

審査の結果の要旨

論文提出者名 杉山友康

イノシトール1, 4, 5-三リン (IP₃) 酸受容体は、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Ca²⁺濃度を制御している。これまでにマウス、ヒトなどからcDNAがクローン化され、3つのサブタイプが存在することが明らかになっている。様々な組織由来の細胞において、IP₃受容体の関与する細胞内Ca²⁺情報伝達が知られているが、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。本研究はIP₃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Ca²⁺シグナルへの影響に関する新しい知見を得たもので、7章により構成されている。

第1章は緒論であり、IP₃受容体に関する構造とその発現解析、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、目的および意義を明らかにしている。

第2章ではヒト血球系細胞でのIP₃受容体サブタイプの発現を核酸レベルで解析している。種々のリンパ球系細胞株と骨髄球系細胞株を培養し、3つのIP₃受容体サブタイプの発現を、ノーザンブロットティングなどにより解析した結果、細胞の種類によって異なるIP₃受容体サブタイプのmRNAが発現することを見いだしている。さらに骨髄球系の細胞株を異なる種類の細胞に分化誘導し、その前後のIP₃受容体サブタイプの発現を解析した結果、分化誘導前後で発現するサブタイプが異なり、その発現は誘導刺激後すぐに変化したと述べている。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と述べている。これらの結果から、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があるかと述べている。

第3章では、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3のそれぞれに対して特異的な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受容体サブタイプを解析している。抗原として、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持つペプチドを選択している。これらのペプチドで免疫したマウス脾臓細胞を用いて、モノクローナル抗体を作製し、これを用いて炎症性の血球系細胞でのIP₃受容体サブタイプの発現を検討した結果、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ている。作製したモノクローナル抗体は、ウエスタンブロットティング解析、免疫沈降、免疫組織・細胞染色に使用可能であり、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であると述べている。

第4章では、第3章で作製したモノクローナル抗体を、免疫組織化学解析に応用して、タンパク質レベルでの3つのサブタイプの組織・細胞発現を解析している。ウエスタンブロットティング解析により、気管では気道上皮細胞に3つのIP₃受容体サブタイプが発現していることを確認し、免疫組織化学的解析の結果、気管から細気管支に至る組織では3つのサブタイプの細胞内分布が異なることを見いだしている。また、細気管支でも同じく3つのタイプが発現しているが、気管と異なりIP₃受容体タイプ3が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ている。それらの結果からIP₃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Ca²⁺の制御に関係していると考察している。

第5章では、血管平滑筋細胞におけるIP₃受容体サブタイプの細胞内分布を詳細に解析し、サブタイプと相互作用する細胞骨格タンパク質を解析している。IP₃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を蛍光抗体二重染色法により明らかにしている。IP₃受容体は4量体として1つのCa²⁺チャンネルを作り、ヘテロ4量体もあり得るが、異なるIP₃受容体サブタイプの組み合わせによって、多様なIP₃受容体Ca²⁺チャンネルが形成され、細胞内Ca²⁺濃度増加のパターン形成に影響を与えている可能性があるとして述べている。

次に蛍光二重染色法により、焦点接着に関係するアクチンフィラメントやテーリンとIP₃受容体タイプ2の分布が一致することを見いだしている。さらに免疫沈降法で、IP₃受容体サブタイプはテーリン、ビンキュリン、 α アクチンなどの細胞骨格タンパク質と結合する事を見いだしている。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、その制御を介して細胞接着や増殖に影響する可能性があるとして述べている。

第6章では、平滑筋細胞における細胞増殖における、血管作動性物質が細胞内Ca²⁺濃度増加に及ぼす影響とIP₃受容体サブタイプの発現との関係を解析している。温度により細胞増殖性が変化する新しい血管平滑筋細胞株SVSCを樹立し、その血管作動性物質に対する応答性を解析した結果、種々の血管作動性物質に応答して細胞内Ca²⁺濃度が上昇したと述べている。SVSCの細胞増殖性を培養温度によって抑制した結果、血管作動性物質の種類により、細胞内Ca²⁺濃度の増加の促進・抑制が異なると述べている。一方、ウエスタンブロット解析したところ、IP₃受容体サブタイプの発現も、タイプによって変化したと述べている。これらの結果から、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察している。

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ている。

以上本論文は、これまでほとんど不明だったIP₃受容体サブタイプの発現や機能を、抗体作製を行うことにより、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Ca²⁺シグナルへの影響に関して分子生物学的に解析し、新しい知見を得ている。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。