The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Direct suppression of TCR-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase by leukocyte protein tyrosine phosphatase, a tyrosine-specific phosphatase
Author(s)	大洞, 将嗣
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41764
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

【26】

氏　　名	大洞將嗣（おおほら まさつぐ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15231　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Direct suppression of TCR-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase by leukocyte protein tyrosine phosphatase, a tyrosine-specific phosphatase （チロシン特異的脱リン酸化酵素、leukocyte protein tyrosine phosphatase によるTCRを介したextracellular signal-regulated kinaseの活性化の直接抑制）
論文審査委員	（主査） 教　授　濱岡　利之 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　審良　静男

論文内容の要旨

【目的】

ERKはMAPキナーゼ（MAPK）ファミリーに属し、T細胞の分化や活性化に関与することが知られている。ERKは、上流のキナーゼであるMEKでリン酸化されて活性化され、逆に脱リン酸化されることで不活性化される。哺乳動物ではこれまでMAPKの脱リン酸化にチロシン特異的な脱リン酸化酵素（PTP）が関わるか否かは明らかでなかった。

我々は、yeast two-hybrid法を用いて、神経系に特異的に発現しているチロシン脱リン酸化酵素PTPBR 7の標的分子としてERK 1を同定した。我々は、PTPBR 7がERK 1、ERK 2両分子に直接結合し、ERKの脱リン酸化を行うことを明らかにした。LC－PTP／HePTPは、PTPBR 7と類似の構造をとるPTPで、血球細胞に特異的に発現する。PTPによるMAPKの抑制機構を明らかにする目的で、LC－PTPがPTPBR 7と同様にMAPKを標的とするかどうか検討した。さらに、PTPとMAPKの結合部位、リンパ球におけるLC－PTPの機能を明らかにすることを目的とした。

【成績】

最初に、LC－PTPが、ERKを試験管内で脱リン酸化できるかどうかを調べた。その結果、LC－PTPは、試験管内でERKを直接脱リン酸化した。次に、細胞内においてもLC－PTPが、ERKを直接脱リン酸化できるかどうかを調べた。構成的に活性化されたMEK 1の変異体を用いて、上流のシグナル伝達過程非依存性にERKを活性化した場合でも、LC－PTPの過剰発現は、ERKの脱リン酸化を誘導した。従って、LC－PTPは、ERKを直接の標的とすると考えられた。このとき、酵素活性を失ったLC－PTPの変異体は、ERKを脱リン酸化できなかった。次に、LC－PTPがERKカスケードを抑制するかどうかを、Jurkat細胞においてレポーターアッセイを用いて検討した。その結果、LC－PTPは、TCR刺激におけるERKを介した転写活性を抑制した。さらにTCRのシグナル伝達過程の上流部分をionomycine＋PMA刺激でバイパスした場合でも転写活性を抑制した。また、同様の刺激時におけるNF－ATの活性化も抑制した。

LC－PTPのERK 2との結合領域を同定するため、LC－PTPの様々な変異体を作製した。in vivoまたはin vitroにおけるbinding assayの結果、LC－PTPは、ホスファターゼドメインの外側の、N末端部分だけでERK 2と結合できることが明らかとなった。この領域内の41、42番目の保存されたArgをAlaに置換すると、ERK 2との

結合能が失われ、これらのアミノ酸が結合に必須なことが判明した。ERK 2と結合しないLC－PTP変異体は、ERK 2のリン酸化や機能を抑制しなかった。また、その他のMAPKに結合するかどうかを調べたところ、LC－PTPはp38 αとはERK 2と同じドメインで結合したが、JNK 2とは全く結合しなかった。次に、ERK 2におけるLC－PTPの結合部位を検討した。ショウジョウバエのsevenmaker（sem）変異は、MAPKの点突然変異で、機能亢進が見られる。しかし、試験管内でのキナーゼ活性は野生型と殆ど変わらず、この変異が、MAPキナーゼの調節異常に関連すると考えられていた。そこで、semに相当する点突然変異をヒトERK 2に導入したところ（ERK 2^{sem}）、LC－PTPとの結合性の消失とともに、LC－PTPによる抑制も受けなくなった。また、p38 αにおいても、semに相当する点突然変異を導入した場合（$p38^{sem}$）、LC－PTPとの結合性が消失した。

【総括】

LC－PTPはERK 2と直接結合し、脱リン酸化する。LC－PTPは、構成的に活性化されたMEK 1を使用してERK 2をリン酸化した場合でも、ERK 2を脱リン酸化した。酵素活性を失ったLC－PTPの変異体、及びERK 2と結合しないLC－PTP変異体は、ERK 2のリン酸化や機能を抑制せず、またMAPKの点突然変異で、機能亢進の見られる変異型ERK 2^{sem}が、LC－PTPとの結合活性を失うと同時に、LC－PTPによる抑制から離脱していることが明らかとなった。従ってLC－PTPの酵素活性とともに、LC－PTPとERK 2の結合は、抑制作用に必須の機構である。

以上から、哺乳動物において、PTPによる新しいMAPKの制御機構が存在することが示された。LC－PTPは、血球系での組織特異的なMAPキナーゼの制御系に関与すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ERKはMAPキナーゼ（MAPK）ファミリーに属し、上流のキナーゼであるMEKでリン酸化されて活性化され、逆に脱リン酸化されることで不活性化される。酵母においては、MAPKの脱リン酸化に、チロシン特異的な脱リン酸化酵素（PTP）が関与していることが明らかにされている。しかし、哺乳動物では、これまでMAPKの脱リン酸化にPTPが関わるか否かは明らかにされていなかった。

申請者は、クローニングしたチロシン特異的脱リン酸化酵素、PTPBR 7の結合分子を同定し、ERKである事を明らかにした。さらに、PTPBR 7がERKを脱リン酸化し、不活性化することを明らかにした。また、PTPBR 7と類似の構造をとるLC－PTPが、ERKに対して同様な脱リン酸化／抑制作用を持つことを示した。

申請者は、PTPとMAPKの結合部位を明らかにし、PTPとMAPKの結合が、PTPによるMAPK抑制に必須なことを示した。特に、生体内で機能亢進の見られるMAPKのsevenmaker変異体が、PTPと結合せず、抑制をも受けないという結果は、PTPによるMAPキナーゼ抑制システムが、個体レベルで実際に働いていることを強く示唆するものと言える。

本研究は、哺乳動物において、PTPがMAPKの活性を直接抑制できることを明らかにし、哺乳動物MAPKの新しい制御機構の可能性を示したものであり、学位の授与に値すると考えられる。