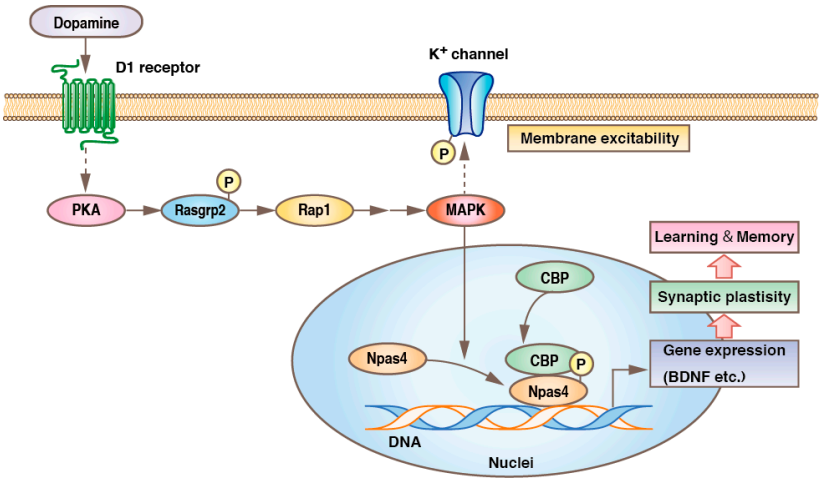
29　ニューロモジュレーターによる行動・記憶制御の解明	貝淵　弘三

【目的】ニューロモジュレーターは、樹状突起や細胞体上の G 蛋白質共役型受容体を介して、種々のリン酸化酵素を活性化させることで、比較的ゆっくりとしたタイムコースで、神経細胞の興奮性やシナプスの可塑性、遺伝子発現を制御していると考えられている。ドーパミンは、最も注目されているニューロモジュレーターの 1 つであり、側坐核の中型有棘神経細胞に働き、D1 受容体を介して PKA や MAPK（ERK）などの蛋白質リン酸化酵素を活性化する。これらの蛋白質リン酸化酵素は下流の基質蛋白質をリン酸化することで、神経細胞の興奮性や遺伝子発現を制御し、報酬関連行動とその学習・記憶の形成に貢献すると考えられている。しかしながら、ドーパミンがどのように遺伝子発現を制御し、報酬学習・記憶に関与しているのかについては不明な点が多い。本研究では、ドーパミンシグナルの下流でリン酸化される転写関連因子を網羅的に同定し、そのリン酸化による遺伝子発現の制御機構と報酬学習・記憶の制御機構を明らかにすることを目的とする。

【方法および結果】報酬学習・記憶に関与する転写共役因子である CREB binding protein（CBP）を固相化したアフィニティカラムを用い、側坐核の中型有棘神経細胞で働く転写因子の網羅的同定を行った結果、Neuronal PAS domain protein 4（Npas4）などの転写因子が同定された。Npas4 は MAPK によってリン酸化され、MAPK による Npas4 のリン酸化により Npas4 と CBP との結合量が増加した。Phostag-SDS PAGE を用いた解析により、MAPK による Npas4 のリン酸化部位（T423、T427、S577、S580、T611、S615）を同定した。Npas4 の 427 番目のスレオニン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体を作製し、細胞内での Npas4 のリン酸化を解析した結果、培養線条体神経細胞において脱リン酸化酵素阻害剤や cAMP 活性化剤により Npas4 のリン酸化が亢進し、そのリン酸化は MAP2K（MEK）阻害剤により抑制された。BDNF プロモーターなどを用いたレポーター解析を行った結果、MAPK による Npas4 のリン酸化により Npas4 の転写活性が増強した。Npas4 が報酬関連の学習および記憶と関連しているかどうかを調べるために、コカインによる条件付け場所嗜好性試験を行った。その結果、側坐核の D1 受容体発現細胞で特異的に Npas4 を欠損させたマウスでは、報酬学習・記憶能の低下が認められた。Npas4 欠損による報酬学習・記憶能の低下が Npas4 の野生型を発現させることで回復出来たのに対し、Npas4 のリン酸化部位欠損変異体では回復できなかった。以上の結果から、Npas4 が MAPK によるリン酸化依存的に CBP と結合し、BDNF などの遺伝子発現を調節することで、報酬学習・記憶に関与することが示唆された（下図）。

MAPK による Npas4 リン酸化は遺伝子発現を調節することで、報酬学習・記憶を制御する



29. ニューロモジュレーターによる行動・記憶制御の解明

貝淵　弘三

名古屋大学 大学院医学系研究科 神経情報薬理学講座

Key words：ニューロモジュレーター，ドーパミン，リン酸化，行動，学習・記憶

緒　言

ニューロモジュレーターは、樹状突起や細胞体上の G 蛋白質共役型受容体を介して、種々のリン酸化酵素を活性化させることで、比較的ゆっくりとしたタイムコースで、神経細胞の興奮性やシナプスの可塑性、遺伝子発現を制御していると考えられている。ドーパミンは、最も注目されているニューロモジュレーターの 1 つであり、側坐核の中型有棘神経細胞に働き、D1 受容体を介して PKA や MAPK（ERK）などの蛋白質リン酸化酵素を活性化する。これらの蛋白質リン酸化酵素は下流の基質蛋白質をリン酸化することで、神経細胞の興奮性や遺伝子発現を制御し、報酬関連行動とその学習・記憶の形成に貢献すると考えられている。我々は最近、新規に開発したリン酸化プロテオミクス法を駆使して、マウスの側坐核で起こるリン酸化反応を網羅的に解析し、ドーパミンの下流でリン酸化される蛋白質を 100 種類以上同定した［1]。それらの情報を基に、報酬関連行動制御に関わるシグナル伝達経路を絞り込み、ドーパミンが中型有棘神経細胞の D1 受容体/PKA 経路を介して低分子量 G 蛋白質 Rap1 の活性化因子 Rasgrp2 をリン酸化することで Rap1 を活性化することを明らかにした［1]。さらに、Rap1 が MAPK と K チャネルを介して神経細胞の興奮性を高め、グルタミン酸神経伝達への応答性を高める結果、報酬関連行動が発現することも見出している［1]。しかしながら、ドーパミンがどのように遺伝子発現を制御し、報酬学習・記憶に関与しているのかについては不明な点が多い。本研究では、ドーパミンシグナルの下流で制御される転写関連因子を網羅的に同定し、そのリン酸化による遺伝子発現の制御機構と報酬学習・記憶の制御機構を明らかにすることを目的とする。

方　法

1. アデノ随伴ウイルス（Adeno-associated virus：AAV）の導入

Npas4 flox（fl/fl）マウスの側坐核にサブスタンス P（D1 受容体を発現する中型有棘神経細胞特異的）プロモーターの下流で Cre リコンビナーゼを発現する AAV-SP-Cre を導入し、側坐核の D1 受容体発現細胞で特異的に Npas4 を欠損させた。また、Cre 依存的に Flex 配列内の目的タンパク質を発現させることが出来る Cre-Flex システムを用いて、Npas4 の野生型あるいはリン酸化部位変異体を側坐核の D1 受容体を発現する中型有棘神経細胞特異的に発現させた。

2. コカインによる条件付け場所嗜好性（Conditioned place preference：CPP）試験

CPP 試験は動物に依存性薬物を投与した時、薬物が引き起こす感覚効果（中枢神経作用）と環境刺激（視覚、触覚など）を結び付ける方法であり、薬物の報酬効果と場所の連合学習を評価することができる。CPP 装置は、2 つのボックスの中央に取り外し可能な仕切りのある、白・黒 の 2 コンパートメントボックスを使用した。黒のボックスは平らな床面、白のボックスは凹凸のある床面で構成されており、ボックスの視覚（白黒）および触覚（凹凸）の違いが条件刺激となっている。

・前試験（1 日目）：仕切りを外した状態の CPP 装置にマウスを入れ、2 つのボックスを自由に行き来させた。白・黒ボックスの滞在時間を 15 分間測定し、Pre 値とした。

・場所条件付け訓練（2 日目～4 日目）：午前中に生理食塩水をマウスに腹腔内投与して、一方のボックスに 30 分間閉じ込めた。午後にコントロール群には生理食塩水を、薬物投与群にはコカインを投与し、他方のボックスに 30 分間閉

じ込めた。これらの操作を1セッションとし、3セッション（3日間）行った。
・後試験（5日目）：1日目と同じく、仕切りを外した状態のCPP装置にマウスをいれ、白・黒ボックスの滞在時間を15分間測定し、Post値とした。薬物を投与した側のPost値からPre値を差し引いた値をCPPスコア（秒）とし、コカイン条件付けによる場所嗜好性を評価した。

結果および考察

1. CBP結合蛋白質のプロテオミクス解析

CREB binding protein（CBP）は様々な転写因子との相互作用を介して転写を活性化する転写共役因子としての機能を有している。側坐核でCBPを欠損したマウスではコカインにより誘導される場所指向性が抑制されるため、CBPは報酬学習・記憶に重要な役割を担っていることが示唆されている［2］。本研究において、我々は、報酬学習・記憶に関与する転写因子を網羅的に同定するため、マウスにコカインによる場所条件付け訓練を行わせた後、側坐核を含む線条体領域の蛋白質抽出液とCBPを固相化したビーズを混合し、プルダウンアッセイを行った。質量分析及び、イムノブロットによる解析を行ったところ、既知のCBP結合蛋白質としてcAMP response element binding protein（CREB）、Histon-H3、FosBおよびΔFosB、また、新規CBP結合蛋白質としてNeuronal PAS domain protein 4（Npas4）、Myocardin-like protein 2（Mk12）、Matrin3、Pur-alphaなどの転写関連因子が同定された（図1A）。さらに、CBPとNpas4の結合量がコカインによる場所条件付け訓練後に増加することを見出した（図1B）。Npas4は脳特異的に発現する転写因子であり［3］、*c-Fos*および脳由来神経栄養因子（*Bdnf*）などの神経活動に応答して誘導される遺伝子の発現を制御することが報告されている［4］。また、Npas4は海馬のCA3領域において恐怖条件づけ文脈学習の成立に必須であることが示されている［5］。しかしながら、Npas4の側坐核における報酬学習・記憶への関与、およびCBPとの相互作用関係についてはよくわかっていなかった。

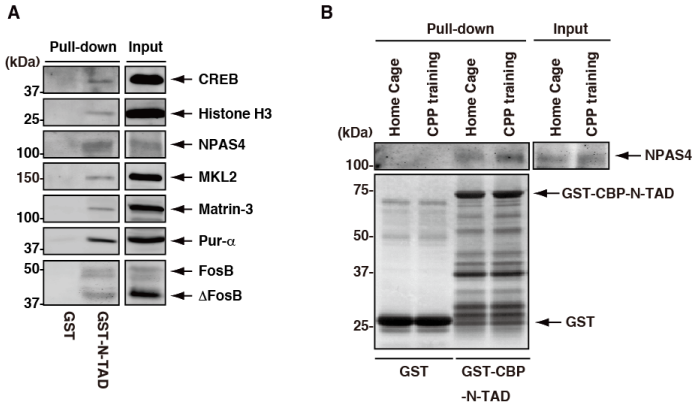


図1. CBP結合タンパク質のプロテオミクス解析
（A）CBP結合蛋白質の同定。（B）コカインによるCPP訓練後にCBPとNpas4の結合が増加する。

2. MAPKによるNpas4リン酸化によってCBPとの結合が増加する

CBPは、N末のKIXドメインを通じてリン酸化依存的にCREBと結合して活性化されることが知られている［6］。そこで、Npas4とCBPとの結合がリン酸化によって制御されるかどうか検討するため、COS7細胞にNpas4野生型を発現させ、GST-CBPによるプルダウンアッセイを行った。脱リン酸化酵素阻害剤（オカダ酸）の処置によりNpas4のリン酸化を亢進させることで、Npas4とCBPとの結合量が増加し、その結合はMAP2K（MEK）阻害剤（U0126）の処置により抑制された。また、Npas4野生型とMEK1の恒常活性型変異体を共発現させたところ、Npas4とCBPの結合量が増加した。次に、Npas4が細胞内でリン酸化されるかどうかを検討するために、Phostag-SDS PAGEによる解析を行った。COS7細胞にNpas4野生型とMAP2K1（MEK1）の恒常活性型変異体を発現させたところ、Npas4の顕著なバンドシフトが検出された（図2A）。このバンドシフトはNpas4のリン酸化候補部位（T423、T427、S577、S580、T611、S615）をアラニンに置換した変異体（Npas4-6A）において抑制されたことから、MAPKはNpas4の

T423、T427、S577、S580、T611、S615 をリン酸化することが示唆された（図 2A）。さらに、細胞内での Npas4 のリン酸化の変動をモニターするために、Npas4 の 427 番目のスレオニンのリン酸化を特異的に認識する抗体を作製した。COS7 細胞に Npas4 野生型と MAP2K1（MEK1）の恒常活性型変異体を共発現させたところ、Npas4 の T427 のリン酸化が亢進した。また、培養線条体神経細胞においてオカダ酸（Okadaic acid ; OA）あるいは cAMP 活性化剤（FSK）により Npas4 の T427 のリン酸化が亢進し、そのリン酸化は MAP2K（MEK）阻害剤により抑制された（図 2B）。MAPK による Npas4 のリン酸化部位が CBP との相互作用に影響するかどうかを調べるために、Npas4 のリン酸化欠損変異体（Npas4-6A）およびリン酸化擬似変異体（Npas4-6E）を作製し、GST-CBP によるプルダウンアッセイを行った。オカダ酸による刺激により、Npas4 野生型と CBP の結合量は増加したが、Npas4-6A と CBP の結合量は増加しなかった（図 2C）。また、CBP は Npas4 野生型と比較して Npas4-6E と強く結合した。これらの結果は、MAPK による Npas4 のリン酸化が、Npas4 と CBP との相互作用を増強することを示唆している。

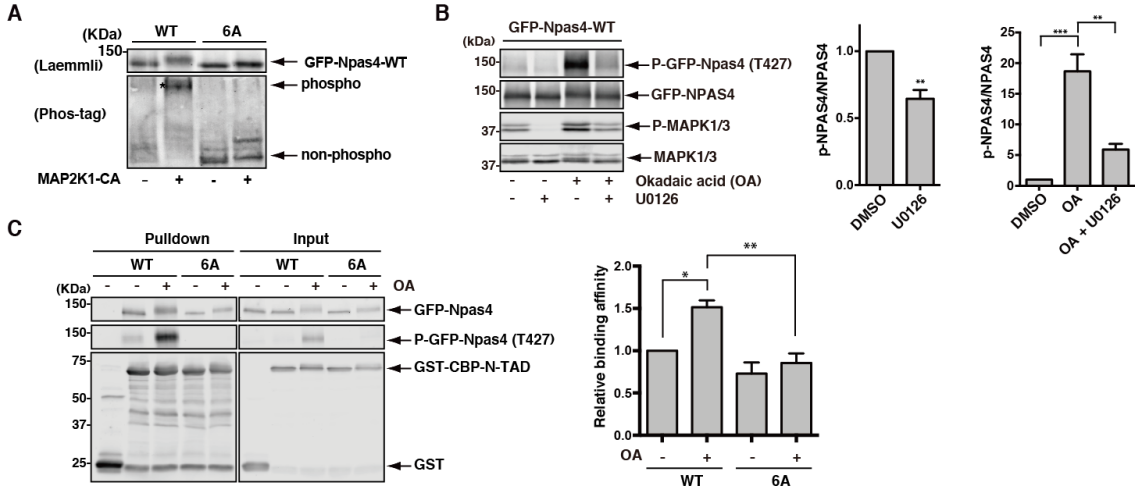


図 2. MAPK による Npas4 リン酸化により、Npas4 と CBP との結合が増加する

（A）Phostag-SDS PAGE による Npas4 のリン酸化解析。MAP2K1（MEK1）の恒常活性型変異体は Npas4 のバンドシフトを誘導する。このバンドシフトは Npas4 のリン酸化部位変異体（Npas4-6A）において抑制される。

（B）MAP2K（MEK）阻害剤（U0126）処置により Npas4 のリン酸化が減少する（n = 3、平均値±標準誤差、** $p < 0.01$、Student t 検定、DMSO vs U0126）。オカダ酸（OA）処置により Npas4 のリン酸化が亢進し、そのリン酸化は U0126 で抑制される（n = 3、平均値±標準誤差、** $p < 0.01$、*** $p < 0.001$、Tukey 多重比較検定）。

（C）オカダ酸処置により Npas4 のリン酸化を亢進させると CBP との結合が増加する。Npas4 と CBP との結合は Npas4 のリン酸化部位欠損変異体で抑制される。（n = 3、平均値±標準誤差、* $p < 0.05$、** $p < 0.01$、Tukey 多重比較検定）。

3. Npas4 のリン酸化は Npas4 の転写活性を調節する

Npas4 は神経細胞のシナプス可塑性にとって重要な *Bdnf* などの遺伝子の発現を調節することが報告されている[3]。また、*Bdnf* は、生体脳におけるシナプス可塑性および記憶形成において重要な役割を果たすことが知られている [5]。そこで、MAPK による Npas4 のリン酸化が Npas4 の転写活性を調節するかどうかを調べるために、BDNF exon1 プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたレポーターベクターを用いて、遺伝子発現解析を行った。その結果、培養線条体神経細胞に Npas4 の発現させることによって、BDNF のプロモーター活性が亢進し、この活性の亢進は MAP2K1（MEK1）-CA の共発現または cAMP 活性化剤（FSK）の処置によってさらに亢進した（図 3A、3B)。また、Npas4 のリン酸化擬似変異体（Npas4-6E）は Npas4 野生型と比較して、BDNF プロモーター活性をさらに亢進させた（図 3C)。これらの結果は、MAPK による Npas4 のリン酸化が Npas4 の転写活性を亢進させることを示唆している。

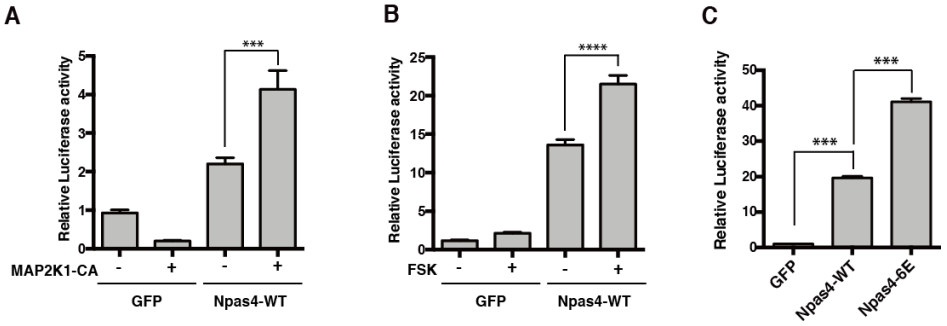


図 3. Npas4 のリン酸化は Npas4 の転写活性を制御する

（A）Npas4 と MAP2K1-CA の共発現は BDNF プロモーター活性を亢進する。(n = 5、平均値±標準誤差、* p < 0.05、Tukey 多重比較検定)

（B）Npas4 の発現および FSK の処置は BDNF プロモーター活性を亢進する。(n = 6、平均値±標準誤差、* p < 0.05、Tukey 多重比較検定)

（C）Npas4 のリン酸化擬似変異体（Npas4-6E） は Npas4 野生型と比較して、BDNF プロモーター活性を亢進する。* p < 0.05、** p < 0.01（n = 3、平均値±標準誤差、Tukey 多重比較検定)。

4. Npas4 とそのリン酸化は、報酬関連の学習・記憶を制御する

Npas4 が報酬関連の学習および記憶と関連しているかどうかを調べるために、野生型および Npas4 ノックアウトマウスを用いて、コカインによる CPP 試験を行った。その結果、野生型のマウスでは、生理食塩水が投与された場所での滞在時間（CPP スコア）に変化はなく、コカインが投与された場所での滞在時間が優位に延長した（図 4A)。一方、全身の NPAS4 を欠損させたマウスでは、野生型のマウスと比較して、コカインが投与された場所での滞在時間が優位に減少した（図 4A)。次に、Npas4 のコンディショナルノックアウトマウスの側坐核にサブスタンス P プロモーターの下流で Cre リコンビナーゼを発現する AAV を導入し、側坐核の D1 受容体発現細胞で特異的に Npas4 を欠損させた。側坐核の D1 受容体発現細胞で特異的に Npas4 を欠損させたマウスでは、全身の Npas4 を欠損させたマウスと同様に、コカインが投与された場所での滞在時間が優位に減少した（図 4B)。次に Npas4 欠損による報酬学習・記憶能の減少が Npas4 を発現させることにより回復できるかどうかを検討した。Npas4 欠損による報酬学習・記憶能の減少が Npas4 の野生型を発現させることで回復出来たのに対し、Npas4 のリン酸化部位変異体では回復できなかった（図 4B)。以上の結果から、Npas4 とそのリン酸化が報酬学習・記憶に重要な役割を果たすことが明らかになった。

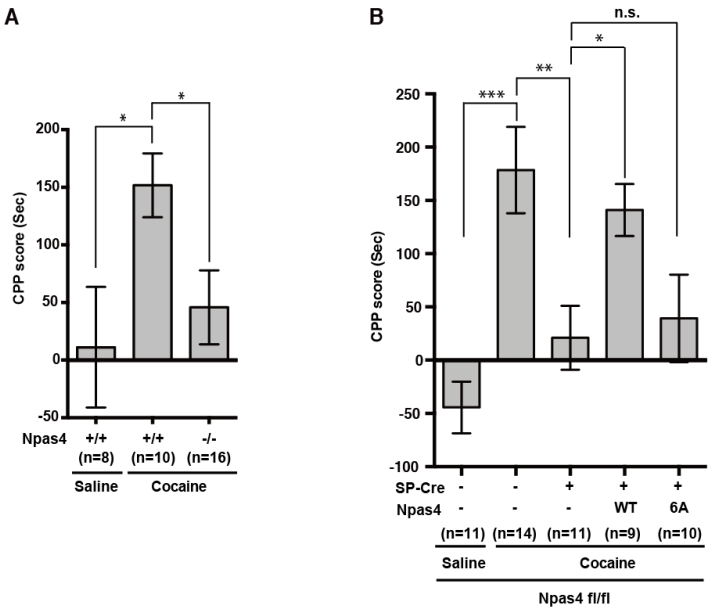


図 4. Npas4 とそのリン酸化は、報酬関連の学習・記憶を制御する

(A) Npas4 を欠損させると報酬学習・記憶が障害される。(平均値±標準誤差、* $p < 0.05$、Tukey 多重比較検定)。

(B) Npas4 を側坐核の D1 受容体発現細胞特異的に欠損させると報酬学習・記憶が障害される。Npas4 欠損による報酬学習・記憶能の低下が Npas4 の野生型を発現させることで回復するのに対し、Npas4 のリン酸化部位欠損変異体では回復しない。(平均値±標準誤差、* $p < 0.05$、** $p < 0.01$、*** $p < 0.001$、Tukey 多重比較検定)。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科神経情報薬理学講座の船橋靖広、名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学講座の永井拓である。

文　献

1) Nagai T, Nakamuta S, Kuroda K, Nakauchi S, Nishioka T, Takano T, Zhang X, Tsuboi D, Funahashi Y, Nakano T, Yoshimoto J, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Miura M, Nishi A, Kobayashi K, Yamada K, Amano M, Kaibuchi K. Phosphoproteomics of the Dopamine Pathway Enables Discovery of Rap1 Activation as a Reward Signal In Vivo. Neuron. 2016 Feb 3;89 (3): 550-65. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.019.

2) Malvaez, M., Mhillaj, E., Matheos, D.P., Palmery, M., and Wood, M.A. (2011). CBP in the nucleus accumbens regulates cocaine-induced histone acetylation and is critical for cocaine-associated behaviors. J Neurosci 31, 16941-16948. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2747-11.2011.

3) Ooe N, Saito K, Mikami N, Nakatuka I, Kaneko H.Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. Mol Cell Biol. 2004 Jan;24 (2): 608-16. PMID: 14701734

4) Lin Y, Bloodgood BL, Hauser JL, Lapan AD, Koon AC, Kim TK, Hu LS, Malik AN, Greenberg ME. Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. Nature. 2008 Oct 30;455 (7217):1198-204. doi: 10.1038/nature07319.

5) Ramamoorthi K, Fropf R, Belfort GM, Fitzmaurice HL, McKinney RM, Neve RL, Otto T, Lin Y. Npas4 regulates a transcriptional program in CA3 required for contextual memory formation. Science. 2011 Dec 23;334(6063):1669-75. doi: 10.1126/science.1208049.

6) Parker, D., Ferreri, K., Nakajima, T., LaMorte, V.J., Evans, R., Koerber, S.C., Hoeger, C., and Montminy, M.R. (1996). Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. Mol Cell Biol 16, 694-703.
7) Bekinschtein P1, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 19;105 (7):2711-6. doi: 10.1073/pnas.0711863105.