

Fyn チロシンキナーゼ過剰発現による 恐怖条件づけ障害の分子機構

児島 伸彦

Molecular mechanism for impaired conditional fear in Fyn-overexpressing mice

Nobuhiko KOJIMA

Fyn tyrosine kinase has critical roles in transducing extrasynaptic signals to intracellular signaling cascades that participate in synaptic function including synaptic plasticity. In the present study, biochemical and behavioral phenotypes of Fyn-overexpressing mice (Fyn-TG) were analyzed to characterize the Fyn signaling in fear conditioning. Tone-dependent conditioned freezing was significantly attenuated in Fyn-TG. The selective NR2B antagonist ifenprodil, when administered before conditioning, restored conditioned freezing in Fyn-TG. These results suggest that impairment of conditioned fear in Fyn-TG is caused by disruption of the NR2B-containing NMDA receptor function. The biochemical data support the notion that NMDA receptor activity is tightly correlated with protein tyrosine phosphorylation. We identified the NR2B and PSD-95 as Fyn substrates. Fyn might regulate acquisition of tone-dependent conditioned fear through the regulation of NMDA receptor trafficking.

1. はじめに

Fyn は Src ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼで、脳内に広く分布している。海馬 CA1 錐体細胞シナプス伝達の長期増強 (long term potentiation; LTP) がチロシンリン酸化に依存しているとの薬理的知見を受けてノックアウトマウスを解析した結果、数あるチロシンキナーゼの中で Fyn が LTP 誘導に重要であることがわかった。LTP 障害とともに Fyn ノックアウトマウスは Morris 水迷路学習の障害も示すことから、Fyn はシナプス可塑性と学習機能に重要な分子として一躍注目を集めることとなった¹⁾。本研究は Fyn がどのような分子メカニズムでシナプス可塑性や学習記憶に関わっているかを知ることを目的として、Fyn を脳で過剰に発現するトランスジェニックマウス (Fyn-TG) を用いて行動解析と生化学解析を行った。

2. 実験方法

2.1 Fyn トランスジェニックマウス

本研究で用いた Fyn-TG は筆者が米国コロンビア大学に留学中に作成したものである^{2,3)}。内在の Fyn 活性の 8 倍と 3 倍の過剰発現のみられる系統 N8 および N39 をそれぞれ C57BL/6J との交配により継代した。生後 2.5-5 ヶ月齢のみを実験に供した。トランスジーンを持たない同腹個体を対照とした。

2.2 恐怖条件づけ

条件づけは防音箱内に設置した床に通電グリッドを配したショックチェンバー内で行った。条件刺激 (conditioned stimulus; CS) としての音刺激 (70dB、10kHz トーン、10 秒間)、無条件刺激 (unconditioned stimulus; US) としての床からの電気ショック (0.3mA、1 秒間) はコンピュータソフト FZC ver.2.2 (小原医科産業) 上で制御した。マウスをショックチェンバーに入れ、1 分後に CS と US の組み合わせ刺激を 20 秒間隔で 2 回提示した。刺激の 50 秒後にマウスをチェンバーからホームケージに戻した。一定時間 (1 時間後および 24 時間) 後に次の記憶テストを行った。音の CS によるテストではマウスをショックチェンバーとは異なる種類のチェンバーに入れ、1 分後に音の CS を 1 分間提示した。コンテキスト (文脈) の CS によるテストではマウスを条件づけに用いたショックチェンバーに 2 分間入れた。これら CS に対して引き起こされるフリージング (すくみ反応) を条件づけ恐怖反応とした。フリージングの程度は 1 秒間以上の無動状態を計測し、1 分間毎のフリージング%として表示した。

2.3 イムノプロット解析・免疫沈降

Fyn-TG を断頭後すみやかに脳出しし、各脳部位を氷上で切り出した。10 倍量の RIPA バッファー (10mM Tris-HCl, pH7.5, 1% ノニデット P-40, 0.1% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% SDS, 0.15M NaCl, 1mM EDTA,

1mM バナジル酸ナトリウム, Complete™-EDTA free (Roche) でホモジェナイズし, 15,000rpm, 15 分の遠心分離後上清を回収した. 蛋白量は Lowry 法で行った. イムノブロット解析のためには 25 μ g 蛋白質を SDS-PAGE し, PVDF 膜へ転写後各種抗体と反応させた. シグナルの検出は HRP 標識二次抗体を使った ECL™ (GE Healthcare) による化学発光法で行った. 画像は蛍光画像解析装置 LAS-1000 (Fuji film) で取得した.

特定蛋白質のチロシンリン酸化をみるためには免疫沈降法/イムノブロット解析を用いた. 1% SDS で可溶化した膜蛋白質 500 μ g を 10 倍量の RIPA-SDS バッファー (上記の RIPA バッファーの組成に SDS を含まないもの) で希釈したサンプルと抗体 1 μ g を 4°C で一晩反応させ, 抗原-抗体複合体を Protein G セファロースで沈殿させた. 免疫沈殿物を上記の方法でイムノブロット解析した.

2.4 単離 PY100 蛋白質の質量分析

Fyn-TG 前脳の RIPA バッファー抽出液を PY-20 アガロースと 4°C で一晩反応させた後, 0.1% Tween-20 を含む TBS で洗浄し, PY-20 アガロースに結合したリン酸化蛋白質を 5mM フェニルリン酸で溶出した. 6% SDS-PAGE ゲルに泳動し, クマシーブリリアンブルーによる蛋白染色後分子量 100kDa 付近の蛋白質バンドを切り出した. ゲル片は脱染色後脱水, 還元, アルキル化して, 37°C で一晩トリプシン消化した. 消化後のペプチドをアセトニトリルで抽出し, MS/MS 法によりペプチドの一次配列を決定した. ペプチド配列結果から Mascot 検索によってサンプル中に含まれる蛋白質を特定した.

2.5 His タグ蛋白質の *in vitro* リン酸化

マウス脳全 cDNA から特異的プライマーを使って PCR で増幅した PSD-95 cDNA の全長と, その部分欠失断片を翻訳フレームに合わせて 6xHis タグ発現ベクター pTrcHis (Invitrogen) に導入した. 各クローンは大腸菌 BL21 株に形質転換し LB 培地中で培養し, IPTG 添加により融合蛋白質を発現誘導させた. 誘導後 3 時間で大腸菌を回収し B-PerII (Pierce) で菌体を処理し, 融合蛋白質を調製した.

融合蛋白質を精製 Mg²⁺/ATP 存在下で Fyn と反応させた (30°C で 30 分間). リン酸化蛋白質は PY20 によるイムノブロット解析で検出した.

3. 結果

3.1 蛋白質チロシンリン酸化の変化

Fyn-TG では外来性の Ca²⁺/カルモジュリンキナーゼ II α のプロモータ領域の制御により前脳ニューロン特異的に Fyn トランスジーンを過剰に発現する^{2,3}. Fyn 過剰発現による蛋白質のチロシンリン酸化変化を調べた. 抗リン酸化チロシン抗体 PY20 による脳蛋白質のイムノブ

ロット解析の結果, Fyn-TG(N8)脳では少なくとも 4 種類の蛋白質のチロシンリン酸化が增強していることがわかった (図 1A). およその分子量からそれぞれ PY60, PY100, PY120, PY180 と命名したが, 免疫沈降実験の結果, PY60 は Fyn そのものであり, PY180 は NMDA 受容体サブユニット NR2B であることがわかった (図 1B).

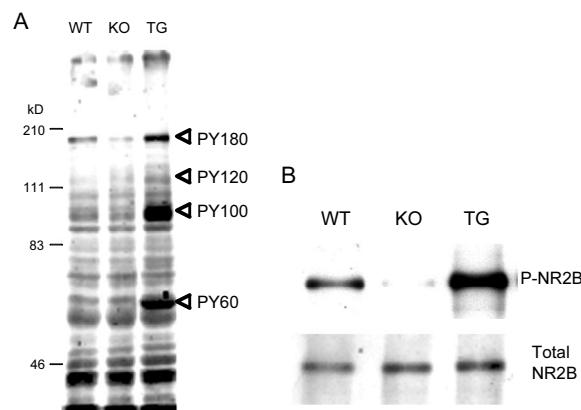


図1 Fyn過剰発現による蛋白質チロシンリン酸化増強 (A)野生型(WT)、Fynノックアウト (KO)、Fyn-TG(TG)前脳RIPA抽出蛋白質のPY20でイムノブロットした. (B)前脳シナプス膜蛋白質を抗NR2B抗体で免疫沈降しPY20 (上段)、抗NR2B抗体(下段)でイムノブロットした.

3.2 Fyn 過剰発現マウスの恐怖条件づけ

Fyn-TG では外見上特に異常は認められない. 音や電気ショックに対する感受性も Fyn の過剰発現で特に影響されない. また電気ショック直後のフリージングは特に動物群間で差はなかった. しかし条件づけ後, 音の CS 提示に対して野生型は顕著なフリージングを示したが, N8 と N39 のフリージングは野生型に比べていずれも有意に低かった⁴) (図 2A). 一方, ショックコンテキスト提示では野生型と同程度のフリージングを示した.

3.3 NR2B 活性阻害の効果

Fyn-TG では NR2B が過度にリン酸化されているために NR2B を含む NMDA 受容体に機能異常があると予想される. 恐怖条件づけには NMDA 受容体活性が重要であることが知られているので, NR2B の特異的アンタゴニスト ifenprodil の恐怖条件反応への効果を調べた. ifenprodil (5 mg/kg 体重) を腹腔内投与してから条件づけを行ったところ, Fyn-TG(N8)の音の条件刺激に対するフリージングは野生型のレベルにまで回復した (図 2B). これに対して, ifenprodil を条件づけの直後や, 条件反応テストの直前に投与しても Fyn 過剰発現マウスの音の CS に対するフリージングは回復しなかった.

ifenprodil の効果とチロシンリン酸化の増強の関係を調べるために, ifenprodil を投与後脳のチロシンリン酸化をウェスタンブロットにより調べたところ, Fyn 過剰発

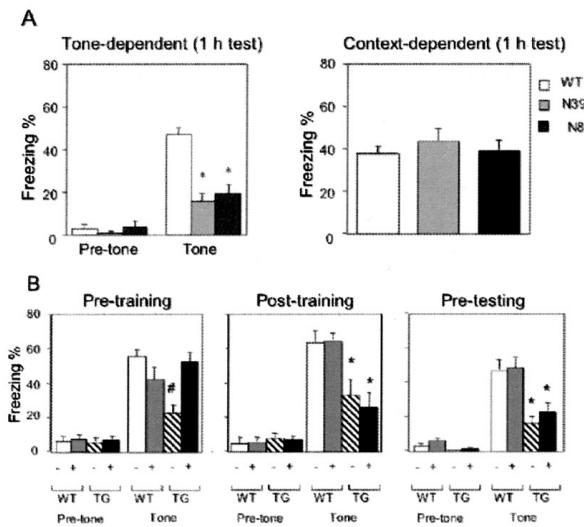


図2 Fyn-TGの条件づけ恐怖反応と ifenprodil の効果 (A) 条件づけした野生型(WT)、Fyn-TG(N8およびN39)の音とコンテキストに対するフリージング。(B) 音に対するフリージングへの ifenprodil 投与の効果。

現によって増強しているタンパク質のチロシンリン酸化が有意に減弱した (図3)。

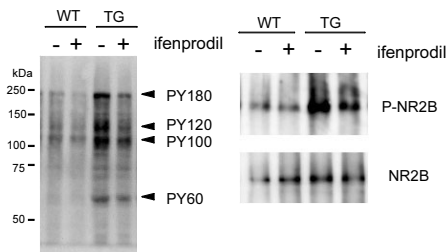


図3 チロシンリン酸化に対する ifenprodil の効果

3.4 NR2B 以外の脳内 Fyn 基質の同定

Fyn 過剰発現マウスの行動表現型と NR2B を含む NMDA 受容体機能が密接に関連していることがわかったが、Fyn の基質は NR2B だけではない。Fyn の神経細胞内での情報伝達経路を明らかにするためにはこれらの Fyn 基質を同定することが必要である。そこで、NR2B 以外に Fyn 過剰発現マウス脳でリン酸化の増強している PY100 蛋白質を質量分析計で解析し、その一次配列から蛋白質の同定を試みた。

PY20 アガロースカラムにより分離したチロシンリン酸化蛋白質を電気泳動し分子量 100kDa バンドを含むゲルを切り出した。ゲル中には分子量 100kDa 付近の複数の蛋白質が含まれており、解析の結果 α -アクチニン 2、 α -アクチニン 4、ダイナミン、PSD-95 などが含まれていた。これらのうち Fyn-TG でチロシンリン酸化が増強されるものを PY20 の免疫沈降/イムノブロット解析で検

討したところ、ほとんどは PY-20 で免疫沈降される (すなわちチロシンリン酸化される) ことが確認されたものの、Fyn 過剰発現で増強されていなかった。唯一 PSD-95 が Fyn-TG 脳でリン酸化の増強が認められた (図4A)。したがって PY100 はリン酸化 PSD-95 であると考えられる。

3.5 PSD-95 の *in vitro* リン酸化

PSD-95 の部分配列を含むいくつかの融合蛋白質を Fyn により *in vitro* でリン酸化したところ、PDZ2 ドメインを含む蛋白質が Fyn によりリン酸化されることがわかった (図4B)。

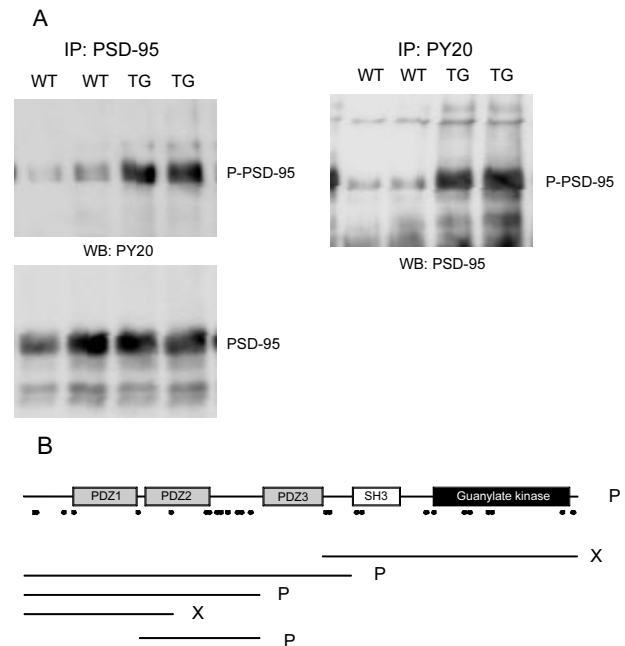


図4 PSD-95 の Fyn によるチロシンリン酸化 (A) 野生型(WT)と Fyn-TG(N8)前脳での PSD-95 チロシンリン酸化。(B) PSD-95 部分断片の *in vitro* リン酸化。Fyn によりリン酸化された断片を P、リン酸化されなかった断片を X で示す。

4. 考察

本研究は Fyn を過剰に脳ニューロンで発現させて顕れる生化学的変化、行動上の変化を調べることによって Fyn チロシンキナーゼの脳内での機能を理解しようとするものである。Fyn を過剰に発現させた動物では音に対する恐怖条件づけが障害される。この障害は NR2B の特異的アンタゴニストである ifenprodil を条件づけの前に投与しておくことで改善されるので、条件づけ中の NR2B を含む NMDA 受容体の活性調節不全が音と電気ショックとの連合を阻害したと考えられる。生化学的にはいくつかの蛋白質のチロシンリン酸化が Fyn の過剰発現で増強する。そのうちのひとつは NR2B であるが、その

他に PSD-95 が含まれていることが明らかとなった。

4.1 Fyn 過剰発現によって生ずる音の恐怖条件づけの障害

音と電気ショックの組み合わせ刺激の提示によって獲得される恐怖条件づけは動物の学習と記憶機能を調べるために広く行われている。Fyn-TG は音を CS とした条件づけが障害されたが、同じ動物をもとのショックチェンバーに入れたときに引き起こされるコンテキスト依存的恐怖反応は野生型同様に強かった。このことは Fyn 過剰発現が恐怖反応の発現には影響しないことを示している。いずれの条件づけにも扁桃体は不可欠な脳部位であるが、海馬はコンテキスト条件づけには必要であるが音を CS とした条件づけには必ずしも必要ではない。一方、音の条件づけには扁桃体の外側核が重要である⁵⁾。したがって、Fyn-TG では扁桃体外側核かその関連脳領域に異常があると考えられる。

Fyn-TG の音による条件づけ障害は NR2B の特異的アンタゴニストの投与により条件づけ中に NR2B を含む NMDA 受容体活性を抑制しておくことで回復した。この結果は、Fyn-TG では NMDA 受容体機能の亢進によって音とショックの連合が阻害されている可能性を示唆している。また、Fyn-TG でみられるチロシンリン酸化の増大が NR2B 阻害によって低減された。以上より、NMDA 受容体活性と Fyn によるチロシンリン酸化は互いに密接に関連していることがわかる。

NMDA 受容体はチャンネル機能に必須なサブユニット NR1 (ζ 1) と機能制御に重要な修飾サブユニット NR2A-D (ϵ 1-4) の組み合わせによる多量体として一つの受容体を形成している。構成サブユニットの違いによってそれぞれの NMDA 受容体のチャンネル特性やその発現様式は異なっている。NR2B を含む NMDA 受容体は未発達のシナプスに多く、成熟とともに NR2A を含む受容体が増えてくる⁶⁾。成熟脳で存在する NR2B はシナプスの新生や可塑性に重要な機能を担っているのかもしれない。NR2B サブユニットは脳内の主要なチロシンリン酸化タンパク質である。LTP を誘導するようなテタヌス刺激後の海馬、味覚嫌悪学習の際の島皮質 (insular cortex)、水迷路学習後の海馬などでこのリン酸化程度が変化するという報告がある^{7, 8, 9)}。これらの報告は NR2B のチロシンリン酸化が学習記憶に重要な過程であるという考えを支持する。興味深いことに NR2B のリン酸化部位を他のアミノ酸に置換してリン酸化されなくした動物では、Fyn-TG と同様、音の条件づけが特異的に障害されることが報告されている¹⁰⁾。

4.2 NR2B のチロシンリン酸化による NMDA 受容体局在の制御

現在 NR2B を含む NMDA 受容体のシナプス膜への局在の調節については NR2B のカルボキシル基末端にある

クラスリンアダプター蛋白質 AP-2 との結合部位と PSD-95 などの PDZ ドメインを有する蛋白質との結合部位の2つで調節されていると考えられている¹¹⁾ (図5)。前者はクラスリンを介する細胞内への取り込みを、後者はシナプス膜への局在に関係している。後者の配列を欠くとシナプス膜から排除される。また前者の配列内の1472番目のチロシン残基 (Y-1472) がリン酸化されるとシナプス膜に留まっているが、脱リン酸化されることでエンドサイトーシスが起る。Fyn 過剰発現マウスでは NR2B が高度にチロシンリン酸化されているためシナプス膜への集積が促進された状態になっており、この異常な集積が受容体機能の破綻につながっていると考えられる。Ifenprodil は一過性にシナプス膜上の NMDA 受容体の活性を抑えることで Fyn-TG での NMDA 受容体の機能を正常な状態に近づけているのであろう。

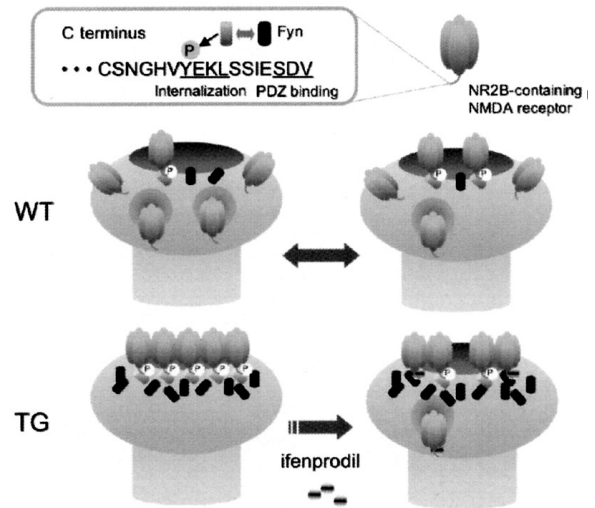


図5 NR2B を含む NMDA 受容体のシナプス膜局在の調節

4.3 PSD-95 のチロシンリン酸化

PSD-95 は NMDA 受容体の細胞内カルボキシル末端に特異的に結合する PDZ ドメインを有する蛋白質で NMDA 受容体をシナプス膜につなぎ止める足場蛋白質 (scaffolding protein) としてはたらく。PSD-95 は PDZ1 および PDZ2 を介して NR2B と結合していることが知られているが、Fyn と PDZ3 ドメインを介して直接結合することが示されている¹²⁾ (図6)。NR2B を含む NMDA 受容体のチャンネル活性は PSD-95 の存在で増加することが *Xenopus* 卵母細胞への強制発現系で示されている¹³⁾。PSD-95 は Fyn と NR2B の結合を強めることで NR2B のチロシンリン酸化を増加させて膜上の受容体集積を促進しているのかもしれない。本研究によって明らかになった Fyn による PSD-95 のチロシンリン酸化の生理学的意義についてはまだ不明であるが、PSD-95 のリン酸化部位が NR2B との結合部位の近傍にあることから、NR2B の PDZ 結合ドメインによる膜への集積の調節機構に関わ

っている可能性がある。

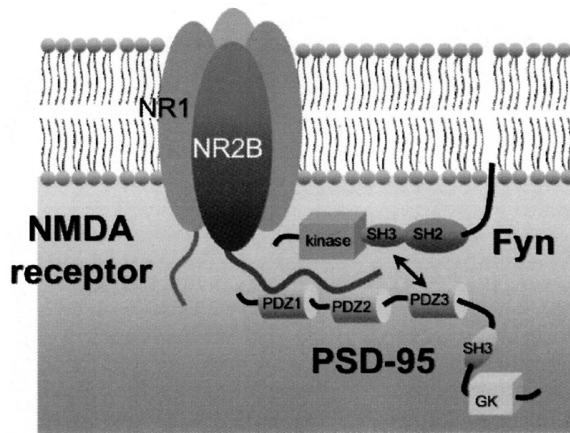


図6 FynのNMDA受容体/PSD-95複合体との結合

5. おわりに

Fyn-TGを解析することによって、Fynの脳における役割の理解に一步近づくことができた。脳研究においてトランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスの解析は個々の分子の機能を知る上で有効な研究手法であるが、遺伝子の改変とそれによって生ずる行動様式の変容との間には相当な隔たりがあり、これらは必ずしも単純に結びつかないことが多い。今後、時期や特定細胞種に限定した遺伝子操作が個体レベルで確立すれば、学習過程において脳のどの部位でどの時期にFynが活性化することが重要であるのかを知ることができるであろう。

謝辞 本報告の結果の一部は、理化学研究所脳科学総合研究センターにおいて、二木宏明博士、遠藤昌吾博士、伊藤正男博士の協力を得て行われました。また、PY100蛋白質の質量分析は同センター内リサーチリソースセンターで行っていただきました。ここに記して心より感謝致します。

引用文献

- 1) Grant S.G., O'Dell T.J., Karl K.A. et al. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science*, **258**, 1903-1910, 1992.
- 2) Kojima N., Wang J., Mansuy I.M. et al. Rescuing impairment of long-term potentiation in *fyn*-deficient mice by introducing Fyn transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4761-4765, 1997.
- 3) Kojima N., Ishibashi H., Obata K., Kandel E.R. Higher seizure susceptibility and enhanced tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor 2B in *fyn* transgenic mice.

Learn. Mem., **5**, 429-445, 1998.

4) Kojima N., Sakamoto T., Endo S., Niki H. Impairment of conditioned freezing to tone, but not to context, in *Fyn*-transgenic mice: relationship to NMDA receptor subunit 2B function. *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1359-1369, 2005.

5) Blair H.T., Schafe G.E., Bauer E.P., et al. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn. Mem.*, **8**, 229-242, 2001.

6) Loftis J.M., Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol. Ther.*, **97**, 55-85, 2003.

7) Rosenblum K., Dudai Y., Richter-Levin G. Long-term potentiation increases tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in rat dentate gyrus *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10457-10460, 1996.

8) Rosenblum K., Berman D.E., Hazvi S. et al. NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J. Neurosci.*, **17**, 5129-5135, 1997.

9) Mizuno M., Yamada K., He J. et al. Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn. Mem.*, **10**, 108-115, 2003.

10) Nakazawa T., Komai S., Watabe A.M. et al. NR2B tyrosine phosphorylation modulates fear learning as well as amygdaloid synaptic plasticity. *EMBO J.*, **25**, 2867-2877, 2006.

11) Prybylowski K., Chang K., Sans N. et al. The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* **47**, 845-857, 2005.

12) Tezuka T., Umemori H., Akiyama T. et al. PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 435-440, 1999.

13) Yamada Y., Chochi Y., Takamiya K. et al. Modulation of the channel activity of the $\epsilon 2/\zeta 1$ -subtype N-methyl-D-aspartate receptor by PSD-95. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6647-6652, 1999.