

学 位 論 文 題 名

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
PP2B の生理的意義の解析ならびにホスファターゼ阻害剤
トウトマイシンの構造／機能相関に関する研究

学位論文内容の要旨

タンパク質のリン酸化／脱リン酸化は、そのタンパク分子の重要な機能調節機構であり、これにより生体機能は可逆的に調節される。タンパク質のリン酸化と脱リン酸化は、それぞれプロテインキナーゼとプロテインホスファターゼにより触媒される。プロテインホスファターゼはその基質特異性によりセリン／スレオニン残基特異的ホスファターゼ、チロシン残基特異的ホスファターゼ、スレオニン／チロシン残基特異的ホスファターゼに分類される。このうちセリン／スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼ（以下セリン／スレオニンホスファターゼ PP とする）は、内在性のインヒビター I-1 および I-2 により阻害される PP1 と阻害されない PP2 に分けられ、PP2 はさらにポリカチオン要求性の PP2A、カルシウム/カルモジュリン要求性の PP2B およびマグネシウム要求性の PP2C に分類される。

本論文において、1 章では生体内での PP2B の役割を明らかにする目的で、脳および免疫担当臓器における PP2B 活性、免疫担当細胞の活性化における本酵素活性の動態、肝癌細胞における PP2B の癌性変異を解析した。2 章では、セリン／スレオニンホスファターゼ阻害剤トウトマイシンの最小機能単位を明らかにする目的で、トウトマイシンの構造／機能相関を調べた。本論文の要点は以下にまとめられる。

1 章： PP2B は、脳での発現が高く、また免疫系においては T 細胞の活性化や細胞死に関与することが知られている。しかし、細胞の応答や病態における本酵素の解析は、ほとんどなされていない。本章では、生体内での PP2B の意義を解析するため、正常および自己免疫疾患モデルマウス *lpr* マウスにおける PP2B の挙動、T 細胞の細胞内情報伝達系での PP2B の動き、老化促進マウスにおける PP1, PP2A, PP2B 活性、および移植性腹水肝癌細胞株と正常肝細胞における PP2B 活性を解析した。

1). マウス PP2B では、脳の mRNA・タンパク発現量が脾臓のそれに比して著しく高いにもかかわらず、活性は逆に脾臓より低かった。また *lpr* マウスにおいて正常マウスに比べ脾臓での活性が 2 倍程度上昇していた。

2). T 細胞の活性化過程では、PP2B 総活性に変化は見られなかった。したがって、T 細胞活性化における PP2B の活性化は、PP2B の量的変化によるものではなく、カルシウムによる PP2B の活性化などの質的上昇によるものと考えられる。

3). 老化促進マウスで脳のホスファターゼ活性を測定した。PP1, PP2A は小脳・前脳で同程度の活性が認められ、加齢による活性変化は見られなかった。しかし PP2B は、前脳で、小脳の約 2 倍の活性を示し、さらに老化促進 P-10 系マウスの前脳で、加齢に伴う PP2B 活性の減少傾向が観察された。

4). 移植性腹水肝癌細胞で PP1 の転写が亢進するとき PP2B 活性は逆に減少しているものが多かった。

以上の実験結果により、PP2B が種々の病態や生理的条件下に、各々異なった分子機構により、量的・質的に調節されていることがわかった。

2 章： 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阻害剤オカダ酸は、T 細胞にアポトーシスを誘導する。本章ではまず、オカダ酸と類似した構造と分子量をもつトウトマイシンを用いて T 細胞へ与える影響を調べた。その結果、トウトマイシンもまた白血病 T 細胞株に対しアポトーシスを誘導することが明らかにされた。

トウトマイシンは PP1 と PP2A を同程度の濃度で阻害するが、オカダ酸はトウトマイシンと類似した構造と分子量をもちながら PP2A を PP1 に比してより強く阻害する。このことは部分構造の差異が活性阻害の特異性を決定していることを強く示唆する。したがって、トウトマイシンの部分構造を用いることにより PP1, PP2A 活性阻害をもたらす最小機能単位の決定、さらに PP1, PP2A それぞれの特異的阻害構造を用いることによりアポトーシス誘導との関係を解析することができる。そこでトウトマイシンおよびその部分合成物や誘導體を用いて、ホスファターゼ活性阻害とアポトーシス誘導について構造/機能相関を調べた。トウトマイシンは無水マレイン酸部分をもつ左セグメントと、スピロケタール構造を含む炭素数 26 の右セグメントからなるが、ホスファターゼ活性阻害には既に報告がある無水マレイン酸部分や C₂₂ の水酸基の重要性の他に、C₂₂-C₂₆ 炭素骨格が必要であると結論された。また活性阻害を示す化合物は、左セグメントを含む活性阻害を示した最小構造の化合物以外は、PP2A より PP1 を強く阻害したことから右セグメントが阻害の特異性を決定していると考えられる。一方、アポトーシス誘導にはトウトマイシンの右セグメントのスピロケタール構造を含む C₁-C₁₈ の骨格が最小単位と考えられ、ホスファターゼ阻害に重要な部分である無水マレイン酸部分を改変した化合物や左セグメントをもたない化合物でもアポトーシス誘導能を示した。さらにアポトーシス誘導の最小骨格と考えられる C₁-C₁₈ 部分の化合物は、ホスファターゼ活性を阻害しなかった。これらのことより、ホスファターゼ阻害作用を示す構造とアポトーシス誘導を引き起こす構造には平行関係は見られず、トウトマイシンによるアポトーシス誘導とホスファターゼ阻害は異なる機序によるものと結論された。また、アポトーシス誘導能を示す最小骨格の C₁-C₁₈ にあるスピロケタール構造は、他のアポトーシス誘導能を示すホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸やチルシフェリル-23-アセテートにも共有されており、これらの化合物においてもアポトーシス誘導とホスファターゼ阻害は異なる機序によるものであると考えられる。

本論文では、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 PP2B の生理機能の解析ならびに PP1, PP2A 阻害剤トウトマイシンの構造/機能相関の解析を行った。今後、さらに脳と免疫系の PP2B の差異を解析するため PP2B の精製などを行う必要がある。また、トウトマイシンにおいては、トウトマイシンのスピロケタール構造をもつ部位を用いたアポトーシスのシグナル伝達分子の探索、他のスピロケタール構造をもつホスファターゼ阻害剤でのアポトーシス誘導とホスファターゼ阻害の関係を解析することにより、その作用機構がさらに解明されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菊 池 九 二 三

副 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 矢 澤 道 生

学位論文題名

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 PP2B の生理的意義の解析ならびにホスファターゼ阻害剤 トウトマイシンの構造／機能相関に関する研究

タンパク質のリン酸化／脱リン酸化は、生体における重要な機能調節機構である。タンパク質の脱リン酸化は、プロテインホスファターゼにより触媒される。本論文において、1章では生体内でのホスファターゼ PP2B の役割を明らかにする目的で、脳および免疫担当臓器における PP2B 活性、免疫担当細胞の活性化における本酵素活性の動態、肝癌細胞における PP2B の癌性変異を解析した。2章では、ホスファターゼ阻害剤トウトマイシンの最小機能単位を明らかにする目的で、トウトマイシンの構造／機能相関を調べた。本論文の要旨は以下にまとめられる。

1章： 生体内における PP2B の意義を明らかにするため、正常および自己免疫疾患モデルマウス *lpr* マウスにおける PP2B の挙動、T細胞の細胞内情報伝達系での PP2B の動き、老化促進マウスにおける PP1, PP2A, PP2B 活性、および移植性腹水肝癌細胞株と正常肝細胞における PP2B 活性を解析した。

1). マウス脳では PP2B の mRNA・タンパク発現量が脾臓のそれに比して著しく高いにもかかわらず、活性は逆に脾臓より低い値を示した。また *lpr* マウスにおいて正常マウスに比べ脾臓での活性が2倍程度上昇していた。

2). T細胞の活性化過程で、PP2B 総活性に変化は見られなかった。したがって、T細胞活性化における PP2B の活性化は、PP2B の量的変化によるものではなく、カルシウムによる PP2B の活性化などの質的上昇によるものと考えられる。

3). 老化促進マウスで脳のホスファターゼ活性を測定した。PP1, PP2A は小脳・前脳で同程度の活性が認められ、PP2A は加齢による活性変化は見られなかったが、PP1 の前脳で加齢にともない約 30%の活性上昇が認められた。また PP2B は、前脳で、小脳の約 2 倍の活性を示し、老化促進マウス、コントロールマウスともに、加齢により前脳の PP2B 活性が減少する個体が多く見られた。

4). 移植性腹水肝癌細胞で PP1 の転写が亢進するとき、PP2B 活性は逆に減少しているものが多かった。

2章： 本章ではまず、トウトマイシンが白血病 T細胞株に対しアポトーシスを誘導することを明らかにした。次いで、トウトマイシンおよびその部分合成物や誘導体を用いて、ホスファターゼ活性阻害とアポトーシス誘導について構造／機能相関を調べた。ト

ウトマイシンは無水マレイン酸部分をもつ炭素数7の左セグメントと、スピロケタール構造を含む炭素数26の右セグメントからなる。ホスファターゼ活性阻害には無水マレイン酸部分やC₂₂の水酸基の重要性が既に報告されているが、阻害活性を示さない左セグメントにC₂₂-C₂₆部分を含む骨格を付加した化合物が阻害活性を示すこと、C₁-C₂₆フラグメントが阻害活性をもつことから、活性阻害にはC₂₂-C₂₆の炭素骨格が重要であると結論された。また左セグメントとC₂₂-C₂₆の炭素骨格を含む活性阻害を示した最小構造の化合物はPP1とPP2Aを同じ濃度で阻害したが、他の活性阻害を示す化合物はすべてPP1をPP2Aよりわずかであるが低濃度で阻害した。このことから右セグメントが阻害の特異性に影響を与えていると考えられる。一方、アポトーシス誘導にはトウトマイシンの右セグメントのスピロケタール構造を含むC₁-C₁₈の骨格が最小単位と考えられ、ホスファターゼ阻害に重要な部分である無水マレイン酸部分を改変した化合物や左セグメントをもたない化合物でもアポトーシス誘導能を示した。さらにアポトーシス誘導の最小骨格と考えられるC₁-C₁₈部分の化合物は、ホスファターゼ活性を阻害しなかった。これらのことより、ホスファターゼ阻害作用を示す構造とアポトーシス誘導を引き起こす構造には平行関係は見られず、トウトマイシンによるアポトーシス誘導とホスファターゼ阻害は異なる機序によるものと結論された。また、アポトーシス誘導能を示す最小骨格のC₁-C₁₈にあるスピロケタール構造は、他のアポトーシス誘導能を示すホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸やチルシフェリル-23-アセテートにも共有されており、これらの化合物においてもアポトーシス誘導とホスファターゼ阻害は異なる機序によるものであると考えられる。

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PP2Bの調節機構ならびにホスファターゼ阻害剤トウトマイシンの構造/機能相関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研究に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。