

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム（2006.12）7巻1号:69～80.

平成16年度「独創性のある生命科学研究」参画プロジェクト2 細胞内恒常性機能維持のための研究

研究班長 鈴木 裕

依 頼 稿 (報告)

平成16年度「独創性のある生命科学研究」参画プロジェクト2 「細胞内恒常性機能維持のための研究」

鈴木 裕*

各研究グループとテーマおよび研究班成果総括

研究班長 鈴木 裕

本研究班（プロジェクト2）では“細胞内恒常性の維持機構とその破綻による病態発症”をキーワードに7つのグループが集合いたしました。そしてそれぞれがこのテーマに密接する具体的テーマを提案し、“恒常性”についていろいろな側面からの研究を推進し班全体としての成果と特徴を形成するべく企画いたしました。各グループの研究課題名と研究代表者は下記の通りです。

1. 細胞外プロテアーゼによるCキナーゼ応答修飾：
吉田成孝教授グループ（解剖学講座・機能形態学分野）
2. 内分泌顆粒形成の基盤となるゴルジ装置内腔の微小環境の形成・維持機構の解明：渡部剛教授グループ（解剖学講座・顕微解剖学分野）
3. 細胞内 Ca^{2+} 動態に関与する TRP 陽イオンチャネルの同定とクローニング：高井章教授グループ（生理学講座・自律機能分野）
4. 嗅細胞機能維持に関わる電位依存性 Ca^{2+} チャネルと TRP チャネル：柏柳誠教授グループ（生理学講座・神経機能分野）
5. 細胞内 Ca^{2+} 動態制御による細胞高次機能維持とその異常による病態の分子基盤：鈴木裕教授グループ（生化学講座・機能分子科学分野）
6. 眼科領域におけるチャネルパシーへの分子細胞学的研究法導入：吉田晃敏教授グループ（眼科学講座）
7. ユビキチン・プロテアソーム（USP）による Numb 分解の解析：伊藤喜久教授グループ（臨床検

査医学講座）

課題から理解できるようにグループ1-6のテーマではカチオン、特に“カルシウム”の細胞内動態制御とそれによる細胞恒常性維持についての研究であり、グループ7ではタンパクの分解がいかに細胞の機能と恒常性維持に関わるかという観点からの研究です。上記各グループ研究代表者には次のセクションでそれぞれの研究成果の具体を報告していただきました。上記研究課題番号に対応して要約いたしますと、本研究班では、下記のことが明らかになりました。

<研究成果要約>

1. マウス皮膚にTPA（Cキナーゼ賦活剤）を塗布すると表皮の増殖・分化を促進させる。
KLK8（ニューロプシン）はこの作用に促進的に働くが、これは他のカリクレインとの協調作用によりデスモゾームタンパク質の分解を行う事が重要である事を明らかにした。
2. 内分泌細胞における分泌顆粒形成過程でセクレトグラニン III（SgIII）が果たす役割について検討し、SgIII が TGN や分泌顆粒膜上に集積するラフト様膜微小領域を構成するコレステロールやカルボキシペプチダーゼEと特異的に結合して、ペプチドホルモンの分泌顆粒への選別輸送に寄与していることを明らかにした。
3. ウシ毛様体筋における電気生理学的実験により、ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激時に開口して収縮持続相に必要な細胞外からのカルシウムイオン流入経路として機能する2種類の新規非選択性陽

*旭川医科大学 生化学講座

イオンチャネルを同定した。また、このような受容体作動性チャネルの分子本体候補として注目されている TRPC 型イオンチャネルがこの組織の細胞膜に多く発現していることを、分子生物学および免疫組織化学的手法により確認した。

4. 嗅上皮には何種類かの TRP チャネルが存在し、嗅神経軸索の伸長に関係する可能性を見出した。この結果は、神経系における再生医療の発展に寄与するものと期待される。
5. Ca^{2+} ポンプによる Ca^{2+} 輸送のエネルギー共役の仕組みについての理解を顕著に進め、その本質を明らかとした。またその遺伝子異常による細胞 Ca^{2+} 恒常性異常と病態発症について、 Ca^{2+} ポンプ分子レベルから理解を進めた。さらにゴルジ装置 $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$ ポンプの角化細胞分化における機能を明らかとした。
6. 先天性停止性夜盲症の原因遺伝子変異を持つ L 型 Ca^{2+} チャネル (1-サブユニット網膜アイソフォーム) 遺伝子を培養細胞系で発現させることに成功し、視細胞機能障害の発症メカニズムを解明するための実験系を確立した。
7. 神経系細胞でユビキチン・プロテアソーム系が Numb 蛋白の機能 (転写活性化・細胞内凝集) を制御することを示した。今後、Numb を介したユビキチン・プロテアソーム系とエンドサイトーシスとの関連について解析することにより、蛋白質分解の全体像とその細胞恒常性機能維持・制御に果たす役割を理解できると期待される。

次のセクションで記述していただきました各成果の詳細からも分かるように、それぞれ重要な発見や進展があり、各専門分野においても重要な貢献がなされています。これらの成果はもちろん、本学が研究推進の足場をしっかりと固めて下さっていることによるためであり、このような大学全体の方針によりいかに研究者が勇気づけられるか認識を新たにしながら同時に心より感謝申し上げます。今後も本学全体の研究がさらに発展することを心から願い、本研究班の総括報告とさせていただきます。

研究課題名「細胞外プロテアーゼによる C キナーゼ応答修飾」

研究代表者：吉田 成孝

【研究成果の概要】

＜背景＞ 細胞外プロテアーゼは食物の消化や血液凝固・止血系などではたらくはよく知られているが、組織内ではたらくものの機能は十分理解されていない。カリクレインはキニノーゲンからブラッディキニンを産生するセリンプロテアーゼとして知られていたが、ヒトゲノムの解析により15種類の近縁プロテアーゼからなる遺伝子ファミリーを形成している事が明らかとなった。これらのプロテアーゼ分子の多くは様々な組織において発現している事が明らかとなり、また、癌細胞ではカリクレインを含む多くのプロテアーゼが発現し、細胞浸潤や転移との関連で注目されている。KLK8 はニューロプシンとして同定されたカリクレイン型のプロテアーゼで、脳や皮膚などの限定された分布を示す。マウスでは KLK8 は胎生後期から表皮ケラチノサイトに発現し、損傷時や皮膚疾患において発現の増強が見られてきた。KLK8 ノックアウトマウスでは紫外線損傷からの回復が有意に遅延するという知見と合わせると、KLK8 は表皮の増殖や角化に重要な関与をしていると考えられる。ケラチノサイトの角化には細胞外のカルシウムイオン濃度上昇とそれに伴う細胞内の C キナーゼの活性化が不可欠な物である事はよく知られている。そこで、今回の研究は C キナーゼ活性化に伴うケラチノサイトの角化に対する KLK8 の関与を検討した。

＜方法と材料＞

6 ~ 9 週齢雌性の C57BL/6-neuropilin^{+/+} マウス (WT マウス) と C57BL/6-neuropilin^{-/-} マウス (KLK8^{-/-} マウス) を使用した。背部皮膚を剃毛したのち、10 nM TPA を 200 μ l 塗布した。塗布前、塗布後24時間、48時間、72時間、5日、7日の皮膚を採取した。

RT-PCR：マウス皮膚から RNA を抽出し、RT-PCR を施行し、TPA 塗布後の KLK8、KLK7、KLK6 mRNA の発現変化について検討した。Real-time PCR を用いて定量的解析も行なった。

組織染色：凍結切片を 1 % サフラニン水溶液で染色後、2% KOH にて封入し、角層数を計測した。1 切片につき任意に 6 箇所選び、計測を行なった。

免疫染色：凍結切片を用いてヒト皮膚を抗 hKLK8

抗体、マウス皮膚を抗 mKLK8 抗体、抗 KLK6 抗体、抗コルネオデスモシン (CDSN) 抗体、抗デスモグレイン 1 (DSG1) 抗体を 1 次抗体として ABC 法にて行なった。

蛋白分解活性測定：マウス皮膚を 1M NaCl で 4℃、72 時間インキュベートし、表皮と真皮に分離した。表皮のみを 62.5mM Tris-HCl、2% glycerol、1% NP-40、5mM EDTA でホモジェナイズし、15000g で 20 分間遠心し、上清を蛋白分解活性の測定に用いた。基質には KLK8 の基質である Boc-Val-Pro-Arg-MCA (VPR-MCA)、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (FSR-MCA) を使用した。100mM の基質に蛋白量 10μg の抽出液を加え、37℃ で 2 時間インキュベートした。放出された AMC は吸光光度計により測定した。In situ zymography：凍結切片を 2% Tween20+Milli Q で洗浄後、BOPY-FL 標識カゼインで 37℃、2 時間反応させた。水洗後、蛍光顕微鏡下で観察した。

免疫プロット法：マウス皮膚を 56℃ の 10 mM EDTA+PBS で 5 分間加熱し、表皮と真皮に分離した。表皮のみを lysis buffer でホモジェナイズし、15000g で 20 分間遠心した。上清を表皮蛋白抽出液とした。SDS-PAGE し、転写後、抗 DSG1 抗体、抗 CDSN 抗体を 1 次抗体として反応させた。HRP 標識 2 次抗体で室温、1 時間で反応させたのち、ECL advance western blot detection kit (Amersham) により化学発光させた。

<結 果>

正常皮膚と尋常性乾癬における KLK8 の発現：免疫プロット法で、尋常性乾癬で 28kDa hKLK8 の発現が増強していた。免疫染色では、正常皮膚で顆粒層から角層下層に弱く発現し、尋常性乾癬では有棘層上層から角層に発現が増加していた。

TPA 塗布後の KLK8 発現変化と表皮の形態変化：TPA 塗布により、WT では KLK8 mRNA の発現が 48 時間をピークに 5 倍に増加した。WT と KLK8^{-/-} マウスの表皮について変化を調べたところ、TPA 塗布後の角層数は、72 時間を過ぎてから KLK8^{-/-} マウスで WT に比較して有意に肥厚した。

TPA 塗布後の KLK8 以外の KLK 発現変化：WT では KLK6、KLK7 mRNA は 24 時間をピークにそれぞれ 35 倍、2.4 倍に増加した。ところが KLK8^{-/-} マウスでは、KLK7 mRNA の有意な増加は認めず、KLK6

mRNA の増加は 4 倍にとどまった。免疫染色では KLK8 は有棘層上層から角層に強く発現し、KLK6 は顆粒層から角層に発現を認め、両者の局在は顆粒層から角層で一致した (図 1)。

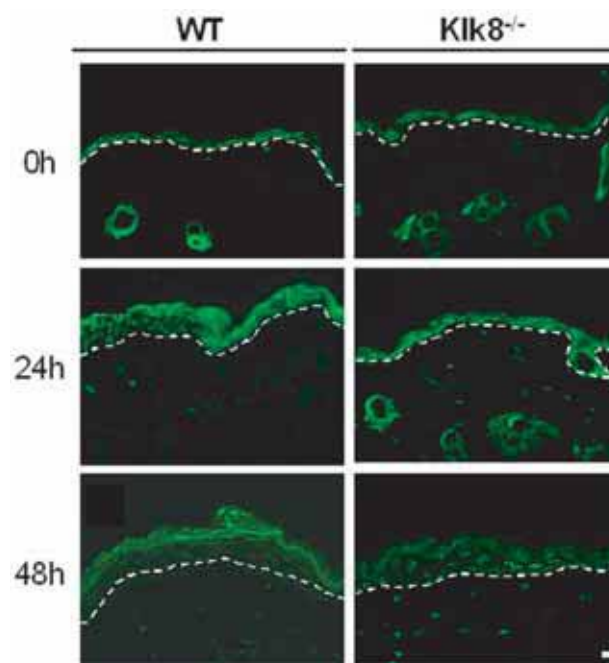


図 1 WT と KLK8^{-/-}での TPA 塗布後の KLK6 の発現。WT と KLK8^{-/-}皮膚に TPA を塗布後 24 時間と 48 時間後に KLK6 発現を観察した。WT に比べ KLK8^{-/-}皮膚では KLK6 発現が弱い。

蛋白分解活性の変化：TPA 塗布後の蛋白分解活性に差がないか検討を行なったところ、WT では VPR-MCA 分解活性が 72 時間後まで上昇した。FSR-MCA 分解活性は 48 時間をピークに上昇した。KLK8^{-/-} マウスではいずれも活性が低かった。また、活性は顆粒層から角層に認め、KLK8 と KLK6 が共局在する部位と一致した。

角層間デスモゾーム構成蛋白の変化：角層間接着分子である DSG1 と CDSN について検討した。WT では、TPA 塗布後 48 時間までに DSG1 蛋白の減少を認めたが、KLK8^{-/-} マウスでは認めなかった。また、WT では KLK8^{-/-} マウスに比較して、CDSN の 2 次分解産物である 32kDa CDSN が有意に増加した。

<考 察>

過去の報告と同様に乾癬病巣部での KLK8 の発現増加を認めた。TPA は表皮ケラチノサイトの増殖を誘導し、ターンオーバーを亢進することで乾癬類似の

表皮を形成する。TPA により WT と KLK8^{-/-} マウスともに表皮の増殖が誘導されるのを確認した。WT ではより強く増殖が誘導され、KLK8 がケラチノサイトの増殖に関わるとする過去の報告とも一致する。RT-PCR および免疫染色の結果から、KLK8 が TPA 塗布後の KLK6、KLK7 mRNA の十分な誘導に必須であり、KLK8 が有棘層で KLK6 の誘導に働いたのち、顆粒層で KLK6 を活性化することが示唆された。KLK はカスケード反応によって機能することが知られており、今回の研究でも、KLK8 は KLK6 と KLK7 にパラレルな変動を示し、カスケード中の 1 つの因子として機能する可能性が示唆された。さらに免疫染色および蛋白分解活性の検討から、KLK8 がカスケードの上流に位置して効率よく活性を上昇させ、維持する可能性が示唆された。最近、KLK カスケードが落屑において重要な役割をもつことが明らかにされた。KLK5 は KLK7 を活性化し、角層デスモゾーム構成蛋白である CDSN、DSG 1 およびデスモコリン 1 を分解する。その他、少なくとも KLK5、KLK6、KLK7、KLK8 を含む 8 つの KLK がカスケードに関連する可能性が指摘されている。TPA 塗布 72 時間以降では KLK8^{-/-} マウスの角層が有意に肥厚した。KLK8^{-/-} マウスでは、WT に比べて角層間接着分子である DSG 1 および CDSN の分解がみられなかったことから、角質細胞の脱落が遅延し、角層の肥厚が生じたと考えられる。

研究課題名「内分泌顆粒形成の基盤となるゴルジ装置 内腔の微小環境の形成・維持機構の解明」

研究代表者：渡部 剛

【研究成果の概要】

<背景と目的>

内分泌細胞において、ホルモンなどの分泌蛋白は分泌顆粒に選択的に蓄積され、細胞外からの分泌刺激に応答して適切なタイミングで細胞外に放出される。このホルモンの選別はゴルジ装置の出口であるトランスゴルジネットワーク (TGN) で行われると考えられているが、その分子細胞生物学的基盤に関しては、これまでほとんど解明されていなかった。

我々は、これまでに内分泌顆粒に特異的に輸送されるグラニン蛋白群と総称される分泌蛋白に注目し、その分泌顆粒への選択輸送機構を解析してきた。その過

程で、代表的なグラニン蛋白のひとつであるクロモグラニン A (CgA) が、分泌顆粒内でやはりグラニン蛋白のひとつであるセクレトグラニン III (SgIII) と特異的に結合することを発見した (Hosaka et al., Mol Biol Cell (2002))。さらに、CgA と SgIII の部分欠失変異体を用いた解析で、CgA の分泌顆粒への選別輸送には SgIII と結合することが必要であることを明らかにし、SgIII が CgA とペプチドホルモンの凝集塊のソーティングレセプターとしての役割を果たしている可能性を示した。しかしながら、SgIII は可溶性蛋白であり、この分子が分泌顆粒へのソーティングレセプターとして機能するためには、TGN で分泌顆粒へ輸送される膜と結合する必要がある。

そこで、本研究課題ではゴルジ装置 (特に TGN) 内腔の微小環境におけるこの SgIII と膜脂質や膜結合蛋白との相互作用の解析を中心として、同分子が分泌顆粒形成に果たす役割について検討した。

<成 果>

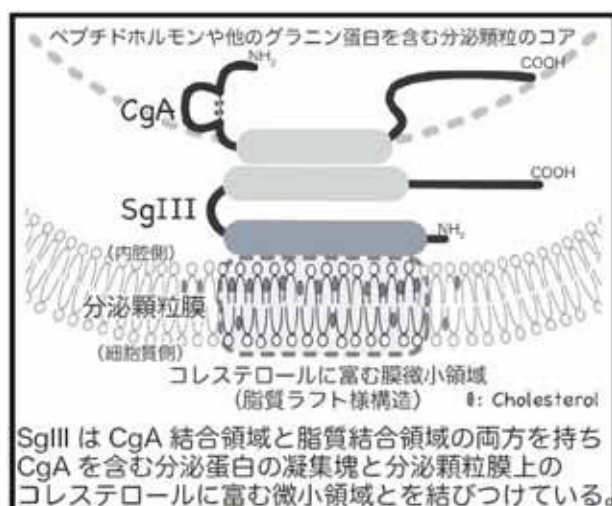
I. SgIII と膜脂質との結合特性の解析

これまでの我々の研究から、内分泌細胞内で SgIII は分泌顆粒膜近傍に集積して局在することが示されている (Sakai et al., J Histochem Cytochem (2003))。しかし、SgIII のアミノ酸配列自体には膜貫通性の疎水性領域はないため、まず SgIII と膜脂質との結合特性を、SgIII の部分アミノ酸配列を含む GST 融合蛋白とリポソームとの結合アッセイを用いて解析した。

その結果、脳から抽出された脂質や人工的に生体膜の構成脂質を混合して作製したリポソームと SgIII が特異的に結合することが明らかになり、さらに、その結合能がリポソーム中のコレステロール含量に依存して増強することが示された。この SgIII と膜脂質との結合は TGN や分泌顆粒内の微小環境を模した弱酸性 (pH5-6) 条件下で増強した。また、様々な部分欠失体を用いた解析では、膜脂質との結合ドメインは、同分子の中央に位置する CgA 結合ドメインとは異なり、アミノ末端近傍に局在した。これらの結果は、ゴルジ装置以降の細胞内膜系に豊富に存在し細胞内の様々な機能分子の足場としての役割を果たしている脂質ラフト構造に SgIII が特異的に結合することを示唆している。

さらに、単独ではリポソームと結合できない CgA が SgIII の存在下でリポソームと特異的に結合できる

ようになることから、SgIII が脂質ラフト様膜脂質領域と CgA の両者を結びつけることによって CgA を含むホルモン-グラニン蛋白複合体の分泌顆粒への選択的輸送・蓄積に寄与している可能性が示された（下図）。

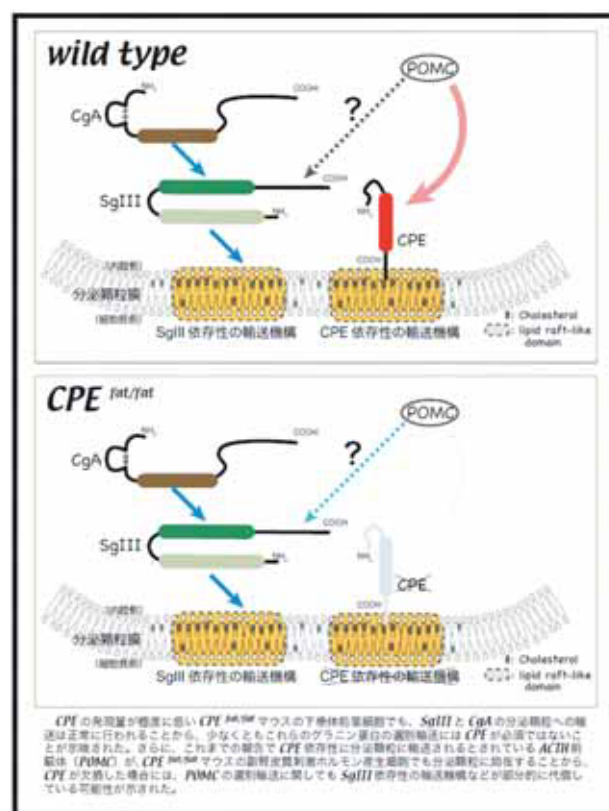


Ⅱ. CPE 依存的ホルモン選別輸送機構が欠損したミュータントマウスにおける SgIII の細胞内局在と役割
前項の研究結果から、SgIII とコレステロールに富む脂質ラフト様膜領域が特異的に結合し、ホルモンなどの分泌顆粒への選別輸送に関与する可能性が示された。しかし、我々が見いだした SgIII 依存的な輸送機構の他にも、他の研究グループからカルボキシペプチダーゼ E (CPE) がやはり脂質ラフトに結合しホルモンの選別輸送に関与しているとの報告がある。そこで、SgIII 依存的な選別輸送機構に CPE が関与しているかどうか、CPE 欠損ミュータントマウスにおける SgIII の細胞内局在やホルモン輸送過程の変化について検討した。

まず、電子顕微鏡で内分泌細胞における SgIII と CPE の局在を検討したところ、両蛋白は分泌顆粒の周辺領域で近接して局在していた。また、生化学的にも SgIII と CPE の間には特異的な蛋白質間相互作用が認められ、この結合は上述した TGN や分泌顆粒内の微小環境を模した弱酸性 (pH5.5) で高 Ca^{2+} 濃度 (10mM) の条件下で増強した。これらの所見は、この二つの分子が TGN から分泌顆粒に至る経路で協同的にホルモン選別輸送に関与している可能性を示唆している。

一方、CPE 欠損ミュータントマウスの電顕免疫組織化学観察によって CPE の有無に関わらず SgIII が分泌顆粒に正しく輸送されることが示され、SgIII の分泌顆粒への輸送には CPE は必須ではないことが示唆された。また、野生型では主として CPE 依存的な選別輸送機構で分泌顆粒に運ばれるとされていた POMC (ACTH と MSH の前駆体) が、CPE 欠損ミュータントマウス下垂体でも分泌刺激に適切に応答する分泌顆粒に輸送されていた。興味深いことに、この CPE 欠損ミュータントマウス下垂体では、SgIII の発現が野生型マウスと比べ上昇していた。

以上の結果を総合すると、正常な個体では脂質ラフト様膜領域に集積した CPE と SgIII が共同して分泌蛋白の選別輸送過程に関与し、さらに、どちらか一方が欠損した場合には、他方がその機能を補う可能性が示唆された（下図）。



＜まとめと今後の展望＞

以上の研究成果のうち、Ⅰで述べた成果の詳細は次項の論文(1)に、Ⅱで述べた成果については論文(2)に発表した。また、この研究に関連して様々な分子の細胞内局在を検討する過程で、電顕免疫組織化学用の標本

作製方法を改良し、その詳細を論文(3)に発表した。また、今回得られた成果を元に、この研究期間中に獲得した外部研究資金を本研究報告書の末尾に記載した。

さらに現在、今回の研究課題と関連して、DNA マイクロアレイ解析を用いて分泌顆粒形成過程に関与する機能分子を網羅的に探索している。この研究期間中には、視床下部-下垂体-性腺系の機能状態を人為的に変化させたラットモデルの作製とマイクロアレイ解析を進め、既に各機能状態の下垂体・副腎における遺伝子発現の大局的解析をほぼ完了した（平成18年3月・日本解剖学会総会で報告）。今後は、個々の遺伝子の発現変化パターンを詳細に解析し、電顕免疫組織化学法による局在解析を組み合わせ、分泌顆粒形成において重要な役割を果たす分子の絞り込みを進めていく予定である。

研究成果（原著論文）

- (1) Hosaka M, Suda M, Sakai Y, Izumi T, Watanabe T, Takeuchi T: Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem* 279:3627-3634 (2004)
- (2) Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T: Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J Cell Sci* 118: 4785-4795 (2005),
- (3) Sakai Y, Hosaka M, Hira Y, Watanabe T: Addition of phosphotungstic acid to ethanol for dehydration improves both the ultrastructure and antigenicity of pituitary tissue embedded in LR White acrylic resin. *Arch Histol Cytol* 68:337-347 (2005)

研究課題名「細胞内 Ca^{2+} 動態に関与する TRP 陽イオンチャネルの同定とクローニング」

研究代表者：高井 章

【研究成果の概要】

本研究の対象は、副交感神経刺激に応じて収縮する平滑筋や分泌を起す腺細胞などの効果器に存在し、ムスカリン受容体刺激に伴い開口するイオン選択性の低い陽イオンチャネル（non-selective cation channel；NSCC と略す）であった。開口した NSCC は、消化管平滑筋やある種の腺細胞の場合のように脱分極を介して間接的に電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口を誘発し

たり、また毛様体筋の場合のようにそれ自身が直接に Ca^{2+} 流入経路を形成するなど、ムスカリン受容体を介する信号伝達の上で非常に重要な役割を演ずる（図1）。しかし、その分子実体についてはほとんど不明である。

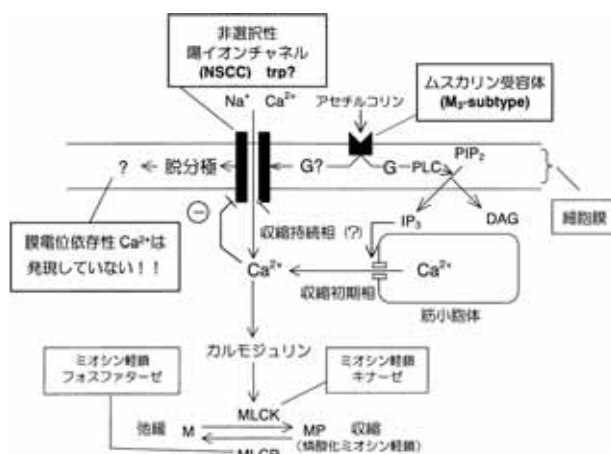


図1 副交感刺激による平滑筋収縮
（予想図：毛様体筋の場合）

この点に関し、近年、もともとショウジョウバエ複眼における光受容メカニズムの研究過程で発見されたTRP陽イオンチャネルの類似体が哺乳動物でも続々と発見され、それらが単独または複合体としてさまざまな受容体作動性NSCCを形成する可能性が注目されている。

そこで、今回の研究でわれわれは実験動物（ウシ、ブタおよびモルモット）の毛様体筋、消化管平滑筋、唾液腺など副交感神経支配下の組織におけるTRPチャネル（特にそのTRPCタイプ）の発現をまずRT-PCR法を用いて調べた。その結果、これらの組織に複数のTRPC mRNAが存在することを確認し、その全cDNA配列を決定した。さらに配列から予想される細胞内外ドメインの特定アミノ酸配列を認識する各種抗体を作成し、それを用いた蛍光免疫染色法による実験によって、RT-PCRで検出されたTRPCがウシ毛様体筋細胞において実際に膜蛋白として発現していることを確認した（図2）。これらの成果の一部は、すでに学術誌に発表している（Takai *et al.* 2004；Sugawara *et al.* 2006）。

現在、さらに、ウシ毛様体筋の単離細胞における全細胞膜電位固定法による実験を行い、上記の抗TRPC

TRPC4

MR₃

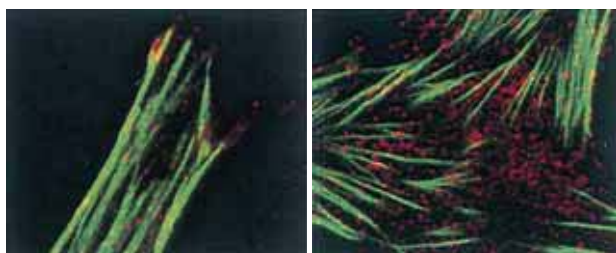


図2 ウシ毛様体筋細胞 semi-intact 平面膜標本において TRPC4、M₃ 型ムスカリン受容体 (MR₃) および平滑筋 α -アクチンをそれぞれに特異的な抗体を用いて蛍光染色した。 α -アクチン (緑、疑似カラー) の存在する領域に TRPC4 (左、赤) と MR₃ (右、赤) の染色が確認できる (Sugawara *et al.* 2006 より)。

抗体の細胞内灌流や RNAi による TRPC のノックダウンがムスカリン受容体刺激で誘発される NSCC 電流に与える影響を検討中である。また、同様の処理が fluo-4 蛍光法により観察される細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に与える影響も並行して調べている。まだ、いくつか確認すべき課題は残っているが、すでに複数の TRPC が毛様体筋のムスカリン受容体刺激に伴う持続的収縮に必要な細胞外からの Ca^{2+} イオンの流入経路としての NSCC の本体の一部をなしているという仮説を支持するいくつかの有力なデータを得ている (投稿準備中)。

本プロジェクトの期間中において、ムスカリン受容体から NSCC への信号の流れについても並行して研究を進めてきた。以前の研究により毛様体筋の収縮調節にかかわるムスカリン受容体は M₃ サブタイプに属することを確かめているので、G_{q/11} タイプの GTP 結合蛋白 (G 蛋白) と共役した信号の流れが予想される。そこで、最近 G_{q/11} を特異的に不活性化作用を持つことが報告され細菌由来の depsipeptide の一種 YM-254890 の、収縮、膜電流、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度に対する影響を調べた。その結果、ウシ毛様体筋においては、予想通りムスカリン受容体から NSCC への信号の流れにおいて G_{q/11} が決定的に重要な仲介の役割を演じていることを強く示唆するデータを得ている (投稿準備中)。

<既刊論文>

1. Sugawara R, Takai Y, Miyazu M, Ohinata H, Yoshida A & Takai A (2006). Agonist and antagonist sensitivity

of non-selective cation channel currents evoked by muscarinic receptor stimulation in bovine ciliary muscle cells. *Autonom & Autacoid Pharmacol* **26**, 285-292

2. Takai Y, Sugawara R, Ohinata H & Takai A (2004). Two types of non-selective cation channel opened by muscarinic stimulation with carbachol in bovine ciliary muscle cells. *J Physiol (London)* **559**, 899-922.

研究課題名「細胞内恒常性機能維持のための研究：嗅細胞機能維持に関わる電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと TRP チャンネル」

研究代表者：柏柳 誠

【研究成果の概要】

<研究目的>

細胞機能を制御する Ca^{2+} の細胞内動態異常は、様々の重篤な病態の発症 (発癌、角化異常、細胞分化異常、神経および感覚器官障害、精神症状・行動異常など) との関連が最近指摘されている。本講座は、嗅細胞には cADP リボースと IP₃ で開口するトランスダクションチャンネルが細胞膜に存在し¹⁾、その機能が細胞内 Ca^{2+} により制御されることを見いだしたがその分子の実態は不明である。そこで、 Ca^{2+} が関係する感覚障害の発生要因を知る基礎的な知見を得るために、トランスダクションチャンネルの分子の実態を明らかにするとともにその機能調節における電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが感覚応答に及ぼす影響を明らかにする。

<研究成果>

1. 嗅細胞におけるトランスダクションチャンネルの遺伝子の検索

ショウジョウバエの視覚異常ミュータントからクローニングされた TRP チャンネルは30種類以上のチャンネルが見いだされており、味覚、聴覚などの感覚受容に関与していることが報告されている。そこで、マウス嗅上皮に発現している TRP チャンネルについて、RT-PCR 法により検索したところ、何種類かの TRP チャンネル遺伝子が嗅上皮に存在することを見いだした。トランスダクションチャンネルとして機能する可能性の高いものについて、in situ hybridization 法により解析したところ、図1のように、少なくとも8種類の TRP チャンネルが嗅細胞に発現していることを確認した。TRPV2 に対して強い発現がみられたために、さ

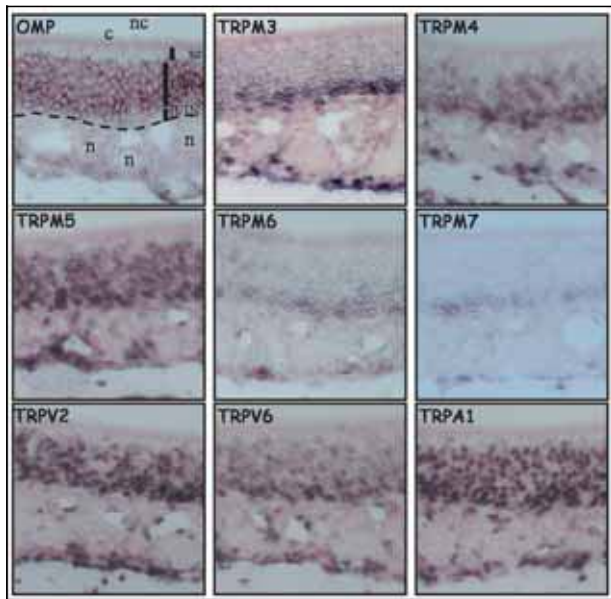


図1 マウス嗅上皮における TRP チャンネルの発現

らに、解析を進めたところ、TRPV2 のチャンネル蛋白質は、細胞体には発現しておらず神経軸索に発現していることを見いだした。嗅細胞は、神経細胞でありながら30日の周期で脱落新生を繰り返すユニークな特性を持っている。新生した嗅細胞は、一次中枢である嗅球へ軸索を伸展する。その際に、神経成長因子 IGF が関与している可能性が報告されている。TRPV2 の発現は、IGF 受容体の発現と良く対応していた。IGF で嗅細胞を刺激したところ、細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加がみられたことから、TRPV2 は、トランスダクションチャンネルとして機能するよりも、神経軸索の伸展に関与している可能性が考えられる²⁾。

2. 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルサブユニット欠損マウスを使用した電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞内 Ca^{2+} 濃度調節の感覚応答に及ぼす影響

順応は、感覚機能における重要な現象であるがその分子的機構は不明な点が多い。匂い応答の嗅覚系における順応には、セカンドメッセンジャー作動性チャンネルである cAMP 作動性チャンネルと IP_3 作動性チャンネルの細胞内 Ca^{2+} により閉鎖が一つの機構として考えられている^{3,4)}。一方、嗅細胞には電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの存在が報告され、受容器電位の形成と神経伝達物質の放出に関与することが予想されていた。我々は、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの β_3 欠損マウスを用いて、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して流入した Ca^{2+} の順応に対する関与に注目するという新たな視点で解析を

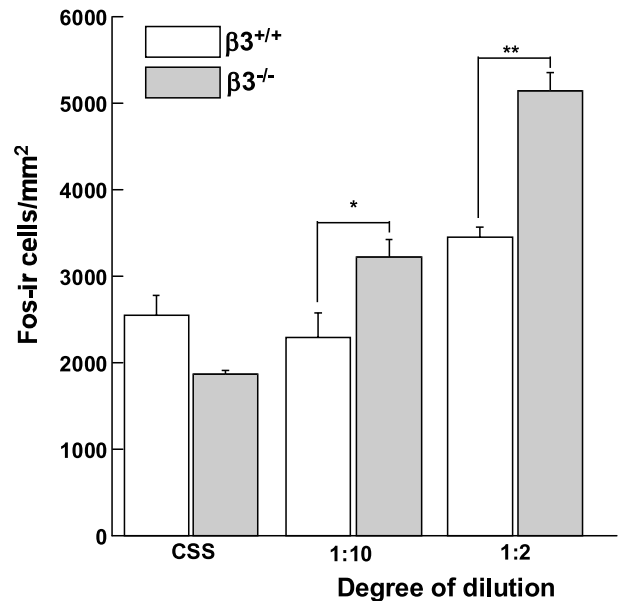


図2 β_3 欠損マウス嗅球僧帽細胞における匂い刺激により引き起こされる Fos 陽性細胞の発現増加

行った。 β_3 欠損マウスでは、電気刺激により活性化される Ca^{2+} 電流の抑制がみられたので、 β_3 欠損マウスでは電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの機能が低下していることが示された。末梢レベルでの匂い応答を記録したところ、 β_3 欠損マウスでは野生型マウスと比べて強い応答がみられた。さらに、一次中枢における匂い応答を神経興奮の指標となる Fos 蛋白質の発現を免疫組織化学的に解析したところ、一次中枢レベルでも β_3 欠損マウスの方が野生型マウスよりも強く匂いに対して応答することが示された。この結果は、従来、興奮性に作用すると考えられていた電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが、匂い応答の形成に関しては、むしろ順応という抑制的な関与をしていることが示唆された⁵⁾。

<文 献>

- 1) M. Kashiwayanagi, K. Tatani, S. Shuto, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate and adenophostin analogues induce responses in turtle olfactory sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12, 606-612, 2000.
- 2) 神山直也, 松井等, 柏柳誠. マウス嗅上皮に発現する TRP チャンネル. 日本味と匂学会誌 13, 559-560, 2006.
- 3) T. Nakamura, K. Tsuru, and S. Miyamoto. Regulation of Ca^{2+} concentration by second messengers in newt olfactory receptor cell. *Neurosci. Lett.* 171, 197-200, 1994.

- 4) M. Kashiwayanagi. Dialysis of inositol 1,4,5-trisphosphate induces inward currents and Ca^{2+} uptake in frog olfactory receptor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 666-671, 1996.
- 5) T. Shiraiwa, M. Kashiwayanagi, T. Iijima et al. Involvement of the calcium channel $\beta 3$ subunit in olfactory signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, in press.

研究課題名「細胞内 Ca^{2+} 動態制御による細胞高次機能維持とその異常による病態の分子基盤」

研究代表者：鈴木 裕

【研究成果の概要】

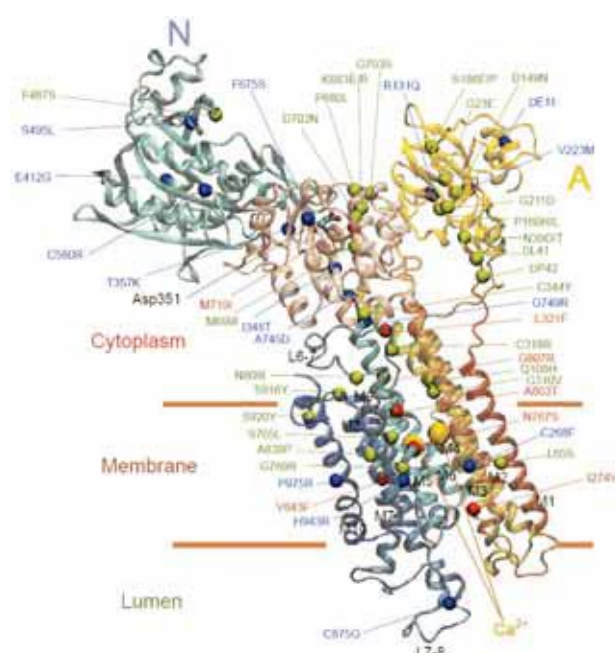
<背景と目的>

P型カチオン輸送ATPaseの代表的メンバーである小胞体膜 Ca^{2+} ポンプは、ATP加水分解に共役して Ca^{2+} を数千倍の濃度勾配に逆らい小胞内腔に汲み上げ、細胞の Ca^{2+} 動態と機能を制御する。ATP加水分解過程では自己リン酸化中間体を形成する。本研究プロジェクトではどのような仕組みでATP分解と Ca^{2+} 輸送のエネルギー共役がなされているか、そのためにどの構造領域と残基がどのような機能を担っているかを解明すること、また本蛋白質の原子レベルの結晶構造を明らかにするために各反応中間体を固定化し結晶構造解析を可能とする安定な中間体構造類似体を開発することを目的とした。さらに本蛋白質の遺伝子異常による病態発症について蛋白分子レベルから異常を解明することを目的とした。他方、 Ca^{2+} ポンプと同じファミリーに属するゴルジ装置 $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$ ポンプについても同様の目的で解析を進めた。

<結果と考察>

その結果、小胞体 Ca^{2+} ポンプの細胞質の3つのドメイン(N, P, A)が Ca^{2+} 輸送過程で4種の顕著に異なる集合状態を変化すること、輸送部位を形成する膜貫通ヘリックスの配向性がこの細胞質ドメイン集合状態変化により変化して Ca^{2+} の輸送部位への閉塞と内腔への放出を引き起こすことを明らかにし、 Ca^{2+} 輸送におけるその意義を解明しエネルギー共役の本質を提示した。さらに細胞質3ドメインの集合状態変化、すなわち動きと集合に必須な構造因子を残基レベルで明らかにしそれぞれの機能の具体を解明した。また自

己リン酸化中間体の種々の安定な構造アナログを開発して結晶構造解析に供し、さらにこれらアナログの構造特性解明と反応過程への帰属により、触媒部位と Ca^{2+} 放出路の協調した動きがいかに内腔への Ca^{2+} 放出と内腔 Ca^{2+} の輸送部位へのアクセス(すなわち細胞質への漏れ出し)を制御するかを明らかとした。他方、小胞体 Ca^{2+} ポンプ遺伝子異常によるダリー病について、残基置換および削除を引き起こす遺伝子変異としてこれまで報告されたほとんど全ての変異、すなわち51家系のそれぞれの変異が一体どのような異常を Ca^{2+} ポンプ蛋白に引き起こすかを解析した(挿入図には、51の変異を Ca^{2+} ポンプ結晶構造上に示した)。その結果、変異に依存して異なる内容のポンプ分子蛋白の発現と機能における異常が誘起し発症原因となることを明らかにした。そしてそれぞれの異常がどのような細胞 Ca^{2+} 動態異常を引き起こすかを分子レベルから示し、本病態発症機序理解の基礎を与えた。特に、本学病院で発見したダリー病の3家系のそれぞれの変異についての詳細な解析により、細胞質 Ca^{2+} レベルと輸送速度のごく僅かな異常が病態を引き起こすことを明らかにした点、および小胞体内腔の異常な高 Ca^{2+} レベルの設定とダリー病にしばしば伴う精神疾患との関連を指摘した点は特筆に価する。他方、ゴルジ装置 $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$ ポンプは、皮膚基底層に特異的に発現・局在していることを発見し、siRNAによるノックアウト実験により本ポンプが角化細胞の分化制御に



必須な機能を担うことを明らかにした。これにより $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$ ポンプ遺伝子異常による病態発症の理解のための分子基盤を確立した。なお、これらの成果はすべて本分野の代表的国際誌に発表した。主な論文を下記に示した (1-7)。

<文 献>

- 1) Y. Miyauchi, T. Daiho, K. Yamasaki, H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Danko, H. Suzuki, and H. Iizuka; Comprehensive Analysis of Expression and Function of Fifty-one Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Mutants Associated with Darier Disease; *J. Biol. Chem.* Vol.281 (32), 22882-22895, 2006
- 2) M. Yoshida, K. Yamasaki, T. Daiho, H. Iizuka, and H. Suzuki; ATP2C1 is specifically localized in the basal layer of normal epidermis and its depletion triggers keratinocyte differentiation; *J. Dermatol. Sci.* Vol.43 (1), 21-33, 2006
- 3) G. Wang, K. Yamasaki, T. Daiho, and H. Suzuki; Critical hydrophobic interactions between Phosphorylation- and Actuator-domains of Ca^{2+} -ATPase for hydrolysis of Phosphorylated Intermediate; *J. Biol. Chem.* Vol.280 (28), 26508-26516, 2005
- 4) K. Yamasaki, T. Daiho, S. Danko, and H. Suzuki; Multiple and distinct effects of mutations of Tyr¹²², Glu¹²³, Arg³²⁴, and Arg³³⁴ involved in interactions between the top part of second and fourth transmembrane helices in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; *J. Biol. Chem.* Vol.279 (3), 2202-2210, 2004
- 5) S. Danko, K. Yamasaki, T. Daiho, and H. Suzuki; Distinct natures of beryllium fluoride-bound, aluminum fluoride-bound, and magnesium fluoride-bound stable analogues of an ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; *J. Biol. Chem.* Vol.279 (15), 14991-14998, 2004
- 6) K. Sato, K. Yamasaki, T. Daiho, Y. Miyauchi, H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakamura, H. Iizuka and H. Suzuki; Distinct types of abnormality in kinetic properties of three Darier disease-causing sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2b) mutants, that exhibit normal expression and high Ca^{2+} transport activity; *J. Biol. Chem.* Vol.279 (34), 35595-35603, 2004
- 7) (総説論文) H. Suzuki; Changes in Cytoplasmic

Domain Organization and Energy Transduction in Calcium Pump; 生物物理, Vol.45 (1), 16-21, 2005

研究課題名「眼科領域におけるチャネルパシーへの分子細胞学的研究法導入」

研究代表者：吉田 晃敏

【研究成果の概要】

本研究では、チャネル遺伝子変異を伴う視細胞機能障害の発症メカニズムを、当該遺伝子の人為的発現や特異的ノックダウンの技法を応用して分子レベルで検討するための培養細胞実験系を確立することを目指して実験を進めてきた。特に、ヒト網膜細胞腫培養細胞系を利用することにより、直接に臨床的な研究にも応用できるような実験系となるよう努めた。また、疾患と遺伝子異常との因果関係が確認されている先天性停止性夜盲症をモデルケースとして、新しい実験系の有用性を検討している。

実験としては、まず、ヒト網膜芽細胞腫 (Y 79株、WERI-Rb-1 株) において nystatin 法による全細胞電位固定実験を行い、 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} にイオン選択性を示すいくつかのチャネルを同定した。また、グルタミン酸など代表的な神経伝達物質の投与によって開口する非選択性陽イオンチャネルの存在を示唆するデータも得られている (投稿準備中)。

生理学の高井教授のグループ (本プロジェクトで「細胞内 Ca^{2+} 動態に關与する TRP 陽イオンチャネルの同定とクローニング」のテーマを担当) と共同で、網膜芽細胞腫細胞における各種イオンチャネルの発現を mRNA レベル、タンパク質レベルで検討した。その結果、CNGA3, CNGB3, CNAT2 などの陽イオンチャネルのほか、毛様体筋など同定された数種の TRPC チャネルのいくつかは網膜芽細胞腫にも存在することが確かめられた¹。

先天性停止性夜盲症における遺伝子変異が報告されている L 型 Ca^{2+} チャネル α_1 -サブユニットの網膜アイソフォーム遺伝子 (CACNA1F) や α_2 -, β_1 -, β_2 -, γ - および δ -サブユニットが、ヒト網膜芽細胞腫培養細胞 (Y79 株および WERI-Rb-1 株) で発現しているか否かについての検討をおこなってきた。しかし、今のところ、CACNA1F と同一の遺伝子の発現は確かめられていない。

そこで、まず正常 CACNA1F (約 6 kbp) の発現ベクトルを作成し、網膜芽細胞腫、HEK293 細胞、CHO 細胞に導入して発現させる系を確立した。また、先天性停止性夜盲症例で報告されているのと同じ位置に人為的配列変異を導入したベクトルも作成し、同様の培養細胞系で発現させることに成功した (図 1)。現在、これらの人為的発現系を用いて全細胞電位固定法で配列変異のチャネル活性への影響を調べる実験を進めている。

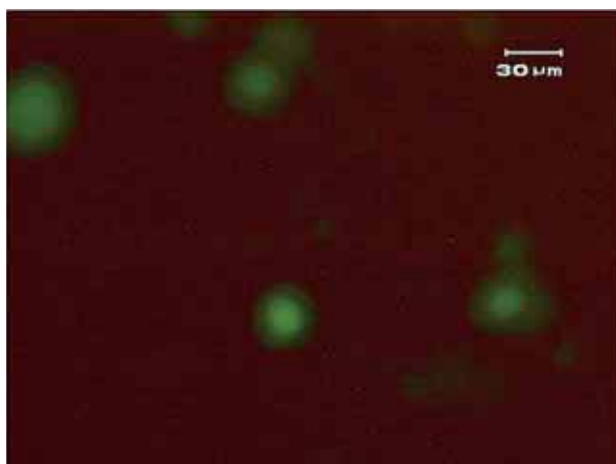


図 1 HEK293 細胞における CACNA1F 遺伝子の人為的発現。CACNA1F の ORF の全長を pLP-IRES-EGFP ベクター (Clontech) にサブクローニングし HEK293 細胞に発現させた。目的遺伝子の発現が EGFP の緑色の蛍光により確認できる。

今後、この先天性停止性夜盲症などをモデルケースとして研究をさらに進め、一般的な応用に適用範囲を広げてゆきたい。

<既刊論文>

1. Sugawara R, Takai Y, Miyazu M, Ohinata H, Yoshida A & Takai A (2006). Agonist and antagonist sensitivity of non-selective cation channel currents evoked by muscarinic receptor stimulation in bovine ciliary muscle cells. *Autonom & Autacoid Pharmacol* **26**, 285-292.

研究課題名「ユビキチン・プロテアソーム (USP) による Numb 分解の解析」

研究代表者：伊藤 喜久

【研究成果の概要】

<研究目的>

細胞内蛋白質は合成・修飾・分解のバランスよりその機能が制御され、細胞内恒常性機能を維持している。細胞内蛋白質分解機構としてリソソーム系とユビキチン・プロテアソームシステム (USP) の二つが存在する。UPS は E1, E2, E3 によるタンパク質のユビキチン化、26S プロテアソームによる分解という一連の酵素反応により蛋白質を分解するシステムであり、ユビキチンは再利用される。

Numb は神経系細胞内で非対称分配され神経系の発生過程を制御する蛋白質の一つであり、Notch シグナル (側方抑制シグナル) を負に制御するアダプター蛋白として機能する分子として解析されてきた。Numb 蛋白質には、機能的モチーフとして N 末端に phosphotyrosine binding (PTB) ドメイン、中央部に poly Proline region (PPR)、C 末端に DPF・NPF 等が存在する。DPF・NPF モチーフには α -アダプチンなどエンドサイトシスに関与する分子が結合する。PTB ドメインと分子中央部をコードする mRNA 領域の違いによる 4 種類のスプライシングバリエーションが報告されており、分子量の異なるアイソフォーム (p65, p66, p71, p72) が確認されている。

本研究では、USP による Numb の分解に関連した機能を解析することにより、タンパク質分解が恒常性機能維持・制御に果たす役割を検討した。

<研究方法>

1. 各種タグを付加した野生型・欠失変異型 Numb タンパク発現プラスミドを作製した。
2. 培養細胞内へ発現プラスミドをトランスフェクションして蛋白質を強制発現させ、その機能を解析した。安定発現細胞株を作製して一部の解析に用いた。培養系に各種薬剤を添加し、その効果を検討した。
3. 転写活性化能は、GAL4-ルシフェラーゼシステムにて測定した。
4. 細胞内タンパク質を可溶化・回収し、ウエスタンブロット法により蛋白質の発現量を解析した。一部で免疫共沈法により蛋白質間の結合を解析した。

5. 抗タグ抗体を用いた免疫染色を行い、蛍光顕微鏡により蛋白質の細胞内局在を検討した。

<研究結果>

1. UPS により制御される Numb の転写活性化能

GAL-4 システムにより Numb の転写活性化能を測定した。野生型（全長）では活性が認められなかったが、PPR を含む領域に転写活性化能が認められた。以上の結果から Numb N 末領域には転写活性化能を抑制する領域があると推測され、この領域の GAL4-VPI6TAD（他の転写活性化ドメイン）に対する影響を検討した。N 末領域を構成する N 末端 25 アミノ酸領域、PTB ドメインはそれぞれ独立して GAL4-VPI6TAD による転写活性化を抑制した。N 末端 25 アミノ酸領域内のリジン残基をアルギニン残基に置換した場合には抑制能に変化は認められなかったが、グルタミンに置換した場合は抑制能が低下した。

転写活性化に関与するコアクチベーターとして p300・PCAF 等の因子が知られている。免疫共沈法により Numb と p300・PCAF との結合を解析した結果、転写活性化能がある N 末+PTB 欠失変異型は p300 と結合することが確認された。

転写活性化能が認められない野生型（全長）の活性を誘導する薬剤を検索した。その結果、プロテアソームインヒビターである MG132 とラクタシスチンが転写活性化能を誘導した。以上の結果から Numb の転写活性化能は UPS により制御されると考えられ、今後 Numb が誘導する遺伝子（群）の検索と転写活性化に関与する細胞内情報伝達系の解析が必要と考えられる。

2. プロテアソームインヒビターによる Numb の細胞質内凝集

パーキンソン病におけるレビー小体のように、種々の疾患で細胞内蛋白質分解能が低下した結果、分解されない蛋白質が増加し可溶性の低い蛋白は凝集・沈殿を起こす現象が知られている。

Enhanced green fluorescence protein (EGFP) を付加した Numb 蛋白質（全長、PTB 欠失、C 末欠失、N 末+PTB 欠失）を細胞内に発現させ、プロテアソームインヒビターによる凝集傾向を解析した。

PC12, COS7, 293 細胞を用いた一過性発現系において、未添加の場合はいずれの蛋白質も凝集傾向は認められなかったが、MG132 あるいはラクタシスチンを培養系に添加した場合、PTB 欠失、N 末+PTB 欠失

変異体が核近傍の細胞質に凝集する傾向を認めた。全長、C 末欠失変異体は、添加時でも凝集傾向を認めなかった。

次に EGFP-Numb を安定発現する 293 細胞株を作製して解析を行った。一過性発現系の場合と同様に、MG132 あるいはラクタシスチンによる PTB 欠失、N 末+PTB 欠失変異体の凝集傾向を認めた。（下図は PTB 欠失 Numb を安定発現する 293 細胞株に、MG132 未添加、添加した場合の蛍光抗体による染色像である。MG132 添加時における矢印が凝集を示す。）

凝集傾向のある蛋白質は、凝集化することにより可溶性が変化する。安定発現細胞株を用いて、凝集時における Numb の可溶性（1% TritonX 可溶化/非可溶化）を検討した。凝集傾向を示す Numb 変異体は、MG132 添加により 1% TritonX 非可溶化となる傾向が認められた。

ポリグルタミンを含む蛋白質の凝集・沈殿には、微小管による細胞内輸送が重要な役割を果たすことが知られている。Numb 変異体の凝集における微小管の役割を検討した。重合を抑制するノコダゾールを培養系に添加することにより、Numb 変異体の凝集は抑制された。

以上の結果から Numb は UPS により制御される凝集傾向のある蛋白質であると結論できる。

<まとめと展望>

インヒビターを用いた検討により、ユビキチン・プロテアソームシステムが Numb の機能（転写活性化・細胞内凝集）を制御することを示した。Numb は形質膜直下から初期エンドソームにかけて局在し、エンドサイトーシスに関与すると報告されている。Numb を介したユビキチン・プロテアソームシステムとエンドサイトーシスとの関連に興味を持たれ、これを解析することで蛋白質分解の全体像が理解できるのではないかと考えている。

