

【 計畫共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔 目 次 〕

1. 容積センサーTweety Homolog/Maxi Anion Channel の生理的意義の検討 (鈴木 誠ほか)	152
2. 容積感受性 Cl ⁻ チャンネルの候補蛋白質の機能解析 (赤塚結子ほか)	152
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)	153
4. Na ⁺ センサー蛋白質と生理機能 (檜山武史ほか)	154
5. 低浸透圧感受機構の解明 (富永 真琴ほか)	154
6. イノシトール三リン酸特異的蛍光プローブを用いた小脳プルキンエ細胞における PLC 活性化の時間的制御の解明 (森 泰生ほか)	155
7. GFP 一分子キャリブレーション法を利用したシナプス機能分子の絶対数の測定 (岡部繁男ほか)	155
8. 運動学習の短期記憶から長期記憶への固定化の神経機構 (永雄総一ほか)	156
9. スパイク生成を担う持続性ナトリウム電流の組織学的検索 (姜 英男ほか)	157
10. 神経回路の発達・再編におけるバイオ Cl ⁻ センサーとしての GABA/グリシン応答の解析 (福田 敦夫ほか)	157
11. 神経活動同期性センサー作用を有する NMDA 受容体機能の局所的抑制が神経回路形成におよぼす作用 (岡田 誠剛ほか)	158
12. 脊髄内感覚神経終末部に発現する熱受容体センサーの役割とその機能的意義に関する研究 (吉村 恵ほか)	159
13. 神経終末部における PLC および電位センサーチャンネルの役割とその発達変化に関する研究 (石橋 仁ほか)	159
14. アディポネクチンの中枢・末梢作用に及ぼす AMP キナーゼ (AMPK) の 調節機構とその生理的意義に関する研究 (門脇 孝ほか)	160
15. 糖脂質代謝におけるバイオセンサー分子としての APM キナーゼの生理的意義 (益崎 裕章ほか)	161
16. 摂食調節系の分子メカニズムに関する生理学的研究 (中里 雅光ほか)	161
17. 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)	162
18. CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子トランスジェニックマウスの作製と機能解析 (八木 健ほか)	163
19. 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)	163
20. 魚類脳の電位依存性チャンネルと行動 (岡 良隆ほか)	164
21. 電位依存性ホスファターゼの生殖生理機能における役割 (吉田 学ほか)	164
22. 脊椎動物の祖先型のイオンチャンネルのアミノ酸配列推定と、そのタンパク質の機能解析 (斎藤成也ほか)	165
23. ゲノム情報に基づく神経発生関連膜タンパク分子機能の解析 (高橋 弘樹ほか)	166
24. 次世代 cameleon を用いたカルシウムイメージングによる、 ゼブラフィッシュの発生過程および神経回路の解析 (宮脇 敦史ほか)	167
25. 赤外レーザー・赤外放射光の細胞・神経作用と温度受容機構の解明 (小田 紀子ほか)	167
26. 体液 Ca ²⁺ イオン濃度を感受する Ca ²⁺ チャンネルの解析 (伊村 明浩ほか)	168
27. 内耳前庭における TRP ファミリーを介する感覚受容 (久保 伸夫ほか)	168
28. 感覚神経における侵害刺激センサーとしての TRPA1 の役割 (野口 光一ほか)	169
29. シリコンベース膜タンパクバイオセンサー制作のためのタンパク質発現・精製・集積技術開発 (宇理須 恒雄ほか)	169

1. 容積センサー Tweety Homolog/Maxi Anion Channel の生理的意義の検討

鈴木 誠 (自治医科大学薬理学分子薬理学講座)

Sabirov Ravshan

Tweety(TTY) はショウジョウバエの遺伝子で、5-6回膜貫通蛋白質である。鈴木らはこの蛋白質がClチャンネルをコードしている可能性を示した。即ち、TTY3はChinese Hamster Ovary cellで発現すると、Ca-dependent Cl channelを観察する事ができた。linear I-V, 350 pSで μM レベルのCaを活性化に必要とした。Poの電位依存性は脱分極側にあり、非ベル型を示しており、一般的に認められるベル型を示すClチャンネルとは性質を異にしている。TTY1はD, E, Qなどのアミノ酸の繰り返し構造を欠いており、活性化の刺激がわからなかった。しかし、細胞容積を低浸透圧で、大きくすると活性化した。

TTY1は100-200 pSのチャンネルを発現するが、CHO細胞には内因400 pS Clチャンネルがあり、測定の障害になった。そこで今回、内因性ClチャンネルがないHEK-T細胞を用いた。HEK細胞にはTTY3がRT-PCRで検出でき、抗体で蛋白も確認できるが、HEK-T細胞にはTTY1, 2, 3

共にmRNAは検出できなかった。またHEK細胞には内因性の外向き整流性のClチャンネルが見つかるが、HEK-T細胞では見つからなかった。

TTY1の発現をHEK-T細胞で試みたが、発現は認められなかった。そこで、CHO細胞では明らかに発現が確認されたTTY3を用いたが、チャンネル発現が認められなかったため、分子自身が膜に移行しているのかどうか検討しなおすことにした。

添付図左上にあるようにTTY3をGFP蛋白とfusionさせた。図は、GFPに対する抗体を用いて、ウェスタンを行ったものである。Fusion蛋白ではバンドが上方にシフトしている。これらのベクターを用い、CHO細胞とHEK-T細胞で、発現を検討した。図右にあるようにGFP単独では蛍光は細胞に一様に広がっている。TTY3-GFPはCHO細胞では膜に発現するのに対し、HEK-T細胞では細胞質内にとどまっているのが明らかであった。

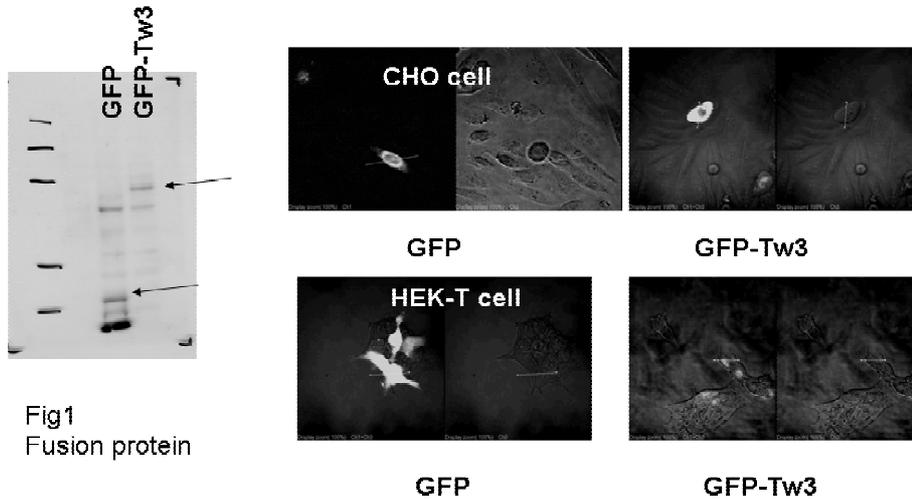


Fig1
Fusion protein

2. 容積感受性 Cl⁻チャンネルの候補蛋白質の機能解析

赤塚結子 (三重大学医学部生理学第一講座)

清水貴浩, 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ン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^- チャンネル (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誘導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見出した。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、その結合には両者のアミノ末端側領域が必要であることを明らかにしており、アクチニン-4 には ABCF2 による VSOR の抑制を解除する働きがあることがわかった(投稿準備中)。さらに、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, 楠堂達也, 永井宏幸, 向井佐輝子, 浅野亘 (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。

昨年度までの共同研究において、脂肪滴をため込んだ分化脂肪細胞を使った細胞内カルシウムイメージングの実験系を確立し、脂肪細胞の分化に伴い発現が上昇する TRP チャンネルをモニター分子の候補として同定した。同定された TRP チャンネルはこれまでの研究より、温度、成長因子だけでなく、ストレッチなども活性化シグナルとすることが報告されており、容積センサーとしての条件を備えていると考えられる。今年度は昨年度構築したカ

ルシウムイオンイメージング及びパッチクランプでの測定系を用いた TRP チャンネルの特性評価および容積センサー分子としての機能の解析を試みている、まだ具体的な成果は得られていないが引き続き行っていく予定である。また、脂肪細胞が外界の脂肪酸等の化学的因子をシグナルとして受容している可能性も考えられる。本チャンネルを直接的あるいは間接的に活性化する生理的なリガンドはほとんど同定されていないが、同じサブファミリーに属する TRP チャンネルは脂肪酸など様々な化学的因子により活性化されることから、本チャンネルも脂肪酸類縁体によって活性化される可能性が高い。そこで、細胞内カルシウムイオン濃度に変化を与えるシグナル分子の効率的な探索を行うために、蛍光プレートリーダーを用いた TRP チャンネルのリガンド一次スクリーニング系を確立し現在スクリーニング中である。さらにスクリーニングで得られたリガンド候補物質の確認のため、カルシウムイオンイメージングセット及びパッチクランプセットによる測定法も確立した。今後はこれらの方法を用い、TRP

チャンネルのリガンド探索を進め、それが TRP チャンネルを介して脂肪細胞の容積制御および分化に関してどのよう

な役割を果たしているかということも、先の容積センサーとしての解析に加えて行っていく予定である。

4. Na センサ蛋白質と生理機能

檜山 武史 (自然科学研究機構 基礎生物学研究所)
岡田 泰伸, 井本 敬二

Nax チャンネルは細胞外の Na^+ 濃度の生理的範囲での上昇に応答して開口する Na レベルセンサーである。脳室周囲器官の一つである脳弓下器官において体液 Na レベル増加の検出に関与する。本研究では、中枢における Nax の発現を詳細に検討した。また、Nax が細胞生理機能において果たす役割を検討する手がかりの一つとして、細胞内領域に結合する分子を探索した。さらに、Nax の開口により細胞内へ流入した Na が Na/K-ATPase の機能制御に関与する可能性、細胞内液の浸透圧変化に伴って細胞容積が変化する可能性について検討した。

1) Nax の中枢における発現解析

免疫電子顕微鏡法により、Nax が脳室周囲器官の脳弓下器官と終板脈管器官において、上皮細胞と星状細胞から伸びたニューロン周囲の薄膜状突起に発現することが判明した。脳弓下器官から単離したグリア細胞において Na イメージングを行なったところ、細胞外 Na レベルの上昇に応じた Na 流入が確認された。

2) Nax の細胞内領域と結合する分子の探索

Nax の細胞内領域と相互作用する蛋白質を探索した。成体マウスの後根神経節から cDNA ライブラリーを作成し、酵母ツー・ハイブリッド法により結合分子を探索し、

Na/K-ATPase を含む複数の結合候補分子を見出した。

3) Nax による細胞代謝制御の可能性に関する検討

Na/K-ATPase と Nax の相互作用の存在が示唆されたことから、グルコース・イメージング法を用いて脳弓下器官より単離したグリア細胞のグルコース代謝を測定した。Nax 陽性細胞において Na 依存的にグルコース取り込みが増加することが明らかとなった。また、マウスの脳から作成した脳弓下器官の急性スライスにおいて、野生型マウス特異的に Na 依存的なグルコース取り込みが観察された。

4) Nax を介したイオン流入が細胞容積に影響する可能性についての検討

Nax チャンネルの開口によるイオン流入によってもたらされる細胞内浸透圧の増加が、水分子の流入と細胞容積の増加をもたらす可能性を検討した。C6 グリオーマ細胞に Nax を発現させ、細胞膜を PKH26 により染色して共焦点顕微鏡により細胞の形態を観察した。細胞外液のナトリウム濃度変化に伴って細胞体の大きさが顕著に変化することはなかった。今後、局所的かつ微細な形態変化を捉えられる実験系を構築し、さらに検討する予定である。

5. 低浸透圧感受機構の解明

富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)
柴崎 貢志 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)
東 智広 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)
岡田 泰伸 (生理学研究所)
清水 貴浩 (生理学研究所)

細胞外の低浸透圧状態を感知してさまざまな細胞応答が引き起こされる。低浸透圧で活性化するクロライドチ

ャネルの電気生理学的な解析はなされているが、いまだその分子実体は明らかでない。一方、低浸透圧刺激によ

って活性化する非選択性陽イオンチャネルTRPV4がクローニングされ、バイオ分子センサーとして浸透圧感受性に分子から迫ることが可能になった。そこで、まず、TRPV4の低浸透圧感受性をTRPV4を強制発現させた培養細胞で確認した後、TRPV4が発現していることが知られている表皮ケラチノサイトとマウス脳でTRPV4の遺伝子発現を検討し、十分量のmRNAの発現を観察した。次に、単離ケラチノサイト、単離海馬神経細胞で低浸透圧応答をCa²⁺イメージング法、パッチクランプ法を用いて検討した。その結果、両方法において、低浸透圧刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度の増加、膜電流の活性化を観察

した。そこで、容積感受性クロライドチャネルがTRPV4と機能的のみならず物理的にカップルしていることを想定してYeast Two-Hybrid法を用いて、ケラチノサイトおよび脳のcDNAライブラリーからTRPV4のカルボキシル末端と結合する蛋白質を探索した。細胞骨格関連蛋白質は得られたもの、容積感受性クロライドチャネルの分子実体と思われる蛋白質を得ることはできなかった。TRPV4と結合する胞骨格関連蛋白質との結合蛋白質として容積感受性クロライドチャネルを得ることができるともかもしれない。

6. イノシトール三リン酸特異的蛍光プローブを用いた小脳プルキンエ細胞におけるPLC活性化の時間的制御の解明

森 泰生 (京都大学 大学院 工学研究科)

井本 敬二 (生理学研究所)

小脳プルキンエ細胞においては代謝型グルタミン酸受容体などホスホリパーゼC (PLC)と共役した受容体が、神経可塑性などの生理現象に重要な役割を果たしていることが知られている。しかしこれら受容体活性化の時空間的な動態とその制御機構については明らかになっていない。本研究ではPLCの活性化により産生されるイノシトール3リン酸に対する特異的蛍光プローブを用いて、PLC共役型受容体の活性化をリアルタイムで可視化すること目的とし技術的改良を行った。

これまでに我々は、PLCの活性化により産生されるイ

ノシトール3リン酸特異的蛍光プローブの作製に成功し、その有用性を報告した。本研究では急性単離した小脳プルキンエ細胞に蛍光プローブを取り込ませることを試みた。

PLCのPHに基づいたイノシトール三リン酸特異的蛍光プローブの、現在までの最大の問題点の一つが細胞内への導入法であった。今回、エレクトロポレーションにより導入効率が数倍上昇することが明らかとなった。また、このことにより様々の細胞に蛍光プローブの導入が可能となり、汎用性が格段に改善された。

7. GFP一分子キャリブレーション法を利用したシナプス機能分子の絶対数の測定

岡部繁男 (東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科)

培養神経細胞および脳スライスにおいてGFP融合シナプス蛋白を発現させ、これらの蛋白質のシナプス1個あたりの絶対数をGFPの蛍光量をもとに算出することが可能である。更に内在性の分子についてもGFP融合蛋白質との量比からその単一シナプスあたりの存在数を推定することが出来れば、機能的な分子数の測定が不可能な多様なシナプス分子についてのその局所に存在する分子数

を求めることが出来る。このような方法論の具体化を目的として以下の実験を行った。

シナプス後肥厚部とほぼ同じサイズの蛍光ビーズの蛍光量を測定し、全反射顕微鏡による観察から求められた単一GFP分子の蛍光量と比較を行った。その結果、単一GFP分子と直径200 nmの蛍光ビーズとの蛍光比は1:3700と求められた。このキャリブレーションされた蛍光ビー

ズを利用して、培養海馬神経細胞の単一シナプスに局在する GFP 融合足場蛋白質 4 種類 (PSD-95, GKAP, Shank, Homer) の分子数を算出した。更に GFP 融合足場蛋白質を過剰発現する細胞と、していない細胞での足場蛋白質の量比を蛍光抗体法で決定することにより、遺伝子導入操作を加えていない海馬神経細胞での内在性の分子数を決定した。内在性の分子については、PSD-95, GKAP, Shank, Homer の 4 種類の足場蛋白質全てについて、およそ 100-450 分子が 1 つのシナプスあたり存在することが明らかになった。4 種類の蛋白質の分子数に大きな隔たりが無いことから、足場蛋白質間の結合の stoichiometry は比較的単純であることが示唆された。更に培養神経細胞が分化する過程で、単一シナプスあたりの分子数は培養二週間目までは単調に増加するが、それ以降は平均値およびその分散に大きな変化は見られなかった。一旦成熟した神経細胞においては、単一シナプスでの足場蛋白質の分子数およびその分散を一定に保つ分子機構が存在すると考えられた。更にこれら 4 種類のシナプス足場蛋白質

の質量の総和は約 100 MDa となり、PSD 構造全体の質量のおよそ 10%を占めることになる。この結果は今回測定した 4 種類の足場蛋白質が形成する骨組が PSD 構造の維持に十分な役割を果たすことを示唆する。

上記のシナプス足場蛋白質の絶対数測定法の確立を基に、この手法を更にシナプスの微細構造および機能と結び付けるための実験手法の検討を行った。より内在性の蛋白質発現に近い状態での測定を可能にするため、GFP 融合シナプス後部蛋白質を発現するトランスジェニックマウス系統の作製を行い、これらのマウス系統由来の細胞で同様の分子数推定法を適用することが可能であることを確認した。更に海馬神経細胞の培養に用いる新規基質の検討を行った。新規の基質を利用することで、分子数の推定に必要な蛍光画像を取得後に、電子顕微鏡標本の作製を行い、同一のシナプスを同定することが可能になった。今後この方法を利用して、シナプスに局在する足場蛋白質の絶対数と、スパインおよび PSD の微細構造の関連を解析する予定である。

8. 運動学習の短期記憶から長期記憶への固定化の神経機構

永雄総一 (理化学研究所脳科学総合研究センター 運動学習制御研究チーム)

慢性マウス標本を用いて、運動学習の短期記憶から長期記憶への固定化の神経機構を実験的に検討した。マウスに、1 日 1 時間の視覚性眼球反応(HOKR) の訓練を 1 週間継続的に行うと、その動特性に短期適応と長期適応が生じる。先行研究により、短期と長期の記憶痕跡がそれぞれ小脳片葉と前庭核に形成されることと、前庭核の長期記憶痕跡の形成に、小脳片葉と小脳神経回路のシナプス可塑性の長期抑圧がともに必要であることが報告されている。本年度は、小脳皮質の遺伝子発現の変化が、短期記憶と長期記憶の痕跡の形成に関与している可能性を、遺伝子マイクロアレイ法を用いて検討した。1 日 1 時間の訓練を行った直後と、1 週間持続的に訓練を行った直後のマウスから小脳皮質を摘出し、片葉とその近傍の傍片葉を分離摘出した。摘出した組織より mRNA を抽出し、GeneChip 法 (Affymetrix) により 45,000 個以上の

遺伝子について、その発現パターンを比較検討した。その結果、長期適応が生じたマウスの片葉では、対照群のマウスの片葉と適応が生じたマウスの傍片葉に比べて、1,200 個程度の遺伝子に発現量の有意な変化が生じており、かつそのうちの 70%では発現量が減少していることを見出した。一方、短期適応が生じたマウスの片葉では、対照群のマウスの片葉と短期適応が生じたマウスの傍片葉に比べて、発現量の変化が見られた遺伝子数は 400 個程度で、そのうちの約 3 分の 2 には発現量の減少が見られた。片葉で、短期適応と長期適応にともに平行して発現の減少する遺伝子群がそれぞれ存在することは、運動学習によって小脳皮質の遺伝子発現にも長期抑圧が生じることを示唆する。これらの結果を 2005 年度の冬の日本分子生物学会に報告した。

9. スパイク生成を担う持続性ナトリウム電流の組織学的検索

姜 英男 (大阪大学大学院歯学研究科 高次脳口腔機能学講座 口腔生理学教室)

重本 隆一 (自然科学研究機構 生理学研究所 大脳皮質機能研究系 脳形態解析研究部門)

持続性 Na^+ 電流 (persistent Na^+ current) は、軸索における興奮性シナプス入力の統合や、三叉神経中脳路核ニューロンを含む様々なニューロンで既に報告がなされている様に、膜電位のオシレーションにおいて重要な役割を担っている。我々は本研究課題において、三叉神経中脳路核ニューロンの軸索小丘から幹軸索にわたる領域において、持続性 Na^+ 電流が活動電位の生成及び細胞体への侵入に対して果たす重要な役割を明らかにした。

軸索小丘からホールセル・パッチクランプを行なうと、膜電位のオシレーションが観察されたが、その閾値は、細胞体において記録されたオシレーションのものよりも 10 mV 低かった。4-アミノピリジンを投与すると、オシレーションは顕著に遅くなり、5~10 μM リルゾール及び 5~10 nM テトロドトキシンに感受性を持つランブ状あるいは持続性の脱分極が観察された。細胞体に 0.5 mM QX-314 を含んだ内液を充填したパッチ電極を、軸索小丘には QX-314 を含まない内液を充填したパッチ電極を用いてデュアル・ホールセル・パッチクランプを形成することにより、細胞体から軸索小丘にかけて QX-314

の濃度勾配が生じると想定され、この時、短い電流パルスを繰り返し与えると、電流パルスによって生じる遅い閾値下脱分極の持続時間のみならず、軸索小丘で記録される活動電位の振幅も、時間の経過とともに減少していった。一方、細胞体で記録される活動電位はほとんど変化しなかった。これらの所見から、持続性 Na^+ 電流は、軸索小丘部或いは、それを越えた幹軸索において生成されている可能性が示された。更に、軸索小丘部のパッチ電極を通じた電流パルス注入、及び、幹軸索の電気刺激を交互に繰り返して活動電位を発生させると、10~50 nM テトロドトキシン或いは 10 μM リルゾールの灌流投与によって、先ず幹軸索刺激による軸索活動電位の発生が抑制される。その際、電流パルスの注入によって活動電位を生成することはできるが、必要な電流強度は段階的に上昇していた。その後は、活動電位の逆伝播 (spike backpropagation) が観察されなかった。これらの所見から、持続性 Na^+ 電流は、軸索小丘から幹軸索にわたる領域に局在し、活動電位の生成及び侵入に直接的に関与していることが示唆された。

10. 神経回路の発達・再編におけるバイオ Cl^- センサーとしての GABA /グリシン応答の解析

福田 敦夫 (浜松医科大学)

鍋倉 淳一 (生理学研究所)

KCC2 は細胞内の Cl^- を細胞外に排出することにより $[\text{Cl}^-]_i$ を低く維持して、GABA の作用を過分極すなわち抑制性ならしめる蛋白であるが、細胞内での KCC2 の機能調節については今だ不明な点が多い。yeast two-hybrid 法、免疫沈降法を用いて、脳型のクレアチンキナーゼ (CKB) を KCC2 機能制御タンパク候補として同定した。機能的相互作用を見出すため、HEK293 細胞に KCC2 と Cl^- チャンネルであるグリシン受容体を共発現させた KCC2 活性の評価系を用いて、KCC2 の活性の指標である $[\text{Cl}^-]_i$ を推定できるグリシンの逆転電位 (E_{gly}) をグラミシジン

穿孔パッチクランプ法を用いて測定した。この系に dominant-negative CKB を導入すると KCC2 発現細胞においてのみ E_{gly} は脱分極側にシフトし、wild type 導入細胞より有意に $[\text{Cl}^-]_i$ が上昇した。また、ネイティブに KCC2 と CKB が発現しているマウス大脳皮質の初代培養細胞を用いて CKB の抑制実験を行った。CKB 阻害剤の DNFB を投与すると $[\text{Cl}^-]_i$ が有意に上昇した。これらのことから、CKB は KCC2 を活性化することが示唆された。

回路再編での Cl^- ホメオスタシスの役割をバイオ Cl^- センサーとしての GABA/グリシン応答を指標に解析する

目的で、まず回路形成過程での GABA/グリシン応答の役割を検討した。大脳皮質層構造構築に重要な役割をもつ辺縁帯の細胞間のクロストークにおける GABA/グリシン応答の役割を明らかにするため、辺縁帯における興奮の空間的伝播を膜電位イメージングで可視化した。活動電位は径シナプ斯的に放射状に伝播し、GABA_A受容体とグリシン受容体が関与していたがグルタミン酸受容体は関与していなかった。細胞内にCl⁻を取り込み [Cl⁻]_iを高

く維持してGABAの作用を脱分極すなわち興奮性ならしめる蛋白NKCC1の活性を阻害すると興奮伝播は抑制された。マイクロダイアライシス法を用いてアミノ酸を測定したところ、単発刺激で内因性のグリシン受容体アゴニストであるタウリンとGABAが放出されていた。すなわち、NKCC1によって高 [Cl⁻]_iを維持する辺縁帯の細胞では、タウリンとGABAが興奮性に働いて細胞間クロストークに寄与していた。

11. 神経活動同期性センサー作用を有する NMDA 受容体機能の局所的抑制が神経回路形成におよぼす作用

岡田 誠剛 (関西医科大学)

鍋倉 淳一 (生理学研究所)

神経活動は発達段階におけるシナプス形成・排除に影響を与え、周囲の神経細胞との活動性の差の重要性が近年の研究によって示されている。一方、神経活動の同期性は、中枢シナプス伝達の可塑的变化や、視床・大脳皮質間の情報伝達に対して重要な役割を果たすことが示されている。これまでの可塑性についての研究は、NMDA受容体が同期性センサーとして作用することを示しているが、同受容体の発現量は部位、時期によって大きく異なり、これ以外の分子も同期性センサーとして関与している可能性が推測される。内向き整流性 K⁺チャンネル (Kir)mRNA の発現は中枢神経系において広く認められるが、その作用は明らかではなく、Kirの内向き整流性およびシナプス後膜に存在する PSD95 への結合能から、同チャンネルがシナプス伝達に対して同期性センサーとしてはたっている事が推測される。そこで、本研究は内在性 Kir 発現が少ない (Prüss et al,2005) 海馬 CA1 領域の錐体細胞に、低毒性で長期間の発現が可能なレンチウイルスベクターを用いて、Kir を発現させ、神経活動への影

響を全細胞記録により検討した。Kir電流は、未感染細胞では 3.9±1.0 nS であったのに対し、ウイルスベクター感染細胞では 27.1±4.1 nS であった。静止膜電位は Kir 発現により、平均 8.8 mV 低下した。mEPSP による電位上昇は、Kir 発現により有意に低下した。さらに、電流注入による電位変化を検討すると、200 pA までは、Kir 発現は上昇を有意に抑制したにもかかわらず、300 pA 以上の電流注入では抑制は認められなかった。すなわち、Kir の内向き整流性が、興奮性入力に対して同期性センサーあるいはノイズ・フィルターとしての作用することが示唆された。また、予備的な実験では Kir 発現は、幼弱な海馬に特徴的に認められる Giant Depolarizing Potentials の頻度を減少させた。本研究により、Kirの同期性センサーとしての作用が示されたと共に、同発現ベクターによる神経活動の抑制作用は、神経活動およびその同期性が、神経系の発達や高次機能へ与える影響の今後の検討に有用である事が示唆された。

12. 脊髄内感覚神経終末部に発現する熱受容体センサーの役割と その機能的意義に関する研究

吉村 恵, 古江 秀昌 (九州大学)
鍋倉淳一 (生理学研究所)

唐辛子の主成分であるカプサイシン受容体 (TRPV1) が遺伝子クローニングされ、機能的発現実験からカプサイシンのみでなく、熱およびプロトンの変化を受容することが明らかになった。この受容体は神経末梢のみでなく脊髄内中枢端にも発現しており、何らかの役割を果たしていることが示唆されていた。そこで、脊髄スライスに後根を付した標本と *in vivo* の標本からパッチクランプ記録を行い、カプサイシンに対する作用、pH 変化に対する応答および *in vivo* 標本を用い皮膚に熱刺激を加えた時の応答の解析を行うことを目的にした。スライスパッチクランプ記録：成熟ラット脊髄の横断スライスに後根を付した標本を用い、後角第 II 層の膠様質細胞からパッチクランプ記録を行い、後根刺激によって誘起されるシナプス応答を対照に、カプサイシン、pH および熱変化に対する応答を記録解析した。

In vivo パッチクランプ記録：ラット腰部脊髄の椎弓切除を行い、脳脊髄固定装置にセットする。脊髄表面を Krebs 液で灌流し、薬液も同じラインから投与を行った。パッチ電極を膠様質に刺入し、皮膚刺激によって誘起されるシナプス応答を記録解析した。記録側の後肢に触お

よび機械的痛み刺激を加えると、EPSC の振幅および頻度の著明な増大が全ての細胞で観察された。しかしながら、熱刺激を加えても全ての細胞で何ら応答を得ることが出来なかった。ところが、カプサイシンを脊髄に直接投与するとほとんど全ての細胞で mEPSC の頻度の増加が観察され、膠様質細胞に入力する線維の中枢側には TRPV1 受容体が発現されていることが示唆された。一般的な考えでは中枢側に発現している受容体は同じ線維の末梢側にも発現している、すなわち熱刺激にも応答することが予測されたが、結果は一般的な予測とは矛盾するものであった。さらに熱刺激を加えることによって膠様質細胞に C-Fos の発現が増える報告があり、そのこととも矛盾している。このことは C-Fos の発現には必ずしもシナプス伝達が必要ではないことを示唆している。次に、熱刺激情報が如何なる部位に運ばれているかを検討するため、深層の細胞から記録を行った。約 20% の III-IV 層の細胞では熱刺激によって著明な EPSC の頻度の増大が観察された。この応答は全て経過の早い EPSC、すなわちグルタミン酸によるものであり、ペプチドの関与はないものと判断された。

13. 神経終末部における PLC および電位センサーチャネルの役割と その発達変化に関する研究

石橋 仁 (九州大学)
張 一成, 鍋倉淳一 (生理学研究所)

活動電位がシナプス前神経終末部に到達すると、電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開口し、細胞外から Ca^{2+} が流入して神経伝達物質が放出される。従って、細胞外 Ca^{2+} 濃度が低下すると神経伝達物質の放出は減少すると考えられている。一方、シナプス周囲の細胞外スペースは非常に狭いため、シナプス伝達に伴うシナプス前終末部およびシナプス後細胞の細胞内への Ca^{2+} 流入によって、細胞外 Ca^{2+} 濃度は急速に減少すると考えられている。しかし、

これまで、細胞外の Ca^{2+} 濃度が低下した場合に神経終末部が受ける影響は十分には解明されていなかった。

我々は、細胞外に Ca^{2+} が存在しなくても高 K^+ 溶液による脱分極刺激によって神経伝達物質の放出が増強されることを最近発見し、予備実験の結果からホスホリパーゼ C (PLC) の関与が示唆されていた。本年度は、この現象の詳細なメカニズムを解明することを目的に研究を遂行した。ラット脊髄後角からシナプス前神経終末部が付

着した状態で急性単離した神経細胞に、ホールセルパッチクランプ法を適用してグリシン作動性の自発性抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し、細胞外の K^+ 濃度をコントロールの 2.5mM から 30mM にすると IPSC の発生頻度が著明に増加した。この応答は、膜透過性 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM, Ca^{2+} ポンプ阻害剤 Thapsigargin および PLC 阻害剤 U-73122 によって抑制された。U-73122 の不活性化体である U-73343 は無効であった。従って、細胞外に Ca^{2+} が存在しなくても、神経終末部の脱分極自

体によって、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出が起こって神経伝達物質の放出が増強されることが明らかとなった。PLC は IP_3 の濃度上昇を介して Ca^{2+} 放出を誘発することが知られているが、膜透過性 IP_3 受容体拮抗薬と報告されている Xestospongin C および 2-APB は無効で、 Ca^{2+} 放出の機序は未解明のまま残った。今後、PLC 活性化や Ca^{2+} 放出の詳細なメカニズムを明らかにするとともに、生後発達による影響を検討することを予定している。

14. アディポネクチンの中枢・末梢作用に及ぼす AMP キナーゼ (AMPK) の調節機構とその生理的意義に関する研究

門脇 孝 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)
窪田 直人 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)
窪田 哲也 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)
岡本 昌之 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)
矢野 互 (東京大学大学院医学研究科糖尿病代謝内科)

箕越 靖彦

アディポネクチンは、レプチンとともに脂肪細胞から分泌されるアディポカインである。レプチンは中枢では生体内エネルギーセンサーである視床下部 AMPK 活性を低下させることにより摂食を抑制し、末梢では骨格筋における AMPK 活性を上昇させ脂肪酸酸化を促進させる。一方アディポネクチンも肝臓、骨格筋において AMPK 活性を上昇させ脂肪酸酸化を促進し、インスリン感受性ホルモンとして作用することが明らかとなっているが、中枢における役割はまだ不明である。

我々は、まずはじめに、視床下部におけるアディポネクチン受容体の発現について検討した。2つのアディポネクチン受容体、AdipoR1/AdipoR2 はいずれも視床下部においてその発現が認められ、その程度は肝臓における AdipoR1/AdipoR2 の発現量に匹敵する程であった。さらにその局在を *in situ hybridization* にて検討したところ、AdipoR1/AdipoR2 の発現はいずれもレプチン受容体が強発現している視床下部の特に弓状核に強く認められた。次に我々は、髄液中にアディポネクチンが存在するかどうかについて検討した。同じ個体の血清と髄液からそれ

ぞれサンプルを採取しその濃度を測定したところ、髄液中のアディポネクチン濃度は血中の約 1/2000 程度存在することが明らかとなった。さらに摂食とアディポネクチンの関連について検討したところ、血中のレプチン濃度とは逆に、血中のアディポネクチン濃度と視床下部における AdipoR1 の発現は絶食時に上昇し、逆に摂食後低下することが明らかとなった。一方 AdipoR2 の発現は絶食、摂食後で有意な変化は認められなかった。以上のことより、アディポネクチンは中枢、特に視床下部において摂食さらには個体のエネルギー調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

現在これらの結果を踏まえ、アディポネクチンの中枢作用をより詳細に検討するため、外来性にアディポネクチンを脳室内に投与し、摂食量やエネルギー代謝量、体重などにおける影響を検討中である。またアディポネクチンによって視床下部 AMPK 活性が変化するかどうか、もし変化が認められた場合にはレプチン、アディポネクチンの視床下部 AMPK 活性調節における相互作用についても検討していく方針である。

15. 糖脂質代謝におけるバイオセンサー分子としての AMP キナーゼの生理的意義

益崎 裕章 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 中所 英樹 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 田中 智洋 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 石井 崇子 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 泰江 慎太郎 (京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科)
 箕越 靖彦

肥満者の多くにおいては、レプチンのエネルギー代謝亢進作用が充分発揮されずレプチン抵抗性の存在が示唆される。本研究で我々は、レプチン感受性と骨格筋 AMP キナーゼ (AMPK) の関連を解明する目的で、高レプチン血症を呈するレプチン過剰発現トランスジェニックマウス (LepTg) を用い、レプチン感受性の異なる条件下での代謝パラメーターと骨格筋 AMPK 活性を検討した。レプチンによる体脂肪量の減少、インスリン感受性の亢進を認め、レプチン感受性を示す標準食下 LepTg のヒラメ筋では、対照群と比べて AMP/ATP 比の上昇 (1.6 倍)、リン酸化 AMPK の増加 (1.5 倍)、AMPK の標的分子：アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) のリン酸化の亢進 (2.7 倍) が認められ、AMPK の持続的活性化が証明された。LepTg は 4 週間の高脂肪食負荷により、対照群と同程度の肥満とインスリン抵抗性を来したことからレプチン抵抗性の発症が示唆され、この時 LepTg のヒラメ筋における AMPK 活性亢進は消失した。更に LepTg を標準食に戻すと、対照群と比較し、より急速な体重減少とインスリン感受性亢進状態の回復を示し、レプチン感受性

の回復と共に、ヒラメ筋 AMPK 活性の亢進が認められた (Tanaka T et al. *Diabetes*, 54: 2365, 2005)。以上より、レプチン作用と骨格筋 AMPK 活性の密接な関連が示され、レプチン感受性の指標としての骨格筋 AMPK 活性の意義が明らかとなった。

次に我々は、長鎖脂肪酸の中枢投与が視床下部の Stat3 のリン酸化を惹起し摂食を抑制することを明らかにした。脂肪酸による Stat3 のリン酸化はレプチン受容体欠損 db/db マウスや内因性のメラノコルチン受容体拮抗物質：agouti 蛋白を視床下部に異所性に発現する KKA^y マウスにおいても認められることから、レプチン受容体シグナル系とは独立した経路を介していると考えられる (投稿準備中)。最近、短鎖脂肪酸である α リポ酸がレプチンと同様に視床下部 AMPK 活性の抑制を介して摂食を抑制することが報告され、脂肪酸によるエネルギー代謝制御における AMPK の意義が注目される。我々は現在、長鎖脂肪酸-G 蛋白共役型受容体システムによる食欲調節機構の解析を進めており、この経路における AMPK の生理的意義の解明が期待される。

16. 摂食調節系の分子メカニズムに関する生理学的研究

中里 雅光 (宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野)

グレリンは、胃で産生される消化管ペプチドで、末梢投与により摂食亢進に作用する。末梢産生物質が摂食調節に作用するためには、何らかの伝達経路を介し、その情報が中枢に到達する必要がある。我々は、グレリンの摂食亢進作用が、迷走神経遮断および中脳切断ラットにおいてキャンセルされること、末梢投与したグレリンは、迷走神経求心線維に存在するグレリン受容体に結合し、その電気活動を変化させることにより空腹情報を視床下

部へと伝達することを証明している。さらに、消化管ペプチド；peptide YY (PYY) の摂食抑制機構およびグレリンと cholecystokinin (CCK) の相互作用についての研究から、エネルギーバランス制御における迷走神経求心路の重要性を呈示してきた。グレリン、PYY、CCK の摂食調節に関するシグナルは、迷走神経経由で延髄孤束核に到達し、ニューロンを変換して視床下部へ伝達されることが考えられる。延髄孤束核は、迷走神経をメディエーターとす

る末梢の物理・化学的刺激あるいはホルモンなどの液性因子情報の入力部位であり、視床下部に投射する多数のノルアドレナリン(NA)産生ニューロンを含んでいる。我々は、グレリン末梢投与による孤束核でのNA生合成および視床下部弓状核でのNA分泌を評価し、神経解剖学的知見と併せて、グレリンによる摂食行動とNA神経系との機能連関を検討した。

グレリン投与により視床下部弓状核でのノルアドレナリン放出が増加し、延髄孤束核でのDBH遺伝子発現も有意に増加することを見いだした。弓状核でのNAレベルの上昇は、中脳切断ラットでは認められなかった。 $\alpha 1$ および $\beta 2$ アドレナリン受容体拮抗薬の前投与により、グレリン投与による摂食亢進作用は減弱した。視床下部

弓状核に抗DBH抗体をconjugateしたsaporin神経毒(DSAP)をマイクロインジェクションし、弓状核でのNAを選択的に枯渇させたラット(DSAPラット)では、孤束核NAニューロンの約60%が脱落しており、グレリンによる摂食亢進作用はキャンセルされた。グレリンはNPYニューロンを活性化し、その約50%がDBHの投射を受けていた。

以上の実験結果から、延髄孤束核に入力した末梢グレリンシグナルは、NA神経系に変換され、弓状核NPYニューロンを活性化することにより摂食亢進に機能することが明らかになった。胃内分泌細胞から分泌されるグレリンの視床下部への一次、二次神経を介する情報伝達経路の全貌が初めて明らかになった。

17. 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, 関口 佐保子, 小野 保長 (藤田保健衛生大学・内分泌代謝内科)

長尾 静子 (藤田保健衛生大学・疾患モデル教育研究センター)

平林 真澄, 加藤 めぐみ (生理学研究所・遺伝子改変動物作製室)

老化に伴う変化では骨組織より軟部組織へのカルシウムの移行がその一因と想定されている。石灰化の担い手はカルシウムとリンであるが、最近細胞膜Ⅲ型Na依存性リン酸輸送担体Pit-1の骨ならびに血管石灰化での重要性が注目されている。本研究で作成したPit-1過剰発現ラット(Pit/Tg)は、骨格の成長には影響を認めないものの、二重X線吸収法(DEXA)法による骨塩定量にては、雌雄ともに野生型(WT)に比し骨密度の低下を認めた。また、生後8週目頃より巣状の糸球体障害が明らかとなり、低アルブミン血症、蛋白尿、高脂血症というネフローゼ症候群パターンをしめし、低栄養状態となって生後8ヶ月で死亡した。末期には低アルブミン血症に基づくと思われる骨軟化症へと進行するが、骨量の低下は低アルブミン血症発症前から認められることより、Pit-1の過剰発現による細胞へのリン負荷は、骨石灰化に負に働くことが示唆された。また、今回のラットでは、過剰発現させる

細胞を条件付けせずにユビキタスに過剰発現を行ったため、リンの再吸収に関わる腎近位尿細管中でも発現が上昇することが考えられたが、免疫組織学的検討でも、尿細管細胞でのPit-1蛋白の発現上昇が確認された。そのため尿細管でのPit-1過剰発現により、血中のカルシウム・リン代謝に影響が有るかどうかについても検討した。末期まで血清カルシウム・クレアチニンの上昇は認めないままであったが、血清リン濃度は常にPit/TgでWTに比べ高値を示し、体液中のリン濃度の恒常的な上昇により細胞へのリン負荷が持続することが示唆された。

細胞外からの細胞へのリン供給はATP産生のために必須であるが、同時に細胞外リン濃度の上昇による過剰なリン負荷はアポトーシスを引き起こすことが知られている。今後は、Pit-1過剰発現による細胞障害のメカニズムを解明するために、骨芽細胞ならびに腎糸球体上皮細胞の初代培養細胞を用いた検討を行う予定である。

18. CNR/プロトカドヘリン α 遺伝子トランスジェニックマウスの作製と機能解析

八木 健, 平林 敬浩, 金子 涼輔 (大阪大学大学院・生命機能研究科)

平林 真澄 (生理学研究所・遺伝子改変動物作製室)

CNR (Cadherin-related neuronal receptor) は、非受容体型チロシンリン酸化酵素 Fyn との結合活性によって単離された新規カドヘリン様細胞接着分子である。このCNRには14種のファミリー分子が存在し、いずれも中枢神経系で発現している。CNR 遺伝子は染色体上にタンデムに並んだ14個の可変領域エクソンと3つのエクソンからなる共通領域からなるクラスター構造を有し、各CNR ファミリーはそれぞれひとつの可変領域エクソンと3つのエクソンからなる共通領域エクソンから転写されていることが明らかになった。この転写様式はT細胞受容体やイムノグロブリン遺伝子群と類似していることから、CNRはシナプスでの選択的細胞接着と多様化機構の両特徴を兼ね備えた分子であり、中枢神経系における多様化と組織化をもたらす分子である可能性が考えられる。また、単一神経細胞におけるCNR各分子種の発現様式をRT-PCRを用いて染色体レベルで解析結果、一つの神経細胞ではCNRは複数の分子種を発現しており、その組み合わせは個々の神経細胞ごとに異なっていた。また、各分子種について染色体由来を調べると、片方の染色体のみに由来するものが多数であった。これらは中枢神経系における

新たな染色体遺伝子発現機構であり、神経細胞の多様性に寄与していると考えられる。そこで本研究ではCNRの特異な転写制御機構を明らかにするために種々のCNR 遺伝子トランスジェニック (Tg)マウスの作製を行った。なお、CNR 遺伝子は全長が200kb以上におよぶため、本研究でのTgマウスを作製は同遺伝子領域を含むBACを改変したものを導入遺伝子として用いた。

まず、CNR各分子種のエクソンに蛍光タンパク質の遺伝子を挿入し、CNRとの融合タンパク質として発現するように改変したBACを作製し、これを用いてTgマウスを作製した。また、ヒトおよびマウスのゲノム配列を比較したところ、CNR 遺伝子の上流に約5kbpにわたる領域が高度に保存されていることが明らかになった。この領域はCNR 遺伝子の発現制御に関わっていることが予想されるために、この領域を欠損したBACを作製し同様にTgマウスを作製した。

いずれのTgマウスも複数の系統が得られており、現在これらを用いて蛍光を指標にしたCNRの発現様式の解析を進めている。

19. 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 (生理学研究所遺伝子改変動物作製室)

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-1)を介するものとされている。血中IGF-1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-1ノックアウトラットであるdrに着目し、ヒトGH遺伝子を脂肪細胞に特異的に発現させ、その生物作用を検討した。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、drラット精子と混合して未受精卵子に顕微注入することにより3匹のLep-hGH-dr個体を作製した。

平成17年度は、成熟個体に達した♂ラットよりとdr♀とを交配し、F1、F2世代を作製し、遺伝子発現と分泌態を検討した(N=6)。RT-PCR解析の結果、Lep-hGH遺伝子は脂肪細胞とそれ以外に、♂では精巣、♀では卵巣に強く発現した。生後6ヶ月では♂♀とも、体重は対照drと比較して3-5倍を示し、体脂肪は同週齢のSD♂14-18%

に対して、dr δ 40-50%、Lep-hGH-dr 68-75%と著しい肥満を示した。20分毎8時間の血中hGH濃度は、対照マウスでは2.5~3.5時間毎の規則正しい脈動的分泌(0.3-100ng/ml)を示したが、Lep-hGH-drでは脈動的分泌は消失し、著しい持続的低値(0.03ng/ml)を示した。

以上の成績より、Lep-hGH-drは予想に反して肥満症の表現型を示した。肥満の機序として、半定量的RT-PCR

解析の結果、脂肪細胞におけるhGH発現量が精巣や卵巣組織の1/5と低値を示し、且つ、ごく低濃度の血中GHが摂食中枢を刺激し、肥満症を生じた可能性が考えられる。今後は、脂肪細胞のみに強発現するpromoter遺伝子を選択し、再度Tg作出を試み、GHのIGF-1非依存性の脂肪分解や脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討する必要があるものと結論した。

20. 魚類脳の電位依存性チャンネルと行動

岡 良隆 (東京大学大学院理学系研究科)

阿部 秀樹 (東京大学大学院理学系研究科)

赤染 康久 (東京大学大学院理学系研究科)

羽田 幸祐 (東京大学大学院理学系研究科博士課程)

岡村 康司

本計画の提案者らは、ペプチドGnRHを産生するニューロン群の示す神経修飾のメカニズムについて多角的に解析し、多くの業績を上げてきた。特に、GnRHニューロンの示すペースメーカー活動は神経修飾作用の基礎となつていると考えられ、これには新規Na⁺チャンネルの寄与がわかっている。一方、魚類の視床に存在する神経核のニューロンでは特殊な新規Na⁺チャンネルが神経核構成ニューロンの応答特性を決定していることがわかっている。しかしながら、それらのチャンネルの構造や機能の実態は明らかでない。そこで、統合バイオサイエンスセンターと東大が連携し、この新規イオンチャンネルの分子実態や生理機能について解析すると同時に行動の動機付けへの関与についても調べることを計画した。従来の研究で用いてきた熱帯魚ドワーフグラーミーの脳においてNa⁺チャンネル遺伝子のクローニングを行った結果、TTX耐性のNa⁺チャンネル遺伝子断片と思われるものが見出された。今後はこれがGnRHニューロンの示すペースメーカー活動に関与しているかどうかをHeterologous expression実験などで確認すると同時に配列情報を詳細に調べていく予定である。

21. 電位依存性ホスファターゼの生殖生理機能における役割

吉田 学 (東京大学理学系研究科大学院)

柴小菊 (東京大学理学系研究科大学院)

稲葉一男 (筑波大学下田臨海実験センター)

保住暁子 (筑波大学大学院生命環境科学研究科博士課程)

西野敦雄 (日本学術振興会特別研究員)

佐藤裕公 (筑波大学大学院生命環境科学研究科博士課程)

紺野 在 (筑波大学大学院生命環境科学研究科修士課程)

海津麻衣子 (筑波大学大学院生命環境科学研究科修士課程)

岡村康司

東大の吉田らは、これまで尾索動物カタユレイボヤ において卵放出性の精子誘引物質SAAFを同定するなど、

精子運動機能の発現やその制御に関する研究を推進してきた。一方、村田らが同定した Ci-VSP はカタユウレイボヤの精子に発現していることから、精子の運動や受精反応にこの分子が関わる可能性が考えられた。本研究の最終目標は、生殖機能、精子生理機能に関して優れた実験系であるカタユウレイボヤを用いて、Ci-VSP の生理機能を解明することである。この解析のためには、カタユウレイボヤ精子の鞭毛運動パターンを数理的に解析できる実験系を立ち上げることが必須である。そこで、ストロボ画像取得システムを用いて精子の運動の軌跡を解析することを行った。

まずは鞭毛運動解析装置の構築を行った。ストロボ装置として高速度 LED を用い、高速度ビデオカメラと同期を行うことで、200 フレーム/秒のレートで高解像度の画像を得ることに成功し、さらに自作の画像解析プログラムを開発することにより、運動中の精子の鞭毛運動を数理的に解析する手法を確立した。この手法を用い、SAAF が正常精子の鞭毛運動に与える影響の解析を行った。カ

タユウレイボヤ精子は通常は円運動をしているが、卵や SAAF の様な誘引源があると、誘引源に近づいている時には直進に近い軌跡を描き、遠ざかっている時には誘引源へ向かうように「turn」と呼ばれる急激な方向転換を起こすという運動変化を見せる。この際の鞭毛運動パターンの解析を行ったところ、turn の際に一過的にきわめて非対称的な鞭毛打を起し、その後対称的なパターンを示すことが明らかとなった。一方、運動中の精子に均一濃度となるように SAAF を添加すると、円運動を続けるものの、その運動軌跡の半径が増大していることが明らかとなった。この際、鞭毛運動パターンはより対称的になっていた。この結果は、精子走化性時に特徴的に見られる turn は SAAF の絶対濃度でコントロールされるのではなく、濃度変化によって引き起こされることを示唆する。

今後、Ci-VSP の変異体を発現させた精子を用いて、この解析法を用い、精子運動における Ci-VSP の解明を行いたい。

22. 脊椎動物の祖先型のイオンチャネルのアミノ酸配列推定と、そのタンパク質の機能解析

齋藤成也 (国立遺伝学研究所)

増山和花 (総合研究大学院大学生命科学研究科博士課程)

隅山健太 (国立遺伝学研究所)

西野敦雄 (日本学術振興会特別研究員)

岡村康司

電位センサータンパクが生物進化の過程でどのように変遷してきたかを明らかにするため、遺伝研側で、各生物からの ortholog 遺伝子のアミノ酸配列をもとに、分子系統樹を作成した。解析の対象となった生物種は、ヒト、チンパンジー、カニクイザル、イヌ、ウシ、チキン、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル (*Xenopus tropicalis*)、ミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*)、ホヤ、ウニ、オポッサム (*Monodelphis domestica*) と、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、トラフグ (*Fugu rubripes*) であった。その結果、哺乳類の中では顕著に進化速度が速くなっていた。アミノ酸配列の比較により、電位センサードメインの S4 の陽性チャージの配列パターンが哺乳類とそれ以外で異なっていた。一方、岡崎側で、ヒト、マウス、ラット、

トリ、ゼノパス、ゼブラフィッシュの各 ortholog 分子を、ツメガエル卵母細胞に強制発現させ、電位センサー機能の電気生理学的計測を行った。その結果、ゼブラフィッシュ、ゼノパス、トリでは明確なゲート電流を示したが、哺乳類の VSP ではゲート電流を出さなかった。この結果は分子系統樹での結果と良くあっており、哺乳類進化の過程で、膜電位感知機能に変更され、生理的な役割も変化したことを示しているのかも知れない。今後は、1. 哺乳類とトリの間に位置する生物種の分子機能解析も行う、2. 酵素活性についても種差を明らかにする、3. 哺乳類の VSP においてアミノ酸配列を非哺乳類型に変更し、電位センサー機能が回復するかを調べる、4. ウニやそれ以外の無脊椎動物の VSP を同定し、その分子機能を解析する、5.

各動物種での組織発現パターンを比較する, などの解析を行い, 生物進化での変遷の意味を明らかにする予定である。

23. ゲノム情報に基づく神経発生関連膜タンパク分子機能の解析

高橋 弘樹 (基礎生物学研究所 形態形成研究部門)

山田 成宏 (基礎生物学研究所 形態形成研究部門)

堀田 耕司 (慶応義塾大学 理工学部生命情報学科)

小笠原 道生 (千葉大学 理学部生物学科)

岡戸 晴生 (東京都神経科学総合研究所 分子神経生理)

西野 敦雄 (日本学術振興会特別研究員)

岡村 康司

神経発生過程における細胞間相互作用には生物種間で高度に保存された膜タンパク群の分子機能が重要である。しかし, これら膜タンパク質群の分子機能は遺伝子の点と点の繋がりとしては解明されているがダイナミックな時系列としての理解には程遠い。本研究では, 近年ゲノム情報が整備されるとともに単一細胞レベルでの個体発生が記述された原索動物ホヤ胚やEST情報が整備されたアフリカツメガエル胚を用い, 神経発生関連膜タンパク質とくに Notch シグナルや膜電位センサー分子のダイナミックな分子機能を個体まるごとのシステムで時系列的に解析を進めることを目的とした。

1) 神経形成における脊索の役割

脊索動物の発生過程において, 脊索は体軸伸長において働くのみならず, 神経誘導や神経管形成過程においても重要な役割を果たしていると考えられているが, その分子メカニズムについては明らかにされていない点が多い。これまでに, 我々はホヤの Ci-Scale (Ci-Scabrous-like) の mRNA は脊索細胞のみに特異的に発現することを脊索動物で初めて明らかにしている。興味深いことに Ci-Scale タンパク質の局在を Ci-Scale 抗体を用いて調べたところ, 脊索細胞および脊索細胞外の表皮感覚細胞お

よび中枢神経細胞に沿った繊維状の構造に局在することが明らかになった。

2) Notch シグナルによる Scale の局在変化

ショウジョウバエの Scabrous は遺伝学的な解析から Notch と相互作用することが示唆されている。そこで, Ci-Notch と Ci-Scale の関係を解析するために Ci-Notch 活性化型の過剰発現あるいはガンマーセクレターゼ阻害剤による Notch シグナルを阻害したときの Ci-Scale の影響を調べた。その結果 Ci-Notch 活性化型を過剰発現させた場合は通常よりも多くの Ci-Scale が脊索外に局在するが, これとは逆に, Notch シグナルを阻害した場合は脊索外にほとんど局在しなかった。このことから, Notch シグナルによって Ci-Scale タンパク質の局在そのものが変化することが明らかになった。

3) Scale の神経形成における機能解析

Notch シグナルを阻害すると同時に Ci-Scale の変異体を発現させると幼生期では, 頭部において神経細胞の分化異常, 尾部において神経軸索の走行異常が観察された。このことから, Ci-Notch と Ci-Scale は, 神経細胞分化・形成において協調的に働いていることが示唆されており, さらに機能解析を進めている。

24. 次世代 *cameleon* を用いたカルシウムイメージングによる、ゼブラフィッシュの発生過程および神経回路の解析

宮脇 敦史 (独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター)

東島 真一

cameleon は遺伝学的にコードされたレシオメトリックカルシウム指示薬である。最近、われわれは、従来型よりもはるかに高感度にチューンされた次世代*cameleon*の開発に成功した。本研究では、イメージングに適した生物ゼブラフィッシュに次世代 *cameleon* をトランスジェニックゼブラフィッシュの手法により発現させて、様々な発生過程(たとえば体節形成)におけるカルシウムシグナルの関与、および、(ii) 遊泳行動、逃避行動などの行動中にどのような神経細胞が活動するか、をカルシウムイメージングによって調べることを長期的な目標とした。まず、次世代 *cameleon* の一種、YC3.60 を、すべての細胞で発現を促す *hs70b* プロモーターの下につないだコンストラクトを作製し、それに関してトランスジェニックフィッシュを作製した。得られたトランスジェニックフ

ィッシュでは、期待通りすべての細胞で YC3.60 が発現しており、また、母性効果のためトランスジェニックフィッシュの母から生まれた胚では、1細胞期から YC3.60 の発現が認められた。神経細胞で、その発火に伴うカルシウムシグナルが得られるかどうかを、感覚神経細胞である Rohan-Beard 細胞を用いて検討した。ブンガロ毒素によって不動化した幼魚の皮膚に電気刺激を与えてシグナルの変化を見たが、期待に反して、明確なシグナルは認められなかった。これは、YC3.60 は従来型の *cameleon* よりも高感度ではあるが、カルシウムとの親和性の低いタイプのものであることが原因として考えられる。今後、カルシウムと高親和性タイプの YC2.60 を用いて改めて検討を行う予定である。

25. 赤外レーザー・赤外放射光の細胞・神経作用と温度受容機構の解明

小田 紀子 (立命館大学 放射光生命科学研究センター)

山田 廣成 (立命館大学 放射光生命科学研究センター)

山田 久夫 (関西医科大学)

片岡 洋祐 (関西医科大学)

富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

恒温動物では体表温度は環境に依存して変動しているが、深部体温は常に 37°C 付近で保たれている。これは、体表の温度情報が神経を介して中枢の体温調節機構へフィードバックされているためである。近年、温度受容体タンパク質群 (TRPV1~TRPV4) がクローニングされ、この4つのサブタイプ TRPV1~TRPV4 がそれぞれ異なる温度に反応して開閉するイオンチャンネルであること、また TRPV1 は辛味成分カプサイシンにも応答することが明らかとなった。しかし、体温付近の数度の温度変化を感知し、タンパク質の構造が変化する仕組みは未だ明らかでない。そこで、TRPV の熱受容・体温調節機構への関与を検討するため、マウスに赤外線による熱刺激を

与えたときの深部体温変化を測定した。

熱刺激に用いた赤外線は波長 830nm、出力150mW の半導体レーザーで、皮膚温度が 55 度を超えないように照射範囲を調節しながら 5 分間照射した。通常のマウスでは、この熱刺激で深部体温は変化せず、一定に保たれた。TRPV1 に高濃度のカプサイシンを与えると脱感作が起こる。マウスに高濃度のカプサイシンを塗布し、TRPV1 を脱感作させた後、同様の赤外線による熱刺激を与えると、通常では起こらない体温上昇が計測された。この結果は、TRPV1 の体温調節機構への関与を示すものである。

今後、TRPV の赤外応答の波長特異性について、近赤外から遠赤外に亘って強い放射光を発生する小型放射光

装置「みらくる 20」からの放射光を分光照射して検討するとともに、数種類ある TRPV のうち特定のサブタイプ

の遺伝子欠損マウスを用いて、熱受容と体温調節における TRPV サブタイプの役割を検討したい。

26. 体液 Ca イオン濃度を感受する Ca チャネルの解析

伊村 明浩 (京都大学大学院医学研究科)

久保田 幸治 (京都大学大学院医学研究科)

富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

ヒト型老化疾患モデルマウスとして報告された *klotho(kl)* マウスをヒントにして、Klotho 分子の機能を解析してきた。Klotho 分子は一回膜貫通型の I 型膜タンパクであり、主として遠位尿細管、脈絡膜、上皮小体の細胞内の膜構造中に分布する。細胞膜表面に分布する量は少ないこと、また、膜貫通部位近傍で切断されて分泌され、体液中を循環することが判っていた。

脳脊髄液は中枢神経系を包み込んで灌流する体液であり、組成や圧力が厳密に制御されている。脈絡膜がその

大部分を産生することは知られているが、その成分管理システムは知られていない。脳脊髄液中の Ca 濃度を測定したところ、*kl-KO* マウスでは有意に低下していた。そこで、脳脊髄液を感知するシステムに該当すると思われるセンサー分子を調べたところ、TRPV4 が有力な候補の一つであると考えられるいくつかのデータを得た。Klotho 分子は TRPV4 シグナルに従って細胞膜イオン輸送体を細胞膜にリクルートするための分子装置であると推定して解析を進めている。

27. 内耳前庭における TRP ファミリーを介する感覚受容

久保 伸夫 (関西医科大学医学部)

沈 静 (関西医科大学医学部)

小西 将矢 (関西医科大学医学部)

濱田 聡子 (関西医科大学医学部)

富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

Ca²⁺ 透過性チャネルと考えられている浸透圧感受性受容体 (TRPV4) は、細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。内耳液のイオン環境及び透過性の変化による局所の浸透圧変化は、蝸牛の外有毛細胞の運動能及び細胞内 Ca²⁺ 濃度に影響を与え、結果聴覚機能になんらかの影響を与える可能性も考えられる。TRPV4 の遺伝子が、蝸牛の内有毛細胞、外有毛細胞、螺旋神経節細胞、血管条 margin 細胞に発現していることは既に報告されているがその機能は不明であった。そこで我々は、野生型及び TRPV4 knock-out マウスを用い、蝸牛の TRPV4 の発現、単離外有毛細胞における低浸透圧刺激による細胞内 Ca²⁺ 動態について比較検討を行った。

RT-PCR 方法によって、野生型のマウス蝸牛において TRPV4 遺伝子の発現が検出されたが、knock-out マウスの蝸牛では陰性であった。single-cell RT-PCR 解析により、TRPV4 遺伝子は野生型マウス蝸牛の螺旋神経節細胞、外有毛細胞、内毛細胞に発現していることが確認された。これらの細胞では TRPV4 免疫反応も陽性であったが、knock-out マウスにおいては、いずれの細胞でも陰性であった。また、低浸透圧刺激及び TRPV4 の agonist である 4 α -PDD に対して、野生型マウス外有毛細胞の [Ca²⁺]_i 上昇が認められた。この上昇は TRPV 受容体の antagonist である Ruthenium Red により抑制された。一方、TRPV4 knock-out マウス外有毛細胞では、低浸透圧刺激及び 4 α -PDD による [Ca²⁺]_i 上昇が認められなかった。

以上の結果から、TRPV4 受容体が外有毛細胞における細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じている可

能性が考えられた。

28. 感覚神経における侵害刺激センサーとしての TRPA1 の役割

野口 光一（兵庫医科大学医学部）

戴 毅（兵庫医科大学医学部）

富永 真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

TRPA1 は 2003 年にクローニングされた新規チャンネルタンパクで、17 度以下の侵害性冷刺激によって活性化される。また、TRPA1 はマスタードやマリファナの成分により活性化されることが報告され、痛みの標的分子の新しいメンバーとして注目を浴びている。そこで、炎症疼痛モデル動物の疼痛過敏の発症メカニズムにおける TRPA1 の役割とその調節機構を明らかにすることを目的とする。TRPA1 遺伝子とタンパク質の発現を解析したところ、後根神経節細胞の約 30% に TRPA1 の発現を認

めた。また、TRPA1 は小径の TRPV1 陽性細胞に発現していた。さらに、TRPA1 が神経栄養因子受容体とも高率に共発現していたことから、神経栄養因子の TRPA1 活性化への影響を感覚神経細胞において Ca^{2+} イメージング法で検討したところ、神経栄養因子の投与は、リガンドによる TRPA1 を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を増強した。よって、神経栄養因子は TRPA1 機能を制御しているものと推測された。

29. シリコンベース膜タンパクバイオセンサー制作のための タンパク質発現・精製・集積技術開発

宇理須 恒雄（分子科学研究所）

岡村 康司（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

森垣 憲一（産業技術総合研究所）

内海 裕一（兵庫県立大学 高度産業科学技術研究所）

富永 真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

イオンチャンネルの電気生理学的研究において、ピペット利用のパッチクランプが果たした貢献は計り知れないものがあるが、最近、新しいタイプのパッチクランプ：プレーナータイプのパッチクランプの研究が、特に欧米各国で活発化している。これは、1) 高集積が可能で、スクリーニング応用が可能、2) 二次元面内の多点測定が可能、3) 熟練を要しない、4) 小型により、体内挿入が可能、5) 蛍光や、細胞の活動電位の時空間分布との同時測定が可能、などの、ピペットパッチクランプに無い数々の特色があり、将来、マイクロ流体回路と組み合わせるものに取って代わることすら予測されてもいる。本共同

研究では、シリコンを基板とするプレーナー型パッチクランプ素子の開発を、富永が開発した TRP チャンネル発現 HEK293 細胞を用いて進めている。素子開発における重要な技術的問題は、(1) 細胞あるいは、脂質二重膜を微細貫通孔に置いた時の孔のシール抵抗をギガオーム以上にすること(ギガオームシール)、および(2)電流雑音を低減し、岡村が研究を進めているプロトンチャンネルなどの微小電流チャンネルや高速応答計測を可能とすることである。本共同研究では Si 基板として SOI 構造基板を用い、グラミジンの系でシングルイオンチャンネルを計測し、雑音電流としてテフロン基板並みの低雑音を実現

した。従来 Si 基板は雑音電流が大きいのでパッチクランプの基板としては不適とされていた常識を変えるとことに成功した。

さらに微細貫通孔(径 0.5-100 μm)を形成した基板をマイクロ流体回路に組み込み細胞を貫通孔部に導入し、現在、ギガオームシールを形成する実験をすすめている。

今後、ギガオームシールの安定な形成をめざした微細孔周辺の化学修飾, カプサイシンなどのリガンドを導入し、ホールセルモードや、シングルチャンネルの動作確認を行い、さらに、より低雑音化, シール抵抗の安定高度化, マイクロ流体回路の高性能化などを進める。