学位論文題名

骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1細胞) の
タンパク質チロシンホスファターゼの精製と性質Purification and characterization of phosphotyrosine protein phosphatase
from a clonal osteoblastic cell line (MC3T3-E1 cell)

学位論文内容の要旨

[緒言]

細胞機能の調節に蛋白質のリン酸化が重要な役割を果たしており、増殖因子受容体の多くがチロシンキナーゼ(PTK)活性を保持していることが報告されている。蛋白質のチロシンリン酸化状態はPTKによるリン酸化と、チロシンホスファターゼ(PTP)による脱リン酸化に依存しており、PTPも細胞機能調節の情報伝達に関与していると推測されている。PTPは現在までに数十種類の報告があり、骨形成系細胞に存在するPTPについても報告されているが、石灰化との関連に着目した報告は少ない。骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1細胞(E1細胞)は分泌基質を石灰化する能力を有し、石灰化とPTPとの関連を研究するのに適していることから、本研究ではその関連を調べるための一環としてPTPの精製を試み、それらの性質を調べ、新種のPTPの有無について検討した。

[材料と方法]

E1細胞は10%牛胎児血清を加えた α -MEMで通法に従い培養した。細胞に0.25M蔗糖溶液を加えて回収後、超音波処理を20秒間2回行って細胞を破碎して懸濁液を得、さらにガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。その後核・未破碎画分、ミトコンドリア画分、細胞膜画分、細胞質画分に分画した。

PTP活性の測定は ^{32}P -ATPでリン酸化した ^{32}P -RCM-lysozymeを用いた。

PTK活性の基質としてグルタミンとチロシンが4:1で結合している重合体を用いた。

精製にはCM-Sepharose, DEAE-Sephacel, Sephacryl S-400, Superdex 200HRカラムを用いた。

SDS-PAGEはLaemmliの方法で行い、ウェスタンブロッティング法は1次抗体として抗PTP1B, PTP1C, PTP1D抗体を用いた。

蛋白質量の測定はLowry法及び、280nmの吸光度によって行った。

[結果]

PTK活性は石灰化部位が観察される時期まで上昇し、その後減少し、再び緩やかに上昇した。PTPの比活性は培養開始後上昇を続けた。一方チロシンリン酸化蛋白質は多数発現しているが、263, 224, 29.5, 28.2kDaの4つの蛋白質の発現量が石灰化時期に増加していた。遠心分離によって分画した4画分についてPTP活性を測定した結果、総活性の73%は細胞質画分に存在していた。また比活性も細胞質画分が最も高いことが認められたため細胞質画分について精製を行

うこととした。

細胞質画分をCM-Sephacryl, DEAE-Sephacelカラムにかけた結果、3種のPTP(E1-PTP1,2,3)に分画された。さらにこのPTPをSephacryl S-400カラムにかけE1-PTP1,2,3はそれぞれ分子量1580,500,66kDaとして溶出した。E1-PTP1をさらにSuperdex 200HRカラムにかけた結果、全細胞ホモジネートと比較して4779倍精製され、回収率は16.8%であった。分子量は933kDaに溶出した。SDS-PAGEでE1-PTP1は33及び39kDaの蛋白質として認められた。

E1-PTP1,2,3と抗PTP1B,1C,1D抗体との反応を調べた結果、E1-PTP1はいずれの抗体とも反応しなかった。E1-PTP2は抗PTP1B抗体と反応し、E1-PTP2,3は抗PTP1D抗体と反応した。E1細胞におけるPTP1BとPTP1Dの培養時間経過にともなう発現量の変化を調べたところ、時間経過とともに発現量は増加していた。E1-PTP1の至適pHは約pH6であったが、E1-PTP2,3ではpH7付近であった。

E1-PTP1,2,3ともにセリン/スレオニンホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸による阻害は見られず、一般的なPTPの阻害剤である亜鉛、モリブデン酸及びバナジン酸により阻害された。マンガン、カルシウムはE1-PTP1,3の活性を阻害したが、E1-PTP2の活性を促進した。マグネシウムはE1-PTP3の活性を阻害し、E1-PTP1,2の活性を増強した。また2価金属キレート剤であるEGTA,EDTAはいずれの活性も阻害した。E1-PTP1は酸性ホスファターゼの阻害剤であるフッ素や酒石酸によってその活性が部分的に阻害された。

[考察と結論]

骨組織の細胞にPTK活性を有する種々の増殖因子受容体が存在しており、骨芽細胞の機能と関連しているとの報告がある。また、PTPの阻害剤が骨組織の細胞のチロシンリン酸化程度を上昇させ、これにより細胞増殖が促進されるとの報告もあり、E1細胞においてもPTPが骨芽細胞の増殖、分化機能調節に関与しているものと推測される。

本研究においてE1細胞の培養中に、チロシンリン酸化レベルが変化する4種類の蛋白質を見いだした。この4種類のタンパク質の同定は今後の課題であるが、分子量が近似するチロシンリン酸化タンパク質についていくつかの報告がある。その中のひとつが、細胞接着に関与するインテグリンを介して増加するタンパク質であり、インテグリンを介したコラーゲンとの接着による石灰化開始シグナルの伝達に関与している可能性がある。PTK,PTPの培養中の変化を解明するためにはおのおのについて調べる必要があるが、本研究ではそのうちPTPの精製を試み、その性質を検討することにした。

PTP1B,1Dの分子量はそれぞれ53kDa,72kDaであり、一方E1-PTP2のSephacryl S-400によるみかけの分子量は500kDaであった。PTP1Dのイムノブロッティング法を行う際、還元剤を除いた試料処理液を使用した場合と、煮沸を行わなかった場合に分子量133kDaとして認められた。以上の結果は、E1細胞ではPTP1B,PTP1Dは会合体を形成して機能していることを示唆している。骨形成系の細胞にPTP1B,PTP1Dが存在しているとの報告はなく、これらPTPが骨芽細胞の増殖、分化機能の調節にも関与していると推測される。

E1-PTP2,3の酵素的性質について過去の報告と比較すると、PTP1BではEDTA,EGTAによって活性が増強され、また、PTP1Dではバナジン酸によって活性が阻害されないこと等が異なっていた。一つの理由として、本研究では培養細胞から分離したPTPであるのに対し、過去の報告では組換え型のPTPの性質であることが考えられた。

E1-PTP1の精製を試みた結果分子量はSDS-PAGEで33あるいは39kDa、Sephacryl S-400カラムで1580kDaであり、Superdex 200HRカラムでは933kDaであった。細胞質型のPTPは細胞内情報伝達系の多数のタンパク質と相互作用していることが確かめられており、界面活性剤非存在下では他のタンパク質との会合によって見かけ上大きな分子量として溶出されてくるものと推定される。ま

た、Sephacryl S-400に比較して、Superdex 200HR後は会合体が小さくなって溶出したものと考えられる。これらの知見はE1-PTP1の機能とも関連すると考えられ、今後の研究によって明らかにされる必要がある。

E1-PTP1の酵素的性質を既に知られているPTPと比較検討した。E1-PTP1の至適pHはpH6付近であり、酸性ホスファターゼの一般的な阻害剤である酒石酸、フッ素によって阻害効果が見られた。しかし、酸性ホスファターゼの至適pHはさらに酸性側であり、阻害剤に対する効果も不完全であることと、酸性ホスファターゼのよい基質であるパラニトロフェニルリン酸がよい基質とならなかったことから、酸性ホスファターゼである可能性は低いと考えられる。セリン/スレオニンホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸に対して非感受性であり、基質作製にはPTKを使用したことからセリン/スレオニンホスファターゼではないと考えられた。PTPの一般的な阻害剤であるバナジン酸、モリブデン酸、亜鉛によって活性が阻害され、またMgCl₂によって活性が増強され、EDTAによって活性阻害されることからマグネシウム要求性であると考えられた。このようなPTPの報告はなく、新たなPTPである可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 村 進 治
副 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 久 保 木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1細胞) の タンパク質チロシンホスファターゼの精製と性質

Porification and characterization of phosphotyrosine protein phosphatase
from a clonal osteoblastic cell line (MC3T3-E1 cell)

審査は担当者がそれぞれ個別に申請者に対し、口頭試問あるいは筆記試験により提出論文の内容とそれに関連した学問分野につき行った。

申請者は、骨形成系の細胞においても標的蛋白質チロシン残基のリン酸化・脱リン酸化によって細胞機能調節がなされているのではないかと推測し、本研究を行った。

MC3T3-E1細胞中のチロシンキナーゼ(PTK)活性は石灰化部位が観察される時期まで比活性が上昇し、その後減少、再び緩やかに上昇した。チロシンホスファターゼ(PTP)活性は培養開始後上昇を続けた。一方チロシンリン酸化蛋白質は多数発現しているが、263,224,29.5,28.2kDa の4種類の蛋白質の発現量が石灰化時期に増加していた。この4種類の蛋白質は未同定であるが、分子量が近似するチロシンリン酸化蛋白質の一つに細胞接着に関与するインテグリンを介して増加する蛋白質があり、これらの蛋白質の一つは、インテグリンを介したコラーゲンとの接着による石灰化開始のシグナルに関与している可能性がある。PTK,PTPの培養中の変化を解明するためには各々について調べる必要があるが、本研究ではその内PTPの精製を行い、その性質について検討している。遠心分離によって分画した画分のうち、細胞質画分が総活性、比活性ともに最も高いため精製の出発材料として細胞質画分を選択している。

細胞質画分にはカラム操作の結果、3種類のPTP(E1-PTP1,2,3)が存在していた。これらのPTPをSephacryl S-400カラムにかけた結果、E1-PTP1,2,3はそれぞれ分子量1580,500,66kDaとして溶出した。E1-PTP1をさらにSuperdex 200HRカラムにかけた結果、分子量933kDaに溶出し、SDS-PAGEでは33及び39kDaとして認められた。

E1-PTP1,2,3と抗PTP1B,1C,1D抗体との反応を調べた結果、E1-PTP1はいずれの抗体とも反応せず、E1-PTP2は抗PTP1B,1D抗体と反応し、E1-PTP3は抗PTP1D抗体と反応した。PTP1B,1Dの分子量は53,72kDaであり、一方E1-PTP2のSephacryl S-400カラムでの分子量は500kDaであった。PTP1Dは還元剤を除いた試料処理液を使用した場合及び煮沸を行わずにイムノブロッティングを行うと分子量133kDaとして認められることを確認しており、PTP1B,1Dが会合体を形成して機能していることを示唆している。また、MC3T3-E1細胞におけるPTP1B,1Dの培養時間経過にともなう発現量の変化を調べたところ、時間経過と共に発現量は増加しており、これらPTPが骨芽細胞の増殖、分化機能の調節への関

与が推測される。

E1-PTP1,2,3ともにセリン/スレオニンホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸による阻害は認められず、一般的なPTPの阻害剤である亜鉛、モリブデン酸、バナジン酸により阻害された。マンガン、カルシウムはE1-PTP1,3の活性を阻害し、E1-PTP2の活性を促進した。マグネシウムはE1-PTP3の活性を阻害し、E1-PTP1,2の活性を増強した。また2価金属キレート剤であるEDTA,EGTAはいずれの活性も阻害した。E1-PTP1は酸性ホスファターゼ(ACP)の阻害剤であるフッ素や酒石酸によってその活性が部分的に阻害された。E1-PTP1の至適pHはpH6であったが、E1-PTP2,3はpH7であった。

E1-PTP2,3の酵素的性質について過去の報告と比較するとPTP1BではEDTA,EGTAによって活性が増強されており、PTP1Dではバナジン酸によって活性が阻害されないことが異なっていた。一つの理由として、本論分では培養細胞から分離したPTPであるのに対して、過去の報告では組換え型のPTPであることが考えられる。E1-PTP1の酵素的性質について既に知られているホスファターゼと比較した。E1-PTP1は至適pHはpH6であり、ACPの一般的な阻害剤であるフッ素・酒石酸によって部分的に阻害された。しかしACPの至適pHはさらに酸性側であること、フッ素・酒石酸による阻害が不完全であること、ACPのよい基質であるパラニトロフェニルリン酸がよい基質とならなかったことからACPではないと考えられる。セリン/スレオニンホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸に対して非感受性であり、基質作成にはPTKを使用したことからセリン/スレオニンホスファターゼではないと考えられる。PTPの一般的な阻害剤である亜鉛、モリブデン酸、バナジン酸により阻害され、マグネシウムによって活性を増強、EDTAによって活性が阻害されることからマグネシウム要求性のPTPであると考えられる。このようなPTPの報告はなく、新種のPTPである可能性が示唆している。

以上のように本論分はMC3T3-E1細胞の石灰化過程にPTK,PTPにより調節されるチロシンリン酸化が関与し、さらに新種のPTPの存在する可能性があることを示唆した点これからの骨代謝の研究に資すること大である。よって申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格を持つものと認めた。