

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

山口大学大学院共同獣医学研究科

池田 俊太

2024年3月

目次

第 1 章 背景および目的	1
1-1 Protein phosphatase 2A (PP2A)	1
1-2 PP2A 複合体の構造と機能	2
1-3 PP4 および PP6 複合体の制御機構	4
1-4 PME-1 による PP2A 複合体の制御機構	5
1-5 本研究の目的	7
第 2 章 PME-1 が細胞内シグナル伝達に与える影響の解明	8
2-1 PME-1 欠損が type 2A protein phosphatase のメチル化レベルに与える影 響	9
2-2 PME-1 WT と KO MEF における遺伝子発現データの取得	11
2-3 Gene set enrichment analysis (GSEA) を用いた網羅的解析	13
2-4 DEGs を利用したエンリッチメント・パスウェイ解析	15
2-5 PME-1 欠損が炎症性シグナルに与える影響の検討	17
2-6 PME-1 欠損が EMT および TGF- β シグナル経路に与える影響	19
2-7 PME-1 欠損が Akt リン酸化レベルに与える影響の検討	21
2-8 考察	23
2-8-1 PME-1 が type 2A protein phosphatase のメチル化レベルに与える影 響	23
2-8-2 PME-1 が MEFs の細胞内シグナル伝達に与える影響	24
第 3 章 骨髄由来間葉系幹細胞の分化能における PP2A メチル化の関与 ..	29
3-1 マウス骨髄由来間葉系幹細胞の単離と細胞表面マーカーの発現確認	30

3-2	単離した BM-MSC の多分化能の確認.....	32
3-3	脂肪分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響.....	34
3-4	骨分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響.....	36
3-5	筋線維芽細胞への分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響.....	38
3-6	分化誘導刺激が PP2Ac メチル化レベルに及ぼす影響.....	40
3-7	脂肪分化誘導に伴う PP2A メチル化レベルの低下が Akt のリン酸化レベルに与える影響.....	42
3-8	PME-1 阻害剤が脂肪分化誘導に与える影響.....	44
3-9	PME-1 阻害剤が骨および筋線維芽細胞への分化誘導に与える影響...	47
3-10	考察.....	49
3-10-1	PP2A のメチル化レベルと BM-MSC の脂肪分化誘導の関係.....	49
3-10-2	BM-MSCs の筋線維芽細胞分化.....	52
第 4 章 PME-1 の 2 つの機能がマウス生体に果たす役割の解明.....		53
4-1	2 種類の変異体 PME-1 KI マウスの作製と KI マウスの周産期および生後 4 週目における遺伝子型の割合の検討.....	54
4-2	PME-1 変異体の脱メチル化酵素活性の検討.....	57
4-3	PME-1 MD 変異体がマウスの発生・出生に与える影響.....	59
4-3-1	PME-1 MD/MD マウスの肉眼的所見と生存曲線.....	59
4-3-2	PME-1 MD/MD マウスの血糖値.....	61
4-3-3	PME-1 MD/MD マウスの骨格筋におけるグルコース取り込み能	63
4-3-4	PME-1 MD/MD マウスの嗅覚に関する解析.....	65

4-4	PME-1 SA 変異体がマウスの発生・出生に与える影響の検討.....	67
4-4-1	PME-1 SA/SA マウスの肉眼的所見.....	67
4-4-2	PME-1 SA/SA マウスの脳組織の肉眼所見と病理学的所見.....	69
4-5	PME-1 SA 変異体が脳組織の発生に与える影響の網羅的解析.....	71
4-6	PME-1 SA 変異体が小脳組織の神経細胞に与える影響.....	73
4-7	PME-1 SA 変異体が小脳組織のアポトーシスに与える影響.....	75
4-8	PME-1 脱メチル化酵素活性の阻害が神経分化に与える影響.....	77
4-9	考察.....	79
4-9-1	PME-1 MD/MD マウスが出生後致死である原因.....	79
4-9-2	PME-1 SA/SA マウスが出生後致死である原因.....	81
4-9-3	PME-1 変異体 KI マウスと PME-1 KO マウスの表現型の相違点..	84
第5章	総合討論.....	85
5-1	非 DNA タンパク質のメチル化に着目した研究.....	86
5-2	PME-1 を標的とした分子標的薬の可能性.....	88
5-3	PME-1 の機能調節機構.....	90
第6章	実験材料および実験方法.....	92
6-1	動物の飼育.....	92
6-2	トランスクリプトーム解析 (RNA-seq).....	92
6-3	マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (mBM-MSC) の単離.....	93
6-4	細胞培養法.....	93
6-5	BM-MSCs の分化誘導.....	94
6-6	培養細胞の染色法.....	94

6-7	フローサイトメトリー (FACS)	94
6-8	Western blotting によるタンパク質発現量の解析	95
6-8-1	タンパク質抽出.....	95
6-8-2	Western blotting	95
6-8-3	Type 2A protein phosphatase のメチル化レベルの解析	96
6-9	<i>Ppme1</i> 変異体 KI マウスの作製.....	96
6-10	Genotyping による遺伝型の判定.....	97
6-11	血中グルコース値の測定	98
6-12	グルコース取り込み能試験	98
6-13	<i>o</i> -キシレン嗅覚試験.....	99
6-14	免疫組織化学染色	99
6-15	統計処理	100
6-16	使用抗体リスト	101
	引用文献.....	103
	謝辞.....	118

第1章 背景および目的

1-1 Protein phosphatase 2A (PP2A)

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 (protein kinase) によって制御されている (1,2)。一方、セリンとスレオニン残基の脱リン酸化を担う酵素 (protein phosphatase) 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 (3)。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 (4)。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 (5)。PP2A は、細胞周期、アポトーシス、細胞分化など多岐にわたる細胞機能を制御しており、進化的に高く保存されている (6)。

1-2 PP2A 複合体の構造と機能

PP2A は3つのサブユニットにより構成されている。酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac) および足場サブユニットとして機能する A サブユニット (PP2A A) がコア二量体を形成し、このコア二量体に調節サブユニットである B サブユニットが結合することで ABC 三量体を形成する。B サブユニットには、B (B55/PR55)、B' (B56/PR61)、B'' (PR72)、B''' (PR93/PR110) の4つのファミリーからなる20種類以上のアイソフォームが存在し、結合する B サブユニットの種類によって PP2A の基質特異性や細胞内局在が調節される (7) (図 1-1)。

PP2A の機能異常は、がん、アルツハイマー病などの神経変性疾患、糖尿病など様々な疾患の発症に関与している (8)。特にヒトの細胞のがん化には PP2A 活性の抑制が必須であり (9)、ほとんどのがんで PP2A の変異や発現低下、PP2A 阻害タンパク質の発現上昇による PP2A 複合体の制御異常が観察される (10,11)。PP2A は、Akt や MEK1/2、ERK1/2、AMPK などの発がん性シグナル因子の活性を制御することで無秩序な細胞増殖を抑制するとともに、BCL2 や MCL1 などの抗アポトーシス因子を標的としてアポトーシスの誘導を制御するなど、重要ながん抑制因子として働いている (11-15)。

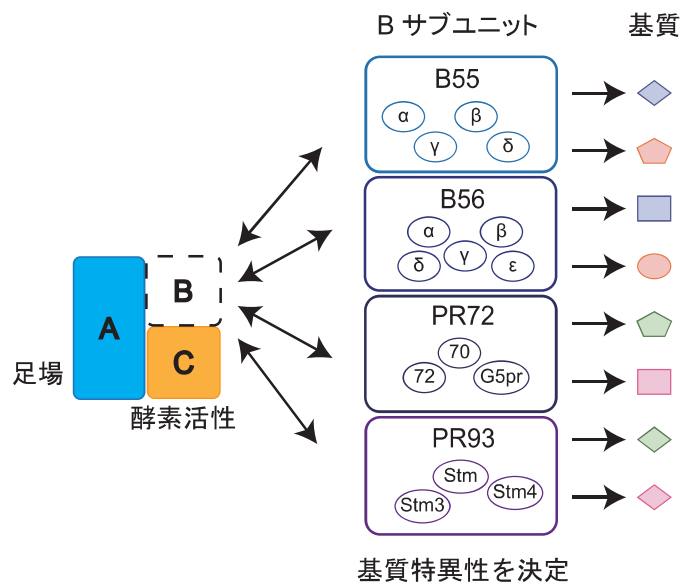


図 1-1 PP2A 複合体の構造と機能

PP2A は、酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac) と足場サブユニットとして機能する A サブユニット (PP2A A) によるコア二量体を形成している。B サブユニットには 4 つの異なるファミリーからなる 20 種類以上のアイソフォームが存在し、結合する B サブユニットの種類によって PP2A の基質特異性や細胞内局在が調節される。

1-3 PP4 および PP6 複合体の制御機構

PP4 は酵素活性を持つ PP4c と 5 種類の制御サブユニット (PPP4R1、PPP4R2、PPP4R3A、PPP4R3B、PPP4R4) とヘテロ二量体もしくはヘテロ三量体を形成することで機能する (16)。PP4 は DNA 傷害応答において重要な役割を果たすことが知られていたが、近年、がんや細胞周期制御、グルコース恒常性などにも関与していることが明らかになってきた (17)。

PP6 も PP2A や PP4 と同様に複合体として機能するホロ酵素であり、真核生物間で高度に保存された制御サブユニットを有する (18)。PP6 の制御サブユニットは Sit4 Associated Protein (SAPs) ドメインを持つ、PP6R1/SAPS1、PP6R2/SAPS2、PP6R3/SAPS3 の 3 種類がある (19)。SAPS ドメインは、PP6 と結合する領域であり、PP2A や PP4 とは結合しない (20)。PP6 は、細胞周期や DNA 損傷修復、炎症性シグナルの伝達、腫瘍の形成および進行、オートファジーなど幅広い細胞機能を制御することが知られている (18,21–23)。

1-4 PME-1によるPP2A複合体の制御機構

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(24-26)。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。具体的には、B55やB56a/εはメチル化されたコア二量体に結合することが示されている(25,27-33)。また、PP2Aと同じファミリーに属するPP4とPP6もC末端のロイシン残基がメチル化を受けるが、それぞれの複合体の形成に与える影響は異なる。PP4のメチル化は一部の複合体の安定化に重要である一方で、PP6複合体の形成には影響を与えない(31,34)。

PME-1発現の上昇は神経膠腫、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(35-38)、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(39-41) 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。しかし、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。PP2Aの活性化には活性部位にMn²⁺などの2価の金属イオンが存在することが重要であり、*in vitro*の系では2価の金属イオンの欠乏は脱リン酸化活性の低下につながる(42)。構造学的な解析から、PME-1は

PP2Acと結合すると活性部位から2価の金属イオンを排除することが明らかになっている(43)。したがって、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(43)。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(37,44)。したがって、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。

1-5 本研究の目的

本研究では、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への基盤的研究となることを目的とした。

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 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。第 3 章では、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: 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。さらに、第 4 章では、PME-1 の 2 つの機能を個別に欠損させた knock-in (KI) マウスを製作し、PME-1 のメチルエステラーゼと PP2A 阻害タンパク質としての機能がマウスの発生に与える影響を検討した。

第 2 章 PME-1 が細胞内シグナル伝達に与える影響の解明

PME-1 の生理学的小よび病態生理学的な重要性にもかかわらず、PME-1 の発現の変化が transcriptome に及ぼす影響は報告されていない。そこで第 2 章では、PME-1 KO MEFs を用いて RNA-seq を行うことで、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理解することを目的とした。

2-1 PME-1 欠損が type 2A protein phosphatase のメチル化レベルに与える影響

PME-1 欠損が type 2A protein phosphatase のメチル化レベルに与える影響を明らかにするために、PME-1 wild-type (WT) および KO MEFs における type 2A protein phosphatase のメチル化レベルを解析した (図 2-1)。PP2A および PP4 のメチル化レベルは PME-1 KO MEF において有意に上昇していた。一方で、PME-1 の欠損は PP6c のメチル化レベルには影響を与えなかった。

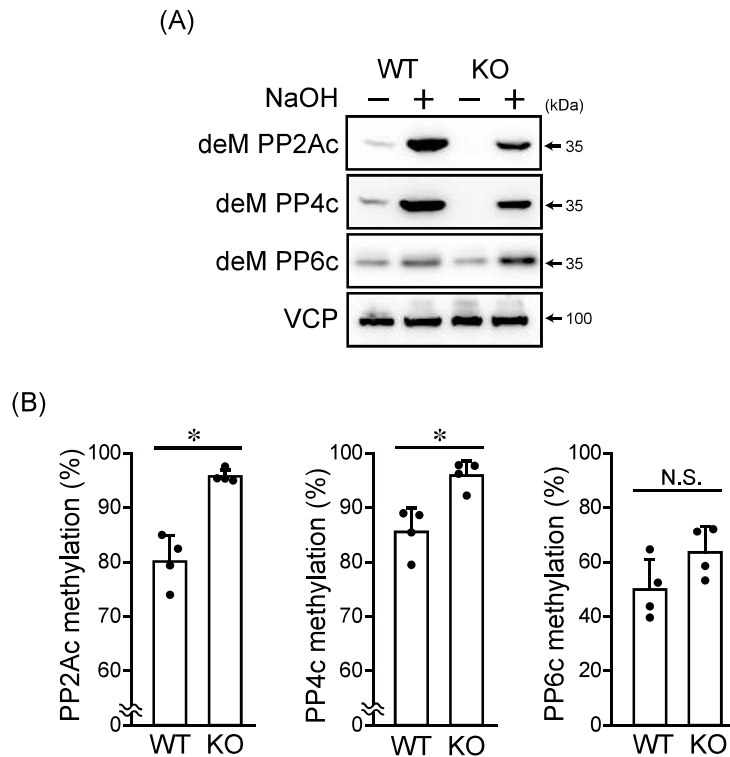


図 2-1 PME-1 欠損が type 2A protein phosphatase のメチル化レベルに与える影響

PME-1 が type 2A protein phosphatase のメチル化レベルに与える影響を明らかにするため、PME-1 WT および KO MEF における type 2A protein phosphatase のメチル化レベルを第 6 章に記載の方法で解析した。典型的な画像 (A) と定量図 (B) を示した。N=4、*: $P < 0.05$ (WT との比較)

2-2 PME-1 WT と KO MEF における遺伝子発現データの取得

RNA-seq 等の大規模解析から得られる遺伝子発現データの活用は、タンパク質の機能を解明する上で非常に有用であるが、PME-1 に関するデータは存在しない。そこで、我々は PME-1 WT と KO MEF を用いて RNA-seq を行い、細胞プロセスにおける PME-1 の影響を包括的に理解することを目指した (図 2-2 A)。上位 146 個の differential expressed genes (DEGs) ($P < 0.05$ and $|\log_2 \text{fold}| > 4$) を用いたクラスタリング解析では、WT と KO の群に分類されることが確認された (図 2-2 B)。

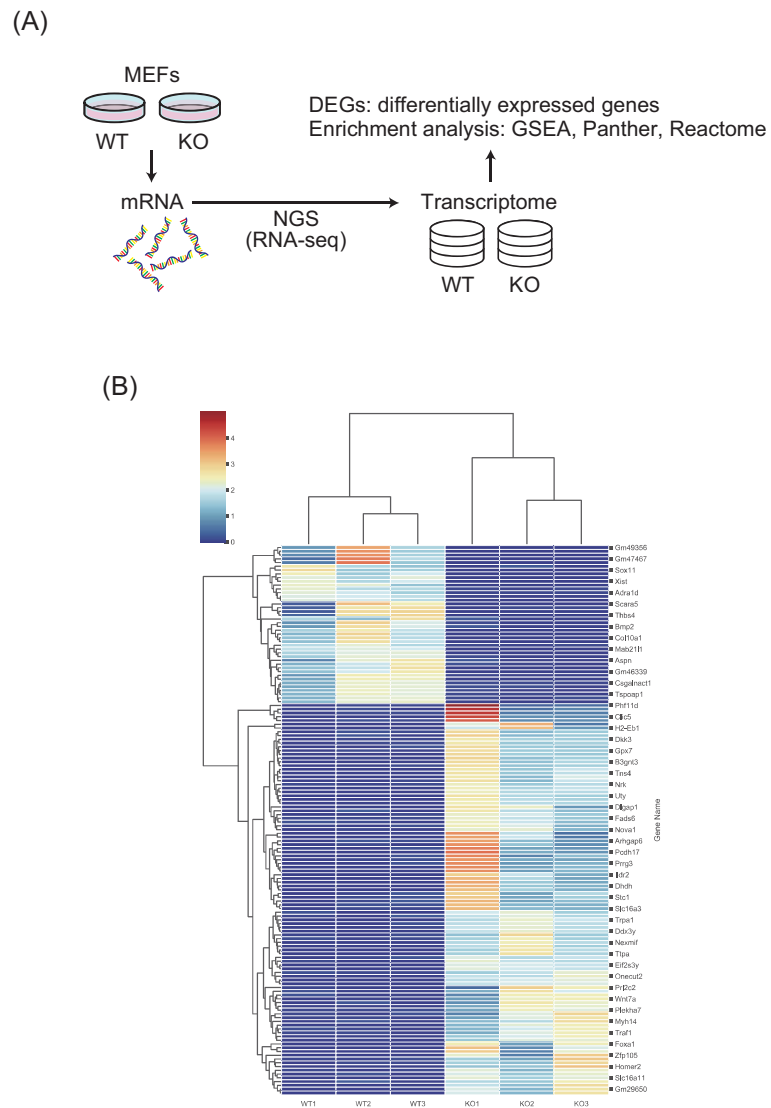


図 2-2 PME-1 WT と KO MEF における遺伝子発現データの取得

(A) トランスクリプトーム解析の模式図。(B) 上位 146 個の DEGs を用いたクラスタリング解析。

2-3 Gene set enrichment analysis (GSEA) を用いた網羅的解析

PME-1 が細胞内のシグナル伝達に与える影響を網羅的に明らかにするため、取得した遺伝子発現データに対して gene set enrichment analysis (GSEA) を行った (図 2-3)。GSEA の結果、PME-1 KO は 20 個の遺伝子セットを変化させ (FDR q 値 $<$ 0.25)、そのうち上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) や TGF- β シグナル伝達などに関連する gene set をはじめとする 11 個の gene set が増加、NF- κ B や JAK/STAT3 を活性化する炎症性シグナルに関連する gene set など 9 個の gene set が減少していた。

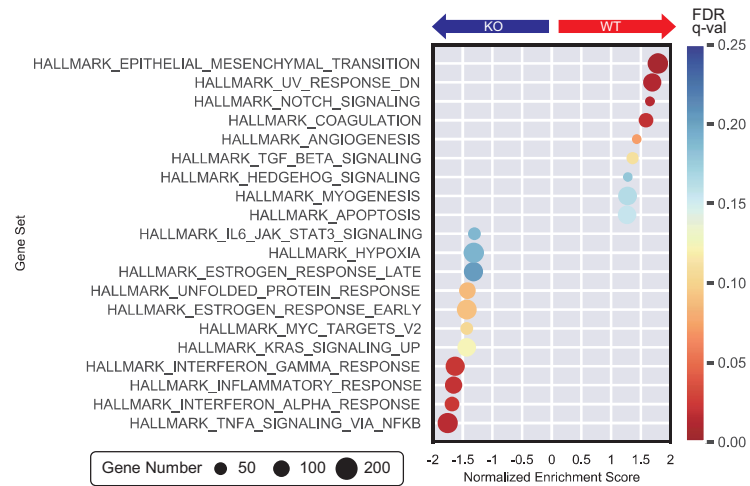


図 2-3 Gene set enrichment analysis (GSEA) を用いた網羅的解析

PME-1 WT MEF と KO MEF の遺伝子発現データを用いて GSEA を行い、PME-1 が細胞内のシグナル伝達に与える影響を検討した。X 軸はエンリッチメントスコアを、Y 軸は gene set を示す。円の大きさは gene set 中にアノテーションされた遺伝子数を、色は FDR q 値を表す。

2-4 DEGs を利用したエンリッチメント・パスウェイ解析

PME-1 KO により発現が上昇した 878 個および発現が低下した 477 個の DEGs ($P < 0.05$ and $|\log_2\text{fold}| > 1$) に対して REACTOME エンリッチメント解析を行った (図 2-4)。GSEA 解析によりピックアップされているエンリッチメントのみならず、特に、インテグリンシグナルや PI3K/Akt シグナルが PME-1 欠損により抑制されていることが示唆された。

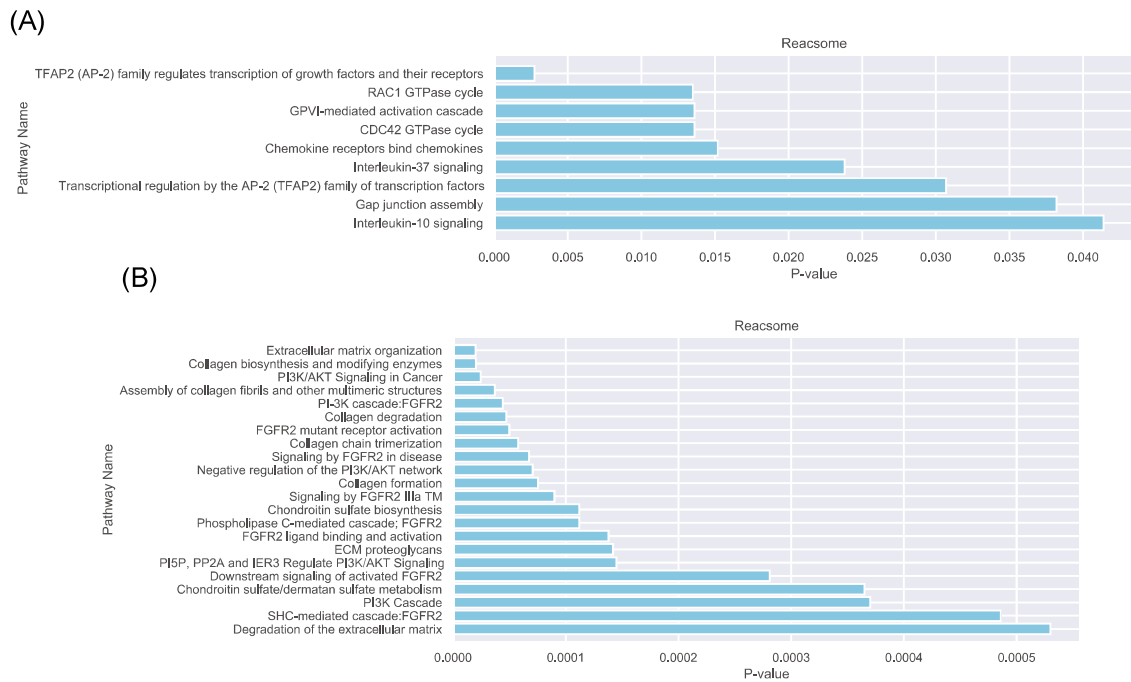


図 2-4 DEGs を利用したエンリッチメント・パスウェイ解析

Reactome によるエンリッチメント・パスウェイ解析の結果。解析には PME-1 KO により発現が上昇した 878 個 (A) または、発現が低下した 477 個 (B) の DEGs を用いた。

2-5 PME-1 欠損が炎症性シグナルに与える影響の検討

エンリッチメント解析の結果から、PME-1 KO によって炎症性のシグナル経路が活性化されることが示された。NF- κ B および JAK/STAT3 経路は、炎症の重要なメディエーターである。そこで、PME-1 欠損が NF- κ B と STAT3 のリン酸化レベルに与える影響を western blotting によって解析した (図 2-5)。その結果、PME-1 KO MEFs で NF- κ B と STAT3 のリン酸化レベルが増加していることが認められた。この結果は、炎症シグナルが活性化されていることを示しており、エンリッチメント解析の結果が裏付けられた。

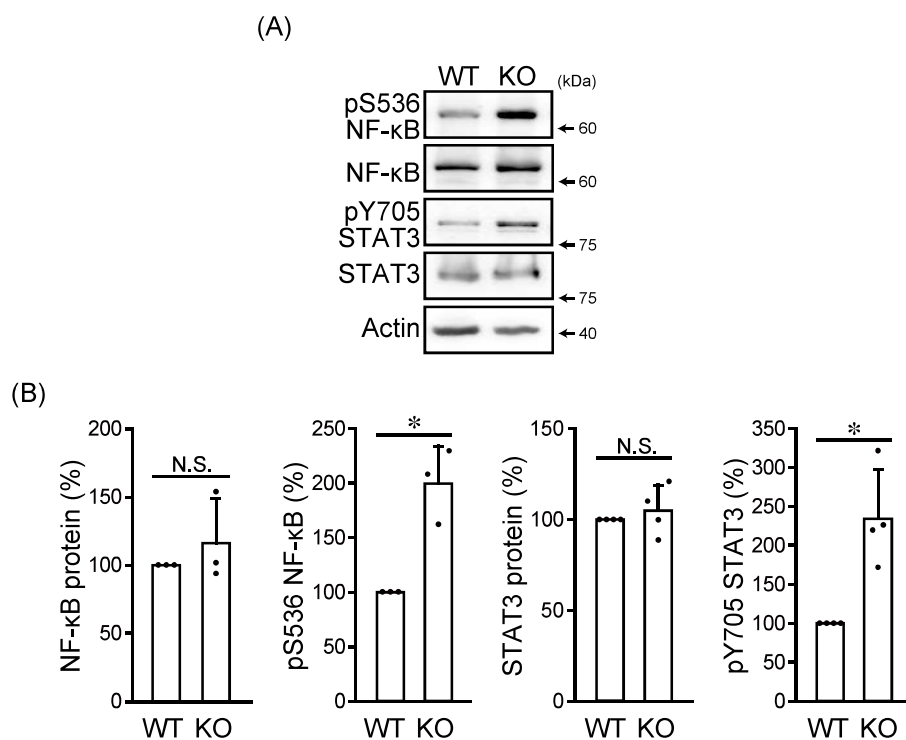


図 2-5 PME-1 欠損が炎症性シグナルに与える影響の検討

NF-κB および STAT3 のタンパク質発現、pSer573 NF-κB および pTyr705 STAT3 のリン酸化レベルを western blotting により解析した。典型的な画像 (A) と定量図 (B) を示した。N=3-4、*: P<0.05、N.S.: 有意差なし (WT との比較)。

2-6 PME-1 欠損が EMT および TGF- β シグナル経路に与える影響

GSEA の解析結果から、PME-1 KO により上皮間葉転換の抑制つまり間葉上皮転換の促進や、TGF- β シグナル経路の抑制が示唆された。そこで、PME-1 KO MEFs における上皮系マーカー E-cadherin と間葉系マーカー N-cadherin、 α SMA のタンパク質発現量を western blotting によって解析した (図 2-6 A-B)。PME-1 KO により細胞内の E-cadherin タンパク質発現の増加および、N-cadherin、 α SMA のタンパク質発現の低下が認められた。TGF- β /Smad シグナル伝達は、EMT 誘導の重要な因子の一つである。そこで、TGF- β 刺激により誘導される Smad3 のリン酸化レベルに与える影響を western blotting によって解析したところ (図 2-6 C-D)、PME-1 KO により Smad3 のリン酸化レベルが有意に低下した。

これらの結果は EMT および TGF- β シグナル経路が PME-1 KO により抑制されていることを示しており、エンリッチメント解析の結果が裏付けられた。

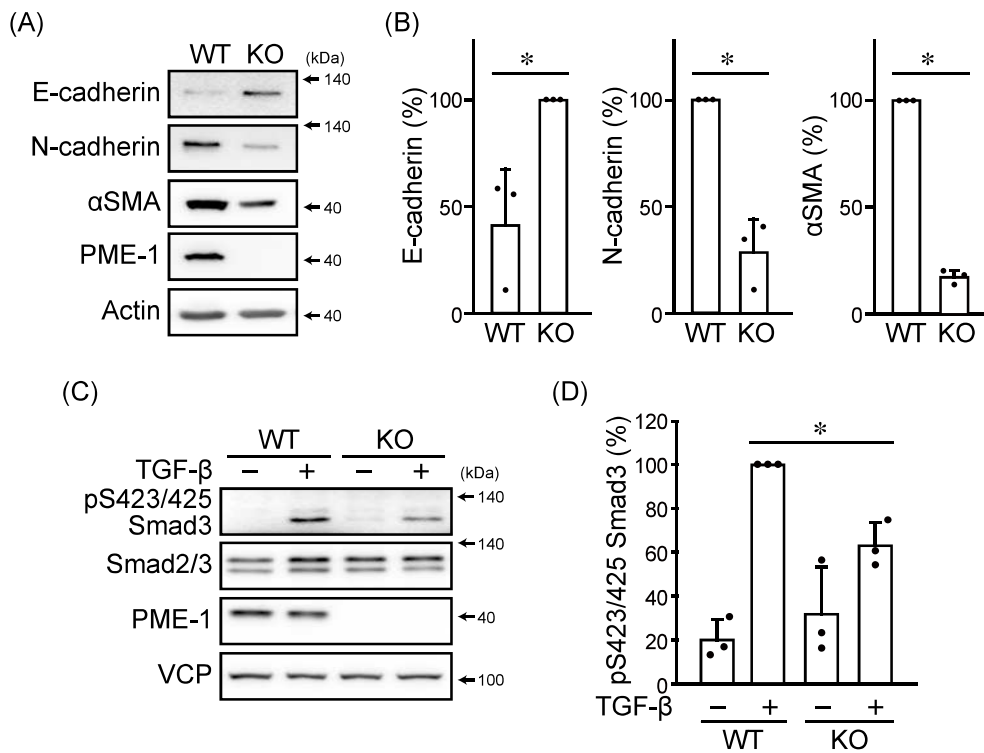


図 2-6 PME-1 欠損が EMT および TGF-β シグナル経路に与える影響

E-cadherin、N-cadherin、αSMA、Smad2/3 および pSer423/425 Smad3 のタンパク質レベルを western blotting により解析した。典型的な画像 (A、C) と定量図 (B、D) を示した。N=3、*: P < 0.05 (WT との比較)。

2-7 PME-1 欠損が Akt リン酸化レベルに与える影響の検討

Akt の活性化は Thr308 と Ser473 のリン酸化によって誘導されるが、これらは PP2A/B55 α と PP2A/B56 β/γ 複合体の基質である (45,46)。REACTOME エンリッチメント解析の結果、PME-1 欠損により「PI5P, PP2A, IER3 regulate PI3K/Akt Signaling」など PI3K/Akt シグナル伝達に関連する複数のパスウェイが抑制されていることが示された (図 2-4 B)。GSEA においても、PME-1 KO MEF による PI3K/Akt シグナルの抑制が示された (図 2-7 A)。そこで、PME-1 KO が Akt の Thr308 および Ser473 リン酸化に与える影響を western blotting を用いて解析したところ (図 2-7 B-C)、どちらも有意に低下しており、PME-1 欠損により PI3K/Akt シグナル伝達が抑制されることが確認された。

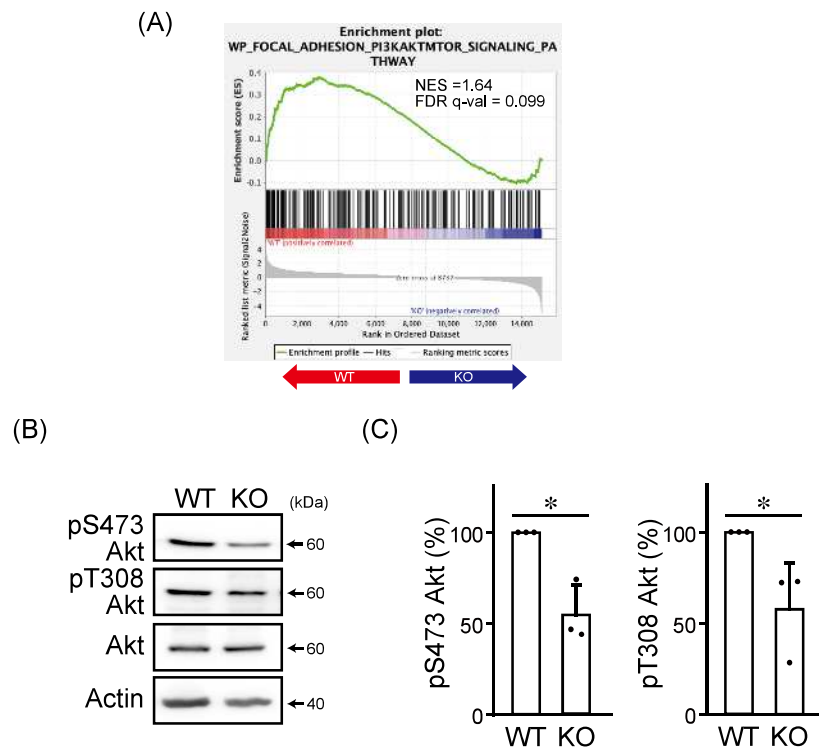


図 2-7 PME-1 欠損が Akt のリン酸化レベルに与える影響の検討

WP_FOCAL_ADHESION_PI3KAKTMTOR_SIGNALING_PATHWAY のエンリッチメントプロット (A)。また、pSer473 Akt、pThr308 Akt、および Akt のタンパク質レベルを western blotting により解析した。典型的な画像 (B) と定量図 (C) を示した。N=3、*: P< 0.05 (WT との比較)。

2-8 考察

2-8-1 PME-1 が type 2A protein phosphatase のメチル化レベルに与える影響

我々の研究室では以前、PME-1 KO 細胞における PP2A のメチル化レベルの上昇を報告している (47)。本研究ではこれに加えて、PP2A とともに type 2A protein phosphatase ファミリーを構成する PP4 と PP6 のメチル化レベルに対する影響を検討し、メチル化酵素 LCMT-1 は PP2A、PP4、PP6 のすべてを基質とするのに対して (34,48)、脱メチル化酵素 PME-1 は PP2A と PP4 だけに作用することを明らかにした。PME-1 は PP6 と結合しないことが報告されており (34)、PP6 の脱メチル化には PME-1 以外の酵素が関与していると考えられる。PP6 は、細胞周期、DNA 損傷修復、細胞／組織のサイズなど、様々な細胞内シグナル伝達において極めて重要な役割を果たす必須の脱リン酸化酵素である (18)。したがって、PP6 のメチル化がホロ酵素の機能をどのように変化させるのか、また PP6 の脱メチル化酵素は何なのかについては、今後解明すべき重要な問題である。

2-8-2 PME-1 が MEFs の細胞内シグナル伝達に与える影響

本研究では、PME-1 が細胞内シグナルに及ぼす影響を包括的に理解するために、トランスクリプトーム解析を行い、PME-1 に関する遺伝子発現データを取得した。このデータは、Gene Expression Omnibus database に登録し (GSE242289)、世界中の研究者が使用できるようになっている。PME-1 に関する遺伝子発現データは公共データベース上には存在しておらず、本データが今後の研究に役立つことを期待する。

トランスクリプトーム解析の結果、PME-1 欠損により TNF- α などの炎症性サイトカインや IFN のシグナルが活性化していることが示唆され、NF- κ B および STAT3 のリン酸化レベルの低下が確認された。PP2A および PP4 は NF- κ B p65 を脱リン酸化することで NF- κ B シグナル伝達を負に制御することから (49–52)、PME-1 KO MEF における NF- κ B p65 リン酸化レベルの上昇は、PME-1 欠損に伴う PP2A、PP4 の活性上昇による影響である可能性が高い。

一方で、JAK/STAT 経路における PP2A の役割は複雑である。PP2A/B56 γ 複合体は JAK2 を活性化するが、PP2A/B56 α 複合体はその活性を阻害するなど、PP2A による STAT3 活性の制御は、正と負の両方が報告されている (53–58)。したがって、PP2A の活性化が STAT シグナルに及ぼす影響は状況依存的であり、PME-1 の欠損がどのように JAK/STAT シグナルを活性化するのかについては、更なる検討が必要である。

PME-1 欠損は EMT および TGF- β /Smad シグナル伝達を抑制することが明らかになった。TGF- β /Smad シグナル伝達は、EMT 誘導の主要な因子の一つである。

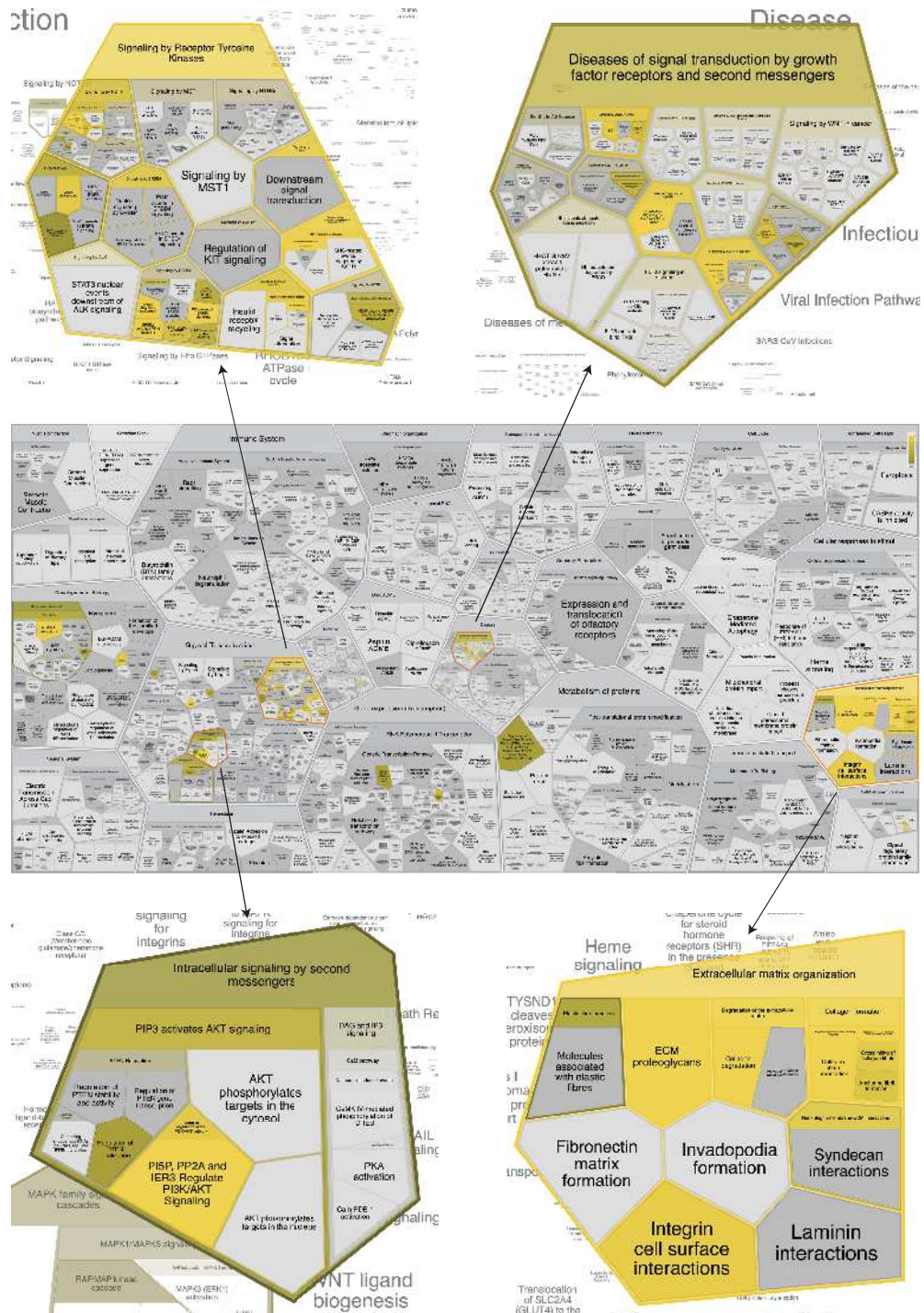
PP4 と Smad3 の直接的な関係はこれまでに報告がないものの、Smad3 は PP2A の基質として報告されており (59)、TGF- β 刺激条件下での PME-1 欠損における Smad3 Ser423/425 リン酸化レベルの低下は、PP2A の活性上昇による影響である可能性が考えられる。これらのデータは、PME-1 が PP2A 阻害を介して TGF- β /Smad シグナルの活性を増加させることによって間葉系表現型を維持していることを示唆している。

PME-1 KO MEF では Akt Thr308 および Ser473 リン酸化レベルが低く、PME-1 の欠損が PI3K/Akt シグナル伝達を抑制していることが明らかになった。PP2A/B55 α と PP2A/B56 β/γ 複合体は、Akt Thr308 と Ser473 を脱リン酸化することから (45,46)、PME-1 KO による PP2A のメチル化がこれらの PP2A 複合体の形成や活性化を誘導し、Akt 活性を抑制すると考えられる。PME-1 KO および PME-1 阻害剤は PP2A/B55 α 複合体の形成を促進する一方で PP2A/B56 複合体の形成には影響を与えない (32,47)。PME-1 は PP2A/B56 γ 複合体に直接結合して活性を阻害することから (60)、PME-1 KO では PP2A/B56 複合体の活性が上昇すると考えられる。本研究で観察された表現型に、PME-1 の脱メチル化酵素としての機能と PP2A 阻害タンパク質としての機能のいずれが関与しているかを明らかにするためには、PME-1 の 2 つの機能を個別に欠損させた KI マウス (第 4 章) から MEF を樹立し、解析することが有効であると考えられる。

エンリッチメント解析の結果は、本研究で検証したシグナル伝達以外にも様々な経路が PME-1 欠損により影響を受けることを示唆する。PME-1 KO MEF で発現が低下している DEGs ($P < 0.05$ and $\log_2\text{fold} > 1$) を用いた REACTOME および PANTHER pathway のエンリッチメント解析の両方で、インテグリンシグナ

ル伝達が同定された (図 2-8)。REACTOME では、細胞外マトリックス関連シグナルがヒットしており、細胞外マトリックスの組織化に PME-1 が寄与している可能性が示唆された。PME-1 の過剰発現は、複数のがんの予後不良と関連している (35,37,38)。我々の本研究データは、PME-1 が炎症性シグナルを抑制し、PI3K/Akt シグナルを活性化し、EMT を促進することを示している。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。

(A)



(B)

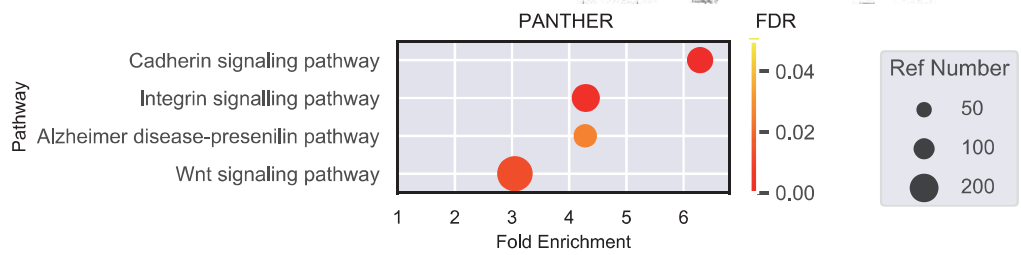


図 2-8 REACTOME および PANTHER pathway 解析の解析結果

PME-1 KO MEF で発現が低下している DEGs を用いた REACTOME (A) およ
び PANTHER pathway 解析 (B)

第3章 骨髄由来間葉系幹細胞の分化能における PP2A メチル化の関与

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) は、自己複製能と多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注目されている。第2章の結果から、PME-1 が EMT を促進させている可能性が示唆されており、間葉系細胞である MSC の細胞性状や分化能においても PME-1 が重要な役割を果たしていると予想される。そこで本章では、マウスから骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells: BM-MSCs) を単離し、BM-MSCs の分化能における PME-1 の機能を解明することとした。

3-1 マウス骨髄由来間葉系幹細胞の単離と細胞表面マーカーの発現確認

6週齢マウスの大腿骨および脛骨から BM-MSCs を単離した。BM-MSC 単離の成否を確認するため、フローサイトメトリーで表面マーカーを分析した（図 3-1）。単離された細胞は白血球マーカー CD45 と赤血球マーカー Ter119 の発現が低く、MSC マーカーである CD44、CD140a、Sca-1 の発現が高かったことから、MSC の単離が確認された。

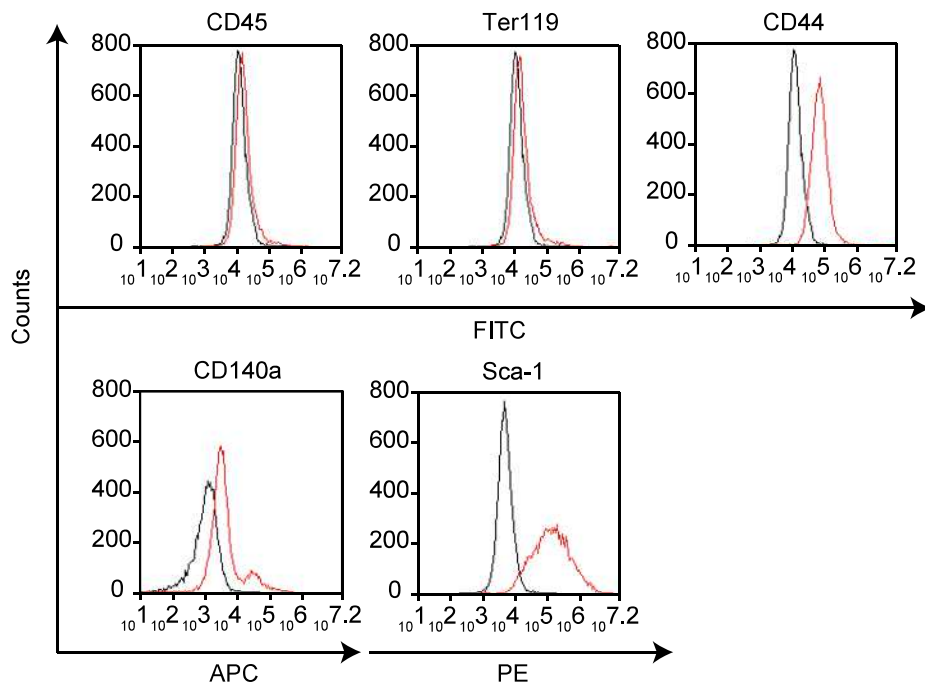


図 3-1 マウス骨髄由来間葉系幹細胞の単離と細胞表面マーカーの発現確認

実験材料および実験方法の項に記載した方法で BM-MSCs を単離し、細胞表面抗原の発現をフローサイトメトリーで解析した。黒線：アイソタイプコントロール、赤線：表記している細胞表面マーカーに対する抗体。典型的な画像を示す。N=4。

3-2 単離した BM-MSC の多分化能の確認

BM-MSC は、自己複製能と分化能を持つ多能性の幹細胞であり、適切な分化誘導のもとで脂肪細胞や骨芽細胞、筋線維芽細胞へと分化させることができる。そこで、単離した細胞を MesenCult Adipogenic Differentiation 培地、MesenCult Osteogenic Differentiation 培地で 14 日間、TGF- β で 2 日間処置することで、それぞれ脂肪細胞、骨芽細胞、筋線維芽細胞に分化させた (図 3-2)。単離された細胞の脂肪細胞、骨芽細胞、筋線維芽細胞への分化は、それぞれ Oil red O 染色、アルカリホスファターゼ染色、 α SMA の免疫蛍光染色によって示され、単離した BM-MSC の分化能が確認された。

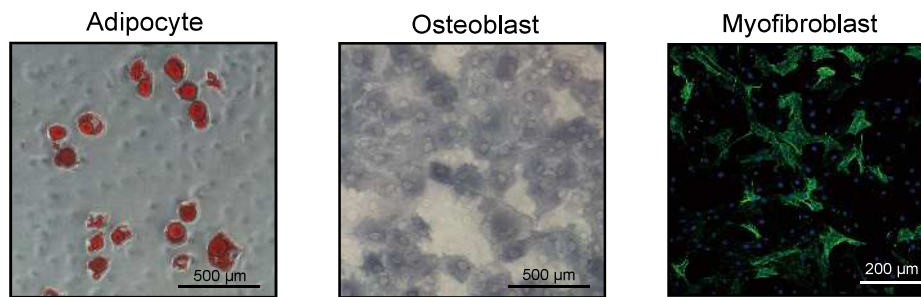


図 3-2 単離した BM-MSC の多分化能の確認

BM-MSC を脂肪分化培地、骨分化培地、TGF- β で処置した。Oil red O 染色、アルカリホスファターゼ染色、 α SMA の免疫蛍光染色を行い、それぞれ脂肪細胞、骨芽細胞、筋線維芽細胞への BM-MSC の分化を解析した。

3-3 脂肪分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響

PP2A の活性低下は BM-MSC の脂肪細胞分化を促進することが報告されていることから (61)、分化誘導中 (分化誘導開始から 0、7、14 日) の PP2A 関連タンパク質発現量を western blotting により解析した (図 3-3)。脂肪分化誘導は、PP2Ac、PP2A A、B55 α 、B55 γ 、PR72 および PME-1 のタンパク質発現量には影響を及ぼさなかった。一方で、B56 α は 7 日目に一過性に増加し、14 日目には 0 日目の水準に戻った。また、PR130 は 7 日目に一過性に減少し、LCMT-1 も 7 日目にわずかに減少した。

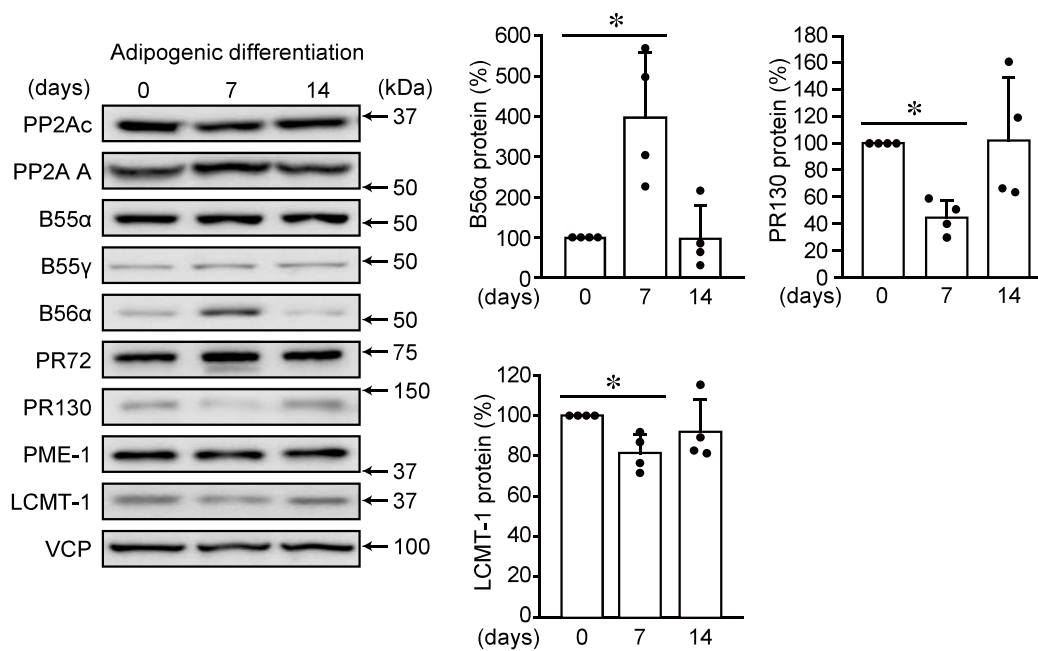


図 3-3 脂肪分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響

BM-MSCs を脂肪分化培地で 7 もしくは 14 日間処置し、PP2A 関連タンパク質の発現量を western blotting により解析した。各タンパク質の典型的な画像と変化が認められた B56α、PR130、LCMT-1 の定量図を示した。N=4、*: P< 0.05 (Day 0 との比較)。

3-4 骨分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響

PP2A の活性低下はマウスの骨量・骨密度を上昇させることから (61)、分化誘導中 (分化誘導開始から 0、7、14 日) の PP2A 関連タンパク質発現量を western blotting により解析した (図 3-4)。骨分化誘導は、PP2A A、B55 α および PME-1 のタンパク質発現量には影響を及ぼさなかった。一方で、PP2Ac、B55 γ 、B56 α 、PR72 および PR130 のタンパク質発現量は、0 日目と比較して 7 日目および 14 日目に低下した。また、脂肪分化誘導と同様に LCMT-1 タンパク質は 7 日目にわずかに減少した。

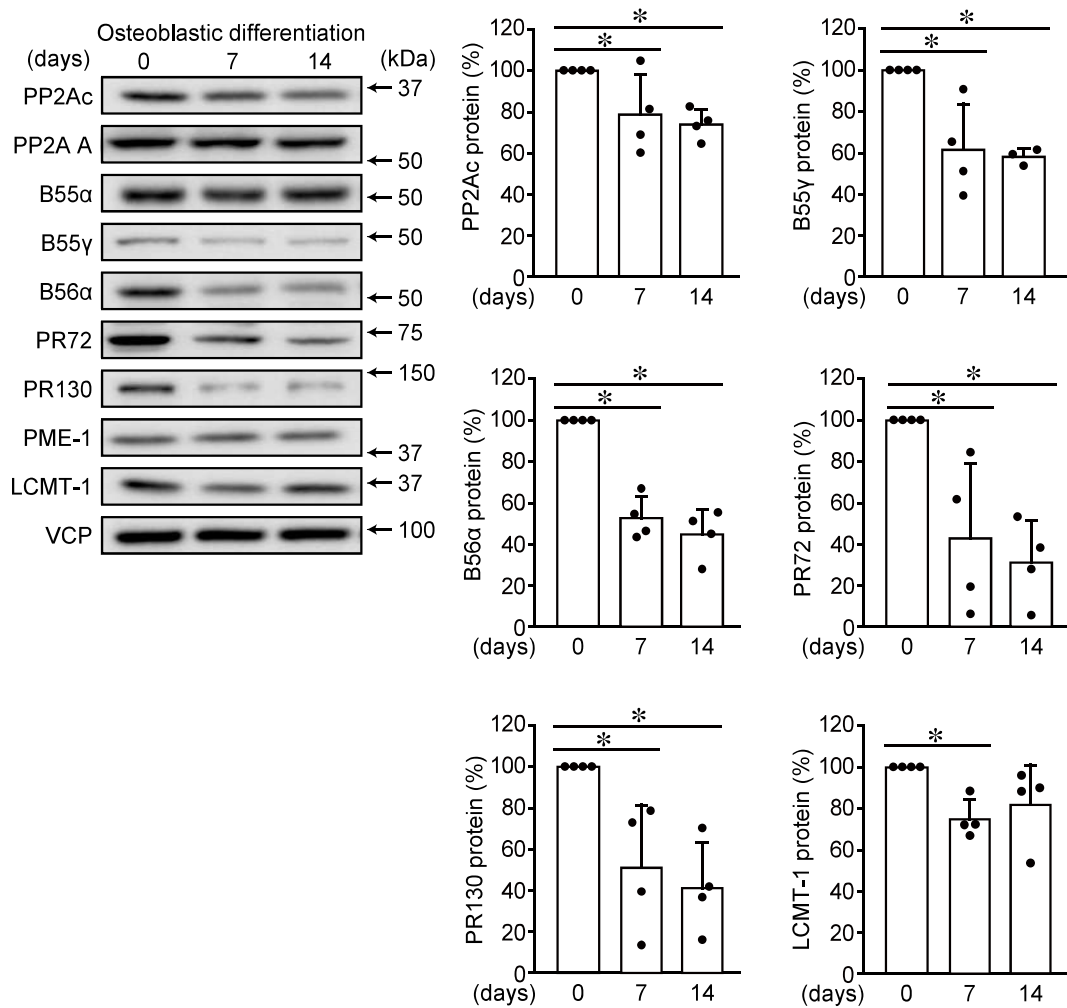


図 3-4 骨分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響

BM-MSCs を骨分化培地で 7 もしくは 14 日間処置し、PP2A 関連タンパク質の発現量を western blotting により解析した。各タンパク質の典型的な画像と変化が認められた PP2Ac、B55γ、B56α、PR72、PR130、LCMT-1 の定量図を示した。N=4、*: P<0.05 (Day 0 との比較)。

3-5 筋線維芽細胞への分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響

BM-MSC の筋線維芽細胞への分化における PP2A 関連タンパク質発現量を western blotting により解析した (図 3-5)。筋線維芽細胞分化刺激である TGF- β は、PP2A A、B55 α 、B55 γ 、PME-1 のタンパク質発現量には影響を及ぼさなかった。一方で、B56 α と LCMT-1 は減少し、PR130 は増加した。

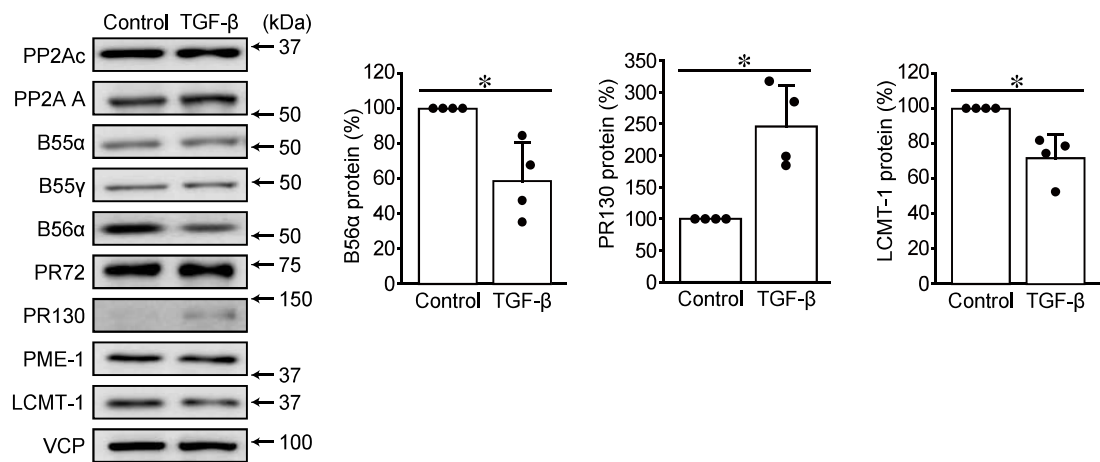


図 3-5 筋線維芽細胞への分化誘導が PP2A 関連タンパク質の発現量に与える影響

BM-MSCs を TGF-β (5 ng/mL) で 2 日間処置し、PP2A 関連タンパク質発現量を western blotting により解析した。各タンパク質の典型的な画像と変化が認められた B56α、PR130、LCMT-1 の定量図を示した。N=4、*: P < 0.05 (Control との比較)。

3-6 分化誘導刺激が PP2Ac メチル化レベルに及ぼす影響

検討した 3 種の分化誘導刺激すべてにおいて、PP2Ac メチル化酵素 LCMT-1 のタンパク質発現量が低下していた。このことは、PP2Ac のメチル化制御が BM-MSC の分化に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。そこで、分化誘導刺激が PP2A のメチル化レベルに与える影響を検討したところ、脂肪分化誘導が PP2A のメチル化レベルを時間依存的に減少させること、骨分化および筋線維芽細胞分化刺激は、PP2A のメチル化レベルに影響を与えないことが明らかになった (図 3-6)。

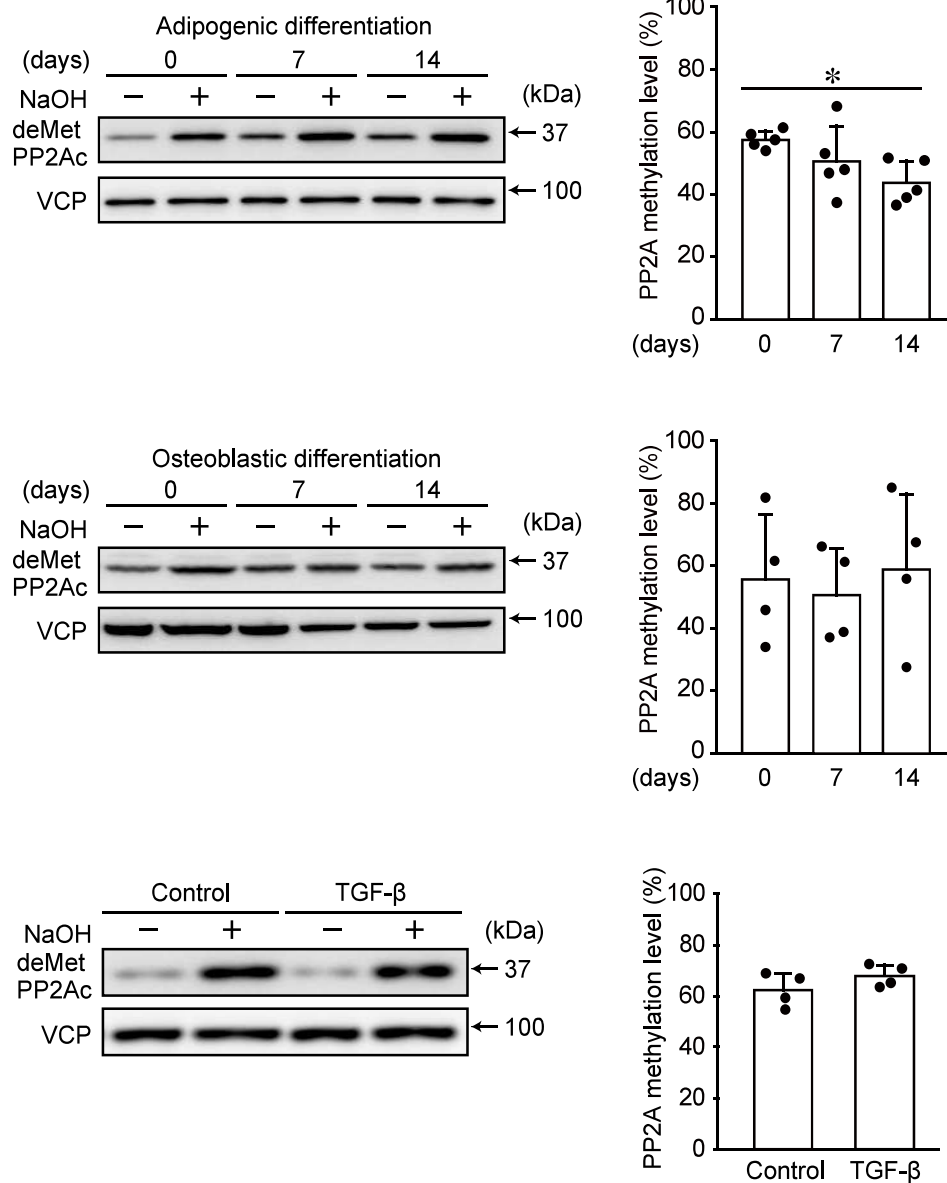


図 3-6 分化誘導刺激が PP2Ac メチル化レベルに及ぼす影響

BM-MSCs を脂肪分化培地、骨分化培地および TGF- β で処置した。第 6 章に記載した方法で PP2A のメチル化レベルを測定した。典型的な画像と定量図を示す。N=4、*: P<0.05 (Day 0 または Control との比較)。

3-7 脂肪分化誘導に伴う PP2A メチル化レベルの低下が Akt のリン酸化レベルに与える影響

脂肪分化刺激による PP2Ac メチル化レベルの低下は、PP2A 複合体の構成が変化していることを示唆する。脂肪細胞への分化には、インスリンとその下流の PI3K/Akt シグナルが重要な役割を果たす (62)。また、PP2A メチル化で形成が促進される PP2A/B55 α 複合体は Akt を脱リン酸化する (45)。そこで、Akt のリン酸化レベルに与える影響を western blotting により解析したところ、脂肪分化誘導 7 日目において Akt のリン酸化レベルの有意な上昇が認められた (図 3-7)。この結果は、PP2A メチル化レベルの低下にともない PP2A/B55 α 複合体が減少している可能性を示唆する。

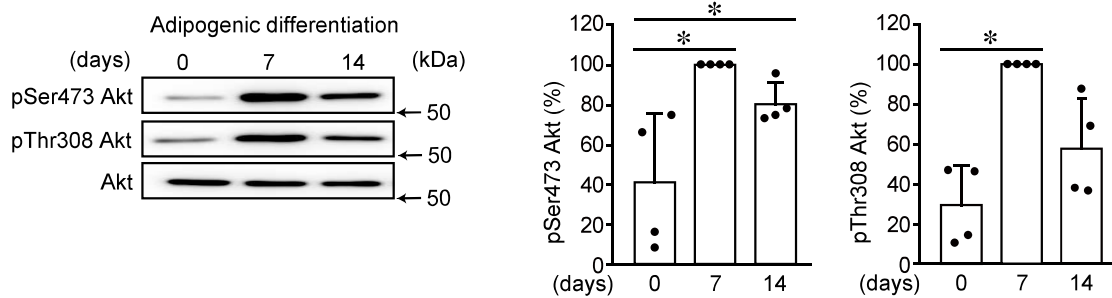


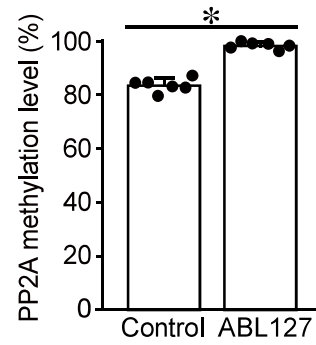
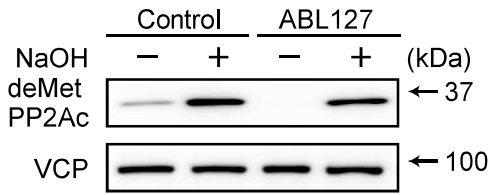
図 3-7 脂肪分化誘導に伴う PP2A メチル化レベルの低下が Akt のリン酸化レベルに与える影響

BM-MSCs を脂肪分化培地で 7 もしくは 14 日間処置し、pSer473 Akt、pThr308 Akt、および Akt のタンパク質レベルを western blotting により解析した。各タンパク質の典型的な画像と定量図を示す。N=4、*: P<0.05. (Day 0 との比較)

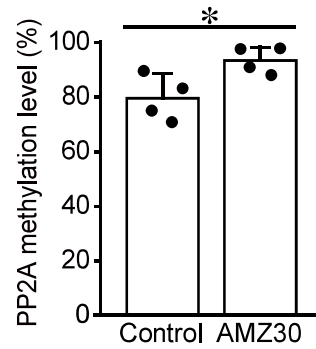
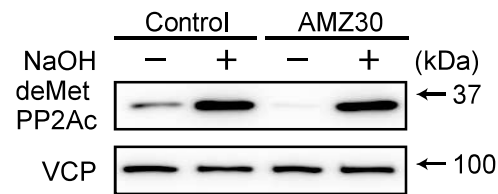
3-8 PME-1 阻害剤が脂肪分化誘導に与える影響

脂肪分化誘導が PP2Ac メチル化レベルを低下させることから、PP2Ac メチル化の亢進は脂肪分化を抑制すると考えられる。そこで、PME-1 の脱メチル化酵素活性に対する阻害剤である ABL127 と AMZ30 を用いて、PP2A メチル化レベルの上昇が脂肪分化に与える影響を解析した。BM-MSC を ABL127 と AMZ30 で 24 時間処置すると、PP2A メチル化レベルが上昇することが確認された（図 3-8 A-B）。脂肪分化誘導培地に PME-1 阻害剤を添加したところ、予想に反して、PME-1 阻害によって単位面積当たりの脂肪細胞数が増加した（図 3-8 C-D）。

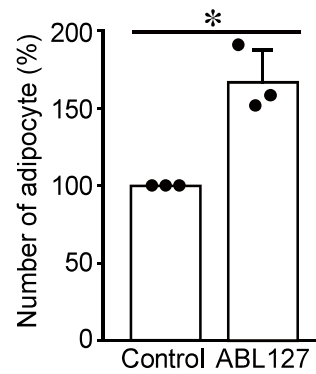
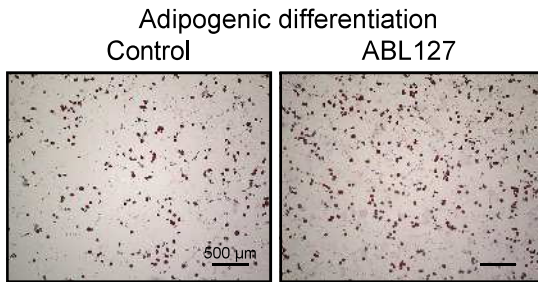
(A)



(B)



(C)



(D)

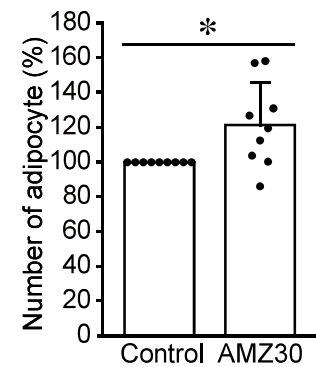
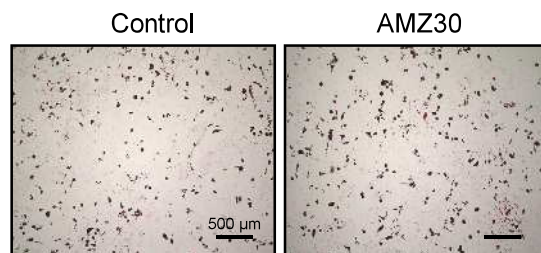


図 3-8 PME-1 脱メチル化活性阻害剤が脂肪分化誘導に与える影響

BM-MSC を、ABL127 (10 μ M) または AMZ30 (20 μ M) の処置・非処置下で脂肪分化培地を用いて培養した。(A–B) PP2A メチル化レベルに与える影響を第 6 章に記載した方法で測定した。典型的な画像と定量図を示す。N=4 or 6、*:
 $P < 0.05$ (Control との比較)。(C–D) BM-MSC の脂肪分化を解析するために、Oil Red O 染色を行った。典型的な画像と定量図を示す。N=3 (ABL127)、N=9 (AMZ30)、 $P < 0.05$ (Control との比較)。

3-9 PME-1 阻害剤が骨および筋線維芽細胞への分化誘導に与える影響

骨および筋線維芽細胞への分化誘導では、PP2A のメチル化レベルに顕著な変化は認められなかったが、これらの分化誘導においても PME-1 阻害剤の影響を検討した (図 3-9)。骨芽細胞分化は ABL127 処置で有意ではないが促進傾向であった。一方、筋線維芽細胞分化では、ABL127 処置は TGF- β 刺激による α SMA 発現を阻害するのに対して、MSCs マーカーである ISLR/meflin の発現低下には影響を与えなかった。このことは、TGF- β 刺激による MSCs の筋線維芽細胞への分化を ABL127 が一部阻害することを示している。

これらのデータから、PME-1 の脱メチル化活性が BM-MSCs のさまざまな分化過程において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

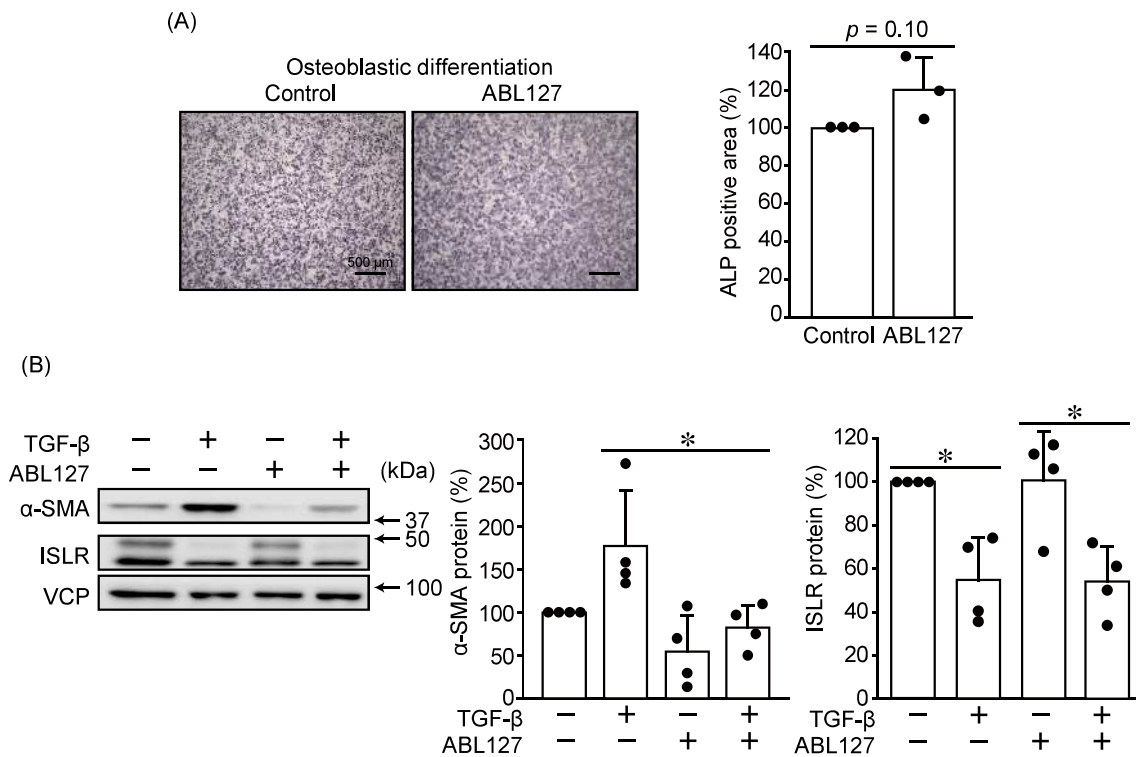


図 3-9 PME-1 脱メチル化活性阻害剤が骨および筋線維芽細胞への分化誘導に与える影響

BM-MSC を、ABL127 (10 μ M) の有無のもと、骨分化培地 (A) または TGF- β 刺激下 (B) で培養した。BM-MSC の骨分化および筋線維芽細胞への分化を検討するために、アルカリホスファターゼ染色または、 α SMA および ISLR タンパク質発現量を western blotting により解析した。それぞれの典型的な画像と定量図を示す。N=3-4、 $P < 0.05$ (Control との比較)。

3-10 考察

3-10-1 PP2A のメチル化レベルと BM-MSC の脂肪分化誘導の関係

B55 γ タンパク質の蓄積は、MSCs の骨芽細胞分化に重要な役割を果たし、B55 発現が低下すると、MSCs は脂肪細胞へと分化する (63)。急性骨髄性白血病患者 (acute myeloid leukemia : AML) から単離された BM-MSCs は、健常ドナーと比較して PP2A B55 ファミリーのタンパク質発現が高く、骨芽細胞へと分化しやすく、脂肪細胞に分化しにくい (64,65)。本研究では、脂肪分化刺激によって B55 γ や B55 α タンパク質の発現は増加しなかったが、PP2A のメチル化レベルは減少した。PP2A のメチル化は PP2A/B55 複合体や PP2A/PR72 複合体の形成を促進することから (32)、PME-1 阻害による PP2Ac メチル化の亢進は、BM-MSCs の脂肪分化を抑制し、骨分化を促進すると考えられる。しかし、PME-1 阻害剤である ABL127 と AMZ30 は、いずれも脂肪細胞分化を促進した。この矛盾の原因として以下の可能性が考えられる。PP2A/B55 複合体や PP2A/PR72 複合体の活性の上昇は骨分化において重要な役割を果たすが、MSCs の脂肪分化においてはその活性は重要ではない可能性がある。ABL127 が BM-MSCs の骨分化に対して有意ではないが促進傾向を示したこと (図 3-9A)、脂肪分化誘導により B55 や PR72 のタンパク質発現レベルが変化しなかったこと (図 3-3) はこの説を支持する。

脂肪分化誘導は、PP2Ac メチル化レベルを低下させたのに対して、ABL127 による PP2A メチル化レベルの上昇は、脂肪細胞数を増加させるという矛盾した結果が得られた。Oil red O 染色の結果は、脂肪分化誘導によって脂肪細胞に

分化する BM-MSCs は一部の細胞にとどまることを示しており、western blotting に用いた細胞抽出液中のタンパク質のほとんどは、分化抵抗性の細胞由来であると考えられる。実際、GSK3 β の活性化は MSC の脂肪分化を正に制御するが (66)、本研究では脂肪分化誘導によって GSK3 β Ser9 リン酸化の上昇 (GSK3 β 活性の低下) が観察された (図 3-11)。神経細胞では GSK3 β は PP2A のメチル化を増加させることが報告されており (67,68)、GSK3 β 活性低下が、分化抵抗性細胞における PP2A のメチル化レベルの低下に寄与している可能性がある。ABL127 処置により PP2A メチル化レベルの上昇が脂肪細胞への分化を促進した結果と合わせて、PP2A のメチル化レベルの低下は、BM-MSCs の脂肪細胞への分化に対する抵抗性因子として働いていると考えられる。

脂肪分化刺激下で B56 α 発現は増加し PR130 発現は減少した。Wnt/ β -catenin シグナル伝達は、MSC の骨分化を促進し、脂肪分化を抑制するが、Wnt/ β -catenin シグナルに対して、PP2A/B56 α 複合体は抑制的に、PP2A/PR130 複合体は促進的に働くことが知られている (69-71)。このことから、B56 α タンパク質の増加と PR130 タンパク質の減少は、Wnt/ β -catenin シグナル活性を抑制することで、脂肪分化を促進する可能性が考えられる。しかし、この考察は、western blotting に用いた細胞抽出液中のタンパク質のほとんどが脂肪分化抵抗性の細胞由来であるという前述の考察と矛盾する。本研究では、脂肪分化した細胞と分化抵抗性を示した細胞を同時に解析したため、過去の知見との矛盾点が生じていると考えられる。PP2A のメチル化が脂肪分化に与える影響を明らかにするためには、セルソーターを用いて脂肪分化した細胞と分化抵抗性を示した細胞を分取して解析するなど、シングルセルレベルでの解析が必要であると考えられる。

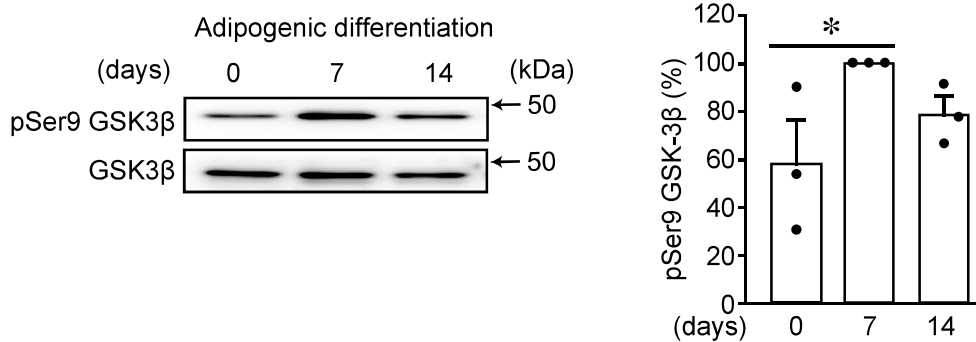


図 3-11 脂肪分化誘導に伴う PP2A メチル化レベルの低下が GSK3β リン酸化レベルに与える影響

BM-MSCs を脂肪分化培地で 7 もしくは 14 日間処置し、GSK3β および pSer9 GSK3β タンパク質発現量を western blotting により解析した。各タンパク質の典型的な画像と定量図を示す。N=3、*: P<0.05. (Day 0 との比較)。

3-10-2 BM-MSCs の筋線維芽細胞分化

TGF- β は、筋線維芽細胞分の主要な誘導因子である (72)。ISLR/meflin は、MSC の未分化状態の維持に重要であり、その発現は TGF- β 刺激によって低下する (73-75)。本研究においても、BM-MSCs を TGF- β で処置すると、筋線維芽細胞マーカーである α SMA が顕著に増加し、ISLR/meflin が減少したことから、筋線維芽細胞への分化が確認された。ABL127 は TGF- β による α SMA 誘導を抑制したが、ISLR/meflin の減少には影響しなかった。したがって、TGF- β 刺激による BM-MSCs の筋線維芽細胞への分化には、BM-MSCs の未分化状態が失われる段階と、その細胞が筋線維芽細胞へ分化する段階の 2 ステップ存在すると考えられ、PME-1 は後者のみに関与し、前者には関与していないと考えられる。以上のことから、ABL127 と TGF- β の共処置によって、BM-MSCs は分化の途中で停止している、あるいは筋線維芽細胞以外の細胞へと分化している可能性が考えられるが、近年、TGF- β 刺激による BM-MSCs の筋線維芽細胞への分化が可逆的な反応であることも報告され (76)、PP2A メチル化が MSC の筋線維芽細胞分化にどのような影響を与えているかについては、さらなる検討が必要である。

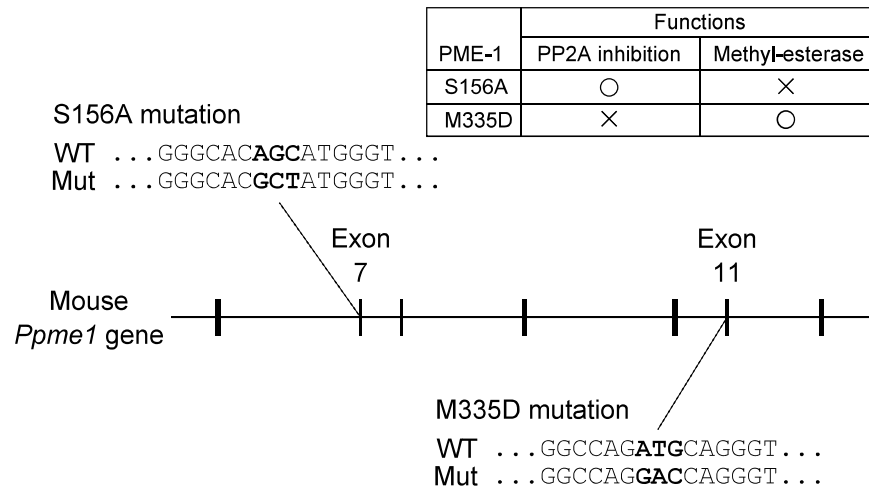
第4章 PME-1の2つの機能がマウス生体に果たす役割の解明

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ことから、PME-1が制御する生理学的および病態生理学的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。我々は以前、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た(32)。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、我々はPME-1 SA 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。

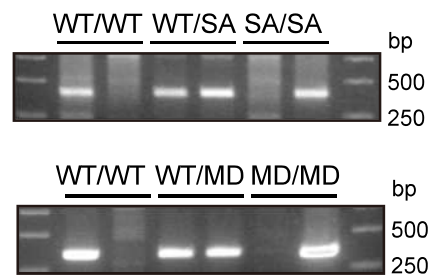
4-1 2種類の変異体 PME-1 KI マウスの作製と KI マウスの周産期および生後4週目における遺伝子型の割合の検討

マウスの *Ppme1* 遺伝子に点変異を加え、PME-1 S156A (SA) および M335D (MD) 変異体を発現させた (図 4-1A)。各変異のファウンダーマウスを C57BL/6NJcl と交配し、ヘテロ KI マウスとして N1 世代を出生させた。続けて、ヘテロ型の PME-1 WT/SA マウスと PME-1 WT/MD マウスをそれぞれずつ交配し、4つのステージ (E14.5-16.5、E18.5、P0、P28) におけるマウスの遺伝子型を解析した (E: embryonic day、P: post-natal day) (図 4-1B,C)。出生直後の P0 まではメンデルの法則に従った割合で全ての遺伝子型が存在したが、離乳時の P28 では PME-1 SA/SA および PME-1 MD/MD マウスの存在は確認できなかった。

(A)



(B)



(C)

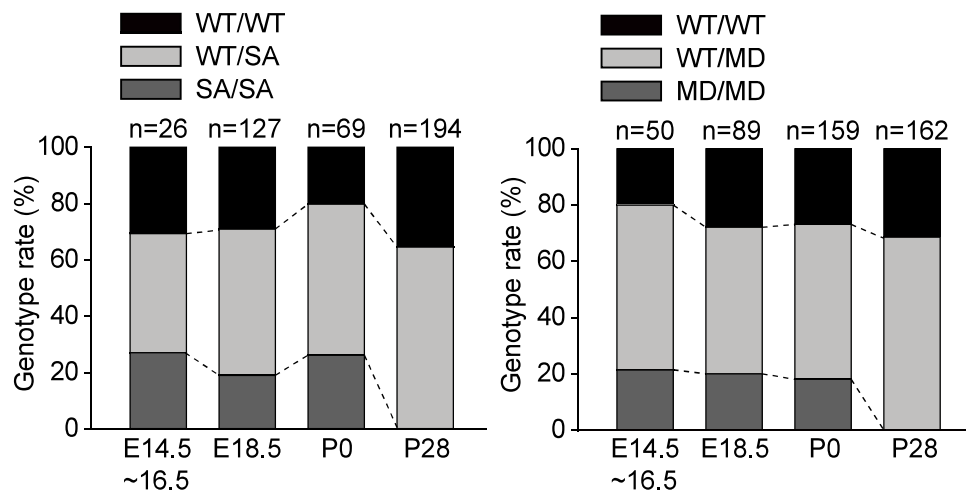


図 4-1 2種類の変異体 PME-1 knock-in (KI) マウスの作製と KI マウスの周産期および生後 4 週目における遺伝子型の割合の検討

(A) マウス *Ppme1* 遺伝子上の 156 番目のセリンと 335 番目のメチオニンをコードする遺伝子の位置と変異の概略図。(B,C) それぞれのマウスの遺伝子型を 4 つのステージ (E14.5-16.5、E18.5、P0、P28) で解析した。PCR により各マウスの遺伝子型の確認をしたときの典型的な画像と (B) と定量図 (C)。解析したマウスの数は棒グラフの上に示した。E: embryonic day、P: post-natal day、WT : wild-type、SA : S156A、MD : M335D。

4-2 In vivo における 2 種類の変異体 PME-1 の脱メチル化酵素活性の検討

マウスでは脳と精巣組織で *Ppme1* の mRNA 発現が高い。作製した KI マウスの PME-1 脱メチル化酵素活性を確認するため、E18.5 の脳組織における PP2Ac メチル化レベルを解析した。SA/SA マウスの脳では、ほとんどすべての PP2Ac がメチル化されており、この変異体が酵素活性を失っていることが確認された。一方、MD/MD マウスの脳では、PP2Ac メチル化レベルは WT/WT より低く、PME-1 M335D が脱メチル化酵素活性を持つことが確認された。

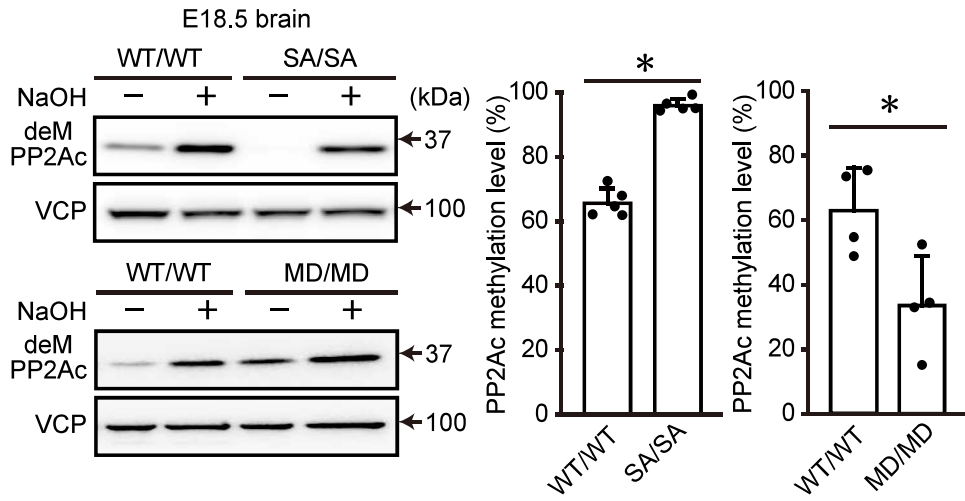


図 4-2 In vivo における 2 種類の変異体 PME-1 の脱メチル化酵素活性の検討

各種マウスの脳の PP2Ac メチル化レベルを第 6 章に記載の方法で解析した。典

型的な画像と定量図を示した。N=4、*: P<0.05 (WT/WT との比較)

4-3 PME-1 MD 変異体がマウスの発生・出生に与える影響

4-3-1 PME-1 MD/MD マウスの肉眼的所見と生存曲線

PME-1 MD/MD マウスは、出生後 4 週目までに全て死亡していた。出生直後の PME-1 MD/MD マウスは WT/WT マウスと比べて肉眼的な異常は認められなかった (図 4-3-1A)。そこで、PME-1 MD/MD マウスがいずれのタイミングで死亡しているのかを検討した (図 4-3-1B)。全ての PME-1 MD/MD マウスが生後 2 日以内に死亡しているのが明らかになった。

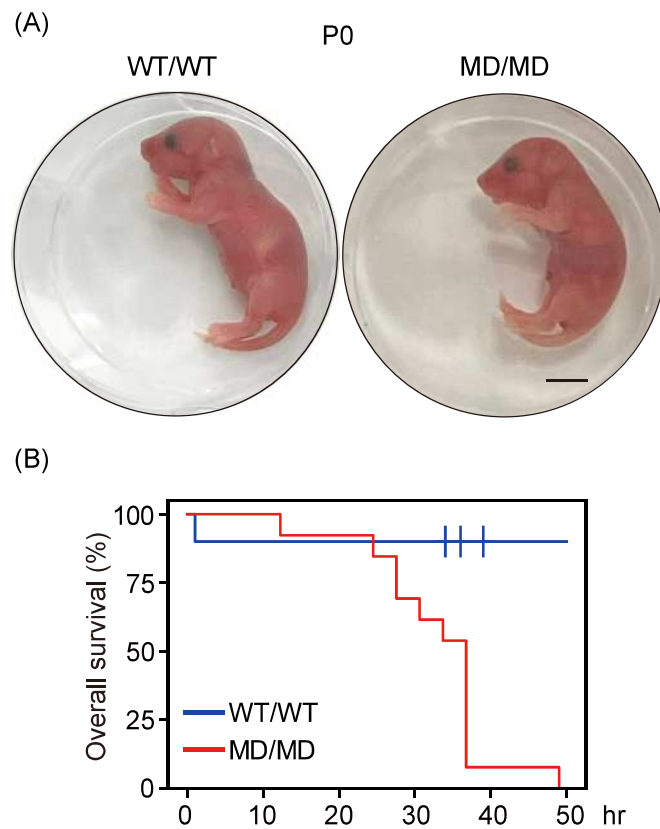


図 4-3-1 PME-1 MD/MD マウスの肉眼的所見と生存曲線

(A) P0 における PME-1 MD/MD マウスの典型的な肉眼所見。スケールバー：5 mm。(B) PME-1 WT/WT マウス (青) と MD/MD マウス (赤) の生存曲線。WT/WT : N=10、MD/MD : N=13。

4-3-2 PME-1 MD/MD マウスの血糖値

PME-1 MD/MD マウスでは、胃に母乳の存在がほとんど確認できず、母乳を摂取できていない可能性が考えられた。そこで、出生後 18 時間程度のマウスの血糖値を測定したところ、PME-1 MD/MD マウスの血糖値は WT/WT マウスと比較して低いことが明らかになった (図 4-4-3)。これらの結果は、低血糖が MD/MD マウスの死亡原因の一つである可能性を示唆する。

score	blood glucose (mg/dL)	WT/WT (N = 18)	MD/MD (N = 24)
1	0 ~ 20	1	8
2	21 ~ 40	3	10
3	41 ~ 60	2	4
4	61 ~ 80	9	2
5	81 ~	3	0

P < 0.05

図 4-3-2 PME-1 MD/MD マウスの血糖値

PME-1 MD/MD マウスの出生後 18 時間程度における血糖値の解析結果。

WT/WT : N=18、MD/MD : N=24。

4-3-3 PME-1 MD/MD マウスの骨格筋におけるグルコース取り込み能

低血糖の原因として、グルコース取り込み能の亢進が考えられる。そこで、PME-1 MD/MD マウスの筋肉におけるグルコース取り込み能を解析した。PME-1 MD/MD マウスから摘出した筋肉組織のグルコース取り込み能は WT/WT マウスと差がなかった (図 4-3-3A)。また、グルコース取り込みに関わる glucose transporter type 4 (GLUT4) のタンパク質発現量も変化しなかった (図 4-3-3B)。

インスリン分泌の亢進も低血糖の原因となる。PME-1 MD/MD マウスでインスリン分泌が亢進して低血糖が誘発されている可能性が考えられたが、P0 マウスの血中インスリンは検出限界以下であった (data not shown)。また、インスリン刺激の下流に存在する Akt のリン酸化レベルは、PME-1 MD/MD マウスで顕著に低下していた (図 4-3-3B)。したがって、PME-1 MD/MD マウスで認められる低血糖は、組織のグルコース取り込み能の亢進やインスリンの過剰分泌によるものではないと考えられる。

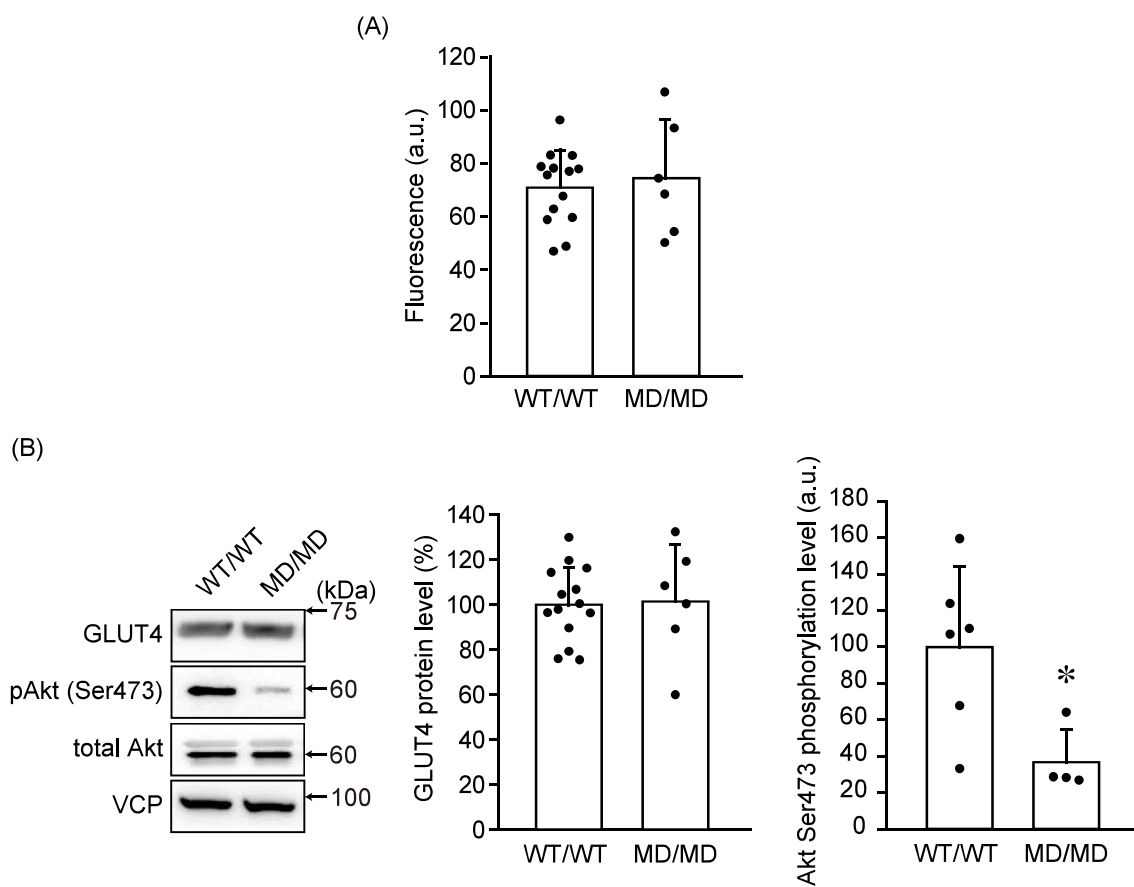


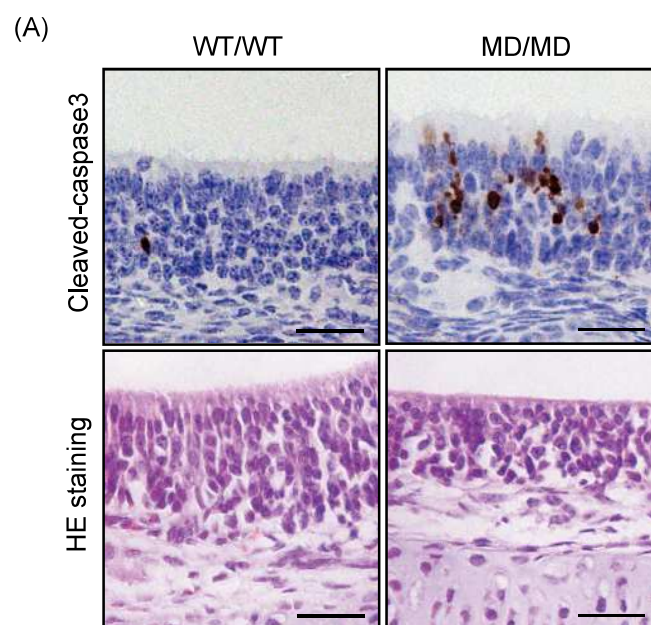
図 4-3-3 PME-1 MD/MD マウスの骨格筋におけるグルコース取り込み能

(A) PME-1 MD/MD マウスの骨格筋におけるグルコース取り込み能を測定した。(B) GLUT4、Akt、pSer473 Akt のタンパク質発現量を western blotting により解析した。典型的な画像と定量図をそれぞれ示す。WT/WT : N=14、MD/MD : N=6、N.S. : 有意差なし * : $P < 0.05$ (WT/WT との比較)。

4-3-4 PME-1 MD/MD マウスの嗅覚に関する解析

新生児期のマウスは、視覚が未発達であるため、主に嗅覚を頼りにして母体を認識し、母乳を摂取する。そこで、*o*-キシレンを用いた嗅覚試験を行い、*o*-キシレンに対する反応を4段階に分類した（図 4-3-4A）。その結果、PME-1 MD/MD マウスは WT/WT マウスに比べて嗅覚が弱いことが示唆された。そこで、アポトーシスマーカーである cleaved-caspase 3 の免疫組織化学染色を行ったところ、PME-1 MD/MD マウスでは嗅上皮細胞に陽性細胞が多く認められ、嗅覚上皮細胞特異的なアポトーシスの亢進が示唆された（図 4-3-4B）。

これらのデータから、PME-1 MD/MD マウスは嗅覚に異常があり、母乳に到達できないことが原因でエネルギー不足となり死亡してしまう可能性が示唆された。



(B)

o-xylene olfactory test			
score	reactivity	WT/WT (N = 8)	MD/MD (N = 5)
0	no reaction	0	3
1	slight reaction	2	2
2	escape reaction	4	0
3	escape reaction (inverting the body)	2	0

図 4-4-4 PME-1 MD/MD マウスにおける嗅覚試験

(A) 各マウスの *o*-キシレンに対する反応を 0 から 3 の 4 段階に分類した *o*-キシレン嗅覚試験の結果。 $P < 0.05$ (WT/WT との比較)。 WT/WT : N=8、MD/MD : N=5。 (B) 嗅覚上皮においてアポトーシス細胞マーカーである cleaved-caspase 3 の免疫組織染色と HE 染色をおこなった。それぞれ典型画像を示す。スケールバー : 30 μm 。

4-4 PME-1 SA 変異体がマウスの発生・出生に与える影響の検討

4-4-1 PME-1 SA/SA マウスの肉眼的所見

PME-1 SA/SA マウスも、出生後 4 週目までに全て死亡していた。出生直後の PME-1 SA/SA マウスは WT/WT マウスよりも小さく、出生時に死亡が確認された (図 4-5-1A)。また、胎児の発育段階を観察したところ、E14.5 では外見上の違いは見られなかったが、E16.5 以降では姿勢異常が観察され、その異常は E18.5 でより顕著になった。E18.5 マウスの身長 (頭頂部から尻尾の付け根までの直線距離) と体重を測定したところ、いずれも PME-1 SA/SA マウスで減少していた (図 4-5-1B)。

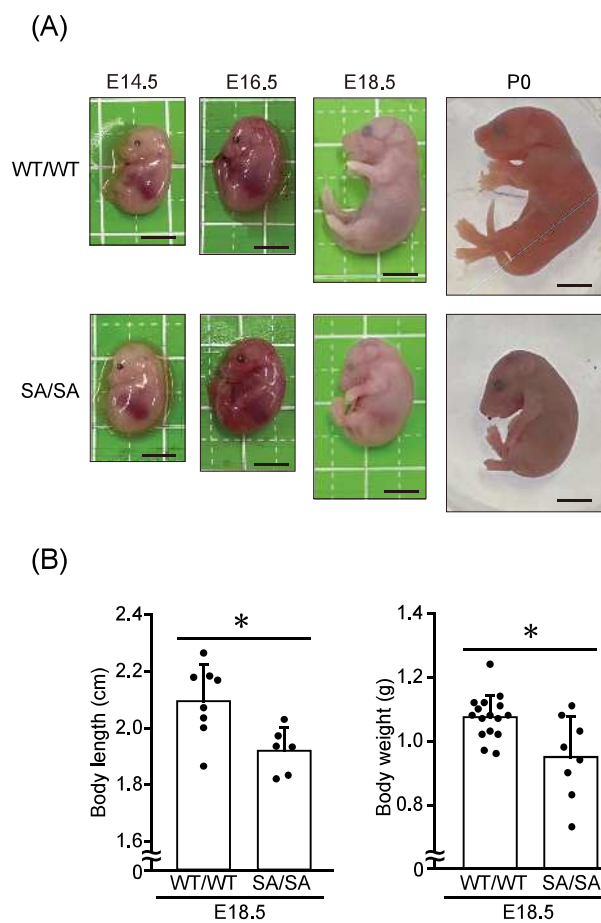


図 4-4-1 PME-1 SA/SA マウスの肉眼的所見

(A) 発生段階 (E14.5、E16.5、E18.5、P0) における胎児および出生直後マウスの典型的な外観を示す。スケールバー：5 mm。(B) E18.5 における WT/WT マウスと SA/SA マウスの体長と体重。N=6-16、*P < 0.05 (WT/WT との比較)。

4-4-2 PME-1 SA/SA マウスの脳組織の肉眼所見と病理学的所見

出生直後の PME-1 SA/SA マウスでは、頭蓋内出血が観察された (図 4-5-2A)。PME-1 SA/SA マウスの脳は萎縮し、特に小脳の萎縮が顕著であった (図 4-5-2A)。出生直後のマウスの小脳は、外顆粒層、分子層、プルキンエ細胞層、内顆粒層、髄質からなる明確な層構造を有している。小脳組織の HE 染色を行ったところ、PME-1 WT/WT マウスでは明瞭な層構造が認められたが、PME-1 SA/SA マウスの小脳ではこれらの層構造は崩壊していた (図 4-5-2B)。また、P0 と同様に、E18.5 の段階においても小脳の層構造は崩壊していたが、E14.5 と E16.5 では正常な小脳構造を有していた (図 4-5-2C)。これらの結果は、PME-1 の脱メチル化酵素としての機能が、胎齢期後期の正常な発生に必須であることを示唆している。

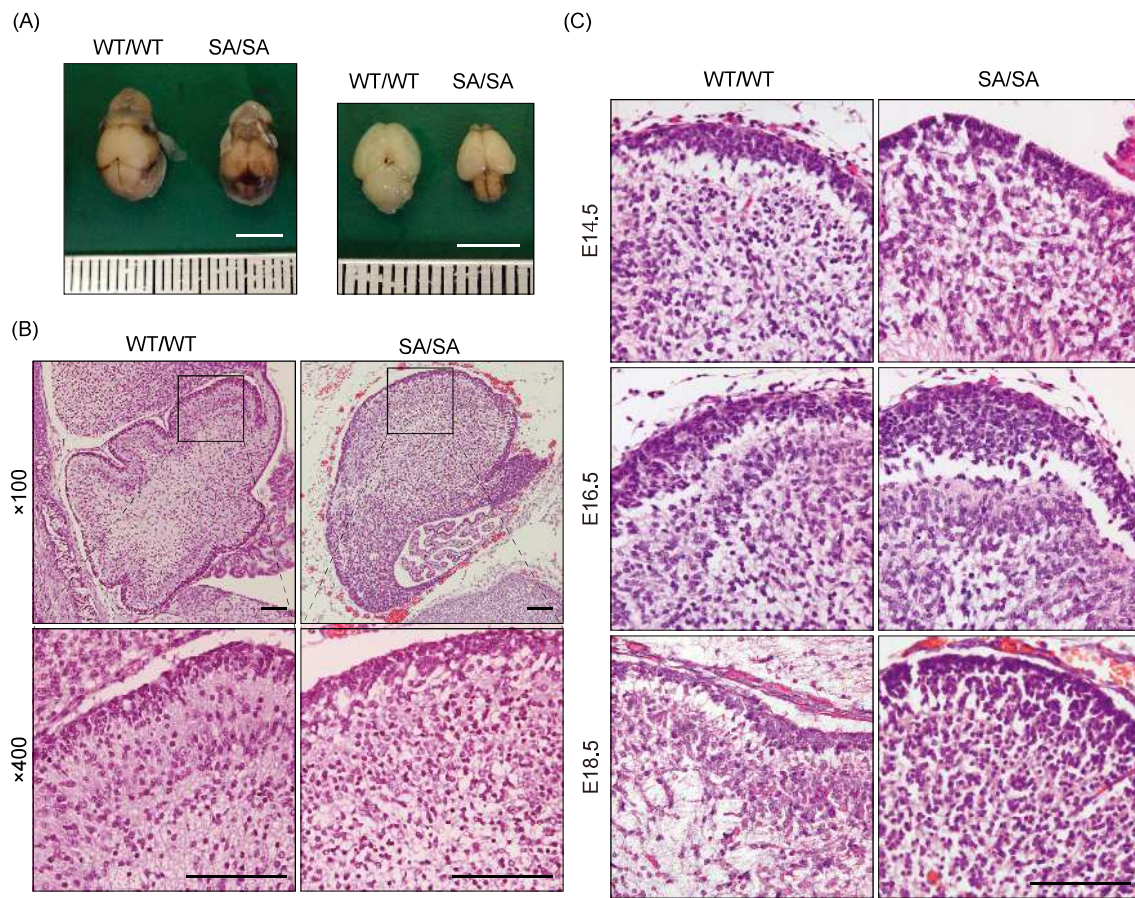


図 4-4-2 PME-1 SA/SA マウスの脳組織の肉眼所見と病理学的所見

(A) 出生直後のマウスにおける脳の典型的な外観像。スケールバー：5 mm。(B) 出生直後のマウス小脳の HE 染色像。弱拡大（100 倍）と強拡大（400 倍）画像それぞれを示す。スケールバー：100 μm。(C) 発生段階（E14.5、E16.5、E18.5）におけるマウス小脳の HE 染色像。スケールバー：100 μm。

4-5 PME-1 SA 変異体が脳組織の発生に与える影響の網羅的解析

PME-1 の脱メチル酵素活性の欠損が脳の発達に及ぼす影響を包括的に理解するため、E18.5 の脳組織を用いてトランスクリプトーム解析を行った。取得した遺伝子発現データセットを用いて MSigDB (v7.5) の C8: cell typesignature gene sets について GSEA を実施した (図 4-6)。小脳に関連する DESCARTE_FETAL_CEREBELLUM の gene set において、PME-1 SA/SA マウスでは WT/WT と比較して、プルキンエ細胞やその他の抑制性介在ニューロンに関連する gene set が抑制され、ミクログリアに関連する gene set が促進していた。

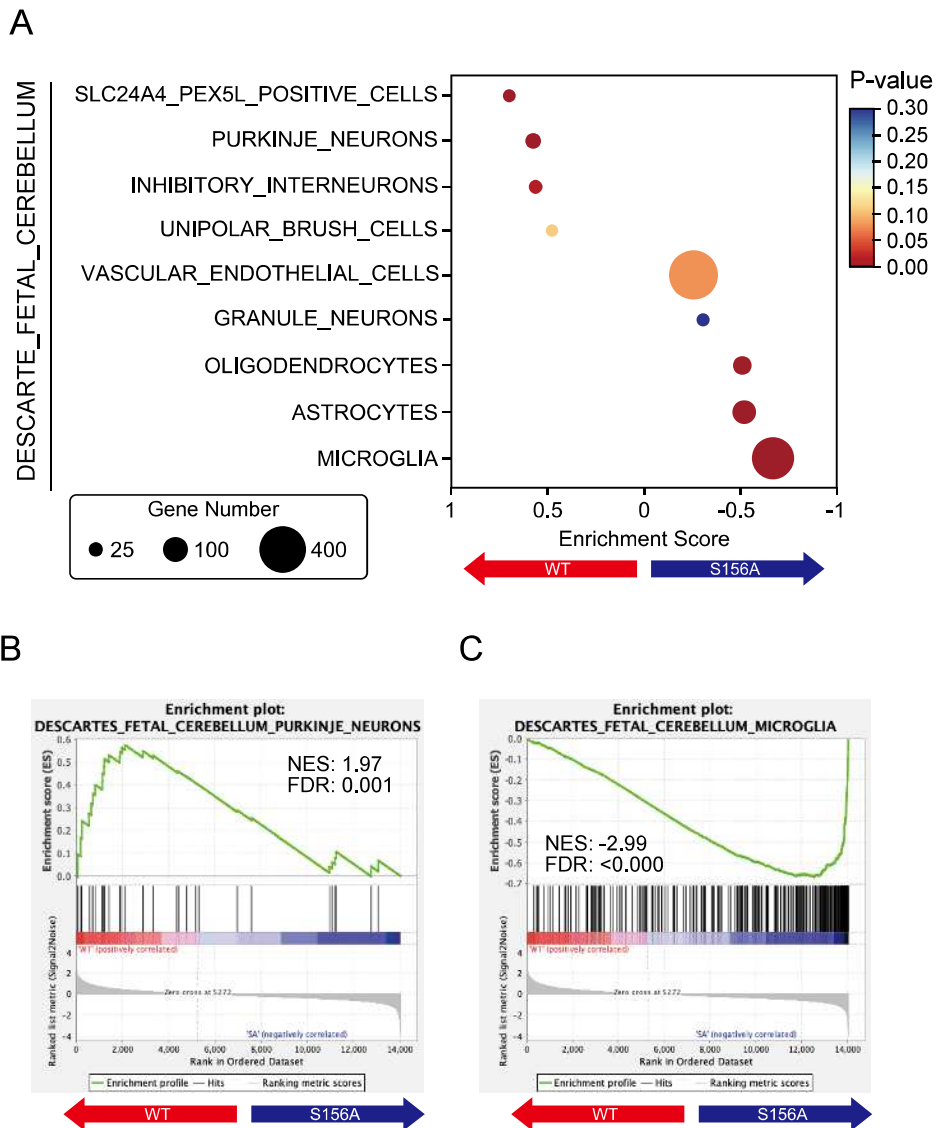


図 4-5 PME-1 SA 変異体が脳組織の発生に与える影響の網羅的解析

E18.5 の PME-1 WT/WT および SA/SA マウスの脳の RNA-seq データを用いた GSEA の解析結果。(A) X 軸はエンリッチメントスコアを示し、Y 軸は DESCARTE_FETAL_CEREBELLUM に属する gene set を示す。記号の大きさは gene set 中にアノテーションされた遺伝子数を表し、色は P 値を表す。(B-C) PURKINJE_NEURON と MICROGLIA に関する gene set のエンリッチメントプロット。

4-6 PME-1 SA 変異体が小脳組織の神経細胞に与える影響

HE 染色画像から小脳の層構造の破綻が認められ、GSEA による網羅的な解析結果から、PME-1 SA/SA マウスの小脳では一部の神経細胞数が減少している可能性が示唆された。そこで PME-1 SA/SA マウスの小脳組織における、層構造の 1 つを担うプルキンエ細胞数を検討するため、免疫組織化学染色を行った (図 4-7)。抗 Calbindin 抗体に陽性を示すプルキンエ細胞は SA/SA の小脳で有意に減少しており、HE 染色像や GSEA の結果を支持するものであった。

神経細胞の移動は、脳の発達に不可欠なイベントである。Radial glia は胎生期、新生児期に特有の神経細胞で、神経突起を形成することで細胞移動の足場となり、小脳の発達には不可欠である。そこで、radial glia の局在を解析したところ、抗 nestin 抗体に陽性を示す radial glia は、WT/WT マウスの小脳では外顆粒層から中心に向かって直線状に局在していたが、SA/SA マウスでは消失していた (図 4-7)。

この結果から、PME-1 SA/SA マウスの小脳では radial glia の神経突起が伸長しないか、プルキンエ細胞や radial glia が細胞死を起こしている可能性が考えられる。

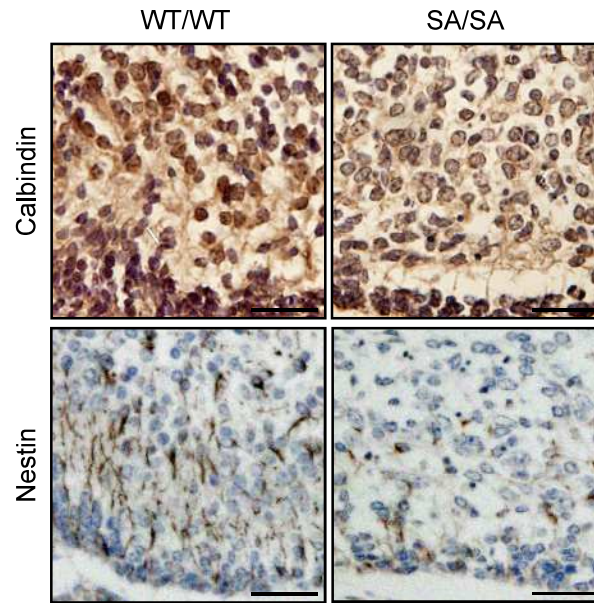


図 4-6 PME-1 SA 変異体が小脳組織の神経細胞に与える影響

マウスの小脳において、プルキンエ細胞マーカーである calbindin と radial glia マーカーである nestin の免疫組織化学染色を行った。典型画像を示す。スケールバー：30 μm 。

4-7 PME-1 SA 変異体が小脳組織のアポトーシスに与える影響

これまでの結果から、PME-1 SA/SA マウスの小脳組織中のいくつかの神経細胞数が減少していることが示唆される。その原因として、神経細胞がアポトーシスにより減少している、あるいは神経幹細胞の神経細胞への分化が抑制されている可能性が考えられる。そこで、小脳組織におけるアポトーシス陽性細胞数を免疫組織化学染色により解析した（図 4-9）。PME-1 SA/SA マウスでは、抗 cleaved-caspase 3 抗体に陽性を示すアポトーシス陽性細胞が有意に増加していた。したがって、PME-1 の脱メチル化酵素活性は神経細胞のアポトーシスを抑制すると考えられる。

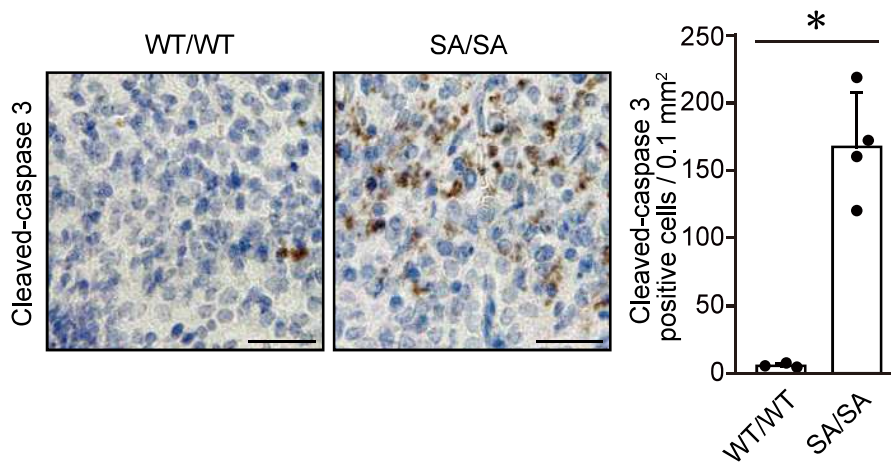


図 4-7 PME-1 SA 変異体が小脳組織のアポトーシスに与える影響

マウス小脳を用いて cleaved-caspase 3 の免疫組織化学染色を行った。典型画像と定量図を示す。定量データは面積あたりの cleaved-caspase 3 陽性細胞数を計測した。N=3-4、*P < 0.05 WT/WT との比較。スケールバー：30 μ m。

4-8 PME-1 脱メチル化酵素活性の阻害が神経分化に与える影響

神経分化に対する PME-1 脱メチル化酵素活性の影響を解析するため、マウス ES 細胞 (mouse embryonic stem cells: mESCs) の神経分化モデルを利用した。SDIA 法では、ES 細胞は神経分化誘導 4 日後に神経前駆細胞になり、10 日後に神経細胞に分化する。そこで、4 日目に PME-1 阻害剤 ABL127 を滴加し、10 日目に細胞を回収して、神経細胞マーカーである *tuj1* の発現を western blotting により解析した (図 4-9)。ABL127 で処置した細胞では PP2Ac のメチル化レベルが上昇し、*tuj1* の発現が低下していた。したがって、PME-1 の脱メチル化酵素活性は神経細胞の分化に重要な役割を果たすと考えられる。

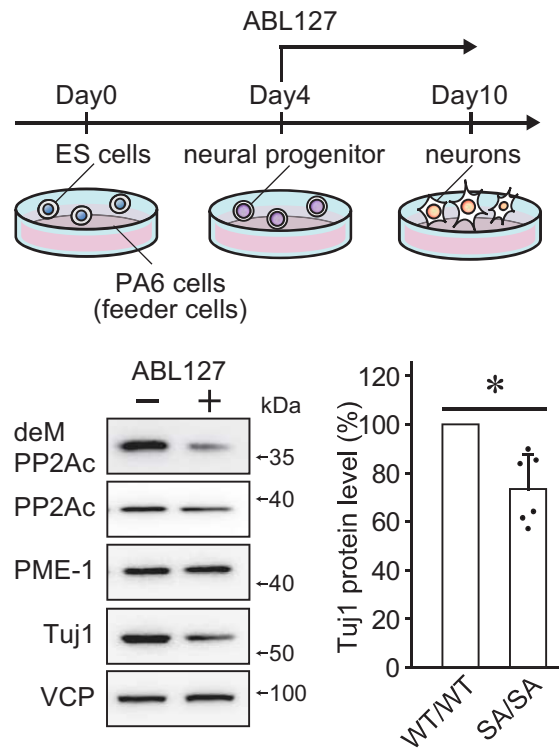


図 4-8 PME-1 脱メチル化酵素活性の阻害が神経分化に与える影響

SDIA 法を用いて mESC の神経分化を誘導し、示した抗体について western blotting を行った。本研究で行った SDIA 法の模式図 (A)、典型的な画像、および ABL127 (-) を 100% とした定量図を示す (B)。N=6、*P < 0.05 v.s. (ABL127 (-) との比較)。

4-9 考察

4-9-1 PME-1 MD/MD マウスが出生後致死である原因

PME-1 の Met335 は、進化的に高度に保存されている疎水性アミノ酸であり、PP2Ac との結合に重要な役割を果たしている。構造解析から、PME-1 と PP2Ac の相互作用は、PME-1 の活性部位周辺で大きな構造変化をもたらし、脱メチル化酵素としての機能を活性化することが示唆されている (43)。したがって、PP2A に対する結合能が低い PME-1 M335D 変異体は脱メチル化酵素活性を持たない可能性が考えられたが、我々の以前の報告および本研究の結果から、この変異体は、脱メチル化酵素として活性を維持していることが示された (32)。

PME-1 MD/MD マウスは出生後 2 日以内に死亡したが、WT/WT マウスと比較して肉眼的に顕著な変化は認められなかった。視覚が未発達な新生児マウスにとって、嗅覚は生命維持に重要である (77)。本研究は、MD/MD マウスでは嗅上皮特異的にアポトーシスが起き、嗅覚異常により母乳を摂取できないことが死因である可能性を示した。このことから、MD/MD マウスを人工保育することで寿命を延ばすことができると考えたが、新生児期のマウスの人工保育は技術的に困難であり検証できていない。

Pdn マウス は、遺伝性無嗅脳症を示し、母マウスの乳頭から出る物質に対する嗅覚受容障害によって吸啜行動障害が生じることで生後まもなく死亡する (77)。また、嗅覚のシグナル伝達に重要な AC3 や CNGA2 の KO マウスのほとんどが餓死すること (78,79)、tetanus toxin で嗅神経細胞の活動を抑制すると新生児の発育の遅れが認められることが報告されており (80)、嗅覚がマウスの正常な

発達に重要な役割を果たすことが明らかになっている。MD/MD マウスでは一部の嗅上皮のみでアポトーシスが起きていることから、嗅覚が部分的にのみ阻害されており、ある程度の栄養摂取ができていた可能性が考えられる。しかしながら、MD/MD マウスにおいて、なぜ一部の嗅上皮のみでアポトーシスが起きているのかについては検討できていない。嗅上皮は表層の支持細胞と中間層の嗅神経細胞と基底細胞の3層に大別される。MD/MD マウスでは中間層の嗅神経細胞がアポトーシス陽性を示していると考えられるが、嗅上皮の組織学的な観点からの変化は認められない。一部の嗅覚受容体をもつ嗅神経細胞のみで細胞死が誘導されている可能性も考えられるが、今後の検討課題の1つである。

本研究の結果は、PME-1 の PP2A 阻害タンパク質としての機能が嗅上皮つまり嗅覚の正常な発達において重要な役割を果たしていることを示している。これまでにパーキンソン病モデルマウスにおいて嗅覚異常と PP2A 活性低下の相関が報告されているが (81)、PP2A 活性異常と嗅覚異常を直接的に結びつけた知見は本研究が初めてである。

4-9-2 PME-1 SA/SA マウスが出生後致死である原因

小脳形成不全をはじめとする様々な脳疾患に対する研究の中で、発症や進行における分子機構の解明にはマウスが重要な役割を果たしてきた。マウスの小脳については、多くの研究からその構造や発生・分化の分子機構の詳細が解明されている (82–85)。マウスの脳の発生はヒトと異なり、出生後も神経細胞が分化・移動することで生後 3–4 週目頃に小脳が成熟する。小脳を構成する主な神経細胞は、顆粒細胞とプルキンエ細胞であるが、前者は胎齢 12.5 – 16 日の間に、後者は胎齢 10.5 – 14.5 日の間に分化し、その後分化した細胞らは、適切な場所へと細胞遊走し適切な場所へ配置される。Radial glia は発生期中枢神経系に存在する神経前駆細胞である。発生中期には神経細胞に分化し、徐々にグリア細胞（アストロサイトとオリゴデンドロサイト）に分化する。また、radial glia は、長い放射状突起を伸ばして新生ニューロンの移動の足場を提供し、ニューロンが適切な位置に配置するために重要な役割を果たす。PP2A は radial glia の局在制御に関わることが報告されており (86)、SA/SA マウスでは、radial glia の数の減少や突起形成の低下が観察された。また、GSEA による網羅的な解析から、SA/SA マウスではプルキンエ細胞に関連する gene set が抑制されていたが、小脳のもう一つの主要な神経細胞である顆粒細胞に関連する gene set には変化が認められなかった (図 4-6)。このことから、PME-1 脱メチル化酵素活性の欠損は一部の神経細胞の分化に影響を与えられられる。したがって、PME-1 脱メチル化酵素活性の欠損が PP2A 活性を変化させることで radial glia の局在不全を引き起こし、発生後期（特に E16.5 以降）にプルキンエ細胞を含む

神経細胞の移動が阻害され、層構造が破綻したと考えられる。SA/SA マウスの脳の構造崩壊は出生直後のマウスの生命維持に深刻な影響を及ぼし、出生後すぐに致命的な状態に至ると考えられる。

本研究では、PME-1 SA/SA マウスは小頭症、特に小脳萎縮を示した。GSEA および免疫組織化学染色の結果から、SA/SA マウスの脳組織ではプルキンエ細胞を含む神経細胞の数が減少していることが明らかになった。RNA-seq から得られた SA マウスで発現が低下する 184 の DEGs のうち、*CIT* 遺伝子が KEGG データベースの先天性小頭症の病因遺伝子と共通遺伝子であることを見出している (図 4-10)。CIT タンパク質は、細胞分裂の最終段階に関与するタンパク質であり、昆虫から哺乳類まで高く保存されている (87,88)。CIT 欠損マウスでは、神経前駆細胞の細胞質分裂が破綻することでアポトーシスが誘導される (89-91)。また、SA/SA マウスと同様に、プルキンエ細胞の消失と小脳層の菲薄化が観察される。一方、CITKO マウスでは、SA/SA マウスで認められる小脳の脳溝の消失が観察されず、生存期間も約 2 週間と SA/SA マウスよりも長い (91)。一般的に、小脳皮質の神経細胞数が増加すると、その表面積を拡大するために脳溝が形成されることが考えられており、CITKO マウスでは限られた種類の神経細胞のみが影響を受けたのに対し、SA/SA マウスでは radial glia を含む広範囲の神経細胞が影響を受けたことが、脳溝消失の原因であると考えられる。したがって、PME-1 脱メチル化酵素活性の消失による小頭症には、CIT 発現の低下以外の分子機構も関与していると考えられる。

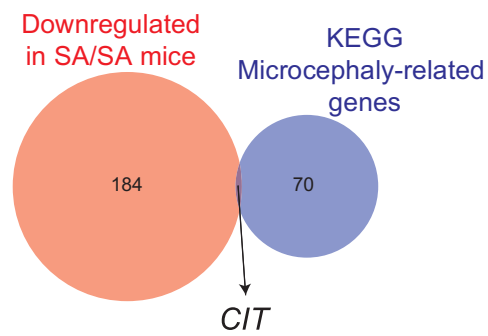


図 4-9 SA マウスにおける DEGs と小頭症原因遺伝子の関係

RNA-seq の解析から SA マウスで発現が低下している 184 の遺伝子を抽出し、小頭症の原因遺伝子として報告されている 70 の遺伝子との共通因子を探索したところ、唯一 *CIT* 遺伝子がヒットした。

4-9-3 PME-1 変異体 KI マウスと PME-1 KO マウスの表現型の相違点

PME-1 KO マウスは徐々にチアノーゼを起こして死亡していくのに対して、SA/SA マウスは出生後即致死であり、MD/MD マウスは生後 2 日以内に栄養失調で死亡した (92)。PME-1 KO マウスの新生仔で脳の萎縮は報告されておらず、SA/SA マウスでのみ観察されることから、PP2A の過剰なメチル化だけが原因ではない。SA/SA マウスでは、PP2A 阻害タンパク質としての機能は維持されており、PME-1 SA 変異体は PME-1 WT よりも PP2A に対する阻害活性が高いことから (32)、PP2A の過剰なメチル化と PME-1 による PP2A 阻害が合わさることで、脳の萎縮が引き起こされると考えられる。一方、PP2A 阻害タンパク質としての機能を欠損した MD/MD マウスの脳は肉眼的な異常はない。In vitro 実験において、PME-1 MD 変異体は PME-1 WT と比較して、PP2A 脱メチル化速度が低いことが明らかになっている (32)。しかし、MD/MD マウスの脳では、PP2Ac メチル化レベルは WT/WT マウスの脳よりもむしろ低いことが観察された。この原因は明らかではないが、細胞内での局在の変化が関与している可能性が考えられる。マウスの脳が正常に発生するためには、PP2A メチル化レベルと PP2A 活性阻害の絶妙なバランスが必要であると考えられる。

第5章 総合討論

5-1 非 DNA タンパク質のメチル化に着目した研究

メチル化とは、様々な基質に対してメチル基が置換または結合することを意味し、遺伝子発現の調節、タンパク質の機能調節、RNA 代謝などに深く関わっている。特に、DNA のメチル化に関しては、およそ 100 年前に細菌で発見されて以来、ほぼすべての生物において、遺伝子発現とゲノム構造における重要なエピジェネティック制御因子であることが示されている (93–95)。真核生物では、この DNA の修飾はシトシンに見られ、DNA メチル化酵素である DNMT がシトシンへのメチル基の転移を媒介することで、DNA の一次配列そのものを変えることなく転写活性を変化させる、いわゆるエピジェネティックな制御において重要な役割を果たす。DNA のメチル化に対してこれまでに世界的に研究がなされており、PubMed で”DNA”、”methylation”と検索すると、2023 年 11 月の段階において 10 万件に迫る文献がヒットする。また、タンパク質のメチル化については同様にエピジェネティックな制御機構の中心である histone が最も研究されており、3 万件以上の文献がヒットする。タンパク質のメチル化は栄養として摂取するメチオニン等の量によっても大きく変動することが知られているが、一方で、ヒストン以外のタンパク質のメチル化に関する知見は極めて少ない。

本研究では、未だ研究の進んでいない非ヒストンタンパク質のメチル化の役割を明らかにするため、PP2A に注目して研究を進めた。PubMed で”PP2A”、”methylation”と検索しても、400 件弱の文献がヒットするのみで、ヒストンと比べておよそ 80 分の 1 と明らかに少ない。第 2 章では、PP2A のメチル化が炎症性シグナルや EMT といった細胞内のシグナル伝達を大きく変化さ

せることを明らかにした。また、第3章では、PP2Aのメチル化によりMSCの脂肪分化能を促進することを示し、PP2Aのメチル化が細胞の表現型に与える影響について一部を明らかにした。第4章では、PP2Aの特異的脱メチル化酵素であるPME-1の2つの機能に着目し、マウスの発生に与える影響を解析することで、それぞれが重要な役割を持つことを明らかにした。本研究により、非DNAタンパク質のメチル化にも重要な役割があるということが明らかになった。今後のこの分野の発展の礎になるものだと考える。

5-2 PME-1 を標的とした分子標的薬の可能性

本研究ではまず、PME-1 KO MEFs を用いて PME-1 欠損が細胞内シグナルに与える影響を網羅的に解析した。その結果、PME-1 欠損による PP2A や PP4 のメチル化レベルの上昇は広範なシグナルを変化させることを明らかにした。具体的には、PME-1 は NF- κ B や STAT3 などの炎症性シグナル伝達を抑制していること、EMT（上皮間葉転換）を促進していることが示唆された。炎症反応の過程で生成された活性酸素は、DNA に傷害を与えて細胞のがん化を促進するが、炎症の初期にはこれに応答した免疫系細胞によってがん化した細胞は排除される。慢性的な炎症では、サイトカイン、増殖因子、血管新生因子、プロテアーゼなどの発現が亢進することで、がん細胞の増殖・浸潤・転移が活性化するとともに、PD-L1 などの発現が誘導されることで腫瘍免疫を回避し、がんの成長・悪性化につながる (96,97)。本研究で用いた MEFs は不死化細胞であり、がん化する前段階にあると言える。したがって、不死化した MEFs における PME-1 は、炎症反応を抑制することで免疫細胞による排除を回避するとともに、EMT を誘導する役割をもち、がん化を促進すると考えられる。

PME-1 を標的とした薬剤はこれまでに、構造的に関連のない 2 つの化合物、aza- β -lactum 系化合物 ABL127 と sulfonyl acrylonitrile 系化合物 AMZ30 が報告されている。いずれの阻害剤も PME-1 の活性部位に共有結合することで活性を阻害する (98,99)。ABL127 (50 nM) もしくは AMZ30 (25 μ M) の処置による PME-1 阻害は、培養細胞レベルでの子宮内膜癌細胞の増殖と遊走を抑制するが、免疫不全マウスへの腫瘍細胞移植モデルでは ABL127 (5 mg/kg) の腫瘍内投与

により腫瘍の成長は抑制されない (100)。一方、PME-1 発現を siRNA または shRNA により抑制すると、移植モデルでもがん細胞の成長が抑制される (100)。また、PME-1 発現抑制はキナーゼ阻害剤に対する感受性を高めるが、ABL127 処置にはこのような効果が無いことが報告されている (101)。これらの知見から、がんの悪性化においては特に PME-1 の PP2A 阻害タンパク質としての機能が重要であると考えられる。今後、PME-1 を標的とし、がん細胞自身をターゲットにした分子抗がん剤を開発するためには、PME-1 の PP2A 阻害タンパク質としての機能を阻害することに焦点を当てたアプローチが必要かもしれない。

5-3 PME-1 の機能調節機構

PME-1 の2つの機能、PP2Ac の脱メチル化酵素と PP2A 阻害タンパク質という機能が、それぞれ細胞内でどのような役割を果たしているかは明らかになっていない。第3章では PME-1 特異的脱メチル化酵素活性阻害剤 ABL127、AMZ30 を用いた検討を、第4章ではそれぞれの機能を欠損させた PME-1 変異体 KI マウスを用いた検討を実施し、脱メチル化酵素としての機能と PP2A 阻害タンパク質としての機能が細胞やマウス生体の表現型に与える影響を解析した。特に、脱メチル化酵素としての機能は細胞・生体レベルで非常に重要であることが示唆され、機能の欠損は重大な変化をもたらした。このことから、PP2A メチル化における LCMT-1 活性と PME-1 活性のバランスの変化は、PP2A の機能、ひいては細胞シグナルにダイナミックな影響を及ぼすと考えられる。しかし、PP2A のメチル化は、PP2A の酵素活性自体にほとんど影響を与えない (27)。我々の研究室では、PP2A のメチル化が少なくとも B55 α と PR72 との複合体形成に重要であることを報告している (32)。また近年、B56 ファミリーでも、B56 α と B56 ϵ との複合体形成には PP2A メチル化が重要であること、一方で、striatin ファミリーとの複合体構成には PP2A メチル化は影響を与えないことが示された (31)。このように、PP2A のメチル化は PP2A 複合体の構成を変化させることで基質特異性に影響を与え、細胞内のシグナル伝達を変化させているのではないかと考えられる。

以上より、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も

のである。

第6章 実験材料および実験方法

6-1 動物の飼育

動物の飼育ならびに使用にあたっては、山口大学の定める「国立大学法人山口大学における動物使用に関する規則」に基づいて適正な管理のもと行った。具体的には、12時間おきに明暗が自動切り替えされ、温度・湿度管理された飼育室において、マウスを環境エンリッチメントが配置されたケージで飼育し、週1回のケージ交換を行った。マウスの使用に際しては、使用数の削減や苦痛の軽減に留意し、実験を実施した。

6-2 トランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

4×10^5 個の MEFs を 6 ウェルプレートに播種し、24 時間培養した。RNeasy mini kit (QIAGEN) または TRIzol Reagents (Invitrogen) を用いて抽出した RNA を RNA-seq (Rhelixa, Tokyo, Japan) に用いた。poly(A) RNA とライブラリーの調製には Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) と NEBNext Ultra™II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) をそれぞれ使用した。cDNA サンプルのシーケンスには NovaSeq6000 (Illumina) を用い、サンプルあたり約 1000 万個の 150 bp ペアエンド配列リードを得た。得られたデータは、TrimGalore (v0.6.6) を用いてクリーニングとクオリティチェックを行い、HISAT2 (v2.2.1) を用いて参照ゲノム (hg38) にマッピングした。

平均カウントが 10 以上の遺伝子について、TCC-GUI (102) を用いて TMM 法

でサンプル間の正規化を行い、edgeR で DEGs の同定を行った。ヒートマップクラスタリング解析には python (v3.8.8) の seaborn (v0.11.1) clustermap を用いた。また、エンリッチメント解析は、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, v4.3.2) (103)、PANTHER pathway (104)および Reactome pathway (105)を用いて行った。第2章では MSigDB (v7.5.1) の mouse-ortholog hallmark (MH) と curated (M2) gene sets を、第4章では cell type signature gene sets (C8) を参照遺伝子セットとして選択した。

6-3 マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (mBM-MSC) の単離

4-8 週齢の C57BL/6JmsSlc マウスを麻酔下で、安楽死させた。左右の大腿骨および脛骨を取り出し、骨端を切り落とした後に乳棒と乳鉢を用いて骨組織を叩く様に粉々にした。HEPES buffered saline (HBS: 25 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4) を加え全量を回収した後、EasySep Neg Mouse Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Enrichment Kit (Veritas) を用いて、mBM-MSC を単離した。

6-4 細胞培養法

マウス胎児線維芽細胞 MEF は 1% antibiotic-antimycotic (AA、Thermo Scientific)、10% fetal bovine serum (FBS、SIGMA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、SIGMA) を培地として用い、37°C、5% CO₂ に保った

インキュベーター (MCO-5AC、SANYO) 内で培養した。また、mBM-MSCs は MesenCult medium (MesenCult Expansion Kit、Veritas) を培地として用い、37°C、5% O₂、5% CO₂ に保ったインキュベーター内で培養した。細胞の継代は、培地を除去して HBS で 1 回洗浄した後、trypsin/EDTA (0.05% trypsin、0.53 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有 HBS) を加えてピペッティングすることで細胞を剥がして行った。

6-5 BM-MSCs の分化誘導

BM-MSCs の脂肪細胞分化誘導には MesenCult Adipogenic Differentiation Kit (Veritas)、骨芽細胞分化誘導には MesenCult Osteogenic Stimulatory Kit (Veritas) を用いた。筋線維芽細胞分化には、BM-MSCs を 5 ng/mL の TGF- β (R&D systems) で 48 時間処理した。

6-6 培養細胞の染色法

BM-MSCs の脂肪細胞分化の解析には Oil red O 染色 (Wako) を用いた。骨芽細胞分化の解析には TRACP&ALP 二重染色キット (Takara Bio) を用いた。

6-7 フローサイトメトリー (FACS)

培地を除去した細胞を HBS で洗浄し、トリプシンにより剥がした後に再度

HBS で細胞を洗浄した。Fc 結合をブロックするために、遠心して回収した細胞を 2% FBS と 0.01% sodium azide を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で anti-mouse CD16/32 (eBioscience) で処理した。一次抗体またはアイソタイプコントロールは氷上で 30 分間処理した。使用した一次抗体は 6-16 使用抗体リストに記載した。蛍光強度は Accuri C6 フローサイトメーター (BD) で解析した。

6-8 Western blotting によるタンパク質発現量の解析

6-8-1 タンパク質抽出

培地を除去した細胞を HBS で洗浄し、lysate buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0、5 mM EDTA、5 mM EGTA、1 mM Na₃VO₄、20 mM sodium pyrophosphate、1% Triton X-100、1 tablet/50 ml Roche Complete protease inhibitor) を加えて細胞を可溶化した。得られた細胞溶解液を数分間静置した後に、4°C、15000 rpm で 15 分間遠心し、上清をタンパク質抽出液として使用した。

6-8-2 Western blotting

得られたサンプルのタンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて Lowry 法により測定した。タンパク質サンプル 10 – 40 µg を SDS ポリアクリルアミドゲル (8 – 12%) で泳動して分離した後に、転写装置 (Bio-Rad) を用いて PVDF 膜 (Bio-Rad) もしくはニトロセルロース膜 (wako) に転写した。PVDF 膜もしくはニトロセルロース膜を 0.5% もしくは 3% スキムミルク含有

TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、0.05% Tween 20) により室温で 30 – 60 分間ブロッキングした後に、一次抗体を 4°C で振とうしながら一晩反応させた。使用した一次抗体は 6-16 使用抗体リストに記載した。

洗浄後、二次抗体を室温で 1 時間反応させ、ECL Pro western blotting Detection Reagent (PerkinElmer) で発光させ Amersham ImageQuant800 (Cytiva) または LuminoGraph II EM (ATTO) で観察した。イメージスキャナーで取り込んだバンドは、ImageJ (National Institutes of Health) を用いて測定し数値化した。ローディングコントロールには VCP および actin 抗体を用いた。

6-8-3 Type 2A protein phosphatase のメチル化レベルの解析

PME-1 阻害剤 ABL127 (Sigma-Aldrich、1 μ M) を加えた lysate buffer で細胞を溶解し、細胞抽出液を 2 つのチューブに分けた。一方に 0.1 M の NaOH を加え、脱メチル化させた。Anti-demethylated PP2Ac 抗体、anti-demethylated PP4c 抗体、anti-demethylated PP6c 抗体を用いて western blotting を行った。PP2A、PP4 および PP6 のメチル化レベルは、NaOH 処理サンプルと未処理サンプルのバンド密度の比として計算した。

6-9 *Ppme1* 変異体 KI マウスの作製

T7 プロモーター、プロトスペーサー配列、および guideRNA (gRNA) を含む DNA 断片を overlapping PCR により作製した。PCR 産物は QIAQuick PCR

purification kit (Qiagen) を用いて精製し、MEGAscript T7 Transcription kit (Thermo Fisher) を用いて *in vitro* 転写の鋳型とした。gRNA は RNeasy mini kit (Qiagen) または RNA Clean & Concentrator-5 kit (ZYMO RESEARCH) を用いて精製し、Opti-MEM I (Thermo Fisher) に懸濁した。

4 週齢の C57BL/6NJcl 雌マウスに 7.5 IU の妊娠雄血清ゴナドトロピンを注射し、48 時間後に 7.5 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピンを注射した。体外受精を行い、エレクトロポレーション用の接合体を得た。接合体を 100 ng/μl の Cas9 タンパク質 (Thermo Fisher)、100 ng/μl の gRNA、および 50 ng/μl の ssODNs (Ultramer DNA oligos) を含む Opti-MEM I で満たした 5 mm 間隔の白金金属プレート (Nepa Gene) を備えたガラスチャンバー上に並べた。接合体のエレクトロポレーションは、NEPA21 エレクトロポレーター (Nepa Gene) を用いて行い、2 細胞期の胚を偽妊娠ヘテロ接合体 CD1 ノードマウスの卵管に移植した。

6-10 Genotyping による遺伝型の判定

胎児の尾部および 4 週齢のマウスの耳を採取し、EZNA Tissue DNA Kit (Omega) を用いて、DNA を抽出した。PCR 反応は、熱変性 (98°C、10 秒間)、アニーリング (62°C、30 秒間)、伸長 (68°C、60 秒間) を 30 サイクルで行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いて電気泳動した後、ethidium bromide で染色し、ゲル撮影装置 (DigiDog-It System、UVP) で可視化した。

使用プライマー配列

PME-1 M335D Forward: ACCTCCACATGTGCCAGGTGC

PME-1 M335D WT Reverse: TGCTGGATGACTTACCCTGCATC

PME-1 M335D KI Reverse: TGCTGGATGACTTACCCTGGTCC

PME-1 S156A Forward: AGACCAAGGGCCTCTCTTTC

PME-1 S156A WT Reverse: ATGCTGATTGGGCACAGC

PME-1 S156A KI Reverse: ATGCTGATTGGGCACGCT

6-11 血中グルコース値の測定

生後 18–24 時間齢のマウスを断頭により安楽死させ、切断面から血液を採取した。実験動物用グルコースメーターLab Gluco (Research & Innovation) を用いて、血中グルコース値を測定した。血中グルコース値を 20 mg/dl 以下、21 mg/dl 以上 40 mg/dl 以下、41 mg/dl 以上 60 mg/dl 以下、61 mg/dl 以上 80 mg/dl 以下、81 mg/dl 以上の 5 段階に分類し評価した。機器の測定範囲は 20 mg/dl 以上 600 mg/dl 以下。

6-12 グルコース取り込み能試験

生後 18–24 時間齢のマウスを断頭により安楽死させ、大腿部から筋組織を採取した。筋膜を取り除いた後に HBS で洗浄し、Glucose Uptake Assay Kit-Green (Dojindo) を用いて、筋組織にグルコースを取り込ませた。Lysate buffer で筋組織を可溶化し、タンパク質抽出液を用いて筋組織中に取り込まれたグルコー

ス量を蛍光強度として測定した。筋組織の総タンパク質量濃度を DC protein assay kit を用いて Lowry 法により測定し、蛍光強度の正規化を行った。

6-13 *o*-キシレン嗅覚試験

生後 18~24 時間齢のマウスを簡易ドラフト前に置き、*o*-キシレン (Wako) を染み込ませた綿棒をマウスの鼻部に近づけ、マウスの反応を撮影した。マウスの忌避反応は 0 から 3 の 4 段階で評価した。

6-14 免疫組織化学染色

マウスを麻酔下で頸椎脱臼し、子宮内から胎児を取り出した。胎児および出生後のマウスは失血死させた後、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。組織ブロックから厚さ 4 μm の切片を切り出した。その後キシレンおよびアルコールを用いて脱パラフィンおよび再水和を行った。Tris-EDTA 緩衝液 (pH9.0 または pH6.0) に浸した切片を圧力鍋で 20 分間の加熱処理、または 1%トリプシンで 37°C、30 分間処置することで抗原賦活化を行った。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、3%過酸化水素含有 PBS に浸漬して内因性ペルオキシダーゼを不活化した。切片を 5%スキムミルクと 1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS で 30 分間ブロッキングし、一次抗体を室温で 30 分間添加した。スライドを PBS で 2 回洗浄し、Histofine Simple Stain MAX-PO (ニチレイ) または ImmPRESS Goat IgG (Vector Laboratories Inc.) で処理した。陽性

シグナルはペルオキシダーゼ-ジアミノベンジジン反応で可視化し、核はヘマトキシリンで染色した。使用した一次抗体は 6-16 使用抗体リストに記載した。

6-15 統計処理

実験成績は、平均±標準偏差で示した。有意差検定は Student *t*-test もしくは Mann-Whitney *U* test を行い、危険率 (*P*) が 5%未満の場合を有意差ありとした。

6-16 使用抗体リスト

使用した抗体は表1、表2および表3にまとめた。

表1 フローサイトメトリー 使用抗体リスト

抗体	メーカー	カタログナンバー
CD45	eBioscience	11-0451-82
Ter119	eBioscience	11-5921-81
CD44	Biolegends	103005
Cd140a	eBioscience	17-1410-81
Sca-1	eBioscience	12-5981-81

表2 western blotting 使用抗体リスト

抗体	メーカー	カタログナンバー
deMet PP2Ac	Santa Cruz	sc-13601
deMet PP4c	Bethyl	A300-893A
deMet PP6c	Bethyl	A300-844A
NF- κ B	Santa Cruz	Sc-372
p-NF- κ B (S536)	Cell Signaling	3033
stat3 α	Cell Signaling	8768
p-stat3 α (Y705)	Cell Signaling	9145
E-cadherin	Cell Signaling	4065
N-cadherin	Cell Signaling	13116
α -smooth muscle actin	Dako	M0851
PME-1	Santa Cruz	sc-25278
p-Akt (S297)	Cell Signaling	4060
p-Akt (T308)	Cell Signaling	13038
Akt	Cell Signaling	2920

PP2Ac	Millipore	07-324
PPP2R2A	Cell Signaling	5689
PPP2R2C	proteintech	12747-1-AP
PPP2R5A	Bethyl	A300-976A-1
PPP2R3A	Novus	NBP1-87233PEP
PP2A A	Santa Cruz	Sc-6112
LCMT-1	Thermofisher	MA5-25597
ISLR	Novus	NBP2-14131
tuj1(β 3 tubulin)	Cell Signaling	5568
nestin	IBL	18741
VCP	Gene Tex	GTX113030

表 3 免疫組織化学染色 使用抗体リスト

抗体	メーカー	カタログナンバー
nestin	IBL	18741
calbindin	Santa Cruz	sc-7692
cleaved-caspase 3	Cell Signaling	9664

引用文献

1. Moorhead GBG, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemée A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):234–44.
2. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 2006 Nov;127(3):635–48.
3. Brautigan DL. Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J.* 2013 Jan;280(2):324–45.
4. Slupe AM, Merrill RA, Strack S. Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Res.* 2011;2011:398751.
5. Zhang Q, Claret FX. Phosphatases: the new brakes for cancer development? *Enzyme Res.* 2012;2012:659649.
6. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 2001 Feb;353(Pt 3):417–39.
7. Sents W, Ivanova E, Lambrecht C, Haesen D, Janssens V. The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J.* 2013 Jan;280(2):644–61.
8. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 2005 Oct;22(8):1942–50.

9. Chen W, Possemato R, Campbell KT, Plattner CA, Pallas DC, Hahn WC. Identification of specific PP2A complexes involved in human cell transformation. *Cancer Cell*. 2004 Feb;5(2):127–36.
10. O'Connor CM, Perl A, Leonard D, Sangodkar J, Narla G. Therapeutic targeting of PP2A. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018 Mar;96:182–93.
11. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 2008 Apr;14(4):152–60.
12. Eichhorn PJA, Creighton MP, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jan;1795(1):1–15.
13. Haanen TJ, O'Connor CM, Narla G. Biased holoenzyme assembly of protein phosphatase 2A (PP2A): From cancer to small molecules. *J Biol Chem*. 2022 Dec;298(12):102656.
14. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):211–8.
15. Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem*. 1999 Jul;274(29):20296–300.
16. Nasa I, Kettenbach AN. Effects of carboxyl-terminal methylation on holoenzyme function of the PP2A subfamily. *Biochem Soc Trans*. 2020 Oct 30;48(5):2015–27.
17. Park J, Lee DH. Functional roles of protein phosphatase 4 in multiple aspects of cellular physiology: a friend and a foe. *BMB Rep*. 2020 Apr 30;53(4):181–90.

18. Ohama T. The multiple functions of protein phosphatase 6. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019 Jan;1866(1):74–82.
19. Twells RC, Metzker ML, Brown SD, Cox R, Garey C, Hammond H, et al. The sequence and gene characterization of a 400-kb candidate region for IDDM4 on chromosome 11q13. *Genomics.* 2001 Mar;72(3):231–42.
20. Guergnon J, Derewenda U, Edelson JR, Brautigan DL. Mapping of protein phosphatase-6 association with its SAPS domain regulatory subunit using a model of helical repeats. *BMC Biochem.* 2009 Oct;10:24.
21. Fujiwara N, Shibutani S, Sakai Y, Watanabe T, Kitabayashi I, Oshima H, et al. Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6. *Cancer Sci.* 2020 Dec;111(12):4371–80.
22. Vincent A, Berthel E, Dacheux E, Magnard C, Venezia NLD. BRCA1 affects protein phosphatase 6 signalling through its interaction with ANKRD28. *Biochem J.* 2016 Apr;473(7):949–60.
23. Wu N, Liu X, Xu X, Fan X, Liu M, Li X, et al. MicroRNA-373, a new regulator of protein phosphatase 6, functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *FEBS J.* 2011 Jun;278(12):2044–54.
24. Chen J, Martin BL, Brautigan DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science.* 1992 Aug;257(5074):1261–4.
25. Lee J, Chen Y, Tolstykh T, Stock J. A specific protein carboxyl methyltransferase that demethylates phosphoprotein phosphatase 2A in bovine brain. *Proc*

Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 11;93(12):6043–7.

26. Schmitz MHA, Held M, Janssens V, Hutchins JRA, Hudecz O, Ivanova E, et al. Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat Cell Biol.* 2010 Sep;12(9):886–93.

27. De Baere I, Derua R, Janssens V, Van Hoof C, Waelkens E, Merlevede W, et al. Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry.* 1999 Dec;38(50):16539–47.

28. Ogris E, Du X, Nelson KC, Mak EK, Yu XX, Lane WS, et al. A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1999 May;274(20):14382–91.

29. Tolstykh T, Lee J, Vafai S, Stock JB. Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *EMBO J.* 2000 Nov;19(21):5682–91.

30. Wei H, Ashby DG, Moreno CS, Ogris E, Yeong FM, Corbett AH, et al. Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits Cdc55p and Rts1p. *J Biol Chem.* 2001 Jan;276(2):1570–7.

31. Lyons SP, Greiner EC, Cressey LE, Adamo ME, Kettenbach AN. Regulation of PP2A, PP4, and PP6 holoenzyme assembly by carboxyl-terminal methylation. *Sci Rep.* 2021 Nov;11(1):23031.

32. Yabe R, Tsuji S, Mochida S, Ikehara T, Usui T, Ohama T, et al. A stable association with PME-1 may be dispensable for PP2A demethylation - implications for the detection of PP2A methylation and immunoprecipitation. *FEBS Open Bio*. 2018 Sep;8(9):1486–96.
33. Yu XX, Du X, Moreno CS, Green RE, Ogris E, Feng Q, et al. Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of Balph regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen. *Mol Biol Cell*. 2001 Jan;12(1):185–99.
34. Hwang J, Lee JA, Pallas DC. Leucine Carboxyl Methyltransferase 1 (LCMT-1) Methylates Protein Phosphatase 4 (PP4) and Protein Phosphatase 6 (PP6) and Differentially Regulates the Stable Formation of Different PP4 Holoenzymes. *J Biol Chem*. 2016 Sep 30;291(40):21008–19.
35. Puustinen P, Junttila MR, Vanhatupa S, Sablina AA, Hector ME, Teittinen K, et al. PME-1 protects extracellular signal-regulated kinase pathway activity from protein phosphatase 2A-mediated inactivation in human malignant glioma. *Cancer Res*. 2009 Apr;69(7):2870–7.
36. Wandzioch E, Pusey M, Werda A, Bail S, Bhaskar A, Nestor M, et al. PME-1 modulates protein phosphatase 2A activity to promote the malignant phenotype of endometrial cancer cells. *Cancer Res*. 2014 Aug;74(16):4295–305.
37. Aakula A, Isomursu A, Rupp C, Erickson A, Gupta N, Kauko O, et al. PP2A methylesterase PME-1 suppresses anoikis and is associated with therapy relapse of PTEN-deficient prostate cancers. *Mol Oncol*. 2023 Jun;17(6):1007–23.

38. Du B, Liao H, Zhang S. Expression Pattern and Prognostic Utility of PME-1 in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2020;12:2937–45.
39. Gnanaprakash M, Staniszewski A, Zhang H, Pitstick R, Kavanaugh MP, Arancio O, et al. Leucine Carboxyl Methyltransferase 1 Overexpression Protects Against Cognitive and Electrophysiological Impairments in Tg2576 APP Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis JAD.* 2021;79(4):1813–29.
40. Park HJ, Lee KW, Oh S, Yan R, Zhang J, Beach TG, et al. Protein Phosphatase 2A and Its Methylation Modulating Enzymes LCMT-1 and PME-1 Are Dysregulated in Tauopathies of Progressive Supranuclear Palsy and Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018 Feb 1;77(2):139–48.
41. Theendakara V, Bredesen DE, Rao RV. Downregulation of protein phosphatase 2A by apolipoprotein E: Implications for Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci.* 2017 Sep;83:83–91.
42. Longin S, Jordens J, Martens E, Stevens I, Janssens V, Rondelez E, et al. An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Biochem J.* 2004 May;380(Pt 1):111–9.
43. Xing Y, Li Z, Chen Y, Stock JB, Jeffrey PD, Shi Y. Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A. *Cell.* 2008 Apr;133(1):154–63.
44. Kaur A, Westermarck J. Regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) tumor suppressor function by PME-1. *Biochem Soc Trans.* 2016 Dec;44(6):1683–93.

45. Kuo YC, Huang KY, Yang CH, Yang YS, Lee WY, Chiang CW. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem*. 2008 Jan;283(4):1882–92.
46. Rocher G, Letourneux C, Lenormand P, Porteu F. Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene IEX-1 leads to control of Akt activity. *J Biol Chem*. 2007 Feb;282(8):5468–77.
47. Yabe R, Miura A, Usui T, Mudrak I, Ogris E, Ohama T, et al. Protein Phosphatase Methyl-Esterase PME-1 Protects Protein Phosphatase 2A from Ubiquitin/Proteasome Degradation. *PloS One*. 2015;10(12):e0145226.
48. Stanevich V, Jiang L, Satyshur KA, Li Y, Jeffrey PD, Li Z, et al. The structural basis for tight control of PP2A methylation and function by LCMT-1. *Mol Cell*. 2011 Feb;41(3):331–42.
49. Zhang T, Park KA, Li Y, Byun HS, Jeon J, Lee Y, et al. PHF20 regulates NF- κ B signalling by disrupting recruitment of PP2A to p65. *Nat Commun*. 2013;4:2062.
50. Raja R, Wu C, Bassoy EY, Rubino TE, Utagawa EC, Magtibay PM, et al. PP4 inhibition sensitizes ovarian cancer to NK cell-mediated cytotoxicity via STAT1 activation and inflammatory signaling. *J Immunother Cancer*. 2022 Dec;10(12):e005026.
51. Kavousi N, Tonge DP, Mourtada-Maarabouni M. New insights into the functional role of protein phosphatase 4 regulatory subunit PP4R3A/SMEK1 in the regulation of leukemic cell fate. *Int J Biol Macromol*. 2023 Apr;233:123467.

52. Breuer R, Becker MS, Brechmann M, Mock T, Arnold R, Krammer PH. The protein phosphatase 2A regulatory subunit B56 γ mediates suppression of T cell receptor (TCR)-induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity. *J Biol Chem*. 2014 May;289(21):14996–5004.
53. Kawashima I, Kirito K. Metformin inhibits JAK2V617F activity in MPN cells by activating AMPK and PP2A complexes containing the B56 α subunit. *Exp Hematol*. 2016 Dec;44(12):1156-1165.e4.
54. Togi S, Kamitani S, Kawakami S, Ikeda O, Muromoto R, Nanbo A, et al. HDAC3 influences phosphorylation of STAT3 at serine 727 by interacting with PP2A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb;379(2):616–20.
55. Mandal T, Bhowmik A, Chatterjee A, Chatterjee U, Chatterjee S, Ghosh MK. Reduced phosphorylation of Stat3 at Ser-727 mediated by casein kinase 2 - protein phosphatase 2A enhances Stat3 Tyr-705 induced tumorigenic potential of glioma cells. *Cell Signal*. 2014 Aug;26(8):1725–34.
56. Woetmann A, Nielsen M, Christensen ST, Brockdorff J, Kaltoft K, Engel AM, et al. Inhibition of protein phosphatase 2A induces serine/threonine phosphorylation, subcellular redistribution, and functional inhibition of STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep;96(19):10620–5.
57. Liu CC, Lin SP, Hsu HS, Yang SH, Lin CH, Yang MH, et al. Suspension survival mediated by PP2A-STAT3-Col XVII determines tumour initiation and metastasis in cancer stem cells. *Nat Commun*. 2016 Jun;7:11798.
58. M L, P PV, T K, M P, E S, J P, et al. Essential role of HDAC6 in the

regulation of PD-L1 in melanoma. *Mol Oncol*. 2016 May;10(5):735–50.

59. Heikkinen PT, Nummela M, Leivonen SK, Westermarck J, Hill CS, Kähäri VM, et al. Hypoxia-activated Smad3-specific dephosphorylation by PP2A. *J Biol Chem*. 2010 Feb;285(6):3740–9.

60. Li Y, Balakrishnan VK, Rowse M, Wu CG, Bravos AP, Yadav VK, et al. Coupling to short linear motifs creates versatile PME-1 activities in PP2A holoenzyme demethylation and inhibition. *eLife*. 2022 Aug;11:e79736.

61. Yoshida K, Teramachi J, Uchibe K, Ikegame M, Qiu L, Yang D, et al. Reduction of protein phosphatase 2A C α promotes in vivo bone formation and adipocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Jul;470:251–8.

62. Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1988 Jul;263(19):9402–8.

63. Serguienko A, Hanes R, Grad I, Wang MY, Myklebost O, Munthe E. PP2A Regulatory Subunit B55 γ is a Gatekeeper of Osteoblast Maturation and Lineage Maintenance. *Stem Cells Dev*. 2017 01;26(19):1375–83.

64. Battula VL, Le PM, Sun JC, Nguyen K, Yuan B, Zhou X, et al. AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth. *JCI Insight*. 2017 Jul;2(13):e90036, 90036.

65. Kornblau SM, Ruvolo PP, Wang RY, Battula VL, Shpall EJ, Ruvolo VR, et al. Distinct protein signatures of acute myeloid leukemia bone marrow-derived stromal cells are prognostic for patient survival. *Haematologica*. 2018 May;103(5):810–21.

66. Okamura H, Yang D, Yoshida K, Teramachi J, Haneji T. Reduction of PP2A $C\alpha$ stimulates adipogenesis by regulating the Wnt/GSK-3 β / β -catenin pathway and PPAR γ expression. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1843(11):2376–84.
67. Zhang Y, Zhang J, Wang E, Qian W, Fan Y, Feng Y, et al. Microcystin-Leucine-Arginine Induces Tau Pathology Through $B\alpha$ Degradation via Protein Phosphatase 2A Demethylation and Associated Glycogen Synthase Kinase-3 β Phosphorylation. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2018 Apr;162(2):475–87.
68. Wang Y, Yang R, Gu J, Yin X, Jin N, Xie S, et al. Cross talk between PI3K-AKT-GSK-3 β and PP2A pathways determines tau hyperphosphorylation. *Neurobiol Aging*. 2015 Jan;36(1):188–200.
69. Li Y, Jin D, Xie W, Wen L, Chen W, Xu J, et al. PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018 Feb;13(3):185–92.
70. Patturajan M, Nomoto S, Sommer M, Fomenkov A, Hibi K, Zangen R, et al. DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling. *Cancer Cell*. 2002 May;1(4):369–79.
71. Creighton MP, Roël G, Eichhorn PJA, Vredeveld LC, Destrée O, Bernards R. PR130 is a modulator of the Wnt-signaling cascade that counters repression of the antagonist Naked cuticle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr;103(14):5397–402.
72. Desai VD, Hsia HC, Schwarzbauer JE. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *PloS One*. 2014;9(1):e86865.

73. Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, et al. Identification of Meflin as a Potential Marker for Mesenchymal Stromal Cells. *Sci Rep*. 2016 Feb;6:22288.
74. Hara A, Kobayashi H, Asai N, Saito S, Higuchi T, Kato K, et al. Roles of the Mesenchymal Stromal/Stem Cell Marker Meflin in Cardiac Tissue Repair and the Development of Diastolic Dysfunction. *Circ Res*. 2019 Aug;125(4):414–30.
75. Hara A, Kato K, Ishihara T, Kobayashi H, Asai N, Mii S, et al. Meflin defines mesenchymal stem cells and/or their early progenitors with multilineage differentiation capacity. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 2021 Jul;26(7):495–512.
76. Xu R, Wu M, Wang Y, Li C, Zeng L, Wang Y, et al. Mesenchymal stem cells reversibly de-differentiate myofibroblasts to fibroblast-like cells by inhibiting the TGF- β -SMAD2/3 pathway. *Mol Med Camb Mass*. 2023 Apr;29(1):59.
77. Hongo T, Hakuba A, Shiota K, Naruse I. Suckling dysfunction caused by defects in the olfactory system in genetic arhinencephaly mice. *Biol Neonate*. 2000 Nov;78(4):293–9.
78. Wong ST, Trinh K, Hacker B, Chan GC, Lowe G, Gaggar A, et al. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron*. 2000 Sep;27(3):487–97.
79. Brunet LJ, Gold GH, Ngai J. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron*. 1996 Oct;17(4):681–93.
80. Fujimoto S, Leiwe MN, Aihara S, Sakaguchi R, Muroyama Y, Kobayakawa

R, et al. Activity-dependent local protection and lateral inhibition control synaptic competition in developing mitral cells in mice. *Dev Cell*. 2023 Jul;58(14):1221-1236.e7.

81. Farrell KF, Krishnamachari S, Villanueva E, Lou H, Alerte TNM, Peet E, et al. Non-motor parkinsonian pathology in aging A53T α -synuclein mice is associated with progressive synucleinopathy and altered enzymatic function. *J Neurochem*. 2014 Feb;128(4):536–46.

82. Consalez GG, Goldowitz D, Casoni F, Hawkes R. Origins, Development, and Compartmentation of the Granule Cells of the Cerebellum. *Front Neural Circuits*. 2020;14:611841.

83. Hashimoto M, Hibi M. Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ*. 2012 Apr;54(3):373–89.

84. Leto K, Arancillo M, Becker EBE, Buffo A, Chiang C, Ding B, et al. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum Lond Engl*. 2016;15(6):789–828.

85. Rahimi-Balaei M, Bergen H, Kong J, Marzban H. Neuronal Migration During Development of the Cerebellum. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:484.

86. Huang C, Liu T, Wang Q, Hou W, Zhou C, Song Z, et al. Loss of PP2A Disrupts the Retention of Radial Glial Progenitors in the Telencephalic Niche to Impair the Generation for Late-Born Neurons During Cortical Development†. *Cereb Cortex N Y N 1991*. 2020 Jun 1;30(7):4183–96.

87. D'Avino PP, Savoian MS, Glover DM. Mutations in sticky lead to defective

organization of the contractile ring during cytokinesis and are enhanced by Rho and suppressed by Rac. *J Cell Biol.* 2004 Jul;166(1):61–71.

88. Naim V, Imarisio S, Di Cunto F, Gatti M, Bonaccorsi S. *Drosophila* citron kinase is required for the final steps of cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 2004 Nov;15(11):5053–63.

89. Bianchi FT, Tocco C, Pallavicini G, Liu Y, Vernì F, Merigliano C, et al. Citron Kinase Deficiency Leads to Chromosomal Instability and TP53-Sensitive Microcephaly. *Cell Rep.* 2017 Feb 14;18(7):1674–86.

90. Gai M, Camera P, Dema A, Bianchi F, Berto G, Scarpa E, et al. Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin. *Mol Biol Cell.* 2011 Oct;22(20):3768–78.

91. Di Cunto F, Imarisio S, Hirsch E, Broccoli V, Bulfone A, Migheli A, et al. Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron.* 2000 Oct;28(1):115–27.

92. Ortega-Gutiérrez S, Leung D, Ficarro S, Peters EC, Cravatt BF. Targeted Disruption of the PME-1 Gene Causes Loss of Demethylated PP2A and Perinatal Lethality in Mice. *PLOS ONE.* 2008 Jul 2;3(7):e2486.

93. Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet TIG.* 2022 Jul;38(7):676–707.

94. Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci.* 2015;11(5):604–17.

95. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2013 Jan;38(1):23–

38.

96. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*. 2006 Nov;72(11):1605–21.

97. Galdiero MR, Marone G, Mantovani A. Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Aug;10(8):a028662.

98. Bachovchin DA, Mohr JT, Speers AE, Wang C, Berlin JM, Spicer TP, et al. Academic cross-fertilization by public screening yields a remarkable class of protein phosphatase methylesterase-1 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Apr 26;108(17):6811–6.

99. Bachovchin DA, Zuhl AM, Speers AE, Wolfe MR, Weerapana E, Brown SJ, et al. Discovery and optimization of sulfonyl acrylonitriles as selective, covalent inhibitors of protein phosphatase methylesterase-1. *J Med Chem*. 2011 Jul;54(14):5229–36.

100. Pusey M, Bail S, Xu Y, Buiakova O, Nestor M, Yang JJ, et al. Inhibition of protein methylesterase 1 decreased cancerous phenotypes in endometrial adenocarcinoma cell lines and xenograft tumor models. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2016 Sep;37(9):11835–42.

101. Kaur A, Denisova OV, Qiao X, Jumppanen M, Peuhu E, Ahmed SU, et al. PP2A Inhibitor PME-1 Drives Kinase Inhibitor Resistance in Glioma Cells. *Cancer Res*. 2016 01;76(23):7001–11.

102. Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K. TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics*. 2013

Jul;14:219.

103. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct;102(43):15545–50.

104. Mi H, Thomas P. PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2009;563:123–40.

105. Gillespie M, Jassal B, Stephan R, Milacic M, Rothfels K, Senff-Ribeiro A, et al. The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan;50(D1):D687–92.

謝辞

本研究および論文の作成をすすめるにあたり、懇切な御指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学研究室 大浜剛准教授、佐藤晃一教授、獣医病理学研究室 森本将弘教授、獣医発生学研究室 加納聖教授、鹿児島大学獣医生理学研究室 白石光也教授に心より厚く感謝の意を表します。

岡山理科大学獣医毒性学講座 早川晃司准教授、獣医創薬学講座 藤原信行講師には SDIA 法による ES 細胞の神経分化誘導を行っていただきました。山口大学獣医病理学研究室 櫻井優准教授、国立感染症研究所感染病理部 坂井祐介主任研究官には、マウス組織切片の免疫組織化学染色について御指導および御助言をしていただきました。心より厚く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、懇切な御指導および御助言を頂いた山口大学獣医薬理学教室の皆様、また私を暖かく見守ってくれた父・池田静昌、母・池田桃子、妹・池田惇名に心より感謝の意を表します。