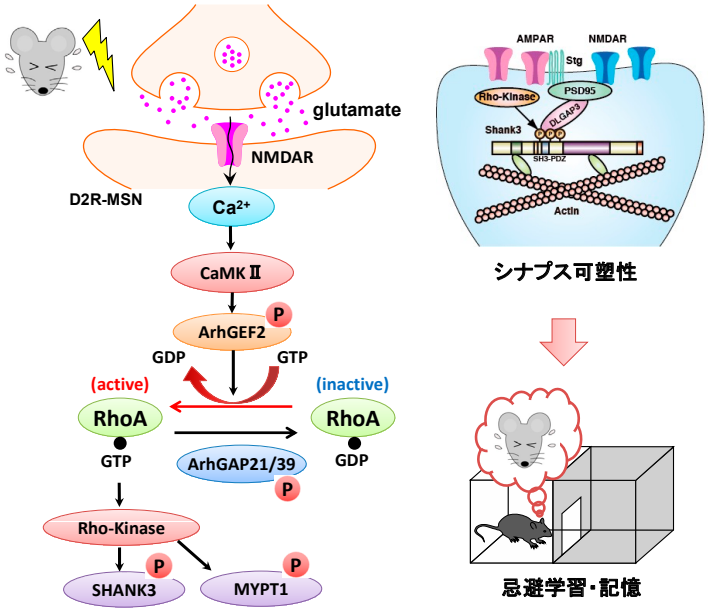
161　グルタミン酸による情動行動・記憶の制御機構の解明	船橋　靖広

【目的】中枢神経系の主要な神経伝達物質の１つであるグルタミン酸はNMDA（N-メチル-d-アスパラギン酸）受容体を介して樹状突起スパインにカルシウムイオン（Ca^{2+}）の流入を誘導する。刺激誘発性のCa^{2+}流入は、カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（CaMKⅡ）などのCa^{2+}依存性プロテインキナーゼを活性化する。CaMKⅡは神経細胞内で受容体・イオンチャネル、シグナル分子、転写因子などの様々な標的蛋白質（基質）をリン酸化することで、樹状突起スパインの形態可塑性やそれに引き続く長期増強（LTP : long-term potentiation）を誘発し、情動・意欲・認知機能に関与すると考えられている。しかしながら、CaMKⅡがどのような基質をリン酸化するのか完全には理解されていないため、どのような機構で神経細胞のシナプス可塑性や情動・意欲・認知機能が制御されているのか、依然として不明な点が多い。

【方法および結果】本研究では、グルタミン酸シグナルの下流でリン酸化される基質を同定するため、線条体／側坐核スライスを培養し、高カリウム（KCL）やNMDA受容体作動薬（NMDA）による刺激を行った。リン酸化プロテオミクス解析の結果、KCL刺激やNMDA刺激によってリン酸化が亢進する100種類以上のタンパク質を同定した。その中で低分子量Gタンパク質RhoAの制御因子ARHGEF2はCaMKⅡによってリン酸化されることで、そのGEF活性が増強した。また、マウスに忌避刺激（足裏への電気ショック）を与えた際、側坐核のドーパミンD2受容体を発現する中型有棘細胞（D2R-MSN）内にCa^{2+}が流入し、CaMKⅡによるARHGEF2のリン酸化とRhoA／Rho-kinase経路の活性化が誘導された。さらに、アデノ随伴ウイルス（AAV）によりD2R-MSN特異的にRho-kinaseのドミナントネガティブ変異体（DN）を発現させ受動回避学習試験を行った結果、Rho-kinase-DNを発現するマウスでは忌避学習能が低下した。また、Rho-kinaseはポストシナプスの足場タンパク質SHANK3をリン酸化し、NMDA受容体やAMPA受容体との相互作用を増加させることを見いだした。以上の結果から、マウスに忌避刺激が与えられた際、D2R-MSN内でCaMKⅡ／RhoA／Rho-kinase経路が活性化され、Rho-kinaseによってSHANK3がリン酸化されることでスパインの構造可塑性および学習・記憶が制御されることが示唆された。

NMDAR／CaMKⅡ／RhoA／Rho-kinase経路は忌避学習を制御する



161. グルタミン酸による情動行動・記憶の制御機構の解明

船橋　靖広

*藤田医科大学 総合医科学研究所 神経・腫瘍のシグナル解析プロジェクト研究部門

Key words：グルタミン酸，学習・記憶，リン酸化，プロテオミクス，シグナル伝達

緒　言

中枢神経系の主要な神経伝達物質の１つであるグルタミン酸はNMDA（N-メチル-d-アスパラギン酸）受容体を介して樹状突起スパインにカルシウムイオン（Ca^{2+}）の流入を誘導する。刺激誘発性のCa^{2+}流入は、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（CaMKⅡ）などのCa^{2+}依存性プロテインキナーゼを活性化する。CaMKⅡは神経細胞内で受容体・イオンチャネル、シグナル分子、転写因子などの様々な標的蛋白質（基質）をリン酸化することで、樹状突起スパインの形態可塑性やそれに引き続く長期増強（LTP : long-term potentiation）を誘発し、情動・意欲・認知機能に関与すると考えられている［1］。しかしながら、CaMKⅡがどのような基質をリン酸化するのか完全には理解されていないため、どのような機構で神経細胞のシナプス可塑性や情動・意欲・認知機能が制御されているのか、依然として不明な点が多い。また、LTP誘導時にCaMKⅡは樹状突起スパインにおけるRhoAおよびRac1を含むRhoファミリー低分子量G蛋白質の活性化にも関与している［2］。RhoAは、Rho-kinase／ROCKなどのエフェクターの活性化を通じてアクチン細胞骨格を再編成することにより、スパインの形態可塑性を調節すると考えられている［2］。Rho- kinase 特異的阻害剤の脳内局所投与では学習や記憶能力が低下することから、Rho-kinase がスパインの形態可塑性だけでなく学習や記憶にも関与していることが示唆されている［3～5］。しかしながら、RhoA が CaMKⅡによってどのように活性化されるのか、また、RhoA および Rho-kinase がどのような機構でシナプス可塑性と学習・記憶を調節するのかについてはあまり良く分かっていない。

方　法

1.　線条体スライス培養法

マウス（C57BL/6J、7 週齢、雄）を解剖して取り出した脳を振動刀ミクロトームで冠状断し、厚さ 350 μm の脳組織スライスを作製した。脳組織スライスから線条体領域を切り抜き、30℃で 30 分間培養した。その後、高濃度の塩化カリウム溶液（40 mM KCL）やグルタミン酸受容体作動薬（100 μM NMDA）を処置し、15 秒後にスライス標本を凍結した。あるいは、Rho-kinase 阻害剤（20 μM、Y27632）を 60 分間前処置後、脱リン酸化酵素阻害剤（350 nM、Calyculin-A）を処置し、60 分後にスライス標本を凍結した。その後、抽出バッファーを加え、超音波ホモジナイザーにより、タンパク質を抽出した。

2.　リン酸化プロテオミクス解析

GST-14-3-3、GST-Check2-FHA、GST-Pin1-WW などのリン酸化タンパク結合タンパク質を、グルタチオンセファロース 4B ビーズと混合してビーズに固相化した。次に、線条体のスライス標本から調製した抽出液とアフィニティビーズを１時間反応させた後、ビーズを洗浄バッファーで３回洗浄した。ビーズに結合したタンパク質をグアニジンにより溶出後、ジチオトレイトールとヨードアセトアミドを加えて還元・アルキル化処理を行った。次に、この溶液をクロロホルム・メタノール沈殿法により脱塩し、Speedvac で乾燥、1 M 尿素溶液に再溶解させ、トリプシン／Lys-C を加えて 37℃で一晩、酵素消化処理を行った。最後に、リン酸化ペプチドを Titansphere Phos-TiO tip により濃縮、SPE c-tip により脱塩を行った。得られたペプチドを Orbitrap Fusion 質量分析計により分析した。

*現在の所属：藤田医科大学 医科学研究センター 神経・腫瘍のシグナル解析プロジェクト研究部門

3. *in vitro* リン酸化アッセイ

GST-ARHGEF2 と CaMKⅡまたは、GST-SHANK3-SH3-PDZ と Rho-kinase-CAT を［γ-^{32}P］ATP 存在下、30℃で 30 分間反応させ、オートラジオグラフィーにより検出した。

4. GST-RhoA-G17A Pull down アッセイ

GST-RhoA-G17A をグルタチオンセファロース 4B ビーズと混合してビーズに固相化した。次に、COS7 細胞に HA-ARHGEF2 と GFP-CaMKⅡ（野生型あるいは活性化型）を発現させ、タンパク質を抽出した。抽出液とアフィニティビーズを 1 時間反応させた後、ビーズを洗浄バッファーで 3 回洗浄した。ビーズに 1×SDS サンプル溶液を加え、99℃で 10 分加熱処理を行った。

5. アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターによる遺伝子導入

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、Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体（AAV-Flex-Rho-kinase-DN）を Adora2a-Cre マウスの側坐核に注入し、ドーパミン D2 受容体を発現する中型有棘神経細胞（D2R-MSN）に特異的に発現させた。

6. 受動回避学習試験

マウスが明室から暗室に進入した際に忌避刺激（足裏への電気ショック）を与えることにより、暗室への進入と痛みである恐怖を関連付けて学習・記憶させる試験である。

（1 日目）訓化：マウスを明室に入れ、マウスが暗室に入ったらマウスを箱から取り出した。

（2 日目）条件付け：マウスを明室に入れ、暗室に入るまでの時間を測定した。進入と同時に扉を閉めると共に電気刺激（0.7 mA、3 秒）を与えた。

（3 日目）試験：1 日後、明室にマウスを入れ、明室に留まった時間を最大 300 秒として測定した。

結果および考察

1. グルタミン酸シグナルのリン酸化プロテオミクス解析

グルタミン酸シグナルの下流でリン酸化されるリン酸化基質とそのリン酸化サイトを同定するために、線条体スライス培養法を用いて、高カリウム（KCL）や NMDA 受容体作動薬（NMDA）による刺激を行った。対照群と比較して、KCl や NMDA 刺激群では、CaMKⅡの既知の基質である NR2B と GluR1 のリン酸化、および CaMKⅡの自己リン酸化が亢進することを確認した。次に、網羅的かつ高感度でリン酸化基質を濃縮するため、リン酸化スレオニンあるいはリン酸化セリンと結合する 14-3-3 タンパク質や Check2 の FHA ドメイン、Pin1 の WW ドメインを固相化したアフィニティビーズを用いた［6, 7］。KCL や NMDA で刺激したマウスの線条体のスライス標本から調製した抽出液とアフィニティビーズを反応させ、得られたリン酸化タンパク質をトリプシン／Lys-C により消化した。得られたリン酸化ペプチドを質量分析計にて解析した。対照群と比較して薬剤投与群で 2 倍以上リン酸化が亢進したタンパク質を基質候補とした。その結果、KCL 刺激によってリン酸化が亢進する 390 種の基質候補を得た。同定した基質候補のうち、124 種類は 14-3-3 特異的、67 種類は FHA ドメインに特異的、105 種類は WW ドメインに特異的に得られた基質であった。また、NMDA 刺激によってリン酸化が亢進する 395 種の基質候補を得た。同定した基質候補のうち、98 種類は 14-3-3 特異的、60 種類は FHA ドメインに特異的、151 種類は WW ドメインに特異的に得られた基質であった。リン酸化プロテオミクス解析データを基にパスウェイ解析を行った結果、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の関連経路を含む数種類のシグナル伝達経路が同定された。

2. CaMKⅡによる ARHGEF2 のリン酸化は、RhoA の活性化を誘導する

リン酸化プロテオミクス解析データを基にしたパスウェイ解析の結果から、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の制御タンパク質に着目し、*in vitro* リン酸化アッセイを行ったところ、CaMKⅡが ARHGEF2 を直接リン酸化した。次に、ARHGEF2 の生体内でのリン酸化の変動を解析するため、ARHGEF2 の T103 のリン酸化を認識する抗リン酸化抗体を作製した。線条体スライス培養を用い、KCL や NMDA 刺激を行ったところ、ARHGEF2 のリン酸化が亢進した。このリン酸化の亢進は CaMKⅡ阻害剤（KN-93）の前処置により抑制された（図 1）。これらの結果は、NMDA

受容体の下流で、CaMKⅡが ARHGEF2 をリン酸化することを示唆している。

ARHGEF2 のリン酸化がそのグアニンヌクレオチド交換活性に影響を及ぼし、RhoA の活性化を制御するどうかを調べるために、COS7 細胞に HA-ARHGEF2 と GFP-CaMKⅡ（野生型あるいは活性化型）を発現させ、RhoA のヌクレオチドフリー変異体（RhoA-G17A）を用いた Pull down アッセイを行った。RhoA のヌクレオチドフリー変異体は活性化した Rho-GEF に高い親和性をもつことが知られている。対照群と比較して、CaMKⅡの活性型を共発現させることにより、RhoA-G17A で沈殿した ARHGEF2 の量が増加した。これらの結果は、CaMKⅡが ARHGEF2 をリン酸化し、その GEF 活性を増強することを示唆している。以上の結果より、NMDA 受容体を介した Ca^{2+}流入により CaMKⅡが RhoA 制御タンパク質をリン酸化することで RhoA シグナル伝達経路を活性化することが示唆された。

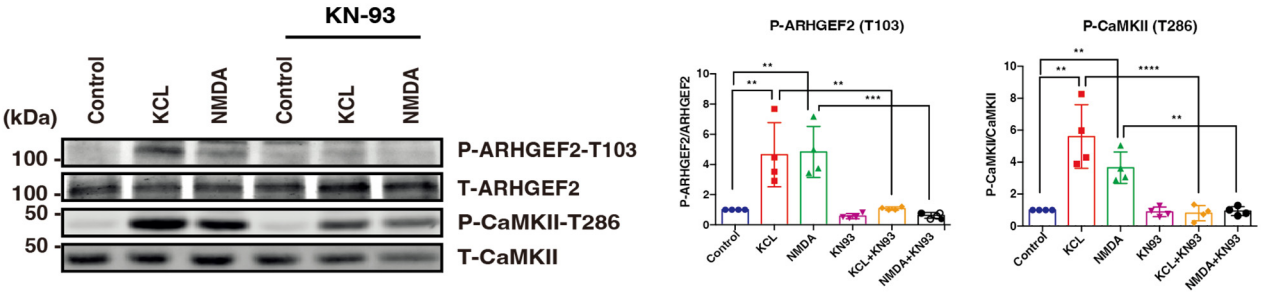


図 1. NMDA 受容体刺激により、CaMKⅡが ARHGEF2 をリン酸化する

線条体スライスを CaMKⅡ阻害剤 KN-93（50μM）で前処理した後、KCL（40 mM）または NMDA（100μM）で 15 秒間処置した。左図は代表的なイムノブロット、右図はイムノブロットの定量を示す。

** p＜0.01、*** p＜0.001、*** * p＜0.0001（Tukey 多重比較検定）。

3. RhoA/Rho-kinase シグナルのリン酸化プロテオミクス解析

RhoA のエフェクターである Rho-kinase／ROCK によりリン酸化されるリン酸化基質とそのリン酸化サイトを同定するために、線条体のスライス培養法を用いて、脱リン酸化酵素阻害剤（Calyculin-A）と Rho-kinase 阻害剤（Y-27632）を組み合わせた処置を行った。これまでの研究で Rho-kinase が MYPT1 をリン酸化することが報告されている［8］。対照群と比較して、Calyculin-A 処置群では、MYPT1 の T850 のリン酸化が亢進し、Y-27632 でそのリン酸化が抑制されることを確認した。マウスの線条体のスライス標本から調製した抽出液と 14-3-3 アフィニティビーズを反応させ、得られたリン酸化タンパク質をトリプシンにより消化した。得られたリン酸化ペプチドを質量分析計にて解析した。その結果、Rho-kinase の基質候補として 221 種を同定した。リン酸化プロテオミクス解析データを基にパスウェイ解析を行った結果、ポストシナプス関連タンパク質（SHANK3、DLG2、DLG4、DLGAP2、DLGAP3、SYNGAP 1 など）の関連経路が同定された。Rho-kinase の基質候補の中で、ポストシナプスの足場タンパク質である SHANK3［9］に着目し、*in vitro* リン酸化アッセイを行った結果、Rho-kinase により SHANK3 の SH3-PDZ を含む領域（461-812 aa）がリン酸化され、SHANK3 のリン酸化部位欠損変異体ではリン酸化が抑制された。次に、SHANK3 の T551、S694、S781 のリン酸化を認識する抗リン酸化抗体を作製し、線条体スライス培養を用いて内在性の SHANK3 のリン酸化の変動を解析した。KCL や NMDA 刺激により SHANK3 のリン酸化が亢進し、そのリン酸化の亢進は Y-27632 の処置により抑制された（図 2）。したがって、グルタミン酸シグナルの下流で Rho-kinase により SHANK3 がリン酸化されることが示唆された。

Rho-kinase による SHANK3 のリン酸化部位変異体を作製し、ポストシナプスの足場タンパク質 DLGAP3 との相互作用を解析した。SHANK3 のリン酸化部位をアラニンに置換したリン酸化部位欠損変異体は野生型と比較して、DLGAP3 との結合が低下し、リン酸化部位をアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化変異体は野生型と比較して、DLGAP3 との結合が増加した。さらに、Rho-kinase による SHANK3 リン酸化により、NMDA 受容体や AMPA 受容体との相互作用も促進された。以上の結果より、Rho-kinase による SHANK3 のリン酸化が DLGAP3 を介して、NMDA 受容体や AMPA 受容体との相互作用を調節することで、シナプス機能を制御することが示唆された。

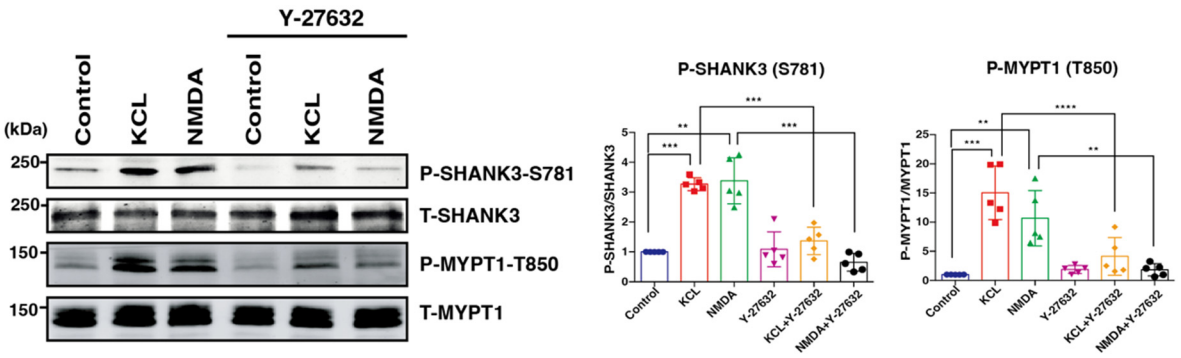


図 2. グルタミン酸シグナルの下流で、Rho-kinase が SHANK3 をリン酸化する
線条体スライスを Rho-kinase 阻害剤 Y-27632（20 μM）で前処理した後、KCL（40 mM）または NMDA（100 μM）で 15 秒間処置した。左図は代表的なイムノブロット、右図はイムノブロットの定量を示す。** p＜0.01、*** p＜0.001、**** p＜0.0001（Tukey 多重比較検定）。

4. 側坐核 D2R-MSN における Rho-kinase の阻害は忌避学習を抑制する

RhoA／Rho-kinase 経路が忌避学習・記憶に関与するかどうかを調べるために、忌避刺激として足裏への電気ショック刺激を用いた受動回避試験を行った。この試験は、マウスが明室から暗室に入った際に足裏への電気ショック刺激を与えることにより、暗室への進入とショックの恐怖を関連づけて記憶させる試験である。まず始めに、受動回避学習試験において、忌避刺激（足裏への電気ショック）後のマウスの側坐核を採取し、CaMKⅡの基質である ARHGEF2、Rho-kinase の基質である SHANK3 や MYPYT1 のリン酸化レベルをイムノブロットにて解析したところ、忌避刺激により側坐核におけるこれらのタンパク質のリン酸化が増加した。SHANK3 や MYPYT1 のリン酸化は Rho-kinase の特異的阻害剤（Fasudil）を忌避刺激の 15 分前に腹腔内投与することにより低下した。側坐核にはドーパミン D1 受容体を発現する中型有棘神経細胞（D1R-MSN）、ドーパミン D2 受容体を発現する中型有棘神経細胞（D2R-MSN）が存在する。D1R-MSN は報酬行動を、D2R-MSN は忌避行動を制御すると考えられている［10］。D2R-MSN 特異的に Rho-kinase の活性を抑制するため、cre リコンビナーゼ依存的に Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体を発現するアデノ随伴ウイルス（AAV-Flex-Rho-kinase-DN）を作製した。AAV-Flex-Rho-kinase-DN を Adora2a-cre マウスの側坐核に注入し、D2R-MSN 特異的に Rho-kinase を抑制し、受動回避学習試験を行った。対照マウスと比較して Rho-kinase-DN を発現するマウスでは学習・記憶能力が優位に低下した（図 3）。

以上の結果より、マウスに忌避刺激が与えられると、グルタミン酸が前頭皮質から側坐核へ投射する神経細胞の神経終末で放出される。D2R-MSN 細胞膜上の NMDA 受容体が活性化され、Ca^{2+}が D2R-MSN の細胞内に流れ込み、Ca^{2+}の細胞内濃度が上昇する。D2R-MSN の細胞内で CaMKⅡ - RhoA - Rho-kinase 経路が活性化され、SHANK3 を含む様々な基質が Rho-kinase によってリン酸化されることでシナプス可塑性および学習・記憶を制御することが示唆された。

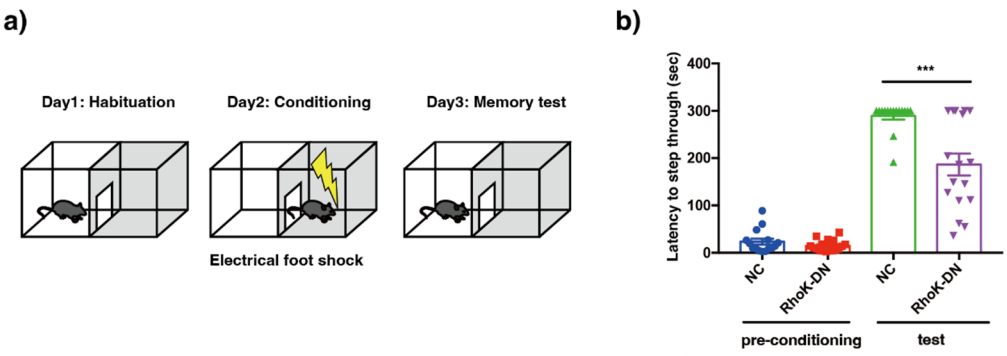


図 3. 側坐核 D2R-MSN における Rho-kinase の阻害は忌避学習を抑制する

a) 受動回避学習試験、略図。

b) AAV-Flex-Flag-Rho-kinase-RB/PH（TT）（DN 変異体）を Adora2a-Cre マウスの側坐核へ注入した。対照マウスと比較して Rho-kinase-DN を発現するマウスでは学習・記憶能力が優位に低下した。***P＜0.001（unpaired t-test）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、藤田医科大学の貝淵弘三教授、永井拓教授、坪井大輔講師、西岡朋生講師、張心健助教、名古屋大学の天野睦紀准教授、黒田啓介准教授、Rijwan Uddin Ahammad 研究員である。

文　献

1) Luscher C, Malenka RC (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). Cold Spring Harb Perspect Biol 4

2) Murakoshi H, Wang H, Yasuda R. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. Nature. 2011 Apr 7;472(7341):100-4. doi: 10.1038/nature09823. Epub 2011 Mar 20.

3) Sweetat S, Rosenblum K, Lamprecht R. Rho-associated kinase in the gustatory cortex is involved in conditioned taste aversion memory formation but not in memory retrieval or relearning Neurobiol Learn Mem. 2012 Jan;97(1):1-6. doi: 10.1016/j.nlm.2011.08.007. Epub 2011 Aug 30.

4) Hodges JL, Newell-Litwa K, Asmussen H, Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Myosin IIb activity and phosphorylation status determines dendritic spine and post-synaptic density morphology. PLoS One. 2011;6(8):e24149. doi: 10.1371/journal.pone.0024149. Epub 2011 Aug 26.

5) Huentelman MJ, Stephan DA, Talboom J, Corneveaux JJ, Reiman DM, Gerber JD, Barnes CA, Alexander GE, Reiman EM, Bimonte-Nelson HA. Peripheral delivery of a ROCK inhibitor improves learning and working memory. Behav Neurosci. 2009 Feb;123(1):218-23. doi: 10.1037/a0014260.

6) 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. Epub 2016 Jan 21.

7) Shohag MH, Nishioka T, Ahammad RU, Nakamuta S, Yura Y, Hamaguchi T, Kaibuchi K, Amano M. Phosphoproteomic Analysis Using the WW and FHA Domains as Biological Filters. Cell Struct Funct. 2015;40(2):95-104. doi: 10.1247/csf.15004. Epub 2015 Jun 27.

8) Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). Science. 1996 Jul 12;273(5272):245-8. doi: 10.1126/science.273.5272.245.
9) Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. Neuron. 1999 Jul;23(3):569-82. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80809-0.
10) Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. Neuron. 2010 Jun 24;66(6):896-907. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.011.