

氏名・(本籍)	卯木 智 (島根県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第212号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成8年3月22日
学位論文題目	Src homology 2 domains of protein tyrosine phosphatase are associated in vitro with both the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 via different phosphotyrosine motifs (チロシン脱リン酸化酵素のsrcホモロジー2領域はインスリン受容体及びインスリン受容体基質1と異なるチロシンリン酸化モチーフを介して結合する)

審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
	副査 教授	堀 池 喜八郎
	副査 教授	吉 川 隆 一

## 論文内容の要旨

### [目的]

Src homology 2 (SH2) 領域は src 遺伝子ファミリーでよく保存されている約100個のアミノ酸からなる領域で、特定のホスホチロシン残基のモチーフを認識して結合することが知られている。インスリンはその受容体に結合すると受容体チロシンキナーゼが活性化し、内因性基質である IRS-1 のチロシン残基をリン酸化する。この IRS-1 のチロシンリン酸化モチーフにSH2領域を介して結合し、インスリンシグナル伝達に関する分子の存在が示唆されている。SHPTP2 はチロシンキナーゼの逆反応を解媒するホスファターゼ (PTPase) であるが、そのN端に二つのSH2領域を有し、EGFやPDGFシグナル伝達に関与していることが知られている。そこで、SHPTP2のインスリンシグナルにおける役割を明かにするため、インスリン受容体及びIRS-1とSHPTP2の相互作用について検討した。

### [方法]

(1) SHPTP2のSH2領域及びIRS-1蛋白の作製: AGPC法によりIM9細胞よりmRNAを抽出し、RT-PCR法でSHPTP2 cDNAのSH2領域を増幅し塩基配列を決定後、発現ベクター (pGEX)へサブクローニングした。この発現ベクターを大腸菌へtransform後、Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside存在下に37°C、7時間振盪培養し、Glutathione-S-transferase (GST)との融合蛋白を作製した。大腸菌を可溶化し、アフィニティーカラムを用いてGST蛋白を作製した。また、Factor-XaによりGSTを切断し、SH2領域のみの蛋白を精製した。同様に、ラット肝よりGenomic DNAを抽出し、PCR法によりN端側とC末端側の二箇所のIRS-1の断片蛋白を含むGST融合蛋白 (GST-IRS-1-N、GST-IRS-1-C)を上記の方法で合成した。

(2)正常及び変異インスリン受容体の精製:正常インスリン受容体はヒトインスリン受容体を過剰発現しているラット1線維芽細胞 (HIRc)よりWGAカラムを用いて部分精製した。また、SHPTP2の結合部位と推定されるインスリン受容体のC末端 Y<sup>1322</sup>XXMモチーフのチロシンをフェニールアラニンに置換した変異受容体 (Y/F2) cDNAを発現ベクター CVSVに取り込み、COS7細胞へtransfectionしWGAカラムを用いて精製した。

(3) GST-SH2蛋白のインスリン受容体キナーゼによるリン酸化及びインスリン受容体との結合:部分精製したインスリン受容体をインスリンで4°C、16時間刺激した後、 $[\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP存在下に、GST-SH2蛋白と4°C、3時間孵値し、抗インスリン受容体抗体及び抗 GST-SH2 抗体

にて免疫沈降後、SDS-PAGEにて解析した。

(4) SH2 蛋白の IRS-1との結合：GST-IRS-1 (N及びC) 融合蛋白をインスリン受容体にて [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP存在下にリン酸化し、GSTを切断したSH2蛋白と孵置し、抗 GST-IRS-1 抗体にて免疫沈降後、SDS-PAGEにて解析した。

[結果]

(1) GST-SH2 蛋白のインスリン受容体キナーゼによるリン酸化及びインスリン受容体との結合：GST-SH2 蛋白は、インスリン受容体によりリン酸化された。このリン酸化は変異受容体においても認められた。また、抗GST抗体にてインスリン受容体は GST-SH2 蛋白と共に免疫沈降された。しかし、この共沈は、トリプシンでC末端を切断したインスリン受容体や Y/F2 受容体では認められなかった。

(2) SH2 蛋白の IRS-1 との結合：factor-Xa によりGSTを切断して作成したSH2蛋白も抗GSTにより、GST-IRS-1 と共に免疫沈降されたが、GST-IRS-1-N とは免疫沈降されなかった。

[考察]

SHPTP2 はインスリン受容体によりリン酸化され、受容体キナーゼの基質となりうることを示された。また、インスリン刺激によりインスリン受容体及び IRS-1 と結合することが確認された。インスリン受容体との結合部位はC末端欠損及び Y/F2 受容体を用いた検討よりC末端の YTXM モチーフと考えられた。Y/F2 受容体は、糖代謝促進よりも増殖刺激を伝達しやすく、IGF-1 受容体に相似することが報告されており、この PTPase が Y/F2 受容体のC末端に結合しないことが、この Y/F2 受容体でのシグナル伝達の相違に関しての可能性が示唆された。SHPTP2 のSH2 領域の認識するリン酸化チロシンモチーフは、ペプチドを用いた結合実験の検討では、Y (I/V) X (V/I/L/P) と報告されており、SHPTP2 の IRS-1 との結合部位は、GST-IRS-1-Cに含まれている Y<sup>117</sup>IDL と考えられた。

[結論]

SHPTP2 はインスリン刺激により、インスリン受容体キナーゼによりリン酸化され、同時にインスリン受容体及び IRS-1 と結合した。以上より、SHPTP2 がインスリンシグナル伝達の調節に関与し、その機能異常がインスリン抵抗性発症に関わる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

Src homology 2 (SH2) 領域を有する蛋白質は特定のホスホチロシンモチーフを認識して結合し、チロシンリン酸化を介するシグナル伝達において重要な役割を果たしている。インスリンシグナル伝達においても、SH2領域を有する phosphatidylinositol 3-kinase がインスリン受容体の内因性基質である insulin receptor substrate-1 (IRS-1) に結合することより活性化され、糖の取り込みを促進することが知られている。一方、Src homology 2-protein tyrosine phosphatase 2 (SH-PTP2) 及び protein tyrosine phosphatase 1C (PTPIC) は SH2 領域を有する protein tyrosine phosphatase (PTPase) であり、インスリンシグナル伝達への関与が推定される。本論文はこれら二つの PTPase のインスリンシグナル伝達への関与の有無を明確にする目的で、これらの PTPase とインスリン受容体及び IRS-1 との相互作用を glutathione-S-transferase 融合蛋白を用いて検討したものである。

本論文では、

- 1) SH-PTP2 の SH2 領域はインスリン刺激によりインスリン受容体及び IRS-1 の carboxyl terminus に結合すること
- 2) SH-PTP2 の SH2 領域はインスリン受容体キナーゼよりリン酸化されること
- 3) PTPIC の SH2 領域はインスリン受容体及び IRS-1 と結合せず、またリン酸化も受けないこと

を確認した。以上の結果より、SH-PTP2はPTP1Cとは異なり、インスリンシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。PTPaseのインスリンシグナル伝達機構における役割に関しては現在も不明な点が多く、本論文はインスリンシグナル伝達機構を解明するうえで重要な意味を持つと考えられ、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。