

平成23年 5月 31日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21870049

研究課題名（和文）

IP₃シグナル制御タンパク質IRBITファミリーによるリン脂質代謝制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of phospholipid metabolisms by IRBIT family

研究代表者

安東 英明 (ANDO HIDEAKI)

独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・客員研究員

研究者番号： 50373262

研究成果の概要（和文）： IRBIT/Long-IRBIT と PIP₂合成酵素との相互作用の解析を行った。IRBIT はマウス脳において PIP₂合成酵素 I 型 α と特異的に結合し、その結合は直接的なものだった。一方、Long-IRBIT は PIP₂合成酵素 I 型とは結合しなかった。IRBIT のリン酸化部位、及び PIP₂合成酵素 I 型 α の活性中心のアミノ酸が結合に関与していた。さらに、IRBIT は PIP₂合成酵素 I 型 α の活性を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We analyzed the interaction between IRBIT/Long-IRBIT and PIP kinase family. IRBIT specifically bound to PIPKI α in mouse brain and the interaction was direct. On the contrary, Long-IRBIT did not interacted with PIPKI. The interaction between IRBIT and PIPKI α was dependent on the phosphorylation sites of IRBIT and the catalytic amino acid of PIPKI α . Furthermore, in vitro lipid kinase assay suggested the possibility that IRBIT suppresses the activity of PIPKI α .

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,110,000 | 333,000 | 1,443,000 |
| 2010年度 | 1,010,000 | 303,000 | 1,313,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,120,000 | 636,000 | 2,756,000 |

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：IRBIT、PIP₂合成酵素、イノシトールリン脂質、タンパク質相互作用

1. 研究開始当初の背景

細胞外刺激により細胞膜の PIP₂ が加水分解されると、セカンドメッセンジャー IP₃ が産生される。IP₃ は、細胞内カルシウムチャネル

IP₃ 受容体を活性化し、カルシウム放出を誘導する。IP₃ 受容体は、細胞内カルシウム動態の制御に中心的な役割を果たしており、受精、発生・分化、細胞死、分泌、シナプス可塑性など多様な生理現象

を制御している。我々はこれまでに、IP₃受容体に結合する新規タンパク質 IRBIT を発見しており、IRBIT が IP₃受容体の IP₃結合領域に IP₃と拮抗して結合することにより、IP₃受容体の活性化を抑制することを解明してきた。

また、IRBIT の相同タンパク質である Long-IRBIT は、IRBIT と 90%近い相同性を持つが、N 末端に他のタンパク質と相同性を持たないユニークなドメインを持つ。このドメインのために、Long-IRBIT は IP₃受容体との結合活性を持たず、その機能は不明である。

我々は、IRBIT および Long-IRBIT からなる IRBIT ファミリーのさらなる機能を解明する目的で、IRBIT ファミリーと結合するタンパク質の探索を行った。IRBIT ファミリーを免疫沈降し、共沈殿する分子を質量分析機で解析した結果、PIP₂合成酵素が候補分子として同定された。PIP₂は、IP₃や PIP₃の前駆体であるだけでなく、それ自身もアクチン細胞骨格、endocytosis/exocytosis、内膜輸送、チャネル活性などを制御する重要なシグナル分子である。PIP₂合成の制御機構を解析することは、IP₃/リン脂質代謝の制御機構を解明する上で重要な意義があると考えられる。

2. 研究の目的

IRBIT ファミリーと PIP₂合成酵素との相互作用とその生理的意義について解明することを目的とする。

(1) IRBIT ファミリーと PIP₂合成酵素ファミリーとの結合解析

PIP₂合成酵素には、PI(4)P をリン酸化して PIP₂を産生する I 型と、PI(5)P をリン酸化して PIP₂を産生する II 型がある。I 型、II 型ともそれぞれ α , β , γ の 3 種類のアイソフォームが存在する。IRBIT ファミリーが結合する PIP₂合成酵素のアイソフォームとその特異性を解析する。

また、IRBIT はリン酸化されることにより、IP₃受容体の IP₃結合領域に、IP₃が相互作用するアミノ酸を認識して結合する。すなわち IRBIT は IP₃と類似の結合様式で IP₃受容体に結合する。IP₃と PIP₂合成酵素の基質 PI(4)P あるいは PI(5)P とは構造的に共通部分が多いことから、IRBIT が PIP₂合成酵素の基質認識部位を認識して、PIP₂合成酵素に結合する可能性が示唆される。また、PIP₂合成酵素の酵素活性中心部位や、細胞膜への targeting に関わる正電荷アミノ酸が結合に関与する可能性も推測される。これらの可能性を検証する。

さらに、PIP₂合成酵素との結合に、IRBIT ファミリーのリン酸化が必要であるか解析する。

(2) IRBIT ファミリーによる PIP₂合成酵素の

活性制御機構の解析

IRBIT 及び Long-IRBIT が、PIP₂合成酵素の酵素活性を制御する可能性を、*in vitro*でのリン脂質リン酸化アッセイなどで解析する。

また、PIP₂はアクチン細胞骨格を制御することから、IRBIT ファミリーが PIP₂合成酵素の制御を介してアクチン細胞骨格系を制御する可能性を解析する。

さらに、IRBIT ファミリーによる PIP₂合成酵素制御が、IP₃産生に及ぼす影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 発現ベクター、抗体、組み換えタンパク質

IRBIT, Long-IRBIT の発現ベクターは、各々の cDNA をホ乳細胞用発現ベクターにクローニングして作製した。PIP₂合成酵素各アイソフォームの発現ベクターは、神戸大学医学部竹縄教授の研究室より譲渡を受けた。IRBIT 及び PIP₂合成酵素 I 型 α の欠失変異体、部位特異的変異体は、通常の PCR 法により作製した。

IRBIT, Long-IRBIT に対する特異的抗体は、各々の N 末端領域の組み換え精製タンパク質をウサギに免疫することにより作製した。PIP₂合成酵素各アイソフォームに対する特異的抗体、抗 HA 抗体、抗 myc 抗体は、試薬メーカーより購入した。

組み換え IRBIT タンパク質は、His タグを付加した IRBIT を昆虫細胞で発現し、ニッケルカラムで精製した。組み換え PIP₂合成酵素 I 型 α タンパク質は、FLAG タグを付加した PIP₂合成酵素 I 型 α を大腸菌、あるいは COS-7 細胞で発現し、抗 FLAG 抗体ビーズで精製した。あるいは、GST と融合した PIP₂合成酵素 I 型 α を大腸菌で発現し、グルタチオンセファロースビーズで精製した。

(2) 結合解析

培養細胞を用いた免疫沈降法では、HA タグを付加した IRBIT/Long-IRBIT、および myc タグを付加した PIP₂合成酵素ファミリーの発現ベクターを COS-7 細胞に遺伝子導入し、抗 HA 抗体および抗 myc 抗体で免疫沈降を行った。IRBIT や PIP₂合成酵素 I 型 α の突然変異体を用いた解析も同様にして行った。

マウスの脳を用いた免疫沈降法では、マウス脳抽出液に、抗 IRBIT 抗体、抗 Long-IRBIT 抗体、あるいは PIP₂合成酵素の各アイソフォームに対する特異的抗体を加えて免疫沈降を行った。

プルダウン法では、IRBIT やその変異体を過剰発現した COS-7 細胞の抽出液に、PIP₂合成酵素 I 型 α の GST 融合タンパク質を添加して行った。

(3) PIP₂合成酵素の活性測定

組み換え PIP₂合成酵素 I 型 α タンパク質を、組み換え IRBIT タンパク質の存在/非存在下で氷上で静置後、基質である PI(4)P と [γ -³²P]ATP を添加し、37 度で酵素反応を行った。反応液から脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで展開した。生成された PIP₂の放射比活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

4. 研究成果

(1) 結合のアイソフォーム特異性

IRBIT/Long-IRBITとPIP₂合成酵素の6種類アイソフォームとの結合特異性を解析した。COS-7細胞に過剰発現して、免疫沈降法で結合解析した結果、IRBITは、6種類すべてのアイソフォームと結合した。しかし、マウスの脳を用いた免疫沈降法により内在性タンパク質同士の結合を解析したところ、IRBITはPIP₂合成酵素I型αとのみ特異的に結合した。この結果より、*in vivo*においては、IRBITはPIP₂合成酵素I型αと結合していることが明らかになった。ただし、良い抗体が入手できないアイソフォームがあることや、脳以外の組織では解析していないことなどから、IRBITがPIP₂合成酵素の他のアイソフォームとも結合する可能性は否定できない。

また、精製した組み換えタンパク質同士の結合解析により、IRBITはPIP₂合成酵素I型αに直接結合することが示された。

一方、Long-IRBITは、過剰発現での免疫沈降法では、PIP₂合成酵素I型には結合せず、PIP₂合成酵素II型にのみ結合した。ただし、マウスの脳を用いた免疫沈降法では、現時点では結合は確認できておらず、さらなる解析が必要である。

以上の結果より、IRBITとPIP₂合成酵素I型αとの結合が最も確からしいとの結果を得たので、以降は主にこの両者に絞って解析を行った。

(2) IRBITのリン酸化部位の変異解析

IRBITはN末端近傍にセリンに富む配列があり、この配列が複数箇所リン酸化されることにより、IP₃受容体と結合する。このセリンに富む配列がPIP₂合成酵素I型αとの結合に関与する可能性を調べるため、N末端を欠失する変異体とPIP₂合成酵素I型αとの結合を免疫沈降法およびプルダウン法で解析した。その結果、セリンに富む配列が結合に必須であることが明らかになった。さらに、セリンの部位特異的突然変異体の結合を解析したところ、IRBITのSer68, Ser71, Ser74が結合に必須であることが明らかになった。これらのセリン残基は既知のリン酸化部位であることから、PIP₂合成酵素I型αとの結合にはIRBITのリン酸化が必要である可能性が示唆された。

(3) PIP₂合成酵素I型αの部位特異的突然変異体の結合解析

PIP₂合成酵素I型αの酵素活性中心であるアミノ酸Lys179, Asp307, Asp389に部位特異的突然変異を導入し、IRBITとの結合を解析したところ、Asp389の変異により結合が顕著に低下することが明らかになった。この結

果より、PIP₂合成酵素I型αの酵素活性中心がIRBITとの結合に関与する可能性が示唆された。

また、PIP₂合成酵素I型αの基質認識に関与するアミノ酸への変異導入では、IRBITとの結合への影響はわずかしか見られなかった。さらに、PIP₂合成酵素I型αの細胞膜へのtargetingに関与する正電荷アミノ酸の部位特異的変異解析により、Arg225がIRBITとの結合に関与することが明らかになった。

(4) *In vitro*でのIRBITによるPIP₂合成酵素I型αの活性制御

PIP₂合成酵素I型αのPIP₂合成活性をIRBITが制御する可能性を解析した。組み換えPIP₂合成酵素I型αタンパク質を精製し、組み換えIRBITタンパク質の存在/非存在下で、*in vitro*でのPIP₂合成活性を測定した。その結果、IRBITの存在下で、PIP₂合成活性が顕著に低下した。この結果より、IRBITがPIP₂合成酵素I型αの酵素活性を抑制する可能性が示唆された。

(5) IRBITによる細胞内でのPIP₂産生制御

現在、生細胞内でIRBITがPIP₂産生を制御する可能性を、HeLa細胞などの培養細胞を用いて解析している。また、PIP₂の下流に位置するIP₃産生に及ぼす影響を解析している。

また、PIP₂合成酵素I型αは、PIP₂産生を介してアクチン細胞骨格を制御することにより、neuroblastoma細胞の突起伸張を制御することが報告されている。現在、IRBITがPIP₂合成酵素I型α活性制御を介して、これらの現象を制御する可能性を解析している。

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5件)

① Yang D, Li Q, So I, Huang CL, Ando H, Mizutani A, Seki G, Mikoshiba K, Thomas PJ, Muallem S. IRBIT governs epithelial secretion in mice by antagonizing the WNK/SPAK kinase pathway. *J. Clin. Invest.* 121(3):956-965, 2011. (査読有り)

② Mizutani A, Kawaai K, Hisatsune C, Ando H, Michikawa T, Mikoshiba K. Isolation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associating proteins and selective knockdown using RNA interference. *Methods Mol. Biol.* 645:133-141, 2010. (査読無し)

③ Ando H[#], Mizutani A[#], Mikoshiba K. An IRBIT homologue lacks binding activity to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor due to the unique N-terminal appendage. *J. Neurochem.* 109(2):539-550, 2009. [#]equal contribution. (査読有り)

- ④ Kiefer H, Mizutani A, Iemura S, Natsume T, Ando H, Kuroda Y, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor-binding protein released with inositol 1,4,5-triphosphate (IRBIT) associates with components of the mRNA 3' processing machinery in a phosphorylation-dependent manner and inhibits polyadenylation. *J. Biol. Chem.* 284(16):10694-10705, 2009. (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(1):193-202, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計1件)

- ① 安東 英明、水谷 顕洋、御子柴 克彦
IP₃受容体結合タンパク質 IRBIT のホモログ
Long-IRBIT の発現・機能解析
第82回日本生化学会大会
2009年10月21～24日(神戸ポートアイランド)

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

- ① 名称 : Control of function of intracellular Ca ion
発明者 : Mikoshiba K, Mizutani A, Ando H
権利者 : Japan Science and Technology Agency
番号 : US 7709441 B2
取得年月日 : 2010年5月4日登録
国内外の別 : アメリカ合衆国

- ② 名称 : 細胞内 Ca イオンの機能制御
発明者 : 御子柴克彦、廣田順二、安東英明
権利者 : 独立行政法人科学技術振興機構
番号 : 特許第 4472534 号
取得年月日 : 2010年3月12日登録
国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

<http://mikoshiba-lab.brain.riken.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安東 英明 (ANDO HIDEAKI)
独立行政法人理化学研究所・発生神経生物研究チーム・客員研究員
研究者番号 : 50373262

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

竹縄 忠臣 (TAKENAWA TADAOMI)
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号 : 40101315

伊集院 壮 (IJUIN TAKESHI)
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号 : 00361626

伊藤 俊樹 (ITOH TOSHIKI)
神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号 : 30313092