

機関番号：63904

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300113

研究課題名 (和文) 受容体型プロテインチロシンホスファターゼ Ptpro の統合的解析

研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of protein tyrosine phosphatase receptor type 0

研究代表者

新谷 隆史 (SHINTANI TAKAFUMI)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・准教授

研究者番号：10312208

研究成果の概要 (和文) : 受容体型プロテインチロシンホスファターゼである Ptpro の遺伝子欠損マウスについて解析を行った。まず、視神経の脳への投射について詳細な解析を行ったが、野生型マウスとの間に顕著な差は認められなかった。一方、行動学的解析を行った結果、一部の行動学的解析実験において、野生型マウスとの差異を見出した。また、Ptpro は他のサブファミリーメンバーと共同して複数の RPTK の活性制御を行っていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we analyzed *Ptpro*-deficient mice. In the axonal projections from the retina to the brain, we could not find any differences between wild-type and *Ptpro*-deficient mice. On the other hand, in some behavioral tests, we detected a significant difference between wild-type and *Ptpro*-deficient mice. We also found that Ptpro regulates multiple RPTKs in collaboration with other members of the R3 PTP subfamily.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：チロシンホスファターゼ、チロシンキナーゼ、視神経、投射、行動解析

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のチロシンリン酸化を介したシグナル伝達機構は、多細胞生物において劇的に進化したものであり、細胞間のコミュニケーションが最も必要とされる神経系を支える基盤となっている。我々は、RPTP の役割に注目し、これらの神経系における生理機能を明らかにすることを目標に研究を進めて来た。特に、神経系で高発現する RPTP の一つである Ptpro について重点的に研究を進めて来た。解析の結果、Ptpro が RPTK である

Eph を特異的な基質とし、その活性を負に制御することを見出した。Eph は、細胞移動や神経回路網の形成、血管網の形成や免疫反応等において重要な役割を果たしていることが知られており、14 種の分子でファミリーを形成している。詳細な解析の結果、Ptpro は、Eph の活性化においてトリガーとしての役割を果たしている膜貫通モチーフ近傍のチロシン残基を基質サイトとすることが判明した。さらに、発生期のニワトリを用いて、網膜の器官培養系を用いた解析や個体レベル

の解析を行った結果、Ptpro は Eph の活性を負に制御することにより、網膜から脳への領域特異的な神経回路形成において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

Ptpro が関わる情報伝達機構、並びに、生理機能の全容を明らかにするための課題の一つとして、Ptpro の遺伝子欠損マウスを用いた生理機能の解明がある。Ptpro 遺伝子欠損マウスについては、これまでに腎臓における異常が解析されたのみで、その他の組織における異常の有無については全く解析が行われていない。我々は、Ptpro の遺伝子欠損マウスを入手し、現在解析を開始したところ、予備的な結果であるが、欠損マウスにおいて行動学上の異常が見出された。このことから、Ptpro は神経系の機能発現において重要な役割を果たしていることが推測された。

## 2. 研究の目的

本研究においては、以下の点について明らかにすることを目指した。

(1) 遺伝子改変マウスを用いた Ptpro の生理機能の解明

Ptpro の遺伝子改変マウスについて、解剖学的、生理学的、生化学的、及び行動学的解析を行うことにより、神経回路形成、及び、脳の高次機能発現における生理機能を明らかにする。また、そこに関わる分子機構について明らかにする。

(2) Ptpro の新規基質分子となる RPTK の同定と解析

Ptpro の基質トラップ型変異体を用いて基質分子となる RPTK の同定を行うと共に、Ptpro による基質分子の脱リン酸化の生理的意義について明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Ptpro 遺伝子改変マウスの解析

Ptpro の生理的役割について、遺伝子欠損マウスを用いて明らかにする。

① 神経回路形成における機能解析

Eph が関与することが知られている視神経の中核への投射について詳細な解析をすることにより、Ptpro による Eph の制御が投射形成においてどのように機能するかを明らかにする。また、広く神経回路形成の異常を探ることにより、Ptpro の回路形成における役割を明らかにする。

・上丘における視神経投射の解析

Eph が重要な役割を果たしている網膜から中核への投射系を用いて解析する。上丘へ視神経軸索が到達した時期（生後 0-2 日）や軸索の分岐形成が盛んな時期（生後 2-4 日）、不必要な軸索が除去される時期（生後 4-6 日）及び、投射が完成した時期（生後 7 日頃）における上丘における視神経軸索の走行について、蛍光レーザーを用いて標識し観察を

行う。本解析技術は我々らが常時使用しているものである。

・外側膝状体への視神経投射の解析

背側外側膝状体へは両側の網膜からの投射があるが、同側性の視神経と対側性の視神経は明瞭に分離された状態で背側外側膝状体に投射する。このような投射の分離は、発生にともない誤った投射が除去されることによって生じると考えられている。この軸索の除去(refinement)に Ptpro が関与するかどうかについて、蛍光レーザーである、Alexa488-及び Alexa594-コレラトキシンのそれぞれを左右の眼球内に微量注入し、左右の眼球からの視神経軸索の全てをラベルすることにより解析する。

・神経回路網の組織学的解析

神経軸索や樹状突起のマーカー分子の抗体を用いて成体における神経回路網の異常の有無について解析する。

・シナプス形成の解析

シナプス形成における異常の有無についてシナプスのマーカー分子の抗体を用いて解析するとともに、ゴルジ染色によりスパインの形態や密度について解析を行う。

② 神経機能発現における機能解析

最初に広範な行動学的解析を行うことにより、Ptpro の遺伝子改変マウスが神経機能においてどのような異常を有しているかを明らかにする。本解析で異常が明らかになった神経機能について、それが関与する神経回路や神経細胞について、順次解析を行ってゆく。具体的には、オープンフィールドテスト、自発運動測定、強制遊泳テスト、ホットプレートテスト、フットショックテスト、高架式十字路テスト、モリス水迷路テスト、恐怖条件付文脈学習テスト、条件付け位置嗜好テストを行う。

(2) Ptpro の新規基質分子となる RPTK の同定と解析

① 新規基質候補分子となる RPTK の同定

最近の我々の研究により、RPTP が RPTK を基質とし、その活性を制御することによって、生体内において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。Ptpro については、RPTK である Eph を基質とすることを明らかにしているが、それ以外の RPTK についても基質とする可能性がある。そこで、Ptpro が他の RPTK を基質とする可能性について検討する。同時に、Ptpro が属する PTP R3 サブファミリーの他のメンバーについても同様の検討を行い、Ptpro と同じ生理機能を果たす可能性を解析する。

チロシンホスファターゼドメインについては、活性に必須なアスパラギン酸残基をアラニンに変換することにより、PTP 活性を消失させると同時に、基質分子と安定な複合体

を形成させることが可能である。そこで、Ptpro及び他のR3サブファミリーのメンバーについて基質トラップ型変異体を作成し、これらを用いたMammalian two-hybrid法により様々なRPTKとの相互作用について解析する。

上記の方法がうまく機能しない場合には、我々が所属する研究部門において開発したyeast two-hybrid法を改良したPTPの基質分子同定法 (yeast substrate-trapping system)を用いて基質候補分子の同定を行う。

#### ②基質分子であることの確認

同定した分子がPtproの真の基質分子であることを確認するために、培養細胞に基質候補分子とPtproを共発現させ、基質候補分子の脱リン酸化が生じるかを解析する。

#### ③新規基質分子の発現パターンの解析

In situ hybridizationにより、生体内における発現パターンを明らかにする。また、特異的抗体を作製し、これを用いて生体内の発現パターンを明らかにする。

#### ④Ptproによる脱リン酸化サイトの同定

各基質分子について、Ptproによる脱リン酸化サイトを同定する。Ptproによる脱リン酸化反応を受ける前後の基質分子のタンパク質サンプルについて質量分析を行うことにより、また、チロシン残基を他のアミノ酸 (アラニンやグルタミン酸など) に変換した変異体をPtproが基質とするかについて解析を行うことにより、Ptproによって脱リン酸化されるチロシン残基を同定する。同定されたリン酸化サイトについて、ウサギを用いてリン酸化状態の基質分子を認識する抗体を作製し、様々な条件下におけるリン酸化のパターンについて明らかにする。良好な抗体が作製できなかった場合には、使用する動物種を変更することで、対応したい。

#### ⑤基質分子の脱リン酸化反応の生理機能の解明

Ptproによる基質分子の脱リン酸化反応が関与する生理機能について明らかにする。基質分子内のリン酸化を受けることが判明したチロシン残基について、リン酸化を受けないアラニン残基や、リン酸化状態を模倣するグルタミン酸残基に変換した変異体を培養細胞等に発現させた場合や野生型分子を発現させた場合の、突起伸長等に及ぼす影響を解析する。また、この時、Ptproを共発現させた場合の影響を併せて解析することにより、基質分子のPtproによる脱リン酸化反応が関与する生理機能について明らかにする。

## 4. 研究成果

まず、Ptproの遺伝子欠損マウスにおける視神経の脳への投射について、詳細な解析を行った。生後のマウス網膜の鼻側及び耳側の一部領域を蛍光色素であるDiIで微量注入す

ることで視神経軸索を標識し、上丘への投射について野生型のマウスとの比較解析を行ったが、大きな異常は観察されなかった。さらに、左右の眼球にそれぞれ異なる蛍光色素であるAlexa488とAlexa594で標識したコレラトキシンを注入し、外側膝状体への投射について解析を行ったが、この場合も野生型マウスとの間に顕著な差は認められなかった。これらの実験結果から、Ptproの遺伝子欠損マウスの視神経投射形成においては、別のRPTPがPtproの欠損を補償していることが示唆された。そこで、網膜における様々なRPTPの発現解析と、Eph受容体を基質にするかについて解析を行うことにより、候補となる受容体型チロシンホスファターゼを明らかにした。

一方、Ptproの遺伝子欠損マウスについて行動学的解析を行うことによって、Ptpro遺伝子欠損マウスにおいて、神経高次機能発現に異常があるかについて調べた。具体的には、オープンフィールドテスト、自発運動測定、強制遊泳テスト、ホットプレートテスト、フットショックテスト、高架式十字路テスト、モリス水迷路テスト、恐怖条件付け文脈学習テスト、条件付け位置嗜好テスト等を行った。その結果、一部の行動学的解析実験において、野生型マウスとの差異を見出した。

RPTPは様々な受容体型プロテインチロシンキナーゼ(RPTK)を基質とし、それらの活性を広く制御していることが我々の研究により明らかになって来ている。PtproはRPTKであるEphを基質分子とすることを見出していたが、Eph以外のRPTKを基質としている可能性が考えられた。そこでPtproが他のRPTKを基質としているかを明らかにするために、基質トラップ変異体を用いたMammalian two-hybrid法により様々なRPTKとの相互作用について解析を行った。その結果、PtproがEph以外の複数のRPTKを基質とすることが明らかになった。またPtproが属するRPTPのサブファミリーの他のメンバーも同様にこれらのRPTKを基質とすることが明らかになったことから、このサブファミリーのRPTPは共同して複数のRPTKの活性制御を行っていることが示唆された。

RPTPが生体において重要な役割を果たしていることが示唆されていたが、RPTPの生理機能を分子レベルから解明した例はわずかしかない。これは、多くのRPTPについて生理的な基質分子が不明であるため、分子レベルの解析が不十分であることに起因すると考えられる。本研究において我々は、Ptproの新規基質分子の同定とPtproによる基質分子の制御機構の解析という分子・細胞レベルの研究と、遺伝子改変マウスを用いたPtproの機能解析という個体レベルの研究を、相互に関連させながら統合的に行うことによ

て、Ptpro の生理機能の一端を明らかにすることができた。RPTP の新規の生理機能を明らかにした本研究は大きな意義を有すると考えられる。

#### 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7件)

- ① 新谷隆史、野田昌晴 Eph によるシナプスの形成と可塑性の制御機構 生体の科学、査読無、61, 468-469 (2010)
- ② Shintani, T., Ihara, M., Tani, S., Sakuraba, J., Sakuta, H. & Noda, M. APC2 plays an essential role in axonal projections through the regulation of microtubule stability. J. Neurosci. 査読有, 29, 11628-11640 (2009).
- ③ Takahashi, H., Sakuta, H., Shintani, T., & Noda, M. Functional mode of FoxD1/CBF2 for the establishment of temporal retinal specificity in the developing chick retina. Dev. Biol. 査読有, 331, 300-310 (2009).
- ④ Yonehara, K., Ishikane, H., Sakuta, H., Shintani, T., Nakamura-Yonehara, K., Kamiiji, N.L., Usui, S., & Noda, M. Identification of retinal ganglion cells and their projections involved in central transmission of information about upward and downward image motion. PLoS ONE 査読有, 4, e4320 (2009).
- ⑤ Shintani, T. & Noda, M. Protein tyrosine phosphatase receptor type Z dephosphorylates TrkA receptors and attenuates NGF-dependent neurite outgrowth of PC12 cells. J. Biochem. 査読有, 144, 259-266 (2008).
- ⑥ Yonehara, K., Shintani, T., Suzuki, R., Sakuta, H., Takeuchi, Y., Nakamura-Yonehara, K. & Noda, M. Expression of SPIG1 reveals development of a retinal ganglion cell subtype projecting to the medial terminal nucleus in the mouse. PLoS ONE 査読有, 3, e1533 (2008).
- ⑦ 新谷隆史、野田昌晴、視神経投射における受容体型プロテインチロシンホスファターゼの役割 生化学 査読無、80, 733-742 (2008)

[学会発表] (計1件)

- ① 新谷隆史、Protein tyrosine phosphatase receptor type Z dephosphorylates TrkA receptors and attenuates NGF-dependent neurite outgrowth of PC12 cells. 日本生化学会大会、平成21年10月23日、神戸国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://niwww3.nibb.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

新谷 隆史 (SHINTANI TAKAFUMI)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・准教授

研究者番号：10312208