

論文の内容の要旨

論文の題目

Subtype-specific and the ER luminal Environment-Dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44

小胞体内腔の環境に依存した ERp44 によるイノシトール 1,4,5-三リン酸受容

体タイプ 1 のサブタイプ特異的制御

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 12 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 肥後 剛康

Ca²⁺は細胞内におけるセカンドメッセンジャーとして多彩な生理機能の調節を担っている。細胞刺激によって誘発される小胞体(ER)からの Ca²⁺の放出は主にイノシトール 1,4,5 三リン酸受容体(IP₃Rs)が活性化され引き起こされる。IP₃Rs は 3 種のサブタイプが存在し、それらの活性が ER の微小環境に強く影響をされると考えられているが詳細は不明である。そこで、私は、その分子機構をあきらかにするため、IP₃Rs の 3 種ある ER 内腔ドメインの中でサブタイプ間の相同性が低い領域(L3V)に着目し、そこに結合するタンパク質を探索した。イムノグロブリン Fc に融合した各サブタイプ IP₃Rs の L3V タンパク質を精製し、アフィニティークラムを作製した。生後 2 週齢マウスの小脳マイクロソーム画分から IP₃R1 L3V(1L3V)特異的に結合する約 40 kDa のタンパク質を見いだした。これを質量分析し、その部分アミノ酸配列を決定したところ ERp44 に相同した。ERp44 は redox タンパク質である thioredoxin(TRX)に相同性を有する ER 内腔タンパク質であった。免疫沈降法によって ERp44 が IP₃R1 に結合することを確認した。更に詳細に ERp44 と IP₃R1 の結合について調べる為に、大腸菌で発現させ精製した glutathione S-transferase(GST)融合 L3V (GST-L3V) と maltose binding protein(MBP)融合 ERp44(MBP-ERp44)を用いて GST pulldown 実験を行った。その結果、Ca²⁺を含む酸性バッファーにおいて MBP-ERp44 と 1L3V が直接結合す

ることがわかった。次に、ERp44 と 1L3V が還元剤 dithiothreitol(DTT)を含む中性バッファーで結合することがわかった。また、その結合は 1L3V のシステイン残基そして Ca^{2+} 濃度依存的であった。更に、MBP-ERp44 が 3 種のサブタイプのなかで $\text{IP}_3\text{R1}$ にのみ結合することを確認した。これら結合実験は ERp44 が ER の redox state と Ca^{2+} 濃度を感じ $\text{IP}_3\text{R1}$ に特異的に結合することを示唆している。

次に、私は ERp44- $\text{IP}_3\text{R1}$ の結合が *in vivo* においてチャンネル活性にどのような影響を与えるかを、様々な細胞を用いた Ca^{2+} イメージング実験によって調べた。赤色蛍光タンパク質(RFP)融合 ERp44(RFP-ERp44)を細胞に発現させ、 IP_3 産生のアゴニスト ATP 刺激を行った。RFP-ERp44 を発現している HeLa 細胞(サブタイプの中で $\text{IP}_3\text{R1}$ が優勢的に発現)では IP_3 -induced Ca^{2+} release(IICR)が著しく減少していた

次に COS-7 細胞($\text{IP}_3\text{R1}$ がほとんど発現していない)では、RFP-ERp44 の発現は IICR に影響を与えなかった。これらの HeLa, COS-7 細胞を用いた Ca^{2+} イメージングの結果と *in vitro* の結合実験は、ERp44 が全てのサブタイプのなかで $\text{IP}_3\text{R1}$ にのみ結合し、その活性を抑制することを強く示唆している。

更に私はこれを確かめるため、ニワトリ B リンパ球細胞種 DT40 を用いた。この細胞の性質を利用して作製された IP_3R 全てのサブタイプを欠損させた細胞(DT40-TKO 細胞)と $\text{IP}_3\text{R1}$ のみを欠損させた DT40-1KO 細胞を作製した。更に、DT40-TKO 細胞に stable に $\text{IP}_3\text{R1}$ を発現させた細胞(DT40-KMN60)を作製した。IgM 抗体で BCR をクロスリンク後の IICR を調べた。RFP-ERp44 を発現している細胞では IICR は著しく減少したが、DT40-1KO 細胞では IICR への影響は観察されなかった。これにより、ERp44 が $\text{IP}_3\text{R2}$ と $\text{IP}_3\text{R3}$ ではなく $\text{IP}_3\text{R1}$ を介した IICR を抑制することが示された。

更に私は、内在性 ERp44 の機能を調べるために、RNA interference (RNAi)を採用し実験を行った。ERp44 をノックダウンした HeLa 細胞では ATP 刺激による IICR を引き起こす細胞の割合、 Ca^{2+} release の強さ共に顕著に増大した。一方、COS-7 細胞では、ERp44 をノックダウンは、IICR に影響を与えなかった。これら loss-of-function の実験は ERp44 が $\text{IP}_3\text{R2}$ と $\text{IP}_3\text{R3}$ ではなく $\text{IP}_3\text{R1}$ を介した IP_3 -induced Ca^{2+} release を抑制したことを強く示している。またこの結果は、gain-of-function 実験結果を支持する。

更に RNAi による結果を確認するため、ERp44 ノックダウン細胞に ERp44 を

再発現した。ERp44 の発現は IICR を顕著に減少させた。これらの結果をもとに、私は ERp44 が IP₃R1 を抑制すると結論を下した。また、この再発現の系を用いて ERp44 のどの領域が IP₃R1 の抑制に重要なかを調べた。まず、ERp44 の 236-345 番目のアミノ酸が IP₃R1 binding domain (IPBD) であることを見いだした。しかし、用いた変異体は、驚くべきことに IPBD においてさえ、全長 ERp44 ほど IP₃R1 を抑制しなかった。これらの結果は IP₃R1 を抑制するには結合領域だけでなくその他の領域も必要であることを示唆している。次に、IP₃R1 のシステイン残基の重要性を調べた。COS-7 細胞に発現させた IP₃R1 のシステイン変異体と ERp44 の結合は顕著に低下した。その生理的意義を調べるため、DT40-TKO に IP₃R1 のシステイン変異体と RFP-ERp44 を発現、IgM 抗体で刺激したところ IICR の抑制は観察されなかった。この結果により IP₃R1 のシステイン残基が ERp44 による IP₃R1 活性の抑制に必須であることがわかった。

更に、私は ERp44 の IP₃R1 との結合がチャンネル活性にどのような影響を与えるかを調べる為に、人工脂質二重膜を用いたシングルチャンネルレベルの IP₃R1 活性の測定を行った。この *in vitro* 再構成系を用いることで厳密に ER 内腔の Ca²⁺濃度と redox 状態を制御し、ERp44 の IP₃R1 活性への影響を検証することができる。その結果 DTT 存在下かつ低 Ca²⁺濃度で ERp44 は IP₃R1 を不活性化した。この結果は明確に ERp44 が ER の redox state と Ca²⁺濃度を感じ IP₃R1 を特異的に抑制することを示している。

私は、分子生物、生化学、細胞生物学、電気生理学的手法を用いて、全く新しい Ca²⁺ signaling 制御機構を見いだした。