

Title	Critical Regions for Activation Gating of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor
Sub Title	イノシトール三リン酸受容体におけるチャネル開口に必須な領域の同定
Author	内田, 敬子(Uchida, Keiko)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.1 (2006. 3) ,p.13-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060302-0013">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060302-0013</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Critical Regions for Activation Gating of the Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor

(イノシトール三リン酸受容体におけるチャネル開口に必要な領域の同定)

内 田 敬 子

## 内容の要旨

イノシトール1,4,5三リン酸 (IP<sub>3</sub>) 受容体 (IP<sub>3</sub>R) は小胞体上に存在するCa<sup>2+</sup>放出チャネルである。細胞外刺激により形質膜から細胞内に遊離したIP<sub>3</sub>がIP<sub>3</sub>Rに結合することにより、小胞体内に貯蔵されたCa<sup>2+</sup>が細胞質に放出される。IP<sub>3</sub>Rを介するCa<sup>2+</sup>放出は、多くの生命現象にかかわる細胞内シグナル伝達の一つである。

IP<sub>3</sub>Rは、3種のサブタイプ (IP<sub>3</sub>R1、IP<sub>3</sub>R2、IP<sub>3</sub>R3) が組み合わされたホモまたはヘテロ四量体であり、6回膜貫通領域の第5、第6領域の間に存在する配列によってCa<sup>2+</sup>イオンが通過するポアを形成すると考えられている。各サブタイプは、IP<sub>3</sub>結合ドメイン、修飾カップリングドメイン、膜貫通チャネル形成ドメインの3つのドメインからなると考えられてきたが、IP<sub>3</sub>結合がチャネル開口を引き起こす分子メカニズムは未だ不明である。本研究ではマウスIP<sub>3</sub>R1の欠失および点変異体のチャネル活性を測定することで、IP<sub>3</sub>Rのチャネル開口に必要な領域を同定した。

方法 マウスIP<sub>3</sub>R1のcDNAをもとに、IP<sub>3</sub>結合領域と膜貫通チャネル形成領域を除くほぼ全ての領域を網羅的に欠損させた変異型を9種類作成した。また、膜貫通領域近傍で、IP<sub>3</sub>Rサブタイプ間において相同性が高く、さらに細胞内Ca<sup>2+</sup>放出チャネルであるリアノジン受容体とも相同性の高い領域について、cysteine残基をserineに置換した点変異型4種類を作成した。すべての内在性IP<sub>3</sub>Rを欠く細胞株であるR23-11細胞を用いて、これら全13種類の変異受容体を安定に発現する細胞株を樹立した。それぞれの安定発現株からマイクロソーム画分を調整し、IP<sub>3</sub>結合能、Ca<sup>2+</sup>放出能、蛋白質フォールディングを、変異型IP<sub>3</sub>Rと野生型と比較した。

結果 1から223番目のアミノ酸領域を欠失、651から1130番目のアミノ酸領域を欠失、または、2613番目のcysteine残基を置換した変異型IP<sub>3</sub>R3種においてのみ、IP<sub>3</sub>結合活性およびフォールディングは野生型と同等であったにもかかわらず、Ca<sup>2+</sup>放出能が完全に消失していた。よって、これらの領域がIP<sub>3</sub>結合によるチャネル開口に必須であると考えた。

考察 既に報告されている他のイオンチャネルの解析結果と併せて、IP<sub>3</sub>結合シグナルが、N末端及び中間カップリングドメインを介してC末端ドメインへ伝達され、C末端ドメインが直接ポアに作用し開口を引き起こす、と結論した。以上の結果をもとに、IP<sub>3</sub>Rの構造に関して、N末端カップリングドメイン・IP<sub>3</sub>結合ドメイン・中間カップリングドメイン・膜貫通ドメイン・C末端ドメインの5ドメインからなるという5ドメイン構造モデルを提唱した。

## 論文審査の要旨

イノシトール三リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R) において、IP<sub>3</sub>結合領域の立体構造やチャネル形成領域の機能に関する解析が進められているが、IP<sub>3</sub>結合によるチャネル開口のメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、IP<sub>3</sub>Rのチャネル開口機構を解明する目的で、チャネル開口に必須の領域を特定した。まず、3種類全ての内在性IP<sub>3</sub>Rを欠失させたDT40細胞由来の細胞株を用い、マウス1型IP<sub>3</sub>Rのチャネル機能解析系を確立した。次いで、同分子について、IP<sub>3</sub>結合領域と膜貫通領域を除く領域を網羅的に欠損させた変異型、およびチャネル形成領域近傍のCysteine残基の点変異型を作成し、各々について機能解析を行った。IP<sub>3</sub>結合能と立体構造が正常であるにもかかわらずCa<sup>2+</sup>放出能を持たない変異型を特定することにより、1から223番目、651から1130番目の2領域、および2613番目のCysteine残基がチャネル開口のために必須であると結論した。IP<sub>3</sub>結合シグナルが、N末端ドメイン、およびIP<sub>3</sub>結合領域と膜貫通領域の間にある中間カップリングドメインを介してC末端ドメインへ伝達され、C末端ドメインが直接ポアに作用し開口を引き起こすと考えられた。

審査では、IP<sub>3</sub>結合が非協同性である一方、IP<sub>3</sub>結合による開口は正の協同性があることについて質問され、1サブユニットで起こるIP<sub>3</sub>結合と四量体におけるチャネル開口の協同性に関しては、別の解釈が必要であると回答された。審査員より親和性や協同性について慎重な議論が必要と指摘された。N末端と2613番目のCysteineのカップリングのメカニズムについて質問され、電位依存性K<sup>+</sup>チャネルと同様に、第4、5膜貫通領域間の細胞質側ループを介している可能性があるかと回答された。欠損変異型D651-1130のIP<sub>3</sub>結合能が低い理由について質問され、欠損領域はIP<sub>3</sub>結合領域から続くαヘリックス領域であると考えられ、IP<sub>3</sub>結合能に影響することが予測されること、また、欠損領域内のCa<sup>2+</sup>結合領域の意義については現在検討中であると回答された。変異型IP<sub>3</sub>Rは四量体を形成しているかと質問され、クロスリンク法などにより、第5、6膜貫通領域とそれに続くC末端が四量体形成に重要であることが既に報告されている、と回答された。チャネル機能を消失した変異型のIP<sub>3</sub>Rは、ドミナントネガティブ型としての機能を有するかと質問され、同変異体のドミナントネガティブ効果については検討中であると回答された。最後に、少なくとも本研究の実験系においては、quantal releaseの実体が示されたとは言い難く、議論の余地があることが確認された。

以上のように、本研究は、今後検討されるべき課題を残しているものの、多彩な生理現象・病態に関わるIP<sub>3</sub>Rのチャネル開口機構に新たな概念を投入する有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 幸雄  
生理学 岡野 栄之 生理学 柚崎 通介  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者：北島 政樹、岡野 栄之  
審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成17年10月17日