

細胞内シグナル伝達機構の 包括的理解を目指して

先進理工学専攻 白川英樹

平成23年9月29日

電気通信大学 人間福祉テクノロジー研究ステーション セミナー

白川（英）研究室の研究テーマ

細胞生理学的アプローチ
cell physiology

数理モデルの構築
mathematical biology

細胞内シグナル伝達機構の
包括的理解
～カルシウムイオンを中心に～

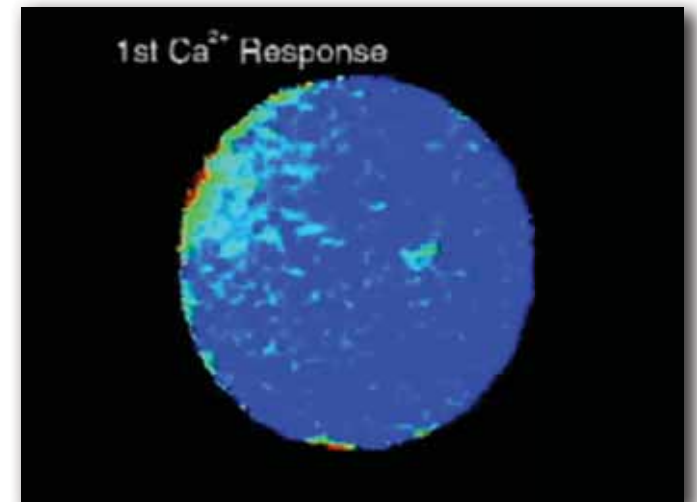
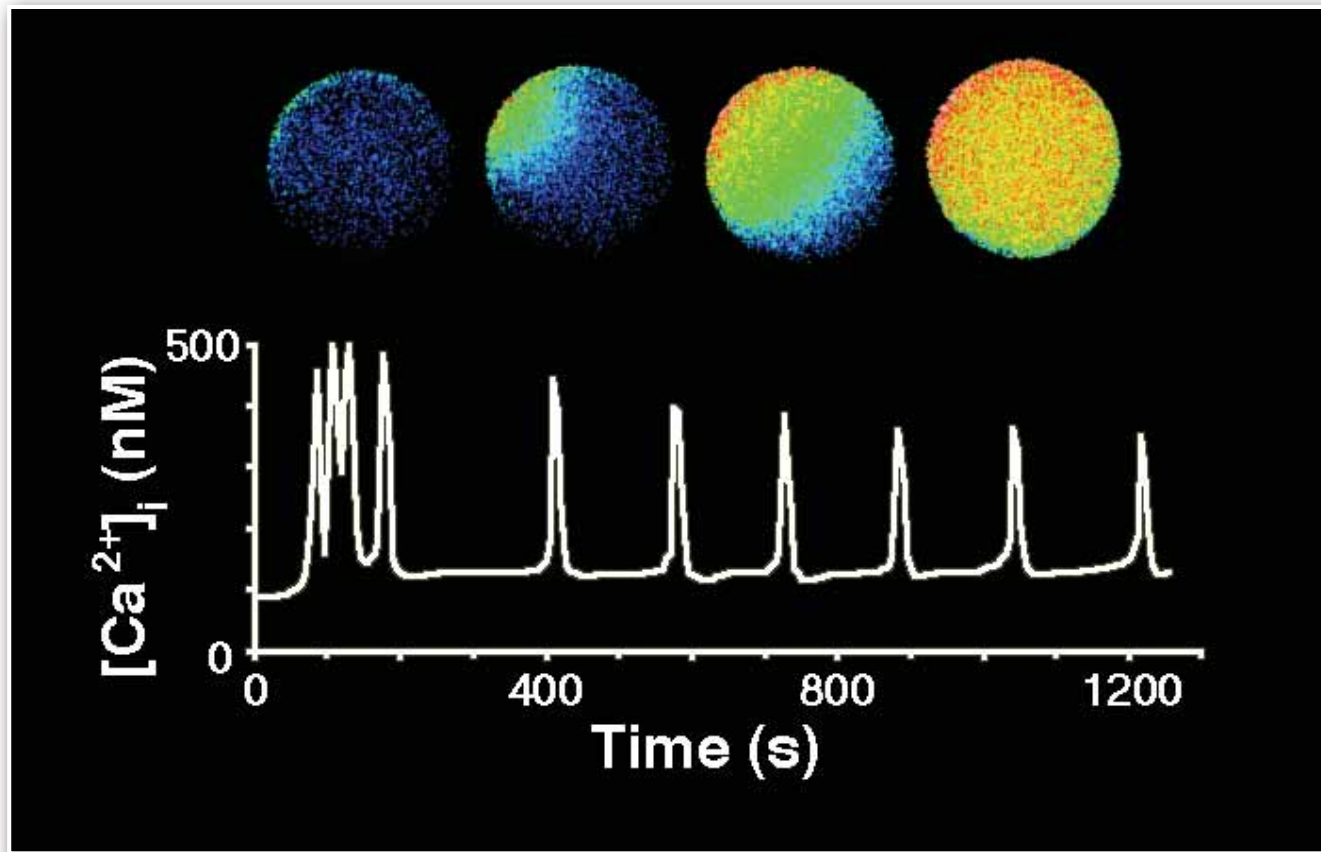
分子生物学的アプローチ
molecular biology

新規イメージング手法の開発
bio-imaging

発表の概要

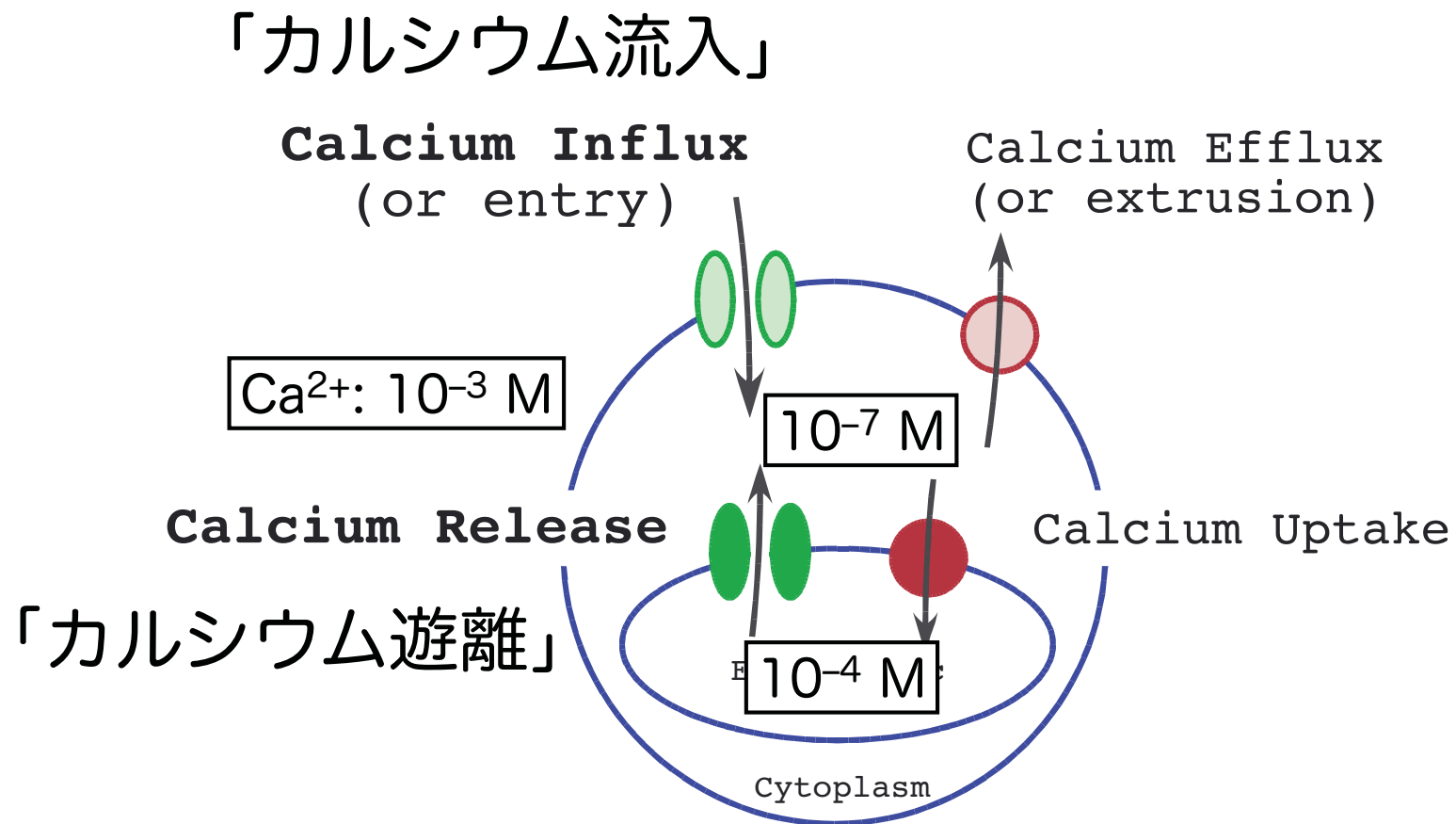
1. 卵細胞内Ca²⁺動態とその制御機構に関する研究
2. 新規蛍光イメージング手法の開発
 - a. 新規蛍光プローブの開発
 - b. 多蛍光成分同時解析システムの開発
3. 現有実験装置の紹介

哺乳類卵受精の細胞内Ca²⁺濃度の変化

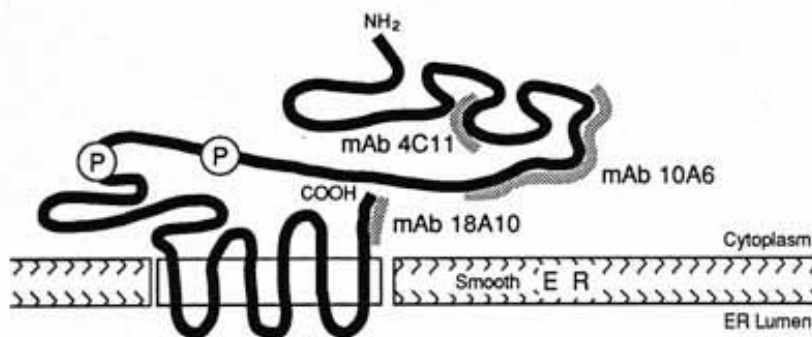


ハムスター卵受精時のカルシウム波（上）とカルシウム振動（下）
（蛍光性Ca²⁺プローブfura-2を用いた記録）

細胞内Ca²⁺濃度の制御機構

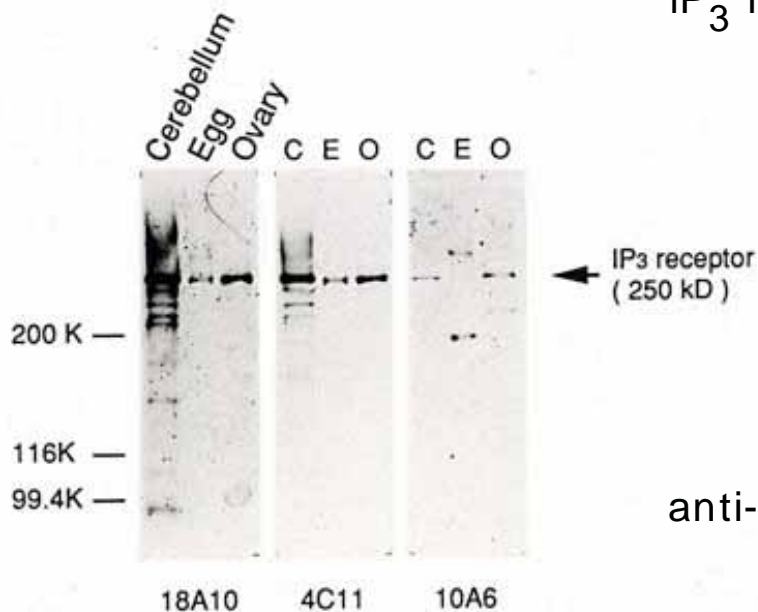


Ca²⁺遊離の経路：IP₃受容体Ca²⁺チャネル



IP₃ : イノシトール1,4,5三リン酸

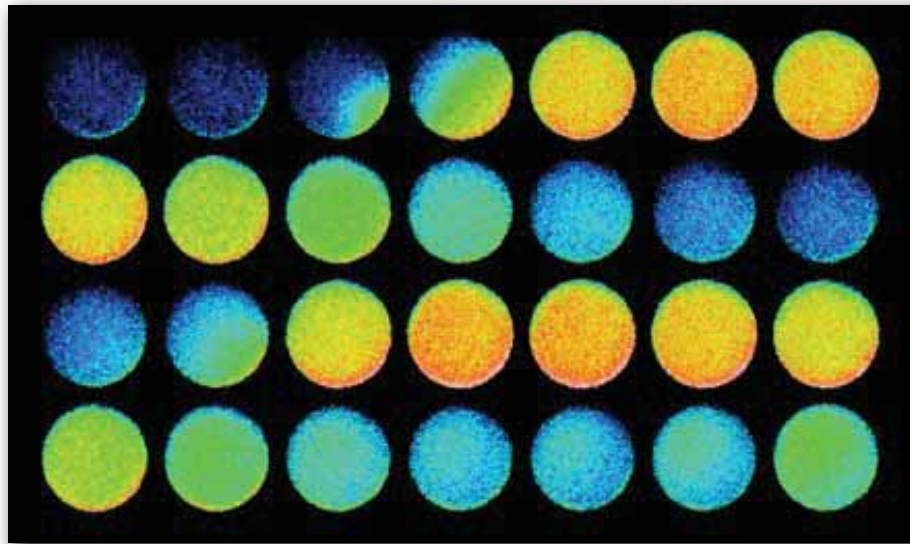
IP₃ receptor/Ca²⁺ channelの構造



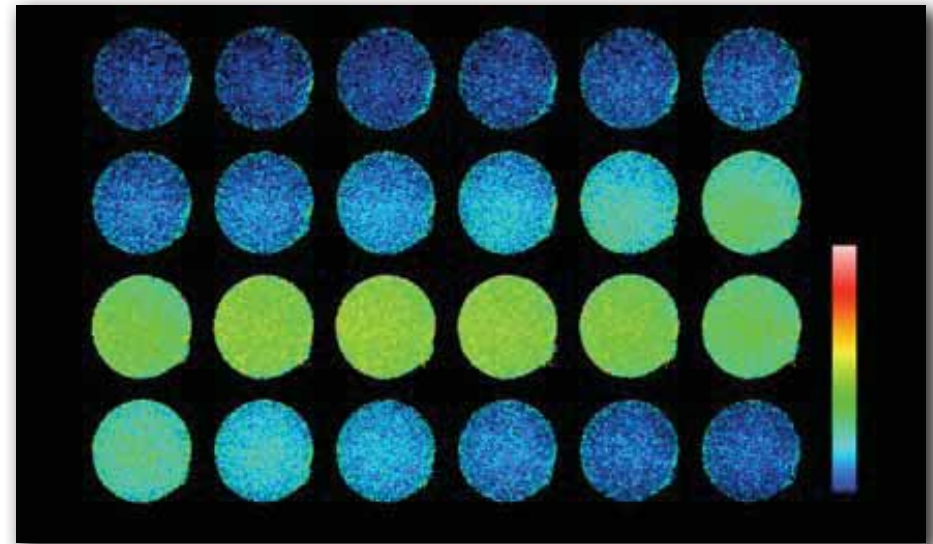
anti-IP₃R mAbによるWestern blot

IP₃受容体 / カルシウム遊離チャネル

IP₃受容体を阻害するとCa²⁺波が抑制される

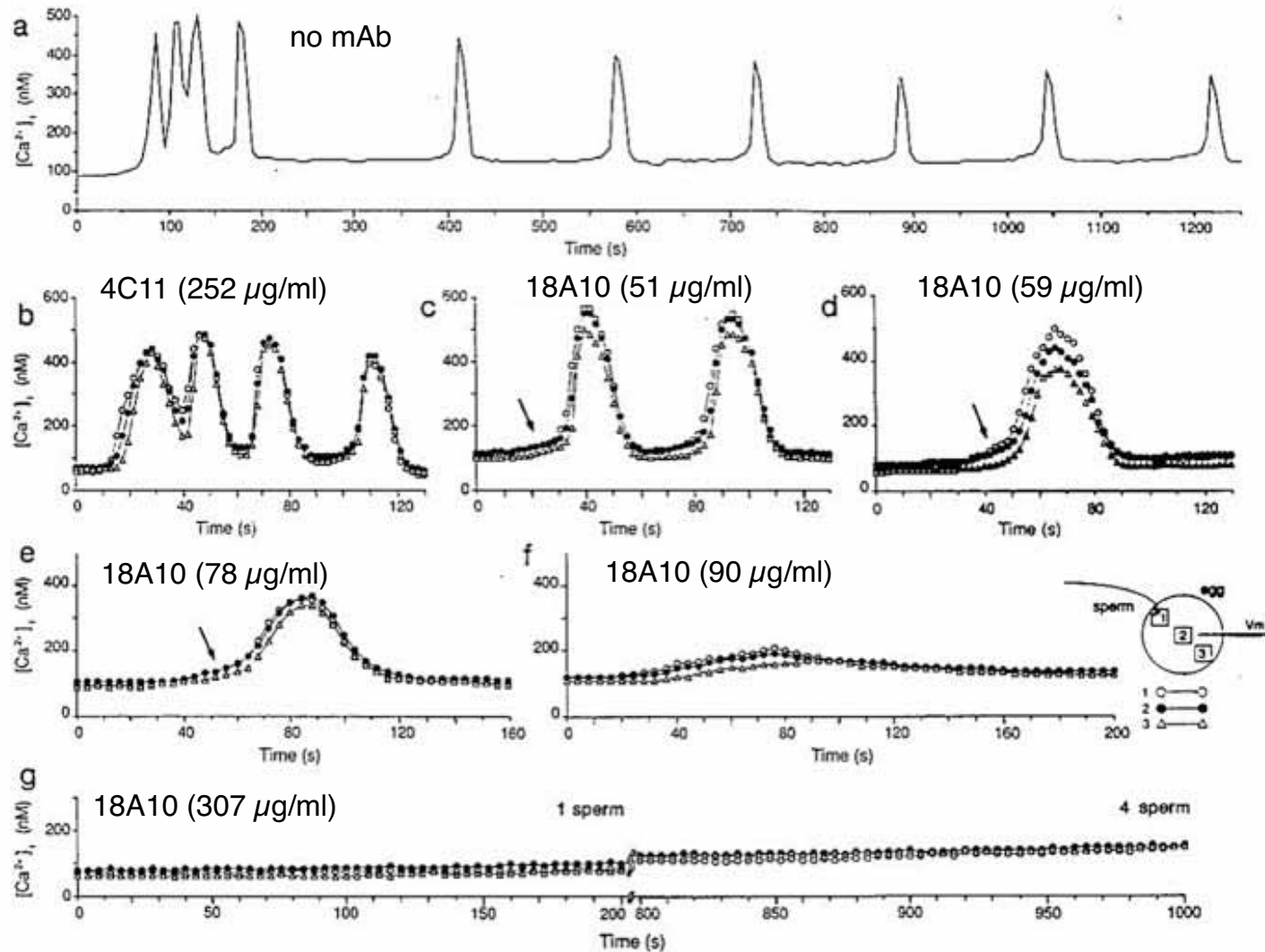


ハムスター卵受精時の
Ca²⁺ wave (control)



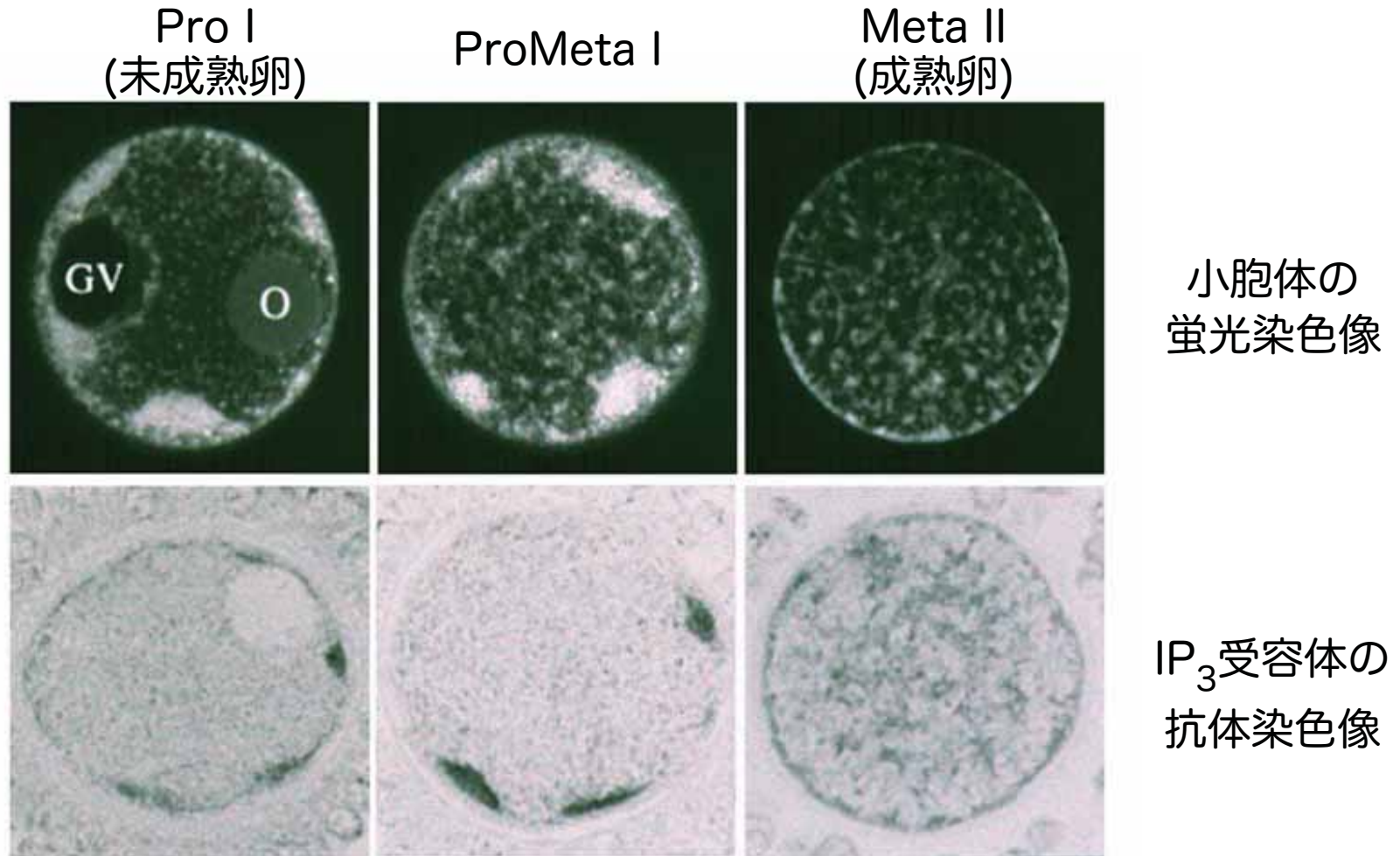
抗IP₃R mAB (18A10)による
Ca²⁺ waveの抑制

IP₃受容体を阻害するとCa²⁺振動が抑制される



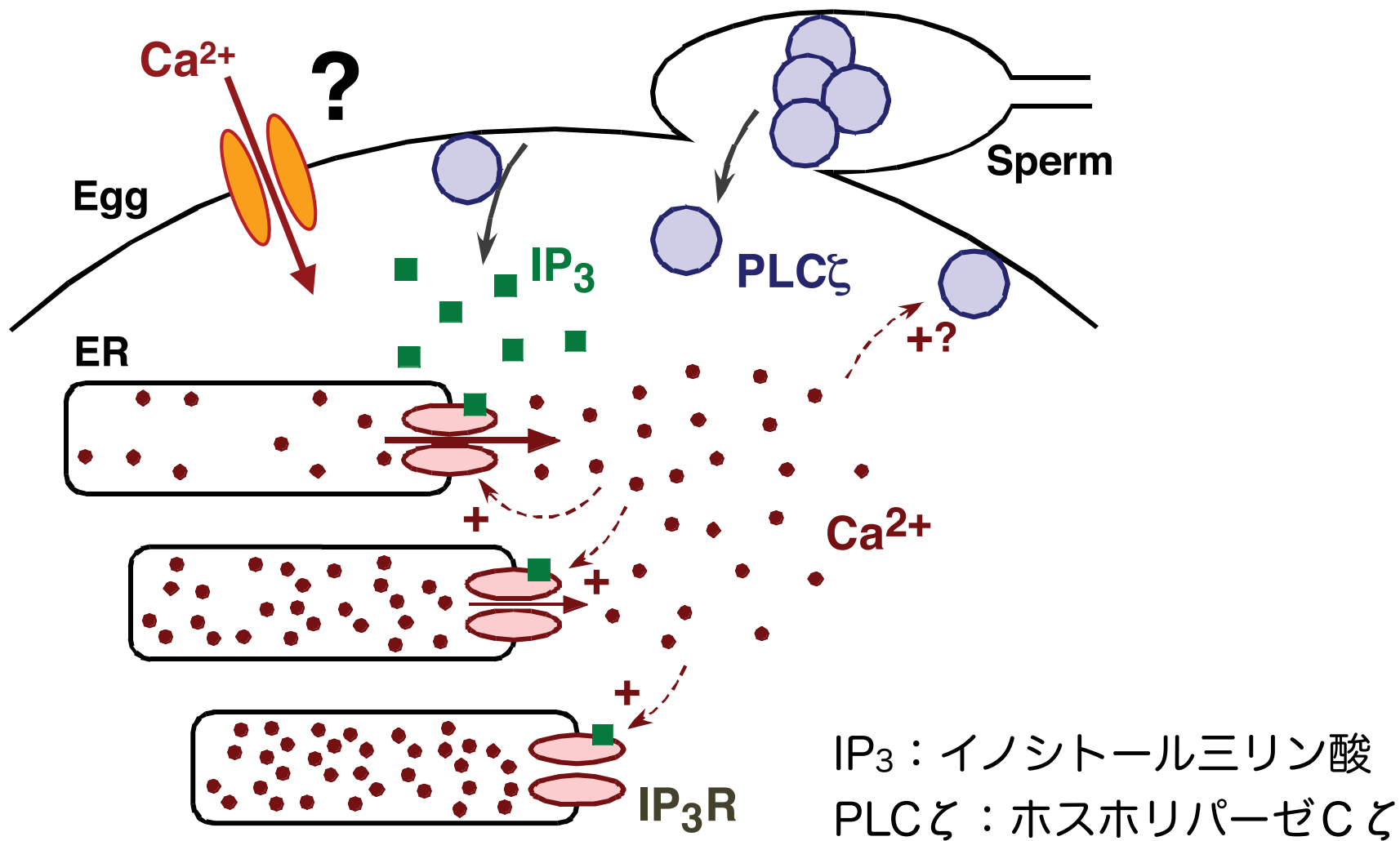
受精時のカルシウム反応にはIP₃受容体を介したカルシウム遊離が必須

細胞内Ca²⁺ストア（小胞体）の分布



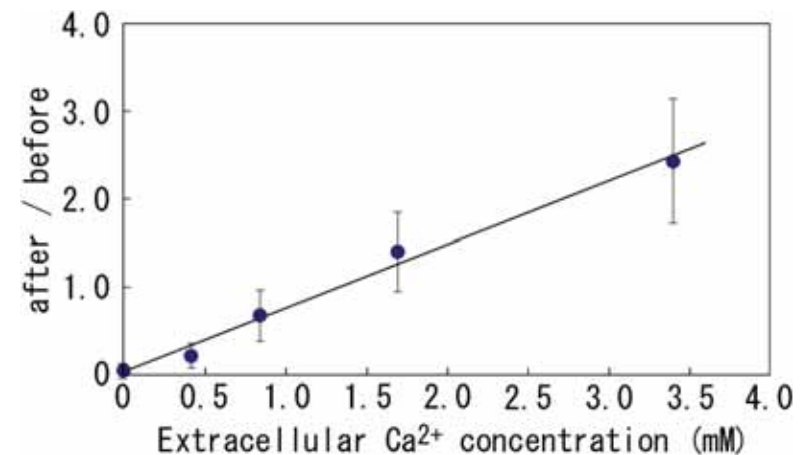
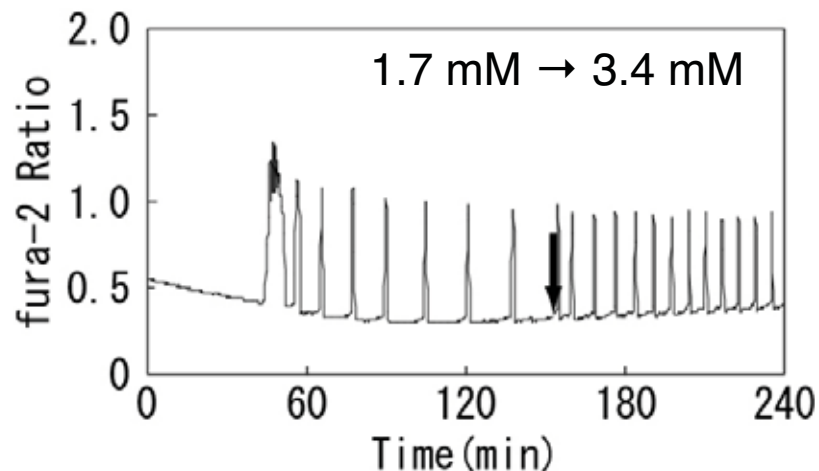
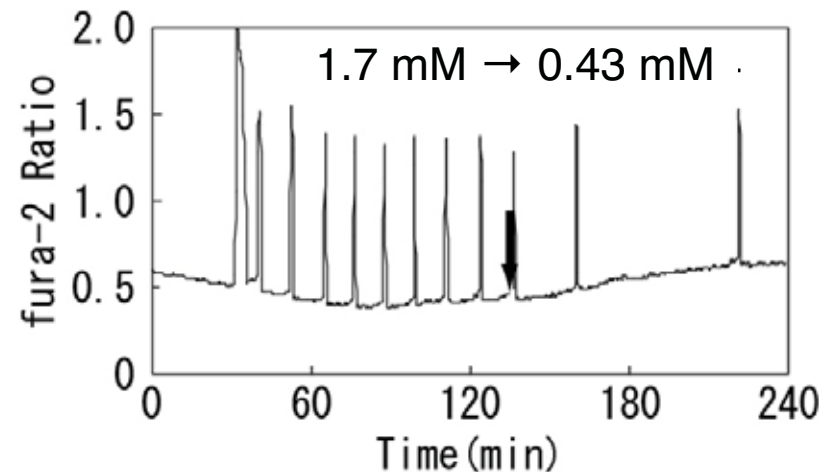
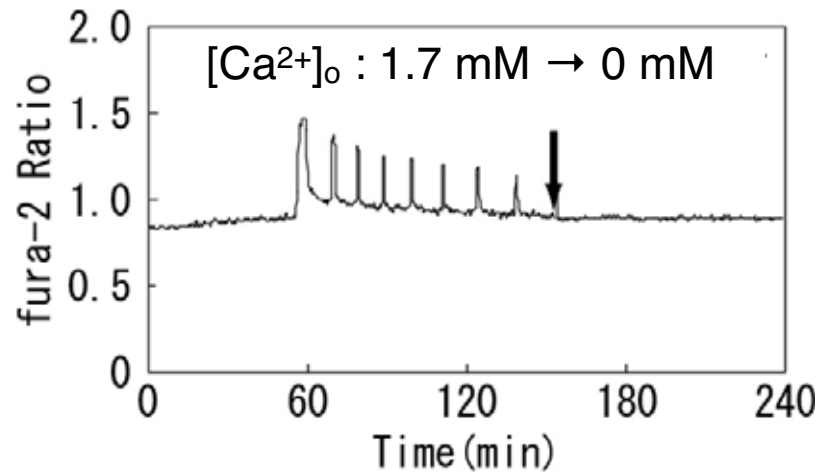
卵成熟に伴う小胞体（=細胞内カルシウムストア）の構造変化

哺乳類受精卵のCa²⁺反応誘発機構



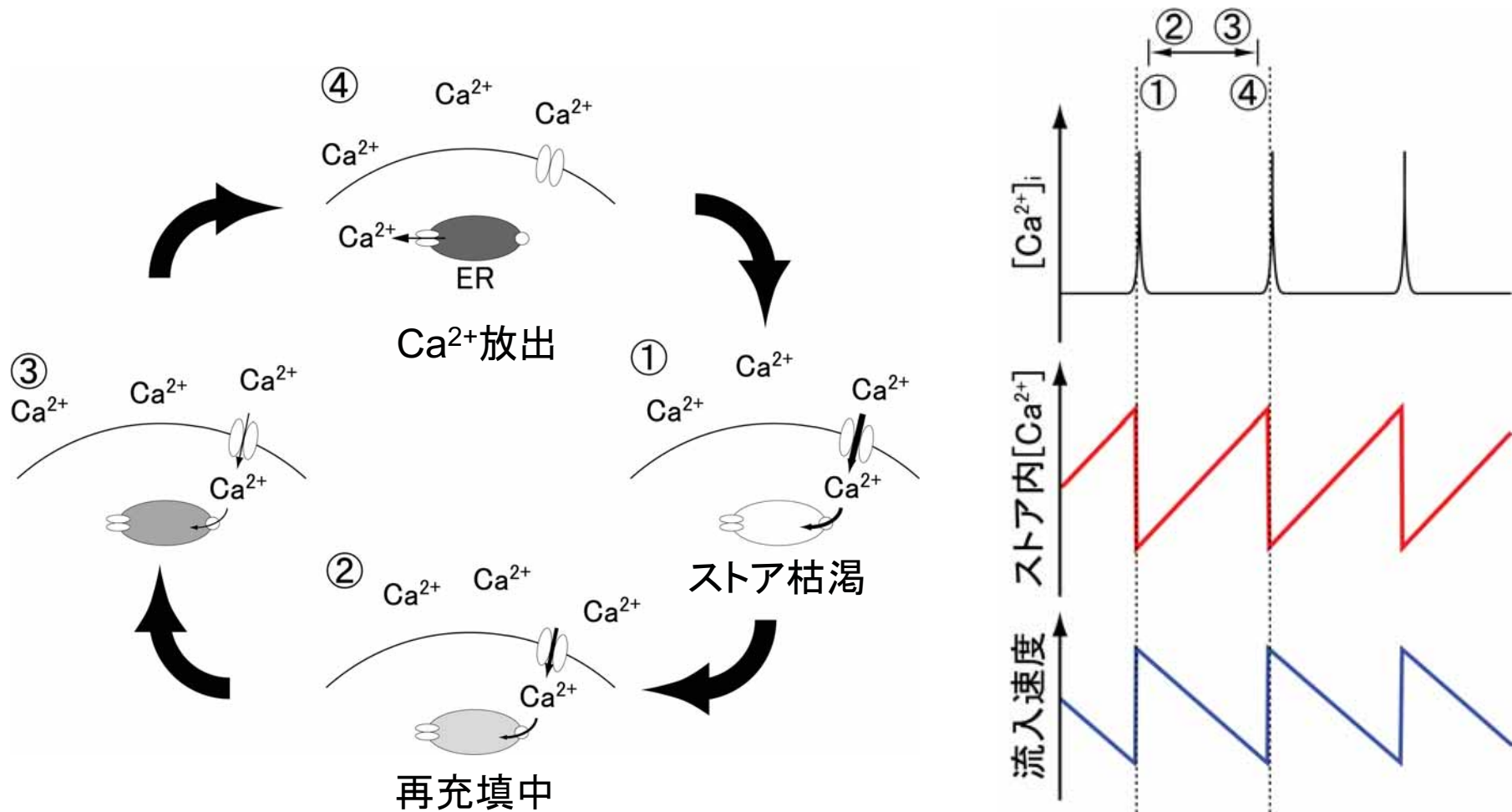
哺乳類受精卵でのCa²⁺反応誘発メカニズムの作業仮説

Ca²⁺振動のCa²⁺流入に対する依存性



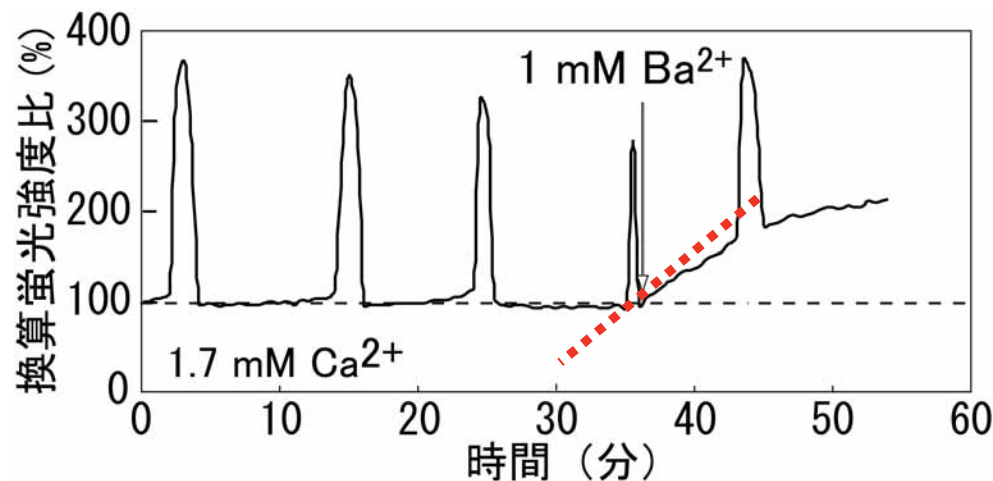
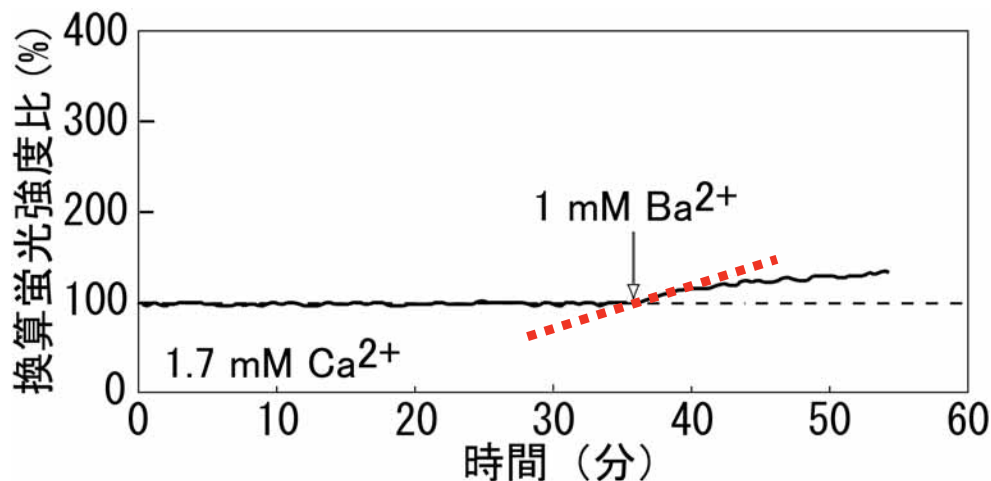
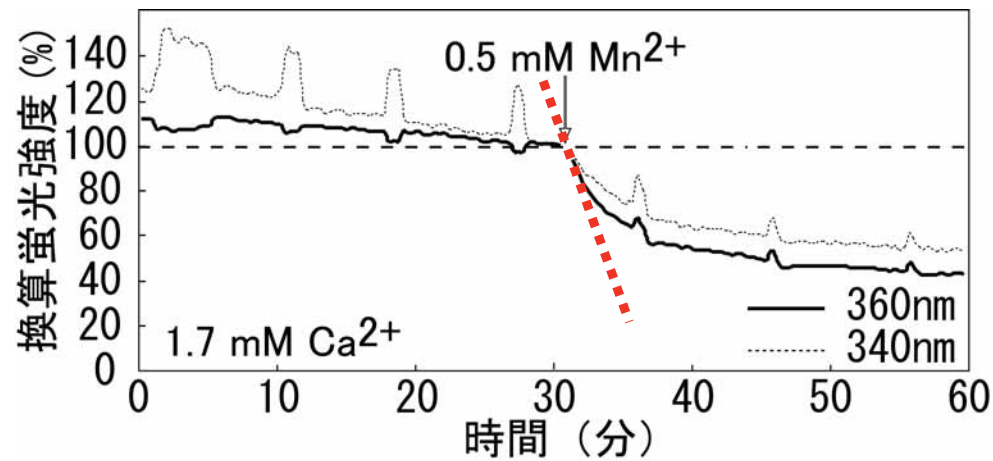
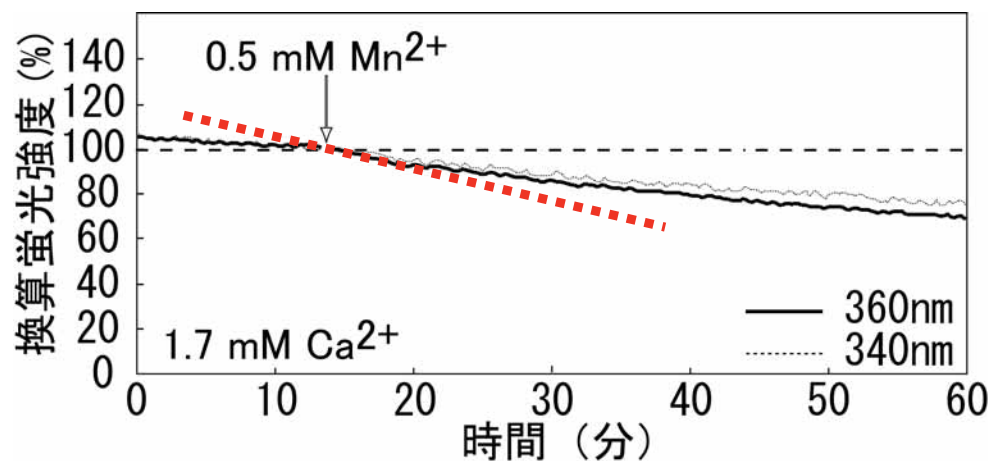
Ca²⁺振動の頻度は外液のCa²⁺濃度に依存するが、振幅は変化しない。

Ca²⁺振動中のCa²⁺流入



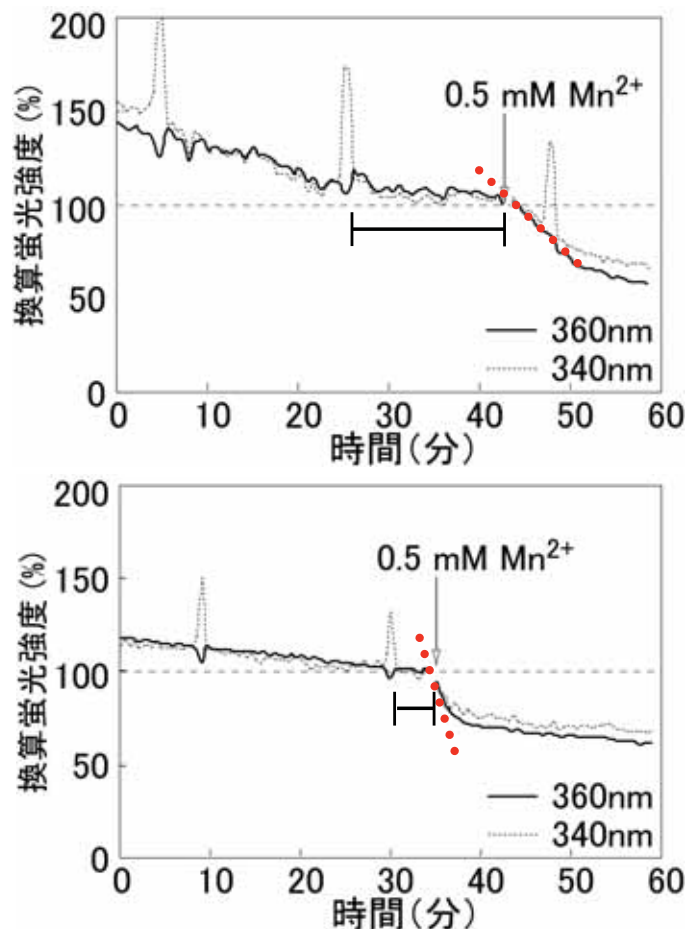
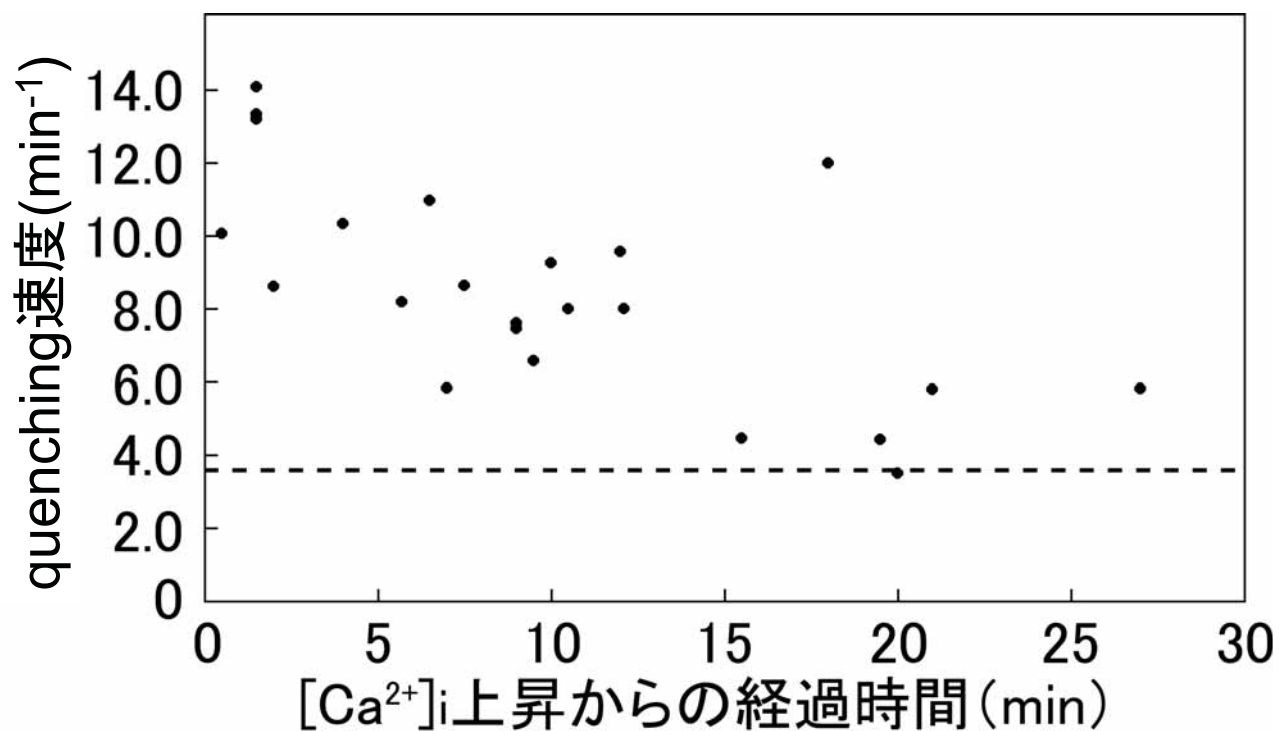
Ca²⁺振動中のCa²⁺流入についての作業仮説
(ストア作動性Ca²⁺流入機構に基づく)

マウス受精卵のCa²⁺振動中の二価イオン流入



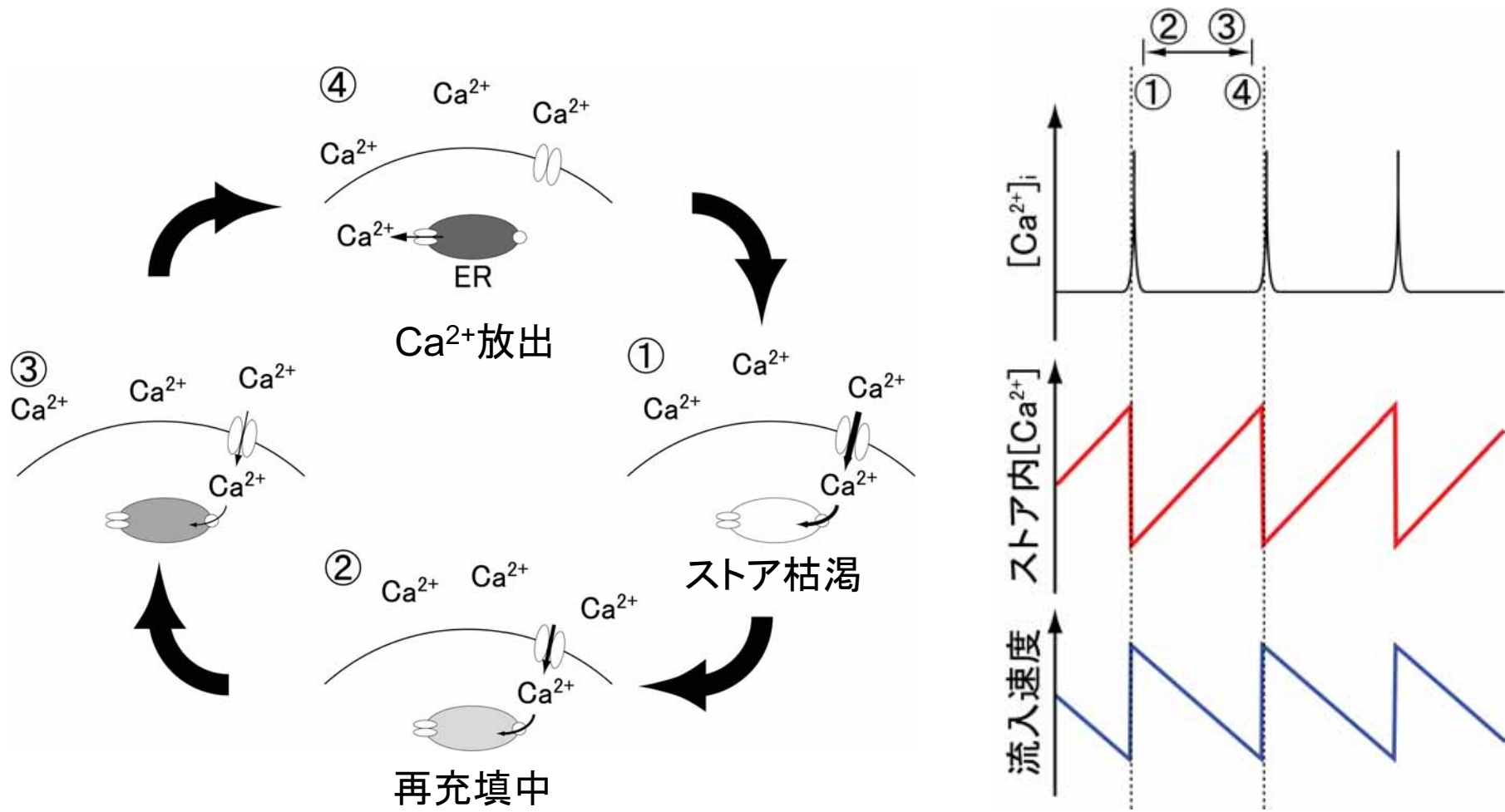
Ca²⁺振動中にはMn²⁺やBa²⁺の流入速度が増加している
(おそらくCa²⁺流入も増加している)

マウス受精卵のCa²⁺振動中の二価イオン流入



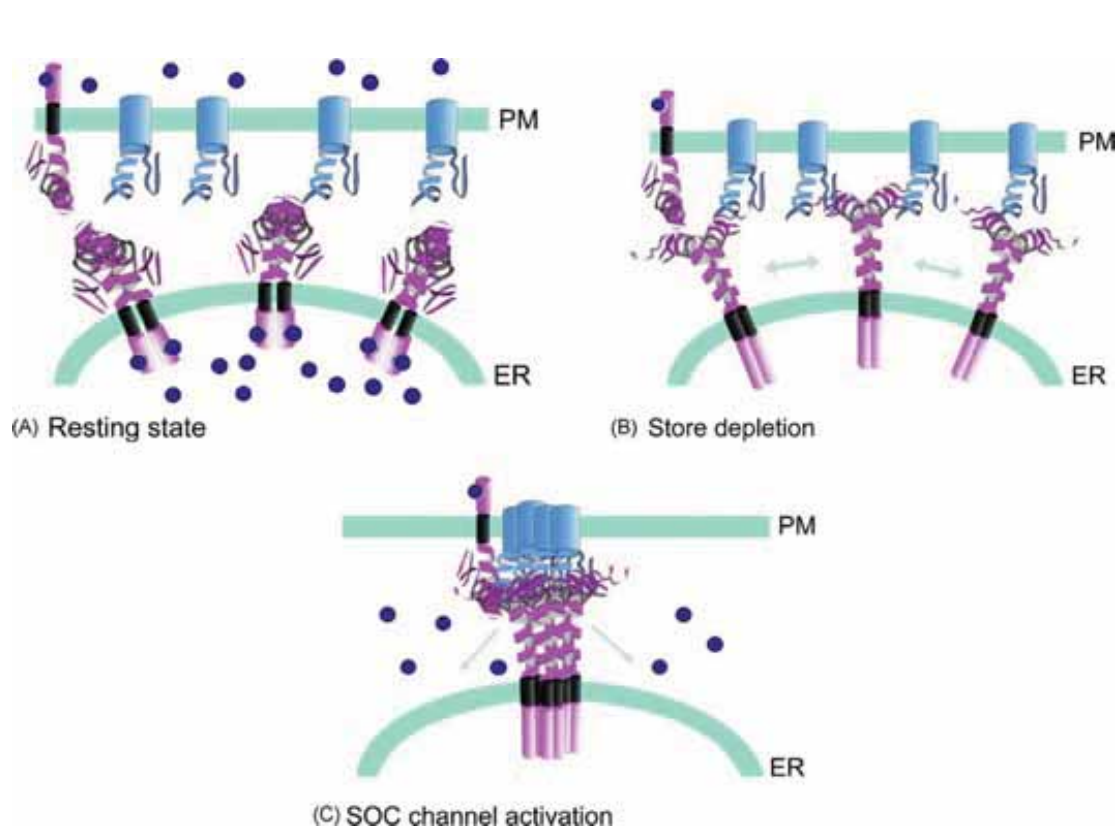
Ca²⁺遊離直後に流入が活性化され、次第に元のレベルにもどる
(Ca²⁺オシレーションと同期してCa²⁺流入もオシレーションしている)

Ca²⁺振動中のCa²⁺流入

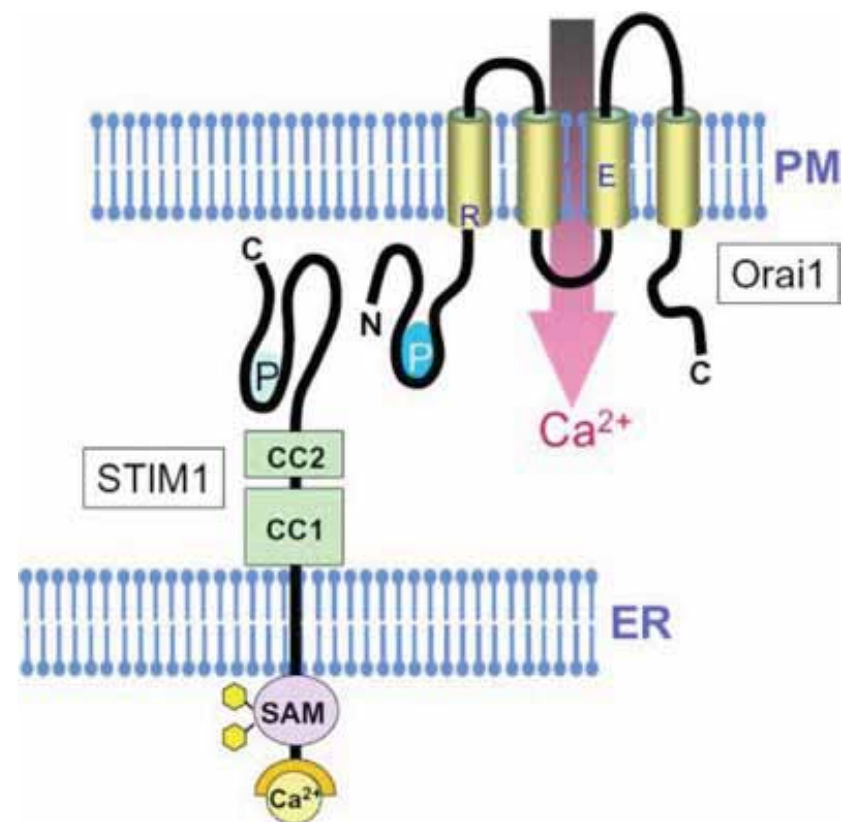


Ca²⁺振動中のCa²⁺流入についての作業仮説
(ストア作動性Ca²⁺流入機構に基づく)

ストア作動性Ca²⁺流入の分子機構



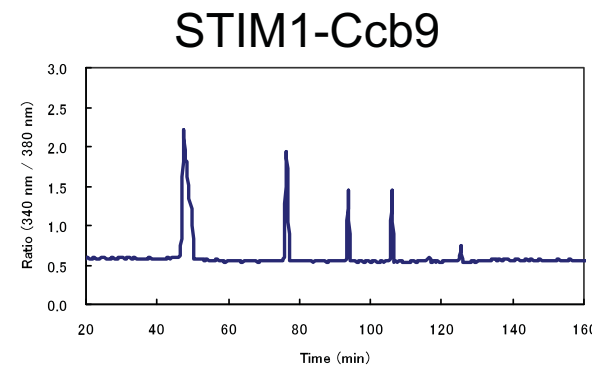
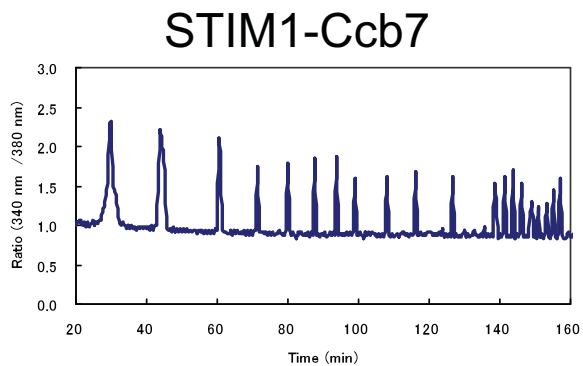
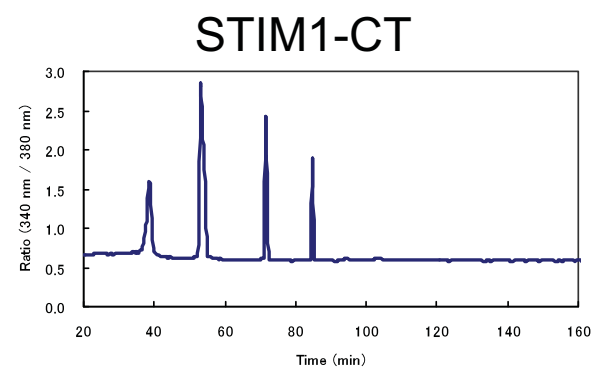
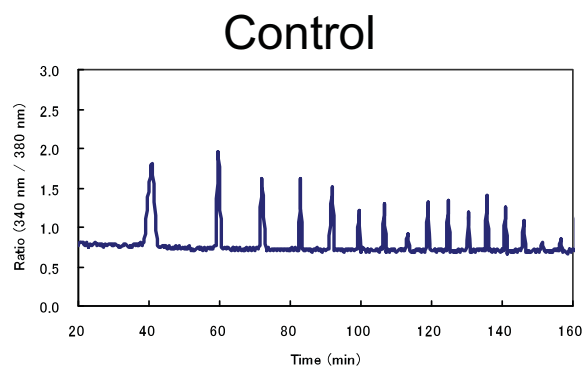
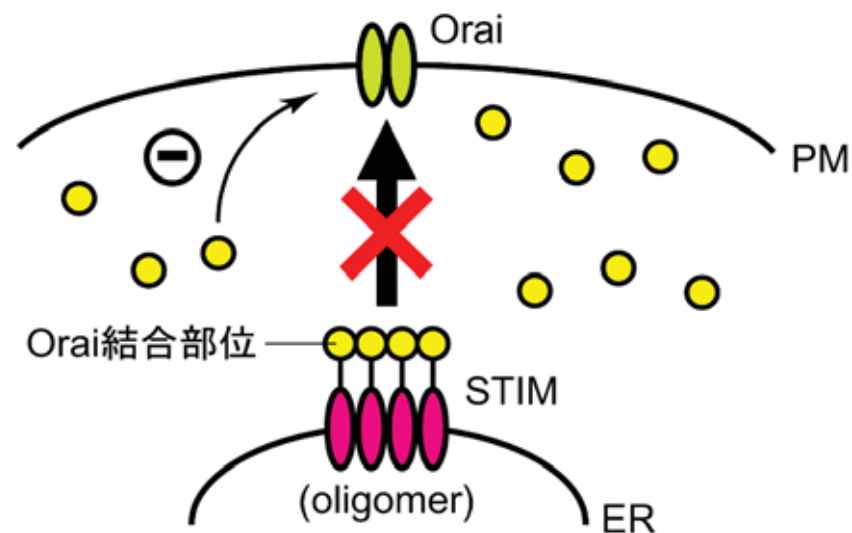
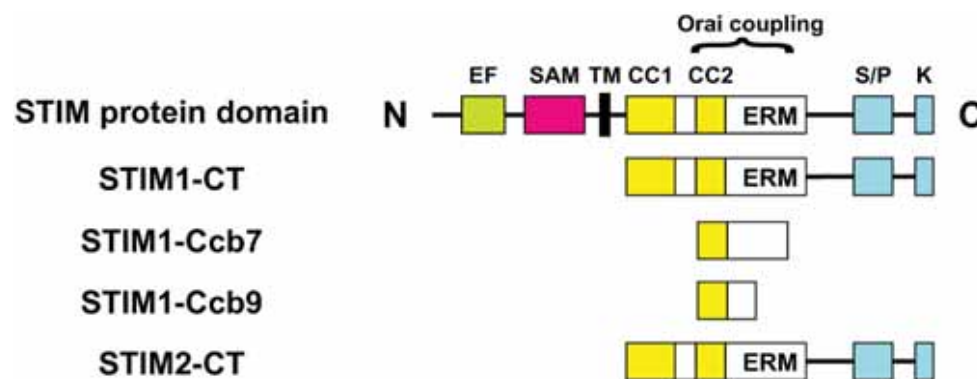
Soboloff et al., J Biol Chem (2006) より



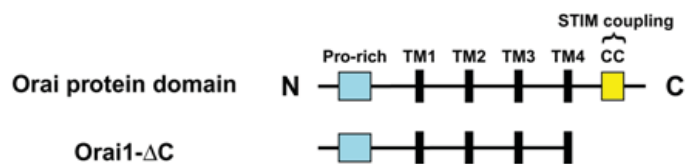
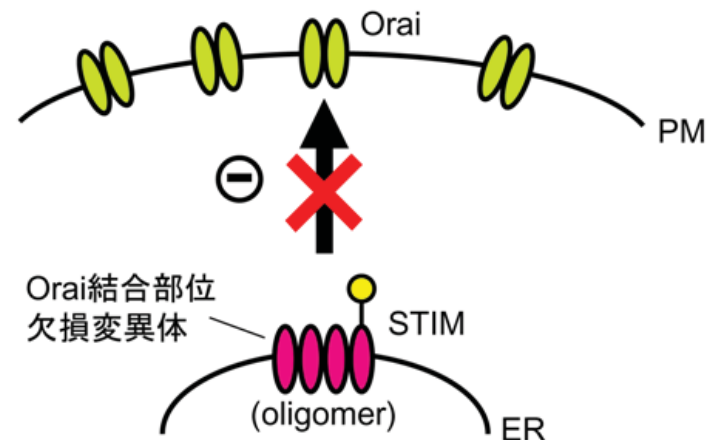
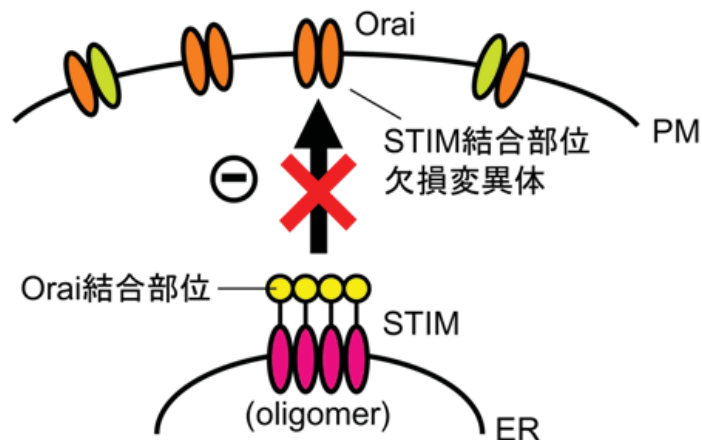
Dziadek et al., Cell Calcium (2007) より

ストア（小胞体）内のCa²⁺濃度のセンサー：STIMタンパク質
STIMによって活性化されるCa²⁺流入チャネル：Oraiタンパク質

Ca²⁺振動時のSTIM/Oraiの関与の検証



Ca²⁺振動時のSTIM/Oraiの関与の検証

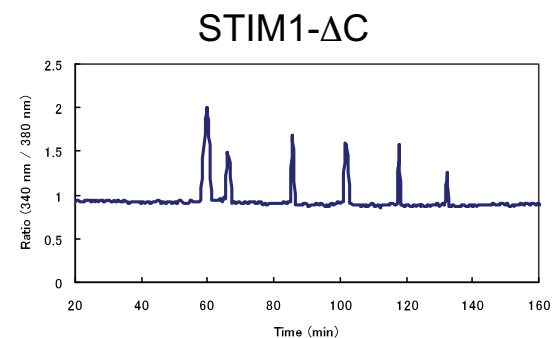
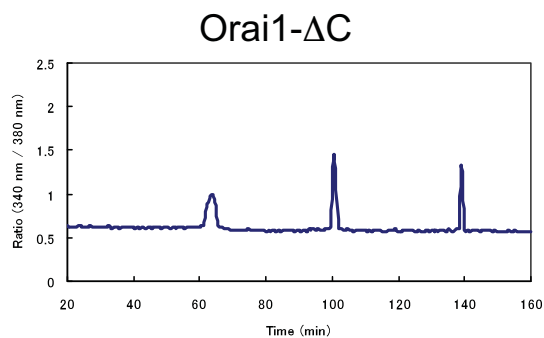
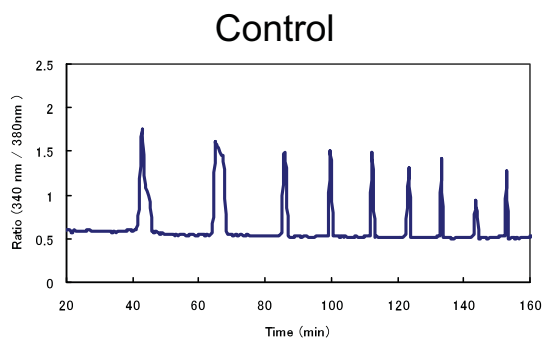


Orai1-ΔC

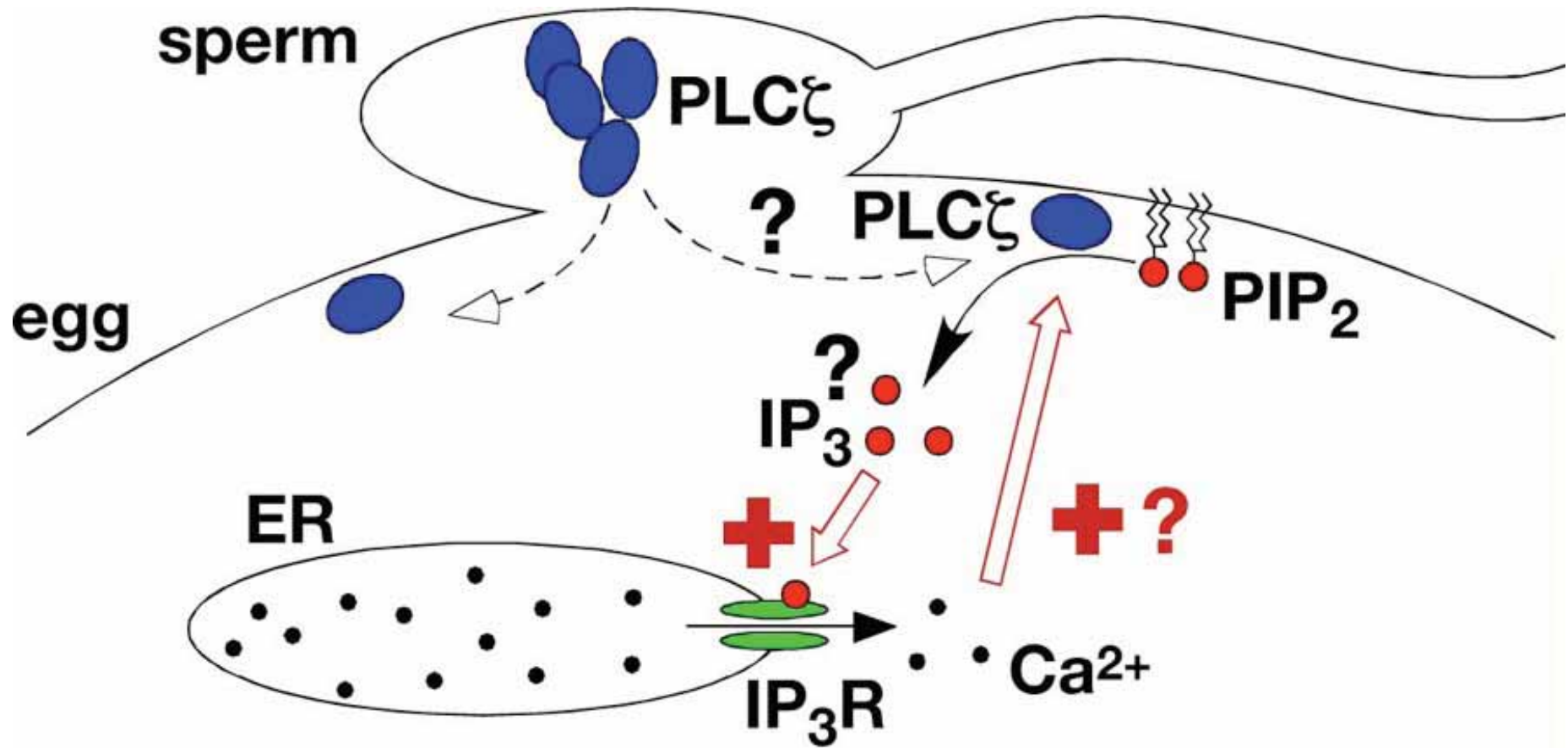


STIM1-ΔC

STIM2-ΔC

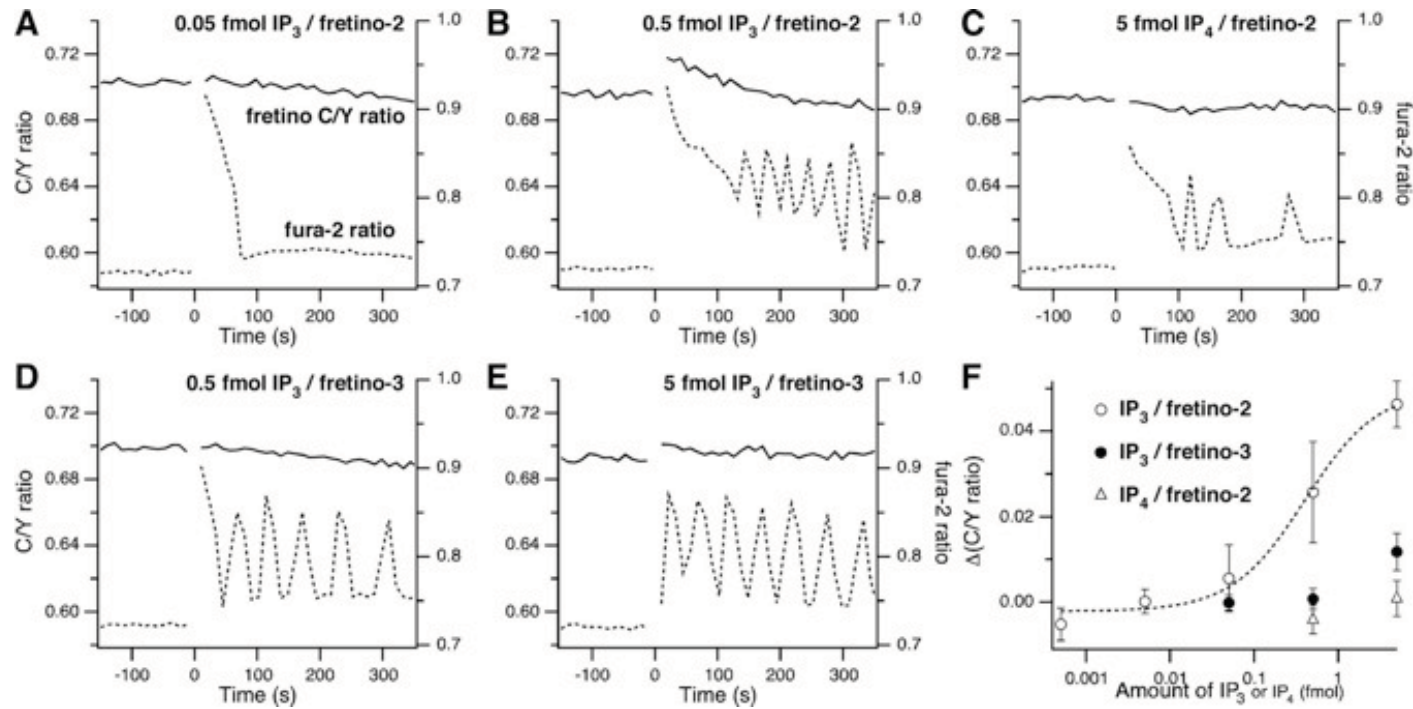
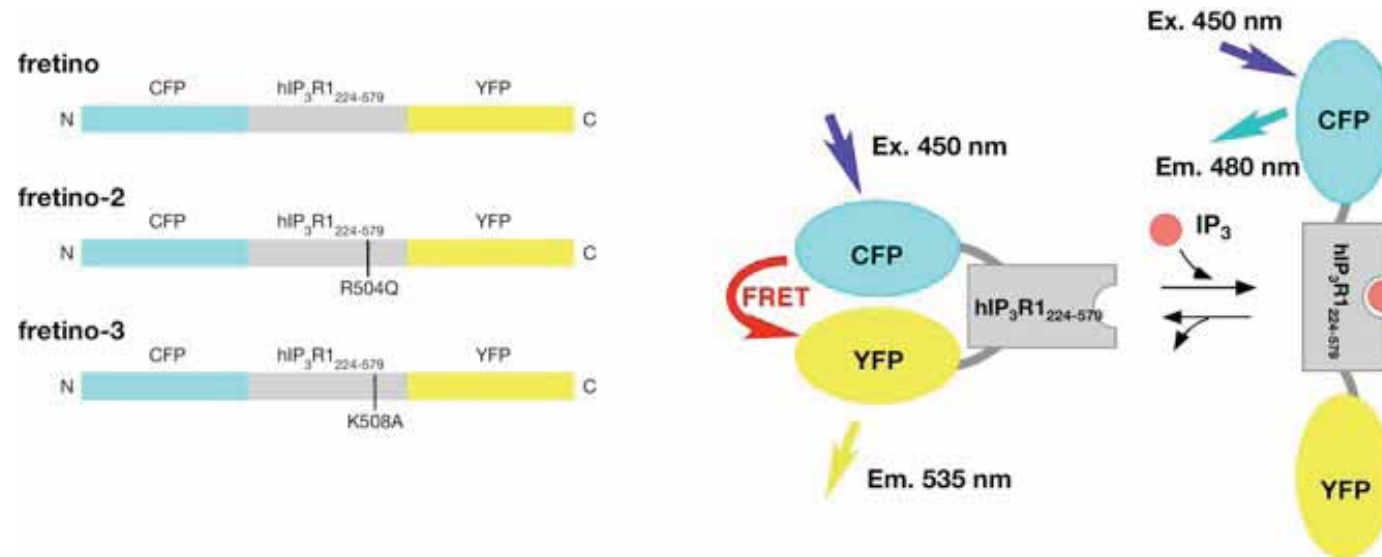


受精時にIP₃濃度は本当に増えているのか？



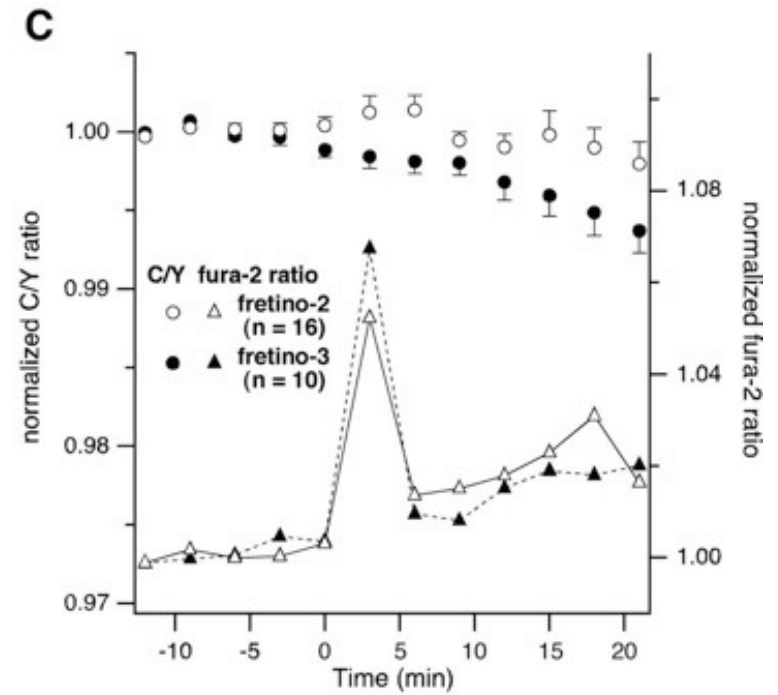
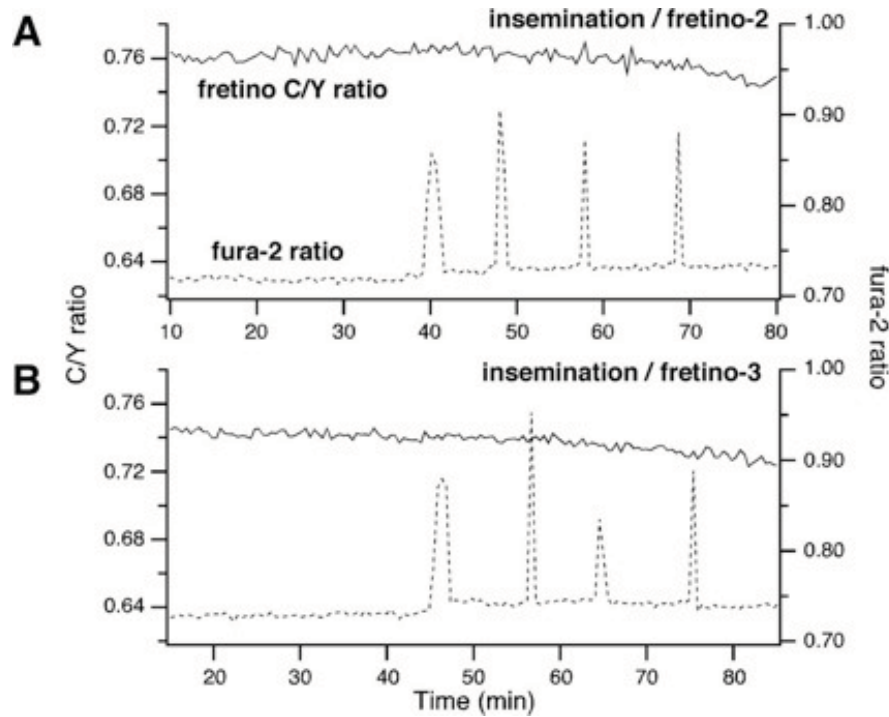
哺乳類受精卵でのCa²⁺反応誘発メカニズムの作業仮説

FRET型IP₃プローブ：fretino

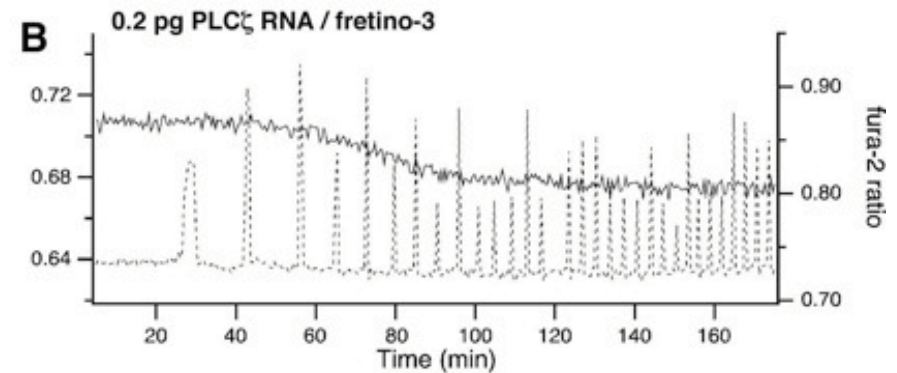
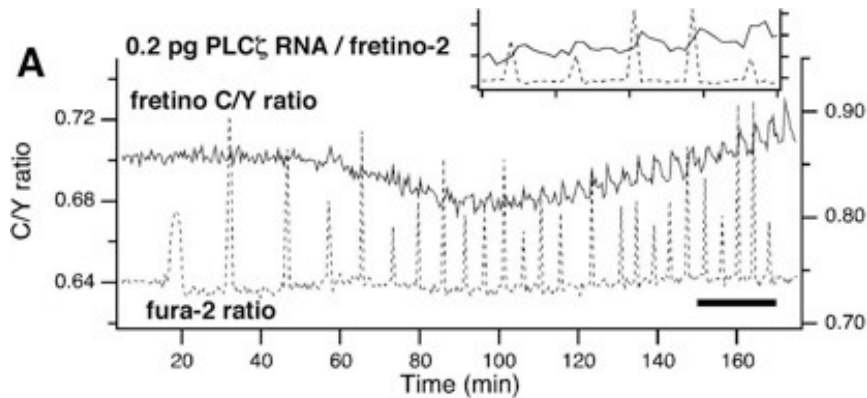


fretinoを用いたマウス卵内IP₃の測定

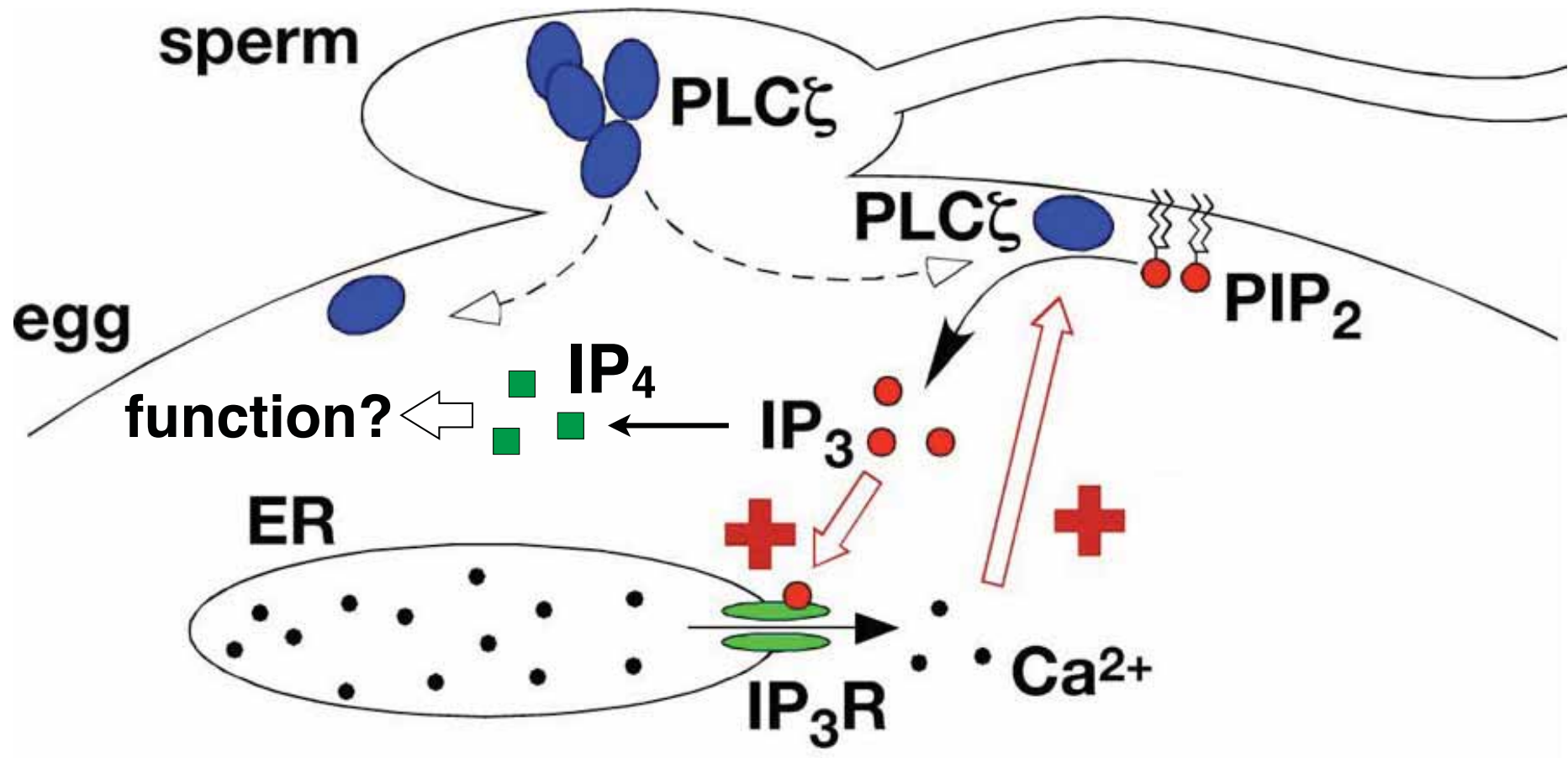
受精卵



PLC ζ 発現卵

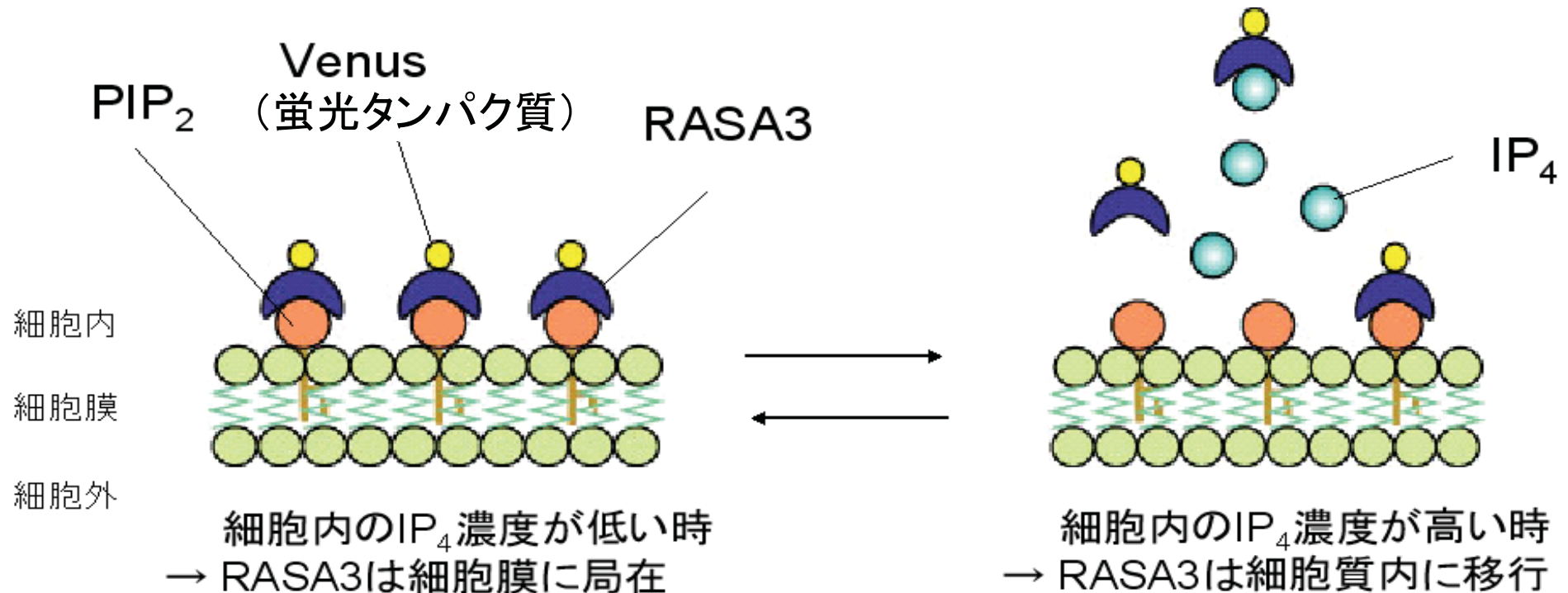


他のイノシトールリン酸は？



哺乳類受精卵でのCa²⁺反応誘発メカニズム

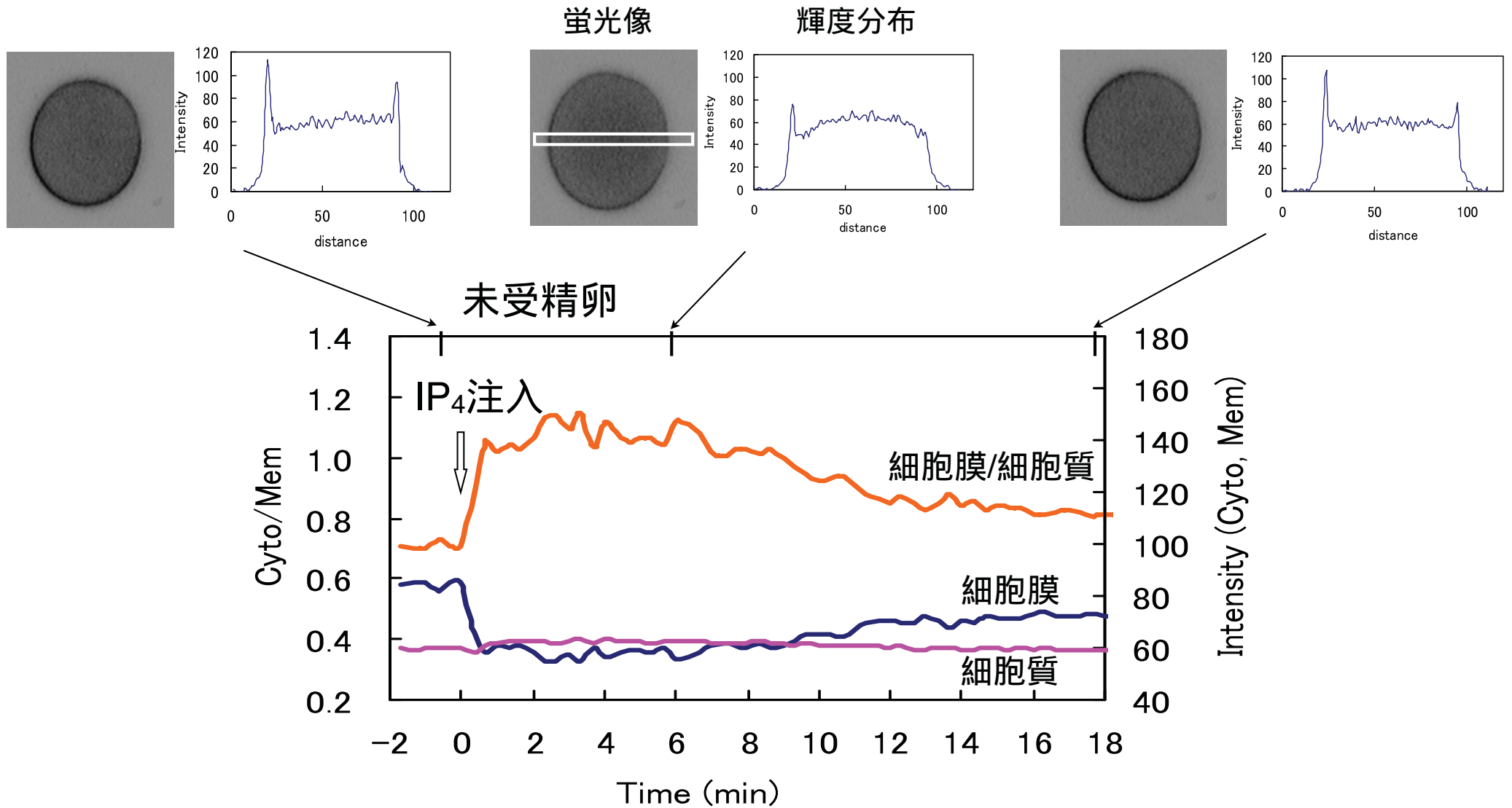
IP₄結合タンパク質RASA3を用いたIP₄プローブ



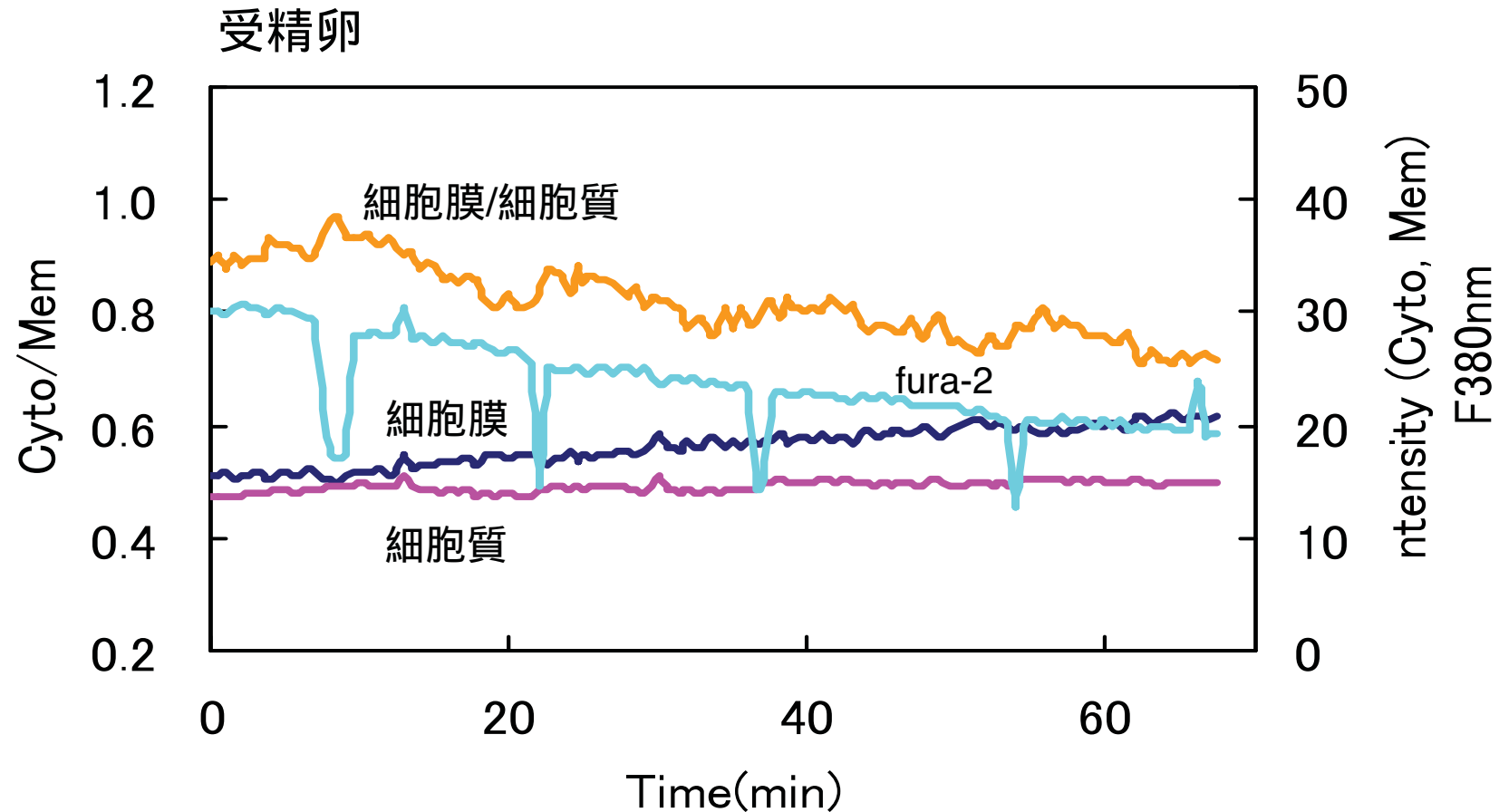
RASA3はIP₄と膜脂質成分PIP₂に競合的に結合する

↓
細胞内IP₄濃度の変化に応じて、RASA3の細胞内局在（細胞膜⇔細胞質）が変化するはず

IP₄注入に伴うV-RASA3 ΔC2の局在変化



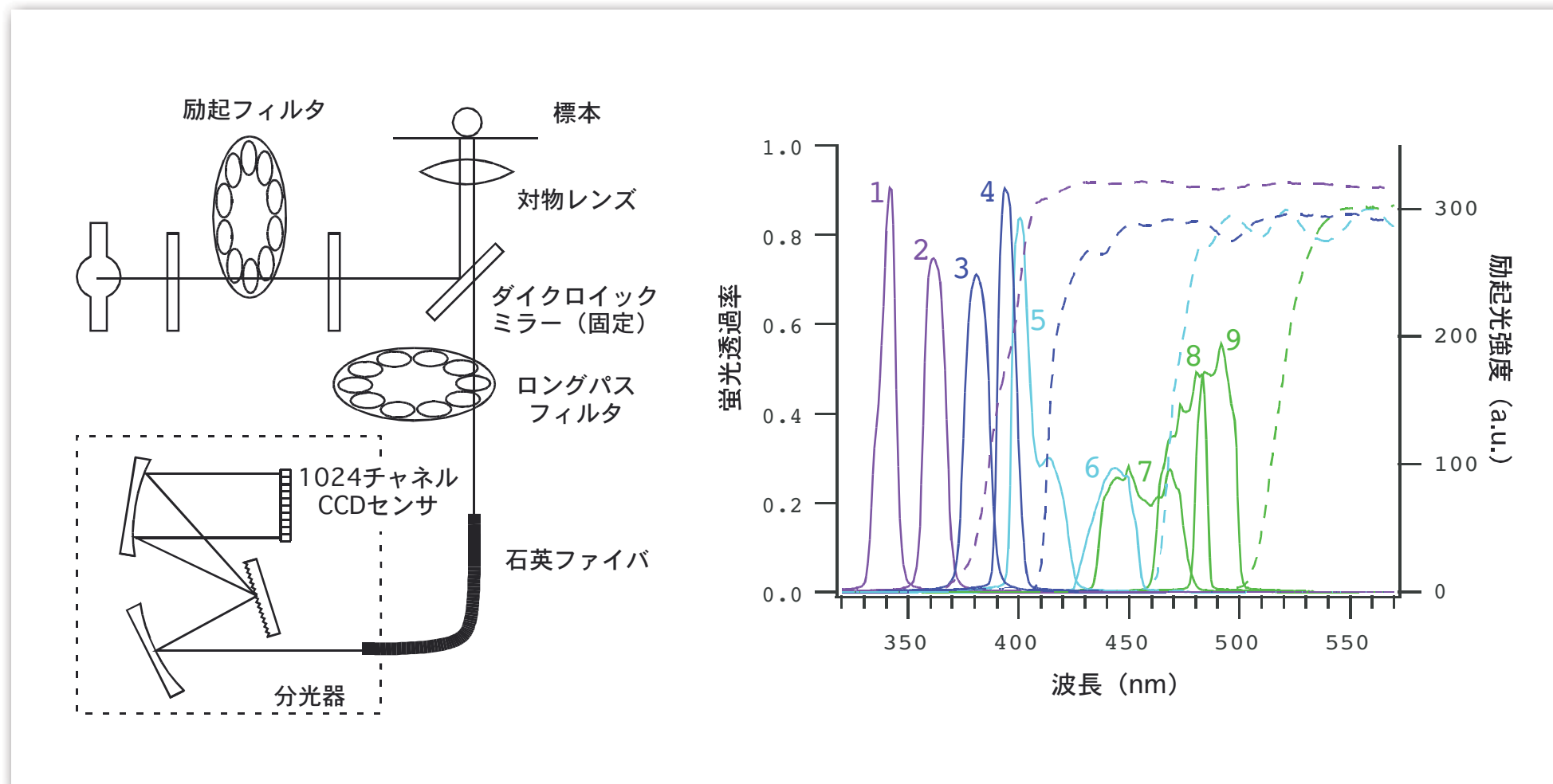
受精卵Ca²⁺振動時のV-RASA3 ΔC2の局在変化



Ca²⁺オシレーションと同期してV-RASA3 ΔC2の局在が変化した

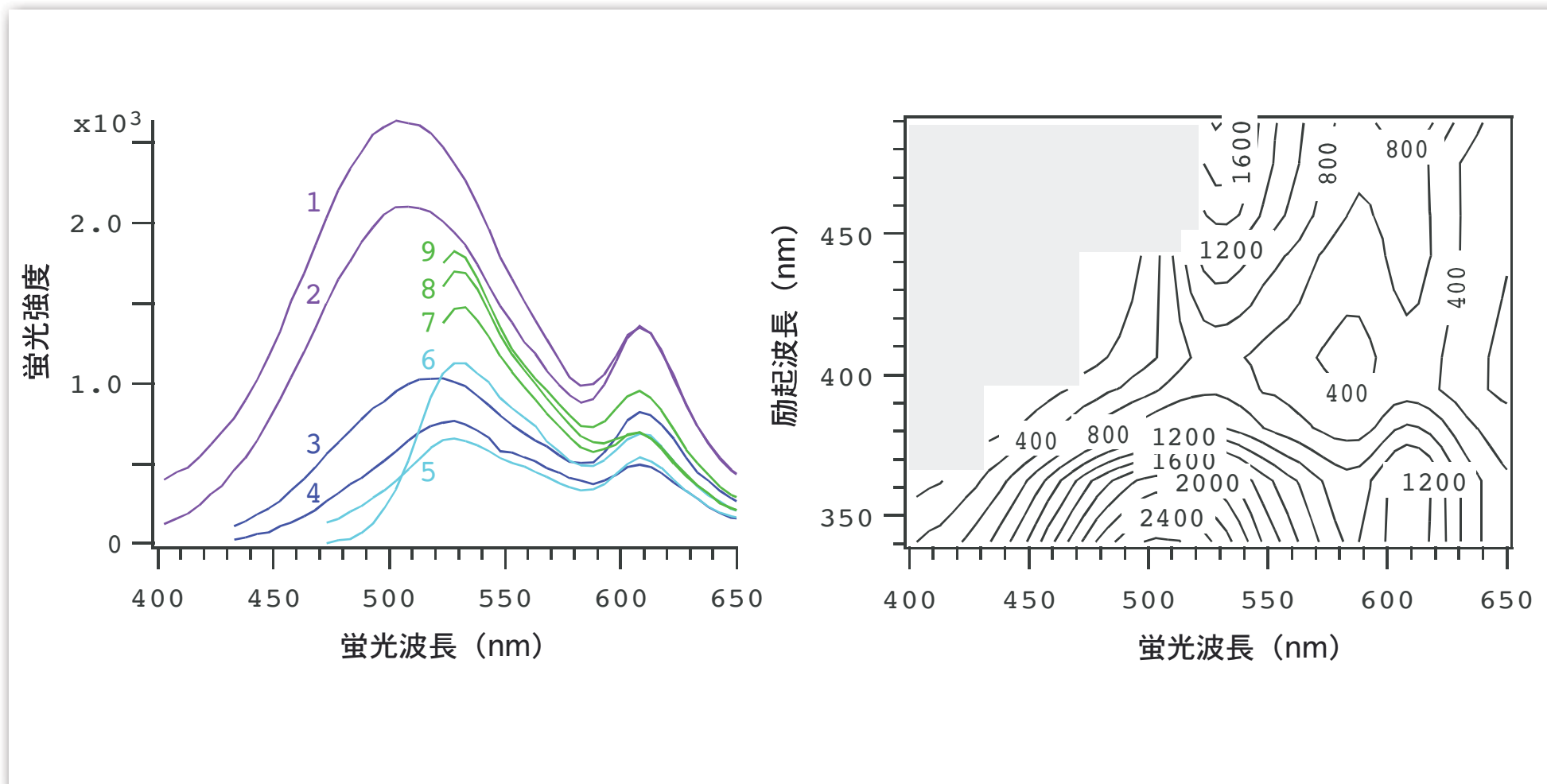
*これがIP₄濃度の変動を意味しているかは要検証

2次元スペクトル顕微測光システム



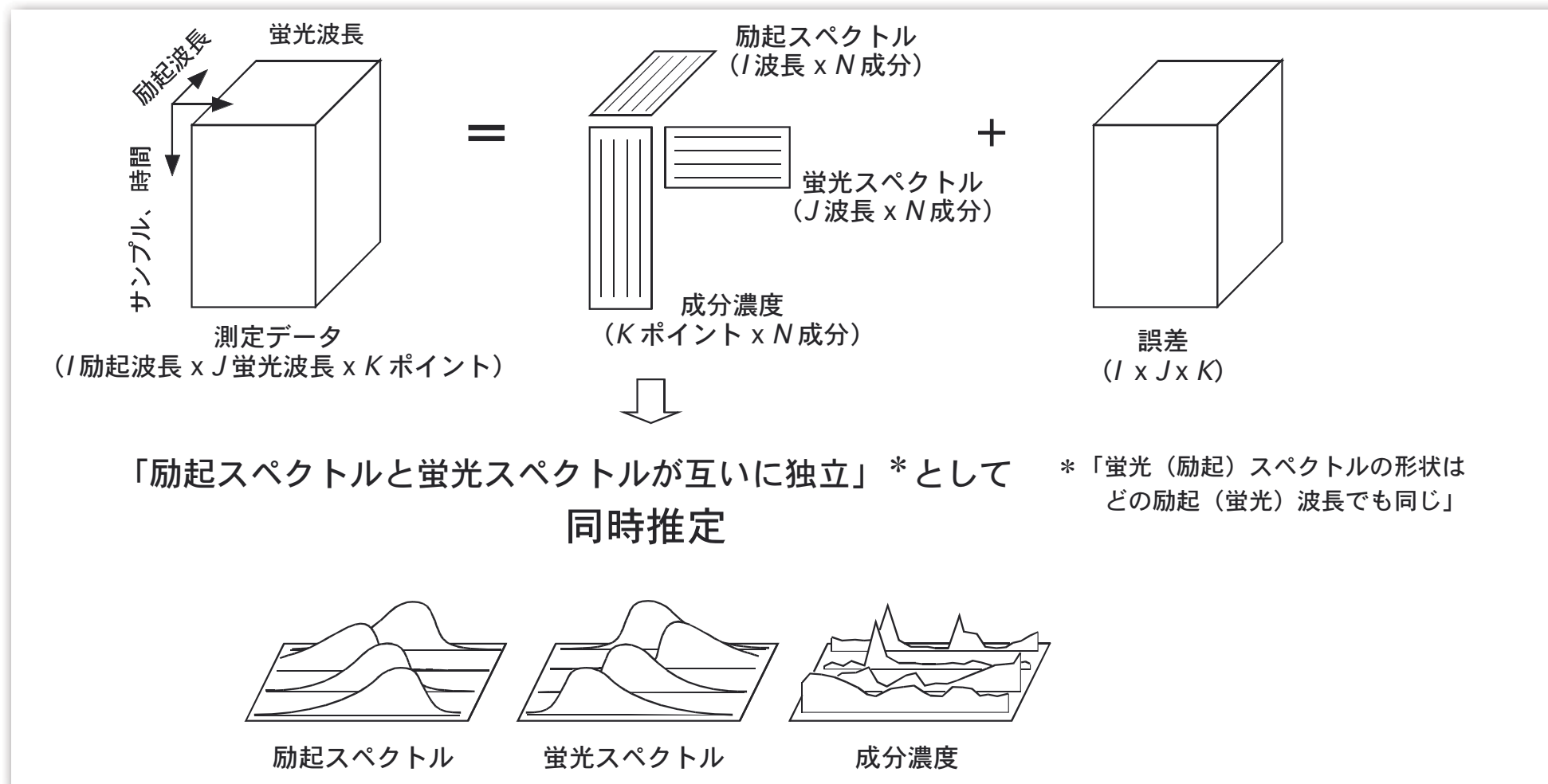
光学系の構成（左）と励起光およびバリアフィルターの波長特性（右）

2次元スペクトル顕微測光システム



9 励起波長で測定した蛍光スペクトル例（左）とその等高線表示（右）

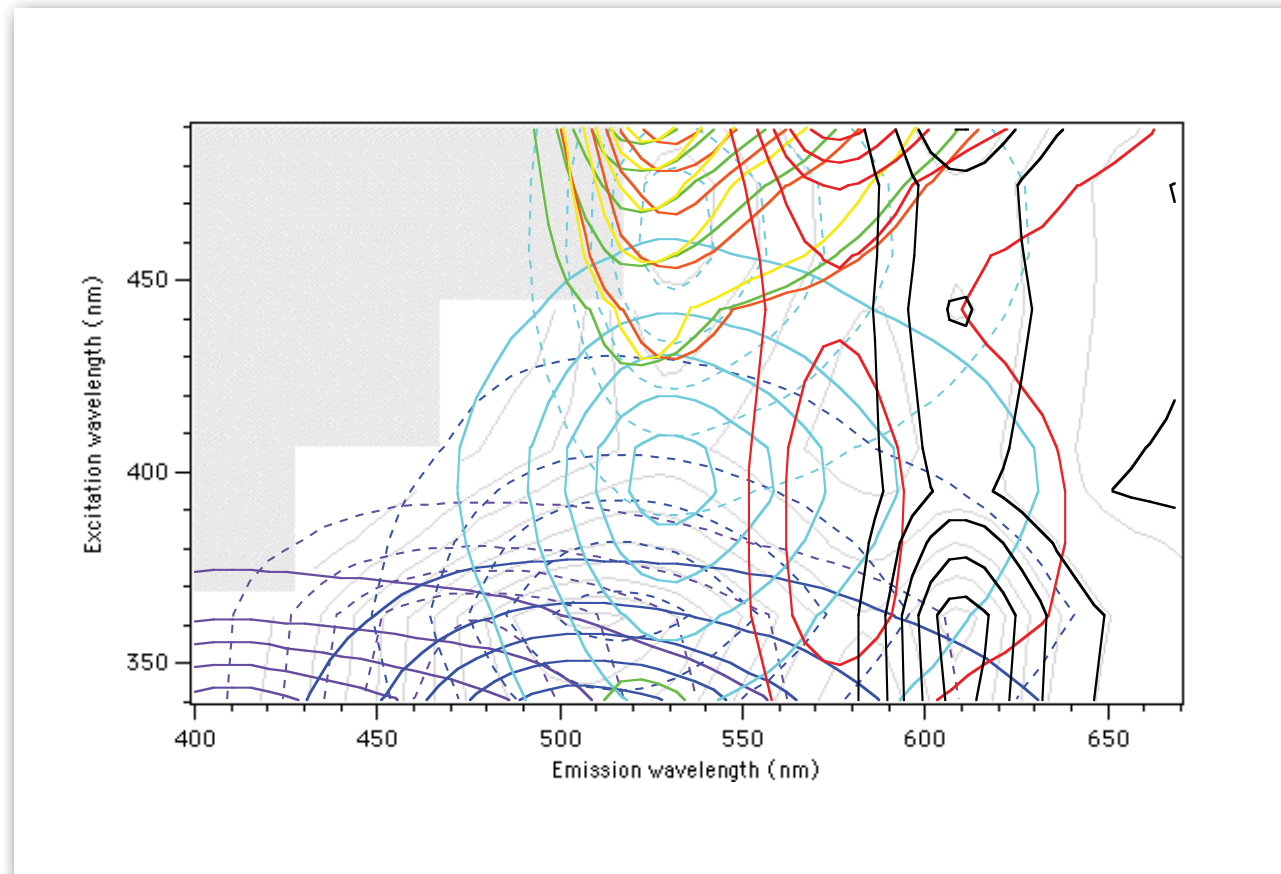
Parallel Factor Analysis (PARAFAC)



PARAFACによるBlind spectral decomposition

励起スペクトル、蛍光スペクトル、成分濃度比を、先見情報なしに一意に求めることができる

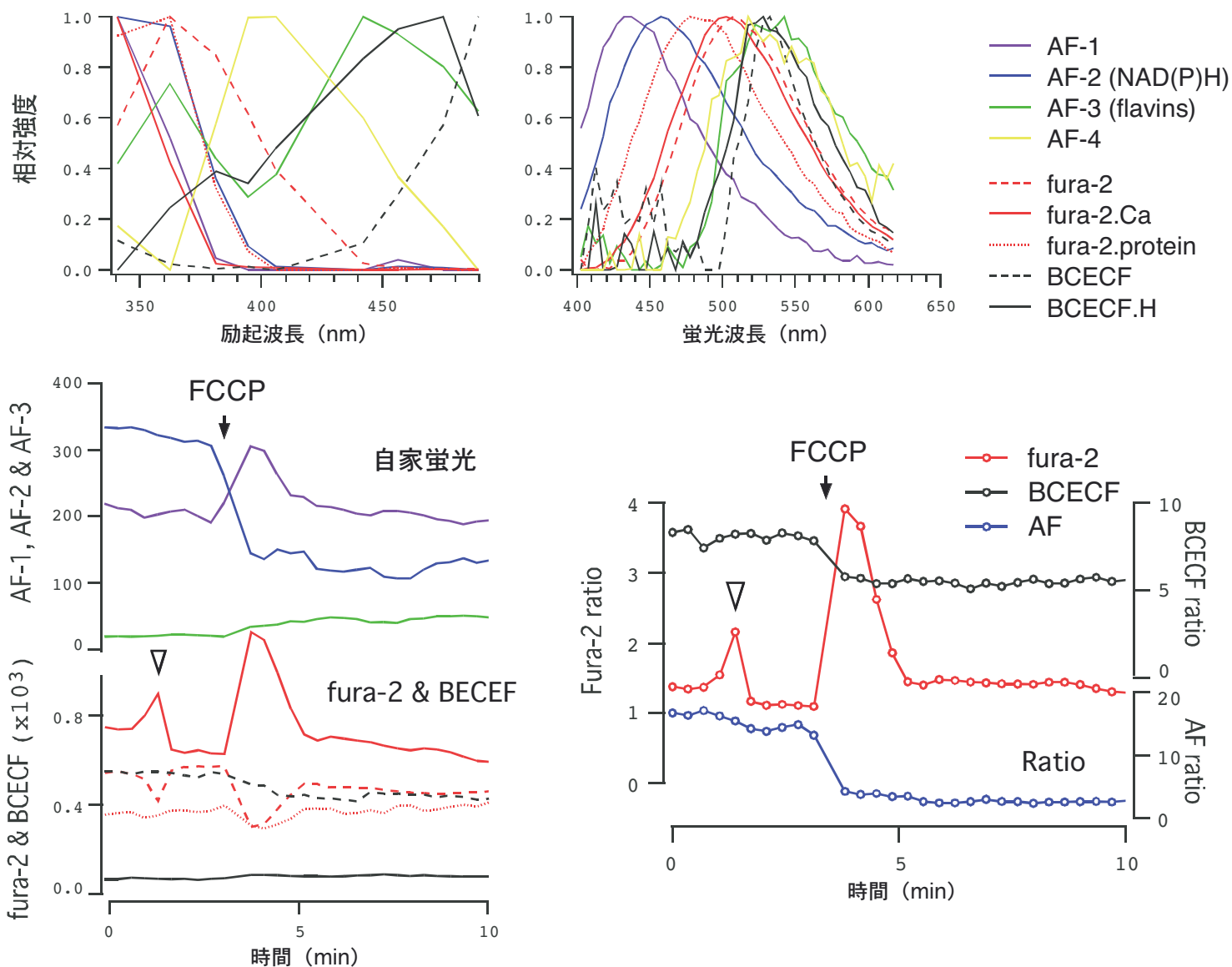
多蛍光成分同時測定システムの適用例



indo-1 (+/- Ca)
fura-2 (+/- Ca)
BTC (+/- Ca)
fluo-3
Oregon Green
Calcium Green-1
rhod-2
Texas Red

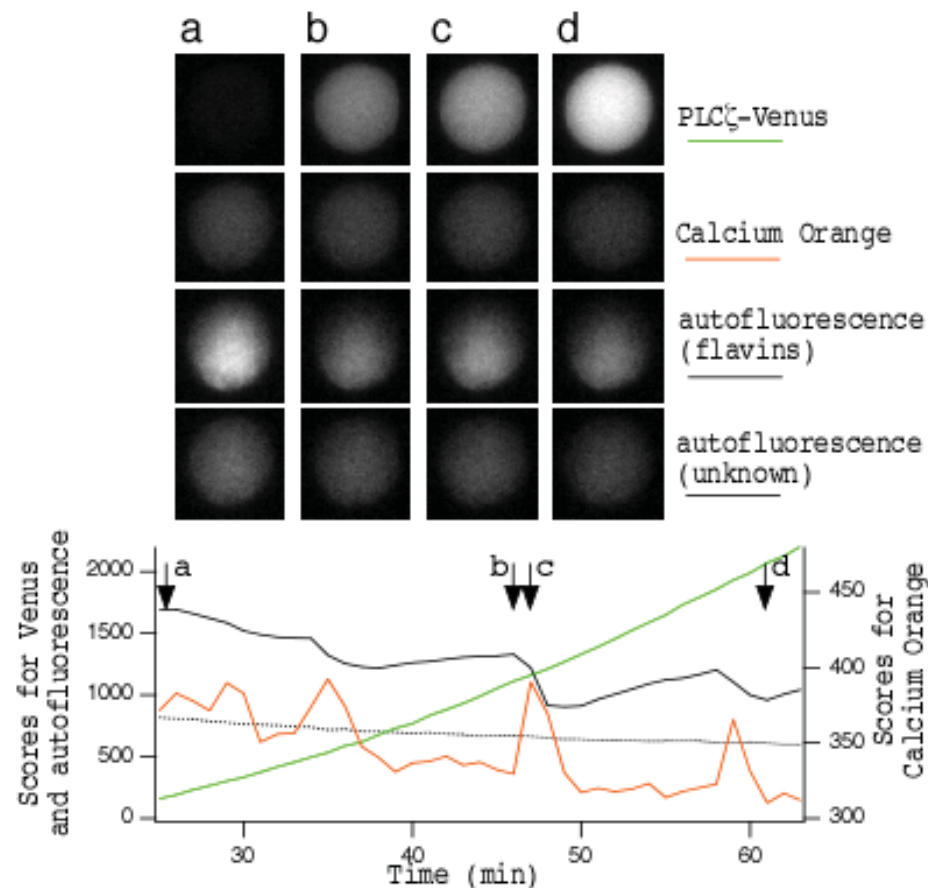
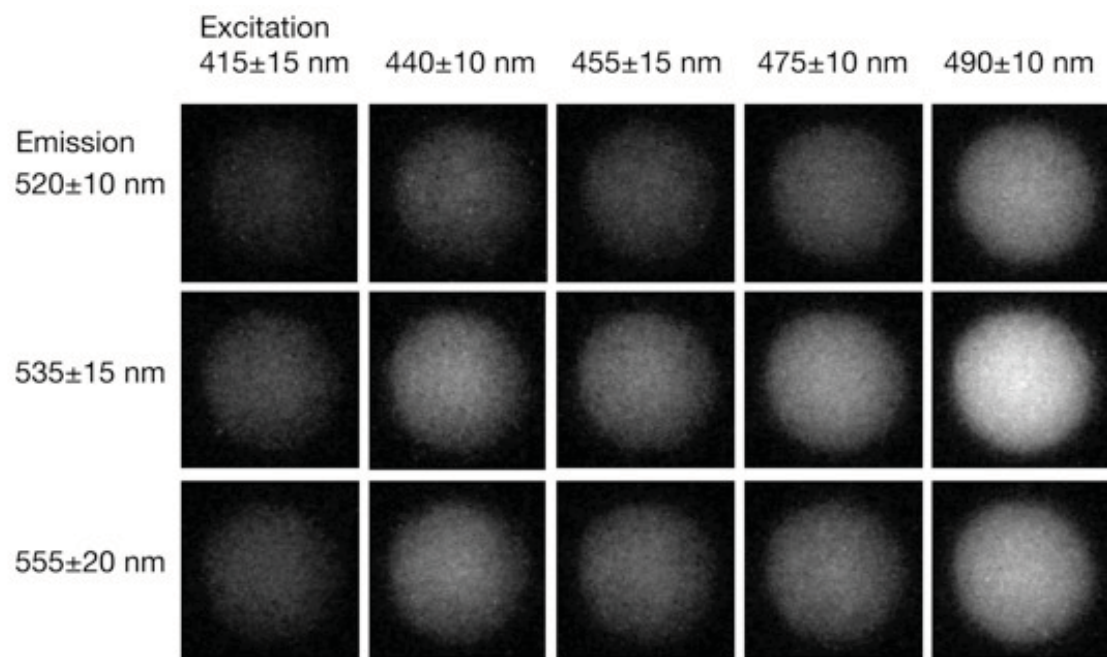
PARAFACにより分離されたスペクトル成分

多蛍光成分同時測定システムの適用例（生細胞）



fura-2とBCECFを用いて細胞内Ca²⁺とpH、および自家蛍光成分の変化を同時測定した例（計9蛍光成分）

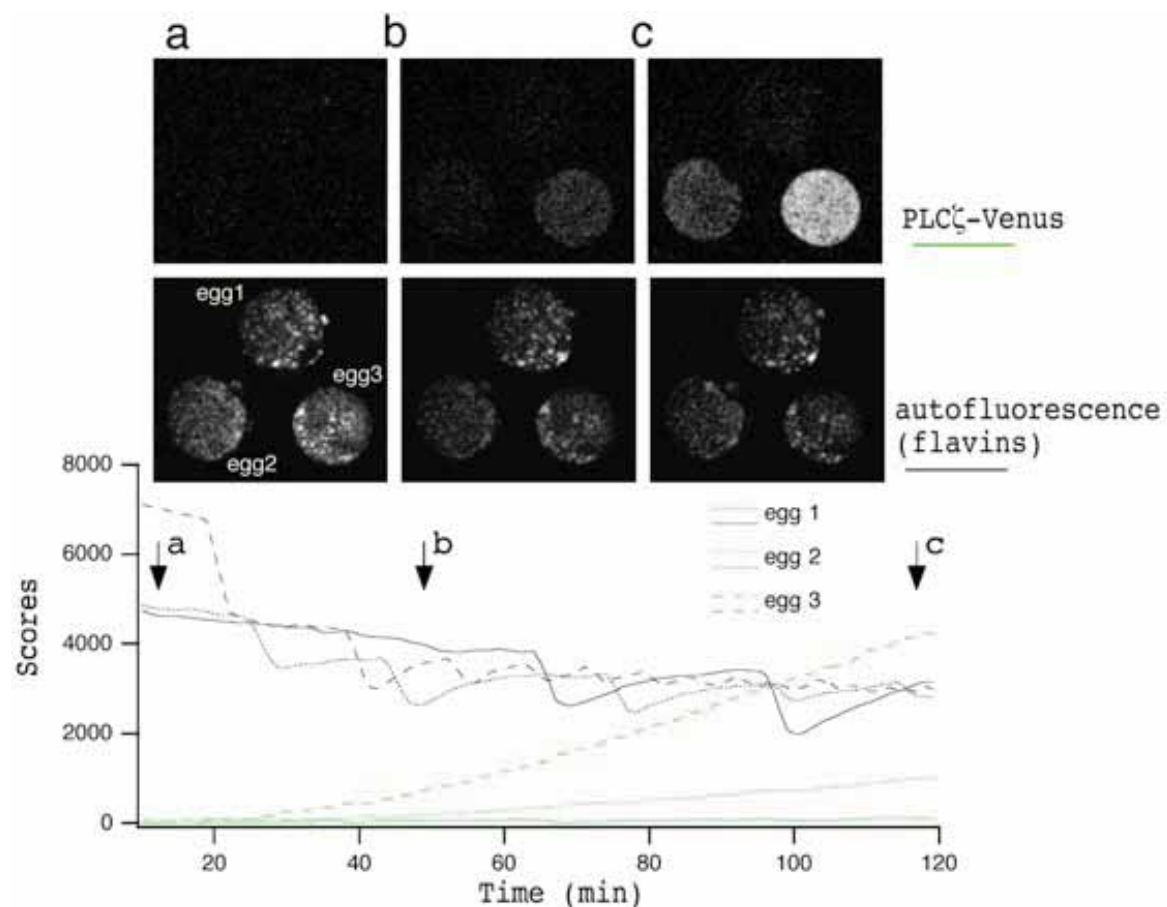
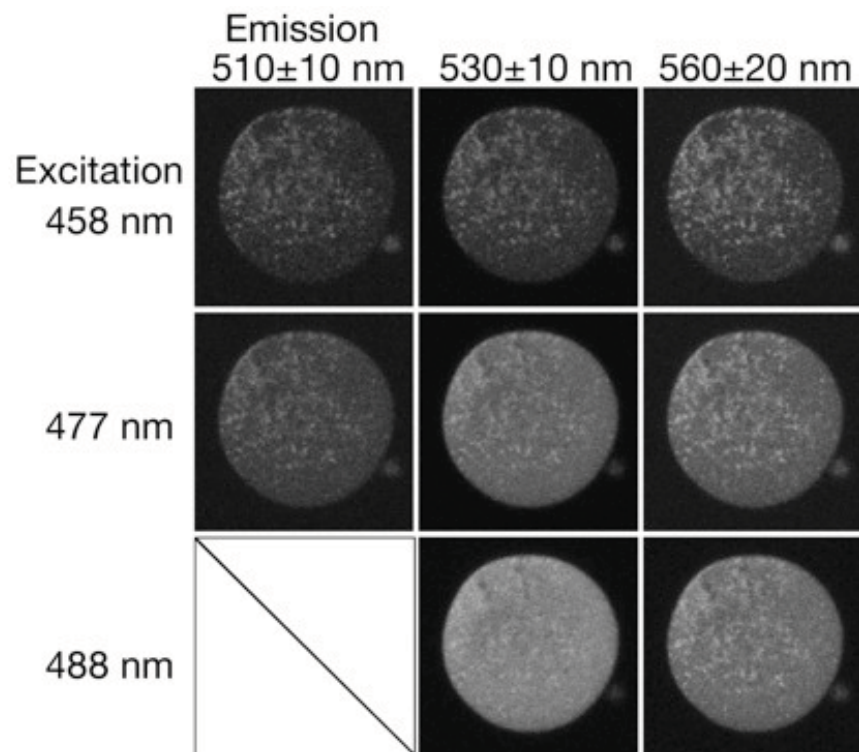
多蛍光成分イメージングシステムへの拡張



5 励起波長 × 3 蛍光波長での蛍光分光イメージング (conventional)

→ 4 種類の成分蛍光画像 (時系列) の分離

多蛍光成分イメージングシステムへの拡張



3 励起波長 × 3 蛍光波長での蛍光分光イメージング (confocal)

→ 2 種類の成分蛍光画像 (時系列) の分離

主要な実験機器一覧

蛍光顕微鏡 (Zeiss, Axiovert)

- ・ パソコン制御による波長切り換え & 画像取得
- ・ 最大10励起波長 × 10蛍光波長
- ・ マイクロマニピュレータ付き

蛍光顕微鏡 (オリンパス, IX-70)

- ・ パソコン制御による波長切り換え & 画像取得
- ・ 最大4励起波長
- ・ マイクロマニピュレータ付き

マルチチャンネル分光器 (浜松ホトニクス, PMA-11)

蛍光分光光度計 (Hitachi, F-2500)

分子生物学実験用機器：サーマルサイクラー、遠心機等

生理学実験用機器：膜電位記録用アンプ、インジェクション装置等