

学 位 論 文 題 名

NIPP1 による pre-mRNA プロセッシングシステム制御機構

学位論文内容の要旨

1 型 Ser/Thr 残基特異的プロテインホスファターゼ (PP1) は、PP2A と共に細胞内ホスファターゼの大部分を占め、種々の細胞機能の制御に関与することが示唆されている。PP1 は、触媒サブユニット (PP1c) と多彩な制御サブユニットとのホロ酵素として存在しており、PP1 の細胞内局在・特異性・活性の調節は、主に、制御サブユニットが担っていることが明らかになってきた。核内 PP1 制御サブユニットである NIPP1 は、PP1c に対する阻害タンパクとして発見されて以来、主に *in vitro* での解析が行われ、リン酸化により PP1c に対する阻害能が減少すること、RNA 結合能があること等が知られているが、その生理機能については明らかではない。本研究は、NIPP1 の機能に関し知見を得ることを目的とした。その結果、NIPP1 が、遺伝情報の発現を転写後の段階で調節する機能をもつことを見出した。また、リン酸化を介した *in vivo* における NIPP1 制御機構についても若干の解析を試みた。得られた知見のうち、重要なものを以下の 6 点にまとめ、本論文の要旨とする。

1. NIPP1 は、脳・胸腺・脾臓・肺において、高い発現が見られた。

また、正常肝に比べ、DAB 肝癌および移植性腹水肝癌細胞において NIPP1 mRNA の著しい発現上昇が見られた。

2. 種々のレポーター遺伝子と野生型 NIPP1 あるいは変異型 NIPP1 を培養細胞に共発現させ、遺伝子情報発現過程における NIPP1 の役割を検討した。NIPP1 は、pre-mRNA スプライシングを促進させる作用を持つことが示唆された。また、この機能には、NIPP1 の FHA ドメイン、RNA 結合領域および PP1c との会合、のいずれもが重要であることが示唆された。
3. NIPP1 には、スプライシングに非依存的に、mRNA の翻訳効率を調節する機能もあることが示唆された。

4. 免疫染色法による解析により、NIPP1 は圧倒的に細胞の核に存在し、核内で細かな斑点状 (speckled パターン) に分布していることが明らかになった。また、NIPP1 が、核—細胞質間をシャトルしていること、さらに、細胞分裂の課程で、その局在を大きく変化させることが明らかになった。
5. NIPP1 の *in vivo* におけるリン酸化について解析を行った。NIPP1 のリン酸化レベルに、組織特異性があることがわかった。調べた中では、胸腺において、最も NIPP1 のリン酸化度が高かった。また、TCR 刺激あるいは強発現させた PKA により NIPP1 のリン酸化が誘導された。

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

NIPP1 による pre-mRNA プロセッシングシステム制御機構

1 型 Ser/Thr 残基特異的プロテインホスファターゼ (PP1) は、PP2A と共に細胞内ホスファターゼの大部分を占め、種々の細胞機能の制御に関与することが示唆されている。PP1 は、触媒サブユニット (PP1c) と多彩な制御サブユニットとのホロ酵素として存在しており、PP1 の細胞内局在・特異性・活性の調節は、主に、制御サブユニットが担っていることが明らかになってきた。核内 PP1 制御サブユニットである NIPP1 は、PP1c に対する阻害タンパクとして発見されて以来、主に *in vitro* での解析が行われ、リン酸化により PP1c に対する阻害能が減少すること、RNA 結合能があること等が知られているが、その生理機能については明らかではない。本研究は、NIPP1 の機能に関し知見を得ることを目的とした。その結果、NIPP1 が、遺伝情報の発現を転写後の段階で調節する機能をもつことを見出した。また、リン酸化を介した *in vivo* における NIPP1 制御機構についても若干の解析を試みた。本論文の要点は、以下の 6 点にまとめられる。

1. Solt-Farber 肝発癌モデルに従って誘発した肝癌では、NIPP1 mRNA の発現上昇が認められなかった一方、DAB 肝癌および移植性腹水肝癌で著しい発現上昇がみられた。また、NIPP1 mRNA は、脳・胸線・脾臓・骨髄において、比較的高い発現がみられた。一方、タンパク質レベルでは、脳・胸線・脾臓・肺において、高い発現がみられた。
2. 種々のレポーター遺伝子と野生型 NIPP1 あるいは変異型 NIPP1 を培養細胞に共発現させ、遺伝子情報発現過程における NIPP1 の役割を検討した。NIPP1 は、pre-mRNA スプライシングを促進させる作用を持つことが示唆された。また、

この機能には、NIPP1 の FHA ドメイン、RNA 結合領域および PP1c との会合、のいずれもが重要であることが示された。

3. NIPP1 には、スプライシングに非依存的に、mRNA の翻訳効率を調節する機能もあることが示唆された。
4. 免疫染色法による解析により、NIPP1 は圧倒的に細胞の核に存在し、核内で細かな斑点状 (speckled パターン) に分布していることが明らかになった。また、ヘテロキャリアオンアッセイにより、NIPP1 が核—細胞質間をシャトルしていることが明らかになった。さらに、間期において核内にみられる NIPP1 は、細胞分裂の過程で、その局在を大きく変化させることが明らかになった。
5. NIPP1 の *in vivo* におけるリン酸化について解析を行った。NIPP1 のリン酸化レベルに、組織特異性があることがわかった。調べた中では、胸腺において、最も NIPP1 のリン酸化度が高かった。Jurkat 細胞においては、TCR 刺激によりリン酸化型 NIPP1 が増加し、最大 3 ケ所においてリン酸化されていた。また、PKA の共発現により、NIPP1 のリン酸化が誘導され、最大で 4 ケ所のリン酸化を受けていた。変異体を用いた解析により、そのうち 2 ケ所は Ser199 および Ser178 であることが示唆された。

これを要するに、著者は核内 PP1 制御サブユニットである NIPP1 の、遺伝子情報発現における転写後の段階の調節機能について新知見を得たもので、NIPP1 の機能面において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。