

様式 2

## 論文要約

学位論文題目

(和文)

PTPRD の細胞外領域におけるがん関連点突然変異はタンパク質の安定性と HSPG 相互作用に影響を及ぼす

(英文)

Cancer-associated point mutations within the extracellular domain of PTPRD affect protein stability and HSPG interaction

氏名 松井 悠

## 〔目的〕

*PTPRD*は受容体型チロシン脱リン酸化酵素  $\delta$  (*PTPRD*)をコードし、細胞の増殖、分化、遊走などの過程を制御するがん抑制遺伝子として知られる。*PTPRD*は3つのイムノグロブリン様(Ig)ドメイン(Ig1-Ig3)、4つ或いは8つのフィブロネクチン3(FN)ドメイン(FN1-FN8)、および細胞内領域の2つのチロシン脱リン酸化酵素ドメインより構成され、様々な悪性腫瘍においてその細胞外、細胞内領域に関わらず、多くのがん関連点突然変異が報告されている。*PTPRD*ががん抑制遺伝子としてがん細胞の増殖、分化の抑制に寄与する主たるメカニズムは、チロシン脱リン酸化酵素活性を介したSTAT3の抑制によるものと推測されているが、その細胞外領域(ECD: Extracellular domain)の機能はまだはっきりとわかっていない。

本研究ではECDに見出された92のがん関連点突然変異について、*PTPRD*タンパク質の機能発現に与える影響を検討した。

## 〔方法並びに成績〕

2021年10月までに報告されている*PTPRD*のECDのがん関連点突然変異をPubMedより92変異渉猟し、その変異がECDにおいて特に偏りなく広く分布していることをまず確認した。

次に線維芽細胞を用いた強制発現系において、それぞれの変異型*PTPRD*を遺伝子導入し、そのタンパク質発現量を定量した。その結果41の変異が野生型と比べて有意なタンパク質発現量の低下を引き起こした。更に1回膜貫通型タンパク質である*PTPRD*はレセプター様タンパク質として機能するために細胞膜に安定して発現することも重要であり、そのタンパク質の局在を細胞膜、細胞全体に分けて定量した。51の変異は細胞全体の発現量に対する膜表面での発現量の比率(細胞膜移行率)を野生型*PTPRD*に比べて有意に減少させ、タンパク質の細胞内での滞留を引き起こすことが示唆された。細胞全体のタンパク質発現量を低下させた41変異のうち約70%(28/41)で細胞膜への移行率も低下しており、がん関連変異によるタンパク質の細胞膜輸送過程における欠陥がタンパク質の分解を来す可能性が示唆された。

このようなタンパク質の安定性と細胞膜への移行率に影響する変異は全体の69.5%(64/92)に上り、*PTPRD*は特定の機能発現とは関係なく、タンパク質の安定性に関わる領域がECDに広く分布し、構造上不安定になりやすいタンパク質であると考えられた。また特定のドメイン内への偏りは認めなかったものの、最後のFN8ドメインから細胞膜貫通部までの172アミノ酸配列において95.2%(20/21)と非常に高い割合でがん関連点突然変異がタンパク質の安定性あるいは細胞膜への移行に影響することも見出した。このFN8ドメインから細胞膜貫通部までの領域内には、ゴルジ体中存在するプロテアーゼ furinによって切断を受ける部位が存在する。furin切断部位の周囲には6つのがん関連点突然変異(W1159M, R1178C, S1180T, R1182P, Y1183F, Y1192C)が報告されてお

り、そのうち4つの変異(R1178C, S1180T, R1182P, Y1192C)が実際に furin による切断を有意に低下させた。さらに、furin 切断部位のアミノ酸配列をグリシン・セリンリンカー配列に置換して、furin による切断を大幅に阻害すると、PTPRD タンパク質の発現と細胞膜への移行が著しく阻害されることがわかった。このことから、この領域に存在するがん関連点突然変異のいくつかは furin による切断効率の低下を介して、間接的に PTPRD の細胞膜への移行を障害する可能性がある。FN8 ドメインから細胞膜貫通部までの領域には明確なドメイン構造はこれまで報告されていないものの、PTPRD タンパク質の構造の安定性と膜移行に関わる重要なドメインの存在が示唆される。

一方、PTPRD のタンパク発現に影響を来さなかった 30.5% (28/92) のがん関連変異の中には PTPRD のがん抑制機能を障害するものが含まれる可能性が考えられた。Ig ドメイン内のグリコサミノグリカン(GAG)結合ポケット周辺にはいくつかのがん関連点変異が点在しており、そのうち Q67E, R123S の 2 変異はヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)に分類されるシンデカン 3 やグリピカン 1 との結合を促進させることがわかった。HSPG は線維芽細胞増殖因子、血管内皮増殖因子、ケモカイン、細胞接着因子などの様々なシグナル伝達受容体を活性化するリガンドや共受容体として機能し、Stat3 等のチロシンリン酸化を介して腫瘍の増生や悪性化に関与することが知られている。一方、HSPG は PTPRD を多量体化させ、チロシン脱リン酸化酵素活性を抑制することが提唱されている。従って、これらの PTPRD 変異は HSPG との結合を強化し、チロシン脱リン酸化酵素活性を抑制することによって、Stat3 等の脱リン酸化を介する抗腫瘍効果を減弱させることが考えられた。

#### 〔総括〕

本研究においてがん抑制遺伝子である PTPRD の ECD におけるがん関連点突然変異を網羅的に解析し、PTPRD タンパク質の安定性と細胞膜への局在に重要な領域を見出した。また、HSPG と PTPRD の結合特性の変化が腫瘍の増生や悪性化に繋がる可能性の一端を明らかにした。