

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 嘉名与

本研究では、生細胞において様々な生理機能を司る細胞内カルシウムダイナミクスの制御機構を解明するべく、細胞内カルシウムの恒常性に最も寄与して細胞機能発現に重要な役割を担っていると考えられている小胞体カルシウムポンプ (SERCA ポンプ) に着目した。生細胞内における SERCA ポンプの働きを明らかにするため、SERCA ポンプの活性を生細胞内でリアルタイムに可視化することができて、さらに、既存のチャンネル測定法やカルシウムセンサーと同時に用いることのできる FRET (蛍光エネルギー移動) base の SERCA センサーを開発した。本研究は、この開発した SERCA センサーを哺乳類細胞株であるアフリカミドリザル腎臓由来 (COS7) 細胞に発現させ、生細胞内の動的環境 (カルシウム振動) 下における SERCA ポンプの活性可視化及び解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. SERCA に2つの蛍光物質を融合させ、FRET 技術を用いて、SERCA ポンプの活性変化に伴う構造変化を FRET 効率の変化として捉えることのできる複数のセンサーの作製を試みた。本研究では、心臓病の原因遺伝子であるとともに癌や神経変性疾患との関わりが報告されている SERCA2a を用いた。FRET のドナーとして ECFP (青色蛍光蛋白質) を、アクセプターとして Venus (黄色蛍光蛋白質) または FIAsh (Tetracycline tag: TC-tag に特異的に結合する小さい蛍光物質) を用いた。結果、SERCA の作用薬や阻害薬に応じて大きな FRET 変化を示し、発現した細胞で正常なカルシウム振動が観察された F-L577 (SERCA2a の577番目のアミノ酸の後に TC-tag を挿入したもの) が SERCA センサーとして働きうることを示された。
2. F-L577 の細胞内局在を調べたところ、F-L577 は小胞体に正しく局在し、Photobleaching 等の結果から、F-L577 自身で FRET が起こっていることが示された。また、F-L577 を発現させた昆虫細胞 (Sf9) から得た小胞体画分を用いて行った *in vitro* kinetic assay により、F-L577 自身が ATP 加水分解能を伴い、カルシウムを取り込む SERCA ポンプ活性をもつことが示された。
3. SERCA ポンプは活性変化に伴い E1-Ca、E1-ATP、E2P、E2 という主要な4つの構造を取る。F-L577 の FRET signal が SERCA ポンプのどのような構造変化を反映しているのかを示すため、F-L577 を発現させ膜透過性処理をほどこした細胞を、構造固定溶液で各構造に固定し、FRET signal を測定した。結果、E1-Ca・E1-ATP・E2P・E2の順に、7, 12, 6, -2% の FRET 変化が観察され、F-L577 が SERCA の構造変化

を FRET signal の変化で検出できる(F-L577 の示す FRET signal が SERCA の構造変化を反映している)ということが示された。

4. F-L577 の活性と構造変化の関係をj知るために、FRET と小胞体内腔のカルシウムの同時イメージングを行った結果、F-L577 の FRET signal が SERCA 活性と相関し、観察される F-L577 の FRET 変化が SERCA ポンプの時々刻々のカルシウムポンプ活性を反映していることが示された。
5. FRET と細胞内カルシウムの同時イメージングにより、F-L577 を用いてカルシウム振動中の SERCA ポンプ活性を測定し、カルシウム振動を SERCA ポンプがどのように制御しているのかを調べた結果、SERCA ポンプが細胞内カルシウムと同期して振動することが示された。さらに、SERCA ポンプが細胞内カルシウム濃度に対して高い協同性をもつことが示され、今まで *in vitro* の研究から考えられていたものより生細胞内で働く SERCA ポンプは、カルシウム濃度の変化に対する活性変化が急峻で、細胞内カルシウムの恒常性を保つためのスイッチのように働いていると考えられた。

以上、本論文では SERCA センサーの開発、リアルタイム SERCA ポンプ活性測定法の確立に成功し、細胞内カルシウムと SERCA ポンプの同時イメージングの結果から、SERCA ポンプが細胞内カルシウムと同期して振動すること、SERCA ポンプが細胞内カルシウム濃度に対して高い協同性もつこと、を示し、細胞内カルシウム濃度上昇時に恒常性を保つため、SERCA ポンプが急激に活性を増加させ、細胞内カルシウム濃度を速やかに減少させる働きがあることを明らかにした。本研究は、生細胞内のカルシウム振動という動的環境下において、これまで未知に等しかった、細胞内カルシウムダイナミクスを司る SERCA ポンプの働き、構造機能相関の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。