

学位論文要旨

氏名 花木駿介

題目：細胞増殖に対する脱リン酸化酵素の役割とその意義

論文要旨：

タンパク質のリン酸化は、細胞内のシグナル伝達機構を制御するために不可欠な機構であり、細胞増殖、分化、代謝制御など多様な生命現象に必須である。タンパク質のリン酸化はリン酸化酵素および脱リン酸化酵素により制御されており、がん化をはじめとした様々な疾患に関与している。脱リン酸化酵素の一つである protein phosphatase 1 γ (PP1 γ) は 200 種類以上知られている PP1 相互作用タンパク質 (PIPs) と結合することにより標的を変化させ、多種多様なシグナル伝達経路を制御する。PP1 γ はヒストンを脱リン酸化し細胞増殖因子の転写制御に重要であることが知られており、ヒストンの脱リン酸化に関与する PIPs の同定はヒストン修飾を介した転写制御の分子基盤の解明につながると考えられる。さらに、脱リン酸化酵素カルシニューリンは主要な標的の一つである nuclear factor of activated T-cells (NFAT) を介して、多くのがんにおける悪性化に関わっている。カルシニューリンによる NFAT の活性化は、核内移行の促進によって説明されるが、タンパク質安定化や相互作用分子の変化に対する影響は不明である。そこで、本研究では、PP1 γ およびカルシニューリンに着目して、転写制御および NFAT タンパク質の安定化を制御する分子機構の解明を行った。

E2F1 プロモーター領域における H3-pThr¹¹ に関与する PP1 γ の制御サブユニットを介した制御機構の解明

【背景・目的】 転写因子 E2F1 は細胞増殖、分化、アポトーシスに重要な役割を果たしている。DNA 損傷は、細胞増殖に関与する E2F1 標的遺伝子のプロモーターにおけるヒストン H3-pThr¹¹ のリン酸化 (H3-pThr¹¹) の低下を誘導し、転写を抑制することが知られている。H3-pThr¹¹ の脱リン酸化は、Chk1 によるリン酸化と PP1 γ による脱リン酸化によって制御されている。PP1 γ は PIPs と結合することで活性を制御しているが、H3-pThr¹¹ の脱リン酸化に関与する PIPs は不明であった。本研究では、PIPs に対し Gene Ontology (GO) term に着目したスクリーニングを実施し、ヒストン H3-pThr¹¹ の脱リン酸化に関与する PIPs を同定し、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

【結果・考察】 PIPs に付加される GO term を参照し PP1 γ を介した H3-pThr¹¹ の脱リン酸化に関わる PIPs として nuclear inhibitor of protein phosphatase 1 (NIPP1) を同定し、NIPP1 が *in vivo* および *in vitro* の両方で PP1 γ を介した H3-pThr¹¹ の脱リン酸化を阻害することを明らかにした。NIPP1 欠失細胞を作製し、NIPP1 が細胞増殖と E2F1 標的遺伝子の発現に必要であることを示した。DNA 損傷後、活性化された PKA は、PP1 結合モチーフに隣接する NIPP1-Ser¹⁹⁹ をリン酸化し、PP1 γ から NIPP1 を解離させ、PP1 γ の活性化を引き起こすこと

を明らかにした。この結果と一致して PKA 活性を阻害すると E2F1 標的遺伝子の転写は活性化された。以上のことから、PP1 γ の PIPs である NIPP1 は、DNA 損傷時に PKA によりリン酸化され、PP1 γ と解離することで、E2F1 標的遺伝子の発現を調節していることが明らかになった。

カルシニューリンによる新たな NFAT 制御機構の解明

【背景・目的】転写因子 NFAT は、免疫応答、組織の発生、がんの悪性化において重要な役割を果たしている。NFAT は、細胞内カルシウムによって活性化されるカルシニューリンによって脱リン酸化され、核内に移行し標的の転写を活性する。最近われわれはカルシニューリンが、がんの悪性化に寄与する様々なタンパク質を脱リン酸化し、それらのタンパク質を安定化することを報告している。しかし、カルシニューリンが NFAT の安定性に寄与しているか不明である。本研究では、カルシニューリンが NFAT の安定性に重要である可能性を検証し、詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

【結果・考察】カルシニューリン阻害が NFAT タンパク質の安定性に及ぼす影響を調べた結果、カルシニューリンの阻害は NFAT を不安定化することが明らかになった。カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は NFAT の安定化を促進するが、脱リン酸化活性が欠損したカルシニューリン変異体は NFAT を安定化できないことが明らかになった。カルシニューリンの活性化に必須な細胞内カルシウムイオン濃度の上昇も、NFAT の安定化を誘導した。加えて、カルシニューリンを阻害した際に、ユビキチンリガーゼ Skp2 により NFAT が分解されることを明らかにした。以上の結果から、カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は、Skp2 による分解から NFAT を保護し、タンパク質の安定化を促進することが明らかになった。

本研究では、PP1 γ およびカルシニューリンが媒介する増殖制御機構の一端を明らかにした。PP1-NIPP1 の相互作用は、熱ショックや低酸素などの経路に関わっている。また、カルシニューリン-NFAT 経路は発生や免疫応答にも重要な役割を持っている。本研究はがんだけでなく異なる領域においても応用できる可能性があり、脱リン酸化酵素が制御するシグナル伝達機構の包括的な理解の一助となる。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	花木 駿介
審査委員	主査：山口大学・准教授・大濱 剛
	副査：山口大学・教授・佐藤 晃一
	副査：山口大学・教授・奥田 優
	副査：山口大学・教授・西垣 一男
	副査：鹿児島大学・教授・藤田 秋一
題目	細胞増殖に対する脱リン酸化酵素の役割とその意義
審査結果の要旨： タンパク質のリン酸化は、細胞内のシグナル伝達機構を制御するために不可欠な機構であり、細胞増殖、分化、代謝制御など多様な生命現象に必須である。タンパク質のリン酸化はリン酸化酵素および脱リン酸化酵素により制御されており、がん化をはじめとした様々な疾患に関与している。脱リン酸化酵素の一つである protein phosphatase 1 (PP1) は 200 種類以上知られている PP1 相互作用タンパク質 (PIPs) と結合することにより標的を変化させ、多種多様なシグナル伝達経路を制御する。PP1 はヒストンを脱リン酸化し細胞増殖因子の転写制御に重要であることが知られており、ヒストンの脱リン酸化に関与する PIPs の同定はヒストン修飾を介した転写制御の分子基盤の解明につながると考えられる。脱リン酸化酵素カルシニューリンは主要な標的の一つである nuclear factor of activated T-cells (NFAT) を介して、多くのがんにおける悪性化に関わっている。カルシニューリンによる NFAT の活性化は、核内移行の促進によって説明されるが、タンパク質安定化や相互作用分子の変化に対する影響は不明であった。 本研究では、第 2 章において、PIPs に対し Gene Ontology (GO) term に着目したスクリーニングを実施し、ヒストン H3-pThr11 の脱リン酸化に関与する PIPs を同定し、その分子メカニズムの解明を行なった。転写因子 E2F1 は細胞増殖、分化、アポトーシスに重要な役割を果たしている。DNA 損傷は、細胞増殖に関与する E2F1 標的遺伝子のプロモーターにおけるヒストン H3-Thr ¹¹ リン酸化 (H3-pThr ¹¹) の低下を誘導し、転写を抑制することが知られている。PP1 は制御サブユニットと呼ばれる PIPs と結合することで活性を制御しているが、H3-pThr11 の脱リン酸化に関与する PIPs は不明であった。PIPs に付加される GO term を参照し PP1 を介した H3-pThr ¹¹ の脱リン酸化に関わる PIPs として nuclear inhibitor of protein phosphatase 1	

(別紙様式第 10 号)

(NIPP1) を同定し、NIPP1 が *in vivo* および *in vitro* の両方で PP1 γ を介した H3-pThr¹¹ の脱リン酸化を阻害することを明らかにした。NIPP1 欠失細胞を作製し、NIPP1 が細胞増殖と E2F1 標的遺伝子の発現に必要であることを示した。DNA 損傷後、活性化された PKA は、PP1 結合モチーフに隣接する NIPP1-Ser¹⁹⁹ をリン酸化し、PP1 γ から NIPP1 を解離させ、PP1 γ の活性化を引き起こすことを明らかにした。PKA 活性を阻害すると E2F1 標的遺伝子の転写は活性化された。以上のことから、PP1 の PIPs である NIPP1 は、DNA 損傷時に PKA によりリン酸化され、PP1 γ と解離することで、E2F1 標的遺伝子の発現を調節していることが明らかになった。

第 3 章では、カルシニューリンが NFAT の安定性に重要である可能性を検証し、詳細なメカニズムの解明を行なった。転写因子 NFAT は、免疫応答、組織の発生、がん化の悪性化において重要な役割を果たしている。NFAT は、細胞内カルシウムによって活性化されるカルシニューリンによって脱リン酸化され、核内に移動し標的の転写を活性化する。カルシニューリンが、がんの悪性化に寄与する様々なタンパク質を脱リン酸化し、それらのタンパク質を安定化することが報告されているが、NFAT の安定性に寄与しているか不明であった。カルシニューリン阻害が NFAT タンパク質の安定性に及ぼす影響を調べた結果、カルシニューリン阻害は NFAT を不安定化することが明らかになった。カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は NFAT の安定化を促進するが、脱リン酸化活性が欠損したカルシニューリン変異体は NFAT を安定化できないことが明らかになった。カルシニューリンの活性化に必須な細胞内カルシウムイオン濃度の上昇も、NFAT の安定化を誘導した。加えて、カルシニューリンを阻害した際に、ユビキチンリガーゼ Skp2 により NFAT が分解されることを明らかにした。以上の結果から、カルシニューリンによる NFAT の脱リン酸化は、Skp2 による分解から NFAT を保護し、タンパク質の安定性を促進することが明らかになった。

本研究では、PP1 およびカルシニューリンが媒介する増殖制御機構の一端を明らかにした。本研究により得られた知見は、がんだけでなく異なる領域においても応用できる可能性があり、脱リン酸化酵素が制御するシグナル伝達機構の包括的な理解の一助となる。

以上により本論文は、博士(獣医学)の付与に資する内容であると考えます。