

氏 名 井原 賢

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1005 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 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 Eph 受容体の自己活性化を制御する脱リン酸化酵素 Ptpro
の同定と、その網膜視蓋投射系における役割

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 野田 昌晴
教授 小林 悟
教授 藤澤 肇（名古屋大学）

論文内容の要旨

神経回路網の形成は高次神経機能発現のための基盤であり、その複雑な分子機構の解明は神経科学における最重要テーマの 1 つである。網膜視蓋投射系 (retinotectal system) は特異的神経結合が形成される仕組みを解明するための研究材料として昔から盛んに使用されてきた。網膜視蓋投射における分子機構の全容を明らかにするためには、それに関わる分子群を網羅的に同定し総合的な解析を進めることが有効な手段であると考えられる。統合神経生物学研究部門ではこれまでに、Restriction landmark cDNA scanning (RLCS) 法を用いて、発生期のニワトリ網膜において領域特異的に発現する遺伝子を多数同定してきた。RLCS 法によって単離されてきた遺伝子の中には、遺伝子の発現調節を行なう様々な転写調節因子群、細胞間の情報伝達に機能する分泌性因子群に加えて、膜タンパク質群、細胞内情報伝達に関わる酵素群および細胞内骨格系の分子群などの、ガイダンスに直接的、間接的に関与すると思われる分子群が多数含まれていた。彼は本研究において領域特異的な投射形成過程において視神経成長円錐内にどのようなシグナル伝達機構が働いているかを明らかにするために、RLCS 法で単離されてきた分子を中心に視神経軸索ガイダンスに関わる分子の分子間相互作用を mammalian two-hybrid 法によって網羅的に解析した。Mammalian two-hybrid 法は、哺乳類培養細胞を用いて二つのタンパク質の相互作用を調べる方法である。その結果、これまでに知られていなかった分子間相互作用を複数検出することができた。この中には、EphB2 と Ptpro の相互作用が含まれていた。

Eph 受容体は、そのリガンドである ephrin の結合に伴うチロシン残基の自己リン酸化によって活性化する。しかしながら、Eph 受容体を負に制御するプロテインチロシンホスファターゼ (PTPs) は、これまで不明であった。彼は、Ptpro が Eph 受容体の自己活性化を抑制する PTP ではないかという仮説のもとに解析を進めた。まず初めに PTP の Substrate-trapping mutant を用いた解析によって、Ptpro と Eph 受容体の特異的な相互作用を明らかにした。続いて、Ptpro が Eph 受容体ファミリーのサブファミリーである EphA 受容体と EphB 受容体の両方を効率よく脱リン酸化することを明らかにした。培養細胞に種々の受容体型 PTP と Eph 受容体を共発現させると、Eph 受容体の脱リン酸化は、Ptpro のみによって特異的に行われ、他の PTPs は Eph 受容体を脱リン酸化しなかった。この結果から、Ptpro によって Eph 受容体が基質として特異的に認識されていることが強く示唆された。

生化学的な解析から、Ptpro は Eph 受容体の膜近傍領域の特定のリン酸化チロシンを脱リン酸化することが明らかとなった。膜近傍領域のチロシンは Eph 受容体のファミリー分子間で保存されており、そのリン酸化は Eph 受容体の活性化と下流へのシグナル伝達に必須とされている。従って、Ptpro は活性化状態にある Eph 受容体の量を調節していると考えられた。彼はさらに解析を進め、ephrin-A2 を用いて stripe アッセイと collapse アッセイを行なうことにより、Ptpro が視神経軸索の ephrin-A2 への感受性を調節していることを実証した。Stripe アッセイとは、視蓋の前側または後ろ側から調製した膜面分のカーベットをニトロセルロースフィルター上に交互に stripe 状に敷き詰めて、その上に網膜組織片を置いて軸索を伸長させる実験系であり、成長円錐は視蓋

前側の膜画分と後ろ側の膜画分を選択しながら伸長することになる。今回の stripe アッセイでは、視蓋の膜画分の代わりに ephrin-A2 を用いており、成長円錐は ephrin-A2 が吸着したカーペットと吸着していないカーペットを選択しながら伸長することになる。collapse アッセイとは、成長円錐の退縮(collapse)と呼ばれる形態変化を指標にして成長円錐の伸長を阻害する分子を同定するための簡便なアッセイ系である。今回の collapse アッセイでは ephrin-A2 を網膜から伸長した視神経に対して加えて、成長円錐の形態変化を観察している。Ephrin-A2 を用いた stripe アッセイの結果から、Eph 受容体の発現量(活性)がもともと高い網膜耳側からの軸索が、野生型 Ptpro (Ptpro(WT))の過剰発現により本来の ephrin に対する感受性を失うこと、および、Eph 受容体の発現量(活性)がもともと低い網膜鼻側からの軸索が、ドミナントネガティブ変異体 Ptpro (Ptpro(DA))の強制発現により ephrin に対する感受性を獲得することが示された。Collapse アッセイからも同様の結果が得られた。以上の結果は Ptpro が視神経軸索の ephrin-A2 への感受性を調節していることを示している。

最後に、視神経における Ptpro による Eph 受容体の活性調節の生理的意義を明らかにするために、ニワトリ胚を用いて in vivo の網膜視蓋投射への影響を調べた。Ptpro(WT)の過剰発現または Ptpro(DA)の強制発現や、RNAi を用いた Ptpro の発現抑制を行なうことによって、網膜視蓋投射における異常の有無を解析した。Ptpro(WT)をニワトリ胚網膜に過剰発現させた場合、EphA3 の発現量(活性)の高い網膜耳側からの軸索は、正しい投射位置(視蓋前側)を越えて視蓋の中程まで伸長し、まばらな arbor を形成していた。これは Ptpro の過剰発現により、Eph 受容体の活性化が抑制されたためであると考えられる。一方、Ptpro(DA)を強制発現させた場合、あるいは Ptpro の発現抑制を行った場合、本来視蓋後側で arbor を形成する網膜鼻側からの軸索は、視蓋前側でも arbor を形成した。同時に、背側網膜からの軸索は、arbor の形成位置が視蓋背側方向へ拡散した。これは、それぞれ、Eph 受容体が Ptpro(DA)のドミナントネガティブ効果、あるいは Ptpro の発現抑制によって、本来の状態よりも強く活性化されたためであると考えられる。

本研究において、彼は、1)Ptpro が Eph 受容体の自己活性化を抑制する特異的な脱リン酸化酵素であること、2)Ptpro が Eph 受容体の活性を制御することによって網膜視蓋投射において重要な役割を担っていることを明らかにした。本研究は、Ptpro が Eph 受容体の活性を調節するホスファターゼであることを、in vitro と in vivo の両方で示した初めての研究である。

論文の審査結果の要旨

本論文は、受容体型プロテインチロシンホスファターゼである **Ptpro** が、受容体型プロテインチロシンキナーゼである **Eph** を基質として脱リン酸化しその活性を負に制御すること、並びに、この制御を通して **Ptpro** が網膜視蓋投射形成において重要な役割を担っていることを明らかにしたものである。

申請者は、網膜において領域特異的分布を示す多数の分子について分子間相互作用の有無を解析した結果、**Ptpro** の基質トラップ型変異体と **EphB2** が安定に結合することを見出した。野生型 **Ptpro** は **EphB2** と安定な結合を示さないことから、申請者は **Ptpro** が **Eph** 受容体を基質とするプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) であると考え研究を進めた。まず、生化学的、並びに細胞生物学的解析により、**Ptpro** が **Eph** 受容体の2つのサブファミリーである **EphA** 受容体と **EphB** 受容体の両方を基質とする PTP であることを明らかにした。また、**Ptpro** が、**Eph** 受容体の過剰発現時に起こる自己集合による自己活性化トリガンドである **ephrin** 刺激による活性化の両方を抑制することを証明した。さらに、その分子メカニズムについて解析を進めた結果、**Ptpro** が **Eph** 受容体の膜近傍領域の特定のリン酸化チロシンを脱リン酸化することを明らかにした。膜近傍領域のチロシンは **Eph** 受容体のファミリー分子間で保存されており、そのリン酸化は **Eph** 受容体の活性化のトリガーとしての役割を担っている。従って、**Ptpro** は **Eph** の活性化の制御を担う重要な分子であると推定された。

申請者は続いて、網膜視蓋投射系を用いて、**Ptpro** が果たす軸索ガイダンスにおける役割について検証した。まず、器官培養したニワトリ網膜から伸長した視神経軸索を用いて **ephrin-A2** に対する反応性を解析し、**Ptpro** が視神経軸索の **ephrin-A2** に対する感受性を調節する活性があることを明らかにした。さらに、ニワトリ胚の発生期網膜に対して、野生型 **Ptpro** の過剰発現、ドミナントネガティブ型 **Ptpro** の強制発現、あるいは RNAi を用いた **Ptpro** の発現抑制を行なうことによって、*in vivo* の網膜視蓋投射形成に与える影響を解析した。その結果、**Ptpro** の発現量や活性の変化に対応して、視神経の視蓋への投射パターンが変化することが観察され、個体レベルにおいても **Ptpro** が **Eph** 受容体の活性制御を通して神経回路網形成において重要な役割を果たしていることを示すことに成功した。

以上、本研究は **Eph** 受容体の活性化を制御する PTP を初めて同定したものであり、**Ptpro** による **Eph** の活性制御のメカニズムを明らかにするとともに、**Ptpro** が領域特異的神経投射において重要な役割を担っていることを個体レベルで実証したものである。**Eph-ephrin** 系は多くの生命現象において重要な役割を果たしており、本研究は神経発生生物学領域にとどまらず、血管形成、癌の悪性化等多方面に対して影響力のある研究成果として高く評価される。従って、本論文は学位論文に値するものと審査員全員一致で判断した。