

論文の内容の要旨

論文題目:新規アポトーシスセンサーを用いたアポトーシス誘導における細胞内 Ca^{2+} 動態の解析

宮本章歳

ホルモン、神経伝達物質、成長因子などの細胞外刺激により、ホスホリパーゼ C (PLC) の活性化を介し、細胞膜成分であるホスファチジルイノシトール 4,5 二リン酸が分解されイノシトール 1,4,5 三リン酸 (IP_3) とジアシルグリセロール (DAG) が産生される。 IP_3 は小胞体などの細胞内 Ca^{2+} ストア膜上に存在する IP_3 受容体 (IP_3R) に特異的に結合して細胞内 Ca^{2+} ストアからの IP_3 誘導性 Ca^{2+} 放出 (IP_3 induced Ca^{2+} release: IICR) を引き起こし、瞬時に細胞質内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。放出された Ca^{2+} は直ちに sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) により細胞内 Ca^{2+} ストアに取り込まれるか、plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) により細胞外に排出される。IICR による細胞内 Ca^{2+} ストアでの Ca^{2+} 枯渇により、小胞体内腔の Ca^{2+} センサーである Stromal interaction molecule (STIM) が細胞膜上の Ca^{2+} チャンネル Orai に結合することで、細胞外からのストア作動性 Ca^{2+} 流入 (Store-operated Ca^{2+} entry: SOCE) が誘導される。

静止状態での細胞質内 Ca^{2+} 濃度は細胞内 Ca^{2+} ストアや細胞外液に比べて約 1 万分の 1 と低く保たれており、神経伝達物質、ホルモン、成長因子などの細胞外刺激により生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度変動はセカンドメッセンジャーとして機能する。細胞質における Ca^{2+} 放出は Ca^{2+} 波や Ca^{2+} 振動といった複雑な時空間的パターンを示し、受精、筋収縮、細胞分化、アポトーシスなどの様々な生命現象において重要な役割を担っている。そのため、刺激により誘導される細胞内 Ca^{2+} 動態には刺激に応じた細胞応答を誘導するための情報が含まれていると考えられ、 Ca^{2+} 振動の周波数が Ca^{2+} 依存性酵素の活性や遺伝子発現など多彩な細胞現象を制御すると考えられている。しかしながら、生細胞内での細胞内 Ca^{2+} 濃度変動は一定の振幅を持った Ca^{2+} 振動以外にも様々な形態で生じることから、 Ca^{2+} 振動の頻度だけが細胞外からの情報を細胞に伝播する細胞内 Ca^{2+} 動態の成分ではないと考えられている。

未成熟 B 細胞であるニワトリ B 細胞由来株 DT40 細胞の細胞膜上にある B 細胞抗原受容体 (BCR) に抗原が結合すると、 $\text{PLC}\gamma 2$ により IP_3 が産生され、IICR により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。その後、DT40 細胞ではミトコンドリア膜電位の消失、シトクローム *c* の放出、カスパーゼ 3 の活性化、DNA の断片化といった典型的なミトコンドリア依存性のアポトーシスが誘導される。3 種類全ての IP_3R アイソフォームが欠損した DT40 細胞では BCR 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇及びアポトーシスが抑制されることから、BCR 刺激によるアポトーシス誘導には IP_3R からの Ca^{2+} 放出が重要であると考えられている。 IP_3R からの Ca^{2+} 放出による細胞内 Ca^{2+} ストアの Ca^{2+} 枯渇は SOCE を誘導するが、SOCE もまたアポトーシス誘導に重要な役割を担っており、SOCE

を構成しているタンパク質である Orai1 や STIM1 の遺伝子に変異が生じ SOCE が阻害されると重度の免疫不全が引き起こされる。

BCR 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がアポトーシスを引き起こす一方で、BCR 刺激により誘導された Ca^{2+} 振動はカルシニューリンを介して Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) を活性化し、遺伝子発現を誘導することで細胞の生存に寄与すると考えられている。このように Ca^{2+} は細胞の生存およびアポトーシスを誘導を制御しているが、従来の研究では細胞内 Ca^{2+} 動態の測定とアポトーシスの解析は別々に行われてきた。つまり、個々の細胞での細胞内 Ca^{2+} 動態とアポトーシスの一対一対応は見られていなかった。しかしながら、アポトーシスを誘導刺激により誘導される細胞内 Ca^{2+} 動態や刺激後の細胞の運命、さらにはアポトーシスが起こる時間も個々の細胞で異なっているため、どのような細胞内 Ca^{2+} 動態がアポトーシスを誘導し、また一方でどのような細胞内 Ca^{2+} 動態が細胞の生存に寄与しているのか全く分かっていない。

細胞内 Ca^{2+} 動態とアポトーシスの相関を調べるためには、アポトーシスを誘導刺激による細胞内 Ca^{2+} 動態とその後の細胞運命を個々の細胞で同時に観察することが必要である。そこで、本研究ではカスパーゼ 3 の活性化を指標としたアポトーシス検出のための蛍光センサーの開発により細胞内 Ca^{2+} 動態と細胞の運命を個々の細胞で観察できる実験系の確立を試みた。従来用いられてきた、改変型青色蛍光タンパク質 (ECFP) と改変型黄色蛍光タンパク質 (Venus) の間の蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) に基づいた活性化カスパーゼ 3 センサーである SCAT3 は、同じ ECFP-Venus ペアを使用した Ca^{2+} センサーである yellow cameleon (YC) と同時に使用することが困難である。そこで、まず YC と同時に使用できる新規蛍光タンパク質 FRET ペア の開発を行った。FRET のドナーには、ECFP と同じ励起波長特性を持ちながらストークスシフトが大きく、570 nm に蛍光スペクトルの最大値を持つ dKeima570 を使用した。FRET アクセプターには、赤色蛍光タンパク質 mRFP1 に 8 箇所の遺伝子点変異を導入することで、蛍光スペクトルが長波長側にシフトし、さらにモル吸光係数が劇的に改善された FP615 を使用した。この dKeima570 と FP615 の蛍光タンパク質 FRET ペアを用いて新規活性化カスパーゼ 3 センサー: RACS3 を開発し、 Ca^{2+} センサーである YC3.60 と RACS3 を用いて、細胞内 Ca^{2+} 動態とカスパーゼ 3 の活性化を同時観察できるデュアル FRET イメージングシステムを構築した。そして、DT40 細胞で BCR 刺激後 1 時間の間に誘導される細胞内 Ca^{2+} 動態を YC3.60 を用いて高サンプリング周波数 (0.2 Hz) で観察し、その後、サンプリング周波数を 16.7 mHz に下げて RACS3 のシグナルを 14 時間追跡した。BCR 刺激後アポトーシスを起こした細胞 (アポトーシス細胞) と刺激後 15 時間生存した細胞 (生存細胞) の細胞内 Ca^{2+} 動態を比較したところ、生存細胞では BCR 刺激により誘導される細胞内 Ca^{2+} 動態の総 Ca^{2+} 量がアポトーシス細胞に比べて有意に多いことが分かった。両細胞群共に、BCR 刺激開始直後に振幅が大きい 1 回から数回の Ca^{2+} スパイクからなる初期 Ca^{2+} スパイクが生じるが、アポトーシス細胞では生存細胞に比べて有意に初期 Ca^{2+} スパイクの振幅が小さいことが分かった。さらに、生存細胞では初期 Ca^{2+} スパイク以降に細胞質内 Ca^{2+} 濃度が静止状態に戻らずに、不規則な Ca^{2+} スパイクを伴った持続的な Ca^{2+} 濃度上昇 (持続性 Ca^{2+} 上昇) が生じた。

そこで次に、BCR 刺激後に見られる細胞内 Ca^{2+} 動態の形成メカニズムについて、細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出の 2 点に着目して解析を行った。細胞外 Ca^{2+} 濃度を下げた状態で BCR 刺激を加えると、初期 Ca^{2+} スパイクの振幅は変化しないものの、持続性 Ca^{2+} 上昇の大きさが顕著に減少した。以上の結果から、初期 Ca^{2+} スパイクは細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出により形成され、初期 Ca^{2+} スパイク以降に生じる持続性 Ca^{2+} 上昇は細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存することが分かった。さらに、測定温度を室温 (25°C) と培養条件である 39.5°C に調整し BCR 刺激を行ったところ、持続性 Ca^{2+} 上昇には温度依存性があり、室温 (25°C) では持続性 Ca^{2+} 上昇が生じず、培養条件である 39.5°C では生じることが分かった。

そこで、さらに SOCE 特異的な阻害剤である DPB162-AE および DPB163-AE を BCR 刺激後に添加し細胞内 Ca^{2+} 動態を測定したところ、阻害剤により持続性 Ca^{2+} 上昇が抑制された。また細胞膜上の Ca^{2+} チャンネルの阻害剤である La^{3+} を添加したところ、SOCE 特異的阻害剤と同様に持続性 Ca^{2+} 上昇が抑制されることがわかった。これらの阻害剤を用いた解析から、持続性 Ca^{2+} 上昇が細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存して生じることが確かめられた。さらに、これらの Ca^{2+} 流入阻害剤を添加することで、BCR 誘導性アポトーシスの割合が増加することがわかった。これらの結果は、SOCE に依存して生じる持続性 Ca^{2+} 上昇が、BCR 刺激後の細胞の生存に相関することを示唆している。

細胞内 Ca^{2+} ストア内の Ca^{2+} 濃度の減少を感知して細胞膜上の Orai1 チャンネルを活性化する STIM には、STIM1 と STIM2 のアイソフォームがある。DT40 細胞におけるこれらのタンパク質の働きを調べるために、STIM1 と STIM2 をノックアウトした STIM1 欠損 DT40 細胞株 (STIM1 $^{-/-}$ 株)、STIM2 欠損 DT40 細胞株 (STIM2 $^{-/-}$ 株)、STIM1 及び STIM2 欠損 DT40 細胞株 (STIM1,2 $^{-/-}$ 株) を用いて、BCR 刺激後の細胞内 Ca^{2+} 動態を測定した。その結果、(1) STIM1 $^{-/-}$ 株では野生型 DT40 細胞に比べ持続性 Ca^{2+} 上昇が有意に低下し、(2) STIM2 $^{-/-}$ 株では野生型 DT40 細胞に比べ持続性 Ca^{2+} 上昇が有意に増加し、(3) STIM1,2 $^{-/-}$ 株では初期 Ca^{2+} スパイクのみ生じ、持続性 Ca^{2+} 上昇が完全に消失していることが明らかとなった。次に、フローサイトメトリーを用いて BCR 刺激によりアポトーシスを起こした細胞の割合を測定したところ、STIM1 $^{-/-}$ 株及び STIM1,2 $^{-/-}$ 株では野生型 DT40 細胞に比べアポトーシスの割合が増加していたのに対し、STIM2 $^{-/-}$ 株では BCR 誘導性アポトーシスに耐性を示すことが分かった。以上の結果から、(1) STIM1 および STIM2 に制御された SOCE により形成される持続性 Ca^{2+} 上昇が BCR 刺激を受けた細胞の生存に相関すること、(2) STIM2 はそれ自身で SOCE を誘導するものの STIM1 による SOCE を抑制するように働いていることが示唆された。

上記の STIM1,2 $^{-/-}$ 株を用いた Ca^{2+} イメージング実験およびフローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の定量化実験から、BCR 刺激直後に生じる初期 Ca^{2+} スパイクは主に細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出により形成されること、および初期 Ca^{2+} スパイクだけでアポトーシスが誘導されることが示唆された。そこで、本研究で開発したデュアル FRET イメージングシステムを STIM1,2 $^{-/-}$ 株に導入し、STIM1,2 $^{-/-}$ 株において BCR 刺激により誘導される細胞内 Ca^{2+} 動態とその後の細胞の運命を個々の細胞で観察した。その結果、アポトーシス細胞では生存細胞に比べて初期 Ca^{2+} スパイクの振幅が有意に小さいことが分かった。以上の結果から、DT40 細胞では BCR

刺激による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出により初期 Ca^{2+} スパイクが形成され、 Ca^{2+} スパイクの振幅が小さい細胞でアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

本研究により、(1) BCR 刺激により誘導される Ca^{2+} 動態は、BCR 刺激直後に生じる一過的な初期 Ca^{2+} スパイクと初期 Ca^{2+} スパイク以降に生じる不規則な Ca^{2+} スパイクを伴った持続性 Ca^{2+} 上昇の少なくとも 2 つの成分から構成されていること、(2) 刺激直後の初期 Ca^{2+} スパイクは細胞内 Ca^{2+} ストアからの放出によって主に形成されており、振幅が小さい細胞でアポトーシスが誘導されること、(3) 初期スパイク以降に生じる持続性 Ca^{2+} 上昇は STIM1 および STIM2 を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存して形成され、持続性 Ca^{2+} 上昇の大きさが BCR 刺激後の細胞の運命に相関することが明らかとなった。