

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 安東 英明

本研究は IP_3/Ca^{2+} シグナル伝達系の制御機構を解明する目的で、細胞内カルシウムストア上のカルシウムチャンネルである IP_3 受容体(IP_3R)の結合タンパク質を探索したものであり、以下の結果を得ている。

1. マウス IP_3R type 1 (IP_3R1)の N 末端側細胞質領域 2217 アミノ酸に対するアフィニティー精製により、ラット小脳膜画分からの高塩抽出画分より、約 60kDa の新規 IP_3R 結合タンパク質を同定し、IRBIT (I P_3 R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate)と名付けた。マウス小脳より IRBIT の cDNA をクローニングした。
2. 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 (アミノ酸 1-104) と代謝酵素 S-adenosylhomocysteine hydrolase と約 50% のホモロジーがある C 末端領域 (アミノ酸 105-530) からなる。また、17 カ所の推定リン酸化部位がある。大腸菌で発現したリコンビナント IRBIT は S-adenosylhomocysteine hydrolase と同じ酵素活性を持たないことが示された。
3. 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 IRBIT の発現を調べたところ、各組織に普遍的に発現していたが、大脳、小脳での発現が最も高かった。また、分画により細胞内局在を調べたところ、細胞質画分と膜画分の両方に存在しており、膜画分の IRBIT は高塩濃度バッファーにより部分的に可溶化したことから、静電的結合により膜に結合していることが示唆された。
4. 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結果、膜結合画分中の IRBIT は IP_3R1 と結合した。一方、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、IP₃R1 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 IP₃R1 との結合に必須であることが示された。

5. IRBIT と IP₃R1 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結果、IRBIT は網状に IP₃R1 とよく共局在しており、小胞体上で IP₃R1 と結合していることが示された。さらにマウス小脳を用いた免疫共沈降を行った結果、IRBIT は *in vivo* でも IP₃R と結合することが示された。
6. IP₃ は特異的かつ濃度依存的に IP₃R1 から IRBIT を解離した。EC₅₀ (最大量の 50% を解離させる IP₃ 濃度) は約 0.5 μM であった。細胞内の IP₃ 濃度は定常状態で数十 nM、刺激後で数 μM と考えられているため、IRBIT は細胞外の刺激により IP₃ が産生されると、IP₃R1 より解離する可能性が示唆された。
7. IRBIT は IP₃R1 の IP₃ 結合領域と結合し、かつ IP₃R1 の Lys-508 は IRBIT と IP₃ の両方の結合に必須であることが示された。この結果より、IRBIT は IP₃ によりおそらく競合的に IP₃R1 から解離する可能性が考えられた。
8. また、ラット小脳細胞質画分からは IP₃R1 結合分子として CARP を同定した。CARP は小脳プルキンエ細胞に高発現しており、IP₃R1 の IP₃ に対するアフィニティーを低下させた。

以上、本論文は IP₃R 結合分子として IRBIT と CARP を同定し、IRBIT は IP₃R のリンカー分子あるいは IP₃R の下流のシグナル分子である可能性、CARP は小脳プルキンエ細胞の IP₃ に対する低感受性に関与している可能性を示した。本研究は IP₃R および IP₃/Ca²⁺シグナル伝達系の制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。