



## Insulin Stimulates the Phosphorylation of Tyr<sup>538</sup> and the Catalytic Activity of PTP1C, a Protein Tyrosine Phosphatase with Src Homology-2 Domains

内田, 亨

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1997-03-26

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2129

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002129>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	内田 亨	(兵庫県)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博ろ第1574号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成9年3月26日	
学位論文題目	Insulin Stimulates the Phosphorylation of Tyr <sup>538</sup> and the Catalytic Activity of PTP1C, a Protein Tyrosine Phosphatase with Src Homology-2 Domains (インスリン刺激によるSrc Homology-2 Domainを有するチロシンホスファターゼ, PTP1Cのチロシン538のりん酸化と酵素作用の活性化)	
審査委員	主査 教授 春日雅人 教授 山村博平 教授 片岡徹	

### 論文内容の要旨

#### はじめに

蛋白質のチロシン残基のりん酸化は、正常細胞の増殖や分化あるいは、細胞の癌化過程において重要な役割を有していると考えられている。また、蛋白質のチロシンりん酸化は、チロシンキナーゼとチロシンホスファターゼの作用のバランスで決定されると考えられている。PTP1Cは、細胞質型のチロシンホスファターゼで、2つのSrc homology-2 (SH2) ドメインを有する。SH2ドメインはいくつかのシグナル伝達蛋白に含まれ、りん酸化チロシン残基に結合してシグナルを下流に伝達するのに重要な役割を有している。そこで、インスリンシグナルにおけるPTP1Cの作用を検討する目的で、インスリンレセプターおよびPTP1Cをもとに発現する。IM-9ヒトリンパ芽球細胞やH35ラットヘパトーマ細胞を用いて実験を行った。その作用は、インスリンレセプターとPTP1Cを過剰発現させた。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いても確認され、更なる詳細が検討された。また、そのSH2ドメインやC-末端部分の作用についても言及した。

#### 方法と結果

IM-9細胞を24時間血清スターベーション後、インスリン $10^{-7}$ Mで刺激した。その細胞ライセートを、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体を用いたウェスタンプロットで解析したところ、95kdのインスリンレセプター $\beta$ サブユニットの他、いくつかのチロシンりん酸化蛋白質が認められたが、その内の一つは65kdでPTP1Cと分子量が一致した。そこで、PTP1C特異的ポリクローナル抗体 ( $\alpha$ PTP1C) を用いてこの細胞ライセート免疫沈降したところ、用量依存性にPTP1Cとのチロシンりん酸化が確認された。このりん酸化は、刺激後30秒後には観察され、5-15分後には最大となった。また同様の結果がH35細胞を用いた検討で認められた。この反応を更に確認するため、CHO細胞にインスリンレセプターを過剰発現させた細胞 (CHO-IR) に、PTP1Cをりん酸化カルシウム法で過剰発現させた。この細胞では、インスリン刺激により65kdのチロシンりん酸化蛋白質が認められ、この蛋白質は $\alpha$ PTP1Cにて免疫沈降されPTP1Cであることが確認された。またこの反応におけるPTP1Cの

SH-2ドメインの働きを検討するために、PCR法を用いてSH-2ドメインを欠くミュータントPTP1Cを作成し、CHO-IRに過剰発現させた。この細胞をインスリンで刺激するとワイルドタイプと同様このミュータントPTP1Cのチロシンりん酸化が認められた。このことよりインスリン刺激によるPTP1Cのりん酸化には必ずしもそのSH-2ドメインを必要としないと考えられた。次にこの反応のStoichiometryを検討する目的で、IM-9細胞をインスリン $10^{-7}$ Mで刺激後、抗ホスホチロシンポリクローナル抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降中に含まれるPTP1Cを $\alpha$ PTP1Cを用いて定量したところ全PTP1C中、約20%のチロシンりん酸化PTP1Cが認められ、有意な反応であることが推定された。更に、インスリン刺激によるPTP1Cのりん酸化が、チロシン残基だけにおけるものであるのかを確認するために、IM-9細胞を $^{32}$ P-orthophosphateを用いて*in vivo*ラベル後、インスリンで刺激した。この細胞ライセートを $\alpha$ PTP1Cを用いて免疫沈降しPTP1Cのりん酸化を評価したところ、PTP1Cはインスリン刺激前より軽度のりん酸化を認めたが、インスリン刺激によりりん酸化レベルは著明に亢進した。この部分のゲルを切り出しりん酸化アミノ酸解析をおこなった。刺激前のPTP1Cは、そのセリン残基のりん酸化を認め、インスリン刺激によりチロシン残基のりん酸化の著明な亢進が観察され、セリン残基のりん酸化レベルの明らかな変化は認められなかった。またPTP1Cのチロシンりん酸化は*in vitro*の系でも認められた。Wheat germ agglutinin-agaroseで部分精製した活性化インスリンレセプターを、免疫沈降したPTP1Cに加え、[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATPの存在下で反応した。りん酸化アミノ酸解析では、チロシン残基のみのりん酸化が認められた。これによりインスリン刺激によるPTP1Cのチロシンりん酸化が確認され、その反応はインスリンレセプターの直接作用であることが推定された。次に、PTP1Cのチロシンりん酸化部位を決定するために、CNBrやトリプシン、V8を用いてペプチド解析を行った。これにより*in vivo*, *in vitro*両系で認められたPTP1Cのチオシンりん酸化部位は、538チロシンと推定され、これはPTP1CのC末端に位置した。更にPTP1Cの538チロシンをフェニルアラニンに置換したミュータントPTP1Cではインスリン刺激によるチロシンりん酸化が完全に消失することにより、インスリン刺激によるPTP1Cの538チロシンのりん酸化が確認された。次に、PTP1Cのその538チロシンりん酸化による活性の変化を検討した。大腸菌で発現・精製したPTP1Cと部分精製した活性化インスリンレセプターを反応する時、加えるATPの濃度を変えることでPTP1Cのチロシンりん酸化レベルを変化させた。このPTP1Cは、チロシンりん酸化レイタيدを用いた*in vitro*の系でホスファターゼ活性が測定された。この結果PTP1Cは、そのりん酸化レベルに依存して最大3.56倍のホスファターゼ活性の上昇が認められ、インスリンシグナルにおけるPTP1Cの活性化、及びその基質蛋白の脱りん酸化反応の亢進が推定された。次に、PTP1Cはそのどの部位でインスリンレセプターと結合するのかを検討する目的で、各部位を大腸菌で発現・精製した。これをゲルに結合した上で、活性化されたインスリンレセプターを含む細胞ライセートを加えその結合を検討した。そのSH2ドメインを欠くミュータントPTP1Cは、インスリン刺激でチロシンりん酸化されることより、SH2ドメインを介する結合は否定的であり、この系でも確認された。この検討により、PTP1CのC末端にインスリンレセプターが結合することが示唆され、更なる詳細な検討では、560-580の間に結合部位が存在することが推定された。また、この部位を欠くPTP1Cをインスリンレセプターとともに細胞に過剰発現させたとき、インスリン刺激によりPTP1Cのチロシンりん酸化は完全に消失した。このことより*in vivo*でもこの部位がインスリンレセプターとの結合部位として働いていることが推定された。

## 考 察

今回、私たちが示したインスリンシグナルにおけるPTP1Cのチロシンリん酸化は、IM-9細胞内の約20%の蛋白質で認められ、有意なものと考えられる。また、PTP1Cは血球系細胞に多く発現することが示されているが、私たちが以前に示したように多くの上皮系細胞にも中等度の発現を認め、また今回ラットヘパトーマ細胞H-35でもインスリン刺激によるPTP1Cのチロシンリん酸化を認めたことは、PTP1Cがインスリンシグナルにおいて重要な役割を有することを強く示唆する。インスリンシグナルにおいて、IRS-1はインスリンレセプターに結合し、高度にチロシンリん酸化される。そして、P13-Kや、PTP1D、Shcなどにシグナルを伝達することが示されているが、PTP1CはIRS-1には結合せず、インスリンレセプターにそのC末端部にて直接結合しチロシンリん酸化されるものと考えられた。PTP1CのC末端部分にはインスリンレセプターへの結合部位のみならず、インスリンレセプターによるチロシンリん酸化部位を含みそのホスファターゼ活性を調節している可能性を示した。しかし、最も重要なことは、PTP1Cがどのようなインスリンシグナルを調節するのかであり、そのためには、PTP1CのSH2ドメインの結合する蛋白の同定など詳細は今後の検討を待たねばならない。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

様々なチロシンキナーゼが伝達する細胞内情報は、細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている。同様にチロシンホスファターゼにも、その情報を打ち消したり、修飾したりする作用が報告されている。Src Homology-2 (SH2) ドメインはリン酸化チロシンと結合し細胞内情報伝達蛋白質間の情報の受け渡しに重要な役割を有することが知らされている。本研究においては、インスリン情報伝達系における2つのSH2ドメインを有するチロシンホスファターゼPTP1Cの役割について検討した。

インスリンレセプターとPTP1Cをもとに高発現するヒトリンパ芽球細胞IM-9をインスリンで刺激すると95kdのインスリンレセプター $\beta$ サブユニットのほかに66kdのチロシンリん酸化蛋白が認められた。この蛋白はPRP1Cの特異的抗体によって免疫沈降され、PTP1Cであることが推定され、また、インスリン10-7で刺激したとき約20%のPTP1Cがチロシンリん酸化された。同様の結果がラットヘパトーマ細胞H35においても観察され、この現象は有意なものと考えられた。

更に詳細を検討する目的で、インスリンレセプターを過剰発現するCHO細胞にPTP1Cを過剰発現させた。この細胞においてもインスリン刺激によりPTP1Cのチロシンリん酸化が観察された。この反応は、PTP1CのSH2ドメインを介するものと想定されたが、SH2ドメインを欠くミュータントPTP1Cを過剰発現させた細胞においても、インスリン刺激によってミュータントPTP1Cのチロシンリん酸化が観察されることより、インスリン情報伝達系において、PTP1Cのチロシンリん酸化には必ずしもそのSH2ドメインは必要ではないことが推定された。

リン酸化アミノ酸解析では、PTP1Cは、インスリン刺激前より軽度のセリン基のリン酸化を認めたが、インスリンの刺激により著明なチロシン基のリン酸化が認められた。また、様々なプロテアーゼ消化による検討や、候補チロシンをフェニルアラニンへの置換研究により、インスリン情報伝達系におけるPTP1Cのチロシンリん酸化部位は、538チロシンと考えられた。この部位のチオシン基は部分精製インスリンレセプターを用いた*in vitro*の系でも確認された。そこで、この*in vitro*の系を用いてチロシンリん酸化したPTP1Cのホスファターゼ活性を測定した。この系に加えるATPの濃度を変化させることでPTP1Cのチロシンリん酸化レベルを変化させることができた。PTP1Cのホスファターゼ活性はチロシンリん酸化レベルに依存して亢進した。インスリン情報伝達系において、PTP1

Cが、チロシンリン酸化を受け、活性化され、何らかの基質蛋白質の脱リン酸化反応を亢進させる経路の存在が推定された。

この研究により、PTP1Cがインスリンレセプターにより直接チロシンリン酸化を受けると考えられたが、SH2ドメインを介さない結合が推定される。そこで、PTP1Cはそのどの部分でインスリンレセプターに結合するのかを検討する目的で、PTP1Cの各部位を大腸菌を用いて発現させ、活性化されたインスリンレセプターを含む細胞ライセートと反応させ、その結合を検討した。PTP1CのC末の560-597にその結合が部位が推定され、その部分を欠くPTP1Cを細胞に過剰発現させた時、インスリンによるチロシンリン酸化は完全に消失した。以上より、PTP1CのC末は酵素活性を調節する重要な働きが推定された。

本研究は、チロシンホスファターゼPTP1Cについて、そのインスリン情報伝達系における役割を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったPTP1Cのインスリンレセプターによるチロシンリン酸化と活性化について重要な知見を得たものとして価値のある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。