

氏名(本籍)	なか がわ よしみ 中 川 嘉 (茨城県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第2080号
学位授与年月日	平成16年12月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Cellular Function of Protein Tyrosine Phosphatase PTPϵ and Its Molecular Mechanism (PTP ϵ の細胞における機能とその作用機序の解析)
主査	筑波大学教授 農学博士 深 水 昭 吉
副査	筑波大学教授 農学博士 藤 村 達 人
副査	筑波大学教授 工学博士 王 碧 昭
副査	筑波大学助教授 農学博士 宮 崎 均

論 文 の 内 容 の 要 旨

細胞内分子のリン酸化・脱リン酸化は、分子の活性のオン・オフと連動することから、シグナル伝達の汎用される反応である。実際、細胞の生存、増殖、分化、アポトーシスなど様々な細胞応答と密接に絡むことが知られている。リン酸化反応を司るキナーゼの研究に対して、逆反応を司るホスファターゼの研究は遅れているが、プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) 遺伝子はヒトゲノムに約 90 存在するなど一大ファミリーを形成している。本研究では、卵巣卵胞や血管壁細胞に他種類の PTP が存在することを示し、その中の PTP ϵ に着目し、特に卵巣卵胞における機能とその作用機序に関して解析を行った。

卵胞は種々のホルモンや成長因子に支配されて発育し、排卵、黄体化を経て退縮する。しかし、発育し排卵に至る卵胞は僅かで、殆どの卵胞は途中で閉鎖を起し退縮する。この卵胞の運命決定機構において、卵胞を構成する顆粒膜細胞の生存とアポトーシスが鍵を握る。この過程にも複数種のプロテインチロシンキナーゼ (PTK) の関与が報告されているが、PTP の機能についての報告は研究開始時には皆無であった。そこで、まず PCR 法により卵胞顆粒膜細胞に 25 種類の PTP が発現し、その一部が性周期にともなった発現変動をしていることを見出した。その中で、卵胞閉鎖期すなわち顆粒膜細胞がアポトーシスにより死んで行く時期に発現が上昇する PTP ϵ に着目した。PTP ϵ は同一遺伝子から受容体型の PTP ϵ M と細胞質型の PTP ϵ C の 2 種類が産生されるが、このうちの PTP ϵ M が特に卵胞閉鎖期の顆粒膜細胞に多く発現していた。そこで、PTP ϵ M が顆粒膜細胞に果たす役割を明らかにすると共に、その基質を同定することにより作用機序を明らかにすることを目的に研究を進めた。

実験は、ラット初代培養顆粒膜細胞を用い、アデノウイルスを用いて PTP ϵ M の野生型および不活性型 DA 変異体 (基質をトラップする能力あり) を遺伝子導入することで、PTP ϵ M の機能と作用機序を解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。① PTP ϵ M は顆粒膜細胞のアポトーシスを誘導する。② PTP ϵ M はアクチンファイバーの形成を阻害し、樹状突起を形成させた後、細胞を細胞外マトリックスから離脱させる。③ PTP ϵ M は細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク質である Rho の活性を減少させる。④ PTP ϵ M

は Rho の上流因子であり細胞接着に重要な Src を基質とする。⑤不活性型 DA 変異体が Src と効率よく結合する。以上のことから、PTP ϵ M は、卵胞閉鎖に直接結びつく顆粒腺細胞のアポトーシスを誘導することにより、卵胞発育の負の制御因子として機能することが示唆された。その作用機序としては、Src を基質として脱リン酸化し、結果的に Rho を不活性化させることで細胞と細胞外マトリックスとの接着を低下させてアポトーシスを起こさせる anoikis を誘導すると考えられる。

次に、PTP ϵ がその基質である Src を脱リン酸化するメカニズムについて、両者の種々の変異体を HeLa 細胞に過剰発現する系を用いて検討した。その結果、PTP ϵ M および PTP ϵ C はともに Src の自己リン酸化部位を脱リン酸化した。PTP ϵ C を用いて詳細に調べると、Src の活性化により下流シグナルである ERK の活性化および細胞の形態変化が生じたが、PTP ϵ C による Src の脱リン酸化に伴い Src の活性は抑制され、それら下流因子も同様に活性が抑制された。また、野生型だけではなく不活性型 DA 変異体でも同様の作用を示した。これは DA 変異体と Src が強固に結合するため、Src が下流のシグナル分子と相互作用できなくなった結果と考えられる。また、DA 変異体は野生型より効率よく Src と複合体を形成し、さらに、Src 依存的に PTP ϵ C のリン酸化レベルが上昇した。このリン酸化の上昇は不活性型変異体の方が野生型に比べて顕著であった。これは、PTP ϵ C が Src の基質であり、また PTP ϵ C は自己脱リン酸化能を持つことを示している。従って、PTP ϵ C と Src はお互いに酵素、基質の関係にある。さらに、PTP ϵ C の Src によるリン酸化部位と予測される C 末端にあるチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した YF 変異体は、Src の自己リン酸化部位の脱リン酸化をはじめ、Src による下流のシグナルへの作用といった PTP ϵ C の働きを消失させた。PTP ϵ C と Src の相互作用のメカニズムとして、以下のことが考えられる。まず、Src は刺激依存的に自己リン酸化によりそれ自身の活性を上げ、PTP ϵ C を Src の基質としてリン酸化する。その後、PTP ϵ C は自己脱リン酸化能により Src によりリン酸化された部位を脱リン酸化し、それと共に Src の自己リン酸化部位を脱リン酸化し、最終的に Src の活性を低下させるという機構である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、卵胞顆粒膜細胞に存在し、その発現が卵胞閉鎖時に上昇するプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) である PTP ϵ に着目し、卵巣における機能とその作用機序、さらには基質として同定した Src との相互作用のメカニズムに関して解析したものである。

一般に、プロテインチロシンキナーゼ (PTK) に比べ PTP に関する研究は遅れており、中でも卵巣顆粒膜細胞における PTP 研究は、細胞調製の煩雑さや遺伝子導入効率の低さから極めて遅れている。著者は、アデノウイルスをベクターに用いることにより、遺伝子導入効率の問題を克服し、興味ある知見を得た。すなわち、PTP ϵ M は Src を基質としてそれを脱リン酸化し、結果的に細胞接着に重要な低分子量 G タンパク質 Rho を不活性化させることで細胞を細胞外マトリックスから離脱させ、アポトーシスを誘導することを明らかにした。卵胞閉鎖に直接結びつく顆粒膜細胞のアポトーシスを誘導することは、PTP ϵ M が卵胞発育の負の制御因子として機能することを意味している。顆粒膜細胞は、細胞外マトリックス因子フィブロワチンを多く産生し、また、卵胞内ではマトリックスメタプロテアーゼが時期特異的に発現しており、細胞接着の制御が卵胞発育に深く関与すると考えられている。従って、細胞接着に関わる Rho や Src などの分子を制御することで細胞接着を緩める PTP ϵ M は、卵胞閉鎖を演出する重要な役者の一つと考えられ非常に重要なデータと言える。

著者はさらに、PTP ϵ と Src との相互作用に関して様々な変異体を用いた過剰発現系で解析を加えた。その結果、PTP ϵ と Src はお互いに酵素と基質の関係にあることが分かった。すなわち、Src は刺激依存的に自己リン酸化によりそれ自身の活性を上げ、PTP ϵ C を Src の基質としてリン酸化する。その後、PTP ϵ C は

自己脱リン酸化能により Src によりリン酸化された部位を脱リン酸化すると共に、Src の自己リン酸化部位を脱リン酸化するというものである。PTP が PTK を脱リン酸化するために、自らが一度 PTK の基質としてリン酸化させるという機構は非常に興味深い。

以上のように、本研究は、卵胞発育の制御のメカニズムという意味だけでなく、PTP とその基質の分子レベルでの相互作用のメカニズム、という意味においても非常に興味深い知見を提供しており、その研究成果は重要と判断できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。