



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the Substrate Recognition and the Novel Substrate Identification Method of Mn ²⁺ /Mg ²⁺ -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	https://hdl.handle.net/2115/85444
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	IT0_Shogo_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 伊藤 祥吾

審査担当者	主査	教授	村上 洋太
	副査	教授	坂口 和靖
	副査	教授	大利 徹
	副査	教授	石森 浩一郎
	副査	准教授	鎌田 瑠泉

学 位 論 文 題 名

Study on the Substrate Recognition and the Novel Substrate Identification Method of
 Mn^{2+}/Mg^{2+} -dependent Ser/Thr Phosphatase PPM Family
(Mn^{2+}/Mg^{2+} 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^{2+}/Mg^{2+} 依存的に脱リン酸化活性を有する Ser/Thr ホスファターゼであり、他の多くのホスファターゼファミリーとは異なり、調節サブユニットを有せず単量体として基質を認識する。PPM ファミリーは極めて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の原因となる。しかしながら、PPM ファミリーの基質およびシグナル経路は不明な点が多く、その解明が強く望まれている。そこで本研究では、PPM1A を標的とした PPM ホスファターゼの基質認識機構の解明、および PPM ホスファターゼに対する新規基質同定法の開発を目的とした。

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 PPM ホスファターゼの機能、従来の基質同定法、PPM1A 機能と構造を含む本研究の背景と、目的を述べている。

第2章では、PPM1A 活性中心に位置する Arg33 と Arg186 の基質のリン酸基認識における機能について述べている。PPM1A は複数の基質認識モチーフを脱リン酸化可能であるが、その機構は不明である。本研究では、詳細な速度論的解析により、リン酸基認識残基として、従来報告されていた Arg33 のみではなく、ペプチド基質の脱リン酸化において Arg33 と Arg186 の両方の残基が重要であることを明らかにした。さらに、基質配列により脱リン酸化反応に対するこれら Arg 残基の寄与が異なることを示した。また、ペプチド基質と PPM1A との複合体構造の Docking model 解析によって、異なる基質により PPM1A 活性中心の異なる溝を利用して結合することを示唆した。

第3章では、PPM ホスファターゼに対する新規基質同定法の開発について述べている。まず、 Zn^{2+} が Mg^{2+} に対して競合的に PPM1A 活性を阻害することが示した。 Zn^{2+} を結合した PPM ホスファターゼの CD およびモデリングによる構造解析により、 Zn^{2+} の結合が立体構造の変化することなく、脱リン酸化のために必要な水分子の活性化をしないことが示唆された。以上の結果より、PPM 活性中心の Mn^{2+}/Mg^{2+} を不活性な二価金属イオンに置換することにより、活性中心の電荷と構造を保持することで安定な酵素-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。リン酸化ペプチドに対する MdST によって本手法の基質配列特異性を示、細胞溶解液に対する MdST によって内在性の PPM1A 既知基質を取得可能であることを示した。これらを基に、PPM1A の新規基質探索を行い、核ラミナの構成タンパク質である Lamin A/C の Thr24 および Thr27 を *in vitro* および細胞内における PPM1A の新規脱リン酸化部位として同定した。さらに、Lamin C は telophase の細胞核内で環状の構造体を形成し、PPM1A はその内部に特に強く局在することを明らかにした。Lamin C 環状核内構造体形成は Thr24, Thr27 のリン酸化状態によって制御されることが示唆された。以上の結果より、PPM ホスファターゼの新規基質同定法 MdST 法の開発に成功し、Lamin A/C が PPM1A の新規基質であることを示した。

第4章では、本研究の総括的な結論について述べている。本研究により、PPM1 ホスファターゼにおける新規な基質認識機構モデルの提案、さらに新規基質同定法有用性とその展開について述べている。

以上、本研究により、PPM1A 活性中心の 2 つの Arg 残基の機能を明らかにし、PPM1A が様々な基質認識モチーフを脱リン酸化可能にしている機構に新たな知見を与えた。さらに、PPM ホスファターゼに対する新規基質同定法” Metal-dependent Substrate Trapping 法” の開発に成功した。MdST 法は PPM の機能と経路の解明を強く推進することが期待される。よって審査員一同は、著者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。