

一分子からの定量的解析によるシナプス活性化機構の解析

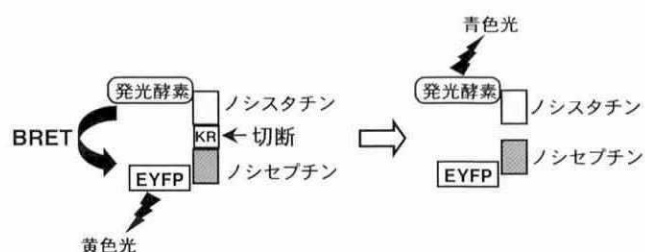
芦高 恵美子

1. 研究のねらい

痛みは、生体警告反応としての生理的機能を担う一方、がん末期の激痛や脊髄損傷に伴う神経因性疼痛などは、痛み自身が有害な病態をもたらす。我々は、同一前駆体蛋白質に隣り合わせに存在し、痛覚伝達において相反する作用を示す神経ペプチド、ノシセプチンとノシスタチンを見いだした。ノシセプチンは、オピオイド受容体類縁体の内因性リガンドで、オピオイドペプチドと相同性を有しているが、従来のオピオイドペプチドが鎮痛作用を示すのとは対照的に、触覚刺激などの非侵害性刺激による痛覚反応（アロディニア）や熱刺激による痛覚過敏反応を誘導することを明らかにしてきた。一方ノシスタチンは、同じ前駆体より切り出され、ノシセプチンによる痛覚反応を抑制するペプチドであることを発見した。同一前駆体に存在するペプチドが相反する作用を示すのは初めての報告であり、疼痛制御のみならず記憶、学習や食欲の制御においてもこれらのペプチドの相反する作用が認められている。この制御機構としては、シナプスにおけるペプチドの産生、遊離および受容体との結合が重要な鍵を担っていると考えられる。本研究においては、ノシセプチンとノシスタチンの生物活性をモデルとしたシナプスの活性化機構の解明を目的とする。

2. 研究成果と考察

生きたままの細胞においてペプチド産生機構である前駆体タンパク質からのプロセッシングを細胞外で定量的にモニターできる分泌型プローブによる一分子内 Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)システムを開発した。(分泌型発光酵素)-(ノシスタチン-Lys(K)Arg(R)-ノシセプチン)-(YFP)の融合蛋白質の遺伝子ベクターをデザインし、細胞に導入した。この融合蛋白質は、ノシスタチンとノシセプチンがプロセッシングされない場合は、発光酵素の光は BRET により、EYFP が励起され黄色光を発したが、プロセッシングされた場合、発光酵素自体の青色光を発した（下図）。



分泌型発光酵素を用いたことで、分泌経路を介する蛋白質のプロセッシングの細胞外でのモニターが可能になり、且つ細胞を破壊することなく培地を連続的に分取し、発色光を指標にペプチドのプロセッシング過程のリアルタイムな追跡が可能となった。また、BRET の効率とプロセッシング量の変化は非常に一致していたことより、蛋白質のプロセッシングの定量的モニターに適用できるものである。確立したシステムを用い、ノシセプチンとノシスタチンの産生に関与するプロセッシング酵素を同定し、プロセッシング酵素の差異により、産生や分泌経路が異なることを明らかにした。

また、プロスタグランジン E₂ によるアロディニア発症は、ノシセプチンの遊離を介しており、ノシスタチンによってその痛覚反応は抑制されたことより、ノシスタチンとノシセプチンの遊離調節により、痛覚制御がなされていることが示唆された。今後、BRET 測定による神経刺激に応答する神経ペプチド産生、遊離の定量化と細胞の膜電位や細胞内 Ca²⁺ 動態との同時イメージングにより、二次元的なシナプスの活性化機構の解明が可能になると考えられる。このようなシナプス活性化機構の解明は、痛みをはじめとする脳神経系の営む高次神経活動を理解するうえで、必要不可欠な分子基盤であり、ノシスタチン受容体の解明とともに新しい鎮痛薬の創薬の開発の手がかりとなると考えられる。

3. 成果リスト

論文

1. Muratani, T., Minami, T., Enomoto, U., Sakai, M., Okuda-Ashitaka, E., Kiyokane, K., Mori, H. and Ito, S. : Characterization of nociceptin / orphanin FQ-induced pain responses by the novel receptor antagonist JTC-801. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 303: 424-430, 2002
2. Mabuchi, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Kitano, T., Kojima, H., Nagano, T., Minami, T. and Ito, S.: Attenuation of neuropathic pain by nociceptin/orphanin FQ antagonist is mediated by inhibition of nitric oxide production. **Eur. J. Neurosci.** 17: 1384-1392, 2003
3. Zeilhofer, H. U., Reinscheid, R. K. and Okuda-Ashitaka, E.: Nociceptin, Nocistatin and Pain. Progress in Pain Research and Management. **International Association for the Study of Pain, IASP press**, 24: 469-480, 2003
4. 芦高恵美子, 伊藤誠二: 痛み-基礎・診断・治療-(編集: 花岡一雄)「ノシセプチン」 37-40, 2003

5. Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Matsumura, S., Takeshima, H., Reinscheid, R. K., Civelli, O. and Ito, S.: Mediation by the opioid peptide nociceptin/orphanin FQ of prostaglandin E₂-induced allodynia, tactile pain associated with nerve injury. (発表準備中)

総説

6. Otsuji, T., Okuda-Ashitaka, E., Kojima, S., Akiyama, H., Ito, S. and Ohmiya, Y.: Monitoring for dynamic biological processing by intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer system using secreted luciferase. **Anal. Biochem.** 329: 230-237, 2004
7. 芦高恵美子、伊藤誠二: 医学のあゆみ「痛みシグナルの制御機構と最新治療エビデンス、ノシセプチンの疼痛制御」 211(No.5): 375-379, 2004

特許

特願 2002-360744 「蛋白質のプロセッシングを測定するためのモニター蛋白質」

謝辞

本研究は、関西医科大学医化学講座・伊藤誠二教授、大阪医科大学麻酔科・南敏明教授、産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門・近江谷克裕グループリーダー、尾辻智美氏、東京大学物性研究所・秋山英文助教授、アトー株式会社・久保田英博博士、榎本敏照博士、研究補助員・熊田志保氏の協力により成し得たものであり、皆さんに心より感謝致します。