

論文の内容の要旨

論文題目

神経細胞接着分子 SHPS-1 の新規相互作用分子の同定と生理機能の解析

氏名 三橋 弘明

[序論]

神経一筋接合部は、神経と筋の間に形成されるシナプスであり、一つの神経末端が一つの筋を支配する比較的単純な構造をもつ。この神経一筋接合部に集積するシナプス関連タンパク質は、そのほとんどが支配神経切断（脱神経）によって大幅に発現量を増加することが知られている。これは、神経切断を回復するための代償反応と考えられている。

私は、神経一筋接合部に関わる新規遺伝子を探索することを目的に、脱神経筋の遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて解析し、候補遺伝子として SHPS-1 を同定した。SHPS-1 は免疫グロブリンスーパーファミリーの膜一回貫通型タンパク質であり、神経一筋接合部でのシナプス形成に重要な NCAM や MuSK とよく似た構造をしていた。また、SHPS-1 は、神経細胞と免疫細胞に顕著に発現しているが、特に神経系では、大脳新皮質、小脳分子層、海馬歯状回、網膜外網状層などシナプスが多い領域に発現している。これらのことから、私は SHPS-1 が神経細胞どうし、および神経一筋の間のシナプス形成に関わるタンパク質ではないかと推測した。しかし、神経や筋における SHPS-1 の役割は明らかになっていない。そこで、私は SHPS-1 の細胞内シグナル伝達経路を解明することで、その生理機能にせまるアプローチをとることにした。

[方法と結果]

SHPS-1 の骨格筋での性質を理解するため、脱神経筋と尾部懸垂筋における SHPS-1 の発現量を検討した。その結果、両方の筋で同程度の萎縮が起こるにも関わらず、尾部懸垂筋では SHPS-1 の発現量は増加しなかった。したがって、SHPS-1 の発現量増加が脱神経特異的であることが明らかとなった。このことから、SHPS-1 が廃用性萎縮ではなく、神経支配に関係していることが明らかとなった。そこで、神経—筋接合部マーカーであるアセチルコリン受容体(AchR)と比較して、SHPS-1 と神経支配の関係を検討した。SHPS-1 は、神経支配下では発現が抑制されており、タンパク質は神経—筋接合部などの一部の領域に局在し、翻訳後修飾を受けていることが明らかとなった。反対に、脱神経によって、SHPS-1 の発現量は増加し、細胞膜全体に存在するようになり、翻訳後修飾が少なくなった。こうした脱神経による発現量と局在の変化は、SHPS-1 と AchR の間でよく一致していた。これらの知見から、SHPS-1 が骨格筋の神経支配に密接に関係しており、神経—筋接合部の形成に関与した機能をもっている可能性が考えられた。

これまで、免疫細胞や線維芽細胞における SHPS-1 の機能は報告されていたが、骨格筋における機能はまったくわかっていない。そこで、骨格筋における SHPS-1 の機能を解明するため、私は SHPS-1 の細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることを目指した。SHP-2 と神経支配の間には関連が見られなかったため、私はより骨格筋機能に関連した新規 SHPS-1 相互作用タンパク質を探索することを試みた。酵母 2-ハイブリッド系を用い、ヒト胎児骨格筋 cDNA ライブラリーから、SHPS-1 の細胞内領域と相互作用するタンパク質をスクリーニングした。その結果、新規相互作用タンパク質として CHK を同定した。CHK は、c-Src を抑制する機能をもつ非受容体型チロシンキナーゼであった。

私はまず、SHPS-1 と CHK の結合を確認するため、免疫沈降実験をおこなった。COS-7 細胞に過剰発現させた系において、SHPS-1 と CHK の結合を確認した。また、この時、SHPS-1 と CHK を共発現すると、SHPS-1 のリン酸化が亢進することが明らかとなった。結合領域を特定するため、CHK の N 末端領域、SH3 ドメイン、SH2 ドメイン、キナーゼドメイン欠失変異体とキナーゼ不活性変異体(K262R)を作成し、酵母 2-ハイブリッド系でアッセイしたところ、N 末端領域を欠いた変異体のみが相互作用を示した。この結果からは、結合領域を特定することができなかったが、K262R が結合しなかった点から、少なくともキナーゼ活性が SHPS-1 との結合に必要であることが示唆された。私は、COS-7 細胞での共発現の結果と総合して、CHK が SHPS-1 をリン酸化し、リン酸化依存的に結合するという 2 段階の相互作用モデルを考えた。そこで、各ドメインの欠失変異体と K262R を COS-7 細胞に発現させ、細胞を過バナジン酸で処理した後に免疫沈降をおこなった。過バナジン酸処理は、SHPS-1 のチロシンリン酸化を引き起こす。免疫沈降の結果、SH2 ドメインを欠いた欠失変異体のみが SHPS-1 との結合を失った。したがって、CHK は SH2 ドメイン

によって SHPS-1 のリン酸化チロシンを認識して結合することが明らかとなった。さらに、CHK が SHPS-1 を直接リン酸化しているかを検討するため、*in vitro* でのキナーゼアッセイをおこなった。大腸菌に GST 融合タンパク質として発現させた SHPS-1 細胞内領域を基質とし、COS-7 細胞に過剰発現させた CHK を免疫沈降で精製して [γ - 32 P]ATP 存在下でインキュベートしたところ、CHK が SHPS-1 の細胞内領域をリン酸化することがわかった。CHK のホモログである Csk をクローニングし、SHPS-1 リン酸化能を比較した結果、Csk は SHPS-1 をリン酸化せず、CHK と Csk の間に機能差があることも明らかになった。

次に、私はリン酸化を受けた SHPS-1 の下流シグナルの検討をおこなった。上皮細胞や繊維芽細胞を用いた実験では、リン酸化された SHPS-1 は SHP-2 チロシンホスファターゼと相互作用して MAP キナーゼカスケードを調節することが知られている。免疫沈降の結果、CHK による SHPS-1 のリン酸化は SHPS-1 と SHP-2 の複合体形成を促進することが明らかとなった。しかしながら、その下流にある MAP キナーゼ Erk-1/2 の活性が変化することは、まだ確認できていない。

さらに、SHPS-1、CHK 相互作用の細胞内局在を知るために、EYFP、ECFP 融合タンパク質を作製し、マウス神経芽細胞株 Neuro2a に導入して局在を観察した。CHK は通常、細胞質に局在したが、SHPS-1 を共発現させることにより、顕著に細胞膜付近へ局在を変化した。同様の実験を、CHK 不活性変異体 K262R を用いておこなったが、K262R は SHPS-1 を共発現させても、局在を変化しなかった。このことから、CHK は SHPS-1 を足場として、細胞膜付近にアンカーすると考えられた。

[考察と展望]

今回、新規相互作用タンパク質として同定した CHK は、SHPS-1 をリン酸化するキナーゼであった。CHK は、SHPS-1 細胞内領域の 4 つのチロシンをリン酸化し、自身も N 末端側の 2 つのリン酸化チロシンを認識して結合するという、2 段階の相互作用を示すことが明らかとなった。また、CHK による SHPS-1 のチロシンリン酸化によって、SHPS-1/SHP-2 複合体の形成が促進された。これらのことから、SHPS-1 と CHK、SHP-2 の 3 者が一体となって、細胞外刺激に対するシグナル伝達を制御している可能性が示唆された。また、リン酸化された SHPS-1 によって、CHK が細胞膜付近に引き寄せられることが明らかになり、これまで謎だった CHK の膜移行のメカニズムが SHPS-1 によって制御されている可能性も示唆された。これらの発見は、新規な SHPS-1 キナーゼを同定した点、CHK の膜移行に関するモデルを提示した点、神経や骨格筋における SHPS-1 シグナル伝達経路の解明への糸口を示した点で重要であると考えられる。

SHPS-1 は、タンパク質の構造上、細胞接着分子または受容体としてはたらくと推測される。神経支配に関連し、脱神経特異的に増加する遺伝子の多くは、神経-筋接合部の形成に関わることが知られている。SHPS-1 はそうした遺伝子と同様に、神経切断によってリガンドが減少したことを補償するために増加している可能性がある。SHPS-1 はそれ自身が酵

素活性をもっていないため、チロシンキナーゼと共役する必要がある。CHKは神経終末からのリガンドに応答し、SHPS-1と共役して受容体チロシンキナーゼのようにシグナルを伝達するためのコンポーネントである可能性がある。

神経一筋接合部で最も重要なAchRの凝集は、c-SrcによるAchR β サブユニットのチロシンリン酸化が鍵となっていることが明らかになっている。AchR β のチロシンリン酸化が過剰でも不足でも、AchR凝集は不安定化してしまう。SHPS-1が、神経一筋接合部でCHKと相互作用するならば、CHKを効率的に細胞膜に移行させ、c-Srcの活性を調節してAchRの安定化に寄与している可能性がある。この可能性を確かめるため、現在、SHPS-1とCHKによるc-Srcの活性調節の検討と、マウス骨格筋におけるCHKの解析をおこなっている。