

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792127
 研究課題名（和文） 開口分泌モデルを用いた新規分子のリン酸化制御における役割解明研究
 研究課題名（英文） Involvement of a novel molecule in the phospho-regulation of exocytosis using a cell-based model
 研究代表者
 高 靖 (GAO JING)
 九州大学・歯学研究院・助教
 研究者番号：40585882

研究成果の概要（和文）：

本研究では、我々が見いだした phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) がリン酸化制御に関わる分子（ホスファターゼとキナーゼ）の働きを調節する仕組みを解明することを目指した。特に「開口分泌」のリン酸化調節における PRIP 役割解明を目標とした。PRIP には異なる2種類のホスファターゼ（PP1 と PP2A）が相互排他的に直接結合し、その結合は PRIP 自身のリン酸化によって調節されることをわかった。PRIP が PP1 を介して、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 のリン酸化状態を修飾することを明らかにした。このように、タンパク質リン酸化シグナルによる開口分泌の調節に PRIP が関与することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

In the current study, we investigated the involvement of phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP), which was firstly identified in our laboratory, in the regulation of the function of protein kinases and phosphatases, especially in the phospho-dependent modulation of exocytosis. We found that PRIP directly interacted with the catalytic subunits of two distinct phosphatases (PP1 and PP2A) in a mutually exclusive manner and the interactions are regulated by phosphorylation of PRIP itself. Moreover, phospho-SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25kDa), a component of SNARE complex, was dephosphorylated by protein phosphatase-1, whose activity was regulated by PRIP. Noradrenalin secretion in PC12 cells was also modulated by PRIP, which was correlated with the phospho-states of SNAP-25. Collectively, these results suggest that PRIP is involved in the regulation of the phospho-states of SNAP-25 by modulating the activity of PP1, thus regulating exocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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、リン酸化、SNARE、ホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化制御のリレーは細胞内シグナリング経路の最も主要な部分を成す。キナーゼとホスファターゼ両者の酵素活性のバランスが重要な決定因子であるこ

とは勿論であるが、これらの酵素が作用部位近傍にリクルートされなければならない。またアダプター分子等が足場（スカフォールド）となって酵素と基質の間接的な特異的相互作用を助け、効率的な反応の場を提供する

ことの重要性もまた認知され、既知の酵素の機能調節因子としての分子の発見や新たな機能の発見が盛んに行われている。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（ゴナドトロピンなど）や神経伝達物質（脳内アセチルコリンやノルアドレナリンなど）の分泌量が増加している事に気づいた。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ている。さらに、同ノックアウトマウスは骨組織の異常、糖代謝の異常、生殖機能の異常、抑制性神経伝達受容体の機能異常などの表現型も示しており、これらの異常を裏付ける分子機構について精力的な研究が行われている。

2. 研究の目的

PRIP はホスファターゼ (PP1 と PP2A) や活性化型 Akt (キナーゼ) と結合し、それらの酵素活性の制御を介して開口分泌を調節していることが示唆される。PRIP がホスファターゼやキナーゼと結合するといっても、作用する場所にこれらが動員されなければならない。そこで、ただ単にリン酸化制御に PRIP が関わるという事だけでなく、どのようにして作用する場所の近傍に行けるのか、などについても検討しなければならない。

本研究では、PRIP がリン酸化制御に関わる分子（ホスファターゼとキナーゼ）の働きを調節する仕組みを解明する事を目指した。特に「開口分泌」のリン酸化調節における PRIP 役割解明を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 組換え体として精製した PRIP, protein phosphatase, SNARE を用いた試験管内結合実験を行った。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った。

(2) 開口分泌のモデル細胞としての PC12 細胞を用いてセミインタクト型にした後のアッセイ：ジギトニンで漏出化したセミインタクト PC12 細胞 (permeabilized PC12) を用いて、生理的濃度の Ca^{2+} ($1\mu\text{M}$ 程度) を添加することによって、 $[\text{H}]$ NA 放出を測定するという実験系における、キナーゼやホスファターゼの組換え体の添加や阻害剤添加などの開口分泌現象に対する影響などを検討する。さらには、予め ^{32}P 標識した PC12 細胞を準備し、SNARE や PRIP のリン酸化程度と開口分泌との関連などを検討した。

(3) インタクト 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^+ 溶液やリガンド刺激による $[\text{H}]$ NA 放出を検討した。その際に、薬剤（活性化剤や阻害剤など）を添加して、細胞膜リン脂質成分を変化させる処理を行ったり、タンパク質リン酸化状態を変化させる処理を行ったりして(2)でのセミインタクト細胞を用いた実験結果との相同性を検討する。また、細胞抽出物から免疫沈降実験も行って、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した。

4. 研究成果

(1) SNAP-25 の脱リン酸化

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。SNAP-25 はプロテインキナーゼ A と C でリン酸化されることが知られているか、SNAP-25 の脱リン酸化についてはまたわかっていない。精製した SNAP-25 を用いた試験管内実験から、PKA でリン酸化された SNAP-25 の脱リン酸化はプロテインホスファターゼのうち、主に PP1 が担うことが明らかとなった。以前の研究より、PP1 は PRIP と結合すると酵素活性が抑制されるが A-キナーゼによって PRIP をリン酸化すると PP1 との結合は減少することがわかった。それで、PRIP を加えることより PP1 の抑制を介して SNAP-25 の脱リン酸化も調製されることが示唆された(図 1)。

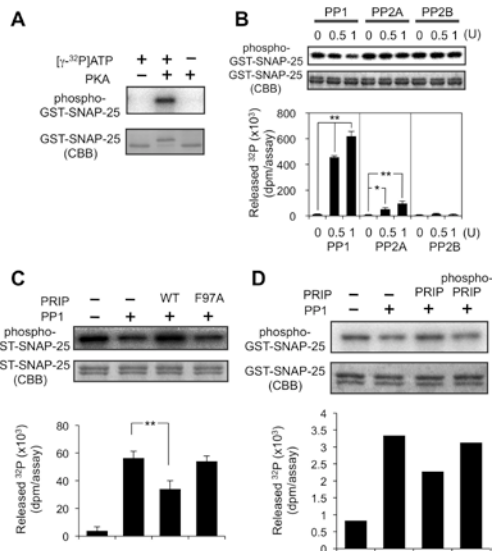


図1 SNAP-25の脱リン酸化

(2) PRIPによるSNAP-25脱リン酸化制御

予め ^{32}P 標識した PC12 細胞を準備し、SNARE や PRIP のリン酸化程度と開口分泌との関連などを検討した。PC12 細胞をフォルスコリンやホルボールエステル処理すると SNAP-25 はリン酸化され、PRIP はその脱リン酸化過程を促進した。但し、PP1 と結合できない、あるいは PKA によってリン酸化できない PRIP の点変異導入体になると、SNAP-25 の脱リン酸化過程を促進する効果を見られなかった (図 2)。

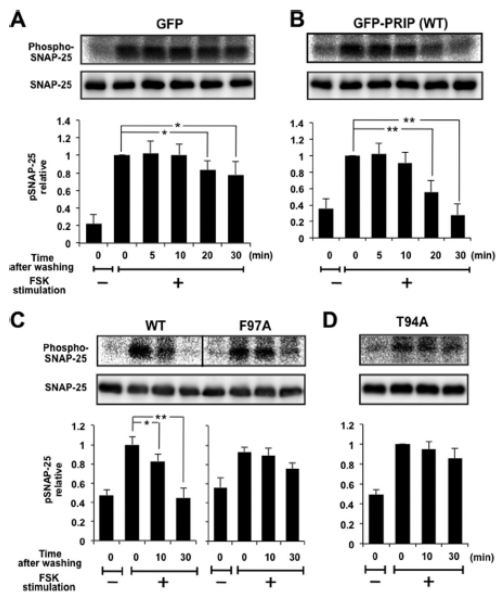


図2 PRIPによるSNAP-25脱リン酸化制御

またこのときのノルアドレナリン分泌量は SNAP-25 のリン酸化レベルとよく一致していた (図 3)

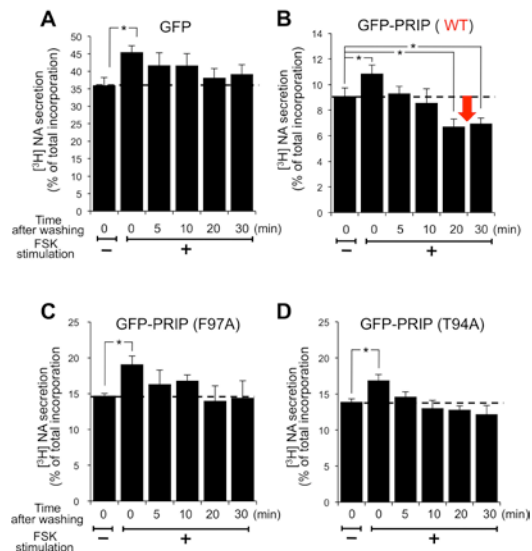


図3 PRIPによるノルアドレナリン分泌の調節

(3) 細胞内 PRIP, PP1 と SNAP-25 の複合体の形成

PC12 の細胞抽出物を用いて免疫沈降実験も行い、SNAP-25, PRIP, PP1 が複合体が形成することが明らかとなった。細胞を forskolin で刺激すると PRIP と共沈降する PP1 量は減少することもわかった。

(4) PRIP と PP1, PP2A の相互に排他的な結合

組換え体として精製した PRIP、PP1 (protein phosphatase)、PP2A を用いた試験管内結合実験を行い、PP1 と PP2A 両方も PRIP と結合するが、両者が混在する時には結合は相互に排他的であることが分かった。A-キナーゼによって PRIP をリン酸化すると PP1 との結合は減弱化し、反対に PP2A との結合は増加した。これらの分子を細胞に強制発現を行い、細胞の再構成系での実験を行った。細胞の抽出物を抗 PRIP 抗体で沈降させて混在する PP1 や PP2A の量を定量した。定常状態では PRIP に混在して PP1 も PP2A も存在した。細胞を forskolin で刺激すると PRIP と共沈降する PP1 量は減り、PP2A は増加した。ついで動物個体を用いた実験を行った。イソプロテレノールをマウスの腹腔内注入して、脳抽出物を抗 PRIP 抗体で沈降させて混在した PP1 ならびに PP2A を定量した。予測通りで PP1 の減少と PP2A の増加を認めた。

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 5 件)

(1) Mizokami, A., Yasutake, Y., Gao, J., Matsuda, M., Takahashi, I., Takeuchi, H. and Hirata, M.: Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. Plos ONE. 査読有. 8: e57375, 2013

(2) Zhang, Z., Takeuchi, H., Gao, J., Wang, DG., James, DJ., Martin, TF. and Hirata, M.: PRIP (Phospholipase C-related but Catalytically Inactive Protein) inhibits exocytosis by direct interactions with Syntaxin 1 and SNAP-25 through its C2 domain. J Biol Chem. 査読有. 288: 7769-7780, 2013

(3) Sugiyama, G., Takeuchi, H., Nagano, K., Gao, J., Ohyama, Y., Mori, Y. and Hirata, M.: Regulated interaction of protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A with phospholipase C-related but catalytically inactive protein. Biochemistry. 査読有. 51: 3394-403, 2013

(4) 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. 査読有. 287:10565-10578, 2012

(5) 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. 査読有. 52:183-194, 2011

〔学会発表〕 (計 6 件)

(1) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Wang, DG. and Hirata, M.: SNAP-25 phosphorylation causes down-regulation of SNARE complex formation. 第 8 5 回日本生化学会大会、福岡市、2012.12.

(2) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Wang, DG. and Hirata, M.: Role of SNAP-25 phosphorylation by protein kinase A in SNARE complex formation. The 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, Sevilla, Spain, Sep 4-9, 2012

(3) Gao, J. Takeuchi, H., Zhang, Z., Sugiyama, G, Nagano, K. and Hirata, M.: Roles of PRIP in phospho-regulation of exocytosis through the interaction with protein phosphatases. The 7th

Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientist, Ulsan, Korea, Feb 17-18, 2012. (招待講演)

(4) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Sugiyama, G, Nagano, K. and Hirata, M.: Phospho-dependent modulation of exocytosis by PRIP. The 10th JBS Biofrontier Symposium on New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, Fukuoka, Japan, Nov 14-16, 2011.

(5) Takeuchi, H., Gao, J., Zhang, Z., Sugiyama, G, Nagano, K. and Hirata, M.: Phospho-regulation of exocytosis by PRIP. The 10th JBS Biofrontier Symposium on New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, Fukuoka, Japan, Nov 14-16, 2011. (招待講演)

(6) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Sugiyama, G and Hirata, M.: Involvement of PRIP in exocytosis through phospho-dependent regulation of SNAP-25. 第 8 4 回日本生化学会大会、京都市、2011.9.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高 靖 (GAO JING)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40585882

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし