

審査の結果の要旨

氏名 宮本章歳

本研究はアポトーシス誘導に相関する細胞内 Ca^{2+} 動態を特定するために、細胞内 Ca^{2+} 動態とアポトーシスの指標となるカスパーゼ 3 の活性化を同時観察できる実験系を確立し、アポトーシス誘導刺激後の細胞内 Ca^{2+} 動態とその後の細胞の運命を個々の細胞で解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. 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) を使用した蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) に基づいたセンサー (FRET センサー) と同時に使用できる新規蛍光タンパク質 FRET ペアを作製するために、赤色蛍光タンパク質 mRFP1 に遺伝子点変異を導入することで、FRET 受容体に適した新規赤色蛍光タンパク質 FP615 の作製に成功し、ECFP-Venus と同時に使用できる新規蛍光タンパク質 FRET ペア dKeima570-FP615 の開発に成功した。
2. 作製した新規蛍光タンパク質 FRET ペア dKeima570-FP615 を使用して、新規蛍光活性化カスパーゼ3センサー: RACS3 の開発に成功した。そして、ECFP-Venus を使用した Ca^{2+} センサーである YC3.60 と RACS3 を用いて個々の細胞での細胞内 Ca^{2+} 動態とその後のカスパーゼ3の活性化を同時に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。
3. デュアル FRET イメージングシステムを用いて、B 細胞抗原受容体 (BCR) 刺激を受けたニワトリ B 細胞由来 DT40 細胞での細胞内 Ca^{2+} 動態とその後の細胞の運命を個々の細胞で観察し、BCR 刺激後に生存した細胞とアポトーシスを起こした細胞での刺激後 1 時間の細胞内 Ca^{2+} 動態を比較したところ、アポトーシスが誘導された細胞では BCR 刺激により誘導される細胞内 Ca^{2+} 動態が生存した細胞に比べ少ないことが分かった。
4. BCR 刺激により誘導される細胞内 Ca^{2+} 動態には、BCR 刺激直後に生じる振幅が大きい 1 回から数回の Ca^{2+} スパイクからなる一過的な Ca^{2+} スパイク (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的な Ca^{2+} 濃度上昇 (持続性 Ca^{2+} 上昇) の少なくとも 2 つの成分が含まれていることが分かった。
5. Ca^{2+} 無添加溶液を用いた解析および遺伝子欠損細胞を用いた解析から、初期 Ca^{2+} スパイクが主に細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出により生じること、持続性 Ca^{2+} 上昇は細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出に伴った細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存して生じることが分かった。また、イメージング温度を調整した実験から、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 で生じることが分かった。

6. 細胞外からの Ca^{2+} 流入阻害剤を用いた解析および遺伝子欠損細胞を用いた解析から、初期 Ca^{2+} スパイクがアポトーシス誘導において重要な役割を担うこと、および細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存して生じる持続性 Ca^{2+} 上昇の大きさが細胞の生存に相関することが分かった。

以上、本論文はニワトリ B 細胞由来株 DT40 細胞において、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用いた解析と、阻害剤および遺伝子欠損株を用いた解析から、アポトーシス誘導に 관련된細胞内 Ca^{2+} 動態およびその制御機構を明らかにした。本研究は細胞内 Ca^{2+} 動態とアポトーシスとの一対一対応を明らかにした初めての論文であり、アポトーシス誘導機構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。