

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Decoding of Ca²⁺ oscillation by NFAT

和訳 NFAT によるカルシウムオシレーションのデコーディング機構

指導教官 飯野正光教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月進学

医学博士過程

機能生物学専攻

氏名 富田太一郎

細胞内カルシウムは生体内で多様な生理現象を制御するセカンドメッセンジャーとして働く。細胞内カルシウム濃度は時間的・空間的に多様な変動パターンを示し、そのパターンに依存して細胞分化、増殖、収縮、分泌、遺伝子発現などの多様な細胞機能が制御されている。カルシウムオシレーションは典型的なカルシウム濃度上昇パターンの一つであるが、近年、カルシウムオシレーションの頻度に依存して活性化される転写因子や、発現する遺伝子セットが変わるという現象が報告された。カルシウムオシレーションによる遺伝子発現制御は、特に免疫系、循環器系、中枢神経系などで重要視されているものの、カルシウムシグナルのパターンを認識して遺伝子転写制御を行う分子機構は未だ解明されていない。

本論文では、転写因子 NFAT を介する遺伝子発現がカルシウムオシレーションの頻度依存的に活性化されることに着目し、NFAT がカルシウムオシレーションシグナルを認識して遺伝子発現を引き起こす分子機構を明らかにすることを目的とした。

<背景> NFAT は、T 細胞活性化に重要な IL-2 の発現を引き起こす転写因子として発見された。現在までに NFAT1~5 のサブタイプが報告されており、これらは免疫系のみならず、循環器系、中枢神経系など生体の広範囲に発現している。このうち、NFAT1~4 がカルシウム依存的に活性化され、遺伝子転写を引き起こす。カルシウム濃度依存的に活性化される NFAT は、その分子内に核移行シグナルをもつ。この核移行シグナルは NFAT のリン酸化状態によって活性が制御されていると考えられており、細胞内カルシウム濃度が低い静止時に

は NFAT は不活性化リン酸化型として細胞質に存在する。カルシウム濃度上昇に伴い、カルシウム依存性の脱リン酸化酵素カルシニューリンによって脱リン酸化を受けると、この核移行シグナルが活性化され、NFAT は核内へと移行して遺伝子転写を引き起こす。そして、カルシウム濃度が下がると NFAT は再びリン酸化されて核外へと排出される。

転写因子の活性化を測定する方法としては、従来レポーター遺伝子等を用いた実験系がよく使われている。しかしながら、従来の方法は最終的な遺伝子転写産物の発現を定量する系であるため、カルシウム濃度上昇に対する転写因子の応答をリアルタイムで評価することはできなかった。また、アゴニスト刺激に伴う細胞質へのカルシウム動員経路として、細胞膜上のチャネルを介したカルシウム流入と細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出が知られているが、これらは複雑なシグナル伝達経路により制御されているため、カルシウム濃度上昇パターンを人為的に厳密に制御することは難しい。それゆえ、カルシウム濃度上昇パターンによる細胞機能制御機構を定量的に解析することは困難であった。

<本文> 本研究では細胞内カルシウムと GFP との同時イメージングの手法に細胞内カルシウム濃度制御法を組み合わせることによって、従来困難であったカルシウム依存的な転写因子の活性化をリアルタイムに観察する実験系を作成し、これを用いてカルシウムオシレーションによる NFAT 核移行の分子制御機構を解析した。

1. カルシウム依存的な NFAT 核移行動態の解析

カルシウム上昇に対する NFAT の応答性を解析するために、NFAT を蛍光タンパク GFP との融合タンパク質として細胞に発現させ、さらに、カルシウム蛍光指示薬を用いて同時にカルシウム濃度を測定し、カルシウム濃度上昇依存的な NFAT 動態をリアルタイムに観察する実験系を構築した。また、細胞内カルシウム濃度は、カルシウムストア作動性カルシウム流入機構を活性化させた状態で、細胞外カルシウム濃度を調節することにより制御した。

カルシウム依存的な NFAT の活性化は、その核移行を定量することにより解析した。GFP-NFAT は静止時には細胞質にのみ存在していたが、カルシウム濃度上昇により核内へと移行し、またカルシウム濃度が下がると再び核外へと排出された。この時間経過を解析すると、NFAT の核内移行はカルシウム濃度変

化に比べて遅れて始まり、またその核移行速度も非常に遅かった。そのため、NFAT 核移行のピーク値は、カルシウム濃度上昇の持続時間に依存して増大した。

非常に興味深いことに、2～3分程度の短時間のカルシウム濃度上昇を惹起させた場合には、NFAT はカルシウム濃度が下がってからも核移行を続けるという現象が観察された。このことは、NFAT が「カルシウム濃度が上昇した」という情報を何らかの形で一時的に記憶できることを示している。

2. NFAT 脱リン酸化と核移行

NFAT はカルシニューリンによる脱リン酸化を受けて核内へと移行する。そこで、カルシウム濃度上昇に伴う NFAT 脱リン酸化の時間経過を、生化学的手法を用いて解析した。すると、カルシウム濃度上昇の後、NFAT の脱リン酸化は数分以内に速やかに生じるのに対し、その後の核内移行は著明に遅れることがわかった。つまり、細胞内カルシウム濃度が上昇すると、まず細胞質に活性化型 NFAT がいったん蓄積し、それが徐々に核内へと移行するという機構が明らかになった。このとき、カルシウム濃度が静止時レベルに下がってからも NFAT はしばらく脱リン酸化型のまま細胞質に維持されていた。つまり、NFAT は「カルシウム濃度が上昇した」という情報を細胞質内脱リン酸化 NFAT の蓄積という形で記憶し、これがいわば「working memory」として機能することが明らかになった。

3. モデルによるカルシウム依存的 NFAT 核移行の解析

任意のカルシウム濃度上昇パターンによる NFAT の活性化状態を定量的に解析するために、1. および 2. で得られた結果に基づいてこの系のモデル化を試みた。NFAT は、細胞質内リン酸化型（不活性型）、細胞質内脱リン酸化型（活性型）、および核内型の三状態のいずれかであると仮定する最も単純なモデルを立てた。各状態間の遷移速度定数は、イメージングで測定した GFP-NFAT 核移行の時間経過データを基に決定した。モデルから予測された NFAT 核移行の時間経過は、イメージングで得られた実測値と良く一致していた。さらに、このモデルを用いて細胞質内脱リン酸化型（活性型）の時間経過を予想すると、これは 2. で行ったリン酸化測定実験の結果にも良く一致し、カルシウム依存的な NFAT 活性化動態を非常に良く再現していた。

そこで、このモデルを用いて頻度の異なるカルシウムオシレーションによる NFAT 活性化動態を予測した。その結果、高頻度カルシウムオシレーションでは、細胞質でいったん脱リン酸化された NFAT が、再リン酸化および核移行によって消失する前に次のカルシウム刺激を受けるために、細胞質に脱リン酸化型 NFAT が蓄積して常に高濃度に保たれており、それゆえ NFAT が核内へと移行することが示された。一方、低頻度カルシウムオシレーションでは、細胞質脱リン酸化型 NFAT は蓄積せず、そのため核にはほとんど移行しなかった。つまり、「working memory」が存在する間は、カルシウム濃度が下がっていても核移行を続けられるために、「working memory」が維持される頻度であれば、カルシウムオシレーションによっても NFAT は核内に移行することが予測された。

4. カルシウムオシレーションによる NFAT の核移行

実際に GFP-NFAT を発現する細胞を用いてカルシウムオシレーション刺激を行い、シミュレーション結果を検証した。その結果、予測と一致してオシレーション頻度依存的に NFAT は核内に移行した。つまり、NFAT がカルシウムオシレーションの頻度をその核移行レベルへと変換していることが、初めて直接的に明らかになった。定常状態での核移行レベルは、定量的にもシミュレーションの結果と非常に良く一致していた。

このとき、カルシウムオシレーションと持続的なカルシウム上昇の間でシグナル伝達効率を比較すると、カルシウムオシレーションのほうが効率良く NFAT 核移行を引き起こすことが明らかになった。つまり、「working memory」である脱リン酸化型 NFAT が細胞質に残っている間はカルシウム濃度が下がっていても核移行するため、非常に短い時間のカルシウム上昇によっても、適切な頻度のオシレーションでうまく「working memory」を使えば十分に核移行することができ、その結果として、持続的なカルシウム濃度上昇よりもオシレーションのほうがカルシウムシグナルの伝達効率が増大すると考えられた。

<結語>本研究により、NFAT がカルシウムシグナルをそのリン酸化状態の変化として記憶しながら核移行するという分子機構が明らかになった。この「working memory」の機構によって、NFAT はカルシウムオシレーションの頻度依存的に核移行し、さらにカルシウムオシレーションのシグナルが効率良く核内 NFAT 濃度へと変換されることが明らかになった。