

論文の内容の要旨

論文の題目

Spatiotemporal inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics revealed by quantitative real-time imaging with a new FRET-based indicator

新規指示薬によるイノシトール1, 4, 5三リン酸の時空間的解析

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11年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

松浦 徹

細胞はホルモンや成長因子、神経伝達物質などの細胞外刺激により、細胞内 Ca^{2+} 濃度を様々に変化させる。細胞外刺激は、ホスホリパーゼ C (PLC) によるホスファチジルイノシトール 4, 5 二リン酸 (PIP_2) の分解を促進し、イノシトール 1, 4, 5 三リン酸 (IP_3) を産生する。 IP_3 は2次伝達物質として細胞内 Ca^{2+} ストアに存在する Ca^{2+} チャネル、 IP_3 受容体 (IP_3R) からの Ca^{2+} 放出 (IP_3 induced Ca^{2+} release: IICR) を促す。例えば Ca^{2+} 上昇が周期的に起こる Ca^{2+} 振動や、 Ca^{2+} 上昇が細胞内または周囲の細胞に広がる Ca^{2+} 波のように、細胞は時間・空間的に複雑な Ca^{2+} 変動を引き起こす。このような Ca^{2+} 変動は、様々な細胞機能を調節していることが知られている。特に Ca^{2+} 振動では、周波数に依存した酵素活性や遺伝子発現の制御が報告されており、その生理的意義が明らかになってきている。一方、 Ca^{2+} 振動の制御機構については未だに議論が残っている。

現在、 Ca^{2+} 振動の制御機構として、主に2つの仮説が提唱されている。1つは Ca^{2+} による IP_3R への正・負のフィードバックが Ca^{2+} 振動を制御する、 Ca^{2+} 誘導性 Ca^{2+} 放出 (CICR) 優位モデルであり、もう一つは IP_3 濃度の振動が Ca^{2+} 振動を制御する、IICR 優位モデルである。1989年に報告された Wakui らの実験では、パッチクランプした細胞に一定の濃度の非代謝型 IP_3 類似体を与えることで、 Ca^{2+} 振動を誘導することに成功している (Wakui, M. et al. 1989, Nature 339,

317-20)。この実験から IP₃ 濃度の振動は Ca²⁺振動の誘発に必要でないことが示唆された。しかし、近年 Hirose らのプレクストリンホモロジドメイン (PHD) を用いた IP₃ 観測では、Ca²⁺振動と同期した baseline IP₃ 振動が観測されており (Hirose, K. et al. Science, 1999 284, 1527-30)、どちらの仮説がより有力であるのかははっきりとはしていない。

私はこの Ca²⁺振動の制御機構を明らかにする目的で、IP₃ の可視化技術を開発した。現在までに、細胞内の IP₃ をリアルタイムに観測するいくつかの技術が報告されている。これらは、ほとんどが上述の PHD を利用したものである。IP₃ 観測には PLC δ の PHD が使用される。しかし、この PHD は PIP₂ と IP₃ 双方に親和性を持つことから、得られたシグナルの解釈には常に注意が必要である。このことから、私は IP₃ 特異的な指示薬の開発を試みた。私は IP₃R の IP₃ 結合部位 (224-575a. a) の N 末に黄色蛍光タンパク質 Venus を、C 末に青色蛍光タンパク質 ECFP を融合した。この分子は IP₃ との結合により ECFP、Venus 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率が変化し、その蛍光スペクトラムが変化した。この分子の蛍光変化を指標とした見かけ上の IP₃ への結合定数はおよそ 400nM であり、蛍光変化は生理的条件の範囲内の pH や Ca²⁺濃度変化に影響を受けないことを確認した。また、この分子は他のイノシトールリン酸に比較して有意に IP₃ への親和性が高かった。以上の結果から私はこの分子が IP₃ 指示薬として有用であると判断した。私はこの分子を IP₃R-based IP₃ sensor (IRIS) と名付け、細胞内での IP₃ 動態を観察した。

私は IRIS を用いて、アゴニスト刺激による HeLa 細胞と COS-7 細胞の Ca²⁺振動時の IP₃ 動態を観察した。IRIS を発現させた細胞に Indo-1 を取り込ませることで、IP₃ と Ca²⁺を同時に測定することを可能とした。3 μ M のヒスタミン刺激は細胞内の IP₃ 濃度を速やかに上昇させた。刺激中、上昇した IP₃ 濃度は小さな増減を繰り返しながら、ほぼ一定に保たれた。この振幅の小さな IP₃ の振動は、Ca²⁺振動と同期して観測された。これに対して、0.3 μ M の ATP によって刺激された COS-7 細胞では Ca²⁺振動と同期した IP₃ 濃度変化は観測されなかった。

HeLa 細胞と COS-7 の IP₃ 動態の相違はどのような分子機構により作り出されるのであろうか？細胞外からのアゴニスト刺激を受け取る G タンパク質共役型受容体、そして PLC β が Ca²⁺により制御されていることが報告されていることから、人為的に細胞内の Ca²⁺濃度を制御することで、IP₃ 産生に対する Ca²⁺濃度の影響を調べた。その結果、HeLa 細胞では、Ca²⁺濃度上昇によりヒスタミン刺激による IP₃ 濃度上昇が一過的に促進され、続いて一過的に抑制されることが示された。この一過的な抑制は PKC を抑制することで失われた。それに対して COS-7 細胞では HeLa 細胞と異なり、促進効果は見られたが、抑制効果は見られなかった。そこで、COS-7 細胞に PKC α を強制発現させると、HeLa 細胞同様に抑制効果

を観測することができた。以上の結果から、IP₃ 産生に対する Ca²⁺からの一過的な負のフィードバックは PKC によって担われていることが示唆され、HeLa 細胞と COS-7 細胞では PKC の活性に差があることが示された。

Ca²⁺振動時の HeLa 細胞と COS-7 細胞の IP₃ 動態の違いが、両者の PKC 活性の違いに起因するのかを調べるために、PKC 活性を抑制した HeLa 細胞での Ca²⁺振動時の IP₃ 動態を調べた。PKC 活性を抑制した HeLa 細胞をアゴニスト刺激することで Ca²⁺振動を誘起することができた。この細胞では COS-7 細胞で見られたのと同様に、Ca²⁺振動と同期した IP₃ 濃度変化が観測されなかった。この結果から、HeLa 細胞と COS-7 の IP₃ 動態の相違は、IP₃ 産生に対する PKC を介した、Ca²⁺からの負のフィードバック活性の相違に起因することが示唆され、IP₃ 濃度の振動には Ca²⁺からの負のフィードバックが必要であることを示すことが出来た。またこの実験は同時に、HeLa 細胞においても IP₃ 濃度の振動が Ca²⁺振動の誘起に必須ではないことを示している。

次に、私は受精時の IP₃ 動態を観測した。試料としては原索動物であるホヤの卵を使用した。棘皮動物から哺乳動物まで、多くの生物種で受精後の卵内で Ca²⁺振動が観察されている。受精後の Ca²⁺濃度変化は卵賦活に必須の現象であり、ホヤやマウスでは IP₃ によって制御されることが報告されている。COS-7 細胞で観測された IP₃ 動態と同様に、ホヤ卵では、IP₃ の濃度は上昇後、およそ定常状態を保ち、Ca²⁺振動と同期した IP₃ の振動は観測されなかった。この結果は Wakui らの実験同様、一定濃度の IP₃ が Ca²⁺振動を誘発することを示している。

ホヤ卵の Ca²⁺振動では一つ一つの Ca²⁺ spike が卵の一点から始まり、全体に広がる Ca²⁺波である。IRIS による観察では、最初の Ca²⁺ spike 時に Ca²⁺波と同調した IP₃ 波が測定された。しかし、それ以降の Ca²⁺ spike では卵内の IP₃ 濃度に空間的な不均一性は観測されなかった。この結果は最初の Ca²⁺ spike は IP₃ 濃度変化が引き金となるが、それ以降の Ca²⁺ spike は IP₃ 濃度変化を必要としないことを示唆している。2 回目以降の Ca²⁺ spike が観測されたときには既に卵内に産生された IP₃ が貯まっている状態である。このことは、ホヤ卵では十分量の IP₃ によって活性化された IP₃R が CICR による制御により Ca²⁺振動を作り出していることを示唆する。

以上の結果から、Ca²⁺振動時の IP₃ 動態には 2 つのタイプがあることを示すことが出来た。1 つは、Ca²⁺振動と同期して小さく IP₃ が振動する、HeLa 細胞で見られたタイプであり、もう 1 つは、IP₃ 振動が観測されない COS-7 細胞と受精卵で観測されたタイプである。IP₃ 振動が観測されない后者では、Ca²⁺からの IP₃R への正・負のフィードバックが Ca²⁺振動を制御していることが予測される。小さな IP₃ 振動が観測される HeLa 細胞においても、PKC 抑制により IP₃ 振動が失われても、Ca²⁺振動が観測されることから、IP₃ 振動は Ca²⁺振動の誘起に必須ではなく、

Ca²⁺からの IP₃R へのフィードバックが Ca²⁺振動の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。