

# 天然物トウトマイセチンによる免疫抑制および抗癌作用の分子機構

菊池 九二三 [北海道大学遺伝子病制御研究所/教授]

小野江 和則 [北海道大学遺伝子病制御研究所/教授]

島 礼 [北海道大学遺伝子病制御研究所/助教授]

三橋 進也 [北海道大学遺伝子病制御研究所/客員研究員]

生方 信 [富山県立大学生物工学研究センター/教授]

## 背景・目的

高等動物において1型セリン/スレオニンホスファターゼ (PP1)は、細胞周期、転写、翻訳、代謝、運動等に深く関与すると考えられている。しかし、その特異性や制御機構の詳細は不明である。それは触媒および制御サブユニットともに多種存在すること、特異的な阻害剤が無かったことに起因する。最近われわれは、PP1特異的阻害剤トウトマイセチン(TC)を見いだした。本事業においては、TCを用いて発がん・免疫制御の主要なシグナル経路である、Raf/MEK/ERK経路とNF- $\kappa$ B経路の2つに注目してPP1の関与の解明を行った。平行して、PP1触媒サブユニットのノックダウンを試みた。癌および免疫系におけるPP1の基質の同定と生理的意義の解明、さらにはタウトマイセチンを臨床薬剤として用いるための基礎研究を目的とした。

## 内容・方法

- (1) Ras-Raf-ERK経路におけるタウトマイセチン(TC)の阻害機能の解明：EGF刺激によるRaf-1、MEK、ERKの活性化に対するTCの影響を調べた。次にPP1とRaf-1を細胞に共発現させ、Raf-1の活性化に対するPP1の作用を調べた。
- (2) TNF/NF- $\kappa$ B経路に対するTCの作用機構：TNF $\alpha$ 刺激によるNF- $\kappa$ Bの転写の活性化、I- $\kappa$ Bのリン酸化-分解、IKKの活性化、JNKの活性化への影響を調べた。
- (3) ノックダウン法によるPP1Cアイソタイプ特異的機能の解析：3種類のPP1Cアイソタイプ(PP1Ca、PP1C $\gamma$ 1、PP1C $\delta$ )を個別にノックダウンし、その表現型を解析した。

## 結果・成果

- (1) Ras-Raf-ERK経路におけるタウトマイセチン(TC)の阻害機能の解明：TCは、EGF刺激によるRaf-1、MEK、ERKの活性化を抑えることを明らかにした。そこで、PP1とRaf-1を細胞内に強発現させ、結合の有無を調べた。両者とも同じ複合体に存在することが明らかとなった。さらに活性を持たない変異PP1はRaf-1の活性化に対してTCと同様に働

くことが明らかとなった。このことは、PP1がRaf-1を直接基質にしている可能性を示唆した。

- (2) TNF/NF- $\kappa$ B経路に対するTCの作用機構：in vivoのNF- $\kappa$ B活性化へのTCの影響を調べるために、 $\kappa$ B-lucをレポータープラスミドとして用い転写の活性化への影響を調べた。TCはTNF $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの活性化を抑えた。次にI- $\kappa$ Bのリン酸化-分解への影響を調べたところ、TCはI- $\kappa$ Bのリン酸化-分解のいずれに対しても阻害することが分かった。さらに上流にさかのぼってIKKの活性化への影響を調べた。TC処理により、IKKの活性化が阻害されていた。一方、TCはTNF $\alpha$ によるJNKの活性化には影響を与えなかった。以上の結果より、TCは、TNF $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの活性化を抑えること。その作用点はTNF $\alpha$ によるシグナルがIKKとMEKKに分岐した後であることが示唆された。
- (3) ノックダウン法によるPP1Cアイソタイプ特異的機能の解析：PP1Cノックダウン細胞には、形態に大きな特徴があった。PP1Caノックダウン細胞は、円くなり、盛り上がっていた。PP1C $\gamma$ 1ノックダウン細胞も程度は低いものの同様の傾向を示した。一方PP1C $\delta$ ノックダウン細胞は扁平になり、葉状仮足様構造が多く認められるようになった。次にノックダウン細胞の体積をフローサイトメトリーにより調べた。PP1CaおよびPP1C $\gamma$ 1ノックダウン細胞においてはコントロール細胞と同じであったが、PP1C $\delta$ ノックダウン細胞においては体積が大きくなっていることが明らかとなった。

## 今後の展望

PP1特異的阻害剤のトウトマイセチン(TC)発見の意義は大きい。TCを用いることで、今回初めてPP1がRAFとNF- $\kappa$ Bの活性化因子であることを見いだした。PP1がこれらの経路を制御してがん、免疫の制御に深く関わる可能性が示唆された。今後は、TCを用いて以下の点についてさらにその詳細を解析したい。また、ノックダウンの実験により、触媒サブユニットが機能の分担をしていることが明らかとなった。今後は、TCをもちいて得られた結果とノックダウンを用いて得られた結果を比較することにより、各アイソタイプの特異的な機能の解明が進められると考える。