

機関番号： 63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700416

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シナプス可塑性の制御

研究課題名(英文) Regulation of synaptic plasticity by receptor-like protein tyrosine phosphatase

研究代表者

藤川 顕寛 (AKIHIRO FUJIKAWA)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号： 50414016

研究成果の概要(和文)： Ptpz は、MMP-9 やプラスミンによって ectodomain shedding を受けることが明らかにされているが、これらプロテアーゼはシナプス可塑的变化時に活性化する。脳組織から分画した神経シナプス後肥大部(PSD)には、Ptpz フラグメントが集積しており、シナプス部位でも同様にプロテオリシスされていることが判明した。既に同定されている基質分子 Git1 と Magi1 の脱リン酸化サイトを特定し、Ptpz の基質モチーフを明らかにした。このモチーフ配列を用いることで paxillin (Tyr118) を含む新たな基質候補分子を同定した。

研究成果の概要(英文)： The extracellular region of Ptpz is shedded by MMP-9 or plasmin, producing its membrane-tethered fragment. Both proteases are reportedly activated when synaptic remodeling is occurring. We revealed that Ptpz fragments are accumulated in the post synaptic density PSD fraction, indicating that this receptor is actually cleaved at central synapses. We identified the dephosphorylation sites in Git1 and Magi1. Alignment of the primary sequences surrounding the target phospho-tyrosine residue in these substrate proteins showed a considerable similarity, suggesting a consensus motif for substrate recognition by Ptpz. We found that the substrate motif thus deduced is present in some proteins, including at Tyr118 of paxillin. Finally, we verified that Ptpz efficiently dephosphorylates paxillin at this site in cultured cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 神経科学・生化学・分子生物学

科研費の分科・細目： 神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード： 神経科学, 生体分子, 蛋白質, 脳・神経

1. 研究開始当初の背景： タンパク質のチロシンリン酸化は、記憶・学習の細胞基盤であ

る神経シナプス可塑性の制御に深く関与することが知られている。本課題では、神経シ

ナプス可塑性の制御における受容体型チロシンホスファターゼ(RPTP)の役割を解析した。神経伝達に直接関わるチャンネルや神経受容体の多くは、シナプス裏打ちタンパク質である PDZ ドメイン含有タンパク質に結合することで、シナプス上に適切に配置される。これらの分子の多くは細胞内 C 末端に PDZ 結合モチーフをもつが、RPTP ファミリー内では、このモチーフは R5 サブファミリーに属する Ptpz と Ptprg だけに認められる。ユビキタスに発現する Ptprg に対し、脳神経系に強く発現し、かつシナプス画分に集積する Ptpz に関心が持たれた。

そこで我々は、Ptpz 欠損マウスの学習能力について解析を行い、本ノックアウトマウスが成熟依存的に海馬学習能力（モリス式水迷路）が低下していること、また、この行動表現型に対応するように、海馬 CA1 の長期増強(LTP)が異常に亢進していることを明らかにした。さらに我々は、Ptpz によって脱リン酸化される基質分子として Git1, p190RhoGAP, Magi1, PIST など複数同定することに成功し、そのうちのひとつ、Rho 活性を負に制御する p190RhoGAP に関して、状況恐怖条件づけ学習刺激 1 時間後、通常のマウスの海馬でチロシンリン酸化レベルが低下するのに対して、Ptpz 欠損動物では変化しないことを見いだした。このことから、学習刺激が入ると Ptpz の活性が亢進することで、p190RhoGAP/Rho/ROCK というアクチン細胞骨格の制御系を介してシナプス機能や可塑的変化の調節しているものと推測された。

2. 研究の目的: これまでの研究からは、学習刺激依存的にシナプスに局在する Ptpz が活性化することが考えられるが、これまで受容体型チロシンホスファターゼの活性化に繋がる分子機構は提示されておらず、シナプス部位で Ptpz の活性化する要因として ectodomain shedding の可能性を検討する。また既に幾つか同定されている Ptpz の基質分子について、脱リン酸化サイトやその機能的意義を同定し、シナプス可塑的変化に関わる Ptpz シグナリングを明らかにする。

3. 研究の方法: シナプス部位における Ptpz の活性化機構: 最近我々は、Ptpz が、MMP-9 やプラスミンによって細胞膜直上で特異的に切断される、ectodomain shedding を受けることを明らかにした。正常なマウス脳内には、Ptpz の分解フラグメントが蓄積しており、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 の脳室内投与によって分解断片量は減少することが確かめられている。

MMP-9 やプラスミン活性は、神経可塑的变化時に亢進することが知られている。Ptpz のホスファターゼ活性は、細胞外領域へのプレイオトロフィンといったリガンド分子の結合によって抑制されることから、この抑制的な細胞外領域が ectodomain shedding によって除去されることで、細胞内ホスファターゼ活性が上昇する可能性が考えられた。

1) まず脳組織を生化学的に分画し、シナプス画分に Ptpz の細胞内フラグメントが含有することをウエスタンブロット法により評価した。

2) 培養細胞では、メタロプロテアーゼによって細胞膜直上で切断された Ptpz は、さらにプレセニリン・ $\gamma$ -セクレターゼによって細胞質へと切り出され、核内に移行する様子が観察されている。学習刺激で生じた Ptpz の細胞内機能ドメインが、スパイン内部から神経細胞の核内にまで移行する可能性を同様に検討した。

3) 上述の仮説に従えば、Ptpz のプロセッシングは、学習刺激によって増強されるはずである。状況恐怖条件づけ学習を用いて、学習刺激の有無でのマウスの海馬組織におけるプロセッシングの程度を評価した。

4) 核内に移行した Ptpz の細胞内フラグメントが遺伝子発現を制御している可能性を検討するため、Ptpz を内因性に発現し、かつメタロプロテアーゼによるプロセッシングが確かめられている C6 細胞株に Ptpz の細胞内フラグメントの強制発現させ、DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現の変化を評価した。

5) 既に我々が Ptpz 基質分子として同定し、シナプス機能への関与が想定される Git1, Magi1 について、脱リン酸化サイトの同定を

行い、リン酸化修飾が分子機能に与える影響を解析した。また既に解析が終了している p190RhoGAP との脱リン酸化サイトと比較することで、Ptpz の基質特異性について酵素化学的な評価を行った。

#### 4. 研究成果

1) 脳組織を生化学的に分画し、ウェスタンブロット法によって Ptpz タンパク質成分の分布を解析した結果、Ptpz の細胞内フラグメントは神経シナプス後肥大部 (PSD) 画分に集積しており、本受容体がシナプス部位でプロテオリシスされていることが実証された。

2) 更に Ptpz の細胞内フラグメントは、脳組織から調整した核画分中にも多く検出され、Ptpz がシナプス膜近傍に局在する基質分子のリン酸化を制御しているだけでなく、生体内でもプロセッシング後、核内にまで移行していることが判明した。

3) 学習刺激の有無によって、Ptpz のプロテオリシスが変化するか検討したが、これまでのところ有意な差異は認められてない。この点に関して、海馬組織において学習刺激時に活性化する神経細胞の占める割合が少ないため、通常の生化学的なアッセイ手法では差異が検出されない可能性がある。今後、新たに Ptpz の分解断片末端を特異的に認識する抗体を調整し、この特異抗体と神経細胞の活性化の指標となる c-fos との共染色によって神経活動と Ptpz のプロテオリシスとの関係の評価する予定である。

4) Ptpz の細胞内フラグメントを過剰発現させた C6 細胞では、数多くの遺伝子産物の発現変化が検出されたが、それら中には、神経可塑性との関わりが想定される幾つかの分子が含まれていた。現在、Ptpz シグナリングとの関係を解析している。

5) Git1 及び Magi1 の脱リン酸化サイトを特定した。Git1 上には、4 箇所的主要なチロシンリン酸化サイトが明らかとなり、そのうち Tyr554 が Ptpz によって選択的に脱リン酸化されることが判明した。Magi1 については、Tyr373 と Tyr858 の 2 箇所の脱リン酸化サイトが判明した。興味深いことに、Ptpz による Tyr554 の脱リン酸化には、PDZ ドメインを介す Magi1 と Ptpz との会合が必要としてい

た。

既に明らかになっている p190RhoGAP のサイトとの比較によって脱リン酸化サイト間の相同性が認められた (下表参照)。そこで Git1 のシーケンスをモデルとして、周辺配列を置換した基質ペプチドシリーズを作成し、*in vitro* での評価を行った結果、Ptpz の良好な基質となるモチーフ配列は、Glu/Asp - Glu/Asp - Glu/Asp - Xaa - Ile/Val - pTyr - Xaa (Xaa は非酸性アミノ酸残基) であることを明らかにした。このモチーフ配列をプローブとし、公的データベースを検索した結果、新たに複数の基質候補が抽出された。そのうちのひとつ paxillin (Tyr118) については培養細胞で Ptpz の良好な基質となることが確認された (論文投稿中)。

		-6	-5	-4	-3	-2	-1		+1	+2	+3	+4	+5	+6
Git1	(Y554)	L	E	D	D	A	I	Y	S	V	H	V	P	A
p190	(Y1105)	N	E	E	N	I	Y	S	V	P	H	D	S	
Magi1	(Y373)	K	I	E	D	P	V	Y	G	V	Y	Y	V	D
Magi1	(Y858)	E	P	G	E	P	I	Y	I	G	H	I	V	P
paxillin	(Y118)	G	E	E	E	H	V	Y	S	F	P	N	K	Q

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

藤川顕寛, Consensus substrate sequence for Ptpz 第 9 回国際プロテインホスファターゼカンファレンス 2011 年 2 月 1-3 日 東京大学 (東京都)

[図書] (計 1 件)

藤川顕寛, 野田昌晴, 秀潤社学研メディカル 細胞工学 (2011) 612-618

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 受容体型チロシンホスファターゼ Ptpz の基質モチーフ及びその用途  
 発明者: 藤川顕寛, 野田昌晴  
 権利者: 自然科学研究機構  
 種類: 特許出願  
 番号: 2010-43147

出願年月日： 2010 年 2 月 26 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤川 顕寛 (AKIHIRO FUJIKAWA)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部

門・特別協力研究員

研究者番号： 5 0 4 1 4 0 1 6