

博士(医学) 朱

棠

学位論文題名

レチノイン酸により誘起された HL-60細胞の分化過程
におけるセリン/スレオニンプロテインホスファターゼ
PP2A および PP1 の動態とその意義

学位論文内容の要旨

[目的] ホルモン応答や細胞増殖など生体における多くの細胞機能は、タンパクのリン酸化/脱リン酸化により可逆的に調節される。タンパク質リン酸化は、プロテインキナーゼによるリン酸化とプロテインホスファターゼによる脱リン酸化により調節される。プロテインホスファターゼは、基質特異性の差異により、セリン/スレオニンホスファターゼ、チロシンホスファターゼ、およびデュアルホスファターゼの3群に大別される。本研究においては、レチノイン酸刺激によってヒト骨髓性白血病細胞株HL-60細胞の顆粒球への分化を誘導し、その過程における二種類のセリン/スレオニンホスファターゼ、PP2A及びPP1の動態を解析した。

[方法及び結果] HL-60細胞は血清飢餓法によりG₀期に同調させた。次いで血清刺激と同時に1μM レチノイン酸の有無により顆粒球への分化と増殖(コントロール)に導いた。この条件下でHL-60細胞は、レチノイン酸による分化誘導2日目まではレチノイン酸非存在下と同様の細胞周期で増殖し、細胞数に有意の差は認められなかった。しかし、4日目には、レチノイン酸存在下の細胞はほとんど増殖を停止した。5日目では、分化型細胞およびNBT染色細胞の割合はそれぞれ35%から95%に、および34%から86%に増加した。そこで、この分化と増殖の過程で、経時的にセリン/スレオニンホスファターゼPP2A及びPP1の動態を解析した。

Myelin Basic Protein (MBP)を基質として測定したHL-60細胞の粗抽出液のPP2A活性は、血清存在下レチノイン酸で刺激後18時間(G1/S期)に、一過性の上昇を示した。ホスホリラーゼaを基質として測定したPP2Aのポテンシャル活性は、レチノイン酸の有無にかかわらず血清刺激後24時間(S期)に一過性の減少を示した。MBPを基質として測定したHL-60細胞の粗抽出液のPP1活性は、血清による増殖刺激後27-36時間(G2,M期)に一過性上昇が認められた。これに対しレチノイン酸による顆粒球への分化過程では、このPP1の活性上昇は完全に抑えられた。ホスホリラーゼaを基質として測定したPP1活性は、レチノイン酸の有無にかかわらず顕著な変動を示さなかった。

次にHL-60細胞の増殖とレチノイン酸による分化の過程において、PP2A及びPP1の触媒サブユニット量の変動をウエスタンプロット法によって解析した。PP2A触媒サブユニット量はレチノイン酸の有無にかかわらず18時間までは変化なく、24時間後に一過性に減少した。このPP2A触媒サブユニット量の減少は、S期におけるPP2Aのポテンシャル活性の減少と時間的に一致した。

レチノイン酸刺激後18時間におけるPP2A活性の上昇の機構を明らかにする目的で、分化または増殖過程にあるHL-60細胞の粗抽出液について、DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーを行った。分化・増殖前の細胞(0時間)の粗抽出液のPP2A活性のほとんどは、0.23M NaCl前後で溶出された。血清刺激のみの増殖過程にあるHL-60細胞の18時間(C18時間)及び24時間(C24時間)後の粗抽出液のPP2A活性は、0時間のPP2A活性と同様に0.23M NaCl前後で溶出された。これに対しレチノイン酸による分化過程18時間(R18時間)のPP2A活性のほとんどは、0.13M NaCl前後で溶出された。しかし分化過程24時間(R24時間)の粗抽出液のPP2A活性は再び元の0.23M NaCl前後に溶出された。1985年Tungらの報告では、ウサギ筋肉の抽出液のPP2A活性は同様のクロマイトグラフィーで0.1-0.15M NaCl、0.19-0.24M NaCl、及び0.28-0.32M NaClの三つのピークとして溶出され、それぞれPP2A₀、PP2A₁、及びPP2A₂と命名された。この命名に従えば、本実験で認められた0時間、C18時間、C24時間のPP2A活性はPP2A₁、レチノイン酸による分化過程18時間のPP2A活性はPP2A₀、そして24時間後の活性はPP2A₁となる。このR18時間のPP2A₀を確認するため、次の三つ実験を行った。①R18時間とC18時間のPP2A活性画分を混合して再クロマトグラフィーを行ったところ、その両活性はそれぞれ分離して元の位置に溶出された。②Tungによれば、PP2A₀活性はホスホリラーゼaを基質とした時にプロタミン依存性がある。本実験のR18時間のPP2A活性をホスホリラーゼaを基質として測定した時のピークは0.25 mU/mlであるが、5 μg/mlプロタミン共存下では著しく増強され、1.1 mU/mlになり、4倍以上の活性化であった。③PP2Aは触媒サブユニット(C)、構造サブユニット(A)、及び調節サブユニット(B)で構成されている。PP2A₀、PP2A₁及びPP2A₂はそれぞれCAB'、CAB及びCAのサブユニット構成であり、PP2A₀とPP2A₁の差異はBサブユニットの違いにあることが知られている。そこで抗B'サブユニット抗体と抗Bαサブユニット抗体を用いて、DEAE-セファロースカラムで溶出された0時間、C18時間、C24時間、R18時間及びR24時間のPP2A活性画分をウエスタンプロット法によって比較した。抗B'サブユニット抗体を用いたウエスタンプロットでは、R18時間のみで54kDのB'サブユニットバンドが認められた。これに対し抗Bαサブユニット抗体を用いたウエスタンプロットでは、R18時間のサンプル以外の0時間、C18時間、C24時間及びR24時間のサンプルに、55kDのBαサブユニットバンドを認めた。

次に、分化あるいは増殖過程にあるHL-60細胞の粗抽出液のPP1活性を同様の条件のDEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーにより解析した。増殖過程30時間においては、MBPを基質として測定したPP1活性は、0.25M NaCl前後で溶出される画分において明らかに上昇していた。しかし、レチノイン酸による分化過程30時間の同画分の活性は、むしろ減少していた。

[まとめ] ①MBPを基質として測定したHL-60細胞の粗抽出液のPP2A活性は、レチノイン酸存在下でのみG1/S期(18時間)に一過性の上昇を示した。この時PP2Aはホロ酵素PP2A₀の性状を示したが、培養24時間には元のホロ酵素PP2A₁の性状に戻った。これらの変化はレチノイン酸依存的であることから、分化誘導機構の一部として機能している可能性がある。すなわちレチノイン酸刺激されたHL-60細胞のG1/S移行期(18時間)にPP2Aのホロ酵素型が変換し、その標的蛋白が変わることで細胞を分化へと導くという機構が考えられる。②ホスホリラーゼaを基質として測定したPP2Aのポテンシャル活性は、レチノイン酸の有無にかかわらず培養24時間に一過性の減少を示した。この時間にのみPP2Aの触媒サブユニットが減少しており、活性の減少と一致した。これらの変化はレチノイン酸非依存的であり、S期と一致することから増殖に関与してい

る可能性がある。③ MBPを基質として測定したPP1活性は、血清添加により培養30時間前後に上昇したが、この上昇はレチノイン酸刺激により抑制された。したがってこの活性上昇は増殖に関与し、その抑制が増殖の抑制および分化の誘導に関連している可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査 教授 小野江 和則
副査 教授 小林 邦彦
副査 教授 斎藤 政樹
副査 教授 菊池 九二三

学位論文題名

レチノイン酸により誘起された HL-60細胞の分化過程におけるセリン/スレオニンプロテインホスファターゼ PP2A および PP1 の動態とその意義

本研究においては、レチノイン酸刺激によってヒト骨髓性白血病細胞株HL-60細胞の顆粒球への分化を誘導し、その過程における二種類のセリン/スレオニンホスファターゼ、PP2A及びPP1の動態を解析した。実験成績は以下のように要約される。

1) Myelin Basic Protein (MBP)を基質として測定したHL-60細胞の粗抽出液のPP2A活性は、血清存在下レチノイン酸で刺激後18時間(G1/S期)に、一過性の上昇を示した。ホスホリラーゼaを基質として測定したPP2Aのポテンシャル活性は、レチノイン酸の有無にかかわらず血清刺激後24時間(S期)に一過性の減少を示した。MBPを基質として測定したHL-60細胞の粗抽出液のPP1活性は、血清による増殖刺激後27-36時間(G2, M期)に一過性上昇が認められた。これに対しレチノイン酸による顆粒球への分化過程では、このPP1の活性上昇は完全に抑えられた。ホスホリラーゼaを基質として測定したPP1活性は、レチノイン酸の有無にかかわらず顕著な変動を示さなかった。

2) 次にHL-60細胞の増殖とレチノイン酸による分化の過程において、PP2A及びPP1の触媒サブユニット量の変動をウエスタンプロット法によって解析した。PP2A触媒サブユニット量はレチノイン酸の有無にかかわらず18時間までは変化なく、24時間後に一過性に減少した。このPP2A触媒サブユニット量の減少は、S期におけるPP2Aのポテンシャル活性の減少と時間的に一致した。

3) レチノイン酸刺激後18時間におけるPP2A活性の上昇の機構を明らかにする目的で、分化または増殖過程にあるHL-60細胞の粗抽出液について、DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーを行った。分化・増殖前の細胞(0時間)の粗抽出液のPP2A活性のほとんどは、0.23M NaCl前後で溶出された。血清刺激のみの増殖過程にあるHL-60細胞の18時間(C18時間)及び24時間(C24時間)後の粗抽出液のPP2A活性は、0時間のPP2A活性と同様に0.23M NaCl前後で溶出された。これに対しレチノイン酸による分化過程18時間(R18時間)のPP2A活性のほとんどは、0.13M NaCl前後で溶出さ

れた。しかし分化過程24時間(R24時間)の粗抽出液のPP2A活性は、再び元の0.23M NaCl前後に溶出された。Tung らの命名に従えば、本実験で認められた0時間、C18時間、C24時間のPP2A活性はPP2A₀、レチノイン酸による分化過程18時間のPP2A活性はPP2A₁、そして24時間後の活性はPP2A₂となる。

4) このR18時間のPP2A₀以下の実験で確認された。①R18時間とC18時間のPP2A主活性画分を混合して再クロマトグラフィーを行ったところ、両活性は完全に分離された。②R18時間のPP2A活性をホスホリラーゼaを基質として測定した時の活性はプロタミン共存下では著しく増強された。③PP2Aは触媒サブユニット(C)、構造サブユニット(A)、及び調節サブユニット(B)で構成されている。PP2A₀、PP2A₁及びPP2A₂はそれぞれCAB'、CAB及びCAのサブユニット構成である。抗B'サブユニット抗体を用いたウエスタンプロットでは、R18時間のみで54kDのB'サブユニットバンドが認められた。これに対し抗B α サブユニット抗体を用いたウエスタンプロットでは、R18時間のサンプル以外の0時間、C18時間、C24時間及びR24時間のサンプルに、55kDのB α サブユニットバンドを認めた。

5) PP1活性を同様の条件のDEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーにより解析した。増殖過程30時間においては、MBPを基質として測定したPP1活性は、0.25M NaCl前後で溶出される画分において明らかに上昇していた。しかし、レチノイン酸による分化過程30時間の同画分の活性は、むしろ減少していた。

公開発表は約30名の聴衆の前で行われ、小林教授から基質を選択した根拠、B'、B'サブユニット変換のメカニズム、プロタミンの作用機構、斎藤(政)教授より、レチノイン酸の作用部位、細胞分化と増殖の関係について、菊池教授より、ホスホリラーゼaホスファターゼ活性の減少機構について質問がなされた。申請者はおおむね適切な回答をなし得た。

以上本実験で得られた成績は、HL-60細胞の分化・増殖におけるプロテインホスファターゼの役割を解明する上で重要な新知見である。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。