

論文内容の要旨

論文題目 Ca^{2+} 振動形成における ホスホリパーゼ $\text{C}\beta 1$ および $\beta 4$ の役割

氏名 石田 幸子

背景と目的

ホルモンやオータコイド等の細胞外刺激は、多くの細胞において細胞質 Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇 (Ca^{2+} スパイク) が周期的に起きる Ca^{2+} 振動を引き起こす。 Ca^{2+} 振動の周波数は細胞外刺激強度 (濃度) に依存して変化し、また Ca^{2+} 振動の周波数に応じて遺伝子の発現効率や特異性といった細胞応答が変化することから、細胞は細胞外刺激の強度というアナログ信号を Ca^{2+} スパイクの周波数というデジタル信号に変換し情報を伝えていると考えることができる。 Ca^{2+} 振動は主に細胞内 Ca^{2+} 貯蔵器官からの Ca^{2+} 放出によって生じており、Gタンパク質共役型受容体やチロシキナーゼ共役型受容体の活性化により産生され、細胞内 Ca^{2+} 放出チャネルの開口を誘導する水溶性のセカンドメッセンジャーであるイノシトール三リン酸 (IP_3) が細胞外刺激による細胞内 Ca^{2+} シグナル生成に関与していることが知られているが、これまでのところ細胞外刺激強度に応じて Ca^{2+} 振動の周波数が変化するメカニズムはよくわかっていない。

Ca^{2+} シグナル研究のモデルシステムとして多用されてきたヒト子宮頸部癌細胞由来の HeLa 細胞を用いて、ヒスタミン刺激により生じる Ca^{2+} 振動の際の細胞質の IP_3 動態が、 IP_3 受容体・ Ca^{2+} 放出チャネルの IP_3 結合部位を利用した蛍光センサータンパク質 IRIS-1 により測定された (Matsu-ura, T., et al., J. Cell Biol., 173, 755-765, 2006)。観察された IP_3 動態は予想された Ca^{2+} 振動と同期した変動、もしくは定常上昇のどちらとも異なり、 Ca^{2+} 振動に伴い徐々に細胞質に蓄積し、その上に Ca^{2+} 振動と同期した小さな振動が乗るといったものであった。さらに細胞質 Ca^{2+} 濃度を人為的に制御することで、HeLa 細胞における IP_3 産生には、(1) ヒスタミン刺激のみによって誘導される速い成分、(2) 細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇のみによって誘導される遅い成分、(3)

ヒスタミン刺激と細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇により、それぞれ単独の場合の線形和とは異なる一過性の速い成分と大きな遅い成分が含まれることが示されているが（図1）、それぞれの成分が実際の細胞において特定の周波数の Ca^{2+} 振動を誘発する IP_3 動態形成にいかに関与しているかについては不明であった。

本研究では、small interfering RNA (siRNA) を用いて HeLa 細胞に発現している IP_3 産生酵素であるホスホリパーゼ C (PLC) アイソザイムを選択的にノックダウンすることにより IP_3 動態形成に関与している PLC タイプを同定し、それぞれのアイソザイムが細胞内 Ca^{2+} 振動形成にどのように寄与しているかを単一細胞の細胞質 Ca^{2+} および IP_3 濃度変動を同時にイメージングすることにより解析した。

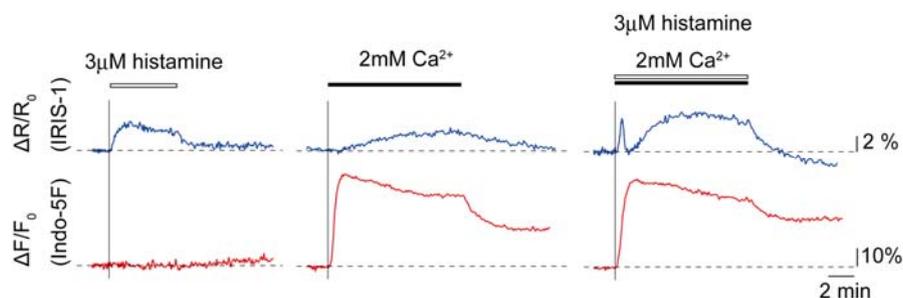


図1 HeLa 細胞における複数の IP_3 産生成分

Ca^{2+} ポンプ阻害剤であるタプシガルジンで細胞内 Ca^{2+} 貯蔵器内での Ca^{2+} を枯渇させた細胞に、図に示した刺激を加えた時の細胞質 IP_3 濃度（上；青線）および Ca^{2+} 濃度（下；赤線）変化を示す。

実験手法

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

HeLa 細胞に発現する PLC アイソザイムを調べるため、HeLa 細胞からトータル RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、各 PLC アイソザイム特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行った。プライマー設計は Prime3 ソフトウェアを用いて行い、全てのスプライスバリエーションを認識するよう設計した。

siRNA による PLC アイソザイムの選択的ノックダウン

PLC のノックダウンは、各アイソザイムに対してそれぞれ2種類の配列の異なる siRNA を用いて行った。各 siRNA の GC 含量に合わせて、同じ GC 含量でランダムな配列を持つ siRNA をネガティブコントロールとして用いた。siRNA は LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) を用いて細胞に導入した。最終的な siRNA 濃度は 20nM とし、トランスフェクションから 8~10 時間後に培地の交換を行った。ノックダウンの効率は、各 PLC アイソザイムに特異的な抗体を用いた全細胞抽出液のウェスタンブロットによって確認した。

蛍光イメージング

siRNA のトランスフェクションから 36~42 時間後に IRIS-1 をコードする発現ベクターを TransIT (Mirus) を用いて細胞に導入し、siRNA のトランスフェクションから 60~72 時間後に

蛍光イメージングを行った。細胞内 Ca^{2+} を検出するために、 $5 \mu\text{M}$ の Indo-5F AM (Invitrogen) を 30~45 分間室温で細胞に取り込ませた。蛍光イメージングは、 37°C で 20mM Hepes pH7.4、 115mM NaCl、 5.4mM KCl、 1mM MgCl_2 、 2mM CaCl_2 、および 10mM グルコースを含む Balanced salt solution (BSS) を $2\text{ml}/\text{min}$ の速度で還流しながら行った。細胞質の Ca^{2+} 濃度を人為的に操作する実験では、予め細胞外液に Ca^{2+} を含まない条件で $1\mu\text{M}$ タブシガルジン処理により、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵ストアの Ca^{2+} を枯渇させた細胞を用いた。この細胞では、ストアの枯渇により細胞膜上の Ca^{2+} チャネルが持続的に活性化される為、細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇を IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出を介さずに、細胞外液からの Ca^{2+} 流入によって誘導することができる。イメージングには IX-71 倒立蛍光顕微鏡 (オリンパス)、ORCA-ER CCD カメラ (浜松ホトニクス)、および $40\times$ 対物レンズ (NA 1.35) を用いた。IRIS-1 と Indo-5F の蛍光変化を同時に測定するため、W-view システム (浜松ホトニクス) に $460\text{-}490\text{nm}$ フィルター (IRIS-1 および Indo-5F 用) とロング・パス 520nm フィルター (IRIS-1 用)、および 2 つの 505nm のダイクロイック・ミラーを装着して測定を行った。IRIS-1 と Indo-5F の連続的な蛍光の切り替えは、高速光路切替機 DG-4 (Shutter Instrument Co.) および $425\text{-}445\text{nm}$ フィルター (IRIS-1 励起波長)、 $330\text{-}348\text{nm}$ フィルター (Indo-5F 励起波長)、 450nm のダイクロイック・ミラーを用いて行った。 Ca^{2+} 振動の測定は 1 または 0.5Hz で行い、タブシガルジン処理した細胞を用いた蛍光イメージングでは、 0.5 または 0.25Hz で行った。データの取り込みは MetaFluor ソフトウェア (モレキュラーデバイス) を用いて行った。

結果と考察

HeLa 細胞で発現している PLC アイソザイムの解析

RT-PCR 解析により、HeLa 細胞では PLC β 1、 β 3、 β 4、 γ 1、 δ 3、 ϵ が発現していることがわかった。これらの6つの PLC アイソザイムについて、HeLa 細胞の全細胞抽出液を用いたウェスタンブロット法によって、タンパク質レベルで発現していることを確認した。

ヒスタミン刺激および Ca^{2+} 濃度上昇によって活性化する PLC アイソザイムの同定

HeLa 細胞で発現が確認された PLC β 1、 β 3、 β 4、 γ 1、 δ 3、 ϵ のそれぞれについて、配列の異なる2種類の siRNA を用いて選択的ノックダウンを試みた。siRNA をトランスフェクションした細胞をアイソザイム特異的抗体を用いたウェスタンブロットにより解析したところ、 ϵ を除くすべてのアイソザイムについてウェスタンブロットの検出限界以下程度にまで発現を抑制できることがわかった。なお、各アイソザイムのノックダウンにより他のアイソザイムの発現効率は有意に変化しなかった。そこでそれぞれの PLC タイプを特異的にノックダウンした細胞を用いて、(1) ヒスタミン刺激のみによって誘導される IP_3 産生、(2) 細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇のみによって誘導される IP_3 産生、および (3) ヒスタミン刺激と細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇を組み合わせたときに誘導される IP_3 産生を IP_3 センサータンパク質である IRIS-1 を用いて測定した。その結果、ヒスタミン刺激のみによって産生される IP_3 が PLC β 4 ノックダウンによってコントロール siRNA をトランスフェクションした細胞の 42.2% に減少し、ヒスタミン刺激と細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇を組み合わせたときに産生される IP_3 が PLC β 1 ノックダウンにより 45.6% に、また PLC β 4 ノックダウンによ

り 51.6%にそれぞれ減少することがわかった。細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇のみによって産生される IP_3 については、 $\text{PLC}\delta 3$ をノックダウンした細胞で、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞よりも 75.6%増加していたが、他のどの PLC アイソザイムをノックダウンしても IP_3 産生量が有意に低下する効果は見られなかった。以上の結果から、ヒスタミン受容体の活性化と細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇を組み合わせることで観察された非線形な一過性の IP_3 産生は $\text{PLC}\beta 1$ および $\text{PLC}\beta 4$ によって担われており、細胞質 Ca^{2+} 濃度が上昇することで観察されるゆっくりとした IP_3 産生には複数の PLC アイソザイムが寄与していることが示唆された。

Ca^{2+} 振動形成における $\text{PLC}\beta 1$ および $\text{PLC}\beta 4$ の役割

$\text{PLC}\beta 1$ および $\text{PLC}\beta 4$ の Ca^{2+} 振動形成における役割を調べるために、それぞれの PLC アイソザイムをノックダウンした細胞を用いてヒスタミンによって誘導される細胞内 Ca^{2+} および IP_3 濃度変動を Indo-5F シグナルおよび IRIS-1 シグナルの同時計測により測定した。代表的な結果を図 2 に示す。

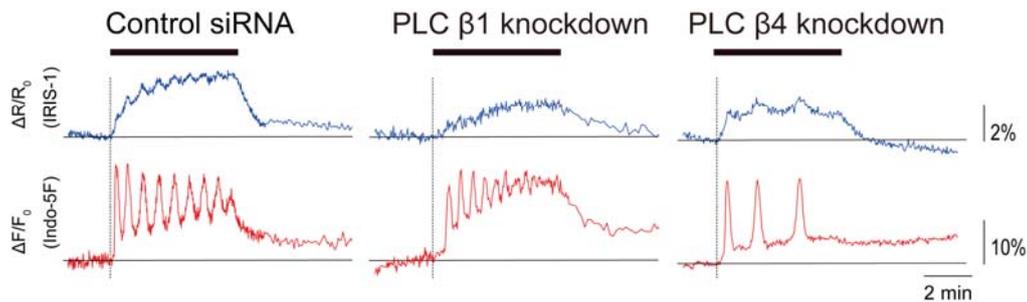


図 2 $\text{PLC}\beta 1$ および $\text{PLC}\beta 4$ をノックダウンした細胞の IP_3 および Ca^{2+} 濃度変化

横棒で示した時間に $3 \mu\text{M}$ ヒスタミンを添加した。 IP_3 濃度変化を青線（上；IRIS-1 シグナル）、 Ca^{2+} 濃度変化を赤線（下；Indo-5F シグナル）で示す。

5 分間のヒスタミン刺激中に増加した IP_3 の積算値の平均は、 $\text{PLC}\beta 1$ をノックダウンした細胞ではコントロール siRNA をトランスフェクションした細胞の 59.3%に低下した。 $3 \mu\text{M}$ ヒスタミン刺激により、コントロール細胞では 66.7%の細胞が Ca^{2+} 振動を示したが、 $\text{PLC}\beta 1$ をノックダウンした細胞では 22.0%とコントロール細胞のおよそ 1/3 に低下していた。 $\text{PLC}\beta 1$ をノックダウンした細胞で見られた Ca^{2+} 振動の周波数の平均は 27.4 mHz であり、コントロール細胞の 26.2 mHz とほぼ同じ値を示した。

$\text{PLC}\beta 4$ をノックダウンした細胞では 5 分間のヒスタミン刺激中に増加した IP_3 の積算値の平均は、コントロール細胞の 46.1%に低下していた。 $3 \mu\text{M}$ ヒスタミン刺激により $\text{PLC}\beta 4$ をノックダウンした細胞では 47.0%の細胞が Ca^{2+} 振動を示したが、興味深いことに Ca^{2+} 振動の周波数の平均値は 17.0 mHz であり、コントロール細胞よりも有意に低下していた。なお、増加した IP_3 の積算値がほぼ同じ細胞であっても、 $\text{PLC}\beta 1$ をノックダウンした細胞よりも $\text{PLC}\beta 4$ をノックダウンした細胞の方が低い周波数の Ca^{2+} 振動を示したことから、単純に産生された IP_3 量ではなく、PLC アイソザイムに固有な性質の違いにより Ca^{2+} 振動の周波数が影響を受けると考えられた。以上の結果から、 $\text{PLC}\beta 1$ が主に Ca^{2+} 振動の維持に重要な働きをしており、 $\text{PLC}\beta 4$ が Ca^{2+} 振動の周波数制御に関与することが示唆された。