

## 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 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300141

研究課題名（和文） シナプス前性タンパク質のリン酸化による脳機能制御機構の解明

研究課題名（英文） Roles of protein phosphorylation in regulatory mechanism of presynaptic functions.

研究代表者

高橋 正身 (TAKAHASHI MASAMI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10318826

研究成果の概要（和文）：

SNAP-25 はシナプス前部に発現するタンパク質で、神経伝達物質の放出に必須な役割を果たしている。SNAP-25 の Ser<sup>187</sup> はプロテインキナーゼ C によってリン酸化を受けるが、その機能的な役割については明らかではなかった。今回 SNAP-25 のリン酸化が PP2A によっても制御され、モノアミン放出の制御や発達期におけるてんかん発症抑制などに重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

SNAP-25 is a presynaptic protein essential for neurotransmitter release from presynaptic nerve terminals. SNAP-25 is phosphorylated at Ser<sup>187</sup> in protein kinase-dependent manner. We found that the phosphorylation SNAP-25 was regulated by protein phosphatase 2A, and played essential roles in the PKC-dependent regulation of dopamine release from presynaptic nerve terminals, and in the suppression of epilepsy during early postnatal period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質、SNARE タンパク質、開口放出、シナプス前世制御、タンパク質リン酸化、ストレス、てんかん

## 1. 研究開始当初の背景

SNAP-25 は神経伝達物質の放出に不可欠な SNARE タンパク質である。我々は PC12 細胞を用いてプロテインキナーゼ C (PKC) が SNAP-25 の Ser<sup>187</sup> をリン酸化し、ドーパミンやアセチ

ルコリン放出を促進することを明らかにした。神経伝達物質放出が促進される機構としては PKC によるリン酸化によって放出可能な小胞プールが大きさが増大することを明らかにした。さらに SNAP-25 のリン酸化が NGF

処理によっても引き起こされ、生後の脳の発達期に大きく増加すること、痙攣発作時に大きく変化することなども明らかにしていた。また成体マウスではストレス刺激を加えると脳内でSNAP-25のリン酸化が上昇することも明らかとなった。

PKC 依存的な SNAP-25 のリン酸化が、どのような脳機能の発現に関わっているかを明らかにするため Ser<sup>187</sup> を Ala に置換したノックインマウスを作成したところ、扁桃体でのドーパミンやセロトニン放出が顕著に低下していることや、オープンフィールド試験や明暗選択試験で顕著な不安様行動を示すことが明らかとなった。さらに変異マウスを高ストレス環境下で飼育すると拒食に陥り、野生型マウスとは異なり決して回復しないことから、SNAP-25 のリン酸化がストレスへの適応機構に関わる可能性も考えられるようになってきた。さらにリン酸化部位を変異させたノックインマウスでは生後3週頃から自発性的てんかん発作を起こすことも明らかになった。

このようなことから SNAP-25 のリン酸化が脳の機能において重要な役割を果たしていることが示唆されたが、(1) 脳内で SNAP-25 のリン酸化、脱リン酸化がどのような機序で制御されているのか、(2) SNAP-25 のリン酸化部位の変異がどのような機序で不安様行動を引き起こすのか、などについては明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

SNAP-25 のリン酸化を介した脳機能の制御機構を明らかにするため、①SNAP-25 のリン酸化が PKC によるモノアミン放出の制御に関わっているかを明らかにする。②SNAP-25 の脱リン酸化に関わるホスファターゼを特定する。③SNAP-25 のノックインマウスで見られるフェノタイプが、生後の発達過程でどのように出現してくるかを明らかにする。④SNAP-25 のリン酸化変異がどのような機序で不安様行動を発症させるかを明らかにする。⑤SNAP-25 のノックインマウスで見られる不安様行動の発症にモノアミン放出の低下が関与しているかを明らかにすることなどを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) ノックインマウスの繁殖

ノックインマウスは体外受精を用いて計画的に同腹の野生型およびホモ変異体を出生させ実験に使用した。動物実験および動物の取り扱いについては、北里大学医学部動物実験委員会の審査と学長の承認の下、北里大学動物実験指針を遵守して行った。

### 2) シナプトゾームを用いた SNAP-25 の脱リ

ン酸化機構の解析。

マウスの脳を4℃低温下でテフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、定法に従って遠心分画を行いP<sub>2</sub>分画を得た。酸素で飽和させたLow-K<sup>+</sup> buffer (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM D(+)-glucose, 15 mM HEPES, NaOH, pH 7.4) 中に懸濁し37℃で10分間インキュベーションした後、さまざまな薬物処理を行った。その後SDSサンプルバッファーで溶解させ、SDS-PAGEでタンパク質を分離し、抗リン酸化抗体を用いてイムノブロット解析を行った。リン酸化バンドの検出には化学発光検出系を使用し、LAS-4000を用いて定量した。

### 3) 行動解析

行動解析は防音室内で11:00~18:00の間に行った。ハンドリングは1日1回5分間行い、行動解析までに3回行った。

明暗選択テストはビーム式小動物行動解析システム(室町機械)を用いて、1回あたり30分間測定を行った。不安様行動の指標として明所移動比率を主要なパラメータとして解析した。

オープンフィールドテストは50 cm x 50 cmの塩化ビニル製の箱内で行った。マウスの行動はオープンフィールド真上に固定されたビデオカメラで撮影し、解析ソフト Lime Light を用いて解析した。不安様行動の指標としては中央移動比率とフリージング時間を主要なパラメータとして解析した。

### 4) 脳波測定

セボフルランの吸入麻酔下で、皮質脳波記録用ビス電極を頭骨上に、深部電極を海馬に刺入留置し、コネクターに接続後、頭骨に固定した。脳波記録は防音暗箱内(明期:午前8時~午後8時)に設置した直径30 cmの円形の脳波測定用ゲージでマウスを飼育し、手術直後から約14日間連続で行った。マウスの行動は動画と脳波を同時に記録し、発作波や痙攣について解析した。暗期の動画撮影には赤外線光源を用いた。

## 4. 研究成果

### 1) ドーパミン放出制御への SNAP-25 のリン酸化の役割

野生型およびリン酸化部位を変異させたノックインマウスの脳からシナプトゾームを調整し、PKCによるドーパミン放出の促進能を比較した。野生型マウスではPhorbol 12, 13-dibutyrateで前処理しPKCを活性化しておくこと、脱分極依存性のドーパミン放出が顕著に促進され、この促進はPKCの阻害剤であるBISによって見られなくなった。一方ノッ

クインマウスの脳から調整したシナプトゾームではドーパミン放出の促進は認められなかった。以上の結果から SNAP-25 のリン酸化は、成体マウスの脳で PKC 依存的なドーパミン放出の促進制御に必須な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 2) SNAP-25 の脱リン酸化機構の解明

野生型マウスから調整した粗シナプトゾームに Phorbol 12, 13-dibutyrate を作用させ PKC を活性化すると SNAP-25 のリン酸化が引き起こされる。その後  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアであるイオノマイシンを作用させると SNAP-25 のリン酸化が大きく減少した。外液の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを除くと脱リン酸化が起こらないことから、SNAP-25 の脱リン酸化には  $\text{Ca}^{2+}$  依存的なホスファターゼが関与することが考えられた。様々なホスファターゼの阻害剤の影響を調べたところ、SNAP-25 の脱リン酸化は PP2B の阻害剤である FK506 やサイクロスポリンでは抑制されなかったが、PP2A の阻害剤であるオカダ酸で抑制されることが明らかとなった。以上のことから SNAP-25 のリン酸化状態の制御には PP2A が関与していると考えられた。

## 3) SNAP-25 ノックインマウスで見られるフェノタイプの生後発達依存性の解析

SNAP-25 のリン酸化が起こらないノックインマウスでは、ストレス脆弱性以外にも、不安感の亢進などの情動異常、アストロサイトの活性化や BDNF の発現亢進などの脳内変化、脂質代謝異常などの様々な興味深い表現系がみられる。これらがどの様な機構で生じるかを明らかにするため、様々な週齢のノックインマウスを用いて行動異常の測定を行った。その結果不安感の亢進という情動異常は生後 3~4 週で出現し、ほぼ同時期に、BDNF の発現亢進やアストロサイトの活性化、自発的なてんかん発作なども起こっていることが明らかとなった。この時期の脳内でどの様な神経活動の変化が生じているかを明らかにするため、免疫組織化学法を用いて c-fos の発現を調べたところ、海馬の歯状回で部域特異的に神経活動の亢進が起きていることが示唆された。

## 4) 不安様行動発現機序の解明

SNAP-25 のノックインマウスでは、不安様行動の発症と自発性のてんかん発作が始まる時期がほぼ同時期であったことから、両者の間には何らかの因果関係が存在することが考えられた。この問題を明らかにするため、慢性埋め込み電極を用いた脳波の連続測定とビデオによる行動観察を行った。その結果海馬や皮質でのてんかん発作波は生後 3 週間後に出現したが、全身発作波が多発した 2 日

以内に不安様行動が出現することが明らかとなった。抗てんかん薬であるバルプロ酸を投与しておくとも不安様行動の発症が著しく抑制されることや、野生型マウスにピロカルピンを投与しててんかん重積を起こさせると、数日後に SNAP-25 のノックインマウスと極めて類似する不安様行動が出現することも明らかとなった。以上のことから SNAP-25 のノックインマウスで見られる不安様行動の発症には、生後発達期でのてんかん発作の多発が関わっていると結論した。

## 5) 不安様行動発現へのモノアミンの関与

SNAP-25 のリン酸化部位が変異したノックインマウスは、様々な不安様行動と共に扁桃体や視床下部でのドーパミンやセロトニン放出の低下が起こっている。行動異常の発症にモノアミン放出の低下が関与しているかを明らかにするため、シナプス間隙へのドーパミンの遊離は高めるが、セロトニンには作用しないメタンフェタミンの作用を野生型マウスとノックインマウスとで比較した。

オープンフィールド中を野生型マウスはまんべんなく移動するのにに対し、SNAP-25 ノックインマウスは壁際を好んで走る接触走性を示したが、野生型マウスも SNAP-25 ノックインマウスもメタンフェタミン投与による大きな変化は見ることが出来なかった。SNAP-25 ノックインマウスは、行動中動作を停止するフリージング様行動を示したが、メタンフェタミンを投与するとフリージング時間が顕著に短くなり野生型と変わらなくなることが明らかとなった。これらの結果から SNAP-25 ノックインマウスの異常行動の中で、フリージング様行動の発症に脳内カテコールアミン放出の低下が関わっている可能性が明らかとなった。

## 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 7 件)

- ① Yasuda K, Itakura M, Aoyagi K, Sugaya T, Nagata E, Ihara H, Takahashi M (2011). PKC-dependent inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis from astrocytes. *Glia* 59:143-151. (査読有)
- ② Yamamori S, Itakura M, Sugaya D, Katsumata O, Sakagami H, Takahashi M (2011) Differential Expression of SNAP-25 Family Proteins in the Mouse Brain. *J Comp Neurol*, 519: 916-932. (査読有)
- ③ Kataoka M, Yamamori S, Suzuki E, Watanabe S, Sato T, Miyaoka H, Azuma

- S, Ikegami S, Kuwahara R, Suzuki-Migishima R, Nakahara Y, Nihonmatsu I, Inokuchi K, Katoh-Fukui Y, Yokoyama M, Takahashi M: A Single Amino Acid Mutation in SNAP-25 Induces Anxiety-Related Behavior in Mouse. PLoS ONE, 6: e25158, 2011. (査読有)
- ④ Buralgossi A, Jung S, Meyer G, Jockusch WJ, Jahn O, Taschenberger H, O'Connor VM, Nishiki T, Takahashi M, Brose N, Rhee JS (2010) SNARE Protein Recycling by  $\alpha$ SNAP and  $\beta$ SNAP Supports Synaptic Vesicle Priming. Neuron. 68: 473-487. (査読有)
- ⑤ Yamazaki M, Fukaya M, Hashimoto K, Yamasaki M, Tsujita M, Itakura M, Abe M, Natsume R, Takahashi M, Kano M, Sakimura K, Watanabe M. (2010) TARPs gamma-2 and gamma-7 are essential for AMPA receptor expression in the cerebellum. Eur J Neurosci. 31: 2204-2220. (査読有)
- ⑥ Sadakata T, Shinoda Y, Sekine Y, Saruta C, Itakura M, Takahashi M, Furuichi T. (2010) Interaction of calcium-dependent activator protein for secretion 1 (CAPS1) with the class II ADP-ribosylation factor small GTPases is required for dense-core vesicle trafficking in the trans-Golgi network. J Biol Chem. 285: 38710-38719. (査読有)
- ⑦ Kataoka M, Sekiguchi M, Takahashi M (2009) Identification of a minimal segment of complexin II essential for preferential distribution in axons. J Neurochem, 108: 1109-1115. (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

- ① 永井利幸、上垣浩一、石川保幸、原とも子、高橋正身、塩坂貞夫、伊丹千晶、熊ノ郷晴子、小島正巳 多型による神経栄養因子の新しい機能制御. 第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 15 日 横浜
- ② 大塚新太郎、山森早織、渡辺滋、鈴木映二、齊藤正範、宮岡等、高橋正身 SNAP-25 のリン酸化は生後発達期のてんかんと不安様行動の発症の抑制に關与する. 第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 16 日 横浜
- ③ 飯田諭宜、山森早織、中屋千恵美、板倉誠、宮岡等、高橋正身 SNARE タンパク質 SNAP-25 の脱リン酸化の機構. 第 54 回日本神経化学学会大会 2011 年 9 月 27 日 山代温泉
- ④ 大城戸太郎、飯塚健、板倉誠、大塚新太郎、渡邊崇嗣、飯田諭宜、高橋正身 不安様行動発現における、BDNF 関与の可能性. 第 54 回日本神経化学学会大会 2011 年 9 月 27 日 山代温泉
- ⑤ 内野達也、澤 智裕、赤池孝章、板倉 誠、高橋正身、居原 秀 8-ニトロ-cGMP のシナプトゾーム内タンパク質に及ぼす影響. 第 54 回日本神経化学学会大会 2011 年 9 月 27 日 山代温泉
- ⑥ 渡辺和泉、板倉誠、菅谷津貴子、高橋正身  $\gamma$ -8 細胞内 C 末端領域の特異的部分に直接カルシニューリン/PP2B が結合する. Neuro2010 (第 53 回日本神経化学学会大会、第 33 回日本神経科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会) 2010 年 9 月 2 日 神戸
- ⑦ 小久保宏俊、山森早織、板倉 誠、飯田諭宜、宮岡 等、高橋正身 マウスの脳の SNAP-25 のリン酸化はモノアミンにより抑制される. Neuro2010 (第 53 回日本神経化学学会大会、第 33 回日本神経科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会) 2010 年 9 月 2 日 神戸
- ⑧ 大塚信太郎、山森早織、渡辺滋、鈴木映二、高橋正身 ビロカルピン投与によるてんかん重積によって引き起こされる可逆的及び非可逆的な情動異常の出現. Neuro2010(第 53 回日本神経化学学会大会、第 33 回日本神経科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会) 2010 年 9 月 2 日 神戸
- ⑨ 國枝恒兵、井田智明章、澤 智裕、赤池孝章、板倉 誠、高橋正身、居原 秀 8-nitro-cGMP による SNAREcomplex 形成の調節. Neuro2010 (第 53 回日本神経化学学会大会、第 33 回日本神経科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会) 2010 年 9 月 2 日 神戸
- ⑩ 水井利幸、上垣浩一、石川保幸、原とも子、塩坂貞夫、高橋正身、熊ノ郷晴子、小島雅己中枢神経系における BDNF 前駆体の役割. Neuro2010 (第 53 回日本神経化学学会大会、第 33 回日本神経科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会) 2010 年 9 月 2 日 神戸
- ⑪ 山崎真弥、深谷昌弘、橋本浩一、山崎美和子、板倉 誠、高橋正身、狩野方伸、渡辺雅彦、崎村建司 TARP  $\gamma$ 2、 $\gamma$ 7 は小脳 AMPA 型グルタミン酸受容体の機能的構成成分である. Neuro2010 (第 53 回日本神経化学学会大会、第 33 回日本神経科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会) 2010 年 9 月 3 日 神戸
- ⑫ 高橋正身、菅野 卓、山森早織、板倉 誠 PKC 依存的な SNAP-25 のリン酸化によるシナプトゾームからのドーパミン放出の促進機構. Neuro2010 (第 53 回日本神経化学学会大会、第 33 回日本神経科学大

- 会、第 20 回日本神経回路学会大会) 2010 年 9 月 4 日 神戸
- ⑬ 安田圭一、板倉誠、永田悦子、山森早織、居原 秀、高橋正身 SNAP-23 リン酸化部位の網羅的解析. 第 52 回日本神経化学学会大会 2009 年 6 月 23 日伊香保
- ⑭ 大塚信太郎、山森早織、内田達也、板倉誠、高橋正身 SNAP-25 のリン酸化サイトを欠失した KI マウスで見られた歯状回顆粒細胞の異常活動. 第 52 回日本神経化学学会大会 2009 年 6 月 23 日伊香保
- ⑮ Yasuda K, Itakura M, Aoyagi K, Sugaya S, Yamamori S, Takahashi M Phorbol 12-myristate 13-acetate suppresses Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytotic release from rat astroglial cells. XXXVI International Congress of Physiological Sciences 2009 年 7 月 28 日 京都
- ⑯ Yamamori Y, Sugaya S, Kokubo H, Itakura M, Takahashi M Cold water stress-induced phosphorylation of SNAP-25 at Ser187 in mouse brain. XXXVI International Congress of Physiological Sciences 2009 年 7 月 30 日 京都
- ⑰ 山森早織、菅谷大地、小久保宏俊、板倉誠、飯田諭宣、鈴木映二、宮岡等、高橋正身 ストレス負荷によるシナプスタンパク質のリン酸化. 第 25 回日本ストレス学会学術総会 2009 年 12 月 5 日 横浜
- ⑱ 飯田諭宣、山森早織、菅谷大地、板倉誠、高橋正身、宮岡等 SNAP-25 の脱リン酸化酵素の検討. 第 25 回日本ストレス学会学術総会 2009 年 12 月 5 日 横浜
- ⑲ 鈴木映二、宮岡等、東貞宏、渡辺滋、片岡正和、高橋正身 山森早織 小久保宏俊、大塚信太郎 SNAP-25 変異マウスの行動異常に対する各種向精神薬の効果. 第 20 回臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会 2009 年 9 月 16 日 仙台
- ⑳ 板倉誠、渡辺和泉、山森早織、菅谷津貴子、田岡万悟、磯部俊明、高橋正身 ラット海馬における Stargazin 様タンパク質  $\gamma$ -8 含有小胞のプロテオーム解析. 第 32 回日本神経科学大会 2008 年 9 月 17 日名古屋
- ㉑ 渡辺和泉、板倉誠、高橋正身 Stargazin 様タンパク質  $\gamma$ -8 はカルシウム/カルモジュリン依存性にカルシニューリンと結合する. 第 32 回日本神経科学大会 2008 年 9 月 17 日名古屋
- ㉒ 深澤有吾、板倉誠、高橋正身、斎藤善人、井ノ口馨、重本隆一. SDS-FRL 法によるシナプス後受容体の再構成の可視化. 第 32 回日本神経科学大会 2008 年 9 月

- 17 日名古屋
- ㉓ 熊ノ郷晴子、大塚充、原とも子、ウルバンチク善子、高雄敬三、宮川剛、小倉明彦、高橋正身、小島正巳 脳由来神経栄養因子プロセッシング不全マウスの行動学的解析と構造的基盤. 第 32 回日本神経科学大会 2008 年 9 月 18 日 名古屋

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 正身 (TAKAHASHI MASAMI)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号：10318826

### (3) 連携研究者

宮岡 等 (MIYAOKA HITOSHI)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号：40909862

板倉 誠 (ITAKURA MAKOTO)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号：30398581

東 貞宏 (AZUMA SADAHIRO)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：80348507

山森 早織 (YAMAMORI SAORI)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：30464803

片岡 正和 (KATAOKA MASAKAZU)  
信州大学・工学部・准教授  
研究者番号：90332676