

細胞内の高濃度カルシウムイオンをとらえるセンサーを開発

—ミトコンドリア・小胞体内カルシウムシグナルの可視化—

1. 発表者：

飯野 正光 (東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野 教授)
鈴木 純二 (東京大学大学院医学系研究科 博士課程3年)
金丸 和典 (東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野 助教)
石井 邦明 (山形大学医学部 薬理学講座 教授)
大倉 正道 (埼玉大学脳末梢科学研究センター 脳科学研究新技術開発部門 准教授)
大久保 洋平 (東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野 講師)

2. 発表のポイント：

- ◆ミトコンドリアと小胞体内におけるカルシウムイオン濃度の変動（カルシウムシグナル）を可視化する蛍光タンパク質型カルシウムセンサーを開発した。
- ◆ミトコンドリアと小胞体内カルシウムシグナルを、時間的・空間的に高い解像度で観察することが可能になった。
- ◆細胞の生理機能および病理に対し、ミトコンドリアと小胞体内カルシウムシグナルが果たす役割を解明する上で、今回開発したセンサーが新たな展望をもたらすと期待される。

3. 発表概要：

エネルギーを産生するミトコンドリア（注1）とタンパク質の合成にかかわる小胞体（注2）は、重要な細胞機能を担う、細胞が共通して有する細胞内小器官であり、これらの機能はカルシウムイオンの濃度変化（カルシウムシグナル）によって制御されることが知られています。しかし、細胞内小器官におけるカルシウムシグナルを時間的・空間的に高い解像度で可視化する手法は乏しく、例えば、「細胞が刺激に応じてカルシウムシグナルが生じるとき、小胞体やミトコンドリア中のカルシウムイオンはどのように変動するのか」などの不明な点が多く残されていました。

今回、東京大学大学院医学系研究科 機能生物学専攻 細胞分子薬理学分野の飯野正光教授らのグループは、ミトコンドリアと小胞体のカルシウムシグナルを高解像度で捉えることが可能な蛍光タンパク質型カルシウムセンサー群「CEPIA」を開発しました。これにより、小胞体からのカルシウムイオン放出が細胞内を波状に伝わる様子、あるいは1つの細胞の中にカルシウムイオンを取り込むミトコンドリアと取り込まないミトコンドリアが存在することを鮮明に可視化できるようになりました。CEPIAによる可視化解析は幅広い細胞種に適用できるため、細胞機能の基礎的理解だけでなく、ミトコンドリアや小胞体が関わる病態研究にも新たな展開をもたらすことが期待されます。

本研究成果は、2014年6月13日に英国科学雑誌『Nature Communications』のオンライン版に掲載されます。

4. 発表内容：

【研究の背景】

細胞内では、外界からの刺激に応じて細胞質（注3）のカルシウムイオン濃度上昇（カルシウムシグナル）が起こり、これによって、筋収縮・神経伝達・免疫反応・細胞の生死決定など、

生命活動に必須となるさまざまな細胞機能が制御されます。細胞内小器官のうち、エネルギーの産生の場として知られるミトコンドリア、およびタンパク質合成の場として知られる小胞体も、このカルシウムシグナルに深く関与しています。小胞体はカルシウムイオンの貯蔵庫としても機能し、細胞質のカルシウムシグナルを形成する上で重要な役割を果たします。また、細胞質でカルシウムシグナルが起こると、ミトコンドリアはカルシウムイオンを内部に取り込み、結果としてミトコンドリアのエネルギー産生能が向上することが知られています。さらに、ミトコンドリアや小胞体のカルシウムイオン制御機構の異常が、神経変性疾患や心疾患などの疾病の原因となることも示唆されています。このように、ミトコンドリアと小胞体は細胞質カルシウムシグナルと密接に関係しますが、不明な点が多く残されています。例えば、「細胞質全体でカルシウムシグナルが生じるとき、小胞体やミトコンドリア中のカルシウムイオンはどのように変動するのか」などです。これらを明らかにするには、ミトコンドリアと小胞体内のカルシウムシグナルを高解像度で観察する必要がありますが、従来法では困難でした。

【研究内容】

そこで、飯野教授らの研究グループは、既存の細胞質用カルシウムセンサーを改変することで、ミトコンドリアと小胞体用のカルシウムセンサーCEPIAを開発しました（図1）。ミトコンドリアおよび小胞体中のカルシウムイオン濃度は、細胞質よりも濃度ははるかに高く（約1,000～10,000倍）、既存の細胞質用のカルシウムセンサーではミトコンドリアおよび小胞体内部のカルシウムイオン濃度の変化を検出できません。ミトコンドリアおよび小胞体用のカルシウムセンサーを作るには、センサーのカルシウムイオンとの親和性を大幅に減少させ、検出する濃度域を調節する必要がありました。そこで、遺伝子工学によりカルシウムセンサーにアミノ酸変異（注4）を導入することで、高濃度におけるカルシウムイオン濃度の変化を検出可能な変異型カルシウムセンサーを作製しました（図2）。こうして得られた変異型センサーに、ミトコンドリア・小胞体局在配列（注5）を付加することで、ミトコンドリア用CEPIAおよび小胞体用CEPIAを作製しました。

培養細胞に特定の刺激を与えると、細胞質中の局所で生じたカルシウムシグナルが波状に広がり細胞全体へと伝播する、カルシウムウェーブと呼ばれる現象が起こります。小胞体用CEPIAを用いることで、このときの小胞体カルシウムイオン濃度の様子を、小胞体の網目様構造が見えるほどの高い解像度で観察することに成功しました。その結果、小胞体の局所で生じたカルシウムイオン放出が波状に広がり、細胞全体に伝播する様子を鮮明に捉えることができました（図3；蛍光強度の低下がカルシウム放出を示す）。これにより、細胞質のカルシウムウェーブを裏打ちするように、小胞体からカルシウムイオンが放出されることが初めて直接的に明らかになりました。

次に、緑色蛍光型小胞体用CEPIAを、赤色蛍光型ミトコンドリアカルシウムセンサーおよび紫外光型細胞質カルシウムセンサーと組み合わせることで、小胞体、ミトコンドリア、細胞質のカルシウムイオン動態を1つの細胞で同時に観察することに成功しました。これにより、周囲の小胞体からカルシウムイオンが放出され、細胞質のカルシウムイオン濃度が上昇しているにもかかわらず、これを取り込むミトコンドリア領域と取り込まないミトコンドリア領域が同一細胞中に存在することが明らかとなりました（図4）。この結果は、ミトコンドリアがカルシウムイオンを取り込む機構が、ミトコンドリア領域ごとに異なる可能性を示唆する新しい知見です。

さらに、明るさや反応性の大きさなど、より高い性能のセンサーが要求される、生体内に近い条件下の神経細胞（注6）においても、CEPIAによって小胞体から放出されるカルシウムイ

オンを鮮明に捉えることができました。CEPIA は、細胞の種類や測定条件を問わず適用可能であることが期待できます。

【展望】

このように、研究グループはミトコンドリアと小胞体におけるカルシウムシグナルを、極めて時間的・空間的に高い解像度で可視化できる手法を開発しました（図5）。近年、研究が盛んなミトコンドリアのカルシウムイオン取り込み機構や、小胞体-ミトコンドリア間のカルシウムイオン輸送機構のさらなる解明に貢献し、ミトコンドリアや小胞体カルシウムシグナルが関わる病態の研究に新たな展開をもたらすことが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Nature Communications（2014年6月13日オンライン版）

論文タイトル：Imaging Intraorganellar Ca²⁺ at Subcellular Resolution Using CEPIA

著者：Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Kuniaki Ishii, Masamichi Ohkura, Yohei Okubo, Masamitsu Iino*

DOI 番号：10.1038/ncomms5153

アブストラクト URL：

<http://www.nature.com/ncomms/2014/140613/ncomms5153/abs/ncomms5153.html>

6. 問い合わせ先：

飯野 正光（いいの まさみつ）

東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学 教授

Tel: 03-5841-3414

Fax: 03-5841-3390

Email: iino@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

（注1）ミトコンドリア：細胞の種々の活動に必須なエネルギーを産生する細胞内小器官。

（注2）小胞体：タンパク質の合成・修飾・輸送を担う細胞内小器官。小胞体の内部にはカルシウムイオンが溜め込まれており、刺激に応じてカルシウムイオンを細胞質に放出し、細胞質カルシウムシグナルを形成する。

（注3）細胞質：細胞において、細胞膜で囲まれた空間のうち、細胞内小器官を除いた部分（図5参照）。

（注4）アミノ酸変異：タンパク質を構成するアミノ酸を別のアミノ酸で置き換えること。タンパク質は20種類のアミノ酸から構成されており、アミノ酸の配列情報はDNAに書き込まれている。このDNA情報を操作することで、アミノ酸を別のアミノ酸で置き換えることができ、タンパク質の性質を操作することができる。

（注5）局在配列：細胞内で合成されたタンパク質を細胞内の特定の場所に局在させることができる特徴的なアミノ酸配列。

（注6）生体内に近い条件下の神経細胞：ここでは、神経細胞の三次元構造および神経回路が生体内に近い状態に保たれる、マウス小脳の急性スライス標本を用い、プルキンエ細胞と呼ばれる神経細胞を可視化解析した。

8. 添付資料：

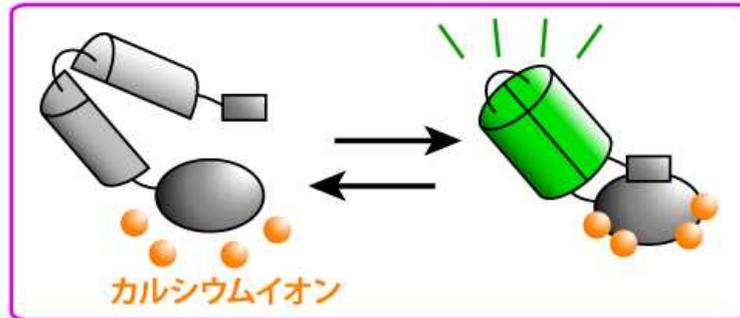


図1. 小胞体・ミトコンドリア内カルシウムセンサーCEPIAのイメージ図

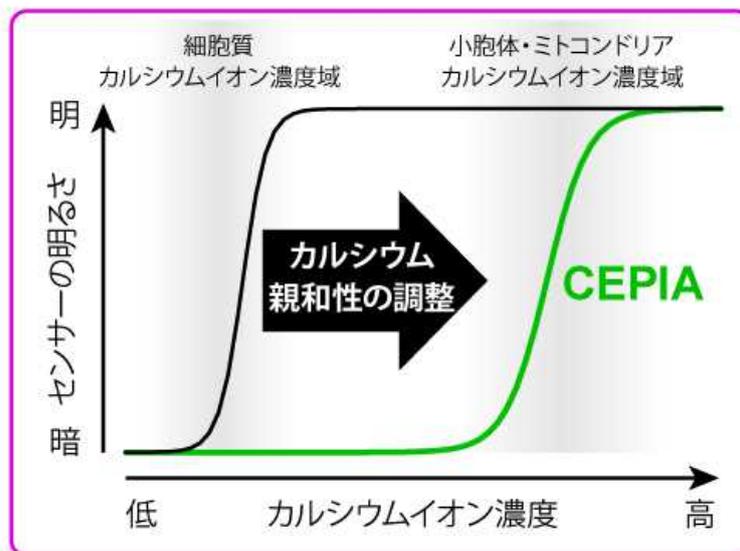


図2. センサーの明るさが変化するカルシウムイオン濃度域の模式図

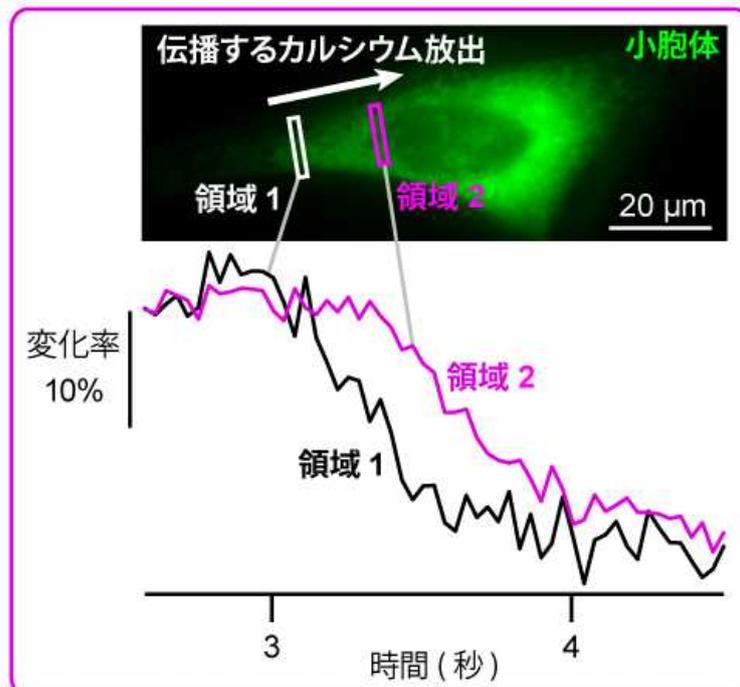


図3. 小胞体内を波状に広がるカルシウム放出

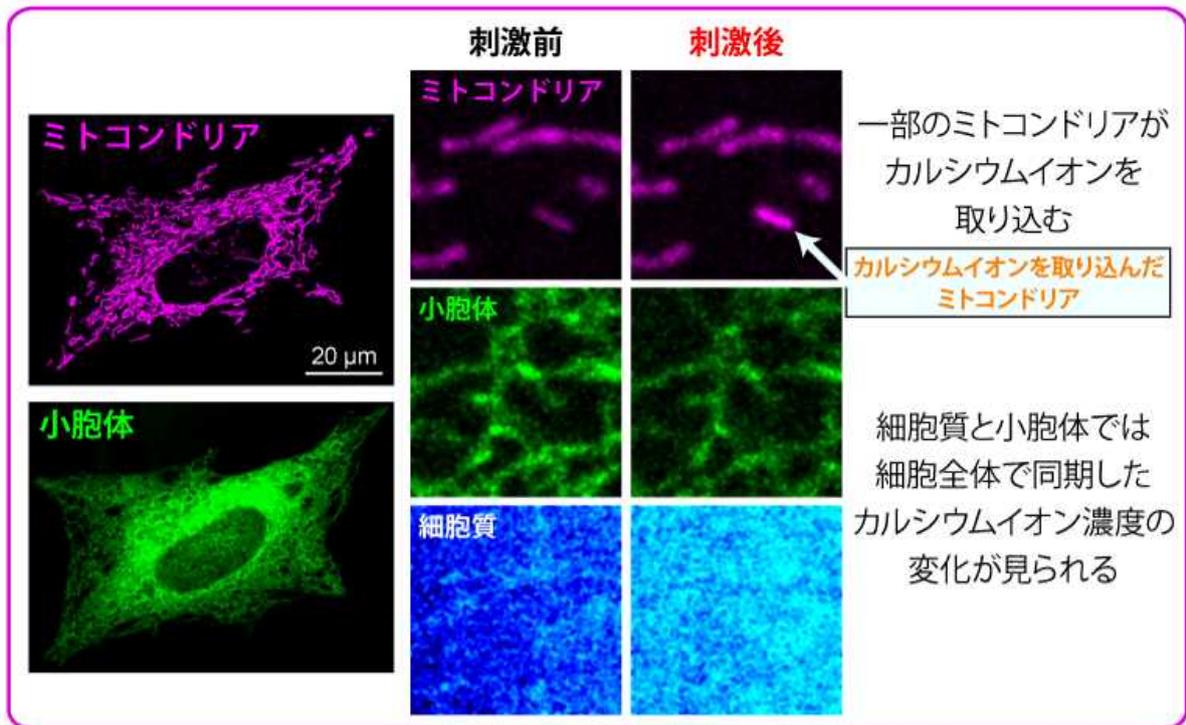


図4. 限局したミトコンドリア内カルシウムイオン濃度上昇が生じたときの周囲のミトコンドリア・小胞体カルシウムシグナル

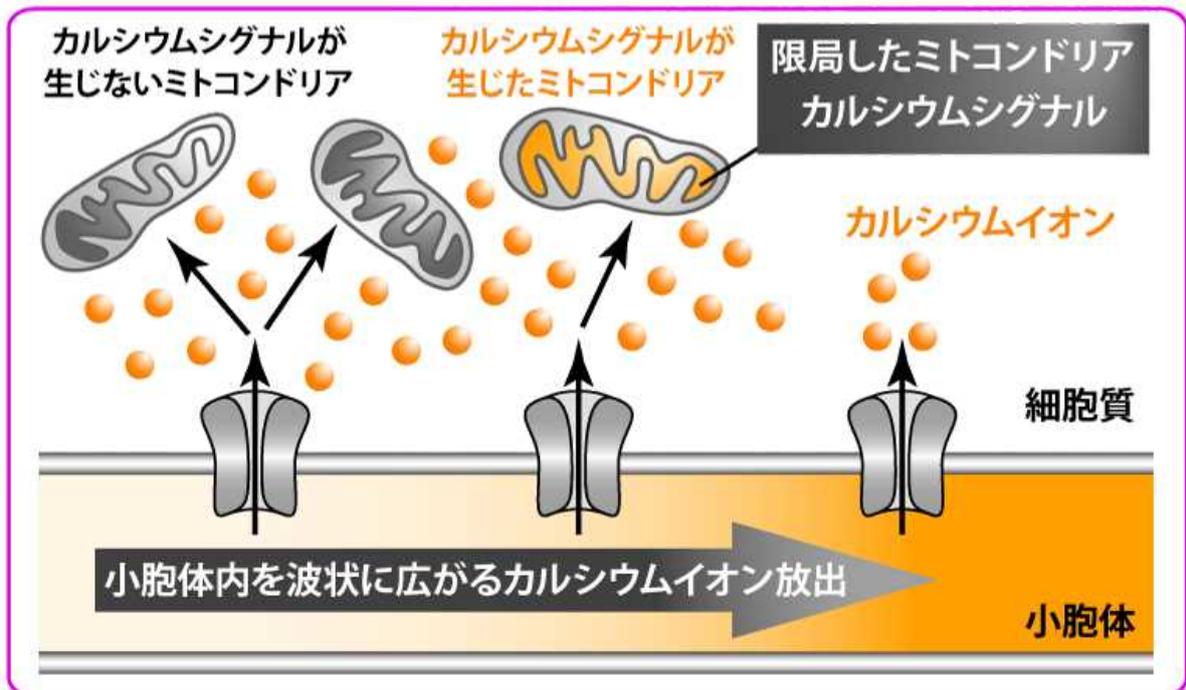


図5. 小胞体・ミトコンドリア内カルシウムシグナルの高時空間解像度イメージングの模式図