

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791807

研究課題名 (和文) 情報伝達分子 PRIP の新機能を解明する研究

研究課題名 (英文) Novel function of the signaling molecule, PRIP.

研究代表者

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：70304813

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、内・外分泌、神経伝達物質の遊離、サイトカイン類の放出などに関わる「開口分泌」という普遍的な細胞機能の一つにおいて、私たちの見出した細胞内情報伝達分子 PRIP が抑制的に働くこと、その一つの作用機構として Ca^{2+} 依存的な開口分泌を促進する CAPS 分子との細胞膜リン脂質 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ を介した競合を見出した。一方で PRIP には $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ 結合能に依存しない開口分泌抑制機序が存在することも明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we examined the role of PRIP in regulated exocytosis, the universal cellular process through which various hormones, neurotransmitters and cytokines are secreted. We discovered that PRIP negatively regulates exocytosis by competing for membrane phospholipid, $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ with a Ca^{2+} -dependent priming factor, CAPS. We also found that PRIP can also inhibit exocytosis independent of its $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -binding ability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2100000	630000	2730000
2010年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

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：シグナル伝達、脂質、開口分泌

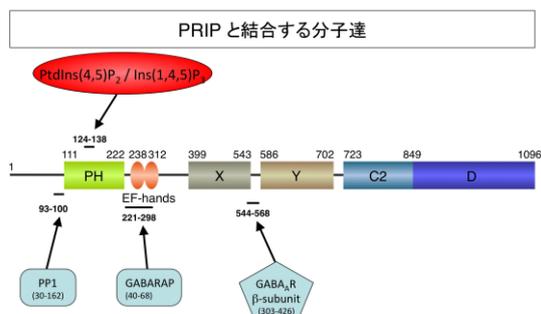
1. 研究開始当初の背景

開口分泌とは、狭義には小胞（有芯小胞やシナプス小胞）と細胞膜が融合し、貯蔵分子が細胞外に放出される現象で、内・外分泌、神

経伝達物質の遊離、サイトカイン類の放出などに関わる。更には、膜融合過程に焦点を当て、輸送小胞に組み込まれた受容体やチャネ

ル、トランスポーターなどが標的膜上に発現される現象にまで広義に解釈されることもある。その普遍性、重要性ゆえに開口分泌に関しては、最小の膜融合装置である SNAREs を始めとする多くの調節因子の関与が見いだされ活発な研究が行われている。

PRIP とは申請者の所属する研究室で新規イノシトール 1, 4, 5-三リン酸 [Ins(1, 4, 5)P₃] 結合性タンパク質として発見され、ホスホリパーゼ C (PLC) - δ と高い相同性を有するが、PLC 酵素活性を持たないことから PLC Related Catalytically Inactive Protein (PRIP) と名付けられた分子である (下図)。



これまで我々は上図に示す様々な PRIP 結合分子を同定し、その役割を調べてきた。現在までに見出されている 2 つのアイソフォーム PRIP-1 及び PRIP-2 を両者とも欠失したダブルノックアウトマウスの表現型を観察する過程でラ氏島からのインスリン分泌が亢進していることが分かった。他のホルモン(例えば、黄体形成ホルモンや卵胞刺激ホルモン)の血中濃度も高値であり、下垂体の器官培養によって性腺刺激ホルモンの分泌亢進を確認した。先に、GABA_A 受容体との関連で中枢神経系を解析していた際に脳内の神経伝達物質、アセチルコリンやノルアドレナリンの分泌量が多い事にも以前から気づいていた。このように内容物に無関係に分泌亢進が見られる事から、開口分泌に共通に働く分子群(膜融合装置)との関わりでこの現象が説明出来ると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は PRIP の既知の結合分子を切り口として種々の開口分泌調節分子との関係を解析し、PRIP が分泌過程のどこに作用するかを明らかにすることを目的とした。恐らく一点ではなく複数の経路に関わることも予想されるが、複数の機能ドメインからなる PRIP の各ドメインについて開口分泌における役割の有無を検索する。本研究の結果は PRIP 欠失マウスの各組織で認められた開口分泌の亢進現象の詳細な分子機構解明につながる。

3. 研究の方法

本研究では開口分泌のモデル細胞として PRIP を内在性に発現していない PC12 細胞(ラット副腎褐色細胞腫由来)を主として用いた。PRIP の各種欠失変異体や点変異を導入して PI(4, 5)P₂ などとの結合能を欠失した組換え体を作製し、それらを安定的に発現する PC12 細胞株を調製して後述の (1) インタクト細胞の実験を行った。また精製した各変異体タンパク質は (2) セミインタクト細胞による実験 (3) 試験管内アッセイ に用いた。

(1) インタクト細胞を用いた実験

モデル細胞としての PC12 細胞を用いた生理学的アッセイ: 予め [³H]ノルアドレナリン

(NA) 標識した PC12 細胞を高 K⁺ 刺激した際の [³H]NA 放出を測定した。PRIP 変異体等を安定的に発現する PC12 細胞による実験を行った。

(2) セミインタクト細胞を用いた実験

① Rotating Disk Electrode (RDE) Voltametric Measurement:

溶液中に分泌された生体アミンの量を測定する方法。遊離された生体アミンが電極上(カーボン電極)で酸化され、遊離量に応じ

て電子を放出する。これを電圧に変換して増幅測定することで開口分泌を測定する。本研究では PC12 を機械的に膜漏出化し、細胞質可溶化成分を洗浄除去したのちに、検討すべき関連因子を加えて各因子の関与について検討した。

② 開口分泌のモデル細胞としての PC12 細胞を用いた生化学的アッセイ: サポニンあるいはジギトニンで漏出化した PC12 細胞 (permeabilized PC12) に外来性に添加した組換え体 (CAPS あるいはその PH ドメイン) の結合実験。

(3) 試験管内アッセイ

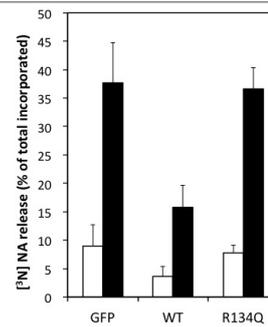
SNARE 依存的膜融合実験: 膜融合に必須の分子群 (SNARE) を含んだドナーやターゲットのリポソーム (一部のリン脂質に蛍光分子を導入) を用いて、蛍光強度の増加を膜融合の指標とする実験系。外来性に PRIP 等の分子を添加して影響を見た。

4. 研究成果

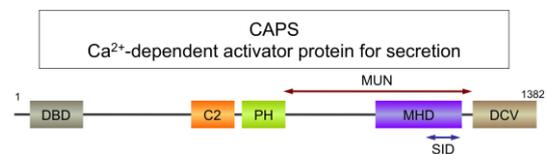
「方法」に示した実験の結果を中心に述べる。

(1) 内在性に PRIP を発現していない PC12 細胞で野生型 PRIP や $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ と結合しない PRIP 変異体 (R134Q) を安定的に発現する細胞株を調製した。これらの細胞からの高 K^+ 刺激によって惹起される ^3H NA 分泌を測定したところ、PRIP は ^3H NA 分泌を抑制し、その抑制効果は PRIP の $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ 結合能に依存していることが分かった (右上図)。

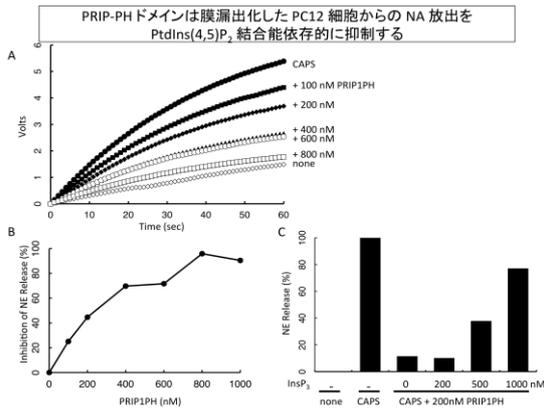
PRIP は膜リン脂質 PIP_2 結合能依存的に開口分泌を抑制した



(2) ① (1) の実験から PRIP が細胞膜脂質 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ との結合能に依存して開口分泌に対し抑制的に作用することがわかった。開口分泌の最終段階で分泌小胞が形質膜と融合する前にはプライミングというステップが必要だが、 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ 依存的にプライミングを促進する分子に CAPS (Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion) がある (下図)。

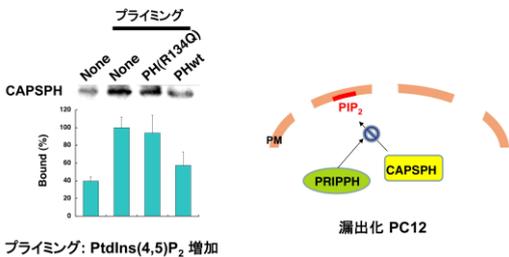


漏出化し細胞質可溶化成分を取り除いた PC12 細胞に Ca^{2+} を添加することで惹起される NA 分泌は精製 CAPS タンパク質存在下で顕著に増強される。PRIP-PHはこの CAPS 依存的な NA 分泌を抑制したが (次図 A、B)、この抑制効果は $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ によって解除されること (同図 C) や、上述の R134Q 変異体では抑制効果を示さなかったことから PRIP-PH の $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ 結合能に依存していることを確認した。



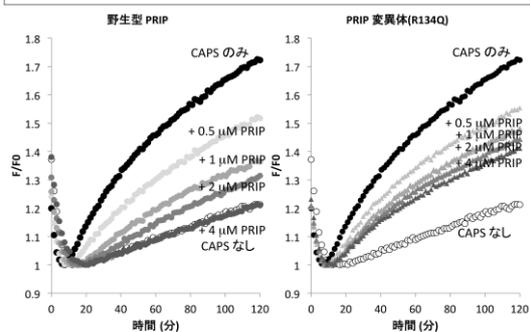
② サポニンにより膜を漏出化した PC12 細胞に CAPS 分子の PH ドメインは結合し、この結合量はラット脳細胞質画分を用いたプライミング操作によって増加した。このことはプライミング操作による細胞膜中の PtdIns(4,5)P₂ 量増加の結果であることが知られている。PRIP の PH ドメインはこの CAPS-PH の細胞膜との結合を PtdIns(4,5)P₂ 結合能依存的に阻害した (下図)。

PRIP-PH は CAPS-PH の細胞膜結合を PIP₂ 結合能依存的に抑制する



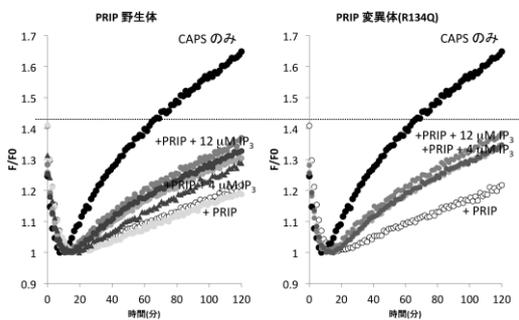
(3) PtdIns(4,5)P₂ を含む SNARE リポソームの膜融合は CAPS 分子によって促進されたが、野生型 PRIP はこれを濃度依存的に抑制した (下図)。

CAPS によって促進される SNARE リポソームの膜融合における PRIP の抑制効果



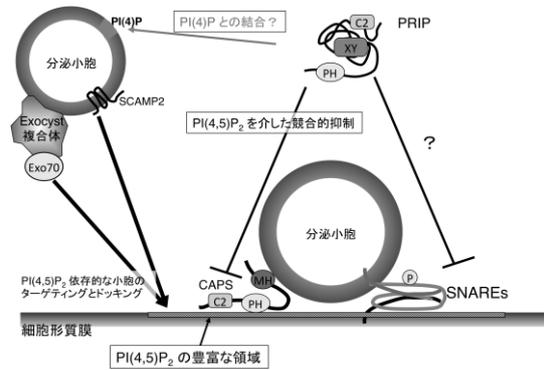
予想に反し、PtdIns(4,5)P₂ と結合しない PRIP 変異体 (R134Q) もこの膜融合に抑制効果を示したが、野生型と R134Q 変異体では高濃度での抑制程度や Ins(1,4,5)P₃ による抑制解除の程度に違いがあった (下図)。すなわち PRIP による CAPS 依存的な SNARE リポソームの膜融合の抑制作用には PRIP の PtdIns(4,5)P₂ 結合能が重要であるものの、それ以外の機能も寄与していることが示唆された。

PRIP による膜融合の抑制効果の Ins(1,4,5)P₃ による解除



本研究により、Ca²⁺ 依存的な調節性開口分泌における PRIP の抑制的な働きは PRIP の PH ドメインを介した PtdIns(4,5)P₂ 結合能に大きく依存しており、その一つの作用機構として Ca²⁺ 依存的な開口分泌を促進する CAPS 分子との競合を見出した (下図参照)。一方で PRIP による膜融合や開口分泌抑制作用には PtdIns(4,5)P₂ 結合能に依存しない機序が存在することも明らかとなった。

本研究で明らかとなった PRIP による開口分泌調節機構



本研究成果をさらに推し進め、PRIP 遺伝子欠損マウスで見られた各種ホルモン等の分泌亢進現象の分子機構を解明することは、普遍的な細胞機能の 1 つに新しい分子の存在と役割を認知させることにつながる。同時に開口分泌（膜融合）の異常による疾患（内分泌異常、外分泌異常、受容体やトランスポーターの発現異常などに基づく疾病など幅広い）の病態の理解に進歩をもたらし、治療ターゲットに新しい分子を付け加えることになる。

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 3 件）

- (1) Takeuchi, H., Takeuchi, T., Gao, J., Cantley, L.C. and Hirata, M.: Characterization of PDK as a protein involved in epidermal growth factor receptor trafficking. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1689-1702, 2010.
- (2) Gao, J., Takeuchi, H., Umebayashi, H., Zhang, Z., Matsuda, M. and Hirata, M.: Assay of dense-core vesicle exocytosis using permeabilized PC12 cells. *Adv. Enzyme Regul.* **50**, 237-246, 2010.
- (3) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, 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.

〔学会発表〕（計 18 件）

- (1) Zhang, Z., Takeuchi, H., Gao, J. and Hirata, M.: Contribution of the C2 domain to the binding of phospholipase C-related but catalytically inactive protein with SNARE proteins. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 神戸市 2010 年 12 月 7-10 日
- (2) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z. and Hirata, M.: Implication of PRIP in phosphor-dependent regulation of exocytosis. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 神戸市 2010 年 12 月 7-10 日
- (3) Takeuchi, H., Gao, J., Zhang, Z., Sugiyama, G. and Hirata, M.: PRIP is involved in PtdIns(4,5)P₂-dependent regulation of dense core vesicle exocytosis. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 神戸市 2010 年 12 月 7-10 日
- (4) 杉山悟郎、竹内弘、高靖、張釗、松田美穂、兼松隆、平田雅人: タンパク質ホスファターゼ PP1 及び PP2A と PRIP の相互作用についての解析 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 神戸市 2010 年 12 月 7-10 日
- (5) 杉山悟郎、竹内弘、松田美穂、兼松隆、平田雅人: PRIP はタンパク質ホスファターゼ PP1 及び PP2A の機能を制御する 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 東京 2010 年 9 月 20-22 日
- (6) 竹内弘: 新しいソーティングネキシン 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 東京 2010 年 9 月 20-22 日
- (7) Zhang, Z., Takeuchi, H., Gao, J. and Hirata, M.: Binding of phospholipase C-related but catalytically inactive protein to SNARE proteins. OzBio2010, Melbourne, Australia, September 29, 2010.

(8) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z. and Hirata, M.: Regulatory role of PRIP in exocytosis through the interaction with protein phosphatase. OzBio2010, Melbourne, Australia, September 27, 2010.

(9) Hirata, M., Gao, J., Matsuda, M., Takeuchi, H., and Kanematsu, T.: Finding of a new protein named PRIP, and struggling to explore the biological function. International Symposium, Network for International Education and Research in Advanced Dental Sciences. Niigata, February 9-10, 2010.

(10) Gao, J., Takeuchi, H. and Hirata, M.: Roles for PRIP in dense core vesicle exocytosis. The 5th International Symposium on Oral Health Science in 2010. Fukuoka, February 6, 2010.

(11) 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. 2nd Pohang Conference on Cellular Signaling. Pohang, Korea, February 2-3, 2010.

(12) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z. and Hirata, M.: Pleckstrin homology domain of PRIP is implicated in the inhibition of dense-core vesicle secretion in PC 12 cells. The 6th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists. Sasebo, November 24-26, 2009

(13) 高 靖、竹内 弘、張 釗、平田 雅人: Pleckstrin homology domain of phospholipase C-related but catalytically inactive protein inhibits the dense-core vesicle secretion in PC12 cells. 第 82 回日本生化学会大会 神戸市 2009 年 10 月 23 日

(14) 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, Italy, September 28-29, 2009.

(15) Gao, J., Takeuchi, H., Kanematsu, T. and Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is implicated in the inhibition of dense-core vesicle secretion in PC12 cells. 先端歯学スクール 2009 淡路市 2009 年 8 月 27 ~ 28 日

(16) Zhang, Z., Takeuchi, H., Gao, J., Hirata, M.: The role of C2 domain 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

(17) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Kanematsu, T. and Hirata, M.: Pleckstrin homology domain of PRIP inhibits exocytosis in PC12 cells by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Shanghai, China, August 2-7, 2009

(18) 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.

[その他]
ホームページ
<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a04/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

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：70304813