

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07069

研究課題名(和文)チロシンホスファターゼによるドーパミン・トランスポーターの活性制御の解明

研究課題名(英文)Regulation of dopamine transporter activity by protein tyrosine phosphatase

研究代表者

藤川 顕寛(Akihiro, Fujikawa)

基礎生物学研究所・神経生理学研究室・特別訪問研究員

研究者番号：50414016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：海馬依存性学習や覚せい剤依存形成に関わる受容体型チロシンホスファターゼのPTPRZシグナルの解明を目的とした。新たに作出されたホスファターゼ不活性型変異ノックインマウス(Ptprz-CS)および、恒常的活性型変異ノックインマウス(Ptprz-D2; ホスファターゼ活性の制御ドメインD2を欠く)を解析した結果、PTPRZのPTP活性は、海馬依存性学習にはほとんど関与せず、覚せい剤応答性を増強していることが判明した。さらに、これまで不明であったPTPRZの活性制御の分子基盤を解明し、その生理的意義についても動物個体レベルで実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海馬依存の恐怖文脈条件付け学習や覚せい剤依存形成に関わるPTPRZシグナルを解明することで、心的外傷後ストレス障害(PTSD)や薬物依存に関わる分子基盤の理解を進め、その治療に向けた新しい創薬戦略の創出に貢献する意義を有する。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify the signaling pathway of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, PTPRZ, in hippocampus-dependent learning and memory, or methamphetamine dependence. We performed behavioral studies on two newly generated knock-in mouse lines: One expresses the catalytically inactive mutant of PTPRZ (Ptprz-CS), while the other expresses constitutively active mutant lacking the negative regulatory D2 (Ptprz-D2). The results suggested that the phosphatase activity of PTPRZ was not essential for the hippocampus-dependent memory, but its absence caused decreases in behavioral responses to methamphetamine. Furthermore, in this study, we revealed that the structural basis for ligand-induced inactivation of PTPRZ and its physiological relevance by comparing the phenotypes of Ptprz-mutant mice.

研究分野：神経科学

キーワード：チロシンホスファターゼ 覚せい剤 海馬 記憶 学習 脳神経 ドーパミン神経 チロシンリン酸化

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) タンパク質のチロシンリン酸化は、チロシンキナーゼ(PTK)とチロシンホスファターゼ(PTP)によって調節されている。Fynをはじめとする PTK は、シナプス可塑性の制御に重要であることはよく知られているが、そのカウンターパートとなる PTP の理解は進んでいない。近年、PTP も、PTK と同様に、その活性をダイナミックに変化させて特定のタンパク質のリン酸化状態を調節するシナプス可塑性の制御因子と考えられるようになってきた。
- (2) 神経伝達を担うチャネルや受容体の多くは、PDZ (PSD-95, Dig, ZO-1)ドメインを含むシナプス裏打ちタンパク質に結合することでシナプスに配置されている。PDZ タンパク質に結合するモチーフを有する受容体型 PTP (RPTP) は PTPRZ と PTPRG のみである(1)。脳神経系に多く発現する PTPRZ はシナプス画分に集積し、*Ptprz* 欠損マウスには、成熟に伴う海馬の長期増強の変化が野生型と異なっており、長期増強の差異に対応して海馬依存性学習能力にも成熟依存的な低下が認められている(2)。
- (3) PTPRZ によって脱リン酸化される細胞内タンパク質には、GIT1, p190RhoGAP, paxillin, MAGI などがあり、これらタンパク質は共通する脱リン酸化サイトのモチーフを有する(3)。p190RhoGAP は、細胞骨格を制御する Rho の抑制因子であり、神経スパインの形態をの制御を介し、恐怖記憶形成に関わっている(4)。p190RhoGAP のチロシンリン酸化レベルは、学習刺激後のマウス海馬で低下するが、*Ptprz* 欠損マウスでは学習刺激後に伴う p190 のリン酸化変化は認められない(5)。このことは、学習時、PTPRZ の活性が一時的に上昇し、可塑的变化に関わることを示唆している。
- (4) 学習時に PTPRZ が活性化する仕組みはまだ解明されていないが、PTPRZ の細胞外領域は、メタロプロテアーゼやプラスミンなどによって分解され、細胞内に遊離型の PTP が生じることが判っている(6,7)。これらプロテアーゼの活性は、スパイン周囲の細胞外マトリックスタンパク質を分解することでスパインの形態変化に寄与している。すなわち、学習時に活性化するプロテアーゼにより、PTPRZ が切断され、その結果生じる遊離型 PTP がシナプス内部に移行することで、種々のタンパク質が脱リン酸化される可能性が考えられる。
- (5) PTPRZ は脳内全域に発現している。*Ptprz* 欠損マウスには、海馬機能の異常の他にも、ドーパミン神経に作用する覚せい剤 (methamphetamine) に対する応答性の減弱が認められていた(当時論文未発表)。以上、PTPRZ には中枢神経シナプスの生後発達や成熟への関与が想定された。研究代表者は、とくに心的外傷後ストレス障害(PTSD)や薬物依存などの定着を増強する分子基盤である可能性に注目し、以下の研究を実施した。

### 2. 研究の目的

- (1) 恐怖文脈条件付け学習や覚せい剤依存形成に関わる PTPRZ シグナルを解明し、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) や薬物依存に関わる分子基盤の理解を進める。

### 3. 研究の方法

- (1) すでに判明している PTPRZ のヌルノックアウトマウス(*Ptprz*-KO)の表現型に対して、新たに作出されたホスファターゼ不活性型変異ノックインマウス(*Ptprz*-CS)、恒常的活性型変異ノックインマウス(*Ptprz*-D2; ホスファターゼ活性の制御ドメイン D2 を欠く)に生じている表現型を比較する。
- (2) PTPRZ の細胞内ドメインの X 線結晶解析をもとに構築した新たな 2 量体構造モデルの妥当性について、各種試験(native MS 解析、培養細胞、初代培養)によって検証する。さらにその活性制御機構について、上記の PTPRZ 変異マウスを用いて動物個体レベルで評価実証する。
- (3) PTPRZ とその下流の基質分子を再構成した細胞アッセイ系を構築し、神経伝達に関わる受容体やトランスポーターの活性制御、細胞分化などに関わる PTPRZ シグナル経路を解明する。
- (4) PTPRZ の脱リン酸化モチーフをもとにした PTPRZ の阻害ペプチド、もしくは低分子阻害化合物を取得し、その薬理的阻害効果を評価する。

### 4. 研究成果

- (1) PTPRZ には 3 種類のスプライシングアイソフォーム、受容体型 PTP(RPTP)として発現する PTPRZ-A 及び PTPRZ-B と、分泌型タンパク質の PTPRZ-S(phosphacan と呼ばれる)が存在する。本研究において、PTPRZ-A および PTPRZ-B には、PTP ドメインの一部、エキソン 16 にコードされる 7 アミノ酸残基を欠く新規なアイソフォーム PTPRZ-A<sub>ex16</sub> 及び PTPRZ-B<sub>ex16</sub> が

存在することを見出した(発表論文 )。

- (2) PTPRZ の全てのスプライシングアイソフォームが発現しないヌル欠損型の *Ptprz*-K0 マウスには、海馬依存性の恐怖文脈条件付け学習能力の低下が認められている(5)。一方、新たに作出したホスファターゼ不活性型の *Ptprz*-CS、恒常的活性型の *Ptprz*-D2 マウスの学習能力は、いずれも野生型マウスと同レベルにあると判明した(発表論文 )。海馬依存性学習については、PTP 活性の寄与は小さく、主に PTPRZ の分泌型バリエーションである PTPRZ-S /Phosphacan が関与していると判断される。PTPRZ-S /Phosphacan は、脳組織における主要な細胞外マトリックス成分であり、N-CAM や tenascin 等と相互作用することが知られている(8)。
- (3) *Ptprz*-K0 マウスには、覚せい剤単回投与(1 mg/kg body weight)で誘発される自発運動の低下に対応して、側坐核におけるドーパミン遊離応答も減弱していること、さらに、覚せい剤の反復投与による行動感作も低下していることが判明した(発表論文 )。これと同様の表現型は、*Ptprz*-CS にも認められたが、*Ptprz*-D2 は野生型マウスと同様であった。PTPRZ の PTP 活性は、覚せい剤応答性を増強する方向に寄与していると判断された(発表論文 3)。
- (4) PTPRZ の細胞内ドメイン(PTPRZ-ICR)の X 線結晶解析の結果、新たな 2 量体構造「head-to-toe」配置が見出された。タンパク質の複合体形成・乖離を精度良く評価できる native MS 法による解析の結果、PTPRZ-ICR は、液相下、モノマー・ダイマーの動的平衡状態で存在していることが判明した。MS ピーク面積から計算された見かけ上の  $K_d$  値は  $5.8 \pm 1.54 \mu\text{M}$  であり、細胞膜上で RPTP 受容体同士との 2 量体形成により抑制制御されることの妥当性を示していた(発表論文 )。
- (5) Head-to-toe のダイマー配置では、PTP-D1 ドメインの活性中心が PTP-D2 ドメインによってマスクされることで脱リン酸化できなくなると説明される。Native MS では、PTPRZ の競合阻害剤(SCB4380)や PTPRZ の基質モチーフをミミックした阻害ペプチド( $\text{F}_2\text{Pmp-GIT1550-556}$ )は、モノマー状態の PTPRZ-ICR のみに結合した。D2 ドメインの欠損変異体( D2)およびダイマーインターフェイスを形成する Asp2178/Asp2179 の Arg 置換(DDKK)変異体は、どちらもダイマーを形成しないことが確認された。D2 および DDKK 変異体の PTP 活性、SCB4380 による阻害効果は、いずれも野生型と同レベルで認められた。以上結果は、head-to-toe モデルの予想と一致した(発表論文 )。
- (6) BHK21 細胞は PTPRZ を内因性に発現していない。この BHK21 細胞に PTPRZ-B アイソフォームの D2、DDKK、CS 変異体を一過性に発現させ、PTPRZ の細胞外リガンド(pleiotrophin)刺激をしても PTP の抑制反応は認められなかった。同様の結果は、*Ptprz*-D2 や *Ptprz*-CS 由来のオリゴペプチド(PTPRZ を内因性に発現するグリア細胞であり、ミエリン鞘を形成する細胞)でも再現した。以上、これまで不明であった RPTP の抑制制御の構造基盤の実態が、細胞内 head-to-toe ダイマー形成によることを世界で初めて実証した(発表論文 )。
- (7) PTPRZ の脱リン酸化モチーフ:Glu/Asp-Glu/Asp-Glu/Asp-Xaa- Ile/Val-Tyr(P)-Xaa (Xaa は非酸性アミノ酸残基)を有するタンパク質を公開データベース Phosphosite で検索し、ヒットした~10 種類の分子について、PTPRZ による脱リン酸化をオリゴペプチド系譜 OL1 細胞を用いて評価し、下流のシグナル伝達経路の全容を解明した(発表論文 )。この成果には、ドーパミン神経細胞等で覚せい剤応答性に関わる PTPRZ のシグナル研究に深く関わる新知見が含まれていた。そのため、当初想定したモデルは破棄して再構築すべきと判断された。
- (8) PTPRZ の最適化基質ペプチド配列にリン酸化チロシンのミミック(phosphonodifluoromethyl phenylalanine;  $\text{F}_2\text{Pmp}$ )を組み込んだ阻害ペプチド(配列 Glu-Asp-Asp-Ala-Ile- $\text{F}_2\text{Pmp}$ -Ser-Val)は、*in vitro*において良好な阻害効果を示したが、細胞膜透過性に問題があり、培養細胞における阻害効果が十分得られなかった(発表論文 1 の実験で使用)。また低分子化合物については、研究代表者は、PTPRZ に対する世界初の競合阻害剤 SCB4380(9)に続き、世界初のアロステリック阻害剤 NAZ2329(発表論文 )を取得した。しかし SCB4380 には細胞膜透過性の問題、NAZ2329 には脳内移行性の問題であった。覚せい剤応答性に対する PTPRZ の薬理的阻害の効果を正しく評価するためには、脳内以降性に優れた低分子阻害化合物を新たに開発する必要があると判断している。

#### 引用文献

1. Fujikawa, A., Chow, J. P., Shimizu, H., Fukada, M., Suzuki, R., and Noda, M. (2007) Tyrosine phosphorylation of ErbB4 is enhanced by PSD95 and repressed by protein

- tyrosine phosphatase receptor type Z. *J Biochem* **142**, 343-350
2. Niisato, K., Fujikawa, A., Komai, S., Shintani, T., Watanabe, E., Sakaguchi, G., Katsuura, G., Manabe, T., and Noda, M. (2005) Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation and impairment of spatial learning through the Rho-associated kinase pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice. *J Neurosci* **25**, 1081-1088
  3. Fujikawa, A., Fukada, M., Makioka, Y., Suzuki, R., Chow, J. P., Matsumoto, M., and Noda, M. (2011) Consensus substrate sequence for protein-tyrosine phosphatase receptor type Z. *J Biol Chem* **286**, 37137-37146
  4. Lamprecht, R., Farb, C. R., and LeDoux, J. E. (2002) Fear memory formation involves p190 RhoGAP and ROCK proteins through a GRB2-mediated complex. *Neuron* **36**, 727-738
  5. Tamura, H., Fukada, M., Fujikawa, A., and Noda, M. (2006) Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is involved in hippocampus-dependent memory formation through dephosphorylation at Y1105 on p190 RhoGAP. *Neurosci Lett* **399**, 33-38
  6. Chow, J. P., Fujikawa, A., Shimizu, H., Suzuki, R., and Noda, M. (2008) Metalloproteinase- and gamma-secretase-mediated cleavage of protein-tyrosine phosphatase receptor type Z. *J Biol Chem* **283**, 30879-30889
  7. Chow, J. P., Fujikawa, A., Shimizu, H., and Noda, M. (2008) Plasmin-mediated processing of protein tyrosine phosphatase receptor type Z in the mouse brain. *Neurosci Lett* **442**, 208-212
  8. Fujikawa, A., and Noda, M. (2016) Role of pleiotrophin-protein tyrosine phosphatase receptor type Z signaling in myelination. *Neural Regen Res* **11**, 549-551
  9. Fujikawa, A., Nagahira, A., Sugawara, H., Ishii, K., Imajo, S., Matsumoto, M., Kuboyama, K., Suzuki, R., Tanga, N., Noda, M., Uchiyama, S., Tomoo, T., Ogata, A., Masumura, M., and Noda, M. (2016) Small-molecule inhibition of PTPRZ reduces tumor growth in a rat model of glioblastoma. *Sci Rep* **6**, 20473

#### 発表論文

- [Fujikawa, A.](#), Sugawara, H., Tanga, N., Ishii, K., Kuboyama, K., Uchiyama, S., Suzuki, R., and Noda, M. A head-to-toe dimerization has physiological relevance for ligand-induced inactivation of protein tyrosine receptor type Z. *J. Bio. Chem.* 294, 14953-14965, 2019
- [Fujikawa, A.](#), Noda, Y., Yamamoto, H., Tanga, N., Sakaguchi, G., Hattori, S., Song, WJ., Sora, I., Nabeshima, T., Katsuura, G., and Noda, M. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ) show reduced responsivity to methamphetamine despite an enhanced response to novelty. *PLoS one*, 14, e0221205, 2019
- Tanga, N., Kuboyama, K., Kishimoto, A., Kihara, M., Kiyonari, H., Watanabe, T., [Fujikawa, A.](#), and Noda, M. Behavioral and neurological analyses of adult mice carrying null and distinct loss-of-receptor function mutations in protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ). *PloS one*, e0217880, 2019
- Tanga, N., Kuboyama, K., Kishimoto, A., Kiyonari, H., Shiraishi, A., Suzuki, R., Watanabe, T., [Fujikawa, A.](#), and Noda, M. PTN-PTPRZ signal activates the AFAP1L2-dependent PI3K-AKT pathway for oligodendrocyte differentiation: Targeted inactivation of PTPRZ activity in mice. *GLIA*, 67, 967-974, 2019
- Kuboyama, K., Tanga, N., Suzuki, R., [Fujikawa, A.](#), and Noda, M. Protamine neutralizes chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of oligodendrocyte differentiation. *PLoS one*, 12, e0189164, 2017
- [Fujikawa, A.](#), Sugawara, H., Tanaka, T., Matsumoto, M., Kuboyama, K., Suzuki, R., Tanga, N., Ogata, A., Masumura, M. and Noda, M. Targeting PTPRZ inhibits stem cell-like properties and tumorigenicity in glioblastoma cells *Sci. Reports* DOI: 10.1038/s41598-017-05931-810.1038, 2017
- [Fujikawa, A.](#), Chow, J., Matsumoto, M., Suzuki, R., Kuboyama, K., Yamamoto, N. and Noda, M. Identification of novel splicing variants of protein tyrosine phosphatase receptor type Z. *J. Biochem.* DOI.org/10.1093/jb/mvx042, 2017

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kuboyama Kazuya, Tanga Naomi, Suzuki Ryoko, Fujikawa Akihiro, Noda Masaharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Protamine neutralizes chondroitin sulfate proteoglycan-mediated inhibition of oligodendrocyte differentiation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0189164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0189164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujikawa Akihiro, Sugawara Hajime, Tanaka Taisaku, Matsumoto Masahito, Kuboyama Kazuya, Suzuki Ryoko, Tanga Naomi, Ogata Atsuto, Masumura Makoto, Noda Masaharu	4. 巻 7
2. 論文標題 Targeting PTPRZ inhibits stem cell-like properties and tumorigenicity in glioblastoma cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1038/s41598-017-05931-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanga Naomi, Kuboyama Kazuya, Kishimoto Ayako, Kihara Miho, Kiyonari Hiroshi, Watanabe Toshio, Fujikawa Akihiro, Noda Masaharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Behavioral and neurological analyses of adult mice carrying null and distinct loss-of-receptor function mutations in protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0217880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujikawa Akihiro, Noda Yukihiko, Yamamoto Hideko, Tanga Naomi, Sakaguchi Gaku, Hattori Satoko, Song Wen-Jie, Sora Ichiro, Nabeshima Toshitaka, Katsuura Goro, Noda Masaharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ) show reduced responsivity to methamphetamine despite an enhanced response to novelty	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0221205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujikawa Akihiro, Sugawara Hajime, Tanga Naomi, Ishii Kentaro, Kuboyama Kazuya, Uchiyama Susumu, Suzuki Ryoko, Noda Masaharu	4. 巻 294
2. 論文標題 A head-to-toe dimerization has physiological relevance for ligand-induced inactivation of protein tyrosine receptor type Z	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14953 ~ 14965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanga Naomi, Kuboyama Kazuya, Kishimoto Ayako, Kiyonari Hiroshi, Shiraishi Aki, Suzuki Ryoko, Watanabe Toshio, Fujikawa Akihiro, Noda Masaharu	4. 巻 67
2. 論文標題 The PTN PTPRZ signal activates the AFAP1L2 dependent PI3K AKT pathway for oligodendrocyte differentiation: Targeted inactivation of PTPRZ activity in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 967 ~ 984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/glia.23583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujikawa Akihiro, Chow Jeremy Pak Hong, Matsumoto Masahito, Suzuki Ryoko, Kuboyama Kazuya, Yamamoto Naoki, Noda Masaharu	4. 巻 162
2. 論文標題 Identification of novel splicing variants of protein tyrosine phosphatase receptor type Z	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 381 ~ 390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1093/jb/mvx042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----