

氏名(本籍)	しお た まさ ゆき 塩田正之(山口県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1890号
学位授与年月日	平成15年1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	農学研究科
学位論文題目	Study on Biological Roles of Protein Tyrosine Phosphatase PTP20 Expressed in Ovarian Granulosa Cells (プロテインチロシンホスファターゼPTP20の機能と作用機序に関する研究)
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 馬場忠
副査	筑波大学教授 農学博士 金井幸雄
副査	筑波大学助教授 農学博士 宮崎均

論文の内容の要旨

卵胞発育・閉鎖はホルモン、成長因子、サイトカインといった様々な因子によって高度に制御されており、性周期に伴い卵胞の構成細胞である顆粒膜細胞では、増殖、分化、アポトーシスといった一連の現象が極めて短期間に起こる。これら因子の刺激により、細胞内では種々の情報伝達分子のチロシンリン酸化、脱リン酸化が盛んに起こり、ヒトゲノム中に200個あると言われるプロテインチロシンホスファターゼ(PTP)も制御因子として重要な役割を担っていると予想される。しかし、PTPによる制御という視点から捉えた卵胞発育制御の研究はいまだかつて皆無である。そこで、顆粒膜細胞に焦点を絞り、そこに発現するPTPのクローニングを行い、性周期のステージに伴い発現変動を示すPTPに着目し、その生理機能・作用機序を明らかにすることを本研究の目的とした。

実験材料として、3週齢幼若雌ラットに妊馬血清性腺刺激ホルモン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを投与することで、性周期の各ステージに対応する卵巣(排卵前卵胞、閉鎖卵胞、黄体、退縮黄体)を人工的に作製した。これらより調整したRNAを用いてPTPの同定および発現量の変化の解析を行い、また凍結切片を作製しPTPの局在の観察に用いた。また未処理26日齢幼若雌ラットより初代培養した顆粒膜細胞を一連の解析に用いた。

PTPが共通に持つ触媒ドメインに縮重プライマーを設計し、PCRクローニングにより少なくとも22種の既知あるいは既知のものと高い相同性を持つPTPを得た。このうち任意に7種類を選び、各々の特異的プライマーを作製し、性周期の各ステージでの発現変動を定量的PCR法で調べた。その結果、PTP20が大きな変動を示すことが分かった。

PTP20はラットPC12細胞からクローニングされた細胞質型PTPで、PESTファミリーに属し、N末端側の触媒ドメイン、それに続くPSTリッチ領域、C末端側の核移行様シグナルの3つの特徴的ドメインから構成される。*in situ*ハイブリダイゼーション法により卵巣におけるPTP20の分布を観察した結果、小卵胞の顆粒膜細胞及び莖膜細胞あるいは大卵胞、閉鎖卵胞の顆粒膜細胞に特異的に発現し、黄体、間質、卵には存在しなかった。高効率な遺伝子導入系の必要性から組換えアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を確立し、顆粒膜細胞において90%以上の遺伝子導入効率を得た。顆粒膜細胞初代培養系を用い、PTP20野生型、酵素活性欠失変異体を過剰発現した後の細胞内チロシンリン酸化の程度の変化を、抗リン酸化チロシン抗体を用いて解析した。その結果、

190kDaのタンパク質がFSH刺激後1時間で選択的に脱リン酸化された。解析の結果、このタンパク質は細胞骨格制御に関わるRhoの調節タンパクであるp190RhoGAPであることが分かった。間接蛍光抗体法を用いた解析より両者が細胞質において一部、共局在すること、p190RhoGAPのリン酸化に関わるSrcやPyk2といったチロシンキナーゼにPTP20は影響を与えないことから、PTP20はp190RhoGAPを基質として直接脱リン酸化することが強く示唆された。さらに、PTP20野生型を過剰発現した細胞は、FSH刺激に応じて24時間から48時間で、Rho活性を迎えた時と同様の形態変化（丸みを帯び細い突起を出す）を起こし、一部の細胞は接着の低下から細胞死を起こすことが観察された。

以上より、顆粒膜細胞において、PTP20は基質であるp190RhoGAPに作用し、FSH刺激に応じて卵胞発育における調節因子として機能していると考えられる。その分子機序として、p190RhoGAPを脱リン酸化することで活性化し、その結果Rhoが不活性化され、アクチン骨格の再構成が起きることがあげられる。

審査の結果の要旨

卵巣卵胞の主要な構成細胞である顆粒膜細胞は、性周期において、生存、死、増殖、分化など劇的な変動を起こす。これら細胞応答の制御には、細胞内タンパク質チロシン残基のリン酸化・脱リン酸化が密接に関与することが予想される。しかし顆粒膜細胞において、リン酸化を司るプロテインチロシンキナーゼ（PTK）の研究は報告されているものの、脱リン酸化を担うプロテインチロシンホスファターゼ（PTP）の研究は皆無である。本研究は、顆粒膜細胞に発現するPTPに焦点を当てた細胞生物学的研究である。

本研究では、ラット卵巣を用いて、まず、22種類の顆粒膜細胞に発現するPTPを同定し、このうち、少なくとも4種類のPTP（PTP-MEGLI, PTP20, PTP ϵ M, PTP ϵ C）が性周期の過程で発現が大きく変動すること、を明らかにした。これらの情報を元に、生理機能が不明であるPTP20に着目し、その顆粒膜細胞での機能について以下の知見を得た。手法として、PTP20の野生型や種々の変異型をアデノウイルスベクターを用いて細胞に遺伝子導入し、細胞の形態変化やリン酸化レベルの変動を中心に検討した。その結果、190kDaのタンパク質が、PTP20により選択的に脱リン酸化された。卵胞刺激ホルモン（FSH）存在下で、このPTP20の脱リン酸化能は増強された。免疫沈降とウエスタンブロットの結果から、このタンパク質は細胞骨格制御に関わるRho調節タンパク質であるp190RhoGAPであることが示された。間接蛍光抗体法を用いた解析より、PTP20とp190RhoGAPが細胞質において一部、共局在することが分かった。PTP20は、p190RhoGAPのリン酸化に関わるSrcやPyk2といったPTKに影響を与えなかった。PTP20野生型を発現した細胞は、FSH刺激依存的に、Rho活性を抑えた時と同様の形態変化（丸みを帯び細い突起を出す）を起こした。

以上のように、本研究では、顆粒膜細胞においてPTP20はp190RhoGAPを直接の基質として作用し、FSH刺激に応じて卵胞発育における調節因子として機能していることが示された。また、その分子機序として、p190RhoGAPを脱リン酸化することで活性化させ、その結果Rhoが不活性化され、アクチン骨格の再構成が起きることを明らかにした。これらの知見は新規のものであり、今後の卵巣研究におけるPTP機能の重要性を提示した先駆的研究として高く評価できる。

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。