

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月12日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592072

研究課題名（和文） IP<sub>3</sub>受容体 type2 の細胞内局在に関する分子メカニズムの解明研究課題名（英文） Study of intracellular localization of IP<sub>3</sub>-receptor type 2

研究代表者

増田 渉 (MASUDA WATARU)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80295865

研究成果の概要（和文）：I型 IP<sub>3</sub>R は PKA によってリン酸化され、Ca<sup>2+</sup>放出能が増強される。しかし IRAG/PKG I $\beta$  が共存すると、これらと複合体を形成し、PKA によるリン酸化とそれによる Ca<sup>2+</sup>放出能の増強は消失する。一方 II 型 IP<sub>3</sub>R は IRAG/PKG I $\beta$  と複合体を形成しても PKA によりリン酸化され、Ca<sup>2+</sup>放出能が増強される。IP<sub>3</sub>R と IRAG の結合領域は、I 型では PKA によってリン酸化されるセリン残基とは近接していたが、II 型では離れていた。よって、I 型 IP<sub>3</sub>R では複合体の形成が PKA によるリン酸化にとって立体障害となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：IP<sub>3</sub>R type I (IP<sub>3</sub>R-I) was phosphorylated by PKA and this causes the potentiation of carbachol (CCh)-induced Ca-release from IP<sub>3</sub>R-I. In the presence of IRAG and PKG I $\beta$ , IP<sub>3</sub>R-I forms a complex with these molecules and this causes the loss of both the phosphorylation by PKA and the potentiation of CCh-induced Ca-release. IP<sub>3</sub>R type II (IP<sub>3</sub>R-II) also be able to form a complex with IRAG and PKG I $\beta$ . However, the phosphorylation of IP<sub>3</sub>R-II by PKA and the potentiation of carbachol (CCh)-induced Ca-release from IP<sub>3</sub>R-II were not inhibited by forming a complex. In this study, we identified the regions of IP<sub>3</sub>R molecules, which were required for interaction with IRAG. In the IP<sub>3</sub>R-I, the region was much close to the phosphorylation site, while it was far from the phosphorylation site in the IP<sub>3</sub>R-II. This result indicated that the interaction of IP<sub>3</sub>R-I with IRAG spatially did not permit PKA to access to phosphorylation site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：IP<sub>3</sub>受容体、IRAG、細胞内局在

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) 正常な唾液分泌の破綻は QOL の低下に直結する。唾液腺細胞における  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、唾液分泌の中核的存在であり、これの破綻は、正常な唾液分泌の破綻を意味する。顎下腺腺房細胞および導管細胞では、細胞外からのムスカリン性刺激に対する  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、まず管腔側膜付近から始まり、しだいに基底膜側へ移行する(Ashby, M.C., et al., (2001) *Cell & Dev Biol* **12**, 11-17)。このような時空間的な  $[Ca^{2+}]_i$  の制御メカニズムにおいて、 $IP_3$  受容体( $IP_3R$ )を介した細胞内  $Ca^{2+}$  プール(主に小胞体)からの  $Ca^{2+}$  動員は非常に重要な役割を果たしている。一方、細胞内における  $IP_3R$  の局在は、様々な外分泌細胞で調べられている。例えば顎下腺腺房細胞、導管細胞、耳下腺腺房細胞、膵臓外分泌腺細胞では管腔側に高密度で局在していることが報告されている(膵臓外分泌腺細胞では I 型  $IP_3R$  と II 型  $IP_3R$ 、顎下腺導管細胞では III 型  $IP_3R$ 、顎下腺と耳下腺の腺房細胞では II 型  $IP_3R$  と III 型  $IP_3R$ (Nathanson, M.H., et al. (1992) *J Biol Chem* **267**, 18118-18121; Lee M.G., et al. (1997) *J Biol Chem* **272**, 15765-15770; Yule, D.I., et al. (1997) *J Biol Chem* **272**, 9093-9098; Yamamoto-Hino, M., et al. (1998) *J Cell Biol* **141**, 135-142; Zhang, X.J., et al. (1999) *Biochem J* **340**, 519-527)。また顎下腺導管細胞における II 型  $IP_3R$  の局在と  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の開始部位がよく一致すること(Lee M.G., et al. (1997) *J Biol Chem* **272**, 15765-15770)、あるいは II 型  $IP_3R$  は 3 つの  $IP_3R$  のなかで最も  $IP_3$  と親和性が高いこと(Miyakawa, T., et al. (1999) *EMBO J* **18**, 1303-1308)から、特に II 型  $IP_3R$  が時空間的な  $[Ca^{2+}]_i$  の制御におけるカルシウム動員の引き金として重要視されている。しかしこれらの研究は、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇の開始部位と、 $IP_3R$  の細胞内局在の関係について検討しているだけにとどまり、「なぜ  $IP_3R$  が特異な細胞内局在を示すのか」という根本的な疑問に対する研究にまでは至っていない。

(2)  $IP_3R$  の細胞内局在を決定するのに必要な細胞内因子についてはほとんど理解されていない。近年いくつかの細胞骨格分子や足場

タンパク質が  $IP_3R$  と相互作用することが報告されてきているが、これらが  $IP_3R$  の細胞内局在維持に参与しているのではないかと推察されているだけである(Vermassen, E., et al. (2004) *Biol Cell* **96**, 3-17)。例えば actin 繊維は接着分子 talin や vinculin とともに I 型  $IP_3R$  と結合することが報告されている。また ankyrin は全ての  $IP_3R$  と結合すること、足場タンパク質 homer や細胞骨格タンパク質 4.1N が I 型  $IP_3R$  と直接結合することが報告されている。

(3) 近年、平滑筋細胞を用いた実験で、I 型  $IP_3R$  が  $IP_3$  receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG)、 $PKG I \beta$  とともに結合し、ヘテロ複合体を形成していること。そして cyclic GMP 存在下で  $PKG I \beta$  を活性化させると、IRAG がリン酸化され、これが I 型  $IP_3R$  からの  $Ca^{2+}$  放出を阻害し、平滑筋の弛緩を誘導することが報告された(Schlossmann, J., et al. (2000) *Nature* **404**, 197-201; Geiselhoringer, A., et al. (2004) *EMBO J* **23**, 4222-4231)。我々は、これまでに、 $IP_3R$  を安定発現する DT40-3KO 細胞(DT40( $IP_3R$ )細胞)を作成し、これらに IRAG、 $PKG I \beta$  を一過性に発現させた系を用いて、全ての  $IP_3R$  が IRAG、 $PKG I \beta$  とともに複合体を作り、cyclic GMP 存在下で有意にムスカリン性刺激による  $IP_3R$  からの  $Ca^{2+}$  放出を阻害することを見いだした。そのなかで DT40( $IP_3R$ )細胞における IRAG の発現は、細胞質内のある局所に集中していた。しかし、 $IP_3R$  と結合できないようにした変異型 IRAG を発現させると、局所への集中は観察されなかった。また DT40-3KO 細胞に IRAG を発現させても局所への集中は観察されなかった。

2. 研究の目的

唾液腺細胞内で  $IP_3R$  は管腔内に局在し、これを介した細胞内  $Ca^{2+}$  プールからの  $Ca^{2+}$  動員は唾液分泌において必須である。しかしながら「なぜ  $IP_3R$  が特異な細胞内局在を示すのか」という根本的な疑問に対する研究にまで至っていない。我々はこれまでに  $IP_3R$  が DT40 細胞内のある局所に集中局在することを発見した。そこで今回、我々は  $IP_3R$  と IRAG との結合が小胞体内での局在に重要であるとの仮説をたて、 $IP_3R$  分子内における IRAG との結合領域の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 各種変異 I 型、II 型、III 型 IP<sub>3</sub>R 発現ベクターの作製と遺伝子導入: I 型 IP<sub>3</sub>R に由来する 4 種の断片(断片 1+2, 断片 3, 断片 4, 断片 5)をコードする cDNA をラット I 型 IP<sub>3</sub>R cDNA を鋳型として PCR により増幅し、pMYC-CMV ベクターに組み込んだ。種々の C 末端欠損 I 型 IP<sub>3</sub>R 断片 3 をコードする cDNA もラット I 型 IP<sub>3</sub>R cDNA を鋳型として PCR により増幅し、pMYC-CMV ベクターに組み込んだ。4 種の部分欠損 I 型 IP<sub>3</sub>R(Δ4627-4686, Δ4687-4750, Δ4663-4711, Δ4627-4662, 4712-4750)は Quickchange Lightning Kit (Stratagene 社)を用いて作製した。同様にして、II 型、III 型 IP<sub>3</sub>R に対しても、I 型の部分欠損変異体と同じ領域を欠損させるように設計したプラスミドベクターを構築した。COS7 細胞は 10 % FBS、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> で培養した。一過的な遺伝子導入は操作マニュアルに従い、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社)を用いて行った。遺伝子導入して 24 時間後、COS7 細胞を回収し、免疫沈降を行った。

(2) 免疫沈降: 遺伝子導入した COS7 細胞を可溶化緩衝液とともに 30 分、4 °C で混和した後、遠心(10,000 *x g*, 5 分)し、上清を得た。上清を Protein G-agarose (SantaCruz 社)とともに 1 時間、4 °C で混和した。これを遠心(2,000 *x g*, 1 分)して得られた上清に、抗 GFP モノクローナル抗体(Roche 社)を加え、1 時間、4 °C で混和した。さらにこれに Protein G-agarose を加え、1 時間、4 °C で混和した。遠心(2,000 *x g*, 1 分)して得られた agarose を可溶化緩衝液で 3 回洗浄後、ウエスタンブロットにより解析した。

(3) Ca<sup>2+</sup>イメージング: M3 受容体を安定発現する DT40-3KO 細胞に I 型、II 型、III 型いずれかの変異 IP<sub>3</sub>R と IRAG もしくは IRAG ΔE12、そして PKG Iβ を共発現させた後、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬 fura-2 を取り込ませ、様々な刺激時における細胞内 Ca<sup>2+</sup>蛍光の変化をモニターした(浜松ホトニクス社)。

#### 4. 研究成果

(1) IP<sub>3</sub>R、IRAG、PKG Iβ は *in vitro* でヘテロ複合体を形成する。

①IP<sub>3</sub>R 分子内の特定のセリン残基が PKA 等によりリン酸化されると、IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出が増強された。

②IP<sub>3</sub>R/IRAG/ PKG Iβ ヘテロ複合体形成時に、PKG Iβ が活性化され、IRAG 分子中の 696 番目のセリン残基がリン酸化されると、IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出が抑制された。

③変異 IRAG 分子(IRAGΔE12)は PKG Iβ とは結合できるが、IP<sub>3</sub>R とは結合できない

ため、PKG Iβ が活性化されても IP<sub>3</sub>R からの Ca<sup>2+</sup>放出抑制は起らなかった。

④IRAGΔE12 分子は野生型 IRAG 分子内の Coiled-Coil 領域の N 末端側約半分にあたる 46 アミノ酸残基を欠如する。この領域は IP<sub>3</sub>R との結合に必須であった。

(2) I 型 IP<sub>3</sub>R が IRAG/ PKG Iβ と複合体を形成すると PKA によるリン酸化と I 型 IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出の増強が消失する。

①cBIMPS により PKA が活性化すると I 型 IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出が増強された。

②IRAG と PKG Iβ の共存下では cBIMPS 処理による I 型 IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出の増強が消失した。

③IRAGΔE12 と PKG Iβ の共存下では cBIMPS で処理することにより I 型 IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出が増強された。

④ IRAG と PKG Iβ の共存下では Forskolin/IBMX 処理による I 型 IP<sub>3</sub>R のリン酸化が抑制された。

(3) II 型 IP<sub>3</sub>R が IRAG/ PKG Iβ と複合体を形成しても PKA によるリン酸化と II 型 IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出の増強には影響しない。

①cBIMPS により PKA が活性化すると II 型 IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出が増強された。

②IRAG と PKG Iβ の共存下でも cBIMPS 処理により II 型 IP<sub>3</sub>R 依存性 Ca<sup>2+</sup>放出の増強がおこった。

③ IRAG と PKG Iβ の共存下でも Forskolin/IBMX 処理により II 型 IP<sub>3</sub>R のリン酸化がおこった。

(4) I 型 IP<sub>3</sub>R 分子内の”断片 3”領域の C 末端に近い領域が IRAG との複合体形成に重要である。

①ラット I 型 IP<sub>3</sub>R をコードする遺伝子を 4 つの領域に分断し、それぞれ myc タグを付加した形でクローニングした。それぞれの断片と IRAG(GFP)あるいは IRAGΔE12(GFP)を COS7 細胞に共発現させ、抗 GFP モノクローナル抗体で免疫沈降させた時、断片 3 のみが共沈されてきた。

②”断片 3”の様々な C 末端欠失断片を myc タグが付加された形でクローニングした。それぞれの欠失断片と IRAG(GFP)あるいは IRAGΔE12(GFP)を COS7 細胞に共発現させ、抗 GFP モノクローナル抗体で免疫沈降させた時、C 末端側から 40 アミノ酸残基(120bp)以上欠失させると断片が共沈されてこなかった。

(5) I 型 IP<sub>3</sub>R 分子内”断片 3”の C 末端側 40 残基中の複数箇所が IRAG との結合に重要である。

①部分欠損 I 型 IP<sub>3</sub>R(I 型 IP<sub>3</sub>RΔ4627-4750)

をクローニングした。部分欠損 I 型 IP<sub>3</sub>R(I 型 IP<sub>3</sub>RA4627-4750) と IRAG(GFP) を COS7 細胞に共発現させ、抗 GFP モノクローナル抗体で免疫沈降させた時、部分欠損 I 型 IP<sub>3</sub>R は共沈されてこなかった。

②部分欠損 I 型 IP<sub>3</sub>R(I 型 IP<sub>3</sub>RA4627-4750) は、IRAG(GFP) と PKG Iβ の共存下でも Forskolin/IBMX 処理によりリン酸化がおこった。

③さらに詳細な結合領域を同定するために、3 種の部分欠損 I 型 IP<sub>3</sub>R(I 型 IP<sub>3</sub>RA4627-4686、I 型 IP<sub>3</sub>RA4687-4750、I 型 IP<sub>3</sub>RA4663-4711、IP<sub>3</sub>RA4627-4662、4712-4750) をクローニングした。それぞれの部分欠損 I 型 IP<sub>3</sub>R と IRAG(GFP) を COS7 細胞に共発現させ、抗 GFP モノクローナル抗体で免疫沈降させた時、IP<sub>3</sub>RA4627-4662,4712-4750 のみが共沈されてこなかった。

④部分欠損 I 型 IP<sub>3</sub>RA4627-4662,4712-4750 は、IRAG(GFP) と PKG Iβ の共存下でも Forskolin/IBMX 処理によりリン酸化がおこった。

(6) II 型、III 型 IP<sub>3</sub>R も I 型 IP<sub>3</sub>R と同じ領域で IRAG と結合する。

①II 型、III 型 IP<sub>3</sub>R に対しても、I 型の部分欠損変異体と同じ領域を欠損させた変異体をクローニングした。それぞれの部分欠損 II 型 IP<sub>3</sub>R あるいは III 型 IP<sub>3</sub>R と IRAG(GFP) を COS7 細胞に共発現させ、抗 GFP モノクローナル抗体で免疫沈降させた時、II 型、III 型変異体共に共沈されてこなかった。

(7) I 型/II 型 IP<sub>3</sub>R と IRAG の結合領域と PKA による IP<sub>3</sub>R のリン酸化部位との関係。

①I 型 IP<sub>3</sub>R の PKA によるリン酸化部位は、IRAG との結合領域に近接し、I 型 IP<sub>3</sub>R が IRAG、PKG Iβ とヘテロ複合体を形成すると、これらのリン酸化部位が立体的にマスクされたような状態となり、PKA によるリン酸化が阻害されると考えられた。

②一方 II 型 IP<sub>3</sub>R の場合、II 型 IP<sub>3</sub>R でも I 型 IP<sub>3</sub>R と同じ部位で IRAG と結合するが、この領域は PKA によってリン酸化されるセリン残基(937 番目)と一次配列レベルで C 末端側に十分離れており、ヘテロ複合体を形成しても PKA はセリン残基へアクセス可能であり、リン酸化できると考えられた。

今回の研究から得られた結果から、I 型 IP<sub>3</sub>R が IRAG/ PKG Iβ とヘテロ複合体を形成することで、PKA のリン酸化による IP<sub>3</sub>R からの Ca<sup>2+</sup>放出増強を遮断することが可能となる。このことは、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化の時空間的な修飾に関わっているのかもしれない

いという新たな細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度調節メカニズムの存在を示唆する発見となった。今後、このようなメカニズムが実際の生体内に存在し、機能しているのかについて、*in vivo* 実験系を用いて検討していきたいと考える。

#### 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)

① Masuda W., Betzenhauser M.J., Yule D.I., InsP<sub>3</sub>R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) determines inositol 1,4,5-trisphosphate receptors susceptibility to phosphoregulation by cyclic nucleotide dependent kinases. *J. Biol. Chem.* 285: 37927-37938, 2010.

[学会発表] (計 3 件)

① 増田 渉, 福島秀文, 自見英治郎, IP<sub>3</sub>R 分子内における IRAG 結合部位, 第 54 回歯科基礎医学会, 郡山(9 月), 2012.

② 増田 渉, 自見英治郎, IP<sub>3</sub>R 分子内における IRAG 結合領域の同定, 第 84 回日本生化学会大会, 京都(9 月), 2011.

③ 増田 渉, Betzenhauser M.J., Yule D.I., IP<sub>3</sub>R /IRAG/PKG Iβ 複合体における Ca<sup>2+</sup>放出機構. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸(12 月), 2010.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田 渉 (MASUDA WATARU)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：80295865

(2)研究分担者

自見 英治郎 (JIMI EIJIROU)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：40276598

(3)連携研究者

福島 秀文 (FUKUSHIMA HIDEFUMI)  
九州歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：70412624

(4)研究協力者

Yule D.I.  
米国ロチェスター大学・教授