

# 【 計画共同研究報告 】

# 計画共同研究報告

## 〔 目 次 〕

|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. コンディショナルジーンターゲティングによる GnRH ニューロンの機能解析<br>(佐久間康夫ほか) .....            | 132 |
| 2. インスリンレセプターによる膵β細胞機能調節とシグナル伝達機序<br>(矢田俊彦ほか) .....                    | 132 |
| 3. 上皮細胞における TRPV1 関連陽イオンチャネルの発現と機能<br>(富永真琴ほか) .....                   | 132 |
| 4. 乳酸アシドーシスによる脳グリア細胞の容積調節<br>(鍋倉 隆ほか) .....                            | 133 |
| 5. 膜孔形成タンパク質による腸管上皮細胞の体積変化の解析<br>(富田敏夫ほか) .....                        | 133 |
| 6. 新規の神経突起伸長遺伝子 <i>norbin</i> のノックアウトマウス作成による生理機能の解析<br>(丸山 敬ほか) ..... | 134 |

## 1. コンディショナルジーンターゲティングによる GnRH ニューロンの機能解析

佐久間康夫, 加藤昌克, 七崎之利 (日本医科大学生理学第一講座)

小幡邦彦, 八木健

性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は生殖機能の神経内分泌調節に重要な役割を果たしていると考えられているがそれは直接的証拠ではなく間接的証拠によるものが多い。本研究ではコンディショナルジーンターゲティングの手法により, 任意の時期に GnRH 遺伝子のノックアウトを行い, GnRH 分子が中枢で果たす役割の解析を目指すものである。特に思春期や更年期にこのニューロンの演じる役割は重要と考えられる。また, 性行動の発現にも GnRH が関与することが示唆されているが, 本計画共同研究でその解析もすすめる。

昨年度までに LoxP 配列を GnRH 遺伝子エクソンの両端に導入した約 16Kb の GnRH gene targeting vector を作成し, ES 細胞にエレクトロポレーション法により導入した。PCR とサザンブロットでターゲティング遺伝子の導入された ES 細胞を選抜し, さらに PGK-neo 遺伝子を除去したクローンを選び出した。次にこの ES 細胞を 8 細胞胚に注入しノックアウトマウスの作成を 4 回試みたが, 全て失敗しキメラマウスを得られなかった。現在この原因を追及中である。

## 2. インスリンレセプターによる膵β細胞機能調節とシグナル伝達機序

矢田俊彦, 出崎克也 (自治医科大学)

橋口鈴子 (鹿児島大学)

岡田泰伸, 森島 繁

グルコース応答性インスリン分泌は, β細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) の増加により仲介されている。インスリンと Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) はグルコース応答性  $[\text{Ca}^{2+}]$  増加の第2相オシレーションを第1相よりも強力に抑制することを見出した。一方, グレリンは, 胃と視床下部に局在するペプチドであり, 成長ホルモン-IGF-1 系の新しい刺激ホルモンとして機能することが明らかにされている。我々は, グレリンにもインスリンや IGF-1 同様の抑制作用があることを見出した。グレリンは  $10^{-8}\text{M}$

にてグルコースおよびロイシン応答性  $[\text{Ca}^{2+}]$  増加を抑制したが,  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル抑制剤による  $[\text{Ca}^{2+}]$  増加には作用しなかった。グレリンはグルコース応答性インスリン分泌も抑制した。以上の結果より, 身体の成長を増強する高濃度のインスリン・IGF-1・グレリンはいずれもβ細胞抑制作用をもつこと, グレリンの作用点は  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルよりも上流のグルコースシグナル部位であると考えられる。

## 3. 上皮細胞における TRPV1 関連陽イオンチャネルの発現と機能

富永真琴, 飯田陶子 (三重大学医学部・生理学第一講座)

岡田泰伸

トウガラシ成分カプサイシンの受容体 TRPV1 は, 非選択性陽イオンチャネルである。上皮細胞には浸透圧変化を感知して開く陽イオンチャネルの存在が知られてい

るが, その分子実体は明らかでない。最近, TRPV1 に構造の類似する陽イオンチャネル (TRPV4) が浸透圧受容体候補として報告された。そこで, TRPV4 が上皮細胞に

おける浸透圧変化の感知に関わっているかどうかを調べるため、小腸上皮での TRPV4 の発現を検討した。ヒト小腸上皮由来培養細胞 (I407) において RT-PCR を行ったところ、TRPV4 の mRNA は検出されなかった。したがって、小腸上皮では TRPV4 以外の分子が浸透圧変化の感知に関与していることが示唆された。他の上皮組織における TRPV4 の発現については現在検討中である。一方、ヒト胎児腎臓由来の細胞株 HEK で TRPV4 mRNA

が検出され、腎臓に TRPV4 が発現しているという以前の報告と一致したが、電気生理学的には HEK でこのチャネルの機能は観察されていないため、さらなる検討が必要である。TRPV4 の mRNA はラットグリオーマ由来の細胞株 C6Bu1 にも発現していることがわかり、TRPV4 が脳機能において何らかの役割を果たす可能性が示された。今後、C6Bu1 における TRPV4 タンパクの機能的な発現を検討していく予定である。

#### 4. 乳酸アシドーシスによる脳グリア細胞の容積調節

鍋倉 隆, 小宗静男 (宮崎医科大学・耳鼻科)  
森島 繁, 森信一郎, 岡田泰伸

一般に細胞に低浸透圧刺激を与えると細胞は、いったん膨張し、まもなく regulatory volume decrease (RVD) により、元の容積に回復することが知られている。この RVD の際に最も重要なのは、volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR)  $\text{Cl}^-$  channel を介する  $\text{Cl}^-$  の細胞外への排出であることがわかっている。乳酸アシドーシスとグリア細胞容積との関係を C6 glioma 細胞を用いて調べた研究で、「乳酸アシドーシス (pH 6.8 以下) によってグリア細胞は膨張し、その後 RVD は生じず、膨張した状態が持続する。」と報告されている (Staub ら, 1990)。我々は、RVD が、ラクトアシドーシス下で、抑制されている

原因は、VSOR  $\text{Cl}^-$  channel の抑制であろうと仮説を立てた。この仮説を検証するためには、VSOR  $\text{Cl}^-$  channel 以外の  $\text{Cl}^-$  排出経路を細胞に新たに供給することが必要である。近年、アニオン特異的イオノフォアとして H. pylori より産生される VacA 蛋白が精製された。我々は、この蛋白を C6 グリオーマ細胞に適用して、アニオン イオノフォアを作成し、RVD 機能が、回復するかどうかを調べた。C6 グリオーマ細胞を用いて乳酸アシドーシス下の RVD が抑制されている事を示した。乳酸アシドーシス下での RVD の抑制は、容積感受性クロライドチャネルの抑制のために生じる事を認めた。

#### 5. 膜孔形成タンパク質による腸管上皮細胞の体積変化の解析

富田敏夫 (東北大学大学院農学研究科)  
Rabshan SABIROV

エノキタケ子実体に存在するフラムトキシンは、ヒト白血球など多くの動物細胞に膜孔を形成して細胞崩壊あるいは膨潤をおこす。この 31 kDa のタンパク質は腸管上皮細胞に対して膨潤作用を示し、細胞間のタイトジャンクションの物質透過性を亢進する。我々は、フラムトキシンが細胞膜上で自己集合して外径 10 nm, 内径 5 nm のリング状の膜孔複合体を形成することを明らかにした。昨年度のプロジェクトにより、フラムトキシンは脂質平面膜 (Planar lipid bilayer) に電位依存的に開閉する大小 2

種類の陽イオン選択的チャネルを形成する事実が明らかになった。大きいチャネルは実効内径 5 nm の親水性の膜孔であり、フラムトキシンが形成するリング状構造体であることが判明した。一方、小さいチャネルの分子の実体はフラムトキシンのダイマーであると考えられた。各種ヒト由来株化細胞に対する作用を調べた結果、フラムトキシンはヒトの腸管上皮細胞 (I-407) に対して効率的にチャネルを形成し、やがて細胞膜の盛り上がりによる bleb 形成および細胞膨潤をおこした。フラムトキシニン

よる腸管上皮細胞の体積変化の仕組みを解析するために、フラムトキシンがヒト腸管上皮細胞に形成するチャネルについて解析した。その結果、フラムトキシンが腸管上皮細胞に形成したチャネルは、脂質平面膜においてと同様に、大小 2 種類の電位依存的に開閉するチャネルであり、細胞の内向きに陽イオンを取り込む性質を示した。このチャネルの特筆すべき性質は、生成したチャネル活性のかなりの部分 (>50%) が細胞を洗浄することで消失することであった。フラムトキシン処理した細胞の洗浄

液を電子顕微鏡で観察すると外径 10 nm のリング状構造体が観察されることから、細胞膜上で自己集合したフラムトキシン複合体が細胞膜に突き刺さる過程が可逆的性質を示すためであると推定された。マウスにおいてはキノコによる接触阻害現象が観察されることから、フラムトキシンの腸管上皮細胞におけるチャネル形成に関してさらに解析するとともに、このタンパク質による腸管機能に対する影響について研究をおこなっている。

## 6. 新規の神経突起伸長遺伝子 *norbin* のノックアウトマウス作成による生理機能の解析

丸山 敬 (埼玉医科大学薬理学教室)

反復刺激後にシナプスの伝導効率の上昇が持続する LTP (長期増強) に関与する遺伝子の探求を、報告者が生理学研究所に在籍当時から開始した。LTP を誘発する K チャネル阻害剤 tetraethylammonium によって発現が上昇する遺伝子を検索した。その結果、神経組織に特異的な遺伝子 (KW8, *norbin*) を特定した。KW8 (現在は *NeuroD2* と命名されている) は、分化関連の転写因子に多く見られる basic helix-loop-helix 領域を持つ新規の遺伝子であった。*norbin* の核酸配列ならびに蛋白質の推定アミノ酸配列は、データベースのホモロジー検索では新規の遺伝子であった。*norbin* の cDNA を神経系培養細胞である *Neuro 2a* に遺伝子導入によって過剰発現したところ、神経突起の伸長が誘引された。以上のことから、神経回路の形成と維持に関与している遺伝子の可能性が考えられる。

本共同研究では、数年来 *norbin* ノックアウトマウスの作成を目指してきた。使用するノックアウト・ベクターを 5 種類作成し、千個以上の ES 細胞のクローンをスクリーニングしたが、相同組換え体を得ることができな

かった。その原因は不明であるが、ゲノムの領域によっては相同組換えがおきにくい場合があるとのことである。2001 年 10 月、ランダムインサーションによりノックアウトマウスを網羅的に作成するプロジェクトを行っているドイツの GSF-Institute of Mammalian Genetics より、*norbin* ノックアウトマウスが提供された。

このノックアウトマウスは肉眼及び光顕レベルでの観察では大きな異常は見いだされず、また、だいたい正常に繁殖している。現在、どのようなゲノム変異が生じているのかと、形態的および生化学的解析を行っている。

我々の最初の報告から 2 年後、軟骨と神経に発現している因子として *neurochondrin* (Ishiduka Y ら *Biochim Biophys Acta*. 1999 1450:92) として *norbin* が報告された。*nobin* の細胞外の分泌を再検証したところ、確実なシグナル配列は見いだされないが、ある程度は細胞外に分泌されることを確認した。したがって、栄養因子のような機能の可能性も浮かび上がってきた。

今後は、入手したノックアウトの行動学的解析を行う予定である。