

モエシンキナーゼおよびフォスファターゼの分離同定

Isolation and characterization of moesin kinase and phosphatase

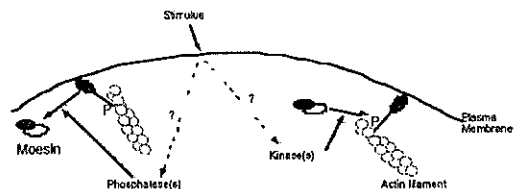
研究代表者 東北大学大学院農学研究科生物環境機能学 助教授 中村文彦
Associate Professor, Department of Environmental Biology, Tohoku University, Fumihiko NAKAMURA

Moesin is a cytoskeletal protein localized at the cytoplasmic face of the membrane in filopodia and other membranous protrusions. Moesin is often co-expressed with its high homologues, ezrin and radixin, in a great variety of cell types. These proteins are required for formation or stabilization of filopodial structure and for cytokinesis, and are hypothesized to provide reversible links between membrane components and the actin cytoskeleton. Moesin is phosphorylated at threonine558 within or near the F-actin binding site. Recently, we prepared antibody (pAbKYYKpTLR) for detection of site-specific phosphorylation of moesin protein family. Here, we developed a non-radioactive method to measure moesin kinase and phosphatase activities using pAbKYYKpTLR by an ELISA. Enzymes were fractionated by DEAE-Sephacel, phenyl-Sepharose, protamine-Sepharose, phosphonic acid peptide-conjugated Sepharose, blue-Sepharose, and gel filtration chromatography. At least, three kinase and two phosphatase activities were detected. One of the phosphatases was isolated and identified as protein phosphatase 2C and the other phosphatase was caryculinA-sensitive enzyme. Attempts to identify the kinases are currently in progress.

1. 研究目的

真核細胞は、細胞質全体に張り巡らされた細胞骨格タンパク質の複雑なネットワーク構造によって、環境変化や細胞周期に対応して、統一のとれた方向性のある運動をすることができる。モエシンは分子量約7万のタンパク質で、アクチンフィラメントと細胞膜を動的に架橋すると考えられている。最近、われわれはモエシンが細胞の形態変化にともなってリン酸化されることを明らかにし、さらに、リン酸化されることによってアクチンフィラメントと結合することを明らかにした。

本研究では、モエシンの活性化あるいは非活性化経路を明らかにするために、モエシンのリン酸化あるいは脱リン酸化を触媒する酵素（キナーゼあるいはフォスファターゼ）を分離同定することを目的とする。



2. 研究経過

2.1. 材料

ヒト血小板破碎液の調製

輸血期限切れの血小板濃厚液を遠心分離し、得られた血小板をHEPES-Tyrode's緩衝液で3回洗浄した。これに細胞破碎緩衝液(10mMTris-HCl, 0.5%Triton X-100, 2%glycerol, 0.1mMEDTA, 0.1%2-mercaptoethanol, 10mME-64, 100μMpAPMSF, pH7.2)を加え血小板を破碎し、遠心分離によって得られた上清を血小板破碎液とした。

リン酸化および非リン酸化基質の合成

モエシンキナーゼの基質には、モエシンのリン酸化部位を含むヘキサペプチドKYKTLRのアミノ末端にシステイン残基を導入したペプチドを合成後、マレイミドベンゾイルを架橋剤としてウシ血清アルブミン(BSA)に結合したものをを用いた。一方、フォスファターゼの基質には、同様のペプチドのスレオニン残基にリン酸基を導入したものを合成後、BSAに結合したものをを用いた。

リン酸化および非リン酸化モエシンの分離

カリキュリンA処理した血小板を破砕後、Heparine-agarose、Blue-sepharose、Phenyl-sepharoseおよびDEAE-celluloseの各カラムクロマトグラフィーに供し、リン酸化モエシンを精製した。非リン酸化モエシンは、スタウロスポリン処理した血小板から同様に精製した。リン酸化モエシンの検出は、抗リン酸化モエシン抗体を用いたウェスタンブロッティングによって行った。

2.1. 方法

ELISAを用いたモエシンキナーゼおよびフォスファターゼ活性の測定

BSA-ペプチドを96穴のマイクロプレートにコートし、洗浄後、スキムミルクによるブロッキングを行った。血小板破砕液をプレートホールに入れ、インキュベートし、洗浄後、抗リン酸化モエシン抗体とインキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼを結合した二次抗体とインキュベートし、洗浄後、TMB溶液を加え、その発色度から酵素活性を測定した。すなわち、モエシンキナーゼ活性の測定には非リン酸化ペプチドを基質に用い、発色度の増加から活性を測定し、一方フォスファターゼ活性の測定にはリン酸化ペプチドを用い、発色度の減少から活性を測定した。

精製モエシンを用いたモエシンキナーゼおよびフォスファターゼ活性の測定

精製したリン酸化あるいは非リン酸化モエシンと細胞破砕液あるいは精製酵素を、緩衝液(10mMTris-HCl, pH7.4, 100mMNaCl, 0.2mMDTT)中でインキュベートし、脱リン酸化あるいはリン酸化反応を行った。リン酸化モエシンの検出は、抗リン酸化モエシン抗体を用いたウェスタンブロッティングによって行った。モエシンキナーゼおよびフォスファターゼの分離

血小板破砕液を95%エタノール処理後あるいは直接、次のカラムクロマトグラフィーに供

し、目的酵素の活性画分を分取した。カラム：DE52-cellulose, Blue-sepharose, Protamine-sepharose, Phenyl-sepharose, KYKcpTLR-affinity (cp=phosphonic acid), KYKTLR-affinity, Heparine-agarose, Threonine-sepharose.

3. 研究成果

モエシンキナーゼおよびフォスファターゼ活性の検出

本研究によって開発したELISAによって、血小板破砕液中に目的酵素の活性を検出できることが明らかとなった。すなわち、Figure-1に示すとおり、マイクロプレートにコートした非リン酸化ペプチドは血小板破砕液中のキナーゼによってリン酸化され、その割合はリン酸化ペプチドを特異的に認識する抗体を用いたELISAによって測定できた(Figure-1A)。一方、フォスファターゼの場合、マイクロプレートにコートしたリン酸化ペプチドの脱リン酸化の割合を同様に測定することによって、活性を測定できた(Figure-1B)。

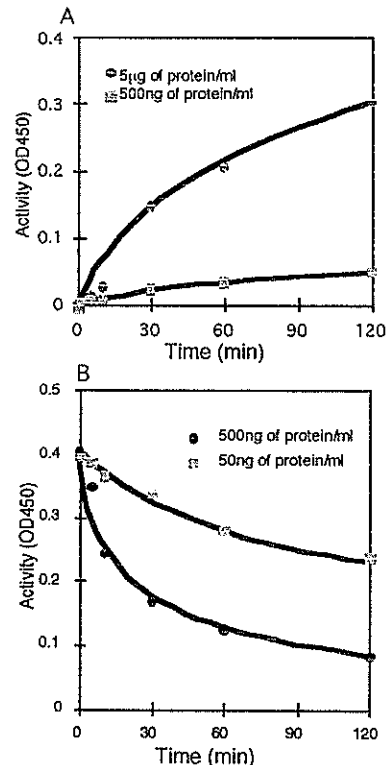


Figure-1. Measurement of moesine kinase (A) and phosphatase (B) activity by an ELISA.

モエシンキナーゼの分離

血小板破砕液をBlue-sepharoseカラムに供して得られた各画分に含まれるキナーゼ活性を上述のELISAによって測定した結果、Figure-2のとおりとなった。すなわち、塩濃度が約600, 900, 1200mMの各画分にキナーゼ活性が検出された。続いて、それぞれの画分をPhenyl-sepharose, DEAE-cellulose, Heparine-agarose, Threonine-sepharoseの各カラムクロマトグラフィーに供し、精製を進めたが、電気泳動上で単一バンドになるまでには至らなかった。また、得られた部分精製酵素と血小板破砕液より分離した非リン酸化モエシンを*in vitro*の系でインキュベートしたが、モエシンはリン酸化されなかった。最近報告されたPKC θ によるモエシンのリン酸化はフォスファチジルグリセロール依存的であり、またRho-キナーゼの場合、完全長の融合タンパク質を殆どリン酸化しないことが報告されている。したがって、得られた部分精製酵素による完全長モエシンのリン酸化には、リン脂質あるいは未同定物質の共存が必要と推定された。

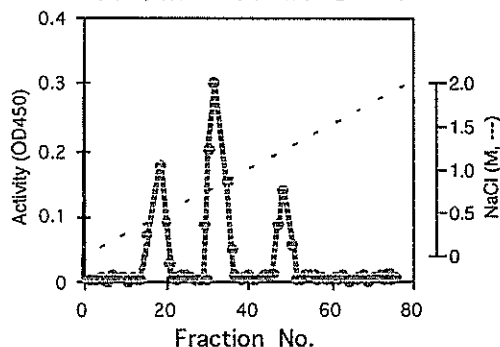


Figure-2. Separation of the moesin kinases by chromatography on Blue-Sepharose.

モエシンフォスファターゼの分離

血小板破砕液をDE-52-celluloseカラムに供して得られた各画分に含まれるフォスファターゼ活性を上述のELISAによって測定した結果、Figure-3のとおりとなった。すなわち、塩濃度が100~200mMの各画分にフォスファターゼ活性が検出された (Figure-3A)。血小板をフォスファターゼの阻害剤であるカリクリンAで処理するとモエシンのリン酸化が充進することをすでに明らかにしている。そこで、血小板破砕液中に存在するカリクリンA感受性および非感受性のフォスファターゼを検出するために、各画分にカリクリンAを加え、フォスファターゼ活性を測定した (Figure-3B)。その結果、カリクリンA非感

受性および感受性のフォスファターゼは、それぞれFigure-3Bおよび3Cに示すとおりに溶出することが明らかになった。少なくとも、本研究で用いたELISAにおいては、カリクリンA感受性のフォスファターゼの活性の方が、非感受性のものより強いことが示されたが、細胞内でのそれぞれの寄与は不明である。一方、極最近カリクリンA感受性のフォスファターゼとして知られるフォスファターゼIがモエシンを脱リン酸化することが報告されたので、本研究では、カリクリンA非感受性のフォスファターゼの精製について述べる。

カリクリンA非感受性のフォスファターゼ活性画分をPhenyl-sepharose, protamine-sepharoseおよびKYKcpTLRアフィニティーの各カラムクロマトグラフィーに供し精製を進めた結果、Figure-4に示すように電気泳動上で単一バンド(約50kDa)になるまで精製することができた。

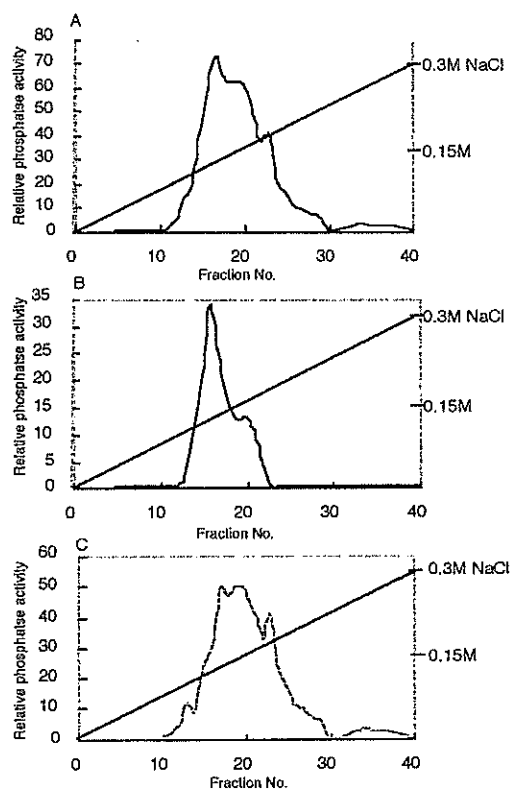


Figure-3. Separation of the moesin phosphatases by chromatography on DE52-cellulose.

A, total; B, calyculinA-resistant; C, A-B

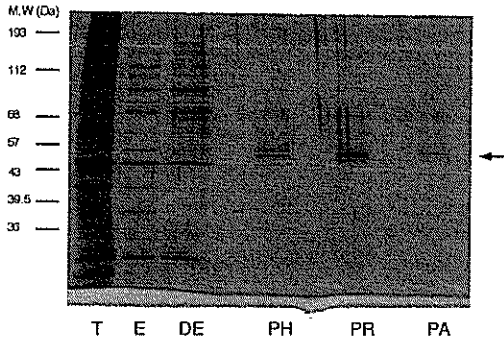


Figure-4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protein samples of each purification step. Aliquots of each step of the purification were subjected to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the gel was silver stained. T, Triton X-100 extract from human platelets; E, ethanol precipitate; DE, DE52 pool; PH, phenyl-sepharose pool; PR, protamine-sepharose pool; PA, KYCqTLR-affinity column pool

モエシンフォスファターゼの性質

得られた酵素のリン酸化モエシンに対する脱リン酸化能を調べた。Figure-5に示すとおり、時間の経過と共にリン酸化モエシンが脱リン酸化され、得られたカリクリンA非感受性フォスファターゼが*in vitro*でリン酸化モエシンを脱リン酸化することが明らかになった。

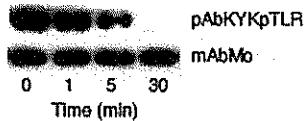


Figure-5. Western blotting showing dephosphorylation of the purified phospho-moesin by purified moesin phosphatase.

モエシンフォスファターゼの同定

最終的に精製されたカリクリンA非感受性フォスファターゼは、その分子量および特異的阻害剤あるいは活性化剤に対する感受性の類似性から、既知のフォスファターゼ2Cと推定された。そこで、フォスファターゼ2Cに対する特異抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った結果、本研究で精製した酵素はフォスファターゼ2Cと同定された。続いて、フォスファターゼ2CのGST融合タンパク質が、リン酸化モエシンを脱リン酸化するか否かを調べた。その結果、大腸菌内で合成したフォスファターゼ2Cも、リン酸化モエシンを脱リン酸化することが明らかになった。

4. 今後の課題と発展

モエシンフォスファターゼに関しては、本年3月にプロテインフォスファターゼのI型が、モエシンキナーゼに関しては、本年2月および4

月にそれぞれRhoキナーゼおよびプロテインキナーゼCθが機能することが報告された。しかし、本研究で分離同定したプロテインフォスファターゼ2Cによるモエシンの脱リン酸化に関する報告はない。また、本研究で少なくとも3つのキナーゼ活性を検出していることから、未同定のモエシンキナーゼが存在することが示唆され、今後の研究が必要である。

本研究により細胞運動、形態保持および変形などの制御機構が明らかになるばかりでなく、ガン細胞の浸潤および転移、神経細胞によるニューロネットワークの形成、マクロファージ(大食細胞)の走化性および異物認識、血小板凝集などを人為的に制御することによって、それらに関わる病気の治療が可能になることが期待される。

5. 発表論文リスト

ヒト血小板からのモエシンフォスファターゼの精製と性質、菱谷彰徳、中村文彦、第50回日本細胞生物学会大会講演要旨集1P-32, pp90, 1997