

## 論文の内容の要旨

論文題目 Identification and Analysis of Novel Inositol 1,4,5-  
Trisphosphate Receptor Binding Proteins

和訳 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体に結合する新規  
分子の同定および解析

指導教官 御子柴克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 安東 英明

### [ 緒言 ]

細胞がホルモン、増殖因子、神経伝達物質などの細胞外からの刺激を受けると、セカンドメッセンジャーとしてイノシトール 1,4,5-三リン酸 (Inositol 1,4,5-trisphosphate; IP<sub>3</sub>) が産生される。IP<sub>3</sub> は、その受容体であり滑面小胞体上の Ca<sup>2+</sup>チャネルである IP<sub>3</sub>受容体 (IP<sub>3</sub> receptor; IP<sub>3</sub>R) に結合することにより、滑面小胞体からの Ca<sup>2+</sup>放出を誘導する。その結果、受精、発生、増殖、分泌、シナプス可塑性など多様な細胞応答が誘導される。

IP<sub>3</sub>R は、4 量体を形成しており、3 種類のアイソタイプが存在する。IP<sub>3</sub>R タイプ I (IP<sub>3</sub>R1) は、中枢神経系、特に小脳プルキンエ細胞で発現が高い。マウス IP<sub>3</sub>R1 は、2749 アミノ酸からなり、N 末端近傍に IP<sub>3</sub> 結合領域、C 末端近傍に 6 回膜貫通領域を有するチャネル形成領域、およびこれら 2 つの領域の間に制御領域が存在する。IP<sub>3</sub>R は、Calmodulin, Ankyrin, IRAG, Fyn, CaBP など IP<sub>3</sub>R と相互作用する種々のタンパク質によってその活性が制御されている。さらに IP<sub>3</sub>R は、Homer などのアダプター分子を介して、細胞膜の受容体と会合して

いることも報告されている。このように  $IP_3R$  及び  $IP_3/Ca^{2+}$ 情報伝達系は  $IP_3R$  と結合する種々のタンパク質によって制御されていると考えられる。

私は、 $IP_3/Ca^{2+}$ 情報伝達系の制御機構を解明する目的で、 $IP_3R$  に結合するタンパク質の探索を行った。方法としては、 $IP_3R1$  の細胞質領域の大部分を含む N 末側 2217 アミノ酸領域を、GST との融合タンパク質としてバキュロウイルス/Sf9 細胞系により発現させてアフィニティーカラムを作成し、小脳抽出液より  $IP_3R1$  結合タンパク質のアフィニティー精製を行った。その結果、IRBIT 及び CARP という 2 つの分子を同定した。

#### [ $IP_3$ により $IP_3R$ から解離する新規 $IP_3R$ 結合タンパク質 IRBIT ]

$IP_3R$  結合タンパク質として、特に  $IP_3R$  のリガンドである  $IP_3$  によりその結合が制御されている分子を探索した。そのために、ラット小脳の膜結合画分（膜画分から高塩濃度バッファーで抽出される画分）を  $IP_3R1$  アフィニティーカラムに添加し、 $50\mu M$   $IP_3$  で結合したタンパク質を溶出した。その結果、分子量約 60kDa の新規分子が同定された。マウス小脳よりその cDNA をクローニングし、IRBIT (I $IP_3R$  binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate) と名付けた。IRBIT は 530 アミノ酸からなり、既知のタンパク質と相同性のない N 末端領域と、代謝酵素 S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼと約 50% の相同性をもつ C 末端領域とからなる。IRBIT は S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼと相同性があったことから、大腸菌で発現させた組換え IRBIT を用いてその酵素活性を測定した結果、同じ酵素活性を持たないことが明らかとなった。

IRBIT の N 末端領域に対する特異的抗体を作成し、マウス組織での発現をウェスタンブロッティングで解析した結果、IRBIT は各組織に普遍的に発現していたが、大脳および小脳での発現が最も高かった。また、マウス小脳を分画して細胞内局在を調べた結果、IRBIT は細胞質画分と膜画分の両方に存在していた。さらに、膜画分の IRBIT は高塩濃度バッファーで部分的に抽出された。膜貫通領域と推定される配列を持たないことと考え合わせると、IRBIT は静電的結合により膜に結合しているものと考えられた。

次に、IRBIT と  $IP_3R1$  との *in vitro* での結合を GST プルダウン法で解析した。その結果、膜結合画分中の IRBIT は  $IP_3R1$  と結合したが、興味深いことに、細胞質画分中の IRBIT は  $IP_3R1$  と結合しなかった。膜結合画分を脱リン酸化処理すると、IRBIT は  $IP_3R1$  と結合しなくなったことから、リン酸化により IRBIT

と  $IP_3R1$  との結合が制御されている可能性が示唆された。また IRBIT の欠失変異体を作成し、 $IP_3R1$  との結合に必要な領域を解析した結果、IRBIT の N 末端領域が  $IP_3R1$  との結合に必須であることが示された。

次に、細胞内において IRBIT が  $IP_3R1$  と結合するかどうかを確認するため、IRBIT と  $IP_3R1$  を COS-7 細胞に共発現し、共焦点免疫蛍光顕微鏡解析を行った。サポニンによる細胞膜透過処理により、膜結合型の IRBIT のみを観察した結果、IRBIT は網状に  $IP_3R1$  とよく共局在しており、小胞体上で  $IP_3R1$  と結合していることが示された。さらに内在性の IRBIT と  $IP_3R1$  との結合を確認するため、マウス小脳を用いた免疫共沈降を行った。その結果、IRBIT は *in vivo* でも  $IP_3R1$  と結合することが示された。

次に、 $IP_3R1$  から IRBIT を解離させる  $IP_3$  の濃度依存性及び他の inositol polyphosphate に対する特異性を検討した。その結果、 $IP_3$  は  $IP_2$ 、 $IP_4$ 、 $IP_6$  など他の inositol polyphosphate に比べ 50 倍の効率で、濃度依存的に  $IP_3R1$  から IRBIT を解離した。 $EC_{50}$  (最大量の 50% を解離させる  $IP_3$  濃度) は約  $0.5\mu M$  であった。細胞内の  $IP_3$  濃度は定常状態で数十 nM、刺激後で数  $\mu M$  と考えられているため、IRBIT は細胞外の刺激により  $IP_3$  が産生されると、 $IP_3R$  より解離する可能性が示唆された。

次に、 $IP_3R1$  の欠失変異体を作成し、 $IP_3R1$  の IRBIT との結合に必須な領域を解析した。その結果、IRBIT は  $IP_3R1$  の  $IP_3$  結合領域と結合することが示された。さらに、 $IP_3R1$  の部位特異的突然変異解析を行った結果、 $IP_3R1$  の  $IP_3$  結合に必須なアミノ酸である Lys-508 に変異を入れると、IRBIT と結合しなくなることが明らかとなった。この結果は、 $IP_3R1$  の Lys-508 は IRBIT と  $IP_3$  の両方の結合に必須であることを示しており、IRBIT は  $IP_3$  によりおそらく競合的に  $IP_3R1$  から解離する可能性が示唆された。

IRBIT が  $IP_3$  により  $IP_3R$  から解離することの生理的意義として、一つには IRBIT は  $IP_3R$  の下流のシグナル分子として機能している可能性が考えられる。これまで  $IP_3R$  の直接の下流のシグナル分子はカルシウムイオンのみと考えられてきた。この数十の標的分子を持つ普遍的なセカンドメッセンジャー以外に、 $IP_3R$  は IRBIT というタンパク分子を、より特異的な標的分子を持つシグナル分子として利用しているという新たなモデルが考えられる。

[  $IP_3R$  の  $IP_3$  親和性を低下させる  $IP_3R$  結合タンパク質 CARP ]

IP<sub>3</sub>R1 カラムを用いたアフィニティー精製により、ラット小脳細胞質画分より 36kDa の分子を同定した。この分子の部分アミノ酸配列を決定したところ、小脳プルキンエ細胞に高発現している遺伝子として 1990 年に同定された carbonic anhydrase-related protein (CARP) であることが明らかとなった。私の属する研究室では、以前に yeast two-hybrid 法によっても IP<sub>3</sub>R1 の制御領域に結合する分子として同定されており、CARP と IP<sub>3</sub>R1 との結合は確からしく思われた。

CARP と IP<sub>3</sub>R1 との結合を確認するため、GST プルダウン法を行った結果、CARP は IP<sub>3</sub>R1 に結合することが確認された。また、その結合は直接的なものであることも示された。

IP<sub>3</sub>R1 の IP<sub>3</sub> 結合に及ぼす CARP の影響を調べた結果、CARP により IP<sub>3</sub>R1 の IP<sub>3</sub> に対するアフィニティーが低下していることが明らかとなった。

小脳プルキンエ細胞の IP<sub>3</sub> による Ca<sup>2+</sup>放出は、他の組織に比べ高い濃度の IP<sub>3</sub> を必要とすることが知られている。これはプルキンエ細胞には CARP が高発現しているためである可能性が示唆された。

#### [ 結語 ]

IP<sub>3</sub> 情報伝達系は、普遍的でありながら、非常に多様かつ特異的な細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態を誘導することができる。これは IP<sub>3</sub>R が様々なレベルで制御を受けているためと考えられる。その一つが CARP などの IP<sub>3</sub>R 結合タンパク質によるチャネル活性の制御である。CARP のようにある細胞特異的に発現している分子は、細胞特異的な Ca<sup>2+</sup>シグナルの形成に関与しているものと思われる。また、別の制御として、IP<sub>3</sub>R がその上流・下流のシグナル分子と複合体を形成し、効率的・特異的なシグナル伝達を実現している点があげられる。IRBIT は IP<sub>3</sub>R を含むシグナル複合体の形成に関与しているのかも知れない。さらに、IRBIT は IP<sub>3</sub>R の下流のシグナル分子として機能するというこれまでにない形で IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>情報伝達系に関与している可能性も考えられる。今後、これらの分子の機能をさらに解析することにより、IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>情報伝達系の制御機構に関し、重要な知見が得られるものと期待される。