

学 位 論 文 要 旨

氏名 池田 俊太

題 目：タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A のメチル化制御機構に着目した
創薬への基盤的研究

論文要旨：

リン酸化は、細胞内のほぼすべてのタンパク質に引き起こされる可逆的な翻訳後修飾であり、タンパク質の構造を変化させることで活性や細胞内局在、相互作用など様々な変化を引き起こす。リン酸化の98%以上がセリンとスレオニン残基で起こり、約400種類のタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）によって制御されている。一方、セリンとスレオニン残基の脱リン酸化を担う酵素（ホスファターゼ）は約40種類存在し、大きくPPP、PPM、Asp phosphataseの3つのスーパーファミリーに分類される。その中でもPPPスーパーファミリーに分類される脱リン酸化酵素は、細胞内のセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素活性の大部分を占めており、protein phosphatase 1 (PP1)、PP5、そしてtype 2A protein phosphataseであるPP2A、PP4、PP6などが属する。これらのうち、PP2Aは細胞内タンパク質の約1%を占めるとも言われ、PP1と合わせて細胞内の脱リン酸化活性の約90%を担う細胞内の主要な脱リン酸化酵素である。PP2Aは複合体を形成することで機能を発揮するが、そのPP2A複合体の活性は、主に構成因子の翻訳後修飾とタンパク質間結合により調節されている。PP2Acサブユニットの翻訳後修飾のホットスポットはC末端の6つのアミノ酸残基(304-TPDYFL-309)に存在する。この領域は、Leu309がメチル化を、Thr304とTyr307がリン酸化を受ける。特に、PP2Ac Leu309のメチル化は、leucine carboxyl methyltransferase-1 (LCMT-1)とprotein phosphatase methylesterase-1 (PME-1)により可逆的に制御され、PP2A複合体の構成に大きな影響を及ぼす。

PME-1の発現上昇は神経膠腫、肝臓がん、前立腺がんなど、様々ながんにおいて予後との負の相関があること、また、アルツハイマー病 (Alzheimer disease: AD) 患者の脳でPME-1発現の上昇が観察され、ADモデルマウスの脳でPME-1を過剰発現させると病態が悪化することなどから、PME-1がさまざまな疾患で重要な役割を果たしていると考えられる。PME-1にはPP2Acの脱メチル化酵素（メチルエステラーゼ）としての機能に加えて、PP2Acの活性部位に結合して金属イオンを排除あるいは物理的に活性部位を覆うことで活性を阻害するPP2A阻害タンパク質としての機能があると考えられている。最近、PME-1はPP2A/B55 α 複合体やPP2A/B56 γ 複合体などの三量体とも結合して活性を阻害することが報告され、PP2A阻害タンパク質としての機能の重要性がますます注目されている。したがって、PME-1はメチルエステラーゼとPP2A阻害タンパク質という2つの機能を有しており、それらが生理学的・病態生理学的にそれぞれどのような役割を果たしているかを理解することは極めて重要である。そこで、PP2A特異的脱メチル化酵素かつPP2A阻害タンパク質であるPME-1に着目してPP2A

制御機構を解明することで、PME-1 を標的として PP2A 活性を回復させる創薬戦略の基盤を形成することを本研究の目的とした。

PME-1 の発現の変化が transcriptome に及ぼす影響はこれまでに報告されていない。そこで第 2 章では、PME-1 knockout (KO) マウスから単離したマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts: MEFs) を用いて、PME-1 欠損が細胞内シグナル伝達に及ぼす影響を包括的に解析したところ、PME-1 が炎症シグナルを抑制し、PI3K/Akt シグナルを活性化し、上間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) を促進することが示唆された。これらは、がんの発生と悪性化に寄与するメカニズムであり、がん促進因子としての PME-1 の機能を支持するものである。

第 2 章の結果を踏まえて、間葉系細胞である骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells: BM-MSCs) に着目した。BM-MSCs は自己複製能と分化能を持つ多能性細胞であり、腫瘍形成の危険性の少なさから、細胞・再生医療の細胞源としても世界的に注目されている。第 3 章では、BM-MSCs の分化能における PME-1 の機能を解明することを目的に PME-1 の脱メチル化酵素活性阻害剤である ABL127 が BM-MSCs の分化に与える影響を検討したところ、脂肪細胞への分化の促進、筋線維芽細胞への分化の抑制が認められた。

前述の通り、PME-1 にはメチルエステラーゼとしての機能と PP2A 阻害タンパク質としての機能がある。したがって、PME-1 が制御する生理学的小および病態生理学的小のプロセスの分子機構を正確に理解するためには、これら 2 つの機能を個別に解析する必要がある。私たちの研究室では、PME-1 S156A 変異体 (SA) は脱メチル化酵素活性を失うが、PP2A 阻害タンパク質としての機能は維持すること、一方、PME-1 M335D 変異体 (MD) は脱メチル化酵素活性を維持するが、PP2A 活性を阻害しないことを報告している。したがって、PME-1 の SA および MD 変異体は、PME-1 が関与する表現型が PME-1 のいずれの機能によって制御させているかを明らかにするために有用である。そこで、第 4 章では、PME-1 SA knock-in (KI) マウスと PME-1 MD KI マウスを作製し、PME-1 の 2 つの機能がマウスの発生に与える影響を解析した。両者共に出生後致死の経過をたどるが、認められた表現型は全く異なっていた。PME-1 S156A KI マウスは矮小化しており、全身性にアポトーシス陽性像が認められた。特に脳組織の萎縮が顕著で、神経細胞のアポトーシスやグリア細胞の活性化が観察された。一方で、PME-1 M335D KI マウスは外見上の異常は認められなかったが、出生後 2 日以内に死亡した。PME-1 M335D KI マウスでは、血中グルコース濃度の低下が認められている点、嗅上皮 (嗅覚に関与する組織) においてのみアポトーシス陽性像が観察される点から、嗅覚異常に伴うエネルギー摂取困難が死因の 1 つだと示唆される。

本研究により、生体レベルおよび細胞レベルでの PME-1 の機能が明らかになった。本研究で得られた数々の知見は PP2A 活性化の分子機構の理解に重要であり、PP2A や PME-1 を標的とした新規治療薬開発の実現に貢献することが期待される。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	池田俊太
審 査 委 員	主 査： 山口大学・准教授・大瀨 剛
	副 査： 山口大学・教授・佐藤 晃一
	副 査： 鹿児島大学・教授・白石 光也
	副 査： 山口大学・教授・加納 聖
	副 査： 山口大学・教授・森本 将弘
題 目	タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A のメチル化制御機構に着目した創薬への基盤的研究
<p>審査結果の要旨：</p> <p>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）により厳密に制御されており、その制御機構の異常は、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。Protein phosphatase 2A (PP2A) は、進化的に保存された主要なセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素の 1 つである。PP2A は A、B、C の 3 つのサブユニットで構成されるヘテロ 3 量体ホロ酵素である。足場サブユニットとして機能する A サブユニット (PP2A A) に、酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac) が結合し、AC コア 2 量体を形成する。そこへ、調節 B サブユニットの 1 つが結合し、AC コア 2 量体を基質へとリクルートすることで基質特異的な脱リン酸化が引き起こされる。B サブユニットは、B55、B56、PR72、PR93 の 4 つのファミリーに分類される約 20 種類が存在する。</p> <p>PP2Ac Leu309 のメチル化は、leucine carboxyl methyltransferase-1 (LCMT-1) と protein phosphatase methylesterase-1 (PME-1) により可逆的に制御され、PP2A ホロ酵素の構成に大きな影響を及ぼす。PME-1 発現の上昇は様々ながんにおいて予後との負の相関があること、また、アルツハイマー病 (AD) 患者の脳で PME-1 発現の上昇が観察され、AD モデルマウスの脳で PME-1 を過剰発現させると病態が悪化することが知られており、PME-1 はがんや神経変性疾患の病態発症・悪性化に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、PME-1 には PP2A 脱メチル化酵素としての役割に加えて、PP2A と直接結合してその活性を抑制する PP2A 阻害タンパク質としての機能も存在するため、PP2A メチル化レベルの変動だけでは、これらの疾患における PME-1 の役割を説明することはできない。したがって、PME-1 のそれぞれの機能が細胞の表現型に与える影響を明らかにすることが、PME-1/PP2A 軸を標的とした創薬実現に必要なことである。</p>	

本学位論文では、PME-1 を標的として PP2A 活性を回復させる創薬への基盤的研究となることを目的とし、まず、第 2 章において PME-1 knockout マウスから単離したマウス胎児線維芽細胞を用いて transcriptome 解析を行い、PME-1 欠損が細胞シグナルに与える影響を網羅的に解析した。これにより、PME-1 は Akt シグナルの活性化、上皮間葉転換の促進、炎症反応の抑制など、がんを促進する様々なシグナル伝達を制御していることが明らかになった。第 3 章では、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いて、MSC の分化における PP2A 複合体の構成や PP2Ac のメチル化の変化を検討した。MSC は骨細胞や脂肪細胞に分化する多分化能を有する細胞で、がん微小環境では筋線維芽細胞に分化することで、がんの進行を補助することが知られている。本章では、PME-1 のメチルエステラーゼ活性が、MSC の脂肪分化を抑制し、筋線維芽細胞分化を促進する役割を果たすことを明らかにした。さらに、第 4 章では、PME-1 のメチルエステラーゼとしての機能と PP2A 阻害タンパク質としての機能を個別に欠損させた knock-in (KI) マウスを作製した。PME-1 のメチルエステラーゼ活性の欠損は脳の萎縮を、PP2A 阻害活性の欠損は嗅覚の異常を引き起こすことで、いずれの KI マウスも出生後致死となることが明らかになった。本研究より明らかになった PME-1 による細胞シグナルの制御機構は、将来的な PME-1/PP2A 軸を標的とした創薬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。