

イノシトール三リン酸受容体の機能解析

機能分子・膜動態研究グループ

廣田 順二

1 カルシウム・カルモジュリンによるイノシトール三リン酸受容体タイプ1 チャンネル活性制御機構の解析

細胞外刺激（ホルモン、神経伝達物質、成長因子など）は、細胞膜上の受容体を介してホスホリパーゼCを活性化し、ホスファチジルイノシトールの代謝を亢進する。このPI代謝系で産生されるイノシトール三リン酸（IP₃）は、細胞内セカンドメッセンジャーとして、時空間的に複雑な細胞内Ca²⁺上昇（Ca²⁺波、Ca²⁺オシレーション）を誘導し、種々の細胞応答を引き起こす。IP₃/Ca²⁺情報伝達系の関わる細胞応答は、広く動物種をこえて多くの細胞生理機能発現に重要な役割を果たしている。このIP₃誘発Ca²⁺放出において中心的役割を担っているIP₃Rには3つのサブタイプが存在することがわかっている。

IP₃Rサブタイプのうちの一つであるIP₃Rタイプ1（IP₃R1）は、細胞質Ca²⁺依存的にチャンネル活性が制御されることが知られている。この現象は、Ca²⁺波、Ca²⁺オシレーションの基本メカニズムと考えられている。しかしながら、Ca²⁺によるIP₃R1のチャンネル活性の制御メカニズムは明らかになっていない。これまでの我々の研究から、リポソーム上に再構成した精製IP₃R1では、Ca²⁺による抑制効果が観測されないことがわかっている。このことは、Ca²⁺によるIP₃R1チャンネル活性の抑制には、Ca²⁺結合タンパク質を介した抑制機構が存在することを示唆するものである。また最近、IP₃Rのチャンネル活性のCa²⁺依存性は、IP₃Rのサブタイプに依存することが報告された。それによると、高い濃度のCa²⁺によるIP₃Rチャンネル活性の抑制は、IP₃R1およびIP₃R2で見られ、一方IP₃R3では観察されなかったというものである。これまでの御子柴らの研究から、IP₃R1およびIP₃R2はCa²⁺/カルモジュリンに結合し、IP₃R3は結合しないことがわかっている。これらのことから、IP₃Rのチャンネル活性のCa²⁺による制御は、カルモジュリンが関与していることが十分考えられる。

そこで、本研究では、IP₃R1とカルモジュリンの結合反応の速度論的解析をし、さらにカルモジュリンのIP₃R1チャンネル活性への影響を検討し、IP₃R1チャンネル活性のCa²⁺による制御機構の解明をおこなった。

実験・結果

IP₃R1は、Ca²⁺結合タンパク質であるカルモジュリンにCa²⁺依存的に結合することが知られている。精製IP₃R1とカルモジュリンとの相互作用を、表面プラズモン共鳴を測定原理としたバイオセンサーBIAcore 2000TMを用いて測定し、結合解離反応の解析をおこなった。さらに精製IP₃R1再構成系および平面脂質二重膜法を用いて、カルモジュリンのチャンネル活

性への作用を詳細に検討した。

Ca^{2+} 存在下、様々な濃度のカルモジュリンと $\text{IP}_3\text{R1}$ の結合反応の時間変化を Fig 1 に示す。カルモジュリン濃度の増加にともない、 $\text{IP}_3\text{R1}$ への結合量が増加していることがわかる (Fig 1A)。また、結合・解離の両反応とも 2 相性であった。極めて速い反応であり、BIAcore2000 の分解能からは正確な速度定数は算出できなかった。Req 値から求めたみかけの解離定数は 27.3mM あった。一方、カルシウム非存在下では、カルモジュリンの $\text{IP}_3\text{R1}$ への結合反応は観察できなかった (Fig 1B)。

以上の結果は、精製 $\text{IP}_3\text{R1}$ は Ca^{2+} 依存的にカルモジュリンと結合するという我々の従来の報告と一致するものであった。また、 Ca^{2+} /カルモジュリンの $\text{IP}_3\text{R1}$ への結合・解離反応は極めて速い速度定数で起こることがわかった。 Ca^{2+} /カルモジュリンの $\text{IP}_3\text{R1}$ チャネル活性への影響を、再構成した精製 $\text{IP}_3\text{R1}$ を用いて検討した。Fig 2 に 1 mM IP_3 誘発 Ca^{2+} 放出量に対する Ca^{2+} /カルモジュリンの効果をまとめた。その結果、再構成した $\text{IP}_3\text{R1}$ のチャネル活性は、 Ca^{2+} /カルモジュリン濃度依存的に抑制されることが明かとなった。このことは、我々の以前の実験から予想された、「高 Ca^{2+} 濃度での $\text{IP}_3\text{R1}$ のチャネル活性の抑制は、何らかの Ca^{2+} 結合タンパクを介する」という推測に一致している。さらにカルモジュリンのチャネル活性への影響を詳しく解析するために、シングルチャネルレコーディングを行なった。精製 $\text{IP}_3\text{R1}$ のチャネル活性の Ca^{2+} 依存性は、小脳マイクロソーム IP_3R のそれと著しく異なるものであった。つまり、高 Ca^{2+} 濃度での IP_3R チャネル活性の抑制は、消失し、逆に活性化する傾向にあった。また、小脳マイクロソーム画分から調製した $\text{IP}_3\text{R1}$ の Ca^{2+} 依存性は、W-7 等のカルモジュリンの阻害剤によって解除され、精製 $\text{IP}_3\text{R1}$ のときと同様の Ca^{2+} 依存性が見られた。

以上の結果から、 $\text{IP}_3\text{R1}$ チャネル活性の Ca^{2+} 濃度依存的阻害は、 Ca^{2+} /カルモジュリンを介したものであることが明かとなった。これらのことは Ca^{2+} 波、 Ca^{2+} オシレーションなどの複雑な Ca^{2+} 上昇を解析していくうえで、重要な知見となるものと思われる。

3 アポトーシスに伴うイノシトール三リン酸受容体タイプ 1 の限定分解

アポトーシスは進化的にも保存された細胞死の形態の一つで、かつ細胞の正常な分化、恒常性の維持に必須な細胞の計画的死である。アポトーシスの一連の反応は、主にシステインプロテアーゼであるカスパーファミリーの活性化とそれに続く基質の限定分解から成り、不可逆的な細胞死に達する。アポトーシスにおいて重要な役割を担うカスパーファミリーの中で、カスパー 3 は細胞死の実行者と考えられている。これまでにカスパー 3 の基質として、poly(ADP-ribose) polymerase, p21-activated kinase 2, gelsolin, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA fragmentation factor 45kDa subunit, a-fodrin などが報告されている。

これらカスパー 3 の基質の切断部位の相同性の解析から、DEXD 配列がカスパー 3 の

認識モチーフとなるものと考えられている。

我々は、マウス IP₃R1 のアミノ酸配列中（1888 - 1891番アミノ酸）にカスパーズ 3 の認識モチーフである DEVD 配列を見いだした。この配列は、ラットおよびヒト IP₃R1 において保存されており、他のタイプの IP₃R には見られない特徴的なものである。そこで、本研究では IP₃R1 がアポトーシスにおいてカスパーズ 3 の基質となるかどうかを検討し、さらにカスパーズ 3 の IP₃R のチャンネル機能への影響を調べた。

実験・結果

IP₃R1 のアミノ酸配列には、その調節領域に Caspase-3 の認識配列である DEVD モチーフが存在する (Fig 3A)。そこで IP₃R1 がアポトーシスのときに Caspase-3 の基質になるかどうかを、in vivo および in vitro での生化学的および分子生物学的実験から検討した。また、カスパーズ 3 欠損細胞である MCF-7 細胞を用いて、アポトーシス時における IP₃R1 の分解を詳細に検討した。さらに in vitro において Caspase-3 による IP₃R1 分解のチャンネル活性への影響を検討した。

まず、IP₃R1 がアポトーシス時に分解されるかどうかをウエスタンブロットによって解析した。Fig 3B は、staurosporine によって Jurkat 細胞にアポトーシスを誘導したときの IP₃R の分解反応の経時変化である。抗体は、IP₃R1, 2, 3 の C 末端をそれぞれ特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた。その結果、アポトーシスの進行とともに、IP₃R1 は完全ではないが分解されていることがわかった。一方、IP₃R2, 3 は IPR1 と比べて、分解されにくい傾向にあった。いずれの刺激を用いてアポトーシスを誘導した場合においても、IP₃R1 は、1 つのメジャーバンド (95K) と 2 つのマイナーバンド (215K, 160K) に分解されることがわかった。また、この限定分解は、カスパーズ 3 の阻害剤によって IP₃R1 の限定分解は阻害されたが、カスパーズ 1 阻害剤では阻害されなかった。以上のことから、アポトーシス時に IP₃R1 は、カスパーズ 3 またはカスパーズ 3 様プロテアーゼによって限定分解を受けることが明らかとなった。

さらにリコンビナントカスパーズ 3 を用いても、IP₃R1 は Jurkat 細胞のアポトーシス時と同じパターンで分解され、この反応はカスパーズ 3 阻害剤存在下で完全に阻害された。

限定分解された 3 つのフラグメントの N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、メジャーフラグメントである 95K フラグメントの N 末端は、RDAPXR であり、この配列は DEVD 配列後に続く RDAPSR (マウス IP₃R1: 1892 - 1897a.a.) であることが判明した。一方、マイナーフラグメントである 215K, 160K のフラグメントの N 末端アミノ酸配列の同定はできなかった。以上の結果から、IP₃R1 はカスパーズ 3 の新規基質であることがわかり、IP₃R1 の DEVD 配列直後で限定分解を受けることが明らかとなった。

アポトーシス時における IP₃R1 の限定分解へのカスパーズ 3 への関与をさらに検討するために、カスパーズ 3 欠損細胞株である MCF-7 を用いて実験を行った。Staurosporine または

TNF- α + Chx 刺激によってこの細胞にアポトーシス誘導を誘導しても、IP₃R1の限定分解は確認できなかった。そこで、MCF-7細胞にカスパー3遺伝子を導入し、カスパー3前駆体発現 MCF-7細胞における IP₃R1 の限定分解を検討した。カスパー3前駆体を恒常的に発現している2つの MCF-7細胞株に、アポトーシス刺激を導入すると、IP₃R1 は Jurkat 細胞や *in vitro* での実験と同様のパターンで限定分解されることがわかった。以上の結果から、アポトーシス時における IP₃R1 の限定分解にはカスパー3が必須であることが示唆された。

カスパー3による IP₃R1 限定分解のチャンネル機能への影響を、小脳マイクロソームを用いた IP₃R1 チャンネル活性測定系において検討した (Fig 4)。様々な濃度のリコンビナントカスパー3によって、IP₃R1 の限定分解の割合を調節し、そのときのチャンネル活性を解析した。IP₃R1 の限定分解の割合は、C末端を認識する抗体を用いたウエスタンブロットのシグナル強度を測ることによって算出した。ATP 添加によるカルシウムストア内へのカルシウムの取り込み反応は、カスパー3濃度によらないことから、Ca²⁺-ATPase の活性はカスパー3の影響を受けないものと考えられる。一方、IP₃ 誘発 Ca²⁺ 放出反応は、カスパー3濃度の上昇にともない減少することがわかった。IP₃R1 チャンネル活性は、分解される割合が50%までは顕著な阻害を受けないが、50%以上分解反応が進んだときに著しく阻害されることがわかった。

以上をまとめると、IP₃R1 のアミノ酸配列には、その調節領域に Caspase-3 の認識モチーフである DEVD 配列が存在する。*in vivo* および *in vitro* での生化学的および分子生物学的実験から、IP₃R1 はアポトーシス時にこの配列直後で限定分解を受けることが明らかとなった。さらに Caspase-3 を遺伝的に欠損した細胞株では、アポトーシス誘導により細胞死はおこるが、IP₃R1 の分解は観測されなかった。この細胞株に Caspase-3 の恒常的に発現させたところ、アポトーシス進行に伴い、IP₃R1 が限定分解を受けることがわかった。さらに Caspase-3 による分解のチャンネル活性への影響を検討した結果、部分分解では、IP₃R1 のチャンネル活性はほとんど影響を受けないが、50%以上のサブユニットが分解を受けると、チャンネルが不活性化されることがわかった。以上のことから、IP₃R1 は Caspase-3 の新規基質であり、細胞死のときに Caspase-3 依存的限定分解を受け、不活性化することにより IP₃/Ca²⁺ シグナルを遮断し、また細胞内カルシウムホメオスタシスを崩すものと思われる。

参考文献

- Berridge, M. J. (1993) *Nature* 361, 315-325
Bezprozvanny, I., J. Watras and B. E. Ehrlich (1991) *Nature* 351, 751-4
Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989) *Nature* 342, 32-38
Hirota, J., Michikawa, T., Miyawaki, A., Furuichi, T., Okura, I. and Mikoshiba, K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 19046-51

- Hirota, J., Michikawa, T., Miyawaki, A., Furuichi, T., Okura, I. and Mikoshiba, K. (1995) FEBS Letters, (1995) 368, 248-252
- Hirota, J., Baba, M., Matsumoto, M., Furuichi, T., Takatsu, K., and Mikoshiba, K. (1998) Biochem. J. 333, 615-9
- Hirota, J., Michikawa, T., Natsume, T., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. FEBS Letters (1999) 456, 322-326
- Hirota, J., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. Journal of Biological Chemistry, (1999) 48, 34433-34437
- Iino, M. and M. Endo (1992) Nature 360, 76-78
- Khan, A. A., Soloski, M. J., Sharp, A. H., Schilling, G., Sabatini, D. M., Li, S. H., Ross, C. A., and Snyder, S. H. (1996) Science 273, 503-7
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997) Cell 89, 175-84
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998) J. Biol. Chem. 273, 9357-60
- Jayaraman, T. and Marks, A. R. (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 3005-3012
- Maeda, N., Niinobe, M. and Mikoshiba, K. (1990) EMBO J. 9, 61-67
- Matsumoto, M., Nakagawa, T., Inoue, T., Nagata, E., Tanaka, K., Takano, H., Minowa, O., Kuno, J., Sakakibara, S., Yamada, M., Yoneshima, H., Miyawaki, A., Fukuuchi, Y., Furuichi, T., Okano, H., Mikoshiba, K. and Noda, T. (1996) Nature 379, 168-171
- Miyakawa, T., A. Maeda, T. Yamazawa, K. Hirose, T. Kurosaki and M. Iino (1999) EMBO J. 18, 1303-08
- Nakade, S., S. K. Rhee, H. Hamanaka and K. Mikoshiba (1994) J. Biol. Chem. 269, 6735-6742
- Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M. and Kurosaki, T. (1997) EMBO J. 16, 3078-3088
- Sugiyama, T., Furuya, A., Monkawa, T., Yamamoto-Hino, M., Satoh, S., Ohmori, K., Miyawaki, A., Hanai, N., Mikoshiba, K. and Hasegawa, M. (1994) FEBS Lett. 354, 149-154
- Sugiyama, T., Yamamoto-Hino, M., Miyawaki, A., Furuichi, T., Mikoshiba, K., and Hasegawa, M. (1994) FEBS Lett. 349, 191-6
- Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1999) Neuron, 23, 799-808
- Yamada, M., A. Miyawaki, K. Saito, T. Nakajima, M. Yamamoto-Hino, Y. Ryo, T. Furuichi and K. Mikoshiba (1995) Biochem. J. 308, 83-8

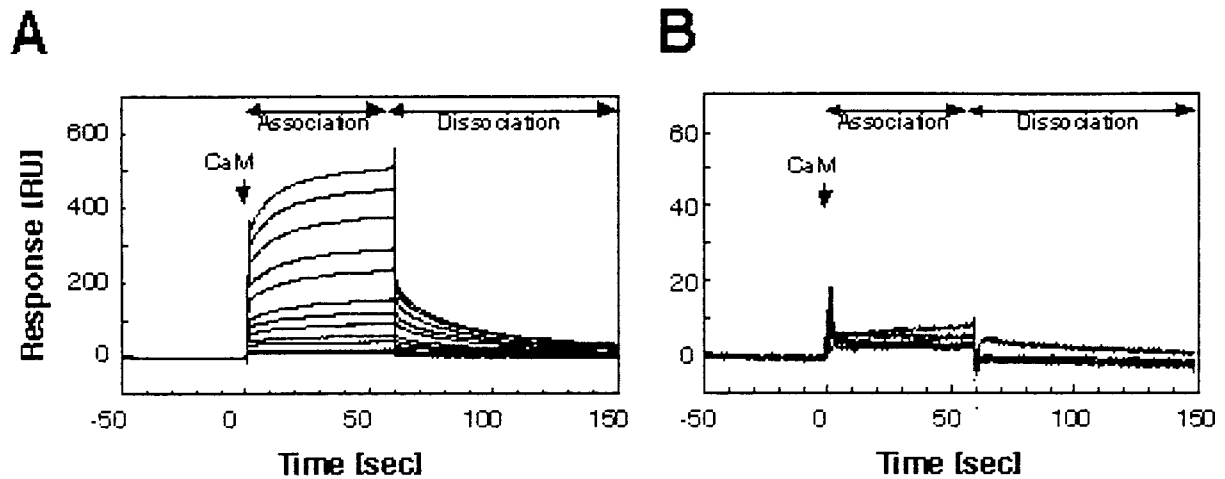


Fig.1 Sensorgram for calmodulin binding to immobilized IP3R1

Net sensorgram for different concentrations of calmodulin (from bottom to top; 0.5, 1, 0, 2.0, 3.0, 5.9, 7.5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 nM of calmodulin injected) (A) in the presence of Ca²⁺, and (B) in the absence of Ca²⁺.

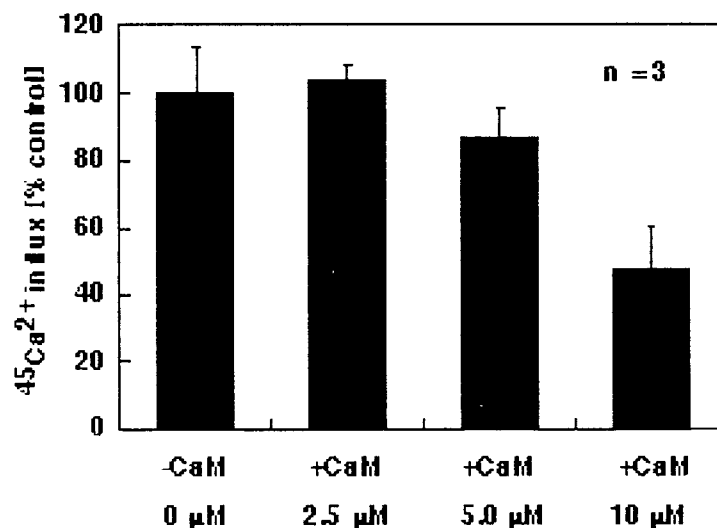


Fig. 2 Calmodulin inhibits IP3-induced Ca²⁺ release through purified and reconstituted IP3R1, in a dose dependent manner.

Effects of Ca²⁺/calmodulin on IP3-induced Ca²⁺ release were investigated using purified and reconstituted IP3R1. IP3-induced Ca²⁺ influx into the liposome was measured in the presence of various concentrations of calmodulin. The IP3R1-reconstituted liposome was incubated with 1 μM of IP3 for 1 min to induce Ca²⁺ influx into liposome. ⁴⁵Ca²⁺ trapped in the liposome was measured after removal of extravesicular Ca²⁺ by Chelex-100.

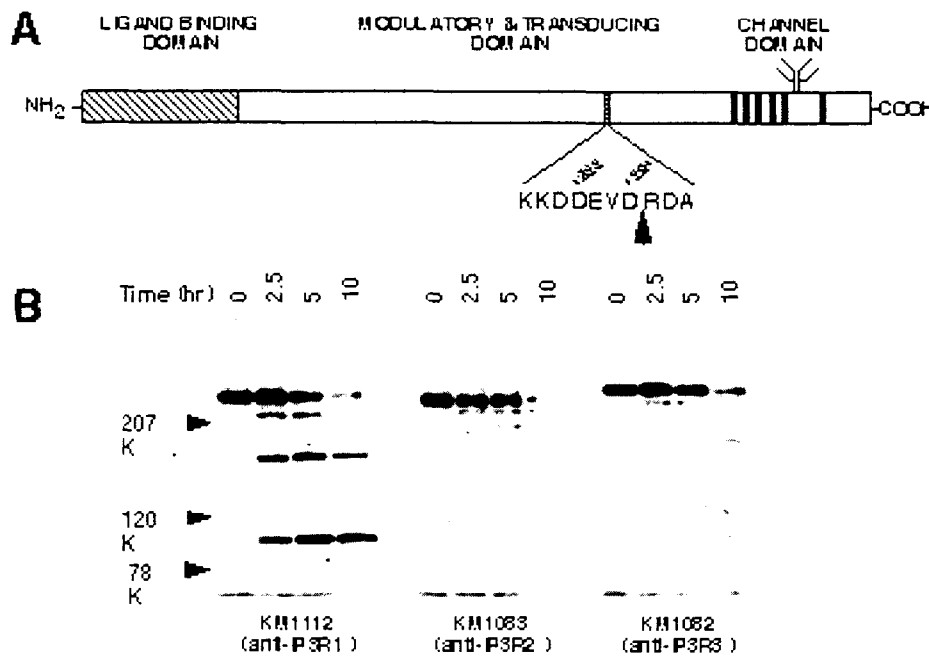


Fig. 3 Specific degradation of IP3Rs during apoptosis

A. Schematic representation of IP3R1, which has the DEVD consensus sequence for caspase-3 cleavage. This sequence was conserved among species (1888DEVD1891 mouse, rat IP3R1, 1835 DEVD1838 human IP3R1). B. Specific degradation of IP3R during apoptosis induced by 2 μ M staurosporine. IP3Rs were detected with type specific mAbs against C-terminus of IP3Rs.

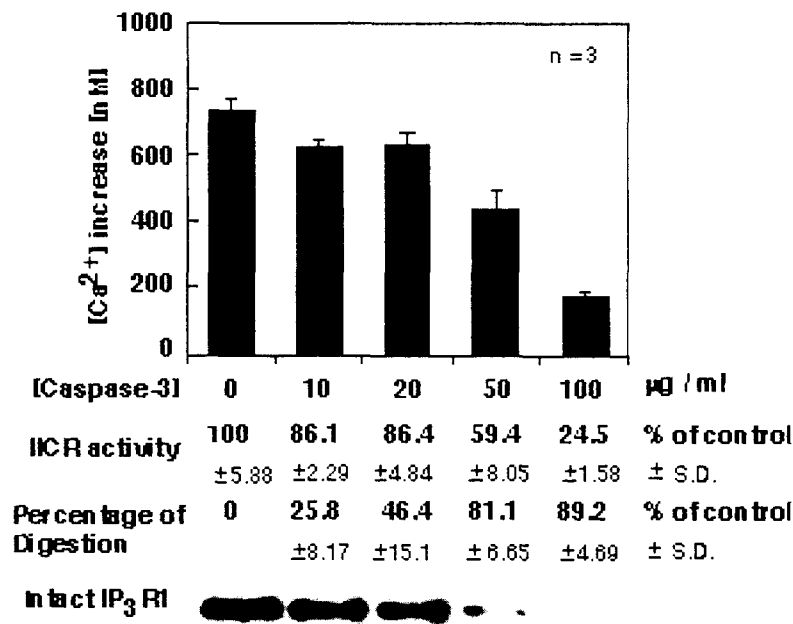


Fig. 4 Effects of digestion by caspase-3 on IP3-induced Ca²⁺ release

Relation between IP3-induced Ca²⁺ release activity and percentage of digestion. Percentage of digestion were measured by densitometric analysis of western blot ICR activity and percentage of digestion were normalized against control ([caspase-3] = 0, values are mean \pm S.D., n= 3).