

## 論文内容の要旨

論文題目 情動行動における NMDA 受容体チロシンリン酸化の生理学的解析

指導教員 山本 雅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月進学

医学博士課程

病因・病理学専攻

デラワリ ミナ

グルタミン酸は哺乳類中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、その受容体はイオンチャネル型と代謝型に分類される。イオンチャネル型は薬理的性質およびそれをコードする遺伝子の一次配列の相同性から、さらに  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) 型受容体 (以下 AMPA 受容体)、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体 (以下 NMDA 受容体)、カイニン酸受容体及び  $\delta$  型受容体に分類される。NMDA 受容体、AMPA 受容体はともに陽イオン透過性チャネルであるが、機能的に大きく異なっている。AMPA 受容体は 1 価の陽イオン ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ ) を選択的に透過させてシナプス後細胞に一過性の脱分極を引き起こす。一方、静止膜電位の状態では、NMDA 受容体はチャネル部位に細胞外の  $\text{Mg}^{2+}$  が閉塞してイオンの流れが阻止され、活性化が阻害されている。しかし、シナプスが高頻度刺激などで活性化することによりシナプス後細胞が脱分極して膜電位が正に傾くと、 $\text{Mg}^{2+}$  ブロックがはずれて陽イオンが透過できるようになる。この際、NMDA 受容体は 2 価の陽イオンである  $\text{Ca}^{2+}$  を透過するという特徴を持つ。細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  は極めて低濃度になるように調節されているため、NMDA 受容体が活性化して  $\text{Ca}^{2+}$  がシナプス後細胞のスパイン内に流入すると、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性の酵素系が活性化し、最終的に長い持続時間を示す興奮性後シナプス電位を生じる (長期増強、long-term potentiation: LTP)。このような特徴を持つ NMDA 受容体は学習・記憶などの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神経細胞死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、その中心となる NR1 サブユニットと NMDA 受容体の多様性を決定する 4 種類の NR2 サブユニット (NR2A~NR2D) から構成されるヘテロ 4 量体である。例えば、成体の海馬においては NR1、NR2A 及び NR2B が発現しており、これらが組み合わされてシナプス後膜に存在する。シナプス伝達における NMDA 受容体の機能を調節する要因としては、大きく二つに分けら

れる。一つは受容体のリン酸化などの生化学的な修飾であり、もう一つはシナプス後膜での受容体の膜表面への挿入や膜表面に存在する受容体の細胞内への取り込みなど、物理的な輸送による修飾である。中でも、リン酸化による NMDA 受容体の修飾は NMDA 受容体複合体の迅速な機能調節を行っており、刺激にตอบสนองして動的に変化する神経回路において重要な役割を担っていると考えられる。NMDA 受容体の各サブユニットのうち、脳内でチロシンリン酸化を受けているのは NR2A、NR2B 及び NR2D である。中でも、NR2B はマウス脳の後シナプス部分における最も主要なチロシンリン酸化タンパク質であることが報告されている。最近の研究より、NR2B のチロシンリン酸化レベルは高頻度刺激による LTP 誘導時や味覚の記憶の際に上昇することが示されており、NR2B のチロシンリン酸化が実際の脳活動の調節に重要であることが示されている。しかしながら、NR2B のチロシンリン酸化による脳活動の制御の分子基盤はほとんど未解明であった。近年、当研究室の中澤らによって、NR2B のチロシンリン酸化の分子レベルでの意義を解明することを目的として、Src 型チロシンキナーゼ Fyn による NR2B の主要なチロシンリン酸化残基 Tyr-1472 が同定された。当研究室では、Tyr-1472 のリン酸化による NMDA 受容体複合体の機能調節、さらには個体レベルでの高次脳機能における意義を明らかにすることを目的として、Tyr-1472 をフェニルアラニンに置換し、リン酸化を受けなくなった NR2B を発現する 1472YF ノックインマウス（以下 YF マウス）を独自に作製した。電気生理学的な解析から、YF マウスにおいて通常 of 神経伝達効率に異常は見られないが、視床-扁桃体外側核経路における LTP が減弱していることが明らかとなった。また、行動学的解析から扁桃体依存性である恐怖条件付け学習の成績が低下していることが明らかとなった。さらに、電子顕微鏡を用いた解析により、YF マウスでは後シナプス膜上における NMDA 受容体の局在異常が見出された。以上の結果から、Tyr-1472 のリン酸化の扁桃体における重要性が明らかになった。そこで、本論文では情動を司る中枢である扁桃体に注目し、Tyr-1472 のリン酸化の生理学的意義を解明するため解析を進めた。

本研究では、YF マウスの情動行動を恐怖・不安関連行動評価法として開発され広く用いられている高架式十字迷路試験により解析した。その結果、YF マウスにおいて恐怖・不安反応の亢進を見出した。そこで、YF マウス恐怖反応の亢進の分子メカニズムを明らかにするため、恐怖・不安との関連が報告されている神経伝達物質を調べたところ、YF マウスの扁桃体でストレス応答ホルモンであるコルチコトロピン放出因子 (corticotropin-releasing factor: CRF) の発現が増加していることを見出した。さらに、CRF 受容体拮抗薬の投与により YF マウスの恐怖・不安反応の亢進が野生型マウスと同程度まで抑えられたことから、CRF の発現増加により YF マウスの情動異常が引き起こされていると考え

られた。次に、野生型マウスを用いて NR2B の Tyr-1472 のリン酸化レベルと CRF mRNA 発現量の変化の関係を調べた。扁桃体を含む脳切片を NMDA で刺激したところ、Tyr-1472 の脱リン酸化が起こり、また CRF mRNA の発現上昇が起こった。この現象は PKC 阻害剤により抑制されたことから、NMDA 刺激による CRF の発現上昇には PKC が関与していることが示唆された。また、マウス個体を用いた解析から、高架式十字迷路試験に供したマウスの扁桃体において Tyr-1472 が脱リン酸化されること及び CRF mRNA の発現上昇が起こることを見出した。これらの結果から、NMDA 刺激時または高架式十字迷路試験時に、扁桃体において Tyr-1472 のリン酸化レベルと CRF mRNA の発現量に負の関係があることが示された。高架式十字迷路試験の他に、鬱状態の評価に用いられる強制水泳試験等もマウスにとってストレスとなり、CRF mRNA の発現上昇が起こることが知られている。そこで、野生型マウスを用いて強制水泳試験を行い、Tyr-1472 のリン酸化レベルと CRF mRNA の発現量の関係を検討した。その結果、強制水泳試験に供したマウスの扁桃体においては、CRF mRNA の発現量は上昇するものの Tyr-1472 の脱リン酸化は見られなかった。強制水泳試験では野生型マウスと YF マウスにおいて無動時間に差はみられないことを考え合わせ、強制水泳試験によるストレスと NR2B の Tyr-1472 のリン酸化は無関係であることが示唆された。これらの結果から、Tyr-1472 のリン酸化状態が変化することにより CRF mRNA の発現量が調節され、恐怖・不安に関する行動が制御されている可能性が考えられた。

さらに、YF マウスの扁桃体機能異常を遺伝子レベルで網羅的に検討することを目的として、マイクロアレイを用いて解析を行った。野生型マウスと YF マウスの扁桃体において発現に差異の見られる遺伝子を網羅的に探索した結果、YF マウスの扁桃体においてニューロテンシン受容体 2 (Ntsr2) の発現が低下していることを見出した。また、脳切片を用いた解析から、YF マウスでは Ntsr2 を介したシグナル伝達に異常があることを見出した。さらに、熱痛覚感受性試験である hot plate test を用いた解析から、YF マウスが Ntsr2 ノックアウトマウスと同様の表現型を示すことを見出し、侵害受容に異常があることを明らかにした。これらの結果から、YF マウスの扁桃体の機能異常の原因の一部が、ニューロテンシン情報伝達の異常である可能性が示唆された。Ntsr2 は主にアストロサイトに発現していることから、神経細胞に発現する NMDA 受容体のリン酸化状態がアストロサイトの Ntsr2 の発現に影響を与えるメカニズムとして、液性因子の関与の可能性などが考えられる。

本研究から、NR2B の Tyr-1472 は扁桃体において情動行動に関わる情報伝達系を広く制御していることが示唆された。