

論文の内容の要旨

論文題目 イノシトール3リン酸受容体の分子生物学的解析

氏名 杉山友康

細胞内 Ca^{2+} は、細胞の機能を制御する第二メッセンジャーとして重要な物質で、その濃度を制御するイノシトール 1,4,5-三リン (IP_3) 酸受容体に着目した研究が進められている。これまでにマウスの IP_3 受容体の cDNA 構造が明らかになり、さらにヒトを含めて他の動物種からも cDNA がクローン化され、動物種間で配列が良く保存されていることがわかってきた。さらに、ヒトや齧歯類では3つのサブタイプが存在することが明らかとなってきた。 IP_3 受容体の関与する細胞内 Ca^{2+} 情報伝達は、様々な組織由来の細胞において知られているが、サブタイプのレベルでの分子機構はほとんどわかっていない。本研究では IP_3 受容体サブタイプの発現を、核酸とタンパク質レベルから検討し、細胞・組織特異的な発現パターン、細胞内局在性、相互作用するタンパク質および生理的条件下での発現変化と Ca^{2+} シグナルへの影響に関する新しい知見を得たもので、以下の7章により構成されている。

第1章は緒論であり、 IP_3 受容体に関する構造とその発現解析、そして生物活性などに関する研究について既往の知見をまとめ、本研究を行うに至った動機を述べるとともに目的および意義を明らかにした。

第2章ではヒト血球系細胞での IP_3 受容体サブタイプの発現を核酸レベルで解析した。血球系細胞として種々のリンパ球系細胞株と骨髄球系細胞株を培養した。3つの IP_3 受容体サブタイプの発現を、ノーザンブロット解析やドットブロット解析するための特異的なプローブを作製して解析した結果、細胞の種類によって発現する IP_3

受容体サブタイプの mRNA が異なることが示された。さらに骨髓球系の細胞株を種々の薬剤存在下で培養して、単球/マクロファージ系の細胞、顆粒球系の細胞、巨核球系の細胞および赤芽球系の細胞に分化誘導し、分化誘導前の細胞および分化誘導させた細胞の発現する IP₃ 受容体サブタイプを解析した結果、分化誘導前の細胞と分化誘導させた細胞では、発現するサブタイプが異なっていた。また分化誘導による IP₃ 受容体サブタイプの発現は、分化誘導刺激後の早い時期に変化していた。したがって IP₃ 受容体サブタイプは、転写レベルで発現が制御されていて、細胞によっては複数種類のサブタイプを発現し、さらに細胞分化誘導によってその発現が動的に変化することが考えられた。これらの結果は、細胞応答における IP₃ 受容体サブタイプの役割が異なる可能性を示唆した。

第3章では、IP₃ 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 のそれぞれのタンパク質に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を作製して、血球系細胞で発現する IP₃ 受容体サブタイプのタンパク質を解析した。抗体を作製するための抗原としては、IP₃ 受容体サブタイプのアミノ酸配列を持つペプチドを使用した。各 IP₃ 受容体サブタイプに特異的なアミノ酸配列としては、IP₃ 受容体の第 5 と第 6 膜貫通領域に挟まれるループ領域、およびカルボキシル末端領域の配列を選択した。これらのペプチドを抗原にして免疫したマウス脾臓細胞を用いて、各ペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製した。IP₃ 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 のカルボキシル末端のアミノ酸配列に対するモノクローナル抗体は、それぞれ 1、6、7 クローン取得した。第 5 と第 6 膜貫通領域に挟まれるループ領域のアミノ酸配列に対するモノクローナル抗体については、IP₃ 受容体タイプ 3 に対して 5 クローン取得した。これらの抗体の中から、IP₃ 受容体サブタイプのそれぞれ特異的な検出と解析用に、カルボキシル末端のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体のセット（タイプ 1 特異的抗体：KM1112、タイプ 2 特異的抗体：KM1083、タイプ 3 特異的抗体：KM1082）を選択した。炎症性の血球系細胞での IP₃ 受容体サブタイプのタンパク質の発現を、作製したモノクローナル抗体を用いて検討した結果、細胞によって発現するサブタイプのセットが異なることを見いだした。さらに IP₃ 受容体タイプ 1、2 を発現する細胞株での、サブタイプのタンパク質の細胞内局在を検討した結果、分布に違いがあることを見いだした。作製したモノクローナル抗体は、ウエスタンブロッティング解析、免疫沈降、免疫組織・細胞染色に使用可能な抗体であり、IP₃ 受容体サブタイプをタンパク質レベルで解析するツールとして非常に有用と考えられた。

第4章では、モノクローナル抗体（KM1112、KM1083、KM1082）を、IP₃ 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 の免疫組織化学解析に応用して、タンパク質レベルでのサ

ブタイプの組織・細胞発現を解析した。気道上皮細胞における IP_3 受容体サブタイプの発現を、モノクローナル抗体 KM1112、KM1083、KM1082 を用いて解析した。気管での IP_3 受容体サブタイプの発現をウエスタンブロッティング解析で検討した結果、約 250 kDa の分子量としてタイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 の特異的なバンドが検出した。したがって気管には 3 つの IP_3 受容体サブタイプが発現していると考えられた。気管から細気管支に至る組織での IP_3 受容体サブタイプの発現を、免疫組織化学的解析した結果、気管ではタイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 が気管上皮細胞に特異的に発現していて、しかも様々な種類の上皮細胞の中で、線毛細胞だけに特異的に発現していた。詳細に見ると細胞内分布が異なっていて、 IP_3 受容体タイプ 1 は線毛に隣接した細胞膜に面する細胞質に、薄い層の様に限定的に局在していた。タイプ 2 は細胞質全体的に分散しており、タイプ 3 は細胞の核上部の気道側に面した細胞質に分散していた。細気管支では、 IP_3 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 は気管の場合と同様に、細気管支上皮細胞に特異的に発現することを示した。ただし気管と違って IP_3 受容体タイプ 3 は線毛細胞のみならずクララ細胞にも発現していることを見いだした。 IP_3 受容体サブタイプは組織・細胞での発現や細胞内分布が特異的に制御されていて、細胞内 Ca^{2+} の制御にサブタイプの違いが役割を果たしていると考えられた。また、モノクローナル抗体 KM1083 は気管上皮細胞の線毛細胞を特異的かつ効率的に検出した。したがって IP_3 受容体タイプ 2 は、気管から細気管支に至る組織の気道上皮に存在する線毛細胞の特異的マーカーとしても利用可能であると考えられた。

第 5 章では、血管平滑筋細胞における IP_3 受容体サブタイプの細胞内分布を詳細に解析し、サブタイプとアソシエーションする細胞骨格タンパク質を解析した。血管平滑筋細胞はラットの動脈から単離して初代培養した。 IP_3 受容体サブタイプの細胞内分布を比較検討するために、モノクローナル抗体の IgG アイソタイプが異なることに着目して、二次抗体に IgG アイソタイプ特異的な標識抗体を用いた蛍光抗体二重染色法を考案して、サブタイプの分布を比較した。その結果、 IP_3 受容体サブタイプによって分布が異なり、細胞内の部位によってサブタイプの存在比が異なることがわかった。 IP_3 受容体は 4 量体として 1 つの Ca^{2+} チャンネルを作り、しかもヘテロ 4 量体構造を形成することが知られている。サブタイプの存在比の違いが、ヘテロ 4 量体におけるサブタイプの構成比に影響する可能性が考えられた。また IP_3 受容体サブタイプの組み合わせによって、極めて多様な IP_3 受容体 Ca^{2+} チャンネルが形成する可能性が考えられた。 IP_3 受容体サブタイプによって特性が異なることが考えられるので、この多様性が細胞内 Ca^{2+} 濃度増加のパターン形成に影響している可能性が考えられた。次に IP_3 受容体とアクチンフィラメントの蛍光二重染色を検討した結果、タイプ 2 とタイプ 3 はアクチンフ

フィラメントと共局在し、タイプ2はアクチンフィラメントの端に存在することを見いだした。アクチンフィラメントの端は細胞接着に関係する焦点接着であることから、IP₃受容体タイプ2のパッチ状の分布が焦点接着である可能性を検討した。焦点接着特異的なタンパク質であるテーリンとIP₃受容体タイプ2の蛍光抗体二重染色を検討した結果、タイプ2の分布がテーリンと一致していた。さらにIP₃受容体サブタイプと焦点接着に存在する細胞骨格タンパク質とのアソシエーションを免疫沈降法で検討した結果、IP₃受容体サブタイプはテーリン、ピンキュリン、 α アクチンとアソシエーションする事を見いだした。これらの結果から、IP₃受容体サブタイプは細胞骨格と密接な関係があり、細胞骨格の制御を介して細胞接着や増殖に影響する可能性が考えられた。

第6章では、平滑筋細胞における細胞増殖の、血管作動性物質の細胞内Ca²⁺濃度増加に及ぼす影響とIP₃受容体サブタイプの発現を解析した。最初に、細胞内Ca²⁺濃度の変化を評価するためのツールとして、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子トランスジェニックマウスから新しい血管平滑筋細胞株SVSCを樹立した。SVSCは平滑筋型ミオシン重鎖と平滑筋型 α アクチンを発現していて、血管の中膜の平滑筋細胞に似た細胞である。SVSCの血管作動性物質に対する応答性を解析した結果、はアンジオテンシンII、ノルアドレナリン、エンドセリン1、バソプレッシン、セロトニン、カルバコール、ATPや高濃度カリウムイオンといった種々の血管作動性物質に反応して細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた。SVSCの細胞増殖性を培養温度によって抑制した結果、ノルアドレナリンとエンドセリン1の刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度の増加が促進された。しかし、アンジオテンシンIIの刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度の増加は、細胞増殖性の有無に関わらず一定の増加を示した。一方、細胞増殖性を抑制した細胞でのIP₃受容体サブタイプの発現をウエスタンブロット解析した結果、IP₃受容体タイプ1とタイプ2の発現が増加していた。しかしタイプ3の発現は逆に減少していた。これらの結果は、細胞の増殖性がIP₃受容体サブタイプの発現に影響をあたえ、その変化が、血管作動性物質による細胞内Ca²⁺濃度の増加に影響していると考えられた。

第7章では、本研究で得られたIP₃受容体サブタイプに関する成果をまとめ、その意義について述べた。