

## 審査の結果の要旨

氏名 立石陽子

本研究は細胞内カルシウム・シグナリングにおいて重要であると考えられるイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体（以下、IP<sub>3</sub>R）の細胞内動態、特に細胞外刺激時に観察されるクラスター形成の機序について解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 従来報告されていた、タイプ2およびタイプ3のIP<sub>3</sub>Rばかりではなく、強制発現させたIP<sub>3</sub>Rタイプ1（以下IP<sub>3</sub>R1）も細胞外刺激に伴い小胞体上で再分布し、クラスターを形成することが観察された。同様の現象はGFPを付加したIP<sub>3</sub>R1（以下、GFP-IP<sub>3</sub>R1）においてもGFP付加の影響もなく観察され、これを用いてIP<sub>3</sub>Rのクラスター形成機序の解析が可能であることが分かった。

2. 従来、IP<sub>3</sub>受容体のクラスター形成は細胞内カルシウム濃度（[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>）上昇時に観察されていたことから、カルシウム依存的な過程と考えられていた。しかしながら、GFP-IP<sub>3</sub>R1および蛍光カルシウム指示薬fura-2を用いて[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>との同時イメージングを行った結果、IP<sub>3</sub>受容体のクラスター形成は[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>上昇に遅れて起こることが観察された。このことから、IP<sub>3</sub>受容体のクラスター形成は[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>上昇によって二次的に引き起こされている可能性が考えられた。

2. COS-7細胞において約90秒の間隔で10 μM ATP（Gq共役型受容体アゴニスト）で刺激を行うと、2回目の刺激時には多くの場合小胞体のカルシウム涸渇により[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>上昇が起こらない。この系を用いてGFP-IP<sub>3</sub>R1とfura2の同時イメージングを行ったところ、2回目の刺激時にカルシウム上昇が起こらないにも関わらず、クラスターが形成された。このことから、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>がIP<sub>3</sub>Rのクラスター形成を直接引き起こしているのではないことが分かった。

3. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>上昇時に活性があがることが知られている細胞内分子を標的とする様々な阻害剤を用いたところ、ホスホリパーゼC阻害剤およびGenisteinのみがIP<sub>3</sub>Rのクラスター形成を阻害した。GenisteinはG蛋白質（Gq）を阻害する事が報告されている事から、これらの薬剤はおそらくホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸の加水分解すなわちIP<sub>3</sub>およびジアシルグリセロールの産生を阻害したと考えられた。しかしながら、ジアシルグリセロールの重要な標的であるプロテインキナーゼCの阻害剤および賦活剤の効果は認められなかった為、IP<sub>3</sub>産生がクラスター形成に関与している可能性が示唆された。

4. GFPを付加したpleckstrin-homology domain（GFP-PHD）を用いて、COS-7細胞を10 μM ATP

で刺激した際の細胞内  $\text{IP}_3$  濃度変化を調べたところ、細胞内  $\text{IP}_3$  濃度のピークは  $\text{IP}_3\text{R}$  のクラスター形成同様、 $[\text{Ca}^{2+}]_c$  のピークに遅れることが分かった。

5.  $\text{IP}_3\text{R1}$  側のクラスター形成において重要な役割を果たす部位を同定するため、様々な変異型  $\text{IP}_3\text{R1}$  においてクラスター形成実験を行ったところ、 $\text{IP}_3$  結合領域を欠失する変異体や、アミノ酸変異により  $\text{IP}_3$  結合能を持たない変異体はクラスターを全く形成しなかった。更に、 $\text{IP}_3$  結合能はあるものの、カルシウム放出能を持たない変異体もクラスターを形成しなかった。しかしながら、チャンネルのポア領域にアミノ酸変異を持ち、 $\text{IP}_3$  結合能およびカルシウム放出能を持たないが開口状態への構造変化はできる変異体はクラスターを形成したことから、 $\text{IP}_3\text{R}$  のクラスター形成は  $\text{IP}_3$  結合とそれに伴う開口状態への構造変化が必要であるがカルシウム放出自体は必要がない事が示唆された。

以上、本論文は  $\text{GFP-IP}_3\text{R1}$  を用いて  $\text{IP}_3\text{R}$  のクラスター形成が、 $\text{IP}_3$  結合とそれにもなう構造変化によって引き起こされる事を明らかにした。本研究は細胞内チャンネルのリアルタイム・イメージングという新しい分野の研究であり、その結果、チャンネル自体の構造変化依存的に可逆的に細胞内分布パターンが変化するという、細胞内チャンネルの再分布機序に関する新しい知見が得られたものであり、学位の授与に値するものと考えられる。