

学位論文題名

Gene expressions and activities of protein phosphatases PP 1 and PP 2 A in rat liver regeneration after partial hepatectomy

(ラット肝部分切除後の肝再生過程におけるプロテインホスファターゼ PP 1 と PP 2 A の遺伝子発現と酵素活性の変動)

学位論文内容の要旨

【目的】

生体機能の基本的な調節機構のひとつに蛋白質のリン酸化・脱リン酸化がある。近年細胞増殖、分化、癌化に蛋白質のリン酸化・脱リン酸化が関与しているという報告が数多くなされその重要性が認識されている。この場合、細胞内のシグナル伝達は標的蛋白質のリン酸化・脱リン酸化のバランス状態により可逆的に制御される。プロテインホスファターゼはこれらの標的蛋白質の脱リン酸化を触媒する酵素である。

プロテインホスファターゼは現在セリン/スレオニンホスファターゼとチロシンホスファターゼに大別され、セリン/スレオニンホスファターゼ(以下 PP) はさらに PP1、PP2A、PP2B、PP2C のサブタイプに分けられ、さらにこれら各々には  $\alpha$ 、 $\beta$  等のイソホームがある。細胞内 PP 活性の大部分は PP1 と PP2A に基づくことが明らかにされている。

われわれは、これまでにラット移植性腹水肝癌をモデルに PP の変化を検討し、PP1 のイソホームのひとつである PP1 $\alpha$  が mRNA、タンパク質の両レベルでこれら肝癌において選択的に増加していることを明らかにしてきた。

本論文においては、生理的条件下での細胞増殖における PP1 および PP2A の役割を明らかにする目的で、ラット肝部分切除後の肝再生過程における PP1 および PP2A の遺伝子発現、蛋白発現、酵素活性等の変動を検討し、その生理的意義について考察する。

【方法】

WKAH/HK $m$  ラット(雄、180-200 g)の肝臓を Higgins and Anderson の方法に準じて約 70% の部分切除を行い、各時間後のラットを屠殺し、肝を摘出してサンプルとした。細胞分画法は基本的に Blobel and Potter の方法に準じ Kurel らの変法にしたがった。すなわちショ糖の密度勾配をかけて 124000  $\times$  g で遠心後、上清を非核画分とし沈殿をさらに 0.5% Triton で洗浄し、再沈殿させたものを核画分とした。酵素活性は Cohen らの方法に準じ、 $^{32}P$  でラベルしたホスホリラーゼ a を基質として用いた。この測定系では PP1 と PP2A のみが測定でき、更にインヒビター 2 の有無により PP1 と PP2A の分別定量ができる。また、 $Co^{2+}$  イオン存在下トリプシン処理、あるいは 2-メルカプトエタノール添加凍結融解処理によりそれぞれ PP1、PP2A が活性化されることが知られており、これらによる活性変化もあわせて検討した。本論文ではこれら処理前の活性を spontaneous 活性、処理後の活性を potential 活性と呼ぶ。酵素 1 単位は 1 分間に 1  $\mu$ mol のリン酸を遊離するのに要する酵素量と定義する。ノーザンプロットは Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform 法により total RNA を抽出し、1 サンプルあたり 20  $\mu$ g の total RNA を電気泳動し、その後ニトロセルロース膜にプロットし、PP1 $\alpha$ 、PP2A の cDNA フラグメントをプローブにして

ハイブリダイズした。インターナルコントロールとしてラットアルブミンcDNAを用いた。

#### [結果]

##### 遺伝子発現：

PP1 $\alpha$  mRNA は肝部分切除後 6 時間より上昇し、以後 12 時間と 48 時間にピークを示した。PP2A mRNA は肝部分切除後 6 時間に著増し、その後すみやかに減少し、10-12 時間に再上昇する 2 相性のパターンを示した。

##### 酵素活性：

非核画分では PP1、PP2A の spontaneous 活性は肝部分切除後 7 日目まで両者とも 1 mU/mg 前後とほぼ一定の値を推移したが、PP1 の potential 活性は 7-12 時間にコントロールに比べ 1.5 倍の増加を示した。核画分では、PP1 活性は肝部分切除後 4-7 時間より上昇しはじめ 12 時間にコントロールの 2.4 倍まで上昇し、以後すみやかに減少し 7 日目までにはコントロールレベルにもどった。PP2A 活性は全経過を通じてきわめて低値を推移した。

#### [考察]

本研究においてわれわれは、核内 PP1 活性が肝部分切除後 12 時間に一過性の上昇することを示した。70% 肝部分切除後の肝細胞の再生動態は肝部分切除後 12-16 時間より DNA 合成が開始され、24 時間にピークに達することより、核内 PP1 活性の一過性上昇が認められる 12 時間は肝細胞周期の観点から考えると、G1/S 移行期にあたる。現在、哺乳動物における細胞周期は G1 後期ないし G1/S 移行期に RB タンパクがリン酸化され、その結果 DNA 合成に必要な種々の転写因子が RB タンパクより離れ活性化されることにより DNA 合成が開始されるとする考えが主流であり、われわれが示した G1/S 移行期に PP1 活性が上昇することと矛盾すると思われる。しかし、肝部分切除後の肝再生過程における RB タンパクのリン酸化状態は一般論と多少挙動を異にするとする報告もあり渾沌としている。G1/S 移行期の核内 PP1 の標的蛋白の解明は今後の課題である。

今回の研究では (1) タンパクレベルでの検討がなされていないこと、(2) ラット肝の PP1 のイソホームには  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\gamma 1$  があるが  $\alpha$  のみの mRNA しか検討していないこと、(3) in vivo の系であるので PP1 活性変化と肝細胞増殖との関係が不確かなこと、などの問題点がある。そこでわれわれはこれらの問題点を解決すべく、初代培養肝細胞の培養液に EGF を添加し肝細胞を同調的に DNA 合成に誘導する系を利用しこれらの問題点の解決を試みた。結果は初代培養肝細胞においても G1/S 移行期に核内 PP1 活性が一過性に上昇し、さらにこの系にその作用点が G1 後期ないし G1/S 移行期にあるとされている TGF $\beta 1$  を加えるとこの核内 PP1 活性の上昇は TGF $\beta 1$  の増殖抑制効果依存的に抑制された。これらのことより核内 PP1 は肝細胞の DNA 合成に対し正の制御をしている可能性が考えられる。また核内 PP1 の蛋白量は活性変化にかかわらず 3 つのイソホーム共に一定であった。従って G1/S 移行期に上昇する活性変化の機序として、蛋白翻訳後の修飾が考えられる。これらの結果は参考論文として提出した論文 (1) に記載されている。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 葛 巻 暹  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

Gene Expressions And activities of protein phosphatases PP 1 and PP 2 A in Rat liver regeneration after partial hepatectomy

(ラット肝部分切除後の肝再生過程におけるプロテインホスファターゼ  
PP 1 と PP 2 A の遺伝子発現と酵素活性の変動)

## I. 目的

生体機能の基本的な調節機構のひとつに蛋白質のリン酸化・脱リン酸化がある。近年細胞増殖、分化、癌化に蛋白質のリン酸化・脱リン酸化が関与しているという報告が数多くなされその重要性が認識されている。この場合、細胞内のシグナル伝達は標的蛋白質のリン酸化・脱リン酸化のバランス状態により可逆的に制御される。プロテインホスファターゼはこれらの標的蛋白質の脱リン酸化を触媒する酵素である。

プロテインホスファターゼは現在セリン/スレオニンホスファターゼとチロシンホスファターゼに大別され、セリン/スレオニンホスファターゼ (以下 PP) はさらに PP1、PP2A、PP2B、PP2C のサブタイプに分けられ、さらにこれら各々にはイソホームがある。細胞内 PP 活性の大部分は PP1 と PP2A に基づくことが明らかにされている。

われわれは、これまでにラット移植性腹水肝癌をモデルに PP の変化を検討し、PP1 のイソホームのひとつである PP1 $\alpha$  が mRNA、タンパク質の両レベルでこれら肝癌において選択的に増加していることを明らかにしてきた。

本論文においては、生理的条件下での細胞増殖における PP1 および PP2A の役割を明らかにする目的で、ラット肝部分切除後の肝再生過程における PP1 および PP2A の遺伝子発現、蛋白発現、酵素活性等の変動を検討し、その生理的意義について考察する。

## II. 方法

WKAH/HK<sub>m</sub> ラット (雄、180-200 g) の肝臓を Higgins and Anderson の方法に準じて約 70 % の部分切除を行い、各時間後のラットを屠殺し、肝を摘出してサンプルとした。細胞分画法は基本的に Blobel and Potter の方法に準じ Kurel らの変法にしたがった。すなわちショ糖の密度勾配をかけて 124000 x g で遠心後、上清を非核画分とし沈殿をさらに 0.5% Triton で洗浄し、再沈殿させたものを核画分とした。

酵素活性は Cohen らの方法に準じ、<sup>32</sup>P でラベルしたホスホリラーゼ a を基質として用いた。この測定系では PP1 と PP2A のみが測定でき、更にインヒビター 2 の有無により PP1 と PP2A の分別定量ができる。酵素 1 単位は 1 分間に 1 μmol のリン酸を遊離するのに要する酵素量と定義する。

ノーザンブロットは Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform 法により total RNA を抽出し、1 サンプルあたり 20 μg の total RNA を電気泳動し、その後ニトロセルロース膜にブロットし、PP1α、PP2A の cDNA フラグメントをプローブにしてハイブリダイズした。インターナルコントロールとしてラットアルブミン cDNA を用いた。

## III. 結果

遺伝子発現：

PP1α mRNA は肝部分切除後 6 時間より上昇し、以後 12 時間と 48 時間にピークを示した。PP2A mRNA は肝部分切除後 6 時間に著増し、その後すみやかに減少し、10-12 時間に再上昇する 2 相性のパターンを示した。

酵素活性：

非核画分では PP1、PP2A 活性は肝部分切除後 7 日目まで両者とも 1 mU/mg 前後とほぼ一定の値を推移した。核画分では、PP1 活性は肝部分切除後 4-7 時間より上昇しはじめ 12 時間にコントロールの 2.4 倍まで上昇し、以後すみやかに減少し 7 日目までにはコントロールレベルにもどった。PP2A 活性は全経過を通じてきわめて低値を推移した。

## IV. 考察

本研究においてわれわれは、核内 PP1 活性が肝部分切除後 12 時間に一過性に上昇することを示した。70% 肝部分切除後の肝細胞の再生動態は肝部分切除後 12-16 時間より DNA 合成が開始され、24 時間にピークに達することより、核内 PP1 活性の一過性上昇が認められる 12 時間は肝細胞周期の観点から考えると、G1/S 移行期にあたる。

S 期移行における核内 PP1 の役割をより詳細に検討するため、初代培養肝細胞の培養液に EGF を添加し肝細胞を同調的に DNA 合成に誘導する系を利用した。結果は初代培養肝細胞においても G1/S 移行期に核内 PP1 活性が一過性に上昇し、さらにこの系にその作用点が G1 後期ないし G1/S 移行期にあるとされている TGFβ1 を加えるとこの核内 PP1 活性の上昇は TGFβ1 の増殖抑制効果依存的に

抑制された。

これらのことより核内 PP1 は肝細胞の DNA 合成に対し正の制御をしている可能性が考えられた。また核内 PP1 の蛋白量は活性変化にかかわらず 3 つのイソホーム  $\alpha$ ,  $\gamma$ 1,  $\delta$  共に一定であった。従って G1/S 移行期に上昇する活性変化の機序として、蛋白翻訳後の修飾が考えられた。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。