

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500437

研究課題名(和文) 脳内ストレス応答を制御する蛋白質チロシンリン酸化シグナルの解析

研究課題名(英文) Analysis of the signaling mechanisms that regulates brain stress responses through protein tyrosine phosphorylation

研究代表者

大西 浩史(Ohnishi, Hiroshi)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：70334125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜型分子SIRP は、強制水泳ストレスにより脳内でチロシンリン酸化を受け、SIRP 欠損により水泳中のマウスの無動が増加する。本研究では、SIRP チロシンリン酸化と強制水泳時の低体温との関連を報告し、SrcファミリーチロシンキナーゼがSIRP のリン酸化に関する事を明らかにした。また、SIRP 以外にも、CaMKIIは低体温依存性に、MEK、CREBは低体温非依存性に強制水泳後の脳内でリン酸化が変化することを見出した。さらに、チロシン脱リン酸化酵素Shp2がSIRP のリン酸化に対してポジティブに作用することをShp2のコンディショナルKOマウスを使った実験から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Forced swim stress induced tyrosine phosphorylation of SIRP, a membrane protein, in the brain of mice, and the lack of this molecule resulted in increased immobility of mice during forced swim in water. We have published our findings suggesting that the tyrosine phosphorylation of SIRP in the brain primarily depended on the hypothermia induced by the immersion of mice in cold water. We have also found multiple src family tyrosine kinases participated in the hypothermia-dependent phosphorylation of SIRP. We found that forced swim stress also induced changes in the phosphorylation level of other signaling molecules, CaMKII, MEK, and CREB. Hypothermia is important for the change of the phosphorylation of CaMKII, but not for MEK and CREB. We also found that a protein phosphatase Shp2, a down-stream signaling molecule of SIRP, positively regulates tyrosine phosphorylation of SIRP in the brain, by the use of neuron-specific conditional Shp2 knockout mice.

研究分野：細胞シグナル伝達

キーワード：タンパク質チロシンリン酸化 脳 ストレス

1. 研究開始当初の背景

脳は外界からの様々なストレスを適切に評価し、これに適応するために多様な生体反応や行動を司る。一方で、脳はストレス感受性の高い組織であり、過度や長期のストレスは脳機能に変調をきたし、うつ病等の気分障害の原因となる可能性が指摘されている。研究代表者は、細胞間で相互作用する2つの膜タンパク質 SIRP α と CD47 について、SIRP α KO マウス、CD47 KO マウスの両方が、実験動物のうつ様行動を評価する強制水泳(FS)テストにおいて、うつ様行動の指標とされる無動時間の増加傾向を示すこと、FS ストレスにより野生型マウスの脳内で SIRP α のチロシンリン酸化が強く誘導されることを明らかにすると共に、この反応には、SIRP α のリガンドである CD47 との相互作用が重要であることを見出し、CD47 と SIRP α の相互作用を中心とするタンパク質チロシンリン酸化シグナルが、脳のストレス応答反応や行動制御に重要な役割を果たす可能性を見出していた。

2. 研究の目的

SIRP α をリン酸化する Src ファミリーチロシンキナーゼ、SIRP α に結合するチロシン脱リン酸化酵素 Shp2 等が関与するチロシンリン酸化シグナルのネットワークが、ストレス応答を制御する可能性を検討し、新規ストレス応答シグナルの探索を進める。それらの結果から、脳の新たなストレス応答メカニズムを明らかにし、その成果を気分障害などストレス性精神疾患の病態解明に結びつけることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳内シグナル分子のリン酸化状態の解析

野生型マウスおよび SIRP α KO マウスについて、強制水泳 (FS) 直後の脳から海馬を摘出し、ホモジネートを作製した。これをサンプルとして、うつ状態との関連が議論されているシグナル分子、カルシウム/カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII)、MEK、CREB について、それぞれの分子のリン酸化状態に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットを行

い、FS がこれら分子のリン酸化状態に与える影響を検討した。さらに、FS に伴う低体温の影響を検討するために、マウスを麻酔下で冷却して低体温を誘導し、これらシグナル分子のリン酸化状態を上記と同様に比較検討した。CaMKII のリン酸化については、冬眠中のシマリスの脳から調製したサンプルでもウェスタンブロットによる解析を行った。

(2) SIRP α チロシンリン酸化メカニズムの検討

研究計画初期の段階で、強制水泳による SIRP α のリン酸化が低体温に依存することが新たに明らかとなったため、そのメカニズムを検討した。チロシンキナーゼである Src, Fyn, Pyk2, FAK をノックダウンするための shRNA を発現するレンチウイルスを作製し、マウス海馬培養神経細胞に感染させ、これらのチロシンキナーゼをノックダウンさせた神経細胞を作製した。これらの神経細胞に低体温刺激を加えて SIRP α のチロシンリン酸化を誘導し、それぞれのチロシンキナーゼ欠損の影響を検討した。さらに、Shp2 についてもノックダウン用のレンチウイルスを作製して、同様にその影響を検討した。

(3) 成熟前脳神経細胞特異的 Shp2 コンディショナル KO マウスの解析

成熟前脳神経細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CaMKII-Cre マウスを、Shp2-flox マウスと交配して、成熟前脳神経細胞特異的な Shp2 コンディショナル KO マウスを作製し、強制水泳による SIRP α のリン酸化状態への影響についてウェスタンブロットによる検討を行った。またこれらの動物について行動解析を行った。

(4) 成熟前脳神経細胞特異的 SIRP α コンディショナル KO マウスの解析

上記(3)と同様の方法で、CaMKII-Cre マウスと、SIRP α -flox マウスを交配して、成熟前脳神経細胞特異的 SIRP α コンディショナル KO マウスを作製し、強制水泳テストを行い、神経細胞に発現する SIRP α の欠損が、強制水泳時の無動行動を制御する可能性を

検討した。

(5) CD47 KO マウスの行動解析

以前より SIRP α のリガンドである CD47 の全身性 KO マウスについて解析を継続していたが、網羅的に行った行動解析のデータをまとめた。

4. 研究成果

(1) 脳内シグナル分子リン酸化状態の解析

抗リン酸化抗体を用いた解析の結果、強制水泳後の野生型マウスの脳内では、MEK、CREB の活性化を示すリン酸化が増強する一方で、CaMKII の活性化を示すリン酸化が減弱することが明らかとなった。また、SIRP KO マウスと野生型マウスの比較では、これら分子のリン酸化状態の変化に違いは見られなかったことから、これら分子の活性化制御に SIRP シグナルが関与する可能性は低いと考えられた。

これら分子のリン酸化状態変化の原因が、強制水泳時にマウスに誘導される低体温にあるかどうかを検討するために、麻酔下のマウスの身体を強制的に冷却して低体温を誘導したところ、MEK、CREB のリン酸化状態には変化がなかったが、CaMKII のリン酸化は強制水泳時と同様に減弱することがわかった。また、脳内 CaMKII リン酸化の減少は冬眠中のシマリスについても認められた。これらの結果から、強制水泳ストレスによる脳内タンパク質リン酸化の変化には、低体温に依存するものと、依存しないものがあることがわかった。低体温に依存しない MEK、CREB のリン酸化変化は、強制水泳による感覚的なストレスが原因となる可能性が考えられた。強制水泳をストレスとして用いる場合、低体温の作用と感覚的、情動的ストレス等の作用とを区別して考慮する必要性が明らかになると共に、MEK、CREB 等のシグナル分子が、後者と関連する可能性が新たに明らかとなった。

(2) SIRP α チロシンリン酸化メカニズム

の検討

レンチウイルスを用いたノックダウンの実験系を確立し、培養神経細胞で Src ファミリーチロシンキナーゼである Src、Fyn をノックダウンしても、神経細胞に発現する SIRP α の低温刺激によるチロシンリン酸化反応は認められたが、その程度は有意に減弱していた。一方、別のチロシンキナーゼである Pyk2、FAK のノックダウンは、SIRP α のチロシンリン酸化状態にほとんど影響を及ぼさなかった。さらに、Src ファミリーチロシンキナーゼの阻害効果が高い dasatinib は、基底状態および低温刺激による SIRP α のチロシンリン酸化を強く抑制した。これらの結果から、SIRP α のチロシンリン酸化には、複数の Src ファミリーチロシンキナーゼが協調的に働いている可能性が考えられた。

(3) 成熟前脳神経細胞特異的 Shp2 コンディショナル KO マウスの解析

Shp2 は、チロシンリン酸化した SIRP α の細胞内領域に直接結合して活性化するタンパク質チロシン脱リン酸化酵素である。成熟前脳神経細胞特異的 Shp2 コンディショナル KO マウスの脳内 SIRP α の basal なリン酸化を検討したところ、野生型マウスに比べてチロシンリン酸化の有意な減弱が認められた。また、強制水泳後の脳内 SIRP α についても同様の解析を行ったところ、強制水泳ストレスによる SIRP α リン酸化も有意に減弱していた。また、前述のレンチウイルスによるノックダウンと同様の実験系を用いて、培養神経細胞の Shp2 をノックダウンしたところ、刺激の有無に関わらず SIRP α のチロシンリン酸化の減弱が認められた。これらの結果から、神経細胞における SIRP α のリン酸化を、チロシン脱リン酸化酵素 Shp2 が促進的に制御するという予想外の可能性が強く示された。

Shp2 コンディショナル KO マウスについては、複数の行動解析を行ったが、Shp2 がストレス応答性のうつ様行動に関わる可能性は見いだせなかった。一方で、このコンディショナル KO マウスが多動行動を示すことを見出し、さらに、脳内における最初期遺伝子の発現解析などにより、Shp2 欠損が神経活動性

の低下を引き起こし、このことが多動の原因となる可能性を示した。

(4) 成熟前脳神経細胞特異的 SIRP α コンディショナル KO マウスの解析

神経細胞に発現する SIRP α が強制水泳時の無動行動を制御する可能性を検討するために、成熟前脳神経細胞特異的 SIRP α コンディショナル KO マウスについて、強制水泳テストを行ったところ、神経細胞に発現する SIRP α の欠損は、全身性 SIRP α 欠損の場合とは逆に、強制水泳時の無動行動を減少させるという予想外の結果を得た。このことから、SIRP α は発現する細胞毎に、異なる形で強制水泳時の無動行動制御に係わっており、神経細胞に発現する SIRP α は無動を促進する作用がある可能性が新たに明らかとなった。さらに、全身性 SIRP α KO マウスは無動が増加する事から、神経細胞以外の細胞に発現する SIRP α が、強制水泳時の無動を抑制する方向に働いている可能性が考えられた。

(5) CD47 KO マウスの行動解析

SIRP α のリガンドである CD47 の全身性 KO マウスについて網羅的な行動解析のデータを蓄積した結果をまとめて報告した。CD47 KO マウスは強制水泳テストにおける無動時間の増加の他に、社会性行動の異常や、感覚運動ゲーティングの障害(プレパルス抑制の異常)が見られることが分かった。

CD47-SIRP α シグナル系が、ストレス応答、うつ様行動以外の行動制御に関わる可能性が新たに示された。

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 1 1 件)

Kusakari, S., Saitow, F., Ago, Y., Shibasaki, K., Sato-Hashimoto, M., Matsuzaki, Y., Kotani, T., Murata, Y., Hirai, H., Matsuda, T., Szuki, H., Matozaki, T., Ohnishi, H. Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice. *Mol. Cell. Biol.*

査読有、Vol.35、2015、pp1557-1572

DOI: 10.1128/MCB.01339-14

Koshimizu, H., Takao, K., Matozaki, T., Ohnishi, H., Miyakawa, T.

Comprehensive behavioral analysis of Cluster of Differentiation 47 knockout mice. *PLoS ONE* 査読有、Vol.9、2014、e89584

DOI: 10.1371/journal.pone.0089584.

Hayashi, Y., Hayashi, Y., Kusakari, S., Sato-Hashimoto, M., Urano, E., Shigeno, M., Sekijima, T., Kotani, T., Murata, Y., Murakami, H., Matozaki, T.,

Ohnishi, H. Hypothermia-dependent and -independent effects of forced swim on the phosphorylation states of signaling molecules in mouse hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、Vol.428、2012、pp475-481

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.083

Maruyama, T., Kusakari, S., Sato-Hashimoto, M., Hayashi, Y., Kotani, T., Murata, Y., Okazawa, H., Oldenborg, P.-A., Kishi, S., Matozaki, T., Ohnishi, H. Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP in the brain. *J. Neurochem.* 査読有、Vol.121、2012、pp891-902

DOI:10.1111/j.1471-4159.2012.07748.x

Ohnishi, H., Murata, Y., Okazawa, H., Matozaki, T. Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. *Trends Neurosci.* 査読有、Vol.34、2011、pp629-637

DOI:10.1016/j.tins.2011.09.005

[学会発表](計 30 件)

Ohnishi, H., Kusakari, S., Saitow, F., Hashimoto, M., Matsuzaki, Y., Kotani, T., Murata, Y., Hirai, H., Suzuki, H., Matozaki, T., Functional analysis of protein tyrosine phosphatase Shp2 in the adult forebrain neurons, *Neuroscience 2014* (第 37 回日本神経科学大会 The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society) 2014.9.11. パシフィコ横浜(神奈川県)

Sato-Hashimoto, M., Hayashi, Y., Kusakari, S., Urano, E., Shigeno, M., Sekijima, T., Kotani, T., Murata, Y., Murakami, H., Matozaki, T., Ohnishi, H. Hypothermia-dependent and -independent effects of forced swim on the phosphorylation states of signaling molecules in mouse hippocampus, *Neuro2013*(第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会、合同

大会) 2013.6.20.国立京都国際会館(京都)

Kusakari, S., Maruyama, T., Hashimoto-Sato, M., Hayashi, Y., Kusakari, Y., Kotani, T., Murata, Y., Okazawa, H., Kishi, S., Matozaki, T., **Ohnishi, H.** Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRPa in the brain, 11th biennial meeting of APSN/55th Meeting of JSN, 2012.9.30. 神戸国際会議場(兵庫県)

大西浩史、的崎尚、Regulation by protein tyrosine phosphorylation of depression-like behavior、第34回日本神経科学大会(Neuroscience2011) 2011.9.17. パシフィコ横浜(神奈川県) **Ohnishi, H.**, Matozaki, T., Stress-evoked tyrosine phosphorylation of SIRP regulates depression-like behavior, ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neurochemistry, 2011.8.29. Athens, GREECE (Megaron Athens International Conference Center)

〔図書〕(計 1 件)

大西浩史 他、メディカルドゥ、脳内環境—維持機構と破綻がもたらす疾患研究、2014, 228(114-118)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://biosignal.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 浩史(OHNISHI HIROSHI)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号: 70334125

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: