

論文の内容の要旨

論文題目

Ca²⁺-sensor region of IP₃ receptor and its significance for intracellular Ca²⁺ signaling

IP₃受容体のCa²⁺センサー部位の同定と細胞内Ca²⁺シグナル形成への影響

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月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 水島亜希子

イノシトール三リン酸(IP₃)を介する細胞内Ca²⁺シグナル制御は、分泌、収縮、転写、シナプス可塑性など極めて多彩で重要な細胞機能を制御している。細胞外からの刺激によるIP₃産生に続くIP₃受容体を介したCa²⁺放出は、細胞内Ca²⁺シグナル形成において中心的な役割を果たす。IP₃受容体を介するCa²⁺シグナルはしばしばCa²⁺オシレーションやCa²⁺ウェーブなどのダイナミックな時間的・空間的パターンを形成し、これこそが細胞機能制御に重要である。

IP₃受容体の活性化にはIP₃だけでなくCa²⁺が必要であり、Ca²⁺を介したIP₃受容体のフィードバック制御がCa²⁺シグナル形成におけるひとつの要因とされる。本論文では、細胞内Ca²⁺シグナル形成の分子基盤となるIP₃受容体の機能制御機構を解明することを目的とした。まずラット1型IP₃受容体に種々の点突然変異を導入することによりIP₃受容体のCa²⁺感受性を決定する部位をE2100に同定し、IP₃受容体のCa²⁺感受性が細胞内Ca²⁺シグナルパターンの決定に必要不可欠であることを示した。さらに、サブユニットのCa²⁺感受性の変化が、ヘテロ4量体IP₃受容体のCa²⁺放出活性に対しドミナント・ネガティブ的に作用することを明らかにした。

1. IP₃受容体の Ca²⁺センサー部位の同定

IP₃受容体は細胞内 Ca²⁺ストア膜上に存在する Ca²⁺放出チャネルであり、IP₃が結合するとストアからの Ca²⁺放出を起こす。IP₃受容体を介した Ca²⁺放出は、IP₃以外に Ca²⁺によっても制御を受ける。すなわち IP₃受容体から放出された Ca²⁺によって、IP₃受容体自身の Ca²⁺放出活性が変化する。このフィードバック機構は、Ca²⁺オシレーションや Ca²⁺ウェーブに代表されるような時間的・空間的な変化を持つ細胞内 Ca²⁺シグナルの形成において、極めて重要であると考えられている。従って IP₃受容体の Ca²⁺感受機構を明らかにすることは細胞内 Ca²⁺シグナルの形成機構の解明に必須である。本研究では、IP₃受容体の Ca²⁺感受部位を同定し、Ca²⁺感受性が細胞内 Ca²⁺シグナルパターンに与える影響について解析を行った。

IP₃受容体と同じ細胞内 Ca²⁺放出チャネルファミリーであるリアノジン受容体については、かつてから Ca²⁺感受性について研究されており、Ca²⁺誘発性 Ca²⁺放出機構がよく知られている。リアノジン受容体と IP₃受容体はアミノ酸配列の相同性が高く、リアノジン受容体の Ca²⁺感受部位に相当するアミノ酸が IP₃受容体にも保存されている。そこで本研究ではラット 1 型 IP₃受容体を用い、リアノジン受容体の Ca²⁺感受部位に相当する 2100 番目のグルタミン酸に点突然変異を導入した変異体を作製した。変異 IP₃受容体の解析は、DT40 ニワトリ B 細胞の内在性 IP₃受容体完全欠損株に対して変異ラット IP₃受容体を発現させた細胞で行った。

まず脱膜化細胞を用いて小胞体内腔の Ca²⁺濃度を測定することにより、変異 IP₃受容体の Ca²⁺放出活性を評価した。その結果、2100 番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に変異させた変異体(E2100D)において、Ca²⁺感受性が野生型に比べて 1/10 倍に低下することが明らかになった。一方で、IP₃や ATP に対する感受性には変化がなく、また Ca²⁺放出の最高速度についても差は認められなかった。すなわち、E2100D 変異体は Ca²⁺感受性のみが変化していることが確認され、IP₃受容体の 2100 番目のグルタミン酸が Ca²⁺感受部位と同定された。

次に、野生型 IP₃受容体発現 DT40 細胞と E2100D 発現 DT40 細胞に対し B 細胞受容体刺激を行い、細胞内 Ca²⁺シグナルパターンを比較した。野生型 IP₃受容体の場合、細胞を刺激するとまず一過性の Ca²⁺濃度上昇が起こり、その Ca²⁺オシレーションが起こり数十分にわたり持続する。ところが E2100D 発現 DT40 細胞では、まず最初に見られる一過性の Ca²⁺濃度上昇に変化が見られ、ピーク値・上昇速度が共に低下していた。そして、さらにそれに続く Ca²⁺オシレーションについては、完全に消失することが明らかになった。この結果は、IP₃受容体の Ca²⁺感受性の変化が細胞内 Ca²⁺オシレーショ

ン形成に与える影響を明確な形で示した最初の例である。

さらに 2100 番目のグルタミン酸をアラニンに変異させた変異体(E2100A)と 2100 番目のグルタミン酸をグルタミンに変異させた変異体(E2100Q)についても E2100D 変異体と同様の解析を行った。その結果、E2100A および E2100Q 変異体のどちらの変異体についても E2100D 変異体よりもさらに著しく Ca^{2+} 感受性が低下しており、生理的条件下での Ca^{2+} 放出活性はほぼ完全に消失した。また、どちらの変異体を発現させた DT40 細胞においても、B 細胞受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起こらないことが確認された。

本研究の結果、 IP_3 受容体 1 型における 2100 番目のグルタミン酸が Ca^{2+} 感受部位であることが明らかになった。さらに、 Ca^{2+} 感受性が Ca^{2+} 放出活性や細胞内 Ca^{2+} シグナルパターンの決定に極めて重要な役割を果たすことが明確に示された。

2. Ca^{2+} 感受性変異 IP_3 受容体サブユニットのヘテロ 4 量体 IP_3 受容体に与える影響

IP_3 受容体には 3 つのサブタイプが存在し、ヘテロ 4 量体を形成して Ca^{2+} 放出チャネルとして機能する。すなわち 1 分子の Ca^{2+} 放出チャネルには 4 ヶ所の Ca^{2+} センサーが存在する。 IP_3 受容体の Ca^{2+} 感受性はヒル係数約 2 を示し、なんらかのサブユニット間の共同性があることが以前から示唆されている。そこで本研究では、 Ca^{2+} 感受性をほぼ消失している E2100A 変異 IP_3 受容体サブユニットを用いて、サブユニットの Ca^{2+} 感受性がチャネルの Ca^{2+} 放出活性に与える影響について解析を行った。

まず DT40 ニワトリ B 細胞の内在性 IP_3 受容体完全欠損株に野生型ラット 1 型 IP_3 受容体と E2100A 変異 IP_3 受容体を共発現させた細胞を作製し、B 細胞受容体刺激に対する細胞内 Ca^{2+} シグナルパターンの解析を行った。その結果、最初に見られる一過性の Ca^{2+} 濃度上昇に変化が著しく低下し、さらにそれに続く Ca^{2+} オシレーションも完全に消失していることが明らかになった。続いてこの細胞を脱膜処理して小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度を測定し、野生型サブユニット/E2100A 変異サブユニット(wt/E2100A)ヘテロ 4 量体 IP_3 受容体の Ca^{2+} 放出活性を評価した結果、wt/E2100A ヘテロ 4 量体 IP_3 受容体は野生型 IP_3 受容体に比べ著しく Ca^{2+} 感受性が低下しており、生理的条件下ではほとんど Ca^{2+} 放出活性を持たないことが確認された。以上の結果から、E2100A 変異 IP_3 受容体サブユニットは野生型 IP_3 受容体に対しドミナント・ネガティブとして作用することが明らかになった。

IP_3 受容体には 1 型から 3 型までの 3 つのサブタイプが存在し、生体内ではこれら 3

種類のサブタイプが各組織ごとに特異的な割合で発現している。また、これらの 3 つのサブタイプはヘテロ 4 量体を形成することが知られている。そこでラット 1 型 E2100A 変異サブユニットが 1 型以外のサブタイプに対してもドミナント・ネガティブとして作用するかどうかを確認するために、1 型、2 型、3 型のみを発現している変異 DT40 ニワトリ B 細胞に対してラット 1 型 E2100A 変異 IP₃ 受容体を発現させた細胞を作製し、B 細胞受容体刺激による Ca²⁺シグナルを解析した。その結果、ラット 1 型 E2100A 変異サブユニットはそれら全てに対しドミナント・ネガティブとして働き、ほぼ完全に Ca²⁺シグナルを消失させるものであることが確認された。

また、さらに HEK-293 細胞、RIN-5F 細胞にもラット 1 型 E2100A 変異サブユニットを発現させた結果、いずれの細胞についても ATP 刺激による Ca²⁺シグナルが消失した。この結果から、種差を超えてラット 1 型 E2100A 変異サブユニットをドミナント・ネガティブとして利用できることが示された。

本論文では、IP₃ 受容体の Ca²⁺感受性を決定する部位を E2100 に同定し、IP₃ 受容体の Ca²⁺感受性が細胞内 Ca²⁺ シグナルパターンの決定に必要不可欠であることを初めて明確な形で示した。さらにサブユニットの Ca²⁺感受性低下がヘテロ 4 量体 IP₃ 受容体の Ca²⁺放出活性をドミナント・ネガティブ的に抑制することを明らかにした。今日まで IP₃ 受容体の機能を制御・抑制することが困難であり、この方法論は今後 Ca²⁺ シグナルの生理的意義を解明する上で非常に有用なものとなることが期待される。