

山口大学博士（獣医学）学位論文

タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A を標的とした新規抗がん戦略の基盤的研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

矢部 滝太郎

2018 年 3 月

指導教官 佐藤 晃一 教授

目次

第 1 章 背景および目的	1
1-1 Protein phosphatase 2A	2
1-2 PP2A の構造と機能.....	3
1-3 PP2A 複合体の制御機構.....	5
1-4 SET	6
1-5 PME-1.....	8
1-6 本研究の目的	10
第 2 章 イヌ SET アイソフォームの同定	11
2-1 各種イヌ細胞における SET タンパク質発現量の比較.....	12
2-2 イヌ SET アイソフォームの同定および塩基配列の比較.....	14
2-4 イヌ SET アイソフォームのタンパク質発現.....	18
2-5 イヌ SET タンパク質の細胞内局在の検討.....	20
2-6 イヌ SET アイソフォームの PP2Ac との結合能の比較.....	23
2-7 考察.....	25
2-7-1 イヌ SET アイソフォームの PP2Ac との結合能に関する考察.....	25
2-7-2 イヌ SET アイソフォームのタンパク質発現に関する考察.....	25
2-7-3 イヌ SET アイソフォームの細胞内局在に関する考察.....	26
2-7-4 イヌにおける SET を標的とした分子標的薬に関する考察.....	27
第 3 章 PME-1 は PP2Ac をユビキチン・プロテアソーム系分解から保護する	29
3-1 PME-1 欠損による PP2A 活性の変化	30

3-2	PME-1 欠損による PP2Ac メチル化レベルの変化.....	32
3-3	PME-1 欠損が type 2A protein phosphatase の発現量に与える影響	34
3-4	PME-1 欠損による PP2Ac mRNA 量の変化.....	36
3-5	PME-1 欠損が PP2Ac タンパク質の分解速度に与える影響.....	38
3-6	PME-1 欠損が $\alpha 4$ と PP2Ac の結合に与える影響.....	40
3-7	PME-1 欠損による PP2Ac タンパク質の分解促進におけるユビキチン・ プロテアソーム系分解の関与.....	42
3-8	PME-1 による PP2Ac 保護機構における PME-1 脱メチル化活性の必要 性に関する検討.....	45
3-9	PME-1 欠損が細胞増殖能に与える影響.....	47
3-10	PME-1 欠損が PP2A 複合体の構成に与える影響	50
3-11	各種細胞株における PME-1 発現抑制が PP2Ac 発現量に与える影響	52
3-12	考察	54
3-12-1	細胞内の PP2Ac タンパク質発現量維持機構に関する考察	56
3-12-2	PP2A 活性に関する考察.....	57
3-12-3	PME-1 と PP2Ac の相互作用に関する考察.....	58
3-12-4	PP2Ac が分解から保護されるメカニズムに関する考察	59
3-12-5	PME-1 欠損が与える影響の細胞種特異性に関する考察.....	61
3-12-6	PP2Ac と PP2A A のタンパク質発現量の相関に関する考察.....	62
第 4 章 PME-1 による PP2Ac 制御機構に基づく PP2Ac メチル化レベル測定 法の確立.....		63
4-1	タンパク質抽出液中における PP2Ac 脱メチル化.....	64

4-2	タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する okadaic acid の効果	66
4-3	タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する ABL127 の効果	68
4-4	タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する PME-1 欠損の影響	70
4-5	ABL127 および okadaic acid が PP2Ac と PME-1 の結合に与える影響	72
4-6	変異型 PME-1 の PP2Ac への結合能の解析	74
4-7	PME-1 の PP2Ac 結合能が脱メチル化反応に与える影響	76
4-8	PME-1 の PP2Ac 結合能が細胞内における PP2Ac 脱メチル化反応に与える影響	78
4-9	タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化が PP2A 複合体の構成に与える影響	80
4-10	考察	83
4-10-1	Okadaic acid がタンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化を抑制できない原因に関する考察	83
4-10-2	PP2Ac メチル化レベルが PP2A 複合体に与える影響に関する考察	85
第5章	総合討論	87
5-1	獣医領域における SET 標的薬の臨床応用への課題	88
5-2	PME-1 発現を抑制した際に現れる表現型の細胞種差	89
5-3	PME-1 の機能調節機構	91
5-4	PME-1 阻害剤の抗がん効果	93

5-5	脱リン酸化酵素 PP2A を標的とした抗がん戦略の展望.....	94
第 6 章	実験材料および実験方法.....	96
6-1	動物の飼育	97
6-2	Genotyping による遺伝型の判定	97
6-3	細胞の単離および培養法	98
6-3-1	MEF 細胞の単離	98
6-3-2	MEF 細胞の不死化	98
6-3-3	細胞培養法	99
6-4	プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製.....	99
6-4-1	プラスミドの作製	99
6-4-2	プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ ..	100
6-4-3	プラスミドのトランスフェクション	101
6-4-4	レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入	101
6-5	リコンビナントタンパク質の精製	102
6-6	PP2A 活性の測定	103
6-6-1	細胞全体（タンパク質抽出液）の PP2A 活性測定法	103
6-6-2	免疫沈降法を用いた PP2A 活性測定法	103
6-7	Western blotting によるタンパク質発現量測定.....	104
6-7-1	タンパク質抽出	104
6-7-2	Western blotting	105
6-8	免疫沈降法および pull down assay.....	105
6-8-1	FLAG M2 beads を用いた免疫沈降法	105

6-8-2	PP2Ac 抗体を用いた免疫沈降法	106
6-8-3	His pull down assay	107
6-9	免疫染色法	107
6-10	Real-time PCR 法	108
6-11	細胞増殖能と細胞生存率の測定	109
6-12	統計処理	109
6-13	使用抗体リスト	110
引用文献		111
謝辞		128

第1章 背景および目的

1-1 Protein phosphatase 2A

タンパク質の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引き起こされ、その構造が変化す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%以上がセリンとスレオニン残基で起こり、約 400 種類のタンパク質リン酸化酵素 (protein kinase) によって制御されている (1,2)。一方、セリンとスレオニン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 (3)。その中でも PPP スーパーファミリーに分類される脱リン酸化酵素は、細胞内のセリン・スレオニンタンパク質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 protein phosphatase 2A (PP2A)、PP4、PP6 などが属する (4)。これらのうち、PP2A は細胞内タンパク質の約 1% を占めるとも言われ、PP1 と合わせて細胞内の脱リン酸化活性の約 90% を担う細胞内の主要な脱リン酸化酵素である (5)。また、PP2A は進化的に高く保存されており、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 (6)。

1-2 PP2A の構造と機能

PP2A は3つのサブユニットにより構成されている。酵素活性を持つCサブユニット (PP2Ac) および足場サブユニットとして機能するAサブユニット (PP2AA) がコア2量体を形成し、このコア2量体に調節サブユニットであるBサブユニットが結合することでABC三量体を形成している。Bサブユニットには、B (B55/PR55)、B' (B56/PR61)、B'' (PR72)、B''' (PR93/PR110) の4つの異なるファミリーからなる20種類以上のアイソフォームが存在し、結合するBサブユニットの種類によってPP2Aの基質特異性や細胞内局在が調節される (7) (図1-1)。

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いる (8)。特に細胞のがん化にはPP2A活性の抑制が必須であり (9)、ほとんどのがんでPP2Aの変異や発現低下、PP2A阻害タンパク質の発現上昇によるPP2A複合体の制御異常が観察される (10-19)。PP2Aは、Aktなどの発がん性シグナル因子の活性を制御することで無秩序な細胞増殖を抑制するとともに、抗アポトーシス因子を標的としてアポトーシスの誘導を制御するなど、重要ながん抑制因子として働いている (10,20,21)。

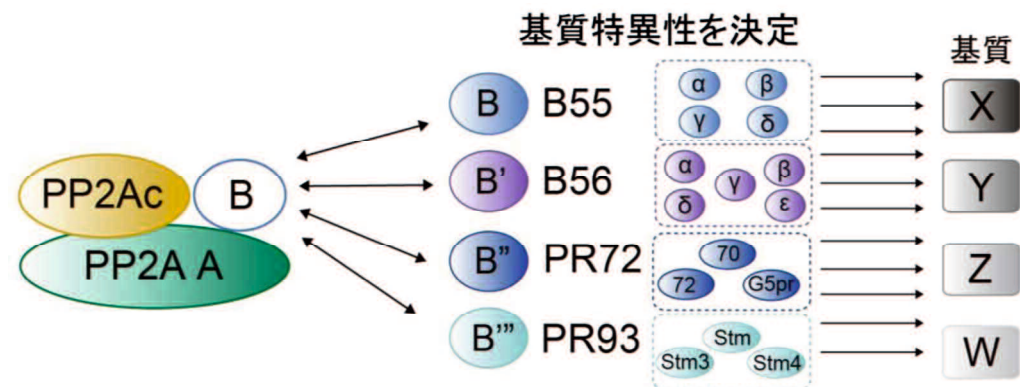


図 1-1 PP2A 複合体の構造と機能

PP2A は、酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac) と足場サブユニットとして機能する A サブユニット (PP2A A) によりコア 2 量体を形成している。B サブユニットには 4 つの異なるサブファミリーからなる 20 種類以上のアイソフォームが存在し、結合する B サブユニットの種類によって PP2A の基質特異性や細胞内局在が調節される。

1-3 PP2A 複合体の制御機構

PP2A の複合体形成や触媒活性の調節メカニズムは極めて複雑である。PP2A 複合体の活性は、主に構成因子の翻訳後修飾とタンパク質間結合により調節されている。PP2Ac サブユニットの翻訳後修飾のホットスポットは C 末端側の 6 つのアミノ酸残基 (304-TPDYFL-309) に存在する。この領域は、Leu309 のカルボキシル基のメチル化や、Thr304 と Tyr307 のリン酸化などを受けることが知られている (22–24)。特に PP2Ac Leu309 残基のメチル化は、leucine carboxyl methyltransferase-1 (LCMT-1) と protein phosphatase methylesterase-1 (PME-1) により可逆的に制御され、PP2A 複合体の構成に大きな影響を及ぼす (24–26)。また、alpha4 ($\alpha 4$ もしくは IGBP1)、type2A-interacting protein (TIP もしくは TIPRL1)、PP2A activator (PTPA) のような PP2A 調節タンパク質が、PP2A ホロ酵素の形成や活性調節に関与する (7)。それに加えて、PP2A 活性を抑制する SET、CIP2A、ENSA などの PP2A 阻害タンパク質が多数発見されている (27)。がんにおいて、これら PP2A 阻害タンパク質の発現上昇が多く報告されており、がん抑制因子である PP2A の活性を低下させることが、がんの発症や悪性化に寄与していると考えられる (27,28)。本研究ではこれら PP2A 制御因子の中で、PME-1 と SET に着目した。

1-4 SET

SET (別名 I2PP2A、TAF-1) は急性骨髄性白血病における染色体の転座によって生じた *SET-CAN* (*SET-NUP214*) 融合遺伝子の構成因子の 1 つとして発見された。ヒトでは、これまでに 2 種類のアイソフォーム SET α (I2 β PP2A、TAF-1 α) と SET β (I2 α PP2A、TAF-1 β) が機能解析されているが (29)、データベース上では 4 種類のアイソフォームが存在する。SET α と SET β はともに PP2A の阻害タンパク質としての機能を持つが (29)、SET β はクロマチンリモデリング活性も有することが報告されている (30)。ヒトでは、SET タンパク質発現量の上昇が、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、結腸癌、乳癌、肺癌など様々ながん種で認められており、細胞増殖シグナルである ERK1/2 や Akt のリン酸化レベルを促進することによりがんの悪性化に寄与している (31–37)。

SET による PP2A 活性阻害を解除することができれば、PP2A 活性が回復し抗がん効果を発揮すると考えられ、多くの検討が試みられている。Apolipoprotein E (ApoE) タンパク質は、コレステロール輸送と免疫調節機能を合わせ持つ多機能タンパク質であるが、SET に結合してその機能を阻害する働きが知られている (38–43)。この性質を利用し、ApoE の SET 結合部位をミミックしたペプチド COG112 および OP449 (COG449) が合成された。これらのペプチドは、SET に結合して PP2A の活性を回復させ (44–46)、OP449 による SET 阻害効果は慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、膵臓癌において抗がん効果を発揮することが報告されている (44,47)。また、免疫抑制剤である FTY720 は、通常リン酸化さ

れることで免疫抑制効果を示すが、非リン酸化 FTY720 は SET と結合して PP2A を活性化することが報告されており (48,49)、FTY720 の抗腫瘍効果は慢性骨髄性白血病、乳癌、肝細胞癌、グリオーマ、ミエローマで確認されている (33,49-51)。

1-5 PME-1

PP2Ac Leu309のメチル化はLCMT-1が、脱メチル化はPP2A特異的脱メチル化酵素PME-1が担っている (25)。PME-1は、44 kDa (386アミノ酸) の細胞内タンパク質であり、*PPME1*遺伝子にコードされる (25,52)。PME-1タンパク質は真核生物で保存されており、マウスでは脳と精巣組織でmRNA発現が高いことが報告されている (25)。PME-1の機能は大きく2つのカテゴリーに分けられ、1つはPP2Acの脱メチル化酵素 (メチルエステラーゼ) としての機能、そしてもう1つは、PP2Acサブユニットの触媒部位に結合するPP2A阻害タンパク質としての機能である (53)。PP2AのAC2量体へのB55 α の結合にはPP2Acのメチル化が必要であるため (52,54)、メチル化酵素としてのPME-1はB55ファミリーを含むPP2A複合体の形成に大きな影響を与える (55,56)。また、PP2A活性には活性部位の2価の金属イオンの存在が非常に重要であり、*in vitro*の系では2価の金属イオンの欠乏は脱リン酸化活性の低下につながることを報告されている (57)。PME-1はPP2Acと結合すると、PP2Acの活性部位において2価の金属イオンと競合することでPP2A阻害タンパク質として機能することが、PME-1の構造学的な解析から明らかになった (53)。しかし、PME-1による2つのPP2A調節機能が果たす役割については、実験的証拠が不十分であるため、いまだ明確に区別できていない。

PME-1発現の上昇は、ヒト悪性グリオーマや子宮内膜癌において予後との負の相関が報告されている (58,59)。中国における胃癌および肺癌患者のコホート研究では、小集団 (~3%) で *PPME1* 遺伝子の増幅が報告されている (60)。また、がんにおける *PPME1* 遺伝子の変化に関して、がんデータベース cBioPortal

を用いて *PPME1* 遺伝子数の変化と変異を解析した結果から (61)、神経内分泌前立腺癌 (NEPC) で高頻度の *PPME1* 遺伝子の増幅 (21%) が認められた。*PPME1* 遺伝子の増幅は、漿液性卵巣癌 (8.7%)、食道癌 (8.2%)、頭頸部扁平上皮細胞 (5%)、膀胱尿路上皮癌 (4.7%)、乳癌 (4.5%)、メラノーマ (4%)、肺癌 (3.5%) 等でも認められる。一方、変異が頻繁に観察される残基は存在せず、変異と機能の関連は明らかになっていない。また、グリオーマや子宮内膜癌などのがん細胞において PME-1 発現を抑制すると、細胞増殖や形質転換が抑制されることから (58,59,62)、PME-1 による PP2A 制御の異常は細胞のがん化やがんの悪性化に寄与すると考えられるが、その詳細な機構に関しては解明されていない。

1-6 本研究の目的

本研究では、ヒトと伴侶動物双方の臨床で重要な疾患であるがんの抗がん戦略の創出を目指して、PP2A 阻害タンパク質である SET と PME-1 を標的として着目し、これら分子による PP2A 制御機構を解明することで、PP2A 活性を回復させる抗がん戦略の基盤となることを目的とした。

SET に関して、ヒトとイヌ双方で SET を標的とした PP2A 活性化が抗がん作用を示すとの報告が蓄積されてきたが (63–65)、ヒトとイヌの比較生物学的検討は一切行われていない。そこで第 2 章では、イヌの SET アイソフォームの解析を行うことで、SET を阻害する PP2A 活性化戦略のヒトとイヌに対する有効性を考察した。

PME-1 に関して、がんの悪性度に寄与することは明らかになっているが、未だにその分子機構の解明は進んでいない。そこで第 3 章では、PME-1 欠損細胞を用いた解析を行い、PME-1 による PP2A タンパク質制御機構を解明した。さらに第 4 章において、PP2Ac と PME-1 の相互作用と脱メチル化活性の関係を明らかにし、PP2Ac メチル化レベルの新たな測定方法を確立した。

第2章 イヌ SET アイソフォームの同定

2-1 各種イヌ細胞における SET タンパク質発現量の比較

近年、ヒトのがんにおいて SET タンパク質発現量と予後が負の相関を示すことが明らかになり (31–33,66–69)、SET が抗がん剤の標的として注目されているが、獣医療分野での検討は少ない。また、ヒト SET には SET α と SET β の 2 つのアイソフォームが存在するが (29)、イヌ SET のアイソフォームに関する報告はない。そこで本研究では、イヌにおける SET アイソフォームの同定を行った。

はじめにイヌ細胞における SET タンパク質発現を比較するために、イヌのがん細胞株としてイヌメラノーマ細胞株 CMeC-1、CMeC-2、KMeC、LMeC、イヌリンパ腫細胞株 Ema、イヌ腎臓尿細管上皮細胞株 MDCK、イヌの正常細胞として末梢血単核細胞 PBMC からタンパク質を抽出し、western blotting により SET 発現量をエピトープの異なる 3 種類のヒト SET 抗体を用いて比較した (図 2-1)。イヌでは、3 つの抗体全てで検出できるバンドが 37 kDa 付近と 25 kDa 付近に検出された。さらに、SET 抗体 (ab97596) と SET 抗体 (bs-5943-R) では 50 kDa および 15 kDa 付近にも共通のバンドが検出された。また SET 抗体 (ab97596) では 30 kDa 付近にもバンドが検出された。これらの結果から、イヌには複数のアイソフォームが存在する可能性が示唆された。

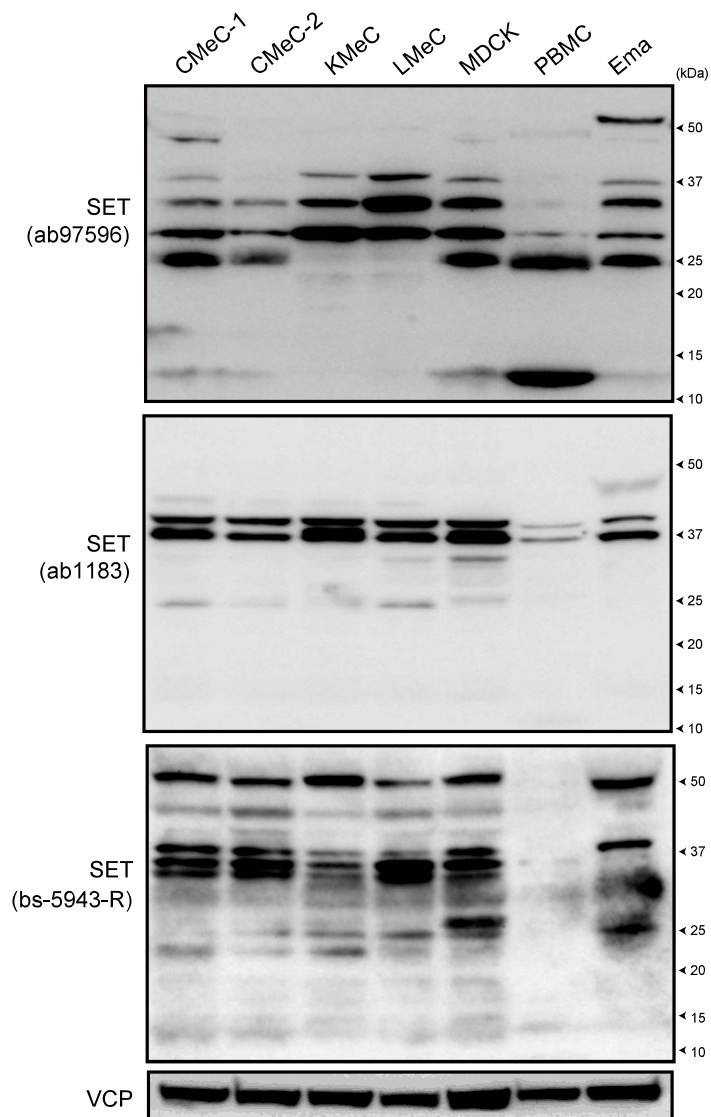


図 2-1 各種イヌ細胞における SET タンパク質発現量の比較

各種イヌ細胞における SET 発現を比較するために、イヌメラノーマ細胞株 CMeC-1、CMeC-2、KMeC、LMeC、イヌリンパ腫細胞株 Ema、イヌ腎臓尿細管上皮細胞株 MDCK、イヌ正常細胞として末梢血単核細胞 PBMC の SET タンパク質量を western blotting により比較した。N=2。

2-2 イヌ SET アイソフォームの同定および塩基配列の比較

イヌの SET アイソフォームの塩基配列を決定するため、ビーグル犬の胸腺から RNA を抽出し、データベースのイヌ SET 配列を参考に作製したプライマーを用いて塩基配列を決定した。興味深いことに、同一のプライマーから 4 種の塩基配列が得られた。これらを塩基配列の長い順に SET α 、SET β 、SET γ 、SET δ と名付け、Clustal X2 (clustal.org) を用いて塩基配列を比較した (図 2-2)。遺伝子解析プログラム BLAST (Basic Local Alignment Search Tool、NIH) を用いて、既知の遺伝子配列データベースから本研究で得られた cDNA 塩基配列と相同性のある遺伝子の検索を行ったところ、CanFam3.1 whole shot-gun sequences の NW_003726126.1、NW_003726067.1、NW_003726047.1 および NW_003726071.1 とそれぞれ約 99%の相同性を示す配列が存在し、これらは X、7、1 および 8 番染色体上に位置していた。

2-3 イヌ SET アイソフォームのアミノ酸配列の比較

次に、イヌ SET アイソフォームのアミノ酸配列の比較を行った (図 2-3)。290 アミノ酸から構成されるイヌ SET α は、ヒト SET α とほぼ同じ長さを持ち、約 94% の相同性を示した。一方、SET β 、SET γ 、SET δ は 223、112、102 アミノ酸から構成され、SET α から C 末端が欠落した形のアイソフォームであることが明らかになった。

A

```

*****.*.***.*** * * *****;* *** *****;*****;*****
Human SETα MAPKRQSPLPQKKKPRPPALGPEETSASAGLPKKGEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQPF 80
Canine SETα MAPKRQSSSLAPQTKKPRPLAPKPEETSTSQHLPK-GEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQPF 79

*****;*****;*****
Human SETα FQKRSELIAKIPNFVWVTFVNHQPVSALLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKVLKVEFLNE 160
Canine SETα FQKRSELIAKIPNFVWVTFVNHQPVSLLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKVLKVEFLNE 159

*****
Human SETα SGDPSSKSTEIKWKSGLTKRSTQNKASRKRQHEEPESFFTFWTDHSDAGADELGEVIKDDIWPNPLOYYLVPDMD 240
Canine SETα SGDPSSKSTEIKWKSGLTKRSTQNKASRKRQHEEPESFFTFWTDHSDAGADELGEVIKDDIWPNPLOYYLVPDMD 239

*****
Human SETα EEDEGEEDDDDEEEE-GLEDI DEEGDEGEDEEDDDDEGEDEGEDD 290
Canine SETα EEDEGEEDDDDEEEEGLEDI DEEGDEGEDEEDDDDEGEDEGEDD 290

```

B

```

*. ***** * * : ** ** ***** * * *****;***** *
α MAPKRQSSSLAPQTKKPR---LPLAPKPEETSTSQHLPKGEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQ 77
β MALKRQSSSLAPQTKKLR---LPPAPKPEETSTSQHLPKGEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQ 77
γ MVPKRQSSSLAPQTKKPR---LPPAPKPEETSTSQHLPKGEKEQQAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLRQ 77
δ MAPKRQSSSLAPQMKPKPKLPPAPKREETSTSQHLPKGEKEQQAIEHTDEVQNEIDRLNEQASEEILKVEQKYNKLLQ 80

*.:. : *:* ..:
α PFFQKRSELIAKIPNFVWVTFVN-HPQVSSLLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKVLKVEFH 157
β PFFQKRSELIAKIPNFVWVTFVN-HPQVSSALLGEEDEEALHYLTRVEVTEFEDIISGYRIDFYFDENPYFENKVLKVEFH 157
γ PVFSEEIGIDRPNPQFLGNNICQPSITGVCTAWGGG----- 112
δ PFFQKRSELIFAKIPNFVWTTIC----- 102

α LNESGDPSSKSTEIK-WKSGKDLTKRSTQNKASRKRQHEEPESFFTFWTDHSDAGADELGEVIKDDIWPNPLOYYLVP 237
β LNESGDPSSKSTEIKKWKSGKDLTKRSTQNKASRKRQHEEPESFFTFWTDHSDAGADELGRGHQR----- 223
γ -----
δ -----

α DMDDEGEDEEDDDDEEEEGLEDI DEEGDEGEDEEDDDDEGEDEGEDD 290
β -----
γ -----
δ -----

```

図 2-3 イヌ SET アイソフォームのアミノ酸配列の比較

イヌ SET アイソフォームのアミノ酸配列を Clustal X2 を用いて比較した。

(A) ヒト SET α とイヌ SET α の比較。(B) イヌ SET アイソフォーム間の比較。

図中の「*」「:」「.」はそれぞれ配列間で「完全に」「強く」「弱く」保存されていることを表す。四角で囲んだ配列部分は PP2Ac との結合に重要な領域を示す。

2-4 イヌ SET アイソフォームのタンパク質発現

次に、SET α 、SET β 、SET γ 、SET δ の4つのイヌ SET アイソフォームが細胞内でタンパク質として安定に存在できるかを検討した。FLAG タグを付加した4つの SET アイソフォーム発現プラスミドを作製し、HEK293T 細胞に発現させて、western blotting によりタンパク質発現を検出した。FLAG 抗体により、SET α には 52 kDa、SET β には 37 kDa、SET γ には 24 kDa、SET δ には 20 kDa 付近に固有のバンドが認められたことから、4つのアイソフォームは細胞内でタンパク質として発現可能であることが明らかになった。検出されたバンドの分子量は、推定される分子量 (SET α : 33.5 kDa、SET β : 26.1 kDa、SET γ : 12.6 kDa、SET δ : 11.9 kDa) よりも高い位置に検出されたが、同様のバンドシフトは FLAG タグを付加したヒト SET α においても認められている (data not shown)。

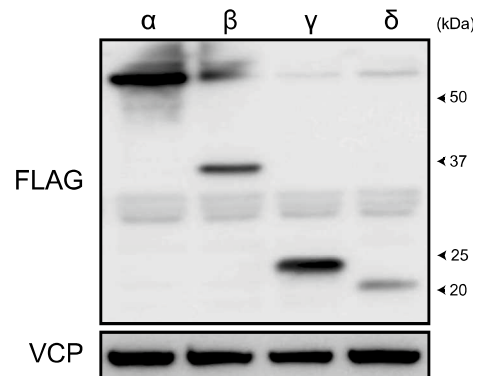


図 2-4 イヌ SET アイソフォームのタンパク質発現

FLAG タグを付加したイヌ SET α 、SET β 、SET γ 、SET δ 発現プラスミドを作製し、HEK293T 細胞に発現させ、FLAG 抗体を用いて western blotting によりタンパク質を検出した。N=2。

2-5 イヌ SET タンパク質の細胞内局在の検討

イヌ SET タンパク質の細胞内局在を検討するために、CMeC-1 細胞において SET 抗体 (bs-5943-R) を用いた免疫染色を行った。その結果、イヌにおいて内在性の SET は核内に局在していることが明らかになった (図 2-5 A)。

次に、イヌ SET アイソフォームの細胞内局在を明らかにするために、HeLa 細胞に FLAG タグを付加した SET α 、SET β 、SET γ 、SET δ をそれぞれ発現させ、FLAG 抗体で免疫染色を行った。SET α 、SET β は核内に局在し、SET γ 、SET δ は核と細胞質の両方に存在することが明らかになった (図 2-5 B)。

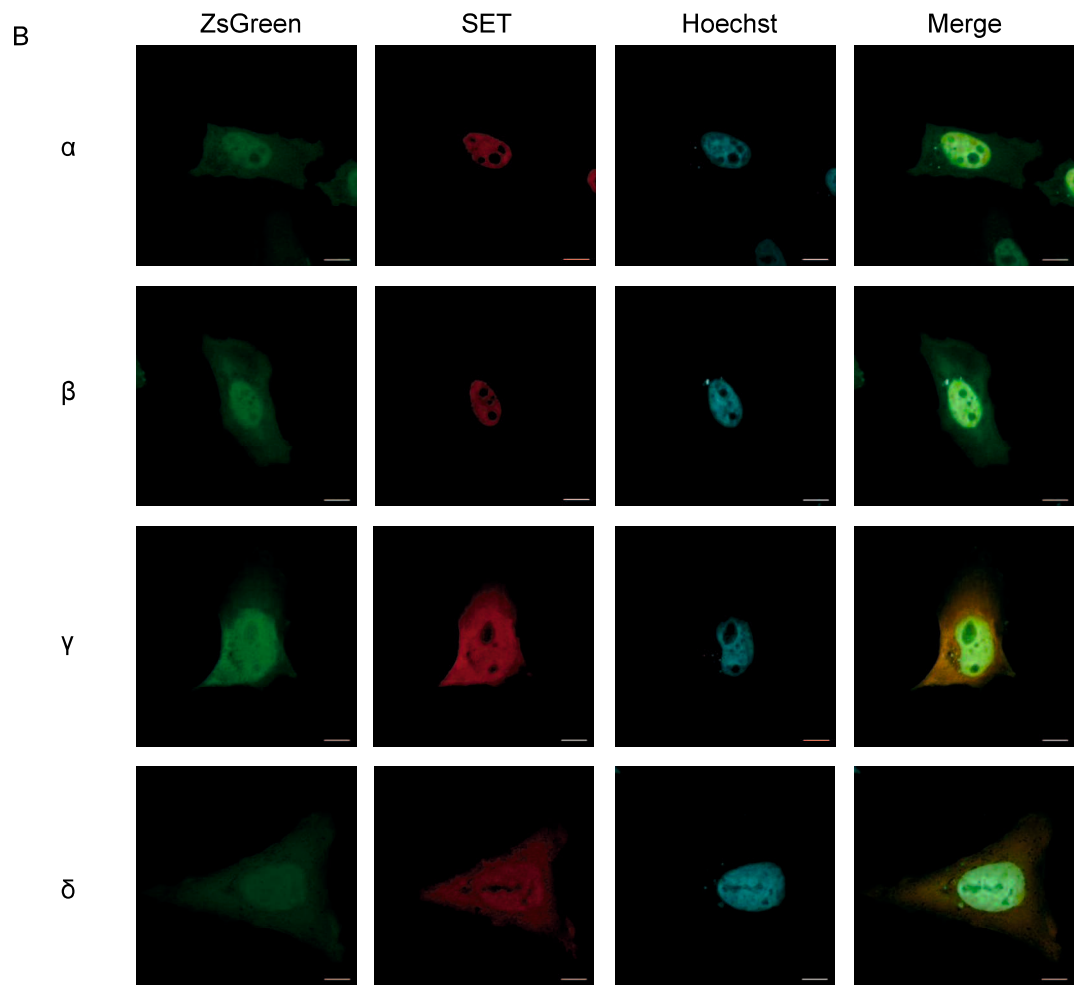
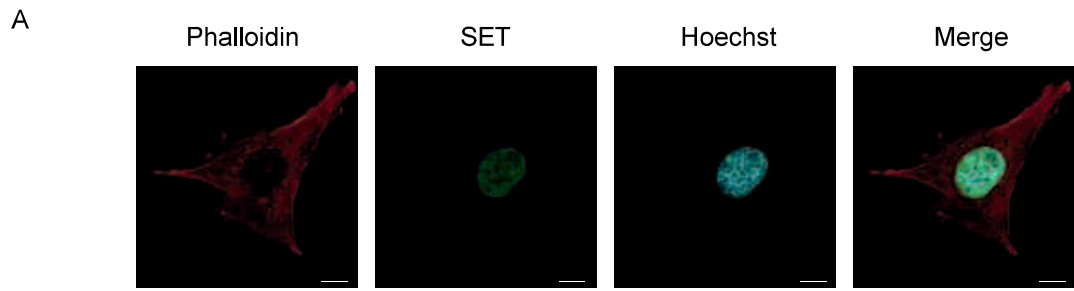


図 2-5 イヌ SET タンパク質の細胞内局在の検討

(A) イヌメラノーマ細胞株 CMeC-1 において、SET 抗体 (bs-5943-R) を用いて免疫染色を行った。Pallodin は細胞骨格を、Hoechst は核を示す。N=2。スケールバーは 10 μm 。

(B) HeLa 細胞に FLAG タグを付加した SET α 、SET β 、SET γ 、SET δ をそれぞれ発現させ、FLAG 抗体で免疫染色を行った。ZsGreen は発現ベクターに組み込まれた蛍光タンパク質であり細胞の全体像を表す。Hoechst は核を示す。N=2。スケールバーは 10 μm 。

2-6 イヌ SET アイソフォームの PP2Ac との結合能の比較

最後に、イヌ SET アイソフォームの PP2Ac との結合能を比較するため、HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した SET α 、SET β 、SET γ 、SET δ を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、PP2Ac との結合を western blotting で検出した。SET α および SET β は PP2Ac との結合が確認されたが、SET γ および SET δ は PP2Ac との結合能を持たないことが明らかになった。

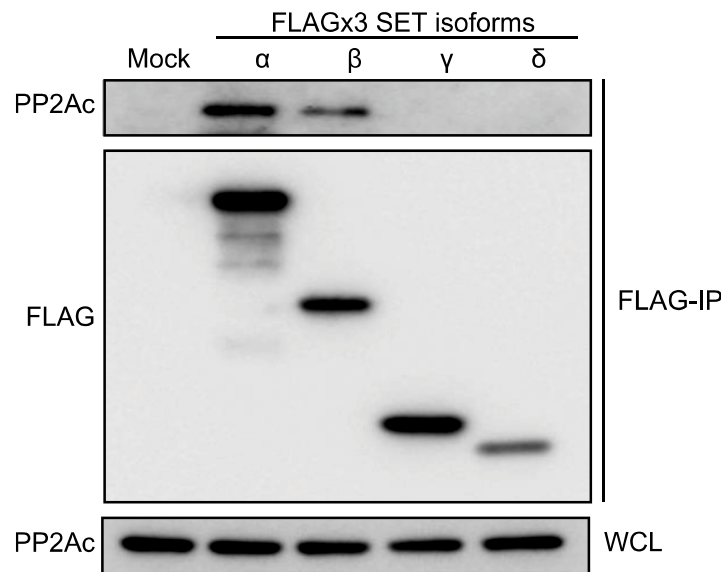


図 2-6 イヌ SET アイソフォームの PP2Ac との結合能の比較

イヌ SET アイソフォームの PP2Ac との結合能を比較するため、HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した SET α 、SET β 、SET γ 、SET δ をそれぞれ発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、PP2Ac との結合を western blotting で検出した。

Mock はコントロールベクター、WCL は whole cell lysate を示す。N=2。

2-7 考察

2-7-1 イヌ SET アイソフォームの PP2Ac との結合能に関する考察

本研究により、イヌでは少なくとも4つの SET アイソフォームが存在しており、その中でも SET α と SET β が PP2Ac と結合することから、細胞内の PP2A 阻害タンパク質として存在していることが示唆された。ヒト SET はその N 末端と C 末端領域の両方が PP2Ac との結合領域として存在し、そのどちらか一方だけで PP2Ac と結合可能である (70)。ヒトの SET α では、Val105 が SET の N 末端領域における PP2Ac との結合に重要であることが報告されている (70)。イヌ SET α および SET β では Val105 の周辺領域は高く保存されているが、SET γ および SET δ では同様の配列は認められない。このことが、イヌ SET γ および SET δ において PP2Ac との結合能が失われている一因であると考えられる。

2-7-2 イヌ SET アイソフォームのタンパク質発現に関する考察

SET 抗体 (ab1183) はヒト SET β の 3-18 番目のアミノ酸配列を認識し、SET 抗体 (bs-5943-R) はヒト SET α と SET β の共通配列部分であるヒト SET α の 175-215 番目のアミノ酸配列を認識する。また SET 抗体 (ab97596) はヒト SET α の N 末端領域を認識する抗体として販売されていたが、我々の検証の結果、SET β の N 末端領域を認識する抗体であることが明らかとなった (data not shown)。この事については、メーカーも誤りを認め、データシート等の修正を行っている。こ

のため、現在ヒト SET α に特異的な抗体は存在しない。アミノ酸配列から推定されるイヌ SET アイソフォームの分子量は、SET α は 33.5 kDa、SET β は 26.1 kDa、SET γ は 12.6 kDa、SET δ は 11.9 kDa である。SET 抗体 (bs-5943-R) を用いた際に検出される 37 kDa 付近の 3 本のバンドのうち、SET 抗体 (ab1183) と SET 抗体 (ab97596) を用いた際には認められない SET 抗体 (bs-5943-R) 特異的に認められるバンドがイヌ SET α である可能性が高いと考えられる。また、SET 抗体 (bs-5943-R) で 25 kDa 付近に認められる複数のバンドは、予測される分子量が極めて近いイヌ SET β を含むと考えられる。イヌ SET γ とイヌ SET δ はイヌ SET α の C 末端部分が大きく欠損したアイソフォームであり、SET 抗体 (bs-5943-R) では検出できないと推測され、SET γ および SET δ が内因性のタンパク質として細胞内に存在しているかは明らかではない。内在性イヌ SET 発現に関する詳細は今後、イヌ SET α の N 末端領域を特異的に認識する抗体の作成を行うことで明らかにする必要がある。また、本研究ではヒト SET β に相当するイヌ SET アイソフォームの存在に関する検討は行っていないため、今後ヒト SET β のプライマーを用いたイヌ SET アイソフォームのクローニングも検討する必要があると考えられる。

2-7-3 イヌ SET アイソフォームの細胞内局在に関する考察

ヒト SET アイソフォームは主に核内に局在することが報告されている (71,72)。これらの報告と一致して、内在性のイヌ SET および FLAG タグの付いた外来性のイヌ SET α とイヌ SET β は核内に存在することが確認された。SET の

核移行シグナルはヒト SET α の ¹⁹²RKR¹⁹⁴に相当する配列が担っており (73)、この配列がイヌ SET α とイヌ SET β にも保存されていることは、イヌ SET α とイヌ SET β が核に局在する結果と一致している。また、イヌ SET γ と SET δ は細胞質にも局在するが、内在性のイヌ SET の局在は核にのみ認められた。これは、ヒト SET α/β 共通の配列を持つ、アミノ酸配列中央を認識する抗体を免疫染色に用いて検出したため、この部分の配列を持たないイヌ SET γ と SET δ が検出されなかったことが原因と考えられる。また、2-7-2 で述べたように SET γ と SET δ が内在性タンパク質として存在しているかは未だ明らかになっていないため、イヌ SET アイソフォーム全てが共通の配列をもつ N 末端領域を認識する、免疫染色に使用可能な抗体を用いて、細胞質に局在する内在性 SET アイソフォームの存在を検討する必要がある。

2-7-4 イヌにおける SET を標的とした分子標的薬に関する考察

近年、ヒト医療分野では、がん治療標的としての SET の有用性が示唆されている (47,74,75)。これまでに当研究室では、SET を標的とし、PP2A から解離させるペプチド薬 OP449 が PP2A 活性を回復させ、イヌリンパ腫、イヌメラノーマ、イヌ乳腺腫瘍細胞株に抗がん効果を示すことを明らかにしてきた (63–65)。一連の報告において、始めにイヌリンパ腫細胞株に対して、OP449 の効果は SET の発現量に依存的であると報告した (63)。しかしその後、イヌメラノーマ細胞株を用いた検討において、OP449 の効果は必ずしも SET 発現量と相関しないことが明らかになった (64)。OP449 はヒト SET α のアミノ酸配列の 190-290 番目の

領域を標的としているが (45)、本研究で同定したイヌ SET β にはこの標的配列がほとんど存在しないため、OP449 はイヌ SET β の機能を阻害できないと考えられる。本研究において、イヌ SET β も細胞内の PP2A 阻害タンパク質として機能することが明らかになったことから、イヌがん細胞において OP449 の効果が SET 発現量に依存しない一因として、イヌ固有の SET β の存在が寄与している可能性が考えられる。この点は、イヌにおける SET を標的とした薬剤の開発において考慮すべきであると考えられる。

第3章 PME-1はPP2Acをユビキチン・プロテアソーム系分解から保護する

3-1 PME-1 欠損による PP2A 活性の変化

PME-1 による PP2A 制御機構を検討するため、PME-1 欠損マウスを用いた解析を行った。PME-1 欠損マウスは出生後致死の表現型を取るため、野生型マウスおよび PME-1 欠損マウスの胎児からマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を単離し、比較解析を行った。単離および培養時の顕微鏡観察像から、野生型と PME-1 欠損細胞の間に形態的に大きな差は認められなかった。

PME-1 は、PP2Ac の酵素活性部位に直接結合することで PP2A 阻害タンパク質としての機能を持つため、野生型と比較して PME-1 欠損細胞では PP2A 活性が上昇していることが予想される。そこで PP2A に選択性の高い基質ペプチド (K-R-pT-I-R-R) を用いて、細胞全体 (タンパク質抽出液) の PP2A 活性を測定した (図 3-1 A)。結果は予想に反し、PME-1 欠損細胞の PP2A 活性は野生型と比較して約 70% であり、PME-1 欠損により PP2A 活性の低下が認められた。手技的な問題である可能性を排除するため、さらに PP2Ac 抗体を用いてタンパク質抽出液から PP2A を単離して PP2A 活性を測定した (図 3-1 B)。この手法においても、PME-1 欠損細胞の PP2A 活性は野生型と比較して約 50 % であった。以上の結果から、PME-1 欠損細胞では PP2A 活性が低下していることが明らかになった。

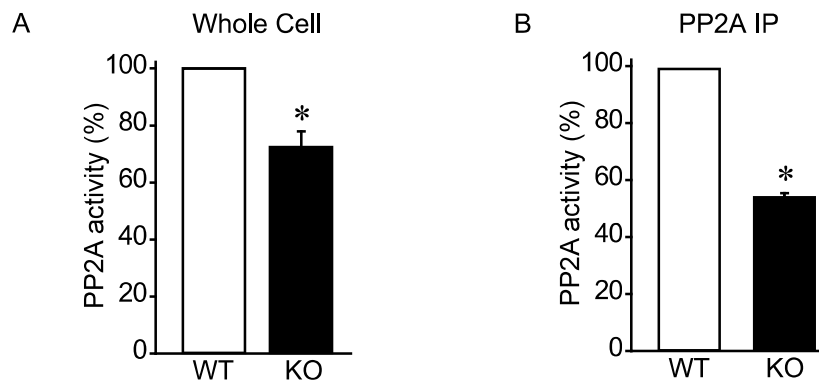


図 3-1 PME-1 欠損による PP2A 活性の変化

(A) Wild Type (以下 WT) および PME-1 knockout (以下 KO) MEF 細胞の細胞全体の PP2A 活性を測定した。定量図は WT の PP2A 活性を 100%として、その相対値で表した。N=4。*: $P < 0.05$ (WT との比較)。

(B) WT および PME-1 KO MEF 細胞の PP2A 活性を、PP2Ac 抗体を用いた免疫沈降法を用いて測定した。定量図は WT の PP2A 活性を 100%として、その相対値で表した。N=4。*: $P < 0.05$ (WT との比較)。

3-2 PME-1 欠損による PP2Ac メチル化レベルの変化

次に、脱メチル化 PP2Ac のみを認識する抗体を用いて、western blotting により PP2Ac の脱メチル化レベルを測定した (図 3-2)。PP2Ac のメチル基は NaOH (0.1 M) 処置により全て加水分解されるため、NaOH 処置群の脱メチル化 PP2Ac は全 PP2Ac 量を表す。NaOH 処置群に対する NaOH 非処置群の割合 (NaOH (-) / NaOH (+)) が PP2Ac の脱メチル化レベルを表す。野生型細胞では 40%程度、PME-1 欠損細胞では 10%程度の脱メチル化レベルを示した。すなわち、野生型細胞では 50%以上、PME-1 欠損細胞では 90%以上の PP2Ac がメチル化されており、PME-1 欠損細胞では PP2Ac メチル化レベルが高く維持されていることが明らかになった。

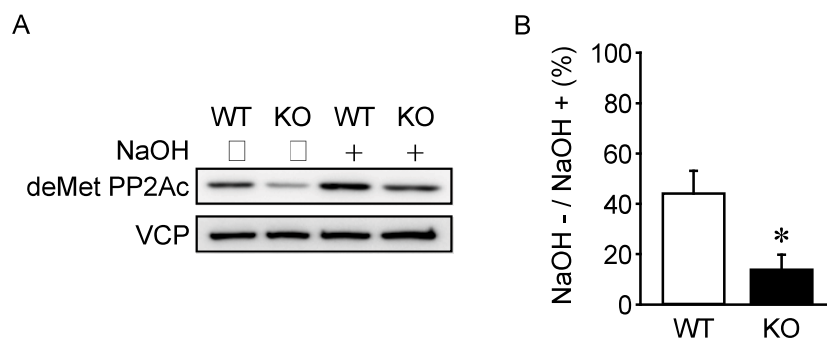


図 3-2 PME-1 欠損による PP2Ac メチル化レベルの変化

(A-B) 脱メチル化 PP2Ac 抗体 (deMet PP2Ac) を用いて PP2Ac の脱メチル化レベルを WT および PME-1 KO MEF 細胞で比較した。典型例 (A) と、それぞれの NaOH 処置群を 100% としてその相対値で表した定量図 (B)。縦軸は、NaOH 処置群に対する NaOH 非処置群の割合 (NaOH-/NaOH+)。N=3。*: $P < 0.05$ (WT との比較)。

3-3 PME-1 欠損が type 2A protein phosphatase の発現量に与える影響

PME-1 欠損細胞における PP2A 活性低下の原因に関して、図 3-2 の NaOH 処置群の deMet PP2Ac 発現量に着目した。NaOH 処置時の deMet PP2Ac 発現量は全 PP2Ac 発現量を表すため、野生型と比較して PME-1 欠損細胞においては PP2Ac 発現量が低下していることが示唆される。そこで、野生型および PME-1 欠損細胞を用いて、type 2A protein phosphatase の発現量を western blotting により検討した (図 3-3)。野生型と比較して PME-1 欠損細胞において、PP2Ac のタンパク質発現量の低下が認められた。一方、PP2A 足場サブユニットである PP2AA、type 2A protein phosphatase ファミリーメンバーである PP4c、PP6c のタンパク質発現量に変化は認められなかった。したがって、PME-1 欠損は PP2Ac のタンパク質発現量を特異的に低下させると考えられた。

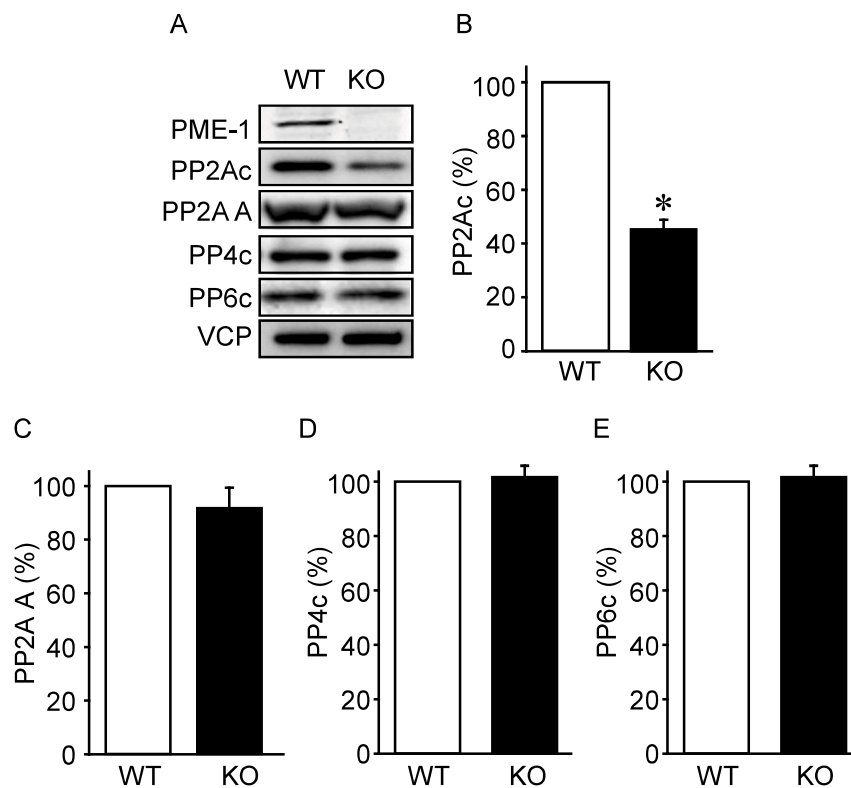


図 3-3 PME-1 欠損が type 2A protein phosphatase の発現量に与える影響

(A-E) WT および PME-1 KO MEF 細胞における type 2A protein phosphatase の発現量を western blotting により検討した。典型例 (A) と WT を 100%としてその相対値で表した定量図：(B) PP2Ac、(C) PP2AA、(D) PP4c、(E) PP6c。N=3。

*: $P < 0.05$ (WT との比較)。

3-4 PME-1 欠損による PP2Ac mRNA 量の変化

タンパク質発現量は、主に転写、翻訳および分解の過程で調節される。そこで、PME-1 欠損が PP2Ac の mRNA 発現量に与える影響を検討するために、野生型および PME-1 欠損細胞を用いて、real-time PCR を行った (図 3-4)。PP2Ac には、PP2Ac α および PP2Ac β の 2 つの相同性の高いアイソフォームが存在するが、PME-1 欠損はどちらのアイソフォームについても mRNA 発現量に大きな影響を与えなかった。したがって、PME-1 欠損による PP2Ac タンパク質発現量の低下は、転写活性の低下や mRNA の安定性の低下によるものではないことが示唆された。

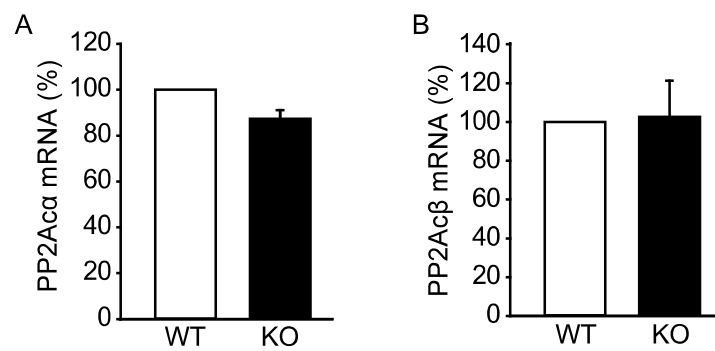


図 3-4 PME-1 欠損による PP2Ac mRNA 量の変化

WT および PME-1 KO MEF 細胞における PP2Ac α (A) および PP2Ac β (B) の mRNA 量を、real-time PCR を用いて検討した。定量図は WT の mRNA 量を 100% としてその相対値で表した。N=4。

3-5 PME-1 欠損が PP2Ac タンパク質の分解速度に与える影響

PME-1 欠損は PP2Ac の mRNA 発現量に影響を与えなかったことから、次に PP2Ac タンパク質の安定性について検討した。野生型および PME-1 欠損細胞をタンパク質合成阻害剤である cyclohexamide (CHX : 50 μ M) で処置し、12 時間後および 24 時間後に残存する PP2Ac タンパク質発現量を western blotting により解析した (図 3-5)。野生型細胞では、CHX で 24 時間処置しても PP2Ac のタンパク質発現量はほとんど減少せず、PP2Ac の半減期が比較的長いことが明らかになった。一方、PME-1 欠損細胞では、CHX 処置によって 24 時間後の PP2Ac タンパク質発現量が約 70%減少した。したがって、PME-1 欠損による PP2Ac 発現量の低下は、PP2Ac タンパク質の分解速度の上昇による可能性が示唆された。

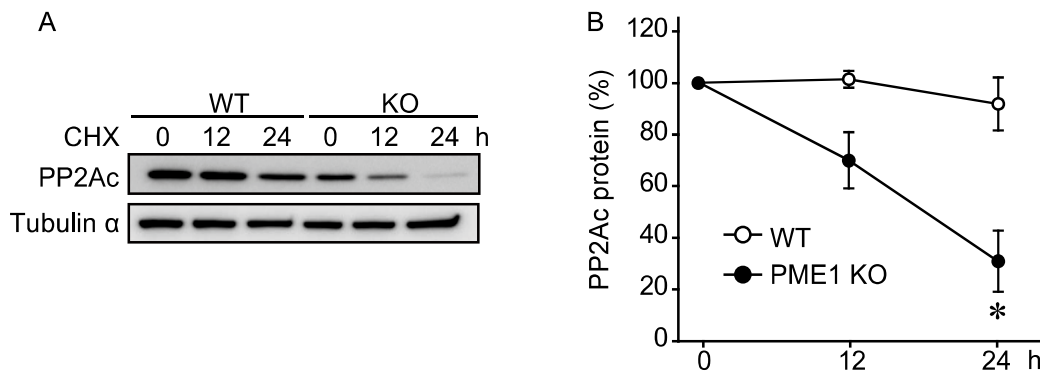


図 3-5 PME-1 欠損が PP2Ac タンパク質の分解速度に与える影響

WT および PME-1 KO MEF 細胞を CHX (50 μ M) で処置し、PP2Ac タンパク質発現量を western blotting により経時的に解析した。各細胞において CHX 無処置の PP2Ac タンパク質発現量を 100%として、その相対値で表した。N=5。* : $P < 0.05$ (WT との比較)。

3-6 PME-1 欠損が $\alpha 4$ と PP2Ac の結合に与える影響

$\alpha 4$ はユビキチン結合モチーフを持ち、PP2Ac のユビキチン・プロテアソーム系分解を抑制的に制御する機能を持つことが知られている (76,77)。そこで、PME-1 欠損が $\alpha 4$ の発現量および PP2Ac との結合に与える影響について検討を行った (図 3-6)。野生型および PME-1 欠損細胞における $\alpha 4$ 発現量に差は認められず、また $\alpha 4$ と PP2Ac との結合にも差は認められなかったため、 $\alpha 4$ は PME-1 による PP2Ac 分解保護機構に関与しないことが明らかになった。

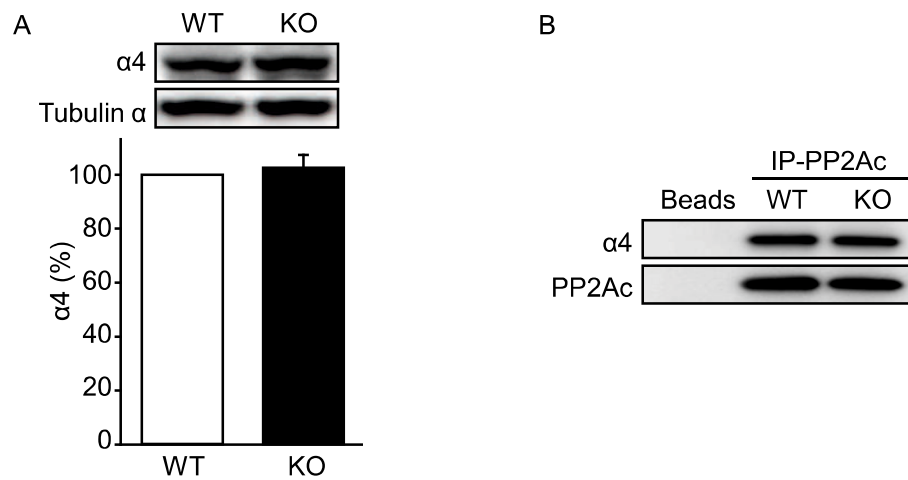


図 3-6 PME-1 欠損が $\alpha 4$ と PP2Ac の結合に与える影響

(A) WT および PME-1 KO MEF 細胞における $\alpha 4$ タンパク質発現量を western blotting により検討した。典型例と WT を 100% としてその相対値で表した定量図。N=3。

(B) WT および PME-1 KO MEF 細胞における $\alpha 4$ と PP2Ac との結合を、抗 PP2Ac 抗体を用いた免疫沈後法により検討した。N=3。Beads は抗体を含まないネガティブコントロールを示す。

3-7 PME-1 欠損による PP2Ac タンパク質の分解促進におけるユビキチン・プロテアソーム系分解の関与

PME-1 欠損が PP2Ac タンパク質の安定性を低下させることが示唆されたことから、次に PME-1 欠損が PP2Ac のポリユビキチン化を促進するか検討した。野生型および PME-1 欠損細胞に、FLAG タグを付加した PP2Ac を、doxycycline 誘導性遺伝子発現システムである TetOn system を用いて、doxycycline で 48 時間処置することで細胞内に発現させた。細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 (10 μ M) で 16 時間処置したのちに、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降をおこない、ポリユビキチン化した PP2Ac を western blotting により検出した。MG132 処置により、野生型と比較して PME-1 欠損細胞ではポリユビキチン化された PP2Ac の蓄積が増加した (図 3-7 A)。また、PP2Ac のユビキチン化部位である Lys41 をアルギニンに置換した PP2Ac K41R 変異体を用いて同様の検討を行ったところ、PME-1 欠損時に認められたラダーが消失したことから、検出されたラダーがポリユビキチン化された PP2Ac であることが示された (図 3-7 B)。さらに、PME-1 欠損細胞における CHX 処置による PP2Ac の分解が MG132 処置により阻害されるか検討したところ、MG132 処置により PP2Ac 分解の抑制が観察された (図 3-7 C)。したがって、PME-1 は PP2Ac をユビキチン・プロテアソーム系分解から保護していることが明らかになった。

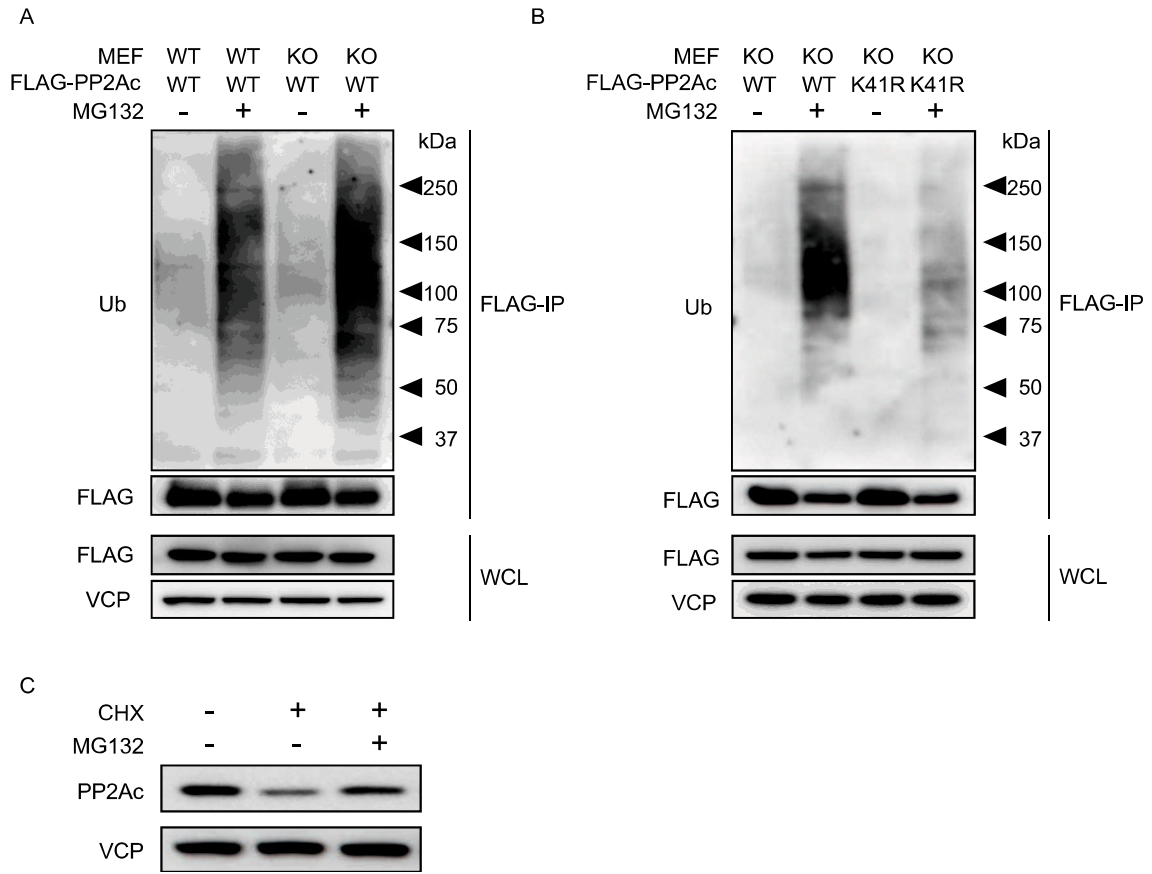


図 3-7 PME-1 欠損による PP2Ac タンパク質の分解促進におけるユビキチン・プロテアソーム系分解の関与

(A) WT および PME-1 KO MEF 細胞に TetOn system を用いて FLAG-PP2Ac を発現させた。細胞を MG132 (10 μ M) で 16 時間前処置し、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い、western blotting でポリユビキチン化した PP2Ac のラダーを検出した。Ub : ユビキチン。WCL は whole cell lysate を示す。N=2。

(B) PME-1 KO MEF 細胞に TetOn system により FLAG-PP2Ac WT および K41R (非ユビキチン化変異体) を発現させた。細胞を MG132 (10 μ M) で 16 時間前処置し、FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行い、western blotting でポリユビキチン化した PP2Ac のラダーを検出した。WCL は whole cell lysate を示す。N=2。

(C) PME-1 KO MEF 細胞を CHX (25 μ M) および MG132 (10 μ M) で処置した際の PP2Ac タンパク質発現量を western blotting により検出した。N=3。

3-8 PME-1 による PP2Ac 保護機構における PME-1 脱メチル化活性の必要性に関する検討

次に、PP2Ac タンパク質の安定化に PME-1 の脱メチル化活性が必要であるかを検討するため、野生型 MEF 細胞を PME-1 の脱メチル化活性阻害剤である ABL127 (78) で処置し、PP2Ac 発現量を比較した。ABL127 は、野生型細胞において PP2Ac の脱メチル化を阻害するとともに (図 3-8 A)、濃度依存的に PP2Ac 発現量を減少させた (図 3-8 B-C)。このことから、PP2Ac の分解保護には PME-1 の脱メチル化活性が必要である可能性が示唆された。この点をさらに検証するため、PME-1 欠損細胞にレンチウイルスベクターを用いて PME-1 WT および不活性型変異体 PME-1 S156A を発現させるレスキュー実験を行った。PME-1 S156A は、活性部位に変異が入っているため脱メチル化活性は失われているが、PP2Ac との結合能は保持している (79)。PME-1 欠損細胞に PME-1 WT を発現させると、PP2Ac 発現量が野生型の約 80%まで回復するが、PME-1 S156A では有意には回復しないことが明らかになった (図 3-8 D-E)。これらの結果から、PME-1 の PP2Ac タンパク質保護作用には、PME-1 の脱メチル化活性が必要であることが明らかになった。

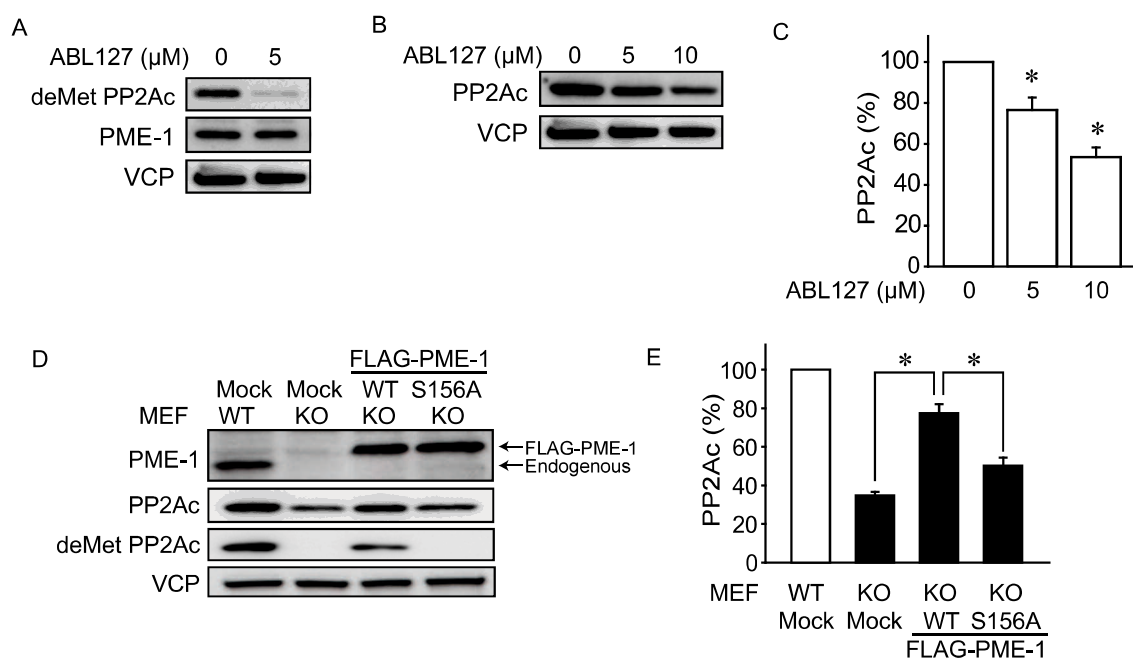


図 3-8 PME-1 による PP2Ac 保護機構における PME-1 脱メチル化活性の必要性に関する検討

(A) WT MEF 細胞を ABL127 (5 μM) で 48 時間処置し、PP2Ac の脱メチル化を western blotting を用いて検討した。N=3。

(B-C) WT MEF 細胞を ABL127 (5、10 μM) で 48 時間処置し、PP2Ac のタンパク質発現量を western blotting を用いて検討した。典型例 (B) と ABL127 非処置群を 100% として相対値で表した定量図 (C)。N=3。*: $P < 0.05$ (ABL127 非処置群との比較)。

(D-E) WT および PME-1 KO MEF 細胞に Mock、PME-1 WT および PME-1 S156A を安定的に発現させ、PP2Ac タンパク質発現量の変化を western blotting により検討した。典型例 (D) と WT を 100% として相対値で表した定量図 (E)。N=3。

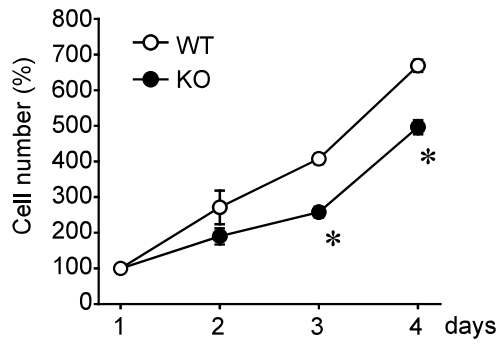
*: $P < 0.05$ (PME-1 WT を発現させた PME-1 KO MEF 細胞との比較)。

3-9 PME-1 欠損が細胞増殖能に与える影響

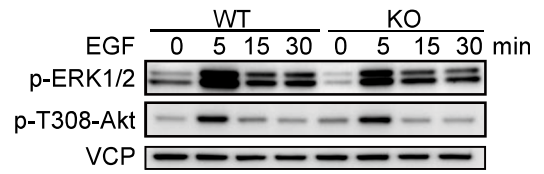
次に PME-1 欠損による細胞の表現型への影響を検討した。野生型細胞と PME-1 欠損細胞で細胞増殖速度を検討したところ、PME-1 欠損細胞では細胞増殖能の低下が認められた (図 9 A)。

グリオーマや子宮内膜癌において PME-1 を RNAi により抑制した際に ERK1/2 カスケードの脱リン酸化を介した細胞増殖の低下が報告されている (59,80)。そこで、MEF 細胞における PME-1 欠損が、ERK1/2 および Akt のリン酸化レベルに与える影響を検討した。野生型および PME-1 欠損細胞を FBS 非存在下で一晩培養し、その後 EGF (50 ng/ml) で刺激を行った際の ERK1/2 および Akt のリン酸化レベルを検討した (図 9 B-D)。野生型と比較して PME-1 欠損細胞では EGF 刺激時の ERK1/2 および Akt のリン酸化レベルの低下が認められた。一方、ERK1/2 および Akt のタンパク質発現量には影響を与えなかった (図 9 E-F)。

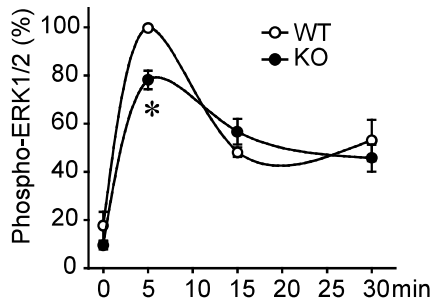
A



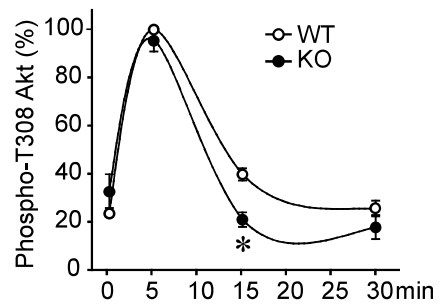
B



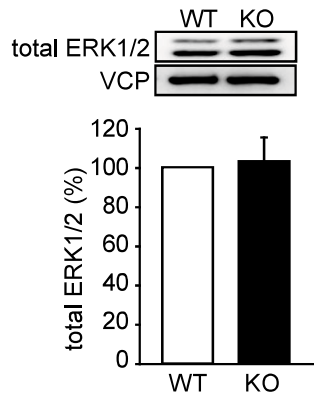
C



D



E



F

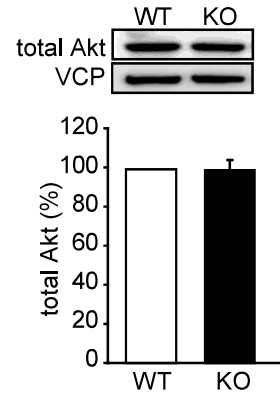


図 3-9 PME-1 欠損が細胞増殖に与える影響

(A) WT および PME-1 KO MEF 細胞の細胞増殖能を Cell Counting Kit-8 を用いて検討した。細胞増殖率はそれぞれ 1 日目の吸光度を 100%として相対値で表した。N=4。*: $P < 0.05$ (WT との比較)。

(B-D) WT および PME-1 KO MEF 細胞を EGF (50 ng/ml) で 5、15、30 分処置し、ERK1/2 および Akt のリン酸化レベルの変化を western blotting を用いて検討した。典型例 (B) と刺激 5 分後の WT のリン酸化レベルを 100%として相対値で表した定量図 (p-ERK1/2 (C)、pT308-Akt (D))。N=3。*: $P < 0.05$ (WT との比較)。

(E-F) WT および PME-1 KO MEF 細胞の ERK1/2 (E) および Akt (F) のタンパク質発現量を western blotting を用いて検討した。定量図は WT を 100%として相対値で表した。N=3。

3-10 PME-1 欠損が PP2A 複合体の構成に与える影響

PME-1 欠損細胞では、細胞内の PP2Ac 発現量の減少に反して、PP2A による ERK1/2 や Akt の脱リン酸化が示唆された。そこで、PME-1 欠損により PP2A 複合体の構成が変化し、一部の B サブユニットを含む PP2A 複合体の活性が上昇している可能性を考えた。野生型および PME-1 欠損細胞における B サブユニットと PP2A AC コア 2 量体の結合を比較検討するために、FLAG タグを付加した B55 α および B56 α を安定的に発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、western blotting を用いて PP2A AC コア二量体と B サブユニットとの結合の変化を検出した (図 3-10)。B56 α と PP2Ac および PP2A A との結合は野生型と PME-1 欠損細胞で大きな差は認められなかったが、B55 α と PP2Ac および PP2A A との結合が PME-1 欠損細胞において顕著に増強された。B55 α を含む PP2A 複合体は ERK1/2 経路と Akt 経路の脱リン酸化に寄与することが報告されており (81,82)、PME-1 欠損による細胞増殖能の低下は、B55 α を含む PP2A 複合体の増加によるものであることが示唆された。また、PME-1 欠損は B56 α を含む PP2A 複合体には影響を与えなかったことから、PME-1 欠損時に見られる複合体の変化には B サブユニット特異性が存在することが明らかになった。

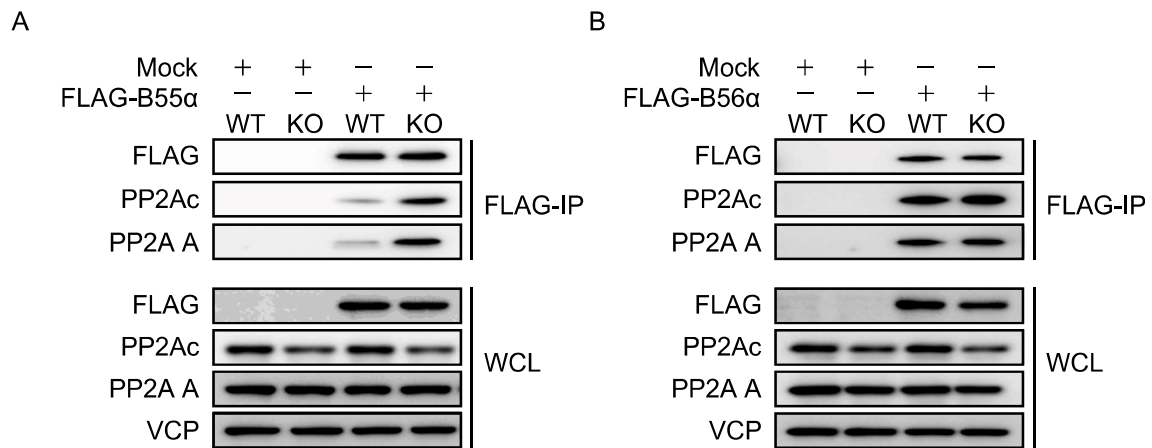


図 3-10 PME-1 欠損が PP2A 複合体の構成に与える影響

WT および PME-1 KO MEF 細胞に FLAG-B55α (A) もしくは FLAG-B56α (B) を安定的に発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行い、PP2Ac、PP2A A と B サブユニットとの結合を western blotting により検出した。WCL は whole cell lysate を示す。N=3。

3-11 各種細胞株における PME-1 発現抑制が PP2Ac 発現量に与える影響

最後に、PME-1 による PP2Ac 分解保護機構が、MEF 細胞以外の細胞種においても一般的に存在するのかを検討するため、各種細胞株において shRNA を用いて安定的に PME-1 発現を抑制することにより PP2Ac タンパク質発現量の変化を検討した (図 3-11)。A549 細胞では MEF 細胞と同様に PP2Ac タンパク質発現量の低下が認められたが、HEK293 細胞と HT29 細胞では PP2Ac 発現量の低下は認められなかった。したがって、PME-1 による PP2Ac タンパク質安定化は細胞種依存的な現象である考えられる。

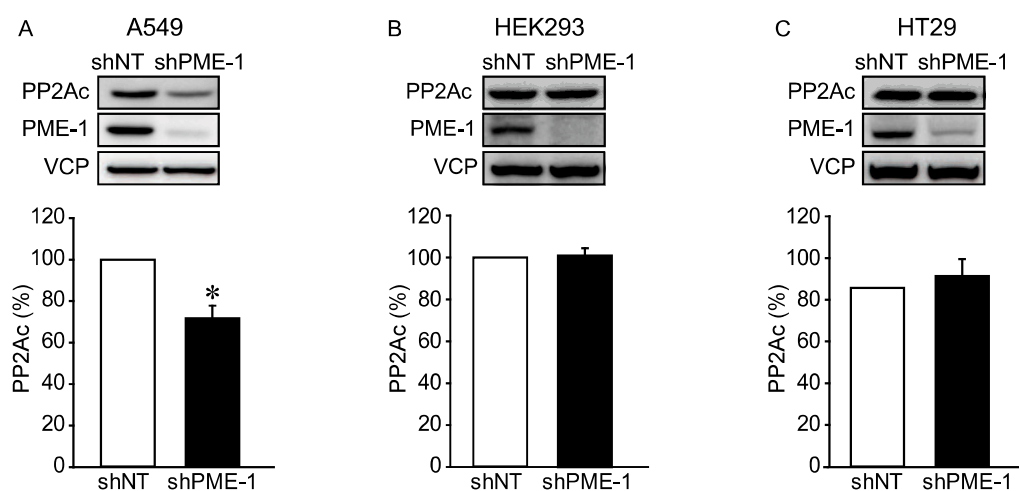


図 3-11 各種細胞株における PME-1 発現抑制が PP2Ac 発現量に与える影響

(A-C) shNT および shPME-1 を安定発現させ PME-1 発現を抑制した (A) A549 細胞、(B) HEK293 細胞、(C) HT29 細胞における PP2Ac タンパク質発現量を western blotting を用いて検討した。典型例 と shNT を 100%として相対値で示した定量図。N=3。*: $P < 0.05$ (shNT との比較)。

3-12 考察

本章では、PME-1 欠損細胞を用いて、PME-1 が PP2Ac を脱メチル化することでユビキチン・プロテアソーム系分解から保護する機能を持つことを明らかにした (図 3-11)。また、PME-1 欠損細胞内では細胞全体の PP2A 活性は低下しているが、ほぼすべての PP2Ac がメチル化された状態であり、B55 α を含む PP2A 複合体が増加することで細胞増殖が抑制されていることが明らかになった。

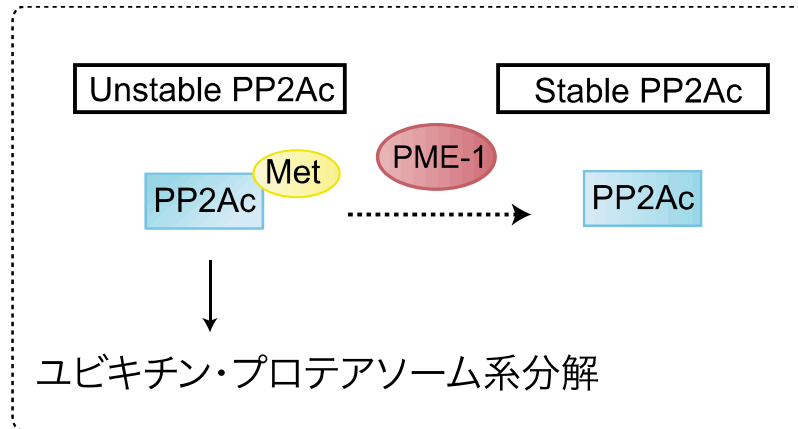


図 3-12 PME-1 は PP2Ac をユビキチン・プロテアソーム系分解から保護する

PME-1 欠損細胞において、PP2Ac のユビキチン・プロテアソーム系分解が促進することで PP2Ac タンパク質発現量が減少しており、これは PME-1 の脱メチル化活性が重要な役割を持つ。したがって PME-1 は PP2Ac を脱メチル化することによりユビキチン・プロテアソーム系分解から保護していると考えられる。

3-12-1 細胞内の PP2Ac タンパク質発現量維持機構に関する考察

PP2Ac タンパク質の発現量は、リン酸化と脱リン酸化反応の均衡を保つために、細胞内で厳格に制御されている。TetOn System を用いて、doxycycline で長時間 (48 時間) 処置して外来性に PP2Ac を安定的に発現させた際には、whole cell lysate の外来性 PP2Ac の発現量に野生型および PME-1 欠損細胞で差はみとめられず、これは本研究で得られた PME-1 欠損細胞において PP2Ac の分解が促進するという結果と矛盾する (図 3-7)。しかし、doxycycline で短時間処置して PP2Ac を外来性に発現させた際には、内在性の PP2Ac 同様に PME-1 欠損による PP2Ac タンパク質分解の促進が認められた (data not shown)。このことから、細胞内にはリン酸化-脱リン酸化反応の均衡を保つために PP2Ac 発現量の上限が存在しており、長時間処置時には PP2Ac の細胞内発現量が上限に達していることが考えられる。この考えに一致するように、外来性に発現させた PP2Ac はフィードバック機構によって一定の発現量に保たれることが報告されている (83)。これらの結果および報告を踏まえると、細胞には PME-1 非依存的に PP2Ac タンパク質発現量の上限を決定する調節メカニズムが存在すると考えられる。

3-12-2 PP2A 活性に関する考察

PP2A は複合体として機能し、基質も多様であることから、現時点で細胞内の PP2A 活性を正確に測定することは極めて困難である。本研究では、細胞全体(タンパク質抽出液)の PP2A 活性測定法と、タンパク質抽出液から抗体を用いて PP2A を単離した免疫沈降 PP2A 活性測定法の二種類の測定法を用いて、PME-1 欠損細胞における PP2A 活性の低下を観察した。本研究の結果と同様に、PME-1 欠損マウスの組織においても、PME-1 欠損により PP2A 活性が低下することが報告されている (84)。PME-1 欠損細胞における細胞全体の PP2A 活性は野生型と比較して 30%ほど減少したが、免疫沈降法による PP2A 活性の測定法では 50% 近く減少していた。細胞全体の PP2A 活性の測定法では、基質ペプチドに対する交差性から、PP2A と同じ type2A protein phosphatase ファミリーである PP4 や PP6 の活性が少なからず検出されてしまうことから、PME-1 欠損により発現量減少を伴わない PP4 や PP6 の活性が混入したことが、PP2A 活性のみを測定する免疫沈降法よりも細胞全体の活性が高く測定された原因と考えられる。一方、免疫沈降法では抗体に反応する PP2Ac を含む PP2A 複合体のみが取れてきてしまうため、偏った集団の PP2A 活性を測定してしまう問題もある。そのため、現状で PP2A 活性を測定する場合には複数の方法を用いて測定することで正確性を期す必要がある。

3-12-3 PME-1 と PP2Ac の相互作用に関する考察

PME-1 は、PP2Ac の酵素活性部位に直接結合することで、脱メチル化活性非依存的に PP2A 活性を抑制することが知られている (79)。本研究において、PME-1 脱メチル化酵素阻害剤の処置および PME-1 欠損細胞への PME-1 不活性化変異体 S156A のレスキュー発現により、PP2Ac を分解から保護する機能には PME-1 の脱メチル化活性が重要な役割を担うことが明らかになった。免疫沈降法の結果から、WT に比べて S156A は PP2Ac に強く結合することが報告されており (59)、我々もこの点を確認している (data not shown)。S156A は PP2Ac に強く結合するにも関わらず、PP2Ac を分解から保護しないことから、PME-1 と PP2Ac の結合は PP2Ac の分解保護に関与しないと考えられる。PP2Ac のメチル化は、 $\alpha 4$ や B55 α 、B56 α といった様々な PP2A 関連タンパク質との相互作用に影響を与えることが知られており (52,85,86)、これらが PP2Ac の E3 ubiquitin ligase との親和性に影響を与えている可能性が考えられる。

3-12-4 PP2Ac が分解から保護されるメカニズムに関する考察

一般的に酵素反応においては、触媒反応後に基質が酵素から解離する。PME-1 の不活性型変異体である S156A が WT と比較して PP2Ac への親和性が高いことから、PME-1 と PP2Ac の解離も、PME-1 の脱メチル化反応が引き金となっていると考えられる。本研究では、脱メチル化された PP2Ac が、どのようにして分解から保護された状態を保っているのかは明らかにできていない。一つの可能性として、 $\alpha 4$ との相互作用が変化することが考えられる。 $\alpha 4$ (酵母におけるオロソログは Tap42) は、PP2Ac や PME-1 同様に進化的に良く保存されたタンパク質であり、PP2AAC コア二量体ではなく単量体の PP2Ac に直接結合する (87)。近年、 $\alpha 4$ はユビキチン結合モチーフを持ち、PP2Ac のユビキチン・プロテアソーム系分解を抑制的に制御することが明らかとなった (76,77,88)。しかし本研究では、野生型および PME-1 欠損細胞における $\alpha 4$ タンパク質発現量に差は認められず、また、 $\alpha 4$ と PP2Ac との結合も差は認められなかった (図 3-6)。したがって、PME-1 欠損による PP2Ac タンパク質の分解促進に $\alpha 4$ が関与する可能性は低いと考えられる。その他の可能性として、PP2Ac のメチル化以外の翻訳後修飾部位や PP2A 阻害タンパク質との結合性への影響が考えられる。メチル化以外の翻訳後修飾として C 末端領域の Tyr307 のリン酸化が、また PP2A 阻害タンパク質として SET や CIP2A が存在する (23,89-91)。Tyr307 の変異は $\alpha 4$ との結合に影響を与えることから (86)、Tyr307 のリン酸化状態の変化も、PP2Ac の安定性に関わるタンパク質との相互作用を変化させる可能性がある。PP2A 阻害タンパク質に関しては、これまで一過性の SET や CIP2A の発現抑制は PP2Ac タンパク質

発現量に影響を与えないことが報告されているが (89,92)、ロックアウトもしくは安定的な発現抑制による PP2Ac 発現量へ影響は検討の余地があり、今後明らかにすべき課題である。

3-12-5 PME-1 欠損が与える影響の細胞種特異性に関する考察

PME-1 発現を抑制した際に、PP2Ac タンパク質発現量が低下するという報告はこれまでに存在しなかった (59,80)。本研究で、MEF 細胞以外にも A549 細胞で PP2Ac タンパク質発現量の低下が認められたが、HEK293 細胞と HT29 細胞では PP2Ac 発現量の低下は認められなかった (図 3-11)。したがって、PME-1 欠損時の PP2Ac 発現量の低下は細胞種に依存して起きる現象であると考えられるが、この差異を生むメカニズムに関してはさらなる検討が必要である。また、PME-1 発現を抑制した際の細胞増殖能や細胞増殖シグナルに与える影響に関しても細胞種によって異なり (59,80)、このような PME-1 が細胞種特異的に多様な機能を発揮するメカニズムは非常に興味深く、今後その詳細な分子機構の解明が望まれる。

3-12-6 PP2Ac と PP2AA のタンパク質発現量の相関に関する考察

細胞内の大部分の PP2Ac は AC 二量体もしくは ABC 三量体として存在し、PP2Ac の発現量は PP2A 複合体の足場タンパク質である A サブユニットの発現量と相関すると考えられてきた (93–95)。しかし本研究では、PME-1 欠損により、PP2Ac タンパク質発現量が低下したのに対して、PP2A 複合体の足場タンパク質である A サブユニットのタンパク質発現量は低下しなかった (図 3-3)。近年の研究では、A サブユニットと PP2Ac のタンパク質発現量は必ずしも相関しないことが明らかとなってきた。例えば、T 細胞において siRNA を用いて PP2Ac をノックダウンした際には、A サブユニットの発現量の減少は引き起こされない (96)。また反対に、PC6-3 細胞において A サブユニットのタンパク質発現量を 60%以上抑制しても、PP2Ac は約 30%減少するにとどまった (97)。さらに、ヒトグリオーマにおいて、A サブユニットの発現量に大きなばらつきが認められるが、PP2Ac の発現量に大きな差は認められない (98)。以上のような研究結果と本研究で得られた知見から、PP2Ac タンパク質発現量と PP2AA サブユニットタンパク質発現量は必ずしも相関せず、独立して制御されていると考えられる。

第4章 PME-1によるPP2Ac制御機構に基づくPP2Acメチル化レベル測定法の確立

4-1 タンパク質抽出液中における PP2Ac 脱メチル化

PME-1 による PP2Ac の脱メチル化は B サブユニットとの結合性を変化させるなど、PME-1 が PP2A 複合体の制御に重要な役割を持つことはこれまでに数多く報告されており (24,52,85)、本研究でも前章で確認した。これらの報告では、免疫沈降法やクロマトグラフィー法により単離した PP2A 複合体を用いて、PP2Ac メチル化による B サブユニットとの結合性や、PME-1 による脱メチル化反応を解析しているが、タンパク質抽出液中で PP2Ac のメチル化レベルが変化し、細胞内のメチル化レベルを正確に反映していない実験的アーティファクトを含む可能性が考えられる。そこで我々は、HEK293T 細胞の標準タンパク質抽出液 (standard lysate buffer) を氷上、4°C、30°C で静置し、試験管内で PP2Ac が脱メチル化される可能性を検討した (図 4-1)。興味深いことに、standard lysate buffer 中の PP2Ac は、氷上でインキュベートさせた場合でも時間依存的に脱メチル化されることが明らかとなった。さらにこの反応は、組成の異なるタンパク質抽出液 (CHAPS lysate buffer) でも同様に認められたため、タンパク質抽出液の組成によらず一般的に認められる現象であることが示唆された。

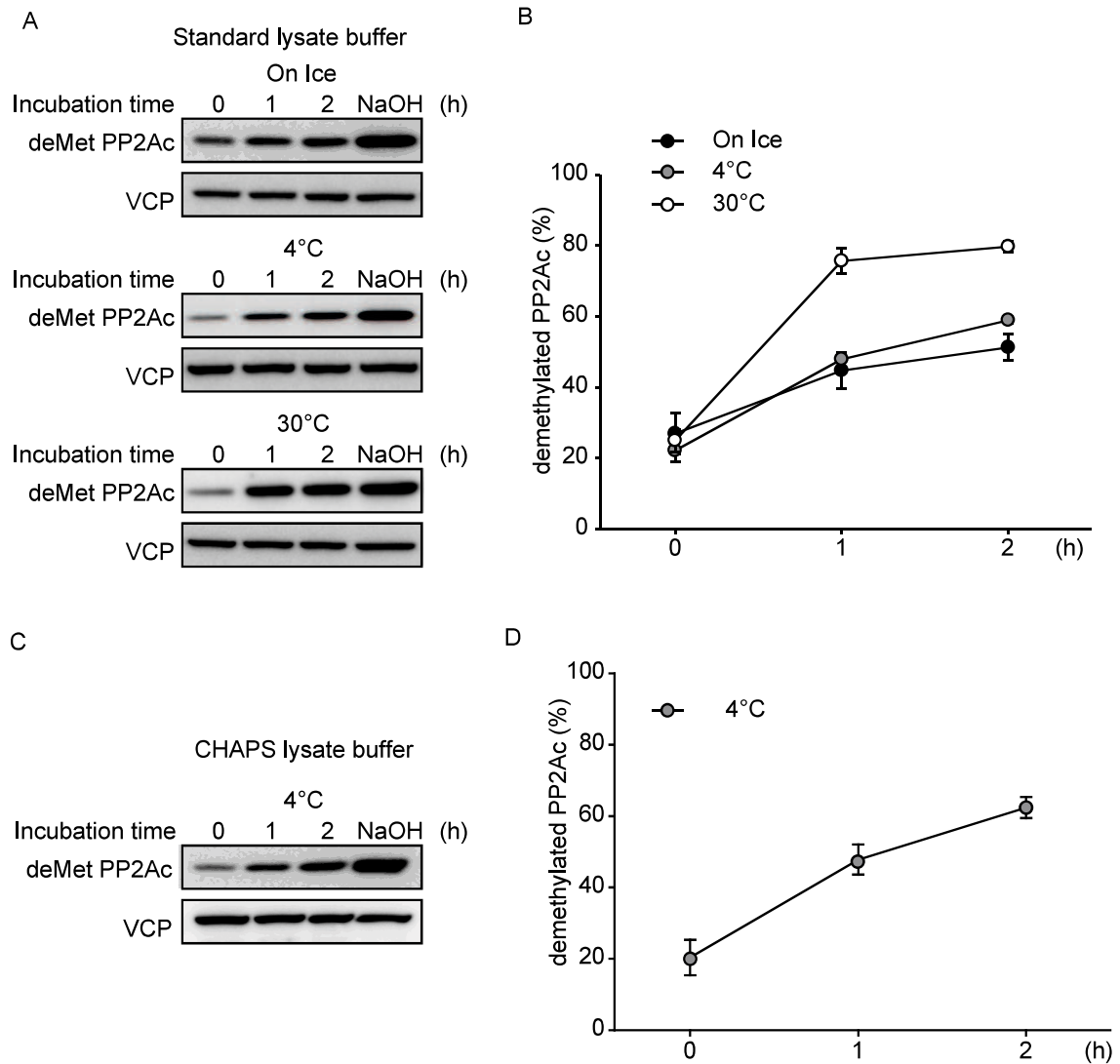


図 4-1 タンパク質抽出液中における PP2Ac 脱メチル化

HEK293T 細胞のタンパク質を standard lysate buffer (A-B) もしくは CHAPS lysate buffer (C-D) を用いて抽出し、氷上 (One Ice)、4°C、30°C でそれぞれ 1 時間、2 時間静置し、PP2Ac 脱メチル化レベルを western blotting により検出した。グラフは NaOH 処置を 100% とした PP2Ac の脱メチル化レベルを示す。N=3。

4-2 タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する okadaic acid の効果

タンパク質抽出液中において PP2Ac が時間依存的に脱メチル化されると、細胞内における PP2Ac の脱メチル化レベルを正確に測定することができず、PP2A 複合体構成等の解析に支障をきたす。PP2A 阻害剤 okadaic acid (OA) は、PP2Ac と PME-1 の結合を阻害することが報告されていることから (79,99)、OA をタンパク質抽出液に加えることで、PP2Ac 脱メチル化が抑制されるか検討した (図 4-2)。HEK293T 細胞のタンパク質を、OA (100 nM) を含む standard lysate buffer を用いて抽出し、タンパク質抽出液を氷上、4°C、30°C で静置して試験管内における PP2Ac 脱メチル化を解析した。しかし、100 nM の OA を添加しても、試験管内における PP2Ac の脱メチル化反応はほとんど抑制されなかった。このことから OA による PP2Ac と PME-1 の結合阻害は、試験管内の脱メチル化反応の抑制には不十分であることが明らかとなった。

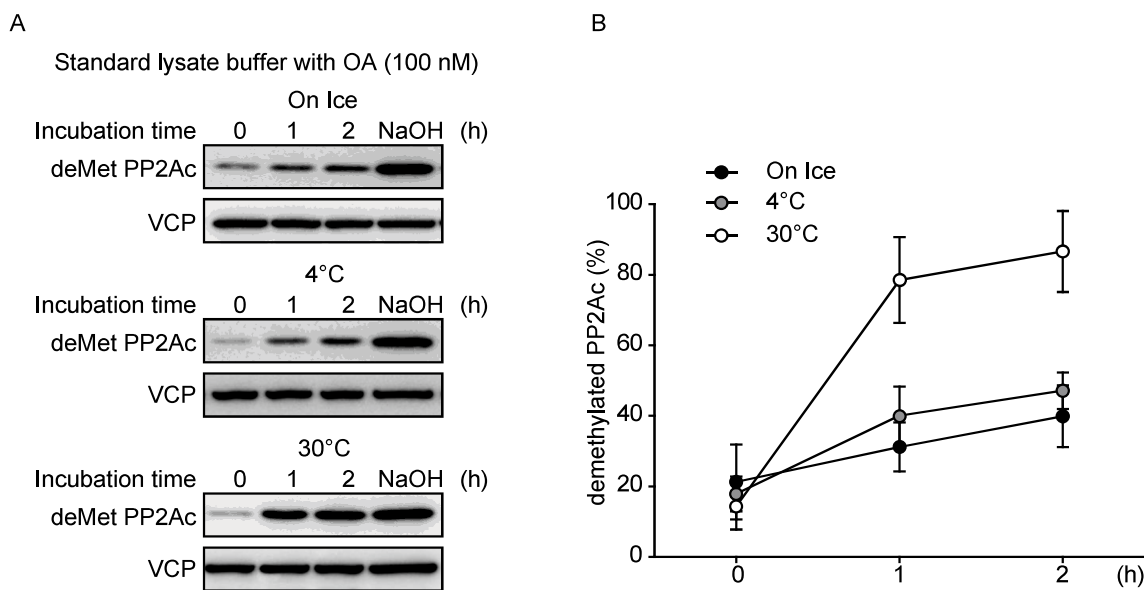


図 4-2 タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する okadaic acid の効果

(A-B) HEK293T 細胞のタンパク質を、OA (100 nM) を含む standard lysate buffer を用いて抽出し、氷上 (One Ice)、4°C、30°C でそれぞれ 1 時間、2 時間静置して PP2Ac 脱メチル化レベルを western blotting により検出した。グラフは NaOH 処置を 100% とした PP2Ac の脱メチル化レベルを示している。N=3。

4-3 タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する ABL127 の効果

そこで、PME-1 特異的脱メチル化活性阻害剤である ABL127 をタンパク質抽出液に加えることで、脱メチル化を阻害できるか検討した。HEK293T 細胞のタンパク質を、ABL127 (1 μ M) を含む standard lysate buffer を用いて抽出し、タンパク質抽出液を氷上、4°C、30°C で静置し、試験管内における PP2Ac 脱メチル化を解析した (図 4-3)。ABL127 を含むタンパク質抽出液中では PP2Ac の脱メチル化は 30°C 条件下でも顕著に抑制された。したがって、ABL127 による直接的な脱メチル化活性の阻害がタンパク質抽出液中の脱メチル化の抑制に必要であることが明らかとなった。

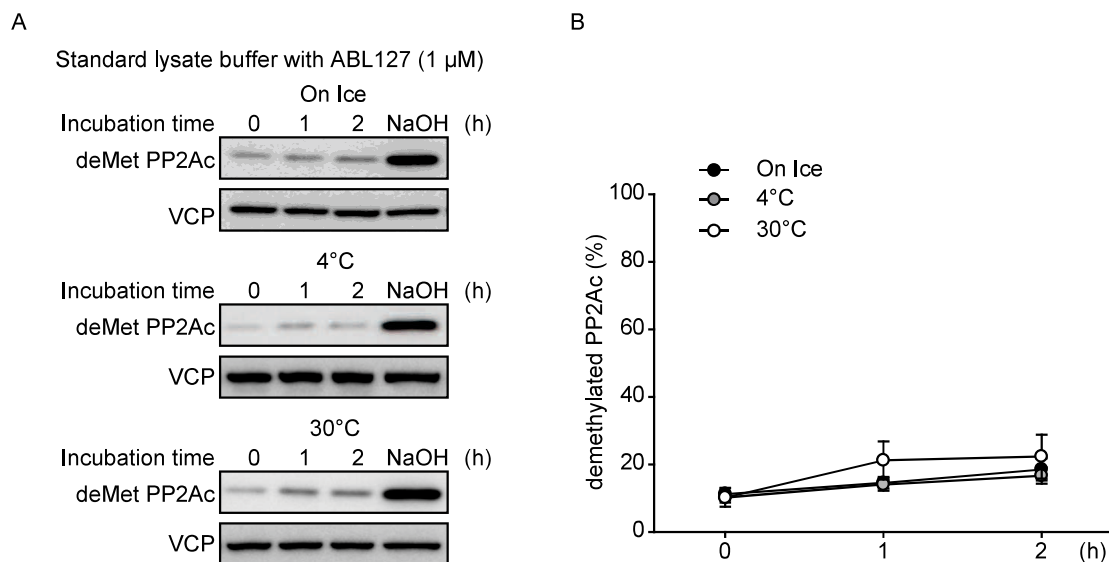


図 4-3 タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する ABL127 の効果

(A-B) HEK293T 細胞のタンパク質を、ABL127 (1 μ M) を含む standard lysate buffer を用いて抽出し、氷上 (One Ice)、4°C、30°C でそれぞれ 1 時間および 2 時間静置して PP2Ac 脱メチル化レベルを western blotting により検出した。グラフは NaOH 処置を 100% とした PP2Ac の脱メチル化レベルを示している。N=3。

4-4 タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する PME-1 欠損の影響

次に、試験管内での PP2Ac 脱メチル化反応が PME-1 依存的であるかを明らかにするため、野生型および PME-1 欠損 MEF 細胞のタンパク質を standard lysate buffer を用いて抽出し、タンパク質抽出液を氷上、4°C で静置し、試験管内における PP2Ac 脱メチル化を解析した (図 4-4)。野生型 MEF 細胞では HEK293T 細胞のタンパク質抽出液と同様に時間依存的な PP2Ac の脱メチル化が認められたが、PME-1 欠損細胞では PP2Ac の脱メチル化は認められなかった。このことから、タンパク質抽出液中における PP2Ac 脱メチル化は PME-1 依存的であることが明らかとなった。

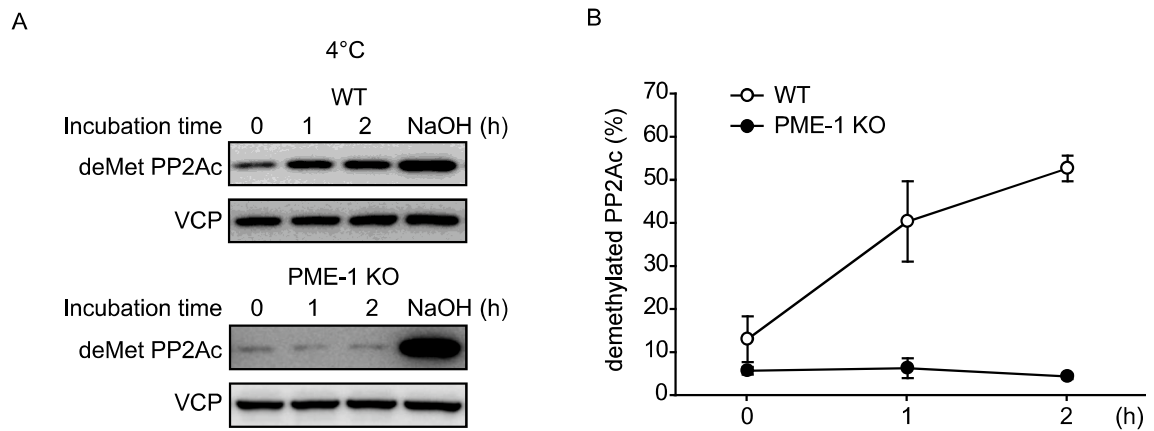


図 4-4 タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化に対する PME-1 欠損の影響

(A-B) WT および PME-1 KO MEF 細胞のタンパク質を standard lysate buffer を用いて抽出し、4°C で 1 時間および 2 時間静置して PP2Ac 脱メチル化レベルを western blotting により検出した。グラフは NaOH 処置を 100% とした PP2Ac の脱メチル化レベルを示している。N=3。

4-5 ABL127 および okadaic acid が PP2Ac と PME-1 の結合に与える影響

タンパク質抽出液中における PP2Ac 脱メチル化は、OA では抑制されず、ABL127 では抑制された。OA は、PP2Ac の酵素活性部位に結合することで PP2Ac 活性を阻害するとともに、PME-1 と PP2Ac の結合を阻害することが報告されている。一方、ABL127 は、PME-1 の酵素活性部位に結合して PME-1 活性を抑制するが、PME-1 と PP2Ac との結合に対する作用は知られていない。そこで、両化合物が PME-1 と PP2Ac の結合に与える影響を検討した。His タグを付加した PME-1 のリコンビナントタンパク質を作製し、PME-1 欠損細胞から抽出したタンパク質抽出液と混合して His-pull down assay を行った。Pull down の際に ABL127 および OA をタンパク質抽出液に加え、PME-1 と PP2Ac の結合に与える影響を検討した(図 4-5)。ABL127 は 1 μ M で、OA は 100 nM で PP2Ac と PME-1 の結合を抑制したことから、両化合物は作用点が異なるが、PP2Ac と PME-1 の結合を解離させることが明らかになった。

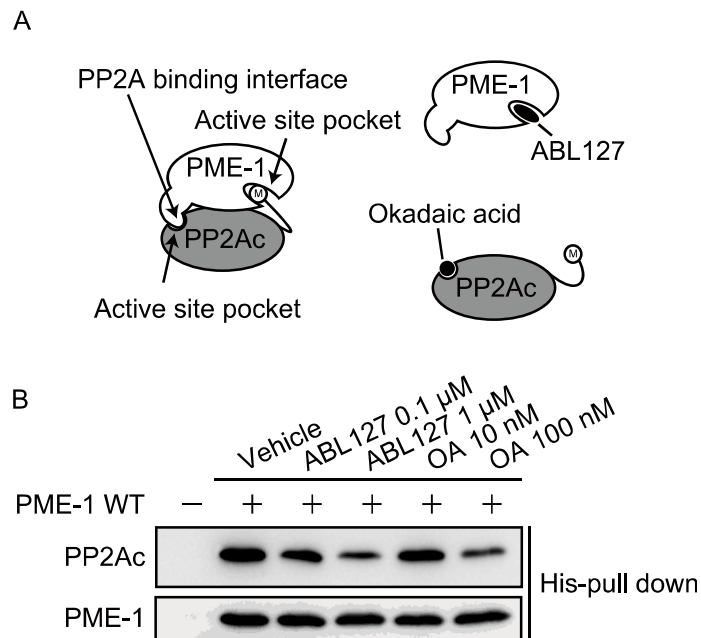


図 4-5 ABL127 および okadaic acid が PP2Ac と PME-1 の結合に与える影響

(A) ABL127 と OA の作用点を示した模式図。OA は PP2Ac の active site pocket (活性部位) に、ABL127 は PME-1 の active site pocket に結合する。

(B) His タグを付加した PME-1 のリコンビナントタンパク質と、PME-1 欠損細胞から抽出したタンパク質抽出液を混合し、His-pull down assay を行った。Pull down の際に ABL127 と OA をタンパク質抽出液に加え、PME-1 と PP2Ac の結合に与える影響を western blotting により検討した。N=3

4-6 変異型 PME-1 の PP2Ac への結合能の解析

OA が PME-1 と PP2Ac の結合を解離させる一方、タンパク質抽出液中の脱メチル化反応を抑制しなかったことから、PME-1 の PP2Ac への安定的な結合は脱メチル化反応に必要でない可能性が考えられる。PME-1 は PP2Ac と結合すると、PP2Ac の活性部位から 2 価の金属イオンを押し出すことで PP2A 阻害タンパク質として機能するが、PME-1 の Met335 はこの機能に必須である。また、Met335 は PP2Ac の Arg214 と水素結合しており、PME-1 と PP2Ac の結合に重要な役割を果たすと考えられ、Met335 をアスパラギン酸に置換した PME-1 M335D 変異体は PP2Ac との安定的な結合を維持できないと予測される。PME-1 の PP2Ac への安定的な結合は脱メチル化反応に必要であるかを検討するため、PME-1 WT (野生型)、S156A (脱メチル化活性を持たない変異体)、M335D のリコンビナントタンパク質を作製し、His-pull down assay を行うことで、PP2Ac との結合能を比較検討した (図 4-6)。PME-1 WT と比較して PME-1 S156A は PP2Ac との結合能が高く、PME-1 M335D は PP2Ac とほぼ結合できないことが明らかとなった。

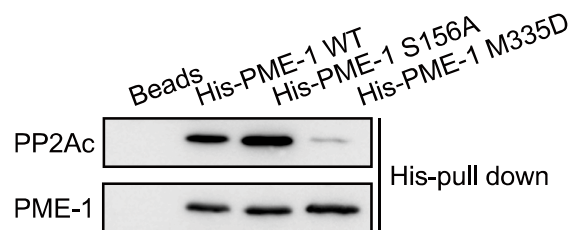


図 4-6 変異型 PME-1 の PP2Ac への結合能の解析

PME-1 WT、PME-1 S156A、PME-1 M335D のリコンビナントタンパク質と、PME-1 欠損細胞から抽出したタンパク質を混合し His-pull down assay を行い、western blotting により PP2Ac との結合を比較した。N=3。Beads はリコンビナントタンパク質を含まないネガティブコントロールを示す。

4-7 PME-1 の PP2Ac 結合能が脱メチル化反応に与える影響

PME-1 WT、S156A、M335D の脱メチル化活性を解析するため、各種リコンビナント PME-1 を PME-1 欠損 MEF のタンパク質抽出液と混合し、PP2Ac 脱メチル化レベルを経時的に測定した (図 4-7)。PME-1 M335D は PP2Ac への安定的な結合ができないにも関わらず、WT よりもゆるやかではあるが PP2Ac 脱メチル化活性を有することが明らかとなった。このことから、OA による PME-1 と PP2Ac の結合阻害だけでは、PME-1 による PP2Ac の脱メチル化反応の抑制には不十分であり、タンパク質抽出液中での PP2Ac の脱メチル化を防ぐためには、ABL127 による脱メチル化活性の直接的な阻害が必要であることが明らかとなった。

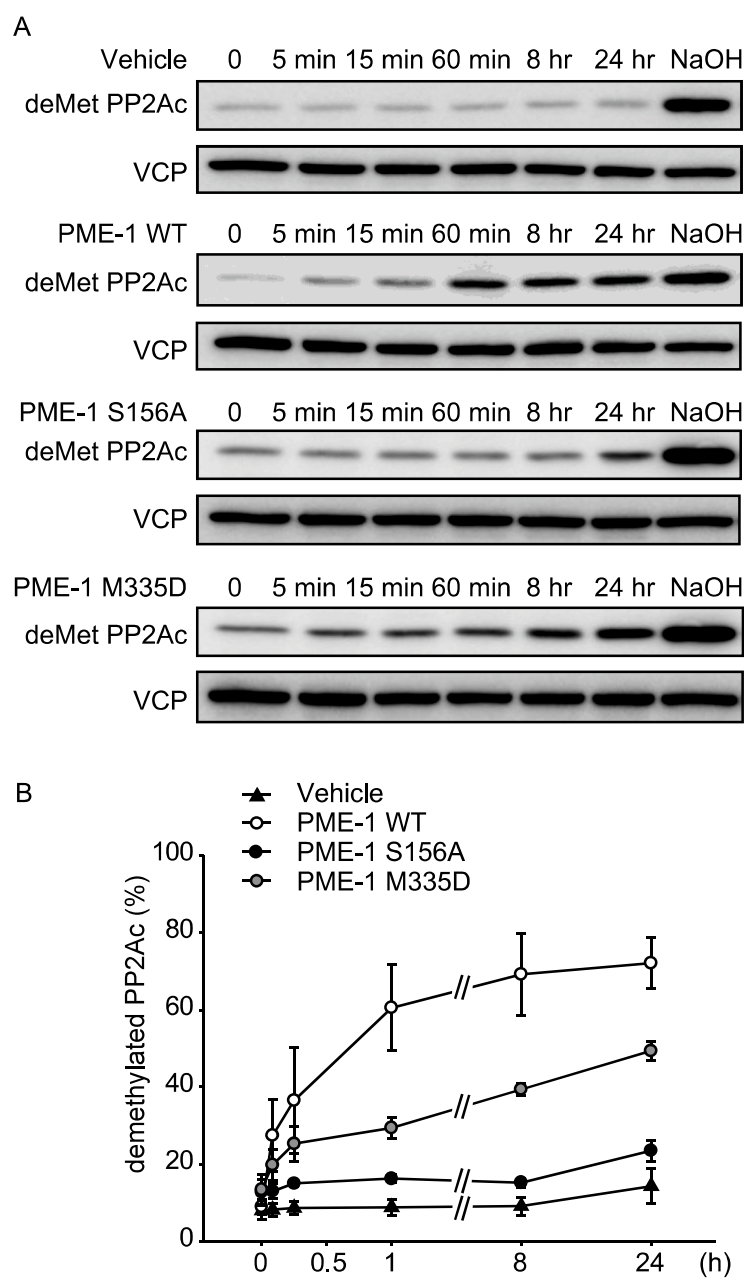


図 4-7 PME-1 の PP2Ac 結合能が脱メチル化反応に与える影響

(A-B) PME-1 欠損細胞のタンパク質抽出液と各種 PME-1 リコンビナントタンパク質およびコントロールとして溶媒の buffer (Vehicle) を混合し、30°C で 5 分、15 分、60 分、8 時間および 24 時間静置し、脱メチル化 PP2Ac を western blotting により比較した。グラフは NaOH 処置を 100% とした PP2Ac の脱メチル化レベルを示す。N=3。

4-8 PME-1 の PP2Ac 結合能が細胞内における PP2Ac 脱メチル化反応に与える影響

次に、レンチウイルスベクターを用いて PME-1 欠損細胞に PME-1 WT、S156A、M335D を安定発現させ、細胞内における各種 PME-1 変異体による PP2Ac 脱メチル化反応を解析した (図 4-8)。リコンビナントタンパク質を用いた結果と同様に、細胞内で発現させた場合においても、PME-1 M335D は PP2Ac の脱メチル化を誘導することが明らかとなった。また 3 章において認められた PME-1 欠損による PP2Ac 発現量の減少は、M335D によってレスキューされることが明らかとなり、M335D は細胞内においても脱メチル化活性を持つことが明らかとなった。

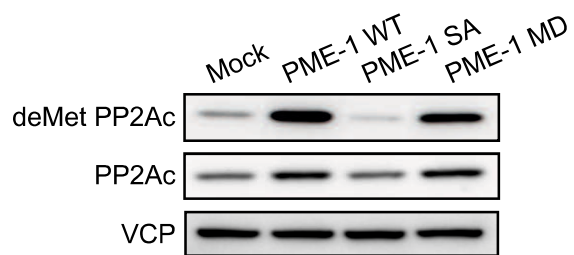


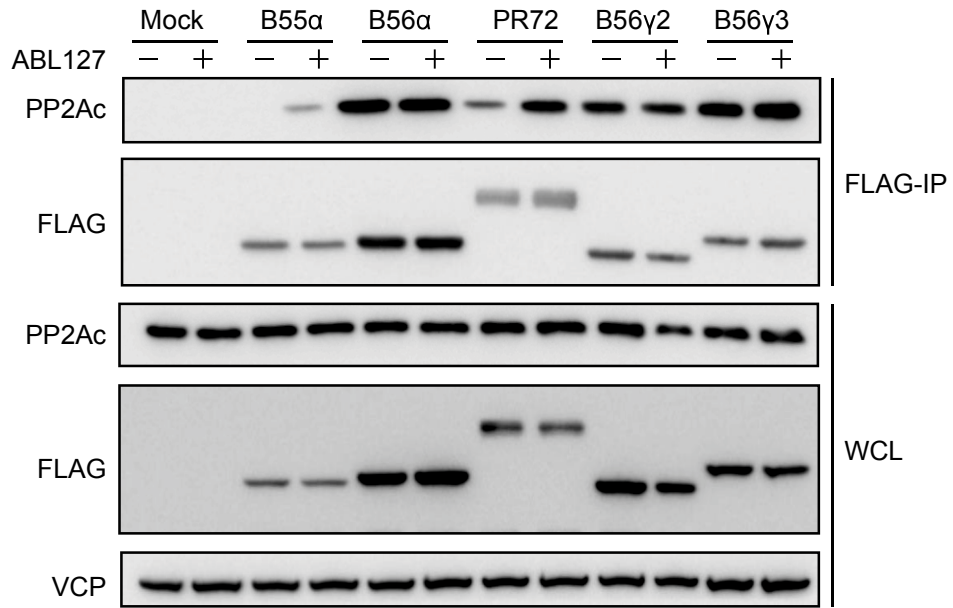
図 4-8 PME-1 の PP2Ac 結合能が細胞内における PP2Ac 脱メチル化反応に与える影響

レンチウイルスベクターを用いて PME-1 欠損細胞に empty vector (Mock)、PME-1 WT、S156A (SA)、M335D (MD) を安定発現させ、脱メチル化 PP2Ac を western blotting で検討した。N=3。

4-9 タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化が PP2A 複合体の構成に与える影響

免疫沈降法は、PP2Ac と B サブユニットとの結合を評価する上で一般的に用いられる手法である。一部の B サブユニットはメチル化レベルの変化により PP2A AC 二量体との結合性が変化する(52,85)。これは3章における免疫沈降法の結果でも再現された(図 3-10)。タンパク質抽出液中の PP2Ac は 4°C 条件下においても脱メチル化されることから、免疫沈降を行うタンパク質抽出液中で PP2A 複合体の構成が変化してしまう可能性が考えられる。この点を明らかにするため、FLAG タグを付加した B サブユニットを HEK293T 細胞に発現させ、FLAG M2 ビーズによる免疫沈降法を用いて、タンパク質抽出液中における ABL127 の有無が PP2A 複合体の構成に与える影響を検討した(図 4-9)。B56 α 、B56 γ 2、B56 γ 3 と PP2Ac の結合は ABL127 の有無で差は認められなかったが、B55 α 、PR72 と PP2Ac の結合はタンパク質抽出液中に ABL127 が存在しない場合は解離することが明らかとなった。

A



B

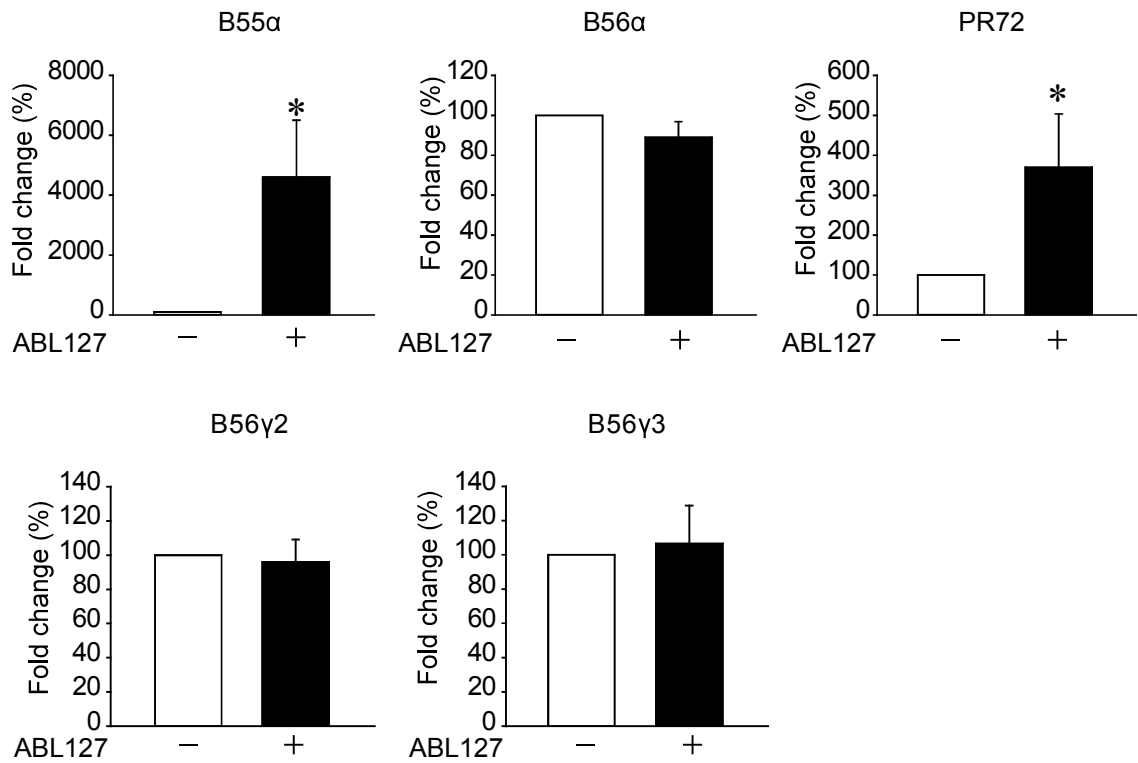


図 4-9 タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化が PP2A 複合体の構成に与える影響

HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した B55 α 、B56 α 、B56 γ 2、B56 γ 3、PR72 を発現させ、FLAG M2 ビーズで免疫沈降を行った。免疫沈降の際のタンパク質抽出液中の ABL127 の有無が PP2Ac との結合に与える影響を western blotting により解析した。(A) 代表例と (B) FLAG 発現量で補正し、ABL127 非処置を 100% として PP2Ac の結合を相対値で示した定量図。Mock はコントロールベクター、WCL は whole cell lysate を示す。N=4-7。*: $P < 0.05$ (ABL 非処置との比較)。

4-10 考察

4-10-1 Okadaic acid がタンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化を抑制できない原因に関する考察

100 nM の OA は PP2Ac の脱メチル化を効果的に抑制することが報告されている (25)。しかし、本研究において同濃度の OA は、タンパク質抽出液中の PP2Ac 脱メチル化をある程度抑制することはできたが、その作用は弱く、特に 30°C 条件下ではほとんど効果がなかった。過去の報告と本研究で矛盾した結果が得られた原因は明確ではないが、一つの可能性として測定系の違いが挙げられる。本研究ではタンパク質抽出液全体を使用しているが、過去の報告では免疫沈降で回収した PP2Ac と PME-1 を発現した大腸菌の細胞抽出液を用いている。免疫沈降で回収した PP2Ac には GST タグが付けられており、生体内での PP2Ac と PME-1 の結合性を正しく反映していない可能性も考えられる。すなわち、比較的結合が弱い PP2A 複合体として回収されていた場合には、OA による弱い結合抑制作用でも PME-1 の脱メチル化を阻害できた可能性が考えられる。また、哺乳類細胞と大腸菌では糖鎖修飾や翻訳後修飾が異なるため、PME-1 の有する脱メチル化活性自体が異なる可能性も存在する。実際に、細胞種や組織により PP2Ac のメチル化レベルには大きな違いが認められるため (data not shown)、今後 PME-1 の活性制御に重要な翻訳後修飾や活性化因子の探索を行うことで、これらの違いが明らかになると考えられる。

OA を添加することで PME-1 による PP2Ac の脱メチル化を阻害する手法は、

PP2Ac の酵素活性部位が PME-1 の安定な結合に必要であり、OA がこの酵素活性部位のポケットを塞ぐことで競合的に結合が阻害されるとする仮説に基づいている (24)。構造学的な研究から、PME-1 は PP2Ac の酵素活性部位から 2 価の金属イオンを追い出す機能を持ち、この機能が PP2Ac と PME-1 の安定的な結合に寄与していると考えられている (79)。PME-1 の M335 はこの機能に重要な役割を持ち、また PP2Ac との水素結合にも関与しているため、この部位に変異が入ると 2 価の金属イオンの追い出しができず PP2Ac との持続的な結合能を失うと考えられる。そのため、PME-1 M335D は PP2Ac との結合が弱いことが予想されたが、この点は本研究において証明された (図 4-6)。リコンビナントタンパク質とタンパク質抽出液を用いた解析から、PME-1 と PP2Ac の相互作用の阻害は、酵素反応の遅延はもたらず、脱メチル化反応の停止には至らないことが明らかになった。また、PME-1 欠損細胞に PME-1 M335D を発現させると、PP2Ac の脱メチル化とタンパク質発現量の回復が観察された。3 章で明らかにした通り、PME-1 欠損細胞における PP2Ac 発現量の減少は PME-1 の脱メチル化活性に依存していることから、細胞内においても M335D は活性を持つと考えられる。これらの結果から、OA による PME-1 と PP2Ac の結合阻害だけでは、PP2Ac 脱メチル化を阻害するには不十分であり、PME-1 脱メチル化活性の直接的な抑制が必要であると考えられる。

4-10-2 PP2Ac メチル化レベルが PP2A 複合体に与える影響に関する考察

PP2Ac のメチル化は、PP2A 複合体の構成、特に B55 ファミリーの AC コア二量体への結合に重要であることが報告されており(52,54,85,100,101)、これは3章における免疫沈降法の結果からも再現された(図 3-10)。今回得られた、タンパク質抽出液中に ABL127 を添加して PP2Ac 脱メチル化を抑制することで、免疫沈降法における PP2Ac と B55 α および PR72 との結合が増強するという知見は、B55 α 、PR72 を含む PP2A 複合体の維持にメチル化が重要であるという過去の報告を裏付ける。一方、過去の報告では *in vitro* 条件下で昆虫細胞から作製したリコンビナント PP2Ac とリコンビナント B55 α の結合にメチル化が必要ないとの報告も存在するが、本研究では哺乳類細胞の細胞抽出液を用いており、両者にはおそらく PP2A 複合体の立体構造の違いや、他のタンパク質との相互作用の有無に違いがあると推測される。B55 α を含む PP2A 複合体の結晶構造解析の報告において、*in vitro* 条件下の PP2Ac の C 末端 14 アミノ酸は結晶中で不安定であることから複合体の形成に不要な部分であると推測しているが、同時に、これはあくまで *in vitro* 条件下であり、PP2Ac メチル化が細胞内で重要な役割を示すという数多くの報告を否定するものではないとしている(102)。

また本研究の結果から、PP2Ac と PR72 の結合は ABL127 を用いない場合でも検出可能であり、PR72 は B55 α ほど PP2Ac メチル化が結合に必要では無いと考えられる。このことは、野生型 PP2Ac とメチル化されない変異型 PP2Ac の PR72 との結合を GST pull-down assay により検討し、PR72 を含む PP2A 複合体はメチル化を必要としないとした過去の報告と一致する(103)。以上より、B55 ファミ

リーや PR72 ファミリーの B サブユニットと PP2Ac の結合を正確に評価するためには、タンパク質抽出液中への ABL127 の添加が不可欠であると考えられる。

一方、B56 ファミリーと PP2Ac の結合には、ABL127 の有無はほとんど影響が認められなかった。これらの結果は、B56 ファミリーと PP2Ac の結合はメチル化にほとんど影響されないという過去の報告と一致する (103-106)。しかし、B56 ファミリーと AC コア二量体の結合に PP2Ac メチル化が関与していないのではなく、B56 ファミリーを含む PP2A 複合体が PME-1 による脱メチル化に抵抗性を持つ可能性も考えられる。その理由として、タンパク質抽出液を用いた PP2Ac 脱メチル化反応において、十分な反応条件においても PP2Ac 脱メチル化レベルは 100%に達しないことがあげられる (図 4-1)。これは、一部の PP2A 複合体が PME-1 による脱メチル化に対して抵抗性を持つ可能性を示している。この仮説は、FLAG タグを付加した各種 B サブユニットを発現した細胞から ABL127 を添加したタンパク質抽出液を用いて免疫沈降を行い、各種 B サブユニットに結合した PP2Ac をリコンビナント PME-1 で処置し、脱メチル化 PP2Ac を検討することで検証できるだろう。

第5章 総合討論

5-1 獣医領域における SET 標的薬の臨床応用への課題

最近の研究から、ヒト医療においては様々ながんで SET 標的薬が有効であることが明らかになってきた (44–51)。また、イヌにおける SET 阻害の効果も一部のがんで明らかになってきている (63–65)。一方、SET 標的薬の効果は必ずしも SET タンパク質の発現量と相関しておらず、未だ SET 標的薬の適用可能性を測るバイオマーカーは存在しない。この原因の1つとして、イヌにおいては、本研究により明らかにしたイヌ特異的な SET アイソフォームの存在が考えられる。しかし、各アイソフォーム間の相互作用や詳細な機能に関しては検討されていないため、今後さらなる分子レベルでの解析が必要である。また、イヌ乳腺腫瘍では、臨床データを基にしてステージの進行にともなう SET タンパク質発現の上昇が報告されているが (65)、SET 発現量と予後の相関関係を解析した研究はなされていないことから、臨床サンプルを用いた観察的研究が重要である。

本研究で明らかになったように、ヒトでがんの標的としての有用性が指摘されているタンパク質が、イヌにおいて必ずしも同じ分子機構で機能しているとは限らず、今後比較生物学的な観点から獣医腫瘍学を研究することが重要である。PP2Ac 遺伝子 (*PPP2CA*、*PPP2CB*) は動物種間で非常に高く保存されているのに対し、PP2A 阻害タンパク質がこのように異なるアイソフォームを持つことは、PP2A の活性制御機構が進化の過程で多様化したとも考えられる。このような生物種間における PP2A 活性制御機構を比較することを通して、新たな PP2A 制御機構の発見が期待される。

5-2 PME-1 発現を抑制した際に現れる表現型の細胞種差

PP2Ac Leu309 のメチル化は PP2A 複合体の構成に大きな影響を及ぼし、異なる PP2A (B サブユニット) 複合体は、異なる標的タンパク質を脱リン酸化する (24-26)。つまり、PP2Ac Leu309 に対する LCMT-1 活性と PME-1 活性のバランスの変化は、PP2A の機能にダイナミックな影響を及ぼすと考えられる。本研究の 3 章で認められた、PME-1 発現抑制による PP2Ac 発現量に与える影響の違いは、細胞種によって脱リン酸化が亢進される標的タンパク質が異なることに起因すると考えられる。

グリオーマで PME-1 発現を抑制すると、PP2A の標的である ERK1/2 および Akt の脱リン酸化が引き起こされることが報告されている (80)。同様の結果は、PME-1 KO MEF 細胞を用いた本研究の 3 章においても得られた (図 3-9)。一方、結腸がん細胞株において PME-1 発現を抑制しても、細胞生存率の低下や、Akt や ERK1/2 のリン酸化レベルの低下は認められない (107)。これは、結腸がん患者の 90%以上 (N=24) でプロモーターのメチル化による *PPP2R2B* (B55β) 遺伝子のエピジェネティックな発現抑制が認められ、約 42% (N=21) で B55α のタンパク質発現量の低下が認められるなど、B サブユニットの異常が原因であると推測される。3 章で明らかにしたように、PP2A 複合体のうち少なくとも B55α と PR72 と PP2Ac の結合には PP2Ac メチル化が重要である。しかし細胞内には 20 種類以上の B サブユニットが存在しており、これらすべてに対して PP2Ac のメチル化レベルが与える影響についての検討がなされているわけではないことから、PME-1 発現抑制による細胞種間の表現型の違いの理解には、より詳細な

B サブユニットの制御メカニズムの解明が必須である。

5-3 PME-1 の機能調節機構

3章において、PME-1 の PP2Ac 結合能の阻害が、PME-1 の脱メチル化活性の阻害には十分ではないことが明らかになった。つまり、細胞内における PME-1 の機能を理解する上で、PP2Ac の脱メチル化酵素と PP2A 阻害タンパク質という 2つの機能が、どのようにして細胞内で正しく制御されているのかを理解する必要があるが、この制御機構に関しては全く明らかとなっていない。PME-1 欠損による PP2Ac タンパク質発現量の低下に関しては、PME-1 の脱メチル化酵素としての機能が重要であることを第3章で示したが、第5章2節で言及した PME-1 発現抑制時の表現型の違いを理解する際には、PME-1 のいずれの機能が重要かに着目することが重要である。この点を明らかにするためには、PME-1 と PP2Ac の結合を特異的に阻害できる化合物を同定し、既存の PME-1 脱メチル化阻害剤と PP2Ac/PME-1 結合阻害剤のいずれが PME-1 発現抑制の効果を反映するかを解析するというアプローチが有効である。

また、PME-1 自身の制御機構に着目すると、PME-1 もまた翻訳後修飾を受けて制御されていることが明らかになってきており、checkpoint kinase 1 (Chk1)、salt-inducible kinase-1 (SIK1)、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI) によってリン酸化を受ける可能性が指摘されている (108–110)。ホスホプロテオミクススクリーニングでは、Chk1 による PME-1 Ser15 のリン酸化の可能性が報告された (108)。リン酸化サイトは明らかになっていないが、SIK1 による PME-1 のリン酸化は、PME-1 の PP2Ac からの解離を促進するとの報告がある (109)。CaMKI により PME-1 Ser15 のリン酸化は報告されているが、その機能に関して

は明らかとなっていない (110)。PME-1 の翻訳後修飾による機能調節には不明な点が多く存在するが、PME-1 の2つの機能制御の理解には、この点の解明が必要である。方法の1つとして、PME-1 の脱メチル化活性の高い細胞株と低い細胞株を用いて、PME-1 のリン酸化プロファイリング解析を質量分析法により行うことで、PME-1 の細胞内における脱メチル化活性に重要なリン酸化サイトの同定の解析が可能である。これは第4章で PP2Ac のメチル化レベルの評価法が確立されたことによりはじめて可能となった解析であり、今後、細胞株間に限らず、組織間や臨床サンプルを用いた個体間の解析を通して、PME-1 の機能調節機構の詳細な解明が期待される。

5-4 PME-1 阻害剤の抗がん効果

これまでに PME-1 脱メチル化活性阻害剤として、本研究で使用した aza- β -lactum 阻害剤 ABL127 と (78)、sulfonyl acrylonitrile 阻害剤である AMZ30 の (111)、2つの異なるファミリーの阻害剤が報告されている。どちらの阻害剤も PME-1 の活性部位に共有結合することで活性を阻害するが、ABL127 ($IC_{50}=10$ nM) の方が AMZ30 ($IC_{50}=500$ nM) よりも強力な PME-1 メチルエステラーゼ阻害剤である (78,111)。ABL127 (50 nM) もしくは AMZ30 (25 μ M) の処置による PME-1 阻害は、培養細胞レベルでの子宮内膜癌細胞の増殖と遊走を抑制するが、免疫不全マウスへの腫瘍細胞移植モデルでは ABL127 (5 mg/kg) の腫瘍内投与により腫瘍の成長は抑制されなかった (112)。一方、子宮内膜癌の PME-1 発現を siRNA または shRNA により抑制すると、培養細胞レベルだけでなく移植モデルでもがん細胞の成長が抑制された (59,112)。PME-1 阻害剤のメチルエステラーゼ阻害効果が十分であるにもかかわらず、腫瘍の成長が抑制されないことから、腫瘍においては PP2A 阻害タンパク質としての機能が重要であるのかもしれない。本研究では、ABL127 も PP2Ac と PME-1 の結合を *in vitro* 条件で解離させる結果が得られたが、細胞内あるいは腫瘍組織で PME-1 と PP2Ac を解離させることができるかは明らかになっていない。5章3節で述べたような PME-1 と PP2Ac への結合を特異的に阻害する化合物が同定されれば、がんにおいて PME-1 を標的とした抗がん戦略の有用性を実証できると考えられたため、今後の発見が期待される。

5-5 脱リン酸化酵素 PP2A を標的とした抗がん戦略の展望

脱リン酸化酵素 PP2A は、がん細胞において活性化されたリン酸化カスケードを抑制するがん抑制因子として働いており、PP2A の活性化は抗がん効果を示す。本研究では、PP2A 阻害タンパク質 SET と PME-1 に着目し、PP2A 活性化の基盤となる PP2A 制御機構の一端を明らかにした。

SET や PME-1 を標的とした抗がん効果にはがん種特異性が存在しており、この原因の 1 つとして、これら阻害タンパク質を標的とした際に活性化する PP2A 複合体の種類が細胞間で異なる可能性があげられる。腫瘍ウイルス SV40 の small t (ST) 抗原は、PP2A 活性を抑制することで細胞の形質転換を誘導するが、この形質転換能は ST 抗原を発現させる代わりに B56 γ の発現を抑制するだけで再現できる。したがって、腫瘍の発生において重要な PP2A 複合体は、B56 ファミリーなど特定の B サブユニットに偏っていると考えられる (9)。がんの発生のみならず、がんの成長や悪性の過程においても、優位に抑制される B サブユニットが異なる可能性も考えられ、今後は、特定の B サブユニットを含む PP2A 複合体を特異的に活性化する戦略が必要となる。本研究の第 4 章では、PP2Ac と B サブユニットの結合を正確に評価する方法を示しており、今後 PP2A 制御のより詳細な分子機構解明に繋がる。

現在、PP2A の活性化により抗がん作用を示す可能性が報告されている化合物が複数存在するが、その作用機序の詳細は未解明である。Forskolin は、急性骨髄性白血病において Akt と ERK1/2 のリン酸化レベルを低下させることで抗がん効果を示す (113)。三環系抗うつ薬である perphenazine は、A サブユニットに結

合することで、T 細胞性急性リンパ芽球性白血病とイヌ T 細胞性白血病において抗がん効果を示す (114,115)。また、三環系抗うつ薬をリード化合物として合成された新規低分子化合物 SMAP は、KRAS 変異型肺癌細胞において抗がん効果を示すことが報告された (116)。さらに、carnosic acid は、前立腺がんにおいて PP2A 活性を上昇させ Akt/IKK/NFκB 経路を抑制することで抗がん効果を示す (117)。これらの PP2A 活性化剤に関する報告のほとんどは、基質のリン酸化レベルの変化を PP2A 活性化の指標としているが、今後、第 4 章で示した手法を用いて、PP2Ac のメチル化レベルへの影響および PP2Ac と B サブユニットへの結合に与える影響を検討することで、PP2A 活性化の詳細な分子機構の解明が期待される。

以上より、本研究で得られた数々の知見は PP2A 活性化の分子機構の理解に重要であり、脱リン酸化酵素 PP2A を標的とした新規抗がん剤開発の実現に貢献するものである。

第6章 実験材料および実験方法

6-1 動物の飼育

PME-1 ヘテロノックアウトマウス (+/-) は Scrips 研究所の Dr. Cravatt より
供与された。動物の飼育ならびに使用にあたっては、山口大学の定める「国立
大学法人山口大学における動物使用に関する規則」に基づいて適正な管理のも
と行った。

6-2 Genotyping による遺伝型の判定

Genotyping には胎児の尾部および4週齢のマウスの耳より採取した組織を
用いた。EZNA Tissue DNA Kit (Omega) を用いて、組織を溶解させた後、遠心
して上清を滅菌したチューブに移し、DNA を抽出した。DNA 量は Nano Drop
(ND-1000、Thermo Fisher Scientific) で定量し、DNA サンプル (10 - 50 ng) を
用いて PCR を行った。

使用したプライマーは以下の通りである。

PME-1 (+/+) : forward : GGTGTCTTCCTCCAGCACTC

reverse : CCATACCAGGGGACCTCCTAC

PME-1 (-/-) : forward : GTCACAGGGGCAAACTGTC

reverse : GCTCCCGATTCGCAGCGCATC

PCR 反応は、熱変性 (94°C、30 秒間)、アニーリング (60°C、30 秒間)、伸長
(72°C、45 秒間) を 40 サイクルで行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用
いて電気泳動した後、ethidium bromide で染色し、ゲル撮影装置 (DigiDog-It System、

UVP) で可視化した。

6-3 細胞の単離および培養法

6-3-1 MEF 細胞の単離

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) の単離には 12.5-14.5 日齢の胎児を使用した。頭部、内臓を除いた体組織を、メス刃を用いて細断した後に 10 cm プレートで培養し、遊走してプレートに接着したものを継代して、MEF 細胞として使用した。

6-3-2 MEF 細胞の不死化

Puromycin 耐性遺伝子と SV40 large T 抗原 (LT) を発現し、SV40 small t 抗原 (ST) を発現しないレンチウイルスプラスミドである EGFP-EF1 α -Large T-IRES-Puro (Addgene ID 18922) を用いて、6-4 に記載する方法でレンチウイルスを初代培養 MEF 細胞に感染させ、puromycin (2 μ g/ml) で 6 日間選別することで、不死化した MEF 細胞を作製した。不死化した MEF 細胞は、図 4-5、図 4-6、図 4-7 における PME-1 欠損細胞タンパク質抽出液として使用した。

6-3-3 細胞培養法

レンチウイルス産生用細胞株 Lenti-X HEK293T (Takara Bio)、ヒト腎由来細胞株 HEK293、ヒト肺癌細胞株 A549、ヒト結腸癌細胞株 HT29、イヌ腎臓尿細管上皮細胞株 MDCK、マウス胎児線維芽細胞 MEF は 1% antibiotic-antimycotic (AA、Thermo Scientific)、10% fetal bovine serum (FBS、SIGMA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、SIGMA) を、イヌメラノーマ細胞株 CMeC-1、CMeC-2、KMeC、LMeC、イヌリンパ腫細胞株 Ema、イヌ末梢血単核細胞 PBMC は 1% AA、10% FBS を含む RPMI-1640 medium (SIGMA) を培地として用い、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。細胞の継代は培地を除去して HEPES buffered saline (HBS: 25 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4) で 1 回洗浄した後、trypsin/EDTA (0.05% trypsin、0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有 HBS) を加えてピペッティングすることにより細胞を剥がし行った。なお、培養に必要な器具は全て滅菌して用いた。

6-4 プラスミド DNA およびレンチウイルスベクターの作製

6-4-1 プラスミドの作製

pLVSIN 3×FLAG イヌ SET α 、SET β 、SET γ 、SET δ はイヌ胸腺 cDNA を鋳型として、pLVSIN 3×FLAG PME-1 WT、PME-1 S156A は pET-45b-PME-1 WT、S156A プラスミド (78)を鋳型として、pLVSIN 3×FLAG PP2A B55 α 、B56 α 3、B56 γ 2、B56 γ 3、

PR72 はヒト肝臓 cDNA を鋳型として PCR を用いて増幅し、pLVSIN-EF1 α -IRES-ZsGreen1 ベクターに組み込んだ。pLVTetOn 3 \times FLAG PP2A α WT と K41R は pKMyc-PP2A α プラスミド (118) と pBabe HA-PP2A α K41R プラスミド (Dr. Egon Ogris より供与) から PCR を用いて増幅し、pLVTetOn ベクターに組み込んだ。pLVSIN 3 \times FLAG PME-1 M335D は pLVSIN 3 \times FLAG-PME-1 WT を鋳型として PCR を用いて増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いて作製した。pHEX1-PME-1 WT、S156A、M335D は pLVSIN 3 \times FLAG-PME-1 をそれぞれ鋳型として PCR を用いて増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて作製した。

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 T4 DNA ligase (Takara Bio) を用いてライゲーションすることで作製した。shRNA の標的配列は以下の通りである。

Nontarget shRNA (shNT) : 5'-CAACAAGATGAGAGCACCA-3'

PME-1 targeting shRNA (shPME-1) : 5'-GGCGATACATCTGAGTTCA-3'

6-4-2 プラスミドのトランスフォーメーションおよびミニプレップ

大腸菌 (XL10GOLD、Stratagene) 10 μ l にプラスミドを 0.5 μ l 加え、氷上で 30 分間静置した。ドライバス (Dry Bath Incubator、Major Science) を用いて 42°C で 45 秒間ヒートショックを加えた後、氷上で 2 分間静置し、100 μ l の LB Broth を加え、37°C で 1 時間振とう培養 (BioShaker BR-22FP、Taitec) した。その後、

LB agar (100 µg/ml ampicillin 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、ガラス管に入った LB Broth (100 µg/ml ampicillin 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 4000 rpm で 10 分間遠心 (卓上小型遠心機 2420、KUBOTA) して、上清を除いた後に、Plasmid Mini Kit I (Omega) を使用してプラスミドを抽出した。

6-4-3 プラスミドのトランスフェクション

12 穴プレートに HEK293T 細胞を 2×10^5 cell/well で播き一晩培養した。200 µl の Opti-MEM にプラスミド 1.0 µg および Polyethylenimine“MAX” (PEI、Polysciences) を 2.5 µl 混合した後に 30 分静置し、1 ml の培地 (10% FBS・1% AA 含有 DMEM) に加え 24 時間培養し使用した。

6-4-4 レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6 穴プレートに HEK293T 細胞を 4×10^5 cell/well で播き一晩培養した。各種レンチウイルスベクタープラスミド (1 µg)、packaging plasmid (psPAX2 ; 0.77 µg)、VSVG coat protein plasmid (pDM2.G ; 0.43 µg) と 2.5 µl の PEI を 1 ml の Opti-MEM に混合した後に 30 分静置した。その後、1.5 ml の培地 (10%FBS・1%AA 含有 DMEM) に加え、8 時間培養したのちに除去し、1.5 ml の培地に交換した。40 時間後、ウイルスを含む培地を 0.22 µm のフィルターでろ過し、レンチウイルスベクターを得た。その後細胞を、ウイルスベクターを含む培地で 12 時間処置し、

目的のタンパク質および shRNA を恒常的に発現する細胞を作出した。

6-5 リコンビナントタンパク質の精製

氷上で解凍した大腸菌 (BL21 DE3 Codon Plus RP、Agilent Technologies) 50 ul に pHEX1-PME-1 WT、S156A、M335D を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、ガラス管に入った LB Broth (100 µg/ml ampicillin、35 µg/ml chloramphenicol 添加) に大腸菌を加え、37°C、250 rpm で一晩振とう培養した。翌日、200 ml の LB Broth (100 µg/ml ampicillin、35 µg/ml chloramphenicol 添加) の入った 1 L 三角フラスコに培養した大腸菌を加え、37°C、200 rpm で 3 時間振とうした。その後、1 mM IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) を添加してタンパク質の発現誘導を行い、37°C、200 rpm で 1 時間振とう培養した。振とう後に大腸菌を 3000 rpm、15 分で遠心集菌し、recombinant buffer A (20 mM Tris HCl pH 7.5、150 mM NaCl) で 2 回洗浄したのちに recombinant buffer B (20 mM Tris HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.1 mM EGTA、5 mM benzamidine、1 mM PMSF、0.1% Tween 20) 10 ml と lysozyme で菌体を溶解した。その後、氷上で超音波破碎機を用いてソニケーションを行い、4°C、12000 rpm で 10 分遠心 (テーブルトップマイクロ冷却遠心機、KUBOTA) して上清を HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific) と混合し、4°C、30 分反応させたのちに imidazole で His タグ融合タンパク質を Ni-NTA ビーズから溶出してタンパク質を精製した。その後、PD-10 (GE Healthcare) を用いて recombinant storage buffer (20 mM Tris HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.01% Tween 20) に溶液を置換した。精製したリコンビナントタンパク質はポリアクリルアミド

電気泳動後に coomassie brilliant blue (CBB) 染色を行うことで濃度を決定した。CBB 染色には、CBB 染色液 (0.1% coomassie brilliant blue、50% methanol、10% acetic acid) および CBB 脱色液 (7.5% acetic acid、5% methanol) を用いた。

6-6 PP2A 活性の測定

6-6-1 細胞全体 (タンパク質抽出液) の PP2A 活性測定法

細胞全体の 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。MEF 細胞に脱リン酸化活性測定用 lysate buffer (50 mM MOPS pH7.4、0.1% NP-40、0.1 mM EGTA、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えてタンパク質を抽出した。ネガティブコントロールとして、細胞溶解液を 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 (K-R-pT-I-R-R) を含む reaction buffer (50 mM MOPS pH7.4、24 mM MgCl₂、2 mM MnCl₂、0.03% 2-mercaptoethanol、2.9% glycerol) 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、マラカイトグリーンアッセイを用いて反応液中のリン酸塩量を 620 nm の吸光度を測定することで定量した。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。

6-6-2 免疫沈降法を用いた PP2A 活性測定法

免疫沈降法を用いた PP2A 活性の測定には DuoSET IC PP2A activity kit (R&D) の基質ペプチド配列部分を改変して用いた。MEF 細胞に DuoSET IC lysate buffer

(50 mM Tris pH 7.5、10 mM MgCl₂、0.02% Brij-35、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えてタンパク質を抽出した。キット付属の active PP2Ac 抗体を 96 穴プレートに加え、一晩インキュベートして吸着させた。抗体を PBS-T (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.76 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄、0.05% Tween 20、pH 7.4) で洗い、blocking buffer (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.76 mM KH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄、1% BSA、0.05% sodium azide、pH 7.4) で 30 分ブロッキングを行った。PBS-T で洗浄後にタンパク質抽出サンプルを加えて 4°C で 3 時間インキュベートし免疫沈降を行った。サンプルを IC Diluent #10 buffer (50 mM Tris pH 7.5、10 mM MgCl₂、Brij-35 0.02%、HCl で pH 7.5 に調整) で洗浄し、リン酸化ペプチド (K-R-pT-I-R-R) を含む IC Diluent #17 buffer (50 mM HEPES pH 7.5、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、120 mM NaCl、0.5% NP-40) と混合し、37°C で 30 分、100 rpm で振とうした。その後、キット付属のマラカイトグリーンアッセイにより、反応液中のリン酸塩量を 620 nm の吸光度を測定することで定量した。

6-7 Western blotting によるタンパク質発現量測定

6-7-1 タンパク質抽出

培地を除去した細胞を HBS で洗浄し、standard lysate buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞溶解液を数分間静置した後に、4°C、15000 rpm で 15

分間遠心し、上清をタンパク質抽出液として使用した。

6-7-2 Western blotting

得られたサンプルのタンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて Lowry 法により測定した。タンパク質サンプル 10 - 40 μg を SDS ポリアクリルアミドゲル (8 - 12%) で泳動して分離した後に、転写装置 (Bio-Rad) を用いて PVDF 膜 (Bio-Rad) もしくはニトロセルロース膜 (wako) に転写した。PVDF 膜もしくはニトロセルロース膜を 0.5% もしくは 3% スキムミルク含有 TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) により室温で 30 - 60 分間ブロッキングした後に、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 Pro western blotting Detection Reagent (PerkinElmer) で発光させ LAS3000mini (FUJIFILM) で観察した。イメージスキャナーで取り込んだバンドは、ImageJ (National Institutes of Health) を用いて測定し数値化した。ローディングコントロールには VCP および Tubulin α 抗体を用いた。

6-8 免疫沈降法および pull down assay

6-8-1 FLAG M2 beads を用いた免疫沈降法

培養細胞の培地を除去した後に、氷上で冷却した HBS で一回洗浄し、Triton

X-100 含有 lysate buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) もしくは CHAPS lysate buffer (40 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、2 mM EDTA、10 mM disodium glycerophosphate、0.3% CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えて可溶化した。得られた細胞溶解液を氷上で5分間静置した後に4°C、15000 rpm 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。Wash buffer (Triton X-100 含有 wash buffer : 50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100。CHAPS wash buffer : 40 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、2 mM EDTA、10 mM disodium glycerophosphate、0.3% CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate。NP-40 含有 wash buffer : 50 mM MOPS-NaOH pH 7.4、150 mM NaCl、5 mM EGTA、1% NP-40) を用いて洗浄した FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) をサンプルに加え、4°C で2-3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 (50 mM Tris-HCl pH 6.8、0.4% SDS、6% β-mercaptoethanol、2% Glycerol) もしくは FLAG peptide (SIGMA) で溶出し、western blotting により検出した。

6-8-2 PP2Ac 抗体を用いた免疫沈降法

MEF 細胞の培地を除去した後に、氷上で冷却した HBS で一回洗浄し、Triton X-100 含有 lysate buffer を加えて可溶化した。得られた細胞溶解液を氷上で5分

間静置した後に 4°C、15000 rpm で 15 分間遠心し、上清を採取してタンパク質抽出液として使用した。NP-40 含有 wash buffer を用いて洗浄した磁気ビーズ Dynabeads protein G (Invitrogen) と PP2Ac 抗体 (Millipore、05-421) をサンプルに加え、4°C で 3 時間反応させた。マグネットを使用して磁気ビーズを洗浄後、結合タンパク質を SDS sample buffer で溶出し、western blotting により結合した $\alpha 4$ を検出した。

6-8-3 His pull down assay

PME-1 欠損不死化 MEF 細胞を培養し、培地を除去した後に氷上で冷却した HBS で 1 回洗浄して EDTA free CHAPS lysate buffer (40 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、10 mM disodium glycerophosphate、0.3% CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えて可溶化した。得られた細胞溶解液を氷上で 5 分間静置した後に 4°C、15000 rpm で 15 分間遠心し、上清を採取してタンパク質抽出液として使用した。EDTA free CHAPS wash buffer (40 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、10 mM disodium glycerophosphate、0.3% CHAPS、10 mM sodium pyrophosphate) を用いて洗浄した HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific) にリコンビナント His-PME-1 を加え、4°C で 2 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 で溶出し、western blotting によりリコンビナント PME-1 に結合した PP2Ac を検出した。

6-9 免疫染色法

細胞を microscope cover glass (Fisherbrand) 上に播き、1 日培養した。PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.76 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) で洗浄後、4% paraformaldehyde (Wako) を用いて室温で 20 分間固定し、PBS で洗浄した。0.05% Triton X-100 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、3% スキムミルク含有 PBS を用いて室温で 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 PBS で希釈し、4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、遮光して二次抗体を 60 分間反応させた。標本は aqueous permanent mounting medium (Diagnostic BioSystems) 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。

6-10 Real-time PCR 法

TRIzol Reagents (Invitrogen) を用いて MEF 細胞の RNA を抽出し、RNA 0.5 μg を QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて逆転写した。合成された cDNA を QuantiTect SYBR Green I Kit (Qiagen) および StepOne Plus (Applied Biosystems) を用いて PCR を行った。PCR 反応は、熱変性 (94°C、15 秒間)、アニーリング (60°C、30 秒間)、伸長 (72°C、30 秒間) を 45 サイクルまで行った。PP2Ac 発現量は GAPDH により規準化し、GAPDH と比較した相対値は comparative Ct (2^{- (ΔCt-Cc)}) method を用いて表した。使用したプライマーは表 1 にまとめた。

表 1 Real-time PCR に使用したプライマー

プライマー		配列
PP2A α	forward	CCTCTGCGAGAAGGCTAAAG
	reverse	GCCCATGTACATCTCCACAC
PP2A β	forward	CGAGTGTAAGCAGCTGAACG
	reverse	ATTCCTTAGCCTTCTCGCA
GAPDH	forward	AGGTTGTCTCCTCTGACTTC
	reverse	TACCAGGAAATGAGCTTGAC

6-11 細胞増殖能と細胞生存率の測定

細胞増殖能および細胞生存率の測定には Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いた。96 穴プレートに MEF 細胞を 1.0×10^4 cell/well で播き、翌日から細胞増殖率を 450 nm の吸光度を測定することで定量した。

6-12 統計処理

実験成績は、平均±標準誤差で示した。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 test を行い、危険率 (*P*) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

6-13 使用抗体リスト

使用した抗体は表2にまとめた。

表2 使用抗体リスト

抗体	メーカー	カタログナンバー
SET	abcam	ab97596
SET	abcam	ab1183
SET	Bioss	bs-5943R
PME-1	Life Span	LS-C26111
PME-1	Santa Cruz	sc-25278
PP2Ac	Millipore	07-324
PP2Ac (IP用)	Millipore	05-421
deMet PP2Ac	Millipore	05-577
deMet PP2Ac	Santa Cruz	sc-13601
PP2A A	Santa Cruz	sc-6112
PP4c	Bethyl	A300-835A
PP6c	Dr.David Brautiganより供与	
α 4	Dr.David Brautiganより供与	
Ubiquitin	Life Sensors	VU-1
p-ERK 1/2 (T202/Y204)	Cell Signaling	9216
ERK 1/2	Cell Signaling	9101
p-Akt (T308)	Cell Signaling	13038
Akt	Cell Signaling	2920
FLAG	SIGMA	F7425
Tubulin α	Thermo Scientific	RB-9281-P0
VCP	Gene Tex	GTX113030

引用文献

1. Moorhead GBG, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemée A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):234–44.
2. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 2006 Nov 3;127(3):635–48.
3. Brautigam DL. Protein Ser/Thr Phosphatases : The Ugly Ducklings of Cell Signaling. *FEBS J.* 2012 Apr 21;
4. Slupe AM, Merrill RA, Strack S. Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Res.* 2011 Jan;2011:398751.
5. Zhang Q, Claret FX. Phosphatases: the new brakes for cancer development? *Enzyme Res.* 2012 Jan;2012:659649.
6. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 2001 Feb 1;353(Pt 3):417–39.
7. Sents W, Ivanova E, Lambrecht C, Haesen D, Janssens V. The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J.* 2013 Jan;280(2):644–61.
8. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 2005;22(8):1942–50.
9. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell

transformation. *Cancer Cell*. 2004 Feb 1;5(2):127–36.

10. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 2008;14(4):152–60.
11. Trotta R, Ciarlariello D, Dal Col J, Allard J, Neviani P, Santhanam R, et al. The PP2A inhibitor SET regulates natural killer cell IFN-gamma production. *J Exp Med*. 2007;204(10):2397–405.
12. Al Murrani SW, Woodgett JR, Damuni Z. Expression of I2PP2A, an inhibitor of protein phosphatase 2A, induces c- Jun and AP-1 activity. *BiochemJ*. 1999;341:293–8.
13. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003;112(5):659–72.
14. Härmälä-Braskén AS, Mikhailov A, Söderström TS, Meinander A, Holmström TH, Damuni Z, et al. Type-2A protein phosphatase activity is required to maintain death receptor responsiveness. *Oncogene*. 2003;22(48):7677–86.
15. Chen K-F, Yu H-C, Liu C-Y, Chen H-J, Chen Y-C, Hou D-R, et al. Bortezomib sensitizes HCC cells to CS-1008, an antihuman death receptor 5 antibody, through the inhibition of CIP2A. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(5):892–901.
16. Vaarala MH, Väisänen M-R, Ristimäki A. CIP2A expression is increased in prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2010;29:136.
17. Chen K-F, Liu C-Y, Lin Y-C, Yu H-C, Liu T-H, Hou D-R, et al. CIP2A mediates effects of bortezomib on phospho-Akt and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*. 2010;29(47):6257–66.

18. Côme C, Laine A, Chanrion M, Edgren H, Mattila E, Liu X, et al. CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009;15(16):5092–100.
19. Junttila MR, Puustinen P, Niemelä M, Ahola R, Arnold H, Böttzauw T, et al. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell.* 2007;130(1):51–62.
20. Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernardis R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1795(1):1–15.
21. Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem.* 1999;274(29):20296–300.
22. Schmitz MHA, Held M, Janssens V, Hutchins JRA, Hudecz O, Ivanova E, et al. Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat Cell Biol.* 2010 Sep;12(9):886–93.
23. Chen J, Martin BL, Brautigan DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science.* 1992 Aug 28;257(5074):1261–4.
24. Lee J, Chen Y, Tolstykh T, Stock J. A specific protein carboxyl methyltransferase that demethylates phosphoprotein phosphatase 2A in bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):6043–7.
25. Ogris E, Du X, Nelson KC, Mak EK, Yu XX, Lane WS, et al. A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1999 May

14;274(20):14382–91.

26. De Baere I, Derua R, Janssens V, Van Hoof C, Waelkens E, Merlevede W, et al. Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry (Mosc)*. 1999 Dec 14;38(50):16539–47.

27. Lambrecht C, Haesen D, Sents W, Ivanova E, Janssens V. Structure, regulation, and pharmacological modulation of PP2A phosphatases. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;1053:283–305.

28. Khanna A, Pimanda JE, Westermarck J. Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A, an emerging human oncoprotein and a potential cancer therapy target. *Cancer Res*. 2013 Nov 15;73(22):6548–53.

29. Saito S, Miyaji-Yamaguchi M, Shimoyama T, Nagata K. Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jun 7;259(2):471–5.

30. Kawase H, Okuwaki M, Miyaji M, Ohba R, Handa H, Ishimi Y, et al. NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 1996 Dec;1(12):1045–56.

31. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, Matta KM, Neil J, Davis ED, et al. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4150–8.

32. Cristóbal I, García-Orti L, Cirauqui C, Cortes-Lavaud X, García-Sánchez MA, Calasanz MJ, et al. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012 Apr;97(4):543–50.
33. Neviani P, Santhanam R, Trotta R, Notari M, Blaser BW, Liu S, et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*. 2005 Nov;8(5):355–68.
34. Van Vlierberghe P, van Grotel M, Tchinda J, Lee C, Beverloo HB, van der Spek PJ, et al. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2008 May 1;111(9):4668–80.
35. Liu H, Gu Y, Wang H, Yin J, Zheng G, Zhang Z, et al. Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015 Jun 20;6(17):14913–25.
36. Janghorban M, Farrell AS, Allen-Petersen BL, Pelz C, Daniel CJ, Oddo J, et al. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 24;111(25):9157–62.
37. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Caramés C, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, et al. Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Jan 15;21(2):347–56.
38. Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor-related

protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature*. 1989 Sep 14;341(6238):162–4.

39. Cal R, Castellano J, Revuelta-López E, Aledo R, Barriga M, Farré J, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesterol ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2012 Jun 1;94(3):469–79.

40. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986 Apr 4;232(4746):34–47.

41. Avila EM, Holdsworth G, Sasaki N, Jackson RL, Harmony JA. Apoprotein E suppresses phytohemagglutinin-activated phospholipid turnover in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem*. 1982 May 25;257(10):5900–9.

42. Curtiss LK, Edgington TS. The biologic activity of the immunoregulatory lipoprotein, LDL-In is independent of its free fatty acid content. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1981 Apr;126(4):1382–6.

43. Pepe MG, Curtiss LK. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1986 May 15;136(10):3716–23.

44. Agarwal A, MacKenzie RJ, Pippa R, Eide CA, Oddo J, Tyner JW, et al. Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Apr 15;20(8):2092–103.

45. Christensen DJ, Ohkubo N, Oddo J, Van Kanegan MJ, Neil J, Li F, et al.

Apolipoprotein E and peptide mimetics modulate inflammation by binding the SET protein and activating protein phosphatase 2A. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Feb 15;186(4):2535–42.

46. Switzer CH, Cheng RYS, Vitek TM, Christensen DJ, Wink DA, Vitek MP. Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene*. 2011 Jun 2;30(22):2504–13.

47. Farrell AS, Allen-Petersen B, Daniel CJ, Wang X, Wang Z, Rodriguez S, et al. Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Mol Cancer Res MCR*. 2014 Jun;12(6):924–39.

48. Suzuki S, Li XK, Enosawa S, Shinomiya T. A new immunosuppressant, FTY720, induces bcl-2-associated apoptotic cell death in human lymphocytes. *Immunology*. 1996 Dec;89(4):518–23.

49. Matsuoka Y, Nagahara Y, Ikekita M, Shinomiya T. A novel immunosuppressive agent FTY720 induced Akt dephosphorylation in leukemia cells. *Br J Pharmacol*. 2003 Apr;138(7):1303–12.

50. Neviani P, Santhanam R, Oaks JJ, Eiring AM, Notari M, Blaser BW, et al. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2408–21.

51. Roberts KG, Smith AM, McDougall F, Carpenter H, Horan M, Neviani P, et al. Essential requirement for PP2A inhibition by the oncogenic receptor c-KIT suggests PP2A reactivation as a strategy to treat c-KIT+ cancers. *Cancer Res*. 2010 Jul

1;70(13):5438–47.

52. Tolstykh T, Lee J, Vafai S, Stock JB. Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *EMBO J.* 2000 Nov 1;19(21):5682–91.

53. Xing Y, Li Z, Chen Y, Stock JB, Jeffrey PD, Shi Y. Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A. *Cell.* 2008;133(1):154–63.

54. Yu XX, Du X, Moreno CS, Green RE, Ogris E, Feng Q, et al. Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of Balph regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen. *Mol Biol Cell.* 2001;12(1):185–99.

55. Hombauer H, Weismann D, Mudrak I, Stanzel C, Fellner T, Lackner DH, et al. Generation of active protein phosphatase 2A is coupled to holoenzyme assembly. *PLoS Biol.* 2007 Jun;5(6):e155.

56. Stanevich V, Jiang L, Satyshur KA, Li Y, Jeffrey PD, Li Z, et al. The structural basis for tight control of PP2A methylation and function by LCMT-1. *Mol Cell.* 2011 Feb 4;41(3):331–42.

57. Longin S, Jordens J, Martens E, Stevens I, Janssens V, Rondelez E, et al. An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Biochem J.* 2004 May 15;380(Pt 1):111–9.

58. Puustinen P, Junttila MR, Vanhatupa S, Sablina A, Hector ME, Teittinen K, et al. PME-1 protects extracellular signal-regulated kinase pathway activity from protein

phosphatase 2A-mediated inactivation in human malignant glioma. *Cancer Res.*

2009;69(7):2870–7.

59. Wandzioch E, Pusey M, Werda A, Bail S, Bhaskar A, Nestor M, et al. PME-1 modulates protein phosphatase 2A activity to promote the malignant phenotype of endometrial cancer cells. *Cancer Res.* 2014 Aug 15;74(16):4295–305.

60. Li J, Han S, Qian Z, Su X, Fan S, Fu J, et al. Genetic amplification of PPME1 in gastric and lung cancer and its potential as a novel therapeutic target. *Cancer Biol Ther.* 2014 Jan;15(1):128–34.

61. Kaur A, Westermarck J. Regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) tumor suppressor function by PME-1. *Biochem Soc Trans.* 2016 Dec 15;44(6):1683–93.

62. Jackson JB, Pallas DC. Circumventing cellular control of PP2A by methylation promotes transformation in an Akt-dependent manner. *Neoplasia N Y N.* 2012 Jul;14(7):585–99.

63. Fujiwara N, Kawasaki H, Yabe R, Christensen DJ, Vitek MP, Mizuno T, et al. A potential therapeutic application of SET/I2PP2A inhibitor OP449 for canine T-cell lymphoma. *J Vet Med Sci.* 2013;75(3):349–54.

64. Enjoji S, Yabe R, Fujiwara N, Tsuji S, Vitek MP, Mizuno T, et al. The therapeutic effects of SET/I2PP2A inhibitors on canine melanoma. *J Vet Med Sci.* 2015 Nov;77(11):1451–6.

65. Kake S, Tsuji S, Enjoji S, Hanasaki S, Hayase H, Yabe R, et al. The role of SET/I2PP2A in canine mammary tumors. *Sci Rep.* 2017 Jun 27;7(1):4279.

66. Carlson SG, Eng E, Kim EG, Perlman EJ, Copeland TD, Ballermann BJ.

Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1998 Oct;9(10):1873–80.

67. Chao A, Tsai C-L, Wei P-C, Hsueh S, Chao A-S, Wang C-J, et al. Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Lett*. 2010 May 1;291(1):99–107.

68. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 2008 Apr;14(4):152–60.

69. Yang Y, Huang Q, Lu Y, Li X, Huang S. Reactivating PP2A by FTY720 as a novel therapy for AML with C-KIT tyrosine kinase domain mutation. *J Cell Biochem*. 2012 Apr;113(4):1314–22.

70. Arnaud L, Chen S, Liu F, Li B, Khatoon S, Grundke-Iqbal I, et al. Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal hyperphosphorylation of tau by I2(PP2A)/SET. *FEBS Lett*. 2011 Sep 2;585(17):2653–9.

71. Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, Ward KE, Mukhopadhyay A, Oaks J, et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med*. 2013;5(1):105–21.

72. Yu G, Yan T, Feng Y, Liu X, Xia Y, Luo H, et al. Ser9 phosphorylation causes cytoplasmic detention of I2PP2A/SET in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2013 Jul;34(7):1748–58.

73. Arif M, Wei J, Zhang Q, Liu F, Basurto-Islas G, Grundke-Iqbal I, et al. Cytoplasmic retention of protein phosphatase 2A inhibitor 2 (I2PP2A) induces

Alzheimer-like abnormal hyperphosphorylation of Tau. *J Biol Chem*. 2014 Oct 3;289(40):27677–91.

74. Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. *J Proteome Res*. 2014 May 2;13(5):2250–61.

75. Sobral LM, Sousa LO, Coletta RD, Cabral H, Greene LJ, Tajara EH, et al. Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. *Mol Cancer*. 2014 Feb 20;13:32.

76. Kong M, Ditsworth D, Lindsten T, Thompson CB. Alpha4 is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Mol Cell*. 2009 Oct 9;36(1):51–60.

77. McConnell JL, Watkins GR, Soss SE, Franz HS, McCorvey LR, Spiller BW, et al. Alpha4 is a ubiquitin-binding protein that regulates protein serine/threonine phosphatase 2A ubiquitination. *Biochemistry (Mosc)*. 2010 Mar 2;49(8):1713–8.

78. Bachovchin DA, Mohr JT, Speers AE, Wang C, Berlin JM, Spicer TP, et al. Academic cross-fertilization by public screening yields a remarkable class of protein phosphatase methylesterase-1 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 26;108(17):6811–6.

79. Xing Y, Li Z, Chen Y, Stock JB, Jeffrey PD, Shi Y. Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A. *Cell*. 2008 Apr

4;133(1):154–63.

80. Puustinen P, Junttila MR, Vanhatupa S, Sablina AA, Hector ME, Teittinen K, et al. PME-1 protects extracellular signal-regulated kinase pathway activity from protein phosphatase 2A-mediated inactivation in human malignant glioma. *Cancer Res.* 2009 Apr 1;69(7):2870–7.

81. Mazur PK, Reynoird N, Khatri P, Jansen PWTC, Wilkinson AW, Liu S, et al. SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature.* 2014 Jun 12;510(7504):283–7.

82. Kuo Y-C, Huang K-Y, Yang C-H, Yang Y-S, Lee W-Y, Chiang C-W. 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.* 2008 Jan 25;283(4):1882–92.

83. Baharians Z, Schönthal AH. Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem.* 1998 Jul 24;273(30):19019–24.

84. Ortega-Gutiérrez S, Leung D, Ficarro S, Peters EC, Cravatt BF. Targeted disruption of the PME-1 gene causes loss of demethylated PP2A and perinatal lethality in mice. *PloS One.* 2008;3(7):e2486.

85. Bryant JC, Westphal RS, Wadzinski BE. Methylated C-terminal leucine residue of PP2A catalytic subunit is important for binding of regulatory Balpha subunit. *Biochem J.* 1999 Apr 15;339 (Pt 2):241–6.

86. Chung H, Nairn AC, Murata K, Brautigan DL. Mutation of Tyr307 and Leu309 in the protein phosphatase 2A catalytic subunit favors association with the alpha 4

subunit which promotes dephosphorylation of elongation factor-2. *Biochemistry* (Mosc). 1999 Aug 10;38(32):10371–6.

87. Murata K, Wu J, Brautigan DL. B cell receptor-associated protein alpha4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 30;94(20):10624–9.

88. LeNoue-Newton M, Watkins GR, Zou P, Germane KL, McCorvey LR, Wadzinski BE, et al. The E3 ubiquitin ligase- and protein phosphatase 2A (PP2A)-binding domains of the Alpha4 protein are both required for Alpha4 to inhibit PP2A degradation. *J Biol Chem*. 2011 May 20;286(20):17665–71.

89. Junttila MR, Puustinen P, Niemelä M, Ahola R, Arnold H, Böttzauw T, et al. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):51–62.

90. Li M, Makkinje A, Damuni Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 1996 May 10;271(19):11059–62.

91. Chen J, Parsons S, Brautigan DL. Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*. 1994 Mar 18;269(11):7957–62.

92. Trotta R, Ciarlariello D, Dal Col J, Allard J, Neviani P, Santhanam R, et al. The PP2A inhibitor SET regulates natural killer cell IFN-gamma production. *J Exp Med*. 2007 Oct 1;204(10):2397–405.

93. Kremmer E, Ohst K, Kiefer J, Brewis N, Walter G. Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit:

abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol.* 1997 Mar;17(3):1692–701.

94. Li X, Scuderi A, Letsou A, Virshup DM. B56-associated protein phosphatase 2A is required for survival and protects from apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* 2002 Jun;22(11):3674–84.

95. Silverstein AM, Barrow CA, Davis AJ, Mumby MC. Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4221–6.

96. Katsiari CG, Kyttaris VC, Juang Y-T, Tsokos GC. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 2005 Nov;115(11):3193–204.

97. Strack S, Cribbs JT, Gomez L. Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47732–9.

98. Colella S, Ohgaki H, Ruediger R, Yang F, Nakamura M, Fujisawa H, et al. Reduced expression of the Aalpha subunit of protein phosphatase 2A in human gliomas in the absence of mutations in the Aalpha and Abeta subunit genes. *Int J Cancer.* 2001 Sep;93(6):798–804.

99. Ogris E, Du X, Nelson KC, Mak EK, Yu XX, Lane WS, et al. A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1999;274(20):14382–91.

100. Ogris E, Gibson DM, Pallas DC. Protein phosphatase 2A subunit assembly: the catalytic subunit carboxy terminus is important for binding cellular B subunit but not

polyomavirus middle tumor antigen. *Oncogene*. 1997 Aug 18;15(8):911–7.

101. Yabe R, Miura A, Usui T, Mudrak I, Ogris E, Ohama T, et al. Protein Phosphatase Methyl-Esterase PME-1 Protects Protein Phosphatase 2A from Ubiquitin/Proteasome Degradation. *PloS One*. 2015;10(12):e0145226.

102. Xu Y, Chen Y, Zhang P, Jeffrey PD, Shi Y. Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation. *Mol Cell*. 2008 Sep 26;31(6):873–85.

103. Evans DR, Hemmings BA. Mutation of the C-terminal leucine residue of PP2Ac inhibits PR55/B subunit binding and confers supersensitivity to microtubule destabilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet MGG*. 2000 Nov;264(4):425–32.

104. Wei H, Ashby DG, Moreno CS, Ogris E, Yeong FM, Corbett AH, et al. Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits Cdc55p and Rts1p. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1570–7.

105. Gentry MS, Li Y, Wei H, Syed FF, Patel SH, Hallberg RL, et al. A novel assay for protein phosphatase 2A (PP2A) complexes in vivo reveals differential effects of covalent modifications on different *Saccharomyces cerevisiae* PP2A heterotrimers. *Eukaryot Cell*. 2005 Jun;4(6):1029–40.

106. Longin S, Zwaenepoel K, Louis JV, Dilworth S, Goris J, Janssens V. Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):26971–80.

107. Kaur A, Elzagheid A, Birkman E-M, Avoranta T, Kytölä V, Korkeila E, et al. Protein phosphatase methylesterase-1 (PME-1) expression predicts a favorable clinical outcome in colorectal cancer. *Cancer Med.* 2015 Dec;4(12):1798–808.
108. Blasius M, Forment JV, Thakkar N, Wagner SA, Choudhary C, Jackson SP. A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biol.* 2011 Aug 18;12(8):R78.
109. Sjöström M, Stenström K, Eneling K, Zwiller J, Katz AI, Takemori H, et al. SIK1 is part of a cell sodium-sensing network that regulates active sodium transport through a calcium-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 23;104(43):16922–7.
110. Lee C-W, Yang F-C, Chang H-Y, Chou H, Tan BC-M, Lee S-C. Interaction between salt-inducible kinase 2 and protein phosphatase 2A regulates the activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I and protein phosphatase methylesterase-1. *J Biol Chem.* 2014 Jul 25;289(30):21108–19.
111. Bachovchin DA, Zuhl AM, Speers AE, Wolfe MR, Weerapana E, Brown SJ, et al. Discovery and optimization of sulfonyl acrylonitriles as selective, covalent inhibitors of protein phosphatase methylesterase-1. *J Med Chem.* 2011 Jul 28;54(14):5229–36.
112. Pusey M, Bail S, Xu Y, Buiakova O, Nestor M, Yang J-J, et al. Inhibition of protein methylesterase 1 decreased cancerous phenotypes in endometrial adenocarcinoma cell lines and xenograft tumor models. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2016 Sep;37(9):11835–42.
113. Cristóbal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, Alonso MM, Calasanz MJ, Odero MD.

PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect. *Leukemia*. 2011 Apr;25(4):606–14.

114. Gutierrez A, Pan L, Groen RWJ, Baleyrier F, Kentsis A, Marineau J, et al. Phenothiazines induce PP2A-mediated apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2014 Feb;124(2):644–55.

115. Tsuji S, Yabe R, Usui T, Mizuno T, Ohama T, Sato K. Anti-tumor effects of perphenazine on canine lymphoma. *J Vet Med Sci*. 2016 Sep 1;78(8):1293–8.

116. Sangodkar J, Perl A, Tohme R, Kiselar J, Kastrinsky DB, Zaware N, et al. Activation of tumor suppressor protein PP2A inhibits KRAS-driven tumor growth. *J Clin Invest*. 2017 Jun 1;127(6):2081–90.

117. Kar S, Palit S, Ball WB, Das PK. Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF- κ B signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2012 Jul;17(7):735–47.

118. Ohama T, Brautigan DL. Endotoxin conditioning induces VCP/p97-mediated and inducible nitric-oxide synthase-dependent Tyr284 nitration in protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 2010 Mar 19;285(12):8711–8.

謝辞

本研究および論文の作成を進めるにあたり、懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学研究室 佐藤晃一教授、大浜剛准教授、獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授、獣医生化学研究室 島田緑教授、鹿児島大学獣医薬理学研究室 宮本篤教授、白石光也准教授、東京農工大学 獣医薬理学研究室 臼井達也特任講師、山口大学院医学系研究科消化器・腫瘍外科学教室 藤原信行先生に心より厚く感謝の意を表します。

山口大学獣医臨床病理学研究室 水野拓也教授にはイヌ胸腺 RNA サンプル、PMBC 細胞、Ema 細胞を提供していただきました。東京大学獣医外科学研究室 中川貴之准教授には CMeC-1 細胞、CMeC-2 細胞、KMeC 細胞、LMeC 細胞を提供していただきました。Scrips 研究所の Dr.Cravatt には PME-1 ヘテロノックアウトマウスと ABL127 を提供していただきました。Virginia University の Dr. David Brautigam には PP6c 抗体と $\alpha 4$ 抗体を提供していただき、多くの助言をいただきました。Medical University of Vienna の Dr. Egon Ogris には PP2Ac K41R プラスミドを提供していただき、多くの助言を頂きました。心より厚く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり懇切なご指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学教室の皆様、また私を暖かく見守ってくれた妻・矢部あすか、矢部家の父・矢部淳一、母・矢部輝江、妹・矢部由里佳に心より感謝の意を表します。

最後に、本研究で犠牲になった多くの動物たちに深く感謝するとともに、その霊が鎮められるよう心よりお祈り致します。