

学 位 論 文 要 旨

氏名 矢部 滝太郎

題 目：タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A を標的とした新規抗がん戦略の基盤的研究

タンパク質の可逆的なリン酸化反応は、リン酸化酵素（キナーゼ）と脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）が協調して厳密に調節しており、タンパク質リン酸化の異常は、がんや神経変性疾患をはじめとした様々な疾患の原因となる。がんは、ヒトと伴侶動物双方の臨床で最も重要な疾患の1つであり、その発生や悪性化には細胞内タンパク質の過剰なリン酸化が重要な役割を果たしている。これまで、キナーゼの異常な活性化がその一因とされ、分子標的抗がん剤の標的として注目されてきた。近年、がんの発生や悪性化には、キナーゼ活性の上昇だけではなくホスファターゼ活性の低下も極めて重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。したがって、ホスファターゼ活性を回復させる分子機構が、抗がん剤の新たな標的として有効であると考えられる。

Protein phosphatase 2A (PP2A) は、細胞内の主要なセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素の1つであり、がん抑制因子として知られている。PP2Aは3つのサブユニットにより構成されており、酵素活性を持つCサブユニット (PP2Ac)、足場サブユニットとして機能するAサブユニット (PP2AA)、基質特異性を決定する調節サブユニットであるBサブユニットがABC三量体を形成している。多くのがんにおいて、PP2Aが内在性阻害タンパク質による機能抑制を受けていることから、これら阻害タンパク質を標的としてPP2A活性を回復させることが、新たな抗がん戦略として有効と考えられる。そこで、PP2Aの内在性阻害タンパク質であるSETとPME-1に着目し、SETを標的としてPP2Aを活性化させる抗がん戦略の獣医領域への応用における問題点の解決と、PME-1によるPP2A制御の分子機構の解明を通して、PP2Aを標的とした新規抗がん戦略の基盤を形成することを本研究の目的とした。

SETは、急性骨髄性白血病における染色体の転座によって生じたSET-CAN融合遺伝子の構成因子の1つとして発見された。これまでにヒトでは、機能解析がなされているアイソフォーム (SET α とSET β) を含めて4つのアイソフォームが同定されている。ヒトとイヌ双方でSETを標的としたPP2A活性化が抗がん作用を示すとの知見が蓄積されてきたが、その分子機構や効果についての比較生物学的検討は行われていない。そこで第2章では、イヌSETのアイソフォームの同定を行うことで、SETを標的としてPP2Aを活性化させる抗がん戦略がイヌにおいても有効であるか検討した。イヌ細胞株のSETタンパク質発現量の解析から、イヌにおいても複数のSETアイソフォームが存在することが明らかになった。そこで、イヌcDNAからクローニングを行ったところ、4つのSET

(別紙様式第3号)

アイソフォームを同定することに成功し、それぞれSET α 、SET β 、SET γ 、SET δ と名付けた。免疫沈降法を用いた検討から、これらのアイソフォームのうちSET α と β は、PP2Aの酵素サブユニット (PP2Ac) に結合することが明らかとなり、これら2つのアイソフォームがイヌにおいてPP2A活性を抑制すると考えられた。

PP2A複合体の構成は、PP2AcのLeu309残基のメチル化レベルによって変化することが知られている。PME-1は、「PP2Ac脱メチル化酵素」であるとともに、PP2Acの触媒活性部位に直接結合することで活性を阻害する「PP2A阻害タンパク質」としての機能も持つユニークなタンパク質である。PME-1タンパク質発現量の増加は、グリオーマや子宮内膜癌において悪性度と相関することが明らかとなっているが、その詳細な分子機構は解明されていない。そこで第3章では、PME-1欠損細胞を用いた解析を行い、PME-1によるPP2A制御機構の解明を目指して研究を行った。PME-1欠損マウスの胎児から線維芽細胞MEFを単離し、PME-1欠損がPP2A制御機構と細胞の表現型に与える影響について検討を行った。PME-1欠損細胞ではPP2Acタンパク質発現量が顕著に低下しており、PP2Acのユビキチン・プロテアソーム系分解が促進していた。このPME-1によるPP2Ac分解保護機構は、PME-1の脱メチル化活性に依存することがPME-1のレスキュー実験、およびPME-1阻害剤ABL127を用いた検討から明らかとなった。また、PME-1欠損細胞では細胞増殖能が低下しており、細胞増殖シグナルを担うタンパク質であるERK1/2とAktのリン酸化レベルの低下がみられた。これらの結果より、PME-1欠損細胞の増殖能低下には、特定のBサブユニットを含むPP2A複合体の増加が関与する可能性が示唆された。

第4章では、PP2AcとPME-1の相互作用と脱メチル化活性の関係に着目して研究を行い、PME-1によるPP2Ac脱メチル化にはPME-1とPP2Acの安定的な結合は必須ではないことを明らかにし、これを基にPP2Acメチル化レベルの新たな測定方法を樹立した。すなわち、PP2Acのメチル化レベルを測定する際に、試験管内において時間依存的な脱メチル化反応が起きるという問題を発見し、細胞抽出液中にPME-1阻害剤を添加することにより、細胞内のPP2Acメチル化レベルを正確に測定することを可能にした。この原理は、免疫沈降法を用いてPP2AcとBサブユニットの結合を評価する際にも重要であり、PP2A複合体の制御機構を解析する上で極めて重要な知見である。

本研究により、イヌSETアイソフォームの同定およびその機能解析を行い、SETを標的としてPP2Aを活性化させる抗がん戦略の獣医領域における発展に重要な知見が得られた。また、PME-1がPP2Acをユビキチン・プロテアソーム系分解から保護するという新たなPP2A制御機構を明らかとし、細胞内のPP2Acメチル化レベルの正確な測定法も確立した。本研究により明らかとなったPP2A阻害タンパク質によるPP2A制御機構は、PP2Aを標的とした新規抗がん剤開発の実現に貢献することが期待される。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	矢部 滝太郎
審査委員	主査： 山口大学・教授・佐藤晃一
	副査： 鹿児島大学・教授・宮本篤
	副査： 山口大学・教授・島田緑
	副査： 鹿児島大学・准教授・白石光也
	副査： 山口大学・准教授・大濱剛
題目	タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A を標的とした新規抗がん戦略の基盤的研究
審査結果の要旨： タンパク質の可逆的なリン酸化反応は、リン酸化酵素（キナーゼ）と脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）が協調して厳密に調節しており、タンパク質リン酸化の異常はがんなどの様々な疾患の原因となる。近年、がんの発生や悪性化には、キナーゼ活性の上昇だけでなくホスファターゼ活性の低下が極めて重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。Protein phosphatase 2A (PP2A) は、細胞内の主要な Ser/Thr 脱リン酸化酵素の 1 つであり、がん抑制因子として知られている。本学位論文は、PP2A の内在性阻害タンパク質である SET と PME-1 に着目し、SET を標的として PP2A を活性化させる抗がん戦略の獣医領域への応用における問題点の解決と、PME-1 による PP2A 制御の分子機構の解明を通して、PP2A を標的とした新規抗がん戦略の基盤を形成することを目的とした。 本研究において、第 2 章では、イヌ SET のアイソフォームの同定などにより SET を標的として PP2A を活性化させる抗がん戦略がイヌにおいても有効であるかを検討し、4 つのアイソフォームを同定すると共に、2 つのアイソフォームがイヌにおいて PP2A 活性を抑制する事を示唆した。第 3 章では、PME-1 欠損細胞を用いた解析などにより PME-1 による PP2A 制御機構の解明を目指して研究を行い、PME-1 欠損細胞の増殖能低下には、特定の B サブユニットを含む PP2A 複合体の増加が関与する可能性を示唆した。第 4 章では、PP2Ac と PME-1 の相互作用と脱メチル化活性の関係に着目して研究を行い、PP2Ac メチル化レベルの新たな測定方法を樹立した。 本研究により明らかとなった PP2A 阻害タンパク質による PP2A 制御機構は、PP2A を標的とした新規抗がん剤開発の実現に貢献することが期待される。 以上より、本論文は博士（獣医学）の付与に資する内容であると考えます。	