

# Effects of Protein Phosphatase Inhibitor on Cell Cycle Control of Human Glioma Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8438">http://hdl.handle.net/2297/8438</a>

## ホスファターゼインヒビターの悪性グリオーマの 細胞周期に及ぼす影響

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

小 出 謙 一 郎

(平成5年2月12日受付)

ヒトグリオーマ細胞 U373MG は、プロテインホスファターゼ (protein phosphatase, PPase) 阻害剤であるオカダ酸 (okadaic acid, OA) の投与により特徴的な細胞周期進行を示し、同時に時間および濃度依存性に生細胞数の減少を認めた。高濃度 (500nM) の OA 投与により、S 期早期に同調された細胞では約1時間で、未成熟染色体凝縮 (premature chromosome condensation, PCC) ならびに細胞の円形化などの形態変化が認められた。また、DNA 合成が抑制され、細胞は G1/S 期に停止した。これらの現象は、シクロヘキシミド (cycloheximide, CHX) 存在下においても同様に認められた。また、同時にヒストン H1 キナーゼ (histone H1 kinase, H1K) 活性が上昇し、2時間後まで有意な上昇が続いた後、対照と同じレベルに復帰した。細胞の生存率は24時間後より直ちに減少した。これに対し、低濃度 (20nM) の OA を投与した場合には、対数増殖状態にある細胞は、約70%が G2/M 期に集積し、48~72時間後より生細胞数が減少した。S 期早期に同調された細胞においては、対照と同じタイミングで S 期を進行するが、90%以上の細胞が G2/M 期で停止し、高濃度投与の場合に見られた H1K 活性の上昇は認められなかった。また、OA に対して、カフェインを投与した場合には、PCC は誘導されなかった。OA 投与により、グリオーマの増殖に密接な関与が示唆されている血小板由来増殖因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGF-R) の発現が時間および容量依存性に抑えられた。以上より、グリオーマの増殖に OA 感受性 PPase が強く関与しており、特に、細胞周期進行の制御に蛋白質のリン酸化-脱リン酸化反応が重要な役割を果たしていることが示唆された。

**Key words** glioma, cdc2 kinase, protein phosphatase, okadaic acid, platelet-derived growth factor receptor

細胞内の蛋白質のリン酸化と脱リン酸化反応は、真核細胞における極めて重要な細胞調節機構の1つである<sup>1)</sup>。細胞外からのさまざまな刺激は細胞の特定の受容体で受けとめられ、細胞内で蛋白質のリン酸化-脱リン酸化反応によって増幅、伝達され、細胞の応答となって表現される。リン酸化反応を触媒するのがプロテインキナーゼ (protein kinase, PK) である。一方で、プロテインホスファターゼ (protein phosphatase, PPase) は蛋白質のリン酸化反応を触媒する酵素であり、PK と対峙する関係にある。

PPase は大別すると、セリン/スレオニン残基特異的 PPase (protein serine/threonine phosphatase, PP) とチロシン残基特異的 PPase (protein threonine phosphatase, PTP) に分けられる。PP は、Cohen によって基質特異性、酵素による阻害特性、2価陽イオン要求性などから PP1, PP2A, PP2B, PP2C の4群に分類された<sup>2)</sup>。

オカダ酸 (okadaic acid, OA) は、1981年クロイソ海綿 (Halichondria okadaei) から分離<sup>3)</sup>されたポリエーテル化合物である。OA は 12-O-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) と同程度に強力

な発癌プロモーターであるが、その作用機序<sup>4)</sup>は全く別である。OA は、TPA と同様に細胞内の蛋白質リン酸化を修飾する。しかし、TPA がプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) を直接活性化するのに対し、OA は PKC には作用せず、触媒性サブユニットのアミノ酸配列に類似性の著しい PP2A, PP1, PP2B を、nM~μM の濃度範囲でこの順に阻害する<sup>5,6)</sup>。一方、これらとは全く異なるアミノ酸配列をもつ PP2C には作用しない。阻害様式は非競合型ないし混合型なので、OA は感受性のある酵素の基質結合部位とは別の部位に作用すると考えられている。Takai らは PP2A, PP1 および PP2B の触媒性サブユニットに対して、活性の50%を抑制するために要する OA 濃度 (ID50) がそれぞれ、1nM, 200nM, 5μM 程度の値になること、また、これらの値が基質の種類によらないことを報告した<sup>7)</sup>。以上の性質を利用して、OA は蛋白質の可逆的リン酸化反応の関与する細胞機能調節系の研究において利用されるようになり、PP が種々の細胞内のプロセスに関与していることが明らかにされつつある。

本研究では、OA を用いて、ヒトグリオーマの増殖と細胞周期における PP の役割を検討した。

Abbreviations: CHX, cycloheximide; FCM, flow cytometry; H1K, histone H1 kinase; HU, hydroxyurea; MPF, mitosis-promoting factor; OA, okadaic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PCC, premature chromosome condensation; PDGF-R, platelet-derived growth factor receptor; PI, propidium iodide; PK, protein kinase; PKC, protein kinase C; PP, protein serine/threonine phosphatase; PPase, protein

## 材料および方法

### I. 細胞培養

#### 1. 培養細胞

ヒトグリオーマ細胞株である U373MG を用いた。株化されたヒトグリオーマ細胞はいくつも存在するが、その中でも本研究で使用した U373MG はよく利用されるものの1つである<sup>8-10</sup>。この細胞を、56°Cで30分間処理して非働化した10%牛胎児血清 (GIBCO 社, グランドアイランド, 米国), 100units/ml ペニシリン G (明治製薬, 東京), 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (明治製薬), 0.3 $\mu$ g/ml L-グルタミンを含有する RPMI1-640 培地 (日水製薬, 東京) を用いて, 37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5% の環境下で培養した。すべての実験において, 特に記載のない限り細胞は対数増殖期にあるものを使用した。

#### 2. 細胞の同期

チミジン (和光純薬, 大阪) とヒドロキシン尿素 (hydroxyurea, HU) (Sigma, St. Louis, 米国) による連続阻害により細胞を S 期早期に同調させた。具体的には, まず細胞をトリプシンによりはがし, 60mm の培養皿に 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の細胞を 2.0mM チミジンを含む通常培地にて 20 時間培養した。その後, 血清を含まない通常培地により細胞表面を 3 回洗った後に, 血清を含む通常培地で 10 時間培養した。その後, 2.5mM HU を含む培地に交換し, 15 時間培養し, 細胞を S 期早期に同調させた。

### II. 細胞の増殖能の検討

#### 1. トリパンブルー色素排除法

対数増殖期にある細胞を, スミロン 48 ウェルプレート (住友ベークライト, 東京) に各ウェル 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 細胞/500 $\mu$ l の割合で培養した。最初は通常の培地で 24 時間培養し, 次に各濃度のオキサダ酸 (和光純薬) を含む培地に交換し, 24 時間毎にトリパンブルーで染色し, 生細胞の数を算定し, 増殖曲線を作成した。

#### 2. 軟寒天中のコロニー形成

直径 60mm のディッシュに上記と同じ組成を持つ 0.5% の寒天培地を加え固くさせた。0.3% の寒天を含む培地中に細胞を浮遊させ, 各濃度の OA を加え, 各ディッシュに細胞が 100 個になるように重層し, 37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5% の環境下で培養した。2 週間後, 形成されたコロニー数を算定した。

### III. 細胞周期の解析

細胞を Taylor の方法<sup>11</sup>に従い, リボヌクレアーゼ (Sigma) にて処理後, プロピディウムアイオダイド (propidium iodide, PI) (Sigma) にて DNA を染色し, フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) EPICS-CS システム (Coulter Electronics Inc., 米国) を用いて, DNA ヒストグラムを作成し, 細胞周期進行を検討した。

### IV. 細胞の形態変化の検討

#### 1. トリジンブルー染色

細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて 2 回洗い, 付着している細胞をトリプシンで培養皿からはがした後, 培養液を加え細胞浮遊液とし, 4°C, 400g で 10 分間遠心し, 細胞をペレットとして回収した。上清を捨て, ペレットを 3% グルタルアルデヒド/カコジール酸緩衝液で

24 時間以上前固定した。このペレットを 10% 蔗糖液の中で一晩置換した後, カコジール酸緩衝液に 2% 四酸化オスミウムを加えた固定液で 2 時間, 後固定を行い, エタノール系列で脱水しエポンアラールダイトに包埋した。マイクロトームを用いて厚さ 4~6 $\mu$ m の切片を作製し, トリジンブルー染色を施した上で光学顕微鏡にて観察した。

#### 2. ギムザ染色

核の形態変化の有無を簡便に確認するために, 細胞をメタノールで固定後, 塗抹標本を作成, ギムザ染色を施し光学顕微鏡で観察した。

### V. ヒストン H1 キナーゼ (histone H1 kinase, H1K) アッセイ

#### 1. 細胞からの蛋白質の抽出

細胞をラバーポリスマンで培養皿からはがし, 氷冷した Tris-HCl 緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) で 1 回洗浄後, 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞に対して 100 $\mu$ l の緩衝液 (40mM HEPES-水酸化ナトリウム pH 7.5, 60mM 2-グリセロホスフェイト, 20mM p-ニトロフェニルホスフェイト, 0.5mM オルトバナジン酸ナトリウム, 250mM 塩化ナトリウム, 15mM 塩化マグネシウム, 1% トリトン X-100, 10 $\mu$ g/ml アプロチニン, 10 $\mu$ g/ml ロイペプチン, 10 $\mu$ g/ml ペプスタチン, 10 $\mu$ g/ml アンチパイニン, 40 $\mu$ g/ml フッ化フェニルメチルスルホニル) を加えた。この緩衝液中のプロテアーゼインヒビターはすべて和光純薬の製品を用いた。水中に 10 分間静置し, 12,000g で 15 分間, -2°C で遠心し, 上清の蛋白質量をバイオーラッド蛋白質定量キット (Bio-Rad, Richmond, 米国) を用いて測定した。

#### 2. H1K アッセイ

H1K 活性は以下のように判定した。15 $\mu$ g 蛋白質を含む上記の粗抽出液に次の組成の緩衝液を加え 40 $\mu$ l とした。20mM HEPES-水酸化ナトリウム pH 7.5, 15mM エチレンジグリコールビス (2-アミノエチルエーテル) 4 酢酸, 20mM 塩化マグネシウム, 1mM ジチオスレイトール, 500nM A-キナーゼインヒビトリペプチド (Sigma), 20 $\mu$ g ヒストン III-S 型 (Sigma)。反応は 15 $\mu$ Ci<sup>32</sup>P-ATP (10mCi/ml, ~3000Ci/mmol, アマシャム・ジャパン, 東京) を含む 50 $\mu$ M ATP の添加により開始し, 20 分間 30°C 下に置き, 3 $\times$ ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecylsulfate, SDS) 電気泳動サンプル緩衝液 20 $\mu$ l を加えて反応を停止した後 3 分間沸騰水浴した。このサンプルを用い, Laemmli の方法<sup>12</sup>に従い, 10~20% のグラディエントゲルにて SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) を行い, 蛋白質を分離した。ゲルは 7% 酢酸, 10% メタノールにて 10 分間 2 回固定し, 水洗乾燥した後, オートラジオグラフィを施行した。

### VI. 血小板由来増殖因子受容体 (platelet-derived growth factor, PDGF-R) 発現量の検討

PDGF-R の発現量を EPICS CS システムにて検討した。細胞をプロテアーゼを含まない冷 PBS 中でビベッティングにてはがし, マウス抗ヒト PDGF-R $\alpha$  サブユニット抗体 (Genzyme, Cambridge, 米国) と水中にて 30 分間反応させた。PBS にて 2 回洗浄後, 蛍光イソシアネート標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン

phosphatase; PTP, protein tyrosine phosphatase; SDS, sodium dodecylsulfate; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TBS, Tris-buffered saline; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate;

ン抗体 (DAKO, Glostrup, デンマーク) と同様に反応させ、PBS で3回洗浄し EPICS CS システムにより解析した。

### 成 績

#### I. U373MG の増殖能に及ぼす OA の影響

OA 投与時の細胞の増殖能に及ぼす影響をトリパンブルー色素排除法および軟寒天培地中でのコロニー形成法を用いて検討した (図1)。トリパンブルー色素排除法による生細胞数の算定では、2nM 以下では、OA 投与後4日目まで、ほとんど増殖能には影響を及ぼさなかった。しかし10nM 以上になると細胞は直後よりほとんど増えず、生細胞数は時間および濃度依存性に減少した。ただ10~20nM の場合、投与後72時間までトリパンブルー色素排除法による生細胞数はほとんど変化せず、72~96時間後より生細胞数が減少した。これに対し、100nM 以上では投与24時間後より早期に生細胞数は減少した (図1-A)。

軟寒天培地中の細胞の増殖は、OA 2nM 以下では対照と比較して、形成されるコロニー数に変化は認められなかった。しかしそれ以上になると容量依存性にコロニー形成能が抑制され、10nM 以上ではコロニー形成は全く認められなかった (図1-B)。

OA 投与時の細胞の形態変化を、位相差顕微鏡で観察したところ、OA 500nM 投与の場合、1時間ではほとんどの細胞が細胞分裂時のように円形化し始め、3時間後には、完全に細胞は円

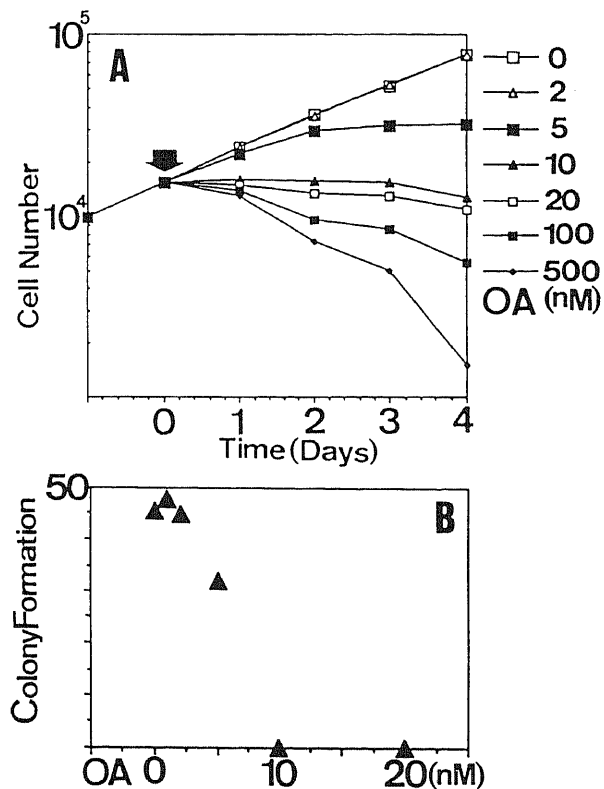


Fig. 1. Effects of OA (2-500 nM) on the growth of U373 MG cells. OA was added at day 0 (arrow). (A) Viable cell number was counted by trypan blue dye exclusion. Cell growth was inhibited by adding OA in a dose-and time-dependent manner. (B) Colony formation in soft agar. Colony formation after adding OA at the concentration of higher than 10 nM was completely inhibited. The data indicate the means of triplicate experiments, with experimental errors (SD) being less than 5%.

形化し、一部は浮遊状態となった。これに対し OA 20nM を投与した場合は、6時間後の時点でもほとんど細胞の形態に変化は見られなかった (図2)。

#### II. 低濃度 (20nM) の OA による細胞周期に及ぼす影響

OA の細胞周期に及ぼす影響を低濃度 (20nM) および、高濃度 (500nM) 投与の場合に分けて検討した (図3, 4, 5)。

対数増殖期の細胞に OA 20nM を投与した場合、12時間後よりS期およびG2/M期の割合が増加し、24時間経過すると、G2/M期への細胞の集積とS期の細胞の減少を認めた。36時間後には、S期の細胞の割合は更に減少した。36時間以降は、細胞周期に大きな変化は認められなかった (図3)。

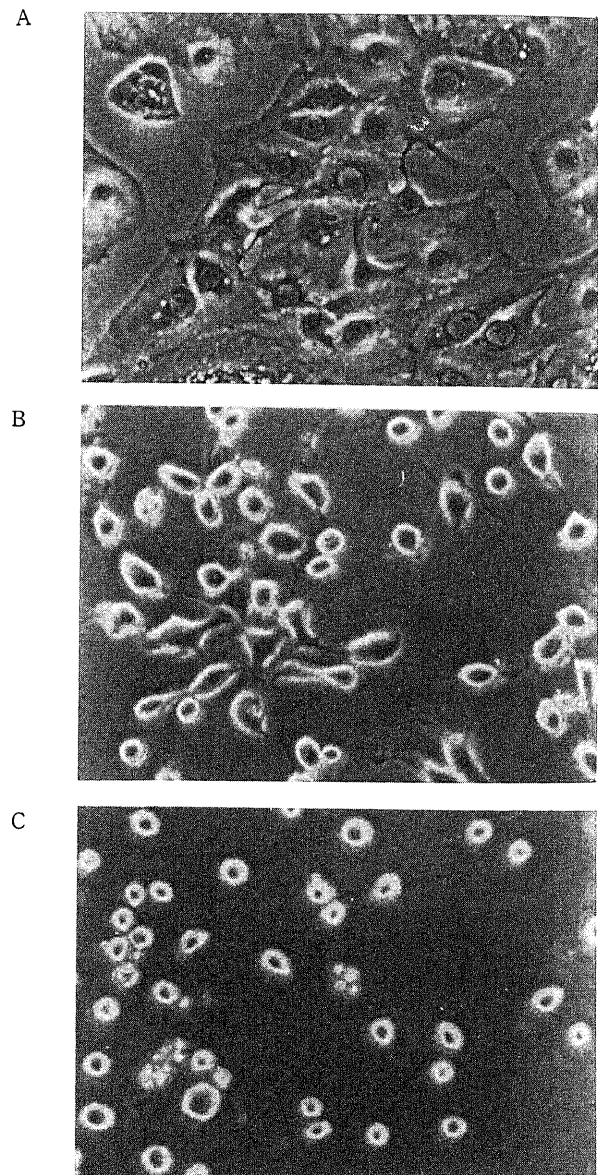


Fig. 2. Phase-contrast micrographs of early S phase-synchronized U373MG cells treated with high concentration of OA. (A) Cells at early S phase. (B) At 1 hr after adding 500 nM of OA, most of cells were round-shaped as if in mitosis. (C) At 3 hr after adding 500 nM of OA, all cells were completely round and floating. Similar results were obtained when exponentially growing cells were incubated with high concentration of OA.

更に、S期早期に同調した細胞を用い細胞周期の検討を行った。HUによるDNA合成阻害を開放すると、細胞は同調して細胞周期を進行した。OA 20nMを投与した場合、対照と比較して、S期の進行に遅れは認められず、正常と同じタイミ

ングでG2/M期に移行した。しかし対照の細胞がG1期に移行した後も、OA 20nMで処理した細胞は90%以上の細胞がG2/M期に停止し、48時間後も同様にG2/M期に停止したままであった(図4)。

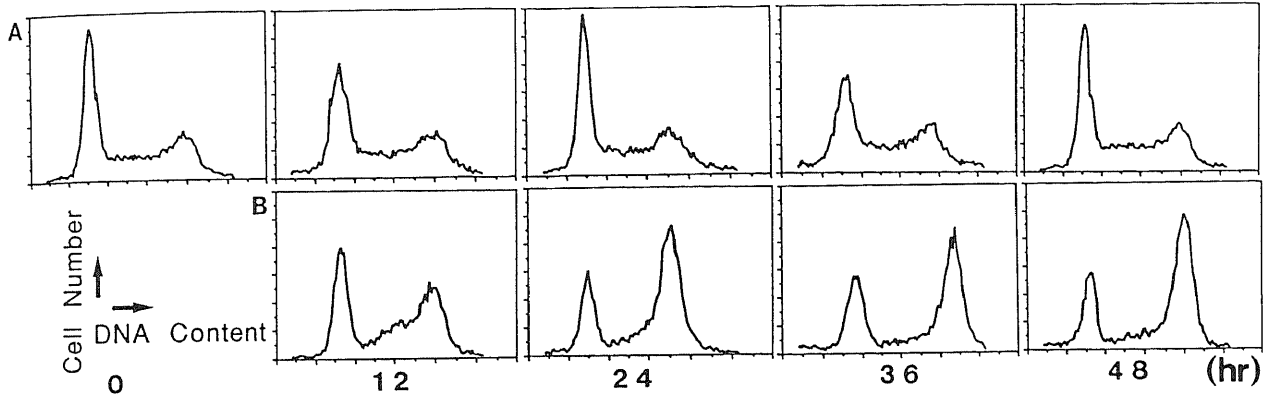


Fig. 3. Flow cytometric analysis of asynchronous U373MG cells. Exponentially growing cells were incubated with OA (20 nM) for indicated time. Cells were harvested by trypsinization and stained with PI. Stained samples were analyzed with EPICS CS system. (A) Non-treated control. (B) OA-treated. After exposure for 12 hr, OA-treated cells accumulated in S and G2/M phases. After exposure for 24 hr, more cells accumulated in G2/M phases, but the content in S phase decreased. There was no significant change in the profile from 36 hr to 48 hr.

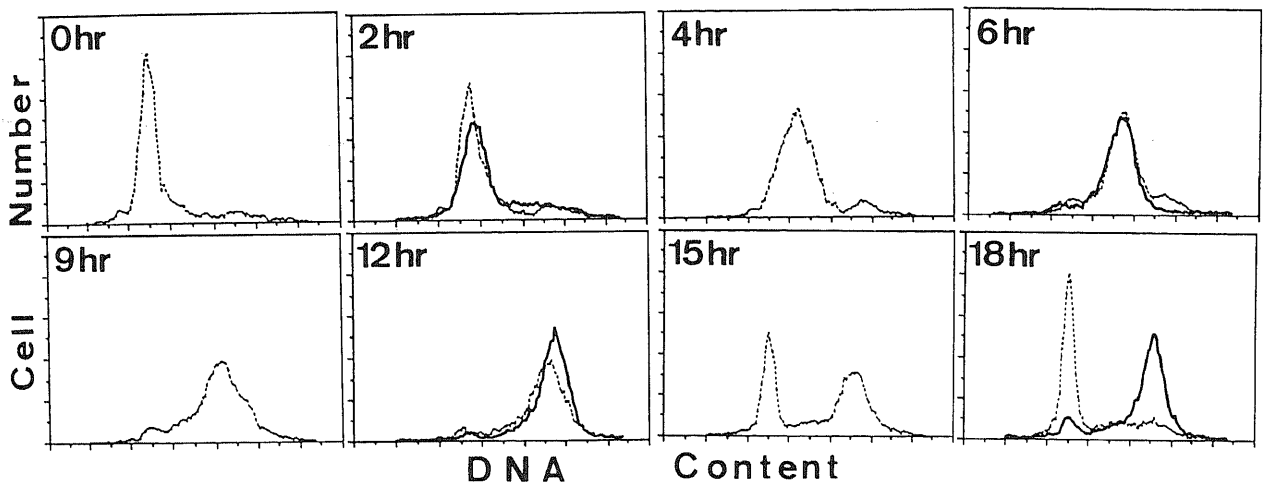


Fig. 4. Flow cytometric analysis of early S phase-synchronized U373MG cells. These cells were synchronized in early S phase with sequential thymidine and HU block. HU was deprived from culture medium at first. The solid line indicates the cells incubated with 20 nM of OA and the dotted line indicates non-treated control cells. Then, the cells were analyzed as in Fig. 3. OA-treated cells entered G2/M phases with normal timing, but they were arrested at G2/M phases.

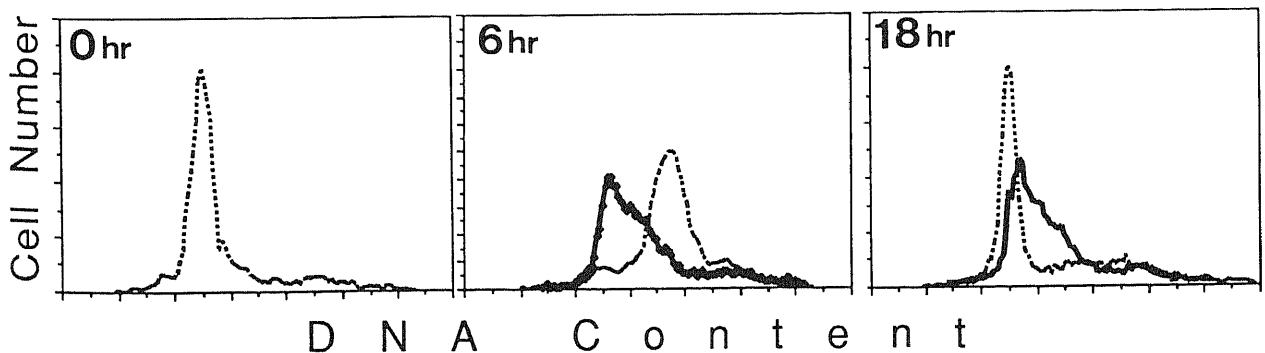


Fig. 5. Flow cytometric analysis of early S phase-synchronized U373MG cells. The cells were synchronized and analyzed as in Fig. 4. The solid line indicates the cells incubated with 500 nM of OA and the dotted line indicates non-treated control cells. OA-treated cells moved for several hours in S and then they were arrested at G1/S phases.

### Ⅲ. 高濃度 (500nM) の OA の細胞周期に及ぼす影響

OA 500nM 投与にて、対数増殖期にある細胞は最高でも12時間前後までは細胞周期を進行したが、その後は全く進行が停止した。S 期早期に同調された細胞も、OA 500nM 投与にて同様に、短時間S 期を進行した後、停止した (図 5)。

### Ⅳ. 細胞の形態変化

既に述べたように、OA 500nM 投与にて、1 時間以内に細胞

は円形化し始める (図 2)。細胞をS 期早期に同調し、刺激3 時間後の核の形態を観察すると、未成熟染色体凝縮 (premature chromosome condensation, PCC<sup>19</sup>) の像を呈する。核染色体は凝縮し、核膜が不明瞭になり、一部の細胞では、染色体は散らばっているように見えた (図6-B)。これに対し、OA 20nM、カフェイン 5mM では、数時間内には PCC の誘導は認められなかった。また、OA 500nM を投与した場合、シクロヘキミド

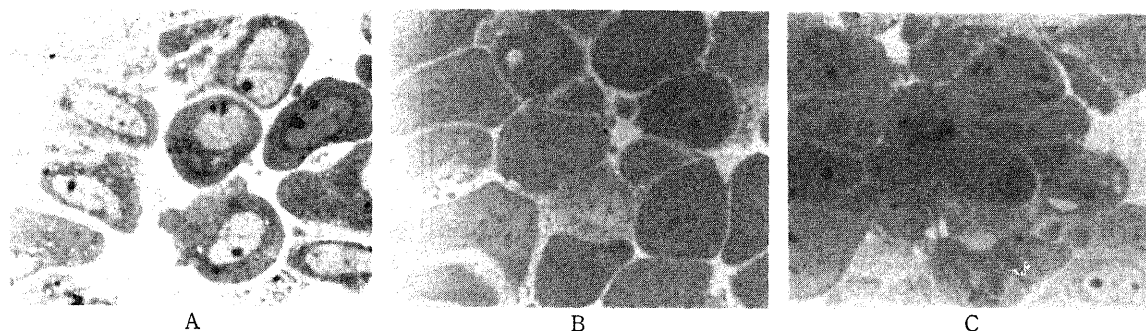


Fig. 6. Light micrographs of cross sections of OA-treated U373MG cells showing mitotic figures. These cells were synchronized in early S phase with sequential thymidine and HU block. (A) Control. (B) The cells were incubated with 500 nM of OA for 3 hr. The chromosomes were condensed and pulverized. Nuclear membranes were not clear. (C) The cells were incubated with 20 nM of OA for 24 hr. The chromosomes were randomly placed in a different manner from those in (B), some what similar to that observed in prometaphase of M phase.

Table 1. PCC induction by OA with or without CHX

	CHX( $\mu$ g/ml)	PCC
OA 500nM	0	+
	10	+
OA 20nM	0	-
	10	-
Caffeine 5mM	0	-
	10	-

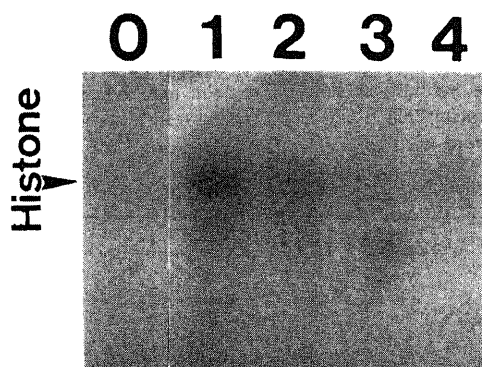


Fig. 7. Histone H1 kinase activity of crude extracts derived from U373MG cells at early S phase after incubation with 500 nM of OA. The phosphorylated histones were analysed by SDS-PAGE and autoradiography. Only regions of autoradiograms corresponding to histone H1 are shown. Lane 0, non-treated control; Lane 1-4, the cells treated with 500 nM of OA for 1, 2, 3 and 4 hr, respectively. Increased H1K activity was detected as phosphorylated histones only at 1-2 hr, then returned to the control level at 3 hr.

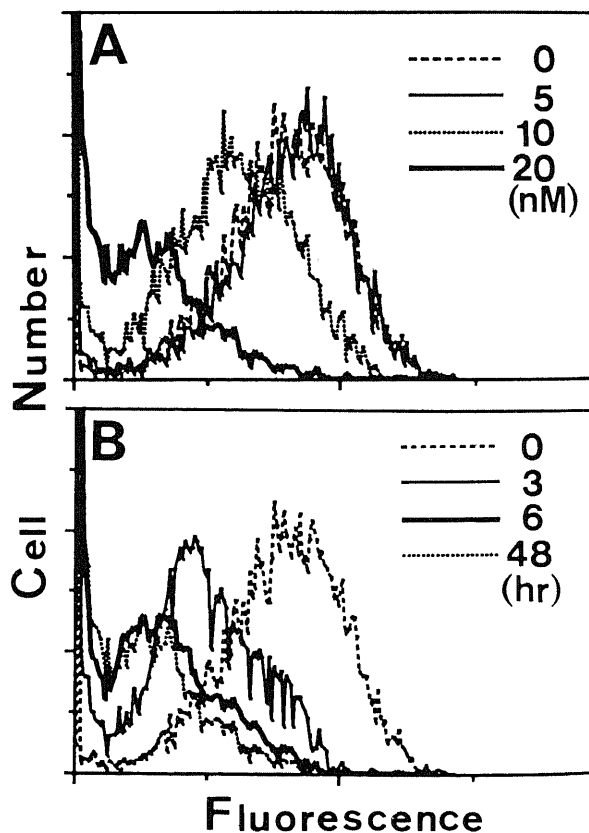


Fig. 8. Single-color histograms displaying green fluorescence intensity of U373MG cells stained with anti-PDGF-R  $\alpha$  subunit monoclonal antibody. (A) Dose-dependent down regulation of PDGF-R in U373MG cells. (B) Time-dependent down regulation of PDGF-R in cells treated with 20 nM of OA. PDGF-R were strongly decreased even within 6 hr.

(cycloheximide, CHX) 存在下でも PCC が誘導された (表 1). これにより, PCC の誘導が翻訳後調節であることが示唆された.

S 期早期に同調された細胞は, OA 20nM 投与にて G2/M 期で停止する. G2/M 期の中のどの位置で停止しているかを知るために, 24時間後の細胞の形態を観察した. 多くの細胞の核中には凝縮した染色体がばらばらに存在し, M 期の前中期の形態と類似していた (図 6-C).

#### V. H1K アッセイ

cdc2 キナーゼの H1K 活性は M 期の開始時に突然上昇する. OA 投与による H1K 活性の変化を調べるために, S 期早期に同調した上で, OA 500nM を投与した細胞の粗抽出物を用いると, 1 時間後よりヒストンのリン酸化が認められ, 2 時間後まで続いた (図 7). これに対し, OA 20nM, カフェイン 5mM 投与では H1K 活性の上昇は投与 4 時間後まで認められなかった.

#### VI. PDGF-R の発現変化

対数増殖期にある細胞に OA (5~20nM) を投与したところ, 48 時間後に容量依存性に PDGF-R の発現の減少を認めた (図 8-A). また, OA 20nM を投与し, 異なる作用時間にて PDGF-R の発現量を検討したところ, 時間依存性に発現の減少を認めた. OA 20nM 投与の場合, 6 時間後には発現が強く抑制された (図 8-B).

### 考 察

今回の実験成績より OA はヒトグリオーマ細胞の増殖を細胞周期依存性に抑制することが判った. OA の効果は容量および時間依存性であり, 低濃度 (20nM) の場合, 細胞は主に G2/M 期に集積し, 投与 72 時間後まで細胞の生存はよく保たれていた. これに対し, 高濃度の OA (500nM) を投与した場合, 細胞は 1 時間以内に形態に変化をきたし, S 期早期に同調された場合, DNA 合成が強く抑制され, 3 時間以内に多くの細胞が PCC を呈した. 生存する細胞も投与 24 時間後より著しく減少していった.

近年, 有糸分裂の開始が PK と PPase のネットワークにより制御されていることが次第に明らかにされつつある. 真核細胞の M 期は, M 期誘導因子 (mitosis-promoting factor, MPF<sup>46</sup>) という蛋白複合体の活性化により始まり, MPF 活性は複合体中の一つである cdc2 キナーゼのセリン/スレオニンキナーゼ活性そのものにある<sup>17-21</sup>. cdc2 キナーゼの活性化のためには, 複合体を形成する別の一つの蛋白サイクリン B の存在<sup>17,22-24</sup> だけでなく, cdc2 キナーゼの少なくとも 3ヶ所ある特定部位でのリン酸化・脱リン酸化反応が複合体形成後に起こることが重要であると考えられている<sup>19-21,25-27</sup>. 具体的には, ATP 結合部位である N 末端より 15 番目のチロシン残基のリン酸化によって, cdc2 キナーゼのキナーゼ活性が失われる<sup>14,28-30</sup>, wee 1 や mik 1 などの PK は cdc2 キナーゼのチロシン残基をリン酸化することによってキナーゼ活性を抑える<sup>31-34</sup>. これに対し, cdc25 蛋白が, cdc2 キナーゼ特異的な PTP として, これらのチロシンリン酸化に拮抗し, cdc2 キナーゼを直接活性化し M 期の開始に関与すると報告された<sup>35-41</sup>. また, この他に最終的な cdc2 キナーゼの活性化にはスレオニンのリン酸化も関与しているらしい<sup>42</sup>. 本研究において, 高濃度の OA により cdc2 キナーゼが活性化されることがわかったが, この結果は, アフリカツメガエルの無細胞系<sup>43,44</sup>, ヒトの卵母細胞<sup>45</sup>, BHK21<sup>46</sup>,

U937<sup>47</sup> において報告された結果に一致する. しかし, どのようにして cdc2 キナーゼを活性化するのかという点に関しては不明である. 最近になって, Kumagai と Dunphy は, OA を間期のツメガエルの無細胞系に加えると cdc25 蛋白質の過リン酸化により, cdc2 キナーゼ特異的な PTP 活性を引き起こし, M 期への進行を促すと報告した<sup>39</sup>. また, Lee らは, OA を用い, アフリカツメガエル未成熟卵母細胞の pre-MPF の転写後抑制物質として同定された INH が PP2A であることを証明した<sup>42</sup>. このように, 蛋白質のリン酸化・脱リン酸化反応が cdc2 キナーゼの活性化に密接に関与している.

PCC という現象は, 簡単に言えば, 有糸分裂が DNA の複製完了前に起きた場合の核染色体の形態であり, Rao と Johnson が細胞融合を用いた実験により初めて報告した<sup>19,48</sup>. 正常な細胞では, M 期の開始は S 期の完了に依存している. つまり, DNA の複製が完了していなかったり, DNA に損傷があるような場合は, 有糸分裂は決して起こることはない<sup>49-52</sup>. 彼らは, HeLa 細胞を用い, M 期と間期である G1, S, G2 期の細胞とをセンダイウイルスにより融合し, 多核細胞を作った. すると, 間期の細胞核に PCC, つまり早熟な有糸分裂像が誘導されることを見出した<sup>19,48</sup>. その後, Nishimoto らは非許容温度にて PCC を呈する BHK 細胞の温度感受性株である ts BN-2 を分離した<sup>53</sup>. この変異株では細胞を S 期早期に同調後, 温度を非許容温度にまで引き上げると DNA 合成が約 2 時間続き, DNA 複製が約 1/2 程進行したところで停止し, PCC が誘導される. ts BN-2 変異を相補するヒト遺伝子として RCC1 遺伝子が分離され, 有糸分裂に必要な一群の遺伝子の転写活性を調節していることが判った<sup>54-56</sup>. さらに, Schlegel と Pardee は BHK 細胞を S 期の早期に同調した後, カフェインを投与すると, 細胞は DNA 合成が完了する前に有糸分裂に入り, PCC が誘導されると報告した<sup>57</sup>. その後, カフェインに加え, OA が S 期早期に同調された BHK21 細胞に対し PCC を引き起こし, それが MPF すなわち cdc2 キナーゼの活性化によると報告された<sup>46</sup>. この報告は本研究の結果に一致する. 本研究においては, S 期早期に同調されたグリオーマ細胞において, 高濃度 (500nM) の OA により 1 時間以内に cdc2 キナーゼの活性化が起こり (図 7), PCC が観察された. しかしこれに対し, 低濃度 (20nM) や OA や 5mM のカフェインでは PCC は起こらなかった (表 1). また, この PCC の誘導はシクロヘキサミド存在下で抑制されなかった (表 1). カフェインによる PCC の誘導が, 種々の細胞間で差異があることについて, Steinmann と Schlegel らはカフェインや OA などによる PCC の誘導が全ての哺乳類細胞に共通の現象ではなく, S 期に同調された時点でハムスターの細胞 (BHK, CHO) では十分なサイクリン B の合成があり, M 期の開始に必要な cdc2 キナーゼ/サイクリン B 複合体が存在するのに対し, ヒトの細胞 (HeLa, FS-2, HT1080) ではその時期に, この複合体がほとんど存在しないために PCC の誘導が起きないとしている<sup>23,58</sup>. しかし, 本研究のように PCC が OA では誘導されるのに対し, カフェインでは誘導されないという結果が, ヒト骨髓白血病細胞である HL-60 や U937 においても報告されている<sup>47</sup>. Osmani らは, *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) の nimA 遺伝子産物を過剰発現させると未熟な有糸分裂を引き起こし, さらに, nimA の機能を負に制御するのが bimE 遺伝子産物であることを示した<sup>59,60</sup>. また, Newport らは, ツメガエルの無細胞系を用いて, 複製前の DNA つまり 1

本鎖 DNA が存在すると、フィートバック機構による翻訳後修飾により MPF を不活化すること、ならびに、DNA の複製終了と有糸分裂の開始のタイミングを調節するシグナルはチロシンのリン酸化反応であり、OA やカフェインは cdc2 キナーゼリン酸化に関与するチロシンキナーゼのリン酸化を更進させ、この酵素活性を不活性化することにより、間接的に cdc2 キナーゼのチロシン残基の脱リン酸化反応を引き起こし、PCC を誘導する可能性を報告した<sup>51,52</sup>。この報告は Devault らの報告と一致する<sup>61</sup>。最近、Enoch らは、分裂酵母において、HU により DNA 複製が阻害されたときに有糸分裂を引き起こす原因となる遺伝子 rad 1, 3, 17, hus 1-5 を単離した<sup>62</sup>。このように、M期の開始には、リン酸化・脱リン酸化反応という巧妙な翻訳後調節による制御機構が存在することが明らかにされてきた。

一方興味深いことに、低濃度の OA の処理では、S 期早期に同調された細胞では、G2/M 期への進行が対照と同じタイミングで起こるが、G2/M 期で停止してしまう。さらに、形態学的結果より、細胞は G2/M 期の無秩序な地点で停止するのではなく、M 期の前中期あたりに停止すると考えられた。Ohkura らは、Schizosaccharomyces pombe (S. pombe) の dis 2 遺伝子が PP1 に相同で、娘染色体の分配に関与していることを dis 2 遺伝子の温度感受性変異株を用いて明らかにした。さらにこの変異株では、本研究での結果と同様に S 期早期から M 期の移行までのタイミングには全く異常がないが、娘染色体が正しく分配されずに、M 期で停止してしまう<sup>63,64</sup>。同様に、A. nidulans の bim G 遺伝子は哺乳類の PP1 に相同な蛋白をコードし、温度感受性変異株 bim G11 は娘染色体の不分配により、M 期の終期に停止する<sup>65</sup>。この他にも、分裂酵母の bws 1 遺伝子<sup>66</sup>、ショウジョウバエの PP1 87B 遺伝子<sup>67</sup>において同様の結果が報告されている。これらの結果より、M 期の終期から完結に PP1 が必要であることが示唆されている。本研究における低濃度の OA 処理による高等真核生物の細胞での結果は、これらの報告と似ている。最近、形態学的に、真菌類だけでなく、高等真核細胞である HeLa 細胞やラット GH<sub>4</sub> 下垂体細胞においても OA にて、染色体の分配異常の形態を示すことが報告された<sup>68-70</sup>。これ以外にもアフリカツメガエルの初期胚における細胞周期<sup>67</sup>、植物 (Tradescantia virginiana) の染色体分配<sup>68</sup>にも PP1 型が関与するという報告がある。最近、Lorca らは、cdc2 キナーゼの N 末端より 161 番目のスレオニン残基の脱リン酸化が cdc2 キナーゼを不活性化し、M 期を完結するのに必要で、少なくともその反応に PP1 が関与していることを報告した<sup>71</sup>。PP1 が本当に有糸分裂の終期に関与するとすれば、細胞内で PP1 の酵素活性を制御しているものに興味を持たれる。既に、PP1 の内因性の阻害剤であるインヒビター 1 とインヒビター 2 が同定されている<sup>11</sup>。Brautigan らは、ラット線維芽細胞のインヒビター 2 は細胞周期により変動し、S 期と M 期にピークがあると報告<sup>72</sup> しており興味深い。

グリオーマの増殖過程には PDGF 系の自律増殖機構の関与が示唆されており<sup>97,98</sup>、特に、PDGF-R $\alpha$  の発現が増殖に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>79</sup>。本研究に用いた U373MG は PDGF-R $\alpha$  を発現し、PDGF A 鎖を分泌するという報告<sup>9</sup> があり、増殖にはこれらの自律増殖機構が働いている可能性がある。本研究において OA を投与したところ、濃度および時間依存性に PDGF-R の発現が抑制された。同様の報告がマウスの線維芽細胞にて観察されている<sup>76</sup>。本研究において、

対数増殖期の細胞に低濃度 OA を投与した時に、30%前後の細胞が G1 期に停止したのは、PDGF-R の発現が数時間でかなり強く抑えられるので (図 8-B)、この受容体発現の低下が関与している可能性もある。OA が PDGF-R の発現を低下させる機構に関しては不明であるが、通常の生理状態では、PDGF の結合後のチロシン残基の自己リン酸化により PDGF-R の発現量は減少する。また、PDGF-R はセリン/スレオニン残基もリン酸化され得る。OA 投与により上皮成長因子受容体の発現低下も同様に報告されており<sup>76</sup>、PDGF-R 自身のリン酸化の亢進により受容体の半減期が短縮している可能性がある。別の可能性としては、PDGF-R 発現の転写レベルや翻訳レベルでの制御がある。過去に、OA が、コラゲナーゼや c-jun ならびに c-fos 遺伝子の発現を転写レベルで制御しているという報告<sup>77,78</sup> や、網状赤血球の溶解液の蛋白質合成を抑制するという報告<sup>79</sup> がある。これらの報告と類似の機構によりグリオーマにおける PDGF-R の発現が制御されているかも知れない。OA による PDGF-R の発現制御については、更に研究の余地がある。

## 結 論

ヒトグリオーマ由来の U373MG を用いて、プロテインホスファターゼインヒビターである OA のおよぼす影響を検討した結果以下の結論を得た。

1. OA 投与により濃度及び時間依存性に増殖が抑制された。
2. 増殖抑制は細胞周期依存性であった。
3. 低濃度 (20nM) OA では、G2/M 期と G1 期に少なくとも 1ヶ所ずつの抑制点があった。
4. 高濃度 (500nM) OA では、DNA 合成が強く抑制され、G1/S 期に細胞の集積が認められた。
5. 高濃度の OA にて 1 時間以内に cdc2 キナーゼの活性化がおり、PCC が誘導された。これに対し、低濃度の OA, カフェインではこの変化はおきなかった。
6. OA 投与により濃度及び時間依存性に PDGF-R の発現が抑えられた。

以上より、グリオーマの増殖過程に OA 感受性 PPase が関与しており、特に細胞周期進行に蛋白質のリン酸化・脱リン酸化反応が重要な役割を果たしていることが判明した。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始、御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚の謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、御協力頂きました金沢大学医学部脳神経外科学教室第一研究室の諸先生各位に感謝致します。

## 文 献

- 1) Cohen, P.: The structure and regulation of protein phosphatases. Annu. Rev. Biochem., 58, 453-508 (1989).
- 2) Hunter, T. & Cooper, J. A.: Protein-tyrosine kinases. Annu. Rev. Biochem., 54, 897-930 (1985).
- 3) Tachibana, K., Scheuer, P. J., Tsujitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y. & Schmitz, F. J.: Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria. J. Am. Chem. Soc., 103, 2469-2471 (1981).



- 4) Cohen, P., Holmes, C. F. B. & Tsukitani, Y.: Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 98-102 (1990).
- 5) Schonthal, A.: Okadaic acid-A valuable new tool for the study of signal transduction and cell cycle regulation? *New Biol.*, **4**, 16-21 (1992).
- 6) Takai, A., Bialojan, C., Troschka, M. & Ruegg, J. C.: Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett.*, **217**, 81-84 (1987).
- 7) Bialojan, C. & Takai, A.: Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases: Specificity and kinetics. *Biochem. J.*, **256**, 283-290 (1988).
- 8) Nister, M., Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Heldin, C. -H. & Westermark, B.: Differential expression of platelet-derived growth factor receptors in human malignant glioma cell lines. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16755-16763 (1991).
- 9) Murphy, P. & Hart, D. A.: Modulation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression in the human U373 glioblastoma/astrocytoma cell line by inflammatory mediators. *Exp. Cell Res.*, **198**, 93-100 (1992).
- 10) Takeda, Y., Chou, K. B., Takeda, J., Sachais, B. S. & Krause, J. E.: Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 1232-1240 (1992).
- 11) Tayler, I. W.: A rapid single step staining technique for DNA analysis by microfluorimetry. *J. Histochem. Biochem.*, **28**, 1021-1024 (1980).
- 12) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 13) Johnson, R. T. & Rao, P. N.: Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*, **226**, 717-722 (1970).
- 14) Morla, A. O., Draetta, G., Beach, D. & Wang, J. Y. J.: Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: Dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell*, **58**, 193-203 (1989).
- 15) Gautier, J., Matsukawa, T., Nurse, P. & Maller, J.: Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34<sup>cdc2</sup> protein kinase during cell cycle. *Nature*, **339**, 626-629 (1989).
- 16) Masui, Y. & Markert, C. L.: Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, **177**, 129-145 (1971).
- 17) Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P. & Maller, J.: Purified maturation-promoting factor contains the product of a *xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*<sup>+</sup>. *Cell*, **54**, 433-439 (1988).
- 18) Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L. & Beach, D.: *cdc2* is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: Evidence for identity with MPF. *Cell*, **55**, 371-378 (1988).
- 19) Draetta, G., Brizuela, L., Moran, B. & Beach, D.: Regulation of the vertebrate cell cycle by the *cdc2* protein kinase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **1**, 195-201 (1988).
- 20) Labbe, J. C., Picard, A., Peaucellier, G., Cavadore, J. C., Nurse, P. & Doree, M.: Purification of MPF from starfish: Identification as the H1 histone kinase p34<sup>cdc2</sup> and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell*, **57**, 253-263 (1989).
- 21) Nurse, P.: Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, **344**, 503-508 (1990).
- 22) Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D. & Newport, J.: The *xenopus* *cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*, **54**, 423-431 (1988).
- 23) Pines, J. & Hunter, T.: Isolation of a human cyclin cDNA: Evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34<sup>cdc2</sup>. *Cell*, **58**, 833-846 (1989).
- 24) Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J. & Beach, D.: *cdc2* protein kinase is complexed with cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*, **56**, 829-838 (1989).
- 25) Simanis, V. & Nurse, P.: The cell cycle control gene *cdc2*<sup>+</sup> of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell*, **45**, 261-268 (1986).
- 26) Lee, M. G., Norbury, C. J., Spurr, N. K. & Nurse, P.: Regulated expression and phosphorylation of a possible mammalian cell-cycle control protein. *Nature*, **333**, 676-679 (1988).
- 27) Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M. & Kirschner, W.: Cyclin activation of p34<sup>cdc2</sup>. *Cell*, **63**, 1013-1024 (1990).
- 28) Dunphy, W. G. & Newport, J. W.: Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *xenopus* *cdc2* protein kinase. *Cell*, **58**, 181-191 (1989).
- 29) Gould, K. L. & Nurse, P.: Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2*<sup>+</sup> protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, **342**, 39-45 (1989).
- 30) Pondaven, P., Meijer, L. & Beach, D.: Activation of M-phase-specific histone H1 kinase by modification of the phosphorylation of its p34<sup>cdc2</sup> and cyclin components. *Genes Dev.*, **4**, 9-17 (1990).
- 31) Russell, P. & Nurse, P.: *cdc25*<sup>+</sup> functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, **45**, 145-153 (1986).
- 32) Parker, L. L., Atherton-Fesser, S., Lee, M. S., Ogg, S., Falk, J. L., Swenson, K. I. & Piwnicka-Worms, H.: Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34<sup>cdc2</sup> in *wee 1*<sup>+</sup> dependent manner. *EMBO J.*, **10**, 1255-1263 (1991).
- 33) Featherstone, C. & Russell, P.: Fission yeast p107<sup>wee 1</sup> mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature*, **349**, 808-811 (1991).
- 34) Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. & Beach, D.: *mik 1* and *wee 1*

- cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*. *Cell*, **64**, 1111-1122 (1991).
- 35) Kumagai, A. & Dunphy, W. G.: The *cdc25* protein controls tyrosine dephosphorylation of the *cdc2* protein in a cell-free system. *Cell*, **64**, 903-914 (1991).
- 36) Dunphy, W. G. & Kumagai, A.: The *cdc25* protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, **67**, 189-196 (1991).
- 37) Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F. & Kirschner, M. W.: *cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates *p34<sup>cdc2</sup>*. *Cell*, **67**, 197-211 (1991).
- 38) Strausfeld, U., Labbe, J. C., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P & Doree, M.: Dephosphorylation and activation of a *p34<sup>cdc2</sup>/cyclin B* complex in vitro by human *CDC25* protein. *Nature*, **351**, 242-245 (1991).
- 39) Kumagai, A. & Dunphy, W. G.: Regulation of *cdc25* protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell*, **70**, 139-151 (1992).
- 40) Jessus, C. & Beach, D.: Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between *cdc25* and *cdc2-cyclinB*. *Cell*, **68**, 323-332 (1992).
- 41) Millar, J. B. & Russell, P.: The *cdc25* M-phase inducer: An unconventional protein phosphatase. *Cell*, **68**, 407-410 (1992).
- 42) Lee, T. H., Solomon, M. J., Mumby, M. C. & Kirschner, M. W.: INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. *Cell*, **64**, 415-423 (1991).
- 43) Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. & Merlevede, W.: Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.*, **245**, 91-94 (1989).
- 44) Felix, M.-A., Cohen, P. & Karsenti, E.: *Cdc2* H1 kinase is negatively regulated by a type 2A phosphatase in the *Xenopus* early embryonic cell cycle: evidence from the effects of okadaic acid. *EMBO J.*, **9**, 675-683 (1990).
- 45) Picard, A., Capony, J. P., Brautigan, D. L. & Doree, M.: Involvement of protein phosphatases 1 and 2A in the control of M phase-promoting factor activity in starfish. *J. Cell. Biol.*, **109**, 3347-3354 (1989).
- 46) Yamashita, K., Yasuda, H., Pines, J., Yasumoto, K., Nishitani, H., Ohtubo, M., Hunter, T., Sugimura, T. & Nishimoto, T.: Okadaic acid, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, activates *cdc2/H1* kinase and transiently induces a premature mitosis-like state in BHK21 cells. *EMBO J.*, **9**, 4331-4338 (1990).
- 47) Ishida, Y., Furukawa, Y., Decaprio, J. A., Saito, M. & Griffin, J. D.: Treatment of myeloid leukemic cells with okadaic acid induces cell cycle arrest at either G1/S or G2/M depending on dose. *J. Cell. Physiol.*, **150**, 484-492 (1992).
- 48) Rao, P. N. & Johnson, R. T.: Mammalian cell fusion: Studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature*, **225**, 159-164 (1970).
- 49) Hartwell, L. H. & Weinert, T. A.: Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**, 629-634 (1989).
- 50) Enoch, T. & Nurse, P.: Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. *Cell*, **60**, 665-673 (1990).
- 51) Dasso, M. & Newport, J. W.: Completion on DNA replication is monitored by a feedback system that controls the initiation of mitosis in vitro: Studies in *Xenopus*. *Cell*, **61**, 811-823 (1990).
- 52) Smythe, C. & Newport, J. W.: Coupling of mitosis to the completion of S phase in *Xenopus* occurs via modulation of the tyrosine kinase that phosphorylates *p34<sup>cdc2</sup>*. *Cell*, **68**, 787-797 (1992).
- 53) Nishimoto, T., Eilen, E. & Basilico, C.: Premature chromosome condensation in a ts DNA-mutant of BHK cells. *Cell*, **15**, 475-483 (1978).
- 54) Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., Murotsu, T., Matsubara, K. & Nishimoto, T.: Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (*RCC1*) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes Dev.*, **1**, 585-593 (1987).
- 55) Ohtsubo, M., Okazaki, H. & Nishimoto, T.: The *RCC1* protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J. Cell Biol.*, **109**, 1389-1397 (1989).
- 56) Uchida, S., Sekiguchi, T., Nishitani, H., Miyauchi, K., Ohtsubo, M. & Nishimoto, T.: Premature chromosome condensation is induced by a point mutation in the hamster *RCC1* gene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 577-584 (1990).
- 57) Schlegel, R. & Pardee, A. B.: Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. *Science*, **232**, 1264-1266 (1986).
- 58) Steinmann, K. E., Belinsky, G. S., Lee, D. & Schlegel, R.: Chemically induced premature mitosis: Differential response in rodent and human cells and the relationship to cyclin B synthesis and *p34<sup>cdc2</sup>/cyclin B* complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6843-6847 (1991).
- 59) Osmani, S. A., Engle, D. B., Doonan, J. H. & Morris, N. R.: Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell*, **52**, 241-251 (1988).
- 60) Osmani, S. A., Pu, R. T. & Morris, N. R.: Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell*, **53**, 237-244 (1988).
- 61) Devault, A., Didier, F., Cavadore, J. -C., Garrigues, A. -M., Labbe, J. -C., Lorca, T., Picard, A., Philippe, M. & Doree, M.: Cyclin A potentiates maturation-promoting factor activation in early *Xenopus* embryo via inhibition of the tyrosine kinase that phosphorylates *CDC2*. *J. Cell Biol.*

118, 1109-1120 (1992).

62) Enoch, T., Carr, A. M. & Nurse, P.: Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes Dev.*, **6**, 2035-2046 (1992).

63) Ohkura, H., Adachi, Y., Kinoshita, N., Niwa, O., Toda, T. & Mitsuhiro, Y.: Cold-sensitive and caffeine-susceptible mutants of the *Shizosaccharomyces pombe* dis genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *EMBO J.*, **7**, 1465-1473 (1988).

64) Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. & Yanagida, M.: The fission yeast *dis2<sup>+</sup>* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative tyrosine protein phosphatases. *Cell*, **57**, 997-1007 (1989).

65) Doonan, J. H. & Morris, N. R.: The *bimG* gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell*, **57**, 987-996 (1989).

66) Booher, R. & Beach, D.: Involvement of a type 1 protein phosphatase encoded by *bwsl<sup>+</sup>* in fission yeast mitotic control. *Cell*, **57**, 1009-1016 (1989).

67) Axton, J. M., Dombrade, V., Cohen, P. T. W. & Glover, D. M.: One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell*, **63**, 33-46 (1990).

68) Ghosh, S. & Paweletz, N.: Okadaic acid inhibits sister chromatid separation in mammalian cells. *Exp. Cell Res.*, **200**, 215-217 (1992).

69) Ghosh, S., Panweletz, N. & Schroeter, D.: Failure of kinetochore development and mitotic spindle formation in okadaic acid-induced premature mitosis in HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, **201**, 535-540 (1992).

70) Dolah, F. M. V. & Ramsdell, J. S.: Okadaic acid inhibits a protein phosphatase activity involved in formation of the mitotic spindle of GH4 rat pituitary cells. *J. Cell. Physiol.*, **152**, 190-198 (1992).

71) Walker, D. H., Depaoli-Roach, A. A. & Maller, J. L.: Multiple roles for protein phosphatase 1 in regulating the *Xenopus* early embryonic cell cycle. *Mol. Biol. Cell*, **3**, 687-698 (1992).

72) Wolniak, S. M. & Larsen, P. M.: Changes in the metaphase transit times and the pattern of sister chromatid separation in stamen hair cells of *Tradescantia* after treatment with protein phosphatase inhibitors. *J. Cell Sci.*, **102**, 691-715 (1992).

73) Lorca, T., Labbe, J. -C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J. -P., Cavadore, J. -C., Le Bouffant, F. & Doree, M.: Dephosphorylation of *cdc2* on threonine 161 is required for *cdc2* kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J.*, **11**, 2381-2390 (1992).

74) Brautigan, D. L., Sunwoo, J., Labbe, J. C., Fernandez, A. & Lamb, N. J.: Cell cycle oscillation of phosphatase inhibitor-2 in rat fibroblast coincident with *p34<sup>cdc2</sup>* restriction. *Nature*, **344**, 74-78 (1990).

75) Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. -H., Westermark, B. & Nister, M.: Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: Expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.*, **52**, 3213-3219 (1992).

76) Dean, N. M., Mordan, L. J., Tse, K., Mooberry, S. L. & Boynton, A. L.: Okadaic acid inhibits PDGF-induced proliferation and decreases PDGF receptor number in C3H/10T1/2 mouse fibroblasts. *Carcinogenesis*, **12**, 665-670 (1991).

77) Kim, S. -J., Lafyatis, R., Kim, K. Y., Angel, P., Fujiki, H., Karin, M., Sporn, M. B. & Roberts, A. B.: Regulation of collagenase gene expression by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Cell Regul.*, **1**, 269-278 (1990).

78) Adunyah, S. E., Unlap, T. M., Franklin, C. C. & Kraft, A. S.: Induction of differentiation and *c-jun* expression in human leukemic cells by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *J. Cell. Physiol.*, **151**, 415-426 (1992).

79) Redpath, N. T. & Proud, C. G.: The tumor promoter okadaic acid inhibits reticulocyte-lysate protein synthesis by increasing the net phosphorylation of elongation factor 2. *Biochem. J.*, **262**, 69-75 (1989).

**Effects of Protein Phosphatase Inhibitor on Cell Cycle Control of Human Glioma Cells** Ken-ichiro Koide, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **102**, 272—282 (1993)

**Key words** glioma, cdc2 kinase, protein phosphatase, okadaic acid, platelet-derived growth factor receptor

**Abstract**

Treatment of human glioma cell line, U373MG with okadaic acid (OA), an inhibitor of protein phosphatases, induced cell cycle arrest in a concentration- and time-dependent manner. Exposure of early S phase-synchronized cells to a high concentration (500nM) of OA induced mitotic-specific events such as roundup of cells and premature chromosome condensation (PCC) within 1 hr. DNA synthesis was inhibited and cell cycle arrest occurred at G1/S phases. These mitotic specific events occurred even in the presence of cycloheximide. Concurrently, cdc2/histone H1 kinase activity rose, but returned to the control level in 3 hr. In contrast to the effects of high concentration of OA, exposure of asynchronous growing cells to low concentration (20nM) of OA increased the cell number in G2/M phases. After exposure for 48 hr, viable cells gradually decreased. Cells synchronized in early S phase entered G2/M phases with normal timing under exposure to low concentration of OA, but were arrested at G2/M. The cdc2 kinase was not activated. Caffeine, in contrast to OA, did not induced PCC in human glioma cells. Platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) is thought to be involved in stimulation of glioma proliferation. Exposure to OA caused the cells to down-regulate PDGF-R in a concentration- and time-dependent manner. These results suggest that glioma proliferation is under the control of OA-sensitive protein phosphatases and that, especially in cell cycle control, PPases and protein kinases play important roles.