

「生体防御のメカニズム」
平成7年度採択研究代表者

飯野 正光

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

「カルシウムシグナル研究の先端的手法による展開」

1. 研究実施の概要

生体機能制御に重要な Ca^{2+} シグナル機構の本質に迫るために、最先端の研究手法を応用・開発して研究を展開した。本年度は、細胞内 Ca^{2+} 放出機構の担当分子であるリアノジン受容体および IP_3 受容体の分子的多様性と機能の関係を明らかにするとともに、外分泌腺房組織で開口放出過程を多光子励起法による可視化解析に成功した。また、 Ca^{2+} シグナルの中樞神経シナプス形成における意義を明らかにした。

2. 研究実施内容

・Aグループ

(1) IP_3 受容体には3種のサブタイプが存在して、特徴的な組織分布をする。この機能的な意義について解答を得るべく研究を進めた。3種のサブタイプはそれぞれ異なった IP_3 、 Ca^{2+} 、ATP 依存性を持ち、受容体刺激によって異なる Ca^{2+} シグナルパターンを発生することが判明した。さらに、サブタイプ間のヘテロ4量体は、これらの特性を複雑に含んだ性質を示し、サブタイプ間の分子間相互作用があることが明らかになった。以上の結果は、組織特有な Ca^{2+} シグナルパターン形成に、 IP_3 受容体サブタイプの発現パターンが関与していることを強く示唆する。

(2) 新たに IP_3 濃度を測定するための蛍光指示薬法を考案し、特許を出願した。この方法を用いて、細胞内 IP_3 濃度動態の観測に成功した。

(3) 悪性高熱症に関与するリアノジン受容体1型の遺伝子異常の候補を明らかにし、特許申請の準備を行った。

(4) 哺乳動物に存在する3種のリアノジン受容体サブタイプの個体レベルでの機能を明らかにするため、ノックアウトマウスを用いた研究を遂行している。平成10年度は胎生致死を示す2型リアノジン受容体(RyR-2)欠損マウスの作製と解析を行い、形態学および生理学的解析により、リアノジン受容体が細胞内 Ca^{2+} ストアの維持に必須の Ca^{2+} leak channel として機能することを示した。また、

RyR-1 と RyR-3 の同時欠損マウスの解析から、両受容体は協調して個体レベルにおける肝臓グリコーゲン代謝に必須の機能を有することを明らかにした。

(5) 細胞膜と小胞体膜の Ca^{2+} チャネル間のクロストークに必須であると予想される近接構造の構築を分子レベルで明らかにすることを目指して、骨格筋三つ組構造の分子構築に関する研究を行った。単クローン抗体による同定と cDNA 単離による構造解析により、既に3種の新規三つ組構造膜に存在する mitsugumin (MG) 蛋白 (MG29, 23, 72 と命名) を見出した。特に、MG29 はシナプトフィジン (シナプス小胞の主要膜蛋白) と高い相同性を示すこと、MG23 は骨格筋のみでなく多くの細胞系で発現される膜蛋白であることが注目された。

・Bグループ

(1) 倒立多光子顕微鏡を利用することにより、

① 多光子励起は長波長光を利用するために組織透過性がよく、膵臓外分泌腺房の単一酵素源顆粒の開口放出過程を、3光子励起自家蛍光の消失と細胞外トレーサーの流入で定量的に可視化することに成功した。この開口放出のおきる腺腔部で生理的なホルモン刺激で $10\ \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} 濃度上昇が起きることが確認された。

② 膵島内の腺腔網状構造が細胞外トレーサー及び膜トレーサーで良好に観察され、刺激により腺腔面で大きな Ca^{2+} 濃度上昇が記録された。ミトコンドリア自家蛍光変化に局所性があることが見出された。

③ 2光子吸収の大きいケイジドグルタメイトを開発し、神経細胞のグルタメイト感受性のマッピングを自動的に行うシステムを構築した。

(2) 正立2光子顕微鏡システムを構築し、予定された空間解像を得て、脳スライス標本への応用を開始した。中枢神経細胞内 Ca^{2+} 上昇に伴いミトコンドリアが高速に脱分極することが明らかとなった。

・Cグループ

(1) 小脳シナプス形成と Ca^{2+} シグナルの関連：ラット小脳皮質培養系において、プルキンエ細胞や顆粒細胞が周期的な脱分極とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こしていることが判明し、この Ca^{2+} オシレーションが機能的シナプス形成に必要であることが示唆された。しかし、培養液中にセリンおよびグリシンが欠如すると、 Ca^{2+} オシレーションが過剰になり、プルキンエ細胞死が生ずることが判明した。この効果は、顆粒細胞のグリシン受容体を介する興奮の抑制によることを明らかにした。

(2) 小脳シナプス形成に関連する細胞内情報伝達系：PLC β 4 ノックアウトマウスの小脳登上線維シナプスの生後発達を調べた。生後2週までの発達は正常であったが、生後3週目以降に約1/3のプルキンエ細胞が複数の登上線維による多重

支配を受けていた。この異常は以前我々が報告した、mGluR、G α q および PKC γ ノックアウトマウスと同様であった。これらより、mGluR1-G α q-PLC β 4- γ -PKC γ を介する細胞内カスケードが発達期の過剰な登上線維排除に必須であることが明らかになった。

(3) 成熟脳シナプス可塑性と Ca²⁺シグナルの関連：G α q ノックアウトマウスの海馬において、長期増強誘発の閾値が上昇していた。また、野生型マウスにおいて、代謝型グルタミン酸受容体をブロックすると G α q ノックアウトマウスと同様に長期増強誘発の閾値が上昇したことから、代謝型グルタミン酸受容体から G α q を介するシグナル伝達が、長期増強誘発に促進的にはたらいていることが判明した。また、G α q および PLC β 4 ノックアウトマウスにおいて、小脳の長期抑圧が欠如していることが明らかになり、mGluR、G α q、PLC β 4 を介するカスケードが小脳長期抑圧誘発に必要であることが明らかになった。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T. and Iino, M. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J.* 17, 3309-3316, 1998.

○Shimuta, M., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., Nakagawa, K. and Takeshima, H. Structure and expression of mitsugumin29 gene. *FEBS Lett.* 431, 263-267, 1998.

○Nishi, M., Komazaki, S., Iino, M., Kangawa, K. and Takeshima, H. Mitsugumin23, a novel transmembrane protein on endoplasmic reticulum and nuclear membrane. *FEBS Lett.* 432, 191-196, 1998.

○Takeshima, H., Shimuta, M., Komazaki, S., Ohmi, K., Nishi, M., Iino, M., Miyata, A. and Kangawa, K. Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem. J.* 331, 317-322, 1998.

○Okada, H., Bolland, S., Hashimoto, A., Kurosaki, M., Kabuyama, Y., Iino, M., Ravech, J.V., Kurosaki, T. Role of the inositol phosphatase SHIP in B cell receptor-induced Ca²⁺ oscillatory response. *J. Immunol.* 161, 5129-5132, 1998.

○Ikemoto, T., Takeshima, H., Iino, M. and Endo, M. Effect of calmodulin on Ca²⁺-induced Ca²⁺ release of skeletal muscle from mutant mice expressing either ryanodine receptor type 1 or type 3. *Pflügers Arch.* 437, 43-48, 1998.

○Hirabayashi, T., Kume, K., Hirose, K., Yokomizo, T., Iino, M., Itoh, H. and

Shimizu, T. Critical duration of intracellular Ca^{2+} response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. **J. Biol. Chem.** 274, 5163-5169, 1999.

○Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T. and Iino, M. Encoding of Ca^{2+} signals by differential expression of IP_3 receptor subtypes. **EMBO J.** 18, 1303-1308, 1999.

○Iino, M. Dynamic regulation of intracellular calcium signals through calcium release channels. **Mol. Cell Biochem.** 190, 185-190, 1999.

○Hashimoto, A., Hirose, K., Okada, H., Kurosaki, T. and Iino, M. Inhibitory modulation of B cell receptor-mediated Ca^{2+} mobilization by SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase (SHIP). **J. Biol. Chem.** 274, 11203-11208, 1999.

他11件