

(様式4)

学位論文の内容の要旨

氏名 神宮 大輝 印

(学位論文のタイトル)

Protein tyrosine phosphatase Shp2 positively regulates cold stress-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in neurons

(タンパク質チロシン脱リン酸化酵素Shp2は、神経細胞において低温ストレス誘導性SIRP α チロシンリン酸化を促進的に制御する)

(学位論文の要旨)

恒常性を外れた体温低下は人体に有害であるが、低温には生体保護作用もあり、脳虚血に対する低体温療法などに応用される。しかし、哺乳類細胞の低温応答についての研究はまだ十分に進められていない。今後、低温での細胞応答を解析することで、通常の生理的条件下では見出されない未知の生体制御機構の発見と理解につながると期待される。

神経細胞に発現する膜タンパク質 SIRP α (Signal regulatory protein α) は、細胞内にリン酸化を受けるチロシン残基を持ち、リン酸化を受けると細胞質型タンパク質チロシンホスファターゼ (PTPase) Shp2 と結合して、これを活性化する。SIRP α 欠損マウスを用いた解析から、SIRP α は脳高次機能に関わるシグナル分子であると考えられているが、どのような条件下で脳内 SIRP α がリン酸化するのかは十分に分かっていなかった。この点について、低温が SIRP α のチロシンリン酸化を強く誘導することが *in vitro*, *in vivo* の両方で明らかとなり、SIRP α は哺乳類神経細胞の低温ストレス応答性シグナル分子として機能することが示された。しかしながら、低温による SIRP α リン酸化誘導のメカニズムや、その生理的意義については、まだ明らかでない。本研究では、低温による SIRP α リン酸化誘導のメカニズムの解明に取り組んだ。

先行研究では、マウス胎仔脳から調製した初代培養神経細胞において、数分程度の低温 (23°C) 処理で、SIRP α リン酸化が強く誘導されることが示されていた。本研究で、より長時間の低温暴露への応答を、リン酸化 SIRP α 特異的抗体を用いた生化学的解析で検討したところ、24 時間低温培養した神経細胞でも、SIRP α リン酸化増加が認められ、低温では長時間にわたり高リン酸化状態が維持されることがわかった。また、これまで、マウスを用いた *in vivo* の解析から、低温による SIRP α リン酸化には、Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) の活性化が重要であると報告されていたが、今回、*in vitro* の解析では低温で SFK の活性化は認められず、さらに、SFK 阻害剤存在下では、SIRP α リン酸化は全体的に低下するものの、低温によるリン酸化増強は依然として観察された。これらのことから、少なくとも *in vitro* において、SFK の活性化が低温による SIRP α リン酸化増加の原因でないと考えられた。一方、非選択的 PTPase 阻害剤 pervanadate の存在下では、通常とは逆に、低温で SIRP α リン酸化が抑制された。Pervanadate 処理により PTPase 活性は強く抑制され、SIRP α のリン酸化状態は主にタンパク質チロシンキナーゼ (PTK) によってのみ決定されると考えられることから、この実験結果は、SIRP α をリン酸化する PTK が、低温でむしろ活性が低下することを示しており、PTK 活性化では低温誘導性 SIRP α リン酸化は説明できないと考えられた。別のメカニズムとして、SIRP α を脱リン酸化する PTPase が、低温で不

活性化する可能性を考えた。SIRP α と結合する Shp2 は、SIRP α を脱リン酸化することも報告されているため、Shp2 の選択的アロステリック型阻害剤 (Shp2 を不活性型の分子構造に固定) である SHP099 の効果を検討したところ、予想に反し、SHP099 はコントロール条件 (37°C) と低温の両方で、SIRP α のリン酸化を強く抑制した。一方、競合型阻害剤 NCS-87877 (Shp2 の活性中心に結合) は、SIRP α リン酸化に影響しなかったことから、SHP099 の作用は、PTPase の触媒活性そのものには依存しないと考えられた。これらの結果から、Shp2 が SIRP α を脱リン酸化し、低温はこの作用を抑制する、というモデルは妥当でないと考えられた。一方で、神経細胞では、Shp2 が SIRP α リン酸化を促進的に制御する可能性が新たに見出された。この点を *in vivo* でも検討するために、強制水泳で低体温を誘導したマウスの脳サンプルで、SIRP α リン酸化を検討したところ、コントロールマウスに比べて神経細胞特異的 Shp2 遺伝子破壊マウスの脳では、SIRP α リン酸化が減少し、*in vivo* においても Shp2 は SIRP α リン酸化を促進的に制御することが分かった。

今回の結果から、Shp2 は低温誘導性 SIRP α リン酸化を促進すると考えられる。アロステリック型の Shp2 阻害剤が SIRP α リン酸化を抑制し、競合型阻害剤は影響を与えなかったことと、Shp2 欠損マウスでの結果と合わせて考えると、SIRP α リン酸化促進には活性化型 Shp2 分子が必要であり、その PTPase 活性には依存しないと考えられる。低温条件で活性化型 Shp2 の SIRP α リン酸化部位への結合が、SIRP α を脱リン酸化から保護して、リン酸化状態を高く維持する可能性などが考えられる。今回の結果は、神経細胞の低温応答を理解するための基盤的知見を提供するものとなる。