

平成21年 4月30日現在

研究種目：特定領域研究  
研究期間：2004～2008  
課題番号：16083206  
研究課題名（和文） カルシウムシグナリングにおける細胞内ナノシステムの統合  
研究課題名（英文） Integration of intracellular nanosystems in calcium signaling

研究代表者  
廣瀬 謙造 (Hirose Kenzo)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00292730

## 研究成果の概要：

本研究では、カルシウムシグナリングに焦点を当て、生体を構成する分子からなる細胞内ナノシステムがどのように細胞機能を実現するかを解明するため、新しい分子イメージングプローブの開発を行った。開発されたプローブによって、分子の可視化を行うことに成功し、カルシウムシグナルがどのように制御されているかについてその実態を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	8,700,000	0	8,700,000
2005年度	14,700,000	0	14,700,000
2006年度	10,400,000	0	10,400,000
2007年度	9,500,000	0	9,500,000
2008年度	8,700,000	0	8,700,000
総計	52,000,000	0	52,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、薬理学一般

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

生体を構成する分子は、一般に比較的少数の分子群がまとまって基本的な機能的単位である細胞内ナノシステムを構成しており、各々のナノシステムは高次のレベルで統合され、目的の細胞機能を実現する。従って、細胞内ナノシステムの構築原理とその統合様式を理解することは生命機能の理解にとって重要である。

## 2. 研究の目的

カルシウムシグナリングは様々な生理機能を制御する重要な細胞内情報伝達系であるが、細胞内カルシウム動員パターンは複雑な時空間パターンを伴うことがわかっている。この複雑なカルシウム動員パターンもこれを制御するナノシステムが担っている。一方、複雑なカルシウム

動員パターンは、転写、細胞運動、分泌制御に関わるそれぞれのナノシステムによって“解釈”され、様々な細胞機能が実現される。本研究では、このような特徴を持つカルシウムシグナリングに焦点を当て、細胞内ナノシステム統合についての理解を目指す。

### 3. 研究の方法

新しい分子イメージングプローブの開発とその利用を通じて、カルシウムシグナルの分子ナノシステムの構築と制御の問題に挑む。特に、空間的に均一でない中枢神経系のシグナリングの解析に本研究の手法が有用であることが明らかとなってきたので、今後の解析においては中枢神経細胞を主な標的として研究を推進する。また、イメージングに加えて、siRNA による遺伝子ノックダウンや計算機を用いたシミュレーションなども併用し、ナノシステムの構築原理にアプローチする。

### 4. 研究成果

(1) 中枢神経における NO シグナルの可視化  
中枢神経シナプスにおけるカルシウムシグナリングに焦点を当て、研究を行った。シナプス前終末に活動電位が伝わると膜電位依存性カルシウムチャンネルが開閉し、カルシウム濃度が上昇する。このカルシウム濃度上昇によって、シナプス伝達物質の放出や一酸化窒素の生産が誘発されることが知られている。そこで、これまで開発した一酸化窒素 (NO) の可視化蛍光プローブである HBR-GFP を用いて、平行線維—プルキンエ細胞シナプスにおける NO 動態を解析した結果、NO の拡散は平行線維入力箇所のごく近傍の微小領域に限局していることが明らかとなった。また、平行線維刺激によるポストシナプスにお

けるカルシウム応答と NO 応答の空間的広がりについて比較解析することによって、NO シグナルはカルシウムシグナル同様の空間的広がりを持つことが明らかとなり、NO シグナルもシナプス特異性のある細胞内応答であることが示唆された (図 1)。

### NOとCaシグナルの空間分布

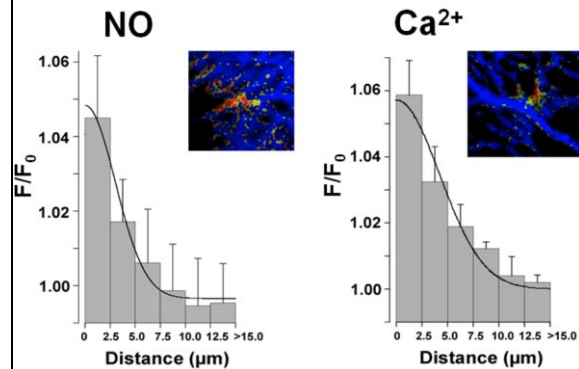


図 1 小脳プルキンエ細胞における NO とカルシウムシグナルの空間分布

さらに、NO の空間限局性の意義についても解析を行った。一箇所での LTP 誘導刺激を与え、刺激部位から様々な距離離れた部位で LTP 誘導の有無を調べた結果、わずか 10  $\mu\text{m}$  離れると LTP の誘導の程度は激減し、20  $\mu\text{m}$  以上の部位では LTP はまったく起こらないことを見出した。さらに、わずかに離れた場所で誘発される LTP は刺激される神経線維のオーバーラップによることが示された。これらの結果は NO の限局性がシナプス特異的な LTP 誘発を制御するのにきわめて重要であることを示唆する。

(2) 細胞間コミュニケーションにおけるカルシウムシグナリングの役割

細胞間コミュニケーションにおけるカルシウムシグナリングの役割については、細胞間の接触の際に一過性のカルシウム濃度上昇が見られること、このカルシウム濃度上昇がチロシンリン酸化酵素である PYK2 を介して

細胞間の repulsion を誘発することが明らかとなった。

(3) ミオシン軽鎖キナーゼ可視化法  
カルシウム依存性のシグナル分子の可視化法については、カルシウム・カルモジュリン依存性であるミオシン軽鎖キナーゼの活性をモニターすることができるプローブである CRCit (ECFP-RMLC-Citrine) を開発することに成功した。CRCit は生きた細胞内でミオシン軽鎖キナーゼの活性をリアルタイムでイメージングすることができるプローブであり、細胞内カルシウムの動因パターンとキナーゼ活性の関係について解析する基盤が構築された。

(4) 細胞オルガネラ内腔のカルシウム濃度のイメージング法の確立  
細胞オルガネラ内腔のカルシウム濃度のイメージング法を確立した。この技術を用いてカルシウム振動時のオルガネラ内カルシウム濃度を解析したところ、小胞体、ミトコンドリアと細胞質の間でどのようにカルシウムがやり取りされているかをはじめて明らかにすることができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Yogo T, Urano Y, Mizushima A, Sunahara H, Inoue T, Hirose K, Iino M, Kikuchi K, Nagano T.: Selective photoinactivation of protein function through environment-sensitive switching of singlet oxygen generation by photosensitizer. *PNAS*. 105, 28-32 (2008) 査読有
- ② Kanemaru K, Okubo Y, Hirose K, Iino M.: Regulation of neurite growth by spontaneous Ca<sup>2+</sup> oscillations in astrocytes. *J Neurosci*. 27, 8957-66. (2007) 査読有
- ③ Hashido, M., Hayashi, K., Hirose, K., Iino, M.: Ca<sup>2+</sup> lightning conveys cell-cell contact information inside the cells. *EMBO Rep.* 7, 1117-1123 (2006) 査読有
- ④ Ishii, K., Hirose, K., Iino, M.: Ca<sup>2+</sup> shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO Rep.* 7, 390-396 (2006) 査読有
- ⑤ Namiki S, Kakizawa S, Hirose K, Iino M.: NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum. *J Physiol.* 566, 849-863 (2005) 査読有
- ⑥ Hashimoto A, Hirose K, Iino M.: BAD detects coincidence of G2/M phase and growth factor deprivation to regulate apoptosis. *J Biol Chem.* 280, 26225-26232 (2005) 査読有
- ⑦ Yamada, A., Hirose, K., Hashimoto, A. and Iino, M.: Real-time imaging of myosin II regulatory light chain phosphorylation using a new protein biosensor. *Biochem. J.* 385, 589-594. (2005) 査読有
- ⑧ Urano, Y., Kamiya, M., Kanda, K., Ueno, T., Hirose, K., Nagano, T.: :

Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J Am Chem Soc.* 127, 4888-4894 (2005) 査読有

- ⑨ Okubo, Y., Kakizawa, S., Hirose, K. and Iino, M.: Cross talk between metabotropic and ionotropic glutamate receptor-mediated signaling in parallel fiber-induced inositol 1,4,5-trisphosphate production in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci.* 24, 9513-9520. (2004) 査読有
- ⑩ Yogo, T., Kikuchi, K., Inoue, T., Hirose, K., Iino, M. and Nagano, T.: Modification of intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics by laser inactivation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor using membrane-permeant probes. *Chemistry & Biology* 11, 1053-1058 (2004) 査読有
- ⑪ Matsushita M, Noguchi H, Lu YF, Tomizawa K, Michiue H, Li ST, Hirose K, Bonner-Weir S, Matsui H.: Photo-acceleration of protein release from endosome in the protein transduction system. *FEBS Lett.* 572, 221-226. (2004) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kenzo Hirose: RNAi library for Potential Drug Target discovery. XVth World Congress of Pharmacology IUPHAR 2006年 7月 北京
- ② 廣瀬謙造 細胞内カルシウムシグナリン

グの可視化 第79回日本薬理学会年会学術奨励賞受賞講演 2006年3月9日 横浜

- ③ 廣瀬謙造 EPRILテクノロジーによる RNAi ライブラリー 第79回日本薬理学会年会シンポジウム 2006年3月8日 横浜
- ④ 廣瀬謙造 小脳プルキンエ細胞における NO イメージング 日本顕微鏡学会第61回学術講演会 2005年6月1日 筑波

[産業財産権]  
○出願状況 (計 1 件)

名称: RNAi ライブラリーの酵素的構築方法

発明者: 廣瀬 謙造 外 4 名  
権利者: 株式会社東京大学 T L O

種類: 特許  
番号: P C T / J P 2 0 0 4 / 0 1 9 6 1 2  
出願年月日: 2 0 0 4 年 1 2 月 2 8 日  
国内外の別: 国際出願

[その他]  
ホームページ等

- ① <http://www.cir.tohoku.ac.jp/higuchi-p/NanoSystem/index.htm>  
② <http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Seiri1/>  
③ <http://www.neurobiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
廣瀬 謙造 (Hirose Kenzo)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 00292730

(4) 研究協力者  
並木 繁行 (Namiki Shigeyuki)  
研究者番号: 90452193  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

太田 裕作 (Ohta Yusaku)

神谷 真子 (Kamiya Mako)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・日本学術振興会特別研究員 S P D

平野 知宏 (Hirano Tomohiro)

名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員

菅生 厚太郎 (Sugao Kohtarō)

東京大学・大学院医学系研究科・博士課程学生

飯沼 将 (Inuma Sho)

東京大学・大学院医学系研究科・博士課程学生

武井 大祐 (Takei Daisuke)

名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課程学生

坂本 寛和 (Sakamoto Hirokazu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課程学生

伊佐 真幸 (Isa Masayuki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課程学生

太向 勇 (Taiko Isamu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課程学生

滝川 健司 (Takikawa Kenji)

名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課程学生

岸 俊輔 (Kishi Shunsuke)

名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課程学生

神田 真衣 (Kanda Mai)

名古屋大学・大学院医学系研究科・修士課程学生

田所 大 (Tadokoro Dai)

名古屋大学・大学院医学系研究科・博士課程学生