

学 位 論 文 題 名

細胞増殖におけるプロテインホスファターゼの動態と意義

ーとくにラット PTP ϵ の分子クローニングと発現について

学位論文内容の要旨

細胞の増殖、分化、癌化のシグナル伝達機構においてタンパク質のリン酸化が重要な役割を果たしている。多くの癌遺伝子産物、あるいは増殖因子受容体がチロシン残基特異的プロテインキナーゼ（PTK）活性をもつことが明らかになって以来、チロシン残基のリン酸化による機能タンパク質の制御機構が解明されつつある。しかしながら、機能タンパク質の可逆的な調節機構にはプロテインキナーゼによるリン酸化だけではなく、脱リン酸化による制御も不可欠であり、チロシン残基を脱リン酸化するチロシン残基特異的プロテインホスファターゼ（PTP）の生理的意義の解明もまた問題となっている。本研究では、主としてこの PTP に着目し、細胞増殖において機能する PTP 分子種を同定する目的で reverse transcriptase · polymerase chain reaction（RT-PCR）法により多種の PTP 分子種に対する cDNA の単離を試み、次いで膜貫通型 PTP である PTP ϵ の生理的機能を解明する目的でその全長 cDNA を単離し、その遺伝子発現と臓器分布を検討した。本論文の要旨は以下の 4 点である。

1. 細胞増殖において機能する PTP 分子種を同定する目的でラット再生肝より PTP の触媒領域における高い相同性を利用した RT-PCR 法により cDNA を単離し、ホモロジー検索の結果、膜貫通型、細胞質型を含め、既知の 13 種の PTP をコードする cDNA を得た。

2. 膜貫通型である PTP ϵ の生理的機能を解明する目的で、ラット脾臓 cDNA ライブラリーよりその cDNA の単離を試み、まず 5' 末端を欠いたラット PTP ϵ の cDNA（クローン S1）を単離した。次いで 5' RACE 法によりクローン S1 において欠如している 5' 末端部分の cDNA（クローン P1）を単離した。その結果クローン S1 とクローン P1 は互いにオーバーラップしており、それらを結合した cDNA の全長は 2155 bp で、それから予測されるアミノ酸配列は 642 残基であった。この配列は既に報告のある膜貫通型のヒト PTP ϵ （HPTP ϵ ）とは異なり、その配列は疎水性アミノ酸に富む膜貫通領域を持たない細胞質型タンパク質を予測させるものであった。5' RACE 法によって単

離したクローン P1 が人工産物ではなく、その塩基配列は細胞内に mRNA として存在することを RNase プロテクション法、RT-PCR 法によって確認し、さらにラット PTP ϵ cDNA の 53 番目の ATG が開始メチオニンをコードすることを *in vitro* トランスレーション法によって示した。

3. ラット脾臓より単離された PTP ϵ (PTP ϵ C) は膜貫通型である HPTP ϵ と非常に相性は高かったが、N 末端領域の配列は異なり、細胞質型タンパク質を予測させるものであった。この違いが動物種の違いによるものなのか、あるいはラットにも膜貫通型 PTP ϵ が存在するのかを明らかにする目的で、ラット脾臓より RT-PCR 法によって膜貫通型のラット PTP ϵ をコードする cDNA の単離を試みた。その結果 5' 末端領域を含めて HPTP ϵ と非常に相性が高いクローン (PTP ϵ M) を得た。その塩基配列から予測されるアミノ酸配列は N 末端付近に疎水性アミノ酸に富む膜貫通領域を含むものであった。PTP ϵ M cDNA の 206 番目以降の塩基配列は PTP ϵ C と完全に一致したことから、PTP ϵ M と PTP ϵ C は単一遺伝子から生ずるイソホームであることが示唆された。

4. PTP ϵ C および PTP ϵ M の mRNA レベルの臓器分布を ribonuclease (RNase) プロテクション法、ノーザンブロット法により解析した結果、PTP ϵ C は胸腺、脾臓、肺に限局して存在し、PTP ϵ M は広い組織分布を示し、特に脳、肺に高く発現していた。PTP ϵ C が胸腺、脾臓、肺で発現が高かったことから免疫系において特異的に発現していると考え、T 細胞、B 細胞、マクロファージ由来の免疫系の培養細胞についてその遺伝子発現を検討した結果、調べたすべての細胞で発現していた。さらに免疫学的手法によりタンパク質レベルでの PTP ϵ C と PTP ϵ M の臓器分布を解析したところ、予測に反し、PTP ϵ M は脳に特異的に発現し、PTP ϵ C は胸腺、脳、脾臓、肺のすべてに発現していた。このことから、これら PTP ϵ C、PTP ϵ M は転写後に何らかの厳密な調節を受けていることが示唆された。以上のことから、PTP ϵ C と PTP ϵ M は N 末端領域のみ異なりその他の配列は共通であるが、その組織分布、細胞内局在が異なることから、それぞれ独立した生理機能を担うことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 谷 口 和 弥

学 位 論 文 題 名

細胞増殖におけるプロテインホスファターゼの動態と意義

ーとくにラット PTP ϵ の分子クローニングと発現について

細胞の増殖、分化、癌化のシグナル伝達機構においてタンパク質のリン酸化が重要な役割を果たしている。多くの癌遺伝子産物、あるいは増殖因子受容体がチロシン残基特異的プロテインキナーゼ活性をもつことが明らかになって以来、チロシン残基のリン酸化による機能タンパク質の制御機構が解明されつつある。しかしながら、機能タンパク質の可逆的な調節機構にはプロテインキナーゼによるリン酸化だけではなく、脱リン酸化による制御も不可欠であり、チロシン残基を脱リン酸化するチロシン残基特異的プロテインホスファターゼ (PTP) の生理的意義の解明もまた問題となっている。本研究では、主としてこの PTP に着目し、細胞増殖において機能する PTP 分子種を同定する目的で多種の PTP 分子種の触媒領域に対する cDNA の単離を試み、次いで膜貫通型 PTP である PTP ϵ の生理的機能を解明する目的でその全長 cDNA を単離し、その遺伝子発現と臓器分布を検討した。本論文の要旨は以下の 4 点である。

1. 細胞増殖において機能する PTP 分子種を同定する目的でラット再生肝より PTP の触媒領域に相当する cDNA を単離し、ホモロジー検索の結果、膜貫通型、細胞質型を含め、既知の 13 種の PTP をコードする cDNA を得た。
2. 膜貫通型である PTP ϵ の生理的機能を解明する目的で、ラット脾臓 cDNA ライブラリーよりその cDNA の単離を試み、5' 末端を欠いたラット PTP ϵ の cDNA を単離した。次いで 5' RACE 法により欠如している 5' 末端部分の cDNA を単離した。これらの cDNA クローンを結合した cDNA の全長は 2155 bp で、それから予測されるアミノ酸配列は 642 残基であった。この配列は既に報告のある膜貫通型のヒト PTP ϵ (HPTP ϵ) とは異なり、その配列は膜貫通領域をもたない細胞質型タンパク質を予測させるものであった。5' RACE 法によって得た cDNA クローンが人工産物ではなく、その塩基配列が細胞内に mRNA として存在することを RNase プロテクション法、RT-PCR 法によって確認し、さらにラット PTP ϵ cDNA の 53 番目の ATG が開始メチオニンをコードすることを *in vitro* トランスレーション法によって示した。

3. ラット脾臓より単離された PTP ϵ (PTP ϵ C) は膜貫通型である HTP ϵ と非常に相同性は高かったが、N 末端領域の配列は異なり、細胞質型タンパク質を予測させるものであった。この違いが何に起因するのかを明らかにする目的で、ラット脾臓より膜貫通型のラット PTP ϵ をコードする cDNA の単離を試みた。その結果、HTP ϵ と非常に相同性が高いクローン (PTP ϵ M) を得た。その塩基配列から予測されるアミノ酸配列は N 末端付近に膜貫通領域を含むものであった。PTP ϵ M cDNA の 206 番目以降の塩基配列は PTP ϵ C と完全に一致したことから、PTP ϵ M と PTP ϵ C は単一遺伝子から生ずるイソホームであることが示唆された。

4. PTP ϵ C および PTP ϵ M の mRNA レベルの臓器分布を解析した結果、PTP ϵ C は胸腺、脾臓、肺に局限して存在し、PTP ϵ M は広い組織分布を示し、特に脳、肺に高く発現していた。PTP ϵ C が胸腺、脾臓、肺で発現が高かったことから免疫系において特異的に発現していると考え、T 細胞、B 細胞、マクロファージ由来の免疫系の培養細胞についてその遺伝子発現を検討した結果、調べたすべての細胞で発現していた。さらに免疫学的手法によりタンパク質レベルでの PTP ϵ C と PTP ϵ M の臓器分布を解析したところ、予測に反し、PTP ϵ M は脳に特異的に発現し、PTP ϵ C は胸腺、脳、脾臓、肺のすべてに発現していた。このことから、これら PTP ϵ C、PTP ϵ M は転写後に何らかの厳密な調節を受けていることが示唆された。

以上の実験成績より、チロシンホスファターゼ PTP ϵ に膜貫通型および細胞質型の少なくとも 2 つの分子種が存在すること、両者の塩基配列は N 末端領域のみ異なりその他の配列は共通であること、また組織分布や細胞内局在を互いに異にすることが示された。これらは、タンパク質チロシン脱リン酸の生理機能とその意義を考える上で重要な新知見である。

これを要するに、著者はチロシンホスファターゼ PTP ϵ 分子の分子多様性とその意義について新知見を得たものであり、タンパク質チロシンホスファターゼ研究において貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は、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。