

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861758

研究課題名(和文) タンパク質複合体によるリン酸化制御機構の解明

研究課題名(英文) Phospho-dependent regulation of protein complex

研究代表者

高 靖 (GAO, JING)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40585882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞の最も普遍的機能の1つである開口分泌におけるリン酸化制御と PRIP の役割の解明を目指した。プロテインキナーゼA (PKA) による開口分泌における膜融合過程に必須の分子複合体を構成する SNAP-25の138番のスレオニンのリン酸化がSNARE 複合体の形成を抑制し、プロテインキナーゼC (PKC) によるSNAP-25の187番のセリンのリン酸化がSNARE 複合体の形成を促進することが分かった。さらに、このリン酸化がPC12細胞からノルアドレナリンの分泌に影響することもわかった。以上の結果からタンパク質リン酸化シグナルによる開口分泌の調節に関与することがわかった。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we investigated the phospho-regulation of exocytosis and the role of PRIP in the modulation of exocytosis. The formation of sodium dodecyl sulfate (SDS)-resistant SNARE complex was decreased by the phosphorylation of Thr 138 of SNAP-25 by PKA in advance. In contrast, increased formation of SNARE complex were seen when Ser 187 of SNAP-25 was phosphorylated by PKC instead. The noradrenaline secretion from PC12 cells was regulated by the modulation of phosphorylation of SNAP-25 by PKA and PKC. On the other hand, we found that C2 domain of PRIP-1 bound t-SNARE proteins as well as SNARE accessory protein, synaptotagmine-1 C2 domain in a calcium-dependent manner. These results suggest that phosphorylation of SNAP-25 by PKC or PKA is differentially involved in exocytosis in PC12 cells by regulating the formation of SNARE complex in the different patterns, which confirmed the notion that protein phosphorylation is involved in regulation of exocytosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リン酸化 SNARE PKA PKC

1. 研究開始当初の背景

「開口分泌」というキーワードで表わされる小胞輸送や膜融合という最も普遍的な細胞機能の調節にもタンパク質のリン酸化制御は大切な役割を果たしている事が認知されている。開口分泌に共通に働く分子群の全員にリン酸化されるが、どのような分子メカニズムで開口分泌に関与しているのかまだはっきり分かっていない。一方、我々が見いだした phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) ノックアウトマウスではラ氏島からのインスリン分泌の亢進に始まり、他のホルモンや神経伝達物質の分泌量が増加している事に気づいた。この異常を裏付ける分子機構を解明するために研究を行ったところ、PRIP の細胞膜局在化機構の詳細を明らかにし、さらに開口分泌における SNARE 分子のリン酸化の役割についても検討し、PRIP はホスファターゼ (PP1 と PP2A) と結合することによって、それらの酵素活性の制御を介して SNARE 分子のリン酸化を調節し、さらに PRIP は C2 ドメインによって t-SNARE 分子と結合することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、我々が見いだした分子 PRIP がキナーゼやホスファターゼといったリン酸化制御に関わる SNARE 分子をその作用部位近傍にリクルートされるという一つの役割を解明し、「開口分泌」調節の分子基盤において SNARE 分子複合体の形成や SNARE 関連分子の機能制御における役割も明らかにする。将来的に目指しているのは、PRIP のリン酸化制御に関わる役割を普遍的な細胞内シグナリングにおけるタンパク質リン酸化制御のリレーに広げることである。次いで、PRIP-KO マウスが示す他の表現型 (例えば骨代謝の異常や抑制性神経伝達受容体の機能異常など) について、その基盤としてのリン酸化制御の可能性についても研究を進展さ

せたい。

3. 研究の方法

(1) SNARE 複合体形成の *in vitro* 実験: 精製した野生型と点変異導入体の SNARE 分子の *in vitro* SDS-resistant SNARE 複合体の形成実験及び PRIP の種々のドメイン、あるいは点変異導入体を添加して SNARE 複合体の形成に与える影響を検討する。

(2) PRIP と SNARE 分子及び SNARE 関連分子との結合: PRIP の種々のドメイン、あるいは点変異を導入した組換え体の調製、さらには蛍光などのタグを繋いだ大腸菌や培養細胞への発現コンストラクトなどを調製する。SNARE 分子及び関連分子の組換え体の調製と PRIP との結合の試験管内での実験。複数の分子 (SNARE 分子と関連分子) の結合の同時性、あるいは相互の排除性を検討する。PRIP が機能部位 (初めには、分泌小胞との融合が起こる場所) にリン酸化関連酵素群を動員する可能性について、PRIP と SNARE タンパク質群との結合やリン脂質との結合とリン酸化関連酵素群との結合の同時性、あるいは相互の排除性、さらに PRIP 自身のリン酸化等の修飾がホスファターゼとの結合に及ぼす影響について試験管内実験を行う。

(3) 開口分泌のモデル細胞としての PC12 細胞を用いたアッセイ: PRIP を内在性に発現していない PC12 細胞に全長 PRIP や種々の PRIP ドメインを安定的に発現する細胞株と SNARE 分子を安定的にノックダウンする細胞株を構築する。これらのインタクト PC12 細胞を用いて高 K⁺ 溶液やリガンド刺激による [³H]NA 放出を検討する。その際に、薬剤 (活性化剤や阻害剤など) を添加して、タンパク質リン酸化状態を変化させる処理を行い、PC12 細胞の内在性の SNARE 複合体の形成を調べて、*in vitro* 実験結果との相同性を検討する。また、細胞抽出物における SNARE 分子や PRIP の免疫沈降実験を組み合わせ

て、分子間相互作用や目標分子近傍の酵素（キナーゼやホスファターゼ）活性などについて検討し、細胞を用いた実験との整合性を検討する。

4. 研究成果

(1) プロテインキナーゼ A (PKA) により SNAP-25 の 138 番のリン酸化が SNARE 分子複合体の形成を抑制する：開口分泌における膜融合過程に必須の分子複合体を構成する SNAP-25 に着目した。精製した組換え SNARE 分子 SNAP-25、syntaxin-1 と VAMP-2 が試験管の中で SDS-resistant SNARE 複合体を形成することがわかった。そこで PKA でリン酸化された SNAP-25 がこの SNARE 複合体の形成を抑制した。PKA によりリン酸化できない変異体 T138A SNAP-25 には同じ効果がみられなかった。さらに PC12 細胞を用いて、forskoline (FSK) で細胞を刺激して PKA を活性化させ、細胞内の SNARE 複合体の形成を調べた。試験管内実験と同様の結果だった。

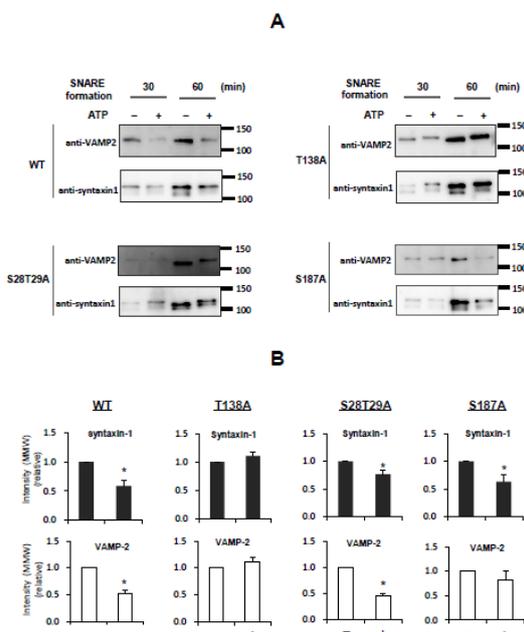


図 1. PKA より SNAP-25 のリン酸化が SDS-resistant SNARE 複合体を抑制する

(2) プロテインキナーゼ C (PKC) により SNAP-25 の 187 番のリン酸化が SNARE 分子複合体の形成を促進する：試験管中で PKC によりリン酸化された SNAP-25 が syntaxin-1、

VAMP-2 とより多い SDS-resistant SNARE 複合体を形成した。PKC によりリン酸化できない変異体 S187A SNAP-25 には同じ効果がみられなかった。さらに PC12 細胞を用いて、PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate) で細胞を刺激して PKC を活性化させ、細胞内の SNARE 複合体の形成を調べた。試験管内実験と同様の結果だった。

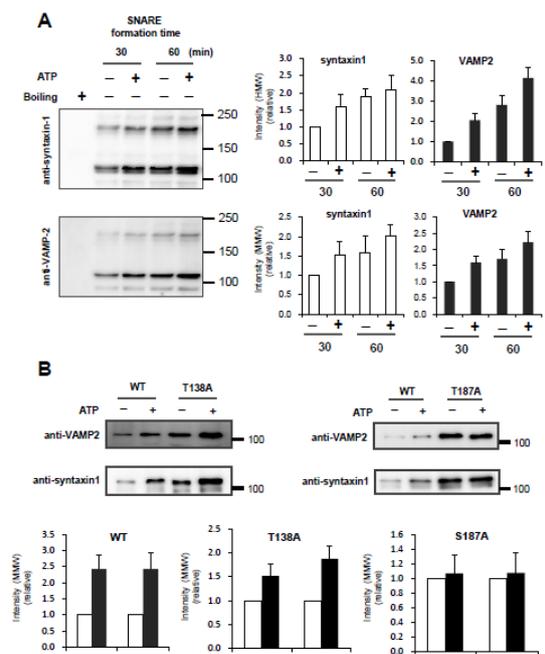


図 2. PKC より SNAP-25 のリン酸化が SDS-resistant SNARE 複合体を促進する

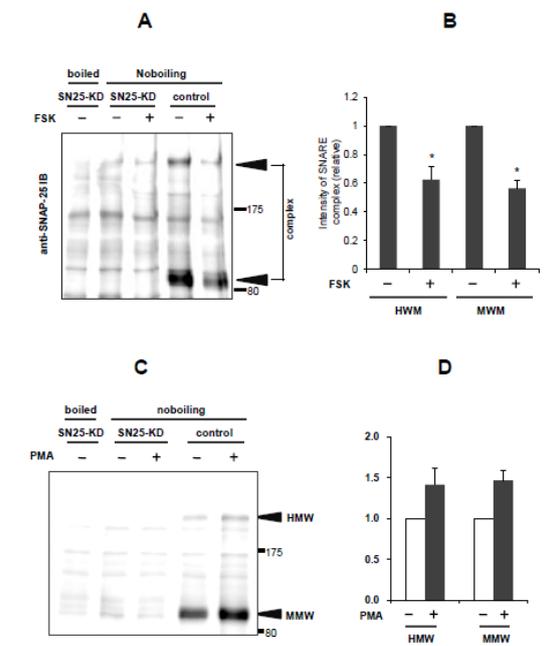


図 3. PC12 細胞中の SNARE 複合体形成

(3) SNAP-25 のリン酸化が開口分泌を調節する: SNAP-25 を安定的にノックダウンした PC12 細胞株を構築した。これらのインタクト PC12 細胞を用いて高 K⁺ 溶液刺激による [³H]NA 放出を検討した。SNAP-25 をノックダウンすると、高 K⁺ 溶液刺激により [³H]NA の放出が明らかに減少した。野生型 (WT) SNAP-25 がこれらの表現型をレスキューできたが、S187A 変異体 SNAP-25 では再現できなかった。一方、T138A SNAP-25 が再発現させた PC12 細胞が WT SNAP-25 と同じように [³H]NA を放出した。その際に、FSK で前処理すると高 K⁺ 溶液の刺激により [³H]NA の放出が増加された。WT SNAP-25 により、SNAP-25 ノックダウンした細胞と T138A 再発現した細胞のほうが FSK の刺激で増加した放出が多かった。

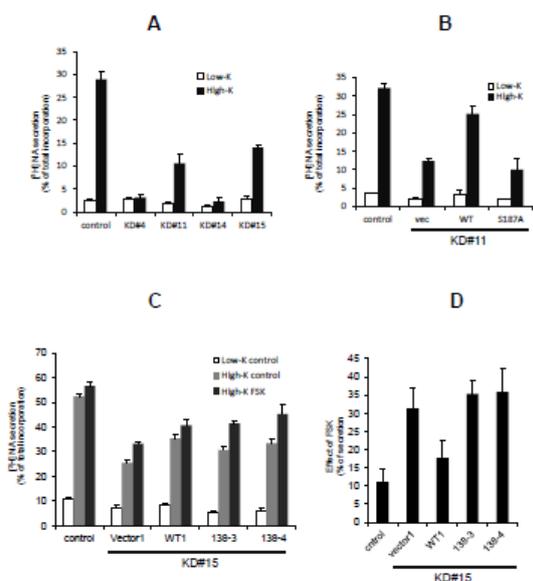


図4. SNAP-25 のリン酸化が開口分泌を調節する

(4) PRIP が C2-domain を介して SNARE 関連分子 synaptotagmin-1 とカルシウム依存的に結合する: 組換え体として精製したタンパク質を用いて PRIP と SNARE 分子及び SNARE 関連分子との試験管内結合実験も行い、PRIP が C2-domain を介して t-SNARE 分子と結合し、SNARE 関連分子 synaptotagmin-1 の C2-domain ともカルシウム依存的に結合する

ことがわかった。

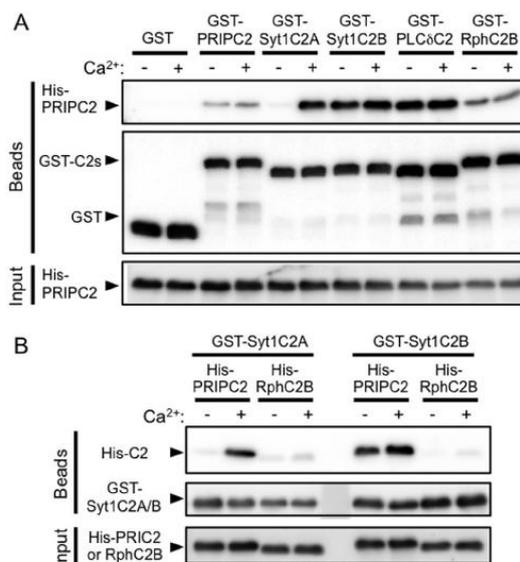


図5. PRIP1 C2 domain と Syt1C2A domain カルシウム依存的に結合する

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) Otani, T., Mizokami, A., Hayashi, Y., Gao J., Mori, Y., Nakamura, S., Takeuchi, H. and Hirata, M.: Signaling pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin.

Cell Signal. 査読有. 27(3): 533-44, 2015

(2) Wang, D., Takeuchi, H., Gao, J., Zhang, Z. and Hirata, M.: Hetero-oligomerization of C2 domains of phospholipase C-related but catalytically inactive protein and synaptotagmin-1.

Adv. Biol. Regul. 査読有. 57:120-9, 2015

(3) Sugiyama, G., Takeuchi, H., Kanematsu, T., Gao, J., Matsuda, M. and Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP as a scaffolding protein for phospho-regulation.

Adv. Biol. Regul. 査読有. 53(3):331-40, 2015

[学会発表] (計 7 件)

(1) **Gao, J.**, Takeuchi, H., Wang, DG and Hirata, M.: Phosphorylation of SNAP-25 by protein kinase-A is negatively involved in calcium-dependent exocytosis in PC12 cells.

第 8 7 回日本生化学会大会、京都、2014. 10.

(2) Hirata, M., Sugiyama, G., **Gao, J.** and Takeuchi, H.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP as a scaffolding protein for phospho-regulation.

The 39th European Symposium on Hormones and Cell Regulation. Mont Saint-Odile, Alsace, France, 2014.10.

(3) **Gao, J.**, Takeuchi, H., Wang, DG and Hirata, M.: Differential role of SNAP-25 phosphorylation by protein kinase-A and C in SNARE complex formation.

第 8 6 回日本生化学会大会、横浜市、2013. 9.

(4) **Gao, J.**, Takeuchi, H. and Hirata, M.: Phospho-dependent regulation of exocytosis.

先端歯学スクール 2013, 東京

(5) Hirata, M., Sugiyama, G., **Gao, J.** and Takeuchi, H.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP as a scaffolding protein for phospho-regulation.

International Symposium on PI-PLC Activity and Signaling, Ulsan, Korea, 2013.07.

(6) Nagano, K., Takeuchi, H., **Gao, J.**, Otani, T. and Hirata, M.: Phosphorylation of tomosyn by Akt is implicated in the regulation of GLUT4 translocation.

The 8th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, Fukuoka, Japan, 2013.11.

(7) Mizokami, A., Yasutake, Y., **Gao, J.**, Takeuchi, H. and Hirata, M.: Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and improves metabolic state in mice.

The 8th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, Fukuoka, Japan, 2013.11.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高 靖 (GAO JING)

研究者番号 : 40585882

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし