

希土類元素のカルシニューリン活性に対する影響

秋 山 珠 璃, 田 中 佑 季, 田 中 進

(高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科*)

(受付 2018年8月27日, 受理 2018年9月21日)

Effect of the rare earth elements on phosphatase activity of calcineurin

Shuri AKIYAMA, Yuki TANAKA, Susumu TANAKA

Department of Health and Nutrition, Faculty of Health and Welfare,
Takasaki University of Health and Welfare*

Summary

The rare earth elements are a group of 17 elements including scandium (Sc), yttrium (Y), and lanthanoids from lanthanum (La) to lutetium (Lu). These elements are used in industrial materials such as capacitors and lenses and also play active physiological and biological roles in the human body. On the other hand, calcineurin (CN), also known as protein phosphatase 2B (PP2B), is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein, and Ser/Thr phosphatase is recognized as a therapeutic target for the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. In this study, we examined the effects of rare earth elements, including lanthanum ions (La^{3+}), *in vitro* on the phosphatase activity of CN using recombinant human calcineurin (rhCN) from *Escherichia coli* and RII phosphopeptide as a substrate. We found that rhCN activity was inhibited by rare earth elements including La^{3+} . To further examine the effect of La^{3+} inhibition on rhCN activity, we performed kinetic analysis. According to a Lineweaver-Burk plot, the phosphatase activity of rhCN showed mixed type inhibition. The inhibition constants were 7.0 μM for rhCN and 10.2 μM for rhCN-R II phosphopeptide complex.

希土類元素は周期表の第3族に属するスカンジウム (Sc), イットリウム (Y), およびランタン (La) からルテチウム (Lu) までの15種類のランタノイドを含む17元素からなるグループであり, レアアースとも呼ばれている。希土類元素は3価になりやすい元素であり, 主にガラス研磨剤, 蛍光体, レーザー素材, 燃料電池, 磁気材料などの機能性素材として工業的に利用されている¹⁾。一方, 一部の希土類元素は医薬品にも応用されており, 例えばLaを主成分とした炭酸ランタンは, リンを吸着させる特徴を持つことから, 慢性腎臓病患者に見られる高リン血症の改善薬 (医薬品名: ホスレノール) として²⁾, セリウムはシュウ酸セリウムとして制吐薬として使用されている³⁾。またガドリニウムはMRIの血管造影剤として^{4,5)}, 放射性のイットリウム (^{90}Y) と放射性のサマリウム (^{153}Sm) は放射性医薬品として使用されている^{6,7)}。従って, 希土類元素の生物学的な影響や機能性を検討することは, 例えばサプリメントなどによる疾病予防を通じた人の健康維持やあるいは新規医薬品の開発による医療分野への利用などの基礎となることが考えられ, 重要なことであると思われる。

先行研究⁸⁾において, 我々は, ランタンイオン (La^{3+}) の細胞性免疫に対する影響の基礎的検討を行う目的で, 免疫抑制剤の標的酵素でありタンパク質脱リン酸化酵素の一つであるカルシニューリン (CN) に着目した。実際には, CNとしてウシ脳から精製したCN (bCN) を使用し, 基質として人工基質である

-

ニトロフェニルリン酸 (pNPP) を用いて検討を行ったところ, ニッケルイオン (Ni^{2+}) で活性化 (刺激) したbCNのホスファターゼ活性は La^{3+} により阻害されることが示された⁸⁾。従って, La^{3+} は細胞性免疫系に影響を与える可能性が示唆された。しかしながらヒトの細胞性免疫に対する影響を詳細に調べるためには, ヒトCNを使用するなど, 実験条件を検討する必要があると考えられる。従って, 本研究では酵素としてリコンビナントヒトCN (rhCN), 基質としてR IIリン酸化ペプチドをそれぞれ使用し, ホスファターゼ活性に対する影響を La^{3+} を中心に希土類元素で詳細に検討したので報告する。

*所在地: 群馬県高崎市中大類町37-1 (〒370-0033)

1. 試薬

塩化スカンジウム (ScCl₃), 塩化イットリウム (YCl₃), 塩化ランタン (LaCl₃), 塩化サマリウム (SmCl₃), 塩化ユーロピウム (EuCl₃), 塩化テルビウム (TbCl₃), 塩化ホルミウム (HoCl₃), 塩化エルビウム (ErCl₃), 塩化ツリウム (TmCl₃), 塩化イッテルビウム (YbCl₃), 塩化ルテチウム (LuCl₃) は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。リコンビナントヒトカルシニューリン (rhCN) 測定のためのホスファターゼアッセイキットは Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA) から購入した。

2. rhCN 活性の測定

CN 活性はホスファターゼアッセイキットのプロトコルに従って測定を行った。酵素反応溶液 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 6 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.025% NP-40 にそれぞれ 8 U/μL の rhCN⁹ と 0.25 μM CaM を添加したものを標準酵素反応液とした。これに任意の濃度の LaCl₃ をはじめ種々の希土類元素をそれぞれ加え、基質として 150 μM の RII リン酸化ペプチド (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-*pSer*-Val-Ala-Ala-Glu)^{10,11} を加え、30°C, 60 分間、酵素反応を行った。60 分後、この溶液の 2 倍量のマラカイトグリーンを添加し、酵素反応の結果、生成したリン酸を波長 620 nm の吸光度 (A₆₂₀) を測定^{12,13} することにより、CN の酵素活性を求めた。なお、酵素活性はあらかじめ作成した A₆₂₀ とリン酸との検量線を使用することにより求めた。

3. キネティクス解析

rhCN 活性に対する La³⁺ の阻害形式を明らかにするために行った逆数プロット解析は、標準酵素反応液に終濃度で LaCl₃ なし (0 μM) あるいは 10 μM をそれぞれ添加して一定濃度で固定し、さらに、基質である RII リン酸化ペプチドを任意の濃度でそれぞれ添加して 30°C, 60 分間反応させた。それぞれの反応速度と基質濃度の逆数をプロットし、阻害形式を求めた。

La³⁺ の阻害定数を求めるために行った Quotient velocity プロット解析は^{14,15}, RII リン酸化ペプチドの濃度をそれぞれ 75 μM, 150 μM に固定し、標準酵素反応液に任意の濃度の LaCl₃ をそれぞれ加え、30°C, 60 分間反応させた。LaCl₃ の濃度と (V-v)/v (V: 最大反応速度, v: LaCl₃ 存在下でのそれぞれの反応速度) をプロットし、阻害定数を求めた。

4. 統計解析

得られた結果は平均値 ± 標準偏差で表し、Dunnett's test で解析した。統計解析は、GraphPad Prism5 を用いて行った。有意水準は p < 0.05 または p < 0.01 とした。

ランタンイオン (La³⁺) のヒトの細胞性免疫に対する影響を検討する目的で、免疫抑制剤の標的酵素として知られているカルシニューリン (CN) のホスファターゼ活性に対する影響をリコンビナントヒト CN (rhCN) を用いて行った。Fig. 1 に示すように RII リン酸化ペプチドを基質として使用した今回の我々の酵素反応系に塩化ランタン (LaCl₃) を添加していくと CN 活性は阻害され、50% 阻害濃度 (IC₅₀) は約 8.8 μM であった。次に希土類元素の仲間 La よりも原子量が小さいスカンジウムイオン (Sc³⁺), イットリウムイオン (Y³⁺) について同様の検討を試みた。Fig. 2 に示すように濃度に差があるものの Sc³⁺, Y³⁺ ともに La³⁺ と同様に rhCN に対して有意な阻害作用を認めた。また、IC₅₀ はそれぞれ約 3.2 μM, 約 8.7 μM であった。次に他の 8 種類の希土類元素を使用して、rhCN に対する阻害の影響を検討した (Fig. 3)。5 μM および 10 μM の塩化サマリウム (SmCl₃), 塩化ユーロピウム (EuCl₃), 塩化テルビウム (TbCl₃), 塩化ホルミウム (HoCl₃), 塩化エルビウム (ErCl₃), 塩化ツリウム (TmCl₃), 塩化イッ

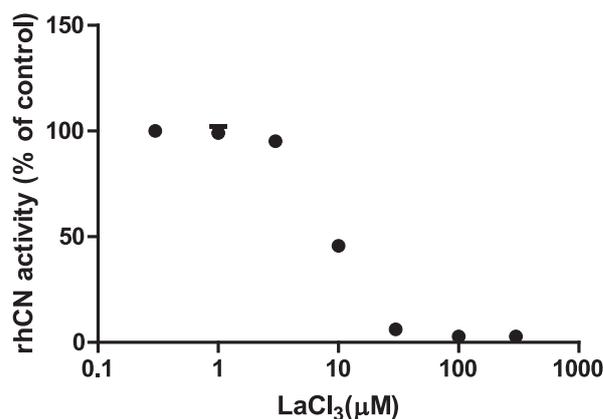


Fig. 1 Inhibition of phosphatase activity of recombinant human calcineurin (rhCN) in *Escherichia coli* by La³⁺. IC₅₀ values were calculated using GraphPad Prism5. Values are presented as mean ± standard deviation.

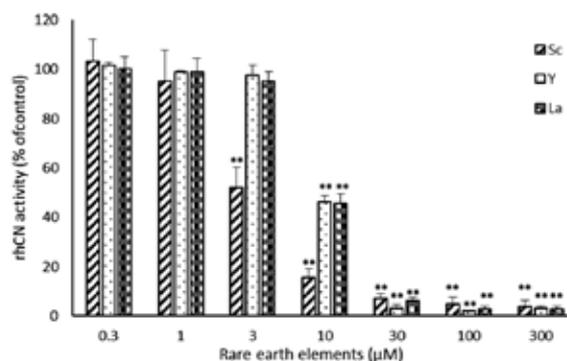


Fig. 2 Effects of La³⁺, Sc³⁺, and Y³⁺ on recombinant human calcineurin (rhCN) activity. With increased rare earth element concentrations, rhCN activity was inhibited. Values are presented as mean ± standard deviation. ** p < 0.01 vs. control.

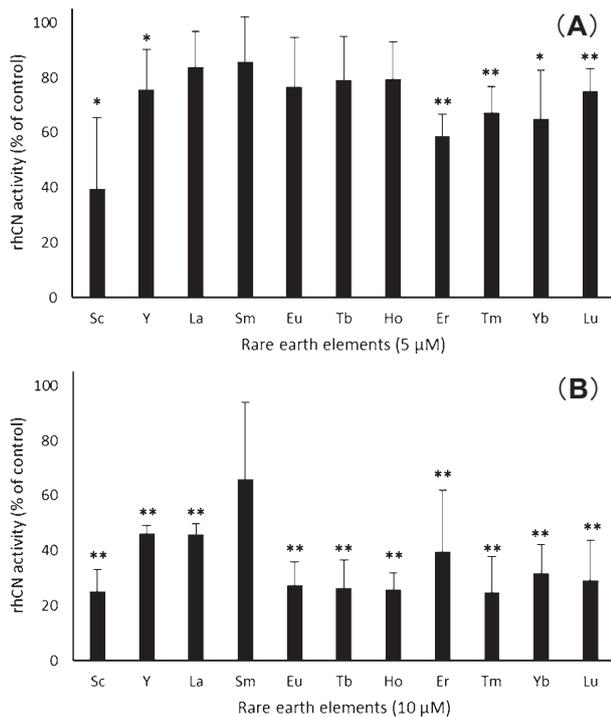


Fig. 3 Effects of rare earth elements at 5 μM (A) and 10 μM (B) on rhCN activity. Higher concentrations of rare earth elements resulted in lower rhCN activity. Values are presented as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

ルビウム (YbCl_3), 塩化ルテチウム (LuCl_3) をそれぞれ使用して rhCN のホスファターゼ活性を測定したところ, 作用する濃度に差があるもの rhCN を阻害することが明らかとなった。特に 10 μM では使用した 8 種類の希土類元素の中で SmCl_3 以外の 7 種類において CN 活性が有意に低下しており, 希土類元素は rhCN のホスファターゼ活性を阻害することが予想された。次に La^{3+} の CN 活性阻害のメカニズムを明らかとするために, キネティクス解析を行い検討した。すなわち LaCl_3 なし (0 μM), あるいは 10 μM でそれぞれ一定の濃度に固定し, 基質として使用した R II リン酸化ペプチドの濃度を変えて CN 活性を測定した。Fig. 4 に示すように基質と反応速度について二重逆数プロットを作成し, La^{3+} の rhCN に対する阻害形式を検討したところ, LaCl_3 なし (0 μM) とあり (10 μM) のそれぞれの直線はグラフの第 3 象限で交叉し, この結果, La^{3+} は混合型阻害により rhCN 活性を阻害することが示された。これは La^{3+} は rhCN 単独あるいは rhCN-R II リン酸化ペプチド複合体の双方に異なる阻害定数 K_i , K_i' でそれぞれ結合することを表しており, Fig. 4 に示す直線は第 3 象限で交叉していることから, $K_i < K_i'$ であることが予想された。従って, Fig. 5 に示すように Quotient velocity プロット解析^{14, 15)} を行い, K_i , K_i' を求めたところ, K_i が約 7.0 μM , K_i' が約 10.2 μM であり, ともに IC_{50} と近い値を示した。

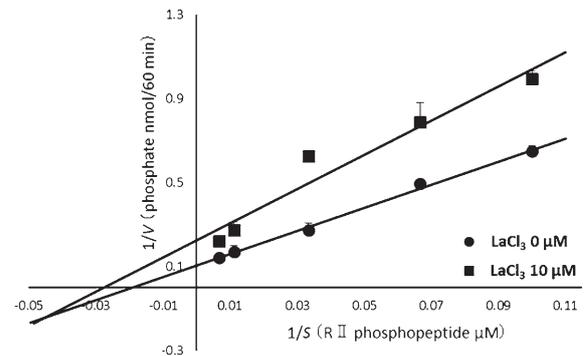


Fig. 4 Double-reciprocal Lineweaver-Burk plot. $1/V$ (phosphate nmol/60 min) linearly increased with an increase of $1/S$ (R II phosphopeptide μM), and was highest at 10 μM and lowest at 0 μM . Values are presented as mean \pm standard deviation.

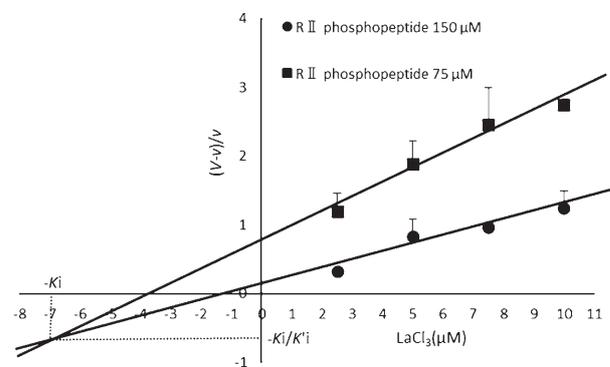


Fig. 5 Quotient velocity plot. The lines indicate the inhibitor concentration (LaCl_3) vs. $(V-v)/v$. $[I] = -K_i$ and $(V-v)/v = -K_i/K_i'$ were calculated from the intersections of the two straight lines in the third quadrant, respectively. Values are presented as mean \pm standard deviation.

考 察

カルシニューリン (CN) は, タンパク質脱リン酸化酵素の一つであり, ホスホプロテインホスファターゼ 2B (PP2B) ともいわれ, カルシウム (Ca^{2+}) / カルモジュリン (CaM) 依存性のセリン / トレオニンホスファターゼとして知られている。CN は真核生物が示す様々な細胞機能において重要な役割を果たしているが, ヒトの免疫系では, T 細胞においてインターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現を制御する転写調節因子の一つであるリン酸化 Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (リン酸化 NFATc1) を脱リン酸化することにより活性化させ, IL-2 mRNA の発現を高めることにより細胞性免疫を上昇させることが知られている¹⁶⁾。さらに, 免疫抑制剤として臨床で使用されている FK506 やシクロスポリンはそれぞれ FK506 結合タンパク質 (FKBP) やシクロフィリンといったイムノフィリンを介して間接的に CN を阻害することにより作用を発揮することから, CN は免疫抑制剤の標的酵素となっている¹⁷⁾。細

胞内のCNは、 Ca^{2+} やCaMおよびその他の因子によって活性が調節されていると考えられるが、*in vitro*では、ニッケルイオン (Ni^{2+}) やマンガンイオン (Mn^{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¹⁸⁻²⁰⁾。また近年、我々は生理的濃度の亜鉛イオン (Zn^{2+}) が Ni^{2+} との競合阻害によりCN活性を阻害すること²¹⁾、また Mn^{2+} が Ni^{2+} 刺激したCN活性を不競合的に阻害することを明らかとし²²⁾、更にバナジウム (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ウシ脳由来のCN (bCN) と人工基質として *p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) を使用して報告してきた^{23,24)}。またリコンビナントヒトCN (rhCN) とR IIリン酸化ペプチドを基質として用いた検討では、 Zn^{2+} の *i-v* カーブはrhCNとbCNで同様の結果を得たが、オルトバナジン酸、メタバナジン酸、バナジルではrhCN活性に変化を認めなかった²⁵⁾。従って、bCNとrhCNでは同じ金属元素に対し、場合によっては異なる活性変化を示す可能性があるかと推定された。先行研究⁸⁾において我々はランタンイオン (La^{3+}) がbCNのホスファターゼ活性を阻害することを報告してきたが、本研究では La^{3+} のヒトの細胞性免疫に対する影響を検討する目的で、酵素としてrhCN、基質としてR IIリン酸化ペプチドを用いて詳細な検討を行った。その結果、 Ni^{2+} 刺激したbCNとrhCNに対する La^{3+} の50%阻害濃度 (IC_{50}) はそれぞれ約7.5 μM と約8.8 μM であり、ほぼ同じ値を示した (Fig. 1)。しかしながら、データは示さないが、 Ni^{2+} 刺激したbCN活性に対するスカンジウムイオン (Sc^{3+})、イットリウムイオン (Y^{3+}) の IC_{50} はそれぞれ約1.9 μM 、約10.8 μM であり、 Sc^{3+} はrhCNの IC_{50} (約3.2 μM) と比較して、低濃度でbCNを阻害することが示された (Fig. 2)。また Sc^{3+} 、 Y^{3+} の *i-v* カーブはrhCNでは観察されない特徴的な二相性を示した。次に8種類の希土類元素を使用してrhCNに対する阻害作用を検討したところ、 SmCl_3 以外は10 μM で有意にホスファターゼ活性が阻害されることが示された (Fig. 3)。従って、これらの結果から希土類元素はrhCNを阻害することが予想されたが、これらの阻害に対するメカニズムの詳細については今後の検討課題であると考えられる。またキネティクス解析から La^{3+} はrhCNを混合型阻害で阻害することが示され (Fig. 4)、Quotient velocity プロット解析^{14,15)} からrhCNに対する K_i は約7.0 μM 、rhCN-R IIリン酸化ペプチド複合体に対する K_i は約10.2 μM であることが明らかとなった (Fig. 5)。

CNは、*in vitro*において多様な金属元素において活性調節を受けることが示されているが、先述したようにbCNとrhCNの結果は必ずしも一致するわけではない²⁵⁾。bCNはウシ脳から精製されたネイティブな酵素であるが、活性発現のためには、 Ni^{2+} または Mn^{2+} による活性化 (刺激) が必要であり、また、人工基質である *p*NPP が良い基質になっている。一方、rhCNはヒト酵素であり、基質としてR IIリン酸化ペプチドを使用しているが、大腸菌か

ら発現させた酵素である。ネイティブCNはミリストイル化されている酵素であるが、大腸菌から発現させたリコンビナントCNは、ミリストイル化の有無により酵素の性状が異なるという報告もある²⁶⁾。本実験で使用したrhCNはミリストイル化されている酵素であり、本研究から得られた結果はネイティブ酵素の結果を反映している可能性が高いものと考えられる。本検討からrhCNは、*in vitro*において La^{3+} をはじめとする希土類元素により酵素活性が阻害されることが明らかとなった。また La^{3+} を使用したキネティクス解析によりrhCNに対する阻害形式は混合型阻害であることが示された。ヒトT細胞株 Jurkat 細胞を用いた先行研究⁸⁾において、我々は La^{3+} が転写調節因子NFATc1を介してコンカナバリンA (ConA) 誘導性のIL-2 mRNA発現およびIL-2タンパク質の産生を抑制することを見出している。CNはIL-2 mRNA発現に関与するリン酸化NFATc1の脱リン酸化反応を触媒するが、本結果からも La^{3+} はrhCN活性を阻害することにより、リン酸化NFATc1の脱リン酸化を阻害し、細胞性免疫に影響を与えている可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Palasz A, Czepak P (2000) Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. Acta Biochemica Polonica 47: 1107-1114.
- 2) Shigematsu T, Sakai T, Kono T, Kimura Y, Takuma Y, Tsuruta Y, Mori Y, Taki M, Moriishi M, Minakuchi J, Obayashi S, Miyake S, Emoto H, Furuhashi M, Tsujimoto Y, Arisaka H, Ishizaki M, Shimoyama H, Kim S, Hirose S, Kurosawa A, Matsui N, Nakazawa R, Watanabe T, Kabaya T, Tanaka Y, Takahashi T, Ozawa T, Nakamura K, Nishioka M, Higashi H, Koga N (2008) Multicenter prospective randomized, double-blind comparative study between lanthanum carbonate and calcium carbonate as phosphate binders in Japanese hemodialysis patients with hyperphosphatemia. Clin Nephrol 70: 404-410.
- 3) Jakupiec MA, Unfried P, Keppler BK (2005) Pharmacological properties of cerium compounds. Rev Physiol Biochem Pharmacol 153: 101-111.
- 4) Sherry AD, Caravan P, Lenkinski RE. (2009) Primer on gadolinium chemistry. J Magn Reson Imaging. 30: 1240-1248.
- 5) Hao D, Ai T, Goerner F, Hu X, Runge VM, Tweedle M. (2012) MRI contrast agents: basic chemistry and safety. J Magn Reson Imaging. 36: 1060-1071.
- 6) Otte A, Herrmann R, Heppeler A, Behe M, Jeremann E, Powell P, Maecke HR, Muller J. (1999) Yttrium-90 DOTATOC: first clinical results. Eur J

- Nucl Med.26: 1439-1447.
- 7) Maciej Bączyk, Piotr Milecki, Piotr Martenka, Jerzy Sowiński, Department of Nuclear Medicine, K. Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznan, Poland, Department of Radiotherapy, Great Poland Cancer Centre, Poznan, Poland. (2007) Efficacy of samarium 153 and strontium 89 treatment for bone metastases in prostate cancer patients: monotherapy vs. treatment combined with external beam radiotherapy. Preliminary Report.12: 211-216.
 - 8) 秋山琉璃, 井上咲季, 中島 徹, 田中 進 (2017) ランタンイオンの細胞性免疫に対する影響の基礎的検討. 微量栄養素研究 34 : 52-58.
 - 9) Mondragon A, Griffith EC, Sun L, Xiong F, Armstrong C, Liu JO. (1997) Overexpression and purification of human calcineurin alpha from *Escherichia coli* and assessment of catalytic functions of residues surrounding the binuclear metal center. Biochemistry 36: 4934-4942.
 - 10) Enz A, Shapiro G, Chappuis A, Dattler A. (1994) Nonradioactive assay for protein phosphatase 2B (calcineurin) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP-dependent protein kinase as substrate. Anal Biochem 216: 147-153.
 - 11) Donella-Deana A, Krinks MH, Ruzzene M, Klee C, Pinna LA. (1994) Dephosphorylation of phosphopeptides by calcineurin (protein phosphatase 2B). Eur J Biochem 219: 109-117.
 - 12) Martin B, Pallen CJ, Wang JH, Graves DJ. (1985) Use of fluorinated tyrosine phosphates to probe the substrate specificity of the low molecular weight phosphatase activity of calcineurin. J Biol Chem 260: 14932-14937.
 - 13) Harder KW, Owen P, Wong LK, Aebersold R, Clark-Lewis I, Jirik FR. (1994) Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. Biochem J 298: 395-401.
 - 14) Yoshino M, Murakami K (2009) A graphical method for determining inhibition constants. J Enzyme Inhib Med Chem 24(6): 1288-1290.
 - 15) Yoshino M, Murakami K. (2015) Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types. SpringerPlus 4: 292.
 - 16) Crabtree GR (1999) Generic signals and specific outcomes : signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. Cell 96: 611-614.
 - 17) Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991) Calcineurin is a common target of cyclosporine A and FKBP-PK506 complexes. Cell 66: 807-815.
 - 18) Li HC, Chan WW (1984) Activation of brain calcineurin towards proteins containing Thr(P) and Ser(P) by Ca²⁺, calmodulin, Mg²⁺ and transition metal ions. Eur J Biochem 144: 447-452.
 - 19) Pallen CJ, Wang JH (1984) Regulation of calcineurin by metal ions. J Biol Chem 259: 6134-6141.
 - 20) Pallen CJ, Wang JH (1986) Stoichiometry and dynamic interactions of metal ion activators with calcineurin phosphatase. J Biol Chem 261: 16115-16120.
 - 21) 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.
 - 22) 田中佑季, 大塚恵美子, 保坂公平, 田中 進 (2009) 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. 微量栄養素研究 26 : 70-73.
 - 23) 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.
 - 24) 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.
 - 25) 田中 進, 田中佑季, 伊藤 昇, 保坂公平 (2011) リコンビナントヒトカルシニューリン活性に対する金属イオンの効果. 医学と生物学 155 (8) : 483-488.
 - 26) Kennedy MT, Brockman H, Rusnak F. (1996) Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. J Biol Chem 271: 26517-26521.