

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21日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21680033

研究課題名（和文） リン酸化シグナルを介した神経系細胞の形態制御、及び水頭症発症の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Studies on the phosphorylation-mediated regulation of neural morphogenesis and its involvement in hydrocephalus

研究代表者

中澤 敬信 (NAKAZAWA TAKANOBU)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：00447335

研究成果の概要（和文）：Fyn チロシンキナーゼを介した神経細胞の形態制御の分子基盤の解明を目的として、Fyn の基質として同定した新規分子 TCGAP の機能解析を行った。その結果、①TCGAP は細胞の輸送系を制御していること②TCGAP は spine のみならず dendrite の形成も制御していること③TCGAP 欠損マウスでは種々の行動に異常が見られること、が明らかになった。以上の結果から、Fyn を介したシグナリングによる脳高次機能制御、及びその破綻による疾患の分子基盤を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：To make clear the molecular mechanisms of Fyn tyrosine kinase-mediated regulation of neural morphogenesis, I focused on TCGAP, one of Fyn substrates in the central nervous system. By analyzing TCGAP KO mice, I found that TCGAP regulated intracellular trafficking, spine morphogenesis, and dendrite morphogenesis. Together with the finding that TCGAP KO mice showed several behavioral abnormalities, Fyn-mediated phosphorylation of their substrates including TCGAP and p250GAP is necessary for higher brain functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	20,200,000	6,060,000	26,260,000

研究分野：分子神経学

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：Fyn、RhoGAP、チロシンリン酸化、シグナル伝達、水頭症、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の樹状突起や軸索といった高度に極性を持つ構造は、神経回路の特有の機能の決定、ひいては多様な神経系機能の獲得に

重要である。また、オリゴデンドロサイトも神経細胞と同様に数多くの突起を持ち、適切な突起形成はミエリン形成に重要である。従って、神経系細胞の形態制御のメカニズムを探ることは脳の高次機能の分子基盤を明ら

かにするうえで重要である。多くのチロシンキナーゼ欠損マウスの解析などにより、チロシンキナーゼが活性化するシグナルが神経発生・発達・脳高次機能に重要であることが示されている。多数あるチロシンキナーゼのなかでも、Fyn が神経細胞やオリゴデンドロサイトの形態形成制御に重要であることが示唆されている。しかしながら、Fyn の基質の同定など、Fyn を介した神経系細胞の形態形成制御の分子基盤は未解明な部分が多い。また、Fyn 欠損マウスは重篤な水頭症になることを見出していたが、発症の分子基盤は未解明であった。

2. 研究の目的

Fyn シグナリングによる脳高次機能制御、及びその破綻による水頭症発症の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 分子細胞生物学的実験は一般的な方法を用いた。遺伝子欠損マウスは通常の相同組み換えのシステムを用いて作出した。
- (2) Fyn によるオリゴデンドロサイトの形態形成制御の分子基盤を解明することを目的として、プロテオームの手法、及び Yeast two hybrid 法を用いて基質の同定を行った。
- (3) 同定された基質のリン酸化の意義や神経細胞、及びオリゴデンドロサイトの形態形成時の機能解析には、神経細胞、オリゴデンドロサイト細胞、及び基質に対する shRNA を発現するレンチウイルスなどの種々のウイルスを用いた。また、必要に応じて *in utero* エレクトロポレーションの系を用いた。
- (4) マウスの行動実験は以下の一般的なバッテリー試験を行った (Open field test, Contextual fear conditioning test, Auditory fear conditioning test, Water maze test, Y-maze test, Prepulse inhibition test, forced swim test, tail suspension test, Light/dark box test, Social interaction test, Elevated plus maze test, Rotarod test)。

4. 研究成果

- (1) TCGAP の会合分子の検索を TCGAP の全長を用いた yeast-two hybrid screening を用いて行い、細胞骨格関連遺伝子や栄養因子の受容体などを同定した。さらに、同定した会合分子による細胞骨格の制御についても解析を行った。
- (2) TCGAP は受容体様分子の細胞膜への輸送を制御していることを明らかにした。また、受容体分子と TCGAP の相関関係を併せて明らかにした。
- (3) 脳内における TCGAP の機能を明らかにするために、TCGAP 欠損マウスを作製した。TCGAP 欠損マウスは、外見は正常であり交配も可能であった。
- (4) TCGAP 欠損マウスの脳内における神経細胞の形態をゴルジ染色によって観察したところ、異常が観察された。形態異常を示した神経細胞の細胞骨格系に異常が観察されたことから、TCGAP は細胞骨格を調節することによって神経細胞の形態を制御していることが明らかになった。
- (5) TCGAP 欠損マウスは、ホームケージにおいて、外見上顕著な行動異常は観察されないが、TCGAP 欠損マウスの行動解析を行ったところ、様々な行動に異常がみられることが明らかになった。
- (6) TCGAP はその N 末端に、タンパク質輸送に関連している PX 領域を持つユニークな RhoGAP である。PX 領域をもつ variant、PX 領域をもたない variant を *in utero* エレクトロポレーションを用いて、発達期の神経細胞に発現させることによって PX 領域の機能解析を行い、その機能の一端を明らかにした。
- (7) TCGAP のホモログである p250GAP と TCGAP との関連性の解析を推進し、神経細胞の形態形成では、一部分重複した機能を持つことを明らかにした

以上の結果から、Fyn/TCGAP、及び Fyn/p250GAP シグナリングによる神経細胞の形態制御の分子基盤を明らかにすることができた。また、TCGAP、及び p250GAP が多様な脳高次機能を制御していること、及びその機能欠損と脳疾患との相関を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yang K, Trepanier C, Sidhu B, Xie YF, Li H, Lei G, Salter MW, Nakazawa T, Yamamoto T, Jackson MF, MacDonald JF. Metaplasticity gated through differential regulation of GluN2A versus GluN2B receptors by Src family kinases. *EMBO J.* 31: 805-816 (2012).
査読有
DOI: 10.1038/emboj.2011.453.
- ② Yokoyama K, Tezuka T, Kotani M, Nakazawa T, Hoshina N, Shimoda Y, Kakuta S, Sudo K, Watanabe K, Iwakura Y, Yamamoto T. NYAP: a phosphoprotein family that links PI3K to WAVE1 signaling in neurons. *EMBO J.* 30: 4739-4754 (2011).
査読有
DOI: 10.1038/emboj.2011.348.
- ③ Chen C, Ito K, Takahashi A, Wang G, Suzuki T, Nakazawa T, Yamamoto T, Yokoyama K. Distinct expression patterns of the subunits of the CCR4-NOT deadenylase complex during neural development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411: 360-364 (2011).
査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.148
- ④ Katano T, Nakazawa T, Nakatsuka T, Watanabe M, Yamamoto T, Ito S. Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. *Neuropharmacol.* 60: 609-616 (2011).
査読有
DOI:10.1016/j.neuropharm.2010.12.005
- ⑤ Delawary M, Tezuka T, Kiyama Y, Yokoyama K, Inoue T, Hattori S, Hashimoto R, Umemori H, Manabe T, Yamamoto T, Nakazawa T. NMDAR2B tyrosine phosphorylation modulates anxiety-like behavior by regulating CRF expression. *Mol. Brain* 3: 37 (2010).
査読有
DOI:10.1186/1756-6606-3-37
- ⑥ Matsumura S, Kunori S, Mabuchi T, Katano T, Abe T, Nakazawa T, Yamamoto T, Ashitaka-Okuda E, Ito S. Impairment of CaMKII activation and neuropathic pain in mice lacking NR2B phosphorylation at Tyr-1472. *Eur J. Neurosci.* 32: 798-810 (2010).
査読有
DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07348.x
- ⑦ Chagnon MJ, Wu CL, Nakazawa T, Yamamoto T, Noda M, Blanchetot C, Tremblay ML. Receptor tyrosine phosphatase sigma (RTPsigma) regulates, p250GAP, a novel substrate that attenuates Rac signaling. *Cell. Signal.* 22: 1626-1633 (2010).
査読有
DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.06.001
- ⑧ Taniguchi S, Nakazawa T, Tanimura A, Kiyama Y, Tezuka T, Watabe AM, Katayama N, Yokoyama K, Inoue T, Izumi-Nakaseko H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y, Umemori H, Inoue T, Murphy PN, Hashimoto K, Kano M, Manabe T, Yamamoto, T. Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behavior. *EMBO J.* 28: 3717-3729 (2009).
査読有
DOI:10.1038/emboj.2009.300

[学会発表] (計 13 件)

- ① Hoshina N, Tanimura A, Yamasaki M, Inoue T, Yokoyama K, Watanabe M, Kano M, Nakazawa T, Yamamoto T 題名: A role of protocadherin 17 in presynaptic assembly of cortico-basal ganglia circuit neurons 学会名: 第 34 回日本分子生物学会・年会 場所: パシフィコ横浜 (神奈川県) 年月: 2011 年 12 月 13 日
- ② Katano T, Nakazawa T, Nakatsuka T, Watanabe M, Yamamoto T, Ito S 題名: The activation of NR2B-NMDAR by phosphorylation of Tyr1472-NR2B triggers phosphorylation cascade in neuropathic pain 学会名: 41th ANNUAL MEETING Society for Neuroscience 場所: Washington DC, アメリカ合衆国 年月: 2011 年 11 月 16 日
- ③ 片野泰代、高尾敏文、奥村宣明、中澤敬信、山本雅、伊藤誠二 題名: プロテオミクス解析による神経障害性疼痛機能性

分子の探索 学会名:第 84 回 日本生化学会・大会 場所:国立京都国際会館(京都府) 年月:2011年9月23日

- ④ David O, Nakazawa T, Yamamoto T, Rosenblum K 題名:Dopamine and tyrosine phosphorylation of NR2B (Y1472) in the hippocampus is fundamental for ERK2 activation and novel learning 学会名:ISN-ESN 2011 場所:Athenes, ギリシャ 年月:2011年8月30日
- ⑤ Nakazawa T 題名:Essential role of tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor in mouse behavior 学会名:ISN-ESN 2011 場所:Athenes, ギリシャ 年月:2011年8月30日(招待講演)
- ⑥ Inoue T, Kawa S, Nakazawa T, Sutoh K, Yamamoto T 題名:Characterization of transmembrane kinase BREK/LMTK2 in endocytic membrane trafficking 学会名:第 33 回日本分子生物学会・年会 場所:神戸国際展示場(兵庫県) 年月:2010年12月8日
- ⑦ Hoshina N, Inoue T, Yokoyama K, Nakazawa T, Yamamoto T 題名:The role of 2-protocadherin family in synapse formation in the basal ganglia 学会名:第 33 回日本分子生物学会・年会 場所:神戸国際展示場(兵庫県) 年月:2010年12月7日
- ⑧ 片野泰代、中澤敬信、渡辺雅彦、山本雅、伊藤誠二 題名:神経因性疼痛における脊髄後角でのリン酸化シグナルカスケード 学会名:第 33 回日本分子生物学会・年会 場所:神戸国際展示場(兵庫県) 年月:2010年12月7日
- ⑨ Matsumura S, Kunori S, Nakazawa T, Abe T, Yamamoto T, Katano T, Watanabe M, Okuda-Ashitaka S, Ito S 題名:Attenuation of neuropathic pain by impaired Ca²⁺ signaling in mutant mice lacking the Tyr-1472 phosphorylation site of the NR2B 学会名:40th ANNUAL MEETING Society for Neuroscience 場所:San Diego, アメリカ合衆国 年月:2010年11月15日
- ⑩ Nakazawa T, Taniguchi S, Tanimura A, Kiyama Y, Tezuka T, Kano M, Manabe T, Yamamoto T 題名:Involvement of GluN2A tyrosine phosphorylation in depression-related behavior 学会名:

7th Forum of European Neuroscience (FENS) 場所:Amsterdam, オランダ 年月:2010年7月5日

- ⑪ 山口和彦、清水知佳、中澤敬信、伊藤正男 題名:小脳プルキンエ細胞 GluR2 細胞内プールの樹状突起スパインからシヤフトへの活動依存的移動の蛍光蛋白質 2 重発現法による解析 学会名:第 87 回日本生理学会大会 場所:盛岡市民文化ホール(岩手県) 年月:2010年5月19日
- ⑫ 横山一剛、手塚徹、小谷政晴、中澤敬信、星名直祐、井上毅、霜田靖、角田茂、須藤カツ子、渡邊和忠、岩倉洋一郎、山本雅 題名:The novel NYAP phosphoprotein family couples activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) p85 with the cytoskeletal WAVE signaling pathway in the brain 学会名:第 32 回日本分子生物学会・年会 場所:パシフィコ横浜(神奈川県) 年月:2009年12月11日
- ⑬ 中澤敬信、谷口幸子、谷村あさみ、城山優治、手塚徹、狩野方伸、真鍋俊也、山本雅 題名:Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behavior 学会名:第 32 回日本分子生物学会・年会 場所:パシフィコ横浜(神奈川県) 年月:2009年12月12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 敬信 (NAKAZAWA TAKANOBU)
東京大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号:00447335

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし