

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Sakurai, M. Sekiguchi, K. Zushida, K. Yamada, S. Nagamine, T. Kubota, K. Wada	Reduction in memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a pontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene	European Journal of Neuroscience	27	691 - 701	2008
T. Kato, K. Yamada et al	Behavioral and gene expression analysis of Wfs1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder	Neuroscience Research	61	143 - 158	2008
N. Kojima, G. Borlikova, T. Sakamoto, K. Yamada, T. Ikeda, S. Itohara, H. Niki, S. E do	Inducible cAMP early repressor acts as a negative regulator for kindling epileptogenesis and long-term fear memory	The Journal of Neuroscience	28 (25)	6459 - 6472	2008
K. Katayama, K. Yamada, VG Ornthanalai, T. Inoue, M. Ota, NP. Murphy, J. Aruga	<i>Slitrk1</i> -deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. Molecular Psychiatry	Molecular Psychiatry		ON LINE	2008
S. Endo, F. Shutoh, T.L. Dinh, T. Okamoto, T. Ikeda, M. Suzuki, S. Kawahara, D. Yanagihara, Y. Sato, K. Yamada, T. Sakamoto, Y. Kirino, N. Hartell, K. Yamaguchi, S. Itohara, A. Narin, P. Greengard, S. Nagao, M. Ito	Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion	PNAS	106 (9)	3525 - 3530	2009
Namihira M., Kohyama J., Semi K., Sanosaka T., Deneen B., Taga T., Nakashima K.	Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells	Dev Cell	16	245 - 255	2009
Ochiai W., Nakatani S., Takahara T., Kainuma M., Masaoka M., Minobe S., Namihira M., Nakashima K., Sakakibara A., Ogawa M., Miyata T	Periventricular notch activation and asymmetric Ngn2 and Tbr2 expression in pair-generated neocortical daughter cells	Mol Cell Neurosci	40	225 - 233	2009
Kohyama J., Kojima T., Takatsuka E., Yamashita	Epigenetic regulation of neural cell differentiation	Proc Natl Acad Sci	105	18012 -	2008

T., Namiki J., Hsieh J., Gage F.H., Namihira M., Okano H., Sawamoto K., Nakashima K	plasticity in the adult mammalian brain	USA		18017	
Sanosaka T., Namihira M., Asano H., Kohyama J., Aisaki K., Igarashi K., Kanno J., Nakashima K	Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells	Neuroscience	155	780 – 788	2008
Namihira M., Kohyama J., Abematsu M., Nakashima K	Epigenetic mechanisms regulating fate specification of neural stem cells	Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci	363	2099 – 2109	2008
Hatada I., Namihira M., Morita S., Kimura M., Horii T., Nakashima K	Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation	PLoS ONE	3	e3189	2008
Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M and Kudo, A	Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction	J Exp Med	205	295 – 303	2008
David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hoecker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R and Franz WM	MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation via Dkk-1 mediated blockage of wnt-signalling	Nat Cell Biol	10	338 – 345	2008
Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y	Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2	Development	135	3511 – 3519	2008
Makino N, Toyofuku T, Takegahara N, Takamatsu H, Okuno T, Nakagawa Y, Kang S, Nojima S, Hori M, Kikutani H, Kumanogoh A	Involvement of Sema4A in the progression of experimental autoimmune myocarditis.	FEBS Lett	582	3935 – 3940	2008
Schwarz Q, Waimey KE, Golding M, Takamatsu H, Kumanogoh A, Fujisawa H, Cheng HJ, Ruhrberg C.	Plexin A3 and plexin A4 convey semaphorin signals during facial nerve development	Dev Biol	324	1-9	2008

Toyofuku T, Yoshida J, Sugimoto T, Yamamoto M, Makino N, Takamatsu H, Takegahara N, Suto F, Hori M, Fujisawa H, Kumanogoh A, Kikutani H	Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells	Dev Biol	321	251 - 262	2008
Sierra JR, Corso S, Caione L, Cepero V, Conrotto P, Cignetti A, Piacibello W, Kumanogoh A, Kikutani H, Comoglio PM, Tamagnone L, Giordano S	Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages	J Exp Med	205	1673 - 1685	2008
Suzuki K, Kumanogoh A, Kikutani H	Semaphorins and their receptors in immune cell interactions	Nat Immunol	9	17 - 23	2008
Tominaga, Y. Ichikawa, M., and Tominaga, T	Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABAA-mediated feed-forward inhibition in signal propagation	Neurosci Res	64	152 - 161	2009
Koganezawa, N., Taguchi, A., Tominaga, T., Ohara, S., Tsutsui, K., Witter, M.P., and Iijima, T.	Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus	Neurosci Res	61	172 - 181	2008
Schenck S, Wojcik SM, Brose N, Takamori S	A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles	Nature Neuroscience	12	156 - 162	2009
Martens H, Weston MC, Boulland JL, Gronborg M, Groshe J, Kacza J, Hoffmann A, Matteoli M, Takamori S, Harkany T, Chaudhry FA, Rosenmund C, Erck C, Jahn R, Hartig W	Unique luminal localization of VGAT-C terminus allows for selective labeling of active cortical GABAergic synapses	The Journal of Neuroscience	28	13125 - 13131	2008

# 統合失調症とモノアミントランスポーター

山田 一之

**Clinical Neuroscience** 別冊

Vol. 26 No. 10 2008年10月1日発行

中外医学社

# 統合失調症とモノアミントランスポーター

山田 一之

## はじめに

トランスポーターとは放出された神経伝達物質を神経末端やグリア細胞、あるいはシナプス小胞へ再度取り込む機能を持つ分子であり、前者を細胞膜トランスポーター、後者を小胞体トランスポーターとよぶ。細胞膜トランスポーターのうち、モノアミントランスポーターとして、ドーパミントランスポーター(DAT)、セロトニントランスポーター(SERT)、ノルエピネフrintランスポーター(NET)の3種類が知られている。また、小胞体トランスポーターのモノアミントランスポーターには、末梢や分泌細胞に存在する小胞体モノアミントランスポーター1(VMAT1)と神経系に選択的に存在する小胞体モノアミントランスポーター2(VMAT2)の2種類が知られている。小胞体モノアミントランスポーターには伝達物質に関する選択性はなく、ドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT)およびノルエピネフリン(NE)の全てをシナプス小胞内に取り込む(図1)。

脳内モノアミンは情動、学習・記憶など主要な精神活動の重要な担い手である。従って、これらの輸送に関わるトランスポーターの異常は、精神活動の混乱を招くものと考えられる。そこで、各種精神疾患とモノアミントランスポーターの関係について、基礎から臨床に至る広範な研究が行われてきた。本稿では、精神疾患の中でも特に統合失調症とモノアミントランスポーターの関係について、動物モデルによる基礎研究とヒトにおける遺伝子解析研究の最近の知見について解説する。

## 基礎研究—遺伝子改変マウスモデル

近年の遺伝子操作技術の発展によって、多様な遺伝子改変動物が作出され、これらは個々の遺伝子機能の解析のみならず、各種疾患の基礎研究に大きく貢献している。統合

やまだ かずゆき 独立行政法人理化学研究所/脳科学総合研究センター

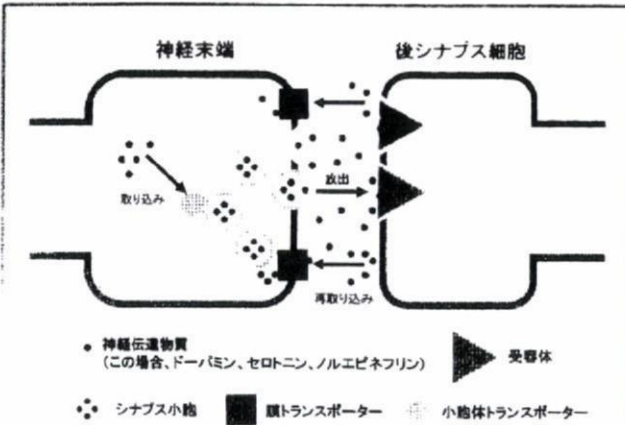


図1 シナプスにおける神経伝達物質と膜トランスポーターおよび小胞体トランスポーターの関係の模式図

受容体、膜トランスポーターは神経伝達物質に対して選択的であるが、小胞体トランスポーターは非選択的である。細胞体で作られた新たな神経伝達物質や膜トランスポーターが回収した神経伝達物質を取り込み、小胞体内に蓄える。

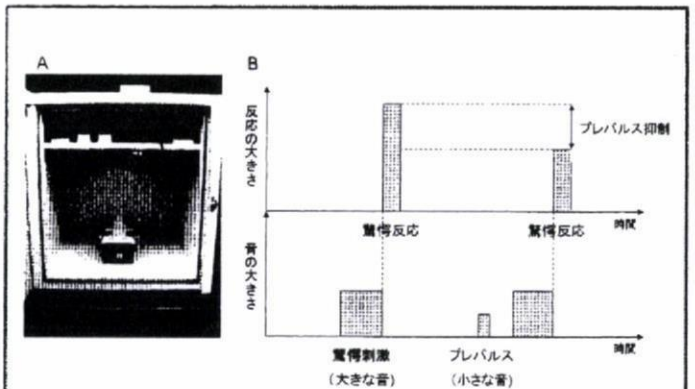


図2 聴覚性驚愕反応のプレパルス抑制

A) 実験装置の一例(小原医科産業)

B) プレパルス抑制の模式図。強い刺激(驚愕刺激)の直前に、驚愕反応をおこさない程度の小さな刺激(プレパルス)を提示すると、直後の驚愕刺激に対する驚愕反応が抑制される。

	基礎研究		臨床研究	
	マウスモデル	統合失調症との関係 (PPIの減弱)	遺伝子解析例	統合失調症との関係
膜トランスポーター				
ドーパミントランスポーター (DAT)	DAT <sup>-/-</sup> マウス	有	SLC6A3	有
セロトニントランスポーター (SERT)	SERT <sup>-/-</sup> マウス	なし	5-HTTLPR	有
ノルエピネフリントランスポーター (NET)	NET <sup>-/-</sup> マウス	なし	NET1287A/G	なし
小胞体トランスポーター				
小胞体モノアミントランスポーター1型 (VMAT1)	—	—	SLC18A1	有
小胞体モノアミントランスポーター2型 (VMAT2)	VMAT2 <sup>+/-</sup> マウス	なし	SLC18A2	なし

失調症についても、遺伝子改変マウスによるモデル構築が試みられてきたが、統合失調症の発症因が未だに特定されていないこと、統合失調症においては特定の臓器に病変がみられ難いことなどから、残念ながら確定的なモデルは得られていない。現状では、マウスがヒトの統合失調症患者に認められる異常行動と同等あるいは類似の行動変化を示した場合に、変異遺伝子が統合失調症と関連すると推測している研究が多い。

統合失調症モデルマウスとしてはカルシニューリンの前脳特異的ノックアウト (KO) マウス<sup>1)</sup>や AMPA 型グルタミン酸受容体1 (AMPA GluR1) KO マウス<sup>2)</sup>などが知られているが、これらのマウスでは自発活動性から学習・記憶に至る広範な行動変化が生じている。ヒトの統合失調症患者においても幻聴・幻視や多動など特徴的な異常行動が知られているが、必ずしもヒトの異常行動と統合失調症モデルマウスにおける行動変化は一貫したものではない。このような状況で、統合失調症患者とモデル動物の間でほぼ同じ変化がみられる現象が、聴覚性驚愕反応のプレパルス抑制 (PPI: prepulse inhibition of acoustic startle response, 図2)である。PPIとは、生体に驚愕反応を生じさせるような強い刺激(驚愕刺激)の直前に、驚愕反応を生じさせない弱い刺激(プレパルス刺激)をあらかじめ与えておくと、その後の驚愕刺激に対する驚愕反応が減弱するという現象である。統合失調症の患者あるいは未発症ではあるが将来統合失調症を発症する可能性の高い被験者において、PPIの生起が抑制されることが知られている<sup>3)</sup>。このような背景から、PPIの減弱がみられることが統合失調症モデルマウスの一つの要件になっている。

モノアミントランスポーターの遺伝子改変マウスについては、DAT KO マウス<sup>4)</sup>、SERT KO マウス<sup>5)</sup>、NET KO マウス<sup>6)</sup>、および VMAT2 KO マウス<sup>7,8)</sup>が開発されている。

これらのマウスはそれぞれ、特徴的な行動変化が報告されているが、PPIに変化が認められているのは DAT KO マウスのみである<sup>9)</sup>。

DATについては、KO マウス以外にも PPIとの関連を示す知見が得られている。たとえば、転写因子の一つである STAT6 の KO マウスでは、線条体(striatum)における DAT レベルの減少が認められるが、このマウスにおいても PPIの減弱が報告されている<sup>10)</sup>。また、前述の AMPA GluR1 KO マウスにおいても、PPIの減弱が報告されている。AMPA GluR1 KO マウスでは線条体における DA のクリアランスが野生型マウスよりも遅いことが見出されているが、これは DAT の機能低下あるいは減少を示唆するものと考えられる。これらの結果は、① DAT の減少が PPIの減弱と関係すること、② PPIは線条体における DAT の量的変化に反応している可能性のあること、そして、③ DAT が統合失調症の発症に関連する可能性があること、を示唆しているといえよう。

### 臨床研究—遺伝子解析

一方、ヒトにおいては各種精神疾患と遺伝子および遺伝子変異(特に多型)との連鎖に関する分析が活発に行われている。ここでは、モノアミントランスポーター遺伝子と統合失調症の関係について、最近の研究を紹介する。

統合失調症のドーパミン仮説として有名であるように、DA 関連遺伝子は統合失調症の遺伝子研究の主要な対象である。DAT の縦列反復配列部位 (variable number tandem repeat: VNTR) の多型に注目した連鎖研究<sup>11)</sup>においては、統合失調症との連鎖は認められなかったが、DAT 遺伝子である SLC6A3 では、多数の一塩基多型 (SNPs)

において統合失調症との連鎖が認められており(米国人被験者群とブルガリア人被験者群の調査)<sup>12)</sup>、DATの変異が統合失調症と関連していることを示唆している。

セロトニンニューロンの変化も、統合失調症の一つの仮説になっている。SERTにおいては、5-HTT linked polymorphic region(5-HTTLPR)における多型と様々な精神疾患との連鎖が認められており、漢民族を対象とした調査からは統合失調症との連鎖が認められている<sup>13)</sup>。

NETについても、NET多型と統合失調症をはじめとする精神疾患との関連が調べられているが、今のところ統合失調症との関連は認められていない<sup>14,15)</sup>。

小胞体モノアミントランスポーターに関しては、副腎などに発現しているVMAT1遺伝子(*SLC18A1*)のSNPsと統合失調症の連鎖を示す報告がある<sup>16,17)</sup>。一方、神経系に

特異的に発現しているVMAT2については、統合失調症患者において発現の変化が報告されているが<sup>18)</sup>、VMAT2遺伝子(*SLC18A2*)のSNPsと統合失調症の間の連鎖は認められていない<sup>19,20)</sup>。今後の研究の進展が待たれるところである。

## むすび

これまで述べてきたとおり、モノアミントランスポーターの変異と統合失調症の関係について、遺伝子改変マウスによる基礎研究とヒトの遺伝子研究による臨床研究の二面から研究が行われている。これらから得られた結果はまだ直接相互に関連付けられる水準にはないが、今後の研究の発展によって、診断と治療の両面に貢献することが望まれる。

## 文献

- 1) Miyakawa T, Leiter LM, Gerber DJ, et al. Conditioned calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 100: 8987-92.
- 2) Wiedholz LM, Owens WA, Horton RE, et al. Mice lacking the AMPA GluR1 receptor exhibit striatal hyperdopaminergia and "schizophrenia-related" behaviors. *Mol Psychiatry*. 2008; 13: 631-40.
- 3) Braff DL, Grillon C, Geyer MA. Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry*. 1992; 49: 206-15.
- 4) Giras B, Jaber M, Jones SR, et al. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 1996; 379: 606-12.
- 5) Bangel D, Murphy DL, Andrews AM, et al. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol*. 1998; 53: 649-55.
- 6) Wang YM, Xu F, Gainetdinov RR, et al. Genetic approaches to studying norepinephrine function: knockout of the mouse norepinephrine transporter gene. *Biol Psychiatry*. 1999; 46: 1124-30.
- 7) Takahashi N, Miner LL, Sora I, et al. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 9938-43.
- 8) Wang Y-M, Gainetdinov RR, Fumagalli F, et al. Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron*. 1997; 19: 1285-96.
- 9) Ralph R, Paulus MP, Fumagalli F, et al. Prepulse inhibition deficits and perseverative motor patterns in dopamine transporter knock-out mice: differential effects of D1 and D2 receptor antagonists. *J Neurosci*. 2001; 21: 305-13.
- 10) Yukawa K, Tanaka K, Owada-Makabe K, et al. Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int J Mol Med*. 2005; 16: 673-5.
- 11) Inada T, Sugita T, Dobashi I, et al. Dopamine transporter gene polymorphism and psychiatric symptoms seen in schizophrenic patients at their first episode. *Am J Med Genet*. 1996; 67: 406-8.
- 12) Talkowski ME, Kirov G, Bammie M, et al. A network of dopaminergic gene variations implicated as risk factors for schizophrenia. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 747-58.
- 13) Liu W, Gu N, Feng G, et al. Tentative association of the serotonin transporter with schizophrenia and unipolar depression but not with bipolar disorder in Han Chinese. *Pharmacogenetics*. 1999; 9: 491-5.
- 14) Stoeber G, Noethen MM, Poerzgen P, et al. Systematic search for variation in the human norepinephrine transporter gene: identification of five naturally occurring missense mutations and study of association with major psychiatric disorders. *Am J Med Genet*. 1996; 67: 523-32.
- 15) Leszczynska-Rodziewicz A, Czerski PM, Kapelski P, et al. A polymorphism of the norepinephrine transporter gene in bipolar disorder and schizophrenia: lack of association. *Neuropsychobiology*. 2002; 45: 182-5.
- 16) Bly M. Mutation in the vesicular monoamine gene *SLC18A1*, associated with schizophrenia. *Schizophrenia Res*. 2005; 78: 337-8.
- 17) Chen S-F, Chen C-H. Support for association of the A277C single nucleotide polymorphism in human vesicular monoamine transporter 1 gene with schizophrenia. *Schizophrenia Res*. 2007; 90: 363-5.
- 18) Zubietta JK, Taylor SF, Huguelet P, et al. Vesicular monoamine transporter concentrations in bipolar disorder type I, schizophrenia, and healthy subjects. *Biol Psychiatry*. 2001; 49: 110-6.
- 19) Kunugi H, Ishida S, Akahane A, et al. Exon/intron boundary novel polymorphism, and association analysis with schizophrenia of human synaptic vesicle monoamine transporter (SVMAT) gene. *Mol Psychiatry*. 2001; 6: 456-60.
- 20) Persico AM, Wang ZW, Black DW, et al. Exclusion of close linkage between the synaptic vesicular monoamine transporter locus and schizophrenia spectrum disorders. *Am J Med Genet*. 1995; 60: 563-5.

# 非臨床試験

—ガイドラインへの対応と

新しい試み—

編集委員 野村 護 / 堀井郁夫 / 吉田武美

LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER



## 第3節 トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析

### 1. はじめに

毒性学(トキシコロジー)はヒトの健康・安全を確保することを目的とし、外来性の物質(化学物質など)が生体に進入した際の生体反応を記述し理解することにより、身の回りの物質の毒性(有害性)を予測し、それらの曝露による被害を未然に防ぐとともに、曝露された場合の治療法を開発する研究分野である。

この毒性予測の精度向上を目指した分子生物学レベルの毒性研究は、遺伝子、遺伝子発現、タンパク合成、タンパク修飾などから最終的な毒性症状までのあらゆる段階を対象とする。その際、探索的な科学研究と異なる点として、毒性学には、予期せぬ事態を見逃がさない「網羅性」の確保が要求されることが挙げられる。我々はその現実的対応として、遺伝子発現をほぼ全遺伝子についてカバーする高密度 cDNA マイクロアレイによる毒性学的トランスクリプトーム研究、すなわちトキシコゲノミクス研究を開始した。

創薬過程における非臨床段階での毒性学、特にラットを用いた一連の毒性試験は、薬の安全性確保に大きく貢献するとともに、審査資料の構成成分としての重要な役割を果たしてきている。これに対するトキシコゲノミクスの位置づけには、その発達段階にも応じて、何通りかあるように思われる。ここでは、薬学の中の副作用学としての毒性学に加えて、医学(病理学)、環境生物学、あるいは生物界に対する化学界の関わりとしての毒性学を念頭に、我々が進める Percellome Project を中心としたトキシコゲノミクスの大規模高精度

データベースの構築と、そのデータ解析についての現状と展望を概説する。

### 2. トキシコゲノミクス研究の目的と最終目標

従来の毒性学は、生物個体が「ブラックボックス」であっても、それに対する「入力」としての化学物質が引き起こす毒性症状をそれからの「出力」として記述し、入出力の関連を体系化することで安全性確保に貢献してきた。我々のトキシコゲノミクス研究は、ブラックボックスの中身を遺伝子発現カスケードの面から解明することにより生体反応メカニズムに基いた分子毒性学を構築することを目的としている。そして、究極の目標としてコンピュータ内のバーチャルマウスやバーチャル人間の完成を掲げ、そこへ向う過程で実験動物からヒトへの外挿の精度向上を実現しようとするものである。前述のごとく毒性学は網羅性を重んじるため、得たデータを既知情報により分類・解析するアプローチ(いわゆる、phenotypic anchoring や、既知の応答に関わるバイオマーカー探索など)は後に回し、トランスクリプトーム情報そのものの中から、生物学的に有意な反応カスケードを描出するアプローチを取ることとした。これは丁度、電子顕微鏡写真が世に現れた時の状況に準えることができる。すなわち、光学顕微鏡では見えない「もの」が新たに見えるようになったわけであるが、それが何であるかは、光学顕微鏡像を参照しても簡単には分からない。電子顕微鏡像を解釈しコンセンサスとしての教科書

(図譜など)ができ上がって初めて日常的に利用されるようになったわけであり、教科書を完成する作業自体が1つの研究分野を形成したという歴史がある。繰り返しになるが、我々の目指すトキシコゲノミクスと従来の毒性学との関係は電子顕微鏡と光学顕微鏡の関係にあり、実用化に向けての教科書作成にあたる基礎研究が必要である。

話は前後するが、毒性学研究は、人体実験が可能な一部の状況(成人を対象とした医薬品の臨床試験など)を除いて、ヒトの身代わりとしての実験動物を用いて行われる。上記の目標を達成するために、我々は動物種としてマウスを選択したが、その理由は、遺伝子情報がヒトに次いで豊富であること、および、遺伝子改変マウスが利用可能であり、それから得られる情報(下流カスケードの情報、ノックアウトマウスが示す欠落症状等)が遺伝子発現カスケードの客観的な描出と毒性学的意義付けに大きく貢献することが予見されたことによる。それでも、複数の実験から得られる大量の実験データを蓄積した上での横断的な解析が必須となる。そのためには、データの標準化と互換性確保が重要となってくる。そこで、我々は、発現データの標準化手法として、マイクロアレイや定量PCRから細胞1個あたりのmRNAコピー数を得るPercellome法を開発した。

### 3. Percellome Project

#### 3.1 Percellome法:細胞1個あたりのmRNAコピー数として発現値を得る方法

原理は、サンプルの細胞数に対してmRNAの発現値を標準化するという単純なものである。具体的には、サンプル破砕液のDNA量から細胞数を求め、外部標準mRNA(スパイクRNA)を細胞1個あたり決まった分子数だけその破砕液に添加し、そしてRNA抽出、測定に移る。スパイクRNAの

発現値が細胞1個あたり何コピーに由来するかが既知であることを利用し、サンプル中の全てのRNA測定値を、細胞1個あたりのコピー数に換算する。スパイクRNAは、枯草菌の5種類の遺伝子のmRNAを濃度を公比3で振って混合したカクテル(dose-graded spike cocktail; GSC)として用意した。これにより、各サンプルに細胞1個あたりのコピー数が既知である標準点5点が導入され、これらを繋げば標準直線が得られる。この直線を用いて実際に測定したmRNAの発現値(マイクロアレイの場合数万種)をコピー数に換算する<sup>1)-3)</sup>。

このような測定に用いるマイクロアレイには十分な定量性・直線性が備わっている必要がある。その検証にはLBM標準サンプル(肝[L]と脳[B]を100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100に混合した5サンプルからなるセット)を用いた。現在までに、Affymetrix社GeneChip(マウス, ラット, ヒト, ゼノパス), Agilent社の単色44kアレイ(マウス, ラット, ヒト), およびCodelink(マウス, ラット, ヒト)マイクロアレイについて、定量性・直線性を確認し、Percellome測定が可能な状態となっている。ただし、真のコピー数は、原則的にマイクロアレイからは求まらず、プローブあるいはプローブセットごとの用量反応特性の影響を受ける(現行のExpression Arrayのプローブの塩基配列設計にはある程度の同一定量性が得られる配慮がなされている)。この問題に対するPercellome法の利点は、定量PCR等で真の値が測定されたサンプルを、一度、マイクロアレイで測定すれば、そこから換算式が導かれ、真の値への一括変換が原理的に可能であることにある。現段階では、AffymetrixのGeneChipのプローブセットごとの特性に依存したデファクト絶対値である。LBMのようなサンプルをPercellome法を実行可能なプラットフォーム間で共通に測定すれば、プローブあるいはプローブセットごとの換算式が用意される。これは、マイクロアレイ間のみならず、定量的PCRとの間、および、同一プラットフォーム

ホーム内での1回増幅プロトコールと2回増幅プロトコールとの間でも可能である。

GSCの添加を正確に行うために高精度を要求されるDNA定量については、手作業プロトコールおよび自動ロボット(PerkinElmer JANUS)のプロトコールを準備した。GSCのストックも含め共同研究ベースで供給可能である(連絡先:kanno@nihs.go.jp)。

### 3.2 Percellome Projectの実験プロトコール

体内に侵入してきた化学物質等を第一に感知するのは、多くの場合タンパク質であり、それからの次の影響が遺伝子発現に波及した場合にmRNAの変動として現れ、それが次のタンパク質を誘導し、次のmRNA変動を招く、と模式的には考えられる。このような初期応答を観測する目的から、まず、成獣の肝を対象とした単回経口投与実験プロジェクトを開始した。mRNA合成のスピードと動物実験の手技上の現実的限界を考慮し、単回強制経口投与の2, 4, 8, および24時間後にサンプリングを行うプロトコールを設定した。また、用量依存性を考慮し、投与量を溶媒対象(0),  $\times 1$ ,  $\times \sqrt{10}$ , および $\times 10$ とした4群を設定した。すなわち、1つの化合物について、4(時点) $\times$ 4(用量)の16群、各群3匹、合計48匹とした。マウスはノックアウトマウスを併用する前提からC57BL/6(SLC)を、週齢は肝の酵素が安定する12週齢、性別は性周期のない雄、とした。また、後述するが、肝、腎、肺、心、脳など、ほとんどの臓器に明瞭な日内変動が認められるため、マウスを10週齢時点で搬入し、明暗12時間サイクルを厳守した環境で2週間馴化した後、明サイクル2時間目に投与、以後、各予定時刻の前後20分~30分以内にサンプリングを完了することとした。1匹につき、麻酔(エーテル)、脱血(腋窩動脈より)の後の2分~3分以内としている(実施要領を執筆中)。マイクロアレイはAffymetrix社GeneChip

Mouse430 2.0(初期は430 A)を用いた。サンプルはプールせず、個体ごとに測定した。

### 3.3 Percellome Project データの構造 (Millefeuille surface data) と解析

化学物質単回投与による遺伝子発現変動は、時間および用量に依存するという考えから、x軸=時間、y軸=用量、z軸=mRNAコピー数とする3次元グラフ上に曲面(surface)として投与が誘発する遺伝子発現変動を可視化した。1つの遺伝子(GeneChipでのprobe set)につき、3匹の平均surfaceと $\pm 1$ 標準偏差(SD) surfaceを表示することで、視覚的に反応を捉えると同時に、ノイズあるいはartifactであるか否かの感触を容易に得られるようにした。Percellome Projectではこの3次元surfaceのパターンを基礎に遺伝子発現カスケードの描出に関わる方法論の開発を進めている。現在、1つの実験から得られるGeneChip 48枚のデータを一括処理する能力を持ったPercellome自動換算・データ品質管理(QC)ソフトウェア、3次元多層データ(Millefeuille data; MFデータあるいはSurfaceデータと呼んでいる)のパターン類似性を元にした候補遺伝子検索ソフトウェア群を中心とした解析システム(MFソフトウェアシリーズ、開発:相崎健一)、およびその概念を発展させた教師なし(クラスター数の指定なし)クラスタリング<sup>4)</sup>を独自に実用化し、現在も改良・開発を継続中である。データの3次元可視化は、コンピュータが選び出した遺伝子クラスターの中身を確認する際、殊にmRNAの合成分解のスピード等の常識から考えて生物学的にあり得ないパターン(用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など)をノイズとして排除する際に威力を発揮している(図1)。

いくつかの化合物の全遺伝子リストを比較し、化合物に共通して同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである。ここで得

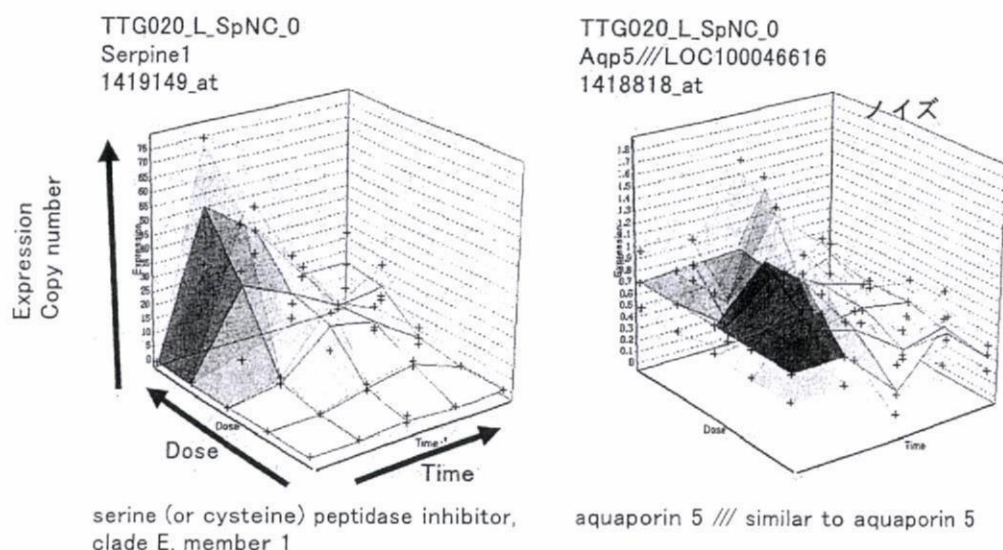


図1 Percellome Projectにおけるデータの3次元表示 (Millefeuille surface データ)

用量, 時間, 発現値を3次元表示し, 1つの遺伝子(probe set)につき1枚の曲面を描く。1つの格子点が1群に対応し, 3匹のデータから計算される平均値からなる平均 surface(濃く色づけ)と±1SDの2つの surface(薄く半透明表示)の合計3層からなる。2,3,7,8-四塩化ジベンソダイオキシン(0, 1, 3, 10, 30 μg/kg)を単回投与した後, 2, 4, 8, および24時間後の肝における serpine 1(左)および aquaporin 5(右)である。serpine 1は, 2時間目をピークとする用量依存的な誘導がかかっており, SD surfaceも平均 surfaceに近接していることから, 生物学的に有意なデータであることが容易に判断される。これに対し, aquaporin 5は, 時間経過からも用量からも生物学的に考え難い上下を繰り返しており, また, SD surfaceも分離していることから, 生物学的蓋然性のない, おそらくノイズであると直感される。実際に, その発現絶対値はこの場合の公称下限感度である1コピー/細胞を下回っている。(図中の(+))は個別のデータを示す)

られた遺伝子群はシグナルカスケードの構成単位である可能性がある。(5TB規模のデータベース部分および, 大量計算アルゴリズム実装, クラスタリングアルゴリズム等は(株)NTTコムウェア・NTTデータおよび(株)日本NCR/Teradata(松本伸哉氏)との共同開発による)。

### 3.4 Percellome Projectの概要とデータ例

現在までに, 単回強制経口投与による肝の初期反応データを, 既知情報のある約100以上の化学物質(医薬品, 一般化学物質, 食品関連物質を含む)について採取し終えた。これに引き続くプロジェクトとして, 食品・食品添加物関連, シックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシコゲノミクス, 1匹のマウスから多臓器を採

取しそれらの連関を解析する多臓器トキシコゲノミクスを開始したほか, 胎児発生, 行動神経に関わるプロジェクトへの展開を図っている。ここで, 多臓器連関解析の一部を紹介する。サリドマイドを0, 100, 300, および1,000 mg/kgの用量で強制経口投与し, その2, 4, 8, および24時間後に, 肝, 腎, 肺, 心, 脳の5臓器を採取, Percellome dataを得た。まず, 投与とは無関係に変動する概日遺伝子は全ての臓器において明瞭なパターンを示し, 最高値が最低値の数倍を超えるものが多数見られた(図2)。ここでは肺に注目した解析の一部を紹介する。2時間目に用量相関性を持って発現誘導のピークを示す遺伝子に, Cdkn1a(P21)が認められた(図3)。類似のパターンを示す初期応答遺伝子には, Fas, Foxo3a, Gata2, など50あまりがあり, 酸化的ストレスが誘発されているこ

Circadian Gene  
 (Dbp : D site albumin promoter binding protein 1438211\_s\_at)

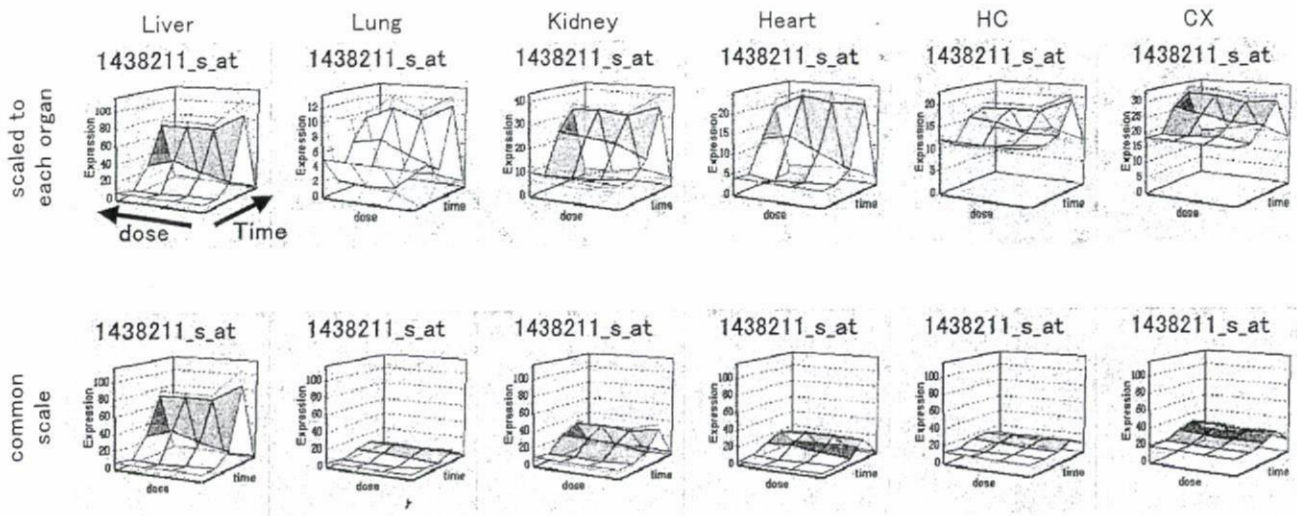


図2 サリドマイドによる多臓器影響(1)

肝, 肺, 腎, 心, 海馬(HC)および大脳(CX)のサリドマイドによる遺伝子発現影響を示す。Dbpは、概日遺伝子であり、全ての組織に投与に依存しない概日変動を認めた。最低値と最高値には数倍の差が多くの臓器で認められた。

Cdkn1a (P21) ; cyclin-dependent kinase inhibitor 1A 1424638\_at

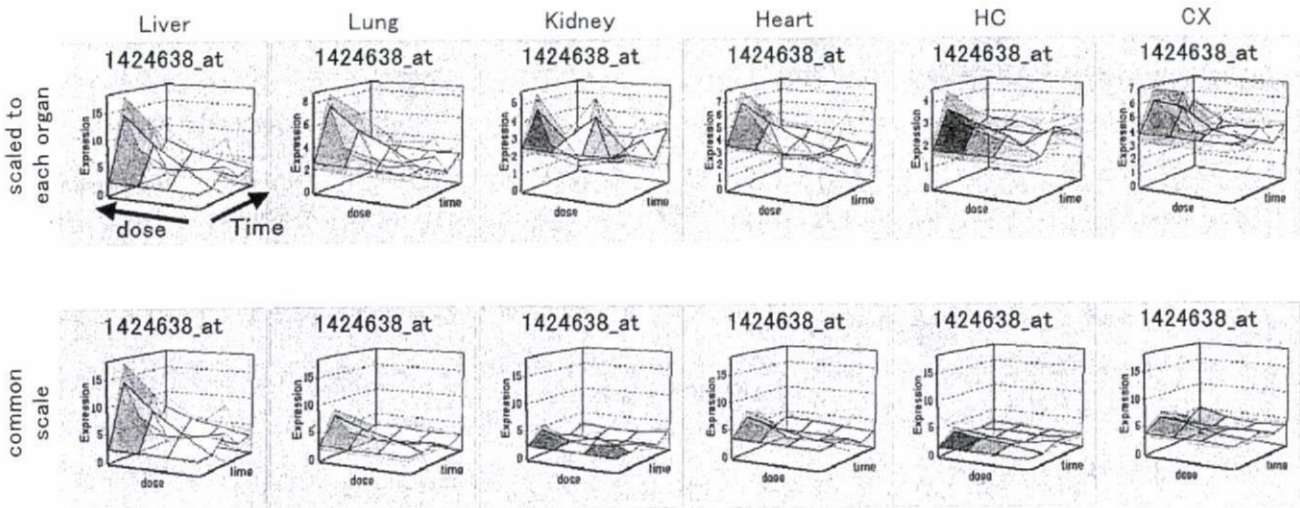
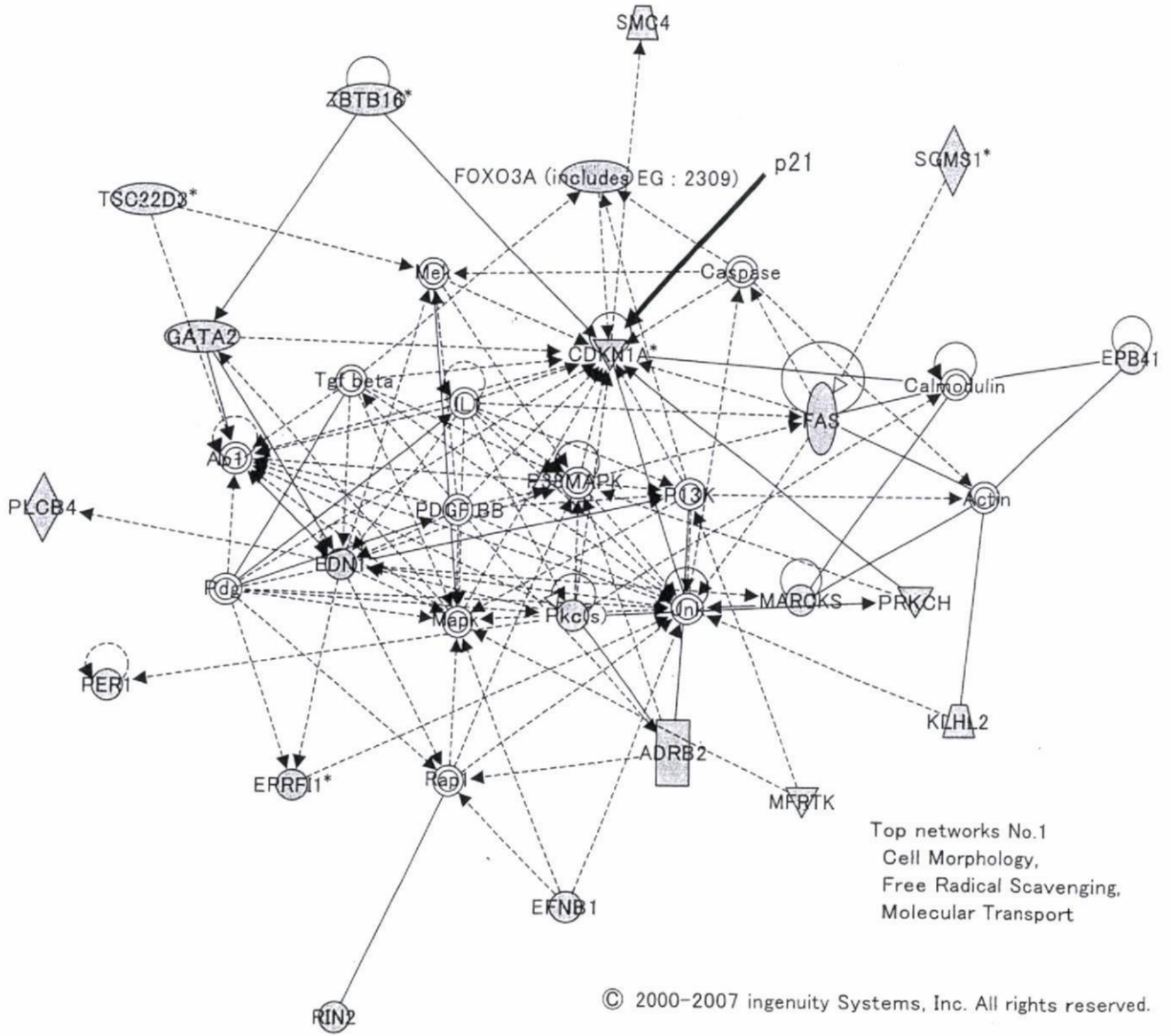


図3 サリドマイドによる多臓器影響(2)

肝, 肺, 腎, 心, 海馬(HC)および大脳(CX)のサリドマイドによる遺伝子発現影響を示す。いずれの臓器・組織においても、2時間目に用量相関性をもって、Cdkn1a(P21)の誘導が認められた。

とが示唆された。既知情報との照合によっても、Free Radical Scavengingなるキーワードが含まれる反応であった(図4)。これらのことから、サリドマイドは肺に対して酸化的ストレスを介した毒

性を示すことが示唆され、文献的に多発性骨髄腫患者にサリドマイドが間質性肺炎を誘発するなどの報告があり、それが確認された。肝ではサリドマイドにより発現が減少する遺伝子はほとんど認



© 2000-2007 ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Lung IPA analysis

図4 肺におけるサリドマイド誘導(発現上昇)遺伝子の既知情報との照合

Ingenuity Pathway Analysis のデータベースとの照合から、フリーラジカルに関するカスケードの関与が示され、文献的に肺に対する障害を示す事例が確認された(灰色：実際に変動している遺伝子)。

められなかったが、肺では数十の発現減少遺伝子が抽出された。既知情報と照合すると、Connective Tissue Development and Function, Skeletal and Muscular System Development and Tissue Development というキーワードにくくられる遺伝子群が含まれており、その中には、肢芽形成に関わる Lbh

(limb-bud and heart)なるものが含まれていた。肺は、肝に比べて間葉系成分が多く、より多彩な反応が観測される可能性が指摘される。どの細胞集団が該当遺伝子を発現しているかの同定には、必要に応じて、*in situ* hybridization を実施することとしており、現在の感度は 50 コピー/細胞程度

であるが、さらなる高感度化を図っている。

#### 4. まとめ

「マイクロアレイデータには再現性がない」と言われることがあるが、その原因としては、その定量性の善し悪しのほかに、実験計画の不充分さが挙げられる場合がある。動物には概日リズムがあり、前述のごとく肝では数千の遺伝子に、また、他のほとんどの臓器でも明らかな概日変動が見られる。サンプリングのタイミングを一定にしないとこの影響を大きく受けてしまい、データが再現しないことが経験される。また、実験前の馴化期間中の動物舎の照明スケジュールが厳密に管理されていないと、タイミングを守っていても実験間誤差が大きくなる。その他、餌の組成、飼育時のストレスにも注意が必要である。これに似た影響は、*in vitro* サンプルにも経験される。例えば、培養細胞の培地交換はもとより、倒立顕微鏡での観察の有無(培地の攪拌等の影響)、インキュベータ内の配置、96穴プレートでの辺縁効果(最外周wellの培養条件が中心と異なる)などが、時に明瞭に遺伝子発現データに反映される。このような点に配慮することで、遺伝子発現データが安定し、再現性が向上することを経験している。

データ解析のアプローチとして、しばしばバイオマーカー検索が行われるが、最終的フェノタイプとの関連性による抽出の限界が気になる場所である。我々の目指すカスケード抽出については、教師なしクラスタリングと網羅的特徴抽出アルゴリズムの組み合わせによる解析が始まったところである。教師なしクラスタリングは、Percellomeデータの3次元曲面の形状の類似性を指標に、45,000枚の曲面について総あたり計算を行い、45,000プローブセットの類似性密度を求め、高密度の中心をそのクラスターの代表反応としてクラスターを抽出する。他方、密度の低いところに

は、他の45,000とは似ていないものが点在する。これらは、1つのプローブセットが1つのクラスターを形成していると考え、single gene clusterとして抽出する。同様に2遺伝子クラスター、3遺伝子クラスター、といった具合に、小さいクラスターから大きいクラスターまで、教師なしクラスター解析を行っている。網羅的特徴抽出アルゴリズムは、Percellome曲面の16格子点情報から凸ピークおよび凹ピークを検出し、その複雑さなどの特徴から、mRNAの反応特性に照らして生物学的意味を持つ可能性の高い曲面を網羅的に抽出するものである。この2つのアプローチを組み合わせることにより、網羅性を確保しつつ、生物学的意味を持つ曲面の抽出を行っている。これらにより、カスケードの要員遺伝子の抽出が可能となっており、このアプローチによるカスケード抽出の糸口が次々に得られている。今後、これらの要員遺伝子の連結作業を加速する手段としてのInformatics研究を外部との共同研究を含めて推進することにより、近い将来には網羅性を確保した状態でのカスケード同定が可能となることが見込まれるに至っている。特に、遺伝子改変マウス情報との対比が有効であることが示されており、国内外のノックアウトマウスプロジェクト(KOMP)や、国立遺伝学研究所の城石俊彦博士らによるMSM/MsマウスとC57BL/6Jマウスのコンソミックマウスライブラリ研究<sup>5)</sup>などとの連携も考慮したデータ解析をも展望するものである。

#### 謝辞

本システムの開発とプロジェクトの遂行にあたっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、森田絃一、近藤優子、古川佑介、青柳千百合、相原妃佐子の各氏に深謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012、H14-トキシコ指定-001、H15-化学-002、H17-化学-一般-003、H18-化学-一般-001等による。

# OSMOTIC AND IONIC REGULATION

---

## Cells and Animals

Edited by  
David H. Evans

 **CRC Press**  
Taylor & Francis Group  
Boca Raton London New York

CRC Press is an imprint of the  
Taylor & Francis Group, an **informa** business





---

# 3 The Contractile Vacuole Complex and Cell Volume Control in Protozoa

Richard D. Allen, Takashi Tominaga, and Yutaka Naitoh

## CONTENTS

I. Introduction .....	69
II. Cytosolic Osmolarity and the Contractile Vacuole Complex of Protozoa .....	71
A. Cytosolic Osmolarity .....	71
B. Structure of CVCs .....	72
C. Effects of External Osmolarity on CVC Morphology.....	74
D. Ions and Osmolytes of the Cytosol and CVC .....	75
E. Electrophysiology of the CVC of Paramecium .....	80
F. Membrane Dynamics of the CVC.....	83
G. Comparing CVCs .....	85
H. The Role of CVC in Osmoregulation.....	88
III. Cell Volume Control in Paramecium and Parasitic Protozoa .....	89
A. Volume Adaptation to the External Osmolarity.....	89
B. Regulatory Volume Control.....	93
C. Cell Volume Control and CVC Activity .....	96
D. Parasitic Protozoa .....	98
IV. Future Work on Protozoan Osmoregulation and Volume Control .....	99
References .....	99

## I. INTRODUCTION

Protozoa, or protists as a whole, are single-celled organisms that live in water or a moist environment. The percentage of solutes dissolved in the water varies from mere trace amounts in freshwater streams to increasing concentrations in sewage treatment plants, in brackish water, and in the ocean. Living in a wide range of environments, protozoa, particularly those that lack cell walls, developed ways of coping with sudden or prolonged changes in their surroundings.

Many wall-less species such as *Paramecium* rely on a contractile vacuole complex (CVC) (Figure 3.1) to maintain their water balance both under normal environmental conditions as well as during dramatic hypoosmotic changes in their environment.<sup>3,6,62,92</sup> This organelle apparently quickly accumulates much of the excess water that passes by osmosis across the plasma membrane of the cell and stores this water briefly in a vacuole before expelling the fluid, along with any accompanying solutes, from the cell. In this way, the CVC provides both a constant water-regulating organelle and a fast-responding mechanism for coping with a potentially catastrophic change in environmental osmolarity. For more long-term adaptation, however, and for adjusting the cytosolic

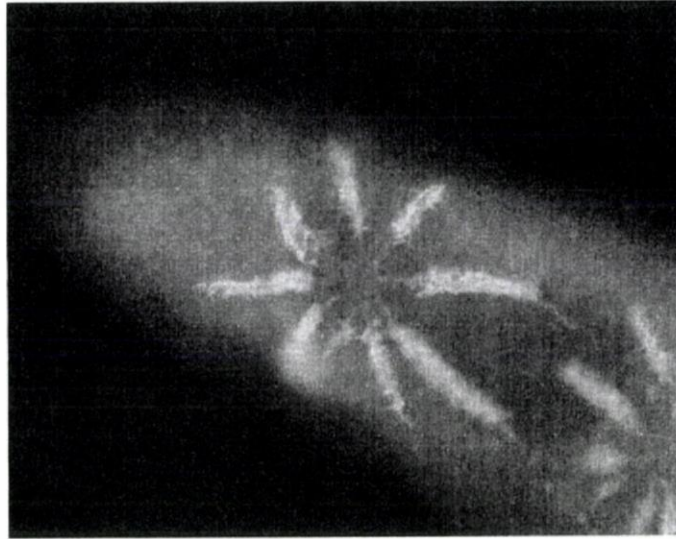


FIGURE 3.1 (See color insert following page 208.) A contractile vacuole complex (CVC) of *Paramecium multimicronucleatum* labeled with monoclonal antibodies (mAbs). Texas red-tagged mAb (red) labels the G4 antigen of the membranes of the smooth spongiome that make up the contractile vacuole (that lies at the hub of this CVC), the radiating collecting canals of the radial arms, and the ampullus. This antibody also cross-reacts with antigens in the membranes of the pellicle of the cell. The fluorescein-tagged mAb (green) labels the A4 antigen found only as part of the V-ATPase that is particularly abundant on the decorated tubules of the CVC. The decorated tubules attach peripherally to each radial arm distal to the ampullus.

osmolarity level and the ionic balance to a new plateau, protozoa have other mechanisms that adapt their internal osmolarity to their surroundings. Like other organisms (see Chapter 2), protozoa have pathways located in their plasma membranes that regulate the overall volume of the cell, in both regulated volume decrease (RVD)<sup>54,101</sup> and probably also regulated volume increase (RVI).<sup>54</sup> Transport mechanisms have been identified or postulated for moving osmolytes into the cytosol and out of the cytosol to adjust the osmolarity of the cell relative to the external osmolarity so the interior of the cell will always remain hyperosmotic to the outside. One of the better studied osmoregulatory mechanisms that does not rely in part on a CVC is that of the glycerol regulatory system in yeast cells,<sup>49</sup> which is used for regulated volume decrease (see Chapter 2). Whether such a system is used by protozoa is not known.

Thus, the CVC is a unique, osmolarity-sensitive organelle limited primarily to single-celled algae and protozoa. Although this organelle was eliminated as multicellular organisms evolved, it has survived to the present time in the single-celled zoospore stage of some multicellular fungi and in several kinds of cells (amoebocytes, pinacocytes, and choanocytes) of freshwater sponges.<sup>15</sup> Presumably, a key role for CVCs in wall-less protists, that of ensuring against rupture of their plasma membranes when exposed to the low osmolarities of hypoosmotic environments, was taken over by other cellular or tissue specializations, such as the introduction of the elimination of organic osmolytes across the plasma membrane as in yeast, or it was no longer required by cells of multicellular organisms where individual cells or tissues were protected against large osmolality fluctuations by the surrounding cells or by specialized nephridial organs.

Although the CVC as a separate organelle has not been passed on to higher forms of life, some of its unique membrane structures and functions were, no doubt, retained and now form the basis for how higher organisms deal with their own osmoregulatory challenges. Thus, further study of how primitive cells solved problems they faced in their environments can continue to shed light on how the essential properties of these systems changed and evolved in higher organisms.

Recent studies on the CVC and its relevance to cellular volume regulation in protists have dealt with (1) the *in vivo* ionic contents of the contractile vacuole (CV), both in standard saline solution and when cells were subjected to different external ionic and osmotic conditions; (2) the regulation of cellular volume and the relative roles of possible transport systems in the plasma membrane vs. the involvement of the CVC in volume regulation; and (3) the involvement of an aquaporin water channel in the swelling of the CV, as well as the role played by acidocalcisomes (accessory vesicles that contain aquaporin) in osmoregulation in some CVCs (see Section II.G). In addition, a number of recent studies on *Dictyostelium* and *Paramecium* have identified, by molecular biological techniques that include forming constructs with green fluorescent protein, several other proteins associated with their CVCs (see Section II.G).

Our own lab has completed studies on the ionic contents of *in vivo* CVs of *Paramecium multimicronucleatum* (see Section II.D). These studies show that the major *in vivo* ions of the CVC, at least in *Paramecium*, are  $K^+$  and  $Cl^-$ . The cation presumably enters the CVC as the result of an exchange process occurring across the CVC membrane in which  $K^+$  or other cations are exchanged for protons that have been pumped into the lumen of the CVC as a consequence of the hydrolytic activity of the vast number of proton-translocating V-H<sup>+</sup>-ATPase enzymes located in the membranes of the CVC. In *Paramecium*, the chloride anion will probably be cotransported with  $K^+$  or will follow through chloride channels attracted by the positive electrical gradient that is formed inside the CVC lumen. Under some conditions, cations other than  $K^+$  can also accumulate in the CV of the *Paramecium*, such as  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$ , when these ions are present in significant amounts in the external medium. Thus, although the principal osmolytes in the CV are  $K^+$  and  $Cl^-$ , the CVC may accumulate other cations if  $K^+$  ions are limited or if other cations in the cytosol such as  $Ca^{2+}$  must be eliminated from the cell.

The amount of fluid expelled will usually follow an inverse relationship to the osmolarity of the external medium; at higher osmolarities, less fluid will be expelled from the cell. Even in very high external osmolarities, however, the CV will continue to eliminate fluid at a reduced rate as the osmolarity of the cytosol will always be adjusted upward to maintain it hyperosmotic to the external medium. The CVC is thus an osmolarity-sensitive organelle that accumulates and expels water and (to some extent by default) osmolytes.

The relatively large size of the CVC in *Paramecium* has made it possible to study the functions and contents of this organelle by electrophysiological and biophysical techniques when it has so far not been possible to do so in many smaller protozoa. As may be true of most CVCs, the CVC of *Paramecium* has a two-membrane compartment system. One compartment has proton pumps that set up the electrochemical gradient (positive inside), and a second compartment has membranes that undergo a cycle of spontaneous tension increase followed by relaxation apparently controlled by its own internal molecular components and timing mechanism. *Paramecium* also has the unique ability to keep the  $K^+$  concentration inside the CVC at a relatively constant level of 2.0- to 2.4-fold higher than that in the cytosol over a wide range of external osmolarities and conditions that alter the  $K^+$  activity of the cytosol. How this  $K^+$  ratio is sensed and regulated is not currently understood. By itself, the CVC does not set the level of osmolarity in the cytosol, as this parameter is determined more by the ion transport mechanisms in the plasma membrane, by the free amino acid composition of the cytosol, and by the accumulation or production of other organic osmolytes produced by the cell.

## II. CYTOSOLIC OSMOLARITY AND THE CONTRACTILE VACUOLE COMPLEX OF PROTOZOA

### A. CYTOSOLIC OSMOLARITY

Freshwater protozoa have a cytosolic osmolarity under normal growth conditions that ranges roughly between 50 and 110 mOsmol/L and is hyperosmotic to the environment.<sup>94,129</sup> In the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, the cytosolic osmolarity was reported to rise linearly as cells were adapted to