

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500390

研究課題名(和文) 恐怖記憶及び覚せい剤依存形成に関わる RPTP の役割

研究課題名(英文) A role of RPTP in fear memory formation and methamphetamine addiction

研究代表者

藤川 顕寛 (Fujikawa, Akihiro)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：50414016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、恐怖記憶並びに覚せい剤嗜好形成における PTPRZ の制御機構の解明を目指した。PTPRZ の欠損マウスの神経シナプトソーム中ではシナプス機能に関わる GIT1 のリン酸化レベルが野生型マウスに比べて高く、PTPRZ による脱リン酸化は正常な GIT1 の機能に必須であることを明らかにした。PTPRZ は GIT1 を介して恐怖記憶(心的外傷後ストレス障害のモデル)や覚せい剤依存に関わると想定されたが、生きた細胞内で PTPRZ の働きをとめる阻害ペプチドが得られず、PTPRZ の薬理的阻害による恐怖記憶などの抑制効果は検証するに至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to determine the signaling pathway in which PTPRZ, a receptor-type tyrosine phosphates, enhances context fear memory formation, and methamphetamine-induced place preference. We found that phosphorylation of GIT1 at tyrosine residue 554 was higher in the synaptosomes obtained from Ptprz-deficient mice than in those from wild-type mice. We also revealed that GIT1 dephosphorylation by PTPRZ was essential for the normal GIT1 function. These new findings suggest that the regulation of GIT1 by PTPRZ in central synapses leads to undesirable learning outcomes in the fear memory consolidation (the animal model of post-traumatic stress disorder), and drug addiction. Unfortunately, we failed to develop a cell permeable pseudosubstrate PTPRZ inhibitor, and therefore the in vivo effect of pharmacological PTPRZ inhibition could not be examined.

研究分野：脳神経科学全般

キーワード：チロシンリン酸化 チロシンホスファターゼ 覚せい剤 記憶 シナプス

1. 研究開始当初の背景:

タンパク質のチロシンリン酸化は、記憶・学習の細胞基盤である神経シナプスの可塑性の制御に深く関与している。チロシンリン酸化シグナルはリン酸化反応を担うチロシンキナーゼ(PTK)と脱リン酸化を担うチロシンホスファターゼ(PTP)によって制御されているが、シナプス可塑性における PTP の役割はよくわかっていない。神経伝達に関わるチャンネルや受容体の多くは、シナプス裏打ちタンパク質として知られる PDZ ドメイン含有タンパク質に結合してシナプス上に適切に配置されている。

受容体型 PTP(RPTP)ファミリーには、ヒトで 37 の分子種が存在するが、その中で R5 サブファミリーに属する PTPRZ と PTPRG のみが PDZ タンパク質に結合するためのモチーフ配列をカルボキシル末端に有している。ユビキタスに発現する PTPRG に対して、PTPRZ は、脳神経系に選択的に強く発現し、シナプス画分への集積も認められている (*Brain Res Mol Brain Res.* 72, 47-54, 1999)。成熟した *Ptprz* 欠損マウスでは同週齢の野生型マウスに比べて海馬学習能力(モリス式水迷路)が低下している。この学習低下に対応するように、成熟時の海馬 CA1 領域における電気生理学特性(長期増強 LTP)にも変調が認められる (*J. Neurosci.* 25, 1081-1088, 2005)。

学習刺激を任意にコントロールできるマウス状況嫌悪(恐怖)学習テストは、学習刺激に伴う脳内変化の経時解析において有用な解析手法になっている。この学習課題は心的外傷後ストレス障害(PTSD)の動物実験モデルとしても有名である。*Ptprz* 欠損マウスでは、嫌悪的な電気刺激(フットショック)を受けた場所の記憶が低下している (*Neurosci. Letts.* 399, 33-38, 2006)。この記憶に関わるメカニズムとして、野生型マウスの海馬では、アクチン細胞骨格の制御に関わる Rho/Rock 系に対する負の調節因子である p190RhoGAP のチロシンリン酸化レベルがフットショック刺激 1 時間に低下するという現象が見出されたが、その一方 *Ptprz* 欠損動物の海馬内においては、こうした p190RhoGAP のリン酸化レベルの変化は認められない (*Neurosci. Letts.* 399, 33-38, 2006)。PTPRZ は、その細胞内の PTP 酵素ドメインによって基質分子を脱リン酸化することでシナプス可塑性を調節していると考えられるが、p190RhoGAP を含め、GIT1, MAGI1, PIST などが PTPRZ によって直接脱リン酸化される基質分子として同定された (*J. Biol. Chem.* 286, 37137-37146, 2011)。ここまでの知見を総合すると、学習刺激が入ると、何らかの仕組みで神経シナプスにおける PTPRZ のホスファターゼ活性が強まり、基質分子群のチロシンリン酸化を調節して、学習が強固になるよう働くものと推測される。

PTPRZ の発現は、成熟マウス脳内全域に広く認められる。このことからすると、PTPRZ は海馬における学習のみに関わっているとは考えにくい。事実、*Ptprz* 欠損マウスは、ドーパミン神経に作用する覚せい剤(methamphetamine)に対する嗜好および依存形成に対して抵抗性を示す知見が得られている。PTPRZ は、中枢シナプスの可塑性が生後発達し、適切な学習能力が付与されていくことに寄与すると思われるが、PTSD や薬物依存などの好ましくない記憶・学習効果に対して、これを増強する方向に関与していると想定される。神経シナプスにおける PTPRZ シグナルの分子基盤の解明、またそのホスファターゼ活性が学習に寄与することの実証が必要と考えられた。

2. 研究の目的

本課題では、申請者が見出した状況嫌悪(恐怖)記憶の形成(PTSDの動物モデル)及び、覚せい剤嗜好形成に関わる PTPRZ シグナリングの解明を行う。また申請者が見出した PTPRZ の基質配列(*J. Biol. Chem.* 286, 37137-37146, 2011)を用いた阻害ペプチドを開発し、恐怖記憶形成などの減弱作用の実証を目指した。

3. 研究の方法

(1) GIT1 は低分子量 G タンパク質 ARF に対する GAP(GTPase activating-protein)である。*Git1* 欠損マウスには海馬学習障害が同定されており(*Brain Research*, 1317, 218-226, 2010)、GIT1 がシナプス神経伝達を直接担う AMPA 型グルタミン酸受容体のスパイン移行へ関与すると報告されている (*J. Neurosci.* 23, 1667-1677, 2003)。このため、GIT1 が PTPRZ シグナリングの下流でシナプス機能の制御に関与すると考えられた。しかし、GIT1 のチロシンリン酸化とシナプス機能の関係はわかっていない。まず、野生型マウスと *Ptprz* 欠損マウスの脳組織における PTPRZ の基質タンパク質のチロシンリン酸化の比較を行う。

(2) シナプス機能との関係性でとくに注目された *Git1* 上の PTPRZ 脱リン酸化サイト Tyr554 の機能的意義を、Tyr554 の各種変異型 GIT1 を培養細胞に発現させ明らかにする。

(3) 脳組織内の PTPRZ は、その細胞外領域がコンドロイチン硫酸(CS)糖鎖によって高度に修飾された CS プロテオグリカンとして発現しているが、シナプスに存在する PTPRZ-B アイソフォームが CS 糖鎖で十分修飾された状態で発現するような培養細胞はなかった。CS 型 PTPRZ-B を発現している細胞株を探索し、これを用いて PTPRZ とその下流の基質分子を再構成した細胞アッセイ系を構築し、神経伝達に関わる受容体やトランスポーターの活性制御を解析する。

(4) 申請者らが、PTPRZ の生理的基質に保存されていることを見出した。PTPRZ の脱リン酸化モチーフ：  
Glu/Asp-Glu/Asp-Glu/Asp-Xaa-Ile/Val-Tyr(P)-Xaa (Xaa は非酸性アミノ酸残基)中のホスホチロシン残基を脱リン酸化されないアナログに置換した擬似基質ペプチドを作成し、これを細胞膜透過型に改変することで PTPRZ の阻害による細胞効果进行评估する。

(5) 上記課題で得られた阻害ペプチドをマウス脳内に投与し、恐怖記憶、覚せい剤嗜好形成の減弱効果について検証試験を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 野生型マウスと *Ptporz* 欠損マウスにおける大脳シナプトソーム画分中の GIT1 のリン酸化を比較した結果、GIT1 タンパク質の存在量に差異はなく、GIT1 上の Tyr554 サイトのリン酸化レベルが *Ptporz* 欠損マウスのシナプトソーム中で高いことが判明した (*Plos One*. e0119361, 2015 で発表)。

(2) 上記の結果、シナプス内の GIT1 が PTPRZ の下流で働く分子と想定された。第二段階として、PTPRZ の脱リン酸化サイト Tyr554 の機能同定を試みた。Tyr554 は GIT1 上のどの機能領域(ドメイン)から離れており、事前に機能予測することは困難であった。そのため、正常な GIT1 と、Tyr554 を非リン酸化型に変異した Y554F を各種培養細胞に発現させて様々な評価・検討を行った。その結果、バナジン酸による細胞処理(PTP の非特異的阻害)によって非特異的に細胞タンパク質のチロシンリン酸化を誘導した状態で HEK293 細胞における正常型 GIT1 及び Y554F 変異体に対する結合分子を比較すると、Y554F 変異体では、細胞接着に関わる paxillin とファミリー分子 Hic-5 との結合がバナジン酸処理によって低下していないことが見出された(*Plos One*. e0119361, 2015)。

すでに GIT1 と paxillin 及び Hic-5 ファミリーとの結合様式は詳細に解析され、GIT1 の FAH ドメイン(647 からカルボキシル末端 770 残基まで)を介した結合の詳細がタンパク質構造レベルでわかっていた (*Cell Signal*. 19, 1733-1744, 2007)。一方、この構造からは FAH ドメインから大きく離れた Tyr554 サイトがリン酸化でされたことで FAH ドメインに対する分子結合が変化する可能性は考えにくく、我々の捉えた現象が副次的ではないかとの指摘がなされた。

そこで検証の為、Tyr554 をリン酸化模倣型のアスパラギン酸に置換した GIT1 の Y554D 変異体を作成し、この Y554D 変異体ではバナジン酸刺激なしの状態でも Hic-5 との結合が正常型に比べて減少しており、paxillin に対して同様の傾向を示すことを確認した。さらに Tyr554 サイトのみで GIT1

と Paxillin/Hic-5 との結合が制御されることを示すための実験を行った。GIT1 上の Tyr554 を含めてリン酸化候補になっているチロシン残基の 10 箇所をフェニルアラニン残基に置換した GIT1-Y10F 変異体では有意なチロシンリン酸化は検出されない (*J. Biol. Chem.* 286, 37137-37146, 2011)、この Y10F 変異体から 554 サイトだけをチロシン残基に戻した Y9F-Y554 変異体では、正常型と同様にバナジン酸処理でリン酸化を誘導すると paxillin などとの結合が弱まることを確認した(*Plos One*. e0119361, 2015)。

GIT1 は FAH ドメイン以外にも ArfGAP, ANK repeat, や SHD などのドメイン構造をもっている。これらドメインは PIX との結合や GIT1 自体のオリゴマー化に寄与している。Tyr554 の変異体は、PIX や GIT1 同士の結合には全く影響を与えなかった。Tyr554 のリン酸化は FAH ドメインへの分子結合のみを選択的に弱めることが判明した。

GIT1 と paxillin や Hic-5 との結合に関してシナプスにおける機能研究はないが、葉状仮足における細胞接着構造のダイナミクスを制御し、細胞移動・接着に関与する主要な制御機構であることはよく知られていた。そこで我々は、GIT1 の Tyr554 サイトのリン酸化が、細胞移動(Boyden chamber, random moving, wound healing で解析)や葉状仮足のダイナミクス(Live cell time-lapse imaging)に影響を与えるのか、こうしたアッセイでよく用いられる静脈平滑筋 A7r5 細胞株を用いて解析を行った。その結果、GIT1 のノックダウンによって失われる細胞移動能は、非リン酸化型(Y554F)、リン酸化模倣型(Y554D)のどちらでも回復せず、正常型もしくは 554 サイトのチロシン残基のみを戻した Y9F-Y554 でレスキューされることが判明した (*Plos One*. e0119361, 2015)。すなわち、Tyr554 サイトの可逆的なリン酸化・脱リン酸化は、FAH ドメインに対する分子結合・解離のスイッチであり、この on/off の繰り返し、正常な GIT1 の機能に必須であると考えられた。

(3) 脳内と同等レベルに CS 修飾された PTPRZ-B アイソフォームを発現させる培養細胞株を見出し、これに制御対象と想定されるトランスポーター等を安定的に発現させた機能解析系を構築した。しかし、GIT1 の Tyr554 リン酸化の機能的意義の解明に予想以上に時間を要したため、PTPRZ-GIT1(Tyr554)シグナルが海馬記憶形成や覚せい剤嗜好形成に関わるメカニズムとしての実証研究は十分できていない。今後も論文発表に向けた努力を継続する。

(4) および(5) 基質モチーフをもとに擬似基質ペプチドのコア配列(配列 Glu-Asp-Asp-Ala-Ile-F<sub>2</sub>Pmp-Ser-Val)を決定した。*in vitro*における PTPRZ の阻害効果は

IC<sub>50</sub> = <10 μM と良好であったが、細胞膜透過性などの問題もあり、培養細胞レベルにおいて PTPRZ を明瞭に阻害するまで性能が向上しなかった。そのため、*in vivo* レベルでの評価に関しては、動物実験の必要性の観点から実施を見合わせた。

本課題の実施によって、PTPRZ が GIT1 を介して恐怖記憶（心的外傷後ストレス障害のモデル）や覚せい剤依存を強固にしている分子機構の実験モデルは想定された。今後も継続してその実証に取り組みたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fujikawa, A., Matsumoto, M., Kuboyama, K., Suzuki, R., and Noda, M. Specific Dephosphorylation at Tyr-554 of Git1 by Ptpz Promotes Its Association with Paxillin and Hic-5. *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0119361 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

Fujikawa, A., Matsumoto, M., Kuboyama, K., Suzuki, R., and Noda, M. Phosphorylation of Git1 at Tyrosine 554 negatively regulates association with Hic-5 and paxillin. 第11回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス 2014年11月12日～14日東北大学（宮城県仙台市）

Fujikawa, A., Matsumoto, M., Kuboyama, K., Suzuki, R., and Noda, M. Phosphorylation of Git1 at Tyrosine 554 negatively regulates association with Hic-5 and paxillin. 第六回日本プロテインホスファターゼ研究学術集会 2014年2月20日～21日三重大学（三重県津市）

〔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://www.nibb.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤川 顕寛 (Fujikawa, Akihiro)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：50414016