

学位論文

生殖細胞特異的に発現するチロシンホスファターゼ
Typの解析

平成9年12月 博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻

大杉 美穂

①

学位論文

生殖細胞特異的に発現するチロシンホスファターゼ
Typの解析

平成9年12月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻

大杉 美穂

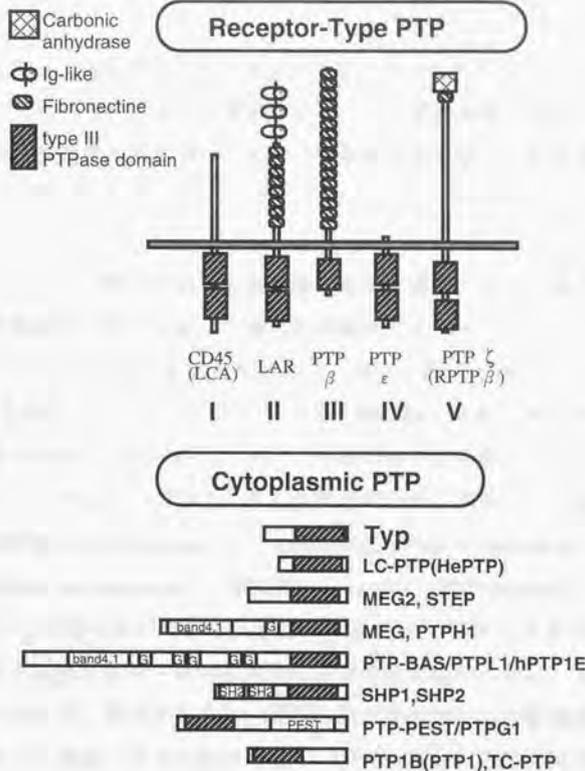
目次

I 序	1
II 材料と方法	7
III 結果	
1. 新規チロシンホスファターゼTypのクローニング	16
2. typは2つの翻訳開始コドンを持つ	22
3. ホスファターゼ活性測定	30
4. Typは生殖細胞特異的に発現するPTPである	31
5. ゲノム構造	41
IV 考察	46
V 謝辞	49
VI 略語表	50
VII 参考文献	51

I 序

タンパク質のリン酸化は細胞の増殖、分化等様々な細胞機能を制御するシグナル伝達系において重要な役割を担っている。細胞外からの刺激は多くの場合、まずチロシンリン酸化反応を誘導し、細胞内シグナルの伝達が始まる。また、シグナル伝達を担う多くの分子の局在や活性がチロシン残基のリン酸化、脱リン酸化により制御されており、細胞内タンパク質のチロシンリン酸化レベルを厳密に制御することが正確で迅速な細胞内シグナル伝達には不可欠である[1]。細胞内のタンパク質のチロシンリン酸化のレベルはリン酸化、脱リン酸化反応を行うチロシンキナーゼ (PTK) とチロシンホスファターゼ (PTP) という互いに逆の反応を触媒する酵素活性によって制御されており、従ってPTK、PTPに関する研究は細胞内シグナル伝達経路の解明に直接結びつく重要な課題である。PTPの分子レベルでの解析は1989年 Charbonneau らによってPTP1Bがヒト胎盤から精製され、アミノ酸配列が決定されたことから始まった[2]。PTPはその構造から、細胞外領域、膜貫通領域、及び1つまたは2つのPTP活性領域 (PTPドメイン) から構成される受容体型PTP (RPTP) と1つのPTPドメインとそれ以外の多様な非触媒領域から構成される細胞質型PTP (NR-PTP) に大別できる (図1A)。PTPドメインは、活性中心を構成するアミノ酸の1つであるシステイン残基を含む、(I/V)HCXAGXXR(S/T)配列(Xは任意のアミノ酸)をはじめとし、高度に保存された240-300残基のアミノ酸から成っているが、同じホスファターゼであるセリン・スレオニンホスファターゼの活性領域とは全く相同性を持たず、触媒機構も異なる[3-5]。主に、PTPドメインの相同性を利用したRT-PCR法やクロスハイブリダイゼーション法により、次々に新規のPTPが同定されており、現在までに70を越すPTPが報告されている。また近年には、リン酸化チロシンと共にリン酸化セリン・スレオニンも基質とする dual specific ホスファターゼや、分子量の小さいPTP (low Mr PTP) も報告されており、これらは活性中心としてCXXXXXRモチーフを持つという構造的な特徴を持つ大きなPTPファミリーを形成している (図1B) [6]。細胞内シグナル伝達系における役割に関しても、単にPTK活性による正のシグナルに拮抗し、シグナルの伝達を終了させるだけの消極的な作用にとどまら

A



B

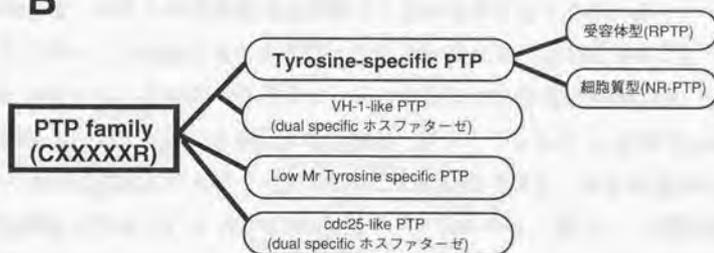


図1 PTPの模式図と分類図

(A)PTPの模式図。RPTPについては細胞外ドメインの構造とPTPドメインの数から大きく5つのサブファミリーに分類できる。ここではそれぞれのサブファミリーの代表的な構造を示した。(B)アミノ酸の一次構造のアライメント、3次構造、及び生物学的機能を基に分類したPTPファミリーの階層図

ず、情報伝達系を正に制御する作用もあることが分かってきている[7,8]。しかしPTKに比べると報告されている分子種も少なく、その機能解析は遅れており、今後のシグナル伝達機構の解明の為にはPTPの機能解析が重要かつ必要な研究課題となる。

言うまでもなく卵子、精子形成は有性生殖に必須の過程である。減数分裂の開始及び進行の制御機構は酵母を用いた遺伝学的解析やヒトデ、アフリカツメガエルの卵細胞を用いての研究が進められており、多くの知見が得られてきている[9]。一方、哺乳類についてはマウスやラットの卵細胞の成熟、精子形成を対象とした減数分裂の研究が進められているが、生殖細胞の成熟がどのような分子機構で制御されているかについてはまだあまり知見がない。精巣中の生殖細胞は幹細胞である精原細胞(spermatogonia)、一次精母細胞(primary spermatocyte)、二次精母細胞(secondary spermatocyte)、精細胞(spermatid)、精子(sperm)の5種類に分類され、さらに細胞や核の大きさ・形状、染色性から細かく分類されている(図12、15)。精子形成過程はA型精原細胞のB型精原細胞への分化、減数分裂、精細胞の精子への分化、成熟からなり、精巣の構成単位である精細管内で、支持細胞であるセルトリ細胞と密接な関係を保ちつつ外縁部から内腔に向かって移行しながら進行する。そのため、精巣の断片にはそれぞれの成熟段階にある生殖細胞が同心円状の層状構造をとって配置している(図2)。また、マウスの精細管内には約1カ月の精子形成過程が約12日間周期で繰り返される“ウェーブ”が生じており、同調的に進む生後第1回目を除けば精子形成は全体としては非同調的に進行する。そのため精巣の切片上にあらわれる精細管組織像は、含まれる生殖細胞の種類とその分布状況から12種類(ステージI-XII)に分類される[10]。ステージIからXIIまでの1サイクルには223.6時間を要し、精原細胞から成熟した精子細胞が形成されるまでには約4.5サイクルかかる(図3A)。核染色の組織像から、精細管組織像は大きく3種類(I-VI、VII-VIII、IX-XII)に大別でき(図3B)、さらにステージIX-XIIに関しては、精子細胞の核の形状や分裂像の有無からより細かくステージを判別することができる。

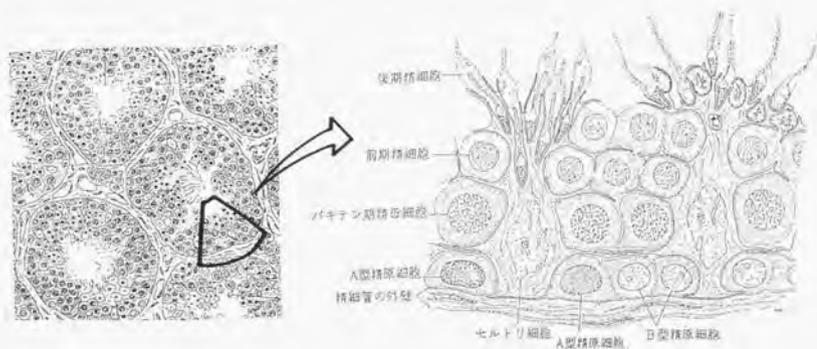
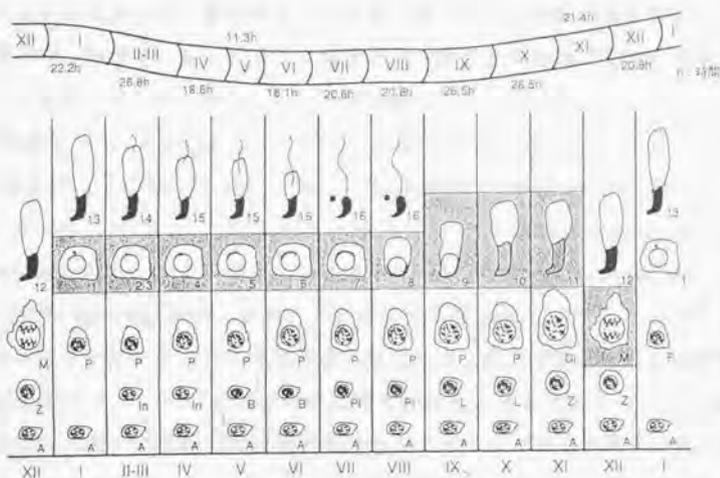


図2 哺乳類精細管上皮の組織像

(Henning, W. "Spermatogenesis: genetic aspects". Springer-Verlag AG, Gerlin, 1987 より 改変)

A



B

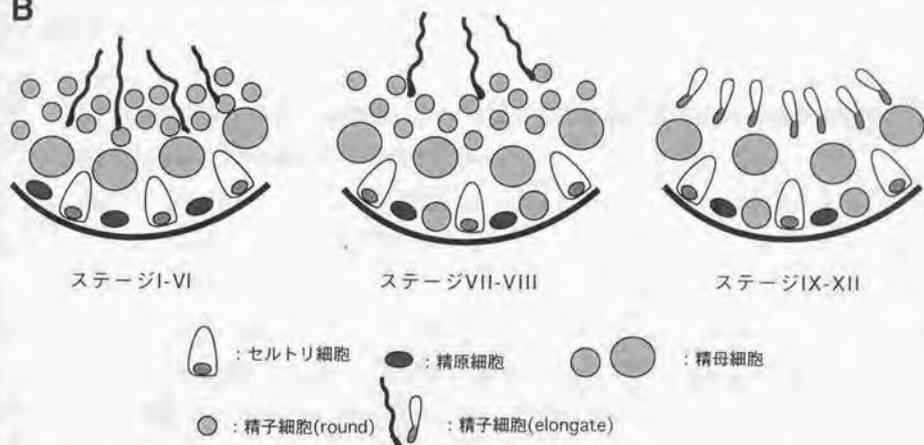


図3 マウスの精子形成サイクル

(A) マウスの精子形成サイクルは12のステージに分けられ、各ステージ(I-XII)は一定の時間で進行する。上に各ステージの進行にかかる時間を示す。1サイクルには223.6時間を要し、精原細胞から成熟した精子細胞が形成されるまでには約4.5サイクルかかる。下に各ステージの精細管断面に見られる生殖細胞の種類を示す。各ステージの特徴となる生殖細胞をタレの背景で示す。ステージI-VIIに関しては、精子細胞の核周辺に存在するアクロソームの大きさに基づいて分類されている。A:タイプA精原細胞、In:中間タイプ精原細胞、B:タイプB精原細胞、Pl:プレレプトテン期精母細胞、L:レプトテン期精母細胞、Z:ザイゴテン期精母細胞、P:パキテン期精母細胞、Di:ディプロテン期精母細胞、M:減数分裂、1-8:精子細胞(round)、9-16:精子細胞(elongate)

(B) 生殖細胞の構成の違いによる精細管の模式図。Aで示したI-XIIのステージは組織像から3種類に大別できる。

遺伝学的手法を用いることが難しい哺乳動物では、減数分裂期の生殖細胞で特異的に発現する蛋白質の機能解析が哺乳類の精子形成の制御機構を解析する重要な手段となっており、近年になり、減数分裂の前後で特異的に発現する遺伝子がいくつか報告されてきている。このような遺伝子の中にはセリン・スレオニンキナーゼ(Mak[11]、c-Mos[12,13]、及び TESK[14]、Nek-2[15])、チロシンキナーゼ(c-Abl[13]、c-Kit[16-18]、及び FerT[19])、dual specific キナーゼ(Nek-1[20])、セリン・スレオニンホスファターゼ(calcineurin B subunit isoform β 1[21])、チロシンホスファターゼ(OST-PTP[22])及びdual specific ホスファターゼ(Twine[23])、をコードするものも含まれており、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化を介して生殖細胞の分化及び、減数分裂を制御する情報伝達系に直接関わっているのではないかと考えられるものも含まれている。実際、c-Kitは精母細胞の体細胞分裂に直接関与していることが報告されている[16]。また、ショウジョウバエのdual specific PTPであるTwineは生殖細胞に特異的に発現しており、雄性生殖細胞の減数分裂過程に必要であることが報告されている[23]。

このような背景のもと、本研究において私は生殖細胞に特異的に発現する新規のPTP、Typをクローニングし、解析を行った。

II 材料と方法

1. 細胞及び細胞培養

アフリカミドリザル腎臓由来のCOS7細胞とヒト腎臓由来のHEK293T細胞は10%ウシ血清 (CS) を加えたDMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose; Gibco BRL)を用い、5% CO₂、37℃の条件で培養した。

2. RT-PCRによるPTP cDNAの増幅

1st strand cDNAの合成及びPCRに用いたプライマーはPTPドメイン中、高度に保存されているアミノ酸配列に基づいてデザインした。1st strand cDNAの合成には下記のprimer 1 (アミノ酸配列QT(E/D/A)QYに相当) を、PCRにはprimer 2 (アミノ酸配列DYINAに相当) 及びprimer 3 (アミノ酸配列HCSAに相当) を用いた。なお、primer 2 及びprimer 3 は下線で示すように、PCR産物をベクターに組み込むための制限酵素部位として、それぞれHindIIIサイト、EcoRIサイト (下線) を含んでいる。

primer 1 : 5'-(A/T)(A/G)(C/T)TG(C/G/T)(G/T)CN(G/T)(A/C/G)(C/G/T)GT(C/T)TG-3'

primer 2 : 5'-ATGAAGCTTGA(C/T)TA(C/T)AT(C/T)AA(T/C)GC-3'

primer 3 : 5'-CATGAATTCC(A/G/T)GCACTGCA(A/G)TG-3'

(NはA、C、G、T全ての塩基の混合)

ヒト乳癌細胞株MDA-MB453 細胞からtotal RNAをAcid Guanidinium-Phenol-Chloroform (AGPC)法[24]により調製した。上述のprimer 1 及び Superscript reverse transcriptase (Gibco BRL) を用いて1st strand cDNAを合成した。PCRは94°C 30秒、53°C 30秒、72°C1分のサイクルを50回繰り返した。ただし、最初のサイクルの94°Cは90秒、最終サイクルの72°Cは5分間にした。PCR産物をEcoRI及びHindIIIで消化後pUC119ベクターに組み込み、塩基配列を解析した。

3. コロニーハイブリダイゼーション

pUC119ベクターに組み込んだPCR産物を大腸菌JM109にトランスフォーメーションし、形成されたコロニーをニトロセルロースフィルター(Schleicher & Schuell)にトランスファーした。ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーションバッファー(50% (v/v) formamide、4×SSC、10×Denhardt's solution、100μg/ml変性サケ精子DNA)中、42℃で2時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P標識した4種類のPTPのPCR断片(LAR[25]、PTP-MEG[26]、DEP-1[27]、BPTP-2[28])をプローブとして加えたハイブリダイゼーションバッファーに交換し、42℃で16時間行った。2×SSC、0.1% SDS 溶液中室温で20分の洗浄を2回、0.1×SSC、0.1% SDS 溶液中50℃で20分の洗浄を2回行い、オートラジオグラフィーにより検出した。

4. ノザン解析

Human Multiple Tissue Northern(MTN) Blot、Human MTN blot II、Human Fetal MTN blotはClontech社から購入し、ヒト*typ* PCR断片またはβ-アクチンcDNAをプローブとしたハイブリダイゼーションを、付属の説明書に従って行った。洗浄は2×SSC、0.1% SDS 溶液中室温で10分を1回、20分を2回、0.1×SSC、0.1% SDS 溶液中、50℃で20分を2回の条件で行った。total RNA (20μg)をマウスの各組織から調製し、1.0%ホルムアルデヒド-アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンフィルター(Hybrid-N membrane filters; Amersham)にトランスファーした。ハイブリダイゼーションは42℃、2時間のプレハイブリダイゼーション後、42℃で16時間行った。³²P標識したヒト*typ* PCR断片をプローブとした場合には、ゆるい条件のハイブリダイゼーションバッファー(20% Formamide、5×SSC、50 mM sodium phosphate (pH6.8)、4×Denhardt's solution、40μg salmon sperm DNA)を用い、洗浄は2×SSC、0.05% SDS 溶液中室温で10分を1回、20分を2回、0.5×SSC、0.05% SDS 溶液中50℃で20分を1回の条件で行った。

typ cDNAクローン#5のインサートcDNAまたはβ-アクチンcDNAをプローブとした場合は通常のハイブリダイゼーションバッファー(50% Formamide、5×

SSC, 50 mM sodium phosphate (pH6.8), 4×Denhardt's solution, 40 μg salmon sperm DNA)を用い、洗浄は2×SSC、0.1% SDS 溶液中室温で10分を1回、20分を2回、0.1×SSC、0.1% SDS 溶液中50℃で20分を2回の条件で行った。

5. 塩基配列の決定及びコンピューターによる解析

Bca BEST Dideoxy Sequencing Kit (TaKaRa)を用いたジデオキシ法[29]によりDNA塩基配列を決定した。塩基配列及びそこから推定されたアミノ酸配列はBLASTまたはFASTAプログラムを用い、GenBank及びPIRデータベースに対してホモロジー検索を行った。

6. マウス *typ* cDNAのクローニング

8-12週齢マウスの精巢から調製したpoly(A)⁺RNA 8μg、oligo(dT)₁₂₋₁₈プライマー (TimeSaver™ cDNA synthesis kit, Pharmacia)、λzapIIベクター (Stratagene)及びGigapackII Packaging Extracts (Stratagene)を用いてマウス精巢cDNAライブラリーを作製した。ヒト *typ* PCR断片をプローブに用いたブラークハイブリダイゼーションにより、 1×10^6 ブラークをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションはゆるい条件下 (ハイブリダイゼーションバッファー: 20% Formamide、4×SSC、50mM HEPES (pH7.0)、10×Denhardt's solution、40μg salmon sperm DNA)、42℃で16時間行い、洗浄は2×SSC、0.05% SDS 溶液中室温で10分を1回、20分を2回、0.5×SSC、0.05% SDS 溶液中50℃で20分を1回の条件で行った。3次スクリーニングまで同じ条件で行った結果、9つの陽性クローンを得た。ヘルパーファージを重複感染させることにより、インサートを含んだpBluescript SK(-)ベクターを切り出し(excision)、塩基配列を解析した。全塩基配列の決定にはクローン#2、#5、#6、及び#8を用い、両方向から解析を行った。またPCR断片内にある、PTPドメイン中高度に保存されているアミノ酸配列WPDHGTの逆鎖に対応するオリゴヌクレオチド5'-AGTGCCATGGTCTGGCCA-3'を合成し、これをシーケンズプライマーとして用い、得られた9つのクローンの塩基配列を約150bp決定した。

7. GST融合タンパク質の作製と精製[30]

プラスミドpGEX-3XまたはpGEX-5Xベクター(Pharmacia)に目的の領域を含む *typ* 遺伝子を組み込むことにより、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質を発現させた。抗原用には平滑末端化した *EcoRI-EcoRV* 断片 (51-164番目のアミノ酸をコードする; GST-TypN1) 及び *EcoRV-EcoRI* 断片 (165-285番目のアミノ酸をコードする; GST-TypC1) を用いた。ホスファターゼ活性測定用には平滑末端化した *EcoRV-XhoI* 断片 (168-426番目のアミノ酸をコードする; GST-TypPTP) を用いた。これらのベクターを大腸菌 JM109 株にトランスフォーメーションし、0.5mM IPTG 存在下で、25℃で16時間培養することにより GST 融合タンパク質を発現させた。遠心して集めた大腸菌を probe sonicator を用いて L バッファー (50mM Tris-HCl(pH7.5)、25% Sucrose、5mM MgCl₂、0.5% Nonidet P-40(NP-40)) 中で超音波破碎した。10,000g で15分間遠心後上清を採取し、グルタチオン-アガロースビーズ (Sigma) を用いて GST 融合タンパク質を回収後、PBS で洗浄した。抗原用には elution バッファー (10mM reduced glutathion、50mM Tris-HCl(pH.9.6)) を用いて溶出した後、PBS(phosphate-buffered saline) に対して透析を行った。10% SDS-PAGE で分離した後、ゲルをクマジーブルー染色し、分子量マーカー (SDS-PAGE Standard Low Range, BioRad) のバンドと比較することによりタンパク質の量を推定した。

8. 抗Typ抗体の作製と精製

Freund's complete adjuvant と混合した GST-TypN1、及び GST-TypC1 それぞれ 1mg をニューゼーランド白兔の背部皮下に注射した。初回免疫後、2週間間隔で 0.5 mg の融合タンパク質を Freund's incomplete adjuvant と混合して追加免疫を行った。GST、GST-TypN1、及び GST-TypC1 を CNBr-activated sepharose 4B (Pharmacia) に結合させてカラムを作製し、これらを用いて、それぞれの抗血清から抗Typポリクローナル抗体をアフィニティ精製した。得られた精製抗体を抗TypN1抗体及び抗TypC1抗体とした。

9. Typ発現プラスミドベクターの構築と培養細胞へのトランスフェクション

Typ発現ベクターpME-Typはtyp cDNAクローン#5のインサートcDNAから調製したHindIII-XhoI断片を発現ベクターpME18S[31]に組み込んで作製した。FLAG付きN末端欠損Typ発現ベクターpME-Flag-4Mは、98-426番目のアミノ酸をコードするcDNA断片を、N末端にFLAGエピトープ (Eastman Kodak) が付くようにpME18Sベクターに組み込んで作製した。変異型Typ発現ベクターpME-Typ1MA、pME-Typ2MS、pME-Typ3MV、pME-Typ4ML、pME-Typ5MP、pMETyp1LV、pME-Typ2LA、pME-Typmut1、pME-Typmut2、pME-Typmut3及びpME-Typmut4はpME-Typに合成オリゴヌクレオチドを使った*in vitro* mutagenesis 法[32]で目的の変異を導入することにより作製し、目的の変異が導入されたことを塩基配列を決定して確認した。なお、pME-Typ1MA、pME-Typ2MS、pME-Typ4ML、pMETyp1LV、pME-Typ2LAの作製に用いたオリゴヌクレオチドは変異部分に制限酵素部位 (それぞれMluI、BglII、XbaI、BglII、MluI) が導入されるようにデザインした。部分欠損Typ発現ベクターpME-TypdelA、pME-TypdelB、pME-TypdelC、pME-TypdelD、及びpME-TypdelEはpME-Typ1MA、pME-Typ2MS、pME-Typ4ML、pMETyp1LV、pME-Typ2LAに導入した制限酵素サイトを利用して構築した。各プラスミドベクターは、293T細胞またはCOS7細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。

10. ウェスタン解析

293T細胞またはCOS7細胞は各プラスミドベクターをトランスフェクションしてから40-48時間後にPBSで洗浄し、TNEバッファー (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、1% NP-40、0.1% SDS、20 mM EDTA、150 mM NaCl、50 mM NaF、0.1 mM Na₃VO₄、aprotinine (50 units/ml)) で可溶化した。精巢、卵巣及び脳組織の抽出液も同じTNEバッファーにより調製した。抽出液のタンパク質濃度はBCA assay (PIERCE)を用い、standard protocolにより定量した。25 µgのタンパク質を含む培養細胞抽出液、又は100 µgのタンパク質を含む組織抽出液を10% SDS-PAGEで分離した後、polybinylidene difluoride membrane

(Immobilon-P; Millipore) に電気泳動的に移した。メンブレンは5%スキムミルクによるブロッッキングを4℃で一晩または室温で1時間行った後、一次抗体(抗TypN1抗体または抗TypC1抗体)と反応させた。TBST(20mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.1% TritonX-100)での洗浄後、二次抗体としてHRP(horseradish peroxidase)標識抗ウサギIgG抗体(Amersham)又はアルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体(Promega)と反応させた。目的タンパク質の検出にはRENAISSANCE(NEN DuPont)又はProtBlot Western AP system(Promega)を用いた。

11. *in vitro* 翻訳反応

T7 RNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いてcDNAクローン#5のインサートcDNAのセンス鎖の転写を行った。得られたRNAをL-[³⁵S]メチオニン存在下でwheat germ cell extract(Promega)を用いて*in vitro* 翻訳した。10% SDS-PAGEで分離した後、オートラジオグラフィーにより合成されたタンパク質を検出した。

12. ホスファターゼ活性測定

p-NPP(*p*-nitrophenyl phosphate)を基質として含む反応溶液(10mM *p*-NPP、50mM imidazole(pH7.5)、0.1% β -Mercaptoethanol)中にグルタチオン-アガロースビーズに結合させたGST、GST-TypPTPタンパク質または500 μ gのタンパク質を含む精巣及び脳抽出液からの抗TypN1抗体による免疫沈降物を加え、全量200 μ lの系で反応を行った。37℃で30分間反応後、800 μ lの0.25M NaOHを加え反応を停止し、遊離した*p*-NP(*p*-nitrophenol)量を410nmの吸光度により測定した[33]。PTP特異的阻害剤であるNa₃VO₄は最終濃度が0.5mMになるように反応溶液中に加えた。

13. *in situ* ハイブリダイゼーション

13-1. Digoxigenin(DIG)標識RNAプローブの作製

typ cDNAの塩基配列21-709番目、218-709番目、710-1071番目を含む3種類のcDNA断片(それぞれ断片1-3)をcDNAクローン#5からPCRによる増幅と制限

酵素処理により調製した。これらの断片を pBluescript II SK(-)ベクター (Stratagene) に組み込み、適切な制限酵素を用いて cDNA の 5' 端のすぐ上流で切断したものを鋳型として、DIG RNA labeling mixture (Boehringer mannheim) 及び T7 RNA ポリメラーゼを用いて 37℃ で 2 時間 *in vitro* transcription 反応を行った。断片 1-3 をそれぞれ鋳型として用いた転写反応により得られた DIG 標識 RNA (それぞれ 689b、491b、362b) を AS-probe 1-3 とした。センス RNA プロブの作製は pBluescript KS(-)ベクターに組み込んだ断片 I を用い、同様に行った。

13-2. 切片の前処理

8 週齢マウスの精巣を OCT compound (Tissue-Tek, Miles) 中に包埋、凍結し、poly-L-Lysine でコートしたスライドガラス上に凍結切片 (5-8µm 厚) を作製した。4% Paraformaldehyde-PB (PB = 0.1M Phosphate Buffer pH7.4) で 20 分間固定した後、0.2M HCl で処理することにより内在性の alkaline phosphatase を不活化し、0.1M Triethanolamine (pH8.0)、0.25% acetic anhydride によりアセチル化を行った。70%、80%、90%、100% エタノールにより脱水し、風乾した。

13-3. ハイブリダイゼーション反応

ハイブリダイゼーションバッファー (50% Formamide、10mM Tris (pH7.6)、1 × Denhardt's solution、10% dextran sulfate、600mM NaCl、0.25% SDS、1mM EDTA (pH8.0)、200µg/ml tRNA) を 85℃ で 10 分間加温してから、DIG 標識 RNA プロブを 10µg/ml になるように加え、更に 85℃ で 3 分間加温した (変性反応)。前処理した切片を PAPPEN で囲い、変性反応を行ったハイブリダイゼーションバッファーを滴下して 50℃ で 16 時間ハイブリダイズした。5 × SSC 溶液中 50℃ で 20 分間、50% Formamide、2 × SSC 溶液中、65℃ で 30 分間洗浄した後、37℃ で 30 分間 RNase-A 処理をし、さらに 2 × SSC、0.1% SDS 溶液中、50℃ で 20 分間、0.2 × SSC、0.1% SDS 溶液中、50℃ で 60 分間の洗浄を行った。シグナルの検出はアルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Boehringer Mannheim) との反応後、アルカリホスファターゼの基質である TNBT (Sigma) を加えて発色させることにより行った。

14. 間接蛍光抗体染色による組織染色

精巣の切片は *in situ* ハイブリダイゼーションの場合と同様に調製、固定を行い、0.2%(v/v) Triton X-100/PBSで10分間処理した。1%(W/V) bovine serum albumin (BSA fraction V; Sigma)/PBS によるブロッキングを室温で30-60分間行った後、0.02%(w/v) Triton X-100/PBSで適切に希釈した抗TypN1抗体、抗TypC1抗体、またはGST-TypN1とあらかじめ混合しておいた抗TypN1抗体と室温で2.5時間又は4℃で一晩反応させた。PBST(0.1%Triton-X100/PBS)で洗浄した後、二次抗体としてFITC標識抗ウサギIgGと室温で1時間反応させた。このとき染色体の存在を示すため、propidium Iodideも加えてDNAを染色した。染色した資料の観察には共焦点顕微鏡(Zeiss and BioRad)を用いた。

15. 精巣細胞の遊離と間接蛍光抗体染色

22日齢マウスの精巣を0.5mg/mlのcollagenase(Sigma)-PBS中、震とうさせながら20分間処理した後、PBS-EDTA中でのピペッティングにより精細管内の細胞を遊離させた。50 μ m孔のメッシュで濾過した後、Opti-MEM培地中で一晩培養することにより細胞をpoly-L-Lysineでコートしたスライドガラス上に接着させた。4% Paraformaldehyde-PBSで20分間固定した後、組織の蛍光抗体染色と同様にブロッキング、抗体反応、及び顕微鏡観察を行った。

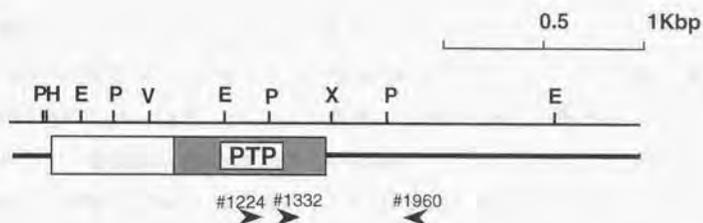
16. RT-PCRによる *typ* mRNAの発現検出

胎齢8.5日、10.5日、12.5日、14.5日マウスの胎児の四肢を取り除いた下半身及び、胎齢16.5日、成体マウスの卵巣及び精巣からAGPC法によりtotal RNAを調製した。oligo(dT)12-18プライマー及びSuperscript reverse transcriptase (Gibco BRL)を用いて逆転写反応を行い、RNaseH処理をしたものをPCRの鋳型cDNAとした。PCRには上流プライマーとしてprimer#1247及びprimer#1332、下流プライマーとしてprimer#1960を用い、94℃ 30秒、53℃ 1分、72℃ 1分のサイクルを40回繰り返し、1%アガロースゲルにて電気泳動した。

primer#1247: 5'-CGTTATGTGAGGAAGAGCCAC-3'

primer#1332: 5'-TGGATGTTGTGTTCTCTGCC-3'

primer#1960: 5'-ATTCGGTTACCAGCTGGAAG-3'



17. *typ* 染色体遺伝子の単離と構造解析

cDNAクローン#5のインサートcDNAから調製した*Hind*III-*Xho*I断片をプローブに用い、 λ FIX II/129SVJライブラリー 1×10^6 プラークをスクリーニングした。得られた陽性クローンから*Not*Iで切断することによりインサートゲノムDNAを切り出し、pBlueScriptSK(+)ベクターにサブクローニングした。それぞれのクローンについて適当な制限酵素による切断、*typ*cDNAの断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行い、制限酵素地図を作製した。必要なゲノムDNA制限酵素切断断片をpBlueScriptSK(+)ベクターにサブクローニングした後、塩基配列を部分的に決定することにより各エクソンの境界を決定した。

III 結果

1. 新規チロシンホスファターゼTypのクローニング

1-1. 新規チロシンホスファターゼの検索

新規PTPを検索する方法としてRT-PCR法を用いた。ヒト乳癌細胞株MDA-MB453細胞から抽出したRNAを鋳型に、PTP領域のC端側において保存されているアミノ酸配列、QRE(A/E/D)Qから設計したディジェネレートプライマー (primer 1、材料と方法の項参照)を用いて逆転写反応を行った。合成されたcDNAを鋳型に、やはりPTP領域内で保存されているアミノ酸配列であるDYINA及びHCSAから設計したディジェネレートプライマー (primer 2及びprimer 3、材料と方法の項参照)を用いてPCR反応を行った。400から500 bpのPCR産物を

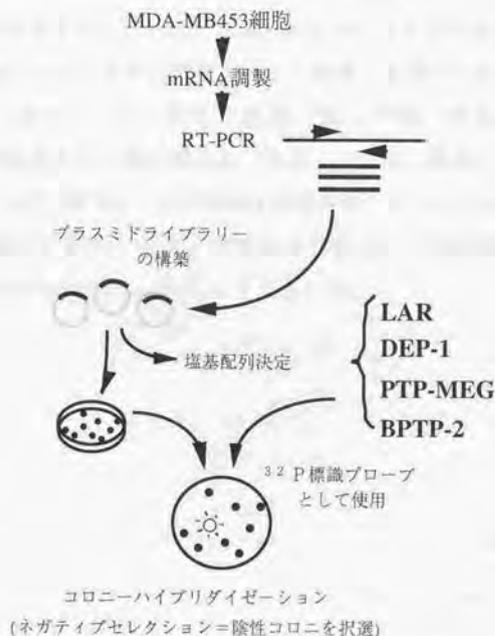


図4 新規PTP遺伝子の検索方法

pUC119ベクターにサブクローニングし、プラスミドライブラリーを構築した。そのうちの一部のクローン（28クローン）について塩基配列を決定したところ、全て既知のPTP遺伝子であるLAR[25]、PTP-MEG[26]、DEP-1[27]及びBPTP-2[28]のいずれかに相当するものであった。そこでライブラリー中からこれら4種のPTP遺伝子を排除するためにコロニーハイブリダイゼーション法による”ネガティブセレクション”を行った(図4)。即ち、ライブラリーDNAで大腸菌をトランスフォームし、得られた約1,200のコロニーに対して、上記の4種のPTPに相当するPCR断片を³²P標識したものを混合プローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーションを行った。その結果、どのプローブともハイブリダイズしない、または極く弱くしかハイブリダイズしなかったクローンを8つ得た。この8つの陰性クローンの塩基配列を決定したところ、6クローンはPTP遺伝子とは相同性を示さないクローンであった。残り2クローンのうち1クローンはプローブとして用いた4種とは別の既知のPTPであるPTP γ [34]をコードしており、1クローンは新規のPTPをコードしていた。新規PTPをコードするPCR断片をプローブに用い、ヒト組織についてノザン解析を行った結果、精巣にのみ約3.2kbのバンドが検出された(図5)。ヒト胎児の組織(脳、腎臓、肺及び肝臓)及び、MDA-MB453細胞を含む19種の細胞株(乳癌、上皮癌、胃癌、顎下腺癌、ほうこう癌、脳腫瘍、リンパ腫及び、胎児繊維芽細胞由来)についてもノザン解析を行ったが、発現は検出できなかった。発現の特異性からこの新規PTP遺伝子を*typ* (testis specific tyrosine phosphatase)と命名した。

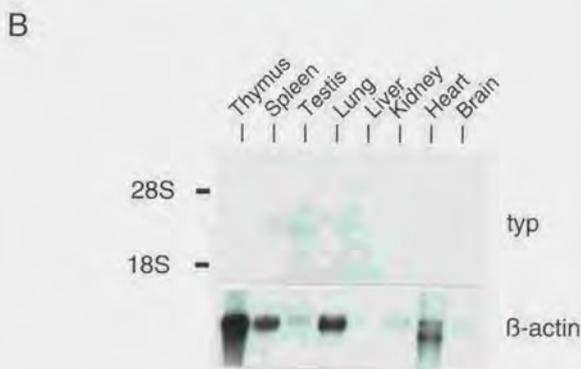
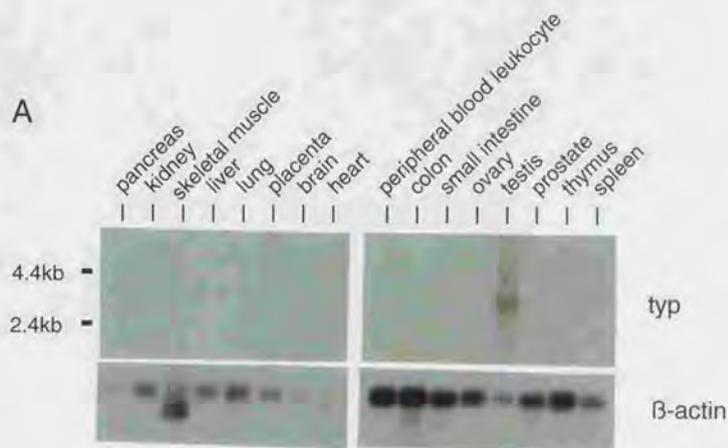


図5 ヒト及びマウス組織における *typ* mRNA の発現 (ノザン解析)

(A) ヒト組織から調製した RNA に対しヒト *typ* PCR 断片または β -アクトチン cDNA をプローブとしてノザンハイブリダイゼーションを行った。各レーンには $2 \mu\text{g}$ の poly(A)⁺ RNA が使われている。(B) マウス組織から調整した RNA に対し、cDNA クローン #5 のインサート cDNA または β -アクトチン をプローブとしてノザンハイブリダイゼーションを行った。各レーンには $20 \mu\text{g}$ の total RNA が使われている。

1-2. *typ* cDNAの単離と塩基配列決定

マウス精巣cDNAライブラリーを構築し、ヒト*typ* PCR断片をプローブに用い、穏やかな条件下でのスクリーニングを行った。1×10⁶クローンをスクリーニングした結果、9つの陽性クローンを得、そのうち8クローンが*typ* cDNAを含むものであった(図6A)。残りの1クローンはPTP-MEGをコードするものであり、これは穏やかな条件下でのスクリーニングの結果、クロスハイブリダイゼーションにより得られたと考えられる。重複したこれらのクローンの塩基配列を決定し統合したところ、*typ* cDNAは3090 bpとなり、最大1278 bp(426アミノ酸)のORF(open reading frame)を含んでいた(GenBank登録番号:#D64141)。このORFはKozakのコンセンサス配列に合致するATGコドンから開始され、その上流にはORFに合致している終止コドンが5つ存在する(図6B)。

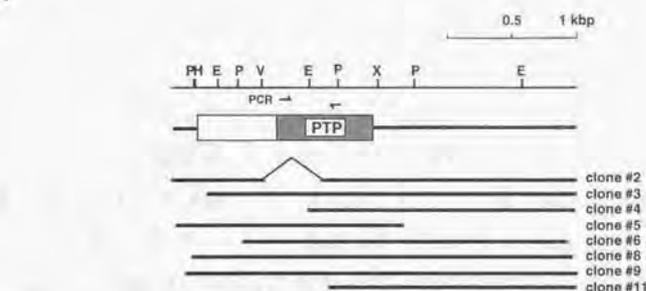
クローン#2のインサートcDNAには、他のクローンのインサートcDNAに比較してORFに影響しない441 bpの欠損が見られた。この欠損部位をはさむ領域に設定した2組のプライマーを用いたRT-PCRを行ったところ、このような欠損をもつmRNAの存在は検出されなかった。また、第5項に示すゲノム構造の解析の結果、この欠損の終始点はエクソン-イントロンの境界とは一致していなかったことから、この欠損はalternative splicingを反映したものではなく、cDNA合成時のartifactであると考えられる。

また、ヒト*typ* PCR断片とマウス*typ* cDNAのそれに相当する部分の塩基配列及び、コードされているアミノ酸配列を比較したところ、それぞれ74.8%及び84.1%の相同性を示した。この相同性は、マウスとヒトのホモログが報告されている他の既知のPTPと比較して低い値である。例えば、細胞質型PTPであるSHP2のPTPドメイン及び受容体型PTPであるPTPδの第1PTPドメインのマウス-ヒトホモログ間のアミノ酸レベルでの相同性は、それぞれ99.6%及び96.3%である[35-41]。しかし一方で、減数分裂過程に関与していることが報告されているセリン・スレオニンキナーゼであるc-Mosのマウス-ヒトホモログ間のアミノ酸レベルでの相同性は、キナーゼドメインにおいても78%しかないという例もある[42-44]。クローン#5のインサートcDNAをプローブに用いて、マウスの組織についてノザン解析を行ったところ、ヒトの場合と同様に精巣にのみ約3.2 kbのバ

ントが検出され(図5B)た。更にヒト *typ* PCR 断片をプローブに用いて、穏やかな条件でマウス組織についてノザン解析を行った場合にも、同じ結果が得られた。従って、今回スクリーニングによって得たcDNAクローンはヒト *typ* のマウスホモログのものであり、精巢特異的に発現し、*typ* のファミリー遺伝子であるようなPTP 遺伝子は他には存在しないと考えられた。

cDNAの塩基配列から推定されるTypはPTPドメインをC末端にもつ細胞質型PTPであった。Typの非触媒領域(N末端領域)には既知のタンパク質との有意に高い相同性は見られず、また特徴的なドメイン構造やモチーフ構造も存在しなかった。しかし、プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン酸に富んだ配列を含んでおり、c-Fosなど短寿命タンパク質の不安定性領域として推定されているPEST配列である可能性がある[45]。PEST配列の強度はPEST値(PS)、すなわち $PS=0.55(MP)-0.5(Ho)$ (MP:プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン酸が占める割合、Ho: PEST配列に含まれるアミノ酸の疎水性の平均値)で算出され、PEST値が-0.5以上であるとPEST配列として認定され、0.0以上であると強いPEST配列であることを意味する。Typのこのアミノ酸配列のPEST値は0.175であり、Typは不安定なタンパク質である可能性がある。また、N末端にはcdc2キナーゼの認識可能配列(S T/P T K/R) が2カ所存在する[46]。

A



B

```

1  CCGAGGCTACAGCCCGAGGTTATGTCACATCTGCATCGGATTTGGCCAAAGCATCTGAGAGTATTTGTCTTTTTCATGAAATGATCAATGATGTCCTCAATTTATGAGCT 120
121 GCGCTCTGGATCACTACATGACCTCTGCTCTGAGAAATAGAGCTCATATCTGCAAGAGCTTTTGGCCATCTATCTGCTATGGGACAGATATCTCTCAACAGAGAGTTAG 240
1  M S S E E E V R R
241 AGGAAAACTGAGAGGATATGATGAGAGAGAGGATATCTGAGTACCGGAACTCTGGCACTTTTGGCTCTCTGATGATGAGAAATGACCGCTGAGAGGCGATTTTGGGAAATG 360
9  G F E P G R D N D E E V G N S G N L N L R H S E L P S S S Q E M T F T F R P I P O N K 48
361 AATGATTCAGAGAAATTAAGAACTCTCCATCTCTGATCTGAGATATGAGCTGTTTGGCTGAGAGCTTTGAGAAATGACATGAGAGCTGTGTGGGAGTCTGAGTACG 480
49  N N S E N V K P E N H L S P S D K Y R E L V V Y P P F I E S D T D S T V V D V S D 88
491 GTCTCTGAGAAAGAGTGGACATGATGGATTCAGAGCTCTGAGAGCTCTCAAGACCTCTCCGACGCTCTTCTGGATGATGAGAGCTCTCAAGAGACACTGGAACTCTGCTCTGA 600
89  S L L R R R W N M D S E T A Q P S E T V S F V L S G S S L S E D T E T S V S E 128
601 AAAGAGCTAATCTGATCTGAGATCTGACCAATATATCAAGATCTGACAGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 720
129 K E L T Q L A Q I R P L I F N S S A R S A M R D C L N T L Q K K E E L D I I R 168
721 GTTTTGGATGAGCAATGATCTCTGCTGATGCTGATCTCTGGGATGAGCTACAGACAGATAGAGACAGATAGAGATATCTCTTCTATGATTCACAGCTGTCTCTCT 840
169 F L L E L Q K T L P D D P H S G H T L Q N R D K N R Y R D I L P Y D S T E V P L 208
841 TGGAAAAACAGGACTACATCAAGCTATGATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 960
209 G K N K D Y I N A S Y I R I V M N H E E V Y P Y I A T O G E L F P E T I E D P H O M 248
961 GCTTCCGAAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1080
249 V L E N N C N V I A M I T T R E I E C G V I K C Y S Y W F I S L E E P L E F R M 288
1081 TAGTCTCTCTGAGAGCTCTTCACTGATCTCAATGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCT 1200
289 S V E L E T F R V T Q V P T T Y R V F Q I V E K S T Q E S D C V E H L Q P F R W P 1280
1201 AGACCAKACCTCTCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCTGATCT 1320
329 D H G T P A S A D P F V I K Y V R Y V R K S H I T Q P L L V H C S A G V Q H T Q V 168
1321 GTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1440
389 F I C V D V V F S A I E N H Y S F D I K H I V T Q M R E Q R C Q M I D T K E Q Y 408
1441 CCGATTTTGTATGAAATTTCTGATGATCTGATGATCTGATGATCTGATGATCTGATGATCTGATGATCTGATGATCTGATGATCTGATGATCTGATGATCT 1560
409 Q F C Y E I T V L E V E Q N D L A L Y *
1561 GCTCTCGGGGCTGATCTCTCTGATTTTCTCTGATGATCTCTGATGATCTCTGATGATCTCTGATGATCTCTGATGATCTCTGATGATCTCTGATGATCTCT 1680
1681 CCTCTGCTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1800
1801 AGTGTGCAAAAGCTCAGACATCTTCAACACTTCAAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCT 1920
1921 AATGTGTTGAGAACTCAGACATCTTCAACACTTCAAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCTCTGAGAGCT 2040
2041 GTTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2160
2161 CTGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCT 2280
2281 TTATGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCTGAGAGCT 2400
2401 TTTCTTTTAACTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2520
2521 ATTCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2640
2641 GATTTAGAGCTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2760
2761 TCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 2880
2881 CCTTACTCAGGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 3000
3001 ATTCCTACTATGAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 3090

```

図6 *typ* cDNAの構造と塩基配列

(A) マウス *typ* cDNA の模式図及び制限酵素地図。ヒト *typ* PCR フラグメントをプローブに用い、マウス精巣 cDNA ライブラリーから *typ* cDNA をコードする cDNA クローンを単離した。3'及び5'非翻訳領域を太線で、ORF を四角で表す。また、RT-PCR に用いたプライマーの設定位置を矢印で示し、上に主な制限酵素認識部位を示す (H: *Hind*III, E: *Eco*RI, V: *Eco*RV, P: *Pst*I, X: *Xho*I)。得られた各 cDNA クローンを線で示してあり、クローン #2 に見られた欠損部位も示してある。(B) マウス *typ* cDNA の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列; クローン #2、#5、#6 及び #8 の塩基配列を決定し、統合した 3090 bp の *typ* cDNA は最大 1278 bp (426 アミノ酸) の ORF を含んでいた。最大 ORF の 5'側及び 3'側に存在する読み枠に合っている終止コドンを太字で示す。p34cdc2 の認識可能配列 (S/T/P/T/K/R) を細下線で、PEST 様配列を太下線で示す。

2. *typ*は2つの翻訳開始コドンを持つ

2-1. 抗Typポリクローナル抗体の作製

Typのアミノ酸配列51-164、及び165-285をGSTとの融合タンパク質として調製した。これらを抗原としてウサギに免疫し、得られた抗血清から抗Typポリクローナル抗体をアフィニティー精製した（それぞれ α TypN1及び α TypC1と命名）。

抗TypN1抗体及び抗TypC1抗体を用いてウエスタン解析を行ったところ、成体マウス精巣の抽出液中に45及び40 kDaのタンパク質が検出された（図7、レーン3、5）。これらのバンドは成体マウスの卵巣及び脳の抽出液中には検出されなかった。2つのバンドが検出される理由として、40 kDaのタンパク質は45 kDaのタンパク質の分解産物である可能性と、40 kDaのタンパク質は第1メチオニンをコードするATG218コドンよりも下流に位置するコドンを翻訳開始コドンとして利用し、合成されるタンパク質である可能性が考えられた。そこでまず、ORF全体を含んでいる*typ* cDNAを*in vitro*で転写、翻訳させたところ、やはり45 kDa及び40 kDaのタンパク質が合成された（図7、レーン6）。更に、Typ発現ベクターpME-Typをトランスフェクションした293T細胞の抽出液中にも精巣抽出液中のTypタンパク質と同じ泳動度のバンドが検出された（図9B、レーン1、2）。一方、ATG218コドンをGCGに置換する変異を導入したTyp発現ベクター、pME-Typ1MAをトランスフェクションした場合には、40 kDaのタンパク質のみが発現した（図9B、レーン3）。この結果は45 kDaのTypはATG218を翻訳開始コドンとして合成されること、及び40 kDaのTypは45 kDaのTypから翻訳後修飾や分解により生じたものではないことを意味している。そこで40 kDaTypの翻訳開始点について解析を進めた。

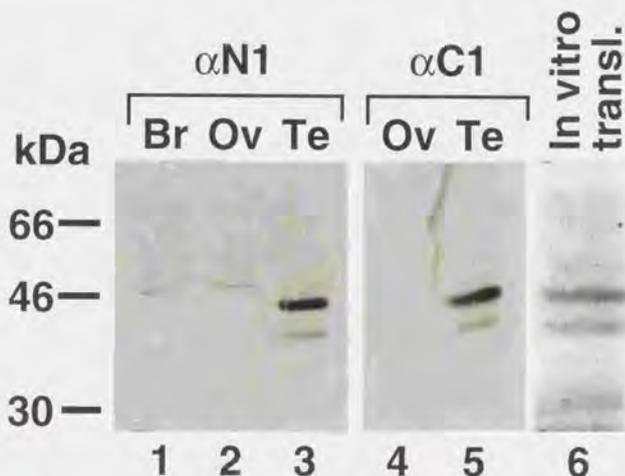


図7 *typ*遺伝子産物の解析

4週齢マウスの脳 (Br)、卵巣 (Ov) 及び精巣 (Te) から調製した抽出液 (タンパク質量 $100 \mu\text{g}$) を SDS-PAGE で分離し、抗 *Typ*N1 抗体 (レーン1-3) または抗 *Typ*C1 抗体 (レーン4、5) を用いてウエスタン解析を行った。また、*typ* cDNA を鋳型にして合成した RNA を $[^3\text{S}]$ メチオニン存在下で *in vitro* 翻訳し、10% SDS-PAGE で分離した後、合成されたタンパク質の検出を行った (レーン6)。

2-2. *typ*の翻訳開始点の解析

まずN末端から97アミノ酸を欠いたTypを、N末端にFLAGエピトープをつけて発現させたところ、合成されたタンパク質は40 kDaのTypよりもやや速い移動度を示した(図9B、レーン9)。従って、40 kDaのTypの翻訳開始コдонはORFの2番目のセリンをコードするTTG221 から97番目のメチオニンをコードするATG506の間に位置すると考えられた(図8)。そこでこの領域内に存在する第2、第3、第4メチオニンをコードするATGコдонをそれぞれTCG、GTT、CTAに換える変異を導入した変異型Typ発現ベクター、pME-Typ2MS、pME-Typ3MV及びpME-Typ4MLを作製した。更に、ATGコдонの他にCTGコдонが翻訳開始コдонとして利用されている例も報告されていることを考慮し、25番目及び60番目のロ

```

      1                               25
1  MSSPRKVRGK TGRDNDEEEG NSGNLNLNRNS
      38                               49                               60
31  LPSSSQKMTP TKPIFGNKMN SENVKPSHHL
      97
61  SFSDKYELVY PEPLESDTDE TVWDVSDRSL
      97
91  RNRWNSMDSE TAGPSKTVSP VLSGSSRRLSK
      150
121 DTETSVSEKE LTQLAQIRPL IFNSSARSAM
      151
151 RDCLNTLQKK EELDIIREFL ELEQMTLPDD
  
```

図8 Typタンパク質のアミノ末端側のアミノ酸配列

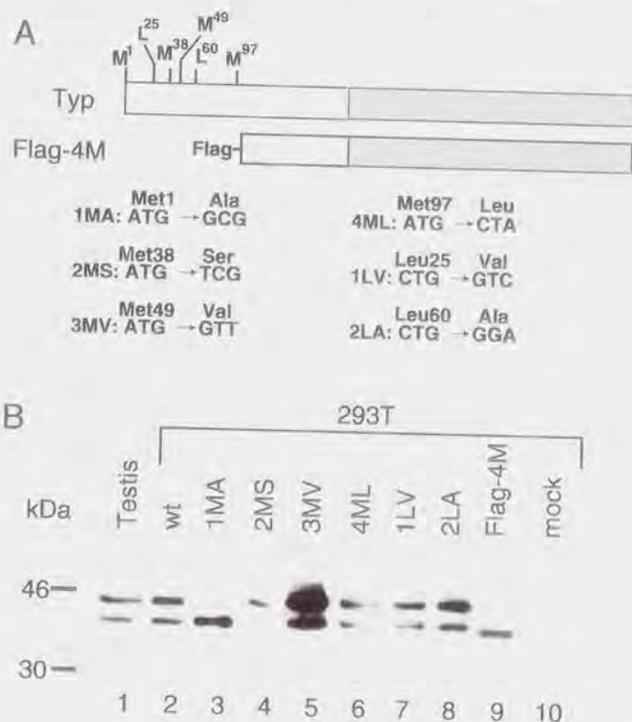


図9 40 kDa Typタンパク質の翻訳開始点の解析 I

(A)FLAG 付き N 端欠損 Typ 及び各 ATG または CTG 変異型 Typ の模式図 (B)精巣から調製した抽出液 (タンパク質量 $100 \mu\text{g}$; レーン 1) 及び、pME-Typ、pME-Typ1MA、pME-Typ2MS、pME-Typ3MV、pME-Typ4ML、pMETyp1LV、pME-Typ2LA、pME-Flag-4M、及びコントロールとして空の pME18S ベクターをトランスフェクションし、それぞれの変異型 Typ を発現させた 293T 細胞から調製した抽出液 (タンパク質量 $25 \mu\text{g}$; レーン 2-10) を SDS-PAGE で分離し、抗 TypN1 抗体を用いてウエスタン解析を行った。

イシンをコードするCTGコドンにも変異を導入した発現ベクター pMETyp1L及び pME-Typ2LAを構築した(図9A)。これら5種の変異型Typ発現ベクターそれぞれを293T細胞に遺伝子導入し、細胞抽出液のウエスタン解析を行ったところ、どのベクターを用いた場合にも45及び40 kDaの両方のTypの発現が確認された(図9B、レーン4-8)。SDS-PAGE上の泳動度は実際の分子量を正確に反映しない場合があることを考え、第5番目のメチオニンである、メチオニン150をコードするATG665をCCGに置換した発現ベクターpME-Typ5MPも作製したが、このベクターからも45及び40 kDaのTypが発現した(図10、レーン8)。以上の結果は、第1メチオニンをコードするATG218コドンと共に、それより下流にあるATG及びCTG以外のコドンが翻訳開始コドンとして使われ、その結果45 kDa及び40 kDaのTypがそれぞれ合成されることを強く示唆している。40 kDaのTypタンパク質の翻訳開始点を決定するため、まず図10Aに示すような5種類の部分欠損Typ発現ベクター pME-TypdelA、pME-TypdelB、pME-TypdelC、pME-TypdelD及び pME-TypdelEを作製し、COS7細胞にトランスフェクションした。pME-TypdelB、pME-TypdelC、及びpME-TypdelEはATG218をGCGに置換しており、45 kDaのTypは発現しないコンストラクトになっている。細胞抽出液をウエスタン解析した結果、pME-TypdelA及びpME-TypdelBをトランスフェクションした細胞では40 kDaのTypが発現したが、pME-TypdelC及びpME-TypdelEをトランスフェクションした細胞では発現しなかった(図10、レーン2-4及び6)。つまり、メチオニン1からメチオニン38までを欠損させても40 kDaのTypの発現には影響がなかったが、メチオニン38からロイシン60までを欠損させると40 kDaのTypは発現しなくなった。更に、ロイシン60からメチオニン97までを欠損させたpME-TypdelDをトランスフェクションした細胞では、45 kDa及び40 kDaのTypが、欠損分だけ分子量が小さくなったと考えられる約40 kDa及び約35 kDaのタンパク質が発現した(図10、レーン5)。この2つのタンパク質はウエスタン解析では抗TypC1抗体によってしか明らかな発現が検出できなかったが、抗TypN1抗体による免疫沈降物をウエスタン解析したところ抗TypN1抗体によっても発現が確認できた(図10、レーン9)。従って、40 kDaのTypの翻訳開始点はメチオニン38からロイシン60の間にあると考えられた。ATGコドンから1塩基だけ変化したコドンのうち、

CTGを含めいくつかのものからも哺乳類の細胞内において翻訳が開始され得ることが報告されている[47-49]。メチオニン38からロイシン60までの間にはATGからの1塩基置換で生じるコドンは4つ存在する（図11A）。Typ発現ベクター中のこれら4つの各コドンに図11Bに示す変異を導入し、COS7細胞にトランスフェクションした。しかしウェスタン解析の結果、どの変異も40 kDaのTypの発現を阻害しなかった（図11C）。

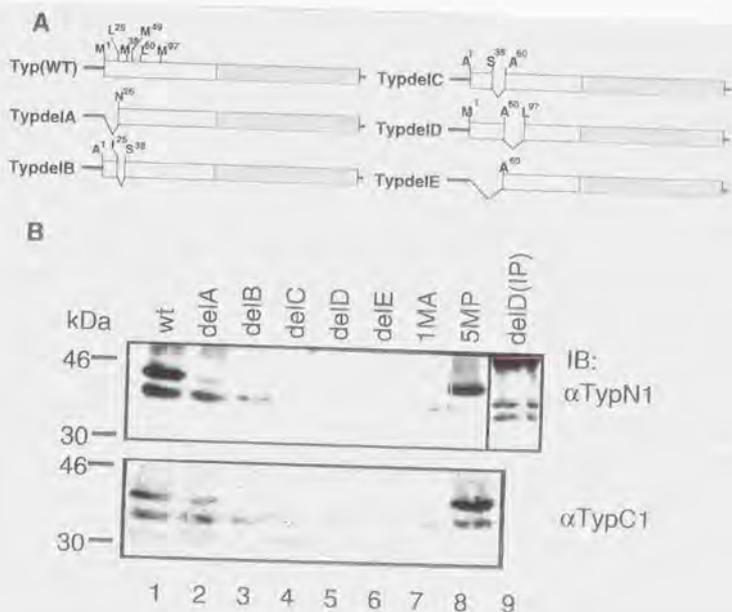


図10 40 kDa Typタンパク質の翻訳開始点の解析 II

(A)野生型及び部分欠損型Typ発現ベクターに組み込んだ*typ* cDNAの模式図。TypdelA、TypdelB、TypdelC、及びTypdelEはATG218に変異を導入し、且つそれぞれメチオニン1-ロイシン25、ロイシン25-メチオニン38、メチオニン38-ロイシン60、及びメチオニン1-ロイシン60に相当する部分を欠損させた。TypdelDはロイシン60-97メチオニンに相当する部分を欠損させた。(B)pME-Typ(wt)、pME-TypdelA(delA)、pME-TypdelB(delB)、pME-TypdelC(delC)、pME-TypdelD(delD)、pME-TypdelE(delE)、pME-Typ1MA(1MA)、pME-Typ5MP(5MP)ベクターをトランスフェクションし、変異型Typを発現させたCOS7細胞から調製した抽出液(タンパク質量25 μ g; レーン1-8)及びpME-TypdelDをトランスフェクションした細胞抽出液(タンパク質量250 μ g)からの抗TypN1抗体による免疫沈降物ををSDS-PAGEで分離し、抗TypN1抗体または抗TypC1抗体を用いてウエスタン解析を行った。

3. ホスファターゼ活性測定

活性測定にはGSTとTypのC端側259アミノ酸（PTP領域とN末端領域の一部を含む）との融合タンパク質（GST-TypPTP）を精製して用いた。*p*-NPPを基質としたホスファターゼ活性を測定した結果、融合タンパク質GST-TypPTPは*p*-NPP分解活性を示し、その活性はPTP特異的阻害剤である Na_3VO_4 で阻害された（図12A）。また、8週齢マウスの抽出液からの抗TypN1抗体による免疫沈降物中にも Na_3VO_4 で阻害されるホスファターゼ活性が認められた（図12B）。これらの結果からTypタンパク質が実際にPTP活性を有することが示された。

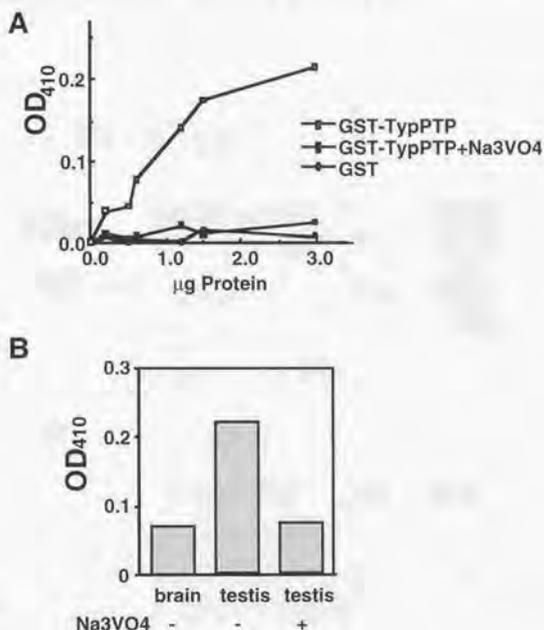


図12 ホスファターゼ活性測定

(A) GSTとTypのPTPドメインとの融合タンパク質（GST-TypPTP）及びGSTを用いて*p*NPPを基質とした反応を行い、410nmの吸光度として*p*NPPの加水分解度を測定した結果を示す。(B) 8週齢マウスの脳及び精巣抽出液から抗TypN1抗体を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降物のPTP活性を*p*-NPPを基質として測定した。PTPに対する特異的阻害剤である Na_3VO_4 を加える場合は最終濃度が0.5 mMとなるようにした。

4. Typは生殖細胞特異的に発現するPTPである

4-1. 精巣におけるTypの発現分布

Typの発現に関して、まずマウス精巣内での発現を生後週齢を追って調べた。抗TypN1抗体によるウェスタン解析の結果、45 kDaのTypの発現が3週齢になってはじめて検出された。40 kDaのTypは3週齢以降に発現が確認できる（図13）。生後第一回目の精子形成は精巣内で同調的に進行することから、Typの発現が生後2週から3週の間を開始されるというこの結果は、Typが生後直後から常に精巣内に存在する体細胞や精原細胞ではなく、精子形成過程が進んだ精母細胞時期以降にある生殖細胞に発現していることを強く示唆する。

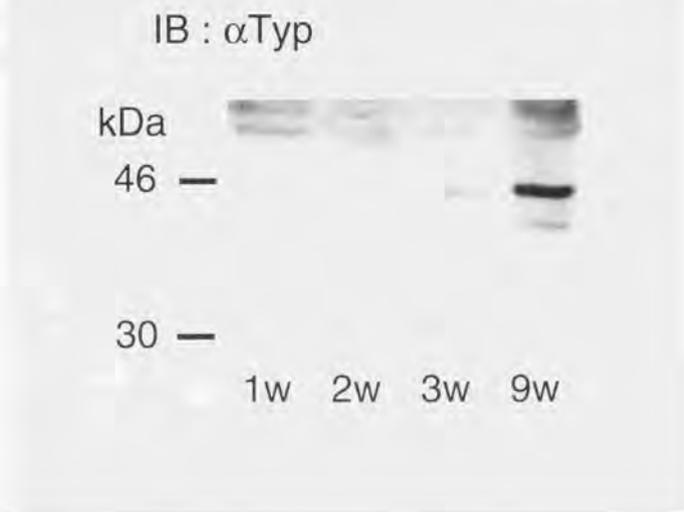


図13 マウス精巣の発育過程におけるTypの発現

1週齢(1w)、2週齢(2w)、3週齢(3w)、及び成体(9週齢;9w)マウスの精巣から調製した抽出液(タンパク質量100 μ g)をSDS-PAGEで分離し、抗TypN1抗体を用いてウェスタン解析を行った。

次に *typ* の精巣組織における発現分布を調べるために、ディゴキシゲニン (DIG) で標識したRNAプローブを作製し、8週齢マウスの精巣の凍結切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。アンチセンスRNAプローブであるAS-probe1 (材料と方法の項参照) による *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、精細管内で最も基底膜側に存在する精原細胞層よりも一層中心寄りの細胞層にシグナルが検出された (図14A)。これらのシグナルはセンスプローブを用いた場合には検出されなかった (図14B)。顕微鏡観察による細胞の形態や精細管内における位置から、強いシグナルが検出されたのは生殖細胞の中でもバキテン期 (厚糸期) 精母細胞であることが分かった。また、ライディヒ細胞やセルトリ細胞などの体細胞及び、精原細胞、減数分裂を終えた精細胞以降の生殖細胞にはシグナルはみられなかった。低倍率の視野で観察すると、シグナルがみられない精細管が存在したが (図14C)、このことは *typ* mRNA の発現が、精子形成過程において第一精母細胞のある一時期に限局されていることを示している。他の2種類のアンチセンスRNAプローブ (AS-probe2及び3; 材料と方法の項参照) を用いた場合にも同様の結果を得た。

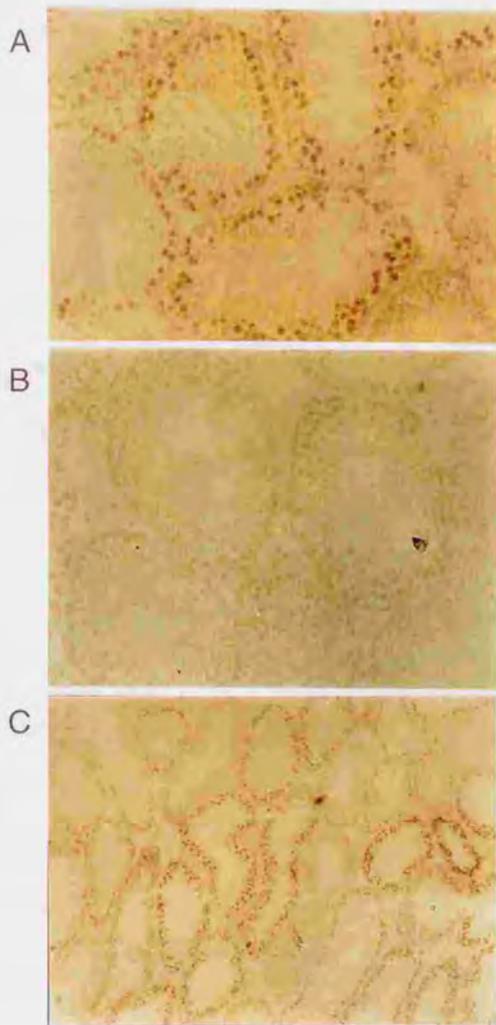


図14 精巣組織における *typ* mRNAの発現分布(*in situ* ハイブリダイゼーション)

8週齢マウス精巣の凍結切切片(5-8 μ m厚)に対し、ディゴキシゲニン(DIG)標識したアンチセンスRNAプローブ(AS-probe); A、C)またはセンスプローブ(B)を用いてハイブリダイゼーションを行った。Cは低倍率で観察した結果である。

次に、Typタンパク質の精子形成過程における発現を、間接蛍光抗体法を用いた免疫組織染色を行い解析した。8週齢マウスの凍結切片に対し、抗TypN1及び抗TypC1抗体を用いて抗体染色を行ったところ、どちらの抗体を用いた場合にも最も強いシグナルは *in situ* ハイブリダイゼーションの結果と同様に、パキテン期精母細胞に認められた。ライディヒ細胞やセルトリ細胞などの体細胞及び、精原細胞、精子細胞にはシグナルは認められなかった（図15D、E、G及びH）。また抗TypN1抗体を、抗原に用いたGST-TypN1タンパク質とブレインキュベーションしてから染色に用いた場合には、これらのシグナルは消失した（図15B）。

免疫組織染色の結果を核染色の像から判定したステージ分けに基づいて検討した結果、TypはステージIXからXIの精細管に含まれる精母細胞に発現していた（図16）。従って、Typは後期のパキテン期以降の精母細胞に発現していることが強く示唆された（図3参照）。生後第1回目の精子形成において後期パキテン期精母細胞が現れるのは生後2週目以降であり[50]、この結果は週齢を追って行った精巣のウエスタン解析の結果とも一致する。ステージVII-VIIIの精細管の中央にみられる抗TypC1抗体による染色はブレイムーン血清を1次抗体として用いた場合にもみられることから非特異的な染色であると考えられる。

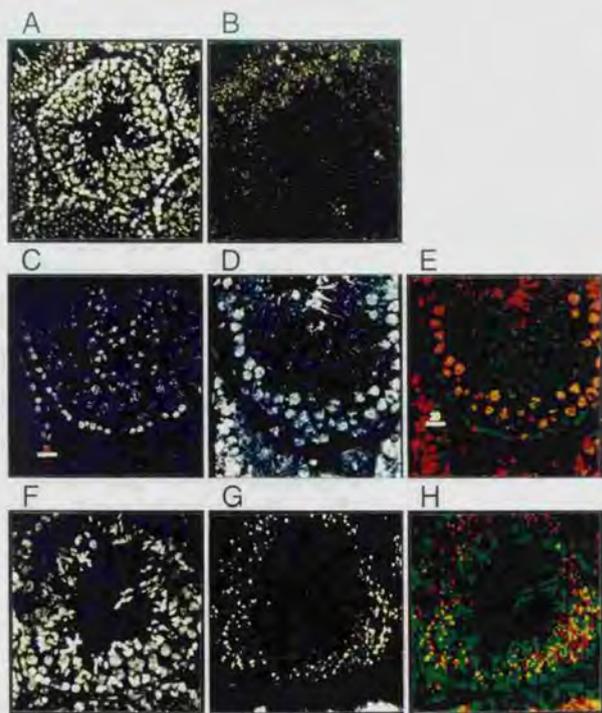


図15 精巣組織におけるTypタンパク質の発現分布

8週齢マウス精巣の凍結切片(5-8 μ m厚)に対し、一次抗体として抗TypN1抗体(D)、抗TypC1抗体(G)、または抗原とブレインキュベーションした抗TypN1抗体(B)を用いた間接蛍光抗体染色を行った。2次抗体としてFITC標識抗ウサギIgG抗体を用い、また染色体をpropidium iodide(PI)により染色し、共焦点顕微鏡により観察した。E、HはFITCシグナルを赤で、PIシグナルを緑で示し、重ねたものである。

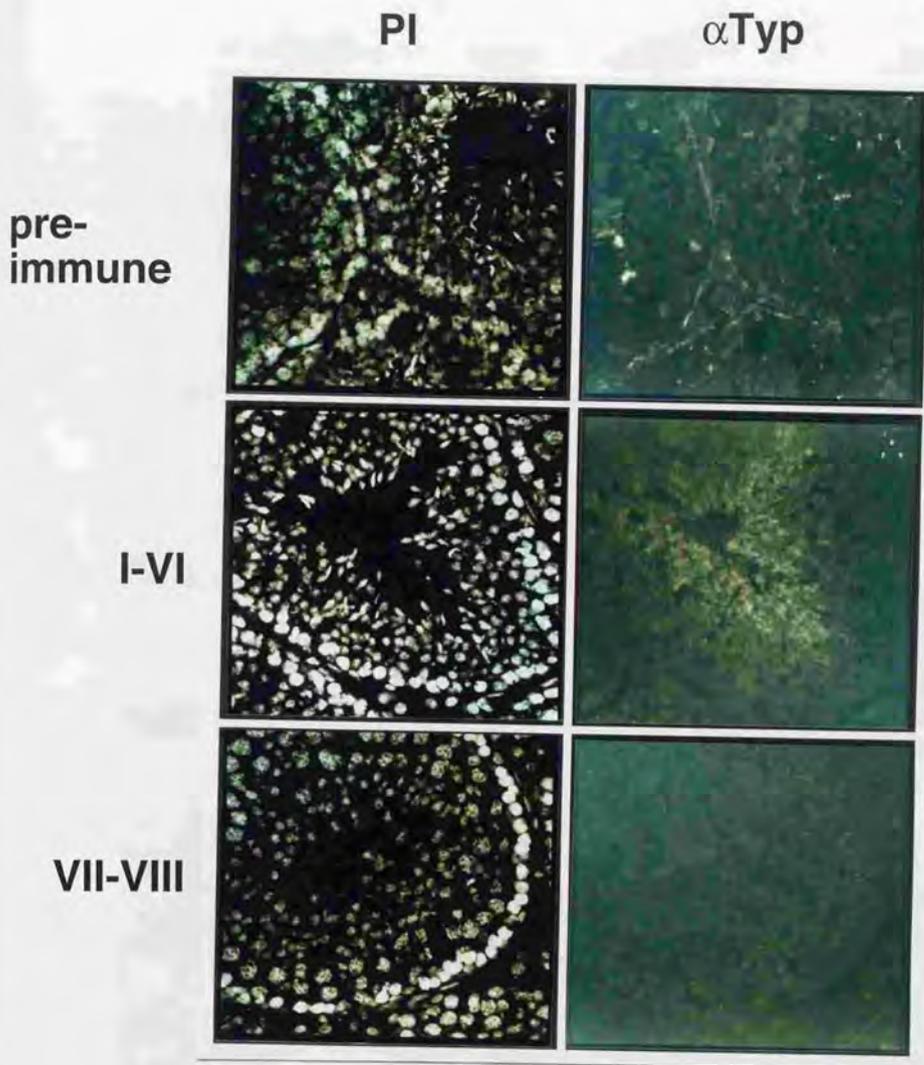


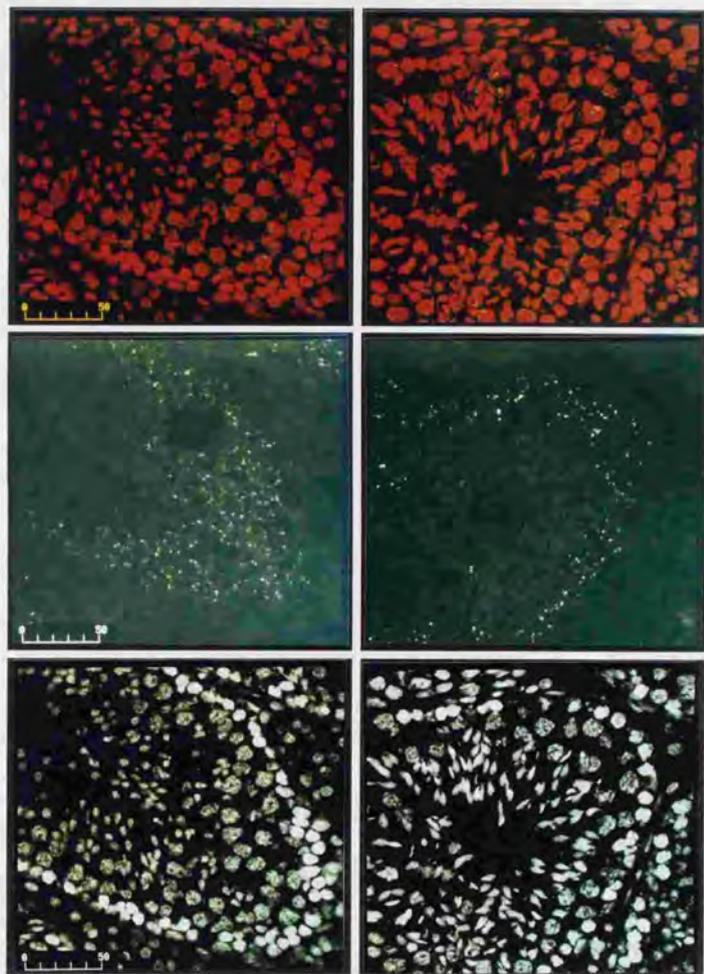
図16-1 ステージI-VIIIの精細管におけるTypの発現

8週齢マウス精巣の凍結切片(5-8 μ m厚)に対し、一次抗体としてブレイムーン血清または抗TypC1抗体を、2次抗体としてFITC標識抗ウサギIgG抗体を用いた間接蛍光抗体染色を行った(右列のパネル)。また染色体をpropidium iodide(PI)により染色し(左列のパネル)、共焦点顕微鏡により観察した。抗TypC1抗体で染色した切片について、左側に示した各ステージの代表的な精細管を示した。

Red:PI
Green:Typ

α Typ

PI



IX-X

XI

図16-2 ステージIX-XIの精細管におけるTypの発現

8週齢マウス精巣の凍結切片(5-8 μ m厚)に対し、一次抗体として抗TypC1抗体を、2次抗体としてFITC標識抗ウサギIgG抗体を用いた間接蛍光抗体染色を行った。また染色体をpropidium iodide(PI)により染色し(左列のパネル)、共焦点顕微鏡により観察し、左側に示した各ステージの代表的な精細管を示した。右列のパネルはFITCシグナルを緑で、PIシグナルを赤で示し、重ねたものである。

更に、Typの細胞内での局在を解析するため、精巣をコラゲナーゼ処理し、精細管内の細胞を遊離させたのちに蛍光抗体染色を行った。その結果、Typは主に細胞質に局在するが、核内にも存在することがわかった。また、抗TypC1抗体を用いた場合に特に顕著であったが、細胞質において染色は均一ではなく、粒上の局在が認められた。また精巣切片の組織染色では精母細胞の分裂像を含むステージXIIの精細管は観察できなかったが、この細胞染色により第一減数分裂の分裂期にある細胞でもTypが強く発現していることが分かった(図17)。

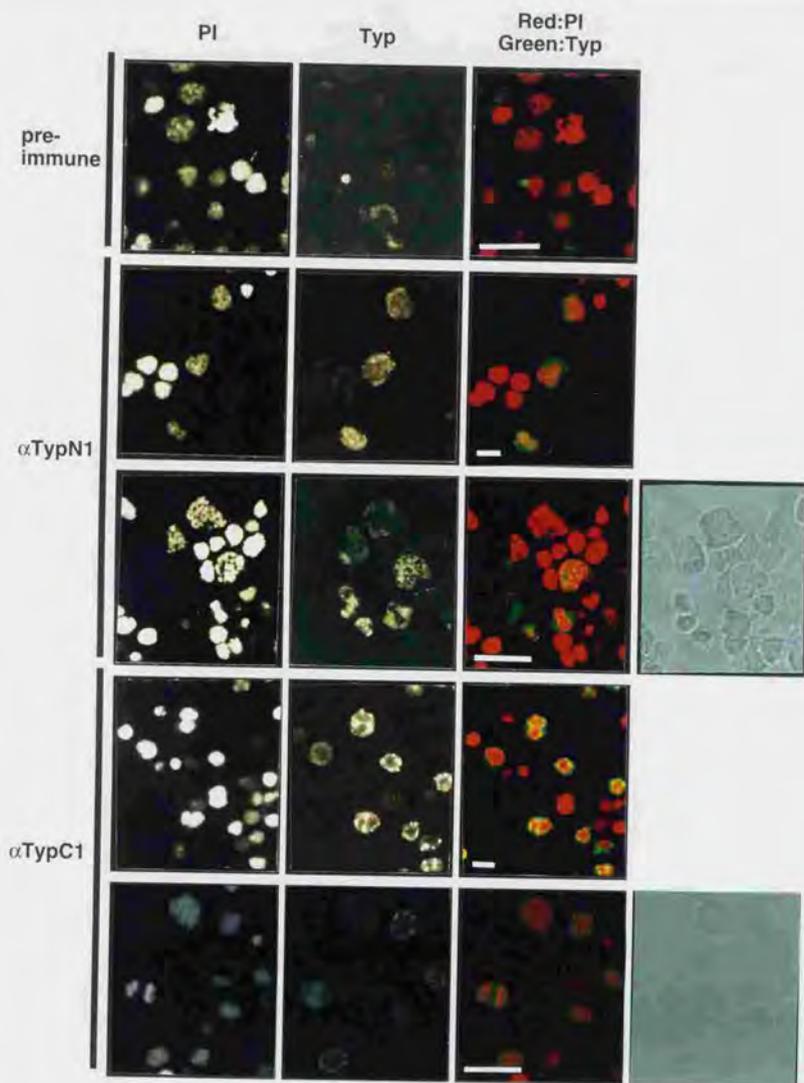


図17 Typの細胞内局在

22日齢のマウス精細管から細胞を遊離させ、一次抗体として左側に示した抗TypN1抗体、抗TypC1抗体、またはプレイミュン血清を用いた間接蛍光抗体染色を行った。2次抗体としてFITC標識抗ウサギIgG抗体を用い、また染色体をpropidium iodide(PI)により染色し、共焦点顕微鏡により観察した。スケールバー：20 μ m

4-3. 卵巣での発現

ノザン解析及びウエスタン解析では、成体の卵巣におけるTypの発現は検出されなかった。しかし、卵巣中の生殖細胞の数は精巣と比較して極端に少ないこと、また卵母細胞の減数分裂は胎齢13日に開始され同調的に進み、胎齢16日あたりでバキテン期に入り、成体の卵巣中の卵細胞は第一減数分裂を終えていることから、卵巣でのTypの発現を否定することはできない。そこで卵巣での発現の有無を確かめるため胎齢8.5日、10.5日、の下半身14.5日、及び胎齢16.5日、成体の卵巣からRNAを調製しRT-PCRを行った。PCRの上流プライマーとして、*typ* cDNAのORFのC端側をコードする領域に設定したprimer #1224、#1332（材料と方法の項参照）を、下流プライマーとして3'非翻訳領域に設定した、primer #1960（材料と方法の項参照）を用いた。primer #1224-primer #1960の組み合わせ、及びprimer #1332-primer #1960の組み合わせによりそれぞれ714bp、629bpの*typ* cDNA断片が増幅される。またこれらのプライマーを設定した領域は、それぞれ別のエクソン中に存在しているため、RNA調整時に混入することが考えられるゲノムDNAからの増幅の可能性は除去できる。RT-PCRの結果、16.5日齢及び成体の卵巣においてバンドが検出され、卵細胞でのTypの発現が示唆された（図18）。従ってTypは厳密な発現調節を受けて生殖細胞において精子・卵子形成過程の一時期に特異的に発現し、生殖細胞の減数分裂過程に関与しているPTPであることが考えられる。

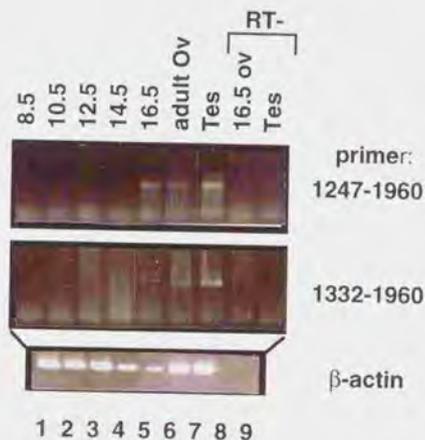


図18 卵巣における *typ* mRNA の発現

胎齢8.5日 (レーン1; 8.5)、10.5日 (レーン2; 10.5) 12.5日 (レーン3; 12.5) の下半身、14.5日 (レーン4; 14.5)、16.5日 (レーン5; 16.5)、成体の卵巣 (レーン6; adult Ov)、精巣 (レーン7; Tes)、から調製したRNAを材料に用い、RT-PCRを行った。ネガティブコントロールとして逆転写反応(RT反応)時に逆転写酵素を加えなかったもの (レーン8,9) をPCR反応の鋳型として使用した。また、RT反応のポジティブコントロールとして β -actin cDNA断片を増幅するプライマーを用いた。

5. *Typ* ゲノム構造の解析

*Typ*の生理機能を解析するためにジーンターゲットニングを行うことを目的とし、*typ*の染色体遺伝子をクローニングした。cDNAクローン#5のインサートcDNAから調製した*Hind*III-*Xho*I断片をプローブに用いてλFIX II/129SVJゲノムライブラリーをスクリーニングした結果、 1×10^6 クローンから15の陽性クローンを得た。それぞれのインサートゲノムDNAをpBlueScriptベクターにサブクローニングし、*Eco*RI及び*Eco*RVによる切断の結果生じる断片を比較した結果、同一と考えられるクローンは3クローン含まれており、独立なクローンは12クローンであった。これらのクローンが*typ*染色体遺伝子のどの領域を含むかを明らかにするため、数種の適当な制限酵素について詳細な制限酵素地図を作製した。更に、エクソン-イントロンの境界を明らかにするため、必要なゲノムDNA断片をサブクローニングした後、一部の塩基配列を決定した。その結果、これらの12クローンは図19A、Bに示すように2つに大別できた。クローン1、2、5、7、9、13、18、21、22はそれぞれ部分的に重なっており、全体としてORFの開始点を含むエクソン（便宜的にエクソンIIとした）から、*typ* cDNAの716番目の塩基配列までで構成される計5つのエクソンを含んでいた（図19A）。また、クローン3、12、19も部分的に重なっており、*typ* cDNAの819番目の塩基配列からORFの終止コドンを含むエクソンまでの計4エクソンを含んでいた（図19B）。A、B 2つの領域は重なっておらず、*typ* cDNAの717-818番目の領域で構成されるエクソンを含むクローンは今回のスクリーニングでは得られなかったが、*typ*のORFは少なくとも10のエクソンから構成されることが明らかになった（図19C）。調べた全てのエクソン-イントロン境界の塩基配列は真核生物のスプライシングドナー、スプライシングアクセプターのコンセンサス配列、5' GT.....AG 3' に合致していた[51,52]。

他のいくつかのPTP遺伝子についてゲノム構造が報告されており、PTPドメインに関してはほぼ保存されたエクソン-イントロン構造をとることがわかっている。図20に、*Typ*及び、細胞質型PTPであるSHP1[53]、PTP-PEST[54]、PTP1B[55]、SHP2[56]、TCPTP[57]、LCPTP[58]、受容体型PTPであるCD45[59]、LAR[60]のPTPドメインのエクソン-イントロンの境界を示した。*Typ*

のPTPドメインはエクソンVIII-XIにコードされており、存在するエクソン-イントロンの境界は全て他のPTPにおいてもよく保存されている位置にあった。しかし、TypのPTPドメインはゲノム構造が報告されているPTPの中では最も少ない数のエクソンから構成されており、他の全て、あるいは大部分のPTPには存在するが、Typには存在しない境界があった。従って、TypはPTPの系統樹に他のPTPとは異なる側枝に位置するPTPであることが示唆された。

また数種類の*typ* cDNA断片をプローブとして用い、マウスゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーションを行った結果から、マウスには*typ*の pseudogene は存在しないことが確認できた (データ示さず)。

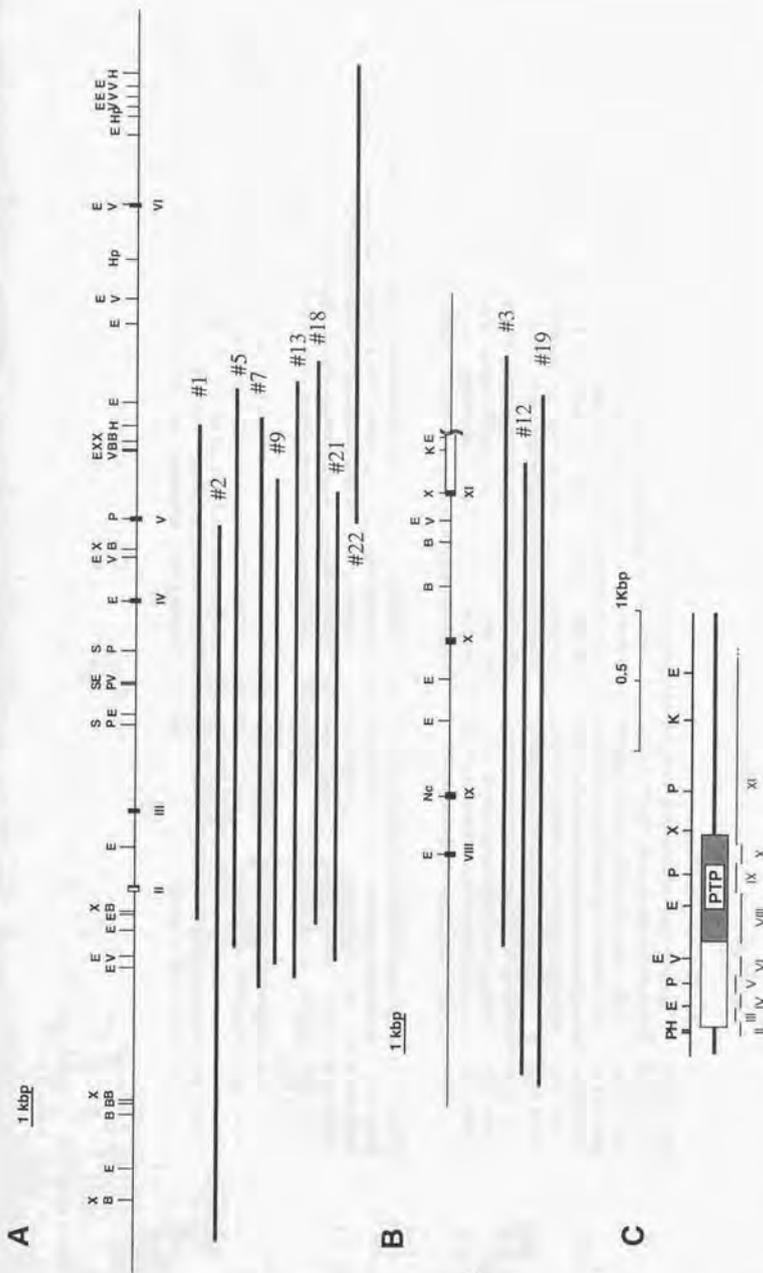


図19 *typ* 染色体遺伝子の構造
 A, B: *typ* 染色体遺伝子構造。ゲノムライブラリーをスクリーニングした結果得られたクロノンを線で表す。A, Bに示すゲノム領域は互いに重ならない。エクソンを四角で表し、下に便宜上付けたエクソン番号を示した。白四角が翻訳領域(ORF)を示す。C: *typ* のcDNAの模式図。エクソンを下に示した。また主要な制限酵素部位を示した。H: *Hind*III、E: *Eco*RI、EV: *Eco*RV、K: *Kpn*I、Nc: *Nco*I、P: *Pst*I、Sp: *Spe*I、X: *Xho*I、Xb: *Xba*I

IV 考察

本研究において、細胞内で極めて低レベルの発現をしている新規のPTP遺伝子を同定するために、コロニーハイブリダイゼーションを併用したRT-PCR法を用いた。RT-PCRにより増幅された様々なPTPドメインをコードするPCR産物から、優先的に増幅された既知のPTPをコードするものを除去するため、まずPCR産物からプラスミドライブラリーを構築した。次にこのライブラリーを大腸菌にトランスフォーメーションして得られたコロニーに対し、除去したいPTPをコードするPCR産物をプローブに用いたコロニーハイブリダイゼーションを行い、陰性コロニーを検索した。このネガティブセレクションにより約1,200クローンの中にただ1クローン存在していた新規のPTP遺伝子、*typ*を同定することができた。ノザン解析では*typ*の発現は精巣にしか認められず、RT-PCRの材料としたMDA-MB453細胞でも発現は検出できなかった。従って、ネガティブセレクションは、クロスハイブリダイゼーションによる見逃しの可能性はあるものの、発現の低い新規の遺伝子を同定するには有効な方法であったと考えられる。

cDNAの塩基配列から想定されるTypタンパク質は、シグナルペプチドや膜貫通領域を含まない細胞質型のPTPであった。PTPドメインはC末端に存在し、活性中心を構成する(I/V)HCSAGXXR(S/T)Gを含め、コンセンサス配列は保存されていたが、ドメイン全体の他のPTPとの相同性は最高でも45%程度であり、既知のPTPとサブファミリーを形成するものではなかった。一般に細胞質型PTPは1つのPTPドメインとそれ以外の多様な非触媒領域から構成されており、非触媒領域がそれぞれのPTPの細胞内での局在や基質特異性、酵素活性を調節していると考えられている[61]。Typの非触媒領域(N末端領域)には既知のタンパク質との有意に高い相同性は見られず、また特徴的なドメイン構造も存在しなかった。しかし、TypにはN末端約40-60アミノ酸の有無の違いをもつ2つのタンパク質(40 kDa及び45 kDa)が存在することから、このN末端領域を介したシグナルがTypの局在や活性を制御していることが考えられる。また、精巣抽出液のウエスタン解析において、45 kDaのTypの上に数本のバンドが検出される場合があることから、TypがN末端領域においてリン酸化を受けている可能性が考えられる。

抗Typポリクローナル抗体により精巣抽出液中に45及び40 kDaのTyp タンパク質が検出された。更に、*typ*のORFの*in vitro*転写/翻訳反応を行うとやはり45及び40 kDaのタンパク質が合成された。このことはこの2つのタンパク質が共に単一の*typ* mRNAから合成される*typ*遺伝子産物であることを示している。また、図9Bに示されているように、ATG218 への変異導入によって45 kDaのTypが発現していない場合にも、40 kDa Typ が発現した。従って、40 kDaのTypタンパク質は45 kDaのTyp が分解等の翻訳後修飾を受けてきたものではない。*in vitro* translationによっても両タンパク質が合成されることから、40 kDaのTypタンパク質は第2の翻訳開始点から合成されるものであることが強く示唆された。これまでに、ATGまたはCTGコドンが第2の翻訳開始コドンとして働いているという報告があるが、*typ*のORF内の、40 kDa のタンパク質を合成し得る位置にあるATGまたはCTGコドンへの変異の導入は40kDaのTypの発現を阻害しなかった。従って、40 kDaのTypはこれまでに報告のないコドンを利用しているなど、新規のメカニズムで翻訳開始されていることが示唆された。部分欠損変異型Typの解析から、40kDaのタンパク質の発現にはTypの39-59番目のアミノ酸をコードする塩基配列が必須であることが示されたが、今後はこの範囲の塩基配列に更に変異を導入し、必須の塩基配列を同定したい。

週齢を追って精巣でのTypの発現をウエスタン解析により調べた結果、45 kDaのTypが3週齢マウス精巣で検出されるのに対し、40 kDaのTypの発現は4週齢以降には見られなかった。成体マウスの精巣において、40 kDaのTypの発現量が45 kDaのTypに比較して低いことを考慮し、Typの検出感度を上げるために抗TypN1抗体を用いた免疫沈降物についてウエスタン解析を行った場合にも、3週齢マウス精巣には40 kDaのTypの発現は検出されなかった（データは示していない）。従って、精子、卵子形成過程において、40 kDa及び45 kDaのTypの発現時期が制御されている可能性が示唆された。今後2つのTypタンパク質に酵素活性や細胞内局在などの違いがあるかを検討したい。

遺伝学的手法を用いることが難しい哺乳動物では、減数分裂期の生殖細胞で特異的に発現する蛋白質の機能解析が哺乳類の精子形成の制御機構を解析する重要な手段となっている。これまでに精巣特異的に発現する遺伝子や、精巣にのみ大

サイズの異なる転写産物が存在する遺伝子がいくつか単離されており、その多くは相当する時期の卵巣内の生殖細胞でも発現が確認されている。そのような遺伝子として、卵子や精子を形成する材料タンパク質や代謝に関与する酵素の他に、減数分裂の開始や進行に直接関与する可能性の高い転写因子関連蛋白質やプロテインキナーゼ、ホスファターゼをコードするものが報告されている。*in situ*ハイブリダイゼーション及び免疫染色の実験から、雄性生殖細胞における *Typ* の主な発現は減数分裂の後期パキテン期から分裂期にかけての時期に限局されていることが明らかとなった。また、パキテン期の卵母細胞が現れる 16.5 dpc 以降の卵巣において、RT-PCR により *typ* のバンドが検出されたことから、*typ* は精母細胞のみならず卵母細胞にも発現していることが示唆され、従って減数分裂進行の制御に関与する可能性が示唆された。パキテン期は減数分裂の特徴でもある、交叉 (crossing over) が起こる重要な時期であり、転写因子である CTfin51 [61] や、セリン・スレオニンキナーゼである TESK [14]、PTK である Fer-T [19]、RPTP である OST-PTP [22] もパキテン期を中心とする時期に特異的に発現するタンパク質として報告されている。しかし、これらのタンパク質の生殖細胞における機能についての解析はまだそれほど進んでいない。タンパク質のチロシンリン酸化・脱リン酸化が細胞内シグナル伝達系の鍵となっていることから、*Typ* はこれらのタンパク質と共に生殖細胞における特異的なシグナル伝達系に深く関与している可能性が高い。そのため *Typ* の機能及び *Typ* が関わるシグナル伝達経路を明らかにすることは哺乳動物の減数分裂の機構解明につながる研究であると期待される。現在 *typ* 遺伝子のターゲティングを進めており、*typ* 欠損マウスを解析することで、*Typ* の基質タンパク質の同定を含め、*Typ* の生理機能を明らかにして行きたい。

V 謝辞

本研究を進めるにあたり、修士からの5年間あたたかく御指導、御助言、御支援を与えてくださった山本雅教授に心から感謝致します。

組織切片を用いた実験手技について多くの御指導を頂きました病理学研究部の塩田真美博士、片野晴隆博士をはじめとする皆様に感謝致します。

三菱生命科学研究所の野瀬俊明先生と研究室の方々には精巣細胞の培養、染色及びマウス胎児の卵巣組織の解析に関し、丁寧な御指導、御助言を頂き大変感謝しています。

また、実験動物施設の岩倉洋一郎教授、須藤カツ子博士、宝来玲子氏をはじめ、研究室のみなさまにはゲノム構造の解析及びマウスの取り扱いについて、御指導、ご協力を頂きました。

本研究は東京大学医科学研究所制癌研究部において、多くの方の御指導のもとに行ったものです。井上純一郎助教授、梅森久視助手をはじめ、研究室の全ての方々の適切な御助言と御指導に感謝致します。特に倉持敏美博士には具体的な実験方法から、親身に指導して頂きました。そして、都竹順子氏、及び手塚徹氏をはじめとする同期、後輩のみなさんには大変励まされ、助けられました。ありがとうございました。また、快適な研究環境をつくりあげてくださった長沢進氏にお礼申し上げます。

最後に、これまでの長い学生生活を経済的、精神的に支え、励まし続けてくれた両親と妹、全ての友人に感謝します。

VI 略語表

- AP: Alkaline phosphatase
BSA: bovine serum albumin
DIG: digoxigenine
EDTA: ethyleneglycol bis(2-aminoethyl-ether) tetra acetic acid
GST: glutathione-S-transferase
HEPES: N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HRP: horseradish peroxidase
IPTG: isopropyl-D(-)-thiogalactopyranoside
NP-40: nonionic detergent P-40
NR-PTP: non receptor type protein tyrosine phosphatase
ORF: open reading frame
PAGE: polyacrilamide gel electrophoresis
PBS: phosphate buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PTK: protein tyrosine kinase
PTP: protein tyrosine phosphatase
RNases: ribonuclease
RPTP: receptor type protein tyrosine phosphatase
SDS: sodium dodecyl sulfate
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

VII 参考文献

- (1) Hunter, T. (1995)
Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. [Review]. *Cell* **80**, 225-36.
- (2) Charbonneau, H., Tonks, N. K., Kumar, S., Diltz, C. D., Harrylock, M., Cool, D. E., Krebs, E. G., Fischer, E. H. & Walsh, K. A. (1989)
Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5252-6.
- (3) Stone, R. L. & Dixon, J. E. (1994)
Protein-tyrosine phosphatases. [Review]. *J Biol Chem* **269**, 31323-6.
- (4) Fischer, E. H., Charbonneau, H. & Tonks, N. K. (1991)
Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. [Review]. *Science* **253**, 401-6.
- (5) Jia, Z. (1997)
Protein phosphatases: structures and implications. [Review] [57 refs]. *Biochem Cell Biol* **75**, 17-26.
- (6) Ramponi, G. & Stephani, M. (1997)
Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* **1341**, 137-156.
- (7) Unkeless, J. C. & Jin, J. (1997)
Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. [Review] [42 refs]. *Curr Opin Immunol* **9**, 338-43.
- (8) Draetta, G. & Eckstein, J. (1997)
Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* **1332**, M53-M63.
- (9) Pelech, S. L., Sanghera, J. S. & Daya, M. M. (1990)
Protein kinase cascades in meiotic and mitotic cell cycle control. [Review] [436 refs]. *Biochem Cell Biol* **68**, 1297-330.
- (10) Oakberg, E. F. (1956)
A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cell cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* **99**, 391-413.

- (11) Jinno, A., Tanaka, K., Matsushime, H., Haneji, T. & Shibuya, M. (1993)
Testis-specific mak protein kinase is expressed specifically in the meiotic phase in spermatogenesis and is associated with a 210-kilodalton cellular phosphoprotein. *Mol Cell Biol* **13**, 4146-56.
- (12) Mutter, G. L. & Wolgemuth, D. J. (1987)
Distinct developmental patterns of *c-mos* protooncogene expression in female and male mouse germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5301-5.
- (13) Iwaoki, Y., Matsuda, H., Mutter, G. L., Watrin, F. & Wolgemuth, D. J. (1993)
Differential expression of the proto-oncogenes *c-abl* and *c-mos* in developing mouse germ cells. *Exp Cell Res* **206**, 212-9.
- (14) Toshima, J., Ohashi, K., Okano, I., Nunoue, K., Kishioka, M., Kuma, K., Miyata, T., Hirai, M., Baba, T. & Mizuno, K. (1995)
Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J Biol Chem* **270**, 31331-7.
- (15) Rhee, K. & Wolgemuth, D. J. (1997)
The NIMA-related kinase 2, Nek2, is expressed in specific stages of the meiotic cell cycle and associates with meiotic chromosomes. *Development* **124**, 2167-2177.
- (16) Manova, K., Nocka, K., Besmer, P. & Bachvarova, R. F. (1990)
Gonadal expression of *c-kit* encoded at the *W* locus of the mouse. *Development* **110**, 1057-69.
- (17) Sorrentino, V., Giorgi, M., Geremia, R., Besmer, P. & Rossi, P. (1991)
Expression of the *c-kit* proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* **6**, 149-51.
- (18) Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T. & Nishikawa, S. (1991)
Role of *c-kit* in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of *c-kit* expression and function. *Development* **113**, 689-99.
- (19) Keshet, E., Itin, A., Fischman, K. & Nir, U. (1990)
The testis-specific transcript (*ferT*) of the tyrosine kinase FER is expressed during spermatogenesis in a stage-specific manner. *Mol Cell Biol* **10**, 5021-5.
- (20) Letwin, K., Mizzen, L., Motro, B., Ben, D. Y., Bernstein, A. & Pawson, T. (1992)

A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *Embo J* **11**, 3521-31.

(21) Muramatsu, T., Giri, P. R., Higuchi, S. & Kincaid, R. L. (1992)
Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 May 15;89(10):4779]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 529-33.

(22) Mauro, L. J., Olmsted, E. A., Skrobacz, B. M., Mourey, R. J., Davis, A. R. & Dixon, J. E. (1994)
Identification of a hormonally regulated protein tyrosine phosphatase associated with bone and testicular differentiation. *J Biol Chem* **269**, 30659-67.

(23) Alphey, L., Jimenez, J., White, C. H., Dawson, I., Nurse, P. & Glover, D. M. (1992)
twine, a cdc25 homolog that functions in the male and female germline of *Drosophila*. *Cell* **69**, 977-88.

(24) Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

(25) Streuli, M., Krueger, N. X., Hall, L. R., Schlossman, S. F. & Saito, H. (1988)
A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leukocyte common antigen. *J Exp Med* **168**, 1523-30.

(26) Gu, M., Warshawsky, I. & Majerus, P. W. (1992)
Cloning and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to retinaldehyde-binding protein and yeast SEC14p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2980-4.

(27) Ostman, A., Yang, Q. & Tonks, N. K. (1994)
Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9680-4.

(28) Adachi, M., Sekiya, M., Arimura, Y., Takekawa, M., Itoh, F., Hinoda, Y., Imai, K. & Yachi, A. (1992)
Protein-tyrosine phosphatase expression in pre-B cell NALM-6. *Cancer Res* **52**, 737-40.

- (29) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- (30) Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988)
Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- (31) Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M. & Arai, N. (1988)
SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* **8**, 466-72.
- (32) Deng, W. P. & Nickoloff, J. A. (1992)
Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal Biochem* **200**, 81-8.
- (33) Guan, K. L., Broyles, S. S. & Dixon, J. E. (1991)
A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**, 359-62.
- (34) Kaplan, R., Morse, B., Huebner, K., Croce, C., Howk, R., Ravera, M., Ricca, G., Jaye, M. & Schlessinger, J. (1990)
Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7000-4.
- (35) Feng, G. S., Hui, C. C. & Pawson, T. (1993)
SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* **259**, 1607-11.
- (36) Freeman, R. J., Plutzky, J. & Neel, B. G. (1992)
Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11239-43.
- (37) Adachi, M., Sekiya, M., Miyachi, T., Matsuno, K., Hinoda, Y., Imai, K. & Yachi, A. (1992)
Molecular cloning of a novel protein-tyrosine phosphatase SH-PTP3 with sequence similarity to the src-homology region 2. *Febs Lett* **314**, 335-9.
- (38) Ahmad, S., Banville, D., Zhao, Z., Fischer, E. H. & Shen, S. H. (1993)
A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2197-201.

- (39) Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. & Ullrich, A. (1993)
Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* **259**, 1611-4.
- (40) Mizuno, K., Hasegawa, K., Ogimoto, M., Katagiri, T. & Yakura, H. (1994)
Developmental regulation of gene expression for the MPTP delta isoforms in the central nervous system and the immune system. *Febs Lett* **355**, 223-8.
- (41) Krueger, N. X., Streuli, M. & Saito, H. (1990)
Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *Embo J* **9**, 3241-52.
- (42) Watson, R., Oskarsson, M. & Vande, W. G. (1982)
Human DNA sequence homologous to the transforming gene (mos) of Moloney murine sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4078-82.
- (43) Mutter, G. L., Grills, G. S. & Wolgemuth, D. J. (1988)
Evidence for the involvement of the proto-oncogene c-mos in mammalian meiotic maturation and possibly very early embryogenesis. *Embo J* **7**, 683-9.
- (44) Sagata, N., Oskarsson, M., Copeland, T., Brumbaugh, J. & Vande, W. G. (1988)
Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* **335**, 519-25.
- (45) Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M. (1986)
Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-8.
- (46) Kennelly, P. J. & Krebs, E. G. (1991)
Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* **266**, 15555-8.
- (47) Peabody, D. S. (1989)
Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 5031-5035.
- (48) Taira, M., Iizasa, T., Shimada, H., Kudoh, J., Shimizu, N. & Tatibana, M. (1990)
A human testis-specific mRNA for phosphoribosylpyrophosphate synthetase that initiates from a non-AUG codon. *J Biol Chem* **265**, 16491-7.

- (49) Bernardis, A. & Monte, S. M. (1990)
The Itk receptor tyrosine kinase is expressed in pre-B lymphocytes and cerebral neurons and uses a non-AUG translational initiator. *Embo J* **9**, 2279-87.
- (50) Bellve, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., A., O. D., Bhatnagar, Y. M. & Dym, M. (1977)
Spermatogenic cells of the prepuberal mouse-Isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* **74**, 68-85.
- (51) Breathnach, R. & Chambon, P. (1981)
Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. [Review] [283 refs]. *Annu Rev Biochem* **50**, 349-83.
- (52) Shapiro, M. B. & Senapathy, P. (1987)
RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* **15**, 7155-74.
- (53) Banville, D., Stocco, R. & Shen, S. H. (1995)
Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics* **27**, 165-73.
- (54) Charest, A., Wagner, J., Muise, E. S., Heng, H. H. & Tremblay, M. L. (1995)
Structure of the murine MPTP-PEST gene: genomic organization and chromosomal mapping. *Genomics* **28**, 501-7.
- (55) Mosinger, B. J., Tillmann, U., Westphal, H. & Tremblay, M. L. (1992)
Cloning and characterization of a mouse cDNA encoding a cytoplasmic protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 499-503.
- (56) Isobe, M., Hinoda, Y., Imai, K. & Adachi, M. (1994)
Chromosomal localization of an SH2 containing tyrosine phosphatase (SH-PTP3) gene to chromosome 12q24.1. *Oncogene* **9**, 1751-3.
- (57) Johnson, C. V., Cool, D. E., Glaccum, M. B., Green, N., Fischer, E. H., Bruskin, A., Hill, D. E. & Lawrence, J. B. (1993)
Isolation and mapping of human T-cell protein tyrosine phosphatase sequences: localization of genes and pseudogenes discriminated using fluorescence hybridization with genomic versus cDNA probes. *Genomics* **16**, 619-29.

(58) Adachi, M., Miyachi, T., Sekiya, M., Hinoda, Y., Yachi, A. & Imai, K. (1994)

Structure of the human LC-PTP (HePTP) gene: similarity in genomic organization within protein-tyrosine phosphatase genes. *Oncogene* **9**, 3031-5.

(59) Johnson, N. A., Meyer, C. M., Pingel, J. T. & Thomas, M. L. (1989)

Sequence conservation in potential regulatory regions of the mouse and human leukocyte common antigen gene. *J Biol Chem* **264**, 6220-9.

(60) O'Grady, P., Krueger, N. X., Streuli, M. & Saito, H. (1994)

Genomic organization of the human LAR protein tyrosine phosphatase gene and alternative splicing in the extracellular fibronectin type-III domains. *J Biol Chem* **269**, 25193-9.

(61) Walton, K. M. & Dixon, J. E. (1993)

Protein tyrosine phosphatases. [Review]. *Annu Rev Biochem* **62**, 101-20.



