

細胞外 GABA による大脳皮質 GABA 作動性神経細胞の多方向性移動の制御

稲田浩之¹, 渡部美穂², 内田 琢³, 福田敦夫², 柳川右千夫⁴, 鍋倉淳一¹

(¹生理研・発達生理・生体恒常, ²浜松医大・医・神経生理, ³福岡大・医・小児, ⁴群馬大・医・遺伝発達行動)

大脳皮質では胎生期から生後初期にかけてニューロン新生や細胞移動, プロセスの伸長, シナプス形成などの回路形成が進行する。抑制性の神経伝達物質として知られる GABA は, この発達期において興奮性あるいは脱分極性に働くことが知られており, 神経回路の形成過程に寄与すると考えられている。今回我々は, 大脳皮質の抑制性神経細胞の移動に着目し, 生体内での GABA の役割について 2 光子顕微鏡を用いて検討した。

大脳皮質抑制性神経細胞は胎生期に終脳腹側の基底核原基で分裂・産生される。分裂した細胞は脳表に対して接線方向の移動し皮質に到達することが知られており, この移動様式は tangential migration と呼ばれている。抑制性神経細胞が皮質内に配置される過程を生体内で観察するために幼若期マウスの *in vivo* イメージング法を独自に開発した。また, 抑制性神経細胞を選択的に蛍光標識するために GAD67-GFP ノックインマウスと VGAT-Venus トランスジェニックマウスを使用した。

過去の報告から GAD67-GFP マウスは幼若期の大脳皮質 GABA 含有量が野生型に比べて低いことが明らかにされている [1]。今回我々は生後 0 日齢において VGAT-Venus マウスの大脳皮質 GABA 含有量が GAD67-GFP マウスよりも有意に高いことを, HPLC 法を用いて明らかにした。この結果をもとに, これら 2 系統の遺伝子改変マウスにおける移動様式を比較することで大脳皮質抑制性神経細胞の tangential migration に対する GABA の役割を検証した。生後 0~3 日齢のそれぞれの動物から *in vivo* タイムラプスイメージングを行い辺縁帯における移動様式を解析したところ, どちらの系統も共通して多方向性の移動を示した。その一方で移動速度には有意な差が認められた (VGAT-Venus > GAD67-GFP)。また薬理学的手法を用いて *in vivo* で GABA_A 受容体の阻害剤である SR95531 を投与すると, 細胞の移動速度は有意に減少した。これらの結果から細胞外の GABA が多方向性移動を正に制御している可能性が考えられた。そのメカニズムを検討するために, スライス標本を作製して移動中の細胞にグラミシジン穿孔パッチクランプ法を適用し Cl⁻ の平

衡電位を調べたところ, GABA が脱分極性に作用することを発見した。さらに Cl⁻ トランスポーターである NKCC1 の機能を薬理的に阻害し Cl⁻ の平衡電位を過分極側にシフトさせたところ, 移動速度は減少した。

以上の結果から GABA_A 受容体の活性化は膜の脱分極を誘導することで抑制性神経細胞の多方向性移動を制御していることが示唆された [2]。今回の研究から, 発達期の GABA の興奮性作用は生体内においても神経回路形成の制御に関与していると考えられる。

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Tamamaki N et al: J Comp Neurol **467** (1): 60-79, 2003
2. Inada H et al: PLoS One **6** (12): e27048, 2011

抑制性シナプス形成におけるシナプス形態の変化と機能分子の動態

栗生俊彦¹, 柳川右千夫², 小西史朗¹

(¹徳島文理大学香川薬学部・薬理学, ²群馬大学医学研究科・遺伝発達行動学)

中枢神経系の興奮性シナプスは, シナプス前部の varicosity とシナプス後部の spine との接触部位に形成される。Spine は, 発生および活動に依存してその形態を変化し, 活動依存性の形態変化は興奮性シナプスの長期増強を支える基質の一つとなっていることが提唱されている。しかしながら, 抑制性シナプスの形態変化については, これまでほとんど明らかにされていない。そこで, 抑制性シナプスの形態変化を観察するために, 抑制性シナプス前部および後部を蛍光蛋白質によって可視化し, time-lapse imaging を試みた。Vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus トランスジェニックマウスの海馬神経細胞を分散培養すると, Venus 蛍光シグナルは抑制性神経細胞に特異的に発現しており, その軸索および varicosity の Venus 蛍光シグナルによって, 抑制性シナプス前部の形態を可視化することができた。一方, 抑制性シナプス後部の足場蛋白質である gephyrin に蛍光蛋白質 mCherry をつないだ遺伝子をアデノウイルスにより培養海馬ニューロンに導入発現させると, 抑制性シナプス後部に局在した mCherry-gephyrin 分子の集積が見られた。このように遺伝子改変マウスを用いる抑制性シナプス前部 varicosity の標識と mCherry-gephyrin による抑制性シナプス後部の標識を組み合わせることで, 抑制性シナプス前部および後部をコンフォーカル顕微鏡により同時に可視化することが可能となっ

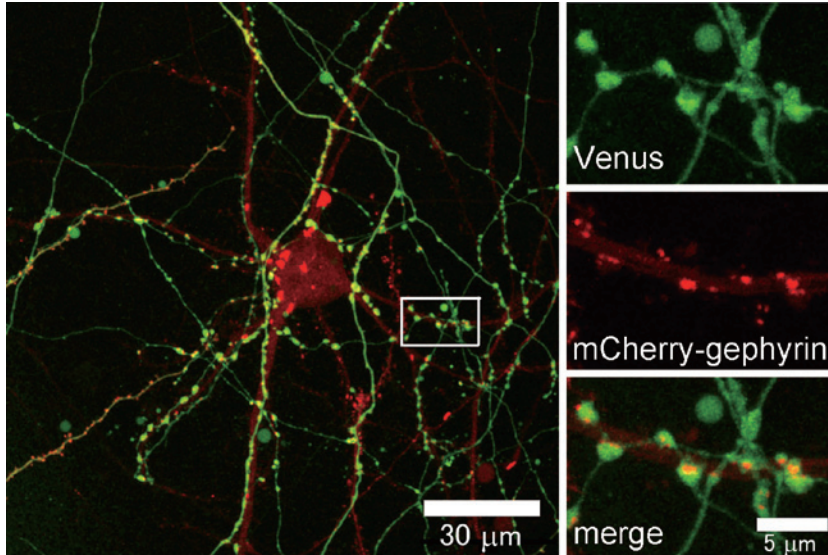


図1. 抑制性シナプス前・後部の可視化. VGAT-Venus トランスジェニックマウスから分散培養された海馬神経細胞にアデノウイルスを用いて, mCherry-gephyrin 遺伝子を導入・発現させた. 緑は抑制性神経細胞由来の軸策で, 赤は興奮性神経細胞に発現した mCherry-gephyrin. 軸策と樹状突起が接している箇所, Venus-positive varicosity と mCherry-gephyrin cluster が共局在している.

た(図1). 培養の各ステージで time-lapse imaging を行ったところ, 培養初期 (9-11DIV) では, 形成された抑制性シナプス前・後部が顕著な形態変化していることが明らかになった. 培養後期 (16-25DIV) ではこれらの形態変化は安定化された. シナプス形態の安定化が急速に進む時期とシナプス密度が増加する時期はよく一致しており, その時期 (12-14DIV) に長時間の time-lapse imaging を行ったところ, 特徴的な形態変化 (シナプスの融合, 分裂, 移動) が観察された. これらの結果は, 抑制性シナプスが培養初期からシナプス形成が活発な時期にかけて, 顕著な形態変化をしながら, 融合・分裂・移動を繰り返して, その配置や密度を調節することを示唆している [1]. 本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない.

1. Kuriu T et al: Mol Cell Neurosci **49** (2): 184-195, 2012

抑制性シナプスにおける GABA・グリシン放出のダイナミックな制御

石橋 仁, 山口純弥, 中畑義久, 鍋倉淳一 (生理学研究所・生体恒常機能発達機構研究部門)

抑制性シナプス前終末部から GABA とグリシ

ンが共放出されていることは Peter Jonas らが 1998 年に初めて幼弱ラットの脊髄で報告したが, その後, 脊髄だけでなく脳幹や小脳でも報告されてきた. 我々は, 脳幹の聴覚伝達経路に存在する台形体内側核 (MNTB) から外側上オリブ核 (LSO) への投射を担う神経伝達物質が, 幼若期には GABA であり, 成熟するとグリシンへと変化することを報告した [1]. また, グリシンをメインに放出していた抑制性神経終末部が, 神経障害後に GABA 伝達を行うようになることなども報告されている [2]. しかし, GABA とグリシンを共放出するシナプスにおいて, それぞれの伝達物質放出がどのように制御されているかはほとんど未解明のままである. そこで本研究では, GABA・グリシンの共放出シナプスにおいて, シナプス小胞内の GABA とグリシンの量を制御する機序を明らかにすることを目的に研究を開始した. 実験は主としてラット脊髄から分散培養した標本を用い, シナプス前ニューロンと後ニューロンの両者にパッチクランプ法を適用することにより, シナプス前ニューロンの刺激により惹起される抑制性シナプス後電流 (IPSC) の解析を行った.

検討を行った大部分の抑制性シナプスは, GABA とグリシンの両伝達物質を放出していた.

通常の0.1Hzで刺激を行った場合、GABAとグリシンの割合は1時間以上にわたって変化しなかったが、シナプス前ニューロン内にパッチ電極からGABAまたはグルタミン酸を投与すると、抑制性伝達を担うGABA成分が著明に増加した。シナプス前ニューロン内にグリシンを投与した場合は、グリシン伝達が優位になったことから、抑制性伝達を担う伝達物質は、細胞質の抑制性および興奮性伝達物質の濃度に依存することがわかった。また、約60%の抑制性ニューロンは、興奮性アミノ酸運搬体を発現していたので、細胞外からグルタミン酸を投与したところ、抑制性シナプス伝達を担うGABA成分は増加し、グリシン成分は減少した。このとき、GABA_A受容体とグリシン受容体の低親和性アンタゴニストを用いた解析から、シナプス小胞内のGABA濃度は増加するが、グリシン濃度は低下していることが明らかとなった。刺激頻度を2Hzにしたところ、GABA性IPSCおよびグリシン性IPSCは両者とも経時的に減少したが、グリシン性IPSCの減少が大きかった。また、グリシン性IPSCのみにたびたびfailureが見られた。

以上の結果から、GABA・グリシン共放出シナプスは、神経終末部に存在するグルタミン酸トランスポーターによりダイナミックに制御されており、神経回路活動が活発なときにはGABAを伝達物質として用いた方が抑制性伝達の維持に有利であることが示唆された。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Nabekura J et al: Nat Neurosci 7: 17-23, 2004
2. Coull JM et al: Nature 424: 938-942, 2003

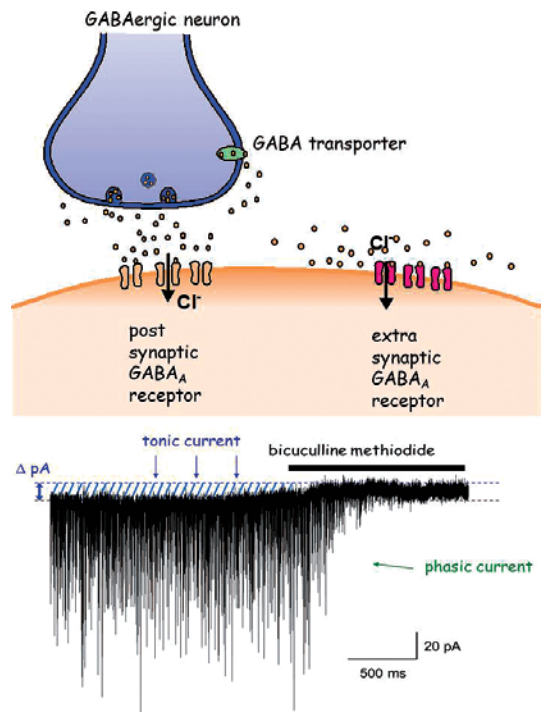
GABA_A受容体を介するトニック抑制の役割

山田順子（弘前大学大学院医学研究科・脳神経生理学講座）

神経終末から放出された神経伝達物質が、シナプス後膜の受容体に作用し生じるフェージック電流に対し、シナプスから漏れだして神経細胞周囲に微量に存在するGABAが、シナプス直下でない場所に存在する受容体に作用して“持続的なシナプス電流（トニック電流）”を引き起こしている事が見出され、細胞の興奮性を調節していることがわかってきた。しかしGABA作動性トニック抑制の意義や調節のメカニズムはよくわかっていない。我々は“トニック”なGABA作動性の抑制性伝達が、ラット大脳皮質錐体細胞にも存在することを受容体阻害薬 bicuculline methiodide (BMI) および、GABAトランスポーター阻害薬 NO711

による、ベースカレントのシフトにより示した。一方、低濃度のGABA_A受容体阻害薬 SR95534 はフェージック電流のみを抑制し、トニック電流には影響しないことがわかった。また、麻酔薬 midazolam は、フェージック電流の増強だけでなく濃度依存性にトニック電流の増強も引き起こすことが明らかとなった。さらに、BMIにより抑制されるトニック電流は、大脳皮質の層で異なる薬理作用を持つことを見出し、この違いはGABA_A受容体のα5サブユニットによるものである事がわかった。

IP3結合タンパクとして、クローニングされたPRIPタンパクはGABA_A受容体の膜への移動に関わる蛋白としての機能も報告されている。したがってPRIPはGABA_A受容体のクラスタリングなどに関係すると考えられ、GABA作動性トニック抑制にも影響している可能性がある。PRIP1ノックアウトマウス (PRIP1-KO) を24時間脳波をモニタリングしたところ、けいれん発作波 (ictal discharge) は24時間で平均4回、単発 spike (interictal discharge) は24時間で約1000回以上見られた。また、最大電流刺激により惹起されるけいれん発作に対する diazepam の効果は、野生型に比べPRIP1-KOでは優位に低下していた。次



に、異常脳波発生に関連すると考えられる海馬 CA1 ニューロンの抑制性シナプス伝達を解析したところ、抑制性シナプス電流の振幅・頻度共、野生型、PRIP1-KO で差は見られなかったが、抗痙攣薬 diazepam 投与により生じる GABA 作動性トニック電流の増強、BMI 投与により生じるトニック電流の抑制共に KO マウスは野生型と比べ優位に減少していた。この結果から、PRIP1-KO マウスは GABA_A 受容体 (特にトニックカレントを引き起こすサブユニット構成の受容体) 機能が低下しており、トニック抑制の減少が興奮性を増強し、自発性の発作を起こすと考えられる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Zhu G et al: J Pharmacol Exp Ther **340** (3): 520-528, 2012
2. Yamada J et al: Cerebral cortex **17** (8): 1782-1787, 2007

1 分子イメージングで探る抑制性シナプス可塑性の分子機構

坂内博子¹, 丹羽史尋¹, 有蘭美沙¹, Antoine Triller², 御子柴克彦¹ (¹理化学研究所脳科学総合研究センター, ²パリ高等師範学校)

細胞膜の構成要素である脂質・タンパク質は流体としての性質を持ち、側方拡散と呼ばれる運動により自由に動く。自由拡散運動により脂質・タンパク質は均一に分布すると予想されるが、実際の細胞膜では膜分子の分布は一様ではない。抑制性シナプス後膜には GABA_A 受容体, glycine 受容体といった神経伝達物質受容体が高密度で局在し、効率の良い神経伝達を可能にしている。いかにして神経細胞は、自由拡散運動に逆らって受容体の密度勾配を形成・維持しているのか? その機構を解明することができれば、抑制性シナプスの機能を支える基本的な仕組みを理解すると同時に、脳神経疾患の治療に対して具体的なターゲット分子を提示することができると考える。

この課題に対し我々は、「量子ドット 1 分子イメージング」という技術で細胞膜上の受容体 1 分子のふるまいを「見る」ことにより取り組んで来た。細胞膜上のタンパク質、脂質分子それ自体は透明で見えないが、それを蛍光プローブでラベルすることにより分子のふるまいを観察できるようになる。本研究では半導体ナノ結晶「量子ドット」を蛍光プローブとして用い、抗体を介して GABA_A 受容体に融合した量子ドットの蛍光シグナルを、EMCCD カメラを装備した倒立落射蛍光顕微鏡を用いて追跡した [1]。量子ドット 1 分子

イメージング法は、内在性分子の動きを観察できる、シナプス間隙のような微小な空間に入っていくほどプローブが小さい、蛍光が明るく長寿命という利点を持つ。これにより、従来の 1 分子イメージング法では難しかった「受容体のシナプスへの出入り」という現象を追跡することが可能になった。

海馬では神経細胞に高頻度脱分極刺激を与えること GABA 作動性シナプス伝達効率が低下する現象が報告されており、「GABA 作動性シナプス長期抑圧」として知られている。この現象は記憶学習やてんかんの病態発現に関わると考えられており、NMDA 受容体を介した細胞外からのカルシウム流入とそれに伴う calcineurin の活性化が必要なことは示されていたが、それ以上の詳細な分子機構はこれまで明らかにされていなかった。量子ドット 1 分子イメージングで GABA_A 受容体 1 分子の拡散運動を解析したところ、過剰な興奮性神経活動により、GABA_A 受容体がシナプス内に滞在する時間が減少し、シナプスへの出入りの回数が増加することを見いだした。また、シナプスにおける GABA_A 受容体の拡散係数と受容体が拡散できる領域の大きさも、神経活動依存的に増加していた。これらの結果は、興奮性神経活動の増加が GABA_A 受容体の側方拡散を増加させ、GABA_A 受容体をシナプス後膜から流出しやすくする現象を引き起こすことを意味している。また、GABA_A 受容体の側方拡散の増加に、神経興奮に伴う細胞外からのカルシウム流入と calcineurin の活性化が必要であることも分かった。カルシウム流入と calcineurin 活性化は、GABA 作動性シナプス長期抑圧にも必要とされる。従って、カルシウム流入と calcineurin の活性化によりシナプス内で GABA_A 受容体の側方拡散が増加することが、GABA 作動性シナプス可塑性を引き起こす分子機構であると考えられる [2]。

これまでに唯一同定されていた抑制性シナプス足場タンパク質 gephyrin は GABA_A 受容体の側方拡散を抑制する役割を持つ。また、シナプス内の gephyrin 量はカルシウム流入に伴って減少する。このため我々は、gephyrin がカルシウムシグナルを GABA_A 受容体の側方拡散の変化に繋げるタンパク質の候補であると仮定した。この仮説が正しければ、GABA_A 受容体の側方拡散が増加するより先に gephyrin に変化がおけると予想される。ところが予想と逆に、カルシウム流入依存的な GABA_A 受容体の側方拡散の増大は、gephyrin の変化に先行することが分かった。また GABA_A 受容体の側方拡散を人為的に阻害すると、カルシウ

ム流入依存的なシナプス内 gephyrin の減少がおこらなくなった。抑制性足場タンパク質 gephyrin がシナプス可塑性時の GABA_A 受容体側方拡散変化の過程に無関係であることを示すこの結果は、カルシウム流入依存的に GABA_A 受容体から解離するような未知の足場タンパク質の存在を示唆している [3]。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Bannai H et al: Nature Protocols **1**: 2628–2634, 2006
2. Bannai H et al: Neuron **62**: 670–682, 2009
3. Niwa F et al: PLoS ONE **7**: e36148, 2012

電位センサードメインを介した KCNQ チャネルゲーティング修飾機構

中條浩一, 久保義弘 (生理研・神経機能素子, 総研大・生理科学)

KCNQ1 チャネルは電位依存性カリウムチャネルファミリーの一種である。KCNE1 などの修飾サブユニットと結合することで、心臓では I_{Ks} と呼ばれる、非常にゆっくりとした開閉のキネティクスを持つカリウムチャネルとして機能する。KCNQ1 と KCNE1 のそれぞれが、心臓の不整脈の一種 QT 延長症候群の原因遺伝子であり、この両分子が心臓での膜興奮性の制御において、重要な役割を果たしていることを示している。一方で、KCNE3 と呼ばれるタンパク質は、KCNQ1 と腸などで複合体を構成しており、電位依存性を失った常時開状態のカリウムチャネルとして機能している。このように、結合する KCNE の種類によって、KCNQ1 チャネルのゲーティングの性質は大きく変化する。KCNQ1 と KCNE1 が構成するストイキオメトリーについて、我々は最近一分子蛍光イメージング法を適用することで、四分子の KCNQ1 サブユニット (四量体なので一個のイオンチャネルに相当) に対し、最大四分子の KCNE1 が結合することを明らかにした [1]。しかしながら、KCNE1 をはじめとする一回膜貫通型の KCNE タンパク質が、どのようなメカニズムで KCNQ1 チャネルのゲーティングを修飾するのかについては、いまだによくわかっていない。

我々は、KCNE タンパク質の共発現により KCNQ1 のゲーティングが大きく変化することから、KCNE が KCNQ1 の電位センサードメインに作用すると考えた。S1 から S4 の 4 つの膜貫通領域 (セグメント) からなる電位センサードメインのうち、S4 セグメントには正電荷を持つアミノ酸がクラスターしており、細胞の脱分極時に細胞外側に向かって動くことが知られている。S4 セグメントの細胞外側の端に位置する 226 番目のアラニン残基をシステイン残基に置き換え (A226C)、細胞外液中に投与した MTSES との反応速度を比較することで、KCNE1 あるいは KCNE3 存在下での電位センサーの動きを測定した [2]。これにより、KCNE1 存在下では電位センサードメインが down state に安定化されること、また KCNE3 存在下では電位センサードメインが up state に安定化することがわかり、KCNE タンパク質によるゲーティング修飾機構が、KCNQ1 の電位センサードメインを介して行われていることが示唆された。他の研究グループによる最近の Voltage clamp fluorometry や KCNQ1 のゲート電流を測

定した結果は、より直接的に KCNE1 の存在が電位センサードメインの動きに変化させることを示している [3, 4]。

では KCNE1 はどのようにして KCNQ1 の電位センサードメインを制御しているのであろうか。S4 セグメントと KCNE タンパク質の間で直接的な相互作用は存在するのであろうか。これまでのいくつかのグループからの報告により、KCNE1 は KCNQ1 の 2 つの電位センサードメインの間に位置すると考えられている (図)。また前述の KCNQ1 に導入した A226C と、KCNE1 の細胞外領域に導入した E43C の間には、脱分極時にのみジスルフィド結合を生じる [2]。このことは、KCNQ1 の S4 セグメントと KCNE1 の間の距離が、少なくとも脱分極時には非常に近い位置にあることを示している。我々は、S4 セグメント上の 232 番目のフェニルアラニンをアラニンに置換すると、野生型の KCNQ1 で顕著に見られる KCNE1 存在下での G-V カーブのシフトがほとんど起きないことを見出した (未発表)。この変異体では、KCNE1 と S4 セグメントの相互作用がうまくいっていないと予想される。さらにこの 232 番目のフェニルアラニンを様々なアミノ酸に置換すると、KCNE1 存在下での G-V カーブの $V_{1/2}$ が、アミノ酸の大きさに依存して変化することを見出した。KCNE1 が電位センサーを制御するうえで、このアミノ酸残基が重要な役割を果たしていると考えられる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Nakajo et al: PNAS **107**: 18862–18867, 2010

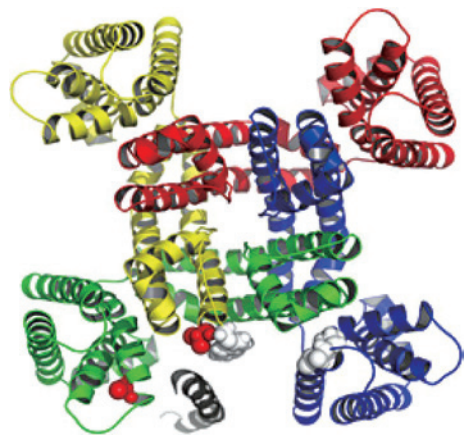


図 開状態における KCNE1 (黒) と KCNQ1 の各サブユニット (4 色) との位置関係

2. Nakajo et al: J Gen Physiol **130**: 269–281, 2007
3. Osteen et al: PNAS **107**: 22710–22715, 2010
4. Ruscic et al: PNAS **110**: E559–E566, 2013

Exploring the gating mechanism of the Hv1 proton channel with intracellular blockers

Francesco Tombola, Liang Hong, Medha M. Pathak, Iris H. Kim (Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine, USA)

Biological processes as diverse as neuronal signaling, muscle contraction, the immune response, and the heart beat depend on the proper function of proteins containing voltage-sensing domains (VSDs) [1]. In recent years, our view on these domains has changed dramatically. Once regarded as simple modulators of pore domains in voltage-gated sodium, potassium, and calcium channels, they are now recognized as structural units that perform different tasks in different proteins, as they control the activity of enzymatic domains in voltage-sensitive phosphatases, act as gated pores in voltage-gated proton channels, and sense chemical signals in thermo-sensitive TRP channels [2]. VSD malfunction, or

misregulation, is the cause of neurological disorders, cardiac arrhythmias, and cancer. In this talk I will focus on the structural organization and function of the voltage-gated proton channel Hv1 as a model for ion permeable VSDs [3].

Biological processes as diverse as neuronal signaling, muscle contraction, the immune response, and the heart beat depend on the proper function of proteins containing voltage-sensing domains (VSDs). In recent years, our view on these domains has changed dramatically. Once regarded as simple modulators of pore domains in voltage-gated sodium, potassium, and calcium channels, they are now recognized as structural units that perform different tasks in different proteins, as they control the activity of enzymatic domains in voltage-sensitive phosphatases, act as gated pores in voltage-gated proton channels, and sense chemical signals in thermo-sensitive TRP channels. VSD malfunction, or misregulation, is the cause of neurological disorders, cardiac arrhythmias, and cancer. In this talk I will focus on the structural organization and function of the voltage-gated proton channel Hv1 as a model for ion permeable VSDs (Fig. 1).

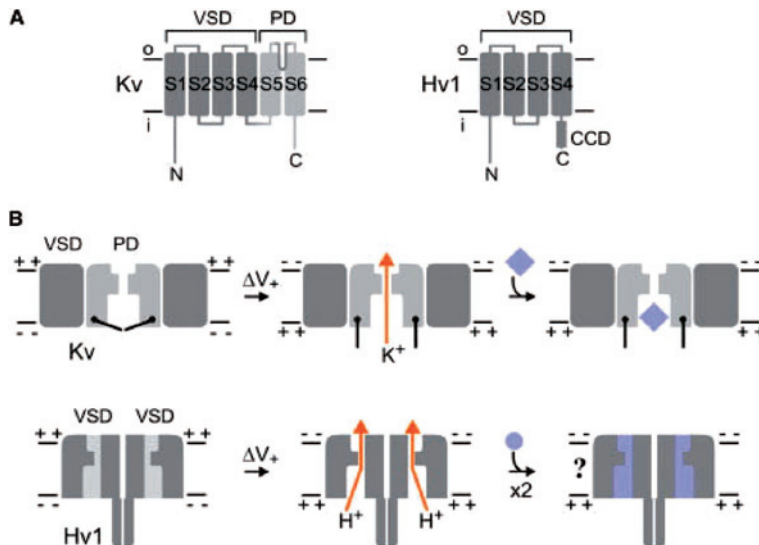


Figure 1. Gating of a VSD Pore Probed with Intracellular Blockers (A) Topology of VSD-containing channels with and without a pore domain (PD). CCD : coiled-coil domain. (B) Voltage-dependent opening and block of PD (top) and VSD (bottom).

Biological processes as diverse as neuronal signaling, muscle contraction, the immune response, and the heart beat depend on the proper function of proteins containing voltage-sensing domains (VSDs) [4].

The authors declare that there are no conflicts of interest.

1. Hong et al: *Neuron* **77**: 274-286, 2013
2. Tombola et al: *Nat Struct Mol Biol* **17**: 44-50, 2010
3. Tombola et al: *Neuron* **58**: 546-556, 2008
4. Tombola et al: *Nature* **445**, 546-549, 2007

電位依存性 H⁺チャネルの二量体化による活性制御と構造基盤

藤原祐一郎, 黒川竜紀, 竹下浩平, 小林 恵, 中川敦史, 岡村康司 (大阪大院・医学系研究科, 大阪大・蛋白質研究所)

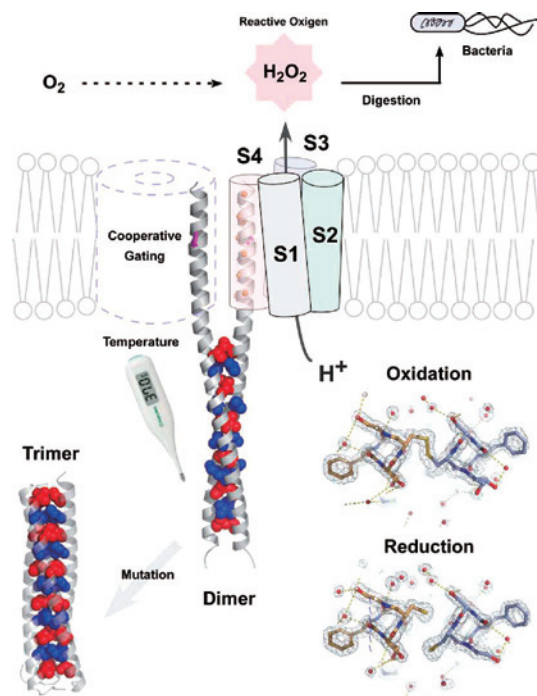
電位依存性 H⁺チャネル (Hv) は, 電位依存性チャネルの電位センサードメインと相同性の高い膜4回貫通領域 (S1-4) からなる膜タンパク質で, それ自身が膜電位依存的に H⁺を透過するユニークなイオンチャネルである. Hv は2量体として機能することがこれまで報告されている. 一般的な電位依存性チャネルが4量体会合 (4回リピート構造) によってイオン透過路を分子の中心に構成するのに対して, Hv はサブユニット単独で H⁺を透過するため, 2量体化の機構・意義はこれまで不明であった.

我々は, 種間で保存性の高い C 端細胞内領域に注目し研究を進め, deletion 変異体による解析から, この領域がチャネルの2量体会合を担っていることを明らかにした. この会合ドメインに対する結晶構造を解析することに成功し, 並行型コイルドコイル構造を呈することを明らかにした [1]. 分析超遠心, CD スペクトラムを用いコイルドコイル会合の熱安定性を解析し, 温度依存的チャネルゲーティングとの相関を電気生理学的に解析した. 2量体会合を減弱させる変異は活性化の温度閾値を下げキネティクスを加速し, 反対に, 会合強度を増強させる変異はその逆の効果を呈した. コイルドコイル会合の熱安定性が温度依存的なゲーティングを決めるという結果を得た [1]. また, コイルドコイル会合の中心部には一対の Cys が存在し, 酸化還元に応答して架橋/解離し会合の安定性が変化することを結晶構造解析により明らかにした [2]. さらに, 構造情報を基にコイルドコイルドメインに変異を導入し, 3量体, 4量体チャネルを作成し電気生理学的解析を行なった.

その結果, 2量体構造が最も効率的にサブユニット間の協調的なゲーティングが発揮されることを明らかにした [3].

以上の結果は, 膜貫通領域で起こるゲーティング機構と細胞内コイルドコイル領域が機能的に連携していることを意味する. 同時に, 膜貫通領域での2量体間の相互作用も示唆される. これらはどうのような構造基盤の上に成り立つのであろうか? この問題に答えるため, 膜貫通領域 S4 とコイルドコイルをつなぐリンカー部分の構造と, 膜貫通ドメインの2量体サブユニット間の配置に着目して実験を行なった.

まず, コイルドコイル領域を1アミノ酸残基ずつ上流及び下流に±10残基移動させた変異体チャネルのゲーティングキネティクスの変化率を電気生理学的に解析し, リンカーの長さとの相関を解析したところ, ~100°/res. の角周波数にスペクトル密度の極大を呈した. これは, 膜貫通領域 S4 とコイルドコイルがαヘリックス構造により連絡していることを示唆する. 次に, 膜貫通領域に Cys を一つずつ導入した点変異体を作成し, 2量体サブユニット間でのジスルフィド結合による架橋確率を残基ごとに解析した. 2量体間で近接する残基の位置が明らかとなり, 特に S4 領域ではαヘリックスの周期性を呈し, ちょうど S4 へ



リックスの片側側面を構成する配置を示した。ゲーティングのキネティクスが変化する変異体チャネルではS4間の架橋が消失した。以上の解析は、細胞内コイルドコイル領域が膜貫通領域S4と一連の長い α ヘリックスを構成しており、2量体間でS4同士が近接した構造を成すことを示す。このS4とコイルドコイルが一塊となったゲーティングユニットによって、2量体間でのゲーティングの協調を生み出している [投稿中]。

本発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Fujiwara et al: Nat Commun **3**: 816, 2012
2. Fujiwara et al: J Biol Chem in press
3. Fujiwara et al: J Physiol **591**: 627-640, 2013

相同モデリングと分子動力学シミュレーションによるHv1プロトンチャネルのプロトン透過機構の解析

城田松之^{1,2}, 千葉 奏¹, 笠原浩太³, 木下賢吾^{1,2,4}
(¹東北大・情報, ²東北大・ToMMo, ³大阪大・蛋白研, ⁴東北大・加齢研)

電位依存性プロトンチャネルHv1は細胞内から細胞外へのプロトンの受動的拡散に働くチャネルタンパク質である。Hv1のアミノ酸配列はK⁺チャネルやNa⁺チャネルとは異なり、ポアドメインに相同な領域を持たず、電位センサードメイン(VSD)がプロトン透過能を持つと考えられている。しかし立体構造が解明されていないために、そのプロトン透過の分子メカニズムは未解決の問題である。プロトン透過のモデルとしてはチャネル内に安定な水分子のネットワークが形成され、そこをGrotthuss hoppingによってプロトンが移動するというwater wireモデルと、Hv1のアミノ酸側鎖がプロトンの担体となるtitratable residueモデルが提案されている。これまでwater wireモデルに基づき、K⁺チャネルのVSDを鋳型とした相同モデリングと分子動力学(MD)シミュレーションによりプロトン透過経路の推定を行っている報告がある [1, 2]。しかし、近年112番目のAsp残基または211番目のArg残基に変異が導入されると、プロトンへの選択性を失いそれぞれアニオン、またはカチオンを透過するという報告がなされ [3, 4]、titratable residueモデルのようにHv1の荷電性残基側鎖が関与する経路も考慮する必要がある。

本研究ではHv1のうちプロトンチャネルを形成すると考えられる、4本のヘリックスS1-S4からなる膜貫通ドメイン(アミノ酸101-212)領域について、Na⁺チャネルのVSDを鋳型として相同モ

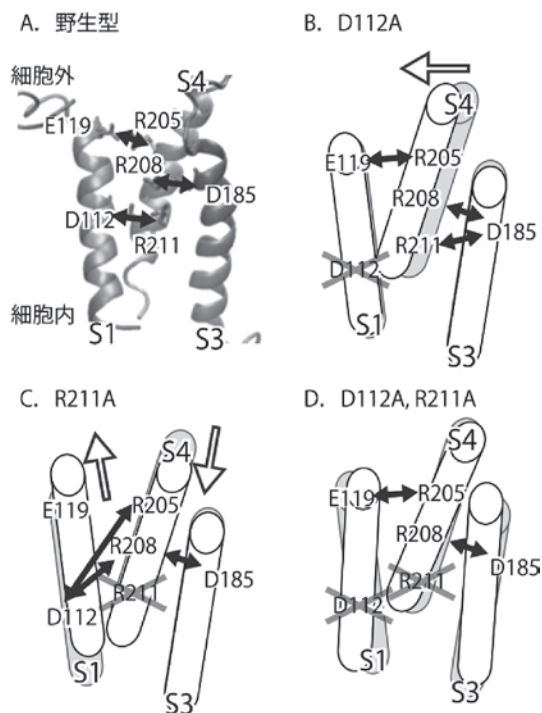


図1. 野生型(リボン図)と変異型(模式図)のHv1構造。S1, S3, S4ヘリックスのみを示す

デリングを行った。この構造モデルをPOPE (palmitoyl-oreoyl phosphoethanolamine) 膜に埋め込み、NaCl 0.15M 溶液で系を満たし、50nsの平衡化後400nsのMDシミュレーションを行った。

モデル化されたHv1分子の膜貫通ヘリックスは400nsのMDにおいて初期構造からRoot Mean Square Deviation (RMSD)で約1~1.5Å範囲で推移し、大きな構造変化は見られなかった。VSDに特徴的なS4膜貫通ヘリックスにおける3つのArg残基であるR205, R208, R211とチャネル内の陰性荷電残基との間の塩橋形成も安定であり、特に、最も細胞内のR211はS1のD112と塩橋を形成し、チャネルの最狭窄部を構成していた(図1A)。

次に、野生型Hv1のモデル構造をもとにD112AとR211Aの単一変異体とD112A, R211Aの二重変異体を作成して200nsのMDシミュレーションを行った。変異体でもシミュレーション中の大きな構造変化は見られなかった。野生型と比較すると単一変異体D112AまたはR211Aの方が、二重変異体よりも大きな変化を示した。これらの変異体の構造を観察すると、単一変異体はチャネル内

の電荷の不均衡が生じるために平衡化の間に大きく構造が変化していた (図 1B, C). 例えば, D112A 変異が起こると R211 は代わりに D185 と塩橋を作り, また S4 ヘリックスが S1 の方に接近した. R211A では塩橋の相手を失った D112 が細胞外よりの R208, R205 と塩橋形成をするため S1 は細胞外へ, S4 は細胞内へ引っ張られて大きな構造変化を起こしていた. これに対して, D112A, R211A 二重変異体ではこのような塩橋のスイッチは起こらないために, 野生型の構造変化は比較的少なかった (図 1D).

本研究では Hv1 について D112 および R211 が

プロトン透過に関与しうるチャンネルの構造モデルを構築することができた. これらのモデルはより詳細なプロトン透過経路の推定をするうえで有用であると考えられる.

本発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない.

1. Ramsey et al: *Nat Struct Mol Biol* **17**: 869–878, 2010
2. Wood et al: *Biochim Biophys Acta* **1818**: 286–293, 2012
3. Musset et al: *Nature* **480**: 273–278, 2011
4. Berger et al: *Neuron* **72**: 991–1000, 2011

水素による遺伝子発現変化

市原正智¹, 祖父江沙矢加¹, 望月利晃², 大桑哲男² (¹中部大学・生命健康・生命医科, ²名古屋工科大学・工学研究・物質工学)

水素は活性酸素の中でヒドロキシラジカルを選択的に消去する抗酸化剤として大澤らにより報告されたが, その後の検討により抗酸化剤としての作用に加えて抗炎症効果を示すことが齧歯類を中心とした疾患モデル動物を用いた検討で明らかにされている。しかしその分子機構の詳細は未だ不明な点も多い。そこで遺伝子発現の観点から水素の生体作用を検討した結果を紹介する。

水素は可燃性を抑えた2.4%程度の水素添加空気として肺から吸入させるか, 水素を溶存させた水素飽和水として経口的に消化管を介して吸収させるかのいずれかの方法で生体内に投与される場合が多い。私達はまず生体内に投与された水素の投与後の経時的動脈血中濃度の変化, 肝臓, 腎臓での臓器濃度の変化についてラットを用いて明らかにした。水素添加空気の投与では心房血に加えて動脈血においても投与期間を通じて持続性かつ吸入濃度依存性に水素濃度の上昇を確認した。一方水素飽和水の経口投与では肝臓および心房血では急峻かつ一過性の肝臓臓器および心房血における水素濃度の上昇が観察されたが, その大部分の水素は肺より排出されて, 動脈血および腎臓では肝臓・心房血に比べてわずかに1/10程度の水素濃度の上昇に留まることが示された。

次に水素に暴露された健康状態の生体内では, どの様な変化が引き起こされるかを明らかにするために, DNA マイクロアレイ解析を用いて水素投与に伴うマウス肝臓内の遺伝子発現変動を検討した。8週齢の雄 Balb/c マウスに3週間水素を水素添加空気および水素飽和水として投与した後, 肝臓より RNA を抽出して遺伝子発現の変化を比較した。低発現の遺伝子を除いた10284 遺伝子を対象として, 水素添加空気および水素飽和水をマウスに投与することで2.15倍の上昇または減少する140個の遺伝子を同定した。そのうち31個は水素により発現上昇, 109個は発現低下が認められたことより, 水素は肝臓内の遺伝子発現レベルを有意に負に制御していることを示す結果であった。これらを Ingenuity Pathway analysis で検討したところ NFκB, NFAT 下流の関連遺伝子が主に変動していることを認めた。ウエスタンブロットによる検討では, 実際に水素によりマウス肝臓中の Erk, p38, NFκB シグナルが減弱していることを確認した。さらに同定した4つの遺伝子について, 水素の投与方法および臓器間で遺伝子

発現に対する影響に差が生じるかどうかを検討した。水素飽和水の飲水に比べて水素を水素添加空気として吸入させた場合には, 生体はより長期に水素に暴露される。しかし遺伝子発現変動を指標とした場合は水素の効果は同等であった。また同時投与により相乗効果を示す傾向があった。これらの結果は, 水素は濃度非依存性に生体に影響を与えることを示唆した。さらに興味深いことに臓器間の比較でも, 肝臓に比べて10分の1以下の濃度に過ぎない脳, 腎臓において肝臓と同等の遺伝子発現に対する影響が確認されたことから, 水素は体内における濃度とは必ずしも関係なく全身臓器の遺伝子発現に影響を与えて全身作用を示すことが推察された。

さらに炎症病態において水素が生体の遺伝子発現に与える影響を明らかにするために, lipopolysaccharide (LPS) 誘発性肺障害モデルマウスを作成し検討した。肺障害モデルマウスは8-10週齢の Balb/c 雄マウスの気管内に LPS を投与し作成した。コントロールとして PBS を気管内に投与し LPS 投与群と比較した。マウスは LPS または PBS 投与前より2%水素添加空気環境下または通常空気環境下で飼育し, LPS 等の投与後も継続して飼育を続けた。マウスを水素添加空気環境で飼育すると, LPS 投与後も活動性が維持され, また肺湿重量比で評価すると水素添加空気により有意な改善をみた。組織標本では好中球が水素投与によりコントロールマウスの肺と比較して有意に減少していた。経時的 DNA マイクロアレイ解析では LPS 投与後2時間の比較で水素投与により2分の1以下の発現量に低下した遺伝子を抽出して gene ontology 解析を行うと cytokine activity, chemokine activity, inflammatory response といった分類に属する炎症関連遺伝子が濃縮されていた。経時的に観察すると4時間の時点で差が一旦少なくなった後, 16時間で再び発現量の差が拡大する傾向にあった。こうした結果より水素は肺組織内で広範な炎症性遺伝子の発現の初期応答を抑制し炎症を軽減させると考えられた。

水素は生体に対して健康, 病的組織で広範なシグナル伝達機構および遺伝子発現に影響を与えて作用を発揮することが示された。しかしその最上位で水素が生体に与える分子機構は依然不明な点が多い。さらなる検討が必要とされる。

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない

水素による炎症反応の抑制メカニズム

伊藤雅史¹, 伊藤智広², 大野欽司³, 野澤義則⁴

(¹東京都健康長寿医療センター研究所・老化機構研究, ²近畿大・農, ³名古屋大大学院・医・神経遺伝, ⁴東海学院大・健康福祉)

2007年に分子状水素の吸入が脳梗塞に有効であることが報告されて以来 [1], 飲用または吸入等により投与された水素が, 心筋梗塞・認知症・パーキンソン病・糖尿病・動脈硬化・潰瘍性大腸炎等多岐にわたる疾患の動物モデルで効果を示すことが報告され, 最近では, パーキンソン病・心筋梗塞等の疾患を対象とした臨床治験も開始されている。水素の作用機序として当初ヒドロキシラジカルの選択的消去が提唱され [1], 実際に多くの酸化ストレス関連疾患の動物モデルにおいて, 水素は酸化ストレスを抑制することが確認されている。しかしながら, 生体内で大量に生じるヒドロキシラジカルに比し, 投与される水素量は微量であり, 直接的な化学反応のみでは水素効果を説明することは難しいことから, 別の分子機構の存在が予想された。

我々は, 酸化ストレス傷害が病態に直接的に関与しない即時型アレルギーの *in vivo* および *in vitro* のモデルで, 水素の効果と作用機序を検討した。水素含有飲用水を1ヶ月間投与したマウスでは, 受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応はほぼ消失し, 抗原刺激後の血中ヒスタミンレベルの上昇も著明に抑制された。続いて, 抗原特異的IgE抗体で感作させたラット好塩基球RBL-2H3細胞を水素存在・非存在下で24時間培養後に抗原で刺激したところ, 水素は脱顆粒, 細胞内カルシウム上昇, 細胞内シグナル伝達の活性化を抑制した。さらに, 水素は抗原刺激後のROS (Reactive oxygen species) の上昇を抑制したが, それは水素によるROSの直接的消去ではなく, 細胞内シグナル伝達の抑制を介したNADPH oxidase (NOX) の活性阻害によるものと考えられた。以上のことから, 水素は細胞内シグナル伝達の抑制を介して即時型アレルギーを抑制することが示され, 分子状水素の新規の作用機序として, 我々はシグナル伝達の調節を提唱した [2]。

潰瘍性大腸炎など複数の炎症性疾患の動物モデルで水素効果が報告されてきたが [3-5], その作用機序は不明であった。そこで, マクロファージRAW264.7細胞において, 水素存在下での24時間の前培養が, lipopolysaccharide/interferon- γ (LPS/IFN- γ) 共刺激後のNO産生, 遺伝子発現, 細胞内シグナル伝達, ROS産生, NOX活性に与える影響を検討した。また, 抗II型コラーゲン抗体およびLPS投与により関節炎を誘発する慢性関節リウマチのモデルマウスで, 水素含有水の経

口投与が, 関節炎スコア, 足容積に与える影響を検討した。その結果, 水素はLPS/IFN- γ で共刺激後のiNOSの発現誘導とNO産生およびCOX-2等の他の炎症関連遺伝子の発現誘導を抑制した。また, 水素はLPS/IFN γ で共刺激後の細胞内シグナル伝達の活性化 (ASK1・p38・JNKのリン酸化, NF κ Bの核移行) を抑制した。しかしながら, 水素はLPS/IFN- γ 共刺激後のNOX活性化および細胞内ROS上昇には影響を与えなかった。一方, 水素水を2週間前投与されたマウスでは, 抗II型コラーゲン抗体およびLPS投与により惹起された関節炎のスコアと足容積が有意に抑制されていた。以上のことから, 水素は細胞内シグナル伝達の抑制を介して遺伝子発現を調節することにより炎症を抑制すること, 水素水の飲用は慢性関節リウマチのモデル動物で効果を示すことを明らかにした [6]。

以上, 即時型アレルギーと炎症反応の疾患モデルで, 水素は細胞内シグナル伝達の抑制を介して効果を示すことが確認されたことから, 水素は酸化ストレスを抑制するだけではなく, シグナル伝達のモデュレーターとしても機能する可能性が強く示唆された。今後, 水素がシグナル伝達を調節する分子機構を明らかにしたいと考えている。

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない

1. Ohsawa I et al: Nat Med **13**: 688-694, 2007
2. Itoh T et al: Biochem Biophys Res Commun **389**: 651-656, 2009
3. Kajiya M et al: Biochem Biophys Res Commun **386**: 11-15, 2009
4. Xie K et al: Shock **37**: 548-555 2012
5. Xie K et al: Shock **34**: 495-501, 2010
6. Itoh T et al: Biochem Biophys Res Commun **411**: 143-149, 2011

放射線障害を抑制する水素分子の作用メカニズム

大澤郁朗¹, 寺崎泰弘², 村上弥生¹ (¹東京都健康長寿医療センター研究所・生体環境応答, ²日本医大・人体解析病理)

水素分子 (H₂) は生体内で容易に拡散して, 毒性の高いヒドロキシルラジカル (・OH) を選択的に還元する。虚血再灌流 (I/R) では短期的に大量の・OHが発生し病態を悪化させるが, 脳, 心臓, 肝臓などのI/R障害は水素ガスの吸引で抑制される。また, H₂を高濃度に溶かした水 (水素水) は, メタボリックシンドローム, 肝機能・腎機能傷害, さらにパーキンソン病などの神経変性疾患などで予防・治療効果が示されている [1]。一方,

放射線照射による生体への影響は、DNA などの高分子が直接イオン化される「直接効果」と、水のような極性分子がイオン化することで生じるラジカル類による生体損傷という「間接的效果」に分けることができる。ラジカル類の主体は $\cdot\text{OH}$ であることから、 H_2 による放射線障害の予防・治療効果が期待されている。

実際、細胞用の培地に放射線を照射すると $\cdot\text{OH}$ が生じるが、 H_2 存在化で減少することを電子スピン共鳴で確かめた。また、放射線照射により肺上皮細胞由来の A549 で生じる $\cdot\text{OH}$ が H_2 によって抑制されることも $\cdot\text{OH}$ 特異的蛍光試薬を用いて確かめている。その結果、放射線による A549 細胞での 8-OHdG を指標とする DNA の酸化と 4-HNE を指標とする脂質の過酸化が H_2 により抑制され、細胞死が抑制された。この時、Bax 及び活性化カスパーゼ-3 の増加も抑制されていた[2]。

では、 H_2 は個体レベルでの放射線障害を改善できるであろうか？我々は麻酔下で H_2 ガスを吸引させたマウスの肺に放射線を照射し、その後は自由に水素水を飲ませ続ける実験を行った。照射1週間後の急性期に観察される TUNEL 陽性の肺細胞が H_2 処置により減少し、Bax 及び TGF β の発現が抑制された。さらに慢性期の障害に対する効果を観察する為に照射5ヶ月後の肺を CT 撮影したところ、 H_2 処置で肺繊維化による CT 値の上昇が抑制されていた。肺組織の Elastica-Masson Goldner 染色像とコラーゲン III 型に対する特異的染色像の比較検討からも H_2 処置による肺繊維化の抑制を確認することができた [2]。同様に Qian らは心臓に放射線を照射する前日からマウスに水素水を飲ませる研究を行い、コントロール群の1ヶ月後生存率が10%の条件下で水素水飲用群では実に80%が生存したことを報告している [3]。さらに Kang らは肝がんの放射線治療患者25名に水素水を飲ませ、プラセボ25名と QOL を比較した。すると、食欲や味覚障害が改善され血中の酸化ストレスが抑制された。水素水の飲用は放射線の治療成績には影響を与えていない [4]。がんの放射線治療では疲労や体力の低下といった QOL の悪化が深刻な問題であり、水素水は放射線治療の副作用を抑制する効果的な手段となるものと期待される。

H_2 の放射線障害に対する作用は2つに分けることができる。細胞レベルの実験では放射線照射直後の $\cdot\text{OH}$ を抑制することから、 H_2 は放射線障害に対する保護剤 (protector) として働く。さらに水素水を飲ませ続けることで慢性期の病態が改善されることから、 H_2 は放射線照射後に進行する障害

の緩和剤 (mitigator) として作用しているものと考えられる。しかし、mitigator として機能する水素水の作用機序を $\cdot\text{OH}$ の還元で説明できるであろうか？ $\cdot\text{OH}$ は非特異的に多くの化合物と反応する。しかも H_2 との反応性は DNA、アミノ酸、糖などと比してかなり低い。水素水の飲用では、 H_2 が呼気ガスとして速やかに体外へ排出される。実際、水素水飲用後に脳や筋肉で H_2 の増加を検出するのは容易でない。我々は最近、予め1から50%の H_2 存在下でヒト神経芽細胞 SH-SY5Y を3から24時間培養することで過酸化水素による細胞死が抑制されることを見いだした。過酸化水素添加後に H_2 を投与しても細胞死は抑制されなかった。 H_2 存在下で培養した細胞ではミトコンドリア膜電位、呼吸活性及び ATP が増加し、グルタチオンの一過的な減少とスーパーオキシドの増加が認められた。さらに Nrf2 の核移行が認められたことから酸化ストレス関連酵素遺伝子の発現を定量的 PCR 法で確かめたところ、カタラーゼやグルタチオン還元酵素が有意に増加していた。これらの結果は、細胞が H_2 の前処置により酸化ストレスに対する防御能を獲得している可能性を示している。現在、以下のモデルを提唱している。 H_2 には $\cdot\text{OH}$ を還元する効果と併せて酸化ストレスに対する適応応答を誘導する効果が存在する。この異なる2つの作用が細胞と生体を様々な障害から防御しているものと考えている。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない

1. 大澤郁朗：日本老年医学会雑誌 **35**: 680-688, 2012
2. Terasaki Y et al: Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **301**: L415-426, 2011
3. Qian L et al: J Radiat Res (Tokyo) **51**: 741-747, 2010
4. Kang KM et al: Med Gas Res **1**: 11, 2011

水素含有透析液がアルブミン酸化還元比 (HSA-redox) に及ぼす影響：血液透析患者および腹膜透析患者における予備的検討

寺脇博之¹, 朱 万君¹, 中山昌明¹, 松山幸枝², 寺田知新², 恵良聖一²

(¹福島県立医科大学腎臓・高血圧内科, ²岐阜大学大学院医学系研究科分子生理学分野)

慢性腎臓病 (CKD) 患者における心血管系疾患 (CVD) の発症リスクは一般人と比較して有意に高い事が、種々の疫学的検討から明らかにされている。この現象の詳細な機序は未だ不明ではあるが、CKD における CVD リスクの増加に酸化スト

レス (OS) が関与している事を示唆する知見が諸家により報告されている [1, 2]. 我々の検討でも、これまでに血液透析 (HD) [3] および腹膜透析 (PD) [4] を施行されている CKD 患者において、還元型アルブミン比率の減少で特徴づけられる OS の亢進が CVD の発症と強く関連している状況が確認されている。しかしながら、OS と CVD が真に原因と結果の関係にあるか否かを明らかにするためには、還元型アルブミンを増加させる手段を確立し、治療的介入を行って確認する必要がある。

近年になり、分子状水素が生体内における安全な抗酸化剤として機能する可能性が注目されている。我々は HD および PD に用いる透析液の溶存水素濃度を上昇させることにより、HD および PD を施行されている患者の OS をできるのではないかと考えた。そこで我々は、電解技術を用いて HD および PD に用いる透析液の水素濃度を上昇させ、この水素含有透析液の OS 抑制能を検証した。

検討は、福島県立医科大学において治療を受けている HD 患者 8 名 (検討 1)、および PD 患者 6 名 (検討 2) を対象として行った。まず HD 患者を対象とした検討 1 では、通常透析液および水素含有透析液を用いて HD を施行し、HD 開始時・終了時にダイアライザ入口部・出口部より採血し、血清 HSA-redox を確認・比較した。次に PD 患者を対象とした検討 2 では、通常透析液および水素含有透析液を 4 時間腹腔内に貯留し、血清および腹腔からの排液における HSA-redox を確認・比較した。

その結果、検討 1 では、水素含有透析液を使用した場合のみにおいて、ダイアライザ出口部における HSA-redox は入口部よりも有意に還元的であった。また検討 2 では、血清および排液のいずれにおいても、水素含有透析液を使用した後の HSA-redox は有意に還元的であった。

このように今回の予備的検討より、HD・PD のいずれにおいても、水素含有透析液の OS 抑制能が確認された。この水素含有透析液の長期的使用が CKD 患者の CVD リスクを抑制しうるか否かにつき、更なる検討を進める必要がある。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない

1. Himmelfarb J et al: *Kidney Int* **62**: 1524-1538, 2002
2. Terawaki H et al: *Kidney Int* **66**: 1988-1993, 2004
3. Terawaki H et al: *Ther Apher Dial* **14**: 465-471, 2010

4. Terawaki H et al: *Clin Exp Nephrol* **16**: 629-635, 2012

水素ガスによる酸化ストレス耐性獲得のメカニズム

野田百美¹, 藤田慶大¹, Margaret A. Hamner², 山藤芽実¹, 城戸瑞穂³, 田中義典⁴, 中別府雄作⁵, Bruce R. Ransom²

¹九州大学薬学研究院病態生理学分野, ²Dept. Neurology, Univ. of Washington Sch. of Med., Seattle, Washington, USA, ³九州大学歯学研究院分子口腔解剖学分野, ⁴パナソニック株式会社アプライアンス社, ⁵九州大学生体防御医学研究所脳機能制御学分野)

水素を含有する飲用水 (水素水) は神経保護作用を示すが、その作用は主に抗酸化作用によることが報告されている。我々も、MPTP パーキンソン病モデルマウスを用い、水素水飲用により、黒質・線条体におけるドパミン神経細胞・神経線維の脱落が、有意に軽減されることを報告した [1]。しかしながら、単なるラジカルスカベンジャーの作用では説明できない事象も数多く報告されており、水素の作用メカニズムは未だに不明な点が多い [2]。そこで我々は、臨床上的問題となっている脳白質の虚血障害に及ぼす長期水素水飲用の効果を検討し、ラジカルスカベンジャーとは異なった水素の作用メカニズムを探るために、神経軸索やグリアで構成される脳白質のモデルとして、視神経を使用し、以下のような検討を行った。マウスに通常水および水素水を 10-14 日間与え、その後、視神経を摘出、両端にガラス電極を装着して複合活動電位を測定した。1 時間の安定期間の後、無酸素・無グルコース (虚血状態) の灌流溶液を 30 分、その後、通常の栄養液に戻し (再灌流)、5 時間、複合電位を観察した。また、再灌流後の視神経を固定し、軸索の脱落・遺伝子損傷を免疫組織染色で観察した。その結果、通常水を飲用したマウスの視神経は、以前観察されたように、虚血状態で速やかに活動電位が消失し、再灌流後も 20% 程度しか回復しなかった [3]。一方、水素水を飲んだマウスから得られた視神経は、完全に活動電位が消失することなく、また再灌流後は 50% 以上のレベルに回復した。視神経軸索は水素水飲用マウスの視神経において顕著に残存しており、核の遺伝子損傷マーカーの蓄積は、主に軸索髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトにおいて顕著であった。

これらの結果から、水素水飲用によって、摘出した視神経の軸索活動電位が虚血になっても消失

せず、顕著に回復することがわかった。しかし、再灌流後のオリゴデンドロサイトの核遺伝子障害と軸索の脱落が抑制されるメカニズムについては、まだ未解明である。脳白質の虚血障害のメカニズムとして、これまでに、逆向きグルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸毒性や、オリゴデンドロサイトに発現する AMPA 型グルタミン酸受容体を介するカルシウムイオンの流入と、それによる酸化ストレスが示唆されている [4]。しかし、水素水飲用がどのステップを抑制するのか、検討する必要がある。

以上のように、水素水の長期飲用によって、神経軸索の虚血障害に対する抵抗性が上がる可能性

が示唆された。今後、分子メカニズムをさらに解明することにより、新規抗酸化剤の開発・各種酸化ストレス疾病の予防が可能になるかもしれない。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない

1. Fujita K et al: PLoS One **4** (9): e7247, 2009
2. Fujita K et al: Oxidative Medicine and Cellular Longevity doi: 10.1155/2012/324256, 2012
3. Tekkök SB et al: J Cereb Blood Flow Metab **23**: 1340-1347, 2003
4. Tekkök SB et al: J Cereb Blood Flow Metab **27**: 1540-1552, 2007

光ファイバーを用いた無麻酔・無拘束マウス視交叉上核からの長期発光測定

小野大輔¹, 本間研一², 本間さと²

(¹北海道大学大学院医学研究科光バイオイメージング部門, ²北海道大学大学院医学研究科時間医学講座)

一日を一周期とする概日リズムは視床下部に位置する視交叉上核により駆動されている[1]. ラットやマウスの視交叉上核には片側約1万個の神経細胞が存在し, 個々の細胞の概日振動が統合され睡眠・覚醒リズムをはじめとする様々な生理機能に出力している. 概日リズム発振の分子メカニズムは複数の時計遺伝子の転写と翻訳産物による転写抑制のネガティブフィードバックループにあると考えられる [2]. このため発光レポーターを用いて時計遺伝子の転写活性やタンパク質レベルを培養細胞あるいは培養スライスを用いて測定する技術が近年広く用いられている. しかし, 視交叉上核からの出力の一つ睡眠・覚醒リズムは個体レベルでのみ評価することが可能であり, 視交叉上核の *ex vivo* 解析では睡眠・覚醒リズムの統合的な理解に結びつかない. また, 視交叉上核は脳底に位置するため, 体外から直接発光を長期間連続して測定することは難しい. そこで私たちは光ファイバーを用い, 無麻酔・無拘束マウスの視交叉上核における時計遺伝子発現リズムを, 発光レポーターを用い長期間連続測定するシステムを構築した.

時計遺伝子の *Per1* あるいは *Bmal1* プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたトランスジェニックマウス (*Per1-luc*, *Bmal1-Eluc*) および *Per2* タンパク質にルシフェラーゼを結合させたノックインマウス (*PER2::LUC*) を使用した. これらのレポーターマウスの頭蓋にガイドカニューレを取り付け, そこに光ファイバーを視交叉上核直上まで挿入した. オスモティックミニポンプを用いルシフェリンを腹腔内あるいは側脳室に持続的に投与し, 血中ルシフェリン濃度を一定に維持した. 光電子増倍管を用いたディッシュ型ルミノメーターを改良し, 光ファイバーからの発光を集光して効率よく発光量を定量化することに成功した. 本システムにて, 視交叉上核からの発光輝度を1分毎に連続測定した. マウスの自発行動を1分毎に赤外線感熱センサーにて測定した.

光ファイバーにより計測した *Per1-luc* のピーク位相は主観的明期の後半にみられ, *PER2::LUC* のピーク位相は主観的明期と暗期の間にみられた. また *Bmal1-Eluc* のピーク位相はこれらとは逆位相の主観的暗期から明期の前半にみとめられた.

この位相差は, *ex vivo* 実験でみられる位相差と一致しており, 本システムが自由行動下のマウス生体内における生理的な遺伝子変動を評価する優れたシステムであることを示している. さらに我々は, 本光ファイバーを用い視交叉上核の *Per1-luc* リズムを1ヶ月以上自発行動量と同時測定し, 本システムが安定かつ長期計測可能な優れた *in vivo* 計測システムである事を示した. 次に主観的暗期の前半から9時間の光照射を与え, 行動リズムと視交叉上核 *Per1-luc* リズムを計測し, 光環境変化への両機能の反応性を評価した. 行動開始位相は9hの光照射翌日にはおよそ3時間の位相シフトを起こすのに対し, 行動終了位相はそれに比べ4.5日かけて位相がシフトした. この時視交叉上核の *Per1-luc* リズムは, 光照射後翌日には位相変位し, 行動開始位相に近い変化が認められ, 中枢時計が速やかに位相変位すること, また行動開始位相が視交叉上核の *Per1-luc* リズムを速やかに反映することを明らかにした.

光ファイバーを用いた視交叉上核 *Per1-luc* リズム計測については, Yamaguchi らが4.5日間の計測結果を報告しているが [3], 基質ルシフェリンを左右の側脳室間に灌流しながら発光を計測するという個体へのストレスの多い条件での計測であり, 行動の計測は行われていない. 本研究では, 個体への負担を最小限にとどめ, 生理的な反応を可能とした. 今後は, 様々な刺激応答の遺伝子レベルでの反応と, 行動への出力の関係性を明らかにするとともに, 薬剤に対する脳内の遺伝子発現パターンと行動の変化についても検討していく.

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない.

1. Stephan FK et al: Proc Natl Acad Sci USA **69**: 1583-1586, 1972
2. Reppert SM et al: Nature **418**: 935-941, 2002
3. Yamaguchi S et al: Nature **409**: 684, 2001

光遺伝学的手法による急性的な睡眠誘導時における大脳皮質の神経活動

宮本大祐^{1,2}, 常松友美³, 山中章弘⁴, 松木則夫², 村山正宜¹

(¹理研 BSI・行動神経生理学, ²東大院・薬・薬品作用学, ³生理研・細胞生理, ⁴名大・環医研・神経系2分野)

視床下部神経ペプチドであるオレキシンは不眠症の治療薬の作用点として注目されている. オレキシン細胞は大脳皮質に対して直接投射をしており, オレキシンは大脳皮質の神経細胞に興奮性に作用することが *in vitro* の実験系において示され

ている。しかし、オレキシン細胞が、大脳皮質に与える影響は生体動物 (*in vivo*) においては解明されていない。NREM 睡眠時の大脳皮質においては、神経細胞集団の活動のオンオフのリズムを反映したデルタ波 (0.5-5Hz) が生じる。NREM 睡眠時のデルタ波は、主に前頭葉や頭頂葉を発生源として、脳広領域にグローバルに伝播する。我々は、*in vivo* においてオレキシン細胞と大脳皮質のデルタ波の関係について検討した。

オレキシン細胞に光活性化型のプロトンポンプであるアーキロドプシンを発現している *Orexin-Arch* マウスを用いて実験を行った。アーキロドプシンを用いることにより、神経活動を光照射期間中のみ高い時間精度で抑制できる。オレキシン細胞が位置する外側視床下部に向けて、左右両側に光ファイバーを刺入し、光照射によりオレキシン細胞の神経活動を抑制した。そして、オレキシン細胞の抑制が、前頭葉、頭頂葉における局所場電位 (LFP, Local Field Potential) 及び LFP に比べてグローバルな神経細胞集団の活動を捉える脳波 (EEG) に与える影響を調べた。

光照射後、EEG のデルタ波のパワーは数秒程度で増強し、筋電位は数十秒程度で減弱し、数十秒程度で NREM 睡眠が誘導された。意外にも、NREM 睡眠が生じるよりも早く覚醒中に EEG のデルタ波の変化が生じたが、このデルタ波の増強は眠気に関与している可能性を考察している。NREM 睡眠の定義に用いられるデルタ波のパワーの変化に関するタイムコースを EEG と LFP 間で比較した。オレキシン細胞を抑制すると、EEG のデルタ波のパワーは急速に増強したのに対して、S1 及び M2 の LFP のデルタ波のパワーは徐々に増強した。EEG と LFP とで挙動が異なることは、EEG のみでは、各大脳皮質領域の睡眠様状態を正確に予測できないことを示している。

何故、睡眠誘導時に EEG と LFP のデルタ波のパワーのタイムコースが異なるのだろうか？ EEG と LFP との挙動の差異の原因として、LFP 間の同期性の影響が考えられる。LFP 間の同期性が増すと、LFP 間で波形同士の打ち消しあいが生じにくくなり、グローバルな神経細胞集団の活動を捉えている EEG として表出する可能性が考えられる。そこで、相互相関解析及びコヒーレンス解析により、LFP 間の同期性を調べた。オレキシン細胞の抑制により、相互相関係数のピーク値及びデルタ帯域のコヒーレンスが急速に増強した。これより、オレキシン細胞の抑制による急速な EEG のデルタ波パワーの増強は、大脳皮質領域間のデルタ波の同期性の上昇を反映している可能性

が考えられる。すなわち、睡眠誘導時に、大脳皮質は同期して情報を連絡し合っていると考えられる。

次に、前頭葉-頭頂葉間の情報連絡と睡眠状態との関係について検討した。大脳皮質領域間の情報連絡を遮断するために、前頭葉-頭頂葉間を薄いプレートを用いてカットした。前頭葉-頭頂葉間をカットしたマウスは、静止時の EEG のデルタ/シータ比が低く、睡眠状態が比較的浅くなっていた。一方で、頭頂葉内をカットしたマウスにおいては、デルタ/シータ比が維持される傾向があった。これより、単にカットによるダメージにより、デルタ波が減弱したわけではなく、デルタ波には前頭葉-頭頂葉間の情報連絡が重要であると考えられる。

前頭葉-頭頂葉間をカットしたマウスの睡眠状態の深さを別の角度から検証するために、睡眠時における感覚刺激に対する運動応答を調べた。まず、睡眠ステージを自動判定し、睡眠状態に応じて出力を返すプログラム“Sleep Blocker”を日本ナショナルインストラメンツ鴨志田氏の協力により作成した。そして、NREM 睡眠時にマウスの後肢を電気刺激した。前頭葉-頭頂葉間をカットしたマウスは体性感覚刺激に対する運動応答が大きかった。これより、前頭葉-頭頂葉間をカットしたマウスは睡眠状態が浅くなっていることが支持された。すなわち、大脳皮質領域間の情報連絡が睡眠の深さに重要であると考えられる。

オレキシン細胞の抑制は、大脳皮質内におけるデルタ波のリズムによる情報連絡を増強させた。この大脳皮質内の情報連絡は、睡眠状態を表現するだけでなく、制御している可能性が示唆された。オレキシン細胞と大脳皮質の連関が、睡眠状態に重要であると考えられる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

オレキシン神経の時期特異的運命制御を用いた新規ナルコレプシーモデルマウスの解析

田淵紗和子^{1,2,3}、常松友美^{2,3}、富永真琴^{1,2}、山中章弘^{2,4,5}

(¹総研大・生命科学・生理科学、²生理研・細胞生理、³日本学術振興会、⁴名大・環研、⁵JST さきがけ)

オレキシンは、視床下部外側野に極わずかに存在する神経から産生される神経ペプチドのひとつである。オレキシンを産生するオレキシン神経は、脳全体に広く投射している。これまでの研究から、オレキシン神経は睡眠覚醒制御に深く関わってい

るとされている。活性化したオレキシン神経は、覚醒中枢を活性化させ覚醒を促進する。一方、睡眠中枢からの抑制性入力が強くなると睡眠へと移行する。オレキシン前駆体遺伝子欠損マウスでは睡眠覚醒の分断化が観察されたことから、オレキシン神経は覚醒の維持に重要な役割を担っていると示唆されている。睡眠障害のひとつであるナルコレプシーは、オレキシン神経が特異的に脱落することによって発症することがわかっている。症状には、日中の強い眠気や睡眠覚醒の分断化、入眠時幻覚、REM睡眠異常、情動脱力発作などがある。ヒトでは、思春期や成人初期に多く発症することが知られている。しかし、未だ詳細な発症メカニズムは解明されていない。これまで用いられてきたナルコレプシーモデルマウスである *orexin/atacin-3* マウスは、生後直後からオレキシン神経が脱落するため、不完全なナルコレプシーモデルマウスであった。そこで、tet-off システムを用いて時期特異的にオレキシン神経を脱落させられる新規ナルコレプシーモデルマウス (*orexin-tTA; TetO DTA* マウス) を作成した。

Orexin-tTA; TetO DTA マウスでは、オレキシン神経特異的にテトラサイクリントランスアクティベーター (tTA) が発現する。tTA は、TetO 配列に特異的に結合しその下流のジフテリア毒素 A 断片 (DTA) 遺伝子発現を強力に誘導する。ドキシサイクリン (DOX) 存在下では、tTA は TetO 配列に結合することができないため、オレキシン神経は正常な状態に保たれる。しかし、DOX 非存在下では DTA 発現が強く誘導されるため、オレキシン神経は細胞死を起こす。このように、*Orexin-tTA; TetO DTA* マウスでは DOX によりオレキシン神経細胞死を制御可能である。まず、このマウスにおいて tet-off システムが正常に作動しオレキシン神経細胞死を DOX により制御可能かどうかを検討した。生後から DOX を与え続けた状態では、オレキシン神経細胞数がコントロールマウス (*orexin-tTA* マウスおよび *TetO DTA* マウス) と同程度であった。DOX 存在下で 10 週齢まで飼育し、その後 DOX 非存在下で飼育した。DOX 非存在下 1 週間後では、約 85% のオレキシン神経が脱落し、2 週間後には約 95% が脱落していた。このとき、オレキシン神経細胞死は、オレキシン神経存在領域において位置に偏り無く一様に起こっていた。このことから、*orexin-tTA; TetO DTA* マウスにおいて tet-off システムが正常に作動し、DOX によりオレキシン神経細胞死の時期を制御できることがわかった。

次に、*orexin-tTA; TetO DTA* マウスの睡眠覚醒パ

ターン変化を同一個体内で観察した。DOX 存在下では、活動期である暗期に覚醒状態を長く保ち、休息期である明期では徐波睡眠とレム睡眠が多くみられた。DOX 非存在下 1 週間後では、本来高い覚醒状態である暗期において、睡眠覚醒の分断化が観察された。さらに 2 週間後では、睡眠覚醒の分断化が進み、情動脱力発作が発現した。その後、時間経過に伴い睡眠覚醒の分断化が著しくなり、情動脱力発作頻度も上昇し続けた。生後直後から DOX 非存在下で飼育したマウスでは、DOX 非存在下 13 週間後よりも残存オレキシン神経細胞数が少ないにもかかわらず、睡眠覚醒の分断化があまりみられず、情動脱力発作頻度も DOX 非存在下 3 週間後程度であった。既存のナルコレプシーモデルマウスである *orexin/ataxin-3* マウスでは、残存オレキシン神経細胞数は DOX 非存在下 2 週間後と同程度であり、睡眠覚醒パターンも類似していた。*Orexin-tTA; TetO DTA* マウスにおいて、情動脱力発作頻度が上昇しても発作持続時間には変化がなかった。

以上の結果から、約 85% のオレキシン神経が脱落することにより睡眠覚醒の分断化が起こり、約 95% の脱落により情動脱力発作が発現することが明らかとなった。さらに、発達後にオレキシン神経を脱落させることで、より顕著なナルコレプシー症状となることがわかった。本研究により、オレキシン神経細胞数とナルコレプシー諸症状発症との相関を初めて明らかにすることができた。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

レム睡眠中の急速眼球運動と脳活動の機能的意義

小川景子

(広島大学大学院総合科学研究科)

一晩の睡眠は、抗重力筋の緊張が低下し身体に力が入らないが、急速眼球運動が生じ脳波活動は覚醒中と類似した状態を示すレム睡眠と、急速眼球運動は生じず脳波も覚醒中とは異なり高振幅徐波を示すノンレム睡眠に分類される。先行研究により、ノンレム睡眠中よりもレム睡眠中により鮮明な夢を見ることが示されている [1]。さらに、レム睡眠中でも眼球運動が頻繁に出現する時期では出現しない時期よりも夢見体験が多く、内容もより臨場感にあふれる鮮明な視覚的要素を多く含むことが報告されている。また、単位時間当たりの急速眼球運動の頻度 (密度) が高いほど夢の内容が活発で積極的になり、鮮明度が増すことや、情動性も高まることも報告され、レム睡眠中の急速眼球運動と臨場感あふれる夢見体験の関連が示唆

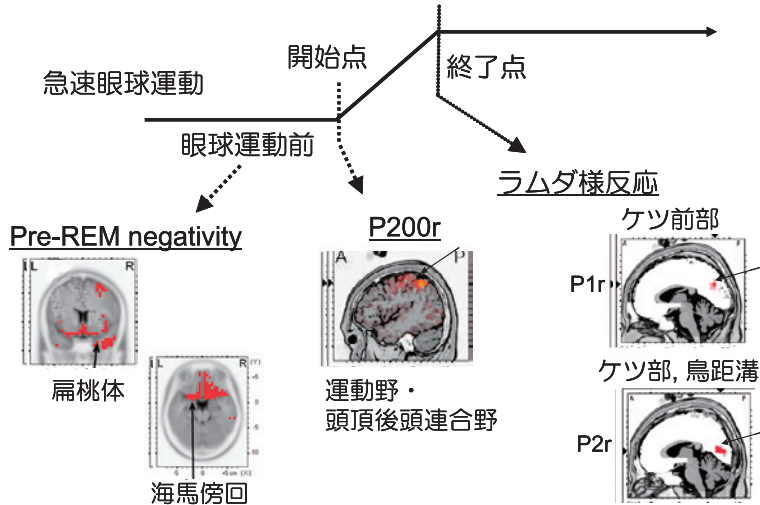


図1. レム睡眠中の急速眼球運動に伴う脳電位の発生源* [2-7]

*LORETA [8] を用いた電源推定結果

左：急速眼球運動前に出現する Pre-REM Negativity の電位発生源

中央：急速眼球運動の開始に伴う P200r の電位発生源

右：急速眼球運動の終了に伴うラムダ様反応の電位発生源

されている。しかし、これまでは夢の主観報告に基づいた検討が主であり、急速眼球運動と夢見体験の関連について客観的な検討が行われてこなかった。

そこで本研究では、急速眼球運動に関連する脳電位（事象関連電位）を用いることで、急速眼球運動の夢見体験に関する機能的意義について検討することとした。事象関連電位を用いることで、ある特定の事象に関連した大脳皮質の神経活動について時間的順序性を考慮した検討が可能となる。

レム睡眠中の急速眼球運動は、覚醒中のサッケードと運動形態が類似している。サッケードとは、覚醒時にある注視対象から別の注視対象へと視点を移動させる際の眼球の非常にすばやい動きのことをいう。両眼球運動の類似性より、脳活動に及ぼす影響も類似している可能性が予測できる。そこで、発表者は、サッケードに伴う事象関連電位を手がかりに、レム睡眠中の急速眼球運動に伴う脳活動を検討した。具体的には、急速眼球運動の開始前、開始時点、終了時点に関連する脳電位を検討し、急速眼球運動と鮮明な夢生成の背景となり得る脳活動について考察した。

検討の結果、急速眼球運動とそれに伴う脳活動について以下の4点が示された。①覚醒中のサッケード前に出現し、眼球運動前の意図的な準備活

動を反映する脳電位についてレム睡眠中の急速眼球運動に関して検討した。その結果、急速眼球運動前に類似した準備電位は出現しないことが示され、急速眼球運動と覚醒中のサッケードとは発生機序が異なる可能性を示した [2]。一方、②覚醒中には認められない陰性電位（Pre-REM Negativity）がレム睡眠中の急速眼球運動開始前に出現し [3]、その発生源は記憶や情動に係る海馬傍回・扁桃体に推定された（図1左） [4]。③急速眼球運動開始に伴い同じく覚醒中には認められない陽性電位（P200r）が出現し [5]、その発生源は視覚運動知覚経路である運動前野・頭頂後頭連合野に推定された（図1中央） [6]。最後に、④急速眼球運動の停留に合わせて、覚醒中の視覚情報処理に係るラムダ反応と類似した脳電位（ラムダ様反応） [2] が観察され、その発生源は後頭部視覚野に推定された（図1右） [7]。覚醒中のラムダ反応も後頭部視覚野に発生源が推定されている [7]。レム睡眠中の急速眼球運動に合わせて生じるこれらの一過性の脳活動が、レム睡眠中のありありとした夢見体験の生成に関与すると考えられる。

続いて、急速眼球運動に関連するこれらの脳電位について、実際の夢内容との対応性を検討した。検討の結果、夢を見た場合で見なかった場合よりも急速眼球運動密度が増大した。さらに、夢の印

象度と急速眼球運動密度との間に正の相関 ($p < .05$) が見られ, P200r 振幅は夢の活動性 ($p < .01$) と奇異性 ($p < .05$) との間に正の相関関係を示した。

発表者らの一連の研究により, レム睡眠中の急速眼球運動およびこれに伴う脳活動が, レム睡眠中に特有のありありとした夢見体験の生成と関連することを示した。夢の精神生理学的検討は, 夢生成のメカニズムだけでなく, レム睡眠中の急速眼球運動や脳活動の機能的意義の検討に貢献すると考えられる。

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない

1. Dement et al: J Exp Psychol **55**: 543-553, 1958
2. Ogawa et al: Sleep **28**: 1077-1082, 2005
3. Abe et al: Neuroreport **15**: 735-738, 2004
4. Abe et al: Clin Neurophysiol **119**: 2044-2053, 2008
5. Ogawa et al: Clin Neurophysiol **120**: 18-23, 2009
6. Ogawa et al: JSR **19**: 407-414, 2010
7. Ogawa et al: SBR **28**: 1077-1082, 2006
8. Pascual-Marqui et al: Int J Psychophysiol **18**: 49-65, 1994

レム睡眠中枢とその発生学的起源に関する遺伝学的解析

林 悠¹, 酒井一弥², 安田光佑¹, Julia Nguyen¹, 安藤れい子¹, 糸原重美¹

(¹理研・脳・行動遺伝学技術開発チーム, ²INSERM・Neuroscience Research Center)

私たちヒトの睡眠は一樣な生理状態ではなく, レム(急速眼球運動)睡眠と徐波睡眠という2種類の非常に特徴的な睡眠ステージが存在する。ヒトは眠りに落ちると浅い睡眠ステージを経た後, この2種類のステージの間を朝まで行ったり来たりする。レム睡眠は夢を生じることでよく知られ, 感覚入力がないにも関わらず脳では覚醒時と似た活動状態が観測される。一方, 徐波睡眠はいわゆる深い眠りに相当し, 徐波とよばれる大脳皮質などの非常にゆっくりとした同調的神経活動を特徴とする。このように睡眠が複雑な生理状態へと進化した動物種は一部の脊椎動物に限られている。中でも夢を生じるレム睡眠は広く一般に知られ, 様々な分野の人の注目を集めてきた。しかしながら, その発見から50年以上経った今なおその生理的意義はほとんど分かっていない。また, レム・徐波睡眠のスイッチ回路を担う脳部位についても, 不明な点が多い。ネコにおいて, 脳幹にある

橋網様体と呼ばれる部位に特定の薬剤を注入すると, 直ちにレム睡眠に陥る。しかしながら, 古典的な生理学的手法では, 橋網様体に混在する様々なニューロンのうち, どのサブタイプがレム睡眠の制御に関わるかは不明であった。

そこで, 本研究ではレム睡眠と徐波睡眠の間を切り替えるスイッチ回路を遺伝学的に同定し, その活動を人為的に操作できることを目指してきた。この回路の活動を操作することで非侵襲的にレム睡眠を阻害できれば, レム睡眠の生理的意義に関するヒントが得られると期待される。方法としては, 一過的に神経興奮を引き起こすことのできる DREADD-hM3Dq という組換え G タンパク質共役型受容体を利用した。この受容体を脳幹の橋に細胞種特異的に発現させ, 神経興奮を引き起こした際に, レム睡眠やノンレム睡眠が影響を受けるか検討した。その結果, 橋網様体において, レム睡眠を強く促進する細胞群と抑制する細胞群の双方の同定に成功した。特にレム睡眠抑制細胞群の活性化により, レム睡眠を任意のタイミングで一過的に阻害することが可能となった。従って, 今後レム睡眠の生理的意義を検討する上でも, 非常に有用なモデルとなると期待される。

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

覚醒機構におけるノルアドレナリンニューロン, ヒスタミンニューロンの役割

高橋和巳

(福島県立医科大学・医学部・神経生理学講座)

視床下部後部の結節乳頭核ヒスタミン (HA) ニューロン及び青斑核のノルアドレナリン (NA) ニューロンは多くの脳領域に投射し, その活動は覚醒時に特異的であることなどから覚醒状態の発現に重要であると考えられている。一方, 睡眠の神経機構については, 視索前野 (POA) にあり睡眠時特異的に活動する GABA ニューロン (「睡眠ニューロン」) が活性化し, HA ニューロン, NA ニューロンあるいは視床下部外側部のオレキシン (Ox) ニューロンなどの「覚醒ニューロン」を抑制することで睡眠が開始するとされている。この説が正しければ, 睡眠開始時の POA 睡眠ニューロンの活動上昇は, 覚醒ニューロンの活動低下に先行し, 睡眠の終了 (覚醒の開始) 時には睡眠ニューロンの活動低下が覚醒ニューロンの活動上昇に先行すると考えられる。この点を検証するため, HA ニューロン, NA ニューロン, Ox ニューロンに加え, POA 及び前脳基底 (BFB) の睡眠ニューロン及び覚醒ニューロンの単一ユニット活

動を睡眠・覚醒中のマウスで記録した。その結果、睡眠の開始時には、脳波の同期化と POA/BFB 睡眠ニューロン活動の開始に先行して、全ての覚醒ニューロン群の活動が有意に低下していた。覚醒の開始時には、NA ニューロンが最も早く活動を開始し、HA ニューロンを除く覚醒ニューロンの活動開始は、脳波の脱同期化と POA/BFB 睡眠ニューロン活動の有意な低下に先行していた。HA ニューロンは常に脳波の脱同期化の後に活動を開始した。これらの結果は上記の仮説を支持せず、睡眠と覚醒の切替えには POA 睡眠ニューロンではなく脳内の覚醒ニューロン群の活動変化が重要な役割を果たすことが示唆された。HA ニューロンは覚醒の開始ではなく維持に関与すると考えられる。

また、我々は青斑核 NA ニューロンの覚醒状態の発現に果たす役割を探るため、マウスの NA ニューロンにヒトインターロイキン 2 受容体 α サブユニットを発現させ、これと特異的に作用するイムノトキシンを用いて NA ニューロンの選択的な破壊を行った。このようなマウスでは一日の総覚醒時間に変化は見られないが、各覚醒状態の平均持続時間が短くなっていた。この結果は青斑核 NA ニューロンが主に覚醒の開始ではなく覚醒の維持に重要であることを示唆している。したがって NA ニューロンのユニット活動記録で得られた脳波覚醒の開始に先行する活動の意義については今後のさらに詳細な解析が必要と考えられる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

小胞体ストレス応答による生体機能調節

今泉和則

(広島大院・医歯薬保・分子細胞情報学)

細胞内外からの様々な刺激によりタンパク質の成熟が障害されると、小胞体内に不良タンパク質が蓄積し細胞にダメージを与える。この状態を小胞体ストレスという。細胞は直ちにストレスから回避するための防御システムを活性化させる(小胞体ストレス応答)。哺乳細胞では異常タンパク質の蓄積を感知して細胞質あるいは核内に情報を伝達する3つの小胞体ストレスセンサー(IRE1, PERK, ATF6)が小胞体膜上に存在する[1]。これら分子は翻訳抑制、シャペロン誘導、小胞体関連分解という3つの応答系を活性化することでストレスから細胞を救済する。最近、小胞体ストレスセンサーであるATF6と構造的に類似したCREB/ATFファミリーに属する膜貫通型転写因子が5つ見つかり、そのうちの2つ、OASIS(骨芽細胞に発現)およびBBF2H7(軟骨細胞に発現)を我々は見出すことに成功した[2, 3]。各遺伝子の欠損マウスの解析等から以下に示す新知見を得た。

1) OASIS: 遺伝子欠損マウスは全身の骨形成不全を示し、大腿骨や脛骨などの長骨では骨折もしばしば観察された。OASIS欠損により発現変動する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析したところ、骨基質の主成分であるI型コラーゲンの転写がOASIS欠損マウスで減少していることがわかった。プロモーター解析、ChIP解析、ゲルシフトアッセイ等により、OASISがI型コラーゲンのプロモーター領域の中に存在するCyclic AMP response element (CRE) 類似配列に直接結合することで転写を誘導することが明らかになった。さらにこのOASISの活性化は、未分化間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する際に生じる小胞体ストレスに依存することも明らかになった。

2) BBF2H7: 遺伝子欠損マウスは全身の軟骨形成が著しく低下し、胸郭形成不全のため生後間もなく呼吸困難により死亡する。骨端部の増殖軟骨細胞では粗面小胞体内に軟骨基質であるII型コラーゲンやCOMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) が大量に蓄積していた。BBF2H7の転写ターゲットを網羅的に解析した結果、ターゲットの候補として小胞体-ゴルジ装置間輸送に必須の分子であるSec23aを見出した。BBF2H7欠損軟骨細胞にSec23aを過剰発現させると小胞体の異常拡張はレスキューされ、内部に貯留していた軟骨基質タンパク質が速やかに細胞外に分泌された。これら結果から、BBF2H7欠損による軟骨形

成異常は、Sec23aの発現低下のために軟骨基質が小胞体からゴルジ装置に輸送されず、その結果として軟骨基質の分泌低下を招いたことが原因であることがわかった。

小胞体ストレスセンサーから発信されるシグナルは、小胞体ストレスに対する細胞保護作用が主な役割であると考えられてきた。しかし、今回示したように骨軟骨組織においては細胞の分化・成熟の段階で細胞外マトリックスタンパク質のダイナミックな代謝に重要な役割を担っていることが明らかになった。小胞体ストレスを介する細胞分化の仕組みは、骨軟骨以外にも中枢神経系のアストロサイト[4]や消化管粘膜の杯細胞[5]でも確認されており、小胞体ストレス応答シグナルは多くの細胞の分化調節に深く関わる可能性が高い。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Kaufman RJ: J Clin Invest **101**: 1389-1398, 2002
2. Kondo S et al: Nature Cell Biol **7**: 186-194, 2005
3. Kondo S et al: Mol Cell Biol **27**: 1716-1729, 2007
4. Saito A et al: Nature Comms **3**: 967, doi: 10.1038/ncomms1971., 2012
5. Asada R et al: J Biol Chem **287**: 8144-8153, 2012

玄米由来成分 γ -オリザノールはマウスにおいて視床下部小胞体ストレス抑制を介して摂食行動を改善する。

小塚智沙代¹, 屋比久浩市¹, 高山千利¹, 松下正之¹, 親泊政一², 島袋充生³, 益崎裕章¹

(¹琉球大学大学院・医学研究科, ²徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・生体機能分野, ³徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・心臓血管病態医学分野)

玄米とは稲の果実、籾から籾殻のみを取り除いたものであり、玄米からぬかと胚芽を取り除き、胚乳のみの状態にしたものが精白米である。玄米はかつて「完全食」と呼ばれたように食物繊維やビタミンB群をはじめ豊富な栄養成分が含まれている。沖縄県のメタボリックシンドローム患者を対象に行われた研究(「玄米食の内臓肥満および糖脂質代謝に及ぼす影響」試験; BRAVO研究)では、玄米が食後の血糖値、インスリン値の上昇を抑えること、さらに、1日3食の主食を2ヶ月間玄米に替えることで、体重減少や糖代謝が改善することが示された。アメリカで行われた疫学研究

においても、玄米が白米に比べ糖尿病の発症リスクを減少させることが報告されている [1].

玄米による肥満症、糖尿病予防効果のメカニズムを明らかにするため、玄米、白米のそれぞれについて、通常食 (CD) および高脂肪食 (HFD) をベースとして、栄養比率・エネルギー含量を統一した混合餌を作成し、マウスに給餌した。玄米を混合した高脂肪食を給餌したマウスでは、食後高血糖の上昇や耐糖能・インスリン感受性の悪化が改善された。白米を混合した高脂肪食ではこれらの効果は認めなかった。マウスはヒトと同様に高脂肪食への嗜好性が強い動物であり、通常食と高脂肪食を選択させると高脂肪食を食べて肥満する。しかし、玄米を混合した通常食と高脂肪食を選択させると、マウスは通常食を好んで食べるようになり、体重の増加が抑制された。一方、白米を混合した餌を選択させた場合には、このような変化は見られなかった。これらの結果から、玄米が高脂肪食に対する嗜好性を軽減させていることが示唆された。玄米による高脂肪食に対する嗜好性軽減効果を担う成分として、私達は玄米にほぼ特有の有効成分である γ オリザノールを見出した。 γ オリザノールは1953年に土屋、金子らにより玄米中から分離抽出された数種のトリテルペンアルコールのフェルラ酸エステル化合物で、米ぬかに含まれる玄米特有の物質である [2]。 γ オリザノールを経口投与したマウスにおいても、通常食を好んで食べることから、玄米による行動変容に γ オリザノールが関与することが示唆された。

高脂肪食に対する嗜好性が変化するメカニズムとして、私達は視床下部における小胞体ストレス (ER ストレス) に注目した。小胞体はタンパク質の合成、修飾、立体構造への折りたたみをつかさどるオルガネラである。正常に折りたたまれないタンパク質が小胞体に蓄積し、小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) が活性化した状態を ER ストレスと呼ぶ。視床下部における ER ストレスの亢進はレプチンシグナルを抑制し、摂食抑制作用を減弱させることが示されている [3]。高脂肪食負荷マウスでは視床下部における ER ストレスが亢進しており、白米を混合した高脂肪食を与えても同様であった。一方、玄米を混合した高脂肪食を与えたマウスでは視床下部における ER ストレスが通常食給餌マウスと同程度まで抑制され、玄米が高脂肪食の摂取により亢進した視床下部における ER ストレスを抑制していることが確認された。 γ オリザノールを経口投与した高脂肪食負荷マウスにおいても、容量依存的に視床下部における ER ストレスの亢進が抑制さ

れた。ER ストレス抑制剤である 4-フェニル酪酸 (4-PBA) を投与し ER ストレスを抑制したマウスに通常食と高脂肪食を選択させると、4-PBA 投与マウスでは対照マウスに比べ通常食をより多く選択した。以上の結果から、高脂肪食を摂取することにより視床下部において ER ストレスが亢進し、さらに高脂肪食を好んで食べるようになる、という高脂肪食への依存状態を引き起こす悪循環が起きていることが明らかとなった。さらに、玄米や γ オリザノールを食生活に取り入れることにより、視床下部における ER ストレスの亢進を抑制し、この悪循環を解除することができると考えられた (特許出願済み : 益崎裕章, 小塚智沙代ら, 特願 2012-005883, 特願 2012-280303, 特願 2013-9341) [4, 5].

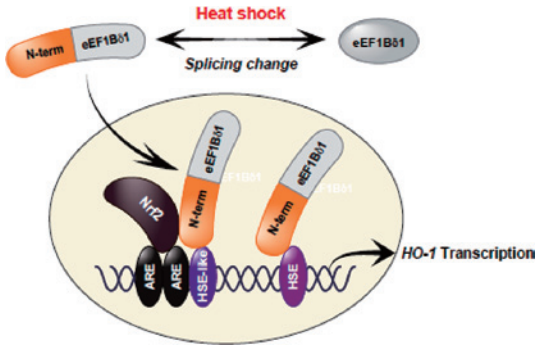
本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Sun Q et al: Arch Intern Med. **170**: 961-969, 2010
2. 金子良平ら: 東京工業試験所報告 **49** : 142, 1954
3. Ozcan L et al: Cell Metab **9**: 35-52, 2009
4. Kozuka C et al: Diabetes **61**: 3084-3093, 2012
5. Kozuka C et al: Obes Res Clin Pract **7**: e165-e172, 2013

転写機能を持つ翻訳因子によるストレス応答機構 松下正之

(琉球大院・医・分子細胞生理学)

低酸素応答機構を解明するためにハエ RNAi ライブラリーを用いて低酸素条件下での個体レベルでの生死を指標にスクリーニングを行い、新たな低酸素応答遺伝子を発見した。この研究によって発見された遺伝子の中に SIRT2 があった。SIRT2 は細胞質に存在する NAD 依存性の脱アセチル化酵素である。我々は SIRT2 の基質をプロテオーム解析を用いて検索し、eEF1B δ 蛋白質を基質として同定した。この蛋白質は、翻訳因子として知られている 40kda に相当する分子量の eEF1B δ が知られていましたが、マウスで組織分布を調べてみる 90kda 付近に脳と精巣に特異的に存在する蛋白質の存在が確認された。eEF1B δ ゲノム解析により、Exon III がスプライシング変化することにより 90kda の蛋白質が生み出されることがわかり、この大きい分子を我々は eEF1B δ L と呼んでいる。eEF1B δ L の機能解析を行ったところ、核内にも存在し過剰発現によるアレキ解析により、酸化ストレス応答の重要な遺伝子である HO-1 やシャペロン遺伝子群の発現を高めることを見出した。また、



eEF1B δ Lの組換え蛋白質はHSE DNAと直接結合し、ChIP Assayでもストレス依存性に結合が増強する結果が得られた。これらの結果より、図のようにeEF1B δ はスプライシング変化によって翻訳因子から転写因子に機能変化することを明らかにした。

神経細胞はエネルギー消費量が多く代謝変化に脆弱である。そのため、代謝変化が引き起こすミトコンドリアに起因する酸化ストレスにより神経変性疾患等が発症すると考えられている。アルツハイマー病やパーキンソン病は原因遺伝子が同定されている家系もあるが、多くの患者では遺伝性の背景は不明である。これらの神経変性疾患はシャペロン病とも呼ばれ、異常蛋白質の蓄積が分子病理の本質である。SIRT2の基質として発見したeEF1B δ Lは、神経細胞に高発現し、ストレス時に翻訳因子から転写因子へと変化しシャペロン蛋白質群の誘導を行う。神経細胞においては、加齢によるエネルギー状態変化に伴うシャペロン蛋白質発現制御の中心転写因子である可能性があり、eEF1B δ Lの遺伝子改変マウスの結果などについても議論が行われた。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Kaitsuka T et al: Transformation of eEF1B-delta into heat shock response transcription factor by alternative splicing. EMBO Reports 12: 673-681, 2011

翻訳精度維持における tRNA 修飾の役割及びその破綻による病態の解析

魏 范研 (熊本大学大学院生命科学研究部)

tRNAは翻訳時においてmRNAの遺伝情報を読み取る小分子RNAである。興味深いことに、tRNAを構成する多くの塩基は化学修飾を受けている。中でもアンチコドン及びその近傍の領域に

位置する塩基は特に多彩な修飾を受けている。しかし、哺乳動物においてtRNAの化学修飾の生理機能また修飾に関わる多くの酵素はまだ不明である。

最近、哺乳動物におけるtRNA修飾酵素であるCdk5 regulator subunit associated protein 1-like-1 (以下Cdkal1)が2型糖尿病リスクを高める因子として初めて同定された [1, 2]。Cdkal1は、リジンコドンに対応する二つのtRNAのうちアンチコドンの配列がUUUであるtRNA^{Lys}(UUU)を特異的に認識し、アンチコドンすぐ近傍の37位アデニンをチオメチル(S-CH₃)修飾を行う [2]。一般的にコドンとアンチコドンの結合は、それらの塩基間の水素結合によって形成される。しかし、最近の結晶解析からアンチコドン外である37位のチオメチル基のチオール基がリジンコドンの第一字目のAと強固な化学結合を形成することが明らかになった。ルシフェラーゼを利用したレポーターアッセイから、37位のチオメチル化はリジンコドンの正確な翻訳に重要であることが明らかになった [2]。膵β細胞特異的Cdkal1欠損マウス(Cdkal1 KO)を作製し、さらに検討を進めたところ、Cdkal1 KOマウスにおいてプロインスリン翻訳時に取り込まれるリジンの量が有意低下していた。プロインスリンはリジン残基において成熟型インスリンへと切断されるから、リジンにおける翻訳異常が成熟型インスリンの産生を妨げることが予想された。実際、Cdkal1 KOマウスでは成熟型インスリンの指標であるC-peptideの量が有意に低下していた。細胞内において異常タンパクの蓄積は小胞体ストレス応答を引き起こし、細胞機能を低下させることが知られている。Cdkal1 KOマウスの膵β細胞においても小胞体ストレス応答に関わる遺伝子(spliced Xbp1)の発現量が野生型マウスと比べ有意に上昇していた。膵β細胞における誤翻訳及びそれによる小胞体ストレスが原因となり、Cdkal1 KOマウスはインスリン分泌低下及び耐糖能障害といった2型糖尿病様の症状を呈した。

一方、Cdkal1と相同性を持つタンパクとしてCdk5rap1が存在する。Cdk5rap1はミトコンドリア局在シグナルをN末端に持つ。蛍光免疫染色によりCdk5rap1はミトコンドリアに局在することが確かめられた。ミトコンドリアは独自のDNAから転写されるtRNA群を持つ。質量分析法を用いて検討したところ、Cdk5rap1はトリプトファン、セリン、チロシン、フェニルアラニンに対応するtRNAの37位アデニンをチオメチル化することが明らかになった。また、ルシフェラーゼを

利用したレポーターアッセイを用いて検討したところ、Cdk5rap1 による tRNA のチオメチル化は翻訳時のフレームシフト抑制に重要であった。ミトコンドリアでは、電子伝達系に関わる 13 種類のタンパクを独自の翻訳システムで翻訳する。Cdk5rap1 欠損マウス (Cdk5rap1 KO) 由来の MEF 細胞では、ミトコンドリアでのタンパク合成が低下していた。組織レベルにおいて Cdk5rap1 KO マウスの筋及び心臓において電子伝達系を構成するミトコンドリアタンパクの量が低下し、電子伝達系の活性が低下した。また、筋及び心臓において Cdk5rap1 KO マウスのミトコンドリアが異常的に肥大した形態が観察された。Cdk5rap1 欠損によるミトコンドリアタンパクの翻訳異常は、Cdk5rap1 KO マウスの筋機能及び心機能を顕著に低下させた。

以上の結果から、細胞質及びミトコンドリアにおける tRNA の 37 位に存在するチオメチル化は、コドンとアンチコドンの安定な結合に必要であり、正確な翻訳に重要であることが明らかになった。チオメチル化欠損は、小胞体ストレスやミトコンドリア機能障害といった細胞機能障害を引き起こし、その結果、2 型糖尿病やミトコンドリア病の発症につながるということが明らかになった。

tRNA の化学修飾を介した細胞の生理機能制御は生理学においてこれまで全く注目されなかった分野である。前述したように、37 位の修飾以外にも tRNA に多彩な修飾が存在し、様々な生理現象及び疾患に関わる可能性がある。今後、これらの化学修飾の生理機能に焦点をあて解明していく必要があると考える。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Steinhorsdottir V et al: Nat Genet **39**: 770–775, 2007
2. Wei FY et al: J Clin Invest **121**: 3598–3608, 2011

翻訳トランス因子による軸索局所翻訳制御と神経疾患との関連

佐々木幸生 (横浜市大院・医・分子薬理神経生物, 現: 横浜市大院・生命医科学)

神経細胞は時には 1m も軸索を伸ばすため、軸索先端部では細胞体から半独立した翻訳調節を行うシステムが重要な役割を果たしている。すなわち、mRNA が運搬する遺伝情報を軸索先端で細胞外刺激に応じて「地方分権的」に局所翻訳する機構が軸索伸長、及び軸索ガイダンス等の軸索機能に必要であると考えられている。それを担う分子

が翻訳トランス因子である。翻訳トランス因子とは mRNA 上の特定のシス配列に結合し、翻訳を調節する因子である。翻訳トランス因子は大きく分けて二種類あり、一つは、シス配列に特異的に結合し、翻訳を調節する RNA 結合タンパク質で、Zipcode binding protein 1 (ZBP1) や Fragile X mental retardation protein (FMRP) がその例として挙げられる。我々は今まで β -アクチン mRNA 結合タンパク質である ZBP1 が脳由来神経栄養因子の刺激に応じて成長円錐で局所翻訳を調節し、軸索ガイダンスに関与することを示してきた [1]。もう一つは、シス配列に特異的に結合する非コード RNA であるマイクロ RNA (miRNA) がその例である。今回は miRNA とその結合タンパク質に注目して神経軸索機能における役割を検討した。

miRNA は一本鎖非コード RNA のうちの一つで、18-25 塩基程度と小さな RNA である。miRNA は Argonaute (Ago) タンパク質を主要成分とする複数のタンパク質と RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる複合体を形成し、特定の mRNA に結合することにより翻訳を制御する。しかし、Ago タンパク質が軸索に局在することは報告されていたが、miRNA の軸索や成長円錐における局在は未知であった。我々は軸索を高純度・高収率で回収できる新規培養法「ニューロンボール法」を開発し、軸索に局在する miRNA のプロファイリングを行った。その結果、数種の miRNA が細胞体に比べ軸索により多く存在していた (論文投稿中)。蛍光 in situ ハイブリダイゼーションで局在を確認したところ、これらの miRNA の多くは軸索だけでなく、成長円錐にも多く局在していた。従って、何らかの分子機構がこれらの miRNA の成長円錐の局在に関与し、それが局所翻訳の調節を行う可能性がある。

FMRP は脆弱 X 症候群 (Fragile X syndrome: FXS) 原因遺伝子産物であり、mRNA だけでなく、miRNA、Ago、及びモータータンパク質と相互作用できる。従って、FMRP は Ago タンパク質あるいは自身が結合した miRNA の輸送に関与する可能性がある。我々は Ago タンパク質と FMRP が軸索及び成長円錐で共局在することを明らかにし、これらの複合体が miRNA を軸索末端に輸送する可能性を示した。さらに、我々は神経軸索ガイダンス因子であるセマフォリン 3A (Sema3A) による翻訳依存的な成長円錐の形態変化が FMRP を介していることを見いだした [2]。Sema3A 刺激により成長円錐内で FMRP が減少し、それがプロテアソーム阻害剤で抑制されることから、FMRP の成長円錐内での分解が局所翻訳

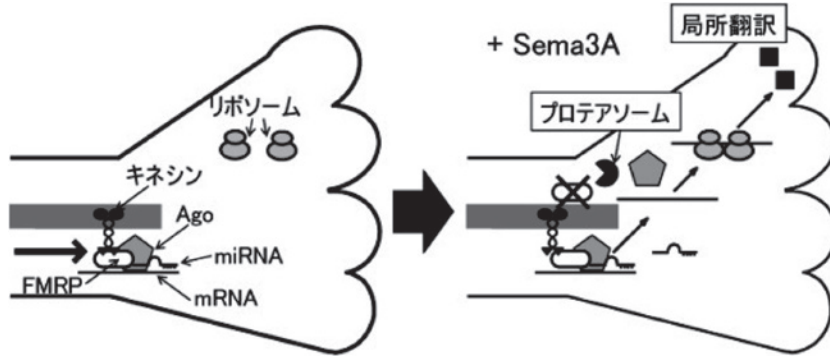


図1. FMRPによるmiRNAを介した局所翻訳のモデル
miRNA-mRNA-Ago複合体がFMRPを介して軸索末端まで輸送される。Sema3Aのような細胞外刺激によりFMRPが分解され、miRNAがmRNAから解離することにより局所翻訳が開始される。

に重要である可能性が示唆された。以上より、我々は次のようなモデルを考えている(図1)。FXSは遺伝性の精神発達障害としては最も頻度の高い疾患である。FXSモデルマウスにおいてはシナプスの形態異常と短期及び長期可塑性の異常が見られ、病態との関連が示唆されている。今回、我々

が示したmiRNAを介した局所翻訳調節の破綻もFXSの病態に関与する可能性があり、今後検討していきたい。本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Sasaki et al: J Neurosci **30**: 9349–9358, 2010
2. Li et al: Front Neural Circuits **3**: 11, 2009

イメージング技術を用いた医薬品開発・臨床研究の支援

松井博史 (株式会社マイクロン)

PET, MRIといったイメージング技術は、近年様々な研究に用いられるようになってきている。弊社は製薬会社などからの依頼を受け、新薬候補の画像評価の実施を支援することを主業務とする imaging CRO (imaging Contract Research Organization) と呼ばれる業態であるが、近年弊社の主な事業範囲でもある治験と、一般の研究機関が行う研究との乖離が従来ほど厳密ではなくなってきたことにより、研究者から研究支援を求められることが多くなってきた。そこで、イメージング技術を用いた研究の支援、及び先進医療申請下の研究等高度な管理を求められる研究の支援の2つの側面から、アウトソーシングによる研究の効率化について具体的な例を紹介又は提案させて頂いた。

イメージングを用いた研究のアウトソーシング具体例として、①画像解析・画像点検の代行、②解析の自動化プログラム提供、③撮像等の協力、④統計解析支援、の4つを挙げることができる。

①は、画像データの処理に関するアウトソーシングである。イメージング研究では撮像後に、的確な画像であったかの点検及び研究目的に応じた画像解析を行うことが多いが、1被験者あたり膨大な時間がかかり、かつ高度な専門性が要求される。そのような人員を用意できないあるいはマンパワー不足である場合、アウトソーシングが有用であると考えられる。②は1の特殊例である。イメージング研究に限らず、データ量の多い研究では繰り返し作業が大量に発生することが多い。そのような場合、研究者が根性で処理したり慣れない自動化処理をプログラムするよりも、こういった作業に慣れたプログラマー等がいる会社に依頼したほうが、研究者のリソースをより有効に配分できることも多い。また、アウトソースすること自体がこれまでやってきた作業の明確化、文書化につながる。③は研究員や事務員自体の派遣を含むが、例えばMRI撮像のための放射線技師、PET製剤作成のための技術者、神経心理データ採取のための臨床心理士などの不足による依頼もある。④は通常の統計解析である。イメージング研究特有の解析が存在すること、医学研究等では統計解析担当者が不足しがちであることから、弊社にも問い合わせが多い。近年学会誌によっては投稿の際に統計解析担当者の氏名とスキルを記載するよう求められることがあることも一因のようである。

高度な管理を求められる研究の具体例としては、(A) 多施設研究の支援、(B) 規制対応、(C)

手順書の作成等が挙げられる。(A)は、例えば複数の病院で症例を集めるような研究である。このような研究の場合、施設間でのデータの標準化、事務手続き等に多大な時間を要する。従って何らかの形で事務を行う人材を確保する必要が生じることが多い。Bは、例えばPET製剤の製造を、治験薬GMP (Good Manufacturing Practice) という規制に対応させたい場合等である。研究によっては用いるコンピュータの管理にも規制がかかるが、対応経験のない研究者や施設の事務員には対応が非常に難しく、アウトソースすることが現実的である。また、高度な管理を行う研究の場合、何らかの形で監査が想定されることが多いことから、詳細な業務内容の文書化、すなわち(C)手順書の作成が必要となる。

上記のようなアウトソーシングを推進するにあたり、最大の問題となるのはやはり金銭面であると考えられる。研究者が考える人件費と、企業が自社の社員を1日業務に従事させる場合の請求額には大きな開きがあることが多い。また、当然だがアウトソースの場合、一日あたりの費用は研究者が直接雇用した場合よりも高くなってしまふ。しかし、必要な人材を必要な量だけ獲得できるアウトソースを利用することで、プロジェクト全体の効率を上げるという意味では最も効率のよい投資となることが多いと思われる。また、企業を研究に参加させることで、研究者が自らの研究効率を見つめなおすきっかけにもなるのではないかと自らの経験からも考えている。

本発表に関して開示すべき利益相反はない。

大学発バイオベンチャーによるモノクローナル抗体作製受託サービス

立花太郎

(株式会社細胞工学研究所, 大阪市立大学大学院工学研究科細胞工学研究室)

モノクローナル抗体は特定の分子に対して高い特異性と親和性を有し、非常にパワフルな研究ツールである。様々な研究分野で利用されているが、自分の研究目的に適した抗体が市販されていることはまれであり、ほとんどの場合は新たに作製する必要に迫られる。しかしその作製には多大な労力と時間が必要で、成功率も高くはない。

私達は大学研究室において、長年モノクローナル抗体作製法の改良に取り組み、非常に短期間で多数のモノクローナル抗体を作製する方法の開発に成功した。そしてバイオベンチャー企業を設立し、この作製法をベースとしたモノクローナル抗体の受託作製サービスを開始した。これまで抗体

の受託作製サービスにおいては抗体の品質保証がなく、「使えない」抗体であっても各研究者は作製料金を支払う必要があった。私達は研究者のリスクを低減させるため、受託作製に完全成功報酬制を導入し、「使える」抗体を作製できた場合のみ、費用が発生するサービスとした。

本シンポジウムでは私達のこれまでの経験から感じた、抗体受託作製サービスのメリットおよびデメリットを紹介する。

本発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。