

審査の結果の要旨

氏名 石井清朗

本研究は細胞内でのカルシウム振動の重要性が広く知られているにもかかわらず、どのように細胞がカルシウム振動を生み出しているのかということはまだ良く分かっていないため、細胞内小器官と細胞質のカルシウム濃度変化を同時に測定することによって、カルシウム振動の発生メカニズムの解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 生細胞における細胞内小器官のカルシウム濃度変化を測定するために、蛍光タンパク質をベースとした分子を用いた。小胞体内腔のカルシウム濃度の測定には **Cameleon** という **indicator** を使用した。しかし既存の小胞体移行シグナルを持つ **Cameleon** では、**calmodulin** のカルシウムに対する親和性が小胞体内腔において適切でないため微小な濃度変化を測定することはできなかった。よって今回、**calmodulin** のカルシウム結合部位のアミノ酸を置換することにより親和性を変化させ、生細胞 (**HeLa cell**) において、カルシウム振動時における小胞体内腔のカルシウム濃度変化を測定することに成功した。
2. 細胞質と小胞体内腔のカルシウムの相互作用を調べるため、細胞外のカルシウムを無くした環境で生細胞にアゴニスト刺激を加え、カルシウム振動を起こし、細胞質と小胞体内腔のカルシウム濃度変化の同時測定を行った。2回目以降のカルシウムスパイクにおいて細胞質カルシウム濃度上昇の立ち上がりは、小胞体内腔からのカルシウム放出以前に起こっていた。細胞外のカルシウムは無い環境なので、他の細胞内小器官からのカルシウム放出により、細胞質カルシウムの濃度上昇が起こったと考えられる。
3. カルシウムを貯蔵する他の細胞内小器官として考えられるのはミトコンドリアである。カルシウム振動時の細胞質カルシウム濃度とミトコンドリア内カルシウム濃度の同時測定を行った。2回目以降のカルシウムスパイクでは、細胞質カルシウム濃度上昇の立ち上がりは、ミトコンドリア内のカルシウム濃度上昇の立ち上がりとは同期していなかった。細胞質カルシウム濃度が上昇し始めるとき、ミトコンドリア内カルシウムは減少、つまり放出している。したがって、細胞質内のカルシウム濃度上昇の立ち上がりは、ミトコンドリアからのカルシウム放出によって起こると考えられる。
4. 上の考えを確かめるため、ミトコンドリアのカルシウムを取り込む機能と放出する機能を阻害し

た。ミトコンドリア内にカルシウムを取り込むことを阻害した場合も、ミトコンドリアからのカルシウム放出を無くした場合もカルシウム振動は起こらない。

5. 今回の実験による細胞質内、小胞体内腔、ミトコンドリア内それぞれのカルシウム濃度測定の結果から、カルシウム振動時におけるカルシウム動態は次のように考えられる。刺激直後、 $IP_3$  受容体を介した小胞体内腔からのカルシウム放出が起こり1回目のカルシウムスパイクが形成される。放出されたカルシウムは、細胞質内とミトコンドリア内のカルシウム濃度を上昇させた後、小胞体内腔に戻ってくる。小胞体内腔のカルシウム濃度がカルシウムポンプ (SERCA) の働きによって上昇してくると、徐々に取り込みは緩やかになる。このときミトコンドリアから放出されるカルシウムが、細胞質内のカルシウム濃度を押し上げる。このことが  $IP_3$  受容体を活性化し、再び小胞体内腔からのカルシウム放出を起こす、つまり **calcium induce calcium release (CICR)** が起こる。この繰り返しによって、カルシウム振動が形作られるというモデルが今回考えられた。

以上、本論文により細胞質におけるカルシウム振動の立ち上がりにはミトコンドリアからのカルシウム放出が必須であることが示唆され、小胞体内腔カルシウムと同様にミトコンドリア内カルシウムの役割の重要性が認識された。つまりこのことは、ミトコンドリアからのカルシウム放出の機能障害はカルシウム振動の動態に大きな影響を与えることを示唆している。よって、カルシウム振動におけるミトコンドリア内からのカルシウム放出の作用は、ミトコンドリアの機能障害による病理的、生理的現象を解明する上で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。