

蛋白質脱燐酸化酵素によるエクソサイトーシス調節機構の解明

Potential role of protein phosphatases in exocytosis

代表研究者 神戸大学医学部保健学科助教授 春藤 久人
Assoc. Prof., Faculty of Health Science, Kobe University School of Medicine
Hisato SHUNTOH

共同研究者 神戸大学医学部薬理学助教授 久野 高義
Assoc. Prof., Dept. of Pharmacology, Kobe University School of Medicine
Takayoshi KUNO

神戸大学バイオシグナル研究センター 斎藤 尚亮
分子薬理学教授
Prof., Biosignal Research Center, Kobe University
Naoaki SAITO

Effects of okadaic acid (OA) and calyculin-A (CL-A), specific inhibitors of protein phosphatases 1 (PP1) and 2A (PP2A) on the release of serotonin from rat basophilic leukemia cell line (RBL-2H3) were investigated. Both OA and CL-A induced the long-lasting release of serotonin in an extracellular Ca^{2+} -independent manner. CL-A did not increase intracellular Ca^{2+} concentration in the fura-2-loaded cells. CL-A was 100-fold more potent than OA in inducing the release, suggesting that PP1 is a dominant protein phosphatase in regulating RBL-2H3 cells. The CL-A-induced release of serotonin was completely inhibited by the nonselective protein kinase inhibitors, staurosporine and K-252a. CL-A induced phosphorylation of several cellular proteins in RBL-2H3 cells, which could be inhibited by staurosporine. These findings suggest that the release of serotonin is subjected to tonic, Ca^{2+} -independent, inhibition by PP1 in RBL-2H3 cells.

研究目的

神経伝達物質やホルモンなどの分泌過程はシナプス小胞（あるいは分泌小胞）と細胞膜との結合（docking）と融合（fusion）により行なわれ、この現象は開口分泌（exocytosis）と呼ばれる。この現象は細胞膜の脱分極に続いて起こる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が引き金となり、これに伴う蛋白質リン酸化反応を介して遂行されると考えられている。この過程にはプロテインキナーゼCをはじめ、種々のプロテインキナーゼとリン蛋白質が関与している。例えばシナプス小胞のリン蛋白質であるシナプシン IはカルモデュリンキナーゼIIによりリン酸化を受けることで伝達物質遊離を惹起することが

示唆されているなど、その他にも多くの知見が得られている。しかし、細胞内で燐酸化反応とcoupleしていると考えられる脱燐酸化反応の機能については未だ不明な点が多い。2B型プロテインホスファターゼ（PP2Bまたはカルシニューリン）の特異的阻害薬である免疫抑制薬のFK506およびシクロスポリンが、肥満細胞のモデルであるラット好塩基球性白血病(RBL-2H3)細胞からのセロトニン遊離を抑制することが報告されている。このことから分泌反応が脱リン酸化反応を介して行なわれる、あるいは調節されていることが示唆される。プロテインホスファターゼはその構造および機能上多様化

が見られ、1型、2A、2B、2C型 (PP1, PP2A, PP2B, PP2C) およびプロテインチロシンホスファターゼに分類される。本研究ではプロテインホスファターゼの機能を細胞工学的および分子生物学的手法を用いて解析し、プロテインホスファターゼによるエクソサイトーシスの調節の分子機構を明らかにすることを目的としている。

研究経過

(1) 細胞培養: ラット好塩基球性白血病

(RBL-2H3)細胞は10%牛胎児血清を含むDMEM培地で、5% CO₂存在下、37度で培養した。

(2) セロトニン遊離実験: 4 × 10⁵/mlのRBL-2H3細胞を3H-セロトニンを含むDMEM培養液中にて18時間培養した後、洗浄し、HEPESバッファーにて懸濁した。0.2 mlずつ24穴プレートに分注し、種々の濃度の1型および2A型プロテインホスファターゼの特異的阻害薬 (okadaic acid (OA) およびcalyculin-A (CL-A)) を適用した後、バッファー中および細胞内に残存する放射活性を測定し、セロトニン遊離量を算定した。

(3) 細胞内カルシウム濃度測定実験: HEPESバッファーにて10⁵/mlの細胞浮遊液を作成し、カルシウム蛍光指示薬 fura-2 (5 × 10⁻⁶ M) を取り込ませ、細胞内カルシウム濃度測定装置 (CAF-100) を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。

(4) 細胞内蛋白質リン酸化実験: 4 × 10⁵/mlの濃度の細胞内浮遊液を作成し、³²P-orthophosphate (0.1 mCi/ml) を30分間取り込ませた。種々の薬物を処置した後、細胞抽出液を調製し、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィによりリン酸化蛋白質を解析した。

研究成果

(1) セロトニン遊離実験: OAあるいはCL-Aを処置により、時間依存的に増加する持続性のセロトニン遊離が惹起された。また、OAあるいはCL-Aにより誘発される遊離反応は濃度依存性であり、ED50値はそれぞれ、1.2 μMおよび15 nMであった (Fig.1および2)。EGTAを含むカルシウム除去HEPESバッファー中でも同様のセロトニン遊離を認めた。従って、この反応はカルシウム非依存性であることが示唆された。蛋白質リン酸化酵素阻害薬であるスタウロスポリン (1 μM) およびK-252a (1 μM) を15分間前処置した細胞ではCL-Aによるセロトニン遊離は完全に抑制された (Fig. 4)。

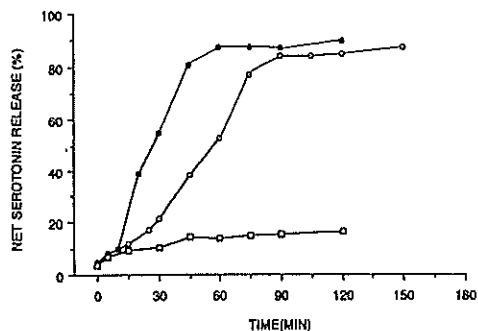


Fig. 1. Time-course of release of serotonin induced by OA or CL-A. RBL-2H3 cells were incubated for 18 h with [³H]serotonin and then incubated with DMSO (0.05%; basal release), OA (3 · 10⁻⁶ M) or CL-A (3 · 10⁻⁸ M) at 37°C. The reaction was stopped at the time indicated on the abscissa. Radioactivity in the supernatant was measured to determine the amount of serotonin released. Net serotonin release was calculated by dividing the radioactivity of supernatant by the sum of the radioactivity in the supernatant and corresponding cell lysate, as described in Section 2. Each point represents the mean of four determinations. (○) OA; (●) CL-A; (□) basal release.

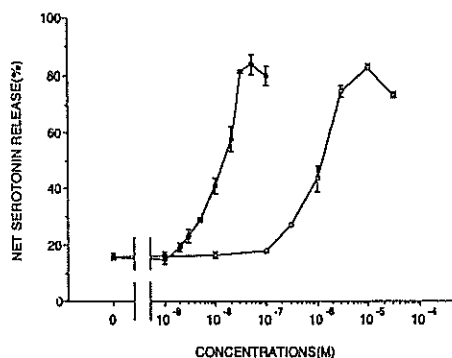


Fig. 2. Concentration-response curves of the release of serotonin induced by OA or CL-A. RBL-2H3 cells were incubated for 18 h with [³H]serotonin, then incubated with various concentrations of OA (○) or CL-A (●). After incubation for 75 min (OA) or 45 min (CL-A) at 37°C, the supernatants were removed and the radioactivity was measured to determine the amount of serotonin released. Net serotonin release was calculated as figure legend for Fig. 1. Each point represents mean ± S.E. of four determinations.

(2) 細胞内カルシウム濃度測定実験: イオノマイシン (0.1 μM) により細胞内カルシウム濃度の急激な上昇を認めた。一方、CL-Aを45分間処置によっても有意の細胞内カルシウム濃度の上昇は認められなかった (Fig. 3)。このことからセロトニン遊離反応がカルシウム非依存性であることが示された。

(3) 細胞内蛋白質リン酸化実験: CL-A (30 nM) を処置した細胞で、25、20、18、15、13および12 KDaの蛋白質のリン酸化の亢進が認められた。スタウロスポリン (1 μM) 前処置によりこのリン酸化

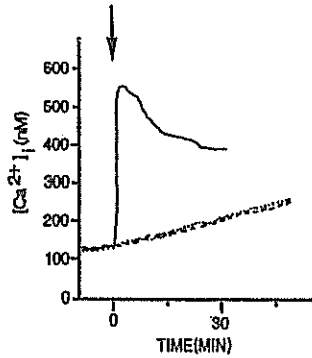


Fig. 3. Effects of CL-A and A23187 on $[Ca^{2+}]_i$ in RBL-2H3 cells. Fura-2-loaded RBL-2H3 cells were stimulated with DMSO (0.05%) (.....), CL-A ($3 \cdot 10^{-8}$ M) (— — —), or A23187 (10^{-7} M) (— — —). Measurement and calculation of $[Ca^{2+}]_i$ were performed as described in Section 2. Figure depicts representative patterns. Three additional experiments showed similar results.

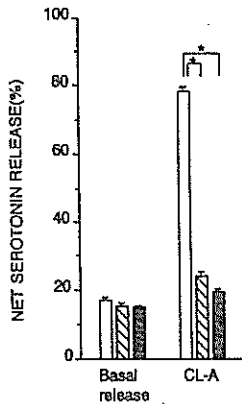


Fig. 4. Effects of protein kinase inhibitors, staurosporine and K-252a on serotonin release induced by CL-A. After incubation with vehicle (DMSO) (0.05%) (□), staurosporine (10^{-6} M) (▨) or K-252a (10^{-6} M) (■) for 15 min at 37°C , the cells were triggered by vehicle (0.05% DMSO) alone or CL-A ($3 \cdot 10^{-8}$ M, 45 min). Each value represents the mean \pm S.E. from four determinations. * Significant difference between two indicated groups ($P < 0.05$).

の亢進は完全に抑制された (Fig.5)。以上の結果よりPP1/2Aは Ca^{2+} 非依存性の構成性分泌に関与していると考えられる。即ち、RBL-2H3細胞からのセロトニン遊離に対してPP1/2Aは tonic に抑制をかけている。それが解除されると、数種類の蛋白質のリン酸化の亢進と共に遊離反応が惹起される。この反応は外液 Ca^{2+} 非依存性であること、高親和性 IgEレセプター刺激を介した Ca^{2+} 依存性セロトニン遊離反応の際に見られるmyosin light chainのリン酸化の亢進は認められないことから、 Ca^{2+} 依存性の調節性分泌とは異なるメカニズムが存在すると考えられる。

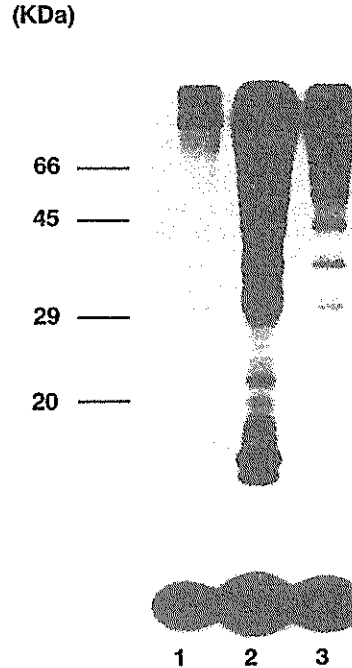


Fig. 5. CL-A-induced phosphorylation in the absence and presence of staurosporine. Cells were triggered by vehicle (0.05% DMSO) alone (lane 1), CL-A ($3 \cdot 10^{-8}$ M, 45 min) (lane 2) or CL-A ($3 \cdot 10^{-8}$ M, 45 min) after pretreatment with staurosporine (10^{-6} M) for 15 min (lane 3).

今後の課題と発展

最近、分泌反応は酵母のような下等動物から高等哺乳動物に至るまで、さらには免疫系および内分泌系細胞から神経系細胞に至るまで、SNAPsとSNAP receptor (SNARE) との組み合わせにより遂行されるという極めて普遍的な機構が存在することが解かった。即ち、シナプス小胞(分泌小胞)膜には synaptobrevin/VAMP が、シナプス前膜には syntaxin と SNAP-25 が局在し、これらが complex を作ることにより、fusionが起こり exocytosisにより伝達物質が放出される。脱リン酸化酵素系はシナプス小胞に局在する種々のリン蛋白質に作用して、分泌反応を調節しているものと考えられる。さらに、開口分泌が起こった直後には endocytosis と呼ばれる現象により分泌小胞の recycling が始まる。endocytosis にはカルシニューリンがその標的蛋白質の dynamin と呼ばれる large molecular weight GTP-binding protein を脱リン酸化することで惹起さ

れると考えられている。さらに、clathrin-coated pit と結合する adaptor peptide (AP-2) もこの過程で機能すると考えられ、これらの分子間相互反応とプロテインホスファターゼの機能については今後の発展が期待される。

発表論文リスト

- 1) Sakamoto, N., Shuntoh, H., Tanaka, C. (1994): Protein phosphatase inhibitors induce the release of serotonin from rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Biochim. Biophys. Acta* 1221, 291-296.
- 2) Katayama, S., Shuntoh, H., Matsuyama, S., Tanaka, C. (1994): Effect of heat shock on intracellular calcium mobilization in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Neurochem.* 62, 2292-2299.
- 3) Mukai, H., Shuntoh, H., Chang, C.-D., Asami, M., Ueno, M., Suzuki, K., Kuno, T. (1994): Isolation and characterization of CAJ1, a novel yeast homolog of dnaJ. *Gene* 145, 125-127.
- 4) Chang, C.-D., Mukai, H., Kuno, T., Tanaka, C. (1994). cDNA cloning of an alternatively spliced isoform of the regulatory subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin Ba2). *Biochim. Biophys. Acta* 1217, 174-180.
- 5) Tamura, K., Fujimura, T., Iwasaki, K., Sakuma, S., Fujitsu, T., Nakamura, K., Shimomura, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kobayashi, M. (1994). Interaction of tacrolimus (FK506) and its metabolites with FKBP and calcineurin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 437-443.
- 6) Yokoyama, N., Kuno, T., Furuyama, S., Wang, J. H. (1994). Immunological approach to identify calmodulin-stimulated phosphatase isozymes from bovine brain. *Mol. Cell. Biochem.* 132, 101-108.
- 7) Nishikawa, M., Toyoda, H., Saito, M., Morita, K., Tawara, I., Deguchi, K., Kuno, T., Shima, H., Nagao, M., Shirakawa, S. (1994). Calyculin A and okadaic acid inhibit human platelet aggregation by blocking protein phosphatases type 1 and 2A. *Cell. Signal.* 6, 59-72.
- 8) Ikegaki, N., Saito, N., Hashima, M., Tanaka, C. (1994). Production of specific antibodies against GABA transporter subtypes (GAT1, GAT2, GAT3) and their application to immunocytochemistry. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 26, 47-54.
- 9) Murakami, N., Sakai, N., Nei, K., Matsuyama, S.,

Saito, N., Tanaka, C. (1994). Potassium and calcium channel involvement in induction of long-lasting synaptic enhancement by calyculin A, a protein phosphatase inhibitor, in rat hippocampal CA1 region. *Neurosci. Lett.* 176, 181-184.

10) Osawa, I., Saito, N., Koga, T., Tanaka, C. (1994). Phorbol ester-induced inhibition of GABA uptake by synaptosomes and *Xenopus* oocytes expressing GABA transporter (GAT1). *Neurosci. Res.* 19, 287-293.