

ICORP カルシウム振動プロジェクト事後評価報告書

日本側代表研究者： 御子柴克彦【東京大学医科学研究所／教授 兼
理化学研究所脳科総合研究センター／グループディレクター】
相手国側代表研究者：Anita Aperia【スウェーデン・カロリンスカ研究所／教授】

評価委員： 浅島 誠【東京大学大学院総合文化研究科／教授】
中西 重忠【財団法人大阪バイオサイエンス研究所／所長】
○野澤 義則【財団法人岐阜県国際バイオ研究所／理事長 兼 所長】
村松 喬【愛知学院大学心身科学部健康科学科／教授】
(○は主査)

総合評価：秀 (Excellent)

1. 研究成果に対する評価

日本側代表研究者（御子柴克彦教授）は、IP₃（イノシトール 3 リン酸）レセプターの発見（1989 年）に始まり、その全構造（3 種のタイプ：1 型、2 型、3 型）を決定した。さらに IP₃ レセプターが小胞体に存在し、細胞内カルシウム（Ca²⁺）動員に重要な役割を果たすカルシウムチャンネルであることを立証し、4 量体構造を形成している 6 回膜貫通タンパク質であることを明らかにした。一方、IP₃ レセプターの生理機能に関しては、受精時の卵母細胞表面の Ca²⁺波、Ca²⁺振動、初期胚発生における腹側化シグナルとしての役割、小脳失調や癲癇の原因分子としての可能性、さらには神経系の発生・分化、神経可塑性に深く関わっていることなど一連の画期的な新知見を得た。これらの研究成果の発表は、世界の中でも最先端の研究を推進しているとして高い評価を受けている。本研究プロジェクトでは、それらの IP₃ レセプター・カルシウムシグナルの研究成果を基盤として、カルシウム振動の発生機構と機能の解析に焦点をあてている。その研究目標、研究手法は独自性の高いもので、その結果、きわめて質の高い研究成果を、研究コミュニティに対して多大なインパクトと共にもたらした。本プロジェクトは、以下の 4 課題を中心に、しかも相互補完的に進められており、多くの独創的な成果は高く評価できる。

(1) IP₃ レセプターの構造・機能相関の研究

御子柴グループのこれまでの研究によって、IP₃ レセプターが4量体構造を形成し6回膜貫通型タンパク質のCa²⁺チャンネルであることが明らかにされているが、本研究はタンパク構造レベルからIP₃ レセプター受容体の機構を理解しようとするものであり、X線結晶構造解析と極低温電子顕微鏡を組み合わせることによって、IP₃ レセプターの構造的特性の解明を目的としている。IP₃ 結合部位とレセプター調節領域のX線結晶構造解析の結果、N末端側を欠失した高親和性IP₃ 結合配列の”IP₃ スポンジ”の解析像(2.2Å解像度)を得ることに成功した。また、Ca²⁺チャンネルゲーティングに重要なN端領域の結晶構造を決定した。さらに、極低温電顕像の一粒子解析によるIP₃ レセプターの内部構造を観察し、多くの空洞構造の表面には多数の孔が存在し、他のタンパク質との機能的結合を推測させるという重要な知見を得ている。このような構造解析の知見から風車型(Ca²⁺存在下)、四角型(Ca²⁺非存在下)の可逆的な二段階構造変化も発見したが、これも4年間にもわたる生理的条件下でのIP₃ レセプタータンパク質の精製なくして実現不可能であった。IP₃ レセプターの欠失変異を用いたCa²⁺チャンネルのゲーティング機構の解析の結果、IP₃ 結合シグナルによるC末端側のシステイン残基を介するチャンネル開閉にN末端側の調節領域も関与するという従来の概念と異なる機構を見出し、IP₃ レセプターの調節メカニズムの複雑さを裏付けている。

一方、イオンチャンネルとして最も核となる膜貫通部位の構造は未解決であり、もしその構造が明らかにされれば、膜機能タンパクの構造解析分野において画期的な成果となるため、今後の発展を大いに期待したい。

(2) IP₃ レセプターの調節機構の解明

本研究は、IP₃ 受容体の細胞内における制御機構を研究主眼として進められている。IP₃ レセプターの機能調節に関与するタンパク質分子の探索を行い、いくつかの新規分子を同定した。その1つにIRBIT (IP₃R binding protein released with IP₃)があり、このユニークなタンパク質はIP₃と同じ部位で結合し、IP₃とリン酸化の二重調節を受けており、IP₃結合によりIP₃レセプターから解離し、リン酸化により結合する。また、IRBITがIP₃レセプターの機能制御因子として位置づけられており、その詳細な機構の解明が待たれる。さらに、IP₃レセプターの調節領域に結合するCARP (carbonic anhydrase related protein)を見つけ、これが結合することによってIP₃の結合親和性が低下する作用を明らかにしたことは、IP₃レセプター(1型)とCARPの両者が小脳プルキンエ細胞に豊富に局在していることを考えると、意義深い知見である。IP₃レセプターのC末端に結合するGIT1も同定されているが、その作用解析が待たれる。また、小胞体内腔側に存在するチオレドキシン

ファミリーの ERp44 タンパク質が IP₃ レセプターの第 3 ループに結合し、活性抑制因子として働くことを明らかにし、この結合が Ca²⁺濃度、pH、レドックス状態に依存することも示した。これは IP₃ レセプター機能が細胞内部環境により制御されていることを示唆するものである。一方、4.1N タンパク質（赤血球膜細胞骨格タンパク質 4.1 のホモログ*）の C 末端が IP₃ レセプターの C 末端と結合し、N 末端がアクチンフィラメントと結合することによって IP₃ レセプターの細胞膜移行を司っていることや、小胞体上の IP₃ レセプターの側方拡散にも同様にリンカーとして働いていることも明らかにした。これらの発見は、IP₃ レセプターの細胞内動態の視点より貴重な知見である。また、IP₃ レセプターが局在化する顆粒状小胞体（vesicular ER）が存在し、これらがキネシンモーターを介して順行性あるいは逆行性に速い移動（海馬内錐体細胞の樹状突起中）をすることを見出した。

ところで、これらの膜タンパクに関する細胞内の生理的機構の研究は、最近他の膜タンパクにおいて大きく進展したものであり、特に画期的な新事実が明らかにされたものではないが、本研究による基礎的な成果は、今後 IP₃ レセプターの制御と機能を理解する上では重要であり、焦点を絞った研究を進めることによって、本研究の効果も発展することを期待したい。

*「ホモログ」:類似した塩基配列を持つ遺伝子など、2つ以上の生物種で似ている成分で、共通祖先に帰すると考えられるもの

(3) IP₃ レセプターの発生・分化における役割の解明

アフリカツメガエル胚の背腹軸形成は、受精して分裂後 4 細胞期に決定され、このプロセスに IP₃ レセプター/Ca²⁺系が重要な役割を果たしているという画期的な新知見が、IP₃ レセプター抗体注入法によってすでに発表されているが（1997 年）、その機構は未解決であった。そこで本研究では、放出されたカルシウムの標的分子を探索し、NF-AT（nuclear factor of activated T cell）を特定し、NF-AT が背側化シグナル系を抑制して腹側化を誘導することを立証した。NF-AT の働きを抑制すると、腹側が背側に変換された。また、受精時の精子の先端反応に Ca²⁺振動が起こることを世界で初めて観察した成果は多くの注目を集め、この機構に IP₃ 産生酵素 PLC δ 4 が必須であることも明らかにした。これは、多様な PLC アイソザイムの中で PLC δ 4 が特異的機能と関連していることを示す貴重な知見である。

これまでの IP₃ レセプターの多くの研究成果は 1 型 IP₃ レセプターに関するものであったが、2 型および 3 型 IP₃ レセプターのノックアウトマウス実験から、一方の IP₃ レセプター欠失では顕著な表現型の変化は生じないが、両レセプターの欠失によって唾液分泌および膵臓のアミラーゼなど消化酵素分泌障害が生じることが分かり、2 型、3 型 IP₃ レセプターの外分泌機

能における役割が明らかにされた。

本研究項目で得られた成果は、本研究プロジェクトの中で最も優れたものであって、特に、IP₃受容体の背腹軸形成におけるメカニズムの解明、さらに2型、3型のIP₃受容体のノックアウトマウスを用いたIP₃受容体の分泌機構における役割の発見は、特記すべき成果であり高く評価したい。

(4) 新しい測定法の開発及び新化合物の合成

IP₃のインディケータの開発及び阻害剤の開発は、生体におけるIP₃受容体及びそのカルシウムの役割を知る上で、きわめて重要な課題である。IP₃結合コアーを用いたFRET解析 (fluorescence resonance energy transfer: 共鳴による励起エネルギーの移動) により、IP₃インディケータの基本的な開発に成功しており、さらなる高感度化が進められている。また、IP₃スポンジのIP₃結合親和性を高める改良が進められており、実用化を期待したい。一方、IP₃レセプター阻害剤に関しては、有機合成による2-APBが開発されているが、IP₃受容体機能に依存しない容量性Ca²⁺流入を特異的に阻害することも示されており、IP₃レセプター阻害剤としての特異性の検証が今後の課題となろう。現時点では尚、特異的なIP₃レセプターの阻害剤が開発されたとは考えられないが、更なる研究が進められており、本項目の発展も大いに期待したい。

以上、カルシウム振動プロジェクト5年間で得られた主な成果を項目別に述べたが、その中心はCa²⁺振動の発振メカニズムの解明と生物現象に果たす役割の解明であり、前者の目的達成のために、IP₃レセプターの三次元X線結晶解析および極低温電子顕微鏡観察により、IP₃レセプターのほぼ全構造の解明に成功し、またIP₃結合によるIP₃レセプターの構造変換機構を明らかにし、さらに調節因子の新規分子IRBIT、CARP、ERp44を発見した。IP₃レセプターの局在する顆粒状小胞体が、キネシンモーターによって高速移動することも見出した。後者の生物現象におけるIP₃レセプター機能に関しても、背腹軸形成、2型・3型IP₃レセプターによる外分泌機能調節という新知見を得ている。これらの優れた研究成果は、Science、Nature、Cell等の一流国際誌における52編の学術論文、口頭発表78件、ポスター発表89件、講演20件、メディア発表7件、特許出願9件に示されるように、質的はもとより、量的にも卓越したものである。これらの独創性の高い研究は、世界のこの分野における牽引役になるとともに、世界の科学技術の発展に多大な貢献をするものと高く評価される。本研究はその完成にかなり近いところにきており、当然インパクトが大きい。尚、ゆっくりしたCa²⁺振動の場合、細胞内からのフィードバックの情報の重要性も考慮に入れば、完成までの時間にはある程度の幅があるであろう。本研究プロジェクトで得られた成果は基礎科学に資す

るのみならず、病因解明や治療法開発の基盤となる重要な情報を提供するものであり、臨床医学にも資するところも大きいものと考えられる。

2. プロジェクトの運営状況に対する評価

日本側研究チーム（御子柴チーム）は IP₃ レセプターの発見に続き、IP₃ レセプターの Ca²⁺ チャンネルとしての機能および全構造を世界で初めて明らかにし、外界刺激による細胞内カルシウムの上昇の分子機構の解明のブレークスルーとなった。このようなこれまでの一連の研究成果を基盤として、本プロジェクトでは Ca²⁺ 振動に焦点を絞り、その発振機構と生理機能の解明を目的としている。IP₃ レセプターのタンパク構造の決定、細胞内生理機構の解明、個体レベルにおける役割の解明、ならびに阻害剤とインディケータの開発はきわめて理にかなった研究目標であり、目標達成の可能性も含めて全体構想としては適切である。

また、研究組織に関しては、日本側の延べ 19 名、スウェーデン側 3 名と必ずしも多くはないが、専門技術を備えた優秀な人材が適切に配置されていることが、本プロジェクトを成功に導いた要因と考えられる。さらに、本プロジェクト推進に必要とされる研究設備ならびに施設は十分に整備されている。異なった研究分野の優れた研究者と、十分な施設・設備の中で本プロジェクト推進するには、代表研究者の強力なリーダーシップが求められるが、御子柴代表研究者は、強力な統率力を発揮した。その指導力および運営力も高く評価して良い。

3. 相手機関との研究交流実施状況

相手国側研究者との研究協力は積極的にかつ順調に進められている。日本側、スウェーデン側の相互訪問が活発に行われ（16 回）、なかでも若手研究者を含む多くの発表者による中間シンポジウム（於カロリンスカ研究所）と終了シンポジウム（ICORP ライブ；於東京国際フォーラム）では詳細な研究成果が報告され、好評であった。また、両国の研究員による相手国側チームへの長期・短期滞在による研究実施も行い相互補完の連携を維持したことは、本プロジェクトの目標達成及び研究交流にとって大きく貢献したものと考えられる。

一方、相手国側代表研究者（Anita Aperia 教授）が明らかにしたウアバインによるカルシ

ウム振動は、御子柴代表研究者が開発した阻害剤（2-APB）では阻害されるが、より特異性を持つ IP₃ スポンジ阻害剤によっては阻害を受けず、従って初期の研究計画は、見直されるべき状況を生んでいるように推測される。特に御子柴代表研究者の IP₃ 阻害剤が他のカルシウムシグナル系の阻害にも関わっていることが示されており、この点はより明快な解析を必要と考える。この結果を踏まえて、御子柴代表研究者と相手国側研究者は、Na, K-ATPase と IP₃ 受容体のタンパク複合体形成の方向に研究を転換し、この複合体形成がウアバインによるカルシウム振動の誘導に関わっていることを示唆する結果を得た。この点はメカニズムの解明を含めた、より明確な証拠をあげる方向性での研究がなされることを期待する。

上記研究に関しては、現時点においても両者の間の相互作用によって一定の成果は上げているが、人材交流を積極的に行うことにより、新たな問題点を踏まえた共同研究が更に進められる事を期待する。