

【 計画共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔 目 次 〕

1. アストログリアにおける細胞容積感受性チャネルの役割 (塩田清二ほか)	144
2. 容積感受性 Cl ⁻ チャネルの候補蛋白質の機能解析 (富永真琴ほか)	144
3. 脂肪細胞の細胞容積・肥大化をモニターする分子機構の解析 (河田照雄ほか)	145
4. 細胞の浸透圧感受機構の解明 (宮崎裕明ほか)	145
5. 統合失調症のカルシニューリン仮説に基づいた統合失調症発症のメカニズムの解明 (宮川 剛ほか)	146
6. 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
7. 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)	147
8. ジーンターゲット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
9. Pit-1 遺伝子を導入したトランスジェニックラットの作製 (鈴木 敦詞ほか)	148
10. 組織特異的にヒト成長ホルモン遺伝子を発現させた遺伝性侏儒症ラットの開発 (片上秀喜ほか)	149

1. アストログリアにおける細胞容積感受性チャネルの役割

塩田清二, 中町智哉, 鈴木隆介, 大滝博和 (昭和大学医学部・第一解剖学)

坪川宏, 岡田泰伸

虚血性神経細胞死は炎症性サイトカイン, グルタミン酸, アラキドン酸, 接着分子, フリーラジカルや一酸化窒素(NO)などの様々な因子が関与する。しかし, その詳細な機構については依然不明である。近年, 細胞容積調節の異常がアポトーシス様細胞死誘導に先立って出現し細胞容積調節の破綻を抑制すると細胞死誘導が抑制されることが報告された (Maeno et al 2000)。また, 我々は, 容積感受性クロライドチャネルを抑制することにより海馬の虚血性神経細胞死が抑制しうることも明らかにした。脳において, 容積感受性イオンチャネルおよび水チャネルは恒常性の維持に重要な働きをする。一方で水チャネルのひとつであるアクアポリン4はアストログリアに発現していることが報告されており脳虚血時において, その過剰応答や応答の減少により, 細胞死誘導に関与することが示唆されている。しかし細胞性浮腫の誘導に関してアストログリアはまだ不明な点が多い。今回, 我々は中大脳動脈閉塞による局所脳虚血モデルを用い,

脳虚血後に生じるアストログリアの変化を GFAP の組織染色によりを用い経時的に明らかにした。さらに, 脳虚血性神経細胞死抑制作用が示されている, 神経ペプチド PACAP のレセプター PAC1R の特異的抗体を用いてアストログリアにおける PAC1R の発現を検討した。

脳虚血前, 大脳皮質において GFAP 陽性細胞は主に表層である分子層および血管周囲に認められる。脳虚血後その発現は徐々に強くなる。さらに, 1 日後から脳梗塞周辺部に沿って GFAP 陽性細胞が強く認められはじめ, 2 から 4 日ではその発現量, アストログリアの形態的な変化も生じる。PAC1R は脳虚血前には主に神経細胞に認められるが脳梗塞部位は時間に従い弱くなる。一方, 2 日目以降には脳梗塞周辺部に存在する活性化したアストログリアにおよび神経細胞における発現が強くなる。

これらの結果はアストログリアが脳虚血時に PAC1R を介し神経細胞死抑制に働く可能性を示唆する。

2. 容積感受性 Cl^- チャネルの候補蛋白質の機能解析

富永真琴 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター)

赤塚結子 (三重大学医学部・生理学第一講座)

清水貴浩, 高橋信之, 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 K^+ と 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 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 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 H_2O_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、今回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。また、ABCF2 結合蛋白質の探索によって VSOR の候補蛋白質を見出し、その機能解析を進めている。

3. 脂肪細胞の細胞容積・肥大化をモニターする分子機構の解析

河田照雄, 井上和生, 江川かおり, 加藤壮太 (京都大学大学院農学研究科)

高橋信之, 岡田泰伸

脂肪細胞は「脂肪を貯める」ことが第一義的な生理機能である。そのために容積が約 1~2 万倍まで肥大化し、可逆的に維持しうる。このような特性は他の細胞に類を見ない。このことは生体のエネルギー供給の保証ともなり、また動物が獲得した進化特性でもある。しかしながら、飽食化した現代社会においては、生活習慣病を招来する主要因ともなっている。本研究では、脂肪細胞が、自身でその発達度合いをどのようにモニターして、その形態形成・容積維持・肥大化制御を行っているかを分子細胞生物学的に解明することを目的としている。

現在までに報告者らは、脂肪細胞が脂肪酸を初めとする様々な分子に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇という応答を示すこと、またこのカルシウムイオンによる応答性が脂肪細胞の容積変化・肥大化と密接に関連しうることを明らかにしてきた。このことから脂肪細胞は自身の細胞容積ならびに肥大化を、細胞内カルシウムイオン濃度変化をもたらす分子を介してモニターしている可能

性が高いと考えられた。そこでまず、脂肪滴を貯め込んだ脂肪細胞を用いたカルシウムイメージング系の立ち上げを試みた。カルシウムイオン指示薬として Fura2 を、細胞内カルシウムイオン濃度を変化させる刺激としてカルシウムイオノフォアであるイオノマイシンを用いて、分化した脂肪細胞の細胞内カルシウムイオン濃度変化を検出する実験系を確立した。現在、この系を用いて、脂肪酸などのシグナル分子の細胞内カルシウムイオン濃度変化に対する作用を詳細に検討している。

またパッチクランプ法による、脂肪細胞の電気生理学的解析のための実験系も確立した。脂肪細胞は、細胞質に脂肪滴を貯め込んでいるため、パッチクランプが困難であったが、今後は脂肪細胞に発現するチャネルの特性を正確に解析することが可能となった。浸透圧変化による一時的な細胞容積変化に伴い活性化されるイオンチャネルが脂肪細胞に存在しているかなど、現在、検討中である。

4. 細胞の浸透圧感受機構の解明

宮崎裕明, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院・生理機能制御学)

サビロブ ラブシャン, 清水貴浩, 岡田泰伸

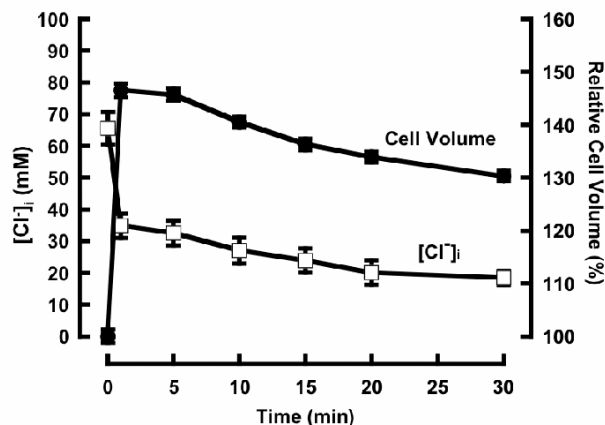
腎遠位尿細管上皮組織でのナトリウム再吸収は血圧調節や体液量維持にとって重要な機能であり、血漿浸透圧によって厳密に制御されている。しかし、細胞がどのように細胞外浸透圧変化を感受するのかという疑問に対する明確な回答は得られていない。一般的に、低浸透圧刺激により一過性の細胞容積膨張とそれに引き続く調節性

容積減少 (Regulatory Volume Decrease; RVD) という現象が観察されるが、RVD の生理的意義については明らかにされていない。我々は、低浸透圧刺激時により惹起される RVD が、tyrosine phosphatase の活性化を制御し、腎遠位尿細管 Na^+ 再吸収に関与する上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の遺伝子発現を増大させることを報告した。一

一般的に、RVD 惹起時には、細胞からの Cl^- の efflux が活性化されることが知られており、それに伴った細胞内 Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) 変化が想定される。すなわち、RVD によって引き起こされた $[\text{Cl}^-]_i$ 変化が、低浸透圧刺激に対する細胞内シグナルとして機能する可能性が強く示唆される。しかしながら、従来の蛍光 Cl^- indicator と蛍光顕微鏡を用いた $[\text{Cl}^-]_i$ 測定法では、RVD のように細胞容積変化と $[\text{Cl}^-]_i$ 変化が同時に起こる場合、細胞内の蛍光 Cl^- indicator 濃度変化により、継時的な $[\text{Cl}^-]_i$ 変化を計測することは非常に困難であった。

そこで本研究では、腎遠位尿細管上皮由来細胞である A6 細胞の容積変化と蛍光輝度を cell analyzer “Quanta” を用いて同時計測し、 Cl^- indicator の蛍光輝度を細胞容積で補正することで、RVD 時における $[\text{Cl}^-]_i$ の測定を試みた。定常時(等浸透圧環境下) で約 65 mM であった $[\text{Cl}^-]_i$ は、低浸透圧刺激 (50%低浸透圧) 後の急激な細胞容積増大 (定常時の約 1.5 倍) に伴い、約 35 mM に減少した。その後、

RVD が惹起され、徐々に細胞容積は減少し、30 分後には定常時の約 1.3 倍にまで減少した。また、 $[\text{Cl}^-]_i$ も RVD に伴い減少し、30 分後には約 20 mM まで低下した (図参照)。以上のことから、A6 細胞においては、低浸透圧刺激後の RVD による $[\text{Cl}^-]_i$ の変化が、細胞外浸透圧感受メカニズムの一つとして機能していることが示された。



5. 統合失調症のカルシニューリン仮説に基づいた統合失調症発症のメカニズムの解明

宮川 剛, 大貫宏一郎 (京都大学大学院 医学研究科)

八木 健, 平林敬浩 (生理学研究所 高次神経機構)

我々はこれまでカルシニューリン CN の前脳特異的ノックアウトマウスが統合失調症様の行動異常を示すことを見出し、さらに統合失調症患者のゲノム DNA を用いた相関解析により CN が統合失調症の感受性遺伝子であることを明らかにしてきた。本研究はこの知見に基づき、CN 情報伝達経路に関与する分子をターゲットとしたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、統合失調症発症のメカニズムを解明することを目的とする。

本年度はターゲティングベクター作成に必要な材料 (ネオマイシン耐性遺伝子, DTA 遺伝子などのプラスミド DNA, 目的の遺伝子を含む BAC クローンなど) を入手し、各断片を順次ベクターに挿入してコンストラクト

を完成した。塩基配列に変異のないものを選択し、ES 細胞への相同組換え実験の検討を進めたが、残念ながら loxP の位置によって相同組換えが起こりにくくなる可能性があるという指摘を受け、現在、ノックアウトベクターの短腕、長腕のそれぞれの長さの不足を補うよう loxP の位置を変更したコンディショナルベクターを再構築しているところである。今後、ベクターが完成しだい、ES 細胞への遺伝子組み換えを行う。今年度はこれと並行して、tTA-tetO system と Cre-loxP system の両方を組み合わせることにより遺伝子発現部位・時期を調節するのに必要な各遺伝子改変マウスの系統を入手した。

6. 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（大阪大学生命機能研究科）

八木 健，平林敬浩，金子涼輔（生理学研究所 高次神経機構）

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 50～60 種類のプロトカドヘリン分子がコードされており，その蛋白質は軸索やシナプスなどに局在し，神経回路形成に重要な役割を果たしていると予想されているが，まだ実験的な検証はほとんど進んでいない。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 (Pcdha) 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，昨年度に引き続き，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。既に高次神経機構部門で作成済

みの定常領域エクソン上流に lox-P 配列を挿入した遺伝子改変マウス (G1) と，本計画共同研究で作成した定常領域エクソン下流に lox-P 配列を挿入した遺伝子改変マウス (CNRdA, CNRdB) および CAG プロモータ制御下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (CAG-Cre: 大阪大学宮崎純一教授より供与) との交配を行うことにより，CAG-Cre トランスジーンを有し，CNR 遺伝子座において G1/CNRdA, G1/CNRdB の遺伝型をもつマウスを交配により作成し，生体内で CNR 遺伝子座における染色体間組換えを誘導した。この遺伝子改変マウスと野生型 C57BL/6 マウスとの交配を行い，F1 において定常領域エクソンが欠損しているマウスを PCR 法およびサザンブロット法により検索し，CNR 遺伝子定常領域エクソン欠損マウスを得た。今後，このマウスを用いて CNR の生体内における機能を解析する予定である。

7. 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（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

八木 健，平林敬浩（生理学研究所高次神経機構）

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。また最近では，ストレス刺激時にヒスタミン神経系が活性化されること，環境の急激な変化への対応にヒスタミン H1 受容体が関与していることなど，さらに新しい知見も加わりつつある。そこで本研究では，ヒスタミン H1 受容体の中枢における機能をさらに詳しく解析するため，H1 受容体に関する遺伝子改変マウスを作製しその行動を解析することをめざしている。

本研究では遺伝子改変マウスとして，2 つの異なる系統を作製することを考えている。1 つは前年度から継続しているもので，H1 受容体を過剰発現させた遺伝子改変マウスの作製である。このためには，H1 受容体の脱感作（ダウンレギュレーション）が全く生じない変異を H1 受容体遺伝子に生じさせた遺伝子改変マウスを作製する。

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。

もう 1 つは，イムノトキシンを用いて，H1 受容体発現ニューロンのみを部位特異的に除去することにより，H1 受容体発現ニューロンの機能を調べようとするものである。

第 1 の遺伝子改変マウスについては，前年度までにキメラマウスが得られたので，まず C57BL6 マウスと交配することにより F1 マウスを得た。サザンブロット及び PCR 法により，ヘテロ遺伝子改変マウスが得られていることを確認した。その後さらに C57BL6 マウスとバッククロスを重ね，現在 F4 マウスまで得られている。

第 2 の遺伝子改変マウスについては，H1 受容体遺伝子部分をイムノトキシン用のカセット（ヒト IL-2R 発現カ

セット, 福島県立医科大学小林和人博士より授受)に置換えたターゲティングベクターを作製し, 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結果, 相同組換えをおこした ES 細胞クローンが 2 個得られた。今後キメラマウスの作製をめざす予定である。

8. 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, 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)

平林真澄 (生理学研究所 脳機能分子解析室)

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の脱落と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 の異常が考えられており, それらの機能異常が凝集体形成に重要と考えられている。われわれは α -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) 凝集体の主要蛋白質には α -synuclein, synphilin-1, ubiquitin などが知られている。これまで α -synuclein タンパク質を過剰発現させる動物モデルやノックアウトマウスが複数の研究グループから報告されており, PD モデルとして解析されているが忠実に PD にみられる凝集体, 病理変化を再現したモデルは無い。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ため, 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。また, われわれは新たに凝集体の主要構成タンパク質の一つであり Siah の基質である synphilin-1 のトランスジェニックマウスの作製を試みている。Synphilin-1 の cDNA を MoPrP vector にサブクローニングし, マウス卵に導入することで, トランスジェニックマウスの作製を行っている。現在までに解析した 77 匹の仔においてトランスジェーンを有するものを 8 匹得ている。今後これらマウスの系統を確立し, 脳内タンパク質発現の確認, 凝集体形成をはじめとする病理学的変化, 行動解析を行っていく予定である。

9. Pit-1 遺伝子を導入したトランスジェニックラットの作製

鈴木 敦詞, 安田 啓子, 小野 保長 (藤田保健衛生大学・内分泌代謝内科)

平林 真澄, 加藤めぐみ, 金子涼輔 (自然科学研究機構・生理学研究所)

細胞外基質石灰化の中核をなす基質小胞でのリン酸取り込みを担う細胞膜Ⅲ型 Na 依存性リン酸輸送担体 Pit-1 過剰発現ラットを共同研究にて作製した。Pit-1 トランスジェニック (Tg) ラットは, 骨格の成長には影響を認めないものの, 長期間飼育することにより腎臓で糸球体障害を惹起し, 低アルブミン血症に引き続き, 骨軟化症へと

進行することが観察された。その作用メカニズムとしては, 出生後の組織におけるリンの取込み増加が細胞障害を惹起し, 自然発症ネフローゼ症候群のかたちとなること, またその結果として, ヒトでも認められるような低蛋白血症に由来する骨軟化症が引き起こされることが示唆された。同時にこの Pit-1/Tg ラットは出生後約 4 週で

白内障を自然発症することが認められ、出生後にリンの取込み増加により蛋白質の変性が惹起されることが示唆された。

今後はさらに骨格、血管、腎臓ならびに水晶体における組織学的検討を加え、疾患発生メカニズムの解明を目的として研究をすすめる予定である。

10. 組織特異的にヒト成長ホルモン遺伝子を発現させた遺伝性侏儒症ラットの開発

片上秀喜（宮崎大学医学部第3内科）

平林 真澄，加藤 めぐみ（生理学研究所脳機能分子解析室）

成長ホルモン(GH)の作用は肝臓で作られるソマトメジン C(IGF-I)を介するものとされている。血中 IGF-I 濃度非依存性の GH の各臓器への直接作用は明らかではない。遺伝性侏儒症ラット(*dr*)は本邦で発見された GH 単独完全欠損症のモデル動物で、天然に存在する GH ノックアウトラットである。本研究では脂肪細胞・軟骨細胞の発生・分化と機能にあたる GH の組織特異的影響を明らかにするため、自然界に存在する GH・IGF-I ノックアウトラットである *dr* に着目し、ヒト GH 遺伝子を脂肪細胞や軟骨細胞などに特異的に発現させ、その生物作用を検討した。平成 16 年度に 2 つの遺伝子、ヒト *leptin* 遺伝子とヒト $\alpha 1$ -collagen 遺伝子のそれぞれ上流域数 kbp をヒトゲノム情報に従い、特異的なオリゴ primer を設計し、PCR で増幅し、pGEM ベクターに組み込み、PCR クローニングを行った。うち、ヒト *Leptin* 遺伝子上流域-3.6kbp とヒト GH 遺伝子 2.1kbp のキメラ遺伝子(Lep-hGH ; 7.6kbp)を調製した。遺伝性侏儒症ラットの未受精卵への

顕微注入は技術的に困難で、かつ、遺伝子注入後の受精卵は対照 SD ラットのそれと比較し、脆弱である。従来は遺伝性侏儒症ラットの生殖細胞系列に組み込むためには、Wild type の対照 SD ラット受精卵への注入(Lep-hGH-SD), *dr* との交配(Lep-hGH-SD/*dr*)という間接的手法を採用していた。今回は *dr* の受精卵に、キメラ遺伝子を注入し、効率よく、Lep-hGH-*dr* を作出する方法、すなわち、凍結ラット精子とキメラ遺伝子混合物をラット未受精卵子に顕微注入する方法(Mol. Reprod. Dev. 69: 153-158, 2004)を採用した。207 個の *dr* 未受精卵子に Lep-hGH キメラ遺伝子と *dr* 凍結精子混合液を顕微注入し、生存した 195 個をレシピエント雌に移植したところ 38 匹の産仔が得られた。PCR 解析の結果、3 匹の Lep-hGH-*dr* 個体が得られた。今後、Lep-hGH-*dr* 個体の解析を進めるとともに、残る Coll-hGH-*dr* の作出を予定している。