

## 論文の内容の要旨

論文題目 Real-Time Imaging of Ligand Binding-Induced Conformational Changes of Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Using Fluorescence Resonance Energy Transfer

和訳 蛍光共鳴エネルギー移動を用いた1型イノシトール1,4,5三リン酸受容体のリガンド結合によって引き起こされる構造変化のリアルタイム可視化

指導教官 坂井克之 准教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成16年4月入学  
医学博士課程  
脳神経医学専攻  
氏名 篠原 理

### [緒言]

ホルモン、神経伝達物質、増殖因子などの細胞外刺激により産生されたイノシトール1,4,5三リン酸 ( $IP_3$ ) は、主に、細胞内小胞体膜上に存在する  $IP_3$  受容体 ( $IP_3R$ ) に特異的に結合して、小胞体内腔からの  $Ca^{2+}$  放出を誘導する。この  $IP_3$  誘導  $Ca^{2+}$  放出は、細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入とともに、 $Ca^{2+}$  波や  $Ca^{2+}$  振動などの複雑な時間的・空間的  $Ca^{2+}$  シグナルを形成し、受精、細胞分化、分泌、筋収縮、シナプス可塑性、遺伝子発現、細胞死などの多彩な生命現象に関与する。

$IP_3R$  は、3種類のサブタイプ (1型:  $IP_3R1$ 、2型:  $IP_3R2$ 、3型:  $IP_3R3$ ) によるホモまたはヘテロ四量体を形成する。各サブタイプは、 $IP_3$  結合領域、中間調節領域、膜貫通チャネル形成領域の3つの機能領域から構成される。さらに、 $IP_3$  結合領域は、アミノ末端 (*N*末端) 側抑制領域とカルボキシル末端 (*C*末端) 側結合領域の2つの機能領域に分けられ、こ

のM末端側抑制領域は、IP<sub>3</sub>Rのチャネル活性に必須であることが明らかにされている。IP<sub>3</sub>のC末端側結合領域への結合シグナルは、M末端側抑制領域と中間調節領域を介して、膜貫通チャネル形成領域に伝えられ、チャネルを開口すると考えられている。

近年、X線結晶構造解析や極低温電子顕微鏡によるIP<sub>3</sub>Rの立体構造解析から、IP<sub>3</sub>結合領域のM末端側抑制領域とC末端側結合領域の3次元構造や、Ca<sup>2+</sup>結合による4量体IP<sub>3</sub>Rの構造変化が明らかにされた。しかし、IP<sub>3</sub>結合によるチャネル開口の分子機構とそれにともなうIP<sub>3</sub>Rの構造変化については、不明な点が多い。また、チャネル開口に不可欠なCa<sup>2+</sup>が、IP<sub>3</sub>とどのように協調してIP<sub>3</sub>Rの構造変化を誘導し、チャネル開口を調節するかは明らかではない。

本研究では、オワンクラゲ由来、緑色蛍光タンパク質変異体である青色蛍光タンパク質 (efficient cyan fluorescent protein: ECFP) および黄色蛍光タンパク質 (Venus) とIP<sub>3</sub>R1とのキメラタンパク質を作製し、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) を用いて、IP<sub>3</sub>およびCa<sup>2+</sup>結合による構造変化をリアルタイムに可視化し、リガンド結合によるチャネル開口の分子機構を明らかにすることを目的とした。

#### [方法]

遺伝子工学的方法により、ECFP (donor) あるいはVenus (acceptor) を、各々、野生型マウスIP<sub>3</sub>R1のM末端あるいはC末端に結合させたキメラタンパク質を作製し、HeLa細胞に共発現させ、細胞をβ-escinにて細胞膜透過性処理を行った。この細胞に種々の濃度のCa<sup>2+</sup>およびIP<sub>3</sub>を含む細胞内様溶液を灌流により添加し、ECFPとVenus間のFRET効率の変化を、蛍光顕微鏡を用いて経時的に測定した。

#### [結果]

ECFPもしくはVenus融合IP<sub>3</sub>R1は、野生型IP<sub>3</sub>R1と同等のIP<sub>3</sub>結合親和性を持ち、小胞体膜上で4量体を形成し、IP<sub>3</sub>誘導Ca<sup>2+</sup>放出チャネルとして機能することが確認された。

IP<sub>3</sub>非存在下でCa<sup>2+</sup>を添加すると、M末端同士、M末端とC末端、および

C末端同士にECFPあるいはVenusを融合させた2種類のIP<sub>3</sub>R1を発現する細胞にて、異なるCa<sup>2+</sup>感受性で、FRET効率は各々最大27%、14%、15%減少した。一方、Ca<sup>2+</sup>非存在下でIP<sub>3</sub>を添加すると、N末端にECFPおよびVenusを融合させたIP<sub>3</sub>R1が発現している細胞でのみ、最大10%程度FRET効率が上昇した。これらの細胞にIP<sub>3</sub>存在下でCa<sup>2+</sup>を加えると、見かけ上、FRET効率減少のCa<sup>2+</sup>感受性は、IP<sub>3</sub>濃度依存的に変化した。さらに、「IP<sub>3</sub>存在下にCa<sup>2+</sup>添加によって起きたFRET効率変化」から「IP<sub>3</sub>非存在下にCa<sup>2+</sup>添加によって起きたFRET効率変化」を差し引くと、従来報告されていたIP<sub>3</sub>R1の単一チャネル開口確率のCa<sup>2+</sup>依存性曲線に酷似した、細胞質の生理的濃度範囲内に正のピークを持つ、二相性のFRET効率のCa<sup>2+</sup>依存性曲線が得られることがわかった。この曲線の正のピークは、IP<sub>3</sub>結合活性を欠く点変異体 (K508A) では完全に消失し、また、単一チャネルの開口確率のCa<sup>2+</sup>感受性が10倍程度減少する事が報告されている点変異体 (E2100A) では、差し引き後の二相性のFRET効率のCa<sup>2+</sup>依存性曲線が、野生型に比べ10倍程度低Ca<sup>2+</sup>感受性を示した。

これらの結果から、IP<sub>3</sub>非存在下にCa<sup>2+</sup>添加によって起きたFRET効率変化を差し引くことで現れたFRET効率の増大が、直接IP<sub>3</sub>R1の開口状態を表していることが示唆された。つまり、Ca<sup>2+</sup>のみによるFRET効率の減少 (N末端同士、N末端とC末端、C末端同士の距離の増大) とIP<sub>3</sub>とCa<sup>2+</sup>の協同作用によるFRET効率の上昇 (N末端同士、N末端とC末端、C末端同士の距離の減少) を引き起こす、2つの相反する構造変化がIP<sub>3</sub>R1のチャネル開口に含まれており、FRET効率の上昇を引き起こす収束型の構造変化が、チャネル開口の実体であることが明らかとなった。

#### [結語]

本研究により、IP<sub>3</sub>R1のチャネル開閉は、収束・発散という2つの相反する構造変化の線形和によって制御されていることが示唆された。