

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

田中 佑季¹⁾, 大塚 恵美子¹⁾, 保坂 公平²⁾, 田中 進¹⁾
(¹⁾高崎健康福祉大健康福祉学部健康栄養学科*, (²⁾群馬大学医学部保健学科**)

Kinetic Analysis of Vanadium Inhibition on the Ni²⁺-stimulated Calcineurin Enzyme Activity

Yuki 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) is a Ca²⁺/calmodulin-binding 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 is well known that the phosphatase activity is stimulated by Ni²⁺ and Mn²⁺ ions *in vitro*. Previously, we examined the effect of three types of vanadium ion, orthovanadate ions (VO₄³⁻), metavanadate ions (VO₃⁻) and vanadyl ions (VO²⁺) on Ni²⁺-stimulated phosphatase activity of CN. We have found that Ni²⁺-stimulated CN activity was inhibited by VO₄³⁻, VO₃⁻ or VO²⁺. In the present study, we further examined effect of vanadium ions (VO₄³⁻ or VO₃⁻) inhibition on the kinetics of Ni²⁺-stimulated CN activity. It has been shown that VO₄³⁻ and VO₃⁻ inhibitions of Ni²⁺-stimulated phosphatase were competitive inhibition using Lineweaver-Burk plot. Inhibition constants (*K_i*) for VO₄³⁻ and for VO₃⁻ were seen at 4.76 μmol/L and 7.16 μmol/L, respectively.

カルシニューリン (CN) は、セリン/スレオニンホスファターゼであり、プロテインホスファターゼ 2B (PP2B) として知られている。CN は、触媒部位を持つ CN-A (分子量 61 kDa) と制御サブユニットである CN-B (分子量 19 kDa) からなり、Ca²⁺/カルモジュリン (CaM) 依存的に活性化され、細胞の増殖、分化あるいはアポトーシスなどに関与することが知られている¹⁾。1991 年には CN はイムノフィリンを介した免疫抑制剤 FK506 ならびにシクロスポリン A の標的分子であることが明らかとなり²⁾、また最近では CN を介した心肥大の形成機序が解析され³⁾、CN を標的とした薬剤開発への応用が検討されてきた⁴⁾。このように細胞内の CN 活性は Ca²⁺ 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、*in vitro* では、ニッケル (Ni²⁺) やマンガン (Mn²⁺) のような二価重金属で活性化 (刺激) されることが判明している^{5,6)}。しかしながら、CN 分子内におけるそれら重金属の結合サイトは同定されていない。近年、われわれは生理的濃度の亜鉛 (Zn²⁺) が Ni²⁺ 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⁷⁾、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 Ni²⁺ 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⁸⁾。本研究では、Ni²⁺ 刺激した CN 活性のキネティック解析におけるオルトバナジン酸、メタバナジン酸の阻害効果について更なる検討を行ったので報告する。

実験方法

試薬：オルトバナジン酸ナトリウム (Na₃VO₄)、メタバナジン酸ナトリウム (NaVO₃)、塩化カルシウム (CaCl₂)、塩化ニッケル (NiCl₂)、塩化マグネシウム (MgCl₂) 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)、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。

Ni²⁺ 刺激した CN 活性のキネティック解析：キネティック解析は高橋等の方法⁷⁾に従って行った。すなわち、反応溶液 200 μL (100 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.5, 1 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L NiCl₂) に任意の濃度の

*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)

pNPPとオルトバナジウム酸、メタバナジウム酸あるいはリン酸を加え、さらに3 UのCNとCaMをそれぞれ添加したものを酵素反応液とし、30℃、60分間、酵素反応を行った。60分後、1 mol/LのNa₂CO₃を800 μL加え、酵素反応を停止し、波長410 nmの吸光度(A₄₁₀)を測定することにより、CNの酵素活性を求めた。なお、A₄₁₀と脱リン酸化型pNPPとの相関を求めるために、既知濃度のパラニトロフェノール(pNP)のA₄₁₀を測定し、検量線を作成した。

結果と考察

バナジウムは生体内の微量元素の一つであり、インスリン類似作用⁹⁾をはじめ、多種多様な薬理作用を示すことが知られている¹⁰⁾。またわれわれは、*in vitro*においてバナジウム(オルトバナジウム酸、メタバナジウム酸、バナジル)がニッケル(Ni²⁺)刺激したカルシニューリン(CN)活性を二相性に阻害することを、V-Iカーブにより明らかとしてきた⁸⁾。従って前報⁸⁾では予備的な実験であったので、本研究では、CNと基質(パラニトロフェニルリン酸;pNPP)、オルトバナジウム酸あるいはメタバナジウム酸の相互作用を解析するため、様々な濃度のpNPPとオルトバナジウム酸あるいはメタバナジウム酸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)。

最初に10 μmol/Lあるいは30 μmol/Lのオルトバナジウム酸を含む系と全く含まない系(コントロール)において、pNPPの濃度を変化させてNi²⁺刺激した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(Fig. 1A)。Fig. 1Aに示すように、オルトバナジウム酸の存在下(10 μmol/L

あるいは30 μmol/L)および非存在下で、3つの直線はy軸上で交差しており、この結果は、オルトバナジウム酸が基質との競合阻害剤として作用していることを示し、最大反応速度V_{max}には変化がなく、ミカエリス定数K_mはオルトバナジウム酸の濃度の増加に伴い増加した。従って、オルトバナジウム酸の作用により、CNと基質の親和性が低下していることが示された。次に、5 μmol/Lあるいは15 μmol/Lのメタバナジウム酸を含む系と全く含まない系(コントロール)において、オルトバナジウム酸と同様にpNPPの濃度を変化させてNi²⁺刺激したCN活性を測定し、キネティック解析を行った(Fig. 1B)。Fig. 1Bに示すように、メタバナジウム酸においても3つの直線はy軸上で交差し、この結果から、メタバナジウム酸もオルトバナジウム酸と同様に基質との競合阻害剤として作用していることが明らかとなった。

Table 1には、オルトバナジウム酸、メタバナジウム酸、オルトリン酸の阻害定数(K_i)をそれぞれ表す。K_iは、競合阻害剤があるときのK_mをみかけのK_mとし、[みかけのK_m] = K_m(1+i/K_i)から求めた。なおここで、iは競合阻害剤の濃度である。オルトリン酸とオルトバナジウム酸、メタバナジウム酸のK_iをそれぞれ比較してみると、オルトリン酸のほうが大きい値を示すことが明らかとなった。一般にオルトリン酸は、ホスファターゼに対して阻害作用があることが知られており¹¹⁾、またオルトバナジウム酸は、オルトリン酸のアナログとしてプロテインチロシンホスファターゼに対して阻害作用を示すことが明らかとなっている¹²⁾。本結果はオルトリン酸のアナログであるオルトバナジウム酸がオルトリン酸よりもK_iが顕著に小さいという興味深い結果を得ることができた。またメタバナジウム酸とオルトバナジウム酸との比較ではメタバナジウム酸のほうがK_iが小さいという結果が示された。

Mn²⁺刺激したCN活性に対するオルトバナジウム酸は阻害作用を示すものの、Ni²⁺刺激とは異なり、二相性は示さないことが明らかとなっている¹³⁾。しかしながらキネティック解析は行われておらず、またメタバナジウム酸については研究がなされていない。したがって、今後はMn²⁺刺激したCN活性のキネティック解析を行い、本結果との

Table 1 Summary of inhibition constants (K_i) values

Basal	V _{max} = 22.2 (nmol/60min)	K _m = 0.52 (mmol/L)
		K _i (μmol/L)
Orthovanadate		4.76
Metavanadate		7.16
Orthophosphate		130.9

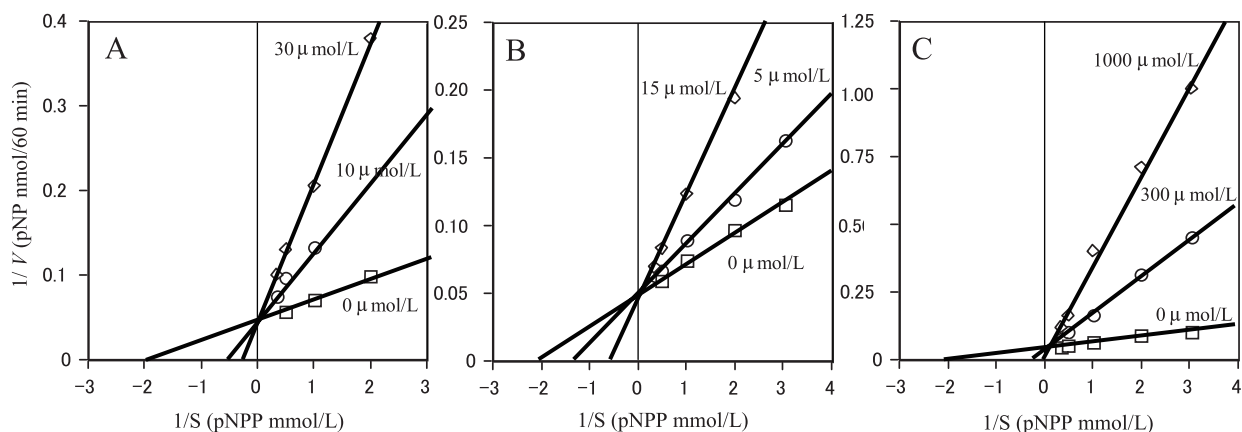


Fig. 1 Effect of vanadium ions on the inhibition of calcineurin, which is activated by Ni²⁺.

A: Orthovanadate, B: Metavanadate, C: Orthophosphate.

比較により CN に対する両バナジウムの阻害効果の異なる検討を行っていく必要があると思われる。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費基盤研究 (C) により行われた。

参考文献

- 1) Shibasaki F, McKeon F (1995) Calcineurin functions in Ca^{2+} -activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 131 : 735–743.
- 2) Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP–FK506 complexes. *Cell* 66 : 807–815.
- 3) Molkenkin JD (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 63 : 467–475.
- 4) Kishi T, Ikeda A, Nagao R, Koyama N (2007) The SCFCdc4 ubiquitin ligase regulates calcineurin signaling through degradation of phosphorylated Rcn1, an inhibitor of calcineurin. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 17418–17423.
- 5) 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.
- 6) Pallen CJ, Wang JH (1984) Regulation of calcineurin by metal ions. *J Biol Chem* 259 : 6134–6141.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Shechter Y (1990) Insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. *Diabetes* 39 : 1–5.
- 10) 植木 寛 (2003) バナジウムの新規な生物学的作用. *薬学雑誌* 123 : 633–646.
- 11) Simons TJ (1979) Vanadate – a new tool for biologists. *Nature* 281 : 337–338.
- 12) Leis JF, Kaplan NO (1982) An acid phosphatase in the plasma membranes of human astrocytoma showing marked specificity toward phosphotyrosine protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 : 6507–6511.
- 13) Wei Q, Yan L (2000) Effect of vanadyl ions on calcineurin and its A subunit. *Biol Chem* 381 : 309–312.