

# 学位論文要旨

細胞のアポトーシスにおける脱リン酸化酵素PP6の機能解析  
(Analysis of protein phosphatase 6 in the regulation of apoptosis)

梶原 隆太郎

Kajihara Ryutaro

指導教員

乾 誠治 教授

熊本大学大学院生命科学研究部(保健学系)生体情報解析学

# 学位論文要旨

## [ 目的 ]

セリン/スレオニン脱リン酸化酵素は細胞周期のコントロール・代謝などを調節することが知られている。PP(protein phosphatase)2A,PP4,PP6 は共通の構造を持ち1つのサブクラスを形成している。シグナル伝達分子 alpha4 は PP2A, PP4, PP6 すべての分子と結合しその酵素活性を制御する。alpha4 はリンパ球の抗原レセプターシグナル伝達経路に関与しリンパ球の活性化、抗体産生などを調節している。B細胞またはT細胞特異的な alpha4 の遺伝子破壊マウスを用いた実験から、alpha4 がリンパ球の生存・増殖に必須の分子であることが明らかとなっている。さらに alpha4 を神経系で遺伝子破壊すると記憶・学習が障害される。記憶・学習のシステムでは PP2A が重要なはたらきをし、alpha4 と PP2A が CAMKII(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II)と結合し、酵素活性を制御することが示された。PP2A はほとんどすべての組織で発現しているが、PP6 は中枢神経系、心臓、免疫系を中心に発現することが報告されている。そこで alpha4 が免疫系、心臓で PP6 を介して細胞生存を制御するメカニズムを解析する目的で PP6 機能を抑制する Dominant-Negative PP6(DN-PP6)を作製した。

## [ 方法 ]

DN-PP6 cDNA を作成し HeLa 細胞にトランスフェクションした。TNF とシクロヘキシミドによってアポトーシスを誘導し、細胞生存試験や各種のウエスタンブロットを行った。さらに CaMKII cDNA や p27 cDNA も細胞にトランスフェクションして、ウエスタンブロットを行った。また、GST-p27 および GST-S10A mutant p27 を作成し、in vitro kinase assay を行った。また、免疫系のモデル細胞として WEHI-231 を用いた実験も同様な方法で行った。

## [ 結果/考察 ]

DN-PP6 を発現した HeLa 細胞は、TNF 刺激後に、野生型細胞に比べて生存率が高かった。さらに、これらの細胞では CaMKII のリン酸化が見られ、p27 と Bcl-xl の発現が上昇していた。また、CaMKII は p27 の 10 番目のセリン残基をリン酸化した。p27 の過剰発現は Bcl-xl 発現量を上昇させた。本研究では、DN-PP6 cDNA を作成し、さらに、CaMKII が p27 の 10 番目のセリンをリン酸化することによってアポトーシスを制御することを示した。PP2Ac のドミナントネガティブ変異体はいくつか発表されている。しかしながら、本研究で初めて PP6 のドミナントネガティブ変異体を作成した。この変異体は、アポトーシスのみならず細胞周期における PP6 のさらなる機能解析に役立つと思われる。CaMKII は学習と記憶に重要であり、中枢神経系では PP1 が CaMKII の酵素活性を調節していることが知られている。今回の研究では、PP6 も同様に CaMKII と結合し、PP2A サブファミリーのホスファターゼも CaMKII 活性の調節に関与している可能性を示した。最近では、CaMKII もアポトーシスに関与していることが示唆されている。いくつかのグループは CaMKII がアポトーシスを誘導するとしているが、他のグループではアポトーシスを抑制するとしている。今研究では、HeLa 細胞で CaMKII はアポトーシスを抑制した。本実験では CaMKII が p27 のセリン 10 番目をリン酸化することによって p27 の発現量を増加させ、アポトーシス耐性能を細胞に与えた。p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化は、p27 の安定性と関係している。また、このリン酸化によって、核内の p27 は細胞質へ移行することが知られている。このことは、p27 がサイクリン/CDK 複合体から離れ、細胞質内でアポトーシス調節因子として機能することを示唆している。今回の実験結果では、野生型 p27 は細胞質に局在することができ、さらに Bcl-xl の量を調節した。これに対し、S10A 変異型 p27 ではそれら現象が見られなかった。p27 の 10 番目のセリン残基のリン酸化を行うキナーゼはいくつか報告されている。今回の研究で、CaMKII も p27 の 10 番目のセリンをリン酸化することを明らかとした。

## [ 結論 ]

ドミナントネガティブ変異型 PP6(DN-PP6)を作成した。DN-PP6 を発現した HeLa 細胞では、CaMKII が p27 の 10 番目のセリンをリン酸化し、p27 の発現量を上昇させた。p27 の発現量の上昇が、Bcl-xl の発現量を上昇させた。PP6 と CaMKII はこのような機序で HeLa 細胞のアポトーシスをコントロールした。