



Title	1型プロテインホスファターゼに対する新規阻害タンパク質Inhibitor-4の構造と機能に関する研究
Author(s)	白土, 治己
Citation	北海道大学. 博士(理学) 甲第5353号
Issue Date	2001-03-23
DOI	10.11501/3182023
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51685
Type	theses (doctoral)
File Information	000000399563.pdf



[Instructions for use](#)

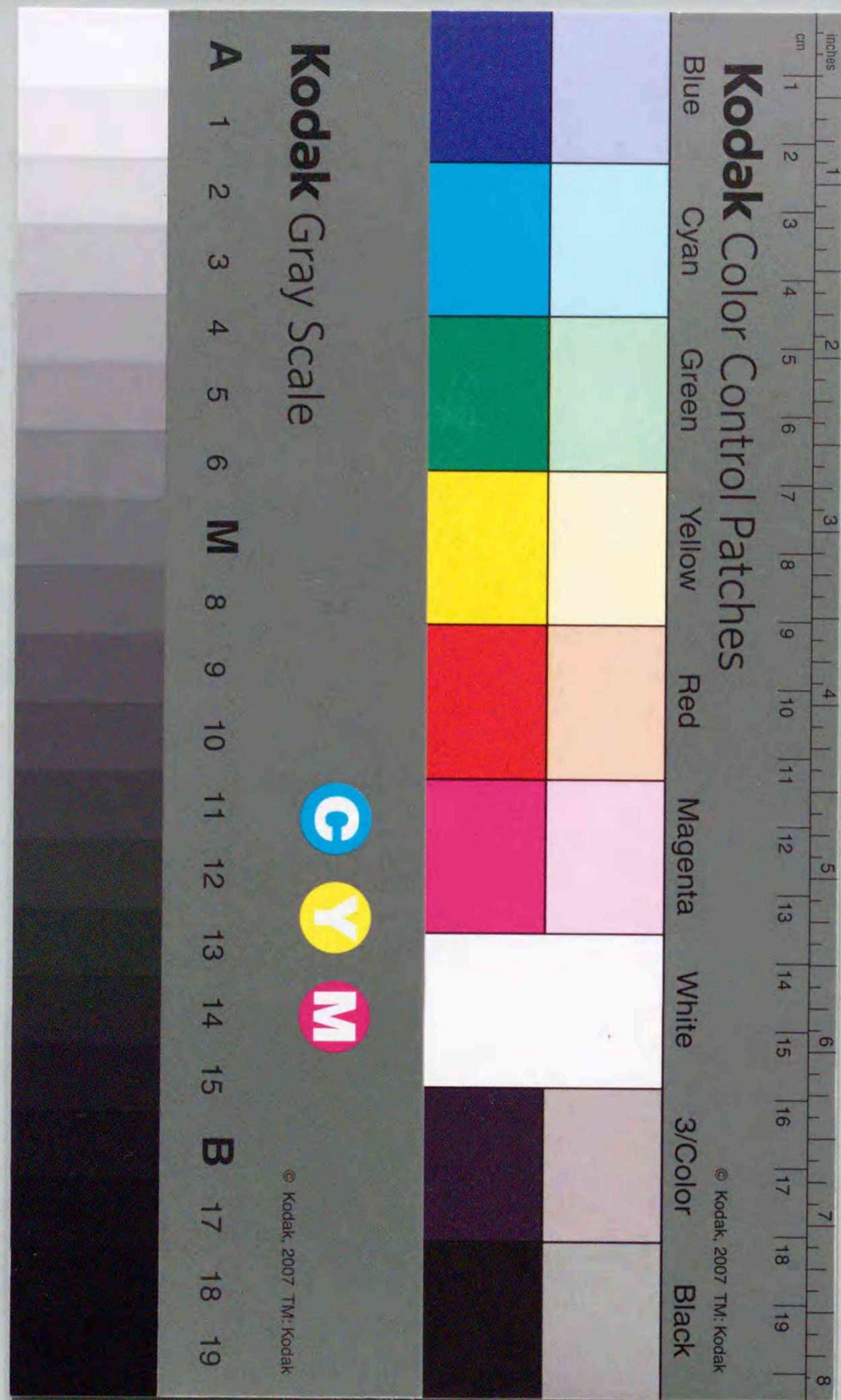
学位論文

1型プロテインホスファターゼに対する
新規阻害タンパク質Inhibitor-4の構造と機能に関する研究

平成12年度

北海道大学大学院 理学研究科 博士後期課程 化学専攻
遺伝子病制御研究所 病因研究部門 情報調節分野

白土 治己



①

学位論文

1型プロテインホスファターゼに対する

新規阻害タンパク質 Inhibitor-4 の構造と機能に関する研究

平成 12 年度

北海道大学大学院 理学研究科 博士後期課程 化学専攻

遺伝子病制御研究所 病因研究部門 情報調節分野

白土 治己

目次

略号	5
要旨	8
第1章 序論	11
第2章 Inhibitor-4 cDNA の単離	23
2-1 目的	23
2-2 材料と方法	
2-2-1 Subcloning	23
2-3 結果	
2-3-1 Inhibitor-4 の塩基及びアミノ酸配列	24
2-3-2 Inhibitor-4 のアミノ酸配列の機能モチーフ	26
2-3-3 相同性分子との Inhibitor-4 アミノ酸配列の比較	28
2-4 考察	31
2-5 まとめ	32
第3章 Inhibitor-4 の機能解析	33
3-1 目的	33
3-2 材料と方法	

3-2-1 GST 融合タンパク発現ベクターの構築	33
3-2-2 GST 融合タンパクの発現と精製	37
3-2-3 GST 融合タンパク質からの GST 断片の除去および精製	37
3-2-4 Ser/Thr プロテインホスファターゼの活性測定	38
3-2-5 PP1M に対する活性測定	39
3-2-6 Western blotting	39
3-2-7 Pull-down Assay	40
3-3 結果	
3-3-1 Inhibitor-4 GST 融合タンパクの発現と精製	41
3-3-2 阻害活性	43
3-3-3 種々の PP1C isoform に対する特異性	45
3-3-4 PP1M に対する Inhibitor-4 の効果	47
3-5 考察	50
3-6 まとめ	52
第4章 Inhibitor-4 による PP1 阻害の分子機構	53
4-1 目的	53
4-2 材料と方法	
4-2-1 GST-I-4 deletion mutant 発現と精製	53
4-2-2 Far-Western Analysis	53
4-2-3 PP1 の活性測定	54
4-3 結果	

4-3-1 deletion mutant の構築	55
4-3-2 PP1C に対する結合活性	57
4-3-3 Inhibitor-4 deletion mutant の阻害活性	61
4-3-4 Competition Assay	64
4-4 考察	66
4-5 まとめ	71
第5章 Inhibitor-4 の発現と細胞内局在	72
5-1 目的	72
5-2 材料と方法	
5-2-1 細胞培養	72
5-2-2 RNA 調製	72
5-2-3 RT-PCR	73
5-2-4 Southern blotting	74
5-2-5 細胞発現用ベクターの構築	75
5-2-6 Transfection	75
5-2-7 免疫染色	75
5-3 結果	
5-3-1 Inhibitor-4 mRNA の発現	76
5-3-2 Inhibitor-4 の細胞内での局在	78
5-4 考察	80
5-5 まとめ	81

第6章 総括と展望	82
謝辞	86
参考文献	87

略号

ATP :	adenosine 5'-triphosphate
BSA :	bovine serum albumin
bp :	base pair
CK II :	casein kinase II
cpm :	count per minute
DARPP-32 :	dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32
DMSO :	dimethylsulfoxide
DTT :	dithiothreitol
EDTA :	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA :	ethylene glycol-bis(2-amino-ethylether)-tetraacetic acid
EST :	the expressed sequence tag
FCS :	fetal calf serum
FITC :	fluorescein isothiocyanate
GSH :	glutathione
GSK-3 :	glycogen synthase kinase-3
GST :	glutathione S-transferase
HRP :	horse radish peroxidase
I-1 :	inhibitor-1
I-2 :	inhibitor-2
I-3 :	inhibitor-3

I-4 : inhibitor-4

I-t : inhibitor-t

IC₅₀ : 50% inhibitory concentration

IPTG : isopropyl-β-D-thiogalactoside

kDa : kilo dalton

MAPK : mitogen-activated protein kinase

2-ME : 2-mercaptoethanol

MLC : myosin light chain

MLCK : MLC kinase

mRNA : messenger ribonucleic acid

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NES : nuclear export signal

NLS : nuclear localization signal

NIPP-1 : nuclear inhibitor of protein phosphatase-1

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PMSF : phenylmethylene sulfonyl fluoride

PP1 : type 1 Ser/Thr protein phosphatase

PP1C : catalytic subunit of PP1

PP1M : myosin-associated phosphatase

PP2A : type 2A Ser/Thr protein phosphatase

PP5 : Ser/Thr protein phosphatase 5

rpm : revolution per minute

r.t. : room temperature

RT-PCR : reverse transcription-PCR

SDS : sodium dodecyl sulfate

要旨

本論文では、EST (expression sequence tag) データベースより見出した 1 型プロテインホスファターゼ (PP1) に対する新規阻害タンパク質 Inhibitor-4 (I-4) の分子特性を明らかにすることを目的として、I-4 のクローニング・生化学的性状解析・遺伝子発現について検討を行い、その PP1 に対する阻害機構や生理機能について考察を行った。本論文は、以下の 6 章から成っている。

第 1 章：序論

第 2 章：Inhibitor-4 cDNA の単離

human Inhibitor-2 (I-2) の塩基配列をプローブとして、EST データベースをスクリーニングした結果得られたクローンは、アミノ酸レベルで I-2 に対し約 44% の相同性を持っていた。その構造から新規 PP1 阻害タンパク質であることが考えられたので、これを Inhibitor-4 (I-4) と名付けた。I-4 は 202 のアミノ酸残基からなり、アミノ酸配列による二次構造および疎水性予測解析の結果、ヘリックス構造を多く持つ親水性に富んだ分子であった。

第 3 章：Inhibitor-4 の機能解析

I-4 を GST 融合タンパク質として大腸菌より発現させ、プロテインホスファターゼに対する阻害活性などの生化学的性状について検討した。その結果、I-4 は PP1 を特異的に阻害し、その阻害活性 ($IC_{50}=0.2$ nM) は非常に強いものであった。PP1 の

触媒サブユニット (PP1C) に存在する 4 つの isoform ($\alpha, \gamma_1, \gamma_2, \delta$) を同等に阻害し、PP1C に対する特異性は認められなかった。また、PP1 のホロ酵素の 1 つであるミオシン軽鎖ホスファターゼ (PP1C と M-subunit の複合体, PP1M) に対する阻害活性についても検討した。I-4 は、PP1M とプレインキュベーションすることにより、PP1M の活性を強く阻害することができた。このとき、GST-I-4 に結合している PP1C の量はプレインキュベーションの時間依存的に増加していたが、I-4 に対する M-subunit の結合は認められなかった。すなわち、I-4 が M-subunit に拮抗的に PP1C と結合することによって、PP1M の阻害をすることが示された。

第 4 章：Inhibitor-4 による PP1 阻害の分子機構

I-4 の deletion mutant を用いて、I-4 の阻害機構の検討を行った。PP1C に対する I-4 の結合サイトは、少なくとも 3 カ所、Site-1 (11-18)、Site-2、Site-3 に存在することが明らかとなった。

(1) Site-1 の 11-18 の領域が I-4 と PP1C との結合において最も寄与が大きいことが示された。また、Site-1 を deletion させた I-4 (19-202) の阻害活性は wild-type の I-4 に対し約 1/150 まで低下し、Site-1 の deletion による結合活性の減少とよく相関していた。

(2) Site-1 と Site-2 の両方の結合部位を含む I-4 (1-131) 等の mutant は、wild-type の I-4 に対し拮抗的に働くことから、少なくとも 2 つの箇所による結合が PP1C との安定な結合を形成するためには重要であることが明らかとなった。

(3) C 末に存在する Site-3 を含む領域を deletion すると、阻害活性が全くみえなくなる。また、Site-3 のみを有する I-4 (124-202) 等の mutant でも阻害活性を示すこと

から、阻害には Site-3 が必須であることが明らかとなった。Site-3 は、触媒部位に親和性を持つことが示唆された。

これらの結果から、PP1 に対する I-4 の阻害は、N 末端の結合領域 (11-18) を中心とした I-4 に存在する複数の結合サイトが、PP1C に結合することによってなされているためと考えられた。

第 5 章：Inhibitor-4 の発現と細胞内局在

Northern blotting 法によって、I-4 mRNA の発現を調べたが、ヒト正常組織にその発現は見られなかった。ヒト由来の cell line から RNA を精製し、RT-PCR 法により調べたところ、Hela 細胞等のガン細胞において I-4 mRNA の発現が認められた。さらに多くのヒト組織やガン細胞について、この発現を検討する必要があると思われる。

I-4 に FLAG-tag を付加し、その細胞内での発現を免疫染色法によって観察した。wild-type の I-4 は核膜に局在するが、その 2 つの deletion mutant (1-131, 19-202) では、その局在がいずれも細胞質に変化することが明らかとなった。2 つの deletion mutant は、各々異なる PP1C 結合サイトを deletion したものであることから、I-4 と PP1C との結合が、I-4 の核膜への局在に関与していることが示唆された。

第 6 章：総括と展望

第 1 章 序論

生物を構成する細胞は、常に外的、内的な環境変化にさらされており、これらの変化に対応するために様々な反応を調節し、それに応じた情報伝達を細胞内及び細胞間で可能にしなければならない。この複雑な反応系や伝達系に関わるタンパクの機能の調節には、タンパク質のリン酸化・脱リン酸が非常に重要な役割を担っている。真核生物細胞のタンパク質のおよそ 3 分の 1 がリン酸化を受けていると言われるほど、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は広範な領域に及んでおり、この可逆的リン酸化を司る酵素がプロテインキナーゼとプロテインホスファターゼである[1]。プロテインキナーゼは、その特異性が高いことや多種多様な存在が知られていたために、その研究は早くから進み、多くの生理的機能の解明がなされた。一方、プロテインホスファターゼは、精製の困難性などのために、その研究が遅れていた。しかし、それまでの Ser/Thr ホスファターゼ (PP) に加え、Tyr ホスファターゼ (PTP)、二重特異性ホスファターゼ (DSP) に含まれる多様な分子種が単離同定され、さらにそれらの制御機構が明らかにされるにつれて、プロテインホスファターゼの研究は急速に発展した。現在では、プロテインホスファターゼは大きく 3 つに分類 (PP, PTP, DSP) され、各々はさらに多くの分子種からなる各種サブファミリーから構成されている (Table 1) [2]。研究が進むにつれ、プロテインホスファターゼの生理機能も明らかにされ、現在、その脱リン酸化の機能は、代謝・膜輸送・細胞周期・転写・翻訳・細胞接着・分化・アポトーシス・情報伝達など多種多様なものに及んでいることが明らかとなっている[3, 4]。

Table I. プロテインホスファターゼファミリー

Family	Subfamily	Protein Phosphatase
Ser/Thr Protein Phosphatase (PP)	PP1	PP1, PPZ1, PP1Z2,
	PP2A	PP2A, PP4 (PPX), PP6, Pph3
	PP2B	PP2B (calcineurin)
	PP2C	PP2C α , PP2C β , PP2C γ , Wip 1, FIN 13
	PP5	PP5
	PP7	PP7
Protein Tyr Phosphatase (PTP)	receptor	PTP α , PTP β , PTP δ , PTP γ , PTP ϵ , PTP κ , PTP μ , LAR, CD45
	non-receptor	PTP-1B, PTP-1C, PTP-TC, SHP-1, SHP-2, PTP-PEST
Dual Specificity Phosphatase (DSP)	CDC25	Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C
	CDC14	CDC14A, CDC14B
	MKP	MKP-1, MKP-2, MKP-3, MKP-4, MKP-5
	LDP	VHR, LDP-1

1型 Ser/Thr プロテインホスファターゼ

Ser/Thr プロテインホスファターゼは、その基質特異性や金属依存性、阻害タンパク質及び天然阻害物質に対する感受性に応じて 6 つのサブファミリーに分類されている (Table II) [5, 6]。なかでも、1型プロテインホスファターゼ (PP1) は、Ser/Thr プロテインホスファターゼのサブファミリーのなかで、その存在が最初に明らかになり、これまで最も研究されているプロテインホスファターゼの 1 つである。

通常 PP1 は、その触媒サブユニット (PP1C) と制御サブユニットで構成されるホロ酵素として存在する [7, 8]。触媒サブユニット PP1C には、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ の 5 種類のアイソフォームが知られており、これらはヒト、マウス、ウサギなどの哺乳類間で高度に保存され、各々の発現も、 $\gamma 2$ が精巣に特異的に発現する以外は、広範な組織分布を示している [9-12]。このうち $\alpha 1$ と $\alpha 2$ そして $\gamma 1$ と $\gamma 2$ は、各々 alternative splicing による産物である。これらアイソフォーム間のアミノ酸の差異は、N 端 40 残基と C 端 30 残基に存在しているが、そのホスファターゼ活性などの生化学的特徴の差異は認められていない [13]。

基質特異性が高いプロテインキナーゼなどとは対照的に、PP1 は様々な基質を脱リン酸化することができ、その基質に共通するモチーフ配列等は見出されていない [14]。しかし、この幅広い基質特異性を持つ PP1 は、必要とされる基質特異性や比活性および局在を、その求められる機能に応じた様々な制御サブユニットと複合体を形成することによって調節し、結果として PP1 の精緻な活性調節を可能としている (Figure 1) [15]。

制御サブユニットには、PP1C の局在や機能に応じて多くの存在が知られている。例えば、G-subunit は PP1C をグリコーゲン顆粒と筋小胞体に局在化し、ホスホリラ

一ゼなどの解糖系酵素を脱リン酸化, その制御に関与する[16]。M-subunit は, 筋原線維に局在化し, PP1C と結合することで PP1 をミオシン軽鎖ホスファターゼ (PP1M) として機能させる[17]。このほか, 制御サブユニットには, PP1 の活性を阻害する inhibitor-1 (I-1) をはじめとした数多くの阻害タンパク質も知られている。PP1C と制御サブユニットの結合は, 制御サブユニットに共通するモチーフ配列 (R/K)(V/I)XF または(R/K)X(V/I)F を介していることが明らかとなっている (Table III) [18, 19]。これら様々な特性を有した制御サブユニットと結合したホロ酵素である PP1 は, 結果として細胞周期, タンパク質合成, 筋収縮, グリコーゲン合成, 転写, 神経シグナリング等の多種多様な細胞内プロセスを制御していることが報告されている (Figure 1) [20-22]。

Table II. Ser/Thr プロテインホスファターゼの分類

	PP1	PP2A	PP2B	PP2C	PP5	PP7
Specificity to Phosphorylase Kinase α or β	β	α	α	α	?	α
Sensitivity to I-1 or I-2	yes	no	no	no	no	no
Requirement of metal ion	no	no	Ca^{2+}	Mg^{2+}	no	Ca^{2+}
Sensitivity to Okadaic Acid (IC_{50} , nM)	3.4	0.07	5000	none	0.2	none

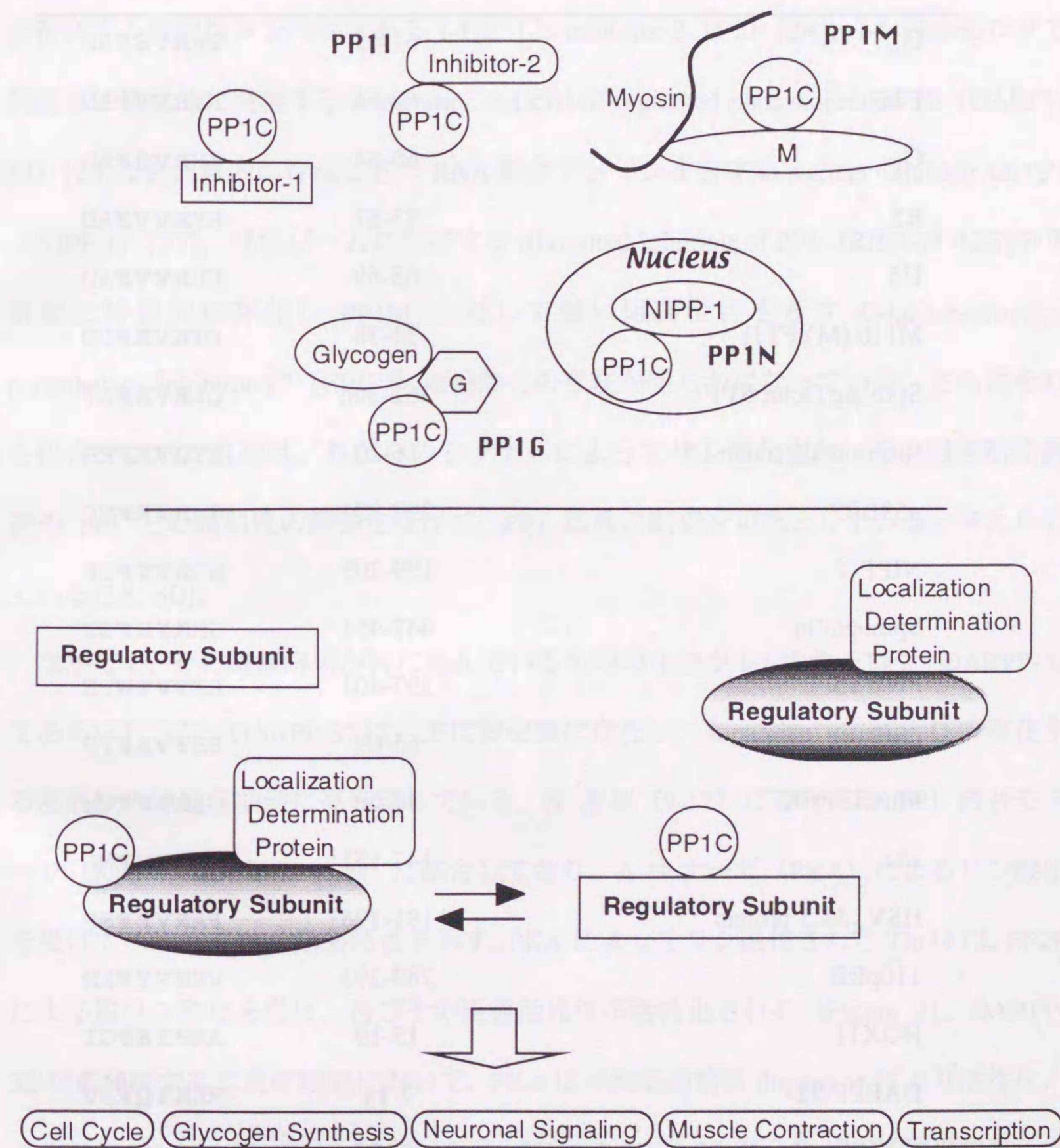


Figure 1. 制御サブユニットによる PP1 の活性調節

Table III. PP1 結合タンパク質とその結合モチーフ

Protein	Residues	Sequence
G _M	61-65	TRRVSFAD
PTG	60-64	KKRVVFAD
G _L	60-64	KKRVSFAD
R5	83-87	KKRVVFAD
U5	65-69	KKRVVFAD
M110 (MYPT1)	34-38	KTKVKFDD
Splicing factor SPF	362-366	QLRVRFAT
Ribosomal protein L5	16-20	RYQVKFRR
p53BP2	797-801	GMRVKFNP
NIPP-1	199-203	NSRVTFSE
Spinophilin	447-451	SRKIHFSST
PNUTS	397-401	RKTVTWPE
GRP-78	65-69	PSYVAFTP
Muscle PFK	46-50	GARVFFVH
sds	147-151	ILDISFNL
HSV _{γ1} 34.5 protein	191-195	PARVRFSP
110pRB	289-293	VKNVYFKN
HOX11	15-19	AEPISFGI
DARPP-32	7-11	RKKIQFSV
MYPT2	52-56	SPRVRFED
Inhibitor-1	8-12	PRKIQFTV
Inhibitor-2	?	?
Inhibitor-3	39-43	EKKVEWTS

PP1 阻害タンパク質

PP1 の阻害タンパク質もまた多くの存在が知られている (Table IV)。主に細胞質に存在する熱耐性タンパクである I-1[23]と inhibitor-2 (I-2) [24], I-1 のホモログで神経系に特異的に発現する dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 (DARPP-32) [25, 26], 核内に存在し且つ RNA 結合ドメインを有する nuclear inhibitor of PP1 (NIPP-1) [27], リボゾームに局在する ribosomal inhibitor of PP1 (RIPP-1) [28]や平滑筋に特異的に存在し PP1M に対して強い阻害活性を示す C-kinase-activated phosphatase inhibitor-17 (CPI17) [29]などの存在が明らかになっている。さらにそれら阻害タンパク自身は、外からのシグナルによってリン酸化され、その阻害活性調節や PP1 との親和性の調整を受けて、PP1 活性の制御を可能としていると考えられている[18, 30]。

なかでも、その機能解明が特に進んでいるものの1つが I-1 のホモログ, DARPP-32 である[31, 32]。DARPP-32 は、主に細胞質に存在し、dopamine receptor D の存在する基底核の神経系細胞に高発現している。N 末端 (9-12) に存在する PP1 結合モチーフ (KIQF) を介して PP1C に結合しており、A キナーゼ (PKA) によるリン酸化を受けてはじめて PP1 阻害活性を示す。PKA によってリン酸化された Thr34 は、PP2B による脱リン酸化を受け、再びその阻害活性は不活性化される (Figure 2)。DARPP-32 が高発現する基底核細胞において、PKA は神経伝達物質 dopamine により活性化、その結果 DARPP-32 のリン酸化が亢進、PP1C/DARPP-32 複合体が不活性化する。一方、PP2B は、glutamate を介した Ca²⁺の増加により活性化され、PP1C/DARPP-32 複合体を脱リン酸化し PP1 を活性化すると考えられている。この dopamine と glutamate は、生理的に拮抗した機能を有していることが知られており、これらの刺激が PP1C ・

DARPP-32・PKA・PP2Bを介して、特に神経系における細胞内タンパク質のリン酸化状態を制御していると考えられている。I-1 についても同様のメカニズムが推測されている。

しかし、I-2 や NIPP-1 など多くの阻害タンパク質については、その生化学的性質は近年明らかにされつつあるが、その生理的機能については、未だに推察の域を出ないのが現状である。

Table IV. PP1 阻害タンパク質の性質

PP1 Inhibitor	IC ₅₀ (nM)	Mw (kDa)	Phosphorylation	Localization
Inhibitor-1	1.6	28	yes	cytoplasm
DARPP-32	1.0	32	yes	cytoplasm
Inhibitor-2	3.1	23	yes	cytoplasm
NIPP-1	0.01	38.5	yes	nucleus
RIPP-1	20	23	?	ribosome
CPI17	0.18	17	yes	cytoplasm

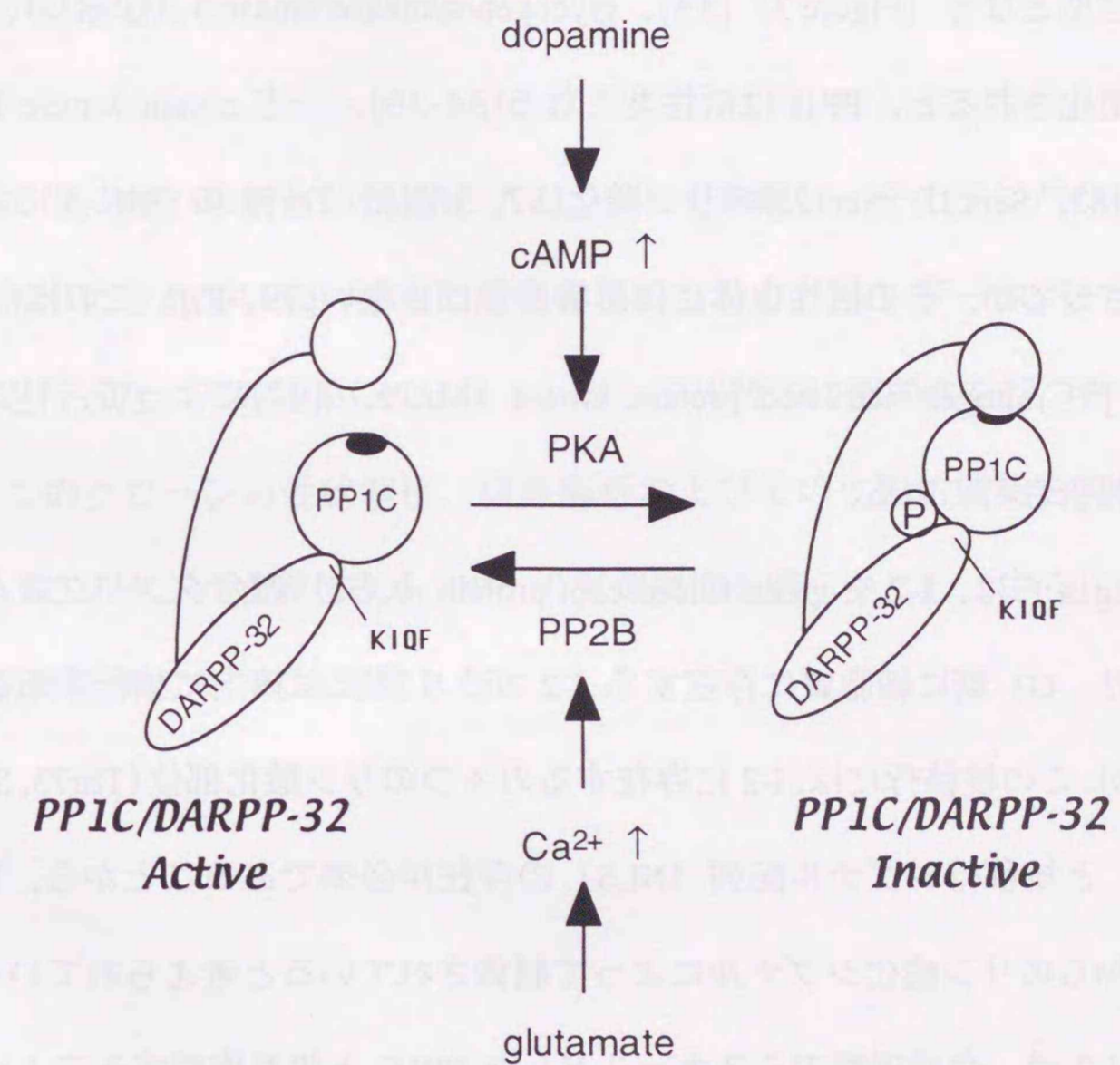


Figure 2. PP1C/DARPP-32 の活性調節

PP1C 上の塗りつぶしは活性部位を表す。PKA による DARPP-32 のリン酸化部位は Thr34 である。KIQF は DARPP-32 の PP1C 結合モチーフ。

Inhibitor-2

骨格筋から熱耐性タンパク質として精製された I-2 は、PP1 を特異的に阻害する ($K_i=3.1$ nM) [24]。他の制御サブユニットとは異なり共通の結合モチーフ (RVXF) は存在しないが、I-2 は PP1C と 1:1 の複合体 (PP1I) を形成、PP1 活性を阻害し PP1I は不活性型となる (Figure 3) [33]。glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) により Thr73 がリン酸化されると、PP1I は活性型となる[34-36]。一方 casein kinase II (CKII) による Ser87, Ser121, Ser122 のリン酸化[37, 38]は、Thr73 の GSK-3 によるリン酸化を亢進させるが、その活性自体には影響を及ぼさない[39, 40]。このほか、Thr73 は、cdc2[41]や mitogen activated protein kinase (MAPK) [42]によって、リン酸化されることも報告されている。

Brautigam らは、I-2 を green fluorescent protein (GFP) 融合タンパク質として細胞に発現させ、G1 期に細胞質に存在する I-2 が、S 期には核内に移行することを見出した[43]。この核移行には、I-2 に存在するの 4 つのリン酸化部位 (Thr73, Ser87, Ser121, Ser122) と核移行シグナル配列 (NLS) の存在が必須であることから、I-2 の核移行は外部からのリン酸化シグナルによって制御されていると考えられている[44]。

また I-2 は、合成過程でミスホールドした PP1C と相互作用することにより、それを再構築し正規の活性型 PP1C を誘導することができることから、I-2 が PP1C に対するシャペロンとして機能することが示唆された。一般的に用いられている recombinant PP1C は、ホールディングの違いのために組織から精製された PP1C と一部性質を異にしていることが知られているが、この recombinant PP1C に I-2 を作用させることによって、精製 PP1C と良く類似した性質を示すことが明らかになっている [45-47]。さらに、培養細胞に I-2 と PP1C を cotransfection すると、PP1C のみでは不

可能であった活性型 PP1C を過剰発現することが可能となり、このことも I-2 が PP1C のシャペロンとしての機能を有することを裏付けていると考えられる。

I-2 の生理機能については様々な研究がなされているにもかかわらず、細胞内で I-2 が何のために存在し、PP1C にどのように作用し、それ自身がどのような制御を受けているかはほとんどわかっていない。

本研究では、PP1 の新しい制御サブユニットを単離し、そのタンパクによる PP1 の未だ明らかにされていない機能の解明を目的として、EST データベースのスクリーニングを行った。その結果、human I-2 に対して比較的に相同性を持つクローンを見出した。このクローンの性状解析、機能解析およびその生理的機能を解析することによって、このタンパク質による PP1 の制御機構を明らかにし、さらに相同性を持つ I-2 の制御機構についても考察したい。

第2章 Inhibitor-4 cDNA の単離

2-1. 目的

新規 PP1 制御サブユニットの探索を目的として、EST データベースを用いた検索を行った。得られたクローンの全長の核酸配列を明らかにし、その配列を既知 PP1 制御サブユニットの配列と比較した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. Subcloning

I-4 cDNA は、human I-2 の塩基配列をテンプレートとして、the National Center for Biotechnology Information (NCBI) の the expressed sequence tag library (EST library) データベースを検索することで見いだした。この I-4 をコードする EST cDNA クローンは、Research Genetics (USA) より購入した (clone ID: IMAGE entry 1470424)。購入した I-4 cDNA は、pT7T3D-Pac ベクター内に *NotI*-*EcoRI* サイトで組み込まれていた。DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) を用いて PCR 反応を行い ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) を用いて、その塩基配列を確認した。

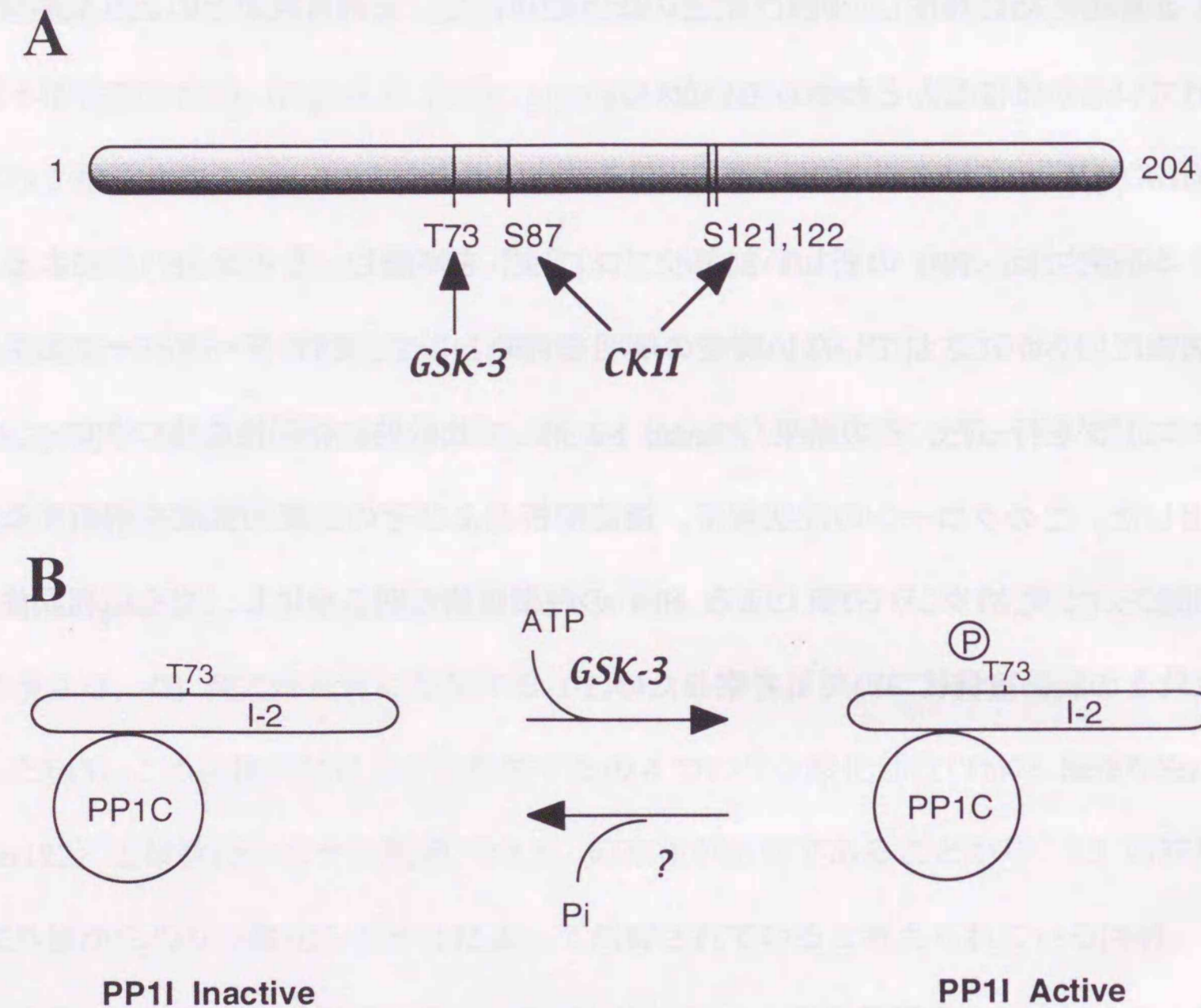


Figure 3. I-2 阻害活性のリン酸化による制御

A, I-2 のリン酸化部位を示した。B, PP1I (PP1C/I-2 複合体) は、GSK-3 によるリン酸化によってホスファターゼ活性が回復する。

2-3. 結果

2-3-1. Inhibitor-4 の塩基配列及びアミノ酸配列

PP1 の阻害タンパク質 human I-2 の塩基配列をプローブとして dbEST library をスクリーニングし、この I-2 に相同性をもつヒトクローンを見いだした。この EST クローン (IMAGE clone entry 1470424) は、three pooled germ cell tumor から調製された cDNA ライブラリーから得られたものである。このクローンの塩基配列は、その一部分のみがデータベース上で明示されているのみであったので、T7・T3 プライマーを用いてその全配列を明らかにし、このクローンを human Inhibitor-4 (I-4) と命名した。

human I-4 cDNA は、open reading frame で 606 bp の塩基とその塩基配列から予想される 202 のアミノ酸残基をコードしていた (Figure 4)。分子量は、計算上 22,659 と推定される。

```
cgtcatacgcagcgcctttgtgacaccagggcctggtgctttaactagggcggtggga 60
cctgttgcccacacagaccgcctgcagtttcagactggagggcggtggacggctactca 120
gcgggcccaactctctcgcagcccttctctccgcaaaatgtcagcctccacctcctcgcac 180
1 M S A S T S S H
cggcccatcaaggggatcctgaaaaacaaaagctcgtcgggttctctcgggtggcgacttcc 240
9 R P I K G I L K N K S S S G S S V A T S
ggtcagcagctctggagggactattcaagatgtgaagagaagaaatcccaaaagtgggac 300
29 G Q Q S G G T I Q D V K R K K S Q K W D
gaatcaagcatccttgccgcacaccgcgcaacgtacagagattacgatttaagaaggca 360
49 E S S I L A A H R A T Y R D Y D L M K A
aatgagcccgccacttctcatgatgtgcaagataatggggaagattcagtgccgat 420
69 N E P G T S Y M S V Q D N G E D S V R D
gtcgaaggagaagattcagtgctggtgtcgaaggaaaggaagccaccgatgcttccgac 480
89 V E G E D S V R G V E G K E A T D A S D
cacagctgtgaggtggacgagcaagagagcagtgaggcctacatgagaaaaatcctctc 540
109 H S C E V D E Q E S S E A Y M R K I L L
cacaaacaggagaaaaagcggcagtttcgaaatgagaagaaggcttactacaacgaagaa 600
129 H K Q E K K R Q F E M R R R L H Y N E E
ttgaacatcaaattagctagacaattaatgtggaagagctacaaagtgaagataatgaa 660
149 L N I K L A R Q L M W K E L Q S E D N E
aacgaagaaacgccacaaggcagcaagagaagactgctgccaagaatcagaggaa 720
169 N E E T P Q G T N E E K T A A E E S E E
gctcctctgaccggtggactgcaaaccagtcacgacccttagaagatgcctgcttca 780
189 A P L T G G L Q T Q S C D P *
cccttgcaattgtttgaatatgtgacgcttagaagatatctgcttcacccttgcaatt 840
gtttgtgaaatacaaaccttgttactgtaaaaaaaaaaaaaaaaa 894
```

Figure 4. human I-4 の塩基配列及びアミノ酸配列

アミノ酸配列は塩基配列より推測し、一文字表記法で示した。開始、終止両コドンは枠で示し、開始コドン上流の終止コドンは下線、poly(A)付加配列は二重下線で示した。

2-3-2. Inhibitor-4 のアミノ酸配列の機能モチーフ

I-4 のアミノ酸配列のモチーフ検索を行い、その結果を Figure 5 に示した。I-4 には GSK-3 モチーフ配列と複数の CKII モチーフ配列が存在する。さらに核移行シグナル (NLS) 配列、核外移行シグナル (NES) 配列と PEST 配列が確認された。

次に I-4 の 2 次構造と疎水性の予測を行った。2 次構造分析は、Chou & Fasman 法[48]を用いて行った (Figure 6A)。疎水性プロフィール解析には、Kyte & Doolittle 法[49]を用いた (Figure 6B)。解析結果より、I-4 は、ヘリックス構造が多く見られ、全体として親水性に富んでいることから、I-4 タンパクは球状にホールディングするような複雑な構造を形成する可能性は低いと推察される。

1	MSASTSSHRP	IKGILKNKSS	SGSSVATSGQ	QSGGTIQDVK	RKKSQKWDES	50
51	SILAAHRATY	RDYDLMKANE	PGTSYMSVQD	NGEDSVRDVE	GEDSVRGVEG	100
101	KEATDASDHS	CEVDEQESSE	AYMRKILLHK	QEKKRQFEMR	RRLHYNEELN	150
151	IKLARQLMWK	ELQSEDNENE	ETPQGTNEEK	TAAEESSEAP	LTGGLQTQSC	200
201	DP					202

Figure 5. I-4 に存在するモチーフ

GSK-3 と CKII によるリン酸化が予想される部位を、各々 (*) と (▼) で示す。NLS は枠、NES は波線、PEST 配列を網枠で示す。

A

AA	MSASTSSHRPIKGILKNKSSGSSVATSGQQSGGTIQDVKRKKSQKWDESSILAAHRATY
PHD sec	HHHHH H
AA	RDYDLMKANEPGTSYMSVQDNGEDSVRDVEGEDSVRGVEGKEATDASDHSCEVDEQESSE
PHD sec	HHHHH HHHHHHHHHH HHHH HH
AA	AYMRKILLHKQEKKRQFEMRRLHYNEELNIKLARQLMWKELQSEDNENEETPQGTNEEK
PHD sec	HHH HHHHH HHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
AA	TAAEESSEAPLTGGLQTQSCDP
PHD sec	HHH

B

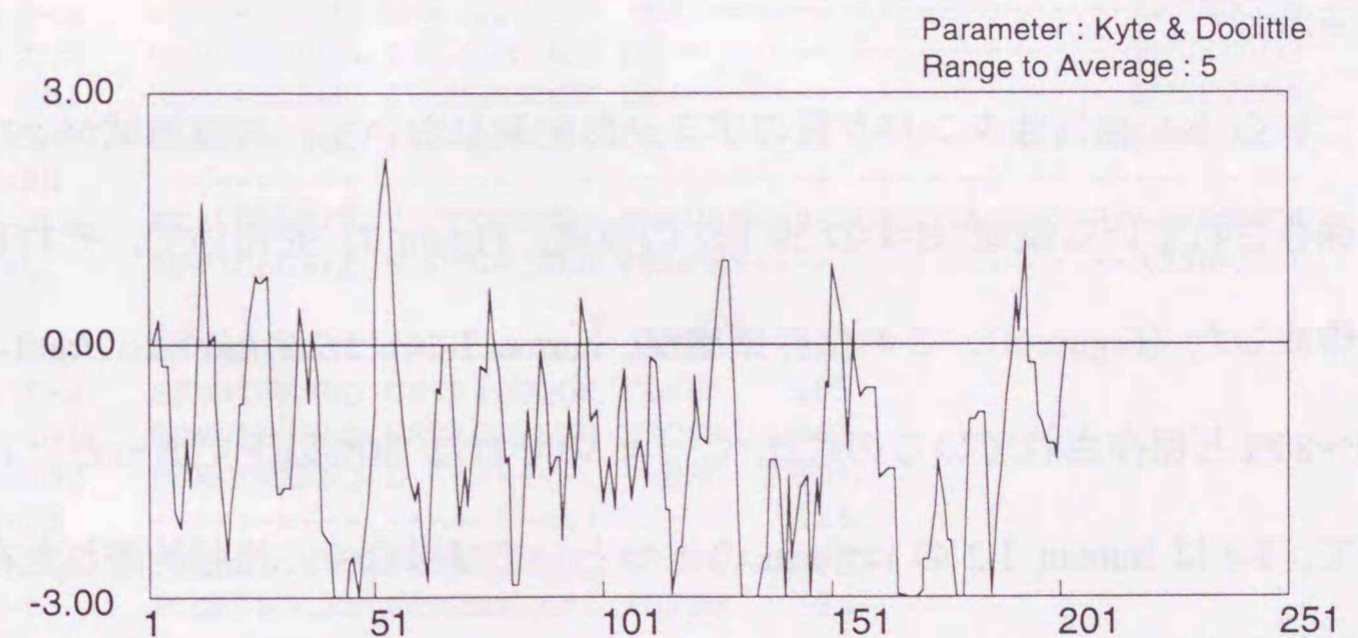


Figure 6. I-4 の予測される二次構造と疎水性プロフィール

A, Chou & Fasman 法による 2 次構造の予測。PHD sec に表記されている略号 H は、helix を示し、空白は loop 構造を示す。sheet は存在しない。B, Kyte & Doolittle 法による疎水プロフィール。横軸はアミノ酸の番号、縦軸は疎水性を示す。

2-3-3. 相同性分子との Inhibitor-4 アミノ酸配列の比較

I-4 は, human I-2 に対して相同性を示し, その他の PP1 阻害タンパク質 (I-1 や NIPP-1 等) への相同性はきわめて低かった。従って, 種々の既知 I-2 homolog とのアミノ酸配列の比較を行った (Figure 7)。

I-4 は, human I-2 に対して塩基配列で 61.5%, アミノ酸配列で 43.7%の相同性を示した。他の human I-2 homolog に対するアミノ酸配列の相同性は, rat I-2 α 1[50]および rat I-2 α 2 で 43.4%, rat I-2 β で 35.0%, drosophila I-2Dm[46]で 24.8%, drosophila I-t[51, 52]で 22.0%, human I-3[53]で 22.9%を示し, I-4 は human I-2 に対して最も高い相同性を有していた。I-4 は, 同一遺伝子由来の splicing variant である 3 つの rat I-2 isoform (I-2 α 1, I-2 α 2, I-2 β) に対しても相同性を示し, 特に N 端と C 端が大きく欠損しかつ阻害活性の非常に弱い I-2 β に対しても, その欠損領域以外では良い相同性を示した。

これら I-4 相同性タンパク質のアミノ酸配列において, 欠損領域が少なく連続的に保存されている領域 (I-4 の 29-147 の領域, Figure 7) を用いて, それらの系統樹を作成した (Figure 8)。この保存領域が, human I-2/rat I-2 α 1/rat I-2 α 2/rat I-2 β 間では, 60~80%と保存されているのに比べ, I-4 のそれは 40%以下であった。系統樹において, I-4 は human I-2 の isoform の 1 つとしてではなく, 比較的離れた存在として分類された。

また, I-2 homolog タンパク質のほとんどの保存されている 4 つのリン酸化部位 (T73, S85, S118, S119) は I-4 にも存在していた (Figure 5, 7)。そのほか, NLS 配列, NES 配列も PEST 配列も保存されていた (Figure 5, 7)。

human I-4	MSASTSSHRP	IKGILKNKSS	SGSSVATSGQ	QSGGTIQDVK	RKKSQKWDES	50
human I-2	MAASTASHRP	IKGILKNKTS	TTSSMVASAE	QPRGNVDEEL	SKKSQKWDEM	50
rat I-2 α 1	MAASTASHRP	IKGILKNKTS	TTSSVVASAE	QPRRTVEEEL	SKKSQKWDEM	50
rat I-2 α 2	MAASTASHRP	IKGILKNKTS	TTSSVVASAE	QPRRTVEEEL	SKKSQKWDEM	50
rat I-2 β	MAS-----	----L-----	----AVASIE	HPFGTFEEL	GKKSQKWDEM	30
dro I-2Dm	MQNNPSPQLP	CKGILK----	-----TS	RSFDKSGASF	-RKSQKWFDEL	37
dro I-t	M-----HKN	FKS-LQ----	---NTNPSNM	KKAKTAAKGF	PIHLGFYRNP	36
			* ▼			
human I-4	SILAAHRATY	RDYDLMKANE	PGTSYMSVQD	NGEDSVRDVE	G-EDSVRGVE	99
human I-2	NILATYHPAD	KDYGLMKIDE	PSTPYHSMG	DDEDACSDTE	ATEAMAPDIL	100
rat I-2 α 1	NILATYHPAD	KDYGLMKIDE	PDTPYHNMIG	DDEDVCSDE	GNEVMTPEIL	100
rat I-2 α 2	NILATYHPAD	KDYGLMKIDE	PDTPYHNMIG	DDEDVCSDE	GNEVMTPEIL	100
rat I-2 β	NILETYHPAN	KDYGLMKKSK	PNTLYRNTVA	DYSDNSDSE	VNEIMNPDFL	80
dro I-2Dm	NVMQTFHPAD	KDYGHMKIDE	PKTPYNYTEG	FDEN--RDEL	DTELL-VEKL	84
dro I-t	SEYDDRTTTN	RDYGLKSSKG	SGTFFPQKQK	KLDT----AA	LTAKLETDSL	82
human I-4	GK--EATDAS	DHSCVEDEQE	SSEAYMRKIL	LHKQEKKRQF	EMRRRLHYNE	147
human I-2	ARKLAAAEGE	EPKYRIQEQE	SSGEEDSDLS	PEEREKKRQF	EMKRKLHYNE	150
rat I-2 α 1	AKKAAAEGS	EPKFRTRQE	SSGEEDNDLS	PEEREKKRQF	EMKRKLHYNE	150
rat I-2 α 2	AKKAAAEGS	EPKFRTRQE	SSGEEDNDLS	PEEREKKRQF	EMKRKLHYNE	150
rat I-2 β	TKKLAVDEAS	EPTNVILEQE	SSGEKDDE--	--ELEKKRQF	DMKRKLHYNE	126
dro I-2Dm	-R--IAANTQ	PSTESIEDDG	SSGDDQP-LS	EEERQRREF	ERRRKAHYRE	130
dro I-t	LR---SELSD	LSIVISERKA	SSEPQV----	ASNTTTEPTF	EMRRKLFDEA	125
human I-4	ELNIKLRQL	MWKELOSEDN	-EN-----	-----	--EETPQGTN	177
human I-2	GLNIKLRQL	ISKDLHDDDE	DE-----	-----	--EMLETADG	180
rat I-2 α 1	GLNIKLRQL	ISKDLHDDDE	DE-----	-----	--EMSETADA	180
rat I-2 α 2	GLNIKLRQL	ISKDLHDDDE	DE-----	-----	--EMSETADA	180
rat I-2 β	-----	-----	-----	-----	-----	126
dro I-2Dm	FEAVKLARKL	IQEEDDDDD	EDKGADSRPS	GSSQGASSSG	RFASSSTKRS	180
dro I-t	EFTICKGHKL	NQDFHHIVED	EKFHFNK----	-----	--RQSAKDNI	159
human I-4	EEKTAAESEE	EAPLTGGLQT	QSCDP	202		
human I-2	ESMNTEESNQ	GSTPSDQQQN	KLRSS	205		
rat I-2 α 1	DSMNIEESNQ	GSTAGDHLQH	KSQSS	205		
rat I-2 α 2	DSMNIEESNQ	G-----	--QSS	194		
rat I-2 β	-----	-----	-----	126		
dro I-2Dm	SSQADSTTSP	STSAGQNMDL	EPSNN	205		
dro I-t	PYSNFMDLKN	FCDQNNIKFS	KGFGG	184		

Figure 7. human I-4 と相同性タンパクのアミノ酸配列の比較

I-4 と各種 I-2 homolog のアミノ酸配列を示した。各々の配列を最適化し, その結果挿入させた gap を (-) で, 相同アミノ酸残基を網掛けで示した。GSK-3 と CKII によるリン酸化サイトは, 各々 (*), (▼) で示した。

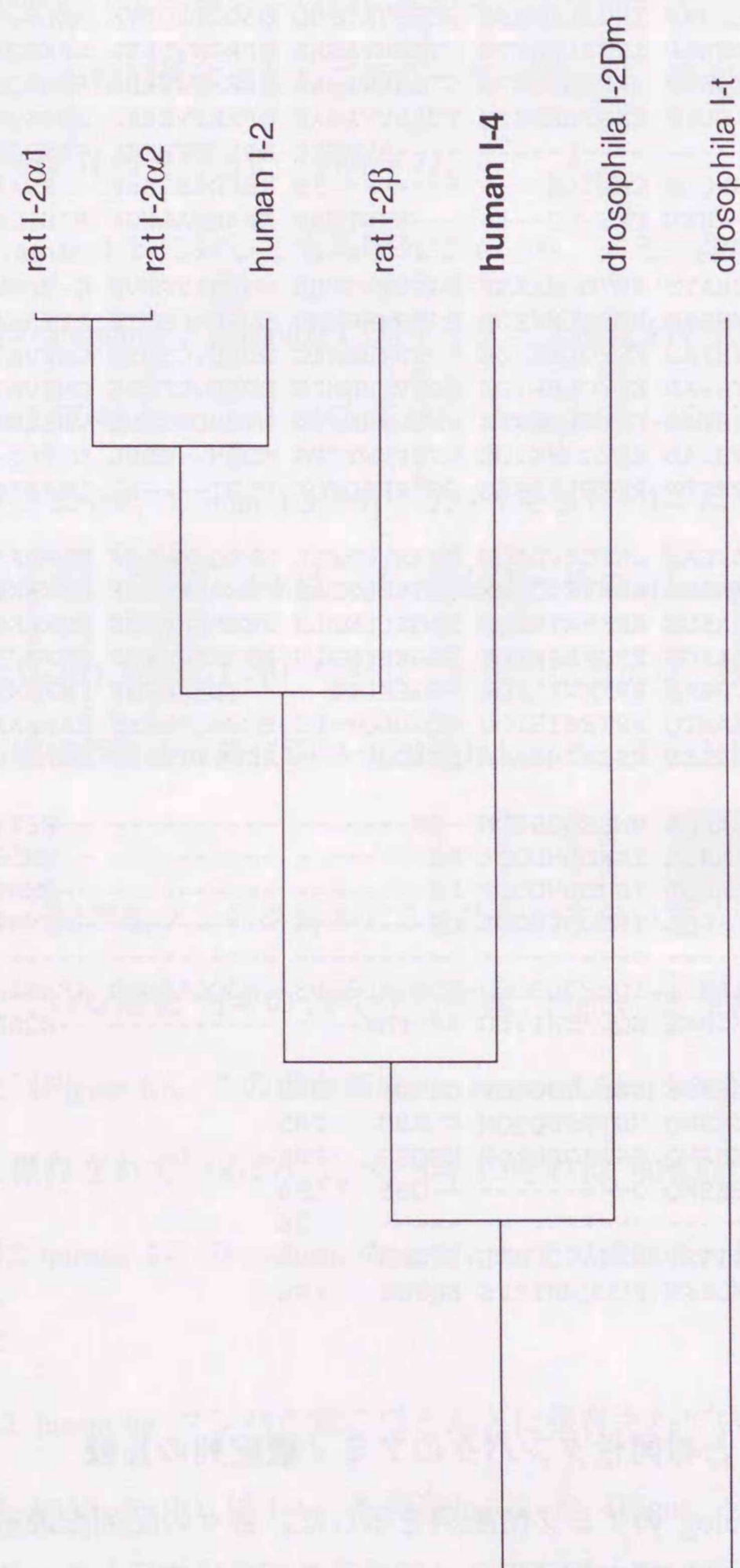


Figure 8. I-4相同性タンパク質の系統樹

2-4. 考察

I-4は、human I-2に比較的相同性を持っていたが、種々のI-2 homolog分子とのアミノ酸配列の比較や系統樹による分類から、それらとは比較的離れた存在として分類された。現時点で、PP1 阻害タンパク質はI-3 まですでに知られていたことから、本研究により見出した遺伝子は、Inhibitor-4 (I-4) と命名した。

次に、I-2 の機能調節に重要と考えられているリン酸化サイトと I-4 に存在するリン酸化サイトについて述べる。I-4 の Thr73 はその周辺配列から、I-2 と同様に、GSK-3 によるリン酸化は可能であると考えられるが、I-2 に存在する隣接した Pro 残基がないために cdc2 や MAPK のターゲットにはならないと推測される。CKII によるリン酸化部位については、I-2 に存在する3カ所のリン酸化サイトのうち1つ (Ser85) のみが保存されていた。I-2 においてその機能制御に重要であると考えられているリン酸化部位の周辺アミノ酸配列に相異が認められることから、I-4 は I-2 とは異なった機構で制御を受けていると考えられる。

Kakinoki らによって示された I-2 の核移行シグナル ($K^{136}KRQFEMKRK^{145}$) [44]は、I-4 では $K^{133}KRQFEMRRR^{142}$ となっており、140 と 142 の Lys が Arg に置換されているものの、同じ塩基性残基への置換であることから、この領域は保存されていると考えられる。また、核外移行シグナル (143-162) と考えられる配列も I-4 や I-2 相同性タンパクに、種を問わず高度に保存されていることから、核-細胞質間の移行がそれらの生理機能を発揮する上で重要であることを示唆している。

human I-2 には2つ存在する PEST 配列[46, 50]は、I-4 には1つしか認められなかった。PEST 配列が存在するタンパク質は半減期が短いことが知られていることから、I-4 も分解を受けやすいタンパク質であると考えられるが、human I-2 よりは安定性

が高いタンパク質であると推察される。

2-5. まとめ

- ・ human I-4 cDNA は、606 bp の塩基と 202 のアミノ酸をコードしていた。
- ・ 構造予測解析結果は、I-4 がヘリックスを多く持つ親水性に富んだ分子であることを示していた。
- ・ human I-4 は、human I-2 に対して約 43.7% の相同性を示した。
- ・ NLS, NES, PEST 配列は、I-4 にも保存されていた。
- ・ I-2 と同様に GSK-3 による Thr73 のリン酸化は可能であると考えられるが、CKII によるリン酸化部位は、Ser86 のみであった。

第 3 章 Inhibitor-4 の機能解析

3-1. 目的

I-4 タンパク質の生化学的性状を調べるために、大腸菌に発現させ、これより精製し、PP1 に対する阻害活性などの機能解析を行った。

3-2. 材料と方法

3-2-1. GST 融合タンパク発現ベクターの構築

第 4 章で使用している I-4 deletion mutant の構築についても、本節とその方法が類似しているため、まとめて示した。

I-4 及び種々の I-4 deletion mutant の GST 融合タンパクの発現ベクターを構築するために、*Eco* RI または *Bam* HI 切断部位を付加させたプライマー (Table V) を Table VI に示されるような組み合わせで、*Pyrobest*TM DNA Polymerase (宝酒造株式会社、大津) を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) を行った。増幅した DNA 断片は、各々対応する制限酵素 (*Eco* RI and/or *Bam* HI) で消化し、1% アガロース又は 8% ポリアクリルアミドゲルにより泳動後、QIAEX II (QIAGEN, Germany) を用いて回収精製し、これをインサート DNA とした。GST 融合タンパク発現ベクター pGEX-3X (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) もまた、適当な制限酵素によって切断し、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP; 宝酒造株式会社、大津) によって脱リン酸化の後、回収精製し、T4 DNA Ligase (GIBCO BRL, USA) を用いて、各種インサート DNA を組み込んだ。

作製した種々の GST-I-4 および GST-I-2 発現ベクターの塩基配列は, sequencer により解析して確認した。

Table V. GST fusion vector 構築に使用したプライマーデザイン

Bam HI と *Eco* RI 制限部位は, 各々二重下線と下線で示す。

Abbreviations	Primers
4F1	5' <u>GGGAATTC</u> GATGTCAGCCTCCACCTCCTCG3'
4F2	5' <u>GGGAATTC</u> AATCAAGGGGATCCTGAAAAAC3'
4F3	5' <u>GGGAATTC</u> AAGCTCGTCGGGTTCTCGGTG3'
4F4	5' <u>GGGAATTC</u> GAGAAAAATCCTCCTCCACAAA3'
4F5	5' <u>GGGAATTC</u> GAGAAAAAGCGGCAGTTCGAA3'
4F6	5' <u>GGGAATTC</u> GCTTCACTACAACGAAGAATTG3'
4R1	5' <u>GGGAATTC</u> CTAAGGGTTCGCATGACTGGGT3'
4R2	5' <u>GGGAATTC</u> CTACCTTCTTCTCATTTGAA3'
4R3	5' <u>GGGAATTC</u> CTACTGTTTGTGGAGGAGGAT3'
4R4	5' <u>GGGAATTC</u> CTACATGTAGGCCTCACTGCT3'
4R5	5' <u>TTGAATTC</u> CTATTTGTTTTTCAGGATCCC3'
2F	5' <u>GTGGGATCCCC</u> ATGGCGGCCTCGACGGCCTCG3'
2R1	5' <u>GTGGGATCCC</u> TATGAACTTCGTAATTTGTT3'
2R2	5' <u>GGGAATTC</u> CTATCGTTCTTCAGGTGAGAG3'

Table VI. GST fusion vector 構築に使用したプライマーの組み合わせ

Constructs	Combinations	Constructs	Combinations
GST-I-4 (1-202)	4F1/4R1	GST-I-4 (19-131)	4F3/4R3
GST-I-4 (1-18)	4F1/4R5	GST-I-4 (19-142)	4F3/4R2
GST-I-4 (1-123)	4F1/4R4	GST-I-4 (124-202)	4F4/4R1
GST-I-4 (1-131)	4F1/4R3	GST-I-4 (132-202)	4F5/4R1
GST-I-4 (1-142)	4F1/4R2	GST-I-4 (143-202)	4F6/4R1
GST-I-4 (11-202)	4F2/4R1	GST-I-2	2F/2R1
GST-I-4 (19-202)	4F3/4R1	GST-I-2 (1-134)	2F/2R2

3-2-2. GST 融合タンパク質の発現と精製

GST-I-4 及び GST-I-2 プラスミドをトランスフォーメーションした BL21 大腸菌を、2YT 培地 (16 g/L Bacto trypton, 10 g/L Bacto yeast extract, 5 g/L NaCl) で、37°C、一晩振盪培養した。この溶液を 2YT 培地で 10 倍希釈、27°C で OD₆₀₀=0.8 に達するまで振盪培養し、isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) を最終濃度 1 mM になるように添加、GST 融合タンパクを誘導発現した。27°C、約 12 時間振盪培養した後に、遠心回収 (5000 G, 4°C, 10 min) した。大腸菌ペレットは、S-buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, 0.1% 2-ME, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1% Triton X-100) に懸濁し、超音波破碎により溶菌させた。溶菌溶液を遠心 (25000 G, 4°C, 15 min) し、上清をあらかじめ W-buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.1% 2-ME, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine) で平衡化させたグルタチオン-セファロース (GSH-Sepharose, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) カラムにロードした。カラムのベット容量の約 50 倍以上の W-buffer で非吸着タンパクを洗浄除去した後、溶出溶液 E-buffer (50 mM Tris-HCl, pH 9.5, 10 mM GSH) で溶出、分画した。各分画は、SDS-PAGE によりその精製度を確認、高純度の分画のみ D-buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 8 mM EDTA, 4 mM DTT, 50% glycerol) で透析濃縮後、-20°C で保存した。

3-2-3. GST 融合タンパク質からの GST 断片の除去および精製

切断する GST 融合タンパク質を、C-buffer (20 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 150 mM NaCl) で透析し、GSH や DTT 等の還元剤や金属キレート剤である EDTA 等を除去した。必要に応じて濃縮した。CaCl₂ を最終濃度 2 mM で添加し、GST 融合タンパ

ク質の 1/200 量 (重量比) の Factor Xa (Roche Diagnostics, Switzerland) を加え, on-ice で 5 時間程度インキュベートした。あらかじめ C-buffer で平衡化させた GSH-Sepharose を反応液中に懸濁, 4°C で一晩インキュベーションした後, 懸濁液をカラムに充填しその流出画分を採取することで, 切断した GST 及び未切断 GST 融合タンパク質を除去した[54]。

流出画分は, 15 分間煮沸後, on-ice で冷却し, 遠心 (15000 rpm, 4°C, 20 min) してその上清を目的サンプルとした。

3-2-4. Ser/Thr プロテインホスファターゼの活性測定

PP1, PP2A および PP5 のホスファターゼ活性測定は, [³²P]phosphorylase *a* を基質として用いた[55]。

基質である [³²P]phosphorylase *a* は, phosphorylase *b* (SIGMA, USA) を [γ -³²P]-ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 存在下でホスホリラーゼキナーゼによってリン酸化し調製した[56]。

活性測定は, 反応溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 15 mM 2-ME, 0.01% Brij 35, 0.3 mg/mL BSA, 5 mM caffeine, 10 μ M [³²P]phosphorylase *a*) に対して, 100 ng/mL のプロテインホスファターゼと種々の濃度の I-4 等の存在下で行った。反応は, 基質以外をすべて混合し (total 20 μ L), 30°C で 10 分間プレインキュベーションした後に, 10 μ L の [³²P]phosphorylase *a* を加え 30°C 10 分間反応させ, 20 mM silicotungstic acid を 30 μ L 添加して反応を停止させた。遠心 (15000 rpm, 4°C, 10 min) 後, 上清 50 μ L と 5% ammonium molybdate 12.5 μ L を混合することにより生じる遊離リン酸塩 phosphomolybdate を, isobutanol/benzene (1:1) 100 μ L で抽出し, 有機相

75 μ L を濾紙にスポットし, 液体シンチレーションカウンター (LS6500, BECKMAN, Germany) を用いて, 放射活性を測定した。

PP1C は, Cohen らの方法でウサギ骨格筋より精製した[56]。PP2A ホロ酵素 (ABC 型) は, Calbiochem (USA) より購入した。GST-PP5 は, 大腸菌より発現, 精製した[57]。PP1C isoforms (α , γ 1, γ 2, δ) 発現ベクターは, Ernest Y. C. Lee 博士 (New York Medical College, USA) から恵与され, Zhang らの方法を用いて大腸菌から精製した [13, 58]。

3-2-5. PP1M に対する活性測定

PP1M の活性は, 400 ng/mL PP1M に対して種々の濃度の GST-I-4 または GST-I-2 を添加したときの, ホスファターゼ活性を 1 μ M [³²P]myosin light chain (MLC) を基質として用いて測定した。 [³²P]MLC は, MLC, MLC キナーゼ (MLCK) と [γ -³²P]-ATP を用いて Ishihara らの方法を用い調製した[59]。MLC ホスファターゼの具体的な測定手段は, 使用した基質が異なるだけで, その他は 3-2-4 と同様に行った。プレインキュベーションは, PP1M と阻害タンパクを基質を除く反応溶液と混合し, 4°C で指定時間行った。

骨格筋ミオシン及び MLCK は, Ikebe らの方法により精製し[60, 61], 骨格筋 PP1M は, 伊藤正明博士 (三重大学, 津) から恵与された[62]。

3-2-6. Western blotting

タンパク質を SDS-PAGE で分離後, transfer-buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.7, 192 mM glycine) でゲルを平衡化し, ニトロセルロース膜 (HybondTM-ECL, Amersham Pharmacia

Biotech, Sweden) にプロットした。プロットした膜を blocking-buffer (5% skim milk, 0.05% NaN_3 , 0.1% Tween 20, PBS) にてブロッキングし, 1次抗体と4°C, 一晚インキュベートした。PBS-T (0.1% Tween 20, PBS) で洗浄 (r.t., 5 min, 3 times) 後, 2次抗体と室温 15分反応させた。PBS-T (0.1% Tween 20, PBS) で洗浄 (r.t., 10 min, 4 times) 後, ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) を用いた化学発光法により, バンドを検出した。

3-2-7. Pull-down Assay

GST-I-4 0.5 μg と PP1M 3.0 μg を binding-buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1 mM MnCl_2 , 60 mM 2-ME, 10% glycerol) 中で, 4°Cで指定時間インキュベーションした。GSH-Sepharose を加え 4°Cで 30分間インキュベーションした後, Wizard-miniprep column (Promega, USA) にアプライし, Vac-ManTM laboratory vacuum manifold (Promega, USA) で吸引ろ過した。続いてすぐに, washing-buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 1.0 M NaCl, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100) で3回洗浄した。カラムに 100°Cに熱した SDS サンプルバッファーを加え, 電子レンジで 90秒加熱し, 遠心 (15000 rpm, 4°C, 1 min) によってサンプルを回収した。再度, SDS バッファーを加え, サンプル回収の操作を繰り返した[63, 64]。

サンプルは 10% SDS-PAGE 分離後, ニトロセルロース膜にプロットした。GST-I-4 に結合したタンパクは, anti-PP1C δ 抗体[65]を用いた Western blotting により検出した。

3-3. 結果

3-3-1. Inhibitor-4 GST 融合タンパクの発現と精製

I-4 の生化学的性状を調べるために, I-4 を pGEX-3X 発現ベクターに組み込み, GST 融合タンパク質 GST-I-4 として大腸菌で発現させ, GSH-Sepharose カラムを用いて精製した。SDS-PAGE の結果から算出された GST-I-4 の分子量 49 kDa は, 計算値とほぼ一致した。精製された recombinant GST-I-4 タンパクは, SDS-PAGE により高純度であることが確認された (Figure 9)。

また, GST-I-4 から, GST タンパクを Factor Xa により除去, 熱処理後精製した I-4 も高い純度で精製されていた (Figure 9)。

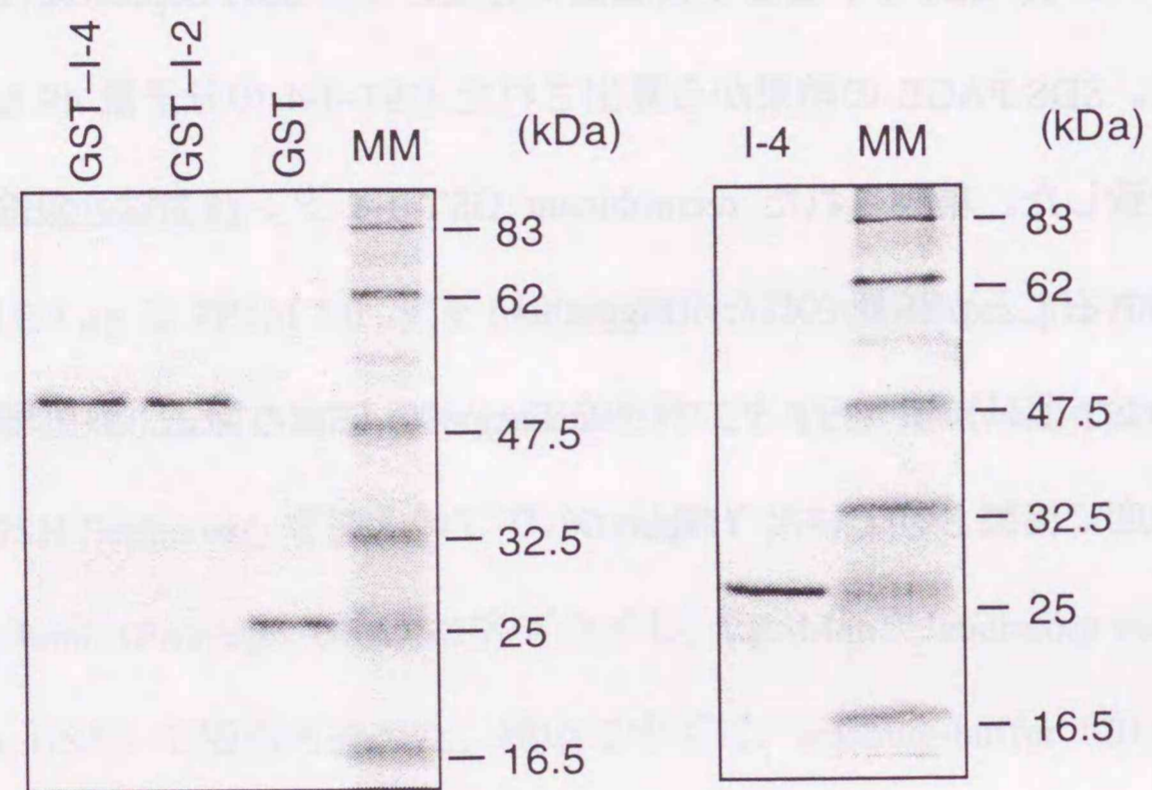


Figure 9. 大腸菌に発現させ、精製した各タンパクの精製結果

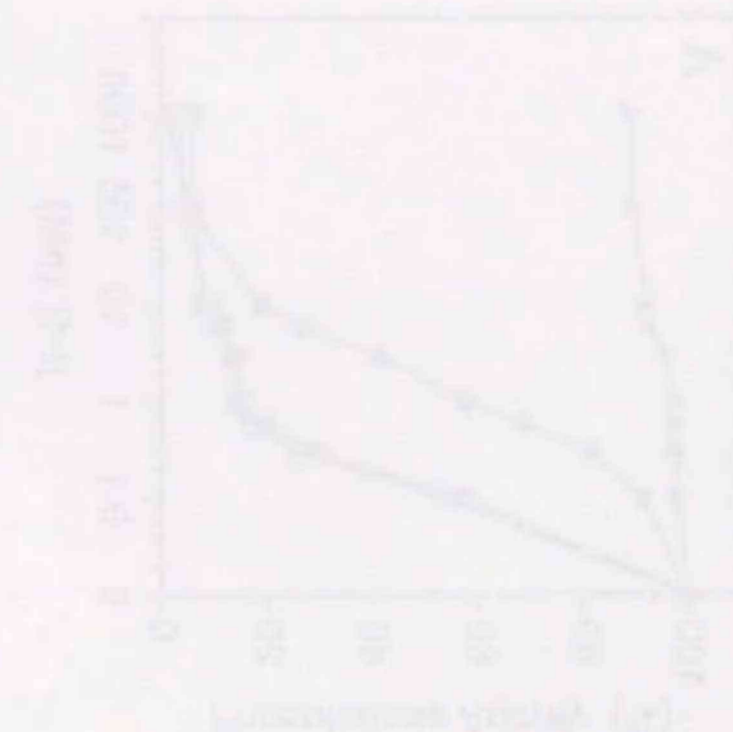
各々 2 μ g のタンパクを SDS-PAGE (12% acrylamide gel) 分離した。I-4 は、GST-I-4 から GST を除去精製した後、15 分間煮沸したものをサンプルとした。

3-3-2. 阻害活性

発現させた GST-I-4 の種々のプロテインホスファターゼに対する阻害活性の有無を調べるために、3 種類の Ser/Thr プロテインホスファターゼ (PP1, PP2A, PP5) について phosphorylase *a* を基質として用い、その脱リン酸化活性を解析した。GST を negative control, GST-I-2 を positive control として用いた。

Figure 10 に示すように、GST-I-4 は PP1 のみを特異的に阻害し、PP2A と PP5 を全く阻害しなかった。GST-I-4 の PP1 に対する IC_{50} は 0.2 nM であり、GST-I-2 ($IC_{50}=2.0$ nM) よりも 10 倍程度強い阻害活性を有することが明らかとなった。

また、I-1 や I-2 などの PP1 阻害タンパク質の 1 つの特徴である熱耐性についての検討を行った。GST-I-4 タンパクの GST 領域は熱変性を起こすので、これをあらかじめプロテアーゼ処理により除去し、その後 I-4 のみを精製した。I-4 は、15 分の熱処理後も、PP1 に対して $IC_{50}=0.3$ nM と熱処理前同様の阻害活性を示し、I-4 もまた熱耐性タンパク質であることが明らかとなった (Figure 10A, B)。



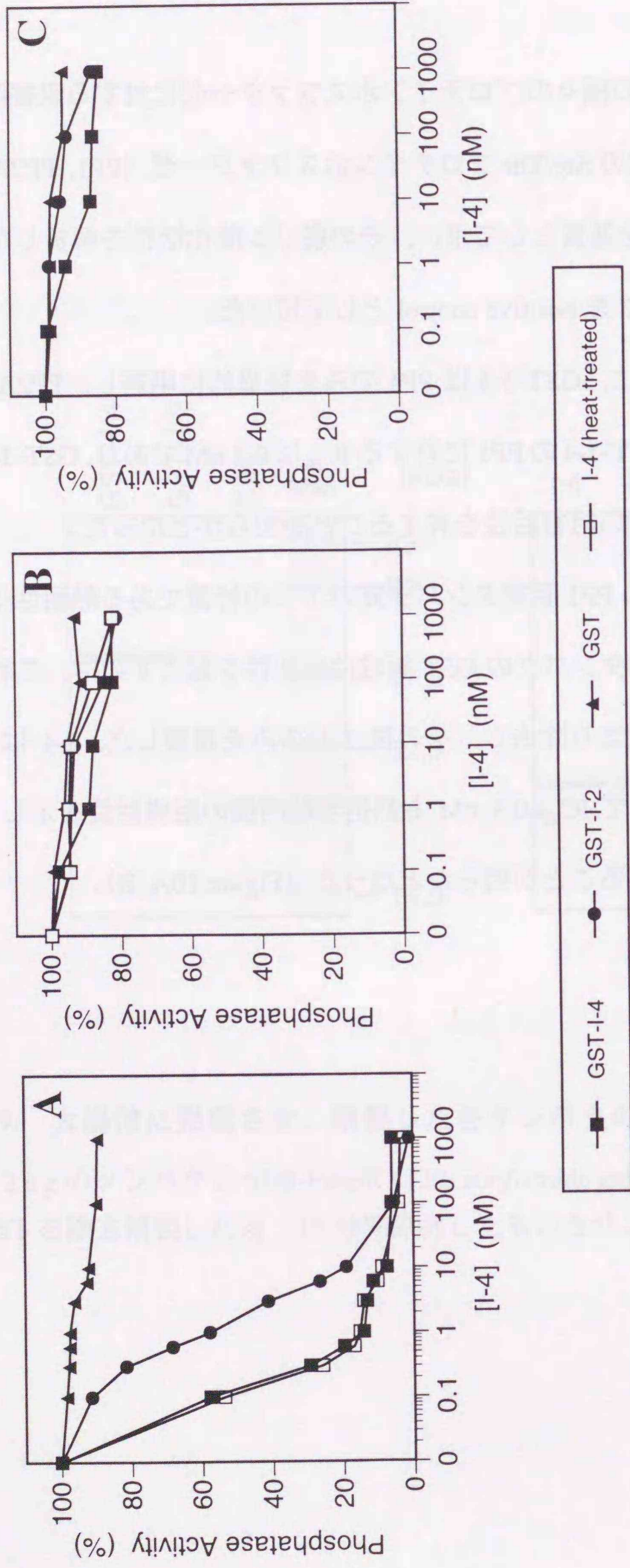


Figure 10. プロテインホスファターゼに対する GST-I-4 の阻害活性

ホスファターゼ活性は、基質として $10 \mu\text{M}$ [^{32}P]phosphorylase α を用い、3種類の Ser/Thr プロテインホスファターゼ: (A) PP1C, (B) PP2A, (C) GST-PP5 に対して行った。I-4 (heat-treated) の熱処理は、GST-I-4 から GST を除去した後に、15 分間煮沸した。

3-3-3. PP1C isoforms に対する特異性

PP1 の触媒サブユニットには、 α , $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ の 4 つの PP1C isoform の存在が知られている。これらは、主として N 末と C 末領域のアミノ酸配列が互いに異なっている。ここでは、これら PP1C isoform に対する I-4 の特異性について検討した。各種 PP1C は、大腸菌により発現精製した recombinant PP1C isoform を使用した。

大腸菌で発現した recombinant PP1C は、動物組織から精製した天然 PP1C よりも活性が低いことが知られている[13]。これは、PP1C のホールディングの違いや活性中心に存在する 2 価金属イオンの違いが原因と考えられている。また、各種 PP1 阻害剤に対する感受性が、ウサギ骨格筋から精製した PP1C よりも若干低いことが知られていた。

活性測定の結果、精製 PP1C に比べて若干感受性が低くなっているものの、I-4 は各種 PP1C isoform を一様に阻害した (Figure 11)。I-4 の阻害活性における PP1C isoform に対する特異性は見られないことから、I-4 は PP1C isoform 間でその構造が保存された部分に作用していると推測される。

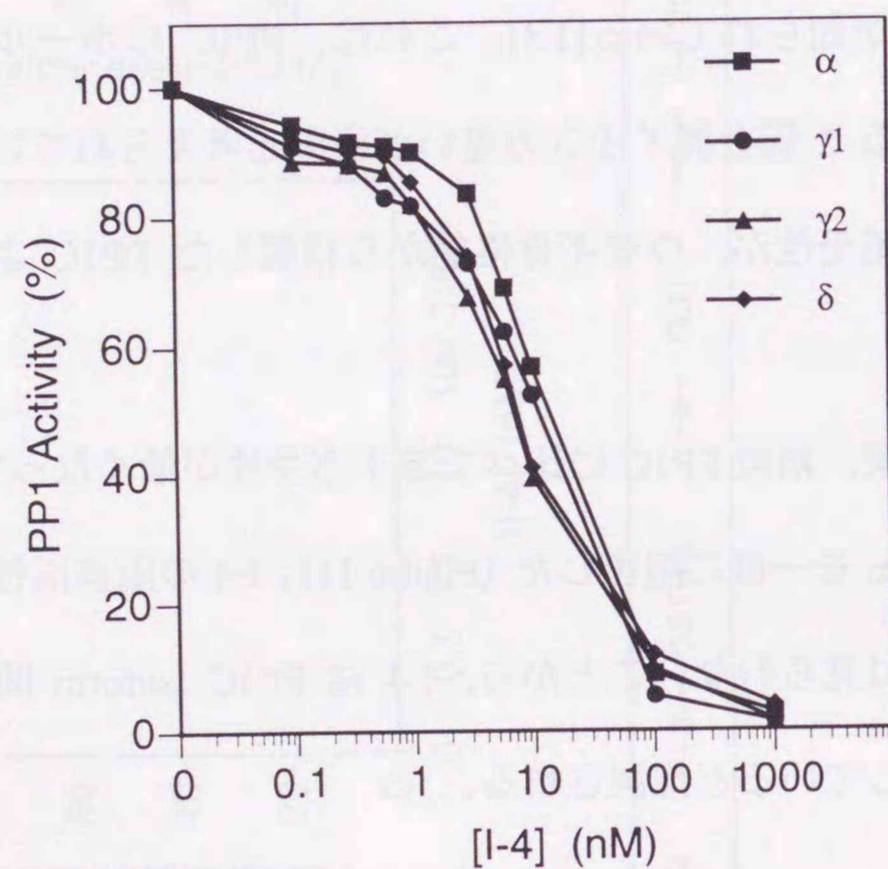


Figure 11. 各種 PP1C isoform に対する GST-I-4 による阻害効果

4 種類の recombinant PP1C isoform の活性は、 $10 \mu\text{M}$ [^{32}P]phosphorylase α を基質として用いて測定した。

3-3-4. PP1M に対する Inhibitor-4 の効果

PP1 ホロ酵素に対する I-4 の阻害活性を調べるために、PP1C δ と M-subunit からなるホロ酵素 PP1M を用いて、I-4 の阻害活性について検討した。PP1M は、ミオシン軽鎖ホスファターゼとして機能するので、その活性測定にはミオシン軽鎖 (MLC) を基質として使用した。

MLC を基質とした場合でも、PP1C に対して I-4 と I-2 は、各々 $\text{IC}_{50}=0.2 \text{ nM}$, $\text{IC}_{50}=1.0 \text{ nM}$ の阻害活性を示したが、両者ともホロ酵素 PP1M に対しては極めて弱い阻害活性しか示されなかった (Figure 12)。ところが PP1M と阻害タンパク質とを 4°C で最大 12 時間までプレインキュベーションすると、I-4 は PP1M に対し次第に強い阻害活性 ($\text{IC}_{50}=2 \text{ nM}$) を示すようになった。これに対し、I-2 は非常に弱い活性 ($\text{IC}_{50}=200 \text{ nM}$) しか示さなかった。

プレインキュベーション中に I-4 の PP1 への結合形態が変化する可能性を考え、pull-down 法により I-4 と PP1M との結合についての解析を行った (Figure 13)。インキュベーション時間にかかわらず、I-4 に結合した M-subunit (M110) は検出できなかったが、I-4 に対する PP1C δ の結合は経時的に増加していた。従って時間依存的に PP1C δ /I-4 のヘテロ二量体が生ずることが確認された。

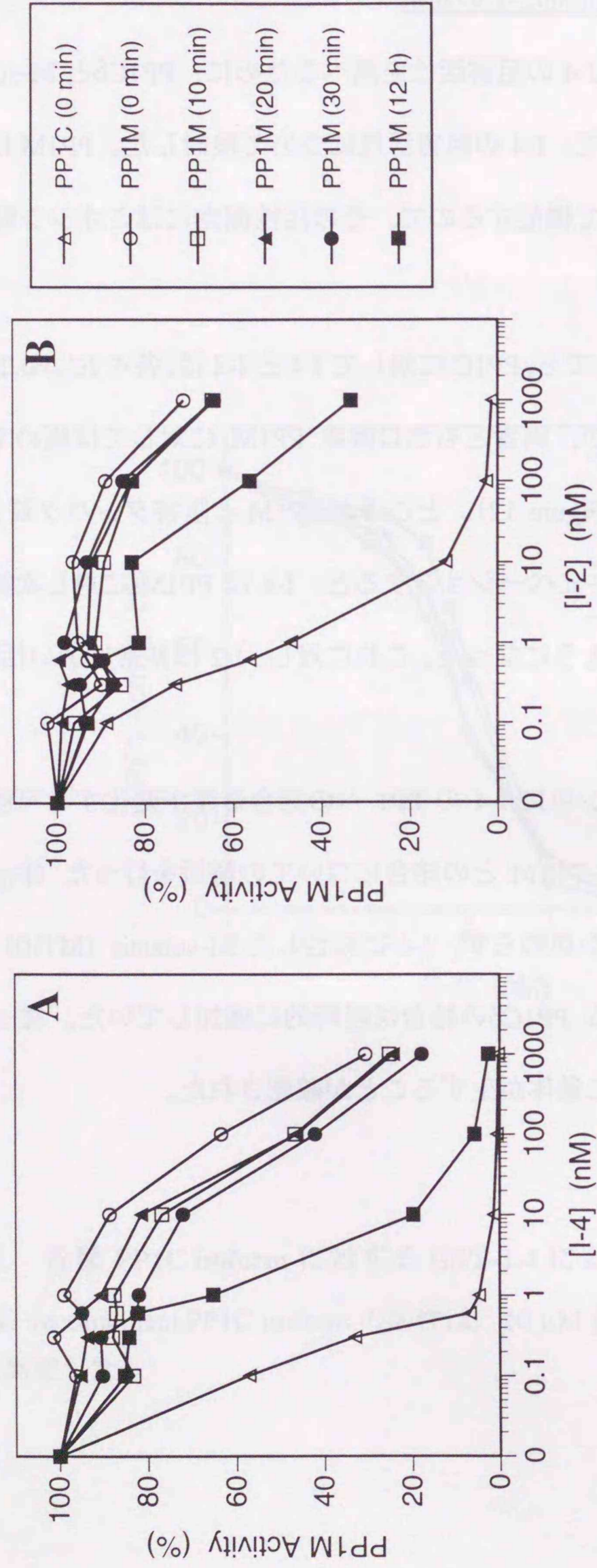


Figure 12. PP1M に対する GST-I-4 及び GST-I-2 の阻害効果

MLC ホスファターゼ活性測定は、1 μ M [32 P]MLC を基質として用い、各濃度の GST-I-4 (A) または GST-I-2 (B) の存在下で行った。図に示された時間 (0~30 min, 12 h), PP1M と GST-I-4 または GST-I-2 を 4°C でプレインキュベーションし、その後、基質を加え活性を測定した。

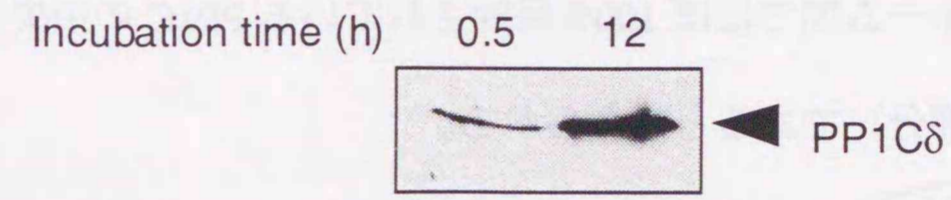


Figure 13. Pull-down 法による PP1M と GST-I-4 間の相互作用の解析

GST-I-4 と PP1M を混合後、4°C でインキュベーションした。Pull-down により回収したサンプルを 10% SDS-PAGE で分離し、anti-PP1C δ 抗体を用いた Western blotting により、結合タンパク質を検出した。

3-5. 考察

I-4 は、PP1 を特異的に阻害し、human I-2 の約 10 倍の阻害定数を示し、既知の I-2 関連遺伝子のなかで最も強力な阻害活性を示した。I-4 固有のアミノ酸配列が、その阻害活性の増強に関わっていると考えられる。I-4 にも認められた熱耐性は、2-3-2 での構造予測結果より推測されたように I-4 が特別な高次構造を持たないためであると推察される。

I-4 は、4 つの PP1C isoform をそれぞれ同様に阻害することから、I-4 の PP1C 阻害に参与する部位（結合部位や阻害部位）は PP1C isoform 間に共通した領域、すなわち、アイソフォーム間でほぼ 100% 保持されている PP1C の中央（N 末端と C 末端の一部を除いた部分）であると考えられる。

I-4 は、長時間インキュベーションすることによって PP1M に対しても比較的強い阻害活性を示し、I-4 と PP1C との結合量も経時的に増加した。この現象は、以下のように説明される。I-4 は、PP1M (PP1C/M-subunit) を効率よく阻害することはできないが、プレインキュベーションにより I-4 は PP1M と置き換わり、PP1C/I-4 の二量体を形成することにより、PP1C 活性を阻害する (Figure 14)。この考えが正しいとすると、I-4 と M-subunit は PP1C 上で結合部位を共有するか、または、互いが作用し得るほど近傍で PP1C に結合することが考えられる。I-4 には、M-subunit の PP1C 結合モチーフ KVKF は存在しないので、I-4 には未知の PP1C 結合モチーフが存在すると推定され、それが PP1C との結合を可能にし、M-subunit と拮抗することを可能としていると思われる。一方、PP1M を効果的に阻害できない I-2 は、M-subunit と容易に置換できるほどには PP1C に対する親和性が強くないと考えられる。従って、I-2 にはなく、I-4 に認められる結合モチーフが I-4 の強力な阻害活性の要因となって

いることが考えられた。

一方、I-4 への M-subunit の結合は検出限界以下であったため、PP1C δ /M-subunit/I-4 のヘテロ三量体の存在の可能性も否定できない。従って、プレインキュベーション依存的にヘテロ三量体が形成される可能性については、今後検討する必要がある。

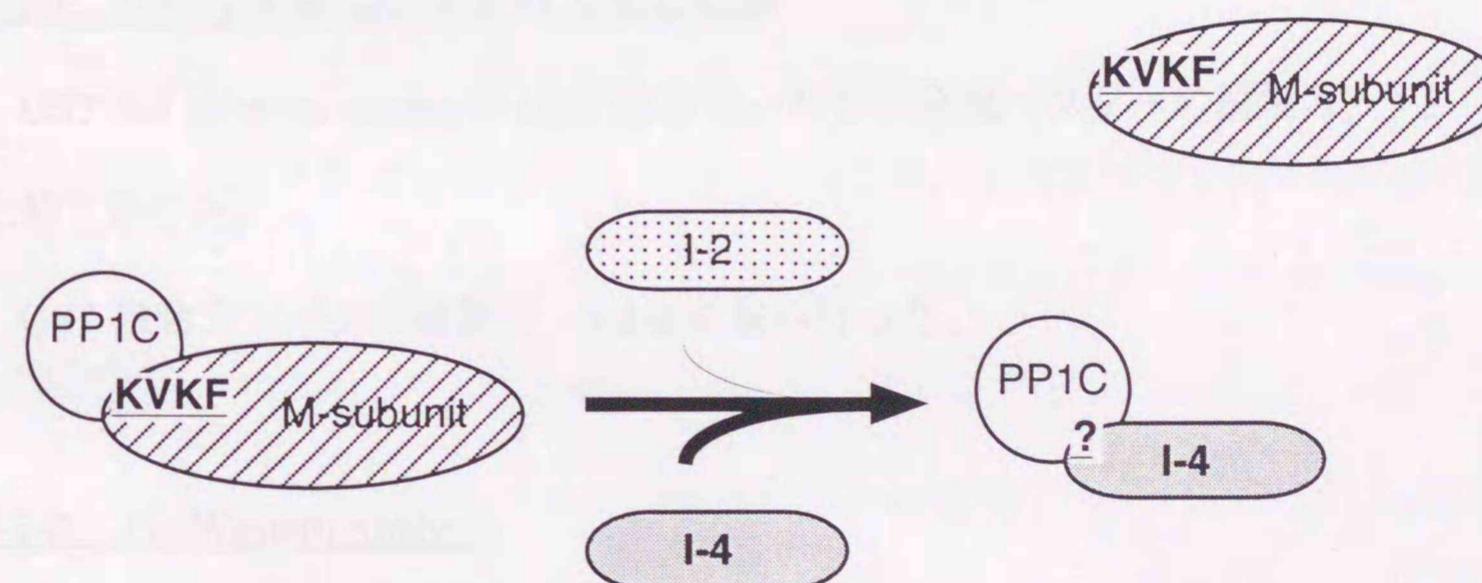


Figure 14. PP1M と I-4 間に予想される相互作用

3-6. まとめ

- ・ I-4 は, PP1 を特異的に強力に阻害し ($IC_{50}=0.2$ nM), 熱耐性タンパク質であった。
- ・ I-4 は, 4 種類の PP1C isoform を各々同程度に阻害した。
- ・ I-4 は, PP1M の MLC ホスファターゼ活性をインキュベーション時間依存的に阻害し, この時の PP1C/I-4 複合体の形成もインキュベーション時間依存的に増加していた。

第 4 章 Inhibitor-4 による PP1 阻害の分子機構

4-1. 目的

前章で, I-4 は I-2 よりも PP1 阻害活性および PP1 結合活性の両方が強いことが示された。その機構を明らかにすることを目的として, I-4 の mutant タンパク質を用いた検討を行った。

4-2. 材料と方法

4-2-1. GST-I-4 deletion mutant 発現と精製

GST-I-4 deletion mutant の GST 融合タンパクの発現ベクターの構築は, 3-2-1 にまとめて示した。

GST 融合タンパクの精製は, 3-2-2 に従った。

4-2-2. Far-Western Analysis

目的の GST 融合タンパク質各々 $1 \mu\text{g}$ を 12% SDS-PAGE で分離後, ニトロセルロースメンブラン (Hybond™-ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) にブロットした。転写したメンブランは, blocking-buffer (5% skim milk, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で, 室温 1 時間ブロッキングした後, TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で洗浄し, PP1C 溶液 ($0.1 \mu\text{g/mL}$ recombinant PP1C γ 1, 0.5 mM MnCl $_2$ in TBST) と 4°C , 4 時間インキュベートした。その後, TBST で 3 回洗浄し, anti-PP1C γ 1 抗体と 4°C , 一晩反応させ, 再び TBST で

3回洗浄した。次いで、2次抗体であるペルオキシダーゼ (HRP) 標識 anti-rabbit 抗体と室温で 15 分間反応させた後、TBST で 4 回洗浄した。バンドの検出は、ECL 化学発光法によって行った[66, 67]。

同一メンブランで GST 融合タンパク質の定量をするために、メンブランから PP1C γ 1 とその抗体の複合体を除去した。除去は、stripping-buffer (62.5 mM Tris-HCL, pH 6.7, 2% SDS, 0.07% 2-ME) で 2 回洗浄 (50°C, 30 min) することにより行った。その後は、再びブロッキングし、1次抗体として anti-GST 抗体、2次抗体に anti-rabbit HRP 抗体を用いて、バンドを検出した。

recombinant PP1C γ 1 は、Calbiochem (USA) より購入した。

4-2-3. PP1 の活性測定

PP1 のホスファターゼ活性測定は、3-2-4 と同様の方法で行った。

4-3. 結果

4-3-1. deletion mutant の構築

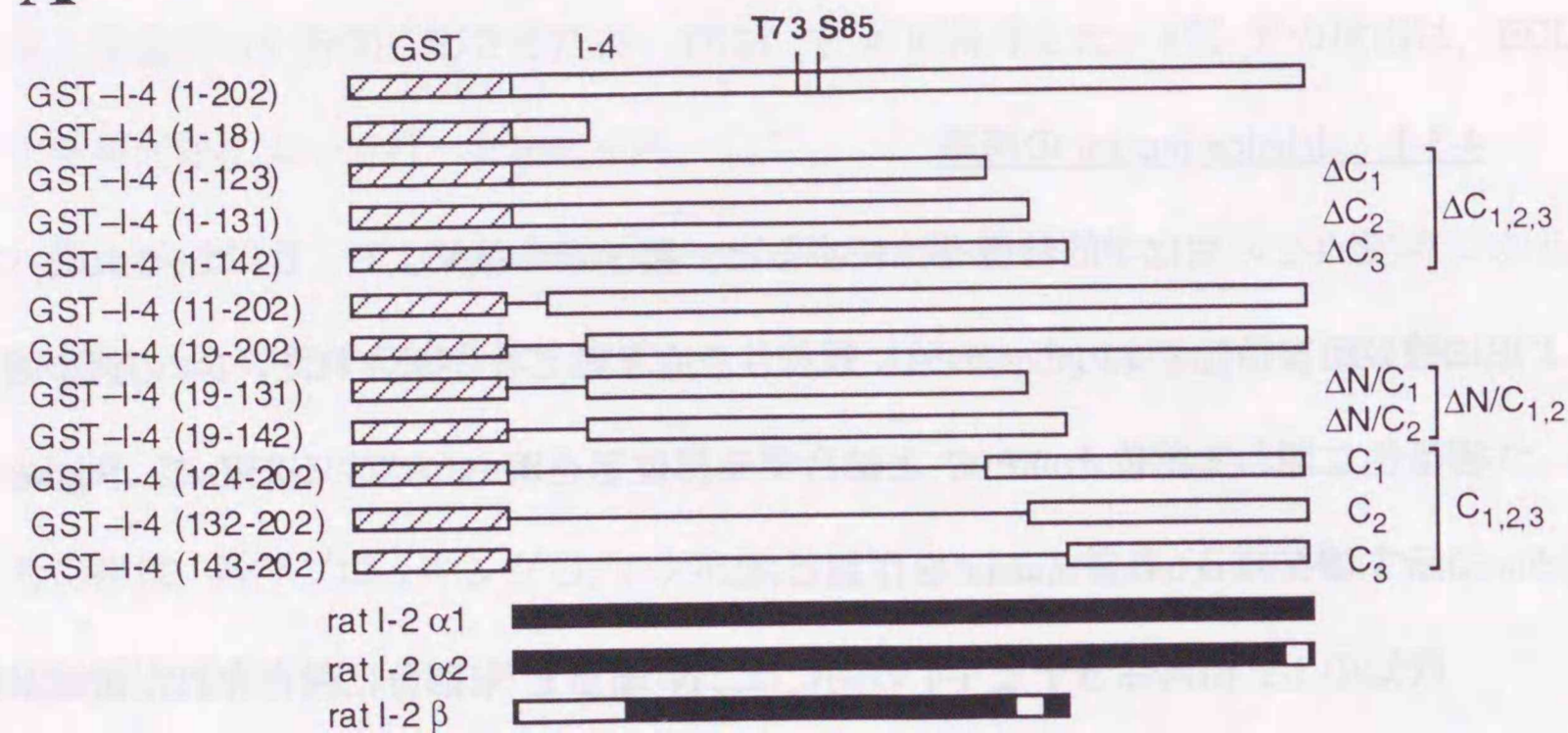
I-4 と I-2 の生化学的特徴を比較すると、第 3 章の結果より、I-4 は I-2 に比べ非常に強い阻害活性と PP1C への強い親和性を有することが示された。I-4 の持つ強い阻害活性に関わる部位と PP1C と結合する部位とを明らかにするために、Figure 15A に示す種々の deletion mutant を作製した。

既知の I-2 相同性分子と I-4 の間には、N 末と C 末部分に保存された領域が存在する。一方、rat I-2 β においては、N 端と C 端領域が欠損し、さらにその阻害活性 ($IC_{50}=1000$ nM) も他のアイソフォーム (rat I-2 α 1, rat I-2 α 2) に比べ著しく弱いことが、Osawa らによって報告されている[50]。

そこで、これら I-4 と相同性を有するタンパクに保存されている領域の機能を検討するために、I-4 相同性分子と rat I-2 isoform の構造を参考にして、N 末端のみ、N 末端領域の deletion、C 末端領域の deletion ($\Delta C_{1,2,3}$)、両方の deletion ($\Delta N/C_{1,2}$) および C 末端のみ ($C_{1,2,3}$) の一連の deletion mutant を GST 融合タンパクとして設計した。

この deletion mutant タンパクは、大腸菌に発現させた後精製し、SDS-PAGE を用いて、分子量を確認し、いずれもほぼ 95%以上の純度を持つことが明らかとなった (Figure 15B)。

A



B

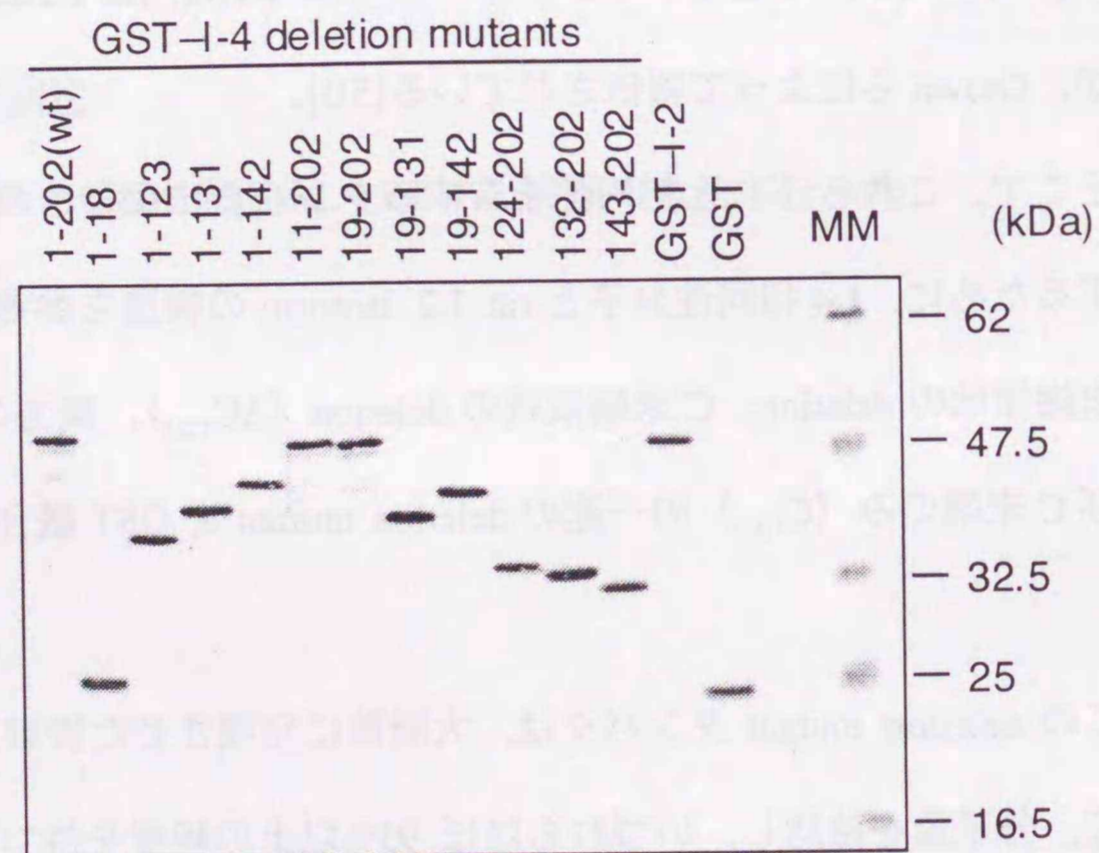


Figure 15. GST-I-4 deletion mutant の構成

A, rat I-2 と作成した GST-I-4 deletion mutant の構造を示した。rat I-2 における欠損領域は、白抜きで示した。B, 各々 0.5 μ g のタンパクを SDS-PAGE (12% acrylamide gel) により分離した。

4-3-2. PP1C に対する結合活性

種々の GST-I-4 deletion mutant を用いて、I-4 の PP1C に対する結合活性について検討した (Figure 16)。

Far-Western 法により、GST-I-4 に結合した PP1C γ 1 を anti-PP1C γ 1 抗体を用いて定量した。この条件では GST 自身には PP1C の結合が全く見られなかったもので、検出された PP1C はすべて目的タンパク質との結合により生じるものである (Figure 16A)。アプライしたサンプル量は、同一メンブランを anti-GST 抗体で定量することでそのアプライがほぼ一定であることも確認した (Figure 16C)。従って、結合量は、定量的な評価に耐え得るものと判断された。

この Far-Western から得られたデータを、1D Image Analysis Software (EASTMAN KODAK, USA) を用いて定量化した結果を Table VII に示した。

I-4 deletion mutant の PP1C に対する結合の強さは、以下のようにまとめられる。

$$I-4 = 11-202 > \Delta C_{1,2,3} > 1-18 > 19-202 \gg \Delta N/C_{1,2} > C_{1,2,3}$$

Figure 16A, B から、wild-type の I-4 と I-2 は強い結合を示した。I-4 deletion mutant において、1-18, $\Delta N/C_{1,2}$ (19-131, 19-142) および $C_{1,2,3}$ (124-202, 132-202, 143-202) の各々に結合を確認することができ (Figure 16A, B), I-4 は少なくとも 3 つの結合サイト (順に Site-1, Site-2, Site-3 とする) を持っていることが明らかとなった。Site-1 である 1-18 は、短いアミノ酸配列にもかかわらず wild-type の約 25% と比較的強い結合を示した (Table VII)。Site-2 [$\Delta N/C_{1,2}$ (19-131, 19-142)] も弱いながら結合を示した。 $C_{1,2,3}$ (124-202, 132-202, 143-202) に存在する Site-3 の結合は、Figure 16A では

検出できなかったが、ECL 発光の露光時間を延長することによって、その結合を検出することができた (Figure 16B)。この3つの結合サイトのうちで最も強い結合活性を示した Site-1 の領域を deletion した 19-202 では、wild-type に比べ結合能の大幅な減少が見られたのに対して、11-202 の mutant では wild-type と同程度の結合量を示すことから、Site-1 (1-18) の領域のなかでも特に 11-18 の領域が強い結合活性を有していることが明らかとなった (Figure 16A)。

また、Site-1 と Site-2 を含む $\Delta C_{1,2,3}$ (1-123, 1-131, 1-142) の PP1C 結合量は、Site-1、Site-2 と Site-3 を有する wild-type の結合量には及ばないことから、Site-3 はその結合力は小さいものの、wild-type I-4 の非常に強い結合には必要であることが示された。

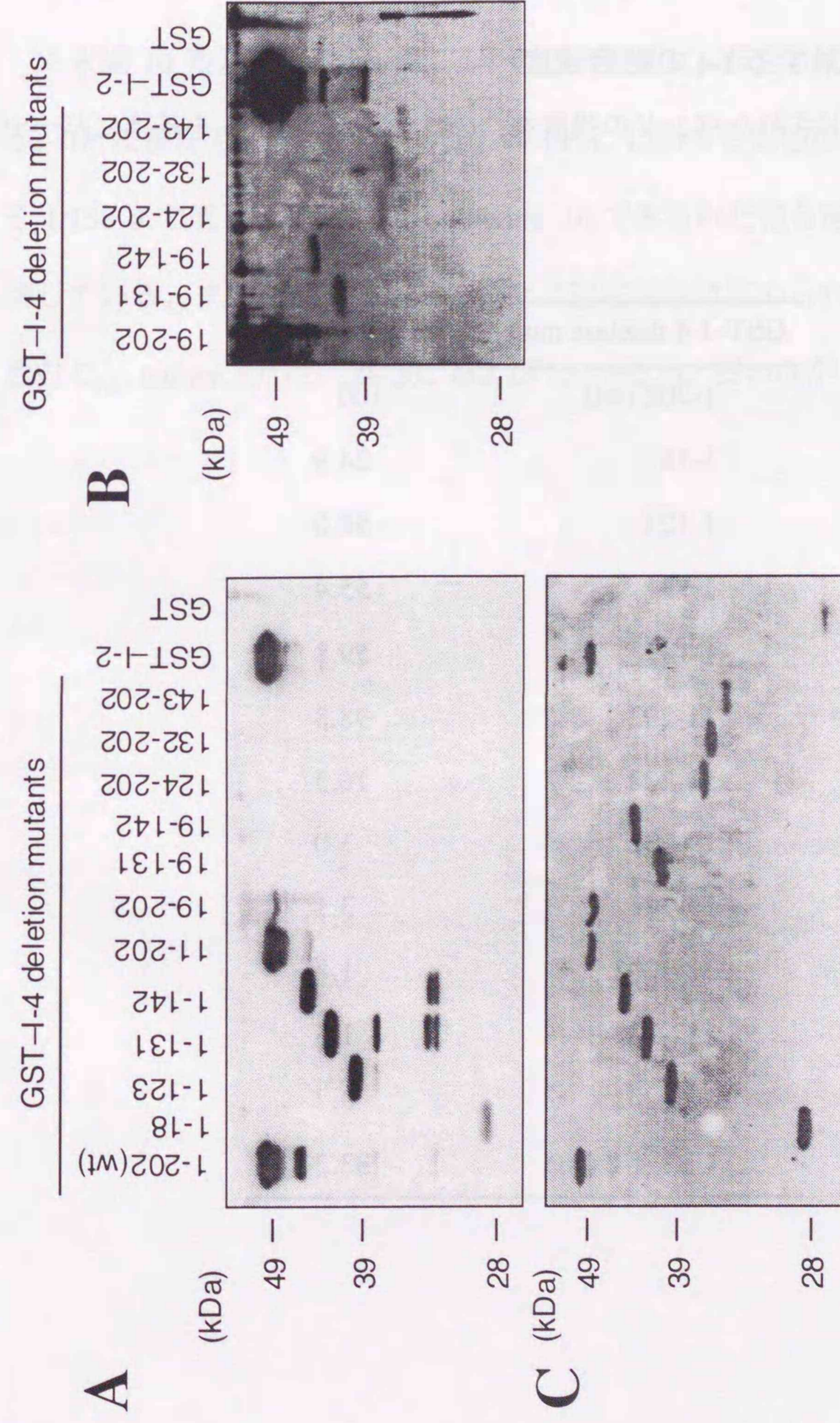


Figure 16. Far-Western 法による PP1C に対する GST-I-4 結合部位の解析

各タンパク質 (1 μ g) を SDS-PAGE (12% acrylamide gel) 分離後、ニトロセルロース膜に転写した。目的タンパク質に結合した PP1C γ 1 は、anti-PP1C γ 1 抗体を用いた Western blotting により検出した (A, B)。露光時間は、各々 30 s (A) と 20 min (B) である。PP1C γ 1 免疫複合体を除去し、anti-GST 抗体を使用して、ニトロセルロース膜上のタンパク量を定量した (C)。

Table VII. PP1 に対する I-4 の結合強度

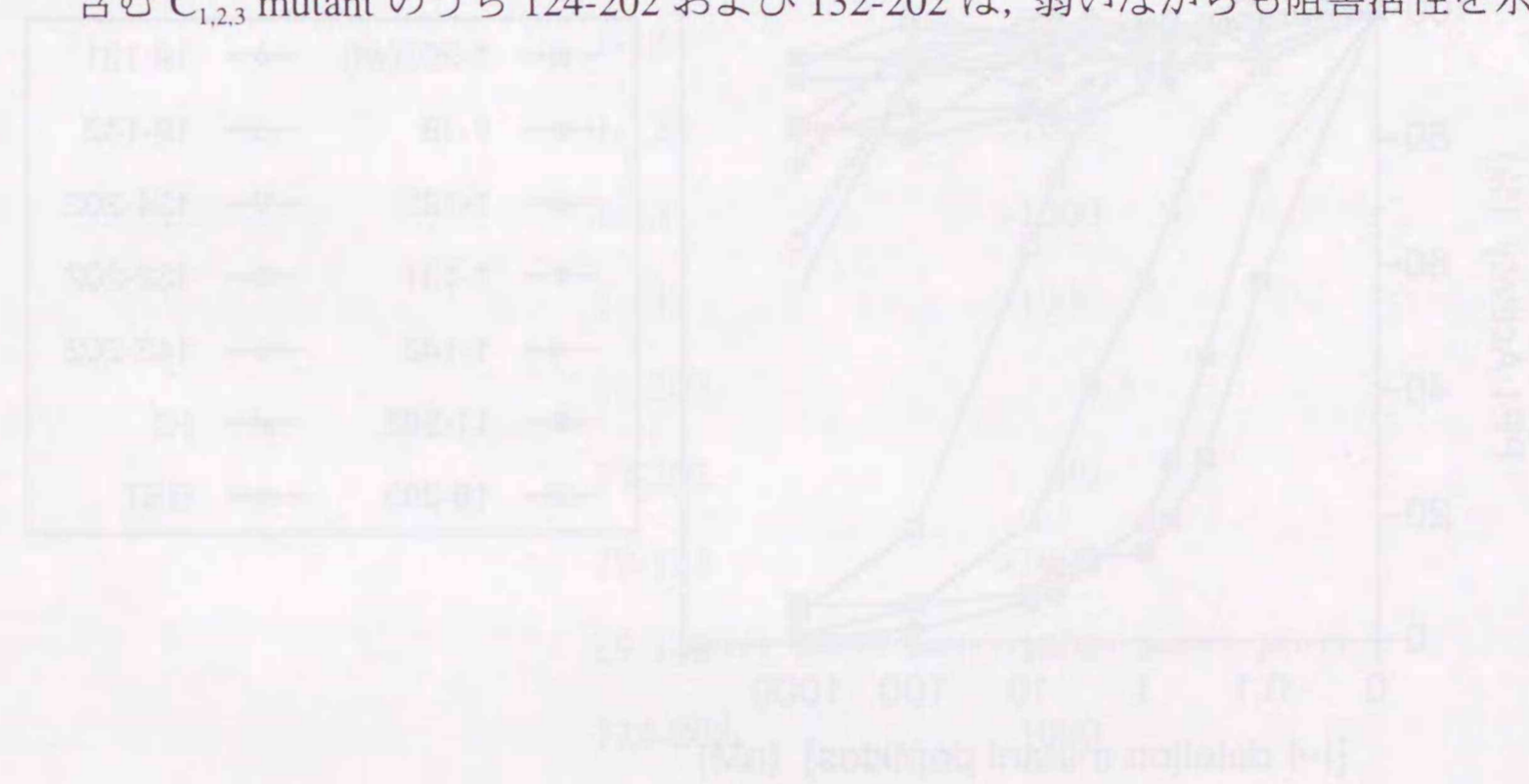
Far-Western で検出されたバンドの強度を, GST-I-4 (1-202)wt を基準にパーセントで表した。

GST-I-4 deletion mutants	Intensity (%)
1-202 (wt)	100
1-18	24.9
1-123	58.0
1-131	55.4
1-142	59.8
11-202	98.8
19-202	16.3
19-131	3.0
19-142	3.1
124-202	1.8
132-202	1.5
143-202	0.7
GST-I-2 (wt)	83.2

4-3-3. Inhibitor-4 deletion mutant の阻害活性

PP1C に対する deletion mutant の阻害活性について検討した (Figure 17, Table VIII)。

N 末端 10 残基の deletion は, I-4 の阻害活性に, ほとんど影響を及ぼさなかったが, 18 残基まで除去された 19-202 の PP1C に対する阻害活性は, wild-type のおよそ 1/150 まで低下した。これは, Figure 16 でみられた結合能の大幅な減少とよく相関している。また, $\Delta C_{1,2,3}$ や $\Delta N/C_{1,2}$ では阻害活性は認められなかったが, Site-3 を含む $C_{1,2,3}$ mutant のうち 124-202 および 132-202 は, 弱いながらも阻害活性を示した。



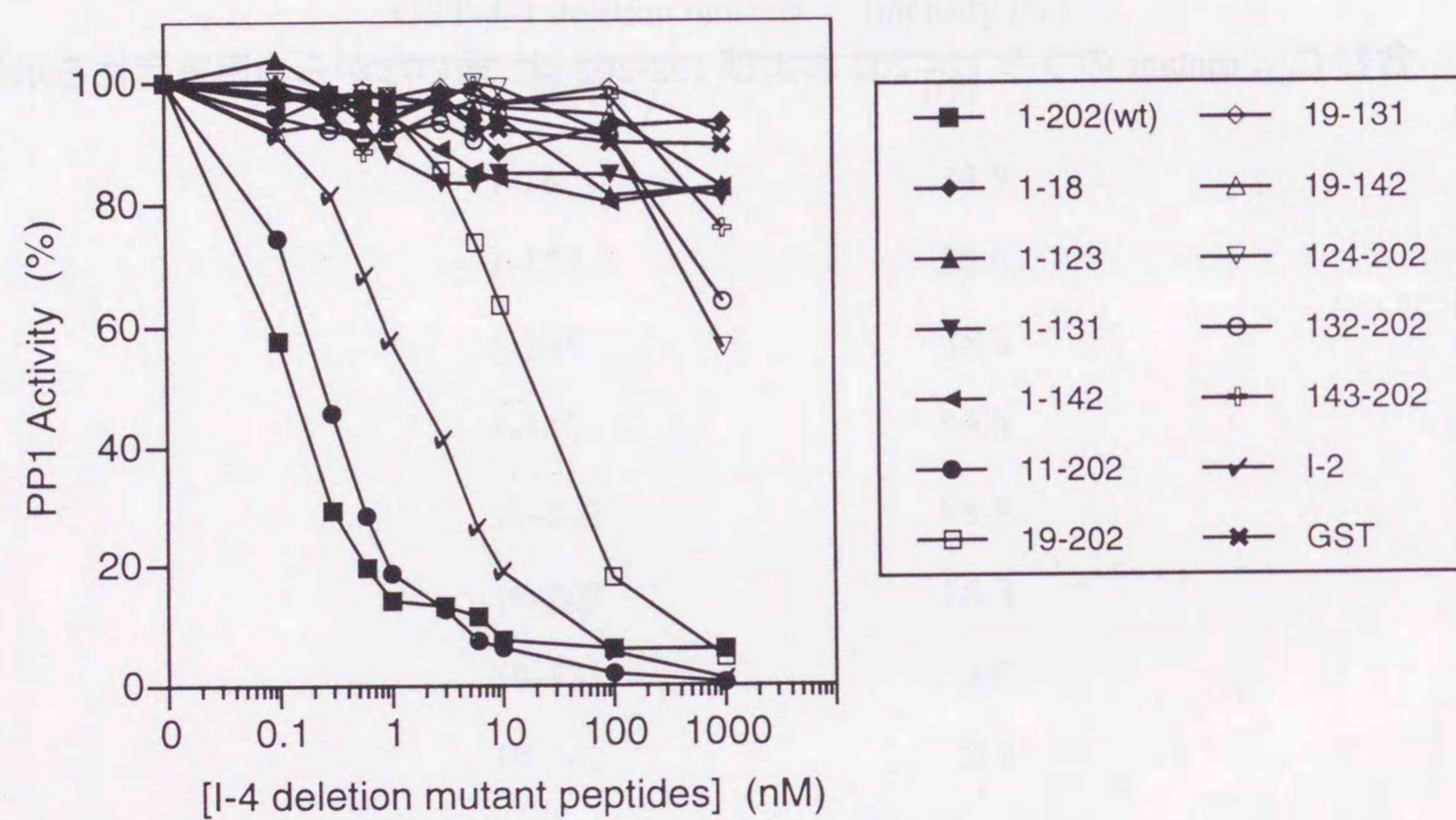


Figure 17. GST-I-4 およびその deletion mutant の PP1C に対する阻害活性

ホスファターゼ活性は、基質として $10 \mu\text{M}$ [^{32}P]phosphorylase *a* を用いて測定した。

Table VIII. GST-I-4 deletion mutant の PP1C に対する阻害活性

GST-I-4 deletion mutants	IC ₅₀ (nM)
1-202 (wt)	0.2
1-18	>1000
1-123	>1000
1-131	>1000
1-142	>1000
11-202	0.3
19-202	30
19-131	>1000
19-142	>1000
124-202	1000
132-202	1000
143-202	>1000
GST-I-2 (wt)	2.0

4-3-4. Competition Assay

4-3-2 と 4-3-3 の結果から、I-4 の deletion mutant には、結合能は有するが阻害活性を示さない種々の mutant (1-18, $\Delta C_{1,2,3}$, $\Delta N/C_{1,2}$, $C_{1,2,3}$) が存在することが明らかとなった。これらは、wild-type の I-4 に対して、dominant negative に作用する可能性がある。この可能性について実験を行った。

wild-type の I-4 (0.5 nM) と I-2 (10 nM) によって、あらかじめ約 80%程度まで活性を阻害した PP1 に対して、上記の mutant を competitor として様々な濃度で加え、wild-type の PP1 阻害活性を抑えるかどうかについて検討を行った (Figure 18)。

$\Delta C_{1,2}$ が抑制されていた PP1 活性を回復させ、wild-type の I-4 と I-2 に対して拮抗的に作用できることが明らかとなった。最も強い結合サイト 11-18 が存在する mutant (1-18) や $\Delta N/C_1$, $C_{1,2}$ には、拮抗作用は認められなかった。従って、 $\Delta C_{1,2}$ のみが、I-4 と I-2 の阻害に対して dominant negative に働くことが明らかとなった。注目すべきことは、I-4 に対する competition assay (A) と I-2 に対する competition assay (B) を比べると、ほぼ同量の competitor で阻害が回復していることである。阻害剤として I-2 は I-4 の 20 倍過剰に添加していることを考えると、この competitor ($\Delta C_{1,2}$) は、I-2 に対してより強力に拮抗することが示された。

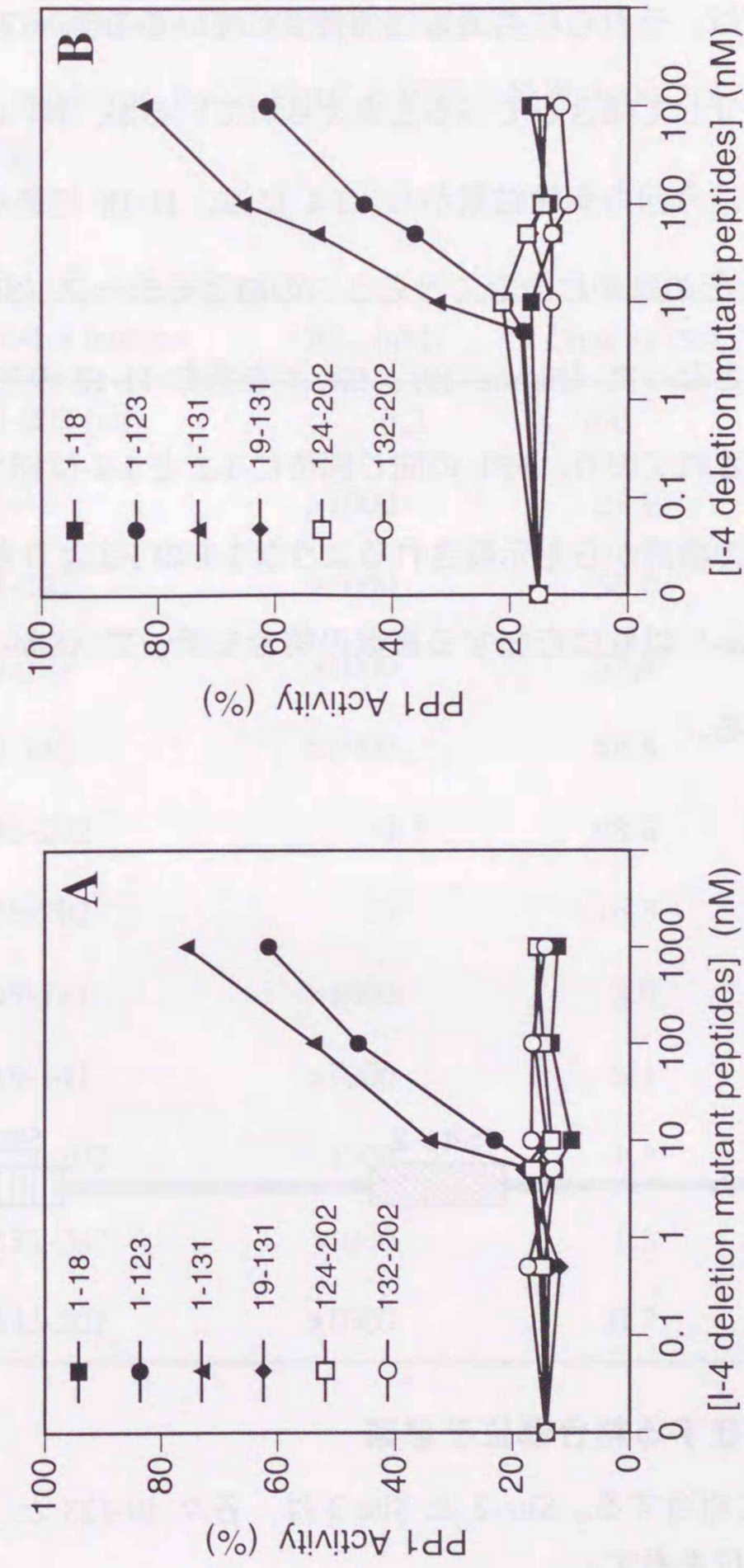


Figure 18. GST-I-4 deletion mutant による PP1C の competition assay

PP1C のホスファターゼ活性は、 $10 \mu\text{M}$ [^{32}P]phosphorylase *a* を用い測定した。PP1C と GST-I-4 (0.5 nM) または GST-I-2 (10 nM) 各々を混合した反応溶液に、示されるような濃度の GST-I-4 mutant を添加し、その PP1C 活性を測定した。

4-4. 考察

第5章で得られた結果を Table IX に示した。

PP1 結合タンパクは、それらに共通して保持されているモチーフ (R/K)(V/I)XF または (R/K)X(V/I)F を介して結合していると考えられているが、I-4 と I-2 にはこのモチーフは存在しない。今回の実験結果から、I-4 には、11-18 にある最も強い結合モチーフ (Site-1) と、そのほかに少なくとも2つの結合モチーフ (Site-2, Site-3) が存在することが明らかとなった (Figure 19)。Site-1 を含む 11-18 のアミノ酸配列は I-2 において完全に保存されており、PP1 の同じ部位に I-2 と I-4 は結合していると思われる。拮抗阻害などの検討からも示唆されるような I-4 の I-2 よりも強い PP1 への親和性は、むしろ、Site-1 以外に存在する複数の結合モチーフ (Site-2, Site-3) に起因していると考えられる。

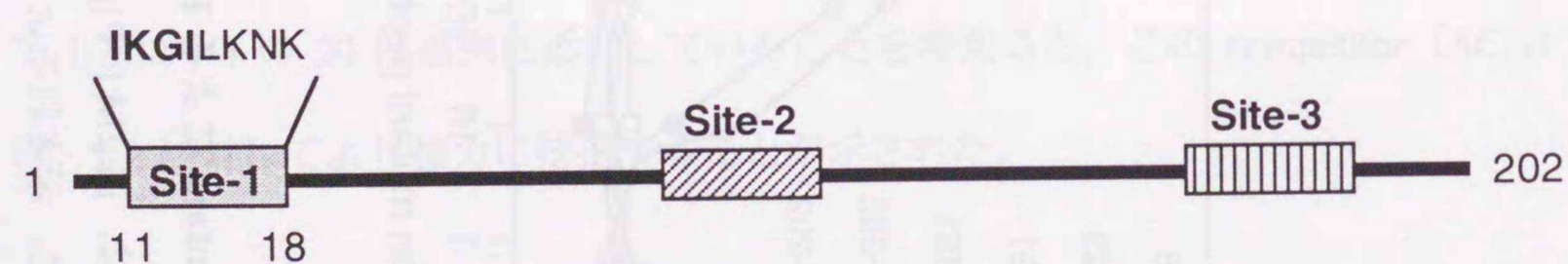


Figure 19. I-4 に存在する結合部位予想図

Site-1 は、11-18 に相当する。Site-2 と Site-3 は、各々 19-123 と 132-202 の間にあると思われる結合部位を表す。

Table IX. I-4 deletion mutant の解析結果

Binding は、wild-type I-4 の PP1C との結合量を 100% として表示した。n.d. は、not determined の略。

GST-I-4 mutants	IC ₅₀ (nM)	Binding (%)	Competition
1-202 (wt)	0.2	100	n.d.
1-18	>1000	24.9	-
1-123	>1000	58.0	+
1-131	>1000	55.4	+
1-142	>1000	59.8	n.d.
11-202	0.3	98.8	n.d.
19-202	30	16.3	n.d.
19-131	>1000	3.0	-
19-142	>1000	3.1	n.d.
124-202	1000	1.8	-
132-202	1000	1.5	-
143-202	>1000	0.7	n.d.

最近, Connor らは分裂酵母の PP1C homolog である GLC7 とその mutant (E53A/E55A または K165A/K166A/K167A) を用いて解析を行った[68]。GLC7 mutant は, そのホスファターゼ活性は wild-type と同程度であるが, I-2 の阻害活性を大幅に減少させることを見出し, これら 5 つのアミノ酸 (E53, E55, K165, K166, K167) が, I-2 と PP1C との相互作用に関わっていることを報告した。立体構造上これら 5 つのアミノ酸残基は, 互いに近傍に存在し, PP1C 上で I-2 結合領域 (I-2 domain) を形成していると考えられる。この I-2 domain は (R/K)(V/I)XF が結合する PP1 上の領域 (RVXF pocket) に隣接することも明らかとなった。さらに, I-2 の Site-1 に相当する部位を変異 (K11E/I13G) させると, wild-type の GLC7 に対する阻害活性も GLC7 mutant を用いた場合と同じ結果になることから, この N 端の I¹¹KGI¹⁴ が I-2 domain に結合することが示唆されている。

この IKGI は, I-2 相同性分子に広く保存されるモチーフで, I-4 においても, 強い結合活性を示す 11-18 中に存在していた。I-4 (1-123) と I-4 (1-131) が I-2 に対して拮抗的に作用することを考えると, I-4 の IKGI モチーフも PP1C の I-2 domain に結合すると考えられる。

I-4 において, Site-3 が存在する C 末領域の欠損によりその阻害活性が完全に消失すること, および Site-3 を含む C 末領域のみ (C_{1,2,3}) で弱いながらも阻害活性を持つことから, Site-3 が活性部位付近に結合することが考えられた。また, この結合は Site-1 と Site-2 のものに比べると弱いものであった。

最近, I-2 が PP1 を阻害するためには, PP1 の C 末端にある β 12- β 13 loop との相互作用も重要であることが報告された[69]。構造的に互いに類似する PP1 と PP2A の C 末端部分を入れ替えることによって, PP1C の β 12- β 13 loop を変異させると, PP1

と PP2A 共通の阻害物質である microcystin-LR 等の阻害活性には全く影響を与えずに, I-2 による阻害を

受けなくなることが明らかとなった。このことから, I-2 が PP1C を阻害するには β 12- β 13 loop との相互作用が必須であり, I-2 (1-134) が wild-type の I-2 と同等の阻害活性を示すのは, この 1-134 の領域のみで, I-2 domain と β 12- β 13 loop への作用が可能であるためと考えられる。I-4 が PP1C の β 12- β 13 loop に作用を及ぼし, それが I-4 の阻害活性に関わっているかどうかは現在のところわからないが, I-4 (1-131) が PP1 に対して阻害活性を持たないことは, この領域が β 12- β 13 loop に作用していないことを示し, I-4 が I-2 と異なる阻害形式をとっていることを示唆するものである。

以上の考察をふまえ, I-4 の PP1C に対する阻害機構のモデルを示した (Figure 20)。I-2 と同様に, Site-1 は PP1 上の E53, E55, K165, K166, K167 で形成されている I-2 domain に結合し, この結合は Site-2 によって, さらに安定化されることで強固な PP1C/I-4 複合体が形成される。一方, Site-3 は PP1C の活性部位または β 12- β 13 loop 付近に親和性を持ち, 結果として I-4 全体で活性部位を遮蔽するような阻害形式をとっていると考えられる。おそらく, I-4 の C 末領域が PP1 阻害に関与している点が, I-2 の場合とは大きく異っていると思われる。

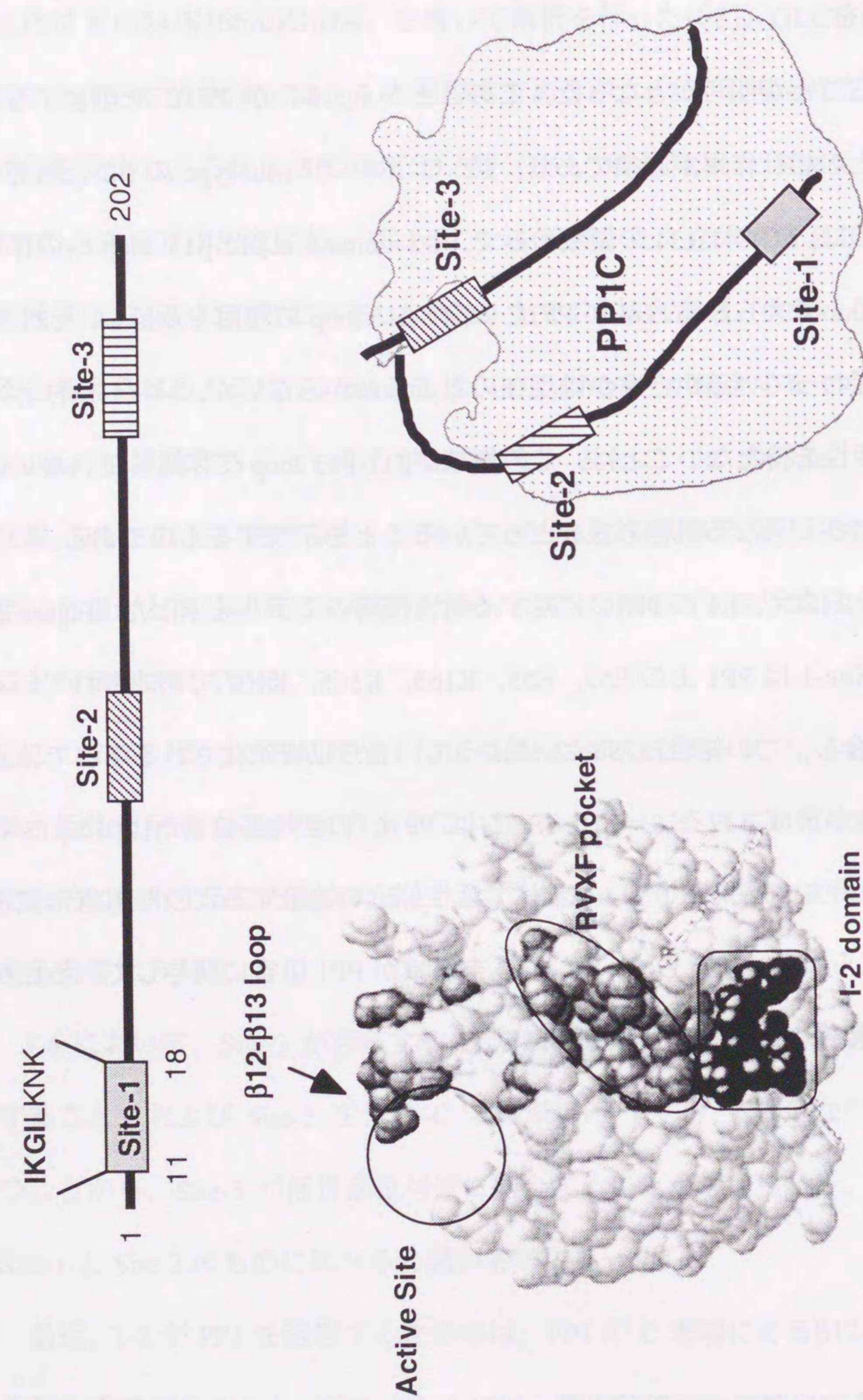


Figure 20. PP1C-I-4 間相互作用のモデル図

実験データと文献 (68) を元に作成。

4-5. まとめ

- ・ I-4 には、少なくとも 3 つの PP1C 結合サイト Site-1 (11-18), Site-2, Site-3 が存在した。
- ・ 最も強い結合サイトは、アミノ酸残基 11-18 に存在した。
- ・ Site-2 は、Site-1 と共に PP1C との安定した結合に機能することが明らかとなった。
- ・ Site-3 は、PP1 阻害に必須であることが明らかとなった。
- ・ $\Delta C_{1,2}$ は、wild-type の I-2 と I-4 の阻害に対して、拮抗的に働くことが示された。

第5章 Inhibitor-4 の発現と細胞内局在

5-1. 目的

I-4 の生理機能を解析するために、組織分布と細胞内局在について検討した。

5-2. 材料と方法

5-2-1. 細胞培養

使用した細胞株は、10% fetal calf serum (FCS ; INTERGEN, USA) を含む DMEM (SIGMA-Aldrich, USA) もしくは RPMI1640 (GIBCO BRL, USA) に 0.04 mg/mL 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓, 東京) と 100 unit/mL ペニシリン G カリウム (明治製菓, 東京) を加えた培地で、37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。付着細胞の場合は、0.1% trypsin/EDTA を用いて回収し、継代した。

NCCIT (human germ tumor cell line) [70]は、坂本裕美博士 (国立がんセンター研究所, 東京) より、恵与された。

5-2-2. RNA 調製

total RNA は、AGPC 法に従い調製した[71]。

培養回収した細胞ペレット 2.0×10^7 につき Sol.D (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citric acid, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-ME) 500 μ L 加え、2 M 酢酸ナトリウム、水飽和フェノール、CIA (chloroform : iso-amylalcohol = 49 : 1) を Sol.D の各々 1/10, 1, 1/5 量添加した。良く攪拌し on-ice で 15 分間放置後、遠心分離した (15000 rpm, 20 min,

4°C)。得られた上清を慎重に単離し、等量のイソプロパノールを加えた後、-20°C で 1 時間放置した。遠心 (15000 rpm, 20 min, 4°C) で得られたペレットを、再度 Sol.D 300 μ L に溶かし、等量のイソプロパノールを加え-20°C で 1 時間放置後、遠心 (15000 rpm, 10 min, 4°C) した。得られたペレットは、75% エタノールで洗浄、乾燥させた後に、適量の DEPC 処理滅菌水 (DEPC-H₂O) に溶解した。吸光度から濃度を測定し、これを total RNA サンプルとした。サンプルの純度の確認は、電気泳動分離により行った。

5-2-3. RT-PCR

逆転写 (RT) による first strand cDNA 合成には、SuperScript™ RNase⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL, USA) を使用した。

total RNA 5 μ g に oligo (dT)プライマー 500 ng を加え (全量 12 μ L), 70°C で 10 分間インキュベーションした後、on-ice で急冷した。この混合溶液に、RTase 以外の添付試薬を加え、42°C で 2 分間インキュベーションした後に、RTase 1 μ L (200 unit) を添加し (全量 20 μ L) 42°C で 50 分間反応させた。熱処理 (70°C, 15 min) により反応を停止させ、first strand cDNA サンプルとした。また、逆転写酵素の代わりに水を添加したサンプルをコントロール (without RT) として作成した。

PCR は、RT 産物 (first strand cDNA) 及び without RT 産物 0.5 μ L をテンプレートとし、5' AACAAAAGCTCGTCGGGTTTC3' と 5' AGAGGAGCTTCCTCTGATTC3' のプライマーセットを用いて PCR (reaction mixture 25 μ L; 94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 2 min; 25 cycle) を行った。

5-2-4. Southern blotting

前述した RT-PCR 産物 10 μ L を 1.2% アガロースゲルで電気泳動した後、ゲルを変性溶液 (0.2 M NaOH, 0.6 M NaCl) にて変性 (20 min, 2 times) させ、次いで中和溶液 (0.2 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.6 M NaCl) で 30 分、2 回振盪することで中和した。最後に、10 \times SSC (166.5 mM NaCl, 166.5 mM sodium citrate, pH 7.0) で 20 分間振盪することによって、ゲルを平衡化させた後、ニトロセルロース膜 (BA 85, Schleicher & Schuell, Germany) にブロットし、UV クロスリンカー (Stratagene, USA) による UV 照射で固定化した。

作製したニトロセルロース膜を hybridization-buffer (50% formamide, 1 \times Denhardt's solution, 50 mM NaHPO₄, pH 6.5, 1% glycine, 5 \times SSC, 0.1 mg/mL boiled salmon sperm DNA) を用いて 42°C, 2 時間 prehybridization した。

プローブには、I-4 全長の約 600 bp を用いた。Mega Prime DNA Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) を用いて、[α -³²P]-CTP (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) により標識した。

5 分間煮沸, on-ice で急冷したプローブを、適量の hybridization-buffer に加え、prehybridization 済みのニトロセルロース膜と 42°C で一晩インキュベーションした。

次いでニトロセルロース膜は、1 次洗浄 (2 \times SSC, 0.1% SDS, r.t., 5 min) を 2 回繰り返り、2 次洗浄 (0.5 \times SSC, 0.1% SDS, 50°C, 15 min), 3 次洗浄 (0.2 \times SSC, 0.1% SDS, 50°C, 15 min), 4 次洗浄 (0.1 \times SSC, 0.1% SDS, 50°C, 15 min) の順で処理した。

検出は、ニトロセルロース膜をラップで包み BAS IIIIS イメージングプレート (富士フイルム, 東京) に感光させ、BAS 1000 (富士フイルム, 東京) により、解析した。さらに、autoradiography は X-ray フィルム (Eastman Kodac, USA) を使用して -80°C

下で行った。

5-2-5. 細胞発現用ベクターの構築

2-1 で作成した GST-I-4 プラスミドを *Eco*RI で消化し、アガロース電気泳動により回収、精製した *Eco*RI サイトを持つ I-4 DNA 断片を、発現ベクター pFLAG-CMV-2 Expression Vector (SIGMA-Aldrich, USA) に組み込んだ。作成したベクターの塩基配列は、sequencer により確認した。

5-2-6. Transfection

培養細胞への transient transfection は、FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Switzerland) を用いて、この添付プロトコールに従って行った。

5-2-7. 免疫染色

オートクレーブ滅菌済みのカバーグラスをシャーレ (33 mm) に入れ、VITROGEN 100 (COLLAGEN, USA) で 37°C, 一晩インキュベートすることによって、コーティングした。カバーグラスを PBS で 3 回洗浄した。このカバーグラスを入れたシャーレに 4.0 \times 10⁴ の Hela 細胞を加え、DMEM-10% FCS 培地で 24 時間培養した後、3 種類の pFLAG-I-4 プラスミドを各々トランスフェクションした。36 時間後、最終濃度 10% のホルマリンによって細胞を固定化した (r.t., 10 min)。PBS で 3 回洗浄後、カバーグラスを新しいシャーレに移し、0.25% Triton X-100 を添加、室温で 10 分間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、3% BSA/PBS でブロッキングした (37°C, 120 min)。カバーグラスを新しいシャーレに移し、1 次抗体溶液 (0.1 μ g/mL anti-FLAG

antibody M2, 3% BSA in PBS) を添加し, 4°Cで一晩インキュベートした。PBS で3回洗浄後, 2次抗体溶液 (2.5 µg/mL anti-mouse FITC antibody, 3% BSA in PBS) と 37°C 遮光条件下 20 分間インキュベートした。PBS で3回洗浄後, PI (SIGMA-Aldrich, USA) の PBS 溶液で室温 3 分間インキュベートし, 核を染色した。その後, 4°C 遮光条件下, PBS で十分に洗浄した。カバーガラスは, 90% glycerol/PBS を流し込みスライドグラスにマニキュアで封入した後に, 蛍光顕微鏡を使用してその発光を観察した。

mouse anti-FLAG antibody M2 は Eastman Kodak (USA), donkey anti-mouse FITC antibody は Jackson Immuno Research (USA) より購入した。

5-3. 結果

5-3-1. Inhibitor-4 mRNA の発現

I-4 mRNA の発現は, はじめ Human Multiple Tissue Membrane (CLONTECH, USA) を用いて Northern blot 法により解析したが, その発現は検出感度以下であった。そこで, 数種類のヒト由来の培養細胞から RNA を抽出し, RT-PCR 産物を用いた Southern blot 法により, I-4 mRNA の検出を試みた (Figure 21)。

I-4 cDNA の全長 600 bp に相当するバンドが, HeLa 細胞で強く見られた。また, 非常に弱いシグナルではあるが HepG2 や Y79, T98G, NCCIT にも認められた。しかし, K562, Jurkat, HL-60 にはまったく発現は見られなかった。

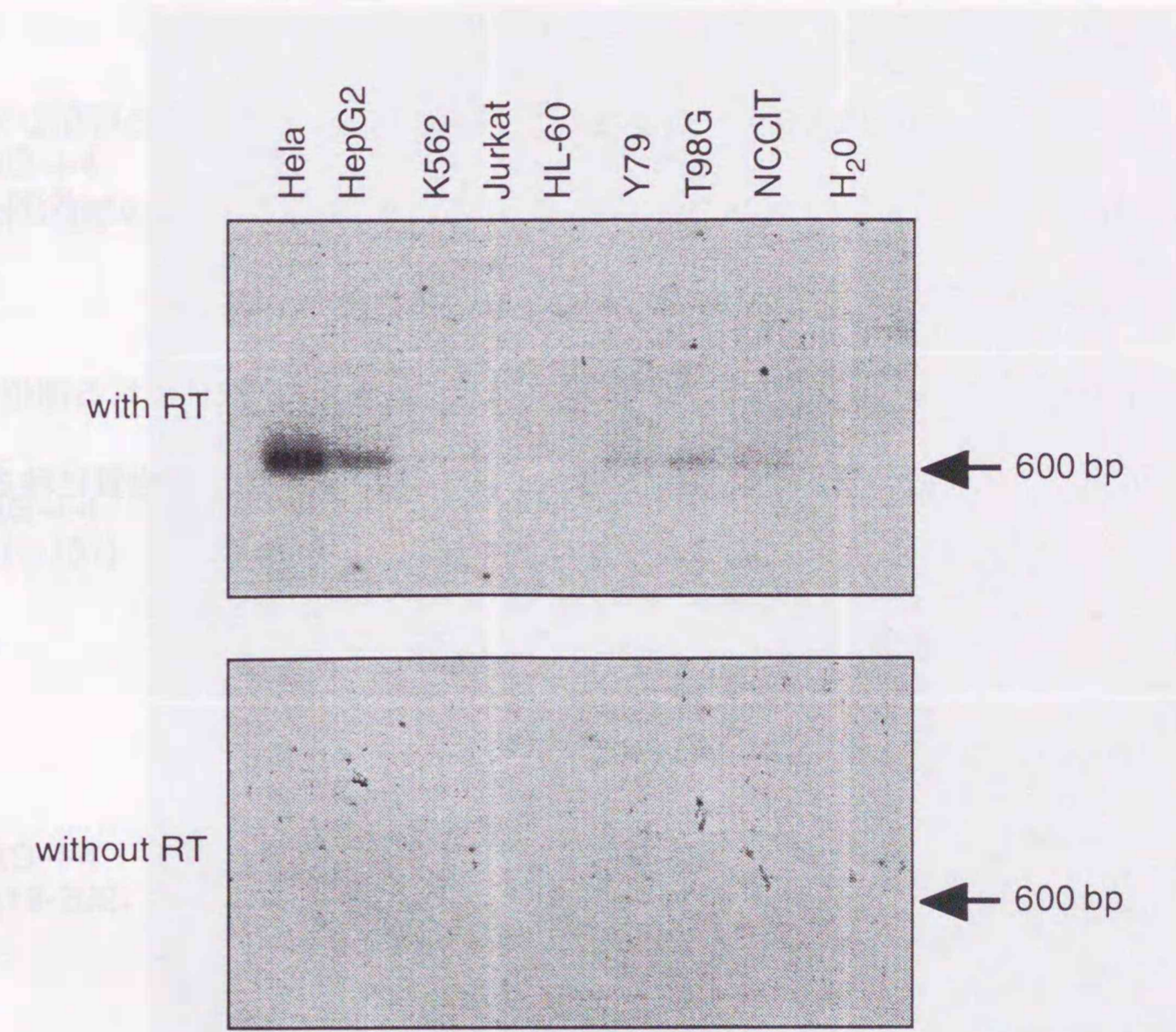


Figure 21. RT-PCR Southern blotting による I-4mRNA の検出

DNase I 処理を施し精製した各培養細胞の total RNA を使用した。逆転写酵素を加えたもの (上段) と逆転写酵素を加えなかったもの (下段) をテンプレートに PCR を行い, Southern blotting により検出した。

5-3-2. Inhibitor-4 の細胞内での局在

I-4 の細胞内局在を調べるために、Hela 細胞に pFLAG-tag を付加した I-4 を一過性に強制発現し、anti-pFLAG 抗体を用いた免疫染色法により、その局在を蛍光顕微鏡で観察した。核の染色には、PI を使用した (Figure 22)。

wild-type である pFLAG-I-4 (1-202) は、核付近もしくは核膜に局在していると考えられる。I-4 mutant である pFLAG-I-4 (1-131) と pFLAG-I-4 (19-202) は、両者とも細胞質に存在し、核内での存在は認められなかった。

I-4 の細胞内局在は、その全長から PP1C 結合モチーフと推定される部位を deletion (19-202)、または C 末を deletion する (1-131) と、核膜から細胞質に移ることが明らかとなった。

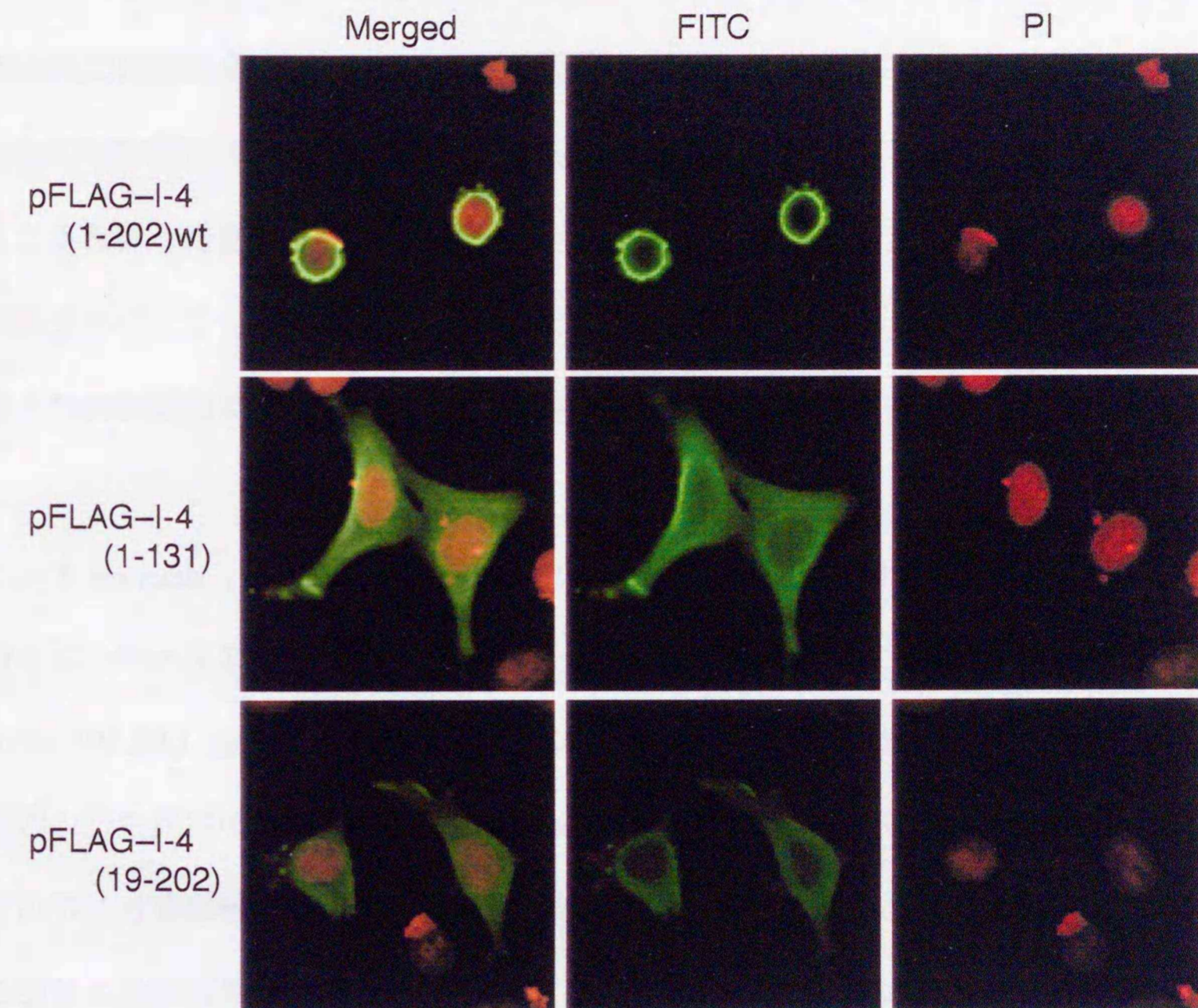


Figure 22. pFLAG-tagged I-4 の細胞内局在

pFLAG-tagged I-4 を一過性トランスフェクションした HeLa 細胞を、36 時間後に固定化、免疫染色法により、発色させた。1 次抗体に mouse anti-FLAG 抗体、2 次抗体に anti-mouse FITC 抗体を用いた。核は、PI で染色した。

5-3. 考察

I-4 mRNA の発現量は、RT-PCR によってのみ確認される程度であり、それほど高いものではないと考えられる。ヒト正常組織の RNA を用いての RT-PCR はまだ行っていないが、cell line の RNA を用いて調べた限りにおいて、一部の細胞に mRNA の発現が見られた。I-4 の発現が子宮頸癌、肝細胞癌、神経芽細胞腫、奇形腫由来の cell line に認められたことから、I-4 がガン細胞に特異的に発現する遺伝子であることも考えられる。または、cell line 化することに伴い I-4 が発現するようになった可能性も考えられる。将来的には、正常組織の RNA を含め、より広範な組織における発現を調べる必要があると思われる。

I-4 の細胞内局在も I-2 とは異なり、核膜または核近傍に存在し、deletion することでその局在を失うことは、I-4 の生理機能を研究する上で、重要なキーポイントになると期待される。興味深いことに最近、A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) の 1 つである AKAP149 が PP1 と結合すること、およびその細胞内局在が核膜付近に局限していることが明らかとなった[72]。AKAP149 は、PP1 結合モチーフ有し、このモチーフを介して PP1 と結合することによって、PP1C を核ラミナ付近に凝集させることが報告されている。AKAP149/PP1 と I-4 の細胞内における局在が一致することから、I-4 が AKAP149/PP1 ホロ酵素と結合し、制御する可能性がある。以前から、PP1 が核膜のアセンブリーに関与するデータが示されてきたが、この制御に I-4 が関与する可能性があり、この点を明らかにしていきたいと考えている。

5-4. まとめ

- ・ I-4 mRNA の発現は、子宮頸癌、肝細胞癌、神経芽細胞腫、奇形腫由来の細胞株に見られた。
- ・ 細胞内の局在において、I-4 は核膜付近に局限していることが明らかとなった。
- ・ I-4 の PP1 結合サイトや C 末端領域を deletion させると、その細胞内局在は細胞質へ移動した。

第6章 総括と展望

本論文では、EST データベースより見出した新規 PP1 阻害タンパク質 I-4 の分子特性を明らかにすることを目的として、human I-4 のクローニング・生化学的性状解析・遺伝子発現についての検討を行い、その PP1 に対する阻害機構や生理機能についての考察を行った。

human I-4 は 202 のアミノ酸残基からなり、アミノ酸レベルで PP1 阻害タンパク質 I-2 に対し約 43.7% の相同性を持っていた。I-4 は PP1 を特異的に阻害し、その阻害活性 ($IC_{50}=0.2$ nM) は、I-2 の約 10 倍強かった。PP1 触媒サブユニットの isoform (α , $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ) を同等に阻害し、PP1C の特定アイソフォームに対する特異性の違いは認められなかった。また、PP1 のホロ酵素の 1 つである PP1M (PP1C と M-subunit の複合体) に対しても、I-4 は PP1M とプレインキュベーションすることにより、PP1M の活性を強く阻害することができた。このとき、GST-I-4 に結合している PP1C の量がプレインキュベーションの時間依存的に増加していたことから、I-4 が M-subunit と拮抗的に PP1C と結合することによって、PP1M の阻害をすることが示された。

I-4 deletion mutant を用いた実験によって、PP1C に対する I-4 の結合サイトは、少なくとも 3 カ所、Site-1 (11-18)、Site-2、Site-3 に存在した。各種 deletion mutant を用いた実験により、I-4 による PP1 の阻害は、Site-1 と Site-2 による PP1C/I-4 の安定した複合体形成に加え、Site-3 による活性部位への直接的な作用によって可能になると考えられた。

I-4 mRNA の発現は、Hela 細胞等のガン由来の細胞株において認められた。以前、okadaic acid を用いた研究などからホスファターゼ (主に、PP1 と PP2A) が、がん抑

制遺伝子として働く可能性が示唆された。このことを考えると、ホスファターゼ阻害剤は、がん遺伝子様に働くことが予想され、さらに多くのヒト組織やガン細胞について、この発現を検討する必要があると考える。

I-4 の細胞内局在について、FLAG-tag を付けた wild-type I-4 が、核膜に局在することが明らかとなった。一方、2 つの deletion mutant (1-131, 19-202) では、その局在を失ったことから、deletion させた PP1C 結合サイトと PP1C との結合が、I-4 の核膜への局在に関与することが考えられた。

本研究で行った以上の解析によって、I-4 の生化学的性状、阻害機構を明らかにすることができ、さらに I-4 の遺伝子発現は、その生理機能を考える上で非常に興味深い情報を得ることができた。I-4 の生理機能については、今後さらなる検討が必要であり、その解析結果によっては PP1 の新しい機能を見出せるかもしれない。

I-4 の阻害機構をより詳細に明らかにするためには、PP1C/I-4 複合体の 3 次元構造解析が最も有効であると考えられる。現在、構造解析は、主に X 線解析法と NMR 解析法によって行われている。X 線解析はサンプルの結晶化の難しさ、NMR 解析は分子量 25000 程度までの分子に対してしか適応できないなど、各々難解な問題を抱えている。しかし、PP1C/I-4 は強固な複合体であると考えられ、結晶化も可能であると思われる。また、NMR 解析技術は最近目覚ましい進歩を遂げており、PP1C/I-4 の分子量まで解析可能になるのも時間の問題と思われる。将来的に、PP1C/I-4 複合体の構造解析がなされれば、これまで推定でしかなかった I-2 の阻害機構についても、多大な情報を与えるものと考えられる。

I-4 は、GSK-3 および CKII によるリン酸化サイトが存在する。外からの刺激により、これらのリン酸化を介して PP1 活性を調節していると考えられることから、これら可逆的リン酸化についての検討をする必要があると思われる。

I-2 は、S 期で mRNA とタンパクレベルの両方で上昇することや PP1C のシャペロンであることが提唱されているが、その詳細は分かっていない。I-4 deletion mutant (I-123 や I-131) は、I-2 と拮抗することができる dominant negative form であることから、これを細胞に強制発現することで、これまで I-2 の関与が考えられていた細胞周期や PP1C のシャペロン等の機能にどのような効果を及ぼすのか興味深い。この dominant negative form が、I-2 や I-4 自身の機能解析の新しい手段として使用できると考えている。

PP1 の阻害物質には microcystin-LR[73]や tautomycin[74]など数種類のものが知られているが、それらはすべて PP1 と同時に PP2A をも阻害する。そのために、これらの化合物添加によって引き起こされるアポトーシスや発がん誘導が、PP1 の阻害に起因しているのか、それとも PP2A を含む他のホスファターゼによるのかを判断することは、これまで不可能とされてきた。一方、PP1 特異的阻害タンパク質を用いた研究では、I-1 がリン酸化されることによって阻害活性を発揮するために、細胞内に強制発現させても PP1 を完全に阻害することが困難であった。一方、I-2 は PP1 ホロ酵素に対する阻害作用が弱いこと等の問題があった。今回の実験から、I-4 を細胞内に強制発現させることで、PP1 触媒サブユニットおよび PP1 ホロ酵素を効率よく阻害することができると考えられ、その結果現れるフェノタイプを解析することによって、PP1 の細胞内機能の一端を明らかにできると思われる。

生体内では PP1C は単独では存在せず、制御サブユニットによって局在、基質特異

性を規定され、通常ホロ酵素として存在する。しかし、一般に PP1 の阻害タンパクは、PP1 ホロ酵素に対して阻害活性が弱いとされており、その生理的意義に対する疑問があった。しかし、この謎の一部が明らかになってきたように思われる。例えば、最近発見された CPI-17 は、PP1C に対してより、むしろミオシン軽鎖ホスファターゼ (PP1M, PP1C と M-subunit からなるホロ酵素) を特異的に阻害することが明らかにされ、また最近、I-2 がグリコーゲン結合型 PP1 (PP1G) に PP1C を介して結合し、3 量体を形成していることが報告された。今回、我々は、I-4 が特異的に核膜に局在することを見出したが、この局在は、核膜形成に働く PP1 ホロ酵素のものと同じであり、I-4 がある種のターゲットタンパクにより、PP1C とともに核膜を局在を決定されていることが示唆された。最近の報告によると、そのターゲットタンパクが AKAP149 である可能性がある。現在これらのタンパク質が、結合しているかどうかについて検討を加えており、今後、一連の実験により、I-4 が PP1 を介して核膜のアセンブリーの調節をする可能性について検証したい。

謝辞

本研究の遂行においてご指導賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所情報調節分野 菊池九二三教授に感謝申し上げます。本論文の御校閲を賜りました北海道大学理学研究科 谷口和彌教授，同研究科 矢澤道生教授，並びに同大学遺伝子病制御研究所病態修飾分野 畠山昌則教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり御指導ならびに貴重な御助言を賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所情報調節分野 島 礼助教授，並びに同分野 中村恒史助手に心より御礼申し上げます。

PP1C isoform 発現ベクターを恵与していただきました New York Medical College, Ernest Y. C. Lee 博士に御礼申し上げます。培養細胞 NCCIT を恵与していただいた国立がんセンター研究所 坂本裕美博士に御礼申し上げます。PP1M を恵与していただきました三重大学医学部 伊藤正明博士に御礼申し上げます。

本研究の遂行に御協力いただいた北海道大学遺伝子病制御研究所情報調節分野の吉田栄子技官，斉藤代志美研究推進員，川村 猛博士，漆原範子博士，今井陽子博士，三橋進也博士，田沼延公氏，増田耕平君，金 世殷さん，坂下暁介君，福川千香子さん，佐藤毅史君，友近裕一君，田上 款君，ならびに，富樫卓志君，斉藤正典君，佐藤公昭君，藤岡正樹君，以上のみなさまに心より感謝いたします。

参考文献

1. Cohen, P. T., Chen, M. X., and Armstrong, C. G. (1996) Novel protein phosphatases that may participate in cell signaling. *Adv Pharmacol* **36**, 67-89.
2. Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
3. Cohen, P. T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**, 245-251.
4. Shenolikar, S., and Nairn, A. C. (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **23**, 1-121.
5. Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508.
6. Ingebritsen, T. S., Stewart, A. A., and Cohen, P. (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur J Biochem* **132**, 297-307.
7. Shenolikar, S. (1994) Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 55-86.
8. Wera, S., and Hemmings, B. A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **311**, 17-29.
9. Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., and Elledge, S. J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein

- phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* **7**, 555-569.
10. Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T., and Nagao, M. (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas [published erratum appears in *Jpn J Cancer Res* 1991 Jul;82(7):873]. *Jpn J Cancer Res* **81**, 1272-1280.
 11. Shima, H., Hatano, Y., Chun, Y. S., Sugimura, T., Zhang, Z., Lee, E. Y., and Nagao, M. (1993) Identification of PP1 catalytic subunit isotypes PP1 gamma 1, PP1 delta and PP1 alpha in various rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 1289-1296.
 12. Takizawa, N., Mizuno, Y., Ito, Y., and Kikuchi, K. (1994) Tissue distribution of isoforms of type-1 protein phosphatase PP1 in mouse tissues and its diabetic alterations. *J Biochem (Tokyo)* **116**, 411-415.
 13. Zhang, Z., Bai, G., Shima, H., Zhao, S., Nagao, M., and Lee, E. Y. (1993) Expression and characterization of rat protein phosphatases-1 alpha, -1 gamma 1, -1 gamma 2, and -1 delta. *Arch Biochem Biophys* **303**, 402-406.
 14. Pinna, L. A., and Donella-Deana, A. (1994) Phosphorylated synthetic peptides as tools for studying protein phosphatases. *Biochim Biophys Acta* **1222**, 415-431.
 15. Hubbard, M. J., and Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* **18**, 172-177.
 16. Ragolia, L., and Begum, N. (1998) Protein phosphatase-1 and insulin action. *Mol Cell Biochem* **182**, 49-58.
 17. Hartshorne, D. J., and Hirano, K. (1999) Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase. *Mol Cell Biochem* **190**, 79-84.
 18. Aggen, J. B., Nairn, A. C., and Chamberlin, R. (2000) Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* **7**, R13-23.
 19. Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P., and Barford, D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* **16**, 1876-1887.
 20. Bollen, M., and Stalmans, W. (1992) The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**, 227-281.
 21. DePaoli-Roach, A., A, Park, I. K., Cerovsky, V., Csontos, C., Durbin, S. D., Kuntz, M. J., Sitikov, A., Tang, P. M., Verin, A., and Zolnierowicz, S. (1994) Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul* **34**, 199-224.
 22. Ingebritsen, T. S., and Cohen, P. (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* **221**, 331-338.
 23. Cohen, P., and Nimmo, G. A. (1978) The purification and characterization of protein phosphatase inhibitor- 1 from rabbit skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* **6**, 17-20.
 24. Huang, F. L., and Glinsmann, W. H. (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* **70**, 419-426.
 25. Hemmings, H. C., Jr., Greengard, P., Tung, H. Y., and Cohen, P. (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* **310**, 503-505.
 26. Walaas, S. I., Aswad, D. W., and Greengard, P. (1983) A dopamine- and cyclic AMP-

- regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* **301**, 69-71.
27. Beullens, M., Van Eynde, A., Stalmans, W., and Bollen, M. (1992) The isolation of novel inhibitory polypeptides of protein phosphatase 1 from bovine thymus nuclei. *J Biol Chem* **267**, 16538-16544.
 28. Beullens, M., Stalmans, W., and Bollen, M. (1996) Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. *Eur J Biochem* **239**, 183-189.
 29. Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K., and Morita, F. (1995) A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem (Tokyo)* **118**, 1104-1107.
 30. Oliver, C. J., and Shenolikar, S. (1998) Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci* **3**, D961-972.
 31. Greengard, P., Allen, P. B., and Nairn, A. C. (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* **23**, 435-447.
 32. Greengard, P., Nairn, A. C., Girault, J. A., Ouimet, C. C., Snyder, G. L., Fisone, G., Allen, P. B., Fienberg, A., and Nishi, A. (1998) The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Brain Res Rev* **26**, 274-284.
 33. Vandenhede, J. R., Goris, J., Yang, S. D., Camps, T., and Merlevede, W. (1981) Conversion of active protein phosphatase to the ATP-Mg-dependent enzyme form by inhibitor-2. *FEBS Lett* **127**, 1-3.
 34. Aitken, A., Holmes, C. F., Campbell, D. G., Resink, T. J., Cohen, P., Leung, C. T., and Williams, D. H. (1984) Amino acid sequence at the site on protein phosphatase inhibitor-2, phosphorylated by glycogen synthase kinase-3. *Biochim Biophys Acta* **790**, 288-291.
 35. DePaoli-Roach, A., A. (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F_A /GSK-3 and casein kinase II ($PC_{0.7}$). *J Biol Chem* **259**, 12144-12152.
 36. Hemmings, B. A., Resink, T. J., and Cohen, P. (1982) Reconstitution of a Mg-ATP-dependent protein phosphatase and its activation through a phosphorylation mechanism. *FEBS Lett* **150**, 319-324.
 37. Holmes, C. F., Kuret, J., Chisholm, A. A., and Cohen, P. (1986) Identification of the sites on rabbit skeletal muscle protein phosphatase inhibitor-2 phosphorylated by casein kinase-II. *Biochim Biophys Acta* **870**, 408-416.
 38. Holmes, C. F., Tonks, N. K., Major, H., and Cohen, P. (1987) Analysis of the in vivo phosphorylation state of protein phosphatase inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle by fast-atom bombardment mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **929**, 208-219.
 39. Park, I. K., and DePaoli-Roach, A., A. (1994) Domains of phosphatase inhibitor-2 involved in the control of the ATP- Mg-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem* **269**, 28919-28928.
 40. Park, I. K., Roach, P., Bondor, J., Fox, S. P., and DePaoli-Roach, A., A. (1994) Molecular mechanism of the synergistic phosphorylation of phosphatase inhibitor-2. Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of inhibitor-2. *J Biol Chem* **269**, 944-954.

41. Puntoni, F., and Villa-Moruzzi, E. (1995) Phosphorylation of the inhibitor-2 of protein phosphatase-1 by cdc2- cyclin B and GSK3. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 732-739.
42. Wang, Q. M., Guan, K. L., Roach, P. J., and DePaoli-Roach, A. A. (1995) Phosphorylation and activation of the ATP-Mg-dependent protein phosphatase by the mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **270**, 18352-18358.
43. Brautigan, D. L., Sunwoo, J., Labbe, J. C., Fernandez, A., and Lamb, N. J. (1990) Cell cycle oscillation of phosphatase inhibitor-2 in rat fibroblasts coincident with p34cdc2 restriction. *Nature* **344**, 74-78.
44. Kakinoki, Y., Somers, J., and Brautigan, D. L. (1997) Multisite phosphorylation and the nuclear localization of phosphatase inhibitor 2-green fluorescent protein fusion protein during S phase of the cell growth cycle. *J Biol Chem* **272**, 32308-32314.
45. Alessi, D. R., Street, A. J., Cohen, P., and Cohen, P. T. (1993) Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem* **213**, 1055-1066.
46. Bennett, D., Szoor, B., and Alphey, L. (1999) The chaperone-like properties of mammalian inhibitor-2 are conserved in a Drosophila homologue. *Biochemistry* **38**, 16276-16282.
47. MacKintosh, C., Garton, A. J., McDonnell, A., Barford, D., Cohen, P. T., Tonks, N. K., and Cohen, P. (1996) Further evidence that inhibitor-2 acts like a chaperone to fold PP1 into its native conformation. *FEBS Lett* **397**, 235-238.
48. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **47**, 45-148.
49. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-132.
50. Osawa, Y., Nakagama, H., Shima, H., Sugimura, T., and Nagao, M. (1996) Identification and characterization of three isotypes of protein phosphatase inhibitor-2 and their expression profiles during testis maturation in rats. *Eur J Biochem* **242**, 793-798.
51. Helps, N. R., Street, A. J., Elledge, S. J., and Cohen, P. T. (1994) Cloning of the complete coding region for human protein phosphatase inhibitor 2 using the two hybrid system and expression of inhibitor 2 in E. coli. *FEBS Lett* **340**, 93-98.
52. Helps, N. R., Vergidou, C., Gaskell, T., and Cohen, P. T. (1998) Characterisation of a novel Drosophila melanogaster testis specific PP1 inhibitor related to mammalian inhibitor-2: identification of the site of interaction with PP1. *FEBS Lett* **438**, 131-136.
53. Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S., and Lee, E. Y. (1998) Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry* **37**, 16728-16734.
54. Khromykh, A. A., Harvey, T. J., Abedinia, M., and Westaway, E. G. (1996) Expression and purification of the seven nonstructural proteins of the flavivirus Kunjin in the E. coli and the baculovirus expression systems. *J Virol Methods* **61**, 47-58.
55. MacKintosh, C. (1993) *Assay and purification of protein (serine/threonine) phosphatases*, Oxford Univ. Press, Oxford.

56. Cohen, P., Alemany, S., Hemmings, B. A., Resink, T. J., Stralfors, P., and Tung, H. Y. (1988) Protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* **159**, 390-408.
57. Fukuda, H., Shima, H., Vesonder, R. F., Tokuda, H., Nishino, H., Katoh, S., Tamura, S., Sugimura, T., and Nagao, M. (1996) Inhibition of protein serine/threonine phosphatases by fumonisin B1, a mycotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 160-165.
58. Zhang, A. J., Bai, G., Deans-Zirattu, S., Browner, M. F., and Lee, E. Y. (1992) Expression of the catalytic subunit of phosphorylase phosphatase (protein phosphatase-1) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 1484-1490.
59. Ishihara, H., Martin, B. L., Brautigan, D. L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D., and et al. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 871-877.
60. Ikebe, M., and Hartshorne, D. J. (1985) Effects of Ca^{2+} on the conformation and enzymatic activity of smooth muscle myosin. *J Biol Chem* **260**, 13146-13153.
61. Ikebe, M., and Hartshorne, D. J. (1985) Proteolysis of smooth muscle myosin by *Staphylococcus aureus* protease: preparation of heavy meromyosin and subfragment 1 with intact 20000- dalton light chains. *J Biol Chem* **260**, 13146-13153.
62. Okubo, S., Ito, M., Takashiba, Y., Ichikawa, K., Miyahara, M., Shimizu, H., Konishi, T., Shima, H., Nagao, M., and Hartshorne, D. J. (1994) A regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 429-434.
63. Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yajnik, V., and Margolis, B. (1994) A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine- phosphorylated growth factor receptors. *J Biol Chem* **269**, 32031-32034.
64. Wu, J., Kleiner, U., and Brautigan, D. L. (1996) Protein phosphatase type-1 and glycogen bind to a domain in the skeletal muscle regulatory subunit containing conserved hydrophobic sequence motif. *Biochemistry* **35**, 13858-13864.
65. Takizawa, N., Mizuno, Y., Saadat, M., and Kikuchi, K. (1994) Selective increases in isoform PP1 alpha of type-1 protein phosphatase in ascites hepatoma cells. *Jpn J Cancer Res* **85**, 274-278.
66. Campos, M., Fadden, P., Alms, G., Qian, Z., and Haystead, T. (1996) Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin- biotin affinity chromatography. *J Biol Chem* **271**, 28478-28484.
67. Huang, H. B., Horiuchi, A., Watanabe, T., Shih, S. R., Tsay, H. J., Li, H. C., Greengard, P., and Nairn, A. C. (1999) Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* **274**, 7870-7878.
68. Connor, J. H., Frederick, D. L., Huang, H. b., Yang, J., Helps, N. R., DePaoli, R. A., Cohen, P. T., Tatchell, K., Nairn, A. C., and Shenolikar, S. (2000) Cellular Mechanisms Regulating Protein Phosphatase-1: A Key Functional Interaction between Inhibitor-2 and the PP1 Catalytic Subunit. *J Biol Chem* **275**, 18670-18675.
69. Connor, J. H., Kleeman, T., Barik, S., Honkanen, R. E., and Shenolikar, S. (1999) Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors. *J Biol Chem* **274**, 22366-22372.
70. Teshima, S., Shimosato, Y., Hirohashi, S., Tome, Y., Hayashi, I., Kanazawa, H., and

Kakizoe, T. (1988) Four new human germ cell tumor cell lines. *Lab Invest* **59**, 328-336.

71. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.

72. Steen, R. L., Martins, S. B., Tasken, K., and Collas, P. (2000) Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A- kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* **150**, 1251-1262.

73. MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P., and Codd, G. A. (1990) Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* **264**, 187-192.

74. MacKintosh, C., and Klumpp, S. (1990) Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. *FEBS Lett* **277**, 137-140.

