

氏名	ちょう えい 張 莹
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第194号
学位授与の日付	平成19年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Localization of Tyrosine-Phosphorylated Proteins in the Normal Rat Kidney (正常ラットの腎臓におけるチロシンリン酸化タンパク質の局在)
論文審査委員	主査 教授 追手 巍 副査 教授 山本 格 副査 教授 下條 文武

博士論文の要旨

リン酸化はタンパク質機能の制御に関与する重要な翻訳後修飾であることは一般的に認められている。タンパク質を構成するアミノ酸のうち、セリン、スレオニン、チロシン残基がリン酸化の基質となるが、中でもチロシンのリン酸化は、多くの細胞内シグナル伝達系の制御に関与することが明らかになっており、その制御の破綻が多くの疾患の発症に関与していると考えられている。本研究では、チロシンリン酸化タンパク質を特異的に認識することが明らかにされており、チロシンリン酸化タンパク質の検出に最もよく利用されている抗リン酸化チロシン抗体を用いて、正常ラット腎臓におけるチロシンリン酸化タンパク質の分布と局在を詳細に検討した。

PBSで灌流した正常ラット腎臓の3つのコンパートメント(糸球体、皮質、髄質)からlysis solution (1% Nonidet P-40、0.1% sodium deoxycholate、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM Na_3VO_4 、25 mM NaF、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM PMSF、1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin、1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A)で抽出したタンパク質について、抗リン酸化チロシン抗体であるP-tyr-100と4G10を用いてウェスタンブロッティングにより解析したところ、ほとんどのチロシンリン酸化タンパク質が抽出液中に回収され、さらにこれらの多くが糸球体に強く発現している事が明らかになった。分子量220 kDa、145 kDa、120 kDa、80 kDa、70 kDaのチロシンリン酸化タンパク質が見出され、このうち、220 kDa、145 kDa、70 kDaのタンパク質は糸球体に特異的であり、120 kDaと80 kDaのタンパク質は皮質と髄質にも共通に検出された。これらのタンパク質のチロシンリン酸化はタンパク質リン酸化チロシン脱リン酸化酵素阻害剤であるsodium orthovanadateを腎臓灌流時にPBSに添加することにより増強され、また、3つのリン酸化アミノ酸(セリン、スレオニン、チロシン)を用いた吸収実験により、リン酸化チロシンのみが検出されたすべてのチロシンリン酸化タンパク質のシグナルを消失させたことから、ウェスタンブロッティングはチロシンリン酸化タンパク質を特異的に検出していることが確認された。

抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫蛍光染色により、チロシンリン酸化タンパク質は糸球体毛細血管壁にそって強い染色が認められ、また、メサンギウム領域と一部の尿細管の基底外側に弱い染色が見出された。さらに、局在を明らかにするため、免疫電子顕微鏡法を用いて詳細に検討したところ、チロシンリン酸化タンパク質は主に糸球体上皮細胞足突起の基底膜に近接した部位に局在し、一部糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞の細胞外基質との接着部位、さらに近位尿細管、遠位尿細管、集合管の基底膜側にも見出された。

以上の結果は、糸球体上皮細胞の足突起の基底膜に近接した部位に存在するタンパク質が生理的条件下でも恒常的にチロシンリン酸化を受けていることを示す。また、チロシンリン酸化タンパク質が細胞と細胞外基質の接着部位に局在しているという結果は、細胞と細胞外マトリックスの接着に関与する装置、特に糸球体上皮細胞足突起のフォーカルアドヒージョンを構成するタンパク質がチロシンリン酸化を受けていることを示唆するものであり、糸球体足突起の特徴的構造の維持、糸球体における限外ろ過の調節に関与している可能性が高い。現在、質量分析計を用いたチロシンリン酸化タンパク質の同定のための実験が進行中である。

(論文審査の要旨)

チロシンのリン酸化は多くの細胞内シグナル伝達系の制御に関与している。申請者はチロシンリン酸化蛋白を特異的に認識する2種類の単クローン抗体を用い、正常(無処置)ラット腎臓におけるチロシンリン酸化蛋白質の分布と局在を検討した。

灌流腎の糸球体、皮質、髓質から抽出した蛋白をウエスタンブロッティングしてチロシンリン酸化蛋白を解析すると220、145、70 kDaの糸球体特異的蛋白が、また皮質と髓質にも共通な120、80 kDの蛋白が検出された。免疫蛍光法によるチロシンリン酸化蛋白の局在は主に糸球体上皮細胞足突起で、メサンギウム領域と一部の尿細管基底側にも存在した。免疫電子顕微鏡法で更にその局在を検討すると糸球体上皮細胞足突起の基底膜に近接した部位、一部糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞の細胞外基質との接着部位、近位尿細管、遠位尿細管、集合管の基底膜側にも存在した。

以上の所見は、細胞-細胞外基質間の接着に関わる蛋白群、例えばfocal adhesionに相当する蛋白が活性化状態で存在している可能性を示している。現在、質量分析計を用いて、このチロシンリン酸化蛋白の同定を進めている。

以上、本論文は上皮細胞のチロシンリン酸化蛋白の存在、特に生理下でも存在することを超微形態学的手法により示した点に学位論文としての価値を認める。