

細胞のサイズと紡錘体のサイズは相似となる (図 2b)。コンピュータシミュレーションを行うと、これら二つの要因を組み合わせることにより野生型胚および三量体型 G タンパク質機能欠損胚における紡錘体の細胞サイズ依存性を定量的に再現することができた⁸⁾。我々のモデルは細胞内構造物の大きさ制御の様式を細胞サイズから直接説明付ける初めてのモデルである。データの定量化とモデルの定量化を組み合わせた解析戦略は細胞のデザインに関わる問題に効果的であると考えている。

5. 細胞サイズと細胞分裂速度

最近、同じく線虫を用いて Oegema らは細胞分裂の際の分裂溝の進行速度も細胞サイズに比例することを報告した¹³⁾。大きい細胞では分裂溝が速く進行し、小さい細胞では遅くなるというものである (図 1)。これによって、細胞サイズに関わらず一定の時間で細胞質分裂が完了できる。これは、我々が見出した染色体分配の際の紡錘体の伸長速度が細胞サイズに比例し、従って紡錘体の伸長にかかる時間が細胞サイズによらずほぼ一定になると対応していると考えられる⁸⁾。Oegema らは、この定量的な結果に基づいて細胞サイズと収縮の進行が比例するモデルを考え、FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) 法など細胞生物学的な手法を駆使してモデルを支持する知見を集めた。

6. おわりに

本稿では細胞サイズと細胞内構造体の関係についての近年の研究を紹介した。いずれの研究も出発点は、それぞれの構造体と細胞サイズの定量と比較だが、その後解析を進展させた方向は、遺伝学的手法を用いた細胞操作、生化学的手法を用いた要因の追求、シミュレーション解析を用いた力学モデルの追及、細胞生物学的手法を用いた現象の追求、と多様である点は興味深い。このことは、データの定量化が様々な方向に発展し得ることを示すと同時に、多様な解析を組み合わせれば、さらに研究が発展する可能性を示している。データの定量化、モデルの定量化は複雑な生命現象を解析する基盤であり、また多様な専門性をもつ研究者をつなぎとめる拠り所として、今後ますます重要性をもつと考えられる。

- 1) Wilson, E.B. (1925) *The Cell in Development and Heredity*, Macmillan., New York.
- 2) Neumann, F.R. & Nurse, P. (2007) *J. Cell Biol.*, 179, 593–

- 600.
- 3) Jorgensen, P., Edgington, N.P., Schneider, B.L., Rupes, I., Tyers, M., & Futcher, B. (2007) *Mol. Biol. Cell*, 18, 3523–3532.
- 4) Jorgensen, P. & Tyers, M. (2004) *Curr. Biol.*, 14, R1014–1027.
- 5) Newport, J. & Kirschner, M. (1982) *Cell*, 30, 675–686.
- 6) Edgar, B.A., Kiehle, C.P., & Schubiger, G. (1986) *Cell*, 44, 365–372.
- 7) Wuhr, M., Chen, Y., Dumont, S., Groen, A.C., Needleman, D. J., Salic, A., & Mitchison, T.J. (2008) *Curr. Biol.*, 18, 1256–1261.
- 8) Hara, Y. & Kimura, A. (2009) *Curr. Biol.*, 19, 1549–1554.
- 9) Brown, K.S., Blower, M.D., Maresca, T.J., Grammer, T.C., Harland, R.M., & Heald, R. (2007) *J. Cell Biol.*, 176, 765–770.
- 10) Mogilner, A., Wollman, R., Civelekoglu-Scholey, G., & Scholey, J. (2006) *Trends Cell Biol.*, 16, 88–96.
- 11) Dumont, S. & Mitchison, T.J. (2009) *Curr. Biol.*, 19, R749–761.
- 12) Gotta, M. & Ahringer, J. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3, 297–300.
- 13) Carvalho, A., Desai, A., & Oegema, K. (2009) *Cell*, 137, 926–937.

木村 暁

(国立遺伝学研究所 新分野創造センター
細胞建築研究室)

Quantitative biology on the size of cellular architectures
Akatsuki Kimura (Cell Architecture Laboratory, National Institute of Genetics, Yata 1111, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan)

コリンキナーゼアイソザイムの機能

1. はじめに

ホスファチジルコリン (PC) は動物の細胞膜を構成する主要なリン脂質であるとともに、リポタンパク質や胆汁などの構成成分としても重要であり、その産生および分解がコレステロール等を含めた個体全体の脂質代謝に影響をおよぼすことが示されてきた¹⁾。図 1 に示すように PC の生合成経路には CDP-コリン経路と、ホスファチジルエタノールアミン (PE) メチル化経路の二つが存在する。後者は PE メチルトランスフェラーゼ (PMT) によって PE に三つのメチル基が付加されることにより PC が産生される、肝臓に特異的な経路である。他の臓器での主な PC の生合成はもう一方の CDP-コリン経路を介して行われ、コ

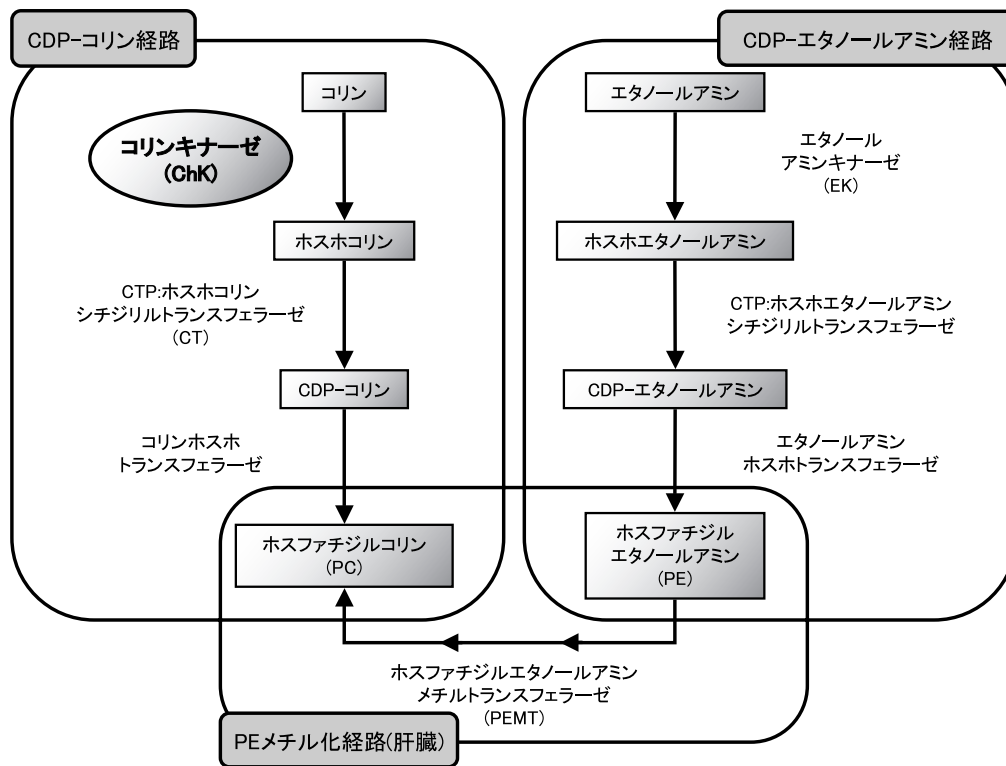


図1 ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン合成経路

リンキナーゼ (ChK), CTP:ホスホコリンシチジリルトランスフェラーゼ (CT) およびコリンホスホトランスフェラーゼの三つの酵素によって順次触媒される。PC 合成の律速酵素は第二段階を触媒する CT と考えられているが、筆者らは初段階反応を触媒する ChK に注目し研究を行ってきた。CT に比べるとこれまで ChK の役割はあまり注目されなかったが、最近になり ChK のノックアウトマウスの解析から興味深い知見が得られたり、リン脂質合成以外の役割も指摘され見直されるようになった。

2. コリンキナーゼアイソザイム

哺乳類には二つの ChK 遺伝子 *chka* および *chkb* が存在する²⁾。 *chka* は 435 アミノ酸からなる $\alpha 1$ サブユニットと、スプライシングの違いにより 18 アミノ酸が挿入された $\alpha 2$ サブユニットをコードする。 *chkb* は 394 (ヒトは 395) アミノ酸からなる β サブユニットをコードする。両サブユニットのアミノ酸配列の間には約 60% の相同性があり、リン酸基転移酵素に共通の Brenner のコンセンサス配列が共に認められるが、他にもいくつかの保存された領域が存在する。これらはヒト³⁾および線虫⁴⁾の ChK タンパク質の結晶構造解析により、ATP との結合や二量体形成時の相

互作用領域に相当する部分であることが示された。N 末端部分の相同性は比較的低く、筆者らはこの領域の GST 融合タンパク質を抗原として α および β サブユニットに特異的な抗体の作製を行った⁵⁾。

ChK タンパク質が精製された当初は、SDS-PAGE 像が単一バンドであったことなどから α/α 、 β/β ホモ二量体として存在すると考えられていた。しかし筆者らのサブユニット特異的な抗体を用いた実験で α と β が共沈することや⁵⁾、タグを付加した ChK の過剰発現実験でも同様の結果が得られたことなどから⁶⁾、活性型の ChK タンパク質は α/β ヘテロ二量体としても存在することが明らかになった。 α サブユニットには $\alpha 1$ および $\alpha 2$ が存在するため、 β サブユニットを考慮に入れると 6 種類の ChK アイソザイムが存在する可能性がある。 $\alpha 2$ サブユニットの 18 アミノ酸の挿入が $\alpha 1$ サブユニットとどのような違いをもたらすのかは不明である。ヘテロ二量体の精製、活性の測定は行われていないので詳細は不明であるが、ChK α および β の二つのサブユニットを同時に導入し発現させた時の細胞溶解液中の ChK 活性は、それぞれを単独で導入した時の中間の値であった⁶⁾。

ChK 二量体には α/α 型、 β/β 型および α/β 型が存在す

るが、これらアイソザイムの割合は臓器によって大きく異なっている⁵⁾。ChK 活性の高い肝臓や精巣では、ほとんどの ChK 活性は α/β ヘテロ二量体由来である。一方心臓や骨格筋では ChK 活性は低く、そのほとんどの活性は β/β ホモ二量体由来である。また様々ながん細胞^{7,8)}や四塩化炭素投与後の肝臓⁹⁾で ChK 活性が上昇することが知られているが、この時誘導されるのは α/α ホモ二量体であった。以上のように *chka* および *chkb* mRNA の発現量は臓器により様々であり、組織特異的二量体形成の組み合わせや、ChK 活性との関連は今後の興味深い課題である。

3. コリンキナーゼノックアウトマウス

(1) ChK α ノックアウトマウス

ChK α の個体における機能を解明するためノックアウトマウスの作製を試みたが、ホモ接合体は胎生 3.5~7.5 日の間に致死となることが明らかになった⁹⁾。これは CDP-コリン経路の律速酵素である CT α のノックアウトマウスと同様の結果であり、細胞分裂が盛んな発生初期における PC 生合成の重要性を示していると言えよう。また両者ともに別の遺伝子にコードされるアイソザイムが存在し、さらに別の PC 合成経路である PE メチル化経路も存在するが、これらでは失われた PC 生合成能を補えないことも示唆する。実際 ChK α ヘテロマウスの肝臓や精巣では ChK α の発現が減少し、ChK 活性も約 30% 減少しているにもかかわらず、ChK β の発現量には変化が見られなかった。

ChK α ノックアウトマウスが胎生致死であった他の理由として ChK の反応産物であり細胞増殖に密接に関連しているホスホコリン¹⁰⁾の不足による可能性も考えられる。血小板由来成長因子 (PDGF) や上皮成長因子 (EGF) などの刺激により ChK を介したホスホコリンの増加がみられるが、ChK 阻害剤によってホスホコリンの産生が押さえられると、増殖因子による DNA 合成も抑制された。さらにこの DNA 合成阻害は細胞内へのホスホコリンのマイクロインジェクションによって一部回復した。また ChK の過剰発現により増加する細胞内ホスホコリンは PC 生合成には影響しないものの、インスリン刺激による細胞分裂を促進した。このようにホスホコリンには PC 生合成の中間体としてばかりでなく細胞増殖のセカンドメッセンジャーとして働くとの指摘もあり、増殖シグナル伝達での異常が胎生致死の原因の一因であるかもしれない。

一方、ChK α ヘテロマウスは野生型と比べ外見上特に違いは見られず、出生率もほぼメンデルの法則に従うものであった。ヘテロマウスの肝臓や精巣では ChK 活性の低下

に伴いコリンの蓄積、ホスホコリンの低下が観察されたが、PC 量に変化は見られなかった。またヘテロマウス由来初代培養肝細胞の PC への [³H] コリンの取り込みも野生型との差はなく、発生においても成体においても完全な ChK α の発現は必要ないことが示された。

PC 量に変化がなかった一方で、意外なことに PE 量の減少が観察された。PE 生合成経路の一つとして CDP-コリン経路と同様の CDP-エタノールアミン経路が存在するが、初段階反応はエタノールアミンキナーゼ (EK) によって触媒される。この EK はエタノールアミンのみを基質とする一方、ChK にもわずかながら EK 活性が存在し、ChK α ヘテロマウスにおける PE 量の低下は、生体において ChK α が PE 生合成にも関与していることを示唆すると思われる。

(2) ChK β ノックアウトマウス

ChK β ノックアウトマウスは意外なところから見いだされた¹¹⁾。遺伝的に筋ジストロフィーを発症するマウス *rmd* (rostricaudal muscular dystrophy) の変異遺伝子を調べた結果、*chkb* のエキソン 3 からイントロン 9 に欠失が認められたのである。このマウスは生後 2~3 ヶ月までに後肢の明らかな筋力低下を認め、後足を引きずるようになる。これに比べ前肢は生後 6 日の時点で骨の変形を認めるが筋組織への影響は軽微であり、このためマウスは移動や食餌をすることが可能であり、寿命には大きな影響はなかった。これまでに知られている筋ジストロフィー発症の原因として、筋細胞膜の強度に重要なジストロフィン-ジストログリカン複合体構成因子や、膜の修復に関わるジスフェリンの異常によるものなどが報告されている¹²⁾。*rmd* マウスはこれらタンパク質の発現には異常がなく、またエバンスブルー色素の細胞内への透過や血漿中へのクレアチンキナーゼの逸脱などの度合いは軽微であることから、ジストロフィン欠損によって引き起こされるような筋細胞膜の脆弱化はないものと考えられた。

rmd マウスの ChK 活性は各臓器で大きく低下しており、特に筋肉における ChK 活性はほぼすべてが β/β 型由来であるため、*rmd* では検出されなかった。これに伴い前肢、後肢骨格筋では PC 量の低下が見られ、これは PC 生合成能の低下と、さらに PC 分解の亢進によることが生体でのアイソトープによるラベリング実験から明らかになった^{11,13)}。カルジオトキシン投与により障害された筋肉の再生実験において *rmd* マウスでは顕著な筋肉再生の遅延が認められ、ChK 反応をバイパスする CDP-コリンの投与に

より症状の改善が見られた。筋肉は運動による損傷と修復を繰り返しており、PC合成能の低下によって起こる組織の修復機能の低下が筋ジストロフィー進行の一因と考えられた。

rmd マウスのもう一つの特徴は、筋肉の電子顕微鏡による観察で肥大したミトコンドリアが認められることである。ミトコンドリアのPC含量には変化が認められなかったものの、膜電位の低下が観察されたことから、ミトコンドリアの機能異常が原因である可能性が考えられた。またミトコンドリアのPC量を保つために細胞膜のPC量が減少し、障害される可能性も考えられる。

ヒトの筋ジストロフィーの中にはいまだ原因遺伝子が特定されていない症例もある。この中には *chkb* の変異が原因である疾患がいまだ未同定のままである可能性もあり、*rmd* マウスは治療法開発のためのモデルマウスとして役に立つであろう。

4. その他のヒトの疾患との関わり

(1) がんとの関わり

先にも述べたが、種々の腫瘍やがん細胞においてその悪性度に比例して ChK 活性およびホスホコリンが上昇していることや、細胞培養の実験において阻害剤や RNAi などによる ChK の阻害ががん細胞の増殖を特異的に抑制することなどから、近年 ChK をターゲットにした抗がん剤の開発が進められている¹⁴⁾。がん細胞における ChK 酵素活性の増加に寄与するアイソフォームは α 型であり、 β 型にこのような誘導は認められない。ChK α ヘテロマウスにおけるようなある程度の ChK 活性の減少では個体に大きな障害を引き起こさなかったことから、ChK α 特異的な抗が

ん剤の開発により、高い抗がん作用と低い副作用を併せもつ薬剤が得られることが期待される。

(2) 過眠症

近年日本人のナルコレプシーに関連のある SNP が、*chkb* とその約 300bp 下流に存在する筋型カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-1 (CPT1B) 遺伝子の間に見いだされた¹⁵⁾。ChK の基質であるコリンは神経伝達物質アセチルコリンの前駆体でもあり、コリン代謝の変化が睡眠に影響を与える可能性は十分に考えられる。一方の CPT1B はカルニチン輸送を介してミトコンドリアへの脂肪酸の輸送や β 酸化に関わるタンパク質であるが、カルニチン欠乏や他の β 酸化関連遺伝子と睡眠障害の関連も指摘されている。SNP の塩基配列において、TT に比べナルコレプシーに関連する TC をもつ健常人由来白血球中の mRNA の発現は ChK β および CPT1B とともに低下していたため、現段階ではどちらが原因遺伝子であるのかは不明であり、今後の解析が待たれる。

謝辞

研究を御指導くださいました石館光三先生、Dennis Vance 教授はじめ多くの共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

- 1) Vance, D.E. (2008) *Curr. Opin. Lipidol.*, 19, 229-234.
- 2) Aoyama, C., Liao, H., & Ishidate, K. (2004) *Prog. lipid. Res.*, 43, 266-281.
- 3) Malito, E., Sekulic, N., Too, W.C., Konrad, M., & Lavie, A. (2006) *J. Mol. Biol.*, 364, 136-151.
- 4) Peisach, D., Gee, P., Kent, C., & Xu, Z. (2003) *Structure*, 11,

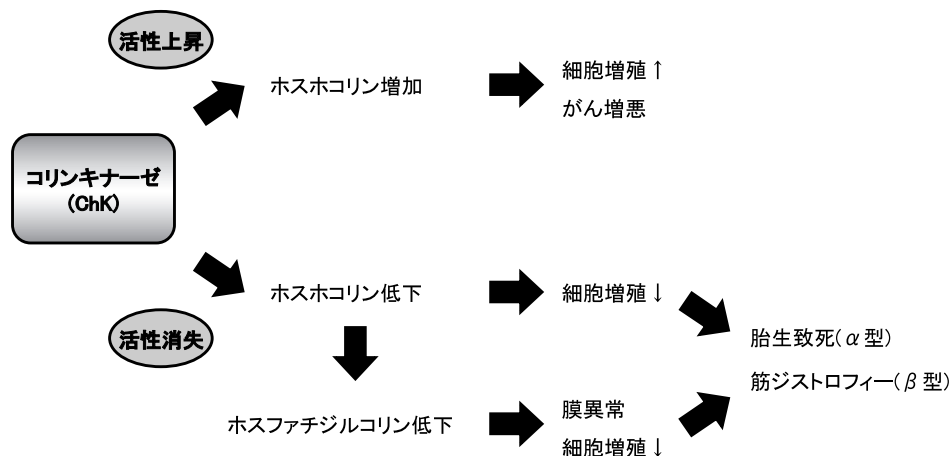


図2 コリンキナーゼ活性の変化と病態

- 703-713.
- 5) Aoyama, C., Ohtani, A., & Ishidate, K. (2002) *Biochem. J.*, 363, 777-784.
 - 6) Liao, H., Aoyama, C., Ishidate, K., & Teraoka, H. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 111-120.
 - 7) Ramírez de Molina, A., Bález-Coronel, M., Gutiérrez, R., Rodríguez-González, A., Olmeda, D., Megías, D., & Lacal, J.C. (2004) *Cancer Res.*, 64, 6732-6739.
 - 8) Hernando, E., Sarmentero-Estrada, J., Koppie, T., Belda-Iniesta, C., Ramírez de Molina, V., Cejas P, Ozu, C., Le, C., Sánchez, J.J., González-Barón, M., Koutcher, J., Córdón-Cardó, C., Bochner, B.H., Lacal, J.C., & Ramírez de Molina, A. (2009) *Oncogene*, 28, 2425-2435.
 - 9) Wu, G., Aoyama, C., Young, S.G., & Vance, D.E. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 1456-1462.
 - 10) Cuadrado, A., Carnero, A., Dolfi, F., Jimenez, B., & Lacal, J. C. (1993) *Oncogene*, 8, 2959-2968.
 - 11) Sher, R.B., Aoyama, C., Huebsch, K.A., Ji, S., Kerner, J., Yang, Y., Frankel, W.N., Hoppel, C.L., Wood, P.A., Vance, D. E., & Cox, G.A. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 4938-4948.
 - 12) Cohn, R.D. & Campbell, K.P. (2000) *Muscle Nerve.*, 23, 1456-1471.
 - 13) Wu, G., Sher, R.B., Cox, G.A., & Vance, D.E. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, 1791, 347-356.
 - 14) Janardhan, S., Srivani, P., & Sastry, G.N. (2006) *Curr. Med. Chem.*, 13, 1169-1186.
 - 15) Miyagawa, T., Kawashima, M., Nishida, N., Ohashi, J., Kimura, R., Fujimoto, A., Shimada, M., Morishita, S., Shigeta, T., Lin, L., Hong, S.C., Faraco, J., Shin, Y.K., Jeong, J.H., Okazaki, Y., Tsuji, S., Honda, M., Honda, Y., Mignot, E., & Tokunaga, K. (2008) *Nat. Genet.*, 40, 411-421.

青山 智英子
(獨協医科大学 生化学)

The function of choline kinase

Chieko Aoyama (Department of Biochemistry, Dokkyo Medical University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan)

蛍光プローブによるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) 動態の定量的測定—カルシウムオシレーションと IP₃ 動態—

1. はじめに

Ca²⁺は様々な細胞反応を制御する細胞内メッセンジャーであり、細胞増殖や分化、エネルギー産生、アポトーシス、分泌などの細胞機能の調節に関与している¹⁾。最近の20年の間に、高速・高解像度のイメージング技術の発達

により細胞内のCa²⁺反応をリアルタイムで可視化することが可能になり、様々な細胞でCa²⁺ウェーブやオシレーションなどの複雑なパターンを持ったCa²⁺シグナルが発生することが明らかになってきた。このような時間・空間的パターンを持ったCa²⁺シグナルによって、多彩な細胞機能が調節されると考えられている。

Ca²⁺シグナルの発生には、細胞外から細胞質にCa²⁺を流入させる様々なCa²⁺チャネルに加えて、細胞内ストアからCa²⁺を放出するチャネルであるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) 受容体やリアノジン受容体が関与する。特に非興奮性細胞におけるCa²⁺応答では、IP₃受容体を介するCa²⁺放出が重要な役割を担っている。近年、Ca²⁺シグナルを調節する重要な細胞内メッセンジャーであるIP₃をリアルタイムで計測できる蛍光プローブが開発され²⁻⁴⁾、時間・空間的Ca²⁺シグナルとIP₃動態の関係を解析することが可能になった。本稿では、このIP₃蛍光プローブとそれらを用いた新しいIP₃測定法を紹介する。さらに、このIP₃測定法によって明らかになってきた細胞内のIP₃動態とCa²⁺オシレーションとの関係⁵⁾について解説する。

2. IP₃ 蛍光プローブの開発

IP₃はホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 (PIP₂) の加水分解によって産生され、細胞内Ca²⁺チャネルであるIP₃受容体を活性化することによって細胞内ストアからのCa²⁺放出を調節する情報伝達分子である。IP₃の産生系としては、Gタンパク共役型レセプターを介して活性化されるホスホリパーゼC (PLC) βがよく知られているが、それ以外にもT細胞レセプターやB細胞レセプター刺激によるチロシンリン酸化酵素を介して活性化されるPLCγが知られている。

従来のIP₃測定では、³H-D-ミオイノシトールの代謝で生成されたIP₃を陰イオン交換カラムや高速液体クロマトグラフィーを使って分離・定量する方法や、IP₃結合タンパク質を使ったバインディングアッセイが使われてきた。しかし、Ca²⁺ウェーブやCa²⁺オシレーションに代表される時間・空間的に制御されたCa²⁺シグナルとIP₃の関係を解析するためには、単一細胞レベルで細胞内IP₃濃度 ([IP₃]_i) 変化の測定ができる蛍光プローブを使ったIP₃測定法が必要である。

蛍光による [IP₃]_i 変化の測定に初めて利用されたのは、蛍光タンパク質 GFP と PLCδ の PH ドメインの融合タンパク質 (GFP-PHD) である⁶⁾。PLCδ の PH ドメインは、PIP₂ と結合する特性を持っており、PIP₂ をモニターする蛍光プ