

Title	Localization of PTP-FERM in Nerve Processes through Its FERM Domain
Author(s)	内田, 陽三
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43855
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	うちだ ようぞう 内 田 陽 三
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 7 3 5 5 号
学位授与年月日	平成 14 年 12 月 3 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Localization of PTP-FERM in Nerve Processes through Its FERM Domain (C. エレガンスのチロシンホスファターゼ PTP-FERM の FERM ドメインを介した神経突起への局在化)
論文審査委員	(主査) 教授 濱岡 利之 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

チロシンの脱リン酸化はシグナル伝達の重要な制御因子である。脱リン酸化に関わるチロシンホスファターゼ (PTP ; protein tyrosine phosphatase) はモジュール構造を取り、酵素ドメイン (PTP ドメイン) に加えて、機能上重要と思われる様々なドメインから構成される。FERM (band four point one, ezrin, radixin, moesin homology) ドメインは、もともと band4.1 などの細胞骨格タンパクに見出され、タンパク分子間相互作用に重要と考えられるが、この FERM ドメインを持つ PTP サブファミリーが存在する。しかし、この PTP サブファミリーの生体における役割は良く分かっていない。そこで、モデル生物系である C. エレガンスでこの PTP サブファミリーの新規メンバー PTP-FERM について、その構造、局在と機能を解析した。

[方法ならびに成績]

まず、PTP-FERM の構造と酵素活性について検討した。PTP-FERM は、C. エレガンスのゲノムデータベースと EST データベースからその存在が予想された。そこで、cDNA 全長のシークエンスを行い、オルターナティブスプライシングで3種類の異なったフォームがあることを見出した。3種類のフォーム全てが FERM ドメイン、PDZ ドメイン、PTP ドメインを有していた。FERM ドメインや PDZ ドメインは様々な分子で分子間相互作用に関わることから PTP-FERM の機能に重要と考えられた。次に、PTP-FERM が脱リン酸化酵素活性を有するか否か検討した。PTP-FERM と GST の融合タンパクを大腸菌で発現させ精製し、人工基質にて酵素活性を確認した。この活性は PTP ドメイン内で保存されたシステイン (C) 残基をセリン (S) に置換すると完全に消失した。

PTP-FERM の線虫における発現と細胞内分布を知るために、PTP-FERM の転写調節領域を含む約 7 kb の DNA の下流に、PTP-FERM の全長 cDNA と GFP を融合させたミニ遺伝子 (*ptp-ferm::ptp-ferm-gfp*) を作成した。このミニ遺伝子は PTP-FERM の全長と GFP の融合タンパク (PTP-FERM-GFP) を、PTP-FERM 自身の転写調節領域を用いて発現するように設計されている。このミニ遺伝子を線虫の性腺にマイクロインジェクションし、PTP-FERM-GFP を発現する線虫ラインを樹立した。PTP-FERM-GFP の発現は、イムノブロッキングと蛍光観察で確認した。PTP-FERM-GFP は、主に線虫の神経環や腹側神経索などの神経細胞に強く発現した。

神経細胞中では細胞体の細胞膜近傍と神経突起に局在していた。この細胞内局在に PTP-FERM のどのドメインが重要かを調べるため、PTP-FERM のさまざまな変異体を作成し発現させ、その細胞内分布を検討した。その結果、FERM ドメインを欠く変異体 ($\Delta 4.1$) が上記の細胞内局在を失う一方、FERM ドメインのみ (4.1) でも PTP-FERM 全長と同様な細胞内局在を示すことから、FERM ドメインが細胞膜近傍と神経突起への局在化に必要十分なことが明らかになった。なお、PTP-FERM の細胞膜近傍への局在化は、ヒトの培養細胞に異所性に PTP-FERM を発現させた場合にも認められ、この局在化にも FERM ドメインが必要十分であった。

PTP-FERM の線虫での役割を検討する目的で、PTP-FERM の欠質変異体を線虫で過剰発現させ、内在性の PTP-FERM との競合によるドミナントネガティブ効果を検討した。その結果、FERM ドメインを欠いた PTP-FERM の欠質変異体 ($\Delta 4.1/CS$) を過剰発現させると、コントロールに比べて線虫の成長が有意に遅延することを見出した。従って、PTP-FERM が線虫の成長に関わること、そして、その機能に FERM ドメインが重要な役割を果たすことが示唆された。

[総括]

モデル生物系である *C. elegans* で、新規チロシン脱リン酸化酵素 PTP-FERM の構造を明らかにし、FERM ドメインが細胞内局在化に必要なことを生体レベルで明らかにした。また、PTP-FERM の欠質変異体分子が線虫の成長遅延を引き起こすことから、PTP-FERM が線虫の成長制御に関わる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

細胞の機能制御は、様々なシグナル伝達を介して行われており、チロシンの脱リン酸化は、シグナル伝達の重要な制御因子である。チロシンホスファターゼはモジュール構造をとり酵素ドメインに加えて機能上重要と考えられる様々なドメインから構成される。

FERM ドメインは、もともと細胞骨格蛋白の band4.1 やエズリン、ラディキシン、モエシンといった蛋白に見つかった共通構造で、このドメインをもつ一連のチロシンホスファターゼのファミリーが存在し、このドメインの蛋白分子間相互作用への重要な機能が示唆されている。

本論文では、モデル生物系の線虫で FERM ドメインをもつ唯一のチロシンホスファターゼである PTP-FERM をクローニングし、その構造および生物活性相関を明らかにした。PTP-FERM は酵素活性を有し、主に神経細胞に局在し、FERM ドメインが PTP-FERM の神経突起への局在化に重要であることを示した。

この研究は、モデル生物系の線虫を用いたチロシンホスファターゼの構造機能解析を行った先進的な研究であり、とりわけ FERM ファミリー分子の機能を解析する上でも有用な実験系を提供するものであり、学位に値するものと認める。