

【筋生理の集い】

## カルシウムによるカルシウム放出機構のファミリーヒストリー

飯 野 正 光

日本大学医学部細胞分子薬理学部門

(受付 2020年3月25日)

### FAMILY HISTORY OF CALCIUM-INDUCED CALCIUM RELEASE

Masamitsu IINO

*Division of Cellular and Molecular Pharmacology, Nihon University School of Medicine*

#### I. はじめに

骨格筋においてCa<sup>2+</sup>によるCa<sup>2+</sup>放出機構(CICR機構)を遠藤ら<sup>1)</sup>が報告してから13年後、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)によるCa<sup>2+</sup>放出機構が膵外分泌腺細胞でMichael Berridgeらにより報告された<sup>2)</sup>。当時、いずれのCa<sup>2+</sup>放出機構も分子実体が明らかでなく、両者の関係性も知られていなかった。次第に2つのCa<sup>2+</sup>放出機構の類似性が明らかになり、今日では同じ遺伝子が2通りに進化してきたものと想定されるに至るが、その経緯について関連する研究を進めてきた視点から述べたい(注1)。

#### II. 端緒となった平滑筋スキンドファイバー実験

遠藤らによるCICR機構の発見には、名取線維(スキンドファイバー)を用いた実験が主要な役割を果たした<sup>1)</sup>。遠藤研では、機械的に細胞膜を剥離する方法に加えて、サポニンを用いて「化学的に」スキンドファイバーを作製する方法<sup>3)</sup>が確立され、多細胞の集合体である平滑筋組織からもスキンドファイバー標本を作成することが可能となった<sup>4)</sup>。1984年当時、東京大学医学部薬理学教室の遠藤研で平滑筋スキンドファイバーを用いた

CICR機構解析が行われていたが、実験を進める上で大きな障害があった。骨格筋スキンドファイバーでCICRを解析する際は、筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出量を収縮張力で推定するバイオアッセイが可能だった。ところが、平滑筋スキンドファイバーでは、収縮系のCa<sup>2+</sup>感受性が時間とともに急速に低下するので骨格筋と同じ方法は使えなかった(注2)。そこで、Roger Tsienらによって開発された蛍光Ca<sup>2+</sup>指示薬<sup>5)6)</sup>を応用してCa<sup>2+</sup>放出量を測定する新たな方法(注3)を確立してこの問題を回避し、ようやく平滑筋でもCICR機構解析が行えるようになった<sup>7)</sup>。この解析を進めるうちに、Berridgeらの論文<sup>2)</sup>が発表されてからしばらくしてIP<sub>3</sub>によるCa<sup>2+</sup>放出のことが耳に入った。

#### III. IP<sub>3</sub> と Ca<sup>2+</sup>

薬理学教室に隣接する第二生化学教室から少量のIP<sub>3</sub>サンプルをいただき、Ca<sup>2+</sup>放出を起こすか平滑筋スキンドファイバーで試してみたが、Ca<sup>2+</sup>放出を観測することはできなかった。しばらくして、IP<sub>3</sub>が市販されるようになり、それを購入して試してみたが、結果は変わらなかった。IP<sub>3</sub>はBerridgeらが報告した膵外分泌腺では機能するものの、平滑筋ではCa<sup>2+</sup>放出を起こすことはないとはほぼ確信した頃に、予期せぬことがおきた。プロ

トコールを少し取り違えて予定と異なる実験を行なってしまったところ、強力なCa<sup>2+</sup>放出が観測されたのだ。何を間違えたか考えてみると、こういうことであった。私はCICRの実験をしていたので、Ca<sup>2+</sup>濃度はCa<sup>2+</sup>緩衝薬であるEGTAを使って厳密にコントロールしていた。また、IP<sub>3</sub>によるCa<sup>2+</sup>放出をCICRと区別して観測したいので、CICRは起きないようにCa<sup>2+</sup>濃度はゼロの状態にIP<sub>3</sub>を投与していた。この条件では、Ca<sup>2+</sup>放出を観測できなかった。ところが、IP<sub>3</sub>を投与する際にCa<sup>2+</sup>濃度をゼロから静止時の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度か、それよりやや上げた条件にしたところ、見事なCa<sup>2+</sup>放出が見えたのである (Fig. 1A)<sup>8)-10)</sup> (註4)。このことは、IP<sub>3</sub>によるCa<sup>2+</sup>放出は、IP<sub>3</sub>だけでは不十分で、IP<sub>3</sub>とCa<sup>2+</sup>の両方が同時に必要であることを明確に示していた (Fig. 1B)。つまり、IP<sub>3</sub>

によるCa<sup>2+</sup>放出機構は、IP<sub>3</sub>を必要とするCICR機構と言い換えることもできた。

このようにして発見したIP<sub>3</sub>によるCa<sup>2+</sup>放出のCa<sup>2+</sup>感受性に生理的意義があるのか確かめたいと考えた。CICRと同様の性質であるので、ポジティブフィードバック機構として機能すると予測はできるものの、そのためにはCa<sup>2+</sup>が即時的な促進作用を持つ必要がある。つまり、Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇してもCa<sup>2+</sup>放出速度が亢進するまでに何秒もかかるようでは、有効なポジティブフィードバックはかからない。そこで、ケージドCa<sup>2+</sup>を用いて過渡現象を観察することにし、約1ミリ秒の紫外線フラッシュを当てて急速にCa<sup>2+</sup>濃度を上昇させる装置を自作して実験を行なった。その結果、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇直後からCa<sup>2+</sup>放出速度が上昇することが明らかとなった<sup>11)</sup>。

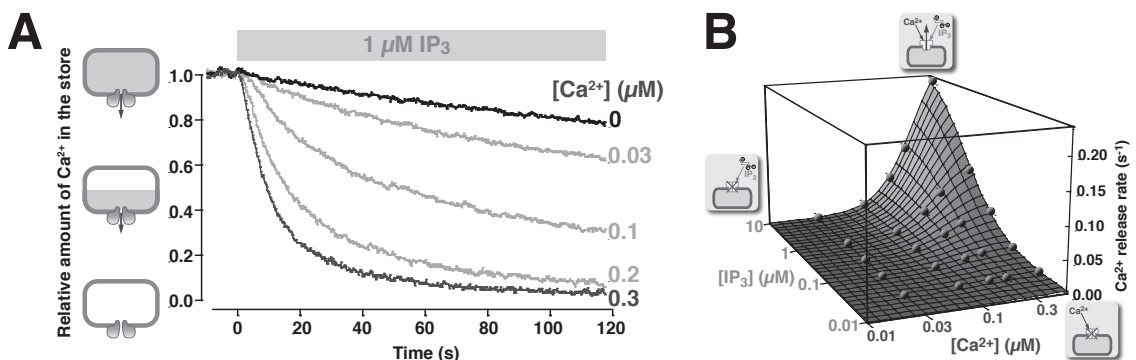


Fig. 1. IP<sub>3</sub>によるCa<sup>2+</sup>放出のCa<sup>2+</sup>感受性  
A 平滑筋スキンドファイバーにIP<sub>3</sub>と同時に低濃度のCa<sup>2+</sup>を投与するとCa<sup>2+</sup>放出速度が著明に高まる。  
B IP<sub>3</sub>とCa<sup>2+</sup>の両方がCa<sup>2+</sup>放出に必要なことを示す3次元グラフ。  
文献<sup>10)</sup>より改変。

<b>RyR1</b>	ELLKELLDLQKDMVVMLLSLLE	4032	EGNVVNGMIARQMVDMLVE	4011-4050
<b>RyR2</b>	ELLKELMDLQKDMVVMLLSMLLE		EGNVVNGTIGKQMVDMLVE	3967-4006
<b>RyR3</b>	ELLKQLLDLLQDMVVMLLSLLE		EGNVVNGTIGKQMVDTLVE	3864-3903
<b>IP<sub>3</sub>R1</b>	KRMDLVLELKNNAASKLLLAIME	2100	SRHDSENAERILYNMRP	2079-2117
<b>IP<sub>3</sub>R2</b>	YRMDLVLQKKNNAASKLLLAIME		SRHDSENAERILFNMRP	2032-2070
<b>IP<sub>3</sub>R3</b>	YRMDLVLQKKNNAASKLLLAIME		SRHDSENAERILISLRP	1983-2021

Fig. 2. RyRとIP<sub>3</sub>RのCa<sup>2+</sup>センサー領域  
全てのRyR及びIP<sub>3</sub>Rサブタイプ遺伝子でCa<sup>2+</sup>センサー領域の一次構造は相同性が高い。  
文献<sup>15)</sup>より改変。

この結果で、ポジティブフィードバックがかかることがより確からしくなったものの、これに生理的な意義があることの証拠が欲しい。どうすればそれが証明できるのか考えた末、IP<sub>3</sub>感受性は変えずにCa<sup>2+</sup>感受性だけを低下させ、それによって細胞の生理的Ca<sup>2+</sup>応答に生じる変化を観測できれば確かな証拠になると考えた。1989年になるとCICR機構とIP<sub>3</sub>によるCa<sup>2+</sup>放出機構の分子実体であるそれぞれリアノジン受容体 (RyR) とIP<sub>3</sub>受容体 (IP<sub>3</sub>R) の両方の遺伝子クローニングが報告された<sup>12)13)</sup>。RyRは約5,000個のアミノ酸、IP<sub>3</sub>Rは約2,700個のアミノ酸からなる分子で、共に4量体でチャネルを形成することがわかった。その後、両者とも3つのサブタイプ (1型~3型) 遺伝子からなることがわかった。

私の予想として、IP<sub>3</sub>R分子のどこかにCa<sup>2+</sup>結合部位が存在し、そこにCa<sup>2+</sup>が結合するとチャネルが活性化すると考えた。とすれば、Ca<sup>2+</sup>結合部位に変異を加えるとCa<sup>2+</sup>感受性だけ変えられるかもしれない。しかし、高親和性のCa<sup>2+</sup>結合構造として有名なEFハンド構造はIP<sub>3</sub>R分子中に見られず、一次構造だけからCa<sup>2+</sup>センサー部位を推定することはできなかった。そのような時、David MacLennanのグループのリアノジン受容体1型 (RyR1) の4,032番目のグルタミン酸 (E4032) がRyR1のCa<sup>2+</sup>センサーであるとの報告<sup>14)</sup>を見つけた<sup>(注5)</sup>。もしかして、類似のセンサーがIP<sub>3</sub>受容体上にもないか、一次構造のアラインメントを調べてみた。すると、よく似た一次構造がIP<sub>3</sub>受容体1型 (IP<sub>3</sub>R1) にもあることがわかった。しかも、この位置は全てのRyR遺伝子とIP<sub>3</sub>R遺伝子で良く保存されていて、重要な部位だろうと予想できるものだった (Fig. 2)<sup>15)</sup>。一次構造のアラインメントによりRyR1のE4032に対応するのはIP<sub>3</sub>R1のE2100であることがわかった<sup>(注6)</sup>。これをRyRの場合と同様に別のアミノ酸に変更してCa<sup>2+</sup>感受性に変化があれば、Ca<sup>2+</sup>センサーとしての明確な証明になる。ところが克服すべき問題があった。

RyRは主として興奮性細胞に発現しているが、IP<sub>3</sub>Rは非興奮性細胞を含め全ての細胞に発現している。従って、どのようなセルラインを用いても細胞に発現させると、内在性のIP<sub>3</sub>Rの反応か、外から導入したIP<sub>3</sub>Rの反応か区別することがで

きない。明確な結果を得るためには、IP<sub>3</sub>Rを全く発現していない細胞が必要であるが、そのような細胞はこの世に存在していなかった。そこで着目したのが、DT40細胞であった。これはニワトリのB細胞由来の細胞株で、相同組み替えが起こりやすいことで有名であった。DT40細胞にはIP<sub>3</sub>R1、IP<sub>3</sub>R2、IP<sub>3</sub>R3全てが発現していたが、当時関西医科大学の黒崎知博教授にお願いして、3つの遺伝子のうち2つを相同組換えで潰して、一つだけのサブタイプを発現するようにした細胞を全種類作製してもらって解析していた<sup>16)</sup>。これをさらに進め、全てのサブタイプを欠損させたIP<sub>3</sub>R-null DT40細胞の作製を依頼して作っていた。

これでようやく準備が整い、IP<sub>3</sub>R1の想定Ca<sup>2+</sup>センサーであるグルタミン酸をアスパラギン酸に変異させたE2100D-IP<sub>3</sub>R1をIP<sub>3</sub>R-null DT40細胞に発現させたところ、予想は的中し、Ca<sup>2+</sup>感受性は10倍以上低下したが、IP<sub>3</sub>感受性にはほとんど変化がなかった (Fig. 3B)<sup>15)</sup>。このことから、この部位がCa<sup>2+</sup>感受性を決める重要な部位であることは明らかだった<sup>(注7)</sup>。さらに、このE2100D-IP<sub>3</sub>R1を発現する細胞を用いれば、Ca<sup>2+</sup>感受性のCa<sup>2+</sup>応答における意義を明らかにできる。実際、アゴニスト刺激後のCa<sup>2+</sup>濃度上昇速度が明確に低下した (Fig. 3C Inset)。これは、自己再生産的なCa<sup>2+</sup>放出が実際に起きていることを如実に物語っていた。また、Ca<sup>2+</sup>オシレーションもみられなくなった (Fig. 3C)<sup>15)</sup>。これによってCa<sup>2+</sup>オシレーション形成にも自己再生産的なCa<sup>2+</sup>放出が必須の働きをしていることが示された。

#### IV. Ca<sup>2+</sup>感受性の生理的意義

単離平滑筋細胞をアゴニストで刺激した際のCa<sup>2+</sup>応答を観察して、細胞内でCa<sup>2+</sup>ウェーブが生じ、ほぼ「全か無か」の応答が得られることを明らかにしていたが (Fig. 4A)<sup>17)</sup>、これも自己再生産的なCa<sup>2+</sup>放出でよく説明できる。つまり、アゴニスト刺激でIP<sub>3</sub>が細胞内で上昇しただけではCa<sup>2+</sup>放出は起こらない、しかし、細胞の一部でCa<sup>2+</sup>放出が起こり始めるとそれが付近のIP<sub>3</sub>受容体を活性化し、ちょうどミノ倒しのように細胞

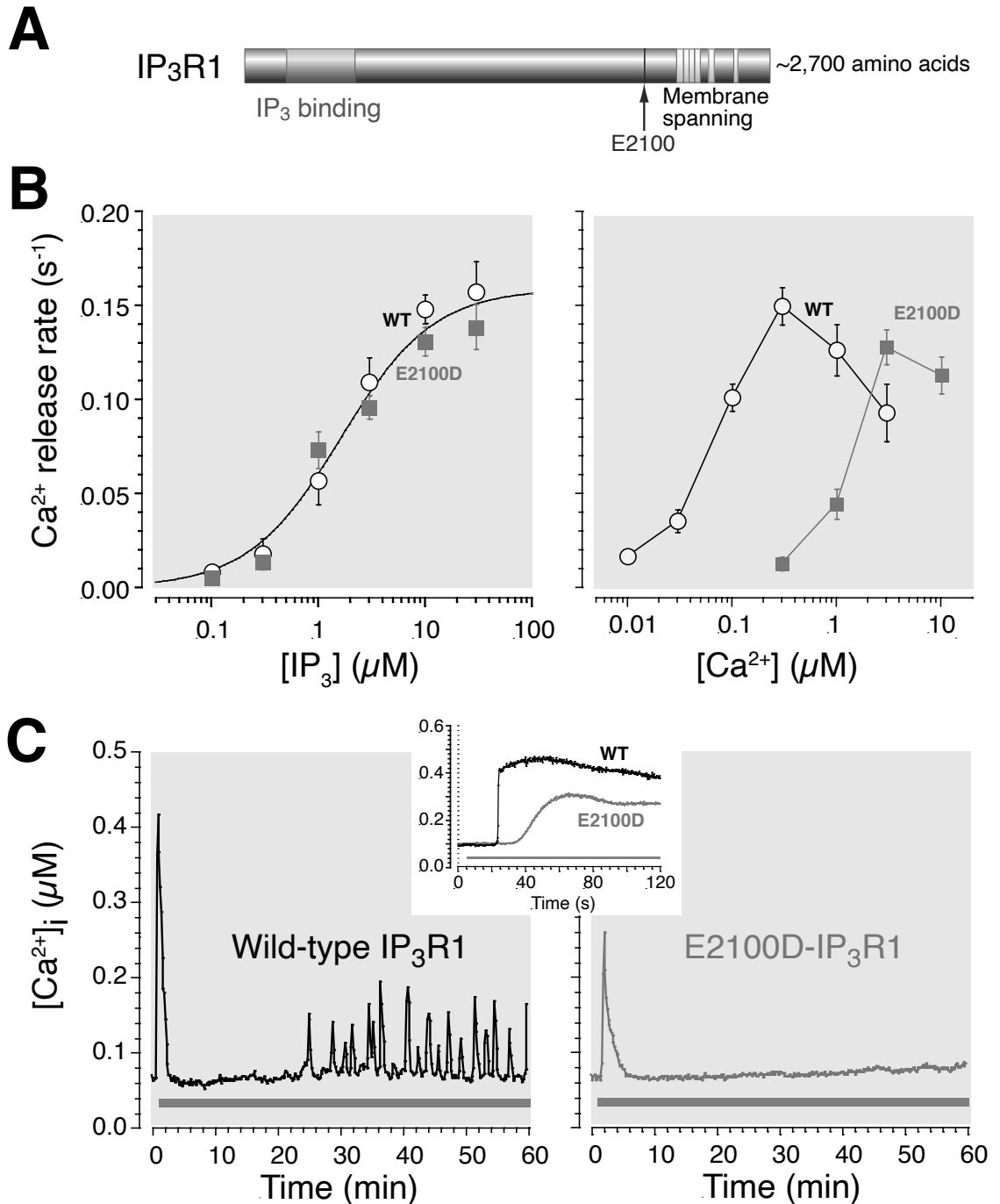


Fig. 3. IP<sub>3</sub>R1のCa<sup>2+</sup>センサーは、Ca<sup>2+</sup>動態に強く影響する

A IP<sub>3</sub>R1の一次構造の模式図

B 野生型およびE2100D変異IP<sub>3</sub>RのIP<sub>3</sub>感受性(左)とCa<sup>2+</sup>感受性(右)

C 野生型IP<sub>3</sub>R1を発現する細胞ではCa<sup>2+</sup>オシレーションが見られるが、E2100D変異IP<sub>3</sub>R1を発現する細胞では、初回の反応だけが見られオシレーションは見られない。また、初回のCa<sup>2+</sup>濃度上昇速度には非常に大きな差がある (Inset)。文献<sup>15)</sup>より改変。

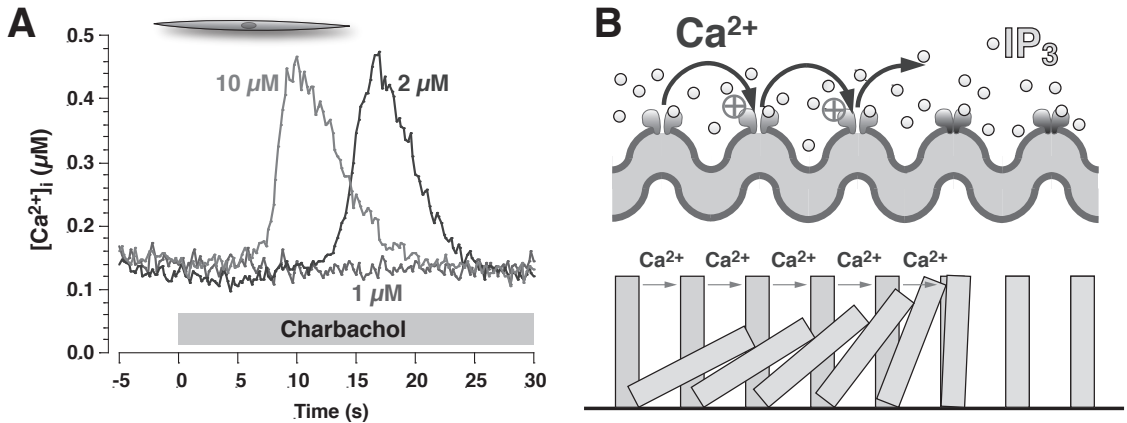


Fig. 4. 単離平滑筋細胞のアゴニストに対する  $Ca^{2+}$  応答  
 A: 単離平滑筋細胞の Carbachol に対する「全か無か」の  $Ca^{2+}$  応答  
 B:  $IP_3$ R の  $Ca^{2+}$  感受性により、細胞の一部で  $Ca^{2+}$  放出が起こるとそれが近接する部位の  $Ca^{2+}$  放出を「ドミノ倒し」のように惹起して  $Ca^{2+}$  ウェーブが生じ全か無かの応答を引き起こすと考えられる。  
 文献<sup>17)18)</sup>より改変。

全体に波及する。これが  $Ca^{2+}$  ウェーブであり、ドミノ倒しと同じように「全か無か」の応答となると考えることができる (Fig. 4B)<sup>18)</sup>。

この、自己再生産的な  $Ca^{2+}$  放出による「全か無か」応答に生理的意義があるのか、考えてみた。個々の平滑筋細胞の  $Ca^{2+}$  応答が「全か無か」ということであるとすると、平滑筋組織は個々の細胞では独立に「全か無か」の反応をしていて、全体としては動的平衡状態にあって微妙な収縮張力の調整が行われているのではないかと考え、平滑筋学会のシンポジウムで提唱した (Fig. 5A)。ところが、反応は冷ややかだった。私の発表がわるや

否や、学会の大御所の先生に「そんなことがあるはずない。だいたい、見てもいないのに見てきた様に言うな。」との手厳しい指摘を受けた。

その指摘は、悔しいけれども当を得たものだった。平滑筋細胞は相互にギャップジャンクションを作って電的に結合した「シンシチウム」を形成するので、細胞は同期して応答するというのが当時の常識であった。その常識に、明確な実験結果もなく想像だけで異を唱えたのだから叩かれたのは当然と言える。これに答えるには実験で「見てくる」しかないと考えた。実験対象として血圧制御に重要な役割を果たす動脈平滑筋細胞を選択

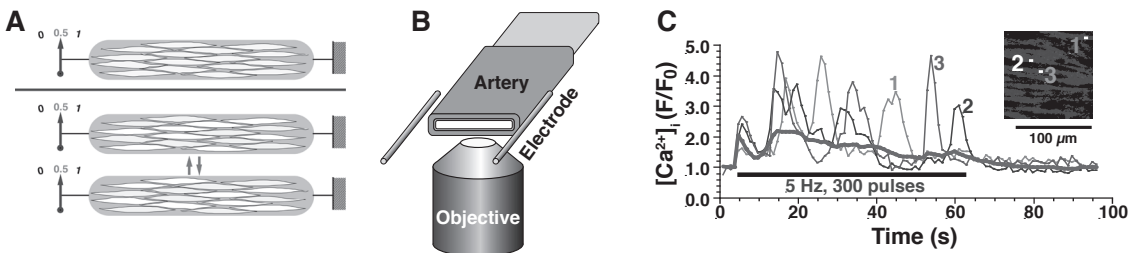


Fig. 5. 動的平衡による  $Ca^{2+}$  制御  
 A 平滑筋組織が最大反応の50%で収縮しているとき、全ての細胞が持続的に50%の応答をしている（上段）とは限らず、個々の細胞は「全か無か」で応答するが、時間平均では全体の50%の細胞が反応している（下段）こともあるのではないかとこの仮説。  
 B 動脈標本を用い、交感神経を電気刺激して平滑筋層の  $Ca^{2+}$  応答を共焦点顕微鏡で観測する実験装置の模式図  
 C 視野内の3動脈平滑筋細胞 (Inset) の交感神経刺激に対する  $Ca^{2+}$  応答の時間経過。個々の細胞は同期せずに  $Ca^{2+}$  ウェーブを発生しており、パネルA下段に示す動的平衡状態が見られた。灰色のトレースは視野全体で平均した  $Ca^{2+}$  応答の時間経過。  
 文献<sup>19)</sup>より改変。

した。ラット尾動脈を丁寧に摘出してCa<sup>2+</sup>指示薬を平滑筋細胞に負荷し、管腔内に平たいガラス管を挿入して顕微鏡ステージ上の実験槽に固定した。標本の両側には白金電極を置いて通電し、血管周囲の交感神経を電気刺激した (Fig. 5B)。つまり、生体内で交感神経が活動した状況を模倣した際の血管平滑筋細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度変化を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果は驚きであった。個々の平滑筋細胞内ではCa<sup>2+</sup>ウエーブが生じていたが、それは隣り合う細胞間でも全く同期していなかった。Ca<sup>2+</sup>ウエーブは何度か繰り返して発生するので、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度はウエーブの発生に伴って上昇し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は上昇と下降を繰り返すCa<sup>2+</sup>オシレーションを示していた (Fig. 5C)<sup>19)</sup>。さらに、Ca<sup>2+</sup>オシレーションの頻度は、交感神経の伝達物質ノルアドレナリン濃度に応じて変化することも分かった<sup>19)</sup>。すなわち、血管の収縮は、血管平滑筋細胞のCa<sup>2+</sup>オシレーションの頻度によって調節されていると考えられた<sup>(註8)</sup>。この経験は私の貴重な体験となり、「見てもいないのを見てきた様に言わない」ためにも、イメージング法を開発・応用して研究に役立てるようにする契機となった。

## V. 未知機能の探索へ

このようにしてIP<sub>3</sub>によるCa<sup>2+</sup>放出機構のCa<sup>2+</sup>感受性の意義が明確となった。その後の研究の進め方として、Ca<sup>2+</sup>感受性の分子メカニズムをさらに詳細に突き詰めていくという方向性はもちろん考えたし興味がないわけでもなかった。しかし、元々生理学に惹かれて基礎医学研究に進んだ経緯があり、生理的な機能との関連を追究するのが自分の仕事だろうと考えた。Ca<sup>2+</sup>によって制御される細胞機能は、筋収縮の他にも、分泌、免疫応答、シナプス可塑性など様々な機能が知られている。しかし、今わかっていることが全てではない。未知の機能がまだ多く残されているはずである。それを探索することにより、新たな生命機能を明らかにできると考えて、研究を進めてきた。最後に、そのような研究成果の一つを紹介したい。

脳には多数の神経細胞が存在しているが、ヒトの脳には神経細胞よりもアストロサイトと呼ばれ

るグリア細胞の方が多数存在している。アストロサイトは、細胞体の周囲に多数の枝分かれする突起を伸ばしており、その先端部分は隣のアストロサイトの突起先端部分と接しており、脳全体を覆い尽くしている。このアストロサイトの突起で埋め尽くされた空間を縫うように神経細胞の軸索や樹状突起、あるいは血管が走っていると言える。アストロサイトは、非興奮性細胞であることから、主たる役割は神経細胞を保持したり、栄養したりする補助的な役割を持つものと長く信じられてきた。しかし、30年ほど前にアストロサイトが明確なCa<sup>2+</sup>シグナルを形成することが発見<sup>20)</sup>されて以来、より積極的な役割を果たすものとして研究が著しく進んでいる。私たちは、生きたマウス脳でアストロサイト細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度変化を観測できるモデルマウスを作成し、二光子励起顕微鏡を用いて生体内イメージング<sup>(註9)</sup>を行ってきた<sup>21)</sup>。その結果、脳の一部が傷害を受けると周囲のアストロサイトで5~10分周期の明確なCa<sup>2+</sup>オシレーションが生じることを明らかにした。興味深いことに、このCa<sup>2+</sup>オシレーションはIP<sub>3</sub>R2ノックアウト・マウスでは見られず、IP<sub>3</sub>R2を介したCa<sup>2+</sup>放出が関与していると考えられた。傷害部位周囲の神経細胞死を比較すると、IP<sub>3</sub>R2ノックアウト・マウスで、著明に細胞死が起りやすくなっていた。このことから、アストロサイトのCa<sup>2+</sup>オシレーションは周囲の神経細胞死を防ぐように働くという、新たなCa<sup>2+</sup>シグナルの意義が明らかになった<sup>22)</sup>。

## VI. おわりに

IP<sub>3</sub>RとRyRは構造的に類似しており、おそらく原始Ca<sup>2+</sup>放出チャネル遺伝子から、遺伝子重複を経て2通りに進化してきた遺伝子ファミリーであろう。10億年以上前からCa<sup>2+</sup>放出機構はあったらしく、後生動物に最も近い単細胞生物である原生生物<sup>(註10)</sup>にもIP<sub>3</sub>RとRyRの相同遺伝子が発現している<sup>23)24)</sup>。N末領域とC末領域で両者の相同性が高いこととRyRの方が分子サイズが大きいことから、RyR遺伝子では原始Ca<sup>2+</sup>放出チャネル遺伝子の中央付近に大きな遺伝子断片の挿入が少なくとも1回は行われたのかもしれない。機能的

に、IP<sub>3</sub>RもRyRもともにCa<sup>2+</sup>によって活性化され、Ca<sup>2+</sup>感受性の分子機構が類似していることを見ると、おそらく原始Ca<sup>2+</sup>放出チャネルの時代からCa<sup>2+</sup>感受性があったと考えられる。その性質によって、Ca<sup>2+</sup>放出にポジティブフィードバックがかかり、自己再生産的にCa<sup>2+</sup>を放出できることなどが進化的に有利で、現代までに保存されたのではなかろうかなどと想像している。一方、IP<sub>3</sub>RのN末領域付近にあるIP<sub>3</sub>結合部位付近の基本構造はRyRでも維持されているが、RyRはIP<sub>3</sub>を結合できない。原始Ca<sup>2+</sup>放出チャネルではどちらだったのだろうか？進化の過程で、IP<sub>3</sub>RがIP<sub>3</sub>結合能を獲得したのか？それともRyRが、不要となったIP<sub>3</sub>結合能を失ったのか？原生生物のCa<sup>2+</sup>放出チャネル遺伝子を丹念に調べていくとファミリーヒストリーの謎に迫れるだろうか、などと思いを馳せたりする。

ナンバリングでは2101になっている。本稿では、歴史的な経緯により2100のままに記載する。

(注7) 最近クライオ電顕を用いた単粒子解析による構造解析が進み、RyR1とIP<sub>3</sub>R1の構造が原子レベルでわかりつつある。RyR1のE4032とIP<sub>3</sub>R1のE2100（実はE2101）が立体構造でも相同の位置にあるのか興味深い。今のところ、異なるという解釈<sup>26)</sup>と、相同であるという解釈<sup>27)28)</sup>がある。心情的なものもあるかも知れないが、相同であるという解釈の方に分があるように思う。

(注8) この成果を、翌年の学会で報告したところ、前年に厳しく批判された先生は、私の発表後ホテルのバーでお酒を奢ってくださいました。素晴らしい先生である。「見てもいないのに見てきたようにいうな。」は、私にとって一生忘れることのできない言葉となった。

(注9) 私が大学院生として研究を始めた頃から考えると、そんなことができるようになるとは、夢にも思っていなかった実験である。

(注10) 例えば、ゾウリムシが例としてあげられる。

## 注 釈

## 文 献

(注1) 本稿は、2019年12月21日に、慈恵医大・筋生理の集いにおいて「IP<sub>3</sub>受容体から見たCICR」として発表した内容に基づいて加筆したものである。

(注2) 平滑筋収縮のCa<sup>2+</sup>制御に必須のカルモジュリンが標本外へ漏出するのがおそらく重要な原因だろう。

(注3) 2年間の英国留学を終えて1982年に東北大学医学部に戻り、骨格筋興奮収縮連関をlongitudinally-cut fiber（単一筋線維の一側面が生筋、反対側がスキンドファイバーという標本）を用い、脱分極に伴うCa<sup>2+</sup>放出を蛍光Ca<sup>2+</sup>指示薬で測定する実験を自作の装置で行っていた。その光学測定技術が生かされた。

(注4) 初めは筋小胞体から放出されたCa<sup>2+</sup>量を高親和性Ca<sup>2+</sup>指示薬を用いて測定していたが<sup>7)9)</sup>、その後、低親和性Ca<sup>2+</sup>指示薬を筋小胞体内腔に取り込ませる方法を開発して<sup>25)</sup>、筋小胞体内腔のCa<sup>2+</sup>濃度変化を直接観測する方法に切り替えた。Fig. 1はそのような実験結果を示している<sup>10)</sup>。

(注5) MacLennanグループによるCa<sup>2+</sup>センサー部位の同定は、ある種幸運な勘違いに起因している。彼らはRyR1の膜貫通部位が12箇所あると一次構造から推定し、E4032はその推定膜貫通部位の一つにあり、チャネル機能に重要ではないかと想定してアミノ酸置換実験を行なった。現在ではそこは膜貫通部位でないことが明確になっている。

(注6) 当時報告されていたラットIP<sub>3</sub>R1の一次構造では問題のグルタミン酸残基は2100番目だったが、現在の

- 1) Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature*. 1970; 228: 34-6.
- 2) Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 1983; 306: 67-9.
- 3) Endo M, Iino M. Specific perforation of muscle cell membranes with preserved SR functions by saponin treatment. *J Muscle Res Cell Motil*. 1980; 1: 89-100.
- 4) Iino M. Tension responses of chemically skinned fibre bundles of the guinea-pig taenia caeci under varied ionic environments. *J Physiol*. 1981; 320: 449-67.
- 5) Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol*. 1982; 94: 325-34.
- 6) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985; 260: 3440-50.
- 7) Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol*. 1989; 94: 363-83.
- 8) Iino M. Calcium dependent inositol trisphosphate-induced calcium release in the guinea-pig taenia caeci. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 142: 47-52.
- 9) Iino M. Biphasic Ca<sup>2+</sup> dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells

- of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol.* 1990; 95: 1103–22.
- 10) Hirose K, Kadowaki S, Iino M. Allosteric regulation by cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{IP}_3$  of the gating of  $\text{IP}_3$  receptors in permeabilized guinea-pig vascular smooth muscle cells. *J Physiol.* 1998; 506: 407–14.
  - 11) Iino M, Endo M. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-triphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Nature.* 1992; 360: 76–8.
  - 12) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature.* 1989; 339: 439–45.
  - 13) Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature.* 1989; 342: 32–8.
  - 14) Du GG, MacLennan DH. Functional consequences of mutations of conserved, polar amino acids in transmembrane sequences of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1998; 273: 31867–72.
  - 15) Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kurosaki T, et al.  $\text{Ca}^{2+}$ -sensor region of  $\text{IP}_3$  receptor controls intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *EMBO J.* 2001; 20: 1674–80.
  - 16) Miyakawa T, Maeda A, Yamazawa T, Hirose K, Kurosaki T, Iino M. Encoding of  $\text{Ca}^{2+}$  signals by differential expression of  $\text{IP}_3$  receptor subtypes. *EMBO J.* 1999; 18: 1303–8.
  - 17) Iino M, Yamazawa T, Miyashita Y, Endo M, Kasai H. Critical intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration for all-or-none  $\text{Ca}^{2+}$  spiking in single smooth muscle cells. *EMBO J.* 1993; 12: 5287–91.
  - 18) Iino M. Spatiotemporal dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and its physiological roles. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010; 86: 244–56.
  - 19) Iino M, Kasai H, Yamazawa T. Visualization of neural control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in single vascular smooth muscle cells in situ. *EMBO J.* 1994; 13: 5026–31.
  - 20) Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science.* 1990; 247: 470–3.
  - 21) Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, et al. In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive  $\text{Ca}^{2+}$  indicator. *Cell Rep.* 2014; 8: 311–8.
  - 22) Kanemaru K, Kubota J, Sekiya H, Hirose K, Okubo Y, Iino M. Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 11612–7.
  - 23) Ladenburger EM, Korn I, Kasielke N, Wassmer T, Plattner H. An  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  receptor in *Paramecium* is associated with the osmoregulatory system. *J Cell Sci.* 2006; 119: 3705–17.
  - 24) Ladenburger EM, Sehring IM, Korn I, Plattner H. Novel types of  $\text{Ca}^{2+}$  release channels participate in the secretory cycle of *Paramecium* cells. *Mol Cell Biol.* 2009; 29: 3605–22.
  - 25) Hirose K, Iino M. Heterogeneity of channel density in inositol-1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Nature.* 1994; 372: 791–4.
  - 26) des Georges A, Clarke OB, Zalk R, Yuan Q, Condon KJ, Grassucci RA, et al. Structural Basis for Gating and Activation of RyR1. *Cell.* 2016; 167: 145–57 e17.
  - 27) Fan G, Baker ML, Wang Z, Baker MR, Sinyagovskiy PA, Chiu W, et al. Gating machinery of  $\text{InsP}_3\text{R}$  channels revealed by electron cryomicroscopy. *Nature.* 2015; 527: 336–41.
  - 28) Baker MR, Fan G, Serysheva, II. Structure of  $\text{IP}_3\text{R}$  channel: high-resolution insights from cryo-EM. *Curr Opin Struct Biol.* 2017; 46: 38–47.