

氏 名 Chow, Pak Hong Jeremy

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1204 号

学位授与の日付 平成 20 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Proteolytic processing of protein tyrosine phosphatase
receptor type Z in the CNS

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 野田 昌晴
教授 上野 直人
教授 門松 健治（名古屋大学）

論文の要旨

Protein tyrosine phosphatase receptor type Z (Ptpz, also known as PTP ζ or RPTP β) is preferentially expressed in the brain as a major chondroitin sulfate proteoglycan. Three splicing variants, two receptor-type isoforms and one secretory isoform, are known. Ptpz interacts with the PSD95 family through its intracellular carboxyl-terminal PDZ-binding motif in the postsynaptic density of the adult brain. *Ptpz*-deficient mice display impairments in spatial and contextual learning. Here, he shows that the extracellular region of the receptor isoforms of Ptpz are cleaved by metalloproteinases including ADAM-17 (TACE) and subsequently the membrane-tethered fragment is cleaved by presenilin/ γ -secretase, releasing its intracellular region into the cytoplasm: Noteworthy, the intracellular fragment of Ptpz shows nuclear localization. Administration of GM6001, an inhibitor of metalloproteinases, to mice demonstrated the metalloproteinase-mediated cleavage of Ptpz under physiological conditions. Furthermore, he identified the cleavage sites in the extracellular juxtamembrane region of Ptpz by TACE and MMP-9. This is the first evidence of the metalloproteinase-mediated processing of an RPTP in the central nervous system.

He also identified the proteolytic processing of Ptpz by plasmin in the adult mouse brain, which is markedly enhanced after kainate-induced seizures. He estimated the cleavage sites in the extracellular region of Ptpz based on cell-based assays and *in vitro* digestion experiments with recombinant proteins. The findings indicate that Ptpz is a physiological target for activity-dependent proteolytic processing by the tPA/plasmin system, and suggest that the proteolytic fragments are involved in the structural and functional processes of the synapses during learning and memory.

論文の審査結果の要旨

受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (RPTP) は 20 種存在し、細胞外領域の構造的特徴から 8 つのサブファミリーに分類される。Ptpz (PTPz/RPTPb) は、Ptpg と共に R5 サブファミリーを構成しており、主に中枢神経系に発現している。Ptpz はプロテオグリカンとして発現する唯一の RPTP である。申請者は *in vitro* 及び *in vivo* の研究から、Ptpz がメタロプロテアーゼ、プラスミン、g-セクレターゼによって多様なプロセッシングを受けることを初めて明らかにした。

Ptpz の cDNA は 1992 年にクローニングされ、1 つの遺伝子から 3 種類のスプライスバリエーション、すなわち、受容体型の Ptpz-A (long form) 及び Ptpz-B (short form)、そして分泌型の Ptpz-S (Ptpz-A の細胞外領域に相当する) が生成することが知られている。成熟マウスの脳には全てのアイソフォームの mRNA が発現しているが、タンパク質レベルでは Ptpz-A がほとんど検出されない一方で、低分子量の未知の分子種が複数抗体によって検出されるなど、分子の発現性状において不明な点が残っていた。

本研究では、まず培養細胞系において、受容体型の Ptpz-A 及び Ptpz-B が細胞膜直上で切断される ectodomain shedding を受けることを見出し、引き続いて本分子がプロテアーゼによって受けるプロセッシングの詳細について検討を行った。Ptpz-A 及び-B では、細胞外の短い領域と細胞膜貫通領域をコードしているエクソン 13 が共通に使われている。メタロプロテアーゼ (TACE 及び MMP-9) はこの領域内で両者を切断していると推定されたが、その正確な部位を合成ポリペプチドを用いた *in vitro* の実験で明らかにした。次にメタロプロテアーゼの阻害剤 GM6001 の脳内投与実験によって、shedding が培養細胞系だけでなく *in vivo* で起きる生理的現象であることを明らかにした。

この shedding によって C 末端側の断片 (ZDE) は細胞膜上に残されるが、続いて g-セクレターゼ (プレセニン) によって更に切断され、細胞内フラグメント (Z-ICF) として遊離することを見いだした。さらに、プロテアソーム阻害剤の処理によって、Z-ICF が細胞質だけでなく核内にも移行していることを明らかにした。グリオーマ細胞への Z-ICF の強制発現実験によって、Z-ICF が核に集積するとともに細胞分化が誘導されたことは、Z-ICF が遺伝子の発現調節に係わる可能性を示唆している。

本研究では、メタロプロテアーゼに加えて、プラスミンによる細胞外領域のプロセッシング様式についても明らかにしている。正常脳で Ptpz-A タンパク質がほとんど検出されない理由として、Ptpz-A のプラスミンに対する感受性が Ptpz-B に比べ約 30 倍も高いことを明らかにしている。

Ptpz のノックアウトマウスでは海馬依存性学習能力や海馬 CA1 シナプスにおける LTP (長期増強) の異常が認められているが、最近、記憶・学習、神経可塑性の制御におけるメタロプロテアーゼやプラスミンの重要性が指摘され始めた。本研究では、神経興奮性アミノ酸であるカイニン酸の投与によって、脳内でプラスミンによる Ptpz の断片化が起こることも明らかにしており、メタロプロテアーゼによる生理的条件下での shedding と併せて、Ptpz のプロセッシングの記憶・学習の成立と保持への関連を示唆する知見として非常に興味深い。

本研究結果については既に 2 報の論文として国際専門誌に発表済みである。

以上、本研究は Ptpz のプロセッシングの詳細を初めて明らかにするとともに、その生理的意義についての考察を初めて行ったものとして高く評価できる。