

## 審査の結果の要旨

中村 直俊

本研究では、ヒト胎児腎由来の培養細胞株である HEK293 細胞をモデル系として用い、機能的に異なる  $\text{Ca}^{2+}$  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。

1. HEK293 細胞に、リアノジン受容体のアゴニストであるカフェインと、 $\text{IP}_3$  受容体のアゴニストである ATP を投与した。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  $\text{Ca}^{2+}$  を放出するのに対し、ほぼすべての細胞が ATP に反応して  $\text{IP}_3$  受容体から  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させることを明らかにした。前者の細胞間不均一性はこれまでの文献には報告がない。カフェインに対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答の細胞間不均一性が、モルモットの門脈平滑筋細胞で観察されることも確認した。
2. カフェインに応答する HEK293 細胞では、リアノジン受容体の存在する  $\text{Ca}^{2+}$  ストアを空にする作用をもつリアノジンの投与によって、カフェインに反応しなくなった。一方このとき、ATP に対する反応も減少したが、ゼロにはならなかった。これまでのコンパートメント説によれば、これはカフェインに応答する HEK293 細胞が「 $\text{IP}_3$  受容体のみが存在する  $\text{Ca}^{2+}$  ストア」と「 $\text{IP}_3$  受容体とリアノジン受容体の両方が存在する  $\text{Ca}^{2+}$  ストア」の両方をもつことを示唆している。
3. カフェインに応答する細胞と応答しない細胞ではコンパートメント構成が異なることから、カフェインに対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答に関わるリアノジン受容体や SERCA ポンプの発現量の差が見られることが期待された。しかし、免疫染色の結果、細胞の発現量の分布は平均値の周りに集積し、細胞間の明確な発現量の差は確認できなかった。
4. カフェインに対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答に関わるタンパク質の発現量に明確な差がないとしても、 $\text{Ca}^{2+}$  応答に差が生じるメカニズムを、リアノジン受容体を介する  $\text{Ca}^{2+}$  放出の数理モデルを援用して解析した。モデルから、 $\text{Ca}^{2+}$  放出と  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みのバランスによって  $\text{Ca}^{2+}$  応答が成立していること、バランスがどちらに傾くかによって  $\text{Ca}^{2+}$  応答の有無が決定することが示唆された。このバランス説（閾値説）は、リアノジン受容体の発現や活性を高めたり、SERCA ポンプを阻害したりする実験によって支持された。この過程には  $\text{Ca}^{2+}$  誘発  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構による  $\text{Ca}^{2+}$  応答の増幅が本質的と考えられた。

5. 限界希釈法によってクローン化された **HEK293** 細胞においても、カフェインに対する反応性に細胞間不均一性が観察された。このことから、**HEK293** 細胞が、同じ環境におかれたクローナルな細胞が、2種類の表現型を示しうる、哺乳動物細胞での興味深い例を提供していることがわかる。
  
6. 上記のクローン化実験で示唆されたように、1個の細胞から「カフェイン応答性」と「カフェイン非応答性」の両種類の細胞が生み出される過程を詳しく観察するため、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光タンパク質 **GCaMP2** を発現させた **HEK293** 細胞を用いて、細胞を培養しながら、カフェインに対する  $\text{Ca}^{2+}$ 応答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2割の細胞が、「カフェイン応答性」から「カフェイン非応答性」へ、あるいは「カフェイン非応答性」から「カフェイン応答性」へと表現型をスイッチさせる現象が明らかになった。スイッチ現象の過程において細胞分裂を経る例、細胞分裂を経ない例が両方観察された。このスイッチ現象によって、**HEK293** 細胞のカフェインに対する応答の細胞間不均一性が維持されていることが示唆された。

以上、本論文では **HEK293** 細胞をモデル系として、細胞のカルシウム応答性がフリップ・フロップ様に時間とともに変化する新しい現象を明らかにした。これは、分子の発現レベルの細胞ごとの差が、ポジティブフィードバックによって増幅されて質的な変化に導かれる機構が、これまで示唆されてきた細菌や酵母のような単細胞生物のみならず、哺乳動物の細胞においても成立するという重要な例を提示しており、学位の授与に値するものと考えられる。