

イノシトール3リン酸受容体の分子生物学的解析

杉山 友康

東京大学図書



0012214326

東京大学総合図書館

略号

- cAMP：サイクリックアデノシン 3,5- リン酸
- DG：ジアシルグリセロール
- IP₃：イノシトール 1,4,5- 三リン酸
- PLC：フォスホリパーゼ C
- PIP₂：フォスファチジルイノシトール 4,5- 二リン酸
- cDNA：complementary DNA
- mRNA：messenger RNA
- DNA：デオキシリボ核酸
- RNA：リボ核酸
- ATP：アデノシン 5'- 三リン酸
- GMP：グアノシンーリン酸
- dCTP：デオキシシチジン 5'- 三リン酸
- FITC：フルオレセインイソチオシアネート
- TPA：12- α - テトラデカノイルホルボール 13- アセテート
- RA：レチノイン酸
- PBS：リン酸緩衝溶液
- DMSO：ジメチルスルホキシド
- NBT：ニトロブルーテトラゾリウム
- SDS：ソディウムドデシルサルフェート
- PCR：ポリメラーゼチェーン反応
- kDa：キロダルトン
- IL-3：インターリューキン 3
- GM-CSF：顆粒球マクロファージ - コロニー刺激因子
- sIgM：細胞膜イムノグロブリン M

fMLP : N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine
ADP : アデノシン 5'-二リン酸
KLH : Keyhole limpet hemocyanin
ECL : Enhanced chemiluminescence
SD rat : Sprague-Dawley ラット
ELISA : enzyme linked immunosolvent assay
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PAGE : ポリアクリルアミドゲル電気泳動
IL-2 : インターリューキン 2
WFA : *Wisteria floribunda* レクチン
ABC 試薬 : アビジンビオチン複合体試薬
DATF : Dichlorotriazynyl amino
DAB : ジアミノベンジジン
CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CCSP : クララ細胞特異的 10 kDa 抗原
TRITC : テトラメチルローダミンイソチオシアネート
EDTA : エチレンジアミンテトラ酢酸
Tris : トリスヒドロキシルアミノメタン
TRP : transient receptor potential
PIP : ホスファチジルイノシトール 4-リン酸
PIP₃ : フォスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸
SM1 : 平滑筋型ミオシン重鎖

目次

第1章 緒論	1
1-1 緒言	1
1-2 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の分子特性	4
1-3 多様な分子構造を持つイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体	7
1-4 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の活性を制御する分子	8
1-5 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の発現分布	12
1-6 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体と相互作用するタンパク質	13
1-7 本研究の目的および意義	14
第2章 ヒトイノシトール 3リン酸受容体サブタイプの発現変化	16
2-1 緒言	16
2-2 材料と方法	19
2-2-1 試薬	19
2-2-2 細胞株および細胞培養	19
2-2-3 細胞の分化誘導	19
2-2-4 ノーザンブロッティング解析と RNA ドットブロッティング解析	21
2-3 実験結果	24
2-3-1 IP_3 受容体サブタイプ特異的に認識する DNA プローブ	24
2-3-2 ヒト血球系細胞株における IP_3 受容体サブタイプの発現	24
2-3-3 細胞分化によるサブタイプ特異的な IP_3 受容体の発現変化	29
2-3-3-1 マクロファージ様の細胞への分化	29
2-3-3-2 顆粒球様の細胞への分化	31
2-3-3-3 成熟した巨核球様の細胞への分化	33
2-3-3-4 赤芽球様の細胞への分化	37
2-4 考察	38
2-5 結語	42
第3章 イノシトール 3リン酸受容体サブタイプ特異的抗体の作製	43
3-1 緒言	43
3-2 材料と方法	45
3-2-1 試薬	45
3-2-2 細胞とその培養	45
3-2-3 IP_3 受容体サブタイプ特異的ペプチド抗原の調製	46
3-2-4 免疫法とハイブリドーマの作製	46

3-2-5	ELISAによるIP ₃ 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体のスクリーニング	49
3-2-6	イムノグロブリンアイソタイプの決定法	50
3-2-7	抗体の精製	50
3-2-8	膜画分の調製とウエスタンブロッティング解析	50
3-2-9	免疫沈降	51
3-2-10	[³ H] IP ₃ 結合活性の測定法	52
3-2-11	蛍光共焦点レーザー顕微鏡観察	53
3-2-12	細胞表面のタンパク質のビオチン化	54
3-3	実験結果	55
3-3-1	IP ₃ 受容体サブタイプ特異的ペプチドの選出	55
3-3-2	モノクローナル抗体のキャラクタリゼーション	55
3-3-2-1	モノクローナル抗体の反応特異性およびイムノグロブリンアイソタイプのELISAによる解析	55
3-3-2-2	モノクローナル抗体の反応特異性のウエスタンブロッティングによる解析	58
3-3-2-3	モノクローナル抗体 KM1083 の特異的認識タンパク質の IP ₃ 結合能の解析	64
3-3-3	IP ₃ 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体の、炎症性細胞における IP ₃ 受容体サブタイプ発現解析への応用	66
3-3-4	IP ₃ 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体の、IP ₃ 受容体サブタイプの細胞内局在の解析への応用	66
3-3-5	IP ₃ 受容体の細胞膜局在性の解析	68
3-4	考察	72
3-5	結語	77
第4章	イノシトール 3 リン酸受容体サブタイプの組織・細胞特異的発現の解析	79
4-1	緒言	79
4-2	材料と方法	82
4-2-1	試薬	82
4-2-2	動物およびその組織化学解析用ブロックの調製	82
4-2-3	膜画分の調製とウエスタンブロッティング解析	83
4-2-4	免疫組織化学解析とレクチン組織化学解析	84
4-3	実験結果	86
4-3-1	気管での IP ₃ 受容体サブタイプ発現のウエスタンブロッティング解析	86
4-3-2	気管上皮細胞での IP ₃ 受容体サブタイプ発現の免疫組織化学的解析	86
4-3-3	細気管支上皮細胞での IP ₃ 受容体サブタイプ発現の免疫組織化学的解析	88
4-3-4	IP ₃ 受容体タイプ2の線毛細胞の特異的マーカーとしての利用可能性	90

4-4	考察	94
4-5	結語	98
第5章	イノシトール3リン酸受容体サブタイプと細胞骨格タンパク質の結合の解析	101
5-1	緒言	101
5-2	材料と方法	104
5-2-1	試薬	104
5-2-2	細胞培養	104
5-2-3	ウエスタンブロットティング解析	106
5-2-4	免疫沈降	107
5-2-5	免疫細胞化学解析	108
5-3	実験結果	110
5-3-1	培養血管平滑筋細胞におけるIP ₃ 受容体サブタイプの発現	110
5-3-2	培養平滑筋細胞におけるIP ₃ 受容体サブタイプの細胞内局在	110
5-3-3	培養血管平滑筋細胞におけるIP ₃ 受容体サブタイプとFアクチンの細胞内共局在性	115
5-3-4	培養血管平滑筋細胞におけるIP ₃ 受容体サブタイプとテーリンの細胞内共局在性	117
5-3-5	培養血管平滑筋細胞のIP ₃ 受容体サブタイプとテーリンとの会合	119
5-3-6	培養血管平滑筋細胞のIP ₃ 受容体サブタイプと焦点接着の細胞骨格タンパク質の会合	121
5-4	考察	124
5-5	結語	130
第6章	細胞増殖とイノシトール3リン酸受容体サブタイプ発現の関連についての解析	132
6-1	緒言	132
6-2	方法と材料	134
6-2-1	試薬	134
6-2-2	血管平滑筋細胞の単離と細胞培養	134
6-2-3	細胞内Ca ²⁺ 濃度測定	136
6-2-4	ウエスタンブロットティング解析	137
6-2-5	DNA合成能の解析	138
6-2-6	電子顕微鏡解析	138
6-3	実験結果	139
6-3-1	アンギオテンシンII刺激による細胞内Ca ²⁺ 濃度変化を指標にした細胞の選択	139

6-3-2	新しい血管平滑筋細胞株 SVSC の種々の血管作動物質に対する応答性の維持	141
6-3-3	新しい血管平滑筋細胞株 SVSC の形態と平滑筋細胞マーカーの発現の解析 ..	141
6-3-4	細胞増殖の血管作動物質応答性への影響	145
6-3-5	細胞増殖の IP ₃ 受容体サブタイプ発現への影響	145
6-4	考察	151
6-5	結語	154
第 7 章	結論	156
引用文献	164
謝辞	180

第1章 緒論

1-1 緒言

生体が調和した生命活動をすることができるのは、外界からの刺激を受容し、その情報を細胞内に正しく情報伝達するからである。カルシウム (Ca^{2+}) は下等生物のバクテリアから高等生物の神経細胞にいたる全ての細胞が共通して利用する細胞内情報伝達物質で、その濃度が細胞機能に重大な影響を及ぼしている。細胞内濃度が高レベルな状態が続くと細胞の死に至る。医薬の観点からは Ca^{2+} の制御が高血圧症、狭心症などの心血管疾患に効果があることが知られ、治療薬として大きな市場を形成している。

通常、細胞質内の Ca^{2+} 濃度は、 Ca^{2+} ポンプや $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ 交換タンパク質などによって細胞外の Ca^{2+} 濃度の1万分の1以下の極めて低濃度に保たれている。細胞が機能的に活動できるのは、刺激に応じて細胞質内の Ca^{2+} 濃度を素早く上昇させて、細胞内の機能分子を活性化しているからである (Carafoli, 1987)。その増加の機構は、興奮性細胞の細胞膜の脱分極刺激による Ca^{2+} 流入と、非興奮性細胞におけるホルモン、成長因子、神経伝達物質などの液性因子による刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が知られており、疾病の治療の標的として既に応用されているのが前者である。後者も調和した生命活動に重要な系であることから、治療への応用が期待されている。

近年の科学の発展による細胞内情報伝達に関する蓄積は、生命維持に重要なホルモン、成長因子、神経伝達物質などの細胞外からの刺激（第一メッセンジャー）は、標的細胞内の生理活性に直接影響を与えず、第二のメッセンジャー分子 [Ca^{2+} 、サイクリックアデノシン 3,5-一リン酸 (cAMP)、サイクリックグアノシン 3,5-一リン酸 (cGMP)、ジアシルグリセロール (DG)、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3)] の生産を高め、第二のメッセンジャーが細胞内の反応を制御することを明らかにしてきた (Hardingham and Bading, 1999, Sharma and Kalra, 1994, Goy, 1991,

Huang, 1990, Berridge, 1993)。細胞内では、これらの第二メッセンジャーが種々のタンパク質を制御し、制御系が複雑に絡んで細胞応答になると考えられている (Fig. 1-1)。1989年には IP_3 によって開口する Ca^{2+} チャンネルが明らかにされ (Furuichi et al., 1989)、細胞内 Ca^{2+} 濃度制御の分子機構に関する理解は飛躍的に深まった。

一方、現象論的には、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の解析技術が進歩した結果、 Ca^{2+} 濃度の増加には様々なパターン (Ca^{2+} オシレーション、 Ca^{2+} スパーク、 Ca^{2+} 波など) があり、単なる増減ではないと考えられるようになった (Tsien and Tsien, 1990, Lechleiter et al., 1991)。最近では、 Ca^{2+} 濃度変化パターンの細胞機能への影響が検討された結果、人工的に作った Ca^{2+} 濃度上昇パターンの違いによって、遺伝子発現が制御されることが示された (Dolmetsch et al., 1997, Dolmetsch et al., 1998)。したがって機能的にも、細胞内 Ca^{2+} 濃度の時間的・空間的な増加の様式が、ある細胞機能に重要で (Clapham and Sneyd, 1995)、 Ca^{2+} という一つの情報媒体を介して、細胞は異なる情報伝達を行いうると考えられるようになっている。

Ca^{2+} の挙動を制御しているのは、 Ca^{2+} の細胞内における物理化学的な性質と、 Ca^{2+} 動員と排出の分子機構である。まず細胞内では、遊離した Ca^{2+} の拡散速度が極めて遅い (Allbritton et al., 1992)。したがってひとつの Ca^{2+} 透過性のチャンネルの開口部には、極度な Ca^{2+} の濃度勾配が形成されている。第2に細胞内に増加した Ca^{2+} は、細胞内に蜘蛛の巣のように三次元的に広がる小胞体および細胞膜によって速やかに排除される (Allbritton and Meyer, 1993)。したがって Ca^{2+} が細胞の隅々まで行き渡るためには、連続した Ca^{2+} 透過性のチャンネルの活性化が不可欠と考えられている。

筆者らは、このような研究情勢の中、非興奮性刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度制御が、医薬や薬学における新しい視点の薬剤開発や、工学における人工物の考案に寄与するという考えの基に、1990年台初頭より IP_3 受容体のヒトホモログの遺伝子クローニング研究に着手した。その過程で、研究初期から IP_3 受容体にはサブタイプが存在する事を見いだして、その役割の異同に注目していた。 IP_3 受容体は細胞内への

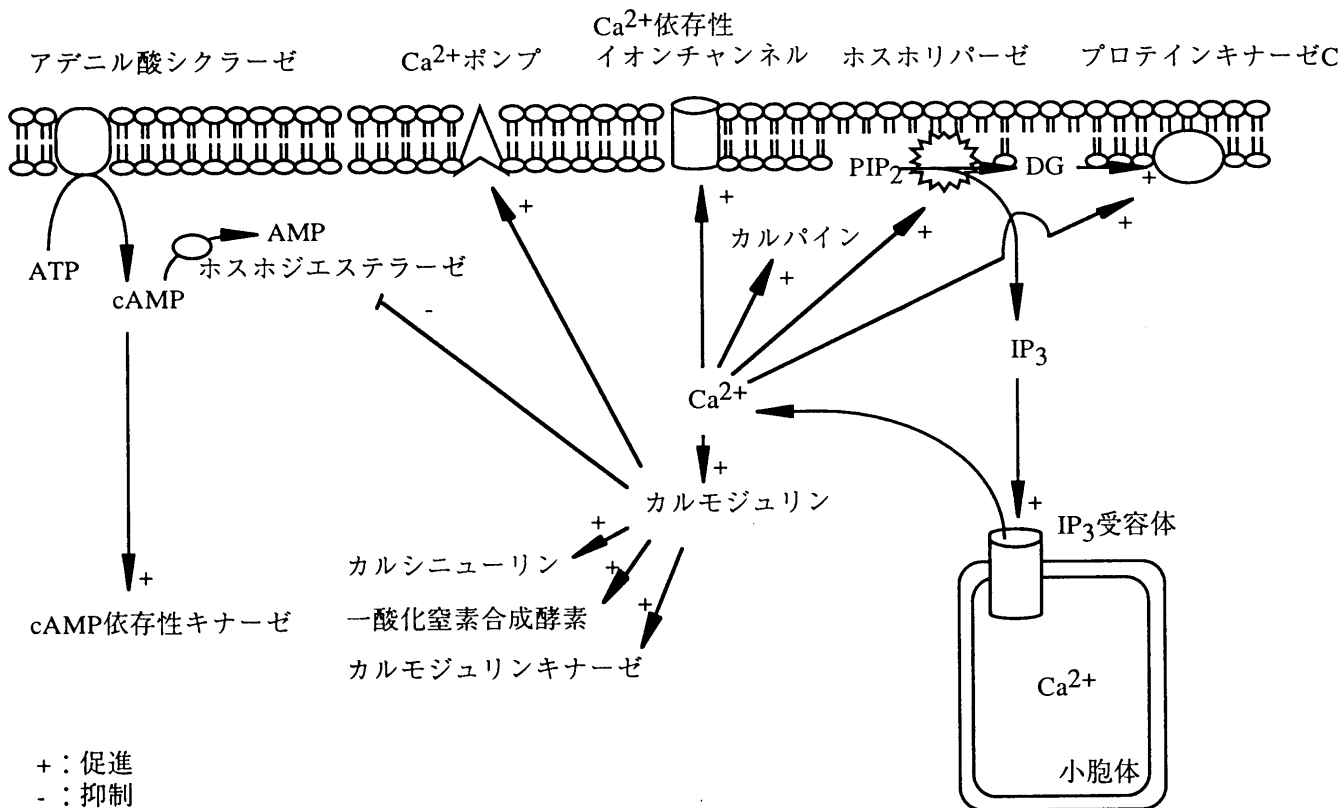


Fig. 1-1 第2メッセンジャーの産生と Ca^{2+} の標的タンパク質
 第2メッセンジャーの産生系タンパク質が Ca^{2+} とカルモジュリンによって調節されている

Ca^{2+} の動員を制御する Ca^{2+} チャンネルである。サブタイプに関する発現や細胞内分布などの基礎的な解析は、 Ca^{2+} による細胞機能の制御機構の解明に寄与すると考えられる。そこで本論文では IP_3 受容体サブタイプの分子レベルでの解析を行った。

本章では以下に IP_3 受容体に関する背景について述べ、最後に本研究の目的並びに意義を示す。

1-2 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の分子特性

IP_3 受容体タンパク質は、細胞質内 IP_3 濃度に応じて小胞体から Ca^{2+} を細胞質に動員させる活性をもつ (Berridge and Irvine, 1989)。 IP_3 受容体の cDNA は 1989 年に御子柴らによって初めてクローニングされた (Furuichi et al., 1989)。mRNA サイズが約 9 kb で、推定アミノ酸配列が 2749 アミノ酸でコードされる巨大なタンパク質であることが示されている (Fig. 1-2)。アミノ酸配列の hydrophathy profile の解析から、カルボキシル末端領域に 6 個の膜貫通領域を持つことが予測されている。アミン末端とカルボキシル末端は細胞質側に配向することが考えられている。アミン末端の 650 アミノ酸残基は IP_3 結合領域であり、アルギニンとリジンが多く、ヘパリンが結合する。 IP_3 結合領域と膜貫通領域の間のアミノ酸配列は制御領域と呼ばれ、プロテインキナーゼ A によるリン酸化部位や、カルモジュリン結合部位、ATP 結合部位がある。膜貫通領域の第 5 と第 6 膜貫通領域の間には長いループ配列と推定チャンネルポアの形成領域が存在する。また、電子顕微鏡観察および生化学的手法により、 IP_3 受容体は 4 量体を形成することがわかっている (Maeda et al., 1990, Maeda et al., 1991)。このことから立体構造的には、4 つの IP_3 受容体で 1 つの Ca^{2+} チャンネルを形成していると考えられている (Fig. 1-3)。すなわち IP_3 の IP_3 結合領域への結合が IP_3 受容体タンパク質の立体構造に変化を起し、 Ca^{2+} が通過するチャンネルポアを開口すると考えられている。一次構造の比較の結果、 IP_3 受容体は骨格筋の筋小胞体にあるリアノジン受容体 (細胞内にある Ca^{2+} チャンネルで、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに接合して Ca^{2+} を細胞内に動員する活性を持つ。4 個

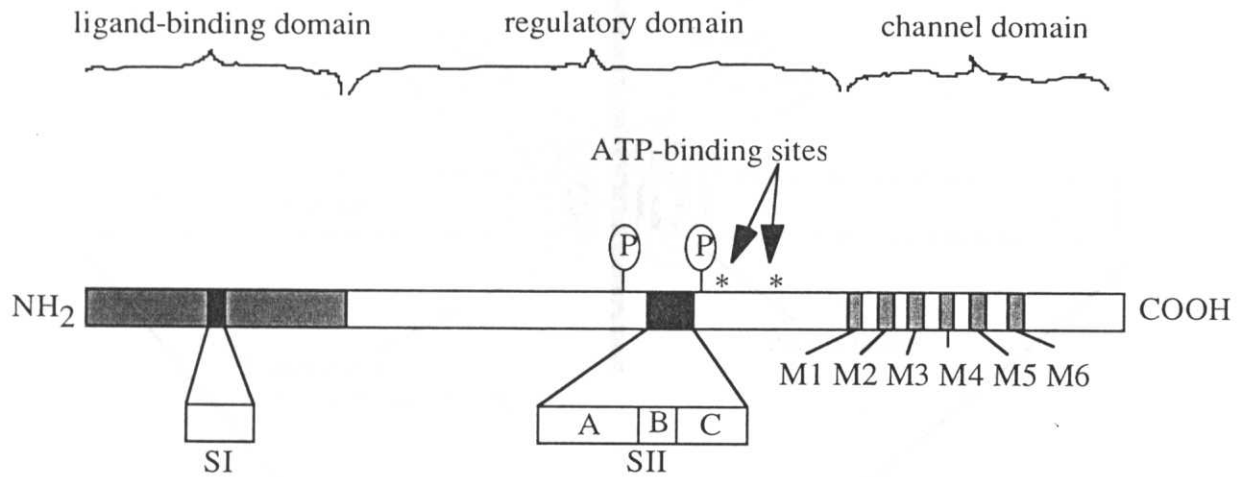


Fig. 1-2 マウス IP₃受容体のアミノ酸配列から推定されるドメイン構造

IP₃受容体は3つのドメイン構造を有する。アミノ末端側にIP₃結合領域をもち、カルボキシル末端側にチャンネルを形成する領域をもつ。アミノ末端領域とカルボキシル末端領域に挟まれる領域は制御領域と呼ばれ、リン酸化部位やATP接合部位がある。P：プロテインキナーゼAリン酸化部位。SIとSII：RNAスプライシング部位。SIIはさらにABCの3つのスプライシングがある。M1-M6：膜貫通領域。(Mikoshiba, 1993. の図を引用)

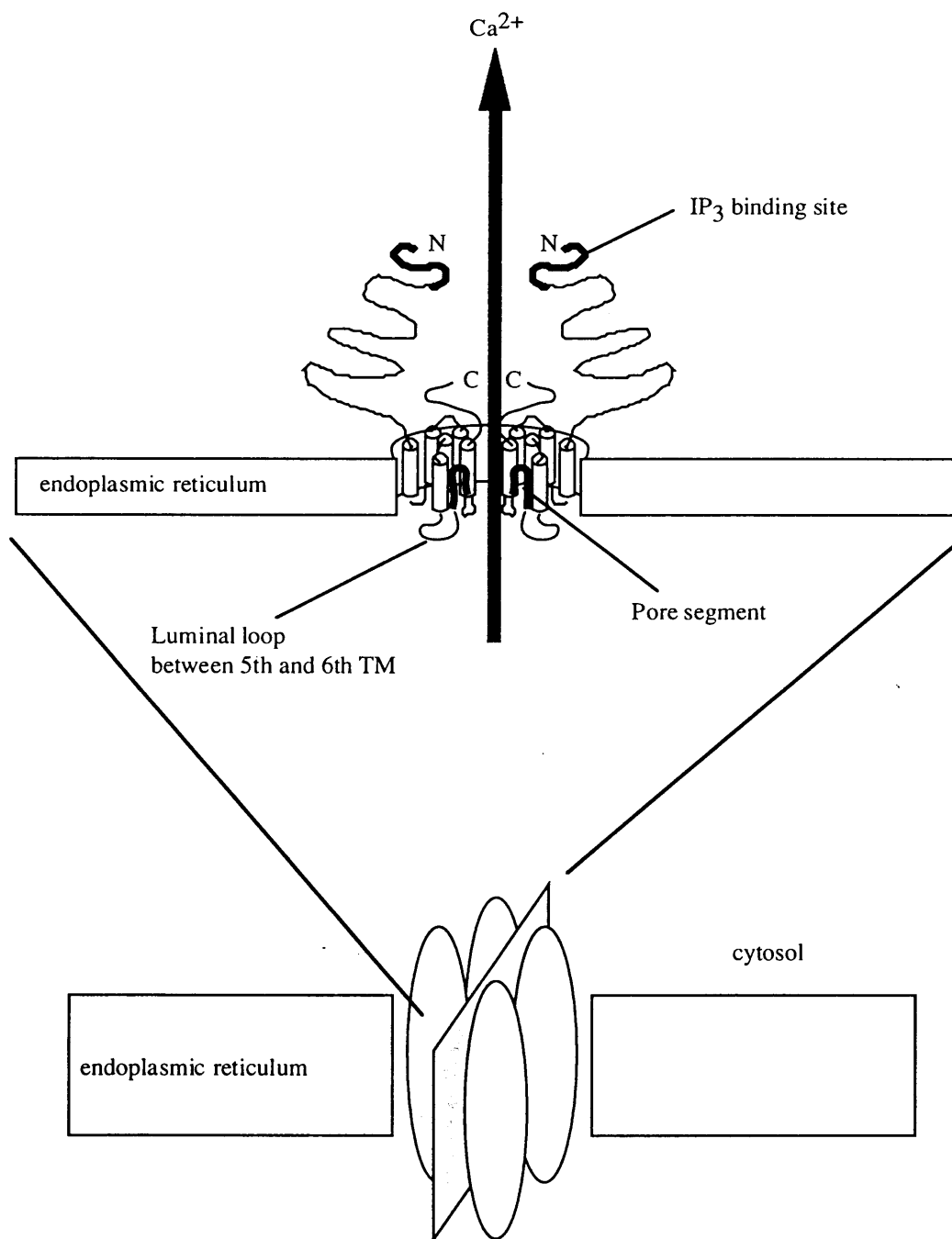


Fig. 1-3 IP₃受容体タンパク質の膜貫通立体構造の模式図

IP₃受容体は4量体として1つのチャンネルを形成する。第5と第6膜貫通領域の間にチャンネルポアを形成するアミノ酸配列があると推定されている。アミノ末端とカルボキシル末端の両方とも細胞質に配向していると考えられている。(Mikoshiya, 1997. の図を引用改変)

の膜貫通領域があり、4量体で存在する)と膜貫通領域に部分的に相同性があるものの、他の細胞膜上の電位依存性Ca²⁺チャンネルなどとは相同性がないことが示されている(Furuichi et al., 1989)。IP₃受容体タンパク質の構造の特異性は、機能の特異性に関係していると考えられている。

ラット(Mignery et al., 1990)、ショウジョウバエ(Yoshikawa et al., 1992)、アフリカツメガエル(Kume et al., 1993)などの他の生物種のIP₃受容体cDNAがクローニングされた結果、IP₃結合領域や膜貫通領域などの基本的なアミノ酸配列は生物種間で保存していることが示された。一方、ヒトに関しては部分配列がクローニングされているにすぎず(Sudhof et al., 1991)、全体構造はわかっていなかった。しかし次節で示すように、筆者らの解析の結果、報告されている上記のIP₃受容体cDNAとは異なる構造のIP₃受容体cDNAが存在することがわかってきていた(Yamamoto-Hino et al., 1994)。

1-3 多様な分子構造を持つイノシトール1,4,5-三リン酸受容体

IP₃受容体にはスプライシングの異なるmRNA変異体が存在することがわかっている(Nakagawa et al., 1991a, Nakagawa et al., 1991b, Danoff et al., 1991)。さらに後述するようにサブタイプも存在することがわかってきている。したがって分子構造の異なる、様々なIP₃受容体タンパク質が存在すると考えられている。

マウスIP₃受容体の解析から、IP₃受容体はスプライシングの違いによって数種類存在することが示されている(Fig. 1-2)。SI, SIIと呼ばれる2つの領域がスプライシングに関与する部位で(Nakagawa et al., 1991a, Nakagawa et al., 1991b)、SIはIP₃結合領域内にある45塩基配列である。SIIは制御領域にある120塩基配列で、さらに内部で3つのスプライシング部位(A, B, C)があり、SII⁺, SII^B, SII(BC), SII⁻の各スプライシング変異体がある。これらすべてのスプライシング変異体は中枢神経組織に存在するが、末梢組織では、SII領域を持たないスプライシング変異体のみが存在することが知られている。

筆者らはマウス IP_3 受容体 cDNA のヒトのホモログを得る目的で、マウス IP_3 受容体 cDNA をプローブにしてヒトの cDNA クローニング解析を行ってきた。その過程で、マウス IP_3 受容体 cDNA のヒトホモログと考えられる cDNA クローンの他に (Yamada et al., 1994)、部分的に塩基配列の異なる cDNA クローンを 2 種類発見した (Yamamoto-Hino et al., 1994)。それらの cDNA の全長の塩基配列を解析した結果、マウス IP_3 受容体 cDNA のヒトホモログとも異なる新しいサブタイプであることを明らかにした。筆者らの研究と前後してラットやマウスからも新しいタイプの IP_3 受容体が異なる遺伝子として存在することが報告され (Sudhof et al., 1991, Blondel et al., 1993)、最初に cDNA クローニングされたマウス IP_3 受容体は IP_3 受容体タイプ 1 と名称が変わった。そして筆者らが新しく cDNA クローニングした IP_3 受容体サブタイプは、 IP_3 受容体タイプ 2 と IP_3 受容体タイプ 3 と命名された (Fig. 1-4)。 IP_3 受容体タイプ 2 は 2701 アミノ酸をコードする約 10 kb の mRNA からなる。 IP_3 受容体タイプ 3 は 2671 アミノ酸をコードする約 10 kb の mRNA からなる。4 つ目のサブタイプがあることを示唆する報告があるが (Ross et al., 1992, De Smedt et al., 1994)、その全長の塩基配列は明らかとなっていない。したがって IP_3 受容体は、すくなくとも 3 つのサブタイプが存在することが明らかとなっている。

IP_3 受容体タイプ 2 はタイプ 1 と 69% のアミノ酸相同性がある。 IP_3 受容体タイプ 3 はタイプ 1、タイプ 2 とそれぞれ 62%、65% のアミノ酸配列相同性がある。 IP_3 結合領域と膜貫通領域はサブタイプ間で高い相同性を示し、それぞれ 72-74%、および 69-75% であることが示されている。また機能に関しては、 IP_3 結合の親和性が IP_3 受容体タイプ 1 よりもタイプ 2 の方が高いことが示されている (Sudhof et al., 1991)。

1-4 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の活性を制御する分子

IP_3 受容体は Ca^{2+} によっても Ca^{2+} 動員の活性が制御されるのが特徴である (Iino and Endo, 1992)。 Ca^{2+} に対してベル型の Ca^{2+} 放出活性曲線を示し、100-300 nM の

1	hIP3R2	MTEKMSFLYIGDIV	SLYAEGSVNGFI STL	GLVDDR CVVHPEAGD	LANPPKKFRDCLFKV	CFMNRYSAQKQYWKA	KQAKQGN--HTEAAL	88
2	rIP3R2	MSDKMSSFLYIGDIV	SLYAEGSVNGFI STL	GLVDDR CVVHPEAGD	LNNPPKKFRDCLFKV	CFMNRYSAQKQYWKA	KQAKQGN--HTEAAL	88
3	hIP3R1	MSDKMSSFLHIGDIC	SLYAEGSTNGFI STL	GLVDDR CVVQPETGD	LNNPPKKFRDCLFKL	CFMNRYSAQKQFWKA	AKPGANS--TTDAVL	88
4	rIP3R1	MSDKMSSFLHIGDIC	SLYAEGSTNGFI STL	GLVDDR CVVQPEAGD	LNNPPKKFRDCLFKL	CFMNRYSAQKQFWKA	AKPGANS--TTDAVL	88
5	mIP3R1	MSDKMSSFLHIGDIC	SLYAEGSTNGFI STL	GLVDDR CVVQPEAGD	LNNPPKKFRDCLFKL	CFMNRYSAQKQFWKA	AKPGANS--TTDAVL	88
6	hIP3R3	-MSEMSFLHIGDIV	SLYAEGSVNGFI STL	GLVDDR CVVEPAAGD	LNNPPKKFRDCLFKV	CFMNRYSAQKQYWKA	KQTQKDKELADVVL	89
7	rIP3R3	-MNEMSFLHIGDIV	SLYAEGSVNGFI STL	GLVDDR CVVEPAAGD	LNNPPKKFRDCLFKV	CFMNRYSAQKQYWKA	KQTQKDKELADVVL	89
1	hIP3R2	LKKLQHAEELEKQKN	ESENRKLGEIVKYS	NVIQLLHKSNNKYL	VNKRLLPALLEKNAMR	VSLDAAGNEGSWFYI	HPFWKLRSEGDNI VV	178
2	rIP3R2	LKKLQHAEELEKQKN	ESENRKLGEIVKYS	KVIQLLHKSNNKYL	VNKRLLPALLEKNAMR	VSLDAAGNEGSWFYI	HPFWKLRSEGDNI VV	178
3	hIP3R1	LNNLHHAADLEKQKN	ETENRKLGTVIQYG	NVIQLLHKSNNKYL	VNKRLLPALLEKNAMR	VTLD EAGNEGSWFYI	QPFYKLRSGDSVVI	178
4	rIP3R1	LNNLHHAADLEKQKN	ETENRKLGTVIQYG	NVIQLLHKSNNKYL	VNKRLLPALLEKNAMR	VTLD EAGNEGSWFYI	QPFYKLRSGDSVVI	178
5	mIP3R1	LNNLHHAADLEKQKN	ETENRKLGTVIQYG	NVIQLLHKSNNKYL	VNKRLLPALLEKNAMR	VTLD EAGNEGSWFYI	QPFYKLRSGDSVVI	178
6	hIP3R3	LQKLQHAHQMEKQKN	DTENKKVHGDVVKYG	SVIQLLHKSNNKYL	VNKRLLPALLEKNAMR	VTLDATGNEGSWLF I	QPFWKLRSNGDNV VV	179
7	rIP3R3	LQKLQHAHQMEKQKN	DTENKKVHGDVVKYG	SVIQLLHKSNNKYL	VNKRLLPALLEKNAMR	VTLDATGNEGSWLF I	QPFWKLRSNGDNV VV	179
1	hIP3R2	GDKVVLMPVNAQQPL	HASNIELLDNPGCKE	VNAVNCNTSWK I TLF	MKYSSYREDVLKGGD	VVRLFHAEQEKFLTC	DEYEKKQHIFLRTTL	268
2	rIP3R2	GDKVVLMPVNAQQPL	HASNVVELLDNPGCKE	VNAVNCNTSWK I TLF	MKFSSYREDVLKGGD	VVRLFHAEQEKFLTC	DDYEKKQHIFLRTTL	268
3	hIP3R1	GDKVVLMPVNAQQPL	HASSHQLVDPGCKE	VNSVNCNTSWK I VLF	MKWSDNKDDILKGGD	VVRLFHAEQEKFLTC	DEHRKQHVFLRTTG	268
4	rIP3R1	GDKVVLMPVNAQQPL	HASSHQLVDPGCKE	VNSVNCNTSWK I VLF	MKWSDNKDDILKGGD	VVRLFHAEQEKFLTC	DEHRKQHVFLRTTG	268
5	mIP3R1	GDKVVLMPVNAQQPL	HASSHQLVDPGCKE	VNSVNCNTSWK I VLF	MKWSDNKDDILKGGD	VVRLFHAEQEKFLTC	DEHRKQHVFLRTTG	268
6	hIP3R3	GDKVILMPVNAQQPL	HASNYELSDNAGCKE	VNSVNCNTSWK I NLF	MQFRDHL EEVLKGGD	VVRLFHAEQEKFLTC	DEYKGLQVFLRTTL	269
7	rIP3R3	GDKVILMPVNAQQPL	HASNYELSDNAGCKE	VNSVNCNTSWK I NLF	MQFRDHL EEVLKGGD	VVRLFHAEQEKFLTC	DEYKGLQVFLRTTL	269
1	hIP3R2	RQSATSATSSKALWE	IEVVHHDPCRGAGQ	WNSLFRFKHLATGNY	LAELNPDYRDAQNE	GK-NVRDGV PPTSCK	KRQAGEKI MYTLVSV	357
2	rIP3R2	RQSATSATSSKALWE	IEVVHHDPCRGAGQ	WNSLFRFKHLATGNY	LAELNPDYRDAQNE	GK-TVRDGL PTSCK	KHQAGEKI MYTLVSV	357
3	hIP3R1	RQSATSATSSKALWE	VEVVQHDPCRGAGY	WNSLFRFKHLATGNY	LAAEVD-----	-----PDQDASRSR	LRNAQEKMYVLSVSV	343
4	rIP3R1	RQSATSATSSKALWE	VEVVQHDPCRGAGY	WNSLFRFKHLATGNY	LAAEVDPDFE EECLE	FQPSVDPDQDASRSR	LRNAQEKMYVLSVSV	358
5	mIP3R1	RQSATSATSSKALWE	VEVVQHDPCRGAGY	WNSLFRFKHLATGNY	LAAEVDPDFE EECLE	FQPSVDPDQDASRSR	LRNAQEKMYVLSVSV	358
6	hIP3R3	RQSATSATSSNALWE	VEVVHHDPCRGAGH	WNGLYR FKHLATGNY	LAAEENPSYKGDASD	PK--AAGMG AQGRTG	RRNAGEKI KYCLVAV	357
7	rIP3R3	RQSATSATSSNALWE	VEVVHHDPCRGAGH	WNGLYR FKHLATGNY	LAAEENPSYKGDVSD	PK--AAGPGAQSRGT	RRNAGEKI KYCLVAV	357
1	hIP3R2	PHGNDIASLFELDAT	TLQRADCLVPRNSYV	RLRHLCNTMVTST	IPIDTDEERP VMLKI	GTCQTKEDKEAF AI V	SVPLSEVRDLDFAND	447
2	rIP3R2	PHGNDIASLFELDAT	TLQRADCLVPRNSYV	RLRHLCNTMVTST	IPIDTDEERP VMLKI	GTCQTKEDKEAF AI V	CVPLSEVRDLDFAND	447
3	hIP3R1	PEGNDISSIFELDP T	TLRGGDSLVPNSYV	RLRHLCNTMVTST	IPIDKEEEKP VMLKI	GTSPLKEDKEAF AI V	PVS PAEVRDLDFAND	448
4	rIP3R1	PEGNDISSIFELDP T	TLRGGDSLVPNSYV	RLRHLCNTMVTST	IPIDKEEEKP VMLKI	GTSPLKEDKEAF AI V	PVS PAEVRDLDFAND	448
5	mIP3R1	PEGNDISSIFELDP T	TLRGGDSLVPNSYV	RLRHLCNTMVTST	IPIDKEEEKP VMLKI	GTSPLKEDKEAF AI V	PVS PAEVRDLDFAND	448
6	hIP3R3	PHGNDIASLFELDP T	TLQKTDVFPNSYV	RLRHLCNTMVIQSTN	PIEDI DEERP IRLML	GTCPTKEDKEAF AI V	SVPVSEIRDLDFAND	447
7	rIP3R3	PHGNDIASLFELDP T	TLQKTDVFPNSYV	RLRHLCNTMVIQSTN	APIDVDEERP IRLML	GTCPTKEDKEAF AI V	SVPVSEIRDLDFAND	447
1	hIP3R2	ANKVLATTVKKLENG	TI TQNERRFVTKLLE	DLIFFVADV PNNQGE	VLDVVI TKNRERQK	LMREQNILAQVFGIL	KAPFKEKAGEGSM LR	537
2	rIP3R2	ANKVLATTVKKLENG	SITQNERRFVTKLLE	DLIFFVADV PNNQGD	VLDVVI TKNRERQK	LMREQNILAQVFGIL	KAPFKEKAGEGSM LR	537
3	hIP3R1	ASKVLGSIAGKLENG	TI TQNERRSVTKLLE	DLVYFVTGGTNSGQD	VLEVVF SKPNRERQK	LMREQNILKQIFKLL	QAPPTDCG-DGFM LR	522
4	rIP3R1	ASKVLGSIAGKLENG	TI TQNERRSVTKLLE	DLVYFVTGGTNSGQD	VLEVVF SKPNRERQK	LMREQNILKQIFKLL	QAPPTDCG-DGFM LR	537
5	mIP3R1	ASKVLGSIAGKLENG	TI TQNERRSVTKLLE	DLVYFVTGGTNSGQD	VLEVVF SKPNRERQK	LMREQNILKQIFKLL	QAPPTDCG-DGFM LR	537
6	hIP3R3	ASSMLASAVEKLN EG	FISQNDRRFVIQ LLE	DLVYFVSDVPNNQGN	VLDIMVTKNRERQK	LMREQNILKQVFGIL	KAPFREKAGEG PLVR	537
7	rIP3R3	ASSMLASAVEKLN EG	FISQNDRRFVIQ LLE	DLVYFVSDVPNNQGN	VLDIMVTKNRERQK	LMRDENILKQIFGIL	KAPFRDKEGGE PLVR	537
1	hIP3R2	LEDLGDQR YAPYKYM	LRLCYRVL RSHSQDQY	RKNQ EYIAKQFCVMQ	SQIGYDILAEDTITP	LLHNNRKLLEKHITA	KEIETFVSLRRNRE	627
2	rIP3R2	LEDLGDQR YAPYKYV	LRLCYRVL RSHSQDQY	RKNQ EYIAKQFCVMQ	SQIGYDILAEDTITA	LLHNNRKLLEKHITA	KEIETFVSLRRNRE	627
3	hIP3R1	LEELGDQRHAPFRHI	CRLCYRVL RSHSQDQY	RKNQ EYIAKQFGFMQ	KQIGYDVLAEEDTITA	LLHNNRKLLEKHITA	AEI DTFVSLVRKNRE	612
4	rIP3R1	LEELGDQRHAPFRHI	CRLCYRVL RSHSQDQY	RKNQ EYIAKQFGFMQ	KQIGYDVLAEEDTITA	LLHNNRKLLEKHITA	AEI DTFVSLVRKNRE	627
5	mIP3R1	LEELGDQRHAPFRHI	CRLCYRVL RSHSQDQY	RKNQ EYIAKQFGFMQ	KQIGYDVLAEEDTITA	LLHNNRKLLEKHITA	AEI DTFVSLVRKNRE	627
6	hIP3R3	LEELSQQNAPYQHM	FRLCYRVL RSHSQEDY	RKNQ EYIAKQFGMMQ	SQIGYDILAEDTITA	LLHNNRKLLEKHITK	TEVETFVSLVRKNRE	627
7	rIP3R3	LEELSQQNAPYQHM	FRLCYRVL RSHSQEDY	RKNQ EYIAKQFGMMQ	SQIGYDILAEDTITA	LLHNNRKLLEKHITK	TEVETFVSLVRKNRE	627
1	hIP3R2	PRFLDYLSDLVCSNT	TAIPVTQELICKF ML	SPGNAD ILIQT KVVS	MQADNPMESI----	LSDDIDDEEVWLYWI	DSNKEPHGKAI RHLA	713
2	rIP3R2	PRFLDYLSDLVCSNS	TAIPVTQELICKF ML	SPGNAD ILIQT KLVS	MQVENPMESI----	LPDDIDDEEVWLYWI	DSNKEPHGKAI RHLA	713
3	hIP3R1	PRFLDYLSDLVCSNM	KSIPVTQELICKAVL	NPTNAD ILIETKLVL	SRFEFEGVSTGENA	LEAG EDEEEVWLFWR	DSNKEIRS KSVRELA	702
4	rIP3R1	PRFLDYLSDLVCSNM	KSIPVTQELICKAVL	NPTNAD ILIETKLVL	SRFEFEGVSTG-ENA	LEAG EDEEEVWLFWR	DSNKEIRS KSVRELA	716
5	mIP3R1	PRFLDYLSDLVCSNM	KSIPVTQELICKAVL	NPTNAD ILIETKLVL	SRFEFEGVSTG-ENA	LEAG EDEEEVWLFWR	DSNKEIRS KSVRELA	716
6	hIP3R3	PRFLDYLSDLVCSNH	IAIPVTQELICKCVL	DPKNSD ILIETELRP	VKEMAQSHEYLS---	IEYSEEEVWLTWT	DRNNEHHEKSVRQLA	712
7	rIP3R3	PRFLDYLSDLVCSNR	IAIPVTQELICKCVL	DPKNSD ILIETELRP	VKEMAQSHEYLS---	IEYSEEEVWLTWT	DRNNEHHEKSVRQLA	712
1	hIP3R2	QEAKEGTKADLEVL T	YYRYQLNLFARMCLD	RQYLAINIQTSLSV	DLILRCVSD ESLPFD	LRASFCLRLMLHMHD	RDPQESVVPVRYARL	803
2	rIP3R2	QEAKEGTKADLEVL T	YYRYQLNLFARMCLD	RQYLAINIQTSLSV	DLILRCVSD ESLPFD	LRASFCLRLMLHMHD	RDPQESVVPVRYARL	803
3	hIP3R1	QDAKEGQKEDRDVLS	YYRYQLNLFARMCLD	RQYLAINIETSGQLDV	DLILRCMSDENL PYD	LRASFCLRLMLHMHD	RDPQEQVT PVKYARL	792
4	rIP3R1	QDAKEGQKEDRDVLS	YYRYQLNLFARMCLD	RQYLAINIETSGQLDV	DLILRCMSDENL PYD	LRASFCLRLMLHMHD	RDPQEQVT PVKYARL	806
5	mIP3R1	QDAKEGQKEDRDVLS	YYRYQLNLFARMCLD	RQYLAINIETSGQLDV	DLILRCMSDENL PYD	LRASFCLRLMLHMHD	RDPQEQVT PVKYARL	806
6	hIP3R3	QEARAGNAHDENVLS	YYRYQLKLFARMCLD	RQYLAI DEISQQLGV	DLIFLCMADEMLPFD	LRASFCHLMHLHVHD	RDPQELVT PVKFA RL	802
7	rIP3R3	QEARAGNAHDENVLS	YYRYQLKLFARMCLD	RQYLAI DEISQQLGV	ELLFLCMADEMLPFD	LRASFCHLMHLHVHD	RDPQELVT PVKFA RL	802
1	hIP3R2	WTEIPTKI TIHEYDS	ITDSSRN DMKRKFAL	TMEFVEYLKEVNVQ	PPFFGDKEKNKLTFE	VVHLARNLI YFGFYS	FSELLRLRTRLLA IL	893
2	rIP3R2	WTEIPTKI TIHEYDS	ITDSSRN DMKRKFAL	TMEFVEYLKEVNVQ	PPFFGDKEKNKLTFE	VVHLARNLI YFGFYS	FSELLRLRTRLLA IL	893
3	hIP3R1	WSEIPSEIAIDDYDS	SG-ASKDEIKERFAQ	TMEFVEYLDRVVCQ	RFFFS DKEKNKLTFE	VVNLARNLI YFGFYN	FSDLLRLTKILLA IL	881
4	rIP3R1	WSEIPSEIAIDDYDS	SG-ASKDEIKERFAQ	TMEFVEYLDRVVCQ	RFFFS DKEKNKLTFE	VVNLARNLI YFGFYN	FSDLLRLTKILLA IL	895
5	mIP3R1	WSEIPSEIAIDDYDS	SG-ASKDEIKERFAQ	TMEFVEYLDRVVCQ	RFFFS DKEKNKLTFE	VVNLARNLI YFGFYN	FSDLLRLTKILLA IL	895
6	hIP3R3	WTEIPTAI TIKDYDS	NLNASRDDKKNK FAN	TMEFVEDYLANNVSE	AVPFANEKKNKLTFE	VVSLAHNLI YFGFYS	FSELLRLRTRLLG II	892
7	rIP3R3	WTEIPTAI TIKDYDS	NLNASRDDKKNK FAS	TMEFVEDYLANNVGE	AVPFANDEKKNKLTFE	VVSLAHNLI YFGFYS	FSELLRLRTRLLG II	892

Fig. 1-4 IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3のアミノ酸アライメント
hIP3R1: human IP₃受容体タイプ1。hIP3R2: human IP₃受容体タイプ2。hIP3R3: human IP₃受容体タイプ3。rIP3R1: rat IP₃受容体タイプ1。rIP3R2: rat IP₃受容体タイプ2。rIP3R3: rat IP₃受容体タイプ3。mIP3R1: mouse IP₃受容体タイプ1。hIP3R2とhIP3R3は筆者らがクローニングした。M1～M6: 推定膜貫通領域。ATP: 推定ATP結合部位。N-gly: 推定N-glycosylation部位。

1	hIP3R2	DIVQAPMSYFERLS	KFQDG-GNNVMRTIH	GVGEMMTQMVLSR--	GSIFPMSVDPVPSI	HPSKQGSPTHEEDVT	VMDTKLKI IEILQFI	980
2	rIP3R2	DIVQAPMSYFERLS	KFQDG-SNNVMRTIH	GVGEMMTQMVLSR--	GSIFPMSVDPVPSI	HPSKQASPGQEDVT	VMDTKLKI IEILQFI	980
3	hIP3R1	DCVHVTTI FPI SKMA	KG EENKGSNMVRSIH	GVGELMTQVVLRG--	GGFLPMTMAAAPEG	N--VKQAEPEKEDIH	VMDTKLKI IEILQFI	967
4	rIP3R1	DCVHVTTI FPI SKMT	KG EENKGSNMVRSIH	GVGELMTQVVLRG--	GGFLPMTMAAAPEG	N--VKQAEPEKEDIH	VMDTKLKI IEILQFI	981
5	mIP3R1	DCVHVTTI FPI SKMT	KG EENKGSNMVRSIH	GVGELMTQVVLRG--	GGFLPMTMAAAPEG	N--VKQAEPEKEDIH	VMDTKLKI IEILQFI	981
6	hIP3R3	DCVQVPPAMLQAYED	PGGKN---VRRSIQ	GVGHMMSTMVLSRQ	SVFSA PLSL SAGASAA	EPLDRSKF ENEEDIV	VME TKLKI LEILQFI	978
7	rIP3R3	DCVQAPAAVLQAYEE	PGGKN---VRRSIQ	GVGHMMSTMVLSRQ	SVFGASSLPTGVGV	EQLDRSKFENEHTV	VME TKLKI LEILQFI	978
1	hIP3R2	LSVRLDYR ISYMLSI	YKKEFGENDGNAPS	ASGSPDTELLPS--AI	VPDIDEIAAQAEATMF	AGRKEKNPVQLDDEG	GRTFLRVL IHLIMHD	1068
2	rIP3R2	LSVRLDYR ISYMLSI	YKKEFGENDGNAPS	ASGTPETLLPS--AL	VPDIDEIAAQAEATMF	AGRKEKTPVQLDDEG	GRTFLRVL IHLIMHD	1068
3	hIP3R1	LNVRLDYR ISCLLCI	FKREFDESNSQTSSET	SSGNSSQEGPSNVPG	ALDFEHEIEEQABGIF	GGSEENTPLDLDDHG	GRTFLRVL LHLIMHD	1057
4	rIP3R1	LNVRLDYR ISCLLCI	FKREFDESNSQTSSET	SSGNSSQEGPSNVPG	ALDFEHEIEEQABGIF	GGSEENTPLDLDDHG	GRTFLRVL LHLIMHD	1071
5	mIP3R1	LNVRLDYR ISCLLCI	FKREFDESNSQTSSET	SSGNSSQEGPSNVPG	ALDFEHEIEEQABGIF	GGSEENTPLDLDDHG	GRTFLRVL LHLIMHD	1071
6	hIP3R3	LNVRLDYR ISHLLSV	FKKEFVEVFPMDQSG	ADGTAPAFDST--TA	NMNLDRIGEQAEMF	GVGKTSSMLEVDDEG	GRMFLRVL IHLIMHD	1066
7	rIP3R3	LNVRLDYR ISYLLSV	FKKEFVEVFPMDQSG	ADGTAPAFDSS--TA	NMNLDRIGEQAEMF	GVGKTSSMLEVDDEG	GRMFLRVL LHLIMHD	1066
1	hIP3R2	YAPLLSALQQLLKH	FSQRAEVLQAFKQVQ	LLVSNQDQVDNYKQIK	ADLDQLRLTV EKSEL	WVEKSSNYENGEIGE	SQVKGGE EPIESNI	1158
2	rIP3R2	YAPLLSALQQLLKH	FSQRAEVLQAFKQVQ	LLVSNQDQVDNYKQIK	ADLDQLRLTV EKSEL	WVEKSSNYENGEIGE	GQA KGGEE ANEENL	1158
3	hIP3R1	YPLVLSGALQQLLKH	FSQRAEVLQAFKQVQ	LLVTSQDQVDNYKQIK	QDLQLRSIV EKSEL	WVYK-----GQ	GPDETMDSAGSEN EH	1138
4	rIP3R1	YPLVLSGALQQLLKH	FSQRAEVLQAFKQVQ	LLVTSQDQVDNYKQIK	QDLQLRSIV EKSEL	WVYK-----GQ	GPDETMDSAGSEN EH	1152
5	mIP3R1	YPLVLSGALQQLLKH	FSQRAEVLQAFKQVQ	LLVTSQDQVDNYKQIK	QDLQLRSIV EKSEL	WVYK-----GQ	GPDETMDSAGSEN EH	1152
6	hIP3R3	YAPLLSALQQLLKH	FSQRAEVLQAFKQVQ	LLVTSQDQVDNYKQIK	QDLQLRSIV EKSEL	WVYK-----GQ	GPDETMDSAGSEN EH	1152
7	rIP3R3	YAPLLSALQQLLKH	FSQRAEVLQAFKQVQ	LLVTSQDQVDNYKQIK	QDLQLRSIV EKSEL	WVYK-----GQ	GPDETMDSAGSEN EH	1152
1	hIP3R2	LSPVQDGT KKPQIDS	NKSNKYR IVKEILIR	LSKLCVQN---KCC	RNQHQRLLNKMGHNS	VVLDLQIPYEKND	-KMNEVM LAHTFLQ	1243
2	rIP3R2	LSPVQDGT KKPQIDS	NKSNKYR IVKEILIR	LSKLCVQN---KCC	RNQHQRLLNKMGHNS	VVLDLQIPYEKND	-KMNEVM LAHTFLQ	1243
3	hIP3R1	KKT EBGNKPKQKHES	TS SYNYR VVKEILIR	LSKLCVQESASVRKS	RKQQORLLRNMGHAH	VVLELLQIPYEKAED	TKMQEIMR LAHEFLQ	1228
4	rIP3R1	KKT EBGTSKPKLKHES	TS SYNYR VVKEILIR	LSKLCVQESASVRKS	RKQQORLLRNMGHAH	VVLELLQIPYEKAED	TKMQEIMR LAHEFLQ	1242
5	mIP3R1	KKT EBGTSKPKLKHES	TS SYNYR VVKEILIR	LSKLCVQESASVRKS	RKQQORLLRNMGHAH	VVLELLQIPYEKAED	TKMQEIMR LAHEFLQ	1242
6	hIP3R3	ERPTEDEEFLHPGGE	KSSENYQ IVKGI LER	LNKMCQVG---EQM	RKKQORLLRNMDAHK	VVLDLQIPYDKGDA	-KMEILR YTHQFLQ	1233
7	rIP3R3	ERPSTDEEFLQHPGGE	KSSENYQ IVKGI LER	LNKMCQVG---EQM	RKKQORLLRNMDAHK	VVLDLQIPYDKGDA	-KMEILR YTHQFLQ	1233
1	hIP3R2	NFCRGNPNQVLLKH	HLNLFPLG LLEAET	MRHIFMNNYHL CNEI	SERVVQHFVHCIE TH	GRHVYLRFLQITV K	ADGKYVKKQDQVMVT	1333
2	rIP3R2	NFCRGNPNQVLLKH	HLNLFPLG LLEAET	MRHIFMNNYHL CNEI	SERVVQHFVHCIE TH	GRHVYLRFLQITV K	ADGKYVKKQDQVMVT	1333
3	hIP3R1	NFCAGNQNQALLHK	HINLFLNPGILEAVT	MQHIFMNNYHL CSEI	NERVVQHFVHCIE TH	GRNVQYIKFLQITV K	ABGKFIKKQDQVMVA	1318
4	rIP3R1	NFCAGNQNQALLHK	HINLFLNPGILEAVT	MQHIFMNNYHL CSEI	NERVVQHFVHCIE TH	GRNVQYIKFLQITV K	ABGKFIKKQDQVMVA	1332
5	mIP3R1	NFCAGNQNQALLHK	HINLFLNPGILEAVT	MQHIFMNNYHL CSEI	NERVVQHFVHCIE TH	GRNVQYIKFLQITV K	ABGKFIKKQDQVMVA	1332
6	hIP3R3	KFCAGNQNQALLHK	HLNLFPLG LLEAET	MQHIFMNNYHL CSEI	SEPVLFVHLLATH	GRHVQYLDLHTVI K	ABGKYVKKQDQMI MT	1323
7	rIP3R3	KFCAGNQNQALLHK	HLNLFPLG LLEAET	MQHIFMNNYHL CSEI	SEPVLFVHLLATH	GRHVQYLDLHTVI K	ABGKYVKKQDQMI MT	1323
1	hIP3R2	ELINGGEDVLI FYND	RASFPILLHMMCSER	DRGDESG-PLAYHIT	LVELLAACTEGKNVY	TEIKCNLSLPLDDIV	RVVTHDDC IPEVKIA	1422
2	rIP3R2	ELINGGEDVLI FYND	RASFPILLHMMCSER	ARGDESG-PLAYHIT	LVELLAACTEGKNVY	TEIKCNLSLPLDDIV	RVVTHDDC IPEVKIA	1422
3	hIP3R1	ELVNSGDEVLFVYND	RASFQTLIQMRRSER	DRMDENS-PLMYHIH	LVELLAACTEGKNVY	TEIKCNLSLPLDDIV	RVVTHDDC IPEVKIA	1407
4	rIP3R1	ELVNSGDEVLFVYND	RASFQTLIQMRRSER	DRMDENS-PLMYHIH	LVELLAACTEGKNVY	TEIKCNLSLPLDDIV	RVVTHDDC IPEVKIA	1422
5	mIP3R1	ELVNSGDEVLFVYND	RASFQTLIQMRRSER	DRMDENS-PLMYHIH	LVELLAACTEGKNVY	TEIKCNLSLPLDDIV	RVVTHDDC IPEVKIA	1421
6	hIP3R3	ELTNAGDDVVVYFND	KASLAHL LDMKKAAR	DGVEDHS-PLMYHIH	LVELLAACTEGKNVY	TEIKCNLSLPLEDDV	SVVTHDDC IPEVKMA	1412
7	rIP3R3	ELTNAGDDVVVYFND	KASLAHL LDMKKAAR	DGVEDHS-PLMYHIH	LVELLAACTEGKNVY	TEIKCNLSLPLEDDV	SVVTHDDC IPEVKMA	1412
1	hIP3R2	YVNFVNHCVYDTEVE	MKEIYTSNHMKLFE	NFLVDMARVCNTTDD	RKHADIFLEKCVTES	IMNIVSGFFNSPFS	NSTSLQTHQPVFIQL	1512
2	rIP3R2	YVNFVNHCVYDTEVE	MKEIYTSNHMKLFE	NFLVDMARVCNTTDD	RKHADIFLEKCVTES	IMNIVSGFFNSPFS	NSTSLQTHQPVFIQL	1512
3	hIP3R1	YINFLNHCYVDTEVE	MKEIYTSNHMKLFE	NFLVDICRACNNTSD	RKHADSILEKYVTEI	VMSIVTTFSSPFS	QSTTLQTRQPVFVQL	1497
4	rIP3R1	YINFLNHCYVDTEVE	MKEIYTSNHMKLFE	NFLVDICRACNNTSD	RKHADSILEKYVTEI	VMSIVTTFSSPFS	QSTTLQTRQPVFVQL	1512
5	mIP3R1	YINFLNHCYVDTEVE	MKEIYTSNHMKLFE	NFLVDICRACNNTSD	RKHADSILEKYVTEI	VMSIVTTFSSPFS	QSTTLQTRQPVFVQL	1511
6	hIP3R3	YVNFVNHCVYDTEVE	MKEIYTSNHMKLFE	NFLVDMARVCNKR-E	RKHADPTLEKYVLSV	VLDTINAFSSPFS	NSTSLQTHQITVQL	1501
7	rIP3R3	YVNFVNHCVYDTEVE	MKEIYTSNHMKLFE	NFLVDMALVCNKR-E	RKHADPTLEKYVLSV	VLDTINAFSSPFS	NSTSLQTHQITVQL	1501
1	hIP3R2	LQSAFRIYNTWPNP	AQKASVESCI RTLAE	VAKNRGIAIPVDLDS	QVNTLFMKSHSNMVQ	RAAMGWRLSARSGRP	FKEALGPPAWDYRNI	1602
2	rIP3R2	LQSAFRIYNTWPNP	AQKASVESCI RTLAE	VAKNRGIAIPVDLDS	QVNTLFMKSHSNMVQ	RAAMGWRLSARSGRP	FKEALGPPAWDYRNI	1602
3	hIP3R1	LQGVFRVYHNCMLMP	SQKASVESCI RVLSD	VAKSRAIAIPVDLDS	QVNNLFLKSHS-IVQ	KTAMNWRLSARN-AA	RRDSVLAASRDYRNI	1585
4	rIP3R1	LQGVFRVYHNCMLMP	SQKASVESCI RVLSD	VAKSRAIAIPVDLDS	QVNNLFLKSHS-IVQ	KTAMNWRLSARN-AA	RRDSVLAASRDYRNI	1600
5	mIP3R1	LQGVFRVYHNCMLMP	SQKASVESCI RVLSD	VAKSRAIAIPVDLDS	QVNNLFLKSHS-IVQ	KTAMNWRLSARN-AA	RRDSVLAASRDYRNI	1599
6	hIP3R3	LQSTTRLL ECPWQQ	QHKGSVEACIRTLAM	VAKGRAILLPMDLDA	HISSMLSSGASCAAA	AQRNASSYKATTRA F	PRVPTANQWDYKNI	1591
7	rIP3R3	LQSTTRLL ECPWQQ	QHKGSVEACIRTLAM	VAKSRAILLPMDLDA	HMSALLSSGSSCAAA	AQRSAANYKATTRA F	PRVPTANQWDYKNI	1591
1	hIP3R2	IEKLQDVVASLEHQF	SPMMQAEFSVLVDVL	YSPELLFPEGSDARI	RCG--AFMSKLI NHT	KKLMEK-EKLCIKI	LQTLREMLEKKS FV	1689
2	rIP3R2	IEKLQDVVASLEHQF	SPMMQAEFSVLVDVL	YSPELLFPEGSDARI	RCG--AFMSKLI NHT	KKLMEK-EKLCIKI	LQTLREMLEKKS FM	1689
3	hIP3R1	IERLQDIVSALEDRL	RPLVQAE LSVLVDVL	HRPELLFPENTDARR	KCESGGFICKLIKHT	QKLEENEEKLCKIKV	LQTLREMMTKDRGYG	1675
4	rIP3R1	IERLQDIVSALEDRL	RPLVQAE LSVLVDVL	HRPELLFPENTDARR	KCESGGFICKLIKHT	QKLEENEEKLCKIKV	LQTLREMMTKDRGYG	1690
5	mIP3R1	IERLQDIVSALEDRL	RPLVQAE LSVLVDVL	HRPELLFPENTDARR	KCESGGFICKLIKHT	QKLEENEEKLCKIKV	LQTLREMMTKDRGYG	1689
6	hIP3R3	IEKLQDII TALEERL	KPLVQAE LSVLVDVL	HWPELLFLEGS EAYQ	RCESSGFSLKLIQHT	KDLMES-EKLCIKV	LRTLQQLMLKKT KYG	1680
7	rIP3R3	IEKLQDII TALEERL	KPLVQAE LSVLVDVL	HWPELLFLEGS EAYQ	RCESSGFSLKLIQHT	KDLMES-EKLCIKV	LRTLQQLMLKKT KYG	1680
1	hIP3R2	EE-----	-----	-----GNT	LRKILLNRYFKGDYS	IGVNGHLS---G--	---AYSKTAQVGGGF	1730
2	rIP3R2	EE-----	-----	-----SST	LRKILLNRYFKGDHS	VGUNGPLS---G--	---AYAKTAQVGGGF	1730
3	hIP3R1	EK-----	-----	-----GEA	LRQVLNRYYGNI RFP	SGRR ES LTFGNGPL	SAGGPGK RGGGGG	1725
4	rIP3R1	EKISIDLENAELP	QPEAE-NSTEELEP	SPPLRQLEDHKRGEA	LRQILVNRYYGNI RFP	SGRR ES LTFGNGPL	SPG GPK RGGGGG	1779
5	mIP3R1	EKISIDLENAELP	QPEAE-NSTEELEP	SPPLRQLEDHKRGEA	LRQILVNRYYGNI RFP	SGRR ES LTFGNGPL	SPG GPK RGGGGG	1779
6	hIP3R3	DR-----	-----	-----GNQ	LRKMLLQNYLQNRKS	TSRGLDFP-----	-----	1709
7	rIP3R3	DR-----	-----	-----GNQ	LRKMLLQNYLQNRKS	GPRGELTDP-----	-----	1709
1	hIP3R2	SGQSDKMGISMSDI	QC LLDKEGASELVID	VIVNTKNDRIFSEGI	FLGIALLEGGNTQTQ	YSFYQQLHEQK KSEK	FFKVLVDRMKA AQKE	1820
2	rIP3R2	TGQDADKGTGISMSDI	QC LLDKEGASELVID	VIVNTKNDRIFSEGI	LGIALLEGGNTQTQ	NSFYQQLHEQK KSEK	FFKVLVDRMKA AQKE	1820
3	hIP3R1	GSSMSRGEEMSLAEV	QC HLDKEGASNLVID	LIMNASDRV F HESI	LLAIALLEGGNTTIQ	HSFFCRLTEDK KSEK	FFKVFYDRMKA AQKE	1815
4	rIP3R1	GSSSTSRGEMSLAEV	QC HLDKEGASNLVID	LIMNASDRV F HESI	LLAIALLEGGNTTIQ	HSFFCRLTEDK KSEK	FFKVFYDRMKA AQKE	1869
5	mIP3R1	GSSSTSRGEMSLAEV	QC HLDKEGASNLVID	LIMNASDRV F HESI	LLAIALLEGGNTTIQ	HSFFCRLTEDK KSEK	FFKVFYDRMKA AQKE	1869
6	hIP3R3	IGTGRLDPDWSAIAAT	QCRLDKEGATKLVCD	LITSTKNEKIFQESI	GLA IHLDDGGNTEIQ	KSFHNLMSDKKSER	FFKVLHDMRKA AQKE	1799
7	rIP3R3	TGSGVDQDWSAIAAT	QCRLDKEGATKLVCD	LITSTKNEKIFQESI	GLA IRLDDGGNTEIQ	KSFYNLMSDKKSER	FFKVLHDMRKA AQKE	1799

つづき

1	hIP3R2	IRSTVTVTNTIDLGSK	KRDDDELMTSGPRM	RVRDSTLHLKEGKMG	QLTEASSATS KAYCV	YRREMDPEI DIMCTG	PEAGNTEEKSAEVEV	1910
2	rIP3R2	IRSTVTVTNTIDLGSK	KREEDSDLMALGPRM	RVRDSSLHLKEGKMG	QLTEASSATS KAYCV	YRREMDPI DTMCPG	QEAGSAAEKSAEVEV	1910
3	hIP3R1	IKATVTVTNTSDLGSK	KKDDEVDNRDAPS-RK	KAKEPTTQITEEVRD	QLLEA SAATR KAFPT	FRREADPDHYQP-G	EGTQATADKAKDDLE	1903
4	rIP3R1	IKATVTVTNTSDLGSK	KKDDEVDNRDAPS-RK	KAKEPTTQITEEVRD	QLLEA SAATR KAFPT	FRREADPDHYQS-G	EGTQATADKAKDDLE	1957
5	mIP3R1	IKATVTVTNTSDLGSK	KKDDEVDNRDAPS-RK	KAKEPTTQITEEVRD	QLLEA SAATR KAFPT	FRREADPDHYQS-G	EGTQATADKAKDDLE	1957
6	hIP3R3	TKSTVAVNMNDLGSQ	PHED-----R	EP-VDPTT-----	-----KG---RVAS	FSIPGSSSR YSLGSP	LRRGHEVSE RVQSSSE	1862
7	rIP3R3	TKSTVAVNMNDLGSQ	PRED-----R	EP-ADPTT-----	-----KG---RVSS	FSMP-SSSR YSLGSP	LRRGHDVSE RAKQNE	1861
ATP								
1	hIP3R2	MSPAIAITMOPILRFL	QLLCENHNRELQNF	RNQNNKTNYNLCVET	LQFLDCICGS TTGGL	GLLGLYLINEKNVALV	NQNLESLETCYCGPC	2000
2	rIP3R2	MSPAITIMRPIILRFL	QLLCENHNRELQNF	RNQNNKTNYNLCVET	LQFLDCICGS TTGGL	GLLGLYLINEKNVALV	NQTLESLETCYCGPC	2000
3	hIP3R1	MSAVITIMOPILRFL	QLLCENHNRELQNF	RQNNKTNYNLCVET	LQFLDCICGS TTGGL	GLLGLYLINEKNVALI	NQTLESLETCYCGPC	1993
4	rIP3R1	MSAVITIMOPILRFL	QLLCENHNRELQNF	RQNNKTNYNLCVET	LQFLDCICGS TTGGL	GLLGLYLINEKNVALI	NQTLESLETCYCGPC	2047
5	mIP3R1	MSAVITIMOPILRFL	QLLCENHNRELQNF	RQNNKTNYNLCVET	LQFLDCICGS TTGGL	GLLGLYLINEKNVALI	NQTLESLETCYCGPC	2047
6	hIP3R3	MGTSVLIMOPILRFL	QLLCENHNRELQNF	RQNNKTNYNLCVET	LQFLDCICGS TTGGL	GLLGLYLINEKNVALV	IQTLETLETCYCGPC	1952
7	rIP3R3	MGTSVLIMRPIILRFL	QLLCENHNRELQNF	RQNNKTNYNLCVET	LQFLDCICGS TTGGL	GLLGLYLINEKNVALV	IQTLETLETCYCGPC	1951
M1								
1	hIP3R2	HENQTCIA THESNGI	DI I I A L I L N D I N P L G	KYRMDLV L Q L K N N A S	K L L L A I M E S R H D S E N	A E R I L F N M R P R E L V D	V M K N A Y N Q G L E C D H G	2090
2	rIP3R2	HENQTCIA THESNGI	DI I I A L I L S D I N P L G	KYRMDLV L Q L K N N A S	K L L L A I M E S R H D S E N	A E R I L F N M R P K E L V D	V M K N A Y N Q G L E C N H G	2090
3	hIP3R1	HENQNCIA THESNGI	DI I T A L I L N D I N P L G	K K R M D L V L E L K N N A S	K L L L A I M E S R H D S E N	A E R I L Y N M R P K E L V E	V I K K A Y M Q G E V F E D	2083
4	rIP3R1	HENQNCIA THESNGI	DI I T A L I L N D I N P L G	K K R M D L V L E L K N N A S	K L L L A I M E S R H D S E N	A E R I L Y N M R P K E L V E	V I K K A Y M Q G E V F E D	2137
5	mIP3R1	HENQNCIA THESNGI	DI I T A L I L N D I N P L G	K K R M D L V L E L K N N A S	K L L L A I M E S R H D S E N	A E R I L Y N M R P K E L V E	V I K K A Y M Q G E V F E D	2137
6	hIP3R3	HENQTCIV THESNGI	DI I T A L I L N D I S P L C	K Y R M D L V L Q L K D N A S	K L L L A L M E S R H D S E N	A E R I L I S L R P Q E L V D	V I K K A Y L Q -----E--	2036
7	rIP3R3	HENQTCIV THESNGI	DI I T A L I L N D I S P L C	K Y R M D L V L Q L K D N A S	K L L L A L M E S R H D S E N	A E R I L I S L R P Q E L V D	V I K K A Y L Q -----E--	2035
M2								
1	hIP3R2	DDEGGDDGVSPKDVG	HNIYILAHQLARHNK	LLQQLMKPGSDPEE-	-----	-----G	DEALKYYANHTAQIE	2150
2	rIP3R2	DDEGGDDGVSPKDVG	HNIYILAHQLARHNK	LLQQLMKPGSDPEE-	-----	-----G	DEALKYYANHTAQIE	2150
3	hIP3R1	GENGEDGAASPRNVG	HNIYILAHQLARHNK	ELQSM L K P G G Q V D - -	-----	-----G	DEALEFYAKHTAQIE	2142
4	rIP3R1	GENGEDGAASPRNVG	HNIYILAHQLARHNK	ELQSM L K P G G Q V D - -	-----	-----G	DEALEFYAKHTAQIE	2196
5	mIP3R1	GENGEDGAASPRNVG	HNIYILAHQLARHNK	ELQSM L K P G G Q V D - -	-----	-----G	DEALEFYAKHTAQIE	2196
6	hIP3R3	-EERENSEVSPREVG	HNIYILALQLSRHNK	QLQHL L K P V K R I Q E E	E A E G I S S M L S L N N K Q	L S Q M L K S S A P A Q E E E	E D P L A Y E N H T S Q I E	2125
7	rIP3R3	-EERENSEVSPREVG	HNIYILALQLSRHNK	QLQHL L K P V K R I Q E E	E A E G I S S M L S L N N K Q	L S Q M L K S S A P A Q E E E	E D P L A Y E N H T S Q I E	2124
M3								
1	hIP3R2	IVRHDRTMEQIVFPV	PNICEVLTRESKCRV	FNTERDEQGSKVND	FFQQT EDLYN EMKWQ	KKIRNNPALFWFSRH	ISLWGSISFNLAVFI	2240
2	rIP3R2	IVRHDRTMEQIVFPV	PNICEVLTRESKYRV	FNTERDEQGSKVND	FFQQT EDLYN EMKWQ	KKIRNNPALFWFSRH	ISLWGSISFNLAVFI	2240
3	hIP3R1	IVRLDRTMEQIVFPV	PSICEFLTRESKLRV	YTTTERDEQGSKIND	FFLRS EDLFNEMNWQ	KKLRQPVLWFCARN	MSFWSSISFNLAVLM	2232
4	rIP3R1	IVRLDRTMEQIVFPV	PSICEFLTRESKLRV	YTTTERDEQGSKIND	FFLRS EDLFNEMNWQ	KKLRQPVLWFCARN	MSFWSSISFNLAVLM	2286
5	mIP3R1	IVRLDRTMEQIVFPV	PSICEFLTRESKLRV	YTTTERDEQGSKIND	FFLRS EDLFNEMNWQ	KKLRQPVLWFCARN	MSFWSSISFNLAVLM	2286
6	hIP3R3	IVRQDRSMEQIVFPV	PGICQFLTTEETHRL	FTTTEQDEQGSKVSD	FFDQS SFLHNEMEWQ	RNVRSMPLIYWFSSR	MTLWGSISFNLAVFI	2215
7	rIP3R3	IVRQDRSMEQIVFPV	PAICQFLTTEETHRL	FTTTEQDEQGSKVSD	FFDQS SFLHNEMEWQ	RRLRSMPLIYWFSSR	MTLWGSISFNLAVFI	2214
M4								
1	hIP3R2	NLAVALFYFPFGDDGD	EGTLSPLFSVLLWIA	VAICTSM L F F F S K P V	GIRPFLVSI MLRSIY	TIGLQPTLILGGAAN	LCNKIVFLVSVFVGNR	2330
2	rIP3R2	NLAVALFYFPFGDDGD	EGTLSPLFSVLLWIA	VAICTSM L F F F S K P V	GIRPFLVSI MLRSIY	TIGLQPTLILGGAAN	LCNKIVFLVSVFVGNR	2330
3	hIP3R1	NLLVAFFYPFKGVGR	-GTLEPHWSGLLWTA	MLISLAIIVIALPKFH	GIRAL IASTI LRLIF	SVGLQPTLFLGAFN	VCNKIIFLMSFVGNC	2321
4	rIP3R1	NLLVAFFYPFKGVGR	-GTLEPHWSGLLWTA	MLISLAIIVIALPKFH	GIRAL IASTI LRLIF	SVGLQPTLFLGAFN	VCNKIIFLMSFVGNC	2375
5	mIP3R1	NLLVAFFYPFKGVGR	-GTLEPHWSGLLWTA	MLISLAIIVIALPKFH	GIRAL IASTI LRLIF	SVGLQPTLFLGAFN	VCNKIIFLMSFVGNC	2375
6	hIP3R3	NIIIAFFYPMEGAS	-TGVLDSPILSLLFW	ILICFSIAALPTKRY	SIRPL IVALI LRSIY	YLGIGPTLNIILGALN	LTNKIVFVSVFVGNR	2304
7	rIP3R3	NIIIAFFYPMEGAS	-TGVLDSPILSLLFW	ILICFSIAALPTKRY	SVRPL IVALI LRSIY	YLGIGPTLNIILGALN	LTNKIVFVSVFVGNR	2303
M5								
1	hIP3R2	GTFTRGYRAVILDDMA	FLYHVAYVLVCMGL	FVBEFFYSFLLFDLV	YREETLLNVI KSVTR	NGRS IILTAVLALIL	VYLFISIIGFLFKDD	2420
2	rIP3R2	GTFTRGYRAVILDDMA	FLYHVAYVLVCMGL	FVBEFFYSFLLFDLV	YREETLLNVI KSVTR	NGRS IILTAVLALIL	VYLFISIIGFLFKDD	2420
3	hIP3R1	GTFTRGYRAMVLDVE	FLYBLLYLIVICAMGL	FVBEFFYSFLLFDLV	YREETLLNVI KSVTR	NGRS IILTAVLALIL	VYLFISIVGLYLFKDD	2411
4	rIP3R1	GTFTRGYRAMVLDVE	FLYBLLYLIVICAMGL	FVBEFFYSFLLFDLV	YREETLLNVI KSVTR	NGRS IILTAAALIL	VYLFISIVGLYLFKDD	2465
5	mIP3R1	GTFTRGYRAMVLDVE	FLYBLLYLIVICAMGL	FVBEFFYSFLLFDLV	YREETLLNVI KSVTR	NGRS IILTAVLALIL	VYLFISIVGLYLFKDD	2465
6	hIP3R3	GTFTRGYKAMVMDME	FLYHVGYILTSVLGL	FABELFYSILLFDLI	YREETLFNVI KSVTR	NGRS IILTALLALIL	VYLFISIVGLYLFKDD	2394
7	rIP3R3	GTFTRGYKAMVMDME	FLYHVGYILTSVLGL	FABELFYSILLFDLI	YREETLFNVI KSVTR	NGRS IILTALLALIL	VYLFISIVGLYLFKDD	2393
N-gly								
1	hIP3R2	FTMEVDRLKRTPTVT	GS---HQVPTMTLIT	MMEACA KENCSP T I P	ASNTADEEYEDGIER	TCDTLLMCI VTVLNQ	GLRNGGGVGDVLRKP	2507
2	rIP3R2	FTMEVDRLKRTPTVT	GN---DGVPTMTLIT	MLGTCPKENCSP T I P	SSNAAGEGEGEDGIER	TCDTLLMCI VTVLNQ	GLRNGGGVGDVLRKP	2507
3	hIP3R1	FILVDRLPNETAVP	ETGESLASEFLSDV	CRVSEGCNCS P A P K	EELVPAEETE QDKHE	TCETLLMCI VTVLSH	GLRSGGGVGDVLRKP	2501
4	rIP3R1	FILVDRLPNETAVP	ETGESLANDFLYSDV	CRVETG ENCT S P A P K	EELLPVEETE QDKHE	TCETLLMCI VTVLSH	GLRSGGGVGDVLRKP	2555
5	mIP3R1	FILVDRLPNETAVP	ETGESLANDFLYSDV	CRVETG ENCT S P A P K	EELLPVEETE QDKHE	TCETLLMCI VTVLSH	GLRSGGGVGDVLRKP	2555
6	hIP3R3	FILVDRLPNNHSTA	SPLG-MPHGAAAFVD	TCSGDKMDCVSGVSV	PEVLEEDRELDSTER	ACDTLLMCI VTMVNH	GLRNGGGVGDILRKP	2483
7	rIP3R3	FILVDRLPNNHSTA	STLG-MPHGAAAFMG	TCSGDKMDCVSEVSV	PEILEDEBELDSTER	ACDTLLMCI VTMVNH	GLRNGGGVGDILRKP	2482
M6								
1	hIP3R2	SKDEPLFAARVYVDL	LFFYFVI IIVLNLIF	GVIIDT FADLRSEKQ	KKEEILKTT C FICGL	ERDKFDNKT VSPFEEH	IKSEHNMMWHLVCFIV	2597
2	rIP3R2	SKDEPLFAARVYVDL	LFFYFVI IIVLNLIF	GVIIDT FADLRSEKQ	KKEEILKTT C FICGL	ERDKFDNKT VSPFEEH	IKSEHNMMWHLVCFIV	2597
3	hIP3R1	SKEEPLFAARVIYDL	LFFFYVI IIVLNLIF	GVIIDT FADLRSEKQ	KKEEILKTT C FICGL	ERDKFDNKT VTFEEH	IKSEHNMMWHLVCFIV	2591
4	rIP3R1	SKEEPLFAARVIYDL	LFFFYVI IIVLNLIF	GVIIDT FADLRSEKQ	KKEEILKTT C FICGL	ERDKFDNKT VTFEEH	IKSEHNMMWHLVCFIV	2645
5	mIP3R1	SKEEPLFAARVIYDL	LFFFYVI IIVLNLIF	GVIIDT FADLRSEKQ	KKEEILKTT C FICGL	ERDKFDNKT VTFEEH	IKSEHNMMWHLVCFIV	2645
6	hIP3R3	SKDESLFPAARVYVDL	LFFFYVI IIVLNLIF	GVIIDT FADLRSEKQ	KKEEILKTT C FICGL	ERDKFDNKT VSPFEEH	IKLEHNMMWHLVCFIV	2573
7	rIP3R3	SKDESLFPAARVYVDL	LFFFYVI IIVLNLIF	GVIIDT FADLRSEKQ	KKEEILKTT C FICGL	ERDKFDNKT VSPFEEH	IKLEHNMMWHLVCFIV	2572
M7								
1	hIP3R2	LVKVKDPT EYTGPE	YVAQMIV EKNDWFP	RMRAMSLVSNEGDSE	QNEIRSLQEKLESTM	SLVKQLSGQLAELKE	QMT EQRKRNKQRLGFL	2687
2	rIP3R2	LVKVKDPT EYTGPE	YVAQMITEKNLDWFP	RMRAMSLVSNEGDSE	QNEIRNLQEKLESTM	SLVKQLSGQLAELKE	QMT EQRKRNKQRLGFL	2687
3	hIP3R1	LVKVKDSTEYTGPE	YVAEMIKERNLDWFP	RMRAMSLVSSDSEGE	QNELRNLOEKLESTM	KLVTNLSGQLSELKD	QMT EQRKQKQRIGLL	2681
4	rIP3R1	LVKVKDSTEYTGPE	YVAEMIRERNLDWFP	RMRAMSLVSSDSEGE	QNELRNLOEKLESTM	KLVTNLSGQLSELKD	QMT EQRKQKQRIGLL	2735
5	mIP3R1	LVKVKDSTEYTGPE	YVAEMIRERNLDWFP	RMRAMSLVSSDSEGE	QNELRNLOEKLESTM	KLVTNLSGQLSELKD	QMT EQRKQKQRIGLL	2735
6	hIP3R3	LVRVKNKTDYTGPE	YVAQMIKNKNLDWFP	RMRAMSLVSNEGE	QNEIRILQDKLNSTM	KLVSHLTAQLNELKE	QMT EQRKRQRIGLVFV	2663
7	rIP3R3	LVRVKNKTDYTGPE	YVAQMIKNKNLDWFP	RMRAMSLVSNEGE	QNEIRILQEKLGSTM	KLVSHLTAQLNELKE	QMT EQRKRQRIGLVFV	2662
1	hIP3R2	GSNTPHVNHHMPPH	2701					
2	rIP3R2	GSNTPHENHHMPPH	2701					
3	hIP3R1	GHPPHMNVNPPQPA	2695					
4	rIP3R1	GHPPHMNVNPPQPA	2749					
5	mIP3R1	GHPPHMNVNPPQPA	2749					
6	hIP3R3	DVQNCISR-----	2671					
7	rIP3R3	DVQNCMSR-----	2670					

つづき

Ca²⁺濃度で活性化され、低濃度や高濃度下では抑制的である。すなわち、IP₃の存在下でCa²⁺がIP₃受容体に対する第2のリガンドとして働き、隣接するIP₃受容体に次々に作用してCa²⁺を放出させ、細胞内の隅々にわたるCa²⁺情報伝達に寄与していると考えられている。その他、プロテインキナーゼA(Nakade et al., 1994)、プロテインキナーゼC(Matter et al., 1993)、ATP (Bezprozvanny and Ehrlich, 1993)の作用によってCa²⁺動員の活性が促進することが報告されている。最近では、カルモジュリン (Michikawa et al., 1999) やサイクリック GMP キナーゼの基質 (Schlossmann et al., 2000) が作用すると IP₃ 受容体の Ca²⁺ 動員の活性が抑制されることがわかってきた。このように IP₃ 受容体は細胞内情報伝達の過程で様々な制御を受け、その結果、細胞質内の Ca²⁺ 濃度の増加は複雑に制御されていると考えられている。しかしこれらの制御の IP₃ 受容体サブタイプによる違いに関しては、ほとんどわかっていない。

1-5 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の発現分布

様々な組織の細胞が、IP₃受容体による細胞内Ca²⁺濃度の制御系を有して細胞内情報伝達に利用している。一方、前節で述べたようにIP₃受容体には多様な分子種が存在することがわかっている。したがってIP₃受容体による細胞内Ca²⁺濃度増加の情報伝達機構を理解する上で、それら多様なIP₃受容体の発現分布に関する解析は重要と考えられている。

多くの解析がなされているのはIP₃受容体タイプ1である。タイプ1は脳その他、動脈や子宮の平滑筋細胞などの特定の末梢組織での発現が確認されていて、部位特異的な発現を示すことが知られている (Furuichi et al., 1990)。脳に関しては詳細に検討され、その結果、海馬、線条体、大脳皮質で発現し、特に小脳プルキンエ細胞で高発現している (Mignery et al., 1989, Otsu et al., 1990, Nakanishi et al., 1991)。さらにタイプ1のスプライシング変異体によっても、これら部位における発現が異なることから (Nakagawa et al., 1991b)、タイプ1の発現は組織・細胞ごとに厳密に制御さ

れていると考えられている。他の IP_3 受容体サブタイプに関しては解析が進んでいない。筆者らは、 IP_3 受容体タイプ2とタイプ3が、少なくとも血球系の細胞で特異的な発現をすることを見いだしている (Yamamoto-Hino et al., 1994)。

IP_3 受容体タイプ1は免疫電子顕微鏡解析によって、小脳プルキンエ細胞において小胞体や核膜に存在し、特に折り重なったタイプの滑面小胞体に高頻度に分布することが示されている (Yamamoto et al., 1991)。しかし興味深いことに、内皮細胞、平滑筋細胞、角化細胞といった細胞では、小胞体ではなく、ある特定の構造をもつ細胞膜にも、 IP_3 受容体タイプ1らしきタンパク質が存在することが報告され (Fujimoto et al., 1992)、注目されていた。もしも細胞膜に IP_3 受容体タイプ1が存在するとすると、 IP_3 受容体の IP_3 結合部位が細胞内にあって、 IP_3 が結合すると受容体は細胞外からの Ca^{2+} 流入を引き起こす可能性があるからである。電気生理学的な解析によると、臭覚神経細胞やT細胞では、細胞膜に IP_3 が結合すると、細胞膜に Ca^{2+} 電流が流れることが示されている (Fadool and Ache, 1992, Kuno and Gardner, 1987)。この現象が IP_3 受容体タイプ1の働きによるのか議論の決着はまだついていない。タイプ1らしきタンパク質という点が、さらなる解析の余地を残している点で、サブタイプをも含めて詳細な検討が必要とされていた。

発現分布に関する情報は、薬剤開発の観点からも重要である。薬剤が作用しうる組織・細胞を知ることによって、薬効の問題を考えることができるからである。3つのサブタイプがどう発現分布しているかの解析によって、 IP_3 受容体サブタイプの役割の解明が進むものと期待されていた。

1-6 イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体と相互作用するタンパク質

筆者らが IP_3 受容体サブタイプの解析をはじめた頃に、ケラチン細胞では IP_3 受容体タイプ1が細胞骨格タンパク質のアクチンと結合することが示された (Fujimoto et al., 1995)。T細胞では細胞骨格タンパク質のアンキリンと結合することが示された (Bourguignon et al., 1993b)。また、生化学的および生理的な解析によっ

でも IP_3 受容体が細胞骨格タンパク質と会合する事が報告され、細胞骨格タンパク質が IP_3 受容体を制御することが示唆された (Feng and Kraus-Friedmann, 1993, Bourguignon et al., 1993a)。一見、細胞の形態に関するタンパク質の、 IP_3 受容体という情報伝達制御タンパク質への関与が不自然に思えるが、そうではない。イノシトールリン脂質代謝系に関しては、 IP_3 の前駆体であるフォスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP_2) が、アクチンの重合を促進させ (Hartwig et al., 1995)、細胞形態に影響することがわかってきていた。最近では PIP_2 の減少がアクチン重合を抑制し (Sakisaka et al., 1997)、細胞骨格の構築に PIP_2 が重要な役割をしていることが報告されている (Takenawa et al., 1999) (Toker, 1998)。すなわち、イノシトールリン脂質代謝系の情報伝達と細胞形態の両方への関与が、総合的な細胞機能に重要と認識されるようになってきている。

1-7 本研究の目的および意義

IP_3 受容体タイプ2とタイプ3に関する情報が極めて不足しているのが現状である。筆者らは IP_3 受容体による、細胞内 Ca^{2+} 情報伝達の分子的基盤の解明を目指し、 IP_3 受容体サブタイプの発現、分布、会合するタンパク質、細胞機能との関係を分子生物学的および細胞生物学的に解析することにする。また、解析のためのツールを開発することにする。

本研究では IP_3 受容体サブタイプによる細胞内 Ca^{2+} 情報伝達を解明することを目的として、以下のような計画で研究を進める。

- (1) IP_3 受容体サブタイプのダイナミックな発現変化を、mRNA レベルで検討する。
- (2) IP_3 受容体サブタイプのタンパク質レベルでの解析を目的として、各 IP_3 受容体サブタイプ特異的な抗体を作製する。
- (3) IP_3 受容体サブタイプの組織レベルでの発現を、組織免疫学的手法により検討

する。

(4) IP_3 受容体サブタイプの細胞内局在を、細胞免疫学的手法により検討する。

(5) 細胞増殖の細胞内 Ca^{2+} 濃度や IP_3 受容体サブタイプの発現に与える影響を解析する。

具体的には、mRNA レベルで IP_3 受容体サブタイプの発現を解析するための、サブタイプを識別するプローブを調製し、RNA レベルでの IP_3 受容体サブタイプの発現変動を検討することにした。さらに、タンパク質レベルでの IP_3 受容体サブタイプを解析するために、 IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体を作製することにした。そして抗体を使って、組織・細胞での IP_3 受容体サブタイプの発現、および細胞内局在を検討することにした。また、 IP_3 受容体サブタイプの機能を解析するための株化培養細胞を樹立し、生理学的現象と IP_3 受容体サブタイプの関係を解析する実験系を構築することにした。

これらの知見は、 IP_3 受容体による細胞内 Ca^{2+} 情報伝達機構の解明に貢献すると考える。また開発したツールは、 IP_3 受容体による細胞内 Ca^{2+} 情報伝達機構の解明のための有用なツールとなると考えられる。

第2章 ヒトイノシトール3リン酸受容体サブタイプの発現変化

2-1 緒言

筆者らはIP₃受容体にサブタイプが存在することを明らかにし、タイプ2とタイプ3のcDNAクローニングを行った(Yamamoto-Hino et al., 1994)。その結果、塩基配列はそれぞれ相同性があり、クローニングしたサブタイプもタイプ1と同様の機能を有することが予想されたが、発現細胞が異なることが、血球系細胞株を用いた解析で明らかとなった(Yamamoto-Hino et al., 1994)。このサブタイプの発見と発現細胞の違いの発見から、IP₃受容体によるCa²⁺情報伝達が生体の全ての細胞に共通の、単純な機構ではない可能性が考えられた。もしも単純であれば、タイプ1が全ての細胞の情報伝達を担えばよいが、実際にはサブタイプが存在して細胞によってサブタイプの発現が異なっていたからである。細胞によって機能が違うように、おそらくIP₃受容体サブタイプによって特性が異なり、細胞毎に必要なサブタイプが異なるためと考えられた。

血球系細胞は極めて多様で、その機能も細胞によって様々だが、元々は生体内では、骨髄由来の1種類の細胞が日常的に分化してできたものである(Fig. 2-1)。すなわち、骨髄に存在する自己複製能を持つ多能性幹細胞が一定の割合で増殖・分化を繰り返して、成熟した血球系細胞(T細胞、B細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好酸球、赤血球等)が産生されている(Akashi et al., 2000, Kondo et al., 1997)。サトカイン産生(Faas et al., 1993, Desai et al., 1990)、抗体産生(Kehrl et al., 1984, McConnell et al., 1992)、貪食(Hishikawa et al., 1991)、遊走(Unkeless et al., 1988)などの細胞機能は、この過程で各血球系細胞毎に特徴づけられていると考えられている。骨髄幹細胞にはフォスファチジルイノシトール代謝(Conti et al., 1993)やIP₃結合活性があるが(Michell et al., 1990)、細胞分化に伴って機能の違いを引き出すために、関連した情報伝達系タンパク質の発現が変化している可能性が考えられた。

細胞分化によってIP₃受容体発現が変化することに関して、生化学的な解析が報告

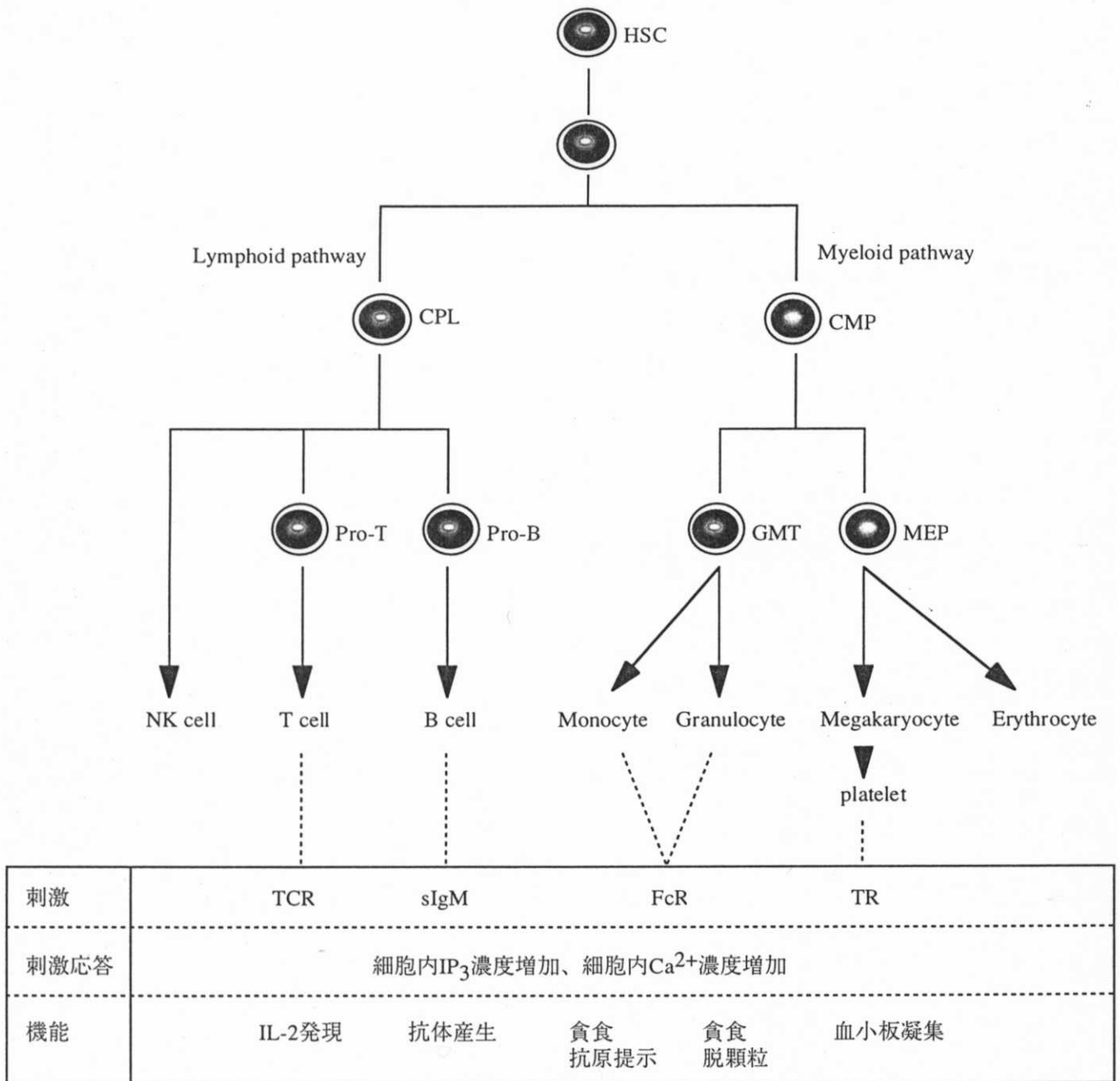


Fig. 2-1 血液幹細胞の血球系細胞への分化と主な細胞機能

HSC: haematopoietic stem cell, CPL: common lymphoid progenitor cell, CMP: common myeloid cell, Pro-T: T-cell progenitor, Pro-B: B-cell progenitor, GMP: granulocyte/macrophage lineage-restricted progenitor, MEP: megakaryocyte/erythrocyte lineage-restricted progenitor, TCR: T-cell receptor, sIgM: surface IgM, FcR: Fc receptor, TR: thrombin receptor

されていて、血球系細胞の分化誘導モデルである単球系細胞株 HL-60 をレチノイン酸 (Bradford et al., 1992) やジメチルスルフォキシド (Bradford and Autieri, 1991) やビタミン D3 (Bradford et al., 1993) で処理した細胞は、 IP_3 結合活性が増加することが知られている。しかし IP_3 受容体の分子生物学的な解析は不十分であった。

IP_3 受容体の発現に関する情報は重要である。筆者らは、3つのサブタイプを解析できる cDNA プローブを作製したことから、この細胞分化に伴う IP_3 受容体の発現変化を、サブタイプを含めて解析する事にした。血球系の細胞株は、細胞分化の過程の一部を培養細胞系で再現できる点で優れており、解析には血球系細胞株を用いることにした。

本章では、種々のヒト血球系細胞株の IP_3 受容体サブタイプの mRNA 発現を解析することにした。さらに、これら細胞株を分化誘導処理したときの、 IP_3 受容体サブタイプの mRNA 発現変化を解析することにした。

2-2 材料と方法

2-2-1 試薬

RPMI-1640 は Gibco BRL 社製を使用した。モノクローナル抗体 Y2/51 と AN51 は、Dako 社製を使用した。制限酵素は宝社製を使用した。その他の試薬は、Sigma 社、和光純薬社製を使用した。 α [32 P]dCTP は Amersham 社製を使用した。

2-2-2 細胞株および細胞培養

ヒト血球系細胞株 K562, HEL, CMK, ML-1, HL-60, KU812, U937 の培養には、RPMI-1640 培養液 (RPMI-1640 medium, 10% fetal calf serum, 4 mM glutamine, 25 units/ml penicillin, 25 μ g/ml streptomycin, 50 mM 2-mercaptoethanol) を使用した。ヒト血球系細胞株 HPB-ALL, Jurkat, HUT-78, Raji, Namalwa, RPMI1788, Jijoye, THP-1 の培養には、RPMI-1640 培養液に 50 mM 2-mercaptoethanol を添加した培地を使用した。細胞培養は培養フラスコを用いて、加湿された 37 °C の CO₂ インキュベーターで行った (Table 2-1)。

2-2-3 細胞の分化誘導

赤血球系細胞への分化誘導には K562 細胞株を用いた。細胞分化はヘモグロビン含有量の増加で評価した (Rutherford and Weatherall, 1979, Rutherford et al., 1979, Villeval et al., 1983)。すなわち K562 を 50 mM hemin 入り培地で 5 日間培養した。細胞は phosphate buffered saline (PBS) で洗浄して PBS に懸濁し、凍結融解を繰り返して細胞膜を破壊した。これを 200 x g で 10 分間遠心した後、さらに 10,000 x g で 45 分間遠心して上清を回収した。ヘモグロビン含有量は、上清の吸光度を分光光度計でヘモグロビンの 414 nm の吸光度で測定して見積もった。また K562 細胞株は、167 pM IL-3 と 10 pM GM-CSF 存在下で 2 日間培養して、骨髄性前駆細胞への分化誘導も試みた。

細胞株	由来	刺激	刺激時の表現型形質
HPB-ALL	ALL		
Jurkat	ALL		
Jurkat(clone15)	ALL	PHA and TPA	
HUT-78	SS		
Raji	BL		
Namalwa(KJM1)BL RPMI1788			
Jijoye	BL		
K562s	CML	hemin	成熟赤芽球様
HEL	EL	DMSO	成熟巨核球様
CMK	ML	TPA	成熟巨核球様
ML-1	AML		
HL-60	APL	TPA or RA or DMSO	単球／マクロファージ
KU812F	CML		
THP-1	AMoL	TPA or RA	マクロファージ
U937	LY	TPA or RA	マクロファージ

Table 2-1. 血球系細胞株とその分化誘導刺激

ALL:acute lymphoblastic leukemia
 AML:acute myeloblastic leukemia
 AMoL:acute monocytic leukemia
 APL:acute promyelocytic leukemia
 BL:Burkitt lymphoma
 CML:chronic myelocytic leukemia
 ML:megakaryocytic leukemia
 EL:Erythro leukemia
 LY:lymphoma
 SS:Sezary syndrome

巨核球系細胞での分化誘導には CMK 細胞株を用いた。細胞分化は血小板の膜糖タンパク質の発現の増加で評価した (Sato et al., 1989, Komatsu et al., 1989)。すなわち CMK を 10 ng/ml 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 入りの培地で 2 日間培養した。細胞は PBS で洗浄後、 10^6 細胞/ml の密度に PBS で懸濁し、1 μ g/ml の GPIIIa を認識するモノクローナル抗体 Y2/51 や、GPIb を認識するモノクローナル抗体 AN51 を添加して、4 °C で 30 分間静置した。これを氷冷した PBS で 3 回洗浄して、さらに FITC-conjugated anti mouse IgG を添加して 4 °C で 30 分間静置した。これを氷冷した PBS で 3 回洗浄して、フローサイトメーターで発現を測定した。

単球、マクロファージへの分化誘導には THP-1, U937, HL-60 細胞株を用いた。細胞分化は、これら細胞に特異的な α -Naphthylacetate esterase 活性や、活性酸素の産生能や、貪食能の増加で評価した。すなわち THP-1 と U937 は、10 ng/ml TPA または 100 nM retinoic acid (RA) 入りの培地で 2 日間培養した (Tsuchiya et al., 1982, Hemmi and Breitman, 1985, Olsson and Breitman, 1982)。HL-60 は 10 ng/ml TPA、100 nM RA または 1.25% dimethylsulphoxide (DMSO) 入りの培地で 2 日間培養した (Collins et al., 1978, Rovera et al., 1979, Breitman et al., 1980, Barnes et al., 1984)。細胞は PBS で 3 回洗浄した。 α -Naphthylacetate esterase 活性は、アッセイキット (Sigma 社製) にしたがって測定した。活性酸素産生能は、nitroblue tetrazolium (NBT) 還元活性を計測した (Imaizumi and Breitman, 1986, Barnes et al., 1984)。すなわち 0.5 mg/ml の NBT 存在下で 37 °C で 25 分間インキュベーションした。その細胞をスライドガラスに張り付けて、黒紫色に染色した細胞を計測した。貪食能は、オプソニン処理したヤギ赤血球の存在下で細胞をインキュベーションし、細胞をスライドガラスに張り付けて、赤血球を貪食した細胞を顕微鏡で計測した (Tsuchiya et al., 1980, Barnes et al., 1984)。

2-2-4 ノーザンブロットイング解析と RNA ドットブロットイング解析

Total RNA の抽出と、CsCl による精製は Molecular Cloning に記載の方法に従った

(Sambrook et al., 1989)。Poly(A)⁺ RNA の精製には oligo(dT)-cellulose を用いて精製した。Poly(A)⁺ RNA は 3 µg/lane で 1% formaldehyde-agarose ゲル電気泳動し、ナイロン膜 Hybond N⁺ (Amersham 社製) にブロッティングした。ブロッティングは Molecular Cloning に記載の方法に従った (Sambrook et al., 1989)。ドットブロッティング解析には、Poly(A)⁺ RNA を denature して 0.5, 1, 3 µg/dot で、それぞれ Hybond N⁺ にドットブロッティングした。ブロッティングしたナイロン膜は、³²P でラジオアイソトープラベルした IP₃ 受容体サブタイプ特異的な cDNA プローブと、それぞれハイブリダイゼーションさせた。

IP₃ 受容体タイプ1特異的な cDNA プローブは、ヒト IP₃ 受容体タイプ1がまだ cDNA クローニングできていなかったため、プラスミド pBactS-CI に挿入されたマウス IP₃ 受容体タイプ1の 4833-5443 に当たる塩基配列を使用した (Furuichi et al., 1989)。IP₃ 受容体タイプ2特異的な cDNA プローブは、プラスミド pBluscript-IP₃R2 に挿入されたヒト IP₃ 受容体タイプ2の 4830-5669 に当たる塩基配列を使用した。IP₃ 受容体タイプ3特異的な cDNA プローブは、プラスミド pcDNAI-IP₃R3 に挿入されたヒト IP₃ 受容体タイプ3の 4742-5694 に当たる塩基配列を使用した (Yamamoto-Hino et al., 1994)。それぞれに特異的な cDNA 断片は、適当な制限酵素で切り出して、ランダムプライマー法により α[³²P]dCTP でラベルしたプローブを作製した (Sambrook et al., 1989)。筆者らが最近 cDNA クローニングした全長ヒト IP₃ 受容体タイプ1と比べると、マウス IP₃ 受容体タイプ1は、選択した部分 cDNA において約 90% の相同性があり (Yamada et al., 1994)、ハイブリダイゼーション用のプローブとして IP₃ 受容体タイプ1特異的であるといえる。

ブロッティングしたナイロン膜は、ハイブリダイゼーション液 {5 x SSPE (0.9 M NaCl, 0.8 M sodium phosphate, 5 mM EDTA, pH 7.7), 0.5% sodium dodecylsulphate (SDS), 5 x Denhardt's reagent} に、100 °C、10 分間処理した 20 µg/ml サケ精子 DNA と 0.5 x 10⁶ cpm/ml プローブを添加して、65 °C で 20 時間インキュベーションした。次に洗浄液 1 (2 x SSPE, 0.1% SDS) 中にナイロン膜を浸漬して、室温で 15 分間を 3 回洗浄し

た。次に洗浄液 2 (0.2 x SSPE, 0.1% SDS) で、IP₃ 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 特異的プローブに対して、それぞれ 60 °C、55 °C、65 °C で 15 分間を 3 回で洗浄を行った。

ヒト c-myc 特異的な cDNA プローブは、プラスミド pMYC7.4 に挿入された c-myc の、PstI 制限酵素で切り出される cDNA 断片を使用した (Watt et al., 1983)。ヒト β -actin 特異的な cDNA は、タンパク質コーディング領域をヒト mRNA から polymerase chain reaction (PCR) で増幅して使用した (Ponte et al., 1984)。

ラジオ活性はイメージプレートに露光して、イメージアナライザー BAS2000 (富士写真フィルム社製) で解析した。

2-3 実験結果

2-3-1 IP₃ 受容体サブタイプ特異的に認識する DNA プローブ

3つのIP₃受容体サブタイプは、互いに塩基配列の高い相同性がある(Yamamoto-Hino et al., 1994)。しかし詳しくみると、塩基配列全体にわたって、サブタイプ特異的な領域が所々に限局して存在していた。そこで筆者らは膜貫通領域の上流に位置する約0.8 kbの塩基配列を、ノーザンブロット解析やRNAドットブロット解析のプローブ領域として選択した (Fig. 2-2)。

これら3つのIP₃受容体サブタイプの塩基配列相同性は、タイプ1とタイプ2間、タイプ2とタイプ3間、タイプ1とタイプ3間の比較で、それぞれ43%、29%、41%である。この領域をプローブとして用いた場合、筆者らの実験条件下ではクロスハイブリダイゼーションはなかった。

2-3-2 ヒト血球系細胞株におけるIP₃受容体サブタイプの発現

ノーザンブロット解析は、IP₃受容体サブタイプ特異的cDNAプローブを用いて行った。解析した血球系細胞株としては、巨核球系細胞株のHEL(Tabilio et al., 1984, Kieffer et al., 1986)、CMK(Sato et al., 1989, Komatsu et al., 1989)、赤芽球系細胞株のK562(Rutherford et al., 1979)、骨髓芽球系細胞株のML-1(Takeda et al., 1982)、前骨髓球系細胞株のHL-60(Collins et al., 1978)、単芽球系細胞株のU937(Anderson and Abraham, 1980)、単球系細胞株のTHP-1(Tsuchiya et al., 1980)、好酸球系細胞株のKU812F(Kishi, 1985)、リンパ球系細胞株のHPB-ALL(Morikawa et al., 1978)、Jurkat(Gillis and Watson, 1980)、HUT-78(Manger et al., 1985)、Raji(Guglielmi and Preud'homme, 1981)、Namalwa(Rosen et al., 1977)、RPMI1788、Jijoye(Sairenji and Hinuma, 1980)を使用した。

興味深いことに、ほとんどの細胞株で一つ以上のIP₃受容体サブタイプが発現し

		10	20	30	40	50	
probe type1	-97	-48
probe type2	1	CAGACATCTT	TTTGGAAAAG	TGTGTTACTG	AGTCAATAAT	GAATATTGTG	50
probe type3	-131	-82
		60	70	80	90	100	
probe type1	-47GAC	3
probe type2	51	AGCGGCTTCT	TTAATTCTCC	CTTTTCAGAC	AATAGTACCA	GCCTCCAGAC	100
probe type3	-81	-32
		110	120	130	140	150	
probe type1	4	CCGCCAGCCT	GTCTTTGTGC	AACTCCTGCA	AGGCGTGTTC	CGAGTTTACC	53
probe type2	101	ACATCAGCCA	GTTTTTATTTC	AGCTACTGCA	ATCTGCCTTC	AGAATTTACA	150
probe type3	-31TCTACCACA	GCCTCCTCG	19
		160	170	180	190	200	
probe type1	54	ACTGCAACTG	GCTGATGCCG	AGCCAAAAG	CCTCGGTGGA	GAGCTGCATC	103
probe type2	151	ATTGCACCTG	GCCAAACCCA	GCGCAGAAAG	CCTCAGTGGGA	ATCCTGTATC	200
probe type3	20	AGTGTCCGTG	GCTACAGCAG	CAGCACAAAG	GCTCCGTGGA	GGCCTGCATC	69
		210	220	230	240	250	
probe type1	104	CGGGTGCTCT	CTGACGTAGC	CAAGAGCCGG	GCCATAGCCA	TTCCCTGTGA	153
probe type2	201	AGAACTTTGG	CTGAAGTGGC	AAAAAATCGT	GGAATTGCCA	TTCCAGTGGGA	250
probe type3	70	CGGACCCCTG	CCATGGTGGC	CAAGGCGGGG	CCATCTTGCT	GCCCATGGAC	119
		260	270	280	290	300	
probe type1	154	CCTGGACAGC	CAAGTCAACA	ACCTCTTCCT	GAAGTCCAC	AACATTGTGC	203
probe type2	251	TTTGACAGC	CAAGTAAATA	CTCTTTTCAT	GAAGAGCCAT	TCAAATATGG	300
probe type3	120	CTGGATGCCC	ACATCAGCTC	GATGCTCAGC	AGTGGAGCCA	GCTGTGCAGC	169
		310	320	330	340	350	
probe type1	204	AGAAAACAGC	CCTGAACTGG	CGGTTATCAG	CCCGAAACGC	CGCTCGCAGA	253
probe type2	301	TGCAGAGAGC	AGCAATGGGT	TGGAGACTAT	CAGCTCGCTC	TGGGCCACGC	350
probe type3	170	TGCCGCCCAG	CGAACGCTCC	AGCTACAAGG	CAACCACGCG	GGCCTTCCCC	219
		360	370	380	390	400	
probe type1	254	GACTCTGTAC	TGGCAGCATC	CAGAGACTAC	CGAAATATCA	TTGAGAGGTT	303
probe type2	351	TTTAAGGAAG	CTCTTGCAGG	GCCTGCTTGG	GATTACAGAA	ATATTATTGA	400
probe type3	220	CGCGTCACCC	CTACCGCCAA	CCAGTGGGAC	TACAAGAACA	TCATTGAGAA	269
		410	420	430	440	450	
probe type1	304	ACAGGACATC	GTGTCTGCCC	TAGAGGACCG	GCTCAGGCCC	CTGCTGCAGG	353
probe type2	401	AAAGTTACAG	GATGTAGTGG	CCTCCTTGGG	GCACCAAGTC	AGCCCAATGA	450
probe type3	270	GCTGCAGGAC	ATCATCACAG	CCCTGGAGGA	GCGGCTGAAG	CCCCTGGTAC	319
		460	470	480	490	500	
probe type1	354	CTGAGCTGTC	TGTGCTCGTG	GATGTTCTAC	ACAGACCAGA	ACTGCTCTTC	403
probe type2	451	TGCAGGCTGA	ATTCTCAGTG	TTGGTTGATG	TATTGTACAG	TCCAGAAGCTG	500
probe type3	320	AGGCTGAGCT	GTCCGTGCTG	GTGGATGTCC	TGCACTGGCC	TGAGCTGCTC	369

Fig. 2-2 IP₃受容体サブタイプに特異的なプローブの相同性

probe type 1: IP₃受容体タイプ1に対するDNAプローブ。probe type 2: IP₃受容体タイプ2に対するDNAプローブ。probe type 3: IP₃受容体タイプ3に対するDNAプローブ。数字はprobe type 2を基準にしたときの相対的な値である。相同性のある配列を太字で示した。

		510	520	530	540	550	
probe type1	404	CCCGAGAACA	CGGATGCCAG	GAGGAAATGT	GAGAGTGGAG	GTTTCATCTG	453
probe type2	501	CTGTTCCTCG	AGGGAAGCGA	TGCAAGAATA	AGATGTGGCG	CTTTCATGTC	550
probe type3	370	TTCTTGGAGG	GCAGTGAGGC	CTACCAGCGC	TGCGAGAGTG	GGGGCTTCCT	419
		560	570	580	590	600	
probe type1	454	CAAGCTAATA	AAACATACCA	AGCAACTGCT	GGAGGAGAAT	GAAGAGAAAC	503
probe type2	551	GAAGTTGATT	AATCATACAA	AGAACTAAT	GGAGAAAGAA	GAAAACTGT	600
probe type3	420	GTCCAAGCTG	ATCCAGCACA	CCAAGGACCT	CATGGAGTCG	GAGGAGAAGC	469
		610	620	630	640	650	
probe type1	504	TATGCATTAA	AGTCTTACAG	ACCCTCAGGG	AAATGATGAC	CAAAGACAGA	553
probe type2	601	GCATTAAAAT	TCTTCAGACA	TTACGAGAAA	TGTTAGAGAA	GAAAGACAGC	650
probe type3	470	TGTGCATCAA	GGTGTGCGG	ACCCTGCAGC	AGATGCTGCT	CAAGAGAGCC	519
		660	670	680	690	700	
probe type1	554	GGCTATGGAG	AGAAGCAAAT	TTCCATTGAT	GAATCGGAAA	ATGCCGAGCT	603
probe type2	651	TTTGTGGAAG	AGGGTAACAC	ATTAAGAAAAG	ATACTTCTGA	ATCGATACTT	700
probe type3	520	AAGTACGGGG	ACCGGGGCAA	CCAGCTGCGC	AAGATGCTGC	TGCAAAACTA	569
		710	720	730	740	750	
probe type1	604	GCCACAG...	653
probe type2	701	TAAAGGTGAT	TATAGTATTG	GTGTGAATGG	ACACCTATCA	GGAGCCTACT	750
probe type3	570	CCTCCAGAAC	CGGAAGTCCA	CCTCGCGGGG	GGACCTTCCC	GACCCCATAG	619
		760	770	780	790	800	
probe type1	654	703
probe type2	751	CCAAAACGTC	ACAGGTGGGA	GGAAGCTTTT	CTGGACAAGA	TTCAGATAAG	800
probe type3	620	GCACTGGCCT	GGACCCAGAC	TGGTCCGCAA	TCGCAGCCAC	CCAGTGCCCG	669
		810	820	830	840	850	
probe type1	704	753
probe type2	801	ATGGGGATAT	CAATGTCAGA	CATTCACTGT	CTGCTGGAT.	850
probe type3	670	CTGGACAAGG	AGGGGGCCAC	CAAGTTGGTA	TGCGACCTCA	TCACCAGCAC	719
		860	870	880	890	900	
probe type1	754	803
probe type2	851	900
probe type3	720	CAAGAACGAG	AAGATCTTCC	AGGAGAGCAT	CGGCCTGGCC	ATCCACCTGC	769
		910	920	930	940	950	
probe type1	804	853
probe type2	901	950
probe type3	770	TGGATGGTGG	CAACACAGAG	ATCCAGAAAT	CCTTCCACAA	CCTGATGATG	819
		960	970	980	990	1000	
probe type1	854	903
probe type2	951	1000
probe type3	820	AGTGACAAGA	AGTCAGAGCG	CTTCTTCAAG	GTGCTGCACG	ACCGCATGAA	869
		1010	1020	1030	1040	1050	
probe type1	904	953
probe type2	1001	1050
probe type3	870	GCGGGCCCAG	CAGGAGACCA	AGTCCACGGT	GGCAGTCAAC	ATGAATGACC	919
		1060	1070	1080	1090	1100	
probe type1	954	1003
probe type2	1051	1100
probe type3	920	TGGGCAGCCA	GCCACATGAG	GACCGCGAGC	CAGT.....	969

つづき

ていた (Fig. 2-3)。IP₃ 受容体タイプ1、タイプ3 特異的プローブでハイブリダイゼーションすると、約9 kDa の塩基長の位置に単一バンドとしてバンドが検出された。IP₃ 受容体タイプ2 特異的プローブでハイブリダイゼーションすると、約9 kDa の塩基長の位置に二重バンドとしてバンドが検出された。IP₃ 受容体タイプ1は、mRNA の塩基長が異なるスプライス変異体が中枢神経系でのみ存在することが知られるので、単一バンドとして検出されたことは、抹消の血球系細胞株の解析としては妥当な結果であった。IP₃ 受容体タイプ2は二重バンドが観察されたが、同様の結果が齧歯類の末梢組織のIP₃ 受容体タイプ2で報告されている (Mignery et al., 1990) (Sudhof et al., 1991, Ross et al., 1992)。この二重バンドは、異なるポリアデニレーション部位の存在、またはスプライスの変異体が (Nakagawa et al., 1991a, Danoff et al., 1991)、血球系細胞のIP₃ 受容体サブタイプに存在する可能性を示していると考えられた。

IP₃ 受容体サブタイプの発現プロフィールは、これら解析した血球系細胞株で極めて異なっていた。赤芽球系細胞株のK562では、IP₃ 受容体タイプ3が優勢的に発現していて、IP₃ 受容体タイプ1はほとんど検出できなかった。巨核球系細胞株のHELとCMKでは、IP₃ 受容体タイプ1とタイプ2のmRNAは良く検出されたが、IP₃ 受容体タイプ3は検出されなかった。骨髓芽球系細胞株のML-1と前骨髓球系細胞株のHL-60は、IP₃ 受容体タイプ1とタイプ2のmRNAを同等レベルに発現していたが、IP₃ 受容体タイプ3の発現レベルは異なっていた。好酸球系細胞株のKU812Fは、ほとんどがIP₃ 受容体タイプ2のmRNA発現という点で特徴的であった。単球/マクロファージ系細胞株とされるTHP-1とU937でのIP₃ 受容体サブタイプのmRNA発現は、非常に異なっていた。U937ではIP₃ 受容体タイプ3が優勢的に発現していたが、THP-1ではタイプ3の発現を検出できなかった。反対に、THP-1ではIP₃ 受容体タイプ1が、U937に比べて10倍以上の発現をしていた。T細胞株であるJurkatやB細胞株であるRajiは、IP₃ 受容体タイプ2とタイプ3のmRNA発現が認められた。T細胞とB細胞でのIP₃ 受容体サブタイプの発現を更に

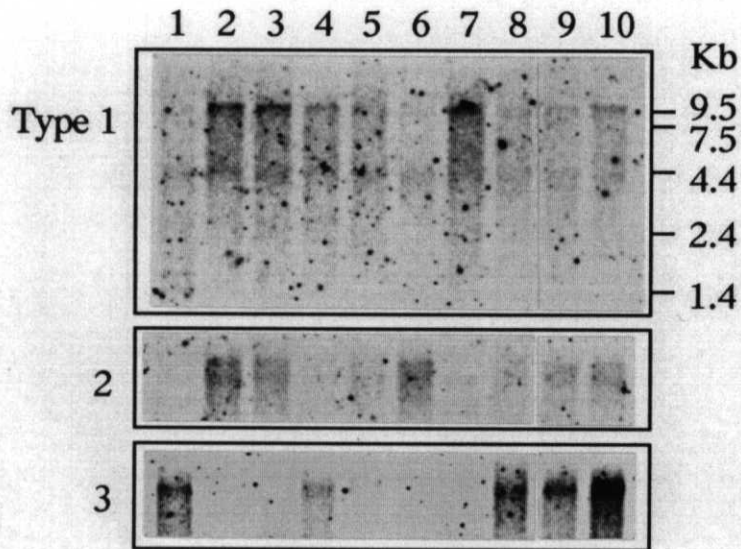


Fig. 2-3 血球系細胞株における IP_3 受容体サブタイプの発現
 各種血球系細胞株の発現する IP_3 受容体サブタイプの mRNA を、ノーザンブロット解析した。レーン 1 : K562、レーン 2 : HEL、レーン 3 : CMK、レーン 4 : ML-1、レーン 5 : HL-60、レーン 6 : KU812F、レーン 7 : THP-1、レーン 8 : U937、レーン 9 : Jurkat、レーン 10 : Raji。Type 1、2、3 は、それぞれ IP_3 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 の発現を示す。 IP_3 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 ともに、約 9 kb にバンドが検出された。2 種類以上の IP_3 受容体サブタイプを発現する細胞があることがわかった。また、細胞によって発現するサブタイプの組み合わせとその度合いが異なっていた。

詳しく調べるために、細胞分化のステージが異なると考えられている T 細胞株の Jurkat, HPB-ALL, HUT-78 と B 細胞株の Raji, Namalwa, RPMI1788, Jijoye を検討した (Fig. 2-4)。HUT-78 以外の細胞株では、 IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 の mRNA は検出されるが、 IP_3 受容体タイプ 1 はほとんど検出されなかった。これらの結果は、 IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 の発現はあるが、タイプ 1 の発現はなかったとする、マウスの胸腺 (T 細胞が濃縮している組織) を解析した報告を支持した (Ross et al., 1992)。HUT-78 は HPB-ALL や Jurkat に比べて、より成熟した T 細胞株と考えられている。この HUT-78 では、 IP_3 受容体タイプ 3 の mRNA 発現は検出されたが、タイプ 2 の発現は非常に低レベルであった。Jijoye は検討した B 細胞株の中で、最も成熟した B 細胞株と考えられている。この Jijoye では他の B 細胞株に比べて、 IP_3 受容体タイプ 2 の mRNA 発現がタイプ 3 の発現より多かった。

2-3-3 細胞分化によるサブタイプ特異的な IP_3 受容体の発現変化

2-3-3-1 マクロファージ様の細胞への分化

単球/マクロファージ系細胞株 HL-60、THP-1、U937 はそれぞれ分化段階の異なる細胞を代表しており (Auwerx, 1991, Barnes et al., 1984)、それぞれ異なる細胞機能を持つ。そしてその機能発現に IP_3 受容体による Ca^{2+} 動員の制御が関与する (Joseph and MacDermot, 1991, Gusovsky et al., 1991)。これら細胞株は、 IP_3 受容体サブタイプのそれぞれ異なる発現プロフィールを示したことから (Fig. 2-3)、細胞分化誘導や刺激が IP_3 受容体サブタイプの発現プロフィールを変化させるのではないかと考えた。

THP-1 と U937 は、レチノイン酸や TPA で培養処理することによってマクロファージ様の細胞に誘導できることが知られる (Tsuchiya et al., 1982, Hemmi and Breitman, 1985, Olsson and Breitman, 1982)。そこでこれら細胞株を刺激して、細胞分化誘導を試みた。分化誘導の判定は、最初に α -Naphthylacetate esterase 活性を検討した。分化誘導前後で活性測定のための細胞染色をした結果、刺激前の細胞では染

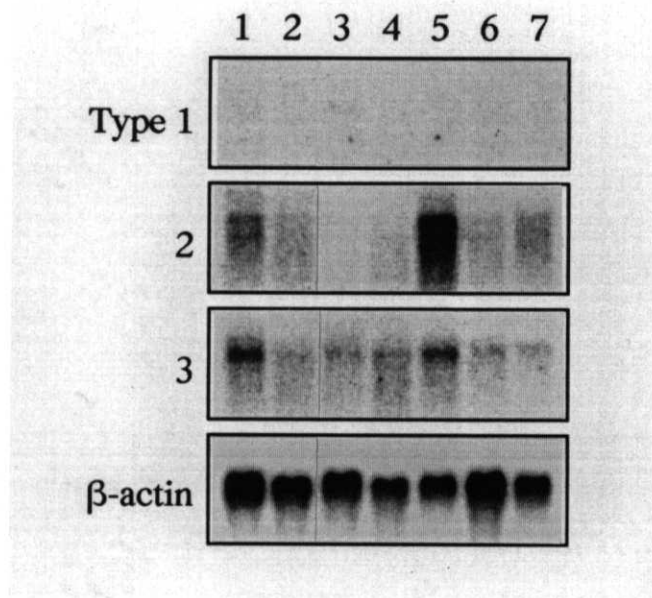


Fig. 2-4 リンパ球系細胞株における IP_3 受容体サブタイプの発現
 リンパ球系細胞株における IP_3 受容体サブタイプ mRNA の発現をノーザンブロット解析した。レーン 1 : HPB-ALL、レーン 2 : Jurkat、レーン 3 : HUT-78、レーン 4 : Raji、レーン 5 : Namalwa、レーン 6 : RPMI1788、レーン 7 : Jijoye。Type 1、2、3 は、それぞれ IP_3 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 の発現を示す。

色細胞は認められたが、非常に薄い染色であった。刺激後の細胞は染色の程度が増加していた。この結果から THP-1 と U937 は、無刺激の状態でも弱いながらマクロファージの性質を有しており、分化誘導剤共存下での培養によって更に成熟したマクロファージに分化すると考えられた。次に貪食能を検討した。貪食は細胞を一定時間ヤギ赤血球と接触させて、赤血球を取り込んだ細胞を顕微鏡観察した。レチノイン酸で分化誘導した THP-1 は、刺激前の細胞では 48% が貪食を示したが、刺激後の細胞は 70% が貪食を示した。したがってこれらの培養条件で分化誘導できることが示された。

THP-1 と U937 の分化誘導前後での IP_3 受容体サブタイプの mRNA 発現をドットプロット解析した (Fig. 2-5)。どちらの細胞株も、分化誘導による IP_3 受容体タイプ 3 の発現には影響しなかった。しかし興味深いことに、 IP_3 受容体タイプ 1 とタイプ 2 の発現は変化した。さらにその変化は分化誘導刺激によって違っていた。レチノイン酸で分化誘導刺激した細胞は、 IP_3 受容体タイプ 1 とタイプ 2 の両方において発現が増加したのに対して、TPA で分化誘導刺激した細胞は、 IP_3 受容体タイプ 2 は発現が増加し、タイプ 1 は発現が減少した。

2-3-3-2 顆粒球様の細胞への分化

HL-60 細胞株は THP-1 や U937 と違って分化誘導剤によって、単球/マクロファージまたは顆粒球の両方の系統の細胞に分化することが知られている (Collins et al., 1978, Breitman et al., 1980, Rovera et al., 1979)。TPA 共存下で培養するとマクロファージ様の細胞に分化する。レチノイン酸や DMSO 存在下で培養すると顆粒球様の細胞に分化する。そこでまず、HL-60 を TPA で刺激して分化誘導を試みた。TPA で刺激された HL-60 は培養フラスコへの接着性が高まり、 α -Naphthylacetate esterase 活性が増加した。次に HL-60 をレチノイン酸や DMSO で刺激して分化誘導を試みた。これら薬剤で刺激された HL-60 の分化の判断は、NBT 還元能試験で行った。刺激した HL-60 を NBT 染色した結果、80% 以上の細胞が染色性の陽性細胞

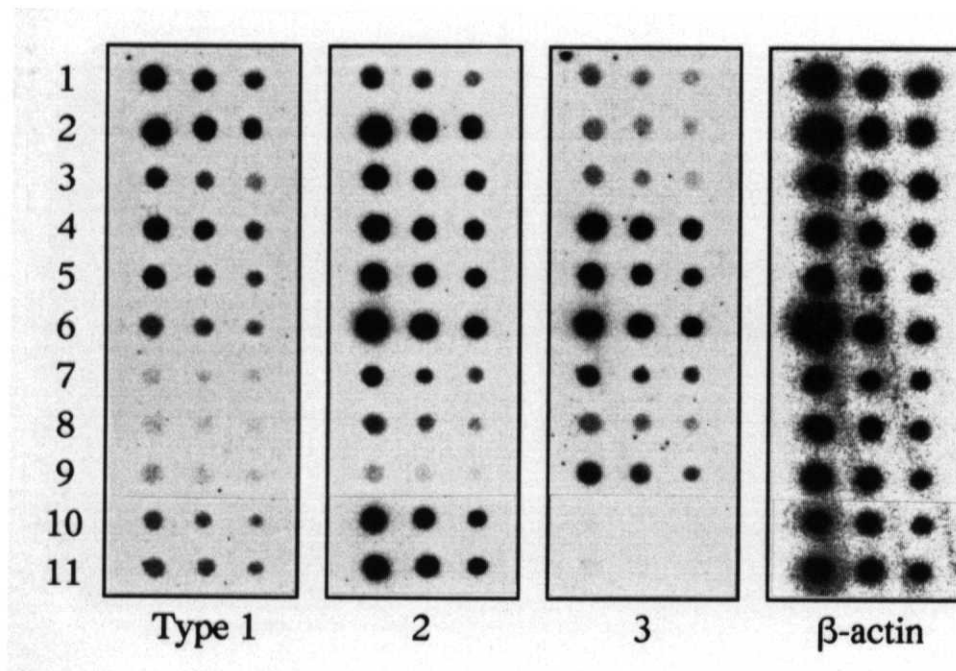


Fig. 2-5 ヒト血球系細胞株の細胞分化による IP_3 受容体サブタイプの発現変化
 細胞分化誘導前と、後の細胞から poly(A)⁺ RNA を調整して、ドットブロッティング解析した。パネルは左から IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3、 β -actin の発現を示す。発現解析は、1つのナイロン膜をリプロベディングして行った。それぞれの細胞に対して、0.5 μ g、1 μ g、3 μ g の poly(A)⁺ RNA を、右から左に向けてドットブロッティングした。THP-1 (レーン1~3)、U937 (レーン4~6)、K562 (レーン7~9)、CMK (レーン10、11) を、レチノイン酸 (レーン2、5)、または TPA (レーン3、6、11)、または hemin (レーン8)、または IL-3 + GM-CSF (レーン9) の存在下で培養して細胞を分化させた。

胞であった。形態は浮遊細胞のままだが、大きさが若干小さくなった。したがって、これらの培養条件で分化誘導できることが示された。

HL-60の分化誘導前後での IP_3 受容体サブタイプのmRNA発現をノーザンブロット解析した (Fig. 2-6)。分化誘導したHL-60は、TPA, DMSO, レチノイン酸のいずれの薬剤存在下で培養した場合も、 IP_3 受容体タイプ1とタイプ2のmRNA発現が増加して、タイプ3の発現が抑制された。 IP_3 受容体タイプ2のmRNA発現増加が特に顕著で、レチノイン酸やDMSOで刺激したHL-60においては、10倍以上の発現量の増加があった。この増加の程度は、TPAで刺激したHL-60よりも大きかった。興味深いことに IP_3 受容体mRNAは、分化誘導刺激して早い時期に発現誘導が始まり、その発現の様子は二相性の増加を示した (Fig. 2-7)。最初の増加ピークは誘導刺激後1時間にあり、2回目のピークは24-28時間後であった。最初のピークは初期応答性遺伝子であるc-mycの発現と同様の増加を示した。また発現誘導の応答が早かったことから、発現が刺激によるタンパク質合成を介していない可能性を考え、タンパク質合成阻害剤の存在下での分化誘導刺激による IP_3 受容体発現を検討した。その結果は推測したように、 IP_3 受容体mRNAの発現はシクロヘキシミド存在下でも発現誘導に影響を受けなかった (Fig. 2-8)。

2-3-3-3 成熟した巨核球様の細胞への分化

血小板様の微粒子を培養中に放出するCMK細胞株は、ヒト巨核球細胞分化や、巨核球/血小板特異的なタンパク質の生合成経路の研究のモデル細胞として使用されている。そしてTPA存在下での培養によって、成熟した巨核球細胞の性質を示すようになることが知られている (Sato et al., 1989, Komatsu et al., 1989)。そこでCMK細胞株のTPA刺激による分化誘導を試みた。分化の判定は血小板特異的なGPIbやGPIIb/IIIa糖タンパク質の発現をセルソーターで解析した。その結果90%以上の細胞がGPIbやGPIIb/IIIa糖タンパク質陽性となり、分化誘導されたことが確認された。

CMK細胞株の分化誘導前後での IP_3 受容体サブタイプのmRNA発現をドットブ

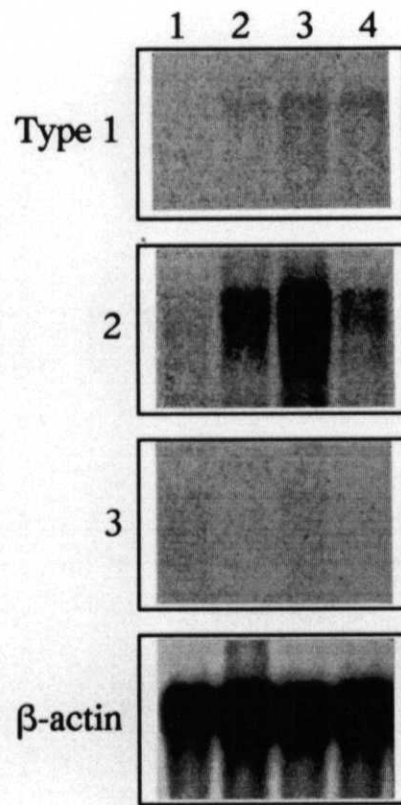


Fig. 2-6 HL-60は細胞分化によってIP₃受容体サブタイプの発現変化
 細胞分化誘導前と、後の細胞から poly(A)⁺ RNA を調整して、ノーザンブロッ
 ティング解析を行った。Type 1、2、3、β-actin は、それぞれ IP₃ 受容体タイプ
 1、タイプ2、タイプ3、βアクトチンの発現を示す。βアクトチンはコントロール
 である。HL-60 (レーン1)。DMSO 存在下で5日間培養したHL-60 (レーン
 2)。レチノイン酸存在下で5日間培養したHL-60 (レーン3)。TPA 存在下で
 2日間培養したHL-60 (レーン4)。

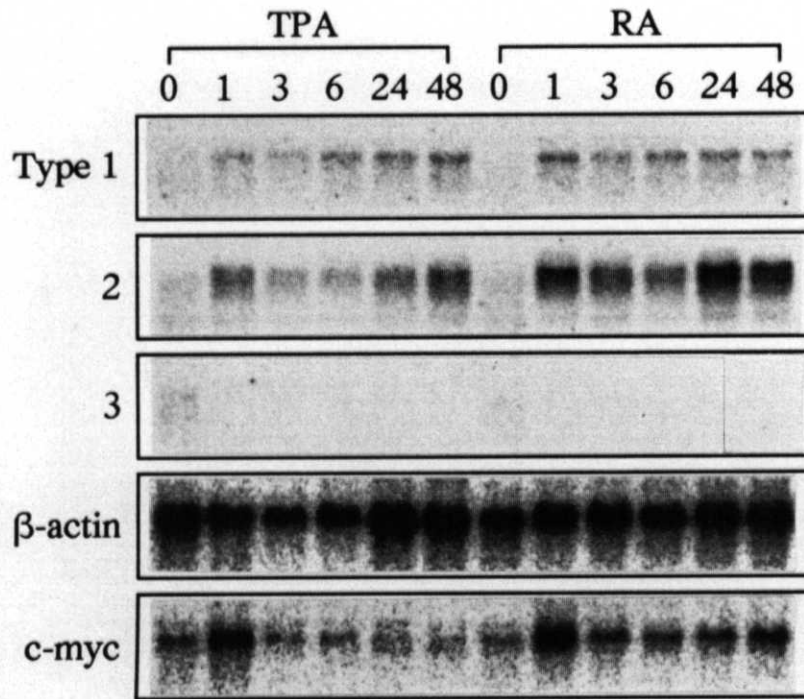


Fig. 2-7 HL-60の分化誘導刺激による IP_3 受容体サブタイプの発現変化
 HL-60をレチノイン酸 (RA) またはTPA存在下で培養して、1時間後、3時間後、6時間後、24時間後、48時間後の細胞を回収し、poly(A)⁺ RNAを調整してノーザンブロットイング解析を行った。Type 1、2、3、β-actin、c-mycは、それぞれ IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3、βアクチン、c-mycの発現を示す。βアクチンとc-mycはコントロールである。刺激の初期から IP_3 受容体サブタイプの発現誘導が認められた。

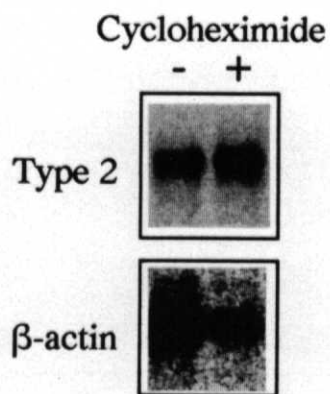


Fig. 2-8 HL-60の細胞分化によるIP₃受容体の発現誘導におけるタンパク質合成の影響

HL-60をタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下(10 mg/ml)でTPAで分化誘導し、48時間後の細胞からpoly(A)⁺RNAを回収して、IP₃受容体タイプ2のノーザンブロッティング解析を行った。 β -actinはコントロールである。シクロヘキシミドは、TPAによるIP₃受容体タイプ2の発現誘導に影響しなかった。

ロットティング解析した (Fig. 2-5)。分化誘導したCMK細胞は分化前と同様にIP₃受容体タイプ1とタイプ2の mRNA を発現しており、発現変化は認められなかった。血小板は mRNA がないため、RNA レベルでの発現解析が困難であるが、CMK 細胞株の結果は、IP₃ 受容体は血小板においてもタイプ1とタイプ2が発現している可能性が考えられた。

2-3-3-4 赤芽球様の細胞への分化

K562 細胞株は赤血球系の細胞および骨髄性前駆細胞に分化可能な多能性幹細胞として知られる (Lozzio et al., 1981, Villeval et al., 1983)。そこで K562 細胞株の hemin 存在下で培養することによって、赤芽球系の細胞への分化誘導を試みた。分化の判定には赤血球に特異的なヘモグロビンの産生を測定した。その結果、ヘモグロビン含有が増加することが検出され、分化誘導されたことが確認された。また、骨髄性前駆細胞への分化には interleukin-3 (IL-3) と granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) の存在下で細胞を培養した。

この細胞を用いて分化誘導前後での IP₃ 受容体サブタイプの mRNA 発現をドットプロット解析した (Fig. 2-5)。K562 細胞株は IP₃ 受容体タイプ2とタイプ3の mRNA を発現し、タイプ1の発現は低レベルであった。hemin で刺激された K562 細胞株は、タイプ2とタイプ3の mRNA 発現が減少した。IL-3 と GM-CSF で刺激したときは、IP₃ 受容体タイプ1とタイプ3の mRNA 発現には影響なかったが、タイプ2の発現が減少した。この結果は、Bradford らの報告 (Bradford et al., 1992) と異なり、IP₃ 受容体タイプ1の増加はなかった。彼らは同時に IP₃ による Ca²⁺ 動員活性が増加することを報告している (Bradford et al., 1993)。筆者らの結果との違いに関しては、さらに検討の余地があるだろう。

2-4 考察

筆者らは IP_3 受容体サブタイプ特異的 cDNA プローブを用いて、血球系細胞における IP_3 受容体サブタイプの mRNA 発現を体系的に検討した。

検討した細胞株全てにおいて、いずれかの複数種類の IP_3 受容体サブタイプが発現していた。さらに IP_3 受容体サブタイプの発現は各細胞株によって違いがあり、細胞株によって発現する IP_3 受容体サブタイプの構成比が異なると考えられた。こういった IP_3 受容体サブタイプの発現の違いは、細胞機能と密接な関係がある可能性がある。 IP_3 受容体サブタイプには、それぞれに特異的な役割があるのかもしれない。

T 細胞は抗原刺激によって T 細胞受容体-CD3 複合体を形成して、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加させ、interleukin 2 (IL-2) を産生することが知られている (Gillis and Watson, 1980, Gootenberg et al., 1981)。さらに T 細胞受容体刺激はフォスファチジルイノシトール代謝回転を誘起することが知られている。筆者らが解析した結果、T 細胞株では IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 の mRNA 発現が多いことがわかった。おそらくこれらの IP_3 受容体サブタイプが、T 細胞受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度増加を起こしているのだろう。最近、T 細胞には IP_3 によって細胞外から Ca^{2+} を流入する機構があるとの報告がなされ、T 細胞の IP_3 受容体が注目されている (Kuno and Gardner, 1987, Khan et al., 1992a)。 IP_3 受容体が細胞膜にも存在することを示唆しており、さらに詳細な解析が求められている。 IP_3 受容体の新しい機能解明につながる可能性が考えられ、タイプ 2 とタイプ 3 がどう関与しているか興味を持たれた。今後、 IP_3 受容体のチャンネル活性や細胞内局在に関して、タンパク質レベルで検討する必要があるだろう。HPB-ALL では、T 細胞受容体の刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が、細胞外からの Ca^{2+} 流入によっているとの報告がある (Brattsand et al., 1990)。Jurkat や HPB-ALL で発現する IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 タンパク質を、詳細に解析する必要があると考えられた。

B 細胞は、細胞膜上にある immunoglobulin M (sIgM) を刺激すると、細胞が活性化

して増殖をはじめが (Hivroz et al., 1988)、フォスファチジルイノシトール代謝と細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が、その細胞内情報伝達経路であることが知られている (Dugas et al., 1987, Gold et al., 1987)。すなわち IP_3 が細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させていると考えられている。興味深いことに B 細胞においても、 IP_3 が外からの Ca^{2+} 流入機構に関与することが示されていて (Brent et al., 1993)、T 細胞における IP_3 による細胞外からの Ca^{2+} 流入機構との異同が注目されていた。筆者らは、B 細胞株は IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 の mRNA を発現するのを見いだした。 IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 の発現はリンパ球系の細胞に共通する特徴であることが考えられ、これらサブタイプが Ca^{2+} 流入機構に関与する可能性が考えられた。

また、筆者らは B 細胞株によって IP_3 受容体サブタイプ mRNA 発現に違いがあることを見いだした。B 細胞株はそれぞれ分化段階や性質が異なることが知られている (Ling et al., 1989)。また、未成熟な B 細胞は、成熟した B 細胞に比べて静止期の細胞内 Ca^{2+} 濃度が高いことが知られている (Yellen et al., 1991)。 IP_3 受容体サブタイプ mRNA の発現の違いは、B 細胞の性質の違いに関連していることが考えられた。以上のようにリンパ球系の細胞は、 IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 の mRNA を発現するという特徴が観察された。これら細胞における IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 の細胞内局在性の解明が次の課題と考えられた。

単球/マクロファージ系細胞株である U937 と THP-1 は、細胞株樹立の由来がそれぞれ組織リンパ腫細胞、抹消血細胞と異なる (Sundstrom and Nilsson, 1976, Tsuchiya et al., 1980)。そして基底レベルでの貪食能が両細胞株で異なることが知られている (Shen et al., 1989)。筆者らはこれらの細胞での IP_3 受容体タイプ 1 とタイプ 3 の mRNA 発現が異なることを見いだした。これら細胞株の IP_3 受容体サブタイプの発現の違いは、細胞機能の違いを反映しているかもしれない。

筆者らはまた、細胞株の分化誘導によって IP_3 受容体サブタイプの mRNA 発現がダイナミックに変化することを見いだした。これら変化は、それぞれの細胞の機能に適した IP_3 受容体サブタイプへの対応である可能性がある。サブタイプによって特徴的

な役割があることが考えられた。単球/マクロファージ様の細胞への分化では、IP₃受容体タイプ2の mRNA 発現が増加し、貪食能を獲得していた。細胞分化に伴う貪食能の増加は、Fc 受容体の発現増加によることが知られるが (Tsuchiya et al., 1982, Honma et al., 1980, Hemmi and Breitman, 1987)、貪食は細胞内 Ca²⁺ 情報伝達に依存するので (Hishikawa et al., 1991)、IP₃ 受容体タイプ2はその情報伝達に関与している可能性が考えられた。

顆粒球系の細胞への分化に関して、HL-60の顆粒球系細胞への分化によって、小脳プルキンエ細胞で発現するタイプ (タイプ1) の IP₃ 受容体が発現誘導されることが報告されている (Bradford et al., 1993)。筆者らは IP₃ 受容体サブタイプの mRNA 発現を解析した結果、IP₃ 受容体タイプ1の mRNA の発現増加を確認した。さらに新たに、IP₃ 受容体タイプ2の mRNA の発現も増加することを見いだした。好中球は、フォスファチジルイノシトール代謝や一過性の細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が、走化性因子の N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP) による細胞遊走に必要とされる (Marks and Maxfield, 1990)。この Ca²⁺ 動員に IP₃ 受容体タイプ1やタイプ2が関与している可能性が考えられた。

HL-60の分化誘導刺激は、*c-myc* の様な初期応答遺伝子と呼ばれる一連の転写因子群が発現して (Muller et al., 1985, Nguyen et al., 1993)、その結果、細胞分化すると考えられている。また、細胞内 Ca²⁺ が細胞分化に関与することが知られている (Wegner et al., 1992)。筆者らは IP₃ 受容体タイプ2、タイプ3が分化誘導刺激によって、タンパク質合成を介しないで、*c-myc* と同様の発現パターンを示すことを見いだした。IP₃ 受容体が、細胞分化のプロセスに関与していることが考えられた。

巨核球細胞から産生される血小板はトロンビン、コラーゲン、adenosine 5'-diphosphate (ADP)、血小板活性化因子などの刺激によって凝集・分泌といった応答をし、細胞内 Ca²⁺ が重要な役割をすることが知られている (Adachi et al., 1989, Siess, 1989)。筆者らは CMK 細胞株の巨核球様の細胞への分化において、IP₃ 受容体タイプ1とタイプ2の mRNA 発現が増加することを見いだした。血小板の IP₃ 細胞内情報伝達系路に IP₃

受容体タイプ1やタイプ2が関与している可能性が考えられた。

以上の様に、 IP_3 受容体サブタイプの発現をmRNAレベルで解析することによって、細胞によって発現するサブタイプが異なり、細胞分化に伴って発現パターンが変化することが示された。 IP_3 受容体サブタイプによって働きに違いがある可能性が考えられるが、これを検討するためにはタンパク質レベルでの解析が不可欠である。そこで次章では、タンパク質レベルでの IP_3 受容体サブタイプを検討することにする。

2-5 結語

ヒト IP_3 受容体サブタイプ特異的プローブを用いて、ヒト血球系細胞株の IP_3 受容体サブタイプ発現をノーザンブロットィング解析した。その結果、リンパ球系の細胞、骨髄球系の細胞などの細胞の種類によって発現する IP_3 受容体サブタイプ mRNA が異なっていた。

血球系細胞は骨髄の多能性幹細胞が分化して種々の細胞種となっているので、細胞株による発現 IP_3 受容体サブタイプが違うのは、細胞分化に伴って IP_3 受容体の発現が変化している可能性を考えた。そこで分化誘導した細胞株に関して、 IP_3 受容体サブタイプの発現についてノーザンブロットィング解析およびドットブロットィング解析した。その結果、単球/マクロファージ系細胞へ分化した細胞株は、 IP_3 受容体タイプ2の mRNA 発現が増加した。顆粒球系細胞へ分化した細胞株は、 IP_3 受容体タイプ1とタイプ2の mRNA 発現が増加した。巨核球系細胞に分化した細胞株は、 IP_3 受容体タイプ1とタイプ2の mRNA 発現が増加した。さらに分化による IP_3 受容体の mRNA 発現は分化刺激後の早い時期に誘導されていた。

これらの結果は、 IP_3 受容体は細胞によって2種類以上のサブタイプが発現し、更に細胞分化によってその発現が動的に変化することを示している。このことから IP_3 受容体を介した細胞内 Ca^{2+} 情報伝達は、複数種の IP_3 受容体サブタイプが関与することが考えられた。また、細胞によって発現する IP_3 受容体サブタイプの mRNA が異なることは、刺激によって反応する IP_3 受容体サブタイプが異なる可能性を示している。

さらに IP_3 受容体サブタイプの機能に関する解析を行うためには、タンパク質レベルでの IP_3 受容体サブタイプの解析が有効と考えられる。そのためには解析のツールとして、 IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3に対するサブタイプ特異的な抗体を使用するのが有望と考えられる。

第3章 イノシトール3リン酸受容体サブタイプ特異的抗体の作製

3-1 緒言

筆者らは第2章において、IP₃受容体サブタイプの発現は細胞によって様々であり、細胞分化誘導刺激によってサブタイプの発現が動的に変化することを示した。この意味するところは、発現するサブタイプが変わることによってIP₃受容体の細胞応答に変化をもたらしていることが考えられる。すなわちIP₃受容体サブタイプによって役割が異なることを示唆していると考えられた。このような結果から、タンパク質レベルでの解析が必要と考え、本章ではIP₃受容体サブタイプ特異的抗体を作製することにした。

IP₃受容体に対する抗体は、唯一、マウス小脳のIP₃受容体に対するモノクローナル抗体がある。しかしそれはIP₃受容体タイプ1に特異的であり、タイプ2やタイプ3に対する抗体は無かった。そのIP₃受容体タイプ1に対するモノクローナル抗体を用いた組織・細胞発現分布の解析では、タンパク質レベルでの分布が明らかにされた。また従来、IP₃受容体は小胞体に存在すると考えられてきたが、T細胞や内皮細胞では、細胞膜にも存在する可能性が示されている (Khan et al., 1992a, Fujimoto et al., 1992)。これらはmRNAの発現解析からは得られなかった結果である。また重要なことに、このモノクローナル抗体を用いて、IP₃受容体タイプ1はホモ4量体として1つのCa²⁺チャンネルを作ることがわかっている (Maeda et al., 1990, Maeda et al., 1991)。さらにIP₃受容体のカルボキシル末端領域を抗原とする抗体が、IP₃受容体のチャンネル活性を阻害する事がわかり (Nakade et al., 1991)、IP₃受容体の生理学的な解析ツールとしても応用されている。

IP₃受容体タイプ2やタイプ3に対する特異抗体が必要である。IP₃受容体サブタイプの役割を調べるために、サブタイプ毎の組織・細胞分布やその重複、さらにサブタイプによる細胞内局在の異同の検討が必要である。また、複数種類のIP₃受容体サブタイプを発現する細胞では、ヘテロ4量体として1つのCa²⁺チャンネルを

作る可能性が考えられるが、サブタイプ特異的抗体はその検討に利用できるだろう。

筆者らは IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体を作製するために、サブタイプの推定アミノ酸配列 (Yamamoto-Hino et al., 1994, Maranto, 1994, Yamada et al., 1994) からサブタイプ特異的な領域として、第5、第6膜貫通領域に挟まれるループ領域、およびカルボキシル末端に位置する領域を選定した。ループ領域は、もし IP_3 受容体が細胞膜に存在すれば、そこは細胞外になると考えられる。したがってループ領域に対する抗体は、 IP_3 受容体の細胞膜存在性を解析への応用も期待した。また、カルボキシル末端は、 IP_3 受容体のチャンネル活性制御に関しており、機能解析に利用されている。そこでカルボキシル末端に対する抗体には、チャンネル阻害活性があることも期待した。

本章では、それぞれに特異的な配列のペプチドを作製して、これらに対するマウスモノクローナル抗体を作製することにした。さらに、作製した IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3それぞれに対する特異的モノクローナル抗体を用いて、炎症に関連する血球細胞の IP_3 受容体サブタイプの発現を解析した。

3-2 材料と方法

3-2-1 試薬

RPMI-1640 および DMEM は Gibco BRL 社製を使用した。ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン G1 (IgG1), IgG2a, IgG2b と IgG3 モノクローナル抗体は Zymed 社製を使用した。ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリンは DAKO 社製を使用した。ビオチン標識抗マウスイムノグロブリン抗体と fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識アビジンは Vector 社製を使用した。Keyhole limpet hemocyanin (KLH) と Pansorbin は Carbiochem 社製を使用した。プロテイン G アガロースは Virax Biotechnology 社製を使用した。Enhanced chemiluminescence (ECL) 検出キットは Amersham 社製を使用した。 $[^3\text{H}] \text{IP}_3$ は Dupont 社製を使用した。その他の分析用試薬は、Sigma 社、和光純薬社、ペプチド研究所、Fisher Scientific 社および Schleicher & Schuell 社製を使用した。sulfo-NHS-biotin は Pierce Chemical 社製を使用した。ペルオキシダーゼ標識 streptavidin は Vector 社製を使用した。

3-2-2 細胞とその培養

ヒト T 細胞株 Jurkat と巨核球系細胞株 CMK は、第 2 章に記載した方法で細胞培養した (Sugiyama et al., 1994b)。COS-7 とヒト IP_3 受容体タイプ 3 の発現プラスミド pcDNA-IP3R3 を形質転換した COS-7 は、10% FBS 含有の DMEM 培地中で、 37°C の加湿された CO_2 インキュベーターを用いて培養した (Yamamoto-Hino et al., 1994)。

小脳は ICR マウスから摘出した組織を使用した。

マクロファージは、thioglycollate broth を腹腔内注射した Sprague-Dawley (SD) ラットを 2 日間飼育し、その腹腔に室温に暖めた PBS を添加して腹腔内を洗うようにして細胞懸濁液を回収し、室温で $1,000 \times g$ で 30 分間遠心して沈殿した使用した (Masseyeff et al., 1993a)。

顆粒球は、casein を腹腔内注射した SD ラットを 2 日間飼育し、その腹空に室温に暖めた PBS を添加して腹腔内を洗うようにして細胞懸濁液を回収し、室温で 1,000 x g で 30 分間遠心して沈殿した使用した (Kudo et al., 1985)。

肥満細胞は以下のように調製した (Sullivan et al., 1975)。すなわち正常 SD ラットの腹腔に室温に暖めた PBS を添加して、腹腔内を洗うようにして細胞懸濁液を回収し、これを Ficoll 400 に重層して室温で 1,000 x g で 30 分間遠心して精製した細胞を使用した。

脾臓細胞と胸腺細胞は、それぞれの組織をスライドガラスを用いてすりつぶして、解して回収した細胞を使用した (Masseyeff et al., 1993b)。

好酸球は以下のように調製した (Sun et al., 1991)。正常ウマ血清を腹腔内注射した Hartley ハムスターを 2 週間飼育した。その腹腔に PBS を添加して、回収した細胞懸濁液を室温で 1,000 x g で 10 分間遠心した。沈殿した細胞を HBSS に懸濁した。これを比重 1.06 に調整した percoll 溶液に静かに重層して、室温で 1,000 x g で 30 分間遠心した。沈殿した細胞を好酸球とした。

3-2-3 IP₃ 受容体サブタイプ特異的ペプチド抗原の調製

ペプチドの化学合成は、ペプチド合成装置 PSSM8 (島津製作所社製) を用いて、9-fluorenylmethoxycarbonyl 法に従って行った。IP₃ 受容体サブタイプのカルボキシル末端領域に相当するペプチドとして、表に示すアミノ酸配列を持つペプチドを合成した (Table 3-1)。アミノ酸は一文字表記で表した。IP₃ 受容体サブタイプの第 5、第 6 膜貫通領域に挟まれるループ領域に相当するペプチドとして、表に示すアミノ酸配列を持つペプチドを合成した (Table 3-2)。全てのペプチドは、オリジナルな配列と関係なくアミド末端にシステインを付加して、抗原となるハプテンを作製する際に、KLH とのペプチド複合体のカップリング部位として使用した。

3-2-4 免疫法とハイブリドーマの作製

ペプチド名	アミノ酸配列	IP ₃ 受容体サブタイプ	アミノ酸残基
peptide-1C	CLGHPPHMNVNPQQPA	タイプ1	2,681 - 2,695
peptide-2C	CLGSNTPHVNHHMPPH	タイプ2	2,687 - 2,701
peptide-3C	CRQRLGFVDVQNS*ISR	タイプ3	2,657 - 2,671

Table 3-1 IP₃受容体サブタイプのカルボキシル末端領域に相当するペプチド
S*：オリジナルはシステインだが disulfide 結合を避けるためにセリンに置換した
アミド末端のシステインは、KLH とのカップリングのために付加した

ペプチド名	アミノ酸配列	IP ₃ 受容体サブタイプ	アミノ酸残基
peptide-1L	CGESLANDFLYSDVS*R	タイプ1	2,483 - 2,497
peptide-2L	CGSHQVPTMTLTTMME	タイプ2	2,436 - 2,450
peptide-3L	CSPLGMPHGAAAFVDT	タイプ3	2,410 - 2,424

Table 3-2 IP₃受容体サブタイプの第5、第6膜貫通領域に挟まれるループ領域に相当するペプチド

S*：オリジナルはシステインだが disulfide 結合を避けるためにセリンに置換した
 アミド末端のシステインは、KLH とのカップリングのために付加した

ペプチド-KLH複合体を用いたBALB/cマウスの免疫法、およびそのマウス脾臓細胞とハイブリドーマ作製用の癌細胞との細胞融合、そして作製したハイブリドーマの選別法は常法にしたがった(Oda et al., 1986)。ハイブリドーマは、限界希釈法によって96穴プレートの1 well 当り1細胞になるように培養して、それぞれのwellの培地中に抗体を分泌させた。培養液は900 x gで10分間遠心して固形物を沈殿させ、培養上清とした。そして培養上清の中に免疫したペプチドに反応するマウスイムノグロブリンが存在するかどうか、enzyme linked immunosolvent assay (ELISA)によって検討した。さらに、免疫したIP₃受容体サブタイプ特異的ペプチド以外のサブタイプのペプチドに、反応しないことも確認した。

3-2-5 ELISAによるIP₃受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体のスクリーニング

ELISAによるIP₃受容体サブタイプ特異的抗体のスクリーニングには、それぞれのペプチドと thyroglobline との複合体を使用した。これら複合体を96穴のELISA用プレートに添加して、4°Cで16時間インキュベーションして、プレートに物理的に吸着させた。プレートの各wellはphosphate-buffered saline (PBS; 0.14 M NaCl, 0.01 M Sodium phosphate, pH 7.2)で洗浄した。次にPBSに溶かした1% BSAを添加して室温で1時間インキュベーションした。PBSで各wellを洗浄した後、それぞれのハイブリドーマの培養上清を添加して室温で2時間インキュベーションした。各wellを洗浄液(PBS, 5% Tween 20)で3回洗い、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリンを加えて、室温で1時間インキュベーションした。反応後、洗浄液で3回洗った。次にペルオキシダーゼ基質の2,2'-azino bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)を添加して、室温で発色させた。発色の定量は、415 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーNJ2001(日本インターメッド社製)を用いて測定した。

3-2-6 イムノグロブリンアイソタイプの決定法

ハイブリドーマの培養上清は、前節の ELISA スクリーニング法に従って評価した。ただし 2 次抗体としては、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン G1 (IgG1), IgG2a, IgG2b と IgG3 モノクローナル抗体を使用した。

3-2-7 抗体の精製

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、無血清の培地中で培養した。その培養上清をイムノグロブリンアフィニティーカラム（ファルマシア社製）に通して、培養上清中に分泌されたモノクローナル抗体を精製した。

3-2-8 膜画分の調製とウエスタンブロッティング解析

細胞は氷冷したホモジナイズ溶液 {5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ M Leupeptin, 10 μ M Pepstatin A, pH 7.4} に懸濁して、ポッター型のホモジナイザーで 1,000 rpm で 10 回上下することによって破碎した。次に 4 °C で 2,000 x g で 10 分間遠心して細胞の核を沈殿させ、上清を回収した。上清はさらに 4 °C で 100,000 x g を 30 分間遠心して膜画分を沈殿させた。次に上清を除去して沈殿を適量の懸濁溶液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose, 0.1 mM PMSF, 10 μ M Leupeptin, 10 μ M Pepstatin A, pH 7.4) に懸濁した。

回収した膜画分や未破碎の細胞は、サンプル緩衝液 (0.1% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) に溶解し、80 °C で 3 分インキュベーションした後に 6% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行ってタンパク質をアクリルアミドゲルに展開した。次にゲル中のタンパク質を、エレクトロブロッティングによってニトロセルロース膜に転写した。すなわちゲルとニトロセルロース膜を密着させて、ブロッティング用緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 5 mM glycine, 1% SDS, pH 7.2) で湿らせた

濾紙で挟み、膜の両側に電圧をかけて、200 mA の定電流で 4 °C で 1 時間通電することによってゲルに展開したタンパク質をニトロセルロース膜にブロッティングした。次にブロッティングしたニトロセルロース膜をブロッキング溶液 (PBS, 10% スキムミルク, 0.2% Tween 20) に浸漬して、室温で 30 分間インキュベーションした。次に PBS で希釈したモノクローナル抗体溶液を添加して、4 °C でさらに 16 時間インキュベーションした。テストしたモノクローナル抗体を以下に示す。

peptide-1C に対する抗体 : KM1112

peptide-2C に対する抗体 : KM1083, KM1084, KM1085, KM1086, KM1087, KM1089

peptide-3C に対する抗体 : KM1076, KM1077, KM1078, KM1079, KM1080, KM1081, KM1082

peptide-3L に対する抗体 : KM1106, KM1107, KM1108, KM1109, KM1110

抗体の特異性チェックのためには、免疫に使用したペプチドを、10 µg/ml の濃度で抗体溶液とあらかじめ 4 °C で 1 時間インキュベーションした溶液を使用した。インキュベーション後、洗浄液 (0.1% Tween 20, PBS) 中で 10 分間の振盪を 3 回繰り返して、特異的な反応をしない抗体を洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体の溶液を添加して、室温で 30 分間インキュベーションした。これを洗浄液を用いて室温で 10 分間の振盪を 3 回繰り返して洗浄した。抗体が反応したタンパクの検出には、化学発光検出システム ECL を使用した。

3-2-9 免疫沈降

免疫沈降には膜画分のタンパク質を使用した。調製した膜画分は、溶解緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10 µM Pepstasin A, 10 µM Leupeptin, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5) を添加して、4 °C で 30 分間インキュベーションして溶解させた。その後、2 °C で 20,000 x g で 30 分間遠心して不溶性成分を沈殿させ、その上清を回収した。上清 100 µl に対して、150 µl のタンパク質変性溶液 (50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 20 mM dithiothreitol, 1% SDS, 1% Triton X-

100, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10 μ M Pepstasin A, 10 μ M Leupeptin, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5) を添加して、100 °C で5分間インキュベーションし、タンパク質の様々な会合状態を解離・変性させた。次に透析緩衝液 (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10 μ M Pepstasin A, 10 μ M Leupeptin, pH 7.2) に対して、4 °C で透析を行った。この可溶化タンパク質に 6 μ g/ml のヤギ抗マウス IgG 抗体 (gamma chain specific) を 4 °C で 30 分間反応させ、さらに Pansorbin を添加して 4 °C で 30 分間反応させた。Pansorbin は、非特異的なタンパク質の吸着を抑制するためにアルブミン溶液 (10% BSA, PBS) を添加し、4 °C で 1 時間のインキュベーション処理して使用した。Pansorbin を反応させたサンプルを遠心分離 (11,000 x g, 2min) して上清を回収し、6 μ g/ml KM1112, KM1083, KM1082 をそれぞれ添加して 4 °C で 1 時間インキュベーションした。さらに 6 μ g/ml のヤギ抗マウス IgG 抗体を添加して、4 °C で 1 時間インキュベーションした。この溶液に、Pansorbin を添加して、4 °C でさらに 1 時間、回転振盪培養機でインキュベーションした。次に 900 x g で 5 分間遠心して Pansorbin を沈殿させて上清を廃棄した。次に洗浄液 (10% Nonident P-40, 10% Triton X-100, 0.1% BSA, PBS) を添加して懸濁し、900 x g で 5 分間遠心して上清を廃棄する操作を 3 回行って Pansorbin を洗浄した。最後に SDS-PAGE のサンプル緩衝液を添加して、100 °C で 5 分間インキュベーションして Pansorbin に結合しているイムノグロブリン/タンパク質複合体を遊離させた。これを室温で 900 x g で 5 分間遠心して上清を回収し、免疫沈降物とした。

3-2-10 [³H] IP₃ 結合活性の測定法

膜画分のタンパク質に溶解緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, pH 7.5) を添加して、4 °C で 30 分間インキュベーションして溶解させた。その後、2 °C で 20,000 x g で 30 分間遠心して不溶性成分を沈殿させ、その上清を回収した。回収した上清に 1 / 20 容量の正常マウス血清を添加し

て、4°Cで1時間インキュベーションした。次にプロテインGアガロースを添加して、さらに1時間、回転振盪培養機でインキュベーションした。次に、9,000 x gで1分間遠心して上清を分離回収して、6 µg/ml KM1083 を添加して4°Cで1時間インキュベーションした。これにプロテインGアガロースを添加して、さらに4°Cで1時間、回転振盪培養機でインキュベーションした。次に、そのプロテインGアガロースを溶解緩衝液で3回洗浄した。次に10 nM [³H] IP₃ (777 Gbq/mol) を添加して、氷上で10分間インキュベーションした。これを13,000 x gで5分間の遠心を行い、プロテインGアガロースの沈殿を回収した。ラジオ活性の測定は、水溶性シンチレーターにプロテインGアガロースを懸濁して、液体シンチレーションカウンターで計測した。

3-2-11 蛍光共焦点レーザー顕微鏡観察

ポリLリジンで表面処理したスライドガラスに、PBSに懸濁したCMK細胞の懸濁液を水滴添加して、37°Cで15分間インキュベーションした。次にスライドガラスに接着した細胞株CMKを固定するために、氷冷した固定液（2% paraformaldehyde, 0.025 M L-lysine, 0.01 M periodate, phosphate buffer, pH 6.2）を添加して15分間インキュベーションした。次にスライドガラスをPBSで洗浄し、可溶化液（0.1% Triton X-100, PBS）を添加して室温で10分間インキュベーションした。これをPBSで洗浄した後、2% 正常ウマ血清を含有するPBSを添加して、中に室温で30分間インキュベーションした。次に、2 µg/ml KM1112 または KM1083 を添加して、4°Cで16時間インキュベーションした。コントロールとして正常マウス血清、およびモノクローナル抗体と免疫に使用した10 µg/ml ペプチドとあらかじめ4°Cで1時間インキュベーションした溶液を使用した。PBSで洗浄した後、ビオチン標識抗マウスイムノグロブリン抗体を添加して、室温で1時間インキュベーションした。PBSで洗浄した後、さらにFITC標識アビジンを添加して、室温で1時間インキュベーションした。次にPBSで洗浄した後、スライドガラスはマウント溶液

(20% glycerol, PBS) でマウントした。蛍光染色像は蛍光共焦点レーザー顕微鏡 InSIGHT-IQ (Meridian Instruments Far East 社製) を用いて観察した。

3-2-12 細胞表面のタンパク質のビオチン化

PBS で洗浄した細胞を、0.1 mg/ml sulfo-NHS-biotin を溶解した PBS 溶液に、4 °C で10分間インキュベーションし、細胞表面のタンパク質をビオチン化標識した。次にPBSで洗浄した細胞を、免疫沈降の解析に供した。

3-3 実験結果

3-3-1 IP₃受容体サブタイプ特異的ペプチドの選出

IP₃受容体サブタイプ特異的なペプチドとして、それぞれのサブタイプのカルボキシル末端領域、および第5、第6膜貫通領域に挟まれるループ領域のアミノ酸配列を選出した (Fig. 3-1)。IP₃受容体サブタイプの立体構造を考えると、カルボキシル末端領域から選んだアミノ酸残基は、細胞質に配列が曝露存在していることが予測される。一方ループ領域から選んだアミノ酸残基は、小胞体の中に配列が存在していることが予測される。

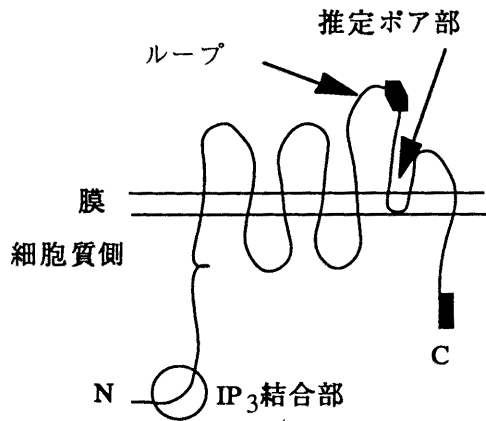
またこれらペプチドのアミノ酸配列は、生物種間で良く保存されている (Fig. 1-4)。したがってこれらのアミノ酸配列は、生物種を問わず IP₃受容体サブタイプに特異的な配列と考えられる。

3-3-2 モノクローナル抗体のキャラクタリゼーション

3-3-2-1 モノクローナル抗体の反応特異性およびイムノグロブリンアイソタイプのELISAによる解析

マウスを IP₃受容体サブタイプ特異的なペプチド複合体で免疫した。免疫したマウスの脾臓細胞を癌細胞と融合してハイブリドーマを作製し、細胞をクローン化した。それぞれのハイブリドーマが産生する抗体の活性は、免疫に使用したペプチドへの結合活性を指標にして探索した。その結果、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3のカルボキシル末端ペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが、それぞれ1個、6個、7個得られた (Table 3-3)。IP₃受容体タイプ3のループ領域ペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが、5個得られた。IP₃受容体タイプ1とタイプ2のループ領域のペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは得られなかった。これら抗体は、免

(a) IP₃Rの小胞体での推定配位



(b) アミノ酸配列の比較

第5ループ領域

type 1	EV DR LPN ET AVP ET	GESLANDFLYSDVCR	VE TG ENC TS PAP KE ELL PA EET EQ DKE HT CET LL MCI
2	EV DR LNN RT PVT	GSHQVPTMTLTTMME	AC AK ENC SP T IP AS NT AD EEY ED GIE RT CDT LL MCI
3	EV DR LPN NH STA	SPLGMPHGAAAFVDT	CSG DK MDC VS GVS VP EVL EE DRE LD STE RA CDT LL MCI

C末領域

QM TE QRK QK QRI GL	LGHPPHMNVNPQQPA
QM TE QRK NK QRL GF	LGSNTPHVNHHPH
QM TE QRK R- - - - -	RQRLGFVDVQNCISR

Fig. 3-1 IP₃受容体サブタイプ特異的なアミノ酸配列

モノクローナル抗体	抗原ペプチド	イムノグロブリンアイソタイプ
KM1112	peptide-1C	IgG1
KM1083	peptide-2C	IgG2a
KM1084	peptide-2C	IgG1
KM1085	peptide-2C	IgG1
KM1086	peptide-2C	IgG2b
KM1087	peptide-2C	IgG1
KM1089	peptide-2C	IgG2a
KM1076	peptide-3C	IgG1
KM1077	peptide-3C	IgG1
KM1078	peptide-3C	IgG2a
KM1079	peptide-3C	IgG1
KM1080	peptide-3C	IgG2a
KM1081	peptide-3C	IgG2b
KM1082	peptide-3C	IgG1
KM1106	peptide-3L	IgG1
KM1107	peptide-3L	IgG1
KM1108	peptide-3L	IgG1
KM1109	peptide-3L	IgG1
KM1110	peptide-3L	IgG1

Table 3-3 IP₃ 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体

疫に使用したペプチドに特異的に反応し、その他のペプチドに対しては全く反応しなかった。モノクローナル抗体のアイソタイプは表のように決定された (Table 3-3)。

3-3-2-2 モノクローナル抗体の反応特異性のウエスタンブロットによる解析

モノクローナル抗体が IP_3 受容体タンパク質を特異的に検出するかどうか、ウエスタンブロット法によって解析した。 IP_3 受容体サブタイプを発現する Jurkat 細胞株の膜タンパク質を使用して解析した結果、モノクローナル抗体は約 250 kDa の分子量のタンパク質を単一バンドとして検出した。このバンドは免疫に使用したペプチド存在下でウエスタンブロット法すると消失した (Fig. 3-2)。 IP_3 受容体は SDS-PAGE 上で約 250 kDa のタンパク質である。またモノクローナル抗体は、 IP_3 受容体サブタイプに特異的なアミノ酸配列を認識する。したがって作製したモノクローナル抗体は IP_3 受容体サブタイプを特異的に認識することが示されたと考えられる。

次にモノクローナル抗体が互いに他のサブタイプの IP_3 受容体タンパク質にクロス反応しないか検討した。 IP_3 受容体は、どのサブタイプも約 250 kDa の分子量を示すため、膜画分の全タンパク質をウエスタンブロット法解析しても、 IP_3 受容体サブタイプの違いを分子量の差として検出するのは困難と考えられた。 IP_3 受容体サブタイプがそれぞれ一種類しか発現していない組織または細胞が存在すれば、解析は容易である。しかしそれを保証できる組織や細胞は不明であった。そこで IP_3 受容体サブタイプをそれぞれ粗精製して、 IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体でウエスタンブロット法解析し、それぞれのモノクローナル抗体が、粗精製した IP_3 受容体サブタイプを特異的に検出できるか検討することにした。 IP_3 受容体サブタイプの粗精製には、 IP_3 受容体サブタイプ特異的抗体を用いた免疫沈降法を応用した。報告では、 IP_3 受容体がホモ 4 量体を形成することが示されている (Maeda et al., 1991)。したがって IP_3 受容体のサブタイプが複数種類発現してい

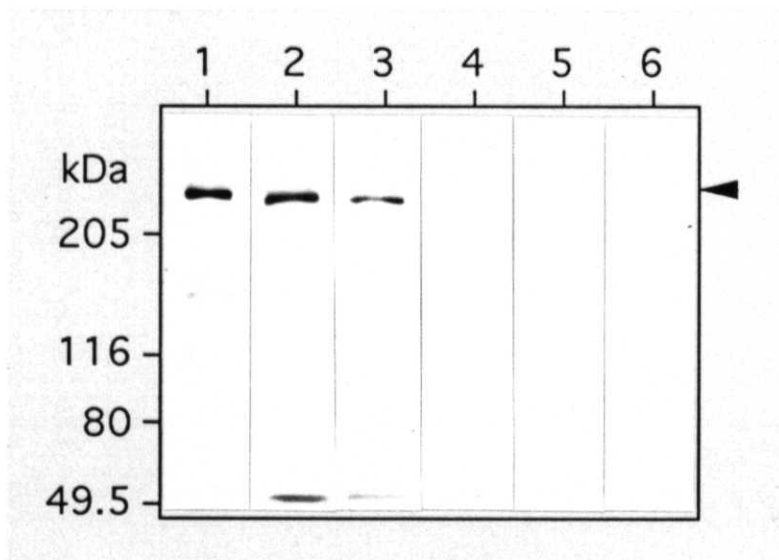


Fig. 3-2 IP_3 受容体のカルボキシル末端アミノ酸配列のペプチドに対するモノクローナル抗体の特異性

Jurkatの膜タンパク質を10 μ g/laneでSDS-PAGEして、ウエスタンブロットティング解析を行った。ブロットティング膜をKM1112(レーン1)、KM1083(レーン2)、KM1082(レーン3)、KM1112 + peptide-1C(レーン4)、KM1083 + peptide-2C(レーン5)、KM1082 + peptide-3C(レーン6)とインキュベーションして、さらに標識二次抗体と反応させ、モノクローナル抗体の結合するタンパク質をECL systemで可視化した。矢印は特異的なバンドで、 IP_3 受容体と考えられる。

る細胞ではヘテロ4量体を形成し、異なるサブタイプのタンパク質が互いに会合している可能性があった。そこで免疫沈降に使用するサンプルは、タンパク質を変性させてタンパク質同士の会合を解離させたタンパク質を使用した。このサンプルを使用することによって、ある IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体で免疫沈降したときに、他のサブタイプも同時に免疫沈降することを防止することにした。すなわち可溶化した Jurkat 細胞株の膜タンパク質を変性させて、 IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体で IP_3 受容体サブタイプを免疫沈降した。これを IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体でウエスタンブロット解析した (Fig. 3-3)。レーン 1、2、3 は、それぞれ IP_3 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 特異的モノクローナル抗体で免疫沈降したサンプルを泳動した。レーン 4 はコントロールとして膜画分の全タンパク質を泳動した。パネル (A)、(B)、(C) は、それぞれ IP_3 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 特異的モノクローナル抗体でウエスタンブロットした結果である。各パネルともレーン 4 は約 250 kDa の特異的なバンドが検出した。したがってウエスタンブロットで使ったモノクローナル抗体が反応したことを示した。次にレーン 1、2、3 について各パネルを比較すると、パネル (A)、(B)、(C) では、それぞれレーン 1、2、3 に特異的な約 250 kDa の分子量のバンドが検出され、各パネルともその他のレーンの約 250 kDa の分子量には反応しなかった。これらの結果は、作製したモノクローナル抗体が IP_3 受容体タンパク質をサブタイプ特異的に認識して検出したことを示した。また、これらモノクローナル抗体は、 IP_3 受容体タンパク質をサブタイプ特異的に免疫沈降したことを示した。したがって、モノクローナル抗体は他のサブタイプの IP_3 受容体タンパク質にクロス反応しないことが示された。

作製したモノクローナル抗体が、 IP_3 受容体サブタイプタンパク質を特異的に検出することを確かめるために、さらに検討を加えた。そのために IP_3 受容体タイプ 1 が優勢的に発現していると考えられる小脳、およびヒト IP_3 受容体タイプ 3 の一過性の発現細胞 (COS-7 細胞株に、ヒト IP_3 受容体タイプ 3 の cDNA 発現プラスミ

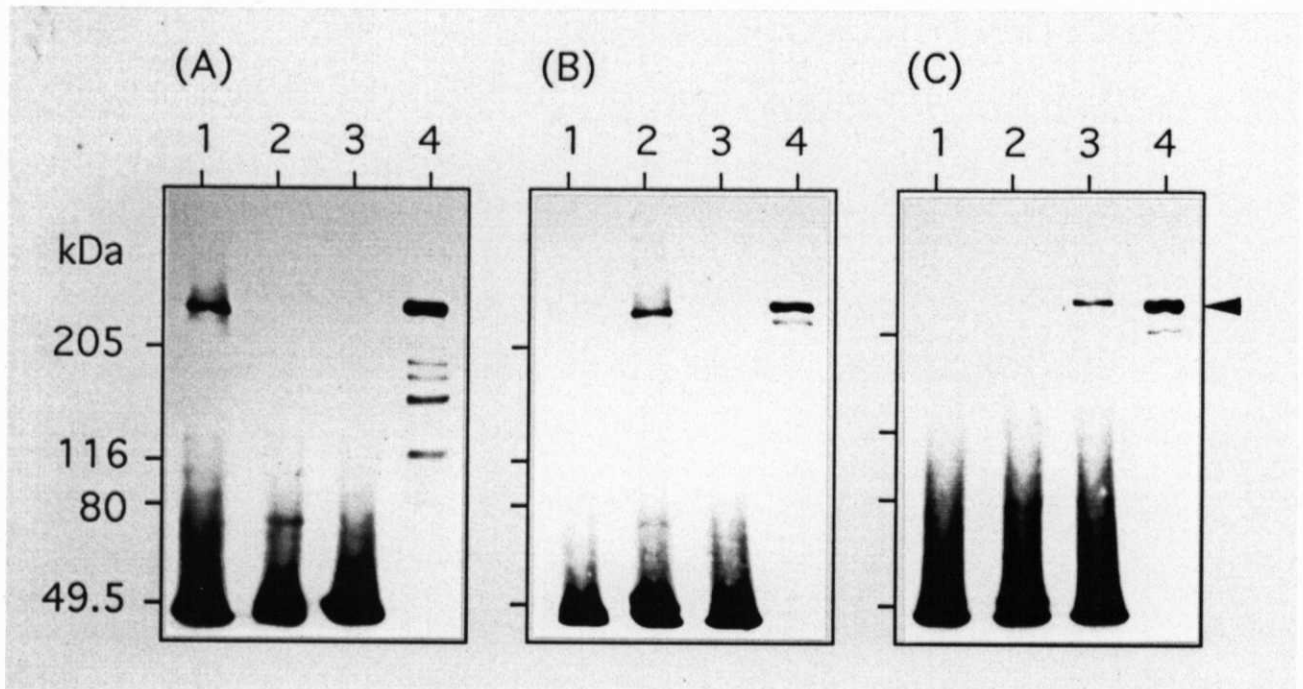


Fig. 3-3 IP_3 受容体サブタイプに対するモノクローナル抗体の特異性
 モノクローナル抗体の、それぞれ IP_3 受容体サブタイプに対する反応特異性を免疫沈降とウエスタンブロットリング解析によって確認した。Jurkatの膜タンパク質を可溶化して変性させ、KM1112 (レーン1) KM1083 (レーン2)、KM1082 (レーン3) でそれぞれ免疫沈降した。その免疫沈降サンプルと Jurkat膜タンパク質を (レーン4) を SDS-PAGE して、KM1112 (パネルA)、KM1083 (パネルB)、KM1082 (パネルC) でウエスタンブロットリングした。矢印は IP_3 受容体を示す。

ドを形質転換した細胞) をサンプルとして、IP₃ 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体のウエスタンブロッティング解析を行った (Fig. 3-4)。レーン 1, 2, 3 はそれぞれ小脳、COS-7 細胞株、ヒト IP₃ 受容体タイプ 3 を発現する COS-7 細胞株の膜タンパク質である。モノクローナル抗体 4C11 は、マウス IP₃ 受容体タイプ 1 タンパク質を抗原にして作製された抗体である (Furuichi et al., 1989)。4C11 が検出するバンドと、筆者らの作製したモノクローナル抗体が検出するバンドの分子量を比較した結果、ほぼ同じ分子量であった。また IP₃ 受容体タイプ 1 に特異的なモノクローナル抗体 KM1112 は、小脳の約 250 kDa の膜タンパク質には強く反応したが、COS-7 細胞株と IP₃ 受容体タイプ 3 を発現する COS-7 細胞株のタンパク質には反応しなかった。このバンドは、KM1112 に対する特異的なペプチドをモノクローナル抗体とインキュベーションすることによって消失した。これらの結果は、KM1112 が IP₃ 受容体タイプ 1 を特異的に認識することを示唆した。

一方、IP₃ 受容体タイプ 3 のカルボキシル末端のアミノ酸配列に特異的なモノクローナル抗体 KM1082 と、第 5、第 6 膜貫通領域に挟まれるループ領域に特異的なモノクローナル抗体 KM1109 は、IP₃ 受容体タイプ 3 を発現する COS-7 細胞株の約 250 kDa の分子量のバンドに強く反応した。このバンドは、KM082 や KM1109 に対する特異的なペプチドをモノクローナル抗体とインキュベーションすることによって消失した。また COS-7 細胞株では、同じ分子量の位置に弱い反応しか観察されなかった。さらに IP₃ 受容体タイプ 1 が多いと考えられる小脳の膜タンパク質には、相当するバンドは検出されなかった。これらの結果は KM1082 と KM1109 が IP₃ 受容体タイプ 3 を特異的に認識することを示唆した。

IP₃ 受容体タイプ 2 特異的モノクローナル抗体 KM1083 については、小脳、COS-7 細胞株、IP₃ 受容体タイプ 3 を発現する COS-7 細胞株のいずれに対しても、約 250 kDa の分子量のバンドに同程度に反応し、シグナルの強度に違いを示さなかった。また KM1083 は、KM1082 と KM1109 が検出しない小脳の約 250 kDa の分子量の膜タンパク質を検出した。KM1083 は、KM1112 が検出しない COS-7 細胞株および

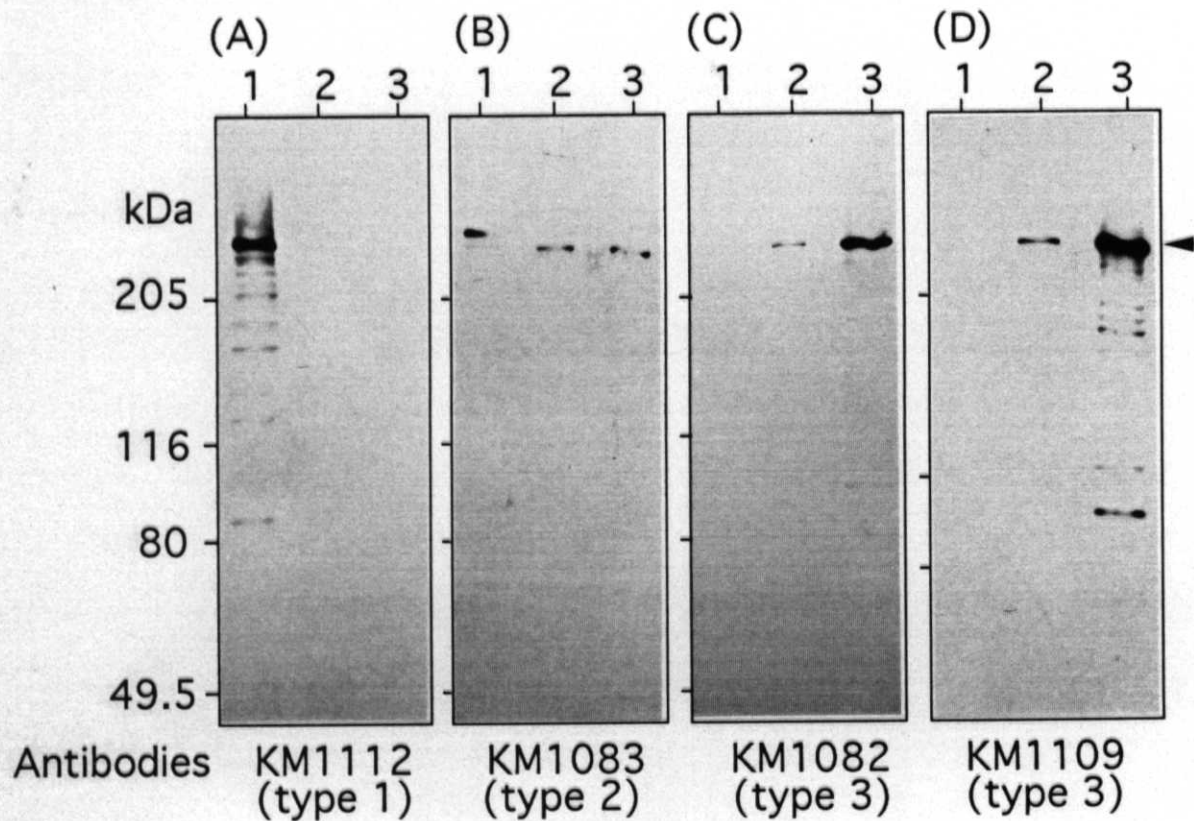


Fig. 3-4 IP_3 受容体のカルボキシル末端および膜貫通領域に挟まれるループ領域に対するモノクローナル抗体の反応特異性

IP_3 受容体タイプ1が多い小脳と、タイプ3の発現細胞を用いて、各モノクローナル抗体の反応特異性を検討した。マウス小脳の膜タンパク質（レーン1）、COS-7培養細胞（レーン2）、ヒト IP_3 受容体タイプ3を発現させたCOS-7培養細胞（レーン3）をSDS-PAGEして、モノクローナル抗体KM1112（パネルA）、KM1083（パネルB）、KM1082（パネルC）、KM1109（パネルD）でウエスタンブロッティング解析した。KM1112とKM1083とKM1082は、それぞれ IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3のカルボキシル末端のアミノ酸配列に対する抗体である。KM1109は IP_3 受容体タイプ3の膜貫通領域に挟まれるループ領域のアミノ酸配列に対する抗体である。

IP₃受容体タイプ3を発現する COS-7 細胞株の約 250 kDa の分子量の膜タンパク質を検出した。これらの結果から KM1083 は、KM1112 や KM1082 や KM1109 が認識しない約 250 kDa の分子量の膜タンパク質を検出したことを示した。

したがって KM1112 は、IP₃受容体タイプ1を特異的に検出することが示された。KM1082 と KM1109 は IP₃受容体タイプ3を特異的に検出することが示された。KM1083 は IP₃受容体タイプ1とタイプ3以外の 250 kDa タンパク質を特異的に検出する事が示された。

3-3-2-3 モノクローナル抗体 KM1083 の特異的認識タンパク質の IP₃ 結合能の解析

以上の検討で、モノクローナル抗体 KM1083 が特異的に認識するタンパク質については、分子量が約 250 kDa であることが示されたが、IP₃受容体であることを検証するためには、さらに検討が必要とされた。IP₃受容体タイプ2は、まだ遺伝子組換えタンパク質を発現する細胞を造成できていなかった。そこで KM1083 が認識する約 250 kDa のタンパク質が IP₃受容体であることを証明するために、そのタンパク質に IP₃ への結合能があることを検討した。第2章で示したように、mRNA レベルで IP₃受容体タイプ2の発現が確認されている Jurkat 細胞株をサンプルとして使用した。KM1083 で免疫沈降されるタンパク質を一定時間 [³H] IP₃ とインキュベーションして、洗浄後の [³H] IP₃ のラジオ活性を測定した結果、正常マウス血清を用いて免疫沈降した時に比べて KM1083 で免疫沈降すると、約 2.5 倍のラジオ活性が測定された (Fig. 3-5)。したがって KM1083 が認識するタンパク質は IP₃ 結合活性があることが確認された。KM1083 は、IP₃受容体タイプ2のカルボキシル末端領域に特異的な配列のペプチドに特異的に反応する。そして IP₃受容体タイプ1やタイプ3特異的モノクローナル抗体が認識しない約 250 kDa の分子量の膜タンパク質を特異的に検出する。したがって KM1083 は、IP₃受容体タイプ2のタンパク質を特異的に検出したと考えられた。

以上の様に、IP₃受容体のカルボキシル末端のアミノ酸配列のペプチドに対して

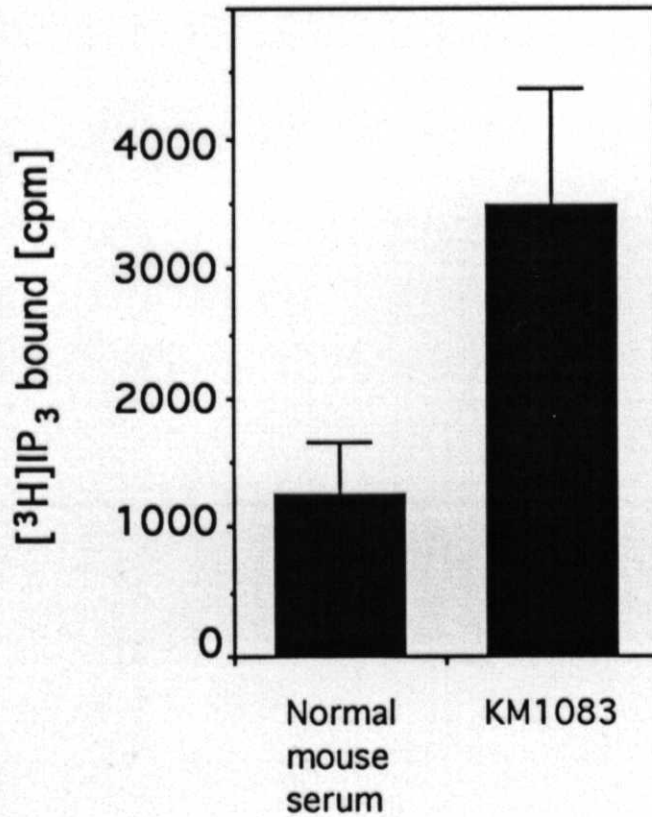


Fig. 3-5 抗IP₃受容体タイプ2モノクローナル抗体の結合蛋白はIP₃結合能KM1083が認識するタンパク質のIP₃結合能を解析して、IP₃受容体であることを確認した。Jurkatの膜タンパク質を可溶化して、KM1083を用いて免疫沈降した。沈降したタンパク質の[³H]IP₃との結合を液体シンチレーション計測器で測定した。コントロールとして、正常マウス血清で免疫沈降したタンパク質を用いた。

は、3つのサブタイプそれぞれに特異的なモノクローナル抗体が作製できた。ループ領域のアミノ酸配列のペプチドに対しては、タイプ3に特異的なモノクローナル抗体が作製できた。次にこれら抗体を使用して、IP₃受容体サブタイプの発現をタンパク質レベルで解析する。

3-3-3 IP₃受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体の、炎症性細胞におけるIP₃受容体サブタイプ発現解析への応用

炎症性細胞としてマクロファージ、多形核白血球、マスト細胞、好酸球を使用した。またB細胞の代表として脾臓細胞を使用した。T細胞の代表として胸腺細胞を使用した。これらの細胞で発現しているIP₃受容体サブタイプのタンパク質発現を、IP₃受容体のカルボキシル末端のアミノ酸配列に特異的なモノクローナル抗体でウェスタンブロッティング解析した結果、約250 kDaの分子量の位置に特異的なバンドを検出した (Fig. 3-6)。興味深いことに、細胞によって発現するIP₃受容体サブタイプがタンパク質レベルで異なることが示された。マクロファージと多形核白血球はIP₃受容体タイプ2タンパク質を優勢的に発現していた。好酸球はIP₃受容体タイプ1とタイプ2のタンパク質を発現しており、特にタイプ1が比較的多量に発現していた。リンパ球系の細胞の胸腺細胞と脾臓細胞は、IP₃受容体タイプ2とタイプ3のタンパク質を優勢的に発現していて、胸腺細胞でタイプ2の発現量がより多いことが示された。マスト細胞はIP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3のタンパク質全てを発現しており、特にタイプ2が優勢的に発現していた。

3-3-4 IP₃受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体の、IP₃受容体サブタイプの細胞内局在の解析への応用

IP₃受容体サブタイプの細胞内局在の異同は、各サブタイプの機能に関係すると考えられる。筆者らはIP₃受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体を作製して、

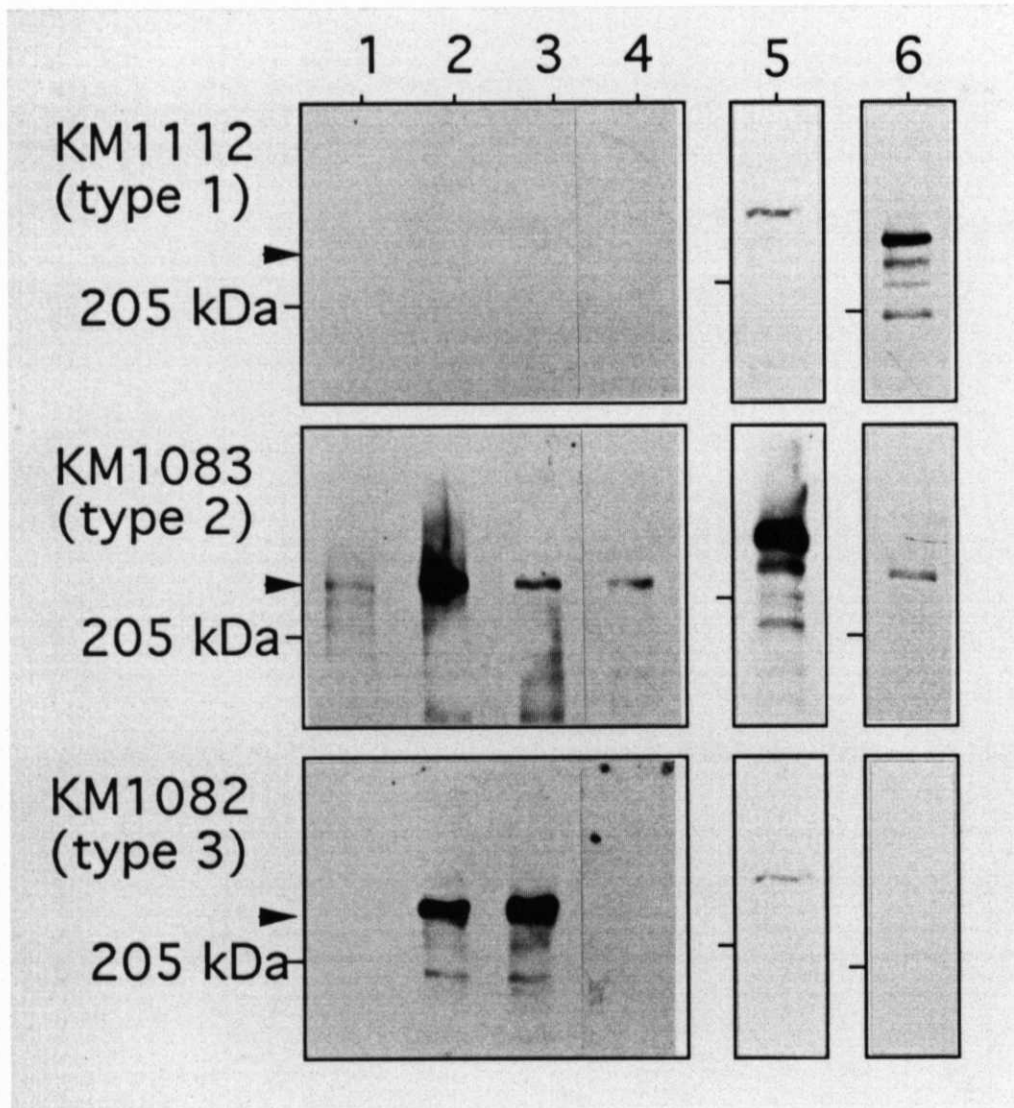


Fig. 3-6 炎症性細胞における IP_3 受容体サブタイプの発現のウエスタンプロット解析
 マウス由来のマクロファージ (レーン1)、胸腺細胞 (レーン2)、脾臓細胞 (レーン3)、多形核白血球 (レーン4)、マスト細胞 (レーン5)、およびハムスター由来の好酸球 (レーン6) を可溶化して、50 μ g/lane で SDS-PAGE した。そしてモノクローナル抗体 KM1112、KM1083、KM1082 を用いて、 IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3 をウエスタンプロットによって検出した。矢印は IP_3 受容体特異的なバンドを示す。

タンパク質レベルでの IP_3 受容体の解析を可能にした。そこで、 IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体を免疫細胞化学解析に応用した。

細胞としてはノーザンブロッティング解析で IP_3 受容体タイプ1とタイプ2が発現していることがわかっている CMK 細胞株を使用した (Sugiyama et al., 1994b)。

KM1112 と KM1083 を用いて免疫細胞染色し、FITC 標識した2次抗体でそれら抗体の特異的結合を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、KM1112 で染色された細胞内部位は、KM1083 で染色された細胞内部位と異なっていた (Fig. 3-7)。

KM1112 は細胞内の一部を比較的強く染色した。KM1083 は細胞内の所々を強く染色したが、全体的には細胞内を比較的均一に染色した。興味深いことに、

KM1083 は細胞膜に近接した部位にパッチ状の染色像をしたが、KM1112 では、その様な細胞膜近辺での強い蛍光像を示さなかった。また免疫細胞染色は、それぞれのモノクローナル抗体に対するペプチドを抗体とあらかじめインキュベーションすることによって消失した。したがってその染色像は、それぞれのモノクローナル抗体に特異的であることが示された。

これらの結果は、作製した IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体が免疫染色に使用可能であることを示した。さらに CMK 細胞株においては、 IP_3 受容体タイプ1とタイプ2の細胞内局在が異なることを示した。

3-3-5 IP_3 受容体の細胞膜局在性の解析

IP_3 受容体の細胞膜への存在性を、作製したモノクローナル抗体を用いて検討した。すなわち、Jurkat 細胞株を sulfo-NHS-biotin / PBS 溶液に懸濁し、細胞表面にあるタンパク質のリジン残基を介してビオチン化標識し、 IP_3 受容体がビオチン化されているかをモノクローナル抗体で解析した。ビオチン化標識した後、細胞を可溶化して、サブタイプ特異的モノクローナル抗体で免疫沈降した。この沈降物を SDS-PAGE で展開して、ビオチン結合性タンパク質であるアビジン、またはサブタイプ特異的モノクローナル抗体でウエスタンブロッティング解析した結果、ビオチ

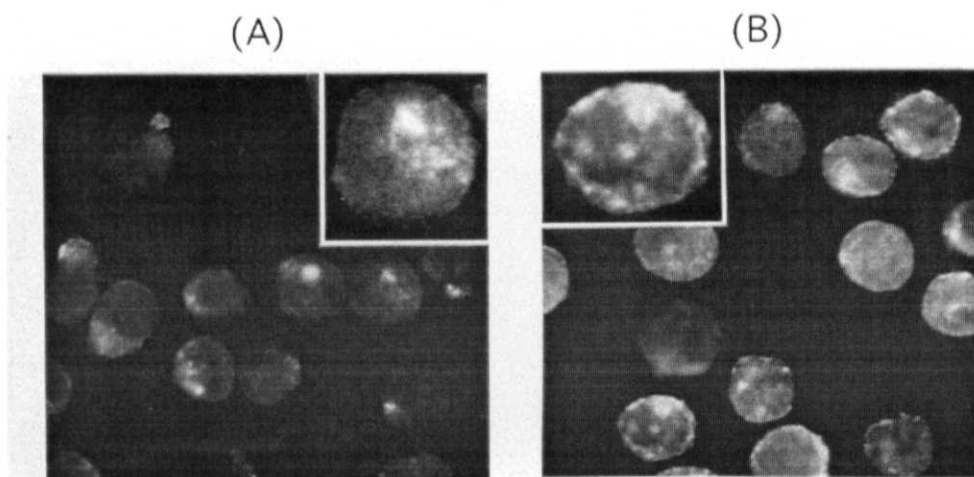


Fig. 3-7 CMK 細胞の IP₃ 受容体タイプ 1、タイプ 2 の免疫細胞化学解析
CMK 細胞株を固定化して、モノクローナル抗体 KM1112、KM1083 を用い
て IP₃ 受容体タイプ 1、タイプ 2 を蛍光染色し、FITC で可視化した。KM1112
(パネル A) または KM1083 (パネル B) で陽性細胞は、共焦点レーザー顕
微鏡で解析した。パネル A、B の挿入図は、細胞内のシグナルをおおざっ
ぱにノーマリゼーションした染色像である。

ン化標識タンパク質は分子量が違い、IP₃受容体とは異なるバンドとして検出された (Fig. 3-8)。したがって Jurkat 細胞株では、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3は細胞膜に存在しないと考えられた。

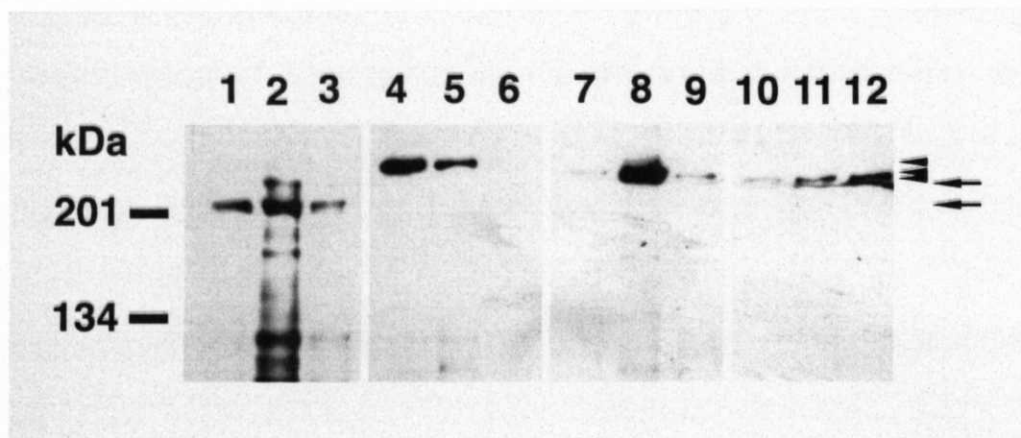


Fig. 3-8 細胞膜タンパク質をビオチン化標識したJurkat細胞の IP_3 受容体サブタイプの免疫沈降解析

Jurkat細胞株の細胞膜タンパク質をsulfo-NHS-biotinで標識し、モノクローナル抗体KM1112（レーン1,4,7,10）、KM1083（レーン2,5,8,11）とKM1082（レーン3,6,9,12）を用いて免疫沈降した。次にSDS-PAGEに供した後、ペルオキシダーゼ標識streptavidin（レーン1-3）、KM1112（レーン4-6）、KM1083（レーン7-9）またはKM1082（レーン10-12）でウエスタンブロットティング解析した。 IP_3 受容体サブタイプは約250kDaの分子量に検出された（矢印の頭）。ビオチン化タンパク質は約200kDaの分子量にバンドが検出され（矢印）、 IP_3 受容体とは異なっていた。

3-4 考察

モノクローナル抗体は IP_3 受容体の構造・機能そして組織／細胞内局在を研究するうえで必須のツールである。事実、唯一作製されていた IP_3 受容体タイプ1に特異的なモノクローナル抗体を使って、 IP_3 受容体タイプ1の組織／細胞での発現解析や、 IP_3 受容体のリン酸化、そして4量体構成による Ca^{2+} チャンネルの形成など、細胞内 Ca^{2+} 情報伝達を解明する上で重要な知見を与えてきた (Mikoshiha, 1993)。

一方筆者らは、初めて IP_3 受容体タイプ2とタイプ3に対するモノクローナル抗体を作製し、今までタンパク質レベルでの情報のなかったタイプ2やタイプ3の解析を可能としたのに加え、3つのサブタイプの相互的な解析も可能にした。ただし、カルボシキル末端に対する抗体は出来たが、ループ領域に対する抗体は出来なかった。免疫系にとって致命的になるなど、その抗体が出来ることが極めて都合の悪い配列だった可能性もある。

作製した抗体によって、まず発現分布解析が可能になり、対象の細胞の Ca^{2+} 濃度変化に関与するサブタイプを特定できるようになった。例えば、貪食している好酸球では、異物を飲み込もうとして形を変えた細胞膜近傍で細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇させ (Sawyer et al., 1985)、また遊走する好中球は細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させて前進することが知られている (Brundage et al., 1991)。このような細胞で発現する IP_3 受容体サブタイプを、ウエスタンブロッティング解析で検討した結果、多形核白血球 (好中球) と好酸球は、発現する IP_3 受容体タンパク質のサブタイプが異なり、 IP_3 に親和性の高い IP_3 受容体タイプ2が、多形核白血球で多いことがわかった。両細胞の Ca^{2+} シグナリングに関する違いとして、走化性因子の fMLP に対する感受性が好中球は好酸球に比べて高いことが知られる (Ogawa et al., 1981)。 IP_3 受容体の発現の違いも細胞機能の違いに関与していることが推察された。このように Ca^{2+} の関係する細胞機能に関して、 IP_3 受容体サブタイプの発現を知ることでより深く理解することできると思われる。

分布と同様に重要なのが、 IP_3 受容体サブタイプの細胞内局在性で、作製した抗

体はその解析を可能にした。ここで問題としたのは、IP₃受容体サブタイプが細胞膜に存在するかについてと、サブタイプによる細胞内局在性の違いである。前者は薬剤の標的として関心の高いところである。筆者らは胸腺細胞に由来するT細胞をモデルにして細胞膜存在性を検討した。

T細胞は細胞性免疫の主要な細胞で、この細胞におけるIP₃受容体の重要な役割の一つに、T細胞受容体の刺激によって産生されるIP₃に結合して、細胞内Ca²⁺濃度を増加させ、免疫で重要なinterleukin-2 (IL-2)の産生を引き起こすことが知られる(Gillis and Watson, 1980, Gootenberg et al., 1981)。この反応において細胞の十分な活性化には、細胞外からのCa²⁺流入が必要とされていたが、その機構は未解明であった。しかしその細胞膜は、IP₃に反応して開口するCa²⁺チャンネルが報告され(Kuno and Gardner, 1987)、IP₃受容体が細胞外からのCa²⁺流入に直接関与している可能性が考えられて注目されていた。生化学的な解析からは、Jurkatで発現するIP₃受容体は、IP₃結合特性やシアル酸含量がタイプ1が優勢的に発現する小脳のIP₃受容体と異なることが示されて(Khan et al., 1992a, Khan et al., 1992b)、そのシアル酸含量の多さが、IP₃受容体が細胞膜に存在する可能性を示す1つの根拠と考えられていた。またマウスTリンパ腫細胞株においては、IP₃受容体が細胞骨格タンパク質のアンキリンを介して細胞膜と作用していると報告されていた(Bourguignon et al., 1993b)。一方筆者らは、ヒトIP₃受容体タイプ2とタイプ3のcDNAクローニングによって、タイプ3のN-グリコシレーション候補部位がタイプ1やタイプ2より多いこと、およびその予測付加部位が異なることを報告した(Yamamoto-Hino et al., 1994)。さらにJurkat細胞株はタイプ2とタイプ3を発現していることを報告し(Sugiyama et al., 1994b)、3つのサブタイプのどれかが細胞膜に存在する可能性を考えていた。しかし本章で筆者らは、細胞表面タンパク質ビオチン化標識法を用いることによって初めて、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3がJurkatの細胞膜には存在しないことを見いだした。よってJurkatの細胞膜にあるとすれば、まだ未知のサブタイプだと考えている。最近の報告によると、細胞内Ca²⁺貯蔵庫枯渇シ

グナル依存的に働く細胞膜にある Ca^{2+} チャンネルの transient receptor potential (TRP) のヒトホモログが、 IP_3 受容体と会合しているらしい (Boulay et al., 1999)。 IP_3 受容体は細胞内の小器官にあって、 IP_3 受容体が細胞膜の Ca^{2+} チャンネルと機能的に会合することによって細胞外からの Ca^{2+} 流入を引き起こしている可能性が高い。

細胞内は極めて不均一な構造体で、タンパク質の局在は、そのタンパク質の働きを知る重要な情報である。 IP_3 受容体に関しても、 IP_3 が細胞内で比較的良く分散するのに対して、 Ca^{2+} の分散性が悪いことから (Allbritton et al., 1992, Allbritton and Meyer, 1993, Jafri and Keizer, 1994)、1つの受容体が作用するタンパク質は限定的であると考えられている。したがって局在性の情報は、サブタイプの働きを理解する上で重要と考えられた。 IP_3 受容体タイプ1は、小脳では小胞体に存在するが (Yamamoto et al., 1991)、アフリカツメガエルの卵細胞では、核膜周囲に局在することが報告されていたり (Kume et al., 1993, Parys et al., 1992)。平滑筋細胞やケラチン細胞では、細胞膜にも存在することが示されていて (Fujimoto et al., 1992)、細胞によっても局在が異なることが知られている。そこで筆者らは、他のサブタイプもタイプ1と同様の局在性を示すか検討した。 IP_3 受容体タイプ1とタイプ2を発現する CMK 細胞株をモデルにして細胞免疫化学的に解析した結果、2つのサブタイプは細胞内局在が異なり、 IP_3 受容体タイプ2の特徴として細胞膜近傍にパッチ状に存在することがわかった。1つの IP_3 受容体が作用するタンパク質が限定的であるとする、タイプ1とタイプ2とでは作用するタンパク質が異なる可能性がある。他のタンパク質との局在性がどうなっているかさらに解析が必要である。そのためには、細胞質が広く観察しやすい細胞系で検討するのが良いと考えられた。 IP_3 受容体サブタイプの細胞内局在に関して、第4章と第5章でも詳細な解析を示す。

なお、CMK 細胞は巨核球様の細胞として (Ikebuchi et al., 1998)、血小板のタンパク質を発現していると考えられているが、最近になって、血小板には IP_3 受容体タイプ1とタイプ2が存在し、タイプ2が細胞膜画分に濃縮することが示されている (Quinton and Dean, 1996)。CMK 細胞でのパッチ状のシグナルは細胞膜直下の局在性

を示していたのだろう。

従来、IP₃受容体はタイプ1のみが知られていたもので、ホモ4量体を形成すると考えられてきた(Maeda et al., 1991)。現在も、小脳プルキンエ細胞ではIP₃受容体タイプ1が優勢的に存在するために、ホモ4量体が正しいと考えられている。しかしJurkat細胞株など3つのサブタイプが発現する細胞があることがわかると(Sugiyama et al., 1994b)、3つのサブタイプがそれぞれホモ4量体で1チャンネルを作るのか、あるいはヘテロなサブユニットとして1チャンネルを作ることがあるのか大きな課題となっていた。細胞膜にある代謝型グルタミン酸受容体では、異なるサブタイプが集まり4量体として1つのCa²⁺チャンネルを作り、しかもサブタイプの構成員によってチャンネル特性が違うことが報告されていて(Wenthold et al., 1992)、ホモであるか、ヘテロであるかはその機能上大きく異なると考えられていた。筆者らはこの課題の解明にはIP₃受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体が応用できると考えた。作製した抗体を利用してIP₃受容体サブタイプを免疫沈降する際に、変性処理してタンパク質の会合をばらばらにすると、各サブタイプが特異的に免疫沈降されるが(Fig. 3-3)、タンパク質の会合状態を許容した条件下では、標的としたタイプ以外のサブタイプも共免疫沈降したことから(Fig. 3-8)、IP₃受容体はヘテロ4量体を形成しうると考えられた。筆者らはさらに詳細に検討して、IP₃受容体は3つのサブタイプがあるので、組み合わせによってIP₃受容体Ca²⁺チャンネルの多様性が増大している可能性を提唱した(Monkawa et al., 1995)。サブタイプの細胞内局在性に関する情報が、その組み合わせに関して有用な情報を与えると考えられた。したがって作製したモノクローナル抗体を用いて様々な組織・細胞を解析し、IP₃受容体の多様性の可能性について検討を加えることが必要と考えられた。

細胞応答におけるIP₃受容体サブタイプの役割解明は重要な課題で、解析のためには、特異的な薬剤を用いるか、または特異的に発現制御をするかの2つが考えられる。しかし、そのような薬剤は知られていないし、発現制御も容易ではない。

IP₃受容体タイプ1に関しては、マウス IP₃受容体タイプ1のカルボキシル末端領域に特異的なモノクローナル抗体 18A10が、*in vitro*で IP₃受容体による Ca²⁺放出を阻害する活性があることから (Nakade et al., 1991)、この抗体を用いて、タイプ1の役割として、受精時の卵細胞の細胞内 Ca²⁺波の形成が示され (Miyazaki et al., 1992)、抗体を機能解析に応用できることが示されている。その機構は、18A10が IP₃受容体のカルボキシル末端に結合してチャンネルを覆い塞いでしまうためと考えられている。同様な活性が筆者らの作製したモノクローナル抗体にあれば、活性阻害抗体として直接的な機能解析への応用が期待される。予備的な実験の結果、*in vitro*で阻害活性を有する可能性があることがわかっている。作製した IP₃受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体による IP₃受容体 Ca²⁺チャンネル活性の阻害効果に関して、詳細に検討する必要があると考えられた。

IP₃受容体サブタイプのカルボキシル末端のアミノ酸配列は、ヒト、マウス、ラット間で非常に良く保存されている。本章では、筆者らの作製した IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3それぞれに対して特異的なモノクローナル抗体が、齧歯類の相当する IP₃受容体サブタイプに特異的に反応することを示した。したがって作製したモノクローナル抗体は、ヒトのサンプルに限らず、豊富なモデル動物（齧歯類）においても利用可能で、IP₃受容体を介した細胞内 Ca²⁺情報伝達の研究に利用可能な有用なツールであると考えられた。

3-5 結語

IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3をタンパク質レベルで解析するツールとして、それぞれに特異的なモノクローナル抗体の作製を検討した。筆者らのIP₃受容体サブタイプcDNAクローニングの結果から、IP₃受容体は全体的には互いに相同性があることがわかっていた。そこでマウスの免疫に使用する抗原として、全アミノ酸配列をもつIP₃受容体タンパク質ではサブタイプ特異的な抗体を作製するのは非効率的と考え、サブタイプに特異的な領域を探索してその相当するアミノ酸配列のペプチドを抗原として免疫することを考えた。

IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3のそれぞれに特異的なアミノ酸配列として、第5と第6膜貫通領域に挟まれるループ領域、およびカルボキシル末端領域のアミノ酸配列を選択した。これらのアミノ酸配列にしたがってペプチドを合成し、これを抗原にしてマウスを免疫した。そのマウスから抗体産生する脾臓細胞を回収してハイブリドーマを調製し、モノクローナル抗体産生細胞を作製した。

作製したモノクローナル抗体の反応特異性を、ELISA、ウエスタンブロッティング、免疫沈降による解析で検討した結果、各モノクローナル抗体は抗原としたペプチドのアミノ酸配列を特異的に認識し、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3タンパク質をそれぞれ特異的に検出することが確認された。これらモノクローナル抗体は他のIP₃受容体サブタイプにクロス反応することがなく、目的のIP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3それぞれに特異的なモノクローナル抗体であった。

IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3のカルボキシル末端のアミノ酸配列に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、それぞれ1クローン、6クローン、7クローン取得した。第5と第6膜貫通領域に挟まれるループ領域のアミノ酸配列に対するモノクローナル抗体については、IP₃受容体タイプ3に対して5クローン取得した。こられの抗体の中から、IP₃受容体サブタイプの特異的な検出と解析に使用できる抗体として、カルボキシル末端のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体のセット（タイプ1特異的抗体：KM1112、タイプ2特異的抗体：

KM1083、タイプ3特異的抗体：KM1082) を選択した。

モノクローナル抗体K1112、KM1083、KM1082は、IP₃受容体サブタイプのウエスタンブロットティング解析、免疫沈降、免疫組織・細胞化学解析に使用可能な抗体であった。

モノクローナル抗体K1112、KM1083、KM1082を用いて、炎症性の血球系細胞でのIP₃受容体サブタイプの発現を検討した結果、細胞によって発現するサブタイプが異なっていて、複数種類のサブタイプを発現する細胞もあった。これらの結果は、第2章に示した mRNA レベルでのIP₃受容体サブタイプの発現プロフィールの解析結果を支持する結果であった。

モノクローナル抗体K1112、KM1083、KM1082を用いて、IP₃受容体タイプ1とタイプ2を発現するCMK細胞株でのサブタイプの細胞内局在を検討した結果、その分布に違いがあることを見いだした。これはIP₃受容体の機能を考える上で重要な知見であると考えられた。

以上のように筆者らは初めて、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3をタンパク質レベルで解析するツールとしてのIP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3に対するモノクローナル抗体を作製した。IP₃受容体の機能を明らかにするには、これらモノクローナル抗体をセットとして用いて、組織・細胞におけるIP₃受容体サブタイプの発現や、他のタンパク質との相互作用について解析を進めるのが有効と考えられる。

第4章 イノシトール3リン酸受容体サブタイプの組織・細胞特異的発現の解析

4-1 緒言

IP₃受容体には3つのサブタイプが存在することが明かとなり (Yamamoto-Hino et al., 1994, Sugiyama et al., 1994b)、いまやIP₃受容体による細胞内Ca²⁺情報伝達を解明するためには、3つのサブタイプを解析しなければその生理機能を誤って解釈することになる。またIP₃受容体の機能を理解するためには、タンパク質レベルでの解析が不可欠である。そこで筆者らは第3章において、IP₃受容体サブタイプのタンパク質レベルでの解析を可能とする、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3に対する特異的モノクローナル抗体を作製した (Sugiyama et al., 1994a)。本章ではこれら抗体を用いて、IP₃受容体サブタイプの組織分布を解析することにした。

生体は様々な組織の有機的な集合体であり、各組織は高度に分化した細胞群で構成されるため、全組織は詳細に調べる必要がある。中枢神経系の組織については共同研究者の御子柴らが主に解析を進め、末梢組織の一部を筆者らが解析した。本章では、気道を構成する組織での解析を中心に述べる。

気道における粘液層の移動機構は、主要な生体防御機構である。すなわち気道上皮の全面を覆う粘液が異物を捕らえると、肺や気管支を保護するために速やかに排出する (Fig. 4-1)。その働きは気道上皮線毛細胞の線毛運動と、杯細胞や粘膜下腺が分泌する粘液で担当され、気道上皮表面における協調的な線毛運動が粘液を咽頭部へ追いやっている。このときの粘液の粘性は、粘液を何の障害もなく気道上部へ移動させるのに重要な要因で、気道上皮細胞の塩素イオン分泌によって制御される粘液の含水量によって決まることが知られている。

気道上皮におけるIP₃受容体の役割は、線毛運動と分泌の制御である。最近の生理学的な研究では、線毛運動 (Salathe and Bookman, 1995, Korngreen and Priel, 1994) と塩素イオン分泌 (Clarke et al., 1994, Yamaya et al., 1993) の制御に細胞内Ca²⁺濃度が関わっていることが示されている。線毛運動においては互いに接触している上皮細

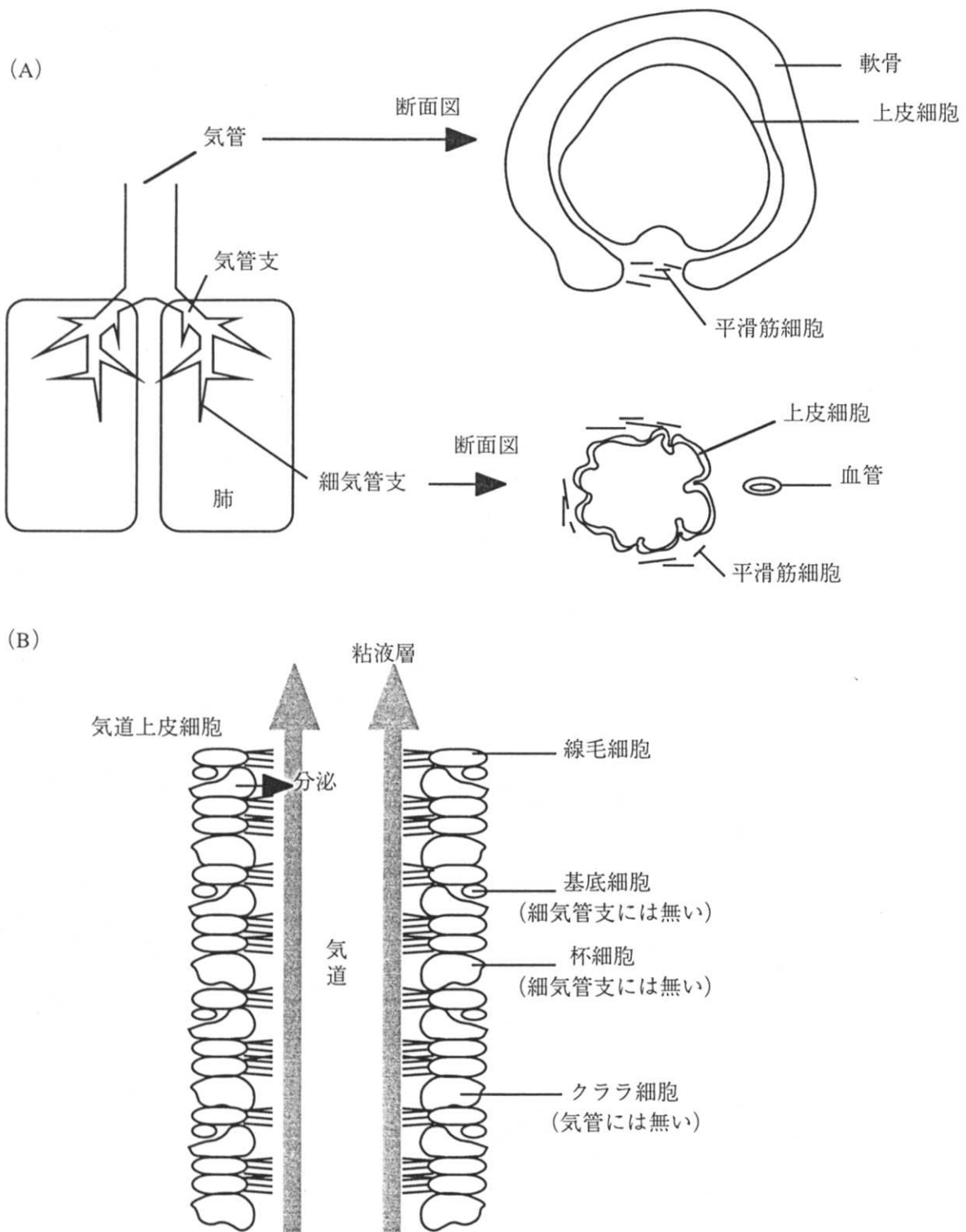


Fig. 4-1 呼吸路の概略

(A) 気管、気管支、細気管支、肺の組織図。気管と気管支は軟骨組織を含む。細気管支になると軟骨組織が消失してくる。(B) 気道上皮細胞の概略図。微絨毛縁をもつ線毛細胞と分泌性の細胞で構成される。分泌性の細胞は気管の場所によって種類が異なる。基底細胞は上皮の他の細胞に替わりうる比較的未分化な細胞の予備である。絨毛の動き、および塩素イオンやムチンの分泌が細胞内 Ca^{2+} によって制御されている。

胞の協調した動きが重要だが、 IP_3 が介在する細胞間 Ca^{2+} 波が (Boitano et al., 1992, Sanderson et al., 1994)、この反応に寄与していると考えられている。 IP_3 は IP_3 受容体に結合して細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫から Ca^{2+} 放出させるセカンドメッセンジャーであり (Berridge, 1993)、 IP_3 が細胞間を何らかの方法で移動して隣の細胞の IP_3 受容体に結合してその細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節すると考えられている。しかしこのような細胞における IP_3 受容体の組織・細胞局在に関する免疫組織化学的な解析は全く検討されていなかった。

本章では、この気道上皮における IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3の発現と細胞局在に関して、筆者らが作製した3つのモノクローナル抗体を用いての解析を述べる。

4-2 材料と方法

4-2-1 試薬

IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3特異的モノクローナル抗体としては、それぞれKM1112、KM1083、KM1082を使用した(Sugiyama et al., 1994a)。クララ細胞特異的抗体としては、ウサギ抗ラット10-kDaクララ細胞特異的ポリクローナル抗体(CCSP抗体)を使用した(Wasano and Hirakawa, 1992)。Wisteria floribunda lectin (WFA)、ビオチン標識抗マウスIgG、アビジンビオチン複合体試薬(ABC試薬)およびローダミン標識アビジンはVector Labs社製を使用した。

Dichlorotriazinyl amino (DATF)標識ウマ抗マウスIgGはChemicon社製を使用した。ローダミン標識ヤギ抗ウサギIgGはDAKO社製を使用した。Enhanced chemiluminescence (ECL)検出キットはAmersham社製を使用した。その他の分析用試薬は、Sigma社、和光純薬社、ペプチド研究所、Fisher Scientific社およびSchleicher & Schuell社製を使用した。

4-2-2 動物およびその組織化学解析用ブロックの調製

成獣雄ウイスターラット(7~8週令)を日本チャールスリバーから入手し、使用した。呼吸器を組織染色用に摘出するために、ラットの腹腔に過剰量の麻酔薬ペントバルビトールを注射して麻酔した。次に喉頭部を切開して気管カニューレーションを行い、引き続き固定液(2% paraformaldehyde, PBS, pH 7.4)を肺の方向に注入した。10分間静置した後に気管と肺を一緒に摘出して、固定液に浸漬した。次に脱気装置を用いて組織中にある気胞を脱気させた。組織はさらに4°Cで16時間インキュベーションして固定した後、パラフィン包埋して組織ブロックとした。次に組織切片を得るために、組織ブロックをクリオスタットを用いて4μm厚に切り出し、ポリLリジンで表面処理したスライドガラスに張り付けた。

4-2-3 膜画分の調製とウエスタンブロッティング解析

ウイスターラットを断頭屠殺後、直ちに気管を摘出してPBSで洗浄し、液体窒素中に浸漬して凍結した。次に凍結した気管を液体窒素で冷却したワーニングブレンダーで粉状に破碎した。次に破碎した気管を氷冷したホモジナイズ溶液（5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose, 0.1 mM PMSF, 10 μ M pepstatin A, 100 μ M AEBSF, 10 μ M E-64, 10 μ M leupeptin, pH 7.4）中で、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした後、2,000 x g で4 °C で10分間遠心した。その上清をさらに100,000 x g で4 °C で30分間遠心して、上清を廃棄して沈殿に懸濁液（50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10 μ M pepstatin A, 10 μ M leupeptin）に再懸濁して回収した。回収した膜画分は、サンプル緩衝液（0.1% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8）に溶解し、80 °C で3分インキュベーションした後に6% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行ってタンパク質をアクリルアミドゲルに展開した。ゲル中のタンパク質は、エレクトロブロッティングによってニトロセルロース膜（Schleicher and Schuell 社製）に転写した。すなわちゲルとニトロセルロース膜を密着させて、ブロッティング用緩衝液（10 mM Tris-HCl, 5 mM glycine, 1% SDS, pH 7.2）で湿らせた濾紙で挟み、膜の両側に電圧をかけて、200 mA の定電流で4 °C で1時間通電することによってゲルに展開したタンパク質をニトロセルロース膜にブロッティングした。次にブロッティングしたニトロセルロース膜をブロッキング溶液（PBS, 10% スキムミルク, 0.2% Tween 20）に浸漬して、室温で30分間インキュベーションした。次に40 ng/ml KM1112 または40 ng/ml KM1083 または40 ng/ml KM1082 を添加して室温で2時間インキュベーションした。洗浄液（0.1% Tween 20, PBS）中で10分間の振盪を3回繰り返して、特異的な反応をしない抗体を洗浄して、次にペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体の溶液を添加して、室温で30分間インキュベーションした。これを洗浄液で10分間の振盪を3回繰り返して洗浄後、結合したモノクローナル抗体は化学発光検出システム

ECL を用いて検出した。

4-2-4 免疫組織化学解析とレクチン組織化学解析

組織切片中の IP₃ 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 のタンパク質を検出するために、パラフィン切片をキシレンに室温 10 分間浸漬して脱パラフィンした後、100% エタノールに浸漬した。次に PBS で段階的に含量を少なくしたエタノールに 10 分間ずつ次々に浸漬して、最終的に PBS に浸漬して切片の親水処理を行った。

最初に切片をブロッキング溶液（2% 正常ウマ血清、PBS）で室温で 30 分間インキュベーションした。次にブロッキング溶液で希釈した 1 µg/ml KM1112、1 µg/ml KM1083 または 1 µg/ml KM1082 を添加して、加湿状態で 4 °C で 16 時間インキュベーションした。このときコントロールとして、10 倍量の、それぞれのモノクローナル抗体に特異的なペプチドであらかじめインキュベーションしたモノクローナル抗体溶液も使用した。組織切片の張り付けたスライドガラスを PBS で 10 分間を 3 回洗浄した後、1 µg/ml ビオチン標識抗マウス IgG を添加して室温で 60 分間インキュベーションした。次にスライドガラスを PBS で 10 分間を 3 回洗浄して、ABC 試薬を添加して 30 分間インキュベーションした。次に diaminobenzidine (DAB) - H₂O₂ 溶液（0.5 mg/ml DAB, 0.01% H₂O₂, 0.05 M Tris-buffered saline, pH 7.2）を添加して、室温で 1 ~ 5 分間インキュベーションして結合した ABC 試薬のペルオキシダーゼ活性を検出した。これを水洗して乾燥した後、マウント剤 Permount にマウントした。

レクチンと抗体との二重染色の検討には、それぞれ WFA と KM1083 を使用した。気管の組織切片を KM1083 で上述の方法に従って反応させた後、1 µg/ml DATF 標識ウマ抗マウス IgG を添加して室温で 1 時間インキュベーションした。PBS で 10 分間を 3 回洗浄して次のレクチン染色に供した。KM1083 で染色した組織切片に PBS で希釈した 10 µg/ml ビオチン標識 WFA を添加して、室温で 1 時間インキュベーションした。PBS で 10 分間を 3 回洗浄した後、ローダミン標識アビジンを添

加して室温で30分間インキュベーションした。次にPBSで10分間を3回洗浄した後、組織切片をPBSで希釈した20%グリセロールにマウントした。

抗体の二重免疫蛍光染色にはKM1083とCCSP抗体を使用した。肺の組織切片をKM1083で上述の方法に従って蛍光染色した後、PBSで希釈した1.6 µg/mlのCCSP抗体を添加して、室温で1時間インキュベーションした。PBSで10分間を3回洗浄した後、ローダミン標識ヤギ抗ウサギIgGを添加して室温で30分間インキュベーションした。次にPBSで10分間を3回洗浄した後、組織切片をPBSで希釈したグリセロールにマウントした。

標本は蛍光顕微鏡（オリンパス社製）で観察した。フルオレセインはExcitation: BP 450-490, Emission: BP 515-565のフィルターセットで緑色に可視化し、ローダミンはExcitation: BP 456, Emission: LP 590のフィルターセットで赤色に可視化した。

4-3 実験結果

4-3-1 気管での IP_3 受容体サブタイプ発現のウエスタンブロットリング解析

気管で発現する IP_3 受容体サブタイプを解析するために、ラット気管の膜タンパク質を使用して、 IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体でウエスタンブロットリング解析した。その結果、KM1112、KM1083、KM1082 とともに約 250 kDa の分子量の位置に、それぞれ IP_3 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 を示すバンドが検出された (Fig. 4-2)。 IP_3 受容体タイプ 1 を示すバンドは、タイプ 2 やタイプ 3 に比べて少し大きい分子量であった。3 つの IP_3 受容体サブタイプのアミノ酸配列に基づく分子量の差や、タンパク質の糖修飾の違いが、アクリルアミドゲル中での泳動に影響を及ぼした可能性が考えられた。 IP_3 受容体タイプ 2 とタイプ 3 は単一バンドとして検出されたが、タイプ 1 は約 200 kDa と約 100 kDa の分子量にもバンドが検出された。筆者らの別の実験での検討で (Monkawa et al., 1995)、このバンドはタイプ 1 の分解物である可能性が高いと考えられた。

以上のように、気管には 3 つの IP_3 受容体サブタイプが発現していることが示された。次に免疫組織染色によってさらに詳細に発現細胞を解析する。

4-3-2 気管上皮細胞での IP_3 受容体サブタイプ発現の免疫組織化学的解析

免疫組織化学的解析には、組織構造の保持が良いパラフィン包埋切片法でサンプルを調製することにした。組織の固定には、通常は組織を固定液に浸漬するだけでよいが、気管や肺の場合には当然、組織内に多数の気胞が入っているため、固定液が十分に全ての細胞に行き届かない。そこで本実験では固定液に浸漬した組織をそのまま脱気装置にセットして、脱気することによって固定液が組織内の隅々まで行き届くように工夫した。

このサンプルの組織切片を用いて、気管をモノクローナル抗体 KM1112、

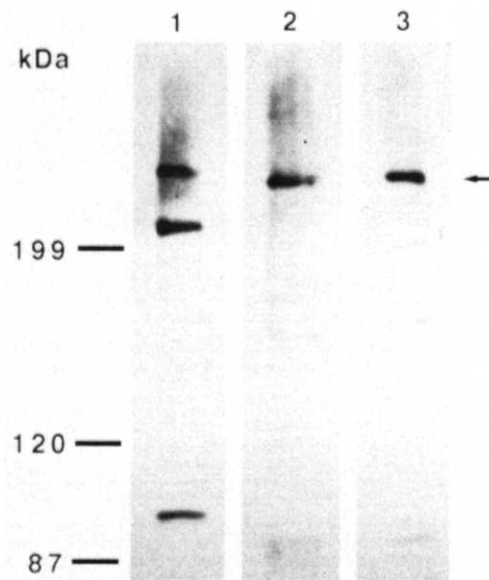


Fig. 4-2 気管での IP_3 受容体サブタイプの内スタンプロツテイソグ解析
 ラツト気管の可溶化タンパク質をSDS-PAGEして、KM1112 (レーン1)、
 KM1083 (レーン2)、KM1082 (レーン3) を用いて内スタンプロツテイ
 ソグ解析した。矢印は IP_3 受容体サブタイプを示すバンドである。3つの
 サブタイプのタンパク質発現が認められる。

KM1083, KM1082 で免疫染色した結果、IP₃ 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3は気管上皮細胞にそれぞれ特徴的な局在を示した (Fig. 4-3a,b,c)。写真は全て上部が気道である。気道に面している細胞が気管上皮細胞で、その下は結合組織である。IP₃ 受容体は茶色に染色されている。Fig. 4-3b の図では細胞の核をマリンプルーの色で対象染色を施した。気管上皮細胞の内、気道側に線毛構造がある細胞が線毛細胞である。気道側が平坦な膜構造になっている細胞は杯細胞 (分泌性の細胞の一種) である。核が他の気管上皮細胞と比べてより気道と離れた位置にある細胞は、基底細胞 (未分化な上皮細胞) と考えられる。

IP₃ 受容体は、気管上皮細胞の線毛細胞に発現が認められた。杯細胞や漿粘液性細胞 (分泌性の細胞の一種) や基底細胞は抗体で染色されなかった。興味深いことに、3つのIP₃ 受容体サブタイプともに線毛細胞で発現していたが、その細胞内分布はサブタイプによって違いが認められた。IP₃ 受容体タイプ1は線毛の直下のごく限られた領域に強く発現していて、その他の細胞内領域には発現していなかった (Fig. 4-3a)。IP₃ 受容体タイプ2は細胞質全体的に強く発現していて、一部の細胞はタイプ1のように線毛の直下の細胞質に多く局在するのが認められた (Fig. 4-3b)。IP₃ 受容体タイプ3は主に核より上部の気道側の細胞質に発現していた (Fig. 4-3c)。

次により肺に近い細気管支を解析することにした。

4-3-3 細気管支上皮細胞でのIP₃ 受容体サブタイプ発現の免疫組織化学的解析

上節と同様にして、細気管支をモノクローナル抗体 KM1112, KM1083, KM1082 で免疫染色した結果、IP₃ 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3は細気管支上皮細胞にそれぞれ特徴的な局在を示した (Fig. 4-3b,e,f)。これらの局在は、一部を除いて基本的に気管でのIP₃ 受容体サブタイプの局在と同じであった。

IP₃ 受容体タイプ1は線毛細胞の線毛の直下に薄い層状に発現していて、その他の細胞内領域には発現していなかった (Fig. 4-3d)。IP₃ 受容体タイプ2は線毛細胞の細胞質全体的に強く分散状に発現していた (Fig. 4-3e)。IP₃ 受容体タイプ3はタ

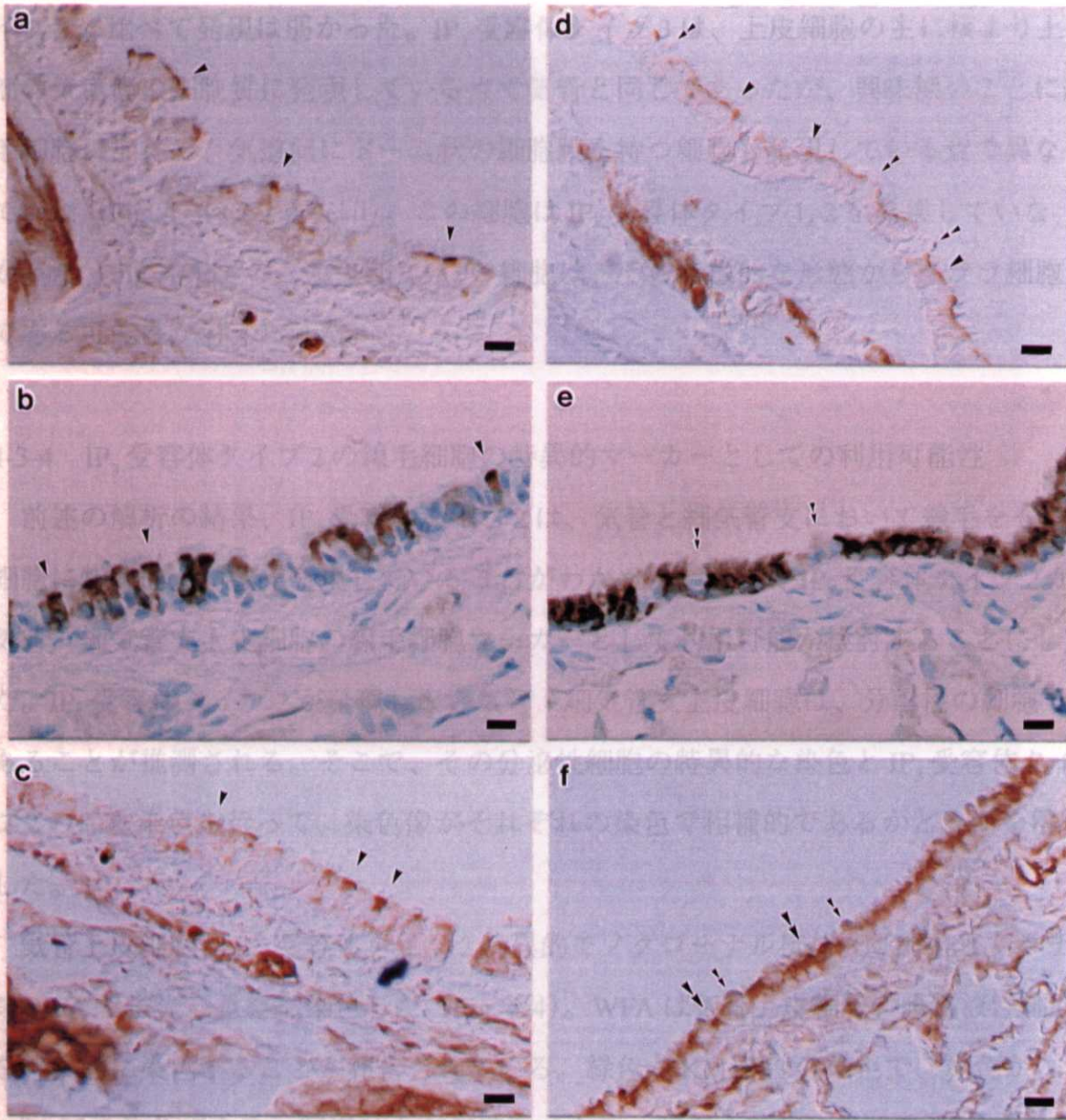


Fig. 4-3 ラット気管、および細気管支上皮における IP_3 受容体サブタイプ発現の免疫組織化学解析
 気管 (a-c) と細気管支 (d-f) の組織切片を、モノクローナル抗体KM1112 (a,d)、KM1083 (b,e)、KM1082 (c,f) を用いて免疫染色した。KM1083とインキュベーションした組織切片はメチルグリーンで細胞の核を対象染色した。(a,d) KM1112が反応するタンパク質は、どちらの気管レベルでも唯一線毛細胞の気道側の薄く限局した細胞質 (矢印) に観察された。二重の矢印は細気管支上皮のクララ細胞で、KM1112で染色されない。(b,e) KM1083で免疫染色した組織切片。密に広がった染色像が線毛細胞で観察される。いくつかの線毛細胞では、密なバンド状の染色が気道側の膜直下の細胞質に観察される (矢印)。クララ細胞は染色されない (二重矢印)。(c,f) KM1082で免疫染色される組織切片。気管上皮では、線毛細胞だけが染色された (矢印)。細気管支の上皮では線毛細胞 (大二重矢印) もクララ細胞 (小二重矢印) も染色された。特徴として、両タイプの細胞ともに、気道側の細胞質の半分の領域に染色が認められた。原図倍率 x100。Bars = 10 μ m

IP₃受容体タイプ2に比べて発現は弱かった。IP₃受容体タイプ3は、上皮細胞の主に核より上部の気道側の細胞質に発現している点で気管と同じであったが、興味深いことに線毛細胞に加えて、気道側にドーム状の細胞膜を持つ細胞も発現している点で異なっていた (Fig. 4-3fの二重矢印)。この細胞はIP₃受容体タイプ1,2を発現していなかった (Fig. 4-3d,eの二重矢印)。この細胞は、その特徴的な形態からクララ細胞である可能性が考えられた。

4-3-4 IP₃受容体タイプ2の線毛細胞の特異的マーカーとしての利用可能性

前述の解析の結果、IP₃受容体タイプ2は、気管と細気管支において線毛をもつ細胞に特異的かつ強く発現していることがわかった。そこでIP₃受容体タイプ2が、気管・細気管支上皮細胞の線毛細胞マーカーとして利用可能か検討することにした。IP₃受容体タイプ2が発現しない気管・細気管支上皮細胞は、分泌性の細胞であることが推測される。そこで、その分泌性細胞の特異的な染色とIP₃受容体タイプ2の二重染色を行って、染色像がそれぞれの染色で相補的であるかどうかを解析した。

気管上皮細胞はIP₃受容体タイプ2特異的モノクローナル抗体KM1083とレクチンWFAで蛍光二重組織染色した (Fig. 4-4)。WFAは気管上皮細胞の漿粘液性細胞を特異的に染色することが報告されている。緑色がKM1083の染色で、赤色がWFAでの染色である。写真は上が気道側である。写真の下部に赤く染まっているのは気管の硝子軟骨組織である。硝子軟骨組織の上部の無染色の暗い部分が結合組織で、その上にある緑色と赤色の染色像が気管上皮細胞である。緑色と赤色は基本的に重なることなく分離していて、IP₃受容体タイプ2は分泌性以外の細胞であることが示された。

細気管支上皮細胞はKM1083と抗クララ細胞特異的10 kDa抗原 (CCSP) 抗体で蛍光二重組織染色した (Fig. 4-5)。CCSPは細気管支のクララ細胞特異的に発現している分泌蛋白であることが報告されている。写真は緑色がKM1083の染色で、赤

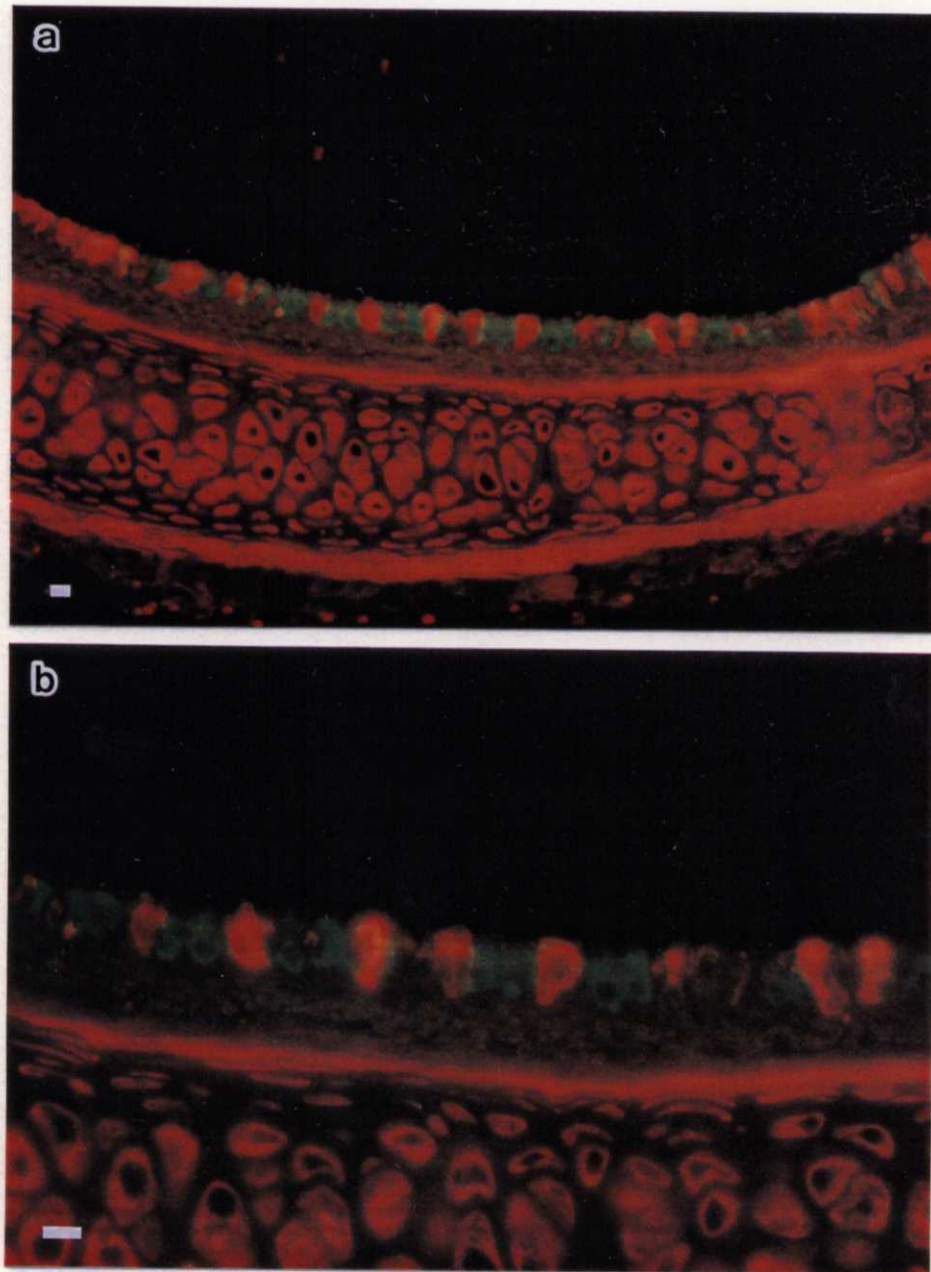


Fig. 4-4 気管上皮線毛細胞の IP_3 受容体タイプ2と WFA レクチンの二重染色
 KM1083と WFA レクチンの染色像を、それぞれDTAF (緑の蛍光) とローダミン (赤の蛍光) を用いて可視化した。それぞれのプローブは明らかに異なる細胞集団を認識している。写真下部に赤く格子状に染色される部分は気管の軟骨で、ムコ多糖類が WFA レクチンで染色されている。原図倍率 (a) x 50、(b) x 100。Bars = 10 μ m。

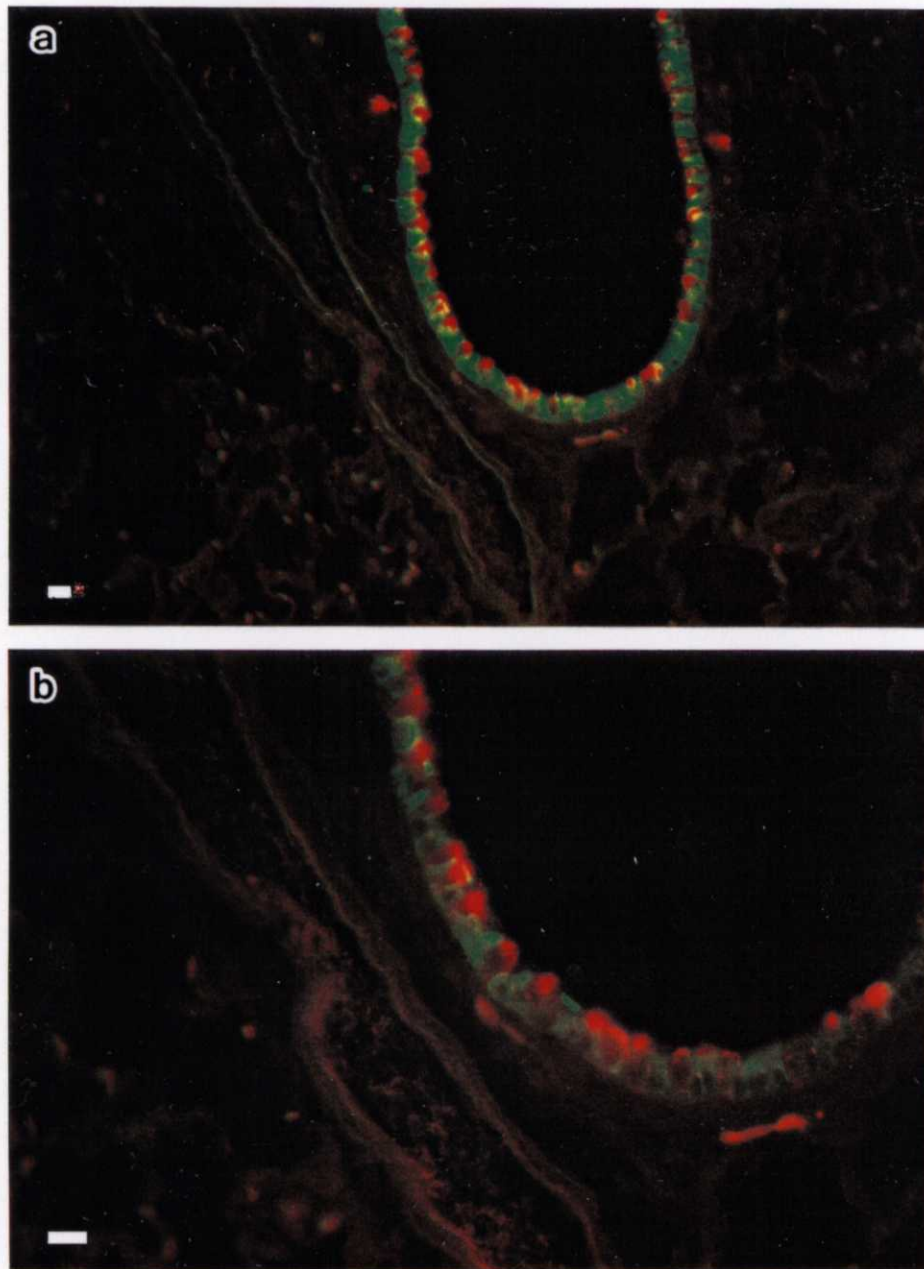


Fig. 4-5 細気管支の IP_3 受容体タイプ2とクララ細胞特異的 10 kDa タンパク質との
蛍光二重染色

KM1083とCCSP抗体で染色される像を、それぞれDTAF(緑の蛍光像)とローダミン(赤の蛍光像)を用いて可視化した。CCSP抗体はクララ細胞の気道側に面したドーム状の突出構造を染色した。一方KM1083はクララ細胞の間にある立方線毛細胞を染色した。基底膜に赤く染まる染色は赤血球の自家蛍光で、組織の摘出時に混入した。原図倍率 (a) x 50、(b) x 100。Bars = 10 μ m。

色が抗 CCSP 抗体の染色である。上部真中の緑色と赤色の輪に囲まれた部分が気道である。左上部から真中下部にかけての薄い緑色の輪は血管である。解析の結果、CCSP はクララ細胞の細胞質の気道側に存在し、CCSP を有する細胞は緑色に染色されなかった。赤色に染色されない上皮細胞は全て緑色に染色された。細気管支上皮細胞は、線毛細胞とクララ細胞だけで構成しているので、IP₃ 受容体タイプ 2 はクララ細胞以外の線毛細胞であることが示された。

したがって、気管および細気管支の結果から、IP₃ 受容体タイプ 2 は線毛細胞の特異的マーカーとしても利用可能であることが示された。

4-4 考察

筆者らは、作製した IP_3 受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体を免疫組織化学解析に応用した。ウエスタンブロッティング解析からは、3つのサブタイプが発現していることがわかった。しかし免疫組織化学解析を加えることで、サンプル中には IP_3 受容体サブタイプを発現する細胞とそうでない細胞が存在することがはっきりと示され、 IP_3 受容体サブタイプの発現細胞を特定するのにモノクローナル抗体が非常に有用であることが示された。さらに、サブタイプの細胞内局在の違いを解析するのも有効なツールであることがわかり、作製したモノクローナル抗体は期待したとおり、 IP_3 受容体サブタイプ発現細胞の詳細な解析に有用なツールであると考えられた。

本章では、ラットの気管から細気管支に至る気道上皮細胞での IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3の発現分布に関して、サブタイプ特異的モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的な解析を行った。気道上皮細胞は粘液の分泌と、それを咽頭部へ移動させる特異な機能を持つ細胞群で構成されている。気管上皮は主要な宿主生体防御機構の一つを担当していて、非常に興味深い細胞からなる組織だといえる。この細胞の一つである気管の線毛細胞に関して、培養細胞を用いた生理学的な研究によって、この細胞は IP_3 受容体情報伝達系を有することが示されていた (Boitano et al., 1992)。しかし本章の解析に至るまでに、気道上皮細胞での IP_3 受容体サブタイプの発現の詳細な解析は行われていなかった。

IP_3 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3は免疫組織化学的解析によって、気道上皮細胞でそれぞれ異なる発現分布を示すことが明かとなった。興味深いことに、 IP_3 受容体タイプ1、2は気管から細気管支にいたるまで、線毛細胞だけに発現が認められた。一方 IP_3 受容体タイプ3は気管上皮では線毛細胞だけに発現があったが、細気管支では分泌系の細胞であるクララ細胞にも発現が確認された。さらに興味深いことに、3つの IP_3 受容体サブタイプの発現のあった線毛細胞では、サブタイプによって細胞内局在が異なっていることが判明した。 IP_3 受容体タイプ1は線毛細胞の線毛の

下に位置する非常に狭く、膜に近い細胞内領域に局限した分布を示した。対照的にIP₃受容体タイプ2は線毛細胞の細胞質全体的な分布を示し、タイプ3は核上部の気道に面した側の細胞質に分布していた。これらの知見は、IP₃受容体の発現がサブタイプによって、それぞれ個別に制御されており、機能の異なる細胞では使用するIP₃受容体が違って、細胞機能に反映していると考えられた。またIP₃受容体サブタイプの細胞内局在性に関しても、サブタイプによって異なる制御があることを示唆していると考えられた。筆者らは第3章に示したように、炎症性の血球系細胞を用いた検討でも、IP₃受容体サブタイプの発現分布や細胞内局在に違いを認めているので(Sugiyama et al., 1994a)、その可能性は前の結果も良く支持すると考えられた。

IP₃受容体サブタイプの発現分布と細胞内局在に関する知識は、この線毛細胞のCa²⁺情報伝達機構とどう関係しているだろうか。生理学的な研究からは、ビーティングと細胞内Ca²⁺とIP₃が関係していることを示す報告がある。初代培養の線毛細胞は、培地に面した細胞膜を微細な針を用いて機械的に刺激すると(生理的には気管上皮粘膜に捕捉される異物による刺激に相当する)、刺激された線毛細胞の線毛のビーティングの周期頻度が増加し(Sanderson and Dirksen, 1986)、さらにこの周期頻度の増加が、隣接した刺激していない線毛細胞にも伝播するらしい(Sanderson et al., 1988, Dirksen and Sanderson, 1990)。この現象で、細胞間Ca²⁺波の伝播がビーティングの伝播に伴っていること(Sanderson et al., 1990)、およびIP₃が、ギャップジャンクションを通過して、隣接する細胞のIP₃受容体に作用し(Hansen et al., 1995)、その細胞内Ca²⁺濃度増加に寄与している(Boitano et al., 1992)ことが報告されている。このCa²⁺波の伝播には、もう一つの細胞内Ca²⁺チャンネルのリアノジン受容体は関与しない(Hansen et al., 1995)。筆者らの見いだした、線毛層に近接した細胞質でのIP₃受容体タイプ1が、線毛のビーティングの制御に関与する可能性が考えられた。しかし、その積極的な関与を明らかにするためには、さらに解析が必要だろう。

筆者らはこの機械的刺激によるIP₃受容体の活性化には、細胞骨格タンパク質が関与していると考えている。例えばリンパ球では、細胞骨格タンパク質のフォドリンが

タンパク質チロシンキナーゼの活性を制御する(Iida et al., 1994)。またアクチンはNa⁺/H⁺ exchanger(Goss et al., 1994)やCl⁻チャンネル(Suzuki et al., 1993)やK⁺チャンネル(Terzic and Kurachi, 1996)の活性を制御することが報告されていて、細胞骨格タンパク質とイオンチャンネルは密接な関係があると考えられているからである(Sormunen et al., 1994, Wang et al., 1993, Forgacs, 1995)。線毛細胞では、線毛側の細胞膜の近傍に細胞骨格タンパク質であるフォドリンやアクチンタンパク質が集積している(Sormunen et al., 1994)。IP₃受容体に関しては、表皮ケラチン産生細胞や血管内皮細胞においてアクチンフィラメントに直接結合していることが報告されている(Fujimoto et al., 1995)。これらの報告から、細胞骨格の構造変化がIP₃受容体の活性を制御している可能性が考えられた。線毛細胞のIP₃受容体が、細胞骨格タンパク質と共局在や会合をするか興味深い。

気道上皮細胞におけるIP₃受容体の機能のもう一つの可能性は、気道上皮を覆う漿粘液の粘性制御である。塩素イオンは漿粘液の粘性を制御する重要な因子の一つで、気道における漿粘液中の塩素イオン濃度増加は粘性を低下させることが知られている。塩素イオンは気道上皮細胞の気道側の細胞膜から分泌されるイオンで、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)(Riordan et al., 1989)や細胞内Ca²⁺で制御される塩素イオンチャンネル(Clancy et al., 1990, Anderson and Welsh, 1991, Yamaya et al., 1993)によって細胞外に放出される。興味深いことに、動物を用いたモデル実験系では、細胞内Ca²⁺で制御される塩素イオンチャンネルの発現を増加させるとCFTRの異常による気管の諸症状を相補的に補完して正常に戻すことができる(Clarke et al., 1994, Leung et al., 1995)。また粘膜下腺腺房細胞を用いた電気生理学的解析から、IP₃受容体が細胞膜の塩素イオン電流を制御することが報告されている(Sasaki et al., 1994)。その一部はCa²⁺によって活性化するカルモジュリン依存性プロテインキナーゼの作用と考えられている(Wagner et al., 1991)。筆者らは本章で、IP₃受容体サブタイプが気道上皮細胞の線毛細胞とクララ細胞で発現していることを見いだした。クララ細胞は細胞内Ca²⁺によって活性化する塩素イオンチャンネルを発現

して (Van Scott and Paradiso, 1992)、ATP 受容体刺激の細胞内情報伝達によって活性化する (Van Scott et al., 1995)。cystic fibrosis は CFTR の異常のために肺に半固形化した粘液成分が蓄積して線維化する病気で、治療法は確立されていなく、治療薬の開発が望まれている。病気の治療的立場から、細胞内 Ca^{2+} で制御される塩素イオンチャンネルを活性化する方法も考えられていることから (Knowles et al., 1991, Devor et al., 1996, Rugolo et al., 1993)、気道上皮細胞における IP_3 受容体の細胞内 Ca^{2+} 濃度制御機構に関して、さらに解析する必要があるだろう。特に気道に隣接した細胞膜近くに局在する IP_3 受容体サブタイプは、 Ca^{2+} 動員によって細胞内 Ca^{2+} で制御される塩素イオンチャンネルを活性化している可能性が考えられ、注目された。

気管上皮細胞における IP_3 受容体サブタイプの発現解析から、期せずして IP_3 受容体タイプ2が線毛細胞の細胞マーカーとして利用可能であることを見いだした。モノクローナル抗体 KM1083 で陽性の細胞は、クララ細胞に特異的な CCSP 抗体 (Wasano and Hirakawa, 1992) および漿粘液性細胞に特異的な WFA レクチン (Shimizu et al., 1991) の両方とも陰性の細胞であった。KM1083 は気管から細気管支に至る気管上皮細胞の正常、および病的条件下での細胞状態を検定するツールとして利用可能と考えられた。

筆者らはモノクローナル抗体 KM1112、KM1083、KM1082 を使用して、ラット中枢神経 (Yamamoto-Hino et al., 1995)、顎下腺 (Yamamoto-Hino et al., 1998)、腎臓 (Monkawa et al., 1998) における IP_3 受容体サブタイプの発現分布を解析して、これらの組織でもサブタイプが細胞特異的に発現し、細胞内局在もサブタイプによって大きく異なることを発見してきた。これらの解析結果はその IP_3 受容体の発現する細胞における IP_3 受容体の機能、および細胞の機能を考える上で示唆に富む情報源であった。これらモノクローナル抗体を用いた IP_3 受容体発現組織・細胞の免疫組織化学的解析は極めて有用と考えられ、現在、様々な組織・細胞の研究解析に利用されている。

4-5 結語

筆者ら以前の研究では、IP₃受容体タイプ1に対する抗体だけが利用可能であったために、タイプ2やタイプ3に関する発現情報は極めて不十分であった。そこでIP₃受容体サブタイプの発現を、特にタイプ2とタイプ3の発現をタイプ1の発現解析と同時にタンパク質レベルで検討することを可能にするために、モノクローナル抗体(KM1112, KM1083, KM1082)を、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3の免疫組織化学解析に応用した。その結果、これら抗体は組織切片のIP₃受容体発現細胞を特異的に検出し、細胞が発現するIP₃受容体サブタイプを同定するのに有効であることが示された。さらにこれら抗体はIP₃受容体発現細胞において、IP₃受容体の細胞内局在を反映した組織染色像を検出し、IP₃受容体サブタイプの細胞内分布を同定するのにも有効であることが示された。

気道上皮細胞におけるIP₃受容体サブタイプの発現を、それぞれIP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3に特異的なモノクローナル抗体KM1112、KM1083、KM1082を用いて検討した。気管でのIP₃受容体サブタイプの発現をウエスタンブロッティング解析で検討した結果、約250 kDaの分子量としてタイプ1、タイプ2、タイプ3の特異的なバンドが検出された。このことから、気管には3つのIP₃受容体サブタイプが発現していることがわかった。さらに、非常に多くの様々なタンパク質を含むような組織ホモジネートをサンプルとしても、モノクローナル抗体KM1112、KM1083、KM1082は、IP₃受容体サブタイプのタンパク質をタンパク質ブロット膜上で特異的に検出することが示され、これら抗体がIP₃受容体サブタイプに極めて特異性が高いことを再確認した。

ウエスタンブロッティング解析は、気管でのIP₃受容体サブタイプ発現をマクロ的な視点で解析するには良い。しかしながら組織が様々な種類の細胞で構成されていることを考えると、IP₃受容体の機能に迫る解析をするためには、その発現に関してさらに詳細な解析が必要とされる。筆者らは、組織中の様々な細胞が発現するIP₃受容体を細胞レベルで解析するために、モノクローナル抗体KM1112、KM1083、KM1082

を組織切片上でIP₃受容体サブタイプ発現細胞を同定する、いわゆる免疫組織化学的解析に応用した。気管から細気管支に至る組織を解析した結果、気管ではIP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3が気管上皮細胞に特異的に発現していて、しかも様々な種類の上皮細胞の中で、線毛細胞だけに特異的に発現していることを、解析の結果からはじめて明かにした。細気管支での解析では、IP₃受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3は気管の場合と同様に、細気管支上皮細胞に特異的に発現することを示した。ただし詳細な解析の結果、気管と違ってIP₃受容体タイプ3は線毛細胞のみならずクララ細胞にも発現していることを明らかにした。これらの結果はIP₃受容体サブタイプが細胞特異的に発現制御されていることを意味し、3つのIP₃受容体サブタイプを解析することの重要性を確認する結果であった。またモノクローナル抗体KM1112、KM1083、KM1082は、IP₃受容体サブタイプのタンパク質を組織切片上で特異的に検出するのに有用であることを確認した。

さらに重要なことは、モノクローナル抗体KM1112、KM1083、KM1082を免疫組織化学的解析に応用できたことによって、組織切片中のIP₃受容体発現細胞のサブタイプの細胞内局在を、解析可能にしたことだ。IP₃受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体で免疫組織染色した細胞を詳細に解析すると、IP₃受容体を発現する線毛細胞では、タイプ1は線毛に隣接した細胞膜に面する細胞質に、薄い層の様に限定的に局在することを明らかにした。タイプ2は細胞質全体的に分散していることを明らかにした。タイプ3は細胞の核上部の気道側に面した細胞質に分散していることを明らかにした。モノクローナル抗体KM1112、KM1083、KM1082は、IP₃受容体サブタイプのタンパク質の細胞内局在を解析するのにも非常に有用であることを再確認した。

モノクローナル抗体KM1083は免疫組織化学的解析において、気管上皮細胞の線毛細胞を特異的かつ効率的に検出することから、IP₃受容体タイプ2は、気管から細気管支に至る組織の気道上皮に存在する線毛細胞の特異的マーカーとしても利用可能なことを示した。

以上の様に本章では、タンパク質レベルでのIP₃受容体サブタイプの解析においてタイプ1に加えて、タイプ2とタイプ3の発現も解析すること、および免疫組織化学的解析を加えることによって、IP₃受容体の機能を考える上でより深い洞察をすることを可能にしたと考えられる。

本章での解析によって線毛細胞がIP₃受容体サブタイプを発現することがわかった。線毛細胞は、生理的な機能として気道内に異物が入ってきたときに、これを認知して漿粘液と共に生体外へ排出する役割をしている。この過程でIP₃受容体や細胞骨格タンパク質が役割を果たしている可能性が考えられた。IP₃受容体サブタイプの機能を解明する上で、IP₃受容体と細胞骨格タンパク質の関係が興味深い。