論文の内容の要旨

論 文 題 目　Microtubule-driven dynamics of an endoplasmic reticulum membrane-bound Ca^{2+} sensor protein STIM1

和訳　微小管に依存した小胞体膜上 Ca^{2+}センサー蛋白質 STIM1 の動態

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 16 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名　林　健二

細胞内カルシウムイオンは受精、細胞死、筋収縮、遺伝子発現など、様々な生理機能に関与する。通常の細胞内カルシウムイオン濃度は 100 nM 程度に抑えられているが、細胞膜の脱分極や、アゴニスト刺激などにより細胞が活性化されるとμM オーダーにまでその濃度は上昇する。この濃度上昇には二つの経路、すなわち、細胞外からのカルシウム流入と、細胞内カルシウムストアからの放出が存在する。細胞内小器官の一つである小胞体が、カルシウムイオンの主要な細胞内ストアとして機能し、細胞内のカルシウムイオン濃度を調節している。カルシウム放出により小胞体内腔のカルシウムが枯渇すると、ストア作動性カルシウム流入(store operated Ca^{2+} influx; SOC 流入)と呼ばれる、細胞膜を介した細胞外からのカルシウムの流入が誘導されることが知られている。

近年、ショウジョウバエにおける RNAi スクリーニングに端を発した一連の研究により、小胞体に局在する一回膜貫通型タンパク質 stromal interaction molecule 1 (STIM1)が SOC 流入の活性化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。STIM1

をノックダウンすると SOC 流入は抑制され、過剰発現すると反対に SOC 流入は増加することが報告されている。STIM1 は小胞体内腔に面した N 末端側に、EF hand Ca^{2+}結合モチーフを持っており、これにより小胞体内腔カルシウムの枯渇を感知していると推測されている。また、小胞体内腔のカルシウムの枯渇により、STIM1 は細胞膜近傍に顆粒状に集積し、そこで SOC チャネルと相互作用することが示唆されている。しかしながら、どのようにして STIM1 が小胞体から細胞膜近傍にまで局在を変化させるのか、また、STIM1 と SOC チャネル以外の因子の関与の可能性など、SOC 流入の全体像はまだ明らかとなっていない。

これまでの研究で、内因性 STIM1 遺伝子をノックアウトしたトリ DT40 B リンパ球において SOC 流入が欠失することを確認している。さらに、この細胞に STIM1 を過剰発現させたところ、SOC 流入は回復することを確認した。STIM1 の機能ドメインを確認するために、様々な欠損変異体を作成し、STIM1 欠失 DT40 細胞に導入した。Coiled-coil (CC)領域、Ser/Thr-rich (ST)領域、Sterile αmotif (SAM)領域のいずれかを欠失した STIM1 は、SOC 流入を回復しないことが明らかとなった。我々はこれらの変異体の細胞内局在に異常がある可能性を考え、GFP-STIM1 の経時的イメージングにより、この変異体の挙動を観察した。その結果、STIM1 がダイナミックな細胞内局在変化を示すことを発見した。この STIM1 の細胞内動態メカニズムを明らかとすることを本研究は目的としている。

STIM1 は小胞体内腔カルシウムの枯渇により細胞膜近傍に顆粒状に局在し、それが SOC 流入に関与することが知られることから、細胞膜近傍における GFP-STIM1 の挙動を高解像度で取得するために全反射顕微鏡を用いた。この観察により GFP-STIM1 は単に小胞体膜上に一様に局在するだけでなく、それに加えて一部の領域に高濃度に集積していることを初めて見出した。この集積は一細胞あたりに数個～数十個ほど観察され、それぞれが 1-2 μm 程度の線維状形態を示し、およそ 0.1 μm s^{-1} の速度で一方向性に移動していた。この形態が彗星（コメット）を連想させることから、以後 STIM1 コメットと呼ぶことにする。STIM1 は小胞体内腔のカルシウムの枯渇時に、小胞体から細胞膜に情報を伝えていると考えられていることから、STIM1 コメットの挙動が小胞体内腔のカルシウム枯渇時に変化するのではないかと推測した。そこで B 細胞受容体アゴニスト刺激による IP_3 シグナリングを介し

た小胞体内腔のカルシウム枯渇、或いは Ca^{2+}-ATPase 阻害薬である thapsigargin による小胞体内腔カルシウム枯渇処理を行った。刺激を行った直後から STIM1 コメットは減少し、その減少に伴って細胞膜直下に顆粒状の集積形成が認められた。

次に、SOC 流入を示さない STIM1 の変異体の挙動を観察した。GFP-STIM1ΔCC は、線維状局在を示したもののほとんど移動せず、小胞体内腔カルシウム枯渇時においても顆粒状の局在は認められなかった。GFP-STIM1ΔST は、小胞体と思われるメッシュ状の構造に一様に局在し、小胞体内腔カルシウム枯渇時においても、顆粒状の集積は認められなかった。GFP-STIM1ΔSAM は、野生型 STIM1 と類似した STIM1 コメット形成を認めることができたが、小胞体内腔のカルシウム枯渇による顆粒状の集積への局在変化は示さなかった。これらのことは、STIM1 は CC 領域および ST 領域を介して STIM1 コメット動態を実現し、顆粒状集積にはそれらに加えて SAM 領域を必要とすることを示唆する。また、これらの変異体において SOC 流入の回復が見られないことから、顆粒状の集積が SOC 流入を誘導していることが支持された。

STIM1 は小胞体膜上に局在するタンパク質であることから、STIM1 コメットも小胞体に局在するのではないかと考えた。DsRed に小胞体移行シグナルを融合させた遺伝子を導入することで小胞体を可視化し、GFP-STIM1 との同時イメージングを行った。これにより STIM1 コメットを含めて、GFP-STIM1 のシグナルは小胞体のシグナルと重なることが認められた。

微小管のプラス端に局在する微小管プラス端集積因子(+TIPs)と呼ばれるタンパク質群が、STIM1 コメット動態に類似していることから、生細胞内における STIM1 と+TIPs の共局在の可能性を追究した。EB1 は APC 結合タンパク質として同定されたタンパク質であり、+TIPs の一つであることが知られる。EB1 に RFP を融合させた RFP-EB1 と GFP-STIM1 を、DT40 細胞より細胞体の大きく詳細な観察の容易な HeLa 細胞に導入し、全反射顕微鏡を用いて観察したところ、両者が共局在していることが認められた。また、微小管の重合阻害薬である nocodazole によりコメット様の挙動を示す GFP-STIM1 の局在が壊されたことも、STIM1 と+TIPs との共局在を裏付けた。同様に、微小管の脱重合阻害薬である taxol も GFP-STIM1 のコメット様の動きを破壊することが明らかとなった。これらのことは、STIM1 が微

小管の重合のダイナミクスを利用することで、細胞内における局在を変化させているということを示唆している。また、+TIPs の一成分である CLIP170 との同時イメージングにより、ストア内腔カルシウムの枯渇により顆粒状に局在した STIM1 は +TIPs とは共局在しないことが示された。

これら一連の研究により、STIM1 コメット動態とそのメカニズムが初めて明らかとなった。すなわち、小胞体内腔カルシウム濃度を検出すると考えられる STIM1 の少なくとも一部は、微小管先端に局在し、微小管の重合ダイナミクスを利用して小胞体膜上における局在を刻々変化させることが示された。今後の研究により、STIM1 コメットが小胞体の形態あるいは機能維持に関与するか、あるいは SOC 流入に関与するかを明らかにする必要がある。