

生体調節機構学

担当 神田真司

理学部生物学科

生体情報学研究室

本郷 理学部二号館245号室

電話 2 4 4 3 9

email: shinji@bs.s.u-tokyo.ac.jp

<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~naibunpi/kanda/>

参考書（講義資料に使用）

ニューロンの生理学 ダニエル トリッチら、京都大学学術出版会、2009

カンデル神経科学 Eric Kandelら、メディカルサイエンスインターナショナル、2014

Molecular Biology of the Cell Bruce Alberts et al., 6th ed、2014

Vertebrate Endocrinology - (Fifth Edition) David O. Norris and James A. Carr, 2013

講義資料(カラー)

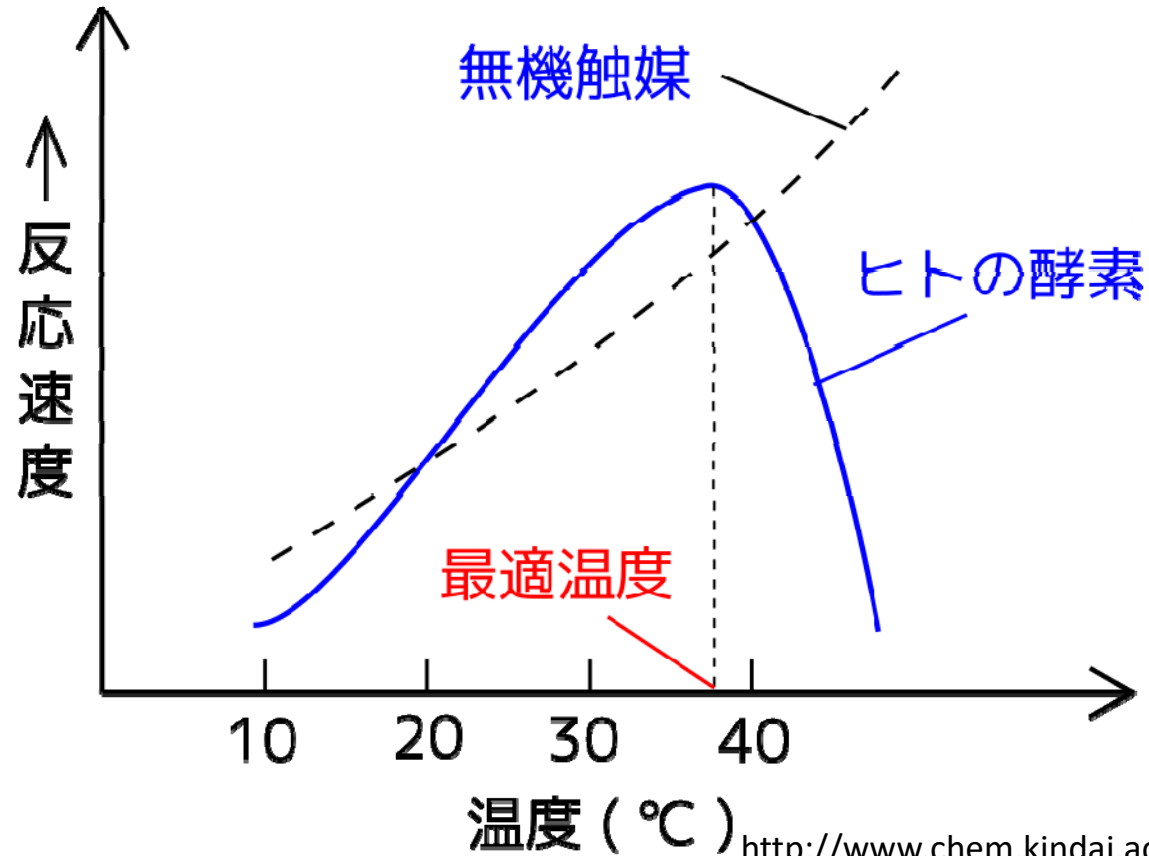
<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~naibunpi/kanda/lecture.html>

よりダウンロード可

4回のスケジュール

1. 細胞間の情報伝達の基礎～神経とホルモン
2. 中枢と末梢の相互作用
3. パラログ遺伝子の進化と新機能の獲得
4. その他

生物は機械と違う



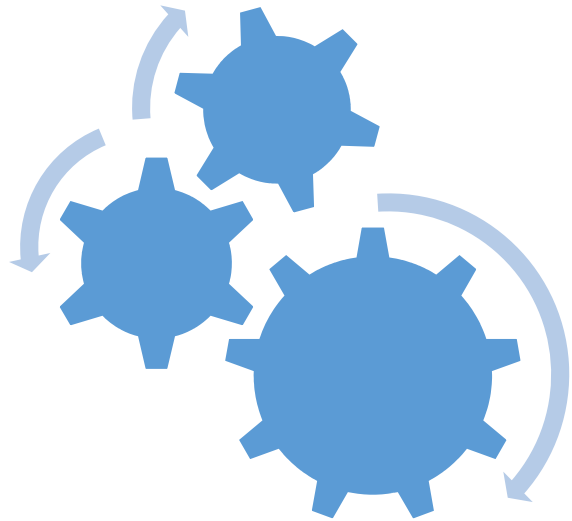
<http://www.chem.kindai.ac.jp/class/reaction/temp.htm>

ヒトはまだしも、変温動物は温度の変化に対してちゃんとした制御が必要

全体的に活性を落としたり、遺伝子発現を変えたり(e.g. コイ・メダカのマイオシン重鎖遺伝子)。

生物は機械と違う

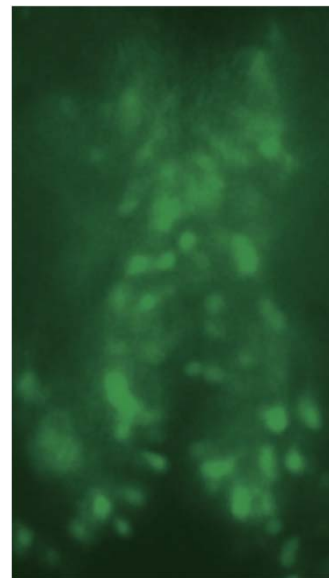
kiss1-EGFPニューロン



ギヤの1°のズレが
増幅される

個々の細胞の差異を
吸収するフィードバック・
相互作用により
外からのノイズに極めて強い

細胞間・組織間・
様々なレベルでのフィードバックがある

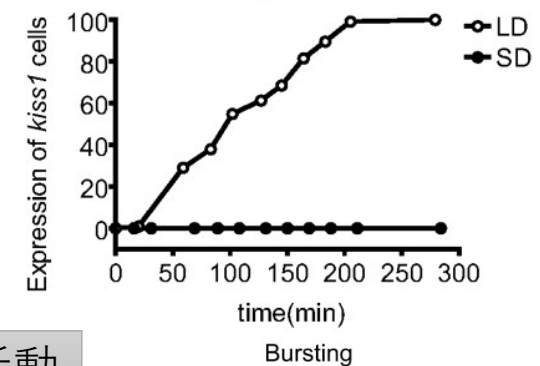
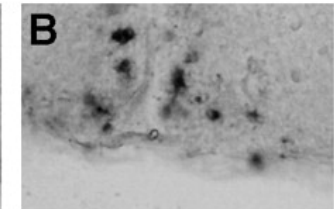
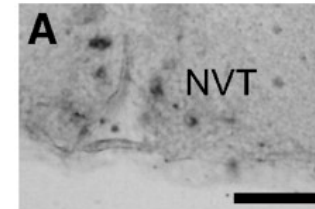


kiss1

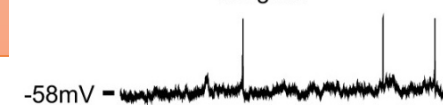
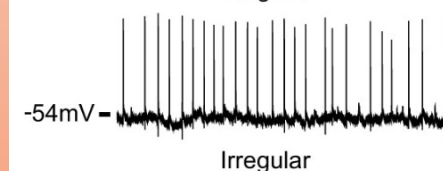
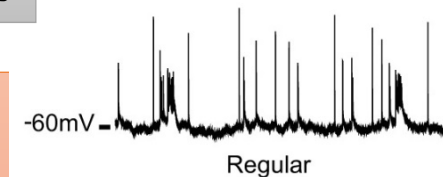
In situ hybridization発色での
時間経過による計数

80 min

140 min



発火活動

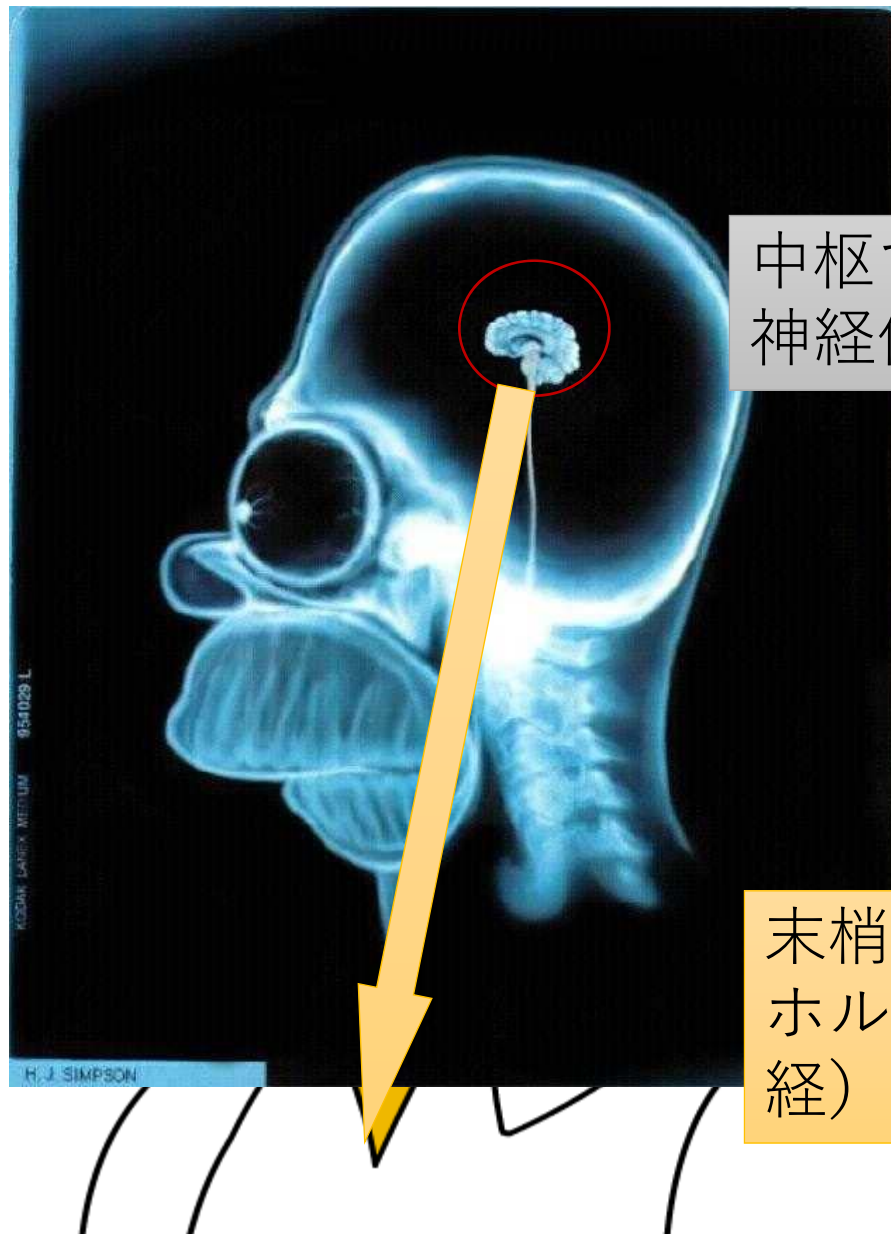


20 mV
5 sec

調べてみたいキーワード

- ホルモン
- 神経伝達物質
- 電位依存性Ca²⁺チャネル
- 小胞体
- 分泌小胞
- エクソサイトーシス
- イオンチャネル共役型受容体
- Gタンパク質共役型受容体
- 核内受容体
- パッチクランプ
- Ca²⁺イメージング

生体の情報伝達機構



中枢での情報処理：
神経伝達

この神経とホルモンのインターフェイスを研究するのが神経内分泌学。

末梢への情報：
ホルモン（と神経）

ホルモンとは

- 特定の分泌器官から分泌され、血流などで体内を移動して他器官の活性を調節する物質。低分子化合物やペプチドなど、化学的には様々なものがある(生物学用語辞典)
- (参考) サイトカイン：血球など免疫システムの細胞から分泌。ホルモンと似ているが、ホルモンは分泌している臓器がある。が、はっきりした区別があるものでもない。(両方に分類されるものもある)
- 例：ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)
オキシトシン(イソトシン)・バソプレシン(バソトシン)
インシュリン・成長ホルモン など

ホルモンと神経伝達物質の違い (後はほとんど一緒)

ホルモン

- 遅い
- 受容体があればOK(血流で全身を循環するため)
- 放出は血中の濃度を測定

ホルモンの研究は
作用・阻害剤
血中濃度の測定
などで行う

* GnRHはホルモン？

神経伝達物質

- 速い
- 投射があって、その先の細胞が受容体を持っていることが必要
- 放出は細胞の発火活動や細胞内カルシウム濃度などを指標に推定

神経科学の研究には
形態
活動の解析
が不可欠

* 電気シナプス(GAPジャンクション)も有り

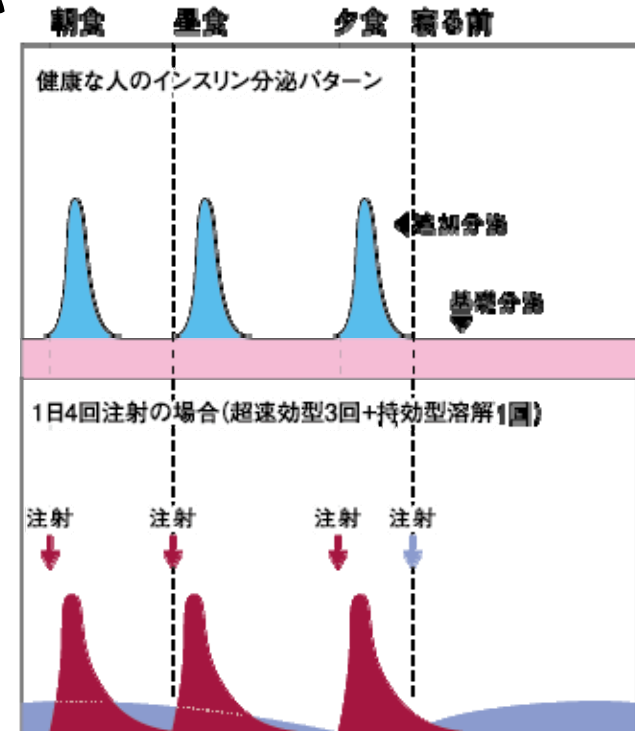
神経は速い

ホルモンは遅い



- 脊椎動物の有髄神経は 20~100m/s
- 甲殻類と脊椎動物の有髄神経は違う（収斂進化）

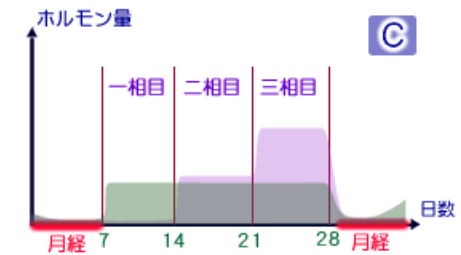
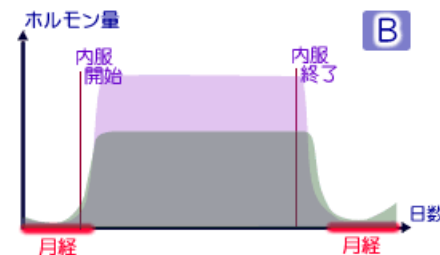
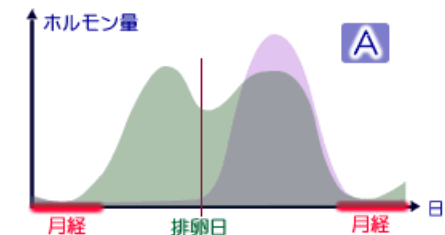
●インスリン療法による分泌パターンの再現



<https://www.diabetes.co.jp/injection/insulin.html>

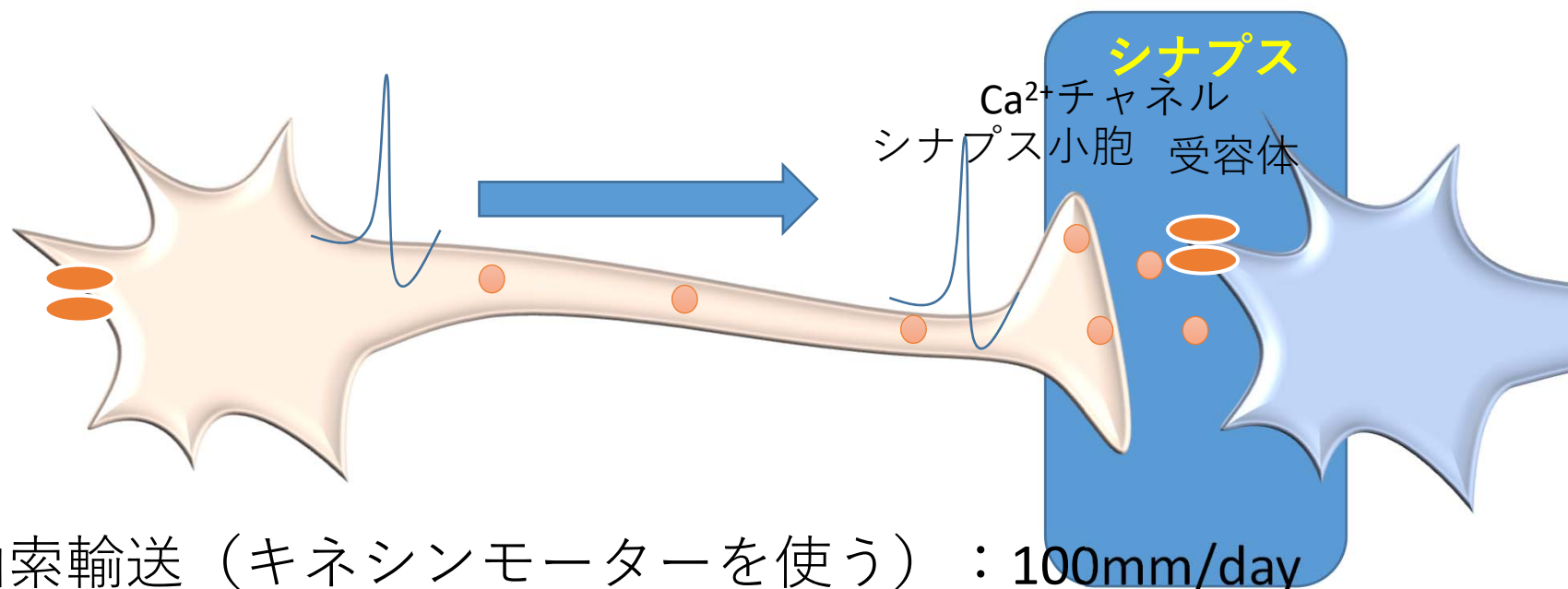
- A 通常ホルモン曲線
- B 中用量ビル内服時のホルモン曲線
- C 低用量ビル（三相性）内服時のホルモン曲線

■ エストロゲン
■ プロゲステロン



<http://www.ladys-home.ne.jp/faqsite/ans-files/FAQ-A/FAQ-A2.html>

なぜ神経伝達は速いか



軸索輸送（キネシンモーターを使う）：100mm/day
電気シグナル伝播(有髄神経)：100m/sec

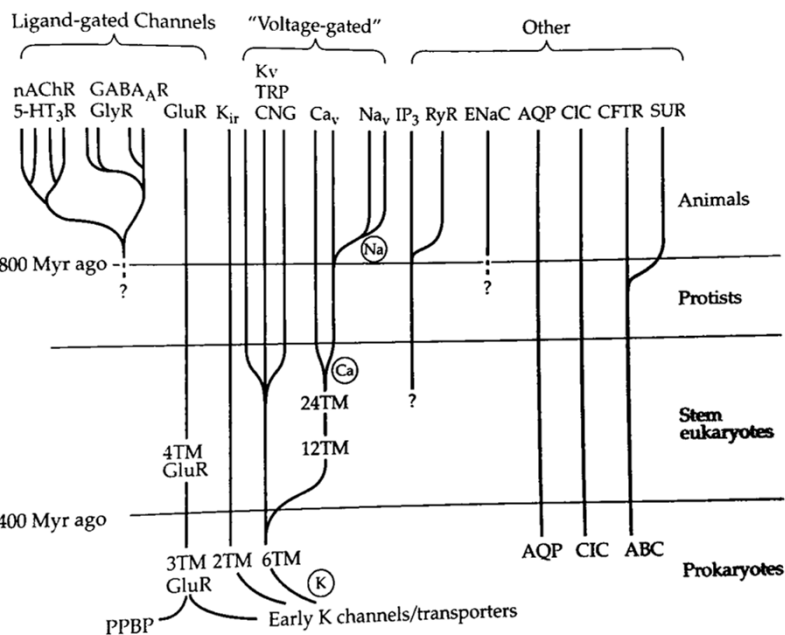
※1mの坐骨神経だと、
軸索輸送は10日かかる。
神経伝導は10msec

ニューロンと内分泌細胞 (神経伝達物質) (ホルモン) の共通項から考える

生物の情報伝達にとって
一番重要なイオンは？

Na^+ ? Ca^{2+} ?

(AT) Na CHANNEL



(Hille)

(B) Ca CHANNEL

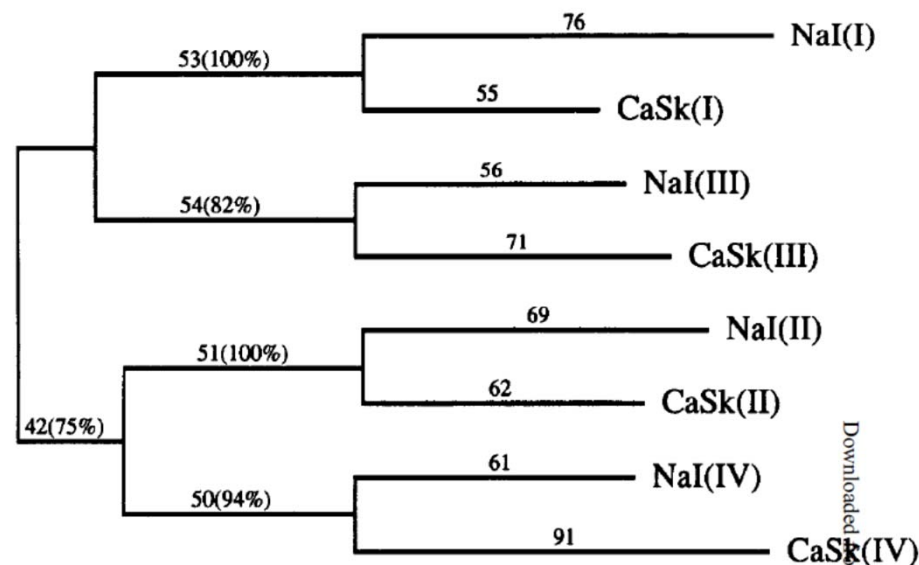
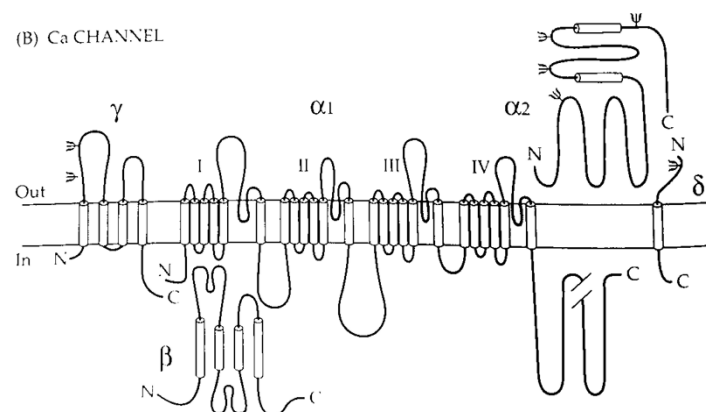
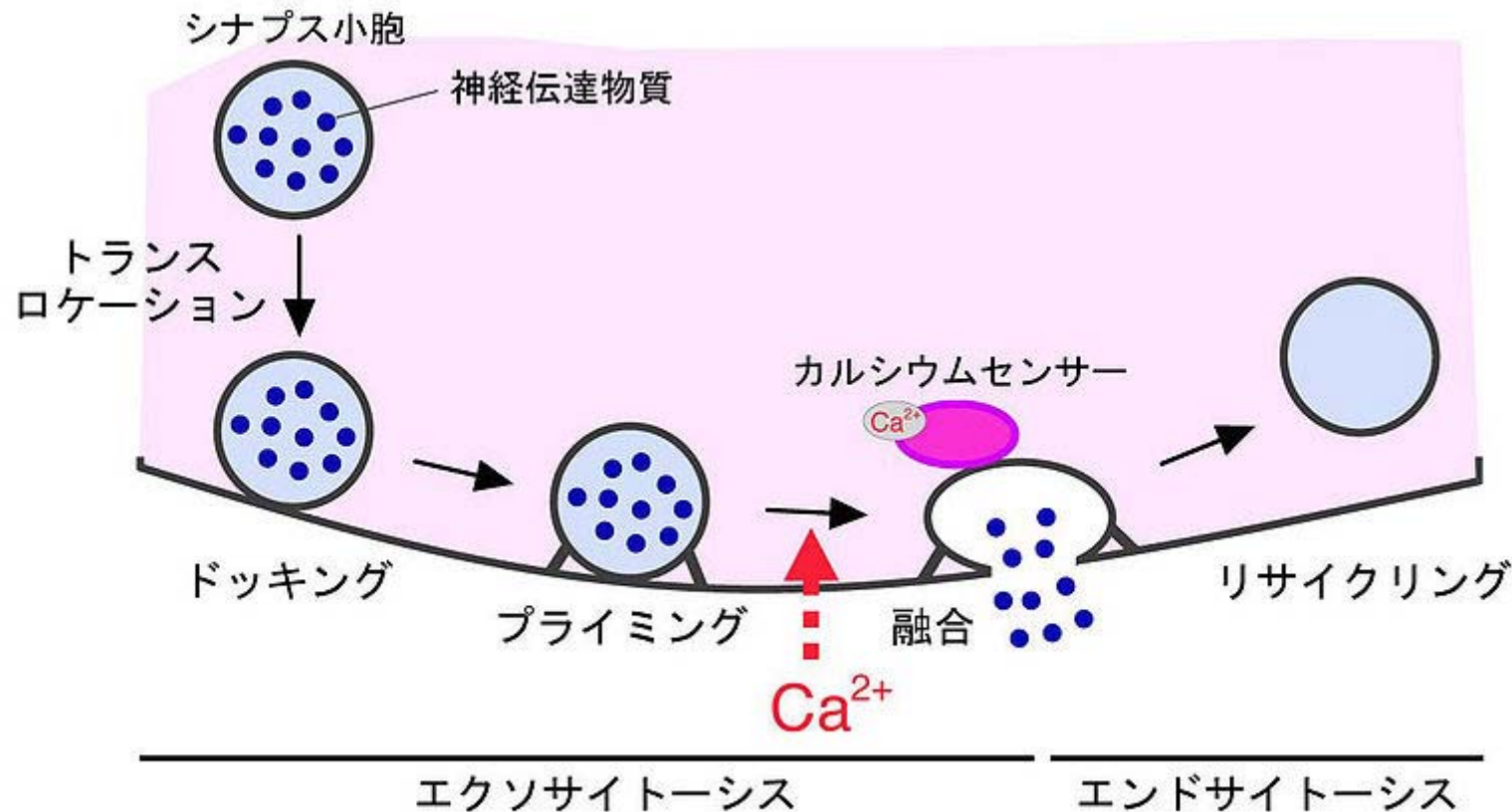


FIG. 7.—Relationships between the four domains of Ca^{++} and Na^{+} channels: most parsimonious tree based on amino acid sequence alignment. Roman numerals in parenthesis indicate each of the four domains within each channel protein. The total tree length is 791 substitutions.

(Strong et al., 1993)

Downloaded from <http://jml.sagepub.com>

細胞が分泌するメカニズム: エクソサイトーシス



- 単細胞生物の持つメカニズム
元の原型を考えてみよう

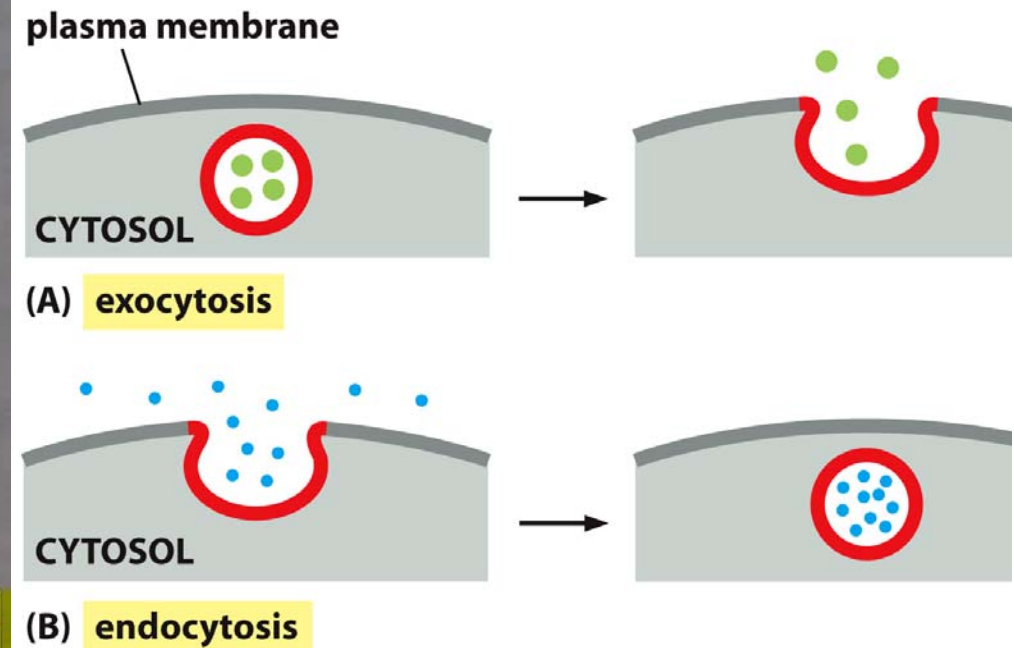
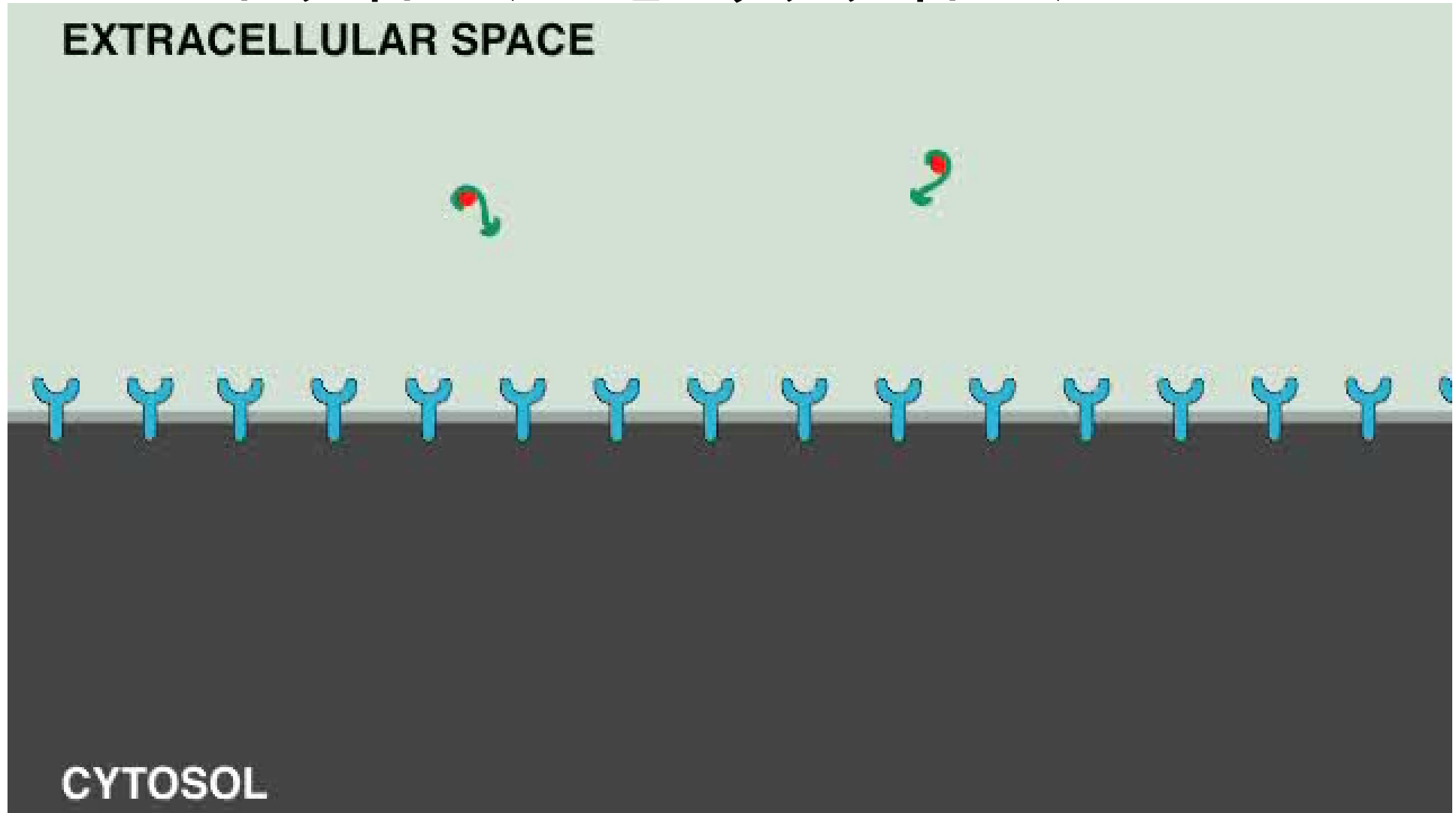


Figure 13-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

<https://www.youtube.com/watch?v=5UWjNITuEjc>

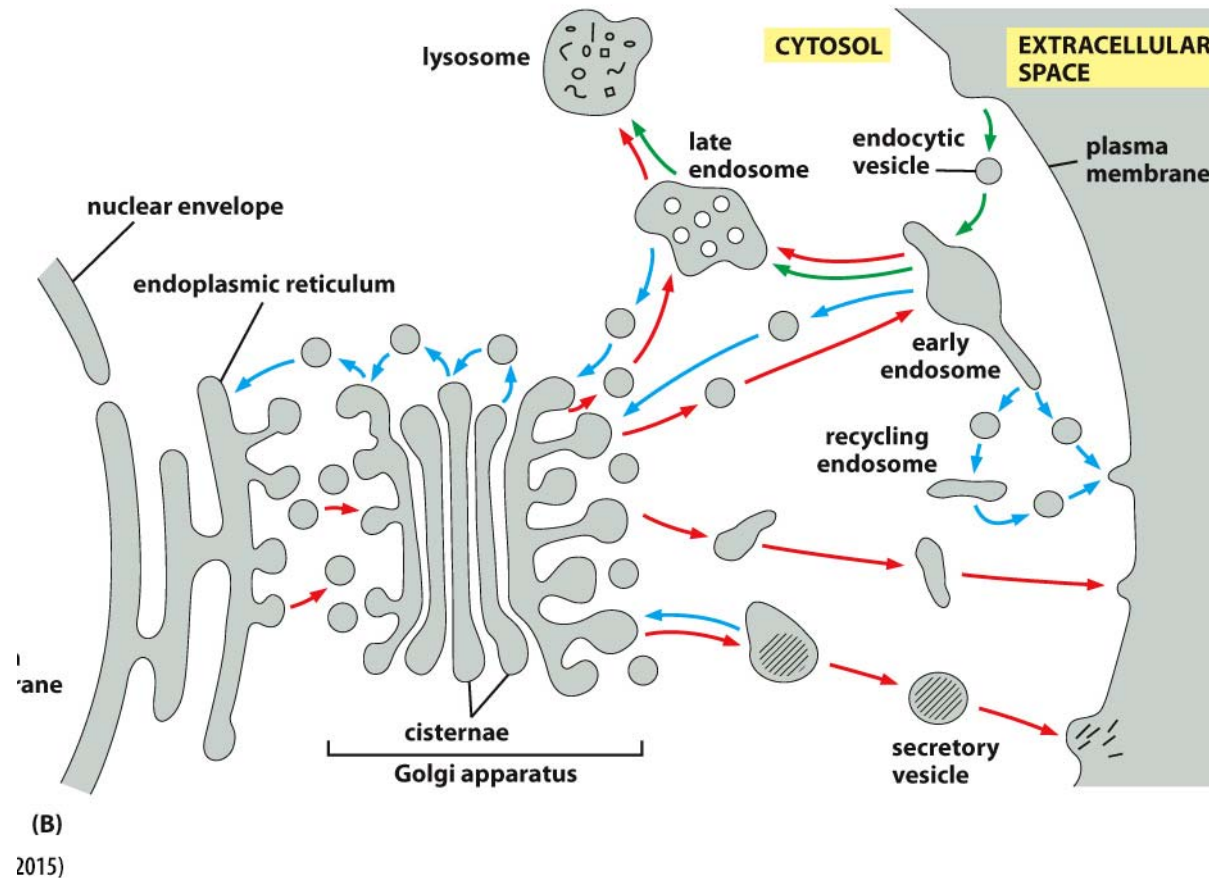
物のやりとりは膜輸送が基本

- エンドサイトーシスとエクソサイトーシス



ホルモン・神経伝達物質をどう詰め込むか： タンパク質と小分子の違い

- ・タンパク質・ペプチド



転写

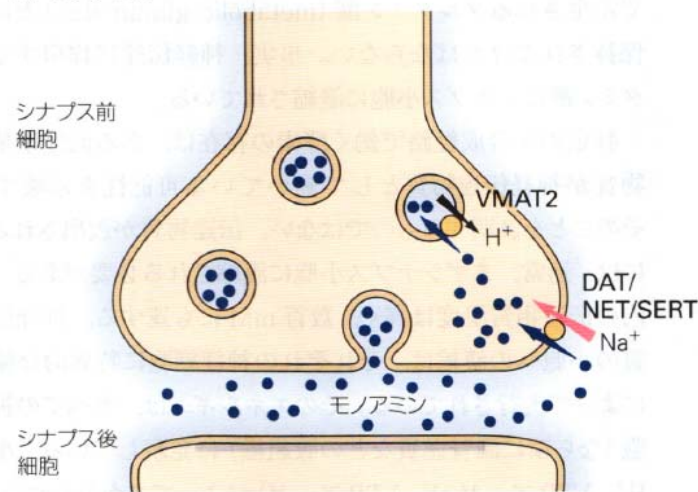
翻訳

糖修飾

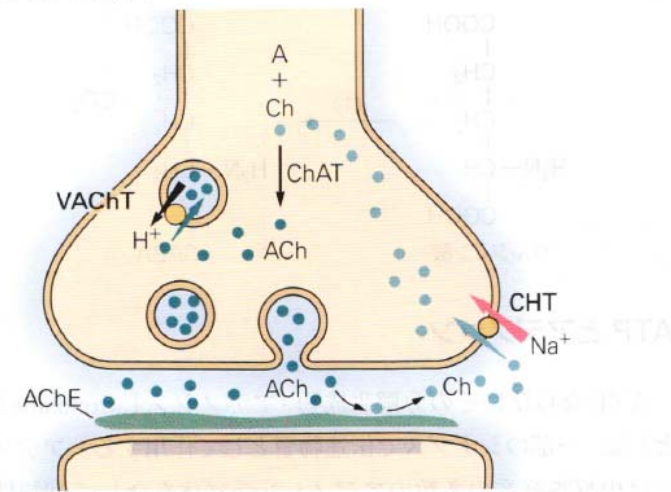
～切断

- トランスポーターが小分子を詰め込む

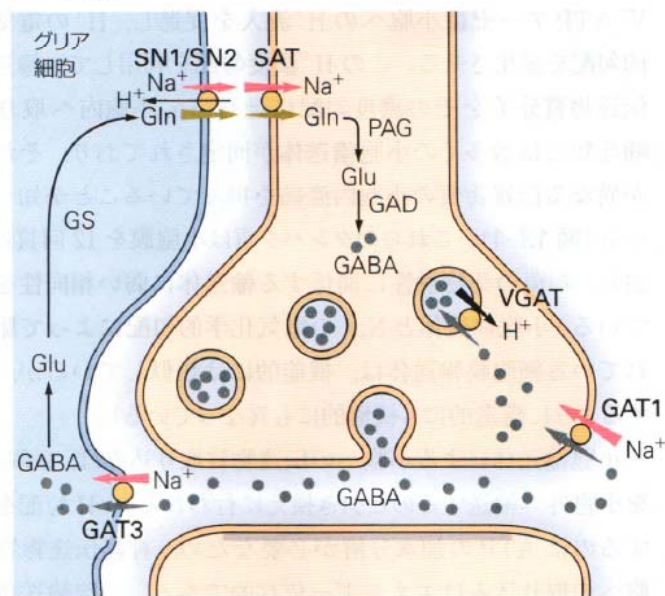
A モノアミン



B アセチルコリン



C GABA



D グルタミン酸

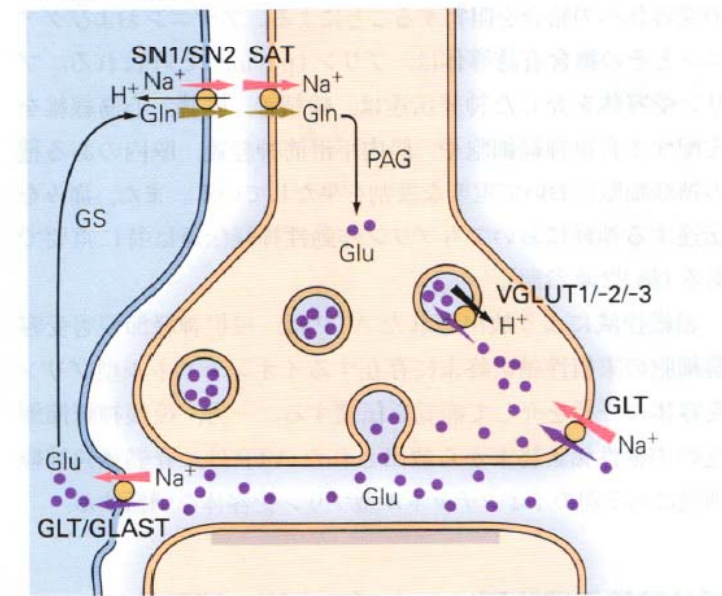
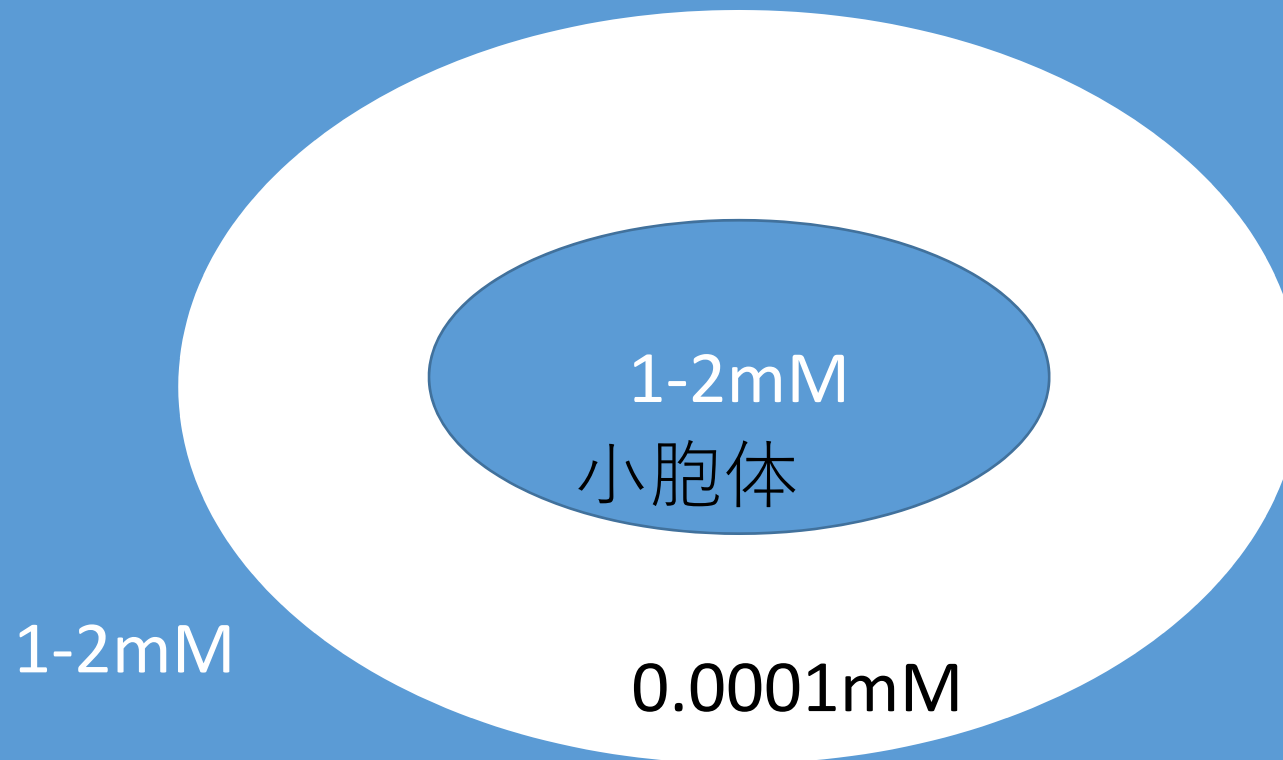


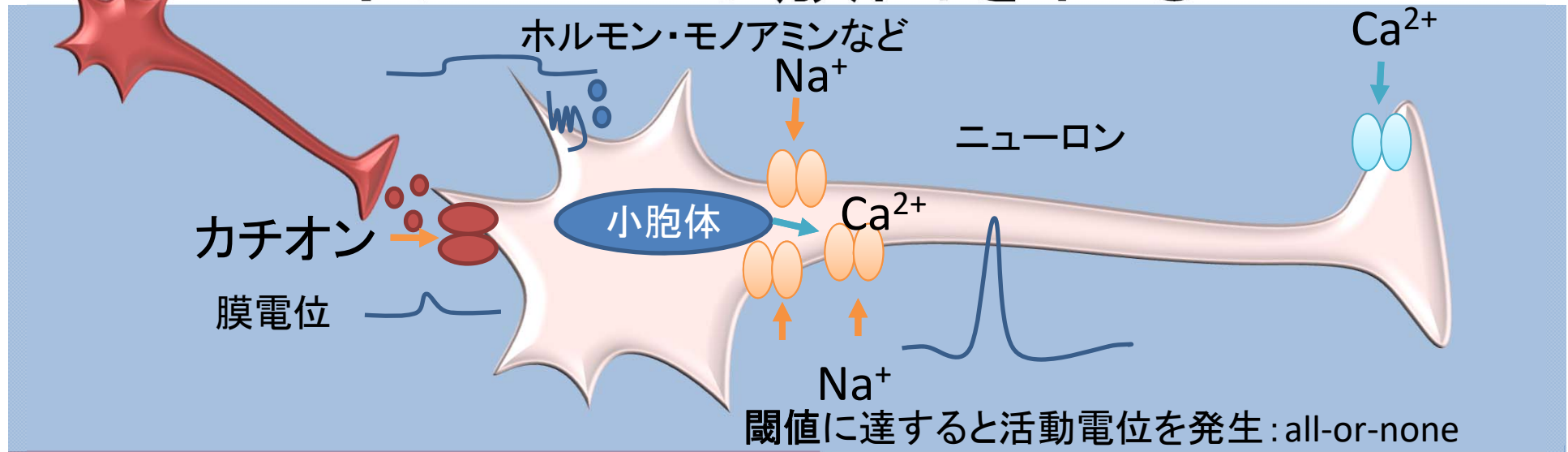
図 13-1 低分子量伝達物質は輸送体によって細胞質から小胞内へ、あるいはシナプス間隙から細胞質へ輸送される

(薄い青色の矢印). そこでコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) によるアセチル化を受けて ACh を再生する。再生された ACh は小胞

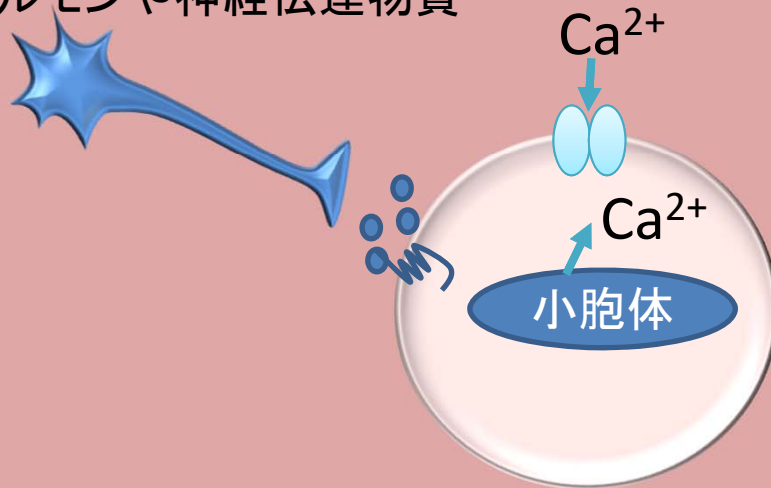
Ca²⁺はどこから？



Ca²⁺を介して神経伝達物質や ホルモンは放出される



ホルモンや神経伝達物質



神経内分泌細胞

- イオンチャネル共役型受容体
- Gタンパク質共役型受容体
など
- 電位依存性Na⁺チャネル
- 電位依存性Ca²⁺チャネル

神経でもシナプスを作らないことがある

- 通常のシナプスを形成する神経伝達

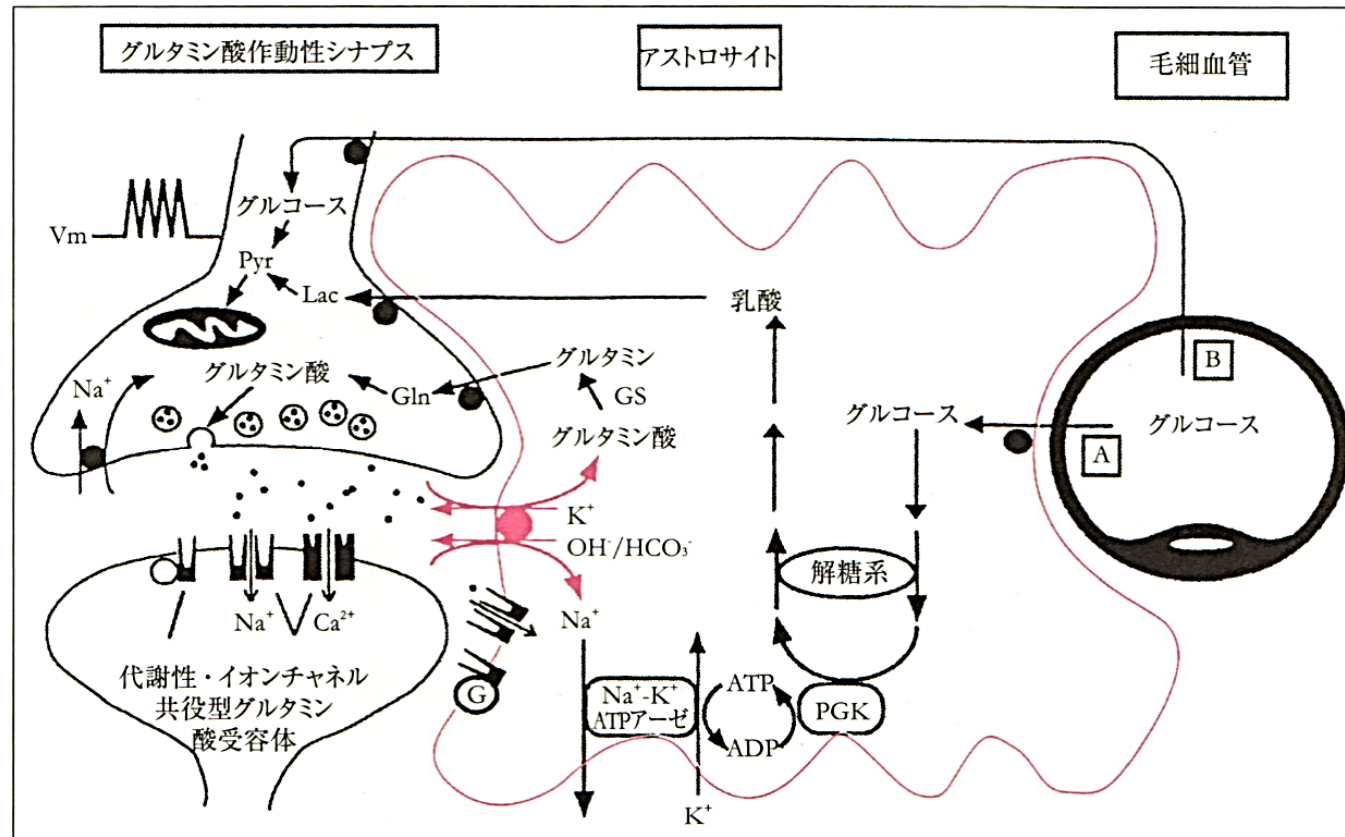


図 2.6 グルタミン酸作動性シナプスと近傍のアストロサイトの間の役割分担. シナプス前終末

一般的にシナプスはアストロサイトに覆われており、グルタミン酸はすぐに回収される

神経筋接合部ではアセチルコリンもコリンエステラーゼによって分解

- Volume transmission
離れたところに効く。ペプチド、モノアミンなど。数mmとも。

小胞で出ている根拠

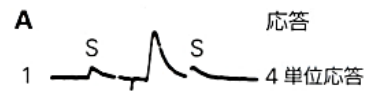
後シナプスの応答は量子的

膜電位の記録

刺激
Ca²⁺
AChの小胞放出

骨格筋

ニコチン性
アセチルコリン受容体



2 無応答

3 S 単位応答

4 3単位応答

5 単位応答

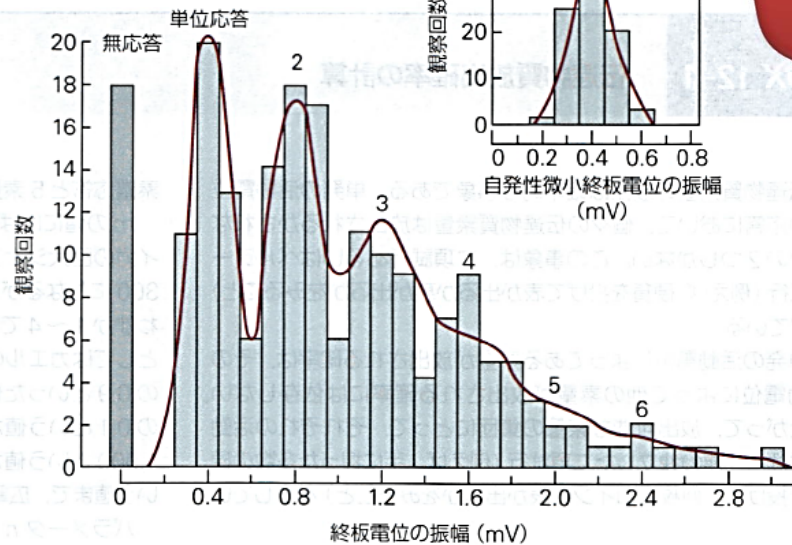
6 無応答

7 S 2単位応答

8 刺激 3単位応答

10 ms 2 mV

B



カandel神経科学第5版

図 12-6 神経伝達物質は素量として放出される

ラフ)の振幅と同じであり、単位応答が1素量の伝達物質の放出によっ

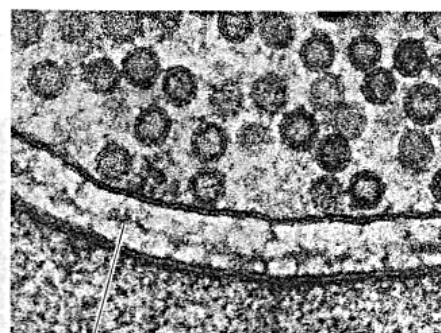
細胞質側シナプス前膜（凍結割断像）

シナプス前膜（超薄切片像）

A シナプスでの細胞膜

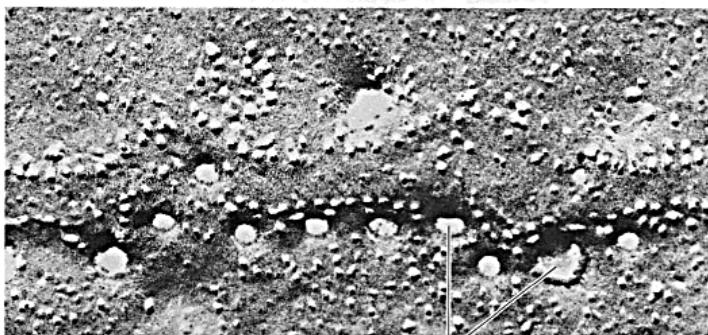


整列した膜内粒子

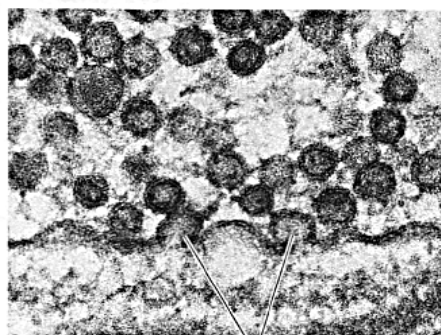


シナプス間隙

B エキソサイトーシス

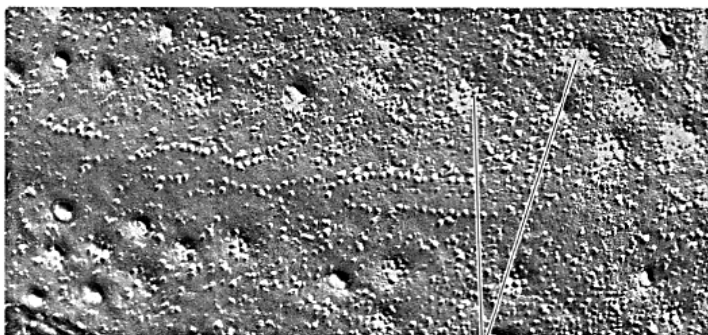


シナプス小胞の融合



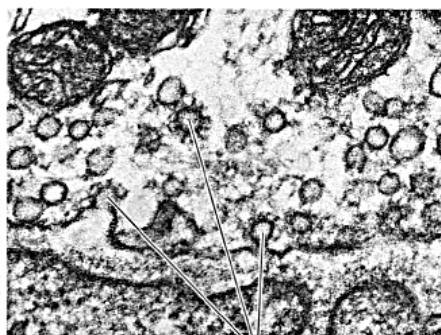
シナプス小胞の融合

C エンドサイトーシス



被覆小窩

100 nm



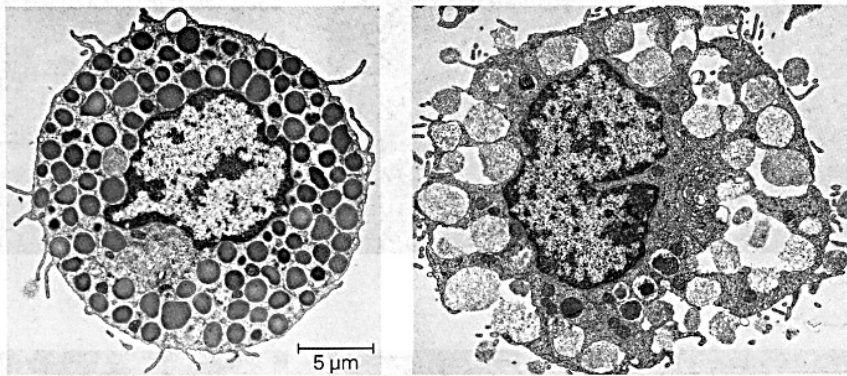
被覆小胞と被覆小窩

カンデル神経科学第5版

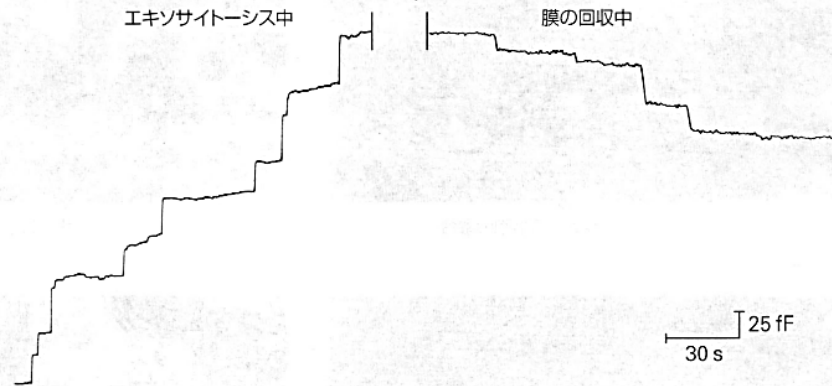
図 12-7 シナプス小胞はエキソサイトーシスにより伝達物質を放出し、エンドサイトーシスにより回収される

らえた。細胞膜に認められる陥凹のそれぞれが、1つの小胞の融合を表している。右側の電子顕微鏡像では、小胞の融合は Ω 形構造として観察

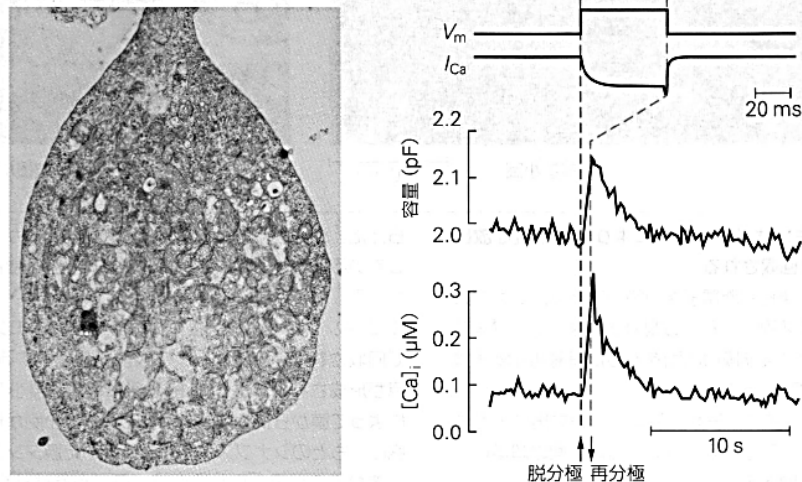
A 分泌顆粒エキソサイトーシスの前後のマスト細胞



B マスト細胞のエキソサイトーシス中およびその後の膜容量



C 網膜双極ニューロン終末

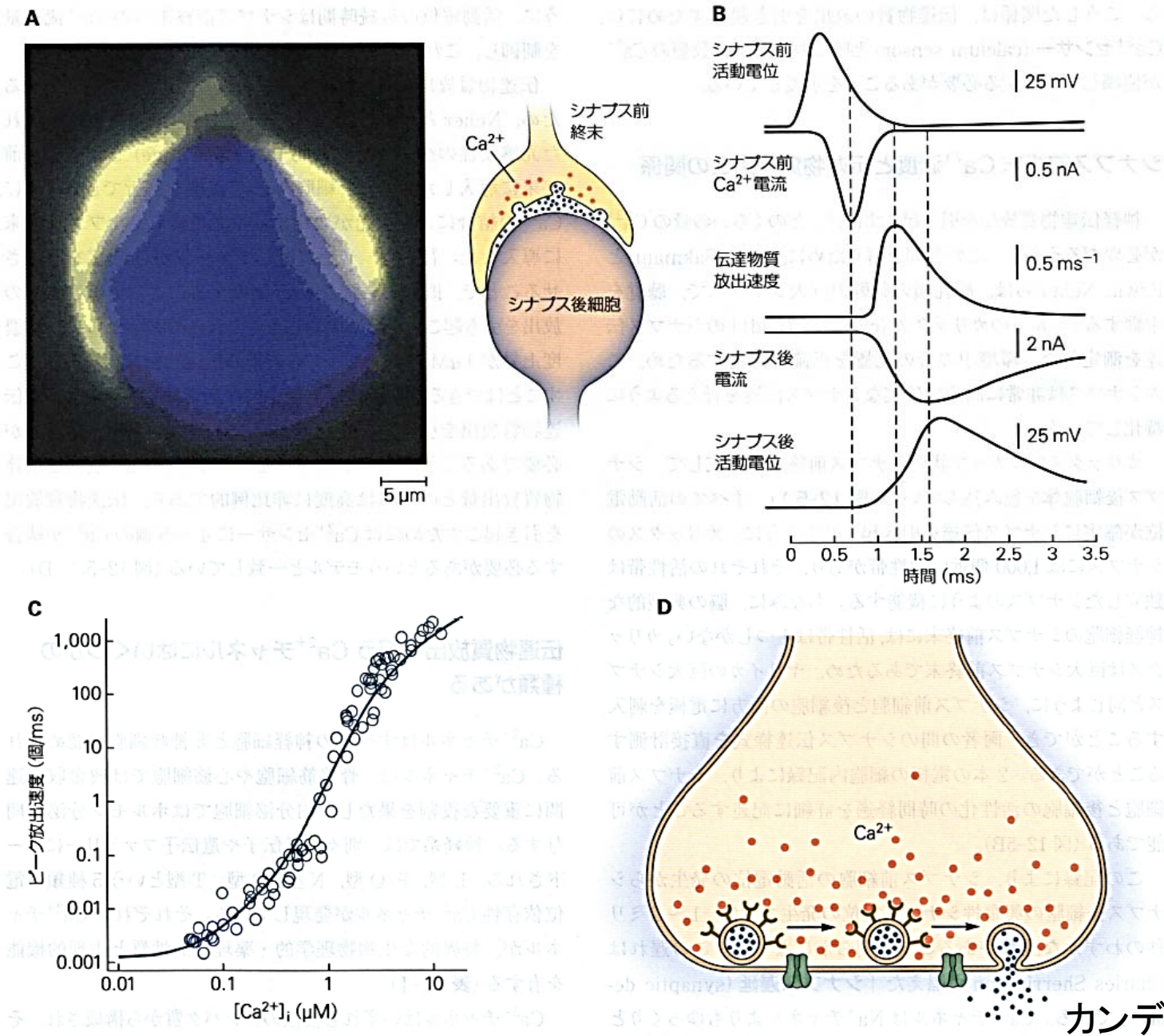


マスト細胞＝免疫系分泌細胞。ヒスタミンが有芯小胞内に。

カンデル神経科学第5版

図 12-8 (前ページ) 膜容量の変化からエキソサイトーシスとエンドサイトーシスの時間経過がわかる

▲ 電子顕微鏡像はエキソサイトーシス前(左)と後(右)のマスト細胞



リリースの見方?

カンデル神経科学第5版

図 12-5 中枢シナプスでのシナプス前細胞 Ca^{2+} と伝達物質放出との詳細な関係を測定する (Meinrenken, Borst, and Sakmann 2003 :

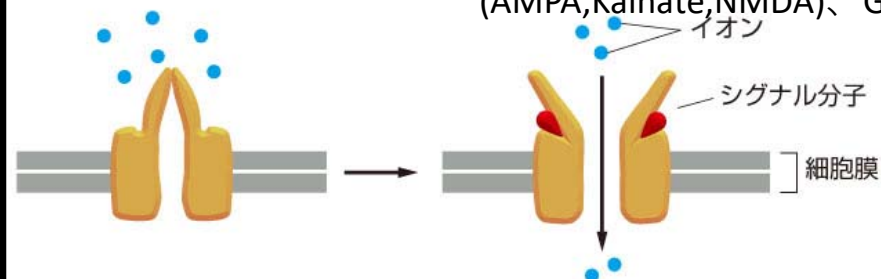
ナプス前終末内 Ca^{2+} の増加を制御できる。対数目盛でのプロットはシナプス小胞からの伝達物質放出速度とシナプス前終末内 Ca^{2+} 濃度と

何を起こすかはリガンドではなく、 受容体が決める

- くっつく先がチャネルなのか、代謝型受容体なのか、核内受容体なのか
 - 代謝型受容体の種類Gs?Gq?Gi?
 - チャネルの場合、抑制か促進か。EPSC?IPSC?
 - 核内受容体の場合、ターゲット配列。一緒に働く転写因子によって促進/抑制も変わる。

(A) イオンチャネル共役型受容体

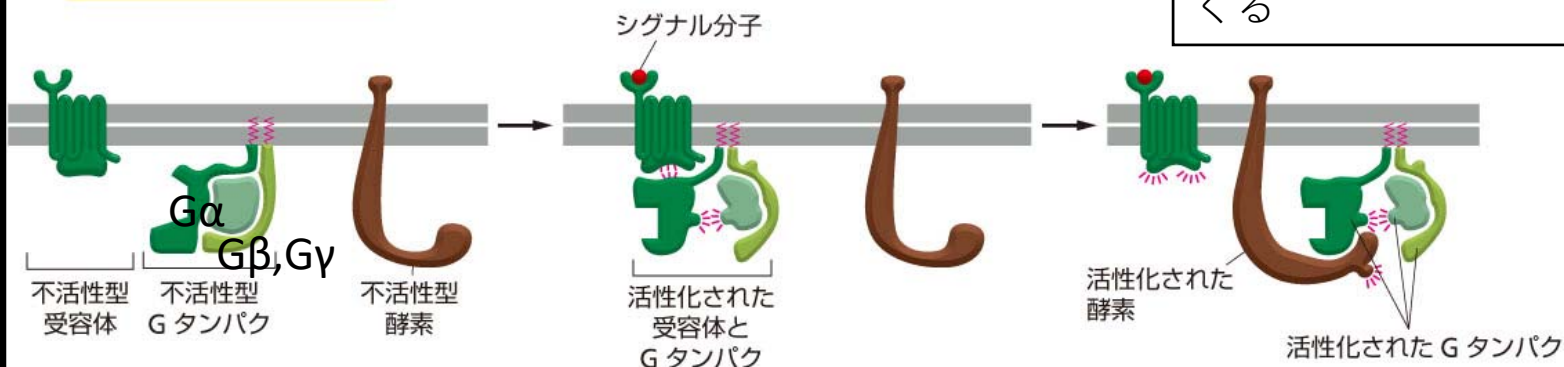
ニコチンアミド型アセチルコリン受容体、グルタミン酸受容体 (AMPA, Kainate, NMDA)、GABA_A受容体など



速い。
ミリ秒単位

(B) Gタンパク共役型受容体

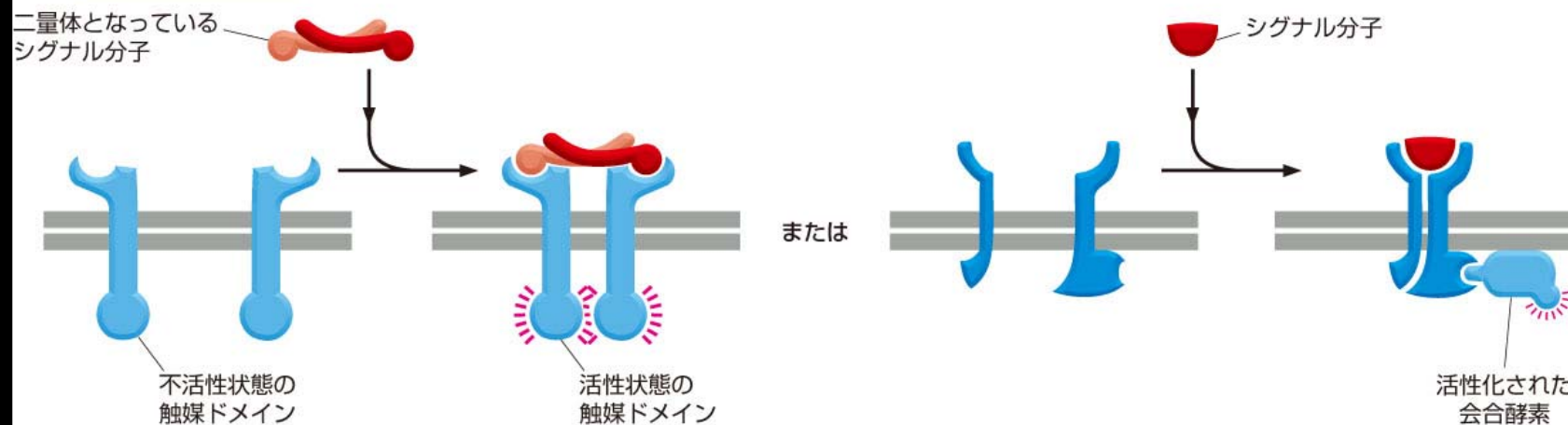
GnRH受容体、ドーパミンD1,D2受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体など



Gαサブユニットによって、活性化される酵素=以降のpathwayが変わってくる

(C) 酵素共役型受容体

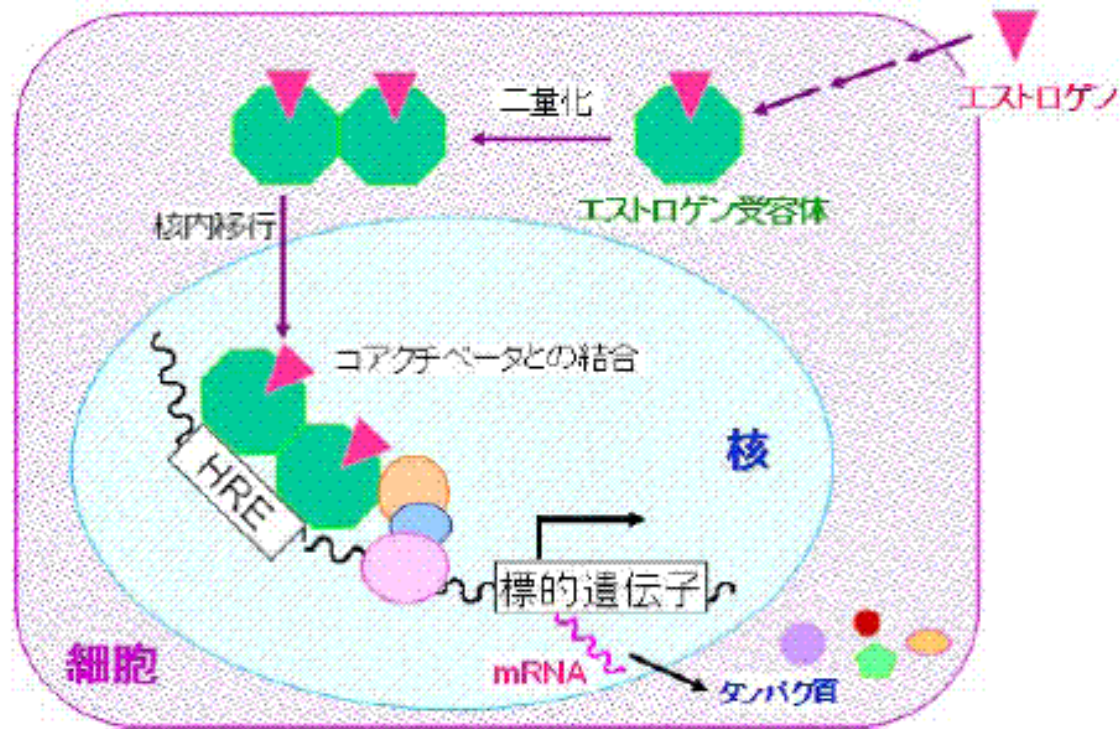
インスリン受容体（受容体型チロシンキナーゼ）など



遅め。
秒単位

核内受容体

ステロイド受容体・甲状腺ホルモン受容体など



遅い。
分単位

例：2つのまったく異なるアセチルコリン受容体

リガンドが同じでも、受け取る受容体によってまったく作用が異なる。

- ニコチン性アセチルコリン受容体
イオンチャネル共役型：神経筋接合部

ムスカリン性アセチルコリン受容体
Gタンパク質共役型受容体：副交感神経 e.g. 心洞房結節

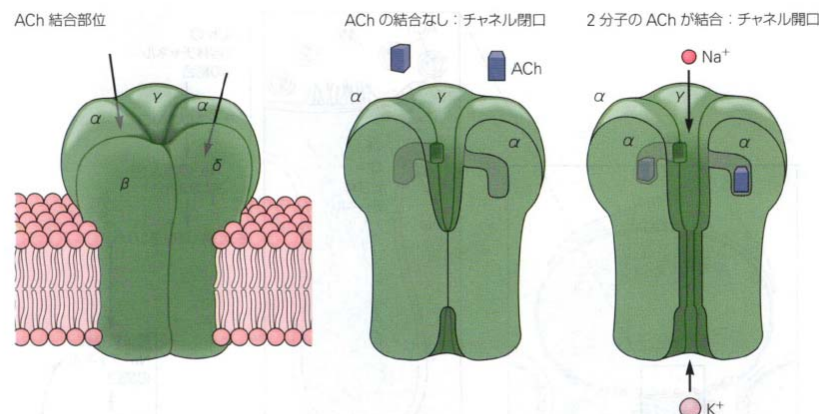


図 9-13 ACh 受容体チャネルは五量体の巨大分子である

ACh 受容体チャネルは、5つのサブユニットが細胞膜を貫く孔を形成している単一巨大分子である(図 9-14 参照)。αサブユニットが2つ、β、γ、δサブユニットがそれぞれ1つずつから構成されている。細胞

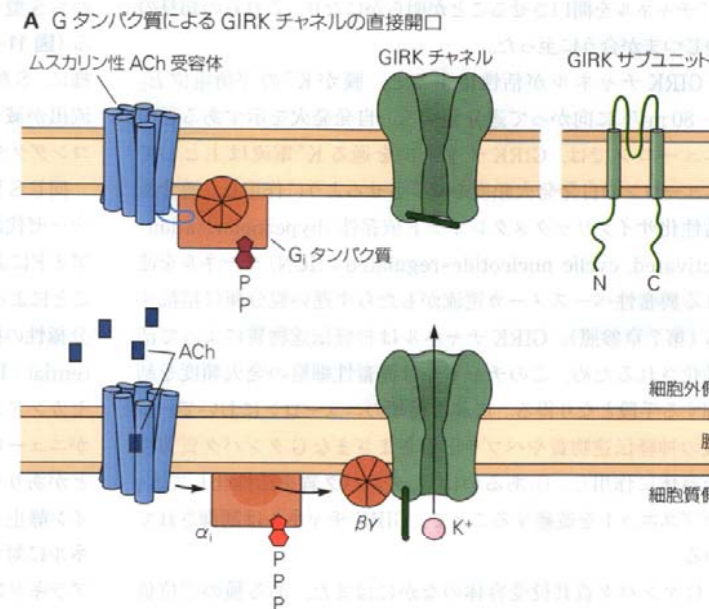
外の2カ所の結合部位(αサブユニットとγサブユニット、αサブユニットとδサブユニットが接する部位にある)に2分子のAChが結合すると、受容体チャネル分子の立体構造が変化する。その結果、チャネルは開口し、電気化学的勾配に従って K⁺ と Na⁺ が孔を通して流れる。

図 11-12 G タンパク質にはセカンドメッセンジャーを動員せずに直接イオンチャネルを開口させるものもある

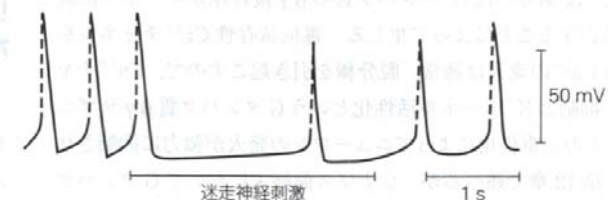
A 内向き整流性 K⁺ チャネル (GIRK) は、G タンパク質によって直接開口する。ACh がある種のムスカリン性受容体に結合すると、G_i タンパク質 α_i β γ サブユニット複合体が解離する。そして、遊離した β γ サブユニットがチャネルの細胞質側ドメインに結合して、チャネルの開口が起こる。

B 副交感性迷走神経の刺激によって ACh が放出され、ACh がムスカリン性受容体に作用して心筋細胞膜上の GIRK チャネルが開く。GIRK チャネルを流れる電流によって細胞は過分極し、それによって心拍数減少が助長される。(Toda and West 1967 より)

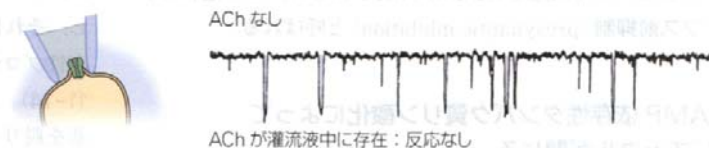
C 3つの単一チャネル記録は、GIRK チャネルの開口には拡散する遊離セカンドメッセンジャーが関与していないことを示している。この実験では、記録電極には高濃度の K⁺ が含まれていて、このために K⁺ の平衡電位 (E_K) がより正の方向に移動している。その結果、GIRK チャネルが開くと、短いパルス状の内向き(記録では下向き)電流が生じる。ACh が存在しない場合は、チャネルの開口は短時間かつ低頻度である(上段の記録)。灌流液中(記録電極の外側)に ACh を投与しても記録電極下のパッチ膜上のチャネル開口は増加しない(中段の記録)。チャネルを活性化するには、ACh は記録電極内に存在しなくてはならない(下段の記録)。これは、ACh が受容体に結合することによって解離した遊離 β γ サブユニットは受容体近傍の膜につなぎとめられたままで、近傍のチャネルのみを活性化できるからである。β γ サブユニットは記録電極下のチャネルに自由に拡散できるわけではない。(Soejima and Noma 1984 より)



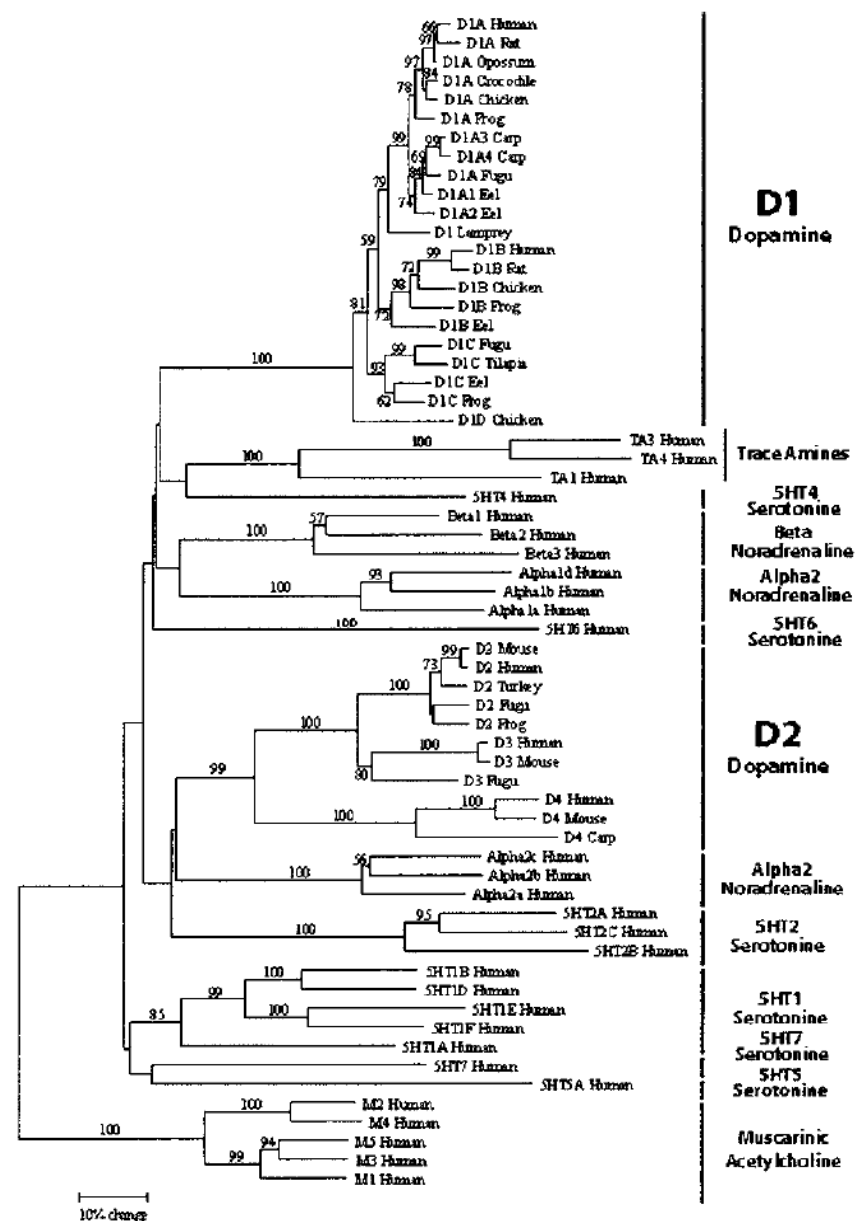
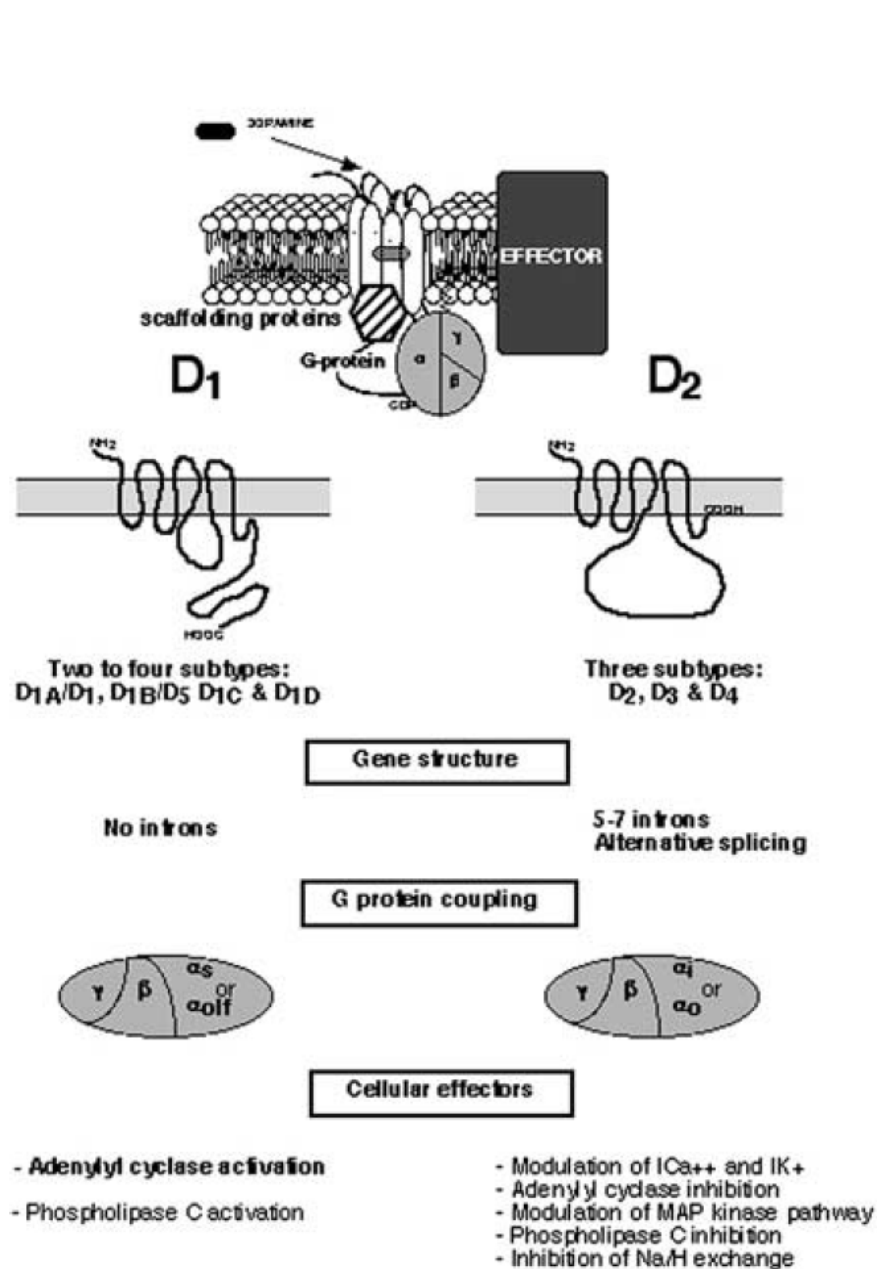
B AChによって GIRK チャネルが開くと心筋細胞が過分極する



C AChによる GIRK チャネル開口にはセカンドメッセンジャーを必要としない



トーパーミン受容体



(Le Crom et al., 2003)

イオンチャネル共役型受容体

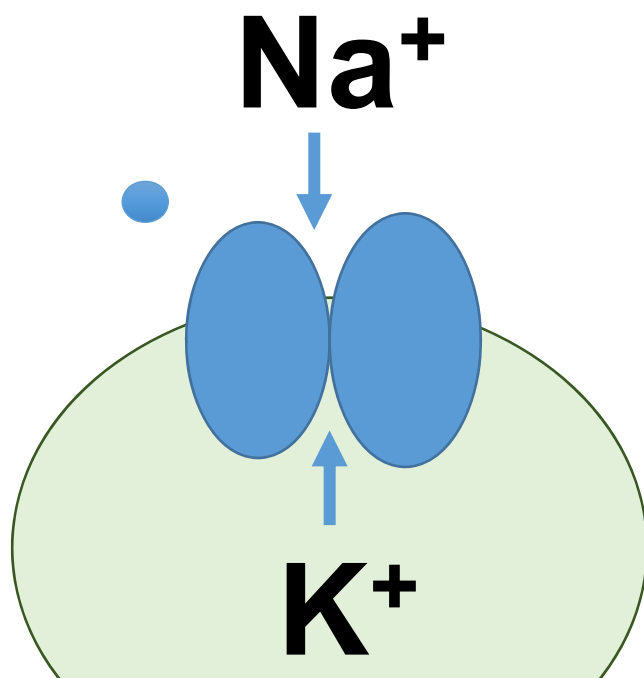
- 特徴：速い。細胞内外のイオン濃度で意味が変わる

イオンチャネル：電位依存性チャネル／リガンド開口型チャネル

例

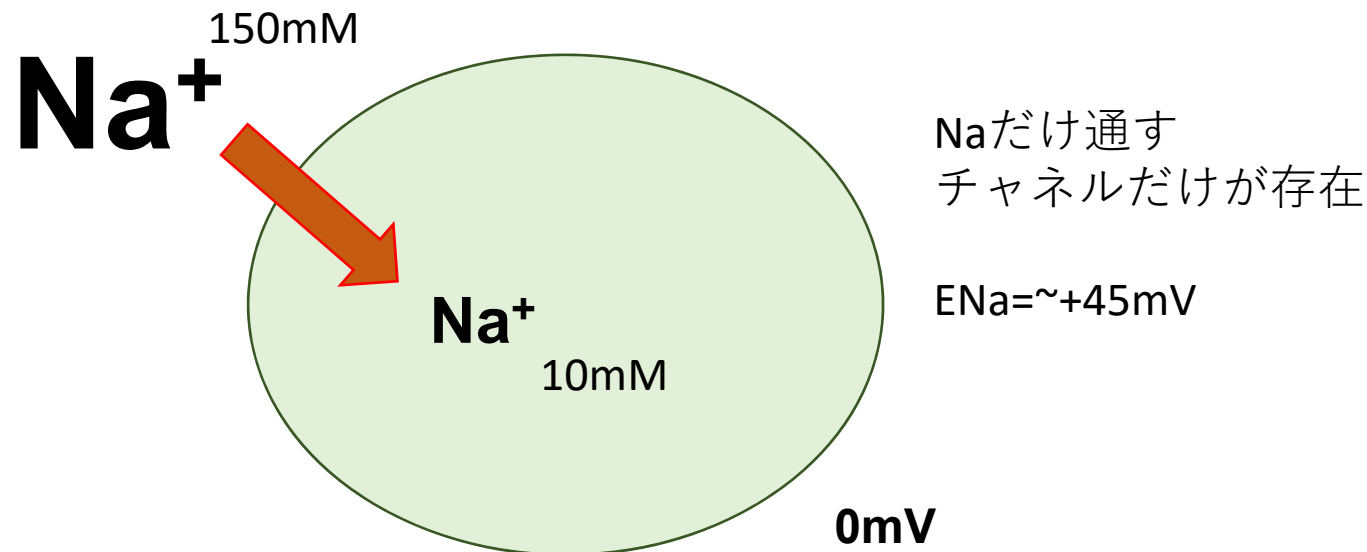
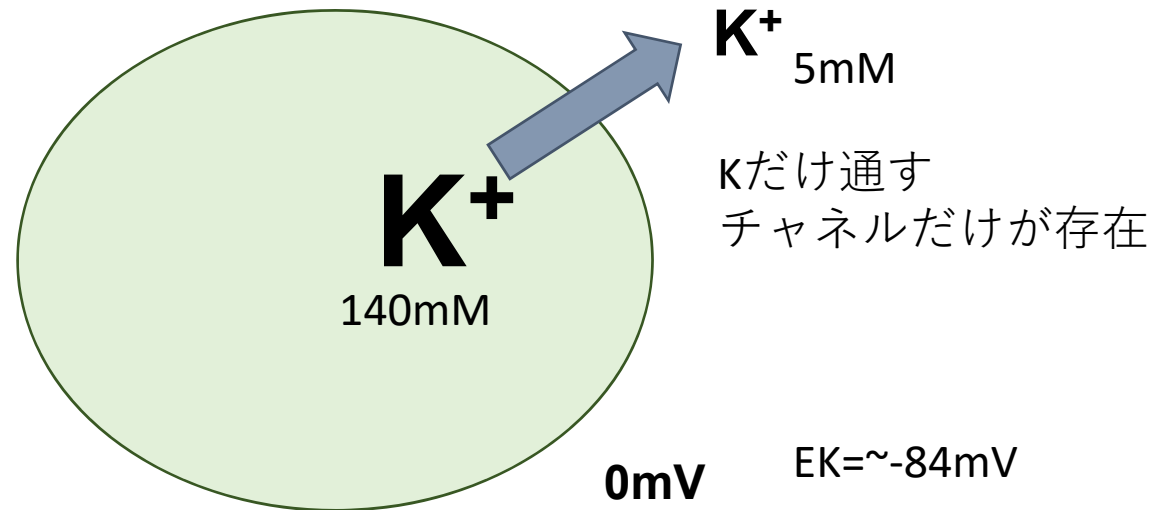
名前	リガンド	通すもの
ニコチンアミド性アセチルコリン受容体	アセチルコリン	Na^+, K^+
グルタミン酸受容体	グルタミン酸	$\text{Na}^+, \text{K}^+, (\text{Ca}^{2+})$
GABA_A 受容体	GABA	Cl^-

※種類によって若干異なる



平衡電位：ネルンストの式

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}$$



計算してみよう

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}$$

$$R=8.3$$

$$F=9.6 \times 10^4$$

$$T=300$$

細胞外液	(mM)		細胞内液	(mM)
NaCl	125		K-gluconate	140
KCl	5		MgCl ₂	3
HEPES	10		HEPES	40
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.3		CaCl ₂	0.0001
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.4		NaCl	15

E_{Na}

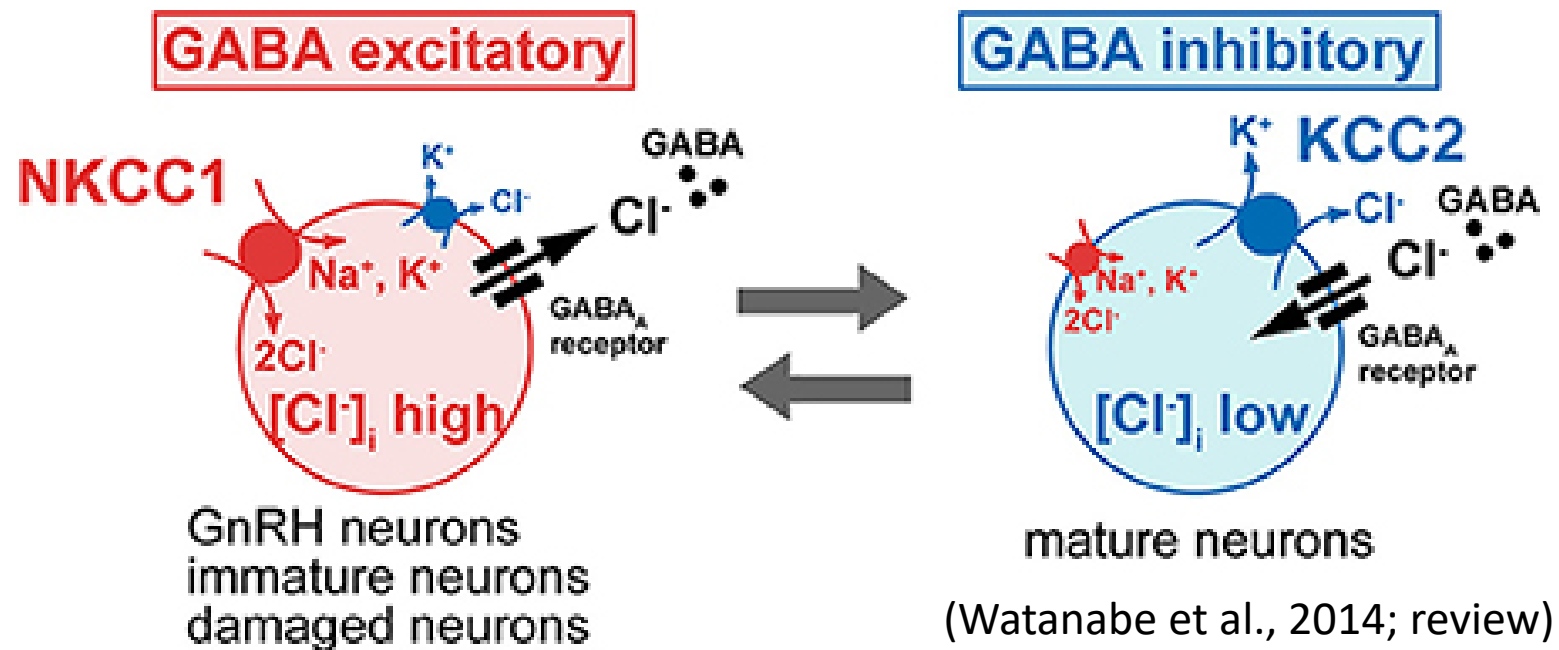
E_K

E_{Ca}

E_{Cl}

Cl⁻チャンネルは要注意

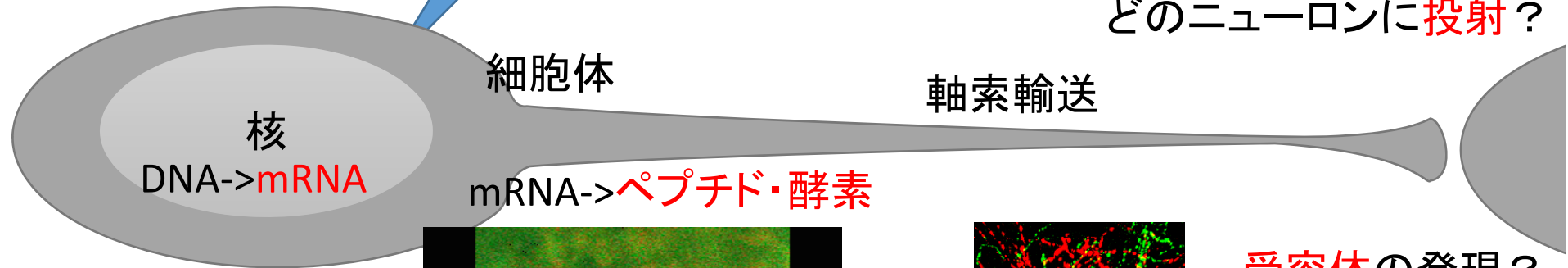
- Cl⁻濃度は一般のニューロンでは細胞内が低い。しかし、一部のニューロンや幼弱ニューロンでは細胞内が高くなっている。Cl⁻が流出すると脱分極するし、Cl⁻が流入すると過分極する。



ニューロンの機能を解析 するアプローチ

パッチクランプ: 発火活動

どのニューロンに**投射**?



受容体の発現?

Ca²⁺イメージング: 放出

シナプス前細胞
シナプス後細胞

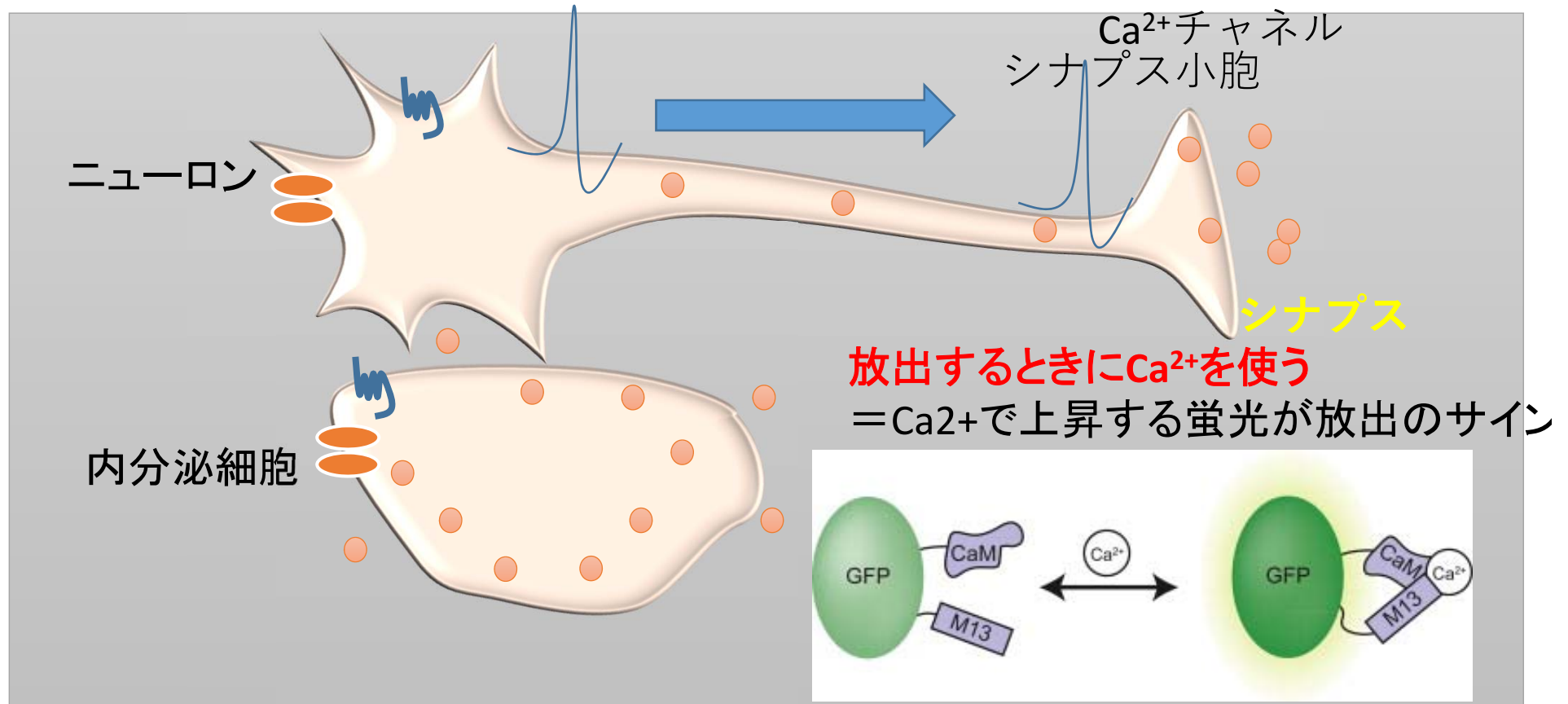
トランスジェニック

In situ hybridization: mRNA

免疫組織化学: タンパク・ペプチド

生理学的な解析

電気生理と Ca^{2+} イメージング

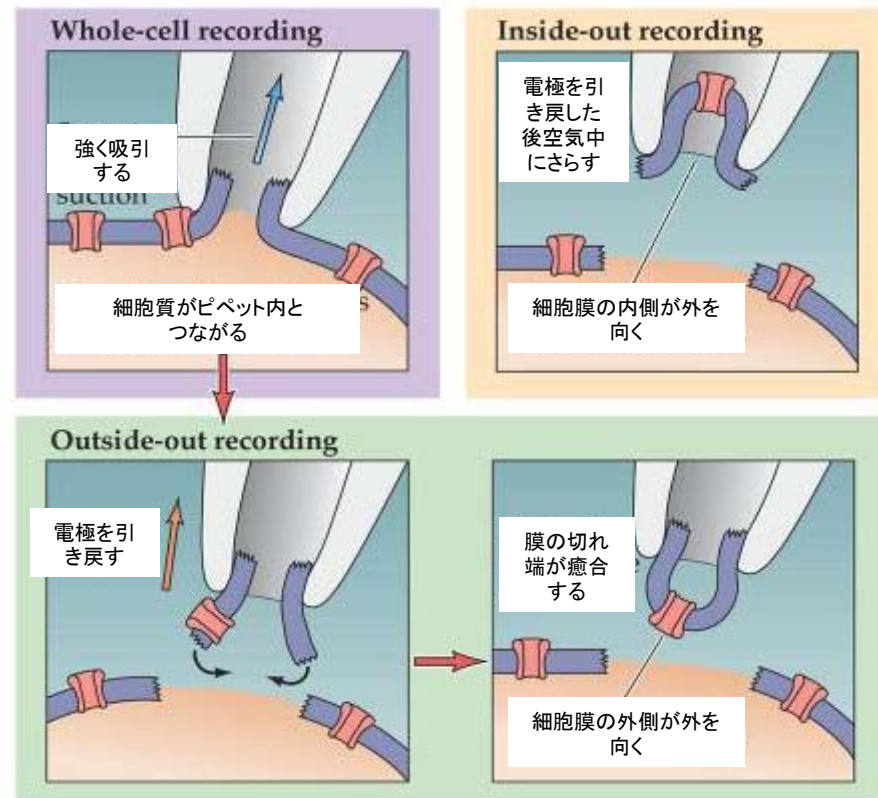
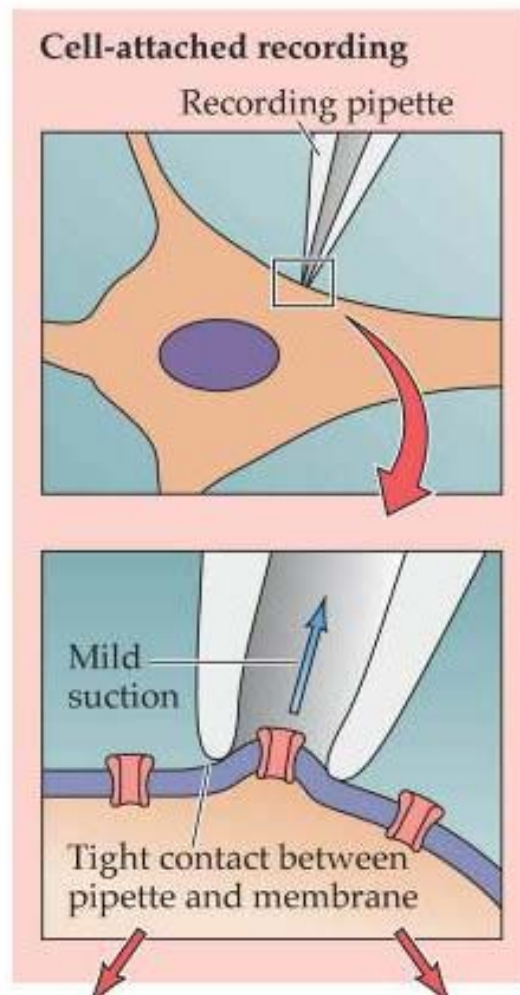


電気生理: 膜電位の絶対値がわかる
自発活動が観察できる

Ca^{2+} イメージング: 相対的な値。
何かの刺激や薬剤投与の作用がわかる

パッチクランプ、電気生理

- 従来は、微小電極による電気生理が主流だった
(適用できる細胞に限られる)
- **GFP**トランスジェニック+パッチクランプで目的の細胞の記録が可能に。



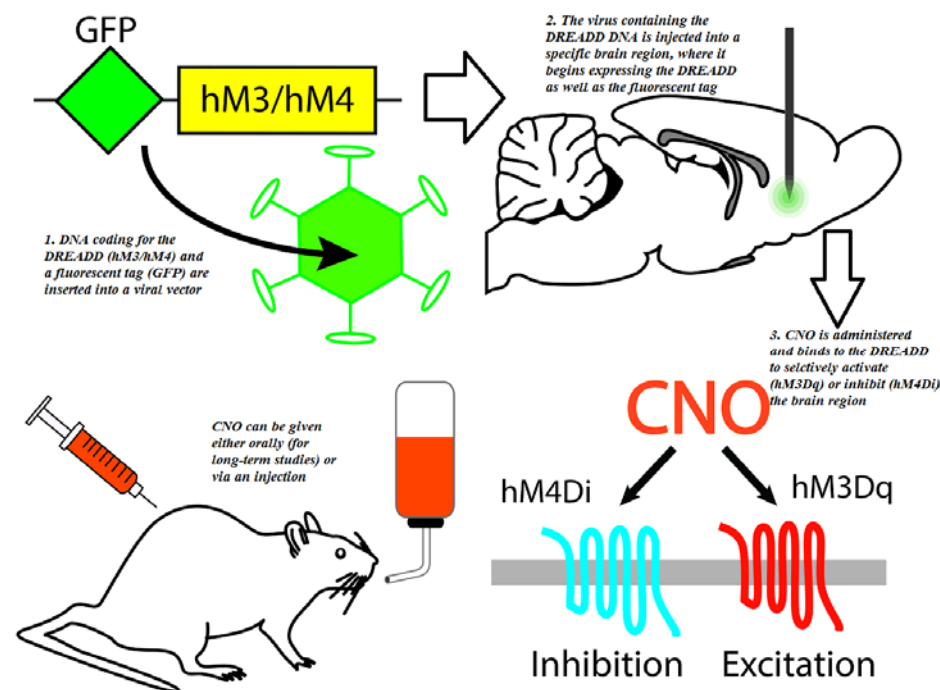
細胞内に電極を刺入するのではなく、
細胞膜に電極を吸い付けて、イオンチャネルの開閉や
細胞全体を流れる電流、細胞の電位変化を記録する

人工的な受容体

～遺伝子導入で任意のタイミングで動かす～

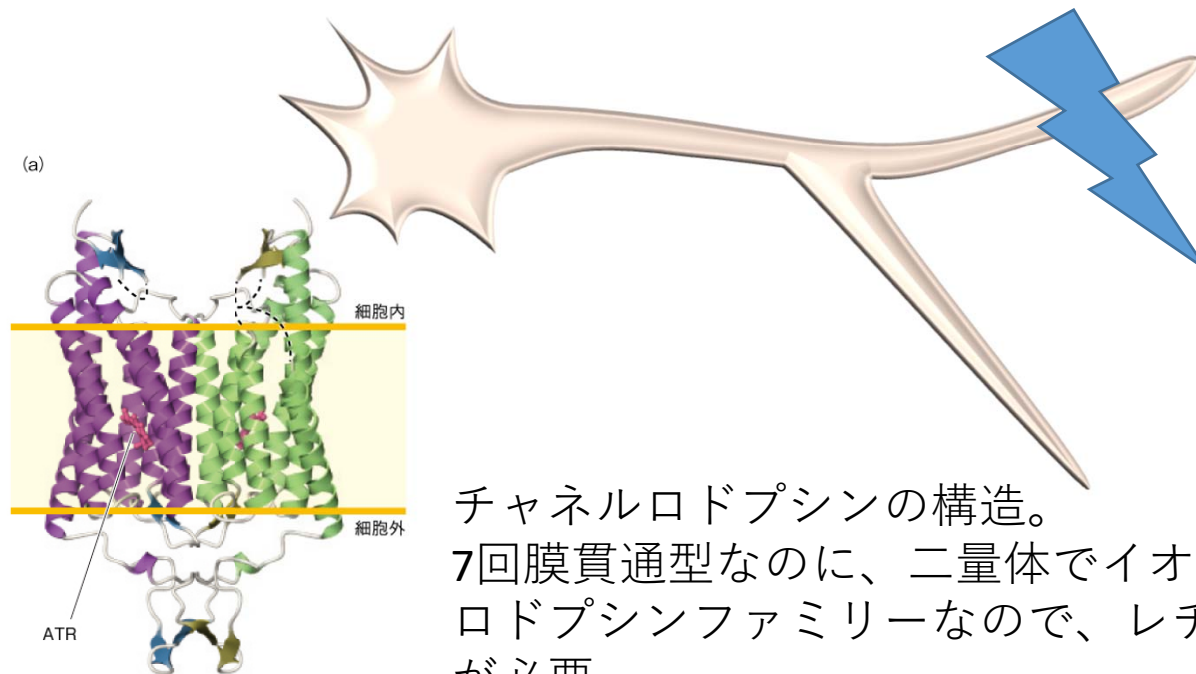
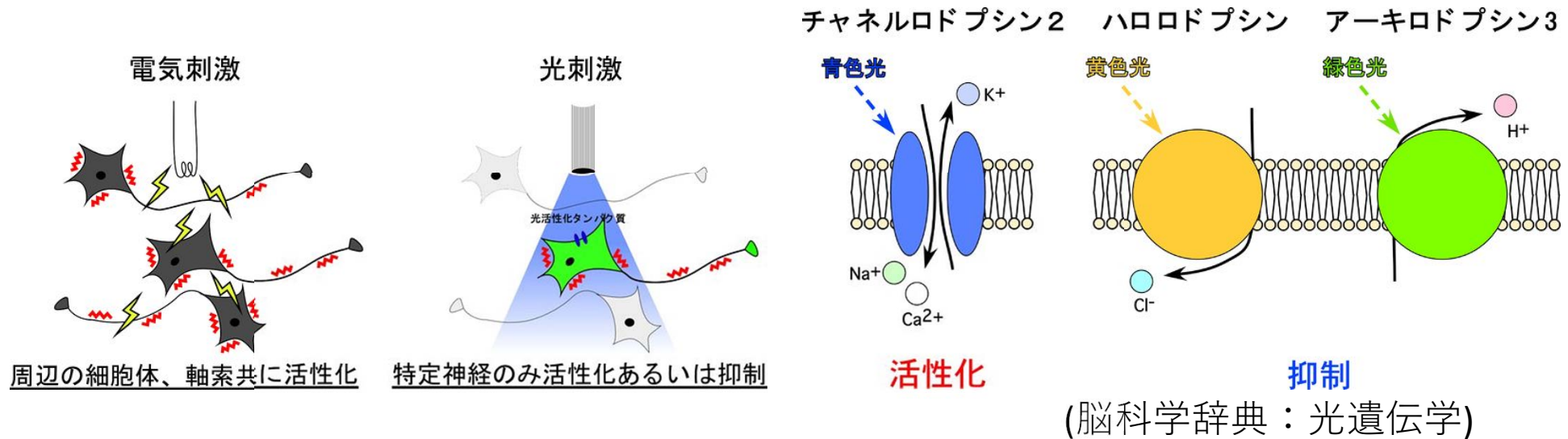
- DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug)

ヒトM3ムスカリン様アセチルコリン受容体の細胞内領域を改変、人工リガンドCNO (Clozapine-N-Oxide)に反応するように。(Achには反応しない)



<https://neuwritesd.org/2016/01/28/dawn-of-the-dreadd/>

• Channel Rhodopsin/ HaloRhodopsin

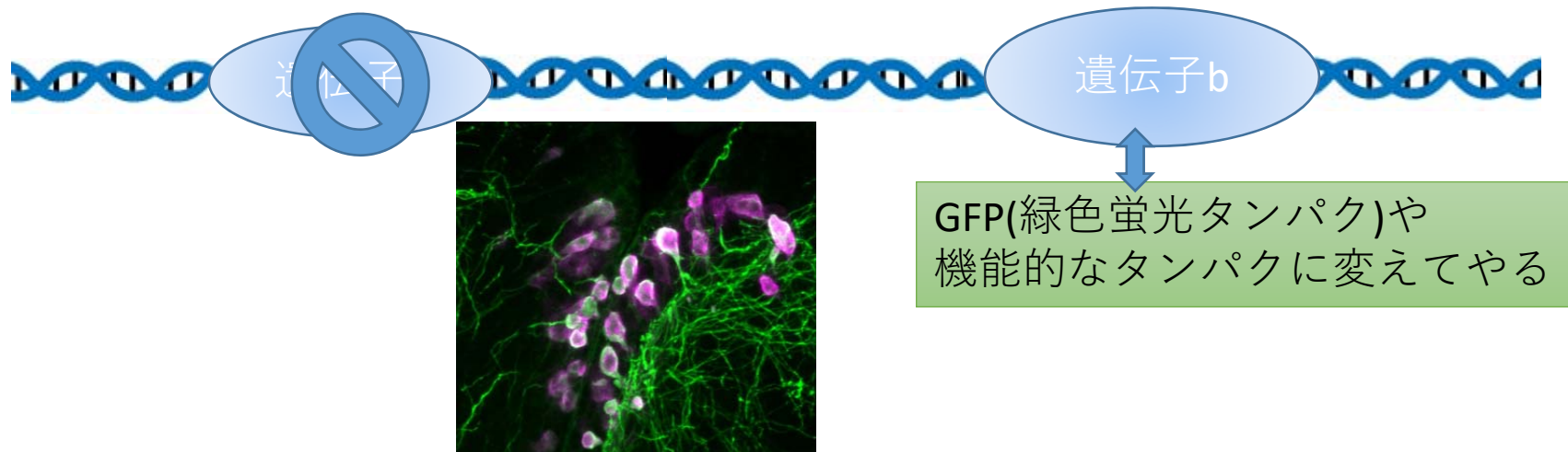


複数にわたる投射先の一部のみで Ca^{2+} の放出を制御、も可能、とされる。

チャネルロドプシンの構造。
7回膜貫通型なのに、二量体でイオンチャンネルを形成。
ロドプシンファミリーなので、レチナール(ATR:all trans-retinal)が必要。

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/4321>

遺伝子導入の仕方

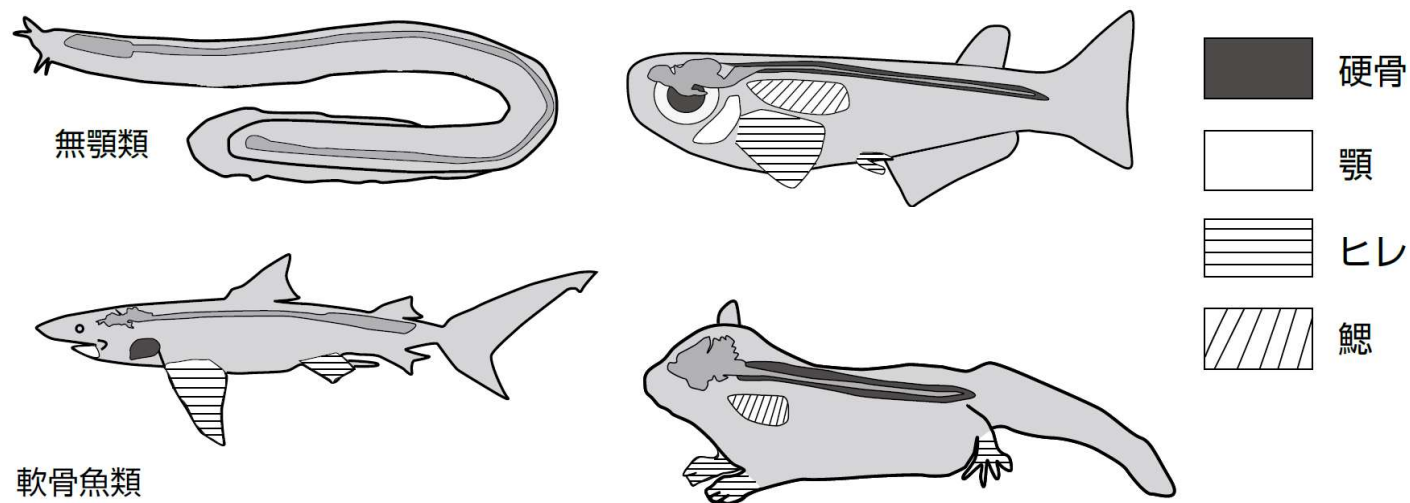
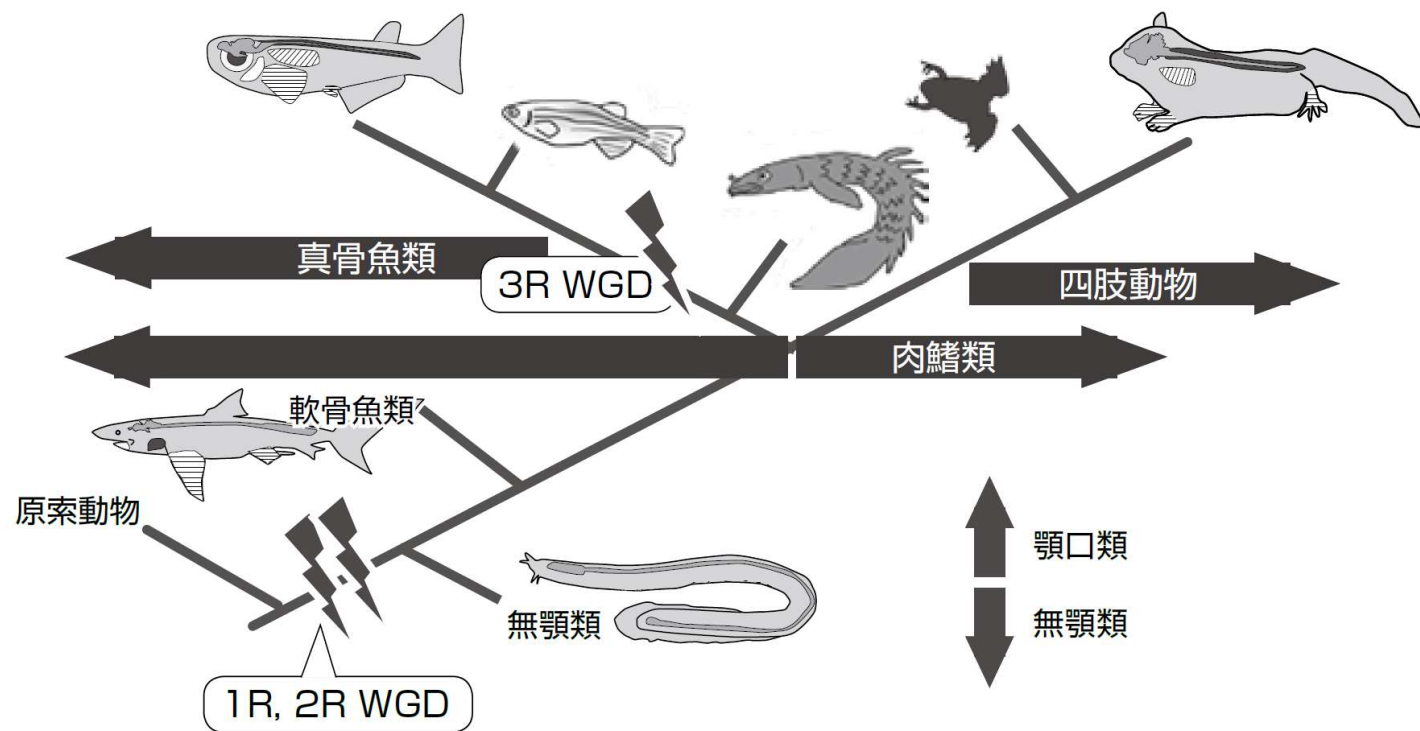


- プラスミドを利用
- エンハンサーを基本プロモーターで利用(c.f.エンハンサートラップ)
- BAC
- ノックイン
 - ES細胞の相同組み換え
 - CRISPR

まとめ

- ホルモンとニューロン、ばらまくか、ターゲットか。
- どちらも Ca^{2+} 依存的な **exocytosis** で放出。
- どこからどこまでがニューロンで、どこから先がホルモンなのか(**GnRH**の例)
- 受容体によって作用が決まる。効くまでの時間も異なってくる
- さらに、リガンドが存在する時間や、受容体が賦活されている時間も異なる

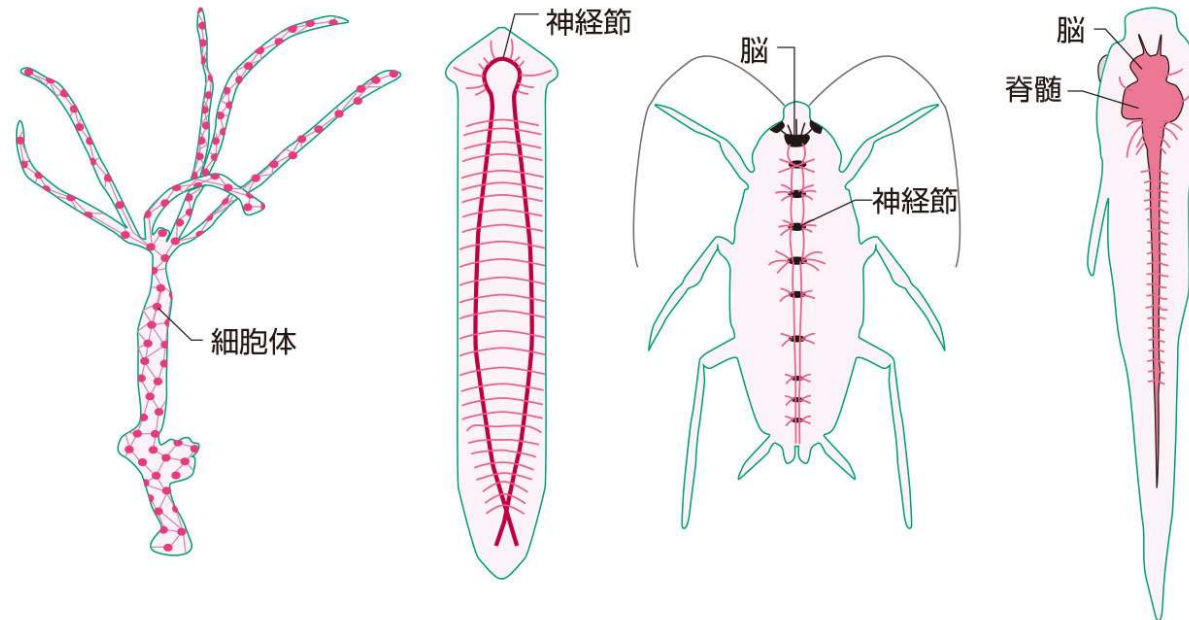
中枢と末梢の相互作用



『遺伝子から解き明かす「魚」の不思議な世界』 2019発刊予定

動物の神経系-神経管の発生とそれ以外の神経系-

脳の構造



ヒドラ

(散在神経系)

プラナリア

(かご形神経系)

ゴキブリ

(はしご形神経系)

メダカ

(管状神経系)

管状神経系 (神経管が膨出、回外して脳を形成する) は脊索動物門(脊椎動物を含む)のみ

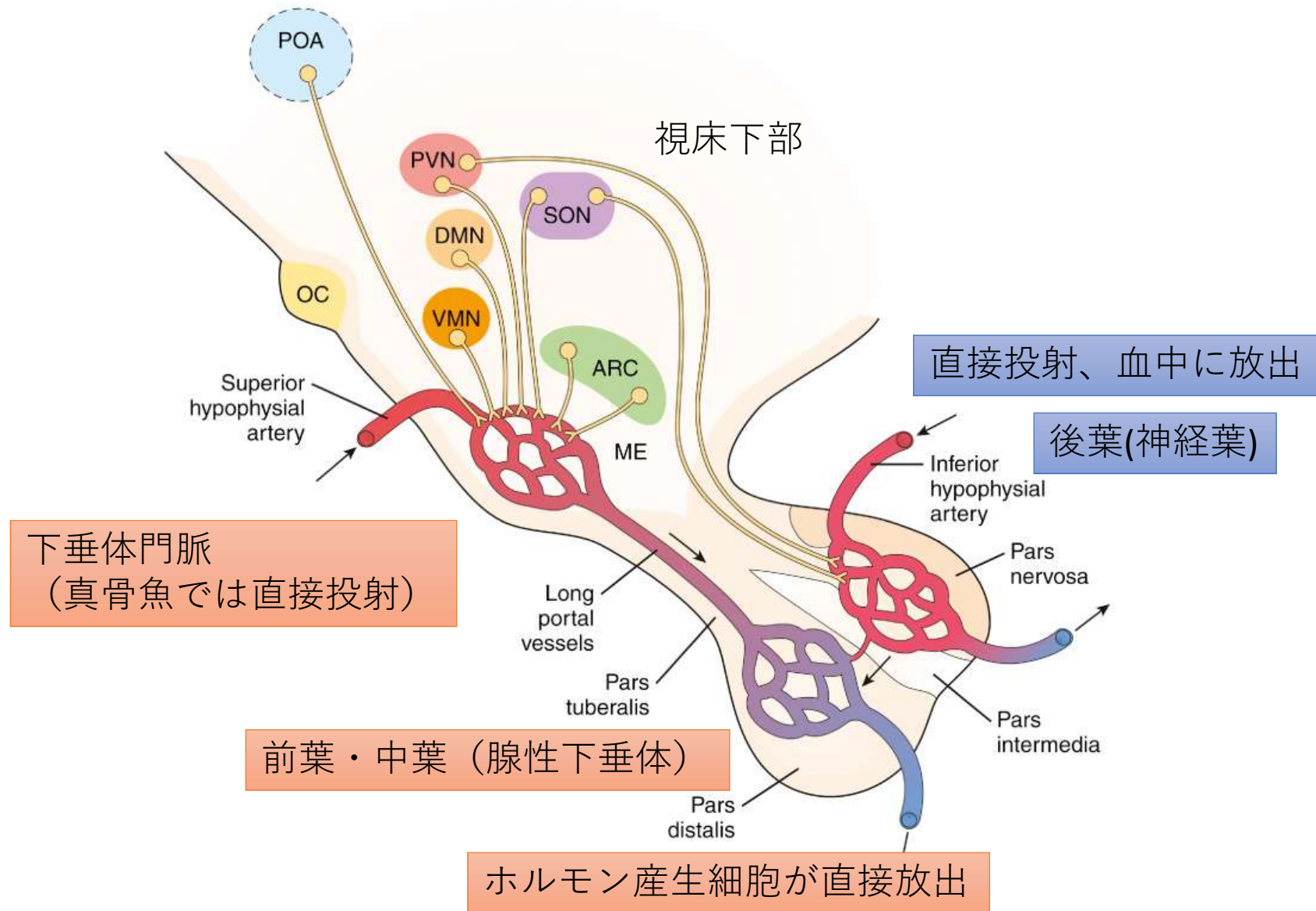


※ハエの中枢の興奮性神経伝達物質はアセチルコリン。
脊椎動物の末梢神経系(神経筋接合部、副交感神経)の神経伝達物質はアセチルコリン。

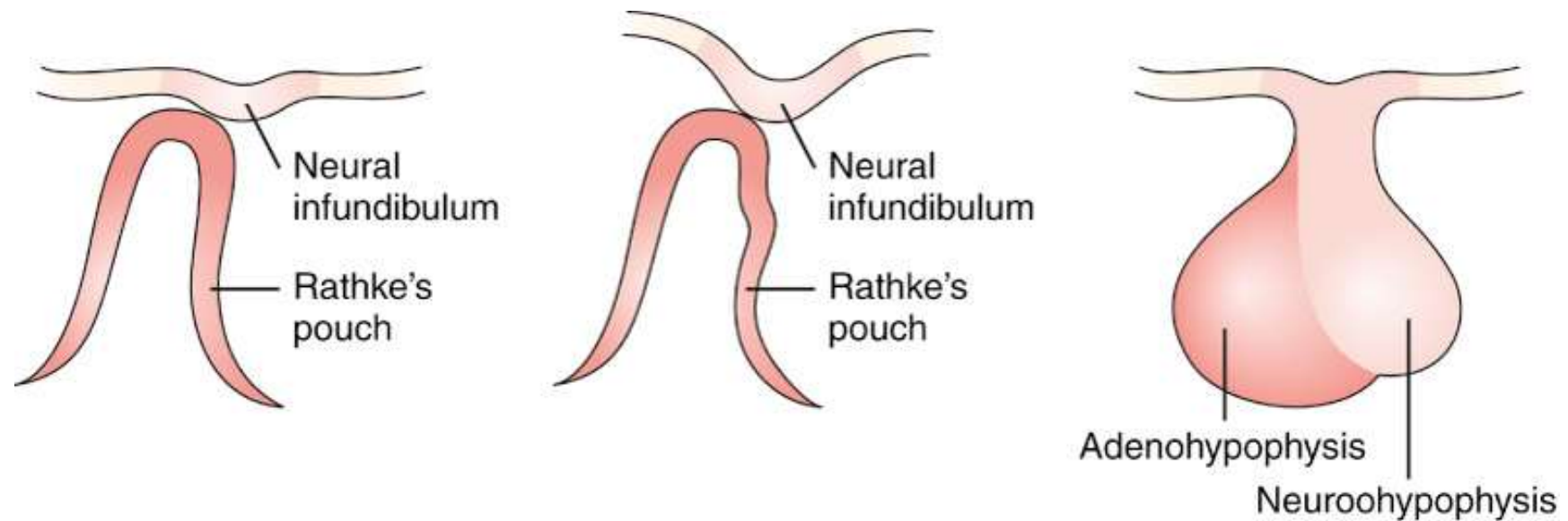
※今回脊椎動物だけを考える

脊椎動物の内分泌器官-脳下垂体-

- 前葉と後葉



前葉と後葉は発生起源からして異なる

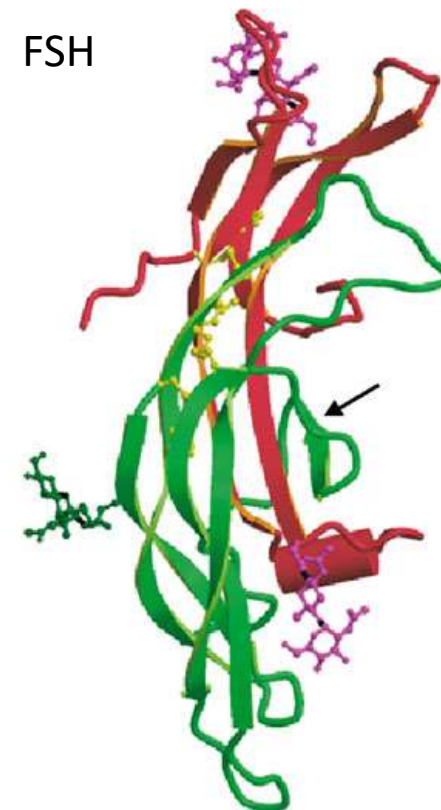
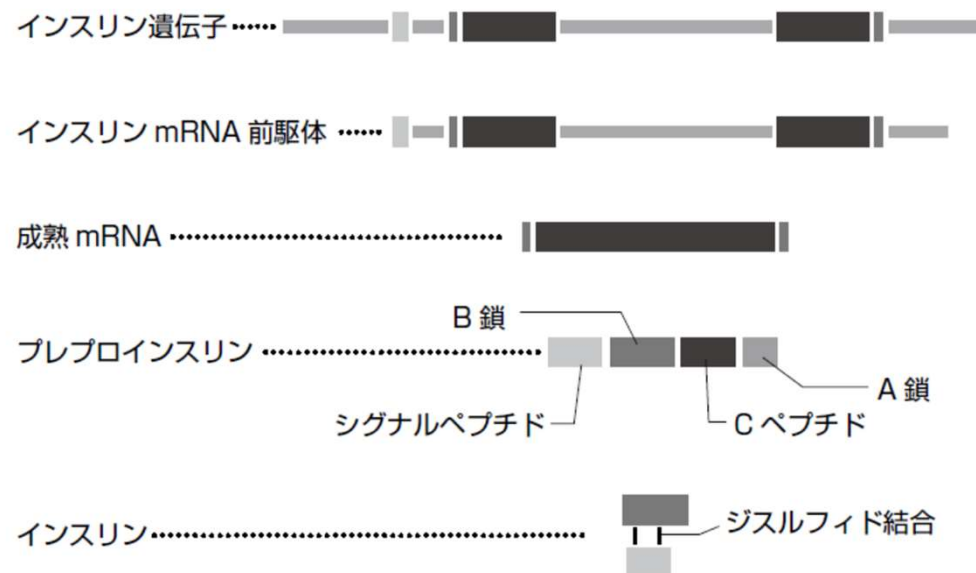


ラトケ嚢から前葉ができ、
神経管から後葉ができる。

Figure 4-4 Pituitary gland development. Early understanding of development of the stomatodeal epidermis into the adenohypophysis from Rathke's pouch and the neurohypophysis from the neural infundibulum. The pars intermedia developed at the point of contact between the neuroinfundibulum and Rathke's pouch. (Adapted from Dubois, P.M. and El Amraoui, A., Trends in Endocrinology and Metabolism, **6**, 1–7, 1995. © Elsevier Science, Inc.)

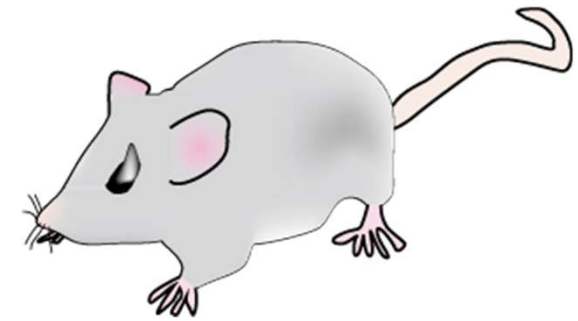
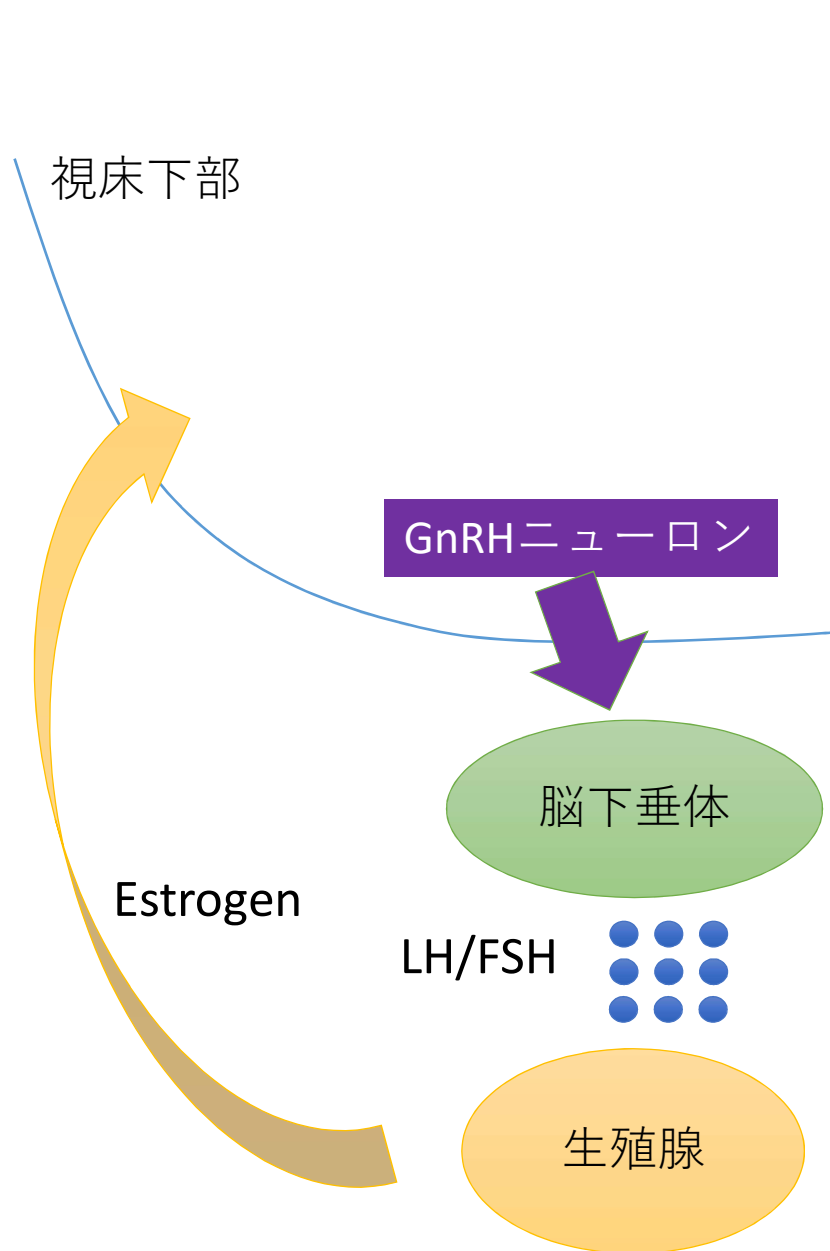
ホルモンの種類

- ペプチド
gonadotropin releasing hormone (GnRH) インスリン グ
ルカゴン バソプレシン/オキシトシン
adenocorticotrophic hormone (ACTH:副腎皮質刺激ホルモン)
- タンパク質
成長ホルモン・プロラクチンファミリー (GH, PRL, SL) 糖
タンパク質ホルモンファミリー (LH, FSH, TSH, hCG)
- ステロイド
エストロジェン アンドロジェン グルココルチコイ
ド
- アミノ酸誘導体
チロキシン (T4) メラトニン アドレナリン

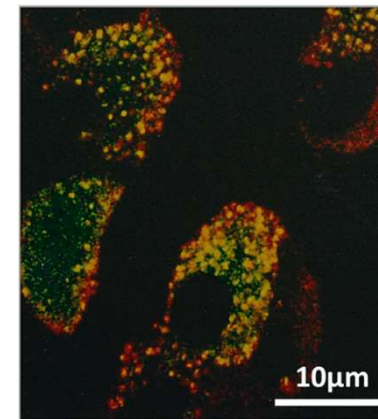


(Alevizaki and Huhtaniemi, 2002)

生殖内分泌の調節-ステロイドフィードバック



FSH/LHは同じ細胞で発現。
FSHはダラダラ出ていて、LHは調節的に放出。



FSH:濾胞刺激ホルモン
LH:黄体形成ホルモン

ヒツジ (Thomas and Clarke et al.,1997)

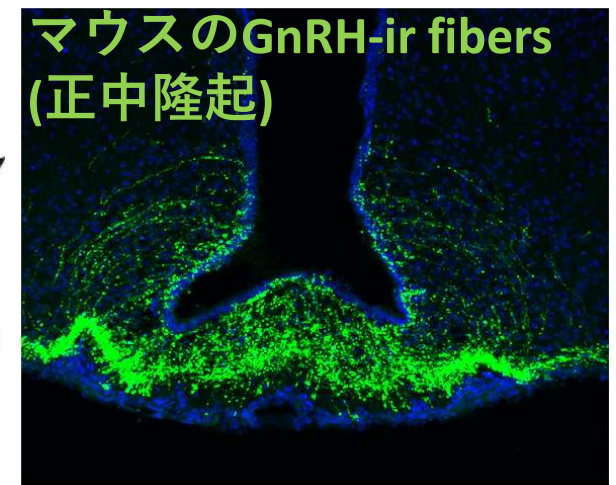
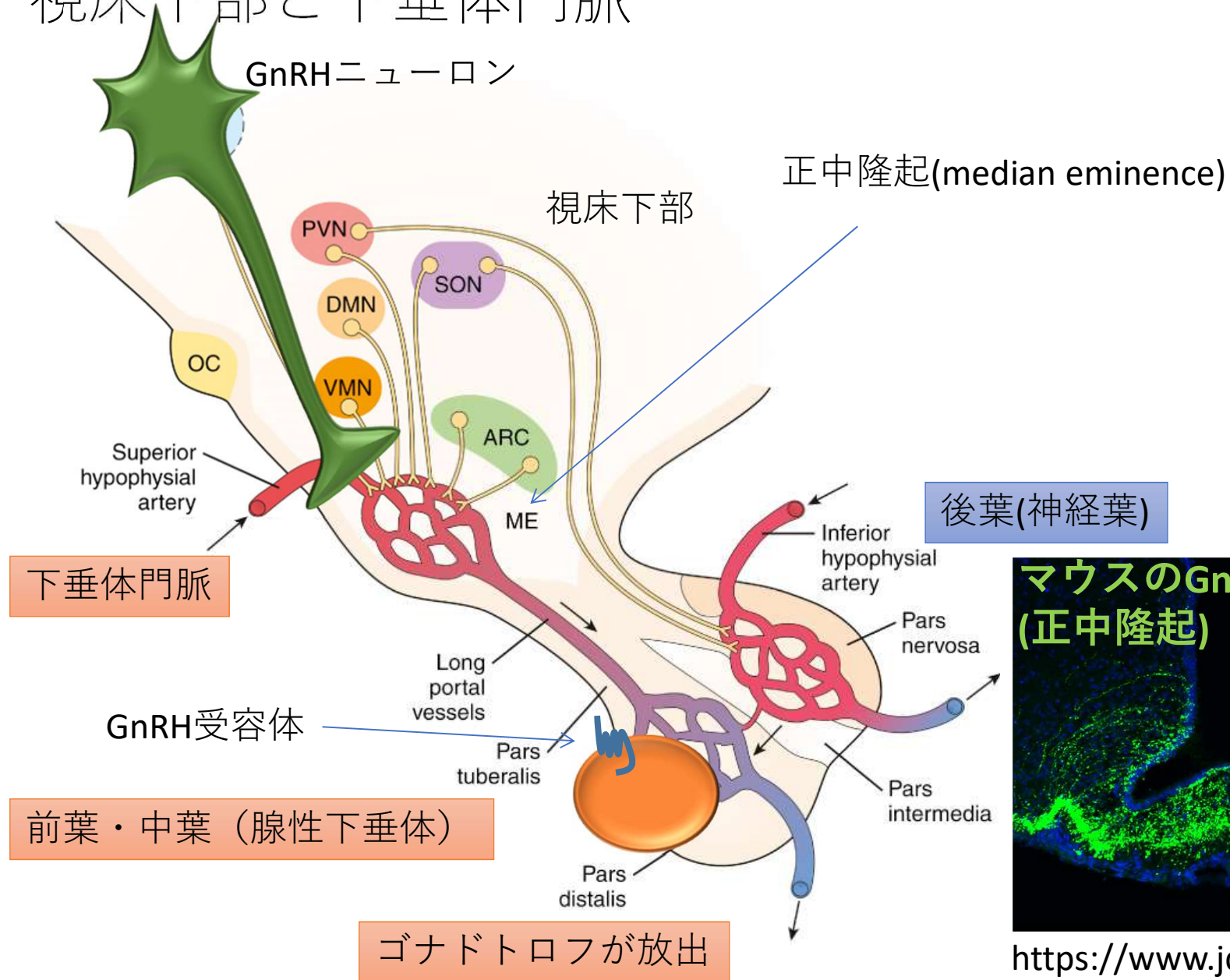
GnRHの発見-GuilleminとSchallyの「ノーベル賞の決闘」



- 元々同じラボの2人。相互不信で Schallyが去る。
- Roger Charles Louis Guillemin
 - 50万頭の羊視床下部
- Andrew Wiktor Schally
 - 16万頭のブタ視床下部
 - 松尾壽之が構造決定
- 視床下部ホルモンを探す
 - ギスギスした戦い
 - 受賞式でも目を合わせない
- ラジオイムノアッセイの開発も同時受賞(Rosalyn Yalow)
- インシュリンの構造解析は30年前。byフレデリックサンガー (エドマン分解)
(インスリンは100g)

参考： <http://www.org-chem.org/yuuki/aminoacid/hormone.html>

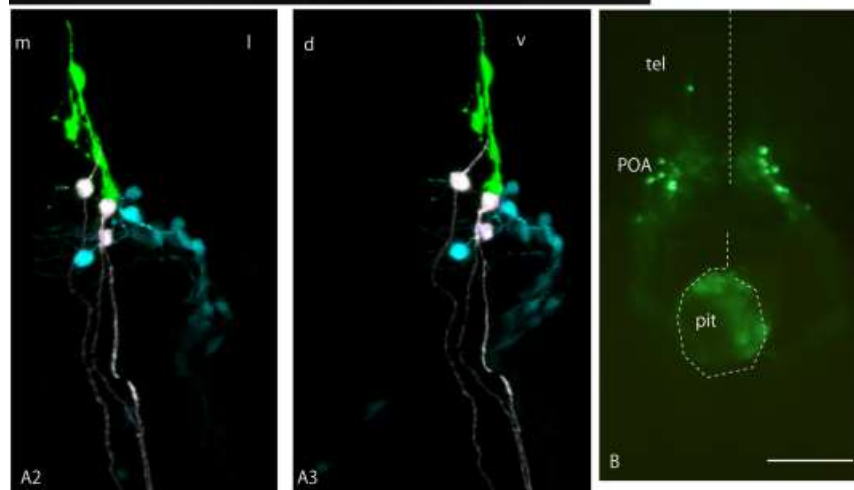
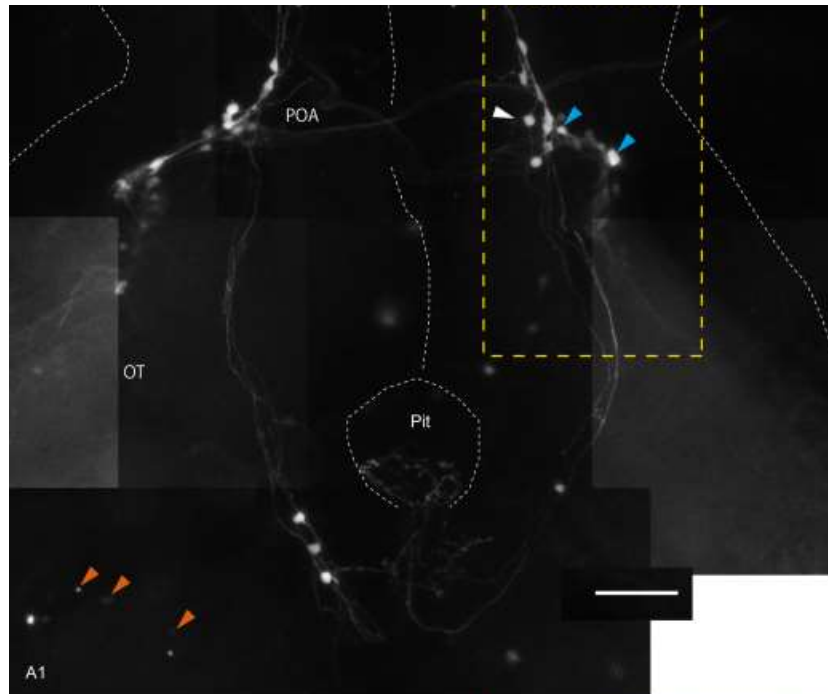
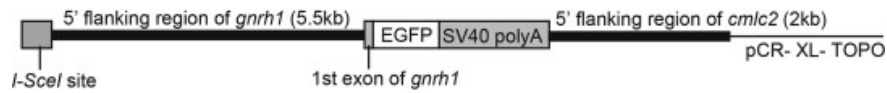
視床下部と下垂体門脈



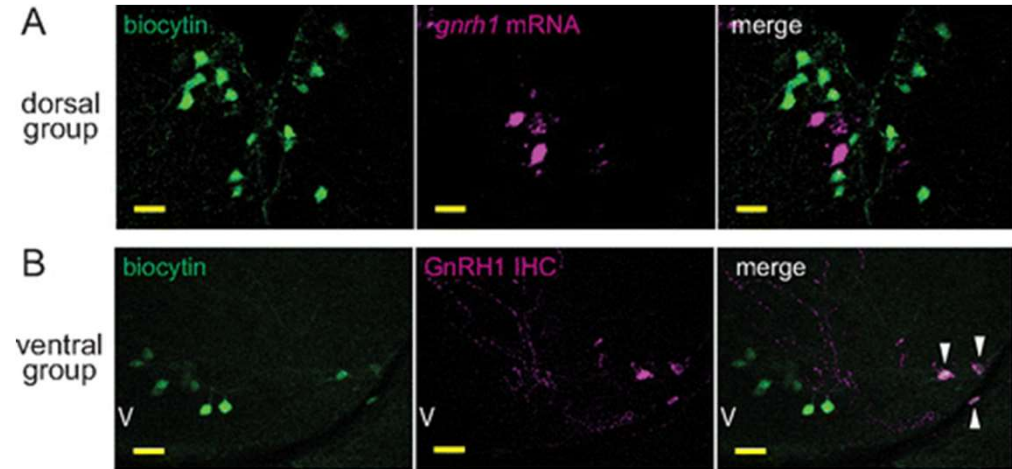
<https://www.jci.org/posts/295>

(Vertebrate Endocrinology 5th ed)

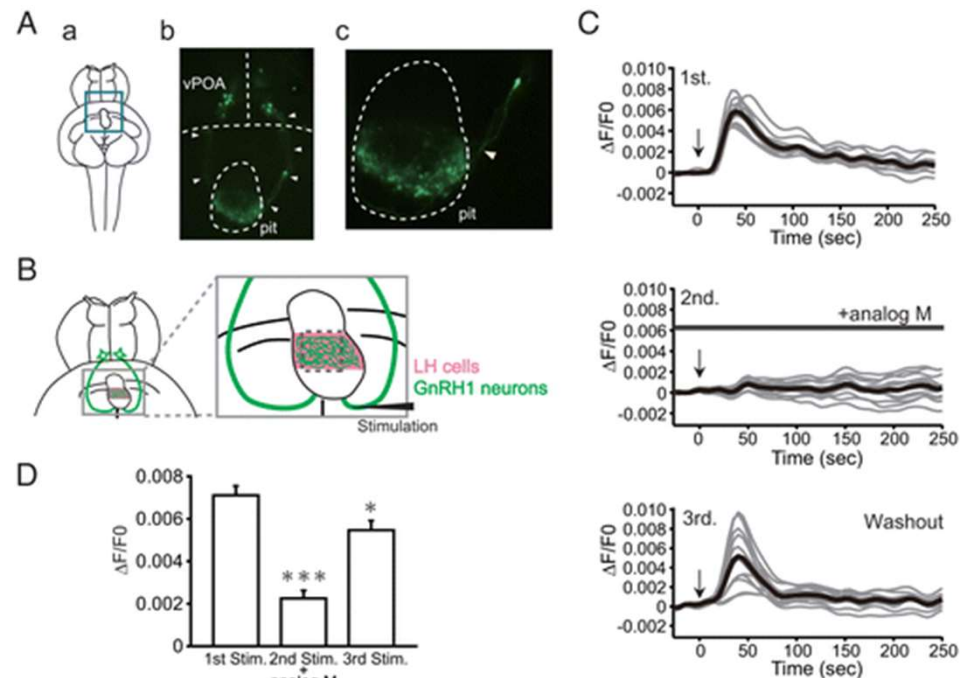
真骨魚類は下垂体門脈を持たない



(Takahashi et al., 2016)

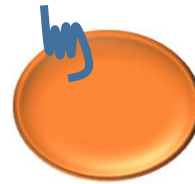
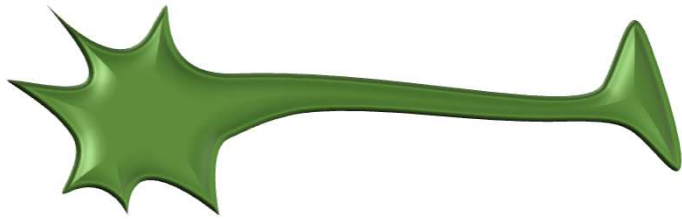


(Karigo et al., 2012)



(Karigo et al., 2014)

LHとFSHの機能—GnRHによる調節

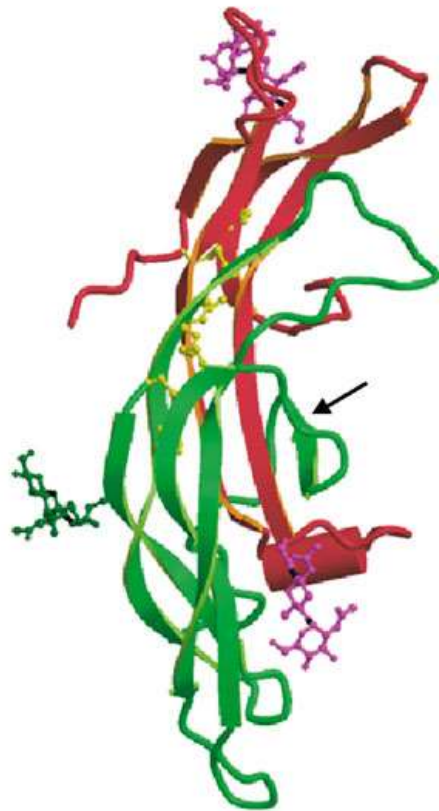


LH,FSHの構造

糖鎖修飾：分解をされにくくする

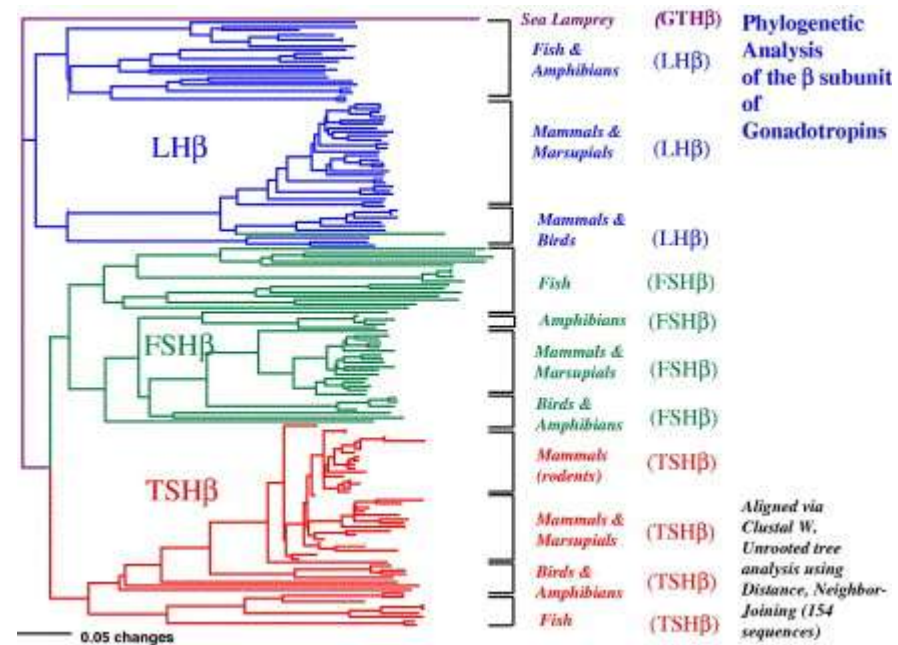
二つのサブユニット：共通の α サブユニット

糖鎖修飾:分解されにくくなる



(Alevizaki and Huhtaniemi, 2002)

どうやってできたのか



糖タンパク質ホルモンの構造を考えてみる

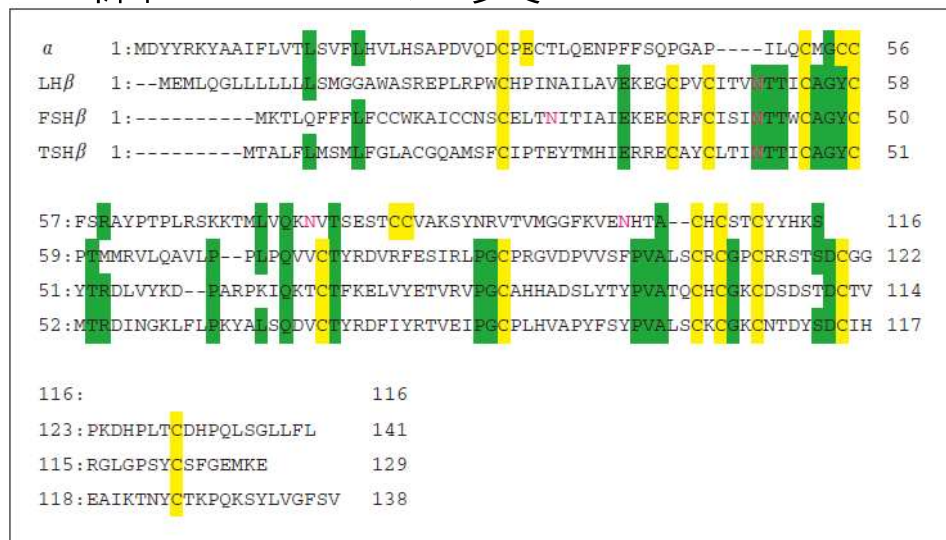


図 1-1 ヒトの糖タンパク質ホルモンサブユニット前駆体のアミノ酸配列の比較
 成熟タンパク質の Cys を黄色で表示。相同性の高いアミノ酸残基を緑色で表示。赤色の N は推定される糖鎖結合部位。ギャップは-で表示。

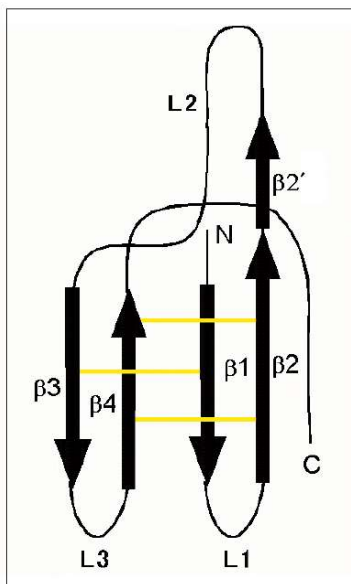


図 1a-4 FSHβサブユニットの分子構造
 α: αヘリックス, β: β鎖, N: N末端, C: C末端, L: ループ。黄色の線は“シスチンノット構造”を形成するジスルフィド結合を表す。

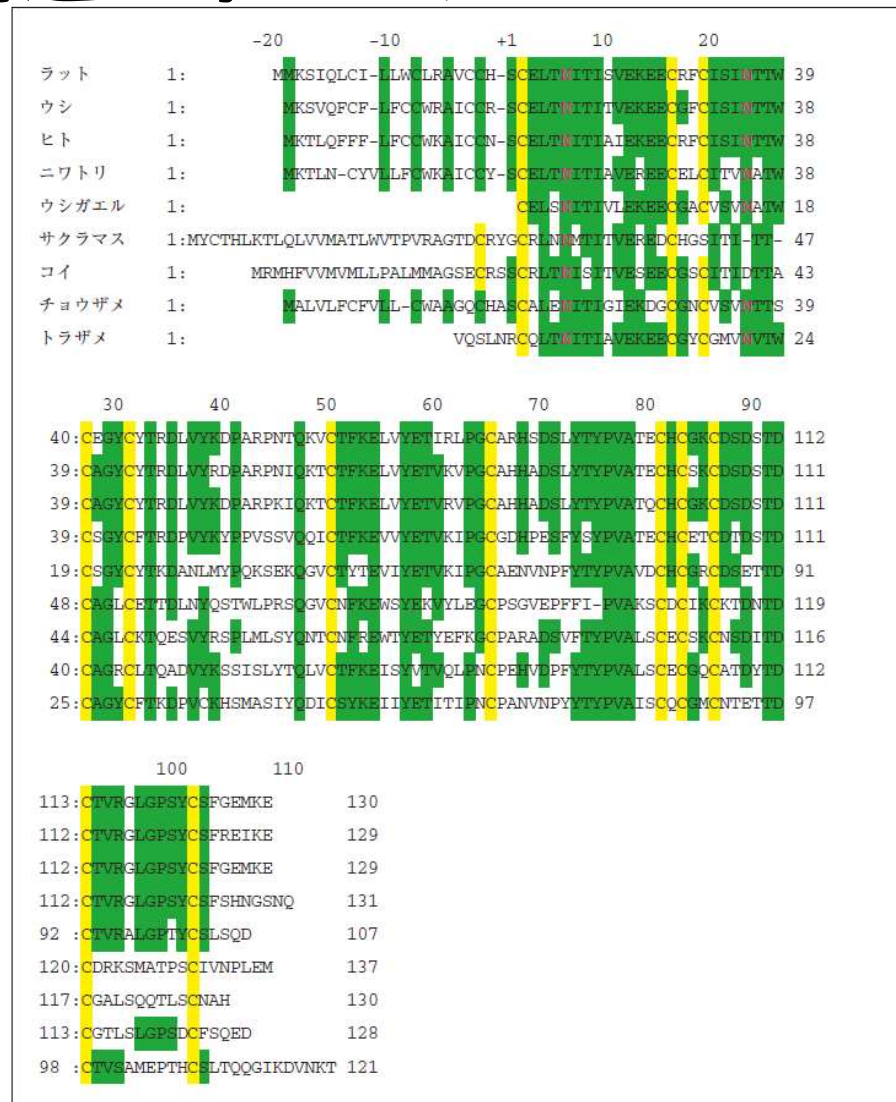
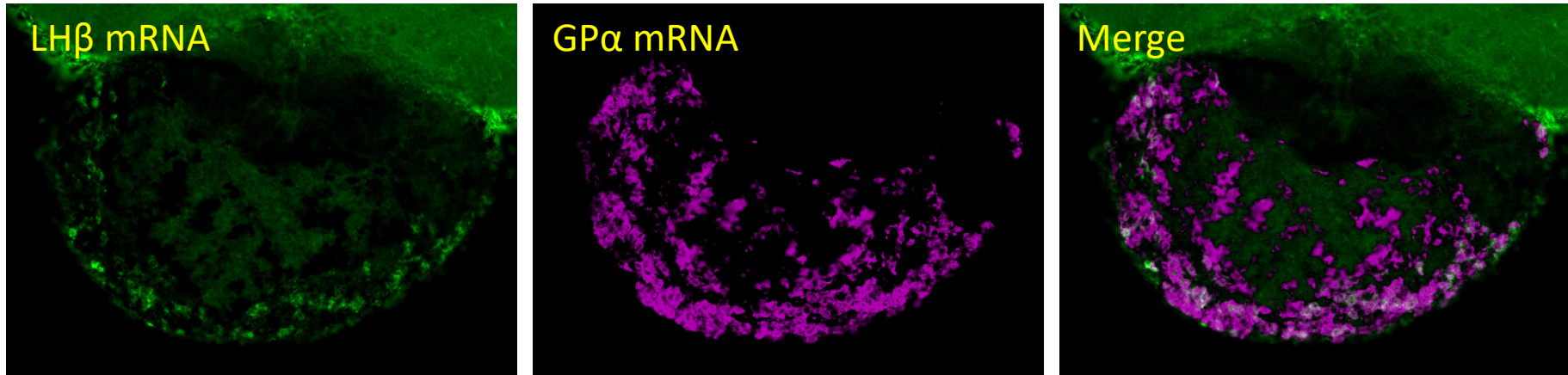


図 1a-3 FSHβサブユニット前駆体のアミノ酸配列の比較
 配列の上の番号は、ラット FSHβサブユニットの配列について、N 末端を +1 として示す。マイナスはシグナルペプチドを表す。ウシガエルは成熟タンパク質のみの配列を示す。また、トラザメはシグナルペプチドの一部と成熟タンパク質を示す。相同性の高いアミノ酸残基を緑色で表示。FSHβサブユニットの分子構造に重要な 12 (13) 個の Cys を黄色で表示。Cys (-2) はサクラマスとコイでは成熟タンパク質に、他のものはシグナルペプチドに含まれると推定される。赤色の N は推定される糖鎖結合部位。ギャップは-で表示。

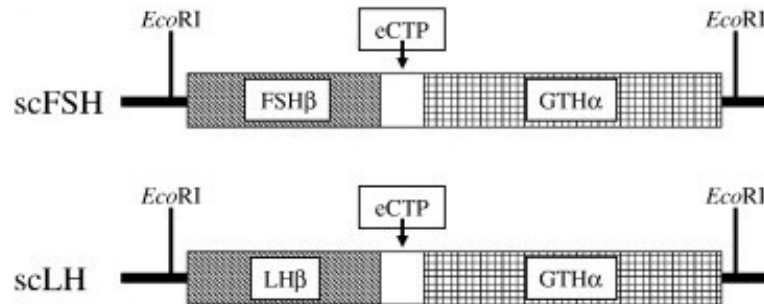
LH,FSH,TSH,Gpa : α (共通)、 β サブユニットの両方が必要

メダカの脳下垂体のdouble in situ hybridization



リンカーでつないで一本鎖にしても正常にはたらく。

(Kanda, unpublished)



(Hayakawa et al., 2008)

受容体との結合 : hCG, PMSG

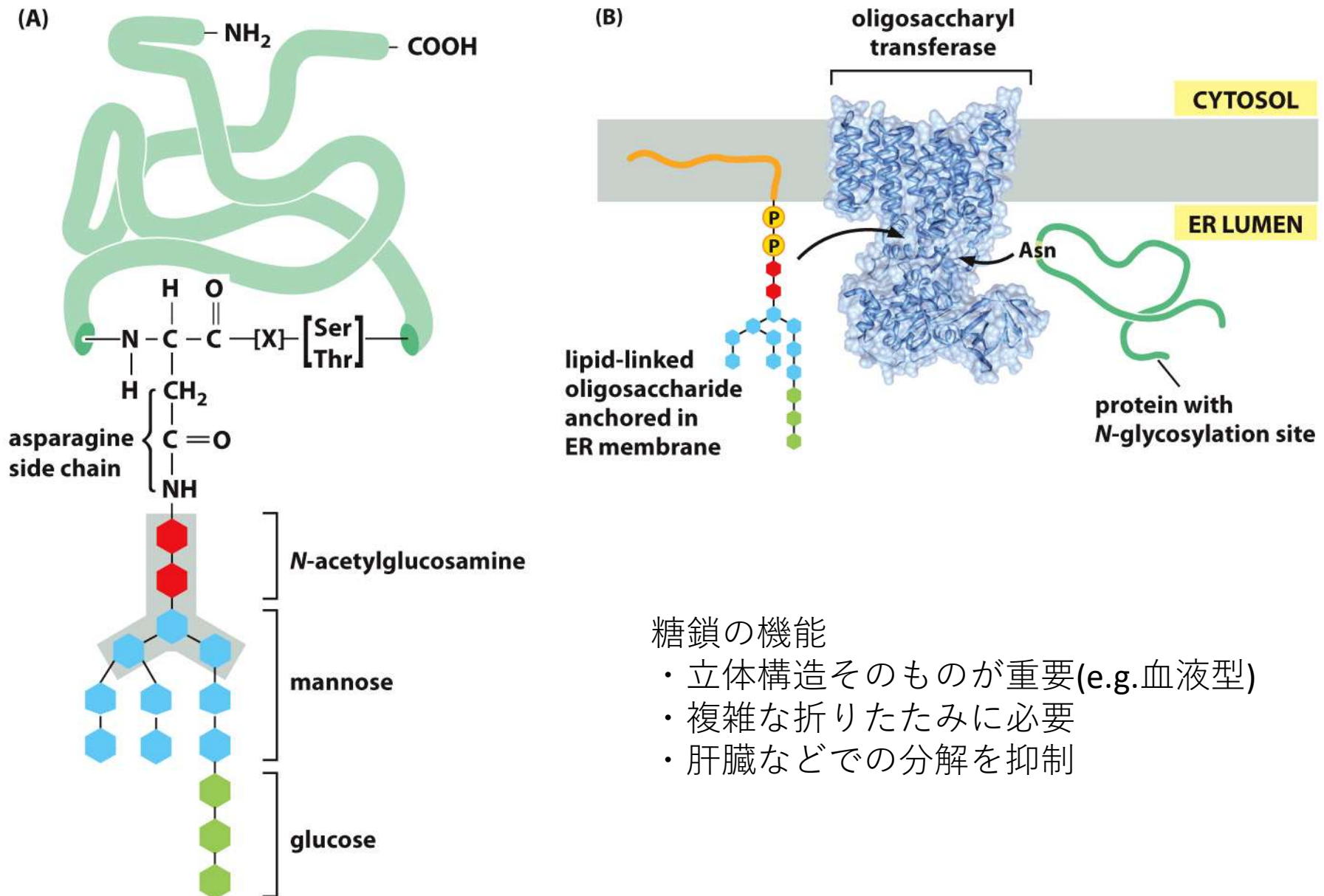
hCGは霊長類のみ。

糖タンパク質ホルモンの人工合成

- 短いペプチド：化学合成が可能
- そこそこのタンパク(～50AAくらい)：大腸菌での合成
- 糖タンパク質ホルモン：大腸菌では複雑な立体構造・糖鎖修飾が不可能

粗面小胞体で合成されたタンパクは、N-結合型糖鎖が付加。

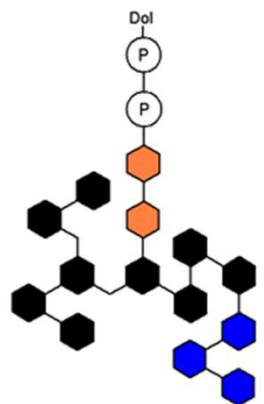
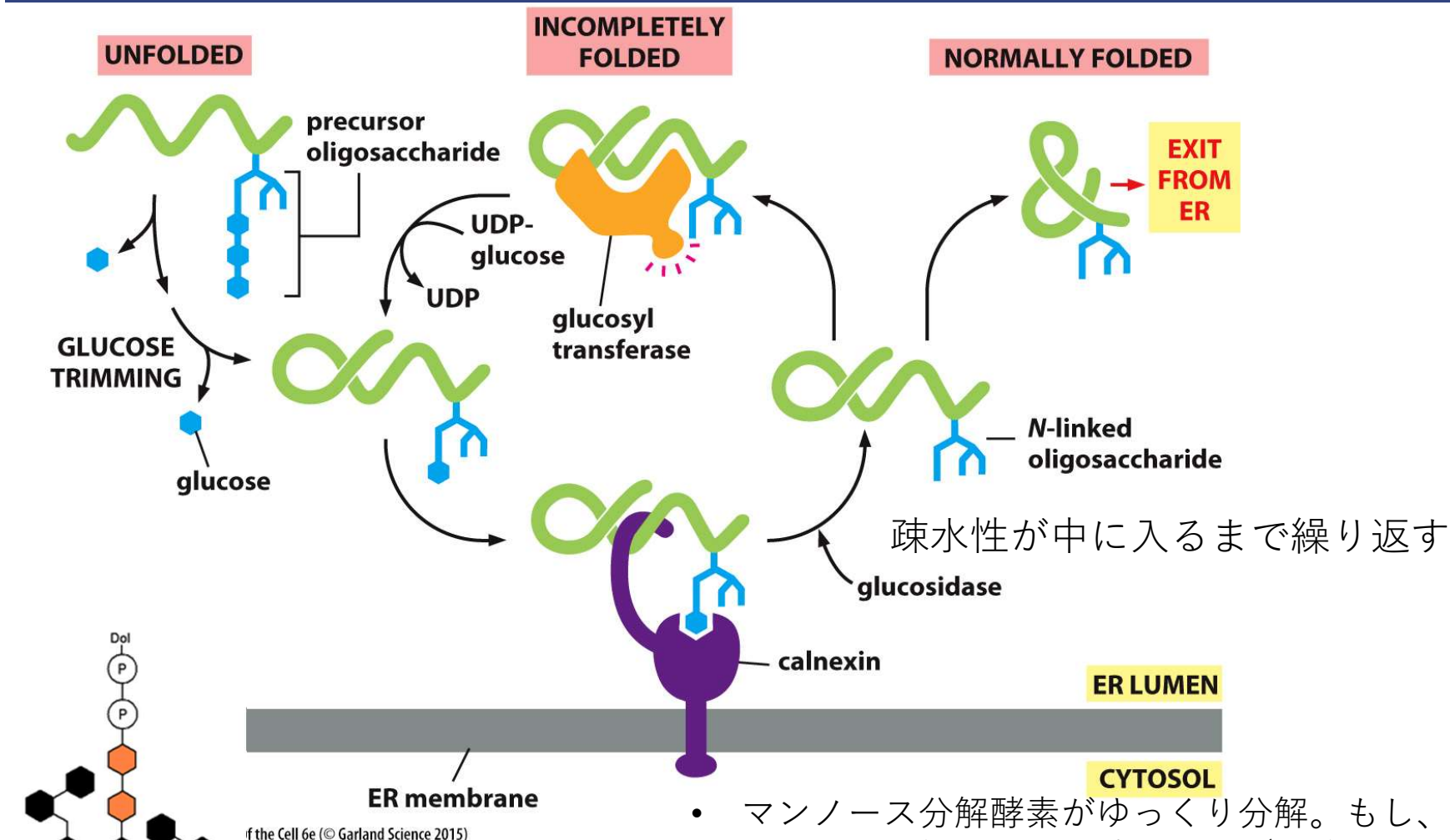
Asn-X-Thr/Serに糖鎖付加



糖鎖の機能

- 立体構造そのものが重要(e.g.血液型)
- 複雑な折りたたみに必要
- 肝臓などでの分解を抑制

N-結合型糖鎖付加で、フォールディングのチェック機構としている

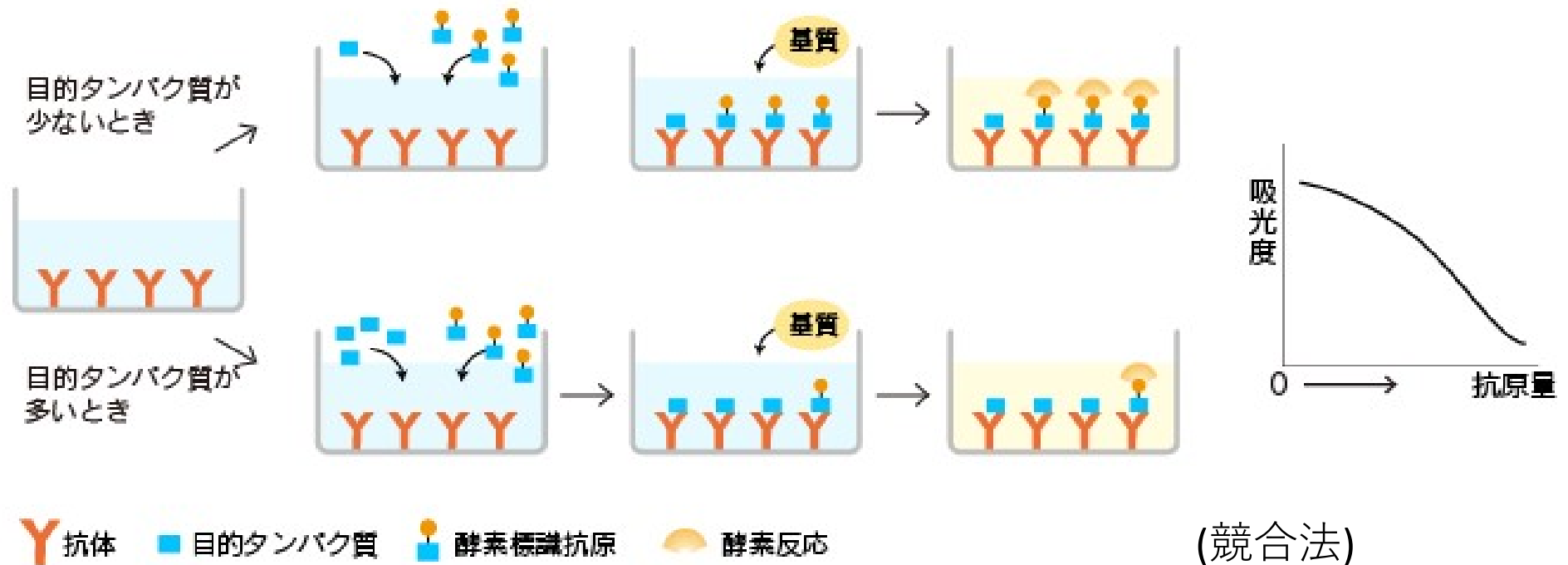


Dolはドリコール、Pはリン酸、橙はN-アセチルグルコサミン、黒はマンノース、青はグルコース。

- マンノース分解酵素がゆっくり分解。もし、マンノースが分解されたら時間切れ（失敗タンパク）→シャペロン・タンパクジスルフィドイソメラーゼで直鎖化→cytosolに転送→ユビキチン経路で分解
- あまりにもこういうミスが多いと、“小胞体ストレス応答”で、小胞体シャペロンを増やしたりする

微量ホルモンの測り方：抗原抗体反応を使う

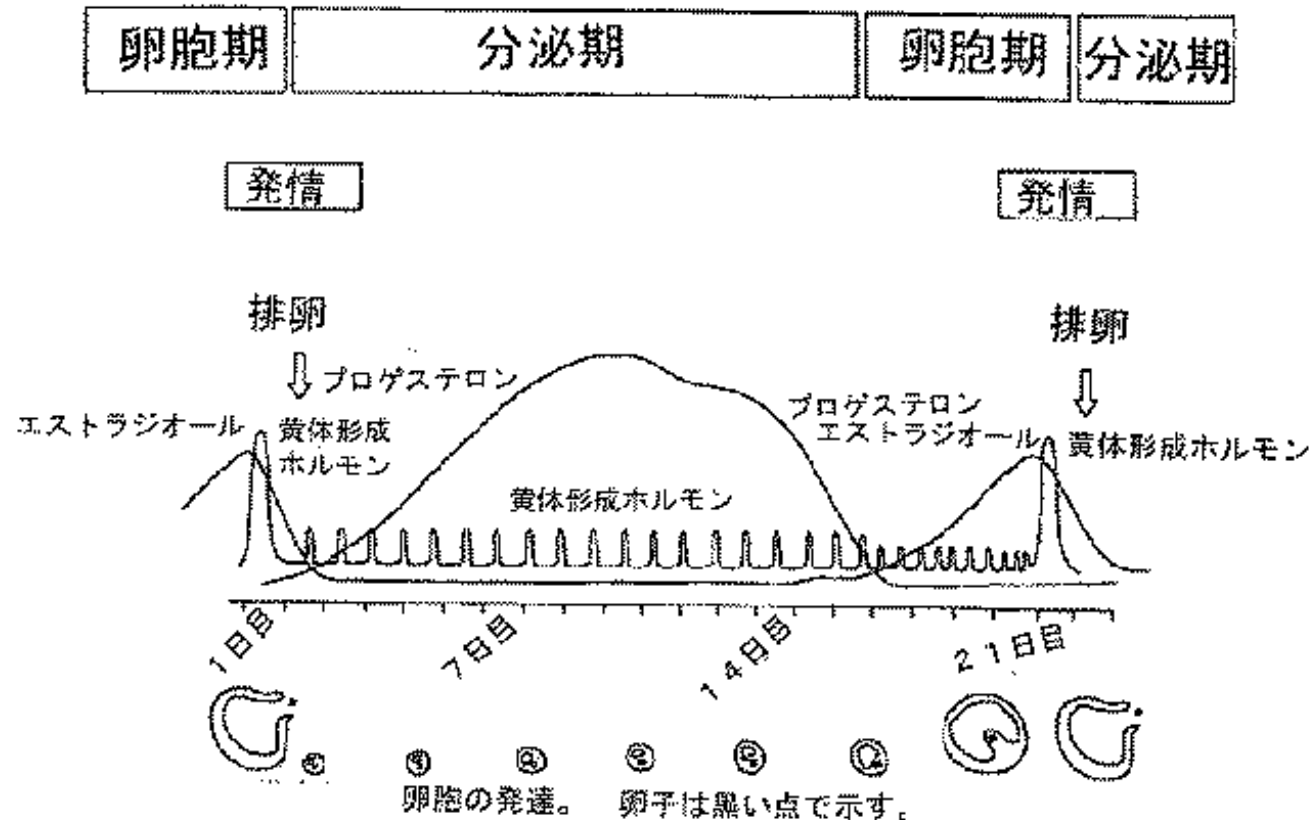
ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay):免疫組織化学の液体版



旧来はRIAを使っていた（今でも使うことあり）。

LHのパルス状分泌・サージ状分泌

図 1



Eがすごく低い：LH放出促進

Eがある程度ある：LH放出抑制する

Eがかなり高くなってくる：LHをたくさん出させる

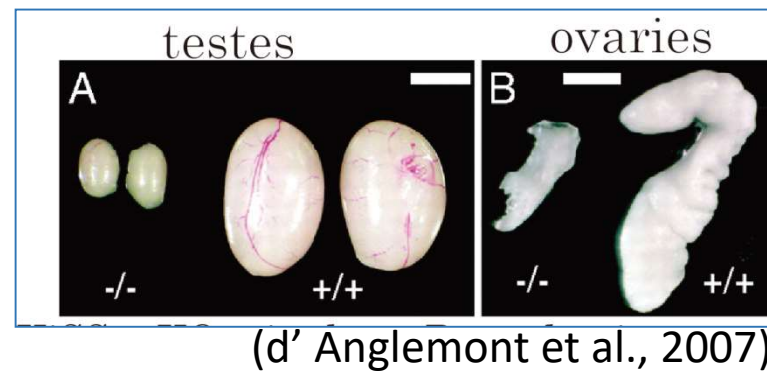
<http://astamuse.com/ja/published/JP/No/2009501035>

これらのLH放出はGnRHニューロンからの調節を受けている

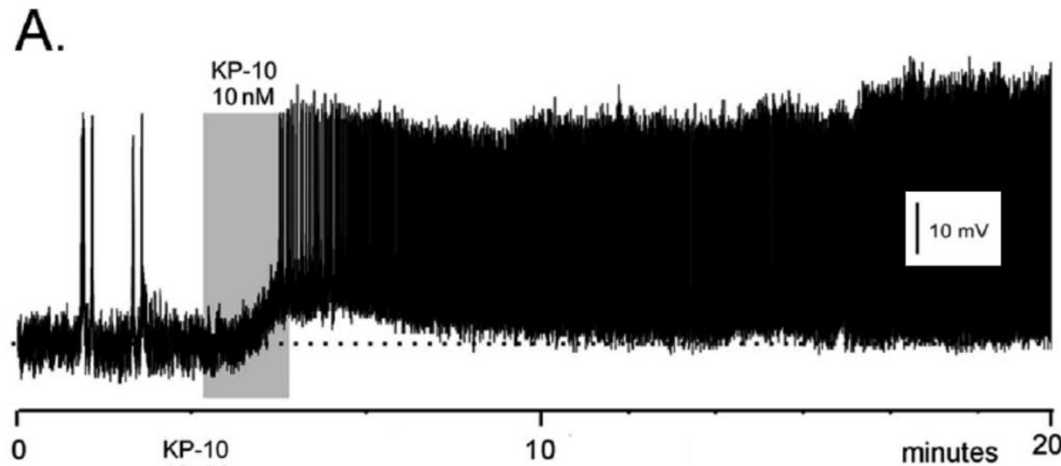
- ・ GnRHニューロン自体の自発的なoscillation
- ・ “パルスジェネレーター”の存在

哺乳類の生殖に必要なキスペプチンニューロン

- Kiss1 KO in mice and rats-> infertile
GPR54 (receptor) mutation -> infertile in mice and human



- Kisspeptin(peptide) depolarizes GnRH1 neurons in a direct manner



(Han et al., 2005)

OVX

KNDyニューロンによるパルス状分泌

脳室内投与

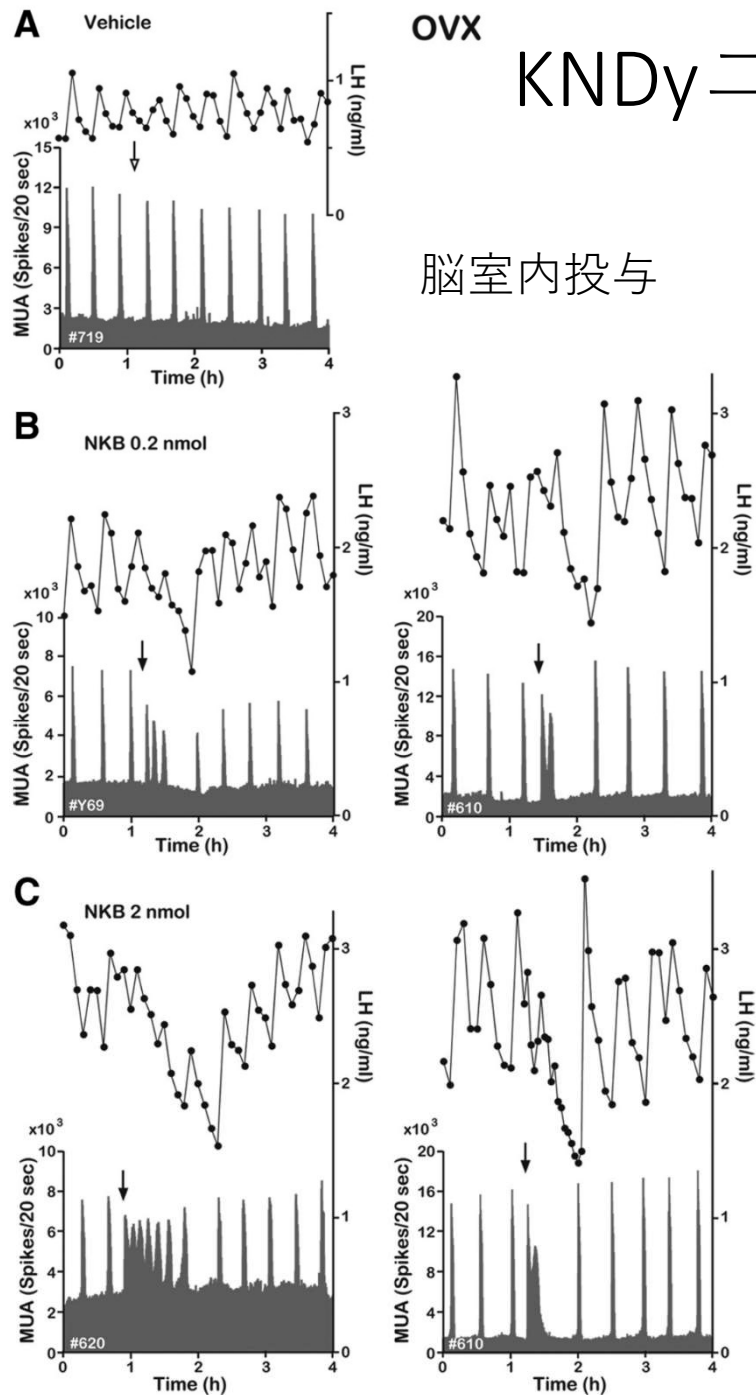
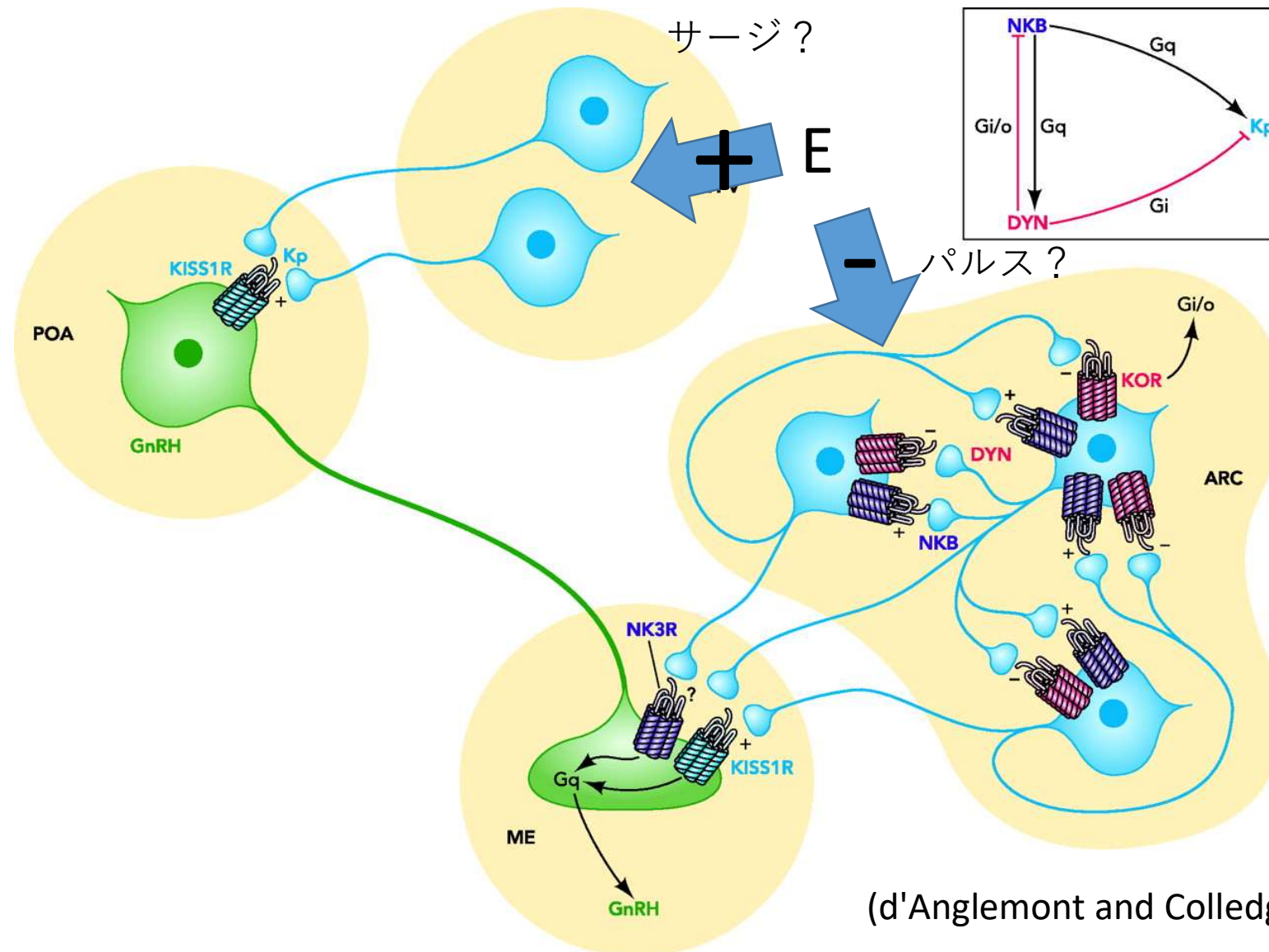


Figure 6. Schematic representation of the role of ARC kisspeptin/NKB/Dyn neurons in the generation of the pulsatile GnRH release. According to this model, kisspeptin/NKB/Dyn neurons in the ARC form a neural circuit by their collaterals and dendrites. Within the neural circuit, NKB/NK3 signaling plays the role of accelerator, whereas Dyn/KOR signaling serves as a brake on activation of kisspeptin/NKB/Dyn neurons. Through the reciprocal actions of NKB/NK3 and Dyn/KOR signaling, rhythmic oscillation of neural activity is generated in kisspeptin/NKB/Dyn neurons, which in turn induces pulsatile GnRH release at the ME and hence pulsatile GnRH release into the portal circulation. Thus, ARC kisspeptin/NKB/Dyn neurons would act as the GnRH pulse generator through the coordinated interaction between three peptides. See text for details.

- GnRH1ニューロン自体の周期性と
 - Kisspeptin神経系による周期的なGnRH放出の inductionがある
- (Wakabayashi et al., 2010)

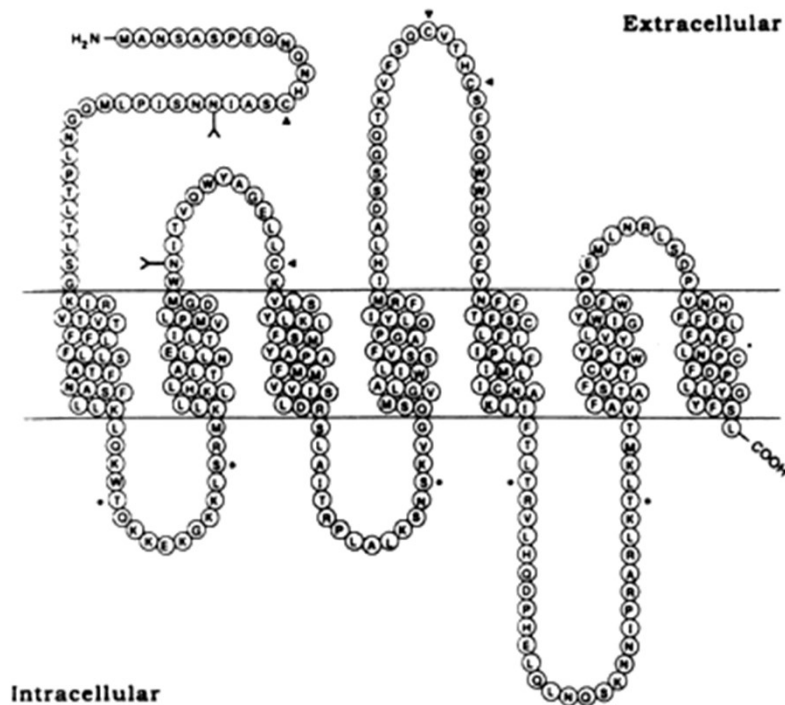
Kisspeptin neuron と negative/positive feedback



(d'Anglemont and Colledge, 2010)

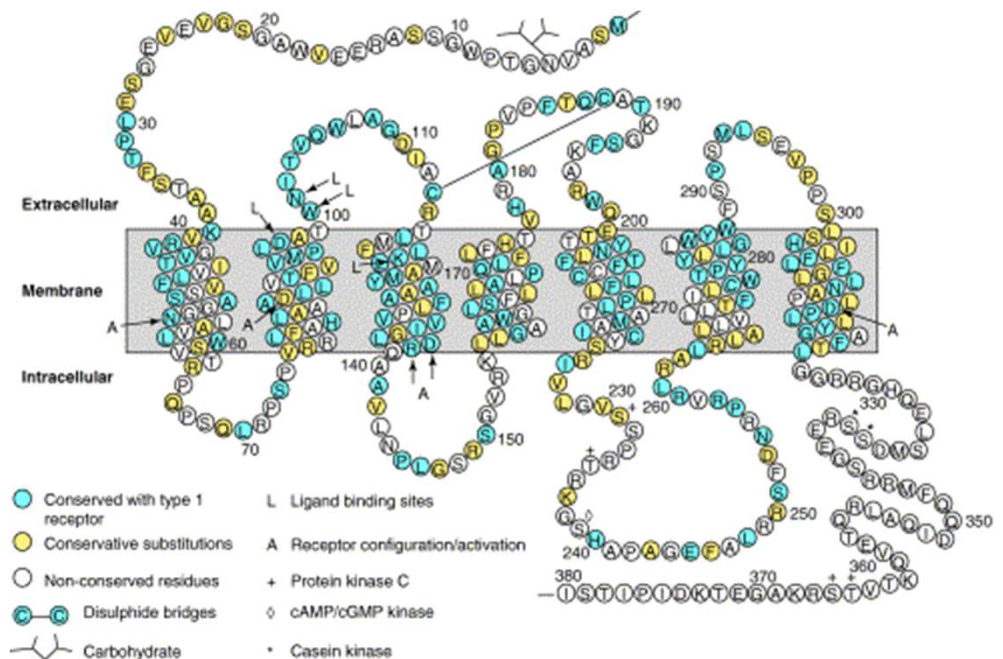
なぜ哺乳類でのみパルス状分泌が存在する
のか-mammalian GnRHR1はC末を欠く-

Human GnRHR1



Kakar et al., 1992

Human GnRHR2

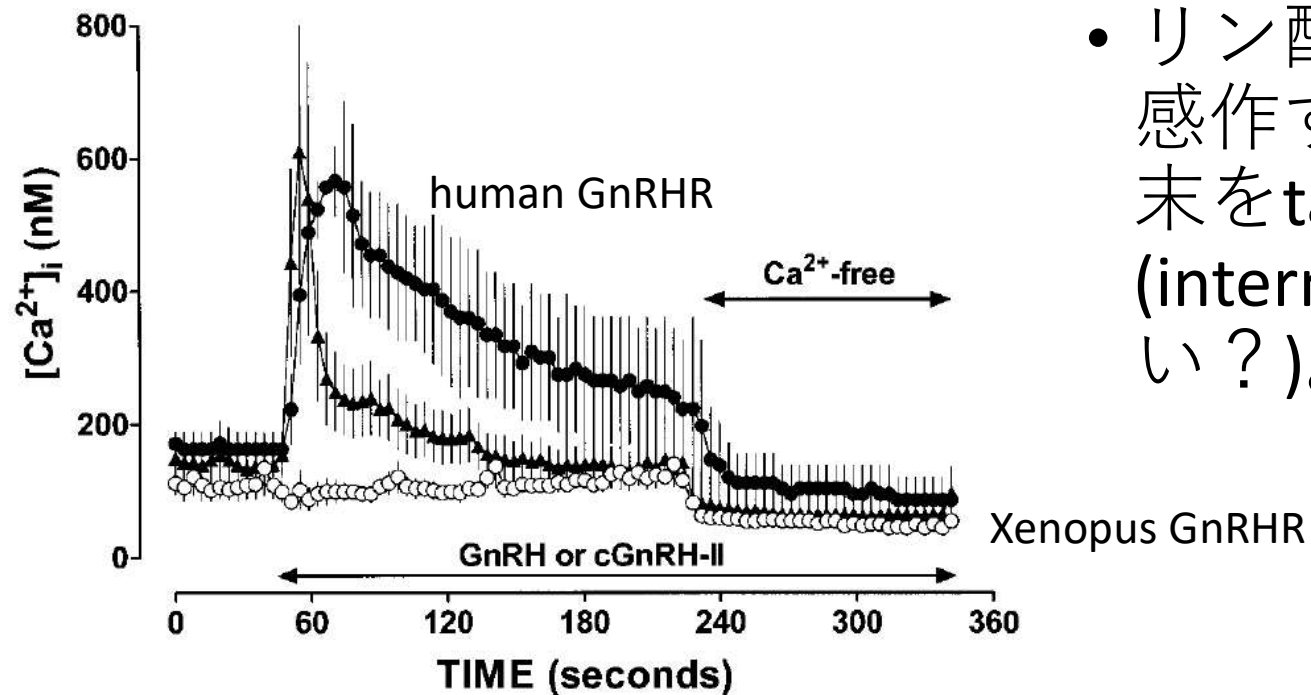


Miller, 2003

TRENDS in Endocrinology & Metabolism

フレームシフトで実はpseudogene化している。
もし正常なら、の想像図。
他の動物のGnRHR(一般的なGPCR)もこんな感じ。

Human GnRHR1は(短時間では)脱感作しにくい



- リン酸化されて脱感作するためのC末をtail欠く (internalizeできない?)。

FIG. 4. Comparison of GnRH effects on $[Ca^{2+}]_i$ in α T4 cells infected with Ad hGnRH-R or Ad XGnRH-R. α T4 cells were infected with Ad hGnRH-R (m.o.i. 1000) or Ad XGnRH-R (m.o.i. 100) and then cultured for one day before being loaded with fura 2 and used for Ca^{2+} imaging. During imaging Ad hGnRH-R infected cells were stimulated with 10^{-7} M GnRH (filled circles) and Ad XGnRH-R infected cells were stimulated with cGnRH-II (filled triangles) in normal medium before being transferred to Ca^{2+} -free medium (still with peptide). Control

(Hislop et al., 2000)

長期的にはとても脱感作しやすい

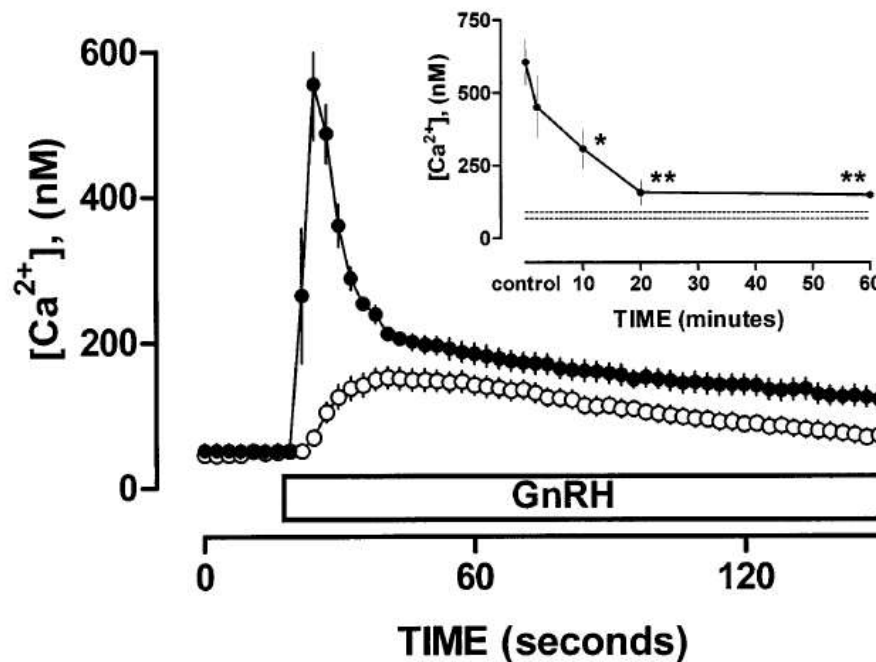
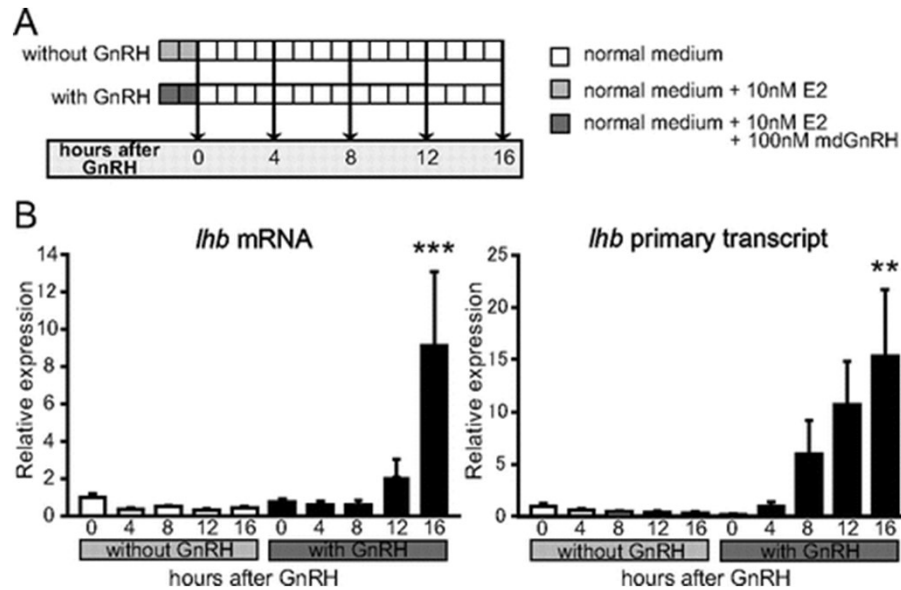


Fig. 3. Desensitization of GnRH-stimulated Ca^{2+} mobilization. Main panel- α T3-1 cells were pretreated for 60 min with 0 (filled circles) or 10^{-7} M (open circles) GnRH, then washed and used for fura-2 measurement of the effect of 10^{-7} M GnRH (bar) on cytosolic Ca^{2+} concentration. Note that the GnRH pretreatment reduced both plateau and spike phases of the response and that the latter effect could not be explained by desensitization of $Ins(1,4,5)P_3$ responses or depletion of the hormone-mobilizable Ca^{2+} pool. Inset-cells were pretreated for the indicated times with 10^{-7} M GnRH then washed

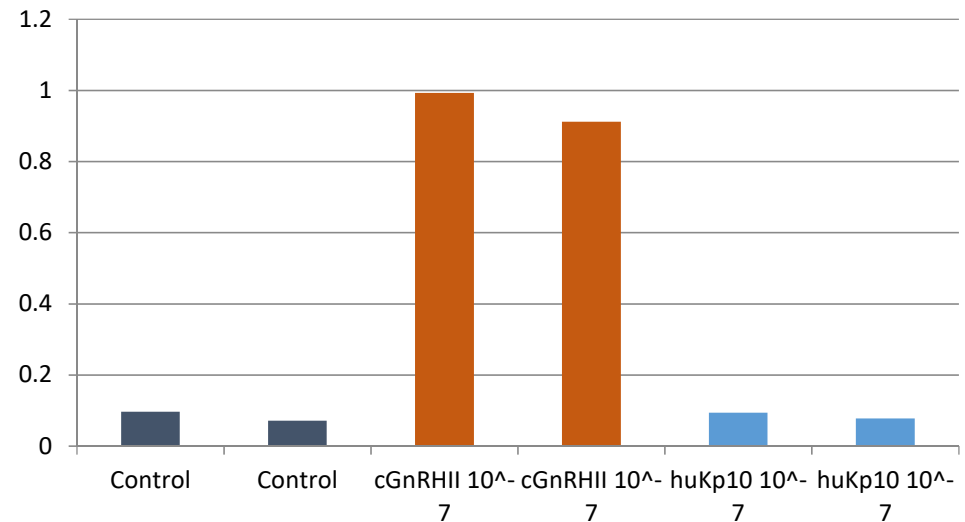
- hGnRHR1は、
GnRH
pretreatmentして
おくと、ほとん
どGnRHに応答し
なくなる
= paradoxical
effect : GnRH”ア
ゴニスト”でLHを
抑える前立腺ガ
ンの療法
McArdle et al.,2002

サカナのpituitary GnRHは長期的な脱感作を示さない(or一度onになったらoffにならない)



Karigo et al., 2012

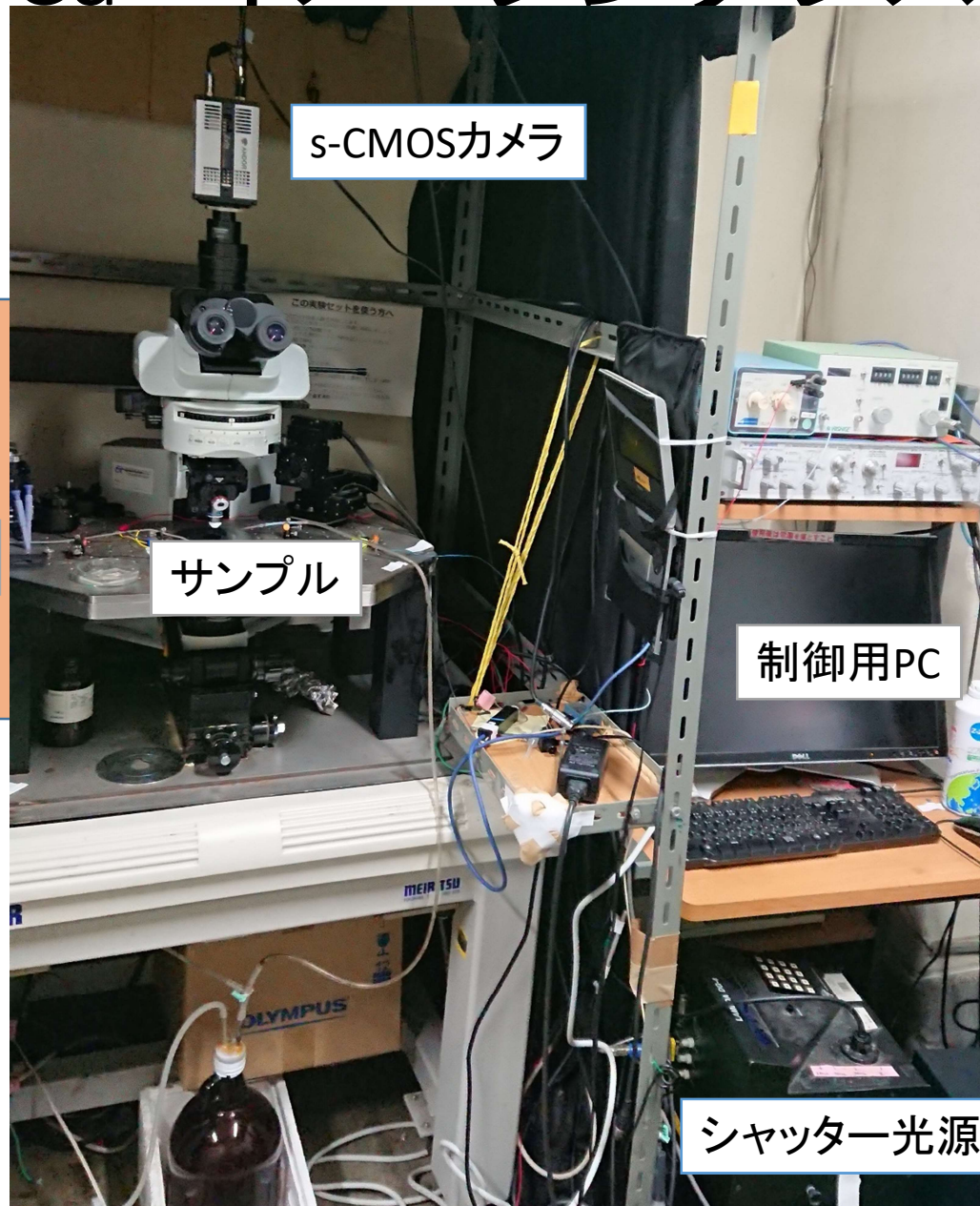
LHb mRNA(48hずっとGnRH液に浸けている)



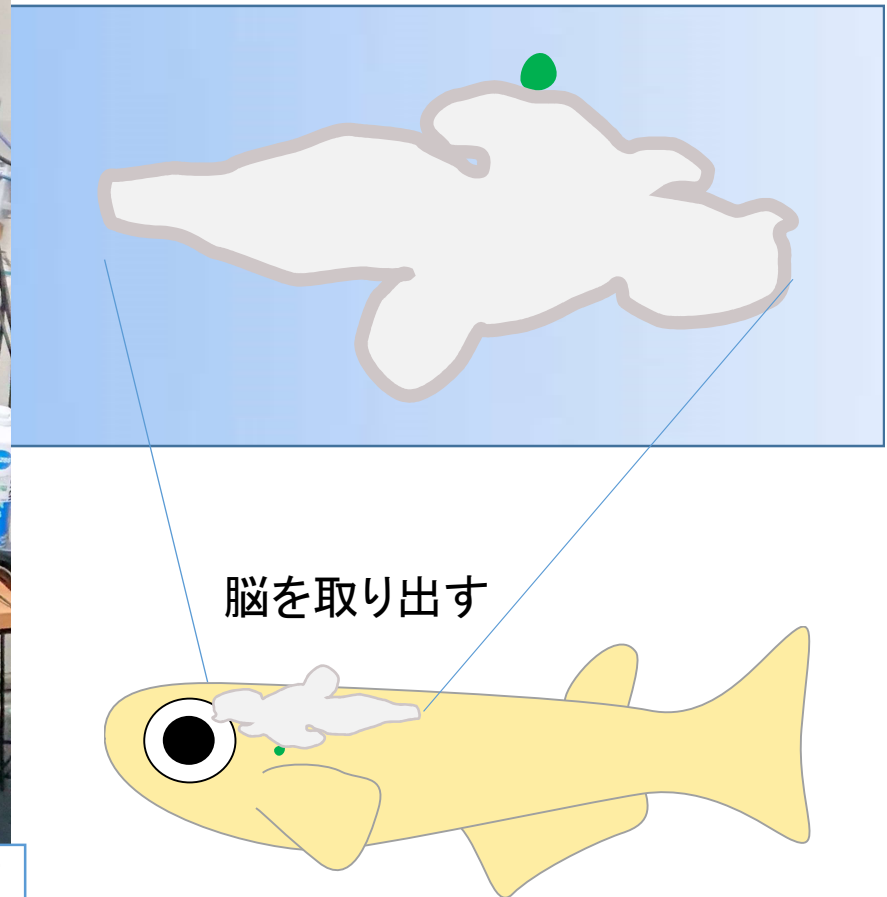
神田、unpublished

哺乳類の知見は脊椎動物に一般的？

Ca²⁺イメージングシステム

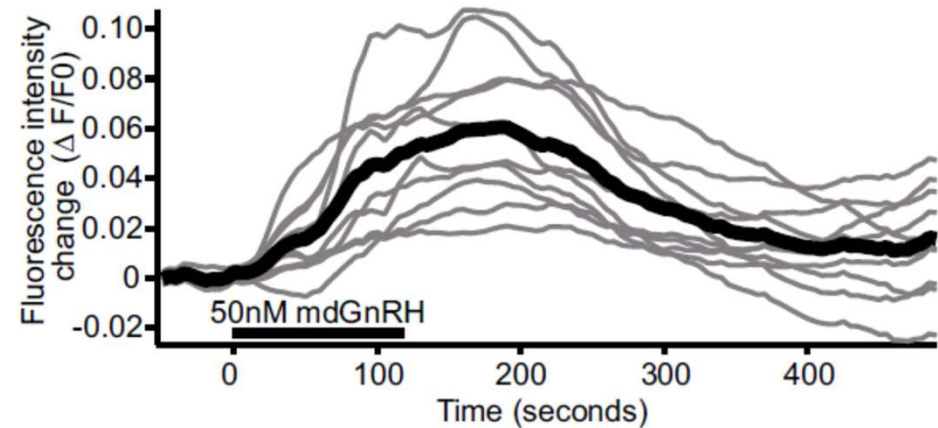
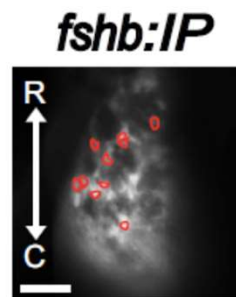
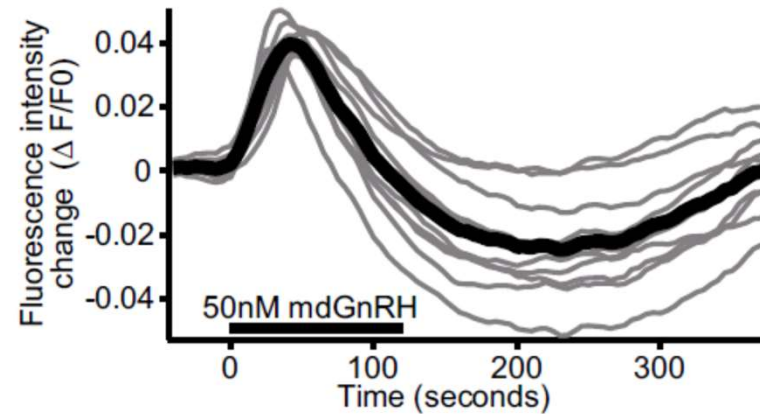
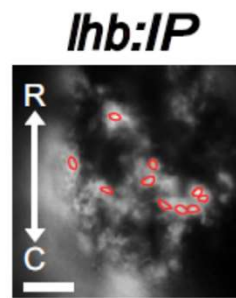
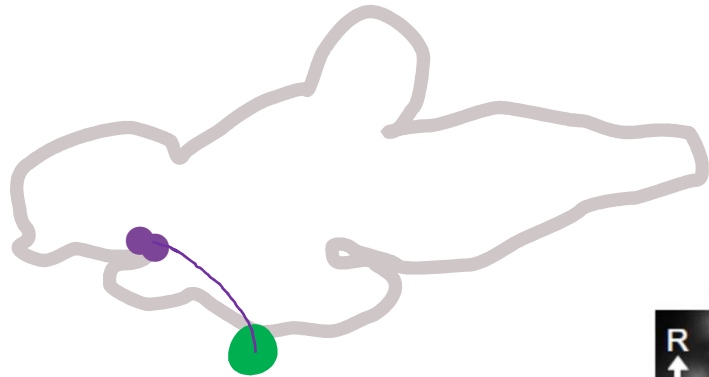


シャッター光源で、10~50msの短い励起光を当てて、蛍光の強さをカメラで経時的に観察



LH発現細胞特異的に[Ca²⁺]インジケータを発現するメダカを作成、利用

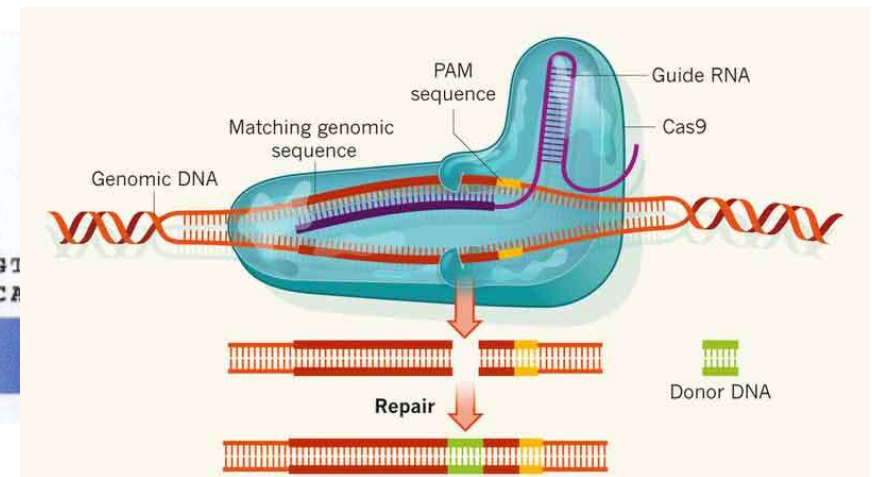
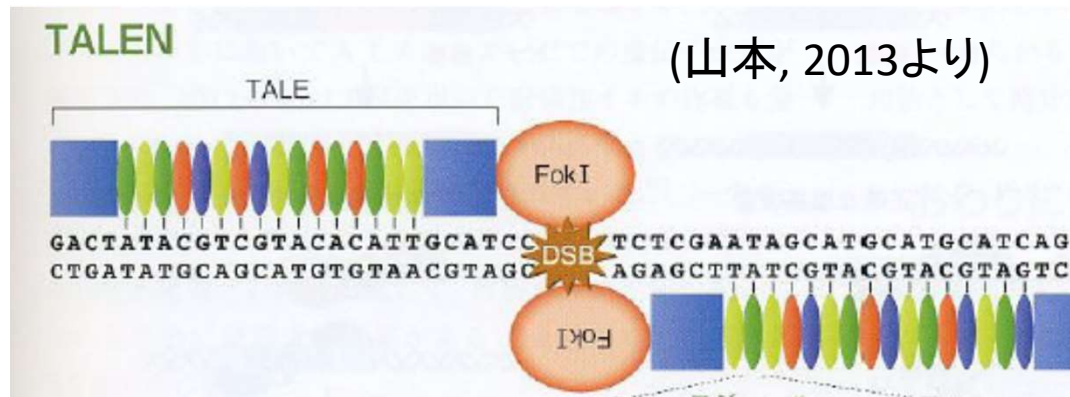
GnRHニューロンはLH,FSH どちらの放出も促進



(Karigo et al., 2014)

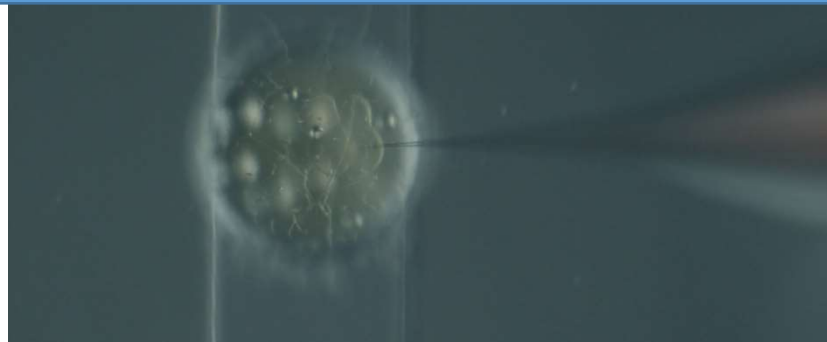
ゲノム編集技術(TALEN)を用いた ノックアウト個体の作成

標的配列を改変可能な、DNA切断酵素(ヌクレアーゼ)を用いて、生体内で思い通りにゲノムを改変する技術の総称。



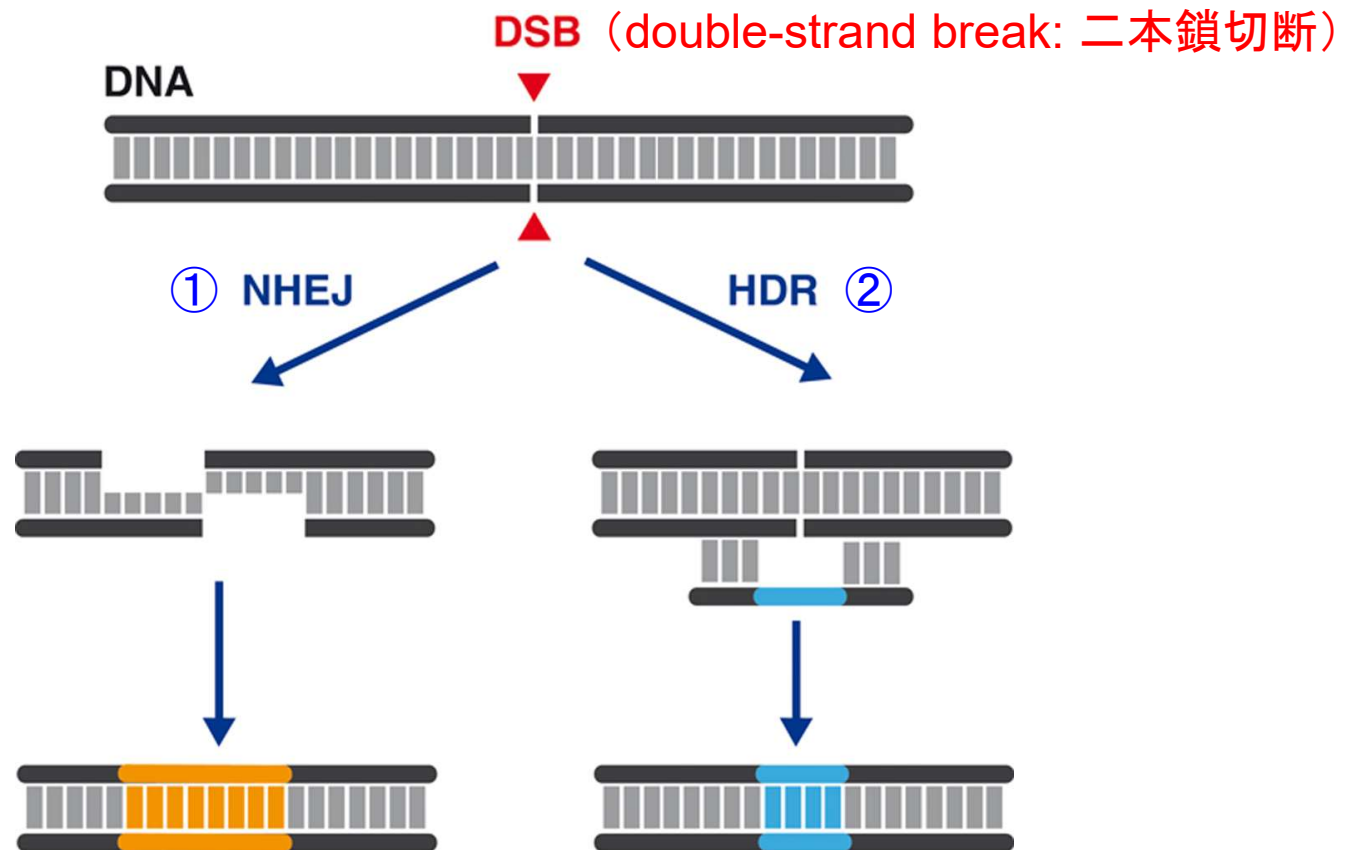
(<http://www.origene.com/CRISPR-CAS9/>)

マイクロインジェクション、
継代後、フレームシフト変異をもっている個体をスクリーニング



DNAの修復機構

- ① “非相同末端連結 (non-homologous end joining; NHEJ) :
切断DNAの末端同士を接着する
- ② “相同組換え修復 (homology-directed repair; HDR) :
姉妹染色体等の相同配列を鋳型にして正確に修復する



HNEJでの修復時のエラー

- ◆ 遺伝子領域内に数塩基程度の小さな塩基欠失・挿入の誘導
- ◆ 離れた2箇所を同時に切断による大規模な欠失の誘導

HDRによる相同組換え

- ◆ 標的領域への遺伝子断片を導入

DNA切断に対する修復機構は、大腸菌から脊椎動物までほぼ全ての生物・組織・細胞が共通して持つ機構。

ゲノム編集による遺伝子改変は“原理的に”全ての生物において利用可能である。すなわち、マウスなど胚性幹細胞が樹立されていたごくわずかな生物でしかできなかった「狙った通りの遺伝子改変」が、ゲノム編集技術を用いることで魚類を含む様々な生物で可能になる。

標的配列を改変可能なヌクレアーゼの開発

「特定のDNA配列を認識して切断する」といえば・・・ “制限酵素”

認識配列

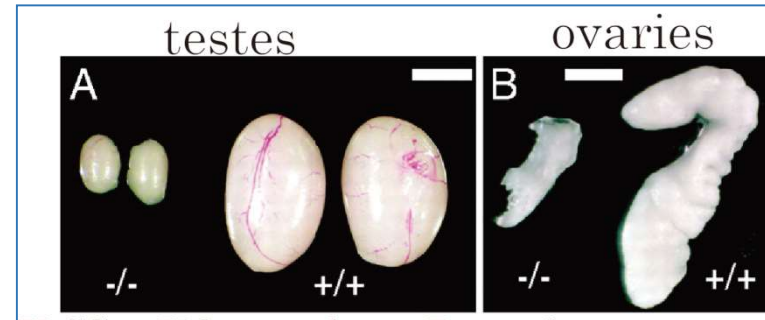
EcoRI “GAATTC”

BamHI “GGATCC”

ゲノム編集技術には、制限酵素の認識配列を自由自在に改変する
ような技術が必要
→ZFN,TALEN,CRISPR

卵胞発育：FSH
排卵：GnRH→LH

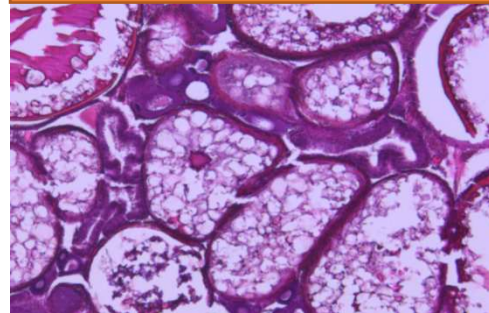
- Kiss1, GnRH KO マウス



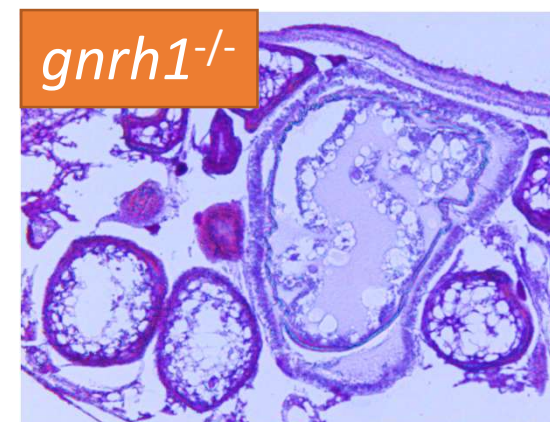
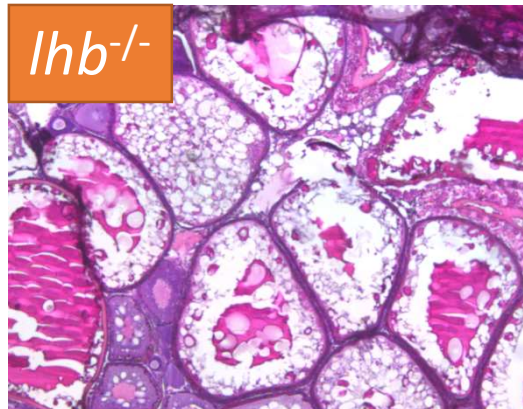
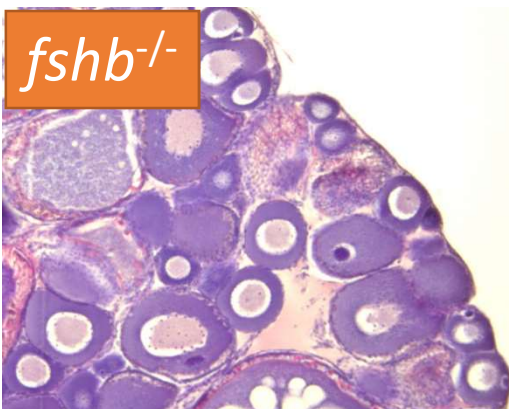
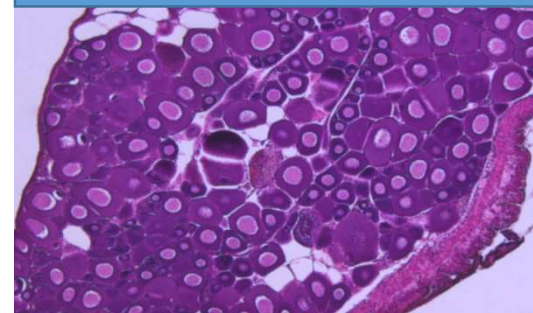
(d' Anglemont et al., 2007)

メダカの
卵巢

繁殖状態(野生型)

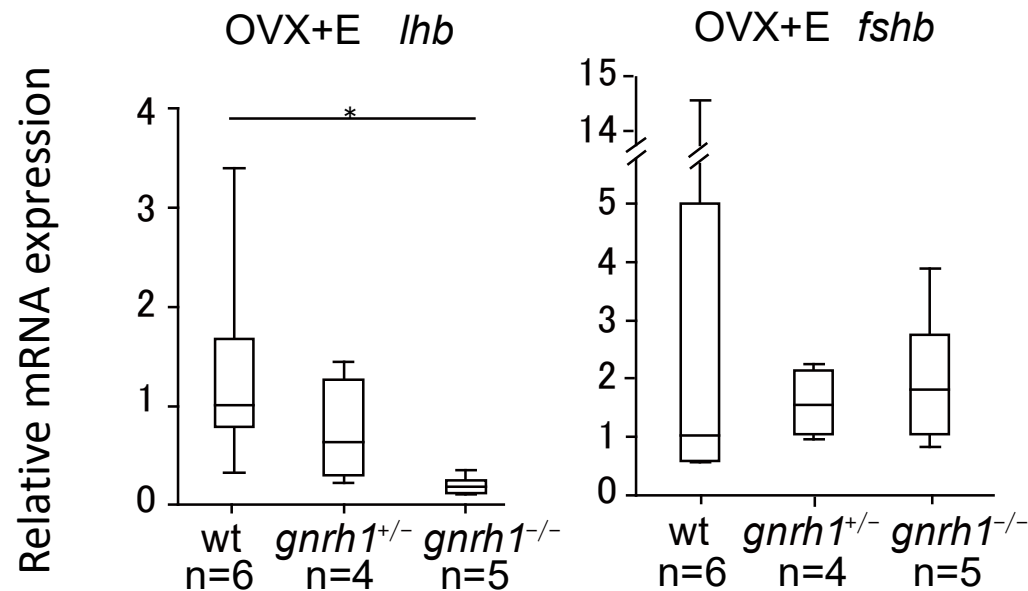


非繁殖状態(野生型)



(Takahashi et al., 2016)

gnrh1 KO ではLH β mRNA が低いが、 FSH β mRNAは正常



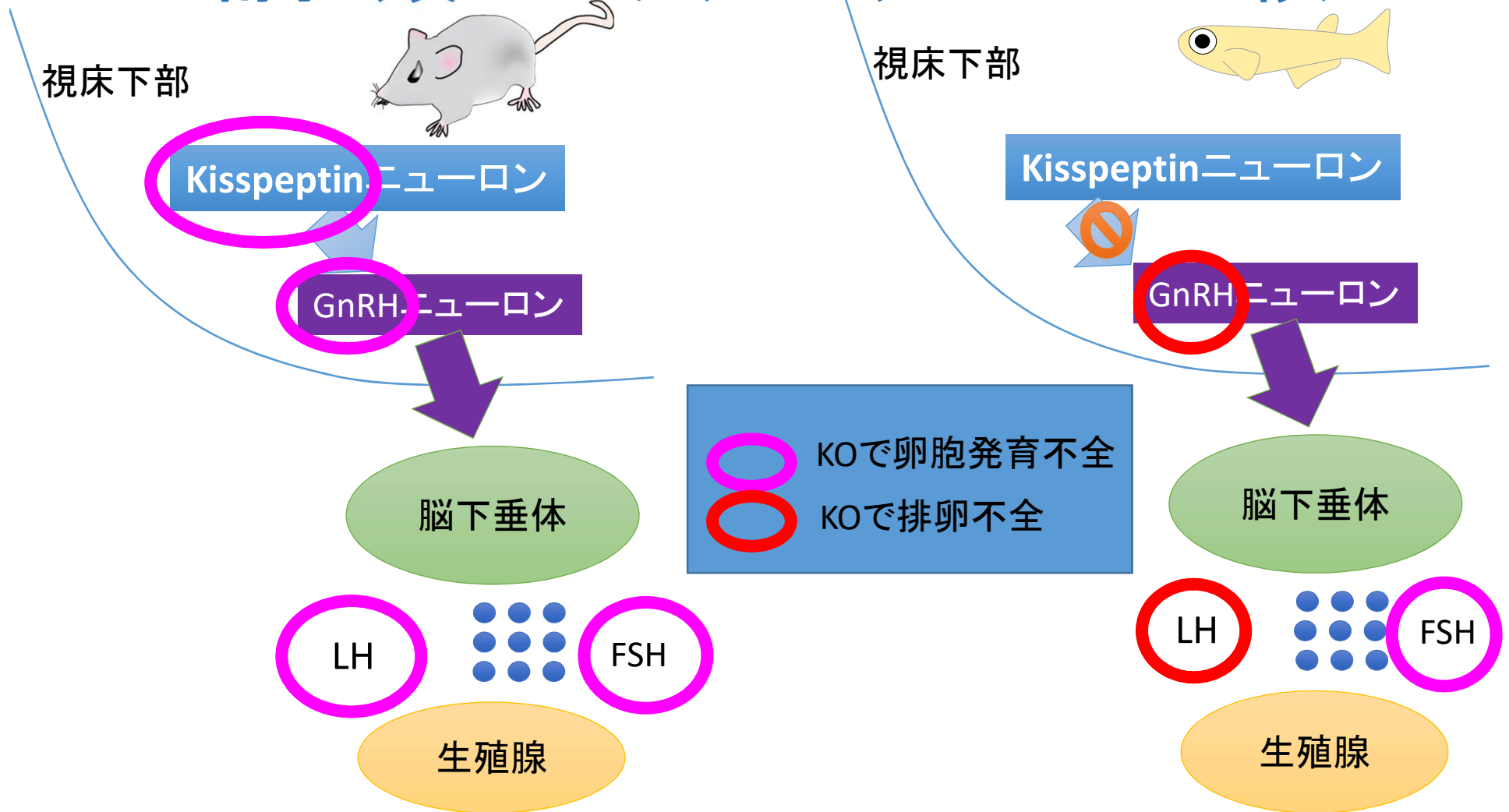
(Takahashi et al., 2016)

GnRHニューロンは

- LHの分泌(排卵)に必須
- FSHの分泌(卵胞発育)にはなくても良い

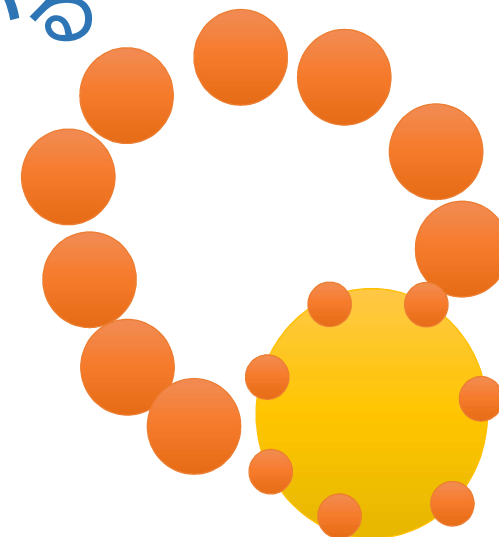
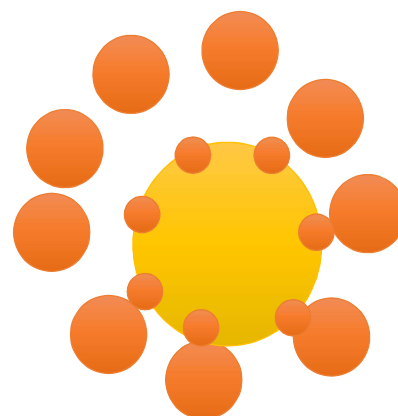
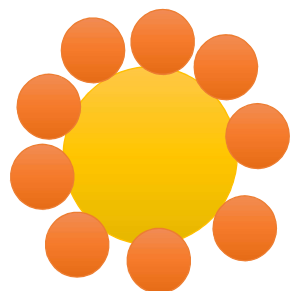
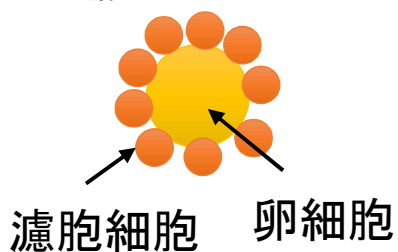
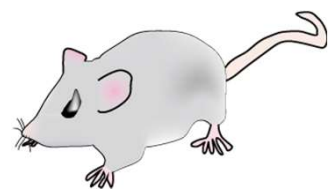
注: 薬理的に効く、
と、必要かどうか、
の違い

哺乳類のノックアウトとの比較



(Cattanach et al., 1977; Ma et al., 2004; Kumar et al., 1997)

哺乳類では脳による制御が強まっている



FSH

Kiss→GnRH→LH(パルス)

Kiss?→GnRH→LH (サージ)

未熟卵

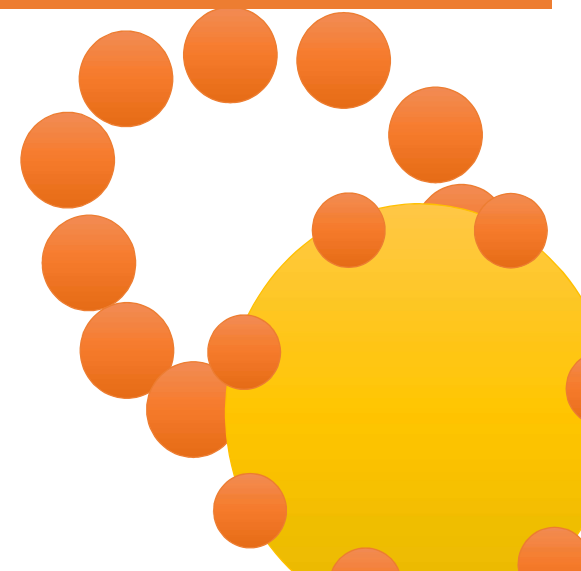
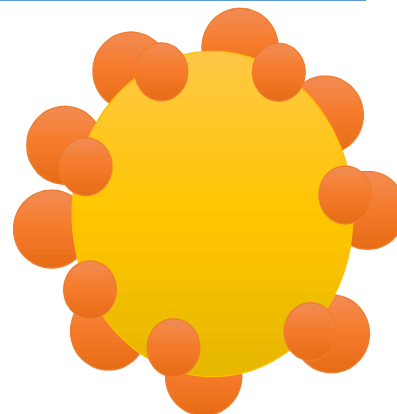
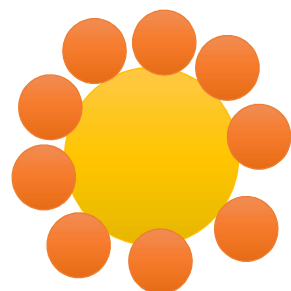
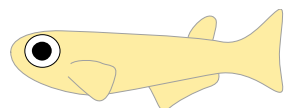
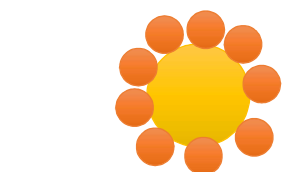
卵胞発育前期

卵胞発育後期

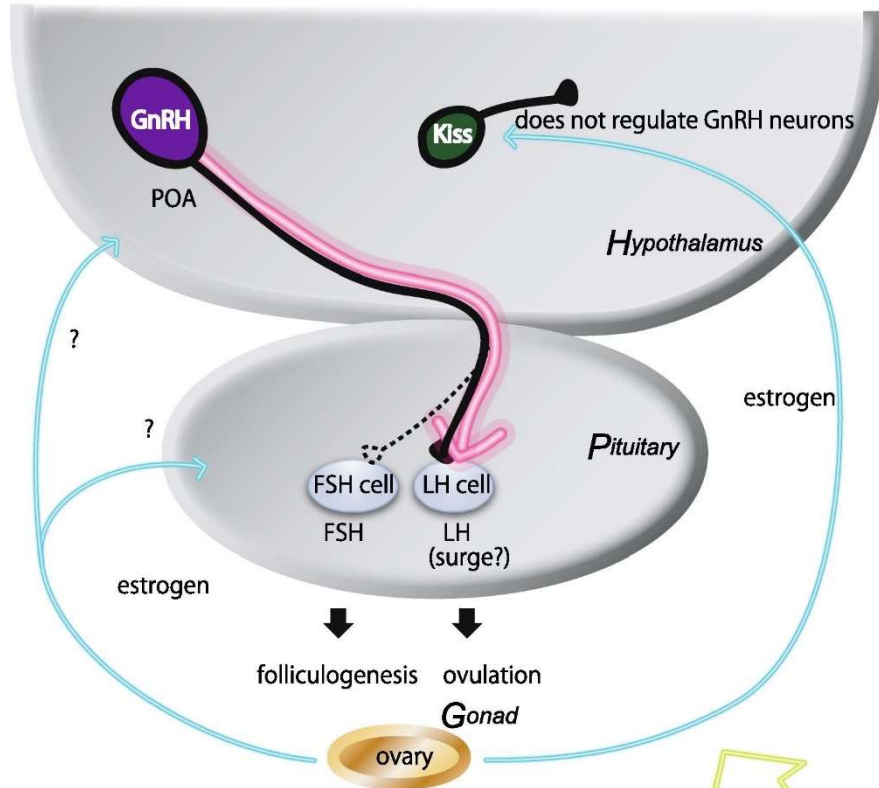
排卵

FSH

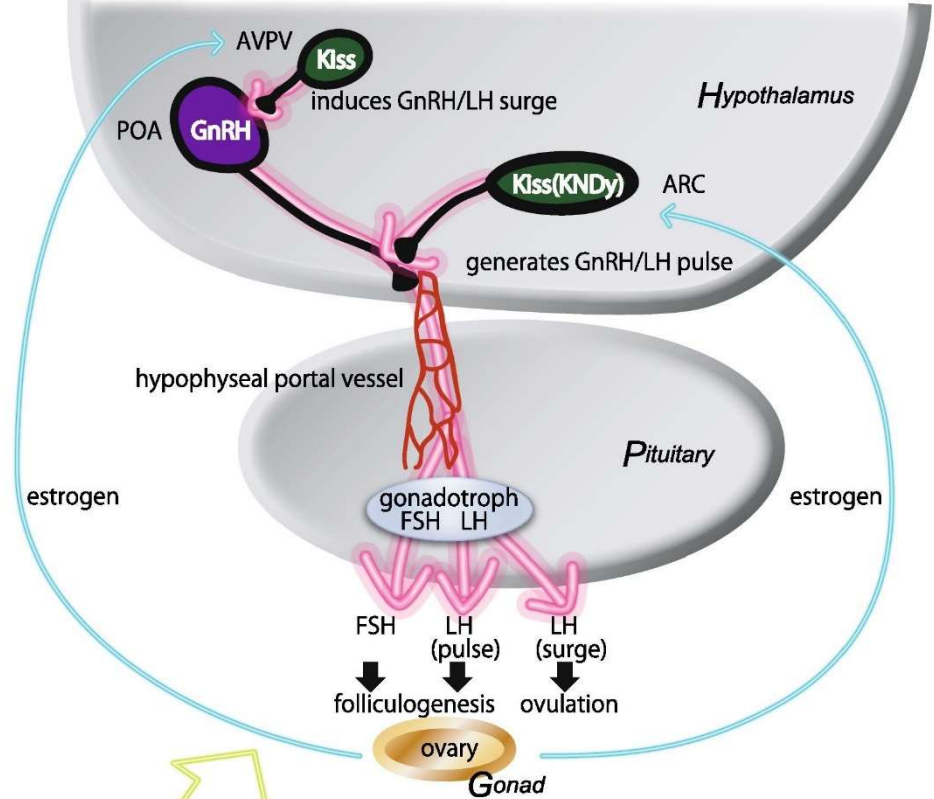
GnRH→LH(サージ)



teleosts

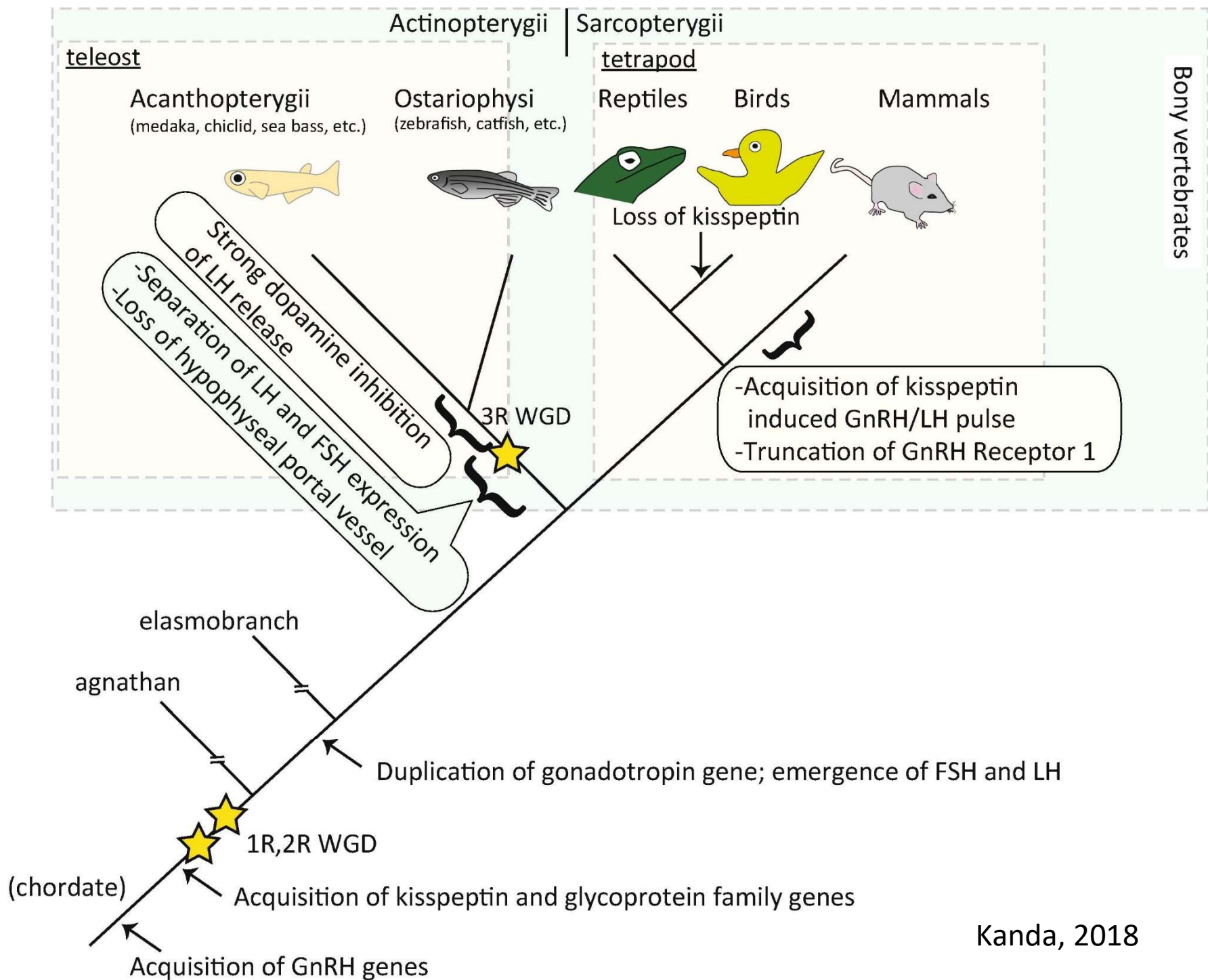


mammals



hypothetical common ancestor:

- GnRH, FSH, and LH were involved in the reproductive regulation.
- Kisspeptin was not involved in the reproductive regulation.
- Estrogen played an important role in the steroid feedback.
- GnRH was transported via hypophyseal portal vessel.
- FSH and LH were expressed in the same cell in the pituitary.



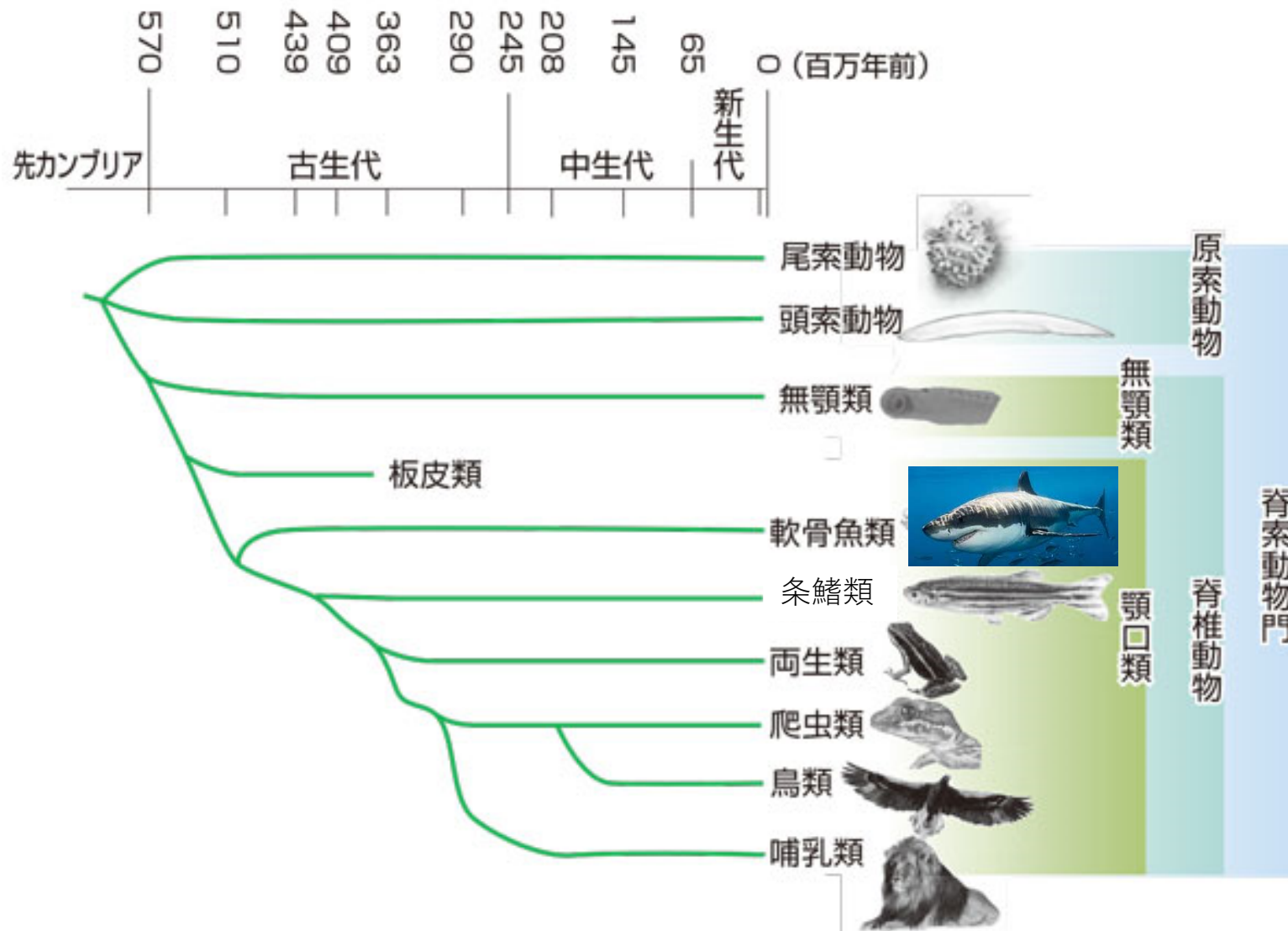
ほ乳類と魚類の共通点・相違点

- ギナドトロピン(FSH,LH)が、性成熟に関わる
- GnRHがLHの分泌を制御
- GnRHの制御の仕方、パルスの有無
- どちらが元なのか？

ホルモンと進化

まずは系統柁を理解-脊椎動物の進化-

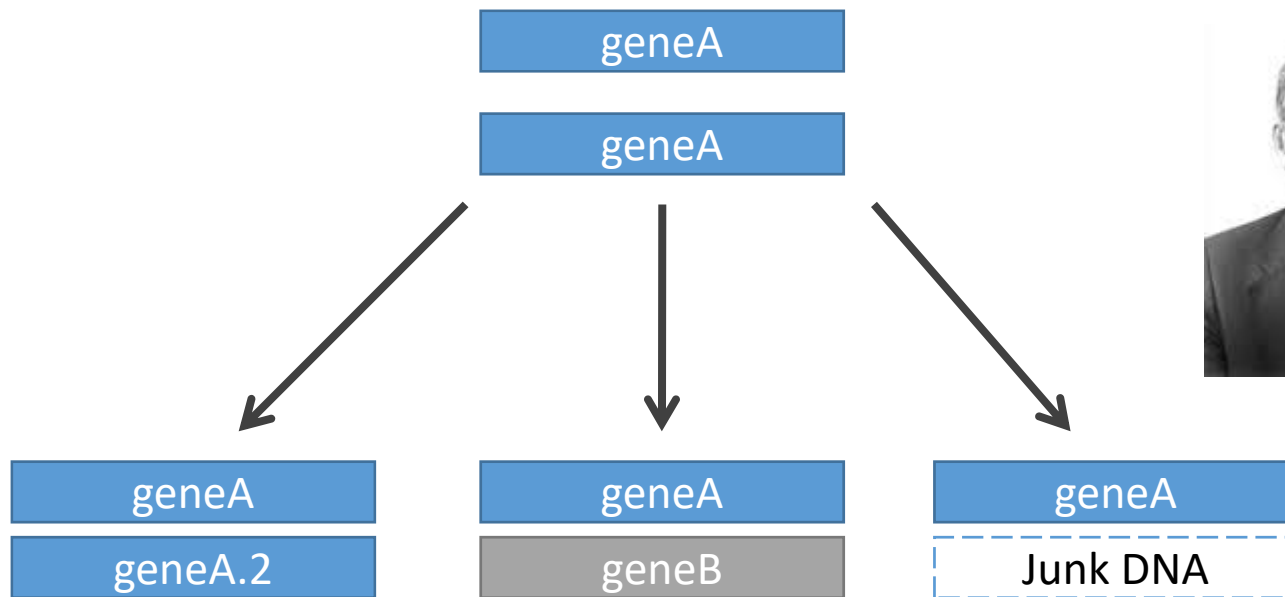
- 系統樹



How genes are made?

- Copy and modify rather than construct *de novo*

Ohno (1970) "Evolution by Gene Duplication"



大野乾

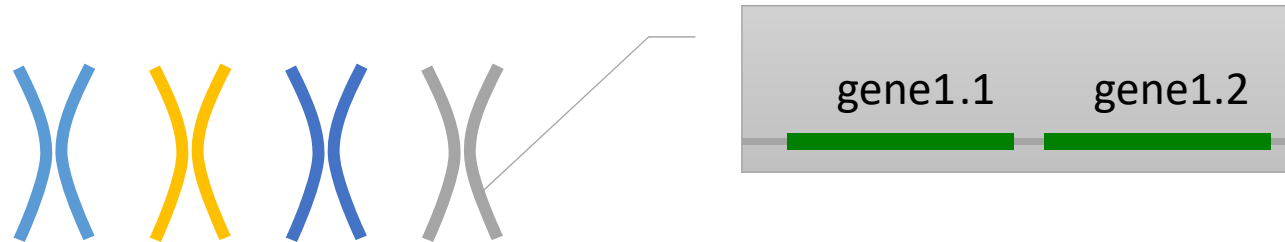
sub-functionalization
(functions in different
parts/timings)

neo-functionalization
(gain new function)

non-functionalization
(no function)

遺伝子重複の種類

- 遺伝子重複
ローカルにコピー & ペースト

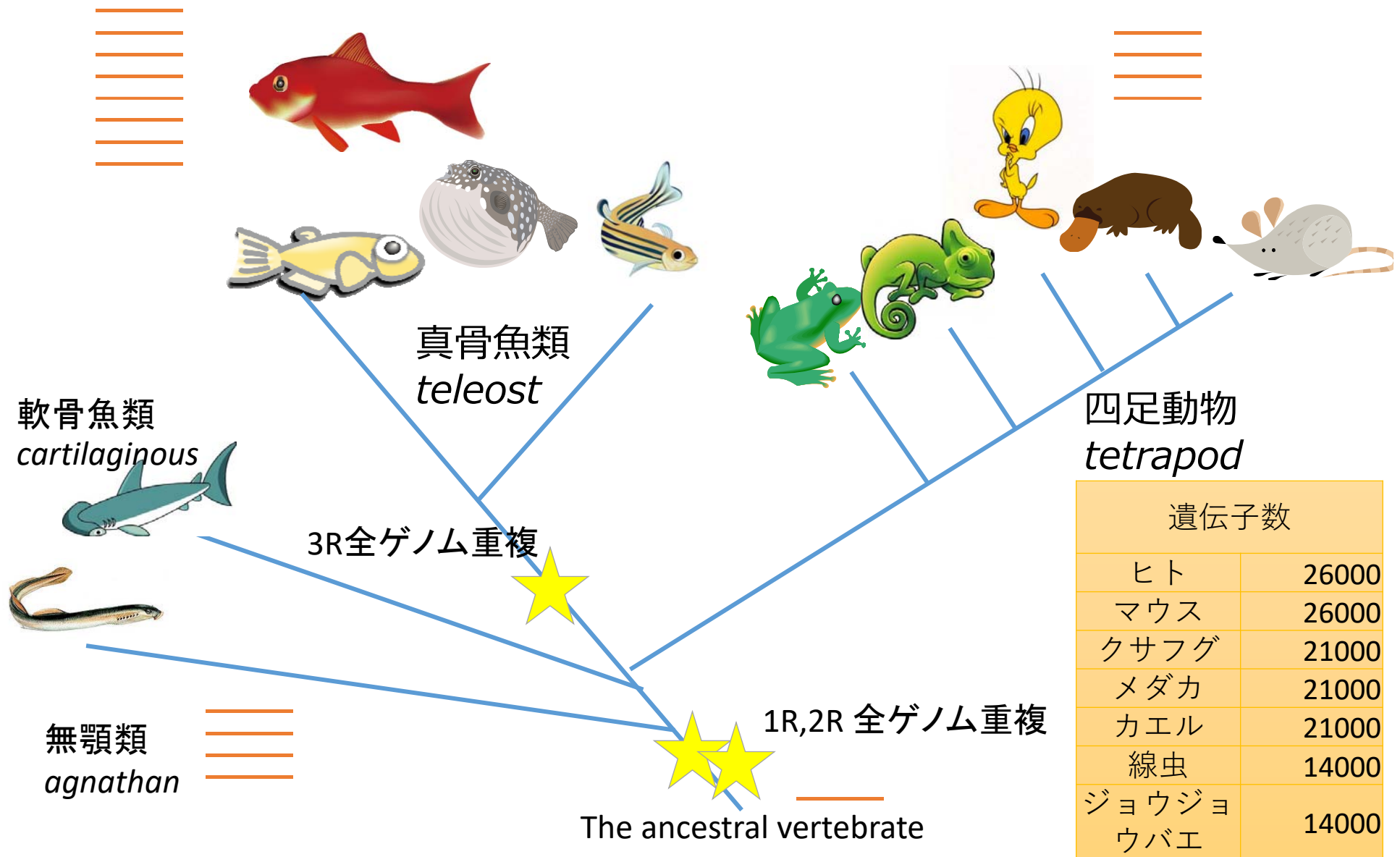


- 全ゲノム重複
全ゲノムが二倍に



偽四倍体（コイ目コイ科：キンギョなど、*Xenopus laevis*等）
→変異の蓄積→徐々に異なる染色体→新しい二倍体の生物に。

脊椎動物の進化



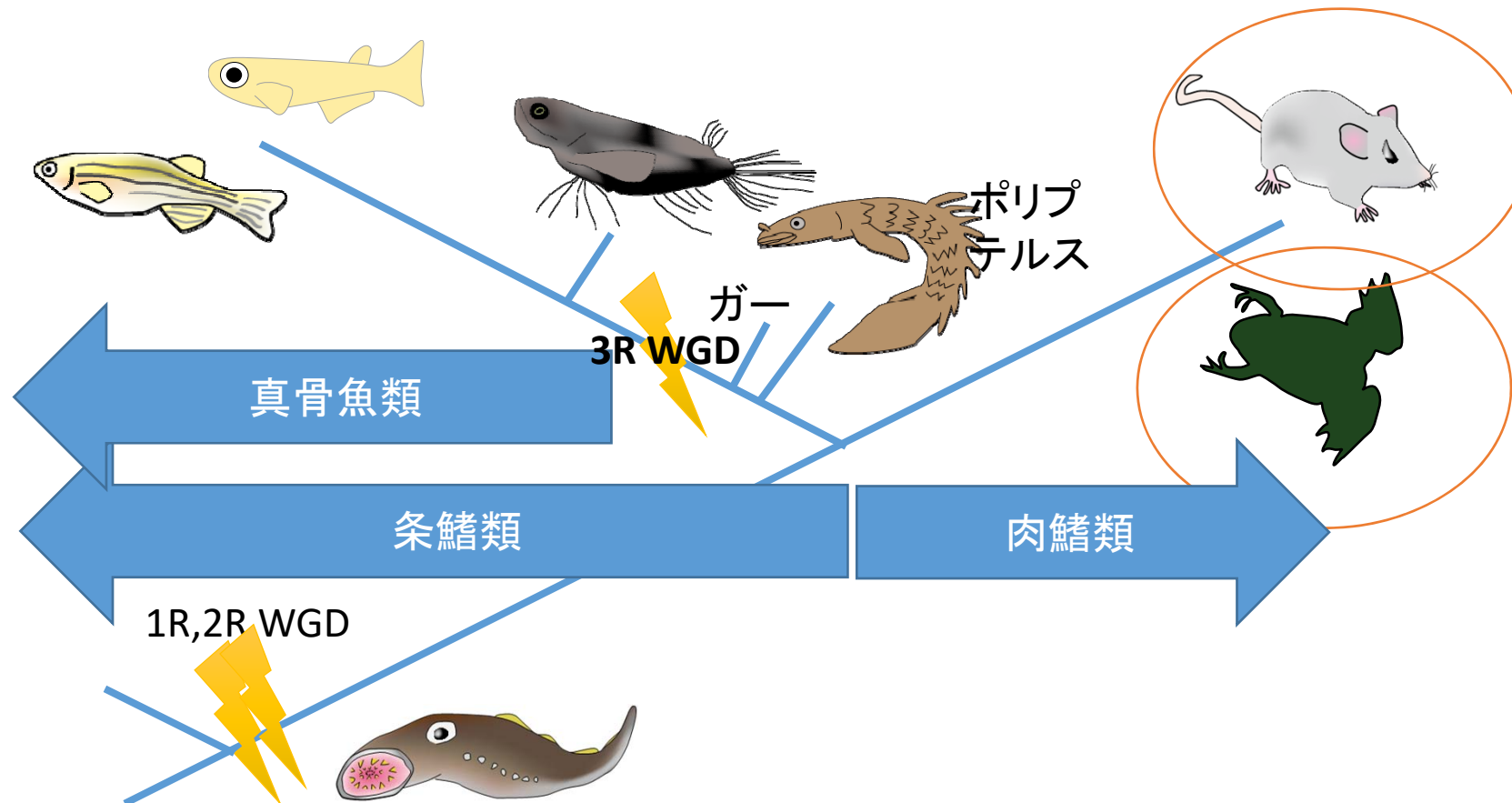
遺伝子数	
ヒト	26000
マウス	26000
クサフグ	21000
メダカ	21000
カエル	21000
線虫	14000
ジョウジョウバエ	14000

硬骨魚類の進化

硬骨魚類の特長

- 硬骨がある
- 肺がある

水たまりに棲んでいたと考えられる



同祖遺伝子かどうかどうやって調べるか

- 相同性検索
遺伝子のタンパク質の配列で比較

```
Human      : MNSLVSWQLLLFLCATHFGEPTIEKVASVGNSRPTGQQLLESGLIAPG-EQ-SLPCTERKPAATARLSRRGTSLS
Chimpanzee: MNSLVSWQLLLFLCATHFGEPTIEEVASVGNSRPTGQQLLESGLIAPG-EQ-SLPCTERKPAATARLSRRGTSLS
Mouse      : MISMASWQLLLLCVATYGEPTIAKVAPLVKPGSTGQSGPQELVNAW-EK-ESRYAESKPGSAGLRARR-SSPC
Rat        : MISIASWQLLLLCVASFGEPTIAKMAPVNVNPEPTGQSGPQELVNAW-QK-GPRYAESKPGAAGLRARR-TSPC
medaka     : -----MAAPLIIVAVIMVAVIAQVWTAHHRHOSTIHTEDNALIKML-RN-FNYLSSS-----MKEW
zebrafish  : -----ETPEETS--LRVLRGTDTRP-----TDGSPP

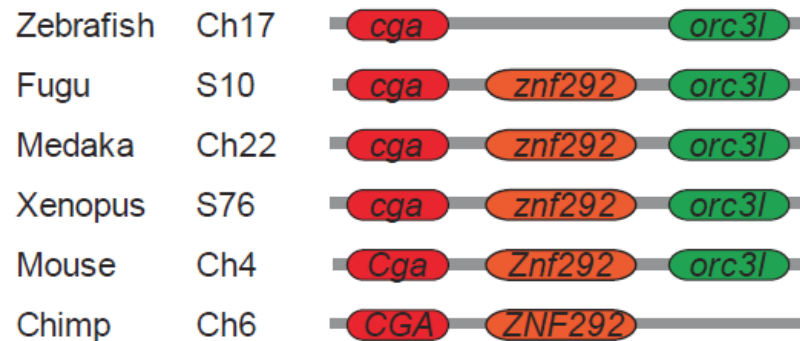
Human      : PPESSSGSPQPGLSAPHSRQIPAPQGAIVLQREKDLIPNYNNSFGLRFGKREAAPGNHGRSAGRGWGAGAGQ-:145
Chimpanzee: PPESSSGSPQPGLSAPNSRQIPAPQGAIVLQREKDLIPNYNNSFGLRFGKREAAPGNHGRSAGRG-----:138
Mouse      : PPVEGPAGRQRP-LCASRSRLIPAPRGAVLVQREKDLSTYNNNSFGLRYGRROAAR-----AARG-----:130
Rat        : PPVENPTGHQRP-PCATRSRLIPAPRGSVLVQREKDM SAYNNNSFGLRYGRROVAR-----AARG-----:130
medaka     : PKSDRSSDGGTPTMVGCMVKAIHP---VAIKKRODLSSYNNNSFGLRYGK-----:100
zebrafish  : SK---LSALFSMAGPQKNTWWWSPESPYTKRRQ-NVAYYNNNSFGLRYGKRE-QDMLTRLKQKSPVK-----: 87
```

Kisspeptin-10

(Kanda et al., 2008)

- シンテニー解析
遺伝子座で検討

例) ゴナドトロピン α サブユニット遺伝子



(Kanda et al., 2011)

同じ遺伝子座に乗っている遺伝子の位置関係は、動物種間で比較的保存されている

何故全ゲノム重複したといえるか：
double/quadruple conserved synteny



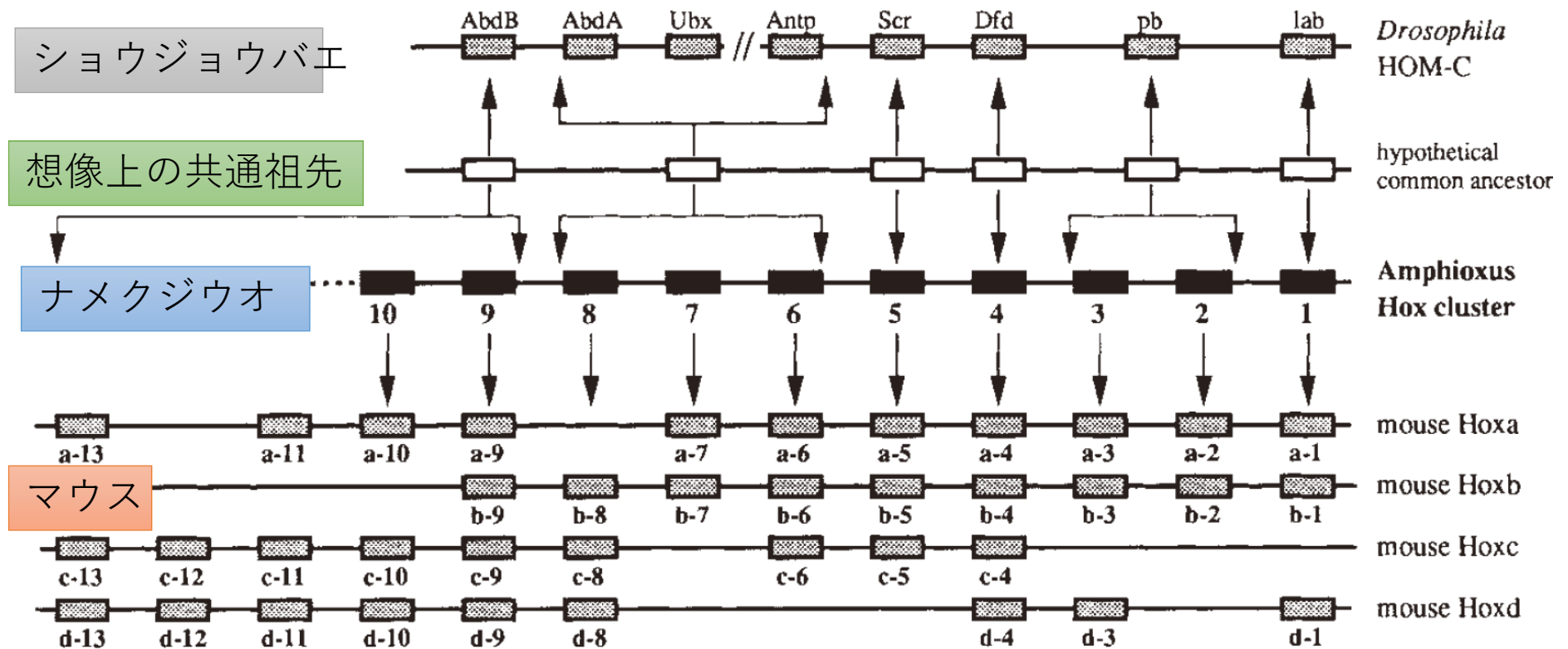
遺伝子数	
ヒト	26000
マウス	26000
クサフグ	21000
メダカ	21000
カエル	21000
線虫	14000
ジョウジョウバエ	14000

これのさらに 2 倍がquadruple conserved synteny

そういった遺伝子重複が実際に
起こってる示唆(1990年代)

ホメオボックスクラスタ(Hox)の解析

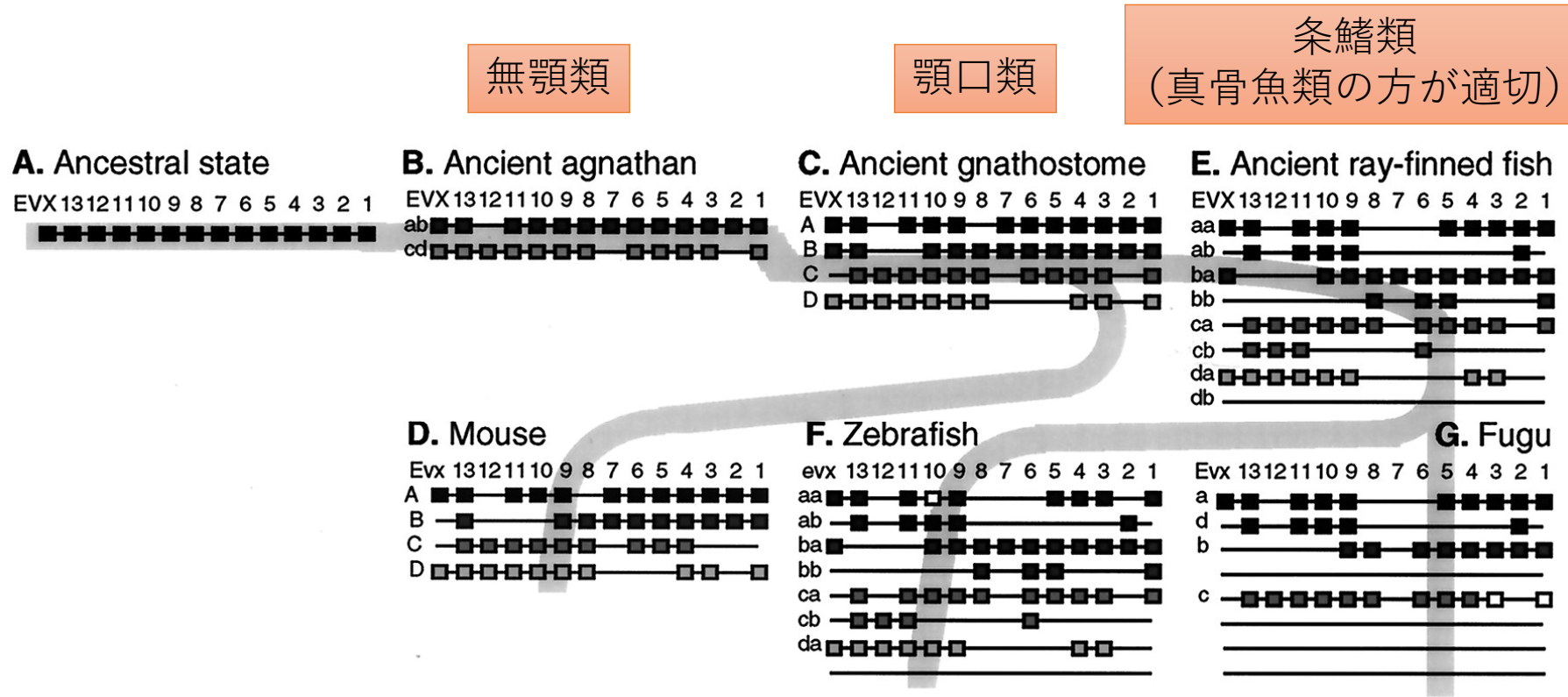
→ **脊椎動物は二回の全ゲノム重複**を受けている



(Garcia-Fernandez and PW Holland, 1994)

余談：Hoxに近い位置にあるので、NPYファミリーの解析もこの時期かなり行われた

魚では更に倍に。

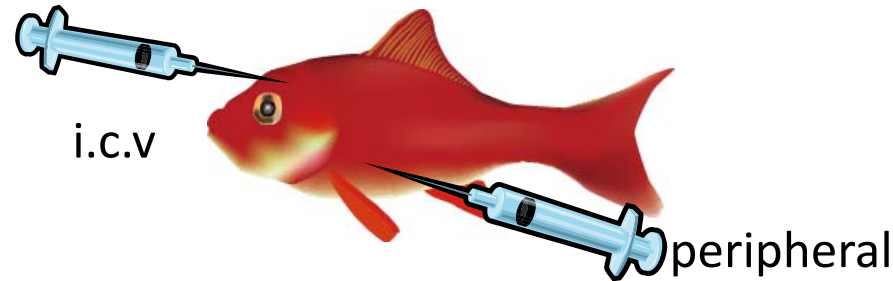


(Amores et al., 1998)

内分泌系から進化を考える／
進化から内分泌系を考える

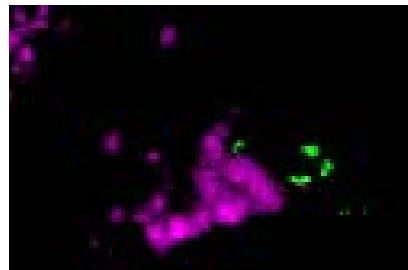
キスペプチンは 魚の生殖調節に関与しない

- キスペプチンの投与は 血中LHを変化させない.



(Nakajyo et al., 2017)

- GnRH ニューロンはキスペプチン受容体を発現しない



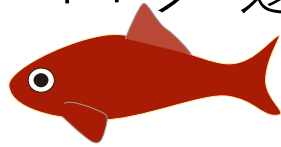
gnrh1 mRNA
gpr54-1 mRNA

(Kanda et al., 2013; Escobar et al., 2013)

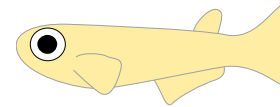
- *Kiss1/ kiss2* ダブルKOも正常に繁殖(TALEN/CRISPR KO)

(Nakajyo et al., 2017)

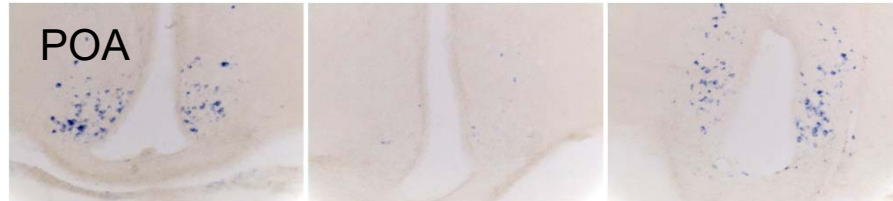
Kiss1,2研究から産まれた疑問 ～パラログ遺伝子発現が入れ替わる？～



goldfish



medaka

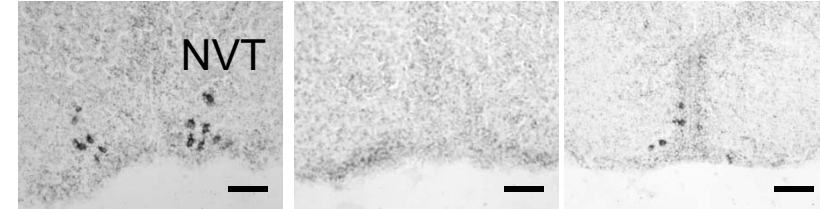


POA

Sham

OVX

OVX+E

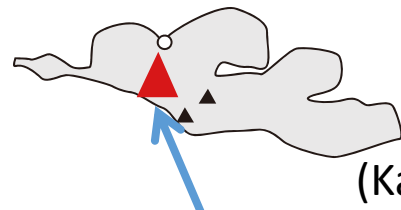


NVT

Sham

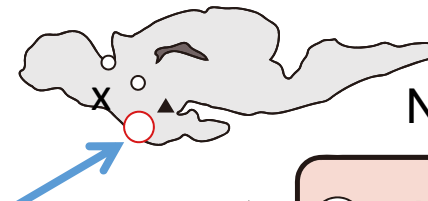
OVX

OVX+E

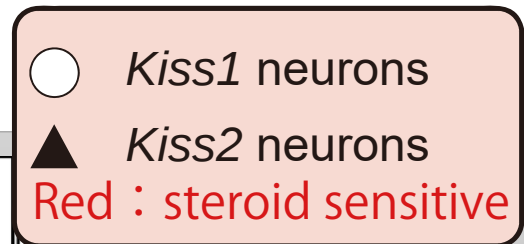


POA Kiss2 Neurons
(Kanda et al., 2012)

Kiss2<->Kiss1???



NVT Kiss1 Neurons



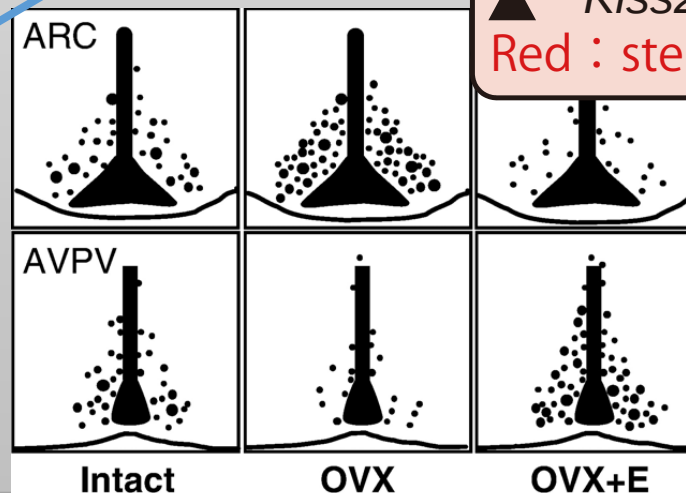
○ Kiss1 neurons

▲ Kiss2 neurons

Red : steroid sensitive



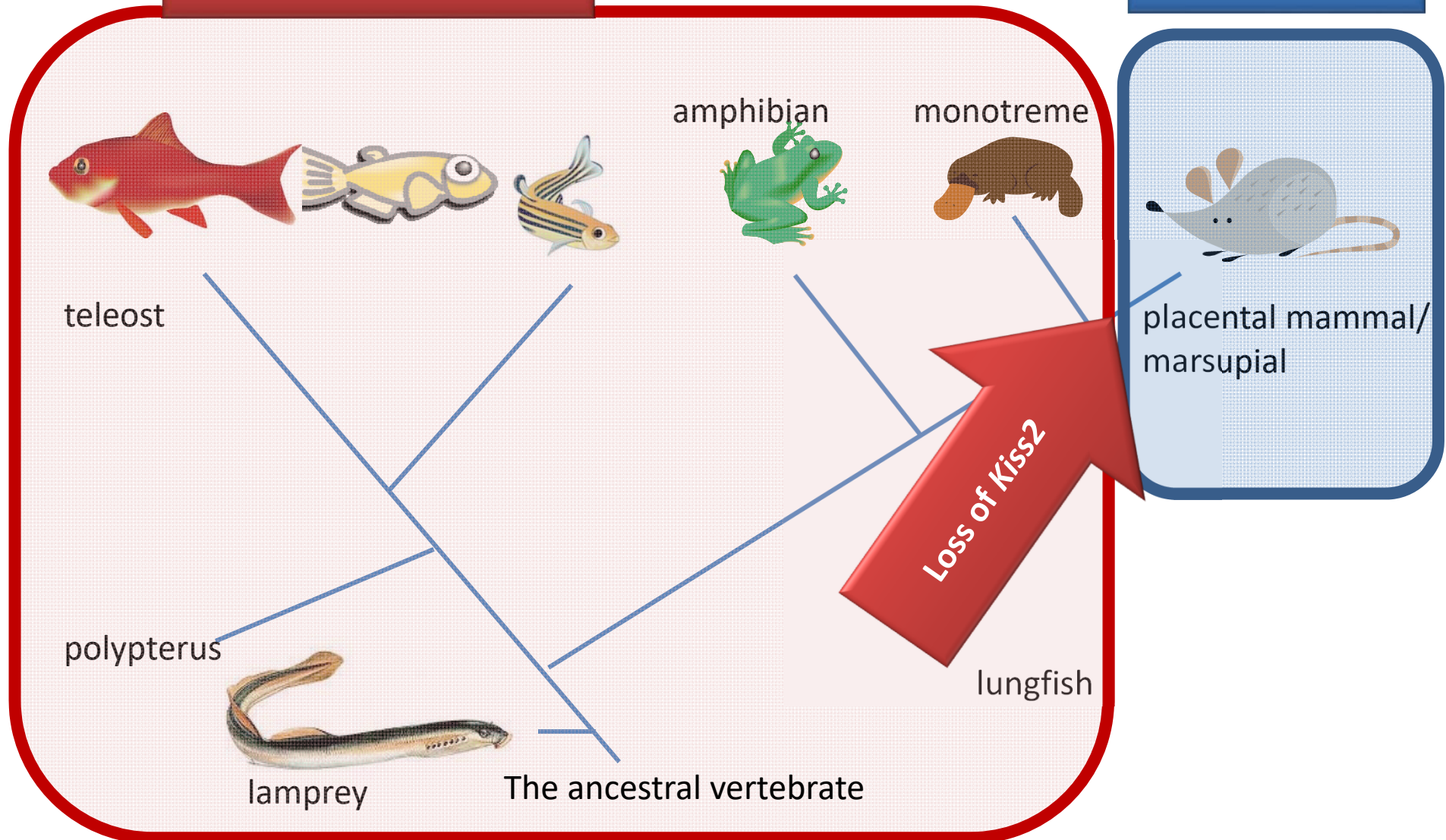
(Smith et al., Brain Res. Rev., 2007)



Kiss2 is lost in mammals

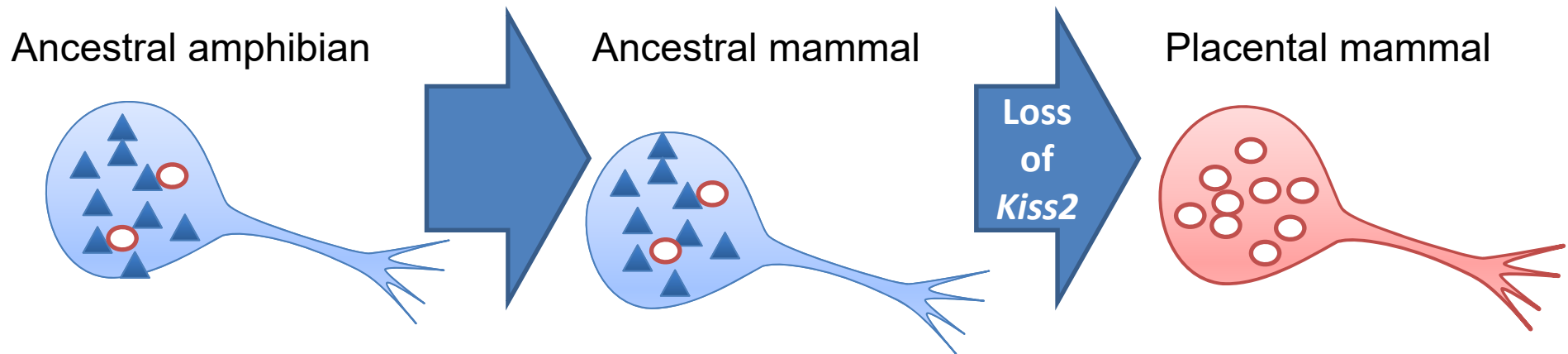
kiss1* and *kiss2

***Kiss1* only**



Genetic robustness

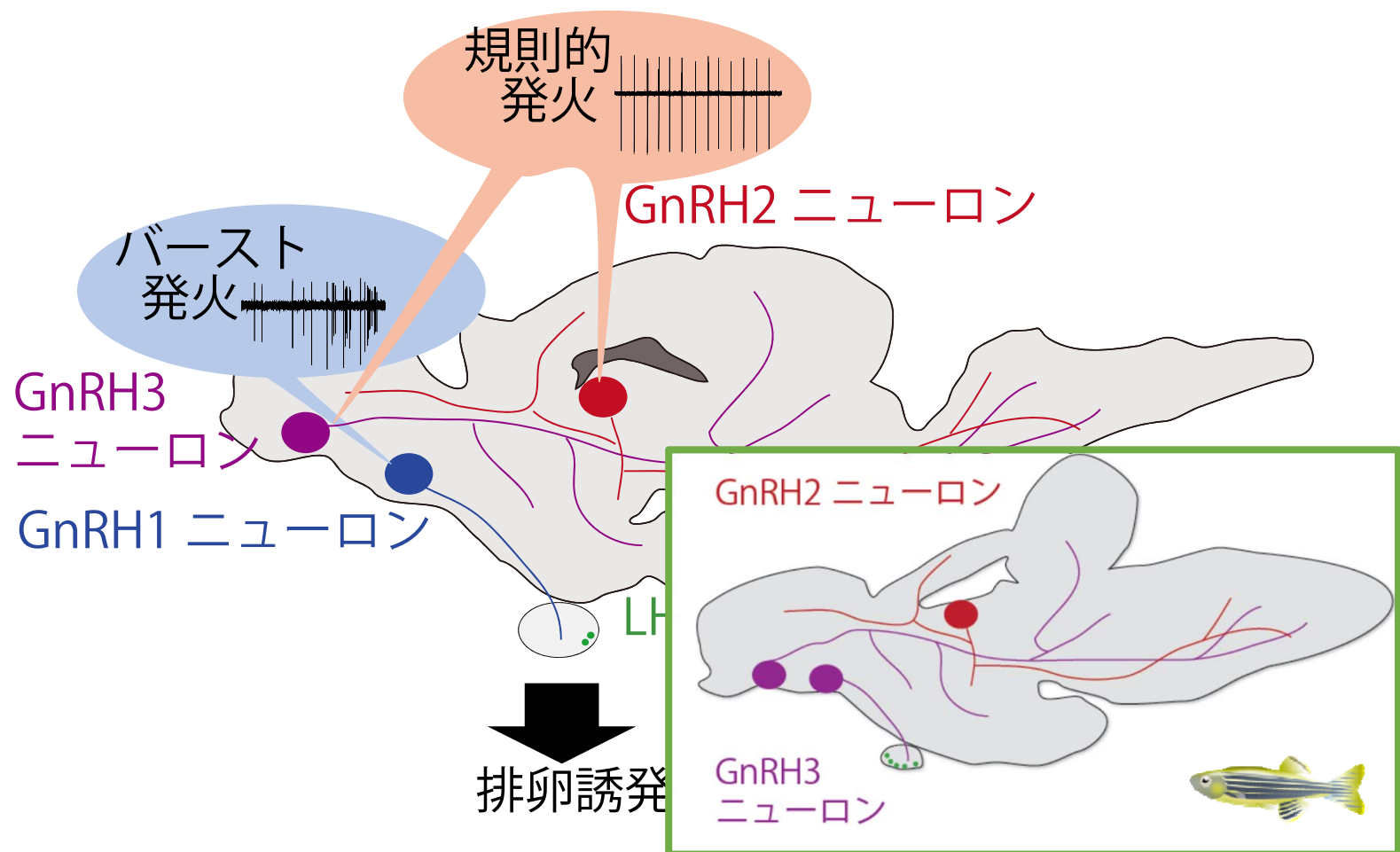
- *kiss1* と *kiss2* はパラログ遺伝子
- 上流を保持している
イーストでは、パラログがある遺伝子はノックアウトで致死になりづらい (Nature, 2003)
- パラログ遺伝子は喪失時にバックアップとして働く可能性



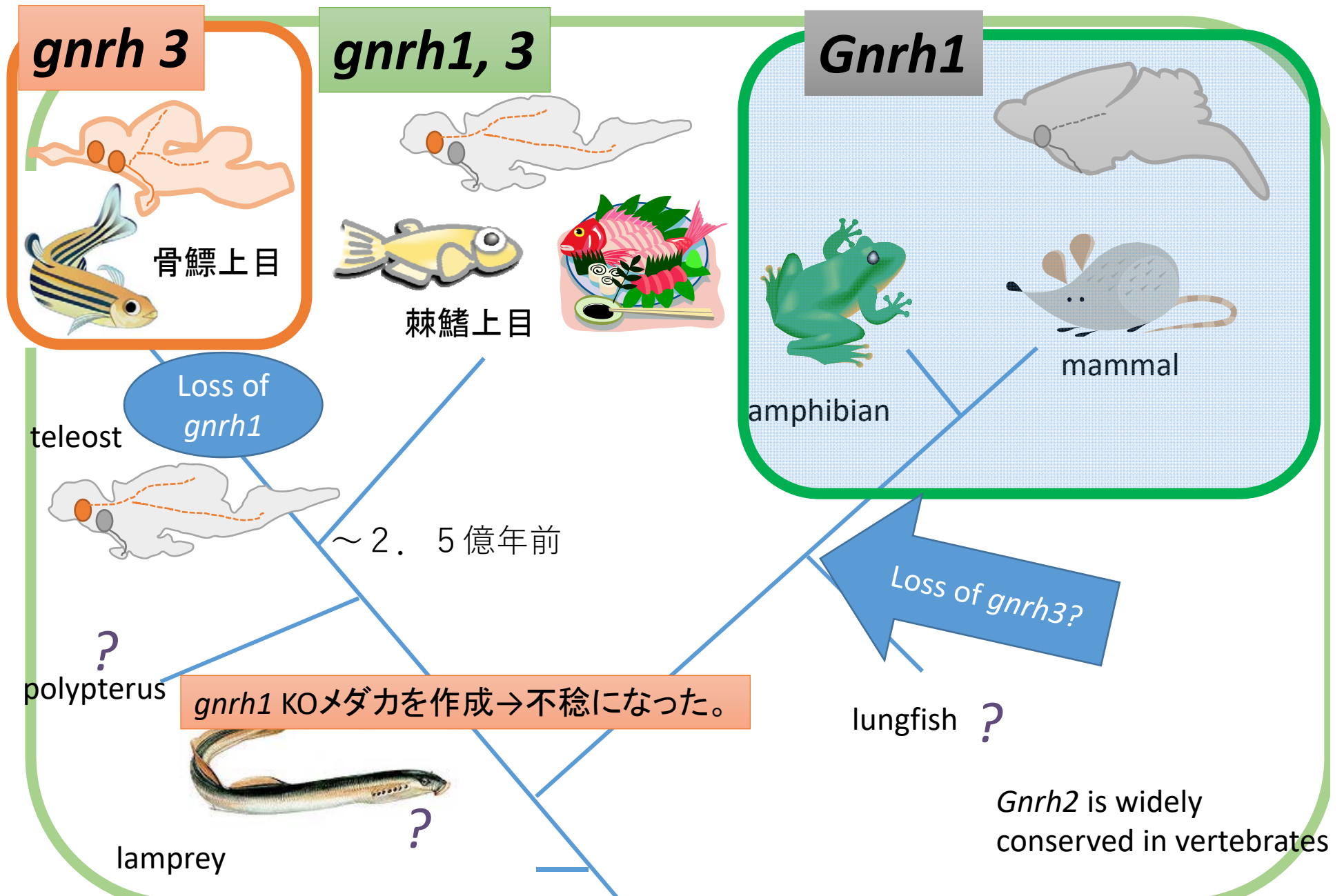
ペプチド神経系は、genetic robustness の理解に有用な系では？

パラログ遺伝子GnRH1,2,3の構成するGnRH神経系 ～GnRH1が脳下垂体を制御～

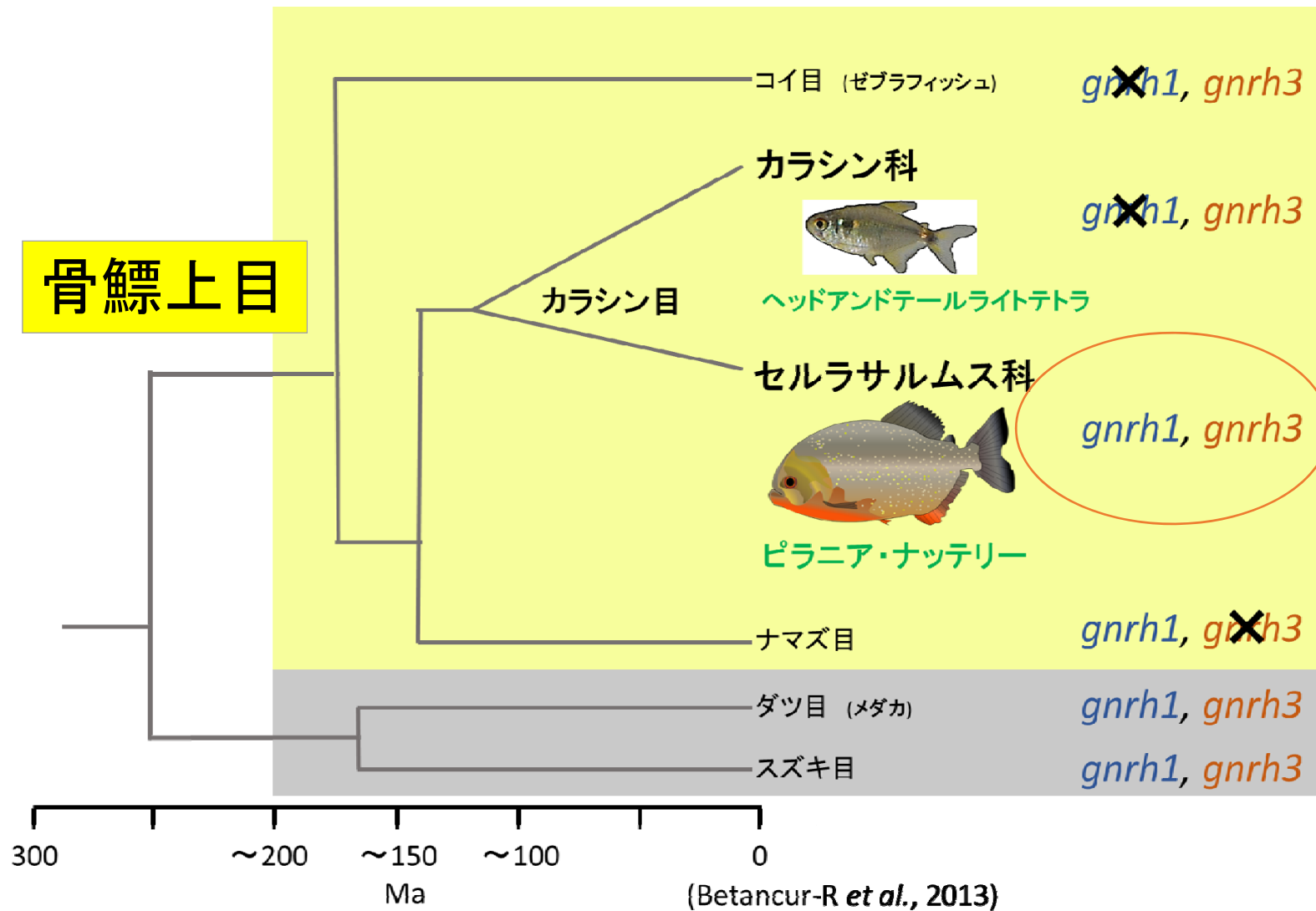
GnRHニューロンは3種。いわゆる"GnRH"はひとつだけ。



GnRH1/3に喪失時の補償?



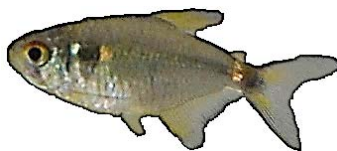
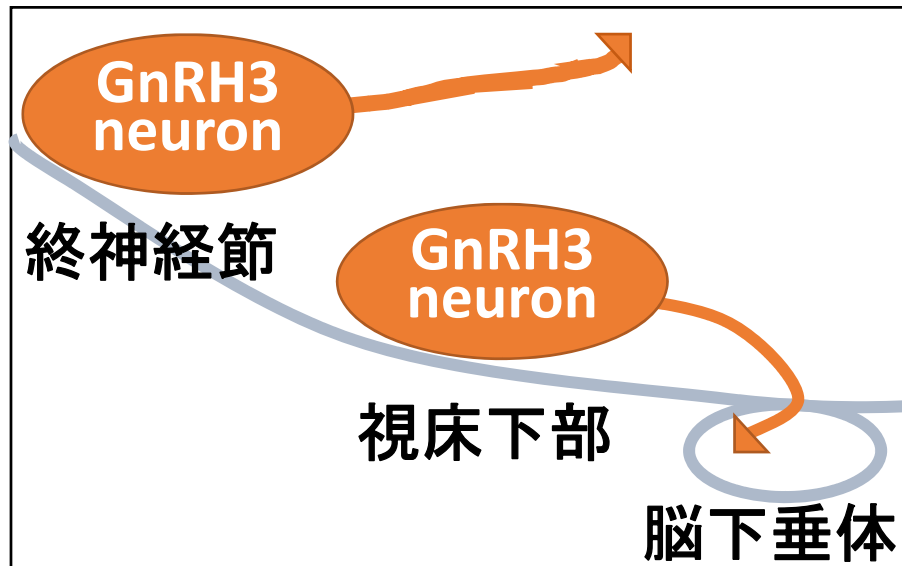
骨鰾上目内でピラニアの系統だけ *gnrh1/gnrh3* を保存



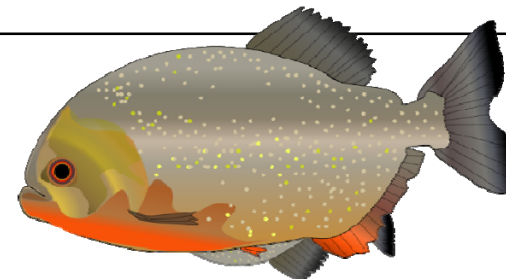
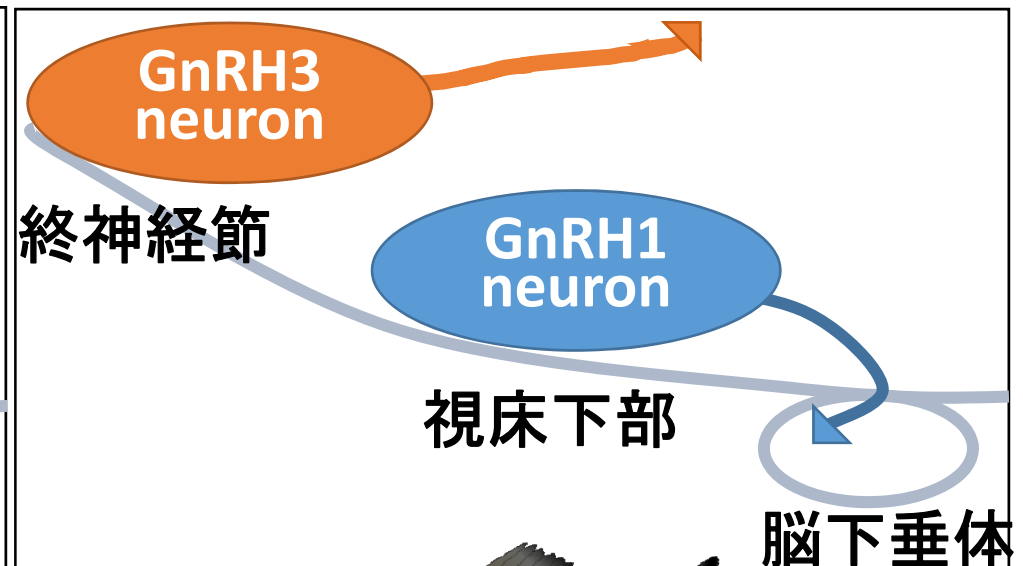
ピラニアはGnRH1発現ニューロンが
近縁のテトラはGnRH3発現ニューロンが
脳下垂体へ

In situ hybridization、免疫組織化学にて検証

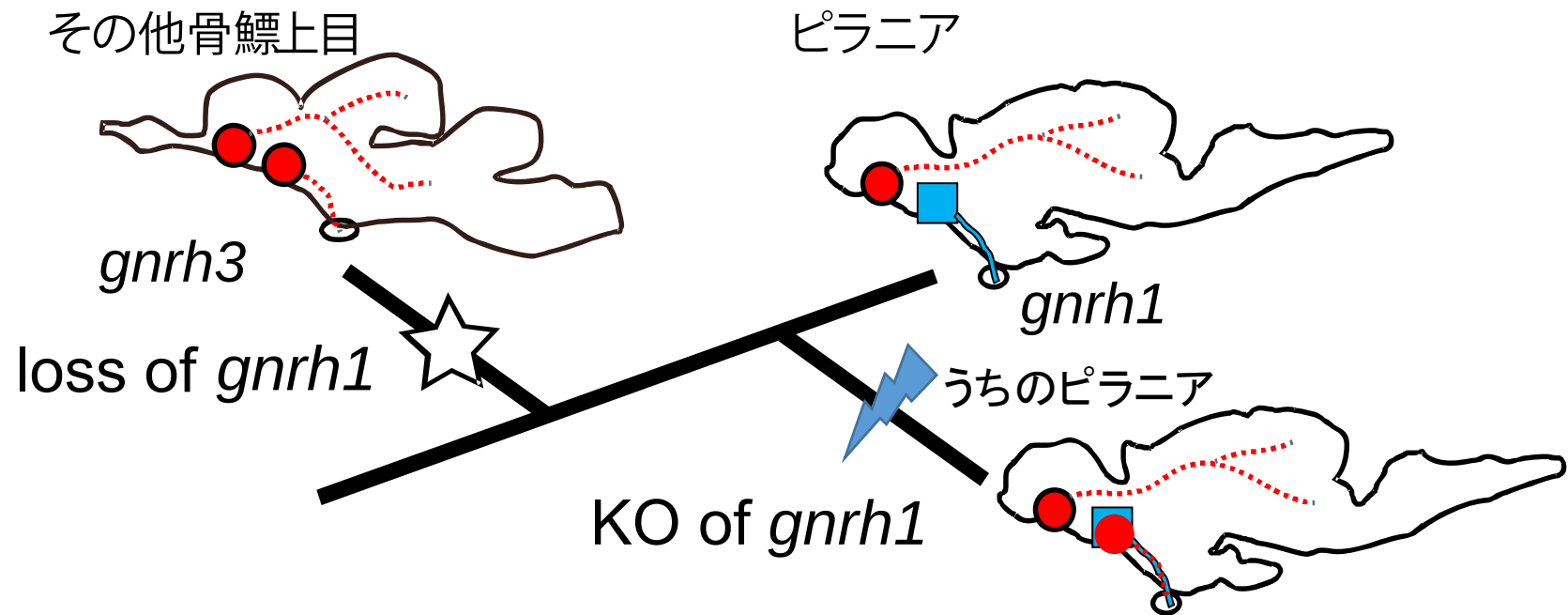
ヘッドアンドテールライトテトラ



ピラニア・ナツテリー

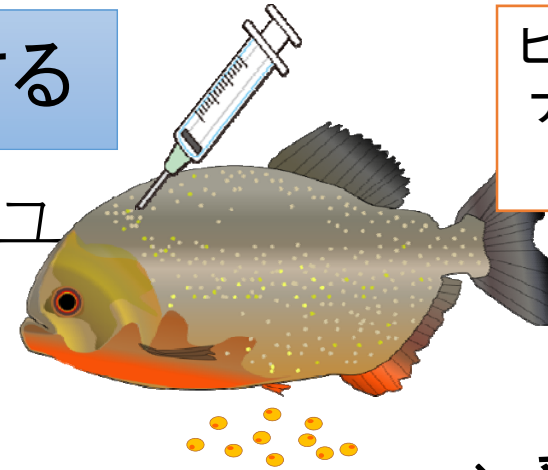


実験的にgnrh1喪失時のgnrh3による補償を再現
するチャレンジ



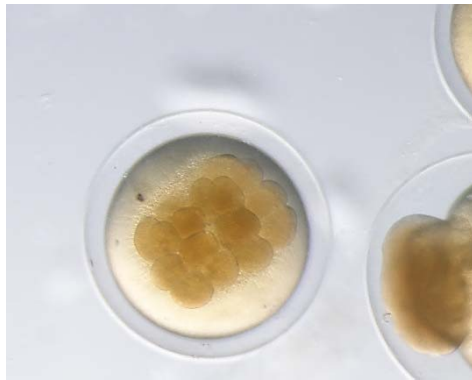
ピラニアナッターを実験動物にする

発生はゼブラフィッシュ
に似ている



ヒト絨毛性ゴ
ナドトロピン
(hCG)

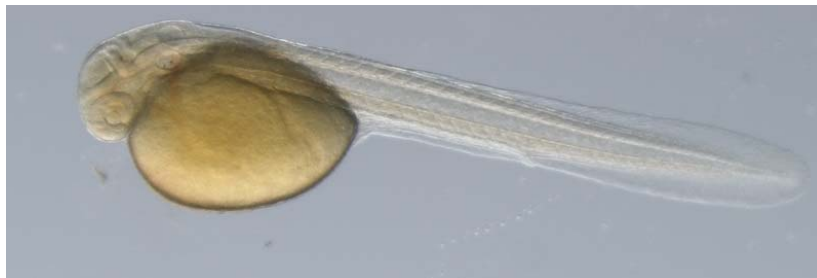
→ 受精



受精後: 3h



24h



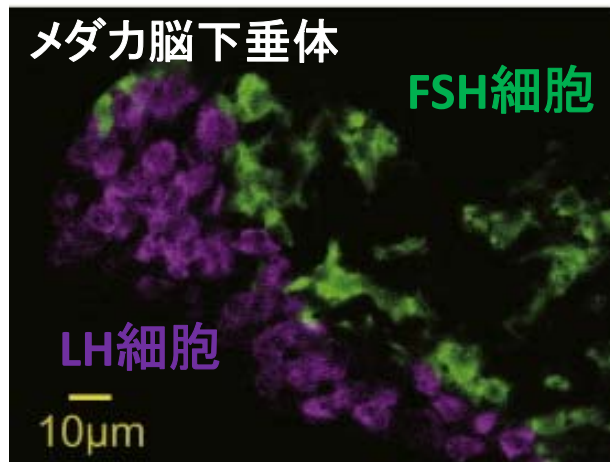
66h(孵化)



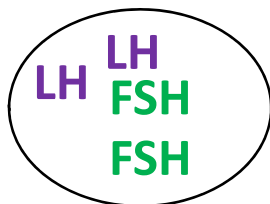
生後1ヶ月

LHとFSHの進化

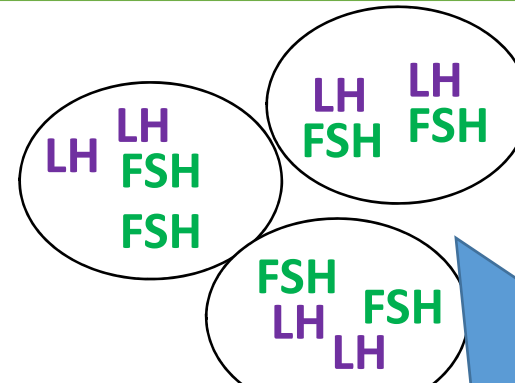
真骨魚:
LH細胞とFSH細胞が独立



祖先型脊椎動物



四足動物:
同一細胞がLHβ, FSHβを共発現(ゴナドトロフ)



LHbとFSHbは元々重複遺伝子
= 元来同一細胞に発現

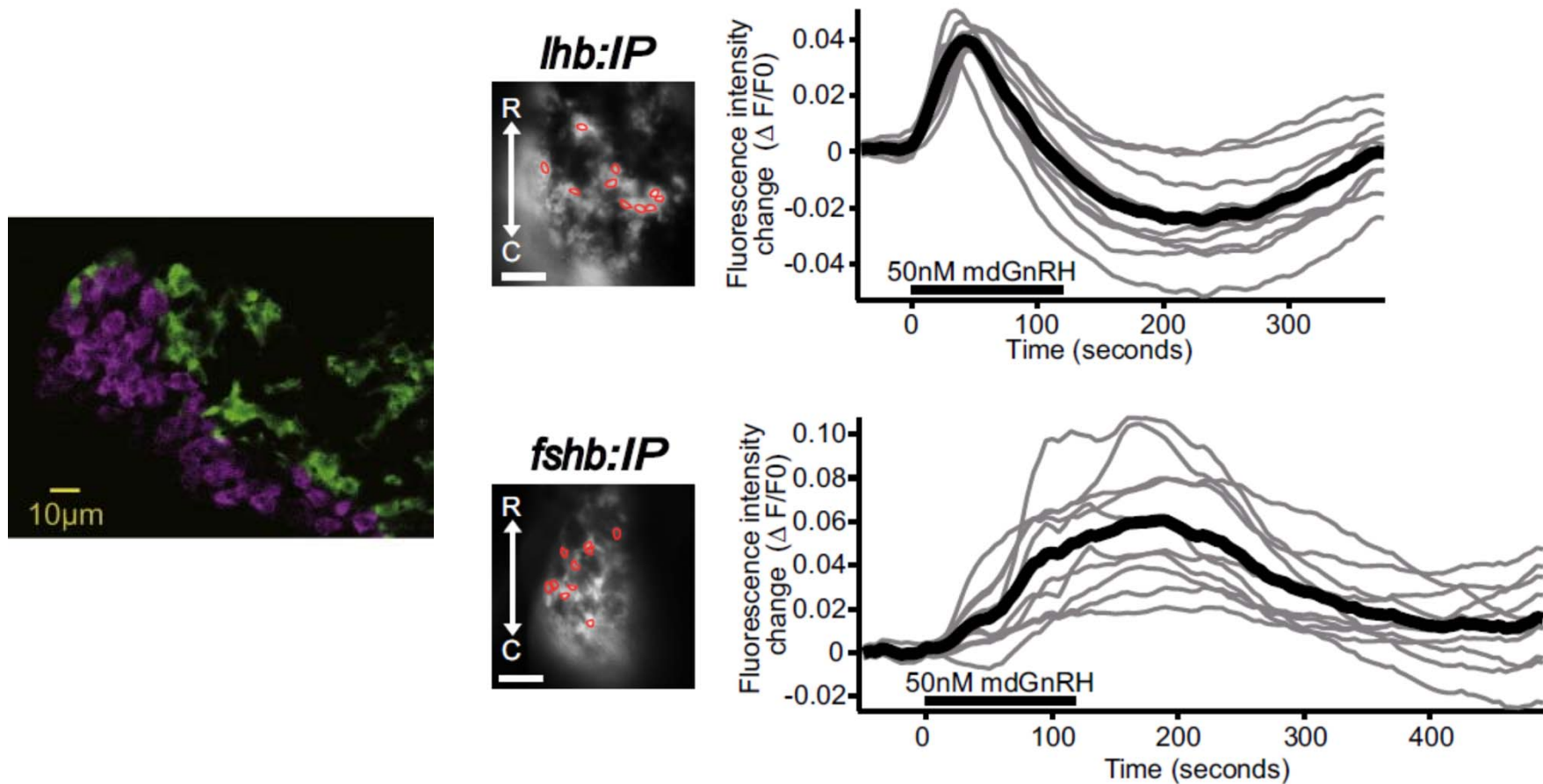
<i>kif18b</i>	<i>lhb</i>	<i>-kcna7</i>
<i>kif18a</i>	<i>fshb</i>	<i>-kcna4</i>
	<i>tshb</i>	<i>-tspan2</i>

(Kanda et al., 2011)

真骨魚類での進化のメカニズム?

離れた細胞の利点を活かした LH,FSHのイメージング

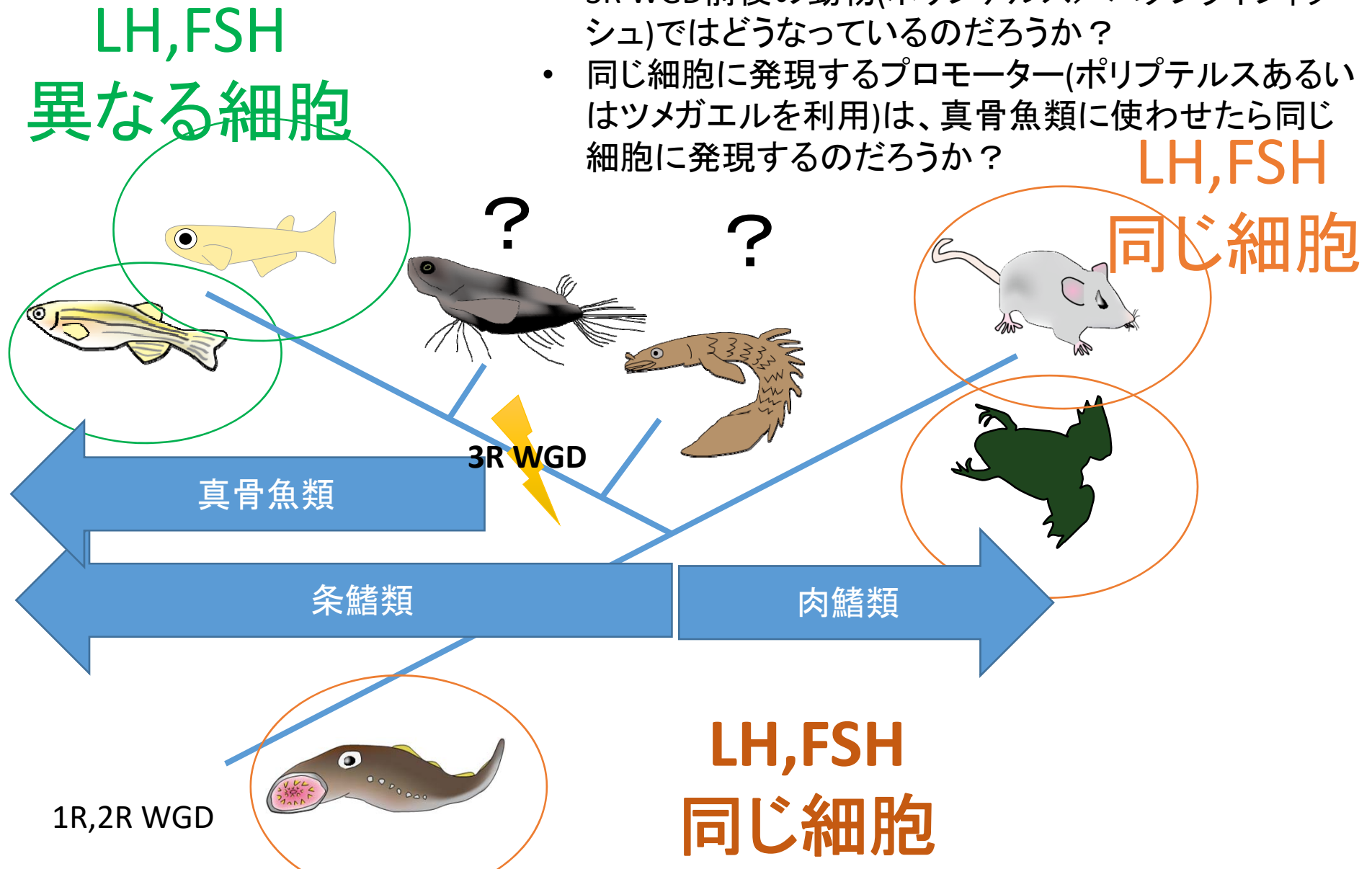
それぞれをCa²⁺インジケーターで標識して、LH,FSHのリリースの挙動を推測できる



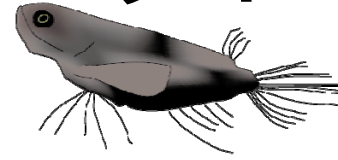
(Karigo et al., 2014)

全ゲノム重複(WGD)が形に与える影響

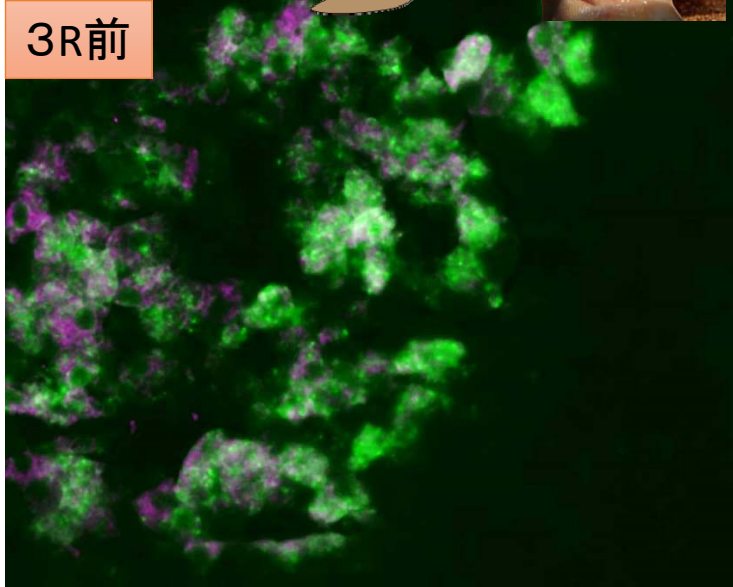
- 3R WGD前後の動物(ポリプテルス／バタフライフィッシュ)ではどうなっているのだろうか？
- 同じ細胞に発現するプロモーター(ポリプテルスあるいはツメガエルを利用)は、真骨魚類に使わせたら同じ細胞に発現するのだろうか？



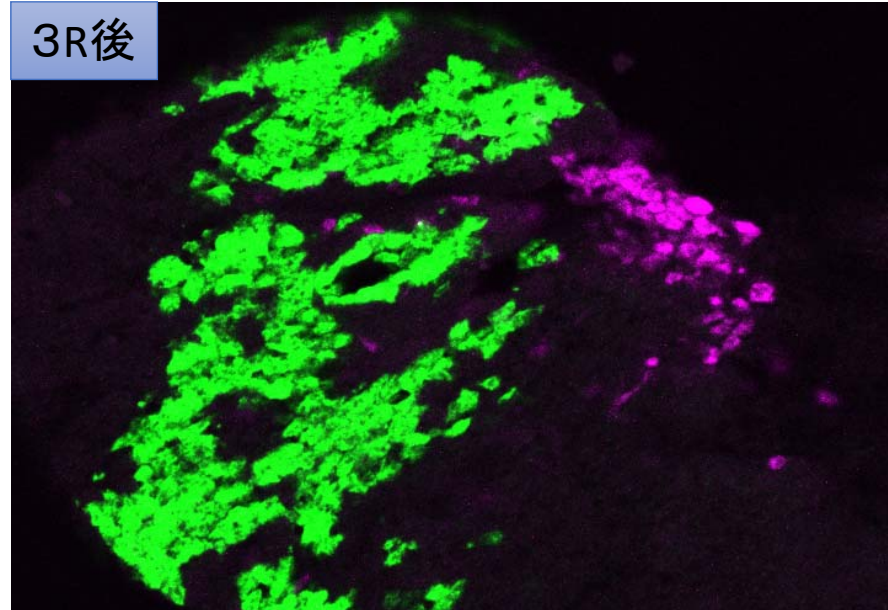
ポリプテルスとバタフライフィッシュ



3R前



3R後



3R後

Zebrafish Ch13



Medaka Ch15



Tetradon Ch17



Stickleback LG VI



Xenopus S460



Lizard S270



3R前

Mouse Ch7



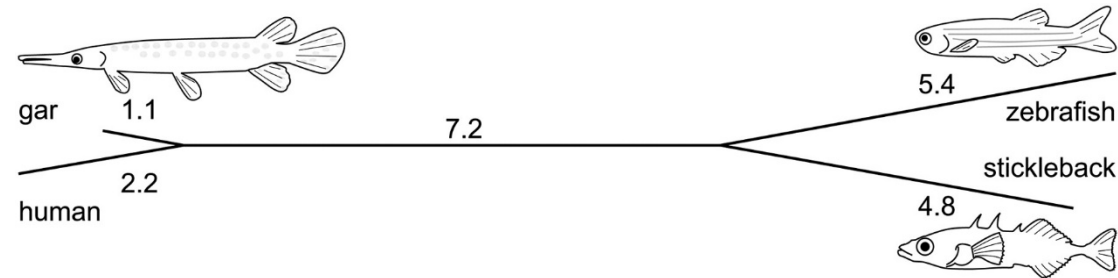
Chimp Ch19



(Kanda et al., 2011)

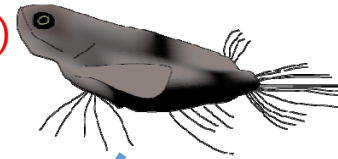
全ゲノム重複は大きなゲノムの再構成を 引き起こしている事実と整合

Syntenic comparisons of two teleosts (zebrafish and stickleback) to gar and human.

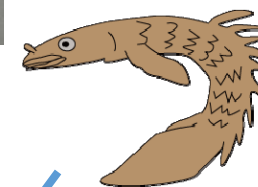


Angel Amores et al. Genetics 2011;188:799-808

別々の細胞で発現
(真骨魚類型)



3R WGD



同一の細胞で発現
(四肢動物型)

しかし、ガーのLHB遺伝子は、配
列・シンテニー共に真骨魚類寄り
→ガーも試してみることに



3R全ゲノム重複が細胞が別になった原因ではなかった！

では、どのようにして発現場所が分化したのか？

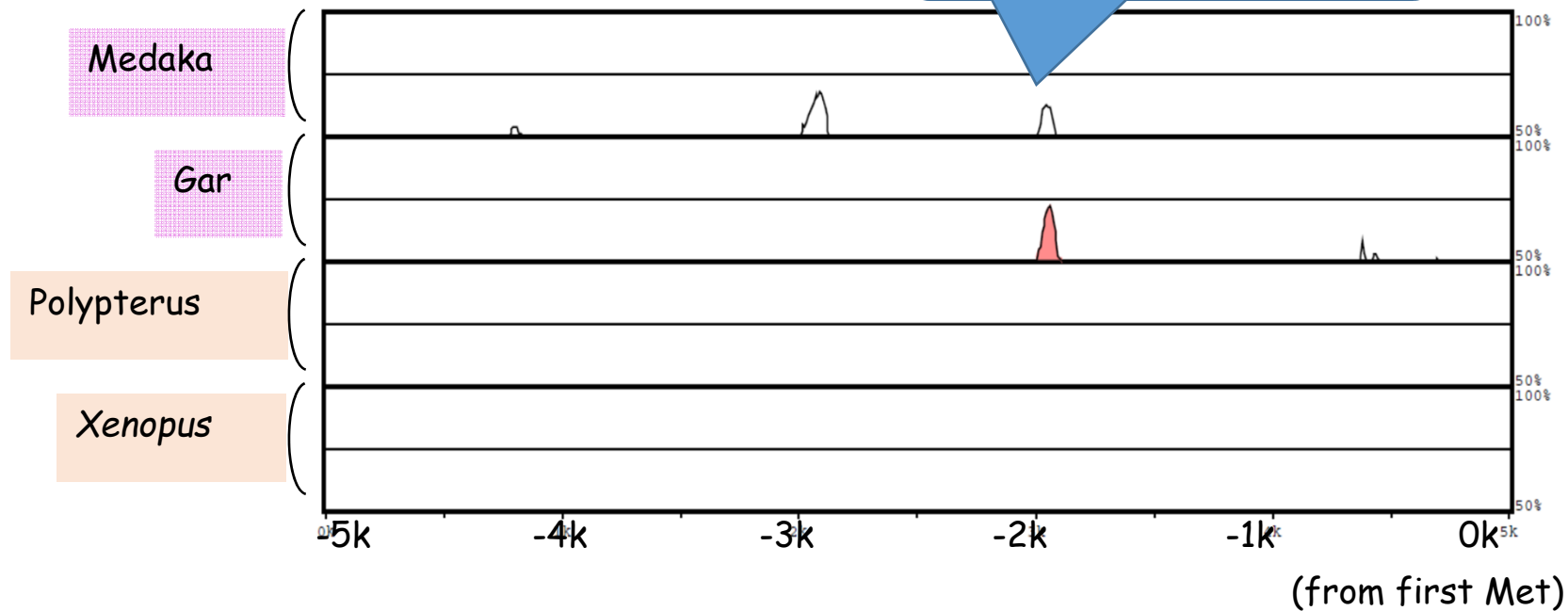
- ・ 上流 promoter/ enhancer 配列の比較
- ・ シンテニー解析

上流ゲノム配列の相同性の確認 (mVISTA:短い相同性を見つける) 共発現種

別発現種

アロワナ *lhβ* 上流 5kbと比較

アロワナの上流にも
存在する配列がマーク

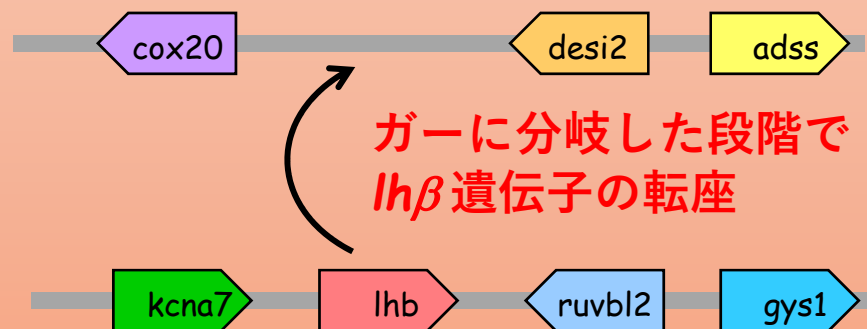
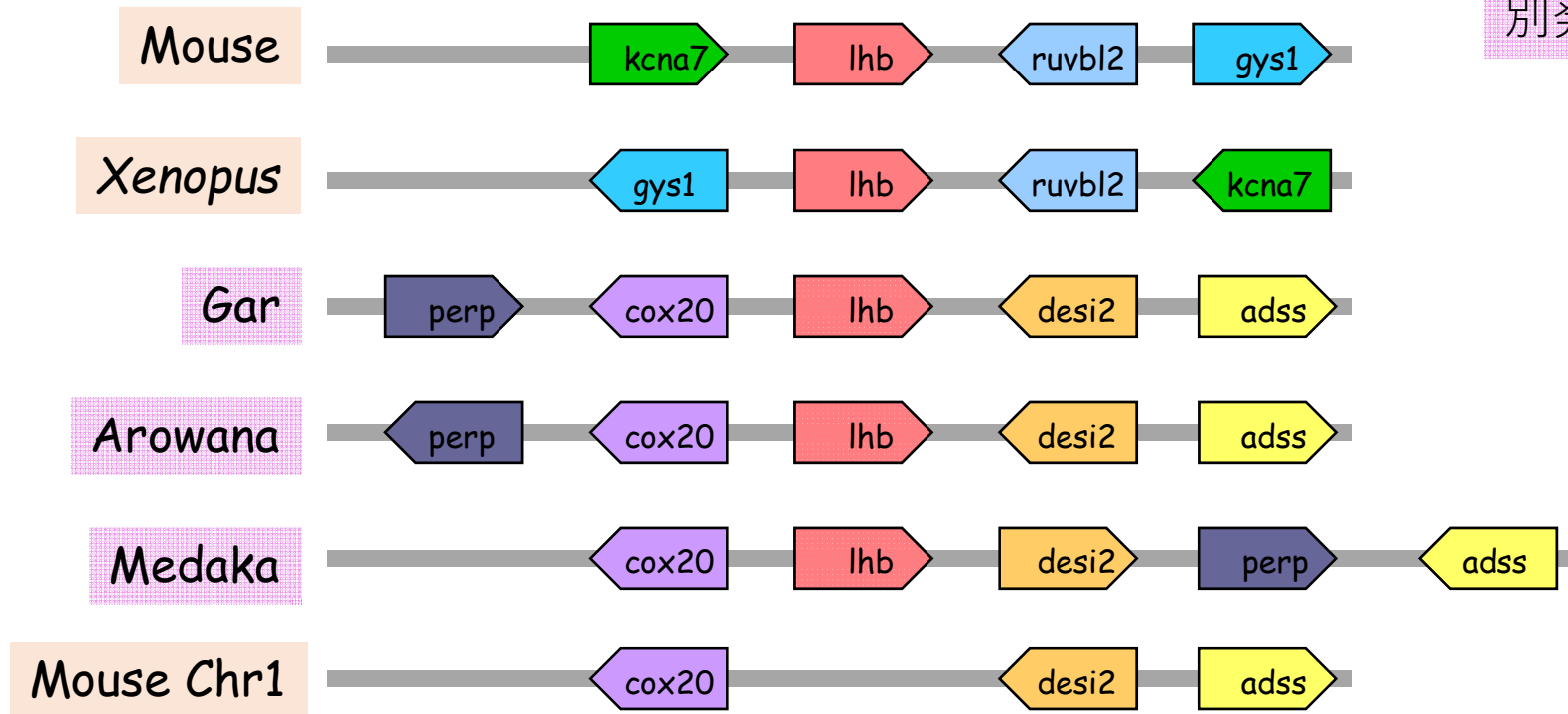


*lhβ*上流配列：ガーは発現も上流配列も真骨魚類寄り

$lh\beta$ シンテニー解析

共発現種

別発現種



ガーに分岐した段階で
 $lh\beta$ 遺伝子の転座

FSH, LHが別細胞で発現する
真骨魚類特有の形質を生み出した

それぞれのエンハンサー活性をメダカを用いて検証

考えたいこと

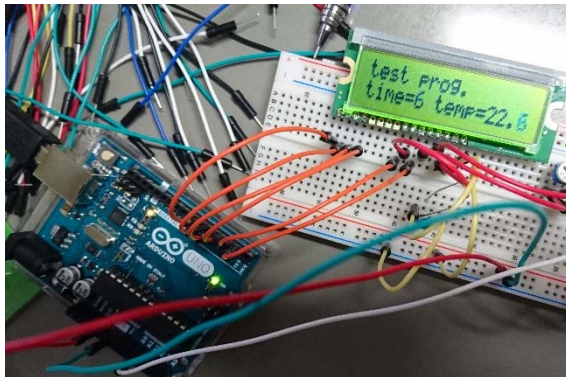
- “原理原則“の理解
- 生物によってホルモンの使い方も異なる
- ホルモンの名前に騙されてはいけない
- それぞれ解析に有利な動物があり、モデルとは違ったアプローチができる
- モデル動物はモデル動物で便利。
- 今までモデル動物にしか使えなかったテクニックをモデルじゃない動物にアプライ？

研究を進めていくこと

- 競争的分野にチャレンジ $\leftrightarrow$ 人のやってないこと
- 力で押す $\leftrightarrow$ できるだけ楽をする
- 自分が決める $\leftrightarrow$ 生物が決める

楽のしかたの一例。 コンピューターで自動化する。

	マイコン	パソコン	ヒト
代表的なもの	Arduino	Raspberry pi	-----
動かし方	スイッチを入れたら組み込んだプログラムが動く	ソフトウェアを走らせる(時刻等)	理屈を理解してもらう
得意	細かい測定、調節(温度センサーなど)	動画を撮ったりもできる、情報処理	既存のシステムの改善
苦手	動画処理、複雑な処理	細かいセンサー(拡張で対応可能)	同じことを同じようにやり続ける、客観的に見る
値段	1,000-3,000	3,000-5,000	?00,000/月

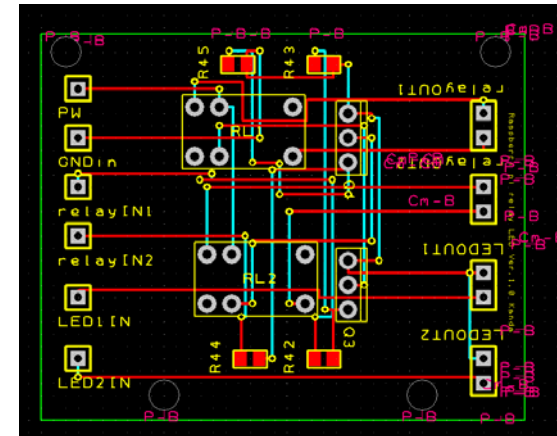


(Raspberry Pi + Pi camera) x 8 = 6.4万

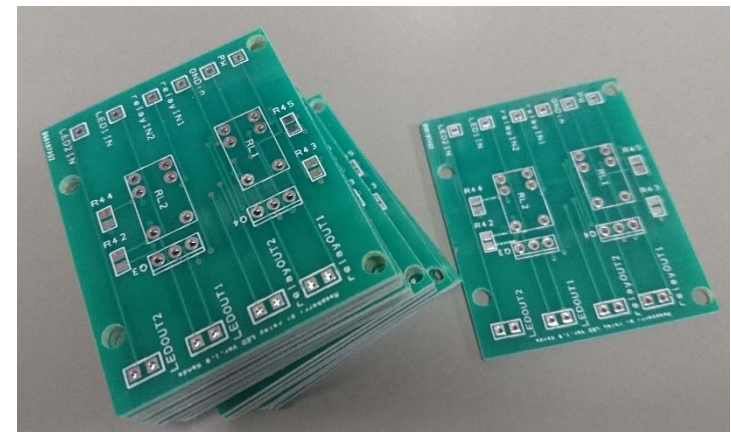


※結局もっとほしくなって28台ある。

リレーを作るボード外注：
(Raspberry piは外部スイッチの起動にちょっと工夫が必要)



1週間後



20枚で¥3464



連動する自動餌やり器

横から覗く

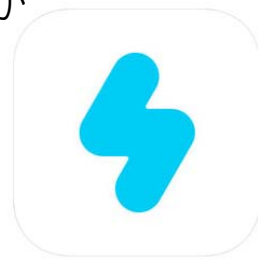


下から覗く

既存ライブラリの利用

- 最近は、いろいろなものがライブラリ化されて、呼び出せば簡単に使えるようになっている

顔認識とか



スノー SNOW - ARカメラ 4+

SNOW INC.

「写真/ビデオ」内6位

★★★★☆ 3.5/23.9K件の評価

無料

iPhoneスクリーンショット



<https://itunes.apple.com/jp/app/%E3%82%B9%E3%83%8E%E3%83%BC-snow-ar%E3%82%AB%E3%83%A1%E3%83%A9/id1022267439?mt=8>