

論文の内容の要旨

論文題目

Intracellular heterogeneity of Ca^{2+} release activity via ryanodine receptors

リアノジン受容体を介するカルシウム放出活性の細胞間不均一性

指導教員 飯野正光教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 中村直俊

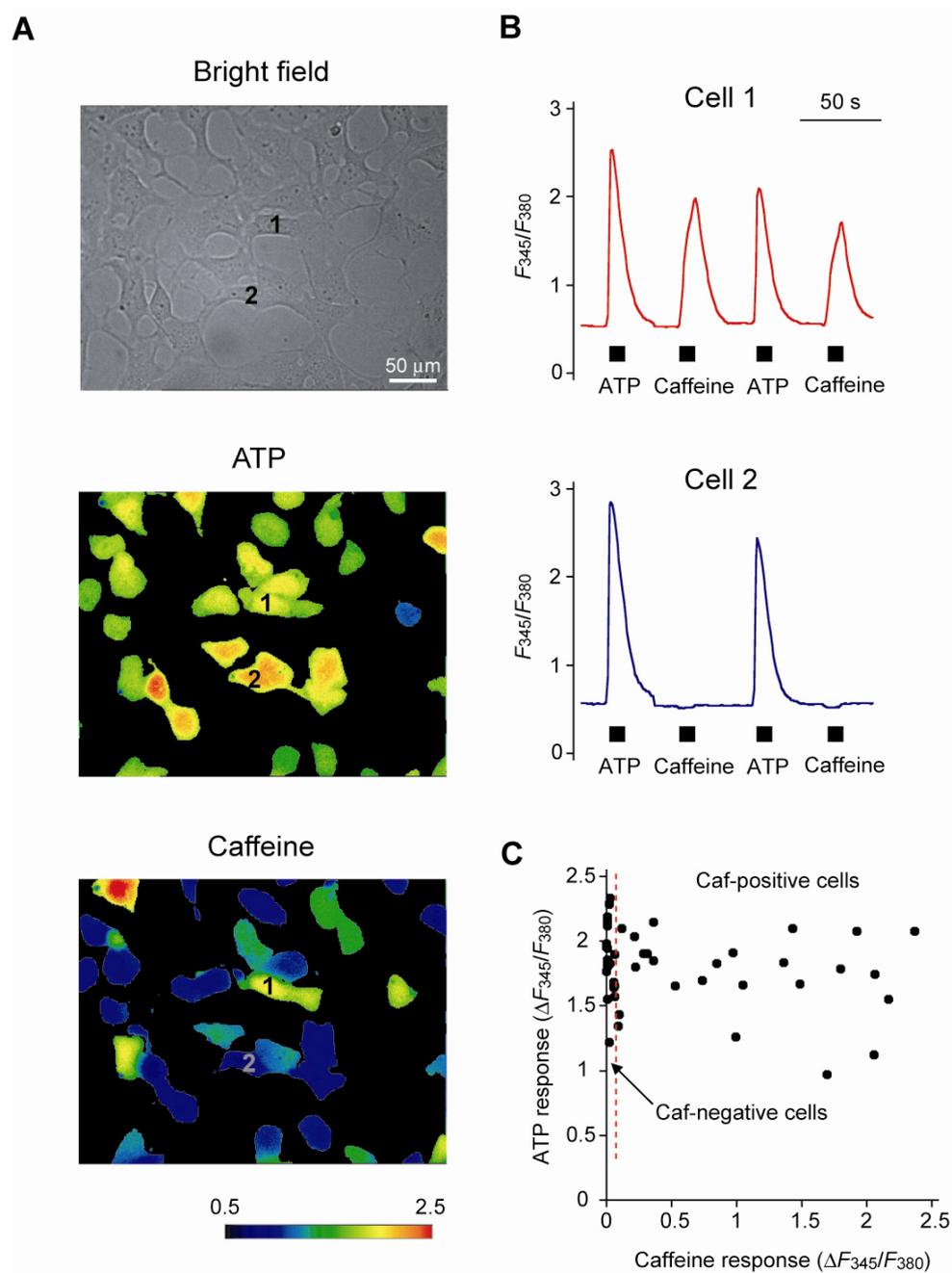
0. 研究の背景

細胞内 Ca^{2+} ストアは、リアノジン受容体およびイノシトール三リン酸 (IP_3) 受容体の 2 種のチャンネルを介して細胞質に Ca^{2+} を放出することにより、種々の細胞機能に重要な役割を担う細胞内 Ca^{2+} シグナルを作り出している。

リアノジン受容体は細胞内 Ca^{2+} ストア膜上に存在する Ca^{2+} 放出チャンネルであり、 Ca^{2+} の結合によって活性化されて Ca^{2+} を放出する (Ca^{2+} 誘発 Ca^{2+} 放出機構)。リアノジン受容体はカフェインなどの薬物によっても活性化される。

IP_3 受容体もリアノジン受容体と同じ細胞内 Ca^{2+} 放出チャンネルファミリーに属し、 IP_3 と Ca^{2+} の両方の結合によって活性化されて Ca^{2+} を放出する。たとえば、細胞外 ATP は P2Y 受容体を介して PLC を活性化し、 IP_3 の産生を促進して Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} を放出させる。

リアノジン受容体と IP_3 受容体は同じ細胞の Ca^{2+} ストアに共局在することがあり、その共局在が細胞内の Ca^{2+} 動態にどのような影響を与えるかについては様々な研究が行われてきた。これまで、「リアノジン受容体の存在する Ca^{2+} ストア」と「 IP_3 受容体の存在する Ca^{2+} ストア」は必ずしも同一ではなく、 Ca^{2+} ストアはいくつかの機能的なコンパートメントに分かれている、という考え方が提唱され、様々な細胞種においてコンパートメントの詳細が調べられている。その中で、「リアノジン受容体が存在する Ca^{2+} ストア」のみをもつ細胞や、「 IP_3 受容体が存在する Ca^{2+} ストア」のみをもつ細胞、「リアノジン受容体が存在する Ca^{2+} ストア」と「 IP_3 受容体が存在する Ca^{2+} ストア」が完全にもしくは部分的に重なり合う細胞などが報告されている。しかし、そのような機能的に異なる Ca^{2+} ストアのコンパートメントが生じるメカニズムは明らかになっていない。



参考図（論文の Figure 2）：HEK293 細胞の Ca^{2+} 応答。

アゴニスト投与後の細胞内 Ca^{2+} 濃度を Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fura-2 で測定した。(A) アゴニスト投与時の F_{345}/F_{380} （細胞内 Ca^{2+} 濃度の指標）。上：明視野像。中：ATP 10 μM 投与時。下：カフェイン 25 mM 投与時。(B) (A) 中の細胞 1, 2 の F_{345}/F_{380} 値の経時変化。細胞 1 はカフェインに反応しているが、細胞 2 は反応していない。(C) ATP の反応 ($\Delta F_{345}/F_{380}$) とカフェインの反応 ($\Delta F_{345}/F_{380}$) を対比した散布図。個々の点は細胞を表す。約 40% の細胞のみがカフェインに反応する。

1. カフェインに反応する細胞と反応しない細胞の違い

本研究では、ヒト胎児腎由来の培養細胞株である HEK293 細胞が、その約 4 割の細胞のみがカフェインに反応してリアノジン受容体から Ca^{2+} を放出させるのに対し、ほぼすべての細胞が ATP に反応して IP_3 受容体から Ca^{2+} を放出させる、という興味深い特徴をもつことを明らかにした。本研究ではこの HEK293 細胞をモデル系として用い、機能的に異なる Ca^{2+} ストアのコンパートメントが生じるメカニズムを研究した。

植物アルカロイドであるリアノジンは、カフェインによってリアノジン受容体が開いているときに結合し、受容体を開口状態で固定する働きをもつため、カフェインとリアノジンの同時投与によって「リアノジン受容体が存在する Ca^{2+} ストア」を空にすることができる。実際、カフェインとリアノジンの同時投与により、カフェインに反応していた HEK293 細胞はカフェインに反応しなくなった。興味深いことに、カフェイン・リアノジンの投与前後で、ATP に対する反応も大きく減少した。一方、もともとカフェインに反応しなかった細胞では、カフェイン・リアノジンの投与前後で、ATP に対する反応にあまり変化は見られなかった。カフェインに反応した細胞と反応しなかった細胞をまとめて解析したところ、ATP に対する反応の減少量と、もともとのカフェインの反応の大きさとの間には正の相関が見られた。以上の結果は、HEK293 細胞が、「 IP_3 受容体のみが存在する Ca^{2+} ストア」と「 IP_3 受容体とリアノジン受容体の両方が存在する Ca^{2+} ストア」の 2 つの Ca^{2+} ストア・コンパートメントを持つことを示唆している。カフェインに反応する細胞は両方のコンパートメントをもち、反応しない細胞は前者のコンパートメントのみを持つと考えられる。

この解釈に基づくと、カフェインに反応する細胞としない細胞の間に、リアノジン受容体の発現量の差が見られることが期待される。これを検証するため、異なるサブタイプのリアノジン受容体を認識する 2 種類の抗体を用いて、HEK293 細胞の免疫染色を行った。免疫染色の半定量性は、リアノジン受容体を過剰発現した細胞の免疫染色によって確認された。当初の期待に反し、細胞間に受容体発現量の明確な差は検出できなかった。また、 Ca^{2+} を Ca^{2+} ストアへ取り込む SERCA ポンプの抗体を用いた免疫染色でも、細胞間に発現量の明確な差は検出できなかった。

この結果を説明するため、リアノジン受容体を介する Ca^{2+} 放出の数理モデルを援用して解析を行った。モデル上で SERCA ポンプの活性を一定にしてリアノジン受容体の活性を増加させると、最初は Ca^{2+} 応答が見られなかったが、ある所から急に Ca^{2+} 応答が見られるようになった。また、リアノジン受容体の活性を一定にして SERCA ポンプの活性を減少させると、最初は Ca^{2+} 応答が見られなかったが、ある所から急に Ca^{2+} 応答が見られるようになった。このように、リアノジン受容体を介する Ca^{2+} 応答は「全か無か」の性格をもち、SERCA ポンプの活性がリアノジン受容体の活性を上回った場合、 Ca^{2+} 応答は見られず、一方リアノジン受容体の活性が SERCA ポンプの活性を上回った場合、それが Ca^{2+} 誘発 Ca^{2+} 放出機構によって増幅されて Ca^{2+} 応答として観察されることが示唆された。

この示唆は次の実験によって裏付けられた。まず、SERCA の阻害薬 CPA を細胞に投与したところ、カフェインに反応しなかった一部の細胞がカフェインに反応するようになった。次に、カフェインの濃度を漸増させて、リアノジン受容体の活性を上げることも、カフェインに反応しなかった一部の細胞がカフェインに反応することを確認した。最後に、リアノジン受容体を過剰発現させた細胞においては、カフェインに対する反応はほぼ 100% 観察された。

2. カフェイン反応性の異なる細胞を生み出すメカニズム

前述したように、HEK293 細胞では約 4 割の細胞のみがカフェインに反応し、残りの約 6 割の細胞はカフェインに反応しない。カフェインに反応する細胞と反応しない細胞を生み出すメカニズムについてさらに解析を進めた。

1 つの可能性として、HEK293 細胞が、カフェインに反応する細胞クローンと反応しない細胞クローンの混合物である、ということが挙げられる。これを検証するため、限界希釈法によって HEK293 細胞をクローン化し、そこから得た単一細胞由来の HEK293 細胞のカフェインに対する反応を調べた。その結果、単一細胞由来の HEK293 細胞においても、約 4 割の細胞のみがカフェインに反応を示した。これにより、上記の可能性は否定され、個々の HEK293 細胞が増殖する過程でカフェインに反応する細胞と反応しない細胞の両方が生まれることが示唆された。この過程を詳しく観察するため、Ca²⁺感受性蛍光タンパク質 GCaMP2 を発現させた HEK293 細胞を用いて、細胞を 37°C、5% CO₂ の環境で培養しながら、そのカフェインに対する反応を時間を置いて観察する実験系を確立した。その結果、12 時間の観察時間を経て、約 1 割の細胞が「カフェインに反応する状態」から「カフェインに反応しない状態」へ、また「カフェインに反応しない状態」から「カフェインに反応する状態」へ、その表現型をスイッチさせる現象が明らかになった。このことは、個々の細胞が、「カフェインに反応する状態」と「カフェインに反応しない状態」の間を一定の確率で遷移していることを示唆しており、これによって全体の一定割合の細胞がカフェインに反応する状態が維持されていることが説明された。

この現象は、リアノジン受容体と SERCA ポンプなどの Ca²⁺応答を決定する種々の因子の活性のバランスが、おそらく時間経過に伴う遺伝子発現のゆらぎによってわずかに変化することで、表現型に劇的な変化がもたらされるという、哺乳類細胞における好例を提供している。カフェイン反応性の細胞間不均一性は HEK293 細胞だけでなく、平滑筋組織などでも観察されることから、同様の表現型スイッチ現象が *in vivo* の細胞間不均一性を説明しうるかどうかは今後の興味深い課題であるといえる。

3. 要約

HEK293 細胞は、約 4 割の細胞のみがカフェインに反応してリアノジン受容体から Ca^{2+} を放出させるのに対し、ほぼすべての細胞が ATP に反応して IP_3 受容体から Ca^{2+} を放出させる、という興味深い特徴をもつ。本論文では、HEK293 細胞をモデル系として、このような細胞間不均一性が生まれるメカニズムを研究した。

その結果、カフェインに対する Ca^{2+} 応答が「リアノジン受容体による Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出」と「SERCA ポンプによる Ca^{2+} ストアへの Ca^{2+} 取り込み」のバランスによって生じ、前者が優位ならば細胞は Ca^{2+} 応答を示し、後者が優位ならば細胞は Ca^{2+} 応答を示さない、という示唆を得た。この考えに基づき、実験結果を統一的に説明できることが確認された。

さらに、カフェインに反応する細胞と反応しない細胞の 2 種類が生み出されるメカニズムについて調べた。限界希釈法によってクローン化した細胞においても約 4 割の細胞のみがカフェインに反応したことから、クローン化された細胞が増殖する過程で、カフェインに反応する細胞と反応しない細胞の両方が生み出されることが示唆された。実際、HEK293 細胞を培養しながらカフェインに対する反応を経時的に観察することにより、細胞が「カフェインに反応する状態」と「反応しない状態」の間を一定の確率で遷移することが明らかになった。