

氏 名 (本籍)	村 上 節
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 第 2573 号
学位授与年月日	平成 5 年 9 月 8 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
最 終 学 歴	昭和 61 年 3 月 25 日 東北大学医学部医学科卒業
学位論文題目	パン酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) タイプ 2C プロテインホスファターゼの精製と性状

(主 査)

論文審査委員	教授 矢 嶋 聰	教授 渡 辺 民 朗
	教授 林 典 夫	

論文内容要旨

細胞内シグナル伝達機構におけるタンパク質のリン酸化・脱リン酸化に関する研究が進む中で、真核細胞に存在する4種類の主要なセリン・トレオニンプロテインホスファターゼ、すなわちタイプ1 (PP1), タイプ2A (PP2A), タイプ2B (PP2B) およびタイプ2C (PP2C) のうち、その活性発現が Mg^{2+} 依存性である PP2C は、きわめてユニークな特徴を持つことが明らかとなってきた。すなわち、哺乳動物細胞より精製された各々の酵素タンパク質の解析の結果、PP2C は他の三者とは異なり、制御サブユニットを持たず、他の三者の活性阻害剤であるオキサリ酸による阻害を受けない。また哺乳動物細胞からクローニングされた各々の遺伝子の解析の結果、PP1, PP2A および PP2B のアミノ酸配列はお互いに高い類似性を有し、同一の gene family に属すると考えられるのに対して、PP2C のみ類似性が極めて低く、従って異なる遺伝子系列であると考えられる。以上のことから、PP2C は、その働きも他の三者とは異なる特徴を有していることが想像されるが、その生理的な役割についての解明はこれら4種類のホスファターゼの中で、もっとも遅れているのが現状である。

そこで、今回、この酵素の生理的機能解明の一環として、その遺伝子操作が容易なことから真核細胞の絶好の実験材料と考えられているパン酵母における PP2C について、まずその酵素的な性質の検討を行い、さらに精製を試みた。

まず、 ^{32}P 標識ホスホ全ヒストンを基質として、パン酵母とラット肝臓を用いて、それらの粗抽出液中での PP2C 活性の全活性に占める比率を比較したところ、哺乳類の各臓器の中で PP2C 活性が比較的高いとされる肝臓では、PP2C 活性は活性全体の約45%を占めるに過ぎないのに対し、パン酵母では75%を占めるという結果を得た。また、パン酵母の6種類の系統間の比較では、PP2C 活性はその比活性に大きな差はなかった。これらのことから、パン酵母において PP2C が主要なセリン・トレオニンプロテインホスファターゼとして機能していることが示唆された。

次に、パン酵母の PP2C 活性の分離精製を試みたところ、PP2C 活性は粗抽出液の30~70%硫酸アンモニウムに回収され、これを脱塩後、DE52 クロマトグラフィーに吸着・溶出することで、主要なアルカリホスファターゼや酸性ホスファターゼとは異なる、3つのピークとして分離、溶出された。溶出塩濃度の低い順にピーク1, 2および3と呼ぶことにすると、これらはいずれも2価イオンの要求性や阻害剤に対する感受性の面で、大腸菌に発現させたラットのリコンビナントの PP2C α (r2C α) と同一の性質を持っていた。しかしながら、ゲル濾過およびショ糖密度勾配遠心法の結果から、ピーク1は約53,000のモノマーと考えられたのに対し、ピーク2はゲル濾過

では分子量120,000前後の高分子であり、シヨ糖密度勾配遠心法により低分子化することが明らかとなり、サブユニット構造をとることが予想された。また、ゲル濾過およびシヨ糖密度勾配遠心法後の挙動からピーク3も同様にサブユニット構造をとることが推察された。このことは、分子量約43,000のモノマーとして精製された哺乳類のPP2Cとは相違する点であり、さらに、 ^{32}P 標識ホスホ H2B ヒストンならびに ^{32}P 標識ホスホカゼインを用いて基質特異性に対する検討を行ったところ、 $r2C\alpha$ がいずれの基質もよく脱リン酸化するのに対し、パン酵母の3種類のPP2Cは、 ^{32}P 標識ホスホカゼインに対する活性は弱く、基質に対する特異性にも相違があることが明らかとなった。

そこで、これら3つの活性のうち、まず低分子型のピーク1の精製を試み、DE52, G100の各クロマトの後、チオリン酸化ミオシン軽鎖-アガロースを用いたアフィニティークロマトを行い、約150倍以上に精製を進めた。さらにディスク電気泳動を精製的手段として利用することにより、完全な純化には至らなかったものの、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上におけるPP2Cタンパク質の同定がほぼ可能となった。今後、この結果をもとに部分アミノ酸配列を決定し、パン酵母PP2Cの遺伝子クローニングへと発展することが可能となったと考えられ、遺伝子レベルでパン酵母と哺乳類のPP2Cを論ずる端緒となることが期待される。

審査結果の要旨

近年の細胞内シグナル伝達機構における研究の進歩から、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化反応は、細胞の分化・増殖及び癌化に深く関与することが明らかにされてきた。従って、タンパク質のリン酸化を司るプロテインキナーゼと、脱リン酸化を受け持つプロテインホスファターゼは、等しく重要な酵素であると考えられるが、前者に比べて後者は、未だ研究面で遅れをとっている。その中でも、真核細胞に存在する4種類の主要なセリン・トレオニンプロテインホスファターゼ（タイプ1, 2A, 2B及び2C）のうち、 Mg^{2+} 依存性のタイプ2Cプロテインホスファターゼは、これまでのところ、他の三者とは遺伝子系列を異にし、従ってその働きも他の三者とは異なる特徴を有するものと推察されているが、その生理的な役割についての情報は充分に得られていなかった。

本研究は、このタイプ2Cプロテインホスファターゼにスポットをあて、遺伝子操作が容易なことから真核細胞の良いモデルと考えられるパン酵母を用いて、その酵素学的な性質の検討と、分離精製を試みたものである。まず、パン酵母粗抽出液中にタイプ2C活性が存在することを確認した後、本酵素活性がDE52クロマトグラフィーにより3つのピークに分離されることを見出し、これら3つのピーク（溶出塩濃度の低い順にピーク1, 2及び3）とラットリコンビナントのタイプ2C α の性状の比較検討を行った。その結果、2価イオンの要求性や阻害剤に対する感受性の面ではいずれも基本的に類似した性質を有するが、ラットリコンビナントのタイプ2C α が分子量43,000のモノマーであるのに対し、ピーク1は分子量約53,000のモノマーと考えられること、ピーク2及び3は、ショ糖密度勾配遠心法により低分子化する性質を有するサブユニット構造を持つ分子量120,000前後の高分子であることを指摘した。この高分子型の存在は、これまで哺乳動物細胞においては知られておらず、本酵素の存在様式と活性調節に関して新たな問題を提起する知見と考えられる。また、基質特異性の検討で、リン酸化カゼインに対する特異性が、パン酵母の3つのピークとラットリコンビナントのタイプ2C α では異なることを明らかにしており、このことは進化の過程における本酵素の構造上の変化を示唆するものとして興味深い。さらに、アフィニティークロマトグラフィーなどの生化学的手法で低分子型のピーク1を精製し、完全な純化には至っていないが、SDS-PAGE上で分子量53,000の活性タンパク質の同定にはほぼ成功しており、今後、この結果をもとに部分アミノ酸配列の決定から、遺伝子のクローニングへと展開していくことが期待される。

以上、本研究で得られた知見は、本酵素の活性制御機構や生理的役割の解明に手がかりを与えるものと考えられ、学位論文に充分値するものであると判断される。