

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-129612
(P2004-129612A)

(43) 公開日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47	2 G O 5 4
C O 7 K 14/705	C O 7 K 14/705	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	4 B O 6 3
C O 7 K 19/00	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 27 O L (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-299429 (P2002-299429)	(71) 出願人 000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22) 出願日 平成14年10月11日 (2002.10.11)	(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔
(特許庁注：以下のものは登録商標) テフロン	(74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 節
	(74) 代理人 100096183 弁理士 石井 貞次
	(72) 発明者 御子柴 克彦 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内
	(72) 発明者 安東 英明 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規 I P 3 受容体結合タンパク質と I P 3 指示薬

(57) 【要約】

【課題】本発明は、I P₃ の検出および定量に有効な指示薬となる新規 I P₃ 受容体結合タンパク質を提供し、ならびにそれを用いた I P₃ の検出および/または定量方法を提供する。

【解決手段】I P₃ 受容体結合タンパク質、特に I P₃ 受容体と相互作用し、かつ該相互作用が I P₃ により制御される、新規 I P₃ 受容体結合タンパク質 I R B I T を同定した。I R B I T は生理的濃度の I P₃ により I P₃ 受容体から解離可能であるという特性を有する。該特性により、I R B I T は F R E T 法等により I P₃ を検出するために指示薬として有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a)、(b) または (c) のタンパク質。

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質 (I R B I T)

(b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 ~ 1 0 4 番目までのアミノ酸配列を含むタンパク質

(c) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列またはその 1 ~ 1 0 4 番目までのアミノ酸配列において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ I P₃ 受容体に結合するタンパク質

【請求項 2】

請求項 1 記載のタンパク質をコードする遺伝子。

10

【請求項 3】

以下の (a)、(b) または (c) の DNA からなる遺伝子。

(a) 配列番号 2 に示す塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 2 に示す塩基配列の 1 ~ 3 1 2 番目までの塩基配列を含む DNA

(c) (a) または (b) の塩基配列からなる DNA に相補的な DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ I P₃ 受容体に結合するタンパク質をコードする DNA

【請求項 4】

請求項 2 または 3 記載の遺伝子を含むベクター。

20

【請求項 5】

請求項 2 または 3 記載の遺伝子に、プロモーターが機能し得る形で連結されている、請求項 4 記載のベクター。

【請求項 6】

請求項 2 または 3 記載の遺伝子を、蛍光または発光タンパク質をコードする遺伝子とインフレームで連結された形で含む、請求項 5 記載のベクター。

【請求項 7】

蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質 (G F P)、シアン蛍光タンパク質 (C F P)、黄色蛍光タンパク質 (Y F P)、V e n u s および F l a s h ならびにこれらの誘導体からなる群から選択される、請求項 6 記載のベクター。

30

【請求項 8】

請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項記載のベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 9】

哺乳動物細胞である、請求項 8 記載の宿主細胞。

【請求項 10】

サンプル中の I P₃ を検出するための、請求項 1 記載のタンパク質を含む I P₃ 指示薬。

【請求項 11】

上記タンパク質が蛍光または発光タンパク質と融合されている、請求項 10 記載の I P₃ 指示薬。

【請求項 12】

上記タンパク質が F R E T 法が可能で 2 つの蛍光分子からなる組み合わせのうちのいずれか一方の蛍光分子で標識されており、上記組み合わせのうちの他方の蛍光分子で標識された I P₃ 受容体の少なくとも I P₃ 結合ドメインを含有するタンパク質と組み合わせる F R E T 法により I P₃ を検出するための、請求項 11 記載の I P₃ 指示薬。

40

【請求項 13】

2 つの蛍光分子からなる組み合わせが、V e n u s と C F P との組み合わせ、Y F P と C F P との組み合わせ、または F l a s h と C F P との組み合わせである、請求項 12 記載の I P₃ 指示薬。

【請求項 14】

請求項 1 記載のタンパク質を特異的に認識する抗体またはその機能的フラグメント。

50

【請求項 15】

ウサギポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 14 記載の抗体およびその機能的フラグメント。

【請求項 16】

サンプル中の IP_3 濃度を測定するための方法であって、

(i) IRBIT またはその IP_3 受容体結合ドメインを含むタンパク質と IP_3 受容体の少なくとも IP_3 結合ドメインを含有するタンパク質からなるタンパク質複合体を調製し；

(ii) 上記タンパク質複合体とサンプルを接触させ；

(iii) 遊離 IRBIT もしくはその IP_3 受容体結合ドメインを含むタンパク質および / または上記複合体を定量すること；
を含む、上記方法。

10

【請求項 17】

上記 (iii) における定量が、抗 IRBIT 抗体および / または抗 IP_3 受容体抗体を用いた免疫化学的反応系を利用して実施されることを特徴とする、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

上記 (iii) における定量が、IRBIT もしくはその IP_3 受容体結合ドメインを含むタンパク質または IP_3 受容体の少なくとも IP_3 結合ドメインを含有するタンパク質を予め標識しておいて、該標識物に由来するシグナルを測定することにより実施されることを特徴とする、請求項 16 または 17 記載の方法。

20

【請求項 19】

標識が蛍光標識である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

上記 (iii) における定量が、FRET 法により実施されることを特徴とする、請求項 16 記載の方法。

【請求項 21】

YFP もしくは Venus で標識した IRBIT またはその IP_3 受容体結合ドメインを含むタンパク質と、CFP で標識した IP_3 受容体の少なくとも IP_3 結合ドメインを含有するタンパク質とを用いることを特徴とする、請求項 20 記載の方法。

30

【請求項 22】

CFP で標識した IRBIT またはその IP_3 受容体結合ドメインを含むタンパク質と、Venus または YFP で標識した IP_3 受容体の少なくとも IP_3 結合ドメインを含有するタンパク質とを用いることを特徴とする、請求項 20 記載の方法。

【請求項 23】

生細胞の細胞内の IP_3 濃度を定量する方法であって、

(i) 細胞に、FRET 法が可能な 2 つの蛍光分子からなる組合わせのうちの一方で標識された IRBIT またはその IP_3 受容体結合ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子、および上記組合せのうちの他方で標識された IP_3 受容体の少なくとも IP_3 結合ドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子を発現可能な形で導入して発現させ；

40

(ii) 該細胞を蛍光顕微鏡下で、上記の 2 つの蛍光分子のうち低波長側の蛍光分子の励起波長を照射して、該分子の蛍光波長と、他方の長波長側の蛍光分子の蛍光波長とを測定すること；

を含む上記方法。

【請求項 24】

FRET 法が可能な 2 つの蛍光分子からなる組合わせが、Venus と CFP との組合せ、YFP と CFP との組合せ、または F1ASH と CFP との組合せである、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

50

I R B I T またはその I P₃ 受容体結合ドメインを含むタンパク質と I P₃ 受容体またはその少なくとも I P₃ 結合ドメインを含有するタンパク質からなる、I P₃ 濃度を定量するためのタンパク質複合体。

【請求項 26】

F R E T 法が可能な 2 つの蛍光分子からなる組み合わせのうち的一方で標識された I R B I T またはその I P₃ 受容体結合ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子、および上記組み合わせのうち他方で標識された I P₃ 受容体の少なくとも I P₃ 結合ドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子を発現可能な形で含み、生細胞内の I P₃ 濃度を定量するためのベクター。

【請求項 27】

2 つの蛍光分子からなる組み合わせが、V e n u s と C F P との組み合わせ、Y F P と C F P との組み合わせ、または F l a s h と C F P との組み合わせである、請求項 26 記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、I P₃ 受容体に結合する新規タンパク質に関する。該タンパク質は、細胞内およびセルフリー (c e l l f r e e) の系において I P₃ 指示薬として有用である。

【0002】

【従来の技術】

細胞膜上のレセプターの活性化に伴いホスファチジルイノシトール 4, 5 - ビスホスフェート (p h o s p h a t i d y l i n o s i t o l 4, 5 - b i s p h o s p h a t e) が加水分解されると、細胞内セカンドメッセンジャーであるイノシトール 1, 4, 5 - トリリン酸 (i n o s i t o l 1, 4, 5 - t r i s p h o s p h a t e (I P₃)) が生成する。I P₃ は I P₃ 受容体 (I P₃ R) に結合することにより、細胞内カルシウム貯蔵オルガネラ (主に小胞体) からの C a²⁺ 放出を誘導する。この I P₃ / C a²⁺ シグナル経路において、I P₃ 受容体は、I P₃ のシグナルを C a²⁺ のシグナルへ変換する役割を担っている (1 - 3) 。

【0003】

I P₃ 受容体は、4 量体の細胞内 I P₃ - 誘導性 C a²⁺ 放出チャネル (I P₃ - g a t e d C a²⁺ r e l e a s e c h a n n e l) である (3, 4) 。哺乳動物では、3 種の異なる I P₃ 受容体が存在する (5 - 7) 。I P₃ 受容体タイプ I (I P₃ R 1) は、中枢神経系、特に小脳において高発現している (8, 9) 。マウス I P₃ R 1 は、2749 アミノ酸からなり (5) 、3 つの機能的に異なる領域に分かれている。すなわち、N 末端近傍に I P₃ 結合ドメイン、C 末端近傍に 6 回膜貫通領域を有するチャネル形成ドメイン、およびこれら 2 つの領域のあいだに制御領域が存在する (10, 11) 。I P₃ 結合ドメインの欠失突然変異体解析より、I P₃ 受容体のアミノ酸 226 ~ 578 残基が特異的かつ高親和性のリガンド結合に必要な最小領域であることが示され、I P₃ 結合コアと呼ばれている (12) 。I P₃ により誘発される I P₃ 受容体チャネル開口の詳細な機序は未だ不明であるが、I P₃ 結合が I P₃ 受容体の何らかの立体構造変化を誘導することによって、チャネルの開口が起こると考えられる (10) 。チャネルの開口以外にも、I P₃ - 誘導性の立体構造変化は、I P₃ 受容体の分解にも関与していると考えられる (13, 14) 。

【0004】

I P₃ 受容体の活性化による細胞質 C a²⁺ 濃度の増加によって、多種多様な下流標的分子の活性が制御される。これら下流標的分子は、受精、発生、増殖、分泌、シナプス可塑性など多岐に渡る細胞応答において重要な役割を担っている (1 - 2, 15) 。このような多岐に渡る細胞機能を制御するために、C a²⁺ シグナルは、空間、時間、および濃度の点で厳密に制御される必要がある (2, 15) 。このような C a²⁺ シグナルの複雑な制御は、I P₃ 受容体アイソフォームの発現の多様性、I P₃ 受容体アイソフォームのヘテロ 4 量体の形成、I P₃ 受容体の細胞内分布、ならびに C a²⁺ 自体、A T P およ

10

20

30

40

50

びリン酸化によるIP₃受容体の制御によって部分的になわれている(3-4, 16)。IP₃受容体チャンネルはまた、カルモジュリン(18, 19)、FKBP12(20-22, 23-24)、カルシニューリン(21, 25, 23-24)、アンキリン(26-28)、 α -1受容体(28)、クロモグラニンAおよびB(29-31)、IRAG(32)、Fyn(33)ならびにBANK(34)などの該チャンネルと相互作用するタンパク質によっても制御される(4, 17)。さらに、CaBPと呼ばれるファミリーが、Ca²⁺依存的にIP₃受容体と結合し、IP₃非存在下でIP₃受容体を直接活性化することが示された(35)。IP₃受容体はまた、タンパク質-タンパク質間相互作用によってその上流または下流のシグナル分子に物理的に会合していることが示されている。例えば、IP₃受容体は、Homerファミリータンパク質を介して代謝型グルタミン酸受容体グループ1(mGluRs)と結合し(36)、また、未知の機序によってB₂ブラジキニン受容体(B₂Rs)と結合している(37)。mGluRsやB₂Rsの活性化によって、IP₃受容体に近接した位置でIP₃が産生され、効率的かつ特異的にシグナルが伝播される。

10

20

30

40

50

【0005】

このように、IP₃分子は、様々な細胞機能を制御する重要なセカンドメッセンジャーであり、その細胞内の濃度は時間空間的に制御された形で変化していると考えられる。しかし、*in vitro*でのIP₃の定量に有効な指示薬として[³H]IP₃を用いた方法が開発されているものの、放射性同位元素を使用するなどの点で簡便ではない。さらに、Ca²⁺やcAMPといった他のセカンドメッセンジャーとは異なり、生細胞内のIP₃濃度変化の経時的な検出法は、GFP-プレクストリン相同性ドメイン(pleckstrin homology domain)の細胞膜から細胞質への移行をモニターすることにより検出する方法があるのみで、該方法も間接的、かつ定量性及び空間解像度の等の点で問題があるなど、必ずしも有効な方法ではない。このことが、細胞内IP₃動態解析の障害となっている。

【0006】

【非特許文献1】

Berridge, M. J. (1993) *Nature* 361, 315-325

【非特許文献2】

Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11-21

【非特許文献3】

Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1995) *J. Neurochem.* 64, 953-960

【非特許文献4】

Patel, S., Joseph, S. K., and Thomas, A. P. (1999) *Cell Calcium* 25, 247-264

【非特許文献5】

Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989) *Nature* 342, 32-38

【非特許文献6】

Sudhof, T. C., Newton, C. L., Archer, B. T., III, Ushkaryov, U. A., and Mignery, G. A. (1991) *EMBO J.* 10, 3199-3206

【非特許文献7】

Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Segino, S., and Bell, G. I. (1993) *J. Biol.*

Chem. 268, 11356 - 11363

【非特許文献8】

Worley, P. F., Baraban, J. M., Colvin, J. S., and Snyder, S. H. (1987) Nature 325, 159 - 161

【非特許文献9】

Furuichi, T., Simon-Chazottes, D., Fujino, I., Yamada, N., Hasegawa, M., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Guenet, J.-L., and Mikoshiba, K. (1993) Recept. Channels 1, 11 - 24 10

【非特許文献10】

Mignery, G. A., and Sudhof, T. C. (1990) EMBO J. 9, 3893 - 3898

【非特許文献11】

Miyawaki, A., Furuichi, T., Ryou, Y., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Saitoh, T., and Mikoshiba, K. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4911 - 4915

【非特許文献12】

Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 18277 - 18284 20

【非特許文献13】

Zhu, C.-C., Furuichi, T., Mikoshiba, K., and Wojcickiewicz, R. J. H. (1999) J. Biol. Chem. 274, 3476 - 3484

【非特許文献14】

Zhu, C.-C., and Wojcickiewicz, R. J. H. (2000) Biochem. J. 348, 551 - 556 30

【非特許文献15】

Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998) Nature 395, 645 - 648

【非特許文献16】

Thrower, E. C., Hagar, R. E., and Ehrlich, B. E. (2001) Trends Pharmacol. Sci. 22, 580 - 586

【非特許文献17】

Mackrill, J. J. (1999) Biochem. J. 337, 345 - 361 40

【非特許文献18】

Patel, S., Morris, S. A., Adkins, C. E., O'beirne, G., and Taylor, C. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11627 - 11632

【非特許文献19】

Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) Neuron 23, 799 - 80 50

8

【非特許文献20】

Cameron, A. M., Steiner, J. P., Sabatini, D. M., Kaplin, A. I., Walensky, L. D., and Snyder, S. H. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1784-1788

【非特許文献21】

Cameron, A. M., Nucifora, F. C., Jr, Fung, E. T., Livingston, D. J., Aldape, R. A., Ross, C. A., and Snyder, S. H. (1997) J. Biol. Chem. 272, 27582-27588 10

【非特許文献22】

Dargan, S. L., Lea, E. J. A., and Dawson, A. P. (2002) Biochem. J. 361, 401-407

【非特許文献23】

Bultynck, G., De Smet, P., Weidema, A. F., Ver Heyen, M., Maes, K., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J. B., and De Smedt, H. (2000) J. Physiol. 525, 681-693

【非特許文献24】

Bultynck, G., De Smet, P., Rossi, D., Callewaert, G., Missiaen, L., Sorrentino, V., De Smedt, H., and Parys, J. B. (2001) Biochem. J. 354, 413-422 20

【非特許文献25】

Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M., Ronnett, G. V., and Snyder, S. H. (1995) Cell 83, 463-472

【非特許文献26】

Joseph, S. K., and Samanta, S. (1993) J. Biol. Chem. 268, 6477-6486 30

【非特許文献27】

Bourguignon, L. Y. W., Jin, H., Iida, N., Brandt, N. R., and Zhang, S. H. (1993) J. Biol. Chem. 268, 7290-7297

【非特許文献28】

Hayashi, T., and Su, T.-P. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 491-496

【非特許文献29】

Yoo, S. H., So, S. H., Kweon, H. S., Lee, J. S., Kang, M. K., and Jeon, C. J. (2000) J. Biol. Chem. 275, 12553-12559 40

【非特許文献30】

Yoo, S. H., and Jeon, C. J. (2000) J. Biol. Chem. 275, 15067-15073

【非特許文献31】

Thrower, E. C., Park, H. Y., So, S. H., Yoo, S. H., and Ehrlich, B. E. (2002) J. Biol. Chem. 277, 15801-15806

【非特許文献32】

50

Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.-X., Allescher, H.-D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and Ruth, P. (2000) *Nature* 404, 197-201

【非特許文献33】

Jayaraman, T., Ondrias, K., Ondiasova, E., and Marks, A. R. (1996) *Science* 272, 1492-1494

【非特許文献34】

Yokoyama, K., Su, I., Tezuka, T., Yasuda, T., Mikoshiba, K., Tarakhovskiy, A., and Yamamoto, T. (2002) *EMBO J.* 21, 83-92

10

【非特許文献35】

Yang, J., McBride, S., Mak, D.-O. D., Vardi, N., Palczewski, K., Haeseleer, F., and Foskett, J. K. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7711-7716

【非特許文献36】

Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J., and Worley, P. F. (1998) *Neuron* 21, 717-726

20

【非特許文献37】

Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F. C., Mistry, M., and Brown, D. A. (2002) *Neuron* 14, 209-220

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、 IP_3 の検出および定量に有効な指示薬となる新規 IP_3 受容体結合タンパク質を提供し、ならびにそれを用いた IP_3 の検出および/または定量方法を提供するものである。

30

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、 IP_3 受容体結合タンパク質、特に、 IP_3 受容体と相互作用し、かつ該相互作用が IP_3 により制御されている分子に注目し、鋭意検討を行った。 IP_3R1 (アミノ酸配列を配列番号7に示している)の細胞質領域の大部分に当たるN末端2217アミノ酸残基を結合させたアフィニティカラムを用いて、 IP_3 で該カラムに結合したタンパク質を溶出することにより、新規 IP_3 受容体結合タンパク質を同定し、IRBIT(IP_3 binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate)と命名した。IRBITは、*in vitro*および*in vivo*で IP_3R1 に結合し、その細胞内局在は IP_3R1 とよく一致した。さらに、IRBITは生理的濃度の IP_3 により IP_3R1 から解離することも判った。これらの結果から、IRBITは IP_3 の指示薬として有用であると考え、本発明を完成させるに至った。

40

【0009】

したがって、本発明は、以下の態様：

1. 以下の(a)、(b)または(c)のタンパク質、
 - (a) 配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号1に示すアミノ酸配列の1~104番目までのアミノ酸配列を含むタ

50

ンパク質

- (c) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列またはその 1 ~ 104 番目までのアミノ酸配列において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ I P₃ 受容体に結合するタンパク質
2. 上記 1 記載のタンパク質をコードする遺伝子、
3. 以下の (a)、(b) または (c) の DNA からなる遺伝子、
- (a) 配列番号 2 に示す塩基配列を含む DNA
- (b) 配列番号 2 に示す塩基配列の 1 ~ 312 番目までの塩基配列を含む DNA
- (c) (a) または (b) の塩基配列からなる DNA に相補的な DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ I P₃ 受容体に結合するタンパク質をコードする DNA 10
4. 上記 2 または 3 記載の遺伝子を含むベクター、
5. 上記 2 または 3 記載の遺伝子に、プロモーターが機能し得る形で連結されている、上記 4 記載のベクター、
6. 上記 2 または 3 記載の遺伝子を、蛍光または発光タンパク質をコードする遺伝子とインフレームで連結された形で含む、上記 5 記載のベクター、
7. 蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質 (GFP)、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、Venus および FLASH ならびにこれらの誘導体からなる群から選択される、上記 6 記載のベクター、
8. 上記 4 ~ 7 のいずれか 1 つ記載のベクターを含有する宿主細胞、 20
9. 哺乳動物細胞である、上記 8 記載の宿主細胞、
10. サンプル中の I P₃ を検出するための、上記 1 記載のタンパク質を含む I P₃ 指示薬、
11. 上記タンパク質が蛍光または発光タンパク質と融合されている、上記 10 記載の I P₃ 指示薬、
12. 上記タンパク質が FRET 法が可能なる 2 つの蛍光分子からなる組み合わせのうちのいずれか一方の蛍光分子で標識されており、上記組み合わせのうちの他方の蛍光分子で標識された I P₃ 受容体の少なくとも I P₃ 結合ドメインを含有するタンパク質と組み合わせ FRET 法により I P₃ を検出するための、上記 11 記載の I P₃ 指示薬、 13. 2 つの蛍光分子からなる組み合わせが、Venus と CFP との組み合わせ、YFP と CFP との組み合わせ、または FLASH と CFP との組み合わせである、上記 12 記載の I P₃ 指示薬、 30
14. 上記 1 記載のタンパク質を特異的に認識する抗体またはその機能的フラグメント、
15. ウサギポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、上記 14 記載の抗体およびその機能的フラグメント、
16. サンプル中の I P₃ 濃度を測定するための方法であって、
- (i) IRBIT またはその I P₃ 受容体結合ドメインを含むタンパク質と I P₃ 受容体の少なくとも I P₃ 結合ドメインを含有するタンパク質からなるタンパク質複合体を調製し；
- (ii) 上記タンパク質複合体とサンプルを接触させ； 40
- (iii) 遊離 IRBIT もしくはその I P₃ 受容体結合ドメインを含むタンパク質および / または上記複合体を定量すること；
- を含む、上記方法、
17. 上記 (iii) における定量が、抗 IRBIT 抗体および / または抗 I P₃ 受容体抗体を用いた免疫化学的応答系を利用して実施されることを特徴とする、上記 16 記載の方法、
18. 上記 (iii) における定量が、IRBIT もしくはその I P₃ 受容体結合ドメインを含むタンパク質または I P₃ 受容体の少なくとも I P₃ 結合ドメインを含有するタンパク質を予め標識しておいて、該標識物に由来するシグナルを測定することにより実施されることを特徴とする、上記 16 または 17 記載の方法、 50

19. 標識が蛍光標識である、上記18記載の方法、
20. 上記(iii)における定量が、FRET法により実施されることを特徴とする、上記16記載の方法、

21. YFPもしくはVenusで標識したIRBITまたはそのIP₃受容体結合ドメインを含むタンパク質と、CFPで標識したIP₃受容体の少なくともIP₃結合ドメインを含有するタンパク質とを用いることを特徴とする、上記20記載の方法、

22. CFPで標識したIRBITまたはそのIP₃受容体結合ドメインを含むタンパク質と、VenusまたはYFPで標識したIP₃受容体の少なくともIP₃結合ドメインを含有するタンパク質とを用いることを特徴とする、上記20記載の方法、

23. 生細胞の細胞内のIP₃濃度を定量する方法であって、 10

(i) 細胞に、FRET法が可能な2つの蛍光分子からなる組み合わせのうち的一方で標識されたIRBITまたはそのIP₃受容体結合ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子、および上記組み合わせのうち他方で標識されたIP₃受容体の少なくともIP₃結合ドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子を発現可能な形で導入して発現させ；

(ii) 該細胞を蛍光顕微鏡下で、上記の2つの蛍光分子のうち低波長側の蛍光分子の励起波長を照射して、該分子の蛍光波長と、他方の長波長側の蛍光分子の蛍光波長とを測定すること；

を含む上記方法、

24. FRET法が可能な2つの蛍光分子からなる組み合わせが、VenusとCFPとの組み合わせ、YFPとCFPとの組み合わせ、またはFLASHとCFPとの組み合わせである、上記23記載の方法、 20

25. IRBITまたはそのIP₃受容体結合ドメインを含むタンパク質とIP₃受容体またはその少なくともIP₃結合ドメインを含有するタンパク質からなる、IP₃濃度を定量するためのタンパク質複合体、

26. FRET法が可能な2つの蛍光分子からなる組み合わせのうち的一方で標識されたIRBITまたはそのIP₃受容体結合ドメインを含むタンパク質をコードする遺伝子、および上記組み合わせのうち他方で標識されたIP₃受容体の少なくともIP₃結合ドメインを含有するタンパク質をコードする遺伝子を発現可能な形で含み、生細胞内のIP₃濃度を定量するためのベクター、ならびに 30

27. 2つの蛍光分子からなる組み合わせが、VenusとCFPとの組み合わせ、YFPとCFPとの組み合わせ、またはFLASHとCFPとの組み合わせである、上記26記載のベクター、に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的に説明する。

【0011】

本発明者らが新たにクローニングした新規IP₃受容体タンパク質であるIRBITは、配列番号1に示すアミノ酸配列を含み、これはN末端領域(アミノ酸1~104)とC末端領域(アミノ酸105~530)とに分けられ、C末端領域はS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼに相同性を有しているものの該酵素活性は示さず、N末端領域はIP₃受容体(本明細書中、IP₃受容体とはIP₃R1およびIP₃受容体タイプII(IP₃R2))を含むIP₃受容体の任意のサブタイプを指す)との結合に必須な領域である。該タンパク質の特徴としては、以下の：(1)中性タンパク質である(推定pI値：6.48)が、N末端領域は比較的酸性である(推定pI値：4.98)こと、(2)N末端領域に7つのリン酸化部位が集中的に局在しており、リン酸化がIP₃R1との相互作用に必要であると推測されること、(3)IP₃R1のIP₃との結合に必須である508番目のリジン残基がIRBITとの相互作用においても必須であること、(4)IP₃によりIP₃R1との相互作用が解離すること、および(5)高塩濃度により、IP₃R1との相互作用が解離し、かつ粗ミクロソーム画分から抽出されることから、IP₃ 50

R 1 との相互作用は静電氣的結合によると推測されること：が挙げられる。

【0012】

したがって、本発明は、IRBITタンパク質、IRBITのIP₃受容体への結合に必要な領域であるN末端領域(1~104番目のアミノ酸)、およびこれらのアミノ酸配列を含むタンパク質を包含する。場合によっては、IRBITの1~277番目のアミノ酸を含むタンパク質が好ましい。さらに、これらのタンパク質の変異体であって、IP₃受容体結合活性を保持したまま、1もしくは複数個のアミノ酸、好ましくは1~50個、より好ましくは1~20個、さらに好ましくは1~10個、特に好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ配列を含むタンパク質もまた、本発明に包含される。

10

【0013】

さらに、これらのタンパク質をコードする遺伝子も本発明に包含される。該遺伝子は、例えばIRBITタンパク質をコードする配列番号2に示す塩基配列、またはIRBITのIP₃受容体結合ドメインであるN末端領域(1~104番目のアミノ酸)をコードする配列番号2に示す塩基配列の1~312番目までの塩基配列を含むDNAである。また、これらのDNAまたはその相補鎖DNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAをも含む。ここで、ストリンジントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が10mM~300mMであり、好ましくは37~65、より好ましくは42である条件をいう。あるいは、このような条件は、ECLTM direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmacia製)を用いて、添付されている説明書の記載に従うことにより達成することができる。さらに、配列番号2の塩基配列またはその1~312番目までの塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつIP₃受容体結合活性を有するタンパク質をコードするものも含む。ここで、欠失、置換または付加を受ける塩基の数は特に制限されないが、好ましくは1~100個、より好ましくは1~50個、さらに好ましくは1~20個、最も好ましくは1~10個である。このような核酸の塩基配列としては、配列番号1に表される塩基配列との相同性が、BLAST等を用いて計算したときに(例えば、BLASTのデフォルトすなわち初期条件のパラメーターを用いた場合)、70%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上もしくは99%以上である。さらに、これらのDNAに対応するRNA、これらのDNAを含むベクター、上記DNAが発現可能なように該DNAにプロモーターが機能し得る形で連結されているベクター、および上記DNAの発現産物(IRBIT分子等)を標識化するための何らかの標識物をコードするDNAと上記DNAがインフレームで連結されているベクター、さらにはこれらのベクターを含有する宿主細胞(昆虫細胞、大腸菌および哺乳動物細胞が好ましいが、これらに限定はされない)も、本発明に包含される。上記標識物は、ヒスチジンタグ(Histag)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)およびビオチン等の免疫学的反応またはタンパク質間結合を利用するための標識でもよく、緑色蛍光タンパク質(GFP)CFP、Venus、FLASHおよびReaSHならびにこれらの誘導体などの蛍光または発光タンパク質であってもよいが、これらに限定されることはなく、公知のあらゆる標識物のうちの任意のものであってよい。

20

30

40

【0014】

さらに、IRBITはIP₃により選択的かつ濃度依存的に、IP₃受容体から解離し得るタンパク質である。例えば、IP₃受容体をIP₃受容体タイプIとした場合、その上記解離に対するEC₅₀値は約0.5μMである。この値は従来法によるIP₃結合アッセイにより測定されたIP₃R1のIP₃への結合におけるK_d値(K_d=83~100nM:60, 61)より高いが、この差は、IP₃のIP₃受容体への結合親和性はpHおよびイオン強度に大きく依存していることから(62-64)、おそらくバッファー条件が異なる(該アッセイでは、pH8.0~8.3、低イオン強度の条件で測定している)ことに起因するのではないかと考えられる。従来法とは異なる表面プラズモンレゾ

50

ナンスバイオセンサーによる研究では、 IP_3R1 のN末端領域(アミノ酸1~604)について生理的条件下(pH7.4、150 mM NaCl)で測定するとKd値は336 nMであり(64)、これは従来法によるKd値と比較して親和性が約7.5倍低いことを示す。この値は、IRBITの IP_3R1 (本発明においては、実験の利便性のためにGST融合タンパク質を用いており、これをGST-ELと本明細書中では呼ぶ)との相互作用の解離におけるEC50値(約0.5 μ M: pH7.4、100 mM NaCl下で測定)に近い。以上のことから、IRBITは IP_3 受容体に IP_3 が結合することにより IP_3 受容体と解離すると考えられる。これを支持するデータとして、Luzziraが検出細胞/キャピラリー電気泳動システムを用いて測定した結果によると、 IP_3 の細胞内濃度は、刺激前は数十nMであり刺激後は数 μ Mに上昇するとされている(50)。上述のとおり IP_3R1 からのIRBITの解離に対する IP_3 のEC50値が約0.5 μ Mであり、この値は、刺激前と刺激後の細胞内 IP_3 濃度の変化範囲に含まれており、IRBITは細胞外刺激により誘導される IP_3 産生後に IP_3 受容体から解離することが強く示唆される。

【0015】

IP_3 により濃度依存的に IP_3 受容体から解離するというIRBITの特性によって、IRBITまたはその IP_3 受容体結合ドメインを少なくとも含有するタンパク質を新規 IP_3 指示薬として利用できる。すなわち、例えばIRBITを用いる場合、対象とするサンプルを、IRBIT- IP_3 受容体複合体(この際の IP_3 受容体は完全な分子である必要はなく、 IP_3 とIRBITの両方が結合できる領域を少なくとも含むフラグメント(以下、 IP_3 BDと称する)でよい)と接触させて、 IP_3 受容体から解離したIRBITの量を定量するか、逆に IP_3 との接触後に残存するIRBIT- IP_3 受容体/ IP_3 BD複合体を定量することにより、 IP_3 の定量的検出が可能となる。IRBITの IP_3 受容体結合ドメインを少なくとも含有するタンパク質を用いた場合も同様である。

【0016】

遊離IRBITまたはIRBIT- IP_3 受容体複合体の定量的検出は、免疫学的手法によっても可能である。

【0017】

本明細書において「抗体」という用語は、完全な抗体分子およびその完全な抗体に由来する抗原結合能を保持しているフラグメント、およびこれらの誘導体を含む。IRBITに対する抗体はモノクローナルまたはポリクローナル抗体であってよく、いずれの場合も、IRBIT分子またはその一部のペプチドを動物に免疫することによる一般的な方法で取得できる。これらの抗体分子を精製する方法、およびIRBITに対する結合性を有する抗体の断片に切断してこれを精製する方法もまた当業者には公知であり、所望により適切な方法を選択することができる。これらの抗体分子を用いて、遊離IRBITを検出することは、当業者であれば容易に達成し得る。また、該抗体分子を用いてIRBIT- IP_3 受容体/ IP_3 BD複合体を検出する方法も、当業者であれば容易に達成し得る。例えば、 IP_3R1 を予め固相支持体(ビーズ、またはアッセイプレート表面等)に結合させておき、 IP_3R1 を介して固相に結合しているIRBITを検出するとよい。

【0018】

さらに、IRBITを適切な分子で標識化し、該標識を検出することにより遊離IRBITまたはIRBIT- IP_3 受容体/ IP_3 BDの定量的検出が可能である。標識は、放射性標識、免疫標識、色素標識、蛍光標識または発光標識等、タンパク質の標識物として公知である標識分子のうち任意のものを該標識分子に応じた公知の方法でIRBIT分子に結合させることにより達成できる。また、使用する標識によって、その標識に由来するシグナルを検出することは、当業者であれば公知技術に基づいて容易に達成できる。

【0019】

まず、IRBITまたはその IP_3 受容体結合ドメインを少なくとも含むタンパク質と IP_3 受容体または IP_3 BDからなる複合体(IRBIT- IP_3 受容体/ IP_3 BD複

合体と称する)を調製する。IRBITは細胞内でIP₃受容体と複合体を形成するため、IP₃受容体を発現する天然の細胞(小脳神経細胞等)から精製することもできるが、IRBITまたはそのIP₃受容体結合ドメインを少なくとも含むタンパク質とIP₃受容体分子またはIP₃BDを含むタンパク質を強制発現させた細胞(大腸菌またはSf9細胞等)から、生化学的分画法によりマイクロソーム画分を分画してもよい。あるいは、分子標識物(ヒスチジンタグ等)が付いた形で上記タンパク質を強制発現させて、細胞溶解液から標識物を利用して抽出することもできる。場合によっては、その他公知の精製法(カラムクロマトグラフィーなど)を用いてもよい。

【0020】

さらに、IRBITとIP₃BDを別々にそれぞれ調製し、複合体を形成させることも可能である。すなわち、例えば、GST-IP₃BDを大腸菌で発現させてグルタチオン-セファロースで精製し、IRBITまたはそのIP₃受容体結合領域を含むタンパク質を大腸菌またはSf9細胞で発現させる。該IRBITまたはそのIP₃受容体結合領域を含むタンパク質をGST-IP₃BDと接触させることにより複合体を形成させ、グルタチオン-セファロースでプルダウンすることにより該複合体を精製できる。あるいはまた、小脳高塩抽出画分などより、組織中のIRBITをGST-IP₃BDとグルタチオン-セファロースでプルダウンすることにより上記複合体を調製してもよい。

【0021】

調製したIRBIT-IP₃受容体/IP₃BD複合体(1~100μM程度に10mM HEPES、100mM NaCl、2mM EDTA、1mM 2-ME、pH7.4中にて調製する)にIP₃を含むサンプルを接触させて、5~30分程度氷上でインキュベートした後、該溶液中に存在する遊離IRBITまたは残存するIRBIT-IP₃受容体/IP₃BD複合体を検出する。反応に用いるIRBIT-IP₃受容体/IP₃BD複合体を予め固相担体に結合させておき、反応後固相担体を液相から分離して液相中の遊離IRBITを検出するか、または固相担体に結合しているIRBIT-IP₃受容体/IP₃BD複合体中のIRBITを検出することもできる。IRBITの検出は、IRBITを認識する抗体を用いて免疫学的反応系により行ってもよく、また標識化IRBITを用いた場合には該標識を検出することで行ってもよい。

【0022】

さらに、本発明の1実施形態では、蛍光のエネルギー移動(fluorescence resonance energy transfer, FRET)を利用した方法により、IP₃を定量することも可能である。

【0023】

蛍光のエネルギー移動(FRET)とは、2つの蛍光団が互いに近距離で適切な位置関係にある時に、一方の蛍光団(エネルギー供与体(donor))から、もう一つのより長波長側の蛍光団(エネルギー受容体(acceptor))へ励起エネルギーが移動する現象である。2つの分子を特定の2種の蛍光分子で標識することにより、その2つの分子間の相互作用の変化をFRET効率の変化として測定することができる。また、分子間の相互作用を制御する別の分子の濃度変化を測定することも可能となる。

【0024】

FRET法により、細胞内Ca²⁺濃度変化の検出法(72)またはcAMP濃度変化の検出法(71)等が開発されている。

【0025】

IRBITはIP₃受容体のIP₃BDに結合しており、IP₃によりIP₃受容体から解離する。この性質を利用し、IRBITとIP₃BDを各々FRETが可能な2種の蛍光標識からなる組み合わせのそれぞれで標識することにより、in vitroあるいは細胞内でのIP₃濃度変化を検出することができる。すなわち、例えば、IRBITを例えば黄色蛍光タンパク質(YFP)またはその改良体であるVenusで標識し、IP₃BDをシアン蛍光タンパク質(CFP)で標識する。IP₃非存在下ではIRBITはIP₃BDに結合しておりCFPからVenusにFRETが起こるが、IP₃存在下では

両者は解離し、FRETが起こらなくなる。さらにVenus-IRBITとCFP-IP₃BDをリンカー配列を介して結合させる(Venus-IRBIT-IP₃BD-CFP)と両者のモル比が等しくなり、効率的である。in vitroでIP₃濃度を測定する場合は、細胞の抽出液などにVenus-IRBIT-IP₃BD-CFPタンパク質を加え、FRETを測定する。また、Venus-IRBIT-IP₃BD-CFPの遺伝子を細胞内に導入させれば、生きた細胞内のIP₃濃度変化を時間空間的に解析することができる。FRET法の測定は、蛍光顕微鏡または蛍光計等で測定することができる。

【0026】

FRET法によるIP₃検出法の例をさらに詳細に以下に記載する。

まず、Venus-IRBIT-IP₃BD-CFP発現ベクターを作成する。IRBIT全長またはIP₃BDとの結合に必要な十分な領域を含むその欠失変異体(例えば、アミノ酸1~104またはアミノ酸1~277からなる変異体)、マウスIP₃受容体タイプIのIP₃結合領域(配列番号7のアミノ酸224~604からなる領域)を含むタンパク質、VenusおよびCFPの4つのcDNAをPCRで増幅し、フレームが合うように哺乳動物細胞発現ベクター(pcDNA3など)に挿入する。順番は、例えばVenus-IRBIT-IP₃BD-CFPのように内側2つにIRBITとIP₃BD、外側2つにVenusとCFPというようにすれば、特に制約はない。リコンビナントタンパク質調製用には、大腸菌発現用ベクター(pETなど)あるいはSf9発現用ベクター(pFastBacなど)に挿入する。この場合は精製用にタグ(Hisタグなど)をN末端あるいはC末端に付加する。

【0027】

Venus-IRBIT-IP₃BD-CFPを大腸菌あるいはSf9細胞で発現させ、Hisタグを付けた場合はProBond resin(Invitrogen)などで精製する。場合によってはイオン交換カラム、ゲルろ過カラムで精製してもよい。

【0028】

精製したVenus-IRBIT-IP₃BD-CFPタンパク質に、濃度の分かっているIP₃溶液を添加し、CFPの励起波長(440 nm付近)をあて、CFPの蛍光波長(480 nm付近、CFP蛍光)と、Venusの蛍光波長(535 nm付近、FRET蛍光)を測定する。IP₃濃度とFRET蛍光/CFP蛍光比をプロットすることにより、検量線を決定する。IP₃濃度が未知のサンプル(細胞抽出液など)にVenus-IRBIT-IP₃BD-CFPタンパク質を添加し、FRET蛍光/CFP蛍光比を求め、検量線と比較することにより、IP₃濃度を定量する。

【0029】

生細胞中のIP₃濃度もまた、FRET法により測定できる。まず、pcDNA-Venus-IRBIT-IP₃BD-CFPを培養細胞(Cos-7、HeLaなど)に遺伝子導入試薬(TransIT(Mirus)など)で遺伝子導入する。遺伝子導入してから1~3日後のグラスボトムディッシュ上の細胞を冷却CCDカメラ付き倒立型蛍光顕微鏡(IX71(Olympus)など)で観察する。CFPの励起波長(440 nm付近)をあて、CFPの蛍光波長(480 nm付近、CFP蛍光)と、Venusの蛍光波長(535 nm付近、FRET蛍光)を測定する。両者の蛍光強度の比をとることによりFRET効率を定量する。IP₃を産生するアゴニスト(Cos-7の場合はATP、HeLaの場合はヒスタミンなど)をグラスボトムディッシュに添加し、FRET効率を経時的に測定する。アゴニストによりIP₃が産生されれば、FRET/CFPの比が低下することが期待される。

【0030】

上記にVenusとCFPの組合せの蛍光標識を用いた場合について例示的に述べたが、この組み合わせは、YFPとCFPまたはFlasHとCFPでも可能であり、またこれらに限定されない。さらに、FRET法に用いるための蛍光分子は今後種々のものが開発されるであろうと予測されるが、それらもまた本発明の実施に使用可能であろう。

10

20

30

40

50

【0031】

また、本発明のIP₃検出方法に使用するための本発明のIP₃指示薬またはIP₃検出用キットもまた、本発明に包含される。該指示薬またはキットには、IRBITの少なくともIP₃受容体結合領域を含むタンパク質またはこれをコードするDNAもしくはRNAが含まれている。場合によっては、IP₃受容体の少なくともIP₃結合領域を含むタンパク質またはコードするDNAもしくはRNAを含む。さらに、標識試薬（蛍光標識化合物等）および/または上記タンパク質を認識する抗体を含んでいてもよい。

【0032】

【実施例】

以下に実施例を示し、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。 10

【0033】

方法

IP₃ R1アフィニティカラムの作製

マウスIP₃ R1のN末端領域（アミノ酸1～225）をコードするcDNAをグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）融合ベクターpGEX-KGに挿入した（40）。該GST-IR₃ R1（1-225）断片をバキュロウイルスストランスマスターベクターpBlueBac4.5（Invitrogen）にサブクロニングした。該GST-IR₃ R1（1-225）のSmaI部位より下流の領域を、マウスIP₃ R1（アミノ酸79～2217に相当）のSmaI-EcoRI断片で置き換え、GST-IP₃ R1 20（1-2217）ベクター（GST-ELと命名した）を構築した。コントロールとしてGSTのみをコードする断片をpBlueBac4.5にサブクロニングした。Sf9細胞は27で10%ウシ胎仔血清を添加したTNM-FH培地で培養した。GST-ELまたはGST遺伝子を持つ組換えバキュロウイルスをBac-N-Blue（商標）トランスフェクションキット（Invitrogen）を用いて、添付の説明書にしたがって作製した。感染多重度5で組換えバキュロウイルスを感染させて48時間インキュベートすることにより、GST-ELおよびGSTを2×10⁸個のSf9細胞で発現させた。細胞を回収後-80で保存した。凍結保存しておいた細胞を10 mM Hepes 30（pH 7.4）、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-メルカプトエタノール（2-ME）、0.1% Triton X-100、およびプロテアーゼインヒビター（1 mM フェニルメチルスフホニルフロライド（PMSF）、10 μM ロイペプチン、2 μM ペプスタチンA および10 μM E-64）に懸濁し、ガラスフロンホモジナイザーでホモジナイズした（1000 rpm、10ストローク）。ホモジネートを20,000×gで30分遠心し、上清を3 mlのグルタチオン-セファロース4B（Amersham Pharmacia Biotech）と共に3時間4でインキュベートした。40 mlの10 mM Hepes 40（pH 7.4）、250 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-MEおよび0.1% Triton X-100で8回洗浄後、グルタチオン-セファロースに結合したGST-ELまたはGSTをカラムに充填して10 mM Hepes 40（pH 7.4）、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-MEおよび0.1% Triton X-100で平衡化した。約5 mgのGST-ELを固定化した。

【0034】

IRBITの精製および部分アミノ酸配列決定

成熟ラット小脳（約5 g）をホモジナイズバッファー（10 mM Hepes（pH 7.4）、20 mM ショ糖、2 mM EDTA、1 mM 2-ME、およびプロテアーゼインヒビター）45 ml中でガラスフロンホモジナイザーでホモジナイズした（950 rpm、10 ストローク）。ホモジネートを1,000×gで10分間遠心し、上清（S1画分）をさらに100,000×gで60分間遠心して、細胞質画分（上清）と粗ミクロソーム画分（ペレット）とを得た。粗ミクロソーム画分を、 50

500 mM NaClを含むホモジナイズバッファ-25 ml中でガラステフロンホモジナイザーでホモジナイズし(1,200 rpm、10 ストローク)、15分氷上でインキュベート後、100,000 x gで60分間遠心して高塩抽出画分(上清)と高塩抽出後粗ミクロソーム画分(ペレット)とを得た。高塩抽出画分を希釈バッファ-(10 mM Hepes (pH 7.4)、2 mM EDTA、1 mM 2-ME、0.01% Brij 35、およびプロテアーゼインヒビター)で5倍希釈し、希釈した高塩抽出画分をグルタチオン-セファロースで前処理した後、結合バッファ-(10 mM Hepes (pH 7.4)、100 mM NaCl、2 mM EDTA、および1 mM 2-ME)で平衡化しておいたGST-EL アフィニティカラムに添加した。コントロールとしてGSTカラムを用いた。カラム容量の20倍の結合バッファ-にてカラムを洗浄した後、50 μM IP₃ (Dojindo)と0.05% Brij 35とを含む結合バッファ-でカラムに結合しているタンパク質を溶出させた。溶出液を濃縮して、10%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で分離してクマシーブリリアントブルー(CBB)で染色した。約60 kDaの位置にあるタンパク質のバンドをゲルから切り出し、公知の方法(41)に従いリジルエンドペプチドチダーゼ(Wako)で切断した。切断したペプチドをSMARTシステム(Amersham Pharmacia Biotech)につないだC-18 逆相カラム(μRPC C2/C18 SC 2.1/10、Amersham Pharmacia Biotech)で分離した。各ペプチドのアミノ酸配列を494 precise protein sequencer (Applied Biosystems)で配列決定したところ、2つのペプチド配列、N-YSFMATVTK-C(配列番号3)およびN-QIQFADDMQEFTK-C(配列番号4)が得られた。

【0035】

IRBITのcDNAクローニング

上記60 kDaのタンパク質から得られた上記2つのペプチド配列を非重複データベース(non-redundant database)についてBLAST検索したところ、これらの配列は、データベース中の1つの配列(登録番号CAC09285)にマッチした。マウス発現配列タグのデータベース(登録番号AW229870およびBE282170)に基づいて、該cDNAに相同的なプライマー(5'-ATGTCGATGCCTGACGCGATGC-3'(配列番号5)および5'-GCGTGGTTCATGTGGACTGGTC-3'(配列番号6))を合成した。IRBITのcDNAを、oligo dT-プライマーを用いて合成したマウス小脳第1鎖cDNAをテンプレートとしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)にて増幅させた。PCR産物をpBluescript I IKS(+)(Stratagene)にクローニングして配列決定した。3つの独立クローンの配列を確認した。

【0036】

組換えタンパク質の調製

IRBITの全長およびN末端(アミノ酸1~104)をコードするcDNAを、大腸菌ヘキサヒスチジン(His)融合ベクターpET-23a(+)(Novagen)にサブクローニングして、各々IRBIT-HisおよびIRBIT(1-104)-His発現ベクターを作製した。同じcDNAをGST融合ベクターpGEX-4T-1(Amersham Pharmacia Biotech)にサブクローニングし、各々GST-IRBITおよびGST-IRBIT(1-104)発現ベクターを作製した。マウスIP₃R1のアミノ酸配列(配列番号7)のアミノ酸1~225、1~343、341~923、600~1248、916~1581および1553~1943をコードするcDNA断片をpGEX-KGに挿入して、各々GST-Ia、GST-Iab、GST-IIab、GST-IIbIIIIa、GST-IIIIabおよびGST-IV発現ベクターとした。マウスIP₃R1のアミノ酸1593~2217をpGEX-4T-1に挿入してGST-IV-Va発現ベクターを得た。これらの融合タンパク質を大腸菌で発現させた。GST-ELは、上記のようにしてSf9細胞で発現させ

た。発現された His - タグ融合タンパク質は ProBond 樹脂 (Invitrogen) を用いて精製し、GST 融合タンパク質は、グルタチオン - セファロースで精製した。GST - IbIia (マウス IP₃ R1 のアミノ酸 224 ~ 604) とその部位特異的突然変異 K508A および R441Q は既に公知であるものを用いた (引用文献 42 参照のこと、GST - IbIia は該文献中 G224 と称されている)。

【0037】

酵素活性測定

S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼの加水分解方向への活性を測定するために、公知の方法に (43) したがって、精製した IRBIT - His (3.0 μg)、GST - IRBIT (4.3 μg)、GST (1.3 μg) およびウサギ S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼ (Sigma) (2.4 μg) を用いて、生成産物 (ホモシステイン) と 5, 5' - ジチオビス (2 - ニトロ安息香酸) (Sigma) との反応による発色を光学的に測定した。412 nm での吸光度を、DU 640 分光光度計 (Beckman) にて 0、5、20 および 60 分後に測定した。3 回の独立した実験結果を平均 ± 標準偏差で示した (図 2)。

10

【0038】

アフィニティ精製用抗 IRBIT 抗体の作製

ニホンシロウサギに、精製 IRBIT (1 - 104) - His を、完全フロイントアジュバントと共に 14 日間隔で皮下注射して免疫した。抗 IRBIT 抗血清を、シアノジェンブロマイド - 活性化セファロース 4B (Amersham Pharmacia Biotech) に共有結合させた GST - IRBIT (1 - 104) に通し、該カラムに特異的に結合した抗体を 100 mM グリシン - HCl (pH 2.5) で溶出した。

20

【0039】

細胞画分の調製およびイムノブロットティング

大脳、小脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、精巣および卵巣を、成熟マウスより摘出して S1 画分を上記方法により得た。マウス小脳の細胞質画分、粗ミクロソーム画分、高塩抽出画分、および高塩抽出後粗ミクロソーム画分を、上記と同様の方法により得た。図に示す量のタンパク質を 10% SDS - PAGE に供し、ポリビニリデンフルオリド (PVDF) 膜に電氣的に転写した。ブロッキングした後に、該膜を抗 IRBIT 抗体 (1 μg/ml) で室温にて 1 時間インキュベートし、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合口バ抗ウサギ IgG (Amersham Pharmacia Biotech) でブロットした。免疫反応したバンドを、増幅化学発光検出システム (enhanced chemiluminescence detection system; Amersham Pharmacia Biotech) で検出した。

30

【0040】

ほ乳細胞発現ベクターの作製とトランスフェクション

全長 IRBIT をコードする cDNA を pcDNA3 (Invitrogen) にサブクローニングした。全長 IRBIT またはその欠失変異体 (アミノ酸 1 ~ 277、1 ~ 104、および 105 ~ 530) をコードする cDNA を pEGFP - C1 (Clontech) にサブクローニングして、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合タンパク質発現ベクターを作製した。マウス IP₃ R1 発現ベクター pBact - STneoB - C1 は既に公開されているものを用いた (44)。Cos - 7 細胞を 10% ウシ胎仔血清、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した DMEM 培地中で 37 °C にて培養した。TransIT transfection reagents (Mirus) を用いて、添付の説明書にしたがって、一過性遺伝子導入を行った。遺伝子導入してから 2 日後の細胞をイムノブロットティング、プルダウン実験、または免疫染色に用いた。

40

【0041】

in vitro 結合実験

マウス小脳細胞質画分を 10 mM HEPES (pH 7.4)、200 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2 - ME および 0.02% Triton

50

n X - 100で2倍希釈した。高塩抽出画分は、10 mM Hepes (pH 7.4)、2 mM EDTA、1 mM 2-MEおよび0.01% Triton X - 100で5倍希釈した。希釈した画分を(両画分ともNaCl最終濃度は100 mM)を20 µgのGST-ELまたはGSTと4にて2時間インキュベートした。10 µlのグルタチオン-セファロースを添加してさらに2時間インキュベートし、該樹脂を洗浄バッファー(10 mM Hepes (pH 7.4)、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-ME、and 0.01% Triton X - 100)で5回洗浄した後、結合したタンパク質を20 mMのグルタチオンで溶出させた。溶出したタンパク質は抗IRBIT抗体によるウェスタンブロットにより解析した。

【0042】

脱リン酸化のためには、希釈した高塩抽出画分を大腸菌アルカリホスファターゼ(Toyoobo)の存在下または非存在下のいずれかで2 mM MgCl₂と共に37にて30分インキュベート後、5 mMのEDTAを添加して、上述のとおりプルダウンアッセイに供した。

【0043】

解離実験には、希釈した高塩抽出画分中のIRBITをGST-ELを用いて、上述のとおりプルダウンにより沈降させて洗浄の後、IP₃、イノシトール4,5-ニリン酸(IP₂) (Dojindo)、イノシトール1,3,4,5-四リン酸(IP₄) (Calbiochem)、イノシトール1,2,3,4,5,6-六リン酸(IP₆) (Calbiochem)またはATP(Amersham Pharmacia Biotech) (各0.1、0.3、1、3または10 µM)を含む洗浄バッファー100 µlを、樹脂に添加した。氷上で10分間インキュベートした後、サンプルを10,000 rpmで1分間遠心し、その上清を抗IRBIT抗体またはヤギ抗GST抗体(Amersham Pharmacia Biotech)によるイムノブロットに供した。定量化のために、Alexa 680-結合ヤギ抗ウサギIgG (Molecular Probes)を二次抗体として用いた。IRBITの免疫反応性のバンドの蛍光強度は、Odyssey infrared imaging system (Aloka)で測定した。定量データ(少なくとも3回の独立した実験の平均±SD)は、10 µMのIP₃溶出物中のIRBITの量に対する比率で示した。

【0044】

IP₃R1のIRBIT結合領域およびIRBIT結合に必要なアミノ酸残基を特定するために、希釈した高塩抽出画分を100 pmolのGST、GST-EL、GST-Ia、GST-Iab、GST-IbIIa、GST-IIab、GST-IIbIIa、GST-IIIIab、GST-IV、GST-IV-Va、K508AまたはR441Qを用いて上述のとおりプルダウンアッセイに供し、抗IRBIT抗体にてウェスタンブロットングにより解析した。

【0045】

IRBITのIP₃R1-結合領域の同定は、GFP-タグ付き全長IRBITまたはこれの末端欠失型変異体を発現するCos-7細胞を溶解バッファー(10 mM Hepes (pH 7.4)、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 2-ME、0.5% Nonidet P-40、およびプロテアーゼインヒビター)で4にて30分間溶解させて遠心した(100,000 x g、30分)。上清を、GST-ELまたはGSTで上述のとおりプルダウンアッセイに供し、結合したタンパク質を抗GFP抗体(Medical & Biological Laboratories)でイムノブロット解析に供した。

【0046】

間接的免疫蛍光法および共焦点顕微鏡法

遺伝子導入したCos-7細胞をガラスカバースリップ上で培養して、生理的リン酸バッファー(PBS)で1度洗浄して4%ホルムアルデヒド含有PBSで15分間固定化し、0.1% Triton X-100含有PBSで5分間、膜透過処理した後、2%

10

20

30

40

50

のヤギ血清を含むPBSで室温にて60分間ブロッキングした。細胞質中のタンパク質を洗い流すために、遺伝子導入した細胞を氷冷した0.1%サポニン含有細胞膜透過化バッファ(80 mM PIPES (pH 7.2)、1 mM MgCl₂、1 mM EGTAおよび4% ポリエチレングリコール)中で細胞膜に穴をあけ、氷冷細胞膜透過化バッファで2回洗浄した後、固定化した。その後細胞に、ウサギ抗IRBIT抗体(1 μg/ml、室温、60分)およびラット抗IP₃R1抗体18A10(45)(4にて一晚)を反応させた。PBSで5分間洗浄した後、Alexa 488-結合ヤギ抗ウサギIgGおよびAlexa 594-結合ヤギ抗ラットIgG(Molecular Probes)を37で45分間反応させた。PBSにて5分間ずつ4回洗浄した後、カバースリップをVectashield (Vector Laboratories)でマウントしてIX-70共焦点蛍光顕微鏡(Olympus)を用いて60倍の対物レンズで観察した。

【0047】

免疫沈降

1% Nonidet P-40を含む50 mM Hepes (pH 7.4)、1 mM MgCl₂ およびプロテアーゼインヒビターで4にて30分間処理することにより、粗ミクロソームから界面活性剤可溶化抽出物を得、20,000 x gで30分間遠心した。上清を免疫沈降バッファ(10 mM Hepes (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM MgCl₂、および1% Nonidet P-40)にて10倍に希釈し、ウサギ抗IRBIT抗体(3 μg)あるいはコントロールウサギIgG(3 μg)と共に4にて2時間インキュベートした。免疫複合体を、プロテインGセファロース4ファストフロー(Amersham Pharmacia Biotech)を添加して4にて2時間反応させた。樹脂を免疫沈降バッファで3回洗浄して抗IRBIT抗体またはマウス抗IP₃R1抗体KM1112(47)によるウエスタンブロットに供した。

【0048】

結果

新規IP₃R結合タンパク質の精製およびcDNAクローニング

IP₃受容体と相互作用する分子を同定するために、マウスIP₃R1のIP₃結合ドメインおよび制御ドメインを含む細胞質領域(10, 11)の大部分をコードするN末端2217アミノ酸領域を、GSTとの融合タンパク質(GST-EL)として用いた。GST-ELおよびGSTをバキュロウイルス/Sf9細胞系により発現させて、グルタチオン-セファロースに結合させた。小脳の粗ミクロソーム画分から高塩濃度バッファ(500 mMのNaClを含む)で抽出される画分は、膜結合タンパク質に富んだ画分であると考えられ、これをGST-ELまたはGSTを固定化したグルタチオン-セファロースアフィニティカラムに添加した。IP₃が存在するとIP₃受容体から解離するタンパク質を検出すべく、50 μMのIP₃を用いてアフィニティカラムに結合したタンパク質の溶出を行ったところ、GST-ELカラムからはこのようなタンパク質は溶出されず(データは示していない)、かかるタンパク質がIP₃R1に特異的に結合するタンパク質であることが示唆された。かかる60 kDaのタンパク質に由来する2つのペプチドの配列を決定し、非重複データベースのBLAST検索を行ったところ、これらの2つの配列はデータベース中のあるヒト由来cDNAの配列とマッチした。このcDNAに相同性のあるマウス発現配列タグの配列情報に基づいて、マウス小脳から逆転写PCRにより、上記60 kDaタンパク質のcDNAを得た。クローニングされたcDNAの推定アミノ酸配列から530アミノ酸残基からなるタンパク質であることが示された(図1B)。計算上の分子量は58.9 kDaであり、SDS-PAGEによって推定された分子量とほぼ一致していた。この60 kDaの分子をIRBITと名付けた。

【0049】

IRBITのC末端領域(アミノ酸105~530)はメチル化経路の酵素S-アデノシ

ルホモシステインヒドロラーゼ (EC 3.3.1.1.) (48) に対して相同性 (同一性 51%、類似性 74%) を有していることが明らかとなった (Fig. 1, C および D)。IRBIT の N 末端側の領域 (アミノ酸 1 ~ 104) は、既知のタンパク質との相同性はなく、セリンに富んだ領域 (アミノ酸 62 ~ 103) を含んでいた (Fig. 1, B および D)。IRBIT の配列のモチーフ検索によって、推定コイルドコイルモチーフ (アミノ酸 111 ~ 138) および推定 NAD⁺ 結合領域 (アミノ酸 314 ~ 344) が存在することが明らかとなった (図 1 B および D)。カゼインキナーゼ II、PKC、PKA / PKG およびチロシンキナーゼなどのプロテインキナーゼによる推定リン酸化部位を 17 箇所含んでいた。そのうちの 7 箇所は、N 末端側に集中していた (図 1 B)。推定膜貫通領域およびシグナル配列は見出されなかった。

10

【0050】

IRBIT は S - アデノシルホモシステインのアデノシンとホモシステインへの可逆的加水分解を触媒する S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼと相同性を有しているため、まず、大腸菌で発現させた組換え IRBIT を用いてこの酵素活性を有しているかどうかについて検討した。C 末端に His タグを付した IRBIT (IRBIT - His) および N 末端に GST タグを付した IRBIT (GST - IRBIT) を精製し、加水分解方向への酵素活性を測定した。図 2 に示すように、両組換え IRBIT は酵素活性を有していなかった。このことから、IRBIT は S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼ活性を有していないと結論づけられる。S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼはその結晶解析および部位特異的変異体を用いた研究 (43, 52 - 56) より、基質との結合および NAD⁺ との結合に関与する残基が決定されている。IRBIT が S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼ活性を示さないのは、S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼの基質結合に重要なアミノ酸、例えば 54 番目のリジン、302 番目のフェニルアラニン、353 番目のヒスチジンなどが置換されていることによるのではないかと推測される (図 1 C)。しかしながら、IRBIT は、基質特異性を異にする酵素活性を有している可能性も否定できない。

20

【0051】

IRBIT の組織分布および細胞内局在

IRBIT の N 末端領域 (図 1 B、枠内) に対する抗体をアフィニティ精製を経て作製した。該抗体の特異性を調べるために、IRBIT の cDNA を Cos - 7 細胞に遺伝子導入して、その細胞溶解液を抗 IRBIT 抗体によるイムノプロットにより解析した。図 3 A に示すように、抗 IRBIT 抗体は、約 60 kDa の位置にあるタンパク質のみを認識した。外来遺伝子から発現させた IRBIT (図 3 A、レーン 1) の分子量は Cos - 7 の内因性タンパク質 (図 3 A、レーン 3) と同じであり、上記 cDNA が全長 IRBIT をコードしていることが確認された。抗 IRBIT 抗体を用いてイムノプロットによりマウスの組織における IRBIT の発現を調べた。IRBIT は普遍的に検出されたが、大脳および小脳で最も発現が強かった (図 3 B)。

30

【0052】

次いで、マウス小脳を分画して IRBIT の細胞内局在を調べた。IRBIT は細胞質画分および粗ミクロソーム画分に存在していた (図 3 C、レーン 2 および 3)。粗ミクロソーム画分をさらに、膜結合画分 (最初に IRBIT が単離された画分)、および高塩抽出後粗ミクロソーム画分に分離した。図 3 C に示すように、粗ミクロソーム画分中の IRBIT は高塩濃度バッファーで部分的に抽出された (図 3 C、レーン 4)。対照的に、小胞体の膜タンパク質である IP₃ R 1 は、全く抽出されなかった (図 3 C、下の図)。これらの結果から、IRBIT は細胞質にも存在し、膜にも結合するタンパク質であることが示された。

40

【0053】

高塩抽出画分中の IRBIT は IP₃ R 1 と結合し、IRBIT の N 末端領域は結合に必須である IRBIT はマウス小脳の細胞質画分と膜結合画分との両方に存在していた (図 3 C)。そこで、これらの画分中の IRBIT が *in vitro* で IP₃ R 1 と相互作用

50

用するか否かを、GSTプルダウン法により調べた。マウス小脳の細胞質画分と粗ミクロソーム由来の高塩抽出画分(すなわち膜結合画分)をGST-ELまたはGSTとインキュベートして、これらの組換えタンパク質とIRBITの結合を抗IRBIT抗体でイムノプロットにより解析した。図4Aに示すように、高塩抽出画分中のIRBITはGST-ELと結合したが、GSTとはしなかった。(図4A、レーン6およびレーン5)。一方、細胞質画分のIRBITはGST-ELとは結合しなかった(図4A、レーン3)。これらの結果は、バッファの影響または画分に含まれる他の低分子物質の影響ではないことを、透析によるバッファ交換後に同様の実験を行うことにより確認した。したがって、IRBITの翻訳後修飾、例えばリン酸化などにより、IP₃受容体との結合が制御されている可能性が考えられる。

10

【0054】

次に、リン酸化の影響を調べるために、高塩抽出画分を非特異的ホスファターゼであるアルカリホスファターゼで処理した後、GST-ELまたはGSTと共にインキュベートした。図4Bに示すように、高塩抽出画分中のIRBITはホスファターゼ処理後GST-ELとは結合しなかった(図4B、レーン6)。この結果からIRBITがIP₃R1と結合するには、IRBITのリン酸化が必要である可能性が示唆された。無論、他のタンパク質がリン酸化されることによりこれらのタンパク質の相互作用が制御されているという可能性も現時点では否定はできないが、IRBITはアルカリホスファターゼ処理により該相互作用は見られなくなり、リン酸化によっても、IRBITとIP₃受容体との相互作用が制御されていると推測される。次に、IP₃R1との相互作用に必要なIRBITの領域を特定するために、GFPのタグを付したIRBITの欠失変異体を用いて、GSTプルダウン法を行った。図5Bに示すように、GFP-IRBITおよびGFP-IRBIT(1-277)は両方ともGST-ELに効率よく結合した(図5B、レーン3および6)。GFP-IRBIT(1-104)はGST-ELと結合したが、GFP-IRBITおよびGFP-IRBIT(1-277)の該結合より弱かった(図5B、レーン7と9をレーン1と3およびレーン4と6と比較)。一方、N末端領域を欠失したGFP-IRBIT(105-530)はGST-ELと結合しなかった(図5B、レーン12および15)。これらの結果から、IRBITのN末端領域がIP₃R1との結合には必須であり、コイルドコイル構造を有する約170アミノ酸(105~277)が該結合の安定化に重要であることが示された。

20

30

【0055】

IRBITには潜在的リン酸化部位が17箇所あり、そのうちの7つがIP₃受容体との相互作用に必要な上記N末端領域に局在していることから、リン酸化がIP₃受容体との相互作用に関与している可能性が予想される。これから推測すると、IRBITは脱リン酸化された状態で細胞質中に遊離しており、リン酸化された状態のものはIP₃受容体との相互作用を介して膜に結合しているという仮説が成り立つ。実証するまでには至っていないが、IRBITとIP₃受容体との相互作用がIP₃と直接または間接的なリン酸化とにより二元的に制御されているということが考えられる。

【0056】

Cos-7細胞内ではIRBITはIP₃R1と共に小胞体上に局在している

IRBITの細胞内局在を調べるために、IRBITとIP₃受容体を過剰発現したCos-7細胞で共焦点免疫蛍光顕微鏡分析を行った。IRBITは細胞質に一様に分布していたが、核内では免疫反応性は示されなかった(図6A)。IRBITは、生化学的分画法による実験では、細胞質画分および粗ミクロソーム画分の両方に存在していた(図3C)ので、膜に結合しているIRBITのみを可視化し、観察することとした。そのために、固定化の前にIRBITとIP₃受容体を共発現したCos-7細胞の細胞膜をサポニンにより透過性にして細胞質に存在するIRBITを洗い出した。そうすると、図6Bに示すとおり、IRBITは網状のパターンで分布しており(図6B、左図)、このことから膜結合性IRBITは小胞体上に分布していることが示唆された。IRBITの免疫反応性は、IP₃R1と大部分重複した(図6B、中央の図、および右図)。IP₃R1の

40

50

染色パターンは、サポニンで細胞膜透過性にしたことにより変化しなかった（データは示さず）。 IP_3R1 とGFP-IRBITとを共発現して、GFPの蛍光を見た場合、同様の結果が観察された（図6CおよびD）。これらの結果より、過剰発現したCos-7においてIRBITは小胞体上の IP_3R1 と結合することが示唆された。これらの局在が特異的なものであることを確かめるために、N末端領域を欠損しているためにGST-ELと結合しないGFP-IRBIT(105-530)と IP_3R1 をCos-7細胞に共発現したところ、GFP-IRBITとは異なり、GFP-IRBIT(105-530)は細胞質と核に分布していた（図6E）。IRBITは核移行シグナルと推定される配列を有していないので、この核への移行の機序については明らかではない。サポニン処理により細胞質に存在するIRBITを洗い出すと、GFP-IRBIT(105-530)は核にのみ存在し、 IP_3R1 との共局在は確認されなかった（図6F）。この結果は、IRBITのN末端領域が IP_3R1 への結合に必須であるという生化学的手法による結果（図5B）と一致する。

【0057】

IRBITはin vivoで IP_3R1 と結合する

組織中でのIRBITと IP_3R1 との結合を確認するため、マウス小脳を用いた免疫共沈降を行った。マウス小脳の粗ミクロソーム画分の界面活性剤抽出物を抗IRBIT抗体で免疫沈降し、沈降物を抗 IP_3R1 抗体でイムノプロット解析した。 IP_3R1 は抗IRBIT抗体で共沈降したが、コントロール抗体ではしなかった（Fig. 7）。この結果は小脳におけるIRBITと IP_3R1 とのin vivoでの結合を示している。

【0058】

生理的濃度の IP_3 により選択的に IP_3R1 からIRBITの解離が起こる

IRBITは最初、50 μM の IP_3 によるGST-ELカラムからの溶出液中で同定された（図1A）。このことは、IRBITと IP_3R1 との相互作用を IP_3 が解離させることを示唆する。しかし、 IP_3 は刺激により上昇した場合でも数 μM 程度の細胞内濃度であり（50）、上記溶出に用いた50 μM という IP_3 の濃度は生理的範囲より高い。したがって、生理的濃度の IP_3 により該タンパク質間相互作用が解離するか否かを検討した。

【0059】

マウス小脳の粗ミクロソームからの高塩抽出画分中のIRBITをGST-ELによりトラップし、これを0.1~10 μM の IP_3 、および他のイノシトールポリホスフェートとして IP_2 、 IP_4 、 IP_6 またはATPにて溶出を試みた。図8Aに示すように、 IP_3 はGST-ELからIRBITを濃度依存的に解離させた（図8A a、下図）。この IP_3 溶出液中のGST-ELの存在を確認したが、検出されなかった（図8A a、上図）。長時間露光しても同様であった。EC50（IRBITのGST-ELからの解離が最大量の50%となる IP_3 濃度）は、約0.5 μM であった。該濃度は IP_3 の生理的濃度の範囲内である（50）（図8B）。また、他のイノシトールポリホスフェートでは、解離効率は IP_3 の50分の1程度であり、ATPは10 μM の濃度でも解離させなかった。したがって、生理的濃度の IP_3 により選択的に、 IP_3R1 からIRBITが解離することが示された。

【0060】

IRBITは IP_3R1 の IP_3 結合領域と結合し、かつ IP_3R1 のLys-508はIRBITと IP_3 の両方の結合にとって必須である

IP_3R1 の IP_3 結合領域または制御領域のいずれの領域がIRBITとの相互作用に必須であるかを調べるために、 IP_3R1 のドメイン構造（51）に基づいてGST融合タンパク質として構築した8種の IP_3R1 の欠変異体を用いた（Fig. 9A）。図9Bに示すように、 IP_3 結合コア領域（アミノ酸226~576）（11）を含有するGST-IbIIa（アミノ酸226~604）は、GST-ELと同程度にIRBITと結合した。一方、GST-IabおよびGST-IIabなどの他のGST融合タンパク質は、IRBITと結合しなかった。次いで、IRBITとの結合に重要な IP_3R

1のアミノ酸残基を特定するために部位特異的突然変異解析を実施した。IP₃R1の508番目のリジン(Lys-508)はIP₃結合に必須なアミノ酸残基であることが判っており(12)、該リジン残基をアラニンに置換したGST-IbIIa(K508A)では、そのIP₃結合親和性が著しく減少することが判っている(42)。一方、GST-IbIIaの441番目のアルギニン残基がグルタミンに置換したR441Qは、IP₃に対する結合親和性がGST-IbIIaより高いことが判っている(42)。これらの組換えタンパク質を用いてプルダウンアッセイを行ったところ、IRBITはGST-IbIIaとR441Qとは同じレベルで結合したが、K508AにはIRBITは結合しなかった(図9C)。IP₃R1の508番目のリジンがIP₃とのみならずIRBITとの相互作用にも必要であることを示しており、このことから、IRBITとIP₃R1との結合はIP₃により解離するという結果が支持される。

【0061】

【発明の効果】

以上の結果を総合すると、IRBITは通常IP₃R1と会合しており、細胞外からの刺激によりIP₃の濃度が上昇するとIP₃R1から解離すると考えられる。IRBITはIP₃によりIP₃受容体との相互作用が制御され得ることが示された、唯一のIP₃受容体結合タンパク質である。

【0062】

本発明者らが、発見したIRBITタンパク質は、IP₃受容体と結合し、該結合はIP₃によって濃度依存的に解離することから、IRBITは、細胞内およびセルフリー系のいずれにおいてもIP₃の検出および定量的ための指示薬として有用なタンパク質分子であることが示された。また、IRBITのアミノ酸配列の1~104番目までの配列がIP₃への結合に必須な領域であることから、このアミノ酸配列を少なくとも含むタンパク質もIRBITと同様、IP₃の指示薬として有用であると考えられる。

【0063】

参考文献

1. Berridge, M. J. (1993) Nature 361, 315-325
2. Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 11-21
3. Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1995) J. Neurochem. 64, 953-960
4. Patel, S., Joseph, S. K., and Thomas, A. P. (1999) Cell Calcium 25, 247-264
5. Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989) Nature 342, 32-38
6. Sudhof, T. C., Newton, C. L., Archer, B. T., III, Ushkaryov, U. A., and Mignery, G. A. (1991) EMBO J. 10, 3199-3206
7. Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., and Bell, G. I. (1993) J. Biol. Chem. 268, 11356-11363
8. Worley, P. F., Baraban, J. M., Colvin, J. S., and Snyder, S. H. (1987) Nature 325, 159-161
9. Furuichi, T., Simon-Chazottes, D., Fujino, I., Yamada, N., Hasegawa, M., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Guenet, J.-L.,

- and Mikoshiba, K. (1993) *Recept. Channels* 1, 11-24
10. Mignery, G. A., and Sudhof, T. C. (1990) *EMBO J.* 9, 3893-3898
11. Miyawaki, A., Furuichi, T., Ryou, Y., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Saitoh, T., and Mikoshiba, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4911-4915
12. Yoshikawa, F., Morita, M., Monkawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 18277-18284 10
13. Zhu, C.-C., Furuichi, T., Mikoshiba, K., and Wojcickiewicz, R. J. H. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 3476-3484
14. Zhu, C.-C., and Wojcickiewicz, R. J. H. (2000) *Biochem. J.* 348, 551-556
15. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998) *Nature* 395, 645-648
16. Thrower, E. C., Hagar, R. E., and Ehrlich, B. E. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 580-586 20
17. Mackrill, J. J. (1999) *Biochem. J.* 337, 345-361
18. Patel, S., Morris, S. A., Adkins, C. E., O'beirne, G., and Taylor, C. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11627-11632
19. Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) *Neuron* 23, 799-808 30
20. Cameron, A. M., Steiner, J. P., Sabatini, D. M., Kaplin, A. I., Walensky, L. D., and Snyder, S. H. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1784-1788
21. Cameron, A. M., Nucifora, F. C., Jr, Fung, E. T., Livingston, D. J., Aldape, R. A., Ross, C. A., and Snyder, S. H. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27582-27588 40
22. Dargan, S. L., Lea, E. J. A., and Dawson, A. P. (2002) *Biochem. J.* 361, 401-407
23. Bultynck, G., De Smet, P., Weidema, A. F., Ver Heyen, M., Maes, K., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J. B., and De Smedt, H. (2000) *J. Physiol.* 525, 681-693
24. Bultynck, G., De Smet, P., Rossi, D., Callewaert, G., Missiaen, L., Sorrenti 50

- no, V., De Smedt, H., and Parys, J. B. (2001) *Biochem. J.* 354, 413 - 422
25. Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M., Ronnett, G. V., and Snyder, S. H. (1995) *Cell* 83, 463 - 472
26. Joseph, S. K., and Samanta, S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6477 - 6486
27. Bourguignon, L. Y. W., Jin, H., Iida, N., Brandt, N. R., and Zhang, S. H. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 7290 - 7297 10
28. Hayashi, T., and Su, T.-P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 491 - 496
29. Yoo, S. H., So, S. H., Kweon, H. S., Lee, J. S., Kang, M. K., and Jeon, C. J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12553 - 12559
30. Yoo, S. H., and Jeon, C. J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 15067 - 15073
31. Thrower, E. C., Park, H. Y., So, S. H., Yoo, S. H., and Ehrlich, B. E. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 15801 - 15806 20
32. Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.-X., Allescher, H.-D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., and Ruth, P. (2000) *Nature* 404, 197 - 201
33. Jayaraman, T., Ondrias, K., Ondriasova, E., and Marks, A. R. (1996) *Science* 272, 1492 - 1494
34. Yokoyama, K., Su, I., Tezuka, T., Yasuda, T., Mikoshiba, K., Tarakhovskiy, A., and Yamamoto, T. (2002) *EMBO J.* 21, 83 - 92 30
35. Yang, J., McBride, S., Mak, D.-O. D., Vardi, N., Palczewski, K., Haeseleer, F., and Foskett, J. K. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7711 - 7716
36. Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanhahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J., and Worley, P. F. (1998) *Neuron* 21, 717 - 726 40
37. Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F. C., Mistry, M., and Brown, D. A. (2002) *Neuron* 14, 209 - 220
38. Kiselyov, K., Mignery, G. A., Zhu, M. X., and Muallem, S. (1999) *Mol. Cell* 4, 423 - 429
39. Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K., and 50

- Birnbaumer, L. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14955-14960
40. Guan, K., and Dixon, J. E. (1991) Anal. Biochem. 192, 262-267
41. Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., and Ferrara, P. (1992) Anal. Biochem. 203, 173-179
42. Uchiyama, T., Yoshikawa, F., Hishida, A., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (2002) J. Biol. Chem. 277, 8106-8113 10
43. Yuan, C.-S., Ault-Riche, D. B., and Borchardt, R. T. (1996) J. Biol. Chem. 271, 28009-28016
44. Miyawaki, A., Furuichi, T., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1990) Neuron 5, 11-18
45. Maeda, N., Niinobe, M., Nakahira, K., and Mikoshiba, K. (1988) J. Neurochem. 51, 1724-1730
46. Maeda, N., Niinobe, M., Inoue, Y., and Mikoshiba, K. (1989) Dev. Biol. 133, 67-76 20
47. 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
48. Ogawa, H., Gomi, T., Mueckler, M. M., Fujioka, M., Backlund, P. S., Jr., Aksamit, R. R., Unson, C. G., and Cantoni, G. L. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 719-723 30
49. Dekker, J. W., Budhia, S., Angel, N. Z., Cooper, B. J., Clark, G. J., Hart, D. N. J., and Kato, M. (2002) Immunogenetics 53, 993-1001
50. Luzzi, V., Sims, C. E., Soughayer, J. S., and Allbritton, N. L. (1998) J. Biol. Chem. 273, 28657-28662
51. Yoshikawa, F., Iwasaki, H., Michikawa, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) J. Biol. Chem. 274, 316-327 40
52. Turner, M. A., Yuan, C.-S., Borchardt, R. T., Hershfield, M. S., Smith, G. D., and Howell, P. L. (1998) Nat. struct. Biol. 5, 369-376
53. Hu, Y., Komoto, J., Huang, Y., Gomi, T., Ogawa, H., Takata, Y., Fujioka, M., and Takusagawa, F. (1999) Biochemistry 38, 8323-8333 50

54. Gomi, T., Takata, Y., Date, T., Fujioka, M., Aksamit, R. R., Backlund, P. S., Jr., and Cantoni, G. L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 16102-16107
55. Aksamit, R. R., Backlund, P. S., Jr., Moos, M., Jr., Caryk, T., Gomi, T., Ogawa, H., Fujioka, M., and Cantoni, G. L. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 4084-4091
56. Ault-Riche, D. B., Yuan, C.-S., and Borchardt, R. T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 31472-31478 10
57. Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., and Sudhof, T. C. (1995) *Cell* 81, 435-443
58. Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G. D., Grumet, M., and Schlessinger, J. (1995) *Cell* 82, 251-260 20
59. Peifer, M., Berg, S., and Reynolds, A. B. (1994) *Cell* 76, 789-791
60. Supattapone, S., Worley, P. F., Baraban, J. M., and Snyder, S. H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1530-1534
61. Maeda, N., Ninobe, M., and Mikoshiba, K. (1990) *EMBO J.* 9, 61-67
62. Worley, P. F., Baraban, J. M., Supattapone, S., Wilson, V. S., and Snyder, S. H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12132-12136 30
63. Hannaert-Merah, Z., Coquil, J. F., Combettes, L., Claret, M., Mauger, J. P., and Champeil, P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 29642-29649
64. Natsume, T., Hirota, J., Yoshikawa, F., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 260, 527-533
65. Yoshikawa, F., Uchiyama, T., Iwasaki, H., Tomomori-Satoh, C., Tanaka, T., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 257, 792-797 40
66. Wojcikiewicz, R. J. H., Furuichi, T., Nakade, S., Mikoshiba, K., and Nahorski, S. R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 7963-7969
67. Wojcikiewicz, R. J. H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11678-11683
68. Bokkala, S., and Joseph, S. K. (1997) 50

-) J. Biol. Chem. 272, 12454 - 12461
69. Oberdorf, J., Webster, J. M., Zhu, C. C., Luo, S. G., and Wojcikiewicz, R. J. H. (1999) Biochem. J. 339, 453 - 461
70. Pollok, B. A., and Heim, R. (1999) Trends Cell Biol. 9, 57 - 60
71. Adams, S. R., Harootunian, A. T., Buchler, Y. J., Taylor, S. S., and Tsien, R. Y. (1991) Nature 349, 694 - 697
72. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997) Nature 388, 882 - 887
73. Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., and Iino, M. (1999) Science 284, 1527 - 1530

10

【0064】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor binding protein and an IP₃ indicator

<130> RJH14-130N

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 530

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Ser Met Pro Asp Ala Met Pro Leu Pro Gly Val Gly Glu Glu Leu

1

5

10

15

30

Lys Gln Ala Lys Glu Ile Glu Asp Ala Glu Lys Tyr Ser Phe Met Ala

20

25

30

Thr Val Thr Lys Ala Pro Lys Lys Gln Ile Gln Phe Ala Asp Asp Met

35

40

45

40

Gln Glu Phe Thr Lys Phe Pro Thr Lys Thr Gly Arg Arg Ser Leu Ser

50

55

60

Arg Ser Ile Ser Gln Ser Ser Thr Asp Ser Tyr Ser Ser Ala Ala Ser
 65 70 75 80

Tyr Thr Asp Ser Ser Asp Asp Glu Val Ser Pro Arg Glu Lys Gln Gln
 85 90 95

10

Thr Asn Ser Lys Gly Ser Ser Asn Phe Cys Val Lys Asn Ile Lys Gln
 100 105 110

Ala Glu Phe Gly Arg Arg Glu Ile Glu Ile Ala Glu Gln Asp Met Ser
 115 120 125

20

Ala Leu Ile Ser Leu Arg Lys Arg Ala Gln Gly Glu Lys Pro Leu Ala
 130 135 140

Gly Ala Lys Ile Val Gly Cys Thr His Ile Thr Ala Gln Thr Ala Val
 145 150 155 160

Leu Ile Glu Thr Leu Cys Ala Leu Gly Ala Gln Cys Arg Trp Ser Ala
 165 170 175

30

Cys Asn Ile Tyr Ser Thr Gln Asn Glu Val Ala Ala Ala Leu Ala Glu
 180 185 190

Ala Gly Val Ala Val Phe Ala Trp Lys Gly Glu Ser Glu Asp Asp Phe
 195 200 205

40

Trp Trp Cys Ile Asp Arg Cys Val Asn Met Asp Gly Trp Gln Ala Asn
 210 215 220

Met Ile Leu Asp Asp Gly Gly Asp Leu Thr His Trp Val Tyr Lys Lys
 225 230 235 240

Tyr Pro Asn Val Phe Lys Lys Ile Arg Gly Ile Val Glu Glu Ser Val
 245 250 255

10

Thr Gly Val His Arg Leu Tyr Gln Leu Ser Lys Ala Gly Lys Leu Cys
 260 265 270

Val Pro Ala Met Asn Val Asn Asp Ser Val Thr Lys Gln Lys Phe Asp
 275 280 285

20

Asn Leu Tyr Cys Cys Arg Glu Ser Ile Leu Asp Gly Leu Lys Arg Thr
 290 295 300

Thr Asp Val Met Phe Gly Gly Lys Gln Val Val Val Cys Gly Tyr Gly
 305 310 315 320

30

Glu Val Gly Lys Gly Cys Cys Ala Ala Leu Lys Ala Leu Gly Ala Ile
 325 330 335

Val Tyr Ile Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Cys Met
 340 345 350

Asp Gly Phe Arg Val Val Lys Leu Asn Glu Val Ile Arg Gln Val Asp
 355 360 365

40

Val Val Ile Thr Cys Thr Gly Asn Lys Asn Val Val Thr Arg Glu His
 370 375 380

Leu Asp Arg Met Lys Asn Ser Cys Ile Val Cys Asn Met Gly His Ser
 385 390 395 400

Asn Thr Glu Ile Asp Val Thr Ser Leu Arg Thr Pro Glu Leu Thr Trp
 405 410 415

Glu Arg Val Arg Ser Gln Val Asp His Val Ile Trp Pro Asp Gly Lys
 420 425 430

Arg Val Val Leu Leu Ala Glu Gly Arg Leu Leu Asn Leu Ser Cys Ser
 435 440 445

Thr Val Pro Thr Phe Val Leu Ser Ile Thr Ala Thr Thr Gln Ala Leu
 450 455 460

Ala Leu Ile Glu Leu Tyr Asn Ala Pro Glu Gly Arg Tyr Lys Gln Asp
 465 470 475 480

Val Tyr Leu Leu Pro Lys Lys Met Asp Glu Tyr Val Ala Ser Leu His
 485 490 495

Leu Pro Ser Phe Asp Ala His Leu Thr Glu Leu Thr Asp Asp Gln Ala
 500 505 510

Lys Tyr Leu Gly Leu Asn Lys Asn Gly Pro Phe Lys Pro Asn Tyr Tyr

10

20

30

40

515

520

525

Arg Tyr

530

<210> 2

10

<211> 1593

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 2

aigtggaigc ctgacgcgat gccgctgccc gggtgcgggg aggagctgaa acaggccaag 60
gagatcgagg acgccgagaa gtactccttc atggccacgg tcaccaaggc tccaagaag 120
caaatccagt ttgctgatga catgcaagag ttaccaaat tcctactaa gactggccgg 180
agatctttgt ctcttccat ctcaaatcc tccacagaca gctacagttc agctgcatcc 240
tatacagata gctctgatga tgaggttcc cctcgagaga agcagcaaac caactcgaag 300
ggcagcagca atttctgtgt gaagaacatc aagcaggcag agtttggacg ccgggagatt 360
gagattgcag agcaagacat gctctgcttg atttactca ggaaacgtgc tcaggagag 420
aagccittgg ctgggtgctaa aatagtgggc tgtacgcaca tcacggccca gacagcggta 480
ttaattgaga cccittgtgc cctgggagct cagtgccgtt ggtctgcttg caacatctat 540
tcaactcaga atgaagtagc tgcagcactg gctgaggctg gactcgcggt gtttgcttgg 600
aagggcgagt cagaagatga tttctgggtg tgcaatgacc gctgtgtcaa catggatggg 660
tggcaggcta acatgatcct ggatgatggg ggagacttaa cccactgggt ttataagaag 720
tatccaaacg tgttaagaa gatccgaggc atgtggaag agagcgtgac tggigtccac 780
aggctgtatc agctctccaa agctgggaag ctctgtgttc cagccatgaa tgtcaatgat 840
tcigtacca aacagaagtt tgataacctg tactgtctgc gagaatccat ttggatggc 900
ctgaagagga ccacggatgt gatgtttggt gggaaacagg tgggtgtgtg tggctatggt 960
gaggtaggaa agggctgctg tgctgctctc aagcccttg gagcaatigt ctacataaca 1020

20

30

40

gaaatigacc ccaatctgtgc tctgcaggcc tgcattgatg ggttcagggt ggtgaagctg 1080
 aatgaagica tccggcaggt ggacgttcta attacttgca caggaaataa gaatgtagtg 1140
 actcgggagc acttggaccg aatgaaaaat agttgtattg tgtgcaatat gggccattcc 1200
 aacacggaga tcgacgtgac cagcctccgc actccagaac taacatggga gcgtgtactg 1260
 tctcaggigg accatgtcat ctggcctgat ggcaaaccgg tcgtccttct agcagagggc 1320
 cgtttactta atctgagctg ctccacagtc cctacccttg ttctttccat cacggctaca 1380
 acacaggctt tggcactgat agagctttac aacgccccgg agggacgcta caaacaggat 1440
 gtgtacttgc ttctaagaa gatggatgaa tatgttgcca gcttgcactt accatcattt 1500
 gatgccacc tgacagaact gacagatgac caagcaaagt atctgggact caacaaaaat 1560
 gggccattca aaccttaatta ttacagatac taa 1593

10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Tyr Ser Phe Met Ala Thr Val Thr Lys

1

5

30

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Gln Ile Gln Phe Ala Asp Asp Met Gln Glu Phe Thr Lys

40

1

5

10

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a primer for mouse IRBIT

<400> 5

atgtcgaigc ctgacgcgat gc

22

20

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: a primer for mouse IRBIT

<400> 6

gcgtggttca tgtggactgg tc

22

<210> 7

40

<211> 2749

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

Met Ser Asp Lys Met Ser Ser Phe Leu His Ile Gly Asp Ile Cys Ser
 1 5 10 15

Leu Tyr Ala Glu Gly Ser Thr Asn Gly Phe Ile Ser Thr Leu Gly Leu
 20 25 30

Val Asp Asp Arg Cys Val Val Gln Pro Glu Ala Gly Asp Leu Asn Asn
 35 40 45

Pro Pro Lys Lys Phe Arg Asp Cys Leu Phe Lys Leu Cys Pro Met Asn
 50 55 60

Arg Tyr Ser Ala Gln Lys Gln Phe Trp Lys Ala Ala Lys Pro Gly Ala
 65 70 75 80

Asn Ser Thr Thr Asp Ala Val Leu Leu Asn Lys Leu His His Ala Ala
 85 90 95

Asp Leu Glu Lys Lys Gln Asn Glu Thr Glu Asn Arg Lys Leu Leu Gly
 100 105 110

Thr Val Ile Gln Tyr Gly Asn Val Ile Gln Leu Leu His Leu Lys Ser
 115 120 125

Asn Lys Tyr Leu Thr Val Asn Lys Arg Leu Pro Ala Leu Leu Glu Lys

10

20

30

40

His Asp Pro Cys Arg Gly Gly Ala Gly Tyr Trp Asn Ser Leu Phe Arg
 290 295 300

Phe Lys His Leu Ala Thr Gly His Tyr Leu Ala Ala Glu Val Asp Pro
 305 310 315 320

Asp Phe Glu Glu Glu Cys Leu Glu Phe Gln Pro Ser Val Asp Pro Asp
 325 330 335

10

Gln Asp Ala Ser Arg Ser Arg Leu Arg Asn Ala Gln Glu Lys Met Val
 340 345 350

Tyr Ser Leu Val Ser Val Pro Glu Gly Asn Asp Ile Ser Ser Ile Phe
 355 360 365

20

Glu Leu Asp Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Asp Ser Leu Val Pro Arg
 370 375 380

Asn Ser Tyr Val Arg Leu Arg His Leu Cys Thr Asn Thr Trp Val His
 385 390 395 400

30

Ser Thr Asn Ile Pro Ile Asp Lys Glu Glu Glu Lys Pro Val Met Leu
 405 410 415

Lys Ile Gly Thr Ser Pro Leu Lys Glu Asp Lys Glu Ala Phe Ala Ile
 420 425 430

Val Pro Val Ser Pro Ala Glu Val Arg Asp Leu Asp Phe Ala Asn Asp
 435 440 445

40

Ala Ser Lys Val Leu Gly Ser Ile Ala Gly Lys Leu Glu Lys Gly Thr
 450 455 460

Ile Thr Gln Asn Glu Arg Arg Ser Val Thr Lys Leu Leu Glu Asp Leu
 465 470 475 480

Val Tyr Phe Val Thr Gly Gly Thr Asn Ser Gly Gln Asp Val Leu Glu
 485 490 495

Val Val Phe Ser Lys Pro Asn Arg Glu Arg Gln Lys Leu Met Arg Glu
 500 505 510

Gln Asn Ile Leu Lys Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gln Ala Pro Phe Thr
 515 520 525

Asp Cys Gly Asp Gly Pro Met Leu Arg Leu Glu Glu Leu Gly Asp Gln
 530 535 540

Arg His Ala Pro Phe Arg His Ile Cys Arg Leu Cys Tyr Arg Val Leu
 545 550 555 560

Arg His Ser Gln Gln Asp Tyr Arg Lys Asn Gln Glu Tyr Ile Ala Lys
 565 570 575

Gln Phe Gly Phe Met Gln Lys Gln Ile Gly Tyr Asp Val Leu Ala Glu
 580 585 590

Asp Thr Ile Thr Ala Leu Leu His Asn Asn Arg Lys Leu Leu Glu Lys

10

20

30

40

595

600

605

His Ile Thr Ala Ala Glu Ile Asp Thr Phe Val Ser Leu Val Arg Lys
 610 615 620

Asn Arg Glu Pro Arg Phe Leu Asp Tyr Leu Ser Asp Leu Cys Val Ser
 625 630 635 640

10

Met Asn Lys Ser Ile Pro Val Thr Gln Glu Leu Ile Cys Lys Ala Val
 645 650 655

Leu Asn Pro Thr Asn Ala Asp Ile Leu Ile Glu Thr Lys Leu Val Leu
 660 665 670

20

Ser Arg Phe Glu Phe Glu Gly Val Ser Thr Gly Glu Asn Ala Leu Glu
 675 680 685

Ala Gly Glu Asp Glu Glu Glu Val Trp Leu Phe Trp Arg Asp Ser Asn
 690 695 700

Lys Glu Ile Arg Ser Lys Ser Val Arg Glu Leu Ala Gln Asp Ala Lys
 705 710 715 720

30

Glu Gly Gln Lys Glu Asp Arg Asp Ile Leu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Gln
 725 730 735

Leu Asn Leu Phe Ala Arg Met Cys Leu Asp Arg Gln Tyr Leu Ala Ile
 740 745 750

40

Asn Glu Ile Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Leu Ile Leu Arg Cys Met
 755 760 765

Ser Asp Glu Asn Leu Pro Tyr Asp Leu Arg Ala Ser Phe Cys Arg Leu
 770 775 780

Met Leu His Met His Val Asp Arg Asp Pro Gln Glu Gln Val Thr Pro
 785 790 795 800

10

Val Lys Tyr Ala Arg Leu Trp Ser Glu Ile Pro Ser Glu Ile Ala Ile
 805 810 815

Asp Asp Tyr Asp Ser Ser Gly Thr Ser Lys Asp Glu Ile Lys Glu Arg
 820 825 830

20

Phe Ala Gln Thr Met Glu Phe Val Glu Glu Tyr Leu Arg Asp Val Val
 835 840 845

Cys Gln Arg Phe Pro Phe Ser Asp Lys Glu Lys Asn Lys Leu Thr Phe
 850 855 860

30

Glu Val Val Asn Leu Ala Arg Asn Leu Ile Tyr Phe Gly Phe Tyr Asn
 865 870 875 880

Phe Ser Asp Leu Leu Arg Leu Thr Lys Ile Leu Leu Ala Ile Leu Asp
 885 890 895

Cys Val His Val Thr Thr Ile Phe Pro Ile Ser Lys Met Thr Lys Gly
 900 905 910

40

Glu Glu Asn Lys Gly Ser Asn Val Met Arg Ser Ile His Gly Val Gly
 915 920 925

Glu Leu Met Thr Gln Val Val Leu Arg Gly Gly Gly Phe Leu Pro Met
 930 935 940

Thr Pro Met Ala Ala Ala Pro Glu Gly Asn Val Lys Gln Ala Glu Pro
 945 950 955 960

Glu Lys Glu Asp Ile Met Val Met Asp Thr Lys Leu Lys Ile Ile Glu
 965 970 975

Ile Leu Gln Phe Ile Leu Asn Val Arg Leu Asp Tyr Arg Ile Ser Cys
 980 985 990

Leu Leu Cys Ile Phe Lys Arg Glu Phe Asp Glu Ser Asn Ser Gln Ser
 995 1000 1005

Ser Glu Thr Ser Ser Gly Asn Ser Ser Gln Glu Gly Pro Ser Asn Val
 1010 1015 1020

Pro Gly Ala Leu Asp Phe Glu His Ile Glu Glu Gln Ala Glu Gly Ile
 1025 1030 1035 1040

Phe Gly Gly Ser Glu Glu Asn Thr Pro Leu Asp Leu Asp Asp His Gly
 1045 1050 1055

Gly Arg Thr Phe Leu Arg Val Leu Leu His Leu Thr Met His Asp Tyr

10

20

30

40

1060	1065	1070	
Pro Pro Leu Val Ser Gly Ala Leu Gln Leu Leu Phe Arg His Phe Ser			
1075	1080	1085	
Gln Arg Gln Glu Val Leu Gln Ala Phe Lys Gln Val Gln Leu Leu Val			10
1090	1095	1100	
Thr Ser Gln Asp Val Asp Asn Tyr Lys Gln Ile Lys Gln Asp Leu Asp			
1105	1110	1115	1120
Gln Leu Arg Ser Ile Val Glu Lys Ser Glu Leu Trp Val Tyr Lys Gly			
1125	1130	1135	20
Gln Gly Pro Asp Glu Pro Met Asp Gly Ala Ser Gly Glu Asn Glu His			
1140	1145	1150	
Lys Lys Thr Glu Glu Gly Thr Ser Lys Pro Leu Lys His Glu Ser Thr			
1155	1160	1165	
Ser Ser Tyr Asn Tyr Arg Val Val Lys Glu Ile Leu Ile Arg Leu Ser			30
1170	1175	1180	
Lys Leu Cys Val Gln Glu Ser Ala Ser Val Arg Lys Ser Arg Lys Gln			
1185	1190	1195	1200
Gln Gln Arg Leu Leu Arg Asn Met Gly Ala His Ala Val Val Leu Glu			
1205	1210	1215	40

Leu Leu Gln Ile Pro Tyr Glu Lys Ala Glu Asp Thr Lys Met Gln Glu
 1220 1225 1230

Ile Met Arg Leu Ala His Glu Phe Leu Gln Asn Phe Cys Ala Gly Asn
 1235 1240 1245

Gln Gln Asn Gln Ala Leu Leu His Lys His Ile Asn Leu Phe Leu Lys
 1250 1255 1260

10

Pro Gly Ile Leu Glu Ala Val Thr Met Gln His Ile Phe Met Asn Asn
 1265 1270 1275 1280

Phe Gln Leu Cys Ser Glu Ile Asn Glu Arg Val Val Gln His Phe Val
 1285 1290 1295

20

His Cys Ile Glu Thr His Gly Arg Asn Val Gln Tyr Ile Lys Phe Leu
 1300 1305 1310

Gln Thr Ile Val Lys Ala Glu Gly Lys Phe Ile Lys Lys Cys Gln Asp
 1315 1320 1325

30

Met Val Met Ala Glu Leu Val Asn Ser Gly Glu Asp Val Leu Val Phe
 1330 1335 1340

Tyr Asn Asp Arg Ala Ser Phe Gln Thr Leu Ile Gln Met Met Arg Ser
 1345 1350 1355 1360

Glu Arg Asp Arg Met Asp Glu Asn Ser Pro Leu Met Tyr His Ile His
 1365 1370 1375

40

Leu Val Glu Leu Leu Ala Val Cys Thr Glu Gly Lys Asn Val Tyr Thr
 1380 1385 1390

Glu Ile Lys Cys Asn Ser Leu Leu Pro Leu Asp Asp Ile Val Arg Val
 1395 1400 1405

Val Thr His Glu Asp Cys Ile Pro Glu Val Lys Ile Ala Tyr Ile Asn
 1410 1415 1420

Phe Leu Asn His Cys Tyr Val Asp Thr Glu Val Glu Met Lys Glu Ile
 1425 1430 1435 1440

Tyr Thr Ser Asn His Met Trp Lys Leu Phe Glu Asn Phe Leu Val Asp
 1445 1450 1455

Ile Cys Arg Ala Cys Asn Asn Thr Ser Asp Arg Lys His Ala Asp Ser
 1460 1465 1470

Ile Leu Glu Lys Tyr Val Thr Glu Ile Val Met Ser Ile Val Thr Thr
 1475 1480 1485

Phe Phe Ser Ser Pro Phe Ser Asp Gln Ser Thr Thr Leu Gln Thr Arg
 1490 1495 1500

Gln Pro Val Phe Val Gln Leu Leu Gln Gly Val Phe Arg Val Tyr His
 1505 1510 1515 1520

Cys Asn Trp Leu Met Pro Ser Gln Lys Ala Ser Val Glu Ser Cys Ile

10

20

30

40

1525	1530	1535	
Arg Val Leu Ser Asp Val Ala Lys Ser Arg Ala Ile Ala Ile Pro Val			
1540	1545	1550	
Asp Leu Asp Ser Gln Val Asn Asn Leu Phe Leu Lys Ser His Asn Ile			10
1555	1560	1565	
Val Gln Lys Thr Ala Leu Asn Trp Arg Leu Ser Ala Arg Asn Ala Ala			
1570	1575	1580	
Arg Arg Asp Ser Val Leu Ala Ala Ser Arg Asp Tyr Arg Asn Ile Ile			20
1585	1590	1595	1600
Glu Arg Leu Gln Asp Ile Val Ser Ala Leu Glu Asp Arg Leu Arg Pro			
1605	1610	1615	
Leu Val Gln Ala Glu Leu Ser Val Leu Val Asp Val Leu His Arg Pro			
1620	1625	1630	
Glu Leu Leu Phe Pro Glu Asn Thr Asp Ala Arg Arg Lys Cys Glu Ser			30
1635	1640	1645	
Gly Gly Phe Ile Cys Lys Leu Ile Lys His Thr Lys Gln Leu Leu Glu			
1650	1655	1660	
Glu Asn Glu Glu Lys Leu Cys Ile Lys Val Leu Gln Thr Leu Arg Glu			40
1665	1670	1675	1680

Met Met Thr Lys Asp Arg Gly Tyr Gly Glu Lys Gln Ile Ser Ile Asp
 1685 1690 1695

Glu Ser Glu Asn Ala Glu Leu Pro Gln Ala Pro Glu Ala Glu Asn Ser
 1700 1705 1710

Thr Glu Gln Glu Leu Glu Pro Ser Pro Pro Leu Arg Gln Leu Glu Asp
 1715 1720 1725

10

His Lys Arg Gly Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Val Asn Arg Tyr Tyr
 1730 1735 1740

Gly Asn Ile Arg Pro Ser Gly Arg Arg Glu Ser Leu Thr Ser Phe Gly
 1745 1750 1755 1760

20

Asn Gly Pro Leu Ser Pro Gly Gly Pro Ser Lys Pro Gly Gly Gly Gly
 1765 1770 1775

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Thr Ser Arg Gly Glu Met Ser Leu Ala
 1780 1785 1790

30

Glu Val Gln Cys His Leu Asp Lys Glu Gly Ala Ser Asn Leu Val Ile
 1795 1800 1805

Asp Leu Ile Met Asn Ala Ser Ser Asp Arg Val Phe His Glu Ser Ile
 1810 1815 1820

Leu Leu Ala Ile Ala Leu Leu Glu Gly Gly Asn Thr Thr Ile Gln His
 1825 1830 1835 1840

40

Ser Phe Phe Cys Arg Leu Thr Glu Asp Lys Lys Ser Glu Lys Phe Phe
 1845 1850 1855

Lys Val Phe Tyr Asp Arg Met Lys Val Ala Gln Gln Glu Ile Lys Ala
 1860 1865 1870

Thr Val Thr Val Asn Thr Ser Asp Leu Gly Asn Lys Lys Lys Asp Asp
 1875 1880 1885

Glu Val Asp Arg Asp Ala Pro Ser Arg Lys Lys Ala Lys Glu Pro Thr
 1890 1895 1900

Thr Gln Ile Thr Glu Glu Val Arg Asp Gln Leu Leu Glu Ala Ser Ala
 1905 1910 1915 1920

Ala Thr Arg Lys Ala Phe Thr Thr Phe Arg Arg Glu Ala Asp Pro Asp
 1925 1930 1935

Asp His Tyr Gln Ser Gly Glu Gly Thr Gln Ala Thr Thr Asp Lys Ala
 1940 1945 1950

Lys Asp Asp Leu Glu Met Ser Ala Val Ile Thr Ile Met Gln Pro Ile
 1955 1960 1965

Leu Arg Phe Leu Gln Leu Leu Cys Glu Asn His Asn Arg Asp Leu Gln
 1970 1975 1980

Asn Phe Leu Arg Cys Gln Asn Asn Lys Thr Asn Tyr Asn Leu Val Cys

10

20

30

40

1985	1990	1995	2000	
Glu Thr Leu Gln Phe Leu Asp Cys Ile Cys Gly Ser Thr Thr Gly Gly				
	2005	2010	2015	
Leu Gly Leu Leu Gly Leu Tyr Ile Asn Glu Lys Asn Val Ala Leu Ile				
	2020	2025	2030	10
Asn Gln Thr Leu Glu Ser Leu Thr Glu Tyr Cys Gln Gly Pro Cys His				
	2035	2040	2045	
Glu Asn Gln Asn Cys Ile Ala Thr His Glu Ser Asn Gly Ile Asp Ile				
	2050	2055	2060	20
Ile Thr Ala Leu Ile Leu Asn Asp Ile Asn Pro Leu Gly Lys Lys Arg				
	2065	2070	2075	2080
Met Asp Leu Val Leu Glu Leu Lys Asn Asn Ala Ser Lys Leu Leu Leu				
	2085	2090	2095	
Ala Ile Met Glu Ser Arg His Asp Ser Glu Asn Ala Glu Arg Ile Leu				
	2100	2105	2110	30
Tyr Asn Met Arg Pro Lys Glu Leu Val Glu Val Ile Lys Lys Ala Tyr				
	2115	2120	2125	
Met Gln Gly Glu Val Glu Phe Glu Asp Gly Glu Asn Gly Glu Asp Gly				
	2130	2135	2140	40

Glu Pro His Trp Ser Gly Leu Leu Trp Thr Ala Met Leu Ile Ser Leu
 2305 2310 2315 2320

Ala Ile Val Ile Ala Leu Pro Lys Pro His Gly Ile Arg Ala Leu Ile
 2325 2330 2335

Ala Ser Thr Ile Leu Arg Leu Ile Phe Ser Val Gly Leu Gln Pro Thr
 2340 2345 2350

Leu Phe Leu Leu Gly Ala Phe Asn Val Cys Asn Lys Ile Ile Phe Leu
 2355 2360 2365

Met Ser Phe Val Gly Asn Cys Gly Thr Phe Thr Arg Gly Tyr Arg Ala
 2370 2375 2380

Met Val Leu Asp Val Glu Phe Leu Tyr His Leu Leu Tyr Leu Leu Ile
 2385 2390 2395 2400

Cys Ala Met Gly Leu Phe Val His Glu Phe Phe Tyr Ser Leu Leu Leu
 2405 2410 2415

Phe Asp Leu Val Tyr Arg Glu Glu Thr Leu Leu Asn Val Ile Lys Ser
 2420 2425 2430

Val Thr Arg Asn Gly Arg Ser Ile Ile Leu Thr Ala Val Leu Ala Leu
 2435 2440 2445

Ile Leu Val Tyr Leu Phe Ser Ile Val Gly Tyr Leu Phe Phe Lys Asp

10

20

30

40

を、セリンに富んだ領域は破線の下線を、コイルドコイル領域には2重下線を、 NAD^+ 結合部位には細い下線を、それぞれ付している。カゼインキナーゼ、プロテインキナーゼC、プロテインキナーゼA/プロテインキナーゼG、およびチロシンキナーゼによる推定リン酸化部位は、それぞれ、黒丸、白丸、黒四角および白四角で配列上部に記している。N末端領域は、実線で囲んでいる。図1Cは、IRBITのC末端領域とS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ(AHCY)(48)との配列アラインメントを表している。*印は同一残基、:印は類似残基を示している。S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼの基質結合に關与する残基には黒丸、 NAD^+ 結合に關与する残基には白丸をそれぞれ付している。図1Dは、IRBITの構造の模式図である。NTRはN末端領域、CTRはC末端領域、SERはセリンに富んだ領域、CCはコイルドコイル領域、およびNADは NAD^+ 結合部位を表す。

10

【図2】図2は、IRBITはS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ活性を有していないことを示す。

組換えIRBIT-His(白丸)、GST-IRBIT(三角)、GST(四角)およびS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ(黒丸)の加水分解方向へのS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ活性を公知の方法(43)にしたがって測定した。結果は、3回の独立した実験の結果の平均±標準偏差として示す。

【図3】図3は、IRBITの組織分布および細胞内局在を示す図である。図3Aは、外来性発現させたIRBITと内因性IRBITのウェスタン分析の結果を示す。IRBIT(レーン1)およびモックコントロール(レーン2および3)を遺伝子導入したCos-7細胞の細胞溶解液を抗IRBIT抗体でウェスタンブロッティング分析した。レーン3はレーン1および2に対して10倍量の溶解液を添加した。図3Bは、マウス組織のS1フラクション(2 μg タンパク質)を抗IRBIT抗体でウェスタンブロッティング分析することにより、IRBITの組織分布を調べた結果である。図3Cは、マウス小脳の細胞内局在を調べた結果である。マウス組織のS1画分を100,000 \times gで遠心後、その細胞質画分(レーン2)および粗ミクロソーム画分(レーン3)を得た。さらに、粗ミクロソーム画分を500 mM NaClを含む高塩濃度バッファーで抽出して、100,000 \times gで遠心後、膜結合画分(レーン4)と高塩抽出後粗ミクロソーム画分(レーン5)を得た。上図は、各画分(1 μg タンパク質)を抗IRBIT抗体によるウェスタンブロッティング分析した結果である。下図は、抗IP₃R1抗体でのウェ

20

30

スタンブロッティング分析の結果である。

【図4】図4は、高塩抽出画分中のIRBITはIP₃R1と*in vitro*で相互作用するが、細胞質中のIRBITは相互作用しないことを示す図である。図4Aは、マウス小脳細胞質画分(レーン1~3)および粗ミクロソームからの高塩抽出画分(レーン4~6)を、GST-EL(レーン3および6)またはGST(レーン2および5)と共にインキュベートし、グルタチオン-セファロースにより結合したタンパク質をプルダウンし、グルタチオンで溶出後、抗IRBIT抗体(上図)でウェスタンブロッティング分析した。グルタチオン-セファロースでプルダウンしたGST-ELおよびGSTは、クマシーブリリアントブルーで染色した(下図)。図4Bは、マウス小脳から得た粗ミクロソームの高塩抽出画分を、アルカリホスファターゼ処理なし(レーン1~3)または該処理後(レーン4~6)にて、GST-EL(レーン3および6)またはGST(レーン2および5)と共にインキュベートし、図4Aと同様にIRBITの結合を分析した結果を示す。

40

【図5】図5は、IP₃R1との相互作用にはIRBITのN末端領域が必要であることを示す図である。図5Aは、IRBITとIRBITのGFP融合欠変異体の構造を模式的に示す。図5Bでは、GFP-IRBIT発現Cos-7細胞(レーン1~3)、GFP-IRBIT(1-277)発現Cos-7細胞(レーン4~6)、GFP-IRBIT(1-104)発現Cos-7細胞(レーン7~9)、GFP-IRBIT(105-530)発現Cos-7細胞(レーン10~12)およびGFP発現Cos-7細胞(レーン13~15)の細胞溶解液をGSTプルダウンアッセイに用いた。各GFP融合タ

50

ンパク質を発現しているC o s - 7細胞の溶解液(インプット: I)をG S T - E L (E)またはG S T (G)とインキュベートした。結合したタンパク質をグルタチオン - セファロースでプルダウンし、グルタチオンで溶出後、抗G F P抗体でイムノブロット解析した。

【図6】図6は、共発現したC o s - 7細胞では、I R B I TはI P₃ R 1と共局在することを示す図である。I P₃ R 1を、I R B I T (AおよびB)、G F P - I R B I T (CおよびD)およびG F P - I R B I T (1 0 5 - 5 3 0) (EおよびF)と共にC o s - 7細胞に一過性に共発現し、それぞれのタンパク質の細胞内局在を間接的免疫蛍光(抗I P₃ R 1および抗I R B I T抗体にて)と蛍光共焦点顕微鏡法(G F P - I R B I TおよびG F P - I R B I T (1 0 5 - 5 3 0))により分析した。B、DおよびFは、細胞を固定化する前に、サポニンで細胞膜透過化して細胞質タンパク質を洗い出した。左列のパネルは、I R B I T (B)、G F P - I R B I T (D)およびG F P - I R B I T (1 0 5 - 5 3 0) (F)を示し、中央のパネルは、I P₃ R 1を示す。右列のパネルは、左列および中央のパネルを合わせたものである。Bの下列のパネルは、上列のパネルを拡大したものである。スケールは10 μmを示す。

10

【図7】図7は、i n v i v oでのI R B I TのI P₃ R 1との会合を示す図である。マウス小脳粗ミクロソームの界面活性剤抽出液を抗I R B I T抗体またはコントロール抗体で免疫沈降した。沈降物をS D S - P A G E後、抗I P₃ R 1(上図)または抗I R B I T(下図)の各抗体でウェスタンブロットした。

【図8】図8は、生理的濃度のI P₃により、選択的にI P₃ R 1からI R B I Tが解離する事を示す図である。図8 Aは、マウス小脳から得た粗ミクロソームからの高塩抽出画分をG S T - E Lとインキュベートした。結合したタンパク質をグルタチオン - セファロースでプルダウンし、グルタチオン(G l u)(a)または0 . 1 ~ 1 0 μ M I P₃(a)、I P₂(b)、I P₄(c)、I P₆(d)またはA T P(e)で溶出した。抽出液中のI R B I Tを抗I R B I T抗体とA l e x a 6 8 0コンジュゲート二次抗体で分析した(a の下のパネル、およびb ~ e)。グルタチオンおよび0 . 1 ~ 1 0 μ M I P₃での溶出液中のG S T - E Lを抗G S T抗体で分析した(a の上のパネル)。図8 Bは、抗I R B I T抗体により検出されたI R B I Tのバンドに由来するシグナル強度を赤外イメージングシステムで定量した結果を示す。相対強度を溶出剤の濃度に対してプロットした。少なくとも3回の独立した実験の平均 ± 標準偏差で示している。

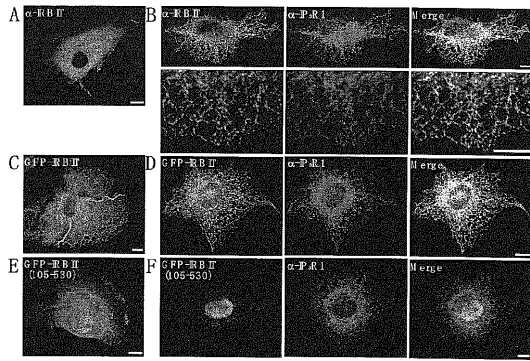
20

30

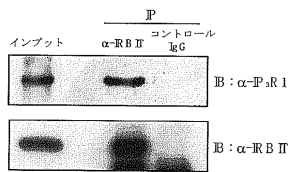
【図9】図9は、I R B I TがI P₃ R 1のI P₃結合領域と相互作用すること、およびこの相互作用にはI P₃ R 1の5 0 8番目のL y sが必要であることを示す図である。図9 Aは、用いたマウスI P₃ R 1と組換えG S T融合タンパク質の構造を模式的に図示している。I P₃結合コア領域は斜線部、推定膜貫通領域を黒塗りの線で示している。I ~ Vのローマ数字は、トリプシン限定分解により決定したI P₃ R 1のドメイン構造を示している(5 1)。各バーの上に付した数字は、アミノ酸残基の番号を示している。図9 Bは、I P₃ R 1のI R B I T結合領域を調べた結果を示す。マウス小脳から得た粗ミクロソームからの高塩抽出画分を(A)に示すG S T融合タンパク質とインキュベートした。結合したタンパク質をグルタチオン - セファロースでプルダウンした後、グルタチオンで溶出して、抗I R B I T抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した。図9 Cは、(B)と同様に、高塩抽出画分をG S T - I b I I a、R 4 4 1 QおよびK 5 0 8 Aでプルダウンアッセイした結果である。結合したタンパク質をグルタチオン - セファロースでプルダウンした後、グルタチオンで溶出して、抗I R B I T抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した(上図)。グルタチオン - セファロースでプルダウンしたG S T融合タンパク質を、クマシーブリリアントブルーで染色した(下図)。

40

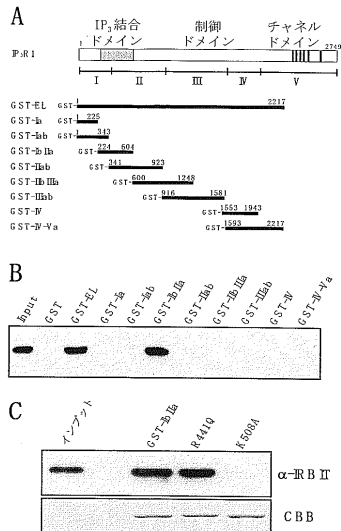
【 図 6 】



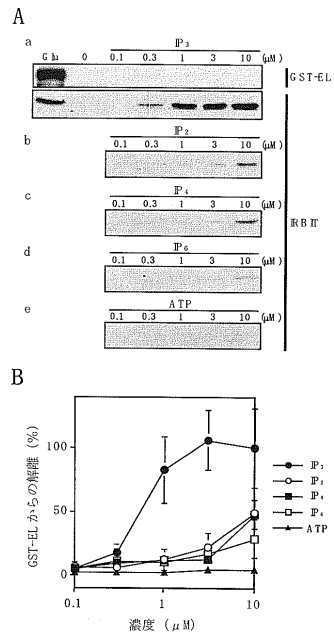
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/58	Z
G 0 1 N 33/58	C 1 2 N 5/00	B

(72)発明者 水谷 顕洋

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

(72)発明者 松浦 徹

東京都目黒区目黒本町5-30-4-203

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BA14 BB01 BB10 BB14 BB20 BB22 BB29 BB41
 BB46 BB50 BB51 CB01 DA13 DA36 FA16 FB03 FB05 FB12
 GC15
 2G054 AA08 CA22 CA23 CE02 EA03 GA04
 4B024 AA11 BA80 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 DA02 DA06 EA04
 FA02 GA11
 4B063 QA01 QA18 QQ62 QR33 QR38 QR41 QR59 QR69 QR77 QR80
 QS12 QS24 QS28 QX02
 4B065 AA90X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA86 EA50
 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	新型ip3受体结合蛋白和ip3指示剂		
公开(公告)号	JP2004129612A	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2002299429	申请日	2002-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	RIKEN		
[标]发明人	御子柴克彦 安東英明 水谷颯洋 松浦徹		
发明人	御子柴 克彦 安東 英明 水谷 颯洋 松浦 徹		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 G01N21/78 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12Q1/02 G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/58.Z C12N5/00.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BA14 2G045/BB01 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/BB29 2G045/BB41 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ62 4B063/QR33 4B063/QR38 4B063/QR41 4B063/QR59 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
其他公开文献	JP4219648B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供新的IP <SB> 3 </ SB>受体结合蛋白，提供有效检测和测定IP <SB> 3 </ SB>的指示剂，并提供检测方法和/或通过使用蛋白质测定IP <SB> 3 </ SB>。ŽSOLUTION：IP <SB> 3 </ SB>受体结合蛋白，特别是新的IP <SB> 3 </ SB>受体结合蛋白IRBIT与IP <SB> 3 </ SB>受体相互作用并具有相互作用控制通过IP <SB> 3 </ SB>已被确定。IRBIT可通过生理浓度的IP <SB> 3 </ SB>从IP <SB> 3 </ SB>受体释放。因此，IRBIT可用作FRET法等检测IP <SB> 3 </ SB>的指标。Ž

【 図 4 】

