

学位論文題名

1型プロテインホスファターゼに特異的な阻害蛋白質, CPI17の標的ホスファターゼの探索

学位論文内容の要旨

CPI17は、1型セリン・スレオニンホスファターゼ (PP1) に特異的な阻害蛋白質である。その阻害活性は、プロテインキナーゼC (PKC) によるリン酸化によって活性化される。また、既存の阻害蛋白質、インヒビター1やインヒビター2などとは異なり、レギュレトリーサブユニットを結合したPP1ホロ酵素の活性も完全に阻害する。このことから、CPI17はPP1の活性制御を通じて細胞機能を調節する因子のひとつである、と考えられている。しかし、CPI17の標的となるホスファターゼについては解明されてはいなかった。そこで、本研究ではCPI17をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー法で標的ホスファターゼを単離、同定し、CPI17の生理的役割を明らかにすることを目的とした。

第1章では、組換え体CPI17 (HtCPI17) の発現、精製と、その性質について述べた。アフィニティークラムの作成には大量のHtCPI17が必要となるが、大量発現の結果、4lの液体培地から57.7mgのHtCPI17が得られた。この収量は、リガンドとして用いるのに十分なものであった。得られたHtCPI17は、PKCによってチオリン酸化され、それによってホスファターゼに対する阻害効果が著しく増加した。これらの結果から、HtCPI17は大動脈から単離されたネイティブのCPI17と同じ性質を持つことが示された。

第2章では、大動脈平滑筋の高イオン強度抽出液中における標的ホスファターゼの探索を行った。ホスファターゼは、チオリン酸化HtCPI17 (tpHtCPI17) -Sepharoseカラムにのみ結合した。また、全てのホスファターゼが結合するのではなく、一部のホスファターゼは結合しないことが明らかとなった。カラムに結合しなかったホスファターゼは、CPI17に対する感受性が結合したホスファターゼに比べ低く、CPI17の標的とはなり得ないことが示唆された。カラムに結合したホスファターゼをイオン交換カラムクロマトグラフィーで展開すると、ホスファターゼ活性がいくつかのピークに分かれて溶出した。従って、標的ホスファターゼにはいくつかの種類があることが考えられた。

大動脈平滑筋における標的ホスファターゼのひとつとして、3量体のミオシンホスファターゼ、PP1Mを同定、精製した。PP1Mの活性は、CPI17のリン酸化に依存して阻害された。速度論的解析の結果、阻害様式は混合型阻害であり、その阻害定数は

$K_i=1.9\text{nM}$ 、 $K_i'=5.1\text{nM}$ であった。ウェスタンブロット法で平滑筋細胞中のCPI17の濃度を見積もったところ、約 $0.3\mu\text{M}$ のCPI17が存在することが明らかとなった。以上の結果から、CPI17はPP1M活性の制御を通じて平滑筋収縮をコントロールしていることが示唆された。

第3章では、脳にもCPI17が存在することを示し、標的ホスファターゼを同定した。脳組織の抽出液を用いたウェスタンブロットの結果、CPI17は脳幹に局在していることが明らかとなった。また、脳幹の高イオン強度抽出液を陰イオン交換カラムで展開し、ホスファターゼ阻害活性を測定した結果、カラムの素通り画分に阻害活性が検出された。ウェスタンブロットの結果、この画分に抗HtCPI17抗体と反応する20kDaのシグナルが検出された。これらの結果から、脳幹のCPI17は大動脈で単離されたCPI17と似たような性質をもつことが示唆された。

脳幹抽出液中のCPI17標的ホスファターゼを検索した結果、第2章で見られたのと同じように、CPI17に感受性の高いPP1と低いPP1の2種類が存在することが明らかとなった。また、標的ホスファターゼのひとつとして脳幹のPP1Mを同定、精製した。このPP1Mは従来知られていたものとは異なり、サブユニットのひとつを欠く2量体であった。このPP1Mの活性は、CPI17のリン酸化に依存して阻害された。従って、CPI17は脳幹においてもPP1Mの活性を制御する因子であり、ストレスファイバーや細胞接着などの細胞機能をコントロールしている可能性が示唆された。

以上の結果から、CPI17は大動脈と脳幹の両方の組織において、PP1Mを標的ホスファターゼの一つとしていることが明らかとなった。最近の研究から、PP1Mは平滑筋収縮のみならず、アクチン系からなるストレスファイバーの形成や細胞運動、また、細胞間接着の制御にも関与していることが示されている。このことから、CPI17はPP1Mの活性阻害を通じて、アクチン系の細胞骨格の制御に関与しているものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 谷 口 和 彌
副 査 教 授 菊 池 九 二 三
副 査 教 授 田 村 守

学 位 論 文 題 名

1 型プロテインホスファターゼに特異的な阻害蛋白質, CPI17 の標的ホスファターゼの探索

CPI17は、1型セリン・スレオニンホスファターゼ (PP1) に特異的に作用する強力な阻害タンパク質であり、その阻害活性は、プロテインキナーゼC (PKC) によるリン酸化で活性化される。また、CPI17は、既存の阻害タンパク質とは異なり、PP1ホロ酵素の活性も完全に阻害することができるので、PP1の活性制御を通じて細胞機能を調節する新規な内在性因子であると考えられる。本研究は、CPI17をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィ法を用いて標的として作用するPP1を同定して単離し、CPI17の生理的機能を明らかにすることを目的として行われたものである。

学位論文は3章からなっている。第1章では大腸菌体内発現系を用いたCPI17組み換えタンパク質 (HtCPI17) の発現・精製と、単離したHtCPI17の性質についての結果を述べている。得られたHtCPI17は、大動脈由来のCPI17と同様の性質を示し、PKCによりチオリン酸化するとPP1に対する阻害効果が著しく増強することを明らかにしている。この結果に基づき、HtCPI17をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー法でCPI17の標的となるPP1の探索が可能であることを示した。

第2章では、大動脈平滑筋に含まれるCPI17の標的PP1の探索結果を中心に述べている。PP1は、チオリン酸化した場合にのみHtCPI17Sepharoseゲルに結合すること、また、一部のPP1は、チオリン酸化HtCPI17Sepharoseにも結合せず、CPI17の標的となりえないPP1が存在することが示された。結合したPP1は、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで複数のPP1活性のピークに分離し、CPIの標的PP1にはいくつかの種類があること明らかにしている。これらの中には、3量体構造をとる大動脈平滑筋ミオシンホスファターゼ (PP1M) が含まれることを明らかにした。PP1Mを単離することで、その活性がCPI17のリン酸化に依存して阻害されること、速度論的解析に基づき、その阻害様式は混合型阻害 ($K_i=1.9\text{nM}$, $K_i^{\prime}=5.1\text{nM}$) であることを明らかにした。ついで、Western blot法によりCPI17の平滑筋細胞内濃度 ($0.3\ \mu\text{M}$) を見積もり、CPI17がPP1M活性の制御を通じて平滑筋収縮を調節するに足る濃度で存在することを明らかにしている。

第3章では、脳、特に、脳幹にCPI17が存在し、大動脈平滑筋と同様に、複数の標的PP1が存在することを明らかにしている。従って、脳幹でもCPI17はPP1の活性制御を通じて細胞機能を調節することが示された。脳幹の標的PP1の1つとして、脳幹のPP1Mを同定し精製し、この酵素は、サブユニットの1つを欠く2量体であることを明らかにした。CPI17は脳幹においてストレスファイバーや細胞接着タンパク質のリン酸化を制御することで細胞機

能を調節する可能性を示した。

以上の結果に示されるように、著者はCPI17が、PKCを介したシグナル伝達過程でPP1活性を制御することで細胞機能を調節する新規な内在性PP1阻害タンパク質であることを明らかにした。このうち、大動脈と脳幹の両方の組織で、CPI17がPP1Mを標的酵素とし、平滑筋収縮のみならず非筋細胞のストレスファイバーの形成や細胞骨格、細胞運動、細胞接着の制御に関与している可能性を明らかにした。以上の業績から著者は、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。