蓄積されることで、全てのシナプス小胞タンパク質に共通した共通原理の発見に繋がるかもしれません。また、この命題は、神経細胞の極性の形成と維持の仕組みとも密接に関係しているのみならず、神経細胞に限らず「細胞の機能的極性」を支配する法則の理解に繋がることが期待できます。

上記の研究課題を遂行するにあたり、当面は、脳内で最も主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の輸送を担当する「小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)」を題材にする予定です。哺乳類の脳内には3つのVGLUTイソ型が存在しており、神経科学分野では、グルタミン酸作動性ニューロン特異的な分子プローブとして最も信頼できるマーカーとして市民権を得ています。しかしながら、トランスポーターとしての詳細な動作原理や、その生理学的意義の理解は発展途上といっても良いでしょう。本特定領域に参加されているトランスポーターやチャネルの専門家の方々に適切なアドバイスを頂きながら、微力ながら当該研究分野の発展に貢献できれば本望です。



ラット脳シナプス小胞の三次元分子モデル
シナプス小胞には、膜融合に関係する Synaptobrevin, Synaptotagmin, rab3 や神経伝達物質の輸送に関係する VGLUT, V-ATPase等が存在し、小胞表面はタンパク質で覆われている。
平均的なシナプス小胞には、1小胞あたり10個程度のVGLUTと、1-2個のV-ATPaseが存在する(Takamori et al., Cell, 2006)。

カルシウムチャネルの局在と機能を制御する膜複合体の解析

富山大学大学院　医学薬学研究部　臨床分子病態検査学

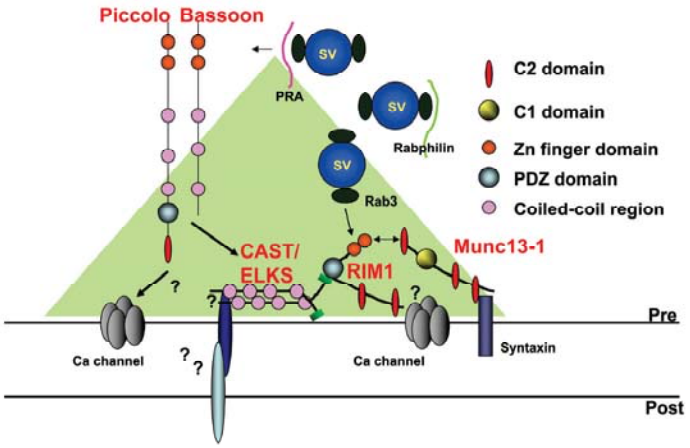
大塚　稔久

私は大阪大学･高井義美教授（現、神戸大学）のもとで生化学･蛋白質化学のトレーニングを受けた後、2000年春にカン研究所にグループリーダーとして着任し、神経シナプス分野の研究をスタートさせました。最初の2、3ヶ月はどんなテーマを独自のものとして推進するかずいぶん悩んだ記憶がありますが、もともと神経系の研究に興味があったので、生化学のバックグラウンドを生かして新規のシナプス蛋白質の精製･同定を開始することにしました。当時は、ポストシナプス分野で各種のPSD-95結合蛋白質や神経伝達物質受容体のシグナル伝達に関する研究が猛烈な勢いで進んでおり、なるべく競争が激しくなくかつ面白い分野ということでプレシナプスのアクティブゾーンに関する研究分野を新たなテーマとして選びました（面白い分野というのは大正解でしたが、競争は極めて激しく、現在も夜な夜な涙で枕を濡らす毎日です･･･）。

アクティブゾーンは神経終末に存在する特殊な構造体で、神経伝達物質を含んだシナプス小胞がドッキングし、膜と融合する場所でもあります。1960年代には電子顕微鏡を用いた解析から、その存在が知られていましたが、構成分子群とそれらの相互作用については長らく不明でした。私の研究チームは、アクティブゾーンを含むシナプス接着構造を高度に精製する系を確立し、新規のアクティブゾーン蛋白質の精製･同定に成功し、その新規分子をCASTと命名しました。2002年夏のことでした（Ohtsuka et al., 2002. **J. Cell Biol**）。CASTは新規のアクティブゾーン蛋白質というだけでなく、いまひとつのアクティブゾーン蛋白質RIM1の結合蛋白質であるというおまけつきでした。RIM1といえば知る人ぞ知る米国テキサス大学のTom Sudhof博士が精力的に研究を進めていた超がつく有名分子だったので、怖さ半分、嬉しさ半分というのがその時の正直な気持ちでした。その後、2004年にCASTがRIM1だけでなく、他のアクティブゾーン蛋白質Bassoon, Piccolo, Munc13-1などとも相互作用し、巨大な分子複合体を形成していることを明らかにすることができました（Takao-Rikitsu et al., 2004. **J. Cell Biol**）（図参照）。これによって、アクティブゾーンの構造に関して分子レベルでの理解が一気に進み、当該研究分野の発展に微力ながらも貢献できたのではないかと思っています。

さて、アクティブゾーンに存在する最も重要な機能分子の一つは疑いもなくカルシウムチャネルです。カルシウムチャネルに関する研究は歴史も長いのですが、実際チャネルがどのようにしてアクティブゾーンに局在しているかについては、ほとんど明らかになっていません。本特定領域研究では、CASTを中心としたアクティブゾーン蛋白質群とカルシウムチャネルの相互作用の解析を通して、カルシウムチャネルの局在と機能を制御している膜複合体の全容解明を生化学的･細胞生物学的に進めたいと考えています。

現在、私の研究チームは、北陸は富山の地で世界との競争に明け暮れております。こじんまりしたチームなので、ブルドーザーを使ったような研究は出来ませんが、“start small and stay focused”の初心を忘れずに、自分の興味に忠実に面白い研究を目指したいと思っています。まだまだ、右も左もわからぬ若輩者ですが、どうぞご指導･ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。



アクティブゾーン蛋白質の分子間相互作用
CASTとそのファミリーメンバーELKSはオリゴマーを形成する。Bassoon, Piccolo, RIM1は直接CASTに結合し、アクティブゾーンにおいて巨大な分子複合体を形成している。

受容体−Snapin−TRPC複合体を介する新しい受容体作動性Ca^{2+}流入機構

福井大学医学部薬理学領域

森島　繁

アドレナリン受容体やムスカリン受容体など$G_{q/11}$タンパク共役性受容体（GqPCR）を刺激すると、細胞内Ca^{2+}が上昇し、それに伴って平滑筋収縮や上皮の分泌などが誘発されます。この細胞内Ca^{2+}濃度の上昇は、右の表に示すとおり、大きく3つの機序（ストアからのCa^{2+}放出、ストア作動性細胞外Ca^{2+}流入、受容体作動性細胞外Ca^{2+}流入）に由来します。近年の様々な研究により、この機構には多くの分子が関与し、それらの精巧な協調によって維持されていることが明らかになってきました。

受容体刺激に伴う細胞内Ca^{2+}の増加

Ca^{2+}増加機構	関連する分子
ストアからのCa^{2+}放出	PLC, IP3, IP3受容体
ストア作動性細胞外Ca^{2+}流入	Orai1, STIM1, Homer, TRPC, PLCγなど
受容体作動性細胞外Ca^{2+}流入	TRPC, PLCγなど

このうち、カラーで示した受容体作動性Ca^{2+}流入については、PLCγの関与が明らかにされる（Nishida et. al., EMBO J., 2003）などCa^{2+}流入経路の最終過程の解明に力点が置かれて来ました。したがって、それより前段階の受容体の構造変化やそれに伴う関連分子の活性化と、それに続くCa^{2+}流入の誘導について研究されたものは少なく（Engelke, et. al. Immunol. Rev. 2007）、とくにG蛋白共役性受容体に関する同様の研究は、私たちの知る限りほとんどありません。私たちは、以前よりα_1アドレナリン受容体の研究を進めてきました。近年、SnapinというSNARE complexと関連する分子が、α_1受容体にも結合すること、Snapinがなければα_1受容体作動性Ca^{2+}流入が起こらないこと、そして、α_1受容体をアゴニスト刺激することにより、**受容体−Snapin−TRPC6**の3分子複合体形成を促進すること（図1）を報告しました（Suzuki, et. al. J. Biol. Chem. 2007）。**この複合体およびその形成・機能はまさにトランスポートソームの1つ**であると考えられます。

この研究における目標は、上に記した、受容体−Snapin−イオンチャネルという複合体の形成が、一般的な$G_{q/11}$タンパク共役性受容体作動性Ca^{2+}流入機構として用いられているかどうかを明らかにすることにあります。受容体が活性化されると上記の3量体トランスポートソームの形成が促進されますが、その分子機構は分かっていません。私たちは、α_1受容体と結合したSnapinとTRPCチャネルと結合したSnapinが1:1に小胞体膜上で結合することにより、この3分子トランスポートソーム（この場合、受容体−Snapin−Snapin−TRPCの4量体）が形成されるという仮説（図2）をたてました。これが真実であれば、Snapinは、受容体とCa^{2+}流入チャネルを結ぶアダプターとして働くことができることになり、Snapinと結合する受容体はすべてこの機構を利用してCa^{2+}流入を活性化することができます。

このように、わたしたちは、この研究においては、Snapinをアダプターとする受容体とCa^{2+}流入チャネル（ROC）がリンクする新しい受容体作動性Ca^{2+}流入のしくみについて、その分子機構を明らかにすることと、その機構が多くの受容体において働いていることを明らかにしたいと考えています。

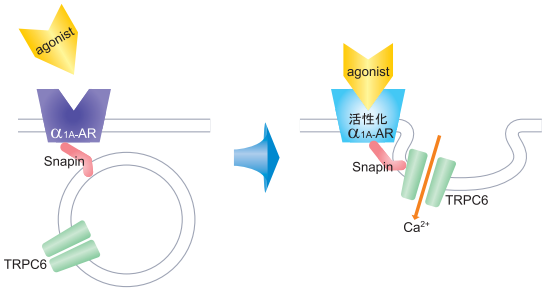


図1　これまでに私たちが明らかにしてきたこと

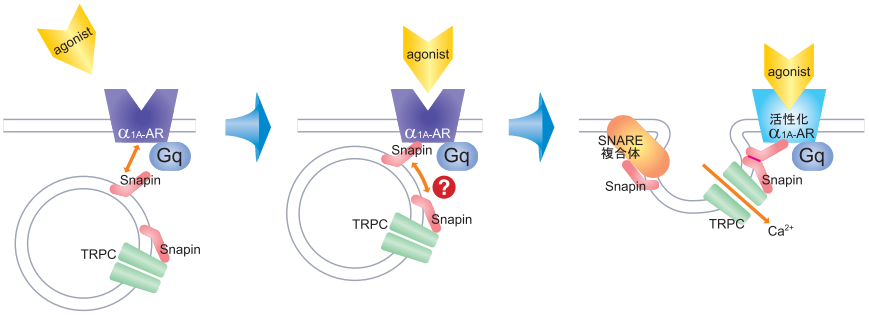


図2　一般的なGqタンパク共役受容体を刺激したときに見られるROCの分子機構仮説

タグ−小分子プローブペアによるタンパク質複合体形成の可視化

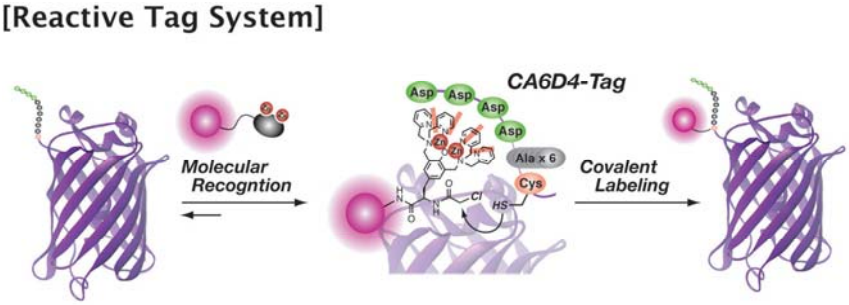
京都大学大学院工学研究科　生物有機化学分野

王子田　彰夫

私は「タグ−小分子プローブペアによるタンパク質複合体形成の可視化」というテーマで前回より継続してこの特定領域に公募班として参加させていただいております。私の研究テーマを一言で端的に述べますと「小分子プローブを用いた生命化学、タンパク質化学研究」となります。採択していただいたテーマ内容に沿ってもう少し詳しく説明しますと、新しくデザインし化学合成した小分子プローブによりタンパク質を蛍光ラベル化して、バイオイメージングによりタンパク質の細胞内機能を解析する手法の開発となります。これまでの二年間、公募班として本特定領域に参加させて頂きましたが、何回かの班会議やシンポジウムでみなさんと少なからず交流をさせていただきました。その間、みなさん自らが専門としている各分野で、未知の生命現象を解き明かしたいという高い志と熱意をお持ちである事、そして（これは時としてケミストリーを専門とする化学者よりももっと高いレベルと思えるほどの）みなさんの研究の夢を拝聴し、その心意気を感じ取ることが出来ました。これまでもっぱら化学の分野にどっぷりとつかって研究を行って来た私としては、この領域に参加されているみなさんと頭の中の知識と言語がずいぶん違う部分を痛感することが多かったこともまた事実でありますが、この領域に参加させて頂くことは私にとって大変刺激的なエネルギーを与えてくれる好機であると大変貴重に思えてなりません。これからの二年間、私の研究に対していろいろなご意見やご助言をいただければと考えております。

学問の話を少ししたいと思います。本研究では、特に細胞タンパク質の可視化、すなわち蛍光バイオイメージングに適した新しい分子ツールの開発を目指しています。近年、顕微鏡技術の進歩と様々な蛍光性GFP（green fluorescent protein）類縁体の開発によりバイオイメージングによる細胞内タンパク質の可視化技術は大いに進展したといえます。しかし比較的大きなGFP類縁体（27 kDa）を目的のタンパク質へヒュージョンした場合、しばしば目的タンパク質の機能阻害が生じます。特に複数のタンパク質集積の場であるタンパク質複合体では、複合体形成自体が阻害されるような致命的な機能障害が生じるために正しい解析が不可能になることが考えられます。これまでに私たちは、このような蛍光ラベルの「大きさ」に由来したタンパク質機能阻害をもたらすことのないバイオイメージングシステムとして目的タンパク質に対する影響を最小限に抑えるペプチドタグ配列−小分子プローブペアの開発を行ってきました。すなわち、可視化したい目的タンパク質に短いタグ配列を付けて発現させ、これを細胞外から導入した小分子蛍光プローブにより特異的にラベル化する技術です。このような小分子プローブを用いる可視化システムは、1）タグ、プローブともに分子サイズが小さいためタンパク質（複合体）の機能に影響を与えにくい、2)任意のタイミングでのタンパク質をラベル化してイメージングを行うことが可能、3)異なる蛍光波長を持つ小分子プローブにより異種あるいは発現時間の異なるタンパク質を染め分けることができるなど、タンパク質複合体が関わる細胞機能の解明に最適な新しい分子ツールとなり得ると我々は考えています。

これまでに私たちは、「タグ−小分子プローブペア」としてオリゴアスパラギン酸配列（D4タグと呼んでいます）と、これと選択的に強く相互作用する多核亜鉛錯体を全く新規に見いだすことに成功しました。そして、このペアを用いて細胞膜上の受容体タンパク質を選択的に蛍光ラベル化できることを示しました。昨年までの研究では、タグ−プローブ間の特異的な相互作用にさらに有機化学反応を組み合わせ、タンパク質を共有結合により小分子蛍光プローブでラベル化する「リアクティブタグシステム」の開発を進めてきました（下図参照）。解離することのない共有結合のラベル化はバイオイメージングにおいて絶対的に有利であると私たちは考えています。今後二年間の本研究の目標は、これまで開発を進めてきたいくつかの種類の「リアクティブタグシステム」を細胞内外の発現タンパク質に適用してバイオイメージングに使えるレベルにまで磨きをかけていくことにあります。みなさんのトランスポートソーム研究に汎用的に使えるような技術にまで発展するには、まだ少し時間がかかると思いますが、みなさんの研究の夢を化学のサイドから支援できる新しいケミカルツールの創製を目指してがんばっていきたいと考えております。どうぞよろしくお願い申し上げます。



タグ導入タンパク質の低分子蛍光プローブによる共有結合ラベル化（リアクティブタグシステム）
亜鉛錯体型の低分子蛍光プローブは、タンパク質に導入した連続アスパラギン酸タグ配列(D4タグ)との特異的な相互作用、引き続く共有結合形成反応によりタンパク質を蛍光ラベル化しバイオイメージングを可能とする。

クローディン分子複合体による細胞間物質透過性の制御機構

大阪大学大学院生命機能研究科／医学系研究科
月田　早智子

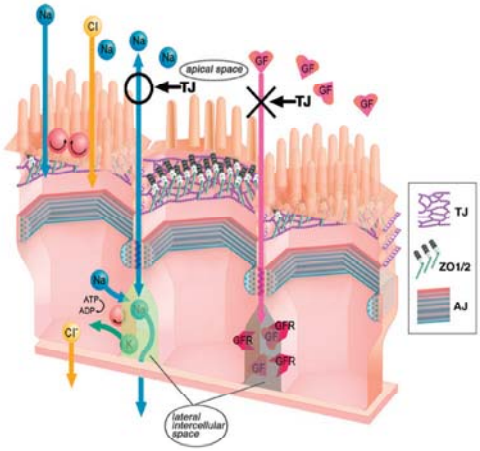
多細胞生物の生体を大小さまざまな閉鎖空間であるコンパートメントのコンビネーションとしてとらえると、生体の機能はそれぞれのコンパートメントの内部環境（ホメオスタシス）の微妙なコントロールで繊細に調節されています。各閉鎖空間は隔壁で仕切られており、その隔壁の物理的、生理学的な性質により、コンパートメント内のホメオスタシスが規定されます。隔壁は細胞と細胞の接着により形成され、内と外の境界が形成されます。コンパートメント内外の環境が規定されることが生体のシステムとしての全体機能に重要であるとすると、そのようなコンパートメントの隔壁のバリアー機能と選択的透過性の役割は見逃せないものでしょう。

私たちの研究室では、そのようなコンパートメントの隔壁の形成に欠かせない細胞接着を介しての上皮細胞シート形成と、シート形成を基盤として成立する細胞間のバリアー機能と選択的物質透過性の分子論と機能解析を行っています。上皮細胞シートの物質透過経路には、上皮細胞そのものを横切るtrans-cellullarの経路と上皮細胞間のタイトジャンクションを通過するpara-cellular（細胞間）の経路があります。そのうち、para-cellularの経路に注目して仕事を進めています。その基盤となる細胞間バリアーがタイトジャンクションの構成分子であるクローディン、オクルーディン、トリセルリン、JAM、CARの5種類で構成されることがしられています。その中で、マウス／ヒトで少なくとも24種類のサブタイプのあるクローディンが、おそらくはバリアー機能にとって最も基本的であると思われます。細胞間バリアーは上皮細胞固有のものであり、細胞と細胞の間をシールするセメントのようなものであり、選択的な物質透過性を可能にする土台のようなものであると考えられています。そのバリアー及びバリアー内para-cellularの経路の形成について、クローディンを中心とした細胞膜蛋白質とそれを裏打ちする細胞骨格性蛋白質の複合体形成という面からチャレンジしていきたいと思っています。

これまでのクローディン-5（Nitta et al. 2005)とクローディン-1（Furuse et al. 2001）のノックアウトマウスの解析からは、血液･脳関門あるいは皮膚における物質透過性について、各々のクローディンが水分子やビオチンなどについてのバリアーを形成することが示されてきました。それに対し、ごく最近のクローディン-15のノックアウトマウスにおける小腸肥大（メガインテスティン）の機能解析から、クローディン-15がイオン透過性のチャネルを形成する可能性が示唆されました(Tamura et al. 2008)。クローディン-15が欠失することで上皮のホメオスタシスのずれが生じ、そのことで、細胞増殖が影響されるのではないかという仮説をたてています。クローディンによるチャネルとはどのようなチャネルでしょうか? Para-cellular のチャネルとは、脂質2重層を横切るものではないので、従来のチャネルとは相当に違うと思われます。この問題に、機能的側面から、in vivo で取り組んでいくために、クローディン-15のノックアウトマウスの解析は非常に有用であると考えられます。さらに、機能的解析を進めていきたいと考えています。

一方で、クローディンなどタイトジャンクションの細胞膜蛋白質の高次構造の形成のためには、その細胞膜蛋白質に付随する細胞骨格性の蛋白質も重要であろうと考えられます。これまで、ZO-1/2というクローディン結合蛋白質が、タイトジャンクションの高次構造形成のために重要であり、同時に、細胞間バリアー機能の構築に必須であることを示してきました（Umeda et al. 2006; Yamazaki et al. 2008）。今後さらに、細胞膜蛋白質／細胞骨格蛋白質の両面から、ジャンクションの構成蛋白質として新規なものが潜んでいないかを追求してみたくおもっています。これらは、クローディンの機能を制御する可能性があります。また、タイトジャンクションのまだきちんと把握されていない機能的側面を担うかもしれません。

私たちの研究室は、もともとは形態学、分子細胞生物学を基盤とする研究室ですが、細胞や生体の生理機能を解析していく必要性にせまられています。今後、生理学の基礎的学問と研究を真摯にうけとめ、融合がはかれればこの上もなく幸いです。そのためにも、共同研究の機会も得ていくことが重要であると身にしみて感じております。大きい視点から、「細胞間バリアーと選択的透過性による生体内ホメオスタシスの制御」の問題にチャレンジしていきたいという夢をもっております。皆様方のご教示のほど、どうかよろしくお願い申し上げます。



細胞間バリアー／選択的透過性によるホメオスタシスの維持
上皮細胞間の選択的透過性により（○←TJ）によりイオンの透過性が調節されることにより、上皮の微小環境が保たれる（緑の領域）。その微小環境の制御により細胞増殖も制御されると思われる。上皮の細胞増殖制御様式には、ほかに細胞間バリアーにより、増殖因子（GF）とそのレセプター（GFR）の結合が阻害される（×←TJ）機構もある（グレーの領域）。

貪食細胞における活性酸素産生トランスポートソームの形成・活性化機構の解明

神戸大学
自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター
分子薬理分野

上山　健彦

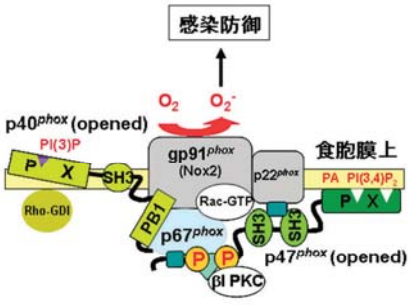
私たちのラボ（齋藤尚亮教授）は、大きく分けて3つのプロジェクトを遂行しており、その1つとして活性酸素の産生を行うNADPH oxidase（Nox）の研究を行っています（写真の6名にて）。

私がNoxの研究を始めたのは、神戸大学医学研究科大学院を卒業後の2001年からです（在学中は、脳梗塞を研究）。生体内における活性酸素の産生は、好中球などの貪食細胞におけるrespiratory burst（呼吸爆発）として1930年代より知られていました。1960年代前半になり、その本体がNox（gp91^{phox}）という酵素であろうことが提唱され、1960年代後半になると小児期より重篤な感染症を繰り返す慢性肉芽腫症（CGD）の患者の貪食細胞がrespiratory burstを消失していることが判明しました。1970年代後半から1980年代後半になるとNox複合体の構成分子が次々とクローニングされ、貪食細胞におけるNoxの全貌が解明されつつありました。ところが、1980年代より、貪食細胞以外の細胞からの活性酸素種（ROS）の産生を報告する論文が相次ぎ、遂に1999年に、上皮細胞に発現する新規 NoxとしてNox1が報告され、これを皮切りに、組織特異的に存在するNox（現在、gp91^{phox}はNox2と呼称統一された）の分子クローニングが次々となされ、2001年には7種のNox（Nox1-Nox5, Duox1 and Duox2）が出揃い、Nox familyと呼ばれるようになりました。ちょうどこの頃私は、脳梗塞とマイクログリアとの関係に注目したことがきっかけで、マイクログリアにおけるNoxであるNox2の活性化機構の研究を始めるようになりました。2003年になると新規Noxの活性化分子であるNox organizer（Noxo1）, Nox activator（Noxa1）が、Nox2の活性化分子（p47^{phox}, p67^{phox}）のホモログとしてクローニングされました。私は幸運にも2004年から、p47^{phox}, p67^{phox}, Noxo1, Noxa1さらにに Nox4をクローニングしたNIHのグループに留学・勉強する機会を得て、新規Nox（上皮細胞における）の研究を始めました。帰国後は、貪食細胞におけるNoxと上皮細胞におけるNoxの両方の活性化機構の仕事を続けています。

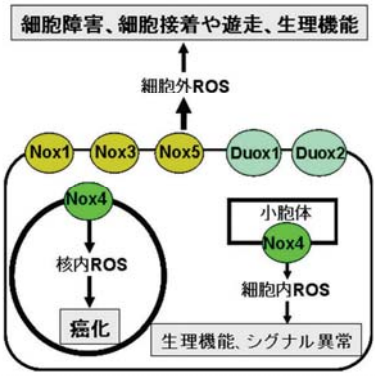
私が現在までのところ、この分野の研究に貢献したといえることは、以下の3つであります。1つ目は、貪食細胞におけるNox（Nox2）による活性酸素の産生が食胞膜上で限局的に行われることを証明したこと（図左）、2つ目は、新規Nox（Nox1とNox3）の活性化にRacが必要であることを突きとめたことです。もう一つは、Nox2の活性化プロセスにおけるp40^{phox}の活性化機構を解明したことであります（分子内結合による不活化状態の維持と刺激時における分子内結合の切断による活性化）（図左）。

全身の組織や細胞種がNoxを発現しているという事実認識に伴い、ROSの生体感染防御（Nox2は貪食細胞での、Nox1, Nox4, Duox1, Duox2は、管腔臓器の上皮細胞での感染防御に関与している）以外の生理的機能（発生・分化・癌化・老化における細胞内シグナリング）が注目されています。ここ数年は、ROSが病態（特に神経変性疾患）の進行・悪化に及ぼす影響に関する興味ある報告も相次いでいます。一方で、Nox2はもとより新規Noxの活性化機構には、依然解明が必要な点が多く残されており、ROSと病態とをつなぐ部分（病態時におけるNox活性化機構など）においては全く不明であるといっても過言ではありません（図右）。

今回本特定領域研究に参加させて頂くに際し、ROSを産生する細胞質膜や細胞内膜器官（食胞も含む）を精密な制御に基づき細胞内を移動する「活性酸素産生トランスポートソーム」と捉え、貪食細胞におけるNoxの活性化機構において依然不明な点を解明することを主とし、可能であれば病態時のNoxの活性化機構の解明、さらにはNox--ROS--病態（形成・進行）の詳細を解明したいと考えております。また班員の先生方との交流により、新しい研究領域にも踏み込んでいけるのではないかと期待しております。ご指導の程、何卒よろしくお願い致します。



貪食細胞における活性酸素産生機構と機能



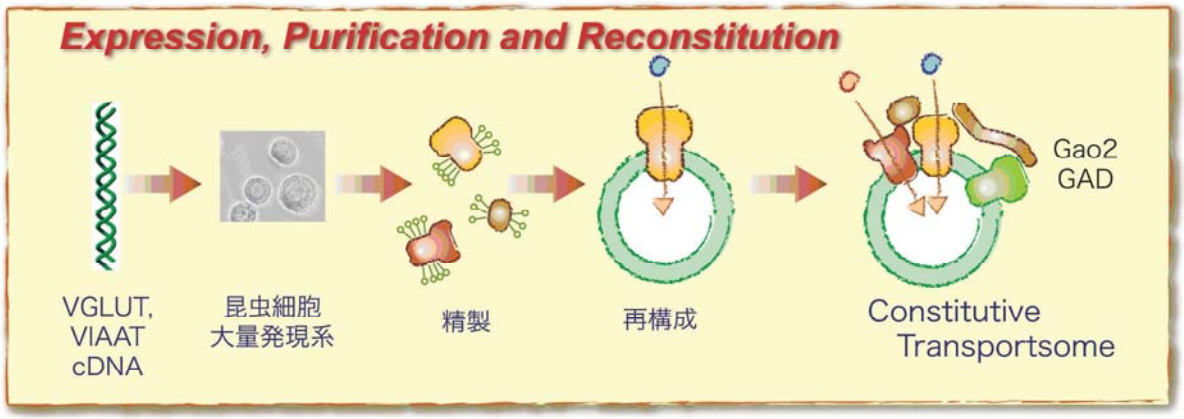
上皮細胞における活性酸素種産生と機能

構成的手法によるシナプス小胞トランスポートソームの実体解明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　生体膜機能生化学研究室

森山　芳則

本年度よりお世話になります。よろしくお願い致します。私の研究母体は生化学です。オルガネラを分離し、膜タンパク質を可溶化しその機能をリポソームに再構成する手法を学生の時から少しずつ改良してきました。この方法によりこれまでV-ATPase（1986），phospghatidylserine flippase（1988），vesicular glutamate transporter2（VGLUT2）（2001），MATE-type drug exporter（2005）などを発見、精製し、その機能を調べてきました。途中10年ほど、トランスポーターの生理的意義を追求したくなり細胞･器官･個体レベルの仕事をしてきましたが、飽きました。4年ほど前からたんぱく質自体を取り扱う生化学に戻ってきました。最近、ようやく全てのトランスポーターに適用できる（はずの）システムを作りました。トランスポーターを昆虫細胞（あるいは酵母や大腸菌）で大量発現させ精製し、純粋なトランスポーターだけを用いて輸送を測定するシステムです（下図）。現在はこのシステムを用い、VGLUTやvesicular inhibitory amino acid transporter（VIAAT），vesicular nucleotide transporter（VNUT）およびvesicular excitatory amino acid transporter（VEAT）の構造と機能に関する研究を進めています。VNUT(2008)はATP等のヌクレオチドを分泌小胞に濃縮する小胞型神経伝達物質トランスポーターの一種で、プリン性化学に重要です。また、VEAT（2008）はアスパラギン酸を輸送する小胞型神経伝達物質トランスポーターとして最近同定しました。本公募研究においては、少し冒険をしようと思っています。VNUTやVEATを発見したこの方法（構成的方法）を基盤にして、そこに新しい因子を加え、分泌小胞における制御された状態に近づけようというものです（下図）。この手法をConstitutive Transportsomeと呼びたいと思っています。この方法で既知のトランスポーターの制御機構をこれまでとは別の角度で追求したいと思っています。



A02班公募研究班員の研究紹介

味覚形成における脂質ミクロドメインの役割

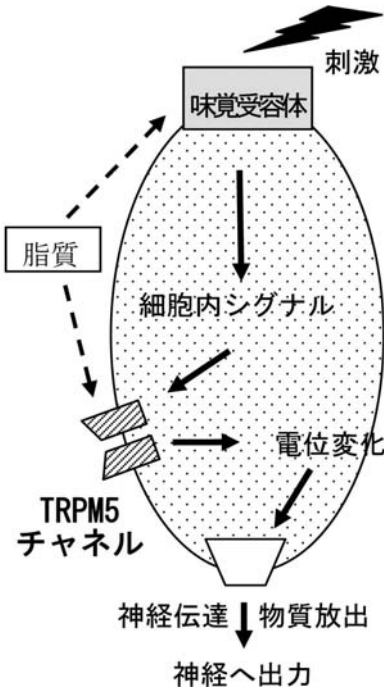
東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯科薬理学分野

若森　実

東北大学の歯学部の若森です。今年度から公募班員として研究班に参加することになりました。どうぞ宜しくお願い致します。今まで、私は福岡、仙台、岡崎、鹿児島、京都と国内だけでも5つの土地で研究をしてきました。しかし、一貫して生きた細胞の活動をリアルタイムで記録できるパッチクランプ法を用いて神経細胞のような興奮性細胞のイオンチャネルやGタンパク質共役型受容体の研究を行ってきました。京都大学の森泰生先生が始めておられたTransient Receptor Potential（TRP）チャネルの研究に参加するようになってからは、非興奮性細胞である免疫系の細胞でのチャネルの役割も研究してきました。東北大学歯学部に来るまでは口腔関連の研究をしたことは殆どありませんでした。歯学部に所属していますから口腔関連の研究をしなければならないというわけではないのですが、口腔関連の研究をした方が歯科の臨床講座から大学院生が研究に参加してくれる可能性が高いと思い、本申請研究のような口腔関連の研究に重心を移しつつあります。しかし、まだ教室の基盤も固まりませんから、先ずは自分の得意な領域から足固めをしようと思い、イオンチャネルの研究を進めています。

イオンチャネルは生体膜中で脂質に埋まっており、脂質により活性が調節されている可能性があります。例えば、inwardly rectifying K^+（Kir）チャネルはPIP_2のようなホスホイノシタイドにより活性が調節されています。細胞膜の脂質構成成分は、組織別にマクロレベルで見た場合は経時変化がないかもしれませんが、膜の局所（ミクロドメイン）では細胞膜の脂質構成成分は変化している可能性があります。我々は脂肪を含む食物を口から食べますので、最も影響を受け易い器官のひとつが口を含む消化器です。

ヒトは欠乏する栄養素を欲します。皆様は体調により味覚が変化した経験はないでしょうか。現在までに、甘、酸、辛、苦、旨味の5基本味の受容体が同定されています。三大栄養素である脂肪自体に味はないとされていますが、脂肪の有無で料理の味は大きく変わります。つまり、脂肪により味覚の受容体、又はその後のシグナルカスケードが修飾されている可能性があります。しかし、食品中の不飽和脂肪酸の味覚に対する効果の研究はあまり行われていません。最近、味蕾に発現し苦味と甘味形成にTRPM5陽イオンチャネルが寄与していることが報告されました（Scott et al. Curr Opin Neurobiol 14：423-427, 2004）。TRPM5チャネル自体は味物質の受容体ではなく味蕾における細胞内情報の増幅器として働いています（図）。一方、我々はTRPM5チャネルの活性がアラキドン酸で修飾されることを見出しました（Oike et al. Biochim Biophys Acta 1761：1078-1084）。そこで、「脂肪や脂肪酸が味蕾細胞の膜に作用し、脂質ミクロドメイン中でTRPM5チャネルの機能を修飾する」のではないかと考え、本研究領域に申請しました。TRPM5チャネル活性を電気生理学的に計測することにより脂質による味覚の修飾機構を明らかにしたいと思っています。最終的には味覚閾値を下げるような食品の開発のための基礎的知見を提供できないかと考えています。つまり、甘味や旨味のような報酬系に働く感覚を受容器レベルで増幅し、『少量の食事で大きな満足』が得られれば、40歳代後半に突入し、メタボが気になる私も小食になり、ズボンのウエストサイズが細くなるのではないかと考えています。



味細胞におけるシグナルカスケードとTRPM5チャネル
味物質は受容体に結合した後、産生された細胞内シグナルがその近傍にあるTRPM5チャネルを活性化し、最終的にシグナルが増幅され神経に伝えられる。TRPM5チャネルはシグナル増幅の中心的役割を担う。

核・小胞体膜を扱う外分泌腺生理学

東北大学大学院医学研究科細胞生理学

丸山　芳夫

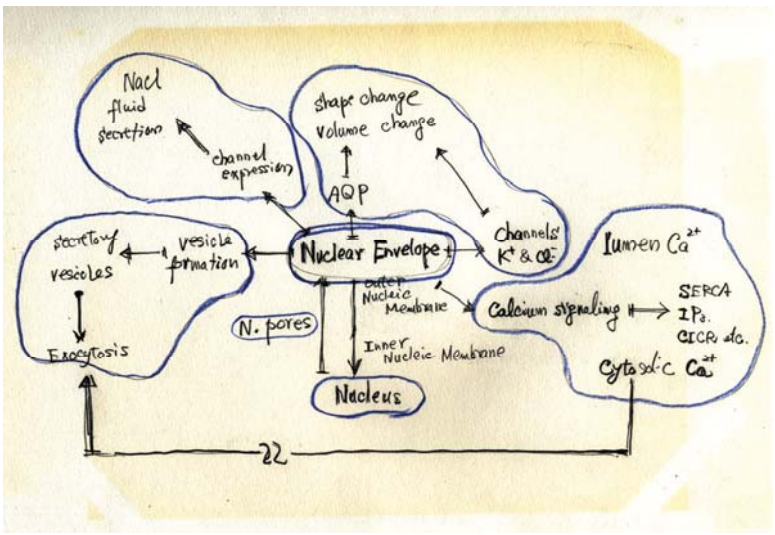
当分野（東北大学大学院医学研究科細胞生理学）が進めてきた研究の大筋は、1世代前から数えると延べ20年を越えるが、引き続き「外分泌腺の電気生理学」であると思う。「外分泌腺」という器官名称による研究分類は直接的で分り易いが、昨今人気がないようだ。ここ50年、外分泌腺（膵腺および唾液腺腺房細胞）において調べられた内容を時代順に追うと、1）Paladeによる開口放出の定義、2）膜電位の存在、3）イオンチャネルの存在、4）IP_3によるCa^{2+}放出証明、5）上皮性分泌細胞（非興奮性細胞）での電位依存性チャンネルの存在、6）等張性NaCl溶液分泌機序、7）カルシウム信号伝達と刺激分泌連関、のように並び、予想されたように比較的多岐に亘っている。1）から5）までは存在証明であり、こまかな話ではあるが、これらは外分泌腺で最初に報告されている。私どもの関与はパッチクランプ法による「イオンチャネルの存在」辺りからである。

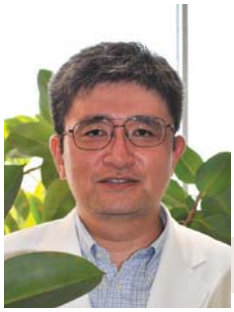
現在、核・小胞体膜のイオンチャネルを調べている。膵腺腺房細胞において、核・小胞体膜構造を保った標本を作製することに苦労したが、以下のイオンチャネルを外側核膜において同定できた：1) 200 pS Maxi-K channel, 2) 80 pS K-channel, 3) 30pS cation-channel, 4) 7 pS Cl-channel, 5) 300 pS IP3-R-channel (type 3), 6) 55 pS cADPR or NAADP-dependent channel。KイオンとClイオンをチャネル不透過イオンに置き換えると標本が縮小することから、核・小胞体構造の維持あるいは変化に果たすチャネルの役割が推定できる。いっぽう内側核膜については、どのようにアプローチしたらよいのか、外側核膜を除去するという方針で検討を重ねている。不思議に思われるかもしれないが、内側核膜にあって外側にはないイオンチャネルも報告があり、そうするとそのチャンネルは核に直接働きかけているのであろうか。

小胞体管腔カルシウム濃度との関連から膜容量変化を追うと、小胞体内腔カルシウムイオン濃度の増加は、核・小胞体標本の総膜容量を増加させる。膜容量は脂質二重膜の表面積に比例する指標であり、電気計測にかかる核・小胞体膜（構造として一続きの）表面積の増加と考えている。局所膜領域（vesicleのような）での加減のバランスが推定できる。核・小胞体はペプチド生合成の現場であり、また小胞出芽の起点でもある。つまり、小胞体管腔内容物および小胞膜表面積は代謝に応じて変化しており、細胞活動が活発であればそれらの変化も大きいと思う。いっぽう、内側核膜との関連で予想を広げれば、核中へ延びる内膜invaginationの分断と再交通で、総膜容量は減少あるいは増加が予想される。いずれにせよ、真偽は不明である。

未だ輪郭も見えない漠とした構図だが、筋としては、「核に働きかける機構」の一端を解明すること、これを目指しているとも言える。つまり、1）核孔を介してcytosolから、2）内側核膜（invagination）を介して小胞体から。後者に電気生理学が貢献できれば、と願っている。

以下、外分泌腺での電気生理学を基とした、あるいは、電気生理学が貢献できそうなと言い換えたほうが適切であろうが、まとめを図に示した。





3種類の胃プロトンポンプトランスポートソームの機能と環境基盤の解明

富山大学大学院医学薬学研究部　薬物生理学研究室

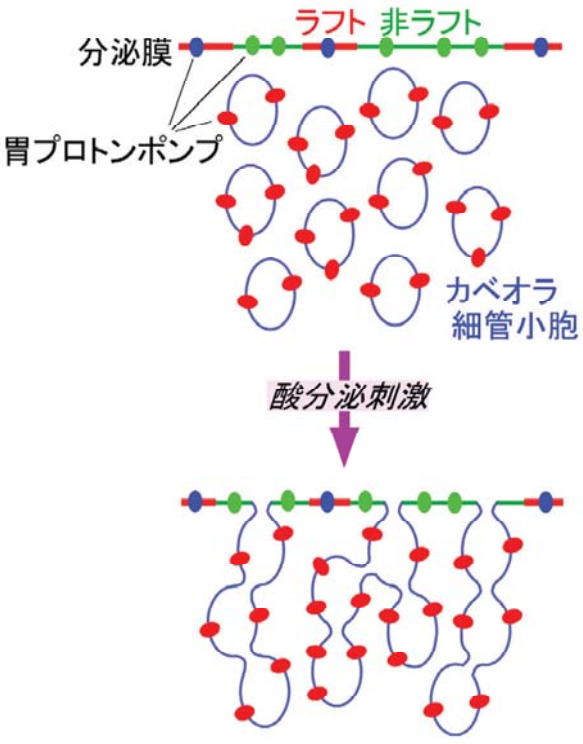
酒井　秀紀

私たちのグループでは、胃プロトンポンプ（H^+,K^+-ATPase）と分子会合や機能共役するイオン輸送蛋白質の研究、高性能コンピュータを駆使した胃プロトンポンプの分子動力学的研究や胃プロトンポンプのフリッパーゼ機能の分子機構の解明などを行っています。当研究室で発見した胃酸分泌細胞の細胞防御塩素イオンチャネルも重要な研究テーマです。大腸のイオン輸送の研究も精力的に行ってきており、これまでにラット大腸粘膜で抗ガン剤により引き起こされる新規下痢機構を見出しました。当大学医学部第2外科と、ヒト大腸組織を使った共同研究を行っており、大腸粘膜におけるイオンチャネルの調節機構や大腸ガン組織におけるポンプやチャネルの発現変動機構などのテーマにも取り組んでいます。このたび「3種類の胃プロトンポンプトランスポートソームの機能と環境基盤の解明」という研究課題で、本領域の公募研究班員として参加させていただくことになりました。私たちの課題を採択していただいたことに感謝し、本特定班に貢献できるよう精一杯頑張ります。

胃酸分泌細胞は、酸分泌休止状態から刺激状態に移行する際に、分泌側の膜形態が劇的に変化します。胃プロトンポンプは、酸分泌休止時にはその大部分が細胞内の細管小胞膜に局在し、分泌刺激時には細管小胞膜が分泌膜（頂端膜）と融合し管腔につながり、プロトンを分泌すると考えられています。しかし私たちは最近の一連の研究で、酸分泌刺激の有無にかかわらず、細管小胞膜と分泌膜は独立しており、酸分泌刺激にともない両膜が一体化しないことを見出しました。また、分泌膜と細管小胞膜における胃酸分泌分子複合体とそれを取り巻く環境が、大きく異なっており、分泌膜と細管小胞膜における異なるトランスポートソームがそれぞれ空腹時と摂食時の胃酸分泌機構に対応しているものと考えました。これまでの消化性潰瘍治療薬のなかで、摂食時と空腹時の胃酸分泌機構の違いを意識して使用されているものはなく、摂食時（刺激時の胃酸分泌）と空腹時（休止時の基礎胃酸分泌）にそれぞれ選択的な治療薬の開発につながる可能性があります。

さらに細管小胞そのものがカベオリン-1で被覆されたカベオソームであること、分泌膜にはラフト領域と非ラフト領域があることを明らかにしました。本研究では、3種類の「場」（カベオソーム、ラフト、非ラフト）に存在する胃プロトンポンプがそれぞれ異なるトランスポートソームを形成しているという新規概念のもとで、各トランスポートソームの機能と環境基盤を明らかにしたいと考えています（図）。具体的には、1）胃細管小胞カベオソームにおけるプロトンポンプトランスポートソームの機能、2）細管小胞（カベオソーム）膜と分泌膜との融合のメカニズム、および膜の独立性を保持する機構、3）ラフトと非ラフトにおける胃プロトンポンプトランスポートソームの機能、局在および活性調節機構等に関する研究を進めて参りたいと考えています。

本研究は3名のスタッフが中心となり遂行しています。研究代表者の酒井はこれまで、電気生理学的手法、分子生物学的手法等により、胃および大腸のトランスポーター、イオンチャネルの研究を継続して行ってきています。研究分担者の森井教授（鈴鹿医療科学大学薬学部）は、胃細管小胞膜および骨格筋小胞体膜の生化学的研究や胃プロトンポンプの分子動力学的研究等を、田渕准教授（当大学生命科学先端研究センター）は胃プロトンポンプをはじめとする多くの蛋白質の生化学的研究やマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ってきています。この他、日本学術振興会特別研究員（D3）の藤井君らが研究に協力しています。本研究では、お互いの協力体制のもと最大限の成果を上げてまいりたいと思います。今後とも諸先生方にはいろいろお世話になりますが、ご指導のほどよろしくお願い申し上げます。



3種類の胃プロトンポンプトランスポートソーム

材料工学的アプローチによる人工生体膜ラフト構造の再現

名古屋大学大学院工学研究科結晶材料工学専攻
宇治原　徹

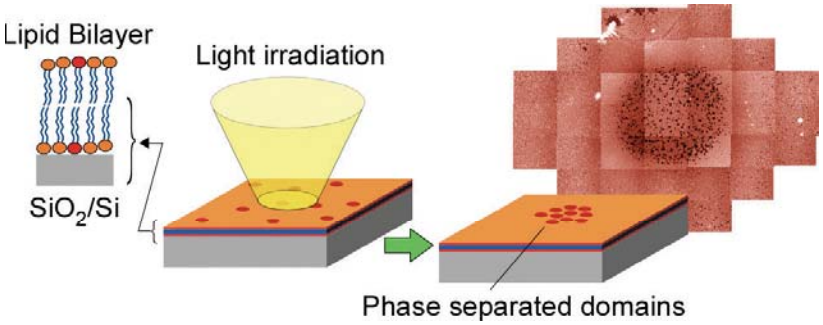
私の専門は「材料工学」です。その私が、生体膜の研究を行うに至った理由は、前回のNewsletterで紹介させていただいたとおり、材料と生体膜の、「ある共通性」に気付いたことにあります。鉄鋼やアルミニウム合金などの特性の多くは、結晶粒のサイズや相分離構造による微細組織によって決まり、これらは「状態図（相図）」と「相分離現象」を駆使することで達成されます。一方、生体膜においても、脂質二重膜の「状態図」に従って「相分離現象」を示します。そして、両者におい形成される相分離構造は、極めてよく似ています。それまで、生物的なものと平衡論で語られる材料とは、全く別個のものと考えていた私にとっては、その類似性は衝撃であり、その時点から、生体膜は私の研究対象となりました。現在は、物理的な手法で、人工生体膜における相分離構造を自在に制御する研究を行っています。

先の公募研究の期間から、本特定領域に参加させていただき、この場がなければ決してお話させていただく機会がなかった多くの先生方と議論を重ねさせていただきました。その中で、私が最も印象深く感じたことは、生物学的な観点と、材料工学的観点の「非常に」大きな違いです。その一例を挙げます。現在、私が興味を持っている生体膜に見られる相分離構造に関してですが、材料工学的（言い換えると熱力学的）観点を持ち合わせている私には、相分離現象は、生体膜という局所系において、自由エネルギー最小、エントロピー最大になった結果である、と考えていました。さらに、ラフト構造にタンパク質が存在するのも、相分離構造がタンパク質にとってより安定な場所であり、その結果、拡散してきているのだと理解しました。このことは、「一見、平衡論とは相容れないと思われる生物もやはり平衡に向かって変化している」ことを示しており、その点に大きな感動を覚えました。しかし、議論を重ねることで、生物学的観点では、この因果関係は逆で理解されているということに、気づきました。つまり、（多少、端的で乱暴な言い方ではありますが、）原因はタンパク質であり、結果が相分離構造であるという理解の仕方です。これは、恥ずかしながら、全く予想しえなかった考え方でありました。研究者の資質の一つは、多面的なものの見方であることは、十分理解していたにも関わらず、自分の小ささを自覚せざる得ない出来事でした。

現在、私の進めている研究は、まさにこの反省に基づくものであります。研究目標は、人工生体膜において相分離構造を再現し、その形成のタイミングや位置を、「物理的に」制御することにあります。これにより、生体膜で見られる相分離現象における物理的要因を明確にすることで、逆説的ですが、タンパク質の機能などによる生物学的要因を明確にすることを目指しています。具体的には、相分離構造の中でも、膜タンパク質の機能と関連があるラフト構造に注目しています。物理的な制御手法としては、我々が得意とする材料工学的なアプローチを用います。金属の相分離構造は、材料の特性を決める重要な要素で、金属材料の開発というのは、まさに相分離構造を制御することを意味します。そこで材料研究者は、熱処理、組成制御、歪み印加、最近では磁場・電場・応力場といった外場を駆使して、ナノオーダーに制御された相分離構造を作りこんでいきます。本研究でも、このような材料工学的手法により人工生体膜においてラフト構造のサイズや密度、位置などを制御することを目指し、さらにはそれを通じて膜タンパク質の機能を制御するデバイスにまで発展させたいと考えています。

特定領域研究では、その第一歩として、半導体基板上に形成した人工生体膜における相分離構造の形成制御を目的として研究を進めています。これまでに得られた結果としては、Si基板上に形成した脂質二重膜において、光照射しながら「熱処理」することで、光照射部に優先的に相分離構造を形成させることに成功しています。（図）これは、蛍光物質を介して、局所的に生体膜を熱膨張させることで、膜内に「歪みを印加」し、その結果、光照射部とそれ以外の部分で組成の分配が生じたためであると理解しています。まさに、材料プロセッシングです。この現象は、当初、液晶相―ゲル相相分離構造で実験を行っていましたが、現在は、液晶相―液晶相相分離構造である擬似的なラフト構造でも実現しています。さらに、膜タンパク質を再構成した膜を形成し、相分離構造とタンパク質の位置関係に関しての評価も進めています。最近では、光照射ではなく電界印加による相分離構造の制御にも成功しています。

最後に、私のような「外来種」を、引き続き本特定領域に参加させていただく機会を与えてくださった皆様方に、深く感謝いたします。全力で貢献させて頂きたいと思います。



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

「脂質場」から生命現象を理解する

京都大学化学研究所　超分子生物学研究領域

梅田　真郷

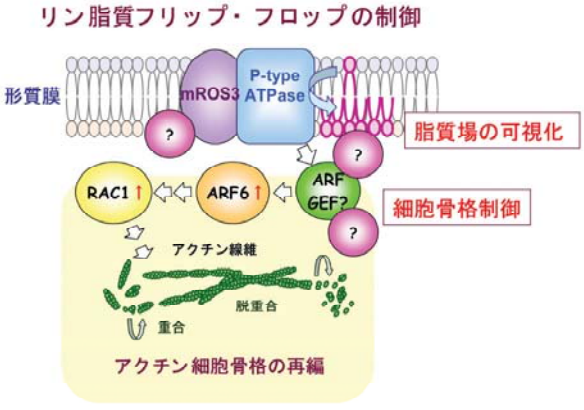
このたび「リン脂質フリッパーゼを介する脂質場の形成とその細胞骨格制御における役割」という研究課題で本特定領域に参加させて頂くことになりました。多くの方にとって「脂質場」や「リン脂質フリッパーゼ」は耳慣れる言葉だと思いますので、まず、研究のバックグラウンドから簡単に説明することにいたします。ご存知のように、生物はその進化の過程で様々なタンパク質を生み出して来ました。一方、膜を構成する脂質もタンパク質と同様にその化学構造の多様化を遂げてきており、現在では生体膜を構築する脂質分子は3万種以上に及ぶことが示されています。この脂質多様性には様々な生物学的な意味があると思いますが、私共は、タンパク質の構造と機能の多様化に伴ってその働く場である膜環境も多様性を獲得する必要があり、それが脂質多様化の要因の一つではないかと考えました。そこで、膜タンパク質を取り囲む脂質分子により構築される特異な膜環境を「脂質場」と呼ぶことにいたしました。また、このような「脂質場」は決して静的な構造ではなく、様々な脂質分子の膜中での離合集散によりその消長が決定される、非常にダイナミックで多様な構造体であると考えられます。

生体膜中での脂質分子運動の際立った特徴の一つは、脂質二重層内での横方向への拡散運動と共に脂質二重層内外を横切る活発なとんぼ返り運動（フリップ･フロップ運動）を繰り返している点にあります。人工膜中では、リン脂質の極性頭部が膜内部の疎水領域を通過するには大きなエネルギーを必要とするため、フリップ･フロップ運動はきわめて起こり難い反応となっています。一方、生体膜中にはATPに依存してリン脂質のフリップ･フロップを積極的に促進するタンパク質いわゆる「リン脂質フリッパーゼ」を介することにより、活発なリン脂質フリップ･フロップが起きていると考えられていますが、その生物学的な意味は未だ明らかにされていません。

私共は、この十数年来、各種リン脂質に特異的に結合するプローブ群を開発し、生体膜中でのリン脂質分子の分布と動態について研究を進めて参りました。その結果、細胞の分裂における分裂溝や遊走細胞の移動先端などの形質膜の局所において、リン脂質の一つであるホスファチジルエタノールアミン（PE）分子の活発なフリップ･フロップが起こり、この脂質分子運動が膜直下のアクチン骨格の再編を制御するシグナルとなっていることを見出しました。これらの観察は、従来、骨格系を包む袋と想定されていた脂質分子の動きそのものが、細胞骨格系の再編を制御し、膜と細胞骨格のクロストークにおいて重要な役割を果たしていることを示していました。この観察から、1）PE分子のフリップ･フロップを制御するタンパク質は何か、2）リン脂質の動きがどのようなメカニズムでタンパク質の機能を制御しているのか、の二つの疑問が提起されました。

まず、第一の問題を解決するために、PE分子の脂質二重層内外での非対称分布に異常を来した酵母変異体を作製し、その原因遺伝子の解析からPE分子のフリップ･フロップを制御する新たなタンパク質Ros3pを同定いたしました。さらに、Ros3pの哺乳動物における相同分子mROS3を同定し、その解析からmROS3はType IV P-type ATPase ATP8A1と複合体を形成し、形質膜においてPE分子のフリップ･フロップを行っていることを明らかにしました。また、mROS3あるいはATP8A1の発現や活性を抑制することにより細胞の形態、運動や分裂に異常を来すことを見出しました。これまでに、mROS3/ATP8A1複合体を介するPE分子のフリップ･フロップの亢進により形質膜の局所に特異な脂質ドメインいわゆる「脂質場」が形成されること、また、この脂質場を介して低分子量GTP結合タンパク質ARF6等の分布や活性が制御されることにより、膜局所での細胞骨格系の再編が進むことが明らかとなりました。今後、このような「脂質場」が、いかなる分子機構でタンパク質機能に影響を及ぼしているかを明らかにする必要があります。

以上のように、私共の研究を大きく括ると「脂質生物学」とも呼べるもので、従来の遺伝子やタンパク質の研究のみでは十分に説明出来なかった様々な生物現象を膜脂質の観点から明らかにすることを目的としています。現在の研究テーマは、上述のような細胞生物学での成果を踏まえて、ショウジョウバエ個体を用いて温度と生物との関わりについても研究を進めております。膜脂質に関することでしたら、何らかのお役に立てるかと存じます。今後とも何卒よろしくお願い申し上げます。



脂質トランスポーターと細胞膜環境の相互制御

京都大学大学院農学研究科　細胞生化学研究室

松尾　道憲

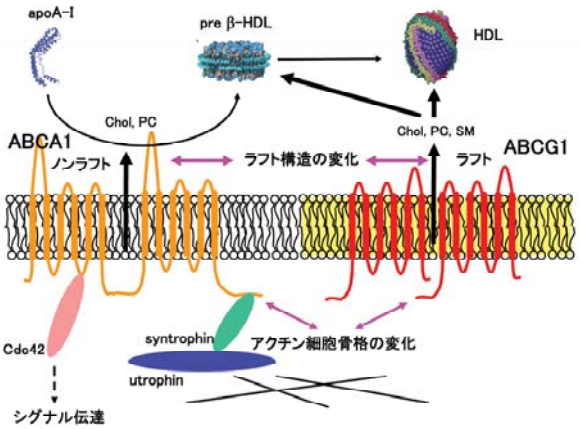
近年、多くのABCトランスポーターが脂質を基質とすることが分かりつつあり、私たちの研究室では、脂質を輸送するABCトランスポーターを中心に研究を行っています。脂血管疾患や心疾患を引き起こすメタボリックシンドロームが社会的問題となっており、高脂血症に注目が集まっています。ABCA1とABCG1はマクロファージを含む末梢細胞に発現し、体内の脂質恒常性維持に重要な役割を果たすABCトランスポーターです。神経細胞やグリア細胞にも発現しており、脳内の脂質恒常性にも働くと考えられています。その生理的重要性は、*ABCA1*遺伝子の変異が低HDL症（タンジール病）を引き起こすこと、高脂肪食を摂取したABCG1のノックアウトマウスがマクロファージに中性脂質を蓄積することから明らかにされています。マクロファージに過剰に蓄積した脂質は動脈硬化症を引き起こしますが、ABCA1とABCG1は細胞内の過剰なコレステロールを排出することで動脈硬化の抑制に働きます。ABCA1が血中のアポリポタンパク質A-I(apoA-I)にコレステロールとホスファチジルコリン(PC)を排出しpreβ-高密度リポタンパク質（HDL）を産生し、ABCG1がpreβ-HDLとHDLにさらにコレステロールとスフィンゴミエリンを排出することを、我々はこれまでに明らかにしてきました。その過程で、ABCA1とPDZタンパク質（α1-syntrophin)が相互作用し、ABCA1の分解制御を介して脂質輸送活性が制御されることを示しました。また、ABCA1がsyntrophin，utrophinを介してアクチン細胞骨格と相互作用することが他のグループの研究により明らかとなっています。これらのことから、ABCA1はトランスポートソームを形成して機能していると考えられます。ABCA1と同様の機能をもつABCG1もトランスポートソームを形成して働く可能性が高いと考えています。

ABCG1が細胞膜脂質ラフトの構成成分であるコレステロールとスフィンゴミエリンを輸送することから、ラフト構造への影響を検討したところ、ABCA1またはABCG1が発現した細胞ではラフトが壊れてノンラフトコレステロールが増加することが分かりました。ラフト構造がABCトランスポーターの機能に与える影響を検討すると、スフィンゴミエリン含量が減少し、細胞膜脂質ラフトが壊れた細胞では、ABCA1の活性は亢進し、ABCG1の活性は減少していました。逆に、スフィンゴミエリン量が増加しラフトが増加した細胞では、ABCA1の活性は減少し、ABCG1の活性は亢進していました。ABCA1とABCG1の違いがラフトへの局在の相違によるものではないかと考え検討したところ、ABCA1は細胞膜上でノンラフトに偏在し、ABCG1はラフトに偏在することが分かりました。これらのことから、ABCA1，ABCG1の機能と脂質ラフト構造は相互に制御する可能性があります。

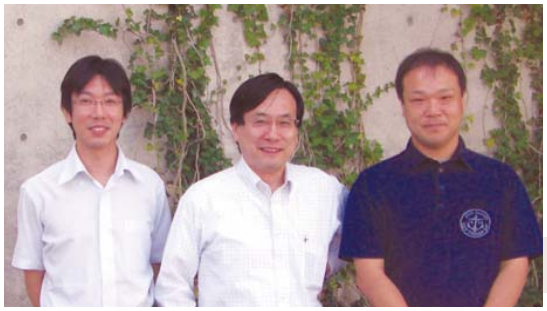
ABCA1がcdc42と相互作用すること、ABCA1の発現によりアクチン重合が促進されフィロポディアが形成されることが報告されています。従って、ABCA1とABCG1のトランスポートソームは、細胞膜脂質ラフトあるいはアクチン細胞骨格と相互に制御しあいながら、細胞の形態変化や移動にも関与するかもしれないと考えています。

そこで、本研究課題では、末梢細胞の脂質恒常性維持に重要な役割を果たす脂質トランスポーター（ABCA1とABCG1）を中心としたトランスポートソームと細胞膜環境（膜脂質ラフトやアクチン細胞骨格）との相互制御機構を明らかにすることを目的としています。具体的には、ABCG1の相互作用分子を探索し、トランスポートソーム構成とラフトへの局在機構を明らかにしたいと考えています。さらに、ABCA1とABCG1のトランスポートソームがラフト構造とアクチン細胞骨格を再編成する機構、逆にラフトとアクチン細胞骨格がABCA1とABCG1の活性を制御する機構を明らかにしたいと考えています。膜脂質ラフトはシグナル伝達の場でもあるので、ABCA1とABCG1の活性によるラフト構造の変化が、ラフトを介するシグナル伝達に与える影響についても調べていきたいと考えています。

最後に、本研究領域には様々な分野の先生方がおられることから、それぞれの専門的なご助言をいただければと考えています。それとともに、脂質トランスポーターを発現させることでラフト構造を変化させることもできますので、それをツールとして共同研究にも発展できればと考えています。今後どうぞよろしくお願いいたします。



PDZタンパク質などを含むABCA1トランスポートソームはノンラフトに局在し、コレステロール（Chol）とホスファチジルコリン（PC）をapoA-Iへ輸送する。ABCG1はラフトに局在し、Chol, PCとスフィンゴミエリン（SM）をHDLへ輸送する。ABCA1，ABCG1トランスポートソームと細胞膜環境（脂質ラフト、アクチン細胞骨格）とは相互に作用する。



トランスポートソームにおけるイオンチャネル局在と関連分子間協関の可視化解析

名古屋市立大学　大学院薬学研究科
細胞分子薬効解析学分野

今泉　祐治

【トランスポートソーム機能】

イオンチャネルを主要な構成因子とするトランスポートソームの重要な機能の一つに「細胞内Ca^{2+}シグナルの電気信号への変換」が挙げられると思います。特にCa^{2+}活性化イオン（K_{Ca}）チャネルは多くの組織の細胞で直接的にこのシグナル変換を担う素子となっています。K_{Ca}チャネル活性はチャネル近傍の局所Ca^{2+}動態（Ca^{2+}transient）で制御され、その局所Ca^{2+}動態の制御にもトランスポートソームが深く係っているため、トランスポートソーム内での分子機能連関により、電気信号への変換が行われ、これがさらにCa^{2+}動態にもfeed back効果を及ぼすという構図です（図1）。

私たちの研究室では、従来から各種臓器の平滑筋において興奮性と収縮を制御するイオンチャネル・トランスポーターの機能解析と病態での変化という観点から研究してきました。平滑筋研究で発見され、生理学上で一般化された概念としてCa^{2+}sparkによる静止膜電位制御があります。小胞体からのリアノジン受容体を介した局所・一過性Ca^{2+}遊離としてのCa^{2+}parkの機能は、もともと発見された心筋では興奮収縮連関のユニット現象ですが、平滑筋では近傍細胞膜上のK_{Ca}チャネル（特にBKチャネル）を活性化し、静止膜電位を深くする方向へ保つことが知られています。組織機能としては筋緊張制御ということになり血圧調節にも深く係っています。トランスポートソームの分子構成は、細胞膜側にBKチャネル、電位依存性Ca^{2+}チャネル、これらが集積すると想定されるカベオリンなど。小胞体側にリアノジン受容体やIP_3受容体などですが、細胞膜と小胞体の位置関係を規定するジャンクトフィリンなどや、寄与する足場タンパクなどを含めて、副メンバーとその分子機能はまだ不明な点が多いのが現状です。この分子基盤を明確にするとともに、このトランスポートソームの統合的な機能を再構築系も用いながら解明つつあります。

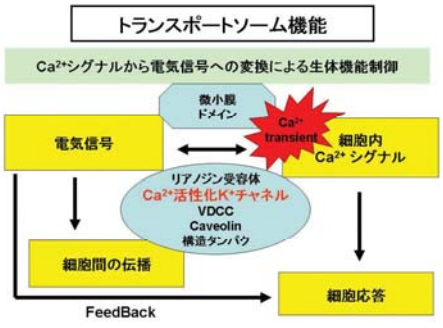


図1

【可視化による細胞分子機能解析】

先進的可視化技術を駆使して、細胞機能を数ミリ秒の高速サンプリング画像解析することにより、全く新たな現象として解析することが可能となりますし、対象がイオンチャネル関連分子の場合はパッチクランプの併用により機能解析が同時に可能であります。現在はレーザー共焦点蛍光顕微鏡に加えて、全反射蛍光顕微鏡を駆使して、生細胞内で機能している分子挙動の一分子可視化解析を集中的に行っており、一分子ダイナミズム解析からトランスポートソーム分子集合体中での分子協関の画像解析へ研究を展開しつつあります。

【イオンチャネル標的創薬研究】

薬学研究科ということもあり、現在は関連した疾患におけるイオンチャネルをターゲットとした創薬関連研究にも大きなエネルギーを注いでおります。イオンチャネルのなかでも特に種類が多く、臓器・組織毎にかなり特異的に発現しているK^+チャネルを中心に、チャネル複合体の特定疾患での機能変化・発現変化の解析、そのチャネルを標的とする創薬（リード化合物の探索）および作用機序の解明を重点的に行っています。HEK293細胞を用いて高効率探索系を開発し、当該K^+チャネルに作用する化合物検索により幾つかの特許を得てきました。イオンチャネル作用薬の高効率探索システムの開発にも大きな関心を抱いており、応用的な研究をしております。

直接的な創薬研究としては、特にK_{Ca}チャネル分子機能解析を基に、その機能変化や遺伝子変異体の機能異常と高血圧・頻尿・癲癇・アレルギー疾患・慢性関節炎・前立腺ガンなど多くの疾患との関連を探求し、治療薬としてチャネル作用薬の創薬を目指しています。非興奮性細胞でのK_{Ca}チャネルは、その活性化が過分極を引き起こしTRPを介したCa^{2+}流入に対して正帰還機構を担うため、持続的なCa^{2+}濃度上昇とそれによって生じる遅延性の細胞応答（細胞増殖やアポトーシスなど）において極めて重要な機能を有します。3種のK_{Ca}チャネル(BK、IK、SK)チャネル作用薬（阻害薬・開口薬）とその作用点でのチャネルタンパクとの相互作用について、親和性と選択性を向上させる分子間相互作用を構造活性相関により検討しています。

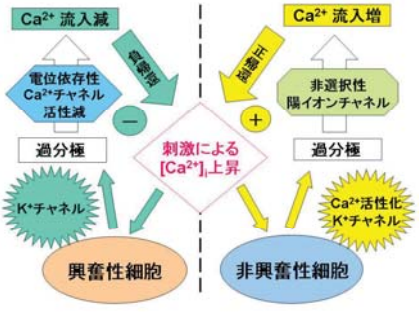
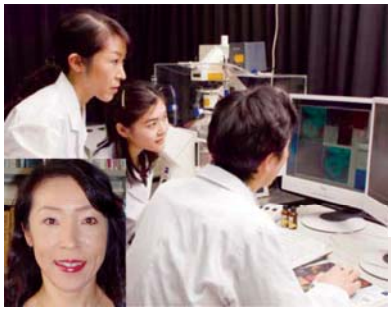


図2

最後になりますが、私たちの研究グループは大矢進准教授（写真右）と山村寿男助教（同左）、大学院博士後期課程4名（社会人博士課程1名を含む）、博士前期課程9名、卒業研究生6名、研究員3名の総勢25名が所属する大所帯の研究室です。大きなマンパワーによって、この特定領域研究の発展に貢献したいと思いますので、宜しくお願いします。



脂質結合蛋白を介した カルシウムシグナロソームの制御機構

東邦大学医学部薬理学講座

赤羽　悟美

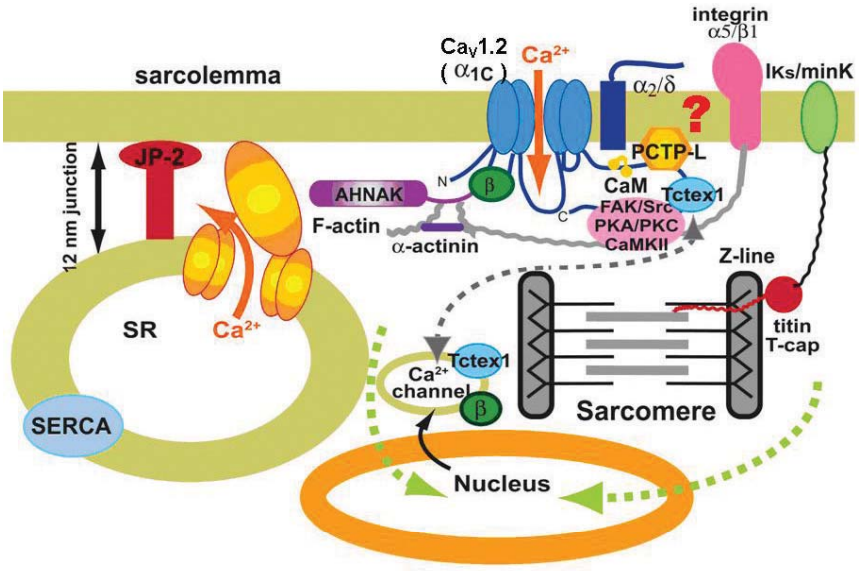
私たちは心筋を中心にL型Ca^{2+}チャネルを介した細胞内Ca^{2+}シグナル制御機構を研究しています。心筋細胞において電位依存性L型Ca^{2+}チャネルから発せられるCa^{2+}シグナルは、ペースメーカー活動電位を形成して心拍リズムを担い、Ca^{2+}誘発性Ca^{2+}放出機構により心筋の興奮収縮連関に必須の役割を担い、さらに心筋細胞の分化や形態維持にも関わっています。Ca^{2+}シグナルの発信装置として、Ca^{2+}チャネルおよびCa^{2+}シグナル変換酵素群はシグナル複合体（カルシウムシグナロソーム）を形成し、精密なシグナル制御の場を構築していると考えられます。私たちは、これまでL型Ca^{2+}チャネル主サブユニット$Ca_V1.2$および$Ca_V1.3$の分子薬理学的解析および心筋細胞のCa^{2+}シグナル制御における機能的役割を解析してきました。

$Ca_V1.2$の開閉機構や膜局在機構は修飾サブユニットをはじめさまざまな相互作用蛋白を介して調節されています。特に$Ca_V1.2$の細胞内カルボキシル末端領域は約600アミノ酸と長く、蛋白間相互作用を介した機能調節に関わると考えられてきました。L型Ca^{2+}チャネルのファシリテーションや不活性化については、カルモジュリンをはじめ調節蛋白やリン酸化による制御が解明されつつあります。そこで私たちは、L型Ca^{2+}チャネルを含むカルシウムシグナロソームの構成分子を同定する目的で、$Ca_V1.2$の細胞内カルボキシル末端領域と相互作用する蛋白を解析し、リン脂質結合蛋白（PCTP-L:phosphatidyl- choline transfer protein-like、StarD10）を新たに同定しました。StarD10はSTART領域という脂質輸送･結合領域を含む蛋白ファミリー（StarD1～StarD15）に属し、phosphatidylcholineやphophatidylethanolamineなどのリン脂質輸送活性を示します。STARTファミリー蛋白については脂質輸送を介して脂質代謝や細胞内シグナル制御に関わるものが報告されています。しかしながら、StarD10の機能的役割については現在のところ不明であり、精巣や肝臓および乳腺や小腸上皮での発現、乳がんや大腸がんに伴う発現の上昇とEGF受容体シグナリング増強への関与が報告されているのみです。一方、私たちはStarD10が心臓では心房特異的に発現するなどユニークな臓器分布を示すことを見出しました。また、StarD10は心房筋細胞の細胞膜に局在し、Ca^{2+}チャネルに対する結合能を有しています。そこで私たちは、StarD10の解析を手がかりとして、Ca^{2+}チャネルを中心としたCa^{2+}シグナル発信の場の構築機構を蛋白と脂質の相互作用という視点から脂質結合蛋白ならびに脂質シグナル分子に注目して解き明かそうと考えました。このような経緯を踏まえて、本特定領域研究においては、L型Ca^{2+}チャネルおよび脂質結合蛋白（StarD10）を含むカルシウムシグナロソームの構成分子を同定し、Ca^{2+}シグナル制御のメカニズムを明らかにしたいと考えております。

これまでに私たちは、StarD10が心房をはじめL型Ca^{2+}チャネルと共通の組織に発現しており、L型Ca^{2+}チャネルの活性を調節し、心房筋細胞の興奮性の調節に関与し、さらに不整脈モデルにおいて心房のPCTP-L発現量が低下することを見出してきました。現在、$Ca_V1.2$およびStarD10を取り巻く複合体の解析を進めるとともに、ノックアウトマウスを作製し、そのフェノタイプ解析を進めています。

本特定領域研究班に参加させていただく機会を得まして、それぞれのフィールドのエキスパートの先生方から質量分析、ゲル濾過解析、イメージング解析をについてはじめ、解析方法や実験技法についてご教示を頂きながら研究を進めることができればと期待しております。

今後ともどうぞ宜しくお願い申し上げます。



心筋細胞膜のL型Ca^{2+}チャネルを取り巻くカルシウムシグナロソーム

NCX分子複合体の生体膜ミクロドメイン集積機構の解析

福岡大学医学部薬理学

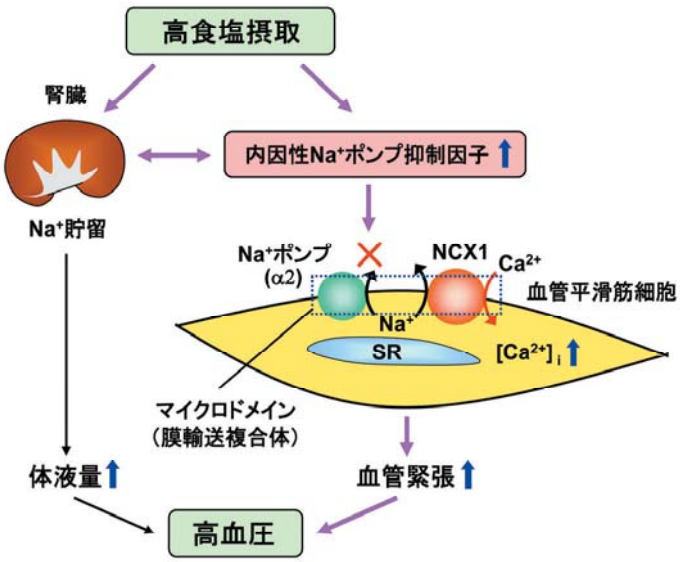
岩本　隆宏

私たちは、遺伝子改変マウスおよび薬理学的ツールを開発・応用することにより、イオン輸送体、特にNa^+/Ca^{2+}交換輸送体（NCX）、の構造・機能および病態との関わりについて研究を行っています。従来、NCXは様々な細胞内Ca^{2+}シグナルを終結させるための細胞内Ca^{2+}排泄システムと考えられてきましたが、最近、NCXは他のイオン輸送体やイオンチャネルと機能連関し、複雑な細胞内Ca^{2+}シグナルを形成する構成分子として重要な役割を果すことが明らかになってきました（後述）。すなわち、NCX輸送体の研究は、本特定領域が目指す方向性に一致して、「単一輸送分子」から「膜輸送複合体」の機能解析へと展開しつつあります。このような研究の流れの中、第2期の公募班にも継続的に参加させて頂けることに大変感謝しています。本特定領域の発展に貢献できるように頑張りたいと思いますので、よろしくお願い致します。

ここ数年、私たちは、血圧調節および血管トーヌス制御における1型Na^+/Ca^{2+}交換体（NCX1）の役割に注目してきました。その結果、血管平滑筋細胞のNCX1がNa^+,K^+-ATPaseα2と機能連関しCa^{2+}流入系として働くことにより、食塩感受性高血圧の発症に重要な役割を果たすことを明らかにしました。また、第1期の公募研究の成果として、血管平滑筋細胞のNCX1が受容体活性化カチオンチャネルTRPC3と膜輸送複合体を構成し、α1受容体刺激時のCa^{2+}流入増幅機構として機能することにより、交感神経刺激時の血管緊張亢進（血圧上昇、血管攣縮）に関与することを示しました。さらに最近、血管平滑筋細胞のスクロース濃度密度勾配分離実験から、NCX1、TRPC3（TRPC6）、α1D受容体の三者がカベオラ分画に共存していることを見いだしました。これらの知見は、NCX1が他の構成分子と共に特定の細胞膜ミクロドメイン（ラフトやカベオラ等）へ集積し、膜輸送複合体として重要な機能を果たす可能性を示唆しています。

今回の研究では、NCX膜輸送複合体の機能発現の場となる細胞膜ミクロドメインを同定し、その集積機構および制御機構を解明したいと考えています。実験としては、蛍光標識したNCX膜輸送複合体の構成分子（NCX1、TRPC3、Na^+,K^+-ATPaseα2など）を用いて、繊維芽細胞、平滑筋細胞および腎尿細管細胞における各構成分子の局在を可視化することにより、細胞膜ミクロドメインへの集積機構（トラフィック機構）を動的に解析したいと考えています。興味深いモデル系として、NCX1を発現させた繊維芽細胞を蛍光標識したNCX1の細胞外領域認識抗体で染色したところ、その局在がクラスター状に可視化されることを見いだしました（図参照）。今後、NCX膜輸送複合体の局在制御およびトラフィック機構に関わる機能ドメインを同定するため、様々な細胞内領域を欠損させたNCX1変異体の局在および動態を調べて行きたいと考えています。また、酵母Two-hybrid法を用い、NCX膜輸送複合体の局在・動態に関わる新たなアダプター・scaffold蛋白質の同定にもチャレンジする予定であります。

最後に、当研究室の紹介をさせて頂きます。平成19年4月から福岡大学医学部の薬理学講座を担当させて頂くことになりました。この時、幸運なことに、全スタッフが一新することになり、現在、私ども（教授）、上原講師、喜多講師、伊豫田助教、佐藤技術職員、研究員2名というメンバーで研究と教育に取り組んでいます（写真:霧島神宮への最初の教室旅行）。しかしながら、メンバーはまだ流動的な要素があり、今年10月に上原講師が病院へ移籍し、来年4月に新しいスタッフ（電気生理屋）が2名加わる予定になっています。1年目の昨年は教育カリキュラムの再編成と研究室の立ち上げで大変でしたが、多くの先生方のご支援や本特定領域を始めとする種々研究費のご援助のお陰で、今年になり教育・研究ともにやっと充実して参りました。これまでに、本特定領域内の多くの先生方と有意義な共同研究をさせて頂く機会に恵まれました。これらの共同研究は私たちの研究活動の大きな推進力になっています。この場をお借りして、お世話になっている先生方にお礼申し上げます。



蛍光標識細胞外抗体を用いて、繊維芽細胞膜表面のNCX1を可視化した三次元ステレオ像

A03班公募研究班員の研究紹介

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

群馬大学大学院医学系研究科　器官機能学分野
下川　哲昭

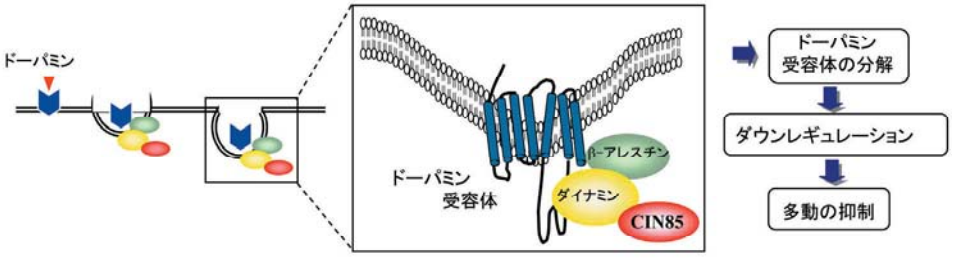
私は在外研究先のルードビック癌研究所（スウェーデン、ウプサラ市）で受容体型チロシンキナーゼ（Receptor tyrosine kinase; RTK）のダウンレギュレーションの研究を始めました。以来、受容体の膜輸送、特にエンドサイトーシスを制御するadaptor/scaffold proteinであるCIN85（Cbl-interacting protein of 85 kD）の機能に興味を持って研究を進めています。このCIN85は2000年に3つの研究室からRING型のubiquitin ligaseとして機能するCblと相互作用を持つタンパク質として同定され、現在その発現機構や新しい機能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

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

さらにこの機構の個体における意義を明らかにする目的で、CIN85ノックアウトマウスを作製しました。このノックアウトマウスは行動学的解析（総移動量、移動速度、折り返し数、新規環境探索度等）のほぼ全ての項目において、野生型に比べて有意な行動量の上昇を示し表現型が「多動」であると認められました。「多動」の原因としてドーパミン及びその受容体の量的、質的変化が挙げられます。我々は電気化学検出器を備えたHPLCでノックアウトマウスの線条体ドーパミン含量を測定したところ、野生型に比べて170%高値を示しました。CIN85はドーパミン受容体の膜輸送に関与するダイナミンと結合します。現在私達は、CIN85は膜輸送複合体の構成分子としてドーパミン受容体エンドサイトーシスを促進することでドーパミンシグナルの過剰による「多動」を抑制していると考えています。ドーパミン神経の約75%は、黒質に存在し線条体に投射されています。この黒質−線条体系のドーパミン神経は運動機能に深く関わっています。一方、中脳の腹側被蓋野から辺縁系および前頭皮質に投射するドーパミン神経は、動機づけ行動に関与しています。本研究ではこれらの知見からCIN85ノックアウトマウスにおける脳内ドーパミンおよびドーパミン受容体の動態の解析を行い、受容体のエンドサイトーシス及び膜輸送におけるCIN85の機能と「多動」との関連を解析していくつもりです。

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

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



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

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

食物質による腸管上皮トランスポートソーム制御の機能的解析

東京大学大学院農学生命科学研究科　応用生命化学専攻

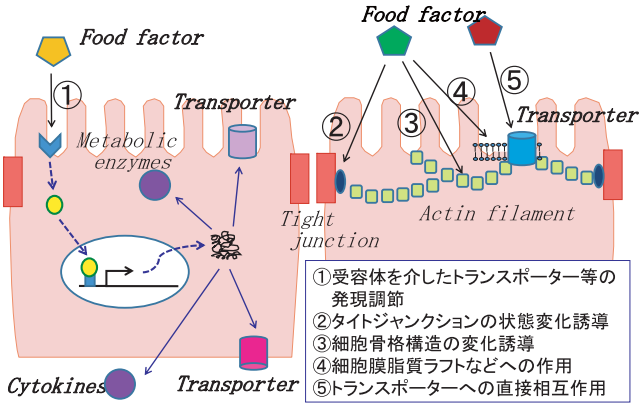
清水　誠

2006～2007年度の2年間は、研究室の助教である薩　秀夫博士が若手公募研究といった形でこのプロジェクトに参加させて頂きまして、大変有難うございました。一線の生化学、生理学、分子生物学の研究者たちの世界に触れて大いに刺激を受けたようですが、年長者にも勉強する権利はあると思うので、本年度からの2年間は清水が代表者を交代して務めさせていただくことにしました。勿論、薩博士には分担研究者として本プロジェクトを継続して担ってもらいます。

さて、私は乳の生化学、特に乳中に分散している脂肪滴（脂肪球）の表面を覆っている膜の分析から研究の世界に入った食品科学者です。実は乳脂肪球は、乳腺細胞の細胞膜に由来する膜様物質で覆われているので、私が最初に触れ、学んだ細胞は乳腺細胞でした。乳腺細胞は様々な乳成分を大量に産生する活発な細胞であり、その細胞膜には多くの輸送機能が備わっています。しかし、当時はそのようなことはあまり意識になく、乳腺由来であるというこの脂肪球膜タンパク質の生化学的分析と乳児栄養学的意義をひたすら考えることに時間を費やしていた気がします。特に、母乳の研究は興味深く、私が母乳の脂肪球膜から世界ではじめて単離したムチン様糖タンパク質PAS-0は、その後これをクローニングした英国のグループによってMUC1と再命名され、上皮性ムチンMUCファミリーの一号となりました。このようにさまざまな食品生化学的研究に携わってきた私ですが、今から18年前に静岡県立大学に赴任し、そこで当時学部長をされていた星　猛先生に出会ったのを契機に、腸管上皮細胞の輸送機能研究に従事するようになったのです。

食品の健康機能（生体調節機能）が学問的にも社会的にも注目されていますが、食品の機能を考える上で腸管上皮と食品成分の相互作用は重要です。星先生が、食品機能研究における腸管の重要性・面白さを説いてくださったのを受け、我々は主にin vitro系を用いて食品成分ー腸管上皮細胞間相互作用の研究を開始しました。その結果、腸管上皮細胞の各種機能、すなわち腸管バリアの主体であるタイトジャンクションの透過性、腸管では恒常的に起こっている炎症反応に関わるサイトカイン類の産生、消化酵素や解毒系酵素の活性、そして各種トランスポーター類の発現や活性が、内因性因子のみならず食品因子（ポリフェノール類、グリセロ脂質、食品タンパク質由来オリゴペプチドなど）によっても変化するという例をこれまでに多数見出すことができました。

腸管管腔表面を覆う腸管上皮は、生体内の各組織とは大きく異なる一つの特性を持っています。それは、上皮細胞が高濃度の食品成分に常に曝されている組織である、食品という異物と常に接触するチャンスを持つ組織であるという特性です。生物が食品栄養素の摂取を通して生命を維持してきた歴史を考えると、腸管での食品成分の認識・吸収・応答はすでに生命システムの一環であるということも言えると私は考えているのですが、食物質による腸管トランスポーターの活性制御も生命活動に欠かせない恒常的な現象であり、腸管上皮では食物質がトランスポートソームの構成要素となっているとも考えることができます。食物質がどのような形でトランスポートソームの構成要素となり得るのか、トランスポーター分子と食物質の間に特異的な直接相互作用があるのか、あるいはそのプラットホーム部分と食物質と間に何らかの相互作用が存在するのかなど、上記の仮説を証明するにはまだ多くの課題が残されています。本研究プロジェクトの中では若干異端の研究であることは自覚していますが、先生方のご発表に学びながら、腸管上皮トランスポートソームの実体解明に向けて、少しでも成果を挙げられればと思っています。どうぞよろしくお願い申し上げます。



腸管上皮トランスポートソームは食物質（Food factor）によって恒常的に調節されている（のでは?）。

小胞体膜トランスポートソームにおける シグナルクロストークと神経機能制御

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経形態学

柿澤　昌

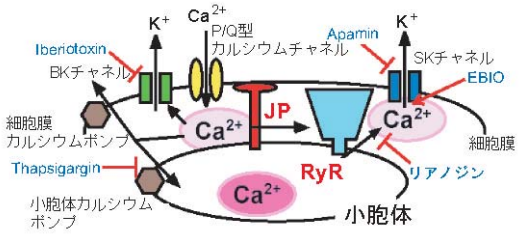
カルシウムシグナルは多くの生命現象に関与する重要なシグナルですが、細胞内カルシウム濃度は細胞外からの流入と細胞内ストアからの放出により上昇します。私が研究対象とする中枢神経細胞では、細胞内ストアからのカルシウム放出、特にリアノジン受容体（RyR）を介する放出の機能的役割については、意外にも、多くのことが未だに不明であります。そこで私はRyRを中心とする小胞体膜トランスポートソームにおけるシグナルクロストークと、それらがニューロン興奮性・シナプス可塑性、さらには個体レベルでの脳機能に及ぼす影響について、小脳の興奮性シナプスをモデル系として研究を進めております。

私と細胞内カルシウムストアとの出会いは前所属である東京大学大学院医学系研究科の飯野正光教授の研究室まで、さらに小脳興奮性シナプスとの出会いは、ポスドク時代にお世話になった狩野方伸先生（現 東京大学大学院医学系研究科）の研究室まで遡ります。私は大学院での研究を終える頃から、「三つ子の魂」が百まで維持される機構、すなわち脳が記憶等の情報を獲得し半永久的に維持する機構に興味を持ち、活動依存的な神経回路網の形成と維持について研究することからアプローチしたいと思っておりました。そして当時、理化学研究所で立ち上がったばかりの狩野先生の研究室でお世話になることになり、0からホールセルパッチクランプ法を教わり、小脳登上線維ープルキンエ細胞シナプスの生後発達機構の解明を目指し研究を進めました。この時に出会った小脳の興奮性シナプスは研究のモデル系として非常に魅力的でして、例えば登上線維シナプスは中枢神経系で単一入力レベルでの機能的・形態的解析が可能な数少ないシナプスで、私はこの特徴を活かし、脳は使っていないと衰えてしまうことを初めて単一シナプスレベルで示すことに成功しました（Kakizawa *et al*. PNAS（2005））。また平行線維シナプスは「可塑性のデパート」と言えるほど様々なタイプのシナプス可塑性が見られます。

狩野研でポスドクをした後、理研の伊藤正男先生の研究室を経て、東大の飯野研に助手として赴任いたしました。飯野研はイメージング法を駆使した筋細胞におけるカルシウムシグナリングの研究で有名ですが、さらに研究の対象を脳にも広げたいと言うことで呼んでいただきました。一方で私はイメージング法を習得し、さらにカルシウムシグナリング、特に細胞内ストアについて色々と勉強させていただきました。また飯野研には、トランスポートソームにおいて様々な分子が凝集するかのごとく、カルシウムやイメージングをキーワードに様々な背景をもった研究者が出入りし、そこから共同研究が生まれることも少なくありません。私も、かつて飯野研に助教授として在籍され当時東北大教授でいらした竹島浩先生（現 京都大学大学院薬学研究科）と共同研究を行う機会を得ました。その共同研究で解析したマウスが、脳型ジャンクトフィリン（junctophilin（JP）；JP-3&4）2重欠損マウス(JP-DKOマウス)でして、このマウスの解析を通じてニューロンにおけるRyRを介するカルシウム放出に強い興味を抱くようになりました。

JPは興奮性細胞における結合膜構造の形成に必要な分子ですが、JP-DKOマウスの小脳プルキンエ細胞では、後過分極(afterhyperpolarization; AHP)の欠損と言う細胞興奮性の異常が見られ、さらにこれが一因でシナプス可塑性の一種、平行線維シナプスの長期抑圧が阻害され、代わりに長期増強が誘導されます。しかもこのAHP形成にはRyRからのカルシウム放出とカルシウム依存性K^+チャネル（SKチャネル）の活性が必要なのですが（図）、JP-DKOプルキンエ細胞においては機能的なRyR・SKチャネルが発現しているにもかかわらず、両イオンチャネルに依存的なAHPが欠損するのです。このことはRyR・SKチャネルと言う両イオンチャネルのみならず、脳型JPもニューロン機能には重要で、両チャネルの機能的共役に必要不可欠であることを示唆します(ニュースレター第4号21-26頁; Kakizawa *et al*. EMBO J (2007))。

現在、小脳プルキンエ細胞と興奮性シナプスをモデル系として、RyR・JPを中心とする小胞体膜トランスポートソームの他のシグナル系による調節機構、および後過分極や平行線維シナプス長期抑圧以外のニューロン・シナプス機能への関与について研究を進めているところです。前所属にて様々な出会いに恵まれ研究が新たに展開したように、本特定領域に参加させていただくことで、さらに新たな出会いと研究の芽が生じることを心より願ってやみません。どうぞ宜しくお願い申し上げます。



小脳プルキンエ細胞における小胞体トランスポートソームとイオンチャネルの機能共役　EBIO: SKチャネルカルシウム感受性増強薬

CFTR-SLC26輸送体複合体のイオン輸送における低分子量G蛋白質の役割

名古屋大学医学部消化器内科

洪　繁

私たちの研究グループでは、膵導管細胞機能のうち、クロライド(Cl^-)および重炭酸イオン(HCO_3^-)分泌の分子機構についての研究を行っています。

哺乳類の膵外分泌腺は、消化酵素を分泌する腺房細胞と水と重炭酸イオンを分泌する膵導管細胞からなっています。腺房細胞から分泌された大量の消化酵素を含む初期膵液は、導管細胞上皮によって作られる導管を通る間に、大量の水とHCO_3^-が分泌(pH 8.5, HCO_3^- :140mEq/L)され、十二指腸内に分泌されます。膵導管細胞から作られる多量のアルカリは十二指腸で胃からの酸を中和するとともに、膵管内での消化酵素の活性化を抑制する働きがあります。以前から、遺伝性疾患であるのう胞線維症(Cystic Fibrosis)や膵の慢性炎症性疾患である慢性膵炎などの患者では、この膵導管細胞からのHCO_3^-輸送機能が障害されていること(つまり膵液中のHCO_3^-濃度は80mEq/L以下と大変低い)が知られていましたが、その詳細な分子機構は解明されていませんでした。

これまで私たちの研究グループでは、膵導管細胞管腔膜に発現するCFTR Cl^- チャネルとCl^-/HCO_3^-交換輸送体であるSLC26蛋白に着目し、その機能連関について調べたところ、以下の分子機構を明らかにしました。

① 実験動物の膵に発現しているSLC26A3やSLC26A6は、これまでのほかの交換輸送体とは違い、Cl^- およびHCO_3^-の交換輸送比率は1:2または2:1であり、起電性の交換輸送体として働いていること

② さらにこのSLC26のCl^-/HCO_3^- 交換輸送活性は、SLC26輸送体と伴にのう胞線維症の原因遺伝子であるCFTR Cl^- チャネルを共発現させ、CFTRをagonistで活性化すると、刺激前に比べて数倍に上昇し活性化を受けていること

③ SLC26陰イオン交換輸送体ファミリー蛋白のC末側には約200-250アミノ酸残基からなるSTAS(Sulfate Transporter Anti-Sigma factor antagonist)と呼ばれる細胞内ドメインの存在が予測されていましたが、その働きについてはほとんどわかっていませんでした。そこで、我々は、SLC26のSTASドメインの役割を検討したところ、STASドメインは自分自身の膜輸送活性に重要であるのみならず、SLC26の活性調節をする側の蛋白であるCFTRのCl^- チャネル活性を、逆に活性化することを発見しました。つまり、STASドメインは自分自身の活性調節部位としての役割とともに、ほかの膜蛋白と結合しすることにより膜輸送複合体(トランスポートソーム)を形成していること

最近私たちは、慢性膵炎患者の膵導管細胞でのCFTRチャネルの細胞内局在を抗CFTR抗体を用いた免疫組織化学染色法で検討したところ、本来なら管腔膜のみに発現しているはずのCFTRチャネルが広く導管細胞の細胞質内に誤局在していることを発見しました。CFTRの遺伝子変異によって起こるCystic Fibrosisでは、遺伝子変異の結果CFTRの細胞膜へのsortingが障害され(例えばΔF508 CFTR)、機能異常が発現します。しかし、後天的な疾患である慢性膵炎では、本来管腔膜に発現するべきチャネルや輸送体分子が正しく細胞膜へsortingされず細胞内に留まることで、膵導管細胞機能障害を起こしている可能性が考えられます。

SLC26輸送体ファミリーは、膵導管細胞だけでなく全身の上皮膜に様々なアイソフォームが広く分布しています。さらに上皮細胞以外にも発現していることが分かっていますが、その機能のみならず蛋白の細胞内trafficking機構などもほとんど分かっていません。私たちのグループでは、特定領域研究膜輸送複合体の研究テーマとしてこのSLC26輸送体の細胞内STASドメインに結合する新規分子を同定し、さらにその機能解析をすることを目的としています。特に、SLC26輸送体のSTASドメインに結合し、膜蛋白の細胞内traffickingに関わる分子を同定することができれば、慢性膵炎患者の膵導管細胞で認められる膜蛋白の細胞内誤局在の分子機構が明らかになり、上皮細胞のイオン輸送機能障害を病態とする疾患全般の病態解明と治療法の開発に役立つと期待しております。

どうぞよろしくお願い申し上げます。

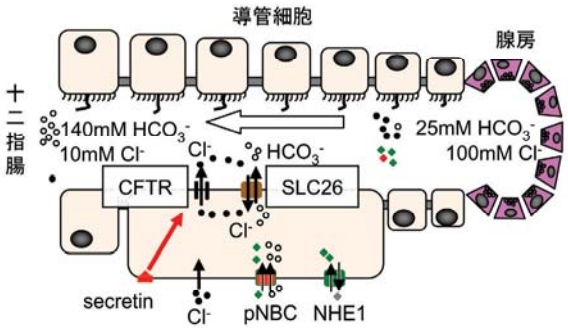


図1　膵導管細胞におけるイオン輸送機構

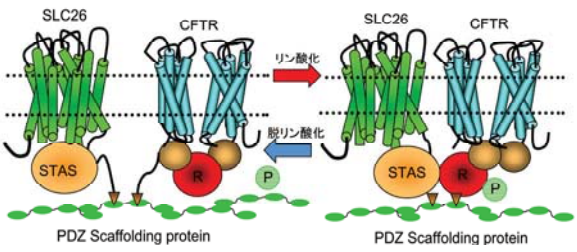


図2　リン酸化依存的なCFTR-SLC26複合体の活性調節機構

神経系セプチンスカフォールドの生理的・病理学的意義

京都大学大学院医学研究科

木下　専

はじめに

生命体の恒常性とそれに依存する高次機能は、物質の秩序立ったフローとストックに依存しています。物質輸送システムの分子実体は、極性をもって配置されたトランスポーターやチャネルです。すなわち、多種多様な輸送体分子群を適切な細胞膜領域に送達し、関連蛋白質群とともに組織化することが極性物質輸送の前提条件といえます。細胞骨格のネットワークは細胞のインフラストラクチャーとして、1）輸送体を振り分ける小胞選別輸送、2）物理的障壁による脂質二重膜の区画化、3）輸送体を係留・組織化するスカフォールドの構築、によって物質輸送システムの構築と支持に寄与します。あらゆる細胞に存在するセプチン重合体は、微小管系、アクチン系、脂質二重膜、一部のトランスポーター複合体に会合して多彩な役割を果たす変幻自在な細胞骨格であることがわかってきました。当公募班は物質輸送システムの一翼を担うセプチン細胞骨格に着目し、未知の生理機能と病態における意義の解明を目指して多面的な解析を行っています。以下、本領域に関連する最近の研究内容をご紹介致します。

研究内容

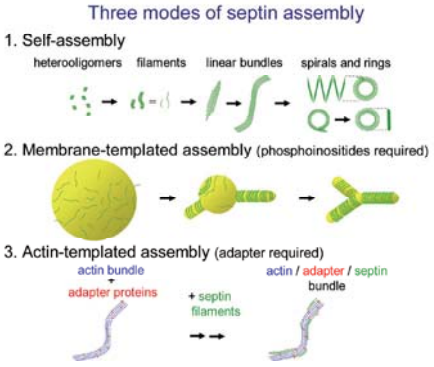
①13種類のセプチン遺伝子のうち脳・肝・肺・腎・精巣の一部の細胞特異的に発現するSept4を破壊し、網羅的行動解析によってドパミン神経伝達の減弱を認めました。これを糸口に、セプチンが前シナプス膜のドパミン輸送体（DAT）や小胞分泌装置（tSNARE）を含む膜輸送複合体を安定化するスカフォールドの構成成分であることがわかりました。ドパミン神経を選択的に障害する病態の代表格がパーキンソン病ですが、Sept4の欠乏はDATトランスポートソームを不安定化するだけでなく、その構成成分α-シヌクレインのリン酸化と凝集による毒性化を促進して病態を加速させ得ることも示しました（猪原ら、Neuron 2007）。

②マウス脳における免疫電子顕微鏡連続切片像をin silico で3次元再構築し、シナプス近傍やグリア突起の細胞膜ドメインに集積する多様なセプチン・クラスターを同定しました。これらの一部はグルタミン酸輸送体GLASTやその他重要な膜蛋白質に近接していますが、その意義は不明でした。そこでまず、FRAP（光退色後蛍光回復）法で膜直下セプチンのターンオーバー（会合、解離、拡散の総和としての分子交換率）を測定したところ、膜蛋白質分子や膜骨格の主成分であるアクチン線維に比べて緩慢でした。すなわちセプチン・クラスターは膜輸送複合体のスカフォールドや膜骨格の一部として十分な安定性を備えているといえます。次に、RNAiでセプチンを枯渇させるとグルタミン酸輸送体や小胞分泌装置syntaxin-1など重要な膜蛋白質のターンオーバーが有意に促進（不安定化）しました。このことは、細胞膜直下の特定の分子を一時的に係留ないし組織化するのにセプチンが要求されることを示唆しています（萩原ら、J Neurosci投稿中）。引き続き、個体レベルでの意義をSept7コンディショナルノックアウトマウスで解析する一方、詳細な分子機構を探索する目的で、セプチンと関連分子の1分子イメージングを楠見班のご協力の下に行っています。

③肝炎や肝障害は肝線維化を経て肝硬変として深刻な問題をもたらします。肝線維化の中心となる細胞現象は「星細胞（ビタミンA貯蔵）→筋線維芽細胞（平滑筋アクチン産生、コラーゲン分泌）」という分化転換です。肝組織では分化転換前の星細胞のみがSept4を発現することを見いだし、Sept4欠損マウスを利用して肝線維化病態におけるセプチン系の関与を探索しました。Sept4欠損肝は一見正常ですが、四塩化炭素、胆道閉塞、脂肪性肝炎の全てのモデルで線維化が悪化します。単離培養したSept4欠損星細胞の分化転換能が亢進していることから、セプチン系が何らかの形で分化転換に歯止めをかけているといえます。未知のメカニズムを探索するため、Sept4欠損星細胞における遺伝子発現プロファイルをDNAマイクロアレイと実時間PCR法で精査したところ、「Wntシグナル抑制因子の減少」と「浸透圧ストレス応答性転写因子の増加」を認め、いずれも単独で培養星細胞の分化転換を亢進させました（祝迫ら、J Hepatol 印刷中および投稿中）。残された問題は、セプチン系の異常から転写異常に至るメカニズムです。事例①のように何らかの輸送体やチャネルが欠乏し、これが炎症・ストレスシグナルを増幅させることなども想定して探索を進めています。

おわりに

セプチンはあらゆる組織・細胞にユビキタスに存在しますので、上記以外にもセプチン系に依存するトランスポートソームは無数にあり、疾患脆弱性などに関与するものと推測されます。当グループの試料、マウス、解析手法などに興味をもたれた方は、お気軽にお問い合わせ下さい。



（fig legend）セプチンは自己集合性を有するGTP結合蛋白質ですが、細胞膜、アクチン線維束、微小管を鋳型として集合し、鋳型の形状や特性を変化させるユニークな機能を併せ持つことがわかってきました（Dev Cell 2002, Curr Opin Cell Biol 2006, J Cell Biol 2008, Curr Biol in press）。

ヒト薬物トランスポートソームの発現プロファイル構築に基づく薬物動態学的意義の解明

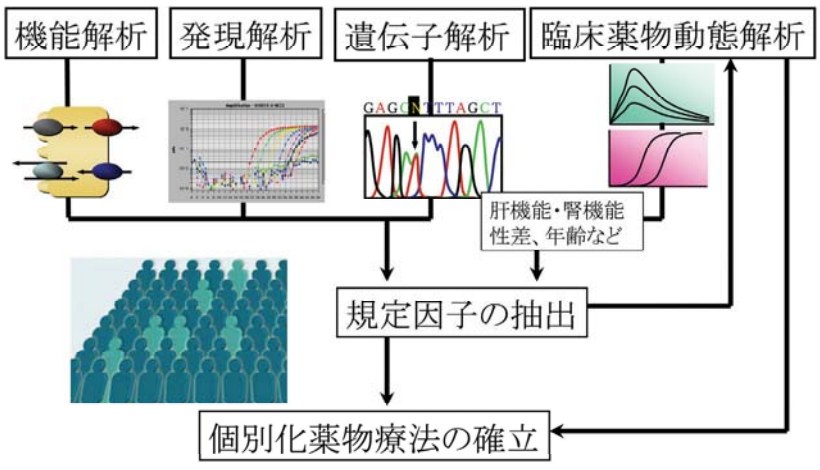
京都大学医学部附属病院薬剤部

乾　賢一

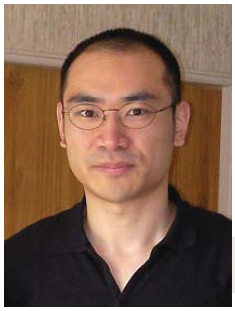
我々の研究室では、「医薬品の体内動態と薬効・毒性に関する基礎と臨床」をメインテーマとし、腎臓、小腸、肝臓などを中心として薬物トランスポータの分子レベルでの解析から、テーラーメイド薬物療法の確立に至るまで、系統的な薬物動態研究を展開しています。対象としている薬物トランスポータは、有機イオントランスポータ（OCT/OAT/OATP）、H^+/有機カチオンアンチポータ（MATE）、ペプチドトランスポータ（PEPT）、P-糖タンパク質をはじめとするABCトランスポータなどが挙げられ、薬物動態に関連するトランスポータは多岐にわたっています。近年では、これら薬物トランスポータの機能解析や発現調節機構解明などの基礎研究を基盤として、ヒト臨床検体における薬物トランスポータの発現プロファイルや遺伝子多型と薬物動態との相関について検討を行い、個別化薬物療法の確立を目指した研究を進めています（図）。具体的には京大病院診療各科（泌尿器科、腎臓内科、消化管外科、肝胆膵・移植外科など）の協力の下、手術時の摘出剰余組織や生検時の剰余組織の提供を受け、種々薬物トランスポータ群の発現量を定量的に解析したところ、その発現量には大きな個体間変動が認められることが明らかとなりました。また、薬物トランスポータ発現量と薬物動態の相関について、生体肝移植施行患者の術後初期における小腸MDR1の発現量と免疫抑制剤タクロリムスの吸収特性が逆相関することや、メサンジウム増殖性腎炎などの原発性腎疾患患者の腎臓における有機アニオントランスポータOAT3の発現量と抗生物質セファゾリンの血中消失速度が相関を示すことが判明し、これらトランスポータの薬物動態学的意義を明確にすることができました。しかしながら詳細に解析を進めた結果、相関から乖離する患者も認められることや、糖尿病生腎症などの続発性腎疾患患者ではOAT3の発現量とセファゾリンの血中消失速度に相関が認められないなど、トランスポータの発現量だけでは薬物動態を説明できない例も示されました。従って、薬物動態や薬物トランスポータ発現量の個体間変動機構を明らかにするためには、薬物トランスポータ分子単独の解析では限界があるものと考えられました。

近年、本特定領域における膜輸送複合体トランスポートソームという概念の重要性が薬物トランスポータ群に関しても認識されつつあり、検討が進められています。そこで本研究では、我々がこれまで行ってきた薬物トランスポータの発現変動と薬物体内動態との相関解析の対象を、薬物トランスポートソームの構成因子に拡大し、ヒト組織（小腸、腎臓、肝臓など）におけるトランスポートソーム構成因子の発現変動や遺伝子多型に関しても解析することで、薬物トランスポートソームの分子機構や薬物体内動態の個体間変動要因を解明することを目的としています。トランスポートソーム構成因子に関しては、種々トランスポータとの相互作用が報告されているPDZタンパク質をはじめとする機能制御分子群、足場タンパク質群などを解析対象とするとともに、未だ結合蛋白質等が報告されていない薬物トランスポータに関しては、そのトランスポートソームの実体についても検討を進める予定です。また、トランスポートソーム構成因子の発現や機能に影響を及ぼすと考えられる遺伝子多型の解析や、必要に応じて発現系を用いたin vitroでの解析を進めていこうと考えております。

これまでトランスポートソームの構成因子である輸送分子群、機能制御分子群、足場タンパク質群の解析は、培養細胞などのin vitro発現系を用いたものが中心であり、また組織、個体レベルの解析に関してはノックマウス等の実験動物を用いた検討が中心となっていました。本研究の推進によって、ヒト個体レベルにおける薬物トランスポートソーム構成因子の役割を明確にするとともに、薬物体内動態の変動要因に関する詳細な分子メカニズムが解明され、個別化薬物療法を可能にするための重要な分子基盤が構築できるものと考えています。最後になりましたが、研究班の先生方から種々のご教示をいただければ幸いです。どうぞよろしくお願いいたします。



薬物トランスポータ研究の個別化薬物療法への応用



細胞膜安定性維持システムの破綻による トランスポートソーム異常と病態

大阪大学大学院　医学系研究科　遺伝医学講座　臨床遺伝学

金川　基

私たちのグループ（教授:戸田達史）は、ゲノム解析を応用した筋ジストロフィーの原因遺伝子同定と機能解析、治療法開発に関する研究を行ってきました。遺伝性疾患である筋ジストロフィーは、原因遺伝子、遺伝形式、発症様式などにより多くの型に分類されていますが、いくつかの型に共通する発症要因として、筋細胞膜の物理的強度・安定性が弱まることが挙げられます。よって、“細胞膜の安定性”は、筋機能の維持に不可欠であり、その獲得や維持に関する分子実体・作動機序を理解することは、生物学的にも生命医学的にも重要な課題と言えます。私たちはまた、それらの破綻がトランスポートソームに異常を引き起こし、病態と密接に関連していると考えています。

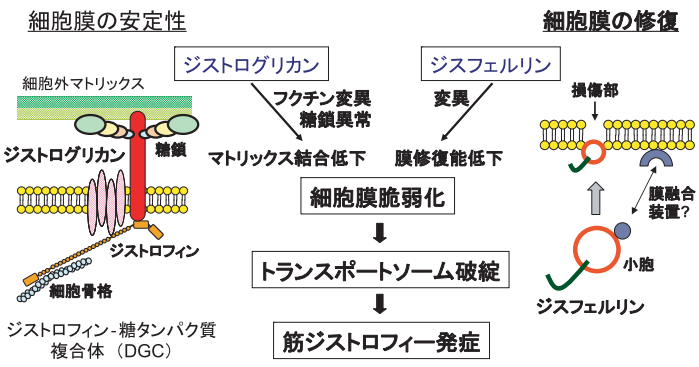
筋ジストロフィーの原因遺伝子は、現在まで、30種以上が同定されていますが、その中でも、細胞外マトリックスと細胞骨格を結ぶジストロフィン-糖タンパク質複合体（dystrophin-glycoprotein complex: DGC）の成分をコードするものが多く含まれています。DGC成分に変異が生じますと、筋細胞は壊死・再生を繰り返し、最終的には筋ジストロフィーが発症しますので、DGCによって結ばれる細胞外マトリックスと細胞骨格の連携が、筋収縮、すなわち筋細胞への機械負荷、に対する物理的強度を細胞膜に与えている、と考えられます。

私は米国留学中（アイオワ大:Kevin Campbell研究室）に、DGC成分の一つ、ジストログリカンの研究に従事していました。膜貫通型タンパクのジストログリカンは、細胞外でマトリックス分子と、細胞内でジストロフィンと結合していますので、DGCの中核的な分子と言えます（図）。以前から、マトリックス分子との結合には、ジストログリカンの糖鎖修飾が必要であることが知られていましたが、私の留学と時を同じくして、ジストログリカンの糖鎖異常が、福山型筋ジストロフィー（FCMD）で認められる、という発見が報告されました。FCMDは、日本ではDuchenne型に次いで多く見られる小児期筋ジストロフィーで、福山幸夫先生によって、高次脳機能障害を伴う新しい型の筋ジストロフィーとして発見され、戸田らによって、原因遺伝子fukutinが同定されています。私は、Campbell研究室で、ジストログリカンも含めDGCの発現自体は正常であるものの、糖鎖異常によってジストログリカンのマトリックス結合能が失われることが、細胞膜脆弱化の要因である、という発症機序の解明に貢献できました。日米の研究者による一連の成果によって、ジストログリカン糖鎖が、まさに、細胞膜の安定性を担う実体である、という新たな概念が提唱されるに至りました。

一方で、骨格筋には、細胞膜の損傷箇所を繕う内在性のシステムも存在します。その鍵となる分子がジスフェルリンです（図）。ジスフェルリンは、細胞膜が損傷すると、Ca依存的に膜小胞を破綻箇所に融合させる役割を担っていると考えられていますが、その詳細な分子機構は明らかにされていません。ジスフェルリン変異マウスは、発症時期は遅いものの、筋ジストロフィーを発症するため、ジスフェルリン依存の膜修復システムもまた、細胞膜安定性の維持、ひいてはトランスポートソームの恒常性に重要であると考えています。

筋ジストロフィーの発症機序は、完全には理解されていませんが、細胞膜の損傷箇所からのCa流入やイオン環境変化によるタンパク質分解酵素などの活性化が関与する説が有力です。従いまして、筋ジストロフィー発症の一要因として、トランスポートソームの破綻が関与している可能性は高いと考えています。トランスポートソームが正常に機能するには、その作動場である細胞膜も恒常性・安定性を維持する必要があります。私たちは、“細胞膜の安定性”という概念に着目し、安定性の維持・獲得の原理、また、破綻から発症に至る病態機序を理解することで、筋ジストロフィー治療法を構築することを目指しています。本特定領域では、筋ジストロフィーのモデルとして、ジストログリカン糖鎖異常を示すfukutin変異マウスやジスフェルリン変異マウスを用い、細胞膜の脆弱化や修復機構の破綻に影響を受けるトランスポートソーム成分の同定や、病態との関連性を検討する予定です。また、細胞膜修復の分子機構を明らかにするため、ジスフェルリンと相互作用するタンパク質の探索やジスフェルリン含有小胞の構成分子の解析も計画しています。

本領域の諸先生方から、ご教示、ご助言を頂けることで、新たな視点から“膜安定性の原理”や“筋ジストロフィー病態の解明”に迫ることができるのでは、と期待しておりますとともに、少しでも領域研究の発展に貢献したく思っております。何卒、ご指導ご鞭撻賜りますよう、よろしくお願い致します。



SLC7ファミリーが関わる神経変性疾患 ポリグルタミン病の病態解明と治療法開発

国立精神・神経センター神経研究所　疾病研究第4部

永井　義隆

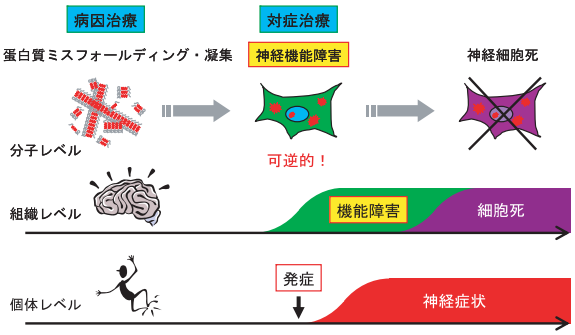
私たちのグループは神経変性疾患のうち、特にポリグルタミン病に着目して、その病態解明・治療法開発を目指した研究を行っています。近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病などの多くの神経変性疾患の病態解明研究が進み、それぞれ異なる蛋白質がいずれもミスフォールディングを起こして凝集体を形成し、脳内の神経細胞内外に蓄積することが明らかになりました。このことから、これらの多彩な神経変性疾患において、蛋白質のミスフォールディング・凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが存在すると考えられるようになりました。このうちポリグルタミン病は、ハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症など9つの遺伝性神経変性疾患の総称で、これらの疾患ではそれぞれ異なる原因蛋白質内のポリグルタミン鎖の異常伸長（>40）により蛋白質がミスフォールディングを生じ、その結果難溶性の凝集体を形成して神経細胞内に蓄積し、細胞レベル・個体レベルで様々な機能異常を来たし、最終的に神経変性を引き起こすと考えられています。

私たちはこれまで、発症の根本原因となる異常伸長ポリグルタミン蛋白質のミスフォールディングを標的として、病因治療の開発を目指して研究を行ってきました。これまでに異常伸長ポリグルタミン鎖に選択的に結合するペプチドQBP1（SNWKWWPGIFD）を同定し（***JBC*** 2000）、QBP1が異常伸長ポリグルタミン蛋白質のミスフォールディング・凝集体形成を阻害し（***JBC*** 2000、***Nature SMB*** 2007、***JBC*** 2007、***HMG*** 2008）、さらにポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを明らかにしました（***HMG*** 2003、***Mol Ther*** 2007）。一方、生体に備わっている分子シャペロンにも着目して、熱ショック転写因子の活性化剤が内在性分子シャペロンの発現を誘導し、ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを示しました（***JBC*** in press）。

しかし、病因治療は疾患の発症を抑制しますが、神経症状そのものに対する治療効果は弱く、神経症状を直接緩和する対症治療の開発も望まれています。元来、神経変性疾患は神経細胞の脱落・変性により発症すると考えられていましたが、近年ポリグルタミン病モデル動物脳の詳細な解析から、著明な神経細胞死が生じる前から神経症状を発症することが明らかにされ、神経症状は神経細胞死よりもむしろ神経機能障害に起因することが明らかになりました。さらに神経機能障害は可逆性であることが示され、対症治療の標的として重要であると考えられるようになりました。しかしながら、ポリグルタミン病において神経症状発症に至る可逆性神経機能障害の分子メカニズムについては、これまで全く解明されていませんでした。

そこで私たちは、ポリグルタミン病の個体レベルでの可逆性神経機能障害に関わる遺伝子を同定し、その分子メカニズムを解明することを目的として、ポリグルタミン病モデルショウジョウバエを用いて遺伝学的スクリーニングを行ってきました。これまでの研究で、神経系に異常伸長ポリグルタミン蛋白質を薬剤濃度依存的に発現するポリグルタミン病モデルショウジョウバエ（GS-ExPolyQ Fly）を樹立しました。そしてこのGS-ExPolyQ Flyは、異常伸長ポリグルタミン蛋白質の発現誘導により神経機能障害による運動障害・寿命短縮を来たして20日以内にほぼすべてが死亡し（野生型の寿命は約50〜60日）、薬剤を除去して異常伸長ポリグルタミン蛋白質の発現を遮断すると、この運動障害は徐々に回復することを明らかにしました。このGS-ExPolyQ Flyと染色体上に様々な部分欠失を持つショウジョウバエ変異体ライブラリー Def Fly（約220系統、欠失領域は全ゲノムの約95%をカバー）との遺伝学的交配を行い、次世代（GS-ExPolyQ/Def Fly）での寿命短縮が改善する変異体9系統を同定し、このうちの1系統の欠失領域から神経機能障害の責任遺伝子として、SLC7ファミリーアミノ酸トランスポーターと予測されるSup1遺伝子を同定しました。

本特定領域研究では、1）培養細胞での発現系を用いて、Sup1のアミノ酸トランスポーター活性、基質アミノ酸を決定してその機能を明らかにし、2）ポリグルタミン病モデルにおけるSup1発現、基質アミノ酸の変動を明らかにし、Sup1が関わるポリグルタミン病の可逆性神経機能障害の分子メカニズムを解明します。そして3）ノックアウトマウスを用いてポリグルタミン病モデルマウスの神経症状発症におけるSup1の関与を解明し、4）Sup1活性阻害剤のスクリーニングを行って、Sup1を標的とした神経症状を緩和する新たな対症治療薬の開発を目指します。当領域においてトランスポーターの専門家からのご助言・ご協力を得て、ポリグルタミン病をはじめとする神経変性疾患の病態解明・治療法開発に貢献して行きたいと考えています。どうぞよろしくお願いいたします。



ポリグルタミン病は可逆性神経機能障害により発症する

K_{ATP}チャネル複合体によるCa^{2+}動員制御

千葉大学大学院　医学研究院　自律機能生理学

三木　隆司

私は今から約13年前にATP感受性K^+チャネル（K_{ATP}チャネル）の研究を開始しました。当初は、「K_{ATP}チャネルのノックアウトマウスを作製すればK_{ATP}チャネルの生体での役割がわかるだろう」という単純な目的でマウスの解析をはじめたわけですが、最初に着手したK_{ATP}チャネルの膵β細胞の役割の解析だけをとっても、次から次へと新たな疑問点が湧き出てきたばかりでなく、膵β細胞以外のK_{ATP}チャネルについても多彩な機能があることが次第に明らかにされ、現在にいたるまでこれらの解析を続けることとなっております。

膵β細胞のK_{ATP}チャネルはABCトランスポーターであるスルホニル尿素受容体1（SUR1）と、内向き整流性K^+チャネルメンバーであるKir6.2から構成されています。私どもはKir6.2のノックアウトマウスの解析から、膵β細胞ではK_{ATP}チャネルが細胞膜電位を規定する重要なチャネルであり、グルコースによる細胞の興奮を担っていることを明らかにしました。すなわち、K_{ATP}チャネルが閉鎖することにより、細胞膜が脱分極し、電位依存性Ca^{2+}チャネルが開口し、細胞外からCa^{2+}が動員され、Ca^{2+}依存性のインスリン分泌が惹起されます。

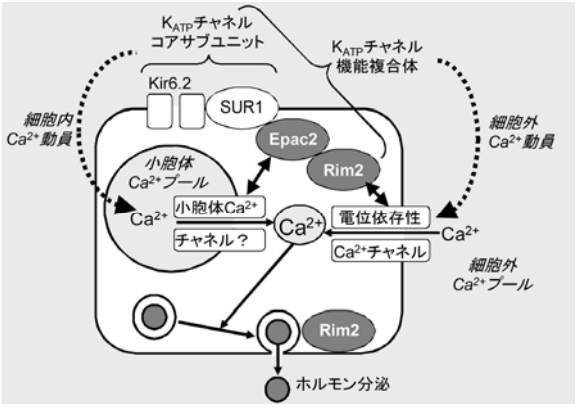
しかしながら、このK_{ATP}チャネルの閉鎖を介したグルコース感知機構は種々の条件下で修飾され、強力な分泌刺激であるグルコースに対する感受性が変化したり、インスリン分泌量が増強したりすることが知られています。そのなかでも、cAMPはインスリン分泌を惹起するグルコース濃度の閾値を低下させることや、グルコース濃度依存性にインスリン分泌を増強させることが知られております。このような複雑なK_{ATP}チャネルの機能制御の仕組みを明らかにする目的で、私どもは今から10年ほど前にK_{ATP}チャネルと相互作用する分子を探索し、Rap1のGEFであるEpac2を同定しました。さらにEpac2と相互作用する分子として開口放出関連分子であるRim2を同定し、K_{ATP}チャネル分子が、細胞膜直下に複数の分子とのチャネル複合体を構成することを明らかにしました(Ozaki et al, Nat Cell Biol, 2000)。

次のステップとして、Epac2およびRim2の欠損マウスを作製し、それぞれの分子の膵β細胞における役割を明らかにし、Epac2およびRim2とK_{ATP}チャネル分子の機能の相互作用を明らかにすることを目指しています。そして、本特定領域研究ではこれらのK_{ATP}チャネル分子集合体の構成分子の相互作用メカニズムや相互作用の生理的な意義を解明することを目指しております。

本特定領域研究でのこれまでの研究から、Epac2ノックアウトマウスの膵β細胞ではcAMPによるインスリン分泌増強が初期相のみで消失しており、Epac2がcAMP依存性にK_{ATP}チャネルのATP感受性を亢進している可能性やK_{ATP}チャネル閉鎖以降のステップに作用して分泌を増強している可能性が示唆されており、そのメカニズムを今後の研究で明らかにしていきたいと考えています。

一方、開口放出関連分子であるRim2に関しても、同様にRim2ノックアウトマウスを作製しました。興味深いことにRim2を欠損する膵β細胞株を解析したところ、グルコース誘導性インスリン分泌は明らかに障害されていました。Rim2はCa^{2+}センサードメインを有することを合わせ考えるとK_{ATP}チャネル閉鎖に惹起されるCa^{2+}の増加をRim2が感知しインスリン分泌に寄与している可能性が考えられた。そこで本研究では、それぞれの分子がどのようなメカニズムにより細胞膜・小胞体膜のCa^{2+}チャネルに作用するのかを明らかにし、K_{ATP}チャネル−Ca^{2+}チャネル間の機能連関を解明することを目的とするに研究を進めたいと考えております（下図参照）。

私は昨年の12月に、長年K_{ATP}チャネルの研究を続けてきた神戸大学細胞分子医学の清野教授の研究室から千葉大学の現研究室へと異動致しました。これまでの研究については継続し発展させながら、新たな研究体制を構築しようと努めているところでございます。本特定領域研究の諸先生方には、これまで以上にいろいろなご指導やご教示をいただき、活発な共同研究を進めることができればと考えております。どうぞよろしくお願い申し上げます。



K_{ATP}チャネル複合体による細胞内外からのCa^{2+}動員制御

NSAIDs輸送タンパク質TETRANの生理的機能と病態における役割

熊本大学大学院医学薬学研究部

水島　徹

アスピリンを代表とする非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）は大変よく使われているが、その細胞膜輸送機構は理解されていない。またNSAIDsの主な副作用である胃潰瘍（NSAIDs潰瘍）、特にその感受性に関する個人差が臨床現場で大きな問題になっている。我々はNSAIDsの多彩な薬理作用（胃潰瘍副作用など）に与る分子機構の解明を精力的に行ってきた。この研究の一環として我々は、NSAIDsの細胞膜輸送に与るタンパク質としてTETRANを同定した。平成18～19年度の本特定領域研究において我々は、TETRAN がNSAIDsを初め多くのアニオン性薬物の細胞内への取り込み、及び排出に関与していること、TETRANが膜の電気的ポテンシャルをエネルギー源として利用していること、TETRANが消化管だけでなく、腎臓、特に近位尿細管のアピカル側膜（brush border membrane）で強く発現していることなどを見出した。以上の結果は、消化管で発現しているTETRANが、NSAIDs潰瘍の感受性に関与していること、及び腎臓で発現しているTETRANがアニオン性薬物の尿への最終的な排泄に関与していることを示唆している。尿への最終的な薬物排泄において、カチオン性薬物に関してはMATE1が重要な役割を果たしていることが最近報告されたが、TETRANとMATE1は、その局在、及びエネルギー源など共通点が多い。そこで我々は、MATE1や TETRANを含むトランスポートソームが近位尿細管のアピカル側膜に存在し、薬物の尿への最終的な排泄を担っている可能性を考えている。そこでこれらから我々はこのトランスポートソームの全体像を解明すると共に、TETRANのノックアウトマウスを作成し、TETRANの生理的・病理的役割を明らかにする。また試験管内再構成系を用いたTETRANの生化学的解析を行う。さらに、TETRANのSNPを網羅的に解析し、患者のNSAIDs感受性を予測する方法の確立につなげたいと考えている。

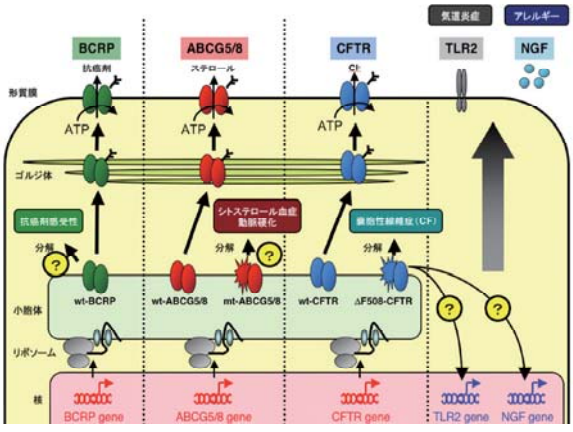
近位尿細管のアピカル側膜に存在する薬物尿排泄トランスポートソームの構成タンパク質を同定するために、近位尿細管のアピカル側膜を調製し、MATE1や TETRANと結合しているタンパク質を免疫沈殿法を用いて単離・同定したり、近位尿細管のアピカル側膜に対するモノクローナル抗体を網羅的に作成したりする予定である。アミノ酸配列の解析や細胞・組織発現解析などから候補タンパク質を絞り込み、最終的には培養細胞を用いて、それらが薬物の尿中排泄に関与しているか（薬物尿排泄トランスポートソームの構成タンパク質であるか）を決定する。一方、TETRANのノックアウトマウスを作成し、NSAIDsを初め各種アニオン性薬物の体内動態、特に尿中排泄を野生型マウスと比較し、TETRANがアニオン性薬物の尿中排泄においてどのような役割を果たしているかを明らかにしたいと考えている。またノックアウトマウスと野生型マウスで、NSAIDs潰瘍、NSAIDsによる抗炎症作用、NSAIDsの抗癌作用、NSAIDsの抗アルツハイマー病作用を比較し、TETRANがNSAIDsの多彩な薬理作用に対してどのように関与しているのかを個体レベルで検証する予定である。また、TETRANを精製しリポソームと混合することにより膜輸送再構成系を確立し、TETRANの薬物輸送活性を生化学的に解析する。さらに低用量のNSAIDsでも潰瘍を発症した患者、高用量のNSAIDsを投与しても潰瘍を発症しなかった患者から細胞を少量採取し、TETRAN遺伝子の解析を行い、NSAIDs感受性に関与するTETRANのSNPを同定したいと考えている。一方、各種ラット腎障害モデルから取り出した腎サンプル、及び各種腎疾患患者の腎サンプルにおいて、TETRANの発現を解析し、TETRANの病態における役割を明らかにしたい。

ABCトランスポーター分子複合体の機能・局在調節とその破綻による病態発症機構

熊本大学大学院医学薬学研究部　遺伝子機能応用学分野
首藤　剛

私たちは、主に「難病」に関する研究を行っています。難病とは、治療薬がなく、患者さんが少ない病気（遺伝病など）のことです。難病に関する研究は、一般にその疾患の病態発症機序の理解および治療薬の開発に貢献しますが、私たちは、さらに、これらの研究を発展させ、その他の一般的な複合疾患（例えば、生活習慣病や慢性疾患など）の治療薬の開発へ応用することを目指しています。その中で、本特定領域に採択していただいたABCトランスポーターに関わる研究テーマは、私たちが長年注目してきた疾患である嚢胞性線維症（CF: cystic fibrosis）に関する研究より得られた知見を基盤としたものです。

CFは、世界的に有名な遺伝性疾患であり、原因遺伝子は、ABCトランスポーターファミリーに属するcAMP依存性Cl⁻イオンチャネルcystic fibrosis transmembrane conductance regulator（CFTR）です。CFTRは、主として外分泌腺上皮細胞、特に気道、肺、腸、膵臓などの管腔側の形質膜上に局在し、細胞内外イオン環境を整える働きを持ちます。さらにCFTRは、Cl⁻イオンチャネルとしての機能だけでなく、他の多くの分子と相互作用するトランスポートソームを形成し、種々の分子の機能制御または発現制御において中心的な役割を担い、細胞の恒常性を維持しています。したがって、上皮細胞におけるCFTRの機能が低下または欠損すると、CFTRやそのトランスポートソームによって調節される細胞内のさまざまな現象に異常を来し、個体は多くの弊害を受けます。実際、CF患者の上皮組織においては、CFTR遺伝子変異に起因した変異CFTRタンパク質が発現しており、このことが、細胞におけるCFTRタンパク質の異常な細胞内局在や機能低下を惹起し、CF病態を引き起こします。このような観点から、CFTRの細胞内局在やその発現調節の分子基盤を理解し、その破綻により発症することで知られる種々の病態との関連性を明らかにすることは、CF治療薬開発の観点のみならず、CFTRが制御する種々の生理機構やさまざまな病態の発症機構の理解のためにも重要であると思われます。



研究の全体構想の概略図

1) BCRPの分解調節に関わる分子の同定→抗癌剤感受性を高めるストラテジーの探索
2) wt-またはmt-ABCG5/8の分解調節に関わる分子の同定
→シトステロール血症・動脈硬化症などの治療ストラテジーの探索
3) ΔF508-CFTR (変異型CFTR) によるTLR2またはNGFの発現誘導機構の解明
→嚢胞性線維症における気道炎症・アレルギー症状などの治療ストラテジーの探索

上述の観点から、私たちは、本分野の甲斐教授の指導のもと、CFTRの細胞内輸送制御機構の解明を主目的とし、正常型CFTRまたはCF患者に最も多い変異体であるΔF508-CFTR（508番目のPheが欠損したもので、小胞体に保持され、正常に形質膜上に輸送されないCFTRタンパク質）に着目し、種々の検討を行ってきました。その結果、I型膜貫通タンパク質である小胞体分子シャペロンcalnexin（CNX）がΔF508-CFTRと特異的に結合することで、ΔF508-CFTRを小胞体に保持し分解系に移行するのを防ぐことを明らかにしました。さらに、CNXのホモログであるcalreticulin（CRT）は、ΔF508-CFTRには影響を与えないが、正常型CFTRの発現を負に制御する因子であることを同定し、CRTを抑制するウコン成分curcuminは、CFTR発現を正に制御することを明らかにしました。

一方、確かにCFTRの細胞内輸送制御機構の理解は重要課題ですが、CF患者において最も問題となるのは、CFTR機能低下によって引き起こされる進行性の呼吸器閉塞および慢性的な細菌感染に伴う持続的炎症による呼吸器機能の低下です。そこで、私たちは、CF患者の慢性炎症病態のメカニズムを解明し、患者のQOLを改善する治療薬開発の糸口を見つけるべく、自然免疫受容体の一つであるtoll-like receptor-2（TLR2）に着目し、種々の検討を行いました。その結果、CF患者由来の上皮細胞におけるTLR2の発現およびリガンド応答性が上昇し、そのメカニズムとしてCF細胞におけるDNAメチル化制御機構の破綻が関与していることを示すことができました。

このように、私たちは、CFTRに着目して、多くの研究展開を実施してきましたが、まだまだ疾患治療薬開発への応用に至っていないのは事実です。そこで、本特定領域では、これまでのCFTR研究をさらに発展させ、さらに、CFTR研究で培ったハウツーを駆使し、シトステロール血症や動脈硬化症に関係が深いABCG5/ABCG8-および抗癌剤排出に関わるBCRPといった各種ABCトランスポーターの膜分子複合体の機能・局在の制御機構を解明し、その破綻により発症することで知られる種々の病態との関連性を明らかにすることで、より応用的な研究を展開したいと考えています（図参照）。若輩で恐縮ですが、本領域の発展に努めていく所存ですので、諸先生方のご指導ご鞭撻をよろしくお願い致します。

グルタミン酸輸送体の機能・局在調節と異種シナプス間拡散性クロストークの生理的連関

自然科学研究機構　生理学研究所　生体情報研究系

佐竹　伸一郎

私たちは、これまで小脳スライスを材料に異種シナプス間クロストークの研究を行ってきました。その過程で、下オリーブ核から小脳への登上線維から放出される興奮性神経伝達物質（グルタミン酸と推定）が、籠細胞（介在ニューロン）-プルキンエ細胞間のGABA作動性シナプス伝達を抑制することを見出し、このGABA伝達抑制が、AMPA型グルタミン酸受容体で仲介されるシナプス前抑制の様式で惹起されることを報告しました（図1）。異種シナプス抑制は、登上線維入力を中継したプルキンエ細胞のアウトプット（小脳出力）を強化する生理的役割（即ち、脱抑制作用）があると推定しています。

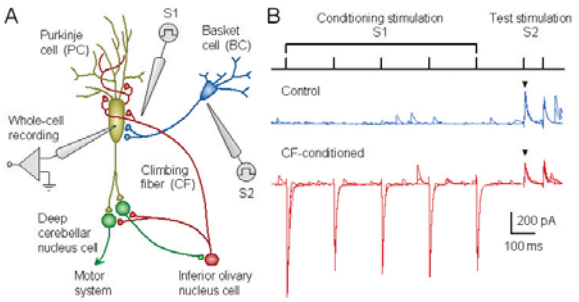


図1　小脳皮質における異種シナプス抑制。（A）脳スライスを作製し、プルキンエ細胞からホールセル記録を行う。ガラス電極（S1）で登上線維に条件刺激を与えた後、別のガラス電極（S2）で籠細胞にテスト刺激を与えた。（B）登上線維の反復刺激（5 Hzで1秒間）に伴い、籠細胞-プルキンエ細胞間のGABA作動性伝達が減弱した（arrowhead）。

登上線維の神経伝達物質が異種シナプス抑制を引き起こす分子基盤の解明に取り組み、①放出部位から拡散した登上線維伝達物質は、籠細胞の軸索終末に局在するAMPA受容体に低濃度で作用して、GABA放出抑制を誘発したとの結論に至りました。また、②異種シナプス抑制はグルタミン酸回収機構により常に阻害されているものの、③高頻度刺激に伴い大量に放出された登上線維伝達物質は、回収機構の能力を超えて前シナプス性AMPA受容体に到達できることを示唆する結果を得ました。これらの結果は、逆にグルタミン酸輸送体の動的変化（例えば、発現量・局在・輸送機能などの変化）が、異種シナプス間拡散性クロストークに強く影響することを予想させます。こうした背景に基づき本研究課題では、①拡散性シグナル供給源としての登上線維-プルキンエ細胞シナプス、②抑制対象としての籠細胞-プルキンエ細胞シナプス、そして③各領域を密に被覆するグリア細胞（Bergmann glia）に局在するグルタミン酸輸送体が、拡散性シグナルの動態をコントロールする分子的基盤を追究します（図2）。近年のグルタミン酸輸送体研究の進展に伴い、グルタミン酸輸送体には、神経細胞をグルタミン酸の興奮毒性から保護する役割のみならず、積極的に神経伝達の修飾に関わるという新しい役割が与えられるようになってきました。拡散というユニークな“神経回路”に、グリア細胞やニューロンに発現するグルタミン酸輸送体を制御因子として組み込むことにより、脳の情報処理機構が今までより深く理解できるようになるのではないかと考えています。

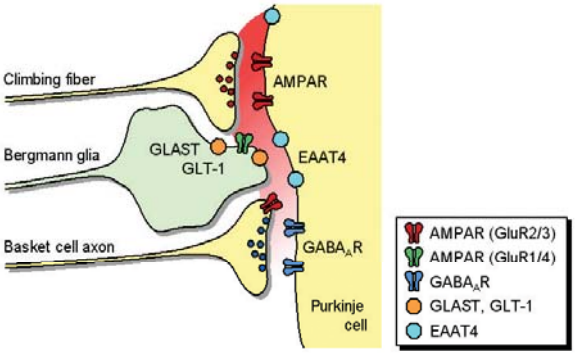


図2　登上線維から放出された興奮性伝達物質は、後シナプス性AMPA受容体を活性化してプルキンエ細胞を興奮させると同時に、シナプス間隙から拡散して籠細胞の前シナプス性AMPA受容体（GluR2/3）を活性化することにより、籠細胞のGABA放出を阻害する。伝達物質の拡散は、グリア細胞やプルキンエ細胞のグルタミン酸輸送体（GLAST/GLT-1/EAAT4）によって常に阻害されているものの、反復刺激に伴い大量に放出された登上線維伝達物質は、回収機構の能力を超えて籠細胞軸索終末のAMPA受容体に到達する。

その第一歩として本研究課題では、ニューロン型ならびにグリア型の各グルタミン酸輸送体が異種シナプス抑制において果たす役割を、それぞれ区別して明らかにすることを目指します。更に、これら輸送体タンパク質が、（発現量・局在・輸送機能などの積極的な調節を介して）拡散過程を制御する鍵分子として働く可能性について検討を進めます。プルキンエ細胞は小脳皮質で唯一の出力ニューロンであることから、グルタミン酸輸送体が登上線維と籠細胞の間の拡散性クロストークを支配する分子的基盤を理解することは、小脳の情報処理機構を分子レベルで解き明かすことにも繋がるのではないかと期待しています。こうした作業計画に基づき、脳・神経システムの情報処理過程において神経伝達物質輸送体が担う普遍的役割や、その生理的意義を総括的に理解することを長期目標に据えて本研究を遂行したいと考えています。今回、幅広い分野から研究者が終結した本特定領域に参加できる機会に恵まれ、新しい概念や実験方法の創出に結びつくような示唆が得られると期待しています。領域研究班の先生方には、何卒ご指導ご鞭撻を賜りますよう宜しくお願いいたします。

ストア作動性カルシウムチャネル複合体の形成機構とその生理的役割

理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 分化制御研究グループ
大阪大学　免疫学フロンティア研究センター　分化制御研究室

馬場　義裕

私たちの研究室では免疫細胞の分化とその分子基盤に関する研究をおこなっておりますが、私はカルシウムシグナルという切り口からそれらの課題にアプローチしています。カルシウム流入、特にストア作動性カルシウム流入がどのようなメカニズムで起こるのか？　また、カルシウム流入による持続的カルシウムシグナルが免疫応答にとってどのような役割があるのか？ ということに着目して研究を進めております。

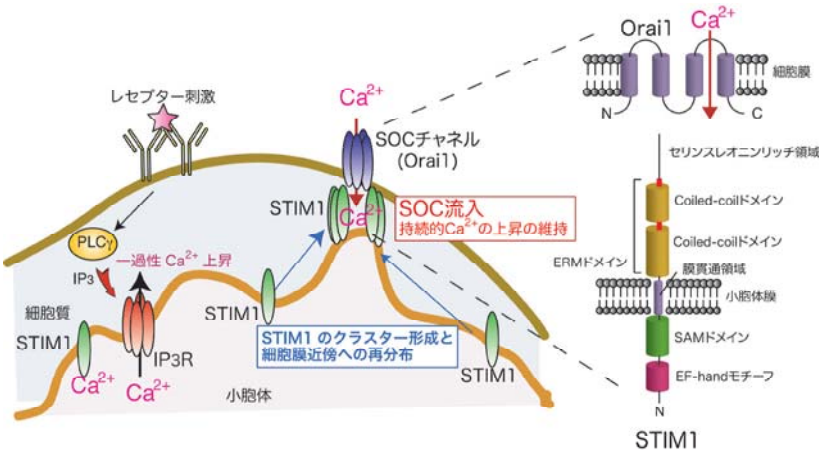
免疫細胞の細胞内カルシウム上昇は主に二つの経路から供給され、一つは細胞内カルシウム貯蔵庫（ストア）である小胞体からのカルシウム放出、もう一つは細胞膜上のチャネルを介した細胞外からのカルシウム流入といわれています。細胞外からのカルシウム流入は小胞体のカルシウム放出（小胞体枯渇）が引き金となって初めて引き起こされるカルシウム流入、つまり、ストア作動性カルシウム(SOC)流入が主要なソースとなり、長時間の持続的カルシウムシグナルを維持する上で重要であると考えられています。SOC流入研究の歴史は古く、現象そのものは20年も前から提唱されていましたが、細胞内カルシウムストアの枯渇が、どのようにして SOC流入を作動させるのかという分子機序は全く明らかではありませんでした。しかし、2005年にSOC活性化に必須の分子として小胞体カルシウムセンサーSTIM1が、翌年その標的となるSOCチャネルとしてOrai1が立て続けに報告され、世界の注目をあびました。それ以来、様々なフィールドの研究者が大きな関心を示し、本分野は大きく進展しつつあります。

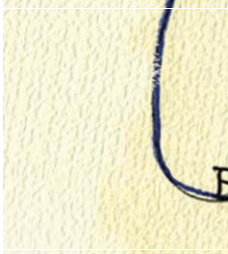
STIM1は主に小胞体に分布するI型膜タンパク質で、小胞体内腔にカルシウム結合部位であるEF-handモチーフを有しており、定常状態ではカルシウムが会合した状態でいます。刺激により小胞体からカルシウムが放出されると、STIM1に結合していたカルシウムがEF-handから離れ、STIM1の凝集がおこり、細胞膜直下、おそらくはOrai1局在部に集積してくると考えられています。私たちも、STIM1欠損B細胞株を作成・解析することにより、B細胞レセプター刺激によるSOC流入がSTIM1に依存しており、STIM1の細胞膜直下でのクラスター形成がSOC流入に重要であることを見出しました。さらに、その際に必須となる機能ドメインも同定しました。また、興味深いことに、STIM1は小胞体上を微小管依存的な動的挙動をとることも観察しています。

個体における生理的意義を明らかにするために、STIM1ノックアウトマウスを作製しました。このノックアウトマウスは分娩前後で致死となり、STIM1依存的SOC流入が個体発生において極めて重要な役割があることがわかりました。さらに、私たちはSOC活性が強いとされるマスト細胞に着目し、STIM1ノックアウトマウスを用いて、SOC流入の生理的役割を検討しました。マスト細胞はアレルギー反応を引き起こす主要エフェクター細胞であり、アレルゲンの刺激によって脱顆粒やサイトカイン産生を引き起こし、アナフィラキシー反応が誘導されます。これらの現象におけるSOC流入の役割は不明でしたが、STIM1がIgE依存的な抗原刺激によるSOC流入に必須であることを確認し、さらに、STIM1がマスト細胞の脱顆粒、サイトカイン産生、そしてアナフィラキシー反応において重要な役割を果すことを見出しました。これらの成果はSTIM1が誘導するカルシウム流入がマスト細胞を介したアレルギー反応に必須であることを示しています。

本研究課題ではSOC流入誘導のためのSTIM／Oraiの分子メカニズムおよびその個体レベルでの生理的役割の解明を目指した研究をさらに発展させていきたいと思っております。具体的には1)STIM/Orai複合体形成メカニズムを遺伝学的、生化学的およびイメージング技術を駆使し解析する。その際、STIM1ホモログであるSTIM2およびOraiファミリー分子にも着目する。特に、STIM2の機能は未だ詳細は不明であるので、SOCチャネル複合体にどう関与するのかを明らかにしたいと思っております。2)STIM1/STIM2のB細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成・解析し、B細胞免疫応答におけるSTIM1およびSTIM2の関与を検討する。B細胞におけるSOC流入の関与も未だ不明であり、本研究により新たな知見が得られることを期待しております。

本研究班では諸先生方から色々と学ばせて頂ければと楽しみにしております。よろしくお願いいたします。





編集後記

大晦日の慌ただしい中（実は研究所内は外の喧騒とは対照的に静寂です）、この編集後記を書いています。2008年秋の発行予定だったのですが、編集が遅れ2009年年頭の発行になりましたことをお詫びいたします。

2008年は世界同時大不況、日本人3名のノーベル賞受賞、福田政権から麻生政権へ、オバマ大統領選勝利、など激動の一年となりましたが、本特定領域研究でも、全33(継続14、新規19)の公募研究班が決まり後半の研究に向けてスタートを切ったところです。そこで、今号では公募研究班とその研究内容の紹介を特集しています。また9月に徳島大学宮本賢一先生のご尽力で淡路島「淡路夢舞台国際会議場」において開催しました平成20年度第1回班会議の特集記事も掲載しています。金井領域代表が常々強調されておられる班員同士の共同研究の展開、ひいては次なる研究領域への発展へとつながることを期待いたします。（古川）

TRANSPORTSOME
第8号（2009年1月発行）
編集人:仁科　博史、畑　裕、古川　哲史
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