

2005年1月14日

独立行政法人 理化学研究所
独立行政法人科学技術振興機構

酸化ストレス状態を認識する分子を細胞の小胞体内で発見

- 活性酸素の酸化・還元が細胞内のカルシウム伝達機構を制御 -

◇本研究成果のポイント◇

- 酸化ストレスを認識するタンパク質 ERp44 が細胞内の IP₃R を介したカルシウム情報伝達を直接に制御
- 細胞内での酸化還元（レドックス）状態の制御とカルシウム情報伝達が深く関連
- 老化現象の関わりなど医学・健康科学への貢献が期待

独立行政法人理化学研究所（理研：野依良治理事長）は独立行政法人科学技術振興機構（JST：沖村憲樹理事長）と共同で、酸化ストレスを制御するメカニズムの一端を解明することに成功しました。理研脳科学総合研究センター（甘利俊一センター長）発生神経生物研究チーム、JST カルシウム振動・国際プロジェクトの御子柴克彦チームリーダー（東京大学医科学研究所教授）、肥後剛康研究員らの研究グループによる研究成果です。

地球上の生物は、絶えず活性酸素種や様々なストレスによって生み出される酸化ストレスの危険に曝されています。しかし、長い進化の過程で、生物は、生体内の酸化還元（レドックス）状態を制御するレドックス制御機構を発達させることで、それらのストレスに対応し、生体内の恒常性を維持することに成功してきました。

今回、研究グループは、ERp44 と呼ばれるタンパク質が、細胞内でカルシウム伝達に関与しているイノシトール 1、4、5-三リン酸(IP₃)受容体(IP₃R)タイプ 1(IP₃R1)に結合し、そのカルシウム放出活性を制御し、レドックス機構を制御することを見いだしました。このことにより、レドックス制御と IP₃R を介したカルシウム情報伝達が、深く関連していることが初めて示されました。細胞内の小胞体と呼ばれる器官でレドックス状態を認識する分子の発見は初めてで、しかも IP₃R と直接連携してカルシウムを制御しているという、この発見の意義は細胞内の酸化ストレス還元メカニズムを解明する点で大変大きいものです。

最近、IP₃R1 のカルシウム放出活性の異常がアルツハイマー病やハンチントン病の発症に関与していることが報告され、また、レドックス状態の制御不全が、加齢に伴う様々な老化現象を引き起こす一因と考えられています。ERp44 を過剰発現させると細胞死を抑制するという結果も含めて、今回の発見が、新たな細胞内シグナル伝達経路の発見にとどまらず、医学・健康科学において応用されることが期待されます。

本研究成果は、米国の科学誌『*Cell*』（セル）（1月14日号）に掲載されます。

1. 背景

地球上の生物は、絶えず活性酸素種や様々なストレスによって生み出される酸化ストレスの危険に曝されています。しかし、長い進化の過程で、生物は、生体内の

酸化還元（レドックス）状態を制御するレドックス制御機構を発達させることで、それらのストレスに対応し、生体内の恒常性を維持することに成功してきました。更に近年、酸化ストレスが細胞の障害になるだけでなく、情報伝達のセカンドメッセンジャー（※1）となり、細胞の機能を調節していることが解明されました。酸化ストレスとレドックス制御は、チオレドキシシン（※2）等のタンパク質が中心的役割を担っており、タンパク質（システイン残基）中のチオール基のレドックス状態を制御することで、情報伝達の on/off の調節を行っています。（図 1）

生物の細胞は、細胞外からの刺激を受けるとそれらを様々な情報に変換し、細胞応答を引き起こします。細胞には、細胞内のカルシウム濃度を変化させることによって情報を伝達するカルシウムシグナル伝達機構が存在しています。カルシウムは、細胞内においてイオンとして存在するため、迅速かつ広範囲にわたる濃度変化つまり空間移動が可能です。その結果、多彩な情報伝達が生み出され、細胞分裂、細胞死、受精、発生等の様々な細胞応答の制御が可能となります。

通常、細胞内のカルシウム濃度は、極めて低く抑えられており、細胞内カルシウム濃度上昇とその変動は、細胞内小器官である小胞体からのカルシウムの放出に依存しています。細胞質へのカルシウム放出は、細胞内の小胞体に局在するカルシウムの受容体である IP_3R （アイピースリーレセプター）を介して行われています。 IP_3R は、ホルモンや神経伝達物質等の細胞外刺激によって細胞内に産生される IP_3 の結合によって活性化され、カルシウムを小胞体内腔から細胞質へ放出します。様々な種の生物に普遍的に存在する IP_3R は、細胞分裂、細胞増殖、細胞死、受精、発生、記憶や学習といった多岐に渡る生命現象において重要な役割を果たしていることが知られています。（図 2）

IP_3R は分子量 300kDa（※3）に及ぶ巨大なタンパク質であり、4 量体（※4）を形成することでチャンネルとして機能します。また、 IP_3R には $IP_3R1 \cdot IP_3R2 \cdot IP_3R3$ の 3 種のサブタイプが存在します。それらの細胞内局在や組織分布は必ずしも同じではなく、それ故にそれぞれのサブタイプが特有の役割を生体内で果たしていると考えられています。その構造の大部分は細胞質に存在、そこには IP_3 結合領域が存在しており、今まで多くの研究者が細胞質領域に焦点を当てることによって、カルシウム制御機構を解明できると考えていました。しかし、どのようにして IP_3R を介した時空間的カルシウム濃度が精密にかつ微細に制御されているかについて、未だ不明な点が多く残されています。

2. 研究手法と成果

今回、研究グループは意外な側面から IP_3R の制御が全く新しい機構によって行われていることを発見しました。 IP_3R には細胞質領域の他、小胞体膜を貫通する部位とその結果生じる小胞体内腔領域(L3)も存在します。重要な特徴は、チャンネルポアというカルシウムが小胞体膜を通過する際に通る入り口が小胞体内腔領域によって形成されていることです。研究グループは、このポア領域に隣接する小胞体内腔領域に注目しました。興味深いことに、L3 の中でもポア領域(L3C)ではサブタイプ間でアミノ酸配列が完全に保存されているのに反し、その隣接領域(L3V)では非常に低い相同性を有していました。

そこで、研究グループは L3V に結合するタンパク質が IP_3R の活性を制御し、そ

の制御はサブタイプ特異的である考え、結合タンパク質を検索しました。その結果、酸性条件下で IP_3R1 にのみ結合する小胞体内腔タンパク質 $ERp44$ を見いだしました。 IP_3R1 は他のサブタイプに比べ、特に脳での発現が多いサブタイプとして知られています。(図 3)

当初、 $ERp44$ がカルシウムシグナル伝達制御に関与するという知見は無く、また、 IP_3R1 がレドックス制御されているか否かは不明でした。しかし、研究グループは $ERp44$ が IP_3R1 のレドックス制御に関与し、そのカルシウム放出活性を制御していると考えました。その可能性を示唆する事実として IP_3R1 の L3V に存在するシステイン残基の存在があげられます。興味深いことに、L3V のアミノ酸配列は 3 つのサブタイプ間で非常に相同性が低いにも関わらず、3 つのシステイン残基が完全に保存されていました。

そこで、それらシステイン残基を他のアミノ酸に置換したところ、 $ERp44$ と IP_3R1 との結合が顕著に減少していることがわかりました。また、これらのタンパク質は酸性条件もしくは中性条件でも還元剤が存在すれば結合しました。これらのことは、 $ERp44$ と IP_3R1 の結合が L3V のシステイン残基のレドックス状態に依存していることを示しています。また、人工脂質膜を用いた単一チャンネル電流測定法によって、 $ERp44$ が小胞体内腔レドックス状態依存的に IP_3R1 の活性を制御することが明確に示されました。これら *in vitro* での再構成実験に加え、*in vivo* においても $ERp44$ の IP_3R1 活性への影響を調べるため、細胞内カルシウムイメージング実験を行いました。(※5)

様々な細胞を用いて調べた結果、 IP_3R1 を多く、またはそれのみを発現している HeLa, DT40-KMN60 細胞において $ERp44$ は IP_3R1 を介したカルシウム放出を抑制していることがわかりました。一方、 IP_3R1 が少ない、または全く発現していない COS-7, DT40-1KO 細胞では、そうした抑制は観察されませんでした。

また、RNA 干渉法によって $ERp44$ の発現を減少させると、 IP_3R1 を介したカルシウム放出が顕著に増大しました。更に、 $ERp44$ との結合が低下するシステイン変異を導入した IP_3R1 と $ERp44$ を DT40-TKO 細胞(IP_3Rs を全く発現していない細胞)に共発現させても、 $ERp44$ による IP_3R1 活性の抑制は観察されませんでした。これらの実験によって、 $ERp44$ が IP_3R1 活性を IP_3R1 のシステイン残基依存的に抑制することが示されました(図 4)。こうして、分子生物学、生化学、細胞生物学、電気生理学的手法を用いて、 IP_3R1 が小胞体内腔側から、結合タンパク質によって、小胞体内腔の環境、特にレドックス状態依存的、そしてサブタイプ特異的に負の制御を受けるといふ、全く新しい機構が示されました。(図 5)

まとめると、チオレドキシシンファミリーに属するタンパク質 $ERp44$ が、カルシウムチャンネルであるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸(IP_3)受容体(IP_3R)タイプ 1(IP_3R1)に結合し、そのカルシウム放出活性を制御することを見いだしました。このことにより、レドックス制御と IP_3R を介したカルシウム情報伝達が、深く関連していることが初めて示されました。とくに小胞体内腔のレドックス状態を認識する分子の発見は初めてで、しかも IP_3R と直接連携してカルシウムを制御するため、この発見の意義は大変大きいものです。

3. 今後の期待

細胞内カルシウム恒常性の攪乱は細胞応答の異常、曳いては様々な疾患を引き起こすことが知られています。特に最近、IP₃R1 のカルシウム放出活性の異常がアルツハイマー病やハンチントン病の発症に関与していることが報告され、また、レドックス状態の制御不全が、加齢に伴う様々な老化現象を引き起こす一因と考えられています。ERp44 を過剰発現させると細胞死を抑制するという結果も含めて、今回の発見が、様々な疾患や神経細胞死の機構の解明に貢献することが期待されるとともに、新たな細胞内シグナル伝達経路の発見にとどまらず医学・健康科学における応用も期待されます。(図 6)

(報道担当・問い合わせ先)

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 発生神経生物研究チーム

チームリーダー 御子柴 克彦

Tel : 048-467-9745 / Fax : 048-467-9744

独立行政法人科学技術振興機構

国際室 山口 憲

Tel : 03-5214-7375 / Fax : 03-5214-7379

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9271 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

独立行政法人科学技術振興機構

総務部 広報室 福島 三喜子

Tel : 03-5214-8404 / Fax : 03-5214-8432

<補足説明>

※1 セカンドメッセンジャー

細胞外情報物質(ホルモンや神経伝達物質)が細胞膜にある受容体に結合した結果、細胞内に新たに生成、または流入する別種の細胞内物質のこと。代表的なセカンドメッセンジャーとしては IP₃, Ca²⁺, サイクリック AMP がある。セカンドメッセンジャーは、さらにその受容体を活性化するか、または何らかの効果器に働きシグナルの空間・時間的拡散や増幅を行い、多様な細胞機能を調節する。

※2 チオレドキシソ

標的タンパク質のジスルフィド結合(S-S結合)を還元開裂させる活性をもつ低分子タンパク質。

※3 Da(ダルトソ)

分子や原子の質量を表す単位。炭素の同位元素 ^{12}C (炭素) 原子の1個の質量を 12Da とする。したがって、 $1\text{Da}=1.661\times 10^{-27}\text{kg}$ 。一般には、 1mol あたりのタンパク質の相対質量である分子量の単位として便宜的に使用している。

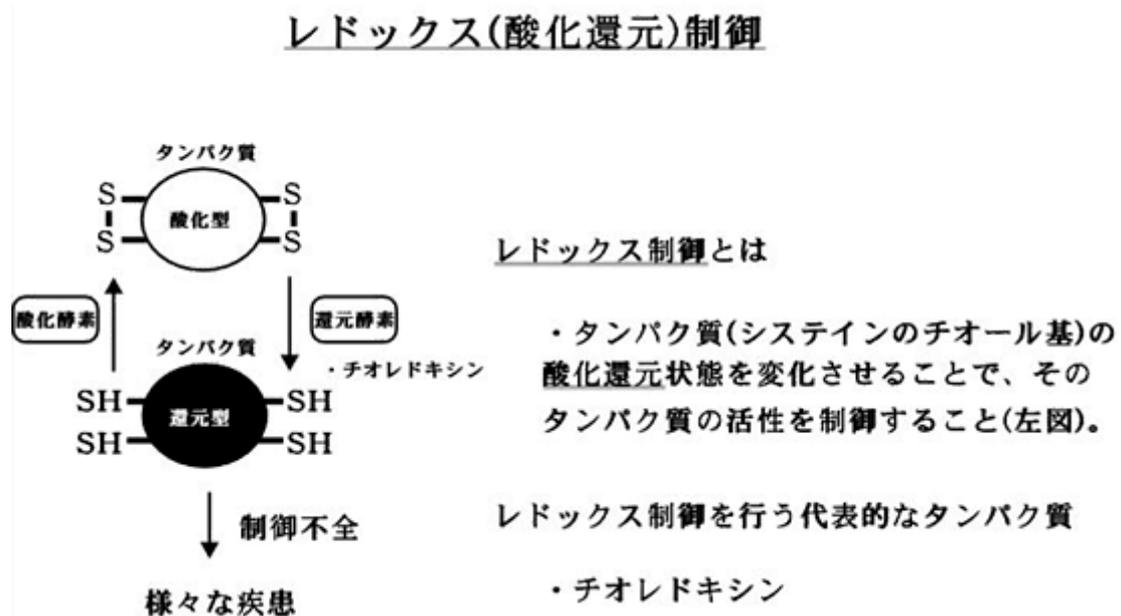
※4 4量体

分子やポリペプチド鎖などの単量体が4個重合したり、会合したものをいう。IP3Rは4量体を形成することで、その Ca^{2+} 放出機能を発揮することができる。

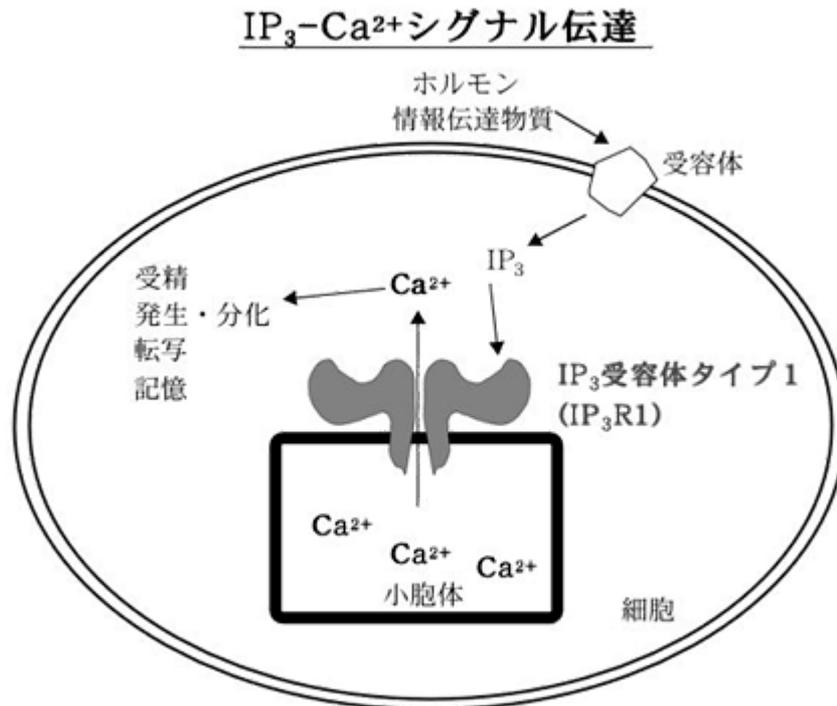
※5 in vitro(インビトロ) in vivo(インビボ)

- in vitro : 生体から物質などを取り出して試験管などで実験を行なうこと。
- in vivo : 生体の各部分が自然のまま置かれた状態で実験などを行うこと。

(図1)



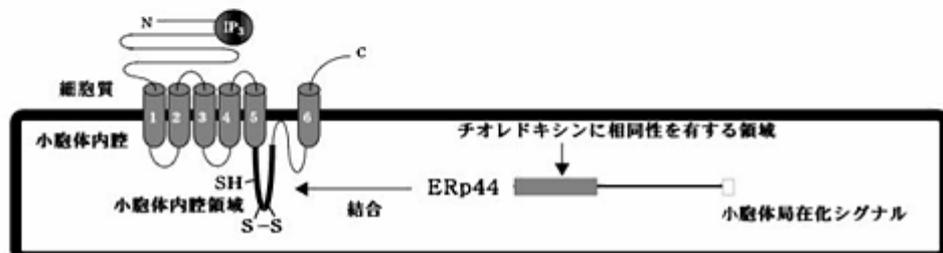
(図2)



IP₃受容体は細胞外刺激によって産生されるIP₃によって活性化され、Ca²⁺を放出し、様々な細胞応答に影響を及ぼす。

(図3)

IP₃R1に小胞体内腔から結合するタンパク質ERp44の発見



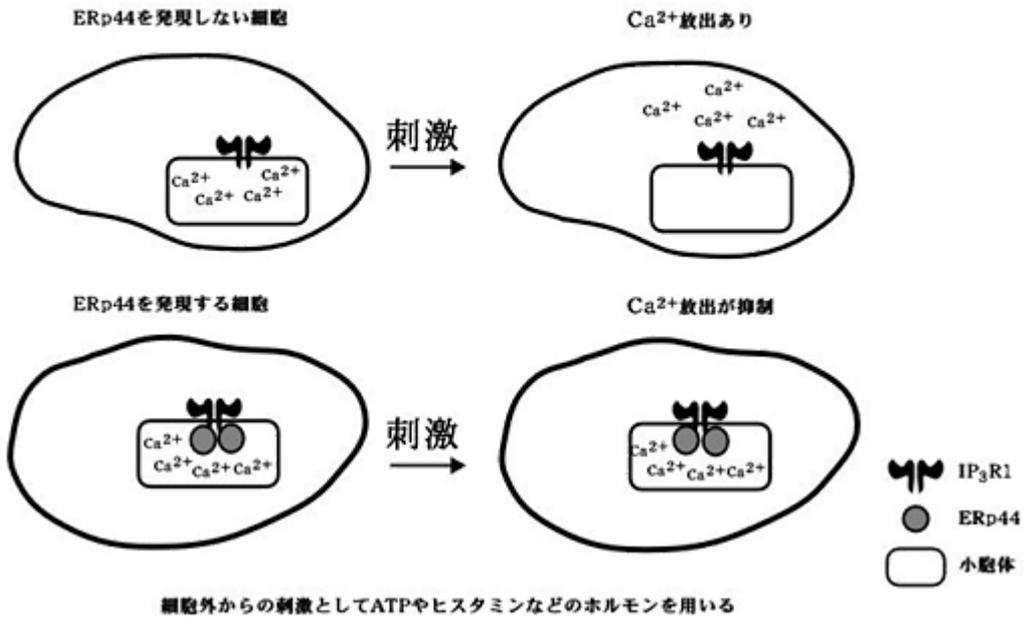
ERp44とIP₃R1の結合に重要なもの

- ・ レドックス(酸化還元)状態
- ・ pH
- ・ Ca²⁺濃度

(図4)

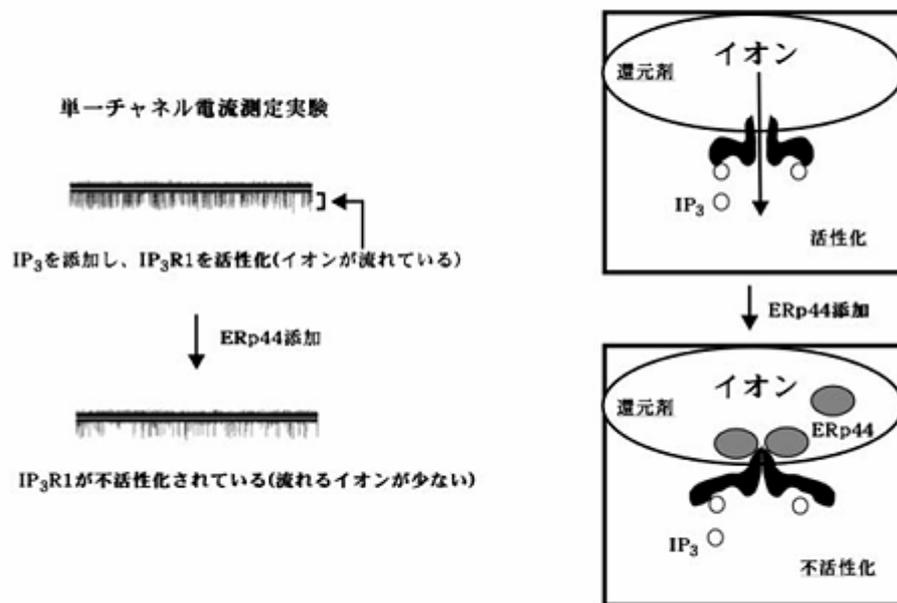
ERp44はIP₃R1のCa²⁺放出活性を抑制する

細胞内Ca²⁺イメージング実験



(図5)

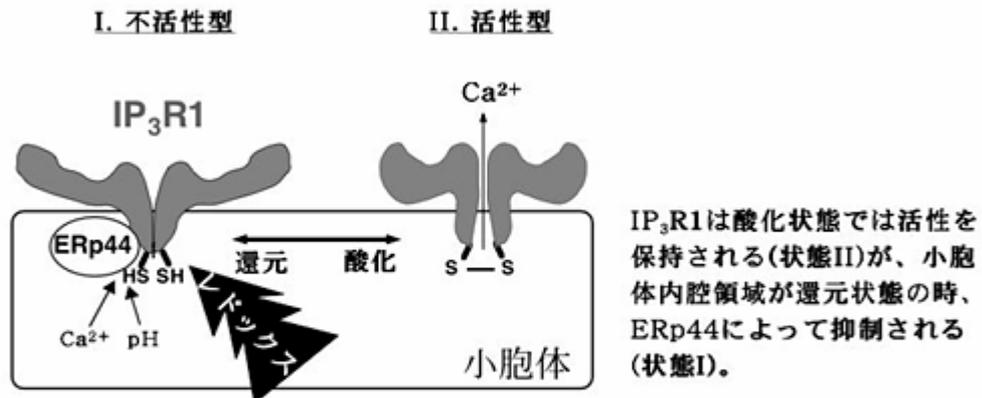
ERp44はレドックス状態に依存してIP₃R1活性を抑制する



ERp44は還元剤存在下でIP₃R1と結合し、その活性を抑制する。

(図6)

ERp44によるIP₃R1活性制御機構



IP₃R1を介した過剰なCa²⁺放出がアルツハイマー病などの疾患の発症に関与していることが知られており、Ca²⁺放出の抑制を行う分子の発見が、それら疾患の機構解明に貢献することが期待される

細胞内Ca²⁺恒常性の攪乱やレドックス制御不全が様々な疾患を引き起こすことが知られており、本研究の知見が疾患の機構解明、医学・健康科学応用に対して貢献することが期待される。