

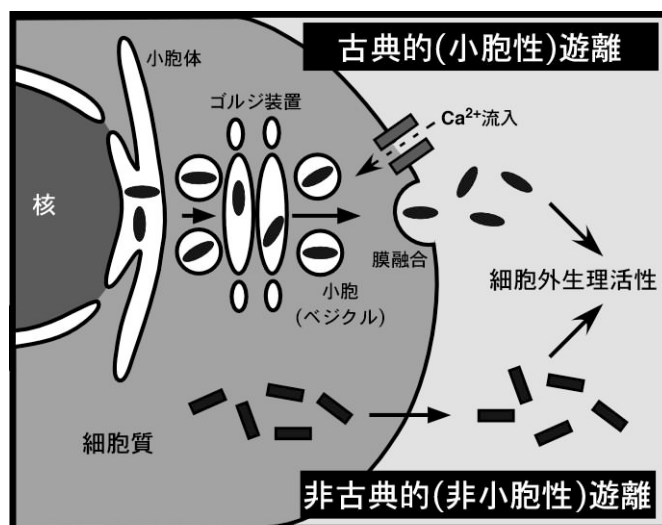
論文内容の要旨

酸性線維芽細胞増殖因子:FGF-1 のストレス誘発性 非小胞性遊離機構とカルシウムイオンの関与

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 松永 隼人

[目的]

タンパク質の遊離の多くは、分泌小胞がカルシウムイオン (Ca^{2+}) 依存的に細胞膜融合するエクソサイトーシスによって細胞外へと輸送される。この機構には翻訳されたタンパク質がシグナルペプチドを有することを必要とする。シグナルペプチドを有するタンパク質は‘小胞体-ゴルジ装置’を介して小胞内へと移行し、細胞外へと輸送される。このメンブレントラフィックを介した遊離機構は古典的遊離機構と呼ばれる。しかしながら、いくつかの細胞外に存在するタンパク質はシグナルペプチドを有していない。このことは分泌小胞非依存的に遊離されていることを意味し、非古典的遊離機構または非小胞性遊離機構と呼ばれている。酸性線維芽細胞増殖因子 (FGF-1) は多様な細胞外活性が知られているが、その遊離機構はほとんど理解されていない。しかも、FGF-1 はシグナルペプチドを有さないことから、この遊離は非小胞性遊離機構によると考えられてきた。興味深いことは、FGF-1 が細胞ストレスに応答して遊離することである。本研究は、脳神経系細胞における FGF-1 の非小胞性遊離の分子機構解明を目的として行い、 Ca^{2+} 依存性のタンパク質間相互作用がこの遊離を制御することを明らかにした。



古典的遊離機構と非古典的遊離機構によるタンパク質遊離

[結果]

1. FGF-1は飢餓ストレスにより、アストログリア細胞, NG108-15神経細胞いずれからも遊離もしくは遊離増強されることを見出した。ストレス負荷アストログリア培養上清に FGF-1 結合 10 kDa タンパク質を見出し, MALDI-TOF 解析より Ca^{2+} 結合タンパク質 S100A13 を同定した。
2. FGF-1 と S100A13 の相互作用は Ca^{2+} 濃度依存性であり, S100A13 の C 末端領域がこの結合に必須であった。また, FGF-1 との相互作用欠失変異体を細胞に過剰発現させるとストレス誘発性の FGF-1 の遊離が抑制された。
3. ストレス誘発性の FGF-1 と S100A13 の遊離は, 細胞内, 細胞外 Ca^{2+} キレート剤により抑制され, また電位開口性 N 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤である ω -conotoxin GVIA でもこの遊離は抑制された。
4. 飢餓ストレスによって不連続な振幅をもつ細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察された。この Ca^{2+} 濃度上昇は N 型 Ca^{2+} チャネル開口を介した小胞体からの Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) が関与することが判明した。
5. 細胞内 FGF-1 と S100A13 の相互作用を FRET 解析により検討したところ, その相互作用は N 型 Ca^{2+} チャネル開口依存的であった。

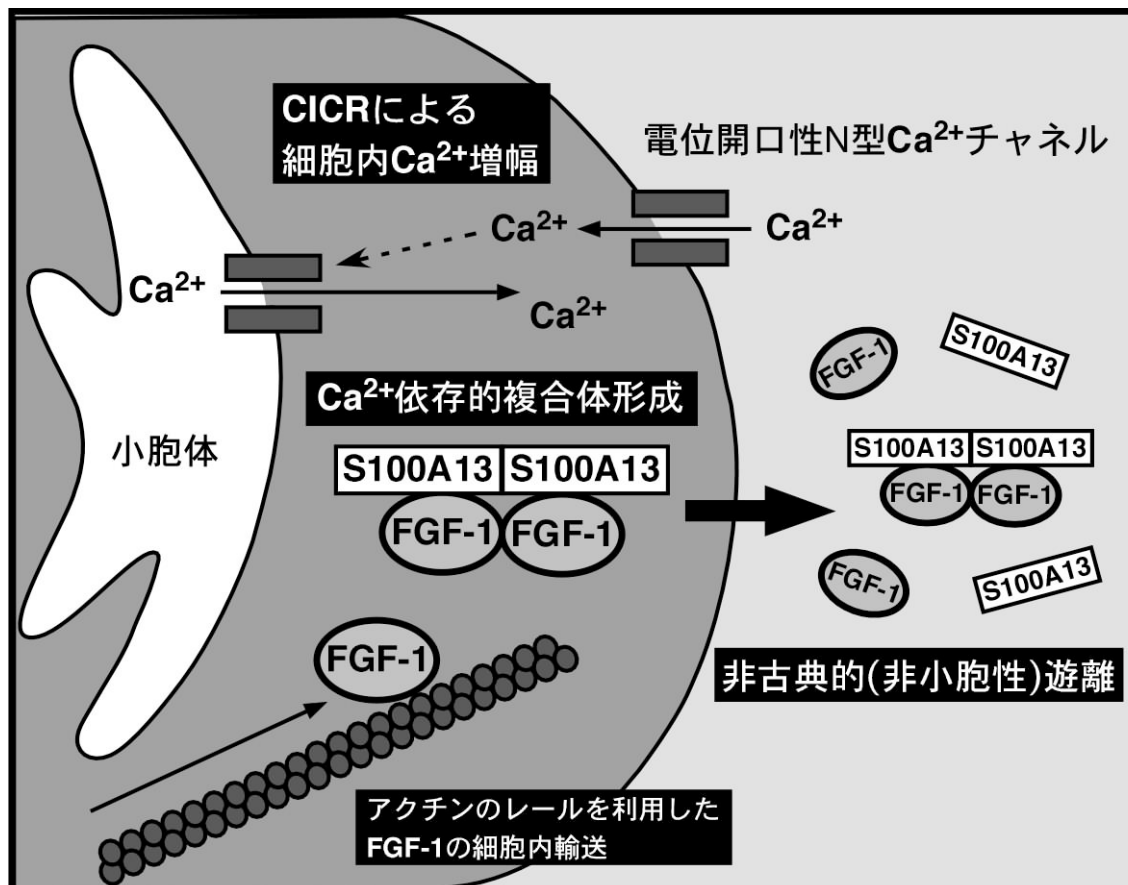
[考察]

本研究では, 脳神経系細胞における細胞飢餓ストレス応答性の FGF-1 の遊離について検討を行った。観察された FGF-1 の遊離は少なくともストレス負荷 30 分後には始まり, 最終的には細胞内量の実に 70% 近くが細胞外へ放出されるという即時応答型の遊離であった。FGF-1 がその細胞外作用として神経保護・血管新生・神経新生を有することから, 脳虚血などの脳障害ストレスから「脳を守る」為に非小胞性遊離機構が活性化されるという仮説が浮かぶ。

今回, FGF-1 のストレス誘発性遊離機構は輸送担体 S100A13 との Ca^{2+} 依存的な相互作用によって制御されることが明らかとなった。観察された細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は CICR が関与しており, この CICR は N 型 Ca^{2+} チャネルによる Ca^{2+} 流入を増幅することが知られている。このことは, ストレスにより細胞内 Ca^{2+} 増幅の系が作動していることを意味し, FGF-1 と S100A13 の相互作用が 10~100 μM オーダーの Ca^{2+} を要求することから, N 型 Ca^{2+} チャネル直下における局所高濃度 Ca^{2+} こそが複合体

形成の鍵であることが予測される。FGF-1 の遊離機構の残された大きな謎は細胞膜通過過程であるが、本研究で FGF-1 遊離への関与を明らかとした N 型 Ca^{2+} チャンネル開口はシナプス小胞の細胞膜融合過程に必須の機構である。また、シナプス小胞タンパク質の一つが FGF-1 と共に精製されたという報告もある。これらのことは FGF-1 の非小胞性遊離機構が古典的遊離機構のタンパク質装置を部分的に共有する可能性を示唆しており非常に興味深い。

以上より、本研究ではタンパク質間相互作用解析を基に、FGF-1 の非小胞性遊離機構のタンパク質装置とそれを制御する Ca^{2+} について検討をおこなった。今後、プロテオミクスを駆使することでこの遊離機構の全貌が明らかとなると考えられ、生理学・病態学的意義の解明が期待される。



FGF-1の非小胞性遊離機構とカルシウムイオンの関与