

論文内容の要旨

論文題目 Negative regulation of store-operated Ca^{2+} influx in B lymphocyte
 B 細胞における容量性カルシウム流入の抑制

指導教官 飯野正光 教授

東京大学大学院医学系研究科

機能生物学専攻

平成9年4月進学

橋本彰子

細胞内 Ca^{2+} 濃度は刺激に応じて上昇し、筋収縮、分泌、記憶、発生など生体内の様々な細胞機能を調節する。血球系の細胞では抗原受容体刺激が細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、分化、増殖、細胞死などを引き起こす。酵素活性や転写因子の核移行が細胞内 Ca^{2+} 濃度によって調節されていることから、刺激に応じた細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のパターンが細胞の運命を決める上で重要な役割を果たすと考えられている。

抗原受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出と、細胞外からの Ca^{2+} 流入によって構成されている。これまでの研究から、抗原受容体刺激が主にチロシンキナーゼ系分子を介したホスホリパーゼC (PLC) の活性化によってイノシトール3リン酸 (IP_3) を産生し、小胞体上の IP_3 受容体を活性化して Ca^{2+} 放出を引き起こす機構が明らかにされている。しかし、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の時間的・空間的性質の決定に重要な Ca^{2+} 流入については不明な点が多く残されている。血球系の細胞ではストア内の Ca^{2+} 量が減ったことによって活性化される容量性 Ca^{2+} 流入が主な Ca^{2+} 流入経路であることが知られているが、チャネル分子の実体はまだ明らかでなく、チャネル活性の制御機構についても全容が明らかにされていない。

本研究では、ニワトリ由来培養 B 細胞である DT40 細胞を用い、B 細胞抗原受容体 (BCR) 刺激が容量性 Ca^{2+} 流入を抑制する2種類の機構を明らかにした。

第一章 BCR 刺激による SHIP を介した容量性 Ca^{2+} 流入の抑制

Src homology2 domain containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) は、phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP_3) を基質とする脱リン酸化酵素である。抑制性の受容体である $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ が BCR と共に刺激されたとき、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を短く抑えるためには SHIP が必要であることから、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ を介する抑制性シグナルの担い手として知られてきた。しかし、最近になって SHIP を遺伝的に欠損した細胞では BCR 刺激のみによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が増強されていたことから、SHIP は抑制性受容体刺激の有無に関わらず Ca^{2+} 濃度上昇の抑制をしていることが明らかになった。そこで、本研究では野生型の DT40 細胞と SHIP 欠損細胞の比較を行うことによって BCR 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を SHIP が抑制する機構を明らかにした。細胞内 Ca^{2+} 濃度は細胞質に Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura-2AM を負荷した細胞を CCD カメラでイメージングすることによって単一細胞レベルで測定した。

< Ca^{2+} 放出について> 野生型細胞および SHIP 欠損細胞に抗 IgM 抗体を添加し BCR 刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を比較してみたところ、報告どおり SHIP 欠損細胞における Ca^{2+} 濃度上昇の方が長引いていることが確認された。そこで、SHIP 欠損細胞における Ca^{2+} 濃度上昇の延長が Ca^{2+} 放出に依存するか否かを確かめるため、細胞外の Ca^{2+} を除去して Ca^{2+} 流入が生じないようにした状態で BCR 刺激を行った。すると野生型細胞に比べて SHIP 欠損細胞における Ca^{2+} 濃度上昇の方が長引いていることが観察され、SHIP 欠損細胞で Ca^{2+} 放出が大きくなっていることが観察された。さらに IP_3 結合タンパク質法を用いた IP_3 濃度測定の結果から、BCR 刺激による IP_3 産生が SHIP 欠損細胞の方でより高く長く続いていることが明らかになり、SHIP の存在は IP_3 産生を抑える効果があることがわかった。

< Ca^{2+} 流入について> SHIP の Ca^{2+} 流入への影響を調べるため、まず細胞外 Ca^{2+} を除いた状態で BCR 刺激による Ca^{2+} 放出を起こし、一旦上昇した細胞内 Ca^{2+} が静止状態近くまで戻るのを待ってから、細胞外液に Ca^{2+} を加えて Ca^{2+} 流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を測定した。この方法で測定した結果では野生型細胞よりも SHIP 欠損細胞での Ca^{2+} 流入の方が大きくなっていた。しかし、BCR 刺激によって Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} 放出を起こしているので、 Ca^{2+} ストアの残量に二次的に Ca^{2+} 放出機構による影響が残っている恐れがある。そこで真に容量性 Ca^{2+} 流入機構に違いがあるのかどうかを確認するため、小胞体 Ca^{2+} -ATPase

阻害薬である Thapsigargin (TG)を用いて両細胞の Ca^{2+} ストアを枯渇させてから外液に Ca^{2+} を加える方法で容量性 Ca^{2+} 流入だけを測定した。この方法では野生型細胞と SHIP 欠損細胞での Ca^{2+} 流入の大きさに差は無かったことから Ca^{2+} 流入活性化機構への SHIP の直接の影響はないことが示唆された。これらの結果から、SHIP は BCR 刺激による IP_3 産生を抑制することによって Ca^{2+} 放出を抑制し、その結果 Ca^{2+} ストアの Ca^{2+} 量があまり減らないので二次的に Ca^{2+} 流入を抑制していることが明らかになった。

SHIP の基質である PIP_3 は PLC の活性化に必要であることが報告されている。したがって SHIP が PIP_3 を代謝することによって PLC の活性が抑制され、 IP_3 産生が抑制されたものと考えられる。

第二章 BCR 刺激による Lyn を介した容量性 Ca^{2+} 流入の抑制

これまでに数多くのシグナル伝達に関わる分子が容量性 Ca^{2+} 流入の促進、抑制をすると報告されてきた。しかしそれらの多くは、 Ca^{2+} 放出と区別して評価されていないので真に容量性 Ca^{2+} 流入の変化であるのかわからない。また、拮抗薬を用いて解析した実験では、使われている薬物が必ずしも Ca^{2+} 流入機構のみに作用するとは限らない。たとえば、その薬物が単に膜電位を変化させて Ca^{2+} 流入の電気的な駆動力に変化を与えている可能性など曖昧な点を残している。本研究では、これらの問題点を解決した上で観察される BCR 刺激による容量性 Ca^{2+} 流入の抑制機構を見出した。

< 2種類の抑制機構 > BCR 刺激が Ca^{2+} 放出を介さずに容量性 Ca^{2+} 流入に及ぼす影響を観察するために、TG を用いて Ca^{2+} ストアを枯渇させ、容量性 Ca^{2+} 流入を誘発してから BCR 刺激を行った。この実験から BCR 刺激が容量性 Ca^{2+} 流入を抑制することを発見した。そこで、この BCR 刺激による容量性 Ca^{2+} 流入抑制の電気的な性質を調べるため、膜電位インジケータである $\text{DiSC}_3(5)$ を用いて細胞の膜電位の測定を行った。すると、BCR 刺激を受けた細胞群では 20 mV 程度の脱分極が観察され、BCR 刺激が細胞膜の脱分極を介して Ca^{2+} 流入を抑制していることがわかった。次に膜電位に依存しない影響があるかどうか確認するため、 K^+ イオノホアである Valinomycin (Val)を用いて膜電位を固定した状態で BCR 刺激を行ったところ、この条件下でも容量性 Ca^{2+} 流入は BCR 刺激によって抑制された。これらの結果から、BCR 刺激は 1) 細胞膜の脱分極による Ca^{2+}

流入の抑制(脱分極依存性抑制)と2) 膜電位には依存しない Ca^{2+} 流入の抑制(脱分極非依存性抑制)を同時に起こしていることがわかった。

< Ca^{2+} 流入抑制に関わる分子> BCR 刺激による容量性 Ca^{2+} 流入抑制に関わる分子を検索するため、細胞内 Ca^{2+} 動員に関わる分子である Lyn, Syk, Btk, SHIP をそれぞれ遺伝的に欠損した細胞を用い、野生型細胞について行った上記と同様の実験を行った。その結果、Syk, Btk, SHIP 欠損細胞では野生型細胞と同じように抑制が見られたが、Lyn 欠損細胞では抑制が見られなかったことから Lyn が BCR 刺激による Ca^{2+} 流入抑制に関与していることが明らかになった。また、Syk, Btk は IP_3 産生経路で必須な分子であり、SHIP も IP_3 産生を調節する分子であることから、ここで問題にしている BCR 刺激による容量性 Ca^{2+} 流入抑制には IP_3 産生は関係していないことが示唆された。

続いて Lyn が Ca^{2+} 流入の脱分極依存性抑制と脱分極非依存性抑制にどのように関与しているかを調べた。Lyn 欠損細胞の BCR 刺激による膜電位変化を測定したところ、野生型細胞に比べて小さく変化速度が遅い脱分極が観察され、Lyn が脱分極に関わっていることが示された。また、脱分極非依存性抑制への Lyn の影響を調べるため、Val 処理をした Lyn 欠損細胞について野生型細胞と同様の実験を行ったところ、Lyn 欠損細胞では容量性 Ca^{2+} 流入の抑制がみられなかった。以上の結果から Lyn は、BCR 刺激による脱分極非依存性抑制に必要であることが明らかになった。

結語

従来 BCR 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対して抑制をかける機構が存在することが知られており、それには $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ などの抑制性受容体を同時に刺激する必要があると考えられていた。これに対して、本研究は BCR 刺激が、自身の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対して自己抑制をかける機構を初めて明らかにした。この機構には2通りあり、第一の機構は、BCR 刺激が SHIP を介して IP_3 産生を抑制してストアからの Ca^{2+} 放出を抑制すると同時に、二次的に容量性 Ca^{2+} 流入を抑制するものである。第二の機構は、BCR 刺激が脱分極を起こして Ca^{2+} 流入の駆動力を減少させるとともに、Lyn を介して容量性 Ca^{2+} 流入機構に直接的に抑制をかけるものである。このようなフィードバック機構により、BCR 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は精密にコントロールされていることが明らかになった。