

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 張 維 (チ ョ ウ イ)

論 文 題 目

Molecular and Cell Biological Studies on Calcium-responsive Factors in Cultured Mammalian Cells

(培 養 哺 乳 類 細 胞 に お け る カ ル シ ウ ム 応 答 性 因 子 に 関 す る 分 子 細 胞 生 物 学 的 研 究)

論 文 審 査 担 当 者

主 査	名古屋大学教授	牧 正 敏
委 員	名古屋大学教授	下 村 吉 治
委 員	名古屋大学教授	松 田 幹
委 員	名古屋大学准教授	柴 田 秀 樹
委 員	名古屋大学講師	高 原 照 直

細胞内において Ca^{2+} はセカンドメッセンジャーとして作用し幅広い細胞応答に関与している。細胞内 Ca^{2+} は主に小胞体 (ER) に貯蔵され、細胞刺激により ER 内腔から Ca^{2+} が遊離する。ER 内腔の Ca^{2+} が枯渇すると、ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) 装置が働き、細胞膜イオンチャネルを活性化して細胞外からの Ca^{2+} 流入が起こる。通常状態で転写因子 NFAT は高度にリン酸化されて細胞質に存在している。細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇すると、 Ca^{2+} と結合した calmodulin が脱リン酸化酵素である calcineurin を活性化し、NFAT は脱リン酸化されて核に移行して標的遺伝子の発現を誘導する。このような NFAT 活性化機構を利用し、NFAT 応答配列に依存したレポーター測定系が開発され、 Ca^{2+} 応答研究のツールとして用いられている。しかし、一般に用いられている測定系は Ca^{2+} 上昇刺激のみではレポーター遺伝子の発現誘導を検出することができず、パートナー転写因子の活性化も必要とする。そこで、張維は、第一の目的として、他の活性化剤の併用を必要とせず、 Ca^{2+} 上昇刺激のみでも応答する測定系の開発を目指した。一方、SOCE 機構において、過剰な Ca^{2+} 流入を抑制する負の制御因子として SARAF が報告されている。しかし SARAF は、分子内に Ca^{2+} 結合モチーフをもたず、どのようにして細胞外からの流入によってもたらされる Ca^{2+} 濃度変動を感知しているのかは不明である。興味深いことに、SARAF 分子内には Ca^{2+} 結合蛋白質である ALG-2 の認識モチーフ配列が存在する。そこで、第二の目的として ALG-2 と SARAF の相互作用様式の解明および ALG-2 の SOCE 調節への関与を明らかにすることを目指した。

【1】 新規 Ca^{2+} 応答性レポーター測定系の樹立

張維は、ヒト胚性腎細胞 (HEK293 細胞) を用いて、*IL2* 遺伝子由来の NFAT 応答配列 (NFAT-RE) をもつ NanoLuc luciferase (Nluc) レポーターと NFAT 発現ベクター、そしてトランスフェクション効率をモニターするホタル luciferase (Fluc) を発現させ、 Ca^{2+} 動員試薬とプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤を添加し、NFAT とパートナー転写因子 AP-1 を活性化させた。その後、細胞溶解液を用いて、Nluc と Fluc の活性を測定し、得られた Nluc と Fluc の活性比により相対ルシフェラーゼ活性を算出した。*IL2* 遺伝子由来の非パリンドローム型 NFAT-RE の場合、 Ca^{2+} イオノフォアである ionomycin (IM) のみの刺激では NFAT の転写活性上昇が観察されず、PKC 活性化剤である PMA による追加刺激が必要であった。これに対して、Nluc 遺伝子の転写開始に必要な最小プロモーターの上流に、*IL8* 遺伝子プロモーターに存在する疑似パリンドローム型の NFAT-RE を付加した場合、付加させた応答配列の反復配列数に依存して IM 刺激に対して応答した。また、Calcineurin 阻害剤である FK506 で前処理すると相対ルシフェラーゼ活性が抑制された。続いて、新たなレポーター測定系が SOCE による Ca^{2+} 上昇に対して応答するかについて調べた。SOCE を誘導させるために、ER/SR Ca^{2+} ポンプ SERCA の阻害剤

である thapsigargin (TG) によって、ER 内腔の Ca^{2+} を枯渇させた。TG 刺激で相対ルシフェラーゼ活性が上昇し、FK506 前処理によって阻害され、また、STIM1 と Orai1 が形成する CRAC チャネルの阻害剤である BTP2 の前処理によっても抑制された。STIM1 と Orai1 が恒常発現している細胞 (HEK293 S1/01) の方が HEK293 親株細胞より高い活性が得られた。また、新しく構築したレポーター測定系は、生理的な刺激剤として GPCR アゴニストである carbachol (CCh) と ATP を用いたところ、これらに対しても応答が観察された。さらに、ALG-2 が SARAF と相互作用することにより SOCE へ関与する可能性を探るため、ALG-2 が細胞内 Ca^{2+} 応答反応に及ぼす影響について調べた。ALG-2 の発現を RNA 干渉法によって恒常的に抑制させた HEK293 細胞 (ALG-2 KD) は、IM、TG、CCh、ATP 刺激により、親株細胞より高いレポーター活性を示した。一方、AP-1 レポーター測定系及び cAMP レポーター測定系では両細胞株間で有意な差が観察されず、ALG-2 は Ca^{2+} 応答性レポーター測定系に対して特異的に抑制効果をもつことが示唆された。

【2】 ALG-2 と SARAF の相互作用様式および ALG-2 の SOCE に対する影響

張維が所属する研究室の先行研究で、内在性の ALG-2 が SARAF と Ca^{2+} 依存的に相互作用する結果が得られていたが、SARAF の結合領域については不明であった。そこで張維は ALG-2 結合モチーフ 2 型 (ABM-2) 配列が存在する SARAF の細胞質溶領域 (cytosolic domain、CytD) を用いて、ALG-2 との結合解析を行った。まず、SARAF と ALG-2 の相互作用における ABM-2 の重要性を明らかにするため、N 末端に Strep 及び HA-tag を繋ぎ、C 末端に SGFP2 を融合させた SARAF CytD (StrepHA-SARAF CytD-SGFP2) の野生型、或いは変異体を HEK293 細胞に発現させ、 Ca^{2+} 存在下で Strep-プルダウン (PD)、及び免疫沈降 (IP) 実験を行った。SARAF CytD 野生型の PD 産物及び免疫沈降産物のウェスタンブロット解析で内在性 ALG-2 のバンドが検出されたが、ABM-2 を欠損した変異体ではシグナルが殆ど検出されなかった。また、SARAF 主バンドの他に、抗ユビキチン抗体と反応する泳動遅延バンドが検出された。PD 条件を変えるとユビキチン修飾の程度に違いが生じ、ユビキチン修飾が細胞溶解後にも起こっていることが分かった。PPxY 配列は NEDD4 ファミリー (E3 ユビキチンリガーゼ) の WW ドメイン認識モチーフであり、SARAF CytD に 2 箇所存在する。このうち ABM-2 より N 末側に存在する PPxY 配列内のアミノ酸置換変異体においてユビキチン修飾の顕著な低下が見られ、WW ドメイン含有 E3 リガーゼの関与が示唆された。次に、SARAF のユビキチン修飾における ALG-2 の役割を調べるために、ALG-2 との共発現実験を行った。SARAF と結合できる ALG-2 の野生型および変異体 (Δ GF、Y180A) の過剰発現によって SARAF のユビキチン修飾が抑制されたが、SARAF と結合できない ALG-2 変異体 (m1.3 や F85A) の場合は抑制されなかった。さらに、ALG-2 と結合しない SARAF F228S 変異体では、ユビキチン修飾が抑制されなかった。以上より、SARAF ユビキチン修飾が ALG-2 によって抑制

されるためには、SARAF と ALG-2 との結合が重要であることが分かった。SARAF CytD には Lys 残基が 2 箇所存在する。しかし Lys 残基を 2 箇所とも変異させても、ユビキチン修飾が依然として検出された。CytD 中の 2 つの Lys 残基ばかりでなく、リンカー領域及び付加した SGFP2 分子内にもユビキチン修飾が起こり、CytD 以外の修飾に対しても ALG-2 が抑制することが示唆された。

ALG-2 によるユビキチン修飾抑制の特異性を検討するために、PPxY モチーフをもち WW ドメインと結合することが知られている WBP2 を StrepHA-SGFP2 に融合させて PD 実験を行った。PD 産物において、WBP2 のユビキチン修飾は確認できたが、ALG-2 によるユビキチン修飾の抑制は観察されなかった。ALG-2 との相互作用が検出されなかったため、Sec31A の ALG-2 結合領域 (ABS) を付加させた WBP2 を用いると、ALG-2 の共発現によって、ユビキチン修飾は部分的に抑制された。これに対して、ALG-2 と結合しない ABS 変異配列を融合させた場合は抑制されなかった。以上より、ALG-2 が ABM-2 含有蛋白質のユビキチン化を抑制することが分かった。作業仮説として、(i) ALG-2 が WW ドメインに結合する、(ii) ALG-2 と WW ドメインが競争的に PPxY 領域に結合することで、ユビキチン修飾を抑制する。或いは、(iii) ALG-2 の結合領域が WW ドメインの結合領域に近い場合、立体障害によりユビキチン修飾を抑制する。ALG-2 と SARAF 変異体との定量的結合実験結果を考慮すると (iii) の可能性の方が高い。

SARAF と ALG-2 との相互作用が細胞内 Ca^{2+} 濃度変動にどう影響するかを調べるために、 Ca^{2+} 応答性蛍光蛋白質 GEM-GECO を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度変動を解析した。HEK293 S1/01 細胞に GEM-GECO を発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で動画を撮りながら、蛍光イメージングを行った。細胞外 Ca^{2+} が存在しない状態で、CCh 刺激により ER から Ca^{2+} 放出させた後、灌流装置を用いて Ca^{2+} 含有バッファーに交換して SOCE を測定した。野生型 SARAF を発現させた場合、SOCE による Ca^{2+} 濃度上昇が抑えられる結果が得られたが、ALG-2 と結合しない SARAF 変異体 F228S では、その抑制効果は減少する傾向が観察された。これらのことから、SARAF が SOCE を抑制するためには、ALG-2 との相互作用が重要であることが示唆された。以上より、ALG-2 は SARAF の Ca^{2+} センサーとして働き SOCE 調節に関与していると推察された。

以上、張維は Ca^{2+} に応答する遺伝子発現機構を利用した新規レポーター測定システムを開発するとともに、カルシウム結合蛋白質 ALG-2 の新規相互作用因子 SARAF における ALG-2 結合部位の同定ならびに SARAF ユビキチン修飾と ALG-2 による阻害様式を明らかにした。審査委員会は、張維の研究成果ならびに学識ともに博士 (農学) に値すると判定した。