

## 論文の内容の要旨

### Src 型キナーゼによる NMDA 受容体機能の調節

### The regulation of NMDA receptor by Src-family kinases

谷口 幸子

*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体は膜電位変化とアゴニストの結合の両方に依存した開口により、Na<sup>+</sup>イオン、K<sup>+</sup>イオンと共に Ca<sup>2+</sup>イオンを透過し、長い持続時間を示す興奮性後シナプス電位を生じる。このような特性をもつ NMDA 受容体は、記憶・学習の分子基盤と考えられているシナプス可塑性、神経細胞の発達、及び興奮性の神経毒性などに重要な役割を果たすことが知られている。NMDA 受容体はチャネル活性に不可欠な NR1 サブユニット、および4種類の NR2 調節サブユニット (NR2A~NR2D) により構成されている。NMDA 受容体の機能の制御は、細胞外からのアゴニスト結合だけでなく、外部からの刺激に応じて引き起こされる修飾により動的に制御されていると考えられており、その一つに Src 型キナーゼによるチロシンリン酸化がある。Src 型キナーゼの一員である Src および Fyn による NR2A のリン酸化は、NMDA 受容体チャネルの活性を増強することが示唆されているが、その神経系の構築や高次機能における役割は不明であった。本研究では、NR2A の Src 型キナーゼによるチロシンリン酸化の生理的意義を個体レベルで検証し、またその裏づけとなる分子機構を明らかにすることを目的として解析を行った。

Src 型キナーゼによる NR2A のリン酸化標的残基についてはこれまで未同定であったため、まず Src および Fyn の標的チロシン残基の同定を試みた。NR2A は C 末端の細胞内領域に 25 個のチロシン残基を含んでいる。当研究室では、*in vitro* キナーゼアッセイを用いた

解析により、Src 型キナーゼの標的候補として 7 個のチロシン残基 ( Tyr-943、Tyr-1105、Tyr-1118、Tyr-1187、Tyr-1246、Tyr-1267、Tyr-1325 ) を同定していた。これらの *in vitro* で同定した 7 個のチロシン残基のうち、実際の細胞内における Src 型キナーゼの標的残基を同定することを目的として、それぞれの YF 変異体および Src を用いた培養細胞の再構成系により検討した。NR2A の全チロシンリン酸化量を比較した結果、細胞内において、Src は NR2A の Tyr-1246、Tyr-1267、および Tyr-1325 を主にリン酸化し、その中でも Tyr-1325 が最も主要な Src 型キナーゼの標的残基であることが明らかとなった。次に、最も主要なリン酸化残基であった Tyr-1325 について、抗リン酸化 Tyr-1325 抗体を作製した。作製した抗リン酸化 Tyr-1325 抗体を用いて、マウス脳における NR2A の Tyr-1325 のリン酸化を検討した結果、マウス前脳において神経発達に依存して Tyr-1325 のリン酸化が見られることが明らかとなった。また、Src 欠損マウスおよび Fyn 欠損マウスの脳において Tyr-1325 のリン酸化量が顕著に減少していたことから、Src および Fyn が脳内において NR2A の Tyr-1325 のリン酸化に深く寄与していることが明らかとなった。

次に、同定した 3 つの標的チロシン残基が NMDA 受容体チャネル活性の Src による増強に与えている可能性を電気生理学的な解析により検討した。NR1/NR2A チャネルを発現させた培養細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により、1 つの細胞に発現する全チャネル電流を Src 非存在下および Src 存在下において測定した結果、NR1/NR2A-WT、NR1/NR2A-Y1246F、および NR1/NR2A-Y1267F により構成したチャネルには Src による増強がみられたが、NR1/NR2A-Y1325F により構成したチャネルには Src による増強がみられなかった ( 図 1 )。このことから、Src が NR2A の Tyr-1325 のリン酸化を介して NMDA 受容体のチャネル活性を調節していることが示唆された。

シナプス可塑性の例である海馬 CA1 領域におけるシナプス伝達の長期増強 ( LTP ) は学習・記憶の基盤になる現象であると考えられており、その誘導には NMDA 受容体からの  $Ca^{2+}$  流入が必

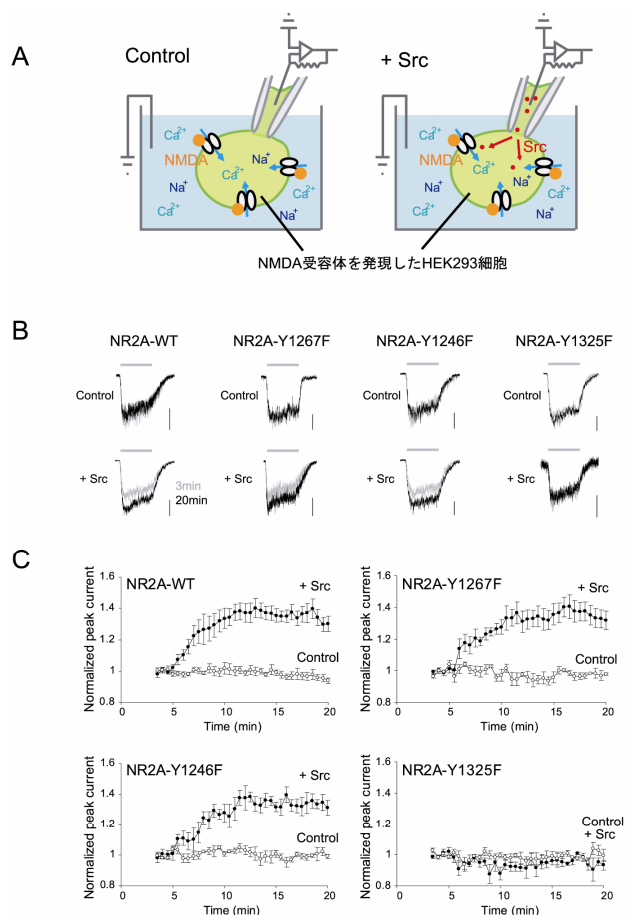


図1. SrcはTyr-1325のリン酸化を介してNR1/NR2A受容体のチャネル活性を増強する。  
A) ホールセルパッチクランプ法の模式図。  
B) HEK293細胞に再構成したNR1/NR2A受容体のチャネル電流。  
灰色は測定開始から3分後の電流、黒は測定開始から20分後の電流。  
灰色の横棒はagonist投与時間 ( 500 ms )、縦棒は100 pA。  
C) 各NR1/NR2A電流の測定開始から3分間の電流の平均を 1 とした時の電流の推移。

須である。Tyr-1325 のリン酸化と LTP との関連性を検討した結果、刺激前に比べ LTP 誘導 30 分後に Tyr-1325 のリン酸化が有意に亢進することが明らかになった。このことから、LTP の発現に Tyr-1325 のリン酸化が関与していることが示唆された。

以上の結果から、Tyr-1325 のリン酸化が海馬におけるシナプス可塑性、またそれに関連すると考えられるマウス個体の記憶形成・学習に関与している可能性が考えられた。

次に、Tyr-1325 をリン酸化されない型のフェニルアラニンへ置換した NR2A-Y1325F (YF) ノックインマウスの作製・解析により、Tyr-1325 のリン酸化の脳高次機能における役割の解明を目指した。NR2A-YF マウスは光学顕微鏡レベルにおいて脳構造や NR2A の局在は正常であった。また、一般的な抗リン酸化チロシン抗体を用いて検討した結果、野生型マウスに比べて NR2A-YF マウスでは NR2A の全チロシンリン酸化量が半減しており、マウス脳において NR2A の Tyr-1325 が主にリン酸化されていることが明らかとなった。

NR2A-YF マウスにおける行動について、一連の課題を用いたバッテリーテストにより検討した。その結果、マウスの回避不可能なストレスに対する回避意欲の程度を判断する尾懸垂試験および強制水泳試験において、野生型マウスに比べて NR2A-YF マウスに無動時間の短縮がみられた。両課題における無動時間は抗うつ薬により短縮するため、抗うつ薬作用の行動薬理学的指標とされている。すなわち、NR2A-YF マウスはストレスに対する回避意欲の向上（抗うつ様行動）を示していた（図 2 A）。また、意欲・行動などに関わる脳領域である線条体において、NR2A-YF マウスではドーパミン D1 受容体機能の増幅因子である DARPP-32 の Thr-34 のリン酸化が亢進していることを見出した（図 2 B）。これらの結果から、NR2A-YF マウスでは、NMDA 受容体機能の低下により、DARPP-32 のリン酸化が亢進し、ドパミン機能亢進に起因する抗うつ様行動を示す可能性が示唆された（図 2 C）。このことは、NR2A のリン酸化による NMDA 受容体の機能調節がドパミン神経機能を制御することを示すものであり、興味深い。

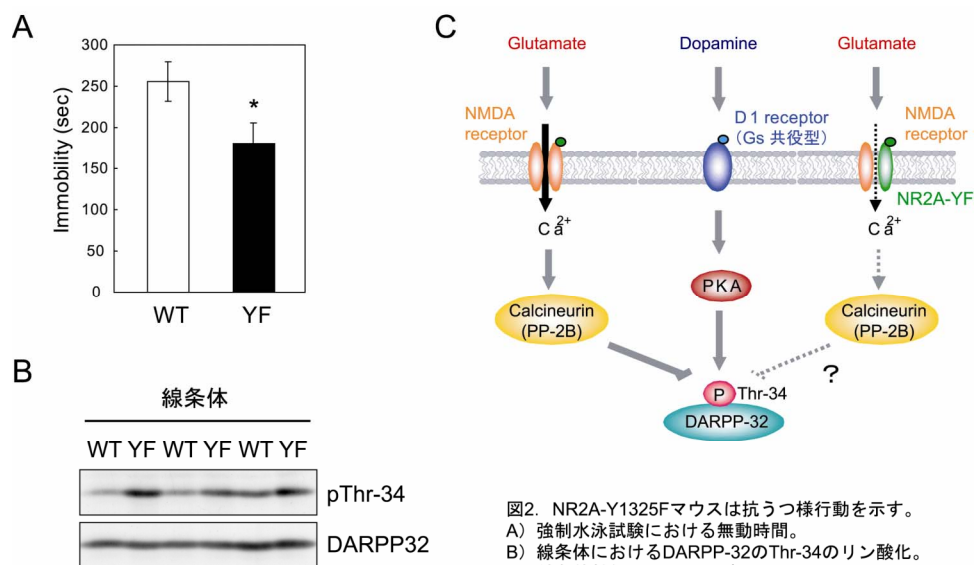


図2. NR2A-Y1325Fマウスは抗うつ様行動を示す。  
A) 強制水泳試験における無動時間。  
B) 線条体におけるDARPP-32のThr-34のリン酸化。  
C) 線条体神経におけるモデル図。

次に、マウスの空間学習能力を調べる最も代表的な課題であるモリス水迷路試験を行った。足場が水面下に固定され、不透明な水が入っている円形プールの中に放されたマウスは、初めは足場を見つけるまで適当に泳いでいるが、この訓練を重ねるとマウスは空間配置を記憶して足場にすぐたどり着くようになる。1日に4回のトレーニングを6日間行った結果、野生型マウスに比べて NR2A-YF マウスでは足場にたどり着くまでの時間や距離の短縮が早く見られた(図3A)。また、2、4、6日目のトレーニングの後に足場を取り除いたプールにマウスを1分間泳がせ、プローブテストを行った結果、NR2A-YF マウスは野生型マウスに比べ、2日目および4日目において足場のあった1/4区画を泳ぐ割合が有意に上昇していた(図3B)。これらの結果から、NR2A-YF マウスはトレーニング回数が少ない状況で学習が成立しており、野生型マウスに比べて空間学習能力が向上していることが示唆された。この原因として、NR2A-YF マウスではストレスに対する意欲向上が見られることが影響している可能性が考えられた。もう一つの原因として、NR2A-YF マウスの海馬において NMDA 受容体の局在に關与する NR2B のチロシンリン酸化が亢進していることも見出しており(図3C)、シナプスに存在する NMDA 受容体数の増加による NMDA 受容体機能の亢進の可能性も考えられた。また、線条体においては NR2B のチロシンリン酸化に変化が見られなかったことから、NMDA 受容体の機能の制御が脳領域によって異なり、特に海馬における NMDA 受容体の機能制御はより厳密に行われていることが示唆された。

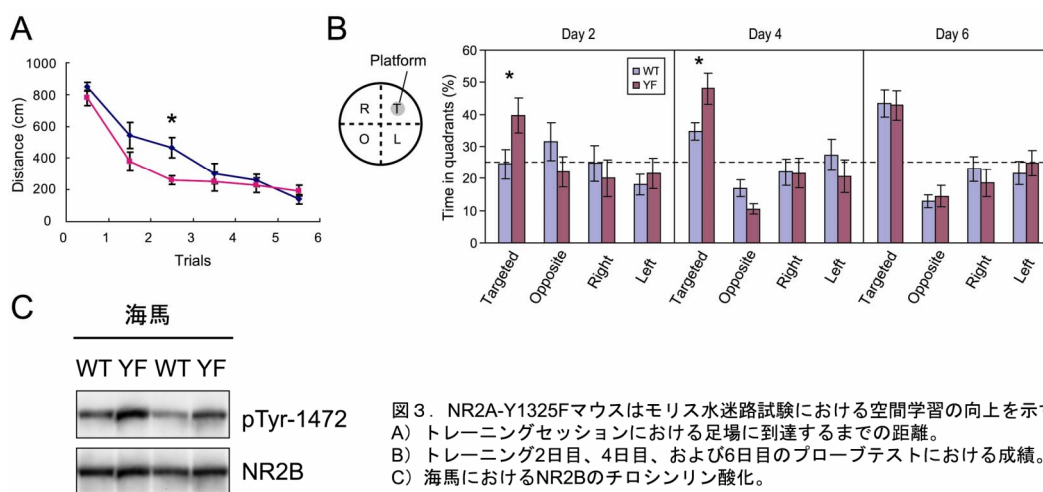


図3. NR2A-Y1325Fマウスはモリス水迷路試験における空間学習の向上を示す。  
A) トレーニングセッションにおける足場に到達するまでの距離。  
B) トレーニング2日目、4日目、および6日目のプローブテストにおける成績。  
C) 海馬におけるNR2Bのチロシンリン酸化。

NR2A の Tyr-1325 のリン酸化についてはまだ不明な点が多く残っているが、本研究において作製した NMDA 受容体の 1 サブユニットの、さらに 1 残基の変異である NR2A-YF 変異が、マウスの行動に大きく影響を与えていることが明らかとなったことは、脳高次機能における NR2A の Tyr-1325 のリン酸化が生理的に重要であることを提示している。今後、Tyr-1325 のリン酸化に注目して更なる解析を行うことで、学習・記憶のメカニズムの理解、および精神疾患の治療への応用につながると期待される。