

- 1) Resh, M.D. (2006) *Sci STKE*, 359, re14.
- 2) Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., & Bastiaens, P.I. (2005) *Science*, 307, 1746-1752.
- 3) Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G., & Hancock, J.F. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3, 368-375.
- 4) Wedegaertner, P.B. & Bourne, H.R. (1994) *Cell*, 77, 1063-1070.
- 5) El-Husseini, Ael-D., Schnell, E., Dakoiji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., Gauthier-Campbell, C., Aguilera-Moreno, A., Nicoll, R.A., & Brecht, D.S. (2002) *Cell*, 108, 849-863.
- 6) Bartels, D.J., Mitchell, D.A., Dong, X., & Deschenes, R.J. (1999) *Mol. Cell Biol.*, 19, 6775-6787.
- 7) Roth, A.F., Feng, Y., Chen, L., & Davis, N.G. (2002) *J. Cell Biol.*, 159, 23-28.
- 8) Roth, A.F., Wan, J., Bailey, A.O., Sun, B., Kuchar, J.A., Green, W.N., Phinney, B.S., Yates, J.R. 3rd, & Davis, N.G. (2006) *Cell*, 125, 1003-1013.
- 9) Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R.A., & Brecht, D. S. (2004) *Neuron*, 44, 987-996.
- 10) Keller, C.A., Yuan, X., Panzanelli, P., Martin, M.L., Alldred, M., Sassoè-Pognetto, M., & Lüscher, B. (2004) *J. Neurosci.*, 24, 5881-5891.
- 11) Huang, K., Yanai, A., Kang, R., Arstikaitis, P., Singaraja, R.R., Metzler, M., Mullard, A., Haigh, B., Gauthier-Campbell, C., Gutekunst, C.A., Hayden, M.R., & El-Husseini, A. (2004) *Neuron*, 44, 977-986.
- 12) Fukata, Y., Iwanaga, T., & Fukata, M. (2006) *Methods*, 40, 177-182.
- 13) Tsutsumi, R., Fukata, Y., Noritake, J., Iwanaga, T., Perez, F., & Fukata, M. (2009) *Mol. Cell Biol.* In press.
- 14) Tsutsumi, R., Fukata, Y., & Fukata, M. (2008) *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 456, 1199-1206.
- 15) Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T., & Igarashi, Y. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 474-483.
- 16) Fernández-Hernando, C., Fukata, M., Bernatchez, P.N., Fukata, Y., Lin, M.I., Brecht, D.S., & Sessa, W.C. (2006) *J. Cell Biol.*, 174, 369-377.

堤 良平¹⁾, 深田 優子^{1),2)}, 深田 正紀^{1),2)}

¹⁾自然科学研究機構 生理学研究所
細胞器研究系 生体膜研究部門,

²⁾科学技術振興機構 さきがけ

Protein palmitoylating enzymes

Ryouhei Tsutsumi¹⁾, Yuko Fukata^{1),2)}, and Masaki Fukata^{1),2)}

¹⁾Division of Membrane Physiology, Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan; ²⁾PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Chiyoda, Tokyo 102-0075, Japan)

STIM1 によるカルシウム応答の制御機構

1. はじめに

レセプターに対するリガンドの結合により誘導される細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) 濃度の変化は細胞機能の調節と深く関連する事象である。この過程はプロテインキナーゼの活性化により始動され、ホスホリパーゼ C (PLC) によるイノシトール 1,4,5-三リン酸 (InsP₃) の生成と InsP₃ の小胞体膜上 InsP₃ レセプター (InsP₃R) への結合により小胞体内に貯蔵された Ca²⁺ の細胞内遊離が促される。小胞体の容量から容易に想像されるように、貯蔵・遊離される Ca²⁺ は少量であり一過性の細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を引き起こすのみである。一例を挙げれば、NF-κB, JNK などは一過性の Ca²⁺ の上昇により活性化され、その後の遺伝子発現が誘導されるが、NFAT (nuclear factor of activated T cells) 依存性の遺伝子の転写は一過性の Ca²⁺ の上昇では十分に活性化されず、持続的に Ca²⁺ レベルが上昇することが必要である。従って、細胞内 Ca²⁺ レベルの増加を維持するためには細胞外からの Ca²⁺ 流入が求められ (細胞外 [Ca²⁺]: ~10⁻³M, 細胞内 [Ca²⁺] 定常状態: ~10⁻⁷M, 活性化状態: ~10⁻⁶M), これを司る機構がストア作動性カルシウム流入 (SOCE: store-operated calcium entry) である。SOCE は小胞体における Ca²⁺ の枯渇を感知して形質膜 Ca²⁺ チャネルを介した細胞外からの Ca²⁺ 流入を促す。小胞体内 Ca²⁺ 濃度に依存するこの現象は容量性 Ca²⁺ 流入 (capacitative calcium entry: CCE) あるいはカルシウム遊離活性化 Ca²⁺ 流入 (calcium-release-activated calcium entry: CRAC entry) とも呼ばれ、上述のように持続的な Ca²⁺ シグナルを担うメカニズムとして重要である。実際、機能的な SOC チャネルを欠損する免疫不全症患者由来の T 細胞 (ある程度は B 細胞においても) においてリンパ球活性化の重篤な不全が認められ、SOCE の重要性を示している¹⁾。最近同定された STIM1 (stromal interaction molecule 1) はこの過程において小胞体 Ca²⁺ レベルの低下を感知するセンサーとしての機能、および形質膜型 Ca²⁺ チャネルと考えられる Orail (別称 CRACM1) を活性化する機能を持つ²⁾。

2. SOCE のメカニズムと STIM1

SOCE のメカニズムに関して多くのモデルが提唱されて

きたが、骨格筋における興奮収縮関連過程において、形質膜の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルであるジヒドロピリジン受容体が細胞内リアノジン Ca^{2+} 遊離チャンネルと相互作用あるいは直接活性化するという知見から、Irvine は Ca^{2+} 流入の制御メカニズムとして小胞体 InsP_3R が形質膜の SOC チャンネルと直接相互作用する機構、すなわち小胞体における内腔 Ca^{2+} レベルの低下が InsP_3R の形態変化を誘導し形質膜に運ばれて形質膜チャンネルと直接相互作用をするモデルを提唱した³⁾。このモデルを支持する実際の実験的な証拠は得られていないが、卵母細胞における細胞内小器官再分布の観察から小胞体に近接した領域においてのみ SOCE が認められ、また形質膜周辺アクチンの重合を促進する薬剤で Ca^{2+} ストアと SOC チャンネルの相互作用が阻害されること、さらにアストロサイトにおいては SOCE が形質膜と小胞体が近接する部位で起こること、などの知見はいずれも STIM1 による SOCE 活性化のメカニズムもしくはモデルに繋がるものと考えられる。

STIM1 自体はストローマ細胞上の I 型膜貫通タンパク質であり、プレ B 細胞と相互作用しその生存を助長する分

子としてクローニングされたものである。ショウジョウバエ S2 細胞を用いた siRNA (small interfering RNA: RNA 干渉) スクリーニングの結果、STIM ノックダウン細胞では、小胞体カルシウム枯渇剤タブシガルギン (Thapsigargin: 細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させ SOC チャンネルを活性化させる) による SOCE が阻害されることが示された⁴⁾。また HeLa 細胞を用いた siRNA スクリーニングの結果、SOCE 関連分子として STIM1 および STIM2 (*Stim 1* と *Stim 2* の二つの遺伝子) が同定された⁵⁾。SOCE における STIM1 の寄与に関しては後述の我々の知見も含め疑問の余地はないが、STIM2 に関しては、1) HeLa 細胞において STIM2 のノックダウンは SOCE を軽度到低下させる、2) HEK293 細胞において *Stim 2* のノックダウンならびに強制発現は SOCE には影響がない、3) STIM2 を非常に高レベルで発現させると SOCE を阻害する、4) STIM2 は小胞体 Ca^{2+} ストアのより微細な変化を感知し非刺激定常状態における Ca^{2+} ストアの調節を行う、など様々な報告があり一定の見解に達していない。したがって STIM2 の生理機能に関しては今後の課題として残されている。

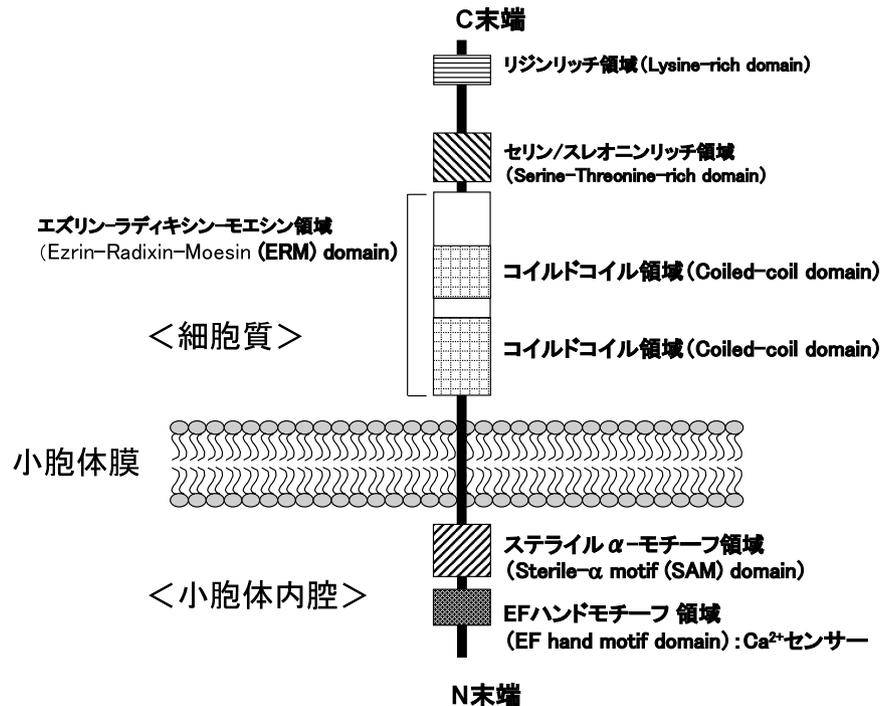


図1 STIM1 の模式図

STIM1 は主に小胞体膜に存在し、小胞体内腔に N 末端を有する一本鎖膜貫通型タンパク質である。図に示すように Ca^{2+} センサー機能を持つ EF ハンドモチーフ、ステライル α -モチーフ領域、コイルドコイル領域、セリン/スレオニンリッチ領域など幾つかの領域 (domain: ドメイン) から構成される。

STIM1の発現はユビキタスであり、主に小胞体膜に局在する一本鎖膜貫通型タンパク質である(図1)。小胞体内腔に位置する部位にCa²⁺を結合するEFハンドモチーフを持つが、この領域の点突然変異はCa²⁺ストアの状態によらず恒常的にSOCEを活性化させる(負荷電を持つAsp76, Asp78やGlu87がCa²⁺濃度の感知に重要である)。したがって、STIM1はEFハンドモチーフにおけるCa²⁺の結合・遊離を通じて小胞体におけるCa²⁺濃度センサーとして働いている。また、小胞体に局在していたSTIM1は小胞体Ca²⁺ストアの枯渇、すなわちEFハンドモチーフからのCa²⁺の遊離、により形質膜周辺部に移動し斑点状凝集体構造(puncta, ホモ多量体あるいはSTIM2分子とのヘテロ多量体クラスター)をとって再分布することが明らかにされている⁵⁾。点状構造の形成の数十秒後にはSOCE/CCEが開始され⁶⁾、また細胞辺縁への再分布は細胞外Ca²⁺の存在に依存せず、小胞体Ca²⁺ストアにのみ依存することも明らかにされている。従ってSTIM1はSOCEを始動させる際に極めて重要である。さらに図1に示すようにSTIM1にはEFハンドモチーフに加えステライル α -モチーフ領域、コイルドコイル領域、セリン/スレオニンリッチ領域などがあるが、これらSTIM1各領域がpuncta形成およびその後のSOCEとどのような機能的関連を持つか、すなわちこれらが機能ドメインとして関与しているか、を解析することもまた極めて重要と思われる。

解明すべきもう一つの問題は、STIM1がSOCEを活性化する際どのような動態を示すか、という点である。STIM1は形質膜に挿入された形で形質膜に存在するSOCチャンネルと相互作用するのか、あるいは小胞体上に留まったままで形質膜近傍に移動し形質膜のSOCチャンネルと相互作用するのか、すなわちSTIM1がpunctaとして再分布する際の細胞内の局在に関する問題である。

STIM1が小胞輸送を通じて形質膜中に移行しているという報告⁷⁾、またSTIM1の一部が形質膜に存在しそこでSOCE機能の一翼を担っている可能性を示す報告が見られる⁸⁾。一方、抗体による細胞表面の染色、共焦点顕微鏡による観察、あるいはフローサイトメトリーにより、STIM1は形質膜近傍に移動するが形質膜中には認められないことが示され^{5,9)}、また、N末端に西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したSTIM1を用いた免疫組織電子顕微鏡の検討はSTIM1の形質膜局在を否定している⁶⁾。これらのポイントに関して、我々はSTIM1の各領域欠損変異体を作成し、SOCEにおける機能ドメインとしての関与および輸送動態と細胞内の局在を検討した。

3. STIM1によるSOCEの制御—SOCチャンネル活性化とpuncta形成におけるSTIM1機能ドメインの関与—

前述のようにSTIM1のCa²⁺センサー領域は小胞体内腔に向けられたN末端のEFハンドモチーフである。それでは他のSTIM1領域はどのような機能を持つのであろうか。我々はSTIM1をノックアウトしたDT40B細胞に各領域欠損変異体STIM1を発現させる系を用いてこれらの問題を検討した¹⁰⁾。

STIM1欠損DT40B細胞(STIM1の欠損はDNA, RNA, タンパク質レベルで検証済み)は細胞表面B細胞受容体(BCR, 細胞表面イムノグロブリン)の発現に関しては野生型DT40B細胞と同様であることを確認の上、実験を進めた。STIM1欠損DT40B細胞においてBCRあるいはタブシガルギン刺激後のCa²⁺流入が著明に抑制され、一方、STIM1欠損DT40B細胞にFlagタグ標識STIM1を導入した細胞ではコントロールの野生型DT40B細胞以上のCa²⁺流入が観察された。このケースでは、*Stim1*遺伝子はノックアウトされているため、Flag標識STIM1は野生型STIM1が存在しない条件で機能している。従ってSTIM1欠損DT40B細胞に種々の変異体タイプのSTIM1を導入する我々の手法はSTIM1の各領域の機能を評価する上で適当なシステムと考えられる。

SOCチャンネルはCa²⁺遊離活性化Ca²⁺チャンネル(Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel: CRACチャンネル)でありパッチクランプ法によりCRAC電流(I_{CRAC})を測定することができる。STIM1欠損DT40B細胞では I_{CRAC} が野生型DT40B細胞に比べ低下し、野生型STIM1の導入は I_{CRAC} を増加させる。また、2mM Ca²⁺存在下で野生型DT40B細胞はBCR刺激で、CRACより誘導されるCa²⁺振動が認められるが、STIM1欠損DT40B細胞ではCa²⁺振動がほぼ完全に阻害されている。これらの知見から、我々のシステムにおいてもSTIM1はCRACチャンネルによるCa²⁺流入、すなわちSOCEに必須であることが明確に示され、またB細胞における長期Ca²⁺振動の生成に寄与していることも推定された。

STIM1の他の領域の機能を解析するため、STIM1欠損DT40B細胞にFlag標識STIM1の各領域を欠損するもの、すなわちコイルドコイル領域、セリン/スレオニンリッチ領域、ステライル α -モチーフ領域、を欠損するSTIM1を発現させ、これらのSTIM1変異体がCa²⁺流入を回復させるかを次に検討した。BCR刺激あるいはタブシガルギン処理によるCa²⁺流入はコイルドコイル領域あるいはセリ

ン/スレオニンリッチ領域を欠損する STIM1 では見られず、またステライル α -モチーフ領域欠損 STIM1 では Ca^{2+} 流入の回復が、特に BCR 刺激の場合、僅かに認められるのみであった。これらの結果は STIM1 による SOC チャネルの活性化にはコイルドコイル領域、セリン/スレオニンリッチ領域、ステライル α -モチーフ領域が必要であることを示している。

STIM1 による SOCE の活性化が形質膜に存在する SOC チャネル (CRAC チャネル) との相互作用に依存するものであるなら、この点に関与する STIM1 の機能ドメインを解析するため野生型 STIM1 および各領域欠損変異体の細胞内動態の比較が必要であり、BCR 刺激の前後でこれら STIM1 変異体の分布を免疫蛍光染色により検討した。定常状態においては、野生型 Flag 標識 STIM1 は小胞体マーカーであるカルネキシンと共に分布しており、BCR 刺激あるいはタブシガルギンにより形質膜近辺もしくは形質膜内に puncta を形成して再分布する。しかしながら、Flag 標識 STIM1 変異体はどの領域を欠損させても BCR あるいはタブシガルギン刺激後の puncta 形成が阻害されており、puncta 形成に伴う STIM1 の形質膜近辺もしくは形質膜内への再分布が SOC チャネルの活性化に必須であることが強く示唆される。

さらに STIM1 の局在に関しては、Flag 標識 STIM1 の細胞外領域を認識する抗体を用いたフローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡による解析、およびエキソサイトーシスを阻害するプレフェルディンは puncta 形成および SOCE に影響しないことなどから、BCR により誘導される STIM1 の puncta 形成は形質膜内ではなく、形質膜内側近傍で起こることが推測された。すなわち Flag 標識 STIM1 は形質膜には検出されないが、形質膜近辺に再分布することにより SOCE を十分にサポートしていることになる。

STIM1 の分布あるいはその動態をより明確にするため細胞質部分が狭隘である DT40B 細胞に換えて HeLa 細胞に GFP 標識した野生型 STIM1 を導入し検討を行った。その結果、ほとんどの GFP 標識 STIM1 は小胞体マーカーであるカルネキシンとともに分布するが、少数の GFP 標識 STIM1 はこの分布パターンをとらず、定常状態の細胞において STIM1 は小胞体全体に加え特種なサブコンパートメントに分布していることが示唆された。ヒスタミンもしくはタブシガルギンにより Ca^{2+} ストア枯渇を誘導すると GFP 標識 STIM1 は puncta となり形質膜に近接した小胞体のごく近傍に濃縮された形で再分布する。細胞内器官特異的マーカーとの二重染色による比較検討により puncta は

小胞体内の独立した領域、特種なサブコンパートメントに分布することが推測され、これは SOC チャネルを制御する Ca^{2+} のプールは小胞体中の小さな構成成分であるとするこれまでの報告に一致する¹¹⁾。

全反射蛍光顕微鏡システム (total internal reflection fluorescence microscopy: TIRFM) はエバネッセント光を励起光として形質膜から 100nm 以内の蛍光分子を選択的に励起することができ微小蛍光であってもこれを解析することが可能である。このシステムを生細胞に適応し、ライブセルイメージングを行い、STIM1 の各機能ドメインの puncta 形成における関連をさらに解析した結果、定常状態では STIM1 はコイルドコイル領域、セリン/スレオニンリッチ領域が機能することにより管状小胞状の形態をとり、彗星のごとく運動しているように観察される。HEK293 細胞においても STIM1 が微小管に沿った小繊維状あるいは管状のパターンをとる。さらにステライル α -モチーフ領域を欠損する変異体型 GFP-STIM1 は管状小胞状の形態をとって動くが、BCR 刺激後の形質膜近傍への集積は認められないことから、BCR 刺激後の puncta 形成と集積にはこれらの領域に加えステライル α -モチーフ領域が必要であることが判明し、これまでの結果が確認された。またノコダゾール処理の結果、定常状態において管状小胞状挙動を示す STIM1 のユニークな分布様式は微小管に依存していることが明らかとなった。しかし、この定常状態の動的挙動がどう puncta 形成や SOCE 活性化に関与するのかは分かっておらず、今後の課題である。

4. SOCE チャネルと Orai1

PLC の下流で活性化されることなどから SOC チャネル担当分子として一過性受容体電位チャネル (TRP: transient receptor potential) が想定され、HEK293 細胞を用いた実験では InsP_3 を介した Ca^{2+} ストアと SOC チャネルとしての TRP (TRP3) の活性化が報告されている¹²⁾。しかしながら TRPC は通常のサイズのシングルチャネルのイオンコンダクタンスを持つが、SOC 電流として捉えられる I_{crac} はイオンコンダクタンスが極小であることなどから、現在 TRP が SOC チャネル本体である可能性は低いと考えられており、SOC チャネルとしては新たに同定された Orai1 が候補として挙げられている¹³⁾。Orai1 は四つの膜貫通領域を有する膜タンパク質であり Orai1 と STIM1 の共発現により I_{crac} 様電流が観察されることから、Orai1 は CRAC チャネルそのものかあるいはその小孔形成サブユニットであるこ

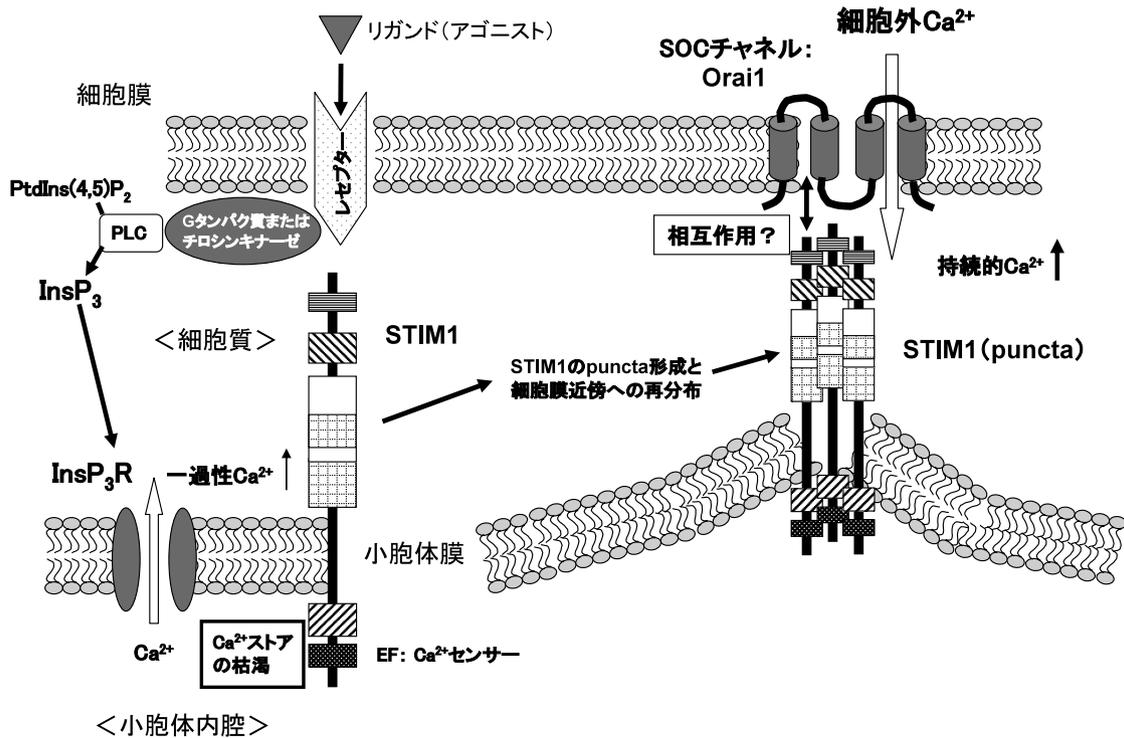


図2 STIM1によるSOCEの誘導

リガンド(アゴニスト)がレセプターに結合するとGタンパク質あるいはチロシンキナーゼを介してPLCの活性化が誘導され、PtdIns(4,5)P₂が加水分解された結果生成するInsP₃が小胞体のInsP₃Rに結合することにより小胞体内に貯蔵されたCa²⁺の遊離を促す。小胞体内Ca²⁺レベルの減少はSTIM1(EFハンドモチーフ)により感知され、またSTIM1は形質膜近傍にpunctaを形成して再分布し、SOCE(CRAC)チャネルと想定されるOrai1と相互作用してSOCEの活性化を促す。その結果細胞外からCa²⁺が持続的に流入し、細胞内Ca²⁺濃度を維持することにより遺伝子発現など種々の細胞機能の発現を誘導する。

とが推測された。おそらくCa²⁺センサーであるSTIM1はpunctaを形成してOrai1に接近し(あるいはOrai1がpunctaを形成したSTIM1に接近し)Ca²⁺枯渇という情報をOrai1に提供しSOCチャネルを活性化するとと思われる(図2)。実際STIM1は形質膜に10-25nmに近接して分布していることが示され、またCa²⁺流入はOrai1とSTIM1が近接した形質膜の領域に局限して起こることも報告されている⁶⁾。

5. 終わりに

STIM1によるカルシウム応答の制御機構をレビューするとともに、STIM1欠損DT40B細胞に種々の変異体STIM1を導入するシステムによりSTIM1の各領域の機能を解析する研究を紹介してきた。最後に我々が最近明らかにした肥満細胞の活性化におけるSTIM1の関与について概説してこの稿を終えることにする。肥満細胞の脱顆粒には細胞内Ca²⁺の上昇が関与するが、この過程もまたSOCEにより担われている。STIM1欠損マウス(*Stim1*^{-/-})由来

の肥満細胞ではSOCEの障害によりCa²⁺流入および細胞内Ca²⁺の上昇が野生型肥満細胞に比し著しく抑制され、細胞内Ca²⁺の低下により脱顆粒機能が阻害される。またSTIM1の発現レベルが低下したヘテロ接合体マウス(*Stim1*^{+/-})ではIgE依存性アレルギー反応(アナフィラキシー反応)による血管透過性上昇が著しく抑制される¹⁴⁾。さらにOrai1欠損マウス由来の肥満細胞においてもSOCEの阻害および脱顆粒の減少やアレルギー反応の減弱が認められ¹⁵⁾、肥満細胞の機能発現にもSTIM1あるいはOrai1に依存したSOCEが重要であることが明らかにされた。しかしながら、我々が解析してきたDT40B細胞、肥満細胞を含め、Orai1とSTIM1の相互作用の詳細は未だ不明であり、またSOCEの際、他のCa²⁺チャネルやCa²⁺マイクロドメイン(局所的高Ca²⁺濃度領域)の関与など、今後解明されるべき点は多く残されており、今後の研究のさらなる進展が期待される。

- 1) Feske, S., Prakriya, M., Rao, A., & Lewis, R.S. (2005) *J. Exp. Med.*, **202**, 651–662.
- 2) Lewis, R. (2007) *Nature*, **446**, 284–287.
- 3) Irvine, R.F. (1990) *FEBS Lett.*, **263**, 5–9.
- 4) Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S. L., Cahalan, M.D., Veligelebi, G., & Stauderman, K.A. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 435–445.
- 5) Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E. Jr., & Meyer, T. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 1235–1241.
- 6) Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M., & Lewis, R.S. (2006) *J. Cell Biol.*, **174**, 803–813.
- 7) Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, L.M.H., Stauderman, K.A., & Cahalan, M.D. (2005) *Nature*, **437**, 902–905.
- 8) Spassova, M., Soboloff, J., He, L.-P., Xu, W., Dziadek, M., & Gill, D.L. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 4040–4045.
- 9) Mercer, J.C., DeHaven, W.I., Smyth, J.T., Wedel, B., Boyles, R.R., Bird, G.S., & Putney, J.W. Jr. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 24979–24990.
- 10) Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 16704–16709.
- 11) Wisnoskey, B.J., Sinkins, W.G., & Schilling, W.P. (2003) *Biochem. J.*, **372**, 517–528.
- 12) Ma, H.-T., Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., Gill, D.L. (2000) *Science*, **287**, 1647–1651.
- 13) Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., & Rao, A. (2006) *Nature*, **441**, 179–185.
- 14) Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 81–88.
- 15) Vig, M., DeHaven, W.I., Bird, G.S., Billingsley, J.M., Wang, H., Rao, P.E., Hutchings, A.B., Jouvin, M.H., Putney, J.W., & Kinet, J.P. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 89–96.

馬場 義裕^{1,2)}, 黒崎 知博^{1,2)}

¹⁾大阪大学免疫学フロンティア研究センター

分化制御研究室,

²⁾理化学研究所 横浜研究所

免疫・アレルギー科学総合研究センター

分化制御研究グループ

Regulation of store-operated calcium entry by STIM1
Yoshihiro Baba^{1,2)} and Tomohiro Kurosaki^{1,2)} ¹⁾Laboratory for Lymphocyte Differentiation, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University; ²⁾Laboratory for Lymphocyte Differentiation, RIKEN Research Center for Allergy And Immunology, 1–7–22 Suehiro-Cho, Tsurumi-Ku, Yokohama City, Kanagawa 230–0045, Japan)

インフルエンザウイルスレプリコンと宿主複製・転写因子

はじめに

ウイルスの複製と病原性発現機構の理解を目指した時、ウイルスが宿主の機能に完全に依存した寄生体であることに鑑みれば、ウイルスゲノムにコードされる因子と宿主に由来する因子(宿主因子)の機能とその相互作用を明らかにすることが重要である。

ウイルス因子の機能を解析するにあたり、ウイルス遺伝子に任意の変異を導入し、その変異遺伝子を含んだウイルスを作成して形質を調べる分子遺伝学的な方法が一般的である。宿主と同じゲノム様態、すなわち二本鎖DNAをゲノムとして持つウイルスでは容易に構築でき、実際用いられてきた方法である。細胞に人工的に導入した時に、一定の条件下で、感染性ウイルス粒子を産生できるウイルスゲノム核酸を「感染性ゲノム」と呼ぶ。従って、二本鎖DNAウイルスのゲノムは、一部の例外(ワクシニアウイルスなどは、細胞質で複製が進行するために、ゲノムの複製と転写を行う酵素を感染時に持ち込む必要がある)を除いて、感染性ゲノムである。mRNAと同じ極性(プラス極性、あるいはプラス鎖)のRNAをゲノムとして持つウイルスでは、感染直後からウイルス因子の翻訳が行われ、複製に必要なウイルスタンパク質が合成される。従って、プラス鎖RNAゲノムは感染性ゲノムである。一方、本稿でとりあげるインフルエンザウイルスなどの、mRNAと逆の極性(マイナス極性、あるいはマイナス鎖)のRNAをゲノムとして持つウイルスでは、精製したゲノムを細胞に導入しても、感染性粒子は産生されない。細胞には、ウイルスRNAを複製できるRNA依存性RNAポリメラーゼが存在せず、mRNAの鋳型では翻訳されることもないからである。ウイルスゲノムの転写・複製には、粒子に付帯しているウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼが必須である。マイナス鎖RNAゲノムに感染性を持たせるには、ウイルス粒子内に存在するウイルスRNAポリメラーゼを含んだウイルスゲノムRNA-タンパク質複合体(viral RNA-viral protein complex, vRNP)として細胞に導入するか、細胞内でvRNPを再構成させる必要がある。

一方、宿主因子については、ウイルスゲノムの複製と転写を再現できる無細胞系を構築し、生化学的な相補試験に