

Role of PRIP as regulator of protein phosphatase 1 (PP1) and protein phosphatase 2A (PP2A)

杉山, 悟郎
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21989>

出版情報：九州大学, 2011, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：



タンパク質ホスファターゼ PP1 および PP2A の
機能調節分子としての PRIP の役割解明に関する研究

2012 年

九州大学大学院歯学府 歯学専攻 口腔顎顔面外科学分野

杉山 悟郎

九州大学大学院歯学研究院 口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野

研究指導者 平田 雅人 教授

九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

指導教官 森 悦秀 教授

対象論文

本論文の一部は下記の論文に発表する。

Goro Sugiyama, Hiroshi Takeuchi, Koki Nagano, Jing Gao, Yukiko Ohyama, Yoshihide Mori and Masato Hirata

Regulated interaction of protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A with phospholipase C-related, but catalytically inactive protein

略語一覧

ATP : アデノシン三リン酸 (adenosine 1,4,5-triphosphate)

DNA : デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid)

ECL : 増強化学発光 (enhanced chemiluminescence)

EDTA : エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)

FBS : ウシ胎児血清 (fetal bovine serum)

FSK : ホルスコリン (forskolin)

GABA : γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid)

GABARAP : γ -アミノ酪酸受容体結合タンパク質 (GABA_A receptor associated protein)

GST- : グルタチオン *S*-トランスフェラーゼ融合 (glutathione *S*-transferase tagged)

His : ヘキサヒスチジン (hexa-histidine)

Ins(1,4,5)P₃ : D-*myo*-イノシトール 1,4,5-三リン酸 (D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate)

PCR : ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction)

PH : プレックストリン相同 (pleckstrin homology)

PLC- δ 1 : δ -1 型ホスホリパーゼ C (phospholipase C)

PKA : タンパク質リン酸化酵素 A (protein kinase A)

PP1 : タンパク質脱リン酸化酵素 1 (protein phosphatase 1)

PP1c : タンパク質脱リン酸化酵素 1の触媒サブユニット (protein phosphatase 1 catalytic subunit)

PP2A : タンパク質脱リン酸化酵素 2A (protein phosphatase 2A)

PP2Aa : タンパク質脱リン酸化酵素 2A の足場サブユニット (protein phosphatase 2A scaffold subunit)

PP2Ac : タンパク質脱リン酸化酵素 2A の触媒サブユニット (protein phosphatase 2A catalytic subunit)

PRIP : プリップ (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein)

RNA : リボ核酸 (ribonucleic acid)

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

目次

要旨	1
緒言	3
材料と方法	6
結果	11
考察	22
謝辞	26
参考文献	27

要 旨

タンパク質のリン酸化状態の変化は多岐にわたる細胞機能の重要な制御機構の一つである。リン酸化状態はキナーゼ(リン酸化)とホスファターゼ(脱リン酸化)の活性バランスによって厳密に調節されるが、ヒトでは数百種類のキナーゼが存在するのに対してホスファターゼはその十分の一にも満たない。ホスファターゼが様々なキナーゼの働きに特異的に対応するために、ホスファターゼの活性、基質特異性を調節するとともに時空間的に効率的な反応の場への動員などを調節する結合分子の多様性が重要だと考えられている。さて、研究室では細胞シグナリング研究から見出したタンパク質 PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) がホスファターゼの主要なファミリーであるタンパク質ホスファターゼ 1 (PP1) ならびにタンパク質ホスファターゼ 2A (PP2A) と複合体を形成すること示した。PRIP は他の結合分子と同様に、これらホスファターゼとの結合を介して細胞内のリン酸化シグナルの制御に関わることが予想される。しかし、2種類のホスファターゼの結合の相互関係などについては不明のままである。

そこで、本研究では PRIP と両ホスファターゼの結合の相互関係について組換え精製タンパク質を用いた試験管内実験から、培養細胞を用いた実験に至るまで詳細に検討した。大腸菌発現系により PP1、PP2A それぞれの触媒サブユニット (PP1c、PP2Ac) およびグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (GST) を付加した PRIP-1 (アミノ酸残基 74-298; 以下 GST-PRIP-1) を調製し、プルダウンアッセイを行った。PP1c、PP2Ac とともに GST-PRIP-1 と結合したが、両者の PRIP に対する結合は相互に排他的であった。したがって PP1c と PP2Ac の結合部位は同一かあるいは立体的に近接していることが示唆された。PRIP に種々の変異を導入して同様の結合アッセイを行ったところ、PP1c と PP2Ac との結合に関与する領域は近接していたものの、直接に結合すると思われるアミノ酸は異なっていることが分かった。それぞれの酵素活性に及ぼす結合の影響も調べたところ、PP1c は PRIP との結合によって抑制されたが、PP2Ac は抑制されなかった。次に PRIP のリン酸化が両ホスファターゼとの結合に及ぼす影響を調べた。試験管内で GST-PRIP-1 をプロテインキナーゼ A (PKA) によりリン酸化すると PP1c の結合量は減少したが、PP2Ac の結合量は変化しなかった。しかし両ホスファターゼが共存する実験系では、PP1c との結合量の減少に伴って PP2Ac の結合量は増加した。両ホスファターゼを内在するものの、PRIP は内在しない培養細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来細胞株: COS7) に PRIP 遺伝子 (野生型と PP1c が結合出来ない変異体) を導入しそれぞれのタンパク質

を発現させた細胞を、ホルスコリンで刺激した。細胞抽出液から抗 PRIP 抗体で免疫沈降し、共沈した PP1c や PP2Ac を定量したところ、野生型 PRIP を発現させた細胞ではホルスコリン処理によって試験管内実験と同様に PP1c の減少と PP2Ac の増加を観察した。

以上より、PRIP には異なる2種類のホスファターゼの触媒サブユニット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が分かった。PRIP はホスファターゼの脱リン酸化酵素活性や細胞内局在などを制御する調節サブユニットとして機能することが示唆された。

緒 言

リン酸化は最も主要なタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、真核細胞では全タンパク質の約 30% がリン酸化されている (1)。リン酸化はタンパク質の機能(酵素活性、他のタンパク質との結合状態、細胞内局在など)や安定性を性格づけることによって多岐にわたる細胞の機能調節において重要な役割を担う (2)。真核生物においてタンパク質は特定のセリン、スレオニンおよびチロシン残基がリン酸化を受けるが、そのリン酸化程度は、個々の残基に特異的なタンパク質リン酸化酵素(プロテインキナーゼ)と脱リン酸化酵素(プロテインホスファターゼ)により可逆的に調節される。ヒトゲノムにはおよそ 500 種類ものプロテインキナーゼが存在する。そのうち 100 種類を占めるチロシンキナーゼに対し、ほぼ同数のチロシンホスファターゼが存在する。一方、セリンおよびスレオニンをリン酸化するセリン・スレオニンキナーゼは、約 400 種類を占めるにも関わらず、セリン・スレオニンホスファターゼは僅か 45 種類程度しか存在しない (3-5)。この不均衡状態にも関わらず、多様に存在する基質タンパク質のリン酸化状態は広大な細胞内空間において時空間的に厳密な調節を受けている。

セリン・スレオニンホスファターゼファミリーの主要なものにプロテインホスファターゼ 1 (PP1) とプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) がある。これらはその機能を発揮する触媒サブユニットが、その基質特異性や活性および細胞内局在を規定する調節サブユニットと複合体を形成して細胞内に存在する (6)。PP1 では約 50 種類が同定されている調節サブユニットが触媒サブユニットと多様な特異性を持つホロ酵素を形成するため、圧倒的多数に存在するプロテインキナーゼによってリン酸化される基質タンパク質に対して個々のリン酸化状態の厳密な調節が可能になると考えられている (7,8)。また PP2A の多くは触媒活性を持つサブユニット (PP2Ac) と足場サブユニット (PP2Aa) からなるコア酵素に、その機能を調節する B サブユニットが結合したヘテロ三量体のホロ酵素として存在し、PP1 同様に広範な細胞機能に関与する (1,9,10)。これらホスファターゼと複合体を形成して機能調節を行うタンパク質は現在も新たに発見され続けている。このように、ホスファターゼの新たな結合タンパク質の発見は、すなわちそのホスファターゼの関与する新たな細胞機能の発見であり、新しい形の調節メカニズムの発見でもあるので、細胞内のリン酸化シグナルの全容解明に重要なステップとなる。さて、PP1 の調節サブユニットとして機能する結合タンパク質の多くには共通して認められる PP1

結合モチーフとして RVxF (x は任意のアミノ酸) というアミノ酸配列が知られているが (6)、その他のホスファターゼ結合タンパク質には PP1 における様なコンセンサス配列は見出されていない。したがって、データベース上のタンパク質一次配列から各ホスファターゼとの結合予測をすることは難しく、新たな調節サブユニットなどの結合タンパク質の発見は実際の個別の実験のなかでなされている。

PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) は細胞内セカンドメッセンジャーであるイノシトール 1,4,5-三リン酸と結合するタンパク質としてマウス脳可溶性画分から同定された分子である (11-14)。遺伝子クローニングにより推定した一次構造から、ホスホリパーゼ C (PLC)- δ 1 と高い相同性を有するが、PLC 酵素活性をもたないことが略称の理由である。その後、より広範な組織にも発現するアイソホームも発見され、PRIP には 1 型 (PRIP-1) と 2 型 (PRIP-2) が存在することがわかった (15,16)。当研究室ではこれまで PRIP が GABARAP (GABA_A-receptor associated protein)、PP1 α 触媒サブユニット (PP1 α)、PP2A 触媒サブユニット (PP2Ac) および GABA_A 受容体の β サブユニットと結合することを見出した (17-23)。PRIP 遺伝子欠損 (KO) マウスを作製したところ GABA_A 受容体を介したシグナルの修飾や生殖異常、種々のホルモンの分泌過多、そして骨代謝異常などの表現型を示した (21,24-27)。それぞれの表現型に関わるいくつかの分子、例えば GABA_A 受容体の β サブユニット (GABA_A 受容体シグナル)、smad-1/5/8 (骨代謝) や SNAP-25 (開口分泌) のリン酸化レベルが野生型と KO マウスで異なったことから、マウス個体で認められた上述の表現型は PRIP の有無がこれらのタンパク質のリン酸化状態に影響を及ぼした結果あらわれた可能性がある。さらに最近では PRIP はインスリン刺激に伴って活性化されたセリン・スレオニンキナーゼの一つ Akt と結合することを見出した (26)。このように PRIP は2種類の異なるホスファターゼやプロテインキナーゼ Akt と結合することから、リン酸化依存的なシグナル経路において関連分子群のハブとして機能し、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化を担う複数の酵素を、個々の標的分子が機能する細胞内局所にリクルートし、効率的な反応の場を提供する役割を持つのではないかと考えている。

PP1c や PP2Ac の調節サブユニットとして機能する個々の結合タンパク質は数多く見出されているが、一つの分子に複数のホスファターゼを結合する例は少なく、前述のように PP1c、PP2Ac に加えてキナーゼである Akt も結合する PRIP は稀な例である。研究室においてこれまでに解明し

てきた PP1c と PP2Ac の結合であるが、PP2Ac については結合部位の特定には至っていない。また、あくまで個別の結合であって両者が混在する細胞内を模した状態での結合は検討されていない。さらには PRIP 自身のリン酸化によってこれらの結合状態が如何に制御されるかなどについては検討していない。本研究ではこれらの点を明確にすることを目指した。

材料と方法

1. 動物

PRIP-1、PRIP-2 のダブルノックアウトマウス(KO マウス)の作製は以下の方法によった。C57BL/6J 系統マウス(チャールズリバーラボラトリージャパン社)に戻し交配した PRIP-1 ノックアウトマウス (PRIP-1 KO マウス) (17) と PRIP-2 ノックアウトマウス (PRIP-2 KO マウス)(28) を交配させ、KO マウス(ホモ接合性 PRIP-KO マウス)を作製した。この KO マウスと野生型マウス(WT)を交配させて作製した F1 と F2 世代を実験に用いた。すべての実験動物の取扱いは九州大学実験動物倫理委員会の承認を得て、日本学術会議により策定された「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006年6月1日施行)に従った。

2. 材料

細胞刺激に用いたインスリンは和光純薬工業(大阪)より入手し、FSK は Calbiochem/Merck (La Jolla, CA, USA) より入手した。試験管内における PRIP のリン酸化に用いた PKA とホスファターゼ活性測定の実験に用いた精製 PP1 および PP2A は Promega (Madison, WI, USA) より入手した。ホスファターゼ活性の測定に必要なホスホラーゼ b は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) より、 $[^3\text{H}]\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (specific radioactivity: 1.11 TBq/mmol) 及び $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (specific radioactivity: 111 TBq/mmol) は Perkin Elmer (Boston, MA, USA) より入手した。液体シンチレーター Clear-sol はナカライテスク(京都市)より入手した。タンパク質の精製と GST プルダウンアッセイ および免疫沈降に用いたグルタチオンセファロース 4B とプロテイン G セファロースは GE Healthcare/Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) より入手した。ニッケル-ニトリロアセティックアシッド (Ni-NTA)-アガロースレジン、抗ヘキサヒスチジン (His) タグ抗体は Qiagen (Chatsworth, CA, USA) より入手した。抗 PP1c 抗体は Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) より、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体、抗 PP2Ac 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より、また抗 GST 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) よりそれぞれ入手した。プレステインド電気泳動用分子量マーカーは New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)、ウエスタンブロットティング用の polyvinylidene difluoride 膜は MILLIPORE (Bedford, MA, USA)、二次抗体として

使用した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識したロバ抗ウサギ IgG 抗体及びヒツジ抗マウス IgG 抗体と検出用の発光試薬 ECL (enhanced chemiluminescence) キット、ECL-prime キットは GE Healthcare/Amersham Biosciences より、それぞれ入手した。抗 PRIP-1 ウサギポリクローナル抗体は当研究室で通法に従い作製し、抗原固相化カラムで精製したものを使用した(抗原:昆虫細胞発現系にて調製した His タグ付加 PRIP-1 タンパク質)(17)。ウェスタンブロットの発光検出と解析には FUJI FILM LAS 3000 mini (東京)を使用した。

3. 細胞培養と形質導入

アフリカミドリサル腎臓由来細胞株 COS7 は 10% (v/v) 非働化牛胎児血清、100 unit/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycin を添加したダルベッコ改変イーグル培地を用い、5% CO₂ 存在下にて 37°C で培養した。Myc タグ付加 PP2Ac、PRIP-1 の発現用プラスミドは Qiagen Plasmid Maxi Kit により調製し、Lipofectamine 2000、OPTI-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて添付のプロトコールに従い COS7 に形質導入した。形質導入した細胞は翌日新しい培養皿に分割継代し、さらにその翌日に免疫沈降実験に使用した。FSK 処理する場合は細胞破碎前に 50 μM FSK 添加培地に置換して 37°C で 15 分間インキュベーションした。

4. 組換えタンパク質発現用プラスミドの作製

PP1c、PP2Ac 両ホスファターゼとの結合領域を含む PRIP-1 (アミノ酸残基 74-298) をラット PRIP-1 全長遺伝子より PCR にて増幅し、GST 融合タンパク質発現用ベクター pGEX-4T-3 (GE Healthcare) に挿入したコンストラクトは教室の Gao 博士らによって調製された(29)。部位特異的アミノ酸置換を導入した各 PRIP-1 変異体は QuikChange site-directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を用い、下記のプライマーにてキットに添付の方法に従い調製した。変異導入は全て DNA シークエンシングを行い確認した。

K92Q/K93A 5'-GTGGTGGCAGACAGGCAACAGTGTCTTTTCAGC-3' (forward)
 5'-GCTGAAAGACATTGTTGCCTGTCTGCCACCAC-3' (reverse)

K104A/K105Q 5'-GCATGCCATCGGCGCAGAAGATTAGCAGTG-3' (forward)
 5'-CACTGCTAATCTTCTGCGCCGATGGCATGC-3' (reverse)

K151Q/K152A 5'-CTGGGAACCTTCCCAGGCAGACCTCGAAAAAGC-3' (forward)
 5'-GCTTTTTTCGAGGTCTGCCTGGGAAGGTTCCCAG-3' (reverse)

PP2A の触媒サブユニット(PP2Ac)と足場サブユニット(PP2Aa)に GST あるいは His タグを付加したタンパク質を大腸菌に発現させるためのプラスミドは以下の様に作製した。PP2Ac および PP2Aa 遺伝子は PCR によって増幅し、いずれも *Bam*HI と *Sal*I で消化した後に pGEX-4T3、pET-His30 各ベクターの同じ制限酵素部位に挿入した。PCR の鋳型にはラット脳トータル RNA からのランダムプライマーを用いた逆転写産物を使用した。PP1c α の大腸菌発現システム用プラスミドは Yoshimura らによって調製された (18)。

遺伝子組換え実験に関しては、九州大学の組換え DNA 実験委員会の承認を得て、九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則及び九州大学研究用微生物安全管理規則に基づき行った。

5. 組換えタンパク質の調製

PRIP の PH ドメインを含む領域 (アミノ酸残基 74-298) の野生体及び変異体組換えタンパク質は Gao らの方法に準じて GST 融合タンパク質 (GST-PRIP-1) として精製した (29)。PP1c、PP2Ac は Yoshimura らの方法に準じて His タグ融合タンパク質 (His-PP1c、His-PP2Ac) として精製した (18)。各タンパク質ともドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後クマシーブリリアントブルーで染色して精製度を確認した。ゲルの染色像をスキャナーでコンピュータに取り込み、Image J (National Institutes of Health: <http://rsb.info.nih.gov/ij/> より入手) でバンドに含まれるタンパク質を推定した。この結果とプロテインアッセイ ラピッドキット ワコー (和光純薬工業) で測定した結果を参考にタンパク質濃度を決定した。

6. 結合実験

PRIP と PP1c、PP2Ac との結合は GST プルダウンアッセイにより検討した。すなわち、大腸菌発現システムにて調製した GST-PRIP-1 の野生型または各変異体と His-PP1c、His-PP2Ac を結合バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100] 中で混合し、4°C で 1 時間転倒混和した。その後、結合バッファーで平衡化したグルタチオンセファロースビーズを加えてさらに 30 分間 4°C で転倒混和した。ビーズを 0.5 ml の結合バッファーで 3 回洗浄した後、SDS サンプルバッファーを加えて煮沸し、SDS-PAGE を行った。その後イムノブロットングにより目的のタンパク質を検出し、Image J でバンドを定量化して結合量を算出した。PRIP のリン酸化の影響を検討する実験では、初めに PRIP を 200 μ M ATP、0.1 mg PKA 中で 30°C、30 分間インキュベーションした後に上述の GST プルダウンアッセイに供した。

[3 H]Ins(1,4,5)P₃ 結合実験は Takeuchi らの方法に従った (30)。表記の濃度の His-PP2A を結合バッファー [50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.2% Triton X-100] 中で GST-PRIP-1 と混合し、氷上で 30 分間プレインキュベーションした後に 6.0 nM の [3 H]Ins(1,4,5)P₃ を加えてさらに 20 分間氷上でインキュベーションした。50 μ l の 10 mg/ml ウシ γ -グロブリンおよび 0.5 ml の 30% (w/v) polyethylene glycol 6,000 を加えた。15,000 g、5 分間遠心後の沈殿を 0.5 ml の 0.1 N NaOH に溶解し、5 ml のシンチレーションカクテルとの混合液として放射活性を測定した。0.1 mM 非放射性 Ins(1,4,5)P₃ 存在下での結合量も測定し、非存在下の測定値から差し引いて、特異的結合とした。

7. 免疫沈降

マウスの脳または COS7 細胞は組織破碎液 [50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 mM dithiothreitol、2.5 μ g/ml pepstatin A、5 μ g/ml leupeptin、3 μ g/ml aprotinin、25 μ g/ml *p*-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride] 中にて、脳はテフロン・ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、細胞はセルスクレイパーで培養皿から回収後 4°C で 1 時間転倒混和した。このようにして調製した破碎液は 15,000g で 30 分間遠心し、上清を回収して免疫沈降に供した。抗体を加えて 4°C で 2 時間転倒混和した後に、破碎液で平衡化したプロテイン G セファロースを加えてさらに 4°C で 1 時間転倒混和した。セファロースビーズは組織破碎液で 3

回洗浄した。その後 SDS-PAGE を行い、抗 PRIP-1 抗体、抗 PP1c 抗体、抗 PP2Ac 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。検出には二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体、ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いて ECL キット を使用した。検出したバンドの定量はイメージアナライザー LAS 3000 mini にて行った。

8. ウェスタンブロッティング

サンプルは SDS-PAGE によって分離し、polyvinylidene difluoride 膜に転写した。この転写膜を用いて抗体によるイムノブロッティングを行った。用いた抗体は既に述べた通りである。検出は二次抗体として西洋ワサビ過酸化酵素標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体、ヤギ抗マウス IgG 抗体を用い、ECL キット によった。

結 果

PRIP と PP1 および PP2A の触媒サブユニットとの結合

PRIP とホスファターゼの結合に関しては、マウス脳や培養細胞を用いた免疫沈降実験で抗 PRIP 抗体を用いた免疫沈降物に PP1c および PP2Ac が含まれていたことから、PRIP と両ホスファターゼが結合することが示されていた (18,21)。PP1c については精製した組換えタンパク質を用いた実験から PRIP と直接結合することも示されたが (18)、PP2Ac については免疫沈降実験の結果のみであった (21)。この結果では PP2Ac が PRIP と直接結合するのか、あるいは PP2Aa を含む他の分子を介して結合するのか明確ではない。そこで、PRIP-1 および PP2Ac、PP2Aa の組換えタンパク質の精製標品を大腸菌発現システムにて調製し、結合実験を行った。実験は GST タグを付加した PRIP-1 (アミノ酸残基 74-298: GST-PRIP-1) をグルタチオンビーズに固相化したものに His-PP2Ac を加えて、十分に洗浄後にビーズに結合している PP2Ac を抗 PP2Ac 抗体で検出した。また、逆に GST-PP2Ac あるいは GST-PP2Aa をグルタチオンビーズに固相化し、His-PRIP-1 を加えて結合を検出した。図 1 に示す様に PP2Ac は GST-PRIP-1 に結合したが、対照としての GST のみには結合しなかった。逆の結合実験でも PRIP-1 と PP2Ac との結合は確認された。一方、PP2Aa 単独での PRIP-1 との結合は認められなかった。

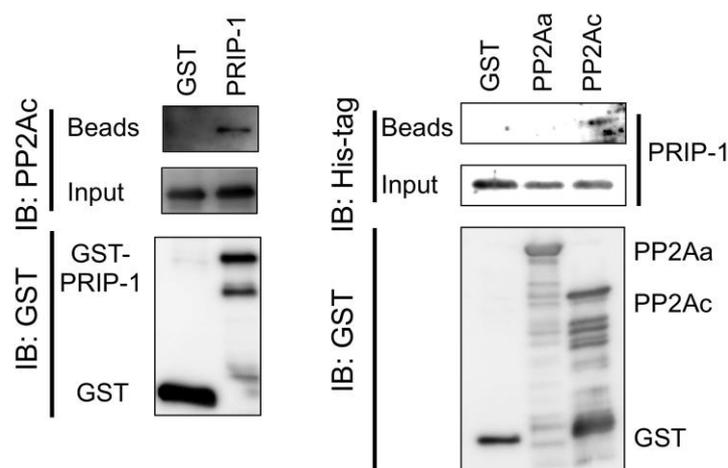


図1. PRIP-1 の PP2A 触媒サブユニットとの結合 あらかじめ GST-PRIP-1 もしくは GST を固相化したグルタチオンビーズを His-PP2Ac とインキュベーションし、洗浄後のビーズに結合しているタンパク質をウェスタンブロットで表記の抗体にて検出した(図左)。逆に GST-PP2Ac もしくは GST-PP2Aa、GST のみを固相化したグルタチオンビーズを用いた His-PRIP-1 のプルダウンアッセイも行った(右図)。各々 3 回以上行った実験からの典型的なブロット像を示した。

次に PRIP と PP1c および PP2A の結合の量的な関係を探るために野生型 (WT) および PRIP KO マウスから脳破碎液を調製して抗 PRIP-1 抗体による免疫沈降を行った。図 2 に典型的な PP1c、PP2Ac および PP2Aa イムノブロット像を示すが、それぞれの分子は両遺伝系マウスでほぼ等しい発現量を認めた。しかし抗 PRIP-1 抗体による免疫沈降複合体については PRIP-1 を含有する野生型マウスからのサンプルにおいてのみ PP1c および PP2Aa、PP2Ac の共沈を認めた。図 1 で観察したが PP2Aa は PRIP-1 とは直接的結合はしないようであったから、PP2Ac を介して共沈したように思われる。同じ実験を 6 回行ったが、それらを平均してバンドの濃さを比較することによって、脳破碎液に含まれる PRIP-1 の約 1.5% が免疫沈降されていることが分かった。この値を共沈した他の分子にも当てはめて PRIP-1 と共沈する PP1c、PP2Ac 量を算定すると、それぞれ破碎液に含まれる総量の $9.3 \pm 0.4\%$ 、 $6.6 \pm 0.4\%$ であった。PP2Aa は $1.6 \pm 0.6\%$ 程度であった。

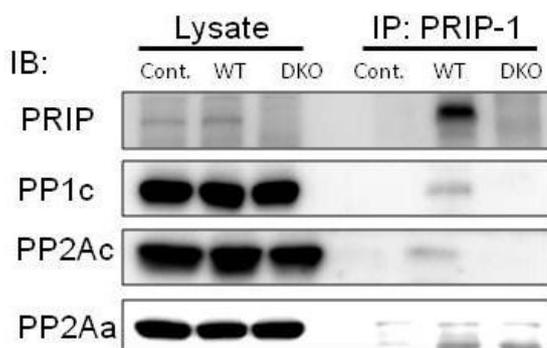


図2. マウス脳における PRIP の PP1、PP2A との複合体形成 PRIP WT および KO マウスの脳破碎液からの抗 PRIP-1 抗体またはコントロール IgG を用いた免疫沈降複合体を調製し SDS-PAGE で分離後、表記の抗体にてウエスタンブロット解析を行った。破碎液 (Lysate) と免疫沈降物 (IP:PRIP-1) は各サンプルについて総量の 1% もしくは 30% を各レーンにアプライした。6 回行った実験のうちの典型的なブロット像を示した。

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いてリン酸化標識した $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ホスホリラーゼ a}$ を基質として、ホスファターゼ活性が PRIP との結合によってどのような影響を受けるかを検討した。PP1c あるいは PP2Ac により $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ホスホリラーゼ a}$ から遊離した $[\text{}^{32}\text{P}]$ の放射活性を測定して酵素活性の指標とし、PRIP-1 添加の影響を調べた。すると図 3 に示すように、PP1c による脱リン酸化は加えた PRIP-1 タンパク質の濃

度依存的に抑制された。この結果は $[^{32}\text{P}]$ ミオシン軽鎖を基質に用いた実験の結果と一致した (18)。一方、PP2Ac の活性は PP2Ac に対して 100 倍量の PRIP-1 を添加しても影響を受けなかった。

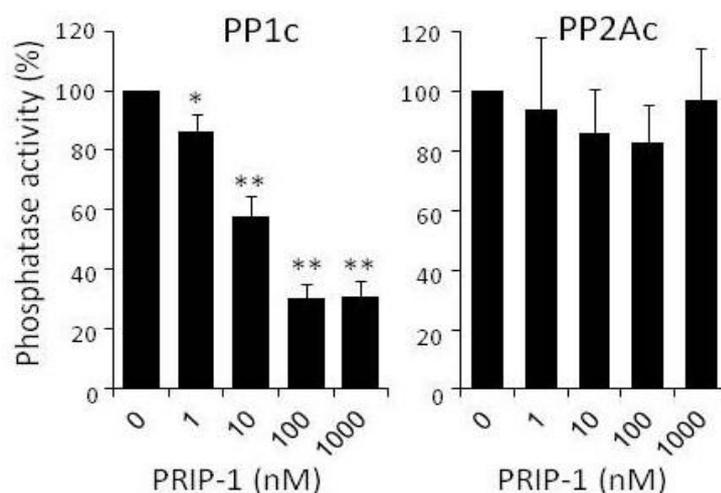


図3. PRIP のホスファターゼ活性への影響 ホスファターゼ活性は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とホスホリラーゼキナーゼにて調製した $[^{32}\text{P}]$ ホスホリラーゼ a を基質として用いて測定した。表記の濃度の PRIP-1 存在下で 10 nM の PP1c あるいは PP2Ac による 10 分間の脱リン酸化反応で遊離した $[^{32}\text{P}]$ 放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。PRIP-1 無添加で遊離した $[^{32}\text{P}]$ 放射活性は PP1c、PP2Ac でそれぞれ約 5,800 dpm と 2,300 dpm であった。結果は PRIP-1 無添加時の値を 100% とし 5 回の実験結果の平均±標準誤差で表した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

PP1c および PP2Ac と PRIP との結合様態

PP1c は PRIP-1 の PH ドメインのアミノ末端側に隣接した領域にある PP1c 結合モチーフ $^{93}\text{KTVSF}^{97}$ を介して結合することが既に示されていた (18)。また PP2Ac も PRIP の PH ドメインを含む領域に結合することが報告されていたが、結合するアミノ酸は特定されていなかった (21)。これらの結果から両ホスファターゼの結合部位は PRIP 上の同一かあるいは近接した部位にあると考えられたので、両ホスファターゼと PRIP 結合の相互関係を調べた。

固相化した PRIP-1 に一定量 (3 nM) の PP1c あるいは PP2Ac を加えて結合させた。その際に、3、9、30 nM の PP2Ac あるいは PP1c を混在させる事による結合量の変化をそれぞれの特異的抗体を用いて定量化した。図 4 に示す様に、それぞれのホスファターゼの結合は相対するホスファターゼによって排除された。一方、相手のホスファターゼの結合は増加した。このように両ホスファ

ターゼの触媒サブユニットは PRIP に対して相互排他的に結合した。これらの結果から両ホスファターゼとは PRIP に対して同程度の親和性を有しており、かつ両ホスファターゼの PRIP との結合部位は同一であるか、もしくは結合部位が非常に近接しているために各ホスファターゼの PRIP との結合が相互に立体的に障害となることが示唆された。

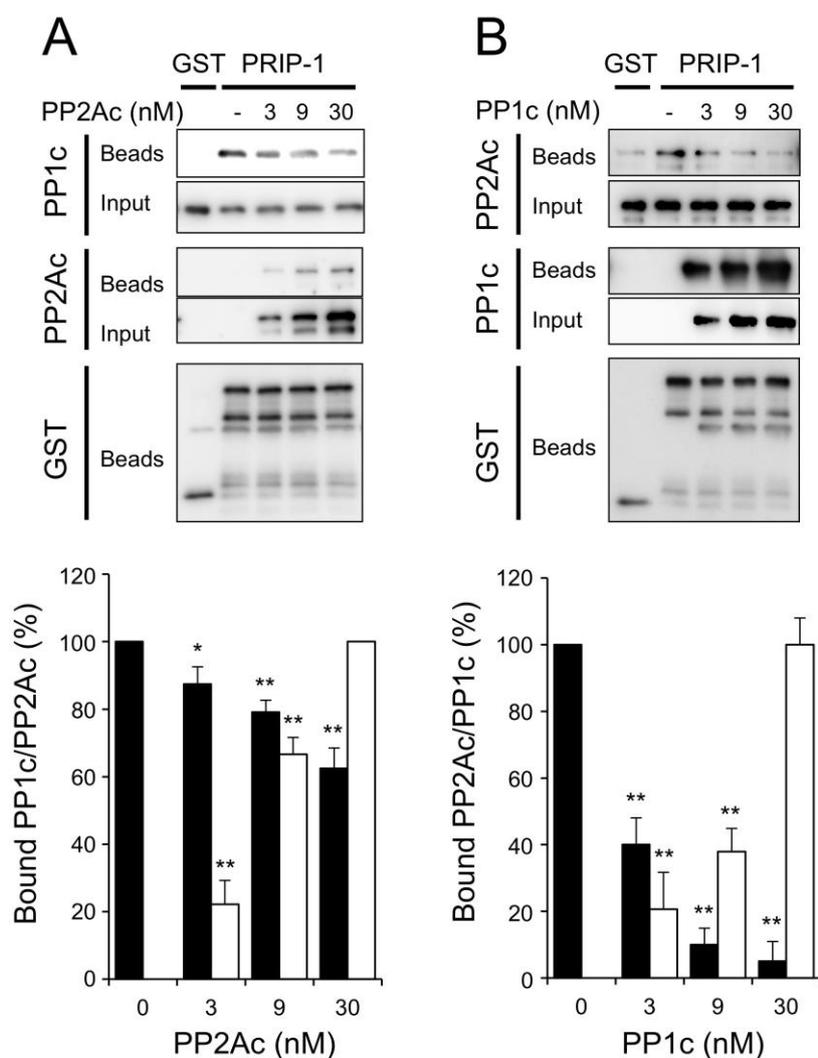


図4. PRIP と PP1c、PP2Ac 結合の相互作用 図1同様 0.6 pmol の GST-PRIP-1 もしくは GST を固相化したグルタチオンビーズを 3 nM の His-PP1c あるいは His-PP2Ac とそれぞれ 3、9、30 nM の His-PP2Ac (A) あるいは His-PP1c (B) 存在下でインキュベーションし、洗浄後のビーズに結合しているタンパク質をウェスタンブロットで表記の抗体にて検出した。ブロット像はそれぞれ 5 回繰り返した実験のうちの典型例を示した。各バンドを Image J で定量化した結果を下パネルに示す。ホスファターゼの結合量は他方のホスファターゼの無い状態での結合量を 100% として黒棒で、他方のホスファターゼの結合量は 30 nM 添加した時のものを 100% として白棒で、5 回の実験の平均値±標準誤差で表した。
*; p<0.05、**; p<0.01。

PP1c および PP2Ac の PRIP への結合が相互排他的であったので両ホスファターゼの PRIP への結合部位について前述の可能性を検討するために、PRIP 上の PP2Ac 結合部位を検索した。我々はこれまで、様々な PRIP 欠失変異体を発現させた細胞から PRIP を免疫沈降する実験で、PP2Ac の結合領域を PRIP-1 のアミノ酸 83-297 番まで絞りこんだものの、PP1c 結合部位との関係は明らかでない(21)ならびに(図1)。一方、前述のように PP2A には多くの結合分子が知られているものの(31-33)、触媒サブユニットと直接結合するものは少なく、またそれらに共通した PP2Ac 結合モチーフに相当するものはない(1,31)。しかし、いくつかの PP2Ac 結合分子では、結合に必要なアミノ酸配列が報告されているので、そのうち以下の3つの報告を参考に PRIP への変異導入部位を選択した。先ず Tap42/ α 4 の場合、種間で保存された配列 RxxKI (x は任意のアミノ酸) 中の二つの塩基性アミノ酸、すなわち 163 番目のアルギニン (Arg-163) と 166 番目のリシン (Lys-166) を酸性アミノ酸のグルタミン酸 (Glu, E) とアスパラギン酸 (Asp, D) にそれぞれ置換すると PP2Ac の結合が減弱していた(34)。PRIP-1 に類似の配列 ²⁷⁷KESKI²⁸¹ を見だし、同様の変異を導入した。すなわち 277 番目と 280 番目の塩基性アミノ酸のリシン (Lys, K) をともに酸性アミノ酸のアスパラギン酸 (Asp, D) に置換した (K277D/K280D)。次に Rb2/p130 では、¹⁰⁸⁰SPSKRLRE¹⁰⁸⁷ と ¹⁰⁹⁷TPTKKRGI¹¹⁰⁴ の2つの領域で塩基性アミノ酸をアラニンに置換することで PP2Ac との結合が消失したので(35)、PRIP-1 でも類似の配列を見だし、¹⁰¹PSEKISS¹⁰⁸ と ¹⁴⁹PSKKDLE¹⁵⁵ 配列中の塩基性アミノ酸をアラニンやアスパラギンに置換した(K104A/K105N、K151N/K152A)。そしてインテグリンの α_{IIb} サブユニットは、PRIP 同様 PP1c、PP2Ac の両者と結合し、それぞれの結合に必要な領域は ⁹⁸⁹KVGF⁹⁹²、⁹⁸⁹KVGFFKR⁹⁹⁵ であり、一部重複していた(36)。この場合、PP2Ac 結合領域では塩基性アミノ酸が追加されており、また上の2例を踏まえて、PRIP-1 でも PP1c 結合領域に近接して存在する塩基性アミノ酸 Lys-92、Lys-93 をアラニンやアスパラギンに置換した変異体を作製した(K92A/K93N)。

これらのアミノ酸変異を導入した PRIP 変異体について、PP1c ならびに PP2Ac との結合をプルダウンアッセイにより検討した(図5)。今回作製した変異体のうち、K277D/K280D は両ホスファターゼの結合に影響しなかった(結果は不提示)。ところが、他の3種の変異体(K92A/K93N、

K104A/K105N および K151N/K152A) はいずれも PP2Ac への結合は減弱したが、PP1c への結合には影響しなかった。一方、PP1c との結合に影響することが分かっている変異体 (F97A) は既報 (18) と同様に、PP1c の結合は抑制されることを確認したが、PP2Ac の結合は抑制されなかった。これらの結果から、PP2Ac は PRIP の PP1c 結合領域と同一ではないものの、非常に近接した部位 (K92/K93) を介して結合することが示唆された。

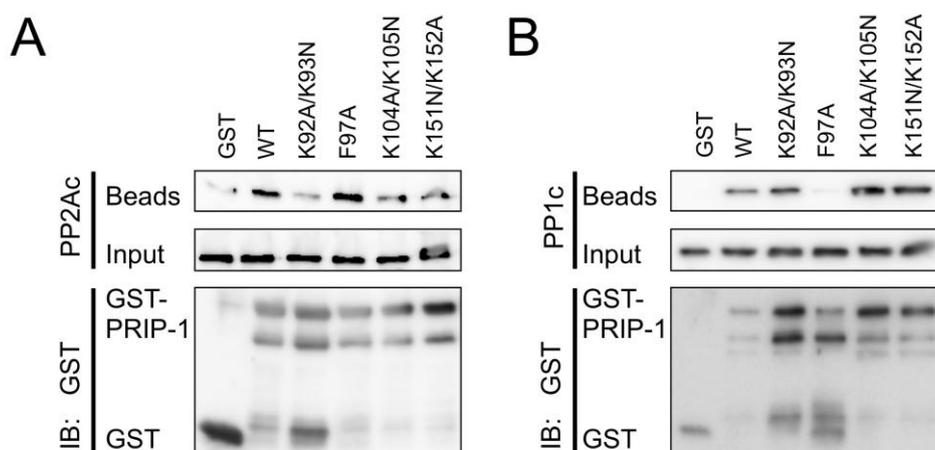


図5. PP2Ac と変異導入 PRIP の結合 図1の実験と同様に野生型もしくは変異体の GST-PRIP-1 あるいは GST を固相化したグルタチオンビーズを His-PP2Ac (A) または His-PP1c (B) とそれぞれインキュベーションし、洗浄後のビーズに結合しているタンパク質をウェスタンブロットで表記の抗体にて検出した。各々 5 回以上行った実験からの典型的なプロット像を示す。

また、図 6A に示す様に PRIP-1 の一次構造上は離れた部位に位置するアミノ酸の置換 (K104/105 および K151/K152) が PP2Ac との結合に影響したことから、PP2Ac は PRIP-1 上に存在する上記のアミノ酸をいずれも含むような表面に結合することが示唆された。多くの分子の PH ドメインについては、その立体構造が解明されているが (37-43)、PRIP-1 についてはその立体構造はまだ分かっていない。そこで一次構造上、類似している PLC- δ 1 の PH ドメインの立体構造を模した PRIP-1 の予測構造を図 6B に示し、予測される PP1c と PP2Ac の結合部位を図示した。

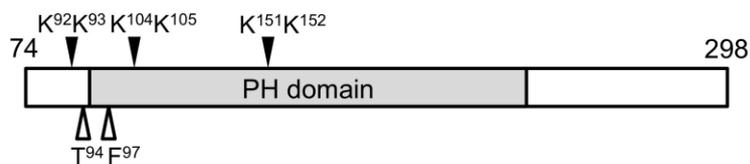
A

```

          *** *          **          β1          β2          β3          **          β4          β5
PRIP-1  91  RKKTVSFSSMPSEKKISSAHDCISFMQAGCELKKVVRPNSRIYNRFFTLDTLQALRWEPSSKKDLEKAKLDISAIKEIRLG 170
PRIP-2 119  RKKTVSFSSMPTEKKISSASDCINSMVEGSELKKVRSNSRIYHRYFLLDADMQSLRWEPSSKKDSEKAKIDIKSIKEVRTG 198

          β6          β7
PRIP-1 171  KNTETFRNGLADQICEDCAFSILHGENYESLDLVANSADVANIWVSGRLRYLVSRKQPLDFMEGNQNTPRFMWLKTV 249
PRIP-2 199  KNTDIFRSNGISEQISEDCAFSVIYGENYESLDLVANSADVANIWVTGLRYLISYGKHTLDMLESSQDNMRMSWISQM 277

```



B

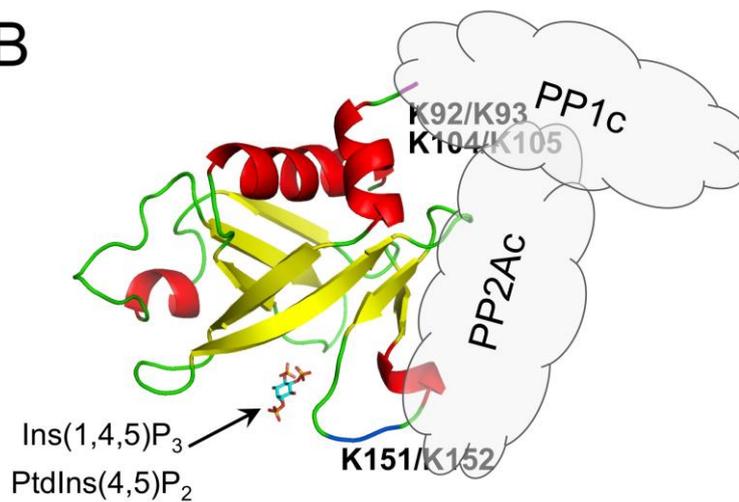


図6. PRIP のアミノ酸変異導入部位と PP2Ac 結合部位 (A) ラット PRIP-1 (アミノ酸残基 91-249) と PRIP-2 (119-277) のアミノ酸配列 (上) と本研究でプルダウンアッセイに用いた PRIP-1 (74-298)。アミノ酸配列アラインメントは Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) を用いて行った。PHドメインで保存されている β ストランドを配列上に示した。本研究で作製した変異体の変異導入部位をアスタリスクで配列上に、また黒塗りの矢頭で示した。本研究で用いた既報の変異導入部位を白抜き矢頭で示した。(B) PRIP-1 の PHドメインの立体構造モデル。立体構造モデリングは PLC- δ 1 の PHドメイン (PDB コード: 1MAI) を参照して SWISS-MODEL ソフト (<http://swissmodel.expasy.org/>) にて行い (44-46)、PyMol (<http://www.pymol.org/>) ソフトにて描画した。PP2Ac との結合に影響した変異導入部位を記した。ただし、モデルに PHドメインより N 末側は表示されていないので PHドメイン外の変異導入部位は N 末付近に記した。モデリングに含まれる Ins(1,4,5) P_3 結合部位と図 5 の実験結果から予想される PP1c、PP2Ac の配位部位を示す。

PRIP-1 の Lys-151、Lys-152 は PLC- δ 1 の PH ドメインにおいて Ins(1,4,5)P₃ との結合に直接関与する部位に相当する (47)。そこで、PP2Ac と Ins(1,4,5)P₃ がそれぞれの PRIP への結合に相互に影響を与えるか検討した (図 7)。PP2Ac の 200 倍量までの Ins(1,4,5)P₃ を加えても PP2Ac の PRIP-1 の結合を抑制することなく、むしろ増加するような結果であった (図 7A)。また、³H]Ins(1,4,5)P₃ 結合実験において 10 倍量までの PP2Ac を添加しても GST-PRIP-1 の ³H]Ins(1,4,5)P₃ 結合に全く影響しなかった (図 7B)。PP2Ac と Ins(1,4,5)P₃ は PRIP との結合に相互に影響しないようであった。

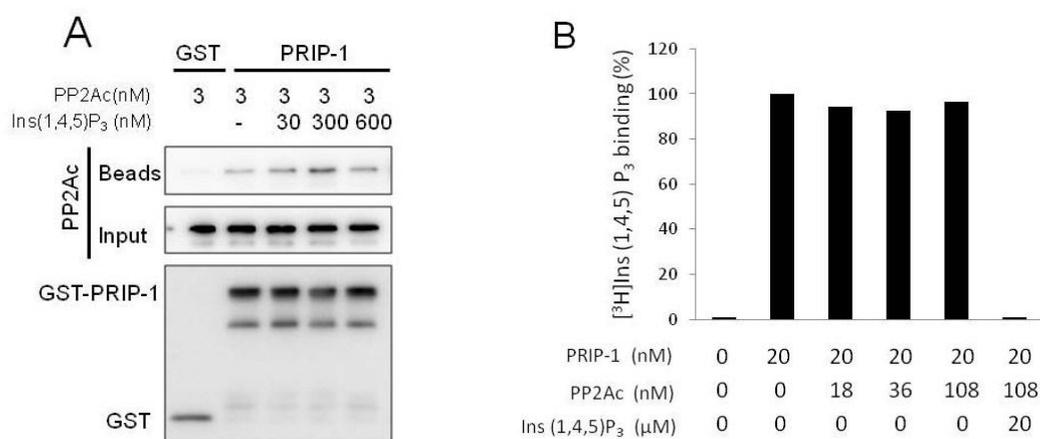


図7. Ins (1,4,5)P₃ と PP2Ac が PRIP 結合に相互に与える影響 (A) Ins(1,4,5)P₃ が PRIP と PP2Ac の結合に与える影響。図1の実験と同様に 0.6 pmol の GST-PRIP-1 もしくは GST を固相化したグルタチオンビーズと 3 nM の His-PP2Ac を表示の濃度の Ins(1,4,5)P₃ 存在下でインキュベーションした。洗浄後のビーズに結合しているタンパク質をウェスタンブロットで表記の抗体にて検出した。各々 5 回以上行った実験からの典型的なブロット像を示す。(B) PP2Ac が PRIP と Ins(1,4,5)P₃ の結合に与える影響。GST-PRIP-1 の Ins(1,4,5)P₃ 結合実験を表記の濃度の PP2Ac 存在下で行った。20 nM GST-PRIP-1 と表記の濃度の His-PP2Ac を含む混合液を氷上で 30 分間ブレインキュベーションし、³H]Ins(1,4,5)P₃ を加えて引き続き氷上で 20 分間インキュベーションを行った。PP2Ac 無添加時を 100% として Ins(1,4,5)P₃ 結合量をグラフ化した。図は 5 回の実験の平均値。

PP1c および PP2Ac との結合における PRIP のリン酸化の影響

PRIP がホスファターゼやキナーゼと結合し、標的分子のリン酸化を厳密に制御するために、PP1c、PP2Ac などの結合状態が細胞のおかれた状況によって変化するとすれば都合がよい。我々は PP1c との結合部位に隣接する Thr-94 が PKA によってリン酸化され、それに伴い PRIP-1 と PP1c との結合が減弱化することを報告している (19)。そこで、PRIP 自身のリン酸化が PP1c および

PP2Ac との結合に与える影響を検討した。予め Mg-ATP 存在下で PKA とインキュベーションして GST-PRIP-1 をリン酸化させた。プルダウンアッセイ時には GST-PRIP-1 のリン酸化は同時には確認しなかったが、同じサンプルで $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いた類似実験を別途行い確認した。GST-PRIP-1 を PKA 処理すると既報 (19) の通り PP1c との結合は減弱した (図 8A)。PKA や Mg-ATP を除いた状態でプレインキュベーションした GST-PRIP-1 の PP1c 結合量は変化しなかったことから、PP1c 結合の減弱化は GST-PRIP-1 のリン酸化によると考えられる。一方、同様の実験で PP2Ac の結合は PKA 処理の影響を受けなかった (図 8A)。

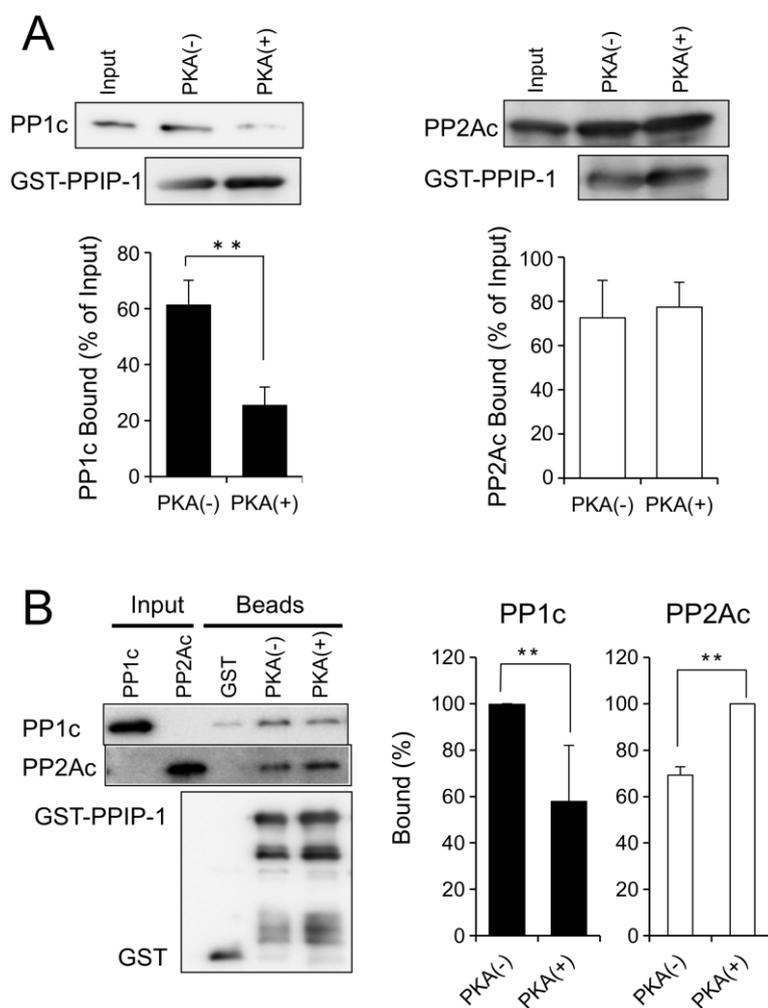


図8. PRIP の PKA によるリン酸化が PP1c と PP2Ac の結合に与える影響 GST-PRIP-1 (36 ng) を PKA と Mg-ATP 存在下で 30℃、30 分インキュベーションした後、グルタチオンビーズに固相化し図1と同様にホスファターゼのプルダウンアッセイを行った。(A) ホスファターゼとして PP1c (25 ng) のみ(左)、PP2Ac のみ (25 ng) (右) を用いた実験と PP1c と PP2Ac を等量 (各 25 ng ずつ) 混合したものを 用いた実験 (B) を行った。それぞれ 5 回行った実験から典型的なプロット像を示す。グラフは各バンドの密度を Image J で定量化しホスファターゼの結合量を (A) インプットを 100% とした割合で、もしくは (B) PKA の有無によって結合量の多い方を 100% とした各々の割合示した。**: $p < 0.01$ 。

このように PP1c もしくは PP2Ac が単独で存在する場合には、PRIP の PKA によるリン酸化は PP1c との結合にのみ影響し、また PP1c と PP2Ac は相互排他的に PRIP に結合することを考えると、両ホスファターゼの共存下では PRIP のリン酸化によって結合状態が変わる可能性がある。そこで、PP1c および PP2Ac 両ホスファターゼの共存下で、GST-PRIP-1 のリン酸化の影響を検討した。図 8B に示す様に GST-PRIP-1 の PKA 処理により PP1c の結合量が減少するのに伴って PP2Ac の結合量は増大した。

細胞内におけるリン酸化が PP1c と PP2Ac の結合に及ぼす影響

生細胞内においても PRIP のリン酸化状態が PP1c および PP2Ac の結合に影響するかについて検討した。野生型 PRIP あるいは PP1c との結合調節に関与するアミノ酸がリン酸化されないように変異を加えた PRIP、すなわち PKA によるリン酸化部位 Thr-94 をアラニンに変換した変異体 (T94A) を調製し、それぞれを COS7 細胞に形質導入した。50 μ M FSK で刺激した後、細胞破碎液に対して抗 PRIP 抗体で免疫沈降を行った。沈降物中の PP1c や PP2Ac の量をそれぞれの特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法によって推定した。図 9 に示す様に、野生型 PRIP 遺伝子を形質導入した細胞では PRIP と結合する PP1c の量は FSK 刺激によって減少した。一方、PP2Ac は増加した。このような FSK 刺激による結合量の変化は T94A で形質導入した細胞では認められなかった。

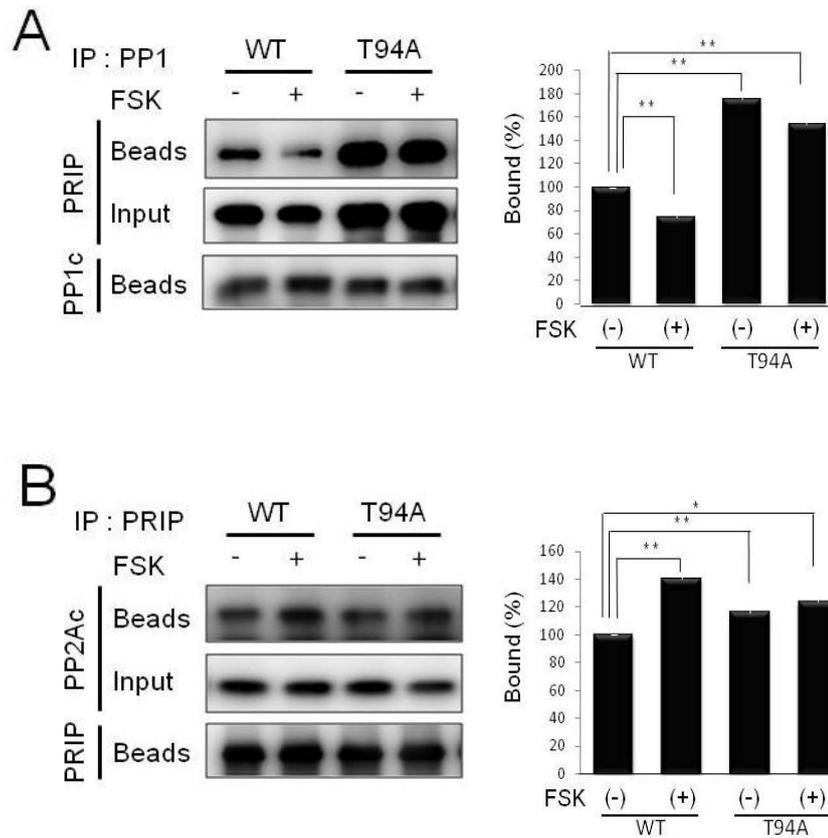


図9. 細胞の FSK 処理が PRIP の PP1c と PP2Ac の結合に与える影響 遺伝子導入によって野生型もしくは変異体 (T94A) PRIP-1 を一過性に発現させた COS7 細胞を 50 μ M の FSK で 15 分間処理した。抗 PP1c 抗体 (A) 及び抗 PRIP-1 抗体を用いた免疫沈降実験に供した。免疫沈降複合体は SDS-PAGE によって分離し、ウェスタンブロットによって表示の抗体を用いて検出した。5 回行った実験のうち典型的なものを示す。各バンドを Image J で定量化し、結果を FSK 処理をしていない細胞における PP1c と結合する PRIP-1 の量を 100% とし (A) あるいは野生型 PRIP-1 と結合する PP2Ac の量を 100% とし (B)、5 回の実験の平均値 \pm 標準誤差をグラフ化した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

考 察

タンパク質のリン酸化は、タンパク質の機能を多面的に修飾し多岐にわたる細胞の機能調節において重要な役割を担っている(4,48,49)。そのリン酸化程度は、個々のタンパク質に特異的なタンパク質リン酸化酵素(プロテインキナーゼ)と脱リン酸化酵素(プロテインホスファターゼ)により可逆的に調節される。ヒトゲノムにはおよそ 500 種類ものプロテインキナーゼが存在する。セリンおよびスレオニンをリン酸化するセリン・スレオニンキナーゼは、400 種類あるが、セリン・スレオニンホスファターゼは僅か 45 種類程度しか存在しない(3,4)。この不均衡にも関わらず、多様に存在する基質タンパク質のリン酸化状態は広大な細胞内空間において時空間的に厳密な調節を受けている。これは、ホスファターゼに結合するタンパク質が多数存在し、その活性や細胞内局在、さらには基質特異性を決定しているためであろう。我々の研究室で発見された PRIP は、PP1c ならびに PP2Ac と結合することが分かり(17,18)、このようなホスファターゼの機能を制御する分子群に属し、種々の細胞機能に関わっているのではないかと多面的に解析してきた(17,19,22,26,50)。しかし、PP2Ac との結合に関しては、PRIP に対する抗体で免疫沈降した際に、沈降物中に PP2Ac が含まれることを示したのみで、結合が直接的なのか、また PP1c との関係はどうかなどについては調べられていない。本研究では PP2Ac と PRIP との結合に重点をおいて検討した。

PP2Ac のほとんどは細胞内で PP2Aa とホロ酵素のコアを形成し、さらに様々な調節サブユニット(B サブユニット)と複合体を形成して機能すると考えられている(33)。これまで PRIP が PP2Ac と直接結合するかどうかは不明であったが、本研究では精製した組換えタンパク質を用いた結合実験で PRIP が PP2Ac と直接結合することを示した。マウス脳破砕液を用いた免疫沈降実験でも抗 PRIP-1 抗体で PRIP と共沈する効率が PP2Aa は組織中の総量に対する割合で比較すると PP2Ac の 25% 程度であったことから PRIP は細胞内でも PP2Ac と直接結合しており、その全てが PP2A の AC コアダイマーではないことが示唆された。プルダウンアッセイや免疫沈降実験における PP1c、PP2Ac 両ホスファターゼの結合量が PRIP-1 と同程度であったことから(20)、PRIP-1 と PRIP-2 がともに発現している脳では抗 PRIP-1 抗体の免疫沈降で共沈するホスファターゼのおよそ 2 倍量のホスファターゼが総 PRIP と結合することになり、細胞内の PP1c、PP2Ac の 13-18% にもなる。この値は数多く存在する PP1c、PP2Ac 結合タンパク質のうちの 1 種類の分子に対するものとしては非常に

高く、両ホスファターゼの機能調節における PRIP の重要性が窺い知れる。

これまでの動物組織や培養細胞抽出液からの免疫沈降実験では PRIP は PP1c と PP2Ac と同時に結合しているようであったが PRIP に対する両ホスファターゼの結合の相互関係は不明であった。本研究における精製タンパク質を用いた実験によって PP1c と PP2Ac とは PRIP に対して相互排他的に結合することが明らかとなった。PRIP の様々な部位特異的変異導入変異体による結合実験から PP1c は PRIP-1 に保存された PP1c 結合モチーフ $^{93}\text{KTVSF}^{97}$ で、また PP2Ac は隣接した $^{92}\text{KK}^{93}$ に加えて $^{104}\text{KK}^{105}$ 、 $^{151}\text{KK}^{152}$ から構成される立体表面で PRIP と結合しているようであった。したがって PP1c と PP2Ac の PRIP 上の結合部位は近接しているものの同一ではなく、両ホスファターゼの PRIP に対する相互排他的な結合は、競合的なものではなく立体障害的な作用によるものであると考えられた。また、PP2Ac との結合に関与することがわかった $^{151}\text{KK}^{152}$ は $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ との結合にも関与することが PLC- $\delta 1$ との類似性から示唆されたが、PP2Ac と $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ はそれぞれの PRIP への結合に影響しなかった。膜脂質ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸への結合も $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ と同様に可能であるので、PRIP/PP2Ac 複合体としての細胞膜に局在する事も可能であろう。

本研究では PKA による PRIP のリン酸化が各ホスファターゼとの結合に及ぼす影響についても検討した。PKA による PRIP の Thr-94 のリン酸化が PP1c との結合を弱めることが明らかになっており (19)、本研究で見出した PP2Ac の結合部位も同リン酸化部位に隣接する $^{92}\text{KK}^{93}$ を含むので、PP2Ac 結合も同様に影響を受けることが予想されたが、直接的に PP2Ac との結合を変化させることはなかった。両ホスファターゼが共存する状態では、PRIP の PKA によるリン酸化によって、PP1c の結合は少なくなり、一方 PP2Ac の結合は増加した。このように PRIP のリン酸化は間接的に PP2Ac の結合にも影響する。両ホスファターゼが共存する生細胞内でも同様の調節が行われている可能性がある。

PRIP が結合する両ホスファターゼの酵素活性に及ぼす影響をホスホリラーゼ a を基質として調べた。PP1c についてはミオシン軽鎖を基質として検討した以前の結果と一致して PRIP はホスファターゼ活性を抑制したが (18)、PP2Ac の活性は影響されなかった。PP2Ac は PRIP によって細胞内の局在調節や基質との反応の場などに関して制御されており、酵素活性は影響されないと思わ

れる。しかし、PP2Ac はチロシンキナーゼの Src によってリン酸化されてホスファターゼ活性が抑制されたり (51,52)、Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 (ANP32) /I1PP2A や SET/I2PP2A によって局在などが制御されるという報告もある (53)。したがって、細胞内ではこれらの PP2A 調節因子が PRIP/PP2Ac の複合体に作用することで、ホスファターゼ活性の調節を受けることも考えられる。今後のさらなる検討が必要である。

PP2Ac の機能調節に関わる結合分子は数多いが、いずれも AC コアダイマーと結合するものであり、単独の触媒サブユニットに直接結合する分子はほとんど報告がない。稀な例として TAP42/ α 4 (54)、integrin α _{11b} β ₃ (36)、HOX11 (55)、転写停止因子 eRF1 (56) が触媒サブユニットと直接に結合することが知られており、本研究から PRIP もこれらの分子同様、PP2Ac 結合分子であることがわかった。さらに、PP1c と PP2Ac という複数のホスファターゼを結合する分子も少なく、ホスファターゼに加えてキナーゼ (Akt) も結合する PRIP はタンパク質のリン酸化を介した細胞内シグナル伝達経路の厳密かつ微細な調節において重要な働きを担う分子であることが想像される。

本研究によって PRIP と PP1c、PP2Ac の相互関係が明らかとなったことで、図 10 に示すような複合体の調節機構が考えられる。PP1c ならびに PP2Ac は PRIP と、それぞれ不活性型および活性化型で相互排他的に結合し、PRIP の他の領域、すなわち PH ドメイン、EF ハンドモチーフ、X-Y 領域あるいは C2 ドメインを介してそれぞれのドメインに固有のリガンドと結合をすることで細胞内において空間的に適切な制御を受ける。細胞が神経伝達物質やホルモン、サイトカインなどで刺激を受けた結果、生じたシグナルによってターゲットタンパク質がリン酸化され、シグナルの増幅や伝播が行われて刺激に応じた細胞機能が効率よく発揮される。一方、同時に PRIP 自身もリン酸化される。すると結合していた PP1c を活性化型として近傍に放出する。加えてより多くの PP2Ac を活性化状態のまま結合するようになり、より迅速な局所にあるターゲットタンパク質の脱リン酸化を進めることができ、巧妙な時空間的なリン酸化制御が行われる。こうして、PRIP はターゲットタンパク質の一過性の鋭敏なリン酸化、すなわち鋭敏な細胞機能を発揮するのに重要な働きをしているように思われる。

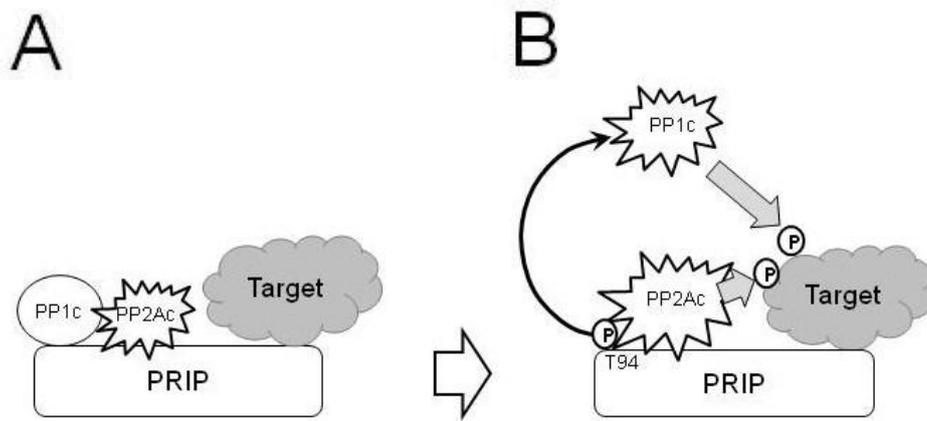


図10. PRIP による PP1c と PP2Ac の調節様式 (A) 及び (B) はそれぞれ細胞刺激によって細胞内のリン酸化シグナルが活性化される前と後の様子を示す。各ホスファターゼの丸い縁取りは不活性型を、鋸歯の縁取りは活性型であることを示している。詳細は本文を参照。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野 平田 雅人 教授 ならびに直接に実験研究の指導をしていただきました九州大学大学院歯学研究院口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野 竹内 弘 准教授に深甚なる感謝の意を表します。このような研究の機会を与えて頂きました九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野 森 悦秀 教授ならびに 大山 順子 助教にも併せて感謝の意を表します。実験に際し、様々な御指導、御助言を頂きました松田 美穂 助教、高 靖 助教、兼松 隆 教授(広島大学大学院医歯薬学総合研究科)に深謝致します。PRIP-KOマウスの維持、管理に御尽力頂きました九州大学大学院医学研究院附属物実験施設の皆様に深謝致します。また、共に学び切磋琢磨しあい、時には実験の御協力を頂きました九州大学大学院歯学府 口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野の大学院生の皆様 ならびに九州大学大学院歯学府 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野の皆様に深謝致します。最後に、研究生生活を支えてくださった家族、両親、全ての皆様に深謝致します。

参 考 文 献

1. Virshup, D. M., and Shenolikar, S. (2009) *Mol Cell* **33**, 537-545
2. Cohen, P. (1989) *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508
3. Plowman, G. D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D., and Hunter, T. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13603-13610
4. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) *Science* **298**, 1912-1934
5. Ceulemans, H., and Bollen, M. (2004) *Physiol Rev* **84**, 1-39
6. Cohen, P. T. (2002) *J Cell Sci* **115**, 241-256
7. Cho, U. S., and Xu, W. (2007) *Nature* **445**, 53-57
8. Aggen, J. B., Nairn, A. C., and Chamberlin, R. (2000) *Chem Biol* **7**, R13-23
9. Millward, T. A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B. A. (1999) *Trends Biochem Sci* **24**, 186-191
10. Mumby, M. (2007) *ACS Chem Biol* **2**, 99-103
11. Kanematsu, T., Misumi, Y., Watanabe, Y., Ozaki, S., Koga, T., Iwanaga, S., Ikehara, Y., and Hirata, M. (1996) *Biochem J* **313** (Pt 1), 319-325
12. Kanematsu, T., Yoshimura, K., Hidaka, K., Takeuchi, H., Katan, M., and Hirata, M. (2000) *Eur J Biochem* **267**, 2731-2737
13. Yoshida, M., Kanematsu, T., Watanabe, Y., Koga, T., Ozaki, S., Iwanaga, S., and Hirata, M. (1994) *J Biochem* **115**, 973-980
14. Matsuda, M., Kanematsu, T., Takeuchi, H., Kukita, T., and Hirata, M. (1998) *Neurosci Lett* **257**, 97-100
15. Kikuno, R., Nagase, T., Ishikawa, K., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1999) *DNA Res* **6**, 197-205

16. Otsuki, M., Fukami, K., Kohno, T., Yokota, J., and Takenawa, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 97–103
17. Kanematsu, T., Jang, I. S., Yamaguchi, T., Nagahama, H., Yoshimura, K., Hidaka, K., Matsuda, M., Takeuchi, H., Misumi, Y., Nakayama, K., Yamamoto, T., Akaike, N., and Hirata, M. (2002) *Embo J* **21**, 1004–1011
18. Yoshimura, K., Takeuchi, H., Sato, O., Hidaka, K., Doira, N., Terunuma, M., Harada, K., Ogawa, Y., Ito, Y., Kanematsu, T., and Hirata, M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 17908–17913
19. Terunuma, M., Jang, I. S., Ha, S. H., Kittler, J. T., Kanematsu, T., Jovanovic, J. N., Nakayama, K. I., Akaike, N., Ryu, S. H., Moss, S. J., and Hirata, M. (2004) *J Neurosci* **24**, 7074–7084
20. Yanagihori, S., Terunuma, M., Koyano, K., Kanematsu, T., Ho Ryu, S., and Hirata, M. (2006) *Adv Enzyme Regul* **46**, 203–222
21. Kanematsu, T., Yasunaga, A., Mizoguchi, Y., Kuratani, A., Kittler, J. T., Jovanovic, J. N., Takenaka, K., Nakayama, K. I., Fukami, K., Takenawa, T., Moss, S. J., Nabekura, J., and Hirata, M. (2006) *J Biol Chem* **281**, 22180–22189
22. Kanematsu, T., Fujii, M., Mizokami, A., Kittler, J. T., Nabekura, J., Moss, S. J., and Hirata, M. (2007) *J Neurochem* **101**, 898–905
23. Uji, A., Matsuda, M., Kukita, T., Maeda, K., Kanematsu, T., and Hirata, M. (2002) *Life Sci* **72**, 443–453
24. Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K. I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S. J., Yamamoto, T., Nabekura, J., and Hirata, M. (2007) *J Neurosci* **27**, 1692–1701
25. Kanematsu, T., Takeuchi, H., Terunuma, M., and Hirata, M. (2005) *Mol Cells* **20**, 305–314
26. Fujii, M., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K. I., Moss, S. J., Nabekura, J., and Hirata, M. (2010) *J Biol Chem* **285**, 4837–4846
27. Doira, N., Kanematsu, T., Matsuda, M., Takeuchi, H., Nakano, H., Ito, Y., Nakayama, K., Nakayama, K., and Hirata, M. (2001) *Biomed Res-Tokyo* **22**, 157–165
28. Takenaka, K., Fukami, K., Otsuki, M., Nakamura, Y., Kataoka, Y., Wada, M., Tsuji, K.,

- Nishikawa, S., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 7329–7338
29. Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Fujii, M., Kanematsu, T., and Hirata, M. (2009) *Cell Signal* **21**, 1180–1186
30. Takeuchi, H., Kanematsu, T., Misumi, Y., Sakane, F., Konishi, H., Kikkawa, U., Watanabe, Y., Katan, M., and Hirata, M. (1997) *Biochim Biophys Acta* **1359**, 275–285
31. Goldberg, Y. (1999) *Biochem Pharmacol* **57**, 321–328
32. Janssens, V., and Goris, J. (2001) *Biochem J* **353**, 417–439
33. Virshup, D. M. (2000) *Curr Opin Cell Biol* **12**, 180–185
34. Yang, J., Roe, S. M., Prickett, T. D., Brautigan, D. L., and Barford, D. (2007) *Biochemistry* **46**, 8807–8815
35. Purev, E., Giordano, A., Soprano, D. R., and Soprano, K. J. (2006) *J Cell Physiol* **206**, 495–502
36. Gushiken, F. C., Patel, V., Liu, Y., Pradhan, S., Bergeron, A. L., Peng, Y., and Vijayan, K. V. (2008) *J Biol Chem* **283**, 12862–12869
37. Baraldi, E., Djinić Carugo, K., Hyvonen, M., Surdo, P. L., Riley, A. M., Potter, B. V., O’Brien, R., Ladbury, J. E., and Saraste, M. (1999) *Structure* **7**, 449–460
38. Ferguson, K. M., Kavran, J. M., Sankaran, V. G., Fournier, E., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., and Lemmon, M. A. (2000) *Mol Cell* **6**, 373–384
39. Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M. P., and Lambright, D. G. (2000) *Mol Cell* **6**, 385–394
40. Soisson, S. M., Nimnual, A. S., Uy, M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (1998) *Cell* **95**, 259–268
41. Dhe-Paganon, S., Ottinger, E. A., Nolte, R. T., Eck, M. J., and Shoelson, S. E. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8378–8383
42. Yoon, H. S., Hajduk, P. J., Petros, A. M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1994) *Nature* **369**, 672–675

43. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Sigler, P. B. (1994) *Cell* **79**, 199–209
44. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006) *Bioinformatics* **22**, 195–201
45. Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997) *Electrophoresis* **18**, 2714–2723
46. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**, 3381–3385
47. Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., and Sigler, P. B. (1995) *Cell* **83**, 1037–1046
48. Shi, Y. (2009) *Cell* **139**, 468–484
49. Pawson, T., and Scott, J. D. (1997) *Science* **278**, 2075–2080
50. Tsutsumi, K., Matsuda, M., Kotani, M., Mizokami, A., Murakami, A., Takahashi, I., Terada, Y., Kanematsu, T., Fukami, K., Takenawa, T., Jimi, E., and Hirata, M. (2011) *J Biol Chem* **286**, 31032–31042
51. Chen, J., Martin, B. L., and Brautigan, D. L. (1992) *Science* **257**, 1261–1264
52. Chen, J., Parsons, S., and Brautigan, D. L. (1994) *J Biol Chem* **269**, 7957–7962
53. Li, M., Makkinje, A., and Damuni, Z. (1996) *Biochemistry* **35**, 6998–7002
54. Murata, K., Wu, J., and Brautigan, D. L. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10624–10629
55. Kawabe, T., Muslin, A. J., and Korsmeyer, S. J. (1997) *Nature* **385**, 454–458
56. Andjelkovic, N., Zolnierowicz, S., Van Hoof, C., Goris, J., and Hemmings, B. A. (1996) *Embo J* **15**, 7156–7167