

学 位 論 文 題 名

肝癌細胞におけるプロテインホスファターゼ1 α 型 (PP1 α) の 遺伝子発現に関する研究

学位論文内容の要旨

蛋白質の可逆的リン酸化は、代謝、細胞増殖、分化、癌化、などの細胞機能の調節において主たる役割を果たしていることが知られている。そのリン酸化をプロテインキナーゼが、脱リン酸化をプロテインホスファターゼが担っている。チロシンキナーゼに多く癌遺伝子が発見されたことから、細胞の癌化において、そのチロシンリン酸化の重要性は良く知られているが、プロテインキナーゼCの活性化剤である TPA に発癌プロモーション活性があること、癌抑制遺伝子 RB の活性調節がセリン・スレオニンリン酸化で行われること、癌遺伝子の多く、特に転写因子がセリン・スレオニンリン酸化で調節されていること、*raf*、*mos*、*mil*などのセリン・スレオニンキナーゼにおいても癌遺伝子が発見されてきたことなどから、近年、セリン・スレオニンリン酸化とその癌化もしくは癌性変異との関連が注目されつつある。PP1においても、2-ハイブリッドによってRBとの結合が確認され、また癌抑制遺伝子 p53 に結合する p53BP2がPP1を阻害すること、分裂異常を起こす酵母変異株の原因遺伝子 *dis2* および *SDS21* がPP1と高いホモロジーを有すること、などの事例からも、PP1と癌性変異との関連が示唆されている。

当研究室において、移植性腹水肝癌細胞株 AH13 内への高グリコーゲン蓄積から、グリコーゲン合成に必須であることが知られているプロテインホスファターゼに注目し、酵素精製によりその性質がウサギでクローニングされていた一型プロテインホスファターゼ (PP1) のものであることが明らかとなり、ラットでの cDNA クローニングにより、その一アイソフォームである PP1 α cDNA を得た。ノーザンブロットングによって正常肝細胞に対する種々の腹水肝癌細胞でのプロテインホスファターゼ mRNA 発現を検討したところ PP1 α のみ様に高発現していた。また、蛋白量、PP1 活性共に上昇しており、その増加は核内で見られた。また肝発癌過程での mRNA の発現上昇、部分肝切除後の肝再生過程、細胞周期を同調した NIH3T3 細胞でも PP1 α mRNA の一過性の発現上昇を観察している。

以上のような背景により、癌化、癌性変異やその代表的な癌の形質の細胞増殖と PP1 との関連を明らかにするため、本研究ではその mRNA 発現上昇の解析を試みた。本論文の要点を以下の四点にまとめた。

1. 移植性腹水肝癌細胞株 AH13 における PP1 α mRNA の高発現の原因を明らかにするため、その mRNA の安定性を肝細胞のものと比較したが、AH13 では安定性の上昇は見られなかった。その

結果、同細胞での PP1 α mRNA の蓄積は、転写速度の上昇によることが明らかになった。

2. 1. の結果から、PP1 α 転写調節機構を解析することが有意義であると考えられたため、そのプロモーター領域の遺伝子、つまり PP1 α 遺伝子 5' -上流域をラットゲノムライブラリーよりクローニングし、その塩基配列を翻訳開始点から上流約 1.8 kbp、下流約 0.4 kbp を決定した。翻訳開始点上流約 300 bp は、非常に高い GC 含量の配列を有し、TATA box、CAAT box は存在しなかった。これは、細胞機能を維持する上で必須な蛋白をコードし、常に低レベルの発現を示す遺伝子である、ハウスキーピング遺伝子のプロモーターの特徴に一致した。また、第一エクソンは 18 アミノ酸残基をコードする領域が含まれていた。

3. 転写開始に関係する領域を同定するため、転写開始点の決定と、レポーター遺伝子による転写活性化能を有する領域の同定を試みた。

転写開始点は高 GC 領域内に複数存在しており、ハウスキーピング遺伝子の特徴と一致した。

また、転写活性化領域を、レポーター遺伝子の実験系で良く用いられる NIH3T3 マウス線維芽細胞株と、腹水肝癌細胞株 AH13 およびそのコントロールとして初代培養肝細胞を使用し、検討した。NIH3T3 および正常肝細胞では、高 GC 領域のみが PP1 α の転写に影響を及ぼしていた。これに対し AH13 では、高 GC 領域のみならず、-0.5 ~ -0.8 kbp の領域が転写活性化にかかわっていることが明らかとなった。

4. 3. に述べた様に、腹水肝癌細胞株 AH13 では高 GC 領域および -0.5 ~ -0.8 kbp の領域で転写活性化していることが明らかとなったため、その領域に結合する因子について検討した。その結果、ゲルシフトアッセイでは、高 GC 領域に対する転写因子 Sp1 の結合量が検討した 5 種の移植性腹水肝癌細胞株すべてで正常肝細胞に比べ増加していた。また、-0.5 ~ -0.8 kbp の約 0.3 kbp の領域のうち、-742 ~ -862 のフラグメントに対し、正常肝細胞核抽出液ではシフトバンドは見られなかったが、AH13 核抽出液では、強いシフトバンドが見られた。このシフトバンドは AH7974F 核抽出液でも観察されたが、AH109A、AH225A の核抽出液では非常に弱く、AH130 核抽出液ではまったく見られなかった。UV クロスリンクによりそのシフトバンド形成に関係する因子の分子量を検討したところ、約 39、35、21 kDa の三つの分子が結合する可能性のあることが明らかとなった。

以上の結果より、種々の移植性腹水肝癌細胞株において PP1 α mRNA 発現上昇するメカニズムは、検討したすべての細胞において Sp1 結合量が増加すること、およびこれに加えて AH13、AH7974F では、正常状態では発現、または DNA 結合活性が抑制されている何らかの因子が活性化していることの両機構によるものであることが明らかとなった。本研究は、腹水肝癌細胞株における PP1 α 高発現の意義を明らかにする上で、足がかりとなる研究である。

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

肝癌細胞におけるプロテインホスファターゼ1 α 型 (PP1 α) の 遺伝子発現に関する研究

蛋白質の可逆的リン酸化は、代謝、細胞増殖、分化、癌化、などの細胞機能の調節において主たる役割を果たしている。その脱リン酸化をプロテインホスファターゼが担っている。チロシンキナーゼに多く癌遺伝子が発見されたことから、細胞の癌化において、そのチロシンリン酸化の重要性は良く知られているが、プロテインキナーゼCの活性化剤であるTPAに発癌プロモーション活性があること、癌抑制遺伝子RBの活性調節がセリン・スレオニンリン酸化で行われること、転写因子がセリン・スレオニンリン酸化で調節されていること、セリン・スレオニンキナーゼにおいても癌遺伝子が発見されてきたことなどから、近年、セリン・スレオニンリン酸化とその癌化もしくは癌性変異との関連が注目されつつある。

当研究室において、種々の腹水肝癌細胞でプロテインホスファターゼ mRNA 発現を検討し、PP1 α の特異的な高発現を観察している。また、蛋白量、PP1 活性共に上昇しており、その増加は核内で見られた。また肝発癌過程での mRNA の発現上昇、部分肝切除後の肝再生過程、細胞周期を同調した NIH3T3 細胞でも PP1 α mRNA の一過性の発現上昇を観察している。

以上のような背景により、癌化、癌性変異やその代表的な癌の形質の細胞増殖と PP1 との関連を明らかにするため、本研究ではその mRNA 発現上昇の解析を試みた。本論文の要点は以下の四点にまとめられる。

1. 移植性腹水肝癌細胞株 AH13 における PP1 α mRNA の高発現の原因を明らかにするため、その mRNA の安定性を肝細胞のものと比較したが、AH13 では安定性の上昇は見られなかった。その結果、同細胞での PP1 α mRNA の蓄積は、転写速度の上昇によることが明らかになった。

2. 1. の結果から、PP1 α 転写調節機構を解析することが有意義であると考えら

れたため、そのプロモーター領域の遺伝子、つまり PP1 α 遺伝子 5' -上流域をラットゲノムライブラリーよりクローニングし、その塩基配列を翻訳開始点から上流約 1.8 kbp、下流約 0.4 kbp を決定した。翻訳開始点上流約 300 bp は、非常に高い GC 含量の配列を有し、TATA box、CAAT box は存在しなかった。

3. 転写開始点は高 GC 領域内に複数存在しており、ハウスキーピング遺伝子の特徴と一致した。

また、転写活性化領域を、NIH3T3 マウス線維芽細胞株と、腹水肝癌細胞株 AH13 およびそのコントロールとして初代培養肝細胞を使用し、検討した。NIH3T3 および正常肝細胞では、高 GC 領域のみが PP1 α の転写に影響を及ぼしていた。これに対し AH13 では、高 GC 領域のみならず、-0.5 ~ -0.8 kbp の領域が転写活性化にかかわっていることが明らかとなった。

4. 高 GC 領域および -0.5 ~ -0.8 kbp の領域に結合する因子について検討した。その結果、ゲルシフトアッセイでは、高 GC 領域に対する転写因子 Sp1 の結合量が検討した 5 種の移植性腹水肝癌細胞株すべてで正常肝細胞に比べ増加していた。また、-0.5 ~ -0.8 kbp の約 0.3 kbp の領域のうち、-742 ~ -862 のフラグメントに対し、正常肝細胞核抽出液ではシフトバンドは見られなかったが、AH13 核抽出液では、強いシフトバンドが見られた。UV クロスリンクによりそのシフトバンド形成に関係する因子の分子量を検討したところ、約 39、35、21 kDa の三つの分子が結合する可能性がある。

以上の実験成績より、PP1 α 遺伝子の 5'-上流域の塩基配列を決定し、転写因子 Sp1 の結合サイトのクラスターの存在を明らかにし、その PP1 α 遺伝子の転写調節機構を明らかにした。次いでこれを土台にして、肝癌の解析へ進み、腹水肝癌細胞において Sp1 の結合量の増大と、さらに上流域でこれと異なる特有なシフトバンドを明らかにした。

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 のイソホーム PP1 α の遺伝子構造を解明してその転写調節機構と肝癌における転写の癌性変異を明らかにしたもので、プロテインホスファターゼの遺伝子調節の面で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。