

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07348

研究課題名(和文) 受容体型チロシンホスファターゼの基質同定法の確立とその応用

研究課題名(英文) Establishment of substrates for receptor tyrosine phosphatase and its application

研究代表者

坂元 一真 (SAKAMOTO, Kazuma)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60612801

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)：本研究では、受容体型チロシンホスファターゼ(RPTP)の基質を網羅的に同定する手法の確立を目指した。特にRPTPファミリーの一つであり中枢神経軸索再生の阻害に關するPTP_βを題材に近位依存性標識法を用いて、この相互作用分子を同定した。この結果、約100のタンパク質がPTP_β相互作用分子として同定できた。このリストには既報にある分子も含まれていた。さらにこの中から軸索の伸長に關わる分子についてそのチロシンリン酸化とPTP_βによる脱リン酸化を確認した。この結果から近位依存性標識法がRPTPの基質同定に有力な手法であることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近位依存性標識法を用いることにより、これまでに困難であったRPTPの基質同定を簡便に行うことができることを示した。既知分子も再現性よくフォローされており、本手法は信頼性も十分に担保されている。これまでにRPTPは神経疾患やがん、炎症性疾患や代謝性疾患に關与していることが報告されている。ヒト疾患において標的とするには、基質分子の不明瞭さが律速段階になっていたが、本手法の利用により、RPTPのバイオロジーの理解につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to establish a method for the comprehensive identification of substrates of receptor-type tyrosine phosphatases (RPTPs). In particular, we focused on PTP_β, a member of the RPTP family that is involved in the inhibition of axon regeneration in the central nervous systems. I applied a proximity-dependent ligation assay to identify the interacting molecules for PTP_β. As a result, approximately 100 proteins were identified as PTP_β interactors. This list included already-known interactors such as Liprin- and Trio. Among these molecules, those involved in axon elongation were validated for their tyrosine phosphorylation and dephosphorylation by PTP_β. Together, a proximity-dependent ligation assay seems to be a powerful tool for the comprehensive identification of substrates for RPTP.

研究分野：生化学

キーワード：受容体型チロシンホスファターゼ 軸索再生 近位依存性標識 基質 タンパク質相互作用

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンホスファターゼ (RPTP) は受容体型チロシンキナーゼ (RTK) と対をなして細胞の機能を制御する I 型膜タンパク質である。ともに細胞外リガンドにより細胞内酵素活性が調節され、RTK が細胞内基質分子のチロシン残基をリン酸化する一方、RPTP は基質分子のリン酸化チロシンを脱リン酸化する。イレッサ・グリベック・イマニチブなど、RTK を標的とした低分子阻害薬・抗体医薬品が多数市場を席捲している一方、RPTP を標的とした医薬品はこれまでのところ上市されていない。このことは RPTP 研究が RTK 研究に比べて大きく遅れを取っていることを意味する。そしてその根幹には、RPTP の生理的基質を効率的に同定する確かなプラットフォームが未だ存在しないことがある。

研究代表者は、中枢神経系の損傷後軸索変性構造である Dystrophic endball 形成メカニズムの一つとして、RPTP の一つである PTP σ によるオートファジーの破綻と、さらにこれを説明する基質分子として機能的探索により Cortactin を新規に同定した (Sakamoto et al., Nat. Chem. Biol. 2019)。しかしながら RPTP の基質を網羅的に同定する手法の必要性を強く実感した。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者の熟知する PTP σ を代表に取り、RPTP の生理的基質を効率的に同定する手法を確立することを目的とした。本手法の確立により、およそ 20 ある RPTP の生理学的・病理学的機能を解明に寄与することが期待できる。

3. 研究の方法

RPTP の基質の同定がこれまで困難であった理由として、(1) 基質となる「チロシンリン酸化タンパク質」の細胞内絶対量が少ないこと、(2) チロシン脱リン酸化反応が極めて速いことから、有効な酵素基質複合体を生化学的に捉えることが難しいということが考えられた。この点を解決するため、本研究では、近位依存性標識法の一つである BioID (Proximity-dependent biotin identification) 法を用いて PTP 基質分子に不可逆的なラベルを付けることで、これらの網羅的同定を目指した。BioID 法では、ビオチンリガーゼ融合標的タンパク質を細胞に発現させる。標的タンパク質と相互作用する分子が十分に近接すると、ビオチンリガーゼが対象分子にビオチンを付加することにより、対象分子に永久的な「足跡」を残すことができる。対象分子はビオチン化タンパク質となるため、その後の精製および同定も容易である。またビオチンリガーゼの酵素反応も極めて迅速である。このことから、RPTP の基質という一過性で弱い相互作用をすると想定される分子にも有効であることが期待された。

4. 研究成果

(1) PTP の細胞内ドメインにビオチンリガーゼ BioID2 を融合させた PTPR σ -BioID2 を発現させた (図 1 左) 。細胞培養液へのビオチン添加により、細胞内タンパク質のビオチン化が確認された (図 1 右) 。これらは PTP 相互作用タンパク質であると想定された。

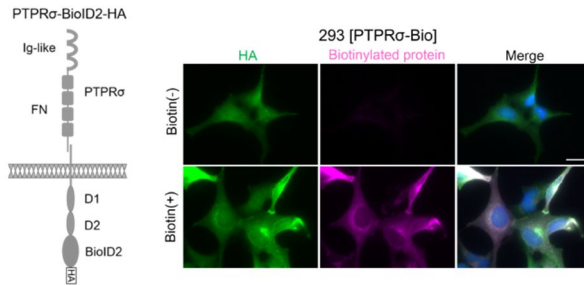


図1 PTPR σ -BioID2によるPTPR σ 近傍分子のビオチン化

(2) これらビオチン化タンパク質を質量分析計にて同定した。PTPR σ -BioID2 発現細胞にビオチンを 16 時間添加し、細胞抽出液を調製した。ビオチン化タンパク質をストレプトアビジン担体により精製し、グアニジン塩酸溶液で溶出した。溶出液を中和して還元・アルキル化処理を行ったのち、トリプシン消化を行

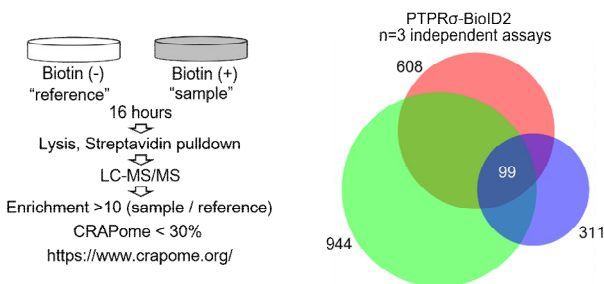


図2 PTP σ 近傍分子の同定

い、LC-MS/MS にてプロテオーム解析を行った。ビオチン添加群で有意に検出されたタンパク質のうち、コンタミネーションが疑われるタンパク質をデータベースを用いて除去した (図 2) 。同様の実験を 3 回繰り返す、再現性良く同定された 99 のタンパク質をリストアップした (図 3)

(3) PTP σ 相互作用分子の既報はこれまで多くはないものの、Liprin- α や Trio など、すでに PTP σ 相互作用分子として報告のある分子も本研究で再現良く同定された。

| | | | | | | | | |
|---------|----------|--------|---------|----------|---------|----------|----------|---------|
| ABI1 | ARHGDI A | DDX24 | EPB41 | GOLGA5 | NCAPH | PRKAR1A | SH3GL1 | TBCB |
| ABI2 | BAG6 | DNAJA2 | EPB41L2 | GOPC | NCKAP1 | PRKAR2A | SLC25A23 | TPD52 |
| ACADSB | BICD2 | DNAJB1 | EPB41L3 | HADHA | NDUFV1 | RAD50 | SLC9A3R1 | TPD52L2 |
| ACBD3 | CASKIN2 | DNAJB6 | EPS15 | HCFC1 | NSFL1C | RDX | SLFN11 | TRAFD1 |
| ACTL6A | CEP170 | DNM2 | EPS15L1 | IDH2 | NUDC | RFC1 | SNX9 | TRIO |
| ADD3 | CKAP5 | DVL1 | EXOSC10 | KIAA1522 | NUP153 | SEPTIN11 | SRP68 | UBE2M |
| AFDN | CLINT1 | DVL2 | EXOSC9 | KLC1 | PDLIM1 | SEPTIN2 | SRP72 | VAT1 |
| AGFG1 | CTPS1 | DVL3 | FARSA | KLC4 | PDXDC1 | SEPTIN6 | SRPRA | VPS4A |
| AKAP12 | CTTN | EDC4 | FHL1 | LSS | PHACTR4 | SEPTIN7 | STAM | WASF1 |
| ALDH3A2 | CYFIP1 | EHPB1 | GAB1 | MOB4 | PLEKHA1 | SEPTIN8 | STAM2 | WASF2 |
| APBB1 | CYFIP2 | EIF5 | GLUD1 | MSH6 | PPFIA1 | SEPTIN9 | STUB1 | ZC3HAV1 |

図3 同定されたPTP σ 相互作用タンパク質

また先の研究で、研究代表者自身が

基質として同定した Cortactin も本

アッセイで同定されたことから、本手法は RPTP の基質を同定する手法として信頼性の高いものとして評価できる (Gong, et al., J Biochem. 2021)

(4) これら基質候補分子のうち、APBB1 について確認を行った。APBB1 はチロシンリン酸化の証拠は乏しいものの、ノックアウトマウスにおいては軸索投射異常が見られることから、PTP σ の下流において軸索伸長の制御を行っている可能性がある。マウス脳における APBB1 のリン酸化を Phos-tag PAGE にて確認したところ、胎生期から出生直後にかけて APBB1 のリン酸化を確認することができた。次に細胞に APBB1 を過剰発現させて免疫沈降とチロシンリン酸化特異抗体により APBB1 のチロシンリン酸化を確認した。さらにチロシンリン酸化 APBB1 を精製し、in tube で PTP σ 酵素ドメインを反応させたところ、APBB1 のチロシン脱リン酸化を確認できた。以上から APBB1 は PTP σ の生理的基質である可能性がある。リン酸化プロテオミクス解析により、APBB1 のチロシンリン酸化サイトも決定することができた。

今後チロシンリン酸化 APBB1 に対する特異抗体を作成し、その生物学的な機能を、特に中枢神経損傷後の神経軸索再生の文脈において検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 9件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Gong Y, Abudureyimu S, Kadomatsu K, Sakamoto K. | 4. 巻 162 |
| 2. 論文標題 Identification of PTPR -interacting proteins by proximity-labelling assay. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Biochem. | 6. 最初と最後の頁 187-194 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa141. | 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 Ito S, Ozaki T, Morozumi M, Imagama S, Kadomatsu K, Sakamoto K. | 4. 巻 340 |
| 2. 論文標題 Enoxaparin promotes functional recovery after spinal cord injury by antagonizing PTPR | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Exp. Neurol. | 6. 最初と最後の頁 113679 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2021.113679. | 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 Sakamoto K. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Regulation of axonal regeneration and its inhibition by glycan ligands | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Trends Glycosci. Glycotechnol. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 Sakamoto Kazuma, Ozaki Tomoya, Ko Yen-Chun, Tsai Cheng-Fang, Gong Yuanhao, Morozumi Masayoshi, Ishikawa Yoshimoto, Uchimura Kenji, Nadanaka Satomi, Kitagawa Hiroshi, Zulueta Medel Manuel L., Bandaru Anandaraju, Tamura Jun-ichi, Hung Shang-Cheng, Kadomatsu Kenji | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Glycan sulfation patterns define autophagy flux at axon tip via PTPR -cortactin axis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 699 ~ 709 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0274-x | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Segi Naoki, Ozaki Tomoya, Suzuki Yuji, Ouchida Jun, Imagama Shiro, Kadomatsu Kenji, Sakamoto Kazuma | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Close association of polarization and LC3, a marker of autophagy, in axon determination in mouse hippocampal neurons | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Neurology | 6. 最初と最後の頁 114112 ~ 114112 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2022.114112 | 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 Sakamoto Kazuma, Ozaki Tomoya, Suzuki Yuji, Kadomatsu Kenji | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Type IIa RPTPs and Glycans: Roles in Axon Regeneration and Synaptogenesis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 5524 ~ 5524 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115524 | 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 Garcia Jimenez MJ, Gil Caballero S, Maza S, Corzana F, Juarez Vicente F, Miles JR, Sakamoto Kazuma, Kadomatsu Kenji, Garcia Dominguez M, Paz JL., Nieto PM. | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Midkine Interaction with Chondroitin Sulfate Model Synthetic Tetrasaccharides and Their Mimetics: The Role of Aromatic Interactions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry A European Journal | 6. 最初と最後の頁 12395 ~ 12409 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202101674 | 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 該当する |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Sakamoto Kazuma, Ozaki Tomoya, Kadomatsu Kenji | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Axonal Regeneration by Glycosaminoglycan | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.702179 | 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 Machino Masaaki, Gong Yuanhao, Ozaki Tomoya, Suzuki Yuji, Watanabe Eri, Imagama Shiro, Kadomatsu Kenji, Sakamoto Kazuma | 4. 巻 170 |
| 2. 論文標題 Dermatan sulphate is an activating ligand of anaplastic lymphoma kinase | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 631 ~ 637 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab085 | 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 Sakamoto Kazuma, Ozaki Tomoya, Suzuki Yuji, Kadomatsu Kenji | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Type IIa RPTPs and Glycans: Roles in Axon Regeneration and Synaptogenesis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 5524 ~ 5524 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115524 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂元一真 Gong Yuanhao 尾崎智也 門松健治 |
| 2. 発表標題 ヘパラン硫酸はALK を介して中枢神経軸索再生を促進する |
| 3. 学会等名 第39回日本糖質学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 坂元一真 伊藤定之 尾崎智也 門松健治 |
| 2. 発表標題 エノキサバリンはPTPR を阻害することにより、神経損傷後機能回復を促進す |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuma Sakamoto, Sadayuki Ito, Tomoya Ozaki, Kenji Kadomatsu |
| 2. 発表標題 Enoxaparin promotes recovery after nerve injury by antagonizing PTPR |
| 3. 学会等名 PG 2019 Proteoglycans Future Leaders Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuma Sakamoto |
| 2. 発表標題 Glycans and dystrophic endball |
| 3. 学会等名 Glyco-Neuroscience Workshop (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuma Sakamoto, Kenji Kadomatsu |
| 2. 発表標題 Chondroitin sulfate and heparan sulfate determine axonal regeneration and its inhibition through PTPR -Cortactin-Autophagy axis |
| 3. 学会等名 HUP0 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 坂元一真 |
| 2. 発表標題 糖鎖リガンドによる軸索再生阻害機構の解明 |
| 3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 硫酸化糖鎖によるDystrophic endball形成機構 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 日本生化学会 | 5. 総ページ数 4 |
| 3. 書名 生化学 | |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | | |
|---------|------------------------|--|--|--|
| 台湾 | Academia Sinica | | | |
| スペイン | Universidad de Sevilla | | | |