

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4219648号
(P4219648)

(45) 発行日 平成21年2月4日(2009.2.4)

(24) 登録日 平成20年11月21日(2008.11.21)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K	14/705 (2006.01)	C O 7 K	14/705
C O 7 K	19/00 (2006.01)	C O 7 K	19/00
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G O 1 N	21/78 (2006.01)	G O 1 N	21/78 C

請求項の数 16 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-299429 (P2002-299429)	(73) 特許権者	503359821 独立行政法人理化学研究所 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
(65) 公開番号	特開2004-129612 (P2004-129612A)	(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
(43) 公開日	平成16年4月30日(2004.4.30)	(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
審査請求日	平成17年10月4日(2005.10.4)	(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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規IP₃受容体結合タンパク質とIP₃指示薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中のIP₃を検出するための、以下の(a)、(b)または(c)に記載のタンパク質を含むIP₃指示薬。

(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1~104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において1~50個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1~104番目までのアミノ酸配列において1~10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IP₃受容体に結合するタンパク質

【請求項2】

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1記載のIP₃指示薬。

【請求項3】

上記タンパク質が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組み合わせるFRET法によりIP₃を検出するための、請求項2記載のIP₃指示薬。

【請求項4】

10

20

2つの蛍光分子からなる組み合わせが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFLASHとCFPとの組合せである、請求項3記載のIP₃指示薬。

【請求項5】

サンプル中のIP₃濃度を測定するための方法であって、

(i) 配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質(IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1~50個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1~104番目までのアミノ酸配列において1~10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IP₃受容体に結合するタンパク質と、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) 遊離した、配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質(IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1~50個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1~104番目までのアミノ酸配列において1~10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IP₃受容体に結合するタンパク質および/または上記複合体を定量すること；

を含む、上記方法。

【請求項6】

上記(iii)における定量が、配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質(IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1~50個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1~104番目までのアミノ酸配列において1~10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IP₃受容体に結合するタンパク質に対する抗体および/または抗IP₃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5記載の方法。

【請求項7】

上記(iii)における定量が、配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質(IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1~50個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1~104番目までのアミノ酸配列において1~10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IP₃受容体に結合するタンパク質、あるいは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5または6記載の方法。

【請求項8】

標識が蛍光標識である、請求項7記載の方法。

【請求項9】

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5記載の方法。

【請求項10】

YFPもしくはVenusで標識した、配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質(IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1~50個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の

10

20

30

40

50

1 ~ 104 番目までのアミノ酸配列において 1 ~ 10 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 IP_3 受容体に結合するタンパク質と、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9記載の方法。

【請求項11】

CFPで標識した、配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質 (IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1 ~ 50 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1 ~ 104 番目までのアミノ酸配列において 1 ~ 10 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 IP_3 受容体に結合するタンパク質と、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9記載の方法。

10

【請求項12】

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み合わせのうち的一方で標識された、配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質 (IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1 ~ 50 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1 ~ 104 番目までのアミノ酸配列において 1 ~ 10 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 IP_3 受容体に結合する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 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；

20

(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13】

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、請求項12記載の方法。

30

【請求項14】

配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質 (IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1 ~ 50 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1 ~ 104 番目までのアミノ酸配列において 1 ~ 10 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 IP_3 受容体に結合するタンパク質と、 IP_3 受容体またはその少なくとも IP_3 結合ドメインを含有するタンパク質からなる、 IP_3 濃度を定量するためのタンパク質複合体。

40

【請求項15】

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、配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質 (IRBIT)、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ンパク質、あるいは配列番号1に示すアミノ酸配列において1 ~ 50 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列または配列番号1に示すアミノ酸配列の1 ~ 104 番目までのアミノ酸配列において 1 ~ 10 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 IP_3 受容体に結合する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 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含み、生細胞内の IP_3 濃度を定量するためのベクター。

50

【請求項16】

2つの蛍光分子からなる組み合わせが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFLASHとCFPとの組合せである、請求項15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、IP₃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 (cell free) の系においてIP₃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 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) 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1,4,5-三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)) が生成する。IP₃はIP₃受容体 (IP₃R) 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Ca²⁺放出を誘導する。このIP₃/Ca²⁺シグナル経路において、IP₃受容体は、IP₃のシグナルをCa²⁺のシグナルへ変換する役割を担っている(1-3)。

【0003】

IP₃受容体は、4量体の細胞内IP₃-誘導性Ca²⁺放出チャネル (IP₃-gated Ca²⁺ release channel) である(3, 4)。哺乳動物では、3種の異なるIP₃受容体が存在する(5-7)。IP₃受容体タイプI (IP₃R1) 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IP₃R1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IP₃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)。IP₃結合ドメインの欠失突然変異体解析より、IP₃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、IP₃結合コアと呼ばれている(12)。IP₃により誘発されるIP₃受容体チャネル開口の詳細な機序は未だ不明であるが、IP₃結合がIP₃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、IP₃-誘導性の立体構造変化は、IP₃受容体の分解にも関与していると考えられる(13, 14)。

【0004】

IP₃受容体の活性化による細胞質Ca²⁺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、Ca²⁺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Ca²⁺シグナルの複雑な制御は、IP₃受容体アイソフォームの発現の多様性、IP₃受容体アイソフォームのヘテロ4量体の形成、IP₃受容体の細胞内分布、ならびにCa²⁺自体、ATPおよびリン酸化による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。

【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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 0 6 】

【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., Seino, 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

【非特許文献 1 0】

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

【非特許文献 1 1】

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 1 2】

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

【非特許文献 1 3】

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

【非特許文献 1 4】

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

【非特許文献 1 5】

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

【非特許文献 1 6】

10

20

30

40

50

- Thrower, E. C., Hagar, R. E., and Ehrlich, B. E. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* 2, 580-586
 【非特許文献 1 7】
- Mackrill, J. J. (1999) *Biochem. J.* 337, 345-361
 【非特許文献 1 8】
- 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 1 9】
- Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999) *Neuron* 23, 799-808 10
 【非特許文献 2 0】
- 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 2 1】
- 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
 【非特許文献 2 2】
- Dargan, S. L., Lea, E. J. A., and Dawson, A. P. (2002) *Biochem. J.* 361, 401-407
 【非特許文献 2 3】
- 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 20
 【非特許文献 2 4】
- 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
 【非特許文献 2 5】
- 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 2 6】
- Joseph, S. K., and Samanta, S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6477-6486
 【非特許文献 2 7】 30
- 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 2 8】
- Hayashi, T., and Su, T.-P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 491-496
 【非特許文献 2 9】
- 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
 【非特許文献 3 0】
- Yoo, S. H., and Jeon, C. J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 15067-15073
 【非特許文献 3 1】 40
- 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 3 2】
- 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 3 3】
- Jayaraman, T., Ondrias, K., Ondriasova, E., and Marks, A. R. (1996) *Science* 272, 1492-1494
 【非特許文献 3 4】 50

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

【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

【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、IP₃の検出および定量に有効な指示薬となる新規IP₃受容体結合タンパク質を提供し、ならびにそれを用いたIP₃の検出および/または定量方法を提供するものである。

【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、IP₃受容体結合タンパク質、特に、IP₃受容体と相互作用し、かつ該相互作用がIP₃により制御されている分子に注目し、鋭意検討を行った。IP₃R1(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、IP₃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IP₃受容体結合タンパク質を同定し、IRBIT(IP₃R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate)と命名した。IRBITは、in vitroおよびin vivoでIP₃R1に結合し、その細胞内局在はIP₃R1とよく一致した。さらに、IRBITは生理的濃度のIP₃によりIP₃R1から解離することも判った。これらの結果から、IRBITはIP₃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。

【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IP₃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IP₃受容体に結合するタンパク質をコードするDNA
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FIAsHならびにこれらの誘導體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、
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IP₃を検出するための、上記1記載のタンパク質を含むIP₃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IP₃指示薬、
- 12 . 上記タンパク質が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組み合わせFRET法によりIP₃を検出するための、上記11記載のIP₃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FIAsHとCFPとの組み合わせである、上記12記載のIP₃指示薬、
- 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IP₃濃度を測定するための方法であって、
- (i) 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IP₃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IP₃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、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IP₃受容体結合ドメインを含むタンパク質または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、
- 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、
- (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の一方で標識された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の他方で標識された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FIAsHとCFPとの組み合わせである、上記23記載の方法、
- 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の一方で標識されたIRBI

T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、および上記組合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

27. 2つの蛍光分子からなる組合せが、VenusとCFPとの組合せ、YFPとCFPとの組合せ、またはFIAsHとCFPとの組合せである、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、IP₃R1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須な領域である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。

【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とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAをも含む。ここで、ストリンジェントな条件とは、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

10

20

30

40

50

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(His-tag)、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、FIAsH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。

【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0.5 μM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Kd値(Kd = 83 ~ 100 nM : 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ナンスバイオセンサーによる研究では、IP₃R1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IP₃R1(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 μM : pH7.4、100 mM NaCl下で測定)に近い。以上のことから、IRBITはIP₃受容体にIP₃が結合することによりIP₃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、Luzziらが検出細胞/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、IP₃の細胞内濃度は、刺激前は数十nMであり刺激後は数μMに上昇するとされている(50)。上述のとおりIP₃R1からのIRBITの解離に対するIP₃のEC50値が約0.5 μMであり、この値は、刺激前と刺激後の細胞内IP₃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IP₃産生後にIP₃受容体から解離することが強く示唆される。

【0015】

IP₃により濃度依存的にIP₃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IP₃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IP₃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-IP₃受容体複合体(この際のIP₃受容体は完全な分子である必要はなく、IP₃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、IP₃BDと称する)でよい)と接触させて、IP₃受容体から解離したIRBITの量を定量するか、逆にIP₃との接触後に残存するIRBIT-IP₃受容体/IP₃BD複合体を定量することにより、IP₃の定量的検出が可能となる。IRBITのIP₃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-IP₃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-IP₃受容体/IP₃BD複合体を検

10

20

30

40

50

出す方法も、当業者であれば容易に達成し得る。例えば、IP₃R1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、IP₃R1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-IP₃受容体/IP₃BD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。

10

【0019】

まず、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受容体またはIP₃BDからなる複合体（IRBIT-IP₃受容体/IP₃BD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。

20

【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（1~100 μM程度に10 mM Hepes、100 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM 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。

30

【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。

40

【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】

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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(Trans IT (Mirus)など)で遺伝子導入する。遺伝子導入してから1~3日後のガ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)をガ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。

40

【0030】

上記にVenusとCFPの組み合わ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FIAsHとCFPでも可能であり、またこれらに限定されない。さら

50

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。

【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。

【0033】

方法

IP₃R1アフィニティカラムの作製

マウスIP₃R1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-IR₃R1(1-225)断片をバキュロウイルストランスファクターpBlueBac4.5(Invitrogen)にサブクローニングした。該GST-IR₃R1(1-225)のSmaI部位より下流の領域を、マウスIP₃R1(アミノ酸79~2217に相当)のSmaI-EcoRI断片で置き換え、GST-IP₃R1(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にサブクローニングした。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 (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、ガラステ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 x 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 (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 (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5mg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5g)をホモジナイズバッファ(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)45ml中でガラステ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 x gで10分間遠心し、上清(S1画分)をさらに100,000 x 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、500 mM NaClを含むホモジナイズバッファ25ml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

10

20

30

40

50

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倍の結合バッファーにてカラムを洗浄した後、50 μ M IP₃ (Dojindo)と0.05% Brij 35とを含む結合バッファー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60kDa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(μ RPC 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60kDa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'-ATGTCGATGCGTGACGCGATGC-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 II KS(+) (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-IIbIIIa、GST-IIIab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IP₃R1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 μ g)、GST-IRBIT(4.3 μ g)、GST(1.3 μ g)およびサグS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ(Sigma) (2.4 μ g)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 \pm 標準偏差で示した(図2)。

【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

10

20

30

40

50

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。

【0039】

細胞画分の調製およびイムノプロットティング

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ロバ抗ウサギIgG(Amersham Pharmacia Biotech)でプロットした。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。

10

【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IP₃R1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プロットティング、プルダウン実験、または免疫染色に用いた。

20

【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 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 °C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20mM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。

30

【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(Toyobo)の存在下または非存在下のいずれかで2 mM MgCl₂と共に37 °C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4,5-二リン酸(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)によるイムノプロットに供した。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。

40

【0044】

50

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-Ilab、 GST-IIbIIIIa、 GST-IIIab、 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。

【 0 0 4 5 】

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 (pH7.4)、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

10

【 0 0 4 6 】

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%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ー(80 mM PIPES (pH 7.2)、1 mM MgCl₂、1 mM EGTA

20

【 0 0 4 7 】

免疫沈降

1% Nonidet P-40を含む50 mM Hepes (pH7.4)、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性抽出物を

30

【 0 0 4 8 】

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ー(500mM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カラムから分子量約60kDaのタンパク質が溶出されたが(図1A)、GST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

40

50

かる60kDa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60kDa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58.9kDa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60kDa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1B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1B)。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。

【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1C)。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。

【0051】

IRBITの組織分布および細胞内局在

IRBITのN末端領域(図1B、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3Aに示すように、抗IRBIT抗体は、約60kDa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3A、レーン1)の分子量はCos-7の内因性タンパク質(図3A、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3B)。

【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3C、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3C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3C、レーン4)。対照的に、小胞体の膜タンパク質であるIP₃R1は、全く抽出されなかった(図3C、下の図)。これらの結果から、IRBITは細

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 5 3 】

高塩抽出画分中のIRBITはIP₃R1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3C)。そこで、これらの画分中のIRBITがin vitroでIP₃R1と相互作用するか否かを、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中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

【 0 0 5 4 】

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

【 0 0 5 5 】

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。

40

【 0 0 5 6 】

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。IR

50

BIT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)。IP₃R1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IP₃R1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IP₃R1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、IP₃R1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IP₃R1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。

10

【0057】

IRBITはin vivoでIP₃R1と結合する

組織中でのIRBITとIP₃R1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IP₃R1抗体でイムノブロット解析した。IP₃R1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IP₃R1とのin vivoでの結合を示している。

【0058】

20

生理的濃度のIP₃により選択的にIP₃R1からIRBITの解離が起こる

IRBITは最初、50 μMのIP₃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IP₃R1との相互作用をIP₃が解離させることを示唆する。しかし、IP₃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IP₃の濃度は生理的範囲より高い。したがって、生理的濃度のIP₃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IP₃、および他のイノシトールポリホスフェートとしてIP₂、IP₄、IP₆またはATPにて溶出を試みた。図8Aに示すように、IP₃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IP₃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IP₃濃度)は、約0.5 μMであった。該濃度はIP₃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IP₃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IP₃により選択的に、IP₃R1からIRBITが解離することが示された。

30

【0060】

IRBITはIP₃R1のIP₃結合領域と結合し、かつIP₃R1のLys-508はIRBITとIP₃の両方の結合にとって必須である

IP₃R1のIP₃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、IP₃R1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IP₃R1の欠失変異体を用いた(Fig. 9A)。図9Bに示すように、IP₃結合コア領域(アミノ酸226~576)(11)を含有するGST-Ib11a(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IP₃R1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-Ib11a(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-Ib11a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-Ib11a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

40

50

ルダウンアッセイを行ったところ、IRBITはGST-Ib11aとR441Qとに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、細胞内およびセフリーの系のいずれにおいてもIP₃の検出および定量の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
13. Zhu, C.-C., Furuichi, T., Mikoshiba, K., and Wojcikiewicz, R. J. H. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 3476-3484
14. Zhu, C.-C., and Wojcikiewicz, 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
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

10

20

30

40

50

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
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., Sorrentino, V., De Smedt, H., and Parys, J. B. (2001) *Biochem. J.* 354, 413-422 10
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
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 20
31. Thrower, E. C., Park, H. Y., So, S. H., Yoo, S. H., and Ehrlich, B. E. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 15801-15806
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., Tarakhovsky, A., and Yamamoto, T. (2002) *EMBO J.* 21, 83-92
35. Yang, J., McBride, S., Mak, D.-O. D., Vardi, N., Palczewski, K., Haeseleer, F., and Foscett, J. K. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7711-7716 30
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
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 Birnbaumer, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14955-14960 40
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
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.* 50

- 51, 1724-1730
46. Maeda, N., Niinobe, M., Inoue, Y., and Mikoshiba, K. (1989) *Dev. Biol.* 133, 67-76
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
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 10
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
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
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 20
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
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 30
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., Niinobe, 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
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 40
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
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) *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., Buechler, Y. J., Taylor, S. S., and Tsien, 50

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

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

20

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

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

30

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
					10
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
					20
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
					30
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					
		515		520	525
					40

Arg Tyr

530

<210> 2

<211> 1593

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

10

<400> 2

atgtcgaigc ctgacgcgat gccgctgccc ggigtcgggg aggagctgaa acaggccaag 60
gagatcgagg acgccgagaa gtactccttc atggccacgg tcaccaaggc tccaagaag 120
caaatccagt ttgctgatga catgcaagag ttacccaaat tccctactaa gactggccgg 180
agatcttigt ctgcttccat ctcaaatcc tccacagaca gctacagttc agctgcatcc 240
tatacagata gctctgatga tgaggtttcc cctcgagaga agcagcaaac caactcgaag 300
ggcagcagca atttctgtgt gaagaacatc aagcaggcag agtttggacg ccgggagatt 360
gagattgcag agcaagacat gtcctgctctg atttacttca ggaaacgtgc tcaggagag 420
aagccttigg ctgggtgctaa aatagtgggc tgtacgcaca tcacggccca gacagcggta 480
ttaattgaga cccittgtgc cctgggagct cagtgccgtt ggtctgcttg caacatctat 540
tcaactcaga atgaagttagc tgcagcactg gctgaggctg gagtcgcggt gtttgccttg 600
aagggcgagt cagaagatga tttctggigg tgcattgacc gctgtgtcaa catggatggg 660
tggcaggcta acatgatcct ggatgatggg ggagacttaa cccactgggt ttataagaag 720
tatccaaacg tgtttaagaa gatccgaggc attgiggaag agagcgtgac tggigttcac 780
aggctgtatc agctctccaa agctgggaag ctctgtgttc cagccatgaa tgtcaatgat 840
tctgttacca aacagaagtt tgataaccig tactgctgcc gagaatccat ttggatggc 900
ctgaagagga ccacggatgt gatgtttggt gggaaacagg tgggtggtgtg tggctatggt 960
gaggtaggaa agggctgctg tgcctgcttc aaggcccttg gagcaatgtt ctacataaca 1020
gaaattgacc ccactgtgct tctgcaggcc tgcattgatg ggttcagggt ggtgaagctg 1080
aatgaagica tccggcaggt ggacgttgta attacttgca caggaaataa gaatgtagtg 1140

20

30

40

actcgggagc acttggaccg aatgaaaaat agttgtattg tgtgcaatat gggccattcc 1200
 aacacggaga tcgacgtgac cagcctccgc actccagaac taacatggga gcgigtacgt 1260
 tctcaggigg accatgtcat ctggcctgat ggcaaacggg 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*

20

<400> 3

Tyr Ser Phe Met Ala Thr Val Thr Lys

1

5

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 4

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

1

5

10

40

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10

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

<400> 5

atgtcgaatgc ctgacgcgat gc

22

<210> 6

20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

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

30

<400> 6

gcgtgggttca tgtggactgg tc

22

<210> 7

<211> 2749

<212> PRT

40

<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

10

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

20

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

30

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
 130 135 140

40

Asn Ala Met Arg Val Thr Leu Asp Glu Ala Gly Asn Glu Gly Ser Trp
 145 150 155 160

Phe Tyr Ile Gln Pro Phe Tyr Lys Leu Arg Ser Ile Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Val Ile Gly Asp Lys Val Val Leu Asn Pro Val Asn Ala Gly Gln Pro
 180 185 190

10

Leu His Ala Ser Ser His Gln Leu Val Asp Asn Pro Gly Cys Asn Glu
 195 200 205

Val Asn Ser Val Asn Cys Asn Thr Ser Trp Lys Ile Val Leu Phe Met
 210 215 220

20

Lys Trp Ser Asp Asn Lys Asp Asp Ile Leu Lys Gly Gly Asp Val Val
 225 230 235 240

Arg Leu Phe His Ala Glu Gln Glu Lys Phe Leu Thr Cys Asp Glu His
 245 250 255

30

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

Thr Ser Ala Thr Ser Ser Lys Ala Leu Trp Glu Val Glu Val Val Gln
 275 280 285

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

40

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

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

20

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

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

30

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
			10
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
			20
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
			30
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			
	595	600	605
			40

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

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

10

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

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

20

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

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

40

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

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

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

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

Glu Glu Asn Lys Gly Ser Asn Val Met Arg Ser Ile His Gly Val Gly

10

20

30

40

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					10
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
					20
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					30
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					
	1060		1065		1070
					40

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
 1090 1095 1100

Thr Ser Gln Asp Val Asp Asn Tyr Lys Gln Ile Lys Gln Asp Leu Asp
 1105 1110 1115 1120

10

Gln Leu Arg Ser Ile Val Glu Lys Ser Glu Leu Trp Val Tyr Lys Gly
 1125 1130 1135

Gln Gly Pro Asp Glu Pro Met Asp Gly Ala Ser Gly Glu Asn Glu His
 1140 1145 1150

20

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
 1170 1175 1180

30

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

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

40

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

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

20

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

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

30

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			10
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	20
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			30
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			
1525	1530	1535	40

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
 1555 1560 1565

Val Gln Lys Thr Ala Leu Asn Trp Arg Leu Ser Ala Arg Asn Ala Ala
 1570 1575 1580

10

Arg Arg Asp Ser Val Leu Ala Ala Ser Arg Asp Tyr Arg Asn Ile Ile
 1585 1590 1595 1600

Glu Arg Leu Gln Asp Ile Val Ser Ala Leu Glu Asp Arg Leu Arg Pro
 1605 1610 1615

20

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
 1635 1640 1645

30

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
 1665 1670 1675 1680

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

40

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

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

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

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

Ser Phe Phe Cys Arg Leu Thr Glu Asp Lys Lys Ser Glu Lys Phe Phe

10

20

30

40

	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	10
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	20
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	30
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				
1985	1990	1995	2000	40

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

Asn Gln Thr Leu Glu Ser Leu Thr Glu Tyr Cys Gln Gly Pro Cys His
 2035 2040 2045

10

Glu Asn Gln Asn Cys Ile Ala Thr His Glu Ser Asn Gly Ile Asp Ile
 2050 2055 2060

Ile Thr Ala Leu Ile Leu Asn Asp Ile Asn Pro Leu Gly Lys Lys Arg
 2065 2070 2075 2080

20

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

Ala Ala Ser Pro Arg Asn Val Gly His Asn Ile Tyr Ile Leu Ala His
 2145 2150 2155 2160

40

Gln Leu Ala Arg His Asn Lys Glu Leu Gln Thr Met Leu Lys Pro Gly
 2165 2170 2175

Gly Gln Val Asp Gly Asp Glu Ala Leu Glu Phe Tyr Ala Lys His Thr
 2180 2185 2190

Ala Gln Ile Glu Ile Val Arg Leu Asp Arg Thr Met Glu Gln Ile Val
 2195 2200 2205

Phe Pro Val Pro Ser Ile Cys Glu Phe Leu Thr Lys Glu Ser Lys Leu
 2210 2215 2220

Arg Ile Tyr Tyr Thr Thr Glu Arg Asp Glu Gln Gly Ser Lys Ile Asn
 2225 2230 2235 2240

Asp Phe Phe Leu Arg Ser Glu Asp Leu Phe Asn Glu Met Asn Trp Gln
 2245 2250 2255

Lys Lys Leu Arg Ala Gln Pro Val Leu Tyr Trp Cys Ala Arg Asn Met
 2260 2265 2270

Ser Phe Trp Ser Ser Ile Ser Phe Asn Leu Ala Val Leu Met Asn Leu
 2275 2280 2285

Leu Val Ala Phe Phe Tyr Pro Phe Lys Gly Val Arg Gly Gly Thr Leu
 2290 2295 2300

Glu Pro His Trp Ser Gly Leu Leu Trp Thr Ala Met Leu Ile Ser Leu

10

20

30

40

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	10
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	20
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	30
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				
	2450	2455	2460	40

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。

【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。

10

【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(2μg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 x 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 x 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(1μg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抗体でのウェスタンブロッティング分析の結果である。

20

【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。

30

【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融合タンパク質を発現しているCos-7細胞の溶解液(インプット:I)をGST-EL(E)またはGST(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GFP抗体でイムノブロット解析した。

40

【図6】図6は、共発現したCos-7細胞では、IRBITはIP₃R1と共局在することを示す図である。IP₃R1を、IRBIT(AおよびB)、GFP-IRBIT(CおよびD)およびGFP-IRBIT(105-530)(EおよびF)と共にCos-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IP₃R1および抗IRBIT抗体にて)と蛍光共焦点顕微鏡法(GFP-IRBITおよびGFP-IRBIT(105-530))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、IRBIT(B)、GFP-IRBIT(D)およびGFP-IRBIT(105-530)(F)を示し、中央のパネルは、IP₃R1を示す。右

50

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。

【図7】図7は、in vivoでのIRBITのIP₃R1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IRBIT抗体またはコントロール抗体で免疫沈降した。沈降物をSDS-PAGE後、抗IP₃R1(上図)または抗IRBIT(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IP₃により、選択的にIP₃R1からIRBITが解離する事を示す図である。図8A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GST-EL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(Glu)(a)または0.1~10 μM IP₃(a)、IP₂(b)、IP₄(c)、IP₆(d)またはATP(e)で溶出した。抽出液中のIRBITを抗IRBIT抗体とAlexa 680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0.1~10 μM IP₃での溶出液中のGST-ELを抗GST抗体で分析した(aの上のパネル)。図8Bは、抗IRBIT抗体により検出されたIRBIT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 \pm 標準偏差で示している。

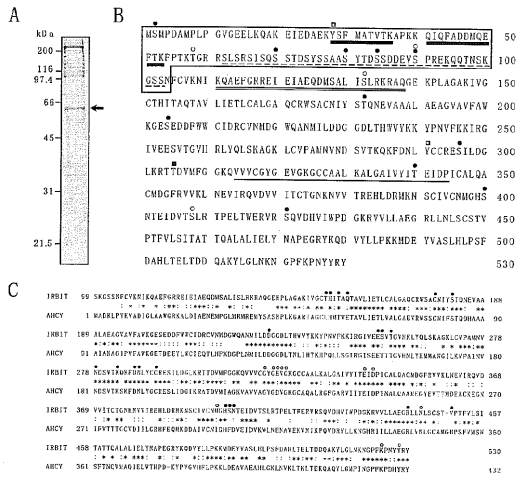
【図9】図9は、IRBITがIP₃R1のIP₃結合領域と相互作用すること、およびこの相互作用にはIP₃R1の508番目のLysが必要であることを示す図である。図9Aは、用いたマウスIP₃R1と組換えGST融合タンパク質の構造を模式的に図示している。IP₃結合コア領域は斜線部、推定膜貫通領域を黒塗りの線で示している。I~Vのローマ数字は、トリプシン限定分解により決定したIP₃R1のドメイン構造を示している(51)。各バーの上に付した数字は、アミノ酸残基の番号を示している。図9Bは、IP₃R1のIRBIT結合領域を調べた結果を示す。マウス小脳から得た粗ミクロソームからの高塩抽出画分を(A)に示すGST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IRBIT抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した。図9Cは、(B)と同様に、高塩抽出画分をGST-IbIIa、R441QおよびK508A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IRBIT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GST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)。

10

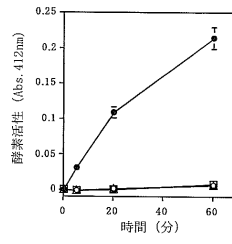
20

30

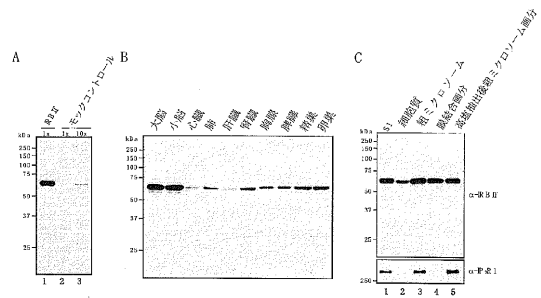
【 図 1 】



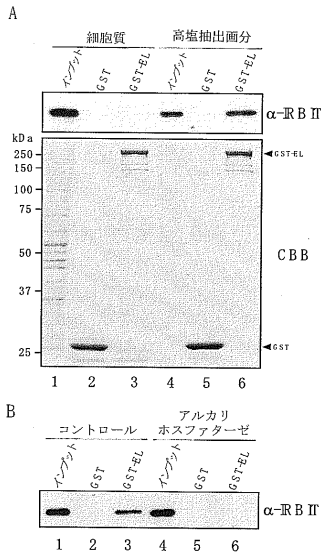
【 図 2 】



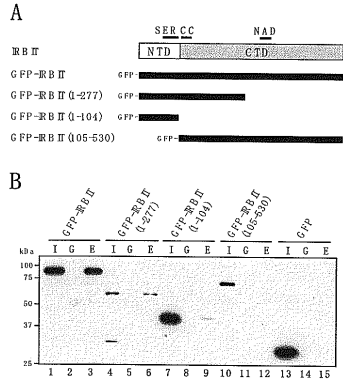
【 図 3 】



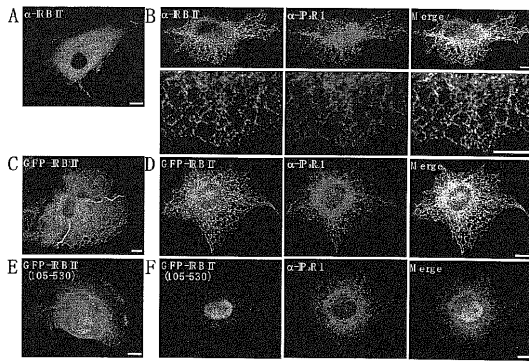
【 図 4 】



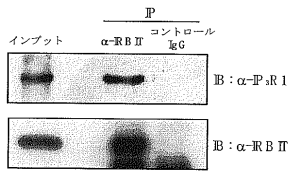
【 図 5 】



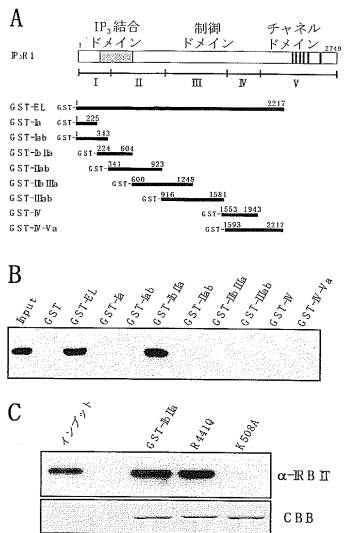
【 図 6 】



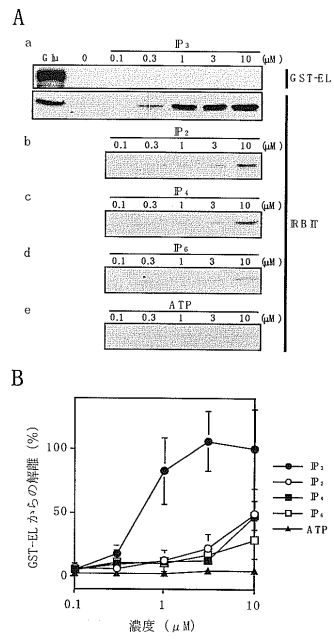
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/58 (2006.01)		G 0 1 N 33/58	Z

(72)発明者 松浦 徹
東京都目黒区目黒本町5 - 3 0 - 4 - 2 0 3

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表2002-513276(JP,A)
国際公開第02/064795(WO,A1)
米国特許第05854023(US,A)
Immunogenetics,Vol.53,No.12(2002.Mar.)p.993-1001

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq

专利名称(译)	新的IP3受体结合蛋白和IP3指示剂		
公开(公告)号	JP4219648B2	公开(公告)日	2009-02-04
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		
当前申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
[标]发明人	御子柴克彦 安東英明 水谷顯洋 松浦徹		
发明人	御子柴 克彦 安東 英明 水谷 顯洋 松浦 徹		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C07K19/00 C12Q1/02 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/12		
CPC分类号	C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K14/705 C07K19/00 C12Q1/02 G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/58.Z C07K14/47 C07K16/18 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.B 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	JP2004129612A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

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

【 図 4 】

