

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 純二

本研究は、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を解明することを目的として、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の開発を試み、開発した測定法を用いることで細胞小器官 Ca^{2+} シグナルの制御メカニズムに迫ったものであり、下記の結果を得ている。

1. タンパク質型細胞質 Ca^{2+} インジケータ-GECO の Ca^{2+} 結合領域に様々なアミノ酸変異を導入することで、変異型 Ca^{2+} インジケータのライブラリーを作成した。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、それらに小器官移行シグナル配列を付加することで、小胞体・ミトコンドリア型タンパク質 Ca^{2+} インジケータ-CEPIA を開発した。さらに、波長特性の異なる GECO に変異を導入することで、異なる波長特性を有する CEPIA を開発した。
2. 小胞体型 CEPIA を発現させた培養細胞株において、アゴニスト刺激依存的な小胞体からの Ca^{2+} 放出を極めて高いシグナル・ノイズ比で可視化できることを示した。また、比色測定が可能な CEPIA を用いることで、小胞体 Ca^{2+} 濃度の絶対値を簡便に定量できることを示した。さらに、CEPIA を細胞質 Ca^{2+} インジケータと併用することで、小胞体と細胞質の Ca^{2+} シグナルを単一細胞で同時に観察できることを示した。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 Ca^{2+} 放出を可視化できることを示した。
3. 小胞体型 CEPIA を発現した HeLa 細胞において、アゴニスト刺激依存的な小胞体からの Ca^{2+} 放出を時間的・空間的に高い解像度で観察することで、細胞内の限局した領域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ことを明らかにした。
4. アゴニスト刺激に応じて容量作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) が生じるときの小胞体・細胞質 Ca^{2+} 動態を観察した。これにより、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生じないまま、小胞体 Ca^{2+} 濃度が刺激前の水準まで回復することを示した。この結果から、細胞種ごとに SOCE 発生時の小胞体・細胞質 Ca^{2+} 動態が異なることが示された。さらに、蛍光タンパク質を付

加した SOCE 関連タンパク質 STIM1 と小胞体型 CEPIA を共発現させた HeLa 細胞を用いて、STIM1 の細胞内局在と小胞体 Ca^{2+} 濃度の変化を定量評価した。これにより、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+} 濃度間に著しいずれがあることを明らかにした。この結果から、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が示唆された。

5. ミトコンドリア型 CEPIA を発現させた HeLa 細胞において、アゴニスト刺激依存的なミトコンドリア Ca^{2+} シグナルを高いシグナル・ノイズ比で検出することに成功した。次に、細胞質とミトコンドリア Ca^{2+} シグナルを同時に観察することで、同程度の細胞質 Ca^{2+} シグナルが生じていても、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存在することを示した。さらに、ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルを高い空間解像度で観察することで、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ことを明らかにした。

6. 単一細胞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るメカニズムに迫ることを目的として、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した。これにより、ミトコンドリア Ca^{2+} シグナルが限局した領域で生じていても、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。この結果から、単一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が示唆された。

以上、本論文は、細胞小器官型タンパク質 Ca^{2+} インジケータ CEPIA 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観察する手法を確立し、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ものであり、学位の授与に値するものと考えられる。