

Title	Purification and biochemical characterization of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding proteins in the mouse brain
Author(s)	Yamaguchi, Yoshihide
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3100527
DOI	10.11501/3100527
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	山 口 宜 秀
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 1 7 4 4 号
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Purification and biochemical characterization of inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate-binding proteins in the mouse brain (マウス脳内におけるイノシトール 1, 3, 4, 5-四リン酸結合蛋白質の精製と生化学的解析)
論文審査委員	(主査) 教授 崎山 文夫 (副査) 教授 畠中 寛 岡崎国立共同研究機構生理学研究所教授 池中 一裕 東京大学医科学研究所教授 御子柴克彦

論 文 内 容 の 要 旨

イノシトール 1, 3, 4, 5-四リン酸 (InsP₄) は、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (InsP₃) と同様に細胞内 Ca²⁺ 濃度を調節する重要なセカンドメッセンジャーとして、近年注目されている。InsP₄ の生理的な機能に関しては種々の報告がなされているが、InsP₄ 特異的受容体の実体が明らかにされていないため、未だ統一的な見解が得られていない。そこで、InsP₄ の生理的機能を明らかにする目的で、マウス小脳からの InsP₄ 受容体の精製とその性質の解明を試みた。

精製は、マウス小脳の P 2 / P 3 膜画分を 1% トリトン X-100 で可溶化した上清から、PEG 沈殿法による [³H] InsP₄ 結合活性を指標に行った。アフィニティー、イオン交換、ゲル濾過などの一連の各種クロマトグラフィーにより 3 種類の InsP₄ 結合蛋白質 (InsP₄-binding protein: I P 4 B P と略す) の精製に成功した。そのうち DE-52 吸着画分由来のものを I P 4 B P 1、素通り画分由来のものを I P 4 B P 2 a, I P 4 B P 2 b とした。

I P 4 B P 1 は SDS-PAGE で 140K と 65K の分子量の 2 本のバンドを示すが、リジルエンドペプチダーゼ処理後ペプチドの逆相 HPLC による溶出パターンから同一の分子に由来するものだと考えられる。得られたペプチドのアミノ酸分析結果はシナプス前部で神経伝達物質の放出に関与するシナプトタグミン II と一致した。また、抗シナプトタグミン II 抗体により認識され、InsP₄ 結合活性が免疫沈降された。

I P 4 B P 2 a は SDS-PAGE で 42K の分子量を示すが、架橋実験により四量体を形成することがわかった。N 末端アミノ酸解析を行ったところ、解糖系のフルクトース-1, 6-二リン酸アルドラーゼの一種であるアルドラーゼ A とほぼ一致した。

I P 4 B P 2 b は SDS-PAGE で 26K の分子量を示し、N 末端アミノ酸解析を行ったところ、中枢ミエリンの構造蛋白質であるミエリンプロテオリピドプロテイン (PLP) とほぼ一致した。この 26K のバンドは抗 PLP モノクローナル抗体により認識され、さらに InsP₄ 結合活性とともに免疫吸収された。

低張条件下での [³H] InsP₄ 結合における I P 4 B P 1 / シナプトタグミン II の至適 pH は 5.0 であり、pH 5.0, 6.2, 7.4 で、K_D は 160nM, 30nM, 30nM, B_{max} は 35pmol / μg, 2.7pmol / μg, 2.4pmol / μg であった。I P 4 B P 2 a / アルドラーゼ A の至適 pH は 5.8 であり、その際の K_D は 1.2 μM, B_{max} は 22pmol / μg であった。I P 4 B P 2 b / PLP の至適 pH は 5.5 であり、その際の K_D は 21nM, B_{max} は 9 pmol / μg であった。 [³H] InsP₄ 結合に対する各種イノシトールリン酸誘導体を用いた阻害実験では I P 4 B P 1 / シナプトタグミン II, I P

4BP2a/アルドラーゼA, IP4BP2b/PLPとも, イノシトールポリリン酸 (InsP₄, InsP₅, InsP₆) で強く阻害された。

IP4BP2b/PLPに関しては等張条件においてInsP₃, InsP₄, InsP₆のうち [³H] InsP₆ 結合のみ測定可能であり, K_Dは58 μM, B_{max}は13pmol/μgであった。また, PLPを豊富に含むミエリン膜画分でも [³H] InsP₆の結合活性が認められた。

アルドラーゼに関しては小脳の機能発現への関与, シナプトタグミンとPLPに関しては細胞内小胞の輸送への関与が注目されており, 以上の結果から, イノシトールポリリン酸 (InsP₄, InsP₅, InsP₆)の小脳の機能発現および細胞内小胞の輸送系への関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

イノシトール1, 3, 4, 5-四リン酸 (IP₄)は, 細胞内Ca²⁺濃度を調節するセカンドメッセンジャーとして注目されている。本研究はIP₄の生理的機能の発現機構の解明を目的として行い, この物質に優先的に結合する3種の蛋白質を確認し, それらを生化学的に同定した。得られた知見は重要であり, 博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。