

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390070
 研究課題名（和文）NMDA 受容体チロシンリン酸化を介する神経可塑性・病態制御の分子生理学的解析

研究課題名（英文） Regulation and de-regulation of NMDA receptor-dependent synaptic plasticity through its tyrosine phosphorylation

研究代表者

山本 雅（YAMAMOTO TADASHI）
 東京大学・医科学研究所・教授
 研究者番号 40134621

研究成果の概要：

NMDA 受容体は、イオンチャネルであると共に、細胞内シグナル分子でもある。私は NMDA 受容体構成成分である NR2A, 2B のチロシンリン酸化が NMDA 受容体の機能や作用の制御に関わると提唱してきた。本研究では、NMDA 受容体のチロシンリン酸化部位を改変した遺伝子操作マウスを用い、NR2A や NR2B のチロシンリン酸化が、それぞれ線条体でのドーパミンニューロンの活性化や扁桃での LTP 誘導を制御し、マウスの抗鬱反応や恐怖学習に関与することを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：脳・神経、神経科学

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は哺乳類の中枢神経系における主要な興奮性神経伝達因子である。その受容体の一つ、NMDA 型グルタミン酸受容体（以下 NMDA 受容体）は、学習・記憶といった脳高次機能に必須な役割を果たしている。刺激に応じて細胞内に Ca^{2+} イオンを流入させ様々な細胞内シグナル伝達経路を活性化すると

う NMDA 受容体の機能の特性上、外界の状況に応じた NMDA 受容体の速やかな機能調節機構が求められる。申請者はその一つに NMDA 受容体自身のチロシンリン酸化・脱リン酸化反応を提唱してきた。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに Src 型チロシンキナーゼ

のメンバーである Fyn や Lyn が、NMDA 受容体 2A、2B サブユニット (NR2A、NR2B) のリン酸化を触媒することを世界に先駆けて示してきたが、そのリン酸化の分子生物学的意義については未解明であった。本研究では、実際の脳内における NR2A、NR2B のチロシンリン酸化の生物学的意義を、リン酸化部位改変マウスを解析することで明らかにし、記憶・学習等の脳高次機能や脳の病態の理解を深める。

3. 研究の方法

(1) NR2A、NR2B サブユニットチロシンリン酸化部位の解析とリン酸化部位変異マウスの作成

これらサブユニットの主要チロシンリン酸化部位 (NR2A では 1325 番目、NR2B では 1472 番目のアミノ酸) の Tyr を Phe に変異させた NMDA 受容体を発現するノックインマウス用い、認知行動学的解析を行う。

yeast tri-hybrid system を用いてリン酸化依存的に会合する分子を同定する。

主要リン酸化部位のリン酸化が NMDA 受容体チャンネルの特性に与える影響を、*in vitro* 培養細胞系並びに *in vivo* 脳スライスを用いて解析する。

主要リン酸化部位を特異的に認識するリン酸化抗体を作成し、これらを用いて免疫生化学的、免疫細胞生物学的研究を行い、それら主要リン酸化部位のリン酸化の脳部位特異性を検討する。また海馬、扁桃体における生理的な電気刺激や個体に学習させた時の主要リン酸化部位のリン酸化レベルの挙動を調べる。

(2) NMDA 受容体会合分子 p100NYAP 及び PTPMEG の機能解析と両分子の欠損マウスの解析

p100NYAP が脳特異的に発現し、NMDA 受容体と機能的に会合することを見いだしている。まず、p100NYAP の NMDA 受容体複合体における機能を生化学的に明らかにする。これと並行して p100NYAP 遺伝子欠損マウスを作成し認知行動学的解析を進める。

NMDA 受容体脱チロシンリン酸化の分子基盤はほとんど明らかになっていない。本課題

では、ポストシナプスに局在する脱リン酸化酵素 PTPMEG の NMDA 受容体機能発現における役割解明を目指す。既に p100NYAP、及び PTPMEG に関しては遺伝子欠損マウスの作成を完了しており、NMDA 受容体との会合の意義のや生理機能の解明を目的とした表現型の解析を行う。

4. 研究成果

NMDA 受容体は、刺激に応じて様々な細胞内シグナル伝達経路を活性化する。申請者は NMDA 受容体調節機構の一つにチロシンリン酸化による制御を提唱している。本研究では、Src 型キナーゼによる NR2A、及び NR2B のリン酸化の意義を追求し、以下の結果を得た。

【NR2A】 HEK293 細胞を使った再構成系を用いて、NR2A サブユニットの Tyr -1325 のリン酸化が src 型キナーゼによる NMDA 受容体チャンネル活性の増強に必須であることを示した。その他の残基 (Tyr -1246、Tyr -1267) のリン酸化はチャンネル活性の制御には関与していないことも見出した。Tyr -1325 のリン酸化を特異的に認識するリン酸化抗体を作成し、それを用いて、Tyr -1325 は海馬、線条体で強くリン酸化されていることを見出した。これらから、NR2A -Tyr -1325 のリン酸化は NMDA 受容体の活性を制御し、その結果マウス個体の行動を制御していることが示唆された。そこで、NR2A の主要なリン酸化残基である Tyr -1325 をフェニルアラニンに置換した Y1325F 改変マウスを作成し、tail suspension, forced swimming, open field, light/dark transition, elevated plus maze, rotor-rod, prepulse inhibition, tail flick, hot plate, Morris water maze など一連の試験を課した。このうちマウスの恐怖学習能力を問う試験では Y1325F 改変マウスで抗鬱様行動が観察された。海馬依存的記憶形成能を判定する試験においては、Y1325F 改変マウスは野生型マウスに比ベトレーニング回数が少ない状況で学習が成立しており、空間学習能力が向上している可能性が考えられた。その他、活動量、運動能力、感覚、統合能力を問う試験では、Y1325F 改変マウスと野生型マウスと有意な差はなかった。一方で、Y1325F 改変マウス脳線条体では、NR2B

の Tyr1472 のリン酸化が亢進していることを見出し、Y1325F 改変マウスでは NMDA 受容体の特定の機能が活性化されている可能性が示唆された。また、Y1325F 改変マウス線条体で、ドーパミン機能を調節する DARPP-32 の Thr-34 のリン酸化が亢進していることを見出し、それが抗鬱様行動に密接に関わると推定した。

【NR2B】NR2B-Y1472F 改変マウスは扁桃体依存の恐怖学習に異常がみられることをすでに示している。そこで Y1472 リン酸化依存的に NR2B に会合する蛋白質を同定することを目的として以下を進めた。yeast tri-hybrid 法により NR2B 会合分子を探索し、PDZ 蛋白質や、細胞接着分子、膜蛋白質、キナーゼ、及び新規を同定した。また、野生型マウスと Y1472F 改変マウスから NMDA 受容体複合体を精製し、複合体中の成分を 2D-DIGE により比較して、 α -actinin2 など数種の蛋白質が野生型マウスと Y1472F 改変マウスで会合程度に差異があることを見出した。NR2B-Y1472F 改変マウスで見られる NMDA 受容体の局在異常の分子基盤確立には、さらなる解析が必要である。

一方、p100NYAP と PTPMEG に関しては以下の結果を得た。【p100NYAP】p100NYAP 分子が脳特異的に発現し、Fyn チロシンキナーゼでリン酸化されることを示した。またこの分子が脳で PI3K に会合する主要な蛋白質であることを示した。また、遺伝子改変マウスの認知行動学的解析から p100NYAP が子育てなどの高次機能に関わる可能性を指摘した。

【PTPMEG】チロシンフォスファターゼ PTPMEG をコードする遺伝子の欠損マウスは、小脳依存性の運動学習において成績の低下がみられ、瞬目反射条件づけにおいても学習スピードの低下がみられた。PTPMEG 欠損マウスでは運動失調が見られないことから、運動協調ではなく、運動学習に特異的に関与することが示唆された。また PTPMEG 欠損マウスでは平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスにおける長期抑圧が减弱していた。本研究によって PTPMEG は小脳のシナプス可塑性及び学習運動に関わるということが明らかとなった。PTPMEG による NMDA 受容体機能制

御に関するより詳細な研究は今後の課題として残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

(1) Isosaka T, Hattori K, Kida S, Kohno T, Nakazawa T, Yamamoto T, Yagi T and Yuasa S. Activation of Fyn tyrosine kinase in the mouse dorsal hippocampus is essential for contextual fear conditioning. *Eur J Neurosci* 28:973-981, 2008、査読有

(2) Nakazawa T, Kuriu T, Tezuka T, Umemori H, Okabe S, and Yamamoto T. Regulation of dendritic spine morphology by an NMDA receptor-associated Rho GTPase-activating protein, p250GAP. *J. Neurochem* 105: 1384-1393, 2008、査読有

(3) Goto J, Tezuka T, Nakazawa T, Sagara H, and Yamamoto T. Loss of Fyn tyrosine kinase on the C57BL/6 genetic background causes hydrocephalus with defects in oligodendrocyte development. *Mol Cell Neurosci* 38: 203-212, 2008、査読有

(4) Kina S, Tezuka T, Kusakawa S, Kishimoto Y, Kakizawa S, Hashimoto K, Ohsugi M, Kiyama Y, Horai R, Sudo K, Kakuta S, Iwakura Y, Iino M, Kano M, Manabe T, Yamamoto T. Involvement of protein-tyrosine phosphatase PTPMEG in motor learning and cerebellar long-term depression. *Eur J Neurosci*. 26: 2269-2278, 2007、査読有

(5) Hoshina N, Tezuka T, Yokoyama K, Kozuka-Hata H, Oyama M and Yamamoto T. Focal adhesion kinase regulates laminin-induced oligodendroglial process outgrowth. *Genes to Cells*. 12: 1245-1254, 2007、査読有

(6) Yamaguchi R, Wada E, Kamichi S, Yamada D, Maeno H, Delawary M, Nakazawa T, Yamamoto T, and Wada K. Neurotensin type 2 receptor in astrocytes is involved in fear memory in mice. *J. Neurochem*. 102: 1669-1676. 2007、査読有

(7) Bai C, Ohsugi M, Abe Y, Yamamoto T. ZRP-1 controls Rho GTPase-mediated actin reorganization by localizing at cell-matrix and cell-cell adhesions. *J. Cell Sci.* 120: 2828-2837, 2007、査読有

(8) Delawary M, Nakazawa T, Tezuka T, Sawa M, Iino Y, Takenawa T, and Yamamoto T. Molecular characterization of a novel RhoGAP, RRC-1 of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357:377-82, 2007、査読有

(9) Chikamori M, Fujimoto J, Tokai-Nishizumi N, and Yamamoto T. Identification of multiple SNT-binding sites on NPM-ALK oncoprotein and their involvement in cell transformation. *Oncogene* 26:2950-2954, 2007、査読有

〔学会発表〕(計 9件)

(1) 星名直祐 (山本雅)、中枢神経系における新規プロトカドヘリンを介したシグナル伝達機構の解析、第31回日本分子生物学会年会 (BMB2008) 2008年12月10日、神戸

(2) 井上毅 (山本雅) Characterization of transmembrane kinase BREK/LMTK2 in endocytic membrane trafficking、第31回日本分子生物学会年会 (BMB2008) 2008年12月10日、神戸

(3) 横山一剛 (山本雅) NYAPファミリーは神経細胞特異的に発現する PI3 kinase p85の主要な制御因子である、第31回日本分子生物学会年会 (BMB2008) 2008年12月10日、神戸

(4) 中澤敬信 (山本雅)、Regulation of dendritic spin morphology by an NMDA receptor associated RhoGAP, p250GAP、*NEUROSCIENCE* 2007, 2007年11月6日、サンディエゴ

(5) 星名直祐 (山本雅)、オリゴデンドロサイトの突起伸長における FAK の機能解析、第

30回日本分子生物学会年会 (BMB2007)、2007年12月11日、横浜

(6) 横山一剛 (山本雅) Phosphorylation at Tyr 694 of Nogo A by Src-family kinases, 第30回日本分子生物学会年会 (BMB2007)、2007年12月11日、横浜

(7) 手塚徹 (中川敦史) コビキチン連結酵素 Cbl-c の X線結晶構造解析による標的基礎認識機構の研究、第30回日本分子生物学会年会 (BMB2007)、2007年12月11日、横浜

(8) 手塚徹 (中川敦史) Human PTPMEG の X線結晶構造解析を目的とした大量発現系の構築、第30回日本分子生物学会年会 (BMB2007)、2007年12月11日、横浜

(9) 手塚徹 (山本雅) Cbl ファミリー蛋白質による表皮形成制御、第30回日本分子生物学会年会 (BMB2007)、2007年12月14日、横浜

〔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〕
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅 (YAMAMOTO TADASHI)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号: 40134621

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

中澤敬信 (NAKAZAWA TAKANOBU)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号: 00447335