

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700387

研究課題名(和文)チロシンリン酸化シグナルを介したオリゴデンドロサイトの分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Determination of the tyrosine phosphorylation signaling to regulate the oligodendrocyte differentiation.

研究代表者

久保山 和哉 (KUBOYAMA, Kazuya)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・NIBBリサーチフェロー

研究者番号：20619671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、ミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイトの分化・ミエリン形成に関わるチロシンリン酸化シグナルの解明である。チロシンリン酸化酵素Fynは、ミエリン鞘形成を促すことが知られている。本課題の成果から、Fynのカウンターパートとして働くチロシン脱リン酸化酵素が、受容体型チロシン脱リン酸化酵素Ptrpzであると判明した。Ptrpzは、発達期のマウス脳において、適切な時期にミエリン鞘が形成されるよう調節しており、Fynでリン酸化されるp190RhoGAPを脱リン酸化することで、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)で誘導した脱髄病変後の再ミエリン化を抑制していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the tyrosine phosphorylation signaling to regulate the oligodendrocyte differentiation and myelination in the central nervous system (CNS). The non-receptor protein tyrosine kinase Fyn, which is a member of the Src family of kinases, is known to induce oligodendrocyte development, and myelination. Here we revealed that Ptrpz, which is a member of the receptor-like protein tyrosine phosphatase (RPTP) family, functions as the counterpart PTP for Fyn in the oligodendrocyte differentiation and myelination. In the study, Ptrpz was found to regulate proper oligodendrocyte differentiation in early CNS development, and suppress remyelination at the injury site induced by the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), through the dephosphorylation of p190RhoGAP that is phosphorylated by Fyn.

研究分野：総合領域

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：神経科学 脳・神経 蛋白質チロシンリン酸化酵素 オリゴデンドロサイト グリア細胞 脱髄疾患

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の特定のチロシン残基に認められる可逆的なリン酸化修飾は、細胞増殖、細胞接着・移動、細胞間コミュニケーションなどに関与する。この反応はリン酸基を付加する蛋白質チロシンリン酸化酵素 (PTK) と、その逆にリン酸基を除去する蛋白質チロシン脱リン酸化酵素 (PTP) で制御されている。

中枢神経系のグリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトは、神経軸索を取り囲むミエリン鞘と呼ばれる絶縁体を形成し、神経伝達速度を高めるなどの役割を担っている。オリゴデンドロサイト系列の細胞において、p190RhoGAP は、PTK である Fyn キナーゼによるリン酸化によって活性化し、細胞の分化を促し、髄鞘形成を誘導することが報告されている (*J Neurobiol.* **49**: 62-78, 2001)。その一方、Fyn のカウンターパートとして働く PTP は不明であった。

最近我々の研究グループでは、受容体型 PTP に属する Ptporz が細胞内で脱リン酸化する基質タンパク質の一つが p190RhoGAP であることを明らかにした (*Neurosci Lett.* **399**: 33-8, 2006)。

この先行知見から、オリゴデンドロサイトの分化を促進する Fyn キナーゼに対して、Ptporz がカウンターパートとして抑制することが推測された。本仮説の実証するために Ptporz 遺伝子の欠失マウス (Ptporz 欠損マウス) を用いて動物個体レベルでの解析を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、オリゴデンドロサイトの分化・成熟、脳発達期のミエリン形成に関わる PTK と PTP を同定することで、チロシンリン酸化シグナル伝達の協調的制御の解明を目的とした。またこの制御機構が脱髄疾患時における再ミエリン化に関与する可能性についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Ptporz の発生期におけるミエリン形成への機能の解析方法

① 発生期の脳内でミエリン鞘形成が開始される生後 10 日齢において、野生型および Ptporz 遺伝子欠損 (Ptporz-KO) マウス脳内の髄鞘の主要な構成タンパク質であるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) の発現量をウェスタンブロット法および免疫組織学的染色法によって解析した。

② 生後 10 日齢における同マウスの脳組織を電子顕微鏡にて観察し、ミエリン鞘の形成の評価を行った。

(2) Ptporz のオリゴデンドロサイト分化・成熟への機能の解析

野生型および Ptporz-KO マウスの脳由来初代培養細胞を用い、オリゴデンドロサイトへの分化・成熟の進行を観察した。

(3) Ptporz の脱髄疾患への機能の解析

① 野生型および Ptporz-KO マウスに対して、脱髄疾患モデル (実験的自己免疫脳脊髄炎, EAE; 多発性硬化症の動物モデルとして広く研究に用いられる) を施しその病態症状を観察した。また、EAE 状態における脊髄組織を MBP 染色および Kluver-Barrera 染色 (ミエリンの染色) にて観察した。

② EAE 状態時における同マウス脊髄内の p190RhoGAP の 1105 番目のチロシンリン酸化状態を免疫沈降法にて観察した。

4. 研究成果

(1) Ptporz の発生期におけるミエリン形成への機能

① ミエリン鞘形成が開始される生後 10 日齢マウス脳内における、MBP の発現量は、Ptporz-KO マウスでは野生型に較べて有意に増加していた (図 1A)。

② 電子顕微鏡観察すると、Ptporz-KO マウスの神経繊維の髄鞘化が野生型よりも早く進んでいた (図 1C)。一方、成体である 3 ヶ月齢になると、このような差異は消失していた (図 1B, D)。

(2) Ptporz のオリゴデンドロサイト分化・成熟への機能

① 初代培養細胞系を用いた解析でも、Ptporz-KO マウス由来の細胞は、オリゴデンドロサイトへより早く分化することが確かめられた。

② Ptporz は、神経軸索が髄鞘で覆われる発達期がくるまで、オリゴデンドロサイトを前駆細胞の状態にとどめておくストッパーのような働きを担うと考えられる。

(3) Ptporz の脱髄疾患への機能

① Ptporz の発現は発達期に限らず成体組織でも持続している。そこで、一見変化が認められない成体マウスにおいて強制的に脱髄を誘導したときの応答性を解析した。脱髄疾患モデル (EAE) を誘導した結果、Ptporz-KO マウスでは、四肢麻痺などの EAE 病態症状が野生型に較べて軽く (図 2)、それに対応して脊髄組織における髄鞘損傷も軽減されていた (図 3)。

② EAE 病態時における Ptporz の基質分子 p190RhoGAP のリン酸化は、野生型と比較して Ptporz-KO マウスで有意に上昇していた。

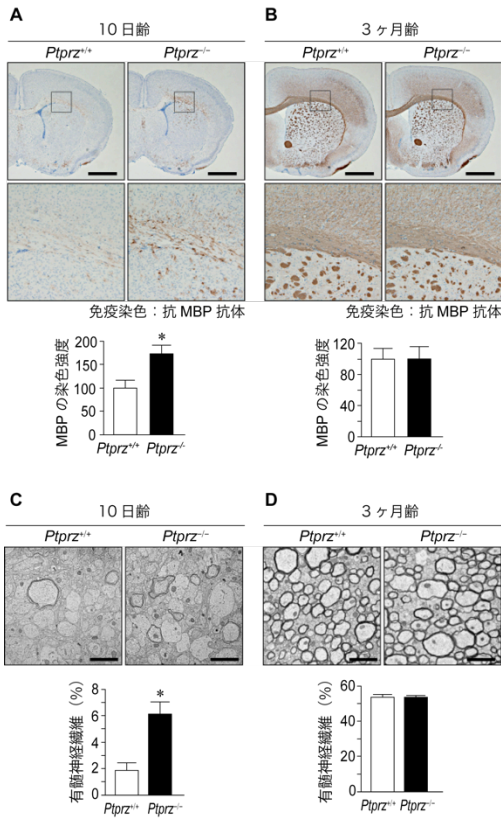


図1: 発生のPtprz欠損マウスにおけるミエリン塩基性タンパク質の発現量及び有髄神経繊維の増加
A, B, ミエリン塩基性タンパク質(MBP)の発現解析。髄鞘形成が始まる生後10日齢(A)および成熟した3ヶ月齢(B)の野生型マウス(*Ptprz*^{+/+})及び*Ptprz*欠損マウス(*Ptprz*^{-/-})の脳組織の抗MBP抗体染色像。スケールバー, 500 μm。下図は上図の四角エリアの拡大。下段グラフはMBP染色強度の定量評価。**P* < 0.05。
C, D, 生後10日齢(C)および3ヶ月齢(D)の脳組織の電子顕微鏡観察。スケールバー, 2 μm。下段グラフは有髄神経繊維の存在比の定量評価。**P* < 0.05。

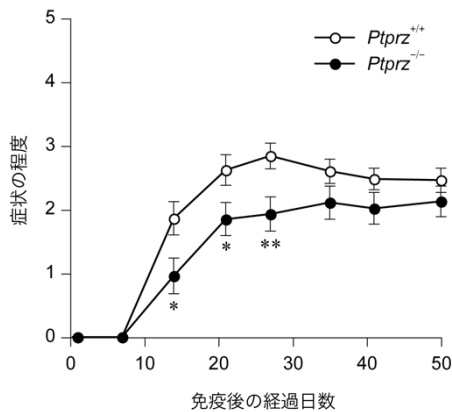


図2: EAEに対するPtprz欠損マウスの抵抗性(臨床的評価)
 ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)由来のペプチド抗原による免疫感作(0日)後の症状の経過観察。**P* < 0.05, ***P* < 0.01。

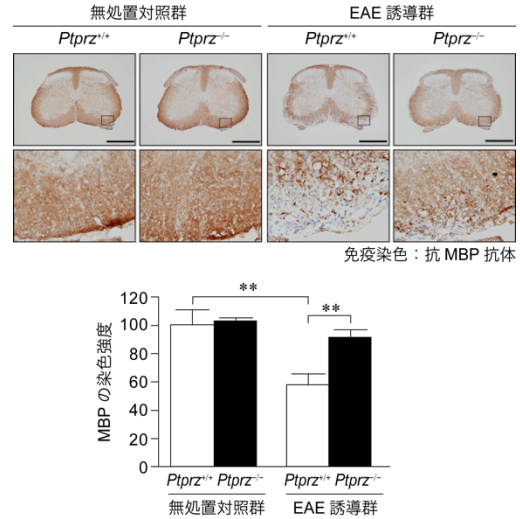


図3: EAEに対するPtprz欠損マウスの抵抗性(組織学的評価)

抗MBP抗体を用いたMOGペプチド抗原による免疫感作35日後(EAE誘導群)と無処置対照群の脊髄組織のMBPの免疫染色解析。スケールバー500 μm。下図は上図の四角エリアの拡大。下段グラフはMBP染色強度の定量評価。*Ptprz*欠損マウスではMBPがほとんど失われていない。***P* < 0.01。

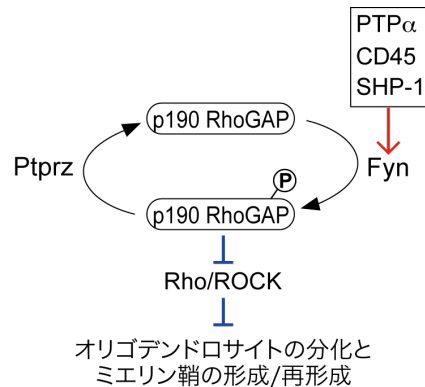


図4: オリゴデンドロサイトの分化及び髄鞘形成に関わるPtprzの役割

*Ptprz*は、Fynキナーゼによってリン酸化されたp190RhoGAPを脱リン酸化して、その働きを抑えることで、オリゴデンドロサイトへの分化/ミエリン鞘の形成を抑制している。一方、PTPα、CD45、SHP-1といった他のチロシンホスファターゼ分子はFynキナーゼを活性化し、オリゴデンドロサイトの分化を促進する働きが報告されている。

(4) 総括

これらの結果から、*Ptprz*はFynのカウンターパートとして機能し、p190RhoGAPを脱リン酸化することによって、オリゴデンドロサイトの分化・成熟、(再)ミエリン化を抑制することが明らかとなった(図4)。ミエリン鞘の損傷が顕著な多発性硬化症などの脱髄疾患は、有効な治療薬に乏しく、再ミエリン化を促す薬剤の開発が待ち望まれている。脱髄疾患に対する新薬開発において*Ptprz*は有望な標的分子の一つになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

① Suzuki R, Matsumoto M, Fujikawa A, Kato A, Kuboyama K, Yonehara K, Shintani T, Sakuta H, and Noda M. “SPIG1 Negatively Regulates BDNF Maturation.” *The Journal of neuroscience*. **34**:3429-3442, 2014 (査読あり)

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1597-13.2014

② Kuboyama K, Fujikawa A, Masumura M, Suzuki R, Matsumoto M, and Noda M. “Protein tyrosine phosphatase receptor type z negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination” *PLoS ONE*. **7**:e48797, 2012 (査読あり)

DOI: 10.1371/journal.pone.0048797

③ Matsumoto M, Fujikawa A, Suzuki R, Shimizu H, Kuboyama K, Hiyama TY, Hall RA, and Noda M. “SAP97 promotes the stability of Nax channels at the plasma membrane” *FEBS letters*. **586**:3805-3812, 2012 (査読あり)

DOI: 10.1016/j.febslet.2012.09.018

〔学会発表〕(計6件)

① 藤川顕寛, 松本匡史, 久保山和哉, 鈴木亮子, 野田昌晴 “Phosphorylation of Git1 at Tyrosine 554 Negatively Regulates Association with Hic-5 and Paxillin” 『第6回 日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会』、津、2014年2月20日～2014年2月21日

② Kuboyama K. “Protein tyrosine phosphatase receptor type Z negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination” 『The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases』、Taipei, Taiwan、2013年11月27日～2013年11月30日、招待講演

③ Kuboyama K, Fujikawa A, Masumura M, Suzuki R, Matsumoto M, and Noda M. “Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Z Negatively Regulates Oligodendrocyte Differentiation and Myelination ” 『10th International Conference on Protein Phosphatase Protein Phosphatases and Diseases』、Tokyo, Japan、2013年2月7日～2013年2月9日

④ 久保山和哉, 藤川顕寛, 升村誠, 鈴木亮子, 松本匡史, 野田昌晴 “Mice deficient in Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Z Show Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis” 『第85回 日本生化学会大会』、福岡、2012年12月14日～2012年12月16日

⑤ 松本匡史, 藤川顕寛, 鈴木亮子, 清水秀忠, 久保山和哉, 檜山武史, Randy Hall, 野田昌晴 “SAP97 は細胞表面における Nax チャネルの安定性を促進する” 『第85回 日本生化学会大会』、福岡、2012年12月14日～2012年12月16日

⑥ 久保山和哉, 藤川顕寛, 升村誠, 鈴木亮子, 松本匡史, 野田昌晴 “Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z show resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis” 『第35回 日本神経科学大会』、名古屋、2012年9月18日～2013年9月21日

〔その他〕

ホームページ等

髄鞘形成の制御機構の解明 ～脱髄疾患の治療薬開発に向けた新たな標的分子の発見～
<http://www.nibb.ac.jp/press/2012/11/08.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保山 和哉 (KUBOYAMA, Kazuya)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・NIBB リサーチフェロー

研究者番号：20619671