博士（理　学）　髙　垣　謙太郎

学 位 論 文 題 名

新規低分子量２重特異性ホスファターゼ、LDP-3およびLDP-4の構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

本論文ではESTクローニングによって２種の新規２重特異性ホスファターゼを同定し、その機能解析を行った。本論文は以下の４章より構成されている。

第 1 章では、EST データベース中で、DSP に特徴的な配列と相同性を持つクローンの検索を行った。その結果、2 種の新規 2 重特異性ホスファターゼを得た。いずれのホスファターゼも触媒ドメイン以外の機能配列を持たない低分子量のものであった。低分子量の DSP としては当研究室で３番目と 4 番目にとれたものであったので LDP-3 (Low molecular mass DSP-3) および LDP-4 と命名した。

第 2 章では、LDP-3 の組織分布、酵素活性、および細胞内局在を明らかにした。LDP-3 mRNA は微量ながら種々の組織に発現していた。LDP-3 はリン酸化チロシンおよびリン酸化セリン／スレオニンのいずれに対しても、脱リン酸化活性を有していた。また、LDP-3 は接着細胞において接着面以外の細胞膜に局在していた。

第 3 章では、LDP-3 の MAPK カスケードに対する影響を解析した。予想に反して LDP-3 はソルビトールにより活性化された JNK、p38 のリン酸化を亢進させることが明らかになった。同様に LDP-3 は JNK、p38 の上流にあたる MKK4、MKK6 のソルビトールによるリン酸化も亢進させた。LDP-3 による JNK、p38 のリン酸化の亢進は UV、TNF-a、熱ショック等の他の刺激ではみられなかった。JNK のリン酸化のタイムコースを調べたところ、LDP-3 非存在下では刺激後しばらくしてネガティブフィードバックにより、リン酸化レベルは横ばいになるが、LDP-3 存在下では、リン酸化レベルはさらに上昇した。このことから、LDP-3 はネガティブフィードバック機構に対し、阻害的に働いているものと考えられる。

第 4 章では、LDP-4 の組織分布、脳内の局在、細胞内局在、MAPK に対する影響、および分解を解析した。LDP-4 mRNA は脳、心臓、および骨格筋において高い発現が見られた。脳内における LDP-4 mRNA の局在を調べたところ、LDP-4 mRNA は脳内に広く分布していたが、海馬においては発現が見られなかった。種々の組織における LDP-4 タンパク質の発現を調べたところ脳に特異的に発現が見られた。LDP-4 は JNK および p38 のリン酸化を引き起こした。LDP-4 は N 末端側で高頻度に切断されていることがわかった。また比較的短い時間で分解を受けていることも明らかになった。

以上、本研究において 2 種類の 2 重特異性ホスファターゼのクローニングを行い、その遺伝子発現、細胞内における機能を明らかにした。今後、LDP-3 の研究によって哺乳類の細胞における浸透圧制御機構が明らかになることが期待される。また、LDP-4 の研究によって神経細胞の細胞死に関して新しい知見が得られることが期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　菊　池　九二三

副　査　　教　授　　矢　澤　道　生

副　査　　教　授　　坂　口　和　靖

副　査　　教　授　　畠　山　昌　則

学 位 論 文 題 名

新規低分子量２重特異性ホスファターゼ、LDP-3およびLDP-4の構造と機能に関する研究

本研究は、新規低分子量 2 重特異性ホスファターゼの構造と機能を解析したもので、本論文の要点は以下の４点にまとめられる。

1. EST データベース中で、DSP に特徴的な配列と相同性を持つクローンの検索を行った。その結果、2 種の新規 2 重特異性ホスファターゼを得た。いずれのホスファターゼも触媒ドメイン以外の機能配列を持たない低分子量のものであった。低分子量の DSP どしては当研究室で３番目と４番目にとれたものであったので LDP-3 (Low molecular mass DSP-3) および LDP-4 と命名した。

2. LDP-3 の組織分布、酵素活性、および細胞内局在を明らかにした。LDP-3 mRNA は微量ながら種々の組織に発現していた。LDP-3 はリン酸化チロシンおよびリン酸化セリン／スレオニンのいずれに対しても、脱リン酸化活性を有していた。また、LDP-3 は接着細胞において接着面以外の細胞膜に局在していた。

3. LDP-3 の MAPK カスケードに対する影響を解析した。予想に反して LDP-3 はソルビトールにより活性化された JNK、p38 のリン酸化を亢進させることが明らかになった。同様に LDP-3 は JNK、p38 の上流にあたる MKK4、MKK6 のソルビトールによるリン酸化も亢進させた。LDP-3 による JNK、p38 のリン酸化の亢進は UV、TNF-α、熱ショック等の他の刺激ではみられなかった。JNK のリン酸化のタイムコースを調べたところ、LDP-3 非存在下では刺激後しばらくしてネガティブフィードバックにより、リン酸化レベルは横ばいになるが、

LDP-3 存在下では、リン酸化レベルはさらに上昇した。このことから、LDP-3 はネガティブフィードバック機構に対し、阻害的に働いているものと考えられる。

4. LDP-4 の組織分布、脳内の局在、細胞内局在、MAPK に対する影響、および分解を解析した。LDP-4 mRNA は脳、心臓、および骨格筋において高い発現が見られた。脳内における LDP-4 mRNA の局在を調べたところ、LDP-4 mRNA は脳内に広く分布していたが、海馬においては発現が見られなかった。種々の組織における LDP-4 タンパク質の発現を調べたところ脳に特異的に発現が見られた。LDP-4 は JNK および p38 のリン酸化を引き起こした。LDP-4 は N 末端側で高頻度に切断されていることがわかった。また比較的短い時間で分解を受けていることも明らかになった。

これを要するに、著者は 2 種類の新規 2 重特異性ホスファターゼ LDP-3 および LDP-4 の分子クローニングを行い、その遺伝子発現、細胞内における機能を解析した。LDP-3 の研究によって哺乳類の細胞における新しい浸透圧制御機構を明らかにし、LDP-4 の研究によって神経細胞の細胞死に関する新しい知見を加えた。よって、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。