

学位論文題名

プロテインホスファターゼ 2 A 阻害タンパク質 I-1^{PP2A}
および I-2^{PP2A} の生理機能に関する研究

学位論文内容の要旨

I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} はプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) の阻害タンパクとして単離されたほか、様々な分野からの報告がなされてきた分子である。種々の癌遺伝子による NIH3T3 細胞のトランスフォーメーションを抑制する癌抑制遺伝子産物、pp32 は cDNA クローニングから I-1^{PP2A} と同一の分子であることが知られている。また、急性骨髄性白血病において染色体転座する遺伝子 set は I-2^{PP2A} をコードしていた。しかしながら、これらの癌抑制あるいは癌化に対する I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の役割は明らかにされていない。本研究では、I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の機能について知ることを目的とした。その結果、I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} が細胞増殖抑制に働くこと、G1/S 期の進行および DNA 合成に関わること、および増殖シグナル伝達系路の一つである MAPK 経路を抑制することを見いだした。本論文は、序章および以下の 6 章より構成される。

第1章 「I-2^{PP2A} mRNA のラット肝癌および再生肝における発現」

マウス I-2^{PP2A} の塩基配列をプローブとしてラット組織、肝癌、および肝再生過程における発現レベルを、ノーザンブロッティング法を用いて検討した。この結果、I-2^{PP2A} mRNA は脳で比較的高い発現を示し、また、胸腺、脾臓、および骨髄で特に高い発現を示した。また、I-2^{PP2A} mRNA は正常肝に比して肝癌で発現が上昇し、肝再生過程では、細胞周期の G1/S 期に相当する時期に一過性の発現上昇が観察された。

第2章 「Tet-Off システムによる I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} 誘導発現細胞株の樹立」

I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} の誘導発現を可能にするため Tet-Off システムを用いた HeLa 細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の細胞内局在を間接蛍光抗体法にて観察したところ、FLAG-I-1^{PP2A}、FLAG-I-2^{PP2A} はいずれも核に局在していた。

0.1% TritonX-100 を用いて細胞を分画したところ、FLAG-I-1^{PP2A} は全て可溶画分に検出された。一方、FLAG-I-2^{PP2A} は可溶画分と不溶画分の両方に検出された。また、I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} 過剰発現の細胞増殖に対する影響について検討した。この結果、I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の発現誘導によって、細胞増殖が抑制された。

第3章 「siRNA による I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} 発現のノックダウンとその効果」

siRNA を用いて HeLa 細胞における I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} 発現のノックダウンを行った。I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} のいずれもコントロールに比べ約 20%にまで発現が低下した。また、

これによって生じる表現型の解析を行ったところ、以下の知見が得られた。(i) I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} 発現のノックダウンにより細胞の大きさが増大した。大きさの増大は全ての細胞周期において観察された。(ii) I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} 発現のノックダウンによりG1 期細胞の割合が減少し、S 期細胞の割合が増加した。

第4章 「I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} のシグナル伝達系への効果」

I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} の過剰発現により、COS-7 細胞における EGF 刺激時の MEK および ERK の活性化が抑制された。

第5章 「I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の PP2A に対する作用」

I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の GST 融合タンパクを作製し、PP2A 活性に対する阻害効果を調べた。この結果、GST-I-1^{PP2A}、GST-I-2^{PP2A} のみならず、GST 部分を除いた精製 I-1^{PP2A}、I-2^{PP2A} も PP2A に対する阻害活性を示さなかった。

また、FLAG-I-1^{PP2A} または FLAG-I-2^{PP2A} を培養細胞に過剰発現させ、これらのタンパクと PP2A 触媒サブユニット (PP2Ac) との結合について免疫沈降法を用いて検討した。FLAG-I-1^{PP2A} および FLAG-I-2^{PP2A} はともに PP2Ac と共沈されなかった。

第6章 「I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} 結合タンパク質の探索」

免疫沈降法を用いて、I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の結合タンパク質の探索を行った。免疫沈降物を銀染色で調べた結果、分子量約 64kDa および約 58kDa のタンパクが I-1^{PP2A} の免疫複合体中に、また、分子量約 54kDa および約 36kDa のタンパクが I-2^{PP2A} の免疫複合体中に検出された。

以上、本研究は I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の細胞増殖抑制機能ならびに細胞周期調節機能を有することを明らかにし、これらの分子の新たな生理的意義を解明した。

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

プロテインホスファターゼ 2 A 阻害タンパク質 I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の生理機能に関する研究

I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} はプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) の阻害タンパクとして単離されたほか、他の研究分野からも報告がなされてきた分子である。すなわち種々の癌遺伝子による NIH3T3 細胞の形質転換を抑制する癌抑制遺伝子産物 pp32 は、I-1^{PP2A} と同一の分子である。また、急性骨髄性白血病において染色体転座する遺伝子 set は I-2^{PP2A} をコードしていた。しかしながら、これらの癌抑制あるいは癌化に対する I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の役割は明らかにされていない。本研究では I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の機能について解析し、それらの生理的役割を明らかにすることを目的とした。その結果、I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} が細胞増殖抑制に働くこと、G1/S 期の進行に関わること、および MAP キナーゼ経路を抑制することを見いだした。本論文の要点は、以下の 6 点にまとめられる。

1. I-2^{PP2A} mRNA のラット肝癌および再生肝における発現

ラット組織、肝癌、および再生肝における I-2^{PP2A} の発現レベルを、ノーザンブロット法を用いて検討した。この結果、I-2^{PP2A} mRNA は胸腺、脾臓、および骨髄でとくに高い発現を示した。また I-2^{PP2A} mRNA は正常肝に比して肝癌で発現が上昇し、再生肝では、細胞周期の G1/S 期に相当する時期に一過性の発現上昇が観察された。

2. Tet-Off システムによる I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} 誘導発現細胞株の樹立

I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} を Tet-Off システムにより誘導発現する HeLa 細胞株を樹立した。この細胞株を用いて細胞内局在を調べたところ、I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} は細胞核に局在していた。また 0.1% TritonX-100 を用いた分画により、I-1^{PP2A} と I-2^{PP2A} が

核内において異なる存在様態をとることが示唆された。

I-1^{PP2A} の発現誘導は HeLa 細胞の足場非依存的増殖を約 60%低下させた。一方 I-2^{PP2A} の発現誘導は HeLa 細胞の足場依存的および非依存的増殖を約 40%低下させた。

3. siRNA による I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} 発現のノックダウンとその効果

siRNA を用いて HeLa 細胞における I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} 発現のノックダウンを行った。I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} のいずれもコントロールに比べ約 20%にまで発現が低下した。これによって生じる表現型の解析を行ったところ、以下の知見が得られた。(i) I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} 発現のノックダウンにより細胞の大きさが有意に増大した。(ii) I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} 発現のノックダウンにより G1 期細胞の割合が有意に減少し、S 期細胞の割合が増加した。

4. I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} のシグナル伝達系への効果

I-1^{PP2A} または I-2^{PP2A} の過剰発現により、COS-7 細胞における EGF 刺激時の MAP キナーゼ経路の活性化が著しく抑制された。

5. I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の PP2A に対する作用

I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の組み換えタンパクを大腸菌で発現・精製し、PP2A に対する阻害効果を調べた。この結果、いずれの組み換えタンパクも PP2A に対する阻害活性を示さなかった。また、FLAG-I-1^{PP2A} または FLAG-I-2^{PP2A} を培養細胞に発現させ、PP2A 触媒サブユニットとの結合について免疫沈降法を用いて検討したが、いずれも PP2Ac と共沈しなかった。

6. I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} 結合タンパク質の探索

免疫沈降法により I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} の結合タンパク質の探索を行った。免疫沈降物を銀染色で調べた結果、I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} のそれぞれについて、特異的な結合タンパクと見られるバンドが検出された。

これを要するに、著者は I-1^{PP2A} および I-2^{PP2A} が細胞増殖抑制機能ならびに細胞周期調節機能を有することを明らかにし、これらの分子の新たな生理的意義を解明したもので、細胞の増殖および周期調節研究の領域に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。