

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2013～2014  
課題番号：25660227  
研究課題名(和文)細胞死のターンアウトスイッチの分子機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of turnout switch for cell death

## 研究代表者

大浜 剛(Ohama, Takashi)

山口大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50579018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の自殺であるプログラム細胞死にはアポトーシスとオートファジー細胞死が存在する。本研究は、細胞が「死に方」を選択する際にどちらの経路へ進行するかを制御するターンアウトスイッチ(分岐器)の分子機構を明らかにすることを目的に、Type2Aタンパク質脱リン酸化酵素であるPP2AとPP6およびオートファジー制御に重要な役割を果たすBeclin1に注目して行った。具体的には、1) Beclin 1新規リン酸化サイトの同定と機能解析、2) PP6によるBeclin 1複合体構成の制御機構の解析、3) PP2A活性の制御によるアポトーシス制御機構の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：There are two types of programmed cell death, called apoptosis and autophagy. The purpose of this project is to clarify the mechanism of turnout switch for cells selecting the way to die. We focused on type2A protein phosphatase family, PP2A and PP6, and Beclin 1 that plays important roles for both apoptosis and autophagy. We performed 1) Identification of novel phospho-site of Beclin 1 and its functional analysis, 2) Analysis for the regulatory mechanism of Beclin 1 complex composition by PP6, 3) Analysis for the regulatory mechanism of apoptosis by PP2A.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：細胞死 アポトーシス オートファジー ホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

発生や発がんにおいて重要な役割を果たすプログラム細胞死は、主にアポトーシスを用いて実行されていると考えられてきた。しかし近年、プログラムされた細胞死のなかには、オートファジー細胞死などの非アポトーシス細胞死が存在し、アポトーシス機構が機能しない場合でも、細胞はオートファジー機構を活性化することで細胞死を誘導することが明らかになってきた。アポトーシスとオートファジーは相互に抑制し合うことが知られており、細胞にはアポトーシス経路とオートファジー経路のどちらへ進行するかを制御する機構(ターンアウトスイッチ/分岐器)が存在すると考えられるが、その分子機構は明らかになっていない(図1)。

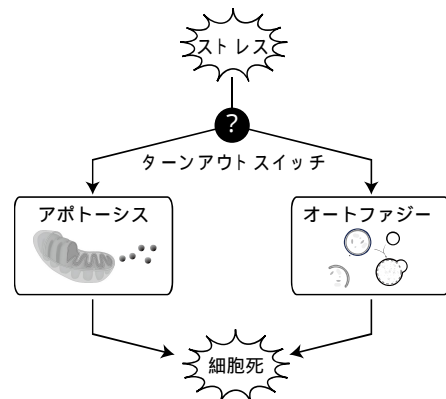


図1 細胞の「死に方」の選択  
様々な原因で細胞が自殺をする際、死に方を選ぶためのターンアウトスイッチが存在すると考えられる。

申請者はこれまで、タンパク質脱リン酸化酵素の生理学的・病態生理学的な役割について明らかにしてきた。オートファジーを促進し、アポトーシスを抑制する因子である Beclin 1 のリン酸化レベルが Protein Phosphatase 2A (PP2A) により制御されていること、Protein Phosphatase 6 (PP6) はオートファジーを抑制し、アポトーシスを促進することを明らかにしていたことから、ホスファターゼ活性の制御が細胞死のターンアウトスイッチとして機能するのではないかとの着想のもと、本研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞死のターンアウトスイッチの分子機構を明らかにすることを目的に、Type2A タンパク質脱リン酸化酵素である PP2A と PP6 およびオートファジー制御に重要な役割を果たす Beclin1 に注目して行った。

## 3. 研究の方法

### (1) Beclin 1 新規リン酸化サイトの機能解析

Beclin 1 はオートファジー誘導に重要な役割を果たし、様々なタンパク質と結合することでオートファジー誘導を正にも負にも制御している。Beclin 1 とオートファジー関連因子との結合はリン酸化などの翻訳後修飾で制御されており、いくつかのリン酸化酵素キナーゼがこれを制御することが知られている。しかし、脱リン酸化を制御するホスファターゼはまだ明らかになっていない。

FLAG-Beclin 1 を安定的に発現させた細胞を PP2A 阻害剤である okadaic acid で処置し、Beclin 1 のリン酸化レベルを Phos-tag HRP を用いて観察した。Beclin 1 の Ser, Thr, Tyr 残基を Ala に置換した各種変異体を作成し、リン酸化サイトの同定を行った。同定したリン酸化サイトに対する特異的抗体の作製は、民間会社に委託した。生理的なリン酸化レベルの変化を検討するため、マウスに対して絶食・再給餌を行い、各種臓器からタンパク質を抽出した。また、培養細胞に対しては、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) で処置することで飢餓刺激を与え、Beclin 1 リン酸化とオートファジー誘導を解析した。同定したリン酸化サイトを制御するリン酸化酵素キナーゼと脱リン酸化酵素ホスファターゼの同定には、shRNA を用いた培養細胞での発現抑制と各種阻害剤を用いた解析、リコンビナントタンパク質を用いた in vitro キナーゼ/ホスファターゼアッセイを行った。Beclin 1 リン酸化によるオートファジー活性への影響については、ウェスタンブロットによる LC-3 の I 型から II 型への変換の解析と、免疫染色による LC-3 puncta 数の解析により行った。オートファジー誘導に必須である Beclin 1 と Atg14L との結合の解析には免疫沈降法を用いた。

### (2) PP6 による Beclin 1 複合体構成の制御

Beclin 1-VPS34 (Class III PI3 kinase) 複合体はオートファジーの進行に必須の因子である。Beclin 1 には Bcl-2 をはじめとした様々な因子が結合し、これにより Beclin 1-VPS34 複合体の局在や PI3K 活性が制御されている。

Beclin 1 と複合体を構成する Type2A タンパク質脱リン酸化酵素を明らかにするため、免疫沈降法を用いて解析した。Beclin 1 との結合部位の解析には、Beclin 1 を各ドメイン構造に分割した切断体との免疫沈降法を用

いた。結合が同定された脱リン酸化酵素について、過剰発現により Beclin 1 複合体の構成に与える影響を、発現抑制によりオートファジー活性に対する影響を解析した。また、Beclin 1 複合体の構成に対する影響には、iDimerize システムを用いた検討も行った。

### (3) PP2A 活性の制御によるアポトーシス制御

PP2A はアポトーシスの誘導を制御しており、多くのがんにおいて PP2A 活性の低下が観察される。がんにおける PP2A 活性の低下には SET を始めとした PP2A 阻害タンパク質の発現上昇が関与する。本項目では、SET 発現抑制や SET 阻害剤による PP2A 活性化が、がん細胞の細胞死に与える影響を解析するとともに、イヌの SET アイソフォームの同定を行った。

ヒト胃癌細胞株を用いて SET 発現を安定的に抑制した際の、細胞増殖、コロニー形成能、足場非依存的な増殖、および抗がん剤に対する感受性を解析した。また、SET 阻害剤と既存の抗がん剤の単独および共処置による胃癌細胞株の細胞死に対する影響を解析した。

イヌの SET アイソフォームのクローニングには、ビーグル犬から採取した mRNA を用いた。得られたアイソフォームについて、シーケンス解析を行い、塩基配列およびアミノ酸配列を同定した。各アイソフォームに FLAG タグを付加し、免疫染色により局在を、免疫沈降法により PP2A との結合性を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Beclin 1 新規リン酸化サイトの機能解析

細胞を PP2A 阻害剤で処置すると、時間依存的に Beclin 1 のリン酸化レベルが上昇することが明らかになった。Beclin 1 の各種リン酸化サイト変異体を用いた検討から、PP2A 阻害剤は Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを上昇させることが分かった。Beclin 1 Ser90 リン酸化に対する特異的抗体を用いた検討から、マウスを飢餓にした際に骨格筋組織でリン酸化レベルが上昇し、再給餌によりリン酸化レベルが低下したことから、飢餓ストレスにより Beclin 1 Ser90 リン酸化が引き起こされると考えられた。飢餓ストレスによる Beclin 1 Ser90 リン酸化は培養細胞でも観察されたことから、各種阻害剤や shRNA による発現抑制を行ったところ、Death Associated Protein Kinase 3 (DAPK3)

がリン酸化を、PP2A が脱リン酸化を制御している可能性が示唆された。DAPK3 および PP2A はリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* のアッセイ系でも Beclin 1 Ser90 をリン酸化/脱リン酸化したことから、直接的にリン酸化レベルを制御していると考えられた。また、Beclin 1 Ser90 を Ala に置換した変異体を用いた検討により、Beclin 1 Ser90 リン酸化は、Atg14L と Beclin 1 の結合を誘導し、オートファジーを促進することが明らかになった。

以上の結果から、Beclin 1 Ser90 リン酸化は特に骨格筋における飢餓ストレスによるオートファジー誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### (2) PP6 による Beclin 1 複合体構成の制御

Beclin 1 と複合体を構成する Type2A タンパク質脱リン酸化酵素を明らかにするため、HA タグを付加した PP2A、PP4、PP6 を発現させ免疫沈降法を行ったところ、PP6 が最も強く Beclin 1 と結合することが分かった。Beclin 1 は BH-3、CCD、ECD のドメイン構造を含んでおり、各ドメイン構造を含む切断体を用いて PP6 の結合部位を検討したところ、PP6 は ECD を含む C 末端領域と結合することが明らかになった。ECD は VPS34 との結合部位であるため、Beclin 1 と VPS34 の結合に対する PP6 の影響を解析したところ、PP6 過剰発現は VPS34 を Beclin 1 から解離させることが観察された。この現象は iDimerize システムを用いて PP6 と Beclin 1 を結合させても観察された(図 2)。

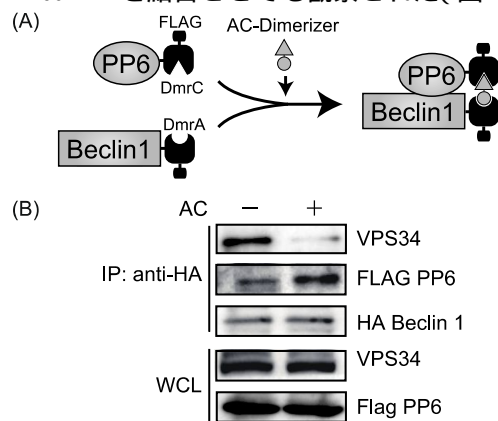


図 2 (A) iDimerize システムの模式図: PP6 に FLAG-DmrC タグが、Beclin 1 に HA-DmrA タグが付加されている。AC Dimerizer 試薬で処置すると、DmrA と DmrC が結合することで PP6 と Beclin 1 が近接する。  
(B) Beclin 1 と PP6 の結合は Beclin 1 から VPS34 を解離させる: HA-DmrA-Beclin1 と FLAG-DmrC-PP6 を発現した 293T 細胞を AC Dimerizer 試薬 (500 nM) で 24 時間処置し、anti-HA 免疫沈降を行い、Beclin1 と VPS34 との結合を検討した。

また、興味深いことに、活性を持たない PP6 変異体を用いても Beclin 1 と VPS34 の解離が観察されたことから、この現象は脱リン酸化に依存しない可能性が示唆された。また、これらの結果と相関して、PP6 発現を抑制するとオートファジーが抑制されることが観察された。

以上の結果から、PP6 は VPS34 と Beclin 1 を奪い合う形で、Beclin 1-VPS34 複合体形成を阻害し、結果としてオートファジーを抑制している可能性が示唆された。

### (3) PP2A 活性の制御によるアポトーシス制御

ヒト胃癌細胞株 MKN45 および MKN74 で SET 発現を抑制すると、細胞増殖には影響を与えないが、コロニー形成能および足場非依存的な増殖が抑制されることが確認された。ヒト胃癌細胞株 H-111-TC および SH-10-TC は SET 阻害剤 OP449 に対して感受性であり、cisplatin との共処置で相加的に細胞死が誘導された。一方、MKN45 および MKN74 は OP449 に抵抗性であった。

イヌの SET アイソフォームの同定には、ビーグル犬の mRNA を用いた。BLAST データベースのイヌゲノム配列情報を元に、4つのイヌ SET アイソフォームをクローニングし、塩基配列およびアミノ酸配列をシークエンスにより同定した。アミノ酸配列の長さの順に SET $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  と名付けた。SET $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  をコードする遺伝子はそれぞれ X、7、1、8 番染色体に存在した。イヌ SET $\alpha$  はヒト SET $\alpha$  と同じ 290 残基で、アミノ酸レベルで 94% の相同性を持っていた。SET $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  は C 末端領域が欠けており、それぞれ 223、112、102 残基であった。また、ヒトおよびマウスにはイヌ SET $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  に相当するアイソフォームは確認できなかった。FLAG タグを付加した SET $\alpha$  と  $\beta$  は主に核内に局在し PP2A と結合したが、 $\gamma$  と  $\delta$  は核と細胞質の両方に存在し、PP2A との結合は観察することができなかった。

以上の結果から、ヒト胃癌細胞において SET は PP2A 活性を抑制することで悪性化に寄与しており、がん細胞の細胞死を抑制していること、イヌにはヒトやマウスに存在しない PP2A 阻害タンパク質としての SET $\beta$  が存在することで、ヒトやマウスとは異なる PP2A 活性の制御機構が存在することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- 1) Yabe R, Fujiwara N, Mizuno T, Usui T, Ohama T\*, Sato K (2014) (査読有り)  
Characterization of SET/I2PP2A Isoforms in Dogs  
*Journal of Veterinary Medical Science*, 76(9):1235-40. (doi: 10.1292/jvms.14-0209)

[学会発表](計 9 件)

- 1) Yabe R, Miura A, Sato K, Ohama T  
Protein Phosphatase Methyl Esterase PME-1 protects Protein Phosphatase 2A from ubiquitin/proteasome degradation  
Europhosphatase 2015, Turku, Finland  
2015 年 6 月 24-29 日
- 2) Fujiwara N, Usui T, Sato K, Ohama T  
Regulation of Beclin 1 association with Atg14L and autophagy by PP2A and DAPK3  
11<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase 東北大学、仙台市、宮城県  
2015 年 6 月 24-29 日
- 3) 円城寺秀平、吉村和大、藤原信行、大島浩子、大島正伸、臼井達哉、大浜剛、佐藤晃一  
PP2A 阻害因子 SET/I2PP2A の胃癌における役割に関する研究  
第 88 回日本薬理学会、名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県  
2015 年 3 月 18-20 日
- 4) Enjoji S, Yoshimura K, Fujiwara N, Oshima H, Oshima M, Usui T, Sato K, Ohama T  
The role of PP2A inhibitor SET/I2PP2A in Gastric Cancer  
11<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase 東北大学、仙台市、宮城県  
2014 年 11 月 12-14 日
- 5) Yabe R, Miura A, Sato K, Ohama T  
Protein Phosphatase Methyl Esterase PME-1 protects Protein Phosphatase 2A from ubiquitin/proteasome degradation  
11<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase 東北大学、仙台市、宮城県  
2014 年 11 月 12-14 日
- 6) Fujiwara N, Usui T, Sato K, Ohama T  
The Role of Protein Phosphatase 2A Associated Phospho-site of Beclin 1 on Autophagy

11<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase 東北大学、仙台市、宮城県  
2014年11月12-14日

- 7) 吉村和夫、藤原信行、大島浩子、大島正伸、臼井達哉、**大浜剛**、佐藤晃一  
胃癌におけるPP2A阻害因子SETの役割の解明  
第157回日本獣医学会 北海道大学、札幌市、北海道  
2014年9月11日
- 8) Fujiwara N, Sato K, **Ohama T**  
The role of protein phosphatase 6 in mammalian autophagy  
Europhosphatase 2013, Rehovot, Israel  
2013年7月7-12日
- 9) Fujiwara N, Sato K, **Ohama T**  
The role of protein phosphatase 6 in mammalian autophagy  
10<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, Protein Phosphatase and Diseases 国立がんセンター、中央区、東京都  
2013年2月7-9日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕(計 0件)

〔その他〕該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大浜 剛 (Takashi Ohama)  
山口大学・共同獣医学部・准教授  
研究者番号：50579018

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし