骨芽細胞と蛋白質脱リン酸化酵素 1 型

—核小体での r-RNA 合成に関して—

森 本 景 之

九州歯科大学口腔解剖学第 1 講座 (指導: 小林 繁教授)

平成 12 年 8 月 25 日受理

Roles of Protein Phosphatase in Cultured Human Osteoblastic Cells

Hiroyuki Morimoto

First Department of Oral Anatomy (Director: Prof. Shigeru Kobayashi)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Protein phosphorylation and dephosphorylation have been recognized as an essential mechanism in the regulation of cellular metabolism and functions in various tissues. cDNA cloning revealed the existence of at least four isoforms of PP1 catalytic subunit, termed PP1 α , PP1 γ 1, PP1 γ 2, and PP1 δ . PP1 targeting subunit is thought to localize to specific subcellular component and to modulate the activity of the enzyme at these sites. In the present study, we examined the cytolocalization of PP1 isozymes and expression of these proteins in MG63 cells by immunofluorescent technique and Western blot analysis, respectively. PP1 α and PP1 δ antibodies recognized 38 kDa and 37 kDa proteins, respectively, present in the nuclear and nucleolar regions of MG63 cells, whereas PP1 γ 1 antibody interacted with 36 kDa protein in cytosolic fraction. This differential distribution of PP1s suggests that these isozymes may act in a sequential fashion on modulating the activity of this enzyme in MG63 cells.

Nucleolin is an abundantly expressed nucleolar phosphoprotein and is located mainly in nucleolus. Nucleolin is directly involved in the regulation of ribosome biogenesis and maturation. Staining pattern of nucleolin in MG63 cells is similar to that of the PP1 δ . PP1 δ and nucleolin were specifically stained as dots in the nucleus. The multiple fluorescence image revealed that PP1 δ and nucleolin represent same localization in nucleolus. To examine the interaction of PP1 δ and nucleolin, whole cell lysates were immunoprecipitated with PP1 δ antibody. The immunoprecipitant was analyzed by Western blotting using anti-nucleolin antibody. The anti-nucleolin antibody interacted with the protein which molecular weight was estimated as 100 kDa indicating. However, the sample precipitated with the normal rabbit serum was not stained with anti-nucleolin antibody. These results indicate that PP1 δ associate with nucleolin directly at cellular nucleolus.

MG 63 cells were treated with actinomycin D to inhibit r-RNA synthesis. In the actinomycin D-treated cells, subcellular localization of PP1 δ and nucleolin were changed. The amount of PP1 δ increased whereas the level of and dephosphorylated nucleolin increased.

MG63 cells were also blocked in G1/S and G2/M phase by exposing them to hydroxyurea and nocodazole, respectively, and followed by immunoblotting. The intensity of immunoreaction of PP1 α , PP1 δ and PP1 γ 1 were different between the proteins prepared from the cells at G1/S and G2/M phase. PP1 α increased at G1/S and G2/M phase, PP1 δ increased at G1/S and G2/M phase with the intensity was higher at G2/M phase. However, the level of PP1 γ 1 increased only at G1/M phase.

The present results indicate that nucleolin is one of the candidate of PP1 δ substrate. The present results also indicate that PP1 is involved in r-RNA synthesis and in cell cycle regulation.

Key words: Protein phosphatase/Osteoblasts/r-RNA synthesis/Cell cycle/Nucleolin

緒 言

様々な生命現象において蛋白質のリン酸化と脱リン酸化はきわめて重要な役割を担っている。蛋白質脱リン酸化酵素は、蛋白質リン酸化酵素との協調作用により、細胞内蛋白のリン酸化レベルを調節する。つまり、多くの蛋白が細胞内でリン酸化状態の変化を可逆的に受け、細胞の増殖、細胞の分化、運動、代謝、免疫応答などの機能を果たす¹⁻⁴⁾。細胞の機能に関する蛋白質リン酸化酵素の役割については多数の報告があるが、蛋白質脱リン酸化酵素に関する研究は、1) その種類が多数有り、多様性を示す、2) その特異的基質がない、3) アッセイ系が確立していない、4) 特異的阻害剤が長年発見されなかった、などの理由から遅れてきた¹⁻⁴⁾。よって細胞機能にはたす蛋白質脱リン酸化酵素の役割を詳細に解明することはきわめて重要である。

蛋白質脱リン酸化酵素 (PP) は脱リン酸化を行うアミノ酸残基の種類により、セリン/スレオニン特異的蛋白質脱リン酸化酵素とチロシン特異的蛋白質脱リン酸化酵素の2種類に大別される。セリン/スレオニン特異的蛋白質脱リン酸化酵素は、酵素学的な性質の違いや基質特異性、阻害剤に対する感受性、活性時の金属イオン要求性などの差異により1型 (PP1)、2A型 (PP2A)、2B型 (PP2B)、2C型 (PP2C) に分類される¹⁻⁴⁾。1型蛋白質脱リン酸化酵素は調節サブユニットと触媒サブユニットから構成されるホロ酵素であり、ラットの触媒サブユニットのアイソフォームは α , δ , γ 1, γ 2の4種類が知られている⁵⁾。各アイソフォーム間のアミノ酸配列の差異はN末端の40残基とC末端の30残基に集中しており、それ以外の部分では高いホモロジーが維持されている⁵⁻⁷⁾。こ

の高い類似性のため各アイソフォームの臓器分布、細胞内局在、機能分担などについては未だ不明な点が多い。多数の調節サブユニットが触媒サブユニットと結合し蛋白質脱リン酸化酵素の基質特異性や酵素活性を調節している⁸⁻¹⁰⁾。蛋白質脱リン酸化酵素1型は調節サブユニットと触媒サブユニットの各アイソフォームを組み合わせることにより、多様な役割を果たす^{11,12)}。ところが、蛋白質脱リン酸化酵素1型の各アイソフォームごとの特異的基質に関する報告は少ない。アイソフォーム特異的基質を発見することおよび各アイソフォームの酵素活性を分別定量することは、アイソフォームの全容を解明する上で非常に重要である。

Nucleolar Organizer Regions (NORs) は細胞の核小体に局在し、病理組織学的には硝酸銀により染色されるAgNORsの一部である¹³⁾。NORsはリボゾームRNA合成と成熟に関与し、構成蛋白の主なものにニュークレオリンとニュークレオフォスミンが知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。ニュークレオリンは核・細胞質間を移行するシャトル蛋白であり、リボゾームRNA合成に関係するリン酸化蛋白である。ニュークレオリンの機能や細胞内局在にはニュークレオリン自身のリン酸化状態が関係しており、そのリン酸化はセリン/スレオニン特異的蛋白質リン酸化酵素による^{15,16)}。よって、ニュークレオリンの脱リン酸化および核小体におけるリボゾームRNA合成と蛋白質脱リン酸化酵素の関係を調べることは非常に意義がある。

本研究で骨芽細胞における蛋白質脱リン酸化酵素1型各アイソフォームの役割を解明するために、ヒトおよびマウス骨芽細胞における各アイソフォームの細胞内局在を調べた。またRNA合成阻害や細胞周期停止に伴

う各アイソフォームの細胞内局在とその発現量を比較検討した。さらに、PP1 δ アイソフォームとニュークレオリンの相互作用について検討し、ニュークレオリンがPP1 δ アイソフォームの特異的基質であることを明らかにした。

材料および方法

I. 材料

A. 細胞培養液

基本培地には、Alpha Modified Eagle's Minimum Essential Medium (α -MEM, Gibco BRL) を処方に従い調製して用いた。さらに 56 °C, 30 分の補体不活化処理したウシ胎児血清 (FBS, JRH Biosciences, Lenexa) を基本培地に最終濃度が 10 % となるように加えて細胞培養液とした。

B. 細胞および細胞培養

実験には、骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (MC3T3-E1)¹⁷⁾、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞 (Saos-2, MG63)^{18, 19)} を用いた。細胞はすべて α -MEM 細胞培養液を用い 5 % 炭酸ガス, 95 % 空気の気相で、100 % 湿潤状態、37 °C を保った炭酸ガスインキュベーターで培養した。それぞれの細胞は 3 日毎に培地交換をしながら、単層培養になった時 0.25 % トリプシンと 1 mM EDTA で分散し継代した。実験には原則としてサブコンフルエント状態の細胞を用いた。

C. 細胞周期阻害剤

細胞周期阻害剤として Hydroxyurea, Nocodazole (Sigma, St. Louis), RNA 合成阻害剤として Actinomycin D (Sigma) を用いた。それぞれの阻害剤は細胞培養液で使用する濃度に希釈して用いた。

D. 抗体

蛋白質脱リン酸化酵素 1 型の各アイソフォーム, α , δ , γ 1, γ 2 に対するウサギポリクロナール抗体は国立ガンセンター長尾美奈子部長 (現東京農業大学), 島礼室長 (現北海道大学) より供与された。抗ヒトニュークレオリンモノクロナール抗体は MBL 社より購入した。二次抗体には FITC および HRP 結合の抗ウサギ IgG ヤギ抗体, 抗マウス IgG ウサギ抗体, ローダミン結合抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (Organon Teknika-Cappel) を用いた。

II. 方法

A. 細胞周期の停止および RNA 合成阻害

35 および 90 mm プラスチックシャーレ (3001, 3003, Falcon, Los Angeles) に播種した細胞を 300 nM Hydroxyurea で 24 時間, 10 ng/ml Nocodazole で 8 時間

処理しそれぞれ G1/S, G2/M 期に細胞周期を停止させた。RNA 合成阻害剤ではサブコンフルエントな状態の細胞を 0-15 nM の Actinomycin D で 4 時間処理した。

B. 蛍光抗体法

35 mm のプラスチックシャーレの底面に無菌カバーガラスを置き、その上に細胞を播種した。細胞を各種薬剤で所定の時間処理し、カバーガラス上の細胞を 10 % ホルマリン液で室温で 10 分間固定した。固定後 PBS にて 15 分間 (5 分 $\times$ 3 回) 洗浄し、さらに -20 °C のメタノールで 20 分間透徹処理を行なった。PBS 洗浄後 4 % Bovine Serum Albumin (BSA) で 20 分間ブロッキング処理し、100-400 倍に希釈した各抗体を室温で 45 分間反応させた。再度 PBS で洗浄し、400 倍に希釈した FITC およびローダミン結合の二次抗体を室温で 45 分間反応させた。PBS 洗浄後、カバーガラスをスライドガラス上に封入し、蛍光顕微鏡 (BX-50, BX-FLA, Olympus) により細胞を観察した。蛍光顕微鏡写真撮影は自動撮影装置 (PM-30, Olympus) を用いて Fuji Presto 400 film 上で行った。

C. 抽出蛋白の電気泳動と免疫ブロッティング

90 mm シャーレに播種したサブコンフルエントの細胞を各種薬剤で所定の時間処理した。ラバーポリスメンを用いて細胞をシャーレより採取し、超音波破碎機にて細胞を破壊後、15,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を蛋白抽出液として用いた。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmli (1970)²⁰⁾ の方法に従って行った。蛋白抽出液は 4 分の 1 量のサンプルバッファー (2 % SDS, 20 % glycerol, 1.54 % DTT, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8) と混合し、沸騰水中で 3 分間変性させた。蛋白サンプルと分子量マーカーを SDS-PAGE により分離し、転写装置を用いて PVDF 膜 (Immobilon, Millipore, Bedford) に転写した。PVDF 膜を PBS で洗浄後 4 % BSA と 4 % 正常ヤギ血清または 4 % 正常ウサギ血清で 2 時間ブロッキング処理した後、400 倍に希釈した 1 次抗体で、4 °C で 16 時間反応させた。PBS にて 30 分間 (5 分 $\times$ 6 回) 洗浄し、5000 倍に希釈した HRP 結合の 2 次抗体と室温で 45 分間反応させた。PVDF 膜を再度 PBS にて洗浄後、化学的蛍光検出剤 (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) と 1 分間反応させ、X 線フィルム (Hyper ECL Film) に 5 分間感光させて、目的の反応蛋白を検出した。

D. 免疫沈降法

90 mm シャーレに培養した細胞をラバーポリスメン

を用いて採取し、200 μ l の RIPA (150 mM NaCl, 1.0 % NP 40, 0.5 % deoxycholate, 0.1 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) を加え細胞を溶解させた。氷上に 20 分間静置後、15,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) と 30 分間攪拌し、Agarose ビーズを遠心で沈殿させ、上清を予め PP1 δ 抗体と結合させた Protein A/G PLUS-Agarose と 4 $^{\circ}$ C で 4 時間攪拌反応させた。反応後、Agarose ビーズを RIPA で 5 回洗浄し、50 μ l の SDS サンプルバッファーを加え、沸騰水中で 3 分間変性させた。遠心により、Agarose ビーズを沈殿させ、上清を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫ブロッティングにより分析した。

E. 細胞分画

90 mm シャーレで培養した細胞をラバーポリスメンを用いて採取し、PBS で洗浄後遠心し細胞を採取した。核分画用 A 液 (10 mM Hepes-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) に再懸濁し、氷上に 10 分間放置して細胞を膨潤させた。細胞懸濁液を氷冷したダウンスホモジナイザーに移し、20-30 ストロークでホモジナイズし、2,500 rpm で 4 $^{\circ}$ C 5 分間遠心した。上清を細胞質画分として回収し、沈殿は B 液 (0.25 M ショ糖, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.1 % Triton X-100) に懸濁し再度ホモジナイズした。遠心管に氷冷した C 液 (0.5 M ショ糖, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.1 % Triton X-100) の上に、ホモジナイズ溶液をゆっくりと重層し、4 $^{\circ}$ C 3,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て、沈殿を核画分として回収した。核小体画分は核画分より Muramatsu ら (1974)²¹⁾ の方法に従って分離、回収した。それぞれの回収した画分を SDS サンプルバッファーと混合し、電気泳動用のサンプルとした。

F. AgNORs 染色

35 mm のプラスチックシャーレの底面に無菌カバーガラスを置き、その上に細胞を播種し、細胞を各種薬剤で所定の時間処理した。カバーガラス上の細胞を 10 % ホルマリン液で室温で 10 分間固定した。固定後超純水にて 15 分間 (5 分 $\times$ 3 回) 洗浄した。銀染色は Goodpasture ら (1975)²²⁾ の方法に従って行った。暗室内で A 液 (0.5 g/ml AgNO₃ 水溶液) と B 液 (0.01 % ゼラチン, 1 % 葉酸水溶液) を 2 : 1 の割合で混合した。遮光下で細胞をこの染色液で 20 分間染色した。超純水で洗浄後カバーガラスをスライドガラス上に封入し、顕微鏡

(BX-50, PH-30, Olympus) により細胞を観察した。顕微鏡写真撮影は自動撮影装置 (PM-30, Olympus) を用いて Fuji Presto 100 film 上で行った。

G. In vitro 脱リン酸化反応

蛋白質抽出液 1 μ g に Lambda Protein Phosphatase (New England BioLabs) 0-200 U と反応バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.01 % Brij 35, 2 mM MnCl₂) を加え 30 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた。反応後 SDS サンプルバッファーを加え、沸騰水中で 3 分間変性させ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動および抗体を用いてニュークレオリンの脱リン酸化状態を免疫ブロッティングにより分析した。

結 果

I. 蛋白質脱リン酸化酵素 1 型各アイソフォームの細胞内局在

蛋白質脱リン酸化酵素 1 型各アイソフォームは MG63 細胞において特異的に細胞内に局在した。Fig. 1 は MG63 細胞の免疫染色を示している。抗 PP1 α 抗体は核と強力に反応した (Fig. 1a)。抗 PP1 δ 抗体は核小体様部位に点状の反応を示した (Fig. 1b)。抗 PP1 γ 1 抗体は核周辺部の細胞質に強力に反応した (Fig. 1c)。正常ウサギ血清を用いたコントロール群 (Fig. 1d) と抗 PP1 γ 2 抗体を用いた免疫染色では MG63 細胞に陽性反応は見られなかった (data not shown)。蛋白質脱リン酸化酵素 1 型の各アイソフォームは、MC3T3-E1 細胞、Saos-2 細胞においても類似した細胞内局在であった (Fig. 2, Fig. 3)。

次に MG63 細胞より核画分、核小体画分および細胞質画分を調製し、ウェスタンブロッティング法により各アイソフォームの細胞内分布を調べた。Fig. 4 は各アイソフォームの特異抗体を用いたウェスタンブロッティング法の結果を示している。抗 PP1 α 抗体は核画分と核小体画分に存在する分子量 38 kDa の蛋白と反応した。抗 PP1 δ 抗体は核画分および核小体画分に存在する 37 kDa の蛋白と強力に反応した。抗 PP1 γ 1 抗体は細胞質画分に存在する 36 kDa の蛋白と反応した。同様に MC3T3-E1 細胞を細胞分画し、各画分から蛋白溶液を調製し、ウェスタンブロッティング法で各蛋白の細胞内局在を調べた (Fig. 5)。MG63 細胞と同様に抗 PP1 α 抗体は核画分と核小体画分に、抗 PP1 δ 抗体は核画分および核小体画分に、抗 PP1 γ 1 抗体は細胞質画分に存在するそれぞれ 38, 37, および 36 kDa の蛋白と反応した。

II. PP1 δ とニュークレオリンとの関係

Fig. 1 Immunocytochemical identification of PP1 isotypes in cultured MG63 cells. The staining method is described in the text. a, PP1 α ; b, PP1 δ ; c, PP1 γ 1; and d, normal rabbit serum. Bar represents 10 μ m.

PP1 δ の細胞内局在は硝酸銀により染色され、リボゾーム RNA 合成に関与しているニュークレオリンを含む AgNORs の局在に酷似している。よって、MG63 細胞におけるニュークレオリンの細胞内局在を調べた (Fig. 6)。ニュークレオリンは主として核小体様部位に点状に分布した (Fig. 6a)。この細胞内分布は PP1 δ の局在と一致した (Fig. 6b)。二重染色により、ニュークレオリンと PP1 δ の細胞内分布は核小体様部に局在し、完全に一致した (Fig. 6c)。次にニュークレオリンと PP1 δ と

の間に直接的な結合が存在するかを抗 PP1 δ 抗体を用いた免疫沈降法で調べた。抗 PP1 δ 抗体を用いて MG63 細胞の細胞抽出液を免疫沈降すると抗ニュークレオリン抗体と反応する 100 kDa の蛋白が検出された。一方、正常ウサギ血清を用いて細胞抽出液を免疫沈降しても抗ニュークレオリン抗体と反応する蛋白は検出されなかった (Fig. 7)。以上の結果は PP1 δ は MG63 細胞の核内でニュークレオリンと結合することを意味する。

Ⅲ. RNA 合成阻害時の PP1 δ とニュークレオリン

Fig. 2 Immunocytochemical identification of PP1 isotypes in cultured MC3T3-E1 cells. The staining method is described in the text. a, PP1 α ; b, PP1 δ ; c, PP1 γ 1; and d, normal rabbit serum. Bar represents 10 μ m.

MG63 骨芽細胞を 0–15 nM の RNA 合成阻害剤 Actinomycin D で 4 時間処理した。Fig. 8a は無処理の MG 63 細胞の AgNORs の細胞内分布を示している。15 nM Actinomycin D 処理で核小体部の AgNORs の細胞内局在は変化した (Fig. 8b)。Actinomycin D 処理により MG 63 細胞の核小体構造が崩壊するに伴い、PP1 δ とニュークレオリンの細胞内局在は変化した。ともに核全体に瀰漫性に分布した (Fig. 9a and 9b)。それぞれの細胞内局在は完全に一致した (Fig. 9c)。Actinomycin D 処

理細胞から蛋白抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングを用いて PP1 δ とニュークレオリンの発現量を調べた。Fig. 10 はニュークレオリンと PP1 δ の発現を示している。PP1 δ は Actinomycin D の濃度に依存してその発現量が増加した。一方ニュークレオリンは Actinomycin D の濃度に依存してニュークレオリンの脱リン酸化型と考えられる 98 kDa 蛋白の発現量が増加した。この 98 kDa 蛋白がニュークレオリンの脱リン酸化型であることを明らかにするために、蛋白抽出液をラムダ蛋白

Fig. 3 Immunocytochemical identification of PP1 isotypes in cultured Saos-2 cells. The staining method is described in the text. a, PP1 α ; b, PP1 δ ; c, PP1 γ 1; and d, normal rabbit serum. Bar represents 10 μ m.

質脱リン酸化酵素 0-200 U と反応した (Fig. 11). 98 kDa 蛋白はラムダ蛋白脱リン酸化酵素の濃度に依存してその発現量が増加した.

IV. 細胞周期停止時の PP1 アイソフォーム

DNA 複製阻害剤である Hydroxyurea と微小管重合阻害剤である Nocodazole で MG63 細胞を処理し、細胞周期をそれぞれ G1/S 期、G2/M 期に停止させた. 同調した細胞から蛋白抽出液を調製し、ウェスタンブロッ

ティング法により PP1 各アイソフォームの発現量を調べた. 各アイソフォームは細胞周期停止に伴いそれぞれ異なった発現パターンを示した (Fig. 12). PP1 α の発現量は G1/S 期と G2/M 期で増加したが特に G1/S 期における増加が著しかった. PP1 δ の発現量は G1/S 期と G2/M 期で増加しその増加量は G2/M 期で強かった. PP1 γ 1 の発現量は G1/S 期においてのみ増加した.

Fig. 4 Identification of PP1 isotypes in cellular fractionation in exponentially growing MG 63 cells.

The cultured cells were fractionated as described in the text and protein preparation was obtained from each fraction. Twelve μ g of each fraction was separated on 12.5 % SDS-PAGE, transferred to Immobilon membranes, and incubated with each antibody. Lane 1: whole cell lysate, Lane 2: cytosolic fraction, Lane 3: nuclear fraction, Lane 4: nucleolar fraction. Upper panel, PP1 α ; middle panel, PP1 δ ; and bottom panel, PP1 γ 1.

Fig. 5 Identification of PP1 isotypes in cellular fractionation in exponentially growing MC3T3-E1 cells.

The cultured cells were fractionated and proteins obtained from each fraction as described in the text. Twelve μ g of each fraction was separated on 12.5 % SDS-PAGE, transferred to Immobilon membranes, and incubated with each antibody. Lane 1, whole cell lysate; Lane 2, cytosolic fraction; Lane 3, nuclear fraction; and Lane 4, nucleolar fraction. Upper panel, PP1 α ; middle panel, PP1 δ ; and bottom panel, PP1 γ 1.

Fig. 6 Immunocytochemical identification of nucleolin and PP1 δ in MG63 cells.

The staining method is described in the text. a, nucleolin; b, PP1 δ ; and c, dualimposition of nucleolin and PP1 δ .

Fig. 7 Interaction of PP1 δ and nucleolin in MG 63 cells.

Whole cell lysate was immunoprecipitated with normal rabbit serum (lane 2) and with anti-PP1 δ antibody (lane 3). Whole cell lysate (lane 1) and immunoprecipitants (lanes 2 and 3) were subjected to SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane. The blotted membrane was incubated with anti-nucleolin monoclonal antibody.

Fig. 8 Cytochemical identification of AgNORs in Actinomycin D-treated MG63 cells.

To inhibit RNA synthesis, the cells were treated with 15 nM Actinomycin D for 4h. The cells were stained for AgNORs as described in the text. a, AgNORs staining of untreated cells and b, AgNORs staining of actinomycin D-treated cells.

Fig. 9 Immunocytochemical identification of nucleolin and PP1δ in Actinomycin D-treated MG63 cells.

a, nucleolin; b, PP1δ; and c, dualimposition of nucleolin and PP1δ.

Fig. 10 Western blotting analysis of PP1δ and nucleolin in actinomycin D-treated MG63 cells.

Subconfluent cells were treated with various concentrations of Actinomycin D for 4 h. Lane 1, untreated control cells; lane 2, 1 nM; lane 3, 2 nM; lane 4, 5 nM; lane 5, 10 nM; and lane 6, 15 nM actinomycin D-treated cells. Upper panel, nucleolin and bottom panel, PP1δ.

Fig. 11 In vitro dephosphorylation of nucleolin by lambda protein phosphatase.

Whole cell lysate was incubated with lambda protein phosphatase for 30 min at 30 °C. The proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane. The blotted membrane was incubated with anti-nucleolin monoclonal antibody. Lane 1, untreated lysate; lane 2, 100 U; lane 3, 200 U phosphatase-treated lysate.

Fig. 12 Expression of PP1 isoforms in MG63 cells arrested at G1/S and G2/M cell cycle phase.

MG63 cells were synchronized at G1/S and G2/M phase as described in the text. Lane 1, unsynchronized cells; Lane 2, G1/S phase arrested cells; and Lane 3, G2/M phase arrested cells. Upper panel, PP1α; middle panel, PP1δ; and bottom panel, PP1γ1.

考 察

蛋白質脱リン酸化酵素は蛋白質リン酸化酵素と同様に細胞の各状態に応じて細胞内で局在し、その局在が細胞の機能に密接に関係していることが明らかになってきた²³⁾。つまり、蛋白質脱リン酸化酵素は、細胞内においてその基質に結合するか、またはその近傍に局在することが必要である。さらに蛋白質脱リン酸化酵素はホロ酵素でありその細胞内局在には調節サブユニットが関与していることが知られている。調節サブユニットの働きによりPP1は細胞質、骨格筋グリコーゲン、平滑筋原線維、胸腺細胞核に局在しその機能が調節されている^{1-4, 24, 25)}。ところが、PP1各アイソフォームの細胞内局在が調節サブユニットによって調節されているか否かについては未知の部分が多い。我々はマウス骨芽細胞においてPP1各アイソフォームが細胞内に特異的に局在することをすでに報告した²⁶⁾。さらに本研究によりPP1各アイソフォームはヒトの骨芽細胞でも特異的な細胞内局在を示すことが判った。この事は細胞内においてPP1各アイソフォームがそれぞれ異なったリン酸化蛋白を基質とし、それぞれ異なった機能を果たしていることを示唆する。また、PP1 δ アイソフォームが核小体に局在することは現在までに知られていない新しいタイプの調節サブユニットが存在する可能性を示している。

次にPP1 δ とニュークレオリンがともに核小体に局在し、かつ互いに結合することを見いだした。このことはPP1 δ の機能を解明するために重要な発見であると考ええる。PP1触媒サブユニットが調節サブユニットにより基質と結合すること、ニュークレオリンのリン酸化部位はセリン/スレオニン残基であること²⁷⁾、ニュークレオリンの脱リン酸化にはPP1またはPP2Aが関係すること²⁸⁾などが現在までに報告されてきた。これらの報告と本研究結果を総合すると、蛋白質脱リン酸化酵素1 δ はニュークレオリンを基質として、ニュークレオリンのセリン/スレオニン残基に結合したリン酸を脱リン酸化すると考えられる。

ニュークレオリンは、真核細胞の増殖期核小体部に豊富に存在するリン蛋白であり、r-RNA前駆体の転写やリボゾームの形成などに深く関わっている^{15, 16)}。したがってPP1 δ とニュークレオリンは核小体においてr-RNA合成に関与すると考えられる。一方、Actinomycin Dは*Streptomyces species*由来の抗生物質系の抗癌剤であり、リボゾームDNAと複合体を作りr-RNA合成を阻害する^{29, 30)}。PP1 δ とニュークレオリンのr-

RNA合成の関与を明らかにするために、MG63細胞をActinomycin Dで処理し細胞のRNA合成を阻害した。RNA合成阻害に伴い、PP1 δ とニュークレオリンの細胞内局在が変化し、PP1 δ の発現量とニュークレオリンの98 kDa フォームが増加した。この98 kDa 蛋白は非特異的蛋白質脱リン酸化酵素(ラムダフォスファターゼ)の作用により増加することから、ニュークレオリンの脱リン酸化フォームであると考えられる。以上の所見は核小体部におけるr-RNA合成にPP1 δ の脱リン酸化活性とニュークレオリンのリン酸化状態の変化とが何らかの役割を果たしていることを意味する。

酵母、コウジカビ、ショウジョウバエなどにおいてセリン/スレオニン蛋白質脱リン酸化酵素1型が染色体の分離とM期の脱出に必須であることが明らかになってきた³¹⁻³⁴⁾。また、哺乳類細胞においても細胞周期進行に伴いPP1の発現や酵素活性が変化することが報告されてきた³⁵⁻³⁸⁾。さらにこれらの機能にPP1の自己リン酸化による活性化が関係していることが報告されてきた³⁶⁾。著者はマウスおよびヒトの骨芽細胞でPP1の各アイソフォームの発現は細胞周期の各段階で異なることを示した。このことはPP1の発現量の変化が細胞周期進行に関与し、その役割がアイソフォームごとに異なっていることを意味する。

蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤(オカダ酸とカリクリンA)はマウス骨芽細胞のアルカリ性フォスファターゼ活性を増加させる³⁹⁾。さらに、オカダ酸とカリクリンAはSCC-25細胞、HSG細胞、Saos-2細胞およびMG63細胞にアポトーシスを誘導する⁴⁰⁻⁴⁴⁾。つまり、蛋白質脱リン酸化は細胞の増殖、分化、アポトーシスを含む細胞の様々な機能に重要な役割を果たす。本研究でさらに蛋白質脱リン酸化はRNA合成や細胞周期にも重要な役割を果たすことを明らかにした。細胞の分裂、増殖、細胞分化、RNA合成、細胞周期、アポトーシスなどは基本的な生命現象であり、このような重要な生命現象に蛋白質脱リン酸化酵素は深く関わっている。ところが、様々な生命現象に対する蛋白質脱リン酸化酵素の果たす役割について解明しなければならないことが多い。今後は蛋白質脱リン酸化酵素1型の各アイソフォームごとに系統的に研究を深め、それぞれの生命現象に対する役割を解明したい。このことは骨芽細胞の増殖、分化を含むあらゆる種類の細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなどの生命現象の理解に繋がるものと考えられる。

結 語

培養骨芽細胞における蛋白質脱リン酸化酵素 1 型の役割について形態的および生化学的に検討した。

1. 蛋白質脱リン酸化酵素 1 型の各アイソフォームはそれぞれ特異的に細胞内に局在した。
2. PP1 δ はニュークレオリンと同じ細胞内局在であり、直接的にニュークレオリンと結合することが明らかとなった。
3. RNA 合成阻害に伴い PP1 δ とニュークレオリンはその細胞内局在を変化させた。
4. RNA の合成を阻害すると PP1 δ の発現量が増加し、ニュークレオリンは脱リン酸化した。
5. 細胞周期停止に伴い、蛋白質脱リン酸化酵素の各アイソフォームは発現量に変化した。

稿を終えるにあたり、終始ご指導と御高閲を賜りました九州歯科大学口腔解剖学第 1 講座小林繁教授と徳島大学歯学部口腔解剖学第 2 講座羽地達次教授に深甚なる感謝の意を表します。また、研究の遂行に御協力を賜りました本学口腔解剖学第 1 講座および徳島大学歯学部口腔解剖学第 2 講座の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。この研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金 (特別研究員奨励費 No.11054) と平成 11 年度九州歯科大学後援会大学院生研究援助費により行った。

参考文献

- 1) Wera, S. and Hemmings, B. A.: Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.* 311: 17-29, 1995.
- 2) Mumby, M. C. and Walter, G.: Protein serine/threonine phosphatases: Structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol. Rev.* 73: 673-699, 1993.
- 3) Cohen, P.: The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 453-508, 1989.
- 4) Ingebritsen, T. S. and Cohen, P.: Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221: 331-338, 1983.
- 5) Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T. and Nagao, M.: Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 1272-1280, 1990.
- 6) 水野裕亮, 菊池九二三: プロテインホスファターゼ 1 のアイソフォームとその意義. *生体の化学* 46: 106-112, 1995.
- 7) Hunter, T.: Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-236, 1995.
- 8) Stralfors, P., Hiraga, A. and Cohen, P.: The protein phosphatases involved in cellular regulation. purification and characterization of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 149: 295-303, 1985.
- 9) Dent, P., MacDougall, L. K., Mackintosh, C., Campbell, D. G. and Cohen, P.: A myofibrillar protein phosphatase from rabbit skeletal muscle contains the beta isoform of protein phosphatase-1 complexed to a regulatory subunit which greatly enhances the dephosphorylation of myosin. *Eur. J. Biochem.* 210: 1037-1044, 1992.
- 10) Beullens, M., Van Eynde, A., Bollen, M. and Stalmans, W.: Inactivation of nuclear inhibitory polypeptides of protein phosphatase-1 (NIPP-1) by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 268: 13172-13177, 1993.
- 11) Hubbard, M. J. and Cohen, P.: On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 18: 172-177, 1993.
- 12) Faux, M. C. and Scott, J. D.: More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* 21: 312-315, 1996.
- 13) Derenzini, M.: The AgNORs. *Micron* 31: 117-120, 2000.
- 14) Sirri, V., Roussel, P., Gendron, M. C. and Hernandez-Verdun, D.: Amount of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 28: 147-156, 1997.
- 15) Srivastava, M. and Pollard, H. B.: Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* 13: 1911-1922, 1999.
- 16) Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. and Bouvet, P.: Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* 112: 761-772, 1999.
- 17) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S.: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96: 191-198, 1983.
- 18) Rodan, S. B., Imai, Y., Thiede, M. A., Wesolowski, G., Thompson, D., Bar-Shavit, Z., Shull, S., Mann, K. and Rodan, G. A.: Characterization of human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res.* 47: 4961-4966, 1987.
- 19) Franceschi, R. T., James, W. M. and Zerlauth, G.: 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ specific regulation of growth, morphology, and fibronectin in human osteosarcoma cell line. *J. Cell. Physiol.* 123: 401-409, 1985.
- 20) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.

- Nature 227: 680-685, 1970.
- 21) Muramatsu, M., Hayashi, T., Saki, M., Takai, K. and Kashiyama, T.: Rapid isolation of nucleoli from detergent purified nuclei of various tumor and tissue culture cells. *Exp. Cell Res.* 88: 245-251, 1974.
 - 22) Goodpasture, C. and Bloom, S. E.: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50, 1975.
 - 23) Inagaki, N., Ito, M., Nakano, T. and Inagaki, M.: Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *Trends Biochem. Sci.* 19: 448-452, 1994.
 - 24) Barford, D., Das, A. K. and Egloff, M. P.: The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27: 133-164, 1998.
 - 25) Campos, M., Fadden, P., Alms, G., Qian, Z. and Haystead, T. A. J.: Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 271: 28478-28484, 1996.
 - 26) Haneji, T., Morimoto, H., Morimoto, Y., Shirakawa, S., Kobayashi, S., Kaneda, C., Shima, H. and Nagao, M.: Subcellular localization of protein phosphatase type 1 isotypes in mouse osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 39-43, 1998.
 - 27) Schneider, H. R. and Issinger, O. G.: Nucleolin (C23), a physiological substrate for casein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156: 1390-1397, 1988.
 - 28) Schneider, H. R., Mieskes, G. and Issinger, O. G.: Specific dephosphorylation by phosphatase 1 and 2A of a nuclear protein structurally and immunologically related to nucleolin. Possible influence on the regulation of rRNA synthesis. *Eur. J. Biochem.* 180: 449-455, 1989.
 - 29) Wadkins, R. M., Jares-Erijman, E. A., Klement, R., Rudiger, A. and Jovin, T. M.: Actinomycin D binding to single-stranded DNA: sequence specificity and hemi-intercalation model from fluorescence and ¹H NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 262: 53-68, 1996.
 - 30) Chen, H., Liu, X., and Dinshaw J. P.: DNA bending and unwinding associated with actinomycin D antibiotics bound to partially overlapping sites on DNA. *J. Mol. Biol.* 258: 457-479, 1996.
 - 31) Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. and Yanagida, M.: The fission yeast *dis²⁺* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell* 57: 997-1007, 1989.
 - 32) Hisamoto, N., Sugimoto, K. and Matsumoto, K.: The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G₂/M. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3158-3165, 1994.
 - 33) Doonan, J. H. and Morris, N. R.: The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell* 57: 987-996, 1989.
 - 34) Axton, J. M., Dombradi, V., Cohen, P. T. W. and Glover, D. M.: One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell* 63: 33-46, 1990.
 - 35) Nakamura, K., Koda, T., Kakinuma, M., Matsuzawa, S., Kitamura, K., Mizuno, Y. and Kikuchi, K.: Cell cycle dependent gene expressions and activities of protein phosphatases PP1 and PP2A in mouse NIH3T3 fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 507-514, 1992.
 - 36) Puntoni, F. and Villa-Moruzzi, E.: Protein phosphatase-1 α , γ 1, and δ : Changes in phosphorylation and activity in mitotic HeLa cells and in cells released from the mitotic block. *Arch. Biochem. Biophys.* 340: 177-184, 1997.
 - 37) Nelson, D. A., Krucher, N. A. and Ludlow, J. W.: High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein. *J. Biol. Chem.* 272: 4528-4535, 1997.
 - 38) Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Villa-Moruzzi, E. and Margolis, R. L.: Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 α , γ 1, and δ isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 273: 1207-1215, 1998.
 - 39) Murata, T., Shirakawa, S., Takehara, T., Kobayashi, S. and Haneji, T.: Protein phosphatase inhibitors, okadaic acid and calyculin A, induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36: 365-372, 1995.
 - 40) Morimoto, Y., Ohba, T., Kobayashi, S. and Haneji, T.: The protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A induce apoptosis in human osteoblastic cells. *Exp. Cell Res.* 230: 181-186, 1997.
 - 41) Morimoto, Y., Morimoto, H., Kobayashi, S., Ohba, T. and Haneji, T.: The protein phosphatase inhibitors, okadaic acid and calyculin A, induce apoptosis in human submandibular gland cell line HSG cells. *Oral Dis.* 5: 104-110, 1999.
 - 42) Fujita, M., Seta, C., Fukuda, J., Kobayashi, S. and Haneji, T.: Induction of apoptosis in human oral squamous carcinoma cell line SCC-25 cells by protein phosphatase inhibitors. *Eur. J. Cancer* 35: 401-408, 1999.
 - 43) Morimoto, H., Morimoto, Y., Kido H., Kobayashi, S., Ohba, T. and Haneji, T.: Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis protect against okadaic acid induced apoptosis in human osteosarcoma cell line

- MG63 cells but not in Saos-2 cells. *J. Bone Miner. Metab.* 17: 266-273, 1999.
- 44) Morimoto, Y., Morimoto, H., Okamura, H., Nomiya, K., Nakamuta, N., Kobaysshi, S., Kito, S., Ohba, T. and Haneji, T.: Upregulation of the expression of Fas antigen and Fas ligand in a human submandibular gland ductal cell line by okadaic acid. *Arch. Oral Biol.* 45: 657-666, 2000.