

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 富田太一郎

本研究では、転写因子 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ため、細胞内カルシウムと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 制御の分子機構の解析を試み、下記の結果を得ている。

1. GFP-NFAT を発現させた BHK 細胞を用いて、細胞内カルシウムとカルシウム依存的な NFAT の核移行を同時にイメージングした結果、NFAT の核移行はカルシウム濃度変化に遅れて始まり、またその速度も非常に遅いことが示された。また、短時間のカルシウム濃度上昇時には、NFAT は細胞内カルシウム濃度が静止時のレベルに戻った後もしばらく引き続いて核内に移行し続けることが示された。

2. カルシウム濃度上昇に伴う NFAT 脱リン酸化と核移行の時間経過を生化学的手法を用いて解析すると、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示された。この結果より、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。また、途中でカルシウムを除去すると、この細胞質-脱リン酸化型は半減期約 7 分程度で消失することが示された。

3. NFAT 核移行の時間経過を基に、カルシウム依存的な NFAT の脱リン酸化と核移行を定量的に予測するモデルを構築し、シミュレーション実験によってカルシウムオシレーション時の NFAT の脱リン酸化および核移行を解析した。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 が再リン酸化あるいは核移行で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、それ故、核内 NFAT が高くなることが示された。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い。したがって、NFAT はカルシウムオシレーションの頻度依存的に核内に移行することが予測された。

4. GFP-NFAT を発現する細胞に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ところ、予測と一致して、カルシウムオシレーションのシグナルは、その頻度依存的に核内 NFAT 濃度へと変換されることが示された。

5. 単位時間あたりのカルシウム濃度上昇が NFAT 核移行を引き起こす効率をオシレーションの場合と持続的なカルシウム上昇の場合で比較したところ、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示された。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、適切な頻度であればオシレーションによっても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增大すると考えられた。

6. Jurkat T 細胞にカルシウム濃度上昇刺激を行い、内在性の NFAT の脱リン酸化、および核移行の時間経過を解析した結果、脱リン酸化は速く、一方、核移行は非常に遅いことが示された。従って、GFP-NFAT を発現させた細胞で観察された細胞質-脱リン酸化型の蓄積は内在性 NFAT の性質を反映したものであると考えられた。

以上、本研究により、NFAT は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り、さらに、この機構によって NFAT がカルシウムオシレーションの頻度依存的に核移行すること、また、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を示した。本研究は、これまでほとんど未知に等しかったカルシウムオシレーションによる遺伝子発現制御の分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。