

学位論文 (博士)

新規レチノイン酸作用機構の解明と抗がん剤開発に
関する研究

2023年3月

星薬科大学大学院 薬学研究科
総合薬科学専攻
病態機能制御学

齋藤 大輔

目次

論文リスト	1
略号リスト	2
緒論.....	3
第一章 α -Actinin に RA が与える影響.....	7
第一節 RA 処理が α -actinin-4 の細胞内局在性に及ぼす影響.....	10
第二節 RA 処理が α -actinin-4 のタンパク質と遺伝子の発現量に及ぼす影響	12
第三節 Cycloheximide 処理による α -actinin-4 の安定性の解析	14
第四節 プロテアソーム阻害剤による α -actinin-4 タンパク質の解析	16
第五節 α -Actinin-4 タンパク質のユビキチン化の解析.....	18
第六節 小括	20
第七節 考察.....	21
第二章 PKA に RA が与える影響	26
第一節 RA 処理が PKA の細胞内活性に及ぼす影響.....	29
第二節 RA 処理によって増加する核 PKA 基質の同定	31
第三節 SF2 タンパク質の PKA によるリン酸化の解析	34
第四節 RA 処理による Mcl-1 スプライシングバリエーションの解析	36
第五節 PKA 阻害剤処理による Mcl-1 スプライシングバリエーションの解析 ...	39
第六節 PKA 阻害剤処理による白血病細胞分化の解析.....	41
第七節 Mcl-1L 阻害剤処理による白血病細胞分化の解析.....	43
第八節 小括	45
第九節 考察.....	46
結論.....	50
実験の部.....	52
謝辞.....	60
REFERENCES	61

論文リスト

1. 第1章

Saito, D., Imai, M., Yamada, C. & Takahashi, N.: Changes in the levels of α -actinin-4 in differentiating human myeloid leukemia cells induced by retinoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1868**, 118968 (2021).

2. 第2章

Saito, D., Imai, M., Hasegawa, S., Yamasaki, M. & Takahashi, N.: A splicing factor phosphorylated by protein kinase A is increased in HL60 cells treated with retinoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1869**, 119142 (2022).

略号リスト

APL	... acute promyelocytic leukemia、急性前骨髄性白血病
AML	... acute myeloid leukemia、急性骨髄性白血病
cRABP	... cellular retinoic acid-binding protein、 細胞内 RA 結合タンパク質
CHX	... cycloheximide、タンパク質合成の阻害剤
DTT	... dithiothreitol、ジチオトレイトール
EDTA	... ethylene diamine tetraacetic acid、エチレンジアミン四酢酸
EGTA	... ethylene glycol tetraacetic acid、エチレングリコール四酢酸
FBS	... fetal bovine serum、ウシ胎児血清
HRP	... horseradish peroxidase、西洋ワサビペルオキシダーゼ
MG132	... proteasome inhibitor、プロテアソーム阻害剤
Myr	... PKA inhibitor myristoylated、PKA 阻害剤
PBS	... phosphate buffered saline、リン酸緩衝生理食塩水
PKA	... protein kinase A、プロテインキナーゼ A
PMSF	... phenylmethylsulfonyl fluoride、 フェニルメチルスルホニルフルオリド
PVDF	... polyvinylidene difluoride、ポリフッ化ビニリデン
RA	... all- <i>trans</i> retinoic acid、オールトランスレチノイン酸
RARs	... retinoic acid receptors、レチノイン酸受容体
RXR _s	... retinoid X receptors、レチノイド X 受容体
S63845	... selective MCL1L inhibitor、Mcl-1L 阻害剤
SDS-PAGE	... sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動

緒論

レチノイン酸 (RA) はビタミン A の代謝活性物質であり、細胞の増殖抑制、分化誘導、免疫調節、成長促進、皮膚粘膜形成などに関わっている¹⁻⁵⁾。ビタミン A は脂溶性ビタミンの一つで、動物性食品に含まれるビタミン A と、植物性食品に含まれるプロビタミン A の 2 種類がある。食品から取り込まれたビタミン A は酵素反応によって、活性型のレチナール、レチノイン酸へと変換される。レチナールは網膜色素変性症に対し治療効果を示し⁶⁾、レチノイン酸は尋常性痤瘡 (ニキビ) や急性前骨髄球性白血病 (APL) の治療に使用される^{7,8)}。

APL は血液がんである急性骨髄性白血病 (AML) の一種であり、造血幹細胞から白血球への分化途中である前骨髄球が、がん化することによって白血病細胞となることにより分化、成熟できなくなり、無制限に増殖する病気である⁹⁾。骨髄で増殖した白血病細胞によって正常な血球細胞が作られなくなり、赤血球、血小板、白血球が減少する。そのため、出血や貧血、感染症等の症状が現れる。また、APL は他の白血病と比較して出血しやすく、従来のがん剤は白血病細胞を攻撃するため、出血を助長する。よって、RA が治療薬として登場する以前、APL は最も治りにくい白血病の一つとされていた^{10,11)}。

1980 年に T. R. Breitman 博士により、RA が白血病細胞の分化を誘導できることが報告され¹²⁾、APL の治療法に有用であることが 1988 年に発表された¹³⁾。RA は従来のがん剤とは異なり、白血病細胞に細胞死を誘導するのではなく、成熟した顆粒球様細胞への分化を誘導させる。よって、RA は白血病細胞にのみ作用し、分化した細胞は正常な細胞と同様に自然に死滅するため、副作用の少ない分化誘導療法として APL の治療に用いられている¹⁴⁾。

RA の作用は以下の機構によって発現すると考えられている。RA が細胞膜を通過し、細胞内 RA 結合タンパク質 (cellular retinoic acid-binding protein, cRABP) と複合体を形成した後、核内に移動して RA 核内受容体 (retinoic acid receptor, RAR; retinoid X receptor, RXR) と水素結合して、DNA 上に存在する RA 応答配列と結合した結果^{15,16)}、その下流にある標的遺伝子の転写調節が行われる¹⁷⁾。また、APL においては、RA が RAR α の分化誘導作用を阻害する promyelocytic leukemia protein-RAR α (PML-RAR α) キメラタンパク質の分解を促進することで治療効果を示すと考えられている¹⁸⁾。

しかしながら、RA による細胞応答が 5 分と非常に速やかに行われていること、RA 核内受容体に結合しないレチノイドでも RA と同様の作用を示すことなどから核内受容体による機序とは別の経路が考えられ、RA がタンパク質に共有結合するタンパク質修飾反応であるレチノイル化も報告されている¹⁹⁾。このレチノイル化は、RA が中間体となるレチノイル-CoA を形成した後、標的タンパク質にレチノイル基を転移する反応である (Fig. 1)^{20,21)}。レチノイル化タンパク質は白血病細胞の HL60 細胞において 20 余りの存在が明らかになっており²²⁾、その中にアクチン結合タンパク質の α -actinin や cAMP 依存性リン酸化酵素であるプロテインキナーゼ A (PKA) の調節サブユニット (PKA-RII α) がレチノイル化されている^{23,24)}。

レチノイル化が α -actinin や PKA に及ぼす影響については未だ明らかになっておらず、細胞分化への関連も深く解明されていない。また、一部の APL 患者には RA の分化誘導療法が有効でないこと²⁵⁾、寛解後に RA 耐性を生じ再発するという問題がある²⁶⁾。また、非 APL の AML 患者には RA 治療が効かないことが知られている²⁷⁾。そこで本研究では、レチノイル化 α -actinin やレチノイ

ル化 PKA の生理的意義を明らかにするため、RA によるこれらタンパク質の変
化や影響を解析し、RA による RAR を介さない新規作用機構を解明すること
を目的とした。そして、この新しい RA 作用機構に基づいて、RA 治療にお
ける問題を解決する抗がん剤の開発を行うことを目標とした。

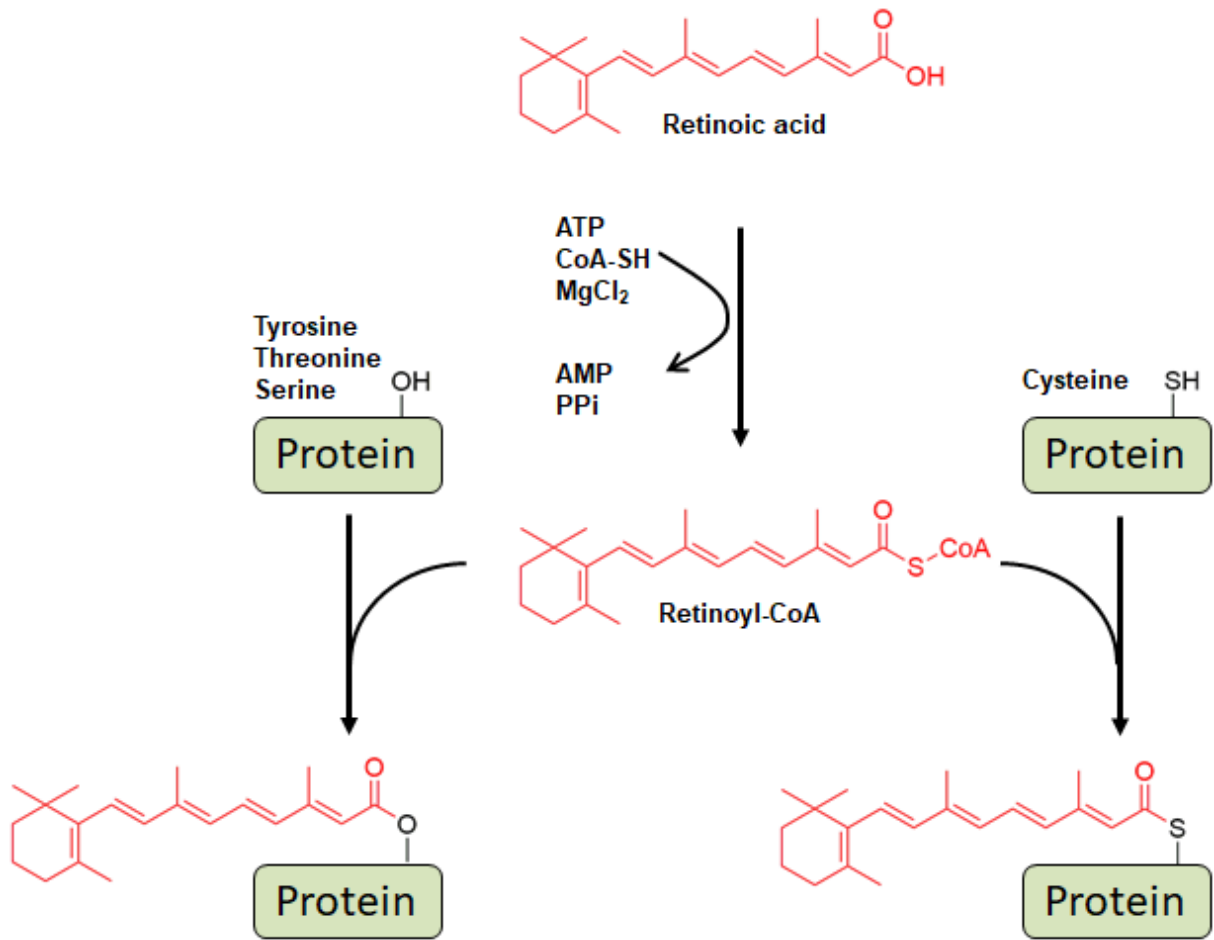


Fig. 1. Retinoylation : protein modification by retinoic acid

第一章 α -Actinin に RA が与える影響

α -Actinin はアクチンに結合し、細胞骨格を形成していることがよく知られている。RA 処理による白血病細胞から顆粒球様細胞への分化時には、細胞の骨格は大きく変化する。 α -Actinin には 4 つのアイソフォームがあり、 α -actinin-2 と α -actinin-3 は骨格筋細胞に存在しており、 α -actinin-1 と α -actinin-4 は非骨格筋細胞に存在している^{28,29)}。非骨格筋細胞の HL60 細胞には α -actinin-1 と α -actinin-4 が発現しており、 α -actinin-4 はがん細胞で過剰に発現していることが報告されている³⁰⁾。これら α -actinin のアイソフォームのアミノ酸配列には高い相同性があり、構造は 2 つのカルポニンホモロジドメイン (CH) からなるアクチン結合ドメイン (ABD)、4 つのスペクトリンリピート (SR)、2 つの EF-ハンドドメインで構成されるカルモデュリンホモロジドメイン (CaM-like) を含んでいる。 α -Actinin はアクチンフィラメントと結合する際、逆平行にホモダイマーを形成しており、ABD の両側でアクチンフィラメントと結合している (Fig. 2)³¹⁾。また、 α -actinin-4 の発現亢進は、アクチンを束状化させることで、細胞突起形成を促進し、細胞の運動性を亢進させるため、転移巣形成を促進させることが報告されている²⁹⁾。加えて、乳がんや卵巣がんにおいて α -actinin-4 が核に局在していることが頻繁に観察されている^{30,32-34)}。さらに、 α -actinin-4 が核移行することや転写因子と相互作用することも報告されており、細胞の分化や増殖におけるシグナル伝達への α -actinin-4 の関与が示唆されている³⁵⁾。

白血病細胞株である HL60 において α -actinin はレチノイル化されており²³⁾、当研究室での免疫沈降法による結果では、 α -actinin-4 ではレチノイル化が起きていたが、 α -actinin-1 ではレチノイル化は起こらなかった (data not shown)。

α -Actinin-1 と α -actinin-4 のアミノ酸配列は 86%の相同性があるが、 α -actinin-1 にレチノイル化が起こっていないことから、この配列の違いがレチノイル基との結合と関連していると考えられる。 α -Actinin-4 は核内に局在することが多く報告されているが^{30,32-34})、 α -actinin-1 は細胞膜に局在しており核内に移行するなどの報告はほとんどない。また、HL60 細胞の RA 誘導細胞分化において、レチノイル化は細胞形態制御因子である Rho グアニンヌクレオチド解離阻害因子 (Rho-GDI β) の局在性の変化やタンパク質の安定性に関与することが報告されている³⁶)。そのためレチノイル化の有無が細胞局在性の変化に関わっていることが考えられた。そこで、本章では RA による α -actinin-4 の細胞内局在の変化やタンパク質の安定性について解明を行った。

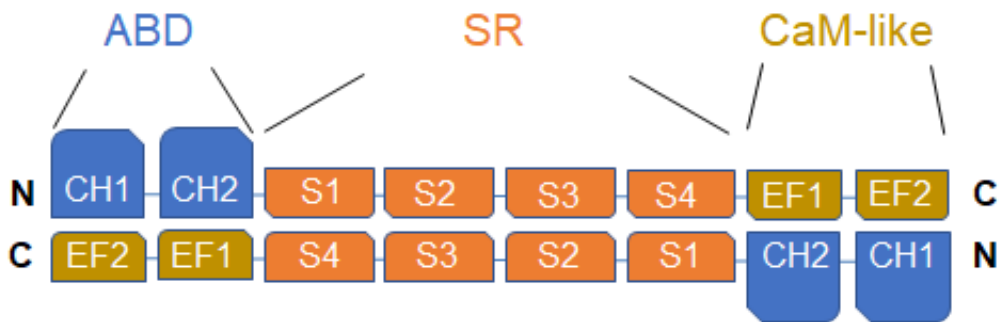


Fig. 2. Functional domains of the human α -actinin-4 protein.

第一節 RA 処理が α -actinin-4 の細胞内局在性に及ぼす影響

α -Actinin-4 は細胞骨格の構成成分であるが、がん細胞株の核にも局在していることが知られている³²⁾。そこで、RA による α -actinin-4 の細胞内局在の変化を検討するために、RA 処理及び未処理の HL60 細胞から、核及び細胞質を分画し、タンパク質を抽出した。各画分のタンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離後、 α -actinin-4 量を抗 α -actinin-4 抗体を用いたウェスタンブロット法により測定した。

その結果、細胞質画分では RA 処理によって α -actinin-4 のバンドの濃さが増したが、核画分では、RA 処理により α -actinin-4 のバンドの濃さが低くなった (Fig. 3A)。これらバンドを解析したところ、Fig. 3B に示すように、細胞質画分では α -actinin-4 量は、RA 処理によってコントロールに比べ約 38% 有意に増加した。これに対し、核画分では、RA 処理によりコントロールに比べ α -actinin-4 量は約 40% 有意に減少した。

また、当研究室での共焦点顕微鏡を用いた蛍光免疫染色法で得られた結果においても、未処理細胞では主に核に局在していたが、RA 処理細胞では未処理細胞に比べ、細胞質に多く局在していた (data not shown)。

よって、RA 処理は、HL60 細胞に発現する α -actinin-4 の局在を核から細胞質に変化させる可能性が明らかとなった。

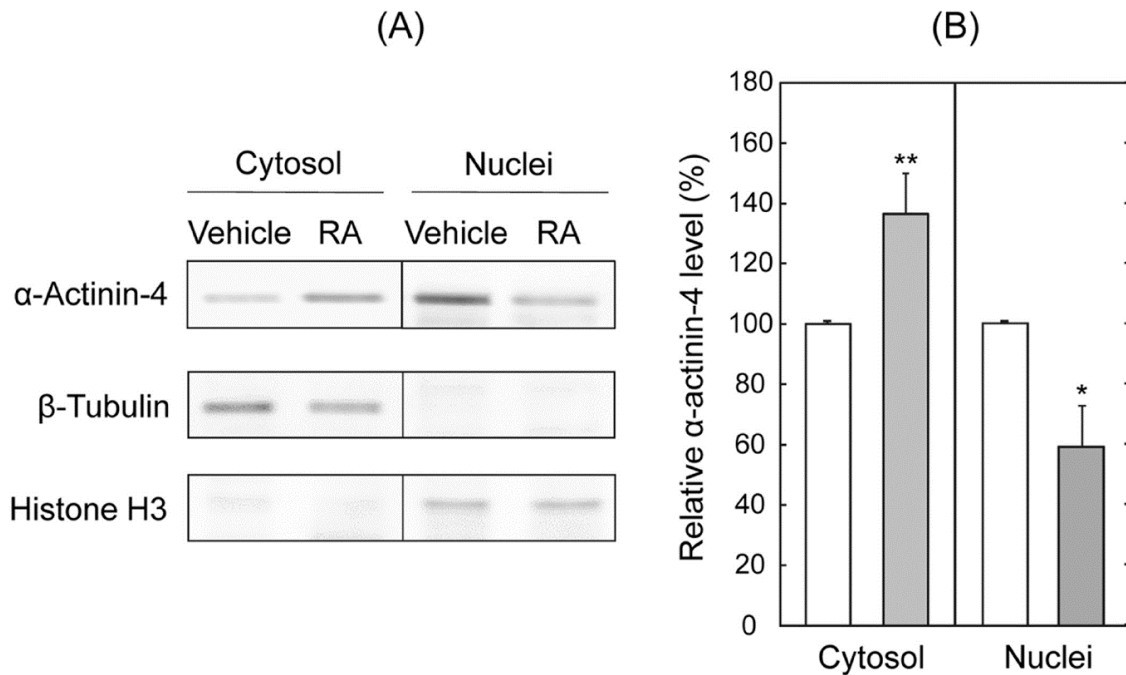


Fig. 3. Intracellular localization of α -actinin-4 in subcellular fractions of HL60 cells treated with RA.

HL60 cells (2×10^5 cells/ml), grown in serum-containing medium with ethanol (vehicle, \square) or 1 μ M RA (RA, \blacksquare) for 4 days, were harvested and fractionated into cytosol and nuclear extracts. (A) α -Actinin-4 in subcellular fractions was detected by immunoblotting analysis using anti- α -actinin-4 antibody. β -Tubulin and histone H3 were used as positive controls for cytosolic and nuclear extracts, respectively. (B) Relative α -actinin-4 expression levels were estimated by normalization with β -tubulin or histone H3 expression levels. Results represent the mean \pm standard deviation (SD) of each group (n = 4). * p < 0.05 and ** p < 0.01, significant differences from vehicle.

第二節 RA 処理が α -actinin-4 のタンパク質と mRNA の発現量に及ぼす影響

HL60 細胞への RA 処理により誘導される白血病細胞分化の過程で、レチノイル化タンパク質と同定されている Rho の解離阻害因子 Rho-GDI β の安定性に影響を及ぼすことが報告されている³⁶⁾。そこで本節では、HL60 細胞に対する RA 処理による α -actinin-4 量の変化について検討を行った。

先ず、RA 処理による α -actinin-4 タンパク質の発現量の経時的な変化を明らかにするため、未処理及び RA 処理した HL60 細胞から経時的に抽出したタンパク質を SDS-PAGE で分離後、ウェスタンブロット法により α -actinin-4 量を測定した。

その結果、RA 処理細胞では α -actinin-4 のバンドの濃さが経時的に増加したが、未処理の細胞では、 α -actinin-4 のバンドの濃さに変化は見られなかった (Fig. 4A)。これらバンドを解析したところ、RA 処理細胞は未処理細胞に比べて、 α -actinin-4 タンパク質発現量は 1 日目で約 1.3 倍、2 日目で約 1.6 倍となり、有意に増加していた (Fig. 4B)。

よって、RA 処理により、 α -actinin-4 タンパク質発現量が増加することが示された。また、この RA 処理による α -actinin-4 タンパク質発現量の増加が、mRNA の転写促進に起因するかを確かめるため、未処理及び RA 処理した HL60 細胞から経時的に total RNA を抽出し、 α -actinin-4 の mRNA 発現量を PCR 法で測定したところ、RA 処理による α -actinin-4 の mRNA 発現量に有意な差は認められなかった (data not shown)。

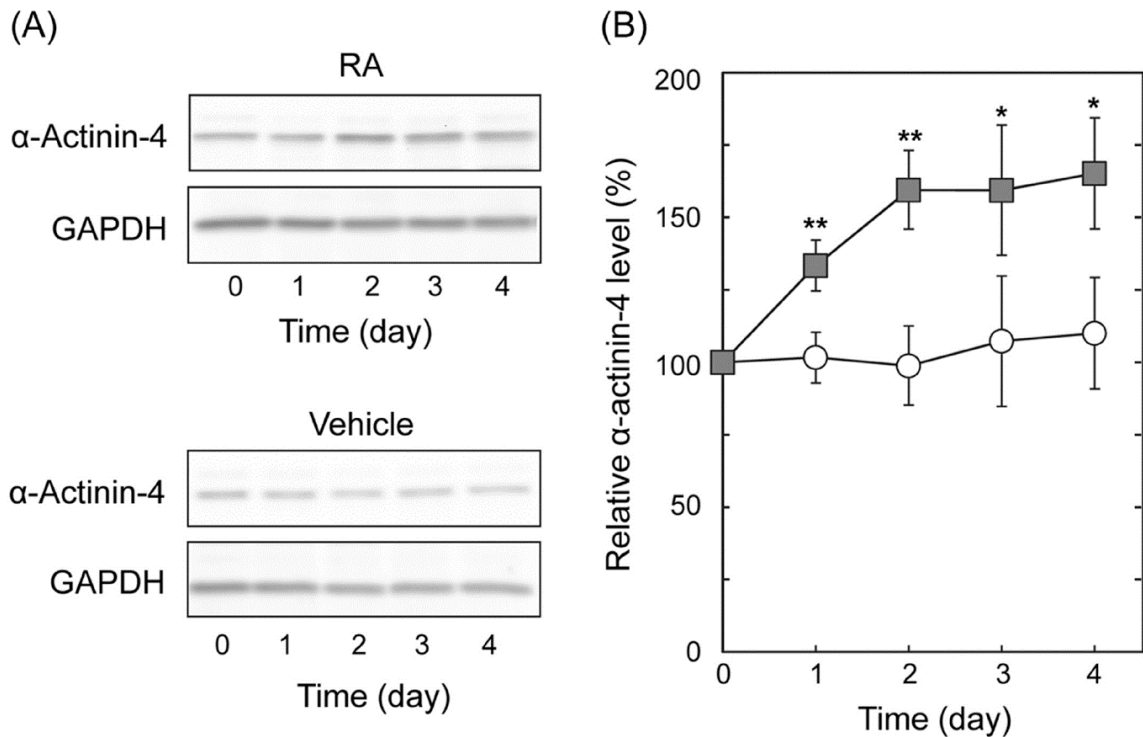


Fig. 4. Changes in α -actinin-4 protein levels in HL60 cells following RA treatment.

HL60 cells (2×10^5 cells/ml), grown in serum-containing medium with ethanol (vehicle, \circ) or $1 \mu\text{M}$ RA (RA, \blacksquare) for the indicated time, were harvested and lysed. (A) Protein ($10 \mu\text{g}$) in cell extracts was separated by one-dimensional - polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) (8%) and analyzed by immunoblotting with anti- α -actinin-4 antibody. (B) Relative α -actinin-4 expression levels were estimated by normalization with GAPDH expression levels. The intensity at 0 h was defined as 100%. Results represent the mean \pm SD of each group ($n = 4$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significant differences from vehicle.

第三節 Cycloheximide 処理による α -actinin-4 の安定性の解析

前節の結果から、RA 処理により α -actinin-4 タンパク質発現量が増加し、mRNA 発現量は変化しないことが明らかになった。このことから、 α -actinin-4 タンパク質発現量の RA 処理による増加は、DNA からの mRNA 転写促進によるものではないことが考えられた。

そこで、次にタンパク質の合成を阻害する cycloheximide (CHX) を用い検討を行った。未処理及び RA 処理した HL60 細胞に CHX を処理し、経時的に細胞を回収した。細胞から抽出した総タンパク質を SDS-PAGE で分離後、 α -actinin-4 量を、抗 α -actinin-4 抗体を用いたウェスタンブロット法で測定した。

その結果、未処理の細胞では α -actinin-4 のバンドの濃さが経時的に減少したが、RA 処理細胞では、 α -actinin-4 のバンドの濃さに変化は見られなかった (Fig. 5A)。これらバンドを解析したところ、未処理細胞では、 α -actinin-4 量は時間依存的 (3 時間で約 50%、6 時間で約 28%) に減少した。これに対し、RA 処理細胞では、 α -actinin-4 量は 3 時間、6 時間後においても 0 時間と同じレベルを維持して減少しなかったことから、RA 処理は未処理と比較して α -actinin-4 の減少を有意に抑制していた (Fig. 5B)。

よって、RA 処理により、 α -actinin-4 タンパク質の分解が抑えられ、安定化される可能性が示唆された。

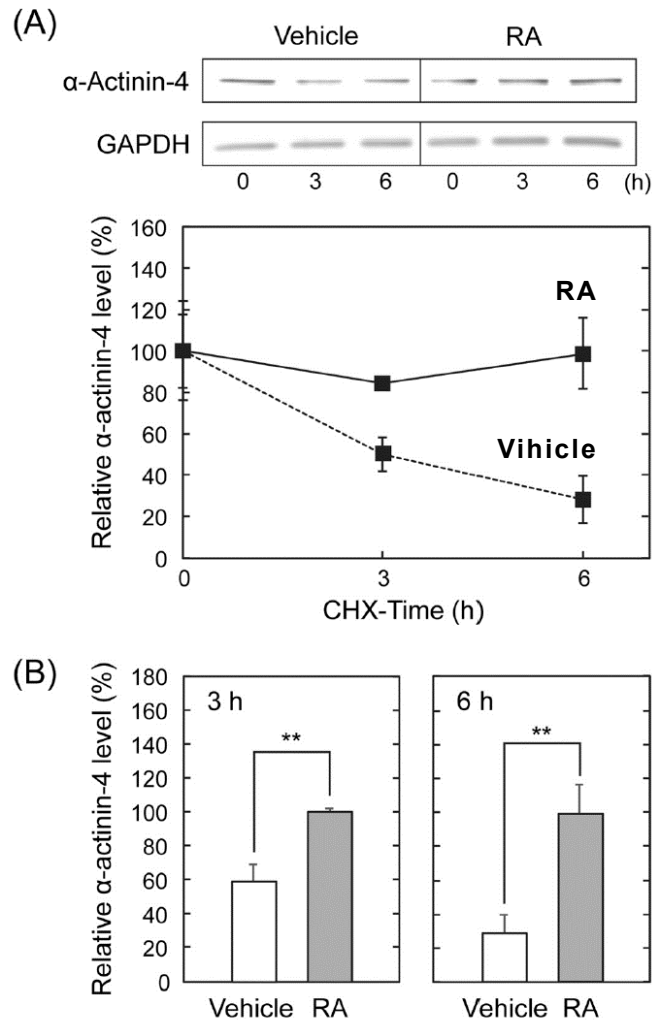


Fig. 5. α -Actinin-4 levels in HL60 cells treated with RA in the presence of cycloheximide.

HL60 cells (2×10^6 cells/ml) were incubated in serum-free medium with or without 1 μ M RA for 24 h and then treated with 100 μ g/ml of cycloheximide (CHX) for the indicated times (CHX-Time). (A) α -Actinin-4 in each fraction was detected by immunoblotting analysis using anti- α -actinin-4 antibody. Relative α -actinin-4 protein levels were estimated by normalization with GAPDH levels. The intensity at 0 h was defined as 100%. Vehicle: dash line, RA: solid line. (B) Relative α -actinin-4 protein levels at 3 h and 6 h were shown. The intensity of RA treatment at each time was defined as 100%. Results represent the mean \pm SD of each group (n = 3). ** $p < 0.01$, significant differences from vehicle.

第四節 プロテアソーム阻害剤による α -actinin-4 タンパク質の解析

前節の結果から、RA 処理により、 α -actinin-4 量の減少が抑えられ、安定化されることが明らかになり、このタンパク質の減少が分解によるものである可能性を推測した。タンパク質の分解には、ユビキチン-プロテアソームシステムがあり、ユビキチンがタンパク質に結合し、選択的にプロテアソームで分解されることが知られている³⁷⁾。そこで、本節では、 α -actinin-4 タンパク質の分解におけるプロテアソームの関与について解析を行った。

まず、未処理及びプロテアソーム阻害剤 MG132 処理細胞から抽出した総タンパク質を SDS-PAGE で分離後、抗 Multi-ubiquitin 抗体でウェスタンブロット法を行った。その結果、未処理細胞に比べてプロテアソーム阻害剤処理をした細胞では、ユビキチン化タンパク質量が顕著に増加していた (Fig. 6A)。

次いで、未処理及びプロテアソーム阻害剤処理細胞から抽出した総タンパク質に対し、抗 α -actinin-4 抗体を用いたウェスタンブロット法を行った。その結果、未処理細胞に比べてプロテアソーム阻害剤を処理した細胞では α -actinin-4 のバンドの濃さが増加した (Fig. 6B, 上段)。これらバンドを解析したところ、プロテアソーム阻害剤処理によって、 α -actinin-4 量は、未処理に比べ約 1.7 倍に増加していた (Fig. 6B, 下段)。

よって、HL60 細胞へのプロテアソーム阻害剤 MG132 処理により、ユビキチン化したタンパク質の分解は抑えられたことから、 α -actinin-4 の安定化にはユビキチン-プロテアソームシステムが関わっていることが示された。

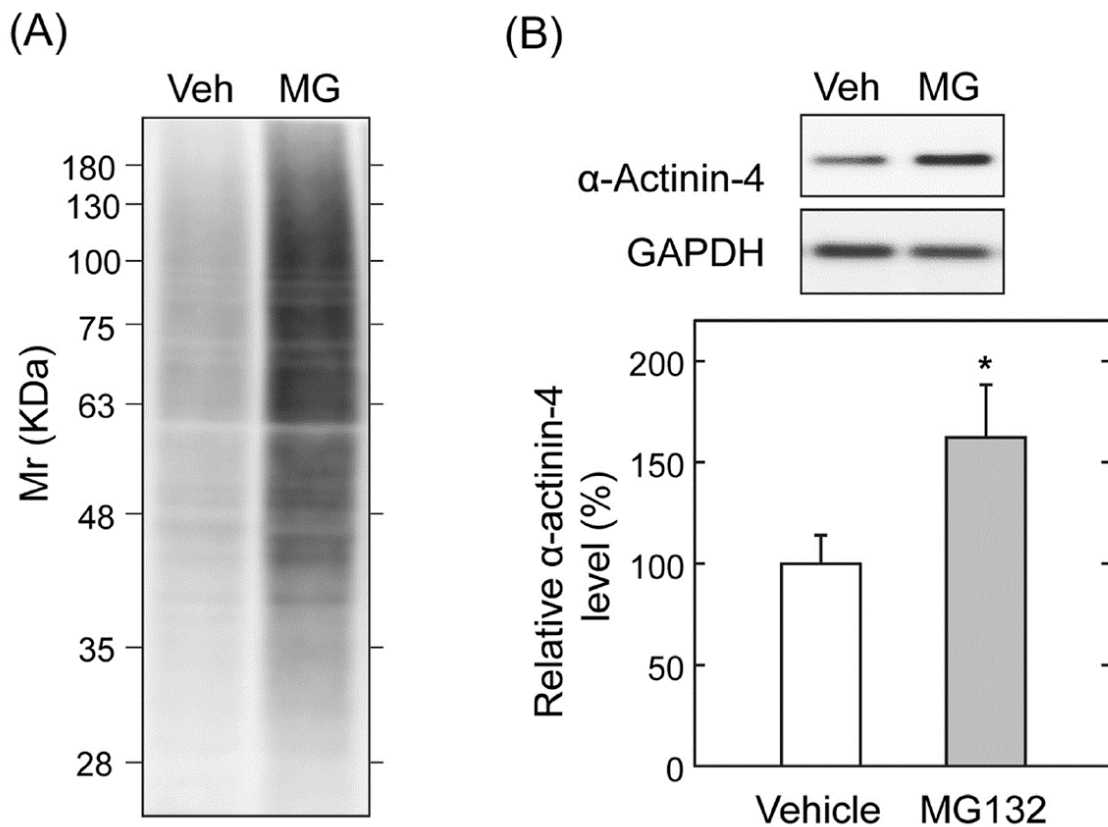


Fig. 6. α -Actinin-4 levels in HL60 cells treated with the proteasome inhibitor, MG132.

HL60 cells (2×10^5 cells/ml) were incubated in serum-free medium with ethanol (vehicle, Veh, \square) or 5 μ M MG132 (MG, \blacksquare) for 4 h. (A) Ubiquitylated proteins were detected by immunoblotting using anti-multi-ubiquitin antibody. (B) α -Actinin-4 proteins were detected by immunoblotting using anti- α -actinin-4 antibody. The intensity of vehicle treatment was defined as 100%. Relative α -actinin-4 expression levels were estimated by normalization with GAPDH expression levels. Results represent the mean \pm SD of each group (n = 3). * p < 0.05, significant differences from the vehicle.

第五節 α -Actinin-4 タンパク質のユビキチン化の解析

前節の結果から、 α -actinin-4 の安定化にはユビキチン-プロテアソームシステムが関わっていることが明らかになったことから、本節では、RA 処理による α -actinin-4 タンパク質の分解におけるユビキチン化の関与について解析を行った。

まず、未処理及び RA 処理細胞から抽出した総タンパク質を、SDS-PAGE で分離後、抗 α -actinin-4 抗体でウェスタンブロット法を行った。その結果、RA 処理における α -actinin-4 量は少し増加していた (Fig. 7, 下段)。

次いで、未処理及び RA 処理細胞から抽出した総タンパク質を、抗 Multi-ubiquitin 抗体で免疫沈降した後、抗 α -actinin-4 抗体を用いたウェスタンブロット法を行った。その結果、ユビキチン化 α -actinin-4 量は、RA 処理により顕著に減少していた (Fig. 7, 上段)。

よって、HL60 細胞への RA 処理により、 α -actinin-4 量は少し増えるものの、 α -actinin-4 のユビキチン化が抑制されることが示された。

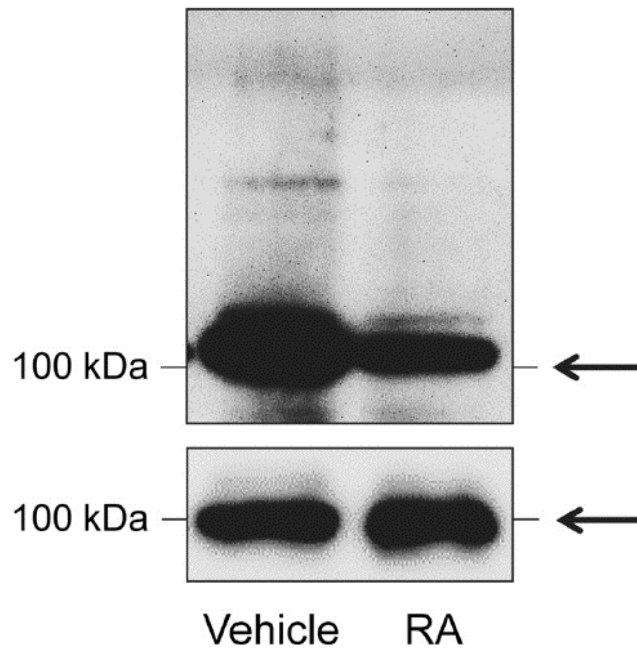


Fig. 7. Alteration in ubiquitylated α -actinin-4 levels in the presence of RA.

HL60 cells (2×10^6 cells/ml) treated without and with 0.1 μ M RA for 24 h were harvested and lysed. Whole cell lysates were immunoprecipitated with anti-multi-ubiquitin antibody and ubiquitylated α -actinin-4 proteins were detected by immunoblotting with anti- α -actinin-4 antibody (upper photo, ubiquitin-conjugated α -actinin-4). α -Actinin-4 protein in 10% input was detected by immunoblotting with anti- α -actinin-4 antibody (lower photo). Arrows show α -actinin-4 (100 kDa). Experiments were repeated four times with consistent results.

第六節 小括

本章で得られた結果は以下の通りである。

1. RA 処理によって細胞内の α -actinin-4 は細胞質で増加し、核で減少した。
2. 未処理の細胞に比べて RA 処理細胞では、 α -actinin-4 タンパク質発現量が経時的に増加したが、mRNA 発現量は変化しなかった。
3. タンパク質合成阻害剤 CHX を処理した細胞では、 α -actinin-4 量が減少したが、RA 処理によってこの減少が抑えられた。
4. プロテアソーム阻害剤 MG132 を処理することでタンパク質の分解が抑えられ、 α -actinin-4 量は増加した。
5. RA 処理によって、 α -actinin-4 のユビキチン化が未処理に比べて減少し、分解が抑えられた。

第七節 考察

本章では、HL60 細胞への RA 処理による α -actinin-4 の細胞内局在性及び安定性の変化について検討を行った。

未処理及び RA 処理の HL60 細胞を細胞分画し、抗 α -actinin-4 抗体を用いて RA 処理による細胞内局在性の変化について検討を行った。その結果、細胞質画分では RA 処理細胞の α -actinin-4 が未処理細胞に比べて多く、核画分では RA 処理細胞の α -actinin-4 が未処理細胞よりも少ないことが示された (Fig. 3)。よって、RA 処理により α -actinin-4 の局在が核から細胞質に変化することが明らかになった。

α -Actinin-4 は SR 領域に核外輸送シグナル (NES) を有しており (523LEAIDQLHLE532)、このアミノ酸配列に核外輸送受容体 (exportin) が結合して核から細胞質に輸送される³⁸⁾。このことから、 α -actinin-4 のレチノイル化は核輸送に影響を与えている可能性が考えられる。

RA による α -actinin-4 量への影響を明らかにするため、抗 α -actinin-4 抗体を用いて、RA 処理及び未処理の HL60 細胞における α -actinin-4 タンパク質の経時的な発現変化について検討を行った。その結果、RA 処理によって α -actinin-4 量が 2 時間まで時間依存的に増加した (Fig. 4)。また、 α -actinin-4 の遺伝子発現量を測定したところ、RA 処理で経時的な影響が見られなかった。このことから、 α -actinin-4 タンパク質発現量の増加は、mRNA 発現量の増加に伴う遺伝子の転写促進を介するものではなく、タンパク質の安定性に影響を与えた結果である可能性が示唆された。

そこで、未処理及び RA 処理細胞にタンパク質合成阻害剤 CHX を処理して、

α -actinin-4 タンパク質の安定性について検討した。その結果、未処理細胞の α -actinin-4 量は時間依存的に減少したのに対し、RA 処理細胞では減少しなかった (Fig. 5)。このことから、RA 処理は α -actinin-4 の分解を抑制する可能性が示唆された。

タンパク質の分解には、ユビキチン-プロテアソームシステムがあり、ユビキチンがタンパク質に結合し、選択的にプロテアソームで分解されることが知られている。そこで、 α -actinin-4 タンパク質の分解におけるプロテアソームの関与について調べるために、未処理及びプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理した細胞からユビキチン化されたタンパク質と α -actinin-4 を検出することを試みた。その結果、プロテアソーム阻害剤処理によってユビキチン化タンパク質量が著しく増加することが明らかとなり、それに伴い α -actinin-4 量も有意に増加していた (Fig. 6)。よって、HL60 細胞へのプロテアソーム阻害剤処理により、ユビキチン化したタンパク質の分解は抑えられ、 α -actinin-4 の安定化にはユビキチン-プロテアソームシステムが関わっていることが示された。

次に、 α -actinin-4 のユビキチン化について調べるため、RA 処理によるユビキチン化修飾を受けた α -actinin-4 の変化について検討を行った。その結果、ユビキチン化 α -actinin-4 量は RA 処理により減少することがわかった (Fig. 7)。このことから、RA 処理は、 α -actinin-4 のユビキチン化を抑制し、分解を抑えることで α -actinin-4 タンパク質を安定化することが示唆された。

ユビキチン化は、レチノイル化と同様にタンパク質の翻訳後修飾であり、タンパク質上のリジンと結合している。RA 処理によってユビキチン化 α -actinin-4 量が減少した理由として、ユビキチン化される α -actinin-4 の構造が変化し、ユビキチン化酵素の基質にならなかった可能性などが考えられる。

レチノイル化において、RA はエステル結合でタンパク質を修飾する機会が多い。エステル結合を切断する Hydroxylamine と KOH でレチノイル化 α -actinin-4 タンパク質を処理すると、レチノイル基の反応が消失したため、RA は α -actinin-4 のチロシン、セリン、スレオニン、或いはシステインとエステル結合で結合している可能性が示唆されている (data not shown)。ユビキチン化は、タンパク質のリシンとユビキチンがアミド結合で結合しているため、エステル結合で結合しているレチノイル化とは同じアミノ酸で直接作用していないことが明らかになった。そのため、ユビキチンが結合するアミノ酸であるリシン周辺のアミノ酸がレチノイル化されて、影響を与えている可能性が考えられる。

α -Actinin は、アクチンに結合するタンパク質の一つであり、 α -actinin がアクチン重合体であるアクチンフィラメントと結合して架橋することから、細胞骨格の形成に重要な成分である。未分化の白血病細胞が RA によって顆粒球様細胞に分化するが、その際に細胞骨格が大きく変化する。この細胞骨格の変化に α -actinin が必要であることから、RA 処理により細胞質での α -actinin-4 量の増加が見られ、細胞分化を誘導している可能性が示唆された (Fig. 8)。

一方、 α -actinin-4 は、がん細胞において核に局在することが報告されている³⁰⁾。核内では NF- κ B のコアクチベーターとして作用し、NF- κ B を介した転写を活性化していることも報告されている³⁹⁾。このようにがん細胞では、細胞増殖に関わる NF- κ B が活性化しているため、がん細胞の増殖が活発に行われる。RA 処理による核内の α -actinin-4 量の減少が、NF- κ B の活性化を抑制し、細胞増殖を抑制している可能性が示唆された。

以上のことから、RAのように α -actinin-4 の核移行を抑える化合物を創製することができれば、がんに対する治療薬の開発につながる考えられる。

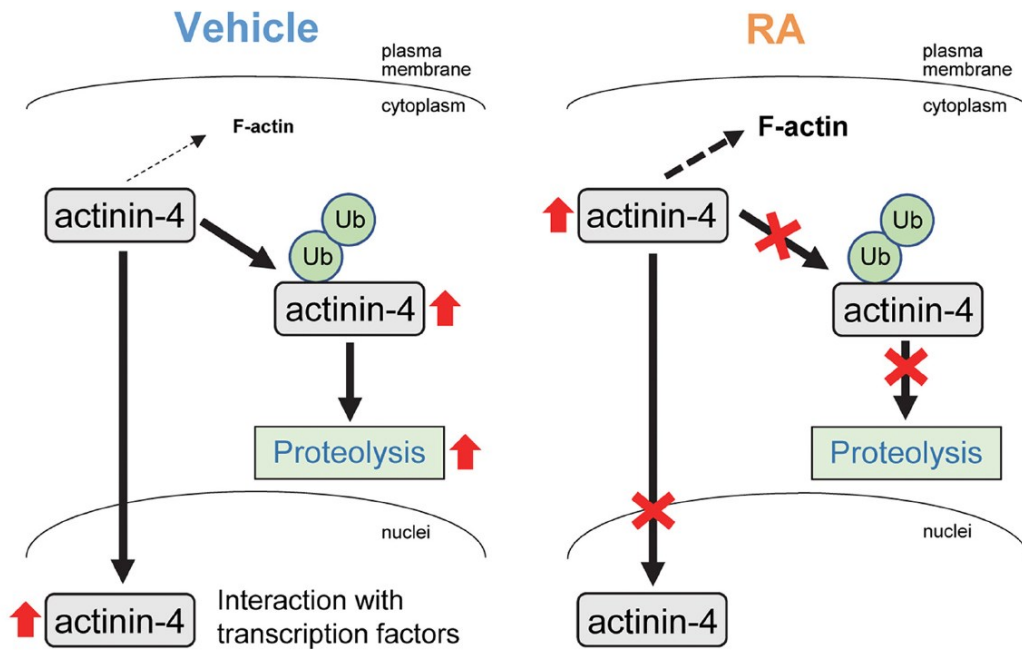


Fig. 8. Schematic representation of the role of α -actinin-4 in RA-induced differentiation of HL60 cells.

HL60 cell differentiation by RA could be associated with intracellular translocation and activation of α -actinin-4 in the cytoplasm. 1: Inhibition of translocation of α -actinin-4 into the nucleus from the cytoplasm. 2: Stabilization of α -actinin-4 by the inhibition of ubiquitination (proteolysis). 3: Accumulation of α -actinin-4 proteins in the cytoplasm may be significant for RA-induced differentiation, resulting in cytoskeleton changes along with the activation of F-actin synthesis related to cell shape and division.

第二章 PKA に RA が与える影響

白血病細胞株である HL60 においてレチノイル化を受けるタンパク質として PKA-RII α が同定されている²⁴⁾。PKA は cAMP 依存性のリン酸化酵素で、タンパク質のセリン、スレオニン残基をリン酸化する酵素である。この細胞内シグナル伝達系は、遺伝子発現、細胞骨格形成、細胞接着、細胞周期の進行、そして細胞分化の進行において重要な役割を果たす^{40,41)}。

PKA は通常、それぞれ 2 つの調節サブユニット (R) と 2 つの触媒サブユニット (C) からなる 4 量体で構成される酵素タンパク質であるが⁴²⁾、cAMP の高濃度状態で、cAMP が調節サブユニットと結合すると、触媒サブユニットが解離しリン酸化活性を発現することで、PKA 基質タンパク質をリン酸化する (Fig. 9)。PKA 調節サブユニットには 4 つのアイソフォーム RI α 、RI β 、RII α 、及び RII β があり、その中でも RII α は主に細胞骨格に存在する⁴³⁾。RII α の細胞内の移動には A-キナーゼアンカータンパク質 (AKAP) が関わっており⁴³⁾、AKAP はホモ二量体を形成した RII α と結合する。AKAP をロックダウンした細胞において、核内の RII α は減少したことが報告されており⁴⁴⁾、このことから RII α の核移行には AKAP が必要であると考えられる。

PKA-RII α はレチノイル化されているが、前述の通り、レチノイル化が局在性の変化に関与する可能性が考えられる。HL60 細胞において、レチノイル化 PKA-RII α は核に存在し、RA 処理によって PKA-RII α は核に局在を変化させることが報告されている⁴⁵⁾。また、触媒サブユニットである PKA-C α においても RII α 同様に、RA 処理した細胞で核に多く局在していたことから⁴⁵⁾、PKA は四量体の形で核移行をしたことが示唆されている。また、APL の細胞分化には

PKA が重要であることも報告されている⁴⁶⁾。これらのことから、レチノイル化により核に移行したPKAが細胞分化に関わっている可能性が考えられた。そこで、本章ではRA処理による核内PKA活性の変化についての解明を行った。

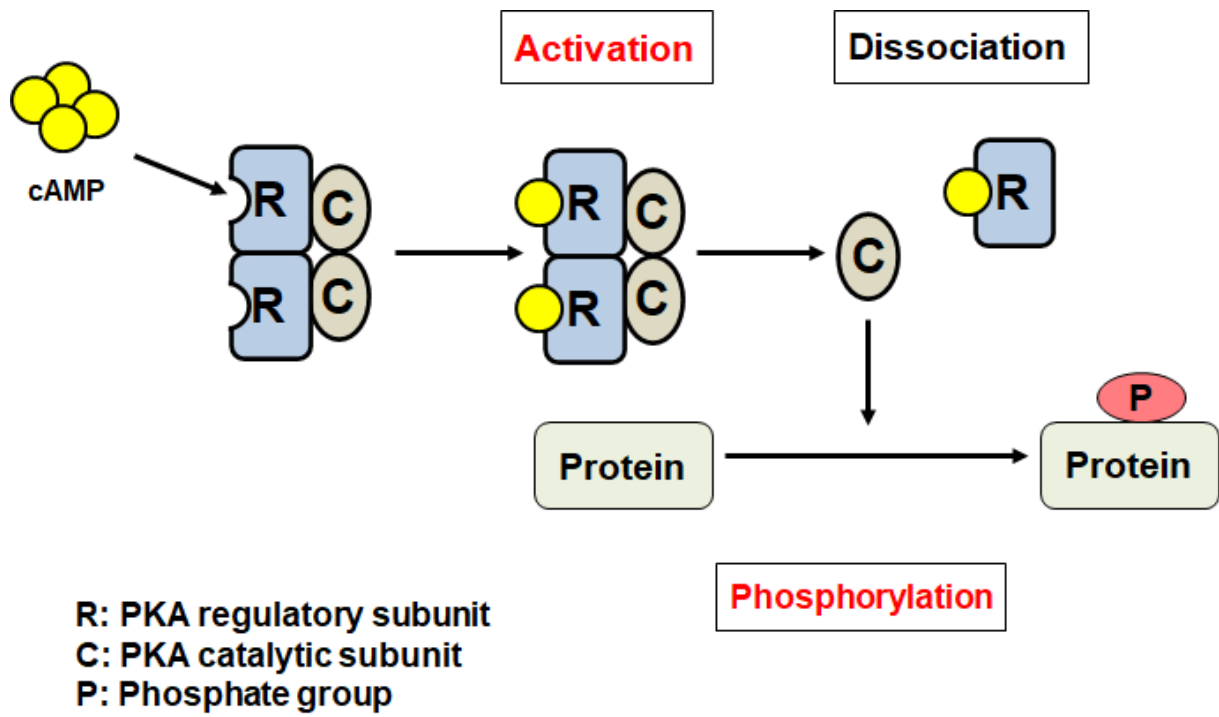


Fig. 9. Mechanism of PKA phosphorylation.

第一節 RA 処理が PKA の細胞内活性に及ぼす影響

RA 処理により、核で PKA 量が増加するため⁴⁵⁾、核内での PKA によるタンパク質のリン酸化も増加することが推測された。そこで、RA 処理及び未処理の HL60 細胞から、核及び細胞質を分画し、タンパク質を抽出した。各画分の PKA 基質の量の変化について抗 phospho-(Ser/Thr) PKA substrate 抗体を用いたウェスタンブロット法により測定した。

その結果、核画分において、未処理と比較して RA 処理で、バンドの濃さが増している PKA 基質タンパク質が 30 kDa、34 kDa、38 kDa、42 kDa、58 kDa の分子量の位置に確認できた (Fig. 10)。細胞質にも PKA 基質タンパク質のバンドは見られるものの、RA 処理で濃さがほとんど変化しないか減少していた。これらの結果から、核画分において、RA 処理が PKA によってリン酸化されるタンパク質量を増加させたことを示唆した。

よって、RA により 4 量体の形で核に移行した PKA が核内のリン酸化を増加させたことが明らかとなった。

今回は、Fig. 10 の矢印で示した分子量 34 kDa で RA 処理によって核内での PKA によるリン酸化が増加するタンパク質について検討を行った。

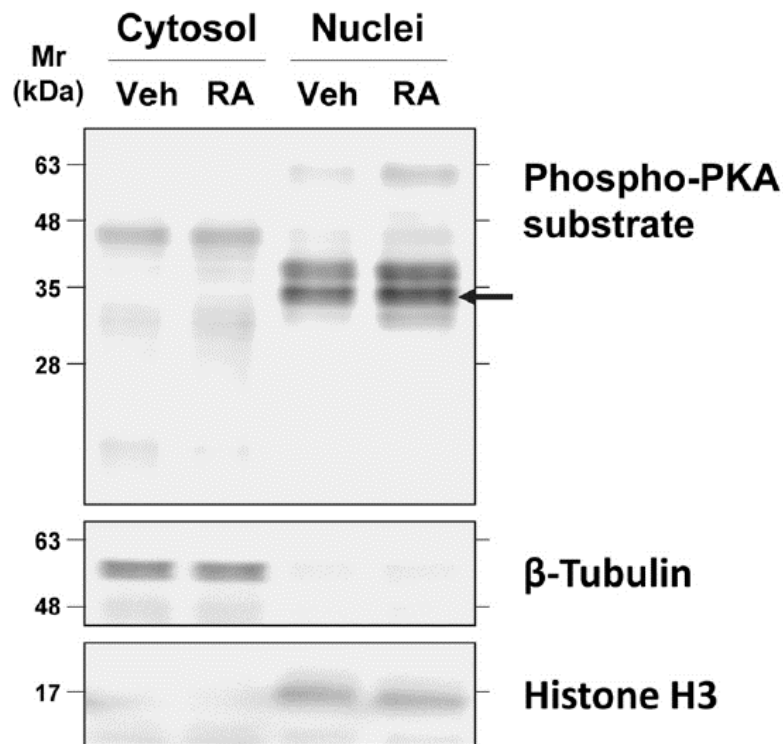


Fig. 10. Intracellular localization of PKA substrates in subcellular fractions of HL60 cells treated with RA.

HL60 cells (2×10^6 cells/ml) were treated with vehicle or 1 μ M RA for 24 h in serum-free medium, homogenized, and fractionated into cytosol and nuclear extracts. PKA substrates in subcellular fractions (10 μ g) were detected by immunoblotting analysis using anti-phospho-(Ser/Thr) PKA substrate antibody. β -Tubulin and histone H3 were used as positive controls for cytosolic and nuclear extracts, respectively. Experiments were repeated at least four times with consistent results. Veh: vehicle.

第二節 RA 処理によって増加する核 PKA 基質の同定

RA 処理により、核タンパク質はリン酸化されることによって、その機能を促進させたり抑制させたりする。そのため、RA による核内のリン酸化量の増加が、HL60 細胞の RA 誘導分化に関わりがあることが考えられた。そこで、RA によって増加したリン酸化 PKA 基質を同定するため、二次元電気泳動法によるタンパク質の分離と質量分析による解析を行った。

RA 処理及び未処理の HL60 細胞から、核画分を分画し、タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を immobilized pH gradient (IPG) ゲルにアプライし、等電点電気泳動を行った後、SDS-PAGE を行った。その後、抗 phospho-(Ser/Thr) PKA substrate 抗体を用いたウェスタンブロット法とタンパク質染色液である SYPRO Ruby で 34 kDa の PKA によってリン酸化されるタンパク質のスポットを特定した (Fig. 11)。そのスポットをゲルから切り出し、質量分析法でアミノ酸配列を解析してタンパク質の同定を行った。

その結果、セリン/アルギニンスプライシング因子 1 (SF2、SRSF1) のアミノ酸配列の断片と一致する 5 つのペプチド断片 (Peptides A~E) が検出され、これらの結果から核内で PKA によってリン酸化されるタンパク質を SF2 として同定した (Fig. 12)。

スプライシングでは一部のエクソンの欠失が見られ、短いスプライシングバリエーションができることがある。SF2 はこのエクソンの欠失 (エクソンスキッピング) を阻害して、スプライシングバリエーションの生成を抑制している。

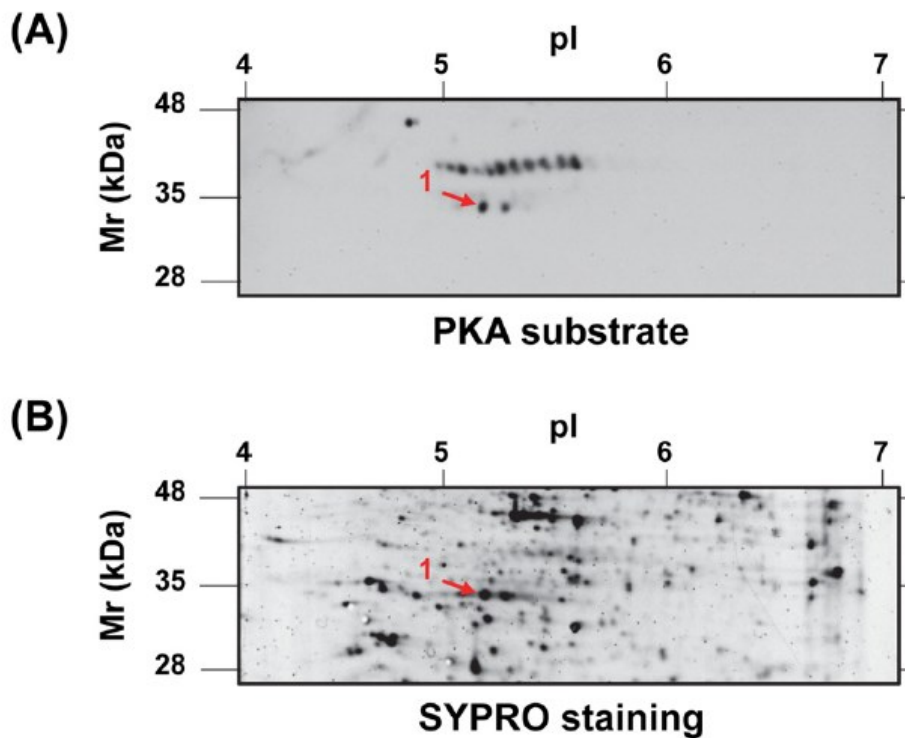


Fig. 11. 2D-PAGE patterns of phosphorylated proteins in nuclear fraction of HL60 cells treated with RA.

HL60 cells (2×10^6 cells/ml) were treated with 100 nM RA for 24 h in serum-free medium and were fractionated into nuclear extracts. Proteins in nuclear fractions (100 μ g) were separated by two-dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) (pH 4–7) and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-(Ser/Thr) PKA substrate antibodies (A) and by SYPRO staining (B). Protein 1 indicated by arrow in (A) corresponds to Protein 1 indicated by arrow in (B). Experiments were repeated at least four times with consistent results.

10	20	30	40	50
MSGGGVIRGP	AGNNDCRI <u>IYV</u>	<u>GNLPPDIRTK</u>	<u>DIEDVFYKYG</u>	<u>AIRDIDLKNR</u>
	Peptide A			
60	70	80	90	100
<u>RGGPPFAFVE</u>	<u>FEDPRDAEDA</u>	<u>VYGRDGYDYD</u>	<u>GYRLRVEFPR</u>	SGR <u>GTGRGGG</u>
	Peptide B			Peptide C
110	120	130	140	150
<u>GGGGGAPRG</u>	<u>RYGPPSRSE</u>	NRVVVSGLPP	SGSWQDLKDH	MREAGDVCYA
	Peptide D			
160	170	180	190	200
<u>DVYRDGTGVV</u>	<u>EFVRKEDMTY</u>	<u>AVRKLNTKF</u>	<u>RSHEGETAYI</u>	<u>RVKVDGPRSP</u>
	Peptide E			
210	220	230	240	
SYGRSRSRSR	SRSRSRSR	SN SRSRSYSPR	SRGSPRYSPR	HSRSRSRT
Serine/arginine-rich splicing factor 1 (SF2, SRSF1)				

Fig. 12. Identification of a nuclear PKA-phosphorylated protein by mass spectrometry.

A protein (Protein 1 indicated by arrows in Fig. 11) was degraded to peptides and analyzed by mass spectrometry. Amino acid sequence of SF2 protein, and amino acid sequences of fragments derived from SF2 determined by mass spectrometry (bold and underlined) are shown. Amino acids are listed by their single letter designation.

第三節 SF2 タンパク質の PKA によるリン酸化の解析

SF2 は PKA によってリン酸化されると、SF2 の機能が不活化されることが報告されている⁴⁷⁾。そこで、SF2 の PKA によるリン酸化を、未処理及び RA 処理 HL60 細胞の総抽出画分を用いて免疫沈降法を用いて解析を行った。

まず、未処理及び RA 処理細胞から抽出した総タンパク質に対し、抗 SF2 抗体で免疫沈降した後、抗 SF2 抗体でウェスタンブロット法を行った。その結果、両条件における SF2 量は同程度発現していた (Fig. 13A)。

次いで、未処理及び RA 処理細胞から抽出した総タンパク質を、抗 SF2 抗体で免疫沈降した後、抗 phospho-(Ser/Thr) PKA substrate 抗体を用いたウェスタンブロット法を行った。その結果、リン酸化 SF2 量は、RA 処理により増加していた (Fig. 13B)。

よって、SF2 の PKA によるリン酸化は、RA 処理によって増加することがわかり、このことから、RA 処理により PKA を介して SF2 の機能が抑制されることが明らかになった。

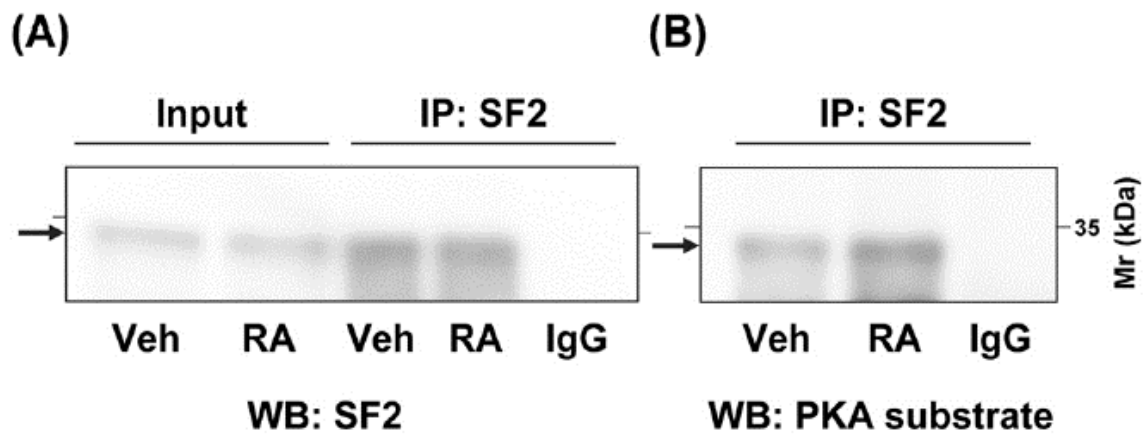


Fig. 13. Reconfirmation of SF2 phosphorylated by PKA after RA treatment.

HL60 cells (2×10^6 cells/ml) were treated with vehicle or 1 μ M RA for 24 h in the serum free medium. Proteins in whole extracts of HL60 cells were immunoprecipitated with anti-SF2 antibodies, and SF2 phosphorylated by PKA was detected by immunoblotting with (A) anti-SF2 antibodies or (B) anti-phospho-(Ser/Thr) PKA substrate antibodies. (A) Photo shows SF2 levels of 10% input. Arrows show SF2. Experiments were repeated four times with consistent results. Veh: vehicle, IP: immunoprecipitation, IgG: antibody (negative IP control), WB: western blotting.

第四節 RA 処理による Mcl-1 スプライシングバリエントの解析

前節の結果から、RA 処理により PKA を介して SF2 の機能が抑制されることが推測された。

SF2 の機能はエクソンの欠失 (エクソンスキッピング) を抑制して、スプライシングバリエントができることを抑えることであるが、この抑制を受けるタンパク質に Bcl-2 ファミリーの Mcl-1 がある⁴⁸⁾。Mcl-1 の遺伝子は 3 つのエクソンを含み、3 つ全てのエクソンからは Mcl-1L ができ、2 番目のエクソンが欠失した短い遺伝子からは Mcl-1S ができる。Mcl-1L は抗アポトーシス作用を示し、Mcl-1S はこの Mcl-1L に結合してその機能を阻害するため、アポトーシス促進作用を示す⁴⁹⁾。Mcl-1S はエクソンスキッピングが起きてできるスプライシングバリエントであり、SF2 がその生成を抑えている⁴⁸⁾。そのため、RA 処理により、PKA を介して SF2 の機能が抑制されると Mcl-1S が増加することが考えられた。

そこで、RA 処理による Mcl-1L 及び Mcl-1S のタンパク質発現量の変化を検討した。未処理及び RA 処理した HL60 細胞から総タンパク質を抽出し、Mcl-1L 及び Mcl-1S 量を、抗 Mcl-1 抗体を用いたウェスタンブロット法で測定した。

その結果、未処理細胞に比べ RA を処理した細胞では Mcl-1L のバンドの濃さが減少した (Fig. 14A, 上段)。これらのバンドを解析したところ、RA 処理によってコントロールに比べ約 70% に有意に減少した (Fig. 14A, 下段)。それに対し、Mcl-1S のバンドの濃さは未処理細胞に比べ RA を処理した細胞では増加していた (Fig. 14B, 上段)。バンドを解析したところ、RA 処理によってコントロールに比べ約 2.8 倍に増加した (Fig. 14B, 下段)。

このことから、RA 処理により SF2 の機能が抑制され (不活化し)、エクソンスキッピングが起こり、Mcl-1L 量は減少し、Mcl-1S 量が増加することが明らかになった。

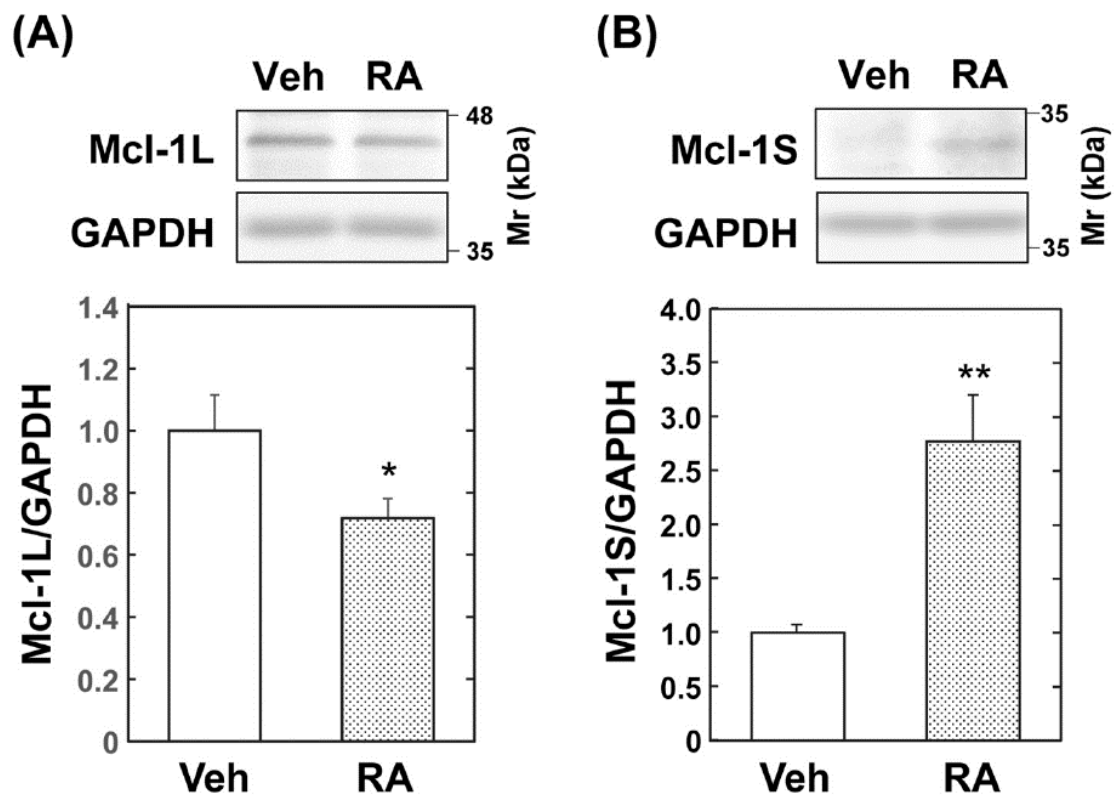


Fig. 14. Mcl-1L and Mcl-1S levels in HL60 cells treated with RA.

HL60 cells (2×10^5 cells/ml) were treated with vehicle or 1 μ M RA for 48 h in serum-free medium, and whole cell extracts were prepared. Mcl-1L (A) and Mcl-1S (B) in cell extracts (10 μ g) were detected by immunoblotting using anti-Mcl-1 and anti-GAPDH antibodies. Relative Mcl-1L and Mcl-1S expression levels were estimated by normalization with GAPDH expression levels. The value of vehicle was defined as 1.0. Results represent the mean \pm SD of each group (n = 3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ significant differences from the vehicle. Veh: vehicle.

第五節 PKA 阻害剤処理による Mcl-1 スプライシングバリエントの解析

RA 処理によって SF2 の機能が抑制され、Mcl-1L は減少し、Mcl-1S が増加することが前節で明らかになったが、この SF2 の機能の抑制が PKA によって引き起こされたかを PKA 阻害剤 Myr を用いて検討した。

未処理、RA 処理、及び RA と PKA 阻害剤を併用処理した HL60 細胞から総タンパク質を抽出し、Mcl-1L 量及び Mcl-1S 量を、抗 Mcl-1 抗体を用いたウェスタンブロット法で測定した。

その結果、RA 処理によって Mcl-1L のバンドはわずかに減少し、その減少は PKA 阻害剤との併用処理により抑えられた。それに対し、Mcl-1S のバンドは RA 処理によって顕著に増加し、その増加は PKA 阻害剤との併用処理によって抑えられた (Fig. 15, 上段)。次に、これらのバンドを解析し、Mcl-1S/Mcl-1L の比を計算したところ、コントロールに比べ RA 単独処理では約 2.5 倍増加し、RA 単独処理に比べて RA と PKA 阻害剤との併用処理により有意に約 40% 低下した (Fig. 15, 下段)。

よって、RA 処理により PKA を介して SF2 の機能が抑制され、スプライシングバリエントである Mcl-1S 量が増加することが明らかになった。

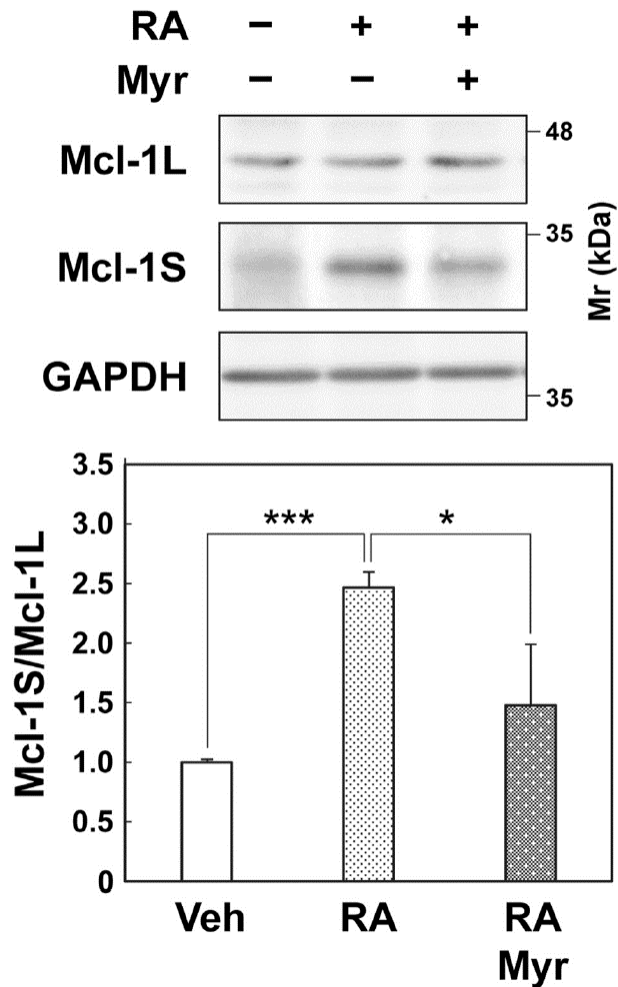


Fig. 15. Effects of PKA inhibitor on Mcl-1L and Mcl-1S levels in HL60 cells treated with RA.

HL60 cells (2×10^5 cells/ml) were treated with $0.4 \mu\text{M}$ RA in the absence or presence of $0.4 \mu\text{M}$ PKA inhibitor myristoylated (Myr) for 48 h in serum-free medium, and whole cell extracts were prepared. Mcl-1L and Mcl-1S in cell extracts ($20 \mu\text{g}$) were detected by immunoblotting using anti-Mcl-1 and anti-GAPDH antibodies. Relative Mcl-1L and Mcl-1S expression levels were estimated by normalization with GAPDH levels. Mcl-1S/Mcl-1L ratios were calculated. The value of vehicle was defined as 1.0. Results represent the mean \pm SD of each group ($n = 3$). $*p < 0.05$ and $***p < 0.001$ significant differences from RA alone. Veh: vehicle, Myr: PKA inhibitor myristoylated

第六節 PKA 阻害剤処理による白血病細胞分化の解析

前節の結果から、RA 処理により SF2 の機能が抑制されて Mcl-1S が増加し、PKA 阻害剤によってこの RA 作用が抑えられることが明らかになった。RA は白血病細胞を顆粒球細胞へと分化させるが、この Mcl-1S の増減の結果は HL60 細胞の分化に対応しているのかを明らかにするため、PKA 阻害剤 Myr と白血病細胞の分化指標である cluster of differentiation molecule 11b (CD11b) の抗体を用いて検討を行った。

未処理、RA 処理、RA 及び PKA 阻害剤を併用処理した HL60 細胞から総タンパク質を抽出し、CD11b 量を、抗 CD11b 抗体を用いたウェスタンブロット法で測定した。

その結果、CD11b のバンドの濃さは RA 処理によって顕著に増加し、その増加は PKA 阻害剤との併用処理によって抑えられた (Fig. 16, 上段)。これらのバンドを解析したところ、コントロールに比べて RA 単独処理では約 18 倍増加し、RA 単独処理に比べて RA と PKA 阻害剤との併用処理により有意に約 50% 低下した (Fig. 16, 下段)。

よって、RA 処理による細胞分化は PKA 阻害剤によって抑えられることが明らかになり、このことから、密接に PKA、SF2 及び Mcl-1S が細胞分化に関わっていることが示唆された。

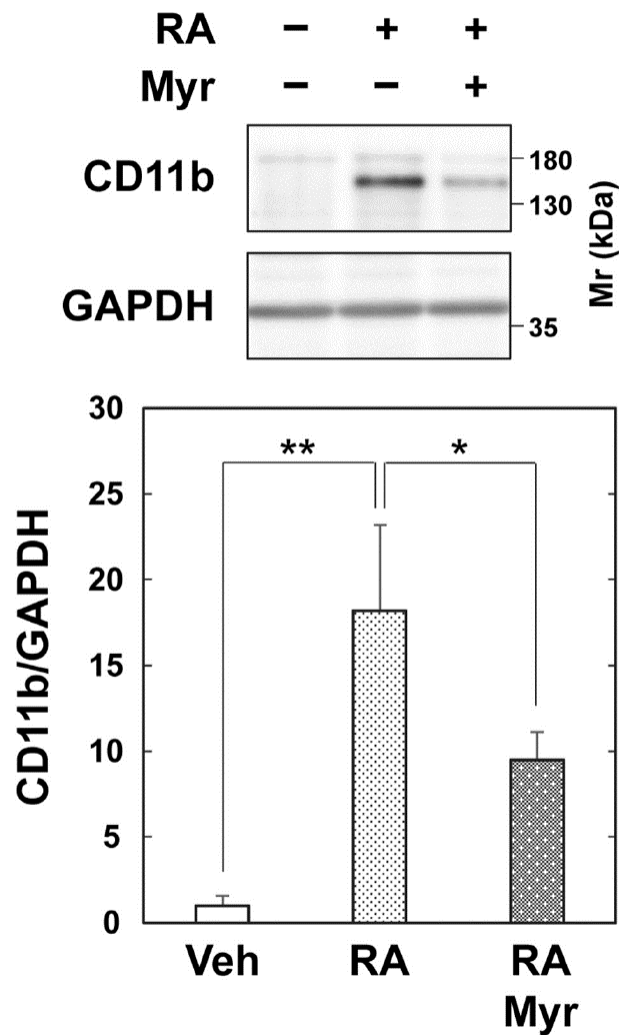


Fig. 16. Effects of PKA inhibitor on differentiation in HL60 cells induced by RA.

HL60 cells (2×10^5 cells/ml) were treated with 0.4 μ M RA in the absence or presence of 0.4 μ M PKA inhibitor myristoylated (Myr) for 48 h in serum-free medium, and whole cell extracts were prepared. The levels of CD11b (differentiation marker) in cell extracts (10 μ g) were detected by immunoblotting using anti-CD11b and anti-GAPDH antibodies. Relative CD11b expression levels were estimated by normalization with GAPDH expression levels. The value of vehicle was defined as 1.0. Results represent the mean \pm SD of each group (n = 3). * p < 0.05 and ** p < 0.01 significant differences from RA alone. Veh: vehicle, Myr: PKA inhibitor myristoylated.

第七節 Mcl-1L 阻害剤処理による白血病細胞分化の解析

前節の結果から、RA 処理による Mcl-1S の増加が細胞分化に関わっていることが考えられた。Mcl-1S は Mcl-1L の BH3 (Bcl-2 homology domain 3) というドメインを阻害することでその機能を抑える⁴⁹⁾。そこで、Mcl-1S が細胞分化に関わっているかを明らかにするため、Mcl-1S と同様に BH3 を阻害する Mcl-1L 阻害剤 S63845 を用いて HL60 細胞の分化を測定した。

未処理、RA 処理、RA 及び Mcl-1L 阻害剤を併用処理した HL60 細胞から総タンパク質を抽出し、CD11b 量を抗 CD11b 抗体を用いたウェスタンブロット法で測定した。

その結果、RA 処理によって増加した CD11b のバンドは、Mcl-1L 阻害剤との併用処理により、さらに増加した (Fig. 17, 上段)。これらのバンドを解析したところ、CD11b 量はコントロールに比べて、RA 単独処理で約 5.5 倍に上昇したが、RA と Mcl-1L 阻害剤の併用処理により約 9.2 倍に増加しており、RA 単独処理に対して有意に増加した (Fig. 17, 下段)。

よって、RA 処理による細胞分化は Mcl-1L 阻害剤によって促進されることが明らかになり、このことから、Mcl-1S の機能である Mcl-1L の阻害は白血病細胞の分化に重要であることが示唆された。

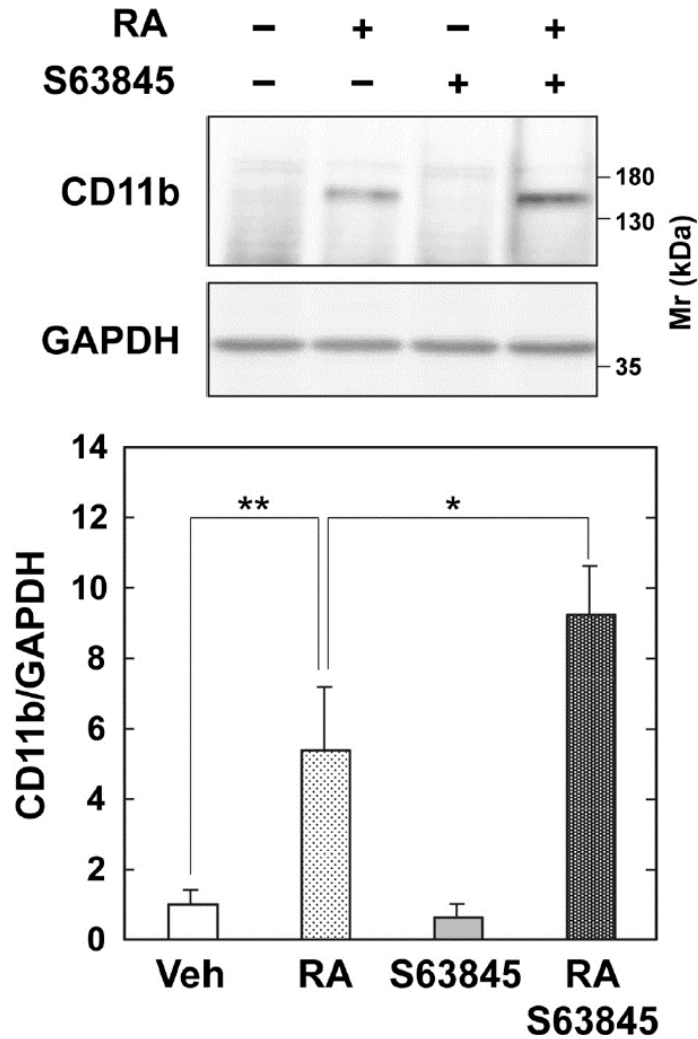


Fig. 17. Effects of Mcl-1L inhibitor on differentiation in HL60 cells induced by RA.

HL60 cells (2×10^5 cells/ml) were treated with 0.4 μ M RA in the absence or presence of 2 nM Mcl-1L inhibitor (S63845) for 48 h in serum-free medium, and whole cell extracts were prepared. CD11b (differentiation marker) in cell extracts (10 μ g) were detected by immunoblotting using anti-CD11b and anti-GAPDH antibodies. Relative CD11b expression levels were estimated by normalization with GAPDH levels. The value of vehicle was defined as 1.0. Results represent the mean \pm SD of each group (n = 3). * p < 0.05 and ** p < 0.01 significant differences from RA alone. Veh: vehicle.

第八節 小括

本章で得られた結果は以下の通りである。

RA 処理によって、

1. PKA によるタンパク質のリン酸化は核で増加した。
2. 増加した核内 PKA 基質の一つは、質量分析での解析によって、スプライシング調節因子である SF2 と同定した。
3. 核内 SF2 の PKA によるリン酸化が増加した。
4. Mcl-1L 量が減少し、Mcl-1S 量が増加した。

PKA 阻害剤処理によって、

5. RA 処理による Mcl-1S 量の増加が、抑えられた。
6. RA 処理による細胞分化指標である CD11b 量の増加が、抑えられた。

Mcl-1L 阻害剤 S63845 処理によって、

7. RA 処理による細胞分化指標である CD11b 量の増加が、さらに促進された。

第九節 考察

本章では、RA 処理による核内 PKA 活性の変化について解明を行った。

未処理及び RA 処理した HL60 細胞を細胞分画し、抗 phospho-(Ser/Thr) PKA substrate 抗体を用いて PKA 基質の変化について検討を行った。その結果、RA 処理によって、核画分における PKA によってリン酸化されるタンパク質量が増加することが示された (Fig. 10)。従って、RA 処理により核に移行した PKA が核内のリン酸化を増加させたことが明らかとなった。

PKA-RII α のアミノ酸配列の N 末に結合する A キナーゼアンカータンパク質 (AKAP) が、PKA-RII α の核局在に関わっていることが報告されている⁵⁰⁾。また、AKAP は核局在化シグナル (NLS) を有しており、このアミノ酸配列に輸送タンパク質 (importin) が結合して細胞質から核に輸送する。このことから、PKA-RII α のレチノイル化は、PKA-RII α と importin の結合親和性に影響を与え、核輸送に関与していることが推測できる。

RA 処理によって増加した核内のリン酸化 PKA 基質を特定するため、二次元電気泳動法によるタンパク質の同定を行った。その結果、スプライシング調節因子である SF2 が HL60 細胞の核内 PKA 基質であることが明らかとなった (Fig. 12)。

同定された SF2 の PKA によるリン酸化を免疫沈降法によって解析し確認を行ったところ、SF2 の PKA によるリン酸化は、RA 処理によって増加することが明らかになった (Fig. 13)。SF2 は PKA によってリン酸化されると、その機能が抑制されることが報告されている⁴⁷⁾。

SF2 には、エクソンスキッピングを抑えて短いスプライシングバリエントが

できることを抑えているといった役割を果たす。この抑制を受けるタンパク質に Mcl-1 があり⁴⁸⁾、SF2 は短いスプライシングバリエーションである Mcl-1S ができることを抑えている。PKA によってリン酸化されると SF2 の機能が抑えられるため、Mcl-1S 量が増加する。

そこで、RA と PKA 阻害剤 Myr の併用処理による Mcl-1 のスプライシングバリエーションの割合の変化を検討したところ、RA 処理によって Mcl-1S/Mcl-1L は増加し、その増加は PKA 阻害剤によって抑えられることが明らかになった (Fig. 15)。このことから、RA 処理により PKA を介して SF2 の機能が抑制され、スプライシングバリエーションである Mcl-1S 量が増加することが明らかになった。

この Mcl-1S 量の増減の結果が HL60 細胞の分化に対応しているかを明らかにするため、HL60 細胞の分化指標である CD11b 量を測定したところ RA 処理によって細胞分化は促進し、その促進は PKA 阻害剤によって抑えられることが明らかになった (Fig. 16)。このことから、Mcl-1S が細胞分化に関わっていることが示唆された。

Mcl-1S は Mcl-1L の BH3 というドメインを阻害することでその機能を抑える⁴⁹⁾。Mcl-1S が細胞分化に関わっているかを明らかにするため、Mcl-1S と同様に BH3 を阻害する Mcl-1L 阻害剤 S63845 を用いて HL60 細胞の分化を測定した。その結果、RA 処理によって細胞分化は促進し、その促進は Mcl-1L 阻害剤によってさらに増加することが明らかになった (Fig. 17)。このことから、Mcl-1S の機能である Mcl-1L の阻害は白血病細胞の分化に非常に重要であることが分かった (Fig. 18)。

本研究結果から、Mcl-1L が Mcl-1S によって阻害され細胞分化に繋がること
が示されたが、Mcl-1L は抗アポトーシス作用を持つ Bcl-2 ファミリーの一つで

ある。その作用は **Bax/Bak** の活性化を阻害することによってシトクロム *c* の放出が抑えられ、アポトーシスの実行に不可欠なカスパーゼの切断による活性化を妨げる。カスパーゼが、白血病細胞である NB4 細胞の RA による分化に関わっていることが報告されている⁵¹⁾。このことから今回の HL60 細胞の分化を測定した条件で RA 処理した細胞から得られた総抽出画分と抗切断型カスパーゼ抗体を用いて切断型カスパーゼを検出したところ、RA 処理による影響を確認できなかった (data not shown)。そこで、Mcl-1L の細胞分化抑制への経路はカスパーゼとは関連がないことが分かった。

一方、Mcl-1L はミトコンドリア分裂に関わるダイナミン様タンパク 1 (DRP1) と BH3 で結合することが報告されている。HeLa 細胞で Mcl-1L は DRP1 と結合することでミトコンドリア分裂を促進させ⁵²⁾、AML 細胞でミトコンドリア分裂を抑えることによって細胞分化を誘導することが報告されている⁵³⁾。このことから、DRP1 によるミトコンドリア分裂の促進を抑制することで、細胞分化が誘導される可能性が考えられる。これについては、今後検討する予定である。

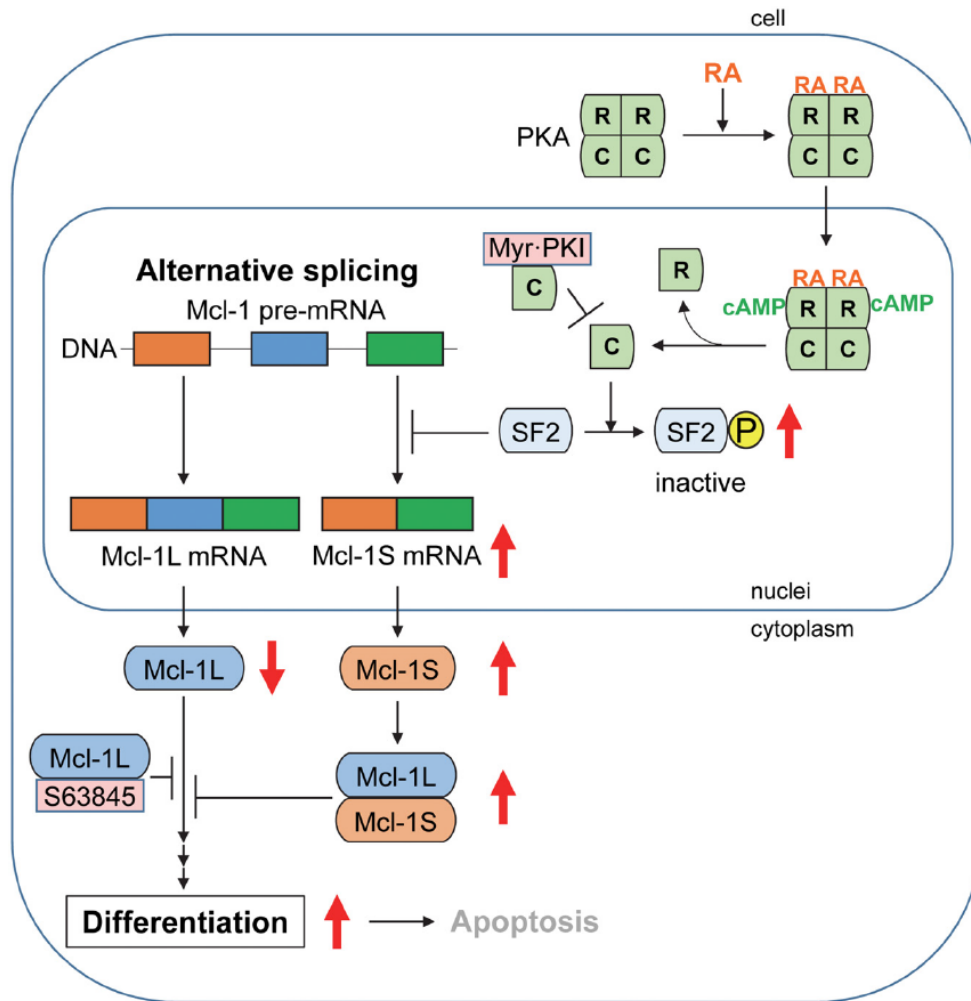


Fig. 18. Scheme of SF2 in RA-induced granulocytic differentiation of HL60 cells.

Granulocytic differentiation induced by RA in HL60 cells could be associated with 1: Increase in nuclear PKA (intracellular translocation and activation of PKA). 2: Increase in nuclear SF2 phosphorylated by PKA. 3: Increase of Mcl-1S level (pro-apoptotic factor) due to increased exon skipping by phosphorylated SF2 (inactive type). 4: Decrease in Mcl-1L activation (anti-apoptotic factor) due to increased Mcl-1S level. 5: Induction of cell differentiation and apoptosis due to decrease Mcl-1L activation. Inhibition of PKA reduces Mcl-1S levels, increases Mcl-1L levels, and suppresses differentiation. PKA-dependent SF2 phosphorylation participates in RA-induced granulocytic differentiation.

結論

本研究で得られた成果は以下の通りである。

HL60 細胞において、

1. α -Actinin-4 は、RA 処理により局在を核から細胞質に変化させた。
2. α -Actinin-4 タンパク質発現量が、RA 処理により経時的に増加したが、mRNA 発現量は変化しなかった。
3. タンパク質合成阻害剤 CHX と RA 処理により、 α -actinin-4 量は変化せず、安定化されていた。
4. タンパク質分解に関わる α -actinin-4 のユビキチン化が、RA 処理によって抑制された。

以上の結果から、RA が α -actinin-4 のユビキチン化を抑え、 α -actinin-4 が細胞質で安定化され増加することが明らかになった。この α -actinin-4 量の細胞質での増加が、白血病細胞の細胞骨格を変化させて細胞の形状を変えることによって、細胞分化を引き起こす可能性が示唆された。

加えて、HL60 細胞において、

5. RA 処理は、核内で PKA によってリン酸化されるタンパク質量を増加させた。
6. スプライシング調節因子である SF2 が、核内の PKA 基質として同定された。
7. PKA によるリン酸化された SF2 量は、RA 処理によって増加した。

8. RA 処理は、スプライシングを抑える SF2 を不活化し、スプライシングバリアントである Mcl-1S 量を増加させ、この Mcl-1S 量の増加は PKA 阻害剤 Myr によって抑えられた。
9. RA 処理によって細胞分化を促進し、この細胞分化は PKA 阻害剤 Myr によって抑えられた。
10. Mcl-1S と同様に Mcl-1L を阻害する Mcl-1L 阻害剤 S63845 によって RA 誘導細胞分化がさらに促進された。

以上の結果から RA 処理によって PKA は細胞質から核に移行し、核タンパク質のリン酸化を増加させること、核内レチノイル化 PKA によるリン酸化が増加する核タンパク質に SF2 があること、SF2 の Mcl-1S のスプライシングを抑える機能を PKA がリン酸化することによって抑制していること、Mcl-1S 量が増加し、Mcl-1L を阻害することによって HL60 細胞の RA 誘導分化を促進していることを明らかにした。Mcl-1L の阻害剤が RA 誘導分化を促進することから、Mcl-1L 阻害剤は有用な白血病の治療薬開発に繋がることが示唆された。

APL の特徴に RAR α の分化誘導作用を阻害する PML-RAR α キメラタンパク質がある。RA 処理では PML-RAR α の分解を促進することで治療効果を示すものと考えられているが、今回明らかにした α -actinin-4 や PKA の細胞分化経路は RAR α を介さない経路であるため、非 APL の AML 患者への治療効果が期待できる。

実験の部

<第一章>

1. 実験材料

a) 細胞

HL60 細胞は T. R. Breitman 博士 (米国国立衛生研究所癌研究所) から譲与された。

b) 試薬

RA は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) のものを購入した。RPMI 1640、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 及び fetal bovine serum (FBS) (USA) は Invitrogen (GIBCO) (Carlsbad, CA, USA)、dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (-) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)、Western Blotting Substrate Plus は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) のものを購入した。Protease Inhibitor Cocktail for Use with Mammalian Cell and Tissue Extracts は Nakarai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)、ブロッカエースは DS Pharma Biomedical Co., Ltd. (Osaka, Japan) のものを購入した。

上記以外の試薬は、市販の特級品を使用した。

c) 抗体

抗 α -actinin-4 抗体 (ALX-210-356) は、Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France) から購入した。抗 Multi-Ubiquitin 抗体、及び Histone H3 は、MBL (Nagoya, Japan) から購入した。抗 β -Tubulin 抗体は、Sigma Aldrich から購入

した。ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体 (HRP 標識) は Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)、及び、ヤギ抗マウス免疫グロブリン G 抗体 (HRP 標識) は、MILLIPORE (Darmstadt, Germany) から購入した。

2. 細胞培養法

HL60 細胞は、10% FBS、10 mM HEPES を添加した RPMI 1640 培地中、インキュベーター (5% CO₂、37 °C) を用いて培養を行った。細胞数はコールターカウンター (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) を用いて測定し、細胞密度 1×10^5 cells/ml で継代した。

3. 薬物処理法

対数増殖期にある HL60 細胞を遠心分離 (4 °C, 200×g, 10 分間) で回収し、D-PBS (-) で 2 回洗浄後、初期濃度が 2×10^5 cells/ml になるように無血清培地 [10 mM HEPES, 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin 含有 RPMI 1640 培地] に懸濁し、播種した。RA を培養液に添加し (最終濃度: 0.1, 1 µM)、対照にはエタノールを添加 (最終濃度: 0.1%) した後、24 時間培養後、細胞を回収した。或いは、MG132 (Sigma, St. Louis, MO, USA) を培養液に添加し (最終濃度: 5 µM)、対照にはエタノールを添加 (最終濃度: 0.1%) した後、4 時間培養後、細胞を回収した。

4. 細胞分画法

HL60 細胞を回収後、D-PBS (-) で 2 回洗浄した。Buffer A [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 10 mM glycerophosphate,

1 mM NaF, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.5% protease inhibitor cocktail] を添加し、氷上に 10 分間静置した。次いで、10% Nonident P-40 を添加後、14,000 x g で 30 秒間遠心した。上清を細胞質画分とし、沈渣には High salt buffer C [20 mM HEPES (pH 7.9), 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 10% glycerol, 10 mM glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.5% protease inhibitor cocktail] を添加した。氷上に 30 分間静置後、14,000 x g で 10 分間遠心し、その上清を核画分とした。細胞質画分および核画分のタンパク質濃度は Bradford 法で定量した。

5. 免疫沈降法

RA 処理及びエタノール処理した HL60 細胞から調製した総可溶化液 (100 µg of protein) を Buffer B [10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1% protease inhibitor cocktail] で希釈し、そこからサンプルを input と免疫沈降用に分けた。この免疫沈降用サンプルに Anti-Multi Ubiquitin mAb-Agarose (MBL) を 10 µL 加え 4 °C で一晩振盪した後、遠心分離 (4 °C, 2500×g, 5 min) によって目的のタンパク質を沈殿させた。この沈殿物を Buffer B で 4 回洗浄後、Sample buffer [63 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0.005% bromophenol blue (BPB)] に溶解し、SDS-PAGE を行った。

6. SDS-PAGE 及び Western blot 法

SDS-PAGE は Laemmli の方法で行った⁵⁴⁾。電気泳動後、タンパク質を半乾式の転写装置を用いて、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜をブロッキング後、抗 α -Actinin-4 抗体、抗 β -Tubulin 抗体、或いは、抗 Histone H3 抗体と反応させた。次に、ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体 (HRP 標識) 或いはヤギ抗マウス免疫グロブリン G 抗体 (HRP 標識) を反応させた。Pierce Western Blotting Substrate Plus と反応後、発光を化学発光検出器 (ChemiStage CC-16, Kurabo, Osaka, Japan) で検出した。

7. 統計解析

結果は各群の平均 \pm 標準偏差 (SD) を表す。データ解析には Prism 6 を使用した。データの統計的有意性は、student の t 検定または Dunnett's の多重比較検定によって評価された。危険率 5% 未満 ($*p<0.05$) 及び 1% 未満 ($**p<0.01$) を有意差ありとみなした。

<第二章>

1. 実験材料

a) 細胞

HL60 細胞は T. R. Breitman 博士 (米国国立衛生研究所癌研究所) から譲与された。

b) 試薬

RA は Sigma Chemical Co. のものを購入した。RPMI 1640、HEPES 及び fetal bovine serum (FBS) (USA) は Invitrogen (GIBCO)、D-PBS (-) は Wako Pure

Chemical Industries, Ltd.、Western Blotting Substrate Plus は Thermo Fisher Scientific のものを購入した。Protease Inhibitor Cocktail for Use with Mammalian Cell and Tissue Extracts は Nakarai Tesque, Inc.、ブロックエースは DS Pharma Biomedical Co., Ltd.のものを購入した。

上記以外の試薬は、市販の特級品を使用した。

c) 抗体

抗 phospho-(Ser/Thr) PKA substrate 抗体は、Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) から購入した。抗 SF2 抗体、抗 GAPDH 抗体、及び抗 CD11b 抗体は Abcam (Cambridge, MA, USA) から購入した。ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体 (HRP 標識) は Southern Biotech (Birmingham, AL, USA)、及び、ヤギ抗マウス免疫グロブリン G 抗体 (HRP 標識)は、MILLIPORE (Darmstadt, Germany) から購入した。

2. 細胞培養法

HL60 細胞は、10% FBS、10 mM HEPES を添加した RPMI 1640 培地中、インキュベーター (5% CO₂、37 °C) を用いて培養を行った。細胞数はコールターカウンター (Beckman Coulter, Inc.) を用いて測定し、細胞密度 1×10^5 cells/ml で継代した。

3. 薬物処理法

対数増殖期にある HL60 細胞を遠心分離 (4 °C, 200×g, 10 分間) で回収し、D-PBS (-)で 2 回洗浄後、初期濃度が 2×10^5 cells/ml になるように無血清培地 [10 mM HEPES, 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin 含有 RPMI 1640 培地] に懸

濁し、播種した。RA を培養液に添加し (最終濃度: 0.4, 1 μ M)、対照にはエタノールを添加 (最終濃度: 0.1%) した後、24 時間、或いは 48 時間培養後、細胞を回収した。RA との薬物併用処理では、RA と 0.4 μ M PKA 阻害剤 Myr·PKI (PKA Inhibitor 14–22 Amide Myristoylated) (Sigma) (最終濃度: 0.4 μ M) 或いは 2 nM Mcl-1L 阻害剤 S63845 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) (最終濃度: 2 nM) を培養液に添加し、対照にはエタノールを添加 (最終濃度: 0.1%) した後、48 時間培養後、細胞を回収した。

4. 細胞分画法

HL60 細胞を回収後、D-PBS (-) で 2 回洗浄した。Buffer A [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 10 mM glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.5% protease inhibitor cocktail] を添加し、氷上に 10 分間静置した。次いで、10% Nonident P-40 を添加後、14,000 x g で 30 秒間遠心した。上清を細胞質画分とし、沈渣には High salt buffer C [20 mM HEPES (pH 7.9), 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5% protease inhibitor cocktail] を添加した。氷上に 30 分間静置後、14,000 x g で 10 分間遠心し、その上清を核画分とした。細胞質画分および核画分のタンパク質濃度は Bradford 法で定量した。

5. 免疫沈降法

RA 処理及びエタノール処理した HL60 細胞から調製した総可溶化液 (100 μ g of protein) を Buffer B [10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10

mM glycerophosphate, 1 mM NaF, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1% protease inhibitor cocktail] で希釈し、そこからサンプルを input と免疫沈降用に分けた。この免疫沈降用サンプルに抗 SF2 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を結合させた Protein G Mag Sepharose (GE Healthcare) を 15 μ L 加え 4 °C で一晩振盪した後、磁気ラックによって目的のタンパク質が結合した磁気ビーズを得た。この磁気ビーズを Buffer B で 4 回洗浄後、Sample buffer [63 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0.005% BPB] に溶解し、SDS-PAGE を行った。

6. SDS-PAGE 及び Western blot 法

SDS-PAGE は Laemmli の方法で行った⁵⁴⁾。電気泳動後、タンパク質を半乾式の転写装置を用いて、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜をブロッキング後、抗 SF2 抗体、抗 phospho-(Ser/Thr) PKA substrate 抗体、抗 GAPDH 抗体、或いはヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体 (HRP 標識) 或いはヤギ抗マウス免疫グロブリン G 抗体 (HRP 標識) を反応させた。Pierce Western Blotting Substrate Plus と反応後、発光を化学発光検出器 (ChemiStage CC-16, Kurabo, Osaka, Japan) で検出した。

7. 2D-PAGE 及び質量分析

2D-PAGE は O'Farrell の方法で行った⁵⁵⁾。Immobiline DryStrip (GE Healthcare) を膨潤後、核抽出液を等電点電気泳動した。SDS buffer [25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 0.55% DTT, 0.0025% BPB] で泳動後の DryStrip を 30 分振盪後、SDS-PAGE を行った。泳動後のゲルを SYPRO Ruby

(Lonza Rockland Inc. Rockland, ME, USA) で染色し、スポットをゲルから切り出し、マイクロ遠心管に移した。質量分析のための試料調製は、製造業者の指示に従って行った。ペプチドを nano-UHPLC (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) に注入した。質量分析は、ナノ ESI 源を備えた maXis-4G-CPR 質量分析計 (Bruker Daltonics) で実行した。L カラム ODS (0.1 × 150 mm、粒子サイズ 3 μm、Ceri) を使用し、その前に Magic C18AQ UHPLC NanoTrap カラム (粒子サイズ 5 μm、細孔径 200 Å) を使用した。50 分かけて 10% から 35% のアセトニトリル勾配を使用して、ペプチドをカラムから溶出した。溶出したペプチドを分光計に直接エレクトロスプレーし、MS/MS スペクトルをデータ依存モードで取得した。

8. 統計解析

結果は各群の平均 ± 標準偏差 (SD) を表す。データ解析には Prism 6 を使用した。データの統計的有意性は、student の *t* 検定または Dunnett's の多重比較検定によって評価された。有意差の検定は、対応のない *t* 検定により解析した。危険率 5% 未満 ($*p < 0.05$)、1% 未満 ($**p < 0.01$) 及び 0.1% 未満 ($***p < 0.001$) を有意差ありとみなした。

謝辞

本研究の遂行にあたり、御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました星薬科大学薬学部 衛生化学研究室 高橋 典子 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご協力を頂きました星薬科大学 薬学部 衛生化学研究室 今井 正彦 講師に深く感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、ご協力を頂きました星薬科大学 薬学部 衛生化学研究室 山崎 正博 准教授に感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、ご指導、ご協力を頂きました星薬科大学 薬学部 衛生化学研究室 長谷川 晋也 講師に感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり貴重なご助言とご指導を賜りました、星薬科大学 薬学部 生化学研究室 東 伸昭 教授、分子薬剤学研究室 服部 喜之 教授に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究に対し御協力頂きました星薬科大学 薬学部 衛生化学研究室内の諸氏に御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Blalock, J. E. & Gifford, G. E.: Retinoic acid (vitamin A acid) induced transcriptional control of interferon production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5382–5386 (1977).
- 2) Hemmi, H. & Breitman, T. R.: Combinations of recombinant human interferons and retinoic acid synergistically induce differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Blood* **69**, 501–507 (1987).
- 3) Trechsel, U., Evequoz, V. & Fleisch, H.: Stimulation of interleukin 1 and 3 production by retinoic acid in vitro. *The Biochemical journal* **230**, 339–344 (1985).
- 4) Takahashi, N.: Inhibitory Effects of Vitamin A and Its Derivatives on Cancer Cell Growth Not Mediated by Retinoic Acid Receptors. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **45**, 1213–1224 (2022).
- 5) Takahashi, N., Saito, D., Hasegawa, S., Yamasaki, M. & Imai, M.: Vitamin A in health care: Suppression of growth and induction of differentiation in cancer cells by vitamin A and its derivatives and their mechanisms of action. *Pharmacology and Therapeutics* **230**, (2022).
- 6) Kiser, P. D. & Palczewski, K.: Pathways and disease-causing alterations in visual chromophore production for vertebrate vision. *Journal of Biological Chemistry* **296**, 100072 (2021).
- 7) Jalian, H. R. *et al.*: All-Trans Retinoic Acid Shifts Propionibacterium acnes-Induced Matrix Degradation Expression Profile toward Matrix Preservation in Human Monocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **128**, 2777–2782 (2008).
- 8) Jimenez, J. J., Chale, R. S., Abad, A. C. & Schally, A. V.: Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature. *Oncotarget* **11**, 992 (2020).
- 9) Grignani, F. *et al.*: The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α

- fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* **74**, 423–431 (1993).
- 10) Mantha, S., Tallman, M. S., Devlin, S. M. & Soff, G. A.: Predictive factors of fatal bleeding in acute promyelocytic leukemia. *Thrombosis Research* **164**, S98–S102 (2018).
 - 11) Wang, Z.-Y. & Chen, Z.: Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* **111**, 2505–2515 (2008).
 - 12) Breitman, T. R., Selonick, S. E. & Collins, S. J.: Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 2936 (1980).
 - 13) Huang, M. *et al.*: Use of All-Trans Retinoic Acid in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* **72**, 567–572 (1988).
 - 14) Degos, L. & Wang, Z. Y.: All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene 2001 20:49* **20**, 7140–7145 (2001).
 - 15) Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. & Evans, R. M.: Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature 1987 330:6149* **330**, 624–629 (1987).
 - 16) Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. & Chambon, P.: A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature 1987 330:6147* **330**, 444–450 (1987).
 - 17) Chambon, P.: A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **10**, 940–954 (1996).
 - 18) Grignani, F. *et al.*: Fusion proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature 1998 391:6669* **391**, 815–818 (1998).
 - 19) Takahashi, N. & Breitman, T. R.: Retinoic Acid Acylation (Retinoylation) of a Nuclear Protein in the Human Acute Myeloid Leukemia Cell Line HL60. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 5159–5163 (1989).

- 20) Wada, M., Fukui, T., Kubo, Y. & Takahashi, N.: Formation of Retinoyl-CoA in Rat Tissues. *The Journal of Biochemistry* **130**, 457–463 (2001).
- 21) Kubo, Y., Wada, M., Ohba, T. & Takahashi, N.: Formation of Retinoylated Proteins from Retinoyl-CoA in Rat Tissues. *The Journal of Biochemistry* **138**, 493–500 (2005).
- 22) Takahashi, N. & Breitman, T. R.: Retinoylation of HL-60 proteins. Comparison to labeling by palmitic and myristic acids. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 19158–19162 (1990).
- 23) Kubo, Y., Ohba, T. & Takahashi, N.: Proteins in Human Myeloid Leukemia Cell Line HL60 Reacting with Retinoic Acid Monoclonal Antibodies. *The Journal of Biochemistry* **144**, 349–355 (2008).
- 24) Takahashi, N., Liapi, C., Anderson, W. B. & Breitman, T. R.: Retinoylation of the cAMP-binding regulatory subunits of type I and type II cAMP-dependent protein kinases in HL60 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **290**, 293–302 (1991).
- 25) Nguyen, C. H., Grandits, A. M., Purton, L. E., Sill, H. & Wieser, R.: All-trans retinoic acid in non-promyelocytic acute myeloid leukemia: driver lesion dependent effects on leukemic stem cells. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1810402> **19**, 2573–2588 (2020).
- 26) Yilmaz, M., Kantarjian, H. & Ravandi, F.: Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms. *Blood Cancer Journal* **2021 11:6** **11**, 1–9 (2021).
- 27) Küley-Bagheri, Y., Kreuzer, K. A., Monsef, I., Lübbert, M. & Skoetz, N.: Effects of all-trans retinoic acid (ATRA) in addition to chemotherapy for adults with acute myeloid leukaemia (AML) (non-acute promyelocytic leukaemia (non-APL)). *The Cochrane Database of Systematic Reviews* **2018**, (2018).
- 28) Beggs, A. H. *et al.*: Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 9281–9288 (1992).

- 29) Honda, K. *et al.*: Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *The Journal of cell biology* **140**, 1383–1393 (1998).
- 30) Honda, K.: The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell and Bioscience* **5**, 41 (2015).
- 31) Feng, D., DuMontier, C. & Pollak, M. R.: The role of alpha-actinin-4 in human kidney disease. *Cell and Bioscience* **5**, 1–7 (2015).
- 32) Yamamoto, S. *et al.*: Actinin-4 expression in ovarian cancer: a novel prognostic indicator independent of clinical stage and histological type. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **20**, 1278–1285 (2007).
- 33) Khurana, S., Chakraborty, S., Cheng, X., Su, Y. T. & Kao, H. Y.: The Actin-binding Protein, Actinin Alpha 4 (ACTN4), Is a Nuclear Receptor Coactivator that Promotes Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 1850 (2011).
- 34) Honda, K. *et al.*: Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. *Oncogene 2004 23:30* **23**, 5257–5262 (2004).
- 35) Yu, H. *et al.*: alpha-Actinin4 nuclear translocation mediates gonadotropin-releasing hormone stimulation of follicle-stimulating hormone beta-subunit gene transcription in LbetaT2 cells. *FEBS letters* **586**, 1466–1471 (2012).
- 36) Takahashi, N. *et al.*: Retinoylation (covalent modification by retinoic acid) of Rho-GDI β in the human myeloid leukemia cell line HL60 and its functional significance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1861**, 2011–2019 (2016).
- 37) Amm, I., Sommer, T. & Wolf, D. H.: Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**, 182–196 (2014).
- 38) Kumeta, M., Yoshimura, S. H., Harata, M. & Takeyasu, K.: Molecular mechanisms underlying nucleocytoplasmic shuttling of actinin-4. *Journal of Cell Science* **123**, 1020–1030 (2010).

- 39) Aksenova, V. *et al.*: Actin-binding protein alpha-actinin 4 (ACTN4) is a transcriptional co-activator of RelA/p65 sub-unit of NF-kB. *Oncotarget* **4**, 362–372 (2013).
- 40) Chen, T. C., Hinton, D. R., Zidovetzki, R. & Hofman, F. M.: Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **78**, 165–174 (1998).
- 41) Breitman, T. R., Chen, Z. X. & Takahashi, N.: Potential applications of cytodifferentiation therapy in hematologic malignancies. *Seminars in Hematology* **31**, 18–25 (1994).
- 42) Taylor, S. S. *et al.*: Dynamics of signaling by PKA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1754**, 25–37 (2005).
- 43) Herberg, F. W., Maleszka, A., Eide, T., Vossebein, L. & Tasken, K.: Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *Journal of Molecular Biology* **298**, 329–339 (2000).
- 44) Lu, J. *et al.*: AKAP95-mediated nuclear anchoring of PKA mediates cortisol-induced PTGS2 expression in human amnion fibroblasts. *Science Signaling* **10**, (2017).
- 45) Sakai, A. *et al.*: Protein kinase A activation by retinoic acid in the nuclei of HL60 cells. *Biochimica et biophysica acta. General subjects* **1861**, 276–285 (2017).
- 46) Nguyen, E. *et al.*: Activation of Both Protein Kinase A (PKA) Type I and PKA Type II Isozymes Is Required for Retinoid-Induced Maturation of Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *Molecular Pharmacology* **83**, 1057–1065 (2013).
- 47) Aksaas, A. K., Eikvar, S., Akusjärvi, G., Skålhegg, B. S. & Kvissel, A. K.: Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation of Serine 119 in the Proto-Oncogenic Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 1 Modulates Its Activity as a Splicing Enhancer Protein. *Genes and Cancer* **2**, 841–851 (2011).

- 48) Gautrey, H. L. & Tyson-Capper, A. J.: Regulation of Mcl-1 by SRSF1 and SRSF5 in Cancer Cells. *PLoS ONE* **7**, (2012).
- 49) Bae, J., Leo, C. P., Sheau Yu Hsu & Hsueh, A. J. W.: MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 25255–25261 (2000).
- 50) Wong, W. & Scott, J. D.: AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004 5:12 **5**, 959–970 (2004).
- 51) Madadi, Z., Akbari-Birgani, S., Monfared, P. D. & Mohammadi, S.: The non-apoptotic role of caspase-9 promotes differentiation in leukemic cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1866**, 118524 (2019).
- 52) Morciano, G. *et al.*: Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. *Molecular Biology of the Cell* **27**, 20 (2016).
- 53) Pei, S. *et al.*: AMPK/FIS1-mediated mitophagy is required for self-renewal of human AML stem cells. *Cell stem cell* **23**, 86 (2018).
- 54) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- 55) O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 4007–4021 (1975).