

審査の結果の要旨

氏名 宮内 浩

本研究は、細胞の機能発現・apoptosisなどに重要な役割を持ち、極めて広範な組織や細胞に存在するイノシトール3リン酸受容体(IP₃R)について、IP₃Rを全く発現しないKnockout Cellが作製されたことを利用し、これに異なる発現量でIP₃Rを発現させ、刺激によりApoptosisを誘導する系を用いて、細胞内Ca²⁺動態を測定し、発現量による細胞機能誘導の解析を試みたもので、下記の結果を得ている。

1. 従来、IP₃Rサブタイプの単独発現の生物種はなく(個体として生存できないため)、ようやく近年cell lineとして確立された。しかし、単独発現系でも、依然として発現量と細胞内Ca²⁺濃度変化や細胞機能との相関を直接観察できる実験系は存在しない。また、IP₃Rはそれぞれのサブタイプが、組織・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と言われており、発現量による機能発現の違いを知る方法もない。今回の実験系の特徴は、単独発現の系で、発現量によって細胞内Ca²⁺変動が変わり、その結果、Apoptosis誘導率も変わることを観察できたことにある。従って、この論文で主張したいことは、発現量の違いが細胞機能発現に関わることを初めて直接示したことである。
2. このことを解析するために、Ca²⁺ signalの量的解析として、平均Ca²⁺上昇量を算出した。野生種のDT40細胞では、平均Ca²⁺上昇(=y)と刺激抗体M4の濃度(=x)とで、両対数グラフ上で直線に近似でき、これは $y=ax^b$ の出力関数で表記することができると考えられる。aはCa²⁺ signalの振幅を、bはM4濃度に依存した勾配を反映する。DT40細胞株でbest fitした時のa, b値は、 $a=54 \pm 10$ 、 $b=0.22 \pm 0.08$ で、計算上 $b \leq 1$ であると、M4濃度と平均Ca²⁺上昇の関係はより非線形的になる。同様に、安定発現細胞株で係数を算出すると、a, b値はそれぞれ、高発現細胞株(KMN1, KMN13)では低発現細胞株(KMN60, KMN107)と比べ、aの値はより大きく、 $a(KMN1, KMN13) \geq a(KMN60, KMN107)$ となった。これは、Ca²⁺ signalの振幅は、発現強度に応じて大きくなることを示している。一方で、b値はいずれも $b \leq 1$ と計算され、平均Ca²⁺上昇量とM4濃度との関係は安定発現細胞株でも線形にならないことを示し、さらにb

値に有意差があることから高発現細胞株と低発現細胞株では非線形性の程度が異なることが示唆される。つまり、**b** 値も高発現細胞株の方が低発現細胞株より大きい傾向を示すので、発現レベルは非線形性に影響する。従来論文では、IP₃R サブタイプの組み合わせを欠如した変異 DT40 細胞株を用いると、

IP₃R1 は、やや不規則な Ca²⁺ oscillation を生じ、

IP₃R2 は、持続的で規則的な Ca²⁺ oscillation に必要で、

IP₃R3 は、単相の Ca²⁺ 上昇を生じる傾向にある、

と報告されているが、それぞれのタイプの発現量については考慮されていない。本研究の実験結果からは、受容体の細胞内発現量が細胞内 Ca²⁺ 動態に有意に影響し、結果的に機能発現も異なってくることを示し、Ca²⁺ 上昇と IP₃R サブタイプとの関係は発現量も考慮すべきであることを示唆した。このため、各々の IP₃R サブタイプ間の機能的な違いを解析するには、組織種や生物種による固有の発現量の違いも考慮し、各サブタイプの機能と細胞機能発現との相関を検討する必要があることを示した。

3. 免疫電子顕微鏡の結果について、細胞内微細構造の保存性が悪く、特異抗体も受容体の存在部位である小胞体上に集積しているとは確認しがたく、曖昧なデータのため、免疫電顕の結果を論文に載せることを取りやめ、図と関連表記を削除した。
4. 野生種の DT40 細胞株において、M4 抗体による BCR 刺激で誘導される Apoptosis について知見を追加し、本文中にも最近の知見の引用を追加した。
5. 各図において、図の表記の順を野生種(DT40)、triple knockout cell (R23-11)、単独発現細胞株(KMN1, KMN13, KMN60, KMN107 : 前 2 者が高発現、後 2 者が低発現)の順に統一した。
6. 免疫細胞染色について、本文と図の表現の乖離を修正し、また比較しやすい写真を使用した。
7. IP₃R の特異的抗体である、4C11 抗体、18A10 抗体につき、文献を明示し、本文中にも内容を補填した。

以上、本論文は IP₃R について自然界には存在しない単独のサブタイプだけを発現した安定細胞株を作製し、これまで比較されたことのない発現量差による細胞内 Ca²⁺ 動態の変化を解析し、細胞機能発現の多様性をもたらす可能性を明らかにするとともに、各サブタイプの混在のため今まで不可能に等しかった単独のサブタイプの機能解析に今後重要な貢献をもたらすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。