

Studies on novel substrates of protein phosphatase type 1 (PP1) using tautomycetin, a specific inhibitor of PP1

(プロテインホスファターゼ1型(PP1)特異的阻害剤トウトマイセチンを用いたPP1の新規基質に関する研究)

学位論文内容の要旨

Reversible phosphorylation of Ser and Thr residues in proteins regulates many key processes such as glycogen metabolism, cell cycle, smooth muscle contraction, and protein synthesis. These processes are strictly controlled by protein kinases and phosphatases. Tautomycetin (TC) was isolated from *Streptomyces griseochromogenes* and found to be a specific protein phosphatase type 1 (PP1) inhibitor. The author suggests a role of PP1 in regulating TNF α -induced pathways by using TC in the master's degree program. However, still very few substrates for PP1 have been established so far. In this doctoral thesis, the author employed TC to screen novel candidate substrates of PP1 through the functional proteomics. In addition, a specific antibody that is against to phospho-(S/T)Q sites of ATM substrate was utilized to study novel substrates of PP1 in ATM-mediated DNA damage signaling pathway. The author present evidence that ribosomal protein S3A (RPS3A) and ribosomal protein S6 (RPS6) are candidate substrates of PP1, and Ser247 of RPS6 at the C-terminus is a target of PP1 and ATM in regulating pathway of DNA damage response. These findings define a direct link between RPS6 and ATM in regulating pathway of DNA damage response. This is the first implication of ATM kinase in its positive regulatory roles in protein translation, and PP1 directly dephosphorylates the C-terminus of RPS6 *in vivo*.

1. Screening and detection of the candidate substrates of PP1

As there are approximately 25 genes encoding serine/threonine-specific protein phosphatases, each phosphatase may have more than 300 physiological substrate proteins, which may increase if we consider individual phosphorylation sites as the substrates. However, still very few substrates for PP1 have been established so far. The author describes an approach by using two dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE) for screening the candidate substrates of PP1 in HEK293-T or HeLa cells

treated with TC. Comparisons of protein expression in 2-D images were carried out, and 22 of differential expressed proteins were detected. Fifteen protein spots were up-regulated and 7 protein spots were down-regulated by over 1.5-fold. These 15 of up-regulated proteins might be substrates candidates of PP1, while the down regulated proteins might be induced by the side effects of TC. Unfortunately, most spots could not be detected by silver stain and the identification of the distinct spot 626 could not be achieved by MALDE-TOF mass spectrometric analysis, because of the low amount of this protein. The author therefore used antibodies that recognize phosphorylated serine or threonine within the context of a protein motif that is phosphorylated by kinase to determine kinase activity and identify potential kinase substrates regulated by PP1. Among the candidate substrates of PP1, the author was interested in a 30 kDa protein detected by anti-phospho-ATM substrate antibody.

2. Phosphorylation of RPS6 at Ser247 is regulated by PP1 and ATM in response to DNA damage

Optimal cellular responses to DNA damage are modulated by kinase and phosphatase. The ataxia telangiectasia mutated (ATM) is a Ser/Thr kinase, which is the core of the DNA damage signaling apparatus. DNA damage induces ATM activation, and then ATM phosphorylates various substrates on Ser/Thr residues followed by Gln (SQ or TQ motif). The loss of ATM functions results in progressive cerebellar ataxia, premature ageing, and an increased risk of cancer. On the other hand, Ser/Thr protein phosphatases type 1 (PP1) has been found to play important role in regulation of the DNA damage response. In this thesis, the author used an antibody to phospho-(S/T)Q sites of ATM substrate and PP1 inhibitor, tautomycetin (TC) to identify common substrates of PP1 and ATM in regulating pathway of DNA damage response. Firstly, Ser247 of ribosomal protein S6 (RPS6) has been identified as a substrate of PP1 and ATM. Secondly, immediately after UV irradiation, the phosphorylation status at Ser247 of RPS6 was decreased significantly by PP1-mediated dephosphorylation. PP1 dephosphorylates specifically phospho-Ser247 of RPS6 *in vivo*. Thirdly, in response to DNA damage, ATM activity is required for rephosphorylation of RPS6 at Ser247. RPS6 directly interacts with the 5'-cap binding complex, which is required for initiation of mRNA translation. The phosphorylation of RPS6 enhances its affinity for the 5'-cap, which strongly implies that RPS6 phosphorylation facilitates initiation of translation. Therefore, the thesis provides the first implication for positive regulatory role of ATM and a novel mechanism for modulation of RPS6 function by PP1 and ATM.

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	生 方	信
副 査	教 授	橋 床	泰 之
副 査	特任教授	鍋 田	憲 助
副 査	助 教	重 富	顕 吾

学 位 論 文 題 名

Studies on novel substrates of protein phosphatase type 1 (PP1) using tautomycetin, a specific inhibitor of PP1

(プロテインホスファターゼ1型(PP1)特異的阻害剤トウトマイセチンを用いたPP1の新規基質に関する研究)

本論文は、英文 120 頁、図 30、表 2、5 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

タンパク質のセリン・スレオニン残基の可逆的なリン酸化は、グリコーゲン代謝、細胞周期、平滑筋収縮、タンパク合成といった重要な過程を担っている。これらの過程はプロテインキナーゼおよびホスファターゼにより厳密に制御されている。トウトマイセチン(TC)は *Streptomyces griseochromogenes* の培養液から単離され、特異的なプロテインホスファターゼ 1 型(PP1)阻害剤であることが見出された。著者は TC を用いることにより TNF α で誘起されたシグナル伝達経路の制御に於ける IKK 阻害に関する PP1 の役割を明らかにしてきた。本学位論文に於いて、著者は機能に着目したプロテオミクスを経て PP1 の新たな基質候補を探索するために TC を用いた。さらに ATM(Ataxia-telangiectasia-mutated, キナーゼの 1 種)で誘起される DNA 傷害シグナル経路における PP1 の新たな基質を研究するために、ATM 基質のリン酸化-(S/T)Q 部位に対する特異的抗体を用いた。著者はリボソームタンパク質 S6(RPS6)が PP1 の基質候補であること、RPS6 の C-末端の Ser247 が DNA 傷害応答の制御過程に於ける PP1 と ATM の標的となることの証拠を提示している。これらの知見は、DNA 傷害応答の制御過程に於ける ATM と RPS6 の直接的な関係の特徴づけるものである。本論文は、生体内で PP1 が RPS6 の C-末端を直接的に脱リン酸化し、タンパク質翻訳を ATM が正に制御することを初めて示唆している。

1) PP1 と ATM の新規基質タンパク質の探索と同定

ヒトゲノムのうち、セリン・スレオニン特異的ホスファターゼをコードしているのはおよそ 20 の遺伝子であることから、それぞれのホスファターゼには 300 以上の生理的な基質があり、基質のリン酸化部位を考慮に入れるとさらに増加すると考えられる。しかしながら、PP1 の基質は少数が認められているにすぎない。著者は TC 処理した HEK293-T 細胞または HeLa 細胞に於ける、PP1 の基質候補を探索するために蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)を用いた方法について言及している。二次元イメージでのタンパク質発現の比較が行われ、発現に差が見られた 22 のタンパク質が検出された。15 箇所のタンパク質スポット発現に 1.5 倍以上の亢進が見られ、7 箇所のタンパク質スポット発現に抑制が見られた。発現亢進が見られた 15 種のタンパク質は PP1 の基質候補であり、発現抑制が見られたタンパク質は TC による副次的な効果と考えられた。ほとんどのスポットは銀線色により検出できず、明確に検出できたスポット番号 626 のタンパク質もタンパク量が十分ではないために MALDE TOF-MS 分析により同定することはできなかった。そこで著者は、PP1 により制御されるプロテインキナーゼの基質を同定し、キナーゼ活性を決定するために、キナーゼによりリン酸化されるタンパク質モチーフとし

てリン酸化されたセリンあるいはスレオニンを認識する抗体を用いた。6種類のキナーゼ、即ちサイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMP)、プロテインキナーゼ C (PKC)、プロテインキナーゼ B (Akt)、サイクリン依存性キナーゼ (CDK)、分裂促進因子活性化キナーゼ (MAPK)、および DNA 傷害に対する細胞応答において司令塔的な役割を果たしている ataxia telegiectasia 原因遺伝子 (ATM) キナーゼの基質中の特定のリン酸化セリン・スレオニンを認識する抗体と PP1 特異的阻害剤 TC を用いることにより、PP1 の基質候補を絞り込んだ。TC 処理によりリン酸化タンパク質の発現亢進が見られた基質候補のうち、著者は ATM と PP1 の共通の基質候補と考えられる 30KDa のタンパク質に着目して精製と解析を進め、30KDa のタンパク質として RPS3A と RPS6 を同定した。特に、RPS6 は TC 処理による Ser247 部位でのリン酸化が LC-MS/MS と二次元ゲル電気泳動の両方で確認され、求める PP1 と ATM の共通の基質であることが判明した。

2) DNA 傷害に応答した PP1 及び ATM による RPS6 の Ser247 部位でのリン酸化制御

DNA 傷害に対する最善の細胞応答はキナーゼとホスファターゼにより調節されている。ATM は DNA 傷害シグナル伝達に於いて中心的役割を果たしているセリン・スレオニンキナーゼである。DNA 傷害は ATM の活性化を誘起し、活性化された ATM はセリンまたはスレオニンに続いてグルタミンが配置されるモチーフ (SQ または TQ モチーフ) を持つタンパク質を基質として、それらのセリン/スレオニンをリン酸化する。ATM 機能の欠損は小脳性運動失調症、早期老化、がん発症のリスクの増加をもたらす。一方で、PP1 は DNA 傷害応答の制御に重要な役割を果たしていることも見出されてきた。本論文では、著者は DNA 傷害応答の制御経路に於いて ATM と PP1 の共通の基質を同定するために、ATM 基質のリン酸化-(S/T)Q 部位を認識する抗体と PP1 特異的阻害剤トウトマイセチンを用いた。まず RPS6 は PP1 と ATM の共通の基質として同定された。RPS6 の Ser247 でのリン酸化は紫外線照射直後に PP1 が介在する脱リン酸化により顕著に減少した。これらの結果は PP1 が生体内でリン酸化-Ser247 の部位で RPS6 をリン酸化することを示唆している。DNA 傷害に応答した ATM の活性化は最終的に RPS6 を Ser-247 の部位でのリン酸化に必要であった。RPS6 は 5' -キャップ結合複合体と直接的に相互作用し RPS6 のリン酸化がこの結合を増加させることが報告されている。このことは RPS6 のリン酸化が mRNA の翻訳開始を促進することを強く示唆している。これらの結果を基に、著者は mRNA 翻訳過程に於ける ATM の正の調節的役割と、DNA 傷害刺激に応答した細胞成長と生存を制御する PP1 と ATM による RPS6 の機能を調節する新たな機構を提案している。

以上、著者は PP1 特異的阻害剤 TC と ATM 基質のリン酸化-(S/T)Q 部位を認識する抗体を用いて PP1 と ATM の共通の基質として RPS6 を同定した。次いで、紫外線などの DNA 傷害刺激に応答した PP1 と ATM による RPS6 のリン酸化状態を TC と抗体を用いて評価し、DNA 傷害に応答した PP1 と ATM による RPS6 の機能を調節する新たな機構を提案した。

これらの研究結果のうち、原著論文二報が学術雑誌である *International Journal of Oncology*、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* に受理された (それぞれ 2008 年 33 巻 1027-1035 頁、2012 年 76 巻印刷中)。

よって、審査員一同は、LI Ying が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。