

## 代謝型グルタミン酸受容体による細胞内カルシウム振動形成機構の解析

●道川 貴章

東京大学 医科学研究所 脳神経発生・分化分野

### <研究の目的と進め方>

細胞外刺激により生じる細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の周期的な増減 ( $\text{Ca}^{2+}$  振動) は、周波数が刺激強度によって変化し、また周波数に依存して遺伝子転写の効率や特異性が変化することから、 $\text{Ca}^{2+}$  スパイクの周波数に情報がコードされていると考えられている。一方、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR5a) 刺激により生じる  $\text{Ca}^{2+}$  振動では、周波数が刺激強度に寄らずほぼ一定になることが示されているが、周波数が変化する場合との振動形成上のメカニズムの違いはよくわかっていない。本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$  放出を誘導する細胞内セカンドメッセンジャーであるイノシトール 3 リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) に対する新規蛍光センサーを用いて  $\text{Ca}^{2+}$  スパイク生成のタイミングを決定する分子機構を同定し、情報伝達分子ネットワークに関する新たなモデルを構築することで、刺激強度に依存しない  $\text{Ca}^{2+}$  振動形成のメカニズムの解明を目的とする。

### <研究開始時の研究計画>

新規  $\text{IP}_3$  感受性タンパク質センサーにより、 $\text{Ca}^{2+}$  振動に伴った  $\text{IP}_3$  振動の有無を調べ、 $\text{Ca}^{2+}$  スパイク生成が  $\text{IP}_3$  濃度変化により引き起こされるのか、それとも  $\text{Ca}^{2+}$  による  $\text{IP}_3$  受容体  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルのフィードバック調節によって引き起こされるのかを明らかにする。また  $\text{Ca}^{2+}$  振動の周波数の mGluR 刺激強度非依存性が  $\text{IP}_3$  産生の段階で生じているのか、それともそれ以降の段階で生じているのかを、刺激強度を変えた細胞の  $\text{IP}_3$  ダイナミクスを測定することで明らかにする。タンパク質キナーゼ C (PKC) を阻害することで mGluR 刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  振動の周波数がグルタミン酸濃度に依存して変化するようになることが知られているため、PKC を阻害した状態での  $\text{IP}_3$  ダイナミクスを測定し、PKC 活性を阻害していない場合と比較することで、両者での  $\text{IP}_3$  ダイナミクスの違いを調べる。これらの結果をもとに PKC バスウェイの有無により  $\text{Ca}^{2+}$  振動周波数の細胞外刺激強度依存性が変化する分子ネットワークモデルを構築し、さらにモデルによって予想されるシステムの挙動を実験によって検証することで、 $\text{Ca}^{2+}$  振動形成の分子機構の包括的な理解を目指す。

### <研究期間の成果>

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  振動形成に深く関与する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルである  $\text{IP}_3$  受容体の構造機能相関について解析を行い、3 種存在するサブタイプはそれぞれ  $\text{IP}_3$  結合様式 (親和性および協同性) が異なることを明らかにした (Iwai M., et al. 2005)。またタイプ 2  $\text{IP}_3$  受容体では、 $\text{IP}_3$  結合領域の N 末端側に位置するサブプレッサー領域内にスプライス部位が存在し、この部位を欠く受容体は  $\text{IP}_3$  結合活性および  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネル活性を有しないこと、さらに他の  $\text{IP}_3$  受容体が示す、刺激によって誘発される小胞体膜上でのクラスター化を抑制することを明らかにした (Tateishi Y., et al., 2005; Iwai M., et al. 2005)。またスプライス部位を欠く受容体を発現させることで、アゴニスト刺激により誘導される細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が抑えられることから、この受容体が  $\text{Ca}^{2+}$  上昇

の持続時間に関与している可能性が示唆された (Iwai M., et al. 2005)。このように  $\text{IP}_3$  受容体分子の活性に大きな影響を及ぼすサブプレッサー領域の 3 次元構造を、X 線結晶構造解析により明らかにした (Bosanac I., et al., 2005)。

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ダイナミクス形成において、 $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネル自身への  $\text{Ca}^{2+}$  によるフィードバック調節は極めて重要であると考えられる。中でも小胞体内腔からの  $\text{Ca}^{2+}$  によるフィードバック調節は、 $\text{Ca}^{2+}$  スパイク生成において決定的な役割を担うことが示唆されてきたが、その制御の実体は不明であった。我々は、 $\text{IP}_3$  受容体の小胞体内腔側に結合するタンパク質をスクリーニングし、ERp44 タンパク質がレドックス、pH、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的に  $\text{IP}_3$  受容体と結合し、チャネル活性を抑制することを見出した (Higo T., et al., 2005)。中でも ERp44 と  $\text{IP}_3$  受容体の結合は小胞体内腔における生理的な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度では低く、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少に伴い両者の結合が促進されることから、小胞体からの過剰な  $\text{Ca}^{2+}$  放出を防ぐ機構として働いている可能性が示唆された (Higo T., et al., 2005)。

$\text{IP}_3$  受容体の  $\text{IP}_3$  結合部位に 2 種類の蛍光タンパク質 (Venus および ECFP) を融合させ、 $\text{IP}_3$  の有無により蛍光タンパク質間の蛍光エネルギー移動効率が変化する新規  $\text{IP}_3$  センサータンパク質を作成した (Matsura T., et al., 2006)。この  $\text{IP}_3$  感受性タンパク質を mGluR5a と共に培養細胞に発現させ、グルタミン酸刺激時の細胞質における  $\text{IP}_3$  濃度変化を測定したところ、(1)  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクが生じる前に  $\text{IP}_3$  濃度が上昇し始めること、(2)  $\text{Ca}^{2+}$  スパイク生成時に  $\text{IP}_3$  濃度上昇の速度が変化しないこと、および (3)  $\text{Ca}^{2+}$  振動時に細胞質の  $\text{IP}_3$  濃度は徐々に蓄積していき、それぞれの  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクは異なる  $\text{IP}_3$  濃度で生じていることを見いだした。これらの結果から、(1)  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクにおける  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の急峻な上昇は、 $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化される自己再生的な  $\text{IP}_3$  産生ではなく、 $\text{Ca}^{2+}$  によって  $\text{IP}_3$  受容体  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルが活性化される自己再生的な  $\text{Ca}^{2+}$  放出によって担われていること、および (2)  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクを生じる  $\text{IP}_3$  濃度の閾値は一定ではなく、見かけ上変化していることが示唆された。以上の結果より、 $\text{Ca}^{2+}$  スパイク生成のタイミングは細胞質の  $\text{IP}_3$  濃度によって一義的に決定されているのではなく、 $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{IP}_3$  感受性を動的に変化させる機構が  $\text{Ca}^{2+}$  スパイク形成に寄与していると考えられた。現在のところ  $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{IP}_3$  感受性を変化させる機構の詳細は不明であるが、少なくとも  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクというデジタル信号は、 $\text{IP}_3$  産生酵素であるホスホリパーゼ C ではなく、 $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルである  $\text{IP}_3$  受容体の段階で生みだされていることが示された。また、細胞内分子ネットワークモデルによる解析から、 $\text{IP}_3$  産生および代謝は従来考えられてきた速度よりも数十倍遅く、また急峻な  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクを生じる細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化に対し、細胞質の  $\text{IP}_3$  濃度変化は緩やかであることが示された。このことから、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は「早いメッセンジャー」であり、一方  $\text{IP}_3$  は「遅いメッセンジャー」であると考えられた。

### <国内外での成果の位置づけ>

1980年代半ばに行われた低分子  $\text{Ca}^{2+}$  センサーの開発とほぼ時を同じくして発見された、一定濃度の細胞外刺激存在下で生じる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  のスパイク状の濃度変化、および細胞外刺激の濃度に依存して異なった周波数で  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクが繰り返し起きる  $\text{Ca}^{2+}$  振動という生命現象は多くの研究者の興味を引きつけ、これまでにさまざまな形成機構が提唱されてきた。なかでも  $\text{IP}_3$  産生酵素であるホスホリパーゼ C が  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化されることから、 $\text{IP}_3$  濃度の振動により  $\text{Ca}^{2+}$  振動が形成されると考えるモデルと、 $\text{IP}_3$  受容体自身への  $\text{Ca}^{2+}$  によるフィードバック調節により  $\text{IP}_3$  振動なしに  $\text{Ca}^{2+}$  振動が起きるという相反するモデルが提唱され、これまで正確な分子機構は不明であった。また、 $\text{IP}_3$  の前駆物質であるホスファチジルイノシトール 2 リン酸に対して親和性を持つタンパク質ドメインに蛍光タンパク質を融合させたセンサーを用いた生細胞の観察により、 $\text{Ca}^{2+}$  振動に伴って  $\text{IP}_3$  濃度が振動することが示唆されていたが、このセンサーのシグナルが本当に細胞質の  $\text{IP}_3$  濃度を反映しているかどうかについては議論があった。本研究では、細胞質の  $\text{IP}_3$  濃度を直接感知することができる新規  $\text{IP}_3$  センサーを作成し、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化と同時に観察することで、 $\text{Ca}^{2+}$  スパイクというデジタル信号が細胞内情報伝達経路のどの段階で生じているかを実験的に明らかにすることができた。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

新規  $\text{IP}_3$  センサーを作成するにあたり最も困難であったのは、いかに実際の細胞内での  $\text{IP}_3$  動態に影響を与えずに十分なシグナル強度を確保するかという点であり、このため計 300 種類以上の組み換えタンパク質を試すことになった。最終的に、十分なシグナルノイズ比を持ち、かつ低  $\text{IP}_3$  親和性のタンパク質を選ぶことで、mGluR5a 刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  振動の周波数および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減衰時間に有意に変化を与えない  $\text{IP}_3$  センサータンパク質の構築に成功したが、ここまで到達するまでに予想以上の時間がかかった。このため、 $\text{IP}_3$  ダイナミクス形成における PKC の役割については解析が終了していない。

### <今後の課題、展望>

さらなる高シグナルノイズ比を持つ  $\text{IP}_3$  感受性タンパク質を作成し、より高空間および時間解像度で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{IP}_3$  濃度の観察を行い、また  $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{IP}_3$  結合機構に関する解析、 $\text{IP}_3$  受容体のチャネル活性制御に関する解析、さらには細胞内分子ネットワークモデルによる解析をすべて統合することで、 $\text{Ca}^{2+}$  振動形成メカニズムの解明を目指す。

### <研究期間の全成果公表リスト>

#### 1) 論文

##### 1. 0601302117

Bosanac I, et al., 'Crystal structure of the ligand binding suppressor domain of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor' *Mol Cell*. 17, 193-203 (2005)

##### 2. 0601311129

Higo T, et al., 'Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44' *Cell*. 120, 85-98 (2005)

##### 3. 0601311148

Iwai M, et al., 'Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant' *J Biol Chem*. 280, 10305-

10317 (2005)

##### 4. 0601311202

Tateishi Y, et al., 'Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state' *J Biol Chem*. 280, 6816-6822 (2005)

##### 5. 0911301938

Matsu-ura T, et al., 'Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells' s. 173, 755-765 (2006)

#### 2) 学会発表

1. 松浦徹 道川貴章、井上貴文、宮脇敦史、吉田学、御子柴克彦「イノシトール 1,4,5-3 リン酸のイメージングによりカルシウム振動の機序に迫る」第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 (2005)

2. Matsu-ura T., Michikawa T., Inoue T., Miyawaki A., Yoahida M., and Mikoshiba K.: "Cytosolic inositol 1,4,5-Trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in cultured living cells", 2006 FASEB Summer Research Conferences: Calcium and Cell Function, Snowmass Village, USA, July (2006)

3. Michikawa T., Matsu-ura T., Inoue T., Miyawaki A., Yoshida M., and Mikoshiba K.: "A genetically encoded fluorescent inositol 1,4,5-trisphosphate sensor based on the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor", 36th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, USA, Oct. (2006)