

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Vitamin K2 によるがん細胞のアポトーシス誘導機構の解明
Title(English)	
著者(和文)	唐澤慧記
Author(English)	Satoki Karasawa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9038号, 授与年月日:2013年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9038号, Conferred date:2013/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 24 年度 学位論文

Vitamin K2 によるがん細胞の アポトーシス誘導機構の解明

東京工業大学

大学院生命理工学研究科

生命情報専攻

平成 23 年度入学

学籍番号: 11D23023

唐澤 慧記

指導教官: 山口 雄輝

目次

第1章 序論

1-1 緒言.....	1
1-2 本研究の背景	
1-2-1 ビタミン.....	2
1-2-2 ビタミン K.....	3
1-2-3 VK の生理活性.....	4
1-2-4 GGCX 非依存的な VK2 の生理活性.....	6
1-2-5 VK2 の抗がん活性.....	7
1-2-6 本研究の目的.....	7

第2章 VK2 によるアポトーシス誘導経路の解析

2-1 緒言.....	9
2-2 材料及び方法	
2-2-1 抗体及び試薬.....	10
2-2-2 生細胞測定.....	10
2-2-3 細胞抽出液の調製.....	10
2-2-4 SDS-PAGE.....	11
2-2-5 Western blotting.....	12
2-2-6 HL60 細胞を用いたミトコンドリア膜電位の測定.....	14
2-2-7 ミトコンドリアから細胞質への cytochrome <i>c</i> 放出の解析.....	14
2-2-8 免疫蛍光染色.....	14
2-2-9 ラット肝臓ミトコンドリアの単離.....	15
2-2-10 単離ミトコンドリアを用いたミトコンドリア膜電位の測定.....	15
2-3 結果及び考察	
2-3-1 HL60 細胞及び HeLa 細胞における VK2 のアポトーシス誘導活性.....	17
2-3-2 ミトコンドリアを介するアポトーシス誘導経路に対する VK2 の影響.....	18
2-3-3 単離ミトコンドリアに対する VK2 の影響.....	20
2-4 本章のまとめ.....	22

第3章 VK2 標的タンパク質の探索

3-1 緒言.....	23
3-2 材料及び方法	
3-2-1 抗体.....	24
3-2-2 VK2 固定化ビーズの作製.....	24
3-2-3 HL60 細胞の細胞質画分抽出液の作製.....	25
3-2-4 VK2 固定化ビーズを用いたアフィニティ精製.....	25
3-2-5 プラスミド DNA の調製.....	26
3-2-6 リポフェクション法による FLAG-Bak の一過的発現.....	26
3-2-7 <i>in vitro</i> における組換え Bak 及び Bax の調製.....	26
3-2-8 siRNA を用いたノックダウン実験.....	26
3-3 結果と考察	
3-3-1 VK2 固定化ビーズを用いた VK2 結合タンパク質の探索.....	28
3-3-2 VK2 がミトコンドリアタンパク質に及ぼす影響.....	30
3-3-3 VK2 と Bak 及び Bax の結合活性の解析.....	32
3-3-4 VK2 のアポトーシス誘導に対する Bak 及び Bax ノックダウンの影響.....	33
3-4 本章のまとめ.....	36

第4章 VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾の解析

4-1 緒言.....	37
4-2 材料及び方法	
4-2-1 質量分析サンプルの調製	
4-2-1-1 FLAG 精製.....	38
4-2-1-2 限外濾過によるタンパク質の濃縮及び溶媒交換.....	38
4-2-2 質量分析.....	38
4-2-3 FD5M を用いたチオール基の標識.....	39
4-2-4 Tris-Tricine SDS-PAGE.....	39
4-2-5 MEF 細胞の cDNA 調製.....	39
4-2-6 プラスミド DNA の調製.....	40
4-3 結果及び考察	
4-3-1 質量分析による VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾の解析.....	41
4-3-2 Bak における VK2 特異的な翻訳後修飾部位の特定.....	43

4-3-3 Bak における VK2 相互作用領域の解析①.....	45
4-3-4 Bak における VK2 相互作用領域の解析②.....	46
4-3-5 Bak における VK2 相互作用部位の同定.....	47
4-3-6 Bak の立体構造を踏まえた VK2 相互作用部位の解析.....	48
4-3-7 mouse Bak に対する VK2 の影響.....	50
4-4 本章のまとめ.....	53

第 5 章 VK2 による Bak の修飾とアポトーシス誘導の関係性

5-1 緒言.....	54
5-2 材料及び方法	
5-2-1 試薬.....	55
5-2-2 293T 細胞の培養.....	55
5-2-3 プラスミド DNA の調製.....	55
5-2-4 細胞内活性酸素種レベルの測定.....	55
5-2-5 warfarin による HL60 細胞の前処理.....	56
5-2-6 Vitamin K2 2,3-epoxide (VK2-O) の合成.....	56
5-3 結果と考察	
5-3-1 VK2 によるアポトーシス誘導に warfarin が及ぼす影響.....	57
5-3-2 VK2-O によるアポトーシス誘導に warfarin が及ぼす影響.....	58
5-3-3 VK2 による活性酸素種の発生誘導とアポトーシス誘導の関係.....	60
5-3-4 VK1, VK2 及び VK3 のアポトーシス誘導活性及び Bak の翻訳後修飾 活性の比較.....	62
5-3-5 MK-4 と MK-7 のアポトーシス誘導活性及び Bak の翻訳後修飾活性 の比較.....	65
5-4 本章のまとめ.....	67

第 6 章 総括

6-1 緒言.....	68
6-2 本研究のまとめ	
6-2-1 VK2 によるアポトーシス誘導経路.....	69
6-2-2 VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾.....	70
6-2-3 VK2 のアポトーシス誘導における vitamin K サイクルの役割.....	71

6-3 考察	
6-3-1 VK2によるアポトーシス誘導経路.....	73
6-3-2 Bak 特異的な VK2 のアポトーシス誘導活性.....	73
6-3-3 VK2 の生理活性とアポトーシス誘導の関係.....	74
6-3-4 VK2 のアポトーシス誘導における Bak の翻訳後修飾の重要性.....	75
6-3-5 VK2-O と Bak の共有結合形成メカニズム.....	76
6-4 本研究の意義と今後の展望	
6-4-1 本研究を通じて得られた成果と今後の展望.....	78
6-4-2 医学的な立場から見た本研究の成果と今後の展望.....	79
6-4-3 本研究の意義.....	80
参考文献.....	81
謝辞.....	90

第1章 序論

1-1 緒言

我々ヒトの体は水分、タンパク質、脂肪、ミネラルなどから構成され、これらのいずれかが欠けても正常な生命活動を維持することは不可能である。従属栄養生物であるヒトは様々な食料を摂取し、外部から栄養素を摂取することで、生命活動を正常に営むことが可能となる。上記に示した4つの要素を足し合わせると、生体構成因子の99%以上にもなるが、これだけではまだ完全な生命体は完成しない。これらに加えて、ビタミンが正常な生命活動を補完する最後の因子となる。

ビタミンは、生命活動を維持するために十分な量を生体内で合成できず、外部から摂取する必要がある有機化合物の総称であり、慣例上、アミノ酸と脂肪酸は含まれない。現在までに13種類の物質がビタミンとして分類されており、各ビタミンは生体内の特定の機能に必須の因子として、正常な生命活動に不可欠なものとなっている。数々の研究により、各ビタミンの発見当初に知られていた生理活性に対する分子メカニズムの多くは解明され、その役割は十分理解されたものと認識されていた。しかし、その後の研究により、ビタミンは発見当初に知られていた生理活性以外にも多様な生理活性を有することが明らかとなっている。これらの生理活性の分子メカニズムは未だ明らかにされていないものも多く存在し、これらを解明することは基礎的な生命現象の理解や生理活性の分子メカニズムを基盤とした医薬品開発へ繋がると考えられる。

本研究で着目したビタミンK2は、血液凝固における必須因子として発見され、その後の研究により抗がん作用を有することが明らかにされた。ビタミンK2を過剰量服用しても毒性が現れないことから、重篤な副作用のない、安全な抗がん剤としてその存在を捉えることができる。しかしながら、ビタミンK2自身の抗がん活性は抗がん治療に利用できるほど十分強くはないことから、がん治療には用いられていない。そこで、ビタミンK2の抗がん活性メカニズムを分子レベルで解明することは、分子メカニズムを基盤とした副作用の少ない抗がん剤の開発に繋がると期待される。そこで本研究では、ビタミンK2の有する抗がん活性に着目し、その分子メカニズムの解明を行った。

1-2 本研究の背景

1-2-1 ビタミン

ビタミンは化学構造ではなく、生化学的もしくは化学的な機能に準じて分類され、現在までに 13 種類のビタミンが発見されている (Table 1.1)。ビタミンの多くは酵素の補因子として働き、各酵素が機能する上で不可欠な存在である。また酵素の補因子として働く以外にも、ビタミン A は細胞増殖や細胞分化の制御、ビタミン D はミネラルの代謝制御に関与するなど、ホルモン様の活性を示すものも存在する。一方、ビタミン C やビタミン E は、ビタミン自身が抗酸化作用を有し、生体内の酸化ストレスの消去に関与する。このように、各ビタミンは固有の機能を持ち、その機能は他の因子による代替が効かないことから、継続的に外部からビタミンを摂取しなくてはならない。

近年の研究により、ビタミンの発見に由来する古典的な機能の他に、ビタミンは様々な生理活性を有することが報告されている。脂溶性ビタミンの一種であるビタミン D は、発生に重要なヘッジホッグシグナル経路を構成する *Smoothed* に直接結合し、その機能を阻害することが知られている (Bijlsma et al., 2005)。抗酸化作用を示すビタミン C は免疫細胞内に高濃度で存在し、ウイルス感染時に速やかに消費されることが明らかになっている (Preedy et al., 2010)。しかしながら、ウイルス感染時に免疫細胞内でビタミン C が消費される現象の分子メカニズムやその生理的意義は解明されていない。そのため、近年明らかになったビタミンの生理活性の分子メカニズムの解明を目指した研究が現在も行われている。

名称	化合物名	生理活性
Vitamin A	レチノール レチナール レチノイン酸 これらの3-デヒドロ体とその誘導体	網膜細胞保護・視神経における信号伝達
Vitamin B ₁	チアミン	糖・分岐脂肪酸の代謝
Vitamin B ₂	リボフラビン	脂肪代謝、呼吸、赤血球の形成
Vitamin B ₃	ナイアシン	糖・タンパク質・脂肪酸の代謝
Vitamin B ₅	パントテン酸	糖・脂肪酸の代謝
Vitamin B ₆	ピリドキサン ピリドキサール ピリドキサミン	アミノ酸の代謝・神経伝達
Vitamin B ₇	ビオチン	糖・脂肪酸の代謝
Vitamin B ₉	葉酸	アミノ酸・核酸の代謝
Vitamin B ₁₂	シアノコバラミン	核酸合成・脂肪酸合成・エネルギー産生
Vitamin C	アスコルビン酸	コラーゲン合成・Vitamin E再生
Vitamin D	エルゴカルシフェロール コレカルシフェロール	血中カルシウム濃度の上昇
Vitamin E	トコフェロール	抗酸化作用
Vitamin K	フィロキノン メナキノン	血液凝固、骨形成

Table 1.1 現在までに発見されているビタミン

各ビタミンの化合物名及び主な生理活性を示した。

1-2-2 ビタミン K

ビタミン K (VK) は 1929 年、デンマークの生理学者 Henrik Dam によって発見された (Dam, 1929)。Dam はコレステロールを欠乏させた餌を鶏に与え続けることにより易出血性となること、その症状はコレステロールの投与で回復しないことから、血液凝固に必要な未知の因子の存在に気づき、VK の発見に至った。Dam は VK の発見と人体に対する機能の解明により、アメリカ合衆国の生化学者 Edward Albert Doisy と共に、1943 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。

VK に属するビタミンは天然に存在する VK1 (phylloquinone) と VK2 (menaquinone)、化学的に合成された VK3 (menadione) の 3 種類に分類されている。この分類は VK の共通骨格であるメチルナフトキノンの 3 位に位置する側鎖の構造を基準にしている。VK2 は menaquinone-n (MK-n, n = 1~14) とも呼ばれる (n は側鎖におけるイソプレン単位の繰り返し数) (Fig. 1.1)。VK1 は光合成における光化学系 I の電子伝達体として働いている (Biggins and Mathis,

1988)。また、VK1 はヒト体内で VK2 に変換される場合もあることから、VK2 の前駆体としても利用される (Davidson et al., 1998)。VK2 は側鎖の長さにより 14 種類の類縁体が知られているが、生体内に存在するのは主に MK-4 と MK-7 である。MK-4 は外部から摂取する以外に、睾丸や脾臓などの組織で VK1 から産生される (Shearer and Newman, 2008)。これに対し、MK-7 は生体内組織で産生されないが、腸内細菌により VK1 から変換されて産生される (Vermeer and Braam, 2001)。VK3 は家畜の飼料などに使用されている。

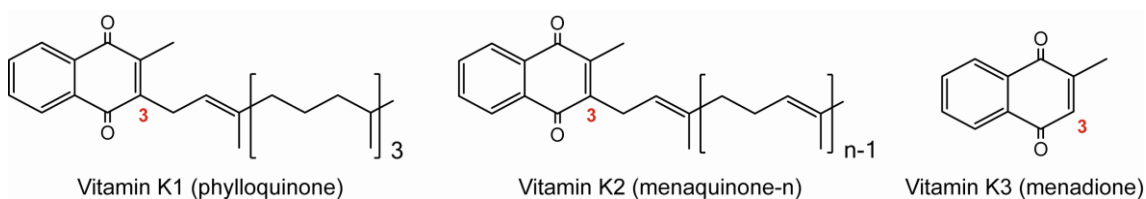


Fig. 1.1 ビタミン K 化合物の構造式
赤字はメチルナフトキノンの 3 位を示す。

1-2-3 VK の生理活性

VK は元々血液凝固の必須因子として発見された (Dam, 1935)。血液凝固における VK の生理活性は、vitamin K oxide reductase complex, subunit 1 (VKORC1), VKORC1 like 1 (VKORC1L1) 及び γ -glutamyl carboxylase (GGCX) の 3 つのタンパク質によって形成される VK の代謝サイクル (Vitamin K サイクル, Fig. 1.2) によって担われている (Stafford, 2005)。VK は VKORC1 及び VKORC1L1 により VK hydroquinone (VK-H2) に変換される。VK-H2 は GGCX の補因子として働き、GGCX が基質タンパク質のグルタミン酸残基をカルボキシル化するために不可欠である (Fig. 1.2)。GGCX が基質タンパク質をカルボキシル化するのに伴って VK-H2 は VK 2,3-epoxide (VK-O) に変換されるが、VK-O は VKORC1 及び VKORC1L1 により再度 VK に変換され再利用される。血液凝固の際に働く Factor VII, Factor IX, Factor X などのタンパク質は GGCX の基質であり、特定のグルタミン酸残基が GGCX によってカルボキシル化されること (γ -carboxylation) がそれぞれの酵素活性に必須であることから、VK は血液凝固に欠かせない因子となっている (Stafford, 2005)。また、骨におけるカルシウムの取り込みやミネラル化の重要な制御因子 osteocalcin も GGCX による

γ -carboxylation がその酵素活性に必須であることが明らかになっており、VK は骨形成にも必須の因子となっている (Hauschka et al., 1975)。上記の様に、VK は血液凝固と骨形成に必須の因子であることから、VK が適切摂取量に満たない場合、これらの機能不全が原因となる VK 欠乏症の症状が現れる。実際、新生児は生体内で VK をうまく合成できないことから、VK 欠乏性出血症になりやすいことが知られている (Thorpe et al., 1975)。VK 不足に由来する γ -carboxylation されていない osteocalcin (undercarboxylated osteocalcin, ucOC) の増加は骨粗鬆症の原因の 1 つであり、血清中の ucOC は骨粗鬆症や骨折リスクのバイオマーカーとして利用されている (Iwamoto et al., 2004)。GGCX の γ -carboxylation 活性を最も高める VK は VK2 に分類される MK-4 であることから、MK-4 は新生児のビタミン K 欠乏性出血症の治療用シロップとして用いられ、日本では骨粗鬆症の治療薬としても広く使用されている。

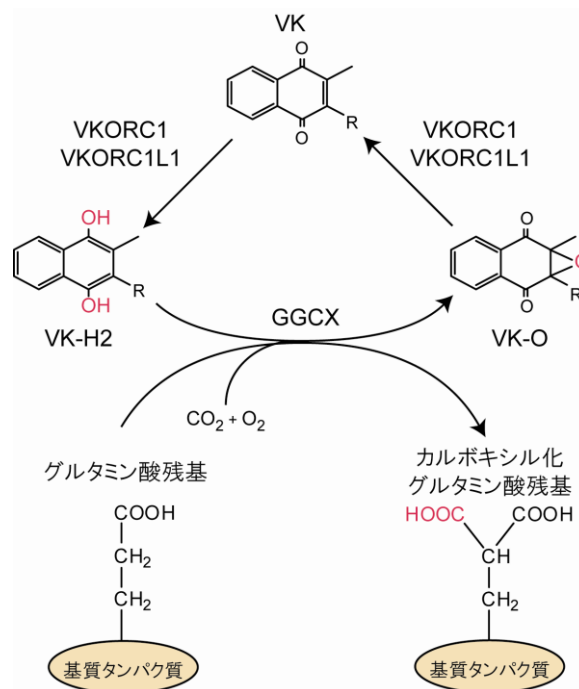


Fig. 1.2 Vitamin K サイクルによる VK の代謝及び GGCX による γ -carboxylation の模式図

VK の化学構造における R は VK 化合物の側鎖を表す。GGCX は VK-H2 を補因子として用い、基質タンパク質の特定グルタミン酸残基の γ 位炭素にカルボキシル基を導入する。VKORC1: vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1; VKORC1L1: VKORC1 like 1; GGCX: γ -glutamyl carboxylase; VK-H2: vitamin K hydroquinone; VK-O: vitamin K 2,3-epoxide.

1-2-4 GGCX 非依存的な VK2 の生理活性

GGCX を介する上記の生理活性に加え、VK の中でも特に VK2 は他の細胞内タンパク質に直接結合することで生理活性を示すことが知られている。以降、特記しない限り、VK2 は MK-4 を指す。Tabb らは遺伝生化学的なスクリーニングにより、核内受容体スーパーファミリーのオーファンレセプターである steroid xenobiotic receptor (SXR) に VK2 が直接結合し、VK2 と SXR の結合が SXR の活性化を引き起こすことを報告した (Tabb et al., 2003)。Ichikawa らは骨芽細胞由来 MG-63 細胞を用いて、SXR が細胞外マトリックスの蓄積に關与する *Tsukushi* を標的遺伝子としていることを明らかにした (Ichikawa et al., 2006)。さらに、Igarashi らはマウス骨芽細胞由来 MC3T3E1 細胞において、VK2 が pregnane X receptor (PXR, 齧歯類における SXR) と結合し、骨芽細胞分化決定因子の 1 つである *msh homeobox 2* の転写を誘導することで骨芽細胞の分化を促していることを報告した (Igarashi et al., 2007)。以上のことから、VK2 は SXR (または PXR) を介して骨形成に關与する遺伝子の転写を制御することで、骨形成に重要な役割を果たしていると考えられる。よって、VK2 は生体内において GGCX とは異なるタンパク質を介しても様々な生理活性を示す。GGCX 依存的な経路と GGCX 非依存的な経路による VK2 の生理活性を Fig. 1.3 にまとめた。

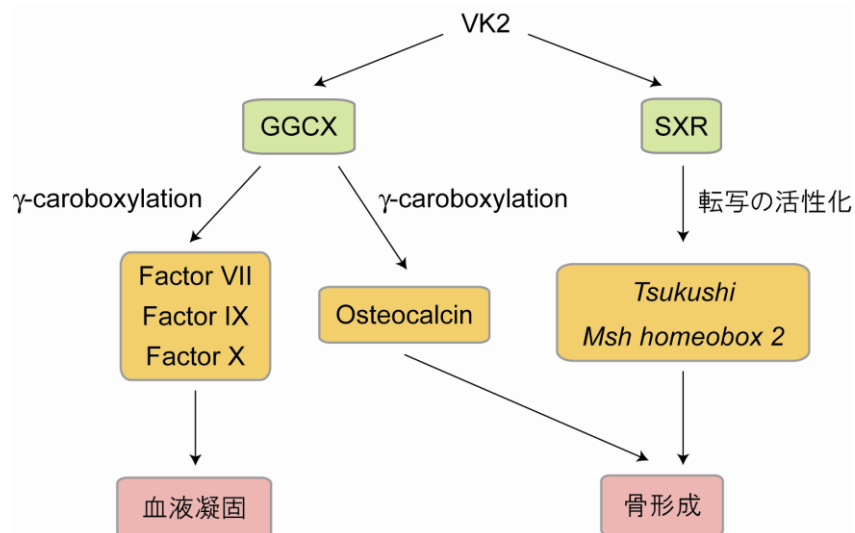


Fig. 1.3 VK2 結合タンパク質と VK2 の生理活性の関係性

VK2 が直接結合するタンパク質 (緑)、VK2 結合タンパク質によって活性化されるタンパク質または転写が誘導される遺伝子 (橙)、VK2 によってもたらされる生理活性 (赤) を示した。

1-2-5 VK2 の抗がん活性

血液凝固や骨形成といった生理活性の他に、VK2 は抗がん活性を有することが知られている。白血病細胞に対する VK2 の抗がん活性が報告されたことから (Yaguchi et al., 1997; Yaguchi et al., 1998)、白血病や前白血病と捉えられている骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS) に対する VK2 の治療効果が調べられ、VK2 投与により MDS 及び MDS から移行した急性骨髄性白血病の症状が緩和されることが明らかとなった (Yaguchi et al., 1999; Miyazawa et al., 2000)。一方、Habu らは VK2 投与により肝硬変から肝細胞がんへの進行が防止されることを報告した (Habu et al., 2004)。また、肝細胞がん完治後に VK2 を服用することで、その再発が抑制されることも報告された (Mizuta et al., 2006)。これらの報告により、VK2 の抗がん活性は広く認められるものとなった。

VK2 による抗がん作用は、種々のがん細胞株を用いて解析されている。VK2 は MDS 由来の細胞株に対してアポトーシスを誘導すること、また急性骨髄性白血病由来の細胞株に対してアポトーシス、G1 停止及び分化誘導を引き起こすことで細胞増殖を阻害していることが報告された (Nishimaki et al., 1999; Miyazawa et al., 2001; Yokoyama et al., 2008)。また、肝細胞がん由来の細胞株に対しても、VK2 がアポトーシスや G1 停止を誘導することが報告された (Otsuka et al., 2004; Matsumoto et al., 2006; Li et al., 2010)。他にも VK2 は多発性骨髄腫や胃がん、大腸がんなどを由来とする種々のがん細胞株に対して、アポトーシスを誘導することが明らかとなっている (Tokita et al., 2005; Tsujioka et al., 2006; Kawakita et al., 2009)。VK2 による抗がん作用は *in vitro* と *in vivo* の双方において確認されているが、既存の抗がん剤を代替できるほど VK2 の抗がん活性は十分に強くなく、未だがん治療に利用されていない。しかし、VK2 は過剰量服用しても特に毒性を示さないことから、VK2 による抗がん作用の分子メカニズムを解明することは、副作用をほぼ持たない抗がん剤の開発に繋がると考えられる。

1-2-6 本研究の目的

種々のがん細胞株に対して、VK2 によるアポトーシス誘導効果が観察されていることから、VK2 による抗がん作用は主にアポトーシス誘導によるものと考えられる。しかし、血液凝固や骨形成における VK2 の作用機構に比べて、VK2

によるアポトーシス誘導の分子メカニズムはあまり解明されておらず、一見矛盾を含む実験結果も報告されている。その一例として、多発性骨髄腫において VK2 は caspase 依存的なアポトーシスを誘導する (Tsujioka et al., 2006) という報告がある一方で、肝細胞がんにおいては caspase 非依存的なアポトーシスを誘導する (Matsumoto et al., 2006) という報告もある。このように、VK2 によるアポトーシス誘導の分子機構に関しては、確立されたモデルがないのが現状である。

生理活性を示す多くの低分子化合物は、細胞内で特定のタンパク質 (群) と特異的に結合し、そのタンパク質 (群) の機能を変化させることでその生理活性を示すとされている。そのため、細胞内で生理活性を有する低分子化合物と特異的に結合するタンパク質 (標的タンパク質) を単離・同定することは、低分子化合物が担う活性の分子機構を明らかにする上で非常に重要と考えられる。血液凝固や骨形成に関与している GGCX や SXR がアポトーシス誘導に関わるとの報告はこれまでにないことから、VK2 によるアポトーシス誘導は GGCX や SXR とは異なるタンパク質によって仲介されると考えられる。そこで、VK2 によるアポトーシス誘導に関与する標的タンパク質を同定し、VK2 によるがん細胞のアポトーシス誘導機構を分子レベルで解明することを本研究の目的とした。

第2章 VK2によるアポトーシス誘導経路の解析

2-1 緒言

第1章で述べたように、VK2のアポトーシス誘導活性は広く認められているものの、その分子機構に関しては確立されたモデルがないのが現状である。そこで、本章では、主にヒト骨髄性白血病由来 HL60 細胞とヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を用いて、VK2によって活性化されるアポトーシス誘導経路を生化学的に解析した。

2-2 材料及び方法

2-2-1 抗体及び試薬

本章で用いた抗体を以下に示す（アルファベット順）。括弧内は抗体のクローン名、購入元、及び使用時の希釈条件である。

Actin (C4, Millipore, 40,000 倍希釈 in blocking buffer)

Bak (NT, Millipore, 3,000 倍希釈 in Can Get Signal solution 1 (TOYOBO))

Caspase-3 (Cell Signaling Technologies, 3,000 倍希釈 in Can Get Signal solution 1)

Cytochrome *c* (BD Pharmingen, 300 倍希釈 in blocking buffer)

GAPDH (Merck, 10,000 倍希釈 in blocking buffer)

PARP-1/2 (H-250, Santa Cruz Biotechnology, 300 倍希釈 in blocking buffer)

アポトーシス誘導剤の cycloheximide (CHX) は Nacalai Tesque から購入した。

2-2-2 生細胞測定

6-well plate に HL60 細胞を 1.0×10^5 cells/mL の濃度で播種した後、もしくは HeLa 細胞を 1.0×10^5 cells/well の濃度で播種して 1 晩静置した後に VK2 (ケイツーN 注®、Eisai) を培地中に加えた。VK2 は光による化学反応にて失活するため、VK2 添加後は 37°C に設定した 5% CO₂ インキュベーター内で遮光して細胞を培養した。HL60 細胞の培養には 10% Fetal Bovine Serum (FBS) を含む RPMI 培地を、HeLa 細胞の培養には 10% FBS を含む DMEM 培地を用いた。細胞を 48 時間処理した後、細胞懸濁液を 100 μL ずつ 96-well plate に移し、10 μL の Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque) を加えた。Cell Count Reagent SF は、細胞内でテトラゾリウム塩から変換されたホルマザンの吸光度を測定することにより、細胞数を測定する試験（水溶性ホルマザン/テトラゾリウム試験）である。37°C で反応させた後、Wallac 1420 Arvo SX Multilabel Counter (Perkin Elmer) を用いて 450 nm における吸光度を測定した。コントロール群の平均を 100% と設定し、各サンプルの生細胞数を比較した。

2-2-3 細胞抽出液の調製

<試薬>

・ PBS

NaCl 200 g, KCl 5 g, Na₂HPO₄·12H₂O 90.7 g, KH₂PO₄ 6 g を純水 1 L 中に溶解させ、Stericap-GV 0.22 μm bottle top filter (Millipore) を用いて濾過し、この溶液を純水で 25 倍希釈した。

<手順>

薬剤処理した HL60 細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄し、High Salt Lysis Buffer [500 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)] を用いてピペッティングによって懸濁させ、氷上で 10 分間静置して細胞を溶解させた。細胞溶解液を遠心分離 (20,400 x g, 30 min, 4°C) して不溶性画分を取り除き、上清を細胞抽出液とした。以降の実験における細胞抽出液も、特に記載がない場合はこの方法に従って調製した。

2-2-4 SDS-PAGE

<試薬>

・ Solution A

Acrylamide (Nacalai Tesque) 146 g, *N,N'*-methylenebisacrylamide (Nacalai Tesque) 4 g をそれぞれ純水 500 mL 中に溶解させ、Stericap-GV 0.22 μm bottle top filter (Millipore) を用いて濾過し、4°C で遮光保存した。

・ Solution B

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Nacalai Tesque) 90.8 g を適当量の純水に溶解させ、濃塩酸を用いて pH を 8.8 に調整した。続いて、sodium dodecylsulfate (SDS, Nacalai Tesque) 2 g を溶解させて純水で全量を 500 mL とし、Stericap-GV 0.22 μm bottle top filter を用いて濾過した。

・ Solution C

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 30.3 g を適当量の純水に溶解させ、濃塩酸を用いて pH を 6.8 に調整した。続いて、SDS 2 g を溶解させて純水で全量を 500 mL

とし、Stericap-GV 0.22 μm bottle top filter を用いて濾過した。

- SDS sample buffer

Solution C 20 mL, SDS 3.2 g, glycerol (Kokusan Chemical Co.,Ltd.) 20 g, β -mercaptoethanol (Nacalai Tesque) 1.6 mL, bromophenol blue (Nacalai Tesque) 10 mg を混合し、純水で4倍希釈した。

- Running buffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 2.4 g, glycine (Kokusan Chemical Co.,Ltd.) 11.54 g, SDS 0.8 g を純水 800 mL に溶解させた。

<手順>

solution B 1.5 mL に solution A を目的の acrylamide 濃度になるように加え、純水を加えて最終体積を 6.0 mL とした。これに 10% ammonium persulfate (APS, Nacalai Tesque) 40 μL , *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED、Nacalai Tesque) 10 μL を加え、ゲル装置に注いで分離ゲルを作製した。分離ゲルが固まった後、solution A 0.45 mL, solution C 0.75 mL, 純水 1.8 mL, 10% APS 21 μL , TEMED 8 μL の混合液を分離ゲルの上に注ぎ、コームを挿して濃縮ゲルを作製した。濃縮ゲルが固まった後にコームを取り外し、作製したゲルをミニプロテイン3泳動装置 (Bio-Rad) に組み込み、800 mL の Running buffer を注いだ。各ウェルにサンプルを注入した後、濃縮ゲル中では定電流 20 mA、分離ゲル中では定電流 40 mA の条件で電気泳動した。電気泳動に用いたサンプルは4倍濃縮の SDS sample buffer を終濃度で 25% になるように添加し、98°C で5分間加熱して熱変性処理させた。

2-2-5 Western blotting

<試薬>

- Transfer buffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 3 g, glycine 14.4 g を純水 800 mL に溶解させた後、メタノール 200 mL を加えた。

- 20xTBS

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 11.8 g, Tris-HCl (Sigma-Aldrich) 63.5 g, NaCl 87 g を純水 500 mL に溶解させた。

- TBS-T

20xTBS 150 mL, Tween 20 (Nacalai Tesque) 3.0 g を脱イオン水 3 L に溶解させた。

- Blocking buffer

Skim milk (Nacalai Tesque) 50 g, 20xTBS 50 mL, 10% NaN₃ 2.0 mL を純水 1 L に溶解させた。

<手順>

ミニトランスブロットセル (Bio-Rad) と同じサイズの 3MM ペーパーと Immobilon transfer membrane (PVDF 膜, Millipore) を用意し、PVDF 膜を 1 分間メタノールに浸した後、transfer buffer 中で振盪して平衡化させた。陽極側からスポンジ、3MM ペーパー、PVDF 膜、SDS-PAGE したゲル、3MM ペーパー、スポンジと並べ、3MM ペーパー、ゲル、PVDF 膜を transfer buffer 中でゲルフォルダーに挟み込んだ。ゲルフォルダーをミニトランスブロットセルに入れ、transfer buffer を十分量注ぎ、4°C、定圧 100 V、60 分の条件でタンパク質をゲルから PVDF 膜に転写した。

PVDF 膜を blocking buffer に浸し、室温で 60 分間振盪して PVDF 膜を blocking 処理した。続いて、PVDF 膜を blocking buffer にて希釈された 1 次抗体と反応させた (室温、1 h)。なお、各抗体の希釈率は抗体情報と共に記載した。1 次抗体反応を行った PVDF 膜を TBS-T で洗浄し (室温、5 min、3 回)、TBS-T で 1,000 倍に希釈された horseradish peroxidase-linked anti-mouse (or rabbit) IgG (2 次抗体、GE Healthcare) と反応させ (室温、1 h)、2 次抗体反応を行った PVDF 膜を TBS-T で洗浄した (室温、5 min、5 回)。

Blocking buffer 及び TBS-T 中で抗体反応が十分に起こらなかった場合は、Can Get Signal (TOYOBO) を用いて各抗体を希釈した。Blocking 処理した PVDF 膜を TBS-T で洗浄し (室温、10 min、3 回)、Can Get Signal Solution 1 で希釈された 1 次抗体と反応させた (室温、1 h)。その後、1 次抗体反応を行った PVDF 膜

を TBS-T で洗浄し（室温、10 min、3 回）、Can Get Signal Solution 2 で 1,000 倍に希釈された 2 次抗体と反応させ（室温、1 h）、2 次抗体反応を行った PVDF 膜を TBS-T で洗浄した（室温、10 min、3 回）。

最後に、ECL Western Blotting Detection Reagents（GE Healthcare）を用いて抗体反応を行った PVDF 膜を発光処理し、Hyperfilm ECL（GE Healthcare）に感光させてシグナルを可視化した。

2-2-6 HL60 細胞を用いたミトコンドリア膜電位の測定

薬剤処理した HL60 細胞の培地中に、終濃度が 10 μ M となるように Rhodamine 123（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）を加え、暗所にて 37°C で 15 分間培養した。細胞を回収し、氷冷 PBS で 2 回洗浄後、PBS に懸濁させ、フローサイトメーター（FACS Aria and FACSCalibur, BD Bioscience）を用いて Rhodamine 123 由来の蛍光を検出した。

2-2-7 ミトコンドリアから細胞質への cytochrome *c* 放出の解析

薬剤処理した HL60 細胞を回収し、氷冷 PBS で 2 回洗浄後、Isotonic Buffer [10 mM HEPES (pH 7.4), 300 mM mannitol, 0.1% Bovine Serum Albumin, 0.4 mM digitonin] で細胞を懸濁させ、氷上で 5 分間静置した。細胞懸濁液を遠心分離（8,500 x *g*, 5 min, 4°C）し、上清を細胞質画分とした。

2-2-8 免疫蛍光染色

12-well plate に滅菌処理されたカバースリップを置き、その上に HeLa 細胞を播種し、1 晩静置した後に VK2 を培地に添加した。48 時間後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、1% paraformaldehyde を含む PBS を加えて室温で 15 分間静置した。PBS で 3 回洗浄後、0.2% TritonX-100 を含む PBS を用いて室温で 5 分間静置した。PBS で 3 回洗浄後、PBS-MT（10% Tween 20, 0.2% skim milk を含む PBS）を用いてカバースリップを blocking 処理（室温、15 min）し、PBS-MT で 100 倍に希釈された抗 Bak 抗体（Ab-1, Millipore）もしくは抗 Bax 抗体（6A7, Medical & Biological Laboratories）を加え、室温で 2 時間静置した。PBS-MT で 6 回洗浄し、PBS-MT

で100倍に希釈された Alexa-fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (Life Technologies) を加え、暗所にて静置した (室温、30 min)。PBS-MT、PBS、純水を用いてカバー スリップを洗浄し、乾燥させたカバースリップを 4',6- diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色した。蛍光顕微鏡 (Olympus IX 81) にて標本の画像を撮影し、MetaMorph (Universal Imaging) を用いて解析した。

2-2-9 ラット肝臓ミトコンドリアの単離

本実験は Utsumi らの方法に従った (Utsumi and Inoue, 2001)。ラット (Wister/ST、6 週齢、雄、三共ラボサービス) をジエチルエーテルにて麻酔し、肝臓を摘出した。以後の操作は全て氷上で行った。摘出した肝臓約 5 g を氷冷 PBS で洗浄し、血液を除去した。洗浄した肝臓を Buffer A [250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA] 45 mL に入れ、はさみを用いて細かく切断し、400 rpm に設定した攪拌機 (MAZELA Z, EYELA) に装着したホモジナイザー

(Potter-Elvehjem style tissue grinder with PTFE pestle, 5 mL capacity, Wheaton) で 2 回ホモジナイズした後、この溶液を遠心分離 (80 x g, 7 min, 4°C) した。上清を回収し、上清と等量の Buffer B [350 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA] の上に回収した上清を静かに重層させ、遠心分離 (700 x g, 10 min, 4°C) した。その後、上層を回収し、さらに遠心分離 (7,000 x g, 10 min, 4°C) した。上清を取り除き、沈殿表面を Buffer A で洗浄し、沈殿を Buffer C [250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)] 500 µL で懸濁させ、遠心分離 (700 x g, 10 min, 4°C) した。最終的に得られた沈殿物をラット肝臓ミトコンドリアとして用いた。

2-2-10 単離ミトコンドリアを用いたミトコンドリア膜電位の測定

< 試薬 >

・ 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)

0.2 M K_2HPO_4 80.2 mL と 0.2 M KH_2PO_4 19.8 mL を混合した。

< 手順 >

タンパク質濃度が 0.1 mg/mL となるように単離ミトコンドリアを Mitochondria Incubation Buffer [150 mM sucrose, 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM potassium

phosphate buffer (pH 7.4), 20 mM succinate] に懸濁させ、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP, Sigma-Aldrich) もしくは 10 μM VK2 で処理した (3 h, 4°C)。その後、終濃度が 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を加え、30°C で 1 時間反応させ、フローサイトメーターを用いて JC-1 由来の蛍光を観測した。

2-3 結果及び考察

2-3-1 HL60 細胞及び HeLa 細胞における VK2 のアポトーシス誘導活性

VK2 が HL60 細胞のアポトーシスを誘導するという報告 (Yokoyama et al., 2008) に従って、VK2 による HL60 細胞のアポトーシス誘導を検証した。様々な濃度の VK2 で HL60 細胞を 48 時間処理し、水溶性ホルマザン/テトラゾリウム試験により生細胞数を測定したところ、VK2 濃度依存的な細胞増殖阻害が観察された (Fig. 2.1A)。また、VK2 で 48 時間処理した細胞では、アポトーシス誘導のポジティブコントロールとして用いた cycloheximide (CHX) よりは弱いものの、アポトーシスの際に見られる caspase-3 の活性化や poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の切断が見られた。一方、VK2 で 24 時間処理した細胞ではこのような現象は見られなかった (Fig. 2.1B)。VK2 は様々ながん細胞株にアポトーシスを誘導することが知られていることから (Tokita et al., 2005; Tsujioka et al., 2006)、現在までに報告例がない HeLa 細胞に対しても VK2 がアポトーシス誘導活性を示すかを検証した。様々な濃度の VK2 で HeLa 細胞を処理し、48 時間後の生細胞数を測定したところ、HL60 細胞より感受性は低いものの、VK2 の濃度依存的に細胞増殖が阻害された (Fig. 2.1C)。また、HL60 細胞のケースと同様に VK2 で 48 時間処理すると、caspase-3 の活性化と PARP の切断が見られた (Fig. 2.1D)。よって、HL60 細胞及び HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理すると、アポトーシスが誘導されることがわかった。

HL60 細胞において、3.0 μM の VK2 は細胞増殖阻害効果を示し、10 μM の VK2 でアポトーシスが誘導された。以下で、アポトーシス誘導が観察された濃度と、VK2 を投与された MDS 患者の体内 VK2 濃度との比較を行う。MDS 患者に対して投与された VK2 量は 45 mg/日であった (Akiyama et al., 2010)。これは骨粗鬆症治療で用いられている VK2 の一般的な投与量と等しく、この投与量での副作用はほぼ報告されていない。Ishii らは薬物動態試験から、45 mg/日の VK2 が投与されたヒトにおける最高血中濃度 (C_{max}) は約 2.5 μM であると報告している (Ishii et al., 1992)。また、イヌにおいては、VK2 の C_{max} が約 14 μM に到達したとの報告もある (Sano et al., 1997)。ラットを用いた VK2 の組織分布試験では、肝臓や副腎、骨髄などのいくつかの組織における VK2 濃度は、血中 VK2 濃度よりも数倍高いことが報告されている (Sano et al., 1995)。これらの報告よ

り、45 mg/日の VK2 を服用した患者体内において、VK2 濃度が 10 μM に至る組織が存在すると考えられることから、10 μM の VK2 で現れた *in vitro* でのアポトーシス誘導は生体内でも起こりうると推察される。

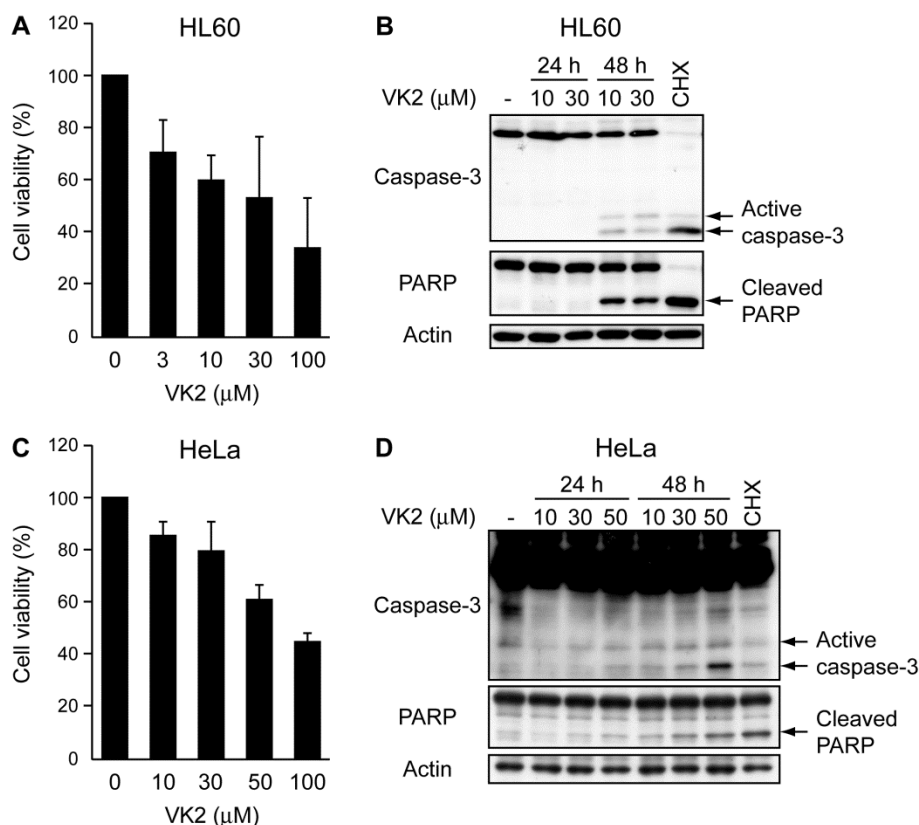


Fig. 2.1 HL60 細胞及び HeLa 細胞に対する VK2 のアポトーシス誘導活性 (A and C) HL60 細胞及び HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理し、Cell Count Reagent SF を用いて生細胞数を測定した。VK2 未処理の生細胞数の平均値を 100% とし、それに対する生細胞数の割合を示している。エラーバーは独立した 3 回の実験の標準偏差を表している。(B and D) HL60 細胞または HeLa 細胞を VK2 もしくは CHX で処理し、western blotting により caspase-3 の活性化及び PARP の切断を検出した。

2-3-2 ミトコンドリアを介するアポトーシス誘導経路に対する VK2 の影響

VK2 によるアポトーシス誘導にはミトコンドリアの機能障害の関与が示唆されている (Shibayama-Imazu et al., 2008)。ミトコンドリアを介してアポトーシスが誘導される際には、ミトコンドリア膜電位の消失が起こることが知られてい

ることから (Petit et al., 1996)、VK2 が HL60 細胞のミトコンドリア膜電位に及ぼす影響を解析した。HL60 細胞を VK2 もしくは膜電位の消失を引き起こすイオノフォア FCCP で処理後、Rhodamine 123 で細胞を染色し、フローサイトメーターにより Rhodamine 123 由来の蛍光を測定した。Rhodamine 123 はミトコンドリア膜電位依存的にミトコンドリア内に蓄積する蛍光物質である。その結果、VK2 処理は FCCP 処理と同様にミトコンドリア膜電位の消失を引き起こしていた (Fig. 2.2A)。また、ミトコンドリア膜電位消失に伴い、電子伝達系の構成因子である cytochrome *c* (cyt *c*) がミトコンドリアから細胞質に放出されることが知られている (Liu et al., 1996)。cyt *c* は通常ミトコンドリア内膜に局在するが、細胞質に放出されると caspase-9 を活性化し、アポトーシスを誘導する。VK2 が cyt *c* の局在に及ぼす影響を調べるために、VK2 処理した HL60 細胞から細胞質画分を調製し、western blotting により cyt *c* を検出した。その結果、VK2 で 48 時間処理した細胞において、VK2 の濃度依存的に cyt *c* が細胞質に放出されていた (Fig. 2.2B)。以上の結果より、VK2 はミトコンドリアを介してアポトーシスを誘導していると考えられる。

VK2 がミトコンドリアに与える影響をより詳細に解析するために、ミトコンドリアを介したアポトーシスを制御している Bcl-2 ファミリータンパク質の Bak と Bax に着目した。正常な細胞において Bax は主に細胞質に存在し、アポトーシス刺激依存的にミトコンドリア外膜に移行するが、Bak はアポトーシス刺激に関係なくミトコンドリア外膜に存在する (Korsmeyer et al., 2000; Wei et al., 2000)。Bak と Bax はアポトーシス刺激を受けると立体構造が変化して活性型となり、巨大複合体を形成してミトコンドリア外膜にポアを形成し、ミトコンドリア膜電位の消失や cyt *c* の放出を引き起こすと考えられている (Belizário et al., 2007)。これまでの実験結果から、VK2 がミトコンドリアを経由してアポトーシスを誘導していると考えられるため、VK2 によって Bak と Bax の活性化が誘導されるかを免疫蛍光染色法で調べた。HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理し、活性型の Bak もしくは Bax のみをそれぞれ認識する抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察したところ、VK2 処理された細胞においてドット状のシグナルが観察された (Fig. 2.2C)。これは Bak と Bax による巨大複合体の形成を示唆している。以上の結果から、VK2 は Bak と Bax の双方を活性化させることでアポトーシスを誘導していると考えられる。

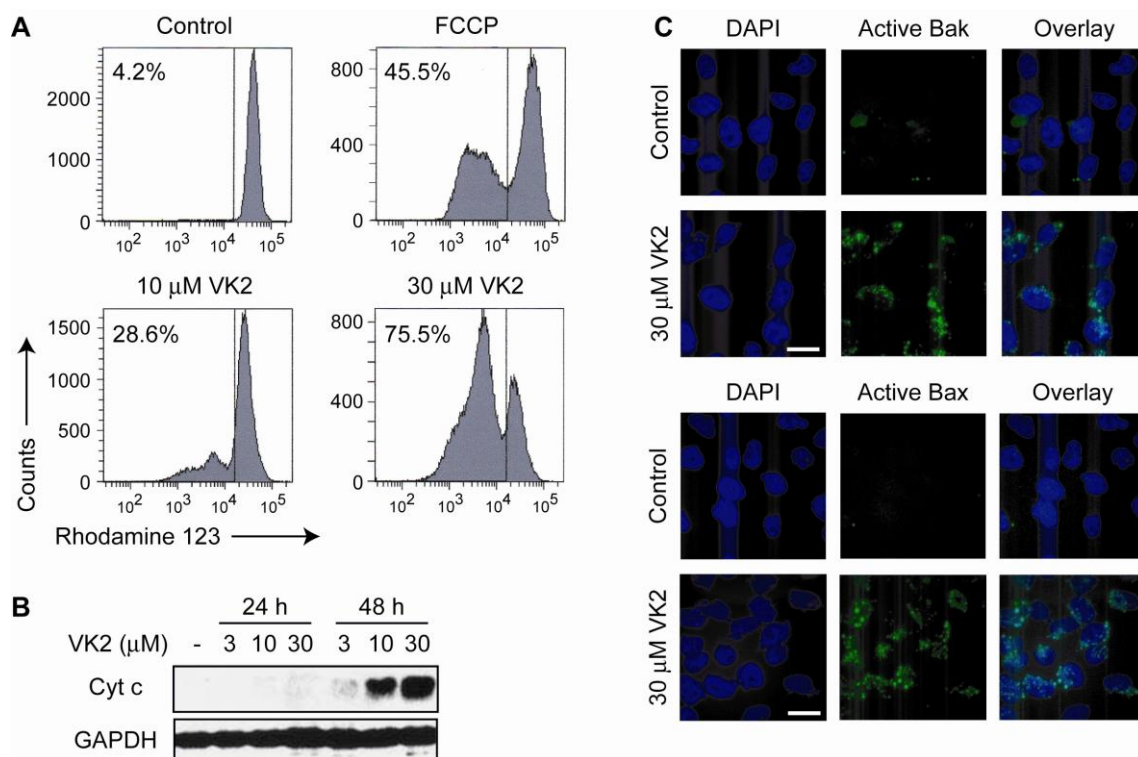


Fig. 2.2 ミトコンドリアを介したアポトーシス誘導経路に対する VK2 の影響

(A) HL60 細胞を VK2 で 48 時間、もしくは FCCP で 4 時間処理後、Rhodamine 123 で細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて膜電位の変化を観察した。各値はミトコンドリア膜電位が消失した細胞の割合を示す。(B) HL60 細胞を VK2 で処理した後、細胞質画分を調製し、western blotting により *cyt c* を検出した。(C) HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理後、活性型の Bak または Bax をそれぞれ認識する抗体を用いて可視化した。細胞の核は DAPI を用いて標識した。スケールバーは 10 μm を表す。

2-3-3 単離ミトコンドリアに対する VK2 の影響

VK2 はミトコンドリアを介してアポトーシスを誘導していると考えられる。VK2 がミトコンドリアのアポトーシス誘導経路を活性化させる方法として、1) ミトコンドリアへの直接作用、2) ミトコンドリア以外のタンパク質を経由する間接的作用、の 2 つの可能性が考えられる。この可能性を検証するために、ラット肝臓から単離したミトコンドリアを用いて、ミトコンドリアの膜電位に対する VK2 の直接的な影響を解析した。単離ミトコンドリアを VK2 もしくは FCCP で処理した後、蛍光試薬 JC-1 で染色し、JC-1 由来の蛍光をフローサイトメーター

で測定した。JC-1 は膜電位依存的にミトコンドリア内に蓄積する蛍光試薬で、集合化した JC-1 は遊離 JC-1 と異なる蛍光を発する。その結果、FCCP よりも程度は弱いものの、VK2 はミトコンドリア膜電位の消失を誘導していた (Fig. 2.3)。このことから、VK2 はミトコンドリアに直接作用し、ミトコンドリアを介するアポトーシス誘導経路を活性化していると示唆される。

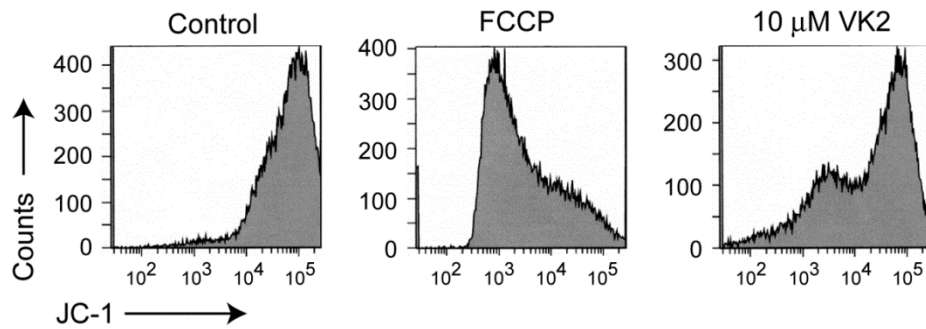


Fig. 2.3 単離ミトコンドリアの膜電位に対する VK2 の影響

ラット肝臓より単離したミトコンドリアを VK2 もしくは FCCP で処理後、JC-1 を用いてミトコンドリアを染色し、フローサイトメーターを用いて JC-1 由来の蛍光の変化を観察した。

2-4 本章のまとめ

本章では、VK2によって活性化されるアポトーシス経路を解析した。VK2処理したHL60細胞及びHeLa細胞において、VK2に起因する細胞増殖阻害活性が見られ、アポトーシス誘導に特徴的なcaspase-3の活性化とPARPの切断も観察されたことから、VK2はこれらの細胞に対してアポトーシスを誘導していることが分かった。以上の結果から、HL60細胞及びHeLa細胞は本研究のモデル細胞として適切と判断した。

ミトコンドリアを経由するアポトーシスに特異的な現象に着目し、VK2により活性化されるアポトーシス経路を解析した。HL60細胞とHeLa細胞を用いた実験より、VK2による1) ミトコンドリア膜電位の消失、2) ミトコンドリアから細胞質へのcyt *c*の放出、3) BakとBaxの活性化の誘導、が観察されたことから、VK2はミトコンドリアを経由してアポトーシスを誘導しているものと考えられる。さらに、ラット肝臓から単離したミトコンドリアに対して、VK2は膜電位の消失を引き起こしたことから、VK2はミトコンドリアに直接作用し、アポトーシスを誘導していると考えられる。

第3章 VK2 標的タンパク質の探索

3-1 緒言

第2章の結果より、VK2 はミトコンドリアに直接作用していると示唆されたことから、本章ではミトコンドリアタンパク質に着目し、VK2 のアポトーシス誘導に関与する標的タンパク質を探索した。VK2 の標的タンパク質を探索する手法として、東京工業大学 半田研究室で独自に開発されたアフィニティ精製用担体 FG ビーズを用いた。FG ビーズは磁性酸化鉄のフェライトの粒子を有機ポリマーで被覆した分散性微粒子である。同研究室は FG ビーズを用いて様々な低分子化合物の標的タンパク質の同定に成功し、その作用機構の一端を解明してきた (Sakamoto et al., 2009; Ito et al., 2010)。これらの先行研究により培われた技術を活かし、VK2 の標的タンパク質の単離・同定を試みた。

3-2 材料及び方法

3-2-1 抗体

本章で初めて用いた抗体を以下に示す（アルファベット順）。括弧内は抗体のクローン名、購入元、及び使用時の希釈条件である。

Bcl-2 (N-19, Santa Cruz Biotechnology, 100 倍希釈 in blocking buffer)

Bcl-xL (54H6, Cell Signaling Technologies, 3,000 倍希釈 in Can Get Signal Solution 1)

FLAG (M2, Sigma-Aldrich, 1,000 倍希釈 in blocking buffer)

PHB1 (H-80, Santa Cruz Biotechnology, 1,000 倍希釈 in blocking buffer)

PHB2 (Millipore, 1,000 倍希釈 in blocking buffer)

VDAC1 (31HL, Millipore, 3,000 倍希釈 in blocking buffer)

粉末の VK2 は Santa Cruz Biotechnology より購入し、DMSO に溶解して用いた。

3-2-2 VK2 固定化ビーズの作製

VK2 固定化ビーズ作製の流れを Fig. 3.1A に示す。カルボキシル化 FG ビーズ (Tamagawa Seiki Co., Ltd.) をメタノールと DMF で洗浄し、200 mM *N*-hydroxysuccinimide (NHS)、200 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) を含む DMF 溶液中で 2 時間、室温にて攪拌させ、カルボキシル基を活性化させた。DMF で洗浄した後、0.5 mM VK2 アミノ基誘導体 (Fig. 3.1B) と 2.0 mM triethylamine を含む DMF 溶液を加え、室温にて 70 分間反応させて、VK2 を FG ビーズ上に固定化した。VK2 アミノ基誘導体は東京工業大学 大学院理工学研究科の高橋孝志教授に合成して頂いた。反応後、上清を除去し、1.0 M ethanolamine 水溶液 (pH 8.0) を加え、4°C にて 16 時間反応させた。反応後、50% メタノール水溶液で洗浄し、50% メタノール水溶液中に再懸濁させて、4°C で保存した。

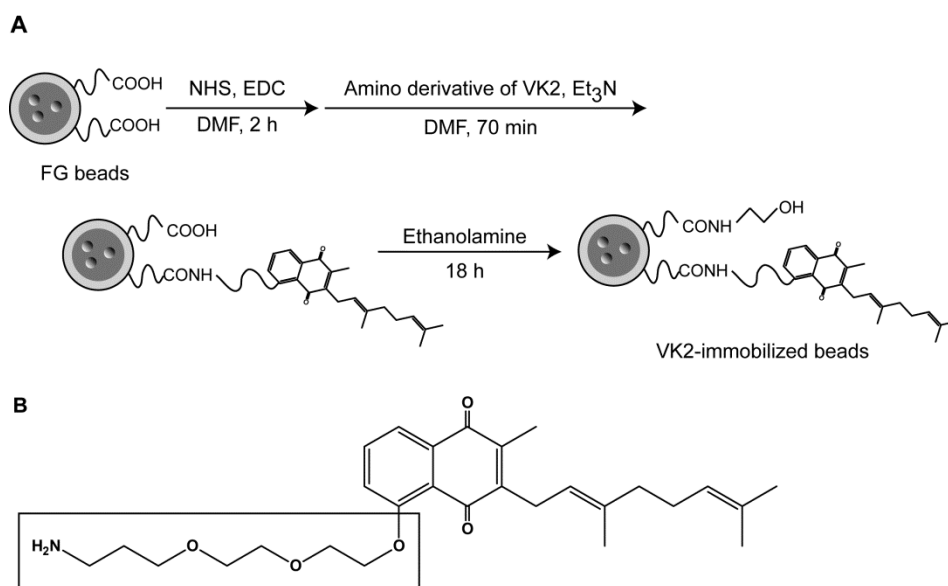


Fig. 3.1 VK2 固定化ビーズの作製スキーム

(A) カルボキシル化 FG ビーズに対する VK2 アミノ基誘導体の固定化スキーム。(B) 固定化用 VK2 誘導体の構造。黒枠は固定化のために付加したリンカー及びアミノ基を示す。

3-2-3 HL60 細胞の細胞質画分抽出液の作製

全ての工程を氷上または 4°C で行った。PBS で洗浄した HL60 細胞ペレットの容積 (Packed Cell Volume, PCV) を測定し、PCV の 3 倍量の Buffer A [10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] を加えて、穏やかに細胞ペレットをほぐした。氷上で 15 分間静置し、10% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS、Nacalai Tesque) 水溶液を終濃度 1% となるように加え、ただちに 10 秒間 vortex して細胞を溶解させた。氷上で 5 分間静置した後、遠心分離 (13,000 x g, 5 min, 4°C) し、その上清を Buffer D [20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM KCl, 1.0 mM EDTA] で透析した。

3-2-4 VK2 固定化ビーズを用いたアフィニティ精製

VK2 固定化ビーズ 0.2 mg を Binding Buffer [20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM

KCl, 1.0 mM EDTA, 1% CHAPS] で洗浄した後、200 μ L の HL60 細胞抽出液（細胞質画分、1.0 mg/mL）、もしくは組換えタンパク質を含む溶液を加え、穏やかに 4°C で 4 時間攪拌した。Binding Buffer で洗浄し、40 μ L の SDS sample buffer にビーズを懸濁させ、98°C で 5 分間加熱することでビーズに結合しているタンパク質を変性させつつビーズから遊離させた。

3-2-5 プラスミド DNA の調製

東京医科歯科大学 清水重臣教授から提供して頂いた human Bak 及び Bax をコードする cDNA を鋳型とし、PCR 法により HA-FLAG tag もしくは FLAG tag が N 末に付加した全長の Bak と Bax の DNA 断片を作製した。これらの DNA 断片を pcDNA3.1(+) (Life Technologies) に挿入し、哺乳類細胞用の発現ベクターとして用いた。

3-2-6 リポフェクション法による FLAG-Bak の一過的発現

前日に 50% コンフルエントで播種した HeLa 細胞に対し、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用い、マニュアルに準じて pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak をリポフェクションした。4 時間後、一度細胞を剥がし、播種し直した。なお、Bak の過剰発現は細胞死を引き起こすことから、pan-caspase inhibitor の zVAD-fmk (Peptide Institute, Inc.) を終濃度 10 μ M となるように培地に加えた。

3-2-7 *in vitro* における組換え Bak 及び Bax の調製

TnT Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) を用いて組換え Bak 及び Bax を調製した。マニュアルに準じて pcDNA3.1(+)-HA-FLAG-Bak もしくは Bax を鋳型として反応液に加え、30°C で 90 分間反応させた。

3-2-8 siRNA を用いたノックダウン実験

ノックダウン実験には以下に示す Stealth RNAi oligonucleotide (Life Technologies) を用いた。配列はセンス鎖のみを示す。

Bak, 5'-UGAAGAAUCUUCGUACCACAAACUG-3'

Bax, 5'-ACUUUGCCAGCAAACUGGUGCUCAA-3'

RNAi のコントロールには Stealth RNAi negative control of low GC content (Life Technologies) を用いた。

前日に 20% コンフルエントで播種した HeLa 細胞に対し、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用い、マニュアルに準じて各 siRNA をリポフェクションした。6 時間後、一度細胞を剥がし、播種し直した。

3-3 結果と考察

3-3-1 VK2 固定化ビーズを用いた VK2 結合タンパク質の探索

第2章の結果より、VK2 はミトコンドリアに直接作用し、アポトーシスを誘導していることが示唆されたため、VK2 のアポトーシス誘導に関与する標的タンパク質はミトコンドリアに局在すると推測した。そこで、東京工業大学 半田研究室で開発されたアフィニティ精製用担体である FG ビーズ (ポリマー被覆型磁性ビーズ) を利用するアフィニティ精製法を用いて VK2 の標的タンパク質の単離・同定を検討した。別途調製した VK2 アミノ基誘導体を FG ビーズ表面に固定化した (Fig. 3.1, A and B)。アフィニティ精製に用いるタンパク質ライブラリーとして、HL60 細胞からミトコンドリアを含む細胞抽出液 (細胞質画分) を調製した。VK2 固定化ビーズを HL60 細胞の細胞質画分と混合し、VK2 特異的に結合しているタンパク質を SDS sample buffer で溶出させた。得られた溶出サンプルを SDS-PAGE し、銀染色により検出したところ、VK2 非固定化ビーズに比べて、VK2 固定化ビーズに多くのタンパク質が結合していた (Fig. 3.2A lane 3)。

次に、得られた VK2 結合タンパク質群から VK2 とアフィニティの強いタンパク質を絞り込むことを検討した。VK2 とアフィニティの強いタンパク質は細胞抽出液中で低濃度であっても優先して精製されると考えられる。そこで、タンパク質濃度を 0.1, 0.3, 1.0 mg/mL に調製した細胞抽出液を用いてアフィニティ精製を試みたところ、タンパク質濃度とは無関係に同様のシグナルパターンが得られた (Fig. 3.2B lane 3-5)。次に、静電的相互作用によるタンパク質の非特異的な結合を少なくするために、VK2 固定化ビーズと細胞抽出液を混合する際の KCl 濃度を 100 mM から 500 mM に変えて、再度アフィニティ精製を試みた。しかし、KCl 濃度に依るシグナルパターンの変化は見られなかった (Fig. 3. 2B lane 7-9)。KCl 濃度を変えてもシグナルパターンは大きく変化しなかったことから、ここで得られた結合タンパク質群は主に、VK2 の分子構造を特異的に認識して結合しているタンパク質と、VK2 の高い疎水性に由来する非特異的結合タンパク質であると考えられる。

ここで得られた VK2 結合タンパク質群から分子構造特異的に VK2 に結合しているタンパク質を探索するために、事前に遊離の VK2 (DMSO に粉末の VK2 を溶解させたサンプル) と混合させた細胞抽出液を用いた競合阻害実験を行った。

しかしながら、VK2 との結合が競合的に阻害されたシグナルは得られなかった (Fig. 3.2C lane 8-11)。これは、FG ビーズ表面に固定化された VK2 に対して、結合タンパク質上で競合するために十分な VK2 量が細胞抽出液中に存在しなかったためと考えられる。以上の様にタンパク質濃度と KCl 濃度の条件検討及び競合阻害実験を行ったが、依然として多くのタンパク質が VK2 固定化ビーズに結合しており、分子構造特異的に VK2 に結合しているタンパク質を絞り込むことはできなかった。ここで得られた結合タンパク質を全て解析し、VK2 の標的タンパク質を同定することは難しいと考え、他の方法により目的の標的タンパク質の同定を試みることにした。

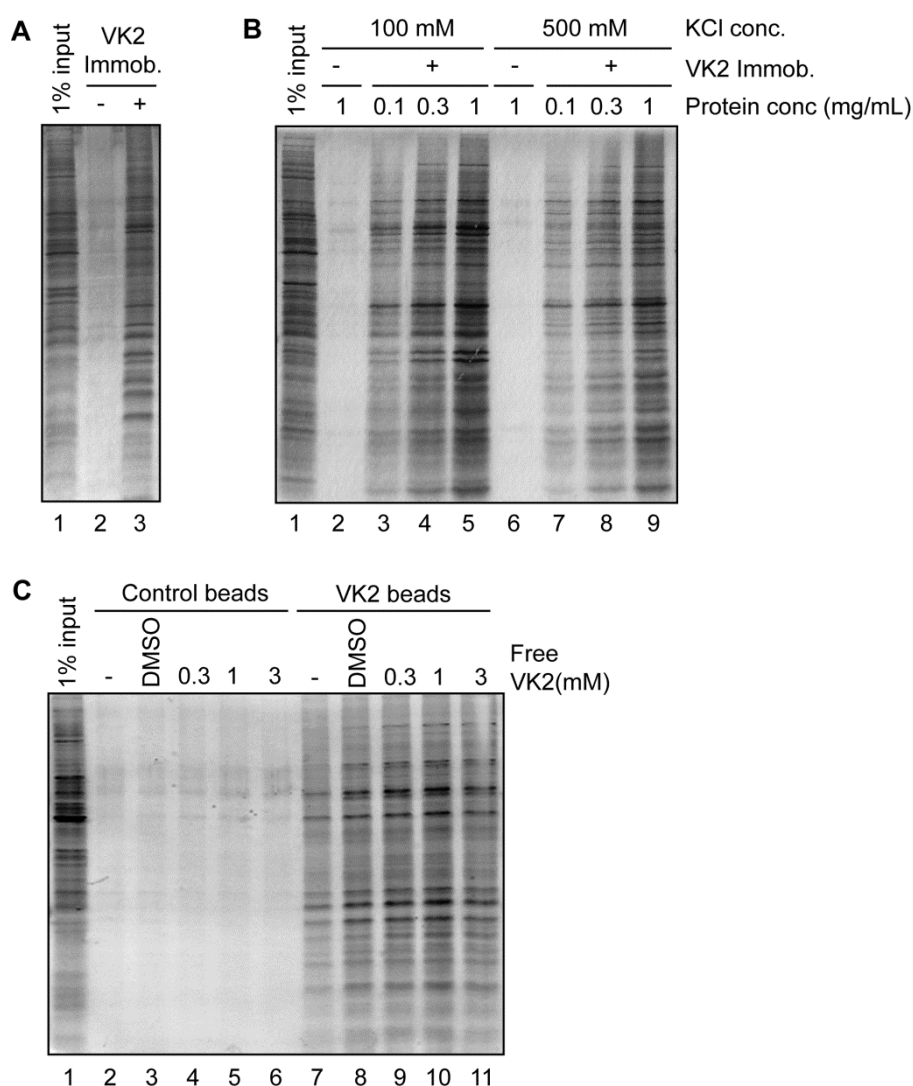


Fig. 3.2 VK2 固定化ビーズを用いたアフィニティ精製

(A) HL60 細胞の抽出液 (細胞質画分) に、VK2 固定化ビーズ(+)もしくは VK2 非固定化ビーズ(コントロールビーズ)(-)と混合した。ビーズに結合したタンパク質を溶出させ、

SDS-PAGE 後、銀染色にてシグナルを検出した。(B) 100 mM KCl もしくは 500 mM KCl の binding buffer 中で、HL60 細胞の細胞抽出液 (細胞質画分、0.1, 0.3, 1.0 mg/mL) と VK2 固定化ビーズ(+)もしくはコントロールビーズ(-)を混合した。ビーズに結合したタンパク質を溶出させ、SDS-PAGE 後、銀染色にて検出した。(C) HL60 細胞の細胞抽出液 (細胞質画分) に、DMSO に溶解させた VK2 を終濃度 0.3, 1, 3 mM となるように加え、2 時間穏やかに混合した。これらの抽出液と VK2 固定化ビーズ(+)もしくはコントロールビーズ(-)を混合し、ビーズに結合したタンパク質を溶出させ、SDS-PAGE 後、銀染色にてシグナルを検出した。

3-3-2 VK2 がミトコンドリアタンパク質に及ぼす影響

VK2 固定化ビーズを用いたアフィニティ精製法では VK2 のアポトーシス誘導に関わる標的タンパク質の単離・同定は困難であった。そこで代わりに、VK2 がミトコンドリアに直接作用し、アポトーシスを誘導していると示唆された点に着目し、アポトーシス誘導に関与するミトコンドリアタンパク質に VK2 が及ぼす影響を解析した。アポトーシス誘導に関与するミトコンドリアタンパク質として、Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス促進因子の Bak と Bax、Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス抑制因子の Bcl-2 と Bcl-xL、ミトコンドリア外膜でチャンネルを形成し、膜電位消失や cyt c 放出に関与している voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) (Shimizu et al., 1999)、ミトコンドリア内膜に局在し、アポトーシス誘導に関与する prohibitin 1 (PHB1) 及び PHB2 (Mishra et al., 2005) などについて調べた。VK2 がこれらタンパク質に及ぼす影響を解析するために、HL60 細胞を VK2 もしくは CHX で処理してから細胞抽出液を作製し、western blotting により各タンパク質を検出した。その結果、VK2 処理によって各タンパク質の発現量は大きく変化しなかったが、抗 Bak 抗体に反応する移動度の遅いシグナルが観察され、このシグナルは VK2 の処理濃度・処理時間依存的に増加していた (Fig. 3.3A *印)。この移動度が遅いシグナルが Bak に由来するものであるかを明らかにするために、一過的に発現させた FLAG-Bak に対しても VK2 が同様の移動度変化を引き起こすかを検証した。FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を VK2 もしくは CHX で処理してから細胞抽出液を作製し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により FLAG-Bak を検出した。このとき、Bak の過剰発現によって引き起こされるアポトーシスを防ぐために、pan-caspase inhibitor

zVAD-fmk を培地に添加した。その結果、Fig. 3.3A と同様に、VK2 処理細胞において移動度の遅いシグナルが観察された (Fig. 3.3B *印)。よって、抗 Bak 抗体に反応する移動度が遅いシグナルは Bak に由来するものであり、VK2 によって翻訳後修飾が誘導された Bak と考えられる。

Bak の翻訳後修飾はほとんど見つかっていないが、唯一、Tyr108 のリン酸化のみが知られている (Fox et al., 2010)。そこで、Bak 点変異体を用いて、VK2 処理によって観察された移動度の遅いシグナルが Tyr108 リン酸化型かどうかを検証した。野生型もしくは Tyr108 をアラニンに置換した FLAG-Bak (Y108A) を一過的に発現させた HeLa 細胞を 30 μ M の VK2 で 48 時間処理後、細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により FLAG-Bak を検出した。その結果、VK2 処理により Y108A の移動度も一部遅くなっていたことから (Fig. 3.3C)、VK2 処理細胞において観察される移動度の遅い Bak のシグナルは新規の翻訳後修飾を受けた Bak であると考えられる。このシグナルは CHX 刺激によって観察されなかったことから (Fig. 3.3, A and B)、VK2 によるアポトーシス誘導において特異的に見られる翻訳後修飾であると考えられる。また、zVAD-fmk により caspase の活性を阻害しても移動度の遅い Bak のシグナルが見られたことから (Fig. 3.3, B and C)、このシグナルはアポトーシス誘導の単なる結果として生じた修飾ではないと考えられる。さらに、HL60 細胞において VK2 によりアポトーシス誘導が生じない条件下 (24 時間の VK2 処理) で移動度の遅い Bak のシグナルが観察されたことから (Fig. 3.3A)、このシグナルの発生はアポトーシス誘導よりも時間的に早く起こっていると言える。これらのことから、VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾は、VK2 のアポトーシス誘導に関与している可能性があると考えられる。

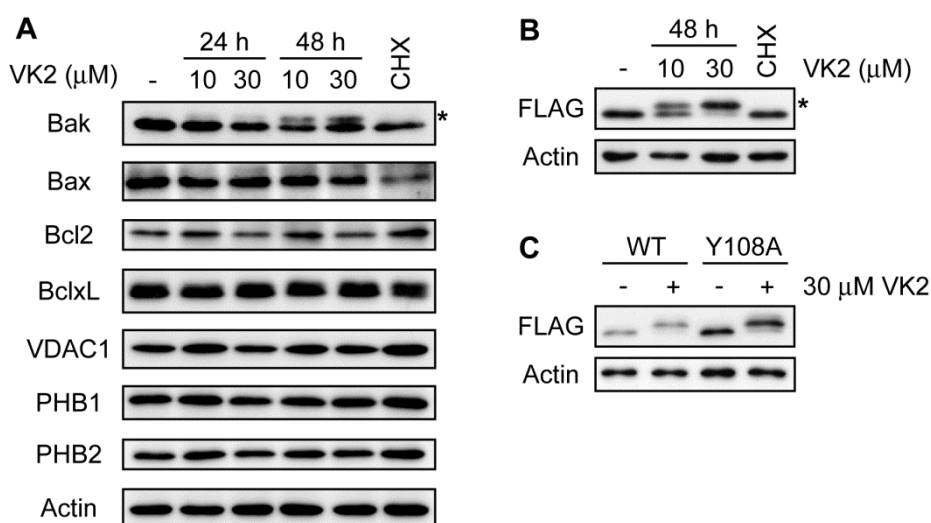


Fig. 3.3 VK2によるアポトーシス誘導特異的な Bak の翻訳後修飾

(A) HL60 細胞を VK2 もしくは CHX で処理後、細胞抽出液を作製し、western blotting により各タンパク質を検出した。(B) FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を VK2 で 48 時間、または CHX で 24 時間処理後、細胞抽出液を作製し、抗 FLAG 抗体を用いて western blotting により FLAG-Bak を検出した。*は VK2 依存的に検出される移動度の遅いシグナル。(C) 野生型 (WT) 及び Y108A の FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を 30 μ M の VK2 で 48 時間処理後、細胞抽出液を作製し、抗 FLAG 抗体を用いて western blotting により FLAG-Bak を検出した。

3-3-3 VK2 と Bak 及び Bax の結合活性の解析

VK2 が特異的に Bak の翻訳後修飾を誘導するメカニズムとして、VK2 存在下では、なんらかのアロステリックエフェクターが Bak に結合し Bak の立体構造を変化させることで、通常 Bak と相互作用しない修飾酵素が Bak と結合して Bak を修飾するのではないかと考えた。VK2 はミトコンドリアに直接作用すること (Fig. 2.3)、Bak がミトコンドリア外膜に局在することから、“VK2 が Bak に直接結合することで Bak の立体構造を変化させる”という仮説を立てた。そこで、VK2 固定化ビーズを用いて VK2 に対する Bak の結合活性を調べた。このとき比較のため、Bak と構造的に類似している Bax と VK2 との結合活性も調べた。VK2 固定化ビーズと HL60 細胞の細胞抽出液 (細胞質画分) を混合し、VK2 結合タ

ンパク質をビーズから溶出させ、SDS-PAGE 後、western blotting により Bak 及び Bax を検出した。その結果、Bak は VK2 固定化ビーズに結合したが、Bax は結合しなかった (Fig. 3.4A)。Bak が VK2 に直接結合しているかどうかを確認するために、VK2 固定化ビーズと *in vitro* で調製した組換え Bak または Bax を用いて結合実験を行った。その結果、Fig. 3.4A と同様に、Bak は VK2 固定化ビーズと結合したが、Bax は結合しなかった (Fig. 3.4B)。以上の結果より、VK2 は Bak と直接結合することがわかった。

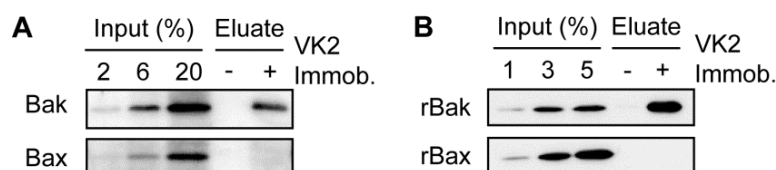


Fig. 3.4 VK2 に対する Bak 及び Bax の結合活性

(A) VK2 固定化ビーズ(+)もしくは VK2 非固定化ビーズ (コントロールビーズ) (-)を HL60 細胞の細胞抽出液 (細胞質画分) と混合し、溶出サンプル中の Bak または Bax を western blotting により検出した。

(B) *in vitro* で調製した HA-FLAG-Bak (rBak) もしくは HA-FLAG-Bax (rBax) を VK2 固定化ビーズ(+)もしくはコントロールビーズ(-)と混合し、ビーズに結合していたタンパク質を溶出させた。溶出サンプル中の rBak または rBax を抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により検出した。

3-3-4 VK2 のアポトーシス誘導に対する Bak 及び Bax ノックダウンの影響

VK2 のアポトーシス誘導依存的に Bak が何かしらの翻訳後修飾を受け、かつ VK2 が Bak と直接結合したことから、Bak が VK2 のアポトーシス誘導において重要な役割を担っているのではないかと考えられる。VK2 によるアポトーシス誘導における Bak の重要性を検証するために、Bak のノックダウンが VK2 の細胞増殖阻害活性に及ぼす影響を解析した。アポトーシス誘導において、構造的に類似している Bak と Bax は重複した役割を果たしていることが数々の先行研究から考えられている。そこで比較のために、Bax のノックダウンが VK2 の細胞増殖阻害活性に与える影響も解析した。siRNA により Bak もしくは Bax がノックダウンされた HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理し、水溶性ホルマザン/テトラ

ゾリウム試験により生細胞数を測定した。コントロール細胞に比べて、Bak ノックダウン細胞では VK2 による細胞増殖阻害が抑制されていたことから、VK2 の細胞増殖阻害活性には Bak が関与していると考えられる。しかし、VK2 は Bax をノックダウンした細胞に対しても、コントロール細胞とほぼ同様の細胞増殖阻害活性を示した (Fig. 3.5A)。Bak ノックダウンにより VK2 の細胞増殖阻害活性が部分的に阻害されたことから、次に *cyt c* の放出を指標として、Bak 及び Bax のノックダウンが VK2 のアポトーシス誘導活性に及ぼす影響を解析した。siRNA により Bak もしくは Bax がノックダウンされた HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理後、細胞質画分を調製し、western blotting により *cyt c* を検出した。その結果、コントロール細胞に比べて Bak ノックダウン細胞における *cyt c* の放出は抑制されていたことに対し、Bax ノックダウン細胞では VK2 による *cyt c* の放出が促進されていた (Fig. 3.5B)。以上のように、Bak と Bax の機能は重複していると考えられているにも関わらず、これらのノックダウンが VK2 のアポトーシス誘導活性に及ぼす影響は異なっていた。このことから、VK2 は Bak のみを介してアポトーシスを誘導していると考えられる。VK2 は Bak に直接結合すること (Fig. 3.4, A and B) と、Bak が VK2 のアポトーシス誘導において機能的に重要であること (Fig. 3.5, A and B) を合わせ、Bak が VK2 によるアポトーシス誘導の標的タンパク質であると考えた。

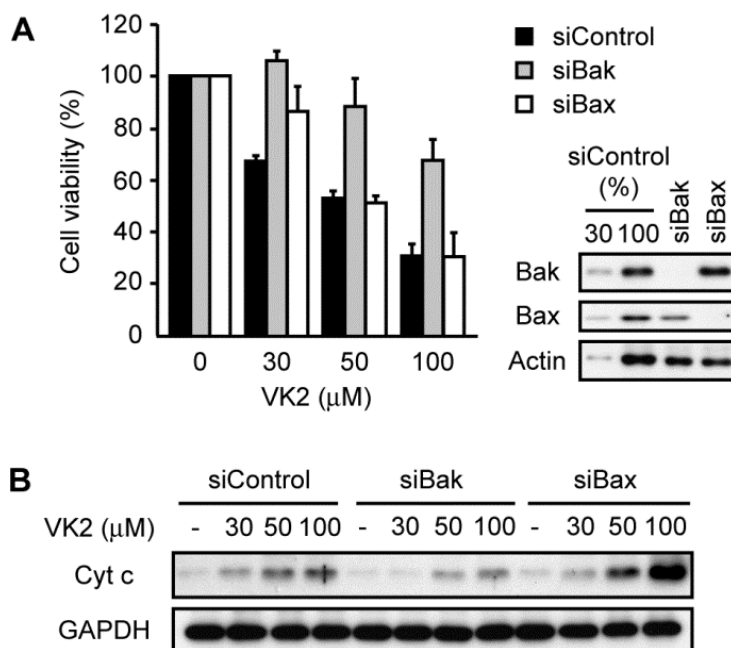


Fig. 3.5 VK2 によるアポトーシス誘導における Bak と Bax の必要性

(A) Bak もしくは Bax を標的とする siRNA、あるいは control siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理し、Cell Count Reagent SF を用いて生細胞数を測定し、western blotting によりタンパク質を検出した。生細胞数の測定において、薬剤未処理の生細胞数の平均値を 100%とし、それに対する生細胞数の割合をそれぞれ示した。エラーバーは独立した 3 回の実験の標準偏差を表している。(B) Bak もしくは Bax を標的とする siRNA、あるいは control siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理した後、細胞質画分を調製し、western blotting により *cyt c* を検出した。

3-4 本章のまとめ

本章では VK2 固定化ビーズを用いたアフィニティ精製により、HL60 細胞抽出液から VK2 のアポトーシス誘導に関与する標的タンパク質を探索した。しかしながら、多数の VK2 結合タンパク質が検出され、VK2 固定化ビーズを用いたアフィニティ精製法による VK2 標的タンパク質の単離・同定は困難であった。そこで、VK2 がミトコンドリアに影響を及ぼすことが第 2 章の結果より示唆されたため、ミトコンドリアのアポトーシス誘導経路に関連するタンパク質に着目し、VK2 標的タンパク質の同定を再度試みた。タンパク質の発現レベル・修飾状態に焦点を絞って解析したところ、VK2 処理した HL60 細胞において、VK2 の処理時間・処理濃度依存的に Bak の翻訳後修飾が起こっていることが明らかとなった。この修飾は、1) 既知のリン酸化とは異なっていた、2) VK2 以外のアポトーシス誘導刺激では起こらなかったことから、VK2 のアポトーシス誘導に特異的な Bak の翻訳後修飾と考えた。

そこで、VK2 が Bak と直接結合することでアロステリックな変化を起こすのではないかと考え、VK2 固定化ビーズを用いて VK2 に対する Bak の結合活性を解析した。その結果、Bak は VK2 と直接結合したが、Bak と構造的に類似している Bax は VK2 と結合しなかった。さらに、HeLa 細胞において、Bak のノックダウン特異的に VK2 による細胞増殖阻害もしくは細胞質への cyt c の放出が抑制されていた。これに対し、アポトーシス誘導における機能が Bak と重複していると考えられている Bax をノックダウンしても、VK2 によるアポトーシス誘導は阻害されなかった。これらのことから、VK2 は Bak のみを介してアポトーシスを誘導していると考えられる。以上の結果から、Bak が VK2 によるアポトーシス誘導に関与する標的タンパク質であると考えた。

第4章 VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾の解析

4-1 緒言

第3章では、VK2 が Bak の翻訳後修飾を引き起こすことを明らかにした。VK2 は Bak を標的としてアポトーシスを誘導していたことから、VK2 により引き起こされる Bak の翻訳後修飾は VK2 によるアポトーシス誘導において重要な役割を担っている可能性がある。そこで、本章では VK2 によって引き起こされた Bak の翻訳後修飾の同定を試みた。タンパク質の翻訳後修飾の解析については、生化学的な手法や放射線同位体を用いた手法など、様々な方法が開発されているが、これらは修飾の種類や修飾を受けるアミノ酸残基が特定されている場合に限られる。ここまで、VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾に関する情報は得られていないことから、質量分析法を利用して VK2 によって修飾を受けた Bak と未修飾の Bak の質量差を測定することで、Bak の新規翻訳後修飾を解析した。

4-2 材料及び方法

4-2-1 質量分析サンプルの調製

4-2-1-1 FLAG 精製

FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を 30 μ M VK2 で 48 時間処理後に、細胞を回収して氷冷 PBS で 2 回洗浄した。その後、IP Buffer [20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM KCl, 1.0 mM EDTA, 1% CHAPS] を加え、細胞を超音波処理して破碎し、細胞破碎液を遠心分離 (20,400 x g, 30 min, 4°C) して上清を回収した。予め IP Buffer で洗浄・平衡化しておいた anti-FLAG agarose beads (抗 FLAG 抗体固定化ビーズ、Sigma-Aldrich) を回収した上清に加え、4°C で 1 時間穏やかに混合した。IP Buffer で 5 回洗浄し、0.2 mg/mL FLAG peptide (Sigma-Aldrich) を含む IP Buffer で抗 FLAG 抗体固定化ビーズに結合したタンパク質を競合的に溶出させた。溶出は 5 回行い、溶出画分は全て混ぜ合わせた。

4-2-1-2 限外濾過によるタンパク質の濃縮及び溶媒交換

4-2-1-1 で得られた溶出画分を限外濾過フィルター (Microcon YM-10, Merck) を用いて濃縮し、0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 水溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で洗浄後、0.1% TFA 水溶液を用いてタンパク質を回収した。

4-2-2 質量分析

質量分析器を用いたタンパク質の解析を東京医科歯科大学 笠間健嗣准教授に依頼した。4-2-1 に示した方法に従って調製したサンプルを Easy-nLC II Liquid chromatography system (Thermo Scientific) に取り付けられた nano-HPLC capillary column (NTCC-360/75-3-110, 0.075 mm x 110 mm, Nikkyo Technos) に注入し、流速 300 nL/min の速度で分離した。このとき、以下の溶出溶媒を用いた。

Eluent A = 0.1% formic acid in distilled water

Eluent B = 0.1% formic acid in acetonitrile

液体クロマトグラフィーによる分析は、最初の 2 分間で Eluent B の濃度を 0%

から 30%まで直線的に上昇させ、続く 20 分間で 30%から 70%に直線的に上昇させて行った。nano-HPLC capillary column は LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) に接続されており、液体クロマトグラフィーによってサンプルを分離し、連続的に質量分析した。測定された各ピークの平均質量は ProMass deconvolution software (Novatia, LLC) を用いて計算した。

4-2-3 FD5M を用いたチオール基の標識

本実験は Nishi らの方法に倣った (Nishi et al., 2002)。野生型もしくは変異型の FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を 30 μ M VK2 で 48 時間処理後、細胞を回収し、4-2-1-1 に示した方法に従って FLAG 精製した。得られた溶出画分に fluorescein diacetate 5-maleimide (FD5M, Sigma-Aldrich) を終濃度が 0.3 mM となるように加え、5 分間氷上で反応させた後、終濃度が 100 mM となるように DTT を加えた。次に、予め -20°C に冷やされたアセトンタンパク質溶液の 10 倍量加えて混合し、 -20°C の冷凍庫内に静置した。2 時間後、サンプルを遠心分離 (20,400 x g, 20 min, 4°C) し、上清を取り除いた。続いて、予め -20°C に冷やされた 80% アセトン水溶液を加えてボルテックスミキサーで混合し、再度遠心分離 (20,400 x g, 10 min, 4°C) した。上清を取り除いた後、真空乾燥機でペレットを完全に乾燥させ、40 μ L の SDS sample buffer を加えた。室温で 90 分間攪拌することでタンパク質の沈殿を完全に溶解させ、さらに 98°C で 5 分間加熱した。サンプルを SDS-PAGE した後、ゲルを 488 nm の励起光でスキャンした (Typhoon Trio, GE Healthcare)。

4-2-4 Tris-Tricine PAGE

2-2-4 に示した手順と同様であるが、running buffer として Tris-Tricine running buffer (100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 100 mM Tricine, 0.1% SDS) を用いた。

4-2-5 MEF 細胞の cDNA 調製

NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) を用いてマウス胎児繊維芽細胞 (MEF 細胞) から total RNA を抽出した。MEF 細胞の培養には 10% FBS を含む DMEM 培地を用いた。MEF 細胞より抽出した total RNA を鋳型とし、Super Script III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて逆転写 PCR し、MEF 細胞の

cDNA を調製した。NucleoSpin RNA II と Super Script III First-Strand Synthesis System のプロトコールは製品に添付されていたマニュアルに従った。

4-2-6 プラスミド DNA の調製

(1) N 末端から 20 アミノ酸ずつ欠失させた Bak 欠失変異体

pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak を鋳型とし、PCR 法により C 末端に FLAG-HA tag が付加された各欠失変異体の DNA 断片を作製した。これら DNA 断片を pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak に挿入した。

(2) C 末端から 20 アミノ酸ずつ欠失させた Bak 欠失変異体

pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak を鋳型とし、PCR 法により N 末端に HA-FLAG tag が付加された各欠失変異体の DNA 断片を作製した。これら DNA 断片を pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak に挿入した。

(3) 4-3-4 で用いた Bak 欠失変異体

pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak を鋳型とし、PCR 法により N 末端に FLAG-tag が付加された各欠失変異体の DNA 断片を作製した。これら DNA 断片を pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak に挿入した。

(4) Bak 点変異体

pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak を鋳型とし、PCR 法により目的のアミノ酸をコードするコドンに変異を入れ、FLAG tag が N 末端に付加された全長の Bak の DNA 断片を作製した。これら DNA 断片を pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak に挿入した。

(5) Mouse Bak

4-2-5 に示した方法に従って調製した MEF 細胞の cDNA を鋳型とし、PCR 法により FLAG tag が N 末に付加された全長の Bak の DNA 断片を作製した。これらの DNA 断片を pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak に挿入した。クローニングした mouse Bak の DNA 断片全てに F194L の変異が入っていたことから、F194L を野生型として用いた。なお、mouse Bak の塩基配列は National Center for Biotechnology Information の Reference Sequence database に登録されている mouse Bak (NM_007523.2) と比較した。また、mouse Bak 点変異体は、pcDNA(+)-FLAG-mouse Bak を鋳型とし、PCR 法により目的のアミノ酸をコードするコドンに変異を入れ、FLAG tag が N 末端に付加された全長の Bak の DNA 断片を作製した。これら DNA 断片を pcDNA3.1(+)-FLAG-Bak に挿入した。

4-3 結果と考察

4-3-1 質量分析による VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾の解析

FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を 30 μ M VK2 で 48 時間処理後、抗 FLAG 抗体固定化ビーズを用いて FLAG-Bak を精製した。得られたサンプルを SDS-PAGE し、銀染色によりタンパク質を検出した結果、未修飾の FLAG-Bak と修飾を受けた FLAG-Bak を含むサンプルが得られた (Fig. 4.1A)。このサンプルを限外濾過にて濃縮・溶媒交換し、質量分析によって解析したところ、未修飾の FLAG-Bak と修飾を受けた FLAG-Bak の質量に 459.9 ± 2.1 Da の差があった (Fig. 4.1B)。FLAG-Bak のアミノ酸配列から計算した理論値 (24,854.4 Da) と未修飾の FLAG-Bak の測定値 (24,852.3 Da) の間に 2.1 Da の差があったことから、測定誤差として 2.1 Da の幅を設定した。約 460 Da の質量差は VK2 の分子量 (444.7 Da) に近いことから、この差は VK2 の細胞内代謝物に相当するのではないかと推測した。Vitamin K サイクルにより産生される VK2 細胞内代謝物には、VK2-hydroquinone (VK2-H2, 446.7 Da) と VK2 2,3-epoxide (VK2-O, 460.7 Da) がある (Oldenburg et al., 2008、Fig. 4.1C)。このうち、VK2-O の分子量が質量分析によって得られた質量差とほぼ一致する。ここで、エポキシ環を有する低分子化合物は、生理的条件下でタンパク質のシステイン残基のチオール基と反応し、共有結合を形成することが報告されている (Watanabe et al., 2006、Fig. 4.2)。これらのことから、VK2 により引き起こされる Bak の翻訳後修飾が、VK2-O が Bak と共有結合を形成したものであるならば、修飾される残基はシステイン残基と考えられる。

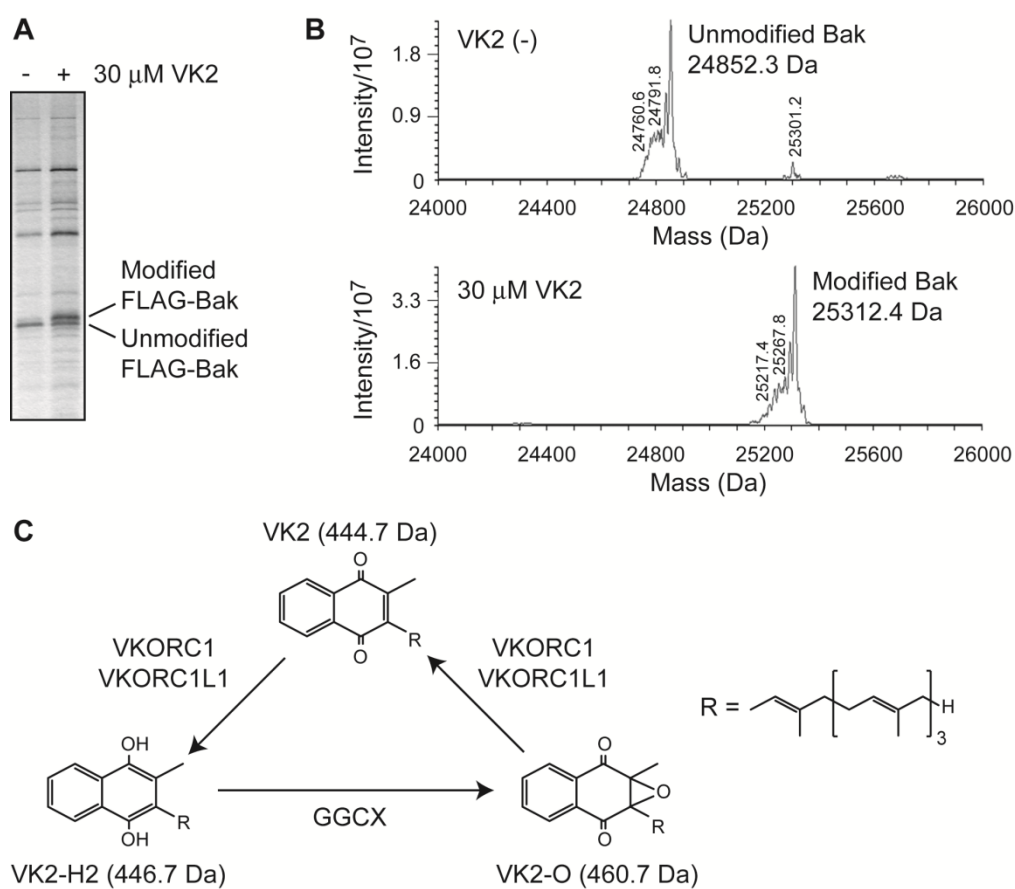


Fig. 4.1 VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾の解析

(A and B) FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理した後、細胞抽出液を作製し、抗 FLAG 抗体固定化ビーズを用いてタンパク質を精製した。得られた溶出サンプルを濃縮し、含まれるタンパク質を銀染色にて検出し (A)、質量分析により解析した (B)。(C) Vitamin K サイクルにおける VK2 の代謝様式。括弧内は VK2 代謝物の質量。VKORC1: vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1; VKORC1L1: VKORC1 like 1; GGCX: γ -glutamyl carboxylase; VK2-H2: vitamin K2 hydroquinone; VK2-O: vitamin K2 2,3-epoxide.

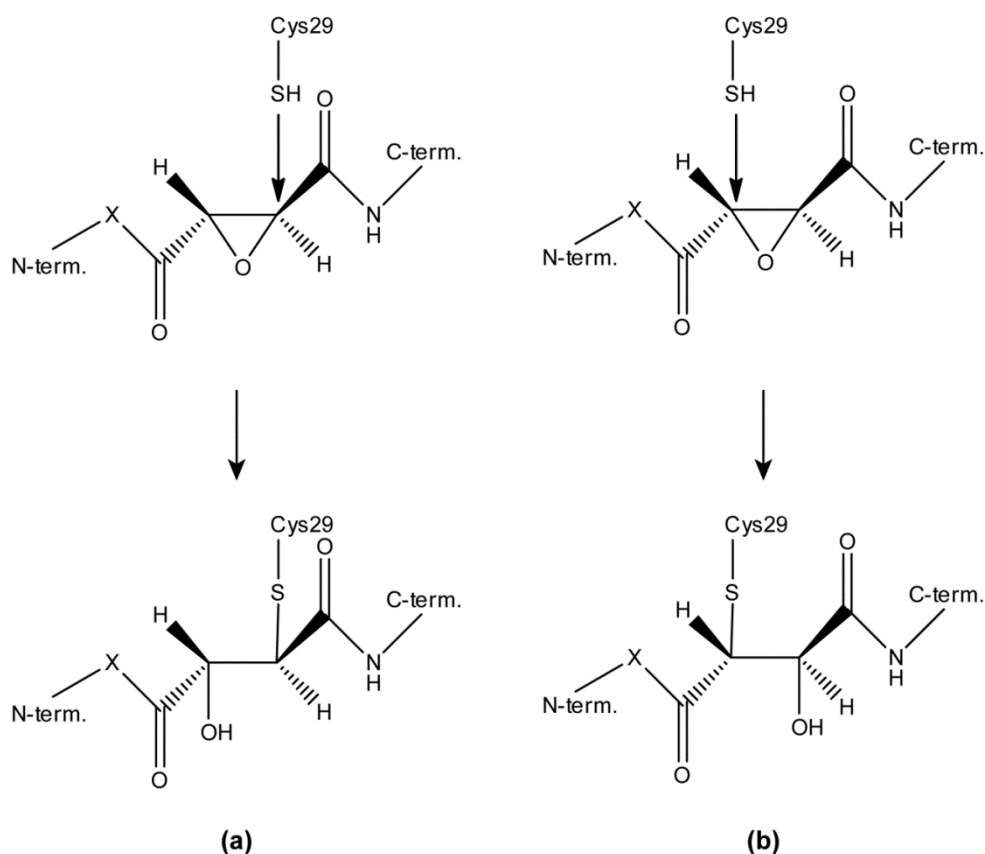


Fig. 4.2 エポキシ環を有する低分子化合物とタンパク質のシステイン残基間での共有結合形成例

Cathepsin B 阻害剤の *trans*-epoxysuccinyl 化合物の一部とエポキシド部位近傍に位置する cathepsin B の Cys29 を示し、その酵素活性阻害機構の一部である共有結合の形成反応の反応様式を示す。Cys29 のチオール基がエポキシ環の 2 位 (a) もしくは 3 位 (b) に攻撃し、エポキシ環が開環することにより共有結合が形成される (Watanabe *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2006 より引用、一部改変)。

4-3-2 Bak における VK2 特異的な翻訳後修飾部位の特定

Bak のシステイン残基が VK2 による Bak の翻訳後修飾に関与する可能性を検証するために、Bak のシステイン残基 (Cys14、Cys166) を 1 つずつ (C14A、C166A)、もしくは両方をアラニンに置換 (C14A/C166A) した点変異体をそれぞれ作製した。VK2 固定化ビーズを用いてこれらの変異体と VK2 との結合活性を調べたところ、各変異体は野生型 Bak とほぼ同等の効率で VK2 と結合した (Fig.

4.3A)。よって、Bak が有する 2 つのシステイン残基は Bak と VK2 との非共有結合的な相互作用に大きく影響しないと考えられる。

次に、野生型 FLAG-Bak もしくは各変異体を一過的に発現させた HeLa 細胞を用いて、Bak の移動度の変化を調べた。VK2 で細胞を 48 時間処理した後、細胞抽出液を作製し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により Bak を検出したところ、野生型もしくは C14A は VK2 処理により移動度が変化したのに対し、C166A と C14A/C166A では VK2 処理により移動度の変化が見られなかった (Fig. 4.3B, Input)。よって、VK2 による Bak の翻訳後修飾に Cys166 が関与していると考えられる。

Bak の Cys166 のチオール基が翻訳後修飾に直接関与しているかを明らかにするために、VK2 処理によってシステイン残基のチオール基の修飾状態が変化するかどうかを解析した。野生型 FLAG-Bak もしくは各変異体を一過的に発現させた HeLa 細胞を VK2 で処理し、抗 FLAG 抗体固定化ビーズを用いて FLAG-Bak を精製した。得られたサンプルに、チオール基と特異的に反応する FD5M を加えて蛍光標識し、SDS-PAGE 後、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting もしくは蛍光イメージアナライザーによりタンパク質を解析した。その結果、VK2 未処理の野生型 FLAG-Bak、C14A 及び C166A は FD5M で標識されたが、C14A/C166A は標識されなかった (Fig. 4.3B, FD5M-labeled lane 1, 3, 5, 7)。このことから、Cys14 と Cys166 は本来、いずれも還元型で存在していると考えられる。一方、VK2 処理によって生じる移動度の遅い修飾型 Bak を見てみると、野生型 FLAG-Bak は FD5M で修飾されたのに対し、C14A は FD5M で標識されなかった (Fig. 4.3B, FD5M-labeled lane 2, 4)。以上の蛍光標識実験から、VK2 処理により翻訳後修飾された Bak において、Cys14 は還元型であるのに対して、Cys166 のチオール基はなんらかの修飾を受けていることが分かった。よって、VK2 処理による翻訳後修飾は Cys166 に何らかの官能基が付加されたものと考えられる。これらの結果は、VK2 による Bak の翻訳後修飾が VK2-O と Bak のシステイン残基との共有結合形成によるものであることを支持する結果と言える。

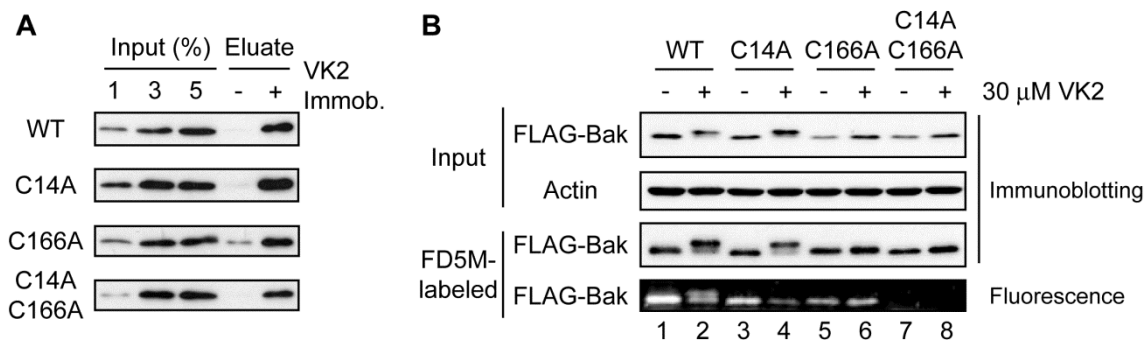


Fig. 4.3 Bak 変異体を用いた VK2 による Bak 修飾部位の解析

(A) *in vitro* で調製した野生型 FLAG-Bak (WT) もしくは変異体を、VK2 固定化ビーズ(+) もしくは VK2 非固定化ビーズ(-)と混合し、結合したタンパク質を抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により検出した。(B) 野生型 FLAG-Bak (WT) あるいは変異体を一過的に発現させた HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理後、細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE 後、western blotting によりタンパク質を検出した (Input)。細胞抽出液から FLAG-Bak を精製し、FD5M で処理した後、サンプルを SDS-PAGE し western blotting 及び蛍光イメージアナライザーにて解析した (FD5M-labeled)。

4-3-3 Bak における VK2 相互作用領域の解析①

VK2 による Bak の翻訳後修飾が、VK2-O と Bak の Cys166 が共有結合を形成したものであるならば、Bak が VK2 と非共有結合的に相互作用するアミノ酸残基は Cys166 の近傍に存在するはずである。そこで、Bak における VK2 の相互作用領域の特定を試みた。VK2 との相互作用に重要な領域を絞り込むために、Bak の N 末端もしくは C 末端から 20 アミノ酸ずつ欠失させた Bak 欠失変異体を作製した。VK2 固定化ビーズを用い、*in vitro* で発現させた各変異体と VK2 との結合活性を調べたところ、N 末端から 120 アミノ酸を欠失させた Bak 欠失変異体でも VK2 と結合したが、C 末端からアミノ酸を欠失させた Bak 欠失変異体に関しては、C 末端から 20 アミノ酸を欠失させただけで VK2 との結合が見られなくなった (Fig. 4.4)。以上の結果から、Bak の C 末端に相当する 192-211 の領域が VK2 との相互作用に必要であると考えられる。しかしながら、この領域はミトコンドリア外膜を貫通している Transmembrane (TM) 領域であり、特定の 3 次構造をとらないと考えられる。よって、VK2 が実際に結合する Bak の領域は他に存在すると考えられる。

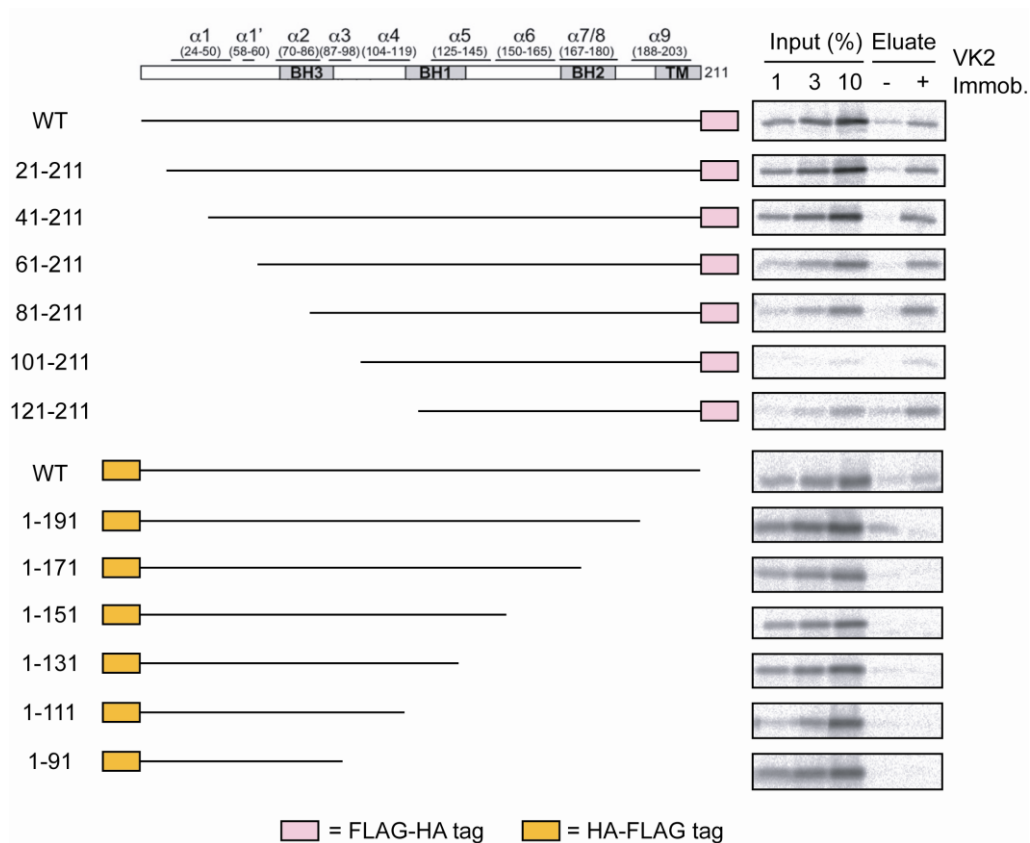


Fig. 4.4 Bak の欠失変異体を用いた VK2 相互作用領域の同定①

in vitro で調製した ^{35}S 標識野生型 Bak もしくは部分長変異体を、VK2 固定化ビーズ(+)もしくは VK2 非固定化ビーズ(-)と混合し、結合タンパク質を溶出させた後、SDS-PAGE し、オートラジオグラフィーで検出した。パネル上部には Bak のドメイン構造の模式図、及び α ヘリックスを形成しているアミノ酸番号を示している。BH: Bcl2 Homology; TM: transmembrane. (Dewson et al., Mol Cell, 2008 より転載、一部改変)

4-3-4 Bak における VK2 相互作用領域の解析②

4-3-3 の実験結果を受けて、TM 領域を残してさらに N 末端からアミノ酸を欠失させた Bak 欠失変異体を作製し、これらの変異体と VK2 との結合活性を評価した。その結果、FLAG-Bak(166-211)は VK2 と結合したが、FLAG-Bak(188-211)と VK2 との結合は見られなかった (Fig. 4.5A)。よって、VK2 との相互作用には Bak の 166-187 の領域が TM 領域よりも必要であると考えられる。さらに、VK2 と相互作用する領域を絞り込むために、166-187 の領域を 4 アミノ酸もしくは

は5アミノ酸ずつ欠失させた各 Bak 欠失変異体を作製し、VK2 との結合活性を評価した。その結果、FLAG-Bak (166-211) は VK2 と結合したが、FLAG-Bak (171-211) と VK2 との結合は見られなかった (Fig. 4.5B)。以上の結果から、Bak の 166-170 に存在するアミノ酸が VK2 との相互作用に最も重要であると考えられる。

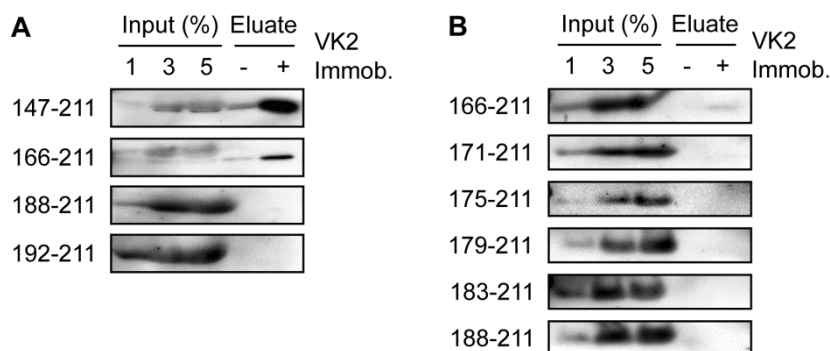


Fig. 4.5 Bak の欠失変異体を用いた VK2 の相互作用領域の同定②

(A and B) *in vitro* で調製した FLAG-Bak の欠失変異体を VK2 固定化ビーズ(+)もしくは VK2 非固定化ビーズ(-)と混合し、結合タンパク質を溶出させ、Tricine-PAGE 後に抗 FLAG 抗体を用いた western blotting にて FLAG-Bak を検出した。

4-3-5 Bak における VK2 相互作用部位の同定

Bak 欠失変異体の立体構造は野生型 Bak と大きく異なると考えられるため、Bak における VK2 の相互作用領域 (アミノ酸残基) を特定するには、タンパク質の立体構造の変化が最小限に抑えられる点変異体を用いることが望ましい。4-3-4 の実験結果から、Bak の 166-170 のアミノ酸残基が VK2 との相互作用に最も重要であると考えられるので、この領域内のアミノ酸を1つずつアラニンに置換した点変異体 (Ala168 なので、C166A、I167A、R169A、W170A の4つ) を作製し、VK2 との結合活性を調べたところ、野生型に比べて R169A と W170A の結合活性が少し弱くなっていた (Fig. 4.6A)。そこで、Arg169 と Trp170 を共にアラニンに置換した変異体 (R169A/W170A) を作製し、VK2 との結合活性を調べたところ、野生型に比べて著しく結合活性が低下していた (Fig. 4.6A)。

R169A/W170A が野生型 Bak に近い立体構造を保持しているかを確認するために、野生型もしくは R169A/W170A を過剰発現させた細胞におけるアポトーシス

誘導活性を比較した。HeLa 細胞に野生型 FLAG-Bak もしくは R169A/W170A をトランスフェクションし、24 時間後の生細胞数を比較したところ、R169A/W170A は野生型 FLAG-Bak とほぼ同等に細胞死を誘導していた (Fig. 4.6B)。よって、R169A/W170A は野生型 Bak と大きく変わらない立体構造を保持していると考えられる。

以上の結果から、VK2 と Bak との相互作用には Arg169 と Trp170 が関与していると考えられる。これらの残基は Cys166 と非常に近いことから、VK2 が引き起こす Bak の翻訳後修飾は、VK2-O が Bak のシステイン残基と共有結合を形成したものであることをさらに支持すると言える。

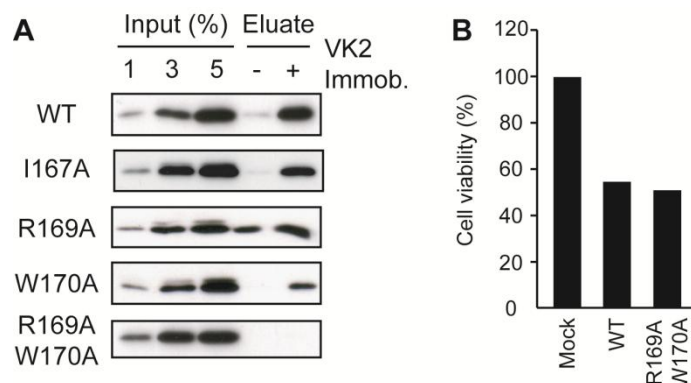


Fig. 4.6 Bak の点変異体を用いた VK2 相互作用部位の同定

(A) *in vitro* で調製した野生型 FLAG-Bak (WT) もしくは各変異体を VK2 固定化ビーズ(+)もしくは VK2 非固定化ビーズ(-)と混合し、結合タンパク質を溶出後、SDS-PAGE し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting にて FLAG-Bak を検出した。(B) HeLa 細胞に野生型 FLAG-Bak (WT) もしくは R169A/W170A をトランスフェクションし、24 時間培養後、SF Reagent を用いて生細胞数を測定した。空のプラスミドをトランスフェクションした細胞の生細胞数の平均値を 100%とした時の生細胞数の割合をそれぞれ示した。

4-3-6 Bak の立体構造を踏まえた VK2 相互作用部位の解析

Bak の立体構造は既に報告されているため (Moldoveanu et al., 2006; Wang et al.,

2009)、1) VK2 によって修飾される Cys166 と VK2 との相互作用に重要である Arg169 と Trp170 が近接するか、2) これら 3つのアミノ酸残基は VK2 が相互作用し得る Bak 表面に存在するか、の 2点について解析した。Bak の立体構造データとして *homo sapiens* Bak (PDB: 2IMT, Moldoveanu et al., 2006) を選択し、UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, University of California, San Francisco) を用いて Bak の立体構造を解析した (Fig. 4.7A)。着目している 3つのアミノ酸 (Cys166、Arg169、Trp170) が存在する領域を解析したところ、これらのアミノ酸残基は Bak の分子表面で疎水性のポケットを形成していたことから (Fig. 4.7B)、これら 3つのアミノ酸残基は VK2 と相互作用し得ると考えられる。この解析結果に、未修飾 Bak と修飾された Bak の質量差が VK2-O と一致したこと (Fig. 4.1B) と、VK2 により Bak の Cys166 が修飾されること (Fig. 4.3B) を合わせ、VK2 による Bak の翻訳後修飾は VK2-O が Bak の Cys166 と共有結合したものであると結論付けた (Fig. 4.8)。

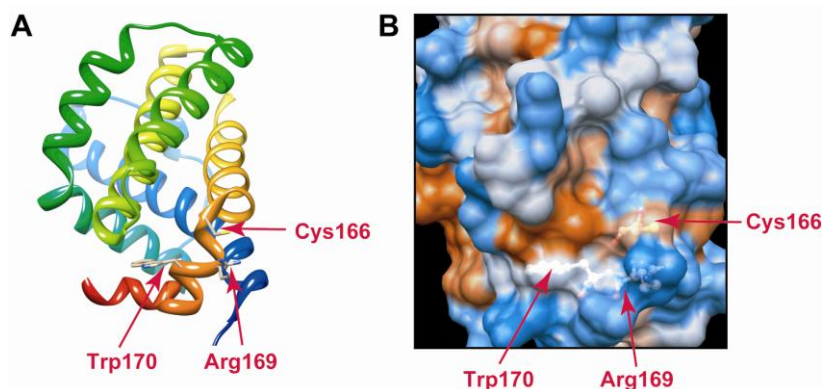


Fig. 4.7 Bak の立体構造を踏まえた VK2 相互作用部位の解析
(A and B) Bak (アミノ酸番号 16-186) の立体構造のリボンモデル (A)、VK2 の相互作用領域周辺の表面構造 (B) を示した。赤字で VK2-O が Bak と共有結合を形成する Cys166 と、VK2 と Bak との相互作用に関与する Arg169 と Trp170 を示す。(B) における青色は親水性領域、橙色は疎水性領域を表している。

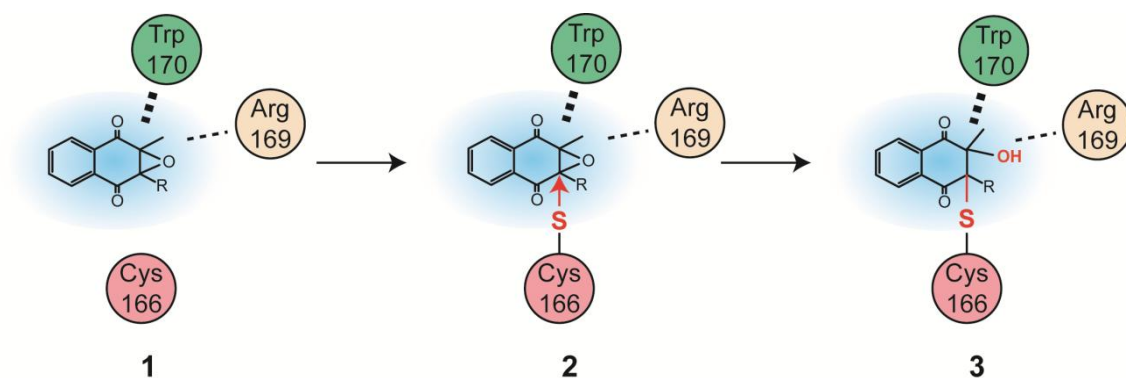


Fig. 4.8 VK2-O と Bak の共有結合形成モデル

(1) VK2-O が Arg169 と Trp170 を介して Bak と相互作用する。Fig. 4.6A で示した実験結果に基づくと、VK2 に対するアフィニティは Arg169 よりも Trp170 の方が強いと考えられる。(2) Bak と相互作用した VK2-O のエポキシ環に近接する Cys166 のチオール基が接近する。(3) Cys166 のチオール基によるエポキシ環の開環反応を経て、VK2-O と Bak の間に共有結合が形成される。

4-3-7 mouse Bak に対する VK2 の影響

ここまでの実験結果から、VK2 による Bak の翻訳後修飾には Cys166、Arg169、Trp170 が大きく関与していると考えられる。そこで、Bak のアミノ酸配列はヒトとマウスの間で進化的に良く保存されていることから、mouse 由来の細胞においても同様に VK2 による Bak の翻訳後修飾が起きるかを検証した。mouse 由来の MEF 細胞を VK2 で 24 時間もしくは 48 時間処理したところ、48 時間の VK2 処理で、わずかに PARP の切断が確認されたことから、VK2 は弱いながらも MEF 細胞のアポトーシスを誘導したと考えられる (Fig. 4.9A)。また、VK2 処理によって、抗 Bak 抗体に反応する移動度の遅いシグナルが観察されたことから (Fig. 4.9A *印)、MEF 細胞においても VK2-O と Bak の共有結合形成が起こっていると示唆される。そこで、mouse Bak (mBak) と human Bak (hBak) のアミノ酸配列を Clustal W によりアラインメントして比較したところ、hBak の Cys166 は mBak では保存されていなかったが、代わりに mBak は Cys154 を有していた (Fig. 4.9B、赤枠及び緑枠)。また、hBak における Arg169 と Trp170 は mBak における Arg167 と Trp168 に相当し、これら周辺のアミノ酸残基は良く保存されていた (Fig. 4.9B、青枠)。よって、VK2-O は mBak とも相互作用し、Cys154 を介して共有結合を形成する、という仮説を立てた。

上記の仮説を検証するべく、*in vitro* で N 末端に FLAG タグが融合した mBak (FLAG-mBak) を調製し、VK2 固定化ビーズを用いて VK2 との結合活性を調べた。その結果、FLAG-mBak は VK2 と結合し、回収率も FLAG-hBak とほぼ同等であった (Fig. 4.9C)。次に、mBak の Cys154 をアラニンに置換した点変異体 (C154A) が野生型 mBak と同様に VK2 と結合するかを確認したところ、野生型 mBak とほぼ同等に結合したことから、mBak における C154A の変異は mBak と VK2 との相互作用に大きく影響しないと考えられる (Fig. 4.9C)。最後に、Bak のシステイン残基が VK2 により誘導される Bak の移動度変化に及ぼす影響を解析した。FLAG-hBak (野生型及び C166A、それぞれ hWT、hC166A と表記) もしくは FLAG-mBak (野生型及び C154A、それぞれ mWT、mC154A と表記) を一過的に発現させた HeLa 細胞を VK2 で 48 時間処理後、細胞抽出液を調製し、western blotting で各 FLAG-Bak の移動度を解析した。その結果、hWT と比べて変化の度合いは少ないものの、mWT でも移動度の遅い FLAG-Bak のシグナルが観察された。一方、mC154A は hC166A と同様に VK2 処理によって移動度は変化しなかった (Fig. 4.9D)。以上の結果から、mouse においても VK2-O は Bak とシステイン残基を介して共有結合を形成していると考えられる。

Fig. 4.9D に示したように、VK2-O と共有結合を形成した mBak は hBak と比べて少なかった。以下、この差が生じた可能性について議論する。VK2-O が hBak または mBak と共有結合を形成する効率が大きく異なる原因として、①VK2-O に対するアフィニティの差、②VK2-O に対するシステイン残基の反応性の差、が考えられる。①については、hBak の Arg169 と Trp170 とその周辺のアミノ酸配列が mBak においてもよく保存されていること (Fig. 4.9B)、VK2 固定化ビーズを用いた結合活性実験において、mBak と hBak はほぼ同等の結合活性を有していたこと (Fig. 4.9C) から、VK2 に対するアフィニティにおいて hBak と mBak に大きな差はないと推察される。より正確に議論するためには VK2-O 固定化ビーズを作製し、Bak の結合活性を比較することが望ましいが、固定化用 VK2-O 誘導体を別途調製しなくてはならないため、現時点では行えていない。②については、VK2-O と共有結合を形成するシステイン残基と VK2 との相互作用に重要なアルギニン残基及びトリプトファン残基との位置関係は mBak と hBak において大きく異なっている (hBak における Cys166 と Arg169 及び Trp170 との距離よりも mBak における Cys154 と Arg167 及び Trp168 との距離は離れている) ことから、VK2-O との共有結合形成効率に違いが生じたのかもしれない。

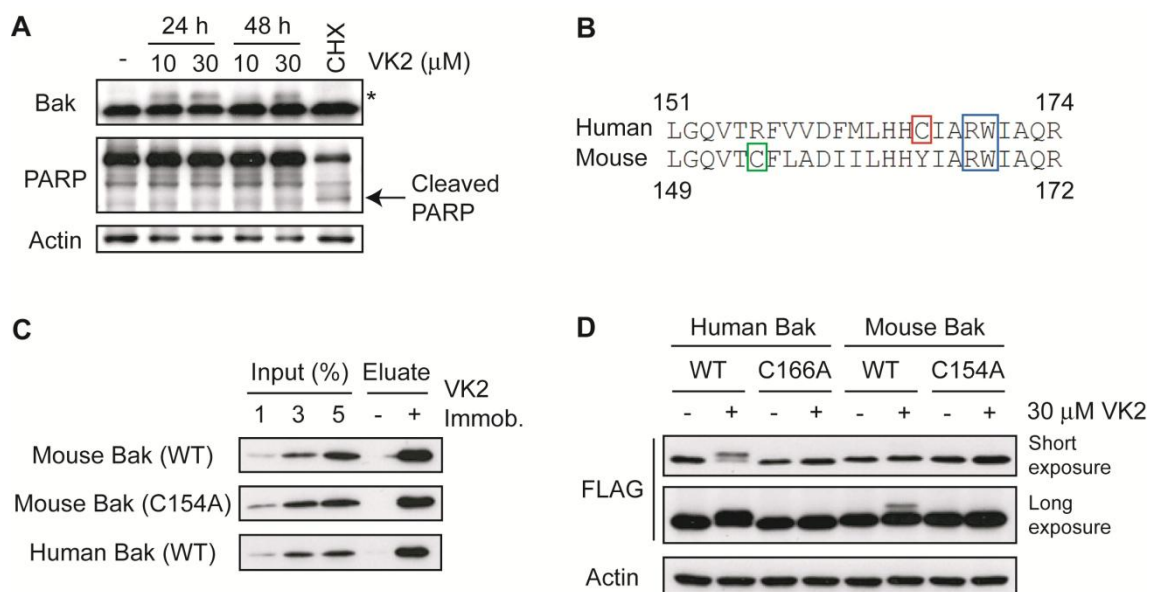


Fig. 4.9 mouse Bak に対する VK2 の影響

(A) MEF 細胞を VK2 もしくは CHX で処理し、western blotting により各タンパク質を検出した。*は VK2 処理依存的に検出される移動度の遅い Bak のシグナル。(B) VK2 結合領域周辺の human Bak (hBak) のアミノ酸配列とそれに対応する mouse Bak (mBak) のアミノ酸配列のアラインメント。赤枠は hBak における VK2-O と共有結合を形成するシステイン残基、緑枠は mBak において注目する領域内に存在するシステイン残基、青枠は hBak において VK2 との相互作用に重要であると考えられる 2 つのアミノ酸残基とそれに対応する mBak の 2 つのアミノ酸残基を示す。(C) *in vitro* で調製した野生型 FLAG-mBak (WT) もしくは C154A を VK2 固定化ビーズ(+)もしくは VK2 非固定化ビーズ(-)と混合し、結合タンパク質を溶出させた後、SDS-PAGE し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting にて Bak を検出した。比較のために hBak のデータ (Fig. 3.4B rBak) を再掲している。(D) FLAG-hBak あるいは FLAG-mBak、もしくはそれぞれの点変異体を発現させた HeLa 細胞を 30 μM VK2 で 48 時間処理後、細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により FLAG-Bak を検出した。

4-4 本章のまとめ

本章では質量分析法を用いて、VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾を解析した。その結果、VK2 処理によって変化する Bak の質量差が vitamin K サイクルによって産生される VK2 細胞内代謝物の VK2-O の分子量とほぼ一致した。VK2-O はエポキシ環を有すること、エポキシ環とシステイン残基のチオール基は生理条件下で共有結合を形成し得ることを踏まえ、VK2-O がシステイン残基を介して Bak と共有結合を形成するという仮説を立てた。Bak の Cys166 をアラニンに置換した点変異体を用いた実験から、Bak が Cys166 を介して VK2-O と共有結合を形成していることを明らかにした。Bak の欠失変異体・点変異体を用いた VK2 との結合活性評価により、Bak の Arg169 と Trp170 が VK2 との相互作用に最も重要であることが分かった。Bak の立体構造を踏まえると、Cys166、Arg169、Trp170 は Bak 分子表面で疎水的なポケットを形成するアミノ酸残基であり、VK2 はこれらのアミノ酸と相互作用し得ると考えられる。以上のことから、VK2 により引き起こされる Bak の翻訳後修飾は、細胞内の vitamin K サイクルによって産生された VK2-O が Cys166 を介して Bak と共有結合を形成したものと結論付けた。

hBak のみならず mBak でも VK2 による Bak の翻訳後修飾が起こるかを検証した結果、VK2-O は Cys154 を介して mBak と共有結合を形成していることを明らかにした。VK2 による Bak の修飾効率は hBak よりも mBak の方が低かったことから、VK2 と共有結合を形成するシステイン残基周辺のアミノ酸残基の配置が Bak の修飾効率に影響することが示唆された。

第5章 VK2によるBakの修飾とアポトーシス誘導の関係性

5-1 緒言

第4章では、VK2特異的に引き起こされるBakの翻訳後修飾は、VK2細胞内代謝物であるVK2-OがCys166を介してBakと共有結合を形成したものであることを明らかにした。BakとVK2-Oが共有結合を形成する報告はこれまでにないことから、本章ではVK2によるBakの修飾とアポトーシス誘導の関係性について解析した。また、アポトーシス誘導を基盤にVK1やVK3などの他のVK化合物の構造活性相関を解析した。

5-2 材料及び方法

5-2-1 試薬

本章で新しく用いた試薬とその使用方法を示す。括弧内は購入元、ストック溶液の濃度と溶媒、保存温度となっている。

Warfarin (LKT Laboratories, 40 mM in DMSO, -20°C)

α -tocopherol (Sigma-Aldrich, 1.0 M in EtOH, 4°C)

VK1 (Nacalai Tesque, 10 mM in EtOH, -20°C)

MK-4 (Santa Cruz Biotechnology, 10 mM in EtOH, -20°C)

MK-7 (Wako Pure Chemicals, 5.0 mM in EtOH, -20°C)

VK3 (Nacalai Tesque, 10 mM in EtOH, -20°C)

VK 化合物の粉末もしくは原液は、EtOH を加え、超音波処理して完全に溶解させた。また、VK 化合物溶液を-20°C で保存しておく、一度溶解した化合物が析出してしまうので、使用直前に超音波処理し、完全に溶解させた。VK 化合物と α -tocopherol は窒素ガスを封入し、遮光チューブで保存した。

5-2-2 293T 細胞の培養

ヒト胎児腎細胞由来 293T 細胞の培養には 10% FBS、0.5 mg/ml G418 (Nacalai Tesque) を含む DMEM 培地を用いた。

5-2-3 プラスミド DNA の調製

4-2-5 に示した方法に従って調製した HeLa 細胞の cDNA を鋳型とし、PCR 法により FLAG tag が C 末に付加された全長の GGCX、VKORC1 及び VKORC1L1 の DNA 断片を作製した。これらの DNA 断片を pcDNA3.1(+) に挿入した。

5-2-4 細胞内活性酸素種レベルの測定

6-well plate に HL60 細胞を 1.0×10^5 cells/mL の濃度で播種し、30 μ M VK2、1.0 mM α -tocopherol、もしくは両者を加えた。また、HeLa 細胞は 1.0×10^5 cells/well

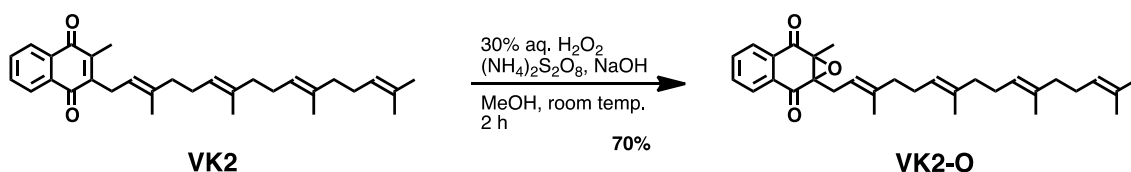
の濃度で播種し、37°C で1晩静置した後、上記の薬剤を加えた。薬剤添加後、細胞を37°C で24時間培養し、培地に終濃度 5.0 μM となるように aminophenyl fluorescein (APF, Sekisui Medical) を添加して、暗所にて37°C で30分間培養した。細胞を氷冷 PBS で2回洗浄し、PBS に懸濁させてフローサイトメーターにより APF 由来の蛍光を検出した。

5-2-5 warfarin による HL60 細胞の前処理

warfarin は培地中の FBS に含まれるアルブミンに良く結合する (Solomon and Schrogie, 1967) ことから、HL60 細胞を warfarin で前処理するには FBS 不含の培地を用いた。FBS 不含 RPMI 培地中に 2.0×10^5 cells/mL の濃度で HL60 細胞を播種し、warfarin を加えて5時間培養した。その後、6%の FBS を含む RPMI 培地を培養液の等量加えた。

5-2-6 Vitamin K2 2,3-epoxide (VK2-O) の合成

VK2-O の合成は当研究室の坂本聡助教に行って頂いた。10 mL フラスコに VK2 (29.9 mg)、メタノール (2.6 mL)、 $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Jung et al., 1993; Kim et al., 1997) (51.3 mg)、30% H_2O_2 水溶液 (8.4 μL)、1.0 M NaOH 水溶液 (74 μL) を加えた。室温で2時間攪拌後、フラスコを 0°C に冷やし、飽和塩化アンモニウム水溶液 (1.0 mL) を加えて反応を停止した。ジエチルエーテルで反応混合物から生成物を抽出し、ジエチルエーテル溶液を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥させた。硫酸マグネシウムを濾別し、濾液を濃縮した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 15/1 → 10/1) で精製し、淡黄色油状物質として VK2-O (21.7 mg, 70%) を得た。



5-3 結果と考察

5-3-1 VK2 によるアポトーシス誘導に warfarin が及ぼす影響

アポトーシス誘導における VK2-O による Bak の修飾の重要性を検証するために、vitamin K サイクル阻害剤である warfarin を用いて解析した。warfarin は vitamin K サイクル構成因子の VKORC1 及び VKORC1L1 に結合し、酵素活性を阻害する。VK2 によるアポトーシス誘導に VK2-O と Bak との共有結合形成が関与しているのであれば、warfarin は VK2 によるアポトーシス誘導を抑制するのではないかと考えた。warfarin で前処理した HL60 細胞を warfarin と VK2 で 48 時間処理後、水溶性ホルマザン/テトラゾリウム試験により生細胞数を測定した。その結果、warfarin 単独では細胞増殖に大きな影響は及ぼさなかったが、VK2 存在下では warfarin の濃度に依存して VK2 による細胞増殖阻害が抑制された (Fig. 5.1A)。また、warfarin で前処理し、次いで VK2 と warfarin で 48 時間共処理した HL60 細胞において、VK2 により誘導された caspase-3 の活性化及び PARP の切断が部分的に抑制された (Fig. 5.1B)。さらに、VK2-O と Bak の共有結合の形成も warfarin 処理により部分的に抑制されていた (Fig. 5.1B)。これは warfarin が VKORC1 及び VKORC1L1 の酵素活性を阻害したことで、vitamin K サイクルにおける VK2 の代謝速度が低下し、VK2-O の産生量が減少したためと考えられる。これらの結果より、vitamin K サイクルが VK2 によるアポトーシス誘導に関与していると考えられる。

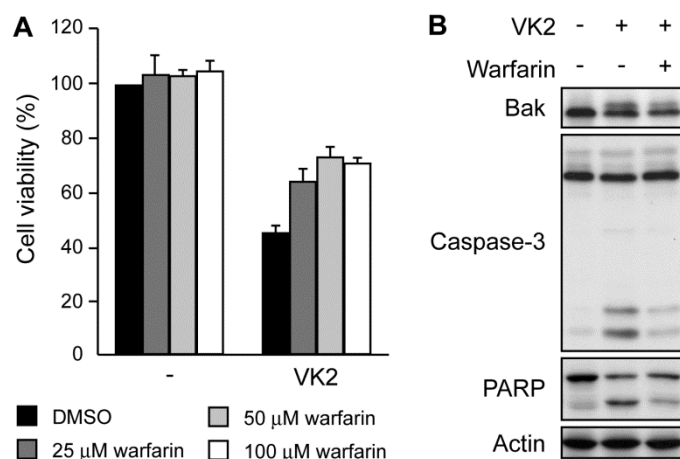


Fig. 5.1 warfarin が VK2 によるアポトーシス誘導に与える影響

(A) HL60 細胞を 25, 50, 100 μ M warfarin で 5 時間処理後、同濃度の

warfarin と 30 μ M VK2 で 48 時間処理し、Cell Count Reagent SF を用いて生細胞数を測定した。薬剤未処理の生細胞数の平均値を 100% とし、それに対する生細胞数の割合をそれぞれ示した。エラーバーは独立した 3 回の実験の標準偏差を表している。(B) HL60 細胞を DMSO もしくは 100 μ M warfarin で 5 時間処理し、同濃度の warfarin と 30 μ M VK2 で 48 時間処理後、western blotting により各タンパク質を検出した。

5-3-2 VK2-O によるアポトーシス誘導に warfarin が及ぼす影響

VK2 ではなく VK2-O がアポトーシス誘導に重要であるとすれば、直接 VK2-O で細胞を処理した場合、そのアポトーシス誘導は warfarin により阻害されないと考えられる。そこで VK2-O によるアポトーシス誘導に対する warfarin の影響を解析した。なお、5-3-2 及び 5-3-4 でのみ、VK2 の他に VK2 (EtOH) という表記を用いている。これらは以下のように定義する。

VK2 : 本セクション以前の実験に用いていた VK2 と同一のもの。

エーザイ株式会社より購入したケイツーN 注®。

VK2 (EtOH) : VK2 の粉末を EtOH に溶解させたサンプル。

以下の実験では、VK2-O を EtOH に溶解させたサンプルを用いているので、溶媒条件を揃えるために VK2 のみではなく VK2 (EtOH) も使用した。DMSO もしくは 100 μ M warfarin で前処理した HL60 細胞を同濃度の warfarin と 30 μ M VK2 (EtOH)、VK2-O、または VK2 で 48 時間処理後、細胞抽出液を調製し、western blotting により caspase-3 の活性化、PARP の切断及び Bak の翻訳後修飾を解析した。なお、warfarin は FBS 中のアルブミンに容易に結合することが知られているため (Solomon and Schrogie, 1967)、通常の 10% ではなく 3% の FBS を含む RPMI 培地で薬剤処理を行った。その結果、VK2 によるアポトーシス誘導は warfarin により大きく阻害されていたが、VK2-O によるアポトーシス誘導は warfarin であまり阻害されなかった。また、VK2 によって誘導された Bak の翻訳後修飾は warfarin により部分的に抑制されたが、VK2-O によって誘導されたと考えられる Bak の翻訳後修飾は warfarin であまり抑制されなかった (Fig. 5.2A)。以上の結果より、vitamin K サイクルにおける VK2 から VK2-O への変換工程が VK2 によるアポトーシス誘導に強く関与していると考えられる。

一方、VK2 (EtOH) は HL60 細胞に対してほとんどアポトーシス誘導活性を示さなかった (Fig. 5.2A)。しかし、Tsujioka らは 10 μ M の VK2 (EtOH) 処理が慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562 の細胞増殖を阻害することを報告している (Tsujioka et al., 2006)。そこで、Tsujioka らの報告における RPMI 培地中の FBS 濃度は 10% であるのに対して、本実験における FBS 濃度は 3% であることに着目し、培地中の FBS 濃度が VK2 (EtOH) もしくは VK2-O のアポトーシス誘導活性に及ぼす影響を解析した。様々な濃度の FBS を含む培地中で、30 μ M VK2 (EtOH) もしくは VK2-O で HL60 細胞を処理した後、細胞抽出液を調製し、western blotting にて PARP の切断を解析した。その結果、FBS 濃度の増加に伴って VK2 (EtOH) のアポトーシス誘導活性は強くなったのに対し、VK2-O のアポトーシス誘導活性は弱くなっていた (Fig. 5.2B)。この結果より、化合物の細胞内への取り込まれ方に FBS 濃度が影響していると推察されるが、FBS 濃度が VK2 (EtOH) 及び VK2-O のアポトーシス誘導活性に影響を与える原因は明らかにできなかった。

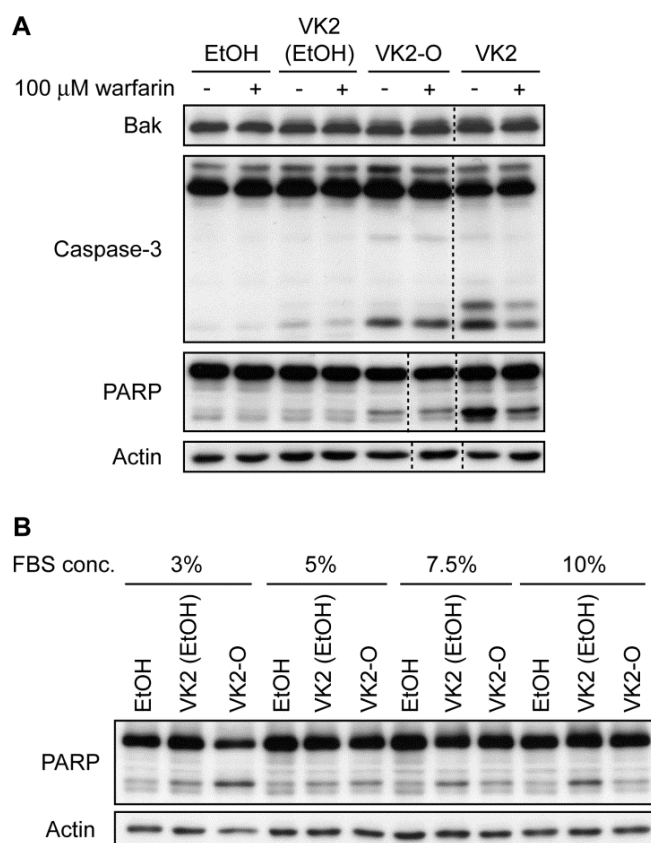


Fig. 5.2 warfarin が VK2-O によるアポトーシス誘導に与える影響
 (A) HL60 細胞を DMSO もしくは 100 μ M warfarin で 5 時間処理し、

同濃度の warfarin と 30 μ M VK2 (EtOH)、VK2-O、もしくは VK2 で 48 時間処理後、western blotting により各タンパク質を検出した。(B) 3%、5%、7.5%、もしくは 10%の FBS を含む RPMI 培地を用い、HL60 細胞を 30 μ M VK2 (EtOH)、VK2-O、もしくは VK2 で 48 時間処理後、western blotting により各タンパク質を検出した。

5-3-3 VK2 による活性酸素種の発生誘導とアポトーシス誘導の関係

VK2 は活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の発生を促し、また ROS 消去作用を持つ α -tocopherol は VK2 によるアポトーシス誘導を部分的に阻害することが報告されている (Shibayama-Imazu et al., 2006)。そこで、 α -tocopherol による VK2 のアポトーシス誘導阻害が Bak と VK2-O の共有結合形成に与える影響を解析した。HL60 細胞または HeLa 細胞を 30 μ M VK2、1.0 mM α -tocopherol、または両方で 24 時間処理後、ROS 依存的に蛍光を示す APF を用いて細胞を染色した。フローサイトメーターで APF 由来の蛍光を測定したところ、VK2 で処理した HL60 細胞と HeLa 細胞は共に APF 由来の蛍光カウントが上昇していた。これに対して、 α -tocopherol と VK2 で共処理した細胞は、VK2 単体で処理した細胞に比べて、APF 由来の蛍光カウントが減少していた (Fig. 5.3, A and B) これらの結果より、VK2 は HL60 細胞及び HeLa 細胞において ROS の発生を誘導していると考えられる。

次に、VK2 によるアポトーシス誘導が α -tocopherol によって阻害されるかを調べるため、 α -tocopherol 単独もしくは α -tocopherol と VK2 で HL60 細胞及び HeLa 細胞を 48 時間処理した。その結果、HL60 細胞、HeLa 細胞共に、 α -tocopherol は濃度依存的に VK2 によって誘導される PARP の切断を阻害し、VK2-O と Bak の共有結合形成も同様に阻害した (Fig. 5.3, C and D)。以上の結果より、ROS の発生誘導が VK2 のアポトーシス誘導及び Bak の翻訳後修飾に必要であることがわかった。これらが関連していることから、Bak の翻訳後修飾は VK2 によるアポトーシス誘導の原因となっていることが示唆された。

VK2 の ROS の産生誘導における Bak の関与を検証するために、Bak もしくは Bax をノックダウンした HeLa 細胞を VK2 で処理し、ROS の発生レベルを解析した。その結果、Bak 及び Bax のノックダウンは、VK2 による ROS の発生誘導に大きな影響を及ぼさなかった (Fig. 5.3E)。よって、VK2 による ROS の発生に

Bak はあまり関与していないと考えられる。ROS はむしろ Bak の上流にあり、Bak の翻訳後修飾に必要である (Fig. 5.3, C and D)。

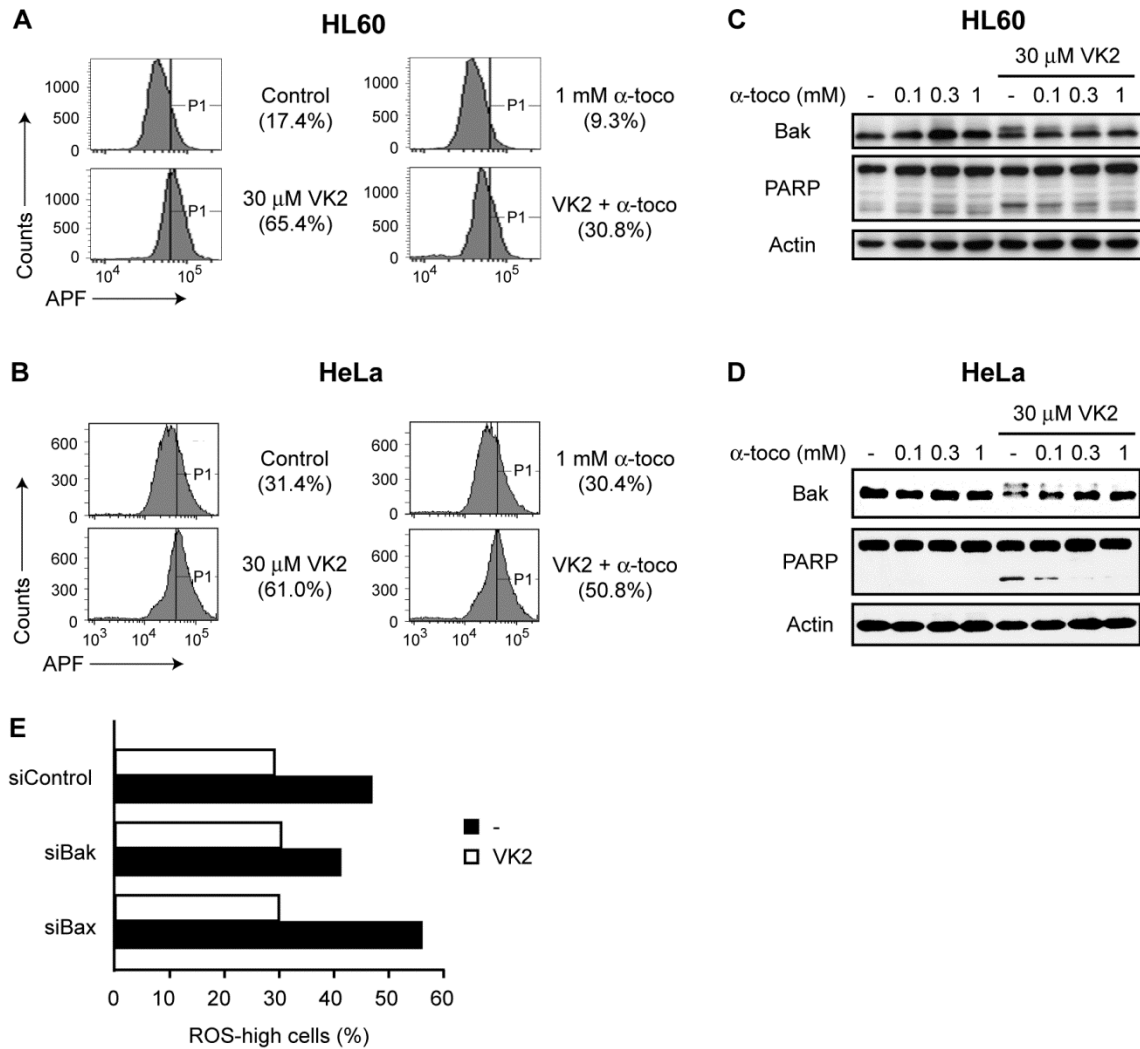


Fig. 5.3 VK2 による ROS の発生誘導とアポトーシス誘導の関係

(A and B) HL60 細胞もしくは HeLa 細胞を 30 μ M VK2、1.0 mM α -tocopherol (α -toco)、または両者で 24 時間処理後、APF で細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて APF 由来の蛍光を測定した。括弧内の値は高 ROS レベル (P1 ゲート) 細胞の割合を示す。(C and D) HL60 細胞もしくは HeLa 細胞を 30 μ M VK2 及び α -toco で 48 時間処理後、western blotting により各タンパク質を検出した。(E) Bak もしくは Bax を標的とする siRNA、あるいは control siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞を VK2 で 24 時間処理した後、APF にて細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて APF 由来の蛍光を測定した。

5-3-4 VK1, VK2 及び VK3 のアポトーシス誘導活性及び Bak の翻訳後修飾活性の比較

VK2 だけでなく他の VK 化合物も抗がん活性を有することが知られている (Wu et al., 1993)。そこで、VK2 の類縁体として VK1 と VK3 を用い、アポトーシス誘導活性と Bak の翻訳後修飾活性について解析した。まず、VK1、VK2 及び VK3 の細胞増殖阻害活性を調べるために、HL60 細胞を 30 μ M の VK 化合物で 48、72、96 時間処理した後の生細胞数を測定した。その結果、VK3 が最も強く細胞増殖を阻害し、VK1 は 96 時間処理してもほとんど細胞増殖を阻害しなかった。また、VK2 は処理時間依存的な細胞増殖阻害活性を示したが、同濃度の VK2 と VK2 (EtOH) とで細胞増殖阻害活性に差が生じていたことから、培地に対する VK2 と VK2 (EtOH) の溶解度が異なると考えられる (Fig. 5.4A)。

次に、HL60 細胞に対する VK1 のアポトーシス誘導活性を検証した。HL60 細胞を 30 μ M VK1、VK2 (EtOH)、もしくは VK2 で 72 時間または 96 時間処理後、caspase-3 の活性化及び PARP の切断を western blotting で解析した。その結果、VK1 で 96 時間処理しても caspase-3 の活性化と PARP の切断が起こらなかったことから、VK2 に比べて VK1 は 30 μ M ではほとんどアポトーシス誘導活性を示さないことがわかった (Fig. 5.4B)。また、VK2 で 72 時間処理した細胞において Bak の翻訳後修飾が確認されたが、VK1 で 96 時間処理した細胞においては Bak の翻訳後修飾は見られなかった (Fig. 5.4B)。VK1 及び VK2 の Bak の翻訳後修飾活性を確認するために FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を 30 μ M の VK1、VK2 (EtOH) もしくは VK2 で 48、72、96 時間処理した後、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により FLAG-Bak を検出した。その結果、48 時間の VK2 (EtOH) 及び VK2 処理で Bak の翻訳後修飾が確認されたのに対し、VK1 で 96 時間処理しても Bak の翻訳後修飾は引き起こされなかった (Fig. 5.4C)。

続いて、VK3 のアポトーシス誘導活性を検証した。HL60 細胞を 30 μ M VK3 で 1.5、3、6 時間処理後、caspase-3 の活性化及び PARP の切断を western blotting により解析した。その結果、VK3 で処理してから 1.5 時間後に PARP の切断が生じていたことから (Fig. 5.4D)、VK3 は少なくとも 1.5 時間以内にアポトーシスを誘導していると考えられる。なお、VK3 で処理した細胞において、VK3 を添加して 1.5 時間後から PARP の発現量が、6 時間後からは caspase-3 の発現量が減少していく傾向が見られたが (Fig. 5.4D)、この原因は明らかにできなかった。

また、VK3によるBakの移動度変化が見られなかったことから (Fig. 5.4D)、VK3はBakの翻訳後修飾を引き起こしていないと考えられる。次に、FLAG-Bakを一過的に発現させたHeLa細胞を用いて、VK3のBakの翻訳後修飾活性を確認した。30 μ M VK3で細胞を1.5、3、6時間処理し、抗FLAG抗体を用いたwestern blottingによりFLAG-Bakを検出したところ、FLAG-Bakの移動度に変化は見られなかった (Fig. 5.4E)。以上の結果から、VK2及びVK3はアポトーシス誘導活性を有するのに対し、VK1にはアポトーシス誘導活性がほぼないことが分かった (Fig. 5.4, B and D)。また、Bakの翻訳後修飾はVK2によって特異的に起こることが分かった (Fig. 5.4, C and E)。

ここで用いた3つのVK化合物は、Fig. 1.1に示したように、メチルナフトキノン骨格を持ち、異なる側鎖を有していることから、ここで得られたアポトーシス誘導活性及びBakの翻訳後修飾活性の差異は側鎖構造に起因すると考えられる。VK1はvitamin Kサイクルにてvitamin K1 2,3-epoxideに変換される (Stafford, 2005) ことから、VK2と同様のメカニズムでアポトーシスを誘導できると予想されたが、それを示唆する実験結果は得られなかった。一方、VK3はVK2に比べて非常に短い時間でアポトーシスを誘導することから、VK3によるアポトーシス誘導は、vitamin Kサイクルを経てアポトーシスを誘導するVK2とは異なるメカニズムを介していると推察される。

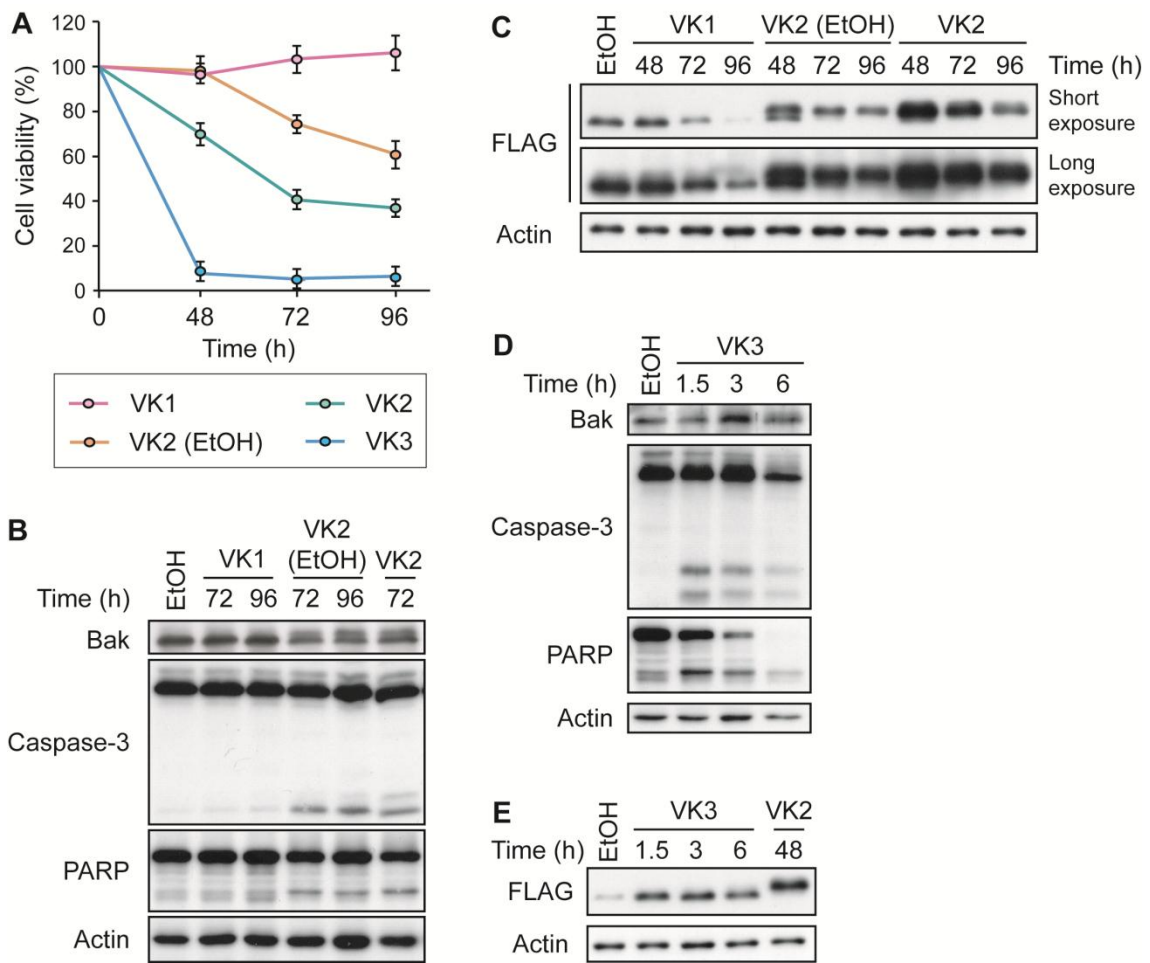


Fig. 5.4 VK 化合物によるアポトーシス誘導活性及び Bak の翻訳後修飾活性の比較

(A) HL60 細胞を 30 μM の VK 化合物で 48、72、もしくは 96 時間処理し、Cell Count Reagent SF を用いて生細胞数を測定した。薬剤未処理の生細胞数の平均値を 100% とし、それに対する生細胞数の割合を示した。(B) HL60 細胞を 30 μM の VK1、VK2 (EtOH)、または VK2 で 72 時間もしくは 96 時間処理後、細胞抽出液を調製し、western blotting により各タンパク質を検出した。(C) FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を 30 μM の VK1、VK2 (EtOH)、または VK2 で 48、72、96 時間処理後、細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により FLAG-Bak を検出した。(D) HL60 細胞を 30 μM の VK3 で 1.5、3、もしくは 6 時間処理後、細胞抽出液を調製し、western blotting により各タンパク質を検出した。(E) FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を 30 μM の VK3 で 1.5、3、または 6 時間処理、もしくは 30 μM の VK2 で 48 時間処理後、細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により FLAG-Bak を検出した。

5-3-5 MK-4 と MK-7 のアポトーシス誘導活性及び Bak の翻訳後修飾活性の比較

VK1、VK2 及び VK3 を用いた構造活性相関研究より、アポトーシス誘導活性及び Bak の翻訳後修飾には VK 化合物の側鎖構造が重要であると示唆された。そこで、VK2 に分類され、側鎖の長さが異なる MK-4 と MK-7 (Fig. 5.5A) のアポトーシス誘導活性を比較した。なお、本セクションで用いた MK-4 は 5-3-2 で定義した VK2 (EtOH) と同一である。HL60 細胞を MK-4 及び MK-7 で 48 時間処理し、caspase-3 の活性化及び PARP の切断を western blotting により解析した。その結果、MK-4 処理は caspase-3 の活性化及び PARP の切断を引き起こしているのに対し、MK-7 処理はこれらをほとんど誘導しなかった。また、MK-4 処理で見られた Bak の移動度変化は、MK-7 では観察されなかった (Fig. 5.5B)。さらに、FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を MK-4 及び MK-7 で処理したところ、MK-4 処理細胞では処理時間依存的な Bak の翻訳後修飾が見られたことに対し、MK-7 では細胞を 72 時間処理しても Bak の移動度変化が観察されなかった (Fig. 5.5C)。以上の結果から、MK-7 はアポトーシス誘導活性をほとんど有しておらず、Bak の翻訳後修飾もほとんど引き起こさないと考えられる。MK-7 は MK-4 と同様に、vitamin K サイクルによりエポキシ環を有する代謝物に変換されることが報告されている (Shearer and Newman, 2008)。これらのことから、MK-4 と MK-7 のアポトーシス誘導活性及び Bak の翻訳後修飾活性の差は vitamin K サイクルによる代謝の有無に起因するものではないと示唆される。以上より、ここで観察された活性の差異は、5-3-4 で得られた知見同様、VK 化合物の側鎖構造に依存すると考えられる。

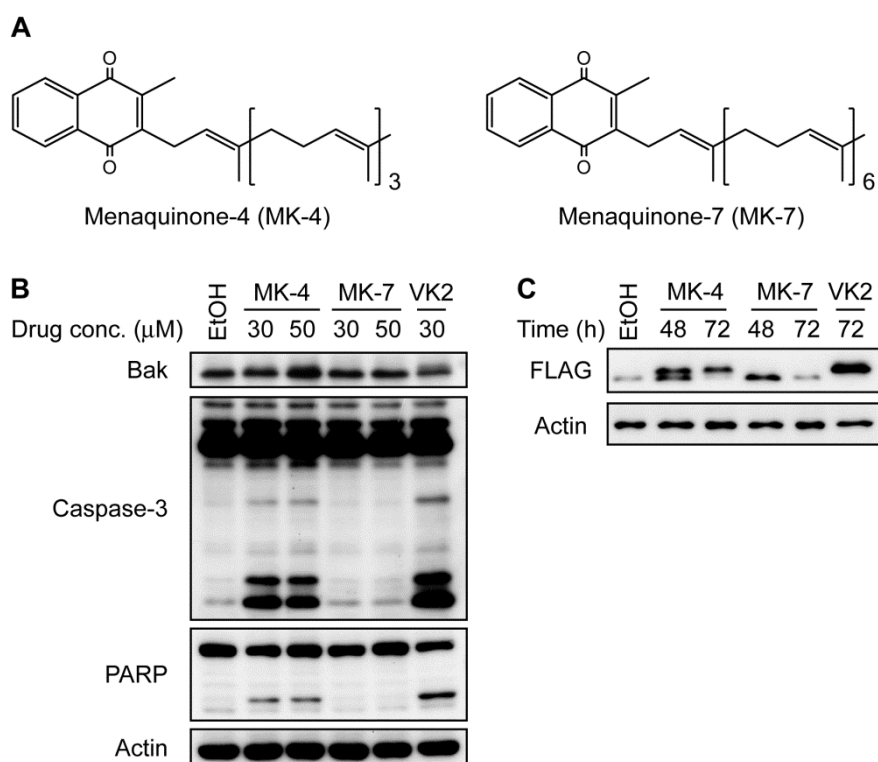


Fig. 5.5 MK-4 と MK-7 によるアポトーシス誘導活性及び Bak の翻訳後修飾活性の比較

(A) MK-4 及び MK-7 の化学構造。(B) HL60 細胞を 30 μM もしくは 50 μM の MK-4、MK-7、もしくは VK2 で 48 時間処理後、細胞抽出液を調製し、western blotting により各タンパク質を検出した。(C) FLAG-Bak を一過的に発現させた HeLa 細胞を 50 μM MK-4、MK-7、または VK2 で 48 時間もしくは 72 時間処理後、細胞抽出液を作製し、抗 FLAG 抗体を用いた western blotting により FLAG-Bak を検出した。

5-4 本章のまとめ

VKORC1 及び VKORC1L1 の選択的阻害剤 warfarin を用い、VK2 のアポトーシス誘導における vitamin K サイクルの役割を解析した。warfarin 処理によって、1) VK2 によるアポトーシス誘導が阻害されたこと、2) Bak と VK2-O との共有結合形成が部分的に阻害されたこと、そして 3) VK2-O によるアポトーシス誘導があまり阻害されなかったことから、vitamin K サイクルにおける VK2 から VK2-O への変換工程が VK2 によるアポトーシス誘導に重要であると考えられる。

次に、VK2 による ROS の産生誘導とアポトーシス誘導について解析した。HL60 細胞及び HeLa 細胞を α -tocopherol と VK2 とで共処理することにより、VK2 による ROS の産生誘導を抑制したところ、VK2 によるアポトーシス誘導の抑制及び VK2-O と Bak との共有結合形成の阻害が見られた。よって、ROS の産生誘導が VK2 によるアポトーシス誘導及び Bak の翻訳後修飾に必要であることがわかった。さらに、Bak と VK2-O との共有結合形成はアポトーシス誘導と関連していることが示唆された。

アポトーシス誘導活性と Bak の翻訳後修飾活性を指標に VK 化合物の構造活性相関を解析した。その結果、VK1 はほとんどアポトーシス誘導活性を示さず、VK3 は VK2 よりも強いアポトーシス誘導活性を示していた。また、Bak の翻訳後修飾は VK2 で細胞を処理した時のみ観察された。VK3 は VK2 に比べて非常に短い時間でアポトーシスを強く誘導したことから、VK2 とは異なる経路でアポトーシスが誘導されたのではないかと推察した。さらに、VK2 に分類され、側鎖の長さの異なる MK-4 と MK-7 のアポトーシス誘導活性も調べた。その結果、MK-4 はアポトーシスを誘導し、かつ Bak の翻訳後修飾を引き起こしたが、MK-7 はアポトーシスをほとんど誘導せず、Bak の翻訳後修飾も誘導しなかった。以上の結果から、VK 化合物の活性の差異は VK 化合物の側鎖構造に起因するものと考えられる。

第6章 総括

6-1 緒言

第2章から第5章に渡って得られた実験結果及び知見をまとめ、これらが示唆することを考察する。また、得られた研究成果の意義や将来展望を議論し、本研究を総括する。

6-2 本研究のまとめ

6-2-1 VK2 によるアポトーシス誘導経路

本研究では VK2 によるアポトーシス誘導の分子メカニズムの解明を目指した。HL60 細胞及び HeLa 細胞をがん細胞モデルとして用い、VK2 によりミトコンドリア膜電位の消失、細胞質への *cyt c* の放出、Bak 及び Bax の活性化が引き起こされることを明らかにした (Fig. 2.2, A-C)。これらの結果から、VK2 は Bak と Bax を介するミトコンドリア経由のアポトーシス誘導経路を活性化していると考えられる。また、ラット肝臓から単離したミトコンドリアを用いた実験により、VK2 はミトコンドリアに直接作用し、アポトーシスを誘導している可能性が示唆された (Fig. 2.3)。

VK2 がミトコンドリアタンパク質に及ぼす影響を解析した結果、VK2 の処理濃度・処理時間依存的な Bak の移動度変化が観察され、Bak の新規翻訳後修飾を発見し (Fig. 3.3, A-C)、これらの知見から Bak に対する VK2 の結合活性に着目した。HL60 細胞の細胞抽出液 (細胞質画分) 及び *in vitro* で調製した組換え Bak を用い、VK2 固定化ビーズを用いたアフィニティ精製実験から、VK2 が Bak に直接結合することを明らかにした。このとき、Bak と同じ Bcl-2 ファミリーであり、Bak と構造的に類似している Bax は VK2 と結合しなかった (Fig. 3.4, A and B)。HeLa 細胞において Bak もしくは Bax をノックダウンしたところ、Bak のノックダウンによってのみ、VK2 による細胞増殖阻害及び細胞質への *cyt c* の放出がそれぞれ抑制された (Fig. 3.5, A and B)。以上の結果より、VK2 は Bak に直接結合し、Bak を介してアポトーシスを誘導していると考えられることから、Bak が VK2 のアポトーシス誘導に関与する標的タンパク質であると判断した。Fig. 6.1 に VK2 によるアポトーシス誘導経路及び VK2 と Bak との結合活性の生化学的解析から得られた実験結果を基に構築した、Bak を介した VK2 によるアポトーシス誘導経路のモデルを示す。

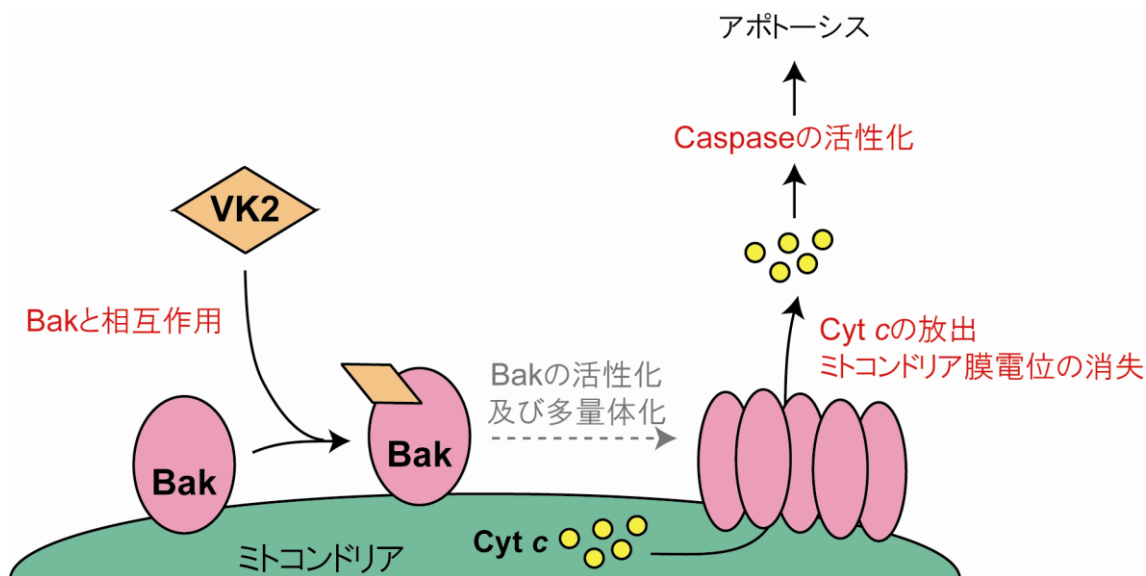


Fig. 6.1 Bak を介した VK2 によるアポトーシス誘導モデル

VK2 はミトコンドリア外膜に局在する Bak と相互作用し、Bak を介したアポトーシス経路を活性化させることで、ミトコンドリア膜電位の消失と細胞質への cyt c の放出を引き起こし、アポトーシスを誘導する。

6-2-2 VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾

VK2 は Bak を標的としてアポトーシスを誘導していると考えられることから、VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾が VK2 のアポトーシス誘導において重要な役割を担っているのではないかと考えた。そこで、VK2 未処理もしくは VK2 処理した細胞から FLAG-Bak を精製し、質量分析器で解析したところ、細胞内における VK2 代謝物である VK2-O の分子量に相当する質量差が観測された (Fig. 4.2B)。VK2-O はエポキシ環を有していることから、生理条件下におけるシステイン残基のチオール基とエポキシ環との反応性に着目し、システイン残基をアラニン残基に置換した Bak の点変異体を用いて翻訳後修飾の解析を進めたところ、この修飾は Cys166 で起こっていることが分かった (Fig. 4.3B)。また、Bak の欠失変異体及び点変異体を用いた結合活性実験より、VK2 と Bak との結合には Arg169 と Trp170 が関わっていることが示唆された (Fig. 4.6)。Bak の立体構造を踏まえると、これら 3 つのアミノ酸残基は Bak 分子表面で疎水的なポケットを形成するように配置されていたことがわかった (Fig. 4.7B)。以上の結果から、VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾は Cys166 を介して VK2-O が Bak と共有結合を

形成したものと考えられる。Fig. 6.2 に VK2 特異的な Bak の翻訳後修飾の解析により得られた実験データを基に構築した、VK2 による Bak の翻訳後修飾モデルを示す。

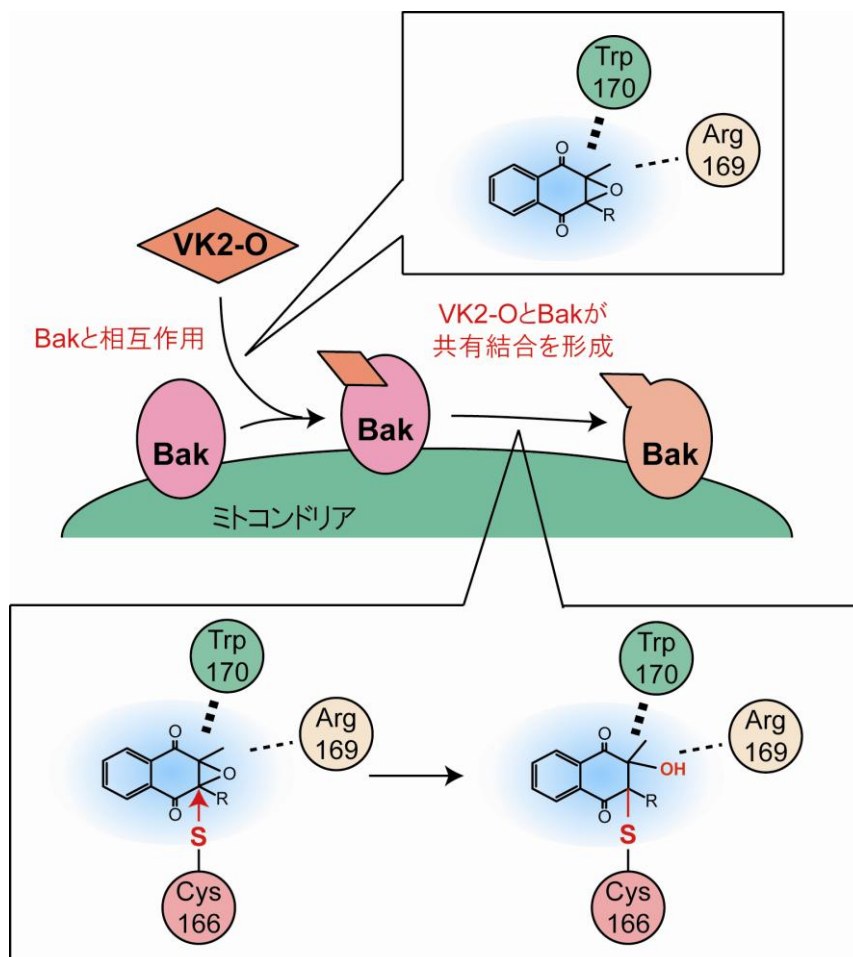


Fig. 6.2 VK2 による Bak の翻訳後修飾モデル

Vitamin K サイクルにて産生された VK2-O は Arg169 と Trp170 を介して Bak と相互作用する。VK2-O の相互作用領域に近接する Cys166 のチオール基が VK2-O のエポキシ環を攻撃し、VK2-O と Bak との間に共有結合が形成される。

6-2-3 VK2 のアポトーシス誘導における vitamin K サイクルの役割

Vitamin K サイクルにおいて産生される VK2 代謝物の VK2-O が Bak と共有結合を形成したことから、VK2 のアポトーシス誘導における vitamin K サイクルの役割を検証した。VKORC1 及び VKORC1L1 の阻害剤 warfarin で細胞を処理した

ところ、VK2によるアポトーシス誘導が阻害されたことから、vitamin KサイクルがVK2によるアポトーシス誘導に関与していると考えられる (Fig. 5.1, A and B)。また、warfarinとVK2で共処理した細胞においてBakの翻訳後修飾が部分的に抑制されていたことから、VK2-OとBakとの共有結合形成がVK2によるアポトーシス誘導に関与していると示唆される (Fig. 5.1B)。さらに、VK2によるアポトーシス誘導はwarfarinによって部分的に阻害されていたが、VK2-Oによるアポトーシス誘導はwarfarinでほぼ阻害されていなかった (Fig. 5.2A) ことから、vitamin KサイクルにおけるVK2からVK2-Oへの変換工程がVK2によるアポトーシス誘導に関与していると考えられる。Fig. 6.3にVK2によるアポトーシス誘導モデルを示す。

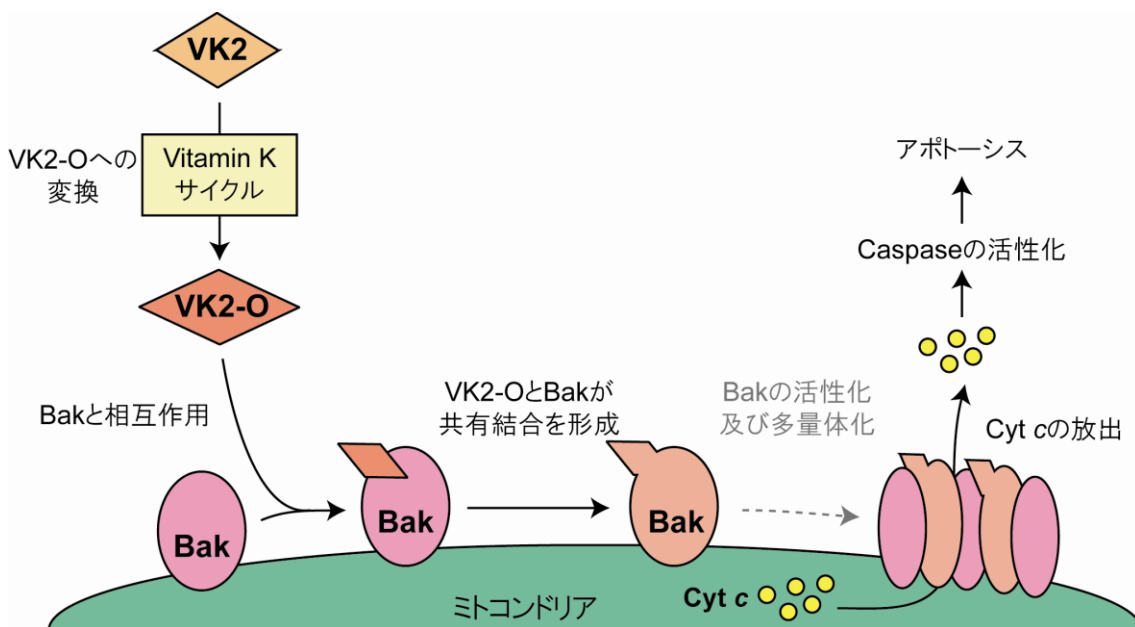


Fig. 6.3 VK2によるアポトーシス誘導モデル

細胞内に取り込まれたVK2はvitamin KサイクルにおいてVK2-Oに変換される。続いて、ミトコンドリア外膜に局在しているBakと相互作用した後、Cys166を介してVK2-OがBakと共有結合を形成する。その後、Bakが活性化されて多量体化することで、ミトコンドリアの膜電位消失と細胞質へのcyt cの放出が起こり、下流のcaspaseが活性化されてアポトーシスに至る。

6-3 考察

6-3-1 VK2によるアポトーシス誘導経路

本研究で得られた実験結果から、Bcl-2ファミリーに属し、アポトーシス促進活性を有するBakがVK2によるアポトーシス誘導に関わる標的タンパク質であり、VK2はBakに結合することでBakを介したアポトーシス誘導経路を活性化していると考えられる。これまでに、ヒト多発性骨髄腫由来の細胞株またはHL60細胞において、VK2がミトコンドリアを介したアポトーシス経路の活性化及びcaspase-3の活性化を介したアポトーシス誘導を引き起こすこと(Tsujioka et al., 2006; Yokoyama et al., 2008)、またBakのアポトーシス促進活性を抑制するBcl-2の過剰発現は、HL60細胞におけるVK2のアポトーシス誘導活性を阻害することも報告されている(Yokoyama et al., 2008)。これらの報告は、VK2がBak特異的なアポトーシスを誘導するモデルを裏付けるものと考えられる。

6-3-2 Bak特異的なVK2のアポトーシス誘導活性

VK2はBak特異的にアポトーシスを誘導するが、同時にBaxの活性化も引き起こしていた(Fig. 2.2C)。しかし、BaxのノックダウンはVK2のアポトーシス誘導活性をあまり阻害しなかったことから(Fig. 3.5, A and B)、Baxの活性化はVK2のアポトーシス誘導に必要なと考えられる。アポトーシス誘導におけるBakとBaxの機能に関する先行研究に、これらの遺伝子のノックアウトマウスを用いた研究がある。*Bak*^{-/-}マウスはほとんど表現型異常を示さないが、*Bax*^{-/-}マウスはリンパ過形成や雄生殖細胞の形成不全など、アポトーシスの機能不全に由来する複数の表現型異常を示す。さらに、*Bak*^{-/-}*Bax*^{-/-}マウスは*Bax*^{-/-}マウスよりも深刻なアポトーシスの機能不全に由来する表現型異常を示し、胎児の多くは出産直前に死に至ってしまう(Knudson et al., 1995; Lindsten et al., 2000)。よって、アポトーシス誘導におけるBakとBaxの機能は大部分重複し、かつBak特異的な機能はほとんど存在しないと考えられる。それ故、本研究で得られたBak特異的なアポトーシス誘導は予想外であった。これらを踏まえると、VK2がBak特異的にアポトーシスを誘導することは、VK2がBakとのみ相互作用し、Bakと共有結合を形成することによるものと考えられる。すなわち、Baxや未修飾の

Bak が存在しても VK2 はアポトーシスを十分に誘導することができず、VK2 と Bak との共有結合形成が VK2 によるアポトーシス誘導の引き金になっていることが示唆される。

6-3-3 VK2 の生理活性とアポトーシス誘導の関係

VK2 は細胞内に複数の標的タンパク質を有し、それぞれ独立した経路によって VK2 の生理活性を示していると考えられてきた。VK2 は vitamin K サイクル構成因子の GGCX の補因子として働き、GGCX の γ -carboxylation 活性に必須である。また、GGCX の基質である Factor VII や Factor X などの血液凝固因子や osteocalcin などの骨形成因子は、GGCX により γ -carboxylation されることがこれらの因子の酵素活性に必要である (Hauschka et al., 1975; Stafford, 2005)。このように、VK2 は GGCX の補因子として働くことで血液凝固と骨形成に関与している。VK2 は SXR に直接結合し、コラーゲンの蓄積に関与する *Tsukushi* や骨芽細胞の分化決定因子 *msh homeobox 2* などの転写を活性化させることから、VK2 は SXR を介しても骨形成に関与している (Tabb et al., 2003; Ichikawa et al., 2006; Igarashi et al., 2007)。本研究では、VK2 が Bak と直接結合し、vitamin K サイクルにて VK2 から変換された VK2-O が Bak と共有結合を形成することでアポトーシスを誘導していることを明らかにした。これらは、当初、VK2 の生理活性とは独立した経路で引き起こされていると考えられていたアポトーシス誘導を、血液凝固や骨形成における VK2 の生理活性に重要な vitamin K サイクルと関連付ける新たな知見であると考えられる。Fig. 6.4 に VK2 の生理活性とアポトーシス誘導の関係性を示す。

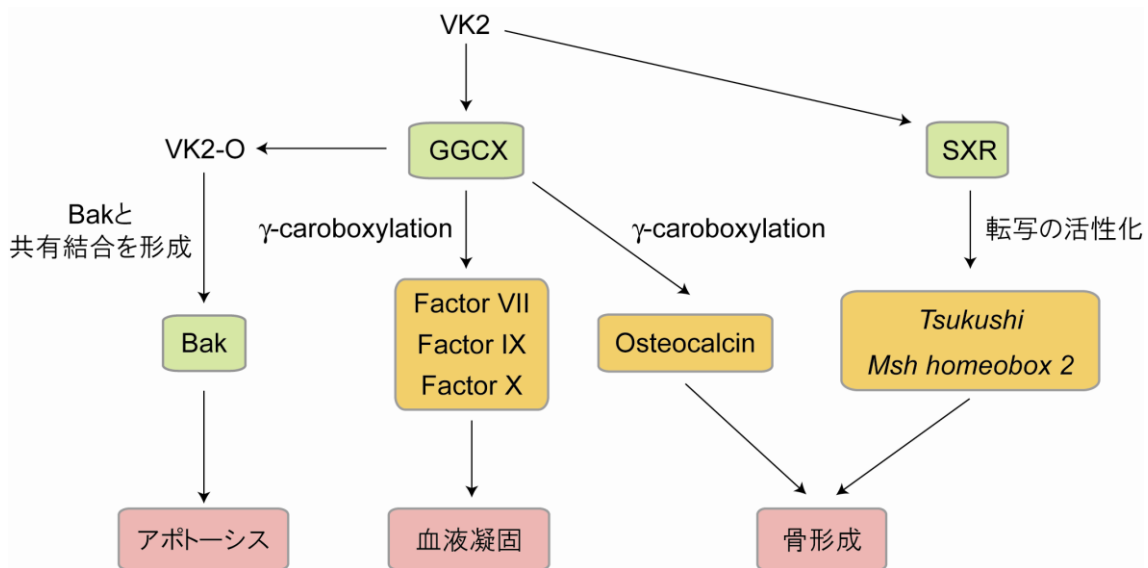


Fig. 6.4 VK2の生理活性とアポトーシス誘導経路の関係性

血液凝固や骨形成において重要な VK2 の作用経路と本研究で明らかにした VK2 のアポトーシス誘導経路の関係性をまとめた。

6-3-4 VK2 のアポトーシス誘導における Bak の翻訳後修飾の重要性

本研究において、VK2-O が Bak と共有結合を形成することを明らかにした。VK2-O と共有結合した Bak は VK2 の処理時間依存的に蓄積し、caspase-3 の活性化や PARP の切断は VK2-O と共有結合を形成した Bak の蓄積後にのみ観察された (Fig. 2.1B and 3.3A)。これらの結果から、VK2-O と共有結合を形成した Bak が細胞内にて一定量蓄積することが、VK2 によるアポトーシス誘導に必要なのではないかと考えられる。また、vitamin K サイクル阻害剤の warfarin は VK2 によるアポトーシス誘導及び Bak の翻訳後修飾を阻害していたことに対し (Fig. 5.1B)、VK2-O によるアポトーシス誘導は warfarin によってあまり阻害されなかったことから (Fig. 5.2A)、vitamin K サイクルによる VK2 から VK2-O への変換工程が VK2 によるアポトーシス誘導に重要であると考えられる。これらの知見は、ヒト前立腺がん由来細胞株 LNCaP における GGCX のノックダウンが VK2 による細胞増殖阻害活性を抑制するという実験結果と一致する (Akamatsu et al., 2012)。GGCX ノックダウンは VK2 から VK2-O への変換を抑制し、VK2 と Bak との共有結合形成をも抑制すると考えられる。以上のような数々の間接的な証拠は、VK2-O による Bak の翻訳後修飾が VK2 によるアポトーシス誘導の引き金となっ

ていることを示唆している。

しかしながら、上記のことを示す決定的な証拠はまだ得られていない。これ
を示すには、内在性の Bak を VK2-O と共有結合が形成できない Bak 変異体
C166A に置換した細胞株を樹立し、野生型 Bak が発現している細胞と VK2 によ
るアポトーシス誘導活性について比較する必要がある。しかし、Bak の過剰発現
はアポトーシスを誘導することから、外来性 Bak の精密な発現量の制御が上記
の Bak 変異体発現細胞株の樹立に必須である。様々な方法にて外来性 Bak の発
現量を制御させた細胞株の樹立を試みたものの、現時点では細胞株の樹立に
至っていない。

6-3-5 VK2-O と Bak の共有結合形成メカニズム

本研究では共有結合形成を介した VK2 によるタンパク質修飾（以下、この現
象を VK2ation と呼ぶ）を初めて発見した。エポキシ環とチオール基の反応は生
理的条件下で容易に進行する (Watanabe et al., 2006)。しかし、精製 Bak と VK2-O
を混合しても Bak の VK2ation が起こらないことから、細胞内の他の因子が
VK2ation に必要であると考えられる。Bak の VK2ation と VK2 によるアポトー
シス誘導が α -tocopherol によって共に抑制されたことから (Fig. 5.3, C and D)、
VK2 による ROS の産生誘導が Bak の VK2ation と VK2 によるアポトーシス誘導
に必要であることが示唆される。これは、ヒト卵巣未分化がん由来 TYK-nu 細胞
における VK2 によるアポトーシス誘導は α -tocopherol や *N*-acetyl-L-cysteine など
の抗酸化剤で抑制される報告と一致する (Shibayama-imazu et al., 2006)。VK2 は
ROS の発生を誘導するが (Shibayama-imazu et al., 2006 and Fig. 5.3, A and B)、Bak
のノックダウンは VK2 による ROS の発生誘導を大きく阻害しなかったことから
(Fig. 5.3E)、ROS の発生誘導に Bak はあまり関与していないと考えられる。よっ
て、ROS が Bak の VK2ation を制御した上で、Bak 依存的なアポトーシスの誘導
に関与している可能性が考えられる。H₂O₂ による酸化ストレスが VKORC1L1
の遺伝子発現を亢進させ、vitamin K サイクル活性を増強させるという報告は、
ROS による VK2ation の制御を示唆しているものと考えられる (Westhofen et al.,
2011)。すなわち、 α -tocopherol は H₂O₂ とは逆に vitamin K サイクル活性を抑制
し、VK2 から VK2-O への変換を阻害することで、間接的に VK2ation を阻害し
ていると考えられる。

VK2 は細胞内に元々存在する化合物であることから、標的タンパク質と共有結合を形成する薬剤ではなく、細胞内の新たな翻訳後修飾の一種であると見なすこともできる。本研究では Bak の VK2ation を明らかにしたが、通常 of 細胞内でも VK2ation されているタンパク質が存在する可能性が考えられる。現在までに数十種類ものタンパク質の翻訳後修飾が明らかとなっているが、本研究による VK2ation の発見はその翻訳後修飾のリストに新たな 1 種類を書き加えたこととなるかもしれない。

6-4 本研究の意義と今後の展望

6-4-1 本研究を通じて得られた成果と今後の展望

本研究では VK2 によるアポトーシス誘導の分子メカニズムの解析を通して、1) Bak が VK2 のアポトーシス誘導に関与する標的タンパク質であり、VK2 が Bak を介してアポトーシスを誘導する、2) vitamin K サイクルにより変換された VK2-O が Bak と共有結合を形成する (=VK2ation)、そして 3) VK2 のアポトーシス誘導に Bak の翻訳後修飾が関与していることを明らかにした。また、VK2ation というタンパク質の新規翻訳後修飾の発見により、生体内における VK2 の新たな機能を提供できた。以下で、本研究を通じて得られた知見により生じた解明すべき点を記述する。

① VK2ation は VK2 によるアポトーシス誘導に必須か。

本研究の結果より、Bak の VK2ation はアポトーシス誘導に関与していると考えられるが、6-3-4 で述べたように、VK2ation がアポトーシス誘導に必須かどうかは厳密には不明である。Fig. 3.3B に示したように、caspase の酵素活性が阻害されても VK2ation された Bak の蓄積が見られたことから、Bak の VK2ation はアポトーシス誘導よりも早く起こっていると考えられる。Bak の VK2ation が VK2 のアポトーシス誘導に必須であることが証明できれば、VK2 によるタンパク質の翻訳後修飾が Bak のアポトーシス誘導活性を制御する、という VK2 の新規作用機構を提供できると考えられる。

② VK2 はどのように Bak を活性化させるのか。

VK2 は Bak に直接結合し、Bak 依存的にアポトーシスを誘導するが、VK2 により Bak が活性化されるメカニズムは不明のままである。通常 Bak の活性化は、Bak のアポトーシス促進活性を抑制するために相互作用している Bcl-2 や Bcl-xL が Bak から解離することで生じる Bak の立体構造変化を意味する。よって、Bak の VK2ation により Bak の立体構造が変化し、アポトーシスを誘導させる活性型 Bak となる可能性が考えられる。VK2 による Bak の活性化機構を解明できれば、Bak の活性制御機構に新たな知見を提供できると考えられる。

③ Bak の VK2ation が VK2 投与された患者の体内で起こりうるか。

本研究は全てがん細胞株を用いた実験 (*in vitro* 実験) であり、VK2 の抗がん作用を明確に証明するには、Bak の VK2ation が VK2 投与による抗がん効果のある患者体内でも起こっていることを示す必要がある。もし、患者由来のがん細胞においても VK2ation が観察されるのであれば、VK2ation は臨床における VK2 の抗がん活性に関与していると考えられる。

6-4-2 医学的な立場から見た本研究の成果と今後の展望

本研究により、がん細胞におけるアポトーシス誘導の標的タンパク質として Bak を同定したことから、がん治療の分子標的として Bak を利用できる可能性を示した。Bak や Bax の活性は Bcl-2 や Bcl-xL などのアポトーシス抑制性の Bcl-2 ファミリータンパク質によって厳密に制御されている。実際、アポトーシス抑制性タンパク質の阻害剤である obatoclax や navitoclax は将来の抗がん剤候補として現在臨床試験に使われている (O'Brien et al., 2009; Gandhi et al., 2011)。*in vitro* で Bax と直接結合し、立体構造を活性型に変化させる低分子化合物も開発されており、新規の作用機序を示す抗がん剤として期待されている (Gavathiotis et al., 2012)。よって、Bcl-2 ファミリータンパク質はがん治療における有望な標的因子と考えられ、Bak も有望ながん治療の標的分子になると期待される。

一方で、がん治療における VK2 のアポトーシス誘導メカニズムの医学的利用を考慮すると、VK2 がどのようにしてがん細胞特異的にアポトーシス誘導作用を示しているのかを明らかにする必要がある。本研究によって、Bak や vitamin K サイクルが VK2 によるアポトーシス誘導に深く関与していることを明らかにしたことから、正常細胞とがん細胞におけるこれらのタンパク質発現プロファイルを比較することで、VK2 のがん細胞選択性を見出させるのではないかと考えられる。Vitamin K サイクル構成因子である VKORC1 の発現が亢進しているがん細胞が数多く報告されていることは (Wang et al., 2005)、正常組織とがん組織における vitamin K サイクルによる VK2 の代謝効率の差が、がん細胞選択性を生み出していることを示唆しているものと考えられる。VKORC1 の発現量と VK2 に対する感受性の相関関係を明らかにすることは、更なる VK2 のがん細胞選択性の要因解明に繋がると考えられ、かつ VK2 より抗がん活性が増強された新規抗がん剤の開発に繋がると考えられる。

6-4-3 本研究の意義

本研究は VK2 によるアポトーシス誘導メカニズムの一端を解き明かしただけでなく、VK2 によるタンパク質の翻訳後修飾という基礎生物学における新たな知見を提供した。本研究から得られた VK2 によるタンパク質の翻訳後修飾という知見が VK2 の有する抗がん活性のさらなる解明の足がかりとなり、新規抗がん剤の開発に応用されることを期待する。

参考文献

Akamatsu S, Takata R, Haiman CA, Takahashi A, Inoue T, Kubo M, Furihata M, Kamatani N, Inazawa J, Chen GK, Le Marchand L, Kolonel LN, Katoh T, Yamano Y, Yamakado M, Takahashi H, Yamada H, Egawa S, Fujioka T, Henderson BE, Habuchi T, Ogawa O, Nakamura Y, and Nakagawa H (2012) Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. *Nat Genet* **44**: 426-429.

Akiyama N, Miyazawa K, Kanda Y, Tohyama K, Omine M, and Ohyashiki K (2010) Multicenter phase II trial of vitamin K(2) monotherapy and vitamin K(2) plus 1alpha-hydroxyvitamin D(3) combination therapy for low-risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* **34**: 1151-1157.

Belizário JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M, and Sesso A (2007) A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res* **40**: 1011-1024.

Biggins J, and Mathis P (1988) Functional role of vitamin K in photosystem I of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Biochemistry* **27**: 1494-1500.

Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, and Peppelenbosch MP (2006) Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol* **4**: e232.

Dam H (1929) Cholesterinstoffwechsel in hühnereiern und hähnchen. *Biochem Z* **215**: 475-492.

Dam H (1935) The antihaemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J* **29**: 1273-1285.

Davidson RT, Foley AL, Engelke JA, and Suttie JW (1998) Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria. *J Nutr*

128: 220-223.

Dewson G, Kratina T, Sim HW, Puthalakath H, Adams JM, Colman PM, and Kluck RM (2008) To trigger apoptosis, Bak expose its BH3 domain and homodimerizes via BH3: groove interactions. *Mol Cell* **30**: 369-380.

Fox JL, Ismail F, Azad A, Ternette N, Leverrier S, Edelmann MJ, Kessler BM, Leigh IM, Jackson S, and Storey A (2010) Tyrosine dephosphorylation is required for Bak activation in apoptosis. *EMBO J* **29**: 3853-3868.

Gandhi L, Camidge DR, Ribeiro de Oliveira M, Bonomi P, Gandara D, Khaira D, Hann CL, McKeegan EM, Hemken PM, Dive C, Enschede SH, Nolan C, Chiu YL, Busman T, Xiong H, Krivoshik AP, Humerickhouse R, Shapiro GI, and Rudin CM (2011) Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol* **29**: 909-916.

Gavathiotis E, Reyna DE, Bellairs JA, Leshchiner ES, and Walensky LD (2012) Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nat Chem Biol* **8**: 639-645.

Habu D, Shiomi S, Tamori A, Takeda T, Tanaka T, Kubo S, and Nishiguchi S (2004) Role of vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *JAMA* **292**: 358-361.

Hauschka PV, Lian JB, and Gallop PM (1975) Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 3925-3929.

Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, and Inoue S (2006) Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* **281**: 16927-16934.

Igarashi M, Yogiashi Y, Mihara M, Takada I, Kitagawa H, and Kato S (2007) Vitamin K induces osteoblast differentiation through pregnane X receptor-mediated transcriptional control of the *Msx2* gene. *Mol Cell Biol* **22**: 7947-7954.

Ishii M, Shimomura M, Hasegawa J, Morishita N, Nakai H, Kayano M, Kurimoto T, Harada H, Tsuji S, Aoki T, Tokuda K, Seto Y, and Azuma J (1992) Evaluation of pharmacokinetics and bioequivalence of soft capsules of menatetrenone. *J Clin Therap Med* **8**: 571-585.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, and Handa H (2010) Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* **327**: 1345-1350.

Iwamoto J, Takeda T, and Sato Y (2004) Effects of vitamin K2 on osteoporosis. *Curr Pharm Des* **10**: 2557-2576.

Jung JC, Choi HC, and Kim YH (1993) Direct facile tetrahydrofuranlylation of alcohols through radical coupling with $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{S}_2\text{O}_8$. *Tetrahedron Lett* **34**: 3581-3584.

Kawakita H, Tsuchida A, Miyazawa K, Naito M, Shigoka M, Kyo B, Enomoto M, Wada T, Katsumata K, Ohyashiki K, Itoh M, Tomoda A, and Aoki T (2009) Growth inhibitory effects of vitamin K2 on colon cancer cell lines via different types of cell death including autophagy and apoptosis. *Int J Mol Med* **23**: 709-716.

Kim YH, Hwang JP, and Yang SG (1997) Practical epoxidation of α,β -unsaturated ketones with tetra-n-butylammonium peroxydisulfate. *Tetrahedron Lett* **38**: 3009-3012.

Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, and Korsmeyer SJ (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**: 96-99.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, and Schlesinger PH (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* **7**: 1166-1173.

Li L, Qi Z, Qian J, Bi F, Lv J, Xu L, Zhang L, Chen H, and Jia R (2010) Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma Smmc-7721 cells by vitamin K₂ is associated with p53 and independent of the intrinsic apoptotic pathway. *Mol Cell Biochem* **342**: 125-131.

Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, and Thompson CB (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**: 1389-1399.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, and Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**: 147-157.

Matsumoto K, Okano J, Nagahara T, and Murawaki Y (2006) Apoptosis of liver cancer cells by vitamin K₂ and enhancement by MEK inhibition. *Int J Oncol* **29**: 1501-1508.

Mishra S, Murphy LC, Nyomba BL, and Murohy LJ (2005) Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol Med* **11**: 192-197.

Miyazawa K, Nishimaki J, Ohyashiki K, Enomoto S, Kuriya S, Fukuda R, Hotta T, Teramura M, Mizoguchi H, Uchiyama T, Omine M (2000) Vitamin K₂ therapy for myelodysplastic syndromes (MDS) and post-MDS acute myeloid leukemia: information through a questionnaire survey of multi-center pilot studies in Japan. *Leukemia* **14**: 1156-1157.

Miyazawa K, Yaguchi M, Funato K, Gotoh A, Kawanishi Y, Nishizawa Y, You A, and

Ohyashiki K (2001) Apoptosis/differentiation-inducing effects of vitamin K2 on HL-60 cells: dichotomous nature of vitamin K2 in leukemia cells. *Leukemia* **15**: 1111-1117.

Mizuta T, Ozaki I, Eguchi Y, Yasutake T, Kawazoe S, Fujimoto K, and Yamamoto K (2006) The effect of menatetrenone, a vitamin K2 analog, on disease recurrence and survival in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment: a pilot study. *Cancer* **106**: 867-872.

Moldoveanu T, Liu Q, Tocilj A, Watson M, Shore G, and Gehring K (2006) The X-ray structure of a Bak homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell* **24**: 677-688.

Nishi T, Shimizu N, Hiramoto M, Sato I, Yamaguchi Y, Hasegawa M, Aizawa S, Tanaka H, Kataoka K, Watanabe H, and Handa H (2002) Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. *J Biol Chem* **277**: 44548-44556.

O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, Faderl S, Kipps T, Keating MJ, Viallet J, and Cheson BD (2009) Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **113**: 299-305.

Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, and Watzka M (2008) The vitamin K cycle. *Vitam Horm* **78**: 35-62.

Otsuka M, Kato N, Shao RX, Hoshida Y, Ijichi H, Koike Y, Taniguchi H, Moriyama M, Shiratori Y, Kawabe T, and Omata M (2004) Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology* **40**: 243-251.

Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B, and Kroemer G (1996) Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* **396**: 7-13.

Preedy VR, Watson RR, and Sherma Z (2010) Dietary components and immune function (Nutrition and Health) pp 36-52, Human Press, Totowa, NJ.

Sakamoto S, Kabe Y, Hatakeyama M, Yamaguchi Y, and Handa H (2009) Development and application of high-performance affinity beads: toward chemical biology and drug discovery. *Chem Rec* **9**: 66-85.

Sano Y, Tadano K, Kaneko K, Kikuchi K, and Yuzuriha T (1995) Distribution of menaquinone-4, a therapeutic agent for osteoporosis, in bone and other tissues of rats. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)* **41**: 499-514.

Sano Y, Tadano K, Kaneko K, Kikuchi K, and Yuzuriha T (1997) Metabolic fate of menaquinone-4 in dogs (I): absorption, distribution, metabolism and excretion after a single oral administration. (1997) *Xenobio Metabol Dispos* **12**: 48-57.

Shearer MJ, and Newman P (2008) Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost* **100**: 530-547.

Sibayama-Imazu T, Fujisawa Y, Masuda Y, Aiuchi T, Nakajo S, Itabe H, and Nakaya K (2008) Induction of apoptosis in PA-1 ovarian cancer cells by vitamin K₂ is associated with an increase in the level of TR3/Nur77 and its accumulation in mitochondria and nuclei. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**: 803-812.

Shibayama-Imazu T, Sonoda I, Sakairi S, Aiuchi T, Ann WW, Nakajo S, Itabe H, and Nakaya K (2006) Production of superoxide and dissipation of mitochondrial transmembrane potential by vitamin K₂ trigger apoptosis in human ovarian cancer TYK-nu cells. *Apoptosis* **11**: 1535-1543.

Shimizu S, Narita M, and Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483-487.

Solomon HM, and Schrogie JJ (1967) The effect of various drugs on the binding of warfarin-14C to human albumin. *Biochem Pharmacol* **16**: 1219-1226.

Stafford DW (2005) The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* **3**: 1873-1878.

Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grün F, Errandi J, Romero K, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, and Blumberg B (2003) Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* **278**: 43919-43927.

Thorp JA, Gaston L, Caspers DR, and Pal ML (1995) Current concepts and controversies in the use of vitamin K. *Drugs* **49**: 376-387.

Tokita H, Tsuchida A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Katayanagi S, Sudo H, Enomoto M, Takagi Y, and Aoki T (2005) Vitamin K2-induced antitumor effects via cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer cell lines. *Int J Mol Med* **17**: 235-243.

Tsujioka T, Miura Y, Otsuki T, Nishimura Y, Hyodoh F, Wada H, and Sugihara T (2006) The mechanisms of vitamin K2-induced apoptosis of myeloma cells. *Haematologica* **91**: 613-619.

Utsumi K, and Inoue M (2001) 新ミトコンドリア学、共立出版、東京.

Vermeer C, and Braam L (2001) Role of vitamins in the regulation of tissue calcification. *J Bone Miner Metab* **19**: 201-206.

Wang Y, Zhen Y, Shi Y, Chen J, Zhang C, Wang X, Yang X, Zheng Y, Liu Y, and Hui R (2005) Vitamin k epoxide reductase: a protein involved in angiogenesis. *Mol Cancer Res* **3**: 317-323.

Wang H, Takemoto C, Akasaka R, Uchikubo-Kamo T, Kishishita S, Murayama K, Terada T, Chen L, Liu ZJ, Wang BC, Sugano S, Tanaka A, Inoue M, Kigawa T,

Shirouzu M, and Yokoyama S (2009) Novel dimerization mode of the human Bcl-2 family protein Bak, a mitochondrial apoptosis regulator. *J Struct Biol* **166**: 32-37.

Wang Y, Zhen Y, Shi Y, Chen J, Zhang C, Wang X, Yang X, Zheng Y, Liu Y, and Hui R (2005) Vitamin k epoxide reductase: a protein involved in angiogenesis. *Mol Cancer Res* **3**: 317-23.

Watanabe D, Yamamoto A, Tomoo K, Matsumoto K, Murata M, Kitamura K, and Ishida T (2006) Quantitative evaluation of each catalytic subsite of cathepsin B for inhibitory activity based on inhibitory activity-binding mode relationship of epoxysuccinyl inhibitors by X-ray crystal structure analyses of complexes. *J Mol Biol* **362**: 979-993.

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, and Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14**: 2060-2071.

Westhofen P, Watzka M, Marinova M, Hass M, Kirfel G, Müller J, Bevans CG, Müller CR, and Oldenburg J (2011) Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J Biol Chem* **286**: 15085-15094.

Wu FY, Liao WC, and Chang HM (1993) Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *Life Sci* **52**: 1797-1804.

Yaguchi M, Miyazawa K, Katagiri T, Nishimaki J, Kizaki M, Tohyama K, and Toyama K (1997) Vitamin K2 and its derivatives induce apoptosis in leukemia cells and enhance the effect of all-trans retinoic acid. *Leukemia* **11**: 779-787.

Yaguchi M, Miyazawa K, Otawa M, Ito Y, Kawanishi Y, and Toyama K (1999) Vitamin K2 therapy for a patient with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **13**: 144-145.

Yaguchi M, Miyazawa K, Otawa M, Katagiri T, Nishimaki J, Uchida Y, Iwase O, Gotoh A, Kawanishi Y, and Toyama K (1998) Vitamin K2 selectively induces apoptosis of blastic cells in myelodysplastic syndrome: flow cytometric detection of apoptotic cells using APO2.7 monoclonal antibody. *Leukemia* **12**: 1392-1397.

Yokoyama T, Miyazawa K, Naito M, Toyotake J, Tauchi T, Itoh M, Yuo A, Hayashi Y, Georgescu MM, Kondo Y, Kondo S, and Ohyashiki K (2008) Vitamin K2 induces autophagy and apoptosis simultaneously in leukemia cells. *Autophagy* **4**: 629-640.

謝辞

本研究を遂行する上で、終始温かく厳しいご指導を賜りました東京工業大学 半田宏特任教授、山口雄輝准教授に心より御礼申し上げます。同じく、最後まで様々な面でご指導・ご協力を頂きました東京工業大学 坂本聡助教に深く御礼申し上げます。

ビタミン K2 に関して、基礎生物学的な面のみならず、臨床的な視点からも有益なご指導・ご助言を頂きました東京医科大学 宮澤啓介教授に心より御礼申し上げます。質量分析を用いた実験の際に、懇切丁寧なご指導を頂きました東京医科歯科大学 笠間健嗣准教授に篤く御礼申し上げます。また、測定機器の使用方法のご指導、また新規実験系に関する有益なご提案等を頂きました慶應義塾大学 加部泰明専任講師に心より感謝致します。

日頃より有益なご指導、ご助言を頂きました国立長寿医療センター 今井剛博士、横浜市立大学 和田忠士准教授、株式会社日本ステントテクノロジー 畠山士博士、日本大学 岸努准教授、天野エンザイム株式会社 石原聡博士、京都府立医科大学 飯泉陽介助教、東京工業大学 伊藤拓水特任助教に深く感謝致します。

また研究グループの仲間として、多くの場面で議論をし、お互いを刺激しあい、楽しい時も辛い時も多くの時間を共有してきた政池由佳氏、Vipul Gupta 氏、坂田未希氏、若林知伸氏、小又一等氏、司馬博氏、飯田結氏、舩造正英氏、Thamamongood Thiprampai 氏、片山美樹氏に心より感謝致します。日々の研究室生活でお世話になった研究室の皆様に、心より感謝致します。

最後に、常に近くにおいて、様々な局面で私を支えて下さった家族と婚約者の合田亜由美さんに感謝致します。

東京工業大学 大学院生命理工学研究科
生命情報専攻 山口研究室
唐澤 慧記