

トピックス

寒冷曝露によってチロシンリン酸化の亢進するタンパク質の解析

—BIT/SHPS-1と自律神経

大阪大学蛋白質研究所・体内環境統合蛋白質研究室

奥村 宣明, 谷口 裕幸, 谷田 守, 濱田 樹里,
中畑 泰和, 奥村 明子, 永井 克也

はじめに

BIT/SHPS-1は一回膜貫通型の糖タンパク質で、神経細胞表面に存在する糖タンパク質抗原として^{1,2)}、あるいは神経細胞間の細胞接着に関与するタンパク質として^{3,4)}、またチロシンホスファターゼSHP-2と結合するチロシンリン酸化タンパク質として^{5,6)}、複数のグループによって独立に見い出された。そのため、BIT, SHPS-1, p84 neural cell adhesion molecule, SIRP- α , MFRなど複数の名称が使用されているが、本稿ではBIT/SHPS-1と表記することにした。

BIT/SHPS-1にはインスリン受容体やEGF受容体などの作用を抑制する働きや⁶⁾、細胞接着や細胞運動を調節する働きなどがあるが⁷⁾、それらについては他の文献を参照していただくこととし、本稿では視床下部における作用、特に寒冷曝露に対する反応、および自律神経調節との関連の可能性を中心に述べたい。

1. BIT/SHPS-1の構造とシグナル伝達

BIT/SHPS-1は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質で、細胞外ドメインに3個の免疫グロ

ブリン様(Ig)ドメインをもつ(図1)。細胞外ドメインにはIntegrin-associated protein(IAP)/CD47が結合し^{8,9)}、細胞運動に関与することが示唆されている⁷⁾。一方、細胞内ドメインにはImmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif(ITIM)があり、インスリンやBDNFなどの受容体型チロシンキナーゼを介して作用する因子^{5,10)}、あるいはインテグリンなどの細胞接着因子の刺激によってチロシンリン酸化され¹¹⁾、チロシンホスファターゼSHP-

2のSH2ドメインと結合する。

近年、ITIMを持つタンパク質として、免疫系に発現するCTLA4やly-49/KIR、あるいはシアル酸結合タンパク質のsiglecファミリーなど、数多くのタンパク質が見い出されている^{12,13)}。ITIMを持つタンパク質はNK細胞などでSHP-2の活性化を介して細胞の活性化を抑制するためにその名前があるが、SHP-2にはMAPKカスケードを活性化する働きもあり¹⁴⁾、ITIMが常に“inhibitory”に働くとは限らない。ITIMとよく似たモチーフにImmunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)があり、CD3, CD79, Fc γ receptorなどの細胞内ドメインに存在して免疫細胞活性化のシグナル伝達系を構成するが、SHP-2とは結合しない。

ITIMやITAMはSrcファミリーチロシンキナーゼの基質となる。ラットの眼に光を当てると、網膜において光のon/offに伴いBIT/SHPS-1のチロシンリン酸化が可逆的に変化するが¹⁵⁾、こ

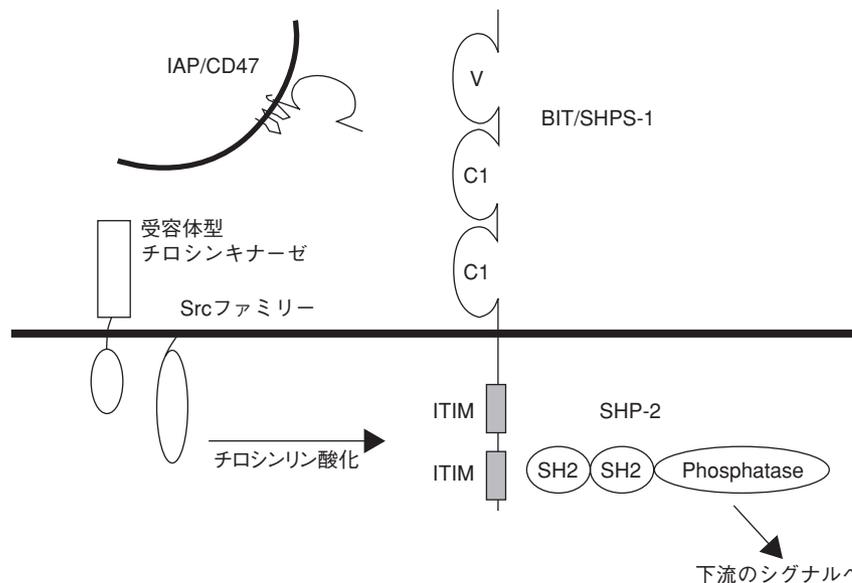


図1 BIT/SHPS-1の構造
BIT/SHPS-1は、Srcファミリーチロシンキナーゼ、あるいは受容体型チロシンキナーゼによってチロシンリン酸化され、SHP-2のSH2ドメインに結合する。

れはSrcファミリーの特異的阻害剤であるPP2によって抑えられる。またPP2はそのbasalなチロシンリン酸化レベルを抑えることから、そのリン酸化レベルは少なくとも網膜ではSrcファミリーキナーゼとチロシンホスファターゼのバランスによって調節されていると考えられる。

2. 概日リズムとBIT/SHPS-1

哺乳類では概日リズムの中樞は視床

下部視交叉上核 (SCN) に存在する。SCNではPer1, Cry1, Clock, BMALなどがフィードバック型の転写調節機構によって約24時間周期の遺伝子発現のリズムを発生し、これが明暗などの情報によって環境のリズムに同調し、最終的に摂食や睡眠などのリズムを形成する。

我々は光による体内時計の同調に関与するタンパク質の検索を目的としてSCNにおけるタンパク質リン酸化の解

析を行い、チロシンリン酸化が明期に高く暗期に低く、暗期に光を当てると亢進する約90kDaのタンパク質を見出した。解析の結果、このタンパク質はBIT/SHPS-1であった¹⁶⁾。

BIT/SHPS-1のチロシンリン酸化は、BIT/SHPS-1の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体1D4によって誘導することができる。この抗体を第三脳室に投与して行動のリズムをモニターすると、光による同調と同様の

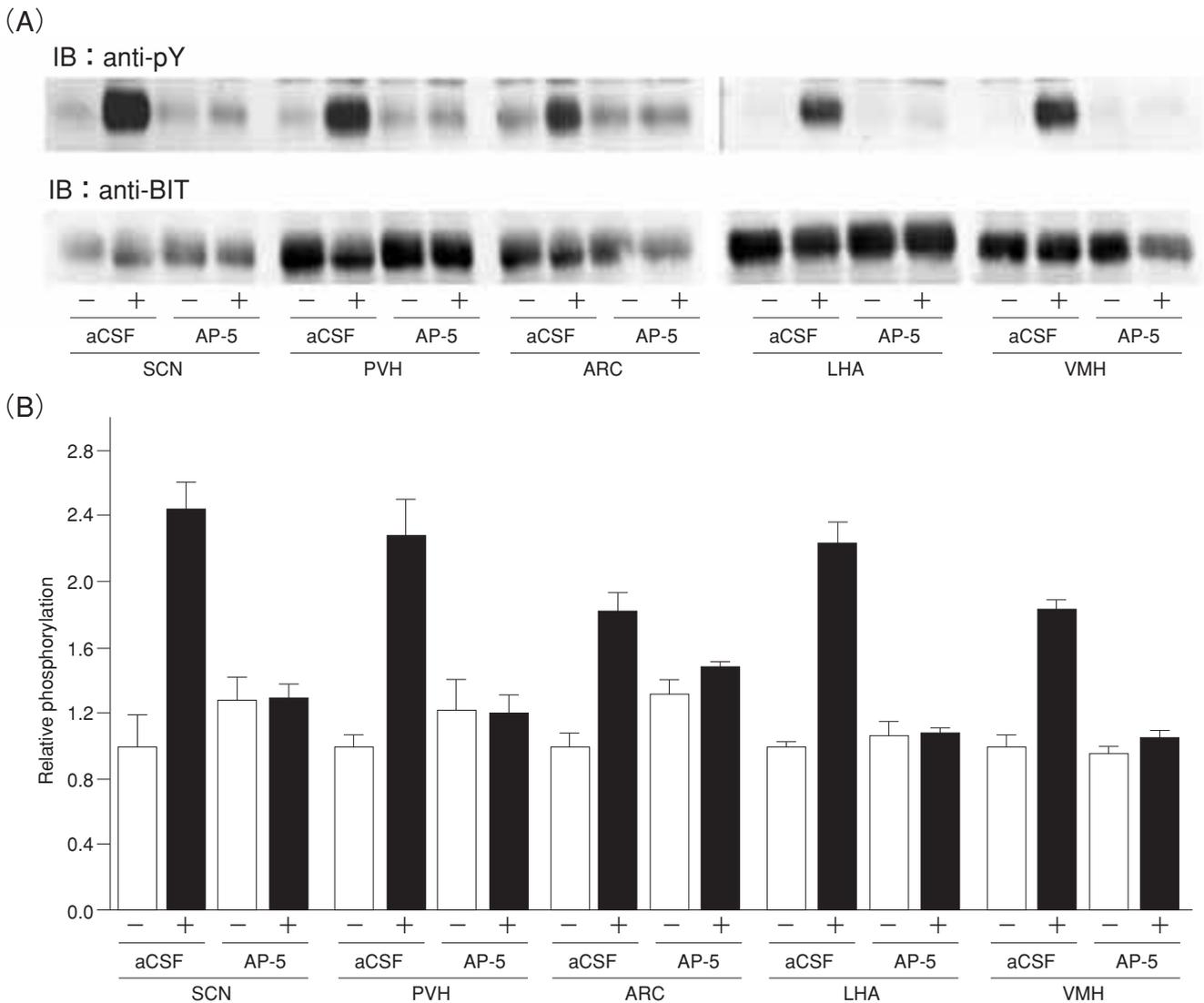


図2 寒冷曝露によるBIT/SHPS-1のチロシンリン酸化

(A) ラット側脳室に人工脳脊髄液 (sCSF) またはAP-5を投与し、その10分後より4時間、4℃で寒冷曝露を行った。その後、脳を取り出し凍結し、切片を作成して、視床下部視交叉上核 (SCN)、室傍核 (VMH)、腹内側核 (VMH)、外側視床下野 (LHA)、弓状核 (ARC) を切り出し、抗ホスホチロシン抗体を用いてそれらの部位におけるBIT/SHPS-1のチロシンリン酸化レベルを解析した。(B) はそれを定量化したもの (Taniguchi et al. : Biochem Biophys Res Commun 2004, 319 : 178-184より)

位相変化が見られた¹⁷⁾。詳しい機構は明らかではないが、MAPKのリン酸化がやはりBIT/SHPS-1と同様のパターンを示すことから¹⁸⁾、BIT/SHPS-1のチロシンリン酸化がSCNにおけるMAPK活性化の一因である可能性が考えられる。

3. 寒冷曝露とBIT/SHPS-1

SCNはまた、自律神経に対しても大きな影響を持つと考えられる。このことは、SCNを破壊すると2-deoxy-D-glucose (2DG)やL-カルノシンなどによる自律神経の活動変化が消失することなどから示唆される^{19, 20)}。また、Pseudorabies virusを用いて神経細胞を多シナプス性に逆行性ラベルすると、副腎などの末梢の臓器から交感・副交感神経の節前・節後線維を經由し、さらに数段階のニューロンを経てSCNに至る神経回路の存在が確認される²¹⁾。

そこで、側脳室に2DGを投与してSCNにおけるBIT/SHPS-1のチロシンリン酸化レベルを調べると、その亢進が認められた。このことから、SCNを介した交感神経の活性化に伴ってBIT/SHPS-1がリン酸化する可能性が示唆された。

視床下部を經由した交感神経系の活性化はほかにもさまざまな条件で起こりうるが、そのひとつに寒冷曝露がある。そこで、寒冷曝露時におけるBIT/SHPS-1のチロシンリン酸化について検討したところ、寒冷曝露開始後数十分～数時間の間、チロシンリン酸化が著しく亢進していた²²⁾。このときのチロシンリン酸化は、SCNのみならず、室傍核、腹内側核、弓状核など視床下部の広範囲の神経核で起こっていた。この寒冷曝露によるチロシンリン酸化は、NMDA受容体のアンタゴニストでブロックされることから、

NMDA受容体が関与することが示唆された。

そこで、さらに前述のモノクローナル抗体1D4を脳室内に投与し、腎臓に入力する交感神経の電気活動について検討した結果、交感神経の活性化とともに、血圧、体温の上昇が見られた。以上のことから、BIT/SHPS-1のチロシンリン酸化が交感神経系の活性化を誘導することが示唆された。

おわりに

以上のように、BIT/SHPS-1は視床下部において、寒冷曝露をはじめとするさまざまな刺激に伴ってリン酸化し、概日リズムならびに自律神経調節に関わっている可能性が示唆された。BIT/SHPS-1は、SHP-2との結合、MAPKの活性化などを通して、概日リズム関連遺伝子の発現調節や、神経細胞の活動の調節を行うことが考えられる。

BIT/SHPS-1が自律神経や体内時計を調節する分子機構は明らかではないが、その下流にあるSHP-2に関してはエネルギー代謝との関連が指摘されている。すなわち、レプチンがOb-Rbと結合するとそのY1138とY985がリン酸化され、Y1138はSTAT-3と結合する一方、Y985はSHP-2と結合し、MAPKの活性化やc-fosの発現を誘導する²³⁾。さらに、コンディショナルノックアウト法により脳のSHP-2を特異的にノックアウトすると、体重の増加とともに、血中のグルコース、インスリン、レプチンのいずれもが上昇すると報告されている²⁴⁾。したがって、SHP-2の活性化を介して、BIT/SHPS-1がエネルギー代謝に影響を与える可能性も考えられる。ただし、SHP-2はほかにも多くのシグナルと関与しており、BIT/SHPS-1の神経細胞における機能についてはさらなる解析が必要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたりまして、終始御助言と御協力を下さいました、三菱化学生命科学研究所の佐野慎一郎博士に深く感謝いたします。

文献

- 1) Sano S, Matsuda Y, Nakagawa H : A novel brain-specific antigen : a glycoprotein electrophoretically similar to but immunochemically different from type B nucleoside diphosphatase. *J Biochem* 1989, **105** : 457-460.
- 2) Sano S, Ohnishi H, Omori A, et al. : BIT, an immune antigen receptor-like molecule in the brain. *FEBS Lett* 1997, **411** : 327-334.
- 3) Chuang W, Lagenaur CF : Central nervous system antigen p84 can serve as a substrate for neurite outgrowth. *Dev Biol* 1990, **137** : 219-232.
- 4) Comu S, Weng W, Olinsky S : The murine p84 neural adhesion molecule is SHPS-1, a member of the phosphatase-binding protein family. *J Neurosci* 1997, **17** : 8702-8710.
- 5) Fujioka Y, Matozaki T, Noguchi T, et al. : A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol* 1996, **16** : 6887-6899.
- 6) Kharitononkov A, Chen Z, Sures I : A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 1997, **386** : 181-186.
- 7) Motegi S, Okazawa H, Ohnishi H, et al. : Role of the CD47-SHPS-1 system; regulation of cell migration. *EMBO J* 2003, **22** : 2634-2644.
- 8) Jiang P, Lagenaur CF, Narayanan V : Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule. *J Biol Chem* 1999, **274** : 559-562.
- 9) Vernon-Wilson EF, Kee W, Willis AC, et al. : CD47 is a ligand for rat

- macrophage membrane signal regulatory protein SIRP(OX41) and human SIRP α 1. *Eur J Immunol* 2000, **30** : 2130–2137.
- 10) Araki T, Yamada M, Ohnishi H, et al. : BIT/SHPD-1 enhances brain-derived neurotrophic factor-promoted neuronal survival in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 2000, **75** : 1502–1510.
- 11) Tsuda M, Matozaki T, Fukunaga K, et al. : Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP2. *J Biol Chem* 1998, **273** : 13223–13229.
- 12) Lanier LL : NK cell receptors. *Ann Rev Immunol* 1998, **16** : 359–393.
- 13) Crocker PR : Siglecs : sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol* 2002, **12** : 609–615.
- 14) Hanafusa H, Torii S, Yasunaga T, et al. : Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty. *J Biol Chem* 2004, **279** : 22992–22995.
- 15) Hamada J, Okumura N, Inagaki M, et al. : Tyrosine phosphorylation of BIT on photic stimulation in the rat retina. *FEBS Letters* 2004, **557** : 204–208.
- 16) Nakahata Y, Okumura N, Shima T, et al. : Light-induced tyrosine phosphorylation of BIT in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurochem* 2000, **74** : 2436–2444.
- 17) Nakahata Y, Okumura N, Otani H, et al. : Stimulation of BIT induces a circadian phase shift of locomotor activity in rats. *Brain Res* 2003, **976** : 194–201.
- 18) Obrietan K, Impey S, Storm DR : Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci* 1998, **1** : 693–700.
- 19) Chun S, Nijijima A, Nagai N, et al. : Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nucleus on hypertlycemia caused by 2-deoxy-D-glucose and vasoactive intestinal peptide in rats. *Brain Res* 1998, **809** : 165–174.
- 20) Tanida M, Nijijima A, Fukuda Y, et al. : Dose-dependent effect of L-carnosine on the renal sympathetic nerve and blood pressure in urethane-anesthetized rats. *Am J Physiol* 2005, **288** : R447–455.
- 21) Buijs RM, Chun S, Nijijima A, et al. : Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas : a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of good intake. *J Comp Neurol* 2001, **431** : 405–423.
- 22) Taniguchi H, Okumura N, Hamada J, et al. : Cold exposure induces tyrosine phosphorylation of BIT through NMDA receptors in the rat hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **319** : 178–184.
- 23) Banks AS, Davis SM, Hates SH, et al. : Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 2000, **275** : 14563–14572.
- 24) Zhang EE, Chapeau E, Hagihara K, et al. : Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *PNAS* 2004, **101** : 16064–16069.