

# 論文審査の結果の要旨

氏名 石田 幸子

ホルモンやオータコイド等の細胞外刺激を受けた細胞内では、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が周期的に上昇・下降する  $\text{Ca}^{2+}$ 振動が観察される。刺激物質の濃度上昇に依存して  $\text{Ca}^{2+}$ 振動の周波数が変化することや、その周波数に依存して遺伝子発現の効率や特異性、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の酵素活性が変化することが報告されていることから、細胞は刺激物質の”濃度”というアナログ情報を  $\text{Ca}^{2+}$ 振動の”周波数”というデジタル情報に変換して細胞内に伝えていると考えることができる。細胞がどのように情報変換を行っているのか、つまり、 $\text{Ca}^{2+}$ 振動の発振機構については多くの研究が行われてきたが、未だ解明されていない。本研究では、小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出を誘導するセカンドメッセンジャーである  $\text{IP}_3$ の濃度変化がどのように産みだされているのかを解明することから、 $\text{Ca}^{2+}$ 振動の発振機構の解明に迫った。 $\text{IP}_3$ 産生酵素であるホスホリパーゼ C (PLC) は全部で 13 種類存在し、サブタイプ ( $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\zeta$ ) ごとに活性化機構が異なることが知られている。また、全ての PLC が  $\text{Ca}^{2+}$ の結合によって活性を上昇させものの、その  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性は個々に異なっていることから、 $\text{Ca}^{2+}$ 振動時の  $\text{IP}_3$ 動態も複雑に制御されていることが予想された。

本論文は大きく分けて 2 部構成の内容から成り、前半部分では、モデル細胞として用いたヒト子宮頸部癌細胞由来の HeLa 細胞をヒスタミン刺激した時に誘導される  $\text{IP}_3$ 産生が、どの PLC アイソザイムによって担われているのかについて同定実験を行った内容が述べられている。まず、PLC の発現解析を行い、HeLa 細胞には  $\text{PLC}\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\gamma 1$ 、 $\delta 3$ 、および  $\epsilon$  が発現していることを明らかにした。同定実験の手法としては、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 技術を利用した  $\text{IP}_3$ センサーである IRIS-1 を発現させた HeLa 細胞に、 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬である Indo-5F を導入し、生細胞内での  $\text{IP}_3$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の同時イメージングを行った。更に、発現する 6 つの PLC アイソザイム個々の活性を評価する為、siRNA を用いて個々の PLC アイソザイムを選択的にノックダウンした細胞を用いた。同定実験には、薬理的な手法によって小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出を抑制したうえで、細胞外からの流入によって細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇をもたらす、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を人工的に制御する実験系を用いた。この実験系を HeLa 細胞に用いた報告では、ヒスタミン受容体の活性化のみによってもたらされる  $\text{IP}_3$  と細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇のみによってもたらされる  $\text{IP}_3$  は時間スケールの異なる成分であることが示されている。更に、ヒスタミン刺激と細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇を同時にもたらすと、一過性の速い成分 (成分 1) と後に続くゆっくりとした成分

(成分 2) の 2 つの  $IP_3$  が観察された。成分 1 の  $IP_3$  はヒスタミン刺激のみの  $IP_3$  および  $Ca^{2+}$  濃度上昇のみの  $IP_3$  の単純な足し合わせではないことから、相乗効果により産みだされていると考えられ、この相乗的な  $IP_3$  産生に  $PLC\beta 1$  および  $PLC\beta 4$  が関与することを明らかにした。興味深いことに、G タンパク質によって活性化される同じ  $PLC\beta$  のサブタイプでありながら、 $PLC\beta 3$  はヒスタミン刺激の下流で全く活性化されないことが示された。また、 $PLC\beta 4$  はヒスタミン刺激のみでも活性化されたが、 $PLC\beta 1$  は  $Ca^{2+}$  濃度上昇を伴って初めてヒスタミン刺激によって活性化されることが示され、 $Ca^{2+}$  依存性に違いがあることが示唆された。

本論文の後半部分では、 $PLC\beta 1$  および  $PLC\beta 4$  の  $Ca^{2+}$  振動形成における異なる役割についての実験内容が述べられている。生理的な条件下でロックダウン細胞をヒスタミン刺激したところ、 $PLC\beta 1$  および  $PLC\beta 4$  ロックダウン共に、刺激開始直後の  $IP_3$  産生速度 (IRIS-1 シグナルの傾き) および刺激中の  $IP_3$  産生量 (IRIS-1 シグナルの積算値) がコントロールに比べて有意に減少していた。このことから、 $PLC\beta 1$  および  $PLC\beta 4$  は刺激開始直後の  $IP_3$  濃度の上昇速度を決めていることが示唆された。また、 $PLC\beta 1$  をロックダウンした細胞では顕著に  $Ca^{2+}$  振動を生じる細胞の割合が減少していたことから、 $PLC\beta 1$  の活性が  $Ca^{2+}$  振動の維持に重要であることが示唆された。一方、 $PLC\beta 4$  をロックダウンした細胞では  $Ca^{2+}$  振動の周波数が低下していたことから、 $PLC\beta 4$  が  $Ca^{2+}$  振動の周波数制御に関与することが示唆された。

以上、本論文は、複雑な  $IP_3$ - $Ca^{2+}$  シグナルネットワークの中で、ヒスタミン受容体の活性化のシグナル経路と  $Ca^{2+}$  によるフィードバック経路を切り分けて PLC の酵素活性を評価するというユニークな研究アプローチにより、 $PLC\beta 1$  および  $PLC\beta 4$  がヒスタミン刺激と  $Ca^{2+}$  濃度上昇の同時性を検出して相乗的な  $IP_3$  成分を産みだしていることを明らかにした。また、これまでは同一視されてきた同じ  $PLC\beta$  のサブタイプの中でも、アイソザイムによって  $Ca^{2+}$  振動形成における役割が異なることを初めて報告した重要な研究成果であり、個々の PLC アイソザイムの微細な性質の違いや、その他の  $Ca^{2+}$  シグナルネットワーク分子の詳細な性質明らかにしていくことの重要性を提唱した報告である。したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。