

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19700335  
 研究課題名（和文） 神経細胞特異的なPI 3-kinase新規制御因子群NYAP  
 ファミリーの機能解析  
 研究課題名（英文） Functional analysis of novel  
 NYAP family proteins in neurons.  
 研究代表者  
 横山 一剛（YOKOYAMA KAZUMASA）  
 東京大学・医科学研究所・特任助教  
 研究者番号：20431760

## 研究成果の概要：

NYAP が GPI アンカー型膜タンパク質のクロスリンクにより活性化されることを明らかにした。また、NYAP ファミリー遺伝子多重欠損マウスの大脳皮質錐体神経細胞の形態異常および中心体タンパク質の動態異常を見出した。近年、神経樹状突起形成と中心体の関連が指摘されはじめてきており、NYAP ファミリーがアクチン系細胞骨格の再編成制御を介して中心体動態をも制御し、樹状突起形態形成に関与する可能性は、きわめて興味深い。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：総合領域

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：チロシンリン酸化・シグナル伝達・神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

出生前後の、発生の比較的後期に起こる神経細胞死の調節機構に関して、各種神経栄養因子の関与が最も研究が進んでいる。これら

の神経栄養因子がアポトーシスを抑制するメカニズムとして、受容体型チロシンキナーゼファミリーから MAP キナーゼ系および PI3K/Akt キナーゼ系を介する情報伝達系が

提唱されている。チロシンキナーゼである増殖因子受容体や神経栄養因子受容体の自己リン酸化チロシン残基、あるいは IRS-1/2, Gab1/2 などのドッキングタンパク質のリン酸化されたチロシン残基に、PI3K の制御サブユニット p85 が結合することにより、PI3K は活性化されると考えられている。

ところが、研究代表者がこれまでに示したように、少なくとも定常状態の脳においては、p85 に結合するチロシンリン酸化タンパク質のほぼ全てが NYAP ファミリーで占められている。神経細胞初代培養で NYAP ファミリーの発現量が顕著に減少すること、神経細胞以外の細胞では NYAP が全く発現していないことをあわせて考えると、神経細胞死に、その他の細胞種の細胞死と共通のメカニズムを見出してきた従来の研究は、いくらかの修正が必要となるかもしれない（培養条件では神経細胞において PI3K 活性化にいたる最も重要な経路 = NYAP の寄与が過小評価されている）。

また、PI3K 阻害剤を用いた実験から、PI3K 経路のシナプス機能への関与、さらに神経細胞の極性決定や神経軸索伸長への関与も示唆されている。これまでの研究は、薬理学的な実験系、あるいは神経細胞や神経様の細胞への PI3K/Akt 経路の分子の大量発現による実験系であった。NYAP および PI3K p85 の発現量が出生前後で最も高いことから、神経発生のごく初期や、LTP が見られるような成熟後の神経細胞において PI3K が主に機能しているとは考えづらく、これらに関しても本研究課題による再検討が重要となると期待された。

これまでの PI3K/Akt 経路の分子の遺伝子欠損マウスの解析においては、複数のファミリー分子の存在および神経細胞以外の細胞での遺伝子発現の問題から、PI3K/Akt 経路の

神経機能について満足に議論することはできていなかった。NYAP 欠損マウスの解析により、長く議論の対象となってきた PI3K/Akt 経路の神経機能について結論が得られるだろう。すなわち、遺伝子欠損マウスの解析も含めた NYAP ファミリーの解析により、神経細胞において、けっきょく PI3K 経路とは何であるのかを結論付けることが可能であるという点で、本研究課題は非常に大きな意味を持っていると考え、本研究の実施を行った。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに、脳神経系において Src 型キナーゼによりチロシンリン酸化される新規のタンパク質 NYAP1 (Neuronal Tyrosine phosphorylated Adaptor for PI3-kinase) を同定した。また、NYAP1 と部分的な相同性を持つタンパク質として NYAP2, NYAP3 を同定し、これらが神経細胞において PI3K/Akt 経路にいたる最も重要なハブとして機能している可能性を示した。

本研究課題は、NYAP ファミリータンパク質が、A. いつ、B. どこで、C. 何をどうするのか、さらには D. その生物個体レベルでの意義について、全貌を明らかにすることを目的としておこなった。

## 3. 研究の方法

### (1). NYAP はいつ機能しているのか

先に述べたように、これまでに、NYAP ファミリーと PI3K p85 は、マウス脳において出生前後に最も発現量が多いことを明らかにした。

また、一般的に、チロシンリン酸化反応は特定の受容体の刺激後に見られることが多く、NYAP も何らかの受容体刺激後にリン酸

化されるものと推定している。NYAP が発生期の神経細胞において、どのような微小環境において機能しているかを調べるために、NYAP のリン酸化を引き起こす刺激の同定を試みる。具体的には、PI3K/Akt 経路と神経細胞死との関連性から、各種神経栄養因子、各種神経伝達物質、さらに、生理活性低分子、アストロサイトやオリゴデンドロサイト由来の因子、および細胞接着分子などのリコンビナントタンパク質を神経細胞初代培養や脳スライス培養に作用させ、NYAP のリン酸化量の変化を調べる。この方法が不成功の場合、目的の上流刺激因子を生化学的に精製・同定することも試みる。

#### (2). NYAP はどこで機能しているのか

これまでに各種初代培養細胞を用いることにより、NYAP1, 2, 3 ともに神経細胞のみに発現し、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトには全く発現していないことを明らかにした。しかし NYAP が脳内でどのようなサブタイプの神経細胞に発現しているか未知であり、NYAP ファミリー 3 分子が同一の神経細胞に発現しているかどうかも分かっていない。本研究では、免疫染色および多重プローブによる *in situ* hybridization により、NYAP が発現している神経細胞のサブタイプを明らかにする。

また、神経細胞は高度に極性を持った細胞であり、NYAP が神経細胞内のどの部位に存在しているのかは、NYAP の機能を理解する上で極めて重要な情報である。これまでに作製した anti-NYAP 抗体は免疫染色に用いることができないものであった。本研究では新たに anti-NYAP 抗体を作製し、NYAP の神経細胞内局在を明らかにする。

また、NYAP ファミリーは、共通して C 末端に PDZ タンパク質と結合しうる配列を持

つ。これに結合する PDZ タンパク質を生化学的に同定することにより、NYAP の神経細胞内局在、そして上流に想定される受容体を同定する手がかりとなると考えている。

#### (3). NYAP は神経細胞内で何をしているのか

先に述べたように、NYAP ファミリーは神経細胞において PI3K/Akt 経路にいたる最も重要なハブとして機能している。本研究課題では、さらにその下流のシグナル伝達経路を検討する。

これまでに NYAP 欠損マウスにおいて Akt の活性化が減弱していることを明らかにした。本研究では NYAP-PI3K/Akt 経路下流のリン酸化基質の存在と、転写レベルでの標的の存在を検討する。

さらに、NYAP ファミリー 3 重欠損マウスにおいて、Rho ファミリー G タンパク質の活性がきわめて顕著に減弱していることを明らかにした(未発表)。本研究では Rho 活性化へ至るシグナル伝達経路を解析するとともに、NYAP-Rho 経路の下流のシグナルについても検討する。

#### (4). NYAP の生物個体レベルでの意義の解明

申請者はこれまでに NYAP1, 2, 3 各遺伝子欠損マウスを作製した。本研究の中心課題として、特に以下の 4 点に注目して NYAP 欠損マウスの解析をおこなう。

PI3K/Akt 経路はアポトーシス関連因子の活性や転写を制御することで神経細胞の生存維持に寄与していると考えられている。本研究では TUNEL 法などの染色法により、NYAP 欠損マウスでの神経細胞死について *in vivo* で検討する。これまでに神経栄養因子と神経細胞死との関連については多くのことが調べられてきたが、技術的な理由から、神経細胞初代培養や培養細胞株を用いた実

験が多かった。しかし、神経細胞初代培養では NYAP ファミリーの発現量は顕著に減少し、また培養細胞には NYAP の発現が見られないことから、再度 *in vivo* の実験系で検討しなおす必要性があると考えている。この点において、本研究課題は神経細胞死研究において、きわめて重要な意義を持つ。

PI3K 阻害剤を用いた実験や Akt の過剰発現の実験から、PI3K/Akt 経路は GABAA 受容体や AMPA 受容体の細胞膜局在の制御などにより、シナプス可塑性を調節している可能性が示唆されている。本研究課題では、NYAP ファミリーのシナプス機能における役割を検討する。

PI3K が神経軸索伸長や樹状突起の枝分かれなど細胞極性の制御に関与しているとの報告があり、NYAP 欠損マウスにおいてゴルジ染色法などにより神経細胞の形態について検討する。これは、Src 型キナーゼ欠損マウスにおいて樹状突起伸長の方向性・枝分かれ・スパイン成熟に異常が見られること、さらに NYAP 欠損マウスにおいて Rho ファミリー G タンパク質の活性が顕著に減弱していることの 2 点から、非常に興味深い。

上記 1-3 の NYAP の機能が、マウス個体においてどのような意義を持つのかを調べるために、NYAP 欠損マウスの行動学的解析をおこなう。

#### 4 . 研究成果

(1) 候補分子アプローチにより、GPI アンカー型膜タンパク質である Contactin ファミリーのクロスリンクにより、神経細胞において NYAP ファミリーのチロシンリン酸化量が上昇することを見出した。

(2) 時間空間的に網羅的な *in situ*

hybridization 法を、各遺伝子欠損マウスを negative control として用いることにより、詳細に解析した。一方で、非常に多くの種類の抗 NYAP 抗体 (モノクローナル抗体を含む) を作製したが、神経細胞に内在性に存在する NYAP タンパク質量がきわめて少ないため、検出には至らなかった。また、C 末端に結合する PDZ タンパク質の存在を仮定していたが、その実証には至らなかった (そのようなタンパク質は、そもそも存在していないかもしれない)。

(3) proteome 解析により、NYAP に結合するタンパク質を網羅的に明らかにし、NYAP 下流のシグナル伝達経路を解明した。

(4)

NYAP 欠損マウスでは異常なアポトーシスが起きていないことを明らかにした。すなわち、NYAP-PI3K 経路は、神経細胞の生存維持ではなく、形態形成にのみ関与していることを明らかにした。

NYAP が発生段階においてのみ発現し、形態形成制御に関与しているとの証拠を得たため、本項目の重要性は低いと考え、形態形成制御の分子機構を探る実験に専念した。

ゴルジ染色法ならびに各種免疫組織化学的方法により、NYAP ファミリー遺伝子多重欠損マウスの大脳皮質錐体神経細胞の形態異常および中心体タンパク質の動態異常を見出した。近年、神経樹状突起形成と中心体の関連が指摘されはじめてきており、NYAP ファミリーはアクチン系細胞骨格の再編成制御を介して中心体動態をも制御し、樹状突起形態形成に関与する可能性は、きわめて興味深い。

NYAP 遺伝子欠損マウスの解析により、NYAP が autism spectrum disorders と関与

する示唆を得た。実際、NYAP1, 3 は autism 関連遺伝子座と密接にリンクしていること、NYAP が関与する生化学的なシグナル伝達経路の構成因子に autism との関与が考えられる因子が多いことから、今後の研究の中心課題としたいと考えている。

#### 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2件)

1. Morita M, Suzuki T, Nakamura T, Yokoyama K, Miyasaka T and Yamamoto T. Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers increment of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth. Mol. Cell. Biol. 27: 4980-4990, 2007
2. Hoshina N, Tezuka T, Yokoyama K, Kozuka Hata H, Oyama M and Yamamoto T. Focal adhesion kinase regulates laminin-induced oligodendroglial process outgrowth. Genes Cells 12: 1245-1254, 2007

[学会発表](計5件)

3. 横山一剛・山本雅 GCOE シンポジウム 「新規 NYAP ファミリータンパク質は PI3K p85 の主要な結合タンパク質である」 2009年3月7日 山梨
4. 横山一剛・山本雅 GCOE シンポジウム 「Novel NYAP family phosphoproteins are the major binding partners of

phosphoinositide 3 kinase p85 in the brain」 2009年2月10日 東京

5. 横山一剛・山本雅 分子生物学会年会 「NYAPファミリーは神経細胞特異的に発現する PI 3 kinase p85 の主要な制御因子である」 2008年12月10日 神戸
6. 横山一剛・山本雅 リン酸化ネットワーク研究会 「脳神経系における Fyn キナーゼの新規標的分子」 2008年5月30日 大阪
7. 横山一剛・山本雅 分子生物学会年会 「Phosphorylation at Tyr -694 of Nogo A by Src-family kinases」 2007年12月11日 横浜

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 一剛

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：20431760

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し