

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	及 川 賢 輔
学 位 論 文 題 目 Neuronal calcium sensor protein visinin-like protein-3 (VILIP-3) interacts with microsomal cytochrome b5 in a calcium dependent manner (邦題：神経性カルシウムセンサー蛋白 visinin-like protein-3 は カルシウム依存性にチトクローム b 5 と介合する) 共 著 者 名 木村 昭治 青木 直子 滝山 由美 柳内 充 小林 博也 佐藤 啓介 笹嶋 唯博 立野 正敏 (未 公 表) 研 究 目 的 カルシウムイオンは細胞間・細胞内情報伝達系において、きわめて重要な役割を担っている。さらに大きな特徴として、中枢神経系あるいは免疫系などにおいて、多様な機能の発現調節にかかわっているということがあげられる。そのカルシウムの多様な作用を媒介しているのが、カルシウム結合蛋白質であり、本研究の主題である visinin-like protein-3(VILIP-3)もカルシウム結合蛋白の一種である。カルシウム結合蛋白質は、大きくカルシウムバッファーとカルシウムセンサーの二つに分けることができる。前者はカルシウムイオンを結合させるのみで、それ自身の構造変化は起こらず、細胞内のカルシウムを緩衝する役割をもっており、後者はカルシウムイオンが結合することによって3次構造が変化し、下流の標的蛋白と相互作用すること			

よって、カルシウムを介する刺激異なる情報伝達系へ伝えるというダイナミックな特性をもっている。カルシウムセンサーの中に、EF-hand というカルシウム結合モチーフを持つ super family があり、さらに、中枢神経系に高レベルで発現する neuronal calcium sensor family が EF-hand super family に属している。今回の研究対象である VILIP-3 は、小脳のプルキンエ細胞に発現する neuronal calcium sensor family に属する蛋白である⁽²⁾。VILIP-3 は、そのアミノ酸配列の相同性から、VILIP-1, VILIP-2, neurocalcin δ 、hippocalcin とともに、VILIP subfamily を形成している。当教室では、マウスの脾臓 cDNA から VILIP-3 の遺伝子をクローニングした。VILIP-3 の末梢組織での発現に関する報告は、マウス以外の種でいくつか報告されているが、免疫組織における発現の解析は今までになく、さらに、この蛋白の細胞生物学的機能は明らかにされていない。一方、カルシウムシグナルは免疫系においても重要なものであることがわかっており、VILIP-3 は中枢神経系のみならず免疫系においても、何らかのカルシウムシグナルに依存する情報伝達系にかかわっている可能性が高いものと考えられた。本研究の目的は VILIP-3 の機能を追究することであり、その過程でマウスの免疫系組織を含む末梢組織および免疫担当細胞株での VILIP-3 mRNA 発現を確認し、さらにカルシウム依存性に結合する標的蛋白を同定し、VILIP-3 の作用の一部を解明したので報告する。

材 料 ・ 方 法

Real time RT-PCR による組織・細胞株における VILIP-3 mRNA の定量

8~10 週齢の C57BL/6 マウスから各組織を採取し、セパゾール RNA I (ナカライテスク)を用いて total RNA を抽出した。また、各種免疫担当細胞株も上記同様の方法で total RNA を抽出した。total RNA から、reverse transcription により cDNA を合成した。real-time PCR は、LightCycler-DNA Master SYBR Green I (Roche) に行った。

GST 融合マウス VILIP-3 蛋白を用いた GST pull down 実験

マウス胸腺腫由来細胞株 B6RVTC1 をカルシウム存在下または非存在下で溶解し、GST 融合マウス VILIP-3 蛋白を加え、Glutathione SepharoseTM 4B (Amersham pharmacia biotech)にて蛋白複合体を沈降させた。そのサンプルを 2 次元電気泳動にて分離し、銀染色法を施行し、蛋白質を検出した。関心のあるスポットをゲルから分離し、in-gel digestion 法により蛋白質を分解し、得られたペプチドマッピングから有意なフラクションのアミノ酸配列をプロテインシークエンサーにて解析した。

免疫沈降法を用いた、VILIP-3 と cytochrome b5 との結合実験

293T 線維芽細胞に VILIP-3 および cytochrome b5 の遺伝子に FLAG、myc epitope、GST、EYFP などのタグを付加した DNA を、プラスミドベクターを用いて遺伝子導入し、両蛋白を一過性に発現させ、カルシウム存在下または非存在下で細胞溶解し、いずれかの蛋白に特異的なタグに対する抗体を用いて免疫沈降した。もう一方の蛋白に特異的な抗体を用いて Western blotting により両者のカルシウム依存性の相互作用を解析した。また、VILIP-3 の N 末端および cytochrome b5 の C 末端をコードする遺伝子を部分的に欠失させた変異体を作成し、上記と同様の方法で、結合の有無を確認し、両者の会合に必要な構造を解析した。

成績

マウス組織および細胞株における VILIP-3 mRNA の発現

以前の報告と同様に、中枢神経系に高いレベルの発現を認めたが、末梢の組織にも発現しており、特に、胸腺、腎にも発現していることがわかった。また、培養細胞株のなかで、胸腺腫由来の BRVTC1 に強い発現を認めた。

GST 融合マウス VILIP-3 蛋白を用いた標的蛋白の同定

B6RVTC1 細胞の細胞溶解液に、精製した GST 融合マウス VILIP-3 蛋白および GS4B beads を加え、沈降した蛋白複合体を、2 次元電気泳動で分離したところ、カルシウム存在下で検出され、カルシウム非存在下で消失する、分子量 16kDa、等電点 5.2 のスポットが認められた。アミノ酸解析から、VILIP-3 と結合する蛋白は microsomal cytochrome b5 であることがわかった。

免疫沈降法による結合様式の解析

それぞれ wild type の遺伝子を用いた共沈実験で、VILIP-3 と cytochrome b5 の特異的な結合が確認された。さらに、その結合がカルシウム存在下で起こることも確認された。変異体を用いた共沈実験により、cytochrome b5 の C 末端側のヘリックスループ構造を有する小胞体膜陥入部位と、VILIP-3 の N 末端側のループ構造が、両者の会合に必須であることがわかった。

考 案

マウス以外の生物種における VILIP-3 の組織分布に関する報告は過去にみられるが⁽¹⁾⁽²⁾、マウスを用いた解析は初の報告となる。他の報告と同様にマウスにおいても中枢神経系優位の組織分布を示していた。しかし、末梢の組織にも分布しており、特に胸腺での発現が比較的高かった。培養細胞においては、特に胸腺腫由来の細胞株に強く発現していた。このことから、VILIP-3 は、中枢神経系だけでなく免疫系においてもなんらかの役割を持っていることが推察される。興味深いのは、同じ VILIP subfamily の中で、もっとも VILIP-3 に近いのが、hippocalcin (VILIP-3 との相同性は 94%) であるが、hippocalcin は、脳の海馬にある錘体細胞に特異的に発現しており、末梢組織での発現は確認されていない。両者は構造的には似ているが、その発現は、ある特定の細胞集団に限られている。VILIP-3 の果たす生物学的機能をさらに検討するために、胸腺細胞の中で発現について、細胞重分画に分けた検討が必要と思われる。

現在までのところ、VILIP-3 の機能については不明な点が多い。しかし、今回、我々は、VILIP-3 を強発現している培養細胞株と、GST を融合した VILIP-3 の組み換え蛋白を用いて、cytochrome b5 が VILIP-3 の標的蛋白であることを同定した。さらに、変異組み換え蛋白を用いた結合実験から、それぞれの会合に必要なモチーフも同定した。cytochrome b5 は小胞体（マイクロゾーム分画）に局在する蛋白で、その疎水性の

高い C 末端側は、小胞体膜に埋め込まれている。会合に必要なモチーフはまさにこの膜陥入部位に存在していた。これらの結果から、VILIP-3 はカルシウム依存性に小胞体膜内で cytochrome b5 に結合すると考えられる。VILIP-3 はもともと細胞質内に局在しており、cytochrome b5 との間に局在の不一致がみられる。しかし、VILIP-3 はカルシウム結合による 3 次構造変化から、自身の内部に隠されていたミリスチン酸化された N 末端を外側に露出する。その結果 VILIP-3 の膜構造への親和性が高まる。さらに、近年、hippocalcin と neurocalcin δ が、細胞内カルシウム濃度の上昇により、細胞質から核周辺部（ゴルジネットワーク）に移動するという報告もあり⁽³⁾、VILIP-3 が同様の挙動を示すのであれば、小胞体に局在する cytochrome b5 は理想的な標的ともいえる。

cytochrome b5 は小胞体で電子伝達系にかかわっているヘム結合蛋白であるが、特に cytochrome P450 とともに microsomal monooxygenase (MMO) を構成し、P450 の酵素活性を高める役割を持つ。MMO の中心となる酵素が P450 である。P450 には数多くのアイソタイプがあり、おもに生体内異物の酸化にかかわっている。最近、この P450 が活性酸素発生源となり、発生した活性酸素が一種のシグナル伝達分子として作用する仮説が提唱された。また、P450 のなかには、生理活性を有するエイコサノイドやステロイドホルモンの代謝にかかわるアイソタイプも存在する。すなわち、MMO は単なる異物を分解する代謝酵素系ではなく、細胞内情報伝達にかかわっている可能性がある。われわれの知る限りでは、VILIP-3 の標的蛋白を同定したのは、今回が初めてである。さらに、小胞体に局在する代謝酵素系 MMO とカルシウムシグナル伝達分子を結び付ける初めての報告である。VILIP-3 と cytochrome b5 との相互作用について、今後の検討が必要と考えられる。

結 論

1. マウス VILIP-3 mRNA は、中枢神経系のみならず、末梢の組織にも発現していた。特に、免疫系組織の中で胸腺での発現レベルが高かった。
2. マウス VILIP-3 は、カルシウム依存性に microsomal cytochrome b5 に結合する。
3. 両者の結合は、VILIP-3 のアミノ末端側の loop 構造 (-HTEFTDH-) と cytochrome b5 のカルボキシル末端の helix-loop 構造 (-VIPAISALAVALMY-) を介して小胞体膜内で起こると考えられた。

引用文献

- (1). Bernstein HG, Baumann B, Danos P, Diekmann S, Bogerts B, Gundelfinger ED, Braunewell KH
Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1
and VILIP-3) in human brain. *J Neurocytol* 28:655-662, 1999
- (2). Spilker C, Richter K, Smalla KH, Manahan Vaughan D, Gundelfinger ED, Braunewell KH
The neuronal EF-hand calcium-binding protein visinin-like protein-3 is expressed in cerebellar
Purkinje cells and shows a calcium-dependent membrane association.
Neuroscience 96:121-129, 2000
- (3). O'Callaghan DW, Ivings L, Weiss JL, Ashby MC, Tepikin AV, Burgoyne RD
Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of
spatio-temporal aspects of Ca²⁺ signal *J Biol Chem* 277:14227-14237, 2002

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	及 川 賢 輔
審査委員長 鈴木 裕 ㊟ 審査委員 笹 嶋 唯 博 ㊟ 審査委員 立 野 正 敏 ㊟ 審査委員 吉 田 成 孝 ㊟			
学 位 論 文 題 目			
Neuronal calcium sensor protein visinin-like protein-3 (VILIP-3) interacts with microsomal cytochrome b5 in a calcium dependent manner (神経性カルシウムセンサー蛋白 visinin-like protein-3 はカルシウム依存性にチトクローム b5 と会合する)			
中枢神経系で高レベルに発現する neuronal calcium sensor family のメンバーである visinin-like protein-3 (VILIP-3)の生体内局在と機能を明らかにするため、本論文提出者は先ずその組織特異的発現を mRNA 定量によりマウスで初めて検討した。その結果、VILIP-3 は脳以外にも胸腺および腎で高レベルに発現していることを明らかにした。そこで、ミクログリア細胞を指標として、種々の培養細胞におけ			

る VILIP-3 の発現を解析したところ、胸腺腫由来の BRVTC1 細胞にきわめて高い発現を認め、また他の免疫系細胞でも神経系細胞に匹敵するレベルの発現を認めた。

本論文提出者は次に、胸腺腫由来細胞で発現した VILIP-3 の結合標的蛋白を免疫沈降法により検索した結果、小胞体膜上の cytochrome b5 が Ca^{2+} 存在下で VILIP-3 に結合することを明らかとした。そして、VILIP-3 および cytochrome b5 両者の部位特異的欠失変異体および置換変異体を巧みにデザインすることにより実施した結合実験により、cytochrome b5 ではその C 末端のヘリックスループ構造の小胞体膜陥入部位が、他方、VILIP-3 ではその N 末端ループの特定領域が、互いの結合に必須に関与することを明らかにした。また、これらの研究過程で本論文提出者はやはり neuronal calcium sensor family のメンバーである hippocalcin も Ca^{2+} 依存性に cytochrome b5 に結合することをも発見した。

Cytochrome b5 は小胞体で電子伝達にかかわるヘム蛋白であり、cytochrome P450 と共に microsomal monooxygenase (MMO) を構成することから、論文提出者はこの MMO が VILIP-3 や hippocalcin を介して Ca^{2+} 依存的に制御されることを示唆している。

このように本論文は、免疫系細胞において Ca^{2+} センサー蛋白と小胞体 MMO 代謝酵素系の間に相互作用が存在することを発見したものであり、VILIP-3 の機能および免疫系細胞さらに中枢神経系細胞における Ca^{2+} 制御システムに関する新知見を提供した極めて重要な研究である。

また、論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対して適切な回答が得られ、論文提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。