

## TOPICS

Small molecules regulating the activity  
of protein phosphatase 2C isolated from the plant extract

# 植物由来のプロテイン ホスファターゼ 2C 活性制御物質

油井信弘 大西素子 木村賢一

キーワード プロテインホスファターゼ 2C、  
pisiferdiol、sanguinarine、アポトーシス、ストレス応答

## はじめに

タンパク質のリン酸化を制御するプロテインキナーゼやプロテインホスファターゼは、タンパク質の機能調節において重要な機能を果たしている。その中でタンパク質のセリン/スレオニン残基を特異的に脱リン酸化するプロテインホスファターゼ (PP) は、PP1、PP2A、PP2B (カルシニューリン) および PP2C の 4 種のファミリーに分類される。トートマイシンやオカダ酸は PP1 と PP2A の、FK506 (タクロリムス) やシクロスポリン A は PP2B の強力な阻害剤であり、その機能解析のための重要なバイオプローブとして用いられている。さらに、FK506 はイムノフィリンである FKBP と、またシクロスポリン A はシクロフィリンと特異的に結合して PP2B を抑制することで、免疫抑制剤やアトピー性皮膚炎の軟膏として世界中で広く使われている<sup>1)</sup>。しかし、PP2C には、特異的で強力な活性制御物質が報告されておらず、PP2C 機能研究が遅れている 1 つの理由となっている。

そこで筆者らの研究室では、PP2C 活性制御物質を植物天然資源と化合物ライブラリーから探索した結果、PP2C の活性化物質と阻害物質を同定したので紹介したい<sup>2),3)</sup>。

## 1. プロテインホスファターゼ 2C

PP2C には、①触媒活性発現に  $Mg^{2+}$ 、または  $Mn^{2+}$  を要求する、②他の PP1、PP2A および PP2B が、いずれも触媒サブユニットのほかに、1 つまたはそれ以上の調節サブユニットを有するのに対して、単量体として存在している、③ PP1、PP2A および PP2B に阻害活性を示すオカダ酸に感受性が認められないなどの特徴がある。哺乳動物細胞では、それぞれ異なった遺伝子にコードされている 17 種類のサブタイプが知られ、その中でも PP2C $\alpha$  は多くの細胞内基質が報告されており、ストレス応答やアポトーシス誘導などの制御に関わるとされる<sup>4)</sup>。すでに、PP2C 活性化物質としてオレイン酸などの不飽和脂肪酸が、阻害物質としてリン酸の基質ホモログなどが報告されているが、より特異的で強力な活性制御物質が望まれる。

## 2. プロテインホスファターゼ 2C 活性化物質

マウス PP2C $\alpha$  を酵素、 $\alpha$ -カゼインを基質とし、マラカイトグリーン法により遊離リン酸量を比色定量するスクリーニング系を用い、700 種類の植物天然資源のメタノール抽出物から探索を行った。その結果、植物のサワラ (*Chamaecyparis pisifera*) の球果に強い PP2C 活性化作用を見いだした。そこで、定法により活性化物質の単離精製を行い、各種機器分析によりアビエタン型ジテルペノイドのピシフェルジオール (pisiferdiol) とピシフェリン酸 (pisiferic acid) を同定した (図 1 A)。In vitro において、ピシフェルジオールは PP2C のみを活性化したが (1.3 倍、100  $\mu$ M)、ピシフェリン酸と既知の活性化物質オレイン酸は PP2C の活性化に加え、PP1 と PP2B の阻害活性も示した。

筆者紹介：あぶらい・のぶひろ (ABURAI, Nobuhiro) 岩手大学大学院連合農学研究科 (The United Grad. Sch. of Agricultural Sciences, Iwate Univ.) 2010 年岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻修了 博士 (農学) 専門：化学生物学

連絡先：〒 020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-15 (勤務先)

おおにし・もとこ (OHNISHI, Motoko) 中部大学応用生物学部応用生物化学科 (Col. of Biosci. and Biotechnol., Dept. of Biological Chemi.) 教授 1996 年東北大学大学院医学研究科博士後期課程修了 医学博士 専門：生化学、分子生物学

連絡先：〒 487-8501 愛知県春日井市松本町 1200 E-mail mohnishi@isc.chubu.ac.jp (勤務先)

きむら・けんいち (KIMURA, Ken-ichi) 岩手大学大学院連合農学研究科 (The United Grad. Sch. of Agricultural Sciences, Iwate Univ.) 准教授 1984 年東北大学大学院農学研究科修士課程修了 農学博士 専門：化学生物学 連絡先：〒 020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-15 E-mail kimurak@iwate-u.ac.jp (勤務先)

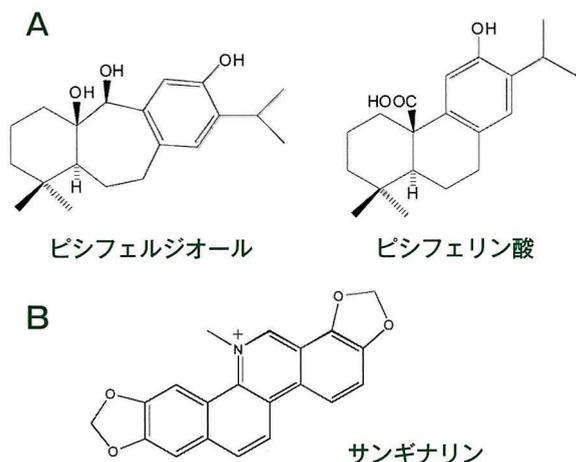


図1 PP2C 活性制御物質の構造  
 A: PP2C 活性化物質ピシフェルジオールとピシフェリン酸の構造  
 B: PP2C 阻害物質サンギナリンの構造

両者の PP2C に対する活性化作用は同様であったが、ユニークなアビエタン型 7 員環構造を有するピシフェルジオールの方が、通常の 6 員環構造のピシフェリン酸よりも特異的に PP2C を活性化した。

次に、急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する作用を調べたところ、ピシフェルジオールはカスパーゼ 3/7 を活性化し、アポトーシス誘導による細胞毒性活性を示した ( $IC_{50}=18.3\mu M$ )。さらに、PP2C $\alpha$  の細胞内基質でアポトーシス誘導に関わる Bad と p38 を、前者に対しては時間依存的、また後者に対しては一

過的に脱リン酸化した (図 2 A)。Bcl-2 ファミリーの Bad は脱リン酸化によりアポトーシスを誘導するが、ストレス応答に関わる MAPK の p38 は脱リン酸化により不活性化される。そのため、ピシフェルジオールは PP2C を活性化することにより Bad を脱リン酸化し、アポトーシス誘導に関わると推定される (図 2 B)。

### 3. プロテインホスファターゼ 2C 阻害物質

植物天然資源には、PP2C に対する強い阻害活性が認められなかったが、標準阻害剤キット (化学療法基盤情報支援班より恵与) 中の、植物由来のアルカロイドであるサンギナリン (sanguinarine) に強い阻害活性を見いだした (図 1 B)。In vitro において、サンギナリンは PP1、PP2A および PP2B に比べ、PP2C に対し 17 倍以上の強い阻害活性を示し、基質  $\alpha$ -カゼインに対する PP2C の活性を  $K_i=0.68\mu M$  で拮抗的に阻害した。

次に、HL60 細胞に対する作用を調べたところ、カスパーゼ 3/7 を活性化し、アポトーシス誘導による細胞毒性活性を示したが ( $IC_{50}=0.37\mu M$ )、サンギナリンはピシフェルジオールとは逆に、時間依存的に Bad と p38 の脱リン酸化を抑制した (図 2 A)。リン酸化 p38 はアポトーシスを誘導することが知られ、p38 阻害剤である SB203580 を同時に加えると、サンギナリンのアポトーシス誘導が部分的に阻害された。Bad はリン酸化により不活性化型となり、アポトーシス誘導を

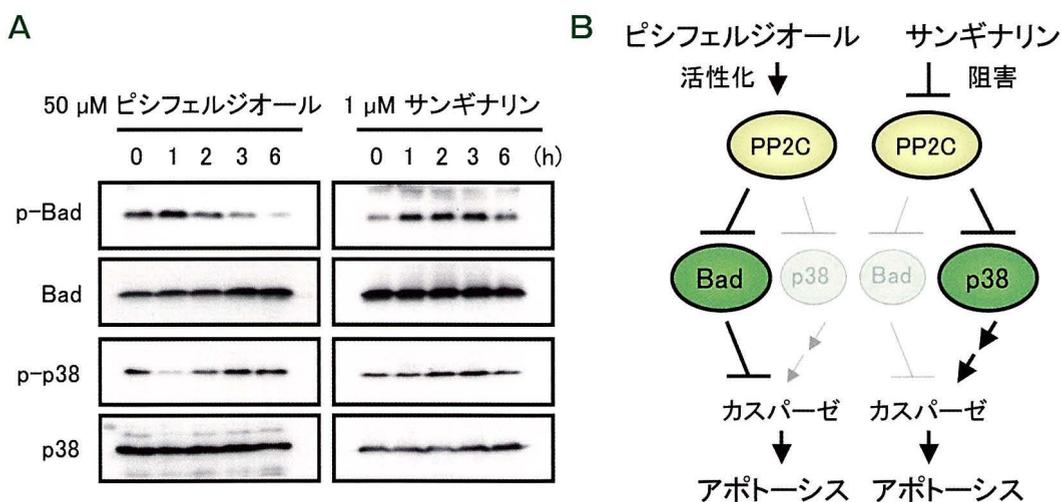


図2 PP2C 活性制御物質の Bad と p38 に対する作用  
 A: HL60 細胞における薬剤処理後の Bad と p38 のリン酸化状態 (ウェスタンブロット法)  
 B: ピシフェルジオールとサンギナリンのアポトーシス誘導メカニズムの作業仮説

促進しないことから、サンギナリンは PP2C を抑制することで p38 の脱リン酸化を抑制し、アポトーシス誘導に関わると推定される (図 2B)。

### おわりに

今回、PP2C を正と負に制御する植物由来の天然有機化合物が得られたことから、本研究成果を出発点として、さらなる PP2C 活性制御化合物の探索や、PP2C を標的としたがんや 2 型糖尿病などの治療薬の開発へと発展することが期待される。最近、植物におけるアブシジン酸の活性制御に PP2C が重要な役割を果たすことが明らかになり<sup>5)</sup>、PP2C 活性制御物質は、動物から植物へと種を超えて PP2C が関わる生命現象を制御することができ、基礎研究から創薬研究において有用なバイオプローブになるかもしれない。

### 参考文献

- 1) McCluskey, A. *et al.* : Serine-threonine protein phosphatase inhibitors : development of potential therapeutic strategies, *J. Med. Chem.*, 45, 1151 ~ 1175 (2002)
- 2) Aburai, N. *et al.* : Pisiferdiol and pisiferic acid isolated from *Chamaecyparis pisifera* activate protein phosphatase 2C *in vitro* and induce caspase-3/7-dependent apoptosis via dephosphorylation of Bad in HL60 cells, *Phytomedicine*, in press
- 3) Aburai, N. *et al.* : Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C *in vitro* and induces apoptosis *via* phosphorylation of p38 in HL60 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 548 ~ 552 (2010)
- 4) Klumpp, S. *et al.* : Protein phosphatases types 2C $\alpha$  and 2C $\beta$  in apoptosis, *Biochem. Soc. Trans.*, 34, 1370 ~ 1375 (2006)
- 5) Sheard, L. B. and Zheng, N. : Signal advance for abscisic acid, *Nature*, 462, 575 ~ 576 (2009)