

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500338

研究課題名(和文) 神経細胞の活動依存的なリボソーム機能の調節機構とシナプス可塑性

研究課題名(英文) Neuronal activity-dependent regulation of ribosomal functions and synaptic plasticity

研究代表者

山本 秀幸 (YAMAMOTO HIDEYUKI)

国立大学法人琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60191433

研究成果の概要(和文)：シナプスの伝達効率は、神経細胞の活動性が高い場合に増強される。この現象は記憶の分子機構と考えられている。我々は、これまでの報告から、リボソームタンパク質(RP)の中の RPS19 のリン酸化が、シナプス局所でのタンパク質産生を増加させる可能性を考えた。今回、試験管内、神経細胞の培養系および脳内での検討から、CaM キナーゼ I が、神経細胞の活動依存的に RPS19 をリン酸化することで、リボソームの形成を調節していることを示唆する結果が得られた。これらの研究成果は、記憶の分子機構の理解に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Neuronal activity regulates synaptic functions. We considered that phosphorylation of a ribosomal protein (RPS19) might regulate the ribosomal functions. Our present results strongly suggest that CaM kinase I phosphorylates RPS19 and regulates the ribosomal formations in synapse in a neuronal activity-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生化学、神経化学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：カルモデュリン、記憶、シナプス可塑性、神経細胞、リボソーム、リン酸化反応、CaM キナーゼ I、RPS19

1. 研究開始当初の背景

シナプスの伝達効率の変化は、神経細胞の活動性に応じて変化する。このシナプス可塑性

の変化へのリボソーム機能の関わりは不明であった。神経細胞の活動依存性に複数のタンパク質リン酸化酵素が活性化されるが、そ

の中の CaM キナーゼ I の生理機能についても不明であった。また、神経細胞以外の培養細胞系およびヒトの遺伝子疾患の解析から、リボソームタンパク質 (RP) の中でも RPS19 がリボソーム形成に重要であることが知られていた。しかし、RPS19 のリン酸化反応についての詳細な報告はなかった。

2. 研究の目的

- (1) 神経細胞の活動依存性に活性化されることが知られている 5 種類のタンパク質リン酸化酵素により、RPS19 が試験管内でリン酸化されるかを検討する。
- (2) リン酸化された場合は、そのリン酸化反応が培養神経細胞内、さらに脳内でも起こるかを検討する。
- (3) リン酸化により、RPS19 の機能が変化するかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) 放射性同位元素 (^{32}P) でラベルされた ATP を用いて、5 種類のタンパク質リン酸化酵素による試験管内での RPS19 のリン酸化反応を検討する。
- (2) リン酸化された場合は、質量分析法と遺伝子工学的手法を用いて、リン酸化部位を決定する。
- (3) 決定された部位がリン酸化された RPS19 に対する特異抗体を作製する。
- (4) 作製した特異抗体を用いて、培養神経細胞 (GT1-7 細胞) および脳内での RPS19 のリン酸化反応について検討する。
- (5) GT1-7 細胞内でのリン酸化については、CaM キナーゼ I 阻害剤の影響を検討する。
- (6) リン酸化 RPS19 の細胞内での存在部位を決定することで、リン酸化の生理的意義について検討する。
- (7) 以前に我々が見いだした RPS19 結合タン

パク質との結合への RPS19 のリン酸化の影響を解析することで、リン酸化による RPS19 の立体構造変化と機能変化を検討する。

4. 研究成果

- (1) 試験管内での検討では、CaM キナーゼ I のみが RPS19 をリン酸化した。
- (2) 質量分析法から推定されたリン酸化部位を変異させた複数の変異体を作製した。作製した変異体のリン酸化反応から、59 番目のセリンがリン酸化されることが明らかになった。
- (3) 59 番目のセリンがリン酸化された RPS19 に対する抗体を作製した。
- (4) 作製した抗体を用いて、GT1-7 細胞内で RPS19 がリン酸化されていることを見いだした。
- (5) GT1-7 細胞内でのリン酸化は CaM キナーゼ I の阻害剤の添加により消失した。
- (6) ラットの脳を用いた細胞分画法により、リボソーム内の RPS19 が強くリン酸化されていることが明らかになった。
- (7) RPS19 結合タンパク質との結合は、リン酸化により増強された。

これらの研究から、CaM キナーゼ I による RPS19 のリン酸化が脳内の神経細胞でも起こっていることが示唆された。また、そのリン酸化が RPS19 の機能を調節していることも示唆された。ヒトの遺伝子疾患の解析から 59 番目のセリンが変異することでリボソーム形成が障害されることも報告されている。今後は、シナプス伝達効率の変化への RPS19 のリン酸化の関与を詳細に解析する必要がある。また、神経細胞以外の細胞での RPS19 のリン酸化についても検討することで、本反応の神経細胞以外での生理機能についても検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Mizutani A, Maeda N, Toku S, Higa-Nakamine S, Isohama Y, Sunakawa H, Sugahara K, Yamamoto H. Interaction of ethyl pyruvate in vitro with NF- κ B subunits, RelA and p50. *Eur J Pharmacol* 2011;650:151-156. 査読有り
- ② Mizutani A, Maeda N, Toku S, Isohama Y, Sugahara K, Yamamoto H. Inhibition by ethyl pyruvate of the nuclear translocation of nuclear factor- κ B in cultured lung epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther* 2010;23:308-315. 査読有り
- ③ Maeda N, Toku S, Naito Y, Nishiura H, Tanaka T, Yamamoto H. Phosphorylation of Ribosomal Protein S19 at Ser59 by CaM Kinase I α . *J Neurochem* 2009;109:393-402. 査読有り
- ④ Hossain QS, Ulziikhishig E, Lee KK, Yamamoto H, Aniya Y. Contribution of liver mitochondrial membrane-bound glutathione transferase to mitochondrial permeability transition pores. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;235:77-85. 査読有り
- ⑤ Mutiara S, Kanasaki H, Oride A, Purwana IN, Shimasaki S, Yamamoto H, Miyazaki K. Follistatin gene expression by gonadotropin-releasing hormone: a role for cyclic AMP and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in clonal gonadotroph LbetaT2 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2009;307:125-132. 査読有り
- ⑥ Song T, Hatano N, Kambe T, Miyamoto Y,

Ihara H, Yamamoto H, Sugimoto K, Kume K, Yamaguchi F, Tokuda M, Watanabe Y. Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 2008;412:223-231. 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

- ① 徳誠吉 RPS19 の M 期におけるリン酸化反応. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸ポートアイランド
- ② 前田紀子 ヒト肺胞上皮細胞 A549 における Ethyl Pyruvate による NF- κ B 経路の抑制機構. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド
- ③ 仲嶺 (比嘉) 三代美 GnRH ニューロンでの GnRH 受容体刺激による ErbB-4 の切断. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 7 日 神戸ポートアイランド
- ④ 山本 秀幸 視床下部神経細胞での GnRH による ErbB 受容体の CaM キナーゼ II を介する活性化反応. *Neuro 2010* 2010 年 9 月 2 日 神戸コンベンションセンター
- ⑤ 水谷 文子 A549 細胞における Ethyl Pyruvate による NF- κ B 経路の抑制. 日本生化学会九州支部例会 2010 年 5 月 22 日 鹿児島大学郡元キャンパス
- ⑥ 前田 紀子 Phosphorylation of Ribosomal Protein S19 at Serine 59 by CaM Kinase I α . 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日発表 パシフィコ横浜
- ⑦ 水谷文子 肺胞上皮 A549 細胞における Ethyl Pyruvate による NF- κ B の核内移行の抑制. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日発表 パシフィコ横浜

- ⑧ 山本秀幸 CaM キナーゼによるリボソームタンパク質 S19 のリン酸化反応. 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 24 日発表 神戸ポートアイランド
- ⑨ 前田紀子 リボソームタンパク質 S19 のリン酸化と S19 結合タンパク質との相互作用. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 12 日発表 神戸ポートアイランド

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/biochemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 秀幸 (YAMAMOTO HIDEYUKI)
国立大学法人琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60191433

(2) 研究分担者

前田 紀子 (MAEDA NORIKO)
国立大学法人琉球大学・大学院医学研究科・教務職員
研究者番号：40231584