

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:64-65.

平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 11) Visini-like protein subfamily とmicrosomal cytochrome b5 との親和性についての研究

及川 賢輔

11) Visinin-like protein subfamily と microsomal cytochrome *b5* との親和性についての研究

研究代表者 及川 賢輔

【研究の背景と目的】

Visinin like protein-3 (VILIP-3) は、小脳のプルキンエ細胞に発現するカルシウム結合蛋白であるが、その細胞生理学的機能あるいは標的蛋白に関しては不明であった。我々はマウス VILIP-3 の標的蛋白が小胞体シトクロム *b5* に結合することを見出した (J Biol Chem, 2004. 279(15): p.15142)。

VILIP-3 は hippocalcin、neurocalcin- δ 、VILIP-1、VILIP-2 などと共に、visinin-like protein subfamily (VILIPs) に属している。VILIPs 内では、組織発現パターンが異なるもののアミノ酸配列相同性は 65~94% と高い。従って VILIPs に属する VILIP-3 以外の蛋白質も、VILIP-3 のカルシウム依存性標的分子であるシトクロム *b5* に親和性を示す可能性が高いと考えられた。今回われわれは、マウスの VILIPs をクローニングし、各蛋白のシトクロム *b5* への結合能力を、免疫沈降法を利用して明らかにした。

【研究方法】

マウス脳の total RNA を用いて、VILIP-3、hippocalcin、neurocalcin- δ 、VILIP-1 およびシトクロム *b5* を RCR 法にてクローニングし、それらを 293T 細胞に遺伝子導入し、tag 融合蛋白質を共発現させた。tag を利用した共沈実験を行い、シトクロム *b5* との親和性をウエスタンブロット法にて解析した。

【結果】

VILIPs のうち、VILIP-3、hippocalcin、neurocalcin- δ の3者は、シトクロム *b5* にカルシウム依存性の結合を示したが、VILIP-1 は結合を示さなかった。さらにシトクロム *b5* に結合を示した3者の中で、VILIP-3 が最も強い親和性を示した (下図)。

C 末端 FLAG タグを融合した VILIPs 各蛋白と N 末端に myc タグを付加したシトクロム *b5* (Cy**b**₅) を、

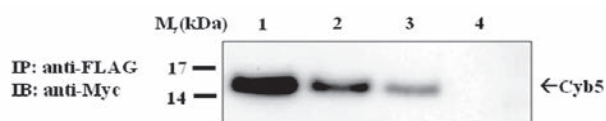


図 シトクロム *b5* に結合する VILIPs

293T 細胞に共発現させ、カルシウム存在下で細胞を融解し共沈実験を行った。抗FLAG抗体で免疫沈降し、抗Myc抗体でブロットしている。共沈される蛋白はCyb₅であり、各免疫沈降蛋白は以下の通りである。lane 1, VILIP-3; lane 2, hippocalcin; lane 3, neurocalcin- δ ; lane 4, VILIP-1.

【考 察】

VILIPsにおけるアミノ酸配列相同性は、VILIP-3に対して、hippocalcinは94%、neurocalcin- δ は90%、VILIP-1およびVILIP-2はそれぞれ66%、65%である。このアミノ酸配列相同性に基づいてVILIP-3、hippocalcinおよびneurocalcin- δ を一つのグループ(A)、VILIP-1とVILIP-2をもう一つのグループ(B)に亜分類することができる。今回我々が共沈実験から得た結果は、このアミノ酸配列解析に相関しており、グループAはシトクロムb₅に対する親和性を示すが、グループBに属するVILIP-1は親和性を示さなかった。またVILIP-3との相同性に相関して、シトクロムb₅への親和性の強さも変化していることがわかった。

以上のことよりシトクロムb₅は、グループAのカルシウム依存性標的蛋白であり、VILIP-1はグループAとは別の標的蛋白および機能を有する蛋白であることが推察された。

これらの結果は、VILIPsに属する蛋白質間の生理学的機能の差異を類推する上で、重要な知見であると考えられた。