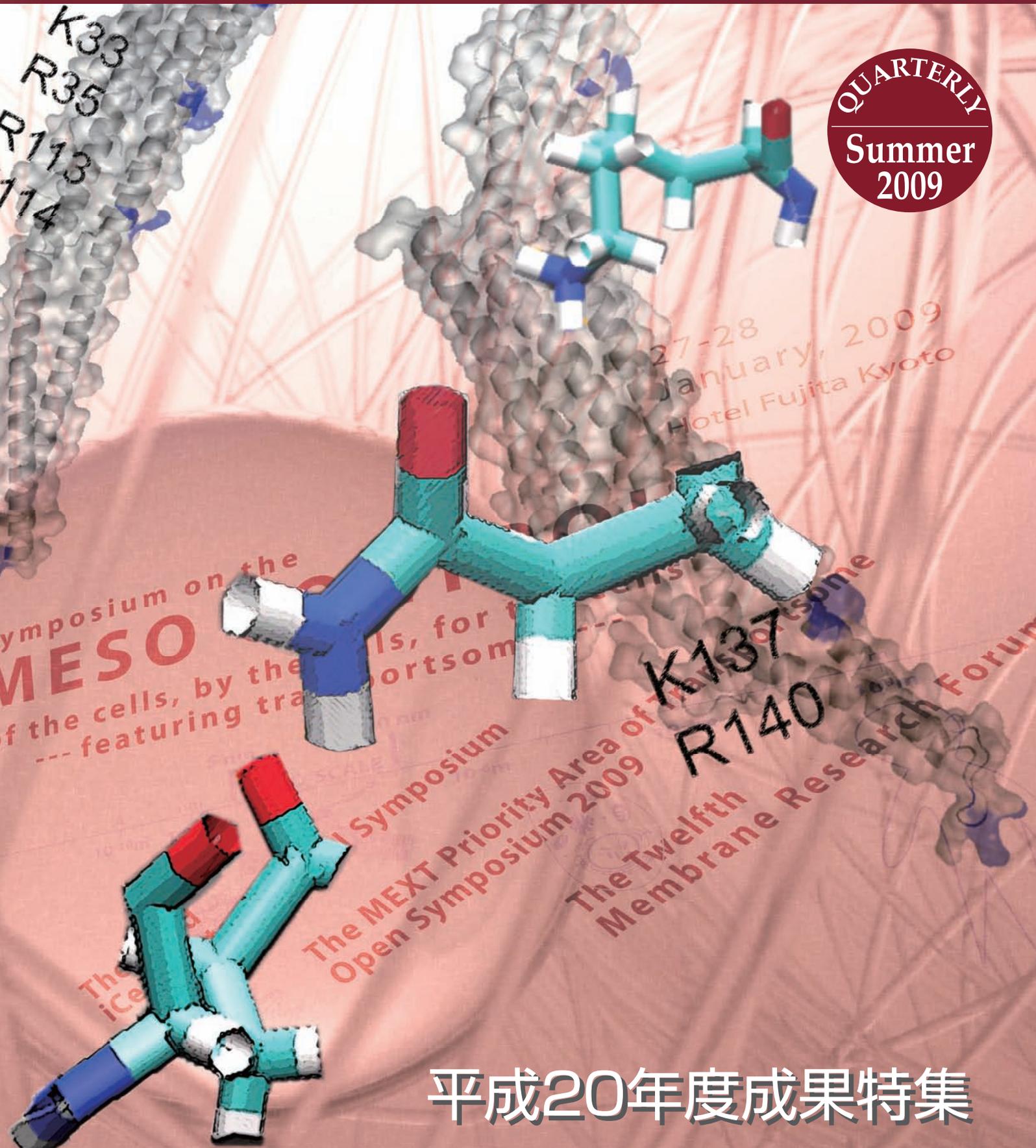


TRANSPORTSOME

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
2009



平成20年度成果特集

目次

平成20年度公開シンポジウム・第2回班会議報告	畑 裕	2
「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 2009年1月29日から1月31日神戸セミナーハウス	永森 收志	4
「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2009に参加して	池田 光伸	5
「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2009優秀賞受賞報告	宮地 孝明	6
平成20年度成果特集		
EFC/F-BARタンパク質とN-WASP-WIP複合体による 脂質膜の曲率依存的なアクチン重合の制御機構	末次 志郎	7
胃酸分泌細胞のプロトンポンプトランスポートソームの解明 酒井 秀紀、藤井 拓人、田淵 圭章、森井 孫俊		11
興奮性シナプス伝達の意外な協役？ — 脳内塩素イオンの重要な役割の解明 —	高森 茂雄	15
エネルギー代謝と体温調節：ショウジョウバエ低温選択性変異体 <i>atsugari</i> から学ぶこと	梅田 真郷	21
受賞報告		
内耳蝸牛内高電位の成立機構の解明 第24回日本薬理学会学術奨励賞	日比野 浩	25
心筋イオンチャネル機能機構と不整脈の研究 平成21年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞受賞	黒川 洵子	26
糖と脂質の恒常性維持に関与するABCタンパク質の研究 日本農芸化学会 農芸化学奨励賞受賞	松尾 道憲	27
トランスポートソームの機能破綻による 神経性異常とヒトにおける病態解析	下川 哲昭	29
フルーツ王国から研究室便り	大塚 稔久	30
編集後記		31

表紙について

今回の表紙は、末次先生、酒井先生からお寄せ頂いた図と、公開シンポジウムのプログラム表紙を組み合わせてデザインされています。本特定領域の活動成果を通じて明らかになりつつある「分子と細胞の間に位置するトランスポートソーム」の姿を観取して頂けると幸いです。

平成20年度公開シンポジウム・第2回班会議報告

2009年1月27日、28日に、京都市の鴨川沿いのホテルフジタ京都において、本特定領域研究「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「Meso Control, of the Cells, by the Cells, for the Cells—featuring transportsomes」が、京都大学 物質-細胞統合システム拠点(iCeMS = アイセムス)、科学技術振興機構(JST)国際共同研究事業(ICORP)膜機構プロジェクト、JST 戦略的創造研究推進事業 発展研究(SORST)細胞力覚プロジェクトの共催で開かれました。異分野交流のよい機会とあって、本特定領域からも多くの参加を見ました。まず、iCeMS 拠点長の中辻憲夫先生のご挨拶に続いて、A02 班の楠見明弘先生が Meso Control に関するコンセプトを説明し、シンポジウムが始まりました。初日には、A01 班の森泰生先生、高森茂雄先生、大塚稔久先生が、二日目には、A02 班の竹島浩先生が、本特定領域研究を通じて得られた研究成果を発表し、活発な質疑を呼びました。最後には、領域代表の金井好克先生が研究発表の後 closing

remark を述べ、二日間の日程を終了しました。特定領域では公開シンポジウム、国際シンポジウムを開催してきましたが、今回のシンポジウムでは、bioinformatics、imaging、chemical biology など、これまでとは少し違った発想に立つ研究に触れることができ、大変に刺激的なものとなりました。楠見先生のご尽力により、初日の夜には、清水寺近くの Oblio で、二日目昼には、角倉了以ゆかりのがんこ高瀬川二条苑で交流を深めることができました。この間、計画班代表者会議をもち、金井代表から、残された期間を有効活用して、トランスポートソームの実体解明を行い、その情報をもとに、多方面への応用的展開を進め、領域外の人々の目にみえる成果を残す必要性が強調され、出席者全員、気を引き締める一場面もありました。ともかくも、実りあり、かつ、味わい深い京都での二日となりました。楠見先生、森先生、竹島先生はじめ京都大学の諸先生方に深謝する次第です。

(文責：TRANSPORTSOME 担当 畑)



楠見先生



森先生



高森先生



大塚先生



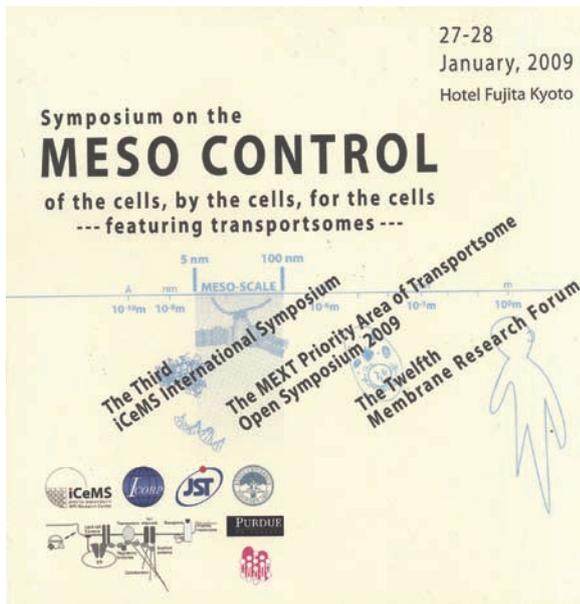
竹島先生



金井先生



写真使用をご許可下さいました京都大学物質-細胞統合システム拠点 iCeMS に深謝致します。



懇親会会場 Oblio



鴨川風景

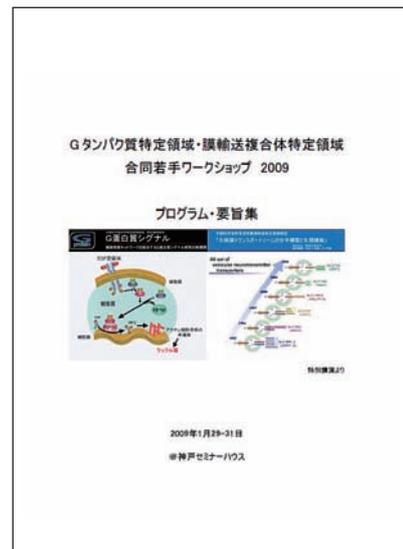
「G 蛋白質シグナル」 & 「膜輸送複合体」 合同若手ワークショップ 2009 年 1 月 29 日から 1 月 31 日 神戸セミナーハウス

本特定領域としては三度目の若手ワークショップ、G 蛋白質シグナルとの二度目の合同ワークショップが開催された。今回のワークショップには、本領域から 58 人、G タンパク質から 43 人、さらに領域外から 20 人が参加した。領域外からの講演者には、UCLA Jeff Abramson 博士、浜松医科大学 瀬藤光則教授ら本領域班員になじみのある研究分野からだけでなく、宇治原世話人の尽力により全くの異分野から「生体現象の数理」をテーマに複数の講演者を迎えた。班内の交流、領域間の交流、さらに異分野との交流。これらの「交流」を深めるため、若手であると自任する方々に多く集まっていた。人里離れた合宿所でのハードスケジュールな三日間にもかかわらず、参加者の半数から回答のあったアンケートによると 90%以上には好評であった。悪印象を持った参加者が回答を拒否した可能性もあるだろう。極めて少数であったが否定的な意見があったことは、今年度の開催に関して考慮されるようにしたい。開会に際しての願い「ボスの考えではなく、あなたの声が聞きたい」は、実現することが出来たのではないかと考えている。当然、その声は深夜になればなるほどよく聞こえてくる傾向が観察された。今年度の第四回若手ワークショップでは、

声がさらに大きく絶え間なく聞こえてくることを第三回若手ワークショップ世話人一同願っている。

永森 収志

(大阪大学大学院医学系研究科 生体システム薬理学)



「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 2009 に参加して

2009年1月29日から1月31日にかけて、神戸セミナーハウスにおいて「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 2009 が開催されました。電車とタクシーを乗り継いで到着した神戸セミナーハウスは、ポートアイランドも異人館も見当たらない閑静な山の中にたたずんでいました。受付を終え、主会場である講堂に行くと、前年の合同若手ワークショップや膜輸送複合体特定領域の班会議で知り合った方々との久々の再会。挨拶と簡単な近況報告をしていると、最初のワークショップが始まりました。合同のワークショップということで内容は多岐にわたり、しっかり準備された発表が続きました。今回のワークショップでは1人あたり15分の発表時間のうち、7分が質疑に充てられていました。最初にプログラムを見たときには長いと思ったその時間も、途切れることなく議論が繰り返され、とても有意義でした。夕食をはさんで、金保先生、森山先生による特別講演。研究における考え方を、多くの経験談とともにお話いただきました。合同ワークショップ恒例(?)の深夜までのディスカッションも盛り上がり、参加者の親睦も大いに深まりました。2日目、皆遅くまで起きていたはずなのに、朝のワークショップからまた活発な議論が行われました。研究者には体力が必要であることを改めて思い知らされます。夜のPh.Dのキャリアについての講演では、留学体験や企業での研究の実情など、幅広いお話を聞くことができました。3日目の最後のプログラムでは、異分野融合シンポジウム「数理とパターン形成生体現象の数理」が行われました。世話人の方が目玉と言われていただけあって、興味深い研究成果を分かりやすく紹介していただきました。生命科学の研究を進めるうえでも参



考になる考え方を含んでおり、とても勉強になりました。

私は今回の合同ワークショップに参加してたくさんの刺激を受けました。自分とあまり年の変わらない研究者が、しっかりとした考えを持って研究に真摯に向き合っていると感じたからです。また、研究のことからそれ以外のことで、たくさんのお話をした人たちとの繋がりは、今後の研究生活を送る上で貴重な財産になると思います。閑静な山の中の神戸セミナーハウスは、今では多くの若手研究者と語り合った思い出の場所です。最後に、素晴らしい時間を作ってくださった世話人の皆さまに改めて感謝を申し上げます。ありがとうございます。

池田 光伸

(東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 病態代謝解析学)



「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 2009 優秀賞受賞報告

この度は「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にて優秀賞を頂き、誠にありがとうございました。今回私は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科森山芳則教授の下で、修士課程から博士課程の間で行った研究、「小胞型アスパラギン酸トランスポーターの発見」について発表しました。

アスパラギン酸は興奮作用を示す NMDA 受容体の天然のリガンドであり、脳内に多量に含まれています。特に、一部の神経のシナプス小胞に含まれており、開口放出されることもわかっていました。しかしながら、アスパラギン酸を小胞内に取り込む機構は全くわかっていませんでした。そのため、アスパラギン酸はグルタミン酸に次いで多量に存在しているにも関わらず、これまで一人前の神経伝達物質として扱われてきませんでした。シナプス小胞内へのアスパラギン酸濃縮を司る、いわば小胞型アスパラギン酸トランスポーターというべき分子を見つけることが、アスパラギン酸化学伝達の解明において最も大きな課題でした。

しかし、小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) はアスパラギン酸を輸送しません。また、アスパラギン酸自体もシナプス小胞内へ輸送されたという報告がありませんでした。こうした状況下、森山研では真核細胞のトランスポーターを機能解析する普遍的な方法

をつくり、VGLUT が属する SLC17 アニオントランスポーターファミリーの構造・機能解析を行っていました。私は小胞型アスパラギン酸トランスポーターの候補として、このファミリーに属する リソソーム・H⁺/シアル酸トランスポーター (シアリン) に着目しました。なぜなら、神経細胞においてシアリンはリソソーム以外のオルガネラにも広く分布していたため、他の輸送機能が想定されたからです。私はこの手法を用いて、シアリンからアスパラギン酸輸送活性を検出しました。その後、シアリンが生体内で小胞型アスパラギン酸トランスポーターとして機能することをいくつかの方法を用いて実証し、さらに、この機能欠損が、強い神経障害を引き起こすサラ病と関連する可能性を指摘しました。

昨年論文が *PNAS* に掲載され、その内容が若手ワークショップにおいても評価され、優秀賞を頂いたことは非常に大きな喜びです。時間を費やした分、その喜びも一潮でした。現在は岡山大学自然生命科学研究支援センター、ゲノム・プロテオーム解析部門助教として、この研究を継続しています。今後も、高く評価して頂けるような研究を続けていきたいと思っております。

宮地 孝明

(岡山大学自然生命科学研究支援センター
ゲノムプロテオーム解析部門)



「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優秀賞受賞者。
左から3人目が宮地先生です。

EFC/F-BAR タンパク質と N-WASP-WIP 複合体による 脂質膜の曲率依存的なアクチン重合の制御機構

末次 志郎 (AO2 計画班)

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細胞形態研究分野

発表論文:

Takano K, Toyooka K, Suetsugu S. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* 27, 2817-2828, 2008

1. はじめに

細胞の運動時に形成されるラメリポディアやフィロポディア、エンドサイトーシスによる膜小胞の取り込みにおいては、細胞膜のダイナミックな変形が伴われる。最近の研究から、エンドサイトーシスのような細胞膜の陥入を伴う小胞の形成では、Bin-Amphiphysin-Rvs167(BAR)と呼ばれるタンパク質ドメインが、膜の形態変化に関与していることが示されている。BAR ドメインは、amphiphysin などの細胞膜の陥入に関わるタンパク質に見いだされるドメインである。このドメインはバナナ型の構造をとり、カーブの内側の正電荷と細胞膜の負電荷が相互作用することで、細胞膜を変形させる(図 1)^{1,2)}。我々が今回着目した extended FCH(EFC)/FCH and BAR(F-BAR)ドメインは、BAR ドメインに弱い相同性をもつドメインであり、BAR ドメインと同様に細胞膜結合活性および変形活性を持っている³⁾。EFC/F-BAR ド

メインもバナナ型の構造で、その凹面は正に帯電している。しかしながら、EFC/F-BAR ドメインは BAR ドメインより緩やかに湾曲した構造を持っており、BAR ドメインより数倍大きな直径を持つチューブ状脂質膜を形成する^{4,5,6)}。この結果から、タンパク質の立体構造が脂質膜の曲率を認識、あるいは生成していると推測される。それ故、膜の曲率は、膜タンパク質の集積やその触媒活性を制御している可能性がある。

今回我々は、EFC/F-BAR ドメインを含むタンパク質として、エンドサイトーシスに関与していると言われている formin-binding protein 17(FBP17)と transducer of Cdc42 dependent actin assembly 1(Toca-1)を用い^{3,4,5,6)}、リボソームとの相互作用を調べた。これらのタンパク質は、分子間相互作用の仲立ちをする Src-homology 3 (SH3)ドメインなども含んでいることが明らかにされている。しかしながら、膜結合タンパク質が脂質膜の幾何学的形状を認識することで、そのエフェクターや相互作用分子がどのような作用を受けているかはよく理解されていない。エフェクターの候補の一つとして、SH3 ドメインを含む N-WASP が挙げられる。N-WASP は Arp2/3 複合体の活性化因子であり^{7,8,9)}、Arp2/3 は、細胞運動の過程でアクチンフィラメントの枝分かれ構造を生成する。それ故、N-WASP が活性化されると Arp2/3 複合体が活性化し、アクチン重合が促進されると考えられる。このような N-WASP に誘導されるアクチン重合が、エンドサイトーシスに重要であることも示されている^{9,10)}。そこで我々は、様々な曲率をもつリボソームと膜タンパク質の相互作用が、アクチン重合に及ぼす効果を検討した。結果として、EFC/F-BAR タンパク質である Toca-1 または FBP17 存在下では、N-WASP は脂質膜の曲率依存的に活性化された。我々はさらに、N-WASP と EFC/F-BAR ドメインが脂質膜に結合することが、アクチン重合に必要なことを明らかにした¹¹⁾。

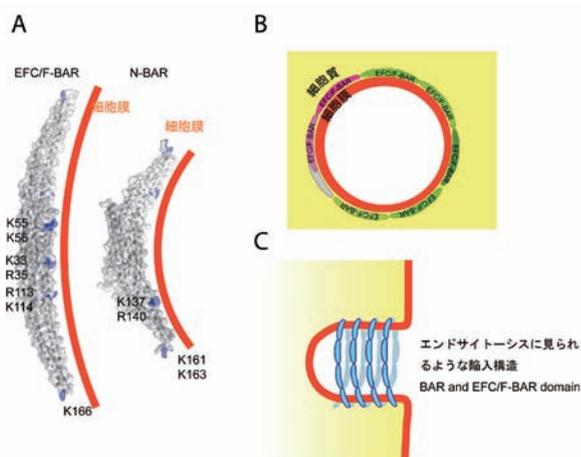


図 1 EFC/F-BAR ドメインと BAR ドメインの二量体の立体構造 (A)EFC/F-BAR ドメインと BAR ドメインの二量体の立体構造。K はリジン、R はアルギニンで、正に荷電した側鎖をもつ塩基性アミノ酸であり、リン脂質のホスファチジルセリンは負に荷電している。これらの塩基性アミノ酸に変異を導入すると、膜結合が失われることから、静電相互作用により点線で示された領域で EFC/F-BAR ドメインは脂質膜に結合すると考えられる。(B)湾曲した EFC/F-BAR ドメインは、脂質膜の管状構造の外側に、静電相互作用により結合する。(C)EFC/F-BAR ドメインの局在は、リボソームの場合は外側、細胞の場合は内側(細胞質側)であるので、エンドサイトーシスに見られるような陥入構造に対応していると考えられる。

2. FBP17 と Toca-1 を介した N-WASP の脂質膜への結合活性

まず始めに、Toca-1 と FBP17 を介した N-WASP のリボソームに対する結合能を、共沈降法(co-sedimentation assay)により調べた(図 2)。リボソームは brain total lipids (Folch fraction)から作製した。このリボソームは、

phosphatidylserine (PS) に富み、phosphatidylinositol phosphates (PIPs) と phosphatidylinositol (4,5) - bisphosphate (PI (4,5) P₂) 等のリン脂質はほとんど含まない¹²⁾。我々は、この Folch fraction から large multilamellar vesicles (LMVs) と small unilamellar vesicles (SUVs) を調整して実験に用いた。LMV の直径は最大 1 μm であり、SUV の直径は最大でも 0.1 μm である。FBP17 あるいは Toca-1、FBP17、N-WASP は単独でリボソームに結合することが分かっており、我々の研究でも確かめられた (data not shown)。しかしながら、N-WASP は、その basic region を介してリン脂質に結合することが知られているので^{13,14)}、N-WASP 単独での膜結合状態を排除するため、basic region を欠損した N-WASP (Δ basic N-WASP) を作製し、FBP17 や Toca-1 の SH3 ドメインを介したリボソームへの結合能を調べた。FBP17 存在下では、リボソームに full length の N-WASP で約 48% が結合し、N-WASP Δ basic で約 42% が結合した。FBP17 を作用させない場合には、それぞれ、36%、29% であったので、FBP17 の存在下で LMV への N-WASP の結合能が上昇した。実際の細胞内では、N-WASP は WIP と複合体を形成していることが知られているので^{15,16)}、我々は N-WASP-WIP の複合体を精製し、リボソームとの結合を検討した (図 2)。N-WASP の場合と同様に、FBP17 存在下では LMV への結合は、43% から 62% に上昇した。Toca-1 を用いた場合でも同様の傾向が見られた (data not shown)。phosphatidylcholine (PC) および phosphatidylethanolamine (PE) からなるリボソーム

にはほとんど結合が見られなかったことからこれらの結合も PS に対する静電的相互作用によっていると考えられる。これらの結果は、N-WASP 単独での脂質膜への結合様式とは別に、FBP17 あるいは Toca-1 を介した N-WASP の脂質膜への作用機序が存在することを示している。

さらに SUV と LMV に対する N-WASP-WIP 複合体の結合を調べた。LMV に対する N-WASP-WIP 複合体の結合は Toca-1 の存在下で 9% から 92% に増加したのに対し、SUV に対する結合は 22% から 76% に増加した (data not shown)。このことは Toca-1 および FBP17 は N-WASP-WIP 複合体を LMV に選択的に、すなわち、膜の幾何学的形状に応じて結合させる能力を、1.2 倍程度であるが、持っていることを示唆している。

3. 脂質膜の曲率によるアクチン重合の制御機構

N-WASP は Arp2/3 の活性化を経てアクチン重合を促進することが知られているが、膜の曲率とアクチン重合の関係性はこれまで議論されてこなかった。そこで、膜の曲率によるアクチン重合の制御機構を明らかにするため、FBP17 または Toca-1 と N-WASP-WIP 複合体をリボソームに作用させ、pyrene 標識アクチンによる actin polymerization assay を行った (図 3)。N-WASP-WIP 複合体とリボソーム、あるいは N-WASP-WIP 複合体と FBP17 の組み合わせでは、それほどアクチン重合の変化はもたらされなかったが、FBP17 または Toca-1 (data not shown) を N-WASP-WIP 複合体存在下で LMV に作用させることで、アクチン重合の速度が大きく増加したのに対し、SUV を作用させた場合ではほとんど変化しなかった。その差はおおよそ 4-8 倍程度であった。この増加の程度は図 2 および前節で示した膜結

		Anti-N-WASP	Anti-WIP	Anti-GST (FBP17)
		sup ppt	sup ppt	sup ppt
Folch LMV	N-WASP-WIP (300 nM)	43±11%	44±13%	
	N-WASP-WIP + GST-FBP17	62±13%	58±9%	87±5%
	N-WASP WT (400 nM)	36±13%		
	N-WASP WT + GST-FBP17	48±5%		82±5%
	N-WASP Δbasic (400 nM)	29±5%		
	N-WASP Δbasic + GST-FBP17	42±12%		85±6%
PC/PE LMV	WIP (300 nM)		48±5%	
	WIP + GST-FBP17		43±10%	90±5%
	N-WASP-WIP (300 nM)	8±5%	8±7%	
	WIP (300 nM)		5±3%	

図 2 共沈降法による脂質膜への結合の検討
共沈降法 (co-sedimentation assay) により、FBP17 を介した LMV への N-WASP、N-WASP-WIP 複合体、N-WASP Δ basic の結合能の変化を調べた。数字 (%) は沈殿効率を表す (sup, supernatant; ppt, precipitate)。N-WASP は FBP17 あるいは Toca-1 によってリボソームに結合することが示された。

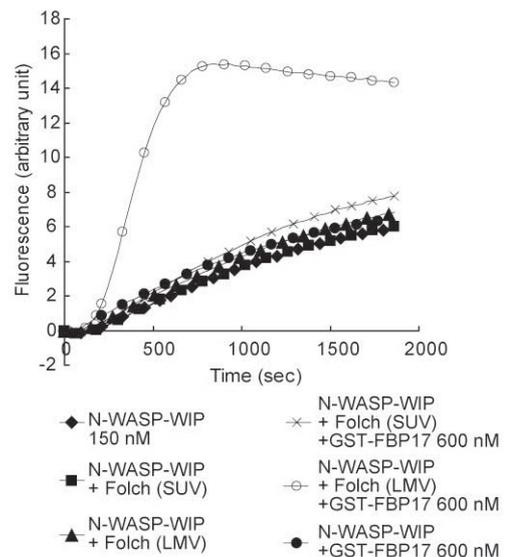


図 3 膜の幾何形状に依存したアクチン重合
アクチンの重合反応に取り込まれると、蛍光の増強が起こる pyrene 標識アクチンをプローブとして用いることにより、アクチンの重合を定量した (pyrene-actin assay)。FBP17 と LMV 存在下では N-WASP-WIP 複合体および Arp2/3 複合体によるアクチン重合が促進されたが、SUV 存在下では促進されず、膜の形態 (幾何学的な形状) が重要であることを示した。

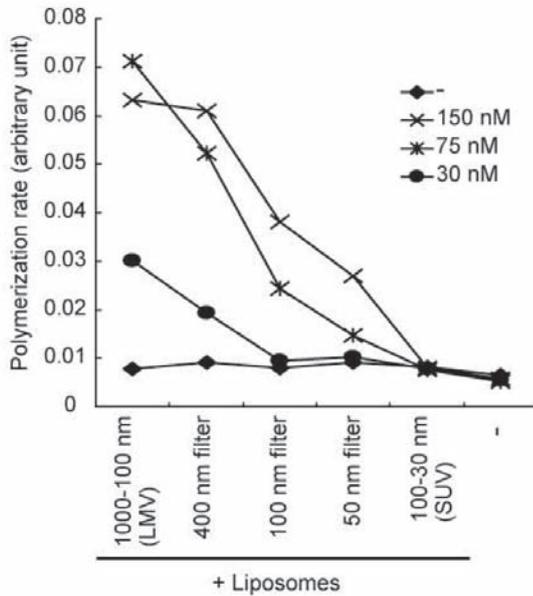


図4 膜の幾何形状に依存したアクチン重合の定量化
サイクロポアメンブレンフィルターを用いて、直径の大きさの上限を限定したリポソームを作製した。その後、N-WASP-WIP 複合体、Arp2/3 複合体、アクチン、リポソームの濃度を一定とし Toca-1 の濃度を変化させて、アクチン重合を pyrene-actin assay で調べた。リポソームの直径が大きいほど、アクチン重合が促進された。

合した N-WASP の増加に比較してかなり大きい。

次に、LMV 存在下では SUV 存在下と比較して、アクチンの重合が促進されていた結果より、Toca-1 と FBP17 が膜の曲率依存的にアクチン重合を制御していることが示唆された。そこで、サイクロポアメンブレンフィルターを用いてリポソームを直径の大きさにより分離し¹⁷⁾、アクチン重合の度合いを調べた (図 4)。その結果、リポソームの直径が大きいほど Toca-1 によるアクチン重合が促進されているという結果が得られた。これらの結果は、Toca-1 と FBP17 の EFC ドメインが、直径のより大きなリポソームを選択的に認識し、N-WASP の活性化とアクチンの重合を促進していることを示している。

また興味深いことに、膜に結合できない N-WASP の変異体である Δ basic 変異体を用いた場合には、LMV および SUV のいずれの場合にも Toca-1 存在下でアクチン重合速度の増加がみられなかった (data not shown)。

4. Toca-1 と FBP17 の SH3 ドメインに隣接するアミノ酸配列の電荷が、N-WASP-WIP 複合体による膜の曲率依存的なアクチン重合を制御する

N-WASP-WIP 複合体は、Toca-1 や FBP17 の SH3 ドメインを介して膜に結合する。したがって、N-WASP が膜と相互作用してアクチン重合を誘起するためには、膜に対する SH3 ドメインの位置が重要である。Toca-1 や FBP17 の SH3 ドメインに隣接するアミノ酸配列を調べたところ、保存性の高い残基が集中しており、相対的に負の電荷に帯電する部位であった (図 5)。実験で用いた Folch fraction は PS を多く含み負に帯電しているため、この部位は静電相互作用により、膜に対して比較的距離があると考えられる。この SH3 の膜に対する位置が、LMV と SUV にみられたような N-WASP の膜結合に比較して大きなアクチン重合速度の変化に関与している可能性がある。我々は、負電荷を持つアミノ酸のいくつかを、正電荷をもつアミノ酸に置換する変異を導入して電荷を中和した HHK ミュータントを作製した。FBP17 (図 6) または Toca-1 (data not shown) の HHK ミュータントでは、N-WASP-WIP 複合体によって誘導された膜の曲率依存的なアクチン重合が抑制された。

得られた結果をさらに考察するため、FRET を用いて N-WASP-WIP 複合体とリポソーム間の距離を測定した (図 7)。その結果、FBP17 と Toca-1 の HHK ミュータントでは、wild type に比べて FRET 効率が有意に減少した。これは、N-WASP-WIP 複合体とリポソームの距離が増加したことを意味する。また SUV 存在下では、LMV の存在下に比べて、Toca-1 存在下での N-WASP-WIP 複合体の膜に対する位置が遠くなっていた (図 7)。さらに膜に結合できない N-WASP の変異体である Δ basic 変異体を用いた場合も、N-WASP の膜に対する位置が遠くなっていた (図 7)。つまり、LMV と SUV の間のアクチン重合速度の違いには、膜への結合の変化に加えて、結合した N-WASP 自体の膜に対する空間配置が関与していることを示している。これらの結果は、N-WASP の結合領域である、Toca-1 または FBP17 の SH3 ドメインの膜に対する位置により、N-WASP あるいは N-WASP-WIP 複合体の膜に対する位置がきまり、膜の曲率に依存したアクチン重合が制御されていることを示している。

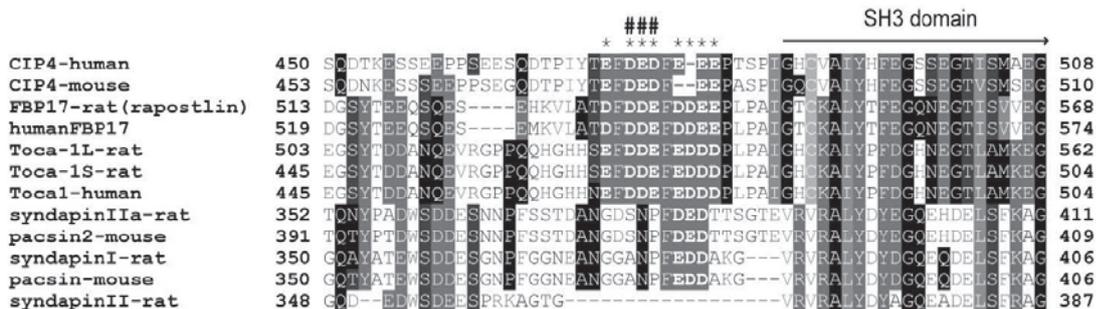


図5 FBP17 および Toca-1 の SH3 ドメイン周囲のアミノ酸

膜の曲率を認識すると考えられているタンパク質の、SH3 ドメインに隣接するアミノ酸配列。* は保存性の高い酸性アミノ酸、# は FBP17 と Toca-1 の残基に変異を導入した部分 (HHK ミュータント) を示す。SH3 ドメインに隣接する保存性の高い領域は、負の電荷に帯電する配列であった。

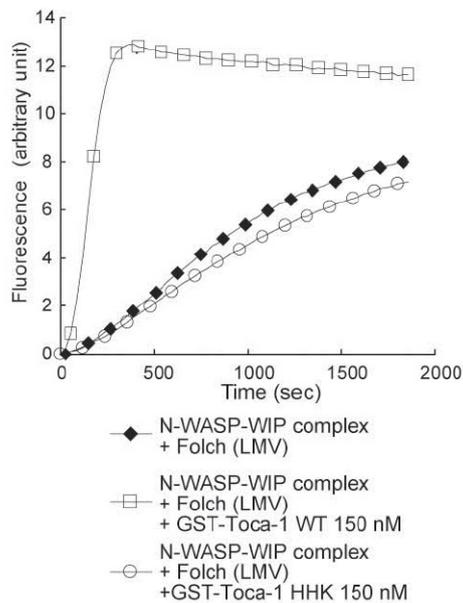


図6 SH3ドメイン直近の酸性アミノ酸の変異の巻く依存的アクチン重合への影響

Toca-1のHHKミュータントにN-WASP-WIP複合体とLMVを作用させ、pyrene-actin assayでアクチン重合を調べた。HHKミュータントでは、膜の曲率に依存したアクチン重合が誘導されなかった。

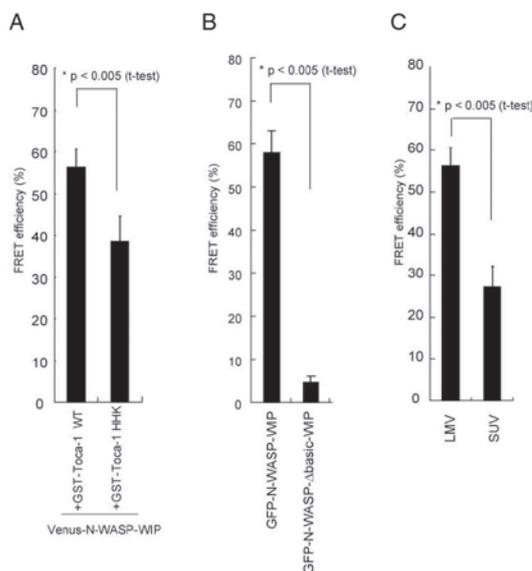


図7 N-WASPと膜の間のFRET効率

(A) Toca-1の野生型とHHKミュータントを用いて、GFP/Venus-N-WASP-WIP複合体とローダミン標識したリボソームの距離をFRET効率から見積もった。HHKミュータントではFRET効率が減少したので、N-WASP-WIP複合体とリボソームの距離が増加したと考えられる。(B) Toca-1の野生型存在下でGFP-N-WASPの野生型または Δ basic変異体とWIPの複合体とリボソームの距離をFRET効率から見積もった。 Δ basic変異体ではN-WASP自体の膜結合が弱まっていることからFRET効率が減少したので、N-WASP-WIP複合体とリボソームの距離が増加したと考えられる。(C) Toca-1の野生型存在下でGFP-N-WASP-WIP複合体とLMVまたはSUVリボソームの距離をFRET効率から見積もると、SUVリボソームではLMVリボソームに比較してN-WASPとリボソームの距離が増加したと考えられる。

5. 終わりに

上述したように、我々の研究は、膜の曲率に依存してアクチン重合のようなシグナルを誘起できることを初めて示した。実際の細胞では、今回研究対象としたFBP17はクラスリン依存性エンドサイトーシスにおける膜陥入に関与していることが知られている⁶⁾。クラスリン被覆小胞はそれだけでは陥入構造にすぎず、ダイナミンの活性化による膜切断やN-WASPの活性化によるアクチン重合による推進力による細胞膜からの切断を受け、輸送されることを想像すれば、我々の研究はクラスリン依存性エンドサイトーシスの形成機構に新たな知見を与えたと考えられる。

また、我々の結果と関連して、枯草菌の孢子形成では、膜タンパク質が細胞膜の幾何学的な情報(曲率)を手がかりにして特定部位に局在化し、その後のシグナルを誘導しているという報告が得られている¹⁸⁾。従来考えられてきた生化学的なシグナルとは異なるこれらの新しい概念は、トランスポートソームの研究においても、新たな視点からその機能を理解するきっかけになると考えている。

6. 謝辞

この場をお借りして、本特定領域研究班に参加させていただいたことに、および共同研究者の方々に、心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Scita, G. *et al.* (2008) *Trends Cell Biol* 18, 52-60
- 2) Peter, B. J. *et al.* (2004) *Science* 303, 495-499
- 3) Kamioka, Y. *et al.* (2004) *J Biol Chem* 281, 29042-29053
- 4) Itoh, T. *et al.* (2006) *Biochem Biophys Acta* 1761, 897-912
- 5) Tsujita, K. *et al.* (2006) *J Cell Biol* 172, 269-279
- 6) Shimada, A. *et al.* (2007) *Cell* 129, 761-772
- 7) Loisel, T. P. *et al.* (1999) *Nature* 401, 613-616
- 8) Pollard, T. D. *et al.* (2003) *Cell* 112, 453-465
- 9) Takenawa, T. *et al.* (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 37-48
- 10) Merrifield, C. J. *et al.* (2005) *Cell* 121, 593-606
- 11) Takano, K. *et al.* (2008) *EMBO J* 27, 2817-2828
- 12) Michelsen, P. *et al.* (1995) *Rapid Commun Mass Spectrometry* 9, 1109-1114
- 13) Rohatgi, R. *et al.* (1999) *Cell* 97, 221-231
- 14) Prehoda, K.E. *et al.* (2000) *Science* 290, 801-806
- 15) Ho, H. Y. *et al.* (2004) *Cell* 118, 203-216
- 16) Ho, H. Y. *et al.* (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11306-11311
- 17) Mayer, L. D. *et al.* (1986) *Biochem Biophys Acta* 858, 161-168
- 18) Ramamurthi, K. S. *et al.* (2009) *Science* 323, 1354-1357

胃酸分泌細胞のプロトンポンプトランスポートソームの解明

酒井 秀紀¹(A02 公募班)、藤井 拓人^{1,4}、田淵 圭章²、森井 孫俊³

¹ 富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学、² 富山大学生命科学先端研究センター

³ 鈴鹿医療科学大学薬学部、⁴ 日本学術振興会特別研究員

1. はじめに

胃酸は、胃粘膜の胃腺に存在する胃酸分泌細胞より分泌される。胃酸分泌細胞は、酸分泌時に劇的な形態変化をおこす。休止時に細胞内に多数存在する細管小胞膜が、アピカル膜と連結することで、大量の胃酸が分泌される(図1)。胃プロトンポンプ(H^+,K^+ -ATPase)は、細胞膜を隔てた100万倍以上ものプロトン濃度勾配に逆らって H^+ を胃管腔(pHは約1)へ分泌する。 H^+,K^+ -ATPaseのアミノ酸配列の相同性は、魚類からヒトまで約97%以上と極めて高い。

胃酸(HCl)の H^+ 輸送が H^+,K^+ -ATPaseにより行われていることはよく知られている一方で、 Cl^- 輸送を担う分子については種々議論されている。これまでにCFTR¹⁾、SLC26A9²⁾、CLIC-6³⁾などの Cl^- チャネルが候補として報告されている。また、 H^+,K^+ -ATPaseが活性化され H^+ の分泌を維持するには、細胞内への K^+ の安定な供給が必要不可欠である。これまでに管腔側膜におけるこの K^+ 供給実体について、KCNQ1/KCNE2⁴⁾やKir4.1⁵⁾などの K^+ チャネルが報告されている。

私たちは、 K^+-Cl^- 共輸送体(KCC)の胃酸分泌機構における役割を明らかにすること、また H^+,K^+ -ATPaseがどのような分子メカニズムで、 H^+ 輸送を行うのかについて解明することを目的とした研究を行った。

2. 胃酸分泌細胞基底側膜におけるKCC3aの発現と機能⁶⁾

KCCは、 K^+ と Cl^- を細胞外に共輸送する二次性能動輸送体であり、種々の上皮細胞において細胞内 Cl^- 濃度調節や細胞容積調節などに関与している。KCCにはこれまでに4つのisoform(KCC1-4)が報告されている。またKCC3には、開始エキソンの違いによりKCC3aからKCC3cの3つのsplicing variantが存在する。KCC1はユビキタスに存在し、KCC3aおよびKCC4は、主に上皮細胞に発現している。KCC2は神経細胞に、KCC3bは腎臓にそれぞれ発現している。これまで、胃酸分泌細胞においてKCC isoformの発現についての報告は無かった。KCCならば、 H^+,K^+ -ATPaseと機能共役することが可能で、 H^+,K^+ -ATPaseへの K^+ 供給を行うと同時に Cl^- を管腔へ分泌することが可能であると考えられる。

私たちは、ラット、ウサギ、ヒトの胃粘膜において抗KCC3抗体を用いたWestern blotによりKCC3aの特異的なバンド(180kDa)を検出した。そこで、胃酸分泌細胞の管腔側膜においてKCC3aが H^+,K^+ -ATPaseと共役した Cl^- 輸送タンパク質として機能している可能性を期待して、ラット胃粘膜で抗KCC3抗体による免疫組織染色を行った。KCC3aタンパク質は、酸分泌能の高い胃腺上部(頸部)に存在する胃酸分泌細胞に高発現していた。しかしKCC3aは胃酸分泌細胞の管腔側膜ではなく基底側膜に発現し、 Na^+,K^+ -ATPase $\alpha 1$ -isoform ($\alpha 1NaK$)と共局在していた。一連の実験により、KCC3aは $\alpha 1NaK$ と分子会合し、脂質ラフトへと移行させることで、 $\alpha 1NaK$ をアップレギュレーションすることが明らかとなった。

3. 胃酸分泌細胞アピカル膜におけるKCC4の発現と機能⁷⁾

KCC3aに続き、マウス、ラット、ブタおよびヒトの胃粘膜において、抗KCC4抗体を用いたWestern blotによりKCC4の特異的なバンド(165kDa)を検出した。ラット胃粘膜標本の免疫組織染色を行ったところ、KCC4の分布は H^+,K^+ -ATPase α サブユニット(HK α)の分布と重なり、 $\alpha 1NaK$ の分布とは明らかに異なった。KCC4は、酸分泌能の高い胃腺上部の胃酸分泌細胞に分布していた(図2)。

胃酸分泌細胞において H^+,K^+ -ATPaseは細管小胞とアピカル膜に存在する。細管小胞は酸分泌休止時には細胞内に存在し、刺激時にアピカル膜につながる。KCC4が胃酸分泌細胞の細管小胞に存在するのか、アピカル膜に存在するのかを調べるために、ブタ胃粘膜より細管小胞由来ベシクル(tubulovesicles; TV)およびアピカル膜由来ベシクル(stimulation-associated vesicles; SAV)を調製した(図1)。両ベシクル共にHK α および H^+,K^+ -ATPase β サブユニット

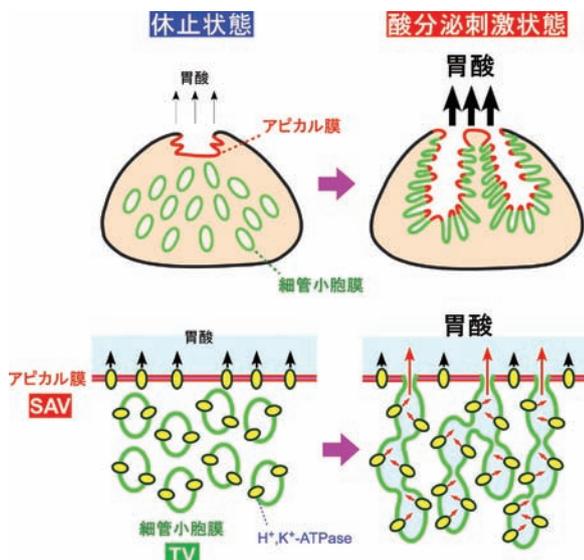


図1 休止時および酸分泌刺激時の胃酸分泌細胞における細管小胞とアピカル膜

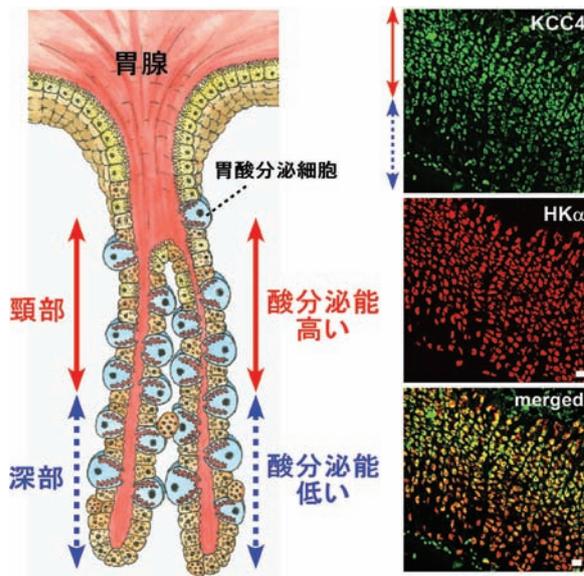


図2 ラット胃粘膜における KCC4 の発現と分布
 H^+, K^+ -ATPase α サブユニット(HK α)は、胃腺の全ての胃酸分泌細胞に発現している一方で、KCC4 は、酸分泌能が高い胃腺の管腔側上部(頸部)に存在する胃酸分泌細胞に高発現していた。図中のバーは $10\mu m$ 。

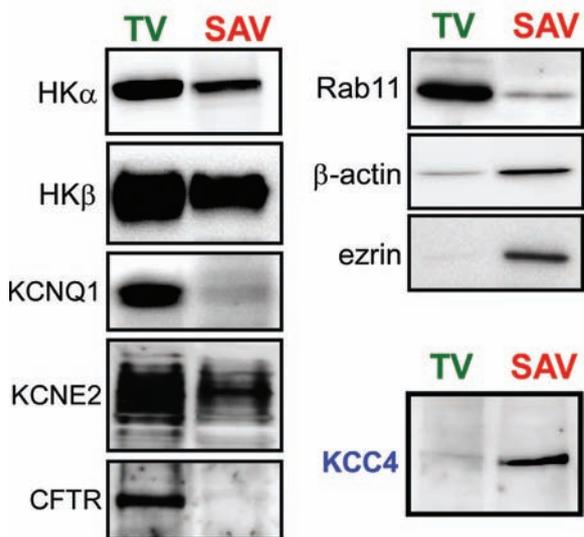


図3 細管小胞とアピカル膜におけるイオン輸送関連タンパク質の発現
 プタの細管小胞ベシクル(TV)とアピカル膜由来ベシクル(SAV)における H^+, K^+ -ATPase α -subunit (HK α ; 95 kDa)、 H^+, K^+ -ATPase β -subunit(HK β ; 80kDa)、KCNQ1 (70kDa)、KCNE2 (60kDa)、CFTR(150kDa)、Rab11(27kDa)、 β -actin(45kDa)、ezrin(85kDa)および KCC4(165kDa)の発現。

(HK β)が発現していた(図3)。他方、TVには SAV に比べ KCNQ1/KCNE2、CFTR、Rab11 が高発現していた。SAVには TV に比べ β -actin や ezrin が高発現していた(図3)。興味深いことに KCC4 は、SAV に高レベルで発現し、TV における発現レベルは低かった(図3)。TV、SAV において、KCC1、KCC2 および KCC3 の有意な発現は見られなかった。また、SAV における免疫沈降で、KCC4 は HK α と免疫共沈降した。

TV および SAV における $^{36}Cl^-$ 取込み実験で、SAV のみ DIOA (KCC 阻害薬)で阻害される Cl^- 輸送機構が存在することが明らかになった。この成分は H^+, K^+ -ATPase 特異的阻害薬の SCH28080 によりほぼ完全阻害されたことから、SAV の DIOA 感受性 Cl^- 輸送は H^+, K^+ -ATPase に依存していることが示唆された。

TV および SAV において acridine orange を使用した H^+ 取込み実験を行ったところ、TV、SAV 共に SCH28080 感受性の H^+ 取込みが観察された。しかし DIOA は SAV の取り込みを抑制する一方で、TV の取込みには影響を与えなかった。したがって KCC4 の阻害が、 H^+, K^+ -ATPase による H^+ 取込みの阻害を引き起こすことが示唆された。

さらに DIOA が TV および SAV の SCH28080 感受性 K^+ -ATPase 活性(H^+, K^+ -ATPase 活性)に及ぼす効果を検討したところ、DIOA は SAV の H^+, K^+ -ATPase 活性を抑制したが、TV の H^+, K^+ -ATPase 活性には影響を与えなかった。SAV を凍結乾燥しベシクル膜を破壊すると、DIOA の阻害効果は消失した。これら結果から、DIOA が、KCC4 によるイオン輸送を阻害することで、SAV の H^+, K^+ -ATPase 活性を間接的に抑制しているものと考えられた。

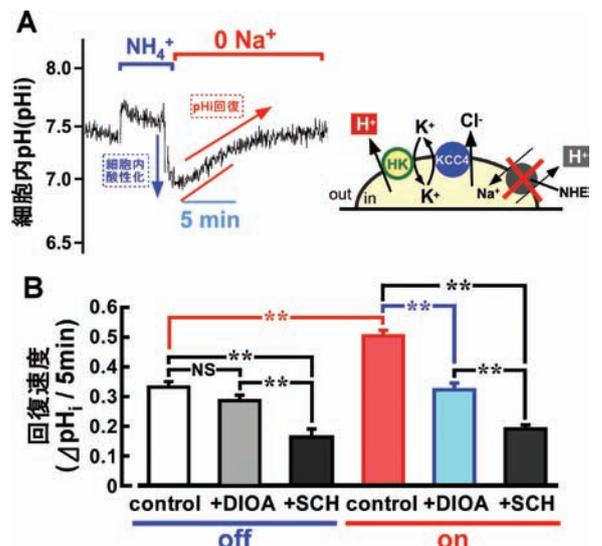


図4 KCC4 の発現による H^+, K^+ -ATPase 機能の上昇
 KCC4 未発現細胞(off)および KCC4 発現誘導細胞(on)において、アンモニウムパルスにより細胞内を酸性化した後の細胞内 pH (pHi) を、 Na^+ 非存在下(内因性の NHE が機能しない条件下)でモニターすることで、 H^+, K^+ -ATPase による細胞外への H^+ 輸送活性を評価した。A、トレース図の例。赤線は、 Na^+ 非存在下にして 0 分から 5 分(青線)までの pHi 変化を示している。B、pHi 回復速度の平均 ($\Delta pHi / 5min$) のグラフ。DIOA ($10\mu M$) および SCH28080 (SCH; $10\mu M$) の効果を検討した。

つぎに、発現系における KCC4 と H^+, K^+ -ATPase の機能連関について検討するため、 H^+, K^+ -ATPase (HK α および HK β) 安定発現 HEK293 細胞に KCC4 の T-REx システムを導入した。KCC4 の発現により H^+, K^+ -ATPase の発現量は変わらなかった。KCC4 発現細胞において、KCC4 は H^+, K^+ -ATPase と免疫共沈降した。KCC4 発現細胞の膜画分を調製し、 H^+, K^+ -ATPase の酵素活性に対する DIOA の効果を検討したが、凍結乾燥 SAV の場合と同様に、DIOA は H^+, K^+ -ATPase の酵素活性に影響を及ぼさなかった。

そこで、アンモニウムパルスによる細胞内酸性化からの回復速度を、細胞内 pH (pHi) をモニターすることで測定すると、KCC4 発現細胞では、未発現細胞に比べて有意に回復速度が上昇した(図4)。上昇した回復速度は DIOA によって未発現細胞と同レベルにまで抑制された(図4)。従って、KCC4 の発現により H^+, K^+ -ATPase の H^+ 輸送活性が有意に上昇したと考えられ、発現系においても KCC4 と H^+, K^+ -ATPase は機能連関していることが示唆された。

以上の結果から、酸分泌能の高い胃酸分泌細胞のアピカル膜において、KCC4 は HK α と機能複合体を形成し、KCC4 による K^+-Cl^- 共輸送が、 H^+, K^+ -ATPase 活性とカップリングしているものと考えられた(図5)。また胃酸分泌細胞において KCC4 は、 H^+, K^+ -ATPase のための K^+ 供給分子として、また胃酸(HCl)分泌のための Cl^- 輸送分子として機能していることが示唆された。

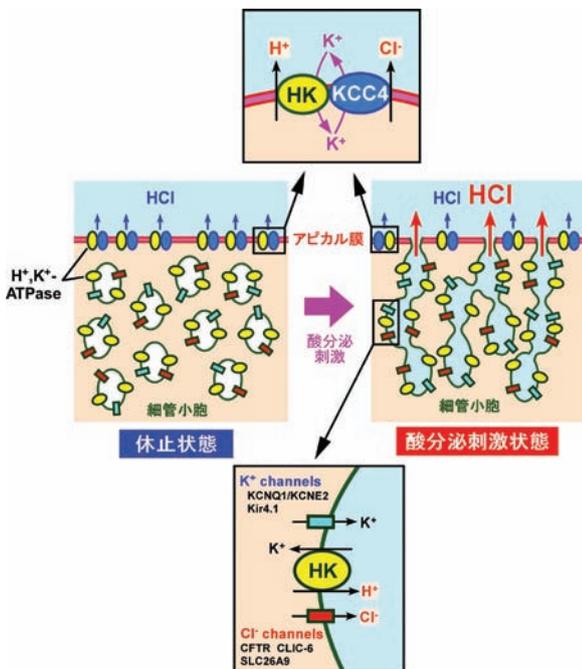


図5 アピカル膜と細管小胞膜のプロトンポンプトランスポートソームのモデル図

休止時の基礎胃酸分泌は、アピカル膜の H^+, K^+ -ATPase (黄色丸) と KCC4 (青丸) が担い、刺激時の胃酸分泌にはそれに加えて、細管小胞膜の K^+ チャネル(青四角)と Cl^- チャネル(赤四角)が関与しているものと考えられる。

4. 胃 H^+, K^+ -ATPase のプロトン輸送に関する電荷移動路⁸⁾

プロトンは、水にプロトンが結合したオキソニウムイオン(H_3O^+)で輸送される場合と、バクテリオロドプシンやシトクロームCオキシダーゼのように、アミノ酸側鎖間に形成される電荷移動路上を電荷として輸送される場合が考えられる。胃 H^+, K^+ -ATPase は、 Na^+, K^+ -ATPase や Ca^{2+} -ATPase などの他のイオン輸送性 P 型 ATPase からの類推で、実験的証明がないままにオキソニウムイオンの形で運ばれると考えられてきた。

私たちは、酸素の安定同位体からなる ^{18}O 水を用い、ブタ胃ベシクル内への水の取り込み量を質量分析法で測定したところ、1 モルの ATP 加水分解によって 1.8 モルの水が輸送される結果を得た。この値は、理論的な ATP 加水分解とプロトン輸送とのカップル比 2 に近いことから、 H^+, K^+ -ATPase では、プロトンと水は 1:1 で輸送される、つまり水にプロトンが結合したオキソニウムイオンの形で輸送されることが明らかとなった。

しかし、ホモロジーモデリングで構築したウサギ胃 H^+, K^+ -ATPase α サブユニットの三次元構造モデルでは、2 個のイオン結合部位はポンプの膜貫通領域に完全に閉塞して、細胞質側からのイオン輸送路は存在しなかった。分子動力学シミュレーションを行なった結果、細胞質に存在するオキソニウムイオンから第二イオン結合部位にかけて、アミノ酸側鎖間の水素結合鎖を電荷が輸送される電荷移動

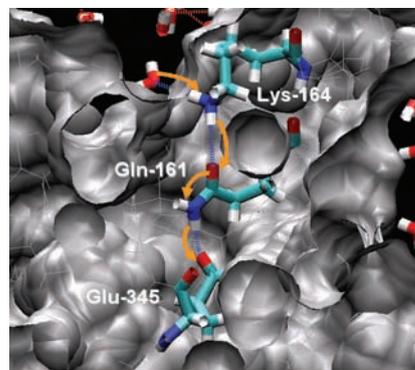


図6 細胞質側からイオン結合部位までの電荷移動路の形成

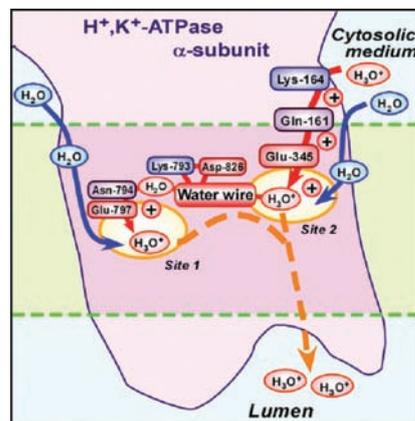


図7 胃 H^+, K^+ -ATPase におけるプロトン輸送モデル

路(H_3O^+ - Lys-164 - Gln-161 - Glu-345)がダイナミックに形成されることがわかった(図6)。第二イオン結合部位のGlu-345から第一イオン結合部位のGlu-797にかけても、水が関与する電荷移動路が形成され、Lys-793が電荷移動に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。相同性が63.5%のヒトの非胃型 H^+ , K^+ -ATPase (human ATP1A1 α 2-subunit; GenBankTM P054707)でもこれら3個のアミノ酸は保存されていて、電荷移動路も形成されていた。一方、相同性が60.3%のシビレイ Na^+ , K^+ -ATPase (GenbankTM P05025)ではこれら3個のアミノ酸は保存されていたが、電荷移動路は形成されなかった。

電荷を中継しているGln-161のQ161L変異体では、電荷移動路は形成せず、K164L、K164A変異体では、 H_3O^+ - Gln-161 - Glu-345の代替電荷輸送路が形成されていた。実際に、ウサギ胃 H^+ , K^+ -ATPaseに部位特異的変異導入を行いHEK293細胞に発現させると、Q161L、E345L変異体では、ATP加水分解活性と細胞内への $^{86}Rb^+$ 取り込み活性は完全に失われた。代替電荷移動路が形成されるK164L、K164A変異体では、両活性は約50%に低下し、分子動力学シミュレーションの結果と一致した。

以上の結果から、プロトンは電荷移動で細胞質側から二つのイオン結合部位まで運ばれ、別の経路で輸送された水と結合しオキシニウムイオンが形成され、E1 - E2コンフォメーション変化の間に分泌管腔側に輸送されるものと考えられる(図7)。水輸送路は明らかになっていないが、2個のイオン結合部位に通じるチャネルがポンプの膜貫通部の中心部側面の2カ所に開口していることから、ポンプ膜貫通部位の外側面と、脂質二分子層膜の疎水性基との界面が水輸送路の候補として挙げられる。

5. おわりに

胃酸分泌細胞の形態は、胃酸分泌刺激休止状態と刺激状態

では大きく異なる。休止状態の細胞において細管小胞は細胞内に存在しているため大部分の H^+ , K^+ -ATPaseは酸分泌には関わっていない。休止時の分泌(基礎分泌)はアピカル膜に存在する H^+ , K^+ -ATPaseが担っているものと考えられる。他方、刺激状態では、細管小胞がアピカル膜につながり、大量の胃酸が分泌される。KCC4は酸分泌休止状態のアピカル膜において特に重要な役割を果たしているものと考えられる。今後、胃のKCC4をターゲットとする薬物の研究が進めば、夜間の空腹時などの酸分泌刺激休止時の胃酸分泌を選択的に抑制することが可能になるかもしれない。今後、アピカル膜の脂質ラフトと非ラフト、並びに細管小胞におけるそれぞれのプロトンポンプトランスポートソームについて、さらに詳細に解明したい。また、胃プロトンポンプにおいて、プロトンは細胞質側からイオン結合部位までは電荷移動で輸送されて水にプロトンを渡し、分泌管腔へはオキシニウムイオンの形で輸送されることが明らかとなった。今後、膜貫通領域に存在すると考えられる水の透過の分子機構について解明したい。

最後に、本特定領域研究でお世話になっております多くの先生方、ならびに御指導を賜りました富山医科薬科大学名誉教授の竹口紀晃先生に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Sidani, S. M., et al. (2007) J. Biol. Chem. **282**, 6068-6074.
- 2) Xu, J., et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105**, 17955 - 17960.
- 3) Sachs, G., et al. (2007) J. Clin. Gastroenterol. **41**, S226-S242.
- 4) Grahmmer, F., et al. (2001) Gastroenterology **120**, 1363-1371.
- 5) Fujita, A., et al. (2002) J. Physiol. **540**, 85-92.
- 6) Fujii, T., et al. (2008) J. Biol. Chem. **283**, 6869-6877.
- 7) Fujii, T., et al. (2009) J. Biol. Chem. **284**, 619-629.
- 8) Morii, M., et al. (2008) J. Biol. Chem. **283**, 16876-16884.

逆流性食道炎治療に期待

胃酸分泌仕組み解明

富山大・酒井教授ら

胃酸の成分は水素イオンと塩素イオンで、水素イオンが分泌される仕組みは既に解明されているが、塩素イオンについては分かっていなかった。酒井教授と日本学術振興会の藤井拓人特別研究員は、動物や人間の胃の組織を分析し、空腹時の胃酸については、塩素イオンが「KCC4」と呼ばれるタンパク質によって作られていることを突き止めた。一方、食後の胃酸は、研究で分かったKCC4の働きに必要ない。食後の胃酸を減らすことなど、空腹時の胃酸の分泌量を減らすことができれば、逆流性食道炎は、胃酸が原因によるがんの原因にもなる副作用のない新たな治療薬の開発につながる。論文は来年一月、米国生化学・分子生物学会誌に掲載される。

富山大学大学院医学薬学部の酒井秀孝教授(右)は、睡眠中など空腹時に分泌される胃酸の成分のうち「塩素イオン」を作り出しているタンパク質の種類を突き止めた。このタンパク質の働きを抑制することで、空腹時に分泌される胃酸の量を減らすことができ、逆流性食道炎の新たな治療薬の開発につながる。論文は来年一月、米国生化学・分子生物学会誌に掲載される。

空腸時の胃酸分泌の仕組みを解明した酒井教授(富山大学)の富山大学

図8 北日本新聞朝刊 H20.12.23

興奮性シナプス伝達の意外な脇役？ — 脳内塩素イオンの重要な役割の解明 —

高森 茂雄 (AO1 公募班)

東京医科歯科大学 脳統合機能研究センター

神経細胞が神経伝達物質を放出するためには、神経終末の細胞質に存在する伝達物質がシナプス小胞に取込まれて濃縮される必要があります。哺乳類の脳内で最も多くの神経細胞が用いている興奮性神経伝達物質はグルタミン酸ですが、我々は、これまでに VGLUT (小胞型グルタミン酸トランスポーター) というタンパク質がその取込を行っていることを明らかにしてきました。従来、シナプス小胞へのグルタミン酸取込は、小胞外の塩素イオン濃度によって制御されていると考えられていましたが、今回、組換え VGLUT タンパク質をリポソームに再構成する実験を行い、小胞外よりも、むしろ小胞「内」に存在する塩素イオンが、VGLUT によるグルタミン酸輸送に重要な役割を果たすことを突き止めました。神経終末でエンドサイトーシスにより新たに形成されたシナプス小胞の内腔は、高濃度の塩素イオンを含んだ細胞外液で満たされています。従って、今回の研究成果は、「細胞外」の塩素イオンが、正常な興奮性神経伝達を支えるために必須な要素であることを示唆しています。本研究成果は、Nature Neuroscience 誌2月号に掲載され、表紙および同号の News and Views 記事に取り上げられました。

はじめに

我々の脳の高次機能を支える神経細胞間のシグナル伝達は、神経細胞の接合部であるシナプスでおこなわれている。電気的なシグナルが神経終末に到達すると、電位依存性カルシウムチャンネルが開くことで神経終末内カルシウム濃度の一過性の上昇が起き、それがシナプス小胞膜と形質膜の融合を引き起こすことにより、シナプス小胞内腔に蓄えられた神経伝達物質が細胞外に放出される。放出された神経伝達物質は、隣接したシナプス後細胞に存在する特異的な受容体に結合することで、シグナルを伝達する。哺乳類の脳内には様々な種類の神経伝達物質が存在するが、大部分の神経細胞はグルタミン酸を興奮性神経伝達物質として用いる。当研究グループは、グルタミン酸をシナプス小胞内に輸送するタンパク質である小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT: Vesicular glutamate transporter) の分子同定以来¹⁾、VGLUT によるグルタミン酸輸送のメカニズムに興味をもって研究を進めてきた。今回、VGLUT 組換えタンパク質の再構成実験の結果から、シナプス小胞のグルタミン酸輸送機構について新しい概念を提唱するに至った²⁾。

シナプス小胞型トランスポーターの駆動力

VGLUT によるグルタミン酸輸送の話題に入る前に、まずは、その輸送の駆動力について簡単に説明した方がよいだろう (釈迦に説法かもしれませんが...)。一般に、神経伝達物質のシナプス小胞内腔への輸送は、シナプス小胞膜上にある液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) によって形成されるプロトン電気化学勾配によって駆動される。V-ATPase は、シナプス小胞のみならず、ライソソーム・エンドソーム・ゴルジ装置など様々なオルガネラに存在し、内腔の酸性化に関わっていることが知られているが、シナプス小胞での大きな役割は、神経伝達物質の輸送の駆動力を提供することである。

V-ATPase はプロトンを小胞内腔へ輸送することで、2つの異なる性質の勾配を形成する (図 1.a)。膜電位 ($\Delta\Psi$) と pH 勾配 (ΔpH) である。V-ATPase は起電性 (=electrogenic) であり、ATP の加水分解のエネルギーを

利用して、プロトンを小胞内腔に運ぶ。ここで重要なのは、V-ATPase によって輸送された H^+ が $\Delta\Psi$ の ΔpH のどちらの成分を形成するか? である。その問いに対する鍵は、オルガネラ膜の他のイオンに対する透過性が握っている。生体内では、陰イオンである塩素イオン (Cl^-) に対する透過性が特に重要である。 ΔpH 形成の度合いは、シナプス小胞をはじめ、エンドソーム、リソソームなど、所謂「酸性オルガネラ」を組織や細胞から精製し、pH 感受性蛍光色素であるアクリジンオレンジを用いた酸性化アッセイを用いて解析されてきた。これらのオルガネラに共通するのは、ATP を加えて V-ATPase を活性化させても、膜内腔の酸性化は殆ど起

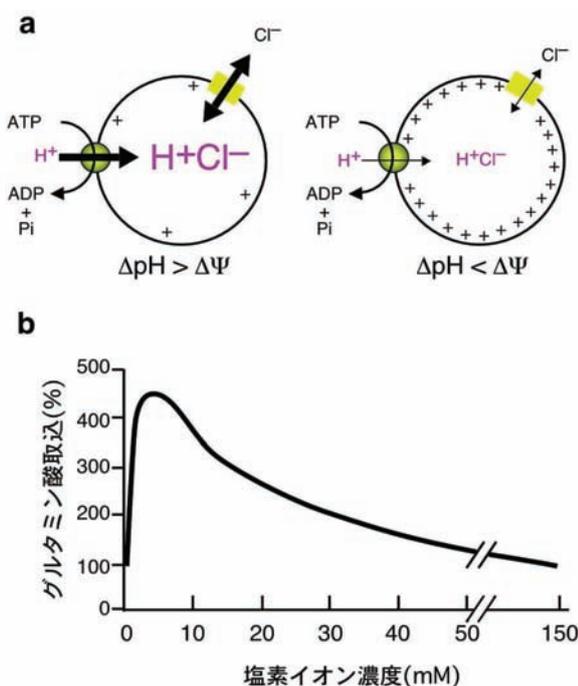


図1 シナプス小胞のグルタミン酸取込
a. プロトン電気化学勾配の形成 (本文参照)
b. グルタミン酸輸送における二層性の塩素イオン依存性

こらず、内腔側がポジティブな $\Delta\Psi$ が形成されるのに対し(図 1.a, 右)、高濃度の Cl^- を加えると強い酸性化が起こることである(図 1.a, 左)。すなわち、小胞外に Cl^- が存在しないと、実質の H^+ 流入は非常に限られており、その時内腔に運ばれた H^+ は膜電位勾配の形成に寄与する。それに対して、小胞外に Cl^- が存在すると、対イオンを得た H^+ が勢いよく内腔に流入し、 HCl が形成されることで内腔が大きく酸性化される。このことから、小胞膜には Cl^- の透過性を司る Cl^- チャネル、或いは、 Cl^- トランスポーターが存在し、その活性が $\Delta\Psi$ と ΔpH の制御に重要な働きをすることを考えられてきたが、その分子実体は明らかになっていなかった。

シナプス小胞へのグルタミン酸取込における不可解な Cl^- 依存性

シナプス小胞へのグルタミン酸取込活性は、1980年代になって生体脳から精製したシナプス小胞膜画分を用いて初めて捉えられた。その特徴は、低親和性であること($K_m \sim 1\text{-}2\text{mM}$)、グルタミン酸に特異的であること、V-ATPase 活性に依存することなどであるが、興味深いことに、小胞外の Cl^- 濃度に対して二層性の依存性を示す。すなわち、小胞外液に Cl^- が含まれない時には輸送活性が非常に低く、 $2\text{-}5\text{mM}$ の Cl^- 存在時に最大の活性を示す。更に Cl^- を増やすと徐々に輸送活性が減衰し、 150mM 存在時には活性が殆ど見られない(図 1.b)。グルタミン酸輸送が、V-ATPase が形成する $\Delta\Psi$ に依存するとすれば、高濃度の Cl^- 存在下でのグルタミン酸輸送の低下は $\Delta\Psi$ の減衰(= ΔpH の増加)で説明できるが、数 mM の Cl^- 存在下で最大の活性を示すことや、 $\Delta\Psi$ が最大となるはずの Cl^- 非存在下における低いグルタミン酸輸送活性を合理的に説明することはできなかった。数 mM Cl^- による輸送の活性化に関しては、 Cl^- イオンのVGLUT への直接結合による活性化とする説と、数 mM Cl^- により形成された至適な ΔpH がグルタミン酸輸送を活性化すると異なる説が唱えられて来たが、双方ともV-ATPase / VGLUT / Cl^- チャネルの3つのコンポーネントの相関をうまく説明するモデルとしては不十分であった³⁾。

シナプス小胞の Cl^- チャネル

シナプス小胞へのグルタミン酸取込における不可解な Cl^- 濃度依存性を解き明かすには、イオン・基質それぞれの輸送を司る分子の実体を知らなければならない。VGLUT が同定された現在^{1,4)}、問題となるのは、シナプス小胞膜上に存在する Cl^- チャネルの実体であろう。 Cl^- チャネルは、細胞表面の電位依存性 Cl^- チャネルが最初にクローニングされたが、その後イソ型が続々とクローニングされ、現在では哺乳類で9種類のイソ型が同定されている。その中の幾つかが細胞内膜に局在していることが徐々に分かってきた頃、筆者はThomas J. Jentsch 博士との共同研究で、脳で豊富に発現しているCIC-3のノックアウトマウスを用いて、「CIC-3=シナプス小胞の Cl^- チャネル仮説」の検証を行う機会に恵まれた⁵⁾。興味深いことに、CIC-3 ノックアウトマウスから得られたシナプス小胞画分では、野生型マウスのシナプス小胞

画分に比べて、 Cl^- の透過性が50%程度減少していることが分かった⁵⁾。しかしながら、CIC-3 ノックアウトマウスのシナプス小胞では、 Cl^- 透過性だけでなく、グルタミン酸輸送活性・VGLUT1 タンパク質の量も同様に半減していることが分かった⁵⁾。それだけではない。更に、CIC-3 ノックアウトマウスのシナプス小胞において、グルタミン酸輸送における Cl^- 濃度の影響を調べてみると、野生型と同様であることが分かった。この実験結果は、もしCIC-3 がシナプス小胞の Cl^- チャネルであるとする「奇妙」である。CIC-3 がシナプス小胞の Cl^- 透過性を司りV-ATPase が形成するプロトン電気化学勾配に影響を与えるとすれば、CIC-3 を欠損したシナプス小胞におけるグルタミン酸輸送活性にもなんらかの影響を与えてしかるべきである(具体的には、 Cl^- が通らないと ΔpH が形成されないため、 Cl^- 濃度が高い時のグルタミン酸輸送阻害がなくなることが予想される)。加えて、Edwards らは、VGLUT1 を過剰発現させたPC12細胞由来の分泌小胞は、対照群に比べて高い Cl^- 透過性を示すことを報告した⁴⁾。つまり、VGLUT1 がシナプス小胞の Cl^- 透過性の全てを担う分子であるかどうかは定かではないが、VGLUT1 タンパク質自体が Cl^- 透過性の分子実体である可能性が提示されたのである。これらの結果を総合すると、CIC-3 ノックアウトマウスのシナプス小胞でみられた Cl^- 透過性の低下は、CIC-3 の欠損に起因するのか、はたまたVGLUT1 発現量(あるいはVGLUT1 陽性小胞数)の半減に起因するのか結論づけることはできない。蛇足であるが、用いたノックアウトマウスでは、脳において夥しい細胞変性を呈し、特に生体脳では、VGLUT1 を強く発現している海馬が完全に消失している。

VGLUT1 ノックアウトマウスの解析

前置きが長くなったが、今回の論文の内容に移ろう。我々は、上記に記した様な、シナプス小胞へのグルタミン酸取込過程を更に理解するには、シナプス小胞膜上において「 Cl^- 透過性を担う分子」を同定することが重要であると考えた。そこで、今回の論文では、CIC-3 ノックアウトマウスの再検討に加えて、新たにVGLUT1 ノックアウトマウス⁶⁾の解析を行った。その結果、VGLUT1 ノックアウトマウス由来のシナプス小胞は、 Cl^- 依存性の酸性化が顕著に低下した(図 2.b)。生後3週目のサンプルよりも8週目のサンプルの方が、更に低下傾向が顕著であった。これは、2-3週目以降にVGLUT1 の発現が増え、もう一つのメジャーなVGLUT イソ型であるVGLUT2 の発現ニューロンの割合が減っているというDevelopmental なVGLUT イソ型発現変化と矛盾しない。これらのサンプルでは、CIC-3 タンパク質量には変化がなかった(図 2.c)。では、CIC-3 ノックアウトマウスの以前の実験結果をどう解釈するべきか?可能性として、海馬が完全に消失した成体脳のサンプルでは、野生型マウス脳と比較してVGLUT1 の量に関してなんらかの違いがあり、酸性化アッセイで得られた実験結果は、その副次的な効果を見ていることが挙げられる。そこで、海馬の変性・消失が始まる前の若い週齢(2-3週齢)のCIC-3 ノックアウトマウスの脳を用いて、同様の実験を行ったところ Cl^- の

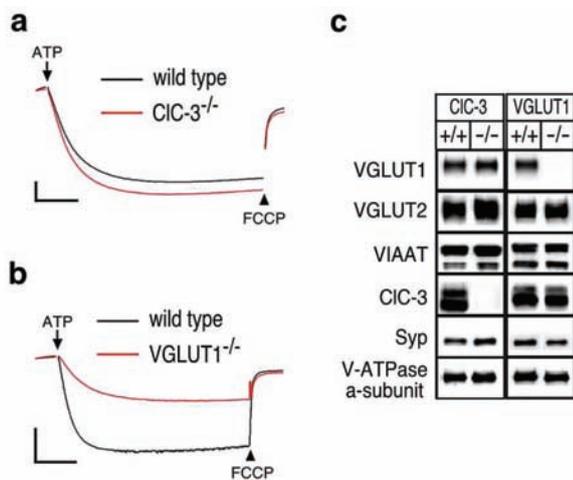


図2 CIC-3 ノックアウトマウスと VGLUT1 ノックアウトマウス由来のシナプス小胞における Cl⁻ 透過性
 a. 3 週齢 CIC-3 ノックアウトマウスのシナプス小胞では、Cl⁻ 透過性は正常である。
 b. 3 週齢 VGLUT1 ノックアウトマウスのシナプス小胞では、顕著な Cl⁻ 透過性の低下が見られる。
 c. 両ノックアウトマウスのシナプス小胞におけるタンパク質の発現。

透過性は正常であるばかりでなく(図 2, a)、VGLUT1 の減少も見られず(図 2, c)、グルタミン酸の取込も正常であった。更に、1 小胞当たりの CIC-3 タンパク質のコピー数を試算したところ、VGLUT1 が 1 小胞あたり 10 個程度存在するのに対し⁷⁾、CIC-3 は 1 小胞あたり 0.002 個しか存在しないという数字を得た。つまり、僅か 500 個につき 1 コピーの割合である。これでは、シナプス小胞全般が有すると考えられてきた Cl⁻ 透過性の責任分子として、CIC-3 は明らかに失格である。以上の実験結果を総合すると、「VGLUT=シナプス小胞の Cl⁻ チャンネル説」が浮上した。

VGLUT1 の人工脂質膜への再構成

VGLUT1 の Cl⁻ 透過性を支持するこれまでの実験データは、全て組織或いは細胞から得られた膜画分を試料として得られている。そこで、我々は、VGLUT1 タンパク質自身が Cl⁻ 透過性を示すことを更に確実な方法で証明するために、組換え VGLUT1 タンパク質を人工脂質膜(リポソーム)に再構成する方法を用いることにした。tsA201 細胞に streptavidin-binding peptide をタグとして結合させた VGLUT を一過性に発現させ、Streptavidin ビーズを用いたアフィニティー精製により組換え VGLUT1 タンパク質を得(図 3, a)、プロトン電気化学勾配の供給源として Thermophilic Bacillus sp. PS3 の ATP シンターゼ(T-F₀F₁, His-タグを付したもの)(図 3, a)を用いた。この ATP シンターゼは、本来プロトンの外向きの移動により、ATP を合成する酵素であるが、リポソームに再構成し、ATP 存在下で K⁺ イオノフォアである Valinomycin を添加した時のみ内腔の酸性化を示す性質は、V-ATPase と類似している。T-F₀F₁ のみをリポソームに再構成し、外液に 100mM の Cl⁻ を加えても内腔の酸性化は見られないのに対

し、T-F₀F₁ と VGLUT1 を一緒にリポソームに再構成させると、外液に 100mM の Cl⁻ を添加すると、内腔の酸性化が検出された(図 3, b)。この酸性化は、リポソーム内液の陰イオン組成(acetate, gluconate, Cl⁻)に関係なく観察されることから、VGLUT1 が T-F₀F₁ のプロトンポンプ活性と共役した Cl⁻ 流入を可能にする Cl⁻ 透過性を担っていることが明らかになった。

VGLUT1 の Cl⁻ 透過性とグルタミン酸輸送活性の関係

上記のことから、VGLUT1 タンパク質はグルタミン酸輸送能と Cl⁻ 透過性の 2 つの性質を内含している。では、この 2 つの活性の相関性は如何なるものであろうか? つまり、具体的には、シナプス小胞によるグルタミン酸輸送で見られる「二層性の Cl⁻ 濃度依存性」は、VGLUT が持つ Cl⁻ 透過性で説明できるのであろうか? また更に、従来のシナプス小胞や VGLUT 過剰発現細胞分泌顆粒を用いた研究では、小胞外(=細胞質側)の Cl⁻ 濃度の影響が記述されてきたが、もし VGLUT タンパク質が方向に関係なく Cl⁻ を透過させるとしたら、小胞内の Cl⁻ 濃度がグルタミン酸輸送に如何なる影響を及ぼすのか? という疑問が挙げられる。正確な測定はされていないが、シナプス終末の細胞質における Cl⁻ 濃度は数 mM ~ 20mM 程度と言われている。それに対して、細胞外液中には 130mM 程の Cl⁻ が含まれており、シナプス小胞が形質膜からのエンドサイトーシスで合成されることを考え合わせると、シナプス小胞が出来上がった時には、細胞質に比べて非常に高い濃度の Cl⁻ を内腔に含むはずである。その高濃度の小胞内 Cl⁻ がグルタミン酸輸送に与える影響も VGLUT タンパク質をリポソームに再構成する実験系で検証可能性である。

そこで、我々はまず始めに、100mM の gluconate を含むバッファーと 100mM の Cl⁻ を含むバッファーで VGLUT を再構成し、グルタミン酸取込に最適と言われている 4mM

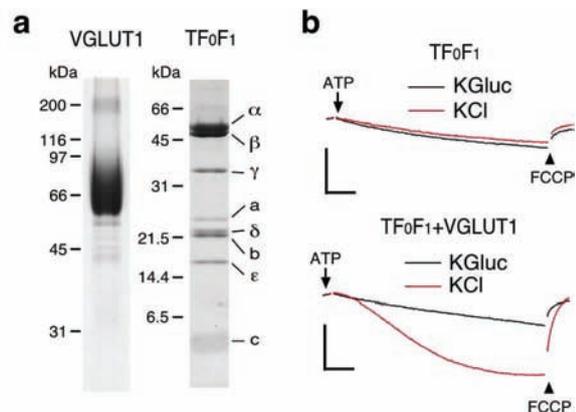


図3 組換え VGLUT1 タンパク質は Cl⁻ 透過性を示す。
 a. 再構成実験に用いた VGLUT1 (左)とプロトンポンプ(TF₀F₁; 右)のクマシーブルー染色像
 b. VGLUT1 リポソームは Cl⁻ 透過性を示す。小胞外に 100mM の KCl を加えた時、プロトンポンプのみ(上)では酸性化は起こらないが、プロトンポンプと VGLUT1 を共に再構成した時は、内腔の酸性化が起きる(下)。

の塩素イオンを含むバッファー中でグルタミン酸輸送活性を調べてみた所、高濃度の Cl^- を含む VGLUT リポソームは、 Cl^- を含まない VGLUT リポソームに比べて約3倍、グルタミン酸輸送活性が高いことが分かった(図 4, a)。輸送のキネティクスを調べると、 K_m 値は両条件間で大差がないものの ($K_m=1 \sim 2\text{mM}$)、 V_{\max} は Cl^- を含むリポソームが約3

倍の値を示した。これらの結果から、リポソーム内腔に高い Cl^- が存在すると、VGLUT によるグルタミン酸輸送は速くなり、より多くのグルタミン酸を取り込むことが分かった(実際には、 Cl^- 含有リポソームで輸送が飽和する所は見えていないが、最長2時間まで計測した所、取り込まれたグルタミン酸量の両者の差は開く一方であった：未発表データ)。

では、従来精製したシナプス小胞で見られた「外側」の Cl^- 濃度の二層性の影響は、VGLUT リポソームで再現できるであろうか？また、VGLUT の Cl^- 透過性の性質で合理的に説明可能であろうか？更に、「内側」の高濃度の Cl^- が影響を及ぼすのであろうか？これらの疑問に答える為に、リポソーム再構成の後、アッセイメディウム中の Cl^- 濃度を变化させた時のグルタミン酸輸送活性を測定した結果が図 4, b である。まず、 Cl^- を含まないリポソーム(図中 100Gluc $^-$)は、シナプス小胞と同じ小胞外 Cl^- に対する依存性を示すことが分かる。つまりシナプス小胞で見られる外液中の Cl^- の影響は、V-ATPase と VGLUT の2つのコンポーネントだけで起こることを示唆している。それに対して高濃度の Cl^- を含むリポソーム(図中 100 Cl^-)では、100Gluc $^-$ のリポソームに比べて常に高いグルタミン酸輸送活性を示すだけでなく、小胞外 Cl^- 濃度の効果も異なる。4mM Cl^- による活性の上昇と高濃度の Cl^- での活性の減衰の傾向は見られるものの、外液中に Cl^- が存在しない時には、100Gluc $^-$ リポソームに比べて約10倍の輸送活性を示す。つまり、小胞内に高濃度の Cl^- が存在すると、 $\Delta\psi$ が最大となる条件である小胞外 Cl^- 非存在下でも高いグルタミン酸輸送活性を示すことが明らかになった。図 4, c では、基質であるグルタミン酸の濃度を生理条件に近い 5mM に設定した時の実験結果であるが、小胞外 Cl^- の効果は類似しているものの、内腔陰イオンによる輸送活性の差は更に大きくなる傾向が見られた。

では、 Cl^- を含むリポソームと含まないリポソームのグルタミン酸輸送活性の大きな違いは、何に起因するのであろうか？我々は、次に同じ実験を K^+/H^+ 交換体である nigericin 存在下で行った(図 4, b と c, 点線)。Nigericin 存在下では V-ATPase によって内腔に運ばれた H^+ が即座に小胞外の K^+ と交換されるため、V-ATPase は常に $\Delta\psi$ を形成し、 ΔpH は形成されない。この条件でグルタミン酸輸送を計測した所、100 Cl^- リポソームと 100Gluc $^-$ リポソーム間ではっきりとした違いが観察された。すなわち、100Gluc $^-$ リポソームにおいては、nigericin 存在下では、小胞外 Cl^- 濃度に関係なくグルタミン酸輸送活性が顕著に低下するのに対し(輸送が ΔpH に有意に依存していることを示す)、100 Cl^- リポソームでは、小胞外 Cl^- が低い状態では、有意な残存活性を示すことが分かった。特に、小胞外に Cl^- が存在しない場合は、nigericin による活性阻害は殆どないこと、つまり、小胞内 100 Cl^- 小胞外 0 Cl^- の時のグルタミン酸輸送は、 $\Delta\psi$ に完全に依存した輸送であることが判明した。小胞外 0 Cl^- の条件では、グルタミン酸輸送活性が小胞内 Cl^- 濃度に依存することから、小胞内 Cl^- はあたかもグルタミン酸輸送の基質として働くか(exchange)、もしくは Cl^- の外向きの濃度勾配がグルタミン酸輸送の駆動力として働いていることを示唆している。

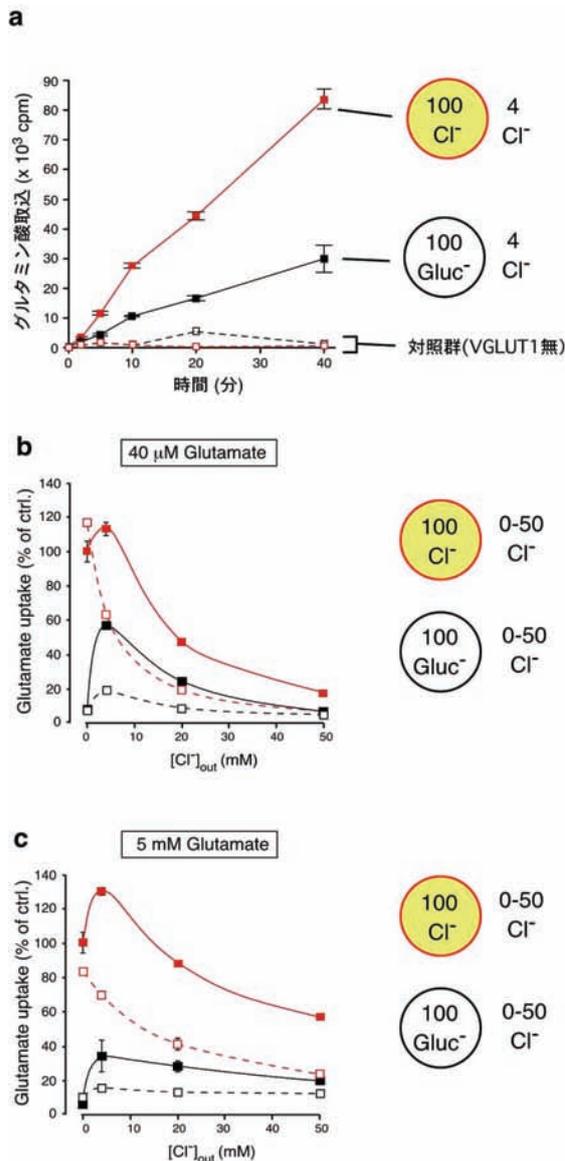


図4 VGLUT1 リポソームのグルタミン酸輸送活性と小胞内外の Cl^- 濃度の相関

- リポソーム内の陰イオン組成がグルタミン酸輸送に与える影響。100mM Cl^- を含むリポソームの方が Cl^- を含まないリポソーム(100 Gluc $^-$) よりも高い活性を示す。
- 高濃度の Cl^- を含むリポソームは $\Delta\psi$ を利用してグルタミン酸を輸送する。100mM Cl^- を含むリポソーム(赤実線)は 100mM Gluc $^-$ を含むリポソーム(黒実線)に比べて、全ての小胞外 Cl^- 濃度においても高いグルタミン酸輸送活性を示す。 Cl^- を含むリポソームでは、Nigericin 非感受性の輸送活性が見られる。特に小胞外 Cl^- 濃度が低い時に明らかである。
- b と同様の実験を生理的なグルタミン酸濃度 (5mM) で行った結果。小胞外 Cl^- 濃度の影響が b より小さい。

VGLUT による2つの輸送機構

上記に示した実験結果から、シナプス小胞のグルタミン酸取込機構に関して、以下の新しい概念を提唱した。

(1) VGLUT は膜電位勾配のみでグルタミン酸を効率的に輸送できるが、そのためには、小胞内に電荷を補填するための陰イオンの流出が必要である。シナプス小胞がエンドサイトーシスで作られた時に小胞内腔に取り込まれた Cl^- が電荷補填役の陰イオンであり、VGLUT 自身が持つ Cl^- 透過性によって、この機構は支えられている(図 5a, 右)。

(2) 小胞外に透過性の陰イオンが存在する場合、VGLUT は ΔpH を駆動力としてグルタミン酸を輸送できる。無論、この時は H^+ /グルタミン酸交換体として働く(図 5a, 左)。この時の ΔpH も VGLUT の Cl^- 透過性があるからこそ形成される。従来、シナプス小胞で見られた数 mM Cl^- による活性化も、恐らくこの機構によるものである。

(3) 数 mM Cl^- による輸送の活性化は Cl^- の直接結合による VGLUT タンパク質の修飾ではない。Nigericin 存在下で ΔpH を消失させた場合、小胞外の Cl^- は輸送を阻害すると

いうことは、この成分は ΔpH による輸送の活性化と考えた方が妥当である(左記(2)にも関連)。更に、小胞外の Cl^- を増加させた時に見られるグルタミン酸輸送の減衰は、従来提唱されていた $\Delta\psi$ の減少によるものではなく、小胞外の Cl^- がグルタミン酸輸送に競合的に阻害している為であると考えられる。Nigericin により ΔpH を消失させた場合にも、小胞外の Cl^- による輸送阻害が見られることから明白である。

これらの知見が、脳から精製したシナプス小胞を用いた実験から得られなかった理由は、以下の通りであろうと推測できる。生体脳内で、グルタミン酸の充填が完了したシナプス小胞は、おそらく既に Cl^- を失っている(図 5b)。その小胞画分を幾ら沢山集めてきても、小胞内 Cl^- に依存する輸送機構は検出されるはずがないのである。近年、pH 感受性の蛍光タンパク質技術を用いた実験でシナプス小胞内の pH は約 5.5 程度であると予想されている。pH ~ 5.5 というのは、数 $10\mu\text{M}$ のオーダーであり、シナプス小胞の大きさ(直径約 40nm)を考え合わせると、ものの数個しかない。 H^+ /グルタミン酸交換体のモードで取り込まれたグルタミン酸は H^+ を対イオンとして酸として存在し、この pH に寄与すると考えられるが、その数は非常に限られている。従って、生体内のシナプス小胞では、グルタミン酸は今回の研究結果で見つかった Cl^- /グルタミン酸交換体として取り込まれたナトリウム塩として存在していると考えられる(厳密には、典型的な exchanger/antiporter とは異なる可能性は残されている)。グルタミン酸と Cl^- のストイキオメトリーは不明であるが、もし 1:1 であれば、今回新しく提唱した輸送モードでは、浸透圧が維持される、pH の急激な低下がおこらない、グルタミン酸の不溶化が起こり得ないなど、生理学的な見地からも合理的な面が多い。以上を考え合わせ、今回我が提唱した新しい概念を図 5 に示した。

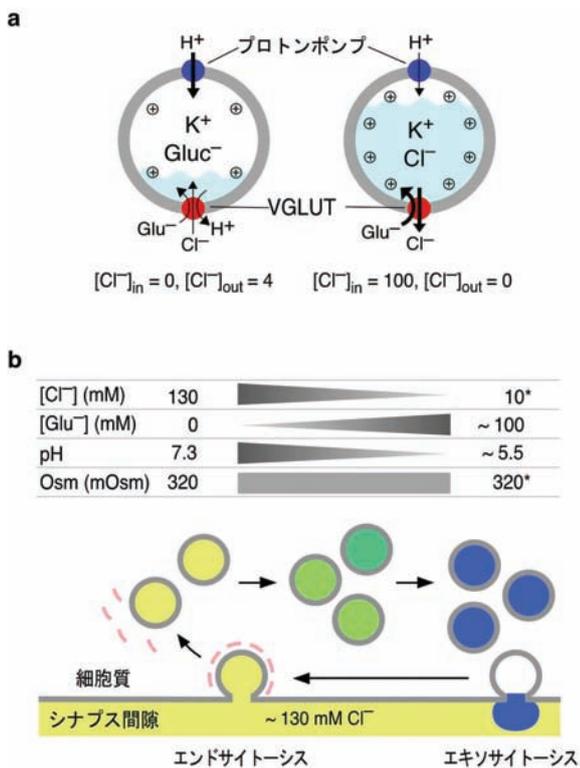


図 5 VGLUT が司るグルタミン酸輸送のワーキングモデル
a. 小胞内に高濃度の Cl^- が存在すると、VGLUT は Cl^- /グルタミン酸交換体として働き、主に $\Delta\psi$ を利用してグルタミン酸を輸送する(右)。それに対して、小胞内に Cl^- がいない場合は、 H^+ /グルタミン酸交換体として働き、主に ΔpH を利用してグルタミン酸を輸送する(左)。生体内では、主に右の様式で輸送しているため、小胞内腔でのグルタミン酸は、グルタミン酸塩として存在する。
b. エンドサイトーシスとグルタミン酸取込の関係。シナプス小胞がエンドサイトーシスで新たに合成される時、高濃度の Cl^- を含んだ細胞外液を内腔に取り込む。高い Cl^- を含むシナプス小胞は、a 右図の様式で、 Cl^- を排出しながら細胞質のグルタミン酸を取り込むことで高濃度のグルタミン酸を貯蔵できる。

おわりに

今回発表した論文の内容をかいつまんで紹介させていただきました。紙面の都合もあり、また多少専門的すぎる記述も含まれ、理解しにくい面があったかもしれませんが、少しでもご興味を持たれた方には、ここに挙げた幾つかの参考文献と原著にあたっただけであれば、この拙文も報われます。今回の発見は、シナプスの生理学という学問で長らく謎であった題材に“ひさしぶり”にメスを入れたものと自負しておりますが、実はそれ以外の側面も持っております。御周知の方も多いと思いますが、近年、タンパク質構造生物学の分野で、「トランスポーター分子内のイオンチャネル活性」というのが話題になっております。従来型のトランスポーターとチャネルという単純な分類では記述が困難な“leak”といわれる現象です。恐らく、我々が今回捉えた VGLUT の Cl^- 透過性も、この leak の一種だと考えています。今後も VGLUT の研究を通じて、脂質二重膜を分子が通過するメカニズムの原理解明に、多少なりとも貢献できるように努力したいと思います。

参考文献

1. Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C. & Jahn, R., Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**, 189-194 (2000) .
2. Schenck, S., Wojcik, S.M., Brose, N. & Takamori, S. A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat. Neurosci* **12**, 156-162 (2009) .
3. Edwards, R.H. The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* **55**, 835-858 (2007) .
4. Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Fremneau, R.T., Jr. & Edwards, R.H. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**, 957-960 (2000) .
5. Stobrawa, S.M. et al. Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* **29**, 185-196 (2001) .
6. Wojcik, S.M. et al. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7158-7163 (2004) .
7. Takamori, S. et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846 (2006) .

興奮性神経伝達で 脳内塩素イオンが重要な役割

東医歯大の研究グループが発見

主にグルタミン酸によって行われる興奮性神経伝達と、主にGABA(ガンマアミノ酸)によって行われる抑制性神経伝達に大別される。

後者において、脳内塩素イオンが重要な役割を果たしていることは解明されていたが、興奮性神経伝達に果たす役割となると全くと言ってよいほど未解明であった。

グルタミン酸は生体内の全ての細胞に普遍的に存在する必須アミノ酸の一つ。ほ乳類脳内では、およそ70%の神経細胞が、興奮性神経伝達物質として、記憶・学習、知覚・認知、運動制御に利用されている。東京医科歯科大学脳統合機能研究センターの高森茂雄准教授、ステファン・シェンク氏の研究グループは、グルタミン酸の輸送を行うVGLUT(小胞型グルタミン酸トランスポーター)が働くためには、細胞外の塩素イオン濃度が高く保たれる必要があることを見出すことに成功した。

脳内のシナプス伝達は、

興奮性神経伝達と、主にGABA(ガンマアミノ酸)によって行われる抑制性神経伝達に大別される。

後者において、脳内塩素イオンが重要な役割を果たしていることは解明されていたが、興奮性神経伝達に果たす役割となると全くと言ってよいほど未解明であった。

これにより小胞内に高濃度の塩素イオンがないとVGLUTによるグルタミン酸輸送がうまくいかないことが分かった。神経細胞で新しく形成されたシナプス小胞の内側は、塩素イオンを多く含んだ細胞外液で満たされている。

それだけに、今回の発見は、細胞外の塩素イオンが正常な興奮性神経伝達を支えるために重要なことを示唆している。特に、グルタミン酸神経伝達の破綻は、アルツハイマーや統合失調症などの脳神経疾患を引き起こすといわれているだけに、脳内の塩素イオン濃度を制御する方法ができれば、新たな治療戦略が展開できるものと期待される。

高森准教授の話「今回初めて生化学的に脳内塩素イオンの動きをとらえることができました。それにより、なぜこのような役割を果たしているのか、その構造を解く意味がでてきたことになりました。今後、そこにトライしていきたい」

エネルギー代謝と体温調節：ショウジョウバエ低温選択性変異体 *atsugari* から学ぶこと

梅田 真郷(AO2 公募班)

京都大学化学研究所 超分子生物学研究領域

はじめに

体温は、酸素、水、食物と共に生物の体内環境を決定する最も重要な因子の一つですが、個体に至適な体温がどのようにして決まり、維持されているのか、その分子レベルでのメカニズムは未だ明らかにされていません。最近になり、TRPチャンネルを始めとする温度センサータンパク質が次々と同定され、体温調節機構の一端が明らかにされつつあります^{1,2)}。一方、体温は、生物が進化の過程で獲得した食性とエネルギー代謝系、温度環境や気候風土とも密接に関連しており、またその生物が生存できる土地を決める大きな要因でもあります。生物はエネルギー状態を含めた体内環境をいかに把握・統合し、状況に応じた至適な体温を決めているのだろうか？「暑がり」と「寒がり」はどう違うのだろうか？このような疑問に答えるべく、ショウジョウバエ幼虫の体温調節行動に着目して研究を開始しました。

恒温動物と変温動物

生きているということは、常に物質の化学変換いわゆる新陳代謝を行っていることであり、この反応には必ず熱の産生が伴います。鳥類や哺乳類などのいわゆる恒温動物は、高水準の代謝と熱産生を行うことにより体温(核心部体温)を狭い範囲に保つ精密な制御機構を発達させた生物であり、エネルギー的にはきわめて贅沢な方法をとっています。一方、無脊椎動物、魚類、両生類、爬虫類などのいわゆる変温動物は、通常時は体内の熱産生の水準が低いため、寒冷にさらされた時には代謝と体温は下降します。したがって変温動物の体温調節は主に環境との熱交換により行われていますが、必要に応じて体の移動により太陽からの放射熱を吸収したり、運動により熱産生を上昇させたり、あるいは集団を作るなど様々な方法により体温を調節しています。このような体温調節の方法を行動性体温調節と呼びます。従来、変温動物は環境温の変動に応じて体温が大きく変化することから、哺乳動物のような精密な体温調節システムを備えていない印象を与えがちでした。しかし、実際には様々な生物が我々の想像を絶する温度検知能力と体温調節システムを有していることが報告されています。例えば、細胞性粘菌の集合した多細胞体は、 $0.009^{\circ}\text{C}/\text{cm}$ のわずかな温度勾配を検知して温度域を選択する行動をとります³⁾。この生物では、微小な温度変化を分子運動のゆらぎとして検知して増幅し、化学情報へと変換、行動へと導く特異なシステムが備

わっていると考えられますが、その実体は明らかではありません。

ショウジョウバエの温度選択行動

我々は、ショウジョウバエを実験材料として選び、研究を開始しました。その主な理由の一つとして、ショウジョウバエの膜脂質組成が他の動物と違ってとてもユニークな点、また脂質合成系も *C.elegans* 等の他の動物に比べ非常に単純であり、多くの脂質を食餌中から摂取して利用していることが挙げられます⁴⁾。これまで、細胞膜上での脂質分子の動きとその生物機能を研究してきましたが、膜脂質研究の観点からもショウジョウバエは極めて魅力的な生物でした。まず、ショウジョウバエ幼虫の温度選択行動を定量的に測定する装置を開発し、ショウジョウバエ幼虫がその飼育温度に依存した厳密な温度選択性を示すことを見出しました。また、サーモグラフィー観察によりショウジョウバエ幼虫の体温は、その選択した温度と一致することも示されました。古くから、動物が低温環境で生育すると膜脂質の脂肪酸の不飽和結合が増加し、膜流動性を一定に保ついわゆる恒流動性適応が観察されます。それでは、膜脂質を低温状態のように変化させた場合に温度選択行動は変化するのでしょうか？我々は、まずショウジョウバエを完全合成培地で、さらに腸内細菌等の微生物由来の脂質の影響を除くために無菌的に飼育する方法を確立しました。さらに、食餌中に様々な脂質を添加することにより膜脂質組

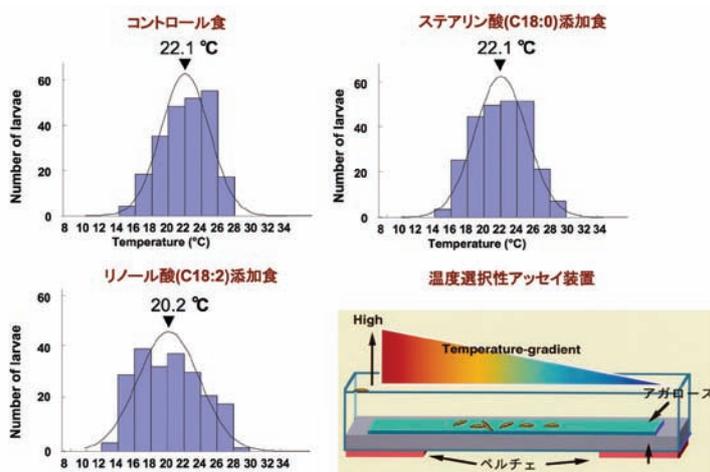


図1 温度選択性アッセイ装置と各種脂肪酸メチルエステルを添加した合成培地で飼育したショウジョウバエ3齢幼虫の選択温度の分布とその中央値

コントロール食：脂肪酸を含まない完全合成培地
ステアリン酸(C18:0)添加食：1%のステアリン酸メチルエステルを添加した合成培地
リノール酸(C18:2)添加食：1%のリノール酸メチルエステルを添加した合成培地
リノール酸添加培地で飼育した幼虫の選択温度は、コントロール食、ステアリン酸添加培地に比べ2℃程低温側にシフトしている (p 値 < 0.0001)

成を変化させた際の選択温度に及ぼす影響を検討しました。その結果、ショウジョウバエ幼虫の選択する温度は、餌の種類や含まれる脂質によって微妙に、かつ再現性よく変化することが明らかとなりました。例えば、リノール酸(C18:2)を加えた培地で飼育すると、膜脂質中のリノール酸含量が顕著に増加し、幼虫の選択温度はコントロール培地やステアリン酸(C18:0)添加培地で飼育した場合より、2℃程低温側の領域にシフトします(図1)。この膜脂質と温度選択性の変化のメカニズムは未だ明らかではありませんが、電子スピン共鳴(ESR)解析により膜流動性の有意な亢進が観察されることから、温度知覚に関わるTRPチャネルの開閉制御に何らかの影響を与えている可能性が考えられました。現在、膜脂質の脂肪酸の不飽和化を制御する脂肪酸不飽和化

酵素の発現不全個体や他動物の脂肪酸不飽和化酵素を導入した形質転換個体の作製が終わり、さらなる解析を進めようとしております。

これら一連の予備的な解析により、ショウジョウバエ幼虫が体内の状態の変化を何らかのかたちで検知し、緻密に選択温度(体温)をコントロールしていることが明らかとなりました。

低温選択性変異体 *atsugari* の樹立と解析

次に、上記の温度選択性の分子機構を明らかにするために、トランスポソンの1種であるP因子を挿入することにより温度選択性に異常を来したショウジョウバエ突然変異体のスクリーニングを行いました。その結果、低温域を

好む変異体 *atsugari* (図2)、高温域を好む *samugari*、温度に対する感受性が低く高温および低温域に分散して分布する *atsusashirazu* 等の変異体を同定することができ、そのうち低温選択性変異体 *atsugari* (*atu* 変異体)についてさらに詳細な解析を進めました⁵⁾。まず、*atu* 変異体が、運動性、走光性、味覚応答性など他の知覚系には異常がないことを確認し、原因遺伝子の解析の結果、ジストログリカンの発現調節部位にP因子が挿入した低発現変異体(標準株の約1/7の発現量)であることが示されました。また、*atu* 変異体と類似したゲノム部位にP因子が挿入した他の変異体でも低温選択性が認められること、*atu* 変異体にジストログリカンを遺伝子導入することにより温度選択性が正常なレベルに回復すること、RNA干渉により標準株においてジストログリカンの発現を抑制すると低温選択性を示すことなど、一連の分子遺伝学的解析によりジストログリカンの発現低下により低温選択性が誘導されることを確認しました。

ジストログリカンは、細胞外マトリックスと細胞骨格を結びつける膜糖タンパク質であり、デュシャンヌ型筋ジストロフィーの研究により筋繊維膜の安定性に関与していることが示唆されているタンパク質でした。遺伝学的な因果関係は比較的順調に解決できたのですが、難問として残ったのは、なぜジストログリカンの発現低下が低温選択性を誘導するのか?ということでした。最近になり、TRPチャネルの発現不全によりショウジョウバエの温度選択行動に異常を来することが報告されましたが^{6,7)}、当初、我々もジストログリカンの発現不全がグリア系の細胞に強く発現することから、神経系に着目しTRPチャネルの発現異常、温度知覚神経の形成不全など様々な観点から検討し

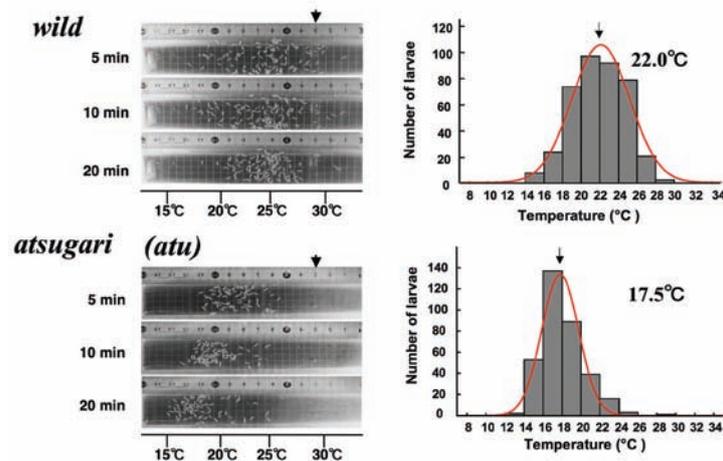


図2 野生株と *atu* 変異体の選択温度の分布
atu 変異体は野生株(標準株)に比べ、4℃ほど低温を選択する (p 値 < 0.0001)

ショウジョウバエの身体検査

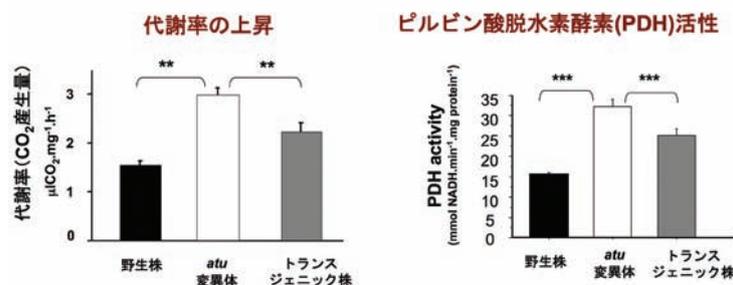
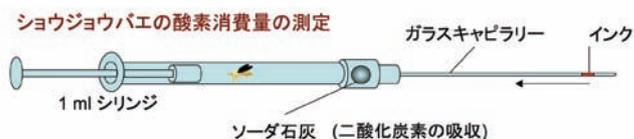


図3 *atu* 変異体における代謝率およびピルビン酸脱水素酵素(PDH)活性の亢進
代謝率の測定: 代謝率の測定は、1ml注射筒に10匹の3齢幼虫を入れ、25℃、30分間に産生されるCO₂をSoda lime(ソーダ石灰)で吸収することにより測定した。
PDH活性測定: 3齢幼虫よりミトコンドリア画分を調製し、反応液中のNADH産生をモニターすることにより測定した。
atu 変異体は野生株(標準株)に比べ、代謝率ならびにPDH活性ともに2倍に上昇し、*atu* 変異体にジストログリカンを発現誘導することによりそれぞれ有意に(代謝率 p < 0.01; PDH活性 p < 0.001)低下した。

ました。しかし、解決の糸口が見つからず、数年の悪戦苦闘を強いられることになりました。

この問題を解決する契機となったのが、*atu* 変異体が低温選択性ばかりでなく著しい低温耐性をも示すことを見出したことでした。低温耐性は温度選択性とは全く異なる温度応答と考えられており、特に変温動物では個体の代謝レベルを変えることにより様々な温度ストレスに対処することが報告されていました。そこで、*atu* 変異体の代謝率を自作の装置で測定してみると、標準株に対して約2倍に上昇していることが明らかになりました(図3)。さらに、本研究

領域の森泰生先生、清中茂樹先生の協力を得て一連の解析を進めた結果、ジストログリカンの発現低下によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、それが引き金となってピルビン酸脱水素酵素(PDH)の活性化を介する酸化的リン酸化の亢進によりエネルギー代謝の上昇が引き起こされていることが明らかとなりました。遺伝学的に PDH の活性化を抑制することにより、また酸化的リン酸化の阻害剤の投与により *atu* 変異体の低温選択性が解消することから、エネルギー代謝亢進により低温選択性が誘導されていることが示されました。低温域に移動することにより *atu* 変異体の代謝レ

ベルが標準個体と同等のレベルまで低下することから、*atu* 変異体の低温選択行動は亢進したエネルギー代謝を抑制する適応行動とも考えることが出来ます。次に、ショウジョウバエ幼虫が何を指標にエネルギー代謝の亢進を知覚しているのか、について検討を進めました。その結果、糖代謝の関与は少なく酸化的リン酸化の亢進が重要であること、さらに *atu* 変異体を数十分ほど高酸素状態に曝すと、その低温選択性が解消することが示されました。また、*atu* 変異体には低酸素応答が認められないことから、これまで報告されている低酸素状態で体温低下とは異なる反応であることが明らかとなりました⁸⁾。要約すると、ショウジョウバエ幼虫は、酸素濃度の変化を指標に体内のエネルギー代謝レベルを把握し、適正な温度環境を選択している(体温調節をしている)ことが明らかとなりました(図4)。

atu変異体における低温選択行動の誘導メカニズム

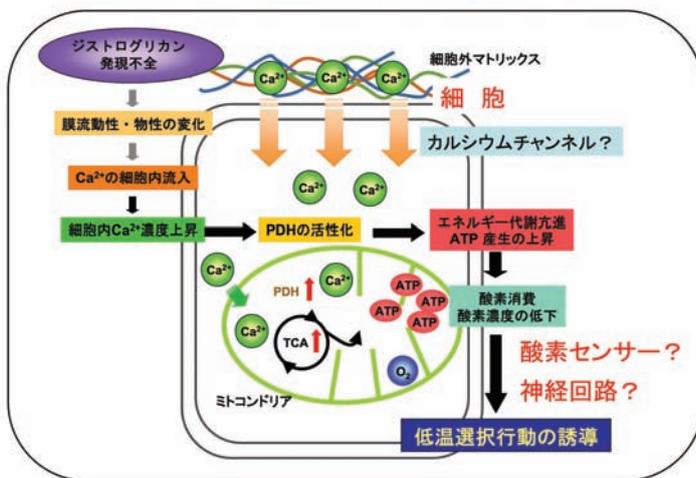
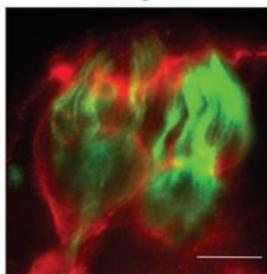


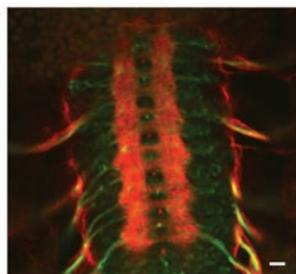
図4 *atu* 変異体における低温選択行動の誘導メカニズム

atu 変異体においては、ジストログリカンの発現低下によって細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度が上昇し、それが引き金となってエネルギー代謝の亢進が起き、酸素の要求性が高まることにより低温選択行動が誘導されることが明らかとなった。

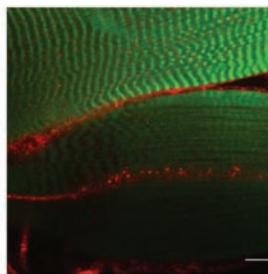
antennomaxillary complex



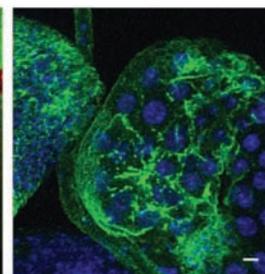
ventral nerve cord



muscles



ring gland



赤: ジストログリカン 緑: ニューロン

緑: ジストログリカン 青: 核

ring glandでのジストログリカンの発現抑制により低温選択性が誘導される

control: 22.1 ± 3.1 °C (N=4, n=121)
fat body: 23.8 ± 2.5 °C (N=4, n=109)
ring gland: 20.1 ± 3.3 °C (N=5, n=109)

図5 ジストログリカンのショウジョウバエ組織における発現

ショウジョウバエ・ジストログリカンに対する特異的抗体を作製し、ジストログリカンの組織分布を観察した。ジストログリカンは、各種グリア系および上皮系細胞、骨格筋、内分泌器官である ring gland(環状腺)に強く発現している。ジストログリカン dsRNA 導入個体を作製し、各種 GAL4 ドライバー個体と掛け合わせることで、組織特異的にジストログリカンの発現を抑制し、温度選択性へ及ぼす影響を観察した。これまでの解析では、ring gland での発現を抑制した場合にのみ有意に低温選択性が誘導された(標準株の選択温度: 22.1 ± 3.1 °C (N=4, n=121); 脂肪体での発現抑制個体の選択温度: 23.8 ± 2.5 °C (N=4, n=109); 環状腺での発現抑制個体の選択温度: 20.1 ± 3.3 °C (N=5, n=109)) (N は実験回数, n は個体数)。図中のスケールバーは 1 μ m。

ショウジョウバエ幼虫において、ジストログリカンはグリア系や上皮系細胞に強く発現していますが、特徴的なのは内分泌器官である ring gland(環状腺)に強く発現している点です(図5)。実際、ring gland 特異的にジストログリカンの発現を抑制すると有意に低温選択性が誘導されます。一方、エネルギー代謝に関わると考えられる脂肪体やエノサイトでの発現抑制では温度選択性の変化は観察されませんでした。これらの知見は、神経内分泌系の関与を示唆するものですが、組織特異性のさらなる解析、カルシウム流入のメカニズム、酸素センサーの同定、行動へと導く神経回路の解明、温度選択性と低温耐性の分子レベルでの連関、等々が今後の課題として残されました。

最後に：地球の体温、私の体温

以上、*atsugari* に関する一連の解析によりエネルギー代謝の観点から体温設定の分子機構の一端を明らかにすることが出来た、として報告しました。しかし、果たしてその通りなのか？温度選択行動の生物学的な意味については今後のさらなる検証を待つ必要があると思っています。最近の研究により、私たちの体内あるいは体表面には無数の微生物が生息し、私たち動物の生命活動を支えられていることが明らかにされつつあります。例えば、最近の報告によれば、男女計6人の肘から手首までの皮膚の表面に生息するバクテリアを解析した結果、少なくとも152種の既知の、また30種の未知のバクテリアが同定されました⁹⁾。これらの微生物は、宿主と様々にコミュニケーションし、私たちに必要な様々な物質を産生し、また有害な細菌感染から体を守る働きもしています^{10,11)}。このような意味では、私

たちヒトを単独の生物種として捉えるより、地球と同じように多様な生物が集合したエコシステム(生態系)を形成していると考えの方が適切かもしれません。現在、人間活動による地球の温暖化(体温の上昇)により引き起こされる生物種の大量絶滅と生物多様性の減少が危惧されています。一方、体温と人体のエコシステムとの関係は明らかではありませんが、我々の体温調節も共生するバクテリアとの相互作用をも考慮に入れた上で今後考察する必要があるかもしれません。

参考文献

- 1) 山本伸一郎、高橋重成、清中茂樹、森泰生、蛋白質核酸酵素 54, 212 (2009).
- 2) C. Montell, M. J. Caterina, *Curr Biol* 17, R885 (2007).
- 3) K. L. Poff, M. Skokut, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2007 (1977).
- 4) 竹内研一、梅田真郷、実験医学 23, 961 (2005).
- 5) K. Takeuchi *et al.*, *Science* 323, 1740 (2009).
- 6) F. N. Hamada *et al.*, *Nature* 454, 217 (2008).
- 7) Y. Kwon, H. S. Shim, X. Wang, C. Montell, *Nat Neurosci* (2008).
- 8) P. W. Hochachka, L. T. Buck, C. J. Doll, S. C. Land, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9493 (1996).
- 9) Z. Gao, C. H. Tseng, Z. Pei, M. J. Blaser, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2927 (2007).
- 10) F. Backhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, J. I. Gordon, *Science* 307, 1915 (2005).
- 11) A. Mullard, *Nature* 459, 159 (2009).

受賞報告

内耳蝸牛内高電位の成立機構の解明 第24回日本薬理学会学術奨励賞

大阪大学大学院医学系研究科 日比野 浩(A02 計画班)

この度、平成21年3月に横浜で開催されました第82回日本薬理学会年会にて、「内耳蝸牛内高電位の成立機構の解明」に対し、第24回日本薬理学会学術奨励賞を賜りました(図1)。小生のような未熟者が受賞に果たして値するかは疑問でありましたが、継続してきた内耳研究が評価して頂けたということに、大変感激しました。冒頭にまず、研究活動を粘り強く支えて下さった、大阪大学医学系研究科の倉智嘉久教授、土井勝美病院教授をはじめとした諸先生方に、この場を借りて深謝いたします。また、いつも温かい眼で見守り、熱く指導して下さい下さった本特定領域の先生方にも厚く御礼申し上げます。

蝸牛内高電位は、内耳蝸牛を満たす内リンパ液という液体で観察されます。これは、他の体液を基準にすると +80 mV を示します(図2A)。内リンパ液には、細胞外液であるにも関わらず高濃度の K^+ を含むという特徴もあります。これらの環境は、ほ乳類の生体内で蝸牛にのみ認められ、生理学や薬理学を学んだ方を驚かす特殊な状態です。聴覚の一次受容器である有毛細胞は、頂部にある感覚毛のみを内リンパ液に浸しており、一方でその細胞体は通常の細胞外液と同じイオン組成を持つ外リンパ液に接しています。音が蝸牛に伝わると、有毛細胞の感覚毛が屈曲し、毛頂部に



図1

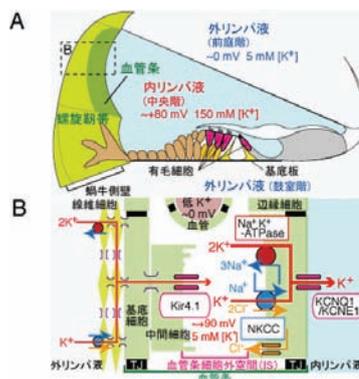


図2

分布するチャネルを介して内リンパ液の K^+ が細胞内に流入することで細胞が興奮します。これにより内耳の音伝達が始まる訳ですが、蝸牛内高電位は、その際の K^+ 流入の駆動力を増大します。つまり、有毛細胞の膜電位は -60 mV 程度ですから、+80 mV の蝸牛内高電位によって、差し引き 140 mV もの電位勾配が維持されており、僅かな感覚毛の屈曲でも K^+ が流入し易くなっています。因みに、感覚毛がたった 0.003 度傾いただけで有毛細胞は興奮して我々は音を感知できますが、これも蝸牛内高電位がある故になせる業です。よって、蝸牛内高電位は、蝸牛の音に対する高感受性の成立にとって必須の要素であります。実際に、蝸牛内高電位が低下している遺伝子改変動物は難聴となります。標題の研究によって、蝸牛内高電位は、我々が上皮組織の血管条に見出した内向き整流性 K^+ チャネルの Kir4.1 と、血管条の別の K^+ チャネルを介して発生する、2つの拡散電位により主に成立することが明らかになりました(図2B)。血管条が周辺の体液から電気的に隔離されていることも高電位の維持に不可欠であることが判明いたしました。蝸牛内高電位が初めて測定されてから半世紀が経過しますが、本研究による成果は、その成立機構を、実験的手法を用いて初めて定性的にほぼ説明するものとなりました。

小生が本課題に最初に取り組んだのは、耳鼻科の大学院生として倉智研でお世話になり始めた 1995 年ですので、途中の留学の期間を外すと研究期間は 10 年を超えます。当初は、骨に囲まれた小さな組織を解析するのに苦戦しました。色々な研究室をグリラ的に訪問して、上手く内耳を解析する方法を取得しようと四苦八苦していたことが思い出されます。失敗は沢山ありました。ご自身のご専門ではないにも関わらず、どこの馬の骨ともわからない小生に内耳研究を続けさせて下さった倉智教授には、本当に頭が下がります。また、

大学院の途中で、内耳の生理実験を発展させるため、数百万円もする臨床の手術用顕微鏡を教授に買って頂きましたが、実験に挫折し、何年も顕微鏡を眠らせてしまいました。当時は、その眠った顕微鏡は「戦艦大和」と呼ばれていましたが、2006年から京都府立医大の耳鼻科から出向して下さった大学院生の任 書晃戦闘隊長により、見事に復活してその役目を十二分に果たしました。戦艦大和はまだ現役です(図3)。また、任隊長は、イオン電極法という極めて困難な実験方法を独力で立ち上げてくれました。これは、まさに主砲にあたるもので(難しいが昔からある手法で、最新鋭のミサイルやステルス戦闘機ではなく、やはり主砲)、本課題の最重要知見は、任先生のイオン電極の実験によってもたらされました。彼の功績には多大なものがあり、本研究においては最も評価されるべき人物です。

この研究において最も嬉しかったことは、最近、(社)全日本難聴者・中途失聴者団体連合会と呼ばれる患者様の団体の取材を受け、ホームページに成果を紹介して頂いたことです。小生の長期の目的の一つに、研究成果の臨床分野への還元があります。今回の成果が、その目的に直接結びつくかは分かりませんが、端緒となる可能性はあり、今後とも全身全霊をもって内耳研究を続けて行く所存です。

今後は、実験のみならず、蝸牛内高電位の成立過程を *in silico* でモデル化し、その定量的な理解を進めていく予定です。これは、難聴の病態理解や薬剤の開発・副作用の予測に役立つと考えています。更に将来的には、高 K^+ 、低



図3

Ca^{2+} (20 μM)、高粘性(硝子体より高い)などの、内リンパ液の特性の成立機構と生理的意義、その破綻による疾患との関連の研究に挑んでいく所存です。最近下火になってしまった日本の内耳研究を活性化し、積極的な営業活動を通じて少しでも内耳研究者を増やすことも使命の一つです。最後になりましたが、上記の先生方に加え、多大なご援助を頂いた、京都府立医科大の久 育男教授、鈴木敏弘先生、Tours 大の Ian Findlay 教授、Rockefeller 大の A.J. Hudspeth 教授に感謝申し上げます。

心筋イオンチャンネル機能機構と不整脈の研究 平成21年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞受賞

東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授 黒川 洵子(AO1 計画班)

この度、日本薬学会からの推薦により平成21年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞を「心筋イオンチャンネル機能機構と不整脈の研究」に対していただく機会を得まして、その表彰式が平成21年4月14日に虎ノ門パストラル新館「鳳凰の間」にて執り行われました。文部科学大臣表彰は、「科学技術に関する研究開発、理解増進等において顕著な成果を収めた研究者について、その功績を讃えることにより、科学技術に携わる研究者の意欲の向上を図り、もって我が国の科学技術水準の向上に寄与することを目的」として制定されたものです。その中で若手科学者賞は平成17年度から新たに設置され、萌芽的な研究、独創的視点に立った研究等、高度な研究開発能力を示す顕著な研究業績をあげた40歳未満の若手研究者個人に贈られるものとされており、今回の受賞は非常に光栄であり嬉しく感じております。

1992年に東京大学薬学系研究科薬効安全性学教室に卒研究生として入り、一貫してイオンチャンネルの機能解析を中心に研究を進めてきました。特に心筋イオンチャンネルが局所的に機能制御を受けることの生理学薬理学的意義に関して興味を持っていました。細胞内外刺激によるチャンネル機能の微妙な変

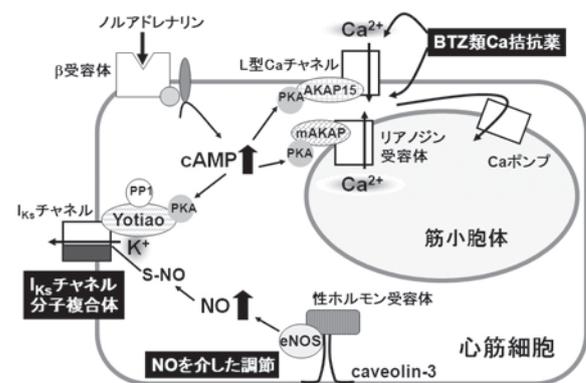


図1 心筋イオンチャンネルを修飾する局在化した細胞内シグナル

化が不整脈などの病態を誘発する事が知られ、特に薬剤誘発性不整脈(QT延長症候群)による突然死は現在も医薬品開発の大きな障壁であり、分子機構の解明が待たれます。近年、イオンチャンネルが細胞内外シグナルにより「局所的に」機能制御されていることが明らかになってきており、局所的な制御機構を解析することではじめて致死性不整脈等の病態機構

を分子レベルで調べることができると考え、研究を進めています。

研究の初期課程では、Ca拮抗薬ジルチアゼム類の作用部位の局在を調べ、心筋Ca²⁺チャンネル上の作用部位に細胞内外からアクセスできることを見出しました。続いて、交感神経系刺激による心臓機能調節が局在化している分子機構を探索する研究に携わりました。長いこと実体が明らかになっていなかったcAMPに対するチャンネル機能応答の局在化機構に関して、K⁺チャンネル分子複合体の関与を見出しました。交感神経活動時には、心拍が速まり収縮力が増大すると同時に、心筋活動電位幅が短縮して収縮期と弛緩期の時間関係を正常に保ち不整脈のリスクを回避します。この基本的応答にはcAMP上昇に伴う心筋K⁺チャンネル(I_{Ks}チャンネル)電流の増大が大きく寄与しており、Yotiaoというアダプター蛋白を含むI_{Ks}チャンネル分子複合体による局所的制御が必要であることを示唆する結果を得ました。交感神経系刺激下に致死性不整脈誘発の傾向が強いQT延長症候群の遺伝子異常により、この分子複合体の正常な機能が障害されました。この結果は、チャンネル分子複合体の維持が正常な心臓機能に必須であることを明らかにした初めての報告でした。

現在は、性ホルモンによる心筋イオンチャンネルの局所的制御機構の研究を行っています。QT延長症候群による致死性不整脈は女性において男性の約2倍の頻度で発症し、性差医療の必要性が指摘されています。しかし、この性差には性ホルモンの関与が臨床結果から示唆されてきたものの、転写調節作用によっては説明がつかず、分子機構は全く不明でした。転写を介さない性ホルモンの急性作用を調べることで、

膜に局在した受容体を介する新しいI_{Ks}チャンネル修飾機構を提唱することができました。

最後になりましたが、ご指導賜りました長尾拓先生、赤羽悟美先生、Martin Morad先生、Robert S Kass先生、古川哲史先生をはじめこれまでの研究生生活を支えてくださった皆様にこの場を借りて深い感謝の意を表したいと思います。



表彰式の会場(虎ノ門パストラル)にて

糖と脂質の恒常性維持に関与するABCタンパク質の研究

日本農芸化学会 農芸化学奨励賞受賞

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 助教 松尾 道憲(AO2公募班)

2008年3月に日本農芸化学会より農芸化学奨励賞を受賞いたしました。本特定領域には医学、薬学分野の先生方が多いことから、農芸化学会をご存じないかもしれませんが、動物、微生物、植物を対象とし、主に化学的な考えに基づいて基礎から応用まで研究する幅広い分野であり、比較的大きな学会です。農芸化学会には動物、植物、微生物それぞれのチャンネル、SLCトランスポーター、ABCトランスポーターを含む膜輸送分子を研究する多くの研究者がいます。この賞は「農芸化学の進歩に寄与する優れた研究をなし、将来の発展を期待し得る満40歳以下の会員に授与」とのことで、毎年若手10名に与えられます。今回、受賞内容を紹介する機会を与えていただき、また本特定領域における私の研究課題とも関連するので、その内容について触れたいと思います。

近年、メタボリックシンドロームの患者数の増大に伴い、生体の糖と脂質の恒常性維持機構が注目されています。ABCトランスポーター(ABCタンパク質)は体内の糖と脂質両方の恒常性維持に関与することが分かってきました。学生時代

とポストドクでインスリン分泌に関与するABCトランスポーターであるスルホニル尿素受容体(SUR)とヌクレオチドの相互作用を生化学的に解析し、ヌクレオチドによるSURを介したATP感受性カリウムチャンネル(K_{ATP}チャンネル)制御の分子基盤を明らかにしてきました。現在の研究室で助手になって以降、ABCGタンパク質による細胞膜脂質の排出活性とABCGタンパク質の細胞内局在を解析し、脂質輸送機構と局在調節機構を明らかにしてきました。これらの研究に対して受賞したのですが、ABCトランスポーターの体内における重要性が評価されたと感じうれしく思います。

1. 糖の恒常性維持に関与するABCトランスポーター

膵β細胞のK_{ATP}チャンネルは、ABCトランスポータースーパーファミリーに属するSUR1とチャンネルポアサブユニットKir6.2から構成され、ヘテロ八量体を形成して細胞内代謝状態を感知し電気化学的信号に変換します。K_{ATP}チャンネルは定常状態では開口して膜電位を維持しており、血糖上昇

に伴う細胞内ヌクレオチド濃度の変化を感知して閉鎖し、膜が脱分極し、それが最終的にインスリン分泌を引き起こします。電気生理学的解析はされていましたが、生化学的解析は進んでおらず、 K_{ATP} チャンネルのヌクレオチドによる制御の分子機構は不明でした。そこで、ヌクレオチドによるチャンネル活性の制御機構を明らかにするため、SUR の2つのヌクレオチド結合領域 (NBF1, NBF2) のヌクレオチド結合特性を検討しました。ATP 類似体である 8-azido-ATP を用いた光親和性標識実験から、生理的な細胞内 ATP, ADP 濃度では、SUR の NBF1 に ATP, NBF2 に ADP が結合した形でチャンネルを活性化するモデルを示しました(図 1)。従って、SUR が細胞内 ADP 濃度の変化を感知するセンサー分子として機能し、チャンネル開閉を制御することが生理的に重要であることを初めて明らかにしました。

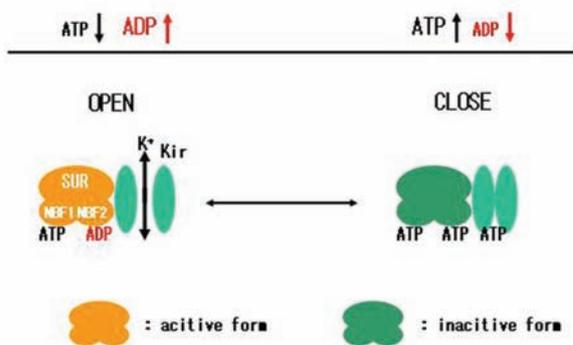


図 1 SUR による K_{ATP} チャンネル制御モデル
SUR の NBF1 に ATP が、NBF2 に ADP が結合したときチャンネルが活性化される。細胞内 ATP, ADP 濃度がそれぞれ増加、減少すると、ADP が NBF2 から解離し ATP が結合し、チャンネルは不活化される。ATP が加水分解されるか、解離して ADP が NBF2 に結合し、再びチャンネルが活性化される。SUR は活性型と不活性型の平衡関係にあり、SUR は細胞内の ADP 濃度センサーとして動く。

2. 脂質の恒常性維持に関与する ABC トランスポーター

ABC タンパク質はハーフサイズの ABC トランスポーターで、ホモ二量体又はヘテロ二量体を形成して体内の過剰なコレステロールの排出に関与します。マクロファージを含む末梢細胞の ABCG1 は、ABCA1 と協調して高密度リポタンパク質 (HDL) 形成と肝臓へのコレステロール逆転送に働きます。ABCG5 と ABCG8 は小腸でステロール吸収抑制に働き、肝臓で MDR3(ABCB4) や BSEP(ABCB11) と協調して胆汁ミセル形成に働きます。ABC タンパク質が脂質の恒常性維持に重要な役割を果たすことが予想されていましたが、ABC タンパク質の脂質輸送機構と制御機構は不明であったため、ABC タンパク質の輸送基質と細胞内局在を調べました。

ABCA1 がコレステロールとホスファチジルコリンをアポリポタンパク質 A-I に排出するのに対し、ABCG1 は ATP 加水分解依存的にコレステロールとスフィンゴミエリンを HDL に排出することを明らかにしました(図 2)。コレステロールとスフィンゴミエリンは細胞膜でラフトを形成します。ABCA1 と ABCG1 がそれぞれノンラフト、ラフトに局在すること、ABCA1 と ABCG1 の脂質排出活性は細胞

内スフィンゴミエリン量とそれぞれ逆相関、相関することを示しました。また、ABCG1 の発現によって、細胞膜のコレステロールが再編成されることを示しました。これらの結果から、ABCG1 が細胞膜ラフトで脂質を輸送することを見出しました。

ABCG1 のホモ二量体は細胞膜に局在するのにに対し、ABCG5 又は ABCG8 のホモ二量体は小胞体に局在し、ヘテロ二量体になって初めて細胞膜に移行することを明らかにしました。小腸モデル細胞では、ABCG5 と ABCG8 のヘテロ二量体が頂端膜側に発現し、胆汁酸ミセルへのコレステロールと植物ステロール排出に働くことを示しました。さらに、キメラタンパク質の解析から、ABCG5, ABCG8 の細胞質領域がホモ二量体の小胞体残留に関与し、その領域に新規 ER 残留・逆送シグナル配列が存在する可能性を示しました(図 2)。

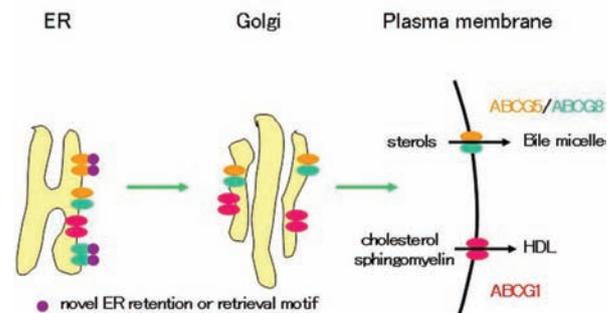


図 2 脂質恒常性維持に働く ABCG タンパク質の機能と局在制御
小腸と肝臓で ABCG5/ABCG8 が体外へのステロール排出に働く。ABCG5 と ABCG8 のホモ二量体は小胞体 (ER) に残留し、ヘテロ二量体のみが細胞膜に移行しステロールを排出する。ABCG5, ABCG8 の細胞質領域に新規 ER 残留・逆送シグナルが存在する可能性がある。末梢細胞では、ABCG1 がホモ二量体を形成して細胞膜ラフトドメインに局在し、コレステロールとスフィンゴミエリンを排出する。

以上のような ABCG タンパク質の脂質輸送解析を通して、脂質トランスポーターと脂質膜環境 (脂質ラフト) との相互制御が存在する可能性を意識するに至り、本特定領域における公募研究「脂質輸送トランスポーターと細胞膜環境の相互制御」に発展しています。今後は研究をさらに発展させて、メタボリックシンドロームに対する治療薬の開発や病態を予防するための食品の開発につなげていきたいと考えています。機能不明な ABC トランスポーターがまだ多く存在することから、それらの機能解析が進めば、生体内の糖と脂質の恒常性維持機構に対する理解が一層深まることが今後期待されます。

これらの研究は、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学研究室で行われたものです。本研究を行う機会を与えてくださり、終始指導していただいた京都大学物質一細胞統合システム拠点および農学研究科教授 植田和光先生に深謝いたします。また、学生時代の指導教官でありご指導いただいた京都大学名誉教授 天知輝夫先生に心から感謝いたします。多くの共同研究者と細胞生化学研究室の関係者の皆様に深く感謝いたします。



トランスポートソームの機能破綻による神経性異常とヒトにおける病態解析

群馬大学 大学院医学系研究科 応用生理学分野

下川 哲昭

細胞膜上に存在する受容体はリガンドと結合し情報を細胞内に伝えた後、細胞膜上から細胞内に引きずり込まれ(インターナライゼーション)、エンドソームを経てリソソームでの分解やリサイクル過程に選別されます。この機構は過剰な情報の暴露から細胞機能を守る情報伝達のダウンレギュレーションとして極めて重要な仕組みで、この一連の受容体の細胞膜を介した輸送には様々な分子と機構が複雑かつ精巧に関わっています。私はこの細胞膜受容体のエンドサイトーシスの機構について CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kD) というアダプタータンパク質の解析を中心に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、最近ではシナプス伝達や乳がんの浸潤にも深く関わっていることが相次いで報告されています。

我々は CIN85 が EGF の刺激後、EGF 受容体の膜輸送、特にエンドサイトーシスによる Down-regulation に関与していることを明らかにした後、この分子の個体における生理的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。現在までに、以下の 3 点が明らかになりました。

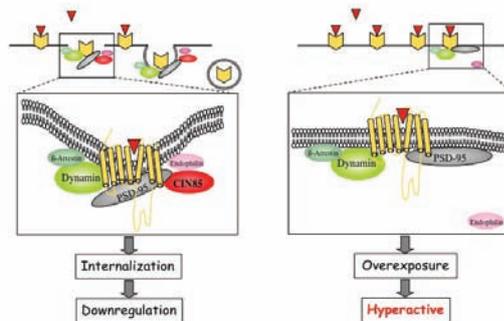
- I. CIN85 ノックアウトマウスは「多動」である。
- II. CIN85 欠損による「多動」はドーパミン受容体のエンドサイトーシスの異常による。
- III. CIN85 はヒト X 染色体連鎖精神疾患や多動性障害の病態形成に関与しているかも知れない。

特に「多動」という行動異常の原因の一つが多様な機能を持つ膜タンパク質の複合体形成異常によってもたらされている事を示している点で意義ある成果と考えています。今後、ヒトの精神疾患、例えば ADHD(Attention Deficit Hyperactivity Disorder, 注意欠陥多動性障害)の発症・病態に CIN85 が関与しているか否かを CIN85 遺伝子の一部欠損や一塩基多型の検索から解析することを考えています。

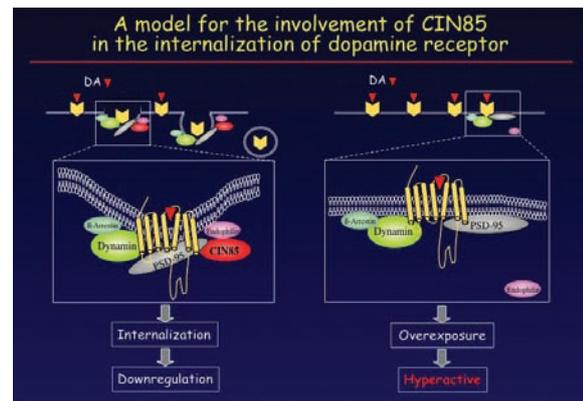
現在私のグループは 7 人。皆好き勝手なことをやっていますが、学部学生が殆どなので講義や実習のあいている時間を見つけては熱心にピペットを握っています。

これまでの 2 年間(A03・公募)本研究班に入れていただいたおかげで自身の研究を推進するための様々な刺激とヒントをいただきました。班会議における討論はもちろんのこと、細胞膜上に存在するタンパク質の同定について領域代表の金井好克先生から、多動抑制の薬理実験では京都大学・木下専先生からそれぞれ貴重なアドバイスをいただき、そこから膜受容体のエンドサイトーシスのメカニズムを理解

する上で重要な実験結果を得ることができました。また富山大学の大家稔久先生からは、今でも私のプレゼン時における「笑いのネタ」の甘さを指摘され続けています。これからの 2 年間、これまでの研究成果を示して本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 機能欠損による多動性とその分子メカニズム



お詫び

本年 2 月に皆様のお手元にお届けした TRANSPORTSOME Winter 2009 におきまして、公募班の紹介記事を掲載させて頂きました。その際に、編集の不手際から、下川哲昭先生(A03 班)の紹介原稿を取り違えて、以前の原稿を掲載してしまいました。大変に失礼を致しました。ここに深くお詫び申し上げますと共に、あらためて下川先生のご研究を紹介させて頂きます。

(TRANSPORTSOME 編集担当: 畑)

フルーツ王国から研究室便り

山梨大学医学部生化学講座第一教室 大塚 稔久(AO1 公募班)

皆様、本特定領域研究ではお世話になっております。早いものでこの領域も最終年度となり、まさに光陰矢のごとしと思う今日この頃でございます。さて、前回のnewsレターで北陸は富山の地で世界を相手に頑張っていますと書きましたが、縁あって、この4月より山梨大学医学部生化学講座第一教室に着任いたしました。このnewsレターが発行されるころには研究室の改装も終了し、ばりばり研究をやっている・・・と勝手に妄想しています。これまで、カン研究所(グループリーダー)、富山大学(准教授)では独立した形で研究をさせていただいてきましたが、今回が本当の意味で独立した環境ですので、やる気满满々楽しみな反面、プレッシャーも感じています(本当です)。もちろん場所は変わっても、特に奇をてらうつもりはなく、これまで推進してきた神経シナプス・アクティブゾーンの分子構造基盤とその生理機能の解明に関して、研究を発展させていきたいと思っています。この研究分野は神経科学領域でも、もっとも競争の激しい分野のひとつですが、生化学・蛋白質化学を基礎におもしろい研究を心がけて、成果を出していきたいと思っています。

今、ちょうどゴールデンウィークに入る前ですが、すでに4回ほど生化学の授業を担当しました。山梨大学の学生は大変まじめでほとんど出席しています。おそらく新人教授のものめずらしさも手伝っているのかもしれませんが、90分授業の準備はなかなか骨が折れるものですが、生化学の知識を今一度自分なりに整理することができるメリットもあります。そのため、教科書をよく読んでます(それも複数です)。しかし、正直に告白しますと、鹿児島大学医学部の学生だったころ、私は生化学が一番苦手でありまじめな学生ではありませんでした。そんな私が、“酵素反応速度論とはなんぞや”“自動フラクションコレクターはたまに止まるので、低温室でじっとみておかなきゃいけないんです。自動の意味ないですよ(ここで一部の学生にウケる)”と学生を前に偉そうに講義しているのは、これぞまさしく人生摩訶不思議といえるのかも知れません。それはさておき、講義をきいてラボで研究してみたいと言ってくれる(言うだけかもしれませんが)学生もいて、部屋の改装も終わって梅雨が明けるころには、にぎやかな研究室になっていることと期待しています。



山梨大学研究室からの眺め

研究面では、研究費の獲得やラボのセットアップなど、しんどいことが多いですが、こと周りの環境は研究するにはもってこいです。まず、道を挟んでおとなりに昨年完成した大きなショッピングモールもあります。レストラン、ドラッグストア、巨大電気量販店、ボウリング場に加え、おまけに24時営業の食料品スーパーもあります。これで、学生(もちろんポスドクも)は徹夜で実験しても空腹に困ることはありません。これは、時差のある欧米各国との競争に打ち勝つために、山梨大学医学部が24時間オープンさせていると私は見えています。恐るべしです。また、実験がうまくいかないときは富士山が元気付けてくれます。富士山なんてベタ過ぎる!と思う方は、北に八ヶ岳、西に南アルプスを望むことができます。私の研究室は基礎棟の6階で、大実験室からは八ヶ岳を望みながらピペティングできます。教授室でディスカッションするときは私の背後に富士山の頂上が見えるはずですよ。おまけにフルーツも食べ放題です(もちろんお金を払えば)。やはりベタになってしまいますが日本の山、富士山の下で、一緒に世界一の研究を目指してみませんか?興味ある学生・ポスドクの方 etc、気軽に連絡ください。ラボ訪問の際は、フルーツ各種、ほうとう&信玄もち(夜ならワインつき)でお持ちしています。

編集後記

TRANSPOTOSOME「平成20年度成果特集」をお届けします。今回のNews Letterは、先日、班員の皆様にお配りしたアンケートへの回答をもとに企画致しました。年度末、年度初めのご多用な時期に、ご協力くださいました執筆者の方々に心より御礼申し上げます。今後もTRANSPOTOSOMEをご研究の宣伝、情報交換の場としてご活用ください。次号以降にも多くの班員の皆様にご寄稿頂きたく、ご連絡をお待ち申し上げます。(畑)

TRANSPORTSOME

第9号(2009年6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