

氏 名 丹賀 直美

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2087 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The PTN-PTPRZ signal activates the AFAP1L2-dependent
PI3K-AKT pathway for oligodendrocyte differentiation:
Targeted inactivation of PTPRZ activity in mice

論文審査委員 主 査 教授 藤森 俊彦
教授 野田 昌晴
教授 吉田 松生
教授 武内 恒成 愛知医科大学 医学部

(様式3)

Summary of Doctoral Thesis

氏 名 丹賀 直美

論文題目 The PTN-PTPRZ signal activates the AFAP1L2-dependent PI3K-AKT pathway for oligodendrocyte differentiation: Targeted inactivation of PTPRZ activity in mice (PTN-PTPRZ シグナルはオリゴデンドロサイト分化のための AFAP1L2 依存的 PI3K-AKT 経路を活性化する: マウスにおける PTPRZ 活性の不活化)

Myelination is an essential feature of the vertebrate nervous system that electrically insulates axons, thereby enabling the saltatory conduction of nerve impulses. Oligodendrocyte precursor cells (OPCs) are the principal source of myelinating oligodendrocytes. The protein tyrosine phosphorylation of various signaling molecules, which is reversibly regulated by Protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPs), is crucial for regulating OPC differentiation to oligodendrocytes. FYN plays essential roles in the induction of OPC differentiation by phosphorylating multiple distinct substrates including p190RhoGAP. Protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ) is one of the most abundant PTPs in OPCs. PTPRZ dephosphorylates p190 RhoGAP, thereby acting as a counterpart of FYN.

Three PTPRZ isoforms are generated by alternative splicing from a single gene: two transmembrane isoforms, PTPRZ-A and PTPRZ-B, and one secretory isoform, PTPRZ-S (or phosphacan). All isoforms are heavily modified with chondroitin sulfate chains, and identified as chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) in the central nervous system. The chondroitin sulfate moiety on their extracellular domain of PTPRZ is essential for achieving high-affinity binding sites for the endogenous ligands such as pleiotrophin (PTN). It has been revealed that

PTPRZ functions to maintain OPCs in an undifferentiated state. The inhibition of PTPase by its ligand pleiotrophin (PTN) promotes OPC differentiation; however, the substrate molecules of PTPRZ involved in the differentiation have not yet been elucidated in detail.

I herein demonstrated that the tyrosine phosphorylation of AFAP1L2, paxillin, ERBB4, GIT1, p190RhoGAP, and NYAP2 was enhanced in OPC-like OL1 cells by a treatment with PTN: OL1 cells are OPC-like cells established by my laboratory. Among them, AFAP1L2, an adaptor protein involved in the PI3K-AKT pathway, exhibited the strongest response to PTN. Therefore, I focused on AFAP1L2 in my study.

PTPRZ dephosphorylated AFAP1L2 at tyrosine residues *in vitro* and in HEK293T cells. Immunoprecipitation experiments showed that AFAP1L2 stably associated with the intracellular region of PTPRZ (Z-ICR). Because a public database search suggested fourteen potential tyrosine phosphorylation sites in AFAP1L2, I generated a series of AFAP1L2-F₁₃-Y mutants, in which these tyrosine residues are replaced to phenylalanine residues except for one site. Co-immunoprecipitation experiments detected the binding of wild-type and F₁₃-Y54 AFAP1L2 to p85 α of PI3K, indicating that Tyr-54 is the primary phosphorylation site for its association with p85 α . The co-transfection of wild-type PTPRZ-B, but not the catalytically-inactive Cys to Ser (CS) mutant, significantly reduced the tyrosine phosphorylation levels of the eleven mutants, in which AFAP1L2-F₁₃-Y54 and -F₁₃-Y56 showed the most prominent decreases.

In OL1 cells, the knockdown of AFAP1L2 or application of a PI3K inhibitor, LY294002 suppressed cell differentiation as well as the induced phosphorylation of AKT and mTOR induced

by PTN. PTN also induced ERK1/2 phosphorylation and RhoA activation in OL1 cells, whereas LY294002 did not affect these responses, excluding the possibility of the non-specific actions of this reagent. These results suggested that AFAP1L2-dependent PI3K-AKT-mTOR activation is one of the key downstream reactions of PTN-PTPRZ signaling during OPC differentiation.

My laboratory previously reported the earlier onset of the expression of myelin basic protein (MBP), a major protein of the myelin sheath, as well as the earlier initiation of myelination in neonatal brains in *Ptpz*-deficient (null) mice than in wild-type mice. To assess the physiological significance of its PTPase activity, I generated a *Ptpz* knock-in mouse harboring a catalytically-inactive CS mutation in its PTPase domain. The phosphorylation levels of AFAP1L2, AKT, and mTOR were higher, and the expression of oligodendrocyte markers, including MBP and myelin regulatory factor (MYRF), was stronger in CS knock-in brains than in wild-type brains on postnatal day 10; however, these differences mostly disappeared in the adult stage. Adult CS knock-in mice exhibited earlier remyelination after cuprizone-induced demyelination through the accelerated differentiation of OPCs. These phenotypes in CS knock-in mice were similar to those in *Ptpz*-deficient mice.

In summary, I revealed that the PTN-PTPRZ signal stimulates OPC differentiation partly by enhancing the tyrosine phosphorylation of AFAP1L2 to activate the PI3K-AKT pathway. PTN-induced PTPRZ inactivation regulates multiple signaling pathways, in cooperation with FYN kinase, as a hub molecule that is essential for oligodendrocyte differentiation and myelination.

(備考)

- 1 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A 4 縦型とする。
- 2 和文で作成する場合は 2,000 字～3,000 字、英文で作成する場合は 700 語～2,000 語程度とする。
ただし、生命科学研究科に出願 (申請) する場合は、英文 700 語程度で作成すること。
- 3 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページ当たり 40 行で作成する。
- 4 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
- 5 タイトルと本文の間は、1 行空ける。
- 6 片面印刷とし、ホチキス止めをしないこと。
- 7 別紙の添付は不可。
- 8 ページ番号は入れないこと、また改行を行わないこと。
- 9 図表を挿入する際は、白黒印刷でも判別できるように配慮すること。
- 10 論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本要旨を総合研究大学院大学リポ
ジトリにおいて、インターネット公開する。

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 丹賀 直美

論文題目 The PTN-PTPRZ signal activates the AFAP1L2-dependent PI3K-AKT pathway for oligodendrocyte differentiation: Targeted inactivation of PTPRZ activity in mice

オリゴデンドロサイト(OL)は有髄神経の神経軸索を取り巻く髄鞘を形成しており、絶縁シートとして機能することで神経インパルスの跳躍伝導を可能にしている。OLはグリア細胞の一種であり、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)から分化・成熟する。細胞における情報伝達の基本的な仕組みであるタンパク質チロシンリン酸化は、OL細胞の分化調節にも密接に関わることが知られている。チロシンリン酸化は、プロテインチロシンキナーゼ(PTK)およびプロテインチロシンホスファターゼ(PTP)によって、可逆的に調節されている。FYNチロシンキナーゼは、細胞骨格系の制御に関わるRho/ROCK経路のネガティブ・レギュレーターであるp190RhoGAPなどを含む、複数のシグナル伝達分子をチロシンリン酸化することによってOLの細胞分化に重要な役割を果たしている。PTKの逆反応を担うPTPに関する研究は遅れてきたが、出願者の丹賀直美氏が所属する研究室では、受容体型PTPの一つであるPTPRZがOPCに強く発現しており、OLの分化制御に関わることを次のように明らかにしてきた。

*Ptprz*遺伝子からは3つのスプライシングアイソフォームが発現する。すなわち、2つの受容体型PTPアイソフォームであるPTPRZ-AとPTPRZ-B、そしてPTPRZ-Aの細胞外領域に相当する分泌型アイソフォームPTPRZ-S(Phosphacanとも呼ばれる)である。脳神経系に発現している全てのPTPRZアイソフォームは、多数のコンドロイチン硫酸鎖で修飾されている。PTPRZ受容体型アイソフォームにおけるコンドロイチン硫酸鎖修飾は、内因性の塩基性ペプチドリガンド分子であるpleiotrophin(PTN)などの高親和性結合に必須である。負電荷に富むコンドロイチン硫酸鎖に覆われたPTPRZ受容体は、細胞膜上で互いに反発することによってモノマーとして存在している。モノマー状態において細胞内PTPaseは活性状態にあり、これによってPTPRZの基質分子のリン酸化レベルは抑制され、OPCは未分化状態に留まっていると考えられる。ここに正電荷に富むPTNなどのリガンド分子が結合・集積するとコンドロイチン硫酸基に起因する静電的反発力が中和されて、PTPRZ受容体は集合し、二量体形成が始まる。その結果、細胞内PTPaseが不活化し細胞分化が促進される。しかしながら、OPCの分化制御に関わるp190RhoGAP以外のPTPRZの基質分子は不明であり、PTN-PTPRZシグナルの経路については多くが未解明であった。そこで丹賀氏は、OPC分化に関与するPTPRZシグナルの全容解明を目指し以下の研究を行った。

出願者は、研究室で樹立したOPCの形質を良好に保持したOL系譜細胞であるOL1細胞をモデル系として用いて、PTN刺激によってチロシンリン酸化レベルが亢進するタンパク分子の同定を行った。その結果、PTPRZの基質(候補)分子の中でAFAP1L2、paxillin、

ERBB4、GIT1、p190RhoGAP、およびNYAP2などが、PTN刺激によってチロシンリン酸化レベルが有意に上昇することを明らかにした。出願者は、これらのリン酸化レベルが上昇した分子の中で、OPC分化の制御に関わる主要なシグナル経路の一つであるPI3K-AKT経路に密接に関係するアダプタータンパク質であるAFAP1L2に注目した。

最初の取り組みとして、PTPRZの基質補足変異体による共沈実験や精製タンパクを用いた*in vitro*での脱リン酸化実験によってAFAP1L2がPTPRZの基質であることの証明を行った。引き続き、PTPRZによる脱リン酸化サイトを同定した。AFAP1L2内でリン酸化を受ける可能性のある14個のチロシン残基について点変異体を作成し、HEK293T細胞に発現させることによって、13個のチロシンリン酸化サイトを同定した。とくに54番目と56番目のチロシン残基(Y54およびY56)のリン酸化修飾がPTPRZによって顕著に脱リン酸化されること、また、リン酸化Y54が、PI3Kのp85 α ユニットのSH2ドメインに対するAFAP1L2中の唯一の結合サイトであることを明らかにした。その結果、PTPRZによる脱リン酸化によってPI3K-AKT経路が抑制的に制御される可能性が明らかになった。さらに、OL1細胞において、AFAP1L2のノックダウンとLY294002 (PI3K阻害剤)によるPI3K-AKT経路の薬理的阻害の効果を検討した。AFAP1L2ノックダウンとLY294002による阻害は、PTN刺激で誘導されるAKTおよびその下流のmTORのリン酸化を共に抑制するとともに、PTN刺激で促進されるOL1細胞の分化を抑制することを明らかにした。このように、AFAP1L2は、PI3K-AKT-mTOR経路の活性化を通じて、PTN刺激によるOL1細胞の分化誘導に関わる分子であることが明らかになった。

出願者はさらに、これらの細胞レベルで明らかにした事象が、個体レベルでも起きている生理的なものであることの証明に取り組んだ。PTPRZの全てのアイソフォームを発現しないヌルノックアウトマウス(*Ptprz-KO*)では、生後発達期の脳内で、ミエリン鞘の主要タンパク質であるmyelin basic protein (MBP)の発現や髄鞘形成が早まっていることがすでに明らかにされていたが、その表現型に対するPTPase活性の関与については不明であった。そこで、PTPドメインの活性中心のCys残基をSer残基へと変換したPTPase不活性型変異ノックインマウス(*Ptprz-CS*)を作出し解析した。その結果、*Ptprz-CS*マウスでは、*Ptprz-KO*マウスと同様にMBP、およびその発現調節因子MYRFの発現ピークが早まっており、AFAP1L2、AKTとmTORやp190RhoGAPのリン酸化レベルが亢進していることが明らかになった。また、成熟マウスを用いたクプリゾン誘発性脱髄モデルにおいて、*Ptprz-CS*マウスでは*Ptprz-KO*マウスと同様に、髄鞘再生が早いことを証明した。

このように出願者は、オリゴデンドロサイトの分化に関わるPTN-PTPRZシグナルの下流の新規の基質分子群を同定するとともに、その中でPI3K-AKTという主要な分化経路に結びつける鍵分子であるAFAP1L2について、チロシンリン酸化による分子機能制御の詳細と細胞分化において果たす役割を明らかにした。さらに*Ptprz-CS*マウスを作出し、そのPTPase活性の生理的重要性を実証することに成功した。本研究はオリゴデンドロサイトの分化機構に対する理解を大きく前進させるものであり、本研究論文は学位授与に値すると審査員全員一致で判断した。