[シンポジウム 2 : 病態プロテオミクス 最近の進歩 I. 発現プロテオミクス 原著]

アポトーシスのプロテオミクス

藏満保宏・藤本正憲・中村和行

SUMMARY

In these days proteome analyses are performed in the field of apoptosis. There are two methods to identify the proteins related to apoptosis. The first is to identify the proteins whose expression change after adding the stimuli which induce apoptosis in cells. The second is to compare 2DE pattern of intracellular proteins from two cell lines, one is sensitive against the inducer to apoptosis, and the other is resistant against this. We used these two methods and identified some proteins which may be related to apoptosis.

For the first, heat shock (45°C, 30 min) induced the over expression of stathmin and thymosin β -4 in human T cell line Jurkat, and decrease of eukaryotic initiation factor 5A in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2.

For the second, we established TNF- α -resistant cell line cKDH-8/11 and sensitive cell line KDH-8/YK from rat hepatoma cell line KDH-8. From differential display using 2-DE, we detected spot 1 which expressed in only KDH-8/YK, and spot 2 whose expression is increased in cKDH-8/11. The spot 2 was identified as phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP).

Key words: proteomics, proteome, apoptosis, 2DE, PEBP.

緒 言

ゲノム解析が完了し, post-genome project として, ゲノム構成遺伝子の翻訳産物である全てのタンパク質の解析, すなわち「proteomics / プロテオミクス」が始まっている。プロテオミクスとは, 網羅的にタンパク質を分離同定して疾患, 環境, 薬物などに対し特異的に変動するタンパク質を特定し, それらの発現, 機能を解析, データベース化して医療に応用しようとするものである。昨今, 二次元電気泳動 (2DE) と質量分析によるタンパク質一次構造決定の技術を駆使したプロテオーム解析が盛んであるが, アポトーシスの研究分野でもプロテオーム解析が進められている。

アポトーシスとは, 主に病理的な外因によって細胞が膨潤, 破裂して死に至るネクローシスとは異なり, より生理的な細胞死のことである。細胞の縮小, クロマチンの凝集, 核の断片化, アポトーシス小体の形成が見られる。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ので, より自然に起こり終結する^{1,2)}。このアポトーシスのプロテオーム解析には, 細胞にアポトーシスを誘導する刺激を加えて細胞内の発現が増強または減少してくるタンパク質を検出する方法がとられる。今までこの方法で cytokeratin 18, peroxiredoxin 4, caspase-3, caspase-4, cathepsin D, hsp27, Bcl-2, STAT3, p-STAT3, peroxiredoxins の acidic form 等のアポトーシス関連タンパク質が同定されている^{3~7)}。またもう一つの方法としてアポトーシス誘導因子に対して感受性と抵抗性の細胞株を樹立して互いに比較して検討する方法がある。つまり, TNF- α などの誘導因子によってアポトーシスに陥る株と陥らない株を比較し, 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と考えられる。2DE でこの2株の細胞内タンパク質を分離して比較し, 感受性株に発現の多いタンパク質ならばアポトーシスに正に働く

Proteomics for Apoptosis.

Yasuhiro Kuramitsu, Masanori Fujimoto, Kazuyuki Nakamura; 山口大学医学部分子感知医科学講座・生化学

Correspondence address: Yasuhiro Kuramitsu; Department of Biochemistry and Biomolecular Recognition, Yamaguchi University School of Medicine, Minami-kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan.

略語一覧: 2DE; two dimensional electrophoresis, PEBP; phosphatidylethanolamine-binding protein.

第 53 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

(受付 2003 年 7 月 14 日, 受理 2003 年 7 月 21 日, 刊行 2003 年 12 月 15 日)

もので、抵抗性株に発現の多いタンパク質ならば負に働くものであると考えられる。今回、我々は上記の方法を用いてアポトーシスに関連すると考えられるタンパク質をいくつか同定したので紹介する。

材料と方法

ヒト T リンパ芽球性白血病株の Jurkat と、ヒト膀胱癌細胞株 MIA PaCa-2 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際に変化する細胞内タンパク質を 2DE を用いて解析した。まず Jurkat と MIA PaCa-2 に 45°C で 30 分間熱ショックをかけた。細胞を回収、PBS (-) にて洗浄後、1 mM EDTA を用いて細胞内可溶性タンパク質を抽出した。そのサンプルを等電点電気泳動と SDS-PAGE の組み合わせによる 2DE によって分離して、37°C のままのコントロールの泳動像と、45°C で 30 分間熱ショックをかけた泳動像とを詳細に比較した。熱ショックを与えた細胞内で増加したスポットのタンパク質のアミノ酸配列をエドマン分解法により決定した。一方、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のために、DAB 発癌ラット肝細胞癌 KDH-8 から、TNF- α に対して感受性の KDH-8/YK と抵抗性の cKDH-8/11 の 2 種類のサブクローンを樹立した⁸⁻¹⁰⁾。同様に、細胞質内可溶性タンパク質を 2DE を用いて分離してその発現を比較し、その発現に違いのあるスポットのタンパク質のアミノ酸配列をエドマン分解法により決定した。

結 果

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

18.5 kDa、等電点 (pI) 5.6 のスポットが増加していた。このスポットのタンパク質の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¹¹⁾。さらに、分子質量 10.0 kDa 以下、pI 5.1 のスポットが 45°C から 51°C での 30 分の熱ショックで増加し、アミノ酸配列の決定の結果 thymosin β -4 であることが明らかになった¹²⁾ (Fig. 1)。

MIA PaCa-2 に熱ショックを与えると、アポトーシスの特徴とされる DNA の断片化は観察されなかったが、細胞の増殖が抑制されて細胞死が誘導されており、細胞内タンパク質の 2DE による解析で eukaryotic initiation factor 5A の発現が減少していることが明らかになった¹³⁾ (Fig. 2, Fig. 3)。

TNF- α に対して感受性である KDH-8/YK と、抵抗性の cKDH-8/11 (Fig. 4) の細胞質内可溶性タンパク質の 2DE 分離像を比較すると、KDH-8/YK のみに発現する分子質量 36 kDa、pI 4.8 のスポット 1 と、cKDH-8/11 に強く発現する分子質量 23 kDa、pI 5.0 のスポット 2 を認めた。このうちスポット 2 のタンパク質のアミノ酸配列を決定したところ、phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) であることが明らかになった¹⁴⁾ (Fig. 5)。

考 察

細胞にアポトーシスを誘導させ、発現が変化してくる細胞内タンパク質を 2DE によって分離・同定する方法とアポトーシス誘導因子に対して感受性と抵抗性の株を樹立し、それらの細胞内タンパク質を 2DE で分離して比較検討する方法はアポトーシスのプロテオーム解析の方法として有効であると考えられた。

Phosphatidylethanolamine (PE) は正常では細胞膜内側に局在して膜脂質の非対称性を維持しているが、アポトーシ

Fig. 1. Intracellular proteins in Jurkat cells exposed to heat stress were analysed by 2-DE.

The cells were incubated (A) at 37°C for 30 min, (B) at 45°C for 30 min, and lysed in 1mM EDTA. The protein samples were separated with 2-DE. The arrows indicate thymosin β -4, and the open arrow heads indicate stathmin.

Fig. 2. Intracellular proteins in MIA PaCa-2 cells exposed to heat stress were analysed by 2-DE.

The cells were incubated (A) at 37°C for 30 min, (B) at 45°C for 30 min, and (C) 51°C for 30 min, and lysed in 1 mM EDTA. The protein samples were separated with 2-DE. The arrows indicate eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A).

スの細胞では逆に細胞膜外側に局在してくることが報告されている¹⁵⁾。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てアポトーシスが抑制され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、

Fig. 3. Magnification of the 2-DE pattern indicated by the square in Fig. 2. (A) 37°C, (B) 45°C, (C) 51°C.

Fig. 4. The sensitivity of rat hepatoma cell lines KDH-8/YK and cKDH-8/11 against TNF-α.

Raf-1 による transformation と AP-1 依存型転写が抑制される^{16,17)}。現在、この PEBP の発現を cKDH-8/11 細胞で減少させることで TNF-α によるアポトーシスが誘導されるようになるか、また、KDH-8/YK 細胞で PEBP の発現を増強させてアポトーシスが抑制されるかを確認中である。また、同時に KDH-8/YK のみに発現するスポット 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。

Fig. 5. 2-DE patterns of intracellular proteins of KDH-8/YK and cKDH-8/11 cells.

The patterns are for KDH-8/YK cells (A) and cKDH-8/11 (B). The open arrow heads indicate spot 1 of 36 kDa and pI 4.8. The arrows indicate spot 2 of 23 kDa and pI 5.0, which was identified as phosphatidylethanolamine-binding protein.

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, 東京: 羊土社, 1996:12-15.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.

- 17) 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.

要 旨

アポトーシスの研究分野でプロテオーム解析が進められている。これには、細胞にアポトーシスを誘導する刺激を加えて発現が変化するタンパク質を検出する方法と、アポトーシス誘導因子に対して感受性と抵抗性の細胞株を樹立して比較検討する方法がある。今回、我々は上記の二つの

方法を用いてアポトーシスに関連すると考えられるタンパク質をいくつか同定した。

45°C, 30 分間の熱ショックによりヒト T 細胞株の Jurkat の stathmin と thymosin β -4 の発現が増強され、またヒト膀胱癌細胞株 MIA PaCa-2 には eukaryotic initiation factor 5A の発現が減少することが確認された。

TNF- α 感受性の KDH-8/YK と、抵抗性の cKDH-8/11 を樹立して細胞質内可溶性タンパク質の 2DE 分離像を比較すると、KDH-8/YK のみに発現するスポット 1 と、cKDH-8/11 に強く発現するスポット 2 を認めた。このうちスポット 2 のタンパク質のアミノ酸配列を決定したところ、phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) であることが明らかになった。