

2005年度 生理学研究所研究会

「細胞シグナリングの時空間統御機構解明への方略探索」

日時：10月6日（火）～7日（水）

場所：自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター 小会議室

対案代表者：曾我部 正博（名古屋大学 大学院医学系研究科）

所内対応者：久保 義弘（神経機能素子研究部門）

10月6日（木）

0:30-0:40 挨拶

Session （座長：小島 至）

午後

0:40- 1:10 [ファブサイトーシスにおける Rac サブタイプの局在と機能](#)

○ 齋藤尚亮、上山健彦、辰野敏彦、住本英樹、Michelle Lennartz（神戸大学
バイオシグナル研究センター）

1:10- 1:40 [腎マクラデンサ細胞一酸化窒素合成酵素 nNOS の発現と活性制御機構](#)

○ 川田英明、安岡有紀子、小久保謙一、小林弘祐、福田英一、広瀬茂久、
河原克雅（北里大学医学部）

1:40- 2:10 [シナプス小胞へのグルタミン酸取り込み速度](#)

○ 金子 雅博、堀 哲也、高橋 智幸（東京大学大学院医学系研究科）

2:10- 2:20 コーヒーブレイク

Session （座長：久保 義弘）

午後

2:20- 2:50 [海馬シナプスにおける神経ステロイドによるメタ可塑性の調節：膜電位イメージングによる解析](#)

○ 曾我部正博、陳玲（名古屋大学大学院医学系研究科）

2:50- 3:20 [NMDA 受容体 NR1 における部分アゴニストの作用機序](#)

○ 稲野辺 厚（大阪大学大学院医学系研究科）

3:20- 3:50 [中枢ニューロンにおける代謝型GABA・グルタミン酸受容体の複合体化と機能的相互作用](#)

○ 田端俊英、狩野方伸（大阪大学大学院医学系研究科）

3:50- 4:00 コーヒーブレイク

Session （座長：最上 秀夫）

午後

4:00- 4:30 [樹状突起スパインの可塑性と安定性](#)

- 河西春郎、本蔵直樹、安松信明、松崎政紀、野口潤（生理学研究所）
- 4:30- 5:00 [破骨細胞における Vacuolar-type H⁺-ATPase の多様な酸分泌メカニズム](#)
 - 久野みゆき、酒井啓、川脇順子、森浦芳枝、森畑宏一、森啓之（大阪市立大学大学院医学研究科）
- 5:00- 5:30 [脳脊髄液の pH 調節における脈絡叢の重炭酸イオン輸送機構](#)
 - 福田英一、河原克雅、広瀬茂久（東京工業大学大学院生命理工学研究科）
- 5:30- 6:00 [蛍光 1 分子イメージングによるシグナル伝達と核内輸送のダイナミクス](#)
 - 十川久美子、徳永万喜洋（理化学研究所・免疫・アレルギー科学総合研究センター）
- 6:30- 懇親会

10 月 7 日（金）

Session （座長：曾我部正博）

午前

- 8:45- 9:15 [KCNQ/M チャンネルの抑制における PIP2 と PKC の異なる役割](#)
 - 中條浩一、久保義弘（生理学研究所）
- 9:15- 9:45 [HERG カリウムチャンネルの流動電位測定によるイオン透過機構の解析](#)
 - 老木 成稔・安藤博之・清水啓史・岩本真幸・久野みゆき（福井大学医学部）
- 9:45-10:15 [免疫応答細胞における酸化的ストレス感受性 Ca²⁺ チャンネル TRPM2 の活性化機構および生理的役割](#)
 - 山本伸一郎、原雄二、森泰生（京都大学大学院工学研究科）
- 10:15-10:25 コーヒーブレイク

Session （座長：老木 成稔）

午前

- 10:25-10:55 [マクロファージにおける TRPV2 の調節機構](#)
 - 長澤雅裕、小島至（群馬大学生体調節研究所）
- 10:55-11:25 [PLC-zeta の分子構造と Ca²⁺オシレーション誘発能および核移行能](#)
 - 宮崎俊一・伊藤昌彦・黒田恵司（東京女子医科大学医学部）
- 11:25-11:55 [Ca²⁺オシレーションの細胞分子機構](#)
 - 飯野正光（東京大学大学院医学系研究科）
- 11:55-12:25 [プリズム式全反射蛍光顕微鏡を用いた細胞内タンパク輸送の可視化法の開発](#)
 - 最上秀夫、嘉副 裕、佐藤 洋平（浜松医科大学）

ファゴサイトーシスにおける Rac サブタイプの局在と機能

○齋藤 尚亮、上山 健彦、辰野 敏彦、住本 英樹¹、Michelle Lennartz²

(神戸大学・バイオシグナル研究センター、九州大学・生体防御医学研究所¹、Albany Medical College²)

貪食細胞は、進入物の殺菌のために NADPH oxidase を用いて活性酸素を産生するが、その活性化には 2 つの細胞膜成分(Nox2, p22^{phox})と 4 つ細胞質成分 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, Rac) による膜上での機能的複合体の形成が必須である。この必須成分のひとつで、small GTPase である Rac は、貪食作用時に p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox} 複合体とは独立して膜移行することが報告されている。しかしながら、活性酸素産生に関わる Rac の分子種特異性やその作用機序については不明である。今回我々は、GFP 標識 Rac (1, 2, 3)およびその変異体を用いて、マクロファージ細胞株での FcγR を介した貪食時の Rac の分子種特異的膜ターゲティング機構を、Rac 分子種間で最も大きな相違が存在する C 末端側 10 個のアミノ酸、特に polybasic region (PB)と呼ばれる 6 つのアミノ酸に注目し、解明を試みた。

その結果、貪食時に、GFP 標識 Rac は Rac1 > Rac3 > Rac2 の順に強く食胞膜に集積し、その集積の強さ、活性酸素産生能は C 末端側の PB の正電

荷アミノ酸残基数 (Rac1: 6 個; Rac3: 4 個; Rac2: 3 個) に依存することがわかった。更に、各分子種の PB のみを GFP 標識した蛋白でも、貪食時に食胞膜に集積することを確認した。各分子種 PB の脂質結合能を protein lipid overlay assay を用いて行ったところ、Rac1 の PB は PI(3)P、PI(4)P、PI(5)P、PI(3,4,5)P₃、PA に強く結合したが、Rac2 の PB は特異的結合を示さなかった。また、Rac2 の活性型変異体(Rac(Q61L))の集積を観察すると、小胞体などの細胞内器官の膜に局在し、貪食時にそれらの小器官膜が線状に食胞膜へ癒合するのが観察されたが、この集積機序が PB の正電荷に依存しないことを、PB を 6 つのアラニン残基で置換した GFP 標識 Rac キメラ蛋白を用いて確認した。これらのことから、Rac1 は貪食時に PB の高い正電荷とその脂質結合能を利用し食胞膜に集積するが、Rac2 は PB の正電荷を利用した弱い集積機序の他に、細胞内器官膜にターゲットし、この膜が食胞膜に融合することを利用した PB の正電荷に依存しない集積機序を持つことが示唆された。

腎マクラデンサ細胞一酸化窒素合成酵素 nNOS の発現と活性制御機構

○ 川田 英明¹⁾、安岡 有紀子¹⁾、小久保 謙一²⁾、小林 弘祐²⁾、福田 英一³⁾、広瀬 茂久³⁾、河原 克雅¹⁾ (北里大・医・生理¹⁾、北里大・医療衛生・臨床工学²⁾、東工大・生命理工³⁾)

腎マクラデンサ (MD) 細胞が産生する一酸化窒素 (NO) は、尿細管系球体フィードバック (TGF) 機構を抑制する、血管拡張因子である。 MD 細胞は、管腔内液 NaCl 濃度 ([NaCl]_i) の変化を感知し、 TGF 機構を修飾する神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の発現量を増減させているが、その細胞内調節因子は不明である。われわれは、新規に樹立した MD 細胞 (NE-MD) において、細胞外液 [NaCl] 変化、 furosemide (Na⁺-K⁺-2Cl⁻ 輸送体阻害薬) や amiloride (Na⁺-H⁺ 逆輸送体阻害薬) 投与による、 nNOS の発現量 (Western blotting) と NO 産生 (NO 電極法) への影響を調べた。その結果、 nNOS の発現量は、 furosemide

投与後時間依存性に増加し、 L-Arginine (1 mM) 添加による NO 産生量も並行して増加した。この NO 産生は、 BAPTA-AM (Ca²⁺ chelator) や 50 μM 7-nitroindazole (nNOS 阻害薬) で完全に阻害された。細胞外液 [NaCl] 変化を、 [Na⁺] と [Cl⁻] を独立して変化させると、 [Na⁺] 低下による NO 産生は小さい事、 NO 産生抑制の一部は Na⁺-H⁺ 逆輸送体阻害のためであることがわかった。結論： MD 細胞の nNOS の発現量は、 furosemide 投与や [Cl⁻] の低下で誘導され、細胞内 Ca²⁺ と pH の影響下にあることがわかった。

シナプス小胞へのグルタミン酸取り込み速度

○金子 雅博、堀 哲也、高橋 智幸 (東京大学大学院医学系研究科 神経生理学教室)

シナプス伝達は、シナプス小胞が伝達物質を開口放出後、再利用されることで維持される。この再利用過程において、シナプス小胞への伝達物質取り込みは必須のステップであり、これに要する時間は、シナプス小胞が再利用されるまでの時間を制限する。シナプス小胞は回収後、数十秒以内に再利用可能となるが、生化学的に単離したシナプス小胞への伝達物質の取り込み時間は数分-10分におよんでいる。我々は脳幹スライスの calyx of Held シナプスにおいてこの問題を検討した。シナプス小胞内のグルタミン酸を枯渇させた後にシナプス前末端にケージドグルタミン酸を注入し、UV照射で瞬間的にグルタミン酸濃度を上昇させ、シ

ナプス後細胞から同時記録される EPSC の振幅の時間経過を指標に、グルタミン酸の小胞への取り込み時間を測定した。UV 照射後、EPSC は直ちに増大し、その時定数は室温で 5.1 秒であった。この反応は、小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) ブロッカー Trypan blue、及び VGLUT の駆動力である H^+ の電気化学ポテンシャルをつくる液胞型 H^+ -ATPase (V-ATPase) のブロッカー bafilomycin A1 により完全に抑えられた。これらの結果から、シナプス小胞への VGLUT を介するグルタミン酸取り込み速度は従来の報告より 2 桁近く速いと結論された。

海馬シナプスにおける神経ステロイドによるメタ可塑性の調節 ：膜電位イメージングによる解析

○ 曾我部 正博^{1,2,3}、陳 玲²（¹名古屋大学大学院・医学系研究科・細胞生物物理、²JST・ICORP/SORST・細胞力覚プロジェクト、³生理研・分子生理系・細胞内代謝）

神経ステロイドの一部は、核内受容体を経由せずに、細胞膜受容体に急性に作用して、シナプス伝達を修飾することが明らかになりつつある。海馬での合成が知られている硫酸プレグネノロン(PREGS)を海馬に注入すると、若齢ラットの学習能力の促進、加齢マウス、ラットの記憶学習の改善、あるいはβアミロイド負荷ラットでみられる学習能力低下の防止効果などが報告されている。しかしながら、そのシナプス機構は不明で、PREGSの標的受容体も定まっていない。最近我々は、ラット脳海馬スライスへのPREGSの急性投与が、歯状回のシナプス伝達に用量依存的な長期増強(LTP)を誘導することを見いだした。この長期増強は、少なくとも短期と中長期の2段階からなり、前者はニコチン受容体を介した前終末からのグルタミン酸放出の増強、後者は、短期増強に依存するとともに、シナプス後膜のNMDA受容体

チャンネル活性の亢進と、引き続く細胞内シグナルカスケードの活性化を必要とする。一方、海馬では条件刺激の周波数に依存して長期抑圧(LTD)や長期増強(LTP)が生じ、活動度依存的な可塑性のモデルとして使われている。成ラット海馬では、1Hzで最大のLTD、100Hzで最大のLTDが生じ、EPSPの振幅変化を刺激周波数の対数に対してプロットするとS字状の曲線がえられる。この周波数依存性は過去の神経活動などによって修飾され(メタ可塑性と呼ぶ)、経験依存的な可塑性のモデルとされている。神経ステロイドPREGSの投与は、この曲線を大きく左シフトさせることが分かった。すなわち、PREGSはそれ自身がシナプス伝達の増強をもたらすだけではなく、活動度依存的なシナプス可塑性の周波数に対する感度を増大させるメタ可塑性調節因子であることが示唆された。その分子機構の解析結果を紹介する。

NMDA 受容体 NR1 における部分アゴニストの作用機序

稲野辺 厚（大阪大学大学院医学系研究科薬理学講座・分子・細胞薬理学）

リガンド開口型イオンチャネルはアゴニストの結合情報をチャネルの開閉に変換する膜蛋白質である。完全アゴニストはチャネルを最大に活性化し、部分アゴニストは不完全に活性化する。NMDA 受容体の NR1 サブユニットのグリシン結合部位における部分アゴニストの作用を検討するために、炭素環リングの異なる 3 つのグリシンホモログ（ACPC、ACBC、cycloleucine）を用いて、結晶学的、電気生理学的解析を行った。ACPC、ACBC は完全アゴニストであるグリシンと比して、NR1、NR2B からなる NMDA 受容体をそれぞれ約 80%、42%活性化した。しかし、それら部分アゴニストと NR1 のリガンド結合領域との複合体の結晶構造は、グリシンとの複合体と同程度のドメイン開閉を示した。一方、cycloleucine はアンタゴニストとして働き、リガンド結合領域の開

状態を安定化していた。以上の知見は、NR1 のリガンド結合領域は完全、部分アゴニストに関らず、同一の開状態をとることを示している。Non-NMDA 受容体である GluR2 のリガンド結合領域は、部分アゴニスト結合時には完全アゴニストとアンタゴニスト結合時と比して、中程度のドメイン開閉を示すことが、結晶構造で明らかとなっている。そのため、進化的に類似するイオノトロピックグルタミン酸受容体は部分アゴニストに対して異なる応答をすることが判った。しかしながら、cycloleucine を結合した NR1 リガンド結合領域は GluR2 と同様に 2 量体構造を取っていたことから、リガンド結合領域のサブユニット間の相互作用はイオノトロピックグルタミン酸受容体間で保存されていることが明らかとなった。

中枢ニューロンにおける代謝型 GABA・グルタミン酸受容体の複合体化と機能的相互作用

○ 田端 俊英、狩野 方伸（大阪大学大学院医学系研究科細胞神経科学）

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) は脳に広く分布する G タンパク共役型受容体 (GPCR) であり、シナプス可塑性の誘導など重要な役割を果たしている。発現系では mGluR がグルタミン酸以外に細胞外カルシウム (Ca^{2+}_o) に対して感受性を示す(1)。我々はマウス小脳プルキンエ細胞を用い、 Ca^{2+}_o がニューロンに自然発現した 1 型 mGluR (mGluR1) を活性化するとともに、mGluR1 のグルタミン酸感受性を劇的に増強することを明らかにした(2, 3)。当初 Ca^{2+}_o は直接 mGluR1 を機能修飾すると思われた。しかしその後、中枢ニューロンにおいて mGluR1 が B 型 GABA 受容体 (GABA_BR) をはじめとする Ca^{2+}_o 感受性のある異種 GPCR と近接して存在することが報告された(4)。そこで Ca^{2+}_o の GABA_BR に対する作用を薬理阻害した場合や GABA_BR を遺伝学的にノックアウトした場合について調べたところ、 Ca^{2+}_o による

mGluR1 のグルタミン酸感受性増強が起こらないことが判明した(5)。これらの結果は GABA_BR が Ca^{2+}_o の効果を仲介していることを示しているが、従来の GABA_BR 介在反応と異なり $\text{G}_{i/o}$ タンパクを必要としない。免疫共沈でマウス小脳から GABA_BR - mGluR1 複合体が検出された事実を考え合わせると、 GABA_BR が直接 mGluR1 と相互作用している可能性がある。以上の結果は、中枢ニューロンにおいて GPCR が異種 GPCR の機能制御 co-factor として働くことを示唆している。

1.Kubo Y, Miyashita T, Murata Y (1998) *Science* **279**, 1722-1725, 2. Tabata T, Aiba A, Kano M (2002) *Mol Cell Neurosci* **20**, 56-68, 3. Tabata T, Kano M (2004) *Mol Neurobiol* **29**, 261-270, 4. Kulik A, Nakadate K, Nyiri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R (2002) *Eur J Neurosci* **15**, 291-307, 5. Tabata T, Araishi K, Hashimoto K, Hashimoto Y, Van der Putten H, Bettler B, Kano M (2004) *PNAS* **101**, 16952-16957.

樹状突起スパインの可塑性と安定性

○河西 春郎、本蔵 直樹、安松 信明、松崎 政紀、野口 潤（生理学研究所・生体膜部門）

海馬 C A 1 錐体細胞の樹状突起スパインの性質をスライス培養標本を用いて調べている。ケイジドグルタミン酸の 2 光子アンケイジングにより、単一スパインに pairing 刺激を与えると著しいスパイン頭部増大が見られるが、これは頭部の形態依存性があり、大きなスパインではほとんど長期的な増大はない。同様な違いは、自発発火環境で数日に渡る観察でも見られ、大きなスパインは書き込み禁止状態にある

と考えられた。この原因の一つとして、大きなスパインのネックは太いことが多く、NMDA 受容体依存性カルシウムシグナルが小さいことがある（昨年報告済み）。更に、スパインの主たる細胞骨格である F-actin の構築を 2 光子光変換が可能な PA-GFP-actin を用いて調べた結果、大きなスパインと小さなスパインは F-actin の構築に重要な違いがあることがわかってきた。

破骨細胞における Vacuolar-type H^+ -ATPase の多様な酸分泌メカニズム

○久野 みゆき、酒井 啓、川脇 順子、森浦 芳枝、森畑 宏一、森 啓之
(大阪市立大学大学院医学研究科・分子細胞生理学・中央研究室)

破骨細胞は酸・蛋白分解酵素を分泌して骨吸収を行う。骨表面に接する破骨細胞の細胞膜は ruffled border と呼ばれるひだ状の構造を形成し、ここには酸分泌の主力と考えられている vacuolar-type H^+ -ATPase (V-ATPase) が高密度で存在している。V-ATPase は、 H^+ トランスポートを担う membrane sector (V_o) と ATPase 活性をもつ catalytic sector (V_i) から成り、更にそれぞれが複数のサブユニットの集合体である。この複雑な構造を反映して、V-ATPase による酸分泌能は、分布密度、エネルギーレベル、サブユニットの集合・乖離、細胞内 Vacuole 膜の融合などの影響を受けて多様に調節されている。私達は、破骨細胞から V-ATPase による H^+ 電流を記録し、サブユニット構成に基づく酸分泌の制御機構を検討した。殆どの破骨細胞で、

細胞内 ATP に依存して増加し、V-ATPase のブロッカーであるバフィロマイシン及び DCCD によって抑制される H^+ 電流が検出された。 V_i は actin に結合することが知られている。サイトカラシンで前処理すると H^+ 電流の ATP 依存性が失われ、actin filament との相互作用がポンプ機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。しかし、サイトカラシン処理あるいは細胞内 ATP 除去後も、脱分極時 (0 mV) には、バフィロマイシン及び DCCD 感受性 H^+ 電流が残存した。これらの結果は、破骨細胞では V-ATPase が holoenzyme として働くだけでなく、ATP の枯渇や V_o/V_i diassembly などポンプ機能が阻害された際には V_o の H^+ トランスポート機構によって酸分泌機能が保たれることを示唆している。

脳脊髄液のpH調節における脈絡叢の重炭酸イオン輸送機構

○ 福田 英一¹⁾、河原 克雅²⁾、広瀬 茂久¹⁾ (東工大・生命理工¹⁾、北里大・医・生理²⁾)

脳脊髄液は中枢神経系を衝撃から守るクッションの役割をするだけでなく、老廃物を排出し、神経伝達における環境を提供するなど重要な機能を担っている。この脳脊髄液の大部分は脈絡叢と呼ばれる組織から分泌されることが知られており、その主要成分の輸送機構も大部分は分子レベルで同定されているが、pH緩衝剤として重要な重炭酸イオンについては明らかにされていない。我々は重炭酸イオン輸送体の有力な候補分子として、ラ

ット脈絡叢より $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送体⁴の新規バリエーション (NBC4g) を単離し、それが脈絡叢上皮細胞の頂端膜に局在することを発見した。NBC4gは既報のNBC4cと異なり、cAMP依存的な電気生理的活性をもつことを示すと共に、ラット脈絡叢上皮の初代培養細胞において、RNA干渉によるNBC4発現抑制を用い、NBC4が頂端膜で重炭酸イオン輸送に関わっていることを明らかにした。

蛍光 1 分子イメージングによるシグナル伝達と核内輸送のダイナミクス

○十川 久美子¹、徳永 万喜洋^{1,2,3} (1理研・免疫センター、2遺伝研・構造センター、3総研大)

(1) シグナル伝達における lipid raft の役割

lipid raft は、シグナル分子が集合し、外からの刺激を効率よく細胞内に伝達する細胞膜のマイクロドメインとして重要であると考えられている。種々のプローブを用いたイメージングにより存在は確認されているものの、その動態については、不明な点が多い。

我々は、正常細胞における lipid raft の動態可視化を目的として、lipid raft 局在タンパク質として知られる LAT と GFP との融合タンパク質 LAT^{ΔCP}/GFP を構築し、全身性に発現する Transgenic マウスを樹立した。発現した LAT^{ΔCP}/GFP は、lipid raft 局在シグナルを維持し、生化学的な lipid raft 画分に存在する。一方、リン酸化される tyrosine 残基を持たないので、タンパク質相互作用に関わらず、lipid raft マー

カーとして機能する。Transgenic マウス由来のマスト細胞を用いた全反射顕微鏡による蛍光イメージングにより、直径約 1 μm 範囲での速い動きをする、数～数十分子の集合体として観察され、lipid raft の 1 クラスターの動きが示唆される。1 分子イメージングの解析から、LAT^{ΔCP}/GFP 1 分子は、クラスターと同様に速い動きを示したが、MβCD による cholesterol 除去や、raft 局在シグナルを欠失した LAT^{ΔCP} 変異体では、動く範囲が大きく制限された。この結果は、lipid raft に局在することでタンパク質が広い範囲を動くことができることを示しており、シグナルタンパク質の移動の観点から lipid raft の重要な役割が示唆される。

(2) 細胞質-核間輸送の分子機構

細胞質-核間輸送は、種々の分子や核内・核外輸送など、多種多様な分子が同時に並行して輸送されるというダイナミックな特徴を持っている。それでいて、選択的にかつ、必要なものは RanGTP の濃度勾配を使って速く輸送を行っている。核膜孔複合体は約 30 種類の構成蛋白質で分子量約 125 Mda と複雑な構造をとることにより、多様な特性の輸送を実現しているが、それゆえに分子機構の解明を複雑にしている。

1 分子イメージングの定量解析から、Ran と反応する活性部位は 8 分子/核膜孔あるとの結果が得られた。近年言われている不特定多数の部位ではなく、特定の部位と反応している事を示す。活性部位の手前にある約 100 分子を結合する部位は、輸送される分子を濃縮する効果があり、生理的に重要な 10nM ~ 100nM 前後の薄い濃度範囲で、輸送速度を速める重要な役割を果たしていることがわかった。

KCNQ/M チャネルの抑制における PIP₂ と PKC の異なる役割

○ 中條 浩一^{1,2}、久保 義弘^{1,2} (1. 生理学研究所・神経機能素子研究部門、2. SORST, JST)

電位依存性カリウムチャネルの KCNQ/M チャネルは、神経細胞などに発現し細胞の興奮性を抑える役割を果たしている。G_q カップルの受容体が活性化すると、KCNQ/M チャネルが抑制されることがよく知られており、結果として細胞の興奮性は上昇する。長い間 KCNQ/M チャネルの抑制機構は不明であったが、近年この抑制機構が主に PIP₂ の分解によるものであることが提唱され、それを裏付ける実験結果も数多く発表されている。その一方で、PKC の活性化がチャネルの抑制に関わっていることも明らかとなっている。しかしながら PKC が PIP₂ 減少による抑制の補助的な役割を担っているのか、あるいは PIP₂ とは異なった方法で KCNQ/M チャネルを抑制しているのかは、明らかではない。今回、我々は KCNQ チャネルと M1 受容体を共発現させることでアフリカツ

メガエル卵母細胞に M 電流を再構成した。10 μM の oxo-M によって M1 受容体を活性化させると KCNQ チャネルのコンダクタンス-電圧関係(G-V カーブ)が脱分極側にシフトした。また PKC のアクチベーターである PMA を投与したところ KCNQ2 チャネルの G-V カーブは 17.5mV シフトした。一方、10 μM の wortmannin によって PIP₂ を減少させると、最大電流量は約 5 分の 1 に減少したものの、G-V カーブにはほとんど影響を与えなかった。これらの結果により、G-V カーブのシフトは主に PKC の活性化によるものであると考えられた。M 電流抑制時において、PIP₂ の減少がチャネルの電位依存性を変化させずに電流量を減少させるのに対し、PKC はチャネルの電位依存性を変化させることでチャネルを抑制すると思われる。

HERG カリウムチャネルの流動電位測定によるイオン透過機構の解析

○老木 成徳、安藤 博之、清水 啓史、岩本 真幸、久野 みゆき（福井大学医学部・分子生理、大阪市立大学・生理）

Kチャネルの高いイオン選択性と多様な透過性を解明するために、結晶構造や分子動力学など、様々なアプローチがとられてきた。これらを総合して得られたイオン透過モデルの検証と展開が求められている。本研究では 1) イオン透過機構を明らかにするための新しいアプローチとして流動電位を基にした解析法を考案し、2) 流動電位の新しい測定法を開発し、3) これを HERG チャネルに適用しその透過機構を検討した。

流動電位とは、浸透圧差によってポアを流れる水が透過イオンを押し流し、透過イオンの平衡電位でもイオンが流れることにより生じる。“水で満たされたポア”内のイオンと水の相互作用を反映する。流動電位はほとんどの場合、脂質平面膜法によって単一チャネル電流を対象に測定されてきたが、今回私たちは全細胞電流記録法による流動電位測定に成功した（浸透圧パルス法）。方法の要点は 3 つある。1) 大きな浸透圧差に暴露させても細胞に損傷がないように浸透圧暴露時間を 1 秒以内にした。2) 流

動電位は平衡電位からのずれとして定義できるので、実験的に得られる逆転電位を高精度で評価する方法を確立した。3) 浸透圧差によって生じる 2 次的な変化（濃度分極など）を避けるために浸透圧ジャンプ後、数ミリ秒以内の変化を捉えた。

HEK293 細胞に HERG チャネルを発現させ全細胞記録を行った。細胞内外 10 mM $[K^+]$ において、浸透圧差（500 mOsm ~ 1500 mOsm）に対する流動電位の値は線形変化を示し、その勾配から -0.7 mV/Osm を得た。この値から水 - イオンカップル比（ n : 水流束 / K^+ 流束）が 1.6 と求められた。細胞内外 $[K^+]$ を 100 mM にすると n は 0.9 に減少した。透過イオン濃度増大による n 値の減少は、ポア内イオン占有確率の増大による水分子占有確率の減少を意味する。一方、 $[K^+]100 \text{ mM}$ での n 値が約 1 ということはポア内でイオンが最小の水和状態であることを反映する。これらの結果は KcsA チャネルの透過モデルが HERG チャネルに適用できることを示した。

免疫応答細胞における酸化ストレス感受性 Ca^{2+} チャネル TRPM2 の 活性化機構および生理的役割

○山本 伸一郎、原 雄二、森 泰生

(京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻分子生物化学分野)

TRPM2 は過酸化水素 (H_2O_2) などの酸化ストレスにより活性化される Ca^{2+} 透過性チャネルであり、TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入は細胞死を引き起こすことが明らかにされている。酸化ストレスによる TRPM2 の活性化は細胞内で産生された NAD^+ および ADP-ribose が TRPM2 の C 末端に存在する Nudix motif に作用して引き起こされていると考えられているが、その詳細はまだ明らかにされていない。TRPM2 は単球、好中球、およびリンパ球などの免疫応答細胞で高い発現が認められている。しかしこれらの免疫細胞における TRPM2 の生理的役割は明らかにされていない。そこで本研究では酸化ストレスによる TRPM2 の活性化機構の詳細および生理的役割を明らかにすることを目的とし検討を行った。

TRPM2 活性化機構解明にあたり様々なストレス応答シグナルに着目したところ、我々は extracellular signal-regulated kinase (ERK) が TRPM2 活性化に重要な役割を果たしていることをつきとめた。また生理的役割については TRPM2 発現が認められている単球細胞株 U937 を用いて H_2O_2 によるサイトカイン産生に着目したところ H_2O_2 による IL-8 産生誘導に TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が関与することを明らかにした。また当研究室では TRPM2 KO マウスの作製に成功している。そこで、TRPM2 KO マウスを用いて免疫応答細胞における TRPM2 の生理的役割についても現在検討を行っているので報告する。

マクロファージにおける TRPV2 チャンネルの制御機構

○長澤 雅裕、小島 至（群馬大学生体調節研究所）

マクロファージには TRPV2 チャンネルが発現しているが、TRPV ファミリーの他のメンバーの発現は極めて低い。非血清存在下、TRPV2 チャンネルは主に細胞内に局在するが、血清投与により一部が細胞膜に移行する。さらに fMLP の投与により細胞膜への移行が促進される。パッチクランプ法により Cs^+ をチャージキャリアーとしたチャンネル電流が観察されるが、TRPV2 チャンネルを抑制する ruthenium red、変異型 TRPV2 遺伝子導入、TRPV2 siRNA の投与により抑制される。この Cs^+ 電流は fMLP 投与によって増加する。また fMLP 投与により急速でかつ持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が惹起されるが、細胞外液 Ca^{2+} の除去、ruthenium red

投与、変異型 TRPV2 遺伝子導入、siRNA 投与などにより持続相の Ca^{2+} 上昇が消失し一過性の上昇になる。fMLP により惹起される TRPV2 の細胞膜へのトランスローケーションは PI-3 キナーゼを抑制するワートマニンや百日咳毒素によりブロックされる。fMLP により誘発されるマクロファージの遊走は ruthenium red 投与、変異 TRPV2 遺伝子導入により抑制される。マクロファージにおいて、TRPV2 は主にポドゾームと呼ばれる部位に局在している。ポドゾームは細胞の遊走に重要な構造で、TRPV2 はこのドメインへの Ca^{2+} 流入を制御して遊走に関与していると考えられる。

PLC-zeta の分子構造と Ca^{2+} オシレーション誘発能および核移行能

○宮崎 俊一、伊藤 昌彦 黒田 恵司（東京女子医大・医・第二生理）

phospholipase C-zeta ($\text{PLC}\zeta$) は近年マウス精子に発現する新たな PLC サブタイプとして発見され、哺乳類卵細胞に Ca^{2+} オシレーションを誘発する卵活性化精子因子の有力候補として注目されている。 $\text{PLC}\zeta$ と蛍光蛋白 Venus を連結した蛋白質をコードする RNA をマウス卵に注入して発現させると、注入後 30 分から Ca^{2+} オシレーションを誘発し、 Ca^{2+} 増加反応によって卵は活性化される（単為受精）。発現した $\text{PLC}\zeta$ は、RNA 注入後約 5 時間で形成される前核に蓄積した。その後第 1 卵割直前の核膜崩壊時に $\text{PLC}\zeta$ は核から細胞質に拡散し、細胞分裂後に形成される 2 細胞期の核に再び集積した。

$\text{PLC}\zeta$ 分子は N 端側の 4 つの EF-hand domain、中央部の X と Y の catalytic domain、

C 端側の C2 domain から成る。X と Y の間の領域には分子が折れ曲がる部分 (hinge portion) が想定されており、この付近に核移行配列候補がある。ここに point mutation を加えると核移行能を喪失した。他方、EF-hand domain の N 端から 10 個目のアミノ酸以降の部分削除しても、 Ca^{2+} オシレーション誘発能も核移行能も喪失した（ Ca^{2+} オシレーションを誘発しない変異 $\text{PLC}\zeta$ の場合は、精子で受精させた卵で前核が形成されてから RNA を注入して発現させ核移行能を観察した）。EF-hand domain とされる部分は、 Ca^{2+} -binding site としてよりも、機能的立体構造をとるために必須であると考えられる。

Ca²⁺オシレーションの細胞分子機構

飯野 正光 (東京大・医学系研究科・細胞分子薬理)

一定強度のアゴニスト刺激に伴って細胞内 Ca²⁺濃度が周期的に増減する Ca²⁺オシレーションは、受精卵、平滑筋細胞、分泌細胞、リンパ球、神経細胞、グリア細胞などほとんど全ての細胞で見られ、細胞機能制御に深く関わっている。なぜ細胞内 Ca²⁺濃度が振動するのかについては、多くの研究者の興味を引き理論的な研究も行われて来た。Ca²⁺オシレーション理論のエッセンスは、Ca²⁺ストアに「Ca²⁺による Ca²⁺放出機構」が存在し、Ca²⁺ストアから放出された Ca²⁺は一旦別のコンパートメントに移った後 Ca²⁺ストアへ再び取り込まれる条件がそろうことである。Ca²⁺による Ca²⁺放出機構については、リアノジン受容体の他、IP₃受容体にも Ca²⁺感受性があることを我々は示した。実際、IP₃受容体の Ca²⁺感受性低下型変異体を発現する細胞では Ca²⁺オシレーションが生じないことを我々は示し、Ca²⁺による Ca²⁺放出機構が Ca²⁺オシレーションにエッ

センシャルであることを明確にした。しかし、オシレーションのペースメーカー機構は不明のままであった。我々は、小胞体内腔に局在させた分離型カメレオンを用い、Ca²⁺オシレーションに伴う Ca²⁺ストア内 Ca²⁺濃度を経時的にモニターした。その結果、アゴニスト刺激開始後最初の Ca²⁺濃度上昇に際しては、ストアからの Ca²⁺放出と細胞質 Ca²⁺濃度上昇がほぼ同期して起こるが、2回目以降の Ca²⁺オシレーションでは、まず細胞質の Ca²⁺濃度が上昇し始めてからストアからの Ca²⁺放出が起こることが明らかになった。これは細胞外 Ca²⁺を除いた条件でも同じく観測され、何らかの細胞内小器官からまずペースメーカーCa²⁺が供給され、それに引き続いて Ca²⁺による Ca²⁺放出が起きて Ca²⁺オシレーションが形成されることを示している。このペースメーカーCa²⁺の解析について述べたい。

プリズム式全反射蛍光顕微鏡を用いた細胞内タンパク輸送の可視化法の開発

最上 秀夫 (浜松医科大学生理学)

近年の遺伝子工学や光学技術の発展により、開口放出や酵素の活性化などの細胞膜近傍での生体反応を全反射型蛍光顕微鏡法 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: TIRFM) を用いてシグナル感度よく観察することが可能となってきた。本手法の最大の特徴は、蛍光観察の際に励起光源として、屈折率の異なる 2 物質界面での光の全反射に伴い発生するエバネッセント波を用いる点にある。エバネッセント波は全反射界面から数十～数百 nm 程度の領域に僅かに染み出す光である。高開口数対物レンズを用いて蛍光試料とスライドガラスの界面でエバネッセント波を発生させることで、試料の極一部即ち細胞膜近傍に限定した高 SN 比の蛍光観察が可能となる。しかしながら、こ

れまでの TIRFM は対物レンズを通してエバネッセンス波を作り出すために細胞膜近傍の高倍率観察に限られており、同時に細胞膜近傍より深い核周辺の情報は得ることが出来なかった。そこで、我々はこの点を解決するため、スライドガラス型オープンチャンバーを用いた低倍率対物レンズプリズム式 TIRFM を開発することを試みた。この方式を用いることにより TIRF 像と落射蛍光像を同時に観察することが可能となった。即ち、多数の細胞の細胞内からの細胞膜へのタンパク輸送やタンパクの局在変化等を核を含む細胞内と細胞膜近傍の現象とを同時観察することにより蛋白質輸送メカニズムや蛋白質の局在変化の多角的解析が可能となった。