

新潟大学脳研究所
「病理リソースを活用した脳神経病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ドーパミン神経回路の細胞質-核間輸送制御機構の解明

研究代表者 板倉 誠¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 齊藤 奈英²⁾

1) 北里大学医学部生化学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

神経伝達物質ドーパミンによって介在される神経回路は、不安や恐怖などの情動に深く関与している。中脳黒質緻密部や腹側被蓋野のドーパミン作動性神経細胞は、線条体、扁桃体、側坐核などに投射し、ドーパミン受容体を介して短期的・長期的な作用をもたらす。また神経前終末にもドーパミン受容体は存在し、ドーパミン作動性神経細胞の機能制御に関与している。

嫌悪記憶の形成においてドーパミン神経回路に長期的な変化が起きると考えられるが、その際にはドーパミン受容体シグナルによって核内への情報伝達が起き、転写制御が行われていると示唆される。本研究では、ドーパミン神経回路を形成する神経細胞の細胞質-核間輸送タンパク質の翻訳後修飾の変化を同定し、この翻訳後修飾がドーパミン依存的な嫌悪記憶形成の細胞質-核間物質輸送をどのように制御しているかを、ドーパミン受容体遺伝子改変マウスを用いて明らかにすることを目的とする。

A. 研究目的

不安障害や心的外傷後ストレス障害(PTSD)などの精神疾患の発症と嫌悪記憶には密接な関係があると考えられる。そのため、これら疾患の治療法の開発には、嫌悪記憶の形成や想起の分子機構を詳細に理解する必要がある。近年、ドーパミン神経回路が嫌悪記憶に関与することが明らかになりつつある。そこで、本研究ではドーパミン神経回路の嫌悪記憶形成に、転写を制御する細胞質-核間輸送に関連するタンパク質（インポーチンファミリーなど）および転写制御因子自身の翻訳後修飾がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. 神経モデルPC12細胞を用いた細胞質-核間輸送関連タンパク質の翻訳後修飾の同定

これまでに、脳神経栄養因子(BDNF)をはじめと

するニューロトロフィンがドーパミン作動性神経細胞の生存を制御していることが報告されている。そこでドーパミンを放出する神経モデルPC12細胞を用いて、ニューロトロフィン受容体(Trk)の細胞内情報伝達系が、細胞質-核間輸送関連タンパク質および転写制御因子にどのような影響を与えるかを検討した。

2. ドーパミン受容体ノックアウトマウスおよびノックダウンマウスの翻訳後修飾の定量プロテオーム解析

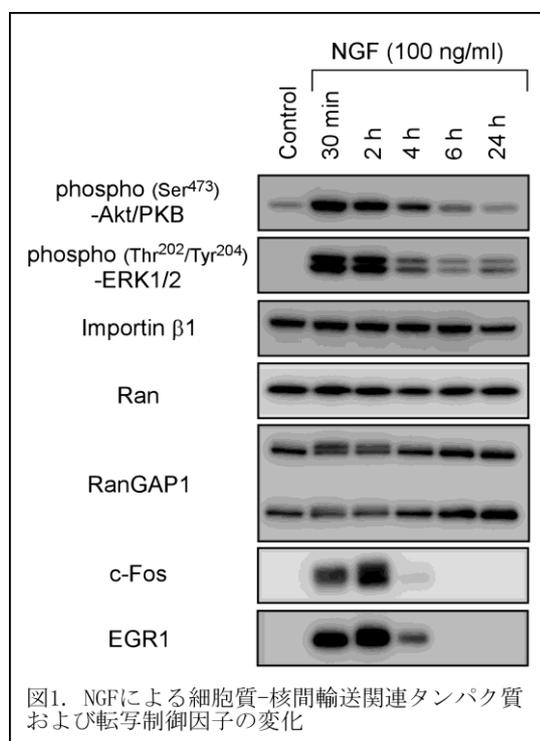
新潟大学脳研究所・笹岡教授が作製したドーパミン受容体ノックアウトマウスおよびノックダウンマウスおよび野生型マウスに、拘束浸水ストレスなどの短期的なストレスを負荷した後に、脳の各部位を採取し、定量プロテオーム解析を行い、ドーパミンシグナルが関与する細胞質-核間輸送関連タンパク質および転写制御因子の翻訳後修飾を同定する。

次に、同定した翻訳後修飾部位の抗体（翻訳後修飾ペプチドを抗原としてウサギで作成する。）を用いて、足への電気刺激による嫌悪記憶の形成時にも、翻訳後修飾が起きているかをウエスタンブロットおよび免疫染色によって確認する。

C. 研究結果

1. Trk シグナルによる神経モデル PC12 細胞タンパク質の経時的な変化

PC12 細胞を神経成長因子 NGF(100 ng/ml)で処理し、細胞質-核間輸送関連タンパク質および転写制御因子がどのように変化するかをウエスタンブロットにより検討した(図1)。



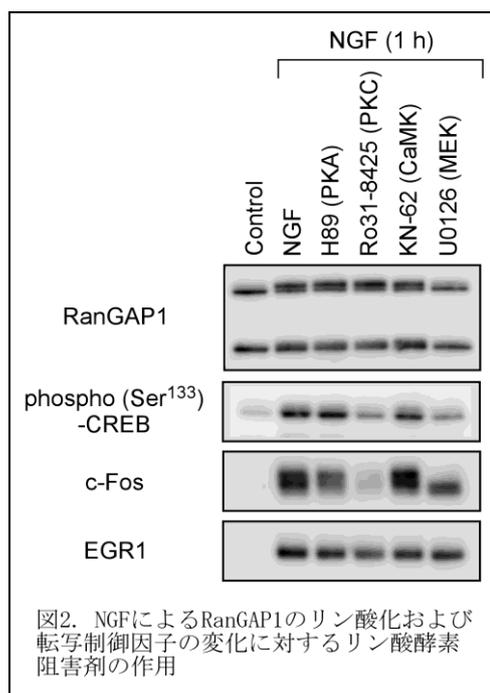
NGF によって活性化されるリン酸化酵素 Akt/PKB および ERK1/2 のリン酸化の亢進は、NGF 30 分間処理から見られ、Akt/PKB では 24 時間後にはほぼ定常レベルに戻る。これに対して、Erk1/2 のリン酸化の亢進は NGF 30 分間処理で最大になるが 24 時間後でも続いていた。

核輸送タンパク質インポーチンファミリーやインポーチンの機能を制御する低分子量Gタンパク質 Ran では、NGF 処理による変化を検出することはできなかった。しかしながら、Ran の GTP アーゼ活性化因子 RanGAP1 は、NGF 処理 30 分間および 2 時間で、リン酸化による上方へのバンドシフトが検出された。(RanGAP1 のバンドシフトは、脱リン酸化酵素で処理することで消失する。)

また代表的な最初期遺伝子である c-Fos, EGR1 は、NGF 30 分間、2 時間処理で発現誘導が見られるのに対し、4 時間処理では明らかな発現量の減少が観察された。

2. Trk シグナルによって活性化される神経モデル PC12 細胞のリン酸化酵素の役割の検討

Trk シグナルによる PC12 細胞の変化に関与しているリン酸化酵素を同定するために、リン酸化酵素阻害剤の前処理を行った上で、NGF を 1 時間処理し、ウエスタンブロットのサンプルとした。



Ran の GTP アーゼ活性化因子 RanGAP1 のリン酸化は、MEK 阻害剤 U0126 によって顕著に減少した。また U0126 は、CREB および c-Fos のリン酸化も顕著に抑制していた。

また、conventional PKC 阻害剤 Ro31-8425 は、CREB のリン酸化および c-Fos の発現誘導を顕著に抑制した。しかしながら、EGR1 の発現誘導に対する抑制効果はわずかであった。

D. 考察

神経モデル PC12 細胞に神経成長因子 NGF を作用させると、Ran の GTP アーゼ活性化因子 RanGAP1 がリン酸化されることがわかった。また、RanGAP1 がリン酸化されている NGF30 分間から 2 時間処理のサンプルにおいて、最初期遺伝子 c-Fos および EGR1 の発現量の増加が観察され、4 時間処理ではすでにタンパク質分解が進んでいた。そこで、こ

の2つの細胞内変化に関連性があるのかを、リン酸化酵素阻害剤を用いて調べた。

MEK 阻害剤 U0126 の前処理では、RanGAP1 のリン酸化が抑制されるにも関わらず、最初期遺伝子 c-Fos および EGR1 の発現誘導が起きることから、RanGAP1 のリン酸化は、c-Fos および EGR1 の発現誘導には必須でないことがわかった。しかしながら、U0126 は c-Fos のリン酸化を抑制するので、c-Fos の細胞内局在に RanGAP1 のリン酸化が関与している可能性が考えられた。

また、PKC 阻害剤 Ro31-8425 は、c-Fos の発現誘導を顕著に抑制するのに対して、EGR1 の発現誘導に対してはあまり効果がないことから、最初期遺伝子の発現誘導を引き起こす細胞内情報伝達系は、個々の遺伝子ごとに異なっていることが示唆される。

E. 結論

核輸送因子インポーチンの機能は、低分子量 G タンパク質 Ran によって制御されている。本研究では、Ran の GTP アーゼ活性化因子 RanGAP1 のリン酸化が、最初期遺伝子 c-Fos および EGR1 の発現誘導には必須でないことを明らかにした。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

0 件

2. 学会発表

0 件

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

0 件