細胞透過性ステアリン酸化ペプチド, InCELLect™を用いた *in vivo* における細胞内PKAシグナル伝達の探査

By Said Goueli, Ph.D., and Kevin Hsaio, M.S.
Promega Corporation

プロテインキナーゼやプロテインホスファターゼを介したリン酸化や脱リン酸化は、細胞制御における主要なメカニズムです。細胞内での厳密な局在性は、これらの活性化に加えて、刺激に対する応答シグナリングの特異性に深く関与します。タンパク質-タンパク質相互作用は、スカフォールド(足場)やアンカーの形態をもつシグナルカスケードのメンバー同士の適切な会合を促進します。アンカープロテインに由来するペプチドにより、酵素とそれに対するアンカープロテイン間の相互作用を解除させることができます。A-キナーゼアンカープロテイン(AKAP) Ht-31 (ヒト甲状腺)由来のペプチドは、いくつかのモデル系でキナーゼのアンカーリング、それに伴うAキナーゼを介した応答を妨害します。

我々はステアリン酸化ペプチドであるInCELLect™ AKAP St-Ht31[a](カタログ番号V8211)とそれに対応するコントロールペプチドInCELLect™ St-Ht31P(カタログ番号V8221)を作成しました。このペプチドは細胞透過性で、AKAPを介するPKA応答の研究を容易にします。本稿ではプロメガのInCELLect™ AKAP St-Ht31[a] Inhibitor PeptideとInCELLect™ St-Ht31P Control Peptideを用いた細胞のPKAアンカーリングにおける最近の研究を紹介します。

はじめに

プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼは無数のシグナル伝達過程(細胞増殖、発生、分化、代謝経路、遺伝子発現や細胞死など)をコントロールしています。典型的な哺乳動物細胞のタンパク質の1/3がリン酸化されていると見積もられており、約200種類のプロテインキナーゼと約100種類のプロテインホスファターゼが同定されています。実際、真核細胞全ゲノムの遺伝子のうち、約2～3%がプロテインキナーゼをコードしていると予想されています(1)。リン酸化反応を仲介するいくつかのキナーゼの特異性は厳密な基質特異性に基づいており、これによりこれらのキナーゼは1つ、あるいは限られた数の潜在的な標的分子との反応に限定されます。しかし多くのプロテインキナーゼやホスファターゼは*in vivo*において複数の基質を持ち、このことが生理機能の多様性に関与している可能性があります。リガンドを介した応答の特異性は、プロテインキナーゼ/ホスファターゼの活性化によるものだけではなく、これらの酵素とその生理的標的分子との近接さにも関連しています。したがって、シグナル伝達分子間の認識は細胞内の特異的なシグナル伝達において重要です(2)。いくつかのタンパク質モジュールが、タンパク質-タンパク質相互作用やシグナリングカスケードの適切なメンバー間の信号調和に必要な認識能を与えていることを示しています。カスケード中のタンパク質同士が会合することにより、カスケードのメンバーが足場を与えるタンパク質プラットフォーム上の特異的なモチーフと相互作用した“スカフォールド”(3,4)や2つ以上のメンバーが異なる結合ドメインを介して集まった“アンカー”(5-8)などを形成します。アンカープロテインは多価の分子で、2つ以上の分子をまとめて細胞骨格や核などの細胞内区分に移動させます。これらのタンパク質はそれぞれの標的タンパク質の特異的ドメインに結合することによりシグナル経路を選択的に調節します。

細胞内シグナリングにおけるAKAPの役割

PKAの発見(9)とリン酸化された多くの細胞内タンパク質や酵素との関わりが明かになるにつれてPKAへの関心が高まってきました。PKAの異質性、機能、調節の研究は、多様なプロテインキナーゼの酵素学や細胞内プロセスにおけるこれらのキナーゼの役割解明に寄与しています(10)。さらに様々なアンカープロテインへの結合の結果として現れるA-キナーゼの細胞内局在性はA-キナーゼのシグナリング特異性に新たな要素を加えました。A-キナーゼに対するアンカープロテインはAKAP(A Kinase-Anchoring Proteins)と呼ばれ、PKAの調節サブユニット(R)に結合します。それらはAMPA/カイニン酸チャネルの活性変化、グルタミン酸依存性イオンチャネルの制御、骨格筋のL型Ca^{2+}チャネル(11)の修飾、ホルモンによるクローン化β細胞でのインシュリン分泌(12)、バソプレシンによるアクアポリン-2の腎臓主細胞細胞膜への転位(13)、哺乳動物精子の運動性(14,15)、哺乳動物精子の先体反応(AR)(16)など多くのPKAを介する細胞内プロセスへの関与が示唆されています。

AKAPの分子量レンジは15～300kDaで、様々な組織、いくつかの細胞内区分で検出されています(11)。細胞内レベルのRII、AKAP濃度におけるRII-AKAP相互作用の親和定数は1～11nMで、これは*in vivo*における基底レベルのcAMP濃度ではRII-AKAP複合体を形成していることを示唆しています(6)。各タンパク質はPKAの調節サブユニット(R)に結合する保存された“アンカーモチーフ”と、細胞内の小器官、膜、タンパク質との会合によるPKA-AKAP複合体の細胞内局在性に関する“ターゲットドメイン”の2クラスの結合サイトを持ちます。ヒト甲状腺AKAP(Ht-31)の調節サブユニット(R)結合配列は、親水性表面に酸性残基を持つ両親媒性のα-ヘリックス(らせん)構造を形成します(両親媒性のタンパク質には極性/非極性の各部位を含みます)。このヘリックス構造はRIIαの調節サブユニットの認識に必要で、2次ヘリックス構造を破壊する変異により、*in vitro*においてRIIへの結合が抑えられます(17,18)。近年の報告では中央部の脂肪族側鎖の長さがAKAPのRIまたはRIIへの結合特異性を決定しており、RIへの結合には短い側鎖、RIIへの結合には長い脂肪族側鎖が必要です(19)。

細胞内シグナリングにおけるAKAPの *in vivo*での研究

強い親和性を有し、PKAと複合体を形成するAKAPおよびAKAP由来ペプチドの発見により、細胞内シグナリングのいくつかのモデルを使って、*in vivo*におけるこれらのタンパク質の役割を探求する動きが促進されました(総説: 資料番号6,7,11)。AKAP遺伝子を組込んだ発現ベクターを細胞にトランスフェクションする方法は有効ですが、いくつかの欠点により結果の解釈を困難にします。その例として、発現量が生体レベルであるかどうか、発現されたタンパク質が細胞内のどの部分に存在しているか、などの問題が挙げられます。その他にも、AKAP由来ペプチド(Ht-31)やそれに対応するコントロールペプチド(Ht-31P)の細胞へのマイクロインジェクションや人工的に透過性を高めた細胞を用いてペプチドの取り込みを促進させる方法などがあります。ペプチドHt-31は両親媒性のヘリックス構造を有しており、*in vitro*または*in vivo* (細胞へのマイクロインジェクション)でPKAのHt-31への結合を阻害するのに効果的(11)

である一方、コントロールペプチドHt-31Pには阻害効果がほとんど無く、この活性ペプチドのPKAを介した応答への特異的阻害が裏付けられます。これらの技術は*in vivo*でのAKAP由来ペプチドの役割を研究する上で成功をもたらしましたが、精巧な機器やそれに要する個人的な訓練(例：マイクロインジェクション)が必要で、細胞膜透過剤による細胞へのダメージも考慮しなければなりません。我々はペプチドの細胞膜 親油性微小環境を介した取り込みを向上させるためにアルキル基などの疎水性部の付加を提唱しています。この方法を実証するために、我々はステアリン酸化したHt-31由来ペプチド(St-Ht31)とそれに対するコントロール(St-Ht31P)を用いて哺乳動物精子の運動性試験を行いました。

哺乳動物の精子では、cAMPレベル上昇後10分以内に運動活性が現れ、精子のミトコンドリア外膜におけるPKAII型の優位的局在性が認められるため、細胞運動性におけるAKAPの役割を研究する上で優れた実験モデルとなります。^{32}Pで標識したRIIαまたはRIIβをプローブとして使用したウシ、ヒト、サルの各精子での分析では、各動物種で1種類の優位なAKAPが検出されました(図1,パネルA)。ウシとヒトのAKAPは分子量約110kDa、サルAKAPはそれよりもやや大きい約115kDaに泳動されました。このAKAPの配列を分析したところ、RIIと相互作用する両親媒性のヘリックス構造に8つの機能的に保存された部位を含むことが発見されました。それは精巣、主に精細胞の周縁に存在しており、これは雄胚細胞に固有であることを示しています(20)。RIIへ結合するために必要な両親媒性ヘリックスモチーフを含むHt-31由来ペプチドによりRIIのAKAP110への結合が阻害されました(図1,パネルB)。これは精子AKAPにも両親媒性ヘリックス結合ドメインが含まれることを示しています。また、細胞透過性ステアリン酸化Ht-31(St-Ht31)は*in vitro*においてもRIIのAKAP110への結合を阻害しました。前の実験同様に、コントロールペプチド Ht-31Pやそのステアリン酸化型(St-Ht31P)はRII結合に影響を与えませんでした。

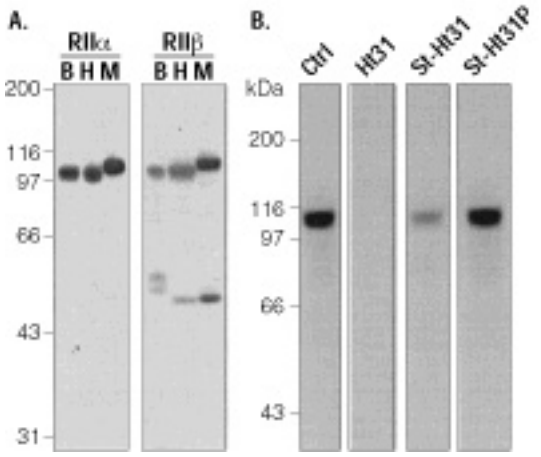

図1. 哺乳動物精子のPKAサブユニットおよびAKAPの同定

ウシ(B)、ヒト(H)、サル(M)の精子を溶解し、タンパク質をSDS-PAGE電気泳動で分離後、ウエスタンブロッティングおよびオーバーレイ分析に供した。**パネルA：**RIIαおよびRIIβのプローブを用いてウシ、ヒト、サルの各精子から1つのメインバンドを検出した。**パネルB：**InCELLect™ AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide(カタログ番号V8211) によるAKAP 精子AKAPへのRIIの結合阻害。Ht-31：AKAP Ht31の非ステアリン酸化型。St-Ht31：InCELLect™ AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide。St-Ht31P：InCELLect™ St-Ht31P Contorol Peptide(カタログ番号 V8221)。(許可を得て参考文献14の再試を行った。)

細胞透過性InCELLect ™ を用いた精子運動性のアッセイ

精子運動性におけるSt-Ht31とそのコントロール(St-Ht31P)の影響をテストするために、様々な条件下で活発な運動性を示す精子とペプチドをともにインキュベートしました。精子の運動性は、運動パーセント(運動速度20mm/秒以上を示す精子の%)×平均速度で算出される前進運動性インデックス(FMI)を用いて計測しました(14)。図2、パネルAに示されたように、基底運動性はSt-Ht31ペプチドの濃度と時間に依存して阻害され、精子の運動はSt-Ht31ペプチド濃度5〜50μM、添加後3〜5分以内に完全に停止しました。処理後5分で運動性を50%阻害するために必要なペプチド濃度は約1μMでした(図2、パネルB)。PKAのAKAPへのアンカリング阻害に影響しないコントロールペプチドSt-Ht31Pは濃度を100μMまで増加しても精子の運動性に影響を与えませんでした。これは活性ペプチドによる運動性阻害がPKAアンカリングの阻害に起因していることを示唆しています。

両親媒性ヘリックスRII結合モチーフを含む異なるペプチドSt-AKAP79も精子の運動性を阻害しました(図2、パネルC)。一方、両親媒性ヘリックスモチーフを持たないペプチドであるSt-CaNBP(カルシニューリン阻害剤)とSt-PKI(PKA阻害剤)は精子の運動性に影響を及ぼしませんでした。St-AKAP79の力価がSt-Ht31に較べて低いのはその水への溶解度の低さに原因があると考えられます(そのためSt-AKAP79の終濃度は不確定)。これらの結果は、RII-AKAP相互作用が運動性に必要とされる実験モデルで一貫していました。

細胞透過性ペプチド存在下における精子の生存能や膜の健全さは、SYBR®-greenおよびrhodamine123の色素取り込みテストとFura2放出テストによりコントロールと同様であることが示されました。精子へのSt-PKI添加(最大100μM)による運動性への影響は、前に示した(図2、パネルC)ようにありませんでした。同様に、異なるPKA阻害剤であるH-89を高レベル(50μM)で添加しても、基底精子運動性の50%以下の阻害効果しか示しませんでしたが、アデノシンアナログであるcDAや細胞内cAMPを増加させるIBMXや8-bromo-cAMPにより刺激された精子運動性への影響はほとんどありませんでした。これはcAMP合成システムにより誘導された精子運動性の活性化には、PKA酵素活性の上昇を必要とせず、PKAキナーゼ活性の実質的な阻害状態でも起こり得ることを示しています。

表1. IMCD細胞におけるフォルスコリン誘導AQP-2転移におけるSt-Ht31ペプチド、St-Ht31Pペプチドおよび H89の影響分析

	Absolute Fluorescence Intensity	
Treatment of Cells	**Intracellular**	**Cell Membrane**
Nonstimulated	72.7 ± 5.5	44.9 ± 3.9
Forskolin	35.9 ± 2.5	113.2 ± 3.1
St-Ht31 + forskolin	79.5 ± 5.2	55.9 ± 5.2
St-Ht31P + forskolin	79.7 ± 5.3	137.2 ± 4.4
H89 + forskolin	73.7 ± 5.2	44.6 ± 3.5

IMCD細胞は合成ペプチドまたはH89の存在/非存在下で30分間インキュベートした(フォルスコリン[100μM]を加えている場合はさらに15分間インキュベーションを延長)。細胞を固定した後、細胞透過処理を行い、抗AQP-2抗体および Cy™3標識抗ウサギ2次抗体とともにインキュベートした。免疫蛍光はレーザー走査顕微鏡で観察し、定量的に分析した(著者とAmerican Society for Biochemistry and Molecular Biologyの許可を得て参考文献13の再試を行った。)。

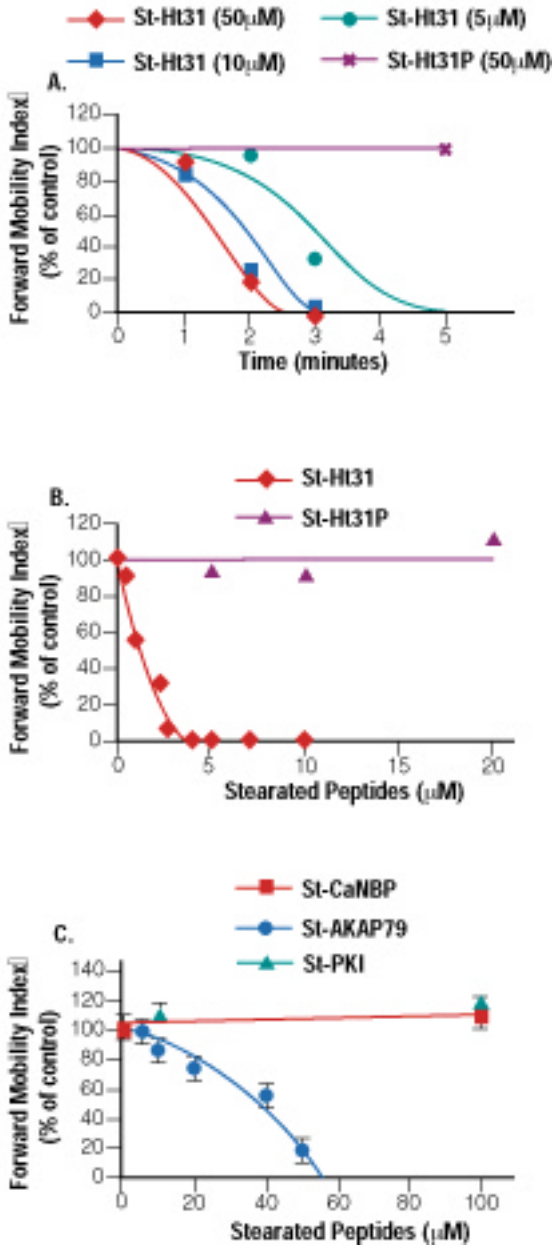

図2. アンカリング阻害ペプチドによる、経過時間、投与量に依存したウシ精子運動性の低下

パネルA：精子は以下の濃度のペプチドを含むバッファーとともにインキュベートした(InCELLect™ AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide (カタログ番号 V8211)、5µM (●)、10µM (■)、50µM (◆)またはInCELLect™ St-Ht31P Control Peptide (カタログ番号 V8221) 50µM (×))。**パネルB：**精子はペプチド濃度を段階的に上げたバッファーとともに5分間インキュベートし(InCELLect™ AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide (◆)、またはInCELLect™ St-Ht31P Control Peptide (▲))、運動性を評価した。**パネルC：**精子はペプチド濃度を段階的に上げたバッファーとともに5分間インキュベートし(アンカリング阻害ペプチドSt-AKAP79 (●)、コントロールペプチドSt-CaNBP (■)またはSt-PKI (▲))、運動性を評価した。(許可を得て参考文献14の再試を行った。)

最新のアプリケーション

AKAP St-Ht31阻害ペプチドを用いたごく最近の研究では、それによりフォルスコリン誘導性アクアポリン-2 (AQP-2)[水チャンネル]の転移(腎臓主細胞の細胞内小胞から成長点細胞膜への移動)が強く阻害されたことが示されています(表1)(コントロールペプチドによる影響は無い)(13)。また、プロゲステロンによる哺乳動物精子の先体反応(AR)を顕著に刺激することも示されています(16)。St-Ht31を加える前に細胞透過性PKA阻害剤、St-PK15-24を添加すると、先体反応は著しく阻害されました。これらの結果と今回の我々の研究結果はともに、アンカリングに依存的なPKA応答に関する研究へのSt-Ht31ペプチドとコントロールペプチドSt-Ht31P使用の有効性をサポートしています。

まとめ

我々はAKAP由来ペプチドのステアリン酸化型であるInCELLect™細胞透過性ペプチドが細胞内シグナリングにおけるPKAおよびPKA応答の役割を解明する上において優れたツールであることを示しました。この細胞透過性ペプチドは比較的低濃度で効果を発揮し、使いやすく、細胞内のPKAを介した機能の研究に高い選択性を与えます。

Correction: This article originally appeared as *Application Note* (AN074). In AN074, the key to Figure 3, Panel C, contained an error. The symbols representing St-AKAP79 and St-CaNBP were switched. We apologize for the error, which has been corrected in the article as it appears here.

参照文献

1. Hunter, T. (1995) *Cell* **80**, 225.
2. Pawson, T. and Scott, J.D. (1997) *Science* **278**, 2075.
3. Levin, D.E. and Errede, B. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol*. **7**, 197.
4. Yasuda, J. *et al*. (1999) *Mol. Cell. Biol*. ***19***, 7245.
5. Mochly-Rosen, D. (1995) *Science* **268**, 247.
6. Dell'Acqua, M.L. and Scott, J.D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12881.
7. Rubin, C.S. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1224**, 467.
8. Yeung, K. *et al*. (1999) *Nature* **401**, 173.
9. Walsh, D.A., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. (1968) *J. Biol. Chem*. **243**, 3763.
10. Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1994) *Ann. Rev. Physiol.* **56**, 237.
11. Colledge, M. and Scott, J.D. (1999) *Trends Cell Biol*. **9**, 216.
12. Lester, L.B., Langeberg, L.K. and Scott, J.D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14942.
13. Klussmann, E. *et al*. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 4934.
14. Vijayaraghavan, S. *et al*. (1997) *J. Biol. Chem*. **272**, 4747.
15. Vijayaraghavan, S. *et al*. (1997) *Biol. Reprod*. **56**, 1450.
16. Harrison, D.A., Carr, D.W. and Meizel, S. (personal communication).
17. Newlon, M.G. *et al*. (1997) *J. Biol. Chem*. **272**, 23637.
18. Newlon, M.G. *et al*. (1999) *Nat. Struct. Biol*. **6**, 222.
19. Miki, K. and Eddy, E.M. (1999) *J. Biol. Chem*. **274**, 29057.
20. Vijayaraghavan, S. *et al*. (1999) *Mol. Endocrinol*. **13**, 705.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）
InCELLect™ AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide[a]	150µl	V8211	45,000
InCELLect™ St-Ht31P Control Peptide[a]	150µl	V8221	45,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）
cAMP-Dependent Protein Kinase, Catalytic Subunit	2,500 units	V5161	25,000
cAMP-Dependent Protein Kinase, Regulatory Subunit (Type II)	2,500 units	V5221	25,000
cAMP-Dependent Protein Kinase, Peptide Inhibitor	1mg	V5681	24,000
SignaTECT® cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Assay System[a]	96 回分	V7480	50,000
PepTag® Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay[b]	120 回分	V5340	53,000
Kemptide PKA Peptide Substrate	1mg	V5601	5,500
cAMP	500µl	V6421	6,000

PepTag and SignaTECT are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office. InCELLect is a trademark of Promega Corporation.
Cy3 is a registered trademark of Amersham Pharmacia Biotech, Ltd. SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

[a]Patent Pending.

[b]U.S. Pat. No. 5,580,747.