

氏 名 石 橋 英 俊

学位（専攻分野） 博士(学術)

学 位 記 番 号 総研大甲第339号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究所 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Functions of Fyn Tyrosine Kinase in Adult
Brain -- Epileptogenesis, akinesia and
learning ability in fyn transgenic mice

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 伊 佐 正
教 授 池 中 一 裕
教 授 小 幡 邦 彦
教 授 山 岸 俊 一
助 教 授 櫻 井 芳 雄 (京 都 大 学)

論文内容の要旨

Fyn, a non-receptor tyrosine kinase, is expressed in lymphocytes and neural system. In the brain, Fyn plays a variety of roles in neural development, and in synaptic plasticity after neural maturation. This information comes largely from knockout approach. Care should be paid, however, in interpreting the results of fyn-knockout mice; the morphological abnormalities, which results from the absence of Fyn in the developmental period, may have influences in the mature neural system. To dissociate Fyn's function in the adult brain from that in the neural developmental period, Kojima generated fyn-transgenic mice, in which transgene expression started postnatally. Aiming at searching the functions of Fyn tyrosine kinase in the mature brains, he used the advantage of fyn-transgenic mice; the logic is that the phenotypes in fyn-transgenic mice would reflect the roles of Fyn in the adult brain.

Tyrosine phosphorylation of proteins in the adult brains was investigated by immunoblotting method using anti-phosphotyrosine antibody. Five proteins were hyper-phosphorylated in fyn-transgenic mice's brains, and hypo-phosphorylated in fyn-deficient mice's brains, suggesting that these five proteins are the substrates of Fyn in the adult brains. Subcellular fractionation revealed that four of the five proteins, designated as PY180, PY120, PY110 and PY100 by their electromobility, and Fyn localized to membrane fraction. He identified PY180, by immunoprecipitation and immunoblotting method, to be the modulatory subunit 2B of the NMDA receptor (NR2B).

Two behavioral phenotypes of fyn-transgenic mice were found. Epileptic phenotype was first noticed by occasional spontaneous seizures characterized by running and bouncing fits. Two seizure-inducing experiments, infusion of a convulsant drug pentylenetetrazol, and electrical kindling protocol, revealed accelerated seizure development in fyn-transgenic mice. The administration of NMDA receptor antagonist MK-801 completely suppressed the accelerated development of clonic seizure (the significant difference without the drug, $p < 0.0001$, disappeared in the presence of the drug, $p > 0.1$, revealed by two-way ANOVA with a repeated measure as a day-series). These results suggest the involvement of the tyrosine phosphorylation of the NMDA receptors in developing clonic seizure.

The other behavioral phenotype, akinesia, was also analyzed. While the count of the spontaneous locomotion of fyn-transgenic mice was significantly lower than that of wild-type control mice ($t_{30}=2.89$, $p=0.0071$ with two-tailed t test), circadian rhythm of the locomotor activity was not different from that of control mice. Furthermore, general behavior was not different between two groups. The administration of NMDA receptor antagonist MK-801 dose-dependency recovered the hypokinesia in fyn-transgenic mice; i. e. two-way ANOVA revealed significant effects in the drug dose ($F_{2,49}=13.48$, $p < 0.0001$) and in the interaction between the drug dose and the genetic group ($F_{2,49}=6.26$, $p=0.0038$), but not in the genetic group ($F_{1,49}=3.45$,

p=0.069), showing that the locomotor-enhancing effect of the drug was stronger in fyn-transgenic mice than in wild-type control mice. These results suggest the involvement of the tyrosine phosphorylation of NMDA receptors in the gain control of total locomotor activity, but not in the initiation of specific behavior.

Since the activated NMDA receptors, at least in part, mediated both epileptogenesis and hypokinesia in fyn-transgenic mice, he inferred close relation between Fyn tyrosine kinase and NMDA receptors, and thus speculated fyn-transgenic mice possessed other phenotypes, which were mediated through the NMDA receptor functions. He, therefore, examined learning and memory abilities thought to depend on the NMDA receptor activity. Contrary to the prediction, tests of three types of learning and memory, passive avoidance learning, spatial learning and odor discrimination learning, revealed no differences in the performance between wild-type control mice and fyn-transgenic mice. These results suggest that the tyrosine phosphorylation of the NMDA receptors does not enhance the learning and memory abilities. Therefore, the tyrosine phosphorylation of NMDA receptors enhances the functions of NMDA receptors in some occasion, but not in another occasion.

In conclusion, he found two phenotypes in adult fyn-transgenic mice; epileptogenesis and akinesia. Both phenotypes were mediated, at least in part, by the activated NMDA receptors. Consistent with these results, he found enhanced tyrosine phosphorylation of the subunit 2B of the NMDA receptors. These results suggest two points. First, some functions of Fyn are mediated through the tyrosine phosphorylation of the NMDA receptors. Second, the tyrosine phosphorylation of the NR2B is involved in expressing the NMDA receptor functions in some occasion in the brain.

論文の審査結果の要旨

非受容体型チロシンリン酸酵素 Fynは、中枢神経系の発生過程に重要な役割を果たすことが知られている。Fynの発現は発生初期にピークに達するが、その後神経系の成熟後も一定の発現レベルを保っている。このことから Fynは成熟脳においても何らかの機能を果たすことが推測される。Fyn分子をノックアウトしたマウスでは、成熟後海馬の長期増強の閾値が上昇することや空間学習能力の低下が見られるが、このことは成熟脳における Fyn分子の欠損していることと、発生過程において Fyn分子が欠損していたことのいずれに起因するのかは明らかでない。

出願者は、Fyn分子を神経系の初期発生が終了した後に外来的に発現させたマウスを用いて、成熟脳における Fyn分子の機能について解析した。外来性 Fynの発現する中枢神経系では、NMDA型グルタミン酸受容体のチロシンリン酸化が亢進しており、受容体・チャンネルの機能修飾が予想された。個体レベルでの表現型として、けいれんが起りやすいことと、自発運動量が少ないことを見出した。けいれんの特性については、二種類のけいれん誘発実験から、顔面から全身にいたる間代性けいれんの発症が速いことを見出した。増強された間代性けいれんの発症は、NMDA型受容体の拮抗薬である MK-801の投与により対照群における MK-801投与例と同じレベルにまで大きく低下したことから、NMDA型受容体の活性化を介していることを示した。自発運動は、日内リズムは対照動物と変わらず、その量のみが少ないことを示した。自発運動量の低下は、NMDA型受容体の拮抗薬である MK-801の投与により回復したことから、NMDA型受容体の活性化が関与していると考えた。つまり、Fynトランスジェニックマウスで観察された個体レベルでの二つの表現型、けいれん易発性と自発運動量の減少は共に、NMDA型受容体の活性化によることを示した。

さらに、NMDA型受容体の活性に依存するといわれる学習・記憶に関する実験を行った。三種類の学習・記憶実験における課題遂行能力には対照動物との間に差がなかったことから、NMDA型受容体のチロシンリン酸化の亢進は、常に記憶・学習能力に変化をもたらすわけでないことを示唆した。

これらのことから、第一に、Fynの機能として NMDA型受容体の活性化を介する経路が重要であり、そして NMDA受容体のチロシンリン酸化の亢進は、けいれん易発性と自発運動量の減少を引き起こすこと、第二に、記憶・学習能力は、NMDA型受容体の機能に依存するとしても、NMDA型受容体のチロシンリン酸の程度とは必ずしも1対1の対応関係にはないことが示唆された。

本研究は、トランスジェニックマウスの行動の詳細かつ系統的な解析を通じて、成熟脳における Fyn分子の機能的意義を明らかにしており、神経系に発現する分子の行動制御における機能解明に新たな知見を加えるものとして、学位論文としてふさわしく、合格と判定した。

また、提出された論文の内容と背景、関連領域の理解度について質問したところ、満足すべき回答が得られた。すなわち、分子神経生物学、神経生理学、行動科学の学識を十分に有し、本研究が出願者自身の確かな基盤に立って、自主的に遂行されたものと判定された。

本論文は英語で書かれ、論旨は明快であり、論文作成能力、語学力ともに十分であると

判断された。