

## 学位論文題名

Neoplastic alterations of type 1 protein phosphatase,  
PP1, in rat ascites hepatomas  
(ラット腹水肝癌における1型プロテインホスファターゼ, PP1, の癌性変異)

## 学位論文内容の要旨

発癌および癌細胞の悪性形質の維持の上で癌遺伝子が決定的な役割を果たしている。癌遺伝子産物は、それ自身タンパクリン酸化能を有するものやタンパクリン酸化により機能調節されるものが多い。したがってこれまで多くの癌研究はタンパクリン酸化側からなされ、逆方向のタンパク脱リン酸側からの研究は極めて限られていた。本研究では、タンパク脱リン酸を触媒するセリン/スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼ(PP)について、肝/肝癌系を用いてそのmRNA, 酵素タンパク, 活性, 細胞内局在を系統的に解析し、肝癌における特有な癌性変異を見いだした。実験成績は以下のように要約される。

1) 14種のラット腹水肝癌細胞株について、PP1 $\alpha$ , 1 $\gamma$ 1, 2A $\alpha$ , 2C $\alpha$ の遺伝子発現を測定し、正常肝に比べてところ、PP1 $\alpha$ mRNAレベルはすべての細胞で顕著な上昇を認め、これに対しPP2C $\alpha$ ではほとんどで減少していた。株化した肝細胞株RLN-B2細胞は、旺盛な増殖能を示すが、肝癌細胞のようなPP1 $\alpha$ mRNAの上昇は見られず、むしろPP1 $\gamma$ mRNAレベルが細胞増殖状態とよく相関して変動した。すなわちPP1 $\alpha$ mRNAの特異的な上昇は、腹水肝癌細胞に特有な遺伝子発現である。

2) 次に腹水肝癌細胞におけるPP1 $\alpha$ の酵素量を、可溶画分・顆粒画分・核画分の3画分について調べ、対照細胞と比較したところ、肝癌細胞では例外なく顆粒画分で約2倍、核画分で数倍の増量を認めた。すなわち腹水肝癌細胞で増量したPP1 $\alpha$ は、特異な細胞内分布を示し、ミクロソームを含む顆粒画分と核に主として分布していた。

3) 酵素活性についてみると、顆粒画分と核画分で肝癌細胞での増加が確認された。とくに核画分における酵素活性は、肝癌ではCo<sup>2+</sup>/トリプシン処理により数倍の活性化が見られたが、非癌細胞では処理前後で活性が不変であった。このことは肝癌と非癌細胞における核局在性PP1 $\alpha$ の存在様式の相異を示唆している。

4) PP1およびPP2Aについて、薬剤耐性および感受性の両腹水肝癌細胞で比較検討した。耐性株においては、感受性株に比べて顆粒画分のPP1活性が有為に上昇していた。PP1 $\alpha$ の酵素量も、耐性株では感受性株に比べて多かった。以上の成績より、

PP1が、肝癌の薬剤耐性の形質獲得に正の方向に関与している可能性が考えられた。

5) 1型プロテインホスファターゼの3つのイソホームPP1 $\alpha$ 、PP1 $\gamma$ 、PP1 $\delta$ の染色体上のマッピングをヒト、ラット、マウスで行い、いずれのイソホームも互いに相異なる染色体上に位置することを明らかにした。すなわち同一の先祖遺伝子から進化した3つのPP1遺伝子は高い相同性を示すが、互いに異なる染色体上で異なる遺伝子産物をコードすることを示した。またPP1 $\alpha$ の遺伝子座は癌において染色体異常がとくに高い頻度で見いだされる位置と一致したことから、PP1 $\alpha$ と癌との密接な関連が示唆された。

以上の実験成績より、ラット腹水肝癌細胞においては、1型セリン/スレオニン残基特異的なプロテインホスファターゼPP1のイソホームのひとつPP1 $\alpha$ の遺伝子発現が特異的に上昇し、その結果PP1 $\alpha$ の細胞内分布は、正常肝細胞の場合と異なり、主として顆粒画分および核画分に蓄積することが明らかにされた。このことは、正常肝細胞の増殖状態である再生肝やEGF刺激後の肝細胞に見られる核内PP1活性の上昇には酵素量の増大を伴わない事実と比べて顕著な特色をなすもので、肝癌細胞の示す無限増殖能などの悪性形質の分子機構を解明する上で重要な知見である。またPP1の各イソホームの遺伝子が、互いに異なる染色体上に同定されたことにより、各イソホームが転写の段階でも独立に調節され得ることが示され、本研究でのPP1 $\alpha$ の特異的な動態を説明する上で重要な知見である。

# 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 谷 口 和 弥

学 位 論 文 題 名

## Neoplastic alterations of type 1 protein phosphatase, PP1, in rat ascites hepatomas (ラット腹水肝癌における1型プロテインホスファターゼ, PP1, の癌性変異)

発癌および癌細胞の悪性形質の維持の上で癌遺伝子が決定的な役割を果たしている。癌遺伝子産物は、それ自身タンパクリン酸化能を有するものやタンパクリン酸化により機能調節されるものが多い。したがってこれまで多くの癌研究はタンパクリン酸化側からなされ、逆方向のタンパク脱リン酸側からの研究は極めて限られていた。本研究では、タンパク脱リン酸を触媒するセリン/スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼ (PP) について、肝/肝癌系を用いてそのmRNA、酵素タンパク、活性、細胞内局在を系統的に解析し、肝癌における特有な癌性変異を見いだした。実験成績は以下のよう

1) 14種のラット腹水肝癌細胞株について、PP1 $\alpha$ 、1 $\gamma$ 1、2A $\alpha$ 、2C $\alpha$ の遺伝子発現を測定し、正常肝に比べたところ、PP1 $\alpha$ mRNAレベルはすべての細胞で顕著な上昇を認め、これに対しPP2C $\alpha$ ではほとんどで減少していた。株化した肝細胞株RLN-B2細胞は、旺盛な増殖能を示すが、肝癌細胞のようなPP1 $\alpha$ mRNAの上昇は見られず、むしろPP1 $\gamma$ mRNAレベルが細胞増殖状態とよく相関して変動した。すなわちPP1 $\alpha$ mRNAの特異的な上昇は、腹水肝癌細胞に特有な遺伝子発現である。

2) 次に腹水肝癌細胞におけるPP1 $\alpha$ の酵素量を、可溶画分・顆粒画分・核画分の3画分について調べ、対照細胞と比較したところ、肝癌細胞では例外なく顆粒画分で約2倍、核画分で数倍の増量を認めた。すなわち腹水肝癌細胞で増量したPP1 $\alpha$ は、特異的な細胞内分布を示し、ミクロソームを含む顆粒画分と核に主として分布していた。

3) 酵素活性についてみると、顆粒画分と核画分で肝癌細胞での増加が確認された。とくに核画分における酵素活性は、肝癌ではCo<sup>2+</sup>/トリプシン処理により数倍の活性化が見られたが、非癌細胞では処理前後で活性が不変であった。このことは肝癌と非癌細胞における核局在性PP1 $\alpha$ の存在様式の相異を示唆している。

4) P P 1 および P P 2 A について、薬剤耐性および感受性の両腹水肝癌細胞で比較検討した。耐性株においては、感受性株に比べて顆粒画分の P P 1 活性が有意に上昇していた。P P 1  $\alpha$  の酵素量も、耐性株では感受性株に比べて多かった。以上の成績より、P P 1 が、肝癌の薬剤耐性の形質獲得に正の方向に関与している可能性が考えられた。

5) 1 型プロテインホスファターゼの 3 つのイソホーム P P 1  $\alpha$ 、P P 1  $\gamma$ 、P P 1  $\delta$  の染色体上のマッピングをヒト、ラット、マウスで行い、いずれのイソホームも互いに相異なる染色体上に位置することを明らかにした。すなわち同一の先祖遺伝子から進化した 3 つの P P 1 遺伝子は高い相同性を示すが、互いに異なる染色体上で異なる遺伝子産物をコードすることを示した。また P P 1  $\alpha$  の遺伝子座は癌において染色体異常がとくに高い頻度で見いだされる位置と一致したことから、P P 1  $\alpha$  と癌との密接な関連が示唆された。

以上の実験成績より、ラット腹水肝癌細胞においては、1 型セリン/スレオニン残基特異的なプロテインホスファターゼ P P 1 のイソホームのひとつ P P 1  $\alpha$  の遺伝子発現が特異的に上昇し、その結果 P P 1  $\alpha$  の細胞内分布は、正常肝細胞の場合と異なり、主として顆粒画分および核画分に蓄積することが明らかにされた。このことは、正常肝細胞の増殖状態である再生肝や E G F 刺激後の肝細胞に見られる核内 P P 1 活性の上昇には酵素量の増大を伴わない事実と比べて顕著な特色をなすもので、肝癌細胞の示す無限増殖能などの悪性形質の分子機構を解明する上で重要な知見である。また P P 1 の各イソホームの遺伝子が、互いに異なる染色体上に同定されたことにより、各イソホームが転写の段階でも独立に調節され得ることが示され、本研究での P P 1  $\alpha$  の特異的な動態を説明する上で重要な知見である。

これを要するに、著者は癌におけるプロテインホスファターゼの意義について新知見を得たものであり、癌細胞の形質に関する研究において貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。