

学 位 論 文 題 名

1 型プロテインホスファターゼに対する新規阻害タンパク質 Inhibitor-4 の構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

本論文では、EST (expression sequence tag) データベースより見出した 1 型プロテインホスファターゼ (PP1) に対する新規阻害タンパク質 Inhibitor-4 (I-4) の分子特性を明らかにすることを目的として、I-4 のクローニング・生化学的性状解析・遺伝子発現について検討を行い、その PP1 に対する阻害機構や生理機能について考察を行った。本論文は、以下の 6 章から成っている。

第 1 章：序論

第 2 章：Inhibitor-4 cDNA の単離

human Inhibitor-2 (I-2) の塩基配列をプローブとして、EST データベースをスクリーニングした結果得られたクローンは、アミノ酸レベルで I-2 に対し約 44% の相同性を持っていた。その構造から新規 PP1 阻害タンパク質であることが考えられたので、これを Inhibitor-4 (I-4) と名付けた。I-4 は 202 のアミノ酸残基からなり、アミノ酸配列による二次構造および疎水性予測解析の結果、ヘリックス構造を多く持つ親水性に富んだ分子であった。

第 3 章：Inhibitor-4 の機能解析

I-4 を GST 融合タンパク質として大腸菌より発現させ、プロテインホスファターゼに対する阻害活性などの生化学的性状について検討した。その結果、I-4 は PP1 を特異的に阻害し、その阻害活性 ($IC_{50}=0.2$ nM) は非常に強いものであった。PP1 の触媒サブユニット (PP1C) に存在する 4 つの isoform ($\alpha, \gamma 1, \gamma 2, \delta$) を同等に阻害し、PP1C に対する特異性は認められなかった。また、PP1 のホロ酵素の 1 つであるミオシン軽鎖ホスファターゼ (PP1C と M-subunit の複合体, PP1M) に対する阻害活性についても検討した。I-4 は、PP1M とプレインキュベーションすることにより、PP1M の活性を強く阻害することができた。このとき、GST-I-4 に結合している PP1C の量はプレインキュベーションの時間依存的に増加していたが、I-4 に対する M-subunit の結合は認められなかった。すなわち、I-4 が M-subunit に拮抗的に PP1C と結合することによって、PP1M の阻害をすることが示された。

第 4 章：Inhibitor-4 による PP1 阻害の分子機構

I-4 の deletion mutant を用いて、I-4 の阻害機構の検討を行った。PP1C に対する I-4 の結合サイトは、少なくとも 3 カ所、Site-1 (11-18)、Site-2 (19-123)、Site-3 (132-202) に存在することが明らかとなった。

(1) Site-1 の 11-18 の領域が I-4 と PP1C との結合において最も寄与が大きいことが示された。また、Site-1 を deletion させた I-4 (19-202) の阻害活性は wild-type の I-4 に対し約 1/150 まで低下し、Site-1 の deletion による結合活性の減少とよく相関していた。

(2) Site-1 と Site-2 の両方を含む mutant は、wild-type の I-4 に対し拮抗的に働くことから、少なくとも 2 つの箇所による結合が PP1C との安定な結合を形成するためには重要であることが明らかとなった。

(3) Site-3 を deletion すると、阻害活性が全くみえなくなる。また、Site-3 のみでも阻害活性を示すことから、阻害には Site-3 が必須であることが明らかとなった。Site-3 は、触媒部位に親和性を持つことが示唆された。

これらの結果から、PP1 に対する I-4 の阻害は、N 末端の結合領域 (11-18) を中心とした I-4 に存在する複数の結合サイトが、PP1C に結合することによってなされているためと考えられた。

第 5 章：Inhibitor-4 の発現と細胞内局在

Northern blotting 法によって、I-4 mRNA の発現を調べたが、ヒト正常組織にその発現は見られなかった。ヒト由来の cell line から RNA を精製し、RT-PCR 法により調べたところ、Hela 細胞等のガン細胞において I-4 mRNA の発現が認められた。さらに多くのヒト組織やガン細胞について、この発現を検討する必要があると思われる。

I-4 に FLAG-tag を付加し、その細胞内での発現を免疫染色法によって観察した。wild-type の I-4 は核膜に局在するが、その 2 つの deletion mutant (1-131, 19-202) では、その局在がいずれも細胞質に変化することが明らかとなった。2 つの deletion mutant は、各々異なる PP1C 結合サイトを deletion したものであることから、I-4 と PP1C との結合が、I-4 の核膜への局在に関与していることが示唆された。

第 6 章：総括と展望

本研究で行った以上の解析によって、I-4 の生化学的性状、阻害機構を明らかにすることができ、さらに I-4 の遺伝子発現は、その生理機能を考える上で非常に興味深い情報を得ることができた。I-4 の生理機能については、今後さらなる検討が必要であり、その解析結果によっては、PP1 の新しい機能を見出せると思われる。

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

副 査 教 授 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

1 型プロテインホスファターゼに対する新規阻害タンパク質

Inhibitor-4 の構造と機能に関する研究

1 型セリン／スレオニンプロテインホスファターゼ (PP1) は、最も重要なセリン／スレオニホスファターゼのひとつである。申請者は、PP1 の生理的意義を明らかにする目的から、その機能調節タンパクを探索し、新規阻害タンパク質 Inhibitor-4 (I-4) の存在を明らかにし、次いで I-4 のクローニング・生化学的性状解析・遺伝子発現について検討を行い、I-4 の構造／機能相関を解析し、PP1 に対する阻害機構や生理機能について考察を加えた。本論文の要旨は、以下の 4 点にまとめられる。

1. Inhibitor-4 cDNA の単離：

human Inhibitor-2 (I-2) の塩基配列をプローブとして、EST データベースをスクリーニングした結果得られたクローンは、アミノ酸レベルで I-2 に対し約 44% の相同性を持っていた。その構造から新規 PP1 阻害タンパク質であることが考えられたので、これを Inhibitor-4 (I-4) と名付けた。I-4 は 202 のアミノ酸残基からなり、アミノ酸配列による二次構造および疎水性予測解析の結果、ヘリックス構造を多く持つ親水性に富んだ分子であった。

2. Inhibitor-4 の機能解析：

I-4 を GST 融合タンパク質として大腸菌より発現させ、プロテインホスファターゼに対する阻害活性などの生化学的性状について検討した。その結果、I-4 は PP1 を特異的に阻害し、その阻害活性 ($IC_{50}=0.2$ nM) は非常に強いものであった。PP1 の触媒サブユニット (PP1C) に存在する 4 つの isoform (α , $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ) を同等に阻害し、PP1C に対する特異性は認められなかった。また、PP1 のホロ酵素の 1 つであるミオシン軽鎖ホスファターゼ (PP1C と M-subunit の複合体、

PP1M) に対する阻害活性についても検討した。I-4 は、PP1M とプレインキュベーションすることにより、PP1M の活性を強く阻害した。このとき、GST-I-4 に結合している PP1C の量はプレインキュベーションの時間依存的に増加したが、I-4 に対する M-subunit の結合は認められなかった。すなわち、I-4 が M-subunit に競争的に PP1C と結合することにより、PP1M の阻害をすることが示された。

3. Inhibitor-4 による PP1 阻害の分子機構：

I-4 の deletion mutant を用いて、I-4 の阻害機構の検討を行った。その結果；

- (1) Site-1(11-18)の領域が I-4 と PP1C との結合において最も寄与が大きい。
- (2) Site-1 と Site-2(19-123)の両方を含む mutant は、wild-type の I-4 に対し競争的に働く。
- (3) Site-3(132-202)の領域を deletion すると、阻害活性が消失する。Site-3 のみでも阻害活性を示す。

これらの結果から、PP1 に対する I-4 の阻害は、N 末端の結合領域 (11-18) を中心とした I-4 に存在する複数の結合サイトが PP1C に結合することによると考えられた。

4. Inhibitor-4 の発現と細胞内局在：

Northern blotting 法によって、I-4 mRNA の発現を調べたが、ヒト正常組織にその発現は見られなかった。ヒト由来の cell line から RNA を精製し、RT-PCR 法により調べたところ、Hela 細胞等のガン細胞において I-4 mRNA の発現が認められた。I-4 に FLAG-tag を付加し、その細胞内での発現を免疫染色法によって観察したところ、wild-type の I-4 は核膜に局在するが、その 2 つの deletion mutant (1-131, 19-202) では、その局在がいずれも細胞質に変化することが明らかとなった。2 つの deletion mutant は、各々異なる PP1C 結合サイトを deletion したものであることから、I-4 と PP1C との結合が、I-4 の核膜への局在に関与していることが示唆された。

以上を要するに、申請者は PP1 の新規阻害タンパクを見出し、その構造／機能相関を明らかにしたもので、PP1 研究において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。