

論文審査の結果の要旨

三橋 弘明

骨格筋は、神経からの刺激を受けてはじめて運動することができる。骨格筋の分化や遺伝子発現もまた、神経性の因子によって制御されている。神経から筋への情報伝達がおこなわれる重要な場として、神経-筋接合部が挙げられる。神経-筋接合部は、神経と筋の間に形成されるシナプスであり、運動神経終末端から放出されたアセチルコリンを効率的に受容するため、アセチルコリン受容体が高密度に凝集している。アセチルコリン受容体の凝集は運動機能に不可欠であり、その異常は様々な運動機能の低下を伴う筋無力症の原因になる。また、MuSK や NCAM などのシナプス形成に関与するタンパク質群も神経-筋接合部に凝集しており、これらの遺伝子をノックアウトしたマウスは、運動失調を呈すことや、呼吸不全によって死亡することが知られている。神経-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という特徴をもっている。

本研究は、神経-筋接合部形成に関わる新たな遺伝子を探索することを目的とした。これまでに、SHPS-1 (Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase substrate-1)が、脱神経によって顕著に発現量を増加することが明らかになっていた。SHPS-1 は、神経-筋接合部でのシナプス形成に重要な NCAM や MuSK と同じ免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜一回貫通型タンパク質である。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、SHPS-1 が神経細胞どうし、および神経-筋の間のシナプス形成に関わるタンパク質である可能性が推測された。しかし、神経や筋における SHPS-1 の機能は明らかになっていないため、本研究では、SHPS-1 と神経支配の関係と、SHPS-1 の細胞内シグナル伝達経路に関わる相互作用分子の探索をおこなった。

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。両方の筋で同程度の萎縮が起こるにも関わらず、SHPS-1 は脱神経筋でのみ発現量を増加し、尾部懸垂筋では変化しなかった。このことから、SHPS-1 が廃用性萎縮ではなく、神経支配に関連して発現を促進す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係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、本研究では、SHPS-1 の細胞内シグナル伝達経路に注目した。ヒト胎児骨格筋 cDNA ライブラリーを用い、酵母 2-ハイブリッド系によって 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結果、新たな相互作用タンパク質として CHK (Csk-homologous kinase) 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。

SHPS-1 と CHK の結合を確認するため、まず最初に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 のチロシンリン酸化が亢進することが明らかとなった。次に、結合領域を特定するため、CHK の各ドメイン (N 末端、SH3 ドメイン、SH2 ドメイン) と GST を融合させたタンパク質を精製し、SHPS-1 との結合を GST-pull down アッセイによって検討した。その結果、SH2 ドメインが SHPS-1 との結合に必須であることが明らかとなった。SH2 ドメインはリン酸化チロシン結合ドメインとして広く知られているため、CHK が SHPS-1 のリン酸化チロシンを認識して結合している可能性が考えられた。そこで、SHPS-1 細胞内領域に存在する 4 つのチロシン残基をそれぞれフェニルアラニンに置換した変異体を作製し、CHK との結合を検討した結果、CHK は、SHPS-1 の N 末端側の第 1、第 2 チロシン残基を認識して結合してい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 の細胞内領域に存在する 4 つのチロシン残基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 が SHPS-1 を特異的にリン酸化することが明らかになった。

次に、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。上皮細胞や線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 の活性化には変化が見られなかった。

また、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。

本研究で、新たな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 と SHP-2 の複合体形成が促進された。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た。

以上、本研究は SHPS-1 が骨格筋の神経支配に関与することを明らかにし、さらに新規相互作用タンパク質 CHK を同定して、SHPS-1 の新たな細胞内情報伝達経路を明らかにしたものである。従って、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。