

IP₃ 依存性カルシウム放出機構の分子的・生理的基礎

The molecular and physiological studies on the IP₃ induced calcium release

代表研究者 東京大学医科学研究所化学研究部門助手 宮脇 敦史
Res. Assoc., Dept. of Molecular Neurobiology, The Institute of Medical
Science, The Univ. of Tokyo
Atsushi MIYAWAKI

The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor directs the InsP₃-induced Ca²⁺ release (IICR) from intracellular stores such as the endoplasmic reticulum (ER) in a wide variety of cell types. The InsP₃ receptor, a homotetramer, exhibits an InsP₃-induced Ca²⁺ channel activity.

To investigate the structure-function relationships of the InsP₃ receptor, we analyzed the cDNA-derived mutant receptors expressed in eukaryotic or prokaryotic cells.

We have been interested in Asn-2475 and Asn-2503 in terms of *N*-glycosylation. Concanavalin A column chromatography with the receptors which have site-directed mutagenesis revealed that both the Asn-2475 and Asn-2503 are glycosylated. The assignment of the two Asn residues in the ER lumen led us to conclude that the receptor traverses the membrane six times. Based on the transmembrane topology (six membrane-spanning) and subunit organization (tetramer formation), we suggest that the InsP₃ receptor belongs to the superfamily that includes the voltage- and second messenger-gated ion channels on the plasma membrane.

IICR is modified by various factors including cAMP-dependent phosphorylation, ATP, Ca²⁺ ion, and calmodulin. Interaction with Ca²⁺/calmodulin is interesting in the light of intracellular Ca²⁺ dynamics such as Ca²⁺ oscillation or Ca²⁺ wave. The InsP₃ receptor was demonstrated to bind to calmodulin in the presence of Ca²⁺ ion. Furthermore, we localized the region required for calmodulin binding to amino acid residues 1565-1582. This region is close to S1589 which is phosphorylated by protein kinase A. It is suggested that calmodulin regulates the gating mechanisms of the InsP₃ receptor Ca²⁺ channel.

It is quite interesting to know the physiological significances of the IICR. What is the difference between the Ca²⁺ ion released from intracellular pools and that from the outside of the cell?

A related question is why are the InsP₃ receptors so concentrated in the cerebellar Purkinje cells? To study the InsP₃/Ca²⁺ signalling in the mouse brain, we analyzed by immunohistochemistry the expression patterns of metabotropic and ionotropic glutamate receptors (mGluR₁ and GluR₁). In the adult cerebellum, mGluR₁ is highly expressed in Purkinje cells and GluR₁ in Bergmann glial cells.

We have cloned the InsP₃ receptor cDNA of *Drosophila melanogaster*, and elucidated the functional domains for InsP₃ binding and for channel formation. From studies on the regional distribution of InsP₃ receptor mRNA expression and InsP₃ binding activity, we found that the receptor is expressed predominantly in legs and antennae, suggesting the importance of the PI signal system for sensory transduction and muscle contraction in insects.

We performed immunohistochemical experiments by using several non-neuronal cells with a monoclonal antibody (4C11) that was generated against the cerebellar InsP₃ receptor protein. 4C11 labeled the caveola structures on the plasma membrane of the endothelium, smooth muscle cell and keratinocyte. The 4C11 reactive protein, with an *M_r* of 240,000 by SDS-PAGE, was biotinylated with a membrane-impermeable reagent in intact cultured endothelial cells, which confirms the presence of the protein on the plasma membrane. We are assuming that a protein structurally homologous to InsP₃ receptor is present on caveola structure of the plasma membrane and might be involved in the Ca²⁺ flux.

研究目的

IP₃ は細胞内のセカンドメッセンジャーとして働き、IP₃ 受容体に結合して、小胞体などの細胞内 Ca²⁺ プールから Ca²⁺ を細胞質内に放出させ (IP₃ 依存性 Ca²⁺ 放出)、Ca²⁺ 依存性の種々の細胞機能を誘導する。この IP₃ を介する情報伝達系は、多くの生物種のさまざまな細胞で機能することが示されているが、その詳細な機構および生物学的意義はよくわかっていない。我々は IP₃ 依存性 Ca²⁺ 放出における中心的分子である IP₃ 受容体に注目し、すでに得ている抗 IP₃ 受容体抗体や IP₃ 受容体 cDNA を用いて以下に述べる観点から IP₃/Ca²⁺ 情報伝達機構を研究する。

1. IP₃ 依存性 Ca²⁺ 放出の分子機構、すなわち IP₃ 受容体の構造機能相関。

2. IP₃ 依存性 Ca²⁺ 放出の生理学的意義。IP₃ によって細胞内プールから放出される Ca²⁺ が、細胞外から流入する Ca²⁺ といかに異なるのだろうか。

研究の経過

IP₃ 受容体の構造機能相関

我々はマウス IP₃ 受容体タイプ 1 (IP₃R₁) cDNA を単離し、一次構造を決定した。cDNA を培養細胞へ導入し発現させる系を用いて、この蛋白質が、1) 4 量体を作って自らチャンネル活性を持つこと、2) N 末端領域が IP₃ 分子との結合に、また C 末端領域が 4 量体形成および Ca²⁺ チャンネル形成に関与すること、を明らかにした。さらにタイプ 1 以外の IP₃ 受容体 (IP₃R₂, IP₃R₃) や、マウス以外の生物種がもつ IP₃ 受容体のアミノ酸配列の比較から、IP₃ 受容体の Ca²⁺ チャンネル形成部位の一次構造が良く保存されていることがわかった。

1) 我々は IP₃R₁ の糖付加部位を調べることで、チャンネル形成領域の膜貫通様式モデル (6 回膜貫通) を提唱するに至った。形質膜にある膜電位感受性チャンネルやセカンドメッセンジャー依存性チャンネルもまた 6 回膜貫通する。IP₃ 受容体を含め、これら 6 回膜貫通型イオンチャンネルは基本的骨格を共有していると思われる。

2) IP₃ 依存性 Ca²⁺ 放出は種々の因子 (A キ

ナーゼ、ATP、Ca²⁺、カルモジュリン (CaM)) によって制御されることが予測される。ことに Ca²⁺、CaM による制御は、Ca²⁺ 振動など、ダイナミックな細胞内 Ca²⁺ 動態の成立に寄与していると考えられる。実際に約 0.3 μM の Ca²⁺ イオンが、IP₃ 受容体チャンネルの開口確率を増大させることが人工膜の系で証明された。我々は IP₃ 受容体が Ca²⁺ 存在下で (CaM) と結合することを示し、その機能調節の実体を探るため CaM 結合部位を調べた。

IP₃ 依存性 Ca²⁺ 放出の生理学的意義

3) IP₃ 受容体は、哺乳類小脳プルキンエ細胞に大量に存在するが、その意義はわかっていない。ところで、G 蛋白質、ホスホリパーゼ C を介して IP₃ 産生を起こすタイプのグルタミン酸受容体 (mGluR) の実体が明らかになった。プルキンエ細胞を中心に、脳における IP₃ 受容体の役割を明らかにし、ニューロンネットワークの高次機能を解明する目的で、IP₃ 受容体、および 2 種のグルタミン酸受容体 (イオン透過型、GluR₁; 代謝型、mGluR₁) の空間的・時間的分布を免疫組織学的に調べた。

4) 無脊椎動物の光応答には、IP₃ 依存性 Ca²⁺ 放出が関与すると考えられている。我々はキイロショウジョウバエの IP₃ 受容体 cDNA をクローニングした。さらにハエにおける IP₃ 受容体の分布 (ノザンプロット、IP₃ 結合実験) から昆虫における IP₃ 情報伝達系の意義を検討した。

5) 一般に IP₃ 受容体は、ER などの細胞内膜系のみ存在すると考えられているが、IP₃ 分子依存性の Ca²⁺ 電流がいくつかの細胞の細胞質膜で観察され、細胞質膜上に存在する IP₃ 受容体が議論されるようになった。我々は IP₃R₁ に対するあるモノクローナル抗体 (4C11) を用いた免疫組織学的研究の過程で、この抗体に反応する 240 kd の蛋白質を血管内皮細胞などの細胞質膜のカヴェオラ構造に検出した。

研究の成果

IP₃ 受容体の構造機能相関

1) IP₃ 受容体の糖鎖結合部位と膜貫通トポロジー

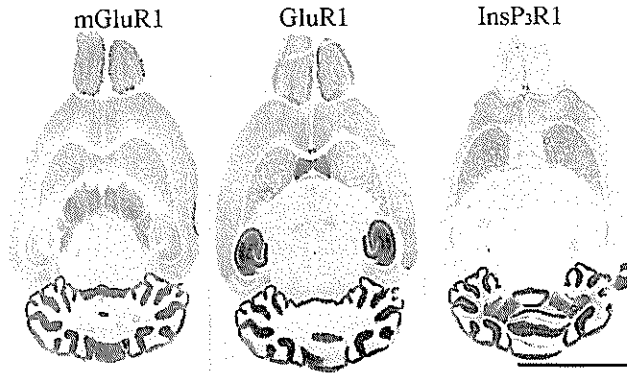


Fig. 1.

IP₃受容体の膜貫通様式として、我々の6回貫通モデルに対し、Sudhofらは8回貫通モデルを提唱している。両者モデル間で局在の異なるアミノ酸2463~2529の領域が小胞体のどちら側に位置するかを調べた。この領域には二つのAsn結合型糖鎖の共通配列(NXS/T)が存在し、その糖鎖付加を小胞体内腔局在の指標とした。2475と2503のAsnをGlnに置換した変異受容体では、Con-Aに対する結合活性が完全に消失していた。よってIP₃受容体のアミノ酸2463~2529の領域が小胞体内腔にあり、2475と2503の2か所にAsn結合型糖鎖が付加されることが明らかになった。これらの結果は、IP₃受容体が6回膜貫通型のイオンチャンネルであることを示唆する。

2) IP₃受容体のカルモジュリン結合領域の同定

種々の欠失変異IP₃受容体蛋白質を培養細胞および大腸菌内で発現させ、CaM結合に必要な領域を調べた。CaM結合はCaM-セフェロースへのCa²⁺依存性結合を指標にした。実験の結果、CaM結合には1565~1582の18アミノ酸残基が必須であることがわかった。この部位は、既知のCaM結合蛋白質のもつCaM結合モチーフとはかなり異なった二次構造を呈すると思われる。当初、IP₃受容体の全長アミノ酸配列から、典型的CaM結合部位がN末端領域(IP₃結合領域内)に見いだされたが、全くCaM結合に関係しないことが明らかになった。この1565~1582の領域

は、PKAによるリン酸化部位1589のごく近傍にあり、機能的に関連する可能性がある。いずれにせよIP₃依存性Ca²⁺放出の制御因子の作用部位はIP₃受容体の中央部位にあり、この部位がCa²⁺チャンネルのゲート機構にあずかると考えられる。

IP₃依存性Ca²⁺放出の生理学的意義

3) マウス脳におけるCa²⁺酸受容体の分布

代謝型(mGluR₁)およびnon-NMDA型(GluR₁)のグルタミン酸受容体に対する抗体を作製し、マウス脳内分布を解析した。抗原は、mGluR₁末端15アミノ酸、GluR₁末端14アミノ酸に相当する合成ペプチドを用いた。正常マウスにおいてmGluR₁は嗅糸球体層、視床、小脳分子層に、またGluR₁は嗅糸球体層、中隔核、海馬、歯状回、小脳分子層で強い発現が観察された(Fig. 1)。小脳分子層において、mGluR₁はプルキンエ細胞に発現が観察されたが、GluR₁はBergmannグリア細胞とプルキンエ細胞にて発現が示唆された。興味深いことに、プルキンエ細胞が変性脱落するpcdミュータントの小脳分子層ではGluR₁の著減が観察された。Bergmannグリア細胞自体の絶対数の減少や、プルキンエ細胞の変性による環境要因でBergmannグリア細胞でのGluR₁の発現が抑制されることが推測される。

4) ショウジョウバエにおけるIP₃情報伝達系
ショウジョウバエ頭部cDNAライブラリーからIP₃受容体cDNAをクローニングした。全長2833アミノ酸の配列は、マウスIP₃受容体のそ

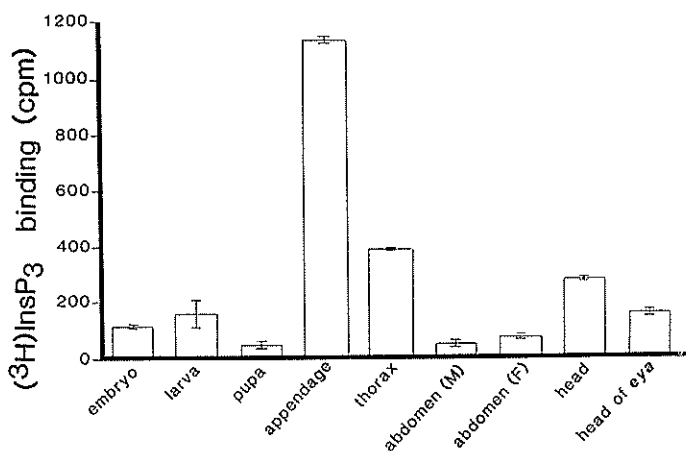


Fig. 2. Specific binding of [^3H]InsP $_3$ to membrane preparations from various stages and tissues of the wild type *Drosophila* and from heads of mutant *eya/eya*.

れと 57% の相同性が認められた。ことに IP $_3$ 結合領域とチャンネル形成領域において保存された配列が存在した。cDNA を発現ベクターに組み入れ、培養細胞で発現させたところ、特異的 IP $_3$ 結合活性が検出された。ノザンブロット解析にて、面白いことに、成虫の付属器(脚、触覚、剛毛)に IP $_3$ 受容体 mRNA の高い発現が観られた。トリチウムラベル IP $_3$ を用いた IP $_3$ 結合実験によっても、同様の発現パターンが得られた (Fig. 2)。さらに肉バエを使って、脚と触覚とを選び分けたところ、IP $_3$ 受容体は両器官に豊富に存在することがわかった。無脊椎動物の感覚器官(複眼、触覚)や運動器官(脚の筋肉)における IP $_3$ 情報伝達系の意義は興味のあるところである。ショウジョウバエの IP $_3$ 受容体遺伝子は第三染色体の 83A5-9 にマップされた。今後、分子遺伝学的手法を駆使した、個体レベルでの IP $_3$ 受容体研究が展開できる。

5) 細胞質膜カヴェオラ構造に見いだされる IP $_3$ 受容体様蛋白質

抗 IP $_3$ 受容体モノクローナル抗体 4C11 を用いて、イムノゴールドによる免疫電顕を行った。マウスの、血管内皮細胞、平滑筋細胞、表皮細胞の細胞質膜カヴェオラ構造に(膜の細胞質側に)陽性反応が検出された。この蛋白質が細胞質膜上にあること、すなわち細胞外に突出する部分をもつ

こと、を示すために次の実験を行った。培養血管内皮細胞を膜不透過性のビオチン化試薬で処理し、トライトンで可溶化した後ストレプトアビジンカラムにかけ、ビオチン化された蛋白質を回収したところ、4C11 に反応する蛋白質が認められた。しかもその蛋白質の分子量は SDS-PAGE 上、240 kd で、IP $_3$ 受容体の大きさとほとんど一致する。対照実験として、細胞内膜系 ER 膜に存在する蛋白質などは、この方法ではビオチン化されなかった。通説では、カヴェオラ構造は細胞内輸送に関わる小器官とみなされているが、我々はむしろ 4C11 反応性 IP $_3$ 受容体様蛋白質がイノシトールポリリン酸に反応する Ca $^{2+}$ チャンネルと仮定して、カヴェオラ構造を細胞内外の Ca $^{2+}$ フラックスにあずかる器官と考えている。

今後の課題と発展

IP $_3$ 受容体の構造機能相関

IP $_3$ 受容体は、リアノジン受容体とともに、細胞内膜系リガンド感受性 Ca $^{2+}$ チャンネルである。IP $_3$ 受容体のチャンネル活性の解析については三つの困難性が挙げられる。1) 細胞内膜にあるため、通常の電気生理学的手法の適用がむずかしい。2) IP $_3$ 依存性カルシウム放出はほとんどの細胞が内因性に有しているため、測定のための発現系確立が困難。3) チャンネルの単一電流が非常に小さい。上記 1), 2) の理由から、例えばアフリカ

ツメガエル卵母細胞や培養細胞での発現解析が不可能である。また 2), 3) の点で, リアノジン受容体と比べ, チャンネルのキネティクス解析が遅れている。先述したように我々の提唱する IP₃ 受容体の 6 回膜貫通モデルは, 従来の膜電位感受性チャンネルやセカンドメッセンジャー依存性チャンネルとの共通性を示唆している。形質膜チャンネルの骨格に IP₃ 受容体のチャンネルポアを導入し形質膜上でのチャンネル活性を観ることを試みている。IP₃ 受容体の内膜系チャンネルとしての特殊性を追いながら, 形質膜チャンネルとの共通性からチャンネルの基本的性質について根本的理解を深めていきたい。

IP₃ 依存性カルシウム放出の生理学的意義

この問題解明のためには IP₃ 情報伝達系の特異的阻害が必要である。Tobias-Meyer らによれば, IP₃ の細胞質内における実質的拡散速度は Ca²⁺ のその 3 倍大きい。これは Ca²⁺ 結合蛋白質などから成る Ca²⁺ 緩衝系に比べ, IP₃ を緩衝する機構が細胞内にほとんど無いことによる。我々はこれまで小脳タイプ IP₃ 受容体に対しては, ある抗体を IP₃ 受容体チャンネルブロッカーとして用い, 卵の受精や, 胃粘膜細胞の分泌機能の抑制現象を観てきた。しかし IP₃ 受容体にいくつかのサブタイプが存在するため, その抗体使用による阻害には限界がある。むしろ形質膜から遊離した IP₃ 分子を細胞質内でトラップする企てが有望である。我々は IP₃ 受容体の構造機能相関を

研究する過程で, IP₃ 受容体全長 2749 アミノ酸のうち, N 末端側約 700 アミノ酸部分が IP₃ 結合に必要十分であることを見いだした。最近, この N 末端側約 700 アミノ酸部分 (IP₃ 結合蛋白質) を cDNA から大量に調製するバキュロウイルスの系を確立した。IP₃ 結合蛋白質の細胞内注入による IP₃ 緩衝系の人工的導入を, 種々の細胞を使って試そうとしている。Ca²⁺ 振動, Ca²⁺ 波など細胞内の動的な Ca²⁺ 濃度変化に, IP₃ 動態がいかに関わっているのかが是非知りたいところである。

発表論文リスト

- 1) Yoshikawa, S., Tanimura, T., Miyawaki, A., Nakamura, M., Yuzaki, M., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1992): Molecular Cloning and Characterization of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16613-16619.
- 2) Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. and Ogawa, K. (1992): Localization of Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor like Protein in *Plasmalemmal caveolae*. *J. Cell Biol.*, **119**, 1507-1513.
- 3) Ryo, Y., Miyawaki, A., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1993): Expression of the Metabotropic Glutamate Receptor mGluR₃ and the Ionotropic Glutamate Receptor GluR₁ in the Brain during the Postnatal Development of Normal Mouse and in the Cerebella from Mutant Mice. *J. Neuroscience Research*, in press.