



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Study on the Substrate Recognition and the Novel Substrate Identification Method of Mn <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -dependent Ser/Thr Phosphatase PPM Family [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 伊藤, 祥吾                                                                                                                                                                                                                              |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                                                                               |
| Degree Name         | 博士(理学)                                                                                                                                                                                                                              |
| Dissertation Number | 甲第14895号                                                                                                                                                                                                                            |
| Issue Date          | 2022-03-24                                                                                                                                                                                                                          |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/85444">https://hdl.handle.net/2115/85444</a>                                                                                                                                                   |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>                                                                                                                             |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                                                                     |
| File Information    | ITO_Shogo_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                                                                                                                                     |



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 伊藤 祥吾

## 学位論文題名

Study on the substrate recognition and the novel substrate identification method of  
Mn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent Ser/Thr phosphatase PPM family  
(Mn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>依存的 Ser/Thr ホスファターゼ PPM ファミリーの基質認識と  
新規基質同定法に関する研究)

PPM ファミリーは Mn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>依存的 Ser/Thr ホスファターゼであり、ヒトにおいて 20 種類のアイズフォームが存在する。PPM は細胞増殖や分化、代謝、免疫応答を含む多様かつ重要な役割を有し、その遺伝子異常が癌を含む種々の疾患において報告されている。しかしながら、PPM ファミリーの多くはその細胞内基質がほとんど明らかになっておらず、各アイソフォームの細胞内における機能や経路は不明な点が多い。このため、PPM ファミリーの細胞内基質を網羅的に同定する手法の開発が強く望まれている。PPM は、アイソフォーム間で高度に保存された触媒ドメインと、アイソフォーム特異的な N 末端領域、C 末端領域および loop 領域を有する。基質認識に調節サブユニットを用いる他の多くのホスファターゼファミリーとは異なり、PPM は単量体として直接的に基質を認識している。一方で、例えば PPM1A は複数の異なる配列モチーフを有する基質を脱リン酸化可能であることが知られているが、その複数基質を認識可能な機構は不明である。PPM ファミリーが基質タンパク質の脱リン酸化部位とその周辺配列を認識する機構を明らかにすることは、PPM の細胞内機能とその制御を理解のために必須である。

そこで本研究では、PPM1A を標的アイソフォームとして選択し、PPM ホスファターゼの基質のリン酸基を認識する機構を解明する研究を実施した。さらに PPM ホスファターゼの基質同定のための、PPM の金属依存性による活性制御を基盤とした新規 substrate trapping 法の開発研究を行った。

本学位論文は、全 4 章より構成されている。第 1 章では総括的な序論として、本研究の背景や目的を述べている。PPM ファミリー、substrate trapping 法、PPM1A 機能と構造について概説した。

第 2 章では、PPM1A の基質リン酸基の認識機能について述べている。PPM1A の活性中心近傍には 2 つの Arg 残基 (Arg33, Arg186) が存在する。PPM1A の R33Q 置換および R33Q/R186Q 置換は PPM1A の pNPP 脱リン酸化における  $k_{cat}/K_m$  を顕著に減少させた一方で、R186Q 置換はほとんど変化させなかった。しかしながら、興味深いことにリン酸化モデルペプチド基質の脱リン酸化においては、R33Q 置換と R186Q 置換はいずれも PPM1A 活性を顕著に減少させることが示された。また、Arg33 と Arg186 の置換の効果は、脱リン酸化部位の近傍配列により異なった。PPM1A とリン酸化モデルペプチド基質との docking model 解析によって、Arg33 および Arg186 は基質リン酸基と相互作用

可能であることが示された。以上の結果より、活性中心に存在する Arg33 と Arg186 が基質配列依存的にリン酸基との相互作用に寄与していることが示唆された。これが、PPM1A が複数の配列モチーフを有する基質を認識可能である要因であり、PPM の基質認識多様性機構であることが示唆された。

第 3 章では、PPM に対する新規基質同定法の開発および同定した新規基質に対する PPM1A 機能について述べている。Tyr ホスファターゼを含むいくつかの酵素に対しては不活性化変異体と基質との複合体形成を利用した **substrate trapping** 法が報告されている。しかしながら、PPM に対する基質同定法は報告が無い。PPM の活性中心は **substrate trapping** 法が報告されている酵素に比べ浅く、基質認識のためのサブユニットを持たないため、PPM の基質を同定するためには活性中心の構造と電荷を変化させない野生型酵素を用いた複合体形成が必要である。PPM1A の活性に対する二価金属イオンの  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  の効果を解析し、 $Zn^{2+}$  が最も強力に PPM1A 活性を阻害し、この阻害は  $Mg^{2+}$  に対し競合的であることが示された。そこで、野生型 PPM 活性中心の  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  を不活性化二価金属イオンに置換し、安定な酵素 - 基質複合体を形成させるという全く新規な原理に基づいた基質同定法“**Metal-dependent Substrate Trapping 法 (MdST 法)**”を考案した。MdST 法の基質配列特異性を確かめるため、リン酸化ペプチドの混合溶液に対する  $Zn^{2+}$  存在下での GST-PPM1A pull-down を実施したところ、PPM1A による脱リン酸化活性が高いペプチドが特異的に trap された。また、細胞溶解液に対する  $Zn^{2+}$  を用いた MdST を行ったところ、既知の PPM1A 基質である eEF2 を取得した。さらに、細胞溶解液由来のタンパク質は  $Mn^{2+}$  および  $Ca^{2+}$  存在下では PPM1A に trap されなかった。これらの結果は、本手法が  $Zn^{2+}$  依存的に内在性 PPM1A 基質を同定可能であることを示す。MdST 法を用いた PPM1A の新規基質探索において、核ラミナタンパク質である Lamin A/C を新規基質候補として選択した。PPM1A の標的部位の探索によって、Lamin A/C Thr24, Thr27 が *in vitro* において PPM1A に脱リン酸化されることが明らかとなった。細胞内に過剰発現させた Lamin C のリン酸化状態は、Thr24, Thr27 の Ala 置換変異体である Lamin C(T24A/T27A) では変化が見られなかった一方で、野生型 Lamin C では細胞周期依存的にリン酸化状態が変化した。PPM1A の過剰発現によって、野生型 Lamin C のリン酸化状態が Lamin C(T24A/T27A) と同様の状態へと誘導されたことから、PPM1A が細胞内で Lamin C Thr24, Thr27 を脱リン酸化することが示された。細胞内に過剰発現させた Lamin C は telophase の細胞において環状の核内構造体を形成し、PPM1A はこの環状核内構造体の内部に集積することを見出した。以上より、Lamin C Thr24, Thr27 が PPM1A の新規基質であること、および MdST 法によって細胞内の新規 PPM 基質を同定可能であることを示した。さらに、Lamin C と PPM1A は核内で相互作用することが示唆された。

以上、本研究において、PPM1A による基質のリン酸基認識の新たな機構を提案した。PPM1A は活性中心周囲に 3 つの溝を有する。PPM1A はこれらの溝と、Arg33 と Arg186 を基質により使い分けることで、様々な配列の基質を認識可能としているモデルを提案する。さらに、本研究では PPM に対する新規基質同定法 MdST 法を開発した。野生型酵素を用いた本手法は、結合様式が異なる基質を網羅的に同定可能である。また、PPM1A の新規細胞内基質として Lamin A/C を同定し、細胞内での PPM1A 機能に新たな知見を与えた。MdST 法は他の金属酵素にも適用可能であるため、様々な細胞内プロセスの分子メカニズム理解に大きく貢献することが期待される。