

論文の内容の要旨

論文題目

The Mechanism of Cluster Formation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor

和訳 イノシトール(1,4,5)三リン酸受容体のクラスター形成機序の解析

指導教官 御子柴克彦教授

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

脳神経医学専攻

氏名 立石陽子

要旨

カルシウムはセカンドメッセンジャーとして様々な機能を持つ。多くの細胞外刺激は G 蛋白質共役型またはチロシンキナーゼ共役型受容体を介して細胞内のホスホリパーゼ C に伝えられ、イノシトール (1,4,5) 三リン酸 (IP₃) が産生される。この IP₃ は細胞内のカルシウム貯蔵庫である小胞体上のカルシウムチャネル IP₃ 受容体を活性化し、カルシウム放出を引き起こす。IP₃ 受容体からのカルシウム放出には様々なパターンがあり細胞内カルシウム・シグナルにおいて非常に重要な役割を担っていることが知られているが、このパターン形成の仕組みはまだ完全には解明されていない。数理理論によるカルシウム・パターン形成機序の解析では、IP₃ 受容体の分布もカルシウム・パターン形成における重要な要因と報告されている。特に、十数から数十の IP₃ 受容体がクラスター状に配置されていると仮定するとこの複雑なカルシウム・パターンの形成機序がうまく説明できるという。

実際の細胞においても IP₃ 受容体が細胞内外の環境に応じてその局在を変化させることが報告されている。そのうちのひとつとして、IP₃ 受容体が細胞外刺激に伴う細胞内カルシウム濃度 ([Ca²⁺]_c) 上昇時にクラスターを形成することが報告されているが詳細は不明である。しかしこのクラスター形成は細胞外刺激依存的に引き起こされることから、細胞内シグナリングにおいて重要な役割を果た

している可能性が高い。

今回私は、GFP を融合させた IP₃ 受容体 type 1 (GFP-IP₃R1) およびその変異体を用いて、IP₃ 受容体のクラスター形成機序の解析を行った。

GFP-IP₃R と RFP を融合させた小胞体のマーカー蛋白質 DsRed2-KDEL を COS-7 細胞に発現させ ATP (Gq 蛋白質共役型受容体のアゴニスト) 刺激時の同時イメージングを行ったところ、IP₃ 受容体のクラスターは刺激開始後 1 分程から現れ始め、刺激中は次第に大きくなり、ATP 除去後には速やかに消失することが観察された。更に、GFP-IP₃R と [Ca²⁺]_c の同時イメージングを行ったところ、[Ca²⁺]_c 上昇のピークは刺激後 15 秒以内であるのに対して、IP₃R のクラスター数は多くの場合刺激後 90 秒以上にピークを迎えた。また、小胞体内のカルシウムを涸渇させた条件下で刺激をすると、カルシウム上昇を伴わなくてもクラスター形成が引き起こされた。これらの結果から、以前の報告ではカルシウム依存的とされていた IP₃ 受容体のクラスター形成はカルシウムから二次的に引き起こされていることが推測された。そこで [Ca²⁺]_c 上昇時に活性化されるいくつかの分子の阻害剤の効果を調べたところ、ホスホリパーゼ C 阻害剤のみが IP₃ 受容体のクラスター形成を阻害した。更に、GFP を融合させた pleckstrin-homology domain (GFP-PHD) によって細胞内 IP₃ 濃度変化を観察したところ、確かに IP₃ 受容体のクラスター数の変化は GFP-PHD により示された細胞内 IP₃ 濃度変化と類似していることが分かった。しかしながら IP₃ 受容体のクラスター形成に必要な細胞内 IP₃ 濃度は、カルシウム放出を引き起こす IP₃ 濃度よりもはるかに高濃度であることが推測された。

IP₃ 受容体の構造と機能については IP₃ 受容体の特に、type 1 (IP₃R1) についてよく研究されており、様々な性質を持つ変異体が知られている。例えば IP₃ 結合能を欠損した変異体 (GFP-IP₃R1-D610、GFP-IP₃R1-ES、GFP-IP₃R1-K508A)、IP₃ 結合能を持つがチャネルの開口状態への構造変化ができない変異体 (IP₃R1-D223、IP₃R1-C2613S) チャネルのポア部分の 1 アミノ酸を変えた為に開口状態への構造変化はできるがカルシウム放出ができない変異体 (IP₃R1-D2550A) といったものがある。これらを用いてクラスター形成に必要な IP₃ 受容体の性質を調べた。その結果、IP₃ 結合能を欠いた IP₃ 受容体 (GFP-IP₃R1-D610、GFP-IP₃R1-ES、GFP-IP₃R1-K508A) は [Ca²⁺]_c 上昇下でもクラスターを形成しないことが観察された。このことは IP₃ 結合が IP₃ 受容体のクラスター形成に不可欠であることを強く示唆している。更に、IP₃ 結合能は有す

るがカルシウム放出能を持たない変異型 IP₃ 受容体 (GFP-IP₃R1-D223 および IP₃R1-C2613S) も [Ca²⁺]_c 上昇かつ IP₃ 存在下でもクラスターを形成しないことが分かった。しかしながら、IP₃ 結合とそれに伴う構造変化は起こるがカルシウム放出を起こさない変異型 IP₃ 受容体 (IP₃R1-D2550A) はクラスターを形成した。以上の結果から、IP₃ 受容体のクラスター形成は IP₃ 結合とそれに伴う構造変化によって引き起こされるが、カルシウム放出は必要ないことが分かった。

以上の結果から、IP₃ 受容体は細胞外刺激に伴って細胞内 IP₃ 濃度が著しく上昇した際、受容体自体の開口状態への構造変化に伴い可逆的にクラスターを形成することが分かった。

このように IP₃ 受容体の分布は細胞内カルシウム・シグナルにおいて重要な要因であると考えられているが、細胞外刺激に応じてその分布をダイナミックに変化させていることが分かった。このことは IP₃ 受容体のクラスター形成が複雑なカルシウム・シグナルのパターン形成において重要な役割を果たしている可能性が高い。この機能を知るには更なる研究が必要であるが、このクラスター形成には非常に高濃度の (通常のカルシウム放出を起こすよりもはるかに多い) IP₃ が必要であること、IP₃ 受容体が互いに距離をとって分布することはカルシウムによる IP₃ 受容体の活性促進およびカルシウム・シグナルの細胞全体への拡大を阻害することなどから、IP₃ 受容体に対する負のフィードバック機構、すなわち、カルシウムの過剰放出の抑制機構であることが可能性の一つとして考えられる。

以上のように IP₃ 受容体のクラスター形成はカルシウム・シグナルにおいて重要な役割を担っている可能性が高く、また細胞内チャネルの細胞内動態という比較的新しい分野を進めて行く上でも今後の研究が期待される。