

# 【 計画共同研究報告 】

# 計画共同研究報告

## 〔 目 次 〕

1. 海馬神経における虚血性 Ca <sup>2+</sup> 動員とイオンチャネル異常 (出崎克也ほか) .....	146
2. 容積感受性 Cl <sup>-</sup> チャネルの候補蛋白質の機能解析 (富永真琴ほか) .....	146
3. Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) .....	147
前駆体蛋白コンディショナルノックアウトマウスの作成 (中澤秀嘉ほか) .....	147
4. パニック障害モデルマウス作製の試み (松岡洋祐ほか) .....	147
5. CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスター改変マウスの作成と機能解析 (濱田 俊ほか) .....	147
6. 遺伝子改変マウスを用いたヒスタミン H1 受容体の中枢機能の解析 (福井裕行ほか) .....	148
7. ジーンターゲティングマウスを使った SIAH の神経系における役割の解明 (山下拓史ほか) .....	148

## 1. 海馬神経における虚血性 $\text{Ca}^{2+}$ 動員とイオンチャネル異常

出崎克也, 矢田俊彦 (自治医科大学医学部・生理学講座統合生理学部門)

脳細胞が虚血状態に陥ると、細胞への酸素およびグルコースの供給が途絶し、エネルギー障害により細胞外から水が流入し脳浮腫が生じる。一方、海馬における虚血性神経細胞死では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が細胞障害の引き金と考えられている。しかし、脳浮腫形成と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加との関連については不明な点が多い。そこで本研究では、マウス海馬スライス標本および単離海馬神経細胞を用いて、虚血刺激時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態および細胞容積変化を測定した。虚血刺激(無酸素/無グルコース)により海馬神経細胞の外液  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度

の上昇が観察された。一方、虚血刺激による細胞容積増加は外液  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的であり、細胞外  $\text{Cl}^-$  の除去や  $\text{Cl}^-$  チャネルブロッカー (DIDS) によって抑制された。以上の結果より、海馬神経において虚血時に細胞外からの水の流入が惹起され、これには  $\text{Cl}^-$  チャネルを介した神経細胞内への  $\text{Cl}^-$  流入が関与することが示唆された。また、虚血時に観察される細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、脳浮腫形成に必須ではないと考えられる。従って、虚血性  $\text{Ca}^{2+}$  動員と脳浮腫は独立した現象と考えられ、両者の制御が虚血性脳障害の治療に必要であると思われる。

## 2. 容積感受性 $\text{Cl}^-$ チャネルの候補蛋白質の機能解析

富永真琴, 赤塚結子 (三重大学医学部・生理学第一講座)

岡田泰伸

細胞外及び細胞内の浸透圧変化に対応して自らの容積を一定に保とうとする働きは、動物細胞が生命を維持する上で必要不可欠な機能であるが、最近ではこの容積調節の破綻が細胞死につながる事が明らかとなっており、細胞がいかに自らの容積をセンスし対応するかという点に注目が集まっている。細胞が一旦膨張した状態から元の体積に戻る調節性容積減少 (regulatory volume decrease: RVD) の過程は、細胞内の蛋白質による情報伝達を介して、最終的には細胞内からの  $\text{K}^+$  と  $\text{Cl}^-$  流出が駆動力となって細胞内の水が細胞外に流出することによって達成される。特にこの場合の  $\text{Cl}^-$  の通り道であるチャネルは細胞の容積上昇を感知して開口するために容積感受性  $\text{Cl}^-$  チャネル (VSOR) と名づけられているが、最近では正常浸透圧下でアポトーシス誘導剤や  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって VSOR が活性化されることによって、細胞の持続性収縮が起こることが明らかとなり、容積調節だけでなくアポトーシスにも深く関わっていることがわかってきている。VSOR の分子実体はいまだ不明であるが、VSOR 及び VSOR の制御因子はアポトーシスをコントロールするという観点

からも重要な蛋白質であり、これら蛋白質群の分子同定によって細胞の容積調節やアポトーシスのメカニズムについてさらに多くの情報が得られることが期待される。

現在までに報告者らは、VSOR の調節蛋白質として ATP-binding cassette (ABC) 蛋白質スーパーファミリーに属する ABCF2 を同定しているが、機能協関部門の岡田泰伸教授との共同研究によって、ABCF2 が VSOR の電流を抑制することと、ABCF2 の発現によって RVD の遅延が起こることを明らかにしている。さらに、ABCF2 がアクチン結合蛋白質であるアクチニン-4 と結合することも見出しており、アクチン-アクチニン-4-ABCF2 が相互作用し容積センサーとして働くことが明らかとなった (投稿準備中)。

本共同研究によって、細胞の容積調節機構が分子レベルで明らかになりつつあり、VSOR を含めて、細胞の容積調節を司る全蛋白質が同定されその相互作用を明らかにすることで、細胞の容積調節機構に関する総合的な理解が深まることが期待される。

### 3. Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) 前駆体蛋白コンディショナルノックアウトマウスの作成

中澤秀嘉, 松川則之, 小鹿幸生 (名古屋市立大学大学院 医学研究科)  
八木 健, 平林敬浩 (生理学研究所 高次神経機構)

本年度 HCNP 前駆体蛋白遺伝子コンディショナルベクターを ES 細胞に導入し, 組み替え ES 細胞を得た後に, 8 細胞胚への ES 細胞注入まで行った。しかしながら, キメラ率が低く目的とした個体を得ることはできなかった。今回の操作においては, 過程において組み替え ES

細胞が分化してしまったことによるキメラ率低下の可能性が考えられた。現在, 組み替え率向上を目的に, コンディショナルベクターを再構築し, 再度 ES 細胞への遺伝子組み換えを行っている。

### 4. パニック障害モデルマウス作製の試み

松岡洋祐 (大阪大学大学院生命機能研究科・分子移動学)  
八木 健, 平林敬浩, 三宝 誠 (生理学研究所高次神経機構部門)

パニック障害は日本人の 1~3%が罹患している神経症で, 誘因なく驚愕反応が出現し, 心拍数の増加, 動悸, めまい, 吐き気, 下痢, 発汗といった自律神経系の強い変化を伴う。本研究ではパニック障害の原因として, クロマチン高次構造を制御すると考えられるクロモドメインを有する核蛋白質をコードし, この障害の脆弱因子とされる染色体重複部位 (Cell, vol. 106, 367-369, 2001) に

存在する MRG15 遺伝子の倍加を考え, 疾患モデルマウスの作製を試みた。MRG15 遺伝子を含むマウス BAC フラグメントをマウス卵に導入することで, この遺伝子を重複して持つトランスジェニックマウスの作製を行ったが, 残念ながら, 現在までに解析した 82 匹の仔においてトランスジーンを有するものはいなかった。

### 5. CNR/プロトカドヘリン遺伝子クラスター改変マウスの作成と機能解析

濱田 俊 (大阪大学大学院 生命機能研究科)  
八木 健, 平林敬浩 (生理学研究所 高次神経機構研究部門)

CNR/プロトカドヘリンファミリーは神経系で発現するプロトカドヘリン様分子群であり, 特異な遺伝子クラスター構造をとる。マウスの場合, 遺伝子クラスター全体では約50種類のプロトカドヘリン分子がコードされており, その蛋白質は神経回路形成期に軸索やシナプスなどに局在するが, その機能はほとんどわかっていない。CNR/プロトカドヘリンファミリーは3つの異なるサブファミリーからなるが, 本研究ではこのうち CNR (Pcdh $\alpha$ ) の遺伝子改変マウスを作成し, その生体内機能を明らかにすることを目的としている。

本年度は, CNR の細胞内領域の大部分を占め, かつ全ての CNR が共通して利用する3つの定常領域エクソン全てを欠損させた CNR 遺伝子改変マウスの作成を行った。また, マウス CNR ファミリーは全部で 14 種類から構成される多様性分子であるが, 互いの相同性が高いため, *in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫染色法では個々の CNR の特異的な発現を可視化することは困難であり, 機能解析の障害になっている。このため, それぞれの CNR のプロモータの制御下で GAP43-Venus あるいは核移行配列を付加した Venus を発現させるノックインマウ

スの作成を行った。CNRv1 および CNRv10 に対して 2 種類の標的組み換えベクターを用い、1500 クローン以上の ES 細胞を単離し、PCR 法とサザンブロット法によりスクリーニングを行った。このうち CNRv1 プロモータ制御下

で核移行型 Venus を発現させる組み換えベクターを用いて、組み換え体 ES 細胞が 1 クローン得られた。この ES 細胞を 8 細胞胚へ注入し、キメラマウスの作成を試みたが、高キメラ率のマウスは得られなかった。

## 6. 遺伝子改変マウスを用いたヒスタミン H1 受容体の中枢機能の解析

福井裕行, 堀尾修平 (徳島大学薬学部薬物学教室)

八木 健, 平林敬浩 (生理学研究所 高次神経機構研究部門)

中枢においてヒスタミン H1 受容体は、睡眠・覚醒、学習・記憶、食欲の制御などの機能に関与することが指摘されている。本研究では、H1 受容体を過剰発現させた遺伝子改変マウスを作製し、行動を正常及び H1 受容体ノックアウトマウスと比較することにより、H1 受容体の中枢における機能をさらに詳しく解析することをめざしている。

我々は、H1 受容体の細胞内情報伝達機構を調べる過程で、脱感作が全くおこらない変異 H1 受容体を得た。この受容体は脱感作の一種であるダウンレギュレーションがおこらないがヒスタミン応答は正常であった。本研究では、H1 受容体にこの変異を導入したノックインマウスを作製する。この遺伝子改変マウスでは、H1 受容体脱感作異常のため受容体発現レベルが増大し、ヒスタミン応答が過剰になると考えられる。

まず H1 受容体遺伝子に目的の変異を導入したターゲットベクターを作製し、ES 細胞に導入、サザンブロ

ット法により相同組換え変異体を同定した。400 個余りのコロニーを検定したが、相同組換えをおこした ES 細胞は得られなかった。ちょうどこの時期に、マウスの全ゲノム配列が決定されたので、さっそく、H1 受容体遺伝子の前後の配列を調べてみた。その結果ターゲティングベクターとして用いた領域の末端 2.0 kb 程が、その下流に 5 箇所にあたって繰り返されていることが判り、これが相同組換えの起こりにくい一因と考えられた。そこでこの重複部分を切り取ったターゲティングベクターを新たに作製し ES 細胞に導入した。その結果、相同組換えをおこした ES 細胞クローンは 3 個得られた。引き続き、ES 細胞をマウス 2.5 日胚に注入し、仮親の子宮内に移植しキメラマウスを得た。キメラマウスは現在 6 匹得られており、そのうち 2 匹は 100%キメラであった。今後、交配により F1 マウス、ホモ変異マウスを作成する予定である。

## 7. ジーンターゲットマウスを使った SIAH の神経系における役割の解明

山下拓史, 中村 毅, 永野義人, 松本昌泰 (広島大学大学院脳神経内科)

高橋哲也 (翠清会梶川病院神経内科)

八木 健, 平林敬浩 (生理学研究所 高次神経機構研究部門)

パーキンソン病 (PD) の発症機序については遺伝性 PD の原因遺伝子を中心に解析がすすめられているが、いまだ解明に至っていない。PD 剖検脳では黒質ドパミン神経を中心とする神経細胞内凝集体形成が特徴的であり、その形成過程の解明は PD 病態解明に重要である。凝集体形成には ubiquitin-proteasome system の異常が考えられ遺

伝性 PD の原因遺伝子の一つである parkin は E3 ubiquitin ligase であり凝集体の主要蛋白質である  $\alpha$ -synuclein, synphilin を分解する。われわれは  $\alpha$ -synuclein, synphilin を分解する新規タンパク質として E3 ubiquitin ligase の一つである Siah を yeast-two hybrid system により同定した。(Nagano, 2003) Human では Siah-1, Siah-2 が存在し両者

ともに $\alpha$ -synuclein, synphilin を分解する。マウスでは siah 蛋白質には siah-1a, siah-1b, siah-2 の 3 種が存在し, これらは機能的に補足しあっている。凝集体の形成機序の一つとして ubiquitin-proteasome system の異常を考えた場合, これら siah 蛋白質をノックアウトし凝集体形成への影響を検討する事は重要と考えられる。昨年度までに cre-loxp system を用いたコンディショナルノックアウトマウスのターゲティング遺伝子の作成を継続している。

コンストラクト作製にあたりベクターに組み込む insert を BAC clone を用いて PCR 法にて構築中であるが, その過程において mutation を生じるなどの問題が生じ完成に至っていない。構築手法を変えるなどの検討が必要と思われる現在その方向で実験を進めている。マウス作製後には行動解析, 中枢神経細胞における凝集体形成の有無とその形成機序, ドパミン神経細胞の機能解析をすすめる。