

学 位 論 文 題 名

セリン／スレオニン残基特異的 1 型プロテインホスファターゼ
PP1 における触媒サブユニットの各イソホームの生理機能解析

学位論文内容の要旨

セリン、スレオニン、チロシン残基への特異的で可逆的なリン酸化の調節により生ずるタンパク質の構造変化は、生体の生理機能において重要な役割を担っている。個々のタンパク質へのリン酸化状態は、そのタンパク質固有のリン酸化を触媒するプロテインキナーゼと脱リン酸化を触媒するプロテインホスファターゼの両活性のバランスにより調節される。プロテインホスファターゼはその基質特異性の差異により、セリン／スレオニン残基特異的、チロシン残基特異的およびスレオニン／チロシン残基特異的の 3 つの群に大別される。本研究は、生体内におけるセリン／スレオニン残基特異的 1 型プロテインホスファターゼ PP1 の 4 つのイソホームの意義を明らかにする目的としている。本論文の要点は以下の 5 点にまとめられる。

1. マウスにおける PP1 の役割を調べる目的で、ラットと同様にマウスにおいても 4 種の PP1 イソホーム、PP1 α 、PP1 γ 1、PP1 γ 2、および PP1 δ が存在することを示し、それらの分別定量を確立した。また、各 PP1 イソホーム間で臓器分布が異なることを明らかにし、それらの役割が異なることを示唆した。

2. グリコゲン代謝における PP1 の役割を明らかにする目的で、インスリン分泌異常による 1 型糖尿病を発症する NOD マウスについて PP1 イソホーム量を検討した。糖尿病発症による血糖値上昇とともに PP1 α の発現量がイソホーム特異的に減少し、この PP1 α がインスリンのターゲット分子のひとつである可能性を示した。

3. 腹水肝癌細胞で正常肝に比べイソホーム特異的に PP1 α の酵素量が増加していることを示し、肝癌細胞の増殖あるいは悪性化における PP1 α の関与を示唆した。

4. 液性免疫を担当するB細胞の分化段階で、PP1 イソホームの発現量を解析した。PP1 α 量はB細胞間で差はなく、これに対しPP1 δ 量に有意な差を見出した。この差異が細胞形態および遊走性に相関していた。細胞骨格のミオシンに結合するPP1Mの調節サブユニットM130/M133についても検討したところ、同様の相関が示された。次にPMA処理により細胞骨格を動かしてPP1Mの動態を調べたところ、A20細胞では濃度依存的にPP1 δ が減少し、CESS細胞ではPP1 δ とM130/M133がともに減少した。これらの結果より、PP1MがB細胞の遊走性に関与している可能性を示した。

5. 未熟B細胞と成熟B細胞の抗原レセプターを介する応答についてPP1の動態を調べた。成熟B細胞株BAL-17は、未熟B細胞株WEHI-231に比べて非核画分でホスホリラーゼホスファターゼ活性が1.4倍高く、この活性上昇は、膜画分におけるものであることがわかり、成熟B細胞に分化する過程でPP1が細胞質画分から膜画分へ移行する可能性が示された。次に抗原レセプター（膜型IgM分子）を介する応答でこの両細胞を比較した結果、両者ともレセプター刺激に伴い、一過性の活性減少が観察された。WEHI-231細胞は刺激後20分で約30%、BAL-17細胞は10分で約10%の活性減少のピークがみられた。これらの活性の変動の間PP1酵素量に変動はなかった。そこで2次元電気泳動後、PP1 イソホームの動態をみたところ、PP1 α にスポットの移動がみられ、PP1 α が何らかの修飾を受けていることが示唆された。しかし、このPP1 α の変動と活性減少との間に時間のずれがあるため、ホロ酵素の調節サブユニットの変化等他の機構による可能性もある。白血病B細胞WEHI-231の非核画分のゲルろ過によりPP1の分子量は110 kDaと算出され、これまでに報告のないホロ酵素分子種であることがわかった。

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 谷 口 和 弥

学 位 論 文 題 名

セリン／スレオニン残基特異的1型プロテインホスファターゼ

PP1における触媒サブユニットの各イソホームの生理機能解析

セリン、スレオニン、チロシン残基への特異的で可逆的なリン酸化の調節により生ずるタンパク質の構造変化は、生体の生理機能において重要な役割を担っている。個々のタンパク質へのリン酸化状態は、プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼの両活性のバランスにより調節される。本研究は、生体内におけるセリン／スレオニン残基特異的1型プロテインホスファターゼ PP1 の4つのイソホームの意義を明らかにすることを目的とする。本論文の要点は以下の5点にまとめられる。

1. マウスにおける PP1 の役割を調べる目的で、ラットと同様にマウスにおいても4種の PP1 イソホーム、PP1 α 、PP1 γ 1、PP1 γ 2、および PP1 δ が存在することを示し、それらの分別定量を確立した。各 PP1 イソホーム間で臓器分布は異なる。

2. 1型糖尿病を発症する NOD マウスについて PP1 イソホーム量を検討した。糖尿病発症による血糖値上昇とともに PP1 α の発現量が特異的に減少していた。

3. 腹水肝癌細胞で正常肝に比べイソホーム特異的に PP1 α の酵素量が増加していることを示し、肝癌細胞の増殖あるいは悪性化における PP1 α の関与を示唆した。

4. PP1 α 量は B 細胞株間で差はなく、これに対し PP1 δ 量とその調節サブユニット-M130/133に有意な差を見出した。この差異が細胞形態および遊走性に相関していた。A20 細胞では PMA 濃度依存的に PP1 δ が減少し、CESS 細胞では PP1 δ と M130/M133がともに

減少し、PP1M がB細胞の遊走性に関与している可能性を示した。

5. 成熟B細胞株 BAL-17 は、未熟B細胞株 WEHI-231 に比べて非核画分でホスホリラーゼホスファターゼ活性が 1.4 倍高く、この活性上昇は、膜画分におけるものであることがわかり、成熟B細胞に分化する過程で PP1 が細胞質画分から膜画分へ移行する可能性が示された。次に抗原レセプター（膜型 IgM 分子）を介する応答で両者ともレセプター刺激に伴い、一過性の活性減少が観察された。これらの活性の変動の間 PP1 酵素量に変動はなかった。2次元電気泳動後、PP1 イソホームの動態をみたところ、PP1 α にスポットの移動がみられ、PP1 α が何らかの修飾を受けていることが示唆された。白血病B細胞 WEHI-231 の PP1 の分子量は 110 kDa と算出され、これまでに報告のないホロ酵素分子種である。

以上の実験成績により、PP1 の4種のイソホームのマウスにおける組織分布を明らかにし、また、糖尿病ラットおよび肝癌における PP1 イソホームの動態を解明した。また免疫系において、種々のB細胞株間で、PP1 イソホームと細胞形態の関係を明らかにし、さらに、B細胞の分化過程における PP1 イソホームの変化を調べた。これらを通じ、PP1 イソホームの各々の特異的な生理機能について重要な新知見を加えた。

これを要するに、著者はセリン/スレオニンプロテインホスファターゼ PP1 の4種のイソホームの生理機能について新知見を得たもので、プロテインホスファターゼの機能面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のあるものと認める。