

## 平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

## 1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

|             |                          |                       |
|-------------|--------------------------|-----------------------|
| 事業名         | 脳科学研究戦略推進プログラム           |                       |
| 研究開発課題名     | 情動の制御機構を解明するための神経情報基盤の構築 |                       |
| 機関名         | 国立大学法人名古屋大学              |                       |
| 研究開発<br>担当者 | 所属 役職                    | 大学院医学系研究科神経情報薬理学講座 教授 |
|             | 氏名                       | 貝淵 弘三                 |

## 2. 研究開発成果の内容

## ① リン酸化プロテオミクス・インタラクトーム解析

1) *in vitro* プロテオミクス

a) ラット脳抽出液を用いて LRRK2、TTBK2、Src、CK2 の基質スクリーニングを行い、LRRK2 について 240 種、TTBK2 について 81 種、Src について 670 種、CK2 について 201 種の候補リン酸化部位を得た。また、CaMK2、GSK3B についてスクリーニングを繰り返し、最終的に CaMK2 について 611 種、GSK3B について 497 種の候補リン酸化部位を得た。

b) KISS 法と補完的なスクリーニング法であるヒトリコンビナント蛋白質アレイ (ProtoArray) を用いて LRRK2 のリン酸化基質のスクリーニングを行い、26 種の基質候補を得た。TTBK2 については精製した TTBK2 の劣化が早く、長期間の輸送に耐えられなかったため実施を中断した。

2) *in vivo* プロテオミクス

a) 14-3-3 に加えて平成 27 年度は CHEK2-FHA ドメインを用いた PIKISS 法により PKA と MAPK のスクリーニングを行い、それぞれ 80 種、91 種のリン酸化部位を同定した。同定したリン酸化部位のうちで、それぞれ 62 種、87 種は FHA ドメイン特異的に得られたリン酸化部位であった。また、PKC については 14-3-3 を用いた PIKISS 法により基質のスクリーニングを 3 回を行い、最終的に 107 種の基質候補、191 種のリン酸化部位を同定した。また、CaMK の基質スクリーニングを行い、127 種の基質候補、322 種のリン酸化部位を同定した。

b) 14-3-3 と FHA ドメインを用いた PIKISS 法 (KIOSS 法) によって、それぞれ 67 種、52 種の D2R の下流のリン酸化部位が得られた。得られたリン酸化配列については、Ser-Pro モチーフを含む配列が多く含まれていることが示されたが、責任酵素の同定までは至らなかった。

② 情動制御関連分子の *in vitro* 機能解析

## 1) スクリーニングで得られた候補基質蛋白質のリン酸化解析

a) 平成 27 年度には、ARHGEF2 が Ca<sup>2+</sup>シグナルの下流で CaMK2 によってリン酸化されることを確認した。また MPAK の基質候補として同定した NPAS4 について、MAPK の基質であることが確認出来た。一方、CRTC1 については MAPK の基質であることは確認出来なかった。

b) Rap1 の下流で MEK/MAPK が細胞の興奮性を促進することを明らかにした。CRTC1 と NPAS4 の AAV ベクターを構築したが、ARHGEF2 についてはそのサイズが大きすぎるために発現を確

認出来なかった。

c) Rap1 の下流で MEK/MAPK が K チャネルの活性を抑制して細胞の興奮性を促進することを明らかにした。

d) D2R 発現細胞ではアデノシンが PKA を活性化し、RASGRP2、RAP1GAP をリン酸化することが確認出来た。また、D2R アゴニストがアデノシンによる PKA の活性化を抑制することが確認出来たので、コンピューティンググループの側坐核の細胞内シグナルモデルを検証し、正当性を証明出来た。

### ③ 情動制御関連分子の in vivo 機能解析

1) 平成 27 年度は、餌報酬を用いた学習における MAPK の関与について解析した結果、側坐核の D1R 発現細胞に恒常活性型変異体 MAP2K1 を発現させたマウスでは、学習が亢進することを明らかにした。ARHGEF2 についてはそのサイズが大きすぎるために AAV ベクターの発現を確認出来なかった。NPAS4 についてはノックアウトマウスを用いて解析を行ったところ、コカインによる条件付け場所嗜好性が有意に抑制された。一方、CRTC1 の dominant negative 体を発現する AAV ベクターを側坐核のドパミン D1R 発現細胞特異的に導入し、コカインによる条件付け場所嗜好性試験を行ったが、嗜好性の変化は認められなかった。

2) 平成 27 年度は、Rap1 の機能解析として、D1R に Rap1 を発現させる AAV ベクターを側坐核に注入したマウスを用いてスパインの形態について解析した。その結果、D1R 発現細胞に野生型および恒常活性型変異体を発現する Rap1 の AAV ベクターを側坐核に投与したマウスでは、スパインの密度や形態に有意な変化は観察されなかった。

### ④ 線虫 (モデル生物) における解析

1) CaMKI の有力な基質候補として同定された Raf キナーゼは、細胞自律的に AFD 温度受容・記憶細胞において機能して、温度記憶のばらつきを制御することを明らかにした。これらの CaMKI および Raf キナーゼに関する研究成果を Cell Reports 誌に発表した。また、PKA を AFD 温度受容・記憶細胞特異的に RNA 干渉によって不活化を試みたところ、野生株に比べて弱い好冷性を示す系統が得られた。

2) オクトパミンなどのモノアミンが作用する神経細胞を同定するために、カルシウムイメージングを行った。固定下の線虫にオクトパミンを投与し、AIY 介在ニューロンの活動を記録したところ、オクトパミン投与によって AIY 介在ニューロンの温度変化に対する応答性が低下することを見いだした。これらのことから、オクトパミンは AIY 介在ニューロンに作用して、意思決定を制御する可能性が示唆された。

3) 自動追尾システムとカルシウムイメージングを使って報酬(餌)や罰(飢餓)に依存した走性行動や感覚神経細胞の活動を計測し、線形応答理論に基づいた数理モデルの構築を進めた。特にモノアミンシグナルが関与していると考えられる介在神経細胞の解析をするため、これまで開発した手法を拡張し、実験やデータ解析に適用した。微細な領域で活動を示す介在神経細胞の活動を解析することで、確率的な応答が報酬(餌)や罰(飢餓)に依存して変化することが明らかになった。さらに、モノアミンシグナルも罰(飢餓)と同様な神経活動の変化を引き起こすことが分かり、罰(飢餓)情報がモノアミンシグナルを介して神経回路の活動状態を変化させることが示唆された。

⑤ データベースの設計とデータの登録・試用

平成27年度は、リン酸化プロテオミクスデータベース (Neural PhosphoSignaling DB 改め Kinase Associated Neural Phospho Signaling DB: KANPHOS DB) のデータを元にした論文を発表し (Amano et al. J Cell Biol 2015; Kobayashi et al. Cell Rep 2016; Nagai et al. Neuron 2016)、データベースに関して記載をした。また、脳プロ内での試用を継続し、公開に向けて全面的に修正・改良を進め、最終的な調整を行った。課題終了後のデータベース公開と国際的な情報発信に向けて、国際薬理学連合 (IUPHAR) のデータベース委員会に出席し、IUPHAR のデータベース (Guide to Pharmacology) との相互リンクについて打ち合わせを行った。

⑥ 課題 F との連携

平成27年度は病因性 NDE1 変異が関わる統合失調症の分子病態を明らかにするため、当該 NDE1 変異で結合に影響を受ける NDE1 相互作用分子を 20 種類同定した。加えてゲノム編集技術を用いて NDE1 変異ノックインマウスを作製した。ARHGAP10 については、当該分子ネットワークを明らかにするため、アフィニティーカラムクロマトグラフィー法を用いて 100 種類を超える ARHGAP10 相互作用部分分子を同定し、その中で神経発達に関与する幾つかの分子との結合を *in vivo* で確認した。これらの知見は課題 F の国立大学法人名古屋大学尾崎らのグループへフィードバックした。

⑦ プロジェクトの総合的推進

プロジェクト全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、分科会、各種小委員会、意見交換会、テレビ会議、メール会議等の枠組みを構築・運営し、参画機関の連携・調整・情報共有に努めた。また P S、P O とも密接な意見交換を行い、プロジェクト全体の進捗状況や方針の確認を行った。

第 1 回分科会 (平成 27 年 4 月 13 日、14 日、学校法人沖縄科学技術大学院大学学園 (O I S T) シーサイドハウス)

データベース委員会 (平成 27 年 6 月 24 日、O I S T)

大脳基底核回路多階層モデル構築に関する打ち合わせ (平成 27 年 6 月 25 日、O I S T)

データベース委員会 (平成 27 年 7 月 17 日、TV 会議)

第 2 回分科会 (平成 27 年 10 月 8 日、9 日、国立大学法人名古屋大学)

データベース委員会 (平成 27 年 11 月 27 日、国立大学法人名古屋大学)

データベース委員会 (平成 28 年 3 月 17 日、TV 会議)