

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19049

研究課題名(和文)オートファジー流と軸索再生を負に制御するチロシンフォスファターゼ下流因子の解明

研究課題名(英文) Identification down stream factors of tyrosine phosphatase which negatively regulate autophagy flux and axonal regeneration

研究代表者

坂元 一真 (Sakamoto, Kazuma)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60612801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経軸索は損傷に伴い、その遠位端にDystrophic endballと呼ばれる変性構造を誘導する。これまで神経細胞受容体PTPRがEndballを誘導することは分かっていたが、その機構は不明であった。本研究ではEndball形成の基盤として、PTPR の新規基質としてCortactinを同定した。CortactinはPTPRにより脱リン酸化され、Endballではほぼ完全にリン酸化が消失していた。また神経軸索でCortactinをノックダウンすることにより、Endball様の変性構造が誘導できた。以上、PTPR-Cortactin系が軸索再生を阻害するメカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Upon injury, the distal terminal of axon transforms into so-called dystrophic endball. This degenerative structure has been thought to be closely associated with inability of regeneration of our axons in the central nervous system. However, underlying molecular mechanism except neuronal cell-surface molecule, PTPR, has been unknown. Here I have identified Cortactin as a new substrate for PTPR. Cortactin was de-phosphorylated by PTPR, and its phosphorylated form was completely diminished in dystrophic endball. Furthermore, knock-down of Cortactin in cultured neurons led to inhibition of axonal elongation, and swollen structures with autophagosomal accumulation which was specific character of dystrophic endball. Taken together, these results have revealed a pivotal role of PTPR-Cortactin axis in axonal regeneration and its inhibition.

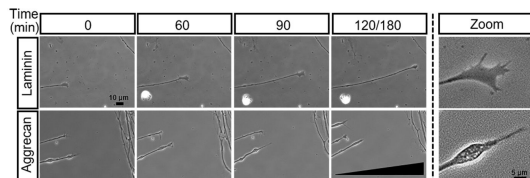
研究分野：生化学

キーワード：オートファジー コンドロイチン硫酸 PTPR 軸索再生

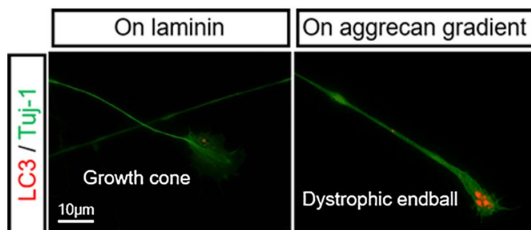
## 1. 研究開始当初の背景

我々の中枢神経軸索は切断を受けると、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンと呼ばれる再生阻害因子の濃度勾配の中で、Dystrophic endball と呼ばれる変性構造を取る。異常腫大と空胞変性を特徴としたこの構造は、100 年近く前に見出され、中枢神経系軸索の再生および神経回路再編成を不能にしている病因と永らく考えられてきたが、その細胞生物学的・分子生物学的理解は遅々として進んでいない。

研究代表者は最近の研究において、Dystrophic endball を *in vitro* で誘導する系(図 1)を用いて、(1)Dystrophic endball 内にはオートファゴソームの異常蓄積がみられること(図 2)、(2)オートファゴソームの異常蓄積はオートファジー流の遅滞によるものであること、を明らかにした。また、(3)この現象はコンドロイチン硫酸およびその受容体 PTPR によって惹起されることを証明した。しかしながら、細胞表面におけるインプットから、オートファゴソームの成熟不全というアウトプットに至る細胞内シグナル系については依然ブラックボックスのままである。



(図 1)



(図 2)

## 2. 研究の目的

本研究計画においては、受容体型チロシンフォスファターゼ PTPR の基質分子であり、Dystrophic endball の形成および軸索伸長を制御する分子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Phosphatase 要求性の確認

上述した PTPR による Dystrophic endball 活性が PTPR の Phosphatase 活性 Phosphatase 活性に依存していることを確認した。PTPR の活性中心近傍にある Wedge ドメインに対する中和ペプチド(以下 Wedge ペプチド)を用いて Phosphatase 活性の阻害を行い、前述した培養皿上の Dystrophic endball 形成活性を測定した。

### (2) Substrate trapping 法による PTPR 基質の同定

チロシンフォスファターゼは基質タンパク質のチロシンを脱リン酸化すると、速やかに基質分子をリリースすると考えられる。この極めて短時間の相互作用が、フォスファターゼ基質分子の同定を困難にしている。この点を解決するため、Substrate trapping 法を用いる。PTPR D1516A 変異体は、基質結合能を維持するものの、酵素活性は著しく低下している。この結果、安定な酵素基質複合体を期待でき、基質の同定を容易にする。本研究計画では、Substrate trapping 法と質量分析計を用いた PTPR 基質の同定を試みた。

### (3) PTPR 基質の機能的スクリーニング

研究代表者らのこれまでの実験で、PTPR はオートファゴソームとリソソームの融合過程を阻害していることが明らかになっている。この過程は特に熱心に研究されている領域であるが、この過程で働くと思われる分子は限られている。また、このうち、チロシンリン酸化により制御される分子はかなり絞り込まれる。ここから候補分子をリストアップし、PTPR との関係性をしらみつぶ的に調べた。

### (4) 同定した基質分子の機能的解析

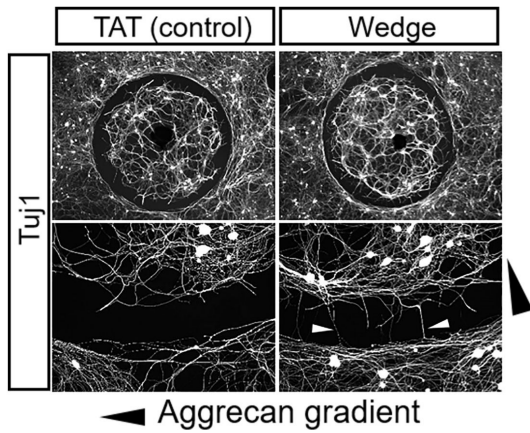
上述(2)あるいは(3)で絞りこんだ基質候補分子について、PTPR の基質分子であることを *in vitro* phosphatase アッセイや細胞株を使用した実験で確認した。また正常成長円錐と、コンドロイチン硫酸により誘導した Dystrophic endball を特異的リン酸化抗体を用いて免疫染色し、リン酸化の程度を定量比較する。また、培養神経細胞において当該分子をノックダウンし、軸索伸長、神経軸索先端部の形態、オートファゴソームの蓄積を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) Phosphatase 要求性の確認

図 3 に示すように、Wedge ペプチドを神経細胞に導入することにより、Dystrophic endball の形成と Aggrecan (コンドロイチン硫酸プロテオグリカン) 上での神経軸索の伸長をレスキューすることができた。さらに、PTPR の酵素活性ドメインを欠損させた変異体(Phosphatase-dead 変異体)を作製して、神経細胞にレンチウイルスを用いて発現させたところ、やはり、Wedge ペプチドと同様に Dystrophic endball の形成と神経軸索伸長をレスキューした。

これらの結果から、Dystrophic endball の伸長と神経軸索伸長阻害には、PTPR の Phosphatase 活性が必須であることを確認した。



(図3)

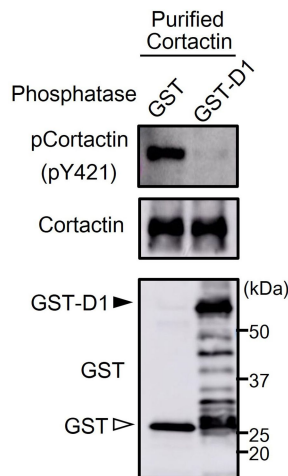
### (2) Substrate trapping 法による PTPR 基質の同定

研究計画を若干修正し、PTPR の活性ドメインに Substrate trapping 変異 (D1516A 変異) を導入し、GST 融合タンパク質として発現・精製した。この変異体を bait とし、チロシン高リン酸化細胞の細胞抽出液に対して Pull-down アッセイを行った。GST による Pull-down をコントロール実験とした。

得られたサンプルを LC-MS/MS によって解析し、IRS4 など複数の基質候補分子が得られたが、Substrate trapping 変異体との結合、PTPR 活性ドメインによる脱リン酸化実験などの Validation 実験においていずれも確認を売るには至らなかった。

### (3) PTPR 基質の機能的スクリーニング

オートファゴソームとリソゾームの融合過程に関わる分子のうち、チロシンリン酸化による制御を受けることが知られている分子として Cortactin に注目した。Cortactin はアクチン結合タンパク質で、421 番目のチロシンリン酸化により、リソゾーム膜外表面に局在する。ここで繊維状アクチンを安定化させることにより、オートファゴソームとリソゾームの融合の足場を提供する。PTPR による Cortactin の脱リン酸化を in vitro で検討したところ、図4に示すように、良好な結果が得られたため、より詳細な機能解析を行うこととした。



(図4)

### (4) 同定した基質分子の機能的解析

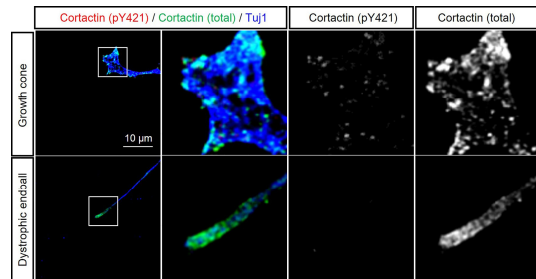
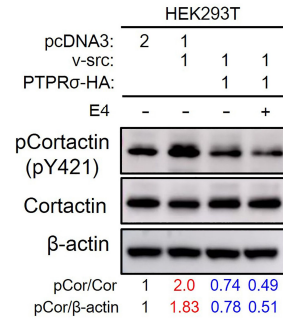
Cortactin についてより詳細な機能解析を

行った。培養細胞株に PTPR を発現させると Cortactin の脱リン酸化が観察された。これは、コンドロイチン硫酸処理で増強した(図5)。

次に神経細胞を用いた検討を行った。正常成長

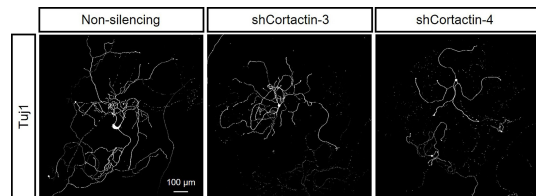
(図5) 円錐と Dystrophic endball をリン酸化 Cortactin 特異抗体で免疫染色すると、成長円錐で確認できるリン酸化 Cortactin のシグナルが、Dystrophic endball ではほぼ消失していた(図6)。

以上の結果から Cortactin は PTPR の特異的基質であり、かつ、コンドロイチン硫酸で制御されると結論した。



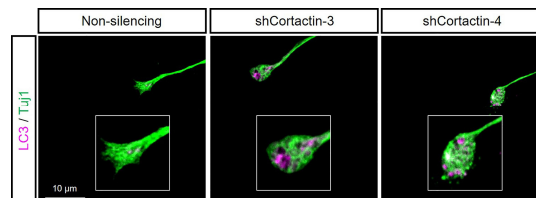
(図6)

次に shRNA を用いて神経細胞において Cortactin をノックダウンしたところ、軸索伸長の有意な抑制を見た(図7)。このことから、Cortactin が軸索伸長を正に制御していると結論付けた。



(図7)

さらに軸索先端部の形態・特性を詳細に解析したところ、Cortactin をノックダウンした神経細胞の軸索先端部はフィロポディアなどのアクチン構造が失われ、大きく腫大していた。さらにオートファゴソームマーカー LC3 の免疫染色により、この内部には多量のオートファゴソームが内包されていた(図8)。



(図8)

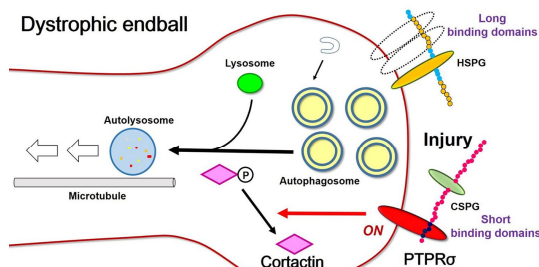
これは、コンドロイチン硫酸により誘導された Dystrophic endball と酷似していた。



## (5) 結論

以上の結果から、コンドロイチン硫酸が神経細胞表面受容体 PTPR の活性化を介して、Cortactin を脱リン酸化し、オートファゴソームとリゾソームの融合が阻害される経路が明らかになった。

さらにこの現象が、Dystrophic endball を誘導し、中枢神経軸索の再生を困難にしていることも明らかにすることができた(図9)。



(図9)

本研究結果は2018年4月段階で、欧州一流誌にて論文改訂中である。

今後は、この経路に介入することにより、脊髄損傷などの外傷性中枢神経疾患の治療を目指していく。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

神経軸索におけるオートファジーとその破綻

坂元一真, 門松健治

90(1): 27-34 (2018)

doi:10.14952/SEIKAGAKU.2018.900027 査読無

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.

Scilabra SD, Yamamoto K, Pignoni M, Sakamoto K, Müller SA, Papadopoulou A, Lichtenthaler SF, Troeberg L, Nagase H, Kadomatsu K.

Matrix Biol. (2017) 59:69-79.

doi: 10.1016/j.matbio.2016.07.004. 査読有

Mechanisms of axon regeneration: The significance of proteoglycans.

Sakamoto K, Kadomatsu K.

Biochim Biophys Acta. (2017) 1861:2435-2441.

doi: 10.1016/j.bbagen.2017.06.005. 査読有

Midkine Promotes Atherosclerotic Plaque

Formation Through Its Pro-Inflammatory, Angiogenic and Anti-Apoptotic Functions in Apolipoprotein E-Knockout Mice.

Takemoto Y, Horiba M, Harada M, Sakamoto K, Takeshita K, Murohara T, Kadomatsu K, Kamiya K.

Circ J. (2017) 25:19-27.

doi: 10.1253/circj.CJ-17-0043. 査読有

Neurocan, an extracellular chondroitin sulfate proteoglycan, stimulates neuroblastoma cells to promote malignant phenotypes.

Su Z, Kishida S, Tsubota S, Sakamoto K, Cao D, Kiyonari S, Ohira M, Kamijo T, Narita A, Xu Y, Takahashi Y, Kadomatsu K.

Oncotarget. (2017) 15:106296-106310.

doi: 10.18632/oncotarget.22435. 査読有

## グリコサミノグリカンと疾病

尾崎 智也, 坂元一真, 内村 健治, 門松 健治

生化学 89: 689-698 (2017)

doi:10.14952/SEIKAGAKU.2017.890689 査読無

[学会発表](計4件)

「Dystrophic endball 形成の細胞生物学的基盤」

坂元一真 門松健治

第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「神経回路側枝形成の分子基盤と機能」

2018年3月28日 日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学 (東京都武蔵野市)\*招待講演

“Probability of glycan sulfation patterns determines axonal fate after injury”

Kazuma Sakamoto Ozaki Tomoya Yuanhao Gong Jun-ichi Tamura Hung Shang-Cheng Kenji Kadomatsu

第40回神経科学学会大会 2017年7月21日 幕張メッセ (千葉県幕張市)

「糖鎖中の硫酸化パターンの頻度が損傷後の軸索運命を決定する」

坂元一真 尾崎智也 キョウエンコウ 田村純一 Shang-ChengHung 門松健治

文部科学省 科研費 新学術領域研究 統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明 最終シンポジウム 2017年3月3日・4日 名古屋JPタワー (愛知県名古屋市)

「Dystrophic endball は autophagy flux の停滞により形成され、中枢神経軸索再生を阻害する」

坂元一真 尾崎智也 キョウエンコウ 田  
村純一 門松健治  
第86回日本生化学会大会 2016年9月25日  
仙台国際センター (宮城県仙台市)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

坂元 一真 (SAKAMOTO Kazuma)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60612801

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし