1P233

イモリ嗅上皮でのシグナル伝達タンパク質の発現解析

○高島 大貴¹、岡野 恵子²、澤田 研¹、中村 整²、岩佐 達郎¹ (¹ 室蘭工大・材料物性、² 電通大・量子物質)

嗅覚受容体は現在知られている G タンパク質共役受容体中でもっとも大きな遺伝子グループであり、嗅覚の受容・情報処理機構には未だ多くの問題が残されている。嗅覚受容体遺伝子はそのコードするアミノ酸配列の相同性から、水性の匂い分子受容に関わると考えられるクラス I 受容体と揮発性匂い分子受容に関わるクラス II 受容体に分類され、両生類アフリカツメガエルでは両クラスの受容体が見つかっている。

我々は両生類であるアカハライモリ (*Cynopus pyrrhogaster*) 嗅上皮から cDNA ライブラリーを作製し、そこから、嗅覚受容体や「匂い分子結合タンパク質」等の匂い分子受容に関わるタンパク質遺伝子や嗅覚情報伝達に関わると期待されるタンパク質遺伝子をクローニングした。嗅覚受容体遺伝子として、Cp-OR1 - 5 の 5 種類の遺伝子全長または断片を得ている。全長配列の得られている Cp-OR1 のアンチセンスリボプローブを用いてイモリ頭部冠状切片で fluorescent *in situ* hybridization (FISH) を行ったところ、嗅上皮の細胞に発現が確認された。発現を示す細胞は一枚の切片では 20 細胞程度であるが、嗅上皮の各部に散在していた。これらの細胞は嗅神経細胞と思われるが、アカハライモリでは適当な細胞マーカーが得られていないので、結論がたい。

そこで我々は、これまでに得た種々の遺伝子を用いて FISH を行い、イモリ嗅上皮での発現パターンから、嗅上皮を構成する細胞を見分けることのできる適当なマーカーを探索している。Gal β は、嗅覚情報伝達に関与することが知られており、有効なマーカーとして期待できるので、現在、イモリ嗅上皮 cDNA ライブラリーから G タンパク質遺伝子のクローニングを進めており、数種の候補遺伝子が得られている。それらの結果についても併せて報告したい。

M.Takashima, K.Okano, K.Sawada, T.Nakamura and T.Iwasa : Expression analysis of signal-transducing proteins in the newt olfactory epithelium

1P235

ランダムペプチドライブラリーからの G タンパク質共役受容体リガンドの検索

佐々木 吉徳¹、○武田 茂樹¹、山田 圭一²、片貝 良一² (¹ 群馬大・工・ナノ材料、² 群馬大・工・材料工学)

G タンパク質共役受容体はヒトゲノム中に約千種類存在し、神経伝達物質やホルモンなどを受容して生体の制御に深く関わっている。それらの特異的リガンドとなる物質を見出すことは新規生理活性物質の探索、新規薬物の設計のためなどに不可欠でありポストゲノム時代の重要な課題である。我々はこれまでに受容体と G α の融合タンパク質を用いた活性測定系による受容体リガンドの検索について生体抽出画分、既知化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリーなどを用いて実験を行ってきた。今回、ランダムペプチドライブラリーからのリガンドスクリーニングを試みたので報告する。Doory らは Ac-XXOOOO-NH₂ という配列をもつ 400 種類のライブラリー (O は 20 種類のアミノ酸の混合物、X はある特定のアミノ酸) から、神経ペプチドをリガンドとするノシセプチン受容体に結合するリガンドとして Ac-RYOOOO-NH₂ の配列をもつペプチド混合物を同定した。同様に Ac-OOXXOO-NH₂、Ac-OOOOXX-NH₂ の混合物を検討し、最終的に 1200 種類の化合物から Ac-RYYRIK-NH₂ という配列のペプチドを nM レベルで結合するリガンドとして同定した (C. T. Dooley et al., J. Pharmacol. Experiment. Ther. (1997) 283 735-741)。この報告を参考に、まず上記 1200 種類のコンビナトリアルペプチドライブラリーを合成し、ノシセプチン受容体と Gi2 α の融合タンパク質を用いて同様のスクリーニングが可能であることを確認した。さらに同様の手法をペプチドに対する受容体であるアベリン受容体と Gi1 α の融合タンパク質にこの方法を適用し、アゴニスト/アンタゴニストの同定を試みた。この結果得られた配列の特徴や活性について報告する。

Y.Sasaki, S.Takeda, K.Yamada, R.Katakai : Ligand screening of G protein-coupled receptors from a random peptide library

1P234

水チャネル AQP4 における格子状構造体と二次元結晶の形成

○谷村 幸宏¹、廣明 洋子^{1,2}、亀川 亜希子^{1,2}、西川 幸希^{1,3}、藤吉 好則¹ (¹ 京大・院理・生物物理、² JST・CREST、³ 日本電子)

AQP4 には M1 と M23 の 2 種類のスプライスバリエントが存在し、現在 AQP4M23 の構造解析を目指し二次元結晶の作製に取り組んでいる。組み換えバキュロウイルスと Sf9 細胞による大量発現系を用いており、Sf9 細胞に発現させる際のベクターとして pBlueBacHis2 (インビトロジェン) と pAcHLT (BD バイオサイエンス) を使用した。共に AQP4M23 の N 末端にプロテアーゼ切断部位を含むリンカーを介し、ヒスチンタグを融合したコンストラクトを作製した。タンパク質の発現量及び精製量は両者間で大差はなかったが、二次元結晶を作製したところ、pBlueBacHis2 由来の AQP4 からは結晶性の良い結晶が得られたのに対し、pAcHLT 由来の AQP4 からは結晶を得られなかった。次に、Sf9 細胞の細胞膜における AQP4 の発現状況を観察するためにそれぞれのコンストラクトを発現させた Sf9 細胞の凍結切断を行った。AQP4M23 は格子状構造体を形成できるのに対し M1 は形成できないことが知られているが、pBlueBacHis2 由来の AQP4M23 は Sf9 細胞膜においても格子状構造体を形成することが明らかとなった。これに対し pAcHLT 由来の AQP4M23 は、AQP4 分子同士が集積することなく、Sf9 細胞由来の膜タンパク質が細胞膜に形成する網目状構造に入り込む形で発現することがわかった。M1 と M23 の関係を考慮すると、両者の違いはコンストラクトの N 末端部分のベクター由来の配列における pAcHLT 特有のアルギニンが 3 つ連なったクラスターの影響などによるものと推測される。本実験では、発現段階での Sf9 細胞膜における格子状構造体形成能と二次元結晶形成能の関連性が確認されると共に、今後新たに作製した AQP4M23 コンストラクトが結晶になり得るか否かを判断する際、凍結切断による細胞膜の発現様式の観察が一つの有効な手段になり得ることが示唆された。

Y.Tanimura, Y.Hiroaki, A.Kamegawa, K.Nishikawa, Y.Fujiyoshi : Formation of orthogonal arrays and 2D crystals of AQP4

1P236

分化アストロサイトからのグルタミン酸放出機構の解析

○志賀 葉月¹、伊藤 悦朗^{1,2} (¹ 北大・院理・生物科学、² 北大・創成)

中枢神経系はニューロンとグリア細胞から構成されている。グリア細胞の役割は、ニューロンの物理的・化学的支持であると考えられてきた。しかし研究が進むにつれ、グリア細胞はさまざまな機能を持つことが明らかになってきた。特にグリア細胞の一つであるアストロサイトでは、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を放出することでニューロンの活動やシナプス伝達を直接調節している可能性があることが示唆されている。

そこで、アストロサイトがシナプス伝達を調節できる可能性を示すために、本研究ではアストロサイトによる伝達物質放出機構について、特に分化した細胞と未分化の細胞との間で比較・検討した。エキソサイトーシス機構の存在を確認するために、刺激依存的な蛍光色素 (FM1-43) の取り込みと放出を検討したところ、分化細胞は未分化細胞よりも活発に取り込みと放出を行っていた。さらに、酵素反応を利用したイメージング法による解析から、分化した細胞は ATP 刺激によってグルタミン酸を放出することがわかった。

ニューロンでは、可溶性 N-エチルマレインド感受性因子結合タンパク質受容体 (SNARE) が関与するカルシウムイオン依存的エキソサイトーシスによって神経伝達物質が放出される。そこで、SNARE タンパク質の発現について免疫細胞化学法およびウェスタンブロッティング法によって解析したところ、分化に伴ってその発現が促進されることが示された。以上の結果から、アストロサイトはグルタミン酸を放出することができると示され、その放出機構は SNARE タンパク質を介したエキソサイトーシスの可能性が高いことが示唆された。さらに、それは分化にともなって起こり得ることも明らかとなった。

H. Shiga and E. Ito : The mechanism of glutamate release from differentiated astrocytes