

Type 2A protein phosphatase を標的とした
抗がん戦略構築に向けた基礎的研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

藤原 信行

2017年3月

目次

第1章 背景および目的.....	1
1-1 Type 2A protein phosphatase とがん.....	2
1-1-1 Protein phosphatase 2A (PP2A) とがん.....	2
1-1-2 Protein phosphatase 6 (PP6) とがん.....	5
1-2 タンパク質分解機構.....	8
1-2-1 ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー.....	8
1-2-2 選択的オートファジー.....	10
1-2-3 Beclin 1 によるオートファジー制御機構.....	11
1-3 研究目的.....	13
第2章 イヌ T 細胞性リンパ腫細胞に対する SET 標的薬 OP449 の抗がん効果の検討 ...	14
2-1 イヌリンパ腫細胞株間での SET タンパク質発現量の比較.....	15
2-2 ヒトとイヌの SET のアミノ酸配列の比較.....	17
2-3 SET 標的薬 OP449 は SET 発現に依存して細胞死を誘導する.....	19
2-4 OP449 は Ema 細胞の PP2A 活性を上昇させる.....	21
2-5 OP449 はイヌリンパ腫細胞株のアポトーシスを誘導する.....	23
2-6 OP449 による細胞死は caspase 阻害剤により抑制される.....	25
2-7 考察.....	27
2-7-1 OP449 のイヌリンパ腫治療薬としての可能性.....	27
2-7-2 OP449 の作用機序.....	27
2-7-3 SET 発現が上昇するメカニズム.....	29
第3章 PP2A によるオートファジー制御機構の解明.....	30
3-1 Type 2A protein phosphatase 阻害剤により Beclin 1 Ser90 がリン酸化される.....	31
3-2 マウス個体に飢餓刺激を与えると骨格筋組織で Beclin 1 Ser90 がリン酸化される.....	34
3-3 培養細胞に飢餓刺激を与えると Beclin 1 Ser90 がリン酸化される.....	36
3-4 インスリン刺激により Beclin 1 Ser90 の脱リン酸化が引き起こされる.....	38
3-5 Beclin 1 Ser90 のリン酸化はオートファジー誘導に寄与する.....	40
3-6 PP2A は直接 Beclin 1 Ser90 を脱リン酸化する.....	42
3-7 B55 α が PP2A を Beclin 1 へとリクルートする.....	44
3-8 OA による Beclin 1 Ser90 のリン酸化に ROS の産生は関与しない.....	46
3-9 Beclin 1 Ser90 をリン酸化するキナーゼは MK2 だけではない.....	48
3-10 AMPK や ULK1 は Beclin 1 Ser90 のリン酸化に関与しない.....	50
3-11 Beclin 1 Ser90 は脊椎動物間で進化的に保存され、DAPK のリン酸化モチーフである.....	52
3-12 DAPK 阻害剤は Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを低下させる.....	54

3-13	DAPK3 は Beclin 1 Ser90 をリン酸化する.....	56
3-14	飢餓刺激を受けたマウス生体において Beclin 1 Ser90 が骨格筋特異的にリン酸化される原因は、関連タンパク質の発現量の違いでは説明できない.....	59
3-15	考察.....	61
3-15-1	B55 α が Beclin 1 から解離する機構.....	62
3-15-2	Beclin 1 Ser90 のリン酸化を引き起こすキナーゼ.....	62
3-15-3	Beclin 1 Ser90 のリン酸化がオートファジーを誘導するメカニズム.....	63
3-15-4	Beclin 1 Ser90 のリン酸化における OA と PP2A 発現抑制による効果の違い.....	64
3-15-5	Beclin 1 Ser90 のリン酸化の組織特異性.....	65
第4章	PP6によるオートファジー制御機構の解明.....	66
4-1	Type 2A protein phosphatase が分解される経路の検討.....	67
4-1-1	PP6 タンパク質発現はオートファジー阻害剤 bafilomycin 処置で増加する.....	67
4-1-2	PP6 タンパク質発現はユビキチン・プロテアソーム系の抑制で減少する.....	69
4-1-3	オートファジー関連タンパク質の発現抑制や遺伝子欠損により PP6 タンパク質発現量は増加する.....	71
4-2	PP6 タンパク質発現は飢餓刺激により生理的に制御されている.....	74
4-3	胃がんモデルマウスの腫瘍部では PP6 タンパク質と p62 タンパク質が蓄積している.....	77
4-4	PP6 がオートファジーで分解されるメカニズムの解析.....	79
4-4-1	PP6 は p62 と結合する.....	79
4-4-2	p62 発現の抑制は PP6 分解を抑制する.....	81
4-4-3	Bafilomycin は PP6 の局在を変化させる.....	83
4-5	PP6 によるオートファジー制御機構の解析.....	85
4-5-1	PP6 発現の抑制はオートファジー誘導を促進する.....	85
4-5-2	PP6 は Beclin 1 の C 末端領域に結合する.....	88
4-5-3	PP6 は脱リン酸化酵素活性非依存的に Beclin 1-Vps34 複合体の形成を阻害する.....	91
4-5-4	PP6 と Beclin 1 の結合誘導は Vps34 を Beclin 1 から解離させる.....	94
4-6	考察.....	96
4-6-1	PP6 発現の制御機構.....	96
4-6-2	PP6 によるオートファジー阻害機構.....	99
4-6-3	がんにおける PP6 とオートファジーの役割.....	101
第5章	総合考察.....	104
第6章	実験材料および実験方法.....	108
6-1	細胞培養.....	109
6-2	イヌ末梢血単核球 (PBMC) の単離.....	109

6-3	細胞生存率の解析.....	109
6-4	PP2A 活性測定法.....	110
6-5	アポトーシス活性の解析.....	110
6-6	プラスミド DNA の作製と細胞への導入.....	111
6-6-1	プラスミドの作製.....	111
6-6-2	プラスミドの細胞への導入.....	112
6-6-3	ウイルスベクターの作製と感染.....	112
6-7	免疫染色法.....	113
6-8	タンパク質抽出.....	113
6-9	免疫沈降法およびプルダウン.....	114
6-10	<i>In vitro</i> kinase assay.....	115
6-11	<i>In vitro</i> phosphatase assay.....	115
6-12	Western blotting.....	115
6-13	Phos-tag を用いたタンパク質リン酸化の検出.....	116
6-14	Anti-pSer90 Beclin 1 抗体の作製.....	117
6-15	Real-time RT-PCR 法による mRNA 発現解析.....	117
6-15-1	mRNA の抽出および逆転写.....	117
6-15-2	Real-time PCR 法.....	118
6-16	Reactive Oxygen Species (ROS) 産生の測定.....	118
6-17	統計処理.....	119
6-18	使用抗体.....	119
	引用文献.....	121
	謝辞.....	133

第 1 章 背景および目的

1-1 Type 2A protein phosphatase とがん

1-1-1 Protein phosphatase 2A (PP2A) とがん

可逆的なリン酸化は、細胞内のほぼすべてのタンパク質に起こり、その構造を変化させることで、活性や細胞内局在、相互作用など様々な変化を引き起こす。リン酸化の 98%以上がセリン (Ser) とスレオニン (Thr) 残基で起こり、約 400 種類のリン酸化酵素 (protein kinase) によって制御されている (1-3)。一方、Ser/Thr 残基の脱リン酸化を担う酵素 (protein phosphatase) は約 40 種類存在し、大きく PPP、PPM、Asp phosphatase の 3 つのスーパーファミリーに分類される (4)。PPP スーパーファミリーに分類される脱リン酸化酵素は、細胞内の Ser/Thr 脱リン酸化酵素活性の大部分を占めており、Protein phosphatase 1 (PP1)、PP5、そして type 2A protein phosphatase である PP2A、PP4、PP6 などが属する (5)。これらのうち、PP2A は細胞内タンパク質の約 1%を占め、PP1 と合わせて細胞内の脱リン酸化酵素活性の約 90%を担う主要な脱リン酸化酵素であるとも言われており (6)、細胞周期の制御、アポトーシス、細胞分化の調節など多岐にわたる細胞機能を制御している。PP2A は、足場となる A サブユニットと酵素活性を持つ C サブユニットから成る AC 二量体に、基質特異性を決定する B サブユニットの 1 つが結合し、特異的な基質へとリクルートされる。B サブユニットは大きく分けて B55、B56、PR72、Striatin の 4 つのファミリーが存在する (図 1)。

PP2A の機能異常は、がん、アルツハイマー病などの神経変性疾患、糖尿病など様々な疾患の発症に関与しており (6,7)、がんにおいては重要な腫瘍抑制因子として働く (8)。PP2A は、c-Myc や Akt、ERK1/2 など、がんの幹細胞性の維持や増殖の促進に働く因子を阻害することで無秩序な細胞増殖を抑制し、Bcl-2 などのアポトーシス抑制因子の働きを阻害したり、反対に caspase 3 など

のアポトーシス促進因子の働きを強めたりすることでアポトーシス誘導を促進する (9-12)。そのため、細胞のがん化には PP2A の抑制が必須であり (13)、ほとんどのがんで PP2A サブユニットの変異や発現低下、PP2A 阻害タンパク質の発現上昇などによる PP2A 活性の低下が観察される (14)。近年、がん細胞において低下した PP2A 活性を回復させることで、抗がん効果が得られることが明らかになったことから、各がん種における PP2A 活性低下の分子機構を明らかにすることが、抗がん剤の創薬標的の同定につながると考えられる (15,16)。

SET/I2PP2A (SET) は、PP2A の内在性阻害タンパク質の 1 つとして知られており、急性未分化白血病における染色体の転座によって生じた *SET-CAN* 融合遺伝子の構成因子の 1 つとして同定された (2)。SET は PP2A に直接結合してその活性を抑制することから、SET 発現上昇による PP2A 活性の抑制が、がんの悪性化機構の 1 つとして重要な役割を果たすと考えられる (17)。実際、ヒトの急性未分化白血病や慢性骨髄性白血病などにおいて SET の発現が上昇し、がんの悪性化に寄与していることが報告されている (18,19)。

OP449 は、ApoE タンパク質の Low Density Lipoprotein (LDL) 受容体認識部位をベースに合成された細胞透過性ペプチドで、SET を標的とすることで PP2A 活性を回復させ、ヒトの B 細胞性非ホジキンリンパ腫や B 細胞性慢性リンパ性白血病の細胞株に対して抗がん効果を示すことが報告されている (19)。これらの結果は、抗がん剤開発の標的としての SET の有用性を強く示唆している。しかし、イヌの腫瘍における SET の発現やその役割、SET 標的薬の抗がん効果に関してこれまでに報告されていない。

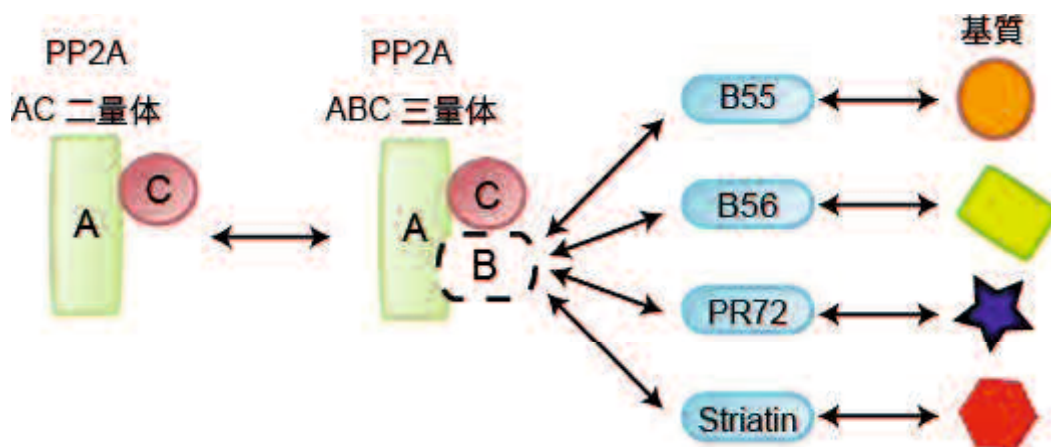


図1 PP2A 複合体

足場となる A サブユニットと酵素活性を持つ C サブユニットから成る AC 二量体に、基質特異性を決定する B サブユニットのうちの 1 つが結合し、特異的な基質へとリクルートされる。B サブユニットには大きく分けて B55、B56、PR72、Striatin の 4 つのファミリーが存在する。

1-1-2 Protein phosphatase 6 (PP6) とがん

PP6は複合体として機能し、触媒活性を持つ触媒サブユニット (PP6c) が調節サブユニットであるPP6Rs (PP6R1、R2、R3) のうちの1つと結合し、特異的な基質へとリクルートされると考えられている (図2) (20,21)。PP6の酵母ホモログであるSit4は、細胞周期の調節や酸化ストレスに対する抵抗性、TORC1依存的な細胞成長や細胞増殖に必要であることなどが報告されている (22,23)。ほ乳類では、PP6は、Aurora A kinaseを不活性化することで細胞分裂を抑制し (24)、DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) を活性化することでDNA修復を促進する (25)。また、PP6は、nuclear factor-kappa B (NF-κB) シグナルを抑制することで抗炎症性に働き (26)、炎症性腸疾患では*Ppp6c*遺伝子の増幅が報告されている (27)。さらに、上皮細胞では細胞密度に依存してPP6のタンパク質発現量が増加し、E-cadherin複合体を安定化することで上皮細胞間接着を維持するなど (28)、PP6は様々な機能を有する。

近年、PP6の機能異常が、がんの発生や悪性化にも関与していることが明らかになってきた。悪性黒色腫では、PP6に高頻度に不活性変異が認められ、PP6が不活性化することでAurora A kinaseのリン酸化レベルを上昇させ、染色体不安定性やDNA傷害を引き起こすことが発症に寄与していると報告されている(29,30)。一方、グリオーマでは、PP6の発現量と予後に負の相関関係があり、PP6発現の上昇により、放射線に対する抵抗性が増加することが報告された (31)。また、ケラチノサイト特異的*Ppp6c*遺伝子欠損マウスでは、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) や紫外線ultraviolet B (UVB) 誘導性の腫瘍形成が促進されることが報告されており (32,33)、PP6はがん腫によって腫瘍促進的に機能するという報告と抑制的に機能するという報告の両方が存在する。

さらに、悪性中皮腫でPP6の発現量が増加していることや (34)、胃がんにおいて変異が認められることが報告されているが (35)、これらのがんにおけるPP6の役割や、PP6発現が上昇する分子機構については明らかになっていない。

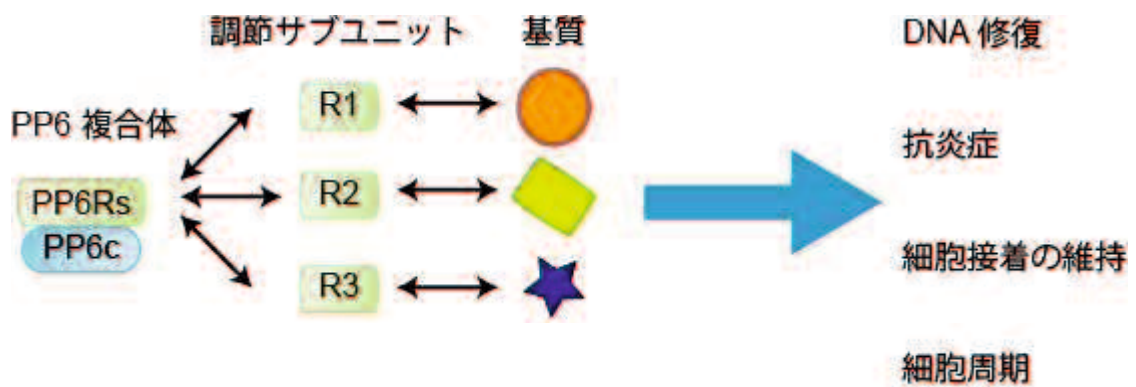


図2 PP6複合体

触媒活性を持つ触媒サブユニット(PP6c) が調節サブユニットである PP6Rs (PP6R1、R2、R3) のうちの1つと結合し、特異的な基質へとリクルートされる。

1-2 タンパク質分解機構

1-2-1 ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー

真核生物には、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の 2 つの主要な細胞内タンパク質分解経路が存在する。生体においては、この 2 つの分解系が独立に、時には協調的に働き、細胞内タンパク質の代謝を制御することで細胞の恒常性が維持されている。

ユビキチン・プロテアソーム系は、分解を受けるタンパク質にユビキチンが結合 (ポリユビキチン化) し、これを指標としてタンパク質をプロテアソームに運び分解する、選択的なタンパク質分解機構である (図 3A)。構造の破たんや機能不全になった異常タンパク質のほとんどはユビキチン・プロテアソーム系により分解されるが、プロテアソームは凝集したタンパク質を壊すことができないため、プロテアソーム系により分解できないタンパク質は、オートファジーにより分解される (36)。

オートファジーは自食作用とも呼ばれる、酵母から哺乳類まで進化的に保存された細胞内タンパク質分解機構である。オートファジーでは、まず隔離膜と呼ばれる脂質二重膜が細胞質内のタンパク質や細胞内小器官を取り囲むことでオートファゴソームと呼ばれる構造になり、リソソームがオートファゴソームと融合してオートリソソームを形成し、その中身をアミノ酸レベルまで分解し、アミノ酸の再利用を行う (図 3B) (37,38)。

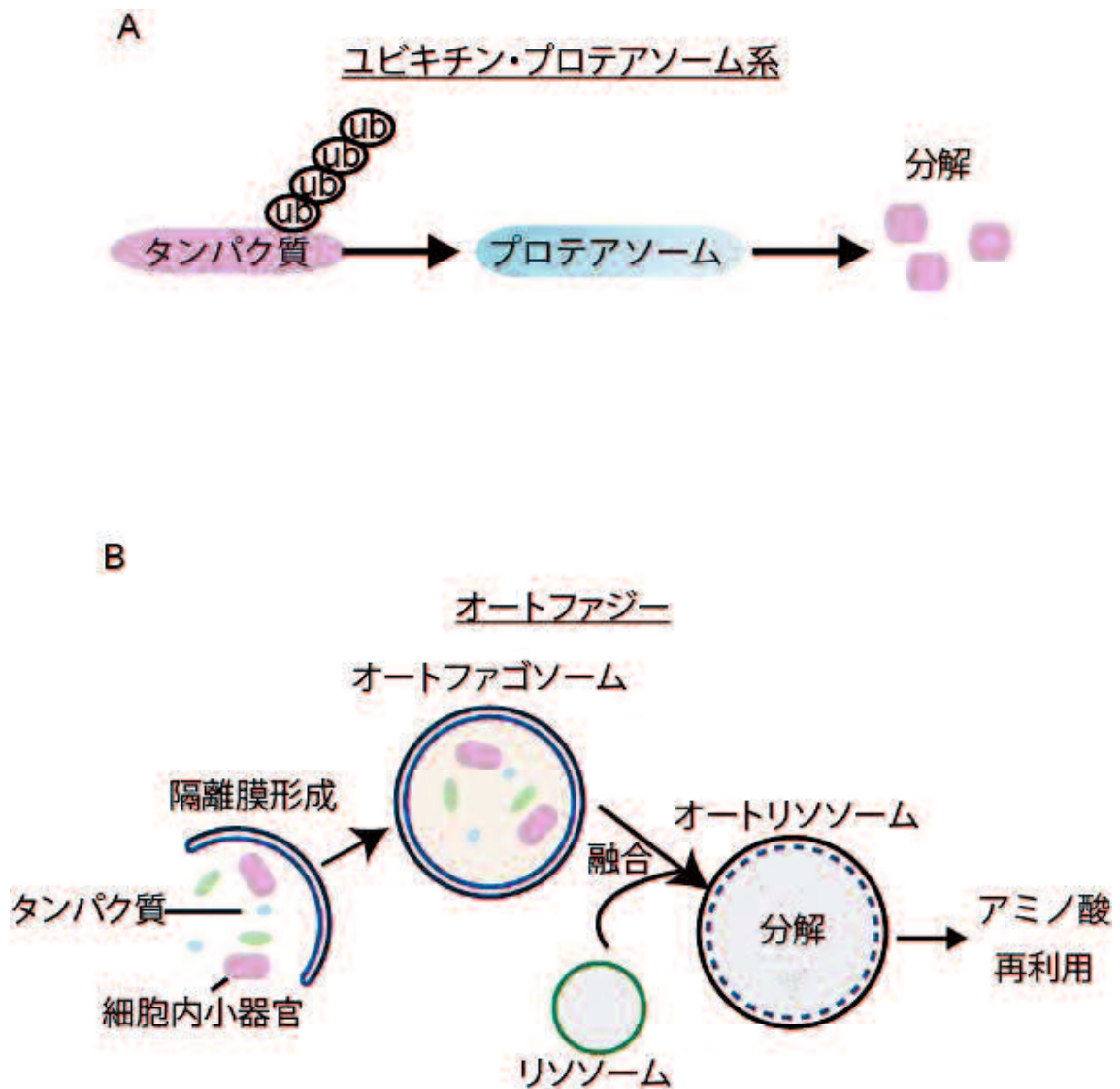


図3 細胞内タンパク質分解機構

(A) 標的となるタンパク質にユビキチン (Ub) が結合し、これをプロテアソームが認識し、タンパク質が分解される。

(B) 隔離膜が細胞質内に形成され、タンパク質や細胞内小器官を取り囲んでオートファゴソームと呼ばれる構造になる。その後、リソソームがオートファゴソームと融合することで (オートリソソーム)、その中身をアミノ酸レベルまで分解し、再利用が可能な状態にする。

1-2-2 選択的オートファジー

オートファジーは、細胞内タンパク質や細胞内小器官を非選択的に分解する機構であるが、プロテアソーム系で分解できない大きな凝集体の分解に関与する選択的なオートファジーの存在も報告されている (39)。オートファゴソームには基質の選択性がないため、選択的にタンパク質を分解するためには基質とオートファゴソームとをつなぐアダプタータンパク質が必要となる。p62/SQSTM1 は、C 末端側にユビキチン結合ドメインである ubiquitin associated (UBA) ドメインとオートファゴソームの膜表面に存在する LC3 との結合ドメインである LC3-interacting region (LIR) の両方をもつことから、ポリユビキチン化タンパク質の選択的オートファジーにおける主要なアダプタータンパク質であると考えられている (39)。ユビキチンタンパク質には 7 つのリジン (K) 残基 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) が存在し、このいずれかに連鎖的にユビキチンが連結し、ポリユビキチン鎖が形成される (40)。いずれのリジン残基でポリユビキチン鎖が形成されるかによって、ユビキチン化の生理機能が異なることが知られている。例えば、K48 のポリユビキチン化はプロテアソームによる分解を誘導するが、K63 のポリユビキチン化はリソソームによる分解すなわちオートファジーによる分解を誘導すると考えられている (41,42)。選択的オートファジーは、大きな凝集体のみならず、障害をうけたミトコンドリアや核などの細胞内小器官、ユビキチン化されたタンパク質、細菌など様々なものを分解することが報告されている (43-45)。選択的オートファジーの不全は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や、がん、感染症など様々な疾患に関与すると考えられている(45-47)。

1-2-3 Beclin 1 によるオートファジー制御機構

オートファジーの誘導には、クラス III PI3 キナーゼ複合体によるホスファチジルイノシトール (PI) のホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) へのリン酸化が必要である (48,49)。クラス III PI3 キナーゼ複合体は、キナーゼ活性を持つ Vps34、調節サブユニットである Vps15/p150、足場タンパク質である Beclin 1 からなるコア複合体を中心としており、Vps34 のキナーゼ活性は Beclin 1 と結合することで維持される (50)。

Beclin 1 は、オートファジーに必須の因子であり、酵母 Atg6 のオルソログである。また、Beclin 1 はヒトの乳がん、精巣がん、卵巣がんなどにおいて高率に欠損や変異が認められること (51-53)、Beclin 1 のヘテロノックアウトマウスでがんの自然発生率が顕著に増加することから、腫瘍抑制因子と考えられている (54,55)。Beclin 1 はコア複合体の足場として様々な因子と結合し、結合する因子によってオートファジー誘導の様々な段階が制御されている。

Autophagy-related protein 14-like protein (Atg14L) と結合したコア複合体は、オートファジーの初期にオートファゴソームの隔離膜の形成を促し (56,57)、UV radiation resistance-associated gene (UVRAG) と結合したコア複合体はオートファジーの後期に働きオートファゴソームの成熟を促す (図 4A) (58,59)。一方、Bcl-2 は Beclin 1 と結合することで Beclin 1 と Vps34 の結合を阻害し、オートファジーを抑制する (図 4B) (59-62)。Beclin 1 の結合因子やクラス III PI3 キナーゼ複合体の活性の制御には、Beclin 1 のリン酸化などによる翻訳後修飾が関与している (表 1) (63-71)。Beclin 1 の可逆的なリン酸化によるクラス III PI3 キナーゼ複合体の構成や機能の制御に関しては多くの報告があるが、脱リン酸化の分子機構については明らかになっていない。

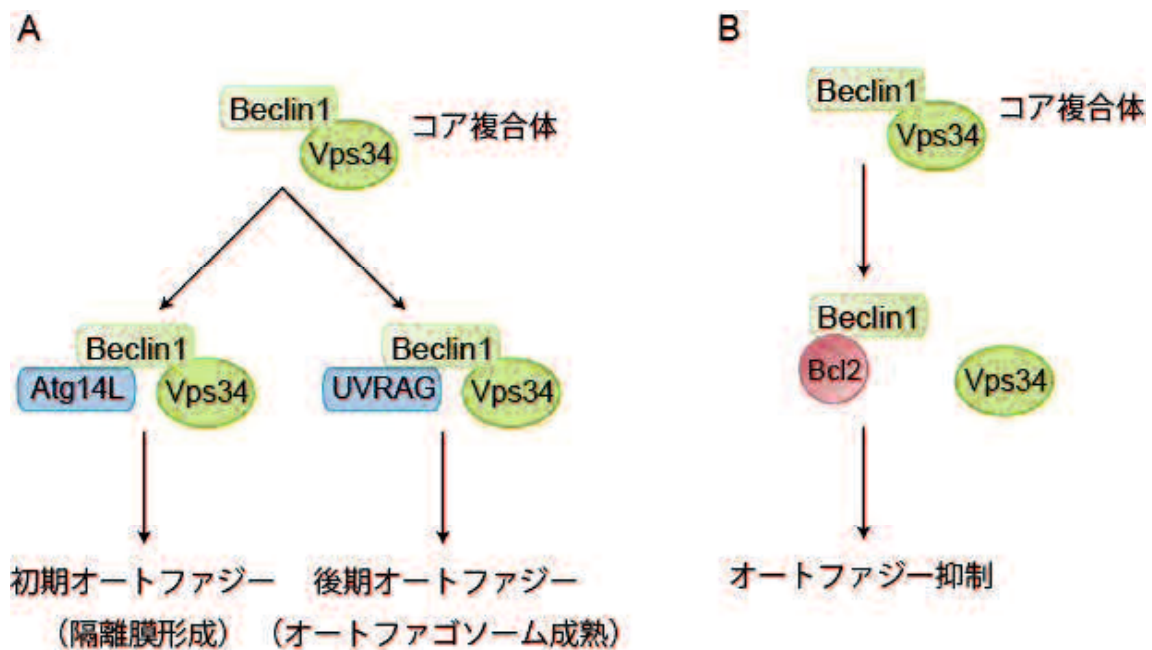


図 4 オートファジー制御機構

(A) Beclin 1/Vps34 コア複合体に Atg14L が結合したクラス III PI3 キナーゼ複合体は、オートファジーの初期に隔離膜の形成に関与し、UVRAG が結合したクラス III PI3 キナーゼ複合体は、オートファジーの後期にオートファゴソームの成熟に関与する。

(B) Beclin 1 に Bcl-2 が結合すると Vps34 が Beclin 1 から解離しオートファジーは抑制される。

表1 Beclin 1 のリン酸化サイトとリン酸化するキナーゼの機能およびオートファジーに与える影響

リン酸化サイト	Kinase	機能	オートファジー
S14	ULK1	PI3K 活性の上昇	誘導
S90	MK2/MK3	PI3K 活性の上昇	誘導
S93	AMPK	PI3K 活性の上昇	誘導
S96	AMPK	PI3K 活性の上昇	誘導
T108	Mst1	Bcl-2 との結合を誘導	抑制
T119	DAPK1	Bcl-2 との結合を解離	誘導
S234	Akt	14-3-3 との結合を誘導	抑制
S295	Akt	14-3-3 との結合を誘導	抑制

1-3 研究目的

本研究は、がんにおける type 2A protein phosphatase の役割と治療標的としての可能性を明らかにすることを目的に行った。第 2 章では、抗がん戦略における PP2A 活性化の有用性を明らかにするため、イヌのリンパ腫に対する SET 標的薬の抗がん効果を明らかにすることを目的に研究を行った。また、第 3 章では、PP2A の機能不全が、がんの発症や悪性化を引き起こす分子機構として、PP2A によるオートファジー活性の制御機構の関与を明らかにすることを目的に研究を行った。さらに第 4 章では、PP2A と同じ type 2A protein phosphatase ファミリーに属する PP6 によるオートファジー活性の制御機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

第2章 イヌ T 細胞性リンパ腫細胞に対する
SET 標的薬 OP449 の抗がん効果の検討

2-1 イヌリンパ腫細胞株間での SET タンパク質発現量の比較

リンパ腫は、イヌで最も重要な疾患の1つであり、イヌが罹患する全てのがんの20%、血球細胞のがんの85%を占めている(72)。リンパ腫の発症原因は、遺伝的要因や環境的要因、ウイルスの感染などが考えられているが、未だにその詳細な分子機構は解明されていない(73)。リンパ腫に対しては、様々な治療法が行われているが、イヌのリンパ腫の予後は悪く、一般的に用いられるシクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロンの組み合わせで行うCHOP療法で、平均寛解期間は26~51ヶ月である(74,75)。したがって、獣医療において、より効果的な抗がん剤の開発が求められている。

ヒトのB細胞性慢性白血病や非ホジキンリンパ腫細胞株では、SETのタンパク質発現の上昇が報告されている(19)。しかし、イヌのリンパ腫細胞株でのSETの発現量を検討した報告はない。そこで本章では、初めにイヌのT細胞性リンパ腫細胞株(CL-1、CLGL-90、Ema、GL-1、Nody-1、UL-1)とB細胞性リンパ腫細胞株(17-71、CLBL-1)でのSET発現量を比較した。

イヌ正常末梢血単核球細胞のSET発現量を100%とし、各リンパ腫細胞株のSET発現量を検討したところ、SET発現量が8細胞株中7細胞株で1.5倍以上に上昇しており、特にEma細胞では約5倍に上昇していることが認められた(図5)。一方、PP2AのCサブユニットやAサブユニットの発現量には、ほとんど変化は認められなかった。

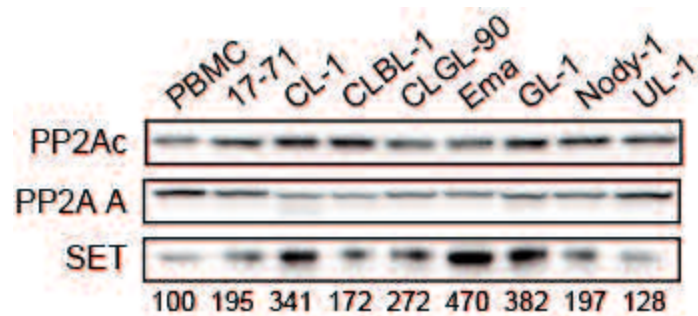


図5 イヌリンパ腫細胞株間での SET タンパク質発現量の比較

各種イヌリンパ腫細胞の PP2Ac、PP2A A、SET のタンパク質発現量を western blotting を用いて検討した。図の下には、PBMC の SET の発現量を 100% とし、リンパ腫細胞株での SET 発現量を相対値で表した。PBMC: Peripheral blood mononuclear cells。

2-2 ヒトとイヌの SET のアミノ酸配列の比較

OP449 は SET の C 末端領域に結合し、ヒトの腫瘍で抗がん効果を示すことが報告されている (15,19,76-78)。OP449 がイヌの SET に結合できるか検討するため、ヒトの SET α (Accession number NM_001122821) とイヌの SET (Accession number XM_846114) のアミノ酸配列を Clustal X2 を用いて比較した。

N 末端領域では相同性は比較的低かったが、C 末端領域では 100%保存されており、全体で約 96%の相同性があることが認められた (図 6)。ヒトの SET α とイヌの SET は C 末端領域が完全に一致したことから、OP449 の SET 阻害効果はイヌでも認められる可能性が示唆された。

2-3 SET 標的薬 OP449 は SET 発現に依存して細胞死を誘導する

イヌのリンパ腫に対する SET 標的薬 OP449 の抗がん効果を検討するため、SET 高発現細胞株である Ema 細胞と SET 低発現細胞株である UL-1 細胞を OP449 で処置し、細胞生存率を解析した。

0.1 μM および 1 μM の OP449 では、Ema 細胞特異的に細胞死が誘導されることが認められた (図 7A)。一方、10 μM の OP449 は、Ema 細胞、UL-1 細胞共に細胞死を誘導することが認められた。さらに、イヌ正常末梢血単核球細胞 (PBMC) を 1 μM の OP449 で処置したところ、細胞死は誘導されなかった (図 7B)。以上の結果から、低濃度の OP449 は SET の発現量依存的に細胞死を誘導することが示唆された。

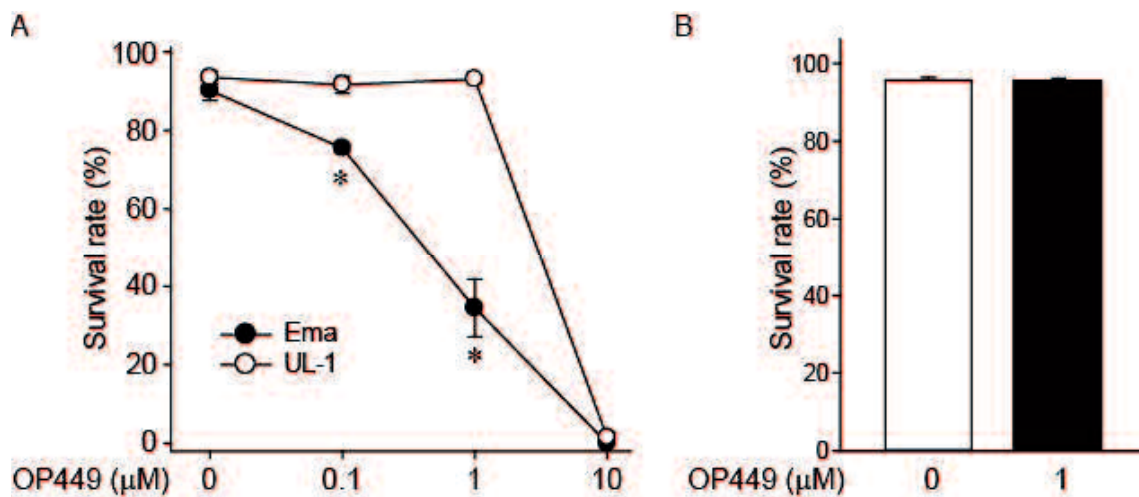


図7 SET標的薬OP449はSET発現に依存して細胞死を誘導する

Ema細胞とUL-1細胞をOP449 (0~10 μ) で72時間 (A)、PBMC (B) をOP449 (1 μM) で72時間処置し、細胞生存率をtrypan blue exclusion assayにより解析した。N=3。

*: $P < 0.05$ (UL-1との比較)。

2-4 OP449 は Ema 細胞の PP2A 活性を上昇させる

ヒトの腫瘍細胞では、OP449はPP2A活性を回復させることで抗がん効果を示す (19,77)。そこで、Ema細胞でのOP449によるPP2A活性の変化を検討したところ、Ema細胞ではOP449によりPP2A活性が約1.5倍に増加することが認められた (図8)。この結果から、OP449はイヌのSETに作用し、PP2A活性を回復させる効果があることが示唆された。

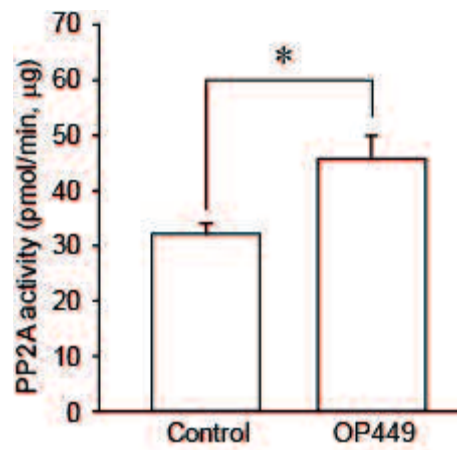


図8 OP449はEma細胞のPP2A活性を上昇させる

Ema細胞をOP449 (1 μM) で2時間処置し、PP2A活性を測定した。

N=3。*: $P < 0.05$ (Controlとの比較)

2-5 OP449 はイヌリンパ腫細胞株のアポトーシスを誘導する

OP449により誘導される細胞死へのアポトーシスの関与を、caspase 3活性およびannexin V陽性細胞数の増加により検討した。

Ema細胞をOP449で処置したところ、活性型caspase 3の発現が上昇していることが認められた (図9A)。さらに、FACS解析から、OP449処置によりannexin V陽性細胞の増加が認められた (図9B)。以上の結果から、OP449による細胞死はアポトーシスであることが示唆された。

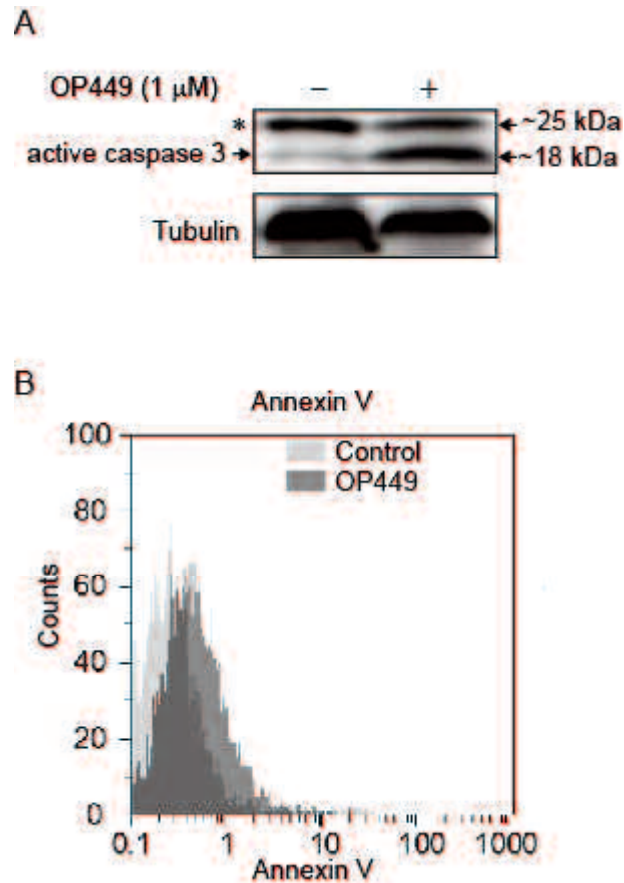


図9 OP449はイヌリンパ腫細胞株のアポトーシスを誘導する

(A, B) Ema 細胞をOP449 (1 μ M) で8時間処置し、(A) western blottingによる caspase 3活性の解析、および (B) FACSによるannexin V 陽性細胞数の解析を行った。* : 非特異的バンド。Tubulinはローディングコントロールとして用いた。

N=2。

2-6 OP449 による細胞死は caspase 阻害剤により抑制される

OP449 による細胞死がアポトーシスにより誘導されていることが示唆されたことから、次に caspase の阻害により OP449 処置による細胞死が抑制されるか検討を行った。

Pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK (20 μ M) で Ema 細胞を前処置し、OP449 処置を行ったところ、OP449 による細胞死が抑制されることが認められた (図 10)。この結果により、OP449 による細胞死がアポトーシスにより誘導されていることが強く支持された。

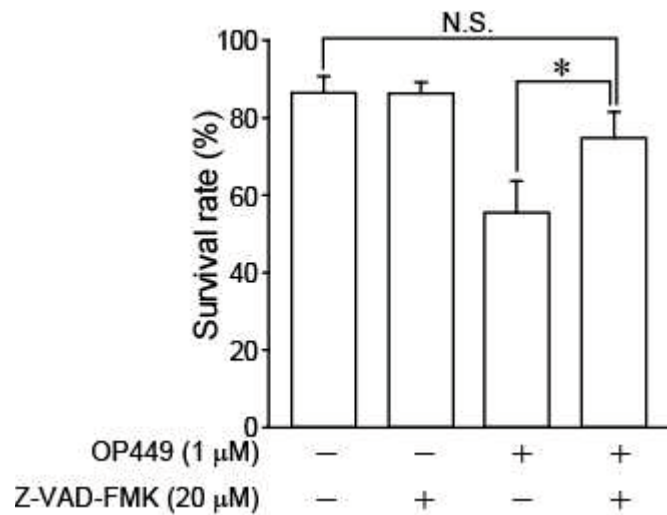


図10 OP449による細胞死はcaspase阻害剤により抑制される

Ema細胞をcaspase阻害剤であるZ-VAD-FMK (20 μM) で1時間前処置し、OP449 (1 μM) で72時間処置した。細胞生存率をtrypan blue exclusion assayにより解析した。N=3。*: $P < 0.05$ 。N.S.: Not Significant。

2-7 考察

2-7-1 OP449 のイヌリンパ腫治療薬としての可能性

本研究では、イヌで症例数の多いがんの1つであるリンパ腫に対する SET 標的薬 OP449 の抗がん効果を検討した。現在、イヌリンパ腫の治療は、主にシクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾロンを組み合わせ投与する CHOP 療法が行われている。イヌリンパ腫は、大きく T 細胞性と B 細胞性に分けられる。T 細胞性リンパ腫は B 細胞性リンパ腫よりも発生頻度は低いが、化学療法に対する耐性を獲得しやすく、予後は悪い (79)。B 細胞性リンパ腫に関しても、化学療法により 80%~90%の寛解率が得られるが、1年以内に再発や耐性の獲得が認められることが多く (74,80)、リンパ腫に対する新規治療法の開発が求められている。

本研究では、イヌリンパ腫細胞株 8 細胞株中 7 細胞株で SET の発現量が PBMC の 1.5 倍以上になっていること、SET 標的薬 OP449 が PP2A 活性を上昇させ、SET 高発現細胞株特異的にアポトーシスを誘導することを明らかにした。以上のことから、SET がイヌリンパ腫の新規治療標的になり得ること、PP2A を活性化させるという抗がん戦略が臨床に応用可能であることが示唆された。

2-7-2 OP449 の作用機序

本研究において、SET標的薬がイヌT細胞性リンパ腫細胞株に対して、アポトーシスを誘導することが認められたが、アポトーシスをどのように誘導しているか、その詳細なメカニズムは明らかにできていない。OP449はPP2A活性を上昇させたことから、PP2A活性の上昇によりアポトーシス誘導シグナルが活性化された可能性が考えられる。PP2Aは重要な腫瘍抑制因子であることが知られており、細胞内の様々なシグナルを制御している。

PP2Aは、酵素活性を持つCサブユニットと足場となるAサブユニットのAC二量体によりコア複合体を構成しており、ここに約20種存在するBサブユニットの1つが結合することで三量体となり、基質特異的な脱リン酸化を引き起こす。SETはすべてのPP2A複合体に結合するのではなく、一部のBサブユニットを含むPP2A複合体とのみ結合し、その活性を抑制する (81)。PP2AcからのSETの解離は、PP2Aの複合体構成を変化させないことが報告されており (82)、OP449はPP2Aの複合体構成を変化させず、一部のPP2A複合体の活性を上昇させていると考えられる。その標的の1つとして、多くの腫瘍で活性化していることが知られるAktが挙げられる (83-86)。PP2AはAktのThr308とSer473を直接脱リン酸化することでAkt活性を抑制し、細胞生存シグナルを阻害している (84,87)。OP449様のSET阻害ペプチドであるCOG112は、Aktのリン酸化レベルを低下させることから (82)、OP449によりPP2Aが活性化され、Akt活性が低下することでアポトーシスが誘導された可能性が考えられる。

また、様々ながんで発現上昇と予後不良の相関が報告されているc-MycもPP2Aの標的である (88,89)。c-Mycは、MAPKやCDKによりSer62がリン酸化されると安定化し、PP2AによりSer62が脱リン酸化されると分解される (90,91)。本研究の後、ヒト乳腺腫瘍やすい臓がんでSET発現が上昇しており、SETの発現抑制やOP449処置がPP2A活性を回復させ、c-Mycを脱リン酸化することで抗がん効果を示すことが報告された (15,77)。さらに、SETは、がん細胞の抗がん剤に対する抵抗性の獲得にも寄与していることが報告されており、ヒト乳がん細胞や非小細胞性肺がん、転移性結腸がんでSETの発現が上昇していることや、SET発現の抑制やSET標的薬の処置がPP2A活性を回復させ、抗がん剤に対する感受性を上昇させることが報告されている (92-96)。

このように、SET標的薬は、様々な腫瘍で抗がん効果を示すことが報告されて

おり、さらなる研究を行っていくことで、将来的にSETを標的とした新規治療薬の開発につながると考えられる。

2-7-3 SET 発現が上昇するメカニズム

本研究において、多くのイヌリンパ腫細胞株で、PBMCと比較してSET発現量の増加が認められたが、SET発現上昇の分子機構については明らかになっていない。ヒトの慢性骨髄性白血病では、Bcr-AblがJak2を活性化し、これがSET発現の増加につながることが報告されている (97)。免疫抑制剤であるFTY720は、SET発現を抑制することでPP2A活性を上昇させ、アポトーシスを誘導するが (98)、FTY720はSphingosine-1-phosphate 1 (S1P1) 受容体シグナルを抑制することから、S1P1の下流に存在するPI3K/AktシグナルやPLC/PKCシグナル、Raf/ERKシグナルの活性化が、SETの発現を上昇させている可能性がある。

また、SET発現を制御する転写因子としてEVI1やMYC/SP1/RUNX1/GATA2複合体、ZFXが報告されており、イヌリンパ腫でこれらの転写因子の活性が上昇している可能性が考えられる (99-101)。さらに、ヒトの絨毛がんでは、microRNA-199b発現の減少がSET発現の上昇を引き起こすことから (102)、microRNA-199bを始めとしたmicroRNAによる制御機構の関与も考えられる。

今後、イヌリンパ腫におけるSET発現調節機構の詳細を明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

第3章 PP2Aによるオートファジー制御機構の解明

3-1 Type 2A protein phosphatase 阻害剤により Beclin 1 Ser90 がリン酸化される

Beclin 1 複合体はオートファジー誘導において重要な役割を果たし、複合体の構成は Beclin 1 の翻訳後修飾によって制御されている。キナーゼによるリン酸化も Beclin 1 複合体の構成を制御することが知られているが、脱リン酸化を制御するホスファターゼに関する情報は無い。

野生型の FLAG-Beclin 1 (WT) を安定発現させたヒト乳がん細胞株 MCF7 細胞を、type 1 protein phosphatase 阻害剤である tautomycin (TAU)、type 2A protein phosphatase 阻害剤である okadaic acid (OA)、type 2B protein phosphatase 阻害剤である cyclosporin A (CsA) で処置し、Beclin 1 のリン酸化レベルの変化を解析した。Beclin 1 のリン酸化の検出には、リン酸基特異的に結合する phos-tag biotin HRP を用いた。その結果、OA により Beclin 1 のリン酸化レベルが上昇することが認められた (図 11A)。

OA によりリン酸化される Beclin 1 のリン酸化サイトを明らかにするために、FLAG タグをつけた Beclin 1 WT と各種ミュータント S90A、T119A、S234A、および S295A をそれぞれ MCF7 細胞に安定発現させ、OA による Beclin 1 のリン酸化レベルを検討した。その結果、Beclin 1 S90A で Beclin 1 のリン酸化がほとんど認められなかった (図 11B)。そこで、Ser90 リン酸化 Beclin 1 に特異的な抗体を作製した。FLAG タグをつけた Beclin 1 WT もしくは Beclin 1 S90A を発現させた MCF7 細胞を OA で処置し、作製した抗体の特異性を western blotting を用いて検討した。その結果、Beclin 1 S90A では Ser90 リン酸化 Beclin 1 抗体によるバンドが検出されず、Beclin 1 WT で検出されたことから、この抗体は Ser90 リン酸化 Beclin 1 を特異的に検出していることが明らかになった (図 11C)。

最後に、この抗体を用いて内在性の Beclin 1 Ser90 のリン酸化を検討した。HeLa

細胞を OA で処置すると、処置時間依存的に Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルが上昇することが認められた (図 11D)。以上の結果から、PP2A が Beclin 1 Ser90 の脱リン酸化に関与していることが示唆された。



図 11 Type 2A protein phosphatase 阻害剤により Beclin 1 Ser90 がリン酸化される

(A) 野生型の FLAG-Beclin 1 (FLAG-Beclin 1 WT) を安定発現させた MCF7 細胞を、type 1 phosphatase 阻害剤 tautomycin (TAU、1 μ M)、type 2A phosphatase 阻害剤 okadaic acid (OA、100 nM)、type 2B phosphatase 阻害剤 cyclosporin A (CsA、10 μ M) で 12 時間処置し、FLAG M2 ビーズを用い FLAG-Beclin 1 を免疫沈降した。

Phos-tag biotin HRP を用いて Beclin 1 のリン酸化を検出した典型例。N=3。

(B) MCF7 細胞に、FLAG-Beclin 1 WT、S90A、T119A、S234A および S295A を安定発現させ、OA (100 nM) で 20 時間処置し、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降した。Phos-tag biotin HRP を用い Beclin 1 のリン酸化を検出した典型例。N=3。

(C) MCF7細胞にFLAG-Beclin 1 WTおよびFLAG-Beclin 1 S90Aを安定発現させ、OA (100 nM) で6時間処置し、FLAG M2ビーズを用いて免疫沈降した。抗Ser90リン酸化Beclin 1抗体 (pSer90 Beclin 1) を用い、Beclin 1 Ser90のリン酸化を検出した典型例。N=3。

(D) HeLa細胞をOA (100 nM) で0~6時間処置し、western blottingを用いてBeclin 1 Ser90のリン酸化を検出した典型例。Actinはローディングコントロールとして用いた。N=3。

3-2 マウス個体に飢餓刺激を与えると骨格筋組織で Beclin 1 Ser90 がリン酸化される

Beclin 1 Ser90が、飢餓刺激もしくは栄養刺激のどちらでリン酸化されるか検討を行った。マウスを絶食前 (1)、絶食後24時間 (2)、絶食後48時間 (3)、その後の再給餌2時間 (4)、再給餌4時間 (5)、再給餌8時間 (6) の各タイミングで安楽殺し (図12A)、腓腹筋、内転筋、肝臓、心臓を摘出した。

LC3のI型からII型への変換をwestern blottingを用いて検討したところ、いずれの臓器でも絶食によるLC3-Iの減少とLC3-IIの増加、再給仕によるLC3-Iの増加とLC3-IIの減少が認められ、絶食によりオートファジーが誘導され、再給餌によりオートファジーが抑制されていることが示唆された (図12B)。一方、Beclin 1 Ser90のリン酸化は、絶食刺激により腓腹筋 (速筋) および内転筋 (遅筋) でのみ認められ、肝臓や心臓ではほとんど認められなかった (図12B)。

以上の結果から、Beclin 1 Ser90のリン酸化はマウス個体で生理的にも引き起こされ、栄養・飢餓刺激による制御を受けていることが示唆された。

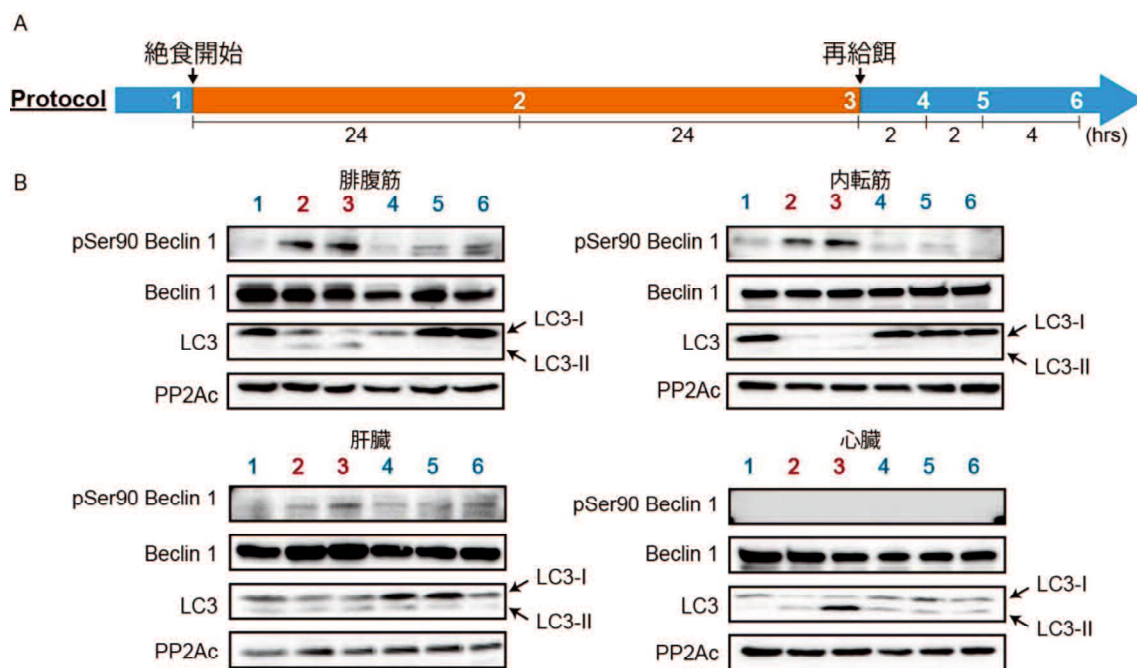


図 12 マウス個体に飢餓刺激を与えると骨格筋組織で Beclin 1 Ser90 がリン酸化される

(A) マウスを絶食前 (1)、絶食 24 時間 (2)、絶食 48 時間 (3)、その後の再給餌 2 時間 (4)、再給餌 4 時間 (5)、再給餌 8 時間 (6) し、各臓器を摘出した。

(B) Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルと Beclin 1 の発現量および LC3 の I 型から II 型への変換を western blotting を用いて検討した典型例。PP2Ac はローディングコントロールとして用いた。N=3。

3-3 培養細胞に飢餓刺激を与えると Beclin 1 Ser90 がリン酸化される

培養細胞においても、飢餓刺激がBeclin 1 Ser90をリン酸化するか検討を行った。

FLAG-Beclin 1を安定発現させたMCF7細胞を、Earle's balanced salt solution (EBSS) で処置することで飢餓刺激を与えたところ、短時間の飢餓刺激でBeclin 1 Ser90のリン酸化が認められた (図13A)。

Beclin 1のThr119は、飢餓刺激によりリン酸化され、オートファジー誘導に寄与していることが示唆されているが (71)、本研究では、飢餓刺激によるリン酸化レベルの上昇は認められなかった。Beclin 1 WTおよびBeclin 1 T119Aを発現させたMCF7細胞を用いてリン酸化Thr119 Beclin 1抗体の特異性を検討したところ、WTでのみBeclin 1 Thr119のリン酸化が検出されたことから、この抗体はBeclin 1 Thr119のリン酸化を特異的に認識していることが確認できた (図13B)。

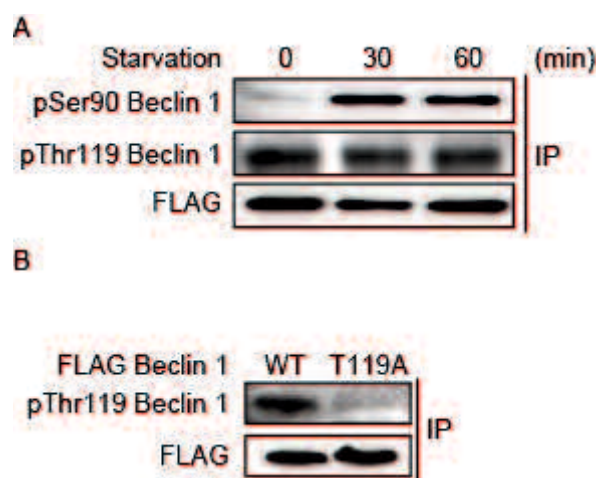


図 13 培養細胞に飢餓刺激を与えると Beclin 1 Ser90 がリン酸化される

(A) MCF7 細胞に FLAG-Beclin 1 WT を安定発現させ、EBSS で 0~60 分 処置することで飢餓刺激を行い、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降した。Western blotting を用いて、Beclin 1 Ser90 と Thr119 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=3。

(B) MCF7 細胞に FLAG-Beclin 1 WT および FLAG-Beclin 1 T119A を安定発現させ、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降した。Western blotting を用いて、Beclin 1 Thr119 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=2。

3-4 インスリン刺激により Beclin 1 Ser90 の脱リン酸化が引き起こされる

オートファジー抑制刺激であるインスリンが、Beclin 1 Ser90のリン酸化を抑制するか検討した。

FLAG-Beclin 1を安定発現させたMCF7細胞を、FBS非含有培地で24時間処置することで飢餓状態にした後にインスリンで刺激した。インスリン刺激後短時間でBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルが減少することが認められた (図14)。以上の結果から、栄養刺激によりBeclin 1 Ser90は脱リン酸化されることが示唆された。

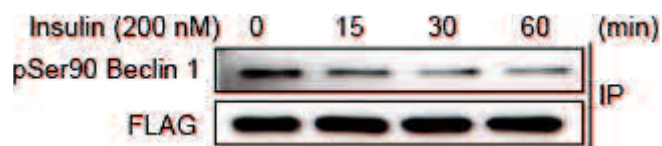


図 14 インスリン刺激により Beclin 1 Ser90 の脱リン酸化が引き起こされる
 FLAG-Beclin 1 WT を安定発現させた MCF7 細胞を FBS 非含有培地で 24 時間処置した後に、insulin (200 nM) で 0~60 分処置し、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降した。Western blotting を用いて、Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=3。

3-5 Beclin 1 Ser90 のリン酸化はオートファジー誘導に寄与する

次に、Beclin 1 Ser90のリン酸化がオートファジー活性に与える影響を検討した。オートファジー活性の指標には、オートファジー阻害剤である**bafilomycin**によるLC3-IIの蓄積量を指標とした方法が用いられており、**bafilomycin**によるLC3-IIの蓄積量の増加はオートファジー活性の上昇を示している (103)。そこで、Beclin 1 Ser90のリン酸化がオートファジーに与える影響を、FLAG-Beclin 1 WTおよびFLAG-Beclin 1 S90Aを安定発現させたMCF7細胞を用いて検討した。その結果、Beclin 1 S90A発現細胞ではBeclin 1 WT発現細胞に比べ、**bafilomycin** や飢餓刺激によるLC3-IIの蓄積が少ないことが認められた (図15A)。

細胞質全体に拡散しているLC3-Iは、オートファジーが誘導されてLC3-IIへと変換されると、オートファゴソームの膜表面に集合しドット状の構造物 (**puncta**) を形成する。この**puncta**数の増加もオートファジー活性の指標として用いられている (103)。FLAG-Beclin 1 WTおよびFLAG-Beclin 1 S90Aを安定発現させたMCF7細胞を用いて**puncta**数を検討したところ、Beclin 1 S90A発現細胞はBeclin 1 WT発現細胞に比べ、飢餓刺激時の**puncta**数が少ないことが認められた (図15B)。以上の結果から、Beclin 1 Ser90のリン酸化は、オートファジーの誘導に寄与していることが示唆された。

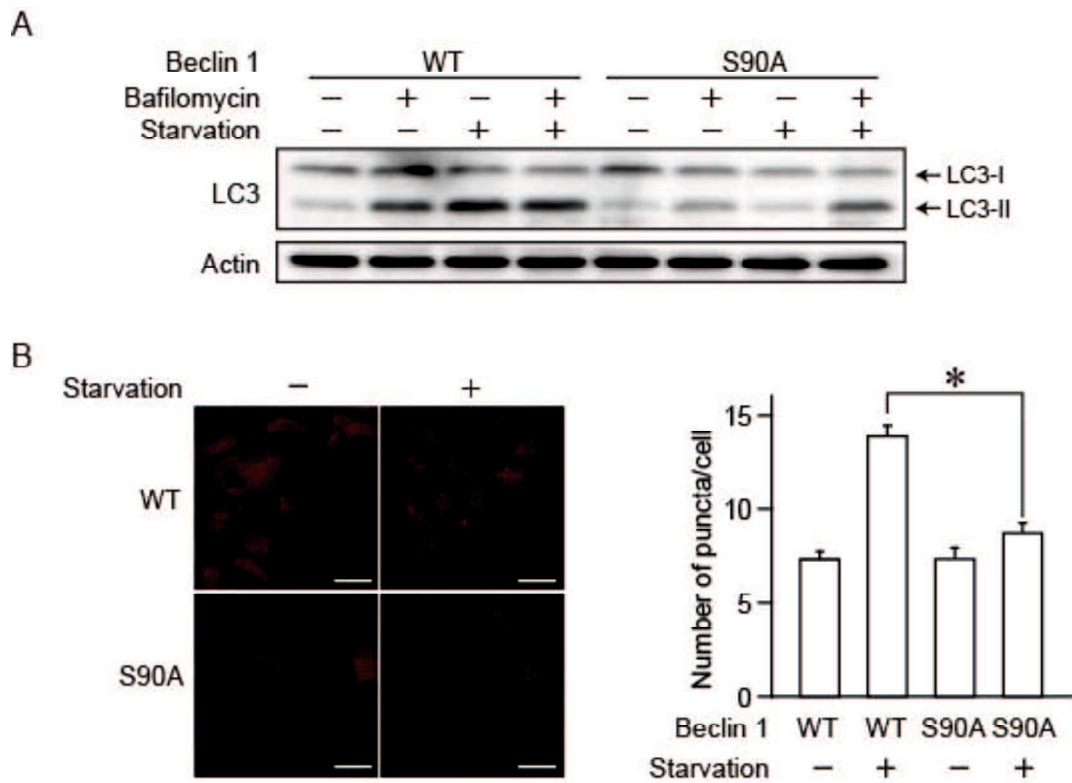


図 15 Beclin 1 Ser90 のリン酸化はオートファジー誘導に寄与する

(A) FLAG-Beclin 1 WT (WT) および FLAG-Beclin 1 S90A (S90) を安定発現させた MCF7 細胞を、bafilomycin (100 nM) 処置・非処置下で 1 時間飢餓刺激した。Western blotting を用いて LC3 の I 型から II 型への変換を解析することでオートファジー活性を検討した典型例。Actin はローディングコントロールとして用いた。N=3。

(B) FLAG-Beclin 1 WT および FLAG-Beclin 1 S90A を安定発現させた MCF7 細胞に飢餓刺激を行い、LC3 の免疫染色を行った。LC3 の puncta 数を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した典型例と 1 細胞当たりの puncta 数の定量図。N=3。

1 サンプルにつき 107~139 個細胞を観察した。スケールバー:30 μ M、*: $P < 0.05$ 。

3-6 PP2A は直接 Beclin 1 Ser90 を脱リン酸化する

OAはtype 2A protein phosphataseであるPP2A、PP4およびPP6を抑制する。この中で、PP2Aは細胞内タンパク質の約1%を占め、PP1と合わせて細胞内の脱リン酸化酵素活性の約90%を担う主要な脱リン酸化酵素である (6)。そこで、PP2Aの発現を抑制し、Beclin 1 Ser90のリン酸化に与える影響を検討した。

FLAG-Beclin 1 WTを発現させたMCF7細胞に、PP2Aに対するshRNAを発現させたところ、PP2A発現の低下が確認された (図16A)。この細胞に飢餓刺激を与え、Beclin 1 Ser90のリン酸化レベルを検討したところ、PP2A発現の抑制によりBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルが上昇することが認められた (図16B)。さらに、リコンビナントPP2Aを用い*in vitro* phosphatase assayを行ったところ、リコンビナントPP2AがBeclin 1 Ser90を脱リン酸化することが認められた (図16C)。以上の結果から、PP2Aは直接Beclin 1 Ser90を脱リン酸化することが示唆された。

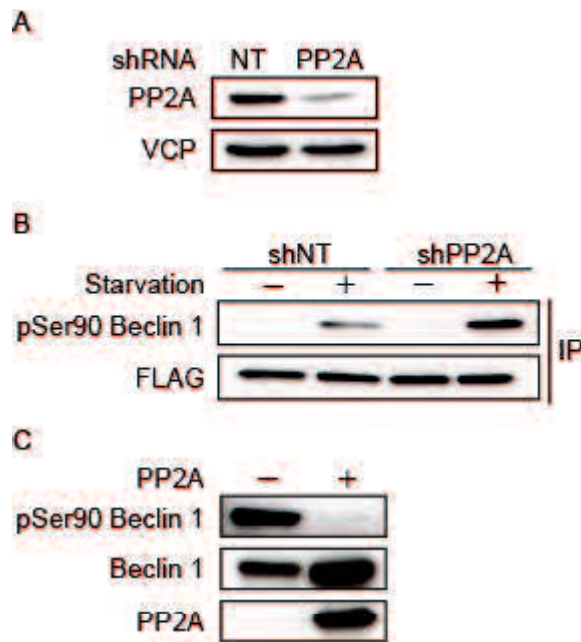


図 16 PP2A は直接 Beclin 1 Ser90 を脱リン酸化する

(A, B) FLAG-Beclin 1 WT を安定発現させた MCF7 細胞に、nontarget shRNA (shNT) と PP2A に対する shRNA (shPP2A) を安定的に発現させた。(A) Western blotting を用いて shRNA の効果を確認した典型例。N=2。VCP はローディングコントロールとして用いた。(B) 細胞に飢餓刺激を 30 分与え、western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=3。

(C) FLAG-Beclin 1 WT を安定発現させた MCF7 細胞を OA (100 nM) で処置することで Beclin 1 Ser90 をリン酸化させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、Ser90 リン酸化 FLAG-Beclin 1 を回収した。FLAG ペプチドを用い、FLAG-Beclin 1 を溶出後、リコンビナント PP2A で処置し、*in vitro* phosphatase assay を行った。その後、western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=3。

3-7 B55 α が PP2A を Beclin 1 へとリクルートする

PP2Aは、足場となるAサブユニットと酵素活性を持つCサブユニットからなる二量体に、基質の決定に関わる各種Bサブユニットの1つが結合することにより三量体として存在する (6)。

いずれのBサブユニットがPP2AのBeclin 1へのリクルートに関与しているかを明らかにするために、FLAG-B55 α とB56 α を一過性に発現させて免疫沈降を行い、BサブユニットとBeclin 1の結合を解析した。その結果、B55 α とBeclin 1の結合が認められた (図17A)。また、Beclin 1-B55 α 複合体は飢餓刺激により解離することが認められた (図17B)。さらに、B55 α がBeclin 1 S90Aに比べBeclin 1 WTに強く結合していることが認められた (図17C)。以上の結果から、PP2A-B55 α 複合体がBeclin 1 Ser90の脱リン酸化に関与していることが示唆された。

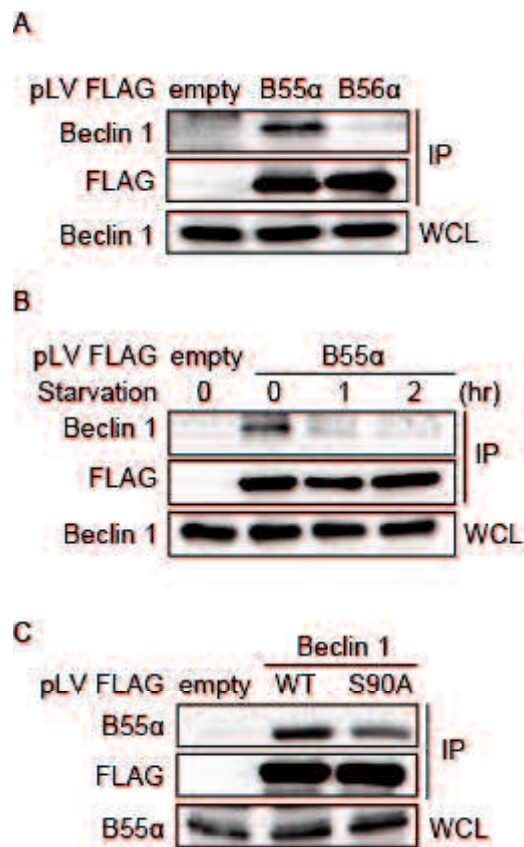


図 17 B55α が PP2A を Beclin 1 へとリクルートする

(A) HEK293T 細胞に empty vector (empty)、FLAG-B55α および FLAG-B56α を発現させ、免疫沈降を行い、western blotting を用いて、Beclin 1 との結合を解析した典型例。N=3。

(B) HEK293T 細胞に empty vector (empty)、FLAG-B55α を安定発現させ、飢餓刺激を与えた。免疫沈降後、western blotting を用いて、Beclin 1 との結合を解析した典型例。N=3。

(C) HEK293T 細胞に empty vector (empty)、FLAG-Beclin 1 WT および FLAG Beclin 1 S90A を発現させ、免疫沈降を行い、western blotting を用いて、B55α との結合を解析した典型例。N=3。WCL : whole cell lysate。

3-8 OAによるBeclin 1 Ser90のリン酸化にROSの産生は関与しない

2015年にWeiらにより、Beclin 1 Ser90はMAPKAPK2/3 (MK2/3) によりリン酸化されることが報告された (66)。MK2/3は、ストレスにより活性化されたp38 MAPKにより直接活性化される (104)。様々なストレスにより細胞内で産生される活性酸素種 (ROS) は、p38 MAPK- MK2/3シグナルを活性化することが知られている。また、Weiらは、ROS産生がp38 MAPK- MK2/3シグナルを介し、Beclin 1 Ser90をリン酸化することを報告している (66)。そこで、OAによるBeclin 1 Ser90のリン酸化にROS-p38 MAPK-MK2/3シグナルが関与しているか検討した。

HeLa細胞をROS捕捉剤である MnTBAPもしくはEUK134で30分前処置し、OAで6時間刺激した。その結果、OAによりROS産生が誘導されることが認められ、ROS捕捉剤の前処置によりROS産生が抑制されることが確認された (図18A)。次に、ROS捕捉剤がBeclin 1 Ser90のリン酸化に与える影響を検討したところ、ROS捕捉剤はOAによるBeclin 1 Ser90のリン酸化に影響を与えないことが認められた (図18B)。したがって、OAによるBeclin 1 Ser90のリン酸化にはROSは関与していないことが示唆された。

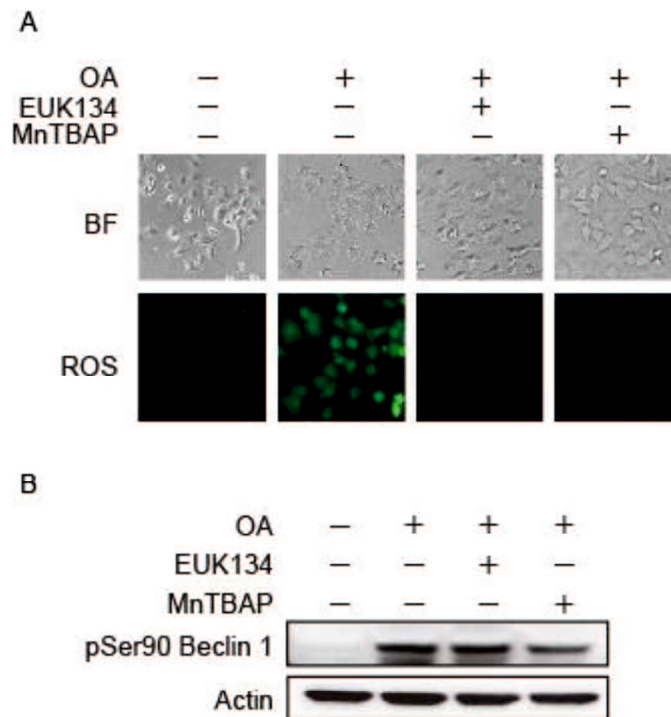


図 18 OA による Beclin 1 Ser90 リン酸化に ROS の産生は関与しない

(A, B) HeLa細胞をROS捕捉剤であるEUK134 (10 μ M) とMnTBAP (10 μ M) で30分前処置し、OA (100 nM) で6時間処置した。Total ROS detection kitを用い、ROS産生を解析した典型例 (A)。N=2。BF: 明視野。Western blottingを用いて、Beclin 1 Ser90のリン酸化レベルを検討した典型例 (B)。Actinはローディングコントロールとして用いた。N=3。

3-9 Beclin 1 Ser90 をリン酸化するキナーゼは MK2 だけではない

p38 MAPK-MK2シグナルのBeclin 1 Ser90リン酸化への関与を検討するため、p38 MAPK-MK2シグナル活性化剤であるanisomycinを用いてBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルを解析した。

MK2の活性化の指標としてMK2の基質として知られるHSP27 Ser82のリン酸化および、MK2のバンドシフトを用いた (105)。その結果、anisomycin処置によりHSP27 Ser82のリン酸化やMK2のバンドシフトが認められたが、Beclin 1 Ser90のリン酸化はほとんど認められなかった。一方で、OAはanisomycinに比べHSP27 Ser82のリン酸化やMK2のバンドシフトをほとんど引き起こさなかったが、Beclin 1 Ser90は強くリン酸化することが認められた (図19)。これらの結果から、Beclin 1 Ser90をリン酸化するキナーゼはMK2以外にも存在することが示唆された。

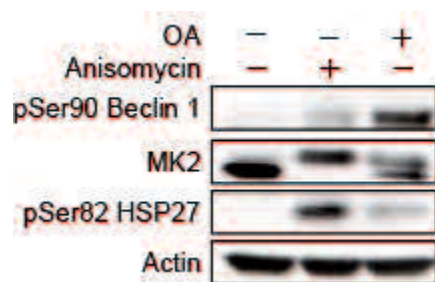


図 19 Beclin 1 Ser90 をリン酸化するキナーゼは MK2 だけではない

HeLa 細胞を anisomycin (25 $\mu\text{g/ml}$) で 30 分もしくは OA (100 nM) で 6 時間処置し、western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベル、MK2 活性の指標である MK2 バンドシフトと HSP27 Ser82 のリン酸化 (pSer82HSP27) を解析した典型例。Actin はローディングコントロールとして用いた。N=3。

3-10 AMPK や ULK1 は Beclin 1 Ser90 のリン酸化に関与しない

MK2以外のBeclin 1 Ser90をリン酸化するキナーゼについて検討を行った。飢餓刺激によりBeclin 1 Ser90がリン酸化されることから、始めに、飢餓により活性化されることが知られるAMPKの関与を検討した。

FLAG-Beclin 1 WTを安定発現したMCF7細胞をAMPK活性化剤である5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) で処置したところ、Beclin 1 Ser90のリン酸化レベルは変化しなかった (図20A)。さらに、AMPKの恒常的活性化変異体 (AMPK CA) を発現させたところ、AMPKの基質であるraptor Ser792のリン酸化は認められたが、Beclin 1 Ser90のリン酸化レベルは変化しなかった (図20B)。したがって、AMPKはBeclin 1 Ser90のリン酸化に関与しないことが示唆された。

次に、mTORC1により抑制され、飢餓刺激により活性化してオートファジー誘導に寄与するULK1の関与を検討した (106)。FLAG-Beclin 1 WTを安定発現したMCF7細胞を、mTORC1阻害剤であるrapamycinで処置してULK1を活性化したところ、mTOR活性の低下を示すS6K Thr389のリン酸化レベルの低下は認められたが、Beclin 1 Ser90のリン酸化レベルは変化しなかった (図20C)。したがって、ULK1はBeclin 1 Ser90のリン酸化に関与しないことが示唆された。

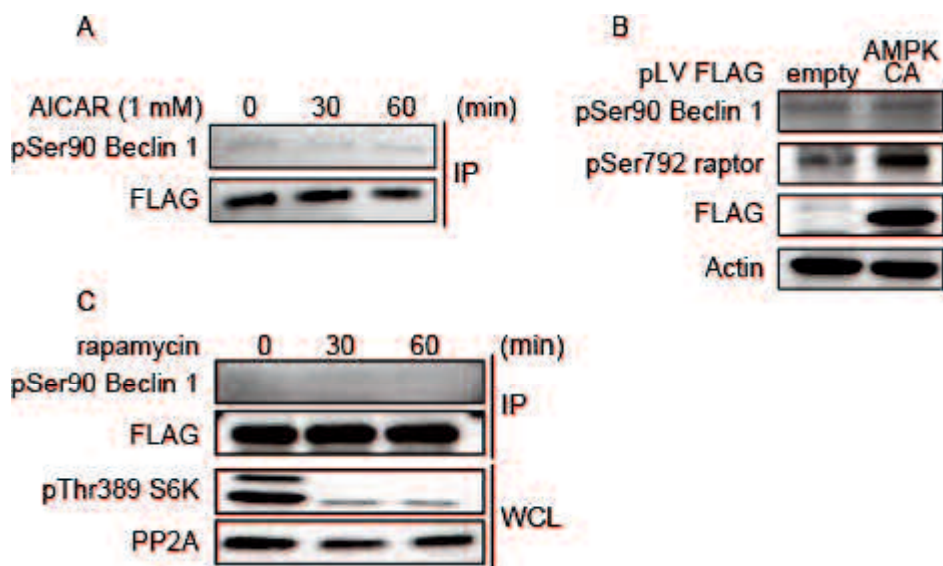


図 20 AMPK や ULK1 は Beclin 1 Ser90 のリン酸化に関与しない

(A) MCF7 細胞に FLAG-Beclin 1 WT を安定発現させ、AICAR (1 mM) で 0～60 分間処置し、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降した。Western blotting を用いて、Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=3。

(B) HEK293T 細胞に empty vector (empty) と FLAG-AMPK の恒常的活性化変異体 (AMPK CA) を発現させ、western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルと raptor Ser792 リン酸化レベルを解析した典型例。Actin はローディングコントロールとして用いた。N=3。

(C) MCF7 細胞に FLAG-Beclin 1 WT を安定発現させ、rapamycin (100 nM) で 0～60 分間処置し、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降した。Western blotting を用いて、Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルと S6K Thr389 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=3。PP2A はローディングコントロールとして用いた。WCL : whole cell lysate。

3-11 Beclin 1 Ser90 は脊椎動物間で進化的に保存され、DAPK のリン酸化モチーフである

Beclin 1 Thr119はDAPK1によりリン酸化され、Beclin 1からBcl-2を解離させることでオートファジー誘導に関与していることが報告されている (63,64)。

DAPK1は、DAPK2/DRP-1やDAPK3/ZIPKと共にDAPK familyに属している (107)。

生物間でBeclin 1の配列を比較したところ、Ser90周辺は脊椎動物間で進化的に保存されおり、そのN末端側の配列がDAPKのリン酸化モチーフであるRXXS/Tであることが認められた (図21)。

Homo sapiens (NP_003757):	85 PARMMS	TESAN	95
Mus musculus (NP_062530):	83 PARMMS	TESAN	93
Gallus gallus (NP_001006332):	82 PARMMS	TESAN	92
Xenopus laevis (NP_001085751):	80 PARMMS	TESAT	90
Danio reio (NP_957166):	82 PARMMS	SAESTN	92
Drosophila melanogaster (NP_651209):	63 PYRLT	DSINGT	73

図 21 Beclin 1 Ser90 は脊椎動物間で進化的に保存され、DAPK のリン酸化モチーフである

Beclin 1 Ser90 (Homo sapiens) は脊椎動物間で保存されているが、Drosophila melanogaster では保存されていない (赤フォント)。Beclin 1 Arg87 (Homo sapiens) は Drosophila melanogaster まで保存されている (青フォント)。

3-12 DAPK 阻害剤は Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを低下させる

OAによるBeclin 1 Ser90のリン酸化にDAPKが関与しているかを検討するため、FLAG-Beclin 1を安定発現したMCF7細胞を、DAPK1とDAPK3に対する阻害剤であるDAPK inhibitorおよびTc DAPK6で処置しBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルを確認した。

これらの阻害剤は、OAや飢餓刺激によるBeclin 1 Ser90のリン酸化を抑制することが認められた (図22A-C)。また、DAPK阻害剤がMK2の活性に与える影響を検討したところ、Tc DAPK6とDAPK inhibitorはOAによるMK2のバンドシフトには影響を与えなかったことから、DAPK阻害剤によるBeclin 1 Ser90のリン酸化の抑制にはMK2は関与しないことが示唆された (図22D)。以上の結果から、Beclin 1 Ser90のリン酸化にDAPK1もしくはDAPK3が関与しており、MK2の関与はないことが示唆された。

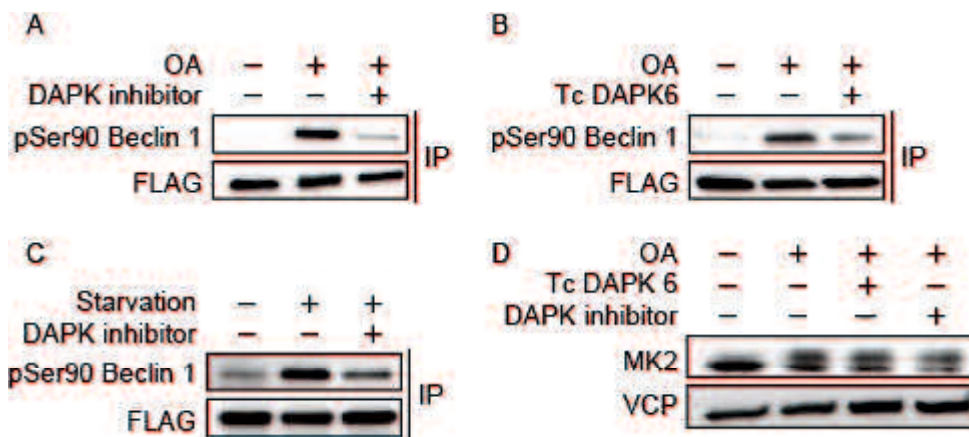


図 22 DAPK 阻害剤は Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを低下させる

(A, B) MCF7 細胞に FLAG Beclin 1 WT を安定発現させ、DAPK inhibitor (10 μ M) (A) もしくは Tc DAPK6 (10 μ M) (B) で 2 時間前処置し、OA (100 nM) で 6 時間処置した。FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降し、western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=3。

(C) FLAG-Beclin 1 WT を安定発現させ、DAPK inhibitor (10 μ M) で 2 時間前処置し、飢餓刺激を 1 時間行った。FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降し、western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例。N=3。

(D) HeLa 細胞を Tc DAPK6 (10 μ M) もしくは DAPK inhibitor (10 μ M) で 2 時間前処置し、OA (100 nM) で 6 時間処置した。Western blotting を用いて MK2 のバンドシフトを解析した典型例。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=2。

3-13 DAPK3はBeclin 1 Ser90をリン酸化する

DAPK1とDAPK3のいずれがBeclin 1 Ser90のリン酸化に関与しているか、shRNAを用いてDAPK1とDAPK3の発現を抑制することで検討した。

初めに、FLAG-Beclin 1を安定発現させたMCF7細胞にDAPK1とDAPK3 (DAPK3 #1) に対するshRNAを安定発現させ、発現抑制効果を確認した (図23A)。これらの細胞に飢餓刺激を与え、Beclin 1 Ser90のリン酸化レベルを検討したところ、DAPK3の発現抑制によりリン酸化レベルが部分的に低下することが認められた (図23B)。Off-target効果を除外するため、DAPK3 #1とは配列の異なるDAPK3に対するshRNA (DAPK3 #2)を作製した。これをA549細胞に安定発現させ、MK2活性に対する影響を検討したところ、DAPK3発現抑制はMK2のバンドシフトには影響を与えなかった (図23C)。この細胞をOAで処置し、Beclin 1 Ser90のリン酸化レベルを検討したところ、DAPK3の発現抑制によりリン酸化レベルが低下することが認められた (図23D)。さらにリコンビナントのBeclin 1とDAPK1、DAPK3を用いて*in vitro* kinase assayを行い、Beclin 1 Ser90のリン酸化に与える影響を検討した。その結果、DAPK1よりもDAPK3処置によりBeclin 1 Ser90が強くリン酸化されることが認められた (図23E)。以上の結果から、DAPK3がBeclin 1 Ser90のリン酸化に寄与することが示唆された。

DAPK3はDAPK1によってリン酸化され活性化されることが報告されているが (108)、これまでの結果は、DAPK1非依存的な経路によるDAPK3活性化を示唆する。Rho-associated protein kinase (ROCK) もDAPK3の活性化に関与することが報告されていることから (109)、OAによるBeclin 1 Ser90のリン酸化にROCKが関与する可能性をROCK阻害剤であるY27632を用いて検討した。しかし、ROCK阻害剤はBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルに影響を与えなかった (図23F)。

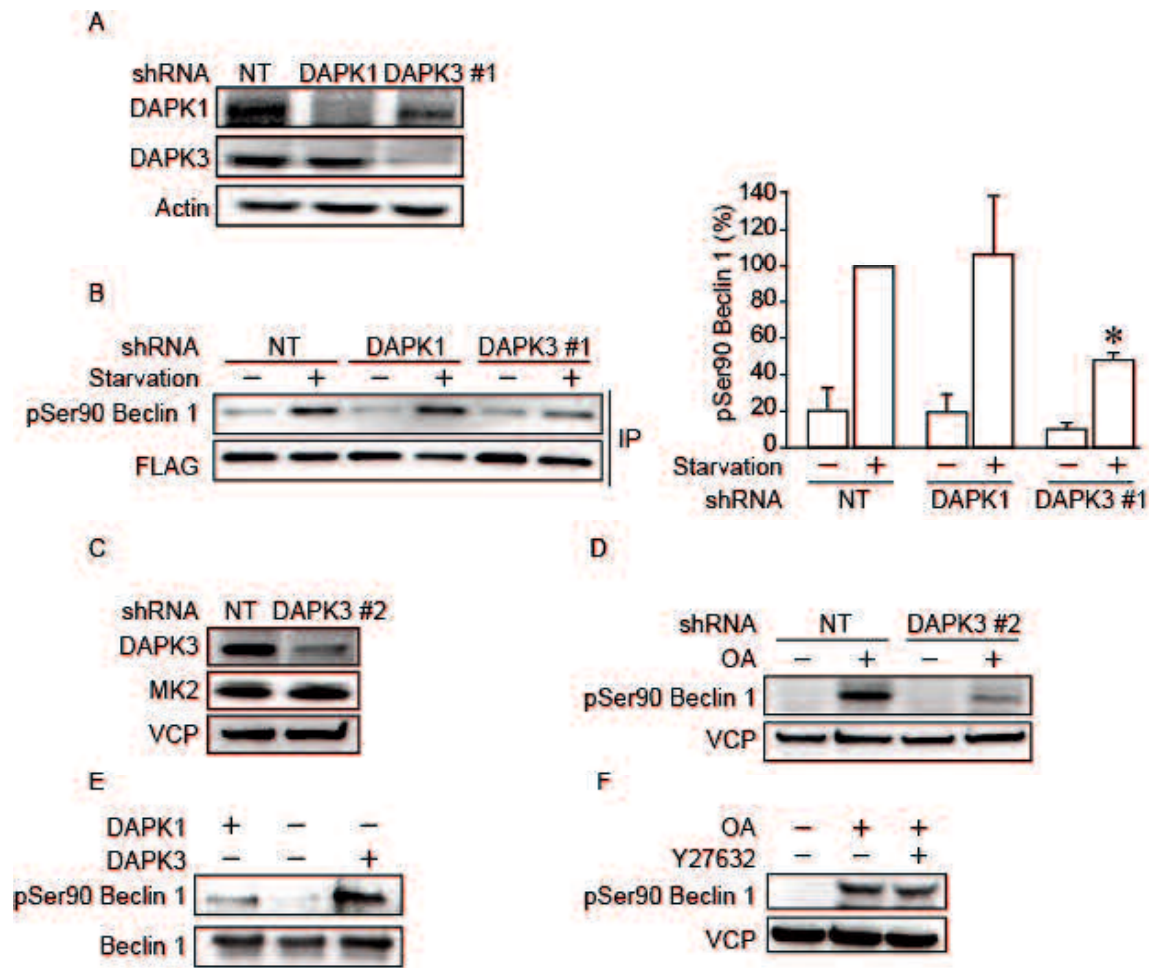


図 23 DAPK3 は Beclin 1 Ser90 をリン酸化する

(A, B) FLAG-Beclin 1 WT を安定発現させた MCF7 細胞に non target shRNA (NT)、DAPK1 に対する shRNA (DAPK1)、DAPK3 に対する shRNA (DAPK3 #1) を安定的に発現させた。(A) Western blotting を用いて shRNA の効果を確認した典型例。Actin はローディングコントロールとして用いた。N=3。(B) 細胞に飢餓刺激を 1 時間与えた後に、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例と定量図。定量図は、NT に飢餓刺激を行ったときの Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを 100%とし、その相対値で表した。N=3。*: $P < 0.05$ (NT に飢餓刺激を行ったものとの比較)。

(C, D) A549 細胞に shNT と DAPK3 に対する shRNA (shDAPK3 #2) を安定的に発現させた。(C) Western blotting を用いて shRNA の効果と MK2 のバンドシフトを解析した典型例。N=3。(D) 細胞を OA (100 nM) で 6 時間処置し、western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。

(E) リコンビナント Beclin 1 をリコンビナント DAPK1 もしくは DAPK3 で処置し、*in vitro* kinase assay を行った。Western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを解析した典型例。N=3。

(F) HeLa 細胞を Y27632 (10 μ M) で 2 時間前処置し、OA (100 nM) で 6 時間処置した。Western blotting を用いて Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルを検討した典型例。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=2。

3-14 飢餓刺激を受けたマウス生体において Beclin 1 Ser90 が骨格筋特異的にリン酸化される原因は、関連タンパク質の発現量の違いでは説明できない

Beclin 1 Ser90 のリン酸化が骨格筋特異的に認められ、肝臓や心臓では認められなかったことから、各種臓器で Beclin 1 Ser90 のリン酸化に関与する MK2、DAPK3、B55 α 、PP2A、Beclin 1 のタンパク質発現を検討した。その結果、各種タンパク質発現と Beclin 1 Ser90 のリン酸化に相関関係は認められなかった (図 24)。

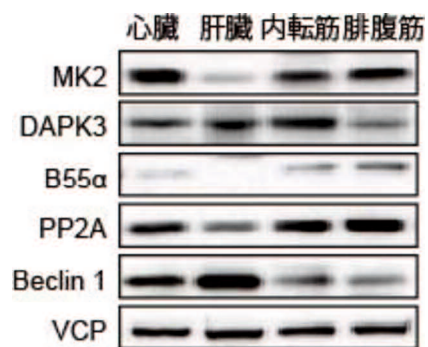


図 24 飢餓刺激を受けたマウス生体において Beclin 1 Ser90 が骨格筋特異的にリン酸化される原因は、関連タンパク質の発現量の違いでは説明できない
 マウスの心臓、肝臓、内転筋、腓腹筋からタンパク質を抽出し、western blottingを用いて各種タンパク質発現を解析した典型例。N=3。

3-15 考察

Beclin 1は、オートファジーを制御する様々なタンパク質の足場として機能する重要なタンパク質である (49)。Beclin 1複合体の構成は、Beclin 1のリン酸化をはじめとした翻訳後修飾により制御されている (63-71)。これまで、Beclin 1のリン酸化を引き起こすキナーゼはいくつか報告されているが、脱リン酸化の制御については全く報告がなかった。本研究では、PP2A-B55 α 複合体がBeclin 1 Ser90の脱リン酸化を制御していることを初めて明らかにした。また、飢餓刺激などの生理的刺激がDAPK3を活性化してBeclin 1 Ser90をリン酸化し、オートファジー誘導に寄与していることを示した (図25)。

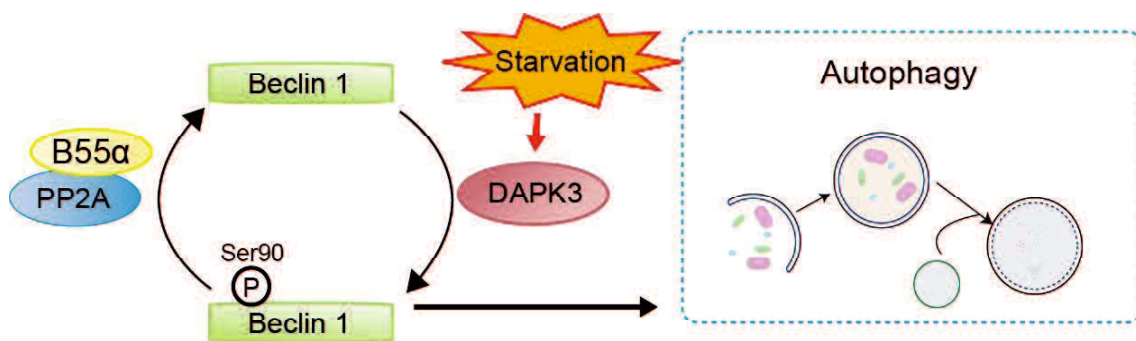


図25 本研究の総括

飢餓刺激により、DAPK3がBeclin 1 Ser90をリン酸化し、オートファジーが誘導される。Beclin 1 Ser90の脱リン酸化は、PP2A-B55 α 複合体によって引き起こされる。

3-15-1 B55 α が Beclin 1 から解離する機構

本研究で、Beclin 1 Ser90を、富栄養状態の細胞をtype 2A protein phosphatase 阻害剤であるOAで処置することによりリン酸化されるサイトとして同定した。また、富栄養状態ではB55 α がBeclin 1に結合しており、飢餓刺激によりBeclin 1から解離していくことが認められた。このことから、富栄養状態では、PP2Ac-B55 α 複合体がBeclin 1 Ser90を脱リン酸化しており、飢餓刺激により、B55 α がBeclin 1から解離することで、キナーゼによるBeclin 1 Ser90のリン酸化が可能になると考えられる。

本研究では、B55 α がBeclin 1から解離する分子機構は明らかにできていない。しかし、B55 α のリン酸化はPP2A三量体からのB55 α の解離を誘導することが報告されており、飢餓刺激によるB55 α の翻訳後修飾がBeclin 1からの解離に関与している可能性が考えられる (110)。

3-15-2 Beclin 1 Ser90 のリン酸化を引き起こすキナーゼ

Weiらは、Beclin 1 Ser90のリン酸化の責任キナーゼとしてMK2/3を報告した (66)。MK2/3は、ROSの産生により活性化されたp38によりリン酸化され活性化するが (104)、本研究ではROS補足剤はOAによるBeclin 1 Ser90のリン酸化を抑制できなかった。また、MK2活性化剤であるanisomycinによりMK2の活性化は確認できたが、Beclin 1 Ser90のリン酸化はほとんど認められなかった。さらに、Weiらの報告ではMK2/3をダブルノックアウトした細胞でBeclin 1 Ser90のリン酸化が完全には抑制されていないことが示されている (66)。以上の結果は、Beclin 1 Ser90のリン酸化に関与しているキナーゼがMK2/3以外にも存在していることを強く示唆する。

本研究により、DAPK3が飢餓刺激によりBeclin 1 Ser90をリン酸化することが示唆された。これまでに、DAPK3の発現抑制によりオートファジーが抑制されることが報告されており、本研究の結果を支持する (111)。一方、飢餓刺激がDAPK3を活性化する分子機構は明らかにできていない。DAPK1がDAPK3を活性化するという報告があるが (108)、本研究においてDAPK1の発現抑制はBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルに影響を与えなかったことから、飢餓によるDAPK3の活性化にはDAPK1は関与していないと考えられる。さらに、ROCKがDAPK3の活性化に関与するという報告もあるが (109)、ROCK阻害剤であるY27632は、OAによるBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルに影響を与えなかった。飢餓刺激がDAPK3を活性化する分子機構については、今後さらなる検討が必要である。

3-15-3 Beclin 1 Ser90 のリン酸化がオートファジーを誘導するメカニズム

本研究から、DAPK3によるBeclin 1 Ser90のリン酸化がオートファジー誘導に関与していることが示された。Fogelらは、細胞が飢餓刺激を受けると、まずSer90がリン酸化され、その後連続的にSer93がリン酸化されること、この2つのリン酸化がオートファジーの誘導に必要であることを報告している (67)。また、Kimらは、AMPKがAtg14L依存的にBeclin 1 Ser93とSer96をリン酸化することでオートファジー誘導を促進することを報告している (68)。さらに、WeiらはSer90のリン酸化によりBeclin 1-Vps34複合体のlipid kinase活性が上昇していること、オートファジー阻害因子であるBcl-2がMK2/3によるBeclin 1 Ser90のリン酸化を阻害し、オートファジーを抑制していることを報告している (66)。これらの報告と本研究の結果を総合すると、細胞が飢餓刺激を受けると、DAPK3やMK2/3によりBeclin 1 Ser90がリン酸化され、これを起点として連続的にSer93とSer96のリン酸化が行われることが示唆された。

ン酸化が誘導されてBeclin 1-Vps34複合体の活性が上昇し、オートファジーが誘導されるという分子機構が考えられる。

3-15-4 Beclin 1 Ser90 のリン酸化における OA と PP2A 発現抑制による効果の違い

本研究では、富栄養状態で細胞をOAで処置した際にBeclin 1 Ser90のリン酸化が認められたのに対し、PP2Aの発現を抑制しただけでは富栄養状態でもBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルの上昇は認められず、飢餓刺激を与えることでリン酸化レベルの差が認められた。この違いの原因は明らかではないが、OAによりBeclin 1 Ser90のリン酸化に関与するキナーゼが活性化している可能性が考えられる。

OAは、他のtype 2A protein phosphataseも抑制するため、PP4やPP6が抑制されることでMK2、DAPK3が活性化している可能性が考えられる。本研究結果から、OAによるROS産生はBeclin 1 Ser90のリン酸化に影響を与えないことが認められたが、MK2が若干バンドシフトすることが認められている。このことから、OAによりMK2が活性化されBeclin 1 Ser90のリン酸化に関与している可能性が考えられる。

MK2は、Thr222、Ser272、Thr334がリン酸化されることで活性化されることから (112)、PP4やPP6がこれらのリン酸化サイトを脱リン酸化している可能性がある。また、DAPK3はThr180、Thr225、Thr265がリン酸化されることが報告されており (109)、PP4やPP6がこのリン酸化サイトを脱リン酸化している可能性もある。さらに、PP4やPP6が直接Beclin 1 Ser90を脱リン酸化している可能性もあるが、PP6のBeclin 1への結合部位はC末端であり (第4章図35C)、PP6がSer90を脱リン酸化している可能性は考えにくい。また、PP4は本研究室でshRNAを8種類作製したが、いずれもPP4発現を抑制することができなかった。今後、ゲノム編

集システム等を用いてPP4発現を抑制し、PP4の関与を検討する必要がある。

3-15-5 Beclin 1 Ser90 のリン酸化の組織特異性

マウス生体に対する飢餓刺激において、Beclin 1 Ser90のリン酸化は、骨格筋で認められたのに対して肝臓や心臓ではほとんど認められなかった。このことから、Beclin 1 Ser90のリン酸化は、骨格筋でのオートファジー誘導に重要であることが考えられるが、Beclin 1 Ser90のリン酸化に関与する因子 (Beclin 1、PP2A、B55 α 、DAPK3、MK2) の発現量の違いでは、組織特異性を説明することはできなかった。

骨格筋のオートファジーは飢餓後48時間まで活性が上昇し続けるのに対し、肝臓では数時間でオートファジー活性が最大になる (113)。また、オートファジーの制御機構は組織間で異なり、骨格筋ではインスリンが重要であるのに対して、肝臓ではアミノ酸が重要であることが報告されている (114)。本研究においても、細胞レベルでインスリン刺激によりBeclin 1 Ser90のリン酸化レベルが低下することが確認された。したがって、Beclin 1 Ser90のリン酸化の制御にインスリンが重要であることが、骨格筋でのみBeclin 1 Ser90のリン酸化が認められた原因の一つである可能性が考えられる。

第4章 PP6によるオートファジー制御機構の解明

4-1 Type 2A protein phosphatase が分解される経路の検討

4-1-1 PP6タンパク質発現はオートファジー阻害剤 bafilomycin 処置で増加する

第3章から、type 2A protein phosphatase がオートファジーを抑制していることが認められた。そこで本章では、反対にオートファジーが type 2A protein phosphatase の制御に関与しているかを検討した。

はじめに、オートファジー阻害剤である bafilomycin を用い、type 2A protein phosphatase の発現変化を western blotting により解析した。HEK293T 細胞を bafilomycin で処置すると p62/SQSTM1 (p62) タンパク質発現量が増加したことから、オートファジー活性が抑制されていることが確認された (図 26A)。この際、PP6 タンパク質発現は増加したが、PP2A および PP4 の発現量に変化は認められなかった。

次に、PP6^{flox/flox} マウス由来線維芽細胞 (PP6^{flox/flox}MEF) にタモキシフェン依存的に Cre recombinase を発現させるため、CreERT を安定的に発現する細胞 (CreERT-PP6^{flox/flox}MEF) を作製した。この細胞を 4-hydroxy tamoxifen (4HT) で処置すると PP6 タンパク質発現量は顕著に減少するが、bafilomycin で共処置すると PP6 発現の減少は抑制された (図 26B)。この際、PP6 の mRNA 発現を Real-time PCR 法で検討したところ、4HT による PP6 mRNA 発現の減少は、bafilomycin 処置では変化しなかった (図 26C)。以上のことから、type 2A protein phosphatase の中で PP6 のみがオートファジー分解による制御を受けている可能性が示唆された。

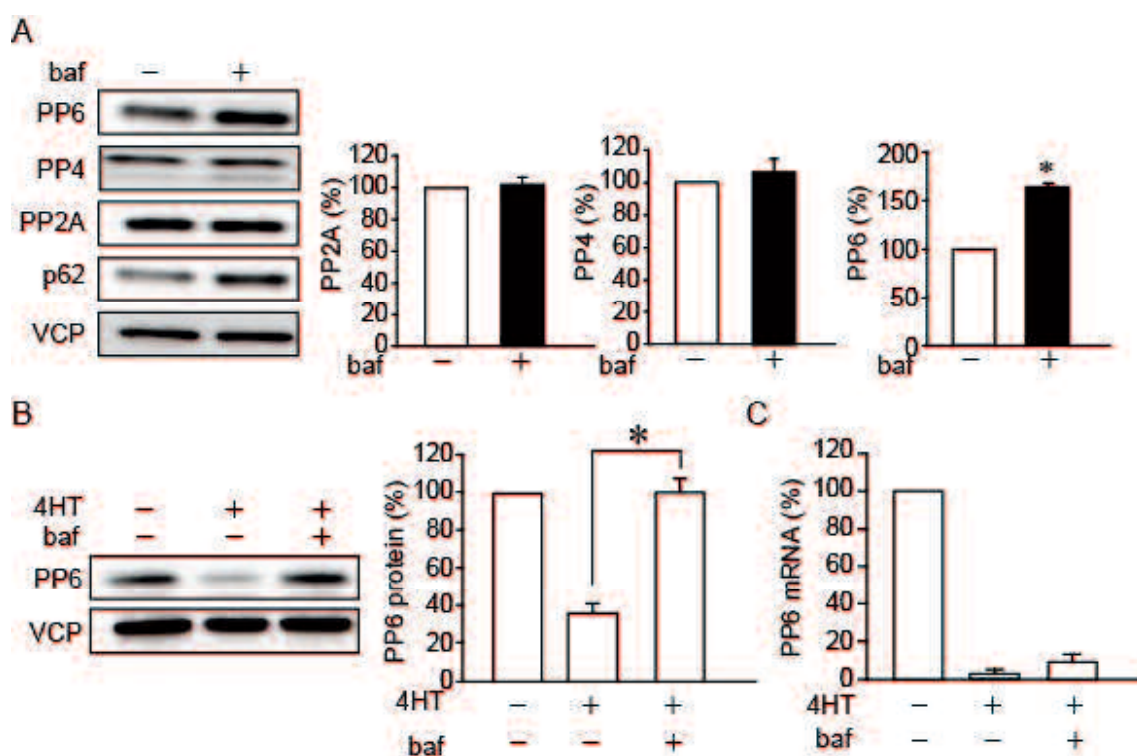


図26 PP6タンパク質発現はオートファジー阻害剤 bafilomycin 処置で増加する

(A) HEK293T 細胞を bafilomycin (baf、100 nM) で 4 時間処置し、western blotting を用いて各種 type 2A protein phosphatase (PP6、PP4、PP2A) と p62 の発現量の変化を検討した典型例と定量図。定量図は bafilomycin 非処置のタンパク質レベルを 100%として、その相対値で表した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。*: $P < 0.05$ (bafilomycin 非処置との比較)。

(B, C) CreERT-PP6^{flox/flox}MEF 細胞を 4HT (500 nM) および bafilomycin (baf、100 nM) で 24 時間処置した。(B) PP6 タンパク質発現量を western blotting で検討した典型例と定量図。定量図は 4HT と bafilomycin 非処置のタンパク質レベルを 100%として、その相対値で表した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。*: $P < 0.05$ 。(C) PP6 mRNA 発現量を Real-time PCR で検討した定量図。4HT と bafilomycin 非処置の mRNA 発現レベルを 100%としてその相対値で表した。N=3。*: $P < 0.05$ 。

4-1-2 PP6 タンパク質発現はユビキチン・プロテアソーム系の抑制で減少する

Type 2A protein phosphatase の分解にユビキチン・プロテアソーム系が関与しているか検討した。

HeLa 細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 で処置し、type2A protein phosphatase のタンパク質発現を western blotting を用いて解析した。PP2A は、ユビキチン・プロテアソーム系により分解されることが報告されており (115)、本研究でも、MG132 により PP2A のタンパク質発現量が上昇することが確認された (図 27A)。また、PP4 の発現量には顕著な変化が認められなかった。一方で、PP6 タンパク質発現量は MG132 により減少することが認められた。

プロテアソームを阻害するとオートファジー活性が上昇することが報告されている (116,117)。そこで、オートファジーの選択的基質である p62 のタンパク質発現量を検討したところ、MG132 により減少することが認められた (図 27B)。したがって、MG132 による PP6 タンパク質発現量の低下は、オートファジー活性の促進によることが示唆された。以上の結果により、PP6 がオートファジーにより分解されることが支持された。

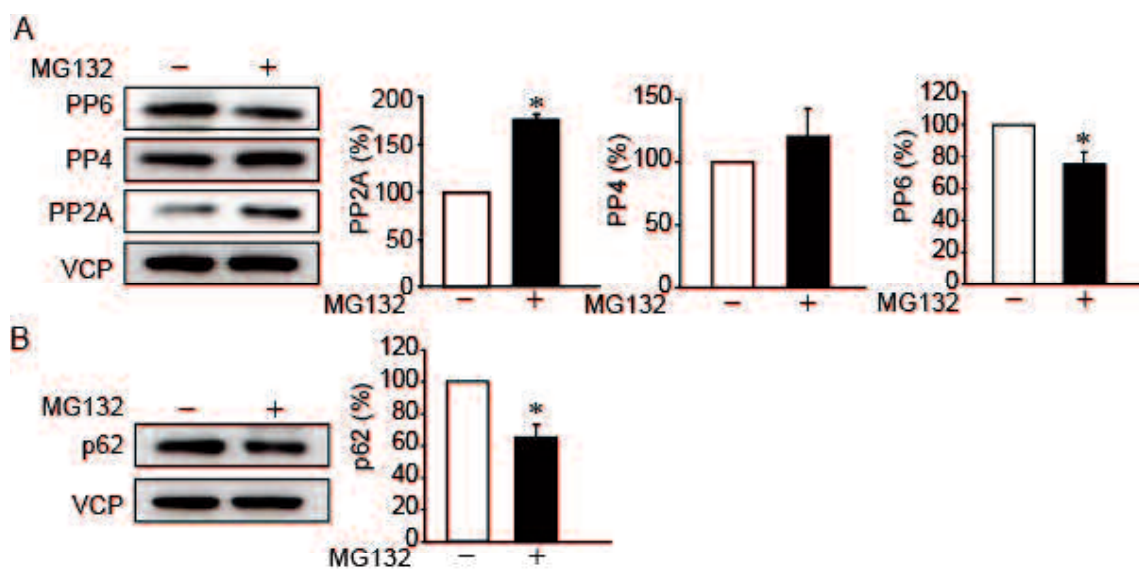


図 27 PP6 タンパク質発現はユビキチン・プロテアソーム系の抑制で減少する (A, B) HeLa 細胞を MG132 (10 μ M) で 24 時間処置し、western blotting を用いて type 2A protein phosphatase (A) と p62 (B) の発現量の変化を検討した典型例と定量図。定量図は MG132 非処置のタンパク質レベルを 100%として、その相対値で表した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。*: $P < 0.05$ (MG132 非処置との比較)。

4-1-3 オートファジー関連タンパク質の発現抑制や遺伝子欠損により PP6 タンパク質発現量は増加する

オートファジー誘導に必須の因子である Beclin 1 や Atg7 の発現抑制細胞および遺伝子欠損細胞を用い、オートファジー不全が PP6 タンパク質発現に与える影響を検討した。

まず、HEK293T 細胞において、shRNA を用いて Beclin 1 の発現を安定的に抑制した際の、type 2A protein phosphatase の発現量に対する影響を western blotting を用いて検討した (図 28A)。Beclin 1 の発現抑制は、PP2A や PP4 の発現量に影響を与えなかったが、PP6 の発現量が増加することが認められた。

次に、*beclin 1* および *Atg7* の遺伝子欠損が type 2A protein phosphatase の発現量に与える影響を、各種ノックアウトマウスから MEF 細胞を作製して検討した。その結果、*beclin 1* および *Atg7* の遺伝子欠損により、PP6 発現が上昇し、PP2A および PP4 の発現量は変化しないことが確認された (図 28B、C)。以上の結果から、PP6 タンパク質発現量はオートファジーにより制御されていることが確認された。

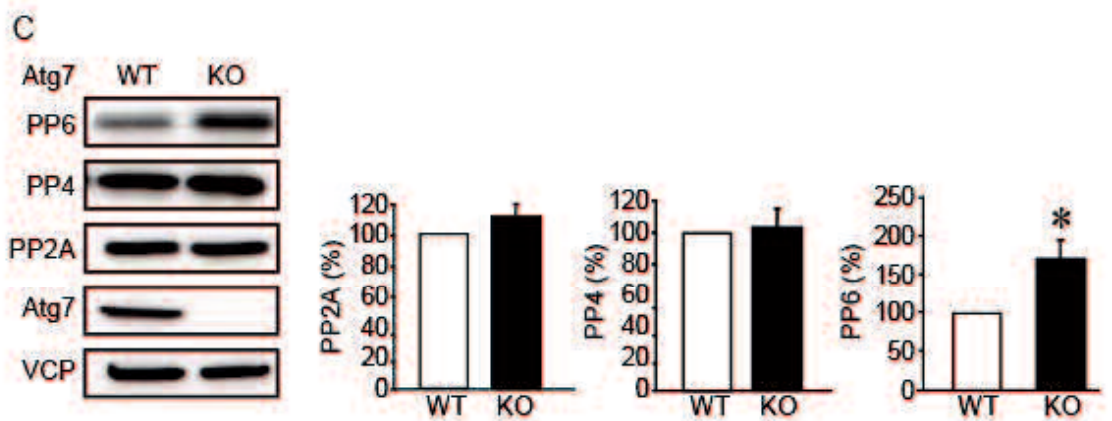
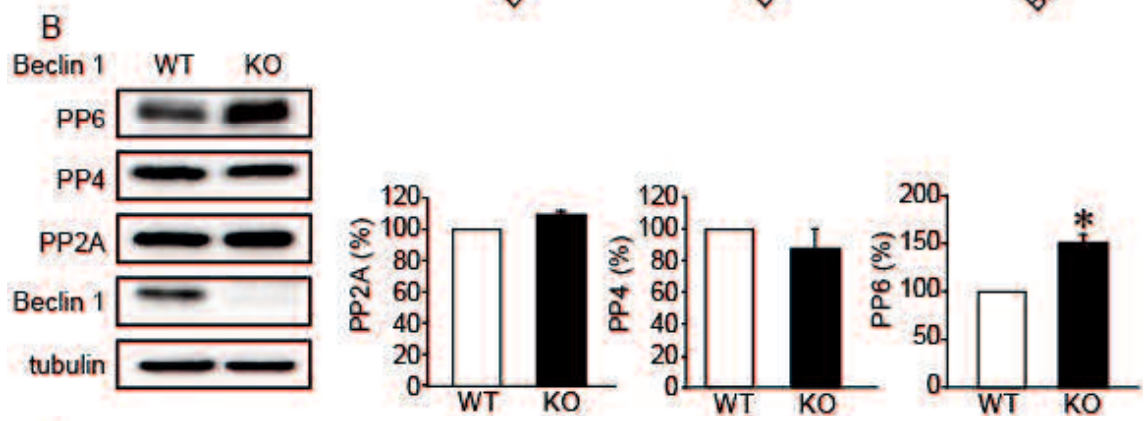
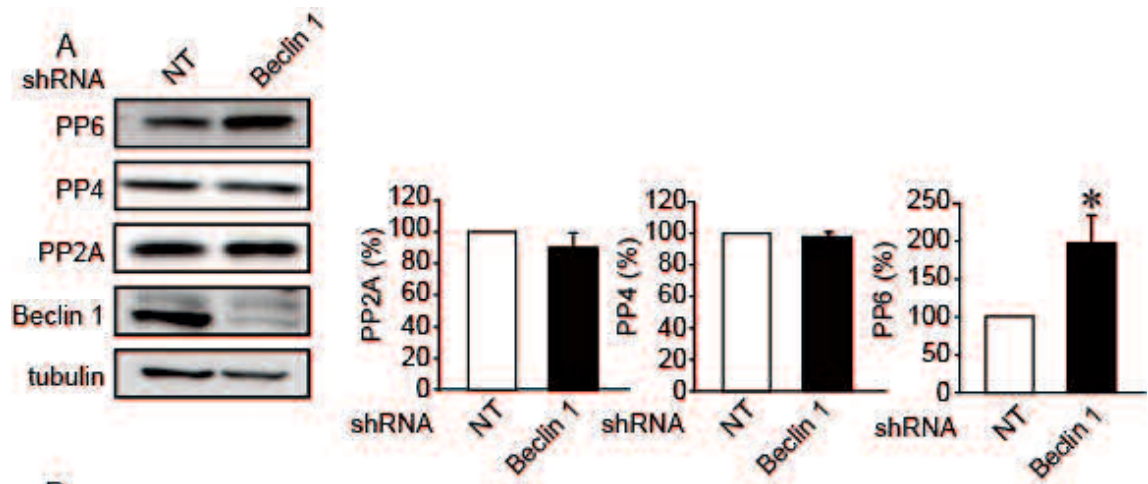


図 28 オートファジー関連タンパク質の発現抑制や遺伝子欠損により PP6 タンパク質発現量は増加する

(A) HEK293T 細胞に non target shRNA (NT)、Beclin 1 に対する shRNA (Beclin 1) を安定的に発現させ、western blotting を用いて type 2A protein phosphatase の発現量に与える影響を検討した典型例と定量図。定量図は nontarget shRNA (shNT) のタンパク質レベルを 100%として、その相対値で表した。tubulin はローディングコントロールとして用いた。N=3。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

(B) 野生型の MEF (WT) と *beclin 1* 欠損 MEF (KO) の type 2A protein phosphatase の発現量を western blotting を用いて検討した典型例とその定量図。定量図は WT の発現量を 100%としてその相対値で示した。tubulin はローディングコントロールとして用いた。N=3。*: $P < 0.05$ (WT との比較)。

(C) 野生型の MEF (WT) と *Atg7* 欠損 MEF (KO) の type 2A protein phosphatase の発現量を western blotting を用いて検討した典型例とその定量図。定量図は WT の発現量を 100%としてその相対値で示した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=4。*: $P < 0.05$ (WT との比較)。

4-2 PP6 タンパク質発現は飢餓刺激により生理的に制御されている

オートファジーは、飢餓刺激により強く誘導されることが知られている。そこで、PP6 タンパク質発現に対する飢餓刺激の影響を検討した。

HEK293T 細胞を EBSS で処置することで飢餓刺激を与え、PP6 の発現量の変化を western blotting を用いて検討した。その結果、飢餓刺激により PP6 の発現量が減少することが認められた (図 29A)。

抗 PP6 抗体の感受性が PP6 の翻訳後修飾に影響され、見かけ上 PP6 発現量が増加・減少している可能性を排除するため、FLAG-PP6 を安定発現させた HEK293T 細胞を EBSS で処置することで飢餓刺激を与え、FLAG-PP6 の発現量の変化を抗 FLAG 抗体を用いて western blotting で検討した。その結果、飢餓刺激により FLAG-PP6 の発現量が減少することが認められた (図 29B)。

さらに、マウスの生体に対する飢餓刺激が PP6 発現に与える影響を検討した (図 29C)。マウスの肝臓を絶食前、絶食 24 時間後、絶食 48 時間後、絶食 48 時間後の再給餌 2 時間後、絶食 48 時間後の再給餌 4 時間後に摘出し、western blotting を用いて PP6 と p62 の発現量を検討したところ、絶食によりオートファジーが誘導され、PP6 と p62 のタンパク質発現が減少することが認められた。以上の結果から、PP6 発現は生理的にもオートファジーにより制御されている可能性が示唆された。

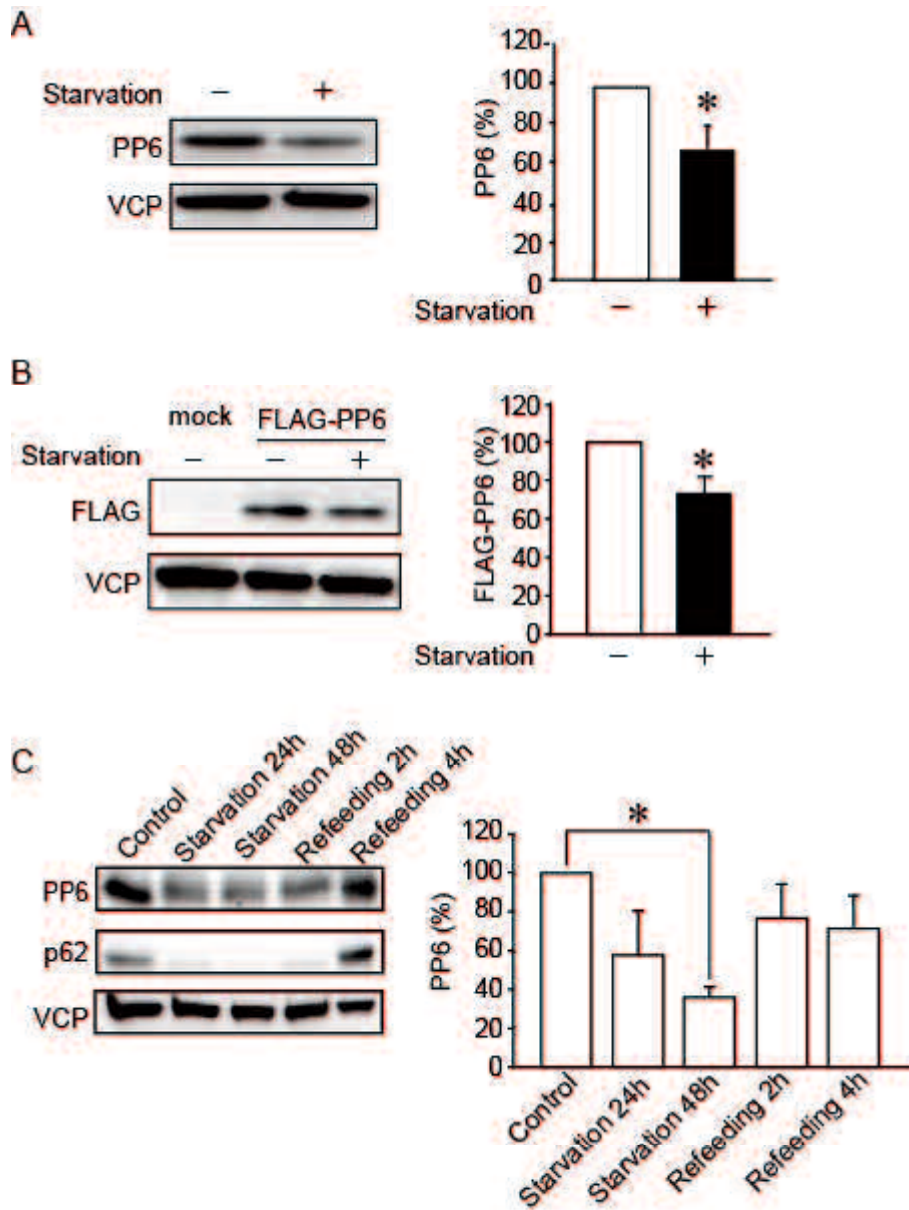


図 29 PP6 タンパク質発現は飢餓刺激により生理的に制御されている

(A) HEK293T 細胞を EBSS で 3 時間処置することで飢餓刺激を与え、western blotting を用いて PP6 の発現を解析した典型例と定量図。定量図は EBSS 非処置のタンパク質レベルを 100%として、その相対値で表した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。*: $P < 0.05$ (EBSS 非処置との比較)。

(B) FLAG-PP6 と empty vector (mock) を安定発現させた HEK293T 細胞を EBSS で処置することで飢餓刺激を与え、western blotting を用いて FLAG-PP6 の発現を解析した典型例とその定量図。定量図は、EBSS 非処置の時の FLAG-PP6 の発現量を 100%とし、その相対値で表した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=6。*: $P < 0.05$ (EBSS 非処置との比較)。

(C) マウスの肝臓を絶食前、絶食 24 時間後、絶食 48 時間後、絶食 48 時間後の再給餌 2 時間後および 4 時間後に摘出し、western blotting を用いて PP6 と p62 の発現を解析した典型例と定量図。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。*: $P < 0.05$ 。

4-3 胃がんモデルマウスの腫瘍部では PP6 タンパク質と p62 タンパク質が蓄積している

胃がんの発生には、ピロリ菌感染による慢性胃炎がリスクファクターとなる。ピロリ菌は、がん因子として機能する CagA タンパク質を分泌し、Wnt シグナルの活性化などを介して上皮細胞の異常増殖などを引き起こす (118,119)。CagA タンパク質はオートファジーにより分解され、Wnt シグナルはオートファジーを抑制することが報告されており、宿主のオートファジー不全により CagA が蓄積することが胃がんの発生に関与する (120,121)。

そこで、胃がん発生過程でのオートファジー活性と PP6 発現の関係を検討するため、胃がんモデルマウスである *Gan* マウスを用いた検討を行った。*Gan* マウスは胃粘膜上皮細胞で PGE₂ 産生を亢進させた K19-C2mE マウスと、Wnt シグナルを亢進させた K19-Wnt1 マウスを交配したマウスで、100%の確立で胃がんを発生する (122)。*Gan* マウスの腫瘍部と非腫瘍部、同腹・同週齢の野生型 (WT) マウスの胃を摘出し、タンパク質発現量を western blotting を用いて解析した。その結果、PP6 および p62 のタンパク質発現は *Gan* マウスの腫瘍部で顕著に高く、*Gan* マウス非腫瘍部では WT マウスの胃と有意な差は認められなかった (図 30)。以上の結果から、病態生理学的にもオートファジーの抑制と PP6 発現の上昇が関連している可能性が示唆された。

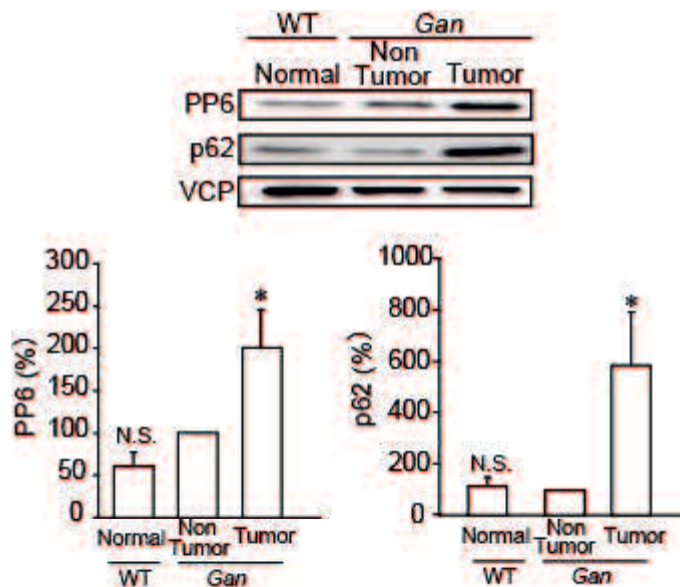


図30 胃がんモデルマウスの *Gan* マウスでの PP6 発現とオートファジー活性の解析

野生型マウスの胃 (WT / Normal)、*Gan* マウスの非腫瘍部 (Non Tumor) および腫瘍部 (Tumor) における PP6 および p62 発現量を western blotting を用いて検討した典型例と定量図。定量図は *Gan* マウスの非腫瘍部を 100%とし、相対値で表した。N=4。VCP はローディングコントロールとして用いた。*: $P < 0.05$ (Non Tumor との比較)。N.S. : not significant (Non Tumor との比較)。

4-4 PP6 がオートファジーで分解されるメカニズムの解析

4-4-1 PP6 は p62 と結合する

p62 は LC3 結合ドメインとユビキチン結合ドメインを持ち、選択的オートファジーにより分解されるタンパク質は、ユビキチン化された後に p62 と結合することでオートファゴソームに取り込まれる (43)。

そこで、FLAG-PP6 を安定発現させた HEK293T 細胞と HeLa 細胞を用いて、PP6 と p62 の結合を免疫沈降で検討した。その結果、どちらの細胞においても PP6 と p62 が結合しており、この結合は bafilomycin でオートファジーを抑制した際に増加することが認められた (図 31 A, B)。

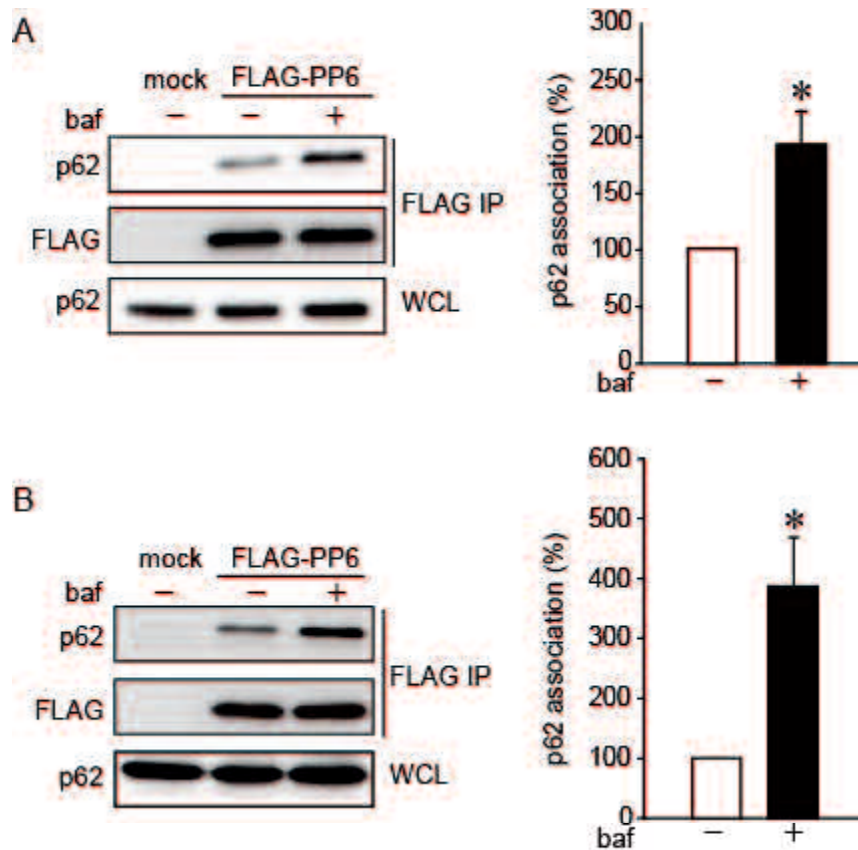


図 31 PP6 は p62 と結合する

(A, B) empty vector (mock) と FLAG-PP6 を安定発現させた HEK293T 細胞 (A) と HeLa 細胞 (B) を bafilomycin (baf、100 nM) で 4 時間処置した。FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い、western blotting を用いて PP6 と p62 との結合を解析した典型例と定量図。定量図は bafilomycin 非処置での p62 の結合量を 100% としたときの相対値で示した。N=3。*: $P < 0.05$ (bafilomycin 非処置との比較)。

4-4-2 p62 発現の抑制は PP6 分解を抑制する

PP6 は p62 と結合することで選択的オートファジーにより分解されることが示唆されたことから、p62 発現の抑制が PP6 分解に与える影響を検討した。

HEK293T 細胞に non target shRNA (NT) と p62 に対する shRNA (p62) を安定発現させ、p62 発現の低下を確認した (図 32A)。次に、飢餓刺激による PP6 発現の低下に与える影響を解析したところ、non target shRNA 発現細胞では PP6 の分解が認められたのに対し、p62 に対する shRNA 発現細胞ではほとんど認められなかった (図 32B)。以上の結果から、PP6 は p62 と結合することでオートファゴソームへと取り込まれ、オートファジーによる分解を受けることが示唆された。

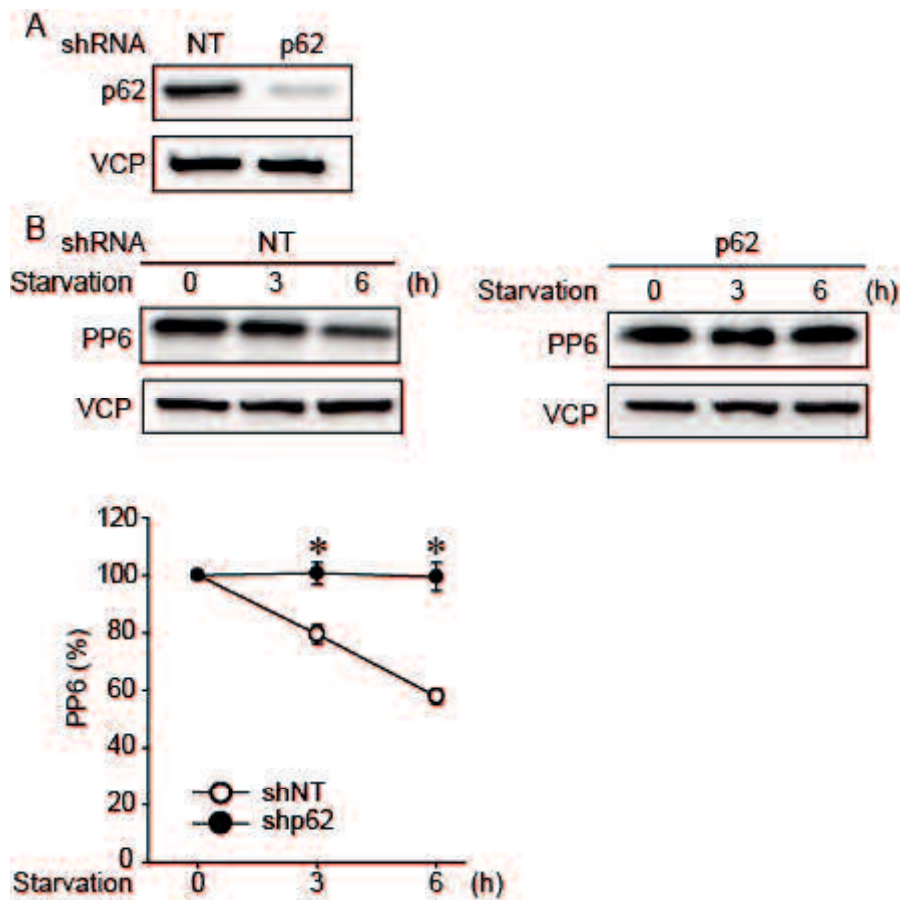


図 32 p62 発現の抑制は PP6 分解を抑制する

(A) HEK293T 細胞に non target shRNA (NT) と p62 に対する shRNA (p62) を安定的に発現させ、western blotting を用いて shRNA の効果を確認した典型例。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=2。

(B) Non target shRNA と p62 に対する shRNA を安定発現させた HEK293T 細胞を EBSS で処置することで飢餓刺激を 0~6 時間行い、western blotting を用いて PP6 の発現量を解析した典型例と定量図。定量図は EBSS 非処置の PP6 タンパク質発現量を 100%として、その相対値で表した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

4-4-3 Bafilomycin は PP6 の局在を変化させる

オートファジーを抑制した際の PP6 の細胞内局在の変化を検討した。

NIH3T3 細胞を bafilomycin で処置し、PP6 とリソソームのマーカである LAMP1 と p62 の局在を解析したところ、PP6 は bafilomycin 非処置 (Cont) では細胞質全体に存在にするのに対し、bafilomycin 処置 (baf) により LAMP1 や p62 と共局在することが認められた (図 33A、B)。以上の結果から、PP6 はオートファゴソームに取り込まれていることが示唆された。

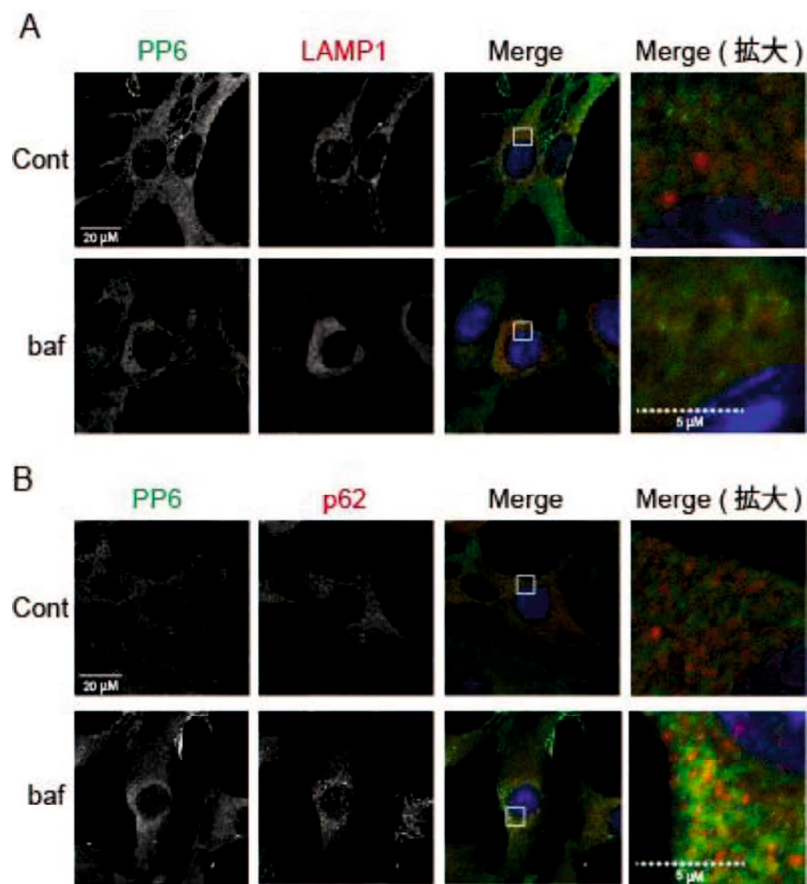


図 33 Bafilomycin は PP6 の局在を変化させる

(A, B) NIH3T3 細胞を bafilomycin (baf、100 nM) で 4 時間処置し、免疫染色法により (A) PP6 (緑)、LAMP1 (赤) および核 (青)、(B) PP6 (緑)、p62 (赤) および核 (青) の局在を解析した (Merge)。なお単独の免疫染色図はグレースケールで表している。核は Hoechst333432 を用いて染色した。拡大図は Merge 写真の□で囲んだ部分を拡大した。スケールバー: 実線 20 μM、点線 5 μM。N=3。

4-5 PP6によるオートファジー制御機構の解析

4-5-1 PP6発現の抑制はオートファジー誘導を促進する

PP6がオートファジーによる選択的な分解を受けることが明らかになったことから、反対にPP6がオートファジー活性にどのような影響を与えるか検討した。

HEK293T細胞にshNT、PP6に対するshRNA (PP6 #1、PP6 #2) を安定発現させ、PP6発現が低下することを確認した (図 34A)。この細胞をbafilomycinで処置し、western blottingを用いてオートファジー誘導の指標であるLC3-IIの蓄積量を検討したところ、PP6の発現抑制によりLC3-IIの蓄積が促進されることが認められた (図 34B)。また、レスキュー実験を行うため、shPP6 #2発現細胞にshPP6 #2に抵抗性のFLAG-PP6を発現させた (図 34C)。この細胞をbafilomycinで処置し、western blottingを用いてLC3-IIの蓄積量を検討したところ、PP6のレスキュー発現によりLC3-IIの蓄積が元のレベルに回復することが認められた (図 34D)。

さらに、*Ppp6c* 遺伝子の欠損がオートファジー活性に与える影響を検討した。CreERT-PP6^{fllox/fllox}MEF細胞を4HTで処置してPP6発現を抑制した後に培地を交換し、細胞をbafilomycinで処置してwestern blottingによりLC3-IIの蓄積量を解析した。その結果、*Ppp6c* 遺伝子の欠損によりLC3-IIの蓄積が促進されることが認められた (図 34E)。以上の結果から、PP6はオートファジーを抑制していることが示唆された。

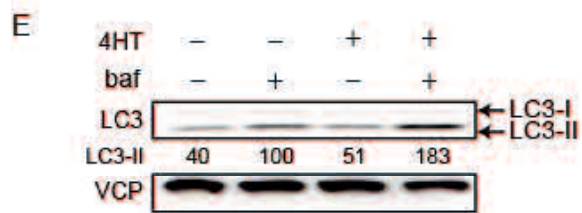
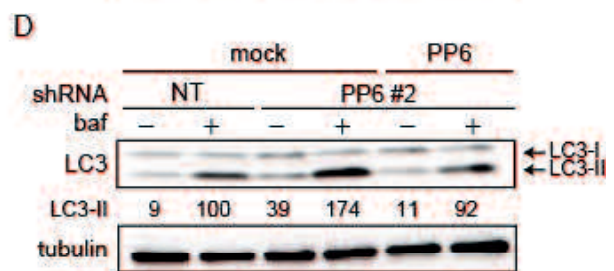
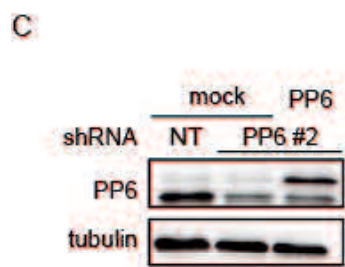
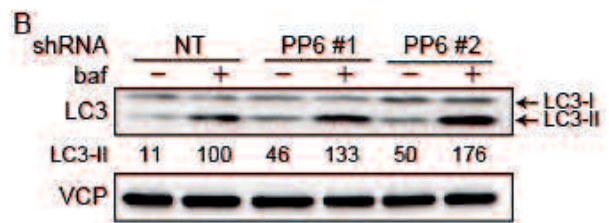
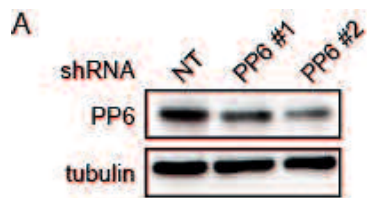


図 34 PP6 発現の抑制はオートファジー誘導を促進する

(A, B) HEK293T 細胞に non target shRNA (NT) と PP6 に対する 2 種類の shRNA (PP6 #1、PP6 #2) を安定的に発現させた。(A) shRNA の効果を western blotting を用いて確認した典型例。tubulin はローディングコントロールとして用いた。N=2。

(B) shNT、shPP6 #1、shPP6 #2 を安定発現させた HEK293T 細胞を bafilomycin (baf、100 nM) で 2 時間処置し、western blotting を用いて LC3-II の蓄積量を解析することでオートファジー活性を検討した典型例。shNT 発現細胞を bafilomycin で処置した時の LC3-II の発現量を 100%とし、LC3-II の発現量を数値化した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。

(C, D) shNT を安定発現させた HEK293T 細胞に empty vector (mock) を、shPP6 #2 を安定発現させた HEK293T 細胞に empty vector (mock) もしくは shPP6 #2 に抵抗性の FLAG-PP6 を安定発現させた。(C) PP6 の発現量を western blotting で検討した典型例。tubulin はローディングコントロールとして用いた。N=2。(D) それぞれの細胞を bafilomycin (baf、100 nM) で 2 時間処置し、LC3-II の蓄積量を解析することでオートファジー活性を検討した典型例。shNT/mock 発現細胞を bafilomycin で処置した時の LC3-II の発現量を 100%とし、LC3-II の発現量を数値化した。tubulin はローディングコントロールとして用いた。N=3。

(E) CreERT-PP6^{flox/flox}MEF 細胞を 4-hydroxy tamoxifen (4HT、500 nM) で 30 時間処置した後に培地を交換し、12 時間後に bafilomycin (baf、100 nM) で 2 時間処置した。Western blotting で LC3-II の蓄積量を解析することでオートファジー活性を検討した典型例。4HT 非処置の細胞に bafilomycin を処置した時の LC3-II の発現量を 100%とし、LC3-II の発現量を数値化した。VCP はローディングコントロールとして用いた。N=3。

4-5-2 PP6 は Beclin 1 の C 末端領域に結合する

第3章で、PP2A が Beclin 1 の脱リン酸化を介してオートファジー活性を抑制していることが明らかになったため、PP6 も同様に Beclin 1 複合体に影響を与えるか解析した。

まず、FLAG-Beclin 1 を安定発現させた HEK293T 細胞に、Tet On System により S-tag を付加した各種 type 2A protein phosphatase を発現させ、FLAG M2 ビーズを用い免疫沈降を行った (図 35A)。その結果、PP6 が type 2A protein phosphatase の中で最も強く Beclin 1 と結合することが認められた。

Beclin 1 には Bcl-2 と結合する Bcl-2 Homology domain 3 (BH3)、Atg14L や UVRAG と結合する Coiled-Coil Domain (CCD)、Vps34 と結合する Evolutionally Conserved Domain (ECD) の3つのドメイン構造が存在する (59)。そこで PP6 が Beclin 1 のいずれの領域に結合しているかを明らかにするために Human Beclin 1 を、BH3 を含む 1-150、CCD を含む 151-242、ECD を含む 243-450 に分け、PP6 との結合性を検討した (図 35B)。HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した Beclin 1 の全長および切断体と HA-PP6 を発現させ、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い、Beclin 1 の各領域との結合性を解析したところ、PP6 の結合は BH3 を含む N 末端領域と CCD ではほとんど認められず、ECD を含む C 末端領域でのみ強く認められた (図 35C)。

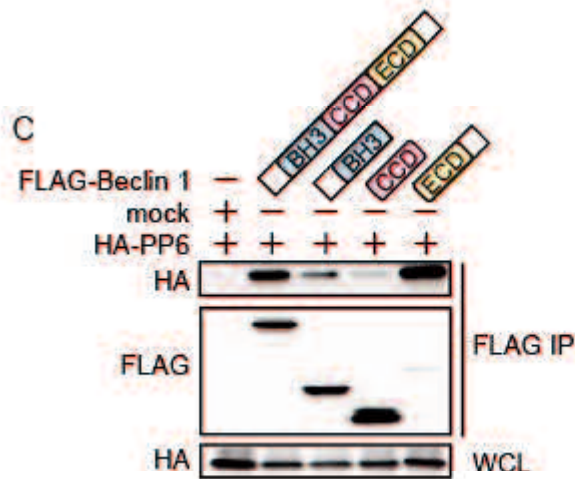
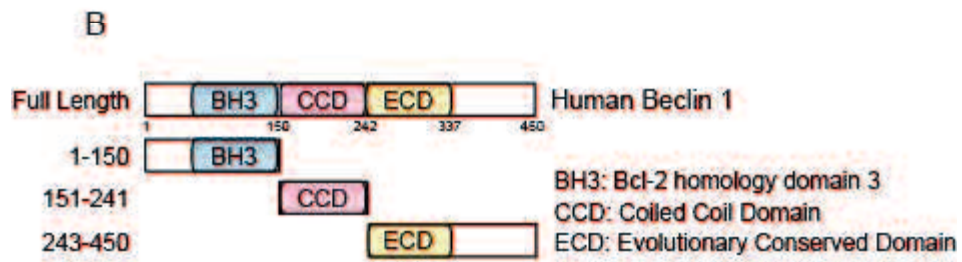


図 35 PP6 は Beclin 1 の C 末端領域に結合する

(A) FLAG-Beclin 1 を安定発現させた HEK293T 細胞に Tet On System で S-tag-PP2A、S-tag-PP4、S-tag-PP6 を発現させ、FLAG-Beclin 1 を免疫沈降して、Beclin 1 と type 2A protein phosphatase との結合量を解析した典型例。N=3。WCL: whole cell lysate。

(B) Human Beclin 1 のドメイン構造の模式図。BH3 (Bcl-2 Homology domain 3)、CCD (Coiled-Coil Domain)、ECD (Evolutionary Conserved Domain)。

(C) HEK293T 細胞に Beclin 1 の各領域を発現させ、免疫沈降を行い、western blotting を用いて PP6 が Beclin 1 のいずれの領域に結合するか解析した典型例。N=2。WCL: whole cell lysate。

4-5-3 PP6 は脱リン酸化酵素活性非依存的に Beclin 1-Vps34 複合体の形成を阻害する

ここまでの結果から、PP6 は Beclin 1 の Vps34 結合領域に結合することでオートファジーを抑制していることが示唆された。オートファジーの誘導には Beclin 1 と Vps34 が複合体を形成することが必要であることから、次に PP6 が Beclin 1-Vps34 複合体の構成に与える影響について検討した。

HEK293T 細胞に、FLAG-Beclin 1 と HA-PP6 の野生型 (WT) と脱リン酸化酵素活性を失った変異体 HA-PP6 H114A (DN) を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting を用いて Beclin 1 と Vps34 の結合への影響を解析した。その結果、PP6 は、Vps34 を Beclin 1 から解離させることが認められ、興味深いことに、この作用は脱リン酸化酵素活性に非依存的であった (図 36A)。また、FLAG-Vps34 と HA-PP6 (WT)、HA-PP6 (DN) を HEK293T 細胞に発現させ、FLAG 免疫沈降を行い、Beclin 1 と Vps34 の結合を解析した検討でも、同様に PP6 が酵素活性非依存的に Beclin 1 を Vps34 から解離させることが認められた (図 36B)。

一方、PP2A の過剰発現では Beclin 1 と Vps34 の解離は認められなかった (図 36C)。反対に shNT と shPP6 #2 を安定的に発現させた細胞に FLAG-Vps34 を発現させ、Beclin 1 と Vps34 の結合を解析したところ、PP6 発現の抑制により Beclin 1 と Vps34 の結合が促進することが認められた (図 36D)。以上の結果から、PP6 は脱リン酸化酵素活性非依存的に Beclin 1-Vps34 複合体の形成を阻害することでオートファジーを抑制している可能性が示唆された。

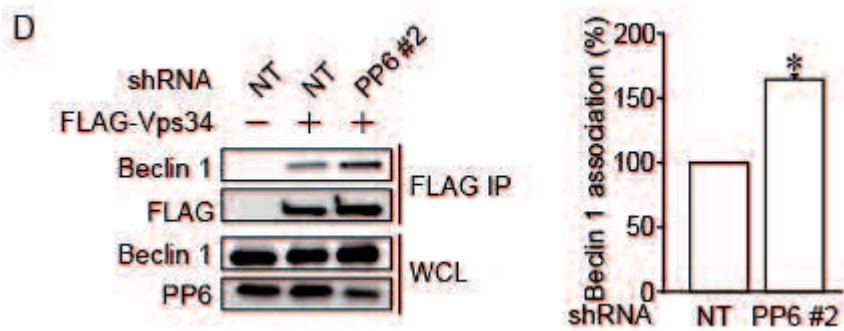
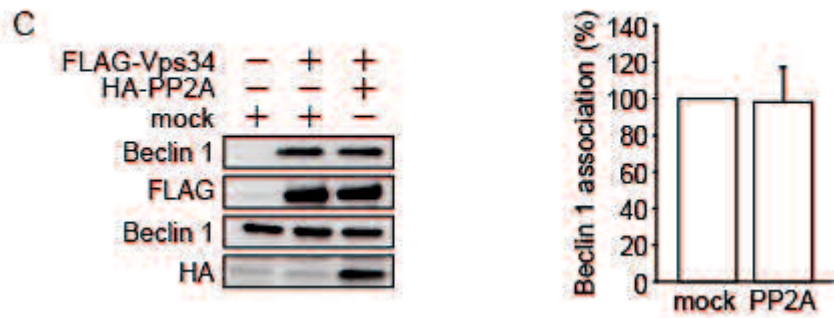
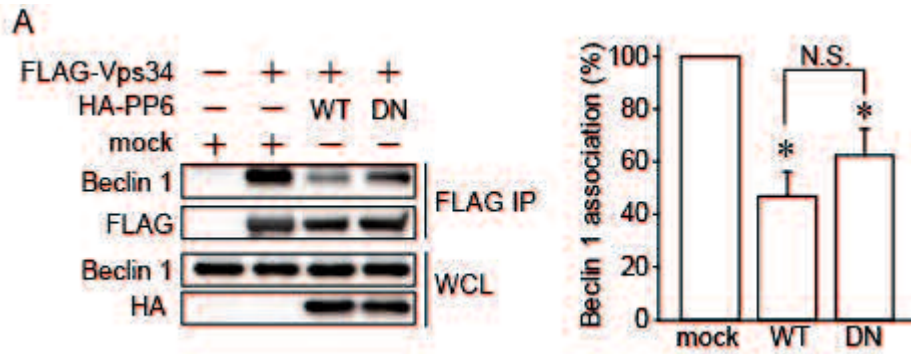


図 36 PP6 は脱リン酸化酵素活性非依存的に Beclin 1-Vps34 複合体の形成を阻害する

(A, B) HEK293T 細胞に、FLAG-Vps34 (A) もしくは FLAG-Beclin 1 (B) と HA-PP6 (WT)、HA PP6-H114A (DN) を発現させ、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い、western blotting により Beclin 1 と Vps34 の結合に対する影響を解析した典型例と定量図。定量図は mock の結合量を 100%とし、その相対値で表した。

N=3。WCL: whole cell lysate。*: $P < 0.05$ 。N.S. : not significant。

(C) HEK293T 細胞に FLAG-Vps34 と HA-PP2A を発現させ、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い、western blotting により Vps34 と Beclin 1 の結合に与える影響を解析した典型例と定量図。定量図は mock の結合量を 100%とし、その相対値で表した。N=3。WCL: whole cell lysate。

(D) Nontarget shRNA (NT) もしくは PP6 に対する shRNA (PP6 #2) を安定発現させた HEK293T 細胞に FLAG-Vps34 を発現させ、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い western blotting により Beclin 1 と Vps34 の結合への影響を解析した典型例と定量図。定量図は shNT を発現させた細胞での Beclin 1 の結合量を 100%とし、その相対値で表した。N=3。WCL: whole cell lysate。*: $P < 0.05$ 。

4-5-4 PP6 と Beclin 1 の結合誘導は Vps34 を Beclin 1 から解離させる

これまでの検討で、PP6 が Beclin 1 の C 末端領域に結合することで、Vps34 を Beclin 1 から解離させることが示唆された。そこで、タンパク質-タンパク質結合を誘導することができる iDimerize システムを用いて、Beclin 1 と PP6 の結合を誘導した際の、Beclin 1 と Vps34 の結合に与える影響を解析した (図 37A)。

HEK293T 細胞に DmrA タグおよび HA タグを付加した Beclin 1 と DmrC タグおよび FLAG タグを付加した PP6 を安定発現させ、A/C Heterodimerizer で処置することで Beclin 1 と PP6 の結合を誘導した。A/C Heterodimerizer 処置により、Beclin 1 と PP6 の結合が確認され、同時に Vps34 が Beclin 1 から解離することが認められた (図 37B)。このことから、PP6 の Beclin 1 への結合誘導が Beclin 1-Vps34 複合体の解離を引き起こすことが示唆された。

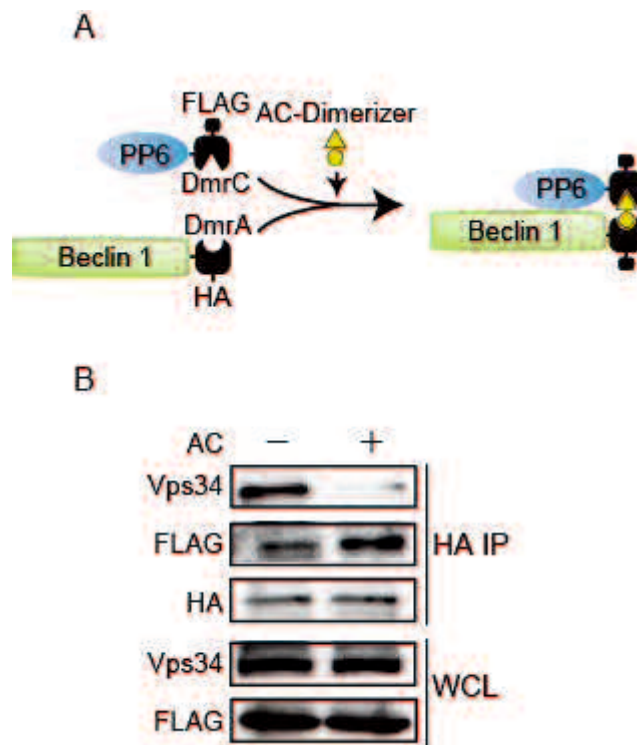


図 37 PP6 と Beclin 1 の結合誘導は Vps34 を Beclin 1 から解離させる

(A) iDimerize システムにより Beclin 1 と PP6 の結合を誘導する模式図。HEK293T 細胞に DmrA タグおよび HA タグを付加した Beclin 1 と、DmrC タグおよび FLAG タグを付加した PP6 を発現させ、A/C Heterodimerizer で処置することで DmrA と DmrC を結合させ、Beclin 1 と PP6 の結合を誘導する。

(B) HEK293T 細胞に DmrA-HA-Beclin 1 と DmrC-FLAG-PP6 を安定発現させ、A/C Heterodimerizer (500 nM) で 24 時間処置し、抗 HA 抗体ビーズを用いて免疫沈降を行った後に、Beclin 1 と PP6 および Vps34 の結合の変化を western blotting を用いて解析した典型例。N=3。WCL: whole cell lysate。

4-6 考察

4-6-1 PP6 発現の制御機構

PP6は、PP2A、PP4とともにtype 2A protein phosphataseファミリーに属する。近年、PP6は、細胞分裂の抑制、DNA修復の促進、炎症反応の抑制などに関与し(24-26)、メラノーマではPP6の変異が頻繁に認められ、その発症に寄与していることが報告されるなど(29,123)、PP6の生理学的・病態生理学的な重要性が明らかになりつつある。しかし、精力的に研究が進められているPP2Aと比較すると、PP6の機能や制御機構には不明な点が多い。

本研究からPP6は、p62依存的な選択的オートファジーにより分解されることが明らかになった。上皮細胞においてPP6は、細胞密度に依存してタンパク質発現が上昇することが報告されている(28)。細胞密度依存的なPP6タンパク質発現の上昇の一部にはmRNA発現の上昇が関与しているが、mRNA発現の上昇以上にタンパク質発現が上昇しており、タンパク質分解機構の抑制が関与する可能性が示唆されている。本研究では、胃がん自然発症マウスにおいてPP6発現の上昇が観察された。グリオーマや悪性中皮腫でPP6タンパク質発現の上昇が(31,34)、神経内分泌分化型前立腺がんでは*Ppp6c*遺伝子の増幅が報告されており(124)、PP6タンパク質は様々な腫瘍で発現上昇している可能性がある。悪性中皮腫では、miRNA31発現の減少によりPP6 mRNA発現が増加することが報告されているが、グリオーマにおけるPP6発現上昇の分子機構は不明である。がんにおけるPP6タンパク質発現上昇は、オートファジー活性の低下が一因となっている可能性が考えられる。

一方、PP6と同じtype 2A protein phosphataseファミリーに属するPP2Aは、ユビキチン・プロテアソーム系で分解されることが報告されており(115)、本研究

でもプロテアソームの阻害により PP2A 発現が上昇することが認められた。PP6 と PP2A の分解機構が大きく異なる原因は明らかでないが、ユビキチン化を受けるとリジン残基が保存されていないことが一因である可能性が考えられる。

Phosphosite plus (<http://www.phosphosite.org/>) によると、PP6 の K8、K17、K132、K231 のユビキチン化がプロテオミクス解析で報告されている。このうち、K8 および K231 は PP2A で保存されていないことから、これらのリジン残基がポリユビキチン化を受ける可能性が考えられる (図 38 A, C)。K48 のポリユビキチン化はプロテアソームによる分解を誘導すること、K63 のポリユビキチン化はリソソームによる分解すなわちオートファジーによる分解を誘導すると考えられている (41)。したがって、PP6 の K8 および K231 が K63 を介したポリユビキチン化を受けることで p62 と結合し、選択的オートファジーにより分解されることが考えられる。

反対に、ユビキチン化を受ける PP2A のリジン残基が PP6 で保存されていないため、PP6 がユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けず、選択的オートファジーによって分解される可能性も考えられる。実際、PP2A のユビキチン化サイトである K41 は PP6 で保存されていない (図 38B)。

A

PP2A: 7 T K E L D **Q** W I E Q L 17
 PP6: 3 P L D L D **K** Y V E I A 13

B

PP2A: 36 K E I L T **K** E S N V Q 46
 PP6: 32 C D L L L **E** E S N V Q 42

C

PP2A: 230 H A N G L **T** L V S R A 240
 PP6: 226 H I N N L **K** L I C R A 236

図 38 PP2A と PP6 のアミノ酸配列比較

PP6 の K8 と K231 がユビキチン化されることがプロテオミクス解析で報告されているが、PP2A ではこのリジン残基は保存されていない (A, C)。一方、PP2A の K41 はユビキチン化されてプロテアソームでの分解に関与しているが、PP6 では保存されていない (B)。赤フォントは PP2A もしくは PP6 で K であるアミノ酸を示す。

4-6-2 PP6 によるオートファジー阻害機構

本研究において、PP6 がオートファジー活性を抑制し、これには Beclin 1-Vps34 複合体の形成が阻害されることが一因である可能性が明らかになった。PP6 の Beclin 1 結合領域が Vps34 と重なっていること、不活性型 PP6 変異体でも Beclin 1-Vps34 複合体の形成が阻害されたこと、Beclin 1 への PP6 の結合誘導で Beclin 1-Vps34 複合体の形成が阻害されたことから、PP6 は脱リン酸化酵素活性非依存的に Vps34 と Beclin 1 を競合的に奪い合っている可能性が考えられる。

一方、不活性型 PP6 変異体の作用が若干弱いことから、PP6 が何らかのリン酸化サイトを脱リン酸化し、Beclin 1-Vps34 複合体の形成を阻害している可能性も完全には否定できない。Beclin 1-Vps34 複合体形成は、Beclin 1 のリン酸化 (63,64,69)、Vps34 のリン酸化による制御を受ける (50,125)。また、Beclin 1 への Bcl-2 や Bcl-xL の結合が Beclin 1-Vps34 複合体形成を阻害することも報告されており (59-62)、これには Bcl-2 や Bcl-xL のリン酸化が関与する (50,59)。したがって、PP6 が Beclin 1-Vps34 複合体の形成に関与する Ser/Thr リン酸化サイト (Beclin 1 の Thr119 や Bcl-2 の Thr69、Ser70、Ser87) を脱リン酸化する可能性や、PP6 は Bcl-xL Ser62 を脱リン酸化することで Bcl-xL を安定化させることから (126)、PP6 の脱リン酸化酵素活性依存的な Bcl-xL の安定化が Beclin 1-Vps34 複合体形成の阻害に関与する可能性も考えられる。

しかし、PP6 の基質特異性は結合する PP6Rs タンパク質によって制御されているが (127)、不活性型 PP6 変異体は PP6Rs タンパク質に結合できない (29)。したがって、不活性型 PP6 変異体が内在性の PP6 から PP6Rs タンパク質を奪い取って PP6 活性に影響を与える可能性は低く、PP6 は脱リン酸化酵素活性非依存的に Beclin 1-Vps34 複合体の形成を阻害している可能性が高いと考える。また、

PP6Rs と結合しない PP6 の不活性型変異体が Beclin 1 に結合していることから、PP6 は基質を決定する PP6Rs を介さずに Beclin 1 と結合していると考えられる (29)。このことから、PP6 は Beclin 1 を PP6Rs の代わり、すなわち調節サブユニットとして利用している可能性も考えられる。PP6 が Beclin 1 を調節サブユニットとして利用することで Beclin 1 の結合因子の脱リン酸化に関与しており、結果として Vps34 から Beclin 1 を奪っている可能性も考えられる。

Beclin 1 は、オートファジー以外にもアポトーシスの制御やエンドサイトーシスの制御にも関与している。Beclin 1 は caspase により D133 と D149 が切断され、切断されてできた C 末端側はミトコンドリアの膜表面に結合することで、シトクロム C を漏出させ、アポトーシスを誘導することが報告されている (128)。この切断された Beclin 1 の機能はリコンビナント Beclin 1 を用いた cell free の *in vitro* のアッセイ系でも認められることから、結合因子に非依存的な作用であると考えられる。Vps34 や PP6 が結合することで Beclin 1 切断体の作用が抑制されるかは、今後の解析が待たれる。また、エンドサイトーシスの制御において、Beclin 1-Vps34-UVRAG 複合体は促進的に、Beclin 1-Vps34-UVRAG-RUBICON 複合体は抑制的に作用する (49)。したがって、PP6 による Vps34 の Beclin 1 からの解離はエンドサイトーシスの制御機構にも影響を与える可能性が考えられる。

PP6 がオートファジー抑制因子として機能していることを明らかにした本研究に対して、Wengrod らは、富栄養状態では mTORC1 により PP6 活性が抑制されており、mTORC1 が抑制されると PP6 が活性化し、オートファジーが誘導されることを報告している (129)。このような違いが生じた理由は明らかではないが、いくつかの可能性が考えられる。第一に、Wengrod らが観察した PP6 発現抑制によるオートファジー誘導の促進は rapamycin 処置時のものであり、基底レベルのオートファジー活性については検討していないことがあげられる。オー

オートファジー活性は、mTOR シグナル、Beclin 1 シグナル、Atg シグナルによって制御されており、それぞれの機構はほぼ独立して働いている (45)。rapamycin は mTORC1 を抑制することでオートファジーを誘導することから、PP6 は mTOR シグナルではオートファジー誘導的に機能し、Beclin 1 シグナルではオートファジー抑制的に機能している可能性が考えられる。第二に、細胞種の違いが原因である可能性が考えられる。Wengrod らは骨肉腫細胞株やメラノーマ細胞株を使用しており、本研究ではがん細胞ではない HEK293T 細胞や MEF 細胞を使用している。がん細胞では、一般的に mTOR シグナルが亢進しており、メラノーマでも mTORC1 シグナルの亢進が報告されている (130,131)。また、PP6 はメラノーマで頻繁に変異が報告されており、PP6 と PP6Rs タンパク質との結合性が変化している (29,30,132)。がん細胞では、PP6 活性の不全は Aurora A kinase のリン酸化レベルを上昇させることが報告されているが (24,29)、*Ppp6c* 欠損 MEF 細胞では、Aurora A kinase のリン酸化レベルの上昇は認められず、細胞増殖も停止することが報告されており (133)、がん種や細胞種によって PP6 の機能がかなり異なると考えられる。

4-6-3 がんにおける PP6 とオートファジーの役割

オートファジーは、炎症反応に対する防御反応として機能することが知られており、オートファジー制御因子の Atg16L1 や Atg7 の欠損によりデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性の腸炎が増悪化することが報告されている (134,135)。また、オートファジー不全は、IL-1 β などの炎症性サイトカインの過剰産生を介して炎症反応が増強されることが知られており (136)、オートファジー機構の異常が炎症性腸疾患の発症に関与すると考えられている。

本研究では、胃癌モデルマウスの *Gan* マウス腫瘍部において、PP6 および p62 タンパク質発現の上昇が観察されたことから、腫瘍部ではオートファジー活性が低下し PP6 発現が上昇していることが示唆された。*Gan* マウスでは PGE₂ 産生と Wnt シグナルが亢進しており、炎症性サイトカイン依存的に胃癌が発症する (122)。Wnt シグナルはオートファジーを抑制することが報告されており (121)、Wnt シグナルの亢進によりオートファジーが抑制されることで、PP6 および p62 タンパク質発現が上昇している可能性が考えられる。この PP6 発現の上昇が、さらにオートファジーを抑制し、炎症反応を増悪化している可能性がある。また、Beclin 1 ヘテロノックアウトマウスでは自然発生がんが増加すること (54,55)、乳がんや卵巣がんでは Beclin 1 に高率に変異や欠損が認められること (51-53)、肝臓特異的な Atg7 ノックアウトマウスで腫瘍形成が認められることなどから (137)、オートファジー活性の低下は腫瘍の形成自体も促進すると考えられる (138)。以上のことから、*Gan* マウスではオートファジー活性の低下が先に起き、その結果 PP6 の発現が上昇することが示唆される。PP6 発現の上昇により、さらにオートファジー活性が低下し、炎症反応が増強されて *Gan* マウスの腫瘍形成に関与している可能性が考えられる。また、グリオーマでは、PP6 の発現上昇と予後に負の相関があること (31)、p62 タンパク質発現量が増加していることが報告されており (139)、グリオーマでも *Gan* マウスと同様にオートファジー不全が発生に関与している可能性が考えられる。

がんにおいて、オートファジーが促進的に働くか抑制的に働くかは、がん種やがんのステージによって変化する (140-142)。また、がん細胞の持つ変異の種類によっても変化する。K-ras 変異誘発性すい臓がんモデルマウスでは、p53 の状態によりオートファジーの機能が異なることが報告されている (143)。この中で Rosenfeldt らは、p53 存在下ではオートファジーはすい臓がんの進行を促進させ

るが、p53 を欠損させるとオートファジーはすい臓がんの進行を抑制することを報告している。また、PP6 についても、腫瘍促進性に機能する報告だけでなく、抑制性に機能する報告が存在する (29,32,33)。PP6 はメラノーマで頻繁に変異が認められ (29,30,132)、PP6 活性の不全は Aurora A kinase のリン酸化レベルを上昇させ、染色体不安定性や DNA 傷害を引き起こすことで、メラノーマの発症に寄与していると報告されている (29,123)。また、ケラチノサイト特異的 *Ppp6c* 遺伝子欠損マウスでは、DMBA/TPA や UVB 誘導性の腫瘍形成が促進されることが報告されており (32,33)、PP6 は皮膚がんでは腫瘍抑制的に機能すると考えられる。

以上より、胃がんにおけるオートファジーの抑制と PP6 発現の上昇が、がん促進的に機能しているか抑制的に機能しているかは、今後より詳細な解析が必要である。

第5章 総合考察

本研究は、がんにおける type 2A protein phosphatase の役割と治療標的としての可能性を明らかにするため、①イヌ T 細胞性リンパ腫に対する SET 標的薬 OP449 の抗がん効果 (第 2 章)、②PP2A によるオートファジー制御機構 (第 3 章)、③ PP6 によるオートファジー制御機構 (第 4 章)、の 3 つの研究を行った。

第 2 章では、イヌのリンパ腫において、PP2A 阻害タンパク質である SET を標的とした薬物が PP2A 活性を回復させ、抗がん効果を示すことを細胞レベルで明らかにした。SET の発現はヒトの様々な腫瘍で上昇していることから (15,77,92-96)、リンパ腫以外のイヌの腫瘍においても上昇していることが考えられる。実際、イヌ乳腺腫瘍において SET タンパク質の発現が上昇することを確認している (研究室の未発表データ)。今後は、SET を含む PP2A 阻害タンパク質を標的とした薬剤が開発され、PP2A 活性を回復させる抗がん戦略がイヌの腫瘍の治療戦略として臨床応用されることが期待される。

第 3 章では、PP2A の機能不全が、がんの発症や悪性化を引き起こす分子機構の一端として、PP2A が Beclin 1 Ser90 を脱リン酸化することでオートファジーを抑制するという機構が関与する可能性を示した。本研究では、イヌリンパ腫細胞株でのオートファジー活性や Beclin 1 Ser90 のリン酸化レベルについて検討できていないが、SET 標的薬の抗がん効果の一部には、PP2A 活性の回復による Beclin 1 Ser90 の脱リン酸化と、それにとまなうオートファジーの抑制が関与していることが考えられる。

第 4 章では、PP2A と同じ type 2A protein phosphatase である PP6 がオートファジーを抑制する分子機構を明らかにした。興味深いことに、PP6 は PP2A と異なりオートファジーによる選択的な分解を受けることから、PP6 タンパク質発現とオートファジー活性に負のフィードバック機構が存在することが明らかとなった。オートファジーは、機能不全になったタンパク質やミトコンドリアなどを

分解し、細胞を様々なストレスから保護することで、細胞のがん化を抑制している (138)。実際、オートファジー必須因子の欠損により自然発生がんの増加が確認されている (54,55,137)。一方で、オートファジー欠損によりがん化した細胞では、核の異形成など悪性度の高い所見は認められないことから、オートファジーはがん細胞を飢餓や低酸素、抗がん剤などから保護することで、がんの悪性化に寄与することも示唆されており、がんにおけるオートファジーの役割は、がん種やステージにより異なると考えられる。第4章で用いた *Gan* マウスには、腫瘍の転移などは認められず悪性度は高くないことから (122)、*Gan* マウスにおける PP6 の発現上昇とオートファジーの抑制は、がんの発生を促進させるが、がんの悪性化へは抑制的に作用していると考えられる。

以上のように、本研究では PP2A と PP6 によるオートファジー制御機構を解明し、抗がん戦略における治療標的としての可能性を明らかにした。本研究は、将来的に PP2A や PP6 を標的とした創薬の開発への礎になると考える。

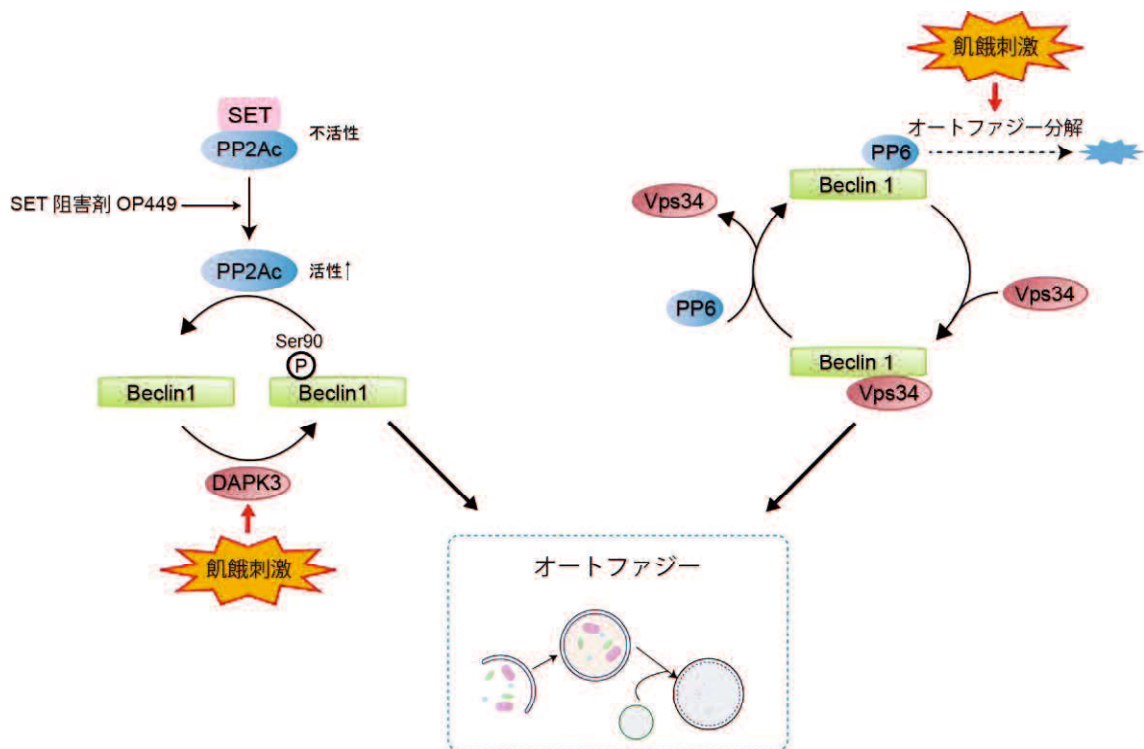


図 39 本研究から得られた知見と作業仮説

SET 標的薬 OP449 は PP2A から SET を解離させることで PP2A 活性を回復させ、抗がん効果を示す。PP2A の新規基質として Beclin 1 Ser90 を同定し、Beclin 1 Ser90 が DAPK3 によりリン酸化されオートファジー誘導に寄与することを明らかにした。OP449 の抗がん効果にオートファジーの抑制が関与している可能性が考えられる。PP6 は Beclin 1 から Vps34 を解離させることでオートファジーを抑制し、選択的オートファジーにより分解されることが明らかになった。

第6章 実験材料および実験方法

6-1 細胞培養

ヒト子宮頸がん由来細胞株HeLa細胞、ヒト胎児腎臓上皮由来細胞株HEK293T細胞、ヒト乳がん由来細胞株MCF7細胞、ヒト肺がん由来細胞株A549細胞、マウス胎児線維芽細胞株NIH3T3細胞、マウス胎児線維芽細胞株MEF細胞は、1% antibiotic-antimycotic (AA)、10% fetal bovine serum (FBS) を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い、イヌ末梢血単核球 (PBMC)、イヌリンパ腫細胞株CL-1細胞、UL-1細胞、GL-1細胞、Nody-1細胞、17-71細胞、CLBL-1細胞、CLGL-90細胞、Ema細胞は1% AA、10% FBSを含むRPMI1640を用い、37°C、5% CO₂に保ったインキュベーター (MCO-5AC、SANYO) 内で培養した。

6-2 イヌ末梢血単核球 (PBMC) の単離

2匹の供血犬から採血後、全血サンプルをPBSで1:1に希釈し、Ficoll-Hypaque (Thermo Scientific) を入れたチューブへ静かに積層した。その後20°C、833 gで20分間遠心し、PBMCを単離した。

6-3 細胞生存率の解析

UL-1細胞、Ema細胞、PBMC細胞を96穴プレートに 1×10^4 個播き、OP449で72時間処置した後に細胞生存率を測定した。細胞懸濁液とtrypan blueを1:1で混合して顕微鏡で観察し、trypan blue陰性細胞を生細胞、陽性細胞を死細胞として計測した。

6-4 PP2A 活性測定法

PP2A 活性の測定にはマラカイトグリーンアッセイを用いた。Ema 細胞を OP449 (1 μ M) で 2 時間処置し、脱リン酸化活性測定用 lysate buffer を加えて細胞を可溶化した。ネガティブコントロールとして、細胞溶解液を type 2A protein phosphatase 阻害剤である OA (10 nM) で 5 分間処置したサンプルを作製した。その後、リン酸化ペプチドを含む reaction buffer と混合し、室温で 20 分間処置した。反応を 60% HClO₄ を加えることで停止させ、反応液中のリン酸塩量をマラカイトグリーンアッセイにより測定した。ネガティブコントロールとの差をサンプルの PP2A 活性とした。

脱リン酸化活性測定用 lysate buffer の組成は以下の通りである。

50 mM MOPS (pH7.4)、0.1% NP-40、0.1 mM EGTA and Roche's complete protease inhibitor cocktail。

Reaction buffer の組成は以下の通りである。

50 mM MOPS (pH7.4)、24 mM MgCl₂、2 mM MnCl₂、0.03% 2-mercaptoethanol、2.9% glycerol、0.2 mM phospho-peptides (K-R-pT-I-R-R)。

6-5 アポトーシス活性の解析

Ema 細胞を OP449 (1 μ M) で 8 時間処置し、500 rpm で 5 分間遠心して細胞を回収した。その後、annexin V-FITC Apoptosis Kit (Bio Vision) を用いて、アポトーシス細胞を annexin V で標識し、CyFlow space flow cytometer (Partec、Munster) により全細胞中の annexin V 陽性率を測定した。

6-6 プラスミド DNA の作製と細胞への導入

6-6-1 プラスミドの作製

各種タンパク質発現プラスミドは、ヒト cDNA を PCR により増幅し、各種ベクターに T4 DNA ligase (Takara) もしくは In Fusion PCR Cloning Kit (Takara) を用いて組み込んで作製した。

shRNA 発現プラスミドは、標的因子の配列に合わせ設計したプライマーをアニーリングした後に pLVmC の ClaI/MluI サイトに組み込むことで作製した。

shRNA の標的配列は以下の通りである。使用した shRNA が 19 bp と 21 bp の場合で、それぞれ対応する shNT を使用した。

shNon target (NT): 5'-CAACAAGATGAGAGCACCA-3'

shNon target (NT): 5'-CAACAAGATGAAGAGCACCAA-3'

shPP6 #1: 5'-GCCTGGAGATACTGTACCA-3'

shPP6 #2: 5'-GACACAAACTACATATTTA-3'

shPP2A: 5'-GATACACTGGATCATATCA-3'

shDAPK1: 5'-TGAGAAGCATGTAATGTTA-3'

shDAPK3 #1: 5'-GGGAACGAGTTCAAGAACA-3'

shDAPK3 #2: 5'-GACGGACGTGGTCCTCATC-3'

shBeclin 1: 5'-TGAGGATGACAGTGAACAG-3'

shp62: 5'-CCGAATCTACATTAAGAGAA-3'

On ice で解凍した 10 μ l の大腸菌 XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene) に 1 μ l のインフュージョン反応液、ライゲーション反応液もしくはプラスミド溶液を加え、on ice で 30 分間静置した。ドライバス (Dry Bath Incubato、Major Science) で 42°C、45 秒間ヒートショックを加えた後、on ice で 2 分間静置し、100 μ l の

LB Broth を加え、37°C で 60 分間振とう培養 (ioShaker BR-22FP、Taitec) した。その後、LB agar (ampicillin 100 µg/ml 添加) プレートに播種し 37°C で一晩培養した。出芽したコロニーを単離し、5 ml の LB Broth (ampicillin 100 µg/ml 添加) に加え 37°C、180 rpm で一晩振とう培養した。培養液をチューブに移し、室温にて 3,000 rpm で 10 分間遠心 (Himac CR20、HITACHI) して、上清を除いた後、Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。なお必要な器具は滅菌して用いた。

6-6-2 プラスミドの細胞への導入

12 穴プレートに 2×10^5 個の細胞を播き一晩培養した。プラスミド総量 1 µg を Opti-MEM 200 µl で希釈した後、2 µl の Polyethylenimine “MAX” (PEI; Polysciences) と混合して 30 分間静置し、細胞培養液中に添加した。

6-6-3 ウイルスベクターの作製と感染

1×10^6 個の HEK293T 細胞を 60 mm ディッシュに播いた。翌日、lentivirus vector plasmid (3 µg)、packaging plasmid (psPAX2: 2.3 µg)、VSVG coat protein plasmid (pDM2.G: 1.3 µg) を 1 ml の Opti-MEM で希釈し、10 µl の PEI を混合して 30 分間静置した。その後、4.5 ml の培地 (10% FBS・1% AA 含有 DMEM) に加え、8 時間培養した後に、3 ml の培地に交換した。48 時間培養後、ウイルスを含む培地を 0.22 µm のフィルター (Millipore) でろ過し、目的の細胞に 8 時間処置することでウイルスベクターを感染させた。

6-7 免疫染色法

細胞を microscope cover glass (Fisherbrand) 上に播き、1 日培養した。PBS で洗淨後、4% paraformaldehyde (Wako) を用いて室温で 20 分間固定し、PBS で洗淨した。0.05% Triton-X 含有 PBS で、室温で 1 分間振とう (Mini Shaker 3D、LMS) することで脱膜化を行った後に、0.2%ゼラチン含有 PBS で、室温で 20 分間もしくは 3%スキムミルク含有 PBS で、室温で 30 分間振とうすることでブロッキングを行った。一次抗体を 0.2%ゼラチン含有 PBS もしくは PBS で希釈し、4°C で一晩反応させた。PBS で洗淨後、遮光して二次抗体を 60 分間反応させた。標本は aqueous permanent mounting medium (Dbiosys) を用いて micro slide glass (Matunami) に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710、Carl Zeiss) を用いて観察した。PBS の組成は次の通りである。

PBS : 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.76 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄。

6-8 タンパク質抽出

細胞は、培地を除去した後に、on ice で冷却した HBS で一回洗淨し、Triton-X 100 含有 lysate buffer を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞懸濁液を on ice で 5 分間静置した後に 4°C、15,000 g で 15 分間遠心し、上清を採取してタンパク質サンプルとして使用した。得られたサンプルのタンパク質濃度は BioRad DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて lowry 法により測定した。細胞用 lysate buffer には次のものを用いた。

Triton X-100 含有 lysate buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA (pH 8.0)、

5 mM EGTA (pH 8.0)、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100、protease inhibitor cocktail (Roche) 1 tablet/50 ml。

6-9 免疫沈降法およびプルダウン

培地を除去した後に、on ice で冷却した HBS で一回洗浄し、Triton-X 100 含有 lysate buffer もしくは NP-40 含有 lysate buffer を加えて可溶化した。得られた細胞懸濁液を on ice で 5 分間静置した後に 4°C、15,000g で 15 分間遠心し、上清を採取してタンパク質サンプルとして使用した。IP 用 wash buffer を用いて洗浄した FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) もしくは Stag protein Agarose (Novagen) をサンプルに加え、4°C で 3 時間反応させた。ビーズを洗浄後、結合タンパク質を SDS sample buffer もしくは FLAG peptide (SIGMA) で溶出し、western blotting を行った。Wash buffer、NP-40 含有 lysate buffer、SDS sample buffer の組成は以下の通りである。

Triton-X 100 含有 wash buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA (pH 8.0)、5 mM EGTA (pH 8.0)、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100。

NP-40 含有 wash buffer : 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl、5 mM EGTA (pH 8.0)、1% NP-40。

Triton-X 100 含有 lysate buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA (pH 8.0)、5 mM EGTA (pH 8.0)、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100、protease inhibitor cocktail (Roche) 1 tablet/50 ml。

NP-40 含有 lysate buffer : 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.4)、150 mM NaCl、5 mM EGTA (pH 8.0)、1% NP-40、protease inhibitor cocktail (Roche) 1 tablet/50 ml。

SDS sample buffer : 50 mM Tris-HCl (pH6.8)、0.4% SDS、6% β -mercaptoethanol (2ME)、2% Glycerol。

6-10 *In vitro* kinase assay

0.05 μ gのリコンビナントBeclin 1 (ProSpec Tech) と、0.1 μ gのGST-human active DAPK1もしくはDAPK3 (Signal Chem) をkinase assay buffer中で混合し、37°Cで60分間反応させた。

Kinase assay bufferの組成は以下の通りである。

50 mM HEPES (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM EGTA、0.2 mM ATP、0.01% Brij-35。

6-11 *In vitro* phosphatase assay

FLAG-Beclin 1を安定発現させたMCF7細胞を100 nMのOAで20時間処置し、Triton-X 100含有lysate buffer で可溶化した。その後、リン酸化したFLAG-Beclin 1をFLAG M2 beadsを用いて回収し、FLAG peptideを加えることで溶出した。

FLAG-Beclin 1を、phosphatase assay buffer中で0.4 μ gのリコンビナントPP2A (Cayman Chemical) と混合し、37 °Cで60分間反応させた。

Phosphatase assay bufferの組成は以下の通りである。

40 mM Tris-HCl (pH 7.4)、34 mM MgCl₂、4 mM EDTA、2 mM DTT、0.05 mg/ml BSA。

6-12 Western blotting

細胞標本より得られたタンパク質サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲルで泳動し分離し、セミドライ式転写装置 (AE6677、ATTO) を用いて PVDF 膜 (BIO

RAD) もしくはニトロセルロース膜 (GE Healthcare) に転写した。メンブレンを 3%スキムミルク含有 TBS-T で 30 分間処置、もしくは 0.5%スキムミルク含有 TBS-T で 60 分間処置することでブロッキングし、一次抗体を 4°C で振とうしながら一晩反応させた。洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、ECL もしくは ECL Pro (GE Healthcare) で発光させて、ルミノ・イメージアナライザー (LAS3000 mini、FUJIFILM) を用いて観察した。

TBS-T の組成は次の通りである。

TBS-T : 25 mM 2-Amino-2-hydroxymethyl -1, 3-propanediol (Tris)-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05% Tween 20。

6-13 Phos-tag を用いたタンパク質リン酸化の検出

10 μ l の 10 mM Phos-tag BLT (Wako)、20 μ l の 10 mM $Zn(NO_3)_2(H_2O)_6$ 、1 μ L の Streptavidin HRP (GE Healthcare) と 469 μ l の Phos-tag 用 TBS-T を混合することで Phos-tag BLT と Streptavidin HRP を結合させた。Amicon Ultra-0.5 Ultra cel 30 (Millipore) に加えて、14,000 g で 10 分間遠心することで、Streptavidin HRP と結合しなかった Phos-tag BLT を除去した。濃縮液 (>10 μ l) を 30 ml の Phos-tag 用 TBS-T と混合し Phos-tag biotin-HRP 溶液として使用した。各種 Beclin 1 を安定的に発現させた MCF7 からタンパク質サンプルを抽出し、SDS ポリアクリルアミドゲルで泳動し分離した後に PVDF 膜に転写した。メンブレンを Phos-tag 用 TBS-T で 1 時間洗浄し、Phos-tag biotin-HRP を 30 分間反応させた。その後、Phos-tag 用 TBS-T で洗浄し、ECL pro で発光させてルミノ・イメージアナライザーを用いて観察した。Phos-tag 用 TBS-T の組成は次の通りである。

Phos-tag 用 TBS-T : 0.1 mM 2-Amino-2-hydroxymethyl -1, 3-propanediol (Tris)-HCl

(pH 7.4)、1 mM NaCl、0.1% Tween 20。

6-14 Anti-pSer90 Beclin 1 抗体の作製

Anti-pSer90 Beclin 1抗体の作製はスクラム社に依頼して行った。Beclin 1 Ser90 リン酸化ペプチド (C_ARMM(pS)TESAN) をウサギに免疫し、回収した血清から、リン酸化ペプチドを結合させたSulfoLink coupling樹脂を用いて特異的抗体を精製した。さらに、非リン酸化ペプチドを結合させたSulfoLink coupling樹脂を用いて非特異的な抗体を除去した。

6-15 Real-time RT-PCR 法による mRNA 発現解析

6-15-1 mRNA の抽出および逆転写

培地を除去した後に細胞を HBS で洗浄し、TRIzol reagent (Invitrogen) を 250 μ l 加えて 3 分間静置した。数回ピペッティングをした後、得られた細胞懸濁液を 1.5 ml チューブに移し、クロロホルムを 50 μ l 加え、十分に混和した後に室温で 3 分間静置した。さらに 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、上清にイソプロパノールを 200 μ l 加えて十分に混和した。-20°C で 10 分間静置し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した後、上清を捨て 500 μ l の 80%エタノールを加え混和した。15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心して上清を除去し、適度に乾燥させた後に、RNase free 超純水 11.5 μ l でペレットを溶解した。Total RNA 量を Nano Drop (ND-1000、nano Drop Technologies) を用いて定量した。Total RNA の逆転写は QuatiTect Reverse Transcription kit を用いて行った。Total RNA 0.5 μ l に対し、gDNA Wipeout Buffer を 1 μ l 加え、反応液が 7 μ l になるように RNase free 超純水を加えた。ドライバスで 42°C、2 分間処置した後に、Primer Mix 0.5 μ l、RT buffer 2 μ l、reverse

Transcriptase 0.5 μ l を加え総量を 10 μ l とし、2720 Thermal cycler (Applied Biosystems) を用いて 42°C で 15 分、95°C で 3 分反応させ、cDNA を作製した。得られた cDNA は -20°C で保存した。

6-15-2 Real-time PCR 法

得られた cDNA を含む反応液 0.2 μ l に SYBR Green Master Mix 5 μ l、PCR Forward Primer (2.5 μ M) 1.2 μ l、PCR Reverse Primer (2.5 μ M) 1.2 μ l、dH₂O 2.4 μ l を加えて計 5 μ l とし、CFX96 Touch リアルタイム解析システム (BIO-RAD) を用いて Real-time PCR を行った。反応条件は 95°C で 15 分間 DNA を変性させた後、94°C で 15 秒、60°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 45 回繰り返し増幅した。使用した Primer 配列は以下に示した。各種 mRNA 発現量は β -Actin を loading control として相対的に評価した。

PP6

Forward: CGCCAGTAACAGTGTGTGGTGA

Reverse: GGCCACTTAGCCTTTAGTGCAAGA

β -Actin

Forward: GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC

Reverse: GACTCATCGTACTCCTGCTTGC.

6-16 Reactive Oxygen Species (ROS) 産生の測定

1×10^4 個の HeLa 細胞を 24 穴プレートに撒き、2 日後 ROS 捕捉剤である MnTBAP (Adiopogen) と EUK134 (Cayman) で 30 分間前処置した。その後、100 nM の OA で 6 時間処置した。ROS 産生量は、total ROS detection kit for

microscopy and flow cytometry (Enzo Life Sciences) を用いて測定した。

6-17 統計処理

実験成績は、平均 \pm 標準誤差で示した。また有意差検定は Student t-test もしくは one-way ANOVA を用いた後に Student-Newman-Keuls を行い、危険率 (P) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

6-18 使用抗体

使用した抗体は表 2 にまとめた。

表 2 使用抗体

抗原	メーカー	商品番号
Actin	Santa cruz	Sc-1615
Atg7	Cell Signaling Technology	8558
Beclin 1	MBL	PD017
Phospho-Thr119 Beclin 1	ABGent	RB34163
caspase3 Asp175	Cell Signaling Technology	9664
DAPK1	Sigma	D1319
DAPK3	Gene Tex	GTX102404
FLAG	Sigma	F7425
HA	Aves	ET-HA 100
Phospho-Ser82 HSP27	Cell Signaling Technology	9709
LC3	MBL	PM036
MK2	Cell Signaling Technology	3042
p62	MBL	PM-045
Phospho-Ser389 p70S6K	Cell Signaling Technology	9234
PP2A A	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6112
PP2A B55 α	Abcam	Ab185712
PP2Ac	Milipore Santa Cruz Biotechnology	07-324 Sc-14020
PP4	Bethyl	A300-835A
PP6	Dr.Brautigan より提供	
Phospho-Ser792 raptor	Cell Signaling Technology	2083
SET	abcam	Ab1183
S-tag	Novus	NB600-511
Tubulin alpha	Thermo Scientific	RB-9281-P0
VCP/p97	Gene Tex	GTX113030
Vps34	Cell Signaling Technology	4263

引用文献

1. Schönthal, A. H. (2001) Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett* **170**, 1-13
2. von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeijer, A., and Grosveld, G. (1992) Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* **12**, 3346-3355
3. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648
4. Brautigan, D. L. (2013) Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J* **280**, 324-345
5. Zhang, Q., and Claret, F. X. (2012) Phosphatases: the new brakes for cancer development? *Enzyme Res* **2012**, 659649
6. Janssens, V., and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**, 417-439
7. Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C. X. (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* **22**, 1942-1950
8. Janssens, V., Goris, J., and Van Hoof, C. (2005) PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 34-41
9. Westermarck, J., and Hahn, W. C. (2008) Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med* **14**, 152-160
10. Eichhorn, P. J., Creighton, M. P., and Bernards, R. (2009) Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1795**, 1-15
11. Hsiung, S. C., Tin, A., Tamir, H., Franke, T. F., and Liu, K. P. (2008) Inhibition of 5-HT1A receptor-dependent cell survival by cAMP/protein kinase A: role of protein phosphatase 2A and Bax. *J Neurosci Res* **86**, 2326-2338
12. Chen, W., Possemato, R., Campbell, K. T., Plattner, C. A., Pallas, D. C., and Hahn, W. C. (2004) Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell* **5**, 127-136
13. Arnold, H. K., and Sears, R. C. (2008) A tumor suppressor role for PP2A-B56alpha through negative regulation of c-Myc and other key oncoproteins. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 147-158
14. Chen, W., Wang, Z., Jiang, C., and Ding, Y. (2013) PP2A-Mediated Anticancer Therapy. *Gastroenterol Res Pract* **2013**, 675429
15. Farrell, A. S., Allen-Petersen, B., Daniel, C. J., Wang, X., Wang, Z., Rodriguez, S., Impey, S., Oddo, J., Vitek, M. P., Lopez, C., Christensen, D. J., Sheppard, B., and Sears, R. C. (2014)

- Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Mol Cancer Res* **12**, 924-939
16. Baldacchino, S., Saliba, C., Petroni, V., Fenech, A. G., Borg, N., and Grech, G. (2014) Deregulation of the phosphatase, PP2A is a common event in breast cancer, predicting sensitivity to FTY720. *EPMA J* **5**, 3
 17. Arnaud, L., Chen, S., Liu, F., Li, B., Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2011) Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal hyperphosphorylation of tau by I2(PP2A)/SET. *FEBS Lett* **585**, 2653-2659
 18. Zhang, S., Han, J., Sells, M. A., Chernoff, J., Knaus, U. G., Ulevitch, R. J., and Bokoch, G. M. (1995) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* **270**, 23934-23936
 19. Christensen, D. J., Chen, Y., Oddo, J., Matta, K. M., Neil, J., Davis, E. D., Volkheimer, A. D., Lanasa, M. C., Friedman, D. R., Goodman, B. K., Gockerman, J. P., Diehl, L. F., de Castro, C. M., Moore, J. O., Vitek, M. P., and Weinberg, J. B. (2011) SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood* **118**, 4150-4158
 20. Stefansson, B., and Brautigan, D. L. (2006) Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets IkappaBepsilon. *J Biol Chem* **281**, 22624-22634
 21. Honkanen, R. E., and Golden, T. (2002) Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr Med Chem* **9**, 2055-2075
 22. Workman, J. J., Chen, H., and Larabee, R. N. (2016) *Saccharomyces cerevisiae* TORC1 Controls Histone Acetylation by Signaling Through the Sit4/PP6 Phosphatase to Regulate Sirtuin Deacetylase Nuclear Accumulation. *Genetics* **203**, 1733-1746
 23. Barbosa, A. D., Pereira, C., Osório, H., Moradas-Ferreira, P., and Costa, V. (2016) The ceramide-activated protein phosphatase Sit4p controls lifespan, mitochondrial function and cell cycle progression by regulating hexokinase 2 phosphorylation. *Cell Cycle* **15**, 1620-1630
 24. Zeng, K., Bastos, R. N., Barr, F. A., and Gruneberg, U. (2010) Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J Cell Biol* **191**, 1315-1332
 25. Hosing, A. S., Valerie, N. C., Dziegielewska, J., Brautigan, D. L., and Larner, J. M. (2012) PP6 regulatory subunit R1 is bidentate anchor for targeting protein phosphatase-6 to DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **287**, 9230-9239
 26. Kajino, T., Ren, H., Iemura, S., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D. L., Matsumoto, K., and Ninomiya-Tsuji, J. (2006) Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem* **281**, 39891-39896
 27. Castellanos-Rubio, A., Martin-Pagola, A., Santín, I., Hualde, I., Aransay, A. M., Castaño, L.,

- Vitoria, J. C., and Bilbao, J. R. (2008) Combined functional and positional gene information for the identification of susceptibility variants in celiac disease. *Gastroenterology* **134**, 738-746
28. Ohama, T., Wang, L., Griner, E. M., and Brautigan, D. L. (2013) Protein Ser/Thr phosphatase-6 is required for maintenance of E-cadherin at adherens junctions. *BMC Cell Biol* **14**, 42
29. Hammond, D., Zeng, K., Espert, A., Bastos, R. N., Baron, R. D., Gruneberg, U., and Barr, F. A. (2013) Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. *J Cell Sci* **126**, 3429-3440
30. Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., Winckler, W., Ardlie, K., Wagle, N., Wargo, J., Chong, K., Morton, D. L., Stemke-Hale, K., Chen, G., Noble, M., Meyerson, M., Ladbury, J. E., Davies, M. A., Gershenwald, J. E., Wagner, S. N., Hoon, D. S., Schadendorf, D., Lander, E. S., Gabriel, S. B., Getz, G., Garraway, L. A., and Chin, L. (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251-263
31. Shen, Y., Wang, Y., Sheng, K., Fei, X., Guo, Q., Larner, J., Kong, X., Qiu, Y., and Mi, J. (2011) Serine/threonine protein phosphatase 6 modulates the radiation sensitivity of glioblastoma. *Cell Death Dis* **2**, e241
32. Hayashi, K., Momoi, Y., Tanuma, N., Kishimoto, A., Ogoh, H., Kato, H., Suzuki, M., Sakamoto, Y., Inoue, Y., Nomura, M., Kiyonari, H., Sakayori, M., Fukamachi, K., Kakugawa, Y., Yamashita, Y., Ito, S., Sato, I., Suzuki, A., Nishio, M., Suganuma, M., Watanabe, T., and Shima, H. (2015) Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin carcinogenesis induced by DMBA. *Oncogene* **34**, 4647-4655
33. Kato, H., Kurosawa, K., Inoue, Y., Tanuma, N., Momoi, Y., Hayashi, K., Ogoh, H., Nomura, M., Sakayori, M., Kakugawa, Y., Yamashita, Y., Miura, K., Maemondo, M., Katakura, R., Ito, S., Sato, M., Sato, I., Chiba, N., Watanabe, T., and Shima, H. (2015) Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes increases susceptibility to ultraviolet-B-induced carcinogenesis. *Cancer Lett* **365**, 223-228
34. Ivanov, S. V., Goparaju, C. M., Lopez, P., Zavadil, J., Toren-Haritan, G., Rosenwald, S., Hoshen, M., Chajut, A., Cohen, D., and Pass, H. I. (2010) Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem* **285**, 22809-22817
35. Network, C. G. A. R. (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **513**, 202-209
36. Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., and Goldberg, A. L. (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell* **14**, 95-104
37. Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**, 2861-2873

38. Tooze, S. A., and Yoshimori, T. (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* **12**, 831-835
39. Johansen, T., and Lamark, T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279-296
40. Komander, D., and Rape, M. (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203-229
41. Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I., and Dikic, I. (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* **34**, 259-269
42. Wooten, M. W., Geetha, T., Babu, J. R., Seibenhener, M. L., Peng, J., Cox, N., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2008) Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* **283**, 6783-6789
43. Wang, D. W., Peng, Z. J., Ren, G. F., and Wang, G. X. (2015) The different roles of selective autophagic protein degradation in mammalian cells. *Oncotarget* **6**, 37098-37116
44. Mochida, K., Oikawa, Y., Kimura, Y., Kirisako, H., Hirano, H., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2015) Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* **522**, 359-362
45. Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741
46. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., and Mizushima, N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889
47. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884
48. Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D., and Emr, S. D. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* **260**, 88-91
49. Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., and Tang, D. (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* **18**, 571-580
50. Furuya, T., Kim, M., Lipinski, M., Li, J., Kim, D., Lu, T., Shen, Y., Rameh, L., Yankner, B., Tsai, L. H., and Yuan, J. (2010) Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Mol Cell* **38**, 500-511
51. Futreal, P. A., Söderkvist, P., Marks, J. R., Iglehart, J. D., Cochran, C., Barrett, J. C., and Wiseman, R. W. (1992) Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms. *Cancer Res* **52**, 2624-2627
52. Aita, V. M., Liang, X. H., Murty, V. V., Pincus, D. L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S.,

- Gilliam, T. C., and Levine, B. (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59**, 59-65
53. Gao, X., Zacharek, A., Salkowski, A., Grignon, D. J., Sakr, W., Porter, A. T., and Honn, K. V. (1995) Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res* **55**, 1002-1005
54. Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., and Levine, B. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809-1820
55. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., and Heintz, N. (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15077-15082
56. Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N. T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010) Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol* **190**, 511-521
57. Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* **11**, 468-476
58. Liang, C., Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., and Jung, J. U. (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* **10**, 776-787
59. Abrahamsen, H., Stenmark, H., and Platta, H. W. (2012) Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: Tuning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression. *FEBS Lett* **586**, 1584-1591
60. Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939
61. Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* **26**, 2527-2539
62. Oberstein, A., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2007) Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem* **282**, 13123-13132
63. Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachi, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009) DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy.

- EMBO Rep* **10**, 285-292
64. Zalckvar, E., Berissi, H., Eisenstein, M., and Kimchi, A. (2009) Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* **5**, 720-722
 65. Wang, R. C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., White, M., Reichelt, J., and Levine, B. (2012) Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* **338**, 956-959
 66. Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Sumpter, R., Su, M., Zang, X., Sinha, S., Gaestel, M., and Levine, B. (2015) The stress-responsive kinases MAPKAPK2/MAPKAPK3 activate starvation-induced autophagy through Beclin 1 phosphorylation. *Elife* **4**
 67. Fogel, A. I., Dlouhy, B. J., Wang, C., Ryu, S. W., Neutzner, A., Hasson, S. A., Sideris, D. P., Abeliovich, H., and Youle, R. J. (2013) Role of membrane association and Atg14-dependent phosphorylation in beclin-1-mediated autophagy. *Mol Cell Biol* **33**, 3675-3688
 68. Kim, J., Kim, Y. C., Fang, C., Russell, R. C., Kim, J. H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K. L. (2013) Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* **152**, 290-303
 69. Maejima, Y., Kyoji, S., Zhai, P., Liu, T., Li, H., Ivessa, A., Sciarretta, S., Del Re, D. P., Zablocki, D. K., Hsu, C. P., Lim, D. S., Isobe, M., and Sadoshima, J. (2013) Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *Nat Med* **19**, 1478-1488
 70. Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., and Guan, K. L. (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* **15**, 741-750
 71. Gurkar, A. U., Chu, K., Raj, L., Bouley, R., Lee, S. H., Kim, Y. B., Dunn, S. E., Mandinova, A., and Lee, S. W. (2013) Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nat Commun* **4**, 2189
 72. O'Connor, C. M., and Wilson-Robles, H. (2014) Developing T cell cancer immunotherapy in the dog with lymphoma. *ILAR J* **55**, 169-181
 73. Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G., and Gugliucci, B. (2001) Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J Vet Intern Med* **15**, 190-195
 74. Garrett, L. D., Thamm, D. H., Chun, R., Dudley, R., and Vail, D. M. (2002) Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *J Vet Intern Med* **16**, 704-709
 75. Marconato, L. (2011) The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: a review of recent developments and future prospects. *Vet J* **188**, 34-38
 76. Christensen, D. J., Ohkubo, N., Oddo, J., Van Kanegan, M. J., Neil, J., Li, F., Colton, C. A., and

- Vitek, M. P. (2011) Apolipoprotein E and peptide mimetics modulate inflammation by binding the SET protein and activating protein phosphatase 2A. *J Immunol* **186**, 2535-2542
77. Janghorban, M., Farrell, A. S., Allen-Petersen, B. L., Pelz, C., Daniel, C. J., Oddo, J., Langer, E. M., Christensen, D. J., and Sears, R. C. (2014) Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 9157-9162
78. Hu, X., Garcia, C., Fazli, L., Gleave, M., Vitek, M. P., Jansen, M., Christensen, D., and Mulholland, D. J. (2015) Inhibition of Pten deficient Castration Resistant Prostate Cancer by Targeting of the SET - PP2A Signaling axis. *Sci Rep* **5**, 15182
79. Marconato, L., Gelain, M. E., and Comazzi, S. (2012) The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol*
80. Keller, E. T., MacEwen, E. G., Rosenthal, R. C., Helfand, S. C., and Fox, L. E. (1993) Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *J Vet Intern Med* **7**, 289-295
81. Hino, H., Takaki, K., and Mochida, S. (2015) Inhibitor-1 and -2 of PP2A have preference between PP2A complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **467**, 297-302
82. Switzer, C. H., Cheng, R. Y., Vitek, T. M., Christensen, D. J., Wink, D. A., and Vitek, M. P. (2011) Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene* **30**, 2504-2513
83. Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y. W., Zeckner, D. J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M. H., Blanchard, K. L., and Thomas, J. E. (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439-444
84. Kuo, Y. C., Huang, K. Y., Yang, C. H., Yang, Y. S., Lee, W. Y., and Chiang, C. W. (2008) Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem* **283**, 1882-1892
85. Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274
86. Willems, L., Tamburini, J., Chapuis, N., Lacombe, C., Mayeux, P., and Bouscary, D. (2012) PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep* **14**, 129-138
87. Andrabi, S., Gjoerup, O. V., Kean, J. A., Roberts, T. M., and Schaffhausen, B. (2007) Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19011-19016
88. Chrzan, P., Skokowski, J., Karmolinski, A., and Pawelczyk, T. (2001) Amplification of c-myc

- gene and overexpression of c-Myc protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. *Clin Biochem* **34**, 557-562
89. Wolfer, A., Wittner, B. S., Irimia, D., Flavin, R. J., Lupien, M., Gunawardane, R. N., Meyer, C. A., Lightcap, E. S., Tamayo, P., Mesirov, J. P., Liu, X. S., Shioda, T., Toner, M., Loda, M., Brown, M., Brugge, J. S., and Ramaswamy, S. (2010) MYC regulation of a "poor-prognosis" metastatic cancer cell state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3698-3703
 90. Arnold, H. K., and Sears, R. C. (2006) Protein phosphatase 2A regulatory subunit B56alpha associates with c-myc and negatively regulates c-myc accumulation. *Mol Cell Biol* **26**, 2832-2844
 91. Arnold, H. K., and Sears, R. C. (2008) A tumor suppressor role for PP2A-B56alpha through negative regulation of c-Myc and other key oncoproteins. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 147-158
 92. Zhang, W., Cai, J., Chen, S., Zheng, X., Hu, S., Dong, W., Lu, J., Xing, J., and Dong, Y. (2015) Paclitaxel resistance in MCF-7/PTX cells is reversed by paeonol through suppression of the SET/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Med Rep* **12**, 1506-1514
 93. Hung, M. H., Wang, C. Y., Chen, Y. L., Chu, P. Y., Hsiao, Y. J., Tai, W. T., Chao, T. T., Yu, H. C., Shiau, C. W., and Chen, K. F. (2016) SET antagonist enhances the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells by reactivating protein phosphatase 2A. *Oncotarget* **7**, 638-655
 94. Liu, H., Gu, Y., Wang, H., Yin, J., Zheng, G., Zhang, Z., Lu, M., Wang, C., and He, Z. (2015) Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **6**, 14913-14925
 95. Liu, H., Gu, Y., Yin, J., Zheng, G., Wang, C., Zhang, Z., Deng, M., Liu, J., Jia, X., and He, Z. (2014) SET-mediated NDRG1 inhibition is involved in acquisition of epithelial-to-mesenchymal transition phenotype and cisplatin resistance in human lung cancer cell. *Cell Signal* **26**, 2710-2720
 96. Cristóbal, I., Rincón, R., Manso, R., Caramés, C., Zazo, S., Madoz-Gúrpide, J., Rojo, F., and García-Foncillas, J. (2015) Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **21**, 347-356
 97. Samanta, A. K., Chakraborty, S. N., Wang, Y., Kantarjian, H., Sun, X., Hood, J., Perrotti, D., and Arlinghaus, R. B. (2009) Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET-PP2A-SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Oncogene* **28**, 1669-1681
 98. Yang, Y., Huang, Q., Lu, Y., Li, X., and Huang, S. (2012) Reactivating PP2A by FTY720 as a novel therapy for AML with C-KIT tyrosine kinase domain mutation. *J Cell Biochem* **113**, 1314-1322
 99. Cristóbal, I., García-Orti, L., Cirauqui, C., Cortes-Lavaud, X., García-Sánchez, M. A., Calasanz,

- M. J., and Odero, M. D. (2012) Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **97**, 543-550
100. Pippa, R., Dominguez, A., Malumbres, R., Endo, A., Arriazu, E., Marcotegui, N., Guruceaga, E., and Odero, M. D. (2016) MYC-dependent recruitment of RUNX1 and GATA2 on the SET oncogene promoter enhances PP2A inactivation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*
101. Xu, S., Duan, P., Li, J., Senkowski, T., Guo, F., Chen, H., Romero, A., Cui, Y., Liu, J., and Jiang, S. W. (2016) Zinc Finger and X-Linked Factor (ZFX) Binds to Human SET Transcript 2 Promoter and Transactivates SET Expression. *Int J Mol Sci* **17**
102. Chao, A., Tsai, C. L., Wei, P. C., Hsueh, S., Chao, A. S., Wang, C. J., Tsai, C. N., Lee, Y. S., Wang, T. H., and Lai, C. H. (2010) Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett* **291**, 99-107
103. Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326
104. Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 50-83
105. Stokoe, D., Campbell, D. G., Nakielnny, S., Hidaka, H., Leever, S. J., Marshall, C., and Cohen, P. (1992) MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J* **11**, 3985-3994
106. Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., and Stork, B. (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* **32**, 2-11
107. Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2006) DAPk protein family and cancer. *Autophagy* **2**, 74-79
108. Shani, G., Marash, L., Gozuacik, D., Bialik, S., Teitelbaum, L., Shohat, G., and Kimchi, A. (2004) Death-associated protein kinase phosphorylates ZIP kinase, forming a unique kinase hierarchy to activate its cell death functions. *Mol Cell Biol* **24**, 8611-8626
109. Graves, P. R., Winkfield, K. M., and Haystead, T. A. (2005) Regulation of zipper-interacting protein kinase activity in vitro and in vivo by multisite phosphorylation. *J Biol Chem* **280**, 9363-9374
110. Schmitz, M. H., Held, M., Janssens, V., Hutchins, J. R., Hudecz, O., Ivanova, E., Goris, J., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A. I., Poser, I., Hyman, A. A., Mechtler, K., Peters, J. M., and Gerlich, D. W. (2010) Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat Cell Biol* **12**, 886-893
111. Tang, H. W., Wang, Y. B., Wang, S. L., Wu, M. H., Lin, S. Y., and Chen, G. C. (2011) Atg1-mediated myosin II activation regulates autophagosome formation during starvation-induced autophagy. *EMBO J* **30**, 636-651

112. Ben-Levy, R., Leighton, I. A., Doza, Y. N., Attwood, P., Morrice, N., Marshall, C. J., and Cohen, P. (1995) Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2. *EMBO J* **14**, 5920-5930
113. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**, 1101-1111
114. Naito, T., Kuma, A., and Mizushima, N. (2013) Differential contribution of insulin and amino acids to the mTORC1-autophagy pathway in the liver and muscle. *J Biol Chem* **288**, 21074-21081
115. Yabe, R., Miura, A., Usui, T., Mudrak, I., Ogris, E., Ohama, T., and Sato, K. (2015) Protein Phosphatase Methyl-Esterase PME-1 Protects Protein Phosphatase 2A from Ubiquitin/Proteasome Degradation. *PLoS One* **10**, e0145226
116. Tang, B., Cai, J., Sun, L., Li, Y., Qu, J., Snider, B. J., and Wu, S. (2014) Proteasome inhibitors activate autophagy involving inhibition of PI3K-Akt-mTOR pathway as an anti-oxidation defense in human RPE cells. *PLoS One* **9**, e103364
117. Bao, W., Gu, Y., Ta, L., Wang, K., and Xu, Z. (2016) Induction of autophagy by the MG-132 proteasome inhibitor is associated with endoplasmic reticulum stress in MCF-7 cells. *Mol Med Rep* **13**, 796-804
118. Hatakeyama, M. (2004) Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. *Nat Rev Cancer* **4**, 688-694
119. Yong, X., Tang, B., Xiao, Y. F., Xie, R., Qin, Y., Luo, G., Hu, C. J., Dong, H., and Yang, S. M. (2016) Helicobacter pylori upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer. *Cancer Lett* **374**, 292-303
120. Tsugawa, H., Suzuki, H., Saya, H., Hatakeyama, M., Hirayama, T., Hirata, K., Nagano, O., Matsuzaki, J., and Hibi, T. (2012) Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of Helicobacter pylori CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host Microbe* **12**, 764-777
121. Petherick, K. J., Williams, A. C., Lane, J. D., Ordóñez-Morán, P., Huelsken, J., Collard, T. J., Smartt, H. J., Batson, J., Malik, K., Paraskeva, C., and Greenhough, A. (2013) Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *EMBO J* **32**, 1903-1916
122. Oshima, H., Matsunaga, A., Fujimura, T., Tsukamoto, T., Taketo, M. M., and Oshima, M. (2006) Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E2 pathway. *Gastroenterology* **131**, 1086-1095
123. Gold, H. L., Wengrod, J., de Miera, E. V., Wang, D., Fleming, N., Sikkema, L., Kirchhoff, T., Hochman, T., Goldberg, J. D., Osman, I., and Gardner, L. B. (2014) PP6C hotspot mutations in melanoma display sensitivity to Aurora kinase inhibition. *Mol Cancer Res* **12**, 433-439

124. Beltran, H., Prandi, D., Mosquera, J. M., Benelli, M., Puca, L., Cyrta, J., Marotz, C., Giannopoulou, E., Chakravarthi, B. V., Varambally, S., Tomlins, S. A., Nanus, D. M., Tagawa, S. T., Van Allen, E. M., Elemento, O., Sboner, A., Garraway, L. A., Rubin, M. A., and Demichelis, F. (2016) Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med* **22**, 298-305
125. Eisenberg-Lerner, A., and Kimchi, A. (2012) PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell Death Differ* **19**, 788-797
126. Kajihara, R., Sakamoto, H., Tanabe, K., Takemoto, K., Tasaki, M., Ando, Y., and Inui, S. (2014) Protein phosphatase 6 controls BCR-induced apoptosis of WEHI-231 cells by regulating ubiquitination of Bcl-xL. *J Immunol* **192**, 5720-5729
127. Stefansson, B., Ohama, T., Daugherty, A. E., and Brautigan, D. L. (2008) Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. *Biochemistry* **47**, 1442-1451
128. Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Vanden Berghe, T., Lippens, S., and Vandenabeele, P. (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* **1**, e18
129. Wengrod, J., Wang, D., Weiss, S., Zhong, H., Osman, I., and Gardner, L. B. (2015) Phosphorylation of eIF2 α triggered by mTORC1 inhibition and PP6C activation is required for autophagy and is aberrant in PP6C-mutated melanoma. *Sci Signal* **8**, ra27
130. Deng, W., Gopal, Y. N., Scott, A., Chen, G., Woodman, S. E., and Davies, M. A. (2012) Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 248-258
131. Meier, F., Schitteck, B., Busch, S., Garbe, C., Smalley, K., Satyamoorthy, K., Li, G., and Herlyn, M. (2005) The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* **10**, 2986-3001
132. Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B. H., Evans, P., Bacchicocchi, A., McCusker, J. P., Cheng, E., Davis, M. J., Goh, G., Choi, M., Ariyan, S., Narayan, D., Dutton-Regester, K., Capatana, A., Holman, E. C., Bosenberg, M., Sznol, M., Kluger, H. M., Brash, D. E., Stern, D. F., Materin, M. A., Lo, R. S., Mane, S., Ma, S., Kidd, K. K., Hayward, N. K., Lifton, R. P., Schlessinger, J., Boggon, T. J., and Halaban, R. (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* **44**, 1006-1014
133. Ogoh, H., Tanuma, N., Matsui, Y., Hayakawa, N., Inagaki, A., Sumiyoshi, M., Momoi, Y., Kishimoto, A., Suzuki, M., Sasaki, N., Ohuchi, T., Nomura, M., Teruya, Y., Yasuda, K., Watanabe, T., and Shima, H. (2016) The protein phosphatase 6 catalytic subunit (Ppp6c) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis. *Mech Dev* **139**, 1-9

134. Deretic, V., Master, S., and Singh, S. (2008) Autophagy gives a nod and a wink to the inflammasome and Paneth cells in Crohn's disease. *Dev Cell* **15**, 641-642
135. Yano, T., and Kurata, S. (2009) An unexpected twist for autophagy in Crohn's disease. *Nat Immunol* **10**, 134-136
136. Khor, B., Gardet, A., and Xavier, R. J. (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 307-317
137. Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadate, M., Yamamoto, M., Lee, M. S., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2011) Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* **193**, 275-284
138. White, E. (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 401-410
139. Zhao, M., Xu, H., Zhang, B., Hong, B., Yan, W., and Zhang, J. (2015) Impact of nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and p62/sequestosome expression on prognosis of patients with gliomas. *Hum Pathol* **46**, 843-849
140. Choi, K. S. (2012) Autophagy and cancer. *Exp Mol Med* **44**, 109-120
141. Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell'antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N., and Kimmelman, A. C. (2011) Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* **25**, 717-729
142. Sheen, J. H., Zoncu, R., Kim, D., and Sabatini, D. M. (2011) Defective regulation of autophagy upon leucine deprivation reveals a targetable liability of human melanoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Cell* **19**, 613-628
143. Rosenfeldt, M. T., O'Prey, J., Morton, J. P., Nixon, C., MacKay, G., Mrowinska, A., Au, A., Rai, T. S., Zheng, L., Ridgway, R., Adams, P. D., Anderson, K. I., Gottlieb, E., Sansom, O. J., and Ryan, K. M. (2013) p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* **504**, 296-300

謝辞

稿を終えるに際し、ご指導並びにご助言を賜った山口大学共同獣医学部獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授、大浜剛准教授、臼井達哉助教、鳥取大学農学部共同獣医学科獣医薬理学研究室 太田利男教授、鹿児島大学共同獣医学部獣医薬理学研究室 宮本篤教授、ご協力を賜った山口大学共同獣医学部臨床病理学研究室 水野拓也教授、山口大学共同獣医学部獣医衛生学研究室 渋谷周作助教に心より厚く感謝の意を表します。また、公私ともに支えて下さった山口大学獣医薬理学研究室内の皆様に心より感謝申し上げます。本研究は、多くの動物の犠牲の上で成り立っています。その霊が慰められるよう、心よりお祈り申し上げます。

第2章では、東京大学農学生命科学研究科 辻本元教授には CL-1、UL-1 細胞を、山口大学共同獣医学部 中市統三教授には GL-1 細胞を、岩手大学農学部 岡村泰彦准教授には Nody-1 細胞を、North Carolina State University Dr. Steven Suter には 17-71 細胞を、Veterinary Medicine Vienna University Dr. Barbara Ruetgen には CLBL-1 細胞を、Ohio State University Dr. Wellman Maxey には CLGL-90 細胞を山口大学共同獣医学部臨床病理学研究室 水野拓也教授には Ema 細胞を提供して頂きました。第3章では、Virginia University Dr. David Brautigan に多くのご助言を頂きました。第4章では、大阪大学微生物病研究所自然免疫学分野 審良静男教授、徳島大学疾患酵素学研究センター・シグナル伝達と糖尿病研究部門 齋藤達哉教授には Beclin 1 欠損 MEF 細胞を、新潟大学医歯学総合研究科 小松雅明教授には Atg7 欠損 MEF 細胞を、金沢大学腫瘍遺伝学分野 大島正伸教授、大島浩子准教授には *GAN* マウスのサンプルを提供して頂きました。心より厚く感謝の意を表します。

最後に、私を温かく見守ってくれた母・藤原しのぶ、妹・藤原由佳、祖父・原田昌康、祖母・原田ちさ代、岡本佳菜子さんに心より感謝の意を表します。