
テクニカルノート

アポトーシスのプロテオーム解析

蔵満保宏, 藤本正憲, 中村和行

山口大学医学部 分子制御系・生化学第一講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : アポトーシス, プロテオーム, 二次元電気泳動,
stathmin, phosphatidylethanolamine-binding protein

アポトーシスとは

細胞の死には二種類あり, 主に病理的な外因によって細胞が崩壊するように膨潤して細胞膜が破裂して死ぬネクローシス (necrosis) と, 細胞膜が保持されたまま細胞が縮小して死ぬアポトーシス (apoptosis) とがある。アポトーシスは「枯葉が散るように」の意でアポトーシスと発音すべきであるが, Kerr¹⁾によればアポトーシスとなっている。アポトーシスは, ネクローシスと比較してより生理的な細胞死で, 形態的には, 細胞の縮小, クロマチンの凝集がまず見られ, 核の断片化によるアポトーシス小体を形成した後にマクロファージ等の貪食細胞によって処理される。ネクローシスのように細胞内成分が放出されて炎症細胞の浸潤を伴うことはないで, より自然に起こり終結する²⁾。生化学的特徴は核内のエンドヌクレアーゼの活性化や, ヒストンなどの分解酵素の活性化によるクロマチンDNAのヌクレオソーム単位での規則的な断片化 (断片は電気泳動で梯子状に分離・検出されるのでDNAラダーと呼ぶ) が挙げられる³⁾。

アポトーシスの検出法

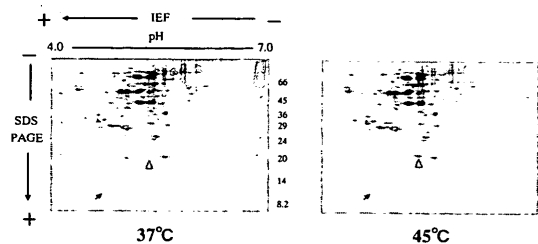
アポトーシスの検出法として, アガロース電気泳動でDNAラダーを検出する方法, ヘキスト染色で形態変化を見る方法, TUNEL法, フローサイトメトリー法, 電子顕微鏡によるアポトーシス小体検出

法などがある。我々の教室では主にDNAラダーをアガロース電気泳動で検出している。

アポトーシスのプロテオーム解析

アポトーシスでは, 死へのシグナルが細胞内で伝達されるために一連の細胞内タンパク質群が変化することが知られている。これらのタンパク質群を網羅的に解析するプロテオーム解析のアプローチとして, 細胞にアポトーシスを誘導することによって細胞内に増加あるいは減少するタンパク質を検出する方法が一般的である。今まで, この方法でいくつかのアポトーシスに関連するタンパク質が同定されている。Poland等はヒト大腸癌株HT-29にアポトーシスを誘導しやすいspheroidの状態でも培養して増加して来るタンパク質を二次元電気泳動 (2DE) を用いて検出したところ, cytokeratin 18やperoxiredoxin 4が増加していた⁴⁾。また, 同じHT-29細胞を用いて, アポトーシスを誘導するbutyrateで処理24時間後にcaspase-4, cathepsin D, hsp27が増加していることも報告されている⁵⁾。酸化ストレスは, 細胞にアポトーシスを誘導する要因のひとつであるが, Rabilloud等はTリンパ芽球性白血病株のJurkatに酸化ストレスを加えるとperoxiredoxinsのacidic formが増加することを, 2DEを用いて明らかにしている⁶⁾。All-transretinoic acid (ATRA) は急性前骨髄芽球性白血病 (APL) にアポトーシスを誘導することで, 治療に用いられているが⁷⁾, Wan等はAPL細胞株のHL-60を用いて, ATRAによって誘導されるアポトーシスのプロテオーム解析結

平成14年7月24日受理



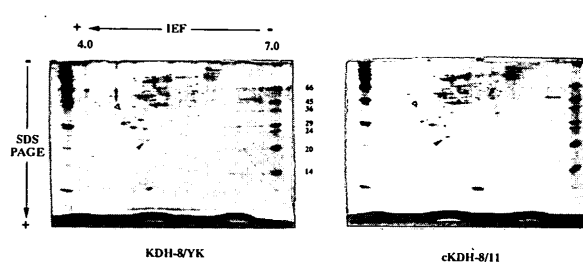
△はstathmin (18.5 kDa, pI 5.6)を、●は thymosin β -4(10.0 kDa以下, pI 5.1)を指す。

図1. 熱ショック (45°C, 30分) 後のJurkat細胞内可溶性タンパク質の二次元電気泳動像

果を報告している。それによると, STAT 3 と caspase-3 が増加し, Bcl-2 と p-STAT 3 が減少しており, これまでの報告に合致していた⁸⁾。

我々は, Tリンパ芽球性白血病株のJurkatに熱ショックを与えることで誘導されるアポトーシスのプロテオーム解析を行っている。45°Cで30分熱ショックをかけたJurkat細胞の細胞内可溶性タンパク質を2DEによって分離したところ, 分子質量18.5kDa, 等電点 (pI) 5.6のスポットが増加した。このスポットのタンパク質を分離精製し, アミノ酸配列を決定したところ, stathminであることが明らかになった⁹⁾。同様の系で我々は, 分子質量10.0kDa未満のpI 5.1のタンパク質スポットが45°Cから51°Cでの30分の熱ショックで増加しており, アミノ酸配列の決定の結果thymosin β -4であることを明らかにした¹⁰⁾ (図1)。一方, ヒト膵癌細胞株MIA PaCa-2に熱ショックを与えると, アポトーシスに見られるDNAラダーは検出されなかったが, 細胞の増殖が抑制されて細胞死が誘導された。2DEによる細胞内タンパク質の解析でeukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) が減少していることが明らかになった¹¹⁾。

もう一つのアポトーシスのプロテオーム解析のアプローチとして, 一つの細胞株からアポトーシス誘導因子に対して感受性株と抵抗性株を樹立して比較検討する方法がある。つまり, ある誘導因子 (TNF- α 等) によってアポトーシスに陥る株と陥らない株を比較して, 陥らない株はその誘導・決定・実行の各過程のうちどこかの過程に関与する分子が欠落している可能性がある。2DEを用いた細胞内タンパク質の解析結果を比較検討する。感受性株に発現の多いタンパク質ならアポトーシスに正に働くもので, 抵抗性株に発現の多いタンパク質なら



△はspot 1 (36kDa, pI 4.7-4.9)を、●はspot 2 (phosphatidylethanolamine-binding protein: 23kDa, pI 4.9-5.1)を指す。

図2. KDH-8/YKとcKDH-8/11の細胞内可溶性タンパク質の二次元電気泳動像

負に働くものである可能性が考えられる。

我々が, DAB発癌肝細胞株KDH-8の担癌ラットに対してのlipid Aの誘導体ONO-4007の治療実験を行ったところ70%の治癒率で有効であった。ところが, KDH-8細胞をサブクローニングして得られた株cKDH-8/11に対しては全く効果がなかった¹²⁾。一方, KDH-8細胞のもう一つのサブクローンであるKDH-8/YKに対しては, 親株KDH-8のそれとほぼ同じように60%の治癒率で有効であった。さらに, このcKDH-8/11とKDH-8/YKの胆癌ラットに対するONO-4007の有効性の違いはTNF- α に対する感受性の違いによることが明らかになった^{13, 14)}。

TNF- α によって誘導されるアポトーシスに関連するタンパク質の同定を行うために, 樹立した2種類のサブクローン, TNF- α に対して感受性のKDH-8/YKと抵抗性のcKDH-8/11の細胞質内可溶性タンパク質を二次元電気泳動で分離し, その発現を比較したところ, KDH-8/YKのみに発現する分子質量36kDa, pI 4.7-4.9のスポット1と, cKDH-8/11に強く発現する分子質量23kDa, pI 4.9-5.1のスポット2を発見した (図2)。このうちスポット2のタンパク質を分離精製し, アミノ酸配列を決定したところ, phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) であることがわかった¹⁵⁾。Phosphatidylethanolamine (PE) は正常では細胞膜内側に局在し細胞膜内側と外側の膜脂質非対称性を維持しているが, アポトーシスの細胞では細胞膜外側に局在してくることが報告されている¹⁶⁾。細胞内でPEBPがPEに結合することにより細胞膜脂質の非対称性が維持されることでアポトーシスを抑制している可能性が考えられる。最近, PEBPがRaf kinase inhibitor protein (RKIP) と同じタンパク質であることが明らかになった。RKIPはRaf-1のキ

ナーゼドメインと相互作用するが、活性型Raf-1とも非活性型Raf-1とも結合してMAPキナーゼシグナル伝達経路に関与することがわかってきた。RKIPはRaf-1やMEKの基質ではないが、活性型Raf-1と会合したRKIPがRaf-1とその基質であるMEKとの結合を競争阻害し、Raf-1によるMEKのリン酸化を減少させてMAPキナーゼ経路の活性化を抑制する。その結果、Raf-1によるtransformationとAP-1依存型転写が抑制される^{17, 18)}。現在、スポット1のタンパク質を分離精製し、アミノ酸配列の決定を行っている。

プロテオーム解析と技術開発

プロテオーム¹⁹⁾解析の流れは、1) 細胞からのタンパク質の抽出、2) 抽出タンパク質の網羅的な分離と同定および定量、3) タンパク質の構造と機能の解析、4) 解析結果のデータベース化と共有、5) 生命科学の発展や医療への応用である²⁰⁾。ヒトプロテオーム解析の推進と研究者間の連携による生命システムや病態の早期解明は21世紀の最重要課題である²¹⁾。

生命システムを解明するには、ゲノムを構成する全ての遺伝子の発現とその産物であるタンパク質の構造と機能を網羅的かつ系統的に解析する必要がある。これらの解析において、遺伝子の転写産物(transcriptome)と翻訳産物であるタンパク質(proteome)を網羅的に解析してゲノム構成遺伝子の発現の総合的な情報をデータベース化することを発現プロテオミクス(expression proteomics)と呼ぶ。一方、遺伝子の産物である個々のタンパク質が細胞において何時、何処で、どのように機能を発現するのか、またそれら機能はどのように調節されるのか解析することを機能プロテオミクス(functional proteomics)と呼ぶ。遺伝子転写産物の網羅的解析には、DNAチップ法²²⁾、チップ(キャピラリー)電気泳動法²³⁾などが有用である。発現プロテオミクスには、2次元電気泳動法²⁴⁾、質量分析法^{25, 26)}、Multidimensional protein identification technology (MUDPIT)²⁷⁾、Isotope-coded affinity tags (ICAT)法^{28, 29)}などが有用である。機能プロテオミクスには、two-hybrid法³⁰⁾、2次元親和電気泳動法³¹⁾、Surface plasmon resonance (SPR法)³²⁾

³³⁾、Tandem-affinity purification (TAP)法³⁴⁾、Green fluorescent protein (GFP)法³⁵⁾などが有用である³⁶⁾。

文 献

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 ; 26 : 239-257.
- 2) 山田 武, 大山ハルミ. Bio Science用語ライブラリー : アポトーシスとは. 三浦正幸・山田武編, 羊土社, 東京, 1996, 12-15.
- 3) Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980 ; 284 : 555-556.
- 4) Poland J, Sinha P, Siegert A, Schnolzer M, Korf U, Hauptmann S. Comparison of protein expression profiles between monolayer and spheroid cell culture of HT-29 cells revealed fragmentation of CK18 in three-dimensional cell culture. *Electrophoresis* 2002 ; 23 : 1174-1184.
- 5) Tan S, Seow TK, Liang RC, Koh S, Lee CP, Chung MC, Hooi SC. Proteome analysis of butylate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer* 2002 ; 98 : 523-531.
- 6) Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, Benahmed M, Louisot P, Lunardi J. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 19396-19401.
- 7) Lehman S, Bengtzen S, Broberg U, Paul C. Effects of retinoids on cell toxicity and apoptosis in leukemic blast cells from patients with non-M3 AML. *Leuk Res* 2000 ; 24 : 19-25.
- 8) Wan J, Wang J, Cheng H, Yu Y, Xing G, Oiu Z, Qian X, He F. Proteomic analysis of apoptosis initiation induced by all-trans retinoic acid in human acute promyelocytic

- leukemia cells. *Electrophoresis* 2001 ; 22 : 3026-3037.
- 9) Fujimoto M, Nagasaka Y, Tanaka T, Nakamura K. Analysis of heat shock-induced monophosphorylation of stathmin in human T lymphoblastic cell line JURKAT by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998 ; 19 : 2515-2520.
- 10) Nakamura K, Fujimoto M, Tanaka T, Aoshima M, Kuramitsu Y, Furumoto H, Takai K, Nagasaka Y. Heat stress increases thymosin beta 4 and stathmin in JURKAT cells of a human T lymphoblastic cell line. *Electrophoresis '99 (abstract)*, *Jap J Electrophoresis* 1999 ; suppl. 1 : 60.
- 11) Takeuchi K, Nakamura K, Fujimoto M, Kaino S, Okita K. Heat stress-induced loss of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) in a human pancreatic cancer cell line, MIA Paca-2, analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2002 ; 23 : 662-669.
- 12) Kuramitsu Y, Nishibe M, Ohiro Y, Matsushita K, Yuan L, Obara M, Kobayashi M, Hosokawa M. A new synthetic lipid A analog, ONO-4007, stimulates the production of tumor necrosis factor-alpha in tumor tissues, resulting in the rejection of transplanted rat hepatoma cells. *Anticancer Drugs* 1997 ; 8 : 500-508.
- 13) Kuramitsu Y, Ohiro Y, Matsushita K, Obara M, Kobayashi M, Hosokawa M. The mechanism of locally enhanced production of tumor necrosis factor-alpha in tumor tissues by the administration of a new synthetic lipid A analog, ONO-4007, in hepatoma-bearing rats. *Anticancer Drugs* 1997 ; 8 : 886-893.
- 14) Kuramitsu Y, Matsushita K, Ohiro Y, Obara M, Kobayashi M, Hosokawa M. Therapeutic effects of a new synthetic lipid A analog, ONO-4007, on rat hepatoma KDH-8 depend on tumor necrosis factor-sensitivity of the tumor cells. *Anticancer Drugs* 1997 ; 8 : 898-901.
- 15) Kuramitsu Y, Fujimoto M, Tanaka T, Ohata J, Nakamura K. Differential expression of phosphatidylethanolamine-binding protein in rat hepatoma cell lines: analyses of tumor necrosis factor-alpha-resistant cKDH-8/11 and -sensitive KDH-8/YK cells by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2000 ; 21 : 660-664.
- 16) Emoto K, Toyama-Sorimachi N, Karasuyama H, Inoue K, Umeda M. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 1997 ; 232 : 430-434.
- 17) Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signaling by RKIP. *Nature* 1999 ; 401 : 173-177.
- 18) Yeung K, Janosch P, McFerran B, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* 2000 ; 20 : 3079-3085.
- 19) Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncun MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes : *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995 ; 16 : 1090-1094.
- 20) 平野 久, プロテオミクスの基礎, 網澤 進, 平野 久編, 講談社, 東京, 2001, 1-39.
- 21) The Human proteome Organisation. <http://yprcdb.proteomix.org/new/main.html>.
- 22) 君塚房夫, 加藤郁之進. DNAチップ技術とその応用 - ゲノムの機能解析に向けて -. 蛋白質核酸酵素 1999 ; 43 : 52-57.
- 23) 馬場嘉信. マイクロチップ/ナノチップ技術によるゲノム解析. 生物物理化学 2000 ; 44 : 85-89.
- 24) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975 ; 250 : 4007-4021.

- 25) 高尾敏文, 里見佳典. 質量分析: 基礎生化学実験法, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 2001, 153-167.
- 26) Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002 ; 2 : 3-10.
- 27) Washburn MP, Wolters D, Yates JR III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001 ; 19 : 242-247.
- 28) Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999 ; 17 : 994-999.
- 29) Zhou H, Watts JD, Aebersold R. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol* 2001 ; 19 : 375-378.
- 30) Fields S, Song O-K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989 ; 340 : 245-246.
- 31) Nakamura K, Takeo K. Affinity electrophoresis and its applications to studies of immune response. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998 ; 715 : 125-136.
- 32) Salamon Z, Brown MF, Tollin G. Plasmon resonance spectroscopy : probing molecular interactions within membranes. *Trends Biochem Sci* 1999 ; 24 : 213-219.
- 33) 中山洋. HPLC-MS法を中心としたポストゲノム解析. *生物物理化学* 2000 ; 44 : 91-95.
- 34) Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heutier MA, Copley RR, Edelman A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 2002 ; 415 : 141-147.
- 35) Einbaurer A, Jungbauer A. Recombinant autofluorescent landmarks for standardization of electrophoretic migration of proteins. *Electrophoresis* 2002 ; 23 : 1146-1152.
- 36) 中村和行. プロテオミクス研究における蛋白質の分離精製. *医学のあゆみ* 2002 ; 202 : 49-53.