



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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	おお ほん まさ つぐ 大 洞 将 嗣
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 3 1 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 ionomycin+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な脱リン酸化酵素、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。