

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500332

研究課題名（和文）蛋白質チロシン脱リン酸化酵素による神経機能制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the role of a protein tyrosine phosphatase in regulation of neuronal functions

研究代表者

大西 浩史 (OHNISHI HIROSHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70334125

研究成果の概要（和文）：

脳における細胞質型チロシン脱リン酸化酵素 Shp2 の機能解析を目標に、Cre-loxP システムを用いて、成熟前脳で Shp2 が特異的に欠損するコンディショナルノックアウト（cKO）マウスを生産した。現在この cKO マウスを用いて行動解析を行い、データを収集中である。また、脳における Shp2 の主要な結合分子である SIRPa のチロシンリン酸化シグナルの解析を進め、低温ストレスが脳における SIRPa のチロシンリン酸化を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the functional roles of cytoplasmic protein tyrosine phosphatase Shp2 in the brain, I have generated adult forebrain specific Shp2 conditional KO (cKO) mice by the use of Cre-LoxP system. The effect of Shp2 ablation on the brain functions is now being examined in the cKO mice by the use of several behavioral tests. In this project, I have also investigated a signaling mechanism of tyrosine phosphorylation of SIRPa, which is a major binding protein of Shp2 in the brain, and found that cold-stress induced tyrosine phosphorylation of SIRPa in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞内シグナル伝達

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：チロシンリン酸化、脳、ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能を司る細胞シグナルの中で、機能分子のリン酸化と脱リン酸化は最も重要なシグナルの1つであり、分泌装置、チャネル、転写因子などのリン酸化状態の変化に

よって、神経機能は短期的・長期的に制御される。様々なリン酸化シグナルの中で、蛋白質チロシンリン酸化シグナルは基本的に多細胞生物のみで見られる反応で、神経系や免疫系など、複雑な細胞間コミュニケーションが求められる組織において特に発達してい

るが、脳高次機能制御におけるチロシンリン酸化反応の役割については不明な点が多い。また、チロシン脱リン酸化を担う蛋白質チロシンホスファターゼ (PTP) については、神経系の発生・発達過程の機能解析が主であり、脳高次機能への関与はほとんど解析が進んでいなかった。

細胞質型 PTP の 1 つ、Shp2 は多くの組織で発現するが、特に脳と心臓に強く発現し、その遺伝子異常は、先天性心疾患、成長障害、骨格異常、精神発達遅滞を特徴とする Noonan 症候群の原因となることが報告されている。Shp2 はその活性化機構が詳細に解析されており、また、神経細胞の分化過程を制御することが報告されているが、成熟脳における役割はまだ明らかにされていない。一方で、我々の研究グループではこれまでに、成熟脳で強く発現する受容体型膜蛋白質 SIRPa の細胞内領域がチロシンリン酸化を受け、Shp2 と結合して、これを強く活性化することを明らかにしている。また電気生理学的な解析により、SIRPa がシナプス前部の機能制御に関わる可能性を見出しつつある。これらの結果は、成熟脳でも Shp2 が SIRPa シグナルと関連して機能しており、脳の高次機能の制御に関わる可能性を強く示唆している。さらに研究代表者は、SIRPa とそのリガンドである膜蛋白質 CD47 が、神経軸索と樹状突起に局在し、方向性を持った細胞間コミュニケーションシステム CD47-SIRPa 系を形成することを報告しており、このシグナル系の下流で Shp2 活性が制御される点に注目していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、Shp2 をモデルとして、成熟脳における PTP の機能解析を推進し、これまで知られていない PTP による高次神経機能制御を明らかにすることを目標とした。さらに Shp2 の活性化を誘導することが明らかになっている SIRPa のチロシンリン酸化シグナルについて解析を進めることで、脳で PTP を制御する分子メカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) Shp2 コンディショナルノックアウトマウスの作製

Shp2 は細胞の分化と増殖に重要な機能を果たすため、遺伝子破壊 (KO) マウスは発生過程が障害されて胎生致死となる。そこで本研究では、Cre-loxP システムを用いて、成熟した前脳で Shp2 が特異的に欠損する Shp2 コンディショナルノックアウト (Shp2 cKO) マウスを得るため、Harvard Medical School, Dr. Neel から Shp2-loxP マウスを、Max-Planck, Dr. Kramer から成熟前脳特異的に Cre リコンビナーゼを発現する CaMKII-Cre マウスを入手し、これらを交配することで、成熟前脳特異的な Shp2 KO マウスを作製し、Shp2 の発現等の基礎検討を行った。

### (2) SIRPa ノックアウトマウスの解析

成熟脳における Shp2 の主要な上流シグナル分子である SIRPa の全身ノックアウト (KO) マウスについて網羅的な行動解析を行った。行動解析には、ヘテロマウスの交配により作製した野生型マウスと KO マウスを準備し、性周期の影響を避けるため、週齢の揃ったオスのみを解析に用いた。

### (3) SIRPa チロシンリン酸化の解析

合成リン酸化ペプチドを抗原にしてチロシンリン酸化を受けた SIRPa を特異的に認識する抗体を作製し、これを用いたウェスタンブロットにより、脳組織における SIRPa のチロシンリン酸化状態を検討した。

強制水泳 (FS) による脳内チロシンリン酸化を検討するために、FS 直後の脳から海馬を摘出し、ホモジネートを作製してリン酸化 SIRPa に対する特異的抗体でウェスタンブロットを行い、リン酸化状態を評価した。また、FS によって誘導される脳内の SIRPa のチロシンリン酸化の増加に対する水温の影響を検討するため、23°C と 37°C の水温にて FS を行い、FS 直後の脳から海馬を摘出し、同様の解析を行った。さらに、拘束条件下の浸水や、エタノール (EtOH)、あるいはピクロトキシ

ン (PTXN) の腹腔内投与、暗所での絶食、麻酔下での腹部の冷却など、様々な方法によって強制的に低体温誘導した場合についても同様の解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Shp2 コンディショナルノックアウトマウスの作製

Shp2-loxP マウスと CaMKII-Cre マウスの交配により、Shp2 cKO マウスを作製したところ、Shp2 cKO マウスは正常に発生し、生育した。また脳の構造や、基本的な行動に異常は認められなかった。一方、コントロールである CaMKII-Cre を持たない flox ホモマウスと比べて、cKO マウスは生育に伴い肥満傾向が認められた。この結果は脳で特異的に Shp2 をノックアウトした既報の研究内容と一致していた (Zhang et al., *PNAS*, 2004)。

作製した Shp2 cKO の脳で Shp2 の発現を解析したところ、生後の、前脳において Shp2 の有意な減少が認められた。また、組織化学的な解析により、多くの神経細胞で Shp2 の染色性が減少していることを確認した。さらに、一部の神経細胞では Shp2 の発現に変化が見られないことを新たに見出しつつあり、現在、各種神経細胞マーカーを用いて、この神経細胞の分類同定に取り組んでいる。

CaMKII-Cre をもつ Shp2-flox ホモのオスと、Shp2-flox ホモのメスを交配することで、週齢の揃った Shp2 cKO マウス (flox/flox, +CaMKII-Cre) とコントロールマウス (flox/flox) を 20 ペア以上作製した。これらのマウスについて脳機能を検討するために、下記の項目について解析できる環境を整え、現在、網羅的な行動解析を進めている。

<行動解析の項目>

1. Light / Dark Transition Test
2. Open Field Test
3. Rotarod Test
4. Social Interaction
5. Prepulse Inhibition / Startle Response
6. Porsolt Forced Swim Test
7. Fear Conditioning Test

#### 8. Tail Suspension Test

#### 9. Home Cage Monitoring

##### (2) SIRPa ノックアウトマウスの解析

成熟脳における Shp2 の主要な上流シグナル分子であると考えられる SIRPa の全身 KO マウスについて網羅的な行動解析を行った結果、SIRPa KO マウスでは FS テスト (FST) における無動時間が増加することが明らかとなった。さらに、チロシンリン酸化を受けた SIRPa を特異的に認識する抗体を作製し、脳における SIRPa のチロシンリン酸化を検討したところ、野生型マウスでは FS 直後の脳で、SIRPa チロシンリン酸化が強く誘導された。また、免疫沈降による解析から、チロシンリン酸化により SIRPa と Shp2 の結合が増加することが確認できた。これらの結果から、FS ストレスにより脳内で SIRPa がチロシンリン酸化を受け、と無動時間の制御にはリガンドである CD47 が必要であることがわかった。

脳内 SIRPa のチロシンリン酸化への Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) の関与について、脳の主要な SFK の 1 つである Fyn の KO マウスを用いて解析を行ったところ、Fyn KO マウスでは、FS ストレスによる SIRPa のチロシンリン酸化が減弱することが分かった。さらに SFK の自己リン酸化を認識する特異的抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果、FS により脳において SFK の自己リン酸化が増強 (=SFK が活性化) することが分かった。

一方、SIRPa のリガンドである CD47 の KO マウスの脳では、FS に伴う SIRPa のチロシンリン酸化が強く抑制された。また、CD47 KO マウスは SIRPa KO マウスと同様に FST における無動時間の増加傾向を示した。これらの結果から、FS ストレスによる SIRPa のチロシンリン酸化と無動時間の制御にはリガンドである CD47 が必要であることがわかった。CD47 との相互作用により、SIRPa がチロシンリン酸化を受けやすい状態、あるいはリン酸化が安定化する状態に維持されている可能性が考えられる。また、FS により CD47 と

SIRPa の相互作用が誘導される可能性も残されている。

SIRPa はチロシンリン酸化を受けて Shp2 を活性化するため、SIRPa KO マウスでは Shp2 基質分子のチロシンリン酸化が増強する可能性が考えられた。質量分析による解析の結果、SIRPa KO マウスの脳では Kv1 ファミリーに属する電位依存性 K<sup>+</sup>チャネルの  $\beta$  サブユニット Kvb2 のチロシンリン酸化が増強することが分かった。さらに、Fyn KO マウスでは、Kvb2 のリン酸化が強く抑制されることから、Kvb2 もまた SFK の基質と考えられた。Kvb2 は細胞質型の蛋白質 Kvb ファミリー (Kvb1-3) の 1 つで、チャネルポアを形成する Kv1 ファミリー  $\alpha$  サブユニットの N 末端細胞内領域と 1:1 で相互作用し、この ab 複合体が 4 つ集まって、1 つの電位依存性 K<sup>+</sup>チャネルが形成される。Kvb2 は  $\alpha$  サブユニットの発現・局在やチャネル機能を制御する可能性が示唆されているが詳細は明らかでなく、またチロシンリン酸化とその機能についてもまだ報告されていない。しかしながら、K<sup>+</sup>チャネルの機能亢進が動物のうつ様行動を促進することが報告されていることから、現在、SIRPa KO マウスでは、Shp2 による抑制がはずれることで Kvb2 のリン酸化が増加し、これが Kv1 チャネルの機能を亢進して無動時間が増加する可能性を想定している。

さらに、Kvb2 以外の分子についても解析をおこない、FS ストレスが Fyn 依存的に NMDA 受容体 GluN2B サブユニットのチロシンリン酸化を増強し、さらに SIRPa KO マウスでは、この FS による GluN2B のチロシンリン酸化が抑制されることを新たに見出し、SIRPa シグナルが SFK による GluN2B のチロシンリン酸化を促進的に制御する可能性を示した。SIRPa KO マウスで見られる無動時間の増加は、24 時間間隔で行った 2 度の FST の 2 回目認められる。このことは FST における無動時間の制御には、学習や記憶が関与する可能性を示しており、SIRPa によるうつ様行動の制御には、NMDA 受容体のリン酸化を介した記憶・学習の制御が関与する可能性を考えている。

### (3) 低温による SIRPa チロシンリン酸化の解析

FS によって誘導される脳内の SIRP  $\alpha$  のチロシンリン酸化の増加に対する、水温の影響を検討するため、23°C と 37°C の水温にて FS を行ったところ、SIRP  $\alpha$  のリン酸化は水温が 23°C の時顕著であったが、水温 37°C ではリン酸化の誘導は認められなかった。FS の前後で直腸温を測定したところ、水温が 23°C の時では FS 後に約 10°C もの体温低下が認められた。一方、水温 37°C では FS 後に体温に変化は認められなかった。また、浅い水に立たせただけのコントロールでは、水温にかかわらず体温の低下は認められなかった。

体温低下と SIRP  $\alpha$  のリン酸化の関連を検討するため、FS とは異なる条件として、拘束条件下の浸水、エタノール (EtOH)、あるいはピクロトキシン (PTXN) の腹腔内投与、暗所での絶食、麻酔下での腹部の冷却など様々な方法で低体温を誘導したマウスの脳で SIRPa のチロシンリン酸化を検討したが、いずれの条件でも低体温に伴い海馬で SIRPa のチロシンリン酸化の増加が認められた。

さらに細胞に対する低温刺激が直接 SIRPa リン酸化を誘導する可能性を検討する為に、培養海馬神経細胞に 23°C の低温刺激を行ったところ、神経細胞においても低温により SIRPa のチロシンリン酸化が認められた。またリン酸化の温度依存性をみるために 4-37°C で温度を変えて刺激を行ったところ、16°C と 23°C にて SIRPa のリン酸化増加を認められたが、4°C と 30°C では有意なリン酸化の増加は認めなかった。さらに、神経細胞ではなくマウスマクロファージ由来の RAW267.4 細胞においても、23°C の低温刺激にて SIRPa のチロシンリン酸化が認められた。これら結果から低温刺激によって誘導される SIRPa のリン酸化は、細胞への直接的な低温刺激によって誘導され、また非神経細胞でも起きることがわかった。

低体温による SIRPa のチロシンリン酸化の分子メカニズムを検討するため、CD47 KO マ

ウスにおいて、麻酔下での冷却にて低体温を誘導したところ、CD47 KO マウスでは野生型マウスに比較して SIRPa のチロシンリン酸化が強く抑制された。一方、Fyn KO マウスで同様の実験を行ったところ、Fyn KO マウスでは野生型マウスに比べて低体温で誘導される SIRPa のリン酸化の程度に有意な差は認められなかった。さらに培養海馬神経細胞において、23°Cの冷却による SIRPa のリン酸化の誘導は、SFK のインヒビターである PP2 の存在下においても認められた。このことから、SFK の活性化は、低温における SIRPa のリン酸化に必ずしも必要でないと考えられた。この結果から、低温での SIRPa のリン酸化には、リガンドである CD47 が重要であり、一方、FS による SIRPa のリン酸化に重要な SFK の寄与は少なく、SFK 以外のチロシンキナーゼが働いている可能性が考えられた。

低温で誘導される SIRPa のリン酸化と、それに伴う Shp2 の活性化は、低代謝状態や神経活動が低下した状態において神経機能を制御するシグナルとして作用する可能性が考えられる。今後、低温状態による SIRPa のリン酸化のメカニズムのさらなる解明から、脳内における SIRP $\alpha$  による Shp2 活性化シグナルの機能解明が進むことが期待される。

#### 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 18 件)

- ① Ohnishi, H., Murata, T., Kusakari, S., Hayashi, Y., Takao, K., Maruyama, T., Ago, Y., Koda, K., Jin, F.-J., Okawa, K., Oldenborg, P.-A., Okazawa, H., Murata, Y., Furuya, N., Matsuda, M., Miyakawa, T., Matozaki, T. Stress-evoked tyrosine phosphorylation of signal regulatory protein a regulates behavioral immobility in the forced swim test. *J. Neurosci.* 査読有、Vol. 30、2010、pp10472-10483
- ② Saito, Y., Iwamura, H., Kaneko, T., Ohnishi, H., Murata, Y., Okazawa, H., Kanazawa, Y., Sato-Hashimoto, M., Kobayashi, H., Oldenborg, P.-A., Naito,

M., Kaneko, Y., Nojima, Y., Matozaki, T. Regulation by SIRPa of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues. *Blood.* 査読有、Vol. 116、2010、pp3517-3525

- ③ Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPa signaling pathway. *Trends Cell Biol.* 査読有、Vol. 19、2009、pp72-80
- ④ Matozaki, T., Murata, Y., Mori, M., Kotani, T., Okazawa, H., Ohnishi, H. Protein tyrosine phosphatase SHP-2; a proto-oncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Sci.* 査読有、Vol. 100、2009、pp1786-1793
- ⑤ Kusakari, S., Ohnishi, H., Jin, F.-J., Kaneko, Y., Murata, T., Murata, Y., Okazawa, H., Matozaki, T. Trans-endocytosis of CD47 and SHPS-1 and its role in regulation of the CD47-SHPS-1 system. *J. Cell Sci.* 査読有、Vol. 121、2008、pp1213-1223

[学会発表] (計 43 件)

- ① Ohnishi, H., Kusakari, S., Murata, T., Hayashi, Y., Maruyama, T., Okazawa, H., Murata, Y., Takao, K., Miyakawa, T., Oldenborg, P.-A., Matozaki, T., Stress-evoked tyrosine phosphorylation of SIRPa mediates an antidepressant effect, 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Neuroscience 2010, 2010. 11. 16. San Diego Convention Center (サンディエゴ、米国)
- ② 大西浩史、草苺伸也、村田考啓、丸山登士、林由里子、高雄啓三、宮川剛、吾郷由希夫、香田健、松田敏夫、大川克也、齊藤泰之、村田陽二、的崎尚、チロシンリン酸化シグナルによる脳のストレス応答制御、Neuro 2010 (第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会、合同大会) 2010. 9. 2. 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ③ 大西浩史、草苺伸也、林由里子、高雄啓三、宮川剛、齊藤泰之、村田陽二、的崎尚、チロシンリン酸化シグナルによる脳のストレス応答制御、第 52 回日本神経化学学会大会、2009. 6. 22. ホテル天保 (群馬県)
- ④ 大西浩史、草苺伸也、村田考啓、村田陽二、岡澤秀樹、的崎尚、CD47 と SHPS-1 のトランスエンドサイトーシスと CD47-SHPS-1 系の制御における役割、第 60 回日本細胞生物学会大会、2008. 7. 1. パシフィコ横浜 (神奈川県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/biosig/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大西 浩史 (OHNISHI HIROSHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70334125