

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 水島亜希子

本研究はイノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)受容体を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナル形成の分子基盤を明らかにするため、ラット 1 型 IP<sub>3</sub> 受容体に点突然変異体を用いて、IP<sub>3</sub> 受容体の Ca<sup>2+</sup>感受性部位の同定、およびその細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルパターン決定との相関の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. まず脱膜化細胞を用いて小胞体内腔の Ca<sup>2+</sup>濃度を測定することにより、変異 IP<sub>3</sub> 受容体の Ca<sup>2+</sup>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、Ca<sup>2+</sup>感受性が野生型に比べて 1/10 倍に低下することを明らかにした。一方で IP<sub>3</sub> や ATP に対する感受性には変化がなく、また Ca<sup>2+</sup>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 Ca<sup>2+</sup>感受性のみが変化していることを確認し、IP<sub>3</sub> 受容体の 2100 番目のグルタミン酸を Ca<sup>2+</sup>感受部位と同定した。
2. 次に、野生型 IP<sub>3</sub> 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 Ca<sup>2+</sup>シグナルパターンを比較した。E2100D 発現 DT40 細胞では、まず最初に見られる一過性の Ca<sup>2+</sup>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 Ca<sup>2+</sup>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。IP<sub>3</sub> 受容体の Ca<sup>2+</sup>感受性の変化が細胞内 Ca<sup>2+</sup>オシレーション形成に与える影響を明確な形で示した。
3. 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ところ、いずれも E2100D 変異体よりもさらに著しく Ca<sup>2+</sup>感受性が低下しており、生理的条件下での Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>濃度上昇が起こらないことが確認された。
4. 野生型ラット 1 型 IP<sub>3</sub> 受容体と E2100A 変異 IP<sub>3</sub> 受容体を共発現させた DT40 細胞

を作製し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルパターンの解析を行ったところ、最初に見られる一過性の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に変化が著しく低下し、さらにそれに続く  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  放出活性を評価した結果、wt/E2100A ヘテロ 4 量体  $\text{IP}_3$  受容体は野生型  $\text{IP}_3$  受容体に比べ著しく  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が低下しており、生理的条件下ではほとんど  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{IP}_3$  受容体サブユニットは野生型  $\text{IP}_3$  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した。

5. 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  $\text{IP}_3$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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。

以上、本論文は  $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を決定する部位を E2100 に同定し、 $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  感受性低下がヘテロ 4 量体  $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{IP}_3$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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、学位の授与に値するものと考えられる。