

学 位 論 文 要 旨

氏名 安藤 紗奈

題 目 : PME-1 による PP2A ホロ酵素の機能的制御とその病態生理学的意義の解明

論文要旨 :

生体内で生成されたタンパク質は、リン酸化やメチル化など様々な翻訳後修飾 (post-translational modification : PTM) を受け、活性や安定性、局在が制御されている。タンパク質のリン酸化は、最も一般的な PTM の一つであり、リン酸化を担うプロテインキナーゼと脱リン酸化を担うプロテインホスファターゼが可逆的に制御する。リン酸化の 99 % 以上はセリンとスレオニン残基に引き起こされ、キナーゼが約 400 種類存在する一方で、セリン・スレオニンホスファターゼは約 40 種類と少ない。Protein phosphatase 2A (PP2A) は細胞内タンパク質の約 1%を占め、protein phosphatase 1 (PP1) と合わせて細胞内のセリン・スレオニンホスファターゼ活性の約 90%を担う。PP2A はホロ酵素として機能し、酵素活性を持つ C サブユニット (PP2Ac)、複合体構成の足場となる A サブユニット (PP2AA または PR65)、基質特異性を決定する B サブユニットからなるヘテロ三量体を構成する。基質特異性や局在に関わる B サブユニットは B55 (PPP2R2)、B56 (PPP2R5)、PR72 (PPP2R3)、Striatin (STRN) の 4 種類のファミリーに分類される。

PP2Ac Leu309 は可逆的なメチル化修飾を受け、leucine carboxyl methyltransferase 1 (LCMT1) と protein phosphatase methylesterase-1 (PME-1) によって可逆的に制御される。PP2Ac のメチル化は、B55 ファミリーなど一部の B サブユニットと AC コア二量体の結合を促進し、PME-1 欠損は細胞内のシグナル伝達が大きく変化させることが明らかになっている。アルツハイマー病 (AD) 患者の脳では PME-1 発現の増加が観察されており、また、悪性神経膠腫や子宮内膜癌、胃癌、肺癌などのがんにおける PME-1 発現の上昇は、悪性度や予後の悪さと正の相関関係を示す。しかし、PME-1 は脱メチル化酵素としての機能以外に、PP2Ac の酵素活性部位に結合して直接的に PP2A 活性を抑制する PP2A 阻害タンパク質としての機能を持つことから、これらの疾患に PME-1/PP2A 軸がどのように関与しているのかは不明である。したがって、PP2A 脱メチル化酵素と PP2A 阻害タンパク質という 2 つの機能が、PP2A 活性制御に果たす役割を分子生物学的・病態生理学的に理解することは極めて重要である。そこで本研究では、PME-1 による PP2A 活性制御およびその病態生理学的意義を明らかにすることで、PME-1 を標的とした治療戦略実現に向けた基盤となることを目的とした。

加齢は AD など神経変性疾患の最も一般的なリスクファクターである。様々な神経変性疾患において、PP2A メチル化制御の異常が観察されているが、PP2A 制御機構が加齢とともに変化することで疾患発症の一因となっているのか、あるいは病態発症の結果 PP2A 制御機構に異常が生じたのか明らかになっていない。そこで第 2 章では、2 歳から 43 歳のカンクイザルの脳組織を用いて、脳の老化が PP2A 制御機構に及ぼす影響を解析した。その結果、加齢に伴い

PP2A 活性やメチル化レベルが低下すること、PP2A メチル化関連因子を説明変数に用いた主成分分析により、老化脳をクラスタリングできることが明らかになった。したがって、加齢による PP2A メチル化レベルの低下が神経変性疾患の病態発症に寄与している可能性が考えられる。

PP2Ac のメチル化は B55 ファミリーとの複合体形成に必須であることから、PME-1 発現上昇による PP2Ac メチル化レベルの低下は、PP2A-B55 複合体の活性低下に直結すると考えられる。PP2A-B55 複合体は細胞周期の進行に重要な役割を果たすが、それ以外の生理的機能や役割については不明な点が多い。そこで第 3 章では、PME-1 阻害および PP2A-B55α 複合体の活性化により共通して認められた c-Myc 活性の低下に着目した。その結果、PP2A-B55α 複合体の量に依存して c-Myc タンパク質分解機構が切り替わることが明らかになった。具体的には、PP2A-B55α 複合体量が減少しているとユビキチンリガーゼ FBXW7 を介したタンパク質分解が、反対に増加しているとユビキチンリガーゼ UBR5 を介したタンパク質分解が誘導される。したがって、がん細胞では PP2A-B55α 複合体が適度な量に維持された結果、がん細胞の生存に有利な c-Myc タンパク質レベルに保たれていると考えられる。

がんにおける PME-1 発現の上昇は悪性度や予後の悪さと正の相関関係を示し、PME-1 発現の抑制は多くのがん細胞株に対して抗がん効果を発揮する。一方で、PME-1 の脱メチル化酵素活性を阻害しても十分な抗がん効果が得られないという報告もある。したがって、がんの悪性化には PP2A 阻害タンパク質としての機能がより重要であると考えられるが、PME-1 と PP2A の結合を制御する分子機構は明らかになっていなかった。そこで、第 4 章では PME-1 と PP2A のタンパク質間結合 (PPI) を制御する分子機構の解明を目的とした。NanoBiT システムを用いたスクリーニング解析の結果、リン酸化酵素 CHK1 が PP2Ac をリン酸化することで PME-1 との結合親和性を高めていることが明らかになった。反対に、PP2A は CHK1 を脱リン酸化することでその活性を抑制することから、CHK1 による PME-1/PP2Ac の結合促進は、CHK1 活性の維持に寄与していることが示唆された。

本研究により、PME-1 による PP2A 活性制御機構およびその病態生理学的意義が示された。本研究で得られた数々の知見は、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	安藤 紗奈
審 査 委 員	主 査： 山口大学・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・宇野 泰広
	副 査： 山口大学・教授・加納 聖
	副 査： 山口大学・教授・水野 拓也
題 目	PME-1 による PP2A ホロ酵素の機能的制御とその病態生理学的意義の 解明

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）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。

PP2Ac Leu309 は可逆的なメチル化修飾を受け、protein phosphatase methylesterase-1 (PME-1) は PP2A を脱メチル化する唯一の酵素である。PP2Ac のメチル化は、B55 ファミリーなど一部の B サブユニットと AC コア二量体の結合を促進し、PME-1 欠損は細胞内のシグナル伝達が大きく変化させることが明らかになっている。アルツハイマー病患者の脳では PME-1 発現の増加が観察されており、また、悪性神経膠腫や子宮内膜癌、胃癌、肺癌などのがんにおける PME-1 発現の上昇は、悪性度や予後の悪さと正の相関関係を示す。しかし、PME-1 は脱メチル化酵素としての機能以外に、PP2Ac の酵素活性部位に結合して直接的に PP2A 活性を抑制する PP2A 阻害タンパク質としての機能を持つことから、これらの疾患に PME-1/PP2A 軸がどのように関与しているのかは不明である。したがって、PP2A 脱メチル化酵素と PP2A 阻害タンパク質という 2 つの機能が、PP2A 活性制御に果たす役割を分子生物学的・病態生理学的に理解することは極めて重要である。

本学位論文では、PME-1 による PP2A 活性制御およびその病態生理学的意義を明らかにすることで、PME-1 を標的とした治療戦略実現に向けた基盤となることを目的とし、まず、第 2 章において、カニクイザルの脳の老化が PP2A 制御機構に及ぼす影響を解析した。その結果、加齢に伴い PP2A 活性やメチル化レベルが低下すること、PP2A メチル化関連因子を説明変数に用いた主成分分析により、老化脳をクラスタリングできることが明らかになり、加齢による PP2A メチル化レベルの低下が神経変性疾患の病態発症に寄与している可能性が示唆された。第 3 章では、PP2A メチル化によって形成される PP2A-B55 複合体ががんのマスターレギュレーターである c-Myc のタンパク質安定性に及ぼす影響を解析した。その結果、PP2A-B55 α 複合体量が減少するとユビキチンリガーゼ FBXW7 を介した c-Myc タンパク質分解が、反対に増加するとユビキチンリガーゼ UBR5 を介したタンパク質分解が誘導されることが明らかになり、がん細胞では PP2A-B55 α 複合体が適度な量に維持された結果、がん細胞の生存に有利な c-Myc タンパク質レベルに保たれていることが示唆された。第 4 章では、PP2A 阻害タンパク質としての PME-1 の機能がどのように制御されているか、その分子機構を解析した。その結果、ゲノム安定性に関わるリン酸化酵素 CHK-1 が PP2Ac をリン酸化することで PME-1 との結合親和性を高めていること、反対に PP2A は CHK1 を脱リン酸化することでその活性を阻害することが明らかになり、CHK1 による PME-1/PP2Ac の結合促進は、CHK1 活性の維持に寄与していることが示唆された。本研究より明らかになった PME-1 による PP2A 活性制御の分子機構は、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る。