

論文の内容の要旨

論文題目 **Imaging intraorganellar Ca^{2+} dynamics at subcellular resolution using genetically encoded fluorescent Ca^{2+} indicators**
(タンパク質型 Ca^{2+} インジケータを用いた細胞小器官 Ca^{2+} 動態の可視化と機能解析)
氏名 鈴木 純二

様々な細胞機能を担う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (Ca^{2+} シグナル) には、細胞小器官である小胞体とミトコンドリアが重要な役割を果たす。小胞体の内腔には高濃度の Ca^{2+} が蓄えられており、刺激に応じて Ca^{2+} を放出し細胞質 Ca^{2+} シグナルを起こすことで、外界からの刺激を細胞内に伝達する。ミトコンドリアマトリックスの Ca^{2+} 濃度は細胞質 Ca^{2+} シグナルに応じて変動し、細胞質の Ca^{2+} 上昇を緩衝する働きを担う。一方で、細胞小器官内の Ca^{2+} 濃度は細胞小器官それ自体の機能を制御することが知られており、タンパク質の合成・品質管理のような小胞体機能や、ATP 産生や細胞死の誘導といったミトコンドリア機能が制御される。近年の研究から、小胞体とミトコンドリアは細胞内で近接構造を形成しており、近接領域を介した小胞体からミトコンドリアへの過剰な Ca^{2+} 供給が細胞死の原因である可能性が示唆されている。さらに、小胞体・ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルの異常が、全身の様々な病態に関与している可能性が指摘されている。

このように細胞小器官 Ca^{2+} シグナルが細胞の生理機能および病態の制御に果たす役割に関する研究は進展しているものの、その全容は未だ解明されていない。研究をさらに進展させる上で、小胞体・ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルの可視化法が重要な鍵を握る。しかしながら、従来の手法には、シグナル強度が小さい、時空間解像度が乏しい、波長特性が限られる、細胞膜を破壊する必要があり、といった制限があり、十分な解析を行えなかった。そこで本研究では、高性能な小胞体・ミトコンドリア型 Ca^{2+} インジケータを新規に開発することで、小胞体・ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルを時間的・空間的に高い解像度で測定する方法を実現し、その制御メカニズムに迫ることを目的とした。

細胞質 Ca^{2+} インジケータ-GECO をもとに、細胞小器官型 Ca^{2+} インジケータの開発に取り組んだ。GECO は Ca^{2+} 濃度に応じて蛍光強度が変化するタンパク質型 Ca^{2+} インジケータであ

る。骨格として用いる蛍光タンパク質に応じて、励起・蛍光波長特性の異なる GECO が存在する。小胞体およびミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 濃度は細胞質よりもそれぞれ数百～千倍あるいは同程度～数十倍程度高く、細胞質 Ca^{2+} インジケーターではこのような高濃度領域における Ca^{2+} シグナルを検出できない。そこで、 Ca^{2+} に対して低い親和性を有する GECO の作成を目指して、GECO の Ca^{2+} 結合領域のアミノ酸に変異を導入した。蛍光強度変化が弱まってしまふ変異体や、親和性が十分に下がらない変異体が多く見られ、開発は困難を極めたが、試行錯誤を重ね百種類におよぶ変異体ライブラリーを作成することでこの問題を克服し、大きなシグナル変化幅を保ちながらも Ca^{2+} 親和性が低下した変異体ライブラリーを得ることに成功した。ライブラリーの中から小胞体とミトコンドリアそれぞれの Ca^{2+} 濃度域に最適な親和性をもつ変異体を選び、それらにシグナル配列を付加することで、小胞体・ミトコンドリア用のタンパク質型 Ca^{2+} インジケーター CEPIA を完成させた。さらに、波長特性の異なる GECO に同様の変異を導入することで、異なる波長特性を有する CEPIA の開発にも成功した。

まず、小胞体型 CEPIA について評価を行った。CEPIA を発現させた培養 HeLa 細胞をアゴニストで刺激したところ、小胞体から Ca^{2+} が放出される様子を極めて高いシグナル・ノイズ比で可視化できた。また、比色測定が可能な CEPIA を用いることで、小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度の絶対値を簡便に定量する手法を実現できた。さらに、異なる波長特性を有する細胞質 Ca^{2+} インジケーターと併用することで、小胞体と細胞質の Ca^{2+} シグナルを一つの細胞で同時に観察することにも成功した。培養細胞株だけでなく、細胞層構造及び投射が保存された小脳急性スライス標本においても、シナプス入力依存的な小胞体からの Ca^{2+} 放出を可視化できた。

次に、CEPIA によって、小胞体 Ca^{2+} シグナルを時間的・空間的に高い解像度で観察することが可能か評価を行った。アゴニスト刺激によって小胞体からの Ca^{2+} 放出を誘発すると、細胞内の限局した領域で発生した細胞質 Ca^{2+} 上昇が細胞全体へ伝播する、細胞質 Ca^{2+} ウェーブと呼ばれる現象が観察される。このとき、小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度の減少も細胞内を波状に広がることが予測されていたが、これを実際に観察した報告はなかった。そこで、CEPIA を用いて小胞体 Ca^{2+} シグナルの高時空間解像度イメージングを試みた。小胞体型 CEPIA を発現した細胞をアゴニスト刺激すると、細胞先端部で発生した小胞体からの Ca^{2+} 放出が細胞内を波状に伝播する様

子を観察できた。これにより、細胞質の Ca^{2+} 上昇と同様に、小胞体からの Ca^{2+} 放出も細胞内を波状に広がることが明らかになった。このように CEPIA を用いることで、小胞体 Ca^{2+} シグナルを時間的・空間的に高い解像度で観察できることが示された。

続いて CEPIA を用いて、容量作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) に伴う小胞体 Ca^{2+} 動態について解析を行った。SOCE は、小胞体 Ca^{2+} 濃度の減少がトリガーとなって細胞外から細胞内へ Ca^{2+} が流入する現象である。従来法では、SOCE が生じるときの細胞質および小胞体 Ca^{2+} の動態を単一細胞で同時に解析することはできず、SOCE によって流入した Ca^{2+} が細胞質と小胞体の間でどのようにやり取りされているか明らかでなかった。そこで CEPIA を用いて、アゴニスト刺激に応じて SOCE が生じるときの細胞質および小胞体 Ca^{2+} 動態を観察した。すると、免疫系細胞である Jurkat T 細胞では小胞体 Ca^{2+} 濃度の減少に応じて細胞質 Ca^{2+} 濃度が大きく上昇するのに対し、HeLa 細胞では小胞体 Ca^{2+} 濃度の減少によって SOCE が生じても、細胞質 Ca^{2+} 濃度にほとんど変化が見られないまま、小胞体 Ca^{2+} 濃度が刺激前の水準まで回復することが明らかになった。

さらに、SOCE を司るタンパク質と小胞体 Ca^{2+} 濃度の関係性について解析を行った。STIM1 は小胞体膜上に存在するタンパク質であり、小胞体 Ca^{2+} 濃度に応じて凝集体を形成し、細胞膜上の Ca^{2+} チャネルを活性化することで SOCE を引き起こす。小胞体 Ca^{2+} 濃度がどの程度の水準に達したときに STIM1 が凝集体を形成し始めるか、また小胞体 Ca^{2+} 濃度の回復に伴ってどのタイミングで凝集体が消失するかについて、明確な結論は得られていなかった。そこで、蛍光タンパク質を付加した STIM1 と CEPIA を共発現させた細胞を用いて、STIM1 の凝集と小胞体 Ca^{2+} 濃度の変化を同時に観察できる系を構築した。この系を用いることで、STIM1 が凝集するときの小胞体 Ca^{2+} 濃度と、STIM1 の凝集が消失するときの小胞体 Ca^{2+} 濃度について定量解析を行うことに成功し、両者の間に著しいずれがあることが示された。この結果は、STIM1 が凝集を形成する反応と凝集が消失する反応が単純な逆反応の関係になく、未知の分子機構が存在する可能性を示唆する。

続いて、ミトコンドリア型 CEPIA を用いた観察を試みた。ミトコンドリア型 CEPIA を発現させた細胞に対しアゴニスト刺激を行ったところ、ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルを高いシグナル・ノイズ比で検出できた。驚くべきことに、細胞質では全ての細胞で同程度の Ca^{2+} シグナル

が観察されたのに対し、ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルには細胞間で著しいばらつきが見られた。このようなばらつきが生じる理由に迫るべく、一つの細胞の中でミトコンドリア領域ごとに Ca^{2+} シグナルにばらつきが生じているのか調べることを目的として、高い空間解像度でのミトコンドリア Ca^{2+} シグナルの観察を試みた。すると、単一細胞の中に、アゴニスト刺激に応答して Ca^{2+} シグナルを生じるミトコンドリアと生じないミトコンドリアが混在する様子が観察された。これは、ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルに、細胞間だけでなく個々のミトコンドリア領域ごとに顕著なばらつきが存在すること示す結果である。

ミトコンドリア領域ごとに Ca^{2+} シグナルにばらつきが生じるメカニズムは明らかにされていない。仮説の1つとして、細胞質および小胞体における Ca^{2+} シグナルに細胞内で偏りが生じている可能性が示唆されている。そこで、ミトコンドリア・小胞体・細胞質の Ca^{2+} 動態を単一細胞内で同時に観察する実験を試みた。CEPIAの波長特性にバリエーションがあることを利用し、異なる3種類の Ca^{2+} インジケータを併用することでこれを実現した。驚くべきごとに、限局したミトコンドリアで Ca^{2+} シグナルが生じていても、その周囲の小胞体や細胞質では均質な Ca^{2+} シグナルが生じていることが示された。これは、一つの細胞内であっても、ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み機構がミトコンドリア領域ごとに局所的に制御されている可能性を示唆する結果である。

このように本研究では、 Ca^{2+} インジケータCEPIAを開発することで、小胞体・ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルを時間的・空間的に高い解像度で観察する手法を実現し、小胞体・ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルの制御メカニズムに関する重要な知見を明らかにした。CEPIAによって、小胞体・ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルの制御機構と生理的・病理的意義に関する研究が進展することが期待される。