

学位論文題名

ラット1型プロテインホスファターゼイソホーム PP1 α
の遺伝子発現における癌性変異とその意義の解析

学位論文内容の要旨

正常細胞が癌化してゆく過程で、多くの遺伝子変異が生じる。これら遺伝子のおおくは細胞増殖を促進する遺伝子や細胞増殖の抑制に関与する遺伝子である。前者を癌遺伝子といい後者を癌抑制遺伝子という。発癌に必要な遺伝子変異のいくつかは、癌遺伝子の活性化および癌抑制遺伝子の失活をもたらす。こうした遺伝子変異の結果、その遺伝子産物の機能は本来のものから逸脱し、これにより正常細胞を癌細胞に至らしめる。ところで癌遺伝子産物の多くはプロテインキナーゼ活性を有し、種々の蛋白をリン酸化し情報を核へ伝え遺伝子発現へと導く。それ故、専らプロテインキナーゼが癌研究の標的とされてきた。しかし我々は、プロテインホスファターゼがプロテインキナーゼと相対峙する反応を触媒することから、本酵素遺伝子が癌抑制遺伝子になり得るという可能性を推定し、ラット肝癌細胞を用いて酵素学および遺伝子レベルで解析を行い、その可能性について検索してきた。本研究では、これまでの酵素学的研究結果を背景にラット肝発癌過程、原発性肝癌、移植性腹水肝癌および再生肝での増殖におけるセリン/スレオニン残基プロテインホスファターゼの意義を解析する目的で、本酵素を分子生物学的立場から解析した。

1. ラット1型プロテインホスファターゼイソホーム PP1 α cDNAの分子クローニング
すでにP.T.W.Cohenらにより報告されているウサギPP1 α cDNAのから一部のオリゴヌクレオチドを合成し、それをプローブにしてラット腎cDNAライブラリーより1型プロテインホスファターゼ触媒サブユニットcDNAを単離した。このcDNAは全長1415 bpからなる。5'側は68bpのGC配列に富む非コーディング領域があり、69番目の開始コドンでコーディング領域が始まり、1060番目の終止コドンでそれが終わり、そしてポリAで終る。こ

の塩基配列はmRNAの特徴をよく備えている。このcDNAのコーディング領域は990 bpからなり、330アミノ酸残基からなる蛋白をコードしていると推定される。これから算出される分子量はウサギ骨格筋から精製されたPP1蛋白のSDS-PAGEから得られる値37 kDaと一致した。このcDNAの塩基配列をウサギPP1 α と比較したところ全体で85%、コーディング領域で88%の相同性をしめしたが、両者のアミノ酸配列は完全に一致した。したがって、このcDNAはラットPP1 α のcDNAと結論され、本酵素のアミノ酸配列が種を越えて保存されていることが明らかとなった。さらにラットPP1 α のアミノ酸配列をラット2A型プロテインホスファターゼイソホームPP2A α およびPP2A β のそれと比較するとそれぞれ49%および50%一致した。したがってこの相同性は、ウサギのみならずラットにおいても保存されていた。

2. ラット肝発癌過程、原発性肝癌、移植性腹水肝癌および再生肝におけるプロテインホスファターゼ、PP1 α 、PP2A α およびPP2C α の遺伝子発現

ラットPP1 α 、PP2A α および2C型イソホームPP2C α のcDNAをプローブにしてSolit-Farberモデルによる実験的肝発癌過程、原発性肝癌、移植性腹水肝癌および再生肝でのmRNAレベルをノザンプロットにより検索した。肝発癌過程において前癌状態である過形成結節でPP1 α 、PP2A α およびPP2C α mRNAレベルは正常肝に比しそれぞれ8, 29および13倍の上昇を認めた。ところが過形成結節を経た後発生した原発性肝癌においてはPP1 α 、PP2A α およびPP2C α のmRNAレベルは正常肝と同程度にまで減少した。同じサンプルにおいて、腫瘍マーカーであるラット胎盤由来のグルタチオン-S-トランスフェラーゼmRNAの高発現が認められたため、この減少は発現の減少であると考えられる。他の2種の原発性肝癌においても前癌状態である過形成結節での発現より明らかに低かった。一方原発性肝癌より悪性な低分化型のラット移植性腹水肝癌においては、PP1 α mRNAレベルが正常肝に比し10倍以上に上昇し、PP2A α mRNAレベルは正常肝よりも減少し、PP2C α mRNAレベルは正常肝と同程度かまたはそれ以下であった。正常増殖過程にあるラット再生肝においてはDNA合成の最盛期にあたる術後24時間でPP1 α 、PP2A α およびPP2C α のmRNAレベルはそれぞれ5, 14および10倍の上昇を認めた。以上より発癌過程および再生肝では、3分子種のmRNAレベルが上昇し原発性肝癌ではそれらすべてが減少し、移植性腹水肝癌ではPP1 α mRNAレベルのみが上昇し、発癌プロモーションお

およびプログレッションの両過程で各分子種の遺伝子発現パターンに差異が認められた。また移植性腹水肝癌でのPP1 α mRNAレベルの高発現から、PP1 α がプログレッション過程で悪性形質の発現の上で重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. ラットPP1 α ジェノミックDNAの解析

プログレッション過程におけるPP1 α mRNAレベルの特異的上昇の分子機構を明らかにする目的でPP1 α ジェノミックDNAを解析した。サザンブロットの結果、プログレッション過程におけるPP1 α の遺伝子増幅および転座は認められず、プログレッション過程におけるPP1 α mRNAレベルの高発現は転写回転の上昇による可能性が強く示唆された。したがって、PP1 α 遺伝子の転写機構を明らかにするために5'上流の分子クローニングをおこなった。ラットジェノミックDNAライブラリーよりPP1 α cDNAライブラリーよりスクリーニングをおこない、5'上流1.1 kbpを単離した。その結果このプロモーター領域には、CAATボックスおよびTATAボックスが存在しないGC配列に富んだハウスキーピング遺伝子であることが明らかとなった。ATG開始コドンを+1とすると-78番にCCGGAAという癌遺伝子産物ets結合配列が、また-97番、-111番、-125番および-146番にGGGGGGというSP1結合配列が存在した。ラットPP2A α のプロモーター領域にもSP1結合配列が存在し、PP1 α と同じ転写因子を共有するにもかかわらず移植性腹水肝癌で遺伝子発現パターンがことなる。今回初めて明らかにされたPP1 α 遺伝子のプロモーター領域に癌遺伝子産物であるets蛋白の結合配列が存在することから、ets蛋白がプログレッション過程におけるPP1 α の転写回転の上昇に重要な役割を果たしていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菊 池 九二三
副 査 教 授 東 市 郎
副 査 教 授 杉 本 和 則
副 査 教 授 西 信 三

学 位 論 文 題 名

ラット 1 型プロテインホスファターゼイソホーム PP1 α の遺伝子発現における癌性変異とその意義の解析

正常細胞が癌化してゆく過程で、多くの遺伝子変異が生じる。これら遺伝子の多くは細胞増殖を促進する遺伝子や細胞増殖の抑制に関与する遺伝子である。前者を癌遺伝子といい、後者を癌抑制遺伝子という。発癌は、癌遺伝子の活性化あるいは癌抑制遺伝子の失活によって惹き起こされる。癌遺伝子産物の多くはプロテインキナーゼ活性を有する。申請者は、プロテインホスファターゼがプロテインキナーゼと相対峙する反応を触媒することから、本酵素遺伝子が癌抑制遺伝子になり得ると推定し、ラット肝発癌過程、原発性肝癌、移植性腹水肝癌および再生肝での種々の増殖状態におけるセリン/スレオニン残基プロテインホスファターゼの動態を遺伝子レベルで解析し、肝癌における本酵素の遺伝子発現の特徴を明かにした。研究は以下の3点に要約される。

1. ラット1型プロテインホスファターゼイソホームPP1 α cDNAの分子クローニング

ラット腎cDNAライブラリーより1型プロテインホスファターゼ触媒サブユニットcDNAを単離した。コーディング領域は990 bpからなり、330アミノ酸残基からなる蛋白をコードすると推定される。これから算出される分子量はウサギ骨格筋PP1蛋白のSDS-PAGEにより得られる値37 kDaと一致した。このラットcDNAの塩基配列をウサギPP1 α のそれと比較したところ全体で85%、コーディング領域で88%の相同性を示したが、両者のアミノ酸配列は完全に一致した。

2. プロテインホスファターゼ、PP1 α 、PP2A α およびPP2C α の遺伝子発現

ラットPP1 α 、PP2A α およびPP2C α のcDNAをプローブにしてSolt-Farberモデルによ

る実験的肝発癌過程，原発性肝癌，移植性腹水肝癌および再生肝でのmRNAレベルをノザンブロットにより解析した。肝発癌過程において前癌状態である過形成結節でPP1 α ，PP2A α およびPP2C α mRNAレベルは正常肝に比しそれぞれ8，29および13倍の上昇を認めた。ところが過形成結節を経た後発生した原発性肝癌においてはPP1 α ，PP2A α およびPP2C α のmRNAレベルは正常肝と同程度にまで減少した。これに対し原発性肝癌より悪性な低分化型のラット移植性腹水肝癌においては，PP1 α mRNAレベルが正常肝に比し10倍以上に上昇し，PP2A α mRNAレベルは正常肝よりも減少し，PP2C α mRNAレベルは正常肝と同程度かまたはそれ以下であった。正常増殖過程にあるラット再生肝においてはDNA合成の最盛期にあたる術後24時間でPP1 α ，PP2A α およびPP2C α のmRNAレベルはそれぞれ5，14および10倍の上昇を認めた。すなわち発癌過程および再生肝では，3分子種のmRNAレベルが上昇し原発性肝癌ではそれらすべてが減少し，移植性腹水肝癌ではPP1 α mRNAレベルのみが上昇し，発癌プロモーションおよびプログレッションの両過程で各分子種の遺伝子発現パターンに差異が認められた。また移植性腹水肝癌でのPP1 α mRNAレベルの高発現から，PP1 α がプログレッション過程で悪性形質の発現の上で重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. ラットPP1 α ジェノミックDNAの解析

PP1 α 遺伝子の転写機構を明らかにするためその5'上流域の分子クローニングをおこなった。その結果このプロモーター領域には，CAATボックスおよびTATAボックスが存在しないGC配列に富んだハウスキーピング遺伝子であることが明らかとなった。ATG開始コドン+1とすると-78番にCCGGAAという癌遺伝子産物ets結合配列が，また-97番，-111番，-125番および-146番にGGGCGGというSP1結合配列が存在した。PP1 α 遺伝子のプロモーター領域に癌遺伝子産物であるets蛋白の結合配列が存在することから，ets蛋白がプログレッション過程におけるPP1 α の転写速度の上昇に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上の結果は，発癌および癌細胞の形質に関する領域において新しい知見を加えるもので，すでに6報にわたり国際学術雑誌に公表され高い評価を得ている。最終試験は2月15日に行われ可の判定が得られた。以上より申請者は，博士（理学）の学位を取得するに値するものと判断する。