

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18570122

研究課題名（和文） IP3 レセプターがチャンネル以外の機能分子として働く可能性について

研究課題名（英文） Possible function of IP3 receptor as a non-channel molecule.

研究代表者

水谷 顕洋（MIZUTANI AKIHIRO）

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・研究員

研究者番号：30242861

研究成果の概要：

IP3 レセプターに結合し、IP3 によって放出される IRBIT 分子の IP3 レセプターへの結合に必須な 4 カ所のリン酸化部位同定に成功した。さらに、IRBIT に結合する種々の機能分子の同定にも成功し、IP3 レセプター-IRBIT-IRBIT 結合蛋白質群による、細胞機能調節機構の存在を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,400,000	0	2,400,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	360,000	3,960,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：IP3 レセプター、IRBIT、小脳、シナプス可塑性、リン酸化

1. 研究開始当初の背景

IP3 レセプター (IP3R) は、IP3 による ER からの Ca²⁺ 放出を担う分子実態で、ER 膜上に存在する蛋白質である。1989 年にマウス小脳から IP3R cDNA が単離され、その一次構造が明らかにされて以来、精力的な研究の結果、哺乳動物では異なる遺伝子からコードされる 3 種類のサブタイプ (type I~III) が存在する事が明らかにされている。2,700 余りのアミノ酸からなる蛋白質で、C 末に 6 回の膜貫

通構造を有しチャンネルを形成する。特筆すべきは、チャンネル領域 (2274~2590) を除く巨大な部分が全て細胞質側を向いている事である。この巨大な領域が、細胞内で上昇した IP3 を感知し、その情報をチャンネル領域に伝え、チャンネルを開口させるのに重要な働きをしていることは間違いなからう。しかし、この巨大な IP3R 細胞質部分は、単に IP3 と結合し、そのシグナルをチャンネル開口に

変換するためだけに存在しているのでしょうか？ IP3R には、別の機能が隠されているのでは無かるうか？

我々は、IP3R に結合する蛋白質を探索することでこれらの疑問解決に道筋を作る事が出来ると考え、研究を行ってきた。これまでに、我々は、Homer 蛋白質、バンド 4.1 蛋白質、IRBIT、等の IP3R 結合蛋白質を発見・報告してきた。この中で、IRBIT は、i) 中枢神経系に豊富に発現し、IP3R の IP3 結合領域に結合する。ii) 試験管内の反応であるが、生理的濃度の IP3 で、IP3R から遊離する。iii) この結合には、IRBIT がリン酸化されていることが必須である、という特徴を有する。このことは、細胞内の IP3 濃度の低い時には IRBIT は IP3R と結合しており、何等かの刺激によって細胞内の IP3 濃度が高くなると、IP3R から遊離し、新たなシグナル分子として機能する可能性を示唆している。これを IP3R 側から換言すると、IP3R は細胞が刺激を受ける前は、IRBIT を自身の IP3 結合領域にドックしており、IP3 が産生されるとそれに反応して Ca²⁺を放出するだけでなく、IRBIT をも「放出」する分子として機能するということになる。実際、小脳の Purkinje 細胞では、IP3R が極めて豊富に発現しているが、これは例外的で、他の組織・細胞では、IP3R 蛋白質の発現量はいずれのサブタイプとも Purkinje 細胞における発現量の、およそ 1/50~1/100 に過ぎず、下流因子の活性化に必要な ER からの Ca²⁺放出は、その程度の発現量で十分まかなえる事が判明している。従って、小脳 Purkinje 細胞における豊富な発現量は、IP3R のチャンネル以外の機能、例えば、上記の様に IRBIT を IP3 濃度に応じて保持したり、放出したりする、構造蛋白質としての機能等を示唆するものである。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、細胞内で産生された IP3 に反応して IRBIT を細胞質に放出する分子として機能する IP3R という捉え方を中心に、IP3R の Ca²⁺チャンネル以外の機能分子としての姿を炙り出すことである。現時点では、in vivo で IP3R と IRBIT とが complex を形成することは証明出来ているが、細胞内で IP3 が産生された時、IRBIT が IP3R から遊離することは、in vivo の現象としては未だ捉えられていない。従って大目的は、(1) 細胞内で IP3 産生に伴って、IRBIT が IP3R から遊離する事を証明することである。この大目的を遂行する上で、IP3R と IRBIT とが結合するには、IRBIT のリン酸化が必須であり、IRBIT のリン酸化状態によってこの結合が制御され得ることから、(2) IP3R に結合している IRBIT のリン酸化部位を同定することが重要である。またこれをもとに、(3) IRBIT のリン酸化酵素、脱リン酸化酵素を同定する。遊離された IRBIT が新たなシグナル分子として機能することを裏付ける為に、(4) IRBIT の標的分子を同定する。更に、チャンネル活性のみを欠失した変異 IP3R type I のノックインマウスを作製・解析し、個体レベルで IP3R のチャンネル以外の機能を探ることである。

3 . 研究の方法

A:細胞内で IRBIT が IP3R から IP3 によって遊離することを証明する。

これまでの研究から、IP3R に結合する IRBIT はリン酸化されていることが必須であることが判明している。実際、マウス小脳から IRBIT は精製されたが、小脳の可溶性画分に存在する IRBIT は IP3R に結合出来ず、膜画分から抽出された IRBIT のみが IP3R に結合出来ることが判明している。この事は、IRBIT が IP3R から IP3 によって放出される過程を

観察するには、従来のような蛍光蛋白質を IRBIT との融合蛋白質として細胞に発現させ、細胞を live imaging で観察する方法では、IP3R と結合しうる IRBIT とそうでない IRBIT とを区別出来ないため、IP3R から遊離した少量の IRBIT を検出することが出来ない。従って、以下の手順を追って IP3R に結合しうる IRBIT のみを検出出来る分子プローブを手に入れることが、本研究目遂行には必須となる。

B:チャンネル活性を欠失した変異 IP3R type I ノックインマウスを作製・解析する。

目的の項で述べたように、IP3R には、異なる3つの遺伝子がコードする3種のサブタイプが存在する。小脳の Purkinje 細胞では、type I IP3R が豊富にかつほぼ独占的に発現しており、現に、type I IP3R のノックアウトマウスは、Purkinje 細胞での Ca²⁺動態の異常、LTD の消失等の異常を来す。従って、この type I IP3R のチャンネル活性のみを欠失させた D2550A 変異ノックインマウスを作製・解析すれば、ノックマウスの異常が IP3R という蛋白質が欠失したためのものか、IP3R からの Ca²⁺放出能が欠失したためのものかを判断することが出来る。

4 . 研究成果

上記、A) に関しては、IP3R への結合に必要な IRBIT のリン酸化部位を、4カ所まで同定することが出来た。しかしながら、この4カ所のリン酸化だけでは、十分とは言えず、更なる研究が必要である。

B) に関しては、ノックインマウス作製までには、至らず、現時点では、IP3R の Ca²⁺チャンネル以外の機能を見つけ出すには至っていない。

しかしながら、IP3R から遊離する IRBIT が、

種々の機能分子に結合し、それらの活性を調節することを見出しており、IP3R が IRBIT を ER 膜上に留めておく機能を有することは、十分に示すことが出来た。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

- 1) Ando H, Mizutani A, Kiefer H, Tsuzurugi D, Michikawa T, & Mikoshiba K. IRBIT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor in a phosphorylation-dependent manner. *Mol. Cell* 22, 795-806, 2006 (査読有り)
- 2) Zhou H, Iwasaki H, Nakamura T, Nakamura K, Maruyama T, Hamano S, Ozaki S, Mizutani A, Mikoshiba K. 2-Aminoethyl diphenylborinate analogues: Selective inhibition for store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 277-282, 2007 (査読有り)
- 3) Mizutani A, Kuroda Y, Futatsugi A, Furuichi T, Mikoshiba K. Phosphorylation of Homer3 by calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates a coupling state of its target molecules in Purkinje cells. *J. Neurosci.* 28, 5369-6382, 2008 (査読有り)
- 4) Mikoshiba K, Hisatsune C, Futatsugi A, Mizutani A, Nakamura T, Miyachi K. The role of Ca²⁺ signaling in cell function with special reference to exocrine secretion. *Cornea.* 27, Suppl 1:S3-8, 2008 (査読有り)
- 5) Yang D, Shcheynikov N, Zeng W, Ohana E, So I, Ando H, Mizutani A, Mikoshiba K, Muallem S. IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO₃-secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. *J Clin Invest.* 119, 193-202, 2009 (査読有り)

[学会発表](計1件)

第31回日本神経科学大会(東京)

Purkinje細胞におけるHomer3のリン酸化、水谷 顕洋、黒田有希子、古市 貞一、御子柴克彦 2008年7月

[産業財産権]

出願状況(計1件)

出願番号:特願2007-73396 (P2007-73396)
発明者:御子柴克彦、水谷顕洋、安東英明
発明の名称:IP₃受容体結合タンパク質による細胞内標的分子の制御

出願人：独立行政法人理化学研究所・独立行政法人科学技術振興機構
出願日：2007. 3. 20

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水谷 顕洋(MIZUTANI AKIHIRO)
独立行政法人・発生神経生物研究チーム・研究員
研究者番号：30242861

(2)研究分担者

波多野 直哉(HATANO NAOYA)
神戸大学・医学研究所・グローバル COE 研究員
研究者番号：10332280