60秒でわかるプレスリリース

2006年6月5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

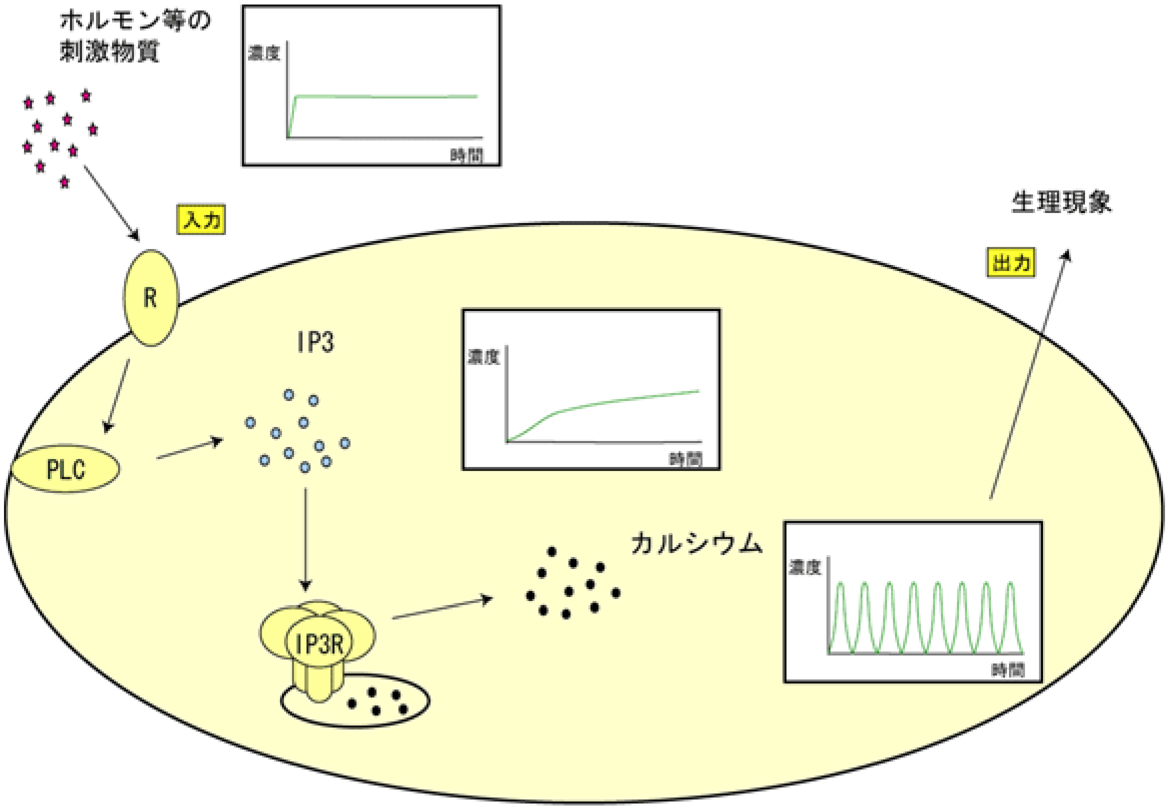
カルシウム振動が生み出されるメカニズムを説明する新たな知見

- 細胞内のＩＰ$_3$の緩やかな蓄積がカルシウム振動に大きく関与 -

私たちの骨格を作っているカルシウムは、細胞内では「情報伝達」という重要な役目も担います。発生、記憶、老化など生命の神秘を解く鍵ともされ、脳をはじめとするライフサイエンスの研究者が、この細胞内のカルシウム（カルシウムイオン）の挙動に魅せられています。その挙動の一つとして、カルシウムイオンの濃度が上昇と下降を繰り返す「カルシウム振動」という現象が、見つかっています。この振動は、受精や、ホルモンや消化酵素の放出、免疫、遺伝子発現までにも関係しているとされています。

脳科学総合研究センター発生神経生物研究チームらは、このカルシウム振動を引き起こす原因物質とされる「イノシトール三リン酸：IP$_3$」の濃度を測定できる可視化技術を開発し、二つあったメカニズム仮説のうち一方を指示する証拠を提示し、振動の発生源を明らかにしました。

この研究によってさらに詳しく「カルシウム振動」のメカニズム解明がされる道が見出されたことになり、生命の神秘の謎解きが加速されることになります。



（図） 今回の研究で明らかにした細胞内での情報変換の様子

報道発表資料

2006年6月5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

カルシウム振動が生み出されるメカニズムを説明する新たな知見

-細胞内のIP_3の緩やかな蓄積がカルシウム振動に大きく関与-

◇ポイント◇
・細胞内のイノシトール三リン酸（IP_3）を高効率で可視化可能に
・周期的なIP_3の濃度変化がなくともIP_3受容体がカルシウム振動を作り出す
・細胞がカルシウムを用いて情報を符号化するメカニズム解明につながる成果

独立行政法人理化学研究所（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、細胞内のイノシトール三リン酸（IP_3）※1の蓄積状況を可視化できる技術を開発し、細胞内のIP_3濃度が緩やかに上昇することにより、さまざまな生理現象を制御するカルシウム振動が生み出されていることを明らかにしました。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及びJST発展研究カルシウム振動プロジェクトの研究代表者である御子柴克彦チームリーダー（東京大学医科学研究所教授）、松浦徹研究員、道川貴章研究員らよる研究成果です。

カルシウムは、細胞内において情報を伝達する物質として重要な働きをし、細胞が、外部から受けた刺激に応じて、周期的なカルシウム濃度の上昇を引き起こします。この現象は、カルシウム振動と呼ばれ、その振動の周期は、生命現象の始まりである受精にも関係し、ホルモンや消化酵素の放出や、免疫、遺伝子発現など広範な生理機構に関わっていると考えられています。

研究グループでは、カルシウム濃度の周期的な変化（カルシウム振動）に関与しているIP_3を高効率で可視化する技術を開発し、IP_3の挙動を観測することに成功するともに、カルシウム振動との関係を明らかにすることに成功しました。その結論は、細胞内のIP_3濃度はカルシウム濃度が上昇し始める前から一定速度で上昇を始め、カルシウム濃度が急速に上昇する場合でも追随しないというものです。このことは、カルシウム振動が、周期的なIP_3の濃度変化に追随して発生するという説を否定し、カルシウム振動がIP_3受容体※2によって作り出されている説を裏付けるものです。

IP_3受容体は、アナログ的に変化するIP_3シグナルをカルシウムのパルスシグナルに変換する役割を担っていると考えられます。今後、IP_3の濃度とカルシウム振動の周期の関係を詳細に調べることで、IP_3受容体がどのようにIP_3シグナルをカルシウムシグナルに変換するのか、つまり細胞がカルシウムを用いて情報を符号化するメカニズムを明らかにすることが期待できます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『The Journal of Cell Biology（ジャーナル・オブ・セルバイオロジー）』（6月5日付けオンライン）に掲載されます。

1.背　景

カルシウムは、私たちの骨格を構成する主要元素であるとともに、細胞内におい

て情報を伝達する物質として重要な働きをしています。細胞内には極微量のカルシウムイオン（Ca^{2+}）しかなく、Ca^{2+}の濃度は通常、細胞外の 10,000 分の 1 程度に保たれています。しかしながら、細胞外から刺激が加わると、細胞中にある小胞体※3に蓄積されていたCa^{2+}が放出され、細胞内のCa^{2+}濃度は 1,000～10,000 倍にも増加します。

細胞外から刺激を受け取った細胞を詳しく観察すると、刺激に伴い細胞内のCa^{2+}濃度が急激に上昇した後、緩やかに元のCa^{2+}濃度に戻るスパイク状の時間変化（カルシウムスパイク）を引き起こします。また多くの細胞では、このCa^{2+}濃度の変化が周期的に繰り返し引き起こす現象が見られます。これらの現象は、カルシウム振動と呼ばれ、生命現象の始まりである受精を引き起こすとともに、ホルモンや消化酵素の放出や、免疫、遺伝子発現など広範な生理機能に関わっていると考えられます。

細胞外からの刺激物質の濃度は、ゆっくりと連続的に変化します。それに対して、刺激に反応して起こる細胞内のカルシウム振動は、急激なCa^{2+}濃度の上昇と下降が非連続的に繰り返すことで発生します。また、その結果もたらされる生理現象は、このカルシウム振動の周期によって制御されています。このことから細胞は、刺激物質の濃度というアナログ値をカルシウム振動の周期というデジタル値に変換し、細胞外刺激によりもたらされた情報を細胞内に伝えていると考えられています。

細胞外からの刺激に関する情報は、刺激物質が細胞膜上の受容体（レセプター）に結合することで細胞内に伝えられます。刺激を受け取った細胞は、イノシトール三リン酸（IP_3）を産生します。このIP_3が小胞体の表面に存在し、Ca^{2+}の放出を調整するカルシウムチャネル（IP_3受容体）に作用（結合）することにより、細胞内のCa^{2+}濃度の上昇を引き起こします。刺激を受けた細胞の細胞内カルシウム濃度は、まずゆっくりと上昇し、ある一定の濃度を越えると急激に上昇します。この急激なCa^{2+}濃度の変化は、一旦始まると上昇する速度と到達する最大カルシウム濃度が、細胞外刺激の濃度に依らずほぼ一定となります。これら一連の変化を起こすためには、Ca^{2+}濃度の上昇を引き起こす機構に正のフィードバック※4がかかっていることが示唆されてきました。

この正のフィードバック機構を説明するために、二つの仮説が立てられています（図 1)。一つは「IP_3産生の段階での正のフィードバック機構を考えるモデル（仮説 1)」、もう一つは「カルシウム放出の段階で正のフィードバック機構を考えるモデル（仮説 2)」です。この 2 つの仮説に基づき、コンピューターシミュレーションを用いて、カルシウム振動を再現することが試みられています（図 2)。仮説 1 のモデルは、1988 年にMeyer T.とStryer L.の研究グループによって、周期的なIP_3スパイクによって、カルシウム振動を作り出されるとされました。それに対して仮説 2 のモデルでは、1992 年にDe Young GWとKeizer J.の研究グループによって、周期的なIP_3のスパイクがなくともIP_3受容体がカルシウム振動を作り出すことができるというものです。

これら二つの仮説のいずれが正しいのかを、実験的に確認するためにはIP_3濃度変化を定量的に測定することが必要であり、IP_3可視化技術の開発が長い間待たれていました。

2. 研究手法と成果

(1) IP_3を可視化する技術の開発

IP_3とカルシウム振動との関係を明らかにするためには、IP_3の挙動を正確に捉えることが必要です。研究グループでは、Ca^{2+}の上流シグナルであるIP_3の挙動を可視化する、IP_3センサータンパク質を開発しました。これは研究グループの成果として 2002 年に得られたIP_3受容体の立体構造※5をもとに、IP_3結合ドメインのアミノ末端（N末端）にECFP（青色蛍光タンパク質）とカルボキシ末端（C末端）にVenus（ヴィーナス:黄色蛍光タンパク質）を融合させたタンパク質で、IP_3と結合することでECFP - Venus間のFRET※6（蛍光エネルギー移動）効率が変化し、蛍光特性が変わることを利用したものです。研究グループでは、この融合タンパク質をIRIS（IP_3 Receptor-based IP_3 Sensor）と命名しました（図 3）。

さらに研究グループでは、IP_3結合ドメインのC末端を短くすることで検出感度を 5%から 25%と 5 倍に増大させることに成功しました。またIRISの開発にあたり、細胞内のIP_3動態の撹乱を最小限にとどめることに最も注意を払いました。結合活性が強すぎると、IP_3の分解を妨げるなどして、本来のIP_3の濃度変化、さらにはCa^{2+}の濃度変化を変えてしまう恐れがあります。そのためIRISはIP_3に対する特異性を下げずに、結合活性を元よりも 10 倍程度弱くなるように改変されています。

このIRISとカルシウム指示薬を細胞に導入することによって、細胞内のIP_3とCa^{2+}の挙動を同時に可視化するとともに、これまで測定が難しかったIP_3の濃度変化を定量的に捉えることに成功しました。またIRISの導入によって、Ca^{2+}の挙動にほとんど影響がないことも確認しました。

(2) 仮説 2 を支持する新たな知見

仮説 1 のモデルのようにカルシウムスパイクがIP_3産生の段階で正のフィードバック調節によって制御されるならば、IP_3濃度とCa^{2+}濃度の時間変動が同じであることが予想されます。一方、仮説 2 のモデルでは、IP_3スパイクがなくともカルシウムスパイクが起こることが示唆されます。

研究グループは、新たに開発したIRISを用いて細胞内のIP_3とCa^{2+}の濃度変化の挙動を正確に観察しました。その結果、細胞内のIP_3濃度が、Ca^{2+}の濃度が上昇し始める前から一定速度で高まり、Ca^{2+}濃度が急速に上昇する際でもその速度は変化しないことを明らかにしました（図 4）。このことから「カルシウム依存的なIP_3産生は、カルシウムスパイクを引き起こす正のフィードバック機構ではない」こと、つまり仮説 1 を否定し、受容体からCa^{2+}が放出される段階での正のフィードバック機構により、カルシウムスパイクが生み出されているというモデル（仮説 2）を支持する知見を得たことになります。

次に研究グループは、カルシウム振動時のIP_3の挙動を観察しました。すると予測されたように、カルシウムのような大きなIP_3の濃度変化は観測されず、カルシウム振動生成にはIP_3スパイクが必要ないことが明らかになりました。

さらに研究グループは、繰り返し起こるカルシウムスパイクに伴い、細胞内にIP_3が徐々に蓄積されていくことを発見しました。この結果は、周期的に起こ

るカルシウムのスパイクは、それぞれ異なるIP_3濃度で引き起こされることを示し、「カルシウムスパイク誘導におけるIP_3の閾（いき）値は一定ではない」ことを示唆します（図5）。

このようにスパイク状に急峻な濃度変化を起こすカルシウムに比べ、IP_3が比較的ゆっくりと濃度変化することから、その下流で働くIP_3受容体によってアナログ的なIP_3シグナルがカルシウムスパイクというパルスシグナルに変換されていることが示されました。またその変換の過程ではIP_3の閾値は一定ではなく、IP_3受容体が細胞内情報伝達系による情報符号化の際に複雑な情報変換を行い、そして極めて重要な役割を担っていることがわかりました（図6）。

3. 今後の期待

今回、細胞内のIP_3の濃度変化を定量的に観察する技術を新たに開発したことにより、IP_3受容体が細胞内情報伝達系による情報符号化の際に複雑な情報変換を行い、そして極めて重要な役割を担っていることがわかりました。カルシウム振動は生体機能をつかさどる重要なシステムであり、今回得られた知見は、カルシウム振動の生成メカニズムに一石を投じる成果です。

今後、IP_3の濃度とカルシウム振動の周期の関係を詳細に調べることで、IP_3受容体がどのようにIP_3シグナルをカルシウムシグナルに変換するのか、つまり細胞がカルシウムを用いて情報を符号化するメカニズムを明らかにすることが期待できます。

（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

脳科学研究推進部　　嶋田　庸嗣
Tel：048-467-9596 / Fax：048-462-4914

独立行政法人科学技術振興機構
戦略的創造事業本部特別プロジェクト推進室
調査役　　黒木　敏高
Tel：048-226-5623 / Fax：048-226-5703

（報道担当）
独立行政法人理化学研究所 広報室
Tel：048-467-9272 / Fax：048-462-4715
Mail：koho@riken.jp

独立行政法人科学技術振興機構　広報室
Tel：03-5214-8404 / Fax：03-5214-8432

<補足説明>

※1 イノシトール三リン酸（IP_3）

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、細胞膜の構成成分の一つである、ホスファチジルイノシトール二リン酸が分解されて生じる。IP_3受容体に結合してカルシウム放出を誘導する。

※2 IP_3受容体

細胞内のカルシウム貯蔵庫の一つである小胞体膜上に存在するカルシウム放出チャネル。IP_3と結合することでチャネルが開き、小胞体内のカルシウムを細胞質に放出する。IP_3受容体のカルシウム放出活性は低濃度のカルシウムで活性化され、高濃度で抑制される。

※3 小胞体

小胞体は細胞内小器官の一つであって、一重の脂質の膜で構成され、網状に細胞内に広がっている。その一部は核膜の外膜とつながっている。細胞の中でタンパク質の合成・修飾・輸送、物質代謝など、様々な機能を果たしている。それらの機能の中の一つに小胞体内腔にカルシウムを蓄積し、必要なときに放出し、細胞内のカルシウム濃度を上昇させることがあげられる。このカルシウム放出の中心として働くタンパク質がIP_3受容体である。

※4 正のフィードバック

出力が入力に影響を与える仕組みをフィードバックという。正のフィードバックとは、出力が入力を促進することである。カルシウムシグナルでは、細胞外の刺激から、IP_3受容体に入力が入り、出力としてカルシウムが放出されます。放出されたカルシウムはIP_3受容体のカルシウム放出活性を促進する。この促進のされ方に2つの仮説が考えられている（本文参照）。

※5 IP_3結合部位の立体構造

IP_3受容体はIP_3との結合により、カルシウムを放出する。そのためIP_3受容体のIP_3結合部位は、IP3受容体の活性化を促すスイッチとして働く非常に重要な部位である。このスイッチの働きを確かめるため、2002年に御子柴チームリーダーは、トロント大学の伊倉教授との共同研究でIP_3結合部位の立体構造を、結晶構造解析した。この成果はIP_3受容体の機能を知るためだけでなく、IP_3センサータンパク質・IRISを開発するためにも、なくてはならない成果であった。

※6 FRET（蛍光エネルギー移動）

2つ以上の蛍光物質が10 nm以内の距離に存在するときに起こる物理現象。一方の蛍光物質から、もう一方の蛍光物質にエネルギーが移動する。生命研究では、タンパク質の立体構造変化や、2種類のタンパク質の相互作用を調べる目的で使用される。

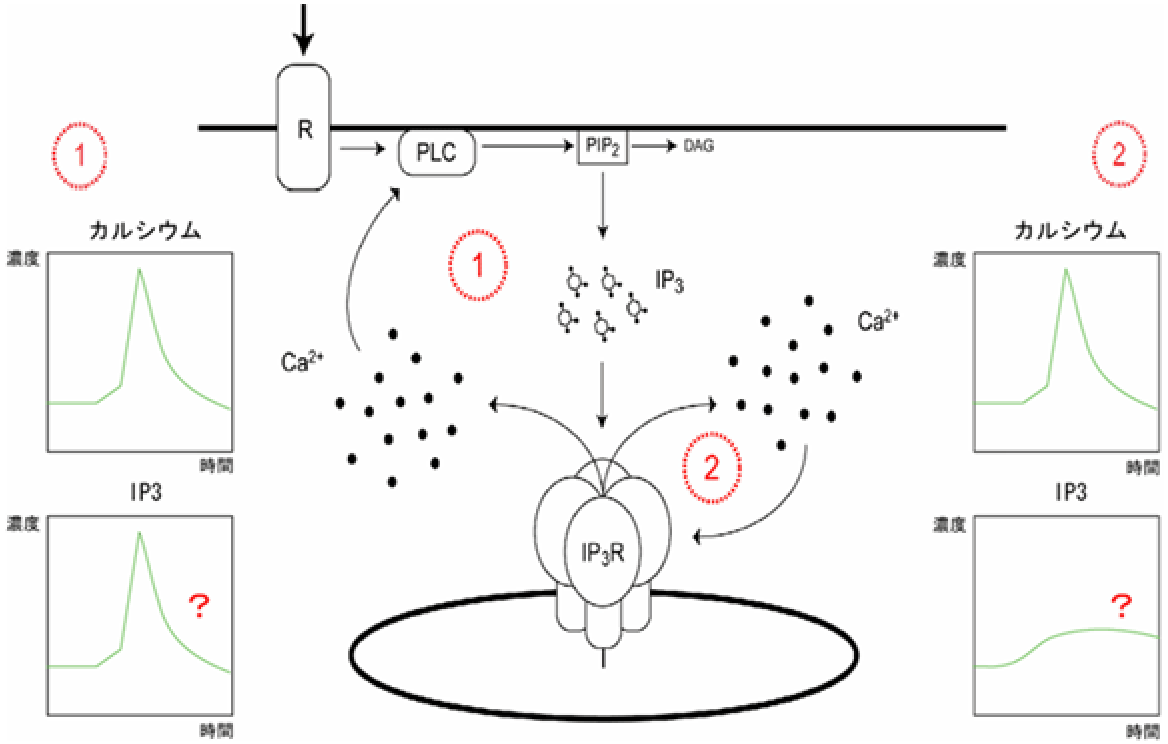
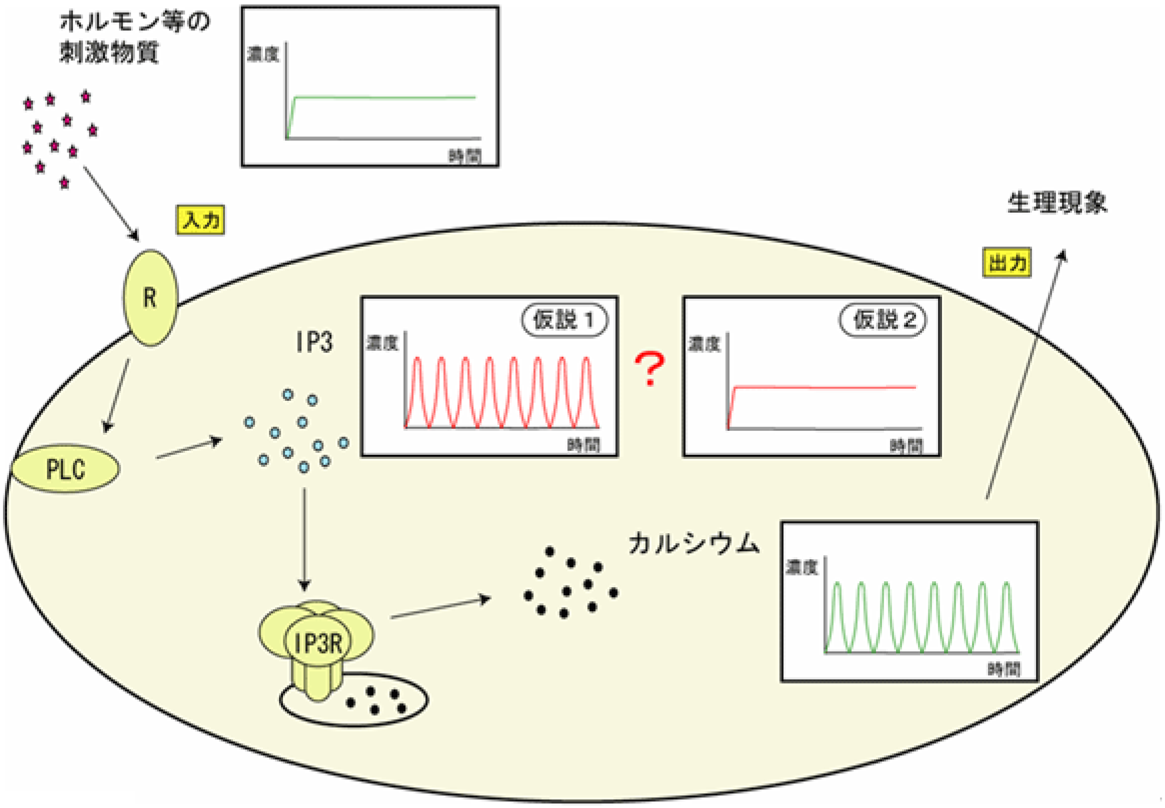


図１　カルシウムスパイク生成における２つの正のフィードバック制御仮説

細胞外刺激が細胞膜上の受容体（R）に結合し、ホスホリパーゼC（PLC）を活性化する。PLCは細胞膜の構成成分の１つであるホスファチジルイノシトール二リン酸（PIP2）から、ジアシルグリセロール（DAG）とイノシトール三リン酸（IP_3）を産生する。IP_3は細胞内カルシウム貯蔵器官である小胞体などに存在するIP_3受容体（IP_3R）に結合し開口させることにより、細胞質のカルシウムイオン（Ca^{2+}）の濃度上昇をもたらす。放出されたCa^{2+}によりPLCが活性化され、IP_3がさらに産生されるためCa^{2+}放出が促進される（仮説 1）。放出されたカルシウムがカルシウム放出チャネルであるIP_3受容体自身を活性化し、カルシウム放出がさらに促進される（仮説2）。



R：　細胞表面にある刺激物質の受容体
PLC：　ホスホリパーゼ C（IP3 産生酵素）

図 2　これまでに予測されていたカルシウム振動の生成メカニズム

ホルモン等の刺激を受けた細胞内では、周期的にカルシウムスパイクが発生する。これをカルシウム振動と言う。カルシウムスパイク生成メカニズムには 2 つの正のフィードバック制御仮説（仮説 1、仮説 2）が提唱されている。仮説 1 では、カルシウム情報伝達の上流のシグナルであるIP_3濃度が振動することによってCa^{2+}濃度が振動することが予測されている。仮説 2 では、カルシウム振動が引き起こされるためにIP_3濃度が振動することは必要ないと考えられている。

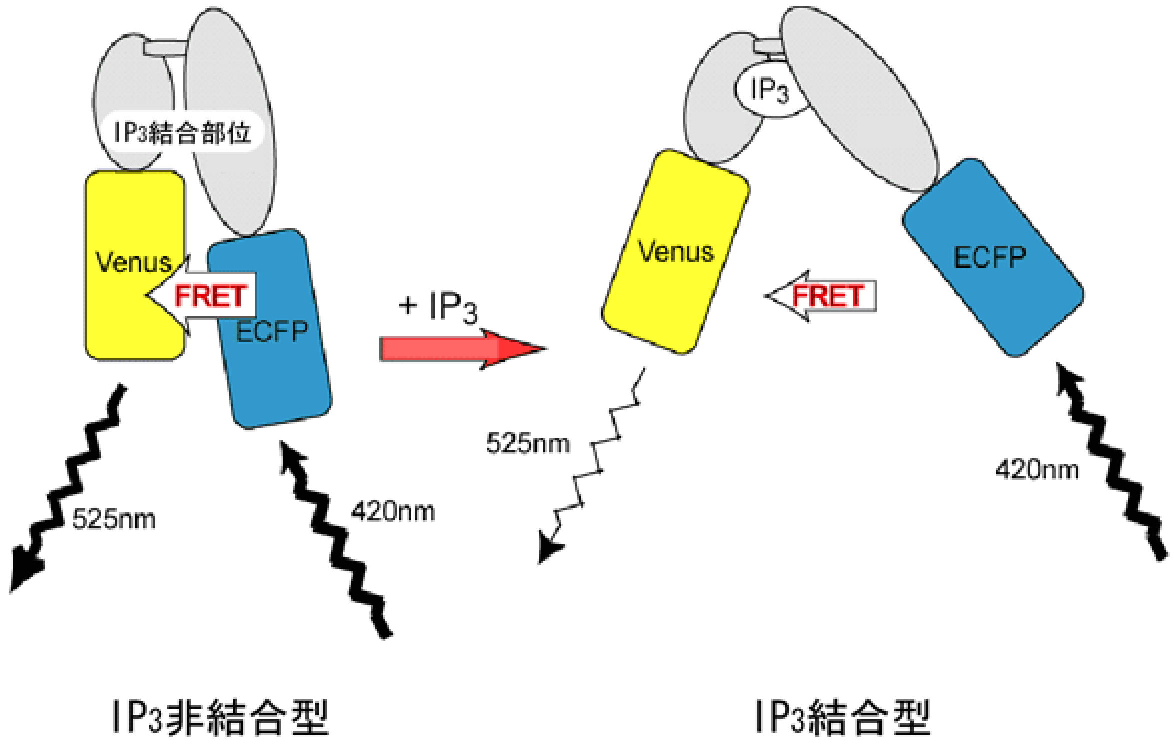


図 3　IP_3センサータンパク質「IRIS」

カルシウム振動の生成メカニズムを知るために、IP_3のセンサータンパク質「IRIS」を作成した。IRISには 2 つの蛍光タンパク質、ECFP（青色蛍光タンパク質）とVenus（ヴィーナス:黄色蛍光タンパク質）が融合されている。IRISは、IP_3と結合することで立体構造が変化し、FRET効率が減少し、Venusからの蛍光が弱くなる。この蛍光の変化によって細胞内のIP_3濃度変化を知ることができる。

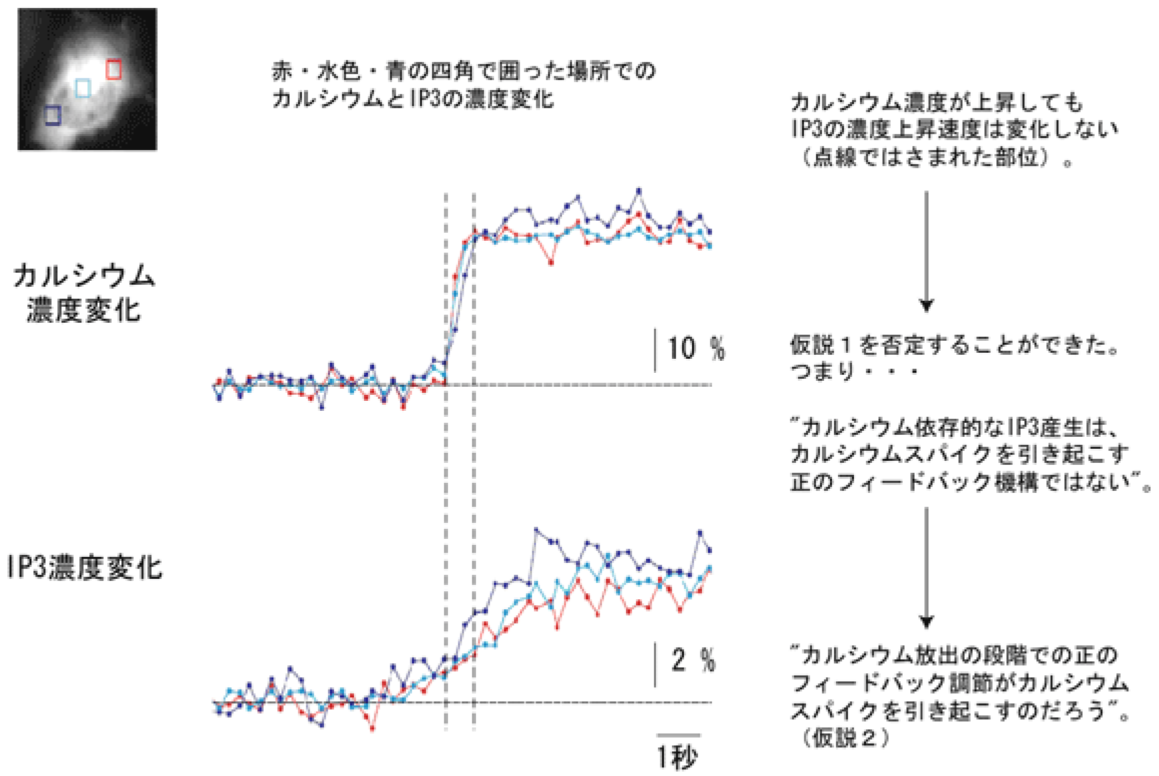


図４　急激なカルシウム濃度上昇とIP_3濃度変動

細胞質のIP_3濃度は、Ca^{2+}濃度が上昇し始める前から一定速度で上昇を始め、Ca^{2+}濃度が急速に上昇する際でもその速度は変化しない。

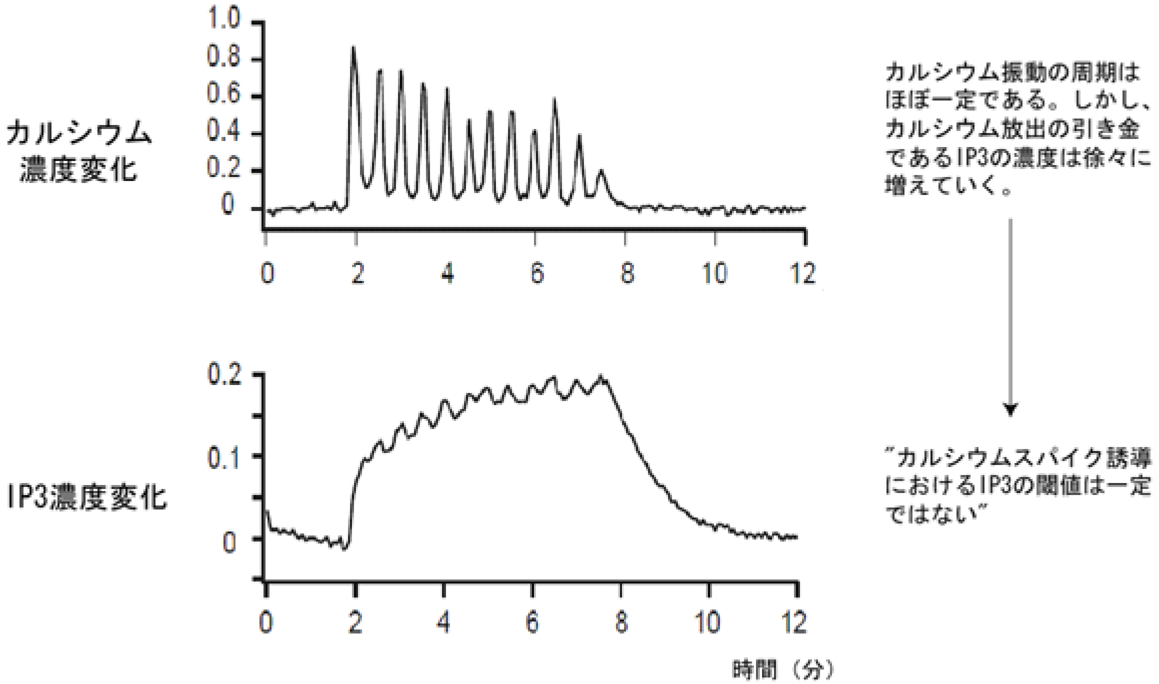


図５　カルシウム振動時のIP_3濃度変動

仮説２では、周期的なIP_3スパイクがなくともカルシウム振動が起こることが示唆されている。観察の結果、予想されたようにカルシウム振動のような大きなIP_3の濃度変化は観測されず、カルシウム振動生成にはIP_3スパイクは必要ないことが明らかになった。さらに周期的なカルシウムスパイクに伴って、細胞内にIP_3が徐々に蓄積されていくことを観測することができた。

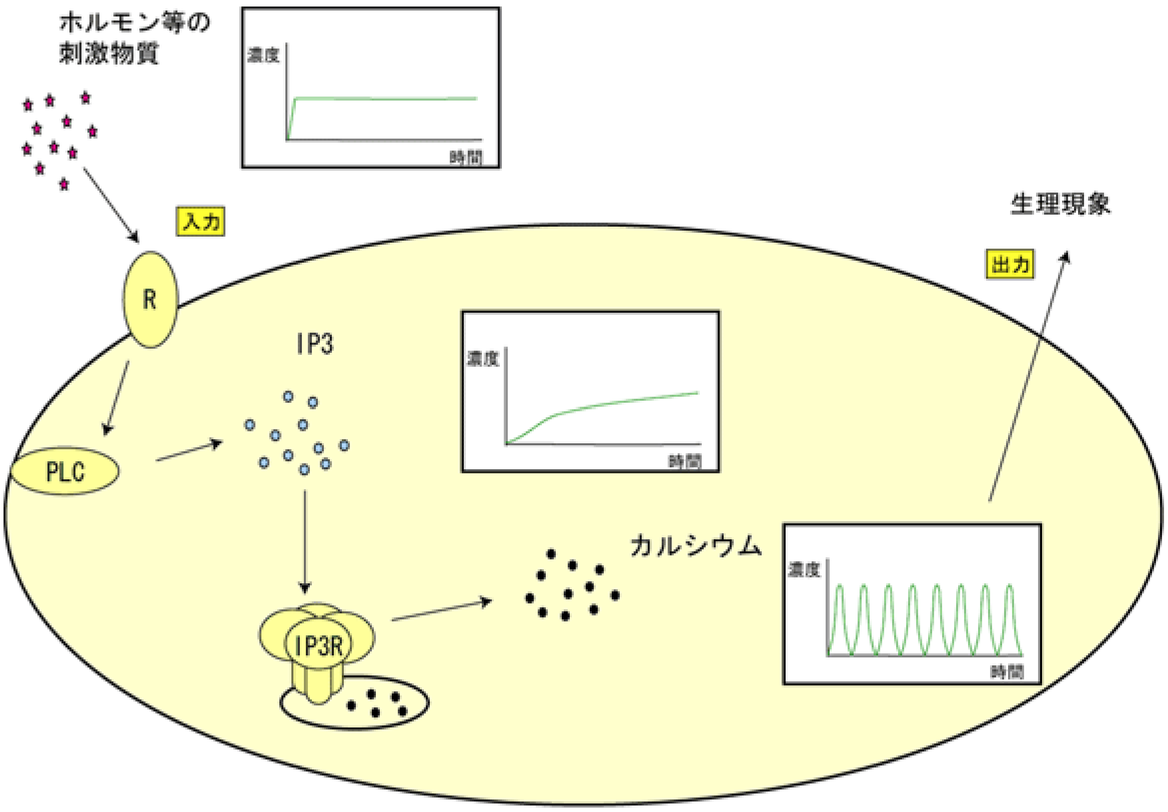


図６　今回の研究で明らかになった細胞内での情報の変換の様子（模式図）

スパイク状に急峻な濃度変化を起こすカルシウムに比べ、IP_3が比較的ゆっくりと濃度変化することから、その下流で働くIP_3受容体によってアナログ的なIP_3シグナルがカルシウムスパイクというパルスシグナルに変換されていることが示された。このことからIP_3受容体が細胞内情報伝達系による情報符号化の際に極めて重要な役割を担っていることがわかった。