Osaka University Knowledge Archive

Title	Functional Analyses of Inositol 1,4,5-Trisphoshate (IP3) Receptor as IP3 - gated Ca2+ Channel
Author(s)	中出, 真嗣
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39217
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏　　名	中出真嗣（なかで しんじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　11478　号
学位授与年月日	平成6年6月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Functional Analyses of Inositol 1,4,5 − Trisphoshate (IP_3) Receptor as IP_3 − gated Ca^{2+} Channel （イノシトール1，4，5－三燐酸（IP_3）受容体におけるIP_3依存性カルシウムチャネル機能の解析）
論文審査委員	（主査） 教授　二井　将光 （副査） 教授　福井　俊郎　　教授　畠中　寛

論文内容の要旨

Ca^{2+}は細胞の生理機能発現に重要な役割を果たしている。細胞質中のCa^{2+}濃度は細胞外からのCa^{2+}流入と，細胞内小胞体からのCa^{2+}放出により調節される。IP受容体は小胞体上に存在し，その内腔に蓄えられているCa^{2+}をIP_3依存的に細胞質中に放出させるCa^{2+}チャネルであり，細胞内情報伝達系において重要な役割を担う蛋白質である。本研究では，(1) IP_3受容体のサブユニット構造を解析し，(2) IP_3受容体に対する抗体を用いて，組織間におけるIP3受容体の構造及び，機能的差異を明らかにし，(3) 単一のIP_3受容体サブタイプを精製し，リポソームに再構成した後その機能的諸性質を解析した。

(1) IP_3受容体のサブユニット構造を解析するために，マウス小脳ミクロソーム画分に架橋剤を反応させた。この画分を電気泳動し，IP_3受容体の抗体を用いて解析したところ，受容体は分子量320Kの分子を一量体サブユニットとし，ホモ四量体を形成していることが分かった。

(2) 次に中枢及び，末梢におけるIP_3受容体の機能を解析するために，小脳及び，肝臓よりミクロソーム画分を調製し，IP_3誘発Ca^{2+}放出のfura2を指示薬とする測定系を確立した。この系を用いてIP_3受容体に対する各種抗体のCa^{2+}放出に及ぼす影響を解析した。その結果，モノクローナル抗体18A10のみが小脳ミクロソーム画分からのIP_3誘発Ca^{2+}放出を部分的に阻害し，Ca^{2+}放出を促すIP_3濃度の最小値が20nMから50nMへ，また，EC_{50}値が100nMから500nMへ移動することが分かった。しかし，肝臓ミクロソーム画分からのIP_3誘発Ca^{2+}放出は18A10抗体により阻害されなかった。また，この抗体のエピトープを，合成ペプチドを用いて検索したところ，抗体は小脳タイプIP_3受容体の最もC末端領域を認識することが分かった。次に小脳と肝臓のIP_3受容体の構造的差異につゥて，小脳タイプの受容体をもとに作製したペプチド抗体を用い，それらの免疫交叉性を指標に比較した。その結果，肝臓のIP_3受容体は，小脳タイプIP_3受容体の中央部に存在する領域で，二つの燐酸化部位の間が欠失していることを蛋白質レベルで明らかにした。以上のことからIP_3受容体は，構造上に組織特異性を示し小脳IP_3受容体C末端領域にはイオンチャネル開口の調節部が存在することが示峻された。

(3) 最近，このようなIP3受容体の組織間での多様性に加え，小脳中にも前述の小脳タイプ（Type 1）IP_3受容体以外

に少なくとも二種類のサブタイプが存在することが分かってきた。そこで，マウス小脳ミクロソーム画分より従来のType 1 IP_3受容体をサブタイプ特異的抗ペプチド抗体を用いてアフィニティー精製した。抗体カラムに吸着したIP_3受容体の溶出には合成したペプチドを拮抗させ，蛋白質を変性させずに精製することに成功した。次にこの受容体を透析法によりリポソームに再構成させ，そのチャネル活性を，IP3を外液に添加したときのCa^{2+}のプロテオリポソーム内への流入量により評価した。18A10抗体の$^{45}Ca^{2+}$流入に対する影響を検討したところ，前述のミクロソーム画分を用いた実験結果とは異なり，抗体は完全にCa^{2+}流入を抑制した。又，予めA－kinaseをプロテオリポソームに作用させておくとCa^{2+}の取り込み量がコントロールに比して約20％増強することが分かった。以上の結果より再構成した受容体は単一サブタイプの受容体であり，本研究において確立した手法は広く膜蛋白質の単一サブタイプ機能の解析に使用できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

中出真嗣君は，本論文において，イノシトール1，4，5，一三リン酸（IP_3）受容体の構造と機能について詳細な生化学的な研究を行った。まず，抗体カラムにより迅速に精製する方法を確立し，小脳の受容体は320kDaサブユニットの四量体であること，燐酸化によりチヤネル活性が上昇することを明らかにした。また，小脳型と肝臓型の受容体を比較し，前者では燐酸化部位が欠損していることを示した。さらに，受容体のモノクロナール抗体の一つ18A10がC末端領域を認識しIP_3誘発Ca^{2+}放出を阻害することを示した。

以上のように本論文はIP_3受容体について，重要な新しい知見を得ており，博士（理学）の学位論文として，価値あるものと認める。