



Exploring IP3-Ca²⁺ signaling by trapping intracellular IP3

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内山, 剛 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1173

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 320号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	内 山 剛		
論文題目	Exploring IP_3 - Ca^{2+} signalong by trapping intracellular IP_3 (細胞内 IP_3 の吸収・低減を用いた IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達の探究)		

博士(医学) 内 山 剛

論文題目

Exploring IP_3 - Ca^{2+} signaling by trapping intracellular IP_3 (細胞内 IP_3 の吸収・低減を用いた IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達の探究)

論文の内容の要旨

[はじめに]

イノシトール1,4,5-三リン酸(D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate; IP_3)は、ホルモン・神経伝達物質などの細胞外刺激によるイノシトールリン脂質代謝の活性化を経て産生される2次メッセンジャーで、細胞内カルシウム(Ca^{2+})プール膜上に存在する IP_3 受容体(IP_3R)に結合して、プール内腔から細胞質内へ Ca^{2+} を動員する(IP_3 -induced Ca^{2+} release; IICR)。この IP_3 誘導 Ca^{2+} シグナル伝達は、発生分化や分泌・免疫・脳神経機能など多彩な生理機能を制御することが知られているが、IICRを特異的に阻害するシステムが少ないため、詳細な $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達の制御機構について不明な点が多かった。

我々は、本来のタイプ1 IP_3R が示す IP_3 結合親和性と特異性を保持したリガンド結合領域のみを、大腸菌に発現させることに成功した。これにより、 IP_3 結合に必須なコア領域が226~578アミノ酸以内に存在し、さらにそれを含むN末端側1~604番目が安定に可溶性タンパク質として発現し、 IP_3 に高い親和性を示すことを報告した(Yoshikawaら(1999)*Biochem. Biophys. Res. Com.*)。そこで本研究では、この IP_3 結合領域の強力な IP_3 結合親和性に着目し、新規の IP_3 シグナル伝達の制御システムの開発を試み、さらにそれを用いて IP_3 依存的な細胞内 Ca^{2+} 動態および生理機能を検討した。

[材料ならびに方法]

マウスタイプ1 IP_3R (m $\text{IP}_3\text{R1}$)の IP_3 結合部位(224~604アミノ酸)を可溶性のGST融合タンパク質として大腸菌に発現させ、glutathione-Sepharoseカラムでアフィニティー精製した。この精製タンパク質を用いて、 IP_3 結合活性の測定、およびfura-2を Ca^{2+} 蛍光指示薬として、マウス小脳マイクロソーム上に存在する IP_3R のIICR活性への阻害効果を調べた。次に、この融合タンパク質を薬剤誘導性に発現制御するHEK293 stable transformantsを構築し、fura 2-AMを用いて、ATPおよびカルバコール刺激による細胞内 Ca^{2+} 変動に対する影響を調べた。さらに、この発現システムを利用して、カルバコールで誘導される転写因子CREB(cAMP応答配列結合タンパク質)のSer133残基のリン酸化について調べた。

[結果ならびに考察]

IP_3 結合部位のGST融合タンパク質は、本来の IP_3R に比較して約1000倍の特異的 IP_3 結合活性を示し、溶液中の IP_3 を特異的に結合吸収することで、 IP_3R が IP_3 に結合するのを競合的に阻害し、 IP_3 吸収体(IP_3 sponge)として作用することがわかった。その結果 IP_3 spongeは、 IP_3 を特異的にトラップすることで、*in vitro* および *in vivo* でともに IP_3R のIICR活性を用量依存的に阻害した。次に、 IP_3 spongeをHEK293細胞に用いることで、ATPまたはカルバコール刺激による IP_3 依存的な細胞内 Ca^{2+} 動態が、濃度的にも、時間的にも刺激特異的な IP_3 産生により影響を受けることがわかった。さらに、 IP_3 sponge発現細胞では、カルバコールで誘導されるCREBのリン酸化応答が有意に減少し、 $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ による転写因子の活性制御が示唆された。

〔結論〕

新規開発したrecombinant IP₃ spongeが、IP₃を特異的にトラップして細胞内IP₃レベルを閾値以下に低減させ、IP₃誘導Ca²⁺シグナル伝達を用量依存的に競合阻害することを示した。さらに、培養細胞にIP₃ spongeを用いることにより、IICR活性が、濃度的・時間的に刺激特異的なIP₃産生により影響を受けることがわかった。今後このIP₃ spongeを細胞特異的・時期特異的・細胞内局所特異的などに発現制御するように蛋白質工学的に改変することで、遺伝子発現を含むIP₃/Ca²⁺依存的な多彩な細胞機能の制御および解析が可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

代表的な細胞内信号系を構成するイノシトール三リン酸(IP₃)は細胞内Ca²⁺ストアーからのCa²⁺放出を引き起こし、多くの生理反応を制御する要の位置にある。しかし、生理反応に対してIP₃関連経路が明らかになった例はまだ限られており、さらに多くの生理反応が確定を待っている状態と思われる。その理由は、これまでIP₃レセプター(IP₃R)の選択的阻害剤が無く、IP₃系の関与を薬理的に証明することが困難であったからである。そこで申請者らはIP₃Rのリガンド結合部位のシーケンスを含むタンパクを細胞に発現させ、そのシーケンスを組換えることによってIP₃結合力を人為的に高め、このタンパクをIP₃の吸収剤として用いるという方法により、実際に細胞内Ca²⁺動態を検討する実験において、生理機能へのIP₃の関与を確定する方法を提案した。

マウスタイプ1 IP₃Rのリガンド結合ドメインを可溶性のGST融合タンパク(以下IP₃スポンジとよぶ)として大腸菌に発現させ、これをglutathione-Sepharoseアフィニティカラムによって精製した。このIP₃スポンジのIP₃結合活性を[³H]-IP₃を用いて測定した。マウス小脳より得たマイクロゾーム分画標本にCa²⁺指示蛍光色素であるfura-2を加え、IP₃が引き起こすCa²⁺放出反応を測定し、この系におけるIP₃スポンジの阻害効果を検定した。またHEK293細胞において、同様の手法でATPやカルバコール刺激をしたときのCa²⁺反応を測定し、IP₃スポンジのコンストラクトをトランスフェクトしたときの影響を調べた。同じ細胞で、カルバコール刺激で誘導されるCREB(cAMP応答配列結合タンパク質)のSer133残基のリン酸化を調べた。

シーケンス組換え型のIP₃スポンジは、本来のIP₃Rの1000倍高い結合活性を示した。これによってIP₃スポンジがIP₃を特異的に結合吸収してIP₃Rの競合的阻害剤として働くことが保障された。マイクロゾーム分画を用いた実験において、IP₃によるIP₃RからのCa²⁺放出がIP₃スポンジの容量に依存して阻害された。HEK293細胞における実験でも、ATPまたはカルバコールによるIP₃経路を介してのCa²⁺放出反応がIP₃スポンジを発現した細胞では低下することがわかった。また、カルバコールにより誘導されるCREBのリン酸化も有意に減少した。

以上より、IP₃スポンジが実際にIP₃を吸収し、IP₃経路を阻害する能力をもつことが示された。また、転写因子の活性制御にIP₃/Ca²⁺信号経路が関与していることが示唆された。

審査委員会は、遺伝子組換えの技術を用いて新しいIP₃Rの競合的阻害剤を開発し、遺伝子発現を初めとする細胞の各種の生理反応におけるIP₃/Ca²⁺信号経路の関与を証明することができるような手法を考案

し、それを実現した点を極めて高く評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) IP₃レセプターのサブタイプについて
- 2) 組織におけるサブタイプ分布の違いはどうか
- 3) レセプター内の抑制性ドメインはどのように働くのか
- 4) マウスタイプ1 IP₃Rを選んだ理由
- 5) 大腸菌の低温培養でIP₃スポンジの発現が得られた理由
- 6) 大腸菌におけるIP₃の役割は
- 7) 発現したIP₃スポンジはすべて可溶性のものか
- 8) IP₃の投与後Ca反応がすぐに低下する理由
- 9) 転写促進因子はどのようなものか
- 10) Doxycyclineによる細胞への直接効果はないか
- 11) IP₃スポンジ発現細胞のthapsigarginによるCa²⁺反応の時間経過の特徴
- 12) 細胞におけるIP₃スポンジ発現の程度はどのように評価(定量)したのか
- 13) IP₃スポンジ発現細胞のクローニングはしなかったか
- 14) 生理的条件下ではCREBのリン酸化はCa²⁺流入系とIP₃系のどちらの経路を使っているか
- 15) CREBの磷酸化は核内で起こるのか
- 16) 細胞質内Ca²⁺は核内へ入れるのか
- 17) 核のIP₃Rについて
- 18) 部位または細胞特異的なIP₃スポンジの発現はどのように起こるのか
- 19) IP₃スポンジの組織(臓器)特異的発現はできるのか
- 20) トランスジェニック動物はできるのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	小 出 幸 夫	
	副査	寺 川 進	副査 小 田 敏 明