

審査結果の要旨

氏名 松浦 徹

Ca²⁺上昇が周期的に起こる Ca²⁺振動や、Ca²⁺上昇が細胞内または周囲の細胞に広がる Ca²⁺波のように、細胞は時間・空間的に複雑な Ca²⁺変動を引き起こす。このような Ca²⁺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 Ca²⁺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。その一方、Ca²⁺振動の制御機構については未だに議論が残っている。本研究では Ca²⁺振動の制御機構の解明に、その上流因子である IP₃ と Ca²⁺との同時イメージングを行うことで迫った。

1. 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が、これらは PLC δ の PHD を利用したものがそのほとんどである。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、IP₃R-based IP₃ sensor (IRIS) と名付け、細胞内での IP₃ 動態観察に用いた。

2. 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。PKC 活性を

抑制した HeLa 細胞では COS-7 細胞で見られたのと同様に、 Ca^{2+} 振動と同期した IP_3 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 IP_3 動態の相違は、 IP_3 産生に対する PKC を介した、 Ca^{2+} 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、 IP_3 濃度の振動には Ca^{2+} 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 IP_3 濃度の振動が Ca^{2+} 振動の誘起に必須ではないことを示している。

3. 次に、私は受精時の IP_3 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 Ca^{2+} 振動が観察されている。受精後の Ca^{2+} 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 IP_3 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 IP_3 動態と同様に、ホヤ卵では、 IP_3 の濃度は上昇後、およそ定常状態を保ち、 Ca^{2+} 振動と同期した IP_3 の振動は観測されなかった。この結果は一定濃度の IP_3 が Ca^{2+} 振動を誘発することを示している。

ホヤ卵の Ca^{2+} 振動では一つ一つの Ca^{2+} spike が卵の一点から始まり、全体に広がる Ca^{2+} 波である。IRIS による観察では、最初の Ca^{2+} spike 時に Ca^{2+} 波と同調した IP_3 波が測定された。しかし、それ以降の Ca^{2+} spike では卵内の IP_3 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 Ca^{2+} spike は IP_3 濃度変化が引き金となるが、それ以降の Ca^{2+} spike は IP_3 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 Ca^{2+} spike が観測されたときには既に卵内に産生された IP_3 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 IP_3 によって活性化された IP_3R が CICR による制御により Ca^{2+} 振動を作り出していることを示唆する。

以上、本論文は、 Ca^{2+} 振動時の IP_3 動態には 2 つのタイプがあることを示し、どちらにおいても Ca^{2+} からの IP_3R へのフィードバックが Ca^{2+} 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。本研究は 10 年以上にわたり論争が続いている、 Ca^{2+} 振動におけるリズムの生成の起源をどの分子が担っているのかという議論に対して、新しく開発した IP_3 指示薬を用いて、 Ca^{2+} からの IP_3R へのフィードバックが大きな役割を担っているということを提唱したものであり、 Ca^{2+} シグナルの解明に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。