

氏 名 西 脇 妙 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第335号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 受容体型チロシンホスファターゼPTPとアイソフォームの
構造、発現および糖鎖修飾の解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 山森 哲雄
教 授 野田 昌晴
教 授 諸橋 憲一郎
教 授 長濱 嘉孝

論文内容の要旨

発生期の脳には、多種多様なプロテオグリカンが豊富に存在し、脳の形態形成において重要な役割を果たしていると考えられている。モノクローナル抗体MAb6B4の抗原分子である6B4プロテオグリカンは、分子量約300kDaのコアタンパク質を持つ可溶性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。MAb6B4を用いた免疫組織化学的研究から、本分子は層構造形成時の大脳皮質においては、移動中の神経芽細胞およびその移動の足場となる放射状グリア細胞上に、また後脳部においては、苔状線維と、その標的であるプルキンエ細胞、ゴルジ細胞、および小脳深部核の神経細胞がシナプスを形成する時期に一致して、これらの神経細胞および苔状線維上に観察される。

筆者は精製6B4プロテオグリカンのコアタンパク質の一次構造を明らかにするため、6B4プロテオグリカンに対するポリクローナル抗体（抗6B4プロテオグリカン抗体）を用いてラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、以下の3種類の分子をコードする cDNA が単離された。

(1) ヒトPTP ζ のラットホモログと考えられる分子；細胞外に carbonic anhydrase 様ドメインとフィブロンネクチンタイプⅢ様ドメイン、そしてセリン、グリシンに富む領域を持ち、膜貫通ドメインを経て、細胞内に2つの隣接するチロシンホスファターゼ（PTP）ドメインを有する。

(2) (1)の分子のセリン、グリシンに富む領域の大部分を欠いた分子。

(3) (1)の分子の膜貫通領域以下をもたない分泌型の分子。

このことは、PTP ζ 遺伝子から選択的スプライシングによって3つの異なる分子が生成すること、そのうち(3)の分子が6B4プロテオグリカンに相当する分子であることを意味している。以後(1)、(2)および(3)の分子をそれぞれPTP ζ -A、-Bおよび-S、またこれらの分子を総称してPTP ζ と呼ぶ。

これまでプロテオグリカン型のPTPの存在は知られていなかったが、PTP ζ -Sがプロテオグリカンであることから、PTP ζ -A および -Bもコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在する可能性が考えられる。そこで筆者は、生後0および20日令ラット脳より得られた膜画分のCHAPS抽出物よりプロテオグリカン画分を調製し、PTP活性を測定した。その結果、膜結合型プロテオグリカン画分にPTP活性が存在すること、PTP活性のピークからPTP ζ -Aおよび-Bが検出されたことにより、この活性が両分子に由来することが明らかとなった。

次に、胎生13日から生後52日までの発生段階における、PTP ζ 分子種の発現とコンドロイチン硫酸鎖による修飾の変動を解析した。PTP ζ -Aは常にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在し、発現量は胎生13日から生後0日までほとんど変化がないが、その後急激に減少した。これに対し、PTP ζ -Bは胎生13日から生後52日までほぼ一定の発現量を示すが、胎生13日から生後0日までコンドロイチン硫酸鎖によって修飾されていないPTP ζ -B分子が存在した。PTP ζ -SはPTP ζ -Aと同様、常にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして存在した。PTP ζ -SはPTP ζ -AおよびPTP ζ -Bと比べると約10倍量発現しており、その発現量は胎生期に徐々に増加し、生後8日目以降徐々に減少した。このようにPTP ζ はそれぞれのアイソフォームによって異なった発現およびコンドロイチン硫酸鎖の修

飾の制御を受けていることが示された。またコンドロイチン硫酸以外の糖鎖の修飾についても、アイソフォームによる違いが見られた。PTP ζ -AとPTP ζ -SはHNK-1、LewisXおよびケラタン硫酸によって修飾されているのに対し、PTP ζ -Bはこれらの糖鎖によって修飾されていなかった。このことは、PTP ζ -Bにおいて欠失しているコアタンパク質部分がこれらの糖鎖の修飾部位であることを示唆している。

PTP ζ はHB-GAM/pleiotrophin, tenascin, N-CAM, L1, Nr-CAM, TAG-1およびcontactinと結合することが報告されているが、PTP ζ -A、-Sおよび-Bにおけるコアタンパク質の一次構造あるいは糖鎖修飾の違いは、これらの分子の細胞外領域に結合するリガンドが異なっている可能性を示唆している。特にPTP ζ -Bはコンドロイチン硫酸鎖の修飾が胎生期に変動しており、PTP ζ -Bのリガンドの種類、あるいはリガンドとの結合の親和性が各発生段階において異なっている可能性がある。

また、PTP ζ -Aおよび-Bの機能に関する知見を得るため、マウス繊維芽細胞であるL細胞にPTP ζ -Aおよび-Bを強制発現し、細胞内局在を解析した。PTP ζ -Aおよび-BはL細胞において、ともにPTP活性を持ったコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして発現した。そして両者ともに細胞周縁部のラッフル膜上や突起上に局在し、F-アクチン、cortactin、および talinと一致した局在を示した。また初代培養大脳神経細胞においては、抗6B4プロテオグリカン抗体による染色が成長円錐や糸状仮足に観察された。これらの知見から、PTP ζ -Aおよび-Bが細胞骨格系の関与する現象において何らかの役割を果たしていることが推測される。

論文の審査結果の要旨

本研究は、受容体型チロシンホスファターゼ ζ (PTP ζ)アイソフォームの構造を明らかにするとともに、その発現及び糖鎖修飾を発生過程を追って解析したものである。更に、cDNA発現細胞及び初代培養細胞における本分子の細胞内局在を明らかにし、その分子機能に関する考察を加えている。

申請者は、脳中の細胞外マトリックスに多量に存在するコンドロイチン硫酸(CS)プロテオグリカン(PG)の脳形成における役割を明らかにする研究の端緒として、その内の1つである 6B4 PGのコア蛋白の構造を cDNAクローニングによって明らかにすることを試みた。その結果得られた cDNAは、既にクローニングされていた受容体型 PTP ζ の細胞外領域にあたる分子をコードしていることが明らかとなった。PTP ζ には更に、細胞外領域の一部(約 800 アミノ酸)が欠失した分子種 dvPTP ζ の存在も報告されており、この結果と合わせて、RNAスプライスによって PTP ζ 遺伝子から3種の分子種が生成すること、その内の1つが可溶性 PGとして細胞外に分泌されている 6B4 PGであることが明らかとなった。

申請者は、3つのアイソフォームを PTP ζ -A、PTP ζ -B (dvPTP ζ)、PTP ζ -S (6B4PG)と命名し、次に、ラット脳におけるこれらの分子の発現と糖鎖修飾の違いを発生過程を追って追求した。その結果、以下のことを明らかにしている。

- ① 3種のmRNAは全て、胎仔期に徐々に増加し、出生期をピークとして漸減して行く。
- ② PTP ζ -A蛋白は生後消失する。
- ③ PTP ζ -Bは胎仔期には CSによる修飾を受けていないものが多量に存在するが、生後は全て CS PGとなる。
- ④ PTP ζ -Aと PTP ζ -Bは、mRNA量と蛋白量の間に関係が見られないことから、翻訳以後の段階でも調節を受けていると考えられる。
- ⑤ PTP ζ -Aと PTP ζ -Sは、HNK-1、Lewiz X及びケラタン硫酸(KS)によって修飾されているのに対し、PTP ζ -Bはこれらの糖鎖を持っていない。

次に、PTP ζ -Aと -Bを L cellに構成的に発現し、その細胞内局在を調べた。その結果、以下のことが明らかとなった。

- ① PTP ζ -Aと -Bは L cellにおいて、PTP活性を有する PGとして発現する。
- ② 両者ともに、細胞周縁部のラッフルリング膜や突起上に局在する。
- ③ F actin、cortactin、talin等と局在が一致している。
- ④ 初代培養脳神経細胞においても、成長円錐や、糸状仮足に局在する。

PTP ζ は、N-CAM、Ng-CAM、F3等の細胞接着因子、テネイシン等の細胞外マトリックス分子、プレイオトロフィン、ミドカインといった増殖・分化因子と結合することが知られているが、その機能については全くといっていい程知見がなかった。申請者の研究は、これらの様々な細胞外の分子からの結合シグナルを蛋白質脱リン酸化を介して細胞骨格系に伝えることによって、細胞運動や突起伸展性を調節している可能性を初めて示したものであり、その学術的価値は高く、博士論文として充分価値があると認められる。

また試験結果については、学位論文として提出された研究結果について説明した後、審査委員が研究の内容及び周辺の知識について試問を行った。その結果、研究内容の把握、位置付け、結果の考察、基礎知識ともに、博士号を授与するに十分なレベルにあると判断

された。また、論文もこれまで共著も含め、国際誌に7報発表しており、外国語の学力にも問題がないと判断された。これらのことを総合的に判断して合格とした。