

学位論文題名

免疫系におけるセリン／スレオニン残基特異的  
プロテインホスファターゼの動態と意義

学位論文内容の要旨

生理機能の調節機構においてタンパク質のリン酸化・脱リン酸化は重要な役割を果たしている。免疫系においても、それを構成する免疫担当細胞の分化・増殖・細胞死において、多数の細胞内タンパク質のリン酸化やプロテインキナーゼの関与を示唆する報告が多くなされている。本研究では、タンパク質の脱リン酸化を触媒するセリン／スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼの免疫系における役割を明らかにする目的で、自己免疫病態・サイトカイン応答・細胞死の各実験系を用いて、免疫担当細胞の分化・増殖・死における本酵素の動態とその意義について主としてその活性を指標として解析した。本論文の要点は以下の5点である。

1. 免疫系におけるセリン／スレオニンホスファターゼの役割を明らかにする目的で、まず、免疫担当臓器粗抽出液における PP1, PP2A, PP2C の活性分別定量法を確立し、ついでこれを用いて正常および自己免疫疾患モデルマウスである MRL/MpJ-lpr/lpr マウス (lpr マウス) の免疫担当臓器の本酵素活性を比較した。その結果、PP1 活性は、正常組織では脾臓で高く、胸腺の2倍の値を示した。lpr マウスでは肝臓と脾臓でコバルト-トリプシン処理前後の活性ともに正常マウスに比べ若干の上昇がみられた。それに対し、PP2A 活性は、正常組織では各臓器とも同レベルの活性を示したが、lpr マウスの脾臓とリンパ節で正常マウスの脾臓に比べ約 2.5 倍の明らかな上昇をみとめ、この活性上昇が lpr マウスの病態発症になんらかの影響を及ぼしていると考えられる。

2. IL-2 情報伝達におけるセリン／スレオニンホスファターゼの役割を明らかにする目的で、IL-2 依存性 T 細胞を IL-2 で刺激し、本酵素活性の経時的変化を観察した。その結果、IL-2 刺激直後から PP1 活性は減少し始め、20 分で最低値に達し、その後活性は上昇し 45 分で対照レベル値にまで回復した。これに対し、

PP2A および PP2C 活性の IL-2 刺激による変化はみられなかった。この点で、lpr マウスでの本酵素活性の変異とまったく異なる。また、PP1活性の一過性の減少はマウス脾細胞より得たIL-2依存性T細胞芽球においてもみられた。さらに、PP1活性の減少はIL-2の濃度に依存してみられ、その活性減少は細胞質画分のPP1のみにみられた。これらの事実は、細胞質のPP1がIL-2受容体を介した情報伝達においてなんらかの役割を果たしていることを示唆する。

3. 強い細胞毒性をもつトリテルペンポリエーテルとして紅藻ソゾ属 *Laurencia obutusa* より単離されたチルシフェリル-23-アセテート (TF23A) は、精製したセリン/スレオニンホスファターゼ PP2A 活性を特異的に阻害し、他のタイプである PP1、PP2B、PP2C およびチロシンホスファターゼ活性には影響しなかった。また、TF23A は細胞粗抽出液における PP2A ホロ酵素についても同様な阻害活性を示した。このことにより、TF23A が細胞粗抽出液における PP2A 活性の特異的分別定量に有用であることが示された。また、阻害が PP2A に特異的であることは PP2A の細胞内での生理機能の解明に有用であることを示すものである。

4. TF23A の細胞毒性の特性を検討するため、種々のヒトおよびマウス白血病株を用いてその影響を調べたところ、TF23A が血清非存在下の培養液中で T および B 細胞株に対して急速に細胞死を誘導することが判明した。この細胞死はネクロシスによるものではなく、プログラムされた細胞死として知られるアポトーシスによるものであることが、その形態学的変化と DNA 断片化により示された。

5. TF23A の細胞毒性の作用機序を解析した。まず TF23A 添加後 1 時間以内に 35 および 36 kDa を含むいくつかのタンパク質のリン酸化の亢進が認められた。次に c-myc タンパクの発現上昇が見られ、それは 2 時間で最大値に達した。これらの事実およびこれまでの報告を総合的に判断すると、TF23A が細胞内 PP2A 活性を抑制することにより、結果としてタンパク質のリン酸化が亢進し c-myc タンパクの遺伝子発現を誘導し、最終的にアポトーシスに至るという経路が想定された。また、TF23A により誘導されるアポトーシスは FCS 添加により完全に抑制された。PKC 活性化剤であるホルボールエステルによっても抑制が見られ、このことはアポトーシスを抑制する情報伝達経路に PKC が何らかの役割を果たしていることを示唆する。

# 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

### 免疫系におけるセリン／スレオニン残基特異的 プロテインホスファターゼの動態と意義

生理機能の調節機構においてタンパク質のリン酸化・脱リン酸化は重要な役割を果たしている。免疫系においても、それを構成する免疫担当細胞の分化・増殖・細胞死において、多数の細胞内タンパク質のリン酸化やプロテインキナーゼの関与を示唆する報告が多くなされている。本研究では、タンパク質の脱リン酸化を触媒するセリン／スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼの免疫系における役割を明らかにする目的で、自己免疫病態・サイトカイン応答・細胞死の各実験系を用いて、免疫担当細胞の分化・増殖・死における本酵素の動態とその意義について主としてその活性を指標として解析した。研究の成果およびその評価は以下のように要約される。

1. 免疫系におけるセリン／スレオニンホスファターゼの役割を明らかにする目的で、まず、免疫担当臓器粗抽出液における PP1, PP2A, PP2C の活性分別定量法を確立し、ついでこれを用いて正常および自己免疫疾患モデルマウスである MRL/MpJ-lpr/lpr マウス (lpr マウス) の免疫担当臓器の本酵素活性を比較した。その結果、PP2A 活性は、正常組織では各臓器とも同レベルの活性を示したが、lpr マウスの脾臓とリンパ節で正常マウスの脾臓に比べ約 2.5 倍の明らかな上昇をみとめ、この活性上昇が lpr マウスの病態発症になんらかの影響を及ぼしていると考えられる。

2. IL-2 情報伝達におけるセリン／スレオニンホスファターゼの役割を明らかにする目的で、IL-2 依存性 T 細胞を IL-2 で刺激し、本酵素活性の経時的変化を観察した。その結果、IL-2 刺激直後から PP1 活性は減少し始め、20 分で最低値に達し、その後活性は上昇し 45 分で対照レベル値にまで回復した。これに対し、PP2A および PP2C 活性の IL-2 刺激による変化はみられなかった。この点で、

lpr マウスでの本酵素活性の変異とまったく異なる。また、PP1活性の一過性の減少はマウス脾細胞より得たIL-2依存性T細胞芽球においてもみられた。さらに、PP1活性の減少はIL-2の濃度に依存してみられ、その活性減少は細胞質画分のPP1のみにみられた。これらの事実は、細胞質のPP1がIL-2受容体を介した情報伝達において何らかの役割を果たしていることを示唆する。

3. 強い細胞毒性をもつトリテルペンポリエーテルとして紅藻ソゾ属 *Laurencia obtusa* より単離されたチルシフェリル-23-アセテート (TF23A) は、精製したセリン/スレオニンホスファターゼ PP2A 活性を特異的に阻害し、他のタイプである、PP1、PP2B、PP2C およびチロシンホスファターゼ活性には影響しなかった。また、TF23A は細胞粗抽出液における PP2A ホロ酵素についても同様な阻害活性を示した。このことにより、TF23A が細胞粗抽出液における PP2A 活性の特異的分別定量に有用であることが示された。

4. TF23A の細胞毒性の特性を検討するため、種々のヒトおよびマウス白血病株を用いてその影響を調べたところ、TF23A が血清非存在下の培養液中で T および B 細胞株に対して急速に細胞死を誘導することが判明した。この細胞死はネクローシスによるものではなく、プログラムされた細胞死として知られるアポトーシスによるものであることが、その形態学的変化と DNA 断片化により示された。

5. TF23A の細胞毒性の作用機序を解析した。まず TF23A 添加後1時間以内に 35 および 36 kDa を含むいくつかのタンパク質のリン酸化の亢進が認められた。次に c-myc タンパクの発現上昇が見られ、それは2時間で最大値に達した。また、TF23A により誘導されるアポトーシスはホルボールエステルにより完全に抑制された。

これを要するに、著者は、免疫系におけるセリン/スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼに新知見を得たものであり、免疫能の生化学的調節機構において貢献するところ大なるものである。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。