



Title	cDNA cloning of a novel protein tyrosine phosphatase with homology to cytoskeletal protein 4.1 and its expression in T-lineage cells
Author(s)	澤田, 元幸
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39004
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	澤田 元幸
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第11764号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	cDNA cloning of a novel protein tyrosine phosphatase with homology to cytoskeletal protein 4.1 and its expression in T-lineage cells (細胞骨格タンパク相同性ドメインを有する新しいチロシンフォスファターゼのクローニングとそのT細胞系リンパ球での発現)
論文審査委員	(主査) 教授 濱岡 利之
	(副査) 教授 平野 俊夫 教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

【目的】

細胞の分化や活性化過程を細胞内で制御する機構として、タンパクのチロシンリン酸化・脱リン酸化が重要な役割を果している。しかし、リン酸化を行うチロシンキナーゼに比べ、これとは逆の脱リン酸化を行うチロシンフォスファターゼの役割については未だ不明なことが多い。例えばリンパ球系細胞で lck, fyn などのチロシンキナーゼが重要な役割を果たしている。しかしチロシンフォスファターゼについては、CD45などの少数の例外を除いて、はたしてどのようなチロシンフォスファターゼが発現しているかさえ殆ど明かにされていない現状である。そこで我々は、マウスのリンパ系組織で発現する各種チロシンフォスファターゼを検索する目的で、フォスファターゼドメインで保存されたアミノ酸配列を利用して polymerase chain reaction (PCR) を行った。その過程でリンパ球の分化に伴なって発現レベルが変化する新しい細胞質型チロシンフォスファターゼを見い出したので、その一次構造と発現について解析を行った。

【方法ならびに成績】

1) チロシンフォスファターゼ PTP36の cDNA クローニング

フォスファターゼドメインで保存されたアミノ酸配列に対応する degenerative な PCR プライマーを用いて、各種のフォスファターゼ cDNA 断片を得た。その一つをプローブに用いてマウス胸腺 cDNA ライブラリーから約2.2Kb の cDNA 断片を得たが、より上流の配列を含むクローンを分離できなかった。そこで、アンカー PCR 法によって上流の配列を得た。

2) PTP36の一次構造

3.9Kb をカバーするオーバーラップしたクローンの解析から、PTP36は、1189個のアミノ酸からなり、その C 末端にただひとつチロシンフォスファターゼドメインをもつ。その N 末端は、細胞骨格の構成タンパクのひとつであるバンド4.1の N 末端と相同性を有している。類似の構造をとる既知のフォスファターゼ分子としては、MEG-01とPTPH1がある。しかし、N 末端のバンド4.1様ドメインと C 末端のフォスファターゼドメインを結ぶ約600アミノ酸からなるスペーサー部分は、これらのフォスファターゼと PTP36で大きく異なっており、興味深いことに PTP36にのみ SH 3 ドメインに結合するコンセンサス配列に適合した、プロリンに富む配列が認められた。

3) PTP36の mRNA の発現

マウスの腎、胸腺、脾で発現を認めた。また弱いながら、骨髓、脳でも発現していたが、肝での発現は認めなかつた。細胞株では各種T系細胞株に発現していたが、これ以外に胸腺ストローマ細胞株や線維芽細胞株で発現が認められた。分化過程にある胸線Tリンパ球では、未熟なCD⁴⁺ CD⁸⁺段階の細胞で一過性に発現がみられたが、成熟Tリンパ球での発現は弱く、また、ConAで活性化しても変化しなかった。

4) 単クローナル抗体の作成とPTP36タンパクの検出

大腸菌で発現させたPTP36の組み換えキメラタンパクを抗原としてラットを免疫し、抗PTP36抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。この抗体は、PTP36遺伝子を導入したCOS-7細胞で、約130kDaのタンパクを認識した。

【総括】

以上、マウス胸腺で発現する新しい細胞質型チロシンフォスファターゼPTP36のcDNA全長を得、その一次構造を決定し、発現を明らかにした。PTP36はそのC末端に、1つのフォスファターゼドメインを持つ。そのN末端には細胞膜への局在に関わると思われる、細胞骨格の構成タンパクと相同性を有するドメインが存在する。またこの2つのドメインを結ぶスペーサー部分には、SH3結合サイト様のプロリンに富む配列が認められた。PTP36タンパクに対する単クローナル抗体を作製し得たので、今後PTP36の細胞内局在や、他のシグナル伝達分子との会合についても検討可能となった。

PTP36はリンパ系臓器だけでなく、それ以外の臓器でも発現が認められた。しかし、分化の途上にある胸腺Tリンパ球にだけ限ってみると、CD⁴⁺ CD⁸⁺細胞で一過性に発現が認められた。つまりPTP36の発現レベルは、T細胞の分化過程で特異的に制御されており、このことは、PTP36がT細胞分化の制御に関与する可能性を示唆するものと考える。

論文審査の結果の要旨

細胞の様々なシグナル伝達系に於て、タンパクのチロシンリン酸化は、重要な役割を果たしている。しかし、チロシンリン酸化を行うキナーゼに比べて、脱リン酸化を行うフォスファターゼの役割は殆ど明らかにされていない。例えば、Tリンパ球でチロシンフォスファターゼCD45が抗原レセプターのシグナル伝達過程に必須である。しかし、これ以外のチロシンフォスファターゼの関与については、全く不明である。

本研究は、未熟T細胞で一過性に発現するチロシンフォスファターゼPTP36の全一次構造と発現を初めて明らかにしたものである。その結果、1) PTP36は細胞質型のチロシンフォスファターゼで、細胞骨格タンパクband4.1様ドメイン、SH3結合モチーフ様配列を持ち、2) 胸腺ストローマ細胞をはじめ様々な種類の細胞で発現するが、分化過程のT細胞では未熟細胞にだけ一過性に発現することを解明した。更に、3) PTP36に対するモノクローナル抗体を樹立することによって、タンパクレベルでの解析を可能にし、4) PTP36が細胞膜の近傍に存在していることを明らかにした。

PTP36の生理的機能についてはまだ解明途上であるが、本研究は今後、PTP36のシグナル伝達系への関与を調べる上で重要な基礎となるべき情報を提供するものであり、本論文は学位に値するものと認められる。