

「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

収縮、分泌、免疫、脳機能などに代表される生命維持に必要な生体機能の制御メカニズムにおいて、 Ca^{2+} シグナルは極めて重要な役割を担っている。本研究グループは、 Ca^{2+} シグナル機構の本質に迫るべく、最先端の研究手法を応用・開発して研究を展開している。我々は、細胞レベルから、細胞内小器官そして分子レベルへ微視的に解析を進めるという方向と、分子・細胞レベルから、組織あるいは個体レベルへ進む方向の 2 通りの研究方針を強く意識してきた。総括的な理解にはどちらも重要だと考えるからである。これに沿って、細胞下レベルの Ca^{2+} イメージング、分子機能解析、新規分子の探索を進めるとともに、組織レベルの Ca^{2+} イメージング、個体機能の解析を強力に推進してきた。

本研究グループの研究実施計画は概ね達成されつつあると考えており、世界に先駆けた発見が以下に例を上げる通り行われている。1) 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した。2) 血圧制御に重要な役割を果しうる、新しい血管平滑筋細胞の Ca^{2+} オシレーション機構(Ca^{2+} リプル)を発見した。3) B 細胞受容体刺激に続く Ca^{2+} 動員抑制機構にSHIPを介する新たな経路を発見した。4) 細胞膜と細胞内 Ca^{2+} ストア膜の近接構造を規定する新規分子群を発見した。5) 著しく高い空間解像度を持つ多光子励起画像システムを独自に構築し、外分泌腺房組織で開口放出過程の可視化解析に成功した。6) 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。7) Ca^{2+} 以外のシグナル分子の可視化にも取り組み、初めて細胞内 IP_3 動態の可視化に成功して、 Ca^{2+} シグナル系研究に新たな視点を導入した。

2. 研究実施内容

グループ A

1) SHIPは PIP_3 の 5 位のリン酸を加水分解して PIP_2 濃度をコントロールする脱リン酸化酵素である。SHIP欠損 B 細胞では、B 細胞受容体(BCR)刺激による Ca^{2+} シグナルが延長するが、その原因を解析して、SHIPによる Ca^{2+} 流入機構の制御メカニズムが明らかにした。すなわち、BCR刺激によりSHIPが活性化されると、PLC

γ 活性が抑制されることによりIP₃産生が抑制されて、Ca²⁺ストアの動員が抑制される。このためCa²⁺ストアの枯渇が起こりにくくなるので、容量性Ca²⁺流入が抑制される。このような一連の反応を引き起こすことによって、SHIPは免疫系細胞のCa²⁺動員を抑制的に制御していることを明らかにした。

- 2) 新たに細胞内IP₃濃度を測定するための蛍光指示薬 (GFP-PHD) を考案し、細胞内IP₃濃度をリアルタイムでイメージングすることに成功した。これによりIP₃オシレーション、IP₃ウェーブなど、これまでわからなかったIP₃の細胞内におけるダイナミックな動きを初めて可視化し、IP₃-Ca²⁺シグナル機構の解明に新たな局面を作り出した。
- 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、特許申請を行った。
- 4) 血管壁に内在するレニン・アンジオテンシン系による血管平滑筋のCa²⁺シグナルを初めて可視化した。これにより、Ca²⁺リプルという新しいCa²⁺シグナルパターンを明らかにした。Ca²⁺リプルは、平滑筋の収縮や細胞増殖に関与する可能性があり、病態での挙動が注目される。
- 5) 細胞膜と小胞体膜のCa²⁺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。昨年度の研究により、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。今年度は、Synaptophysinファミリーに属するMG29のノックアウトマウスを作成して、この蛋白質が三つ組み構造の形成に関与することを明らかにした。また、MG29による欠損に伴い、興奮収縮連関は一見正常であるが、単収縮が抑制され、細胞外に筋小胞体内腔のCa²⁺を失いやすいことが明らかとなった。MG72ノックアウトマウスについても作製中である。

グループ B

多光子顕微鏡を利用して以下の成果を挙げた。

- 1) 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。これにより、開口放出が連鎖上におき逐次開口放出の起きている現場を捉えることにはじめて成功した。内部の顆粒の融合に要する時間は細胞膜にドックしたものと同等にはやく、顆粒の分泌準備状態は最外層と内部で異ならないことが明らかとなった。
- 2) 分泌顆粒に局在するフォグリンGFPを膵島標本にアデノベクターで導入し、インスリン顆粒の細胞内動態を解析可能にする実験系を開発した。
- 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培養細胞で行う実験系を、正立のシステムでも稼動可能にして、脳スライス標本に応用可能にした。

グループC

(1) 小脳シナプス形成と Ca^{2+} シグナルの関連：

プルキンエ細胞と顆粒細胞を主構成要素とする単純なマウス小脳ニューロン培養系を無血清培地条件で1ヶ月以上維持することが可能となった。この方法により、樹状突起の形態や細胞膜の電気生理学的性質が、生体内と同様に2～3週間の培養期間を経て成熟することが分かった。したがってこの培養系は、シナプス形成を検討するのに適している。さらに、培養プルキンエ細胞の形態を観察する技術の確立を目指している。

(2) 中枢神経細胞樹状突起における局所 Ca^{2+} シグナルの動態と機能：

dilute lethal mouseやdilute opisthotonus ratの小脳プルキンエ細胞では、樹状突起スパインで Ca^{2+} ストアが欠如しているが、樹状突起の本幹にはストアは存在する。これらの動物で、興奮性平行線維刺激による IP_3 受容体を介する Ca^{2+} 動員の時空間的プロフィールを調べた。樹状突起スパインの Ca^{2+} 上昇は、樹状突起本幹に比較して、振幅が小さく立上りがゆっくりしていた。これは、樹状突起本幹でストアからの Ca^{2+} 動員がおこり、上昇した Ca^{2+} が樹状突起スパインに流れ込んだためと思われる。

(3) 小脳シナプス形成に関連する細胞内情報伝達系：

リアノジン受容体の内因性アゴニストcyclic ADP riboseの合成酵素であるCD38のノックアウトマウス小脳を調べた。基本的なシナプス伝達の性質や登上線維 - プルキンエ細胞シナプスの発達に異常はみられなかったが、平行線維刺激による IP_3 受容体を介するストアからの Ca^{2+} 動員は野生型に比べてむしろ増強していた。現在、リアノジン受容体を介する Ca^{2+} 動員と IP_3 受容体を介するそれとの関連を追求している。

(4) 海馬シナプス可塑性（長期増強）と Ca^{2+} シグナルの関連：

CD38ノックアウトマウスの海馬長期増強を調べた。海馬シナプス伝達の基本的性質に特に異常はなく、長期増強もおこったが、野生型に比べてむしろ長期増強の大きさが増大している傾向が認められた。この点に関して、引き続き解析中である。

3．主な研究成果の発表（論文発表）

- Hashimoto, A., Hirose, K., Okada, H., Kurosaki, T. and Iino, M. Inhibitory modulation of B cell receptor-mediated Ca^{2+} mobilization by Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase. J. Biol. Chem. 274, 11203-11208, 1999.
- Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H. and Iino, M. Spatiotemporal

- dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns. *Science* 284, 1527-1530, 1999.
- Asada, Y., Yamazawa, T., Hirose, K., Takasaka, T. and Iino, M. Dynamic Ca^{2+} signaling in rat arterial smooth muscle cells under the control of local renin-angiotensin system. *J. Physiol.* 521, 497-505, 1999.
 - Nishi, M., Komazaki, S., Kurebayashi, N., Ogawa, Y., Noda, T., Iino, M. and Takeshima, H. Abnormal features in skeletal muscle from mice lacking Mitsugumin 29. *J. Cell Biol.* 147, 1473-1480, 1999.
 - Hirose, K. Takeshima, H. and Iino, M. Fluorescent indicators for inositol 1,4,5-trisphosphate based on bioconjugates of pleckstrin homology domain and fluorescent dyes. *Anal. Commun.* 36, 175-177, 1999.
 - Inoue, T., Kikuchi, K., Hirose, K., Iino, M. and Nagao, T. Synthesis and elevation of 1-position-modified inositol 1,4,5-trisphosphate analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 1697-1702, 1999.
 - Iino, M. Dynamic regulation of intracellular calcium signals through calcium release channels. *Mol. Cell Biochem.* 190, 185-190, 1999.
 - Iino, M. Molecular aspects of the excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Jpn. J. Physiol.* 49, 323-333, 1999.
 - Iino, M. Molecular basis of spatio-temporal dynamics in inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} signalling. *Jpn. J. Pharmacol.* 82, 15-20, 2000.
 - Maeda, H., Ellis-Davies, G.C.R., Ito, K., Miyashita, Y. and Kasai, H. Supralinear Ca^{2+} signaling by cooperative and mobile Ca^{2+} buffering in Purkinje neurons. *Neuron* 24, 989-1002, 1999.
 - Ito, K., Miyashita, Y. and Kasai, H. Kinetic control of multiple forms of Ca^{2+} spikes by inositol trisphosphate in pancreatic acinar cells. *J. Cell Biol.* 146, 405-413, 1999.
 - Eto, K., Kuga, S., Wakui, M., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Taka, J., Aizawa, S., Noda, M., Kimura, S. and Kasai, H. NADH shuttle system regulates KATP channel-dependent pathway and steps distal to cytosolic Ca^{2+} concentration elevation in glucose-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 274, 25386-25392, 1999.
 - Hashimoto, K., Fukaya, M., Qiao, X., Sakimura, K., Watanabe, M. and Kano, M. Impairment of AMPA receptor function in cerebellar granule cells of ataxic mutant mouse Stargazer. *J. Neurosci.* 19, 6027-6036, 1999.
 - Kobayashi, K., Nada, Y., Matsushita, N., Nishii, K., Sawada, H., Nagatsu, T., Nakahara, D., Fukabori, R., Yasoshima, Y., Yamamoto, T., Miura, M., Kano, M., Mamiya, T., Miyamoto, Y. and Nabeshima, T. Modest neuropsychological deficits caused by reduced

- noradrenaline metabolism in mice heterozygous for a mutated tyrosine hydroxylase gene. *J. Neurosci.* 20, 2418-2426. 2000.
- Ohono-Shosaku, T., Sawada, S. and Kano, M. Heterosynaptic expression of depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in rat hippocapal cultures. *Neurosci. Res.* 36, 67-71, 2000.
 - Hashimoto, K. and Kano, M. Paired-pulse depression and mGluR-mediated modulation of cerebellar climbing fiber synapses. *In* *Slow Synaptic Responses and Modulation* pp. 268-270, 2000.
 - Miyata, M. and Kano, M. Corticotropin releasing factor(CRF) induces persistent depression of parallel fiber to Purkinje cell synaptic transmission. *In* *Slow Synaptic Responses and Modulation* pp. 315-317, 2000.
 - Kano, M. and Hashimoto, K. Signal transduction cascade from mGluR1 to PKC γ is involved in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *In* *Slow Synaptic Responses and Modulation* pp. 333-340, 2000.
 - Kano, M., Miyata, M., Hashimoto, K. and Ito, M. Endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) is required for the induction of cerebellar long-term depression. *In* *Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia* pp.11-14, 2000.