

受容体型チロシンホスファターゼ PTP ζ の機能解析

Functional Analysis of Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase ζ

(日本生化学会推薦)

代表研究者

基礎生物学研究所 野田昌晴

National Institute for Basic Biology Masaharu Noda

Protein tyrosine phosphorylation plays crucial roles in various biological aspects. However, physiological functions of individual PTPs are poorly understood due to a lack of information concerning substrates of respective PTPs. Protein tyrosine phosphatase ζ (PTP ζ /RPTP β /Ptp β) is a receptor-type PTP predominantly expressed in the brain as a chondroitin sulfate proteoglycan. We previously revealed that PTP ζ binds pleiotrophin and midkine, closely related heparin-binding growth factors. We now developed a genetic method “yeast substrate-trapping system” to isolate substrates for PTPs, and successfully identified substrate molecules for PTP ζ including Git1 and p190 RhoGAP, together with many interacting molecules. RPTPs transduce the extracellular signals through the change of their PTP activity, however, our knowledge about the regulatory mechanism is still limited. We demonstrated that oligomers of pleiotrophin dose-dependently enhance the tyrosine phosphorylation of Git1. PTP ζ thus appears to be constitutively active in the monomeric form and negatively regulated by dimerization. Furthermore, we found that mutant mice deficient in PTP ζ exhibited enhanced long-term potentiation (LTP) in the CA1 region of hippocampal slices and impaired spatial learning abilities in an age-dependent manner. The enhanced LTP was canceled out by pharmacological inhibition of Rho-associated kinase (ROCK), a major downstream effector of Rho. These findings suggest that the lack of PTP ζ leads to aberrant activation of ROCK and resultantly to the enhanced LTP and learning impairments.

研究目的：

受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (RPTPs)は、その構造から R1-R8

までの 8 種類に分類されることが判っているが、それぞれの生理機能については、リガンド分子と基質分子の同定が困難なこともあり、判明しているものは少ない。本研究では中枢神経系に主に発現する PTP ζ (RPTP β , Ptp α と呼ばれ、PTP γ とともに R5 を構成する) について、基質分子を同定するとともに、それを用いて、リガンドによる PTP の活性調節機構を明らかにする。また PTP ζ 遺伝子欠損マウスの解析を通して、PTP ζ の関わる生命現象についての知見を得る。

研究経過：

①基質分子の同定

プロテインチロシンフォスファターゼ(PTP)ファミリーは、プロテインチロシンキナーゼ(PTK)とともに、さまざまな生命現象においてタンパク分子のチロシンリン酸化状態を制御するシグナル伝達分子としての役割を担うと推定されている。しかしながら、個々の PTP の役割はほとんど明らかになっていない。これには、それぞれの PTP の基質分子に関する情報が欠如していることに原因がある。数年前、PTP 基質分子トラップ変異体が開発され、いくつかの PTP について蛋白間相互作用をもとに基質分子が同定された。しかし、この方法によって同定された基質分子は、細胞内に豊富に存在し、且つ高度にチロシンリン酸化された分子に限られ、すべての PTP に適用することは困難であった。そのため、適用範囲の広い基質分子同定法の開発が待ち望まれていた。我々は遺伝学的手法を用いた PTP 基質分子の探索法、「酵母基質分子トラップ法」を開発した。本法は、酵母ツーハイブリッド法を基盤としているが、次の 2 点を改変することにより基質分子の同定を可能とした。1 つは、PTK として Src を誘導発現することにより、cDNA ライブラリー由来のタンパク (プレイ) をチロシンリン酸化した状態でスクリーニングを行うこと、2 つめは、PTP の基質分子トラップ変異体をベイトとして用いることである。この方法は、生体内における PTP と基質分子の結合、すなわち、個々の PTP に特有の基質分子認識機構に基づくタンパク間相互作用を利用しており、すべての PTP に適用可能であると考えられる。また、本法では、PTK 非誘導条件を用いることによって、PTP 分子と恒常的に結合する基質とは異なる分子の単離も同時に可能である。本法により同定された PTP ζ の基質分子 (Git1, p190 RhoGAP 等) と相互作用分子 (PSD-95 等) を Table 1 に示す。これらの分子情報は、今後の PTP ζ の役割を明らかにする研究において、重要な貢献をすると思われる。

②PTP ζ の活性調節機構

RPTPs は、細胞内に依存する PTP 活性の変化を通じて、細胞外の情報を細胞内へ伝達すると考えられているが、その活性制御機構の詳細は不明である。PTP ドメインの X 線結晶構造解析および RPTP の変異体を用いた細胞生物学的研究から、二量体化による RPTP の活性抑制モデルが提唱されているが、これらはいずれも非生理的条件下における研究である。また、このモデルを支持しない報告もある。我々は PTP ζ について、二量体化がその PTP 活性に及ぼす影響を、三つの手法を用いて検討した。PTP ζ の活性は、Ptp α の細胞内基質分子である Git1 のチロシンリン酸化レベルを指標に評価した。人工的ダイメライザーを用いて、PTP ζ の細胞内領域を細胞内で強制的に二量体化すると、Git1 のチロシンリン酸化レベルは、ダイメライザーの濃度および処理時間依存的に亢進した。また、野生型 PTP ζ 発現細胞を、PTP ζ の細胞外領域に対する抗体で処理した場合にも同様に、Git1 のチロシンリン酸化レベルは亢進し、このとき細胞膜上で PTP ζ のクラスターが形成される。さらに、PTP ζ のリガンドである pleiotrophin のオリゴマーを細胞に添加した場合にも、Git1 のチロシンリン酸化レベルが亢進した。以上の結果から、Ptp α は単量体としては恒常的に活性型であり、二量体化により不活性化すると考えられる。本研究は、二量体化によって RPTP が不活性化することを、生理的なリガンドと基質分子の組合せを用いて初めて示したものである。

③PTP ζ 遺伝子欠損マウスの解析

PTP ζ は脳において高い発現が見られるが、シナプス可塑性における役割は十分に分かっていない。我々が作成した PTP ζ 遺伝子欠損マウス (PTP $\zeta^{-/-}$) について、電気生理学的、薬理学的、行動学的な解析を行った。その結果、以下に示すように、海馬の可塑性について週齢依存的な異常が見出された。10 週齢以下の若いマウスにおいては、野生型マウス (PTP $\zeta^{+/+}$) との間に差異は見出されなかった。これに対し、成熟した欠損マウス (13 週齢以上) において、海馬の CA1 領域における長期増強 (LTP) の亢進が観察された (Fig. 1)。モリスの水迷路を用いた解析においても、高週齢の欠損マウスにおいて空間学習能力の低下が観察された。PTP ζ と相同性が高い PTP である PTP γ と、PTP ζ と機能的な類似性が示唆されている PTP α について、遺伝子欠損マウスにおける

発現量を解析したが、低週齢および高週齢いずれにおいても、野生型マウスとの間に発現量の差は見られなかった。一方、我々は PTP ζ の基質分子として、p190 RhoGAP を同定している（上記参照）。p190 RhoGAP は Rho の活性を制御していることから、高週齢の欠損マウスにおいて観察された異常が、Rho の情報伝達の異常により生じた可能性が考えられた。そこで、Rho の下流分子である、ROCK (Rho-associated kinase) の阻害剤を海馬スライスに作用させたところ、高週齢の欠損マウスで見られた長期増強の亢進が消失した。このことから、高週齢の PTP ζ 遺伝子欠損マウスにおいては ROCK の活性化が起こっており、その結果、長期増強の亢進と空間学習能の低下が生じると推定された。

<Fig. 1 挿入>

考察：

我々の研究によって、初めて PTP 全般に通用する基質分子の同定法「酵母基質分子トラップ法」が確立された。我々はこの方法を用いて PTP ζ の基質分子と結合分子を複数明らかにすることに成功した。この結果、初めて PTP ζ のリガンド分子と基質分子がセットで明らかとなり、RPTP の調節機構についての解析が可能となった。我々はプレイオトロフィン（リガンド）と Git1（基質）を用いて、RPTP の二量体化が PTP 活性の不活性化につながることを初めて実験的に示した。更に、PTP ζ 遺伝子の欠損したマウスの解析によって、13 週齢以降の海馬のシナプス可塑性に異常があることを見出すとともに、この異常が PTP ζ の基質分子である p190 RhoGAP の活性異常に基づくことを明らかにした。これらの研究成果は、遅れている RPTP の研究分野に、確実な進歩をもたらしたと言える。

研究発表：

口頭発表

1. 深田齊秀、藤川顕寛、野田昌晴；「Ptp α /PTP ζ /RPTP β の基質分子 Git1 の脱リン酸化サイトの同定」第 6 回プロテインフォスファターゼ国際カンファレンス（岡山、2004）
2. 深田齊秀、藤川顕寛、野田昌晴；「Ptp α による Git1 チロシンリン酸化レベルの調節」、第 1 回日本プロテインフォスファターゼ研究会学術集会（札幌、2003）
2. Masahide Fukada, Akihiro Fujikawa and Masaharu Noda；「Identification of tyrosine phosphorylation sites of Git1, a substrate for Ptp α 」、第 27 回日本神経

科学会（大阪、2004）

3. 野田昌晴 ; 「Physiological roles of protein tyrosine phosphatase receptor type Z」、FASEB Summer Research Conference (招待講演、Snowmass, USA, 2004)
4. 深田斉秀、藤川顕寛、野田昌晴 ; 「Ptprz による Git1 チロシンリン酸化レベルの調節」、第 27 回日本分子生物学会（神戸、2004）

誌上発表

1. Masahide Fukada, Hiroyuki Kawachi, Akihiro Fujikawa and Masaharu Noda; “Yeast substrate-trapping system for isolating substrates of protein tyrosine phosphatases: isolation of substrates for protein tyrosine phosphatase receptor type z” *Methods* **35**, 54-63, 2005.
2. Kazue Niisato, Akihiro Fujikawa, Shoji Komai, Takafumi Shintani, Eiji Watanabe, Gaku Sakaguchi, Goro Katsuura, Toshiya Manabe and Masaharu Noda; “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” *Journal of Neuroscience* **25**, 1081-1088, 2005.
3. Masahide Fukada, Akihiro Fujikawa, Shinya Ikematsu, Sadatoshi Sakuma and Masaharu Noda; “Negative regulation of Ptprz activity by dimerization” *Journal of Biological Chemistry*, submitted.

Table 1

Clones isolated as substrate candidates and continuously-interacting molecules for PTP ζ

Name	Structure	Interaction	Note
Git1		pY	ArfGAP
p190		pY	RhoGAP
PIST		pY	TC10-interacting protein
MAGI-1		pY and PDZ	Maguk family
PSD-95		PDZ	Maguk family
MAGI-3		PDZ	Maguk family
Veli-3		PDZ	Mammalian ortholog of LIN-7
Synj2bp		PDZ	Synaptojanin 2 binding protein
Syntrophin acidic1		PDZ	Synaptic adaptor protein
Syntrophin basic1		PDZ	Synaptic adaptor protein
MUPP1		PDZ	Multiple PDZ domain containing protein
Cardiac troponinT		N.D.	Cardiac troponin T isoform
hDKFZp434G232		N.D.	Putative protien
KIAA0167		N.D.	ArfGAP
SPOP		N.D.	Speckle-type POZ protein

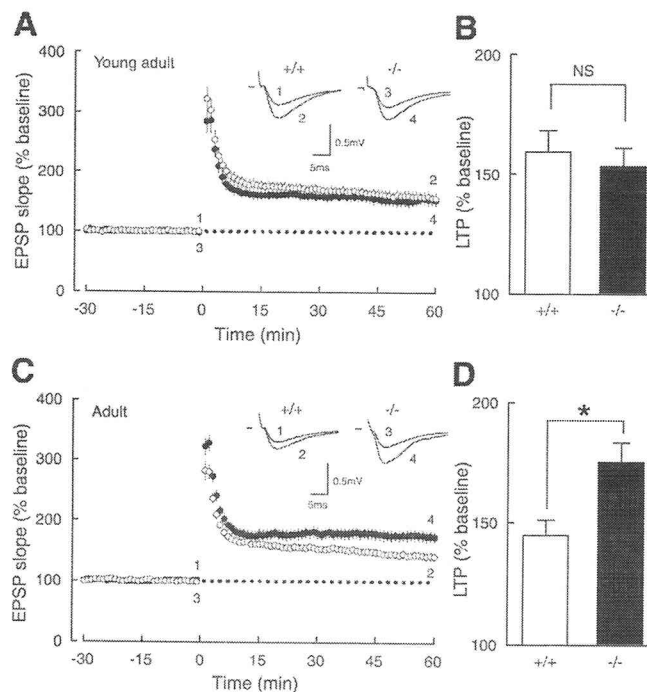


Fig. 1 Age-dependent enhancement of LTP in *PTP ξ* -deficient mice. *A*, The time course of LTP in young adult wild-type (○) and mutant (●) mice. *B*, Summary of LTP experiments in young adult mice. *C*, The time course of LTP in adult wild-type (○) and mutant (●) mice. *D*, Summary of LTP experiments in adult mice.