博士（理　学）　岡　田　只　士

学位論文題名

セリン/スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼ1型（PP1）および6型（PP6）触媒サブユニットの細胞内機能に関する研究

学位論文内容の要旨

本論文では、PP1 触媒サブユニットアイソフォームおよび PP6 触媒サブユニットの発現抑制を行い、細胞内におけるこれらの触媒サブユニットの機能を検討した。本論文は、以下の 3 章により構成されている。

第 1 章では、HeLa 細胞にタグを付加した PP1C アイソフォームを一過性に発現させ、この発現を内部標準とすることで、細胞内における PP1C 各アイソフォームの相対的な発現量を検討した。HeLa 細胞における PP1C 各アイソフォームの相対的発現量は PP1Cαが最も多く（約 67 %）、ついで PP1Cδ（約 17 %）、PP1Cγ1（約 16 %）であることが示された。

第 2 章では、PP1C アイソフォームの発現抑制と表現型の解析を行った。これまでの PP1 研究により、①PP1 が触媒サブユニット（PP1C）と調節サブユニットからなるホロ酵素として機能していること、②調節サブユニットが PP1 のホロ酵素の活性・細胞内局在・基質特異性の制御に重要な機能を担っていること、が明らかにされており、PP1 の生理的調節は主に調節サブユニットにより営まれていると考えられている。一方、高等動物には、ユビキタスに発現する 3 種類の PP1C アイソフォーム（α、γ1、δ）が存在し、①PP1C 各アイソフォームの遺伝子発現がそれぞれユニークなプロファイルを示すこと、また、②各アイソフォームが異なる細胞内局在を示すことが報告されている。これらのことから、PP1C 各アイソフォームが異なる生理機能を担い、細胞内で役割を分担している可能性が考えられるが、そのような研究はほとんど成されていない。本研究ではこの点に焦点をあて、PP1C アイソフォームの役割を明らかにするために、本章では、siRNA を用いて PP1C 各アイソフォームの発現抑制と表現型の解析を行った。細胞周期や細胞運動、細胞のサイズ変化など、いくつかの表現型を解析した限りでは、PP1C アイソフォーム間で大きな機能的差異を認めることはできなかった。しかしながら、PP1Cαノックダウン細胞における増殖抑制や viability の低下、丸く盛り上がった形態や、PP1Cγ1 ノックダウン細胞における細胞周期 G1 期細胞の減少と S 期細胞の増加という細胞周期変化、PP1Cδノック

ダウン細胞における運動能亢進や薄く扁平に広がった形態、多数の葉状仮足様構造など、各ノックダウン細胞は、顕著ではないが再現性のある表現型変化を示した。以上の結果は、PP1C 各アイソフォームが互いに相補的に機能するほかに、部分的には特異的な機能を担っている可能性を示している。

第 3 章では、哺乳類における細胞内機能がほとんど報告されていない、プロテインホスファターゼ 6 型（PP6）の細胞内機能を明らかにすることを目的に、第 2 章に準じ、PP6 発現抑制と表現型の解析を行った。PP6 ノックダウン細胞は、細胞増殖や細胞周期に変化は認められず、細胞の運動能は 1.2 倍程度亢進した。細胞形態は大きな変化を示さなかったが、ノックダウン細胞の一部で明瞭なファイバー状アクチンが観察されなくなるという形態が観察された。このような細胞運動能の亢進と形態的変化に関連があるかは現在のところ不明であるが、複数の siRNA で同様な結果が得られていることから、意味のある表現型であると考えられる。以上の結果より、PP6 がストレスファイバーの形成に関与していることが考えられる。しかし、すべてのノックダウン細胞でこのような形態的変化が確認されないことから、この機能は PP6 の主要な機能ではないと考えられた。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　菊　池　九二三

副　査　　教　授　　矢　澤　道　生

副　査　　教　授　　坂　口　和　靖

副　査　　教　授　　及　川　英　秋

副　査　　教　授　　畠　山　昌　則

学 位 論 文 題 名

セリン/スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼ１型（PP1）および６型（PP6）触媒サブユニットの細胞内機能に関する研究

本研究は、セリン/スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼ１型(PP1)および６型（PP6）触媒サブユニットの細胞内機能を明らかにしたもので、以下の 3 点に要約される。

1. HeLa 細胞にタグを付加した PP1C アイソフォームを一過性に発現させ、この発現を内部標準とすることで、細胞内における PP1C 各アイソフォームの相対的な発現量を検討した。HeLa 細胞における PP1C 各アイソフォームの相対的発現量は PP1Cαが最も多く（約 67 %）、ついで PP1Cδ（約 17 %）、PP1Cγ1（約 16 %）であることが示された。

2. PP1C アイソフォームの発現抑制と表現型の解析を行った。これまでの PP1 研究により、①PP1 が触媒サブユニット（PP1C）と調節サブユニットからなるホロ酵素として機能していること、②調節サブユニットが PP1 のホロ酵素の活性・細胞内局在・基質特異性の制御に重要な機能を担っていること、が明らかにされており、PP1 の生理的調節は主に調節サブユニットにより営まれていると考えられている。一方、高等動物には、ユビキタスに発現する 3 種類の PP1C アイソフォーム（α、γ1、δ）が存在し、①PP1C 各アイソフォームの遺伝子発現が

それぞれユニークなプロファイルを示すこと、また、②各アイソフォームが異なる細胞内局在を示すことが報告されている。これらの事実から、PP1C 各アイソフォームが異なる生理機能を担い、細胞内で役割を分担している可能性が考えられるが、そのような研究はほとんど成されていない。本論文ではこの点に焦点をあて、PP1C アイソフォームの役割を明らかにするために、siRNA を用いて PP1C 各アイソフォームの発現抑制と表現型の解析を行った。細胞周期や細胞のサイズ変化など、いくつかの表現型を解析した限りでは、PP1C アイソフォーム間で大きな機能的差異を認めることはできなかった。しかし、PP1Cαノックダウン細胞における増殖抑制や viability の低下、丸く盛り上がった形態や、PP1Cγ1 ノックダウン細胞における細胞周期 G1 期細胞の減少と S 期細胞の増加という細胞周期変化、PP1Cδノックダウン細胞における運動能亢進や薄く扁平に広がった形態、多数の葉状仮足様構造の出現など、再現性のある表現型変化を示した。以上の結果より、PP1C 各アイソフォームが互いに相補的に機能するほかに、部分的には特異的な機能を担っている可能性が示唆された。

3. プロテインホスファターゼ 6 型（PP6）の細胞内機能を明らかにするため、PP6 発現抑制による表現型の解析を行った。PP6 ノックダウン細胞は、細胞増殖や細胞周期に変化は認められず、細胞の運動能は 1.2 倍程度亢進した。細胞形態は大きな変化を示さなかったが、ノックダウン細胞の一部で明瞭なファイバー状アクチンが観察されなくなるという形態が観察された。以上の結果より、PP6 がストレスファイバーの形成に関与していることが示唆された。

これを要するに、著者は、セリン/スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼ１型（PP1）および６型（PP6）触媒サブユニットの細胞内機能を解析し、新しい知見を加えた。よって、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与させる資格あるものと認める。