

学位論文  
Doctoral Thesis

細胞のアポトーシスにおける脱リン酸化酵素 PP6 の機能解析  
(Analysis of protein phosphatase 6 in the regulation of apoptosis)

梶原 隆太郎

Ryutaro Kajihara

指導教員

乾 誠治 教授

熊本大学大学院生命科学研究部(保健学系)生体情報解析学

2014年3月

# 学位論文

## Doctoral Thesis

論文題名 : 細胞のアポトーシスにおける脱リン酸化酵素 PP6 の機能解析  
(Analysis of protein phosphatase 6 in the regulation of apoptosis)

著者名 : 梶原 隆太郎  
(単名) Ryutaro Kajihara

指導教員名 : 熊本大学大学院生命科学研究部(保健学系)生体情報解析学 乾 誠治 教授

審査委員名 : 主査 教授 氏名 柳沼 裕二

副査 教授 氏名 大坪 和明

副査 教授 氏名 乾 誠治

2014年3月

[目次]

|   |    |
|---|----|
| I. 要旨 .....   | 1  |
| II. 学位論文の骨格となる公表主論文、参考論文、その他の論文のリスト .....                   | 5  |
| III. 謝辞 .....   | 6  |
| IV. 略語一覧 .....  | 7  |
| V. 研究の背景と目的 .....   | 8  |
| 1. B細胞の ネガティブ ネガティブ セレクション セレクション .....                     | 8  |
| 1.1 中枢性免疫寛容 .....   | 8  |
| 1.2 末梢性免疫寛容 .....   | 8  |
| 1.3 WEHI-231 .....  | 9  |
| 2. アポトーシス .....   | 9  |
| 3. TNF- $\alpha$ による細胞死 .....                               | 14 |
| 4. BCR を介したアポトーシス .....                                     | 14 |
| 5. Protein kinase .....                                     | 17 |
| 5.1 Ca <sup>2+</sup> /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) ..... | 17 |
| 5.2 MAP kinase の分類 .....                                    | 17 |
| 5.3 c-Jun N-terminal Kinase(JNK) .....                      | 17 |
| 6. Protein Phosphatase .....                                | 18 |
| 6.1 セリン/スレオニンホスファターゼ .....                                  | 18 |
| 6.2 Protein phosphatase 6(PP6) .....                        | 18 |
| 7. p27 .....  | 19 |
| 7.1 サイクリン、CDK、CDK インヒビター .....                              | 19 |

|   |           |
|---|-----------|
| 7.2 CDK インヒビター.....   | 20        |
| 7.3 p27.....  | 20        |
| 7.4 CKI 以外の役割をもつ Cip/Kip ファミリー.....   | 21        |
| 7.5 Cip/Kip タンパク質の細胞内局在の変化.....   | 21        |
| 8. ユビキチン/プロテアソーム系.....  | 21        |
| 9. 本研究の目的.....  | 23        |
| <b>VI. 研究方法.....</b>  | <b>24</b> |
| 1. 細胞株と細胞培養.....  | 24        |
| 2. 抗体と試薬.....   | 24        |
| 3. 生細胞数測定(Cell Counting Kit-8)法.....  | 24        |
| 4. フローサイトメトリーによるアポトーシス解析.....   | 24        |
| 5. トランスフェクション及び GST 融合タンパク質精製に用いる cDNA の作成.....                                 | 24        |
| 6. Mutagenesis.....   | 25        |
| 7. トランスフェクション.....  | 25        |
| 8. Western Blot Analysis.....   | 25        |
| 9. 免疫沈降.....  | 26        |
| 10. CaMKII による p27 の in vitro リン酸化アッセイ.....                                     | 26        |
| <b>VII. 研究結果.....</b>   | <b>27</b> |
| 1. DN-PP6 cDNA の作成.....   | 27        |
| 2. DN-PP6 を発現させた HeLa 細胞はアポトーシスに抵抗性を示す.....                                     | 29        |
| 3. DN-PP6 トランスフェクタントでは、CaMKII によって p27 発現量が増加していた.....                          | 30        |
| 4. p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化は、Bcl-xL の安定性を上昇させ、細胞をアポトーシス耐性にする.....                 | 31        |
| 5. ラット抗マウス IgM モノクローナル抗体 M41 はアゴニスティックに WEHI-231 細胞の BCR を刺激し、アポトーシスを引き起こす..... | 34        |
| 6. WEHI-231 の BCR 刺激により Bcl-xL はユビキチン化され分解される.....                              | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| 7. Bcl-xL の 62 番目のセリン残基のリン酸化がユビキチン化に重要である .....            | 37        |
| 8. BCR 刺激による Bcl-xL の 62 番目のセリン残基のリン酸化は JNK によって介される ..... | 38        |
| 9. オカダ酸に感受性のあるホスファターゼが Bcl-xL の S62 の脱リン酸化に関与する .....      | 39        |
| 10. PP6 は Bcl-xL のリン酸化およびユビキチン化をコントロールする .....             | 41        |
| 11. CD40 は PP6 と相互作用し、PP6 活性を上昇させる .....                   | 43        |
| <br>   |           |
| <b>VIII. 考察.....</b>                                       | <b>44</b> |
| <br>   |           |
| <b>IX. 結語.....</b>   | <b>47</b> |
| <br>   |           |
| <b>X. 参考文献.....</b>  | <b>49</b> |

## [ I. 要旨 ]

### [ 目的 ]

セリン/スレオニン脱リン酸化酵素は細胞周期のコントロール・代謝などを調節することが知られている。PP (protein phosphatase) 2A, PP4, PP6 は共通の構造を持ち 1つのサブクラスを形成している。シグナル伝達分子 alpha4 は PP2A, PP4, PP6 すべての分子と結合しその酵素活性を制御する。alpha4 はリンパ球の抗原レセプターシグナル伝達経路に関与しリンパ球の活性化、抗体産生などを調節している。B 細胞または T 細胞特異的な alpha4 の遺伝子破壊マウスを用いた実験から、alpha4 がリンパ球の生存・増殖に必須の分子であることが明らかとなっている。さらに alpha4 を神経系で遺伝子破壊すると記憶・学習が障害される。記憶・学習のシステムでは PP2A が重要なはたらきをし、alpha4 と PP2A が CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) と結合し、酵素活性を制御することが示された。PP2A はほとんどすべての組織で発現しているが、PP6 は中枢神経系、心臓、免疫系を中心に発現することが報告されている。そこで alpha4 が免疫系、心臓で PP6 を介して細胞生存を制御するメカニズムを解析する目的で PP6 機能を抑制する Dominant-Negative PP6 (DN-PP6) を作製した。

### [ 方法 ]

DN-PP6 cDNA を作成し HeLa 細胞にトランスフェクションした。TNF とシクロヘキシミドによってアポトーシスを誘導し、細胞生存試験や各種のウエスタンブロットを行った。さらに CaMKII cDNA や p27 cDNA も細胞にトランスフェクションして、ウエスタンブロットを行った。また、GST-p27 および GST-S10A mutant p27 を作成し、in vitro kinase assay を行った。

また、免疫系のモデル細胞として WEHI-231 を用いた実験も同様な方法で行った。

### [ 結果/考察 ]

DN-PP6 を発現した HeLa 細胞は、TNF 刺激後に、野生型細胞に比べて生存率が高かった。さらに、これらの細胞では CaMKII のリン酸化が見られ、p27 と Bcl-xL の発現が上昇していた。また、CaMKII は p27 の 10 番目のセリン残基をリン酸化した。p27 の過剰発現は Bcl-xL 発現量を上昇させた。本研究では、DN-PP6 cDNA を作成し、さらに、CaMKII が p27 の 10 番目のセリンをリン酸化することによってアポトーシスを制御することを示した。PP2Ac のドミナントネガティブ変異体はいくつか発表されている。しかしながら、本研究で初めて PP6 のドミナントネガティブ変異体を作成した。この変異体は、アポトーシスのみならず細胞周期における PP6 のさらなる機能解析に役立つと思われる。

CaMKII は学習と記憶に重要であり、中枢神経系では PP1 が CaMKII の酵素活性を調節していることが知られている。今回の研究では、PP6 も同様に CaMKII と結合し、PP2A サブファミリーのホスファターゼも CaMKII 活性の調節に関与している可能性を示した。最近では、CaMKII もアポトーシスに関与していることが示唆されている。いくつかのグループは CaMKII がアポトーシスを誘導するとしているが、他のグループではアポトーシスを抑制するとしている。本研究では、HeLa 細胞で CaMKII はアポトーシスを抑制した。本実験では CaMKII が p27 のセリン 10 番目をリン酸

化することによって p27 の発現量を増加させ、アポトーシス耐性能を細胞に与えた。p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化は、p27 の安定性と関係している。また、このリン酸化によって、核内の p27 は細胞質へ移行することが知られている。このことは、p27 がサイクリン/CDK 複合体から離れ、細胞質内でアポトーシス調節因子として機能することを示唆している。今回の実験結果では、野生型 p27 は細胞質に局在することができ、さらに Bcl-xL の量を調節した。これに対し、S10A 変異型 p27 ではそれら現象が見られなかった。p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化を行うキナーゼはいくつか報告されている。今回の研究で、CaMKII も p27 の 10 番目のセリンをリン酸化することを明らかとした。

[ 結論 ]

ドミナントネガティブ変異型 PP6 (DN-PP6) を作成した。DN-PP6 を発現した HeLa 細胞では、CaMKII が p27 の 10 番目のセリンをリン酸化し、p27 の発現量を上昇させた。p27 の発現量の上昇が、Bcl-xL の発現量を上昇させた。PP6 と CaMKII はこのような機序で HeLa 細胞のアポトーシスをコントロールした。

## Abstract of the Thesis

### Purpose:

Protein phosphatase (PP) 6 is a serine threonine phosphatase which belongs to the PP2A subfamily of protein phosphatases. PP6 was first identified as yeast phosphatase Sit4, which controls cell cycle progression from G1 to S phase. Later, a mammalian homolog of Sit4 was cloned and studies found that PP6 controls apoptosis as well as cell cycle progression. Transfection of PP6 induces apoptosis in some cells but apoptosis resistance in other cells. Alpha4 was first identified as a BCR signaling adaptor protein and it was later reported that alpha4 functions as a phosphatase regulatory molecule which bound catalytic subunits of PP2A and PP6. A dominant negative form PP6 (DN-PP6) mutant cDNA was prepared and transfected into HeLa cells to investigate the regulation of apoptosis.

### Methods:

DN-PP6 cDNA was prepared and transfected to HeLa cells. Then, cells were treated with tumor necrosis factor (TNF) and cycloheximide (CHX). After that, cell viability assays or western blots were performed.

For in vitro phosphorylation assays, GST-p27 or GST S10A mutant p27 were purified and subjected to in vitro CaM kinase II assay.

### Results:

This study prepares a dominant negative form PP6 cDNA and showed that CaMKII regulates the apoptosis signal by phosphorylating serine 10 of p27. There are several mutant forms of PP2Ac which work as dominant negative forms. However, this is the first study which describes the dominant negative form of PP6. This mutant may be an important tool to further investigate the function of PP6 in the regulation of apoptosis and cell cycle control. CaMKII is a kinase important in learning and memory and PP1 controls the enzymatic activity of CaMKII in the central nervous system. The current results showed that PP6 also associated with CaMKII suggesting that the PP2A subfamily of protein phosphatases was also important in the regulation of CaMKII function. Recently, CaMKII has been implicated in apoptotic signal transduction. Some groups have described it as apoptosis-inducing, while others as apoptosis-inhibiting. In this study, CaMKII inhibited the apoptosis in HeLa cells. The present study showed that CaMKII up-regulated p27 expression by phosphorylation of serine 10 to confer apoptosis resistance.

### Conclusion:

A dominant negative form of protein phosphatase 6 (PP6) cDNA was established. CaMKII phosphorylates serine 10 of p27 and increases the expression of p27 in HeLa cells harboring

this dominant negative form of PP6. Increased expression of p27 leads to increased expression of Bcl-xL PP6 and CaMKII thus regulates apoptosis in HeLa cells.

[Ⅱ. 学位論文の骨格となる公表主論文、参考論文、その他の論文のリスト]

CaMKII phosphorylates serine 10 of p27 and confers apoptosis resistance to HeLa cells

**Ryutaro Kajihara, Shota Fukushige, Norifumi Shioda, Kano Tanabe, Kohji Fukunaga, Seiji Inui**

Biochemical and Biophysical Research Communications, 401, 350–355 (2010).

### [Ⅲ. 謝辞]

本研究を行うにあたり、全面的に御指導, 御支援下さいました熊本大学大学院 保健学教育部 検査技術科学分野 病態解析学領域 乾 誠治教授に深く感謝致します。

論文作成にあたりまして、乾 誠治教授並びに熊本大学大学院 保健学教育部 検査技術科学分野の皆様にご協力いただき、深く感謝致します。

#### [IV. 略語一覧]

2-ME: 2-メルカプトエタノール

BCR: B細胞抗原受容体

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

CaMKII:  $Ca^{2+}$ /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II

CHX: シクロヘキシミド

DTT: ジチオトレイトール

DiFMUP: 6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferyl Phosphate

ECL: Enhanced Chemiluminescence

EDTA: エチレンジアミン四酢酸

GST: グルタチオン S-トランスフェラーゼ

GAPDH: グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素

HRP: 西洋わさびペルオキシダーゼ

Ig: 免疫グロブリン

IMDM: イスコフ改変ダルベッコ培地

JNK: c-Jun N末端キナーゼ

PAGE: ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PCR: ポリメラーゼ連鎖反応

PP: プロテインホスファターゼ

PP6c: PP6 触媒サブユニット

SDS: ドデシル硫酸ナトリウム

TNF: 腫瘍壊死因子

## [V. 研究の背景と目的]

### 1. B細胞のネガティブセレクション

B細胞はその細胞表面に発現している抗原レセプター(B cell receptor; BCR)によって外来抗原を特異的に認識し、活性化する。BCRは膨大な種類の外来抗原に対応するために遺伝子再構成という仕組みを使ってレパートリーを増幅するが、レパートリーの決定はランダムであり外来抗原だけでなく、自己抗原特異的なレセプターも産生される。B細胞の免疫寛容は、B細胞が胸腺非依存的な自己抗原に反応をしないという性質を維持するために必要な事象であり、胸腺依存的な蛋白質抗原に反応する抗体の産生を抑制するという性質をも有している。

#### 1.1 中枢性免疫寛容

未熟B細胞が自己の細胞表面抗原(MHCなど)を認識する抗原レセプターBCRを発現した場合、そのB細胞はアポトーシスをおこすか(クローン消失)、再度遺伝子再構成を行い異なった特異性を持った抗原レセプターを発現する(レセプター編集)。

未熟B細胞が可溶性の自己抗原により架橋される抗原受容体が発現した場合、その未熟B細胞は抗原に不応答性となる(アナジー)。アナジー状態に陥ると、抗原特異的T細胞の補助があっても抗原によって活性化されない。また、このアナジー状態のB細胞は末梢リンパ組織へと移行するが、リンパ組織のT細胞領域に分布し、濾胞へはたどり着けない。濾胞では生存シグナルを受け取れるためB細胞の寿命は長くなるが、濾胞にたどり着けないB細胞の寿命は3日程度となりすぐ死ぬ、したがって、アナジー状態のB細胞は長くは生きられない。

未熟B細胞が可溶性の自己抗原に低親和性、または単価で結合する抗原レセプターを発現した場合、正常に成熟し末梢へ移行する。しかし、抗原が存在してもBCRを架橋しない、または弱くしかレセプターと結合しないため、B細胞が活性化することはない(クローン無視)。骨髄内に存在する時に自己抗原に遭遇しなかった未熟B細胞は、正常に成熟し末梢リンパ組織へと移行する。

#### 1.2 末梢性免疫寛容

中枢性自己免疫寛容が行われているにも関わらず、末梢には多くの自己反応性B細胞が存在する。これは、特定臓器のみにしか発現していない自己抗原が存在するためである。また、活性化B細胞がランダムな遺伝子再構成を再度起こした結果、自己抗原に特異的なBCRをもったB細胞が分化してしまう可能性もある。このような自己抗原に対するBCRを持つB細胞は骨髄で寛容を受けることができず、正常な成熟B細胞として末梢に移行する。しかし、末梢で自己抗原に反応するB細胞が活性化しない仕組みも生体は持っている。

通常B細胞は血中からT細胞領域を通り、T細胞領域で特異抗原と出会うとB細胞濾胞へ移動する。しかし、自己抗原に特異的なBCRを持つB細胞は、T細胞領域からB細胞濾胞へ移行

することができない。これは、外来抗原に応答する細胞の場合はそれに相当するエフェクターCD4 T細胞がT細胞領域に存在するのに対して、自己抗原に応答するB細胞の場合はそのようなヘルパーT細胞は存在しないためである。B細胞濾胞へ移動できないB細胞は生存シグナルを受けることができないことから、すぐにアポトーシスを起こす。

中枢(骨髄)で可溶性抗原と出会ったB細胞はアナジー状態に陥るが、末梢でも可溶性自己抗原に出会うとアナジー状態が誘導される。もしFasリガンドを発現した自己反応性T細胞が存在し活性化・成熟していれば、アナジーB細胞はFas依存的に除去される。アナジーB細胞はFasリガンドとFasによるアポトーシスへの感受性が亢進しているためである。外来抗原への応答のための体細胞高頻度突然変異の結果、自己抗原特異的なBCRを発現するB細胞に分化した場合、これら自己反応性B細胞は胚中心で大量の可溶性抗原と出会うことによりアポトーシスが誘導される。

### 1.3 WEHI-231

WEHI-231細胞はBALB/cマウスとNZBマウスとの交雑F1マウスをミネラルオイル処理により誘発させたBリンパ腫由来の細胞株である。古典的なIgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>の未熟B細胞とは対照的に、WEHI-231細胞はIgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>である。しかしながら、未熟B細胞のように表面IgMと抗イムノグロブリン試薬によるクロスリンクはWEHI-231細胞が細胞周期のG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期に移行し、24-48時間後に死ぬという現象を引き起こす。この様に、抗原刺激により容易にアポトーシスに陥ることから未熟B細胞のアポトーシスの研究によく用いられている。

## 2. アポトーシス

アポトーシスとは細胞死の一形態であり、電子顕微鏡観察により病的に定義されたものである。アポトーシスでは細胞膜の構造変化、核クロマチンの凝集などから始まり、最終的には核や細胞の断片化に至る。アポトーシスを起こした細胞は細胞内の酵素などを放出することなくマクロファージにより貪食され消失する。生体では癌細胞やウイルス感染細胞の除去に働くほか、発生過程において様々な臓器の形態形成や細胞調節に関与している。栄養不足、毒物、外傷などの外的環境要因により起こる受動的細胞死であるネクローシスとしばしば対比されるが、ネクローシスでは核の変性はほぼ認められず、ミトコンドリアの膨潤や細胞の肥大を伴い最終的に細胞膜が破裂して細胞融解に至る。

アポトーシスを開始させる細胞内のシグナル伝達経路は主に線虫の遺伝学的研究から明らかになった。その後線虫や昆虫から哺乳類まで多細胞動物のアポトーシス経路には共通点が多いことが明らかとなった。これは非常に複雑に調節されるネットワークであるが、カスパーゼと総称される一連のプロテアーゼが中心的な働きをし、下流のカスパーゼを順に切断・活性化していくこと、また「アポトーシスの司令塔」であるミトコンドリアも重要な働きをな

すことが特徴である。

その過程はおおよそ次のように分けられる。

- ① TNF などのサイトカインや Fas リガンド(デスリガンド)などによる細胞外からのシグナルはそれらの受容体(デスレセプター)を介してカスパーゼ-8, 10 を活性化し、これら活性化されたカスパーゼがカスパーゼ-3 を活性化する。また、一部はミトコンドリアにシグナルが伝わり、ミトコンドリアからシトクロム c の漏出を引き起こし、カスパーゼ-9、カスパーゼ-3 を活性化する。
- ② DNA 損傷などにより p53 の活性化が起こると、転写依存的または非依存的に様々な分子を修飾する。この際に、ミトコンドリア上の Bax、Bak、Bcl-2 などの蛋白質からなるシグナル系による制御(またはミトコンドリア自体の異常)を必須の経路とする。最終的にミトコンドリアからのシトクロム c の漏出によってカスパーゼ-3 が活性化する。
- ③ 胞体で異常な蛋白質が生成されるなどの小胞体ストレスにより、ストレスキナーゼ(SAPK)と呼ばれる ASK1/JNK、p38 などのキナーゼが活性化されるとミトコンドリアのアポトーシス制御分子が修飾されて最終的にカスパーゼ-3 が活性化する。

以上のように、アポトーシスは様々な刺激により誘導されるが各刺激により活性化されたアポトーシスシグナルは、最終的にほとんどすべての細胞死に共通となる機構に集約される(図 1)。

哺乳類細胞において、ミトコンドリアを介するアポトーシス経路は最終的に MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) と呼ばれるミトコンドリア膜透過性変化に集約してくる。MOMP によってミトコンドリア膜間腔から放出された分子はカスパーゼカスケードを活性化させ、不可逆的にアポトーシスへと導く。

MOMP は通常、Bcl-2 ファミリー蛋白質のうちのアポトーシス抑制蛋白質によって起こらないように阻止されている。Bcl-2 ファミリーに属している蛋白質は最大で 4 つの Bcl-2 homology domain (BH1 から BH4) を共有している。Bcl-2 ファミリーは、アポトーシスにおけるその役割と共有している BH の種類から主に 3 つのサブファミリーに細分される。アポトーシス抑制蛋白質である Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Bcl-B、A1、Mcl-1 は共通して 3~4 つの BH を有しており、Bcl-2 サブファミリーと呼ばれる。アポトーシス促進蛋白質のうちの片方のメンバーである Bax、Bak、Bcl-Xs、Bok、Bcl-G1 は Bax サブファミリーと呼ばれ 2~3 つの BH を有している。アポトーシス促進蛋白質のもう片方のメンバーは BH3-only 蛋白質と呼ばれ、Bad、Bid、Bim、Bik、Noxa、Puma、Bcl-Gs、Blk、Bmf、Hrk などが属し、BH3 のみを共通に有している。これら 3 つのグループのうち、BH3-only 蛋白質は Bcl-2 サブファミリーや Bax サブファミリーの上流に位置し、これらの分子と直接結合することによって、その機能をそれぞれネガティブ、ポジティブに調節している(図 2)。すなわち、上流のアポトーシスシグナルをミトコンドリアに伝えるシグナル伝達分子として機能している。たとえば、サイトカインの枯渇などによって BH3-only 蛋白質が活性化すると、BH3-only 蛋白質は Bax や Bak と結合しそれらを活性化させ、Bcl-2 と結合しそれを不活化させる(図 3)。

MOMP が起こると、膜間腔の蛋白質はサイトゾル内に放出される。この蛋白質の一つであるシトクロム c はサイトゾル内に存在する単量体 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) に結合する。このシトクロム c の結合により、Apaf-1 はコンフォメーションが変化し、Apaf-1 のオリゴマー形成を促進する。これは、intrinsic pathway の開始カスパーゼであるプロカスパーゼ 9 を動員・オリゴマー化させ、活性型カスパーゼ-9 に変換する。このシトクロム c、Apaf-1、カスパーゼ-9 の複合体はアポトソーム (apoptosome) と呼ばれている。続いてカスパーゼ-9 はカスパーゼ-3、-7 などの実行カスパーゼを切断し活性化させる。

MOMP 下流のアポトーシスシグナルの過程は、アポトソームおよびその下流のカスパーゼのレベルで制御されている。カスパーゼの活性は、IAP (inhibitor of apoptosis) ファミリーの分子がカスパーゼに結合することによって調節される。たとえば、ヒト X-linked IAP (XIAP) は少なくともカスパーゼ-3、-7 に直接結合する。XIAP や survivin などのような生存蛋白質は、多くの腫瘍細胞で過剰発現していることが知られている。加えて、これらのカスパーゼインヒビターは、アポトーシス促進蛋白質である SMAC/DIABLO (second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI) によって拮抗されている。SMAC/DIABLO は活性型カスパーゼ 3 から XIAP の結合をはずし、アポトーシスを促進する。このように、カスパーゼの活性化および機能は、多種にわたる結合蛋白質によって調節されている。

その他のミトコンドリア蛋白質でアポトーシス制御因子作用をもつ分子には AIF (apoptosis inducing factor) がある。AIF は bacterial oxidoreductase にホモロジーがあり、通常はミトコンドリア内に局在しているが、アポトーシス時には細胞質に移行してくる。AIF によるアポトーシスはカスパーゼ阻害剤では阻止することができず、その他のアポトーシス促進因子に非依存的に核の濃縮・断片化を引き起こす。興味深いことに、AIF のレドックス活性領域はアポトーシス抑制作用があり、細胞の生存と死の両方に関係する。カスパーゼ非依存アポトーシスの詳しいメカニズムはよくわかっていない。

便宜上、intrinsic pathway と extrinsic pathway に大別したが、実際はこれらの経路は互いにクロストークしている。細胞の種類、刺激、その他の環境要因によって、異なった経路が異なった役割を果たしている。たとえば、細胞内に、実行カスパーゼを直接切断・活性化できないくらいの量しかカスパーゼ-8 が存在しない場合、カスパーゼ-8 によって BH3-only 蛋白質である Bid の切断が起こり、この経路が主となる。Bid の切断により t-Bid が生成され、これがミトコンドリアからシトクロム c を放出させカスパーゼ-9 を活性化する。さらに、カスパーゼ-9 はカスパーゼ-8 を切断し、ポジティブフィードバックループを形成することによって、もともとのカスパーゼ-8 からのシグナルを増強する。

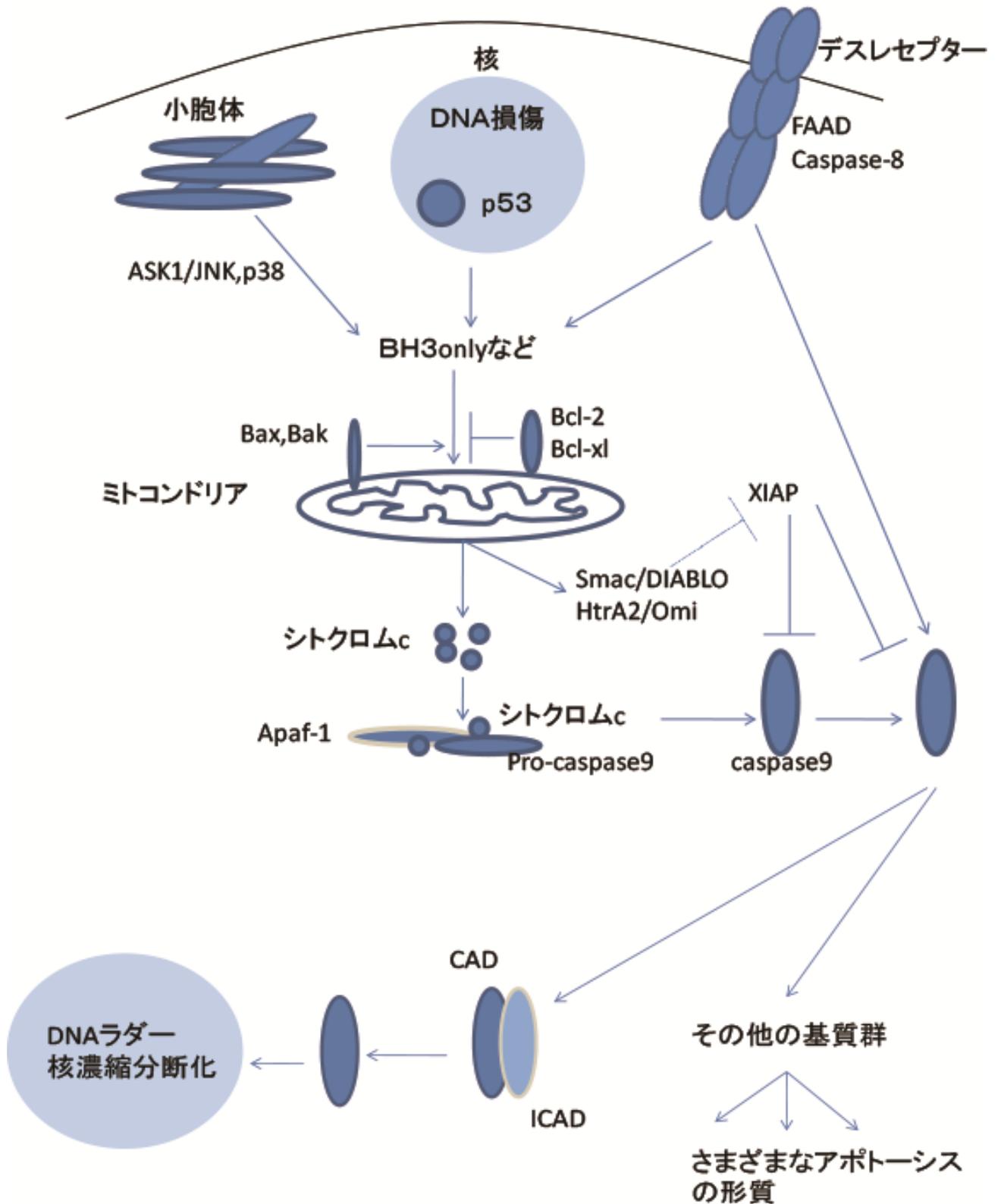


図1 一般的なアポトーシス実行経路の模式図

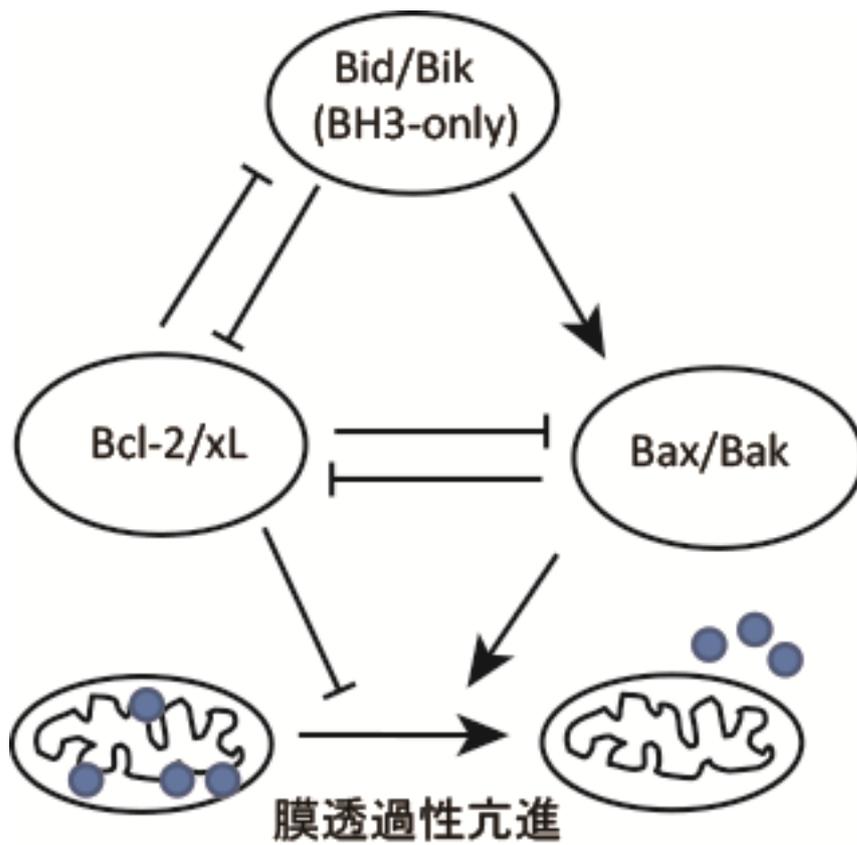


図2 Bcl-2 ファミリー蛋白質の機能

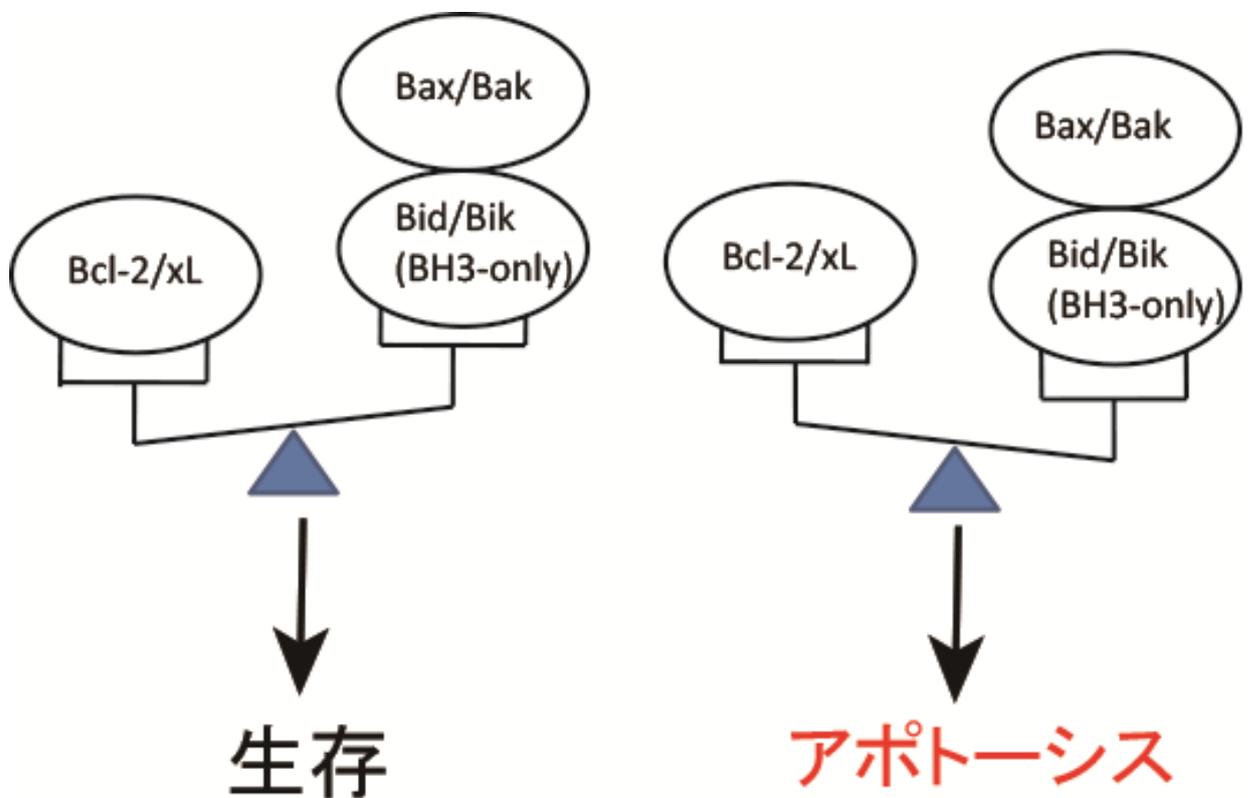


図3 Bcl-2 ファミリーの蛋白質のバランスにより細胞の生死が決定される

### 3. TNF- $\alpha$ による細胞死

TNF (tumor necrosis factor)- $\alpha$ は非常に多様な活性をもつサイトカインである。その多様性は、NF- $\kappa$ B経路、MAPキナーゼ (JNK) 経路、カスパーゼ経路という3つの主要な細胞内シグナル伝達経路を同時に活性化しうることによって起因している。TNF- $\alpha$ による細胞死の誘導には、TNF- $\alpha$ 刺激にともなって産生される活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) によるJNK経路の活性の制御が非常に重要である。ROSはMAP3Kの一つであるASK1を主に活性化すると同時に、JNKの不活性化を担うMAPキナーゼホスファターゼ (MKP) の活性中心のシステイン残基を酸化することでホスファターゼ活性を阻害し、その結果、JNKの持続的な活性化をもたらす。JNK経路がTNF- $\alpha$ による細胞死の誘導に寄与するかどうかのもう一つの重要な決定機構は、NF- $\kappa$ B経路とのバランスである。その機構として、NF- $\kappa$ B (転写因子) がGADD45 $\beta$  やXIAPなどの分子の発現を促すことでJNK経路を直接制御するものと、フェリチンやMn-SODの発現誘導によってROSの除去を促進し、JNK経路の持続的な活性化を制御するものが考えられている。したがって、TNF- $\alpha$ による細胞死を実験的に行うときには、シクロヘキシミド (タンパク合成阻害剤) でNF- $\kappa$ B経路を遮断することが必要となる。

### 4. BCRを介したアポトーシス

アポトーシスにおいて、ミトコンドリアがその中心的な役割を果たしていることは広く知られている。アポトーシスとミトコンドリアの統合性は深く関係しており、統合性の破綻の結果として、酸化リン酸化およびATP産生の停止、細胞内酸化還元電位の変化、ミトコンドリアからのアポトーシス促進因子の漏出がおきる。アポトーシス時にはミトコンドリア内膜の膜透過性変化 (PT) が誘導され、これはミトコンドリアマトリックス内へ急激にイオンおよび水の流入を引き起こし、ミトコンドリアの膨張およびミトコンドリア内膜電位 ( $\Delta \Psi_m$ ) の低下を引き起す。ミトコンドリアの膜透過性は内膜に存在するPTP (permeability transition pore) とよばれる穴構造によって制御されていることが知られている。ミトコンドリアの膨張によりミトコンドリア外膜は破壊され、ミトコンドリア膜間腔に存在するアポトーシス促進因子がサイトゾルへ流出する。

BCRを介して誘導されたアポトーシスにおいても、ミトコンドリアの透過性変化が重要な機能をはたしていることが分かっている (図4)。電子顕微鏡による観察からも、BCR刺激によるミトコンドリア膜の破壊、膨張などのミトコンドリアの形態学的変化が起こることが分かっている。いくつかの研究によって、BCR刺激により $\Delta \Psi_m$ の脱分極が起き、カスパーゼの活性化やDNAの断片化などを引き起こすことが示されている。また、ミトコンドリア電位を安定化させるオリゴマイシン、アンチマイシンなどのミトコンドリアインヒビターは、WEHI-231細胞をBCR誘導性アポトーシスから保護することがわかっている。さらに、PTPを阻害するボングクレキック酸 (BA) は、WEHI-231のBCRによる $\Delta \Psi_m$ の低下を抑制することがわかっており、BCRを介したアポトーシスにおいてもPTPによる $\Delta \Psi_m$ の脱分極がアポトーシスに重要であることが示されている。

ミトコンドリアの統合性はBcl-2ファミリーであるアポトーシス抑制およびアポトーシス促進タンパクのバランスによって制御されている。WEHI-231細胞において、アポトーシス抑制Bcl-2ファミリータンパクの役割は広く研究されている。アポトーシス抑制メンバーである

Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1はBCR刺激により減少し、Bcl-xL、A1の過剰発現により細胞はBCRを介した $\Delta \Psi_m$ の低下に対して耐性となる。さらに、アポトーシス促進Bcl-2ファミリーメンバーの翻訳後修飾もBCRによる $\Delta \Psi_m$ の制御に関係していることが分かっている。たとえば、アポトーシス促進分子Badはリン酸化による修飾を受けることが分かっており、WEHI-231細胞においてBadの脱リン酸化は $\Delta \Psi_m$ の低下と関係している。また、アポトーシス促進分子であるBimのノックアウトマウスの実験から、BimもまたBCRを介したアポトーシスに重要であることが分かっている。

BCR刺激によって $\Delta \Psi_m$ を低下させるその他のメカニズムとして、アラキドン酸(AA)やセラミド(C16)などの脂質がミトコンドリアで蓄積することによって起こることが分かっている(図4)。BCRの刺激はミトコンドリアのホスホリパーゼA2(PLA2)の活性化を誘導し、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸をミトコンドリアに蓄積させる。このアラキドン酸によってミトコンドリア内膜の透過性が変化し、 $\Delta \Psi_m$ の低下を引き起こす。Ramosバーキットリンパ腫細胞株は、BCR刺激によりセラミドのde novo合成が誘導され、このセラミドは直接または間接的にミトコンドリアを傷害する。セラミドの合成は、BCRシグナルを介したカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT)の増加により誘導される。

タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)による実験から、BCRを介したアポトーシスにはタンパクのde novo合成が必要であることが分かっている。濾胞リンパ腫細胞株HF1A3はCHX処理によってBCR誘導性 $\Delta \Psi_m$ の低下がブロックされることから、新規タンパクの増加がミトコンドリア膜透過性変化に関係することが示されている。それに加え、ミトコンドリアの脱分極はBCR刺激から6~12時間後(用いた細胞株によって異なる)の比較的遅いカイネティクスで観察され、これは新規タンパクの合成に時間がかかるからであると考えられている。どんなタンパクが合成され、それらがどのようにミトコンドリアの脱分極に影響を与えるのかは今後の研究の課題となっている。

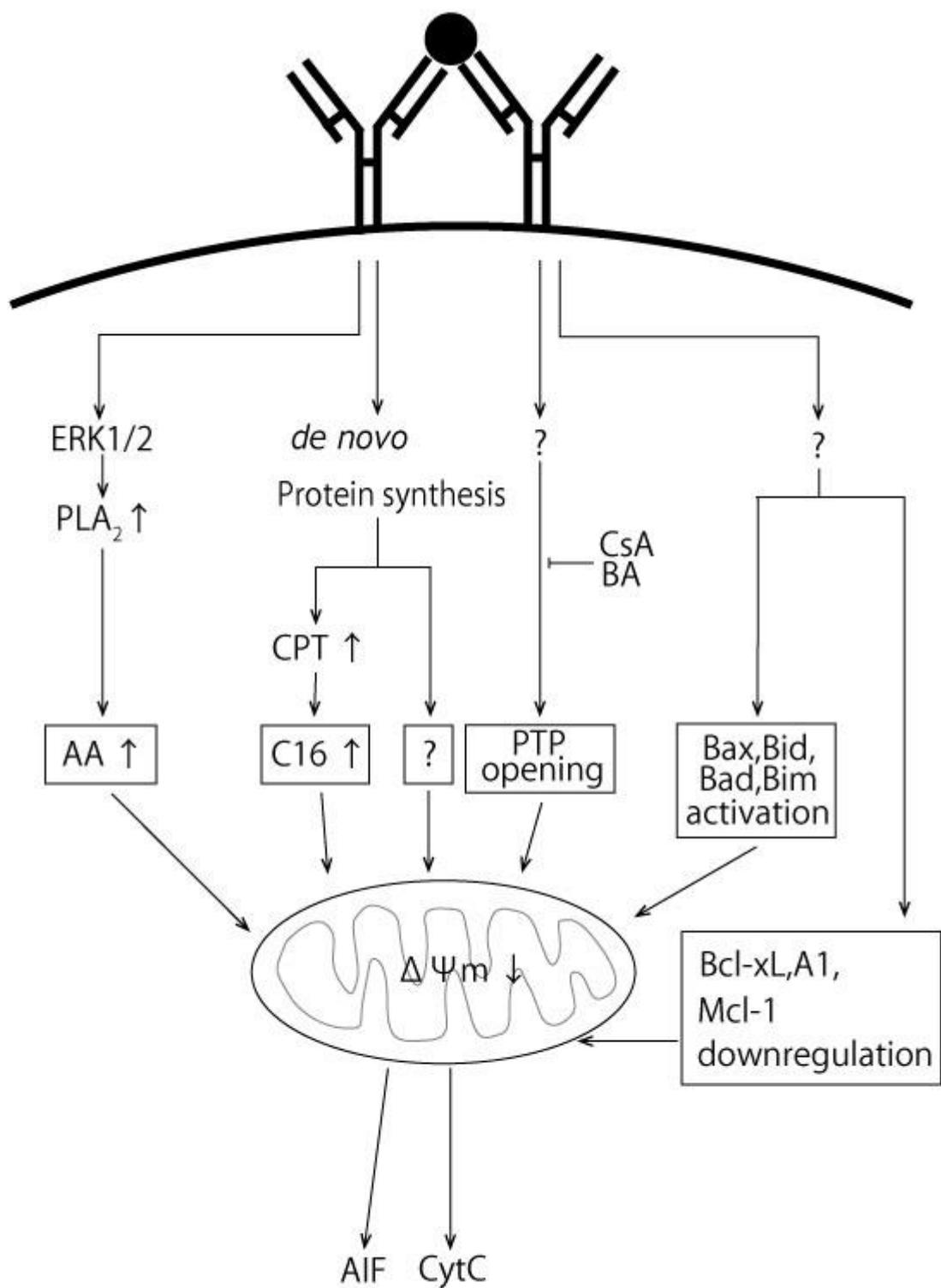


図4 ミトコンドリア膜電位低下を引き起こす分子メカニズム

## 5. Protein kinase

### 5.1 Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMKII)

ホルモンや神経伝達物質をはじめとする種々のシグナル分子は、細胞表面の受容体に結合し、細胞内のセカンドメッセンジャーを活性化することによって、細胞に様々な反応を引き起こす。中でも細胞内のカルシウムイオン(Ca<sup>2+</sup>)増加とそれに引き続くプロテインキナーゼの活性化は、脳内ではいくつもの重要な機能を担っている。そのうち特に重要な経路のひとつが、CaMKIIの活性化である。CaMKIIは神経細胞に豊富に存在し、神経伝達物質合成酵素やシナプス小胞結合蛋白、イオンチャネル、神経伝達物質受容体などをリン酸化することによって、それらタンパク機能を調節し、シナプス伝達の可塑性、さらには、学習・記憶をはじめとする高次脳機能に重要な役割を果たすと考えられている。CaMKIIは脳において現在知られているプロテインキナーゼの中で最も多量に存在し、学習記憶の中核である海馬には特に多く、また基質特異性が広く脳の多種類のタンパク質をリン酸化するセリン/スレオニンキナーゼである。構造的には6個のサブユニットが花のような形をとって重合した多量体が上下に2つに重なった12個のサブユニットからなる。CaMKIIには、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ の4つのアイソフォームがあり、 $\alpha$ 、 $\beta$ はほぼ脳特異的に、 $\gamma$ 、 $\delta$ はubiquitousに発現している。細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇によって活性化したカルモジュリン(Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン)が結合すると、その立体構造に変化が生じて、活性部位が露出し、ATP存在下で隣接するサブユニットの286番目のスレオニン残基のリン酸化(自己リン酸化)と基質タンパクのリン酸化を起こす。自己リン酸化を起こしたCaMKIIはCa<sup>2+</sup>/カルモジュリンをトラップし、活性化状態が一定期間持続することが知られている。脱リン酸化はプロテインホスファターゼによりなされる。

### 5.2 MAP kinase の分類

Mitogen-activated Protein KinaseはCMGC (CDK/MAPK/GSK3/CLK)キナーゼグループに属するセリン/スレオニンキナーゼの一つであり、何らかの刺激(酸化ストレス、サイトカインなど)を受けて活性化される。全身の細胞に広く発現しており、様々な細胞の機能発現において重要な働きをしている。単にMAPキナーゼと略して呼ばれることが多い。

細胞外からの刺激が入ると低分子量G蛋白質であるRasが活性化され、さらにその下流に続くシグナルカスケードの活性化が引き起こされる。また、MAPKホスファターゼ(MAPK Phosphatase; MKP)による脱リン酸化がMAPKを不活性化し、この機構に対して抑制的に働いている。狭義には細胞外シグナル調節キナーゼ(Extracellular signal-Regulated Kinase; ERK) 1/2のみを指すが、広義にはこれに加えてc-jun N-terminal Kinase(JNK)、p38 MAPK、ERK5およびERK7等の分子をも含み、MAPKファミリーとも呼ばれる。

### 5.3 c-Jun N-terminal Kinase(JNK)

JNKはc-Junの転写活性ドメイン中のSer63とSer73をリン酸化する活性を持つキナーゼとして同定された。JNKは放射線やリポ多糖(LPS)、浸透圧及び熱ショックなどの細胞傷害性ストレスやIL-1などの炎症性サイトカインにより活性化されるため、ストレス応答性MAPK

(Stress-Activated Protein Kinase; SAPK) とも呼ばれる。JNKが活性化される方法の一つとして、通常JNKの機能を抑制しているホスファターゼの構造が変化して抑制が外れる事が起こりうる。JNK遺伝子にはJNK1-3が存在する。JNK1, 2は全身の細胞に広く分布しているが、JNK3は主に神経系及び精巣において見られる。JNK1はIL-8やGM-CSFなどのAP-1 (Activated protein-1) を介して、アポトーシスや神経変性, 細胞の分化・増殖, 炎症性サイトカインの産生などの過程に関与している。JNKはリン酸化により、ミトコンドリア内に局在する様々な蛋白質や核内で働く蛋白質の機能修飾をしている。JNKは選択的阻害剤の1つであるSP600125によって阻害される。

## 6. Protein Phosphatase

プロテインホスファターゼ(PP)はリン酸化された蛋白質のリン酸基を加水分解することで脱リン酸化をする酵素である。蛋白質のリン酸化は蛋白質の翻訳後修飾のうち最も多くみられるもので、特に細胞内シグナル伝達に関与する蛋白質に多く、これらの蛋白質はリン酸化の有無によりスイッチとして働く。また、酵素の活性がリン酸化により調節されるものも多い。蛋白質はプロテインキナーゼ(Protein kinase; PK)によりリン酸化される。そのほとんどがセリン、スレオニン、チロシン残基のリン酸化であり、哺乳細胞においてはそれぞれ86%、12%、2%を占める。一方、プロテインホスファターゼはこれらのリン酸化蛋白質の脱リン酸化を行い、プロテインキナーゼの逆の機能を果たす。プロテインホスファターゼは、アミノ酸配列, 構造, 触媒機能によって分類される。

### 6.1 セリン/スレオニンホスファターゼ

リン酸化されたセリンやスレオニンを基質とし、脱リン酸化する機能を持つ。PP1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2)、PP2A、PP2B(カルシニューリン)、PP2C、PP4、PP5、PP6に分けられている。これらの中で、PP2A、PP4、PP6は配列・構造が非常に似ており、まとめてPP2Aサブファミリーに分類されている。セリン/スレオニンホスファターゼの数はこれまでに同定されているセリン/スレオニン・キナーゼと比較してはるかに少ない。そのため、セリン/スレオニンホスファターゼは、数多い種類のリン酸化された蛋白質を基質とし得るために様々な調節サブユニットと結合することによって数多くのホロ酵素型をつくっている。

### 6.2 Protein Phosphatase 6(PP6)

PP6はhuman PP2Aに56%の相同性がある新規の触媒サブユニットとして見つかった。さらに、PP6は、細胞周期調節セリン/スレオニンホスファターゼであるSit4 (*Saccharomyces cerevisiae*) とpp1 (*Schizosaccharomyces pombe*) にそれぞれ61%、68%のアミノ酸配列相同性があり、また機能的ホモログであることが示された。PP6は細胞周期以外に、細胞のアポトーシス、インターロイキンのシグナル伝達などに関与していることが示唆されているが、不明な点が多い。また、PP6は、B細胞などの免疫系細胞や精巣、腸での発現が他の組織に比べてはるかに高いことから、これらの組織で重要な働きをしていることが考えられる(図5)。

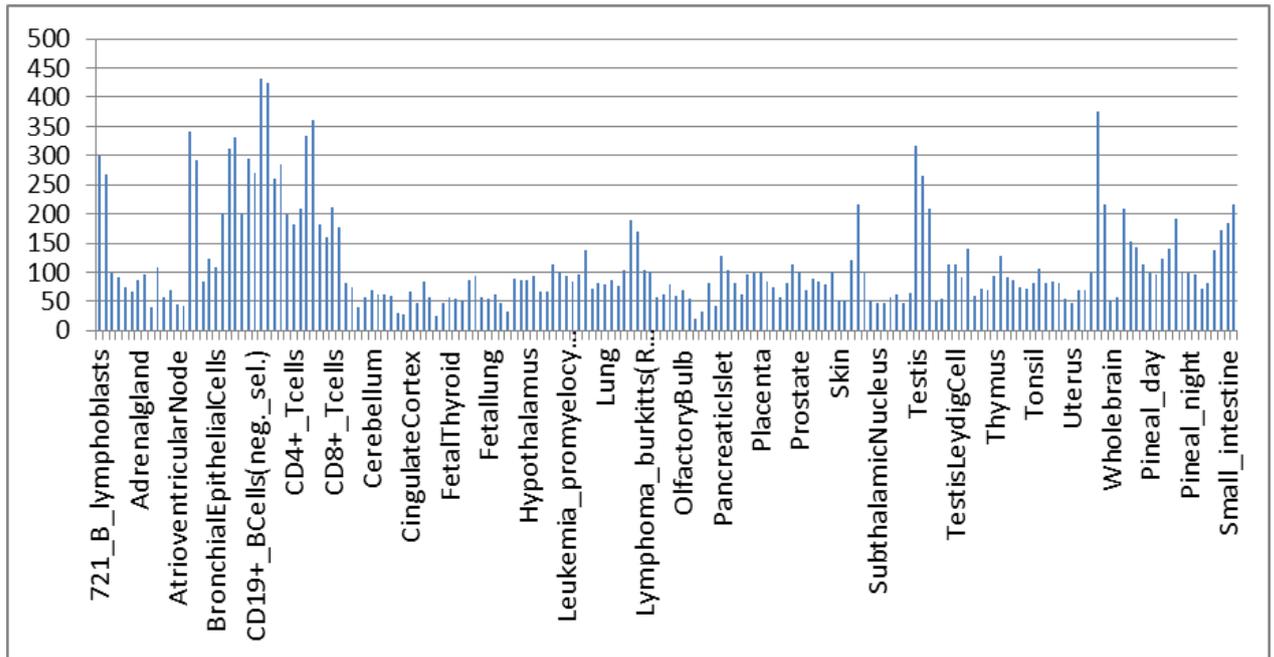


図5 PP6 mRNA expression pattern

## 7. p27

### 7.1 サイクリン、CDK、CDKインヒビター

真核細胞は一定の時間周期で有糸分裂 (mitosis) とDNA複製 (synthesis) を繰り返しており、この周期は細胞周期とよばれている。DNA複製によりDNAが倍加する時期をS期とよび、倍加したDNAが有糸分裂によって娘細胞に等分される時期をM期とよぶ。S期とM期の間の期間は間期 (gap) とよばれ、SからMに移る間をG2期、MからSに移る間をG1期という。増殖を停止している細胞はG1期にあるが、栄養や増殖因子などの条件が整うとS期に入り、G2、M期を経てG1期に戻る。栄養が絶たれたりすると、細胞は増殖を止めG1期で増殖を停止するが、この状態が長く続くとG0期という休眠状態に入ることもある。この細胞周期を駆動させているエンジンは、調節サブユニットであるサイクリンと、触媒サブユニットであるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の複合体の活性である。サイクリン/CDK複合体にはM期で主に働くものとS期で主に働くものがある。酵母ではこの場合のCDKは1種類であり、結合するサイクリンがM期とS期で異なるしくみになっている。それに対して、哺乳類ではM期とS期で働くCDKが異なり、M期ではCDK1、S期ではCDK2が、さらにG0-G1期ではCDK4/6が重要な役割を果たす。これらは、それぞれ特異的なサイクリンと結合し機能を発揮する。すなわち、CDK1はサイクリンAまたはB、CDK2はサイクリンAまたはE、CDK4/6はサイクリンDと協調する (図6)。

これらのサイクリン/CDKエンジンの異常は、無制限な細胞増殖を引き起こして腫瘍に至り、個体を殺すこともある。エンジンの暴走を起こさないようにブレーキ役を担っているのが、CDKインヒビター(CKI)である。

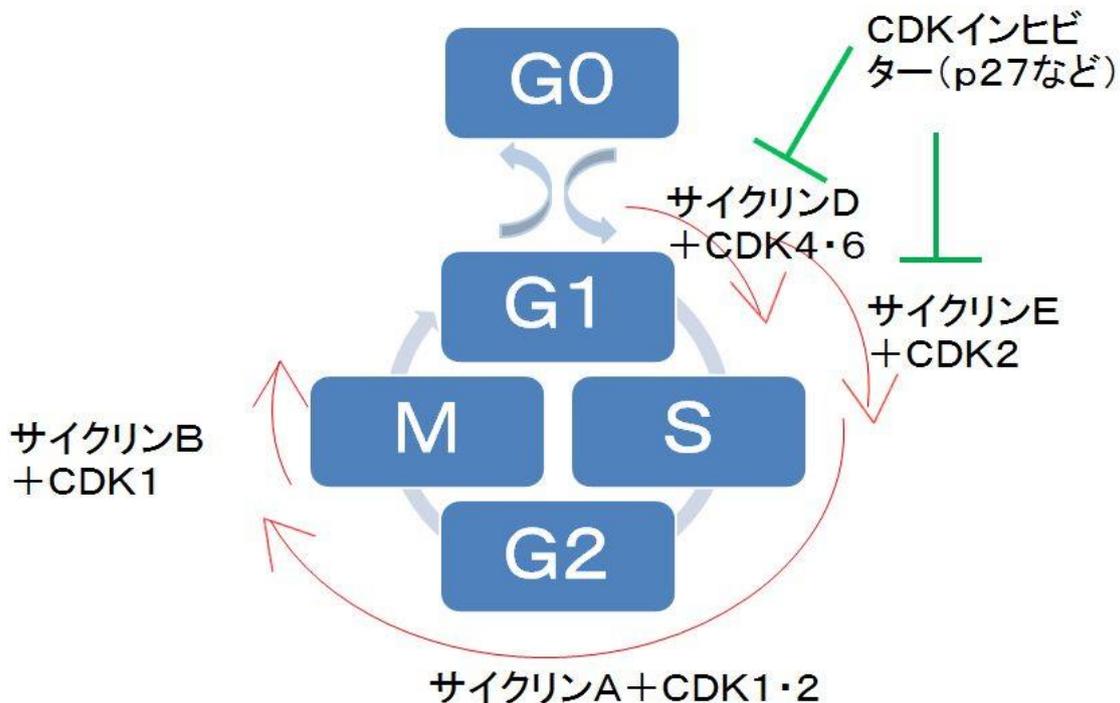


図6 細胞周期とサイクリン/CDK複合体

## 7.2 CDKインヒビター

CDKインヒビターは主に2つのファミリーに大別される。1つはINK4ファミリーと呼ばれ、サイクリンとは結合せず、CDK4/6のみと結合し、したがって初期のG1期に特異的である。もう1つはCip/Kipファミリーと呼ばれており、p21、p27などが有名である。これらはすべてのサイクリン/CDK複合体に対してその活性を抑制しうる。しかしながら、それらの発現時期や抑制活性の程度から、細胞内では主にサイクリンE/CDK2複合体の活性を抑制し、細胞のS期への進行を阻害していると考えられている

## 7.3 p27

p27は染色体12p13-p12部位からポジショナルクローニング法により単離され、CDK2とサイクリンEの複合体(サイクリンE/CDK2)に結合し、キナーゼ活性を抑制することが示された。この遺伝子の発現は、TGF-βによるG1期停止や接触阻止に関与することが知られている。生理的ATPレベル存在下でサイクリンE/CDK2を発現させた場合、p27の187番目のスレオニンがリン酸化され、p27は分解される。この結果、細胞周期はG1期からS期へと進展する。一方、10番目のセリンがリン酸化されると、核内から細胞質へのp27の移行がおき、また、安定性が高まり分解されにくくなる。

#### 7.4 CKI以外の役割をもつCip/Kipファミリー

CDKインヒビターの研究が進むにつれて、最近ではCip/KipファミリーはCKIとしての役割以外の機能をもつことが分かってきた。新しい機能としてassembly factor、アポトーシスの制御、細胞遊走の制御または転写因子として働くことが知られている。

#### 7.5 Cip/Kipタンパク質の細胞内局在の変化

サイクリン/CDK複合体は核内で機能しているので、Cip/KipファミリーがCKIとして働くためには、核内に局在することが必要である。p21とp27はC末端側に存在する核移行シグナルにより核内に移行するが、核膜孔結合タンパク質Nup/mNPAP60との結合もまたp27の核内移行に重要な役割を果たしていることが分かっている。

しかしながら、Cip/Kipタンパク質がassembly factor、アポトーシスの制御、細胞遊走制御として機能するときには、これらのタンパク質が細胞質に存在していることが重要であることが示唆されており、また、p27は増殖刺激により10番目のセリン残基(S10)がリン酸化され、核外移行トランスポーターであるCRM1と結合して、細胞質に移行することが知られている。また、S10のリン酸化は、p27の安定性を上昇させ、分解されにくくすることが報告されている。

### 8. ユビキチン/プロテアソーム系

ユビキチン(ubiquitin)は76個のアミノ酸からなる蛋白質で、至る所にある(ubiquitous)ことからこの名前が付いた。ヒストンの翻訳後修飾分子として発見されたが、現在では他の蛋白質の修飾にも用いられ、蛋白質分解、DNA修復、翻訳調節、シグナル伝達など機能は幅広い。また、真核生物で高度に保存されており、ヒトと酵母の相同性は96%である。標的蛋白質に対するユビキチンの付加はユビキチンシステムと呼ばれ、3つの酵素、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、さらにユビキチン転移酵素(ユビキチンリガーゼ)(E3)によって行われる、ATP依存性の反応である。E1は、ユビキチンとチオエステル結合を形成する。この反応により、それに続くユビキチンとE2の結合を可能にし、さらに、基質蛋白質上のリジン残基とユビキチンのC末端のグリシン間でのイソペプチド結合を形成する。このイソペプチド結合反応には、E3が必要となる。E3は単量体もしくは多量体サブユニット酵素である。ある場合には、各々のポリペプチドにある、ユビキチン結合領域および基質結合領域上のアミノ酸残基が、アダプター蛋白質やキュリンによって連結される。E3には多種あり、それらが基質特異性を規定しており、それぞれのE3が対応する基質蛋白質のサブセットのみ修飾する。さらに、リン酸化による蛋白質の翻訳後修飾がユビキチン化の引き金になる場合もある(図7)。

ポリユビキチン化は以下のように行われる。標的蛋白質のリジン(K)の側鎖のアミノ基(-NH<sub>2</sub>)とユビキチンのグリシン(G)の側鎖のカルボキシル基(-COOH)がイソペプチド結合することで一つのユビキチンが付加され、更にそのユビキチンの中のリジンの側鎖に更に次のユビキチンが付加する、という順に複数のユビキチンが次々と付加されることがわかっている。ユビキチンは7つのリジン残基を持ち、特に、蛋白質の分解に関与するリジン残基はK48である。多量体サブユニット構造を有する26Sプロテアソームは、K48ユビキチンが4つ以上付加された基質を認識し、フォールディング解除後ペプチドに分解する(ユビキチン/プロテアソーム系)。この反応

はプロテアソームの円筒構造の中心内で起こり、触媒中心のスレオニン残基がペプチド結合の水解反応における求電子剤として機能する。また、一度標的蛋白質に結合してプロテアソームに取り込まれたユビキチンは、脱ユビキチン化酵素(DUB)によって基質から除去され、再利用される。またユビキチン化はシグナル伝達やクロマチンの修飾にも用いられる。ユビキチン化はフォールディングが異常な蛋白質(ミスフォールド蛋白質)や不要になった蛋白質を細胞から除去するためにも重要な役割を持っており、このシステムを蛋白質の品質管理と呼ぶ。新生蛋白質の約30%がミスフォールディング蛋白質であると言われており、これらをhsp90等の分子シャペロンが修復しようと試みる。修復が不可能なほど蛋白質の構造が異常なときには小胞体から細胞質に輸送され、分子シャペロンによって品質管理ユビキチンリガーゼとして働く C-terminus of Hsc-70-interacting protein(CHIP)などへと運ばれた後にユビキチン化を受け、分解される。これらの機構を小胞体関連分解(Endoplasmic Reticulum-associated degradation; ERAD)と呼ぶ。

近年、ユビキチン-プロテアソーム系はMHC class I分子を介した細胞内由来蛋白質のCD8陽性T細胞への提示にも関与していることが明らかとなっている。抗原提示細胞の細胞質中にある、または細胞質中に取り込まれた蛋白質(ペプチド)はユビキチン/プロテアソーム系により短いペプチド断片へと分解された後に、小胞体(ER)上のTAPを介してER内にとりこまれ、ER内の MHC class I分子と会合し、細胞表面に輸送されてT細胞エピトープとして提示される。

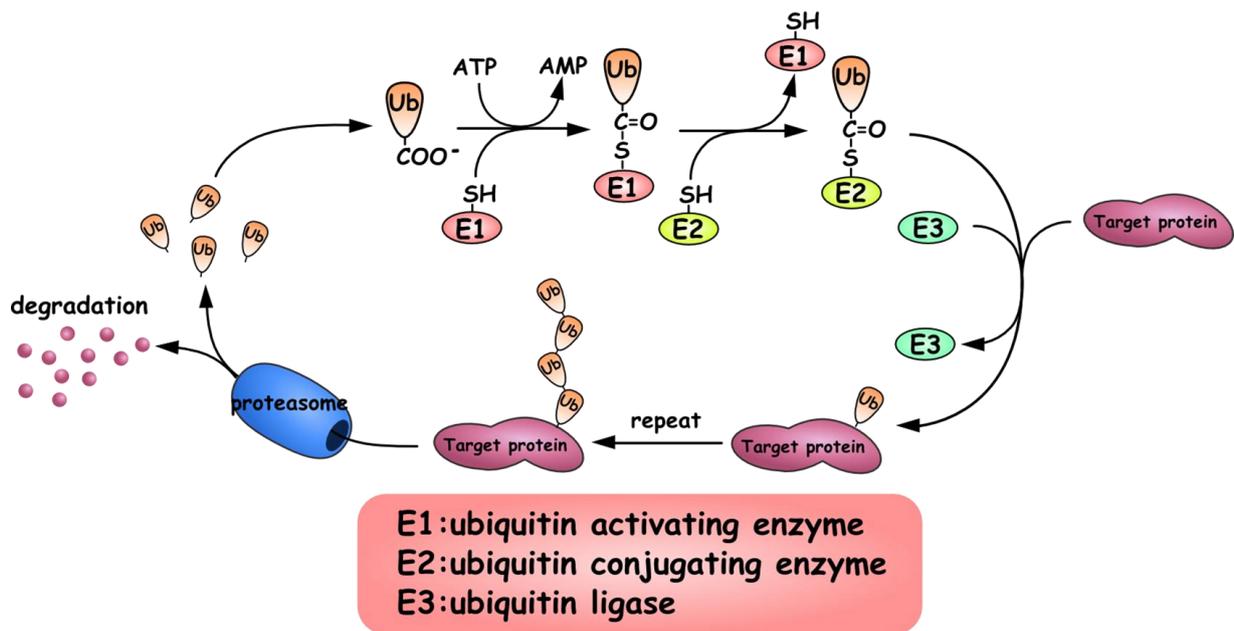


図7 ユビキチン-プロテアソーム系

## 9. 本研究の目的

セリン・スレオニン脱リン酸化酵素は細胞周期のコントロール・代謝などを調節することが知られている。PP2A, PP4, PP6 は共通の構造を持ち 1つのサブクラスを形成している。シグナル伝達分子 alpha4 は PP2A, PP4, PP6 すべての分子と結合しその酵素活性を制御する。alpha4 はリンパ球の抗原レセプターシグナル伝達経路に関与しリンパ球の活性化、抗体産生などを調節している。B 細胞または T 細胞特異的な alpha4 の遺伝子破壊マウスを用いた実験から、alpha4 がリンパ球の生存・増殖に必須の分子であることが明らかとなっている。さらに alpha4 を神経系で遺伝子破壊すると記憶・学習が障害されることを明らかとしてきた。記憶・学習のシステムでは PP2A が重要なはたらきをし、alpha4 と PP2A が CAMKII と結合し、酵素活性を制御することが示された。PP2A はほとんどすべての組織で発現しているが、PP6 は中枢神経系、心臓、免疫系を中心に発現することが報告されている。また、PP6 は human PP2A に 56%の相同性がある触媒サブユニットである。さらに、PP6 は、細胞周期調節セリン/スレオニンホスファターゼである Sit4 (*Saccharomyces cerevisiae*) と pp1 (*Schizosaccharomyces pombe*) にそれぞれ 61%、68%のアミノ酸配列相同性があり、また機能的ホモログである。PP6 は細胞周期以外に、細胞のアポトーシス、インターロイキンのシグナル伝達などに関与していることが示唆されているが、不明な点が多い。そこで alpha4 が免疫系で PP6 を介して細胞生存およびアポトーシスを制御するメカニズムを解析する目的で PP6 機能を抑制する Dominant-Negative PP6 (DN-PP6) を作製した。

## [VI. 研究方法]

### 1. 細胞株と細胞培養

マウス未熟B細胞株 WEHI-231、ヒト胎児腎細胞株 HEK293T およびヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞は 5%CO<sub>2</sub>, 37°C の環境下で 10% Fatal bovine serum (HyCLONE)、2mM L-Glutamine (GIBCO)、100 μg/ml streptomycin、100U/ml penicillin、5x10<sup>-5</sup>M 2-mercaptoethanol を加えた Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium (IMDM) (GIBCO) で培養した。

### 2. 抗体と試薬

Anti-phosphothreonine antibodyはZYMED (San Francisco, CA) から、Anti-FLAG M2 antibodyはStratagene (La Jolla, CA) から、抗p27抗体、抗α-チューブリン抗体はSigma chemical company (St. Louis, MO) から、抗ヒストンH3抗体はCell Signaling Technology (Danvers, MA) から、抗Bcl-xL抗体はBD Bioscience (Franklin Lakes, NJ) から、Fluorescein isothiocyanate-annexin V (FITC-annexin V)、7-amino-actinomycin D (7-AAD)、TNF、A23187、cycloheximide (CHX)はWako Pure Chemical Industries (Tokyo, Japan) から、Anti-phosphoCaMKII抗体、pCMV active CaMK II δ cDNAは福永浩司先生 (東北大学大学院・薬学研究科教授) より御供与頂いた。抗FLAG抗体 (抗DYKDDDDK tag抗体)はWako Pure Chemistry Industries (Osaka, Japan) から、抗Ubiquitin抗体 Lys48-Specific, clone Apu2はMILLIPORE (Billerica, MA) から、抗Bcl-xL (ab2568) 抗体はabcam (Cambridge, UK) から購入した、SP600125はWako Pure Chemistry Industries (Osaka, Japan) より購入した。

### 3. 生細胞数測定 (Cell Counting Kit-8) 法

対数増殖期にある細胞を1x10<sup>5</sup> cells/wellで96 well micro plateを用いて48時間培養した。抗マウスIgM抗体を加えて24時間刺激したのち、生細胞数をCell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto Japan) で測定した。CCK-8は吸光度測定の前3時間前に加えた。吸光度はEnzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) プレートリーダー (Bio-Rad) にて波長450nmで測定した。

### 4. フローサイトメトリーによるアポトーシス解析

対数増殖期にある細胞を1x10<sup>5</sup> cells/wellで24ウェルマイクロプレートで48時間培養した。TNFとcycloheximideを加え、6時間刺激した。FITC-annexin V / 7-AAD二重染色アッセイを行った。細胞をトリプシン処理にてプレートから回収し、2回PBSで洗浄後、200 μlのbinding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) に再浮遊させた。これにFITC-annexin Vを加え、氷上・遮光で20分インキュベートし、続いて7-AADを加え、さらに5分インキュベートした。このサンプルを直ちにFACSCalibur flow cytometerを用いて解析した。

### 5. トランスフェクション及びGST融合タンパク質精製に用いるcDNAの作成

野生型PP6 cDNAはヒトB細胞腫細胞株RPMI 1866のmRNAから、オリゴdTプライマーを用いた逆転写反応後に、PCR法にて用意した。PCR増幅には5' -GGGGATCCAAATGGCGCGCTAGACCTGGACA-3' と 5'

-GGGAATTCTCAAAGGAAATATGGCGTTGTCGTT-3' のプライマーを用いた (EMBL accession No. X92972)。この増幅産物は、pCMV-Tag2ベクターに組み込んだ。Dominant-negative form PP6 (DN-PP6) cDNAは次のようにして作成した。DN-PP6 cDNAの5' 部分の増幅には5' -GGGGATCCAAATGGCGCCGCTAGACCTGGACA-3' と5' -GGGTCGACATCTTCAGGATCTGACCAAACCGGATCACA-3' のプライマーを用いた。DN-PP6 cDNAの3' 部分の増幅には5' -GGGTCGACACCTGGGCTATCAGTCCCCGAGGA-3' と5' -GGGAATTCTCAAAGGAAATATGGCGTTGTCGTT-3' のプライマーを用いた。これらのフラグメントをそれぞれBamHI/SalI、SalI/EcoRIで切断したのち、これらをライゲーションさせて、pCMV-Tag2ベクターに組み込んだ。野生型p27とS10A-p27 (10番目のセリンをアラニンに置換した変異型p27) のcDNAはヒトp27 cDNA (九州大学、中山敬一より御供与頂いた) をテンプレートにしてPCR法にて作成した。5' -GGGGATCCCATGTCAAACGTGCGAGTGTCT-3' と5' -GGGGATCCCATGTCAAACGTGCGAGTGTCTAACGGGGCCCCTAGCCTG-3' をそれぞれ野生型p27、S10A-p27のフォワードプライマーとして用いた。5' -GGGAATTCTTACGTTTGACGTCTTCTGAGGCC-3' は共通のリバースプライマーとして用いた。これらのcDNAはpGEX3Xベクターにそれぞれ組み込んだ。作成したすべてのcDNAはヌクレオチドシーケンス法にて配列を確認した。cDNAはLipofectamine (Stratagene) を用いてHeLa細胞にトランスフェクションした。GST融合タンパク質はグルタチオンセファロースによるアフィニティークロマトグラフィー法にて精製した。

## 6. Mutagenesis

pCAGGS-Kozak-FLAG-Bcl-xL cDNAを鋳型とし、PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa Bio Inc.) を用いてBcl-xL Ser62をアラニンまたはアスパラギン酸に置換したミュータントを作製した。PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kitは、プラスミドを鋳型に5' 側が15塩基オーバーラップした変異導入用プライマーを用いて外向きにPCR増幅を行うことで、オーバーラップ部分が5' 突出したPCR産物が得られる。この増幅産物は形質転換可能な環状構造をとることが可能である。このシステムでは、オーバーラップ部分に変異を導入したプライマーとPrimeSTAR Max、サーマルサイクラーを用いてPCRを行い、増幅したPCR産物で直接大腸菌を形質転換する方法で変異導入体を取得した。適切なPCR増幅産物が形質転換可能な環状構造をとるため、ライゲーション反応や増幅断片のゲルからの回収は不要である。狙った部位のみに確実に変異を導入でき、目的部位以外にPCRエラーが入ることはほとんどない。

## 7. トランスフェクション

マウス未熟B細胞株WEHI-231に関してはGene-Pulser II (Bio-Rad) を用い、250V、960  $\mu$ Fの条件でエレクトロポレーションを行った。ヒト胎児腎細胞株HEK293Tに関してはPolyFect (QIAGEN) を用いて、cDNAをトランスフェクションした。

## 8. Western Blot Analysis

RIPA buffer [0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 1% NP-40, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH8.0), 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin] でWEHI-231およびHEK293Tをvortexにて破碎し氷上で20分間インキュベーション後、13,000rpm/分、20分間遠心し、可溶分画を回収した。こ

の可溶分画は2xSDS Sample Buffer [0.125M Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 20% glycerol, 0.002% BPB, 10% 2-mercaptoethanol]と1:1で混合した。SDS-PAGEポリアクリルアミドゲルは、10% Running Gel [0.375M Tris-HCl (pH8.8), 10% Acrylamide, 1% SDS, 0.5% Ammonium persulfate (APS), 0.05% N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)]にStacking Gel [0.125M Tris-HCl (pH6.8), 3.9% Acrylamide, 1% SDS, 0.5% Ammonium persulfate (APS), 0.1% N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)]を重層し作成した。電気泳動はRunning Buffer [0.025M Tris, 0.2M Glycine, 1% SDS]中で200V, 室温, 45分間行った。SDS-PAGEによって分離された蛋白質を、電気ブロットティング装置を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell) にブロットした。ブロットティングはTransfer Buffer [0.025M Tris, 0.2M Glycine, 20% メタノール]中で100V, 4°C, 60分間行った。トランスファー後の膜をブロッキング溶液 [5% スキムミルク, TBS-0.1% Tween20] 中で1時間インキュベート後、一次抗体を加えて1時間インキュベートした。TBS-0.1% Tween20で15分1回、5分2回洗浄後、horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体中で1時間インキュベートした。TBS-0.1% Tween20で15分1回、5分4回洗浄後、Amersham ECLウエスタンブロットティングキット (GE Healthcare) を用いてシグナルをX線フィルムに露光して検出した。

#### 9. 免疫沈降

0.1%CHAPS-KA溶液 [25mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 15mM NaPPi, 100mM beta-glycerophosphate, 25mM NaF, 0.1% CHAPS, 0.05% NaN<sub>3</sub>, 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM PMSF, 10 μg/ml aprotinin]にWEHI-231およびHEK293Tを氷上で15分間インキュベーション後、13,000rpm/分、20分間遠心し、可溶分画を回収した。調整した細胞抽出液 (1x10<sup>7</sup> cells相当)に目的蛋白質の沈降抗体を加え、4°C、一晩ローテートする。沈降抗体に合わせて、Protein G-Sepharose (Pharmacia)を加えて免疫複合体を沈降した。0.1%CHAPS-KA溶液で4回洗浄し30 μlの2xSDS Sample Buffer [0.125M Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 20% glycerol, 0.002% BPB, 10% 2-ME]に溶解し5分間煮沸して免疫複合体を抽出した。抽出した試料はSDS-PAGE (SDS変性10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で泳動後、ウエスタンブロットティングで検出した。

#### 10. CaMKIIによるp27のin vitroリン酸化アッセイ

GST-p27およびGST-S10A-p27 (各3 μg/tube) に、40 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、100 μM ATP ([γ-32P]ATP 2.5 μCi/tube; specific activity 30 Ci/mmol; Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA)を終容量0.2 mlになるように反応液を調整した。さらに、Ca<sup>2+</sup>/CaM依存性反応には1 mM CaCl<sub>2</sub>と0.12 μM カルモジュリンを加え、Ca<sup>2+</sup>/CaM非依存性反応には1 mM EGTAを加えた。精製CaMKII (0.08 μg/tube)を各反応液に加えることによりリン酸化反応を開始させた。30°C、4分間インキュベートさせた後、SDS sample bufferを加え、3分間煮沸することにより反応を停止させた。リン酸化p27は、7.5%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGE法により分離させ後、Coomassie brilliant blue (CBB) 染色およびX線フィルムに感光させた。

## [VII. 研究結果]

### 1. DN-PP6 cDNA の作成

PP6 はセリン/スレオニンホスファターゼのひとつであり、PP2A, PP4, PP6 は共通の構造を持ち 1つのサブクラスを形成している。数多くの PP2Ac 変異体が報告されており、その中のいくつかは強い dominant negative 活性を有している。すでに PP2Ac の結晶構造は報告されているが、PP6 の結晶構造解析は解明されていない。しかしながら、PP2Ac と PP6 のアミノ酸一次構造の高い類似性から、PP6 も同様の立体構造を有していることが推測される。PP2Ac 変異体の一つに 199 番目のロイシン残基がプロリン残基に置換しているものがあり、これは非常に強い dominant negative 活性をもっている。PP2Ac の 199 番目のロイシン残基周辺のアミノ酸配列は PP6 との間で保存されている (図 8A)。したがって、PP2Ac の 199 番目に対応する PP6 の 194 番目のロイシン残基をプロリン残基へ置換した変異型 PP6 (L194P) は同様な dominant negative 活性を持つことが予想される。「実験方法」に記載した方法でロイシン残基をプロリン残基に置換した。作成した変異型 PP6 が実際に dominant negative 活性を持つかを調べるために 293T 細胞に cDNA をトランスフェクションした。PP6 は基質を脱リン酸化することができるので、変異型 PP6 を発現させた細胞 (変異型 PP6 トランスフェクタント) と野生型細胞の細胞溶解物を抗ホスホスレオニン抗体でウエスタンブロットした。予測した通り、変異型 PP6 トランスフェクタントの方が野生型細胞に比べてリン酸化されたタンパク質が多くなっていた (図 8B)。そのなかで 55kDa の分子に注目した。CaMKII は、中枢神経系で  $\alpha 4$  と PP2Ac と結合して活性を調節されているので、先の 55kDa の分子は CaMKII ではないかと推測した。図 8B に示す通り、55kDa の分子は抗 phospho-CaMKII 抗体で認識された。なお、CaMKII はリン酸化されると活性が上昇することが知られている。図 8C では、免疫沈降法にて CaMKII と PP6 および変異型 PP6 と結合することを示した。これらの結果から、L194P 変異型 PP6 は実際に dominant negative form (DN-PP6) として働き、かつ CaMKII と結合することが示唆された。

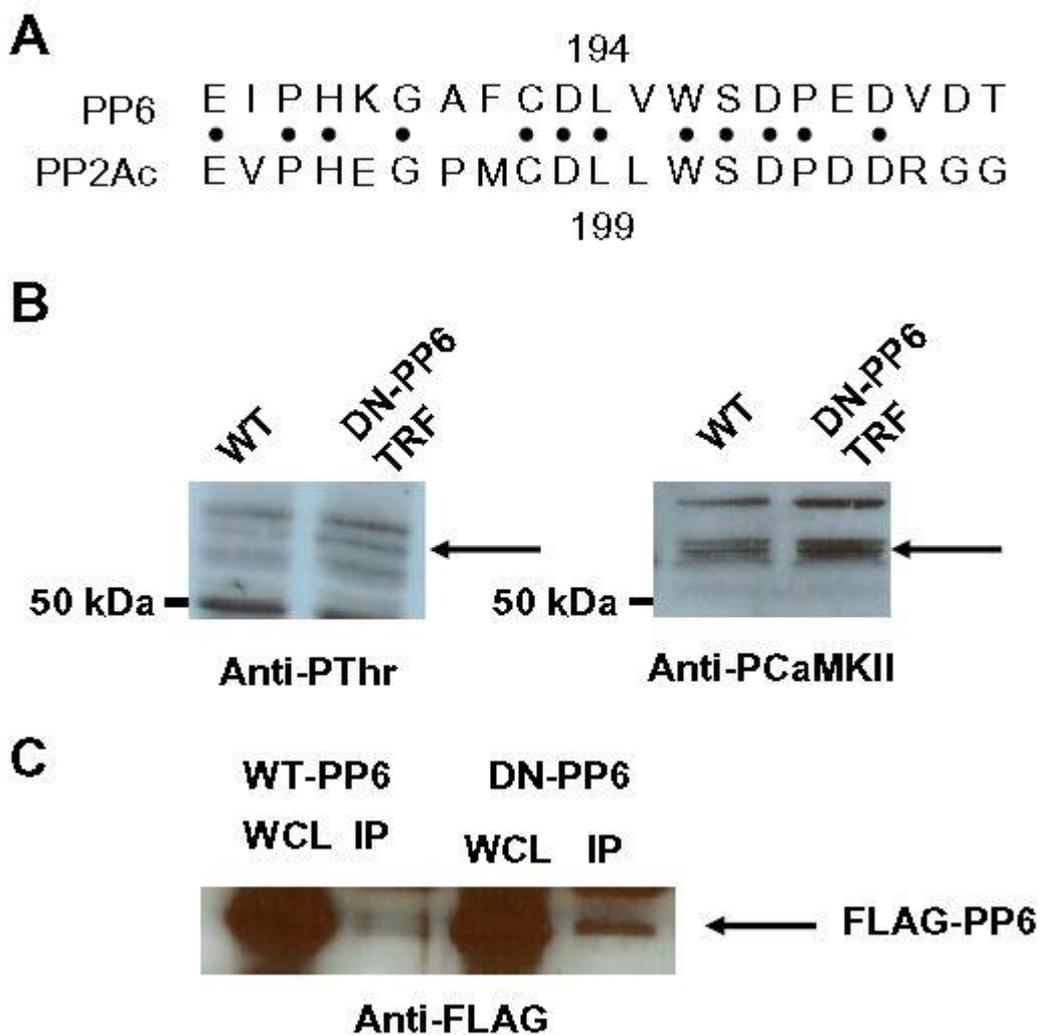


図8 dominant negative 変異型 PP6 の作成 (A) PP6 と PP2Ac の予測アミノ酸配列。同一アミノ酸残基は2つの配列の間に点(・)で示してある。PP6 と PP2Ac に保存されているロイシン残基には、番号を記した。(B) 293T 細胞に変異型 PP6 とコントロールベクターをトランスフェクションした。これらの細胞は、anti-phosphothreonine antibody または anti-phosphoCaMKII antibody にてウエスタンブロットにて解析した。(C) CaMKII は野生型および DN 変異型 PP6 に結合する。293T 細胞に、CaMKII cDNA と野生型または DN 変異型 PP6 cDNA を共トランスフェクションした。ライゼートを anti-CaMKII antibody にて免疫沈降したのち、anti-FLAG antibody にて FLAG-PP6 をブロットした。

2. DN-PP6 を発現させた HeLa 細胞はアポトーシスに抵抗性を示す

DN-PP6 のアポトーシスにおける機能を調べるために、HeLa 細胞に DN-PP6 cDNA をトランスフェクションした。抗 PP6 および抗 FLAG 抗体にて、#6 と #7 のトランスフェクタントに DN-PP6 が発現したことを確認した (図 9A)。DN-PP6 トランスフェクタントの内在性 PP6 発現量は変化していなかった (未記載データ)。ネガティブコントロールとして、コントロールベクターを発現しているクローンを用いた (#4、#5)。TNF と cycloheximide を用いてアポトーシスを誘導した。CCK-8 アッセイを行った結果、野生型 HeLa 細胞は約 40% の生細胞数減少がみられた。ネガティブコントロールでも同様の結果を得た。DN-PP6 トランスフェクタントの生細胞数減少は約 20%にとどまり、野生型およびネガティブコントロール細胞より低くなった (図 9B)。トリパンブルー染色試験においても、PP6 トランスフェクタントがアポトーシス耐性となっていた (図 9C; 50ng/ml TNF 刺激において、DN-PP6 生存率は約 93%、コントロール細胞では 73%)。フローサイトメトリーによる解析においても、DN-PP6 トランスフェクタントがアポトーシス耐性になっていることを確かめた。図 9D では、TNF と CHX 刺激後にネガティブコントロール細胞が約 44% が初期アポトーシスを起こしていることを示した。対して、DN-PP6 トランスフェクタントでは 21% しか初期アポトーシスを起こさなかった (図 9D)。これらの結果は、DN-PP6 過剰発現は HeLa 細胞にアポトーシス耐性能を与えることを示す。

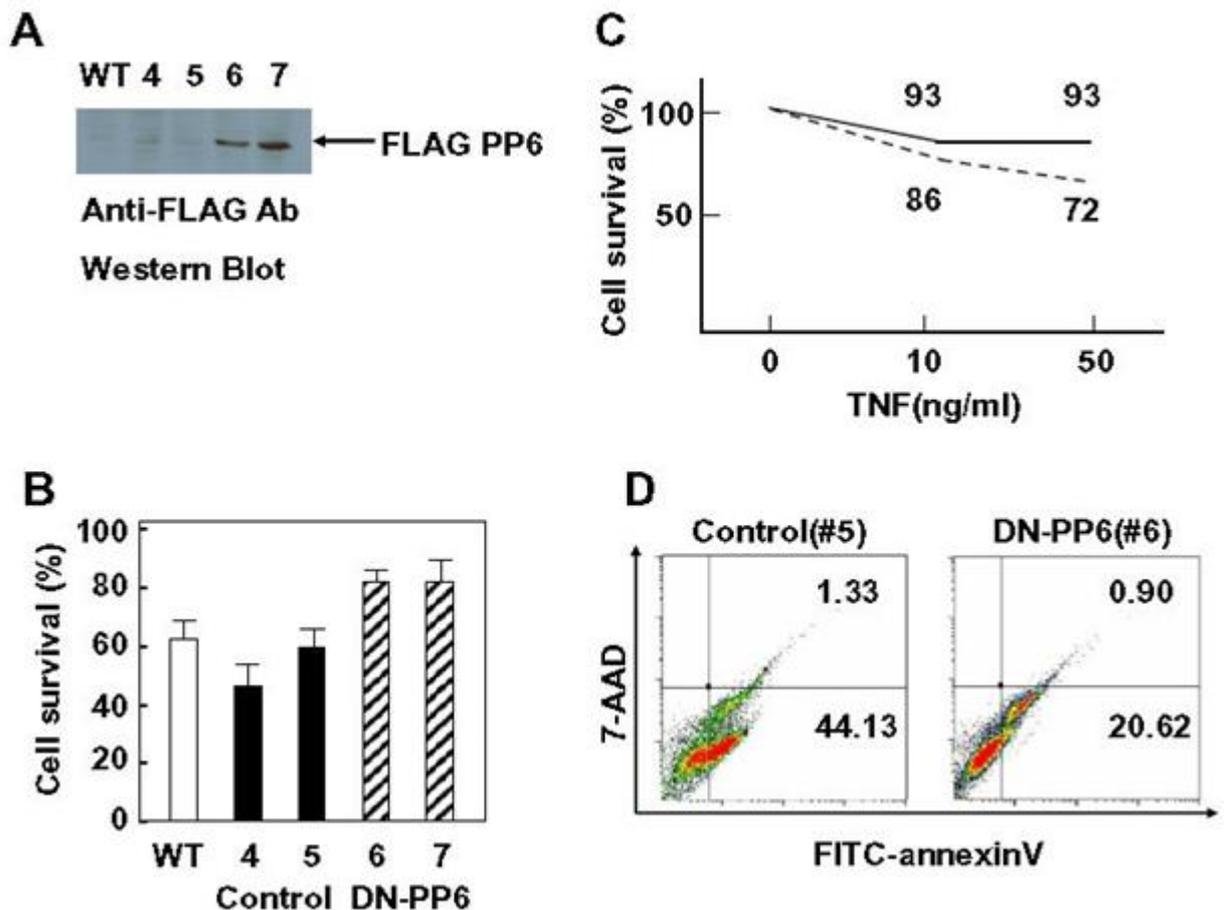


図 9 DN-PP6 の発現により、HeLa 細胞はアポトーシス耐性となる。(A) トランスフェクタン

ト No. 6 と No. 7 で FLAG 標識 DN-PP6 の発現をウエスタンブロットで確認した。(B) 野生型 HeLa 細胞とトランスフェクタントを TNF と CHX によってアポトーシス誘導した。細胞生存率は CCK8 アッセイによって測定した。野生型 HeLa 細胞 (open bar), コントロールトランスフェクタント (black bar), DN-PP6 トランスフェクタント (hatched bar)。(C) 細胞を各濃度の TNF と CHX によって刺激した。生細胞数と死細胞数はトリパンブルー染色にて計数した。(D) 細胞を TNF と CHX にて処理後、FITC-annexin V と 7-AAD の二重染色を行い、フローサイトメトリーにて解析した。

### 3. DN-PP6 トランスフェクタントでは、CaMKII によって p27 発現量が増加していた

PP6 は細胞周期にも関係していることが知られている。そこで、PP6 トランスフェクタントのアポトーシス耐性メカニズムを解析する目的で、CDK インヒビターである p27 およびアポトーシス関連分子群の発現量を調べた。DN-PP6 トランスフェクタントの p27 発現量は野生型細胞にくらべて、TNF と CHX 刺激前後で増加していた (図 10A)。また、野生型細胞では、TNF と CHX 刺激後に Bcl-xL の発現量が減少していたのに対し、DN-PP6 では刺激後の減少が見られなかった (図 10A)。その他のアポトーシス関連分子は野生型と DN-PP6 トランスフェクタント間で有意な差は見られなかった (未記載データ)。CaMKII を活性化するカルシウムイオノフォア A23187 で細胞を刺激すると、p27 の発現量が上昇した (図 10B)。HeLa 細胞に一過性に CaMKII を過剰発現させても同様に p27 が増加した (図 10C)。CaMKII と p27 の物理的な結合の可能性が考えられるので、HeLa 細胞を用いて CaMKII と p27 の共沈実験を行った。CaMKII 免疫沈降物において p27 の共沈降がみられ、逆に、p27 免疫沈降物において CaMKII の共沈降がみられた (図 10D)。p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化が、p27 の安定性を高めて細胞内で分解されにくくするという報告があるので、CaMKII が p27 のセリン 10 番目をリン酸化するか調べた。野生型および S10A 変異型 p27 の GST 融合タンパク質は、実験方法に記載の方法で精製した。それぞれの GST 融合タンパク質を in vitro での CaMKII によるリン酸化アッセイに用いた。野生型 p27 では CaMKII による強いリン酸化がみられたのに比べ、S10A 変異型 p27 ではリン酸化の程度が小さくなっていた (図 11A)。

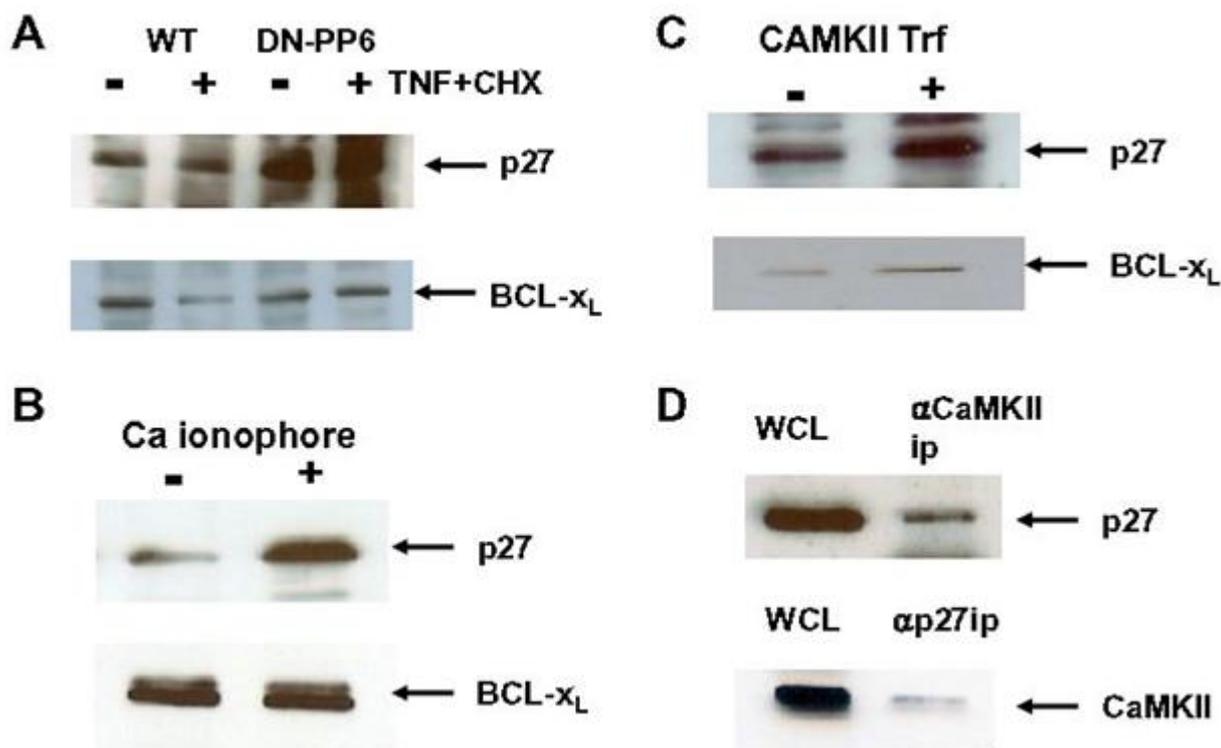


図 10 DN-PP6 トランスフェクタントでは p27 の発現レベルが上昇している。(A)DN-PP6 トランスフェクタントでは p27 の発現量が上昇しており、また、TNF と CHX 刺激後の Bcl-xL の減少が抑えられた。(B)HeLa 細胞をカルシウムイオノフォア A23187 にて 1h 刺激後、p27 および Bcl-xL のウエスタンブロットを行った。刺激した細胞では、p27 の上昇がみられた。(C)CaMKII cDNA を HeLa 細胞にトランスフェクションした。24H 培養後、p27 と Bcl-xL のウエスタンブロットを行った。(D)CaMKII と p27 は結合する。HeLa 細胞に CaMKII と p27 を共トランスフェクションした。Anti-CaMKII または anti-p27 antibody にて免疫沈降後、それぞれ anti-p27 または anti-CaMKII antibody にてブロットした。

#### 4. p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化は、Bcl-xL の安定性を上昇させ、細胞をアポトーシス耐性にする

p27 が細胞のアポトーシス耐性に関与するかを調べるために野生型および S10A 変異型 p27 cDNA を HeLa 細胞にトランスフェクションした。野生型 p27 を発現したトランスフェクタントは、S10A トランスフェクタントおよび野生型 HeLa 細胞に比べてアポトーシスに対して耐性を示した (図 11B)。10 番目のセリンのリン酸化は p27 を核内から細胞質に移行させるのに必要であることが知られており、また細胞質内 p27 がアポトーシス制御因子として働くことが示唆されていた。しかしながら、細胞質内 p27 がどのようにしてアポトーシスを制御しているかは分かっていない。DN-PP6 トランスフェクタントでは p27 の発現量が上昇しており、さらに Bcl-xL の発現も上昇していたので、細胞質内 p27 が Bcl-xL の安定性に関与しているかを調べた。野生型 p27 および S10A 変異型 p27 トランスフェクタントを血清枯渇状態の培地で 24

時間培養した。その後、野生型 p27 を核内から細胞質へ移行させるために、20% FCS 存在下の培地で 8 時間培養した。それぞれのトランスフェクタントからライセートを調製し、細胞質分画と核分画に分けた。野生型 p27 は細胞質分画、核分画ともに存在していた。一方、S10A 変異型 p27 は核外移行できないために、専ら核分画に局在していた (図 11C)。Bcl-xL は細胞質分画に局在していたが、野生型 p27 トランスフェクタントのみ Bcl-xL の発現が上昇していた (図 11C)。CaMKII が p27 の 10 番目のセリン残基をリン酸化して p27 発現量を上昇させたので、CaMKII の活性化および過剰発現が、Bcl-xL の発現量に影響を与えるかどうかを調べた。カルシウムイオノフォア処理では Bcl-xL 発現量に影響を与えなかったが、CaMKII の過剰発現により Bcl-xL の発現量が上昇した (図 11B, 11C)。これらのことは、CaMKII が p27 をリン酸化することを介して Bcl-xL 発現を増加させ、細胞をアポトーシス耐性にするを示す。

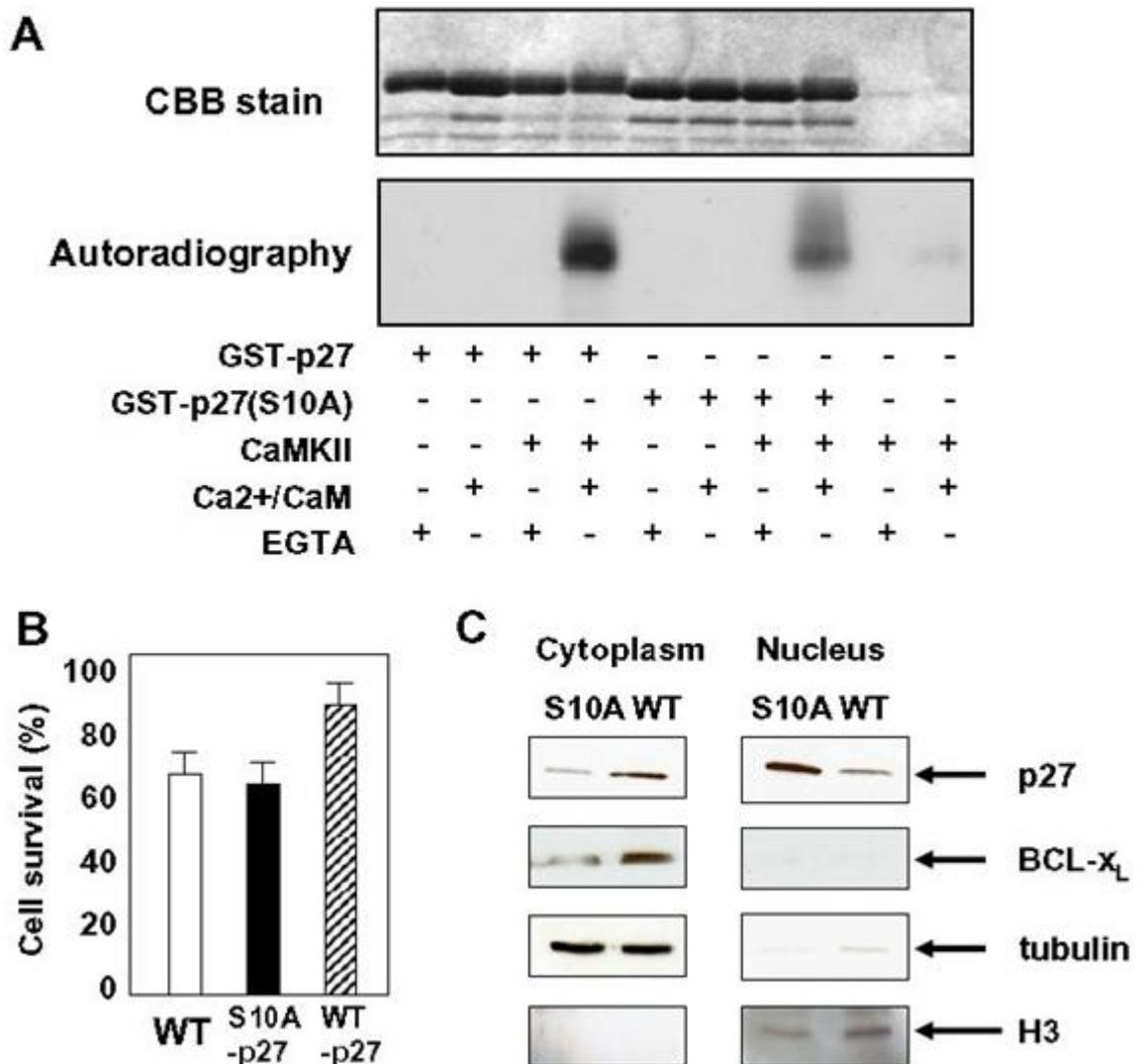


図 11 p27 は CaMKII によってリン酸化され、HeLa 細胞をアポトーシス抵抗性にする。(A) GST-p27 および GST-S10A 変異型 p27 を *in vitro* にて CaMKII でリン酸化させた。野生型 p27 は S10A 変異型 p27 に比べて著しくリン酸化された。(B) 野生型および S10A 変異型 p27 cDNA を HeLa 細胞にトランスフェクションして、TNF と CHX にてアポトーシスを誘導した。(C) S10A 変異型 p27 は Bcl-xL 量に変化を与えないが、野生型 p27 は Bcl-xL 量を上昇させる。野生型

p27 および S10A 変異型 p27 トランスフェクタントを FCS 枯渇状態にて 24h 培養後、20%FCS にて 6h 培養した。細胞ライゼートを核分画と細胞質分画に分離後、p27 と Bcl-xL をウエスタンブロットした。Anti- $\alpha$ -tubulin および anti-histone H3 antibody は、それぞれ細胞質または核分画の分離精度の指標として用いた。

次に、免疫系のネガティブセレクションにおけるアポトーシスのモデル細胞として、未熟 B 細胞株である WEHI-231 細胞を用いた実験を行った。

5. ラット抗マウス IgM モノクローナル抗体 M41 はアゴニスティックに WEHI-231 細胞の BCR を刺激し、アポトーシスを引き起こす

WEHI-231 細胞は BALB/c マウスと NZB マウスとの交雑 F1 マウスをミネラルオイル処理により誘発させた B リンパ腫由来の細胞株であり、未熟 B 細胞のように表面 IgM と抗イムノグロブリン試薬によるクロスリンクは WEHI-231 細胞が細胞周期の G0/G1 期に移行し、24-48 時間後にアポトーシスを引き起こす。この様に、抗原刺激により容易にアポトーシスに陥ることから未熟 B 細胞のモデルとしてアポトーシスの研究によく用いられている。我々の所有する M41 はマウス  $\mu$  鎖に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。モノクローナル抗体によっては認識するエピトープにより BCR をアゴニスティックに刺激するものもあれば、刺激しないものもある。そこで、M41 培養上清中から精製した抗体（以後、単に M41 と呼ぶ）が WEHI-231 細胞の BCR を刺激し、その結果アポトーシスを誘導するかを調べた。

WEHI-231 細胞を  $5 \times 10^4$ /well で 96 well plate に用意し、M41 は 0, 5, 10, 20  $\mu$ g/ml で 48 時間刺激した後 CCK-8 アッセイを行った。その結果、M41 0  $\mu$ g/ml のものを生存率 100%とすると、5  $\mu$ g/ml で刺激したものでは約 39%, 10  $\mu$ g/ml で刺激したものでは約 36%, 20  $\mu$ g/ml で刺激したものでは約 38%の生存率を示し、生細胞数が減少していることが示された(図 12)。

また、光学顕微鏡にて観察すると、M41 5, 10, 20  $\mu$ g/ml で刺激した WEHI-231 細胞は形態的に死んでいることを確認できた(図 13)。以上より、ラット抗マウス  $\mu$  鎖モノクローナル抗体 M41 は WEHI-231 細胞の BCR を刺激し、WEHI-231 細胞をアポトーシスに陥らせることが示された。以後の実験では M41 を抗 IgM 抗体として用いることにする。

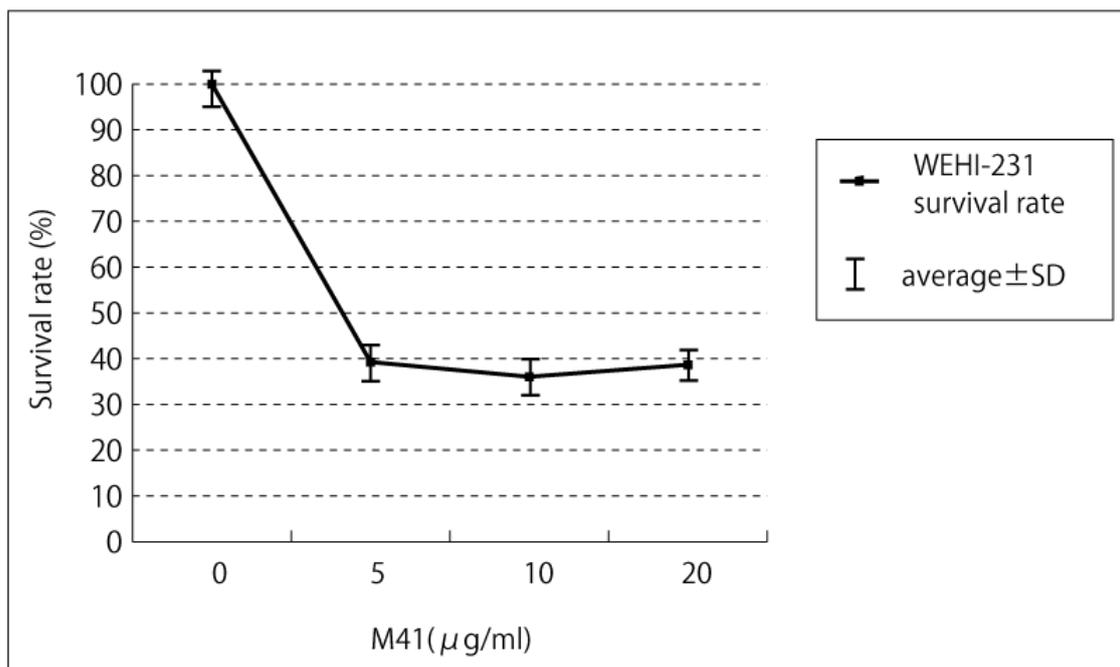


図 12 M41 はアゴニスティックに WEHI-231 細胞の BCR を刺激し、アポトーシスを引き起こす M41 0 μg/ml のものを生存率 100%としたとき、各濃度での細胞生存率を示す。5 μg/ml で刺激したものでは約 39%, 10 μg/ml で刺激したものでは約 36%, 20 μg/ml で刺激したものでは約 38% の生存率を示した。

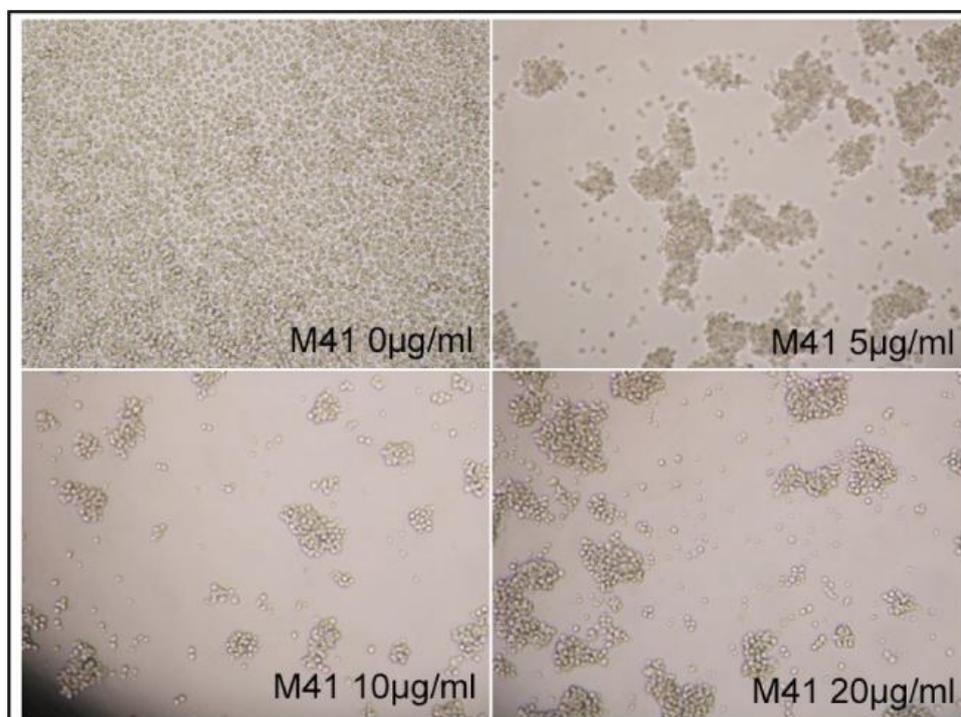


図 13 M41 により BCR を刺激された WEHI-231 細胞の光学顕微鏡像  
M41 各濃度で刺激した場合の WEHI-231 細胞の様子を示している。M41 0 μg/ml では一様に広がり細胞数も多いが、5 μg/ml, 10 μg/ml, 20 μg/ml では凝集し細胞数は少なくなっている。

## 6. WEHI-231 の BCR 刺激により Bcl-xL はユビキチン化され分解される

実験結果 5 より WEHI-231 細胞が BCR 刺激によりアポトーシスを引き起こすことから、アポトーシスを起こす細胞では抗アポトーシス蛋白質である Bcl-xL の蛋白質量がどのように変化していくのかを調べるために、抗 IgM 抗体  $10 \mu\text{g/ml}$  処理した細胞のライセートを抗 Bcl-xL 抗体でウェスタンブロットを行った。その結果、抗 IgM 抗体で BCR を刺激時間に応じて Bcl-xL の蛋白質量が減少していくことが分かった (図 14A)。このタンパク量減少は転写レベルで起こっているのかを調べるために、抗 IgM 抗体刺激後の Bcl-xL mRNA レベルを Real-time PCR 法にて解析した。図 14B に示す通り、抗 IgM 抗体刺激後の mRNA は減少していなかった。いくつかの先行研究において、Bcl-xL はユビキチン・プロテアソーム系で分解されるという報告がある。このことから、プロテアソーム阻害剤 MG-132 存在下で同様に細胞を刺激し、Bcl-xL のタンパク量に変化があるかを調べた。その結果、MG-132 存在下では BCR 刺激による Bcl-xL の減少が起こらないことが分かった (図 14C)。これらのことから、ユビキチン・プロテアソーム系が Bcl-xL のタンパク量レベルの調節に重要な働きをしていることが示唆された。このことをさらに確認するために、BCR 刺激後の Bcl-xL を免疫沈降し、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行った。図 14D に示す通り、WEHI-231 の BCR 刺激によって 6 時間後から Bcl-xL のユビキチン化が検出されることが分かった。

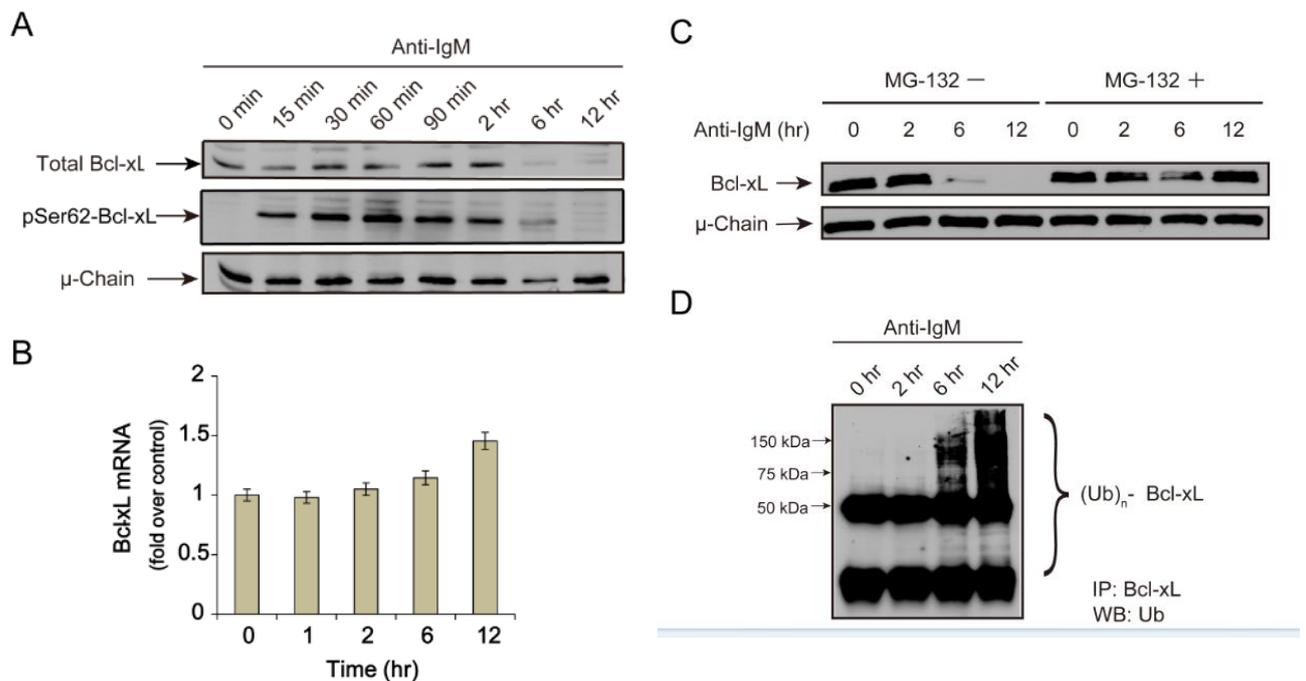


図 14. BCR 刺激は Bcl-xL のユビキチン化とプロテアソーム系による分解を引き起こす。(A) WEHI-231 細胞を  $10 \mu\text{g/ml}$  の抗 IgM 抗体で様々な時間刺激し、細胞ライセートを抗 Bcl-xL 抗体 (total) および抗 pSer62 特異的 Bcl-xL 抗体 (pSer62) でウェスタンブロットした。(B) これらの刺激した細胞をリアルタイム PCR 法にて Bcl-xL mRNA 発現量の測定を行った。GAPDH の mRNA 量にて Bcl-xL の mRNA 量を標準化し、未刺激細胞を 1 として計算した。(C) WEHI-231 細胞を MG-132 存在・非存在下で  $10 \mu\text{g/ml}$  の抗 IgM 抗体にて様々な時間刺激した。Bcl-xL のタンパク量をウェスタンブロットにて定量した。(D) 抗 IgM 抗体および MG-132 で刺激した細

胞のライセートを抗 Bcl-xL 抗体にて免疫沈降し、沈降物を抗ユビキチン化抗体でウエスタンブロットした。

## 7. Bcl-xL の 62 番目のセリン残基のリン酸化がユビキチン化に重要である

いくつかの研究から、ある種のたんぱく質はそのリン酸化が引き金となってユビキチン化が引き起こされることが分かっている。また、Bcl-xL は様々なアポトーシス刺激により 62 番目のセリン残基 (S62) がリン酸化されることが知られている。

これらのことから、BCR によるアポトーシスにおいても S62 のリン酸化が起こるかどうかを調べたところ、刺激後 15 分でリン酸化が見られた (図 14A)。これは、Bcl-xL のタンパク量減少に先立って起こった。

さらに Bcl-xL の S62 のリン酸化が、そのユビキチン化および分解に重要であるかを調べるために、野生型 (WT) および S62 のアラニンミュータント (S62A) の Bcl-xL を作製し WEHI-231 にトランスフェクトし、それぞれ同程度の Bcl-xL を過剰発現しているクローンを樹立した (WEHI-Bcl-xL-WT、WEHI-Bcl-xL-S62A)。それぞれのクローンを BCR 刺激すると Bcl-xL-WT はタンパク量が減少したのに対し、Bcl-xL-S62A は BCR 刺激に対して安定であった (図 15B)。また、それぞれのクローンの Bcl-xL のユビキチン化の程度を確認すると、Bcl-xL-WT ではユビキチン化が起こっていたのに対し、Bcl-xL-S62A ではほとんどユビキチン化が誘導されなかった (図 15C)。さらに、親株の WEHI-231、クローンの WEHI-Bcl-xL-WT および WEHI-Bcl-xL-S62A のアポトーシス抵抗能を調べたところ、WEHI-Bcl-xL-S62A は WEHI-Bcl-xL-WT に比べて BCR 刺激後の細胞生存率が高くなっていた (図 15D)。

これらのことから、Bcl-xL の S62 のリン酸化がユビキチン化および細胞のアポトーシスに重要であることが示された。

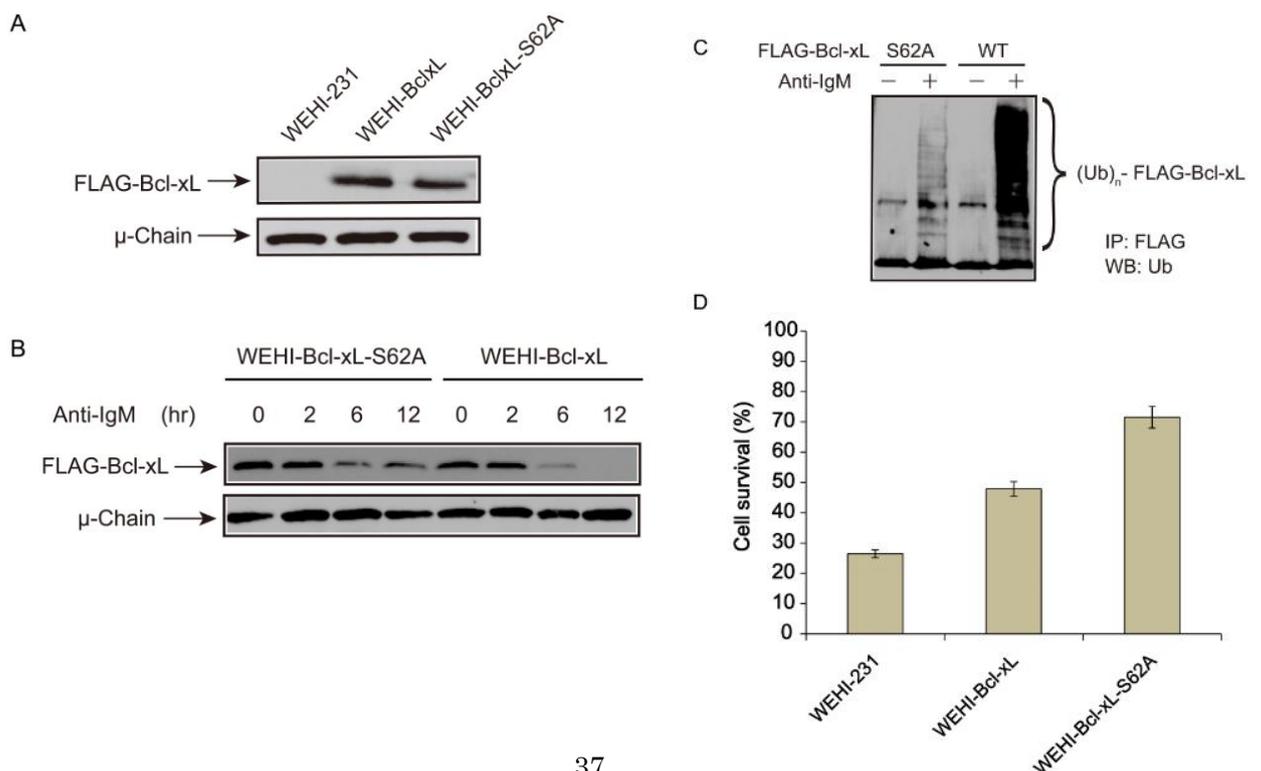


図 15 Bcl-xL の S62 のリン酸化はユビキチン化を促進する。(A) WEHI-231, WEHI-Bcl-xL, WEHI-Bcl-xL-S62A を抗 FLAG 抗体にてウエスタンブロットし、同程度の FLAG 融合タンパクの発現を確認した。(B) WEHI-Bcl-xL または WEHI-Bcl-xL-S62A を 10  $\mu$ g/ml の抗 IgM 抗体にて様々な時間刺激したのち、Bcl-xL のタンパク量をウエスタンブロットにて定量した。(C) 抗 IgM 抗体および MG-132 で刺激した WEHI-Bcl-xL または WEHI-Bcl-xL-S62A のライセートを抗 FLAG 抗体にて免疫沈降し、沈降物を抗ユビキチン化抗体でウエスタンブロットした。(D) WEHI-231, WEHI-Bcl-xL, WEHI-Bcl-xL-S62A を抗 IgM 抗体で 48 時間刺激し、細胞生存率を CCK-8 を用いて測定した。

#### 8. BCR 刺激による Bcl-xL の 62 番目のセリン残基のリン酸化は JNK によって介される

他の実験系において、JNK を含むいくつかのキナーゼが Bcl-xL の S62 のリン酸化を触媒することが知られている。また、BCR 刺激による WEHI-231 細胞のアポトーシスには、JNK が関与しているという報告もある。これらのことから、WEHI-231 の BCR 刺激による Bcl-xL の S62 のリン酸化でも JNK が関与しているのかを調べた。図 16A に示す通り、JNK 阻害剤である SP600125 処理によって、BCR による Bcl-xL のリン酸化は効果的にブロックされた。また、BCR 刺激によって JNK はリン酸化を受け活性化していることも分かった (図 16B)。さらに、SP600125 処理によって、BCR 刺激による Bcl-xL タンパク量の減少も阻害され、Bcl-xL のユビキチン化も起こりにくくなっていた (図 16C, D)。BCR 刺激前後で Bcl-xL と JNK が共沈するかを確認したところ、刺激によって Bcl-xL と JNK の結合が強くなっていることが分かった (図 16E)。

これらのことから、BCR 刺激による Bcl-xL の S62 のリン酸化は JNK によって触媒されることが示された。

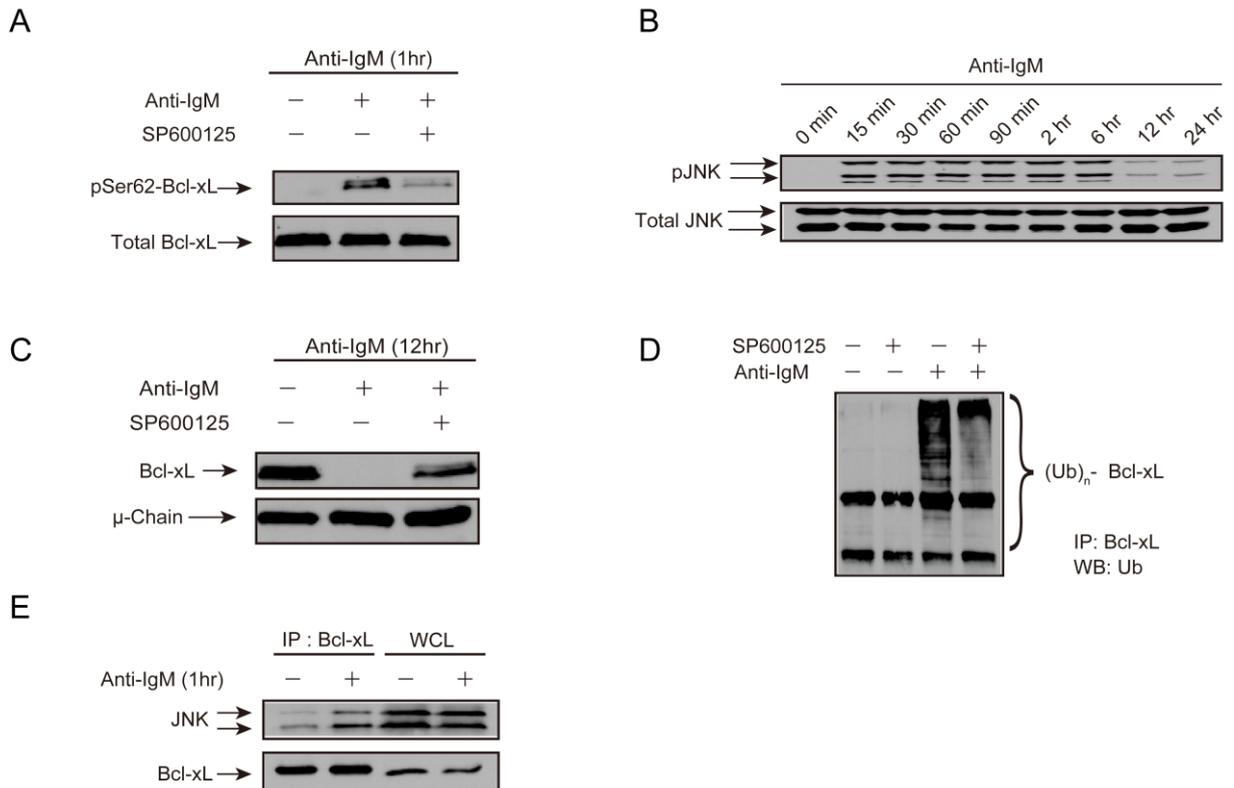


図 16 BCR 刺激による Bcl-xL のリン酸化およびユビキチン化は JNK に依存する。(A) WEHI-231 を抗 IgM 抗体または SP600125 存在下で 1 時間刺激し、Bcl-xL のリン酸化状態をウエスタンブロットにて比較した。(B) WEHI-231 細胞を 10 μg/ml の抗 IgM 抗体で様々な時間刺激し、細胞ライセートを抗 JNK 抗体(total) および抗 pJNK 抗体でウエスタンブロットした。(C) WEHI-231 を抗 IgM 抗体または SP600125 存在下で 12 時間刺激し、Bcl-xL の発現を定量した。(D) 抗 IgM 抗体および SP600125 で刺激した WEHI-Bcl-xL のライセートを抗 FLAG 抗体にて免疫沈降し、沈降物を抗ユビキチン化抗体でウエスタンブロットした。(E) WEHI-231 を抗 IgM 抗体存在下で 1 時間刺激し、抗 Bcl-xL 抗体で免疫沈降したのち、沈降物を抗 JNK 抗体でウエスタンブロットした。

## 9. オカダ酸に感受性のあるホスファターゼが Bcl-xL の S62 の脱リン酸化に関与する

セリン・スレオニンキナーゼである JNK によって Bcl-xL の S62 がリン酸化されることから、逆に脱リン酸化反応を触媒する酵素は、セリンまたはスレオニン残基を脱リン酸化する酵素であるセリン・スレオニンホスファターゼである可能性が考えられた。オカダ酸はセリン・スレオニンホスファターゼのうちの PP1 および PP2A サブファミリー (PP2A, PP4, PP6) を強く阻害する。このオカダ酸の存在下で WEHI-231 を刺激し Bcl-xL の S62 がリン酸化状態への影響を調べたところ、オカダ酸は BCR 刺激による Bcl-xL のリン酸化を増強させた (図 17A)。また、オカダ酸は Bcl-xL のユビキチン化も促進させた (図 17B)。次に、WEHI-231 のアポトーシスにおけるオカダ酸の影響を調べたところ、オカダ酸処理によって BCR 刺激によるアポトーシスが增強することが分かった (図 17C)。これらのことから、WEHI-231 細胞において Bcl-xL の

リン酸化およびユビキチン化にオカダ酸感受性ホスファターゼが関与していることが示唆された。

オカダ酸の PP2A サブファミリーである PP2A, PP4, PP6 への阻害活性はいずれに対してもほぼ等しく、オカダ酸を用いてこれらを区別することはできない。このことから、どのオカダ酸感受性ホスファターゼが Bcl-xL と相互作用するかを共沈によって確かめたところ、PP6 のみの特異的に結合することが分かった (図 17D)。

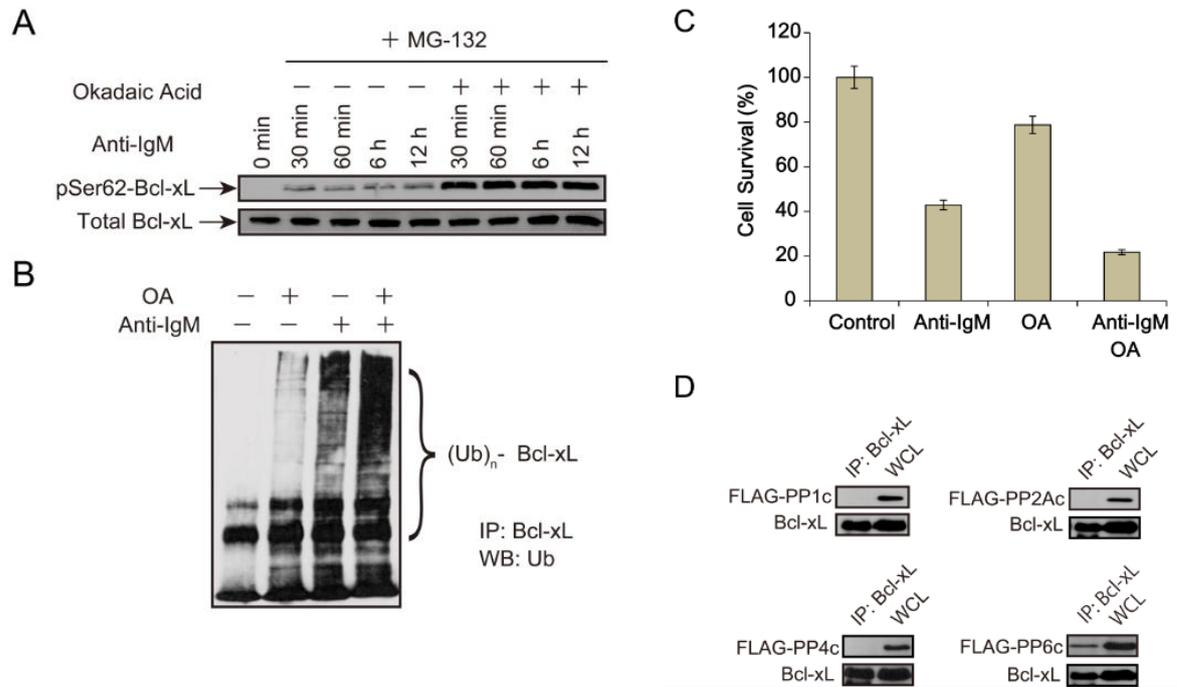


図 17 オカダ酸に感受性のあるホスファターゼが Bcl-xL のリン酸化状態を制御している。(A) WEHI-Bcl-xL 細胞を 10  $\mu$ g/ml の抗 IgM 抗体またはオカダ酸存在下で様々な時間刺激し、細胞ライセートを抗 Bcl-xL 抗体 (total) および抗 pSer62 特異的 Bcl-xL 抗体 (pSer62) でウエスタンブロットした。(B) 抗 IgM 抗体およびオカダ酸で刺激した WEHI-Bcl-xL のライセートを抗 FLAG 抗体にて免疫沈降し、沈降物を抗ユビキチン化抗体でウエスタンブロットした。(C) WEHI-231 を抗 IgM 抗体またはオカダ酸存在下で 24 時間刺激し、細胞生存率を CCK-8 を用いて測定した。(D) 293T 細胞に FLAG-PP1c, PP2Ac, PP4c, PP6c かつ Bcl-xL cDNA をコトランスフェクトした。48 時間後、抗 Bcl-xL 抗体で免疫沈降し、沈降物を抗 FLAG 抗体または抗 Bcl-xL 抗体でウエスタンブロットした。

## 10. PP6 は Bcl-xL のリン酸化およびユビキチン化をコントロールする

PP6 が実際に Bcl-xL のリン酸化およびユビキチン化に関与するかを調べるために、WEHI-231 に PP6 cDNA をトランスフェクトした。PP6 を過剰発現した WEHI-231 (WEHI-PP6) は親株の WEHI-231 に比べて BCR 刺激によるアポトーシスに対して耐性になっていた (図 18A)。このとき、オキサリプラチン処理した WEHI-PP6 は親株 WEHI-231 と比べて有意な差は見られなかったことから、この PP6 過剰発現の効果は、活性そのものに由来することが確かめられた。また、WEHI-PP6 では BCR 刺激による Bcl-xL のリン酸化が抑えられており、Bcl-xL の分解も起こらなかった (図 18B, C)。さらに、この WEHI-PP6 では Bcl-xL のユビキチン化が誘導されなくなっている (図 18D)。

PP6 の過剰発現によって Bcl-xL のリン酸化が抑えられるという現象について、①直接 PP6 が Bcl-xL を脱リン酸化しているという場合と ②PP6 が JNK を脱リン酸化することにより JNK 活性を抑制し、間接的に Bcl-xL のリン酸化が抑えられるという 2通りの可能性が考えられた。このことを調べるためにまず WEHI-231 と WEHI-PP6 の BCR 刺激後の JNK 活性化の程度に差があるかを確認したところ、両細胞において JNK 活性化程度に有意差はなかった (図 18E)。さらに、JNK と PP6 が相互作用しているかを共沈によって調べたが、結合は見られなかった (図 18F)。一方、同条件で Bcl-xL と PP6 の結合を調べたところ、BCR 刺激なしの状態でも強く結合し、刺激後は結合が弱くなることが分かった (図 18G)。これらのことから、PP6 は直接 Bcl-xL と相互作用し、脱リン酸化することが示唆された。

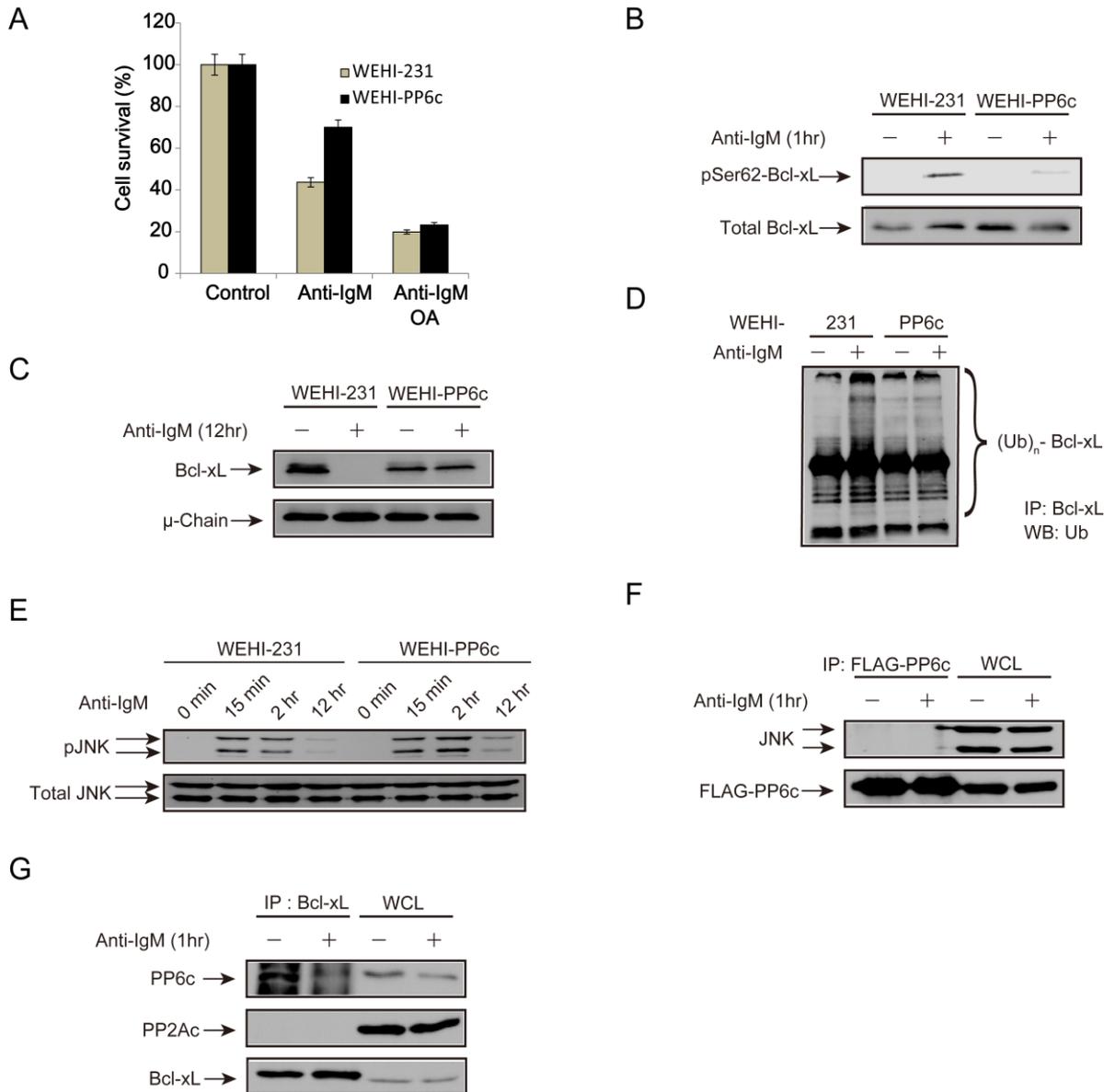


図 18 PP6 は Bcl-xL の S62 を脱リン酸化し、WEHI-231 をアポトーシス耐性にする。(A) WEHI-231, WEHI-PP6c を抗 IgM 抗体またはオカダ酸存在下で 24 時間刺激し、細胞生存率を CCK-8 を用いて測定した。(B) WEHI-231, WEHI-PP6c を抗 IgM 抗体で 1 時間刺激し、ウエスタンブロットにて Bcl-xL のリン酸化レベルを比較した。(C) WEHI-231, WEHI-PP6c を抗 IgM 抗体で 12 時間刺激し、ウエスタンブロットにて Bcl-xL の発現量を比較した。(D) 抗 IgM 抗体および MG-132 で刺激した WEHI-231 および WEHI-PP6c 細胞のライセートを抗 Bcl-xL 抗体にて免疫沈降し、沈降物を抗ユビキチン化抗体でウエスタンブロットした。(E) WEHI-231 および WEHI-PP6c 細胞を 10 μg/ml の抗 IgM 抗体で様々な時間刺激し、細胞ライセートを抗 JNK 抗体 (total) および抗 pJNK 抗体でウエスタンブロットした。(F) WEHI-PP6c を抗 IgM 抗体で 1 時間刺激し、ライセートを抗 FLAG 抗体にて沈降した。沈降物を抗 FLAG 抗体または抗 JNK 抗体にてウエスタンブロットした。(G) WEHI-231 を抗 IgM 抗体で 1 時間刺激し、ライセートを抗 Bcl-xL 抗体にて沈降した。沈降物を抗 PP6c 抗体または抗 PP2Ac 抗体にてウエスタンブロットした。

## 11. CD40 は PP6 と相互作用し、PP6 活性を上昇させる

WEHI-231 が BCR 刺激によるアポトーシスを起こす際に、実際に PP6 の活性がどうなるかを DiFMUP を基質にして *in vitro* ホスファターゼアッセイにより調べた。図 19A に示す通り、BCR 刺激により PP6 活性が低下することが分かった。

また、BCR 刺激による WEHI-231 のアポトーシスは、B 細胞活性化因子である CD40 を同時に刺激することによって回避できることが知られている。さらに、PP2A は T 細胞活性化因子 CD28 と結合することが知られている。これらのことから、同じく CD40 刺激でアポトーシスを回避する経路においても PP6 または PP2A が関与しているのではないかと考えた。まず、PP6 と CD40 が相互作用するかを共沈によって調べたところ、CD40 は PP2A とは結合せず、PP6 と特異的に相互作用することが分かった (図 19B)。さらに、CD40 刺激によって PP6 活性は上昇し、BCR 刺激による PP6 活性の低下を抑えることが示された (図 19A)。

そして、この CD40 によるアポトーシス回避の際には、BCR 刺激による Bcl-xL のリン酸化を抑制することが分かった (図 19C)。

これらのことから、CD40 刺激でアポトーシスを回避する経路において PP6 は Bcl-xL の脱リン酸化作用により、WEHI-231 の BCR 刺激によるアポトーシスをコントロールしていることが示された。

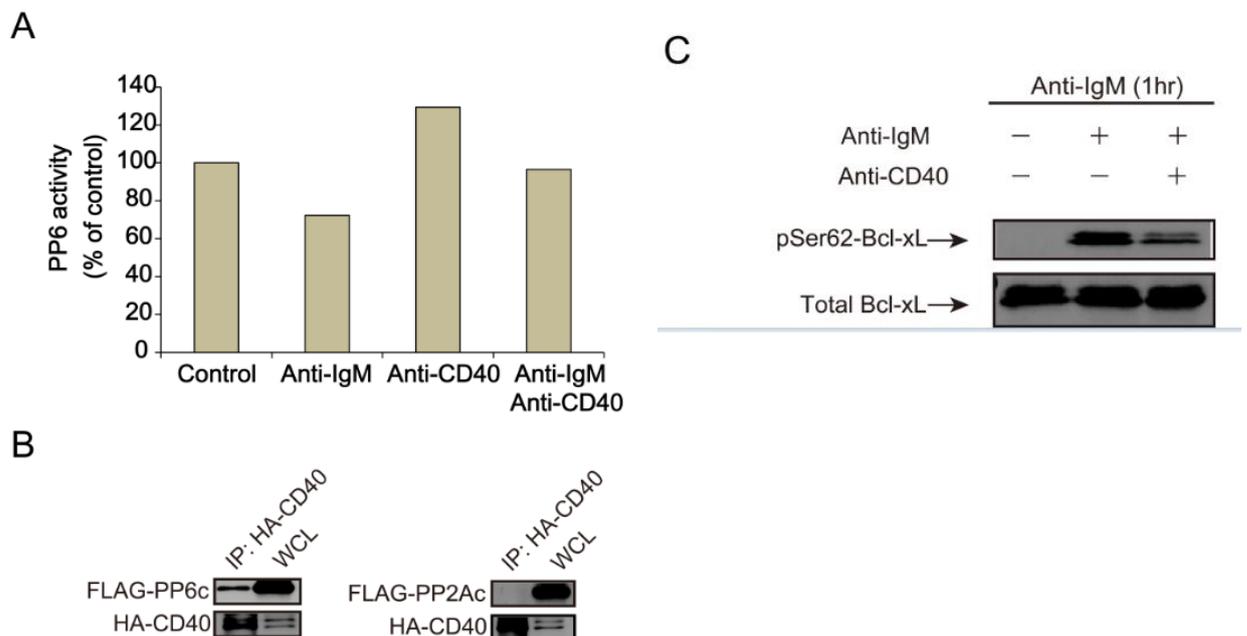


図 19 CD40 刺激は PP6 を活性化し、BCR 刺激による WEHI-231 のアポトーシスを阻止する。(A) WEHI-PP6c を抗 IgM 抗体または抗 CD40 抗体で 1 時間刺激し、ライセートを抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。沈降物を DiFMUP を基質としてホスファターゼアッセイを行った。(B) FLAG-PP2Ac または PP6c cDNA を HA-CD40 cDNA とともに 293T 細胞にコトランスフェクトした。ライセートを抗 HA 抗体で免疫沈降し、抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットした。(C) WEHI-Bcl-xL を抗 IgM 抗体または抗 CD40 抗体で 1 時間刺激し、胞ライセートを抗 Bcl-xL 抗体 (total) および抗 pSer62 特異的 Bcl-xL 抗体 (pSer62) でウエスタンブロットした。

## [VIII. 考察]

本研究では、DN-PP6 cDNA を作成し、CaMKII が p27 の 10 番目のセリンをリン酸化することによってアポトーシスを制御することを示した。さらに、PP6 が未熟 B 細胞のモデル細胞である WEHI-231 のアポトーシスを制御することも解明した。

PP2Ac のドミナントネガティブ変異体はいくつか発表されている。しかしながら、本研究で初めて PP6 のドミナントネガティブ変異体を作成した。この変異体は、アポトーシスのみならず細胞周期における PP6 のさらなる機能解析に役立つと思われる。199 番目のロイシン周辺のアミノ酸配列は、PP6 と PP2Ac でよく保存されており、基質との結合に重要であると予測されている。PP2Ac-L199P 変異体は内在性 PR65/A サブユニットと結合することができる。したがって、この変異体は、触媒活性が無くなっても PP2A 結合タンパク質と結合することができ、これによって競合的に PP2Ac の機能を抑えている。L199P 変異型 PP6 も同様な機序でドミナントネガティブ変異体として機能していることが予想される。DN-PP6 は実際に CaMKII と結合することができ、このように DN-PP6 は基質と競合結合することを示唆する。

PP6 は当初、細胞周期の G1-S 期の移行に関係する酵母の Sit4 を相補するホスファターゼとして見つかった。さらに、PP6 cDNA を細胞にトランスフェクションすると細胞死を引き起こすことが分かった。本研究でも、PP6 がアポトーシス誘導ホスファターゼであることを支持する結果となった。TNF は様々な細胞種にアポトーシスを起こすことが知られている。TNF はアポトーシスシグナルのみならず生存シグナルも伝えるが、この生存シグナルを CHX (de novo のタンパク合成を阻害する) で遮断することが TNF のアポトーシス誘導に必要である。HeLa 細胞は TNF でアポトーシスを誘導できる細胞株のひとつであり、また、少量の PP6 を発現している。したがって、DN-PP6 の導入にこの細胞株を使用した。TNF は Bid の切断を引き起こし、ミトコンドリアシグナルを介してカスパーゼ 9 を活性化する。ある細胞種において、Bcl-2 および Bcl-xL は TNF と CHX によるアポトーシスから細胞を保護することができる。HeLa 細胞は細胞死シグナルをミトコンドリアを介して伝達しており、したがって、この研究で示した通り、Bcl-xL 分子の増加により、細胞にアポトーシス耐性能を与えることができる。

CaMKII は学習と記憶に重要であり、中枢神経系では PP1 が CaMKII の酵素活性を調節していることが知られている。しかしながら、alpha4 と PP2AC は CaMKII と結合しており、alpha4 の神経特異的遺伝子ターゲティングをすると、学習と記憶能力が低下した。今回の研究では、PP6 も同様に CaMKII と結合し、PP2A サブファミリーのホスファターゼも CaMKII 活性の調節に関与している可能性を示した。最近では、CaMKII もアポトーシスに関与していることが示唆されている。いくつかのグループは CaMKII がアポトーシスを誘導するとしているが、他のグループではアポトーシスを抑制するとしている。今研究では、HeLa 細胞で CaMKII はアポトーシスを抑制した。本実験では CaMKII が p27 のセリン 10 番目をリン酸化することによって p27 の発現量を増加させ、アポトーシス耐性能を細胞に与えた。

p27 は当初、細胞周期インヒビターとして見つかり、のちに p27 はサイクリン D 複合体を正に制御して細胞周期を進めることが分かった。興味深いことに、p27 の過剰発現は細胞株に依存してアポトーシスを起こしたり、抑制したりする。今回の研究において、DN-PP6 を発現したトランスフェクタントは p27 の発現量が上昇していた。CHX はタンパク合成を阻害するので、TNF と CHX

刺激後に観察された p27 の発現レベルの上昇は翻訳後修飾によるものと考えられる。p27 中のたくさんのリン酸化部位が知られている。p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化は、p27 の安定性と関係している。また、このリン酸化によって、核内の p27 は細胞質へ移行することが知られている。このことは、p27 がサイクリン/CDK 複合体から離れ、細胞質内でアポトーシス調節因子として機能することを示している。今回の実験結果では、野生型 p27 は細胞質に局在することができ、さらに Bcl-xL の量を調節した。対して、S10A 変異型 p27 ではそれら現象が見られなかった。p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化を行うキナーゼはいくつか報告されている。今回の研究で、CaMKII も p27 の 10 番目のセリンをリン酸化することを明らかとした。CaMKII のトランスフェクションで Bcl-xL の発現量が上昇したが、Ca ionophore 処理による CaMKII の活性化では Bcl-xL の発現は変化しなかった。これは、Ca ionophore は細胞毒性があり、Bcl-xL の量に変化を与えるほどの時間で細胞を刺激できなかったためであると考えられる。p27 の発現量の上昇がどのようにして Bcl-xL 量の上昇を起こすかは不明で、今後の課題となる。

WEHI-231 細胞株は未熟 B 細胞のアポトーシスを調べるための細胞として有益なモデルシステムである。WEHI-231 細胞の BCR 刺激により Bcl-xL のユビキチン化と分解が起こることを示した。また、このユビキチン化に先立って Bcl-xL の S62 がリン酸化されることが分かった。先行研究においても様々なアポトーシスシグナルが誘導されるときには Bcl-xL がユビキチン化によって分解することが分かっている。以前からリン酸化によって Bcl-2 ファミリータンパクの機能が調節されていることが分かっていたが、その詳細な役割については知られていなかった。Bcl-xL の S62 のリン酸化は JNK、PKC、GDK などの様々なキナーゼによって行われることが他の実験系において報告されている。しかしながら、未熟 B 細胞の BCR 刺激によるアポトーシスにおいて Bcl-xL のリン酸化の役割およびそれを実行するキナーゼは分かっていた。今研究によって BCR 刺激の下流で JNK が活性化し、Bcl-xL の S62 のリン酸化およびユビキチン化に重要であることを見出した。

タンパク質の セリン/スレオニン/チロシン のリン酸化は細胞内における様々なシグナル伝達において重要な役割を担っている。キナーゼによってリン酸化された標的タンパク質は立体構造の変化に伴う酵素活性、他のタンパク質との結合状態、および自身の細胞内局在などを変化させながら、シグナル伝達経路を構成する。一方、リン酸化を受けたタンパク質はシグナル伝達経路において主にシグナルが「オン」の状態になるが、その機能を終わると次は脱リン酸化され「オフ」の状態にならねばならない。この反応を触媒しているのがホスファターゼである。このように生体内においてリン酸化酵素と脱リン酸化酵素は表裏一体となって機能しているが、脱リン酸化酵素についての分子メカニズムは未だ不明な点が多い。セリン・スレオニンホスファターゼの一つである PP2A はほとんどの組織にユビキタスに発現しており、細胞生存、細胞周期などの制御に重要な働きをしていることが知られている。また、PP2A は Bcl-2 や Bcl-xL などの Bcl-2 ファミリータンパクを脱リン酸化し、それらの抗アポトーシス活性を制御することも知られている。今研究では、PP2A サブファミリーに属する PP6 が Bcl-xL のリン酸化状態の制御に重要であることを発見した。PP2A がユビキタスに発現しているのに対し、PP6 は免疫系や心臓、精巣などに多く発現していることが知られていることから、免疫系細胞の B 細胞において PP6 が何らかの重要

な役割を果たしていることは容易に想像できる。PP6が Bcl-xL のリン酸化状態の制御するメカニズムとして ①直接 PP6が Bcl-xL を脱リン酸化しているという場合と ②PP6が JNK を脱リン酸化することにより JNK 活性を抑制し、間接的に Bcl-xL のリン酸化が抑えられるという 2通りの可能性が考えられたが、今回の研究においては PP6 と JNK の結合がみられず、また、PP6 過剰発現細胞においても JNK の活性化状態（リン酸化）に違いは見られなかった。一方、PP6 と Bcl-xL との結合は免疫沈降法においてみられたことから、可能性①のメカニズムが働いている可能性が強いと思われる。

WEHI-PP6c は、WEHI-231 に比べて明らかなアポトーシス耐性能を示し、このとき、オカダ酸処理した WEHI-PP6 は親株 WEHI-231 と比べて有意な差は見られなかったことから、この PP6 過剰発現の効果は、PP6 の脱リン酸化活性そのものに由来する。

また、WEHI-231 の BCR 刺激によるアポトーシスにおいて、B 細胞活性化分子である CD40 による刺激はこのアポトーシスを抑えることが広く知られている。PP2A は T 細胞活性化分子である CD28 はと結合するが CD40 とは結合しないことが報告されている。今研究においても PP2A と CD40 の結合は見られなかった。一方、CD40 とは PP6 が特異的に結合することを見出した。また、BCR 刺激によって PP6 活性は減少し、CD40 刺激によって PP6 活性が上昇することを示した。すなわち、CD40 からの刺激は PP6 の活性を上昇させ、Bcl-xL の S62 を脱リン酸化し、Bcl-xL を安定化させる。このことが、CD40 による BCR 誘導性アポトーシスの抑制メカニズムの一つであると示唆された。

[IX. 結語]

ドミナントネガティブ変異型 PP6 (DN-PP6) を作成した。DN-PP6 を発現した HeLa 細胞では、CaMKII が p27 の 10 番目のセリンをリン酸化し、p27 の発現量を上昇させた。p27 の発現量の上昇が、Bcl-xL の発現量を上昇させた。PP6 と CaMKII はこのような機序で HeLa 細胞のアポトーシスをコントロールした (図 20)。

次に免疫系のモデル細胞として未熟 B 細胞株 WEHI-231 を用いた実験に発展させた。WEHI-231 の BCR 刺激によるアポトーシスでは、BCR の下流にある JNK がリン酸化を受け活性化する。活性化した JNK は抗アポトーシスタンパク Bcl-xL の S62 をリン酸化し、また、BCR 刺激による PP6 の活性低下によってさらに S62 のリン酸化状態が促進される。そのリン酸化はなんらかのメカニズムで Bcl-xL のユビキチン化の引き金となり、Bcl-xL はポリユビキチン化をされる。このことによって Bcl-xL はプロテアソームによる分解を受け、Bcl-xL タンパク量が減少し WEHI-231 はアポトーシスへと導かれる。一方、CD40 からの刺激は PP6 の活性を上昇させ、Bcl-xL の S62 を脱リン酸化し、Bcl-xL を安定化させる。このことが、CD40 による BCR 誘導性アポトーシスの抑制メカニズムの一つであると考えられる (図 21)。

これら 2 つの実験系により、PP6 は細胞のアポトーシスを制御していることが分かった。また、どちらの系でも PP6 の下流には Bcl-xL が存在しており、Bcl-xL の発現量の調節を介して PP6 はアポトーシス制御という機能を果たしていることが示唆された。

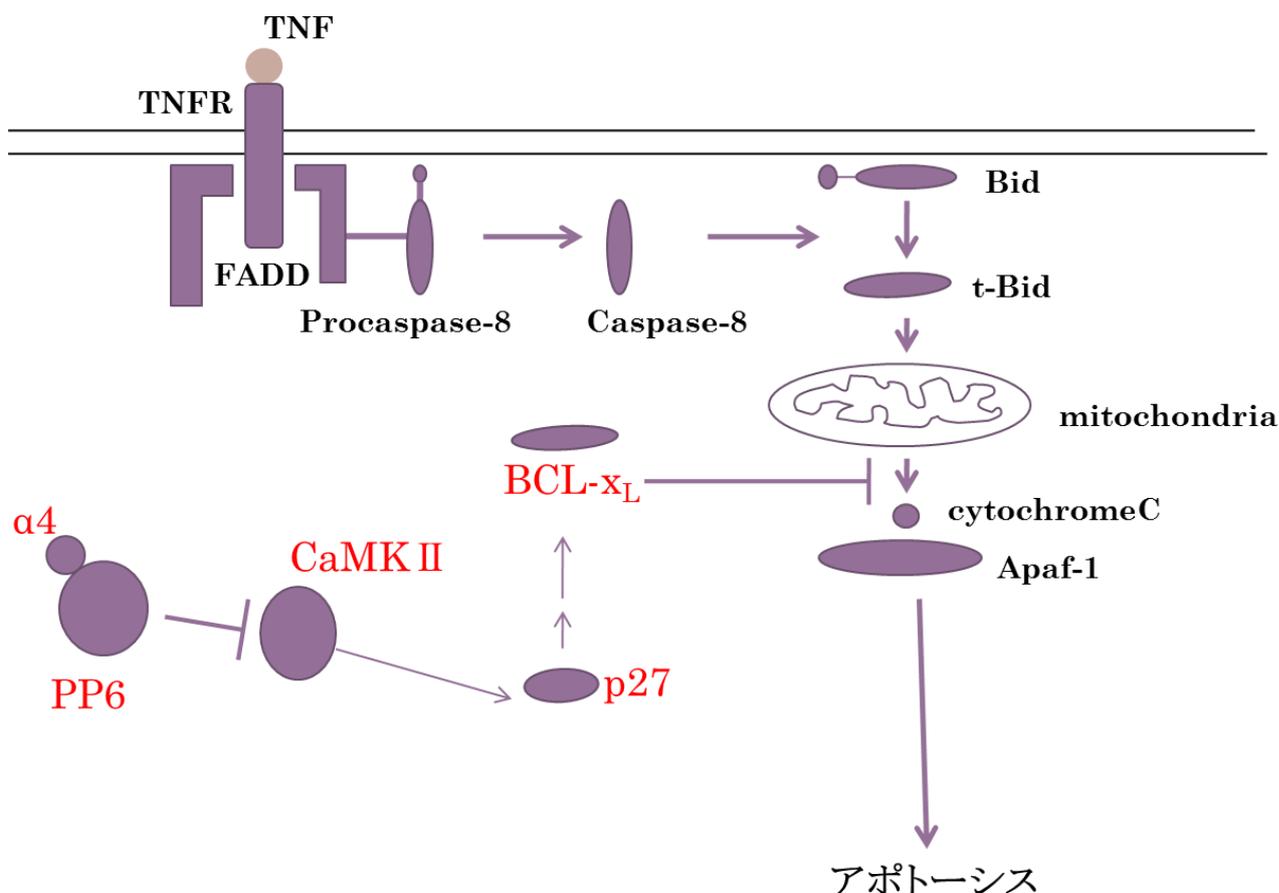


図 20 HeLa 細胞の TNF を介したアポトーシスにおける PP6 の役割

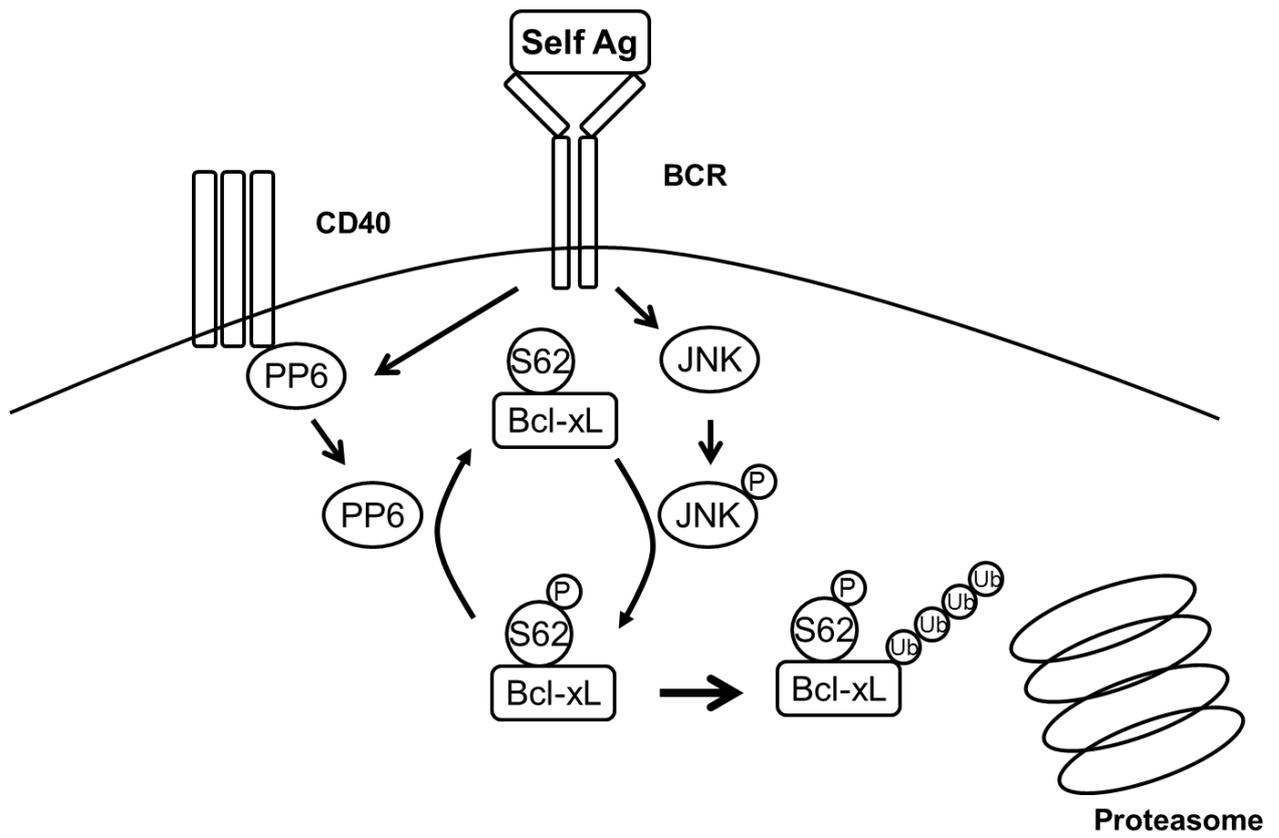


図 21 未熟 B 細胞のアポトーシスにおける Bcl-xL の制御モデル

[X. 参考文献]

- 1 Gottschalk A. R., Quintans J. (1995) Apoptosis in B lymphocytes: The WEHI-231 Perspective, *Immunol. Cell Biol.* 73, 8-16.
- 2 Antony R., Lukiw W. J., Bazan N. G. (2010) Neuroprotectin D1 Induces dephosphorylation of Bcl-xL in a PP2A-dependent manner during oxidative stress and promotes retinal pigment epithelial cell survival, *J. Biol. Chem.* 285, 18301-18308.
- 3 Song X., Kim SY., Lee Y. J. (2012) The Role of Bcl-xL in Synergistic Induction of Apoptosis by Mapatumumab and Oxaliplatin in Combination with Hyperthermia on Human Colon Cancer, *Mol. Cancer Res.* 10, 1567-79.
- 4 El Fajoui Z., Toscano F., Jacquemin G., Abello J., Scoazec JY., Micheau O., Saurin JC. (2011) Oxaliplatin Sensitizes Human Colon Cancer Cells to TRAIL Through JNK-Dependent Phosphorylation of Bcl-xL, *Gastroenterology* 141, 430-434.
- 5 Bastians H., Ponsting H. (1996) The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast pp1, which are involved in cell cycle regulation, *J. Cell Sci.* 109, 2865-2874.
- 6 Becker W., Kentrup H., Klumpp S., Schultz J. E., Joost H. G. (1994) Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain, *J. Biol. Chem.* 269, 22586-22592.
- 7 Kajino T., Hong R., Iemura S., Natsume T., Stefansson B., Brautigan D. L., Matsumoto K., Ninomiya-Tsuji J. (2006) Protein Phosphatase 6 Down-regulates TAK1 Kinase Activation in the IL-1 Signaling Pathway, *J. Biol. Chem.* 281, 39891-39896.
- 8 Stefansson B., Ohama T., Daugherty A. E., Brautigan D. L. (2008) Protein Phosphatase 6 Regulatory Subunits Composed of Ankyrin Repeat Domains, *Biochemistry* 47, 1442-1451.
- 9 Inui S., Sanjo H., Maeda K., Yamamoto H., Miyamoto E., Sakaguchi N. (1998) Ig receptor binding protein 1 (alpha4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A, *Blood* 92, 539-546.

- 10 Chen J., Peterson R. T., Schreiber S. L. (1998) alpha4 associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 827-832.
- 11 Ishida N., Kitagawa M., Hatakeyama S., Nakayama K. (2000) Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27kip1, increases its protein stability, *J. Biol. Chem.* 275, 25146-25154.
- 12 Kajihara R., Fukushige S., Shioda N., Tanabe K., Fukunaga K., Inui S. (2010) CaMKII phosphorylates serine 10 of p27 and confers apoptosis resistance to HeLa cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401, 350-355.
- 13 Sutton A., Immanuel D., Arndt K.T. (1991) The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S Phase, *Mol. Cell. Biol.* 11, 2133-2148.
- 14 Terrano D. T., Upreti M., Chambers T. C. (2010) Cyclin-Dependent Kinase 1-Mediated Bcl-xL/Bcl-2 Phosphorylation Acts as a Functional Link Coupling Mitotic Arrest and Apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* 30, 640-656.
- 15 A. Sutton, D. Immanuel, K.T. Arndt, The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S Phase, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 2133-2148.
- 16 H. Bastians, H. Ponsting, The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast pp1, which are involved in cell cycle regulation, *J. Cell Sci.* 109 (1996) 2865-2874.
- 17 W. Becker, H. Kentrup, S. Klumpp, J.E. Schultz, H.G. Joost, Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 22586-22592.
- 18 J.P. MacKeigan, L.O. Murphy, J. Blenis, Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 591-600.
- 19 S. Inui, H. Sanjo, K. Maeda, H. Yamamoto, E. Miyamoto, N. Sakaguchi, Ig receptor binding protein 1 (alpha4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A, *Blood* 92 (1998) 539-546.

- 20 K. Murata, J. Wu, D.L. Brautigan, B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 10624-10629.
- 21 C. J. Di Como, K.T. Arndt, Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases, *Genes Dev.* 10 (1996) 1904-1916.
- 22 J. Chen, R.T. Peterson, S.L. Schreiber, alpha4 associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1998) 827-832.
- 23 S. Inui, K. Maeda, D.R. Hua, T. Yamashita, H. Yamamoto, E. Miyamoto, N. Sakaguchi, BCR signal through alpha4 is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation, *Int. Immunol.* 14 (2002) 177-187.
- 24 D.R. Hua, S. Inui, T. Yamashita, K. Maeda, K. Takagi, J. Takeda, N. Sakaguchi, T cell-specific gene targeting reveals that  $\alpha 4$  is required for early T cell development, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 1899-1906.
- 25 M. Kong, C.J. Fox, J. Mul. Solt, A. Xu, R.M. Cinalli, M.J. Birnbaum, T. Lindsten, C.B. Thompson, The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis, *Science* 306 (2004) 695-698.
- 26 T. Yamashita, S. Inui, K. Maeda, D.R. Hua, K. Takagi, K. Fukunaga, N. Sakaguchi, Regulation of CaMKII by alpha4/PP2Ac contributes to learning and memory, *Brain Res.* 1082 (2006) 1-10.
- 27 L. C. Griffith, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II : An unforgettable kinase, *J. Neurosci.* (2004) 8391-8393.
- 28 S. Strack, M.A. Barban, B.E. Wadzinski, R.J. Colbran, Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble  $Ca^{2+}$  /calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 1 and 2A, *J. Neurochem.* 68 (1997) 92119-92128.
- 29 A.P. Braun, H. Schulman, The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function, *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 417-445.
- 30 S.C. Wright, U. Schellenberger, L. Ji, H. Wang, J.W. Larrick, Calmodulin-independent

- protein kinase II mediates signal transduction in apoptosis, *FASEB J.* 11 (1997) 843-849.
- 31 T. Zhang, J.H. Brown, Role of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure, *Cardiovasc. Res.* 63 (2004) 476-486.
- 32 O. Rokhlin, A.F. Taghiyev, K.U. Bayer, D. Bumcrot, V.E. Kotelianski, R.A. Glover, M.B. Cohen, Calcium/calmodulin-dependent kinase II plays an important role in prostate cancer cell survival, *Cancer Biol. Ther.* 6 (2007) 732-742.
- 33 S. Mishra, J.P. Mishra, K. Gee, D.C. McManus, E.C. LaCasse, A. Kumar, Distinct role of calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase-II in lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated suppression of apoptosis and antiapoptotic c-IAP2 gene, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 37536-37546.
- 34 B.F. Yang, C. Xiao, W.H. Roa, P.H. Kramer, C. Hao, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of c-FLIP expression and phosphorylation in modulation of Fas-mediated signaling in malignant glioma cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7043-7050.
- 35 X. Guan, L. Chen, J. Wang, H. Geng, X. Chu, Q. Zhang, L. Du, W. De, Mutations of phosphorylation sites Ser10 and Thr187 of p27Kip1 abolish cytoplasmic redistribution but do not abrogate G0/1 phase arrest in the HepG2 cell line, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 601-607.
- 36 N. Fujita, S. Sato, K. Katayama, T. Tsuru, Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 28706-28713.
- 37 O. Conqueret, New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?, *Trends Cell Biol* 13 (2003) 65-70.
- 38 K. Fukunaga, H. Sato, K. Takatsu, A. Tominaga, E. Miyamoto, Monoclonal antibody against a multifunctional calmodulin-dependent protein kinase from rat brain and the tissue distribution of the enzyme, *Biomed. Res.* 7 (1986) 405-413.
- 39 K. Fukunaga, H. Yamamoto, K. Matsui, K. Higashi, E. Miyamoto, Purification and characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ - and calmodulin-dependent protein kinase from rat brain, *Eur. J. Neurochem.* 39 (1982) 1607-1617.

- 40 D.R.H. Evans, T. Myles, J. Hofsteenge, B.A. Hemmings, Functional expression of human PP2Ac in yeast permits the identification of novel C-terminal and dominant-negative mutant forms, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24038-24046.
- 41 U. S. Cho, W. Xu, Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme, *Nature* 445 (2007) 53-57.
- 42 N. Ishida, M. Kitagawa, S. Hatakeyama, K. Nakayama, Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27kip1, increases its protein stability, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 25146-25154.
- 43 D. Wallach, E. E. Varfolomeev, N. L. Malinin, Y. G. Golstef, A. V. Kovalenko, M. P. Boldin, Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms, *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 331-367.
- 44 C. J. Sherr, J. M. Roberts, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1- phase progression, *Genes Dev.* 13 (1999) 1501-1512.
- 45 M. Boehm, T. Yoshimoto, M. F. Crook, S. Nallamshetty, A. True, G. J. Nabel, E. G. Nabel, A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27Kip1 and regulates cell cycle progression, *EMBO* 21 (2002) 3390-3401.
- 46 Y. Janumyan, Q. Cui, L. Yan, C. G. Sansam, M. Valentin, E. Yang, G0 function of Bcl2 and Bcl-xL requires Bax, Bak, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of Bax and Bak in quiescence regulation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 34108-34120.