

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月20日現在

機関番号：12601  
研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2010～2011  
課題番号：22700391  
研究課題名（和文）  
新規 NYAP ファミリーによる神経細胞形態形成制御およびその生理的意義の解明  
研究課題名（英文）  
Functional analysis of novel NYAP family proteins  
研究代表者  
横山 一剛（YOKOYAMA KAZUMASA）  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：20431760

## 研究成果の概要（和文）：

神経細胞において PI3K 経路の活性化および下流のシグナル伝達は完全には明らかにされていない。本研究において、NYAP ファミリータンパク質は PI3K および WAVE1 複合体と会合することで3者複合体を形成することを明らかにした。NYAP 欠損マウスにおいては脳サイズの縮小や神経軸索の伸長阻害が観察された。

## 研究成果の概要（英文）：

The phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway has been extensively studied in neuronal function and morphogenesis. However, the precise molecular mechanisms of PI3K activation and its downstream signalling in neurons remain elusive. In this study, we demonstrated that the NYAPs bridge a PI3K-WAVE1 association by simultaneously interacting with PI3K and the WAVE1 complex. Disruption of the NYAP genes in mice affects brain size and neurite elongation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：神経細胞、チロシンキナーゼ、PI3K、WAVE

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が新規に同定した NYAP ファミリー (NYAP1, NYAP2, NYAP3) は、発生段階の脳における PI 3-kinase (PI3K) 経路の活性化および下流経路の規定という、PI3K から見て上流・下流の両局面において分子生物学的にきわめて重要な機能を持つ。本研究課題は、主に NYAP ファミリー遺伝子多重欠損マウスを解析することにより、研究のステージを生化学・分子生物学的解析から神経形態学・神経発生学・行動学へと進めて、NYAP-PI3K 経路が神経細胞形態形成・神経回路形成においてどのような役割をはたし、どのような生理機能を担っているのかを明らかにすることを目的とする。また、神経細胞内シグナル伝達の細部の解析も完全なものとする。

## 2. 研究の目的

申請者が新規に同定した NYAP ファミリーは、発生段階の脳における PI3K 経路の活性化および下流経路 (WAVE 経路) の規定という 2 つの局面において分子生物学的にきわめて重要な位置にある。本研究期間内の具体的な到達目標は、次のように設定する。

- (1) NYAP ファミリー欠損マウスにおける神経細胞の形態解析
- (2) NYAP ファミリー欠損マウスにおける神経回路形成の解析
- (3) NYAP ファミリー欠損マウスの行動学的解析
- (4) NYAP ファミリー下流のシグナル伝達の分子生物学的解析の完成 (大筋の部分は解析済み)

上記項目 1-3 により、神経細胞のみに特別に用意された PI3K-WAVE 経路制御因子である

NYAP ファミリーの生理機能の全容を明らかにする。さらに項目 4 により、神経細胞形態形成の (少なくとも 1 つの局面の) 分子基盤を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究課題は新規 NYAP ファミリー遺伝子の全てを破壊した多重欠損マウスの細胞形態学的・生理学的解析をおこなうものであり、以下の 4 項目からなる。

- (1) NYAP ファミリー欠損マウスにおける神経細胞の形態の解析
- (2) NYAP ファミリー欠損マウスにおける神経回路形成の解析

NYAP ファミリーは脳での発現パターンがメンバーごとに重なりつつも異なっているため、*in vivo* 脳サンプルを主な解析対象とし、補完的に *in vitro* 初代培養系を利用する。

- (3) NYAP ファミリー欠損マウスの行動学的解析

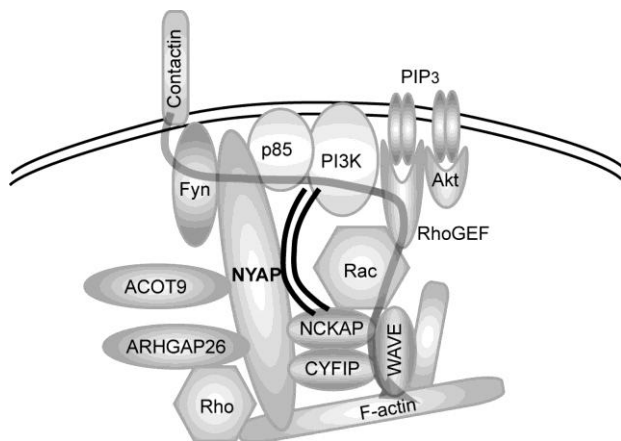
特に自閉症スペクトラム障害 (ASD) との関連を明らかにするために、social interaction などの指標を重点的に解析する。

- (4) NYAP ファミリー下流のシグナル伝達の分子生物学的解析

## 4. 研究成果

phosphoinositide 3-kinase (PI3K) シグナル伝達経路は神経細胞内の様々な現象の制御に関わっており、形態形成、細胞膜の伸展、生存とアポトーシス、イオンチャネルの制御などが知られている。PI3K は制御サブユニット p85 に YxxM (Tyr-x-x-Met) 型のリン酸化チ

ロシンモチーフを持つタンパク質が結合することで活性化する。すなわち、逆に PI3K p85 に結合する YxxM 型リン酸化タンパク質を検出することで、PI3K 活性化因子を網羅的かつ半定量的に同定できる。これまでに多くのタンパク質が YxxM モチーフを持ち PI3K を活性化すると報告されてきたが、新生仔マウス脳における PI3K 活性化因子は、驚くべきことに 4 種類のタンパク質でほぼ全てを占めていることが分かった。本研究では、このうちの 3 つを NYAP ファミリー (NYAPs) として同定し、NYAPs 三重欠損マウス (TKO) を作製したところ、PI3K 自身およびその下流の Akt, Rac1 の活性の減弱、神経初代培養の神経突起伸長遅延、およびマウス個体において脳全体のサイズの縮小と樹状突起形態異常、さらに自閉症スペクトラム障害様の行動異常を明らかにすることができた。また、プロテオーム解析により NYAPs が WAVE1 複合体と直接結合することを明らかにした。WAVE1 は PI3K-Rac1 経路により活性化され、Arp2/3 を介してアクチン重合を制御すると知られている。さらに、非神経細胞では WAVE1 と PI3K は会合していないが、神経細胞においてのみ WAVE1 と PI3K は物理的に会合しており、この会合は NYAPs 三重欠損マウスで完全に消失することも明らかにした (三者複合体の形成)。すなわち、NYAPs は (1) 神経細胞における PI3K 活性化因



子として定量的な観点から最も重要な因子であるのみならず、(2) 様々なエフェクター分子のうち PI3K-Rac1 経路下流で機能する WAVE1 を PI3K 近傍にリクルートしてくるという 2 つの分子機構によって、神経細胞における PI3K シグナル伝達を形態形成へと方向づけていると考えられる。

## 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 Takahashi A, Kikuguchi C, Morita M, Shimodaira T, Tokai-Nishizumi N, Yokoyama K, Ohsugi M, Suzuki T, and \*Yamamoto T. Involvement of CNOT3 in mitotic progression through inhibition of MAD1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 419: 268-273, 2012 年 3 月、DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.007
- ② \*Yamanashi Y, Tezuka T, and Yokoyama K. Activation of Receptor Protein-Tyrosine Kinases from the Cytoplasmic Compartment. *J Biochem.*, in press (2012 年 2 月)、doi: 10.1093/jb/mvs013
- ③ Yokoyama K, Tezuka T, Kotani M, Nakazawa T, Hoshina N, Shimoda Y, Kakuta S, Sudo K, Watanabe K, Iwakura Y, and \*Yamamoto T. NYAP: a phosphoprotein family that links PI3K to WAVE1 signaling in neurons. *EMBO J.* 30: 4739-4754, 2011 年 11 月、DOI: 10.1038/emboj.2011.348

- ④ Chen C, Ito K, Takahashi A, Wang G, Suzuki T, Nakazawa T, \*Yamamoto T, and \*Yokoyama K. Distinct expression patterns of the subunits of the CCR4-NOT deadenylase complex during neural development. *Biochem Biophys Res Commun.* 411: 360-364, 2011年6月、DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.148
- ⑤ Ito K, Inoue T, Yokoyama K, Morita M, Suzuki T, and \*Yamamoto T. CNOT2 depletion disrupts and inhibits the CCR4-NOT deadenylase complex and induces apoptotic cell death. *Genes Cells.* 16: 368-379, 2011年4月、DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01492.x
- ⑥ Delawary M, Tezuka T, Kiyama Y, Yokoyama K, Inoue T, Hattori S, Hashimoto R, Umemori H, Manabe T, Yamamoto T, and Nakazawa T. NMDAR2B tyrosine phosphorylation regulates anxiety-like behavior and CRF expression in the amygdala. *Mol. Brain* 3, 37 (2010).  
doi:10.1186/1756-6606-3-37

[学会発表] (計2件)

- ① 横山 一剛, 山本 雅, 新規, NYAP ファミリーは Contactin ファミリー下流において PI3K-Akt 経路を活性化し神経突起伸長を促進する, 日本分子生物学会年会, 神戸, 2010年12月10日、口頭発表
- ② Yokoyama K, and Yamamoto T. NYAP: the Novel Phosphoprotein Family Activating the PI3K-Rac1-WAVE1 Signaling in Developing Neurons. *Salk*

institute meeting (the 2010 Protein Phosphorylation and Cell Signaling), San Diego, USA, 2010年8月18日

[図書] (計1件)

横山一剛, 手塚 徹, 山梨裕司, 受容体型チロシンキナーゼの細胞内からの活性化 (シグナル伝達研究最前線 2012, 実験医学増刊 Vol.30 No.5), 羊土社, 80-85, 2012年3月

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/frontier/>  
[http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/wakate/profile/ika\\_yokoyama.html](http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/wakate/profile/ika_yokoyama.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 一剛 (YOKOYAMA KAZUMASA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 20431760