

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700438

研究課題名(和文)細胞質型チロシンホスファターゼSHP2による脳機能制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Regulation of brain functions by a protein tyrosine phosphatase SHP2

研究代表者

草苺 伸也(Shinya, Kusakari)

群馬大学・生体調節研究所・研究員

研究者番号：10510901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖因子シグナルの下流でRas/MAPKのポジティブレギュレーターとして機能するチロシンホスファターゼSHP2の成熟前脳神経細胞特異的なKOマウスは多動をはじめとする様々な行動異常を示す。本研究において研究代表者は、多動の原因のひとつとしてBDNF-Ras/MAPKシグナルの機能異常が関係していること、さらにSHP2が記憶・学習の制御に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Forebrain neuron-specific KO mice of tyrosine phosphatase SHP2, a positive regulator of Ras/MAPK, show abnormal behavior including hyperactivity. In this research project, I have shown that alteration of BDNF-Ras/MAPK signal in SHP2 cKO mice is one of causes for hyperactivity. In addition, I have found that SHP2 participates in regulation of memory and learning.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：蛋白質チロシンリン酸化 チロシン脱リン酸化酵素 脳高次機能

1. 研究開始当初の背景

(1) SHP2 は細胞質型の蛋白質チロシンホスファターゼで組織普遍的に発現するが、脳に強く発現している。SHP2 は分子内にリン酸化チロシンと結合する SH2 ドメインを2つ持ち、このドメインを介して様々なチロシンリン酸化蛋白質と結合することで強く活性化する。これまで主に培養細胞を用いた研究から、SHP2 は細胞増殖因子の下流シグナル分子として Ras/MAPK カスケードの活性化に重要な役割を果たし、細胞の増殖・分化・運動をポジティブに制御することが示されている。また生体内では、その遺伝子異常が、精神発達遅滞、先天性心疾患、骨格異常などを特徴とする Noonan 症候群の原因となることが明らかとなっている。さらに、SHP2 の全身性の遺伝子破壊 (KO) マウスは発生過程の異常により胎生致死となることから、SHP2 が発生・発達期に必須の分子であることが示されている。また、神経系においても SHP2 は神経前駆細胞から神経細胞への分化を促進的に制御するとともに、アストロサイトへの分化を抑制することが明らかとなっており、神経前駆細胞の運命決定に重要であることが示されている。一方、SHP2 は成熟した神経細胞にも豊富に発現しているが、神経細胞におけるその生理機能については未だ不明である。

(2) 研究代表者は、成熟前脳の神経細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CaMKII-Cre マウスと SHP2-loxP マウスを交配することで、発生過程への影響を避けて成熟脳の神経細胞特異的な SHP2 コンディショナル KO (cKO) マウスを作製し、このマウスを用いて、成熟脳における神経機能制御への SHP2 の関与について検討を開始した。SHP2 cKO マウスは正常に生まれ、脳構造は正常であり、予想通り発生期の異常は認められなかった。その後の様々な行動解析の結果、SHP2 cKO マウスは、強制水泳テスト、明暗箱テスト、オープンフィールドテストなどの行動テストにおいて異常が認められた。これらの結果から、SHP2 は成熟脳において神経機能制御に関わる可能性が示唆されるが、そのメカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

(1) SHP2 cKO マウスの多動の原因となるシグナル異常を明らかにし、SHP2 を介した制御メカニズムを解明する。

(2) (1) の解析結果をもとに、成熟脳における SHP2 の新たな生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ドパミンシグナルは、マウスにおける多動の原因として最も研究が進んでいるひとつである。そこで、SHP2 cKO マウスにおけるドパミンシグナルについて、ドパミントラ

ンスポーター阻害剤であるメチルフェニデートを用いた解析を行った。

(2) SHP2 の下流シグナルである Ras/MAPK について、多動との関連を明らかにするため、海馬初代培養神経細胞や SHP2 cKO マウスを用いて、in vivo および in vitro での解析を行った。

4. 研究成果

(1) すでに、ドパミン受容体に SHP2 が結合し、ドパミンシグナルの制御に関与する可能性が報告されていることから、SHP2 cKO マウスでは、ドパミンシグナルの亢進が起これ、多動が引き起こされている可能性が考えられた。そこで、まずドパミントランスポーターを阻害することで細胞外のドパミン濃度を高めて多動を誘導するメチルフェニデートに対する感受性について検討を行ったところ、SHP2 cKO マウスではメチルフェニデートに対する感受性に異常は認められなかった。また、マイクロダイアリシスを用いて、生体内におけるドパミンの細胞外濃度およびメチルフェニデート刺激による細胞外のドパミン濃度上昇を測定したところ、シナプス前部からのドパミン分泌においても異常は認められなかった。さらに、線条体におけるドパミン受容体の発現量についても、QPCR を用いて解析を行ったが、SHP2 cKO マウスにおいて明らかな異常は認められなかった。以上の結果から、SHP2 cKO マウスにおける多動はドパミンシグナルの機能亢進が原因である可能性は低いと考えられた。

(2) SHP2 は細胞増殖因子シグナルの下流において、Ras/MAPK のポジティブレギュレーターとして機能する。これまでに、遺伝子改変マウスや阻害剤を用いた解析から、Ras/MAPK の抑制により多動が引き起こされることが、複数のグループより報告されている。さらに、増殖因子のひとつである、脳由来神経栄養因子 BDNF およびその受容体である TrkB の成熟脳特異的な KO マウスもまた多動を引き起こすことが報告されている。以上より、SHP2 cKO マウスの多動の原因として BDNF および Ras/MAPK シグナルが関与している可能性が考えられた。そこで、SHP2 cKO マウスにおける BDNF-Ras/MAPK シグナルの機能異常について解析を行った。まず、SHP2 に対する siRNA を発現するレンチウイルスと培養神経細胞を用いて、SHP2 ノックダウン神経細胞における BDNF 刺激に対する MAPK の応答性について検討した。その結果、SHP2 ノックダウン神経細胞では、コントロール細胞に比べ BDNF 刺激による MAPK の活性化の低下が認められた。さらに、SHP2 cKO マウスの脳においても MAPK 活性の低下が認められた。これらの結果から、SHP2 cKO マウスにおける多動の原因の一つとして BDNF-Ras/MAPK シグナル異常が関与している可能性が示唆された。

(3) BDNF シグナルは記憶・学習の制御と深く関わることが報告されており、SHP2 が BDNF シグナルの下流で記憶・学習の制御に関与する可能性が考えられた。そこで、SHP2 cKO マウスを用いた行動解析により、記憶・学習についての検討したところ、SHP2 cKO マウスが海馬依存的な空間学習実験のひとつであるモーリス水迷路テストにおいて、学習成績の低下を示すことが明らかとなった。さらに、文脈記憶実験のひとつである恐怖条件付けテストにおいても、SHP2 cKO マウスが海馬依存的な記憶に異常を示すことが明らかとなり、SHP2 が海馬依存的な記憶・学習の制御に関与する可能性が示唆された。

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 4 件)

- ① Yuriko Hayashi, Shinya Kusakari, Miho Sato-Hashimoto, Eriko Urano, Masahiro Shigeno, Tsuneo Sekijima, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hirokazu Murakami, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi
Hypothermia-dependent and -independent effects of forced swim on the phosphorylation states of signaling molecules in mouse hippocampus
Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、428 巻、2012、475-481
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.083
- ② Toshi Maruyama*, Shinya Kusakari*, Miho Sato-Hashimoto, Yuriko Hayashi, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hideki Okazawa, Per-Arne Oldenborg, Shoji Kishi, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi (***Contributed equally to this work**)
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain
Journal of Neurochemistry、査読有、121 巻、2012、891-902
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07748
- ③ Tetsuya Kaneko, Yasuyuki Saito, Takenori Kotani, Hideki Okazawa, Hiroko Iwamura, Miho Sato-Hashimoto, Yoshitake Kanazawa, Satoshi Takahashi., Keiju Hiromura, Shinya Kusakari, Yoriaki Kaneko, Yoji Murata, Hiroshi Ohnishi, Yoshihisa Nojima, Keiji Takagishi, Takashi Matozaki
Dendritic cell-specific ablation of

the protein tyrosine phosphatase Shp1 promotes Th1 cell differentiation and induces autoimmunity

Journal of Immunology、査読有、188 巻、2012、5397-5407

DOI: 10.4049/jimmunol.1103210.

- ④ Miho Sato-Hashimoto, Yasuyuki Saito, Hiroshi Ohnishi, Hiroko Iwamura, Yoshitake Kanazawa, Tetsuya Kaneko, Shinya Kusakari, Takenori Kotani, Munemasa Mori, Yoji Murata, Hideki Okazawa, Carl F. Ware, Per-Arne Oldenborg, Yoshihisa Nojima, Takashi Matozaki, Signal regulatory protein α regulates the homeostasis of T lymphocytes in the spleen
Journal of Immunology、査読有、187 巻、2011、291-297
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07748

[学会発表] (計 12 件)

- ① 草薙 伸也、齋藤 文仁、橋本 美穂、柴崎 貢志、吾郷 由希夫、松田 敏夫、Benjamin G. Neel、小谷 武徳、村田 陽二、的崎 尚、大西 浩史
細胞質型チロシンホスファターゼ Shp2 による脳機能制御
第 6 回ホスファターゼ研究会学術集会
2014 年 2 月 20-21 日
三重大大学
- ② 草薙 伸也、齋藤 文仁、橋本 美穂、柴崎 貢志、吾郷 由希夫、松田 敏夫、Benjamin G. Neel、小谷 武徳、村田 陽二、的崎 尚、大西 浩史
チロシンホスファターゼ Shp2 による脳機能・行動の制御
第 3 回群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点シンポジウム
2014 年 1 月 9 日
群馬大学
- ③ 草薙 伸也、橋本 美穂、柴崎 貢志、吾郷 由希夫、松田 敏夫、Benjamin G. Neel、小谷 武徳、村田 陽二、的崎 尚、大西 浩史
細胞質型チロシンホスファターゼ Shp2 の成熟脳における機能解析
第 60 回北関東医学会
2013 年 9 月 26-27 日
群馬大学
- ④ 草薙 伸也、齋藤 文仁、橋本 美穂、柴崎 貢志、吾郷 由希夫、松田 敏夫、Benjamin G. Neel、小谷 武徳、村田 陽二、的崎 尚、大西 浩史
成熟脳における細胞質型チロシンホスファターゼ Shp2 の機能解析

Neuro2013
2013年6月20-23日
国立京都国際会館

- ⑤ **Shinya Kusakari**, Miho Hashimoto, Yuriko Hayashi, Eriko Urano, Yuriko Kusakari, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hideki Okazawa, Per-Arne Oldenborg, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain
10th International Conference on Protein Phosphatases
2013年2月7-9日
がん研究振興財団国際研究交流会館
- ⑥ **草苺 伸也**, 橋本 美穂、柴崎 貢志、吾郷 由希夫、松田 敏夫、Benjamin G. Neel、小谷 武徳、村田 陽二、的崎 尚、大西 浩史
細胞質型チロシンホスターゼ Shp2 の成熟脳における機能解析
第85回日本生化学会大会
2012年12月16日
福岡国際会議場
- ⑦ **Shinya Kusakari**, Miho Hashimoto, Yuriko Hayashi, Yuriko Kusakari, Yukio Ago, Toshio Matsuda, Koji Shibasaki, Takenori Kotani, Yoji Murata, Benjamin G. Neel, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi
Regulation of brain functions by a protein tyrosine phosphatase Shp2
平成24年度国際シナプス研究会
International Synapse Research Workshop 2012
"Understanding of synapse pathology, from genome mutation to functional defects"
2012年11月7日
岡崎コンファレンスセンター
- ⑧ **Shinya Kusakari**, Toshi Maruyama, Miho Hashimoto-Sato, Yuriko Hayashi, Yuriko Kusakari, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hideki Okazawa, Shoji Kishi, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain
The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry

2012年9月29日
神戸国際会議場

- ⑨ **草苺 伸也**、橋本 美穂、林 由里子、小谷 武徳、村田 陽二、岡澤 秀樹、吾郷 由希夫、柴崎 貢志、松田 敏夫、Benjamin G. Neel、的崎 尚、大西 浩史
細胞質型チロシンホスターゼ Sh2 の成熟脳における機能解析
第11回生体機能研究会
2012年7月21日
箱根プリンスホテル
- ⑩ **草苺 伸也**、橋本 美穂、丸山 登士、林 由里子、草苺 百合子、的崎 尚、大西 浩史
低温ストレスによる受容体型分子 SIRP α のチロシンリン酸化誘導
第30回内分泌代謝学サマーセミナー
2012年7月13日
伊香保温泉福一
- ⑪ **草苺 伸也**、小谷 武徳、橋本 美穂、村田 陽二、岡澤 秀樹、吾郷 由希夫、松田 敏夫、Benjamin G. Neel、的崎 尚、大西 浩史
成熟脳における Shp2 の生理機能解析
第5回ホスファターゼ研究会学術集会
2012年1月19日
大阪大学
- ⑫ **草苺 伸也**、小谷 武徳、橋本 美穂、林 由里子、草苺 百合子、村田 陽二、岡澤 秀樹、的崎 尚、大西 浩史
蛋白質チロシンホスファターゼ Shp2 の成熟脳における機能解析
第2回国際放射線神経生物学会大会
2011年12月3日
群馬大学

[その他]
ホームページ等

研究室ホームページ
<http://biosignal.dept.med.gunma-u.ac.jp/>
所属機関ホームページ
<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

草苺 伸也 (KUSAKARI SHINYA)
群馬大学・生体調節研究所・研究員
研究者番号：10510901