

審査の結果の要旨

氏名 篠原 理

本研究は、オワンクラゲ由来、緑色蛍光タンパク質変異体である青色蛍光タンパク質 (efficient cyan fluorescent protein: ECFP) および黄色蛍光タンパク質 (Venus) と 1 型 IP_3 受容体 (IP_3R1) とのキメラタンパク質を作製し、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) をもちいて、 IP_3 および Ca^{2+} 結合による構造変化をリアルタイムに可視化し、リガンド結合によって引き起こされるチャネル開口の分子機構を明らかにすることを目的とし、下記の結果を得ている。

1. Venus 融合 IP_3R1 を発現した組換えバキュロウイルスを Sf9 細胞に感染させ、そのマイクロゾーム画分における蛍光タンパク質融合 IP_3R1 の IP_3 結合活性を、 $[^3H]$ 標識 IP_3 放射性活性により検討した。Venus 融合 IP_3R1 の IP_3 結合活性は、蛍光タンパク質を融合していない野生型とほぼ同等な値を示した。
2. ニワトリ B 細胞 DT40 細胞由来で内在性 IP_3 受容体を欠く細胞株 R23-11 細胞をもちいて、各蛍光タンパク質融合 IP_3R1 の安定発現細胞株を確立した。この安定発現細胞株をもちいて、B 細胞受容体特異的モノクローナル抗体 M4 刺激による、 IP_3 誘導性 Ca^{2+} 放出にともなう細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を Ca^{2+} 指示薬 Fura-2 の蛍光変化により測定した。アミノ (N) 末端あるいはカルボキシル (C) 末端のいずれか一方にのみ蛍光タンパク質を融合した IP_3R1 は、蛍光タンパク質を融合していない野生型 IP_3R1 と同等の 4 量体 IP_3 誘導性 Ca^{2+} 放出チャネルとして機能することが確認された。
3. ECFP 融合 IP_3R1 と野生型 IP_3R1 を HeLa 細胞に一過性に発現させ、48 時間後の細胞膜画分をゲル濾過カラムにより分別し、抗 IP_3R1 抗体および抗 GFP 抗体をもちいてウエスタンブロッティング法により、その回収画分を検討した。ECFP 融合 IP_3R1 は、野生型マウス IP_3R1 よりやや大きい分子量の位置でほぼ同じ分画 13-16 に回収された。この結果からも、蛍光タンパク質融合 IP_3R1 は 4 量体を形成しうることを確認された。
4. ECFP 融合 IP_3R1 を COS7 細胞に一過性に発現させ、48 時間後、細胞を固定

し細胞膜透過性処理した後、抗 IP₃R1 抗体と小胞体のマーカーである calreticulin をコントロールとして 2 重染色をおこない、その細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。ECFP 融合 IP₃R1 は小胞体膜上に網目状に存在することが確認された。

5. ECFP あるいは Venus 融合 IP₃R1 を HeLa 細胞に一過性に共発現させ、その細胞内での両蛍光タンパク質の局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、*N*末端同士、*N*末端と *C*末端、および *C*末端同士の 3 種類いずれの組み合わせにおいても、両蛍光タンパク質の細胞内局在はよく一致することが確認された。

6. ECFP あるいは Venus 融合 IP₃R1 の、*N*末端同士、*N*末端と *C*末端、および、*C*末端同士の各組み合わせの共発現細胞に、Venus 固有の励起波長(515 nm)のレーザー強照射をおこない、照射前後の ECFP の蛍光強度を比較した。これら 3 種類いずれの組み合わせにおいても、Venus の消光後、ECFP の蛍光強度は約 20% 増加した。ECFP 融合 IP₃R1 のみ発現している細胞では、ECFP の蛍光強度の増加は認められなかった。このことから、ECFP あるいは Venus 融合 IP₃R1 は、4 量体を形成し、しかも、静止状態において FRET が生じていることが確認された。

7. *N*末端同士、*N*末端と *C*末端、および、*C*末端同士の組み合わせの ECFP あるいは Venus 融合 IP₃R1 共発現細胞を、PLC 阻害剤、および、Ca²⁺ポンプ阻害剤で処理し、β-escin にて穏やかに細胞膜透過性処理をした後、Ca キレートによって正確に調整された種々の濃度の Ca²⁺含有細胞内様溶液を灌流により添加し、ECFP と Venus 間の FRET 効率(Venus/ECFP)の変化を、蛍光顕微鏡を用いて経時的に測定した。ECFP および Venus の蛍光強度は Ca²⁺濃度依存的に各々増加・減少し、FRET 効率は Ca²⁺濃度依存的に、異なる Ca²⁺感受性で、各々、最大 27%、14%、15%減少した。この結果から、IP₃R1 は Ca²⁺単独刺激により、いずれの相対的末端間距離も離れるような、発散型構造変化をすることが示唆された。

8. Ca²⁺非存在下で IP₃を添加すると、*N*末端同士の組み合わせでのみ、最大 10% 程度の FRET 効率の増加を示した。IP₃結合親和性を欠失した点変異体 K508 の同じ組み合わせでは、この FRET 効率の増加が完全に消失したことから、IP₃結合に伴う相対的 *N*末端間距離が近づくような構造変化が示唆された。

9. 0.01~10 μM IP₃存在下で Ca²⁺を添加すると、*N*末端同士、*N*末端と *C*末端、および、*C*末端同士のいずれの組み合わせでも、FRET 効率変化の Ca²⁺濃度依存性曲線は IP₃濃度依存的により高濃度 Ca²⁺領域へと偏位した。すなわち、みかけの FRET 効率の Ca²⁺感受性は IP₃濃度依存的に低下した。そこで、「IP₃存在下に Ca²⁺

添加によって生じる FRET 効率の変化」から「IP₃ 非存在下に Ca²⁺ 添加によって生じる FRET 効率の変化」を差し引いてみると、いずれの組み合わせにおいても、細胞内の生理的 Ca²⁺ 濃度範囲内に正のピークをもち、IP₃ 濃度依存的により高濃度 Ca²⁺ 領域へ偏位する 2 相性の Ca²⁺ 濃度依存性曲線が現れた。この引き算後に現れた FRET 効率の 2 相性の Ca²⁺ 濃度依存性曲線は、従来報告されてきた IP₃R1 の単一チャネル開口確率の Ca²⁺ 依存性曲線とほぼ一致した。しかもこの 2 相性曲線は、IP₃ 結合親和性をほぼ完全に消失した点変異体 K508 では完全に消失し、さらに、チャネル活性は保持しつつその Ca²⁺ 感受性が 10 倍程度減少することが報告されている点変異体 E2100 においては、引き算後の FRET 効率の Ca²⁺ 依存性曲線もまた 2 相性を保持したまま、約 10 倍程度高濃度 Ca²⁺ 領域へ偏位した。これらのことから、引き算後に現れた FRET 効率の Ca²⁺ 濃度依存性曲線こそが、IP₃ および Ca²⁺ 結合による IP₃ 受容体のチャネル開口に伴う構造変化の実体であることが示唆された。

以上、本論文は、ドナーおよびアクセプター蛍光タンパク質融合 IP₃R1 による FRET 変化もちいて、IP₃ 受容体のチャネル開口に必須な 2 つの主要なリガンドである IP₃ と Ca²⁺ によるリアルタイムな構造変化を明らかにした独創的な研究である。本研究から、IP₃ 受容体のチャネル開口に伴う構造変化は、発散・収束という 2 つの相反する構造変化の線形和によって制御されていることが示唆され、IP₃ 受容体の構造変化とチャネル開口の分子機構との関係を解明する上で有意義であり、学位の授与に値するものと考えられる。