2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　５ 月 １５ 日現在

機関番号：１３９０１

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：１６Ｈ０５１３９

研究課題名（和文）TypeⅡa受容体型チロシンフォスファターゼの細胞内シグナル

研究課題名（英文）Intracellular signaling of TypeII a receptor tyrosine phospatase

研究代表者

門松　健治（Kadomatsu, Kenji）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：８０２０４５１９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究によりPTPRσ基質としてアクチン結合タンパク質コータクチンを同定した。そして、コンドロイチン硫酸との結合によりPTPRσが活性化され、その結果コータクチンの脱リン酸化が起き、それによりオートファジーの中でオートファゴソームとリソゾームの融合が中断されることを証明した。もう一つの課題であったPTPRσ基質の網羅的探索も成功し、コータクチンを含む多くのリン酸化タンパク質を候補として得た。
　本研究は、PTPRとオートファジーの関連について直接のエビデンスを示す意味で重要である。また、オートファジーの神経変性疾患などへの関与を考え合わせると、多様な分野へ影響を与える基盤的研究となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は、PTPRとオートファジーの関連について直接のエビデンスを示す意味で重要である。加えて、これまで糖鎖は細胞表面で様々な分子と結合・相互作用することを主な役割とするという概念が定着しており、細胞内シグナルを動かすようなリガンド糖鎖の存在は予見されてはきたものの、それを示す直接のデータは乏しかった。本研究によってそれが示された意義は大きい。また、オートファジー不全はパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患で深く関与している。がんでもオートファジーと病態の関係が分かっている。これらを考え合わせると、本研究は多様な分野へ影響を与える基盤的研究となる。

研究成果の概要（英文）：We identified the actin-binding protein cortactin as a substrate of protein tyrosine phosphatase σ (PTPRσ). PTPRσ was activated by chondroitin sulfate and dephosphorylated cortactin. As a consequence, the autophagy flux was disrupted at the step of autophagosome-lysosome fusion. In addition, we succeeded in comprehensive screening of PTPRσ substrates.
 Our study provided solid evidence of the direct relationship between PTPR and autophagy. Considering that autophagy dysfunction is involved in various disorders such as neurodegenerative diseases, our results may influence a broad spectrum of research fields.

研究分野：生化学

キーワード：コンドロイチン硫酸　受容体型チロシンフォスファターゼ　PTPRσ　コータクチン　オートファジー　軸索再生　神経損傷　神経変性疾患

１．研究開始当初の背景

大人の中枢神経軸索は一度傷害を受けると再生することは困難である。それは元来の再生能力が低いことに加えて、傷害時に阻害物質が産生され軸索再生を阻害するからである。阻害物質の中で近年注目されているのがコンドロイチン硫酸（CS）である。例えば脊髄損傷などの傷害部位にCSが誘導される。In vitroでCSの勾配をつくるとその勾配に逆らって神経軸索は伸長しない。そのとき軸索先端は特殊なボール様形状に変形する。これをdystrophic endballと呼ぶ。

我々は脊髄損傷を起こしたラットの１次運動神経の軸索を観察した。すると、損傷を受けたほぼすべての軸索先端はdystrophic endballの形状を示した。このことからdystrophic endball形成機構を明らかにしない限り、軸索再生阻害の機構は解明できないであろうと考えた。さらに我々は、CS（中でも高硫酸化型のCS-E）とその受容体PTPRσ、LAR（Type IIa受容体型チロシンフォスファターゼPTPRに属する）の下流でオートファジー中断が誘起されることをはじめて示した。オートファジー中断はautophagosome蓄積を招き、それが軸索先端のdystrophic endball形成を導き、軸索再生阻害につながることを見出した。

２．研究の目的

上記背景を受けて、本研究では、CS-E・PTPRσとオートファジー中断の間のブラックボックス、すなわちPTPRσ下流の細胞内シグナリングを解明することを目的とした。

３．研究の方法

PTPRσを含む受容体型チロシンフォスファターゼは単量体となると活性化されることが知られている。従ってPTPRσの基質となるリン酸化タンパク質を同定することが本研究の眼目であった。「CS-E・PTPRσによるオートファジー中断」という現象を見出してまず着目したのがコータクチンである。アクチン結合タンパク質コータクチンはアクチン重合を介してautophagosomeとlysosomeの融合を促し、その結果autolysosome形成を促すことが報告されていた。そこでコータクチンの421番目のチロシン残基のリン酸化に注目して、2つの実験を行った。

まず、in vitro再構成実験である。PTPRσのフォスファターゼドメインを発現、調整し、Srcでリン酸化を受けたコータクチンとチューブ内で反応させた。もう一つの実験は、細胞内での検証実験である。PTPRσと強制発現させ、その上でコータクチンのリン酸化を見やすくするためにSrcも発現させる。PTPRσによるコータクチン421番目のチロシン残基の脱リン酸化を解析した。

コータクチンの脱リン酸化はコータクチンの不活化を意味する。コータクチンの脱リン酸化の生物学的意義については、初代培養した成体後根神経節神経細胞に対してコータクチンのノックダウンを試み、軸索再生、軸索先端の形状を観察した。

一方、コータクチンのみならずPTPRσには多数の基質があるはずである。そのために網羅的探索を、質量分析器を用いて行った。候補となったタンパク質についてはインフォマティクスを駆使してより可能性の高い候補を絞り込んだ。

４．研究成果

本研究により2つの大きな成果を得た。1つはPTPRσの基質コータクチンを明らかにしたことであり、2つ目はPTPRσの基質の網羅的探索に成功したことである。

（1）PTPRσの基質コータクチンの発見。PTPRσの基質としてアクチン結合タンパク質コータクチンを同定した。In vitroの再構成実験によりPTPRσがコータクチンを脱リン酸化することを示した。また細胞へのPTPRσ強制発現によってもSRCによってリン酸化されたコータクチンの脱リン酸化を示した。CS-E 4糖はさらにコータクチン脱リン酸化を促進した。以上の結果は、CS-Eとの結合によりPTPRσが活性化され、その結果コータクチンの脱リン酸化が起きることを明確に示すものである。

リン酸化コータクチンはアクチンの重合を促進することによりautophagosomeとlysosomeの融合によるautolysosome形成を促すことが知られていた。つまりコータクチンの脱リン酸化は、この機能の阻害を意味する。実際に培養神経細胞でのコータクチンのノックダウンによりautophagosomeとlysosomeの融合が阻害され、autophagosomeが溜まる現象が観察された。Autophagosome貯留は軸索先端を球状に変形させ（dystrophic endballと呼ばれる）、軸索再生を阻害した。

以上により、CS-E→PTPRσ活性化→コータクチン脱リン酸化→autophagosome・lysosome融合阻害→autophagosome貯留→dystrophic endball形成→軸索再生阻害という一連の流れを結びつけることができた。

（2）PTPRσ基質の網羅的探索。PTPRσ基質の網羅的探索を行った結果、コータクチンを含む多数の基質候補タンパク質を得ることに成功した。PTPRσの多くの基質候補を得ることができたので今後はコンドロイチン硫酸・PTPRσ・オートファジー・dystrophic endball形成の軸の中で、候補分子の脱リン酸化がどのステップでどのように関わるのかを明らかにしたい。また、PTPRσと同じサブクラスに属するLARについて網羅的基質探索を開始し、PTPRのサブファミリーの役割の統合的理解に進みたい。

本研究は、PTPRとオートファジーの関連について直接エビデンスを示す意味で重要である。加えて、これまで糖鎖は細胞表面で様々な分子と結合・相互作用することを主な役割とするという概念が定着しており、細胞内シグナルを動かすようなリガンド糖鎖の存在は予見されてはきたものの、それを示す直接のデータは乏しかった。本研究によってそれが示された意義は大きい。また、オートファジー不全はパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患で深く関与している。がんでもオートファジーと病態の関係が分かっている。これらを考え合わせると、本研究は多様な分野へ影響を与える基盤的研究となる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　27　件）

1.Narentuya, Takeda-Uchimura Y, Foyez T, Zhang Z, Akama TO, Yagi H, Kato K, Komatsu Y, Kadomatsu K, Uchimura K. GlcNAc6ST3 is a keratan sulfate sulfotransferase for the protein-tyrosine phosphatase PTPRZ in the adult brain. **Sci Rep.** 査読有, 2019, 9(1):4387. doi: 10.1038/s41598-019-40901-2.

2.Funahashi Y, Kato N, Masuda T, Nishio F, Kitai H, Ishimoto T, Kosugi T, Tsuboi N, Matsuda N, Maruyama S, Kadomatsu K. miR-146a targeted to splenic macrophages prevents sepsis-induced multiple organ injury. **Lab. Invest.** 査読有, 2019, doi: 10.1038/s41374-019-0190-4.

3.Doke T, Ishimoto T, Hayasaki T, Ikeda S, Hasebe M, Hirayama A, Soga T, Kato N, Kosugi T, Tsuboi N, Lanaspa MA, Johnson RJ, Kadomatsu K, Maruyama S. Lacking Ketohexokinase-A Exacerbates Renal Injury in Streptozotocin-induced Diabetic Mice. **Metabolism** 査読有, 2018, 85:161-170. doi: 10.1016/j.metabol.2018.03.020.

4.Mori Y, Masuda T, Kosugi T, Yoshioka T, Hori M, Nagaya H, Maeda K, Sato Y, Kojima H, Kato N, Ishimoto T, Katsuno T, Yuzawa Y, Kadomatsu K, Maruyama S. The clinical relevance

of plasma CD147/basigin in biopsy-proven kidney diseases. **Clin. Exp. Nephrol.** 査読有, 2018,22(4):815-824. doi: 10.1007/s10157-017-1518-2.

5.Su Z, Kishida S, Tsubota S, Sakamoto K, Cao D, Kiyonari S, Ohira M, Kamijo T, Narita A, Xu Y, Takahashi Y, Kadomatsu K. Neurocan, an extracellular chondroitin sulfate proteoglycan, stimulates neuroblastoma cells to promote malignant phenotypes. **Oncotarget** 査読有, 2017,8(63):106296-106310. doi: 10.18632/oncotarget.22435.

6.Tsubota S, Kadomatsu K. Origin and mechanism of neuroblastoma. **Oncoscience** 査読有, 2017,4(7-8):70-72. doi: 10.18632/oncoscience.360.

7.Misa K, Tanino Y, Wang X, Nikaido T, Kikuchi M, Sato Y, Togawa R, Tanino M, Tanaka S, Kadomatsu K, Munakata M. Involvement of midkine in the development of pulmonary fibrosis. **Physiol. Rep.** 査読有, 2017,5(16). pii: e13383. doi: 10.14814/phy2.13383.

8.Tsubota S, Kishida S, Shimamura T, Ohira M, Yamashita S, Cao D, Kiyonari S, Ushijima T, Kadomatsu K. PRC2-mediated transcriptomic alterations at the embryonic stage govern tumorigenesis and clinical outcome in MYCN-driven neuroblastoma. **Cancer Res.** 査読有, 2017,77(19):5259-5271. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3144.

9.Takemoto Y, Horiba M, Harada M, Sakamoto K, Takeshita K, Murohara T, Kadomatsu K, Kamiya K. Midkine Promotes Atherosclerotic Plaque Formation Through Its Pro-Inflammatory, Angiogenic and Anti-Apoptotic Functions in Apolipoprotein E-Knockout Mice. **Circ. J.** 査読有, 2017,82(1):19-27. doi: 10.1253/circj.CJ-17-0043.

10.Ichihara-Tanaka K, Kadomatsu K, Kishida S. Temporally and Spatially Regulated Expression of the Linker Histone H1fx During Mouse Development. **J. Histochem. Cytochem.** 査読有, 2017,9:513-530. doi: 10.1369/0022155417723914.

11.Ohgomori T, Yamasaki R, Takeuchi H, Kadomatsu K, Kira JI, Jinno S. Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Eur. J. Neurosci.** 査読有, 2017,46(4):2001-2014. doi: 10.1111/ejn.13650.

12.Tsubota S, Kadomatsu K. Neuroblastoma stem cells and CFC1. **Oncotarget** 査読有, 2017,8(28):45032-45033. doi: 10.18632/oncotarget.18491.

13.Mu P, Akashi T, Lu F, Kishida S, Kadomatsu K. A novel nuclear complex of DRR1, F-actin and COMMD1 involved in NF-κB degradation and cell growth suppression in neuroblastoma. **Oncogene** 査読有, 2017,36(41):5745-5756. doi: 10.1038/onc.2017.181.

14.Ohgomori T, Yamasaki R, Takeuchi H, Kadomatsu K, Kira JI, Jinno S. Differential involvement of vesicular and glial glutamate transporters around spinal α-motoneurons in the pathogenesis of SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience** 査読有, 2017,356:114-124. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.014.

15.Jiang W, Ishino Y, Hashimoto H, Keino-Masu K, Masu M, Uchimura K, Kadomatsu K, Yoshimura T, Ikenaka K. Sulfatase 2 Modulates Fate Change from Motor Neurons to Oligodendrocyte Precursor Cells through Coordinated Regulation of Shh Signaling with Sulfatase 1. **Dev. Neurosci.** 査読有, 2017,39(5):361-374. doi: 10.1159/000464284.

16.Matsumoto N, Konno A, Ohbayashi Y, Inoue T, Matsumoto A, Uchimura K, Kadomatsu K, Okazaki S. Correction of spherical aberration in multi-focal multiphoton microscopy with spatial light modulator. **Opt. Express** 査読有, 2017,25(6):7055-7068. doi: 10.1364/OE.25.007055.

17.Zhang Z, Takeda-Uchimura Y, Foyez T, Ohtake-Niimi S, Narentuya, Akatsu H, Nishitsuji K, Michikawa M, Wyss-Coray T, Kadomatsu K, Uchimura K. Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified glycans mitigates Alzheimer's pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** 査読有, 2017,114(14):E2947-E2954. doi: 10.1073/pnas.1615036114.

18.Yoshimura T, Hayashi A, Handa-Narumi M, Yagi H, Ohno N, Koike T, Yamaguchi Y, Uchimura K, Kadomatsu K, Sedzik J, Kitamura K, Kato K, Trapp BD, Baba H, Ikenaka K. GlcNAc6ST-1

regulates sulfation of N-glycans and myelination in the peripheral nervous system. **Sci. Rep.** 査読有,2017,7:42257. doi: 10.1038/srep42257.

19.Masuda T, Maeda K, Sato W, Kosugi T, Sato Y, Kojima H, Kato N, Ishimoto T, Tsuboi N, Uchimura K, Yuzawa Y, Maruyama S, Kadomatsu K. Growth Factor Midkine Promotes Nuclear Factor of Activated T Cells-Regulated T-Cell-Activation and Th1 Cell Differentiation in Lupus Nephritis. **Am. J. Pathol.** 査読有,2017,187(4):740-751. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.12.006.

20.Hayashi H, Sato W, Kosugi T, Nishimura K, Sugiyama D, Asano N, Ikematsu S, Komori K,Nishiwaki K, Kadomatsu K, Matsuo S, Maruyama S, Yuzawa Y. Efficacy of urinary midkine as a biomarker in patients with acute kidney injury. **Clin. Exp. Nephrol.** 査読有, 2017,21(4):597-607. doi: 10.1007/s10157-016-1318-0.

21.Scilabra SD, Yamamoto K, Pigoni M, Sakamoto K, Müller SA, Papadopoulou A, Lichtenthaler SF, Troeberg L, Nagase H, Kadomatsu K. Dissecting the interaction between tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1): Development of a "TRAP" to increase levels of TIMP-3 in the tissue. **Matrix Biol.** 査読有,2017,59:69-79. doi: 10.1016/j.matbio.2016.07.004.

22.Ukai J, Imagama S, Ohgomori T, Ito Z, Ando K, Ishiguro N, Kadomatsu K. Nogo receptor 1 is expressed in both primary cultured glial cells and neurons. **Nagoya J. Med. Sci.** 査読有,2016,78(3):303-311.

23.Zhang Z, Ohtake-Niimi S, Kadomatsu K, Uchimura K. Reduced molecular size and altered disaccharide composition of cerebral chondroitin sulfate upon Alzheimer's pathogenesis in mice. **Nagoya J. Med. Sci.** 査読有,2016,78(3):293-301.

24.Murakami-Tonami Y, Ikeda H, Yamagishi R, Inayoshi M, Inagaki S, Kishida S, Komata Y, Jan Koster, Takeuchi I, Kondo Y, Maeda T, Sekido Y, Murakami H, Kadomatsu K. SGO1 is involved in the DNA damage response in MYCN-amplified neuroblastoma cells. **Sci. Rep.** 査読有,2016,6:31615. doi: 10.1038/srep31615.

25.Honda Y, Shishido T, Takahashi T, Watanabe T, Netsu S, Kinoshita D, Narumi T, Kadowaki S, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Kishida S, Kadomatsu K, Takeishi Y, Kubota I. Midkine Deteriorates Cardiac Remodeling via Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Chronic Kidney Disease. **Hypertension** 査読有,2016,67(5):857-865. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06922.

26.Ohgomori T, Yamada J, Takeuchi H, Kadomatsu K, Jinno S. Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Eur. J. Neurosci.** 査読有,2016,43(10):1340-1351. doi: 10.1111/ejn.13227.

27.Suzuki K, Satoh K, Ikeda S, Sunamura S, Otsuki T, Satoh T, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Nogi M, Numano K, Sugimura K, Aoki T, Tatebe S, Miyata S, Mukherjee R, Spinale FG, Kadomatsu K, Shimokawa H. Basigin Promotes Cardiac Fibrosis and Failure in Response to Chronic Pressure Overload in Mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 査読有,2016, 36(4):636-646. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306686.

〔学会発表〕(計　8　件)

1.Kadomatsu, K. “Proteoglycans in axon regeneration and neural plasticity”, Iubm2018, June 4-8, 2018

2.Kadomatsu, K. “Midkine in atherosclerotic plaque formation”, “Midkine promotes NFAT regulated T-cell activation & Th1 differentiation in lupus nephritis”, Fifth Midkine Symposium, May 3-5, 2018

3.Kadomatsu, K. ”Proteoglycans and neural plasticity”, JCGG 日本糖鎖科学コンソーシアム, November 16-17, 2017

4.Kadomatsu, K. “Glycosaminoglycans in axon regeneration and neural plasticity”, 第1回　国際糖鎖神経シンポジウム, September 2-5, 2017

5.Kadomatsu, K. “Glycans in Neural Plasticity, 2017 Glyco-retreat”, April 10-11, 2017

6.Kadomatsu, K. “Sulfated glycans regulate autophagy and axon regenetation”, SfN-Neuroscience2016, November 12-16, 2016

7.Kadomatsu, K. “Mechanisms of axon regeneration inhibition after neuronal injury”, Freiburg/Adelaide/Nagoya Annual Symposium,October 17-18, 2016

8.Kadomatsu, K. “Mechanisms of Axon Regeneration and its Inhibition”, Fourth Midkine Symposium, Apr 28-30, 2016

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
ホームページ等
https://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/

６．研究組織

(1)研究分担者　なし

(2)研究協力者　なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。