

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20700344  
研究課題名（和文）イノシトール三リン酸受容体のチャネル開口機構の解明  
研究課題名（英文）Study on the channel-gating mechanism of the inositol-trisphosphate receptor  
研究代表者  
榎本 匡宏 (Enomoto Masahiro)  
独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・基礎科学特別研究員  
研究者番号：50435632

## 研究成果の概要（和文）：

2年間の研究により IP<sub>3</sub>受容体のチャネル開口機構に関して以下の成果を得た。まず、「チャネルの開閉を直接制御するのは、制御領域とチャネル領域の間の相互作用である。」、「IP<sub>3</sub>結合領域は IP<sub>3</sub>誘導性 Ca<sup>2+</sup>放出を起こすために必須であり、この領域を欠いた IP<sub>3</sub>受容体は Ca<sup>2+</sup>誘導性 Ca<sup>2+</sup>放出を起こす。」以上の成果は、IP<sub>3</sub>受容体のチャネル開口の基本原理を世界で初めて解明した非常にインパクトの高いものである。

## 研究成果の概要（英文）：

I have achieved the following outstanding outcomes from this research project. One is that “the interaction between regulatory domain and channel domain of IP<sub>3</sub>R directly regulates the open-close transition.”, and another is that “IP<sub>3</sub>-binding domain of IP<sub>3</sub>R is essential for the IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release function, and the mutant lacking in this region shows the character of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release channel.” These results are highly-impact outcomes that have firstly in the world elucidated the basic channel-gating mechanism of IP<sub>3</sub>R.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

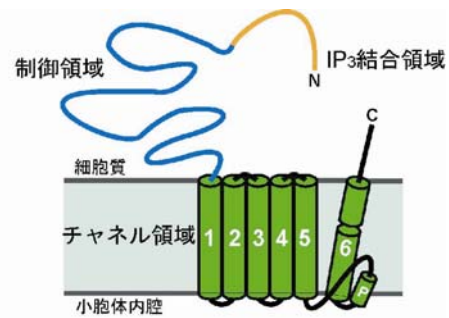
研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学、受容体、イオンチャネル、細胞内カルシウム情報伝達、カルシウム放出

## 1. 研究開始当初の背景

IP<sub>3</sub>受容体は、機能的側面から図に示すように**3つのドメイン構造**をもち、四量体を形成して1つのチャンネルとして働く。図から明らかのように、IP<sub>3</sub>受容体はリガンド結合部位とCa<sup>2+</sup>の通り道であるチャンネル孔が大きな制御領域を挟んでアミド末端側とカルボキシ末端側に離れて存在するため、「**局所的なリガンド結合がどのように分子内を伝わってチャンネルが開くのか?**」という点が**チャンネル開口機構を解明するにあたっての鍵**となる。この点に関しては、これまでに国内外で行われた構造解析や生化学実験の結果から、IP<sub>3</sub>結合領域とチャンネル孔近傍の領域が三次元構造としては近距離にあり、両者の分子内相互作用がチャンネル開口に重要であると予想されていた。申請者は、これに加えて研究開始当初に、「**IP<sub>3</sub>受容体の制御領域はチャンネル領域と直接相互作用することでチャンネルを閉じた状態に保持する**」という研究成果を世界に先駆けて得ていた。この従来のIP<sub>3</sub>受容体のチャンネル開口モデルを塗り替えるような重要な成果は、IP<sub>3</sub>受容体3つの領域に分けて精製し、再構成するという独自に確立した再構成系を用いることで得られた。この再構成系は、「**IP<sub>3</sub>受容体はチャンネル領域のみではチャンネル孔が開いた状態にあるリークチャンネルである**」という性質を利用し、チャンネルの開閉状態をチャンネル領域からのCa<sup>2+</sup>リーク速度を指標にモニターするという実験系である。申請者は、再構成した条件で、IP<sub>3</sub>結合によりCa<sup>2+</sup>リーク速度が変化するという結果も得ており、**Ca<sup>2+</sup>リーク速度がチャンネルの透過生を評価する指標になることを実証していた**。さらに、図にしめした3つの領域の相互作用の強度がIP<sub>3</sub>やCa<sup>2+</sup>濃度に依存して変化するという結果も、pull down法や免疫沈降法とウェスタンブロットティングを組み合わせたことで既に得ていた。



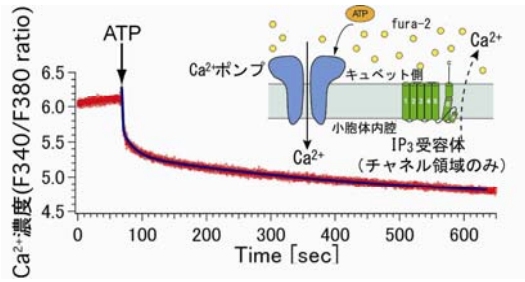
## 2. 研究の目的

本研究では、これまでのIP<sub>3</sub>受容体に関する生物物理学的・生化学的研究を生かし、「**IP<sub>3</sub>結合によるチャンネル開口の分子機構**」を解明することを目的とする。具体的には、IP<sub>3</sub>やCa<sup>2+</sup>濃度に依存したIP<sub>3</sub>結合領域、制御領域、チャンネル領域の3つの領域間の相互作用の中からチャンネルの開口に関連する分子内相互作用を同定し、IP<sub>3</sub>受容体のチャンネル開口機構の中核というべき、「**チャンネルの開口に関わるチャンネルの構造変化**」を明らかにすることを目指す。

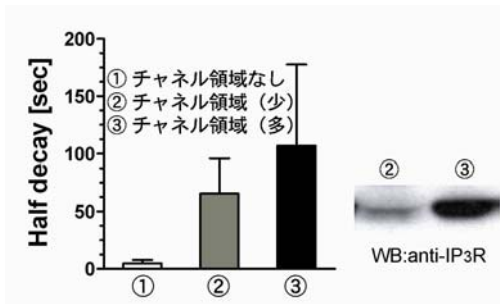
## 3. 研究の方法

はじめに本研究で用いられる方法の中心である、**申請者が独自に開発したIP<sub>3</sub>受容体のチャンネル再構成系**について述べる。

- 1) まず、内在する3種類すべてのIP<sub>3</sub>受容体遺伝子をノックアウトしたニワトリB細胞由来の細胞株DT40細胞より小胞体画分を調整し、キュベット内でATP添加により小胞体膜上に存在するCa<sup>2+</sup>ポンプを活性化することで生じる**小胞体膜内へのCa<sup>2+</sup>の取込み**をCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬(fura-2)を用いて経時的に測定した(下図の赤線)。測定したデータについて指数関数でフィッティングを行い(下図の青線)、取り込みがプラトーに達するCa<sup>2+</sup>濃度を求めた。この値で下図のCa<sup>2+</sup>取込みの減衰曲線を標準化することで半減期を算出し、Ca<sup>2+</sup>取込み速度の指標とした。

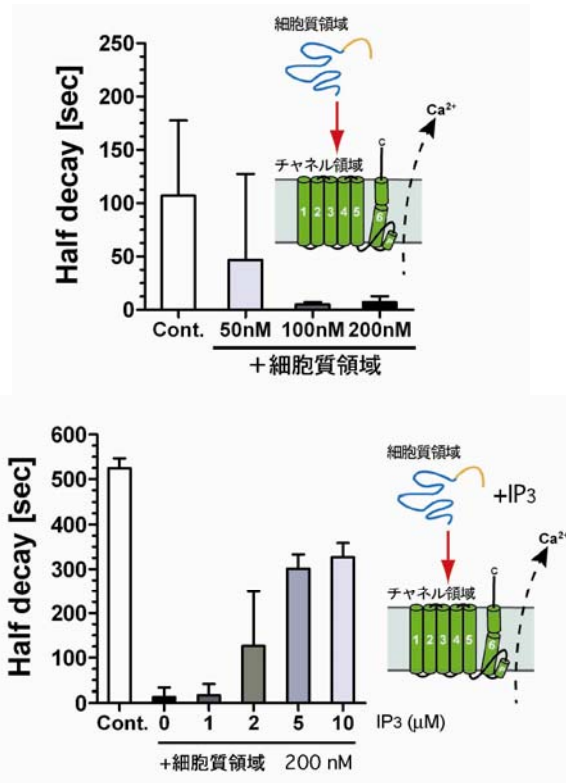


- 2) 次に、上記の細胞からマウス1型IP<sub>3</sub>受容体のチャンネル領域のみ（この領域のみではリークチャンネルであることが報告されている）を発現する安定発現株を樹立して小胞体画分を調製し、同様にATP添加によるCa<sup>2+</sup>取込みを測定した。以上の実験から、IP<sub>3</sub>受容体のチャンネル領域の発現量に依存してATP添加によるCa<sup>2+</sup>取込みの半減期が有意に長くなる、つまりチャンネル領域からのリーク量の増加にともない「Ca<sup>2+</sup>取込み速度が遅くなる」ことが明らかになった（下図）。



- 3) さらに、IP<sub>3</sub>受容体のチャンネル領域の安定発現株から調整した小胞体画分に、精製したマウス1型IP<sub>3</sub>受容体の細胞質領域(1-2217a. a., IP<sub>3</sub>結合領域+制御領域)をさまざまな濃度で添加し、ATP添加によるCa<sup>2+</sup>取込みの半減期を測定した。その結果、細胞質領域の添加によりCa<sup>2+</sup>取込みが速くなることが明らかになった（下図上）。また、添加する領域を絞り込み、制御領域(605-2217a. a.)のみでも同様の実験を行ったところ同一の結果が得られた。さらに、細胞質領域と同時にIP<sub>3</sub>をさまざまな濃度で添加するとIP<sub>3</sub>濃度依存的にCa<sup>2+</sup>取込みが遅くなる（下図下）ことも分かった。以上の結果から、この実

験系において測定されるCa<sup>2+</sup>取込み速度がIP<sub>3</sub>受容体の開閉状態を知る指標となることが分かり、再構成系として有効であることが示された。



従来、IP<sub>3</sub>受容体の再構成系として用いられてきた人工脂質二重膜にチャンネルを再構成する実験系は、高度で熟練した技術を必要とするとともに、非常に多量のチャンネルをマイクロソーム画分あるいは精製タンパク質として調整する必要があり、組換え受容体の解析には不向きであった。申請者が確立した実験系は少量のマイクロソーム画分で実験を行うことができるため、新たな再構成系として効率の良いデータ取得を可能にするという長所をもっている。

本研究では、この再構成系を用いてIP<sub>3</sub>やCa<sup>2+</sup>によるチャンネルの開閉変化を詳細に調べる。また、この3つの領域間の相互作用のIP<sub>3</sub>やCa<sup>2+</sup>濃度に依存した変化を詳細に解析する。実験手法としては、これまで申請者が行ってきた免疫沈降法やpull-down法とウェスタンブロッティングを組み合わせた方法では定量性が不十分であるので、ELISA法を用いた結合実験による定量系を独自に確立し、定量的な解析を行う。

#### 4. 研究成果

本研究を通じ、以下の研究成果を得た。すべて、未発表で機密性の高い重要な成果であるため、図の使用は控えた。

- 1) IP<sub>3</sub> 受容体はチャネル領域のみでは Ca<sup>2+</sup> が漏れ出てしまうリークチャネルであり、そのチャネル孔を閉じた状態に保持しているのが制御領域とチャネル領域との間の直接的相互作用である。
- 2) 上記の相互作用はチャネルが開いた状態では閉じた状態に比べて弱くなる。つまり、チャネルの開閉状態を決めているのは制御領域とチャネル領域との間の相互作用の強度である。
- 3) IP<sub>3</sub> 受容体が開くためには、Ca<sup>2+</sup> と IP<sub>3</sub> の2つのリガンドの結合を必要とするが、IP<sub>3</sub> 結合領域を欠いている変異 IP<sub>3</sub> 受容体は Ca<sup>2+</sup> のみで開く。つまり IP<sub>3</sub> 結合領域の存在により、IP<sub>3</sub> 受容体は IP<sub>3</sub> 誘導性 Ca<sup>2+</sup> 放出チャネルとしての機能を持つ。
- 4) 野生型の全長 IP<sub>3</sub> 受容体が IP<sub>3</sub> 結合により開く際にも、IP<sub>3</sub> 結合領域を欠いた変異 IP<sub>3</sub> 受容体が Ca<sup>2+</sup> のみの結合により開く際にも、制御領域とチャネル領域の結合強度は、チャネルが閉じているときと比べて弱くなる。この結果から、IP<sub>3</sub> 受容体の開口を引き起こす構造変化は IP<sub>3</sub> 結合ではなく、直接的には Ca<sup>2+</sup> 結合により制御されていることが示唆される。

以上の研究成果は、IP<sub>3</sub> 受容体のチャネル開口機構の基本原則を世界で初めて明らかにしたものであり、現在投稿準備中である。本研究の成果は、単に IP<sub>3</sub> 受容体のチャネル開口機構の詳細な原理の解明に止まらず、もう1つの細胞内カルシウム放出チャネルであるリアノジン受容体を含めた、カルシウム放出チャネルの起源の解明にも近い将来、波及効果をもたらすことが確実な非常に重要な成果である。

#### 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1件)

##### <査読あり>

Kanaho YI, Enomoto M, Endo D, Maehiro S, Park MK, Murakami S. Neurotrophic effect of gonadotropin-releasing hormone on neurite extension and neuronal migration of embryonic gonadotropin-releasing hormone neurons in chick olfactory nerve bundle culture. *J Neurosci Res.* 87(10), 2237-44, 2009.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

榎本 匡宏 (Enomoto Masahiro)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：50435632