

氏名(本籍) : 千 田 透 子

学位の種類 : 博士 ( 歯 学 )      学位記番号 : 歯博第564号

学位授与年月日 : 平成23年3月25日      学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : PP2C $\delta$ /ILKAPのp53タンパクの安定性制御への関与

論文審査委員 : (主査) 教授 山本 照子

教授 田村 真理      教授 若森 実

## 論 文 内 容 要 旨

癌抑制遺伝子として知られる p53 は、細胞の恒常性の維持やアポトーシスの誘導といった機能以外に、骨のリモデリングにおいても重要な役割を担っていることが、ノックアウトマウスを用いた研究から明らかとなっている。p53 の機能制御には、安定化を介した量的調節機構と上流のキナーゼによる活性調節機構の二つが作用している。前者では、p53 に直接会合した MDM2 によるユビキチンと、それに続くプロテアソーム分解が主要なメカニズムである。本研究では、セリン/スレオニンホスファターゼである PP2C $\delta$ /ILKAP の発現を RNA 干渉法によりノックダウンすると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下における cleaved caspase 3 の活性化が抑制されることを見出した。そこでアポトーシス誘導能をもつ p53 に対して、PP2C $\delta$ /ILKAP のノックダウンが与える影響を調べた結果、p53 のタンパク質レベルの低下が観察された。この時、p53 の mRNA レベルには影響を与えなかったことから、PP2C $\delta$ /ILKAP が翻訳の過程、あるいは p53 タンパク質の安定化を促進していることが示唆された。さらに、タンパク質合成阻害剤を用いた実験から、PP2C $\delta$ /ILKAP のノックダウンは p53 の不安定化を促進しているとの結論を得た。また、PP2C $\delta$ /ILKAP のノックダウンは、MDM2 と p53 の会合と p53 のユビキチン化を増強した。以上のことより、PP2C $\delta$ /ILKAP は、MDM2 と p53 の会合を抑制することにより p53 を安定化していることが示唆された。さらに、PP2C $\delta$ /ILKAP の細胞内局在が p53 と同様に核であり、核移行配列が 71 ~ 80 残基に存在することを実証した。また、酵母 2 ハイブリッドシステムを用いて、PP2C $\delta$ /ILKAP と相互作用する可能性があるタンパク質として、リボゾームタンパク質 L11 (RPL11) を見出した。RPL11 は MDM2 と直接結合し p53 の分解抑制を行うことから、PP2C $\delta$ /ILKAP が RPL11 を介して p53 の安定性に関与する可能性が示唆された。

## 審査結果要旨

細胞内ストレス反応, 細胞周期, 細胞骨格, mRNA スプライシングや細胞増殖といった, 細胞機能の制御に大きな役割を果たしているプロテインホスファターゼ 2C (PP2C) のうち, PP2C  $\delta$  /ILKAP は, ILK1 を不活性化し, その下流の PKB/AKT や GSK3  $\beta$  の活性化を抑制することが知られている。また, PP2C  $\delta$  /ILKAP の過剰発現は, 細胞周期を停止させるとともに, 腫瘍細胞の足場依存性増殖を阻害するとの報告も見られる。しかし, PP2C  $\delta$  /ILKAP の様々な細胞機能における役割は, 不明な部分が多い。一方, 癌抑制遺伝子として知られる p53 は, 細胞の恒常性の維持やアポトーシスの誘導といった機能以外に, 骨のリモデリングにおいても重要な役割を担っていることが, ノックアウトマウスを用いた研究から明らかとなっている。p53 の機能制御には, 安定化を介した量的調節機構と上流のキナーゼによる活性調節機構の二つが作用している。前者では, p53 に直接会合した MDM2 によるユビキチンと, それに続くプロテアソーム分解が主要なメカニズムである。p53 の量的変化が, 下流遺伝子の発現量に大きな影響を与えることから, p53 や MDM2 の上流因子のうち, MDM2-p53 コンプレックスの会合・解離に関わる因子や翻訳後修飾について研究が進んでいる。しかし, 他の多種多様な要因とのクロストークは複雑であり, その詳細は未だ解明されていない。

以上のことを背景に, 研究結果は以下のように述べられている。まず HeLa 細胞において, セリン/スレオニンホスファターゼである PP2C  $\delta$  /ILKAP の発現を RNA 干渉法によりノックダウンにより, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下における cleaved caspase 3 の活性化が抑制されることを見出だした。さらにアポトーシス誘導能をもつ p53 に対して, PP2C  $\delta$  /ILKAP のノックダウンが与える影響を調べた結果, p53 のタンパク質レベルの低下が観察され, この時の p53 の mRNA レベルには影響を与えなかったことから, PP2C  $\delta$  /ILKAP が翻訳の過程, あるいは p53 タンパク質の安定化を促進していることが示唆された。さらに, タンパク質合成阻害剤を用いた実験より, PP2C  $\delta$  /ILKAP は p53 の安定性を促進するとの結論を得た。また PP2C  $\delta$  /ILKAP のノックダウンにおいて, p53 のユビキチン化と, MDM2 と p53 の会合の両方の増強が観察された。以上のことより, PP2C  $\delta$  /ILKAP は, MDM2 と p53 の会合を抑制することにより p53 を安定化していることが見出された。さらに, PP2C  $\delta$  /ILKAP の細胞内局在が p53 と同様に核であり, 核移行配列が 71 ~ 80 残基に存在することを実証した。従って核局在性のホスファターゼである PP2C  $\delta$  /ILKAP は, MDM2 と p53 の会合を抑制することによって p53 の安定化を促進することが結論づけられている。

本研究で得られた成果は, p53 の安定性に関する分子メカニズムを解明する上で重要な知見を示している。従って, 本論文は博士 (歯学) の学位授与に値するものと判断する。