

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249089

研究課題名（和文） 開口分泌を調節する新規分子の役割解明研究

研究課題名（英文） Possible involvement of a new molecule, PRIP in exocytosis

研究代表者

平田 雅人（HIRATA MASATO）

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60136471

研究成果の概要（和文）：新しいタンパク質を見だし、PRIP と名付けた。この分子を欠損したマウス（KO マウス）を作製して解析したところ、種々の細胞の開口分泌の亢進を観察した。そこで PRIP が開口分泌を抑制する機構について解析した。PRIP は開口分泌に必須の分子や調節する分子（シンタキシンや SNAP-25、CAPS など）の働きを抑制することが分かった。加えて、SNAP-25 のリン酸化状態を調節して、開口分泌の調節にも関わっている事が分かった。

研究成果の概要（英文）：We have isolated a novel protein, PRIP (PLC-related but catalytically inactive protein), followed by generation of the gene-deficient mice (KO mice). KO mice exhibited up-regulation of gonadotropins and insulin, indicating that PRIP might be involved in events common to vesicular fusion processes. In the current studies, therefore, we have explored the mechanisms by which PRIP is involved in exocytosis. The results suggest that PRIP is negatively involved in the dense-core vesicle secretion of PC12 cells, by occupying the membrane phospholipids required for the secretion with the PH domain, and interfering SNARE proteins by the C2 domains. Furthermore, PRIP is involved in the phospho-modulation of exocytosis by regulating activities of protein phosphatases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	18,700,000	5,610,000	24,310,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
年度			
年度			
総計	35,900,000	10,770,000	46,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：開口分泌、SNARE、膜リン脂質、PH ドメイン、C2 ドメイン、リン酸化、

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞内情報伝達に関わる新規のインシトール1,4,5-三リン酸 [Ins(1,4,5)P₃] 結合性タンパク質を発見し、PRIP (phospholipase C-related but catalytically inactive protein) と名付けたが、その細胞内機能は不明であった。機能を解明するために、PRIP 分

子を欠損したマウス（ノックアウトマウス、KO マウス）を作製し、性腺刺激ホルモンやインスリンの分泌亢進を観察した。これは、PRIP が分泌小胞の融合過程に抑制的に作用していることを示唆している。

一方、SNARE と称される分子複合体 (syntaxin/VAMP/SNAP-25) が小胞融合に必須

の最小単位で、これに CAPS、munc-13、munc-18 などの分子群が加わって巧妙な調節が行われることが明らかにされつつある。

2. 研究の目的

PRIP が開口分泌を抑制する分子基盤を求めることを目指した。

3. 研究の方法

① 細胞 : PC-12 細胞 (ラット副腎髄質クロム親和性細胞腫) を用いた。内在性に PRIP を有していないので、野生型やアミノ酸変異を導入した PRIP を恒常的に発現する細胞株を作製した。インタクト細胞のまま、あるいはジグトニンまたは機械的に漏出化した細胞を用いた。

② 膜融合や開口分泌のアッセイ : 試験管内での膜融合は蛍光標識したリポソームを用いた FRET 測定によった。漏出化細胞やインタクト細胞では、NA 放出に基づく酸化還元反応による電気的測定、あるいは ^3H noradrenalin (NA) 放出を指標とした。

③ 分子間結合のアッセイ : glutathione-beads を用いたプルダウンアッセイや細胞抽出物の免疫沈降によった。

④ リン酸化アッセイ : インタクト細胞は ^{32}P 生リン酸標識し、試験管内実験では $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いた。

4. 研究成果

(1) PRIP による開口分泌の抑制

① 試験管内膜融合実験 : SNARE タンパク質を組み込み、かつ蛍光標識したリン脂質からなるリポソームを調製した。t-SNARE 側にはホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP_2) を 1~5% 加えた。CAPS (Ca^{2+} -activated protein of secretion) を添加するとリポソームの融合を示す蛍光強度の増加が観察された。その際に PRIP を加えると濃度依存的に抑制した。単離した PH ドメインでも同様の抑制が見られた。

② 漏出化細胞を用いた実験 : 機械的に漏出化した PC12 細胞 (cracked cell) では、外来性にタンパク質分子を加えてその効果を観察する事が出来る。CAPS を加える事によって NA 放出を示す電位変化が認められた。その際に PRIP を加えると濃度依存的に抑制した。単離した PH ドメインでも抑制が観察された。CAPS 効果を減弱化させる事が示唆されたので、膜脂質への分子結合を検討した。Cracked cell を室温で放置すると CAPS の結合が減弱化した。放置する際に、脳抽出液と ATP を混在しておくこと減弱化は無くなった。これは、膜脂質のうちの PIP_2 がホスファターゼの作

用で PIP あるいは PI へと脱リン酸化された結果の減弱化であり、ATP などを混在させる事によって PIP_2 濃度を保てたためであろう。CAPS の結合は PRIP あるいはその単離した PH ドメインで濃度依存的に抑制された。

ジグトニンで漏出化した細胞 (permeabilized cell) では、外来性にタンパク質を添加する必要がなかった。予め ^3H NA を取り込ませ、 Ca^{2+} を最終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるように添加すると ^3H NA 放出が観察された。しかし、漏出化後に室温で放置すると放出が観察されなくなったが、その際に ATP を添加すると ^3H NA 放出が回復した。これはジグトニンによる漏出化によって小分子である ATP が洗い去られたために、相対的にホスファターゼ活性が強くなって PIP_2 の減少を来たしたためと思われる。上記のように外来性のタンパク質添加の効果が見られないので、 ^3H NA 放出に及ぼす PRIP の効果は、次に述べるインタクト細胞を用いる実験と同様に、恒常的に PRIP あるいはその変異体を発現する細胞を用いて漏出化した。結果の詳細については事項で述べる。

③ インタクト細胞を用いた実験 : PC12 細胞では高 K^+ 溶液による ^3H NA 放出を観察した。細胞外液に Ca^{2+} を含む場合にのみ ^3H NA 放出が認められ、生理的な開口分泌を反映していると思われる。PC12 には内在性 PRIP が無いので、恒常的に PRIP を発現する細胞株を複数作製した。PRIP 発現細胞では発現する PRIP 量に応じて ^3H NA 放出が抑制された。

試験管内実験や漏出化細胞を用いた実験から PRIP による抑制は膜リン脂質 PIP_2 への CAPS 結合を拮抗することが原因であるようなので、PH ドメインのみを恒常的に発現する細胞も作製し、高 K^+ 溶液による ^3H NA 放出を検討したが、強い抑制は認められなかった。

これらのインタクト細胞の高 K^+ 刺激の効果は permeabilized 細胞の Ca^{2+} 刺激でも同様に観察された。したがって、PH ドメインのみによる抑制効果の不全は開口分泌を惹起する経路への作用ではなく、開口分泌そのものに関わる分子群への不全であろう。

④ C2 ドメインの関与 : 全長 PRIP では開口分泌の抑制が観察されたものの、PH ドメイン単独では十分な抑制は見られなかった。したがって、PRIP による開口分泌の抑制効果は PH ドメインを介した CAPS との PIP_2 結合の拮抗だけでは説明出来ない。PH ドメイン以外の領域が関わっている可能性もある。

そこで、C2 ドメインの関与を検討した。C2 ドメインは Ca^{2+} 依存性に膜リン脂質に結合することが知られているが、PRIP-C2 ドメインにはリン脂質結合活性は認められなかつ

た。しかし、SNARE 分子のうちの syntaxin と SNAP-25 に直接に結合する事がプルダウンアッセイで分かった。また、直接結合は SNARE を組み込んだリポソームを用いたフローテーションアッセイ (リポソームは比重が低いので遠心操作で水溶性タンパク質よりも上層に位置する) でも確認した。次いで、SDS-抵抗性の SNARE 複合体形成実験でも、C2 ドメインは全長 PRIP とともに SNARE 複合体形を抑制した。

これらの結果は、PRIP は PH ドメインを介して PIP₂ と結合する事により、CAPS の結合と競合して CAPS の効果を減弱化させて開口分泌を抑制する。加えて、PRIP は syntaxin や SNAP-25 と直接結合して SNARE 複合体の形成を抑制し、開口分泌の抑制に至るという事が分かった (図 1 参照)。

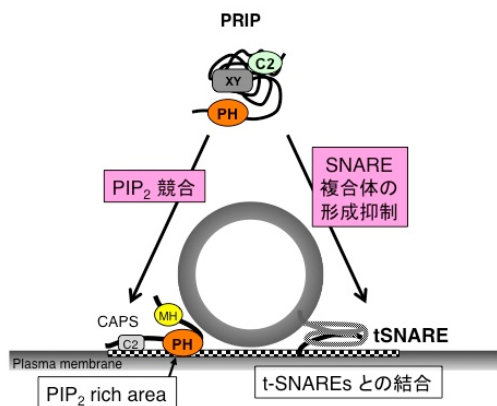


図1 PRIP の開口分泌抑制機序

(2) PRIP による開口分泌のリン酸化制御

① リン酸化による開口分泌の制御: 漏出化細胞を ATP とともに放置する際にプロテインホスファターゼの阻害剤を混在すると [³H]NA 放出が亢進し、一方キナーゼ (PKA, PKC 両方とも) の阻害剤を混在すると抑制された。このことはリン酸化が開口分泌を亢進することを示す。

② SNAP-25 のリン酸化と脱リン酸化に関わるホスファターゼ: 種々の SNARE のリン酸化が報告されているが、なかでも SNAP-25 のリン酸化が開口分泌を亢進する事が知られている。そこで、SNAP-25 の PKA や PKC によるリン酸化を調べた。変異型 SNAP-25 を用いた試験管内リン酸化実験で PKA は 28 番目のセリン残基 (S28)、29 番目 (T29)、138 番目のスレオニン残基 (T138)、187 番目のセリン残基 (S187) を等しくリン酸化し、一方 PKC は T138, S187 を優先的にリン酸化する事が分かった。これらの変異型 SNAP-25 を COS7 細胞 (内在性 SNAP-25 を持たない) に遺伝子導入して、ホルスコリン (FSK) やホルボールエステル (PMA) で刺激し、SNAP-25 のリン酸化を

調べても、概ね試験管内実験と同様の結果が得られた。

SNAP-25 の脱リン酸化に関わるホスファターゼについて検討した。プロテインホスファターゼ 1 (PP1) が最も良く作用し、次いで PP2A で、PP2B はほとんど作用しない事が分かった。変異型 SNAP-25 を用いた脱リン酸化実験から、PP1 は S28, T29, T138, S187 に対して一様に作用するが、PP2A は T138 と S187 に優先的に作用することが分かった。

PP1 による SNAP-25 の脱リン酸化において、PRIP を混在させると脱リン酸化は減弱化した。これは、PRIP が PP1 を結合し、ホスファターゼ活性を抑制するためである。結合出来ない PRIP 変異体 (F97A) では、抑制効果は見られなかった。また、PRIP 自身の T94 をリン酸化すると PP1 との結合能がなくなることを見いだしたが、リン酸化した PRIP でも、そのような抑制効果は見られなかった。

③ 開口分泌のリン酸化制御と PRIP の関わり: PC12 細胞を FSK や PMA で刺激すると [³H]NA 放出の亢進が見られた。薬剤を除去しても亢進状態は 30 分程度に亘って斬減するのみであった。

PC12 細胞に PRIP を遺伝子導入して同様の [³H]NA 放出実験を行った。すると FSK や PMA 刺激によって同程度の亢進が認められたが、刺激剤除去後に回復して元のレベルに戻るのが早くなった。しかし、変異型の PRIP (F97A) や PRIP (T94A) では回復促進効果は見られなかった。これらの [³H]NA 放出実験の際の細胞から SNAP-25 を免疫沈降させて、そのリン酸化程度を併せて調べたが、ほぼ同様であった。

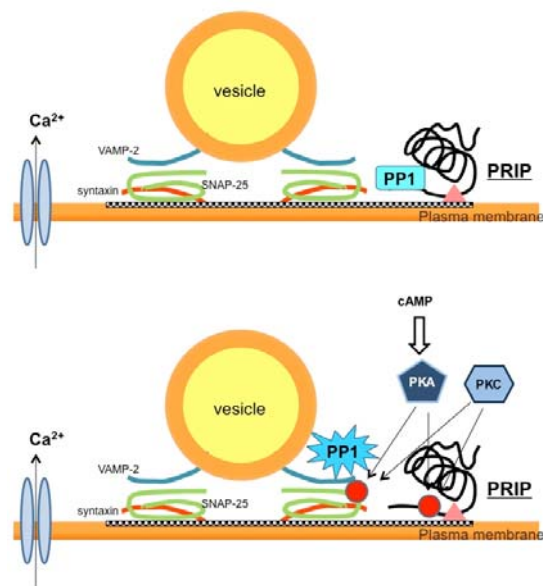


図2 PRIP による開口分泌のリン酸化制御

これらの結果から、図2に示す様なモデルが考えられる。PRIPは、結合して不活性化状態のPP1を、先に述べた様にPHドメインによるPIP₂結合やC2ドメインによるsyntaxinやSNAP-25への結合を介して細胞内の開口分泌が行われている場所にリクルートする(上図)。細胞が刺激されると、SNAP-25がリン酸化されて開口分泌が亢進されるとともに、PRIP自身がリン酸化(T94)されてPP1を遊離・活性化する。これがSNAP-25やPRIPの脱リン酸化を促して活性化の終息にあたる(下図)。このようにPRIPは(1)で述べたような開口分泌の調節に関わるとともに、リン酸化を介した開口分泌の巧妙な調節にも関わる重要な分子であろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件) 全ての論文に査読あり。

- (1) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Fukuda, M. and Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) modulates synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) phosphorylation and exocytosis. *J. Biol. Chem.* **287**, 10565-10578, 2012
- (2) Takeuchi, H., Zhang, Z., Gao, J., Sugiyama, G., Takeuchi, T., and Hirata, M.: Second basic pockets contribute to the localization of PX domains by binding to phosphatidic acid. *Adv. Enz. Regul.* **52**, 183-194, 2012
- (3) Jingushi, K., Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Shiraishi, F., Watanabe, Y., Hirata, M., Morimoto, S., and Sasaguri, T.: DIF-1 inhibits the Wnt/ β -catenin signaling pathway by inhibiting TCF7L2 expression in colon cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 47-56, 2012
- (4) Zhu, G., Yoshida, S., Migita, K., Yamada, J., Mori, F., Tomiyama, M., Wakabayashi, K., Kanematsu, T., Hirata, M., Kaneko, S., Ueno, S., and Okada, M.: Dysfunction of extra-synaptic GABAergic transmission in PRIP-1 KO mice is associated with an epilepsy phenotype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **340**, 520-528, 2012
- (5) Tsutsumi, K., Matsuda, M., Kotani, M., Mizokami, A., Murakami, A., Takahashi, I., Terada, Y., Kanematsu, T., Fukami, K., Takenawa, T., Jimi, E. and Hirata, M.: Involvement of PRIP, phospholipase C-related but catalytically inactive protein, in bone formation. *J. Biol. Chem.* **286**, 31032-31042, 2011
- (6) Migita, K., Tomiyama, M., Yamada, J., Fukuzawa, M., Kanematsu, T., Hirata, M., and Ueno, S.: Phenotypes of pain behavior in phospholipase C-related but catalytically inactive protein type 1 knockout mice. *Mol. Pain* **7**, 79, 2011
- (7) Sugihara, M., Morita, H., Matsuda, M., Umebayashi, H., Kajioka, S., Ito, S., Nishida, M., Inoue, Ryosuke., Futatsuki, T., Yamazaki, J., Mori, Y., Inoue, Ryuji., Ito, Y., Abe, K. and Hirata, M.: Dual signaling pathways of arterial constriction by extracellular UTP in the rat. *J. Pharmacol. Sci.* **115**, 293-305, 2011
- (8) Takeuchi, H., Takeuchi, T., Gao, J., Cantley, L.C. and Hirata, M.: Characterization of PXK as a protein involved in epidermal growth factor receptor trafficking. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1689-1702, 2010
- (9) Fujii, M., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Moss, S.J., Nabekura, J., Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of γ -aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.* **285**, 4837-4846, 2010
- (10) Mizokami, A., Tanaka, H., Ishibashi, H., Umebayashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Yokoyama, T., Nabekura, J., Kanematsu, T. and Hirata, M.: GABA_A receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice. *J. Neurochem.* **114**, 302-310, 2010
- (11) Seo, K., Seino, H., Yoshikawa, H., Petrenko, A.B., Baba, H., Fujiwara, N., Someya, G., Kawano, Y., Maeda, T., Matsuda, M., Kanematsu, T. and Hirata, M.: Genetic reduction of GABA_A receptor γ 2 subunit expression potentiates the immobilizing action of isoflurane. *Neurosci. Lett.* **472**, 1-4, 2010
- (12) Matsuda, T., Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Maenaka, K., Watanabe, Y., Miwa, Y., Morimoto, S., Kubohara, Y., Hirata, M. and Sasaguri, T.: Dictyostelium differentiation-inducing factor-1 binds to mitochondrial malate dehydrogenase and inhibits its activity. *J. Pharmacol. Sci.* **112**, 320-326, 2010
- (13) Gao, J., Takeuchi, H., Umebayashi, H., Zhang, Z., Matsuda, M. and Hirata, M.: Assay of dense-core vesicle exocytosis using permeabilized PC12 cells. *Adv. Enz. Regul.* **50**, 237-246, 2010
- (14) Tomiyama, T., Song, L., Kobayashi, M., Kinsella, A., Kanematsu, T., Hirata, M., Koshikawa, N. and Waddington, J.L.: Orofacial movements in phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 double knockout mice: Effect of the GABAergic agent diazepam and the D1 dopamine receptor agonist SKF 83959. *Synapse* **64**, 714-720, 2010
- (15) Yoshihara, T., Takahashi-Yanaga, F., Shiraishi, F., Morimoto, S., Watanabe, Y., Hirata, M., Hoka, S. and Sasaguri, T.: Anti-angiogenic

- effects of differentiation-inducing factor-1 involving VEGFR-2 expression inhibition independent of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol. Cancer* **9**, 245, 2010
- (16) Kanematsu, T., Fujii, M., Tanaka, H., Umebayashi, H. and Hirata, M.: Surface Expression of GABA_A Receptors –Roles for the Binding Protein- *J. Oral Biosci.* **52**, 322-329, 2010.
- (17) Gao, J., Takeuchi, H., Zhao, Z., Fujii, M., Kanematsu, T. and Hirata, M.: Binding of phospholipase C-related but catalytically inactive protein to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate via the PH domain. *Cell. Signal.* **21**, 1180-1186, 2009
- (18) Matsuda, M., Tsutsumi, K., Kanematsu, T., Fukami, K., Terada, Y., Takenawa, T., Nakayama, K.I. and Hirata, M.: Involvement of phospholipase C-related inactive protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. *Biol. Reprod.* **81**, 681- 689, 2009
- [学会発表] (計 9 4 件) 招待講演・シンポジウム講演のみ記載
- (1) Hirata, M., Tsutsumi, K., Kotani, M., Mizokami, A., and Matsuda M: Involvement of PRIP in bone formation. The 52nd International Symposium on “Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues. Bologna, September 26-27, 2011
- (2) Takeuchi, H., Gao, J., Zhang, Z., Sugiyama, G., Nagano, K., and Hirata, M.: Phosphoregulation of exocytosis by PRIP. The 10th JBS Biofrontier Symposium International Symposium on New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011 (The 100th Anniversary of Kyushu University) November 14-16, Fukuoka, 2011
- (3) 平田雅人: PRIP の骨代謝における機能 (教育講演) 第9回歯科骨粗鬆症研究会学術大会 小倉リーセントホテル 3月13日 北九州市 2011
- (4) 竹内 弘、高 靖、張 剣、杉山悟郎、平田雅人: リン酸化制御による開口分泌の修飾 (シンポジウム) 第84回日本薬理学会年会 3月22-24日 横浜市 2011
- (5) 平田雅人: 新規タンパク質の機能解明に向けた奮闘 第22回蔵王カンファレンス 1月29日 蔵王温泉2010
- (6) Hirata, M., Gao, J., Matsuda, M., Takeuchi, H., and Kanematsu, T.: PRIP, a new Ins(1,4,5)P₃ binding protein, its extension to neuroscience and beyond. The 2nd Pohang Conference on Cellular Signaling, February 2-3, Pohang, Korea, 2010
- (7) Hirata, M.: Inhibition of exocytosis by PRIP, PLC-related but catalytically inactive protein. International Symposium 2010, Cutting-edge Biomedical Research, February 3, Pusan, Korea, 2010

- (8) 兼松 隆、平田雅人: GABA_A受容体の輸送に関わるメカニズム 第82回日本薬理学会年会シンポジウム 3月16日-18日 横浜市 2009
- (9) Takeuchi, H., Gao, J., Zhang, Z., Hirata, M.: Inhibitory role of PRIP in dense core vesicle exocytosis. 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Shanghai, China, August 2-7, 2009
- (10) Hirata, M., Gao, J. and Takeuchi, H.: Inhibition of exocytosis by PRIP, phospholipase C-related inactive protein. The 50th International Symposium on “Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues. Bologna, September 28-29, 2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.mcb.dent.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 雅人 (HIRATA MASATO)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 6 0 1 3 6 4 7 1

(2) 研究分担者

竹内 弘 (TAKEUCHI HIROSHI)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号: 7 0 3 0 4 8 1 3

松田 美穂 (MATSUDA MIHO)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 4 0 2 9 1 5 2 0