

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870110

研究課題名(和文)チロシンホスファターゼShp2を介した脳高次機能制御機構の解明

研究課題名(英文)Functional Analysis of protein tyrosine phosphatase Shp2 in the adult forebrain neurons

研究代表者

草薙 伸也(Kusakari, Shinya)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10510901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質型チロシンホスファターゼShp2の成熟前脳特異的なコンディショナルKO(cKO)マウスは多動をはじめとする様々な行動異常を示す。本研究では、Shp2 cKOマウスの行動異常の原因と、神経細胞におけるShp2の生理機能の解明に取り組んだ。その結果、Shp2 cKOマウスでは新奇環境刺激によって誘導される最初期遺伝子の発現およびErkの活性化が抑制されることを見出した。さらにモリス水迷路において、Shp2 cKOマウスは記憶形成に異常を示すことが明らかとなった。以上の結果から、Shp2はErkの活性化やシナプス機能を制御することで行動や記憶・学習に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The conditional-knockout (cKO) mice lacking Shp2, tyrosine phosphatase, specifically in postmitotic forebrain neurons manifest abnormal behavior, including hyperactivity. In this study, I found that novelty-induced expression of immediate-early genes and activation of extracellular-signal-regulated kinase (Erk) were attenuated in the cerebral cortex and hippocampus of Shp2 cKO mice, suggestive of reduced neuronal activity. The mutant mice also manifested transient impairment of memory formation in the Morris water maze. These results suggest that Shp2 contributes to regulation of Erk activation and synaptic plasticity in postmitotic forebrain neurons and thereby controls locomotor activity and memory formation.

研究分野：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 チロシンホスファターゼ 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脱リン酸化酵素であり、組織普遍的に発現するが、その中でも心臓や脳に強く発現する。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し、基質分子を脱リン酸化すると考えられている。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で Ras/MAPK カスケードのポジティブレギュレーターとして機能し、細胞の増殖・分化・運動の制御に関与することが示されている。生体内では、Shp2 の遺伝子異常が、精神遅滞、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、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が明らかになっており、Shp2 が発生・発達期に重要な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 は分化後の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、成熟脳における神経機能制御への Shp2 の関与を検討するため、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 Shp2-1oxP マウスを交配し、発生過程への影響を避けた成熟脳の神経細胞特異的な Shp2 コンディショナル KO (cKO) マウスを作製した。この 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。このマウスを用いた様々な行動解析の結果、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、Shp2 cKO マウスの行動異常が認められた。その後の詳細な解析から、これらのテストにおける行動異常は Shp2 cKO マウスの多動に起因する可能性が明らかとなった。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、その機能および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、成熟した神経細胞における Shp2 の新たな生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) これまでの解析から、Shp2 cKO マウスの脳では、神経活動性の指標となる最初期遺伝子の発現が低下していることが明らかとなっており、Shp2 cKO マウスでは神経活動性が低下している可能性が考えられた。そこで、Shp2 cKO マウスにおける神経活動性について検討を行った。

(2) Shp2 の下流シグナルである Ras/MAPK カスケードの異常は多動と深く関わることが報告されている。そこで、Ras/MAPK カスケードの Shp2 cKO マウスの多動への関与について検討を行った。

4. 研究成果

(1) Shp2 cKO マウスの多動が観察されたオープンフィールドテストのように、マウスを新奇環境下に暴露すると、これが刺激となり神経活動性の指標とされる Arc や c-fos などの最初期遺伝子の発現が増加することが報告されている。新奇環境下で多動がみられる Shp2 cKO マウスでは、新奇環境刺激による最初期遺伝子の発現に異常が起きている可能性が考えられた。そこで、マウスに新奇環境刺激を与え、最初期遺伝子の発現変化を継続的に計測したところ、Shp2 cKO マウスではコントロールマウスに比べ新奇環境刺激によって誘導される最初期遺伝子の発現が減少していた。この結果から、Shp2 cKO マウスでは神経活動性が低下している可能性が考えられた。

(2) 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ことから、Shp2 cKO マウスの多動の原因として 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 マウスの脳における Ras/MAPK シグナルについて解析を行った。マウスを新奇環境刺激に暴露すると最初期遺伝子の発現を増加させるだけでなく、Ras/MAPK カスケードをも活性化することが報告されている。そこで、新奇環境刺激による Ras/MAPK カスケードの活性化状態について、コントロールマウスとの比較・検討を行った。その結果、Shp2 cKO マウスの脳では新奇環境刺激による MAPK の活性化がコントロールマウスに比べ低下していることが明らかとなった。この結果から、Shp2 cKO マウスの多動は Ras/MAPK シグナルの低下が原因となる可能性が考えられた。

(3) Ras/MAPK カスケードは増殖因子をはじめ様々なシグナルの下流において遺伝子発現の制御に関与する。Shp2 cKO マウスでみられた最初期遺伝子の発現低下は、神経活動性の低下によるものではなく、単に Ras/MAPK カスケードの抑制による可能性が考えられた。そこで、培養神経細胞を用いて、Shp2 ノ

ックダウン細胞とコントロール細胞とを高カリウム刺激し、強制的に神経を興奮させたときの最初期遺伝子の発現について検討した。その結果、Shp2 ノックダウン細胞では高カリウム刺激による最初期遺伝子の発現誘導はコントロールと同程度であった。この結果から、Shp2 cK0 マウスにおける最初期遺伝子の発現低下は Ras/MAPK シグナル抑制が原因ではなく、神経活動性の低下によるものと考えられた。

(4) Shp2 cK0 マウスでは神経活動性の低下とシナプスの機能異常が認められた。神経活動およびシナプス機能は、記憶・学習と深く関わることが明らかとなっていることから、改めて Shp2 cK0 マウスの記憶・学習について詳細な検討を行った。その結果、水迷路において Shp2 cK0 マウスの学習成績の低下が認められた。しかしながら、トレーニングをさらに重ねることで、Shp2 cK0 マウスの成績に改善が認められた。この結果から、Shp2 cK0 マウスは訓練を重ねることでコントロールマウスと同じように記憶を形成することはできるが、その一方で、形成途中の記憶の呼出しに異常がある可能性が考えられた。

(5) Shp2 cK0 マウスではシナプスの機能異常と水迷路における学習成績の低下が認められたことから、Shp2 がシナプス機能を制御することで、記憶・学習に関与する可能性が考えられる。そこで、シナプスにおける Shp2 の関連分子の探索を行った。Shp2 はシナプスにおいて基質分子のリン酸化制御を介して記憶・学習に関与すると予想され、Shp2 cK0 マウスのシナプス画分では基質分子のリン酸化が亢進している可能性が考えられる。解析の結果、Shp2 cK0 マウスのシナプス画分において、チロシンリン酸化レベルが亢進している分子が複数見つかかり、これらについて、質量分析による解析を行ったところ、シナプス機能の制御に関わる分子が含まれることが明らかとなった。

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2件)

- ① Shinya Kusakari, Fumihito Saitow, Yukio Ago, Koji Shibasaki, Miho Sato-Hashimoto, Yasunori Matsuzaki, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hirokazu Hirai, Toshio Matsuda, Hidenori Suzuki, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi
Shp2 in forebrain neurons regulates synaptic plasticity, locomotion, and memory formation in mice
Molecular and Cellular Biology、査読

有、35 巻、1557-1572、2015
DOI: 10.1128/MCB.01339-14

- ② Kemala Isnainiasih Mantilidewi, Yoji Murata, Munemasa Mori, Chihiro Otsubo, Takenori Kotani, Shinya Kusakari, Hiroshi Ohnishi, Takashi Matozaki
Shear stress-induced redistribution of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase (VE-PTP) in endothelial cells and its role in cell elongation.
The Journal of Biological Chemistry、査読有、289 巻、6451-6461、2014
DOI: 10.1074/jbc.M113.529503

[学会発表] (計7件)

- ① Shinya Kusakari, Fumihito Saitow, Miho Sato-Hashimoto, Yasunori Matsuzaki, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hirokazu Hirai, Hidenori Suzuki, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi
Functional analysis of protein tyrosine phosphatase Shp2 in post-mitotic neurons
11th International Conference on Protein Phosphatase Protein Phosphatases in Health and Diseases, 2014 年 11 月 12-14 日
東北大学医学部
- ② Hiroshi Ohnishi, Shinya Kusakari, Fumihito Saitow, Miho Sato-Hashimoto, Yasunori Matsuzaki, Takenori Kotani, Yoji Murata, Hirokazu Hirai, Hidenori Suzuki, Takashi Matozaki
Functional analysis of protein tyrosine phosphatase Shp2 in post-mitotic neuron
Neuroscience 2014
第37回日本神経科学大会
The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society,
2014 年 9 月 11-13 日
パシフィコ横浜
- ③ Miho Sato-Hashimoto, Yuriko Hayashi, Shinya Kusakari, Takenori Kotani, Yoji Murata, Takashi Matozaki, Hiroshi Ohnishi
Regulation of microglial homeostasis through cell-cell interaction signal
Neuroscience 2014
第37回日本神経科学大会
The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society,
2014 年 9 月 11-13 日
パシフィコ横浜

- ④ **草苺 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
三重大学
- ⑤ **草苺 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
- 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
- ⑦ **草苺 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

[その他]

ホームページ等

前研究室ホームページ

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

前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)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10510901