

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19790055

研究課題名 (和文) リン酸化による神経可塑性制御機構の解析

研究課題名 (英文) Regulation of neuronal plasticity by protein phosphorylation

研究代表者

池田 篤史 (IKEDA ATSUSHI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70437242

研究成果の概要：

神経細胞や筋細胞では、 Ca^{2+} ストアである小胞体が細胞膜直下に接合した特殊な構造体が存在する。この構造体の機能を欠く KO マウスにおけるタンパク質リン酸化の変化を評価することでリン酸化による可塑性調節機構を検討し、約 10 種の候補分子を同定した。また、このマウスの小脳における遺伝子発現の解析を行い、可塑性調節因子としての機能が示唆されている複数の分子の発現量が変動していることを見出した。

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：(1)神経化学 (2)脳 (3)情報伝達 (4)リン酸化

1. 研究開始当初の背景

細胞が外界からの刺激に応じて自身の機能や形態を変化させるためには、細胞外からの様々な刺激を細胞内シグナル伝達経路の活性化へと変換する必要がある。このような細胞内のシグナル伝達を担当する分子はセカンドメッセンジャーと総称され、cAMP や Ca^{2+} に代表される。このうち Ca^{2+} は、細胞内において主に小胞体に貯蔵されており、細胞が刺激を受けると小胞体膜上のイオンチャネルを通過して細胞質に放出され、細胞質に存

在する Ca^{2+} 依存性のプロテインキナーゼやホスファターゼといった酵素の活性を調節することが知られている。 Ca^{2+} 依存性の酵素群の活性化によりスタートした細胞内シグナル伝達は、多くの場合最終的には核内において転写因子の活性を制御することで、多岐にわたる標的遺伝子の発現を調節することで細胞の機能を変化させると考えられている。このように細胞質の Ca^{2+} レベルに応じて活性が調節されるシグナル伝達経路は、哺乳動物のほぼすべての細胞種において非常に

重要な機能を担っていることが明らかになっている。

しかしながら、特に神経細胞や筋細胞など電気的興奮性を有する細胞においては、それぞれの細胞腫を特徴づける生理機能の発現にも Ca^{2+} 依存性シグナル伝達経路が必須である。すなわち、神経細胞における興奮の伝播である活動電位の発生やシナプス伝達や、筋細胞における収縮において Ca^{2+} が必要であることがよく知られている。

神経細胞や筋細胞などの興奮性細胞を電子顕微鏡により観察すると、 Ca^{2+} 貯蔵器官である小胞体が、細胞膜の直下に密接に接合した「結合膜構造」の存在が認められる。この「結合膜構造」は、細胞内外の Ca^{2+} の出し入れを調節する細胞膜上のイオンチャネル分子と、貯蔵器官である小胞体から細胞質への Ca^{2+} の放出を司るイオンチャネルが機能的に共役して、厳密かつ効率よく細胞質 Ca^{2+} レベルを調節するために必要な構造体であることが示唆されている。我々は、この結合膜構造の機能の個体レベルにおける検討を試みた。

機能的な結合膜構造の構築において、小胞体を細胞膜にアンカーする「ジャンクトフィリン (JP)」と呼ばれる小胞体膜貫通タンパク質の存在が必須である。ジャンクトフィリンは、一次構造および生理機能において相同性のある JP-1 ~ JP-4 より構成されるタンパク質ファミリーを形成している。これらのうち JP-1 および JP-2 は主に筋細胞に局限して発現が認められる。また、中枢神経系においては、JP-3 および JP-4 がオーバーラップした発現分布を示すことがわかっている。そこで、中枢神経における結合膜構造の機能の解明を目的に、遺伝子工学的手法により JP-3 欠損マウスおよび JP-4 欠損マウスを作製し、表現型の解析を行った。しかしながら、それぞれ単独のノックアウトマウスでは際立った表現型は認められなかった。そこで、JP-3 欠損マウスと JP-4 欠損マウスの交配により、両者を欠失するマウス (JP-ダブルノックアウトマウス、JP-DKO マウス) を作製した。

本研究開始に先立って行った個体レベルでの行動学的な解析や脳スライスを用いた電気生理学的な解析により、JP-DKO マウスの海馬および小脳において神経可塑性に異常が認められることがわかった。神経可塑性は、神経細胞間の情報を伝達するシナプスにおける伝達の効率が経験依存的に変化する現象であり、記憶・学習の分子基盤であることが広く受け入れられている。神経可塑性の誘導や成立には、タンパク質のリン酸化を行う種々の Ca^{2+} 依存性のプロテインキナーゼやホスファターゼが非常に重要な役割を担うことが先行研究により明らかにされてい

る。しかしながら、神経可塑性の誘導および成立、維持といった様々な段階において、いかなる分子がリン酸化されるか、またリン酸化を受けた分子がどのようなメカニズムで可塑性の制御を行うか、という点については、適切なモデル系が存在しないこともあり、大部分が未解明のまま残されていた。

2. 研究の目的

上記のように、神経可塑性の各段階において、細胞質 Ca^{2+} レベルの上昇によって活性化される酵素群が非常に重要な機能を担っていることは明らかである。我々が作製した JP-DKO マウスは、①機能的な結合膜構造の構築に必須であるジャンクトフィリン分子を欠損することで、小胞体から細胞質への Ca^{2+} 放出に異常が生じ細胞質 Ca^{2+} 上昇に依存するシグナル伝達経路の活性低下など、正常なシグナル伝達の阻害が示唆されること、②先行研究における行動学・電気生理学的解析によって、個体レベル・脳スライスレベルの両方において神経可塑性の異常が見いだされたこと、という2点から、神経可塑性調節とタンパク質リン酸化の関連を解明するための非常に優れたモデルであると考えられた。特に、JP-DKO マウスの小脳においては、脳スライスに、神経可塑性の一種であり、シナプス伝達の効率を長時間にわたって低下させる現象である「長期抑圧 (Long-term suppression, LTD)」を誘導するための実験的な刺激を加えると、逆にシナプス伝達の効率が上昇する「長期増強 (Long-term potentiation, LTP)」とよばれる現象が誘導されるという非常に顕著かつ特徴的な異常が生じていることが見いだされていた。正常な状態でのシナプス伝達の可塑性の各段階において、いつ、どこで、どのような分子が、どのようなキナーゼによって、どの部位をリン酸化されるのか、さらにはそのリン酸化が核内における遺伝子発現プロファイルに対してどのように影響を与えるか、という問いに対する解答を提示することを可能にすることを研究の目的として設定した。上述のように神経可塑性は記憶・学習など脳高次機能の細胞・分子レベルにおける基盤であるという考えが広く受け入れられている。したがって、本研究において得られる成果は、統合失調症やうつ、てんかんや記憶障害など、脳高次機能の障害によって引き起される疾患の新たな治療法のターゲットとなりうる分子メカニズムを明らかにすることができると思われる。

3. 研究の方法

研究の対象としては、中枢神経系においては比較的シンプルな構造を有する小脳を第一選択肢として研究を行った。前述のように、

本研究開始以前に行った脳スライスを用いた電気生理学的解析によって、JP-DKO マウスの小脳において可塑性の顕著な異常が生じることがわかっている。そこで、このような可塑性の異常にともなって、正常な状態と比較してリン酸化レベルが変化しているタンパク質を同定することで、シナプス伝達の可塑性が正常に保たれている際に起っている現象を捉えることができると考え、以下のような研究方法を選択した。

はじめに、JP-DKO マウスの小脳において、野生型マウスの小脳と比較してリン酸化レベルが変化している分子を同定するための研究を行った。まず、JP-DKO マウスおよび野生型マウスより、小脳を摘出した。この際、生体内におけるリン酸化状態を保ったままでタンパク質を抽出できるよう、低温において、急性に組織の単離を行った。このようにして得た小脳組織を比較的高濃度の各種プロテインホスファターゼインヒビターの存在下においてホモジナイズし、低速で遠心することで核や細胞 debris を除去し、タンパク質画分を得た。この画分を出発資材料とし、金属イオンアフィニティークロマトグラフィー法により、リン酸化タンパク質を特異的に濃縮精製した。このアフィニティー精製には、QIAGEN 社より市販されている、哺乳動物細胞からリン酸化タンパク質を精製することを目的としたカラムを使用した。リン酸化された部位を特異的に検出することができる複数種の抗体を用いたイムノプロットを行うことで、予想どおりカラムからの溶出画分にリン酸化タンパク質が濃縮されていることを確認した。次に、濃縮精製したリン酸化タンパク質を蛍光標識二次元電気泳動法 (2D-DIGE 法、GE health science 社) により解析した。この方法は、比較したい2つのタンパク質サンプルをそれぞれ異なる傾向波長を有する色素により標識し、蛍光強度の比較により量を比較する手法である。異なる蛍光色素により標識されたタンパク質サンプルは標識後に混合した状態で等電点電気泳動、ラージフォーマットの SDS-PAGE を順に行うことで二次元展開される。すなわち、標識後の展開は混合された状態で一枚のゲルを用いて行うため、本手法はゲル間の再現性が十分でなく、タンパク質スポットの同定が困難であるという従来の二次元電気泳動法の問題点を克服する非常に優れた手法である。ここで、各タンパク質のリン酸化の程度の差は、精製した総リン酸化タンパク質サンプル中における含有量に変換され、ゲル上における比較サンプル間の蛍光強度の差として検出される。すなわち、JP-DKO マウスにおいて野生型マウスと比較してリン酸化が亢進または低下しているタンパク質は、ゲル上においていずれかのサンプルに偏って

蛍光が検出されるタンパク質スポットとして見出される。リン酸化状態に変化が認められたタンパク質のスポットは、ゲルから物理的に切り出した後プロテアーゼによる消化を行った後、MALDI-TOF 型質量分析計による質量分析 (MS) を行った。MS 解析の結果得られたスペクトルデータは、オンラインで公開されているデータベースに対するサーチを行い、スポットに含まれているタンパク質の同定を行った。

また、JP-DKO マウスにおいて観察された神経可塑性の異常の遺伝子発現との関連性について検討を行った。

このため、野生型および JP-DKO マウスの小脳における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法により比較解析した。

まず、野生型・JP-DKO マウスより小脳を摘出し、液体窒素により急速に凍結した。その後市販のミニカラム (QIAGEN RNeasy kit) を使用して total RNA を精製した。このようにして RNA は、quality check 後に逆転写反応を行い、蛍光ラベルすることでアレイプローブを作製した。これらプローブを定法に従ってジーンチップ (アフィメトリックス社) にハイブリダイゼーションし、洗浄後蛍光スキャンによりシグナルを検出した。このようにして得られたデータを解析し、JP-DKO マウス小脳において野生型と発現強度が 1.5 倍以上変動している遺伝子をピックアップした。これらの候補遺伝子について、real time-PCR 法を用いた転写変動の再現性確認を行った。また、候補遺伝子のうち再現性よく変動が認められた遺伝子群においては、各分子を特異的に認識する抗体を用いてイムノプロットを行うことで、タンパク質レベルにおいても同様の発現変動が認められるかどうか検討を行った。

4. 研究成果

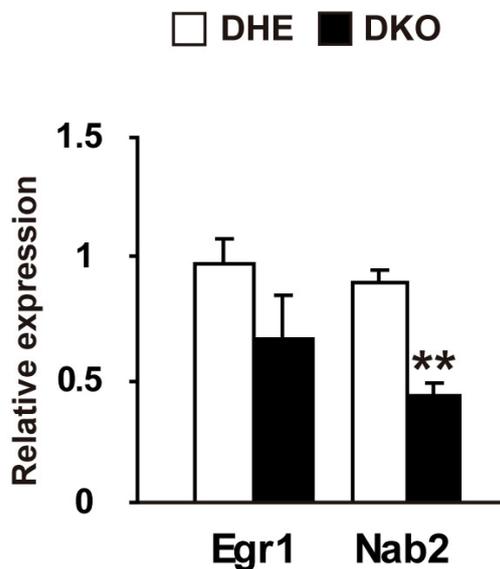
まず、小脳より抽出したタンパク質画分からアフィニティークラムを用いて生化学的にリン酸化タンパク質の濃縮精製を行うための実験系を確立した。脳組織からのリン酸化タンパク質濃縮精製についてはこれまでのところ先行の研究が少なく、本研究において実験系を確立したことで今後さらなる解析を効率よく進めることができると考えられる。

次に、この実験系を用いて野生型および JP-DKO マウス小脳より濃縮精製したリン酸化タンパク質を蛍光標識二次元電気泳動法 (2D-DIGE 法) により展開することで、リン酸化レベルが変動しているタンパク質のスポットを約 20 個程度見出すことができた。各変動スポットについて、ゲルからの切出し、タンパク質消化および MALDI-TOF 型質量分析計を用いた解析を行った結果、約 10

種のリン酸化変動タンパク質を明らかにすることができた。これらの分子はいずれも脳における発現が確認されているタンパク質であり、一部は神経可塑性において機能することが報告されている分子であった（未発表データ）。すなわち、本研究の成果として得られた分子群は、実際に神経可塑性においてなんらかの機能を果しており、その機能がリン酸化によって制御されていることが予想される。

また、JP-DKO マウスと野生型マウスの小脳における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより解析し、発現レベルが変化している遺伝子の同定を試みた。その結果、すでに神経可塑性との関連が報告されている転写因子 Early growth response-1 (Egr-1) および Egr-1 の直接の標的である Nab2 とよばれる転写抑制因子の発現が JP-DKO マウスにおいて野生型と比較して低下していることが見出された。Real time-PCR 法を用いた解析によってより詳細に転写物量を検討する実験においても、同様にこれら2つの遺伝子の発現レベルの低下が認められた(図参照)。

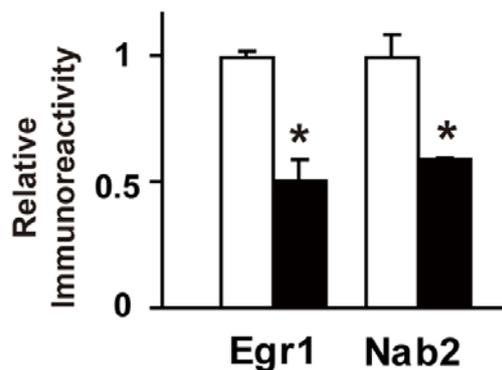
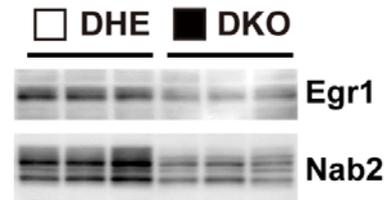
Real-time PCR



さらに、イムノブロット法によるタンパク質レベルにおける発現解析を行ったところ、遺伝子発現の低下と一致して Egr-1 および Nab2 タンパク質の量が JP-DKO マウスの小脳において減少していることも明らかになった(図参照)。Egr-1 は神経可塑性を誘導する強い興奮により転写が誘導されること、また Egr-1 の発現が海馬神経細胞における可塑性の成立に必要なことがすでに報告さ

れている。以上より、本実験結果は、JP-DKO マウスの小脳神経細胞において起っている可塑性の異常を反映する結果であると推察された。

Western blot



このように、本研究においては、神経可塑性の異常とタンパク質リン酸化制御の異常の両方を同時に呈する JP-DKO マウスをモデルとして用いることで、タンパク質リン酸化による神経可塑性の制御機構の解明につながる糸口となる結果を得ることができた。

また、このようなタンパク質のリン酸化による制御が核内における転写制御とどのように結びつけられているかという点について解析を行うことで、今後の同分野における研究を進めていく上で指標となる結果を得ることができた。

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1件)

Abnormal features in mutant cerebellar Purkinje cells lacking junctophilins

Ikeda A, Miyazaki T, Kakizawa S, Okuno Y, Tsuchiya S, Myomoto A, Saito SY, Yamamoto T, Yamazaki T, Iino M, Tsujimoto G, Watanabe M, Takeshima H. *Biochem Biophys Res Commun.* 363, 835-9 2007

査読あり

〔図書〕（計 1 件）

Ikeda A, Yamazaki T, Takeshima H.

蛋白質 核酸 酵素 PNE 共立出版

52, 1965-72

2007 年 12 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田篤史

(IKEDA ATSUSHI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70437242