

Analysis of the intracellular Calcium signal by mouse type 1 IP₃ receptor

-Calcium signals generated by mouse type 1 IP₃ receptor in DT40 chicken B-lymphocytes-

イノシトール 3 リン酸受容体による細胞内カルシウムシグナル形成機構の解析

指導教官 桐野 高明 教授

東京大学大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 平成 9 年度 4 月入学

医学博士課程 77384 宮内 浩

多くの細胞は、ホルモン・成長因子・神経伝達物質などの様々な細胞外刺激によって、イノシトールリン脂質の代謝が活性化され、細胞内メッセンジャーとしてイノシトール 3 リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロールを産生する。このうち、IP₃は、イノシトール 3 リン酸受容体(IP₃R) と特異的に結合・活性化し、小胞体を主とする細胞内 Ca²⁺ストアから Ca²⁺を細胞質内に放出させる (IP₃-induced Ca²⁺ release : IICR) 機能を持つ。IP₃によって放出された Ca²⁺は細胞内においてセカンドメッセンジャーとして作用し、様々な細胞内分子の機能を制御する事によって、受精現象・発生・開口分泌・細胞増殖・アポトーシス・感覚受容・記憶・学習などの多彩な生命活動に関与している。

外界からの刺激応答の際に、多くの細胞でスパイク状の Ca²⁺上昇が周期的に起こる Ca²⁺オシレーションや、Ca²⁺上昇が細胞質内や隣接する細胞に伝わっていく Ca²⁺ウェーブなどのように、細胞質内・細胞間の Ca²⁺濃度が複雑な空間的・時間的パターンをとって変化してゆくことが知られている。このような Ca²⁺変動のパターンは、外界からの刺激の種類や強度に依存して変化し、またそれぞれの細胞に特有のパターンがみられることから、細胞内 Ca²⁺濃度変化の時空間パターンそのものに刺激伝達情報がコードされていると考えられている。

IP₃R は小胞体などの細胞内 Ca²⁺ ストア上に存在する細胞内 Ca²⁺放出チャネルであり、IP₃と結合することで開口し、上記のような複雑な細胞質内の Ca²⁺上昇を引き起こす。IP₃R にはこれまで 3 種類のサブタイプの存在が知られており、各タイプがそれぞれ重複しつつ

組織・細胞などに広く発現することから、おのおのが固有の性質を持つだけでなく、生物種・組織種に固有の発現量でそれぞれのタイプが組み合わさることによって、組織や細胞の複雑で特異的な Ca^{2+} 変動パターンを形成していると考えられている。ところが、 IP_3R はさまざまな細胞に広範に存在し、3 種類の内在性の IP_3R を 1 つでも持たない細胞は報告されていない。また、遺伝子組み替え技術などで 1 種類でも欠損させるとその個体は成体になるまで生存できない上、 IP_3R はそれぞれのサブタイプが、組織種・生物種によって発現量が決まっており、欠失しても相互に補完しあうことがないこともわかっている。そのため、細胞内の発現量の違いによる細胞機能発現の違いを知る方法も従来は無かった。以上のため、ある特定のタイプだけを単独で発現している細胞を使い、その機能や構造を解析するという実験系の開発がきわめて困難で、 IP_3R の各タイプの基本的な構造・機能の違いについては未だ十分に明らかになってはいないのが現状である。

一方、ニワトリ B 細胞由来の DT40 細胞株は、B 細胞抗原レセプター (BCR) 刺激によって IP_3R が産生され、 Ca^{2+} オシレーションが生じることが知られており、刺激強度によって細胞の成熟・増殖・抗体産生・アポトーシスなどの様々な生理現象が引き起こされる。また、DT40 細胞株には 3 種類すべてのタイプの IP_3R が発現しているが、この細胞が高頻度に相同組み替えを起こす性質を利用して、遺伝子ターゲティング法を用いて内在性の 3 種類の IP_3R をすべて欠失させた細胞株 (R23-11 細胞株) が近年作成された。この R23-11 細胞株では BCR 刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇が完全に消失しており、さらにこの刺激による細胞死が生じにくくなっていることが示されている。

そこで、本研究では R23-11 細胞株に対し、 IP_3R 遺伝子の導入方法を確立し、マウスタイプ 1 IP_3R ($\text{mIP}_3\text{R1}$) を安定に単独発現する細胞株で、発現量の異なる株を多数樹立し、単一の IP_3R によって引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 動態を測定し、 $\text{mIP}_3\text{R1}$ の機能について解析を行った。

R23-11 細胞株に全長の $\text{mIP}_3\text{R1}$ をコードする pBact-STneoB-C1 を導入し、G418 を含んだ培地でネオマイシン耐性株を選択し、144 種の安定発現細胞を得た。その中で、 $\text{mIP}_3\text{R1}$ タンパク質の発現量が細胞間で比較的均一な 4 種類の安定発現細胞株 (KMN1, 13, 60, 107) を実験に使用した。各細胞で IP_3R の発現量を抗 IP_3R 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析したところ、得られた細胞株は、野生株の DT40 細胞とほぼ同程度の $\text{IP}_3\text{R1}$ 発現量を示す低発現細胞株 (KMN60, 107) と、野生株の 10–20 倍程度の発現量を持つ高発現細胞株 (KMN1, 13) の 2 種類に分けられた。それぞれの細胞株について $\text{IP}_3\text{R1}$ と小胞体内に存在する BiP タンパク質を免疫二重染色したところ、どの細胞株でも両者の分布領域は一致し、発現させた $\text{IP}_3\text{R1}$ は発現量によらず小胞体上に存在していると考えられた。また、ウエスタンブロット法や免疫組織染色によって、それぞれの細胞株について BCR の発現量や局在は野生株の DT40 細胞株と比べても大きな変化はなかった。さらに電子顕微鏡にて遺伝子導入・発現による細胞内微小構造の変化を観察した。細胞内の構造上の変化は見られず、一方で DT40 細胞とその Mutant 細胞では、原形質全体にまんべん

く存在する粗面小胞体が Calcium 貯蔵の役目を担っていることが示唆された。

ついで、発現した IP_3R1 による細胞内 Ca^{2+} 上昇濃度の変化とそれによる細胞機能発現を観察した。まず、BCR 刺激による各細胞株の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を、細胞内 Ca^{2+} イオン濃度画像解析システム ARGUS-50/CA により、 Ca^{2+} 蛍光色素 Fura 2 を用いて測定した。BCR 刺激には $0.002\sim 2.0\ \mu\text{g/ml}$ の抗 BCR IgM を使用し、それぞれの刺激強度に対する反応を観察した。

DT40 細胞株では、次のような Ca^{2+} オシレーションのパターンの変化がみられた。 $0.002\sim 0.13\ \mu\text{g/ml}$ の範囲の BCR 刺激では、高頻度で持続時間の短い Ca^{2+} スパイクからなる Ca^{2+} オシレーションが観察され、一方でより高濃度の $0.5\sim 2.0\ \mu\text{g/ml}$ では刺激直後から一過性の持続時間の長い Ca^{2+} 上昇が観察され、その後振幅の低い Ca^{2+} 上昇が低頻度でみられた。また、 $0.002\ \mu\text{g/ml}$ 未満の刺激では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は観察されなかった。

低発現細胞株(KMN 60, 107)では野生株の DT40 細胞種とは IP_3R1 発現量は同程度であるが、細胞内 Ca^{2+} の動態は全く異なるパターンで観察された。 $0.025\sim 0.25\ \mu\text{g/ml}$ の範囲の BCR 刺激では、振幅が小さくきわめて低頻度な Ca^{2+} オシレーションがみられ、より高濃度の $0.5\sim 2.0\ \mu\text{g/ml}$ では刺激直後に細胞内 Ca^{2+} 濃度が軽度上昇し、この状態が数十分にわたって持続し、オシレーションは観察されなかった。 $0.002\ \mu\text{g/ml}$ 以下の刺激強度では Ca^{2+} 濃度の上昇は観察されなかった。低発現の 2 つの細胞株で、2 つともほぼ同様な結果であった。

これに対し、高発現細胞株(KMN 1,13)では、非常に興味深いことに野生株の DT40 細胞株の 10 倍もの IP_3R が発現しているにもかかわらず、DT40 細胞株と同様な Ca^{2+} 上昇パターンを示した。また、BCR に対する感受性も類似しており、 $0.002\ \mu\text{g/ml}$ 未満の刺激強度では Ca^{2+} 上昇はみられなかった。さらに発現量の差による BCR 刺激に対する感受性は明らかな差はなかった。

一方、すべての IP_3R を欠失した R23-11 細胞株では各濃度の BCR 刺激に Ca^{2+} 上昇はみられなかった。また、DT40 細胞株, R23-11 細胞株, 各 KMN 細胞株(1,13,60,107)において、Thapsigargin(TG) $0.2\ \mu\text{M}$ でほぼ同様な Ca^{2+} 上昇がみられ、細胞内 Calcium 貯蔵・放出についても差はないと考えられた。

さらに BCR 刺激による Apoptosis 誘導実験を行った。 IP_3R を全く発現していない R23-11 細胞では、刺激で Apoptosis が誘発される細胞は優位に少ないが、 IP_3R1 を単独発現している細胞は野生種 DT40 細胞より細胞死を優位に生じやすいことがわかった。しかも、刺激強度と発現量のそれぞれが細胞死の誘導率に相関をもっている。さらに細胞内 Ca^{2+} の平均上昇量と誘導細胞死との関係から、野生種 DT40 細胞では Ca^{2+} 濃度上昇と細胞死誘導率が正の相関をもつことがわかったが、 mIP_3R 単独発現細胞では発現量に関わりなく、細胞内平均 Ca^{2+} 上昇量と誘導細胞死の間にも正の相関があることがわかった。このことから、3 種類の IP_3R をいずれも発現している野生種と、単独発現した細胞とでは Ca^{2+} シグナルのもつ意味合いが本質的に異なる可能性が示唆された。

自然界には存在しないが、**mIP₃R1** について、単独のサブタイプのみを発現し、なおかつ発現量の異なる複数の安定発現細胞株を世界で初めて作成し、単独の **mIP₃R1** 発現による、細胞内 **Ca²⁺** 変動を観察した。**mIP₃R1** 単独発現でも、発現量によってその細胞内 **Ca²⁺** 動態は全く異なっていることが判明し、さらに野生種と比べ **mIP₃R1** 単独発現細胞では誘導細胞死がより起きやすくなることから、**Ca²⁺** 濃度上昇自体のもつ意味合いが異なってくることもわかった。野生株 **DT40** 細胞株からすべてのサブタイプの **IP₃R** を欠失させた **R23-11** 細胞株を作成する過程で作られた、内在性の 3 種類のニワトリ **IP₃R** をそれぞれ単独で残した細胞を使った、ニワトリの各 **IP₃R** のサブタイプについて解析した報告などから、従来は **Ca²⁺** の細胞内変動による細胞機能発現の違いは、主として **IP₃R** の各サブタイプ間での発現量（存在量）の差とそれぞれのサブタイプに固有の性質によって説明できると考えられていた。しかし、今回の実験では、単独発現の **IP₃R** であっても刺激強度によって十分に多様な細胞内 **Ca²⁺** 動態を生じ得ること、さらに細胞の刺激条件が全く同じでも発現量が違っていれば、個々の細胞での細胞内 **Ca²⁺** 動態が異なることから、個々の細胞・組織における機能発現の違いが説明できることが示唆される。それはセカンドメッセンジャーとしての **Ca²⁺** 動態に依存して細胞機能の発現が異なるとしたならば、単独のタイプの **IP₃R** でも細胞機能の多様性を説明できるだけでなく、さらにそれぞれの **subtype** が全く異なった独自の細胞機能の発現に参与している可能性があることを示している。