

学位論文題名

自己免疫疾患モデルマウス MRL/MpJ-lpr/lpr におけるチロシン残基
特異的プロティンホスファターゼ, とくに SH-PTP1 の動態と意義

学位論文内容の要旨

タンパク質のチロシン残基リン酸化・脱リン酸化は、細胞の増殖や分化などの様々な細胞機能の調節に重要な役割を担っている。タンパク質チロシンリン酸化レベルは、チロシンリン酸化を触媒するチロシンキナーゼとこれに拮抗して脱リン酸化を触媒するチロシンホスファターゼの両作用のバランスにより調節される。免疫系においても、これを構成する免疫担当細胞の増殖、分化、細胞死や免疫応答が、標的タンパク質のチロシンリン酸化を介して調節されることが明らかにされ、チロシンキナーゼ側から多くの研究がなされてきた。それに対し、チロシンホスファターゼ側からの解析は遅れており、本研究はこの点に着目し、免疫系におけるチロシンリン酸化・脱リン酸化の役割を明らかにする目的から、自己免疫疾患モデルマウス MRL/MpJ-lpr/lpr (lprマウス) を実験題材として用い、特にチロシンホスファターゼ側からの解析を試み、その病態変異を検討した。lprマウスは、ヒト全身性エリテマトーデスに似た症状を示す自己免疫疾患モデルマウスであり、生後8週齢頃より自己抗体産生、糸球体腎炎などの病態を発症し、致死率は20週齢で約50%に達する。また最近になり、lprマウスの責任遺伝子lprは、アポトーシスを誘導するFas抗原遺伝子の突然変異を起こしたものであることが明らかになった。本研究の目的、すなわち「免疫系におけるチロシンリン酸化・脱リン酸化の役割の解明」の題材としてこのモデルを用いた理由として、Fas抗原の誘導するアポトーシスには早期のチロシンキナーゼの活性化と、細胞質型チロシンホスファターゼの一つであるSH-PTP1の活性化が必須である、とする報告がなされたことが挙げられる。すなわち、Fas抗原からの情報伝達の下流に、チロシンキナーゼとチロシンホスファターゼの両酵素が関わっていることが示唆された。従って、Fas抗原の機能欠損が原因とされるlprマウスにおいて、チロシンキナーゼおよびチロシンホスファターゼ両酵素を解析することは、この免疫病態における情報伝達機構の変異を理解するのみならず、正常な免疫系でのチロシンリン酸化・脱リン酸化の意義を解明する上でも重要なことであると考えられる。本論文の要点は以下の2点にまとめられる。

1. まず、自己免疫病態におけるチロシンリン酸化の動態を明らかにするため、lprマウスにおけるチロシンリン酸化レベル、チロシンキナーゼ活性、チロシンホスファターゼ活性について、対照マウス (+/+マウス) と比較した。タンパク質チロシンリン酸化レベルの解析では、lprマウス、+/+マウスの脾臓および肝臓について抗ホスホチロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより比較したところ、いくつかのタンパク質で増減が認められた。チロシンリン酸化レベルの増減が、チロシンキナーゼとチロシンホスファターゼの両作用によって調節されることを考慮し、次に両酵素の活性について検討した。

まず、脾臓および肝臓におけるチロシンキナーゼ活性を *lpr* マウスと *+/+* マウスとで比較したところ、細胞質画分・膜画分ともに、*lpr* マウスで1.3-1.5倍の活性上昇がみられた。次いで、臓器粗抽出液におけるチロシンホスファターゼ活性測定系を確立し、それを用いて *lpr* マウスと *+/+* マウスにおける本酵素活性を比較した。チロシンホスファターゼ活性の測定には、基質としてチロシン残基のみが特異的にリン酸化された基質タンパク質を調製する必要がある。そこで、ウサギ脾臓の顆粒画分よりチロシンキナーゼを精製し、これを用いてRCM-リゾチームのチロシン残基を特異的にリン酸化した。ここで得られた³²P-RCM-リゾチームを基質として用い、チロシンホスファターゼ活性測定系を確立し、細胞質画分および膜画分それぞれのチロシンホスファターゼ活性の分別定量を行った。その結果 *lpr* マウスでは、脾臓・肝臓ともに *+/+* マウスに比べて細胞質および膜の両画分ともチロシンホスファターゼ活性は高値を示し、特に *lpr* マウス肝臓の細胞質画分では、*+/+* マウスの約2.5倍に上昇していることがわかった。さらに、*lpr* マウスにおけるチロシンホスファターゼ活性の上昇は、脾臓の細胞質画分においては2-メルカプトエタノール (2-ME) 濃度依存的であったが、これに対し肝臓の細胞質画分においては2-ME濃度非依存的で、その性状が異なることから、両組織において活性上昇に寄与するチロシンホスファターゼ分子種が異なる可能性が示唆された。以上の結果より、自己免疫病態において、チロシンキナーゼおよびチロシンホスファターゼの両酵素活性が亢進していることを明らかにした。その結果として、細胞内タンパク質のチロシンリン酸化のターンオーバーの亢進やチロシンリン酸化レベルの増減を引き起こしている可能性がある。

2. 肝臓において活性上昇を示した分子種が、細胞質型チロシンホスファターゼの一つSH-PTP1であることを明らかにした。SH-PTP1は、遺伝学的アプローチから免疫系特に血液細胞の発生や分化に必須であることが示され、さらに *lpr* 変異の責任遺伝子であるFas抗原からの情報伝達の下流にSH-PTP1が関わっていることが報告されている。そこで、Fas抗原の機能欠損が原因とされる *lpr* マウスにおいて、SH-PTP1の動態をノーザンブロットィング、ウエスタンブロットィングにより解析した。脾臓および肝臓では *+/+* マウスと比べてmRNAおよび酵素タンパク量で有意な差は認められなかった。ところが活性について検討したところ、*+/+* マウスと比べて *lpr* マウスの脾臓では僅かながら有意な減少が認められ、これに対して *lpr* マウス肝臓では3-4倍の顕著な上昇が認められた。これが先に記した2-ME濃度非依存的な *lpr* マウス肝臓のチロシンホスファターゼ活性上昇の主因であることが明らかになった。次いで、SH-PTP1のチロシンリン酸化レベルを解析したところ、脾臓では *lpr* マウスと *+/+* マウスは同程度であったが、肝臓では *lpr* マウスのSH-PTP1は *+/+* マウスのそれに比べてチロシンリン酸化レベルが明らかに低下していた。従って、*lpr* マウス肝臓におけるSH-PTP1の活性上昇とチロシンリン酸化の低下との相関が示唆された。

本研究の対象であるチロシンホスファターゼについては、一般の酵素タンパク質と異なり酵素タンパク質が不安定であり、基質特異性が幅広いこと、またその研究の比較的初期段階に全てのチロシンホスファターゼ分子種に共通のアミノ酸配列の存在が明らかにされたことから、生化学的解析に先行して分子生物学的手法を用いた研究が盛んに行われ、様々なチロシンホスファターゼ分子種の構造が明らかにされてきた。しかし、細胞内基質や膜型チロシンホスファターゼのリガンドなどはほとんど解明されておらず、実際脱リン酸化活性を有するのかどうかを正式には検証できていないケースすらある。従って次の段階では、

基質の同定、活性調節の様式、生理的役割についての研究がなされる必要がある。そのためには、本酵素の精製、活性特性の決定などの生化学的解析が不可欠である。本研究は、遅れていたチロシンホスファターゼの生化学的解析の基礎的な研究であり、また先に述べた次の段階への研究を展望するものである。

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

自己免疫疾患モデルマウス MRL/MpJ-lpr/lpr におけるチロシン残基 特異的プロティンホスファターゼ，とくに SH-PTP1 の動態と意義

蛋白質のチロシン残基リン酸化・脱リン酸化は、細胞の増殖や分化などの様々な細胞機能の調節に重要な役割を担っている。細胞内蛋白質チロシンリン酸化レベルは、チロシンリン酸化を触媒するチロシンキナーゼとこれに拮抗して脱リン酸化を触媒するチロシンホスファターゼの両作用のバランスにより調節される。免疫系においても、これを構成する免疫担当細胞の増殖、分化、細胞死、免疫応答などが、標的蛋白質のチロシンリン酸化を介して調節されることが明らかにされ、チロシンキナーゼ側から多くの研究がなされてきた。それに対し、チロシンホスファターゼ側からの解析は遅れており、本研究はこの点に着目し、チロシンホスファターゼの免疫系における役割を明らかにする目的で、自己免疫疾患モデルマウス MRL/MpJ-lpr/lpr を実験材料として用い、その病態変異を主に酵素活性を指標に解析した。実験成績は以下のように要約される。

- 1) 自己免疫疾患モデルマウス MRL/MpJ-lpr/lpr マウス (lpr マウス) と対照マウス MRL/MpJ- +/+ マウス (+/+ マウス) の脾臓・肝臓について、細胞内蛋白質チロシンリン酸化レベルを抗ホスホチロシン抗体を用いたイムノプロットにより比較したところ、lpr マウスにおいていくつかの蛋白質で増減が認められ、自己免疫病態におけるチロシンキナーゼ、チロシンホスファターゼに、何らかの変異が生じていることが示唆された。
- 2) そこでチロシンキナーゼ活性を lpr および +/+ マウスとで比較したところ、脾臓・肝臓の細胞質画分・膜画分ともに、lpr マウスで 1.3-1.5 倍の活性上昇がみられた。
- 3) 次いでチロシンホスファターゼ活性測定系を確立するため、まずウサギ脾臓からチロシンキナーゼを精製し、これを用いて RCM-リゾチームのチロシン残基を特異的にリン酸化して ^{32}P -Tyr-RCM-リゾチームを調製した。

4) ここで得られた³²P-Tyr-RCM-リゾチームを基質として、細胞質型・膜型チロシンホスファターゼ活性の分別定量系を確立した。

5) ここに確立した系を用いて、チロシンホスファターゼ活性をlprおよび+/+マウスで比較したところ、脾臓・肝臓の細胞質画分・膜画分ともにlprマウスで有意に高値を示し、特にlprマウス肝臓の細胞質画分では、+/+マウスの約2.5倍に上昇していることがわかった。

6) さらにlprマウスにおけるチロシンホスファターゼ活性上昇は、脾臓と肝臓で2-メルカプトエタノールに対する挙動が異なることから、両組織において活性上昇に寄与するチロシンホスファターゼ分子種が異なる可能性が示唆された。

7) lprマウス肝臓におけるチロシンホスファターゼ活性上昇の主因は、細胞質型チロシンホスファターゼの一つSH-PTP1の活性上昇によることを明らかにした。

8) lprマウス脾臓・肝臓では、+/+マウスと比べてSH-PTP1のmRNAおよび酵素蛋白量で有意な差は認められなかった。ところがその活性について検討したところ、lprマウス脾臓では僅かながら有意な減少が認められ、これに対してlprマウス肝臓では約3倍の顕著な上昇が認められた。

9) 次にSH-PTP1のチロシンリン酸化レベルを解析したところ、脾臓ではlprおよび+/+マウスともに同程度であったが、肝臓ではlprマウスのSH-PTP1は+/+マウスに比べてチロシンリン酸化レベルが明らかに低下していた。従って、lprマウス肝臓におけるSH-PTP1の活性上昇とチロシンリン酸化レベルの低下との相関が示唆された。

以上の実験成績より、自己免疫疾患モデルマウス (lprマウス) におけるチロシンホスファターゼの病態変異を解析して、その主因がチロシンホスファターゼの1分子種、SH-PTP1にあること、さらにその生物化学的機構として、SH-PTP1分子自身のチロシンリン酸化レベルに変異があることを明らかにした。これらは、自己免疫疾患における病態の分子機構を解明する上で重要な新知見である。

これを要するに、著者は自己免疫疾患モデルマウス (lprマウス) におけるチロシンホスファターゼの動態と意義について新知見を得たものであり、自己免疫疾患の生物化学的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。