

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主 論 文 の 要 約

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)

氏 名 張 維 (ZHANG, Wei)

論文内容の要約

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 から Ca^{2+} が遊離する。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+} 流入が起こり、細胞質 Ca^{2+} 濃度がさらに上昇する。SOCE 下流の Ca^{2+} 応答性転写因子として、NFAT が報告されている。通常状態で NFAT は高度にリン酸化されて細胞質に存在しているが、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 を活性化させ、NFAT は calcineurin により脱リン酸化され、核に移行した NFAT は他の因子と複合体を形成して、標的遺伝子の発現を誘導する。

NFAT の活性化を利用し、NFAT 応答配列に基づいたレポーター測定システムが開発され、 Ca^{2+} 応答研究のツールとしてよく用いられている。ところが、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問題が存在する。そこで、本研究の1つめの目的として、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レポーター測定系の樹立を目指した。

また、SOCE 機構についても不明な点がある。SOCE は ER 内腔の Ca^{2+} センサー STIM1 と細胞膜の Ca^{2+} チャネル Orail の活性化により細胞外から Ca^{2+} が流入する機構である。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。ところが、SARAF 分子内には Ca^{2+} 結合モチーフは存在せず、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 ALG-2 と相互作用するモチーフ配列が存在する。ALG-2 は EF-hand が 5 つ存在する Ca^{2+} 結合蛋白質である。当研究室では、これまでに ALG-2 結合モチーフ (ABM) として 3 種類 (ABM-1, -2, -3) を同定してきたが、ALG-2 が Ca^{2+} センサーとして ABM-2 を含む SARAF と相互作用し、SOCE に関わる可能性がある。そこで、2 つめの目的は、ALG-2 と SARAF の相互作用および、SOCE への関与を解明することである。

【1】 新規 Ca^{2+} 応答性ルシフェラーゼ測定系の樹立

ヒト胚性腎細胞 (HEK293 細胞) を用いて、従来のシステムに従って、*IL-2* 遺伝子由来の NFAT 応答配列 (NFAT-RE) をもつ NanoLuc luciferase (Nluc) レポーター、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+} 上昇試薬とプロテインキナーゼ C (PKC) 活性剤を添加し、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 (RLA) を算出した。*IL-2* 遺伝子由来の非パリンδρο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 の転写活性が上昇せず、PKC 活性剤である PMA による追加刺激が必要であった。そこで、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、*IL-8* 遺伝子プロモーターに存在する疑似パリンδροーム型の NFAT-RE を付加し、 Ca^{2+} 上昇刺激のみでも応答するかを調べた。期待通り IM 刺激に対しても応答した。また、Calcineurin 阻害剤である FK506 で前処理すると NFAT 活性化が抑制された。続いて、新たなレポーターシステムが 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相対ルシフェラーゼ活性が抑制された。STIM1 と Orai1 が恒常性発現している細胞 (HEK293 S1/01) を樹立しての方が 293 細胞より高い活性が得られた。この測定系が SOCE における Ca^{2+} 応答解析にも適用可能であることが判明した。また、新しく構築したレポーターシステム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した。さらに、ALG-2 が SARAF と相互作用することにより SOCE へ関与する可能性があるため、ALG-2 が細胞内 Ca^{2+} 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細胞 (ALG-2 KD) は、細胞内 NFAT1、STIM1 の発現量への影響は観察されなかったが、IM、TG、CCh、ATP 刺激により、親株の HEK293 細胞より高い活性を示した。一方、非 Ca^{2+} -応答性 AP-1 レポーター測定系及び cAMP レポーター測定系は両細胞株間で差は観察されなかった。以上より、ALG-2 は Ca^{2+} 応答性レポーターに対して特異的に抑制効果をもつことが分かった。

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

当研究室の先行研究より、内在性の ALG-2 が SARAF と Ca^{2+} 依存的に相互作用する結

果が得られたが、SARAF の結合領域については不明であった。そこで私は ABM-2 が存在する SARAF の細胞質ソル領域 (cytosolic domain、CytD)を用いて、ALG-2 との結合様式について調べた。まず、ABM-2 が SARAF と ALG-2 の相互作用における重要性を調べるために、N 末端に Strep-tag, 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、Ca²⁺存在下で Strep-プルダウン (PD)、及び免疫沈降実験を行った。SARAF CytD の野生型の PD 及び免疫沈降産物中に内在性 ALG-2 のバンドが検出された。ABM-2 を欠損した変異体では、ALG-2 のバンドはほとんど検出されなかった。また、PD 及び免疫沈降産物中に 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、*in vitro* で起こっていることが分かった。SARAF CytD に 2 つの PPxY 配列が存在する。PPxY 配列は NEDD4 ファミリー (E3 ユビキチンリガーゼ) の WW ドメインが認識する領域である。PPxY 配列の 1 つめをアミノ酸置換変異させた SARAF においてユビキチン修飾の抑制が見られ、WW ドメイン含有 E3 リガーゼの関与が示唆された。

次に、SARAF のユビキチンバンドの出現における ALG-2 の役割を調べるために、ALG-2 の変異体を用いて実験を行った。SARAF と結合できる ALG-2 の野生型、ABM-1 と結合しない変異体 Δ GF、Y180A を過剰発現させた場合、SARAF のユビキチン修飾を抑制する結果が得られた。一方、SARAF と結合できない ALG-2 変異体である m1.3 や F85A を発現させた場合は、SARAF のユビキチン修飾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 にはリジン残基が 2 つ存在する。ところが、リジン残基を 2 つとも変異させても、StrepHA-SARAF CytD-SGFP2 のユビキチン修飾が依然として検出された。この CytD 中の 2 つのリジンばかりでなく、linker 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、このユビキチン修飾に対しても ALG-2 が抑制する可能性がある。

次に、ALG-2 がユビキチン修飾を抑制する特異性について調べるために、Sec31A の ALG-2 結合領域 (ABS) を付加させた WW ドメイン結合蛋白質 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 との相互作用が検出されず、ALG-2 によるユビキチン修飾の抑制も観察されなかった。ALG-2 と結合できる Sec31A ABS を融合させた WBP2 においては、ALG-2 を発現させた場合、ユビキチン修飾が抑制された。しかし、ALG-2 と結合しない ABS 変異配列を融合させた場合は、WBP2 のユビキチン修飾が抑制されなかった。以上の実験より、ALG-2 が ABM-2 含む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 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、(ii) ALG-2 の結合領域が WW domain 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と考えられるが、ALG-2 と SARAF 変異体との定量的結合実験結果を考慮すると (ii) の可能性の方が高い。

次に、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 を結合しない 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可能性が示唆された。