

氏 名	チヨウ 張 ビョウ 森
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 610 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Calumin, a novel Ca^{2+} -binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum (小胞体新規カルシウム結合膜タンパク質 Calumin に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 島 浩 教 授 中 山 和 久 教 授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

小胞体 Ca^{2+} ストアは生体反応に必要であるが、小胞体の構造とその機能については不明な点が多く残されている。本研究は新規小胞体膜タンパク質 Calumin を同定し、その生理学的意義の解明を目的としている。

1. Calumin の分布解析、一次構造、細胞内局在と分子内領域

マウス臓器の RNA プロット解析にて心臓、脳、肝臓などのほぼ総ての臓器で mRNA が確認された。cDNA クローニングによる一次構造の解析から、Calumin がシグナルペプチドを持つ膜タンパク質と推測された。また、高い特異性を有するモノクローナル抗体を作製し、細胞内では小胞体に局在することが明らかになった。Calumin は膜貫通セグメントを一ヶ所有し、Membrane topology アッセイにより、N 末端が小胞体内腔側に、C 末端が細胞質側に分布するものと推定された。

2. 小胞体内腔領域のカルシウム結合能の検討

N 末端側の内腔領域は豊富に酸性アミノ酸を含み、カルシウム結合活性があると推測される。そこで、小胞体内腔領域のみの Calumin を組み換えタンパク質として発現させて、カルシウム結合タンパク質の染色に汎用される Stains-all 色素による染色性の確認、プロット膜上でのオーバーレイ実験による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の結合活性の検討、さらに $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の飽和結合キネテクスの検討により、小胞体内腔領域のカルシウム結合能が示された。また、Calumin 1 分子に対して Ca^{2+} は15分子結合し、その K_d は約 $750\mu\text{M}$ ということが明らかになった。

3. Calumin 欠損マウスの作製

Calumin 欠損マウスの作製のため、エクソン 2 の部位をネオマイシン耐性遺伝子で置換した変異を有する Calumin 遺伝子をもつマウスを、3 ライン樹立した。ヘテロ欠損マウスにおいては異常が認められなかったが、ホモ接合体の Calumin 欠損マウスは約74%の個体が胎児期に死亡し、約26%の個体が生後まもなく死亡した。Calumin 欠損が致死性を示すことから動物個体レベルでの Calumin 機能が重要であることが推察される。

4. 細胞増殖と細胞死

Calumin 欠損マウスから MEF 細胞 (mouse embryonic fibroblast, 線維芽細胞) を単離し、細胞増殖と細胞死について検討した結果、Calumin 欠損 MEF 細胞は野生型 MEF 細胞と比べ増殖の異常を示さなかった。

一方、thapsigargin または tunicamycin を用いた小胞体ストレスの刺激に対し、Calumin 欠損 MEF 細胞は野生型 MEF 細胞と比べアポトーシスが起きやすいことが明らかになった。

5. カルシウムシグナリング

Calumin 欠損マウスの MEF 細胞について、Fura-2 AM を用いた蛍光カルシウムイメージング測定を行い、カルシウムシグナリングについての検討を行った。thapsigargin, cyclopiazonic acid (ともに小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害剤) を用いて、小胞体のカルシウムハンドリングを検討したところ、Calumin 欠損 MEF 細胞は野生型 MEF 細胞より小胞体のカルシウム

容量の減少と細胞外からのカルシウムの流入 (store-operated calcium entry) の減弱が認められた。

6. レスキュー実験

Calumin 欠損 MEF 細胞に Retrovirus vector を用いて Calumin cDNA を導入すると、Calumin 欠損 MEF 細胞で認められたカルシウムハンドリングの障害がレスキューされた。したがって、Calumin の欠損が Calumin 欠損 MEF 細胞で見られた障害の主要因であったと考えられる。

転写因子 NFAT は細胞の生存と個体の発生に重要な分子であることが知られているが、先行研究により、ストア作動性カルシウム流入に欠陥がある細胞は、転写因子 NFAT の活性化に障害があることが報告されている。上記の結果から、Calumin は小胞体のカルシウムストアとストア作動性カルシウムの流入に重要な役割を果たしているため、Calumin の欠損によって細胞のカルシウムハンドリングが深刻な影響を受け、細胞内シグナル伝達に障害が起きたものと推察される。さらにはそのシグナル伝達のなかでもより細胞の生存と個体の発生に重要な calcineurin-NFAT 経路に障害が生じたため、個体の胎生致死と新生致死に至ったことと思われる。

論文審査の結果の要旨

小胞体 Ca^{2+} ストアは生体反応に必要なものであるが、小胞体の構造とその機能については不明な点が多く残されている。本研究は新規小胞体膜タンパク質 Calumin を同定し、その生理学的意義の解明を目的としている。

1. Calumin の分布解析、一次構造、細胞内局在と分子内領域

マウス臓器の RNA プロット解析にて心臓、脳、肝臓などのほぼ全ての臓器で mRNA が確認された。cDNA クローニングによる一次構造の解析から、Calumin がシグナルペプチドを持つ膜タンパク質と推測された。また、高い特異性を有するモノクローナル抗体を作製し、細胞内では小胞体に局在することが明らかになった。Calumin は膜貫通セグメントを一つ所有し、Membrane topology アッセイにより、N 末端が小胞体内腔側に、C 末端が細胞質側に分布するものと推定された。

2. 小胞体内腔領域のカルシウム結合能の検討

N 末端側の内腔領域は豊富に酸性アミノ酸を含み、カルシウム結合活性があると推測される。そこで、小胞体内腔領域のみの Calumin を組み換えタンパク質として発現させて、カルシウム結合タンパク質の染色に汎用される Stains-all 色素による染色性の確認、プロット膜上でのオーバーレイ実験による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の結合活性の検討、さらに $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の飽和結合キネテクスの検討により、小胞体内腔領域のカルシウム結合能が示された。また、Calumin 1 分子に対して Ca^{2+} は 15 分子結合し、その K_d は約 $750\mu\text{M}$ ということが明らかになった。

3. Calumin 欠損マウスの作製

Calumin 欠損マウスの作製のため、エクソン 2 の部位をネオマイシン耐性遺伝子で置換した変異を有する Calumin 遺伝子をもつマウスを、3 ライン樹立した。ヘテロ欠損マウスにおいては異常が認められなかったが、ホモ接合体の Calumin 欠損マウスは約 74% の個体が胎児期に死亡し、約 26% の個体が生後まもなく死亡した。Calumin 欠損が致死性を示すことから動物個体レベルでの Calumin 機能が重要であることが推察される。

4. 細胞増殖と細胞死

Calumin 欠損マウスから MEF 細胞 (mouse embryonic fibroblast, 線維芽細胞) を単離し、細胞増殖と細胞死について検討した結果、Calumin 欠損 MEF 細胞は野生型 MEF 細胞と比べ増殖の異常を示さなかった。

一方、thapsigargin または tunicamycin を用いた小胞体ストレスの刺激に対し、Calumin 欠損 MEF 細胞は野生型 MEF 細胞と比べアポトーシスが起きやすいことが明らかになった。

5. カルシウムシグナリング

Calumin 欠損マウスの MEF 細胞について、Fura-2 AM を用いた蛍光カルシウムイメージング測定を行い、カルシウムシグナリングについての検討を行った。thapsigargin, cyclopiazonic acid (ともに小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害剤) を用いて、小胞体のカルシウムハンドリングを検討したところ、Calumin 欠損 MEF 細胞は野生型 MEF 細胞より小胞体のカルシウム容量の減少と細胞外からのカルシウムの流入 (store-operated calcium entry) の減弱が認められた。

6. レスキュー実験

Calumin 欠損 MEF 細胞に Retrovirus vector を用いて Calumin cDNA を導入すると、Calumin 欠損 MEF 細胞で認められたカルシウムハンドリングの障害がレスキューされた。したがって、Calumin の欠損が Calumin 欠損 MEF 細胞で見られた障害の主要因であったと考えられる。転写因子 NFAT は細胞の生存と個体の発生に重要な分子であることが知られているが、先行研究により、ストア作動性カルシウム流入に欠陥がある細胞は、転写因子 NFAT の活性化に障害があることが報告されている。上記の結果から、Calumin は小胞体のカルシウムストアとストア作動性カルシウムの流入に重要な役割を果たしているため、Calumin の欠損によって細胞のカルシウムハンドリングが深刻な影響を受け、細胞内シグナル伝達に障害が起きたものと推察される。さらにはそのシグナル伝達のなかでもより細胞の生存と個体の発生に重要な calcineurin-NFAT 経路に障害が生じたため、個体の胎生致死と新生致死に至ったことと思われる。

以上、本研究によって、新規小胞体膜タンパク質 Calumin は小胞体のカルシウムストアとストア作動性カルシウムの流入に重要な役割を果たしていることが示された。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値のあるものと認める。

さらに、平成19年2月20日論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果合格と認定した。