

TRANSPORTSOME

特定領域研究:生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能

QUARTERLY
Spring
2010



総集号

目次

領域終了にあたって	金井 好克	2
各総括班代表者の言葉と各計画代表者のまとめ		
A01班の研究成果と意義	森 泰生	3
有機溶質トランスポートソーム:その構築と機能的意義	金井 好克	4
研究成果と雑感	森 泰生	6
心筋NOトランスポートソームの多面性	古川 哲史	7
Scaffoldの解体と再構築	畑 裕	9
トランスポートソームを対象とした実体を伴った相互作用ネットワークの解析 — 何がどのように相互作用するのか? —	木下 賢吾	12
研究項目A02の研究概要		
結合膜構造とチャネルミクロアセンブリ	竹島 浩	15
微小管から細胞膜へ	竹島 浩	16
特定領域金井班を想い、我を省みる	中西 宏之	18
BARドメインスーパーファミリータンパク質による細胞膜形態形成	日比野 浩	20
	末次 志郎	22
総括班の立場からA03について		
小型魚類を用いたトランスポートソーム	鈴木 洋史	26
下流シグナル伝達系の解析	仁科 博史	27
超短光パルスレーザーを用いた生理と病理のイメージング	根本 知己	29
無機リン酸トランスポートソームの機能制御とその破綻 — 5年間の課題を終えて —	宮本 賢一	31
特定A03 鈴木グループまとめ	鈴木 洋史	34
血液脳関門トランスポートソームの生理的役割	寺崎 哲也	38
疾患起因性変異蛋白の解析による腎臓の水・電解質トランスポートソームの解明	内田 信一	40
編集後記		43

表紙について

東京医科歯科大学の前を流れる神田川沿いの桜と、宮本先生、内田先生、木下先生からお寄せいただいた図を合せてデザインしました。宮本先生の図は金井領域代表が想定されていたトランスポートソームの王道を表現しているのではないかとわれ、「初心忘るべからず」の意味と、桜は新しい旅立ちの意味を込めました。

領域終了にあたって

平成17年度にスタートした文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」(領域略称:膜輸送複合体)も、実質4年半の研究期間を終え、3月末に終了となります。領域の立ち上げ、運営に多大な御尽力を頂きました多くの方々に改めて厚く御礼申し上げます。

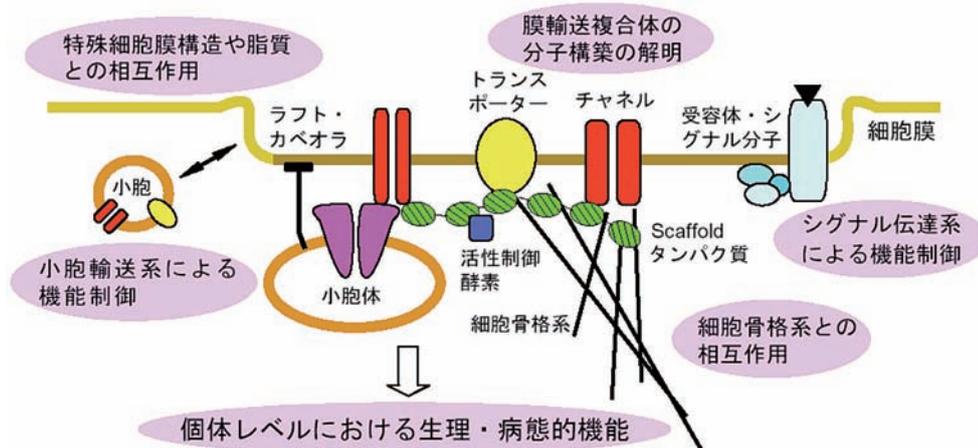
本特定領域は、輸送分子(チャネル、トランスポーター、ポンプ)の分子クローニングの成果に基づいて生理機能を理解しようとする際に遭遇する種々の困難を克服するために、「単一分子」から「分子複合体」へのパラダイムシフトを積極的に実践することを目指して企画されたものです。ここでは、今まで個別の独立の実体として研究されてきた個々の輸送分子を、それらがその制御分子や足場蛋白質とともに集積して形成する分子複合体(トランスポートソーム)の一員と見なします。そして、その分子集積の成り立ちとはたらきを解析することにより、「生体膜輸送の機能ユニット」としてのトランスポートソームの意義を明らかにする研究がなされました。この4-5年間に複合体的イメージが随所で強調されるようになり、内外の動向が「トランスポートソーム」の概念を益々支持する方向へ向かいました。本特定領域の研究者がこの流れを先導し、またこの流れのなかで存分に研究を展開し、大きな成果を挙げることができたと考えています。

本特定領域では、トランスポートソームがどのように構成されどのようにふるまうか、どのように生体膜環境と相互作用するか、そしてどのようにして他の機能要素と関わり、細胞・組織・個体のなかで位置付けられていくかを明らかにするために、3つの研究項目を設けました。すなわち、分子複合体としての実体解析を行う「トランスポートソームの構成と機能に関する研究」(A01)、生体膜との相互

作用を解明する「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」(A02)、調節・生理機能、病態との関連性解析を行う「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」(A03)の3つの観点からの研究を推進してきました。研究項目A01は森泰生先生(京都大学・工学研究科)、A02は竹島浩先生(京都大学・薬学研究科)、A03は鈴木洋史先生(東京大学・医学部附属病院)が、それぞれまとめ役を担当しました。各班の連携のもとに多様なトランスポートソームとその存在の基盤となるプラットフォーム(「場」)の実体と相互作用が解明され、トランスポートソームと生理機能、病態との関連性が見いだされています。また、本領域研究推進にあたり、遺伝子共発現データをもとにタンパク質間相互作用を予測するCOXPRESdbや、一分子追跡技術、レーザー・非線形光学技術を応用した*in vivo*イメージング技術、質量分析による膜蛋白質絶対定量技術等の新たな解析技術が開発され、班内外で利用されて新たな「質」を生み出す原動力となっています。

本特定領域は、近年のプロテオミクス技術や分子可視化技術の革命的な進歩に後押しされ、今までなかなか解析的研究が困難だった分子複合体の領域に挑み、分子と生体を繋ぐ新たな階層としてのトランスポートソームの概念を明確化しようとしたものであり、この5年間の研究で、当初の目的は大方達せられたと考えています。同時に、その過程で多くのエキサイティングな発見に遭遇し、トランスポートソームをさらに発展させた新たな研究の方向性も提示されました。研究期間終了後も、本特定領域の成果を基盤に、トランスポートソーム研究は、膜輸送研究の主要な柱のひとつとして、引き続き多くの成果を生み続けるものと確信しています。

領域代表 金井 好克



各総括班代表者の言葉と各計画代表者のまとめ

A01 班の研究成果と意義

終わるともしれないプロセスを経て、異なった新規の世界に踏み込むことができたが、そこは未知なだけにえも知れぬ茫漠とした不安が広がっている。「国境の長いトンネルを抜けると雪国であった」(「雪国」の冒頭より抜粋)を、小説本来の意図を無視して私個人的な感覚から解釈すると、このようになる。まさに、トランスポートソーム研究が目指す境地である。私たちはそこに辿りつけただろうか？

私達A01班は、トランスポートソームの分子構成を明らかにし、それぞれの構成分子の機能を解明することを目指した。また、細胞生理・細胞生物学実験に*in silico*解析を組み合わせて、膜輸送機能の制御における複合体形成の機能的意義を探究した。その結果、いくつかの新しい点が明らかになった(図を参照)。

第1の点は、複合体形成においてこそ出現する機能が存在することである。複合体の機能が、個々の構成タンパク質の機能の集合でしかなければ、チャンネル・トランスポーター、scaffoldingタンパク質、シグナル伝達タンパク質は機能上の定義通りの働きしかしないはずである。が、今回の研究により、複合体形成により達成される機能の例が示された。また、タンパク質「単体」としても、複合体の中にあることにより浮かび上がってくる新たな活性化機構や機能修飾機構が明らかとなった。これは、複合体解析からのアプローチの圧倒的な有利さ、おもしろさである。

第2の点は、小分子やイオンがシグナル伝達の距離や速度の幅(自由度)を大きくしていることである。これは他の複合体と違い、イオンと小分子のトランスポートソームを研究する上で非常に重要であるが、タンパク質間相互作用がしよせん近接であると考えれば、複合体研究固有の方向性ではない。興奮性組織における電気シグナルと興奮性伝導などのように、むしろ元来のトランスポーター・イオンチャンネル

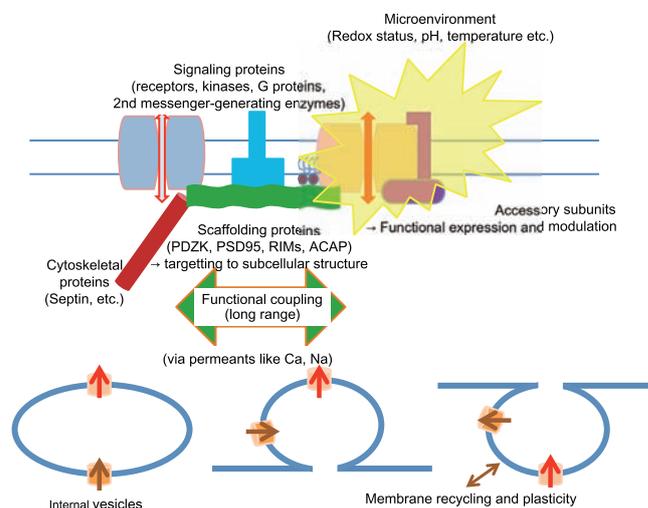
単体の根幹にある本質である。「膜電位」「電荷の中和」「浸透圧」「高拡散性」などの古典的物理学パラメーターがその基盤であると考えられ、小分子・イオンシグナルの重要性を再認識できた。考え方によっては、本トランスポートソーム研究はイオンと小分子の「らしさ」を目指したともいえる。さらに、トランスポーター・イオンチャンネルの局所性が複合体形成により達成されることも分かった。

第3に、A02班とA03班における研究成果を参考に、第二の点をさらに敷衍すると、小分子・イオンシグナルの細胞内局所化を介して、細胞内小器官や微細構造が細胞内に限らず細胞をまたいで統合され、生理機能が統御されている姿が明らかになってきた。小分子・イオンの動態とともに、表面膜と細胞内膜小胞体の機能、形態やそれらの輸送などの「場」を明らかにすることがここでは重要である。

どうだろう、「国境の長いトンネルを抜けると雪国であった」となったであろうか?なんとなくそうではないような気がする。「抜け」でもないし、「雪国」も見てないように思える。むしろ、第2点のように、越後国に抜けたと思ったら上野国に戻ってきたのかもしれない。ただ、第3点には今後の方向性のようなもの示す可能性がある。自身は入口にあって、まだまだ奥には深い山と谷が待ち構えている(だけでなく、そこから出ることはない)。「木曾路はすべて山の中である」(「夜明け前」の冒頭より抜粋)を、中央西線が国道19号線で中津川までたどり着き、馬籠・妻籠宿のあたりで思い浮かべると、そう解釈できる。今あるトランスポートソーム研究の境地ではないだろうか。私個人的には勝手ながら、こっちのほうがどちらかといえば好きかな？

森 泰生

(京都大学大学院工学研究科)



有機溶質トランスポートソーム：その構築と機能的意義

金井 好克(AO1班)

大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学

トランスポーターが関わるタンパク質間相互作用は、当初トランスポーターの機能及び局在の制御という観点からの研究がなされ、酵母ツーハイブリッド法等を用いた検討により、研究開始時には、複数種のトランスポーター分子が足場タンパク質により束ねられ集積して存在することが示唆されていた。我々の計画研究は、「トランスポートソーム」の概念の確立のために、トランスポートソームという分子集積体が存在することの実証と、その機能的意義を明らかにすることを目的として設定された。本研究では、Fig.1Aに示すように、トランスポーターが足場タンパク質とともに形成するトランスポートソームに焦点を当てたが、研究の過程で、基質のやりとりをするトランスポーターと酵素からなるトランスポートソーム(Fig.1B)、近接する細胞膜を架橋するように形成されるトランスポートソーム(Fig.1C)を見いだした。

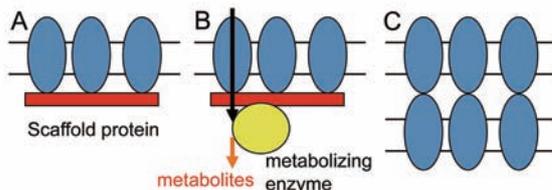


Fig.1 トランスポーターを取り巻くタンパク質間相互作用により形成されるトランスポートソーム。

A, トランスポーターが足場タンパク質とともに形成するトランスポートソーム。B, 基質のやりとりをするトランスポーターと酵素からなるトランスポートソーム。C, 近接する細胞膜を架橋するように形成されるトランスポートソーム。

トランスポーターが足場タンパク質とともに形成するトランスポートソーム

腎臓の近位尿細管の管腔側膜には、有機溶質の上皮輸送に関わるトランスポーターが存在する。これらのうち一群のものは、PDZK1やNHERF1といったPDZタンパク質に結合する。PDZK1と結合する尿酸トランスポーターURAT1と有機アニオントランスポーターOAT4は、PDZK1の存在下で共免疫沈降し、またそれぞれに蛍光タンパク質tagを付けると両者間のFRETが観察されることから、両者は単一のPDZK1に結合し、複合体を形成し得ると考えられる。このように、複数のトランスポーターが、多価の足場タンパク質により分子集積し得る。

このような分子集積が実際に生体内に存在するかどうかを明らかにする目的で、tag付URAT1を近位尿細管で発現させた遺伝子導入マウスを作製した。tag付URAT1は、近位尿細管管腔側膜に局在して発現した。このマウス腎より抗tag抗体による免疫沈降を行い、共沈降するタンパク質を質量分析にて解析したところ、近位尿細管の管腔側のPDZ結合モチーフを持つ複数のトランスポーターとPDZタンパク質PDZK1、NHERF1が共沈降することが明らかになった。これは、実際

に腎近位尿細管の管腔側膜で、PDZタンパク質によるトランスポートソームが実在することを強く支持する。

複数のトランスポーターが集積することにより、基質を媒介とした相互の機能共役の効率化が本当に実現されるかについて、基質の球面拡散を想定したモデルを用いて考察した。Fig.2に示すように、トランスポーターAは、それを中心とした溶質の濃度勾配を形成し、それを交換基質として交換輸送体であるトランスポーターBが駆動されるとする。トランスポーターAとトランスポーターBが細胞膜上に分散して存在する場合、AとBは数十nmの距離にあると想定されるが、この場合は、Aによって形成された溶質の濃度勾配はBの周囲には十分には及ばず、Bへの駆動力は小さい。このため、Bによる基質輸送量は小さい。これに対して、AとBが足場タンパク質によって連結され集積して、数nmあるいはそれ以下の距離に近接して存在する場合は、Aによって形成された溶質の濃度勾配がBの周囲で十分大きいものとなり、Bは大きな駆動力により駆動され、基質輸送量は大きなものとなる。

基質のやりとりをするトランスポーターと酵素からなるトランスポートソーム

トランスポートソームは、イオンチャンネルやトランスポーターに加え、それら輸送タンパク質を活性調節する酵素を含むが、研究の過程で、当初は想定していなかった輸送タンパク質と酵素の関わりがわかってきた。それは、「基質のやり

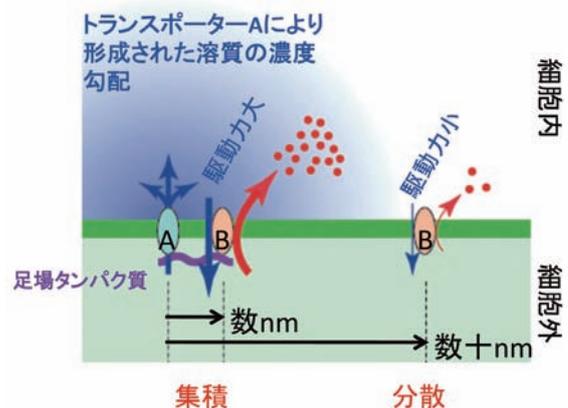


Fig.2 トランスポートソーム形成によるトランスポーター相互の機能共役の効率化。

トランスポーターAは、それを中心とした溶質の濃度勾配(図では、トランスポーターAを中心とする濃淡で表示)を形成し、それを交換基質として、交換輸送体であるトランスポーターBが、トランスポーターBの基質(小円で表示)を輸送するとする。AとBが足場タンパク質によって連結され集積して、数nmの距離に近接して存在する場合は、Aによって形成された溶質の濃度勾配がBの周囲で十分大きいものとなる。これにより、Bは大きな駆動力を受け、トランスポーターが分散して数十nmの距離で存在する場合に比べ、基質輸送量は10-20倍程度大きなものとなると推定される。(鈴木班、寺崎班との共同研究)

とりをするトランスポーターと酵素からなる「トランスポートソーム」の存在が明らかになったことによる。トランスポーターによって細胞内に取り込まれた基質が効率良く代謝酵素により代謝され、あるいは酵素反応の反応生成物がトランスポーターの基質となり効率良く輸送されるといった「輸送と代謝の共役」のいくつかの例が知られていたが、このトランスポーターと酵素からなるトランスポートソームはその分子実体をなすものである。

我々は、SLC22有機イオントランスポーターファミリーのなかに、腎近位尿管の側基底膜に存在するプロスタグランジン(PG)特異的トランスポーター OAT-PGを見いだした。PGE₂は、腎皮質における情報伝達物質でありレニン分泌を促すが、OAT-PGノックアウトマウスでは、腎皮質のPGE₂の上昇とその代謝物の減少、及びレニンの上昇が観察された。従って、OAT-PGは、PGを近位尿管細胞内に取り込むことにより、PGシグナルをOFFにするか、あるいはPGバックグラウンド値を低値に保つ役割を果たしていると考えられる。神経組織における神経伝達物質トランスポーターと同様の機能を、腎皮質でのPGシグナリングにおいてOAT-PG が果たしている。

OAT-PGを介して近位尿管細胞内にとりこまれたPGE₂は、細胞内にあるPGE₂代謝酵素15-PGDH(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase)によって代謝されるが、このPGE₂代謝酵素がOAT-PGのC-末端細胞内ドメインに結合して、トランスポーターと代謝酵素の複合体を形成していた(Fig.3)。この複合体は、トランスポーターを介して細胞内に取り込まれたPGE₂を代謝酵素が即座に捕らえて効率良く代謝するシステムを形成していると考えられる。

15-PGDHはOAT-PGのC-末端に直接結合して複合体を形成するが、さらに我々は、トランスポーターとその基質を代謝する酵素が足場タンパク質を介して複合体を形成する例も見いだしている。このような基質をやりとりするトランスポーターと酵素からなるトランスポートソームは、輸送と代謝を共役させ効率の良い細胞内代謝を進行させるための普遍的な分子装置と想定される。細胞内の代謝の流れのなかには、物質的コンパートメントが想定されることがあるが、トランス

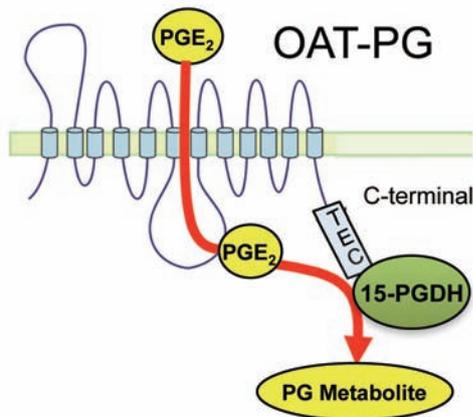


Fig.3 プロスタグランジントランスポーター OAT-PGとプロスタグランジン代謝酵素15-PGDHによって形成されるトランスポートソーム。
OAT-PGのC-末端に15-PGDHが直接結合し、OAT-PGにより取り込まれたプロスタグランジン(図ではPGE₂)を効率良く代謝する。

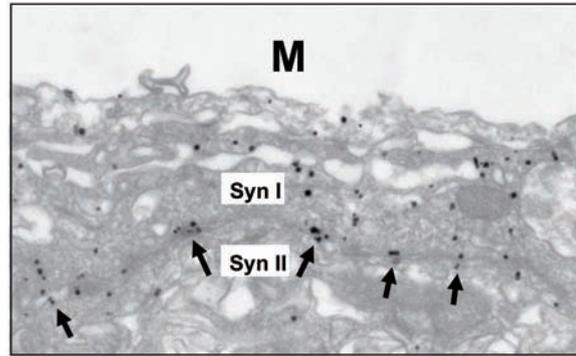


Fig.4: マウス胎盤の塩基性アミノ酸トランスポーターCAT5の免疫電顕像。

マウス胎盤は、2層の合胞性栄養芽細胞(SynIとSynII)からなる。アミノ酸は、母体側血液(M)からSynIとSynIIを通過して、胎児側血液へと移行する。SynIとSynIIが接する面の近接した二つの細胞膜に、CAT5が丁度二つの膜を架橋するように向かい合って存在する(矢印)。(三重大学医学部溝口明教授との共同研究)

ポーターと代謝酵素からなるトランスポートソームは、その分子的背景の少なくとも一つの要素となるものとする。今後、この観点からの解析が代謝コンパートメントの理解に貢献するものと期待される。

近接する細胞膜を架橋するように形成されるトランスポートソーム

マウスやラットの胎盤は、ヒトの胎盤と異なり、合胞性栄養芽細胞が2層あり、両者は、ギャップ結合で繋がれている。胎盤では、細胞融合により形成された合胞性栄養芽細胞が拡散バリアーとして胎盤関門を形成するため、アミノ酸等の栄養素が母体側から胎児側に移行するためには、合胞性栄養芽細胞層を通過しなければならない。合胞性栄養芽細胞層の胎児側細胞膜と母体側細胞膜には、経胎盤輸送(合胞性栄養芽細胞層を介する経細胞輸送)を可能とするトランスポーターが存在する。合胞性栄養芽細胞が2層あるマウスやラットの胎盤では、アミノ酸は、母体側血液に面した第1層(Fig.4のSynI)からトランスポーターを介して胎児側血液に面した第2層(図4のSynII)に挟まれた間隙に入り、この間隙に面したSynIIの細胞膜のアミノ酸トランスポーターによってSynIIに取り込まれ、SynIIの胎児側の細胞膜のトランスポーターによって胎児血液に移行する。

SLC7アミノ酸トランスポーターファミリーの解析の過程で、マウスやラットで胎盤特異的に発現し、ヒトには存在しない塩基性アミノ酸トランスポーター(CAT5:cationic amino acid transporter 5)を見いだした。CAT5は、アルギニン、リジン、オルニチンを主要な基質として輸送する。CAT5のマウス胎盤での局在を検討したところ、SynIの母体側細胞膜と、SynIとSynIIが接する側の細胞膜が、染色された。後者に関して、SynI側の細胞膜とSynII側の細胞膜のどちらにCAT5が存在するかを免疫電顕で検討したところ、Fig.4の矢印で示すように、SynI側の細胞膜とSynII側の細胞膜の両方にCAT5が存在し、しかも驚くべきことに近接する細胞膜上に点在するCAT5が丁度二つの膜を架橋するように向かい合って存在する像が捉えられた。前述のように、2層の合胞性栄養芽細胞

層は、ギャップ結合で繋がれているが、CAT5が向かい合って存在する部位はギャップ結合とは異なっており、ギャップ結合以外の細胞間の「物質の通り道」を形成していると想像される。

このような合胞性栄養芽細胞の2層構造は、マウス、ラットに特徴的な構造であり、ヒトには見られない。このマウス、ラッ

トの胎盤のみに存在するCAT5は、細胞間を架橋するように向かい合って、2層の合胞性栄養芽細胞間のアミノ酸の受け渡しを行うために特化したトランスポーターであると思われる。向かい合ったCAT5は、細胞外ドメイン同士で直接相互作用するのか、あるいはその結合に第三のタンパク質が介在するのか、今後明らかにしなければならない課題である。

研究成果と雑感

森 泰生(AO1班)

京都大学大学院工学研究科

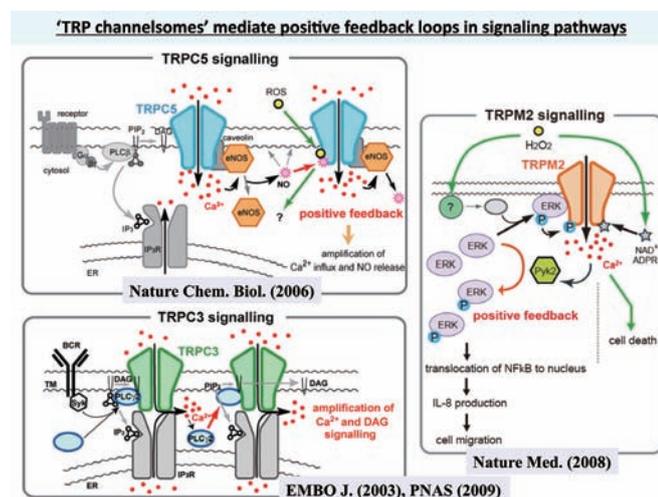
カルシウムイオン(Ca^{2+})及びその膜越えの透過を担う Ca^{2+} チャンネルは、多様な生理的意義を有する。しかし、それらがどのようにして特定の生理応答を特異的に惹起するかは依然として大きな謎である。この課題を探究するために、私達は Ca^{2+} チャンネル複合体の分子的同定と機能解析及び生理的意義の解明を行い、いくつかの成果を得た。

まず、研究遂行の副産物として、 Ca^{2+} 透過型カチオンチャンネルを形成するTRPタンパク質単体としてのユニークな活性制御機構を明らかにした。例えば、受容体活性化チャンネルだと思われていたTRPC5等、そして温度センサーチャンネルとして分類されてきたTRPV1(カプサイシン受容体)等が、pore領域付近のシステイン残基のsulfhydryl基のニトロシル化や酸化修飾により活性化されることが分かった。このような活性機構上の特性は後述のように、細胞シグナル経路におけるfeedback cycleの形成に重要である。

第二に、チャンネルタンパク質が単なる Ca^{2+} 透過装置として働くだけでなく、様々な受容体、シグナル伝達タンパク質、scaffoldingタンパク質等を集積させるシグナル複合体の中心として働くことを明らかにした。具体的には、複合体形成における3種類のTRPチャンネル群(TRPC3、TRPC5、TRPM2)

の役割を示した。また、神経系において、種々のpresynapseタンパク質をactive zoneに集積させるscaffoldingタンパク質RIM1により、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが強く機能制御を受けることを明らかにした。この知見は、複合体形成に伴うタンパク質集積が結果として、 Ca^{2+} チャンネルの機能特性を決定できることを示唆する。

第三に、 Ca^{2+} チャンネル複合体のシグナル制御における意義を明らかにできた。即ち、シグナル経路の構成シグナル伝達タンパク質が Ca^{2+} チャンネルを中心に集積することによって、 Ca^{2+} チャンネルを透過した Ca^{2+} が、当該シグナル経路に対するFeedback制御をかけることがわかってきた(例:TRPC5を介した Ca^{2+} 流入により活性化したNO産生酵素がNOを一旦産生する。このNOはシステインニトロシル化反応によりTRPC5をさらに活性化させ、さらなるNO産生酵素活性化とNO産生に導き、 Ca^{2+} シグナルとNO産生のpositive feedback cycle機構が成立する)。このようなFeedback制御には Ca^{2+} 依存的な細胞内から形質膜へのシグナル伝達タンパク質の移行が重要である(例:phospholipase Cやprotein kinase C)。また、複合体形成は Ca^{2+} シグナルの発生源である Ca^{2+} チャンネルと Ca^{2+} 受容タンパク質との間の距離も制御できる。その結果、



Ca²⁺シグナル伝達効率を変化させ細胞応答の強弱を変化させると考えられる。先述のpresynapseにおけるRab3-RIM1-電位依存性Ca²⁺チャネルによる、シナプス小胞とCa²⁺シグナルの発生点との間の距離の調節を介した神経伝達物質放出制御は、その代表であると言える。

第四に、Ca²⁺チャネル複合体の組織レベルでの生理的意義を示唆することができた。具体的には、TRPC3複合体によるB細胞活性化調節、TRPC5複合体によるNO産生を介した血管収縮の弛緩の調節、TRPM2複合体による単球・マクロファージのケモカイン産生と好中球遊走を介した炎症増悪、電位依存性Ca²⁺チャネル複合体による神経シナプス伝達効率の調節(シナプス可塑性)などが挙げられる。

ところで、特定領域研究のような研究集合体に参加する重要性はなんだろうか?お互い切磋琢磨できる点が何と言っても大事に思える。他の参加研究者にいい仕事ができれば、負けてはいられない気持ちになりとても刺激になる。ますます研究に力が入り、自分が1番(2番じゃだめなんですか?)良い業績をあげようと思う。というのが公式見解である。しかし、私自身の本心は結構違うところにあるのではないかと(これはこれで新鮮な自分を見つけて楽しいのであるが)と、最近思うこと

がある。他人のいい仕事に、嫉妬心交じりながらも、安心してしまう悲しい自分がいるのである。結局は、集合体の中にいるために、他の参加研究者の業績が自分にも利することがわかっているからかもしれない。あるいは、他力本願というのだろうか、自分たちの分野はまだまだ行けるのだと、未来が開けた気がしてしまう。それ以上に浸っているのは、埋没する被虐的喜びだろうか。研究成果は個人に属するものだから、こういう考え方は研究者を墮落させる元である。これはまっとうな考え方である。が、開き直らせて頂くと、やたらと競争原理主義的なこの世の中では、ネガティブな盟友意識もいいのではないだろうか?あまりにストレスにさらされては身が持たない。自身の周辺領域で他の研究者との違いを見ていくところに研究の独自性を確認できるような気もする。複合体「トランスポートソーム」におけるそれぞれの輸送体単体(チャネルやトランスポーター)と同じで、全体の中に自分が生きてくるといったところだろう。以上のように考えるのは年齢を重ね弱気になってきているからかもしれないが、なにせ新年早々、散歩中に「糞」を踏んで(30年ぶり位に)、絶対「運」が付いているはずなので、2010年は疑心暗鬼にならず研究を進めることができる年になるだろう。

心筋 NOトランスポートソームの多面性

古川 哲史(AO1 班)

東京医科歯科大学難治疾患研究所 生体情報薬理分野

本特定領域班における私たちのテーマは、心血管系特異的イオントランスポートソームの研究です。心血管系特異的トランスポートソームと言ってもあまりに漠然としているの

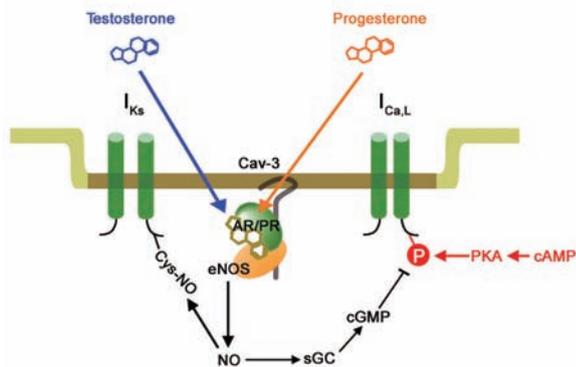


図1 性ホルモン非ゲノム作用による心筋イオンチャネル調節機構

で、ガス状伝達物質として特に心血管系で重要な役割を果たす nitric oxide(NO)がキーとなるイオントランスポートソームに焦点を絞って5年間研究を展開してきました。前半3年間は性ホルモンの非ゲノム経路を中心に据え、NOS3(eNOS)由来のNOによるタンパク質ニトロシル化依存的I_{Ks}チャネルの活性化と soluble guanylate cyclase(sGC)/cGMP依存的I_{Ca,L}チャ



ネル抑制を明らかにしました(図1)。前半の研究に関して、第2回の班会議で金井領域代表から質問をいただいた、心臓では、性ホルモン非ゲノム経路を担当する性ホルモン受容体は、古典的な核内受容体のN末端が短縮したアイソフォームであり、タンパク質がDNA結合ドメインから始まっていることを発表しましたが、N末端が短縮すると何故膜に局在するようになるか、がやり残しの疑問でした。性ホルモンのDNA結合ドメインはZn fingerタイプであり、複数のCysが3次元構造形成に重要な役割を果たします。ところがN末端が短縮し、CysがN末端に位置すると脂質修飾(パルミトイル化)

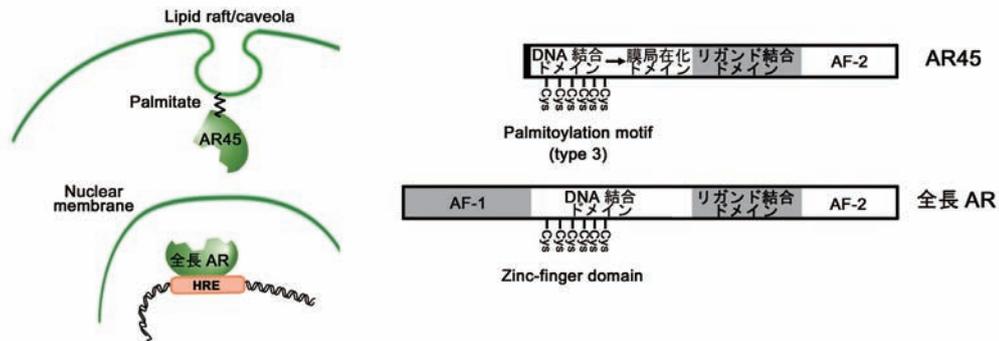


図2 短縮型性ホルモン受容体の膜局在メカニズム

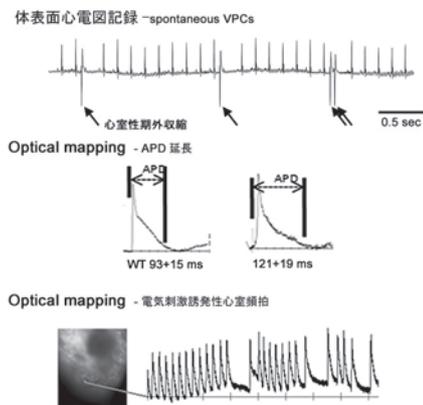


図3 NOS1AP KOマウスの機能解析

のシグナルとなり、膜に局在することが可能となることが分かってきました(図2)。後半は主に下記の2つのテーマに取り組んでいます。

1. NOS1AP KOマウスを用いた研究

NOS1AP(NOS1 adaptor protein)は、NOS1に結合し機能調節を行う分子です。最近のGWAS(genome-wide association study)で、NOS1APのSNPsが2型糖尿病・統合失調症などとともに心電図のQT間隔・心臓突然死に極めて強く関連することが明らかとなりました。研究室の笹野が留学中、in vitro実験でNOS1APをモルモット心室筋に過剰発現させると、 I_{CaL} チャンネルを抑制することを報告しています。そこで、今回はin vivoでの作用を検討するために、NOS1AP KOマウスを国立国際医療センター加藤規弘博士から供与いただき解析を進めています。

基礎データとして、NOS1AP KOマウスは心拍数・QRS

間隔・QT時間が有意に増加しており、自発性に心室期外収縮を頻発しました(図3上段)。これらの変化はNOS阻害薬L-NAME投与により正常化しました。電位感受性色素を負荷したランゲンドルフ還流心から記録した活動電位は、NOS1AP KOマウスでその持続時間が有意に延長していました(図3中段)。また、電気刺激による伝導ブロック・頻脈性心室不整脈の誘発率が上昇していました(図3下段)。

以上から、NOS1APがin vivoでも心筋再分極時間、ならびに不整脈発現に関与することが明らかになりつつあります。性ホルモン非ゲノム作用に関わるNOS3(eNOS)由来NOとNOS1APが関わるNOS1(nNOS)由来NOはいずれも I_{CaL} チャンネルを抑制しましたが、NOS3(eNOS)由来NOはcAMP/PKAにより活性化された I_{CaL} チャンネルを主に抑制したのに対して、NOS1(nNOS)由来NOはcAMP/PKAにより活性化されないベースラインの I_{CaL} チャンネルも抑制したことから、同じNOなのに作用に違いがあるのは何故か、その基盤となるイオントランスポートソームの差異は何か、などは興味深く今後の検討課題としたいと思います。

2. PLA法を用いたトランスポートソームの空間的解析

eNOS由来NOは I_{Ks} チャンネルをニトロシル化して活性化し、標的となるCysは α サブユニットKCNQ1C末端に存在するCys445であることが明らかにしました。これに対して、cAMP/PKAにより活性化 I_{CaL} チャンネルをsGC/cGMP依存性に抑制しますがその機構は十分解明されていません。主要なcGMP依存性シグナルには、protein kinase G(PKG)とphosphodiesterase(PDE)がありますが、PKG阻害薬KT-5823存在下では性ホルモンによる I_{CaL} 抑制作用は依然として観察されますが、PDE阻害薬IBMX存在下では消失したことから、少なくともモルモット心室筋ではPDEを介する

PLA (Proximity Ligation Assay) 法

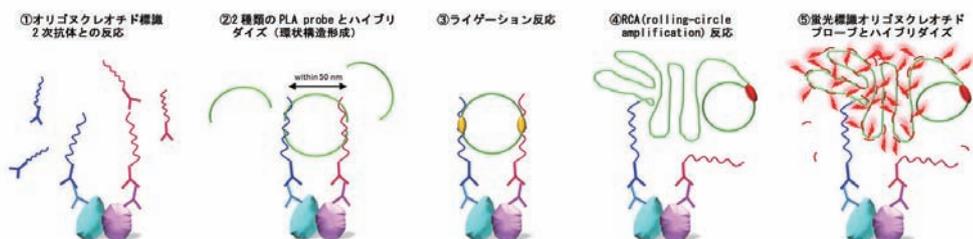


図4 PLA法の基本原理

cAMP分解の亢進がcAMP/PKA活性化 I_{CaL} チャンネルの抑制のメカニズムと考えられました。

PDE2特異的阻害薬EHNA存在下では性ホルモンによる I_{CaL} チャンネル抑制作用は消失し、PDE3特異的阻害薬milrinone存在下では I_{CaL} チャンネル抑制は依然として観察されることからPDE2が I_{CaL} チャンネル抑制に関与することが示唆されました。PDE2・PDE3の局在を検討するために行ったスクロース密度勾配分画法では、私たちの実験条件では分画4-6がlipid raft/caveola分画であり性ホルモン非ゲノム経路に関わるシグナル分子は同lipid raft/caveola分画に局在しました。 I_{CaL} チャンネル α サブユニットCav1.2も大部分はlipid raft/caveola分画(分画4-6)に存在し、小部分がより高い密度の分画に存在しました。PDE2・PDE3の検討では、PDE2は大部分がlipid raft/caveola分画(分画4-6)、PDE3は大部分がより高い密度の分画あるいは細胞質に存在しました。

PLA(Proximity Ligation Assay)法はOlink Bioscience社が開発したタンパク質間の近接性を検出する免疫細胞・組織染色システムです。オリゴヌクレオチド修飾を施した2次抗体を用い、これにPLA probeがハイブリダイズすることにより直径

約50nmの環状構造が形成され、増幅反応でシグナルを増幅することにより50nm以内に近接するタンパク質間の相互作用を感度良く検出できるシステムです(図4)。そこで、Cav1.2とPDE2、PDE3の相互作用を検討したところ、preliminaryな結果としてPDE2・PDE3ともCav1.2の50nm以内の空間に位置することが示されました。電気生理学実験およびスクロース密度勾配分画法の結果と合わせると、PDE2あるいはPDE3と共存する2種類のCav1.2があり、lipid raft/caveola分画でPDE2と相互作用するCav1.2が性ホルモン非ゲノム経路に関与するのではないかと現時点では考えています。

最後に、本特定領域班に加えていただき領域代表の金井先生、総括班の森先生、竹島先生、鈴木先生にこの場を借りて深謝いたします。ちょうど東京医科歯科大学に教授として着任したところであり、ラボをセットアップするのにとても助かりました。さらに、本領域班の方との技術的交流、精神的交流、など得られたものは計り知れないものがあり、今後のイオン輸送研究に役立てていきたいと思えます。

Scaffold の解体と再構築

畑 裕(AO1班)

東京医科歯科大学

「トランスポートソームにおける scaffold 蛋白の役割の解析」という題目で本領域に加えて頂いた。前半と後半で大分、研究内容が変わった。その経緯を振り返ってみたい。

§ Scaffold 蛋白研究の悩み

元はといえば、細胞間結合の研究をしていた。とくに細胞膜裏打ち蛋白に興味をもった。細胞間結合は接着とシグナル伝達の場合だから、接着分子・細胞骨格に加えて受容体・チャンネル・シグナル伝達分子に結合して、これらの機能分子の活動の舞台となる裏打ち蛋白、つまり、scaffold 蛋白 [Scaffold: A raised platform for workers to sit or stand on (The Merriam-Webster Dictionary)] は、重要に違いないと思われた。その思い通りに、私たちが神経シナプスで研究対象とした S-SCAM/MAGI-2 という分子については、特定のアイソフォームを欠損させただけでマウスが死んでしまうことを示せた¹⁾。だから S-SCAM/MAGI-2 は重要と断言できる。神経シナプスの scaffold 蛋白は多数知られているが、欠損させたら致死的と言う例は決して多くない。しかし、残念なことに、S-SCAM/MAGI-2 のノックアウトマウスに関する私たちの報告は、期待したほど反響を呼ばなかった。2年間で5回しか引用されていない。不遇感が漂うが致しかたない。問題はヒト疾病との関係が明らかでないところにある。S-SCAM/MAGI-2 は自閉症に係る接着分子と相互作用するし、そのアイソフォームを欠損

させると、ヒトの精神発達遅滞でしばしば認められる神経樹状突起スパインの形態変化と類似の異常が起こり、NMDA 受容体刺激に伴う Rho 蛋白の活性化と細胞骨格変化が障害されるから、S-SCAM/MAGI-2 はヒトの高次脳機能障害に関係しているのだが、まだ、その報告がない¹⁾⁻³⁾。S-SCAM/MAGI-2 の上皮型アイソフォームである MAGI-1 にも同様の事情がある。MAGI-1 は腸管上皮細胞や尿管上皮細胞ではタイトジャンクションにある。しかし、腎臓のスリット膜では MAGI-1 はスリット膜の実体である接着分子 nephrin と直接複合体を作り、スリット膜の中核を形成している⁴⁾。Nephrin の変異はネフローゼの原因となる。Nephrin だけでなく、Nephrin と相互作用する分子の多くは、その変異がネフローゼの原因となる。この伝でいくと MAGI-1 はネフローゼと関係しそうなのだが、これもまだ報告例がない。「まだ、見つかっていないのか」それとも「そもそもそうしたものがいないのか」わからない。自閉症の患者さんの100例以上を対象に、S-SCAM/MAGI-2 の解析をして頂いたが、変異はみつからなかった。あるいは、大事すぎて、S-SCAM/MAGI-2 や MAGI-1 に異常をもつような個体が存在しえないのか、とも思うのだが、少々強弁に過ぎるだろう。次世代シーケンス技術を駆使して、自閉症やネフローゼの症例の解析を大々的に展開すれば、見つかってくるかもしれない。しかし、その結果、S-SCAM/MAGI-2 や MAGI-1 がヒトの病気に関係することを示したところで、それらが治療標的になるかと問われると

自信が持てない。Scaffold蛋白にまつわるこのもやもや感、実は裏方的なscaffold蛋白の位置づけに由来するよう思う。「いるときは目立たないのだが、いなくなってみると有難いと初めて感じる」といった奥ゆかしさがscaffold蛋白にはついて回る。大事なだけでなく、応用的にはアプローチしづらい、とっつきにくい。なかなか難しい相手だとため息をつきながら、研究を進めて来た。

§ Scaffold蛋白の解体

その一方で、scaffold蛋白の概念の解体が進行した。数多くのprotein interaction databasesが公開されている。いまや、どの蛋白を取り上げても複数の蛋白と相互作用していることが明らかで、こうなってみると、全ての蛋白がscaffoldとしての役割をもつことになってしまふ。「それ自体には積極的な生物活性がない」とするscaffold蛋白の定義に捉われなければ、酵素活性やチャネル活性を持つ分子もscaffold蛋白ということになり、scaffold蛋白は奥ゆかしいと決めつけることはできなくなる。さらに、proteomics研究の進展は歩みをとめず、一個の細胞の中に存在する膨大な組み合わせの蛋白相互作用が浮かび上がってきた。過密な交通網をみるような蛋白相互作用ネットワーク図を眺めていると、めまいがしそうだ。数年前になるが、テレビで面白い企画をやっていた。アフリカのどこか片隅にレポーターが行く。そこでたまたま出会った人を捉まえて「日本に知り合いがいそうな知人を紹介してくれ」と頼む。いきなり日本領事館の人を紹介されては番組にならないが、アフリカの片田舎だから、そうはならず、隣町あたりの誰れさんが紹介される。レポーターは、その誰れさんのところに行って、同じ依頼をする。これを反復して、何人目で実際に日本に到達するか試すのが番組の趣旨だった。アフリカの中を暫時うろうろし、やがて、中東、アメリカあたりを經由し、十五人目で日本の鹿児島に上陸したと記憶している。このアナロジーからは、細胞内のすべての分子は、一見、関係なさそうでも、つながっていると云えないこともない。そうなる、細胞内に認められる無数の相互作用のうちの特定の相互作用を恣意的に取り上げて論じることの妥当性も疑われてくる。実際、世の中の研究の潮流は、質量分析、シークエンス、アレイ解析、ノックダウンライブラリーなどの実験技術・材料の驚くべき進歩を受けて、「網羅的」「genome-wide」「non-bias」「high-through put」といったキーワードが錦の御旗になっている。どの蛋白も複数の他の蛋白と相互作用する事実を突きつけられて、古典的scaffold蛋白の立場が危うくなった時期に、「scaffold蛋白は蛋白相互作用ネットワークの中でハブの位置を占める」と強調することで、scaffold蛋白の砦を守ろうとしたこともあったのだが、そんな新古典的(?)ないし修正的scaffold蛋白観も受け入れられにくくなった。

同時に、蛋白相互作用を論じるに際して、「蛋白AとBが相互作用する」と質的に表現するだけでは、不十分なことも明らかになってきた。ネットワークの中でさりげなく線で繋がれている分子達の量的調整がどの様になされているのか。Scaffold蛋白とトランスポーターが1対1で複合体を作るならば、片方が多すぎたり、少なすぎたりしないように制御されているはずだ。あるscaffold蛋白に結合する複数の分子群は、ひとつ

のグループとして転写、翻訳制御されるのか?さらには、それら分子の合成の場がどのように調整されているのか?細胞の中の右端と左端でばらばらに合成されて、運任せて出会うとも考えがたい。なにか巧みな制御がありそうだが、複雑微妙な調整が一方向性に行われるとも想定しにくい。フィードバックがかかって、無理なく収まるべくして収まるようになっていると考えないと、到底、細胞の恒常性は維持できそうもない。あれこれ心配になって、scaffold蛋白を中心とする分子相互作用を安閑と眺めていられなくなる。

§ 私たちの研究におけるscaffold蛋白の見直し

こんな具合に内心では迷いながらも、表向きは相変わらずMAGI蛋白に拘泥し続けていた私たちであるが、MAGI-1蛋白と相互作用する分子としてRASSF6という蛋白に遭遇したところから、私たちなりにscaffold蛋白の見直しが進行した⁵⁾。意地も張り通せば、どうにかなるものだ。RASSF6そのものは腫瘍抑制分子として知られるRASSF蛋白のひとつで、一見、トランスポーターとは関係していないのだが、RASSF6が関係するHippoシグナル伝達系は、細胞接着と密接に関係する細胞増殖制御機構で、その構成分子のうち少なくとも2つは、本領域でもしばしば取り上げられるNHE-RF1と複合体を作っている。Hippoシグナル伝達系の名前は、その中核をなすキナーゼHippoに由来する。ヒトではmammalian Ste20-like kinase 2 (MST2)がこれに相当する。MST2はRASSF6、Sav1、MOB1などの分子と複合体を形成する^{6,7)}。これら分子の詳細にはここでは立ち入らないが、いずれも重要な機能をもつシグナル伝達分子である。つまり、MST2はHippoシグナル伝達系のscaffold蛋白として機能している。その上、当然、リン酸化酵素としてふるまい、その活性はシグナル伝達系の機能に必須であるし、その活性に応じて分子が離合集散すると想定される。つまり、MST2はscaffoldといっても、役者を縁の下から支える舞台といった地味な存在ではない。喩え話ばかりで恐縮だが、むしろ、フランスの貴婦人のサロンに近い。MST2自体がサロンの主催者と云ってもよい。

蛋白相互作用における量的調節に関連して注目すべきは、MST2とSav1は複合体を作っていると、どちらも安定で、かい離すると不安定化するという報告だ。それだけではない。RASSF6が過剰になりMST2より多くなると、その細胞は細胞死を起こす⁷⁾。これらの知見は、生存している細胞においては、MST2、Sav1、RASSF6の量が、自ずと同じ水準に調節されることを支持する。複合体をつくる複数の分子の量的調節としては、共通の転写因子やmicroRNAの制御を受けて転写・翻訳のレベルで量が合わせられる可能性がまず考えやすいが、蛋白レベルの安定化を通じて量が合わせられる可能性も想定されることになる。もちろん、これらのことは証明されていることではない。ここで云いたいのは、MST2が、様々のインスピレーションを喚起してくれる華やかなscaffold蛋白だということだ。

§ 見方を変えれば、見え方が変わるscaffold蛋白

かくしてscaffold蛋白の粹程を取り直すことによって、私たちの内部におけるscaffold蛋白研究は新たな転回をみせてくれ

ただ、このような scaffold 蛋白観に立つと、トランスポートソームにおける scaffold 蛋白の役割も「トランスポーター・チャンネルによる物質輸送を修飾する」という部分よりも、「トランスポーター・チャンネルを通じて輸送されたものに応答して、細胞機能を修飾する」という部分に注目する方が、面白くなって来る。つまり、「トランスポーター・チャンネルによる物質輸送が正常に機能するために scaffold 蛋白が必要」なのではなくて、「トランスポーター・チャンネルは、scaffold 蛋白を介して細胞機能を修飾するために物質を運んでいる」と見る立場に魅力を感じる。翻ってみれば、S-SCAM/MAGI-2の研究もすでにその見方を支持していた。S-SCAM/MAGI-2、あるいは、PSD-95(云うまでもなくこちらの方が間違いに知名度が高く、S-SCAM/MAGI-2はこの分子の前に霞んでいる)が、接着分子と神経伝達物質受容体の双方に結合することから、「シナプスの scaffold 蛋白の重要な機能は、神経伝達物質受容体を神経伝達物質放出機構の対面に局在化させ、効率的神経伝達を実現することにある」と、極めて初期(happy old days)に想定した。この見方は厳密には立証されているわけでないが、the most probable explanation であって、今でも多くの人が抵抗なく受け入れると思う。だが、その後のノックアウトマウスの解析結果は、S-SCAM/MAGI-2について少し別の局面を示している。ノックアウトマウスにおいては、NMDA型グルタミン酸受容体を介するカルシウム流入には著明な変化がないが、Rho 蛋白が活性化せず樹状突起スパインの細胞骨格変動が起こらない。ノックアウトマウスを解析していた当時は、「S-SCAM/MAGI-2は scaffold 蛋白として Rho 蛋白の GDP/GTP 交換因子を NMDA 型グルタミン酸受容体の近傍に位置づける役割を持ち、ノックアウトマウスではこの因子が受容体に近接しないために異常が起こるに違いない」と考えて、そうした GDP/GTP 交換因子を探したが、結局同定できずに終わった。現在の解析技術を用いれば、何か見つかるかもしれない。しかし、その一方で、S-SCAM/MAGI-2が欠損すると(正確には3つある

alternative splicing variantsのうちの一つ、しかも、量的には少ない variant がなければ)、まったく樹状突起スパインの細胞骨格の変動が起こらなくなることを考えると、たかだか「近傍に位置づける」と云った消極的な役割の欠如だけで、ノックアウトマウスの異常を説明できるのか?と、今となっては疑いたくなっている。華やかな scaffold 蛋白 MST2 を見た後となつては、S-SCAM/MAGI-2 も、実はもっと積極的な役割をもっているのではなからうかと期待する気持ちが生じている。

§ この後について

ここで Hippo シグナル伝達系について補足する。Hippo シグナル伝達系は S-SCAM/MAGI-2 や MAGI-1 とは異なり、ヒト疾患と関係していることが確実である。がんとの関係が第一に注目されているが、心筋肥大や炎症性腸疾患にも関係している。組織幹細胞の機能にも重要とされている。このシグナル伝達系については、まだ不明の部分が多く、とくに上流の制御機構がよくわかっていない。細胞接着分子が制御に関わることは知られている。しかし、先に触れたように、哺乳動物では NHE-RF1 がこのシグナル伝達系に関係していそうだから、トランスポーター・チャンネル・受容体も上流の制御機構に組み込まれていると考えられる。この点を今後も scaffold 蛋白(華やかな scaffold 蛋白)の視点で追及していきたい。しかし、scaffold には処刑台[Scaffold: A platform on which a criminal is executed (The Merriam-Webster Dictionary)]の意味もあるから、あまり浮かれていると飛んだ羽目に陥るかもしれない。

§ おわりに感謝をこめて

2009年は RASSF と Hippo シグナル伝達系にとっては重要な年になりました。2月にカナダで RASSF のシンポジウムが、4月にはイタリアで Hippo シグナル伝達系のシンポジウムが開かれました。いずれもはじめての国際シンポジウムでした。RASSF の会議には、本領域の仁科先生も参加されました。

The Hippo Tumor Suppressor Pathway: A Brainstorming Workshop Rome, Italy, 22-23 April 2009

Clinical and Biological Implications for the Role of the RASSF family of Tumor Suppressor Proteins: First International Symposium Banff, Canada, 4-8 February 2009



第2回 RASSF シンポジウムは 2011 年夏にロンドンで、
第2回 Hippo シンポジウムは 2010 年秋に再びローマで開催予定です

10月には、日本生化学会で仁科先生と私がオーガナイザーになって、Hippoシグナル伝達系のシンポジウムをもつことができました。これも本領域の取り持つ縁と有り難く感じております。本領域が、金井先生はじめ総括班の森先生、竹島先生、鈴木先生のもとに、学問的に自由で豊かな研究環境を提供してくれましたことを、深く感謝しています。松島、京都、東京、淡路島、阿蘇と場所を変えて開催された班会議・シンポジウムでは、それぞれ有意義な情報交換が行うことができました。主催されました関係者の皆様に感謝申し上げます。iCeMSとの合同シンポジウムでは、普段なじみの少ない研究分野の話のを伺って刺激であったことが、とりわけ印象深く思い出されます。本特定領

域での研究を深化させて、応用的にも意味のある成果につなげていきたいと思えます。今後ともよろしくお願い申し上げます。

文献

- 1) Iida J *et al.* Mol Cell Biol. 2007 27(12):4388-4405.
- 2) Iida J *et al.* Mol Cell Neurosci. 2004 27(4):497-508.
- 3) Sumita K *et al.* J Neurochem. 2007 100(1):154-166.
- 4) Hirabayashi S. *et al.* Lab Invest. 2005 85(12):1528-1543.
- 5) Ikeda M *et al.* Exp Cell Res 2007 313(7):1484-1495.
- 6) Hirabayashi S *et al.* Oncogene. 2008 27(31):4281-4292
- 7) Ikeda M *et al.* Sci Signal. 2009 2(90):ra59.

トランスポートソームを対象とした実体を伴った 相互作用ネットワークの解析 － 何がどのように相互作用するのか？－

木下 賢吾(A01班)

東北大学大学院情報科学研究科

はじめに

平成17年度にスタートした本領域もあつという間に5年が経ち、最終年度になりました。個人的な事で恐縮ですが、平成16年度の10月に東京大学に移ったばかりの時期に本特定領域の立ち上げに加えていただき、最終年度を迎えた平成21年10月には東北大学に異動した事を振り返ると、東京大学にいた5年間の間をまるまる特定領域のプロジェクトと共に過ごしたことになるのだと感慨深い物があります。始まる当時は「5年間は長い」と思い、盛りだくさんの計画を練っていましたが、終わってみればあつという間の5年間で十分計画通りに行った部分もある一方、思った以上に大変でなかなか思うとおり進まない部分もありました。ここではこの5年間やってきた事を簡単に振り返ってみたいと思います。

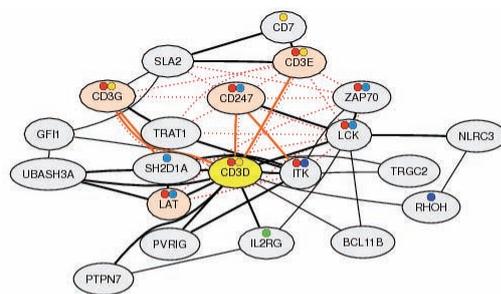
何が相互作用するのか？

タンパク質の生物学的な機能を考える際には、まず相互作用する相手(=何と相互作用するのか)を決める必要があります。これまで酵母ツーハイブリッドなどの大規模実験による網羅的なパートナー決めが多くなされてきました。特にヒトを対象としたツーハイブリッド実験のデータはかなり蓄積され、様々な用途で利用されるようになってきました。しかし、大規模実験データには擬陽性が多い事や、再現性が低い事、特定の条件下でしか相互作用しない場合の相互作用の検出が困難であるという問題がありました。これに対して我々は、最近急激な勢いでデータが蓄積しつつある遺伝子の発現データに着目し、遺伝子の共発現を利用して相互作用の相手を決めるという手法を考案し、実験の研究

者にも利用しやすいようにWebデータベースとして、遺伝子共発現データベースCOXPRESdb(<http://coxpresdb.jp>)の最初のバージョンを2007年1月公開しました。公開後は領域内での活発な利用のみならず、世界的にも利用者が増え、現在では毎月のunique visitorで1000、ページビューで10,000を超えるようになってきています。当初は、特定領域内での利用が最優先だったのでヒト、マウス、ラットで開発を行ってきましたが、その後多くの要望があり最近では、ニワトリ、ショウジョウバエ、線虫、ゼブラフィッシュなどのモデル生物へも対象を広げて開発を行っています。また、共発現データだけでなくタンパク質間相互作用や保存共発現の情報、KEGGのアノテーションなどを加えた統合的なネットワークを提供しています(図1)。

遺伝子の共発現は、mRNAの量をDNAマイクロアレイで測定した発現量データを利用して、多くの実験で協調して増えたり減ったりしている遺伝子を決めることです。mRNAの量が必ずしも遺伝子産物であるタンパク質の存在量を意味するわけではありませんが、ある程度の比例関係はあると期待できます。また、遺伝子の共発現(=同時に存在する)は、遺伝子産物であるタンパク質が相互作用するための必要条件です。実際、共発現している遺伝子は何らかの機能的な関連があることが多く、機能未知の遺伝子を発見するには非常に強力な手段となっています。例えば、ヒトのコレステロール代謝パスウェイには14個の遺伝子が関与していますが、このうち13個の遺伝子が高い共発現を示している事がCOXPRESdbを利用する事で簡単に見取することができます。

遺伝子の共発現という概念自体は古くからあり、その有



KEGG ID	Title	#genes	Link to the KEGG map (multiple genes)
hsa04660	T cell receptor signaling pathway	8	
hsa04640	Hematopoietic cell lineage	4	
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	1	
hsa04650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	5	
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	2	

図1 COXPRESdbによるネットワークの1例。共発現関係(黒線)だけでなく、既知のタンパク質間相互作用(赤線)、マウスやラットで保存している共発現(オレンジ線)により関連遺伝子との関係を示している。

用性は認識されていましたが、アレイデータの取り扱いの困難さや、多細胞生物に於ける共発現指標として良い物が無かった事など、あまり利用がなされていませんでした。これに対してCOXPRESdbでは、機能的に関連している遺伝子の検出感度が高くなるようにデータ処理を最適化し、新しい共発現指標の開発を行ってきました¹⁾。特に、最近開発した多次元共発現指標²⁾は、まだ植物のデータにしか適用できていませんが、タンパク質間相互作用を検出するのに強力な手法となると思っているため、特定領域の残りの期間を利用して、ヒトデータへの適用を進め、何が相互作用するのかについて、より信頼性の高いデータを出していきたいと思っています。

どのように相互作用するのか

相互作用ネットワークなどを考える際にはタンパク質間相互作用は抽象化され、単にグラフの「点」であるタンパク質が相互作用するか否かだけを「線」で表現することがあります。ネットワークとしてのタンパク質間相互作用も解析のしよによっては、ハブタンパク質の存在やシステムの堅牢性の仕組みなど面白い知見を得ることが出来ますが、実際にどのようにそれらが相互作用するのかが分からないと、分子間相互作用を本当に理解したことになるし、薬剤によるタンパク質間相互作用の阻害やネットワーク構造の改変などの応用につながりません。そこでタンパク質複合体の立体構造を知ることが必要になります。しかし、現在のPDBを見渡してみれば分かるように、タンパク質複合体の立体構造解析は単体の構造解析よりはるかに困難です。そこで、単体の構造から複合体の構造を予測する手法が重要になってきます。

これに対して我々は、特定領域の開始当初より複合体の構造予測法の開発に注力してきました。当初は、配列の保存部位に着目して相互作用部位を絞り込み立体構造上可能な複合体構造を探すという手法を採っていました。これはこれでユニークな方法として複合体の予測コンテストCAPRIの評価会議に招かれるなど、高く評価されました。しかし、最初に相

相互作用部位の絞り込みがうまくいかなかったときには、当然のことながら予測はうまくいきません。そこで、これまでの発想を変えてここ1、2年は、「相補的な構造の配置を探す」のではなく「相補的な形を持った部分を探す」というアプローチで取り組んできました。この違いはやや技術的な問題になりますが、「可能な配置を探す」ことに比べ「ある構造と似た構造を探す」方が速い(=可能な配置よりも似た構造の方が場合の数が少ない)事を利用して、より広範な複合体構造の可能性を探究できるようにしました。この結果、あらかじめ相互作用の候補部位を絞ること無しに、全体構造に関して複合体の候補構造を以前の10倍から100倍多く列挙できるようになりました。その結果「答えにきわめて近い構造が候補の中に入るようにはなってきましたが、答えが分かる前にそれをどのように選ぶか」という別の問題に直面しました。そこで、たくさんの候補構造の中から真の構造に近い構造を選び評価関数の開発を進めました。ここでは、我々が得意とする、分子表面構造の相補性と静電ポテンシャルの相補性及び疎水性相互作用の尤もらしさを評価する事としました。その際、これまでは1つの評価関数で尤もらしさを評価する事が行われてきましたが、タンパク質間相互作用の多様性を考えると、1つの相互作用関数で評価するのは限界があると考え、既に複合体の構造が分かっているタンパク質の相互作用部位を相互作用の種類で分類し、その種別毎に評価関数を構築する事を考えました。実際に分類をしてみると、主に疎水性相互作用で出来ている複合体、静電相互作用が支配的な複合体、両方をたくみに使っている複合体など様々な複合体があり、そのそれぞれに応じた評価関数を構築することで、より良い評価関数を構築することが出来ました³⁾。

以上のような改良を続けてきた結果、これまでずっと参加していた複合体の予測コンテストCAPRIに於いても正解を出せる割合が格段に上がってきました。例えば、図2に挙げた例は最近行われたCAPRIでの予測結果です。この例は珍しく答え(複合体構造)が2つある面白い例で、Mode Aの結合様式はいくつかのグループでもある程度正しい予測を出してしま

たが、もう一つの結合様式である Mode Bも含めて両方を正しく予測できたのは我々のグループを含めて数グループでした。

まとめ

以上簡単に見てきたように、何がどのように相互作用するのかに関して5年間で幾ばくかの成果を上げることができました。特に「何が」と言うことに関して、世界に先駆けてヒトの共発現データベースを構築できたことは非常に大きな成果だと思っています。実際、公開してからまだ3年ほどですが、COXPRESdbを利用した研究成果も論文で出始めていて、まだ論文になっていないケースも含めると予想以上に利用が進んでいるようです。一方、「どのように」に関しては、複合体の予測という観点では良い物を作れましたが、シミュレーションの観点ではまだまだやり残したことがあると感じています。特に、現在もまだ進行中の巨大膜系のシミュレーションは、系の巨大さから新しい物が見えつつある一方、系を大きくしたためにシミュレーションそのものだけでなく解析においても多大な時間を要しており、最終的な結果を得るのにもう少し時間がかかりそうです。

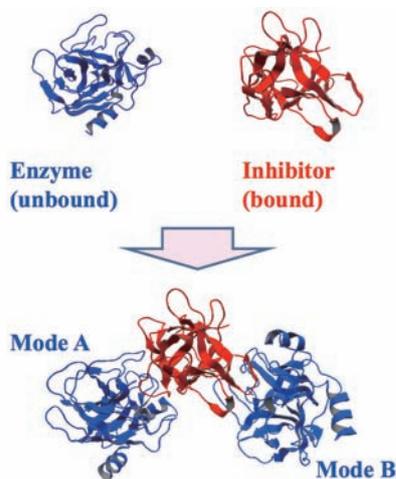
この原稿を書いている時点で、東北大学に来て約4ヶ月。新しいラボの一からの立ち上げでまだまだ忙しい毎日が続いていますが、徐々に研究を推進する環境も整いつつあるので、本特定領域のまとめに向けてラストスパートを頑張ってい

たいと思います。

謝辞

本特定領域では領域代表の金井先生を始め数多くの先生方にお世話になりました。個々の先生方の名前を挙げることはひかえさせていただきますが、多くの刺激を得て研究の幅を広げる上でも、この特定領域の先生方には大変感謝しています。また本稿を書くにあたって、かつてはこの特定領域のポスドクで、現在は私の研究室の助教として本特定領域に加わってくれている大林さんと長年の共同研究者である大阪大学教授の中村春木先生と日立ソフトの金森英司さんには大変お世話になりました。

- 1) T Obayashi and K Kinoshita, Rank of correlation coefficient as a comparable measure for biological significance of gene coexpression, DNA research, **16**, 249-260, 2009
- 2) K Kinoshita and T Obayashi, Multi-dimensional correlations for gene coexpression and application to the large-scale data of Arabidopsis. *Bioinformatics*, **25**, 2677-2684, 2009
- 3) Y Tsuchiya, E Kanamori, H Nakamura and K Kinoshita, Classification of hetero-dimer interfaces using docking models and construction of scoring functions for the complex structure prediction, *Adv. Appl. Bioinfo. Chem.*, **2**, 79-100, 2009



T40_P45	f_nat	L_rmsd	evaluation
Mode B			
M01	0.95	0.84	high
M02	0.76	1.79	high
M03	0.88	0.67	high
M04	0.45	5.34	acceptable
M05	0.76	1.23	high
Mode A			
M06	0.63	5.95	medium
M07	0.88	2.82	medium
M08	0.83	4.55	medium
M09	0.89	1.00	high
M10	0.86	2.31	high

図2 CAPRI Target 40の予測結果。正解との誤差(L_rmsd)が結晶構造解析の解像度と遜色のない1.0Å以下の予測が出来るようになってきた。

研究項目A02の研究概要

膜輸送体が機能を発揮するためには、生体膜上の適切な位置に配置されることが必要であり、その機能活性はリン脂質や共在タンパク質などを含むその作動環境に大きく影響される。本研究項目では、トランスポートソームとそれが形成されるプラットフォームである細胞膜マイクロドメインや細胞骨格との相互作用を明らかにし、その生体膜上での存在の様式と機能発現における作動環境の役割を理解することが目標となった。端的に表現すれば、トランスポートソームのサブオルガネラレベルでの存在や機能の解明ということになる。計画研究は結合膜構造中のチャネル機能共役の解明を目指す竹島班、アストログリアにおける K^+ と水の方向性輸送に注目する日比野班、トランスポートソームと細胞骨格の相互制御機構を解析する中西班、生体膜屈曲の形成とトランスポートソームに着目した末次班、膜輸送体の生体膜上での動態理解を目指す楠見班の計5グループにより構成された。一方、公募研究の応募においては意欲的な申請が殺到し、H18年度採択として計6班と、H20年度採択として計9班の参画が得られた。計画研究の概要については、各グループによる要約を参照していただきたいが、概ね優れた研究進展があったと評価される。また、公募研究班からも予想を上回る研究成果が相次いだ。紙面制限から3つの具体例のみを以下に手短かに紹介する。

胃酸分泌の膜輸送機構の研究を手掛ける酒井秀紀グループ(富山大薬)は、壁細胞における分泌膜と細管小胞膜との比較検討にて、分布する H^+ ポンプ- K^+ チャネル複合体と膜リン脂質の組成の違いを発見し、その生理的意義として基礎胃酸分泌と摂食時酸分泌への対応を示すことに成功している。また、平滑筋 Ca^{2+} シグナリングの研究を手掛ける今泉祐治グループ(名市大薬)は、膀胱平滑筋における自発 Ca^{2+} 放出(Ca^{2+}

spark)の発生とその Ca^{2+} 信号を一過性外向き電流(STOCs)という電気信号に変換するトランスポートソーム機能の理解を推し進め、尿貯留・排泄調節という膀胱機能発現におけるその根源的役割を解明している。一方、膜リン脂質動態や温度感受性機構の研究を手掛ける梅田真郷グループ(京大化研)は、低温指向性ショウジョウバエ変異体においてジストログリカン遺伝子変異を見出し、細胞外マトリックスの異常に起因する Ca^{2+} シグナルやミトコンドリア呼吸の亢進を解明した。これらの成果は、膜輸送複合体がサブオルガネラレベルでの局在により厳格に機能制御されることを示しており、本研究項目で設定した目標の達成に大きく貢献する成果となっている。

本研究項目における研究推進では、直接相互作用による複合体形成によって成立する膜輸送活性のみならず、チャネル、トランスポーターやポンプ間の機能的な共役により効率化される膜輸送の実態も各班の個別研究成果から示唆され始めている。例えば、小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルの効率的な機能発揮には、同調して機能するものの、直接相互作用のない K^+ 透過性TRICチャネルの機能が不可欠であることも本研究項目での成果として得られている。研究対象や実験技術において多様性に富む本研究項目であったが、発展型研究として今後の細胞生理学や細胞生物学の中心課題と予見される新たな目標が設定されたことも大きな学術的成果である。すなわち、膜輸送複合体間の機能的共役という視点に基づいたイオンやアミノ酸の細胞内シグナルの時空間的多様性の発生機構や生理機能の検討が、今後注目すべきフロンティア領域として残されていることである。

竹島 浩
(京都大学大学院薬学研究所)

結合膜構造とチャネルマイクロアセンブリ

竹島 浩(AO2班)

京都大学大学院薬学研究所

本特定領域研究の計画班として「結合膜構造とチャネルマイクロアセンブリ」という課題名にて研究計画を立案して、早くも5年の歳月が過ぎようとしている。ランダムな単クローン抗体作成と組織染色を組み合わせた独自の分子検索法を開発し、骨格筋小胞体より新規膜タンパク質を同定し、その細胞内分布や構造的特徴から小胞体Ca²⁺シグナリングへの関与が想定される分子群について、詳細な解析を企画するという研究スタイルをこの十数年程は貫いている。この研究の中で得られたジャンクトフィリン(JP)と命名した小胞体膜タンパク質には、骨格筋特異的なJP1、筋細胞全般に発現するJP2、神経細胞に共存するJP3とJP4の4種のサブタイプが存在する。心筋細胞のdiadと骨格筋のtriadとよばれる結合膜構造では、ジヒドロピリジン受容体(細胞膜上の電位依存性LタイプCa²⁺チャネル)とリアノジン受容体(小胞体膜上のCa²⁺放出チャネル)が機能共役することにより、脱分極シグナルが筋収縮を誘導するCa²⁺シグナルに変換される。どのような経緯で上記の分子検索法を立案し、どのようなモチベーションでJPサブタイプを分子同定したかについては、別の場にて以前解説している¹⁾。JPサブタイプは小生のお気に入りのタンパク質であり、8回繰り返すMORNモチーフと命名した配列により細胞膜と相互作用し、カルボキシル末端で小胞体膜を貫通することで、両膜系を近接させて結合膜構造を形成することが推定された²⁾⁻⁸⁾。さらに、JP1とJP2欠損マウスの解析から、心筋と骨格筋における結合膜構造の形成へのJPサブタイプの寄与が示唆された^{2),4),5)}。そのような状況下で、5年前に小生は研究調書を提出しており、コンピュータに残されているファイルを開くと、熱意と意欲に溢れて記載された研究計画がモニターに表示された。すなわち、1)心筋と骨格筋におけるJPサブタイプの生理的機能を確定し、2)平滑筋細胞と神経細胞の結合膜構造やチャネルにおけるJPサブタイプの分子機能を究明し、3)循環器や神経疾患における病態とJPサブタイプの関

連を検討するというものである。本特定領域研究が終了しようとする現在、思うような進展に至らずに多少残念な箇所はあるものの、多くの優秀な共同研究者に恵まれて、合格点に達する成果が得られたものと自己評価している。不確定な部分もあるものの、本特定領域への参画にて明らかにされたJPサブタイプの生理機能を図示したものが図1である(詳細については後述する)。

ノックアウトマウスの実験では、JP遺伝子が破壊されている場合に骨格筋と心筋細胞の発達過程で結合膜構造の形成が阻害されることが示された。しかしながら、分化完了過程の結合膜構造にJPが本当に寄与しているのか?、という質問も頑固な研究者達から受けたことがある。そこで、siRNAを成体マウス骨格筋細胞に導入してJP1とJP2をノックダウンする実験を立案した。siRNA導入骨格筋ではtriadの出現率が激減し、ストア依存性Ca²⁺流入(SOCE)の減弱も観察され、筋細胞SOCEへの結合膜構造の関与が示唆された⁹⁾。一方、今泉グループ(名市大薬、本特定公募班)との共同研究では、平滑筋細胞に発現しているJP2はperipheral couplingとよばれる結合膜構造を形成させて、2型リアノジン受容体(RyR2)と細胞膜上の大コンダクタンスCa²⁺依存性K⁺チャネル(BKチャネル)の機能共役貢献するという作業仮説のもとJP2+/-とRyR2+/-マウスの解析を立案した。この作業仮説は間違っていないと思われるが、RyR2+/-マウスにて膀胱平滑筋のBKチャネル活性の低下は観察されるものの¹⁰⁾、JP2+/-マウスでは顕著なBKチャネルの活性変動は認められなかった。困難ではあるが、平滑筋細胞でのJP機能を明確にするためには組織特異的遺伝子欠損マウスの作成が必要であると思われる。

神経細胞におけるJPの機能解析では、JP3とJP4を同時欠損する変異マウス(JP-DKO)が極めて有用なモデル系となった。離乳時期に死亡するJP-DKOマウスではあるが、練り餌による飼育で致死性を回避することを見出したこと、さらに

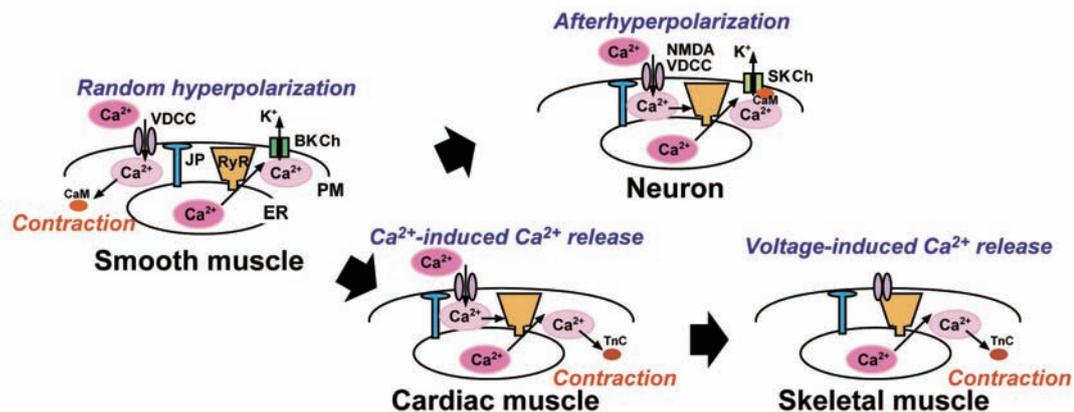


図1 興奮性細胞系におけるJPサブタイプによる結合膜構造とチャネル機能共役の形成

は、森口グループ(東北大薬、本特定公募班)と柿沢グループ(現長崎大医、本特定公募班)と共同研究を企画できたことも幸運であった。成長したJP-DKOマウスは、中枢異常に起因する後肢組み反射(foot-clasping reflex)、記憶学習と運動学習の減弱を示した。JP-DKO海馬CA1神経細胞においては、RyRと小コンダクタンズCa²⁺依存性K⁺チャンネル(SKチャンネル)の機能共役の破綻により脱分極後の後過分極相が消失し、記憶学習に不可欠な長期増強の形成が減弱していた¹¹⁾。JP-DKO小脳プルキンエ細胞においても、RyRと小コンダクタンズCa²⁺依存性K⁺チャンネル(SKチャンネル)の機能共役の破綻により脱分極後の後過分極相が消失し、運動学習に不可欠な長期抑圧の形成が減弱していた^{12),13)}。

JPサブタイプとヒト疾患との関連でも、少なからぬ進展が見られた。JP3遺伝子へのtriplet repeat挿入変異がハンチントン舞踏病類似疾患(HDL2)の原因であるという報告が米国グループからなされ¹⁴⁾、その発症メカニズムが問題視されていた。運動失調を示さないとしたJP3+/-マウスであるが、米国グループとの共同研究にて加齢による運動協調性の低下が認められ、ヒトにおいてもJP3遺伝子異常と加齢によるHDL2発症を示唆する成果が得られた(論文投稿中)。一方、心筋症モデルマウスにおいてJP2発現の減弱が認められることを見出し¹⁵⁾、我々はヒト心筋症との関連に注目した。東京女子医大グループとの共同研究により、JP2遺伝子上のアミノ酸点変異による肥大型心筋症の日本人家系が見出され¹⁶⁾、ほぼ同時期に、JP2遺伝子変異による複数の肥大型心筋症例が米国グループからも報告された。また、米国グループとの共同研究でJPが一酸化窒素NOで修飾されることも判明し¹⁷⁾、様々な病態との関連が示唆されるNOであるため、それぞれの病態メカニズムにおけるJPのNO修飾も今後注目される。

引用文献

- 1) 竹島浩 結合膜形成因子 ジャンクトフィリン 実験医学 26, 462-466, 2008.
- 2) Takeshima H. et al. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell* 6, 11-22, 2000.
- 3) Nishi M. et al. Characterization of human junctophilin subtype genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 920-927, 2000.
- 4) Ito K. et al. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J. Cell Biol.* 154, 1059-1067, 2002.
- 5) Komazaki S. et al. Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. *FEBS Lett.* 524, 225-229, 2002.
- 6) Nishi M. et al. Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 318-324, 2002.
- 7) Komazaki S. et al. Abnormal junctional membrane structures in cardiac myocytes expressing ectopic junctophilin type 1. *FEBS Lett.* 542, 69-73, 2003.
- 8) Nishi M. et al. Coexpression of junctophilin type 3 and type 4 in brain. *Mol. Brain Res.* 110, 102-110, 2003.
- 9) Hirata Y. et al. Uncoupling of store-operated Ca²⁺ entry and altered Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum through silencing of junctophilins. *Biophys. J.* 90, 4418-4427, 2006.
- 10) Hotta S. et al. Ryanodine receptor type 2 deficiency changes excitation-contraction coupling and membrane potential in urinary bladder smooth muscle. *J. Physiol.* 582, 489-506, 2007.
- 11) Moriguchi S. et al. Functional uncoupling between Ca²⁺ release and afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 10811-10816, 2006.
- 12) Kakizawa S. et al. Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. *EMBO J.* 26, 1924-1933, 2007.
- 13) Ikeda A. et al. Abnormal features in mutant cerebellar Purkinje cells lacking junctophilins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 835-839, 2007.
- 14) Holmes S.E. et al. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat. Genet.* 29, 377-378, 2001.
- 15) Minamisawa S. et al. Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 852-856, 2004.
- 16) Matsushita Y. et al. Mutations of junctophilin type 2 associated with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Hum. Genet.* 52, 543-548, 2007.
- 17) Phimister A.J. et al. Conformation-dependent stability of junctophilin 1 (JP1) and ryanodine receptor type 1 (RyR1) channel complex is mediated by their hyper-reactive thiols. *J. Biol. Chem.* 282, 8667-8677, 2007.

微小管から細胞膜へ

中西 宏之(AO2班)

熊本大学大学院生命科学研究部 細胞情報薬理学分野

リン脂質結合タンパク質のSGIP1 α とFCHO2

この特定領域発足時、私共は「トランスポートソームと微小管との関係」を解析し、微小管がチャンネルやトランスポーターの局在や機能にどのように関わっているかを明らかにしようとして研究をスタートさせました。まず、これまでの方法とは異なった方法を利用して新しい微小管結合タンパク質を同定しようとして試みました。そこでチュブリン・プロット・オーバーレイ法を新しく開発し、分子量約100kDの新しい分子を同定しました。この分子をp100と仮命名(のちにSGIP1 α と命名)して、その性状を試験管内で解析したところ、SGIP1 α は高いアフィニティーで微小管と結合し、微小管の重合を促進することを見出しました。SGIP1 α の微小管結合部位はN末端領域(MPドメインと命名)に位置し、既知の分子とのホモロジーはありません。SGIP1 α の他の領域の検索をおこなったところ、機能が不明であり、N末端側にFCHと呼ばれるドメインを有するFCHO1とFCHO2を見出しました(図1)。SGIP1 α とこれらの分子はN末端領域を除いてよく似た分子構造をもっています。当時、FCHは微小管結合ドメインとして知られていたため、SGIP1 α の生化学的性状と併せて、SGIP1 α は間違いなく微小管結合タンパク質であると確信しました。SGIP1 α とFCHO1ならびにFCHO2はファミリーを形成し、同じ微小管結合タンパク質として機能していると推測しました。

FCHO2をノックダウンさせると、特別なアッセイを必要としない明らかな表現型-細胞増殖と細胞接着の抑制-を示しました。一方、SGIP1 α をノックダウンすると神経突起の伸長が見られました。細胞の増殖と接着、さらに神経突起の伸長は微小管と密接に関係しており、FCHO2とSGIP1 α は微小管の機能を介してこれらの細胞機能を制御していると考えられました。一方、FCHO2のFCHドメインとSGIP1 α のMPドメインは、細胞内に強制発現させると線維状の構造物を形成するものの、微小管の走行と一致しないことが判り、この線維構造物は何に由来するのか、なぜ微小管と共局在しないのかと不思議に思っていました。また、細胞レベルでFCHO2とSGIP1 α の機能を微小管との関係から解析していましたが、満足できる結果は得られていませんでした。

ちょうどその頃に開催された初年度の班会議で、東京大学の末次先生の発表に驚愕しました。FCH(とそれに続くコイルド・コイルドメイン)は実はリン脂質結合ドメインであり細胞膜を深く陥入させてチューブ状

の構造物を形成することが示されたからです。この研究成果によって、FCHドメインはEFCあるいはF-BARドメインに改名されていました(図1)。さらに、EFC/F-BARドメインをもつ分子はエンドサイトーシスを制御することが報告されました。これを機に末次先生と共同研究が始まりました。FCHO2とSGIP1 α の機能を細胞膜の視点から解析し、FCHO2のEFC/F-BARとともにSGIP1 α のMPドメインがリン脂質に結合し、細胞膜をチューブ状に変形させることを見出しました。FCHO2とSGIP1 α が形成する線維状構造物は細胞膜由来の膜チューブであることが判明しました。さらに、FCHO2とSGIP1 α はクラスリン依存性のエンドサイトーシスを制御していることを見出しました。このように、共同研究によってFCHO2とSGIP1 α に関する研究は視点が大きく変わって進展しましたが、皮肉にも当初の目的である「微小管との関係」から遠く離れる結果となりました。

FCHO2とSGIP1 α に限らず、微小管結合タンパク質として同定された分子が実は細胞膜結合分子だったという報告はこれまでにいくつかあります。代表例としてダイナミンが知られています。逆に、リン脂質結合タンパク質が微小管に結合することも報告されています。微小管とリン脂質は共に強く負に電化を帯びており、正に帯電した結合ドメインは試験管内で電気的に両者に結合するのではないかと推測しています。

ユビキチン化酵素(E3ユビキチンリガーゼ) Nedd4L

最初に見出したFCHO2の機能のひとつは細胞接着の制御であり、続いて共同研究で見出したのはエンドサイトーシスの制御です。この2つの機能は、もしFCHO2がインテグリンのエンドサイトーシスを制御しているならば、一元的に説明できます。実際、FCHO2をノックダウンさせると、インテグリンのエンドサイトーシスが著明に抑制されました。このことから、FCHO2はどのようなメカニズムでインテグリンの

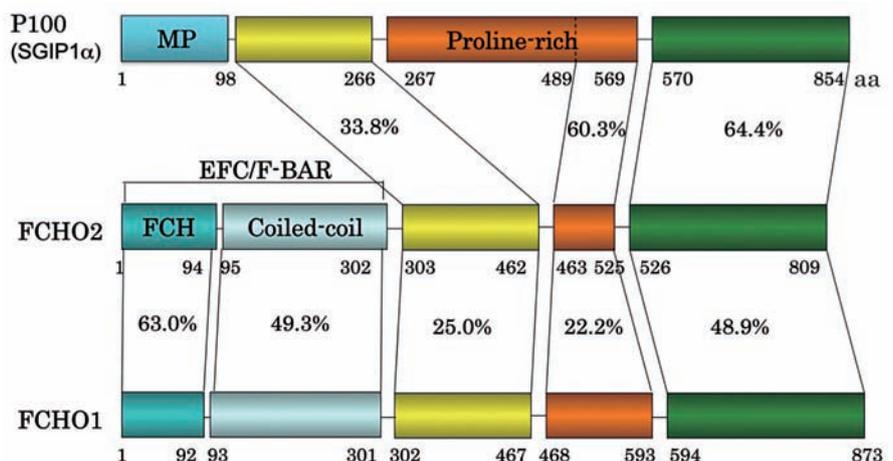


図1 FCHOファミリーの分子構造

利であるかもしれません。私共は今後、ENaCのエンドサイトーシスのアッセイ系を立ち上げて、この系を用いてFCHO2とNedd4Lの関係を解析していきたいと考えています。この研究は、この特定領域の研究期間内には間に合いませんが、

まさしく「トランスポートソーム」の範疇であり、「トランスポートソームと細胞膜との関係」として成果を上げるものと期待しています。

特定領域金井班を想い、我を省みる

日比野 浩(AO2班)

大阪大学大学院医学系研究科

領域代表の金井好克先生、当教室主任教授の倉智嘉久先生のご好意にて、研究者としてはまだまだ成熟していないにも関わらず、計画班代表としてこの特定領域研究に参画させて頂き、早いもので5年が経過しました。冒頭に、金井先生や本特定領域のメンバーの先生方に、深く感謝いたします。同時に、計画班代表であるにも関わらず、あまり業績を挙げることができず、申し訳ない気持ちで一杯です。しかし、非常に得るものが大きかった特定領域研究でした。本稿では、この5年間の成果の簡単なまとめと共に、研究以外で得たもの、それに反省点、今後の抱負などを述べてさせていただきます。

1. 研究について

我々の班は、「 K^+ 水輸送を担う機能的微小膜プラットフォームの同定と構成基盤の解析」という課題名で、種々の細胞で K^+ 水運搬に関わるチャンネルや輸送体等のイオン輸送装置が、細胞膜上でどのように空間配置され、どのように共役して生理機能を担っているかを解明することを目的としました。題材としては、まず、脳のアストロサイトをいたしました。

脳アストロサイトは、シナプスや血管をとり囲む突起を介して、神経細胞の興奮時に細胞外へ放出される K^+ を取り込み、血管方向へ放出する機能“ K^+ -buffering作用”を有します。また、同時に発生する浸透圧変化に伴い一方向性の“水輸送”も行います。 K^+ 水の極性輸送は、互いに共役しており、それは神経回路が正常な活動を営むために必須です。これらの輸送には、内向き整流性 K^+ チャンネルKir4.1ホモ複合体・Kir4.1/5.1ヘテロ複合体と、水チャンネルAQP4が重要な役割を果たしており、本特定領域が開始される前に、それら K^+ チャンネルと水チャンネルは、シナプス周囲突起・神経周囲突起の膜ドメイン上で共存していることを見出していました。しかし、効率的な K^+ 水の共役輸送の達成のためには、単に細胞膜上で共存するのみではなく、更に別の階層の分子共役機構が存在すると考えました。そこで、神経細胞や上皮細胞などで選択的に分子を集積し特定のシグナル伝達系を制御する“界面活性剤不溶性微小膜ドメイン(DRM)”というナノスケールの微小膜コンポーネント

が、アストロサイトにおいてその中心的役割を果たすという仮説をたてて研究をスタートさせました。まず、生化学的手法を用いて、DRM分画を単離し、Kir4.1とAQP4が共にDRMに局在することを、脳及びチャンネルを強制発現させたHEK細胞において示しました。次に、それらチャンネルのDRM局在決定因子と、その機能的意義について解析しました。Kir4.1の機能は、蛍光指示薬DiBACによりHEK細胞の膜電位を可視化して測定し、また、AQP4の水輸送能は、蛍光色素calceinで低浸透圧負荷の際の細胞膨張の程度を測定して評価しました。コレステロールはDRMの主要な要素の一つとして報告されています。DRMを崩壊させるため、コレステロール枯渇剤M β CDを細胞に投与したところ、Kir4.1の生化学的なDRM局在とチャンネル活性は完全に障害されました。一方で、M β CD投与は、AQP4のDRM局在にも機能にも共に影響しませんでした。故に、HEK細胞では、Kir4.1とAQP4は各々M β CD感受性・非感受性DRMという異なった微小膜コンポーネントに局在することが明らかとなりました。更にKir4.1とAQP4をHEK細胞及び培養アストロサイトに導入し、その分布を免疫組織化学で検討すると、各々のチャンネルを発現した微小膜コンパートメントは、異なった場所にあるが一部は近傍に位置することが判明しました。以上より、生体内のアストロサイトでは、少なくともKir4.1-M β CD感受性DRMとAQP4-M β CD非感受性DRMの2つの機能的微小膜プラットフォームから成り、各々が K^+ 水輸送を駆動していることが推測されました(図1)。また、これらの近接が共役輸送の構造的基盤となる可能性も考えられました。

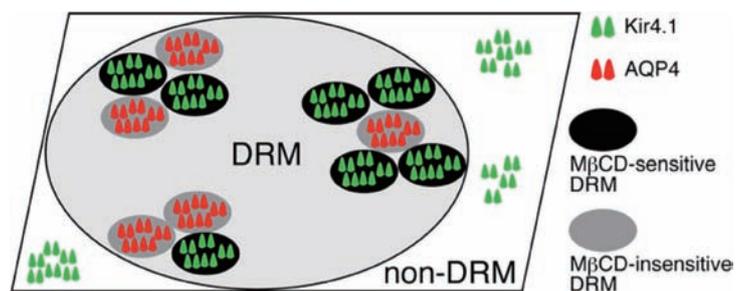


図1 アストロサイトの膜上には、M β CD感受性・M β CD非感受性DRMが存在し、それぞれKir4.1とAQP4を発現する。

H19年度後半からは、上皮組織に発現するトランスポーターを効率的に駆使し、 K^+ を臓器レベルで極性輸送させることで聴覚機能を維持している内耳蝸牛を上皮系器官の典型例として位置づけ、アストロサイトの極性輸送をより深く理解するための題材として解析の対象としました。蝸牛は3つの管腔により構成されます。その中で中央階と呼ばれる管腔は、内リンパ液という高濃度(～150 mM)の K^+ を含む細胞外液で満たされています(図2A)。内耳蝸牛内高電位(Endocochlear potential: EP)は、内リンパ液で観察される+80 mVの高電位です(図2A)。この電位・イオン環境は、ほ乳類では蝸牛に特異的です。音の一次受容器である有毛細胞は、感覚毛が分布する頂上膜のみを内リンパ液に浸しており、細胞体を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、感覚毛の頂部に局在する陽イオンチャネルの開口を介して内リンパ液の K^+ が細胞内に流入することで、細胞が電気的に興奮します。有毛細胞が音刺激に敏感に反応し、蝸牛の音受容の感受性が高く保たれるためには、感覚毛のチャネルを介した K^+ 流入の駆動力を増大し、それを加速する必要があります。この手段として、 K^+ 濃度は有毛細胞内—内リンパ液間でほぼ等しいため、 K^+ 濃度勾配を用いることはできません。代わりにEPが-60 mVである有毛細胞との間に大きな電位差を産生することで、 K^+ 流入の加速を達成している訳です。このように、EP及び内リンパ液の高 K^+ は聴覚に必須の要素と言えます。また、EPが欠如するモデル動物では難聴が観察されるため、この電位は、器官レベルの聴覚機能を端的に表すパラメーターであると位置づけられます。

以前より、EPの成立には、上皮系組織である「血管条」が中心的役割を果たし、更に、血管条を介した内リンパ液—外リンパ液間の K^+ 循環が深く関わると示唆されてきました(図2A)。本特定領域研究において、EPIは、血管条の構造的な特徴と、種々の K^+ 輸送機能分子の組織・器官レベルにおける機能共役により成立していることを見出しました。手法としては、蝸牛に K^+ 選択的イオン電極を挿入し、血管条の各微小区分や内リンパ液の電位・イオン動態を種々の条件下で同時測定する方法を用いました。この方法は、今まで経験がなかったのですが、京都府立医大から出向して下さっていた、任 書晃先生が、見事に立ち上げてくれました。血管条は、辺縁細胞・中間細胞・基底細胞の3種の細胞と、毛細血管から成ります(図2B)。辺縁細胞は1層の上皮細胞層を構成し、中間・基底細胞は、ギャップ結合によって螺旋靱帯の線維細胞と一体化しています。従って血管条は、内層(辺縁細胞)と外層(中間・基底・線維細胞)の2層の上皮細胞層から構成されていると考えることが出来ます(図2B)。血管条内部の細胞外空間はIntrastrial space (IS)と呼ばれ、幅が15 nmの狭い空間です。ISを満たす溶液は、内外上皮層と血管内皮細胞層に認められるタイトジャンクションという細胞間構造体で、両リンパ液・血液といった周囲の細胞外液から分離されていること、またISの溶液は低 K^+ 濃度と

+90 mVの高電位(IS電位)を示すことが報告されていましたが、EP成立との具体的な関係は不明でした(図2B)。我々は、まずこのIS電位がEPの主要素であることを示しました。また、内層の基底側膜に K^+ 取込み分子である Na^+ , K^+ -ATPase・ Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -共輸送体が共存し、両者の間で起こる Na^+ のリサイクルを介して、 K^+ が血管条内部から内リンパ液方面へと一方向性に輸送されること、そしてこの K^+ 輸送によりISの低い K^+ 濃度が維持されていることを見出しました。その結果、ISと外層内部との間に生まれる大きな K^+ 濃度差に依存して、Kir4.1が外層(中間細胞)頂上膜を介して K^+ 拡散電位から成る電位差を発生し、これがIS電位の主な起源であることも理解できました。更に、血管条の各区分の抵抗値を測定する実験において、ISが上記の形態学的特徴により周囲の細胞外液から電気的に隔絶されていることを見出し、その特性に立脚して高いIS電位が保たれていることを示しました。加えて、 K^+ チャネル(KCNQ1/KCNE1)が発生する内層頂上膜の K^+ 拡散電位が、ISと内リンパ液との間の電位差を構成し、EPの成立に寄与していることも明らかになりました。以上より、EPIは血管条内部のISの電気的絶縁と2つの K^+ 拡散電位に依存して成立すると結論づけられました。

2. 研究で嬉しかったこと、悔しかったこと。

アストロサイトの微小膜ドメインについての研究は、機能実験が、当初上手くいかず、随分時間がかかってしまいました。また、 K^+ や水の運搬を、組織・臓器レベルで観察する手法を取得できず、両者の共役関係と微小膜ドメイン配置との有機的な繋がりを、機能アッセーで示すことができませんでした。従って、納得する成果からは程遠く、歯がゆい思いをしました。

内耳蝸牛のEPの成果については、長年に渡り不明であった成立機構をほぼ解明するものとして、ある程度は評価さ

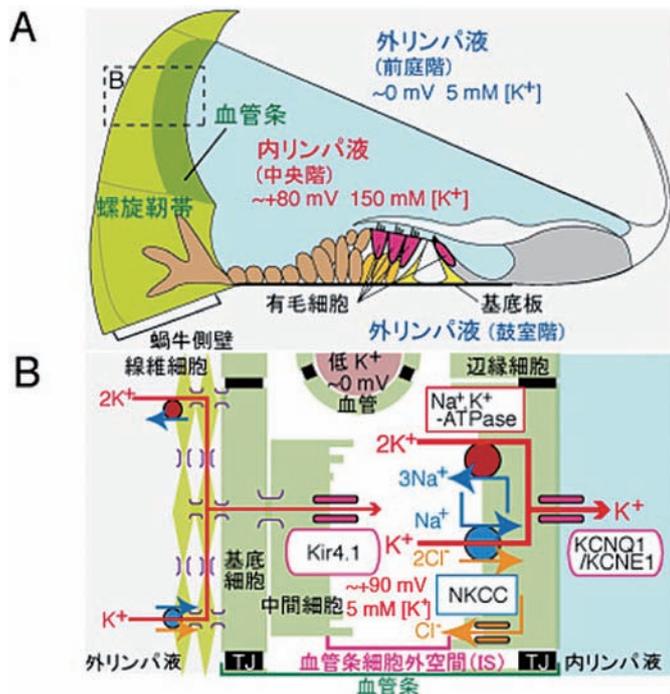


図2 内耳蝸牛(A)と血管条(B)
TJ, タイトジャンクション

れていると感じていますが、嬉しかった事は、(社)全日本難聴者・中途失聴者団体連合会からの取材を受け、そのホームページに紹介された出来事です。小生の研究の長期目的の一つに、研究成果の臨床分野への還元があります。今回の成果が、その目的の端緒となる可能性はあり、難聴の患者様のために内耳研究を続けて行くというモチベーションが再び上がりました。

3. 今後の抱負

アストロサイトに関しては、やはり、 K^+ や水の組織レベル・臓器レベルにおける輸送を、どのように評価するかが、重要な点であると考えています。 K^+ 指示薬による K^+ 輸送の分析法や、蛍光デキストランを用いて細胞外空間の縮小・膨張を測定することで評価する水動態の解析法はありますが、いずれも感度やS/N比などにおいて、十分なものではありません。蛍光プローブの開発や、電気生理学的手法と共役させた実験方法など、新しい測定計の作成が必要であると感じています。

内耳研究については、今後は実験のみならず、蝸牛内高電位の成立過程をコンピューターシミュレーションでモデル化し、その定量的な理解を進めていく予定です。少しやりかけているのですが、まだまだ不十分です。これは、天気予報や地震予知などの医科学バージョンである「予測医学」の発展に繋がる研究で、将来的に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、高 K^+ 、低 Ca^{2+} (20 μ M)、高粘稠性(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解明にも挑んでいく所存です。内耳研究者を増やすことも使命の一つと感じています。

4. 他の活動

本特定領域研究の大きな特徴の一つが、「若手ワークショップ

」の開催でした。小生は、杏林大学の安西尚彦先生の補佐役として、第一回ワークショップのプログラムの振り分けを担当させて頂きました。年長の先生方が、意識的にあまりご意見されなかったことありますが、討議は、普段の班会議よりも段違いに活発で、若い研究者のパワーに大変驚きました。この取り組みは、ご存知のように毎年行われ、若い先生方の研究に対する意欲も、当初に比べてかなり上がってきたように強く感じています。

本特定領域研究を通じて得た人的ネットワークは、何物にも換えられない貴重なものです。本特定領域の班員の先生方とは、とても仲良くさせて頂きました。特に、班会議の際の「場外版」夜のシンポジウムは、毎回激しく(自分が激しくしていたような記憶が。。。。)、年齢の垣根を越えた、酒を交えての交流は、大変有意義なものでした。知らない人と仕事するとき、取りあえず一緒に飲んでみよう、と思うようになったきっかけも、この特定領域の活動を通じてです。わざわざ、特別の部屋を借りて宴会に当てる特定領域は聞いたことがありませんが、そのような活力が、サイエンスを進めるエネルギーそのものであり、近い将来の大きな研究成果に繋がると確信しています。

5. おわりに

本特定領域は、計画班、公募班共に、まさに業界をリードする第一線の先生方ばかりで、毎回、班会議やシンポジウムでは、とても刺激を受けました。総括班の先生方のオーガナイズは素晴らしく、ニュースレターも毎回楽しみに読ませて頂きました。班会議も、毎回、とても気が利いた演出で、楽しめました。この班も、もう終了してしまうと思うと、寂しいかぎりです。最後に、もう一度、本特定領域の先生方に、深く感謝申し上げ、原稿を閉じさせて頂きます。有難うございました。

BARドメインスーパーファミリータンパク質による細胞膜形態形成

末次 志郎(A02班)

東京大学分子細胞生物学研究所

はじめに

生化学事典によれば、細胞とは、「外界を隔離する膜構造に囲まれ内部に自己再生能を備えた遺伝情報とその発現機構を持つ生命体」と定義される¹⁾。細胞を外界から区別する細胞膜構造は、外界から細胞を見た場合、細胞の形、形態そのものである。細胞の形態は細胞の機能によってさまざまに分化している。実際に神経細胞や繊維芽細胞ではその形態は全く異なり、その形態的な違いはそれぞれの細胞の持つ機能の違いと密接に関わっていると考えられる。細胞全体の形態だけでなく、細胞膜には様々な微小形態が存在し、チャネルやトランスポーターなどの生理機能に重要であると考えられている

が、細胞膜の微小形態の形態形成機構はほとんど明らかではなかった。本特定領域研究ではBARドメインスーパーファミリータンパク質が、細胞の微細構造における膜曲率を制御し、かつ細胞膜曲率が細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている可能性を示した。

1. 様々な細胞膜の微細形態

細胞膜は脂質二重膜により構成されている。脂質二重膜は、それ自体では水溶液中では球体をとると考えられる。しかし、実際の細胞の形態はさまざまであり、細胞全体の形が球体でないものが多く存在するだけでなく、細胞表面も様々な微細

構造が存在している(図1)。これらの微細構造は大きく分けて突起構造と陥入構造の2種類に分類される²⁾⁻⁶⁾。突起構造の代表的な例は、繊維芽細胞や上皮細胞などの細胞移動先端や神経細胞の成長円錐で見られる糸状仮足(フィロポディア)や葉状仮足(ラメリポディア)である。これらの突起構造はともにアクチン重合を駆動力として形成されると考えられている。細胞がアポトーシスを起こすときにはブレピングという突起形成を伴う現象が見られるが、こちらは細胞膜が裏打ち蛋白質が破綻することによって生じると考えられている。陥入構造にはエンドサイトーシスなどの輸送に関わるもの、コレステロール輸送やシグナル伝達の場合とも考えられるカベオラと呼ばれる構造が代表的である。エンドサイトーシスにおいては生じた陥入構造は、切断されて小胞となり輸送される。ある種の細胞に見られる構造としては、筋肉にはT tubule(骨格筋横行細管)と呼ばれる長い陥入構造が細胞膜に存在し、カルシウムチャンネルなどが集積している。

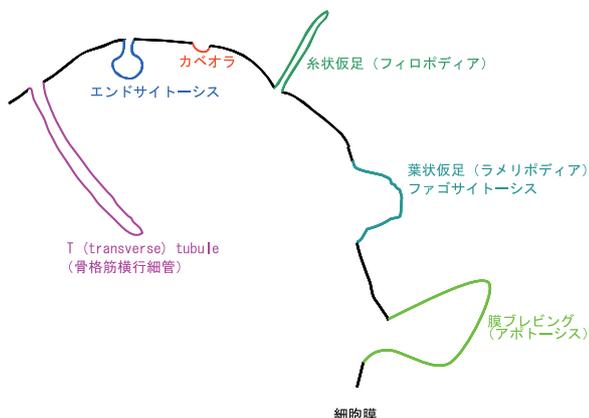


図1 様々な細胞膜の微細構造

細胞膜に見られる様々な微細形態を模式的に示す。大きく突起構造(糸状仮足、葉状仮足、ブレピング)と陥入構造(エンドサイトーシス、カベオラ、骨格筋横行細管)に分けられる。骨格筋横行細管以外はすべての細胞で普遍的に観察される。あげていない微細形態はさまざまに存在すると考えられる。

2. BARドメインスーパーファミリー

2-1. BARドメイン

BARドメインはamphiphysinなどのタンパク質のN末端に多く見いだされるドメインである。Amphiphysinは骨格筋において細胞膜の陥入により形成されるT管に局在している。ショウジョウバエにおけるamphiphysin変異体解析により、T管の陥入が正常に起こらないために、T管のネットワーク構造が破綻し、T管と筋小胞体の連携による筋収縮に異常を来すことが明らかにされた⁷⁾。

AmphiphysinはN末端にBin-Amphiphysin-Rvs167(BAR)ドメイン、C末端にSH3ドメインを持つアダプター分子である。BARドメインは脂質結合ドメインであり、SH3はタンパク質-タンパク質相互作用を担うドメインである。興味深いことにBARドメインはin vitroで人工脂質二重膜を変形し、tubuleを作ることができる(図2)。つまり、caveolaによる膜の陥入の誘導とAmphiphysinのBARドメインによる膜のtubule化がT-tubule形成に関わっていると示唆される⁸⁾。

2004年にMcMahonらのグループによってBARドメインの立体構造が明らかにされた。興味深いことにBARドメインはバナナ型の構造をとるダイマーであった(図2)⁹⁾。変異体の解析の結果、バナナ型のカーブの内側の正電荷と細胞膜の負電荷が相互作用し、膜を変形してtubuleを作ると推察された。バナナ型のBARドメインの内側に膜が結合することから、BARドメインが、膜に巻き付くことで、tubuleを形成するのではないかと考えられている。興味深いことに、立体構造から予想されるバナナ型のカーブの内側の半径と、in vitroでみられるtubuleの半径はだいたい相関していると考えられている。

立体構造からバナナ型のカーブの内側に来る正電荷を持ったアミノ酸は膜変形に重要であった。しかしながらN末の疎水性アミノ酸を含む部分も膜変形に関わっている。AmphiphysinのBARドメインではN末のアミノ酸配列の構造が決定されなかった。この部分は脂質二重膜の片方の膜にのみ脂質二重膜に挿入されることによりヘリックス構造をとり、これによって脂質二重膜の変形を助けられていると考えられる。同様の機構はendophilinのBARドメインでも見られる^{10),11)}。このようなN末の疎水性アミノ酸をもち、タンパク質のN端に位置するものを特にN-BARドメインという。

筋肉以外の細胞においてはAmphiphysinはエンドサイトーシスに関わっているといわれている。ほ乳動物の細胞や酵母を用いた解析からAmphiphysinのSH3ドメインは多数のタンパク質と結合する。その中で、量的に多く含まれるタンパク質はdynaminとN-WASPである。DynaminはGTP依存的に膜を切断する酵素である。N-WASPはアクチン集合を誘導するタンパク質である。つまりAmphiphysinによって特定の曲率を持つ膜にこれらのN-WASPやdynaminが呼び寄せられ、アクチン重合が誘導されたり、dynaminが活性化することがエンドサイトーシスにおける小胞の切断あるいはその後の小胞輸送に必要であると考えられている。

2-2. EFC/F-BARドメイン

BARドメインは多数のタンパク質に見いだされる。私たちはBARドメインに弱い相同性を持つドメインとして、EFC(Extended FCH)あるいはF-BARドメインが見いだした(図2)。FCHドメインは、微小管結合ドメインとして見いだされたが、タンパク質ファミリー間の保存領域はFCHドメイン直後に共通して見いだされるCoiled-coil領域を含むことがわかった。このFCH+Coiled-coil領域は、BARドメインと同じく、膜結合活性および膜変形(tubule形成)活性を持っていた(図2)。従って、この領域全体で、EFC/F-BARドメインと名付けられた。しかしながら、膜変形の結果生じるtubuleの半径は異なっていて、BARとEFCドメインは異なる膜形態に準拠して機能すると考えられる(図2)^{12),13)}。タンパク質の局在はin vitroではリポソーム(人工脂質二重膜)の外側であるのに対し、細胞においては細胞内(リポソームの内側)であるので過剰発現細胞ではチューブ形成が見られる。

EFC/F-BARドメインの立体構造が明らかになった(図2)¹⁴⁾。EFC/F-BARドメインもBARドメインと同様な α ヘリックスからなる二量体でバナナ型の構造を取っていて、しかもバナナの内側の凹面は負に帯電していた。従って変異導入結果を

あわせると立体構造上の凹面で膜に結合すると考えられる。EFC/F-BARドメインには、N-BARドメインで見られるような疎水性アミノ酸の膜への挿入はなさそうで、静電的相互作用によってのみ膜の変形が誘導されるようである。

EFC/F-BARドメインは結晶中で、鎖を形成していた。しかも、鎖の部分の結合を担うアミノ酸に変異を導入すると膜変形能が消失することから、EFC/F-BARドメインはポリマーを形成しポリマーが膜を取り囲むようにして、膜変形を誘導するモデルが示唆された。このモデルは最近発表された膜に結合した状態のEFC/F-BARドメインの立体構造から支持される。膜変形に際して最初に平面膜にEFC/F-BARドメインが結合する際、立体構造上の凹面ではなく、側面が結合し、膜上でポリマー形成を行った後に膜が変形されると考えられている^{14), 15)}。

興味深いことにEFCおよびBARドメインを持つタンパク質のうち、FBP17、Toca-1、CIP4やPacsin/Syndapinなど多数のタンパク質がSH3ドメインを持ち、従って、Amphiphysinと同じようなドメイン構造を持っている。SH3ドメインもまたAmphiphysinのSH3ドメインとおなじように、dynaminとN-WASPに結合する。EFCドメインを持つタンパク質のうちFBP17やCIP4はEFCドメインとSH3ドメインを持ち、エンドサイトーシスに関わっている^{12), 13), 16)}。しかしながら、結合する膜の曲率の違いからToca-1やFBP17などのEFC/F-BARドメインタンパク質はエンドサイトーシスの初期に、BARドメインタンパク質であるamphiphysinなどは、エンドサイトーシスの後期の小胞切断のあたりで関わるものと考えられるがまだ証明はなされていない¹⁴⁾。

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、FBP17やToca-1の存在下での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

をリポソームに作用させ、pyrene標識アクチンによるactin polymerization assayを行った。N-WASP-WIP複合体とリポソーム、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、FBP-17またはToca-1をN-WASP-WIP複合体存在下で直径が0.5–1 μmの比較的大きなリポソーム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、0.1–1 μmを作用させた場合はほとんど変化しなかった。したがって、EFC/F-BARタンパク質は細胞膜の形態に応じてアクチン重合を調節している可能性が示唆された^{16), 17)}。

2-3. IMDドメイン

私たちはさらにIRSp53-Mim-homology domain (IMD)ドメインと呼ばれる、IRSp53やMIMなどのタンパク質のN末に見いだされるドメインを解析した。IRSp53にはC末にSH3ドメインを持ち、MIMの場合はC末部に単量体アクチンに結合するWH2ドメインを持つ。IRSp53などのSH3ドメインを持つ分子の中にもWH2様のモチーフを持つものもある¹⁸⁾⁻²⁰⁾。

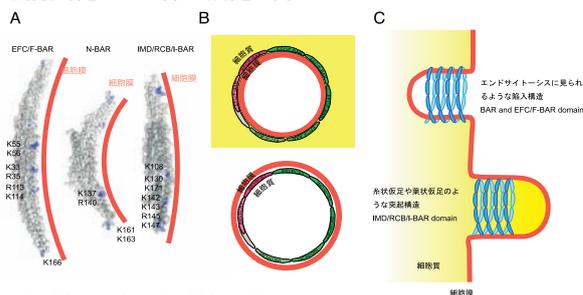
IMDドメインは、BARやEFCと同じくαヘリックスで構成されるダイマーを形成するが、形はバナナ型でなく、ゆるい逆曲率を持った直線上で非常に興味深い(図2)^{21), 22)}。IMDドメインもまた膜に結合する^{22), 23)}。詳細な膜結合アミノ酸マッピングから、IMDドメインもまた塩基性アミノ酸を介して膜に結合する^{22), 24)}。塩基性アミノ酸の配置からIMDドメインは凸型の膜結合面をタンパク質の立体構造表面におくことができ、この凸型の面を介して膜に結合することでBARやEFC/F-BARのような細胞における陥入構造、in vitroにおけるチューブ構造ではなく、細胞における突起構造、in vitroにおける陥入構造を形成する(図2)。すなわちタンパク質の脂質結合面が凸型か凹型によって膜の変形の向きが決定されていると考えられる。IMDドメインはIRSp53、MIMとも低分子量Gタンパク質のRac1に結合する。興味深いことにIRSp53のIMDは活性化型Rac1に結合し¹⁸⁾、MIMのIMDは不活性化型Rac1に結合する²⁵⁾。

IRSp53のSH3ドメインは葉状仮足でアクチン重合を担う分子であるWAVE2の他、同じく葉状仮足形成にかかわるMENAなどに結合することが知られている。IRSp53とWAVE2の結合は葉状仮足の効率の良い形成に必要である²³⁾。MIMのWH2ドメインはGアクチンに結合するが、全長タンパク質としてのその意義は明らかではない²²⁾。

3. おわりに

本研究では、細胞膜結合タンパク質であるIMD/I-BARドメインおよびEFC/F-BARドメインタンパク質について共同研究による立体構造の解明に助けを得て膜への相互作用の機序を明らかにした。両ドメインは立体構造上の正電荷で形成される負電荷を持った細胞膜との相互作用面を持つことを見いだした。脂質作用面は、I-BARは凸面であり、BARおよびF-BARは凹面であって、それぞれの形成する細胞膜構造であるフィロポディア、ラメリポディア(I-BAR)およびクラスリンおよびカベオラのエンドサイトーシス(F-BAR、BAR)で機能していることを見いだした。これらのタンパク質の立体

細胞膜の構造とタンパク質の立体構造の対応



Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P. & Suetsugu, S. IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. Trends Cell Biol 2008, 18(2):52-60. 472-482

図2 BARドメイン、EFCドメイン、IMDドメインの立体構造細胞膜の曲率を検知あるいは生成すると考えられているドメインの立体構造がAに示されている。点線で示した脂質二重膜が青で示した生電荷を持ったアミノ酸依存的に結合する。これらのタンパク質ドメインは細胞質に存在し、脂質二重膜に相互作用すると考えられる。脂質二重膜と相互作用する面の曲率を考えると、黄緑で囲った凹面の脂質結合面を持つドメインはチューブ上の脂質二重膜の外側に結合し、赤で囲った凸上の膜結合面を持つドメインはチューブ上の膜の内側に結合すると考えられる。Cに示すように、凹面による膜との相互作用はエンドサイトーシスなどで見られる膜の陥入構造に対応し、凸面による相互作用は膜の突起構造に対応すると考えられる。²⁰⁾

構造から予測される脂質作用面の形態は、それぞれの細胞構造の持つ細胞膜の形態に、鑄型の様に対応していることを示すことができた。従ってこれらのタンパク質ドメインは、脂質膜の形態をそれぞれの細胞微細形態に応じて形成させる、あるいは、形成された後にその形態を認識するドメインであることを証明できた²⁶⁾。さらに細胞膜の形態が直接的にアクチン重合のようなシグナル伝達を制御することを見だし、形態そのものがシグナルの鍵となることを証明した。

引用文献

- 1) 今堀和友 山川民夫.(2007) 生化学辞典 第4版(大島泰郎 et al., ed.). 東京化学同人
- 2) Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-65.
- 3) Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (2007). Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J Biol Chem* 282, 23005-9.
- 4) Takenawa, T. and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 37-48.
- 5) McMahon, H.T. and Gallop, J.L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. *Nature* 438, 590-6.
- 6) Zimmerberg, J. and Kozlov, M.M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 9-19.
- 7) Razaq, A., Robinson, I.M., McMahon, H.T., Skepper, J.N., Su, Y., Zehlf, A.C. et al. (2001). Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 15, 2967-79.
- 8) Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.C. et al. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297, 1193-6.
- 9) Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R. et al. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495-9.
- 10) Gallop, J.L., Jao, C.C., Kent, H.M., Butler, P.J., Evans, P.R., Langen, R. et al. (2006). Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J* 25, 2898-910.
- 11) Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y. et al. (2006). Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J* 25, 2889-97.
- 12) Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H. and De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell* 9, 791-804.
- 13) Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T. and Takenawa, T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol* 172, 269-79.
- 14) Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K. et al. (2007). Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell* 129, 761-72.
- 15) Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E.H. et al. (2008). Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell* 132, 807-17.
- 16) Suetsugu, S. (2009). The direction of actin polymerization for vesicle fission suggested from membranes tubulated by the EFC/F-BAR domain protein FBP17. *FEBS Lett* 583, 3401-4.
- 17) Takano, K., Toyooka, K. and Suetsugu, S. (2008). EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J* 27, 2817-28.
- 18) Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 408, 732-735.
- 19) Yamagishi, A., Masuda, M., Ohki, T., Onishi, H. and Mochizuki, N. (2004). A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein. *J Biol Chem* 279, 14929-36.
- 20) Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P. and Suetsugu, S. (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol* 18, 52-60.
- 21) Millard, T.H., Bompard, G., Heung, M.Y., Dafforn, T.R., Scott, D.J., Machesky, L.M. et al. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *EMBO J* 24, 240-50.
- 22) Mattila, P.K., Pykalainen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V.O., Vihinen, H., Jokitalo, E. et al. (2007). Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P₂-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol* 176, 953-64.
- 23) Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A. and Takenawa, T. (2006). Optimization of WAVE2-complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP₃, and Rac. *J Cell Biol* 173, 571-85.
- 24) Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T. et al. (2006). The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J Biol Chem* 281, 35347-58.
- 25) Bompard, G., Sharp, S.J., Freiss, G. and Machesky, L.M. (2005). Involvement of Rac in actin cytoskeleton rearrangements induced by MIM-B. *J Cell Sci* 118, 5393-403.
- 26) Suetsugu, S., Toyooka, K. and Senju, Y. (2009). Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin Cell Dev Biol*. in press.

総括班の立場から A03 について

研究項目 A03は、「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」を共通のテーマとして共有し、特にトランスポートソームの調節とシグナル系とのクロストーク、及び細胞、組織、個体における生理機能とその破綻により生じる病態との関わりを解明し、輸送分子が分子複合体の一部として存在した場合の生理的・病態学的意義を解明することを目的としてきた。アカデミアに籍を置く研究者の義務として、研究成果を社会に還元すること、すなわち我々の生命科学領域においては最終的に人類の健康・福祉に資することが求められるであろう。A03班はこの点、病態解明、治療法開発につながる成果を常に意識しながら研究を行ってきたが、計画班として6グループ、また公募班にあっては、トランスポートソームの機能と局在の調節、シグナル伝達系とのクロストーク、及び細胞、組織、器官、個体レベルにおける生理機能とその破綻による疾患の解明に寄与する研究を中心に広く募集し、前期2年間は12グループ、後期2年間は13グループにご協力いただき、延べ代表人数としては20名もの方々にご参画いただいた。病態をキーワードとすることで必然的にそのカバーする臓器・分野は広範に渡り、中枢、神経、肝臓、腎臓、すい臓、筋肉など様々な臓器の高次機能(中枢神経ネットワーク、免疫ネットワーク、異物解毒、内分泌機能、外分泌機能など)に関わる膜輸送複合体を扱う研究が行われた。各々研究グループが専門とする各病態分野において、疾患原因分子とされる膜蛋白質の機能変動に関して、あらためてトランスポートソーム的な視点から再精査する機会を与えられたのではないだろうか。5年間を振り返り、当初A03班全体として標榜した「トランスポートソームと病態との関連の解明」という大きなテーマに関して、十分な成果をあげることができた。詳細に関しては本NEWS LETTERの個々の記事をご覧いただくとして、以下にご簡単に班全体を振り返ってオーバービューしてみたい。

A03班のキーワードである「病態」は正常な「生理学的」状態と表裏一体にあることから分かるように、細胞、臓器、個体レベルでの生理学を理解することも重要視し、そのような観点からの研究、すなわちライブ細胞や生きた臓器で膜蛋白質の様子を可視化する技術、さらには膜蛋白質の絶対定量技術など多方面で応用可能な技術を有するグループが参集したことが特徴の一つである。根本グループは膜表面蛋白質を高い時間・空間解像度で可視化するTIRF顕微鏡、生細胞への侵襲を極力抑え、内因性の蛍光をin vitroのみならずin vivoでも捕らえるべく開発の進む二光子顕微鏡技術など次々と開発し、内田グループはその技術を応用して水チャネルの膜外分泌機能への関与を明らかとするなど班内外での技術相互提供による共同研究が活発にとり行われた。また、トランスポーター分子の輸送活性がトランスポートソーム内に共存する制御分子によって影響されるとの仮説を検証するためには、トランスポーター分子、制御分子のstoichiometryの情報が必要である。さらに、トランスポートソームはA01班では各

種膜蛋白質の分子レベルでの作動原理、A02班では膜脂質や会合因子との共存によるプラットフォーム単位での活性調節機構、A03班では細胞レベル、臓器レベル、個体レベルを対象として拡張する必要があるが、各段階を定量的につなぐには分子個々の絶対定量値が極めて重要な基礎情報となる。この点、膜蛋白質分子の絶対定量法の重要性を啓発し、測定法の確立までを担当した寺崎グループの技術は有用であり、実際に内田グループ、王子田グループ、首藤グループなどとの共同研究が展開された。以上、本特定研究を通して成熟された観測技術・測定技術は、研究期間終了後も引き続き有用な技術として広く応用されることが期待される。

動物個体レベルでの解析という点では、特徴的なモデル動物を利用した研究が行われたこともA03班の特徴であろう。仁科グループは発生過程におけるトランスポートソームの重要性に関してメダカを用いたユニークな研究を展開し、特筆すべき成果を挙げている。哺乳類動物では発生過程を生きたまま視覚化することは困難であるが、この点、メダカは発生が親の体外で行われ、かつ体表が透明なため、発生過程の詳細な観察が可能であるという利点を有する。また、内田グループでは対象遺伝子を解析する際にノックアウトするという通常的手段ではなく、ヒトで疾患に繋がることが知られている変異を有する対象遺伝子を作成し、それをノックインしたマウスを作成して表現型を解析することにより、より正確にヒトの疾患を反映するモデル動物の構築に成功している。トランスポートソームのコンセプトにおいてはトランスポーター(あるいは膜蛋白一般)は多くの場合何らかのパートナーと相互に機能調節していると考えているため、その分子を完全に消す(ノックアウト)のではなく、変異体としてその複合体に組み込まれたときの周囲への影響を観察するほうが妥当であることを示している。我々のグループは脂溶性物質の異物排泄・体液恒常性に重要な臓器である肝臓を対象とし、特に肝胆管側膜、ならびに異物と最初に出会う消化管管腔側膜に発現する種々輸送体が構成するトランスポートソームに関して研究を展開したほか、全く新規な分野への参入ではあったが、骨芽細胞からの骨代謝シグナル分子の細胞外への分泌に関わる膜蛋白質複合体の研究にも挑戦し、この分野の常識から考えて当初予期していなかったいくつかの興味深い成果を挙げることができたと思っている。また、宮本グループはトランスポートソームの機能制御という観点から、特に腎臓尿細管刷毛縁膜における無機リン酸の再吸収に関わるNaPiを取り巻くトランスポートソームと遺伝病に関連する研究を展開した。先の内田グループも腎の水チャネルを対象としていたように、特に腎尿細管管腔側膜は無機物・有機物の分泌・再吸収に関与するトランスポーターがひしめきあう部位である。特に本特定領域研究の基本コンセプトを生み出すきっかけとなった、二次性・三次性能動輸送タイプのトランスポーターが多く発現する、いわばトランスポートソーム研究の要素が集約された臓器といえるであろう。

最後に、繰り返しになるが本特定領域研究全体で行われた個別の基礎研究を個体レベルまで引き上げ、生体の理解、病態の解明につなげるには、トランスポートソーム構成因子個々の活性、発現量、そしてこれらが集合したときの活性を測定し、生体が有する生理学的パラメータと共にモデルを構築し、そこから算出される個体における活性が、個体で実測される活性とどの程度一致するかを定量的に検証していくこ

とが必要である。我々 A03班が究極の目標とした「分子複合体から個体機能への定量的外挿と評価」に関する研究は、今後もますます重要性を増し、例えばシステムバイオロジーという新たなキーワードを加えた研究課題としてさらに継承・発展することが期待される。

鈴木 洋史
(東京大学医学部附属病院薬劑部)

小型魚類を用いたトランスポートソーム下流シグナル伝達系の解析

仁科 博史(A03 班)

東京医科歯科大学難治疾患研究所

2005年1月1日に私は現在の所属に研究室を主催することとなりました。本特定領域は私の研究室の誕生とこの5年間の活動を根底から支えてくれました。感謝の気持ちで一杯です。

生体膜を介する物質の輸送は細胞のホメオスタシスの基本であり、イオンチャンネルやトランスポーターといった輸送体とその中心的な役割を担っています。また、これら細胞膜に存在する分子を裏打ちする複合体(トランスポートソーム)が、細胞増殖、細胞死、細胞極性など多様な細胞応答に関与することが知られています。しかしながら、どのようなシグナル伝達系を介してこの生理機能が担われているかは不明な点が多い現状です。我々の研究グループは、トランスポートソームの下流に位置し、上記の細胞応答を担うシグナル伝達系の研究を行ってきました。1)小胞輸送に関与する足場蛋白質RINファミリー、2)輸送体の局在制御に関与する低分子量G蛋白質Rheb、3)様々なストレスにตอบสนองし細胞の生死を制御するSAPK/JNKシグナル伝達系、4)トランスポートソームに連結し細胞増殖・死を制御するHippoシグナル伝達系の4つの観点から、研究を行いました。1)と2)はトランスポートソームの動態に直結する研究であり、3)と4)はトランスポートソームの生理的役割の解明につながる研究であると位置づけてきました。この5年間で特に進展した3)と4)について述べてさせていただきます。

シグナル伝達系に関する研究

i) JNKの活性化には30分以内に誘導される「早い一過的な活性化」と1時間以降も持続する「遅い持続的な活性化」の2種類の活性化状態が存在し、前者は「細胞の生存に関わる遺伝子発現誘導」、後者は「細胞死の誘導」という正反対の細胞応答を制御すると考えられています。しかしながら、DNA損傷という核内で生じた事象が、どのような分子を介して、細胞質中に存在するJNKの活性化という情報に変換されるのか、すなわち、修復不能なDNA損傷によって誘導される「遅い持続的な活性化」の誘導に関する分子の実体は不明でありました。我々は、核内に複数存在する粒子で、DNA損傷のセンサーとして機能する“Promyelocytic Leukaemia (PML) ボディー”中のDaxx-RASSF1C複合体が、核内から細胞質への情報伝達を媒介し、JNKの遅い持続的な活性化の誘導に関与することを見出しました。すなわち、RASSF1Cの核から細胞質への移行が、核内のDNA損傷という情報を細胞質中のJNK活性化へと情報変換することを見出しました(図1左)。

ii) アポトーシスに代表されるプログラム細胞死は、損傷を受けた細胞や不要になった細胞を速やかに除去するシステムとして、個体の恒常性維持に必須であることが知られています。ストレス刺激を受けたJNKの活性化がアポトーシスの誘導に重要であることが示され、そのアポトーシス誘導の分子機序なども明らかになりつつあります。一方で、アポトーシスを誘導された細胞が、アポトーシスの中心を担うCaspaseカスケードの下流で積極的にJNKシグナル伝達経路を活性化することが知られていましたが、この活性化されたJNKがアポトーシスにおいてどのような役割を果たしているかについてはほとんど明らかにはされていませんでした。我々は、CaspaseによるJNKの活性化がアポトーシスの特徴の一つである核凝集の誘導に必須の役割を果たすことを見出しました(図1右)。

ストレス応答性シグナル伝達系と、2003年に発見されたばかりのHippoシグナル伝達系がクロストークし、細胞の生存と死を制御していることを見出しました(図2)。

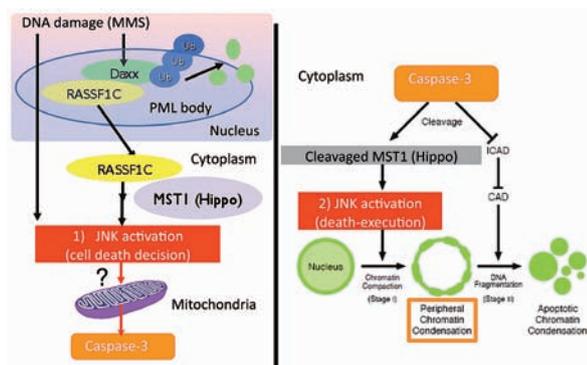


図1 細胞の生死を制御するJNKシグナル伝達系

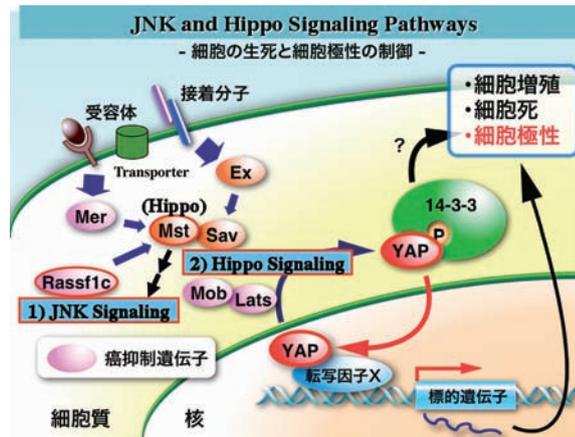


図2 JNKおよびHippoシグナル伝達系

小型魚類をモデル生物に用いた研究

ノックアウトマウスに加えて、小型魚類のメダカやゼブラフィッシュもモデル生物に加えて、研究の発展を目指しました(図3)。



図3 シグナル研究および病態モデルとして期待されるメダカ

iii) JNKはnon-canonical Wntシグナル伝達系により活性化され、初期胚の形態形成にも関与することが示されています。しかしながら、JNKがどのような分子機構によって形態形成運動を制御しているかについては不明です。そこで我々は、母体外で発生し初期発生過程の観察に適したゼブラフィッシュを用いて、JNK活性化因子MKK4およびMKK7の観点から、初期形態形成におけるJNKシグナル系の役割解析を行いました。その結果、1)ゼブラフィッシュにはMKK4A, MKK4BおよびMKK7の3種類の遺伝子が存在すること、2)モルフォリノアンチセンスオリゴを用いてMKK4Bをノックダウンしたところ、原腸形成期における収斂伸長(convergent and extension; CE)運動に異常が認められること、3)MKK4Bをノックダウン胚では上流分子であるWnt11自身の遺伝子発現が亢進することなどを見出しました。すな

わち、MKK4B→JNKシグナル系がWnt11遺伝子の発現抑制を介して、初期原腸胚形成を制御するという新しい分子機構を明らかにしました。

iv) Hippoシグナル伝達系は器官のサイズを決定するシグナルとして、また癌抑制シグナルとして機能することが明らかにされつつあります。我々は、Hippoシグナル伝達系の標的分子YAPに変異があるhirage変異体の解析を行い、YAPが器官形成時の細胞増殖・細胞死・細胞極性の多段階で機能していることを見出しました。

上記研究成果は、海外からも評価して頂き、2009年2月に開催された第1回RASSF meetingに招待演者として発表の機会を得ました。奇しくも本特定領域A01班の畑裕教授もご自身のトランスポートソーム研究の進展から、Hippoシグナル伝達系へと到達され、ご一緒させて頂くこととなりました。本特定領域研究から発展させて頂いたシグナル伝達系であると認識しております。

2009年10月には、高層ビルの21階に研究室が引越しました。研究室レベルでは世界で一番高所にあるメダカ部屋ではないかと思えます(図4)。最終年度の年の瀬、事業仕分けの対象の一つに「モデル生物」がやり玉に上げられました。基礎研究の根底を支えるモデル生物が目に見える形で世の中に貢献していないと評価されたようです。そういう背景から、我々はメダカが基礎研究のみならず、医学研究、特に臨床研究に



図4 高層ビル21階にあるメダカ部屋

も重要な貢献をすることを示す必要性を感じました。ちょうどメダカ変異体と病態モデルの研究が論文に受理された時期と重なりました。モデル生物領域の研究者からの支援も頂戴し、「メダカを用いて腸管から肝臓が発生する仕組みを解明—器官形成および疾患モデルとして期待されるメダカ—」の見出しで、肝形成不全メダカと脂肪肝メダカを紹介させて頂きました(図5)。メダカは日本人に安らぎをもたらしてくれるのでしょうか、朝日や日経新聞各誌に加えて、NHKにも取り上げて頂きました。最終年度の良い思い出となりました。トランスポートソーム研究からスタートした「メダカ疾患モデルの作出」は、新しい領域研究の創出と創薬への貢献が期待されています。

最後に、本特定領域に加えて頂き、5年間自由な研究を温かく見守ってくださった領域代表の金井好克先生、総括班の森生先生、竹島浩先生、鈴木洋史先生に感謝申し上げます。

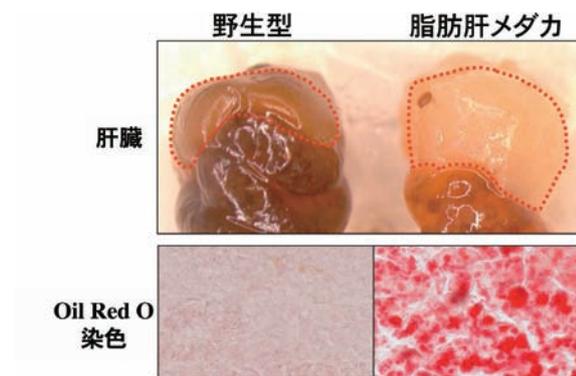


図5 脂肪肝メダカ

また、本領域の多くの先生方に有形無形のご指導、ご好意を賜りましたこと、御礼申し上げます。

超短光パルスレーザーを用いた生理と病理のイメージング

根本 知己(AO3 班)

北海道大学 電子科学研究所

非線形光学現象の一種である多光子励起を用いた蛍光顕微鏡法(2光子顕微鏡)は、特に神経科学の領域で広く使われ始めてきた。2光子顕微鏡は、他の光学顕微鏡法と比較すると、インタクトに近い組織的標本の深部断層像を、高い空間分解能で長時間にわたって取得することができる。本課題では、この2光子顕微鏡法を技術的な核として輸送小胞、開口放出の機能について取り組んできた。編集委員の先生からはカジュアルなエッセイ的なものをとということであったので、成果や今後の展望、その周辺技術について所感をまとめた。

1. 2光子顕微鏡の将来

本研究領域の開始時から、2光子顕微鏡法が生きた生体内部の観察において強力なツールであることを強調してきた。実際、生理学研究所脳機能計測センター長の鍋倉淳一教授との共同研究を通じて、世界で最も深い断面の生体 *in vivo* イメージングが可能であるシステムの開発に成功した(J. Neurosci, 2009, Brain Res. 2009, Mol Cell, 2008等)。さらに、この2光子顕微鏡法の、生体肝、骨組織、免疫組織など、他の臓器への適用も検討している(Blood, in press)。特に、肝細胞の酵素活性の新しい *in vivo* 測定法は先頃、特許申請が完了している。既存の蛍光プローブを新たな視点で使用するることによって拓くことができた酵素活性の測定法は、2光子顕微鏡法の可能性がまだまだ潜在的に存在することを示しているように思える。

2光子顕微鏡は生体 *in vivo* イメージングにおいて「のみ」有効であるということになるであろうか。実は、「多彩かつ厳密な同時多重染色イメージング」や「蛍光色素の退色色の拡散による補償」などの特性は、株化細胞や単層の初代培養系にも通用

する特徴である。前者は、1光子励起過程においては、吸収スペクトルの重なりが少なく同時に1光子励起が困難な複数の色素であっても、2光子励起過程においては同一の波長で同時に励起可能になることを意味する。それは、2光子励起スペクトルが理論的に予想されるよりも広がっているためである。従って、2光子顕微鏡は断層化のために共焦点ピンホールを用いていないため、原理的にほとんど色収差、視差の無い同時多重断層イメージングが可能になる。これは他の顕微鏡法にない特徴である。

この励起の局所性は光活性化物質との組み合わせで、強力な方法論となる。今後、このような光による操作や刺激というものが生理機能の解明に重要な役割を担うことが予想される。

2. 開口放出現象の可視化解析

上述のような様々な特徴を活用し、我々は単一の開口放出現象を可視化する方法論を確立した。即ち、細胞外液に水溶性の蛍光色素を入れることにしたのである。これにより細胞の形態が陰画のように観察される。従って、開口放出の過程で、融合細孔が形成された場合には、その分泌小胞内部に蛍光色素が逆行的に充満することで、融合後の分泌小胞のみが選択的に可視化される。この際に、自己遮蔽効果の回避、褪色の補償という2光子顕微鏡固有の性質が高い分解能での観察を保証している。開口放出の実時間的測定に用いられてきた膜容量測定法と比較した場合、時間分解能は確かに劣っているが、画像として得られる情報は極めて大きい。電子顕微鏡では、単純に比較すれば空間分解能は光学顕微鏡のよりも著しく高いが、あくまでも固定された状態でしか画像が得られないので、時間的な

因果関係の解析に、解釈の問題が不可避的につきまとう。我々は現在、共同研究者と共に膵β細胞のインシュリン顆粒の開口放出の制御に関連する分子の解析を行った(論文準備中)。

3. 逐次開口放出の生理と病理

2001年に我々は膵臓外分泌腺細胞が「逐次開口放出」という新しい分泌様式を用いていることを実証することに成功した。即ち、細胞膜と小胞の膜融合が生じると、その一体化した小胞膜が新たに、細胞の内側にある小胞と膜融合することが可能になる。その結果、数珠のように次々と連なって小胞が開口放出していくという形式である。

このような逐次開口放出現象が膵臓外分泌腺において最も明確に捉えることができた理由は、逐次開口放出の典型である「葡萄の房」のような構造が安定的に観察されるためである。この安定性理由は、アクチン細胞骨格ではないかと考え、前述の同時多重染色性を活用して、我々は刺激後のΩ構造とアクチン骨格系を同時に可視化した。これらを3次元再構築を行い、両者を精密に比較検討した結果、開口放出を起こした分泌顆粒膜選択的に、アクチン細胞骨格が集積することを明らかにした。このような厚いアクチンの層が膜直下に存在することは開口放出に対して阻害的に働くであろうと古典的には信じられていたが、我々の定量的な2光子イメージングによる解析からは、開口放出のスピードは遅くなるものの、数自体は変わらないという結論を得た。これは膜直下のアクチン繊維は動的な構造を持っており、SNARE分子複合体のような膜融合分子機械の機能発現には本質的に影響がなく、分子複合体の形成に要する時間が遅くなっているだけではないかと考えられた。

では、このようなアクチン細胞骨格系の再構築は、生理学的な意味が無いのであろうか。我々はアクチン重合阻害剤等を用いる実験から、この過程が外分泌腺細胞内での大きな空胞様構造の形成を抑制していることを明らかにした。このような空胞は急性膵炎の初期に典型的に観察される構造であり、その内部では本来分泌されるべき消化酵素の活性化が観察されている。急性膵炎は自身の消化酵素による自己消化による重篤な症状を呈し、激痛と意識の喪失および高い致死率を示す。この分泌異常の原因の一つがこのアクチン細胞骨格による保護機能の異常にあることが示された。さらに、内田班との共同研究においては、類似の空胞形成が水・イオンチャネルAQP12のノックアウトマウスにおいても観察されることを明らかにした。

さて、このような細胞膜から連なって連続化している小胞群は、1960年代に既に電子顕微鏡によって撮影されていたが、これが真に逐次開口放出かどうか、証明は困難であった。即ち、予め、細胞内で膜融合を起こした小胞群が、最後に細胞膜と融合している可能性を固定した細胞では否定できないのである。このような古典的な命題を新たな観察法が解決していくことはしばしば生じる。また我々を含め内外の研究者により逐次開口放出はPC12細胞、膵β細胞、好酸球等でも追認されており、一般的な様式である可能性が高い。また2006年にEMBO Journalに報告したように、副腎髄質クロマフィン細胞において、新しい様式ヴァキュオール型逐次開口放出が存在することを世界に先駆けて実証し報告した。分泌小胞内容物ゲルが融合細孔形成後に膨潤することによりΩ構造がヴァキュオール様

に激しく拡張していく。この膨潤が細胞深部の分泌小胞の分泌への動員を加速しており、細胞を破壊することなく、短時間で大量の生理的な分泌を可能とする機構であると推定された。このような劇的ともいえる細胞内微細構造変化が我々の体内で生理的に生じているということは、極めて驚異的であり、2光子顕微鏡法をもってして初めて明らかになった事実である。

一般的な小胞膜輸送の様式となってきた逐次開口放出の生理機能は重要な研究対象であり、生物物理学的な立場から旧来のシンプルなSNARE仮説に再考を求めるものとなっている。またCa²⁺依存性開口放出の様式の多様性とその生理的な意義の解明には、融合細孔自身の安定性とSNAREコア複合体の係数性をその分子機構のレベルで理解することが重要である。今後は研究の進んでいる中枢神経系における結果との比較検討がこの問題を解く鍵となるのではないだろうかと期待している。

4. 超解像イメージング

さて最近の光学顕微鏡の話題はStimulated emission depletion(STED)を用いたイメージングが占有しているといっても過言ではない。STED顕微鏡はドイツのHellらのグループを中心にして膨大な数の報告がなされており、古典的な光学分解能を越える「超解像イメージング」の分野では最も期待される方法論である。最近では、細胞膜上に一過的に形成されるとされるシグナル伝達の「場」、ラフトの存在を古典的な光学分解能を越える精度で実証することに成功したという報告がある。我々も独自に2光子顕微鏡法の同時多重染色性と特徴を活用し、開口放出後の融合小胞や、エンドサイトーシス小胞の大きさや融合細孔径を推定する方法論(TEPIQ法)を提案した(J Physiol., 2005,2006他)。生細胞における適応性という意味ではTEPIQ法の方が優れているかもしれないが、しかし、遠視野で形態的な意味でのナノイメージングを実現できる可能性が見せつけるSTED顕微鏡の方が多くの研究者にとって魅力的であることも事実であろう。なぜならば現在のイメージングの手法では、先述したように、光学顕微鏡と電子顕微鏡の間には空間スケールにおいて大きなギャップが存在するためであり、機能の分子の間を繋ぐ統合的な理解の障害になっているためである。このような状況の中で、我々は新たに機器開発を目指した新しいプロジェクトを開始させている。このような研究展開の有り様もまた、特定領域研究にふさわしいものだろうと考える。

5. 様々な分子の情報の可視化

その他にも、第2高調波発生(SHG)、コヒーレントアンチストークスラマン分光(CARS)などの非線形光学過程を用いた新たな顕微鏡法が、生物学研究の場へも登場している。SHGは生きた生体中での繊維様構造を無染色で可視化することができ、皮膚組織などでの報告例が増えている。神経細胞の活動電位の可視化は、神経科学の研究者、特に、神経回路網の構成原理を追求するものにとっては、囑望されて久しい方法論である。旧来はその電位感受性色素のダイナミックレンジが低いことから、あまり活用されてはいない。しかし、最近ではSHGを用いてその改善に成功したという例が報告されており、この後の発展が期待できる。またCARSでは、分子の指紋と言

われる近赤外の分子振動スペクトルを可視化する。従って、適切な分子振動に関するライブラリーを参考することで、観察対象を標識することなく、分子種を特定できる可能性が高いことから、薬品の成分の同定などの応用可能性が高い。

さらに最近では新しいレーザー光源として、スーパーコンティニウム光、超小型半導体近赤外レーザーパルス光、ベクトルビームなどが登場し、それらのバイオイメージングや医療応用がスタートしている。我々も、この領域の成果に基づき、積極的なこれら光源技術の取り込みも行っていきたい。

6. 蛍光プローブの開発

一方で、測定されるべきプローブや標識の開発も多くの研究者によって積極的に進められており、この分野における日本人研究者の寄与は極めて大きい。阪大・岡村教授らの発見した膜電位感受性リン酸化酵素に基づく、新しい膜電位プローブの報告は記憶に新しい。本年度の班会議で報告したように、北海道大学電子科学研究所の永井健治教授との共同研究を通じ、非線形光学過程を用いたイメージングへ、世界で最も短い蛍光波長の新規蛍光タンパク質シリウス(Nature Methods, 2009)の応用可能性を検討している。

7. 最後に

以上述べてきたようにイメージングを用いた細胞膜における微小形態やシグナル伝達の研究は、いままでの分子生物学的な方向性とは異なり、真の「生理的な機能」にアクセスする有用な手段である。今後、生理学的な視点から先端の技術開発までを包含するような学際的な研究の推進はまさに焦眉の急というべきであろうと考える。

謝辞

逐次開口放出に関する研究は、現東京大学疾患生命工学センターの河西春郎教授のご指導を賜りました。生理学研究所の諸先生方、特に、岡田泰伸所長、鍋倉淳一教授には独立後、多大な支援をいただきました。多光子顕微鏡室のスタッフの前橋寛さん、新谷敦子さん、高松香さんには大変お世話になりました。最後に、A03班の東京医科歯科大学腎臓内科の佐々木成先生、内田信一先生、頼建光先生、太田江里子先生及び、共同研究者の広島大学歯学部 兼松隆先生、京都大学農学部の高橋信之先生、東北大学医工連携の畠山裕泰先生には、この場をかりて心より感謝の意を表したく存じます。

無機リン酸トランスポートソームの機能制御とその破綻 — 5年間の課題を終えて —

宮本 賢一¹(A03班)、伊藤 美紀子¹、辰巳 佐和子¹、瀬川 博子¹、竹谷 豊²

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 ¹分子栄養分野、²臨床栄養

はじめに

平成17年より開始された特定研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」は、今年度で終了となる。我々の課題は「無機リン酸トランスポートソームの機能制御とその破綻」というタイトルで開始した。メンバーは、宮本、竹谷、伊藤、瀬川、辰巳で構成され、それぞれ各自の持ち場で研究が展開された。5年間の無機リン酸(以下リン)トランスポートソーム研究を振り返り、本分野の進歩もふまえて総括する。

リントランスポートソーム

血中リン濃度は厳密に維持されており、リン代謝異常は骨格形成、エネルギー代謝、細胞膜構成など、生体における様々な局面において影響を及ぼす。その中心臓器は腎臓であり、血中リン濃度維持の要である。リン再吸収を担う腎近位尿管において、NaPi-IIa(Npt2a,Slc34A1)、NaPi-IIc(Npt2c,Slc34A3)の2つの輸送体が多くの蛋白質と複合体を形成し、また、様々な因子により調節されている。

NaPi-IIの構造

本研究期間に、竹谷、および伊藤らにより、NaPi-IIトラン

スポートソームの研究が行われた。これまでの、経緯を含めて研究の経緯について述べる。

NaPi-IIaは、腎におけるリン再吸収に中心的な役割を果たす分子である。NaPi-IIaは約640個のアミノ酸から構成された糖蛋白質で、分子量は80~90kDaであり、腎近位尿管の刷子縁膜に発現するが、その発現はS1~S3分節に広く分布している。遺伝子クローニング時には8回膜貫通蛋白質と報告されていたが、その後のエピトープタグ解析やcystine scanning assayにより、現在では第3と第4、第8と第9番目が膜埋没型のreentrant segmentとして追加され、12回膜貫通蛋白質として示されている。これらの領域は、NaPi-IIcを含む他のタイプのNaPiファミリーや、V. Cholerae等の下等な生物まで保存されていることから、Na⁺依存性のリン輸送部位に関与する事が示唆された。また、大きなドメインである-NH₂末、-COOH末とも細胞内に存在し、後述する多くの蛋白質と結合することで機能調節がなされている。第3細胞外ループには2カ所のN型糖鎖付加部位とジスルフォイド結合部位が存在し、三次構造の形成とNaPi-IIaの膜安定的な発現に関与すると考えらる。

NaPi-IIの機能と調節機構

NaPi-II (IIa & IIc) のリン輸送活性は、食事性リン、副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)、活性型ビタミンD (1,25-dihydroxy vitamin D)、FGF23(Fibroblast growth factor 23)および Klothoにより調節される。NaPi-IIaの膜での発現量がリン再吸収能を決定するため、膜上での迅速な調節機構が存在する。PTHは腎近位尿細管細胞のPTH受容体(PTH1R)に作用して、腎近位尿細管刷子縁膜に局在するNaPi-IIaのエンドサイトーシスを誘導する事で、リン再吸収を抑制する。PTH1Rは近位尿細管の刷子縁膜側と側底膜側に局在している。PTHからのシグナルは、PKA(protein kinase A)、PKC(protein kinase C)を介してNaPi-IIaの細胞内へのエンドサイトーシスを促進する。PTH/PTH1Rからのシグナルは直接NaPi-IIaをリン酸化することなく、後述するNaPi-IIaに結合する足場蛋白質(scaffolding protein)であるNHERF1のリン酸化を介して伝達される。さらに、PTHによるエンドサイトーシス機構には、ノックアウトマウスの解析から、腎特異的発現するメガリンとRAP(receptor-associated-protein)が関与することが報告されており、クラスリン被覆小胞を介したエンドサイトーシス機構に関与している。事実、竹谷らは、NaPi-IIaと相互作用する蛋白としてメガリンを同定し、PTHからのシグナルを受容するNaPi-IIa/メガリン分子複合体形成について検討を行っている。一方、NaPi-IIcに対するPTHの作用は、NaPi-IIc蛋白の直接のリン酸化による機能抑制と推察された。また、NaPi-IIc蛋白の分解にはモノユビキチン化が関与していると推察される。

腎刷子縁膜におけるNaPi-IIaの発現調節

C末端にはclass 1 PDZ binding motif(S/T-X-L)であるTRL配列が存在し、PDZ結合領域を持つ多くの蛋白質が結合することで、NaPi-IIaの細胞膜局在に重要な役割を果たす事が知られている。Yeast two hybrid法により、この領域に結

合する蛋白質をスクリーニングすると、 Na^+/H^+ exchanger regulatory factor familyの NHERF1 (NHERF, EBP50), NHERF2 (E3KARP2, SIP-1, TKA-1), NHERF3 (PDZK1, CLAMP, CAP70, DIPHOR-1, NaPi-CaP1), NHERF4 (PDZK2, IKEPP, DIPHOR-2, NaPi-CaP2)と Shank2Eの結合が確認された。NHERF familyはよく似たPDZ binding motifを有するが、その数や発現組織、発現部位は異なっている。免疫組織化学による検討では、NHERF1/3は近位尿細管刷子縁膜に局在し、NaPi-IIaと共局在する。NHERF1/2は2カ所のPDZ結合領域を有しており、-COOH末端側にはMERM(merlin-ezrin-radixin-moesin)蛋白質 familyと結合するドメインを有する。EzrinはPKA(protein kinase A)とも結合し、そのリン酸化がNHERF1との相互作用を調節する可能性が考えられた。また、NHERF1のノックアウトマウスにおいて、刷子縁膜でのNaPi-IIaの膜移行障害が見られ、尿中リン排泄増加と血中リン濃度が低下することから、NaPi-IIaの調節にはNHERF1が関与することが強く示唆されている。NaPi-IIa TRL配列とNHERF1のPDZ domain 1と、PDZ domain 2はPTH受容体(PTH1R)と結合しており、NHERF1ノックアウトマウスにおいてもPTH1Rの減少が確認された。このようにNHERF1は刷子縁膜においてNaPi-IIaの足場蛋白質として機能し、複合体を形成することで、機能調節蛋白質を集積し効率よく作動することが可能である。

さらに、NHERFとNaPi-IIaの相互作用は、NaPi-IIaの膜における安定的な発現や、PTHによる効率的なエンドサイトーシス調節を可能にしている。NHERF1/2はPTH1RとPLC β 1(phospholipase C beta 1)に相互作用することが知られている。腎近位尿細管においてPTHの投与はPLC β 1を活性化し、同時にadenyl cyclaseを阻害する。そのため、NHERF1/2はPTHがPTH1Rに結合した場合に、シグナルを選択的に決定する役割を演じている。また、NHERF1をCHO細胞に過剰発現させると、PTH1Rのエンドサイトーシスが阻害し、リサイ

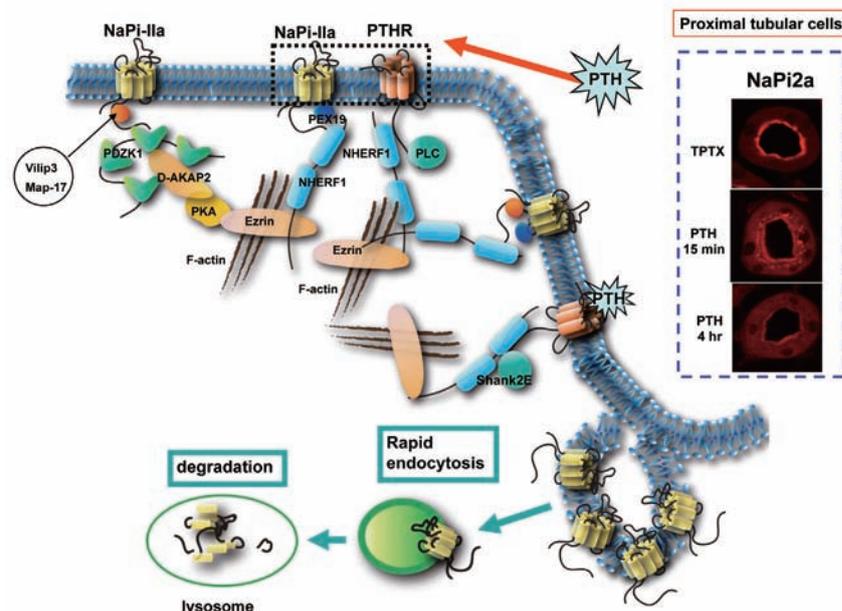


図1 NaPi-IIトランスポートソームとその調節蛋白

PTHからのシグナルは、多くの調節蛋白質との相互作用を介してNaPi-IIaの分解を促進する。



平成20年度、9月24日から26日まで、「生体膜トランスポートソーム」第1回班会議(淡路島夢舞台)
左)夢舞台から見た瀬戸内海、右)懇親会の風景
我々が主催した平成20年度の班会議では、全国から多くの班員が参加し、研究者の交流が見られた。

クルを遅延させる。竹谷らは ezrin のリン酸化が PTH によるエンドサイトーシスに重要である事を明らかにした、つまり、PTH による NaPi-IIa のエンドサイトーシスの誘導は NHERF1/ezrin のリン酸化を介して行われている可能性が示された。

一方、NHERF3/4 は 4 個の PDZ binding motif を持ち、PDZ-3 を介して NaPi-IIa と結合する。近位尿細管細胞である OK 細胞では、dominant-negative NHERF3 を過剰発現させると NaPi-IIa の膜発現は減少するが、NHERF3 ノックアウトマウスでは、正常状態では異常を示さず、高リン食摂食時にのみ、発現量が減少する。このことから NHERF3 は食事における NaPi-IIa の調節に関与している可能性が示唆されている。また、金井(大阪大学)先生および安西(杏林大学)先生らとの共同研究により、NaPi-IIc と相互作用する蛋白として NHERF4 を同定した。NHERF4 も主に腎臓(小腸に少量)に発現するが、その局在は細胞内であることが知られている。 -NH_2 末側に結合する 17kDa の膜関連蛋白質 MAP17 と共発現させると NaPi-IIa/NHERF3/MAP17 の複合体は細胞内に移行し、トランスゴルジネットワーク(TGN)に蓄積したことから、NHERF3/4 は細胞内における調節機構に関与していると考えられる。同様に、伊藤らは、NHERF4 を過剰発現すると NaPi-IIc の細胞内移行が促進し、逆に NHERF4 RNAi を用いた場合には、NaPi-IIc の細胞膜発現が増大することを明らかにした。遺伝性低リン血症くる病(HHRH)患者においても NaPi-IIc 遺伝子の NHERF4 結合領域付近に、変異が観察された。

Shank2E は Shank2 の上皮細胞特異的な isoform であり、1 個の PDZ binding domain と、N 末側にアンキリンリピート配列、SH3 ドメイン、C 末側に proline-rich 領域が存在する。Shank2E も NHERF と同様腎尿細管刷子縁膜に発現し、NaPi-IIa の TRL 配列を介して結合するが、その機能に関しては Shank2 がエンドサイトーシス小胞を形成する dynamin と結合することから、NaPi-IIa のエンドサイトーシス機構に関与していると考えられている。

OK 細胞を用いた検討より、NaPi-IIa の PTH によるエンドサイトーシスには、第 5 細胞内ループにおける KRモチーフが重要である。KRモチーフを変異させた場合には PTH による

NaPi-IIa のエンドサイトーシスが見られず、この配列に結合する蛋白質が PTH からのシグナルを受けるものと推察されている。伊藤らは KRモチーフに結合する蛋白質として PEX19 を同定した。PEX19 はペルオキシソームに必要な蛋白質に対するシャペロン分子として機能し、ペルオキシソーム細胞膜への蛋白質の挿入や運搬に寄与している。腎近位尿細管への NaPi-IIa の挿入に関しても PEX19 はシャペロン分子として機能している可能性が示唆された。

以上のように、NaPi-II トランスポートソームは、様々な蛋白質で構成されており、生体のリン需要に迅速に対応している。中でも、NaPi-II トランスポートソーム構成蛋白である NHERF ファミリーは、膜での安定化と PTH などによるホルモン調節には必須の分子である。紙面の都合上、NaPi-IIa/NaPi-IIc ノックアウトマウスの解析など、遺伝子改変動物の成果は割愛した。今後、リントランスポートソームが、カルシウムイオン輸送と、どのような相互連携で運動しているかなど、重要な課題が山積している。

おわりに(5年間の思い出)

歳をとって物覚えが悪くなり人の名前や物事が思い出せなくなると老化現象として片付けられるが、記憶力に加えて知能も低下してくる。本原稿を書いている、やたら英語名が出て来ない。分子の名前が覚えられないのである。また、知能が低下したせいか、細胞内ループの何番目とかいう計算ができない。当然、5年間で振り返り返っても、忙しい毎日が浮かぶだけで、鮮明な記憶が消失している。ただ、印象深いのは、夏の班会議で、毎晩、遅くまで飲み明かした事は、特に楽しい思い出である。若い先生方が中心となり、東北、伊豆、淡路、熊本など、自然に恵まれた場所でシンポジウムを開催いただき、教室の大学院生が、大いに喜んでいたので思い出す。やはり、若い先生方や大学院生には、人との繋がりが、研究を発展させる大きな原動力になるのではないだろうか。このような研究班に、計画班員として参加させていただく機会を得た事に、感謝申し上げます。

特定A03 鈴木グループまとめ

鈴木 洋史(A03班)

東京大学医学部附属病院薬剤部

この5年間、特定領域研究の一環として、コレステロールの消化管吸収・胆汁排泄関連の輸送体群と、骨代謝制御因子の分泌制御の研究を進めてきた。私達の研究バックグラウンドは薬物動態学であるが、in vivoでの化合物の動態を定量的に扱うことが特に重要視される。トランスポーターを含め、膜蛋白質が単一で機能する孤独な存在ではなく、実に様々な分子と相互作用することで、その発現・機能が制御されているという、生体系の複雑さ、奥深さは大変興味深いものである。以下にこの特定班研究期間に行ってきた研究全体を振り返りたい。

脂溶性・難溶性物質の体内動態制御因子としてのトランスポーター

当研究室では、脂溶性物質の消化管吸収に必須である胆汁ミセルの主要構成成分である胆汁酸・リン脂質・コレステロールの胆汁分泌・消化管吸収を担うトランスポーター群(BSEP/ABCB11・MDR3/ABCB4・ABCG5&ABCG8・Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1))の機能評価系を構築し、発現/機能制御因子・共役因子や、新たな輸送基質・生理機能の発見を目指し、研究を進めてきた^{1)~20)}。立ち上げたばかりの研究室で、扱いにくいトランスポーター群・輸送基質を用いた研究を取って進めてきたが、研究室員の成長とともに少しずつ成果が得られ、コレステロール選択的トランスポーターであると考えられていたNPC1L1によるビタミンE吸収の研究は、Faculty of 1000 Biologyに採択して頂き(F1000 Factor 6.0)⁷⁾、胆汁中に分泌されるコレステロール結合タンパク質であるNiemann-Pick C2 (NPC2)が、NPC1L1による負の発現・分泌制御を受けること、ABCG5&G8ヘテロダイマーによる

コレステロール胆汁分泌の促進因子となることを見出すことができた(図1、論文投稿準備中)。現在は、これら脂溶性物質の全身動態のモデル化を視野に入れつつ、疾患との関連性や個人差の解明を目指し、臨床研究を絡めながら研究を進めている。

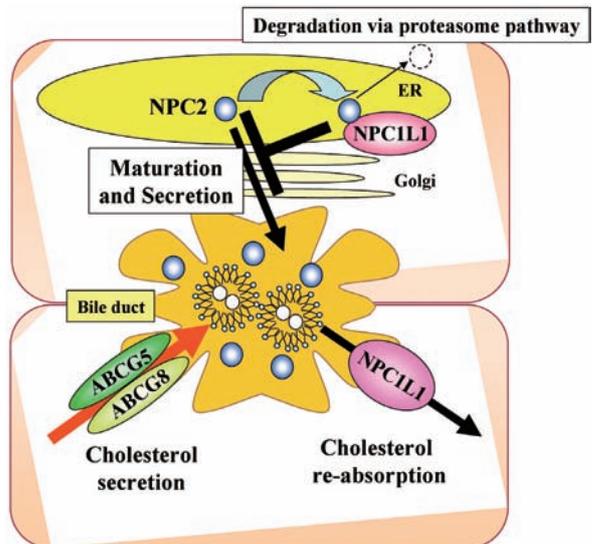


図1 NPC2分泌量制御による胆汁中コレステロール量の調節機構 NPC1L1により発現・分泌抑制を受けるNPC2が、ABCG5&G8によるコレステロール排出を促進する。NPC1L1はNPC2の胆汁分泌を抑制することで、間接的にABCG5&G8の活性を抑制していることになり、トランスポーター機能としての胆汁中コレステロール再吸収活性と併せて胆汁中コレステロール量の低下を担っている可能性が考えられる。

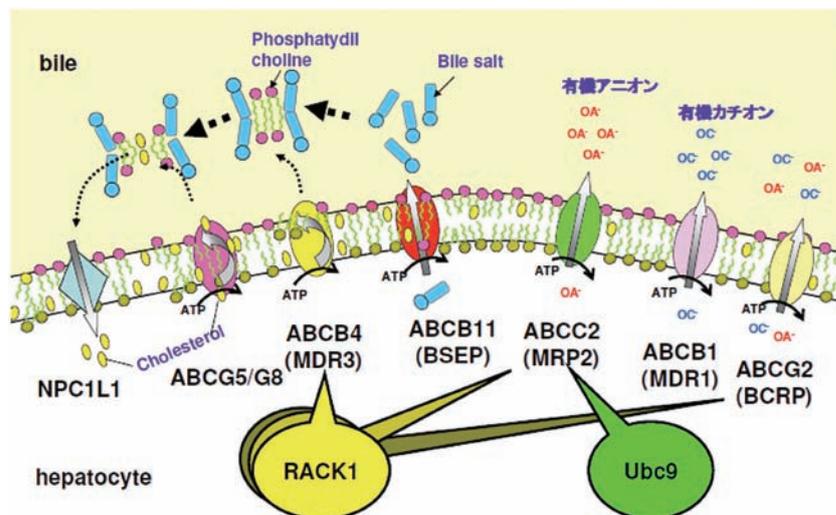


図2 胆汁排泄輸送体群のRACK1、Ubc9による制御選択性

肝細胞の胆管側膜には種々のABCトランスポーターが発現し、混合ミセル、アニオン性、カチオン性薬物の排泄を行う。SUMO化酵素であるUbc9はABCC2の発現を選択的に制御する。RACK1はABCB4、ABCC2、ABCG2など複数のトランスポーターの膜表面発現量・蛋白質発現量を制御する可能性が考えられる。

上記の胆汁分泌トランスポーターの一部に関しては、何らかの会合分子があると想定し、会合分子の単離から着手したのもいくつかある。私達自身が蛋白質相互作用スクリーニングの技術・経験を持ち合わせていなかったため、金井先生、安西先生らの全面的な協力を得て、酵母 two-hybrid スクリーニング技術を一から教えていただいた。その結果、いくつかのSUMO関連分子や、アダプター蛋白質様の相互作用候補分子を同定するに至った(図2)^{4),21)}。その後、複数の胆汁排泄輸送体群を選択的に翻訳後発現調節する蛋白質としていくつかの因子を同定し、報告することができた。そのうちRACK1は、分子内に7回の繰り返し構造を有し、これら全てが他の蛋白質と相互作用する可能性のある極めて多機能な蛋白質である。今なお毎月PubMed検索をするたびにその会合パートナーが新たに増えていることからその多機能性を伺い知ることができる。当初、私達はリン脂質排泄輸送体 ABCB4 の相互作用蛋白質として RACK1 を同定したが、その後の解析で少なくとも抗癌剤排泄輸送体 ABCG2 も同様に RACK1 による制御を受けることが明らかとなり(論文投稿準備中)、胆汁排泄に関わるトランスポートソームにおける重要な共通制御因子としての観点からも興味深いものである。

新たな展開としては、尿酸の体内動態制御因子としてのトランスポーターに関する研究も行っている。2009年11月に発表された防衛医大・大阪大等との共同研究の成果については、プレスリリースもなされ(<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/news/news.php?newsid=575>)、日本経済新聞、朝日新聞など全国紙五紙やNHK、Yahooニュースでも取り上げて頂いた(図3)²²⁾。高尿酸血症に引き続いておこる生活習慣病である痛風の主要な病因遺伝子として尿酸排出トランスポーター ABCG2/BCRP を発見し、ABCG2 の機能欠損・低下をもたらす遺伝子変異の組み合わせが痛風発症リスクの上昇に繋がることを示すことができたが(図4)、この研究は、本特定領域研究の班会議・若手ワークショップをきっかけに交流を深めた防衛医科大学の松尾洋孝助教と当研究室の高田龍平助教らが中心となり、議論を重ねて進められた多施設共同研究であり、若手研究者間の交流の機会の重要性を改めて認識している。

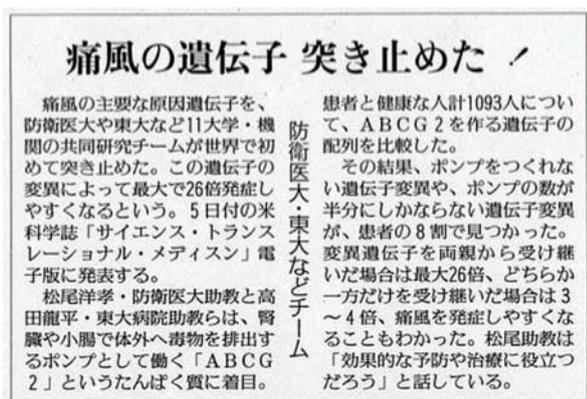


図3 読売新聞 平成21年11月5日朝刊掲載記事

骨代謝制御因子の分泌制御

本特定領域研究の開始に伴い、当研究室においても高解像度の共焦点顕微鏡を使用した研究が可能になったことによって、骨代謝に関連する研究を開始できた。骨代謝は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが絶妙に保たれることで、その恒常性が維持されている。骨芽細胞に発現するリガンド分子であるRANKLが、破骨前駆細胞に発現する受容分子であるRANKに結合し、破骨前駆細胞内にシグナルを入力することで、破骨細胞への分化・活性化がトリガーされるため、このシグナル伝達経路が生体内の骨吸収レベルを決定する中心的な役割を果たしていることが、これまでの研究から明らかになっている。そして、骨粗鬆症の新規治療標的の同定を目標として、RANKの下流シグナル伝達経路の研究が精力的に行われ、関与するシグナル分子群と作動メカニズムが詳細に同定されてきた。一方、RANKLは、RANKシグナルの起点分子であり、その細胞膜表面の存在量がシグナルの入力強度を決定すると考えられる重要な分子であるに

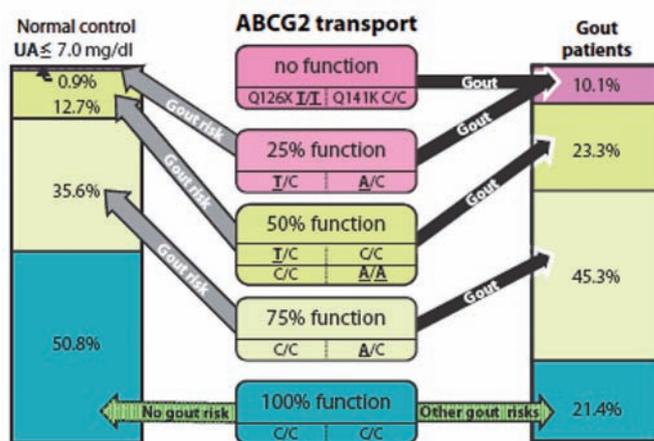


図4⁷⁾ ABCG2機能の個人差と痛風

ABCG2の機能欠損(Q126X)および機能半減(Q141K)をもたらす遺伝子変異の組み合わせでABCG2機能を見積もった場合、尿酸値正常群と比べて痛風患者群ではABCG2機能が低下している割合が高く、機能が25%以下になる変異パターンは痛風発症リスクを約26倍も高めることになる。

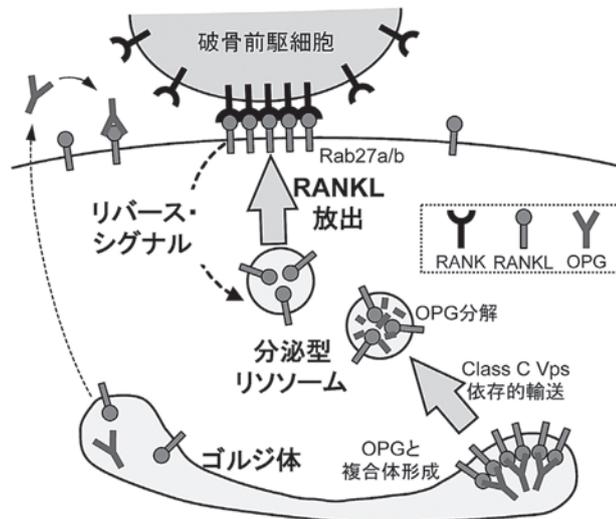


図5 骨芽細胞におけるRANKLの分泌制御機構

も関わらず、その骨芽細胞内における挙動や、その制御機構に関しては全くと言っていいほど研究が行なわれていなかった。私達は、RANKLが細胞膜表面に移行する過程に関与する分子を同定すれば、新規の骨粗鬆症治療標的の提唱につながるのではないかと考え、まず骨芽細胞内におけるRANKL分子の挙動をトレースすることとした。顕微鏡を覗き、GFP標識したRANKLが骨芽細胞内に小胞状に点在している像を観察した時の衝撃は今でもありありと思い出される。RANKLは骨芽細胞の表面において、破骨前駆細胞と接触することでシグナルを入力する分子であるから、当然細胞膜表面上に観察されるだろうと予測していた。ところが骨芽細胞においては、RANKLは主として分泌型リソソームに局在しており、細胞膜表面に局在するRANKLの量は、総発現量の1割にも満たないことが明らかとなった。ここからは、A03班仁科先生のご協力なども得ながら、一気に研究を進展させることが出来た。この特定領域研究の期間を通じて明らかに出来たこととしては(図5)、上述のRANKL細胞内局在の発見に加えて、①細胞膜表面に局在する少量のRANKLは、破骨前駆細胞内にシグナルを入力するリガンド分子としてだけでなく、RANKとの相互作用に伴って骨芽細胞内にリバース・シグナルを伝達するシグナル受容分子としても機能し、②このリバース・シグナルによって、分泌型リソソームからのRANKL放出がトリガーされることなどが明らかとなった²³⁾。またさらに、骨芽細胞に発現するRANKLのデコイ受容体OPGは従来、細胞外に分泌された後に細胞膜表面のRANKLと結合することでシグナル伝達を阻害していると考えられてきたが、③実は大部分のRANKLはゴルジ体でのタンパク質合成段階で既にOPGと相互作用しており、OPGと複合体を形成したRANKLがClass C Vps complexとの相互作用を介して分泌型リソソームへの選別輸送を受けていること、および④このOPGによるRANKL選別輸送の調節機能は、デコイ受容体としての機能より大きく破骨細胞活性化抑制に寄与していることを明らかにすることにも成功した(論文リバイス中)。また、⑤分泌型リソソームから細胞膜表面へのRANKL移行過程には低分子量G

タンパク質であるRab27a/bと、そのエフェクター分子であるSlp4、Slp5、Munc13-4が関与していること、なども見出している。これらの結果は、RANKLの細胞内局在の制御が生体における骨代謝調節に極めて重要な役割を果たしていることを示唆しており、従来のRANKLシグナル伝達制御に関する常識を塗り替えることが出来たと思う。

おわりに

以上、2005年よりスタートした本特定領域研究は、私達の研究室の立ち上げ(2004年度より)と重なった。当初はハード面・ソフト面で何ら基盤の無かった研究室を今日の姿まですることができたのは、本特定班の構成員の先生方からの多大なるサポートの賜物と思い、感謝している次第である。特定班は今年度限りで終了となるが、これまで5年間お世話いただいた方々にご恩返しできるよう、上記特定領域研究で結実しつつある研究を今後さらに発展させていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Yamanashi Y, Takada T, Suzuki H. In-vitro characterization of the six clustered variants of NPC1L1 observed in cholesterol low absorbers. *Pharmacogenet Genomics* [Epub ahead of print] 2009 Oct 9. .
- 2) Takada T, Suzuki H. Mechanisms of regulation of bile acid transport in the small intestine. "Bile Acid Biology and Therapeutic Actions" (edited by D Keppler, U Beuers, A Stiehl and M Trauner, Springer社), pp. 76-81, 2009.
- 3) 伊藤晃成, 鈴木洋史. 薬物動態関連トランスポーターとERMタンパク質. *最新創薬学* 2009(メディカルドゥ):83-88, 2009.
- 4) Minami S, Ito K, Honma M, Ikebuchi Y, Anzai N, Kanai Y, Nishida T, Tsukita S, Sekine S, Horie T, Suzuki H. Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:G406-413, 2009.

- 5) Koh S, Takada T, Kuku I, Suzuki H. FIC1-mediated stimulation of FXR activity is decreased with PFIC1 mutations in HepG2 cells. *J Gastroenterol* 44:592-600, 2009.
- 6) 高田龍平, 鈴木洋史. 消化管コレステロールトランスポーター NPC1L1と高脂血症治療薬. *膜* 33:88-93, 2008.
- 7) Narushima K, Takada T, Yamanashi Y, Suzuki H. Niemann-pick C1-like 1 mediates alpha-tocopherol transport. *Mol Pharmacol* 74:42-49, 2008.
- 8) Kobayashi K, Ito K, Takada T, Sugiyama Y, Suzuki H. Functional analysis of nonsynonymous single nucleotide polymorphism type ATP-binding cassette transmembrane transporter subfamily C member 3. *Pharmacogenet Genomics* 18:823-833, 2008.
- 9) Iwayanagi Y, Takada T, Suzuki H. HNF4alpha is a Crucial Modulator of the Cholesterol-Dependent Regulation of NPC1L1. *Pharm Res* 25:1134-1141, 2008.
- 10) 高田龍平, 鈴木洋史. ABCタンパク質による胆汁脂質分泌と遺伝性疾患. *最新医学* 62:63-67, 2007.
- 11) 伊藤晃成, 鈴木洋史. 肝における輸送体のソーティング調節. *最新創薬学2007(メディカルドゥ)* :135-141, 2007.
- 12) Yamanashi Y, Takada T, Suzuki H. Niemann-Pick C1-like 1 overexpression facilitates ezetimibe-sensitive cholesterol and beta-sitosterol uptake in CaCo-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 320:559-564, 2007.
- 13) Yamamoto T, Ito K, Honma M, Takada T, Suzuki H. Cholesterol-lowering effect of ezetimibe in uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A-deficient (Gunn) rats. *Drug Metab Dispos* 35:1455-1458, 2007.
- 14) Shoda J, Okada K, Inada Y, Kusama H, Utsunomiya H, Oda K, Yokoi T, Yoshizato K, Suzuki H. Bezafibrate induces multidrug-resistance P-Glycoprotein 3 expression in cultured human hepatocytes and humanized livers of chimeric mice. *Hepato Res* 37:548-556, 2007.
- 15) Okuwaki M, Takada T, Iwayanagi Y, Koh S, Kariya Y, Fujii H, Suzuki H. LXR alpha transactivates mouse organic solute transporter alpha and beta via IR-1 elements shared with FXR. *Pharm Res* 24:390-398, 2007.
- 16) Okada K, Shoda J, Kano M, Suzuki S, Ohtake N, Yamamoto M, Takahashi H, Utsunomiya H, Oda K, Sato K, Watanabe A, Ishii T, Itoh K, Yamamoto M, Yokoi T, Yoshizato K, Sugiyama Y, Suzuki H. Inchinkoto, a herbal medicine, and its ingredients dually exert Mrp2/MRP2-mediated choleresis and Nrf2-mediated antioxidative action in rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1450-1463, 2007.
- 17) 高田龍平, 鈴木洋史. 薬物排出トランスポーターと性差. *性差と医療* 3:539-543, 2006.
- 18) Sakamoto S, Suzuki H, Kusuhara H, Sugiyama Y. Efflux mechanism of taurocholate across the rat intestinal basolateral membrane. *Mol Pharm* 3:275-281, 2006.
- 19) Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y. Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB 11) -coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34:1575-1581, 2006.
- 20) Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y. Vectorial transport of unconjugated and conjugated bile salts by monolayers of LLC-PK1 cells doubly transfected with human NTCP and BSEP or with rat Ntcp and Bsep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G550-556, 2006.
- 21) Ikebuchi Y, Takada T, Ito K, Yoshikado T, Anzai N, Kanai Y, Suzuki H. Receptor for activated C-kinase 1 regulates the cellular localization and function of ABCB4. *Hepato Res* 39:1091-1107, 2009.
- 22) Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, Ito K, Kusanagi Y, Chiba T, Tadokoro S, Takada Y, Oikawa Y, Inoue H, Suzuki K, Okada R, Nishiyama J, Domoto H, Watanabe S, Fujita M, Morimoto Y, Naito M, Nishio K, Hishida A, Wakai K, Asai Y, Niwa K, Kamakura K, Nonoyama S, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Hamajima N, Shinomiya N. Common Defects of ABCG2, a High-capacity Urate Exporter, Cause Gout: A Function-based Genetic Analysis in a Japanese Population. *Science Translational Medicine* 1:5ra11, 2009 in press.
- 23) Kariya Y, Honma M, Aoki S, Chiba A, Suzuki H. Vps33a mediates RANKL storage in secretory lysosomes in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 24:1741-1752, 2009.

血液脳関門トランスポートソームの生理的役割

大槻 純男、寺崎 哲也(AO3班)

東北大学大学院薬学研究科

本特定領域開始時期は、我々の研究室において質量分析装置(LC-MS/MS)が導入され、トランスporterのプロテオミクス解析を開始した時期と一致し、その後、特定領域研究の推進とともに解析手法や解析戦略が大きく発展した変革の期間であった。

我々は“疾患”と“トランスポートソーム”というキーワードの基、中枢疾患と深く関わる中枢 cholesterol 恒常性に関わる脳関門トランスポートソーム解析を行ってきた。脳は、非常に cholesterol が豊富な組織であり、その cholesterol はほぼ脳内における de novo 合成によって供給される。cholesterol の恒常性の異常はアルツハイマー病と深く関わっていると考えられている。中枢 cholesterol の維持には、合成のみではなく代謝そして脳からの消失が重要であるが、特に消失に関してはほとんど解析がなされていなかった。一方、これまでの我々の解析では、cholesterol 類の輸送に関わる ATP binding cassette transporter A 及び G 分子群の発現が血液脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞に認められていたことから、中枢 cholesterol の恒常性維持に血液脳関門のトランスポートソームがなんらかの役割を果たしているのではないかと仮説を構築した。

この仮説を基に、 $[^3\text{H}]$ cholesterol もしくは中枢 cholesterol の主代謝物である $[^3\text{H}]$ 24S-hydroxycholesterol をラット脳内に投与し、脳内に残存する放射活性によって血液脳関門を介した脳からの排出を検討した結果、代謝物である $[^3\text{H}]$ 24S-hydroxycholesterol は脳から消失したにもかかわらず、 $[^3\text{H}]$ cholesterol の脳からの消失は検出出来なかった¹⁾。すなわち、血液脳関門は cholesterol に対しては脳内に保持する障壁として機能し、その代謝物である 24S-hydroxycholesterol を脳から排出することによって中枢 cholesterol 恒常性の維持に関わっている可能性が in vivo で初めて明らかとなっ

た。さらに、24S-hydroxycholesterol の生体膜透過に関しては、これまで受動拡散によって説明できると考えられてきた。しかし、我々は in vivo 及び培養細胞を用いた解析によって 24S-hydroxycholesterol の脳関門排出には有機アニオントランスporter-oatp2 が関与していることを明らかにし、これまでの仮説を覆した(図1)¹⁾。

末梢臓器において cholesterol 関連輸送系は、核内受容体によって制御を受けることが報告されていた。我々は、血液脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞及び血液脳脊髄液関門を構成する脈絡叢上皮細胞における核内受容体を解析したところ、両細胞とも LXR を発現し、ABCA1 や ABCG1 が 24S-hydroxycholesterol を含む LXR ligand によって制御を受けていることを明らかにした^{2),3)}。すなわち、脳関門には中枢 cholesterol 代謝物によってフィードバック制御を受けるトランスポートソームが存在する可能性がある。さらに条件的不死化脈絡叢上皮細胞を用いた apolipoprotein による cholesterol の引き抜きの 24S-hydroxycholesterol による誘導は、脳脊髄液側にのみ検出された。加えて、その引き抜きの誘導は ApoE4 よりも ApoE3 で大きかった³⁾。すなわち、ABCA1 や ABCG1 が関わる apolipoprotein を介した cholesterol の release は脳脊髄液側で起こり、ABCA1 と ABCG1 が順次 maturation に関わることにより脳脊髄液内の cholesterol-rich lipoprotein の生成とその制御に関与していると考えられる(図1)。さらに、ApoE4 はアルツハイマー病のリスク因子である。今回の我々の結果から ApoE の subtype は脳脊髄液内の cholesterol 恒常性に影響を与える可能性を示しており、アルツハイマー病のリスクとの関わりが今後注目される。

本特定領域期間中、我々は、脳関門トランスポートソームの解析と平行し、新たな解析技術の開発を行ってきた。脳毛細血管の高純度単離法⁴⁾や基質カクテルによるトランスポー

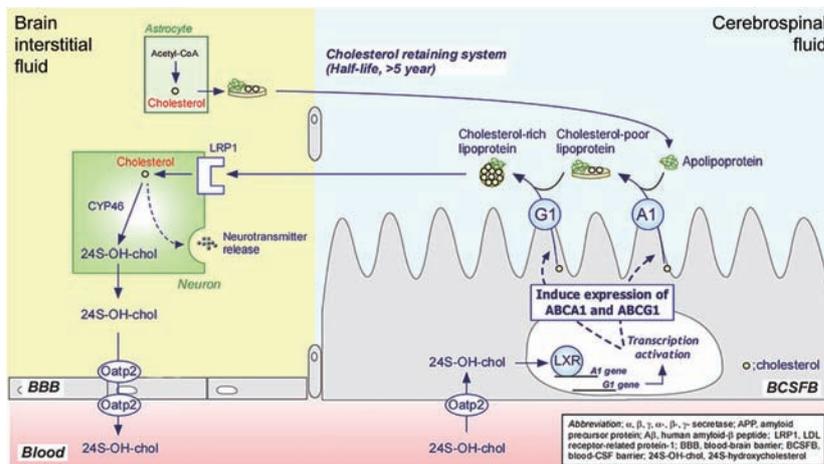
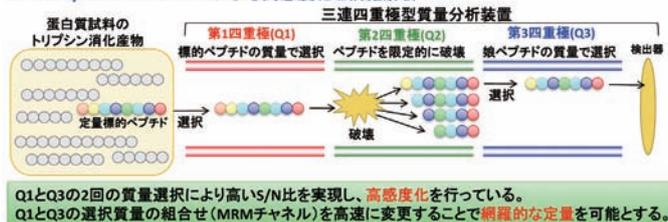


図1 中枢コレステロール恒常性に関わる脳関門輸送機構

1. Multiplexed-MRM modeによる高感度化と網羅解析



2. Multiplexed-MRM modeによる高信頼性

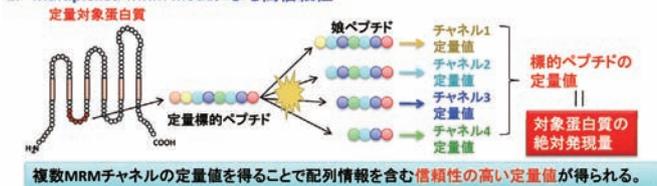


図2 Multiplexed-MRM法によるタンパク質絶対定量の原理と特徴

1. 定量標的ペプチドの選択と検量線の作成



2. ペプチド試料の調製



3. 定量解析

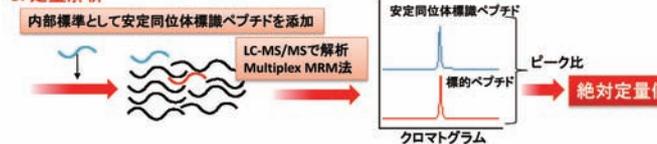


図3 Multiplexed-MRM法によるタンパク質絶対定量の手順

ター基質探索法⁵⁾を開発したが、我々が特に重点を置いたのはトランスポーターの絶対発現量の測定技術開発である。トランスポートソーム解析においては、トランスポーターが単体と複合体を形成している時の機能比較を行うことが必須である。その際には、解析している系においてトランスポーターの絶対量を計測することが必須であるが、これまでそのような定量系は特定のトランスポーターを除き存在しなかった。また、複合体を形成するトランスポーターや足場タンパクの同定には、これまでよりも高感度であり膜タンパク質に適応できるプロテオミクス技術も必要である。そこで、我々はこれまでのGlobal Proteomicsとは原理が全く異なるQuantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP)の技術を開発した⁶⁾。

従来プロテオミクスでは原理的に膨大な種類のタンパク質の中から微量に発現する特定のタンパク質を同定することは困難である。この課題を克服するために、通常プロテオミクスでは用いられない三連四重極タイプのMultiple Reaction Monitoring(MRM)モードを用いた。MRMモードは親イオンと娘イオンの2回の質量フィルターによって大幅なノイズピークの低下を実現し、非常にS/N比が高い測定が可能で

ある(図2)。このMRMモードをペプチド測定に応用することによって、膨大な種類のタンパク質に由来するペプチド試料の中から標的タンパク質由来の特定のペプチドを検出し、定量を実現することができる(図3)。さらに、MRMモードの親イオンと娘イオンの質量フィルターの組合せ(MRMチャンネル)を300種類設定でき、複数同時定量が可能である。そこで、同一親イオンに由来する4つの娘イオンを検出する4つのMRMチャンネルを設定し、それぞれから得られる定量値から標的ペプチドの定量値を算出した(Multiplexed-MRM法、図2)。一つの標的ペプチド当たり8チャンネル(試料と内部標準それぞれ4チャンネル)を用いるため300種類のMRMチャンネルを用いることで、37分子のタンパク質を同時に定量することができる。

今回の開発において最も重要な点は、定量の対象とする標的ペプチドを配列情報のみからin silicoで選択することを実現したことである。ペプチド間のイオン化効率の違いによって数千倍も検出強度が異なり、高い強度を示すペプチドは定量精度も高い。そこで、種々のトランスポータータンパク質のトリプシン分解ペプチドについてイオン化効率とアミノ酸配列を解析し定量に適したペプチドを選択する選択基準を見いだした。この設計法を用いることで遺伝子情報のみから定量系を迅速に構築することが可能となり、発現サンプルがないトランスポーターを含めた331種類の全てのヒトトランスポータータンパク質(ATP binding cassette transporter family 51種、Solute carrier superfamily 280種)について定量用ペプチドを決定し、既に一部をヒト組織におけるトランスポータータンパク質の定量解析に用いている。図4には、本法で計測したマウス血液脳

関門のトランスポーター絶対発現量プロファイル(アトラス)を示す。

現在、本手法を用いて、1分子活性と絶対発現量からのin vivoトランスポーター機能の再構築を進めており、この実現によってトランスポーターをシステムとして定量的に理解することが初めて可能となる。また、脳関門におけるトランスポーターの探索や各種ガンの薬剤耐性に関わる因子をタンパク質レベルで網羅的にプロファイル解析を実施している。すなわち、本技術によってこれまで遺伝子のみで可能であった網羅的定量解析がタンパク質で可能となり、今後、Pharmacoproteomicsへ展開することが期待される。

本特定領域研究は、トランスポートソームをキーワードとして極めて広範な領域の研究者が集まった。このような広範な領域の融合的な班員交流は研究推進に大きな役割を果たした。我々が世話人を務め松島で開催した平成18年度第1回班会議は、多少なりとも班員交流と研究推進に貢献できたことは幸いである。今後は、このトランスポートソームを基盤として新たな研究展開への発展、そして領域で育った若手研究者の新領域の開拓に期待したい。

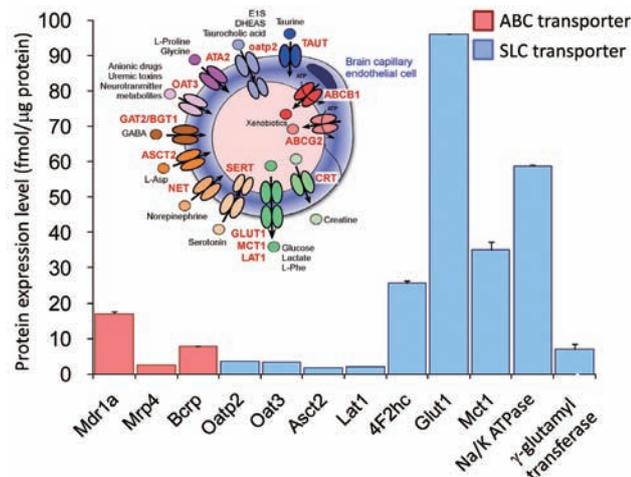


図4 定量的脳関門トランスポーターアトラス

参考文献

- 1) Ohtsuki S. et al., J. Neurochem., 103:1430-1438 (2007)
- 2) Akanuma S. et al., Neurochem. Int., 52: 669-674 (2008)
- 3) Fujiyoshi M. et al., J. Neurochem., 100:968-978 (2007)
- 4) Ohtsuki S. et al., J. Neurochem., 104:147-154 (2008)
- 5) Uchida Y. et al., Pharm. Res., 24:2281-2296 (2007)
- 6) Kamiie J. et al., Pharm. Res., 25:1469-1483 (2008)

疾患起因性変異蛋白の解析による 腎臓の水・電解質トランスポートソームの解明

内田 信一(AO3班)

東京医科歯科大学

はじめに

本特定領域には、水・イオン・小分子のベクトル輸送の分子基盤とシグナル伝達に関する研究の特定領域に引き続き、計画研究班として参加させていただいた。前回の特定班では、我々が以前から研究対象としていたAQP水チャンネル、CLCクロライドチャンネルの細胞内局在機構に焦点を当てて研究した。それによって、これらの水・イオンチャンネルが細胞内の固有の部位に局在するには、チャンネル自身のみならず、他の分子との会合が重要であるという知見をいくつか得た。しかしながら、当時用いた酵母のtwo-hybrid法では、いくつかの結合蛋白の候補蛋白が得られるものの、候補のクローンのどれに焦点をあてるかという際に、どうしてもバイアスが入ることを避けられず、結果的には本命とはいえない制御因子について、その解析に1-2年を費やしてしまうというのを強いられた。特に我々の扱う膜輸送体蛋白は、高度に分化した生体内の尿細管細胞でのみその発現が認められ、培養細胞系で研究しようとするれば、強制発現系に頼る必要があり、そこで得られた結果の生理的な重要性の検討をさらにin vivoで行うには多大な時間と労力を有する事が問題であった。

そこで、本特定領域では、2つの方針を立てて研究を行った。

一つは、本研究領域発足時から急速に進んだ質量分析器による膜輸送体結合蛋白の網羅的解析である。もう一つは、我々の研究課題にも述べられているように、ヒトで疾患を引き起こす膜輸送体ないしその制御因子の変異体を解析することで、その分子本来の機能や制御機構を明らかにしようというアプローチである。輸送体蛋白に機械的に変異を導入して機能ドメインを探る試みは、時として有用な情報も得られることもあるが、すでに機能に障害を来すことが明らかとなっている自然の変異体に焦点を当てることで、より確実にその分子にとって重要な制御メカニズムを解明できると考えたわけである。以下、年代順に主だった成果を述べる。

AQP2水チャンネル遺伝子異常による優性遺伝形式を呈する腎性尿崩症の病態解析。

遺伝性の腎性尿崩症は、ほとんどがバゾプレシンレセプター遺伝子(V2Rレセプター)異常によるX染色体性か、まれにAQP2遺伝子異常でも常染色体劣性形式として発見されていたが、我々は常染色体優性遺伝形式をとっている腎性尿崩症家系の患者において、AQP2遺伝子に共通の変異を発見した。それらの変異は、AQP2のエクソン4の中にフレームシフト

トを引き起こす欠失であり、フレームのずれ方はすべて同じで、正常のC末端部分が欠失して、新たに61の余分な残基がC末端つく変異であった。この変異のもたらす意味を探るため、MDCK細胞にてこの変異AQP2を発現させたが、本来のAQP2の発現細胞でないMDCK細胞では、AQP2は生体のようにきれいにapical側に局在せず評価が難しかった。そこで我々は、この蛋白を発現するノックインマウスを作成して、尿崩症の機序を生体内で検討した。その結果、変異蛋白は正常蛋白とは反対側のbasolateral側に局在し、さらにヘテロ型のノックインマウスでは、正常蛋白も変異蛋白によってbasolateral引きずられていくため、apical側のAQPが不足して尿崩症になることが明らかとなった(図1)。AQPは4量体を形成するが、その一つにでも変異があればapicalに到達できないと仮定しても、理論的には16分の1の確率で、正常AQP2のみからなるAQP2の4量体が作られているはずであり、事実このモデルマウスでも正常AQP2のapical膜上での存在が確認された。よって、この機能する正常AQP2の4量体を最大限活躍させることが治療法として有効となると考え、PDE阻害薬により集合管内cAMP濃度を高める試みをおこなった。いくつかのPDE阻害薬をこのマウスで試したところ、PDE4阻害薬が有意に尿浸透圧を上昇させ、尿量低下に有効であった(PNAS 2006)。

WNKキナーゼの変異による遺伝性高血圧症の原因の解明。

WNKキナーゼは、機能未知のキナーゼであったが、WNK1とWNK4が遺伝性の高血圧疾患である偽性低アルドステロン症II型(PHAI)の原因遺伝子として同定され、注目を浴びることとなった。PHAIはサイアザイドが有効な疾患として知られていたため、サイアザイドの標的蛋白であるNa-Cl共輸送体(NCC)がこのキナーゼの標的蛋白であるとして、共発現実験が主としてアフリカツメガエル卵母細胞で行われた。しかしながら、強制発現系ではNCC以外のどんな輸送体蛋白をWNK4と発現させてもその機能を低下させるため、直接の基質でもないものをキナーゼと過剰発現させてその機能を見るという実験は少々乱暴であると考え、我々は、AQP2同様

に、ヒトのWNK4で発見されたミスセンス変異をもつノックインマウスを作成し解析した。その結果、WNK4ノックインマウスでは、NCCのリン酸化が増加していた。さらにNCCと同じファミリーの輸送体をリン酸化する事が知られていたOSR1/SPAKセリンスレオニンキナーゼのWNKキナーゼによるリン酸化部位のリン酸化も増加しており、このことは、WNK4ノックインマウスでは、WNKキナーゼ活性が上昇してOSR1/SPAKキナーゼを活性化し、それによりNCCがリン酸化されていると推定された。しかもリン酸化されたNCCは細胞膜上に分布することも明らかとなり、WNK-OSR1/SPAK-NCCが生体内でリン酸化カスケードを形成していることが明らかになった(Cell Metab 2007)。OSR1/SPAKにはWNKとNCCとの結合ドメインが存在し、この発見は腎臓での新たなトランスポートソームの同定とその病態への関与を明らかにすることとなった(図2)。その後、この系は食塩摂取やK摂取量(Am J Physiol 2009)によって生理的に制御されていること、食塩摂取量による制御にはアルドステロンが関わっていること(Kidney Int 2008)を明らかにした。Kによる制御は、アルドステロンによる制御とは逆の方向のため、Kが独自に制御をかけている可能性が示唆されていたが、最近培養細胞系にて、培養液のK濃度を生理的な範囲で変動させると、WNK1の活性が低Kでは活性化し、高Kでは抑制される事を見いだした(投稿中)。ホルモン系では、バゾプレシンやアンジオテンシンIIIによっても一過性に制御を受けるが、そのメカニズムは不明である。むしろ最近インスリンがこの系を制御することを見だし、肥満などの高インスリン血症での食塩感受性高血圧症にこの系が関わる可能性を検討している(投稿準備中)。

バーチン変異蛋白により引き起こされるバーター症候群の病態解明と治療法の開発。

バーチンは、我々がクローニングして研究してきたCLC-Kクロライドチャンネルのベータサブユニットである。ヒトで重篤なバーター症候群を引き起こすミスセンス変異体R8Lについて、その病態生理と治療法の開発をめざして、ノックインマ

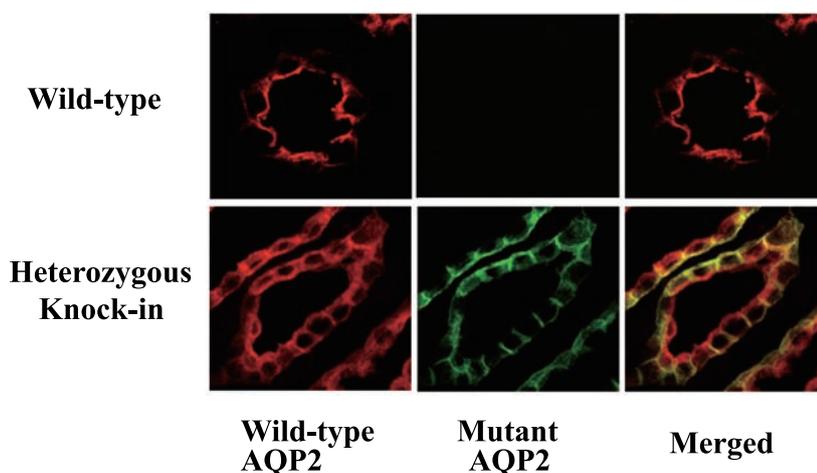


図1 野生型マウスでは正常AQP2は管腔側に存在するが、ノックインマウス(下段)では変異AQP2(緑)は基底側に発現し、正常AQP2も変異AQP2と共存して、基底側にも存在していた。

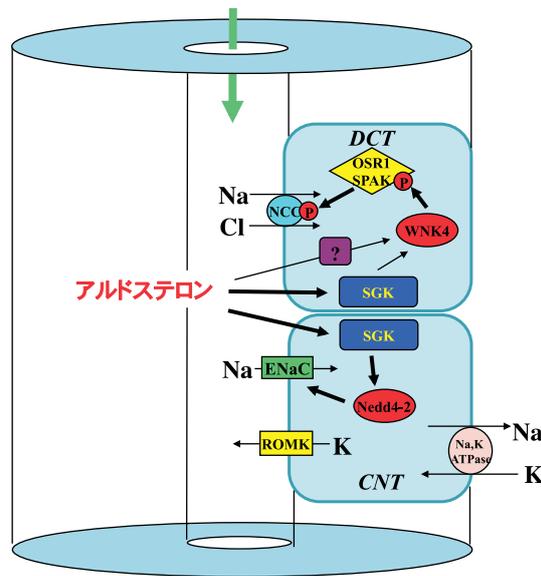


図2 アルドステロンが腎臓でNaを保持する仕組みは、CNT(接合尿管)以降に存在する上皮型Naチャンネルを介する系のみと思われていたが、今回、その上流にWNK-OSR/SPAK-NCC系がトランスポートソームを形成し、アルドステロンのエフェクターとして働いている事が明らかとなった。

ウスを作成して解析した。以前培養細胞における実験結果から、この変異体はERにとどまり、細胞形質膜に到達できないため、チャンネル本体であるCLC-KもERにとどまり機能できずパーチャー症候群になるのではと考えていた。今回、ノックインマウスの解析では、培養細胞と同様にパーチンとCLC-Kの細胞膜への局在は阻害されていた。培養細胞でスクリーニングしたERから細胞膜へ変異パーチンを移動させるのに有効な薬剤を、このマウスにも投与したところ、その症状の改善を確認し、病態の解明と治療法を明らかにすることができた(投稿準備中)。一方、このパーチンとCLC-Kの結合を阻害できれば、強力な利尿薬になることが考えられ、ケミカルライブラリーから候補薬剤を探索中である。両者の会合を水溶液中で蛍光共関分光を用いて検出することで効率よい結合阻害物質のスクリーニングが可能と考えている。

AQP2水チャンネルの結合蛋白による細胞内ソーティング機構の解明。

以上のような、疾患起因性変異蛋白に焦点を当てた研究以外に、やはり平行して網羅的な方法で、輸送体に結合する蛋白を同定することもおこなった。通常のtwo-hybrid酵母法では、いい成果が得られなかったが、膜たんぱく用に開発され

たsplit ユビキチンを用いたtwo-hybrid法にてAQP2に結合するA kinase anchoring protein(AKAP)であるAKAP220を単離同定できた(Kidney Int 2008)。この蛋白とAQP2との結合は免疫沈降では確認できないほど緩やかなものであったが、AQP2のリン酸化アッセイでは、AKAP220存在下で著明にAQP2のリン酸化を亢進し、さらにAKAP220は腎臓髄質でもっとも豊富なAKAPであることもマイクロアレイの結果から判明した。この結果を受けて、やはり両者の結合を阻害する物質の探索を行い、水利尿剤開発にチャレンジしたい。

一方、AQP2抗体でAQP2と共沈する蛋白を質量分析にて解析したところ、G-actinが同定され、しかもAQP2のリン酸化の状態によって、非リン酸化状態ではG-actinが、リン酸化されるとトロポミオシンが結合し、これによりAQP2周囲のF-actinが脱重合し、細胞膜へAQP2が移動するための障害が取り除かれるという新しいメカニズムが解明できた(J. Cell. Biol 2008)。

以上のように、以前から取り組んでいたAQP水チャンネル、CLCクロライドチャンネルの新たな制御機構のいくつかを、トランスポートソームという観点から明らかにできたとともに、新たな腎臓でのNaCl出納に関わるトランスポートソームを同定できたことが、この5年間の成果であった。

編集後記

TRANSPORTSOME「総集号」をお届けします。ニュースレターもこれが最後ですので、今回は計画班員の方々に「思いのたけを吐き出してください。(文言は少々違った言い回しでしたが)」とお願いしました。それぞれの人生観が何となく感じられるニュースレターになったのではないかと思います。最後に、後記編集委員(畑、仁科、古川)を代表して2年間ニュースレターの編集にご協力くださった班員の方々に心より御礼申し上げます。また皆様と当研究領域の益々の発展を祈願いたします。(古川)

TRANSPORTSOME

第11号(2010年3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

