

マンガンはニッケル刺激したカルシニューリン活性を不競合的に阻害する

田中 佑季¹⁾, 大塚 恵美子¹⁾, 保坂 公平²⁾, 田中 進¹⁾

(1)高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科*, (2)群馬大学医学部保健学科**)

Manganese inhibits Nickel-stimulated Calcineurin Enzyme Activity by Uncompetitive InhibitionYuki TANAKA¹⁾, Emiko OTSUKA¹⁾, Kohei HOSAKA²⁾ and Susumu TANAKA¹⁾¹⁾Department of Health and Nutrition, Faculty of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare,²⁾Department of Basic Sciences for Medicine, Gunma University School of Health Sciences

Summary

Calcineurin (CN), also known as phosphoprotein phosphatase 2B, is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein serine/threonine phosphatase that plays a pivotal role in a variety of cellular functions, such as immune and nerve systems in our body. It has been shown that the phosphatase activity is stimulated by divalent ions, such as nickel (Ni^{2+}) and manganese (Mn^{2+}) *in vitro*. In the present study, we examined combined effect of Mn^{2+} and Ni^{2+} on CN activity *in vitro*. Although the combined effect of Mn^{2+} on Ni^{2+} -stimulated CN activity was not observed, we have found that the activity was inhibited by low concentrations of Mn^{2+} . To further examine effect of Mn^{2+} inhibition on Ni^{2+} -stimulated phosphatase activity, we studied on this inhibition by kinetic analysis. The result showed that Mn^{2+} inhibition of Ni^{2+} -stimulated CN activity was uncompetitive inhibition using Lineweaver-Burk plot. Inhibition constant (K_i) for Mn^{2+} was seen at 20.0 $\mu\text{mol/L}$.

カルシニューリン (CN) は、カルシウム (Ca^{2+}) /カルモジュリン (CaM) 依存性セリン/スレオニンホスファターゼの一種であり、ホスホプロテインホスファターゼ 2B として知られている。CN は、下等から高等に至るまで、真核生物が示す多くの生命機能において重要な役割を果たしており、例えば、T 細胞におけるインターロイキン-2 産生¹⁾、心臓の形成²⁾、興奮性神経細胞死³⁾などにおいて、重要な役割を担う酵素である。細胞内の CN 活性は Ca^{2+} や CaM, あるいはその他の因子によって厳密に制御されていると考えられるが、一方、CN は *in vitro* では、マンガン (Mn^{2+}) やニッケル (Ni^{2+}) のような二価重金属で活性化 (刺激) されることが明らかとなっている^{4,5)}。また近年、われわれは生理的濃度の亜鉛 (Zn^{2+}) が Ni^{2+} との競合阻害により、CN 活性を阻害することを明らかとし⁶⁾、さらにバナジウム (オルトバナジン酸, メタバナジン酸, バナジル) が Ni^{2+} 刺激した CN 活性を二相性に阻害することを報告してきた^{7,8)}。このように CN は、多様な微量元素において活性調節を受けることが示されているが、本研究では、CN を活性化する二価重金属の Mn^{2+} と Ni^{2+} について着目し、研究を行った。とくに *in vitro* では、精製したウシ脳の CN をもっともよく活性化するのは Ni^{2+} であ

り、また Ni^{2+} と Mn^{2+} の CN に対する活性化機構については古くから知られており、両者の結合サイトは異なっている事が示唆されている^{9,10)}。したがって、本研究では、このような *in vitro* における Ni^{2+} と Mn^{2+} による CN の活性化を更に検討する目的で、 Ni^{2+} 刺激した CN 活性に対する Mn^{2+} の相乗効果について調べた。

実験方法

1. 試薬

塩化カルシウム (CaCl_2)、塩化ニッケル (NiCl_2)、塩化マンガン (MnCl_2) は、和光純薬工業株式会社から購入し、ウシ脳から精製したカルシニューリン (CN)、ウシ精巢から精製したカルモジュリン (CaM)、パラニトロフェニルリン酸 (pNPP) は Sigma 社 (St. Louis, MO) の製品を使用した。

2. CN 活性の測定

CN 活性は高橋等の方法⁶⁾に従って測定を行った。すなわち、酵素反応溶液は 100 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.5), 1 mmol/L CaCl_2 , 3 mmol/L pNPP を含む反応溶液にそれぞれ

*所在地：群馬県高崎市中大類町 37-1 (〒370-0033)

**所在地：群馬県前橋市昭和町 3-39-22 (〒371-8511)

れ3UのCNとCaMを加えたものを酵素反応液とした。これに任意の濃度のNiCl₂やMnCl₂を加え、30℃、60分間、酵素反応を行った。60分後、終濃度で0.67 mol/LのNa₂CO₃を加え、酵素反応を停止し、酵素反応で生成したパラニトロフェノール (pNP) をA₄₁₀で測定することにより、酵素活性を求めた。なお、A₄₁₀と脱リン酸化型pNPPとの相関を求めるために、既知濃度のpNPのA₄₁₀を測定し、検量線を作成した。

結果と考察

今回、われわれの酵素反応系ではMn²⁺やNi²⁺を添加しないとCN活性を認めることはできなかったが、Mn²⁺あるいはNi²⁺の添加により、濃度依存的にCN活性がそれぞれ上昇することが示された(Fig.1)。次に、Mn²⁺のNi²⁺刺激したCN活性に対する相乗効果を検討するため、Ni²⁺

の濃度を0.03 mmol/Lに固定し、酵素反応系に0.001~1 mmol/Lの種々の濃度のMn²⁺を添加し、CN活性の測定を行った(Fig.2)。その結果、意外にもMn²⁺の相乗効果は観察されず、むしろ、0.001~0.1 mmol/LのMn²⁺の濃度ではCN活性の阻害を認めた。一方、0.1~1 mmol/LのMn²⁺の濃度ではCN活性の上昇が見られたが、活性は回復せず、むしろMn²⁺単独の刺激で得られるCN活性と同程度であった。次に今度はMn²⁺の濃度を0.5 mmol/Lに固定し、酵素反応系に0.001~1 mmol/Lの種々の濃度のNi²⁺を添加し、CN活性の測定を行った(Fig.3)。Fig.3に示すとおり、0.01~1 mmol/LのNi²⁺の濃度ではMn²⁺によるCN活性の阻害が確認された。

したがって、Mn²⁺によるNi²⁺刺激したCN活性の阻害様式を検討するため、様々な濃度の基質(パラニトロフェニルリン酸:pNPP)とMn²⁺の組み合わせでより詳細な阻害実験を行い、キネティック解析による検討を行った。

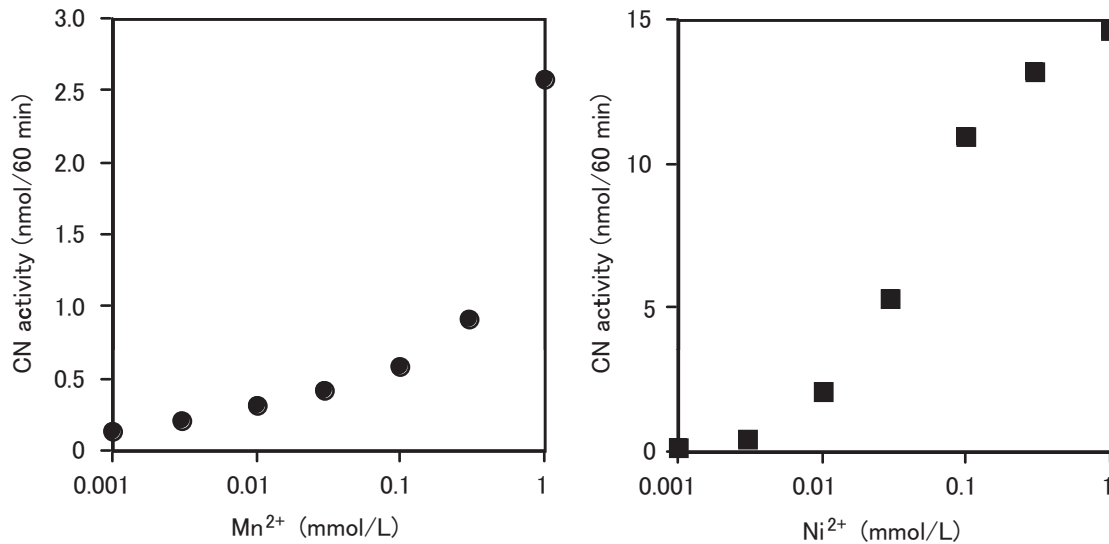


Fig. 1 Effect of Mn²⁺ or Ni²⁺ concentration on calcineurin activity.

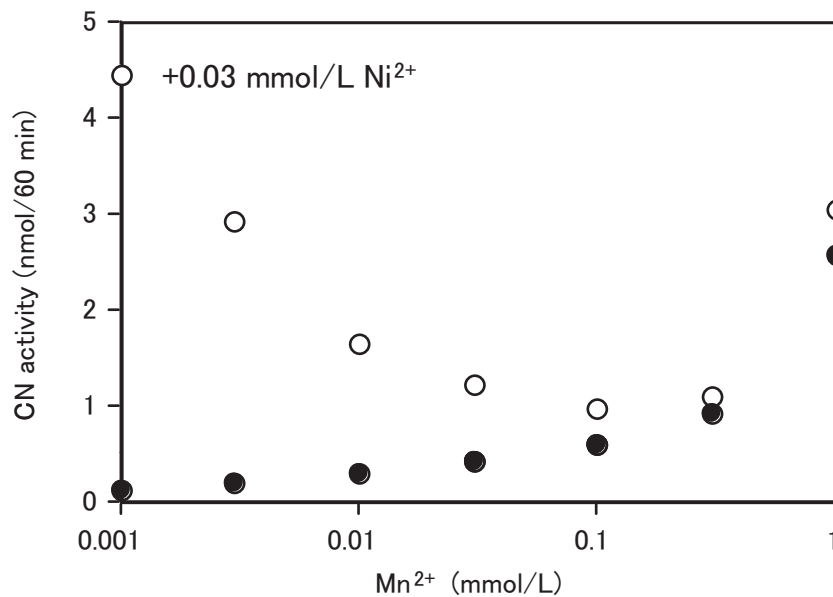


Fig. 2 Effect of Mn²⁺ on Ni²⁺-stimulated calcineurin activity.

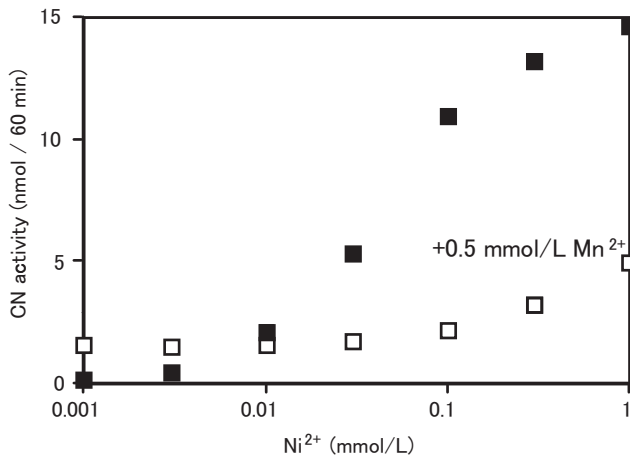


Fig. 3 Effect of Ni^{2+} on Mn^{2+} -stimulated calcineurin activity.

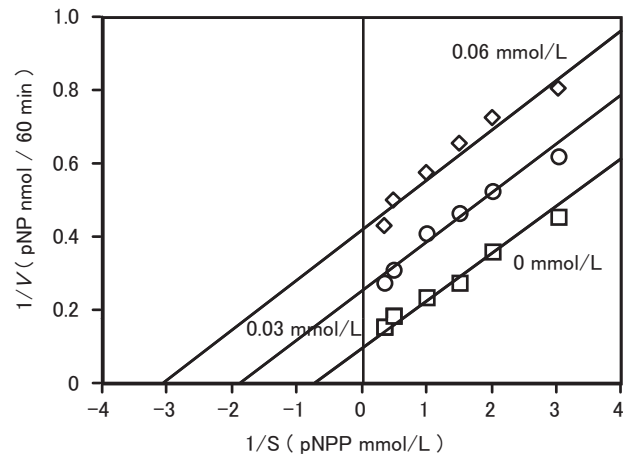


Fig. 4 Effect of Mn^{2+} on the inhibition of calcineurin, which is activated by Ni^{2+} .

Table 1 Summary of V_{\max} , K_m and K_i values.

	V_{\max} (nmol/60 min)	K_m or apparent K_m for pNPP (mmol/L)
Mn^{2+} (0 mmol/L)	10.0	1.25
Mn^{2+} (0.03 mmol/L)	3.97	0.52
Mn^{2+} (0.06 mmol/L)	2.35	0.32
K_i for Mn^{2+} 20.0 ($\mu\text{mol/L}$)		

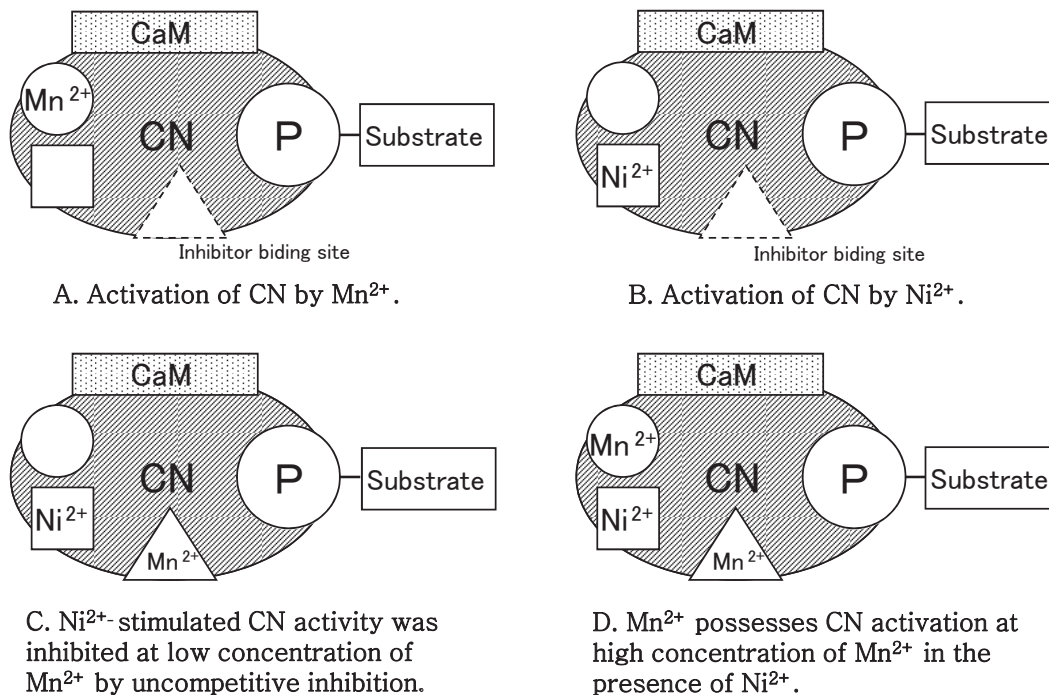


Fig. 5 Proposed scheme for the uncompetitive inhibition of Mn^{2+} on Ni^{2+} -stimulated calcineurin activity.

Ni^{2+} の濃度を 0.03 mmol/L に固定して、0.03 mmol/L あるいは 0.06 mmol/L の Mn^{2+} を含む系とまったく含まない系 (コントロール) において、pNPP の濃度を変化させて CN 活性を測定した。得られた測定結果から Lineweaver-Burk の二重逆数プロットを作成し、キネティック解析を行ったところ Fig. 4 に示すように、 Mn^{2+} の存在下 (0.03 mmol/L あるいは 0.06 mmol/L) および非存在下で、3 つの直線は平行となった。この結果から、 Mn^{2+} は Ni^{2+} 刺激した CN 活性に対し、不競合阻害剤として作用していることが示唆

された。次に、Fig. 4 からそれぞれの測定条件での最大反応速度 (V_{\max}) とミカリス定数 (K_m) を求めたところ、 Mn^{2+} の存在下で、 V_{\max} と K_m は低下した (Table 1)。また、 Ni^{2+} 刺激した CN 活性に対する Mn^{2+} の阻害定数 (K_i) を求めて、平均したところ 20.0 $\mu\text{mol/L}$ であった。

Mn^{2+} と Ni^{2+} は、*in vitro* において CN をよく活性化する二価重金属であり、酵素反応系に両者を添加すると相乗効果により、酵素活性の増加が期待されたが、本研究結果では予想外にも Mn^{2+} が Ni^{2+} 刺激した CN 活性を低下させる

ことが明らかとなった。これは Fig. 2, Fig. 3 の結果から Mn^{2+} と Ni^{2+} の CN に対する結合サイトが同一であり、結合親和力が $Mn^{2+} > Ni^{2+}$ のために起こる現象とも解釈できる。実際に Mn^{2+} と Ni^{2+} の CN に対する結合サイトには諸説があり、以前は Mn^{2+} と Ni^{2+} は同一サイトに結合して CN を活性化すると推定されていた⁵⁾。しかしながら、その後、同じ著者等は、CN に対する放射性⁶³Ni²⁺ と ⁵⁴Mn²⁺ の結合および非放射性 Ni^{2+} と Mn^{2+} の競合実験により、2つの金属の CN 上の結合サイトは異なっているという結論を導き出している⁹⁾。今回、われわれはこの結果と Fig. 4 の結果に基づき、 Mn^{2+} による Ni^{2+} 刺激した CN 活性の阻害のメカニズムについて次の Fig. 5 に示すような仮説を提唱したい。すなわち、CN には活性の発現に必要な Mn^{2+} と Ni^{2+} の結合部位が別々にあり (Fig. 5A, 5B)、なおかつ、 Mn^{2+} が結合する阻害剤結合部位が存在する。 Ni^{2+} 存在下で低濃度の Mn^{2+} を添加した場合、 Ni^{2+} 刺激した CN 活性は Mn^{2+} により、不競合的に阻害されるが (Fig. 5C)、一方、 Ni^{2+} 存在下で高濃度の Mn^{2+} を添加した場合は Mn^{2+} によるものと思われる CN 活性が出る (Fig. 5D)。今後、この仮説を証明するために、CN 中の活性発現に必要なアミノ酸配列等の具体的な Mn^{2+} や Ni^{2+} の結合部位や、 Mn^{2+} が結合する阻害剤結合部位を同定するなどの、更なる詳細な検討が必要であると思われる。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金 (19500690), (21500789) の補助のもとに行われた。

参考文献

1) Crabtree GR (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca^{2+} , calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96: 611–614.

2) Molken JD (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 63: 467–475.

3) Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, Wei FY, Lu YF, Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Matsui H (2004) Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *J Biol Chem* 279 (6): 4929–4940.

4) Li HC, Chan WW (1984) Activation of brain calcineurin towards proteins containing Thr(P) and Ser(P) by Ca^{2+} , calmodulin, Mg^{2+} and transition metal ions. *Eur J Biochem* 144: 447–452.

5) Pallen CJ, Wang JH (1984) Regulation of calcineurin by metal ions. *J Biol Chem* 259: 6134–6141.

6) Takahashi K, Akaishi E, Abe Y, Ishikawa R, Tanaka S, Hosaka K, Kubohara Y (2003) Zinc inhibits calcineurin activity *in vitro* by competing with nickel. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 64–68.

7) 田中 進, 大塚恵美子, 高橋克典, 増田泰紀, 本間千裕, 宮澤紀子, 保坂公平 (2008) ニッケル刺激したカルシニューリン活性に対するバナジウムの効果. *医学と生物学* 152: 88–93.

8) 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中 進 (2008) ニッケル刺激したカルシニューリン活性におけるバナジウム阻害のキネティック解析. *微量栄養素研究* 25: 122–124.

9) Pallen CJ, Wang JH (1986) Stoichiometry and dynamic interactions of metal ion activators with calcineurin phosphatase. *J Biol Chem* 261: 16115–16120.

10) Mukai H, Ito A, Kishima K, Kuno T, Tanaka C (1991) Calmodulin antagonists differentiate between Ni^{2+} - and Mn^{2+} -stimulated phosphatase activity of calcineurin. *J Biochem* 110: 402–406.