

氏 名 (本籍)                    笹 原 洋 二

学 位 の 種 類                    博 士 (医 学)

学 位 記 番 号                    医 博 第 1 3 5 0 号

学 位 授 与 年 月 日                平 成 9 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件                学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻                    東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科  
(博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目                Roles of protein phosphatases in the regulation of neural differentiation of embryonal carcinoma cells.

(プロテインホスファターゼによる胚性腫瘍細胞の神経分化の制御機構)

(主 査)

論 文 審 査 委 員                教 授 今 野 多 助                教 授 岡 本 宏

教 授 林 典 夫

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

蛋白質リン酸化・脱リン酸化は、細胞の分化・増殖の制御因子として重要視されているが、神経細胞分化における知見は未だ少ない。本研究では、未分化な多能性細胞であるマウス胚性腫瘍細胞株 P19 の神経分化の培養モデル系を用いて、主要なセリン/トレオニンホスファターゼ (PP) が神経細胞分化の制御に果たす役割につき、主に分子生物学的手法を用いて検討する事を目的とする。

## 【方法及び結果】

P19 細胞は、懸濁培養による初期細胞凝集塊形成及び  $10^{-6}$ M レチノイン酸処理と、その後の単層培養により神経系細胞へ分化し、ニューロフィラメント (NF) をはじめ、様々な神経細胞特異的なマーカー蛋白質の発現が誘導される。まず、この過程における主要な各 PP サブタイプ (PP1, 2A, 2B 及び 2C) の発現変動につき検討した所、PP1 の発現に有意な変動はなく、また PP2C においては、2C $\beta$  mRNA のアイソタイプの変換が観察されたが、2C 総活性に有意差はみられなかった。これに対し、PP2A 及び PP2B の活性サブユニットの発現量及び活性は、凝集塊形成時にレチノイン酸依存性に上昇し、その高レベルは単層培養における神経突起形成時においても維持された。

次に、この PP2A 及び PP2B の神経分化への制御的役割を検討する為に、膜透過性 PP 活性阻害剤の添加効果につき検討した。PP1, PP2A 及び PP2B の阻害剤であるオカダ酸 (OA) 及びタウトマイシンを神経分化の全過程を通して添加すると、神経突起伸展及び NF-L 鎖 (NF-L) の発現が著しく阻害された。これに対し、PP2B 阻害剤であるシクロスポリン A (CsA) 及び FK506 では細胞分化に影響を与えなかった。

この OA による NF-L の発現抑制機構につき、核ラン・オンアッセイ法にて NF-L 遺伝子の転写活性への効果を検討した所、OA の有無によっては転写活性に有意差はなかった。次にアクチノマイシン D 処理法にて NF-LmRNA の安定性に対する効果を調べた所、OA により 2 種の NF-LmRNA (2.3kb 及び 3.5kb) の安定性が有意に低下することが明らかとなった。

また、OA の標的となる PP 分子種を同定する為に、阻害剤添加時の細胞粗抽出液中の、OA 感受性の各 PP 活性を測定した。その結果、OA 添加では、PP1 及び PP2B 活性は不変であったのに対し、PP2A 活性は著しく阻害された。更に、神経分化に影響を与えない CsA 及び FK506 処理では、PP2B 活性は抑制されたが、PP2A 活性は不変であった事から、特に PP2A が OA の

標的分子である事が強く示唆された。

### 【考察及び結論】

現在まで、生理的に、PP2AがNF-L蛋白質のN末領域を脱リン酸化し、NFの重合化を促進する事が知られているが、今回の研究結果より、神経分化過程において、PP2Aの発現上昇がおこり、更にこのPP2Aは、分化依存性に発現誘導されるNF-L蛋白質の脱リン酸化のみならず、主にmRNAの安定化を介して、その発現調節にも関与する事が示唆された。これらより、神経細胞分化における蛋白質リン酸化の役割の中で、セリン/トレオニンホスファターゼの機能に関する知見が少ない現況において、未分化多能性細胞株を用いて、各々のPPサブタイプの発現につき検討し、又、神経細胞特異的蛋白質の発現調節や細胞形態の解析の結果等より、特にPP2Aが神経分化の重要な制御因子となる事を明らかとした。

## 審査結果の要旨

プロテインホスファターゼは蛋白質の脱リン酸化反応を触媒する酵素であり、多様な分子種を含んでいる。それらは細胞内蛋白質のリン酸化レベルを調節し、細胞内シグナル伝達、遺伝子発現、代謝調節などに重要な役割を担い、細胞の分化・増殖の制御因子としての重要性が指摘されている。しかし、神経細胞の分化における関与については不明なことが多い。この様な背景のもとに、本研究では、未分化な多能性細胞であるマウス胚性腫瘍細胞株 P19 を神経分化モデルとして、セリン/トレオニンホスファターゼ (PP) の神経細胞分化制御の役割について分子生物学的手法を用いて検索を行い、下記の様な興味深い成果を得ている。

1) P19 細胞はレチノイン酸存在下で神経細胞に分化し、ニューロフィラメント (NF) や神経細胞特異的蛋白質が誘導される。この過程において、PP2A 及び PP2B の活性サブユニットの発現量及び活性はレチノイン酸依存性に上昇するのに対して、他の PP サブタイプ (PP1, 2C) の発現の変動はみられない。

2) 膜透過性 PP 活性阻害剤の影響について検討した結果、PP1, PP2A, PP2B の阻害剤であるオカダ酸及びタウトマイシンは、神経突起伸展や NF-L 鎖の発現を著しく阻害したが、PP2B 阻害剤であるシクロスポリンや FK506 は影響を与えない。

3) オカダ酸の NF-L の発現抑制機序を解析した結果、転写活性阻害ではなく、NF-L mRNA の安定性低下であることが判明した。

4) オカダ酸の標的 PP 分子種は、オカダ酸添加で PP1 及び PP2B 活性は変わらず、PP2A 活性が著明に阻害されたので、PP2A であることが同定された。

以上の研究結果から、セリン/トレオニンホスファターゼのサブタイプ PP2A は、神経分化過程において発現が亢進するとともに、分化依存性に発現誘導される NF-L の発現調節にも関与する事が示唆され、PP2A が神経分化の重要な制御因子であることが明らかにされた。よって本研究は学位論文に値するものと評価する。