

学位論文要旨

氏名 北村 菜央

題目：細胞外刺激に対するキナーゼとホスファターゼの生理学的応答メカニズムの解明

論文要旨：

本研究は、生命維持において重要なキナーゼとホスファターゼの関係に着目し、その詳細な生理学的機能を明らかにすることで、がんをはじめとした生活習慣病や神経変性疾患といった様々な病態理解の基盤となり、新たな創薬戦略の創出に寄与することを目的とした。

1. 神経突起形成における PP6 の役割

神経細胞は、神経突起を介して膨大な神経細胞が連絡し合うことで複雑な神経回路ネットワークを形成し、運動、記憶、学習等の高度な機能を可能にしている。しかし、脳卒中や外傷などの急性損傷後の中枢神経系の再生能力は限られており、修復過程の停止によって神経細胞間のネットワークが破綻することで、麻痺などの機能不全が引き起こされる。そのため、神経突起形成などの再生メカニズムを解明することは神経損傷治療のアプローチにおいて極めて重要である。近年、神経細胞機能における type 2A protein phosphatase である PP2A、PP4、PP6 の重要性が注目されつつあるが、神経突起形成における役割はほとんど明らかにされていない。本章では、type 2A protein phosphatase に着目し、神経突起形成における役割とその分子機構を明らかにすることを目的とした。マウス神経芽腫細胞株 Neuro 2A (N2a) はレチノイン酸で刺激することで分化し、神経突起を形成する神経分化モデルとして広く用いられている。本研究ではこのモデルにおいて、type 2A protein phosphatase のうち PP6 のタンパク質レベルのみが上昇することを示した。さらに PP6 発現を抑制すると、mTORC2/Akt/CREB シグナルが抑制され、神経突起形成と伸長が有意に阻害された。mTORC2 の主要な構成要素である SIN1 は脱リン酸化状態において Akt に対する mTORC2 活性を高める。PP6 発現抑制によって、SIN1 のリン酸化レベルの顕著な増加が確認された。以上のことから、PP6 が SIN1 を脱リン酸化し、mTORC2/Akt/CREB シグナルを活性化することで、神経突起伸長を制御している可能性が示された。

2. TGF- β シグナルにおける PP6 の役割

Transforming growth factor β (TGF- β) は細胞遊走、分化、増殖などの細胞プロセスを制御する多面的なサイトカインである。TGF- β は Smad3 を介した経路のほかに、複数の細胞内シグナルを制御しており、その詳細なメカニズムの解明は極めて重要である。これまでに TGF- β シグナル伝達における PP2A の複雑な制御機能が示唆されているが、PP6 の TGF- β シグナルにおける役割は全く明らかにされていない。そこで本章では、PP6 の TGF- β シグナル制御機構を解明することを目的とした。マウス胎児線維芽細胞 MEF において、TGF- β 刺激により転写および翻訳後制御を介して PP6 タンパク質発現量が増加することを示した。PP6 遺伝子を欠損させると、

TGF- β 誘導による Smad3 のリン酸化とその転写活性が抑制され、p38 MAPK シグナルの阻害も認められた。さらに、PP6 の欠損は TGF- β によって誘導される細胞遊走を有意に抑制した。以上の結果より、PP6 が TGF- β シグナル伝達のポジティブレギュレーターとしての役割を担っていることを明らかにした。TGF- β は、正常組織や早期がんでは分化を誘導することから腫瘍抑制因子として働く。本研究の結果から、PP6 による TGF- β シグナルの増強が、がんの発生初期における PP6 の抗腫瘍作用の一因になっている可能性が示された。

3. NanoBiT システムを用いた PDK1-Akt タンパク質相互作用メカニズムの解明

PI3K/Akt シグナルは、細胞外シグナルにตอบสนองして細胞の成長、増殖、生存を広く制御している。がん、糖尿病、自己免疫疾患、神経疾患などさまざまな疾患でこの経路の異常が起こることから、その制御機構を理解することは極めて重要である。細胞外刺激にตอบสนองして PI3K が活性化すると、細胞膜上に PIP₃ が産生される。PDK1 と Akt は PIP₃ との結合を通じて接近し、キナーゼである PDK1 が Akt と結合し Akt をリン酸化することで Akt の活性化につながる。しかし、PDK1/Akt タンパク質相互作用がどのように制御されているのか、基質である Akt のリン酸化がこの相互作用にどのような影響を与えているのか等、これらの時空間なメカニズムは完全に明らかにされていない。そこで本章では、生細胞における PDK1/Akt のタンパク質相互作用メカニズムを解明することを目的とした。NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) システムを用いて、ヒト乳がん細胞株 MCF7 において PDK1/Akt 結合を生細胞内でリアルタイムにモニターできる細胞を作製した。EGF 刺激下で発光強度のダイナミックな変化が観察され、その結合は Akt リン酸化レベルの上昇タイミングよりも早く生じた。この細胞を、Akt 阻害剤 afuresertib (AFU) で処置すると Akt の過剰なリン酸化が観察されたが、結合量は EGF に反応してコントロールと同程度増加した。さらに様々な阻害剤を用いて検討を行うと、PDK1 と Akt の結合は Akt のリン酸化状態ではなく PIP₃ の形成に強く依存していることが明らかとなった。また、Akt のリン酸化および脱リン酸化は、PDK1 との結合・解離によってのみ制御されているのではなく、様々な因子が複雑に関わり合っており、さらなる研究が必要であることが示された。

4. 総括

本研究は、様々な細胞外刺激に応じたキナーゼとホスファターゼの新たな生理機能を提示し、がんや神経変性疾患等の病態メカニズムへと応用できる可能性を示した。これはキナーゼとホスファターゼを標的とした新たな創薬開発の実現に貢献するものであると考える。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	北村 菜央
審査委員	主査：山口大学 教授 佐藤 晃一
	副査：山口大学 教授 度会 雅久
	副査：山口大学 教授 水野 拓也
	副査：鹿児島大学 准教授 宇野 泰広
	副査：山口大学 准教授 大瀨 剛
題目	細胞外刺激に対するキナーゼとホスファターゼの生理学的応答メカニズムの解明
<p>審査結果の要旨：</p> <p>タンパク質リン酸化酵素キナーゼとタンパク質脱リン酸化酵素ホスファターゼの関係性は、生命の維持において重要である。北村菜央氏は、その生理学的機能を明らかにすることにより、神経変性疾患やがん等の様々な病態理解の基盤を構築し、新たな創薬戦略の創出に寄与することを目的として本研究を行った。</p> <p>第2章では、type 2A protein phosphatase に属する PP6 に着目し、神経突起形成における役割と分子機構の解明を目的として研究を行った。神経細胞は複雑な神経回路ネットワークを形成し、運動、記憶、学習等の高度機能を可能にしている。一方、脳卒中などの急性損傷後の中枢神経系の再生能力は限られていることから、修復過程の停止によって麻痺などの機能不全が引き起こされる。そのため、神経突起形成などの再生メカニズムを解明することは神経損傷治療のアプローチにおいて重要である。一方、神経細胞機能における PP6 の重要性が注目されているが、神経突起形成における役割は明らかにされていない。本研究から、マウス神経芽腫細胞株 Neuro 2A (N2a) において、レチノイン酸刺激による神経突起形成時に PP6 のタンパク質発現量が上昇することを明らかとした。PP6 発現を抑制すると、mTORC2/Akt/CREB シグナルが抑制され、神経突起形成および伸長が阻害された。また PP6 発現抑制によって、mTORC2 の主要な構成要素である SIN1 リン酸化レベルの顕著な増加が確認された。以上のことから、PP6 が SIN1 を脱リン酸化し、mTORC2/Akt/CREB シグナルを活性化することで、神経突起形成を制御している可能性が示唆された。</p> <p>第3章では、PP6 の transforming growth factor β (TGF-β) シグナル制御機構を解明することを目的として研究を行った。TGF-β は細胞遊走、分化、増殖などを制御するサイトカインであり、その詳細なメカニズムの解明は極めて重要であるが、TGF-β シグナル伝達における</p>	

PP6 の役割は明らかにされていない。マウス胎児線維芽細胞 MEF において、TGF- β 刺激により転写と翻訳後制御を介して PP6 タンパク質発現量が増加した。PP6 遺伝子を欠損させると、TGF- β 誘導による Smad3 のリン酸化と転写活性が抑制され、p38 MAPK シグナルの阻害が認められた。さらに、PP6 欠損は TGF- β による細胞遊走を抑制した。以上の結果より、PP6 が TGF- β シグナル伝達のポジティブレギュレーターとしての役割を担っていることを明らかにした。TGF- β は腫瘍抑制因子としても働くことから、PP6 による TGF- β シグナルの増強が、がんの発生初期における PP6 の抗腫瘍作用の一因になっている可能性を示している。

第 4 章では、NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) 法を用いた PDK1-Akt タンパク質相互作用メカニズムの解明を目的として研究を行った。PI3K/Akt シグナルは細胞の成長や増殖を制御しており、その制御機構を理解することは極めて重要である。PI3K が活性化すると、細胞膜上に PIP₃ が産生される。PDK1 と Akt は PIP₃ との結合を介して接近し、PDK1 が Akt と結合し Akt をリン酸化することで Akt を活性化する。しかし、これらの時空間的なメカニズムは明らかにされていない。本研究では、初めに NanoBiT 法を用いて、PDK1/Akt 結合を生細胞内でリアルタイムにモニターできるシステムを構築した。このシステムにより、EGF 刺激下での PDK1/Akt 結合が Akt リン酸化レベルの上昇タイミングよりも早く生じる事を明らかとした。Akt 阻害剤で処置すると Akt の過剰なリン酸化が観察されたが、結合量は EGF にコントロールと同程度増加した。さらに様々な阻害剤を用いた検討から、PDK1 と Akt の結合は Akt のリン酸化状態ではなく PIP₃ の形成に強く依存していることが明らかとなった。また、Akt のリン酸化および脱リン酸化は、PDK1 との結合・解離によってのみ制御されているのではなく、様々な因子が複雑に関わり合っており、さらなる研究が必要であることが示された。

本研究では、キナーゼとホスファターゼの関係における新たな生理機能を提示し、これらの関係性が神経変性疾患やがん等との関わりを持つ可能性を示した。これはホスファターゼを標的とした創薬開発の実現に貢献するものである。

以上より、本論文は博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があると認められる。