

特異的内因性阻害タンパクインヒビター2による 1型セリン/スレオニンホスファターゼ PP1 の 制御機構に関する研究

学位論文内容の要旨

インヒビター2 (I-2) は、1型セリン/スレオニンホスファターゼ PP1 に対する特異的な内因性阻害タンパクとして知られている。試験管内における、I-2 の PP1 触媒サブユニット PP1C に対する活性阻害能は高く、 IC_{50} は約 2nM とされている。しかし、I-2 の Thr72 がグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β (GSK-3 β) によりリン酸化されると、PP1 活性が回復する。このとき I-2 は PP1 に結合したままである。またこの他に、I-2 の Ser86、Ser120 および Ser121 はカゼインキナーゼ 2 (CK2) によりリン酸化されることが知られている。これらセリン残基のリン酸化による I-2 の PP1 阻害能に変化はないが、Ser86 のリン酸化は GSK-3 β が I-2 の Thr72 を効率的にリン酸化するために必要であることが明らかにされた。このように、I-2 に関して試験管内における知見は蓄積しているのに対し、細胞内における機能に関しては報告は極めて少なく、不明な点が多く残されている。本研究は、I-2 および PP1C/I-2 複合体の生理的意義に関する知見を得ることを目的とし、I-2 を発現する誘導発現クローンあるいは一過性な発現系を用いて、I-2 の細胞内における機能を検討した。本論文は以下の4章より構成されている。

第1章では、Cre-loxP システムを用いた I-2-FLAG の誘導発現クローンを樹立し、PP1 活性への影響を検討した。I-2-FLAG の過剰発現により、Total PP1 活性が 20~30% 低下した。また、免疫沈降により I-2 と PP1C α 、C γ 1、および C δ との共沈が確認され、I-2 と共沈した PP1 のホスファターゼ活性はほとんどが阻害されていた。

第2章では、I-2-FLAG の発現誘導クローンを用いて I-2-FLAG の過剰発現が細胞の増殖に及ぼす効果を検討した。I-2-FLAG の過剰発現は細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。

第3章では、細胞内における I-2 の Thr72 のリン酸化について検討した。I-2-FLAG の誘導発現クローンにおいて I-2 の Thr72 のリン酸化が検出され、GSK-3 β を共発現することにより一過性の発現系においても検出された。免疫沈降により I-2 と GSK-3 β が共沈し

た。この共沈には GSK-3 β のキナーゼ活性を必要としたが、I-2 の Thr72 のリン酸化は必要としなかった。I-2 と GSK-3 β の共沈は、PP1C の共発現によりさらに増強したが、試験管内では PP1C の存在下においても I-2 と GSK-3 β との共沈は検出されなかった。I-2 と GSK-3 β との共発現時においてのみ、I-2 と共沈する他のタンパクの存在が CBB 染色によって確認された。誘導発現クローンにおいて、I-2-FLAG の免疫沈降物に Mg および ATP を加えてインキュベートすると、I-2-FLAG と共沈した内在性 PP1 の活性が上昇した。この活性上昇は、I-2 と共沈した内在性 GSK-3 β が I-2-FLAG の Thr72 をリン酸化した結果であることが示唆された。

第 4 章では、細胞内における I-2 のチロシンリン酸化を検討した。細胞を pervanadate で処理すると SDS-PAGE における I-2 の上方へのバンドシフトが見いだされた。抗ホスホチロシン抗体を用いたイムノブロットにより、このバンドシフトはチロシン残基のリン酸化によるものであることがわかった。変異型 I-2 を用いた解析から、細胞の pervanadate 処理による I-2 のチロシンリン酸化部位は Tyr62 であることが明らかとなった。I-2 の Tyr62 周辺のアミノ酸配列は、PI3 キナーゼの調節サブユニットである p85 の認識配列、pY-X-X-M に相当したが、Tyr62 がリン酸化された I-2 は p85 と結合はしなかった。

以上、本研究はインヒビター 2 が細胞内において PP1 阻害能を有すること、又、Thr72、Tyr62 のリン酸化されることおよび PP1、GSK-3 β と複合体を形成することを明らかにした。

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

特異的内因性阻害タンパクインヒビター 2 による 1 型セリン／スレオニンホスファターゼ PP1 の 制御機構に関する研究

インヒビター 2 (I-2) は、1 型セリン/スレオニンホスファターゼ PP1 に対する特異的な内因性阻害タンパクとして知られている。試験管内における、I-2 の PP1 触媒サブユニット PP1C に対する活性阻害能は高く、 IC_{50} は約 2nM とされている。しかし、I-2 の Thr72 がグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β (GSK-3 β) によりリン酸化されると、PP1 活性が回復する。このとき I-2 は PP1 に結合したままである。またこの他に、I-2 の Ser86、Ser120 および Ser121 はカゼインキナーゼ 2 (CK2) によりリン酸化されることが知られている。これらセリン残基のリン酸化による I-2 の PP1 阻害能に変化はないが、Ser86 のリン酸化は GSK-3 β が I-2 の Thr72 を効率的にリン酸化するために必要であることが明らかにされた。このように、I-2 に関して試験管内における知見は蓄積しているのに対し、細胞内における機能に関しては報告は極めて少なく、不明な点が多く残されている。本研究は、I-2 および PP1C/I-2 複合体の生理的意義に関する知見を得ることを目的とし、I-2 を発現する誘導発現クローンあるいは一過性な発現系を用いて、I-2 の細胞内における機能を検討した。本論文の要旨は以下の 4 点にまとめられる。

1. Cre-loxP システムを用いた I-2-FLAG の誘導発現クローンを樹立し、PP1 活性への影響を検討した。I-2-FLAG の過剰発現により、Total PP1 活性が 20~30% 低下した。また、免疫沈降により I-2 と PP1C α 、C γ 1、および C δ との共沈が確認され、I-2 と共沈した PP1 のホスファターゼ活性はほとんどが阻害されていた。
2. I-2-FLAG の発現誘導クローンを用いて I-2-FLAG の過剰発現が細胞の増殖に及ぼす効果を検討した。I-2-FLAG の過剰発現は細胞の増殖には影響を及ぼさなかつ

た。

3. 細胞内における I-2 の Thr72 のリン酸化について検討した。I-2-FLAG の誘導発現クローンにおいて I-2 の Thr72 のリン酸化が検出され、GSK-3 β を共発現することにより一過性の発現系においても検出された。免疫沈降により I-2 と GSK-3 β が共沈した。この共沈には GSK-3 β のキナーゼ活性を必要としたが、I-2 の Thr72 のリン酸化は必要としなかった。I-2 と GSK-3 β の共沈は、PP1C の共発現によりさらに増強したが、試験管内では PP1C の存在下においても I-2 と GSK-3 β との共沈は検出されなかった。I-2 と GSK-3 β との共発現時においてのみ、I-2 と共沈する他のタンパクの存在が CBB 染色によって確認された。誘導発現クローンにおいて、I-2-FLAG の免疫沈降物に Mg および ATP を加えてインキュベートすると、I-2-FLAG と共沈した内在性 PP1 の活性が上昇した。この活性上昇は、I-2 と共沈した内在性 GSK-3 β が I-2-FLAG の Thr72 をリン酸化した結果であることが示唆された。
4. 細胞内における I-2 のチロシンリン酸化を検討した。細胞を pervanadate で処理すると SDS-PAGE における I-2 の上方へのバンドシフトが見いだされた。抗ホスチロシン抗体を用いたイムノブロットにより、このバンドシフトはチロシン残基のリン酸化によるものであることがわかった。変異型 I-2 を用いた解析から、細胞の pervanadate 処理による I-2 のチロシンリン酸化部位は Tyr62 であることが明らかとなった。I-2 の Tyr62 周辺のアミノ酸配列は、PI3 キナーゼの調節サブユニットである p85 の認識配列、pY-X-X-M に相当したが、Tyr62 がリン酸化された I-2 は p85 と結合はしなかった。

これを要するに、著者は内因性の PP1 阻害ペプチドインヒビター-2 が細胞内において PP1 阻害能を有すること、また Thr72 および Tyr62 がリン酸化されること、および PP1 および GSK-3 β と I-2 が複合体を形成することを明らかにした。これらは、PP1 の細胞内における存在様式および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者と認める。