

2M-5

海馬スライスをを用いたグリア/神経活動の光学的解析

○宮川博義、井上雅司、工藤佳久

(東京薬科大学・生命科学部・生体高次機能学)

神経系は膨大な量の情報を高速に処理して生体の活動を制御している。シナプスにおける情報の伝達と統合の過程が神経系における情報処理の基礎をなしているが、その速度は意外なほどゆっくりとしている。シナプスにおける情報伝達の速度を決定する要因を明らかにすることは、高速の情報処理がいかにして実現されているのかを理解するための重要なステップである。我々は電位感受性色素によって染色した海馬スライス標本にシナプス入力を与え、フォトダイオードアレイを用いて CA1 領域から膜電位応答を検出し、得られた信号を解析することにより、シナプス伝達の時間経過を決定する要因を調べた。

RH482 および RH155 による吸光測定からは、グルタミン酸トランスポーターの活動によるグリア細胞の脱分極応答が検出できた。この応答からシナプス間隙におけるグルタミン酸濃度の時間経過を見積もったところ、ピークに達するまで 3.8msec、元のレベルに戻るまでには 14.2msec とかなり速いが、神経細胞の AMPA 受容体依存性電流の時間経過よりは遅い事が分かった。この事は、APMA 受容体チャネル自身の特性がシナプス電流の時間経過を決定していることを示している。

JPW1114 による蛍光測定では、閾値下刺激に対して神経細胞に生じた EPSP を樹状突起に沿った各層から記録した。EPSP のピークは細胞体では入力部位に比べ約 13msec 遅れていた。シナプス入力部位の電位応答を神経細胞のコンパートメントモデルの入力として与え、計算によって得られた他の部位における応答を実験結果と比較することにより、樹状突起のケーブル特性を決定するパラメータを求めた。膜比抵抗は 2-10k Ω cm²、細胞内比抵抗は 20-100 Ω cm と、これまで中枢神経細胞について予想されたよりも低い値が得られた。膜抵抗は低くても細胞内抵抗が低いために樹状突起内での EPSP の減衰は大きくないが、時間遅れは大きい。この事は、情報統合を高速化する何らかの機構が存在することを示唆している。

H.Miyakawa, M.Inoue, Y.Kudo: Glial/Neuronal activities optically detected from hippocampal slices.

2M-6

実時間膜電位イメージング法による脳活動計測

○市川道教、富永貴志、松本 元 (理研 脳科学総合研究センター)

脳活動は神経細胞の膜電位活動であるが、膜電位により光学的な特性が変化することによって、2次元の映像として捕らえることが可能となる。色素として数年前までは吸光タイプの色素 (RH155 など) が多用された。しかしながら吸光色素では強力な透過光が必要であるための不便さと、試料によってはアーティファクトが出やすいなどの欠点が指摘されていた。最近では蛍光タイプの色素 (Di4-ANNEPS など) が改良されより安定な計測が可能になってきた。このタイプの色素では、変化量が比較的大きく、照射光を少なくできるという期待がある上、薄層照明のためセットアップが簡単なことも特長である。蛍光色素によるイメージング中の技術的な問題は、(1)色素が脂溶性のため組織に色素を導入する方法が難しいこと、(2)光量子ショットノイズを抑えるため安定で明るい光学系が必要なこと、(3)高速で低雑音な映像システムの開発などが主である。

我々は、CCD を用いた専用装置を開発し、様々な色素を様々な方法で染色し、ラット脳スライスをを用いた光生理の研究を進めている。最も、問題なのは、色素自体の神経活動に伴う変化率は 10%以上なのであるが (ニューロ・プラストマなどで計測した場合)、急性スライス実験では、活動しない膜系が染まっても蛍光を発するために、0.1%程度の変化になってしまうことが少なくないことである。このような場合に、十分な S/N を得るにはアブレーションが適宜に必要である。次に乗り越えなくてはならないのは、計測の安定性と定量計測の実現である。幸運な事に、脂溶性の蛍光色素は染まりにくい落ちにくく、光に対しても安定で約 30 分の連続照射でも脱色はなく、再現性が高い。定量性についても、色素によっては、2波長観察によって、解決できる可能性があり、そのための装置も開発中である。講演では、我々の実験結果を中心に、膜電位イメージングの技術進展と今後の展開について解説する。

M.Ichikawa, T.Tominaga, G.Matsumoto: A Real-time Membrane Potential Imaging Method on Brain Activity Recording.

2A1300

C型レクチンドメイン様毒素機能タンパク質のドメインスワッピングによる二量化機構

○水野洋、藤本瑞、小泉美香、狩野広美、阿刀田英子、森田隆司 (農水省・生物研、明治薬大・生体分子)

タンパク質の二量化 (三量化以上も含む) の際の機構の一つとして、ドメインスワッピングが Eisenberg らによって提唱されている。

毒素由来抗血液凝固タンパク質は、ドメインスワッピングにより二量化したと考えられる立体構造をしている。このタンパク質は血液凝固因子 IX 及び X 因子に結合するタンパク質 (IX/X-bp) で、サブユニット A と B からなるヘテロ二量体である。A/B 間のアミノ酸配列の相同性は 47% であり、それぞれは偽似の 2 回軸対称の関係にある。また、各サブユニットは C 型レクチンの糖鎖認識ドメイン (C 型 CRD) と相同性があるが、構造既知のマノース結合タンパク質 (MBP) と比較すると、中央ループに顕著な違いが見られる。即ち、このループは、MBP では本体側に折り返しているのに対し、IX/X-bp では隣のサブユニットに突出している。このループを A/B 間で互いに交換することによって MBP でみられる C 型 CRD フォールドをつくることができる。従って、この会合様式をドメインスワッピングと考える。

スワッピングしているドメインと本体とを結ぶペプチド鎖はヒンジ領域と呼ばれる。Eisenberg はアミノ酸置換やアミノ酸残基の欠損がヒンジ領域で生じると、閉じたモノマーは立体障害により開いた構造となり二量化により安定化すると説明しており、ドメインスワッピングは進化の過程における多量化機構の一つであるという仮説を提唱している。IX/X-bp と MBP とのトポロジー配列を比較すると、IX/X-bp の C 末端側のヒンジ領域は 6 残基短くなっており、MBP を仮想モノマーとすれば IX/X-bp は上述の欠損によって生じる二量化機構に相当する。現在、毒素に C 型レクチンモノマーは見いだされていないが、おそらく過去の一時期に毒素にも存在した C 型レクチンモノマーのヒンジ部位にあるレクチン活性部位がドメインシャッピングした際に短縮化され、ドメインスワッピングによる二量化が生じたのであろう。この結果、レクチン活性部位が消滅し、IX 因子及び X 因子と結合するという新たな機能が生じたと考えられる。

H.Mizuno, Z.Fujimoto, M.Koizumi, H.Kano, H.Atoda, T.Morita :Domain swapping mechanism of snake venom dimer proteins containing C-type lectin domains.

2A1315

イソロイシル tRNA 合成酵素の持つアミノ酸二重ふるい機構の構造的基盤

○¹藤本理、²Dmitry G. Vassylyev、³館野 賢、¹嶋田睦、¹中間 崇、¹深井周也、⁴今野美智子、⁵Tamara L. Hendrickson、⁵Paul Schimmel、^{1,3}横山茂之

(¹東大・院理・生化学、²松下国研研、³理研、⁴お茶の水大・化学、⁵Scripps Research Institute)

生体内における遺伝情報変換の過程では、校正反応により高精度の変換が維持されている。遺伝暗号翻訳の過程では、例えばイソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) は、L-バリンを誤認識し Val-AMP、Val-tRNA^{Ile} を合成するが、一方で tRNA^{Ile} の結合に依存して、これらの誤産物を加水分解することによって、アミノアルキル化反応の誤りを校正する。実際に、熱力学的には van der Waals 相互作用による L-イソロイシンと L-バリンの識別因子は 1/4 程度であるにもかかわらず、IleRS の持つ校正反応によって *in vivo* のイソロイシンのコドンがバリンに読まれる割合は、1/3000 程度まで抑えられている。1970 年代から、IleRS は第 1 のふるいである L-イソロイシン以下の大きさのアミノ酸を認識してアミノアルキル化を行い、第 2 のふるいである L-バリン以下のアミノ酸を認識し加水分解することにより L-イソロイシンのみをアミノアルキル化するという「二重ふるい説」が提唱されてきたが、その構造的な実体は全く明らかになっていなかった。我々は、高度好熱菌 IleRS と L-イソロイシンおよび L-バリンの複合体の結晶構造を 2.5Å 分解能で解明した。その結果、第 1 のふるいは Rossmann fold domain 上に存在し、イソロイシンおよびバリンを同様に認識していたのに対し、第 2 のふるいは Rossmann fold domain から突出した校正ドメイン (β バレル構造) 上に存在し、バリンを選択的に認識していた。この校正ドメインを欠く IleRS 変異体を作成したところ、校正反応活性を完全に喪失し、L-バリンと L-イソロイシンをほぼ同じ効率でアミノアルキル化することが明らかになった。さらにこの L-バリン特異的ポケットの近くには、全ての生物種の IleRS で保存されている Thr230、His319、Asn237 が近接して存在し、加水分解酵素で見られる catalytic triad を形成していた。大腸菌の IleRS において Thr230 と Asn237 に対応する残基を Ala に置換した変異体を調製したところ、校正反応が完全に失活した。さらに我々は、エネルギー計算を行うことにより IleRS と tRNA^{Ile} のドッキングモデルを作成したところ、校正ドメインが 180 度回転して tRNA の D ループと結合し定位されることにより、catalytic triad がアミノアルキル化活性部位に接近し、アミノ酸の校正を行うことが示唆された。この校正ドメインのトポロジーは、HIV や RSV のカルボキシペプチダーゼに良く似ており、進化の過程でイソロイシンとバリンを識別する必要が生じた際に、IleRS の糖鎖ドメインに取り込まれたとも考えられる。

O. Nureki, D. G. Vassylyev, M. Taieno, A. Shimada, T. Nalama, S. Fukai, M. Konno, T. L. Hendrickson, P. Schimmel, S. Yokoyama : Crystal structure of isoleucyl-tRNA synthetase with two catalytic sites for double-sieve amino-acid selection