

博士（歯学）田中慎一

学位論文題名

培養歯肉癌細胞株（Ca9-22細胞）からのチロシンホスファターゼの
精製ならびに性状

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔癌を含めた上皮系悪性腫瘍では細胞内蛋白質のチロシン残基のリン酸化亢進やEGF受容体の過剰発現が報告されている。本実験に用いたヒト培養歯肉癌細胞株(Ca9-22細胞)においても、EGF受容体が過剰発現し、細胞内チロシンキナーゼ(PTK)活性が亢進しているという報告があり、このことが細胞の癌化に関与しているものと推測される。蛋白質のチロシン残基のリン酸化状態は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より調節されている。このため脱リン酸化反応を触媒するPTPも細胞の増殖・分化や癌化の情報伝達に関与していることが注目されている。現在まで種々の組織からPTPが同定されているが、口腔癌において発現しているPTPを詳しく調べた報告はない。本研究ではCa9-22細胞の亢進しているPTKに競合しうるPTPの性質と機能を解明するためPTPを精製し、その性状を調べた。

【材料と方法】

実験にはヒト培養歯肉癌細胞株であるCa9-22細胞を用いた。遠心操作により細胞質と細胞膜に分画後、細胞膜分画は0.5%TritonX-100により可溶化し、それぞれの分画を精製の材料とした。PTP活性測定には、チロシン残基を³²P-ATPでリン酸化した³²P-RCM-lysozymeを基質として用いた。ウエスタン・ブロッティング分析は、抗PTP1B、抗PTP1C、抗PTP1D抗体を用いた。精製には、DEAE-Sephacel、Poly(A)-Sephadex、Affi-Gel 501、Affi-Gel Blue、Sephacryl S-300、Superdex-200HRカラムを用いた。

【結果】

³²P-RCM-lysozymeを基質とするCa9-22細胞粗抽質液のPTP活性は34.5～51.2units/mgであり、活性の至適pHはpH6.5～7.5の中性付近に認められた。

細胞分画後の部分精製では、細胞質PTPはDEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィーにより、PTP-C1、C2、C3、C4、C5分画に分画され、細胞膜PTP

はDEAE-Sephacel、Poly(A)-SepharoseカラムクロマトグラフィーによりPTP-M1とPTP-M2分画に分画された。ウエスタン・ブロッティング分析より、PTP-C3、C4、C5、M2分画は抗PTP1B抗体と反応し、分子量は32、44、49、53kDaを示した。また、PTP-C3分画は抗PTP1C抗体と反応し、分子量は79kDaを示し、PTP-C2、C4、M2分画は抗PTP1D抗体と反応し、分子量は81kDaと87kDaを示した。PTP-M1分画とPTP-C1分画はいずれの抗体とも反応せず、更に精製を進めた。

PTP-M1分画は5段階のカラムにより单一に精製され、分子量はゲルfiltrationから447kDa、SDS-PAGEから229kDaと推定された。精製PTP-M1の比活性は細胞膜分画の1651倍、回収率は0.3%であった。

一方、PTP-C1分画は3段階のカラムにより单一に精製され、分子量はゲルfiltrationから36kDa、SDS-PAGEから32kDaと推定された。精製PTP-C1の比活性は細胞質分画の4.9倍、回収率は0.008%であった。精製PTP-C1はN末端のアミノ酸分析を試みたが分析不能であった。

精製されたPTP-M1活性とPTP-C1活性は、いずれもpH6.0付近に至適pHを示した。

PTP-M1活性は一般的なPTP阻害剤であるバナジン酸、モリブデン酸により1mM濃度で阻害され、亜鉛では5mM濃度で阻害された。1型、2A型、2B型セリン-スレオニン・ホスファターゼ阻害剤のオカダ酸と酸性ホスファターゼ阻害剤のフッ素に対してほとんど影響を受けなかつたが、酒石酸によって濃度依存的に阻害された。2価金属キレート剤であるEDTAとEGTAにより活性は阻害され、0.1mM濃度のマンガンでは2.9倍に、1mM濃度のマグネシウムでは3.8倍に活性化された。N-エチルマレイミド(NEM)により活性は阻害された。

PTP-C1活性は一般的なPTP阻害剤である、亜鉛、バナジン酸、モリブデン酸により阻害された。セリン-スレオニン・ホスファターゼ阻害剤のオカダ酸と酸性ホスファターゼ阻害剤のフッ素、酒石酸では阻害されなかつた。カルシウムとマグネシウムにより濃度依存的に活性化され、マンガンでは、わずかに活性化され、EDTAとEGTAにより阻害された。また、NEMにより濃度依存的に活性化された。

【考察】

RCM-1lysozymeを基質としたCa9-22細胞破碎物のPTK活性は16.9～25.6units/minであったが、PTP活性はそれを上回る34.5～51.2units/mgであり、PTPの重要性が示唆された。更に、性質と機能を解明するためPTPの精製を行つた。

ウエスタン・ブロッティング分析により細胞質と細胞膜分画からPTP1BとPTP1Dが検出された。これらは膜貫通領域を持たないため、細胞膜の内表面に結合していると考えられる。つまり、PTP1BとPTP1Dが膜受容体に結合し、細胞質と細胞膜間を移動している可能性を示唆するものである。

更にPTP1DとPTP1CがPTP1Bと同じ分画から検出され、また、PTP1BとPTP1D検出されたPTP-M2分画のゲルろ過分析から、PTP1BとPTP1Dが結合したピークとPTP1Bによるピークが観察された。このことはPTP1BがPTP1C及びPTP1Dと結合する可能性を示唆するものである。PTPはアダプター蛋白質として注目されているが、これらは相互に結合し細胞内情報伝達に関与していると推測される。

PTP-M1は、ゲルろ過とSDS-PAGEから推定された分子量より、ホモダイマー形成性酵素であることが示唆された。PTP-M1はマンガンとマグネシウムにより活性化され、EDTAとEGTAにより阻害されることから、2価金属要求性酵素と考えられる。また、NEMによる阻害は、活性の触媒作用に必要なSH基がブロックされたことを示唆する。PTP-M1活性は酒石酸により阻害され、酸性ホスファターゼに似た性質を示したが、酸性ホスファターゼ阻害剤のフッ素による阻害は不完全である。また、一般的に酸性ホスファターゼには2価金属要求性ではなく、至適pHは、より低い4~5付近であることから、酸性ホスファターゼではないと考えられる。オカダ酸で活性が阻害されなかつたことから、セリン-スレオニン・ホスファターゼでもないと考えられる。報告されている受容体型PTPのPTP α 、PTP ϵ 、PTP ζ 、RPTP β の分子量はPTP-M1とは異なる。CD45は有核血球系細胞のみに発現している。上皮系細胞に優位に発現しているLAR、PTP σ 、PTP δ の分子量はPTP-M1と近接するが、2価金属要求性はない。また、PTP μ は細胞接着により膜表面でホモダイマーを形成する分子量195kDaのPTPであるが、2価金属要求性ではなくPTP-M1の性質に相反する。以上のことから、現在までに報告されている受容体型PTPには、本研究より同定されたPTP-M1に相当するものはなく、新しいPTPである可能性が示唆された。

一方、PTP-C1はゲルろ過とSDS-PAGEから推定された分子量より単量体酵素と考えられる。PTP-C1活性はカルシウム、マグネシウム、マンガンにより活性化され、EDTAとEGTAにより阻害されることから、2価金属要求性酵素と考えられる。オカダ酸、酒石酸、フッ素により阻害されなかつたことから、PTP-C1はセリン-スレオニン・ホスファターゼや酸性ホスファターゼではないと考えられる。一般的なPTP阻害剤である、亜鉛、バナジン酸、モリブデン酸により阻害されたが、NEMにより活性化された。NEMにより活性化されるPTPの例は報告されていない。現在まで報告されている細胞質型PTPのPTP-TC、PTP-H1、PTP-MEG1、PTP-MEG2、PTP-G1、PTP-D1の分子量はPTP-C1の分子量とは一致しなかった。以上のことから、現在までに報告されている細胞質型PTPには、本研究より同定されたPTP-C1に相当するものはなく、新しい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 福田 博
副査教授 松本 章
副査教授 久保木 芳徳

学位論文題名

培養歯肉癌細胞株 (Ca9-22細胞) からのチロシンホスファターゼの 精製ならびに性状

審査は審査担当者が一堂に会して行われた。はじめに、論文提出者に研究の概要の説明を求めた。

細胞の増殖や分化などの細胞機能の調節に蛋白質チロシン残基のリン酸化が重要な役割を果たしている。蛋白質のチロシン残基のリン酸化状態はチロシンキナーゼ(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より調節されている。口腔癌を含めた上皮系悪性腫瘍では細胞内蛋白質のチロシン残基のリン酸化亢進やEGF受容体の過剰発現が報告されている。本研究に用いている培養歯肉癌細胞株(Ca9-22細胞)についても、EGF受容体遺伝子の増幅、EGF受容体の過剰発現、細胞内PTK活性の亢進が報告されている。このことは、EGF受容体のPTKが細胞の癌化に関与していることが推測される。そこで本論文提出者は、PTK活性と競合関係にあるPTPに注目し、口腔癌におけるPTPの性質と機能を明らかにするために、Ca9-22細胞のPTP活性を測定し、さらに、そのPTPの精製とその性質について検索した。

その結果、以下の結論を得た。

1. PTP活性の検出とウエスタン・ブロッティング分析

EGF受容体が過剰発現しているCa9-22細胞の亢進したPTK活性と競合しうるPTP活性は、癌細胞の機能において重要であると推定し、PTK活性ならびに、PTP活性を比較した。RCM-lysozymeを基質とするCa9-22細胞粗抽質液のPTK活性は16.9～25.6units/minであった。一方、³²P-RCM-lysozymeを基質とした細胞粗抽質液のPTP活性は、PTK活性の約2倍である34.5～51.2units/mgであり、活性の至適pHはpH6.5～7.5の中性付近に認められた。既知のPTPの抗体である抗PTP1B抗体、抗PTP1C抗体、抗PTP1D抗体を用いた、部分精製標品のウエスタン・ブロッティング分析から、Ca9-22細胞の細胞質分画にはPTP1B、PTP1C、PTP1Dが、膜分画

にはPTP1B、PTP1Dが検出された。抗体と反応しなかったPTP活性分画は、その性質と機能を解明するため、更に精製し、その性状を調べた。

2. 膜分画PTP(PTP-M1)の精製

抗PTP1B抗体、抗PTP1C抗体、抗PTP1D抗体と反応しなかったPTP-M1分画は、5段階のカラムクロマトグラフィーにより均一になり、1651倍精製された。精製されたPTP-M1は、ゲルろ過からの推定分子量が447kDa、SDS-PAGEからの推定分子量が分子量229kDaを示し、ホモダイマー形成性のPTPであることが示唆された。³²P-RCM-lysozymeを基質としたPTP-M1活性の至適pHは6.0を示し、マンガンとマグネシウムにより活性が増強される2価金属要求性の酵素であった。その性状検討から未同定のPTPである可能性が示唆された。

3. 細胞質PTP(PTP-C1)の精製

抗PTP1B抗体、抗PTP1C抗体、抗PTP1D抗体と反応しなかったPTP-C1分画は、3段階のカラムクロマトグラフィーにより均一になり、4.9倍精製された。精製されたPTP-C1は、ゲルろ過からの推定分子量が36kDa、SDS-PAGEからの推定分子量が32kDaを示す、単量体のPTPであった。³²P-RCM-lysozymeを基質としたPTP-C1活性の至適pHは6.0を示し、2価金属要求性の酵素であった。その性状検討から未同定のPTPである可能性が示唆された。

以上が提出論文の概要である。

統いて、研究内容およびその関連事項、さらに、本研究の独創性、今後の発展性などについて種々質問された。これらの質問に対して、論文提出者からそれぞれ明快な説明、解答が得られた。とくに、PTP精製法については詳細な説明を受け、その精製にはかなりの苦心、工夫の跡がうかがわえた。また、本研究で精製されたPTPと推定される微量物質の末端構造の解明、癌化との関連を明らかにするために正常組織でのPTPの状況を明らかにする必要があるなどの問題点および今後の展望についても述べられた。本論文提出者は関連論文、関連事項についても深く理解しており、本研究を中心に広い学識を有することが認められた。また、本研究が独創性に富み、癌化の機序を解明するための一助として高く評価された。

以上より、本論文提出者が博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。