

審査の結果の要旨

氏名 佐野 稔

本論文は、「機械刺激負荷に対する細胞内 Ca^{2+} 応答機構に関する研究」と題し、本文 7 章と付録からなる。

機械刺激を負荷された細胞はさまざまな機能を発現させることが知られているが、再生医療における生体外での組織培養環境の構築など臨床応用の観点からも意義深い研究対象である。しかし、細胞の応答機構について十分に明らかであるとはいえず、特にシグナル伝達経路の上流に関する知見が不足している。Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) や Ca^{2+} といったセカンドメッセンジャーはこの上流域に存在するとされるが、機械刺激に対する動態変化を観察するには従来の生化学的手法では時間および空間的な分解能が絶対的に不足である。

本論文はそのような問題点を克服すべく、生細胞を用いたリアルタイムイメージング手法に取り組み、機械刺激負荷環境下での IP_3 および Ca^{2+} 応答機構について検証したものである。

第 1 章および第 2 章では、研究の背景として細胞の機械刺激受容機構に関する先行研究や Green Fluorescent Protein (GFP) を使ったリアルタイムイメージング手法、 IP_3 - Ca^{2+} 応答機構を概観し、本研究における目的を列挙している。

第 3 章では、 IP_3 を可視化するためのプローブとして Pleckstrin Homology Domain (PHD) と GFP の融合タンパクに着目し、GFP と PHD の配列順序や連結部位タンパクの違いによる IP_3 指示能力の差について検討している。ベクターを遺伝子導入によって生細胞で発現させ、静置状態での GFP 局在を観察した結果では、GFP-PHD で細胞膜近傍への集中が最も顕著であり、 IP_3 の前駆体への結合モデルと一致することから、 IP_3 動態への優れた指示能力が予想されている。

また、 IP_3 - Ca^{2+} 応答の同時測定を実現するための蛍光指示薬の選択や光学フィルターの設計による蛍光観察系の構築や、落射型蛍光顕微鏡でのリアルタイムイメージング観察下での機械刺激負荷装置の構築がなされている。

第 4 章では、GFP-PHD を発現させた細胞での薬剤刺激または機械刺激負荷が行われている。

まず、薬剤刺激に対する細胞応答の結果から、 IP_3 と Ca^{2+} のもつ時間・空間依存的動態が同時かつ明確に補足され、二重蛍光観察系の妥当性が示されている。さらに阻害実験から得られた GFP-PHD の局在変化に関する結果と IP_3 - Ca^{2+} 応答モデルとがよく一致することから、GFP-PHD が刺激に対する IP_3 応答を忠実に指示することが示されている。また、GFP-PHD を指標とすることで各種の阻害実験条件の有効性が裏付けされている。

次に、機械刺激負荷実験結果では IP_3 産生が導かれる直接証拠がリアルタイム画像として得ら

れており、従来の阻害実験による間接的手段では得られなかった単一細胞内での IP_3 産生の偏りや IP_3 の細胞間伝播が時間依存的に変化する様子が示されている。単一細胞での Ca^{2+} 濃度の上昇率が薬剤刺激実験とほぼ等しいにも関わらず、 IP_3 産生量は大きく異なることから、二つの経路が完全に同一ではない可能性が示されている。さらに、Phospholipase C (PLC) や IP_3 産生の阻害実験により Ca^{2+} 応答の IP_3 依存性が示されている。

第 5 章では、前章で得られた Ca^{2+} 応答が IP_3 依存性であるという結果をもとに、シグナル伝達経路の上流側にむけた更なる検討が試みられている。三量体 G タンパクの一種である Gq タンパクと Gq タンパク結合型受容体との相互作用に対する競合的阻害を試みることで、Gq の活性化を介して Ca^{2+} 応答へ至る機械受容機構の可能性が示されている。

第 6 章では、本研究で得られた機械刺激に対する細胞応答機構に関する知見である、Gq α 、 IP_3 、 Ca^{2+} といった情報伝達因子の関与と近頃報告された機械刺激応答性の ATP オートクライン・パラクライン機構との対応や活性化された Gq タンパクの Ca^{2+} 上昇だけではなく低分子量 G タンパクへの作用について議論されている。

第 7 章は「結論」であり、本論文での成果である。

「付録」では、本研究で使用したベクター作製に関する基礎情報およびプロトコルがまとめられている。

以上のように、本論文では機械刺激負荷に対する細胞シグナル伝達経路の解析を目的とし、GFP 融合タンパクをコードする遺伝子導入によってリアルタイムイメージングを実現した。これにより細胞膜上の機械感受性チャネルの関与が想定されていた細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇経路について、細胞内部からの放出を引き起こす IP_3 産生の直接的な証左が得られ、さらに、その上流には Gq タンパク結合型受容体が存在する可能性が示されている。これらの知見は、再生医療における物理刺激を用いた組織培養技術の向上に大きな示唆を与えるものである。このように、本研究は工学的な意義が大きく、細胞の機械受容機構の解明に重要な貢献をなすものと考えられる。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。