

論文

プロテインセリン／スレオニンホスファターゼ2Cの非RI活性測定法
Nonradioactive Assay of Protein Ser/Threonine Phosphatase 2C

大西素子, 三好信寛, 禹済泰, 永井和夫

中部大学応用生物学部

序 論

プロテインホスファターゼは基質特異性から、セリン／スレオニンホスファターゼ、チロシンホスファターゼおよび二重特異性ホスファターゼの3種類に分類されている。セリン／スレオニンホスファターゼは、基質特異性と二価イオン要求性からさらにPP1, 2A, 2Bおよび2Cの4種類に大別される。その中のプロテインセリン／スレオニンホスファターゼ2C (PP2C) は、触媒活性の発現に、 Mg^{2+} が必要であり、PP1, PP2AおよびPP2Bを阻害するオカダ酸に対して感受性が見られない等の特徴を持っている(1)。また、他のセリン／スレオニンホスファターゼ (PP1, PP2AおよびPP2B) が、触媒サブユニットの他に1つ以上の調節サブユニットから構成されるのに対して、PP2Cはほとんどの場合、単量体として存在する。

現在PP2Cの活性の測定には、一般的に ^{32}P により標識したリン酸化タンパク質を使用する方法が広く用いられている(2)。従来の活性測定法では、カゼインまたはヒストンを、 $[^{32}P]$ γ -ATPを用いてプロテインキナーゼによってリン酸化し、ホスファターゼの基質として酵素反応後、遊離した ^{32}P 標識リン酸量を液体シンチレーションカウンターで計測することにより、ホスファターゼ活性を測定している。しかし、RIを使用した活性測定法は、高感度であるにもかかわらず、同時に以下のような問題点をも合わせ持っている。即ち、1) 放射性物質を使用するために実験区域が限定され、また廃棄物の処理等煩雑である。2) 精製したキナーゼを用いて基質調製をしなければならないため、比較的高価である。3) ^{32}P の半減期が約2週間であるため、調製した基質は長期間使用することができず、使用期限が限定される。

そこで本研究では、RIを用いることなく、よ

り簡便にPP2Cの活性を測定する方法を検討した。モリブデンブルー法は、水溶液中のリン酸の比色定量法である(3)。この方法は、酸性溶液中でリン酸とモリブデン酸を反応させると生じる黄色のモリブドリン酸に、種々の還元剤を作用させてモリブデンブルーを生成し、この溶液の吸光度を測定することによって、リン酸イオンの濃度を定量する。マラカイトグリーン法は、マラカイトグリーンとモリブドリン酸の複合体が緑色を呈することを利用する。モリブデンブルー法の改良法の1つであり、この方法とp-nitrophenyl phosphate (PNPP) 等の人工基質を組み合わせ、プロテインホスファターゼの活性がしばしば測定されてきた(4)。

ところでPNPPは、チロシンホスファターゼやアルカリホスファターゼ等の良い基質であるにもかかわらず、PP2Cによってはほとんど脱リン酸化されない。PNPPと比べ、カゼインキナーゼによりリン酸化したカゼインはPP2Cの良い基質であることが知られている。また市販のカゼインは、プロテインキナーゼでリン酸化しなくても、もともとセリン残基に多くのリン酸が結合している。最近、このことを利用したプロテインホスファターゼ2Aの活性測定法が報告された(5)。そこで本研究においても、同様に市販のカゼインを用いて、マラカイトグリーン法により簡便にPP2Cの活性測定ができるのではないかと考え、組換えタンパク質として精製したPP2Cを用い、PP2Cの非RI活性測定法を構築した。

実験方法

PP2Cの発現および精製

GST-PP2C α およびGST-PP2C ϵ の発現プラスミドを導入した組換え大腸菌株は、東北大学加齢医学研究所の田村真理教授から供与していた

だいた, LB培地に上記の大腸菌の培養液を加えた後, IPTG (Wako, Japan) を終濃度0.5mMになるよう加え, 30°Cで5時間, 発現誘導を行なった. 発現誘導後, 大腸菌は集菌し, 50mM Tris-HCl pH7.0を加えて懸濁後, 超音波破碎し, 遠心して上清を回収した. この上清に50mM Tris-HCl pH7.0で平衡化した50% Glutathione Sepharose 4B(Amersham Biosciences, Sweden)を加え, 4°Cで1時間攪拌した後, 遠心分により上清を除去した. この操作を3回繰り返す, GST-PP2Cが結合したGlutathione Sepharoseを十分洗浄した. GST-PP2CはGlutathione Sepharoseに結合した状態のまま, 酵素反応に用いた.

Malachite Green Dye Solutionの調製

MOLYBDIC ACID Ammonium Salt Tetrahydrate (SIGMA, USA) 4.2mgを4N HCl 100mlで溶解したものと, Malachite Green (SIGMA, USA) 45mgを蒸留水100で溶解したものを, 1:3の割合で混合し, 30分間攪拌後, pore size 0.22 μ mのメンブランフィルターでろ過を行ない, 調製した.

カゼインの調製

Casein Sodium Salt (SIGMA, USA) を50mM Tris-HCl pH7.0で10mg/mlになるよう溶解した. その後この溶液から遊離リン酸を除去するため, Sephadex G-25 (Amersham Biosciences, USA) によるゲルろ過クロマトグラフィーを行った. ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出液は, 1mlずつ分取し, Bradford法によりタンパク質画分を同定し, 基質溶液として用いた.

脱リン酸化反応

96穴プレートで100mM Tris-HCl, pH7.5, 20mM MgCl₂, 調製済みカゼイン 20 μ g, およびGST-PP2C α 結合 Glutathione Sepharose 4Bを混合し, 全量100 μ l/wellとなるようdH₂Oで調製し, 37°Cで1時間反応を行なった. NaFまたはオカダ酸は, 反応液に添加した後, 反応を開始した.

活性測定

96wellプレートで, 酵素反応溶液の上清70 μ lにMalachite Green Dye Solution 200 μ lを加え, 15分静置後, 650nmでの吸光度を測定した. 検量線は, 酵素反応溶液の代わりに, K₃PO₄溶液を終濃度500から8000pmolとなるようMalachite Green Dye Solutionと混合し, 同様に吸光度を測定して

作製した.

結果および考察

PP2C α およびPP2C ϵ のGST-融合組換えタンパク質は, IPTGの添加により大腸菌で高発現することがSDS-PAGEにより確認された. これらをGlutathione Sepharose 4Bによって精製後, 溶出しないでSDS-PAGEを行ったところ, CBB染色により発現タンパク質は単一のバンドとして存在することがみとめられたため, Glutathione Sepharose 4Bに結合した状態の融合タンパク質を用いて酵素活性の測定を行った. 測定の結果得られた吸光度は, 検量線から遊離リン酸濃度に換算を行った. 酵素活性が上昇すると, 脱リン酸化反応によって溶液中の遊離リン酸濃度は上昇するため, この値は酵素活性の目安とすることができる. その結果, GST結合Glutathione Sepharose 4Bを加えた時に比べ, GST-PP2C α 結合Glutathione Sepharose 4Bを加えてアッセイを行った時にのみ, 著しく高いホスファターゼ活性がみられた(図1). またこの酵素活性は, GST-PP2C α 結合Glutathione Sepharose 4Bの量を増やすと, それに比例して上昇した. GST-PP2C α に加え, 異なったサブタイプであるGST-PP2C ϵ (6) でも, この量依存的な活性の上昇がみとめられたが, GST結合Glutathione Sepharose 4Bの量を増やしても, 活性の上昇はみとめられなかった(図2). この

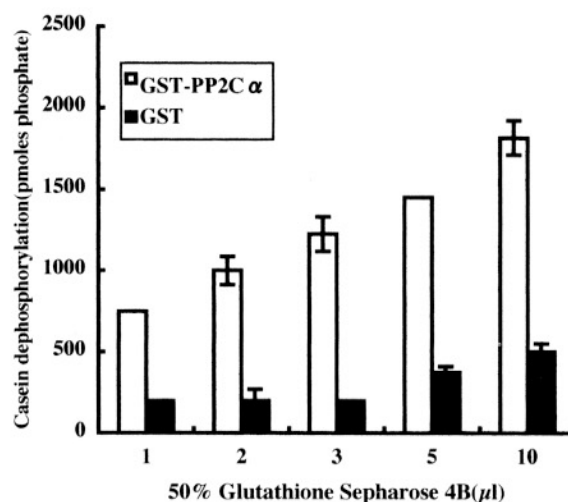


図1 PP2C α の活性測定

GST-PP2C α 量結合Glutathione Sepharose 4B量を変化し, ホスファターゼ活性の測定を行った. 結果は全て3サンプルの測定値の平均を示す.

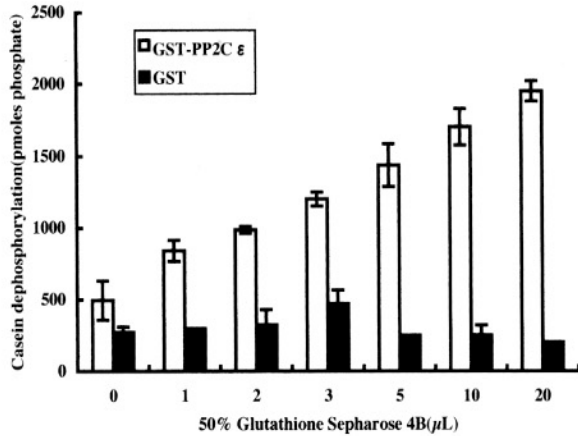


図2 PP2C ϵ の活性測定
PP2C ϵ 結合Glutathione Sepharose 4B量を変化し、ホスファターゼ活性の測定を行った。結果は全て2サンプルの測定値の平均を示す。

ことから、本研究で構築した非RI活性測定法により、PP2Cの活性を測定することができたと考えられた。

次に、さらにこの酵素活性測定法により測定されたのが、PP2C活性であることを確認するために、プロテインホスファターゼの阻害剤を反応溶液に加え、活性に対する影響を調べた。その結果、まずPP1、PP2AおよびPP2B阻害剤として知られるオカダ酸を加え酵素反応を行なったところ、測定されたホスファターゼ活性に変化は見られず、オカダ酸非感受性であるPP2Cの特徴と一致した結果が得られた(図3)。この結果とは対照的に、非特異的なホスファターゼ

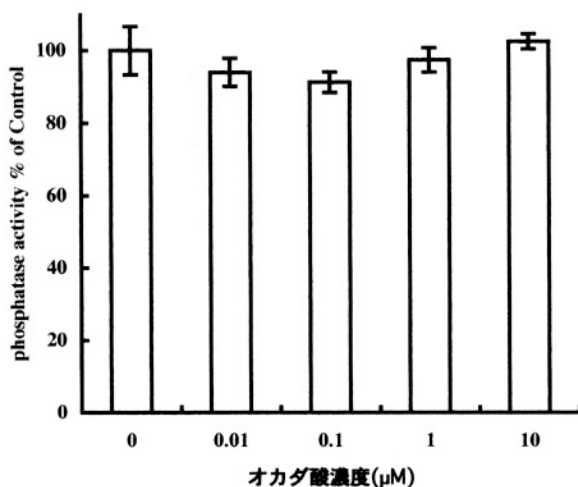


図3 PP2C活性に対するオカダ酸の影響
GST-PP2C α 結合Glutathione Sepharose 4Bを5 μ l加えた反応溶液に、オカダ酸を添加し、酵素反応を行なった。結果は全て2サンプルの測定値の平均を示す。

の阻害剤であり、PP2Cを阻害することが知られるSodium Fluoride (NaF)を加えて酵素反応を行なったところ、NaFの濃度依存的にホスファターゼ活性の抑制がみとめられ、50mMで活性は完全に抑制された(図4)。GST結合Glutathione Sepharose 4Bにわずかながらみとめられた酵素活性も、50mMのNaFによって完全に消失していることから、この酵素活性は発現タンパク質の精製過程でGlutathione Sepharose 4Bに混在する、大腸菌に由来するプロテインホスファターゼではないかと考えられた。

以上のことから、この非RIホスファターゼ活性測定法を用いる事により、各種プロテインホスファターゼ2Cの活性を簡便に測定できると考えられる。このホスファターゼ活性測定法の短所は、Malachite Green Dye Solutionによる比色定量法を利用しているため、従来のRIを使用したPP2C活性の測定法に比べ、活性の検出感度が劣ることと、ホスファターゼによらずとも酵素反応溶液に含まれる遊離リン酸を全て検出するため、反応溶液の組成によってはバックグラウンドが高くなり、正確な活性測定ができない場合があることである。今回のように精製酵素を用いた場合には問題にならないが、細胞抽出液中のPP2C活性を測定する場合等には、この点を克服するためにさらなる工夫が必要であろう。しかしながら、この方法では簡便でしかも比較的安価にPP2C活性を測定することがで

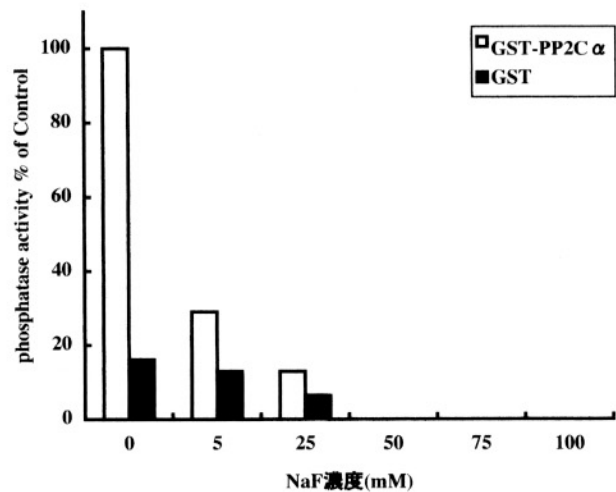


図4 PP2C活性に対するNaFの影響
GST-PP2C α 結合Glutathione Sepharose 4Bを5 μ l加えた反応溶液に、NaFを添加し、酵素反応を行なった。

きるため, PP2C阻害剤の第1次スクリーニング等, 様々な用途が考えられ, PP2C研究の有効なツールに成り得ることが期待される.

引用文献

- (1) Joaquin Arino, Denis Alexander. 2004. Protein Phosphatases (Topics in Current Genetics, 5). Springer Verlag.
- (2) Kusuda K, Kobayashi T, Ikeda S, Ohnishi M, Chida N, Yanagawa Y, Shineha R, Nishihira T, Satomi S, Hiraga A, Tamura S. Mutational analysis of the domain structure of mouse protein phosphatase 2C β . 1998. Biochemical Journal. 332:243-250.
- (3) Lawrence R. 1974. Assay of serum inorganic phosphate without deproteinisation: automated and manual micromethods. Ann Clin Biochem. 11:234-237.
- (4) Geladopoulos TP, Sotiroidis TG, Evangelopoulos AE. 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. Anal Biochem. 192:112-116.
- (5) Ali-Reza Fathi, Andrea Krautheim, Susanne Lucke, Klaus Becker, and Hans Juergen Steinfeld. 2002. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibitor by drugs in cell extracts. Anal. Biochem. 310:208-214.
- (6) Li MG, Katsura K, Nomiyama H, Komaki K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Kobayashi T, Tamura S. Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2C ϵ). 2003. J. Biol. Chem. 278:12013-12021.