

学位論文題名

プロテインホスファターゼPP2Bの新しい活性測定法の確立と  
それによる PP2B の生理的意義の解析,  
ならびにホスファターゼ阻害剤関連化合物  
スピロケタールの構造/機能相関に関する研究

学位論文内容の要旨

本研究では、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の役割を明らかにする目的で、まず粗抽出液における新しい活性測定法を確立し、次いでこれを用いて本酵素の活性分布と量的分布を比較検討し、さらに病態変化を解析した。またホスファターゼ阻害剤の構造/機能相関を調べ、生物活性の発現に要する最小構造を明らかにした。本論文は以下の4章よりなる。

第1章：組織抽出液におけるセリン/スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼ PP2B 活性の測定法の確立

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 (別名カルシニューリン) の、粗抽出液中における正確な PP2B 活性の測定法はこれまでに確立されていなかった。本章では、粗抽出液中における活性測定法を確立した。

基質として用いたりコンビナント I-1 は、PP1 に対する活性阻害作用および基質 PP2B に対する親和性がウサギから精製された I-1 と同程度であった。よって、大腸菌発現のコンビナントも良い基質であることが明らかとなった。抽出時に  $\text{Ca}^{2+}$  のみをキレートし、50%グリセロール存在下-20℃保存によって、少なくとも2ヶ月は安定な活性を示した。反応中の失活は、反応溶液にアスコルビン酸を添加することにより抑えることができた。測定された活性は完全に  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 依存性であり、少なくとも10分間は安定な活性を示した。またオカダ酸に対して低感受性があり、NaF および FK506-FKBP12 によって強く阻害されたことから、測定された活性は PP2B に由来するものと結論した。最も反応性の高い基質 I-1 を用い、5 mM アスコルビン酸によって安定化して反応時間をのばすことで、従来の方法に比べ100-200倍の感度を得ることが出来た。

第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 PP2B の組織および脳内分布

PP2B は神経系組織に多量に存在し、脳においては他の組織の10倍以上の含量があることが、これまでにノーザンブロットングおよびウエスタンブロットングによって明らかにされている。しかし、脳における PP2B 活性は骨格筋と同程度の大きさであると報告されていた。本章では新たに確立された活性測定法を用いて、各組織の粗抽出液における PP2B 活性を測定した。また、脳を6部位に分離し PP2B 活性の脳内局在を調べた。

各組織における PP2B 活性は、全脳、肺、肝臓、心臓、脾臓、骨格筋、精巣、胸腺、腎臓、および卵巣でそれぞれ、22.3, 2.5, 0.36, 0.85, 2.9, 2.2, 1.5, 2.3, 0.7, および 1.7 mU/mg であった。

この結果は、これまでのノーザンブロットィングおよびウエスタンブロットィングによる報告とよく一致するものであった。また大脳、中脳 + 間脳、線条体、海馬、小脳、および脳幹における PP2B 活性はそれぞれ、26.1, 13.7, 42.8, 40.5, 15.1, および 8.6 mU/mg であった。以上より、本章で確立した測定法は、粗抽出中の PP2B 活性の測定法としては、従来のものに比べはるかに優れていること、また PP2B が各組織および各脳内部位によって大きく異なり、異なった生理作用を担う可能性が示された。

脳における PP2B は他の組織における PP2B に比べ、組織摘出後の失活がはやいことが明らかとなり、このため、これまで正確な活性の組織分布が得られなかったと考えられた。

### 第 3 章：種々の病態における PP2B 活性

PP2B の種々の病態変化を解析した。これらの研究は以下の 3 点に要約される、すなわち、1. 老化促進モデルマウス (SAM) における変化、2. 心不全および心筋症モデルにおける変化、3. ラット原発性肝癌における差異の検討。

1. PP1, PP2A および PP2B の脳内の病態変異を明らかにする目的で、脳を 6 つの部位に分離し活性を解析した。老化促進症状を示す SAM P-10 および正常老化を示す R-1 において、大脳、小脳、海馬、線条体、脳幹、そして中脳 + 間脳のそれぞれの部位における PP1, PP2A, および PP2B の活性の加齢による変化を測定した。その結果 P-10 と R-1 に大きな変化はなく、加齢に伴う変化もないことがわかった。

2. 最近、心不全、とくに肥大性心筋症の発症に PP2B が深く関わっていることが明らかとなった。今回、ランゲンドルフ灌流法により調製した心不全モデルおよび心筋症ハムスター J-2-N の心臓を用いてそれらの PP2B 活性を測定した。

10 分間の心虚血および心臓の停止、および心筋症ハムスター J-2-N で PP2B 活性の変化は見られなかった。

3. 原発性肝癌と PP2B の関連を調べるために原発性肝癌組織での PP2B の B サブユニット mRNA 発現量をノーザンブロットィングにて定量し、正常肝のそれと比較検討した。原発性肝癌組織としては、3'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼン (3'-Me-DAB) 投与により誘発したラット由来の肝癌組織 (以下 DAB 肝癌)、Solt-Farber モデルにより肝癌を誘発したラット由来の肝癌組織 (以下 S/F 肝癌) の 2 種を用いた。その結果、原発性肝癌組織では PP2B の mRNA 発現には特異な癌性変倚は見られなかった。

### 第 4 章：スピロケタール化合物の構造とアポトーシス誘導活性の相関

ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸は、種々の細胞にアポトーシスを誘導する。当研究室では以前、プロテインホスファターゼの特異的阻害剤であるチルシフェリル-23-アセテート (TF23A)、およびトウトマイシンのホスファターゼ阻害活性とアポトーシス誘導作用の相関を調べた。合成中間体や誘導体を用いて解析した結果、これら 2 つの生物学的活性の発現には、同一分子内の互いに異なる部分構造が寄与していることを明らかにした。また、トウトマイシンのアポトーシス誘導にはスピロケタールが重要であることも示した。スピロケタールはオカダ酸にも含まれていることから、これがオカダ酸の生物活性に寄与している可能性が考えられた。

本章では 10 種類のスピロケタール化合物を合成し、アポトーシス誘導活性と構造との関係を調べ、以下の結果を得た。

用いたすべてのスピロケタール化合物は、PP1 および PP2A に対し阻害作用を示さなかったが、スピロケタールの 8 位にベンジルオキシメチル基をもつ化合物 7 は、白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞に対してアポトーシスを伴う最も強い細胞毒性 (LC<sub>50</sub>=14μM) を示した。化合物 7 の構造は、オカダ

酸の右翼のスピロケタール部分に類似した構造であった。

以上のことから、従来報告されたオカダ酸のアポトーシス誘導作用は、オカダ酸の PP 阻害作用のみに帰因するものではなく、スピロケタール構造によるものも考慮されなければならないことがわかった。PP 阻害活性をもたない化合物 7 は、アポトーシスの新しいシグナル伝達解明のため有用と考えられる。

# 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

### プロテインホスファターゼPP2Bの新しい活性測定法の確立と それによる PP2B の生理的意義の解析， ならびにホスファターゼ阻害剤関連化合物 スピロケタールの構造/機能相関に関する研究

本研究では、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 の役割を明らかにする目的で、まず粗抽出液における活性測定法を確立し、次いでこれを用いて本酵素の活性分布と量的分布を比較検討し、さらに病態変化を解析した。またホスファターゼ阻害剤の構造/機能相関を調べ、生物活性の発現に要する最小構造を明らかにした。本論文は以下の4章よりなる。

#### 第1章：組織抽出液におけるホスファターゼ PP2B 活性の測定法の確立

ホスファターゼ PP2B (別名カルシニューリン) の、粗抽出液中における PP2B 活性の測定法はこれまでに確立されていなかった。本章では、ラット脳および脾臓の粗抽出液を用いて活性測定条件を検討し、測定法を確立した。

抽出および保存時に  $\text{Ca}^{2+}$  のみをキレートすることで、少なくとも2ヶ月は安定に保存できた。基質としては PP2B に対する選択性および親和性が最も優れているリコンビナントインヒビター-1 (I-1) を用いた。反応中の失活は、反応溶液に5 mM アスコルビン酸を添加することにより抑えることができた。測定された活性は完全に PP2B に由来する性質を示した。これら良い基質の使用と反応の安定化により、従来の方法に比べ100-200倍の感度を得ることが出来た。

#### 第2章：ホスファターゼ PP2B の組織および脳内分布

これまで PP2B 活性の正確な組織分布は報告されていない。そこで本章では新たに確立された活性測定法を用いて、各組織の粗抽出液における PP2B 活性を測定した。また、脳を6部位に分離し PP2B 活性の脳内局在を調べた。

PP2B 活性は、全脳、肺、肝臓、心臓、脾臓、骨格筋、精巣、胸腺、腎臓、卵巣、大

脳、中脳 + 間脳、線条体、海馬、小脳、および、脳幹でそれぞれ、22.3, 2.5, 0.36, 0.85, 2.9, 2.2, 1.5, 2.3, 0.7, 1.7, 26.1, 13.7, 42.8, 40.5, 15.1, および 8.6 mU/mg であった。これらの結果により、これまでの PP2B 酵素タンパク量の分布の知見とよく一致することを初めて明らかにした。このことから本研究で確立した測定法が、従来のものに比べはるかに優れていること、また PP2B が各組織および各脳内部位によって大きく異なり、異なった生理作用が PP2B の量的な変化により調節されている可能性が示された。

脳における PP2B は他の組織における PP2B に比べ、組織摘出後の失活がきわめて早いことが明らかとなり、このような急速で特異的な失活のため、これまでに正確な活性分布が得られなかったと考えられた。

### 第 3 章：種々の病態における PP2B 活性

PP2B が関与していると考えられる種々の病態における、PP2B 活性の変化を解析した。まず老化促進症状を示す SAM P-10 および正常老化を示す R-1 の脳においては、両者に大きな差異はなかった。

心不全モデルおよび心筋症ハムスター J-2-N の心臓を用いてそれらの PP2B 活性を測定したが、虚血や疾患と関連づけられる PP2B 活性の変化は見られなかった。

また原発性肝癌と PP2B の関連を調べるために原発性肝癌組織での PP2B をノーザンブロッティングにて定量し、正常肝のそれと比較検討した。その結果、原発性肝癌組織では PP2B の mRNA 発現には特異な癌性変倚は見られなかった。

以上により PP2B のこれら病態への関与は、PP2B の量的変化ではなく、質的な変化に基づくものと考えられた。

### 第 4 章：スピロケタール化合物の構造とアポトーシス誘導活性の相関

これまでに当研究室では、トウトマイシンのアポトーシス誘導にはスピロケタールが重要であることを示した。本章では 10 種類のスピロケタール化合物を合成し、アポトーシス誘導活性と構造との関係を調べ、以下の結果を得た。

用いたすべてのスピロケタール化合物は、PP1 および PP2A に対し阻害作用を示さなかったが、スピロケタールの 8 位にベンジルオキシメチル基をもつ化合物は、白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞に対してアポトーシスを伴う最も強い細胞毒性 ( $LC_{50}=14\mu M$ ) を示した。この化合物の構造は、オカダ酸の右翼のスピロケタール部分に類似した構造であった。

以上のことから、従来報告されたオカダ酸のアポトーシス誘導作用は、オカダ酸の PP 阻害作用のみに帰因するものではなく、スピロケタール構造によるものも考慮されなければならないことが示唆された。PP 阻害活性をもたないこの化合物は、アポトーシスの新しいシグナル伝達解明のため有用と考えられる。

以上を要するに、申請者はセリン/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、申請者は、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。