

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14962

研究課題名（和文）受容体型チロシンホスファターゼによる新たな標的認識機構の解明

研究課題名（英文）A new molecular mechanism underlying receptor protein tyrosine phosphatase-mediated target recognition

研究代表者

安村 美里 (Yasumura, Misato)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20533897

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）：受容体型チロシンホスファターゼに属し、シナプスオーガナイザーとして知られるRPTPが、シナプス形成に先立つ軸索側枝形成にも働いていることを明らかにした。さらに、RPTPに結合する分子をいくつか同定し、同定された糖タンパク質は糖鎖部分でRPTPと結合することや、RPTPのスプライスバリエント選択的に結合する分子が多いこと、同定された分子の中にノックダウンすると側枝形成が阻害される分子が含まれていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳機能を担っているのは神経細胞が作る精緻な神経回路である。したがって、神経細胞が的確な場所へと軸索を伸ばし、適切な相手とシナプスを形成するに至る「標的認識」を担う分子機構を解明することは、神経回路形成の仕組みや脳機能の基盤理解につながることを期待できる。脳が傷害を受け神経回路が途切れると、重篤な機能障がいが生じるが、リハビリテーションを行えば代償機構によって一部の機能は回復する。代償機構を担うのは側枝形成による神経回路の再編成である。したがって、標的認識の分子機構を解明することは、代償機構を向上させ、神経機能を回復させる新たな治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP), which is known as a synaptic organizer, played roles in the formation of axon collaterals. We identified about 30 candidate RPTP interactors, and confirmed the actual interactions with regard to the several candidate molecules. We found that glycoproteins bound to RPTP through their sugar chains, and that most of the molecules interacting with RPTP exhibited a binding preference for certain splice variants of RPTP. We also revealed that knockdown of some identified molecules inhibited the formation of axon collaterals.

研究分野：神経科学

キーワード：受容体型チロシンホスファターゼ 皮質脊髄路 軸索側枝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精緻な神経回路を作り出すためには、的確な場所への軸索誘導や、適切な相手とのシナプス形成など、標的認識の制御が不可欠である。標的認識の各プロセスごとに分子や機能が報告されているが、複雑な神経回路の形成を説明するに至っていない。また、標的認識の一連の過程が発達時期にどのように連携しているのかについては、その分子機構を含めて多くが不明である。我々は受容体型チロシンホスファターゼ(RPTP)のひとつが前シナプス膜に発現し、後シナプス膜に発現する受容体を認識し結合することで、シナプスオーガナイザーとして働くことを明らかにしてきた。さらに RPTP がスプライシングバリエーションによって多様性を生み出し、それぞれのバリエーションに特異的な結合相手が後シナプス膜に発現することで、RPTP が適切な相手とのシナプス形成に寄与していることを示してきた。近年、ショウジョウバエの神経回路形成において、RPTP69D が脳正中領域より分泌される軸索ガイダンス分子 Slit と共に神経細胞接着分子 Dscam の脱リン酸化を促進し、軸索側枝が特定の軸索領域から出芽する機構に関与していることが報告された。RPTP69D は、哺乳動物にホモログは存在しないが、ドメイン構造は哺乳動物の RPTP と類似している。また、マウス大脳皮質において RPTPs は、それぞれが大脳皮質の特定の層に発現し、シナプス形成開始前の成長円錐や軸索にも存在している。以上のことから、哺乳動物において RPTP は外界のシグナルに従って、シナプスを作るべく軸索の的確な場所からの側枝形成を誘導する役割も担っていると予測した。

軸索側枝を形成することにより、神経細胞は複数の標的細胞とシナプスを形成できる。このことにより、神経細胞は複数の神経核に同時に情報を送ることができ、協調的な活動が可能となる。例えば、大脳皮質から脊髄に投射する皮質脊髄路の神経軸索は、その途中で赤核や橋核、下オリーブ核に側枝を伸ばしシナプスを形成する。様々な脳領域の神経細胞が軸索側枝を形成するが、その分子機構に関する報告は少なく、依然として不明な点が多い。側枝は脳内を走行する軸索シャフトの決まった場所から発芽し、的確な相手とのシナプス形成に至る。RPTP はリガンド刺激下で軸索上にクラスターを形成し、その細胞内ドメインを介してシグナル複合体を形成することで細胞骨格を制御することが知られている。軸索側枝は脳損傷時の代償機構としても働き、傷害によって片側の神経回路が失われると、健常側から軸索側枝が伸びて神経回路が再編成される。RPTP のフォスファターゼ活性欠失型マウスでは、脳傷害からの回復時に、海馬での側枝形成が野生型マウスに比べて遅れることが報告されている。これらのことから、RPTP は、外界からシグナルを受け取り、軸索上に集積することで側枝を誘導し、的確な神経回路形成に寄与しているのではないかと予測した。

2. 研究の目的

皮質脊髄路の神経細胞が橋核に伸ばす側枝形成をモデルに、(1) RPTP の側枝形成への関与を明らかにし、(2) RPTP のリガンド分子や、(3) RPTP の下流で働き細胞骨格を制御するシグナルカスケードを同定することで、RPTP がシナプス形成に先立つ側枝形成にも働くこと、さらに、結合相手を使い分けることで標的認識の各過程で機能しうることを明らかにすることが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) RPTP の側枝形成への関与の検討

我々はこれまでに、皮質脊髄路起始細胞(大脳皮質第 5b 層の神経細胞)が産生される胎生 12.5 日目に子宮内電気穿孔法で shRNA ベクターを導入し、皮質脊髄路起始細胞で RPTP をノックダウンすると、橋核への側枝形成が著しく阻害されるという結果を得ている。in situ hybridization や脳組織の免疫染色を行うことにより、側枝形成時期に RPTP が大脳皮質に発現していることや、軸索側枝にも局在していることを明らかにする。

また、RPTP は 2 箇所存在する 50bp 以下の短いエクソンでコードされるアミノ酸(splice variant1, splice variant2)の挿入の有無によって、4 種類のスプライスバリエーションが存在する。側枝形成時期に皮質脊髄路起始細胞で優位に発現しているバリエーションを、RT-PCR やシーケンスを行い同定する。サンプルは、皮質脊髄路起始細胞特異的に tdTomato を発現する Fezf2-tdTomato マウスから採取し、フローサイトメトリーを用いて皮質脊髄路起始細胞を分離する。

(2) RPTP のリガンド分子の探索

RPTP の細胞外領域(ECD: extracellular domain)に Fc タンパク質を融合させたりコンビナントタンパク質 RPTP(ECD)-Fc を精製し、protein G sepharose beads に結合させカラムを作製する。

橋核の抽出物と反応させ、洗浄後に RPTP の結合分子を溶出し、質量分析法によって分子を同定する。RPTP と同定された分子の結合を、リコンビナントタンパク質と HEK293T 細胞を用いた pull-down 法で確認する。結合が確認できた分子について、shRNA によるノックダウンもしくは、CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトを行い、側枝形成に影響が出るかを確認する。

(3) RPTP の下流で働く細胞骨格を制御するシグナルカスケードの同定

RPTP の細胞質内領域には、フォスファターゼドメインが存在する。軸索側枝形成には RPTP のフォスファターゼ活性が必要かどうかを、細胞質内領域を改変(欠損、点変異など)した変異型 RPTP を用いて、過剰発現させた時に側枝形成に影響が出るか、また、RPTP ノックダウン実験のレスキューができるかどうかを検証することで確認する。フォスファターゼ活性が必要であった場合には、RPTP をリガンドで刺激した時の、既知の基質のチロシンリン酸化状態の変化をウェスタンブロットで解析する。

4. 研究成果

(1) RPTP の側枝形成への関与の検討

生後 2 日目のマウス脳から切片を作製し、大脳皮質第 5b 層のマーカ分子である Ctip2 に対する免疫染色と RPTP に対する in situ hybridization の 2 重染色を行ったところ、RPTP は皮質脊髄路起始細胞に発現していることが確認できた。免疫染色に用いることができる RPTP に対する市販の抗体がなかったため、子宮内電気穿孔法で V5 タグを融合させた RPTP を皮質脊髄路起始細胞に発現させ、抗 V5 抗体でマウス脳組織の免疫染色を行った。その結果、RPTP は軸索シャフトだけでなく、橋核に伸びる側枝の先端にも局在していることが明らかとなった。これらの結果は、RPTP が側枝形成に関与していることを示している。

RPTP は脳の部位や時期によって優位に発現するスプライスバリエーションが異なることが示唆されている。そこで、生後 2 日目の Fezf2-tdTomato マウス脳から大脳皮質神経細胞を抽出し、フローサイトメトリーで tdTomato 陽性である皮質脊髄路起始細胞を分離し、スプライスバリエーションを区別できる primer を用いて RT-PCR を行なった。その結果、側枝形成時期の皮質脊髄路起始細胞は、splice variant 1 のみが挿入されているものと、splice variant 1, splice variant 2 どちらも挿入されていないタイプの RPTP が優位に発現していることが明らかとなった。

(2) RPTP のリガンド候補分子の探索

splice variant 1 を持つ RPTP(ECD)-Fc を bait とし、affinity 精製を行なった。橋核の抽出物は得られるタンパク質量が少なく結合分子が得られない可能性も考えられたので、橋核だけでなく脳全体の抽出物も prey として用いた。質量分析法による解析の結果、橋核のサンプルからはヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)が結合分子として同定された。脳全体のサンプルからは HSPG の他に、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン CSPG や細胞外マトリクスの構成分子、受容体など合計 29 種類の分子が結合分子として同定された。

これらの遺伝子をクローニングして HEK293T 細胞に発現させ、RPTP の細胞外領域との結合を確認したところ、現在までに 8 種類の分子が結合することが明らかとなっている。RPTP との結合が確認できた HSPG について、糖鎖修飾部位に変異を入れたところ、RPTP との結合が強く阻害された。この結果は、HSPG は糖鎖の部分で RPTP と結合することを示している。さらに、結合が確認できた分子について、RPTP との結合にスプライスバリエーション選択性があるかどうかを pull-down 法で確認したところ、大部分の分子が側枝形成時期に優位に発現している splice variant1 を持つ RPTP と、splice variant1, splice variant2 とともに持たない RPTP に結合しやすい傾向にあることが明らかとなった。

RPTP と結合する分子の中に、軸索ガイダンスへの関与が報告されている分子が含まれていた。RT-PCR で皮質脊髄路起始細胞での発現を確認したところ、側枝形成時期に皮質脊髄路起始細胞に発現していることが確認できた。そこで、子宮内電気穿孔法を用いてノックダウンしたところ、橋核への側枝形成が著しく阻害されることが明らかとなった。この結果は、この分子と RPTP が軸索上で協調的に働いて、側枝形成を促している可能性を示唆している。

(3) RPTP の下流で働く細胞骨格を制御するシグナルカスケードの同定

細胞質内に存在するフォスファターゼドメインを欠いた RPTP を、子宮内電気穿孔法で皮質脊髄路起始細胞に発現させたところ、空ベクターを導入した場合と比較して有意に側枝形成が

促進されることが現在までに明らかとなった。RPTP をノックダウンし、フォスファターゼ活性を持たない RPTP で側枝形成がレスキューできるかどうかを検証することにより、側枝形成にフォスファターゼ活性が必要かどうかを明らかにできると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Uemura T, Shiroshima T, Maeda A, Yasumura M, Shimada T, Fukata Y, Fukata M, Yoshida T.
In situ screening for postsynaptic cell adhesion molecules during synapse formation.
J Biochem. 2017 162(4):295-302. doi:10.1093/jb/mvx030. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

猪口 徳一、安村 美里、Nguyen Mai Quynh、三田村 耕平、吉田 知之、岡 雄一郎、
佐藤 真
脳内局所環境感知を担う受容体による軸索側枝制御機構
第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019 年 3 月 28 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター
安村 美里、猪口 徳一、Nguyen Mai Quynh、三田村 耕平、吉田 知之、佐藤 真
Molecular mechanism of axon collateralization in corticospinal tract by receptor protein tyrosine phosphatase.
第 92 回日本薬理学会年会、2019 年 3 月 16 日、大阪国際会議場
安村 美里、猪口 徳一、Nguyen Mai Quynh、三田村 耕平、吉田 知之、佐藤 真
受容体型チロシンフォスファターゼを介した軸索側枝形成の分子機構の解析
第 41 回日本神経科学大会、2018 年 7 月 27 日、神戸コンベンションセンター
猪口 徳一、Nguyen Mai Quynh、安村 美里、吉田 知之、岡 雄一郎、佐藤 真
脳発生における軸索側枝形成を制御する受容体群の役割について
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018 年 3 月 28 日、日本医科大学武蔵境校舎
Nguyen Mai Quynh, Tokuichi Iguchi, Manabu Taniguchi, Misato Yasumura, Makoto Sato
Functional analysis of receptor involvement in controlling axonal collateralization during brain development.
第 11 回神経発生討論会、2018 年 3 月 17-18 日、金沢大学

〔その他〕

ホームページ等

解剖学講座 (神経機能形態学) <http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：猪口 徳一、谷口 学、佐藤 真

ローマ字氏名：Tokuichi Iguchi, Manabu Taniguchi, Makoto Sato

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。