

## 日本神経化学会優秀賞受賞者研究紹介

### 脳機能を制御するリン酸化シグナルの解明に関する研究 Study on the phosphorylation signals regulating brain functions

永井 拓

(名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・医学部附属病院薬剤部)

#### はじめに

知識・情動・意思といった精神活動はヒトが生きていく過程で欠かすことのできない脳機能であり、これらのバランスにより多様な個性が生み出される。例えば、知識が突出していれば利己的な性格となり、情に厚い人は後先のことを顧みずに行動してしまう。さらに、頑固者であれば意思が極端に強い。これらの脳機能について特有の神経核が同定され、神経回路についての知見も次第に蓄積されてきた。知識（記憶）は前頭前皮質や海馬、情動は線条体や扁桃核、そして意思は眼窩前頭皮質や線条体などが重要な役割を果たしている。神経回路を制御する神経伝達物質として、グルタミン酸、ドパミンや神経栄養因子などが関与していることも分かってきた。一方、細胞は内外の環境を絶妙に感知および制御することによって自身のシステムを破綻することなく維持しており、その感知・制御の代表的な機構がタンパク質のリン酸化である。細胞内では、様々なリン酸化酵素が神経の興奮性や可塑性に関与し、脳機能を制御することも次第に明らかになってきているが、リン酸化酵素の下流で作用するシグナル伝達に関しては不明な点が多い。我々は、精神活動を制御するリン酸化シグナルの実態を明らかにするために以下で述べる研究課題に取り組んだ。

#### 認知記憶の制御機構

認知記憶は記憶を構成する基本要素であり、記

憶喪失などではこの種の記憶が障害される<sup>1)</sup>。馴染みのある物事と新奇な物事を識別して記憶する能力は認知記憶によって形成され、ヒトから動物に至るまで幅広く保持されている<sup>2)</sup>。霊長類やげっ歯類を用いた実験から認知記憶に関与する脳部位として前頭前皮質や鼻周囲皮質が知られているが<sup>3)~6)</sup>、認知記憶に関する細胞内シグナルについては不明であった。

Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)は、学習・記憶<sup>7)</sup>などのシナプス可塑性に重要な役割を果たしているリン酸化酵素である。そこで、物体認知記憶における ERK1/2 シグナルの関与について検討した。マウスを新奇物体に10分間暴露すると、その直後に前頭前皮質においてリン酸化 ERK1/2 の著しい増加が認められ、この変化は暴露30分後には消失した<sup>8)</sup>。また、MAP kinase kinase (MEK) 阻害薬である PD 98059 を訓練試行前に前頭前皮質へ微量注入すると、訓練試行時の総探索時間は変化しないが、24時間後の保持試行における新奇物体に対する探索嗜好性が溶媒投与群に比べ有意に低下した<sup>9)</sup>。さらに、別の MEK 阻害薬 SL327 を訓練試行前に投与すると、24時間後の保持試行における探索嗜好性は溶媒投与群に比べ有意に低下したが、1時間後の保持試行では有意な変化は認められなかった<sup>8)</sup>。これらの結果は、前頭前皮質における MEK を介した ERK1/2 の活性化がメタンフェタミン誘発性認知記憶障害に関与していることを示している。さらに、ドパミン D1 受容体アゴニスト SKF 38393 を投与したマウスの前頭前皮質においてリ

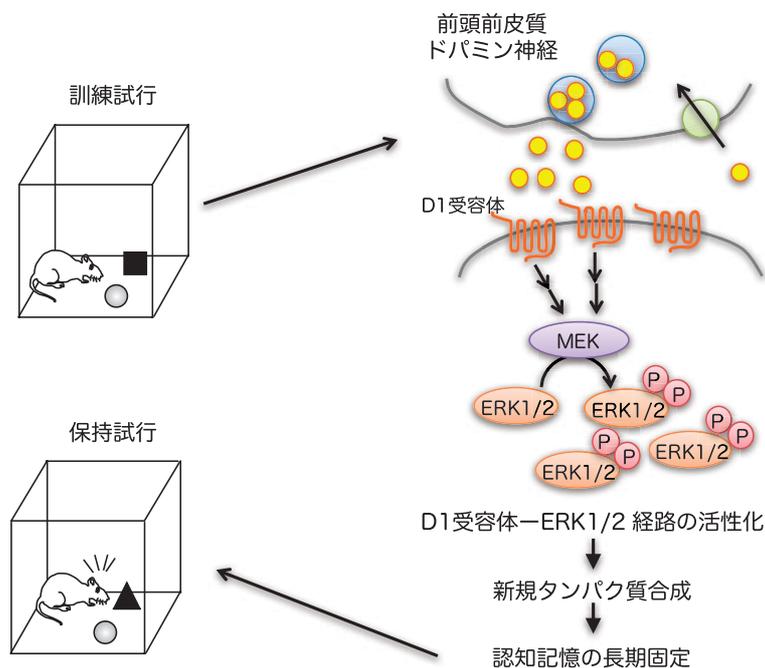


図1 ERK1/2 シグナルによる認知記憶の制御機構  
 新奇物体の認知に関する記憶の長期固定には前頭前皮質におけるドパミン D1 受容体の刺激と下流に存在する ERK1/2 の活性化を介したタンパク合成が重要であると考えられる。

ン酸化 ERK1/2 の増加が認められ、大脳皮質由来の初代培養神経細胞に SKF38393 を処置してもリン酸化 ERK1/2 の活性化が観察された<sup>8)</sup>。したがって、前頭前皮質のドパミン D1 受容体刺激による ERK1/2 の活性化が記憶の長期保持に重要な役割を果たしていると考えられる。

RNA 合成阻害剤やタンパク合成阻害剤を用いた実験から、長期記憶の保持および固定には遺伝子発現およびタンパク合成が必要であることが報告されている<sup>10)11)</sup>。また、ERK1/2 は ets-like gene-1 および cAMP response binding protein などの転写因子を介して c-Fos を誘導する<sup>12)</sup>。実際、訓練試行後のマウスの前頭前皮質ではドパミン D1 受容体刺激に依存した cFos タンパクの発現増加が観察され、タンパク合成阻害剤のアニソマイシンを訓練試行前に前頭前皮質へ微量注入すると、訓練試行 1 時間後では記憶障害が認められず、訓練試行 24 時間後で記憶障害が認められた<sup>8)</sup>。以上の

知見から、新奇物体の認知に関する記憶の長期固定には前頭前皮質におけるドパミン D1 受容体の刺激と下流に存在する ERK1/2 の活性化を介したタンパク合成が重要であると考えられる (図 1)。

#### 海馬のシナプス可塑性維持と長期記憶形成機構

ニューロトロフィンシナプス可塑性に重要な役割を果たしている分子であり、脳由来神経栄養因子 (BDNF) とその受容体 TrkB は学習・記憶に関連する神経生物学的基盤を担っている<sup>13)</sup>。TrkB の下流では、ERK、phospholipase C- $\gamma$  および phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 経路が活性化される<sup>14)</sup>。セリン/スレオニンリン酸化酵素である Akt は、多種の基質をリン酸化することにより脳発達、加齢および神経変性疾患や精神疾患の発症に関与している<sup>15)16)</sup>。また、海馬の神経可塑性に Akt が重

要な役割を果たしていることが知られている<sup>17)</sup>。

Girders of actin filament (Girdin) はアクチン結合能を有する Akt の基質タンパクであり、癌細胞の浸潤や転移に働いている分子として発見された<sup>18)</sup>。中枢神経系において、Girdin は海馬に高発現しており、海馬歯状回の生後発生や成体神経新生における細胞移動に重要な働きを担っていることが分かっている<sup>19)</sup>。Girdin-KO マウスでは吻側移動経路における細胞移動に異常がみられ、その到達部位である嗅球の成長異常が見られる<sup>20)</sup>。また、Girdin は新生ニューロンの接着結合帯の接着部位に見られることから、細胞接着にも関わっている可能性が示唆されている<sup>20)</sup>。しかし、Akt によるリン酸化サイトである 1416 番目のセリン残基に変異を加えた Girdin ノックインマウス (Girdin<sup>SA/SA</sup>) では細胞移動や嗅球の形態に異常は見られないことから<sup>20)</sup>、中枢神経系におけるリン酸化 Girdin の生理学的意義は不明であった。

我々は、BDNF シグナルの下流でリン酸化された Girdin がシナプス可塑性を促進すると想定し、本仮説の検証を試みた。海馬由来初代培養神経細胞を BDNF で刺激すると、Girdin のリン酸化が増加し、このリン酸化は TrkB/Akt の下流で認められた<sup>21)</sup>。Girdin<sup>SA/SA</sup> マウス海馬歯状回の顆粒神経細胞では、スパインの体積や頭部直径が減少し、細長い未熟なスパインが多く観察された<sup>21)</sup>。海馬スライス標本を用いて電気生理学的な解析を行った結果、テタヌス刺激後の long-term potentiation の障害、NMDA 受容体/AMPA 受容体比の減少が認められたが、paired-pulse ratio には変化は認められなかった<sup>21)</sup>。また、野生型マウスの海馬由来初代培養神経細胞を BDNF で刺激すると、NMDA 受容体 NR2A サブユニットのリン酸化に変化は認められなかったが、NR2B サブユニットのリン酸化が上昇した<sup>21)</sup>。一方、Girdin<sup>SA/SA</sup> マウス海馬由来初代培養神経細胞では、BDNF 刺激によるリン酸化 NR2B の増加は観察されなかった<sup>21)</sup>。さらに、Girdin と Src キナーゼおよび NR2B を強制発現させた HEK293T 細胞において、これら 3 分子の共免疫沈降が認められたことから、Girdin は Src を介して NR2B サブユニットと結合していると

考えられる。リン酸化 Girdin の生理学的意義を明らかにするために Girdin<sup>SA/SA</sup> マウスの行動学的解析も行った。Girdin<sup>SA/SA</sup> マウスでは恐怖記憶、物体認知記憶および空間学習に障害が認められたが、情動行動には異常は認められなかった<sup>21)</sup>。野生型マウスの海馬歯状回において恐怖条件付け試験の訓練後に Akt と Girdin および NR2B のリン酸化が増加することも確認した<sup>21)</sup>。これらの結果から、BDNF/TrkB/Akt シグナルによる Girdin のリン酸化は、NMDA 受容体を活性化することにより海馬のシナプス可塑性の維持と長期記憶形成を担っている重要な分子として機能していると考えられる (図 2)。

#### ストレス誘発性脳機能障害の発現機序

近年の少子化は、核家族化と相まって子育ての負担感増大による母親の育児ノイローゼを招くなど新たな社会問題の要因となっている。特に、乳幼児期から児童青年期の発育環境は、その後の身体的発育、知的発達および愛着行動といった精神発達に大きな影響を及ぼすことが示されている<sup>22)</sup>。我々は、雄性マウスの情動行動変化および認知・学習記憶に対する幼若期からの長期隔離飼育の影響を検討し、長期隔離飼育マウスにおいて、不安症状およびストレス脆弱性の形成、激しい攻撃行動の増加、衝動性、認知記憶および空間学習記憶の障害など様々な脳機能障害が出現することを見出した<sup>23)</sup>。このように環境的要因は海馬の発達に影響を与えるが、そのメカニズムについては不明であった。幼若期長期隔離飼育マウスの脳機能障害の分子メカニズムを明らかにする目的で、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を網羅的に解析し、隔離飼育によって発現量が著しく低下する遺伝子として Neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) を同定した<sup>23)</sup>。

Npas4 は、大脳皮質、海馬、線条体などの辺縁系に高発現している<sup>24)</sup>。Npas4 の発現は活動依存的に制御され、特に抑制性シナプスの形成に重要であることが証明されている<sup>25)26)</sup>。そこで、代表的なストレスホルモンであるコルチコステロンが

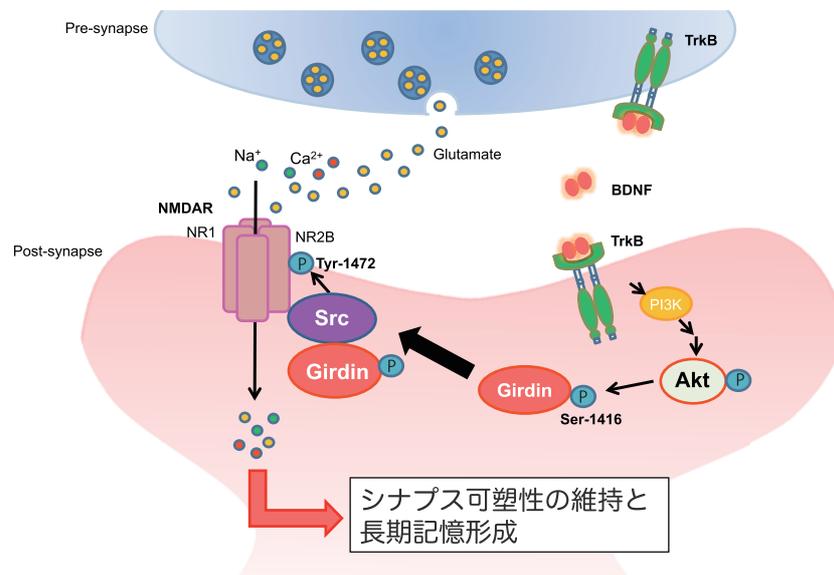


図2 神経可塑性および記憶における Girdin の役割

BDNF/TrkB/Akt シグナルによる Girdin のリン酸化は、NMDA 受容体を活性化して海馬のシナプス可塑性の維持と長期記憶形成を担っている。(文献21) から改変して転載

Npas4 の発現におよぼす影響をマウスおよび株化神経細胞 Neuro2A 細胞を用いて調べた。マウスにおいて海馬の Npas4 mRNA レベルはコルチコステロン投与により有意に低下し、副腎摘出処置により増加した。同様に、Neuro2A 細胞をコルチコステロンで処理すると Npas4 タンパクの発現レベルは有意に減少した<sup>27)</sup>。

コルチコステロンは細胞膜を通過し、細胞質内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) と結合する。コルチコステロン複合体は、グルココルチコイド応答配列 (GRE) との結合を介して遺伝子の転写を制御することが知られており、Npas4 プロモーターにも転写開始点の上流 2,000 から 1,000 bp の範囲に 11 個の GRE が存在している。プロモーターアッセイにおいて、GR 阻害剤の処置あるいは転写開始点の上流 1,659-1,644 bp 領域に存在する 3 つの GRE の欠失により Npas4 プロモーター活性は顕著に上昇した<sup>27)</sup>。さらに、抗 GR 抗体を用いた ChIP アッセイにより、上記領域を含む Npas4 プロモーターに GR が結合することを確認した<sup>27)</sup>。したがって、Npas4 遺伝子はスト

レスによりコルチコステロンを介して発現制御を受けることが示唆された。この他にも 3 週間の拘束ストレス負荷により Npas4 プロモーターの CpG アイランドで DNA メチル化が亢進することを明らかにした<sup>28)</sup>。

Npas4 の機能および標的遺伝子を解析するために、Neuro2A 細胞あるいは初代培養海馬神経細胞に Npas4 を過剰発現させた。Npas4 過剰発現細胞では神経突起の伸長が促進され、リン酸化 synapsin I の増加が認められた<sup>29)</sup>。一方、Npas4 をノックダウンすると神経突起の進展が抑制されたことから、Npas4 が神経細胞の機能発達 (神経突起の伸長) やシナプス可塑性に関与している可能性が考えられた。また、Neuro2A 細胞におけるリン酸化 synapsin I の増加は Cdk5 阻害剤により拮抗された<sup>29)</sup>。抗 Npas4 抗体を用いた ChIP アッセイにより、Npas4 タンパクが Npas4、Cdk5 遺伝子プロモーター領域に結合することを確認した<sup>29)</sup>。これらの結果から、Npas4 は Cdk5 の誘導を介して synapsin I のリン酸化を亢進することが示唆された。したがって、幼若期ストレス負荷は成熟後の

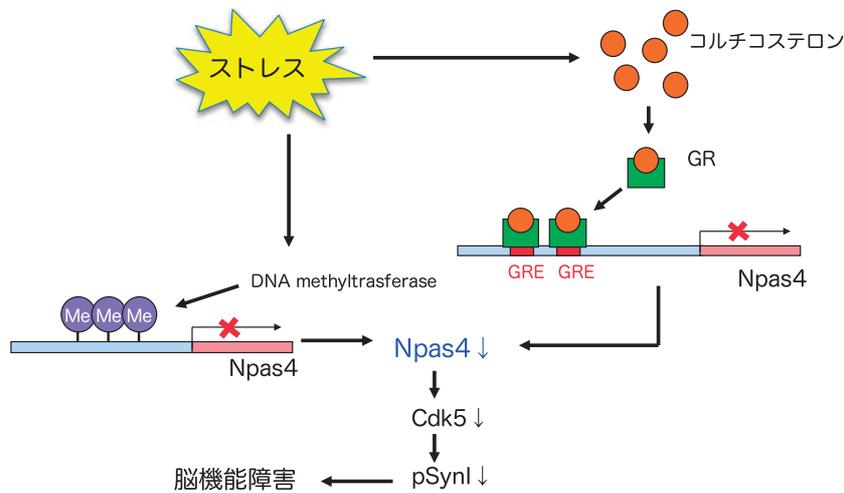


図3 ストレスによる脳機能障害における Npas4 シグナルの関与  
 幼若期ストレス負荷は Npas4 の発現を低下させ、成熟後の学習・記憶や情動行動などの脳機能障害を誘発する。

学習・記憶、情動行動などの脳機能障害を誘発すること、その分子機序の一部として Npas4 が重要な役割を果たしていることを明らかにした (図3)。

### 快情動を司る報酬シグナル伝達機構

線条体にはドパミン D1 受容体 (D1R) を発現する中型有棘神経細胞 (D1R-細胞) とドパミン D2 受容体 (D2R) を発現する中型有棘神経細胞 (D2R-細胞) の異なる 2 種類の神経細胞が存在する。D1R は、Protein kinase A (PKA) を活性化し、逆に D2R は PKA を抑制する。PKA は細胞の興奮性や報酬関連行動に関係していることから、ドパミンは PKA を介して D1R-細胞の興奮性を高め、D2R-細胞の興奮性を抑制すると考えられてきた。しかし、過去の報告では活性化薬や阻害薬を使用した薬理的な実験であり<sup>30)</sup>、神経細胞のシグナルを個別に解析することは困難であった。したがって、ドパミンによる PKA の活性化が D1R-細胞の興奮性や報酬関連行動を亢進するのかどうかは実際には証明されておらず、そのメカニズムもよく分かっていなかった。

我々は、独自に開発したリン酸化タンパク質の

網羅的な解析方法 (Kinase-oriented substrate screening, KiOSS) を使用して、PKA の下流で D1R-細胞の興奮性や報酬関連行動を制御するシグナル伝達経路の存在について探索した。マウスの線条体を用いて KiOSS を行った結果、D1R の下流に存在する PKA のリン酸化基質として 100 種類以上のタンパク質とそのリン酸化部位を同定した<sup>31)</sup>。さらに、得られたデータを基にパスウェイ解析を行った結果、Rap1 シグナルを含めて数種類のシグナル伝達経路を有力な候補として発見した。

Rap1 シグナル経路に含まれる PKA の基質には、Rap1 活性化因子である RAS guanyl releasing protein 2 (Rasgrp2) と Rap1 不活性化因子である RAPI GTPase activating protein (Rap1gap) が含まれていた<sup>31)</sup>。Rap1 は学習・記憶など脳機能に重要な役割を果たすと推定されているタンパク質であることから<sup>32)~34)</sup>、我々は Rap1 シグナル経路が D1R を介した神経機能に関係していると推測し、Rap1 を活性化する Rasgrp2 の解析を行った。ドパミンは PKA を介して Rasgrp2 の 116、117、554 および 586 番目のセリン残基をリン酸化し、リン酸化 Rasgrp2 は Rap1 の活性化に必要であることを示した<sup>31)</sup>。さらに、ドパミンを増加させる薬物の

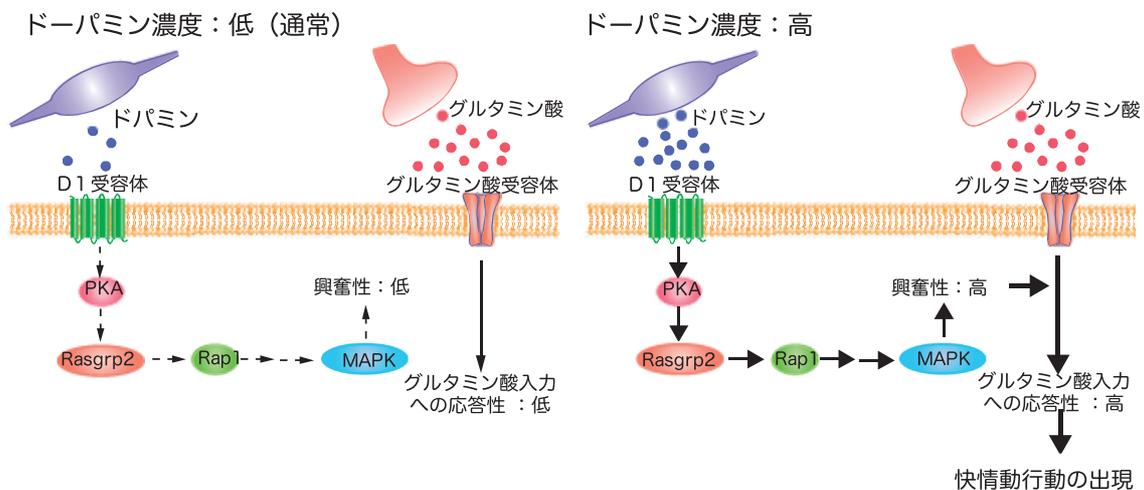


図4 快情動を司る Rap1 シグナル

ドーパミンは PKA-Rap1 シグナルを介して応答性の低い神経細胞を応答性の高い状態に移させ、神経回路を作動しやすくすることで快感を生み出している。(文献 31) から改変して転載

コカインを投与したマウスでは、線条体の一部を構成する側坐核の D1R-細胞で Rasgrp2 のリン酸化レベルが増加し、Rap1 の活性化も観察された<sup>31)</sup>。

側坐核の D1R-細胞で特異的に PKA や Rap1 が恒常的に活性化しているマウスを作製し、これらのマウスでは D1R-細胞の興奮性とコカインの効果が野生型マウスと比べて増加することを見出した<sup>31)</sup>。また、側坐核の D1R-細胞で特異的に Rap1 が欠損しているマウスでは、D1R-細胞の興奮性とコカインの効果が野生型のマウスよりも減少することを確認した<sup>31)</sup>。さらに、Rap1 の下流には MAPK が関係していることも示した<sup>31)</sup>。以上の結果から、Rap1 シグナルは報酬シグナルとして機能することを明らかにした。したがって、通常はドーパミン濃度が低く、D1R-細胞の興奮性や神経活動は抑制されている状態にあるため、報酬関連行動は認められない(図4左)。ドーパミンが側坐核で大量に放出されると、D1R を介して PKA-Rap1 シグナルの活性化が起こる。Rap1 シグナルにより細胞の興奮性が高まると、グルタミン酸などの興奮性入力に反応して神経活動が増加し、報酬(快感)関連行動が引き起こされる(図4右)。つまり、ドーパミンは PKA-Rap1 シグナルを介して応答性の低

い神経細胞を応答性の高い状態に移させ、神経回路を作動しやすくすることで快感を生み出していると考えられる<sup>35)</sup>。

#### おわりに

神経細胞の興奮性や可塑性を介した記憶や情動などの脳機能を制御するリン酸化シグナルを明らかにするために神経化学的研究手法を中心にこれまで研究を行ってきた。これらの研究成果は、記憶や情動に関連する神経精神疾患の理解にも役立つと考えている。例えば、メタンフェタミンなどの覚せい剤は依存誘発作用の強い薬物であり、世界的規模でその乱用が問題となっている。メタンフェタミン乱用者では認知障害が長期間にわたり認められる。我々は、低用量のメタンフェタミンの反復投与により覚せい剤精神病モデルを作製し、前頭前皮質における ERK シグナルの機能不全が認知機能障害に関与していることを明らかにしている<sup>9)</sup>。また、Girdin は精神疾患関連遺伝子 Disc1 と相互作用することも報告されている<sup>19)</sup>。

一方、ヒトを含む哺乳動物は約 500 種類のリン酸化酵素を保有しており、個々のリン酸化酵素は固有の役割を有していると考えられている。また、

近年のプロテオミクス解析技術の進歩により約280,000箇所のタンパク質リン酸化部位が同定されている<sup>36)~38)</sup>。したがって、単純に一種類のリン酸化酵素が約500箇所のタンパク質のリン酸化を担っていると推測される。この数字から考えると未だ解明されていないリン酸化シグナルが多く存在することは明白である。脳は多様な細胞群で構成されていることから、今後は細胞種特異的かつ一細胞レベルの解析も必要であろう。詳細なリン酸化シグナルの解析を進め、いつの日か脳機能を制御するシグナルネットワークの全貌を解明したいと考えている。

## 謝 辞

本紙で紹介した研究成果は、名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・医学部附属病院薬剤部、同大学神経情報薬理学および金沢大学大学院自然科学研究科薬物治療学教室で得られました。多大なるご指導を賜りました鍋島俊隆教授(藤田保健衛生大学・前名古屋大学)、山田清文教授(名古屋大学・前金沢大学)ならびに貝淵弘三教授(名古屋大学)に厚く御礼申し上げます。また、研究遂行にあたり多大なご助力を賜りました高橋雅英教授(名古屋大学腫瘍病理学)、曾我部正博名誉教授(名古屋大学メカノバイオロジー・ラボ)および各研究室の皆様深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci*, 22, 425-444 (1999).
- 2) Brown MW, Aggleton JP. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci*, 2, 51-61 (2001).
- 3) Murray EA, Richmond BJ. Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 188-193 (2001).
- 4) Winters BD, Bussey TJ. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci*, 25, 52-61 (2005).
- 5) Meunier M, Bachevalier J, Mishkin M. Effects of orbital frontal and anterior cingulate lesions on object and spatial memory in rhesus monkeys. *Neuropsychologia*, 35, 999-1015 (1997).
- 6) Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP. The effects of prelimbic and infralimbic lesions on working memory for visual objects in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 77, 29-43 (2002).
- 7) English JD, Sweatt JD. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem*, 271, 24329-24332 (1996).
- 8) Nagai T, Takuma K, Kamei H, Ito Y, Nakamichi N, Ibi D, Nakanishi Y, Murai M, Mizoguchi H, Nabeshima T, Yamada K. Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn Mem*, 14, 117-125 (2007).
- 9) Kamei H, Nagai T, Nakano H, Togan Y, Takayanagi M, Takahashi K, Kobayashi K, Yoshida S, Maeda K, Takuma K, Nabeshima T, Yamada K. Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK1/2 activation in the prefrontal cortex of mice. *Biol Psychiatry*, 59, 75-84 (2006).
- 10) Wang H, Tiedge H. Translational control at the synapse. *Neuroscientist*, 10, 456-466 (2004).
- 11) Duvarci S, Nader K, LeDoux JE. Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci*, 21, 283-289 (2005).
- 12) Janknecht R, Ernst WH, Pingoud V, Nordheim A. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J*, 12, 5097-5104 (1993).
- 13) Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*, 10, 850-860

- (2009).
- 14) Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, 70, 304-322 (2010).
  - 15) Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 297-305 (2001).
  - 16) Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-1274 (2007).
  - 17) Balu DT, Carlson GC, Talbot K, Kazi H, Hill-Smith TE, Easton RM, Birnbaum MJ, Lucki I. Akt1 deficiency in schizophrenia and impairment of hippocampal plasticity and function. *Hippocampus*, 22, 230-240 (2012).
  - 18) Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell*, 9, 389-402 (2005).
  - 19) Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron*, 63, 774-787 (2009).
  - 20) Wang Y, Kaneko N, Asai N, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Kato T, Asai M, Murakumo Y, Ota H, Hikita T, Namba T, Kuroda K, Kaibuchi K, Ming GL, Song H, Sawamoto K, Takahashi M. Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain. *J Neurosci*, 31, 8109-8122 (2011).
  - 21) Nakai T, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Asai N, Enomoto A, Asai M, Yamada S, Saifullah AB, Sokabe M, Takahashi M, Yamada K. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. *J Neurosci*, 34, 14995-15008 (2014).
  - 22) Rutter M. Developmental catch-up, and deficit, following adoption after severe global early privation. English and Romanian Adoptees (ERA) Study Team. *J Child Psychol Psychiatry*, 39, 465-476 (1998).
  - 23) Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J Neurochem*, 105, 921-932 (2008).
  - 24) Ooe N, Saito K, Mikami N, Nakatuka I, Kaneko H. Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. *Mol Cell Biol*, 24, 608-616 (2004).
  - 25) Lin Y, Bloodgood BL, Hauser JL, Lapan AD, Koon AC, Kim TK, Hu LS, Malik AN, Greenberg ME. Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. *Nature*, 455, 1198-1204 (2008).
  - 26) Sun X, Lin Y. Npas4: Linking Neuronal Activity to Memory. *Trends Neurosci*, 39, 264-275 (2016).
  - 27) Furukawa-Hibi Y, Yun J, Nagai T, Yamada K. Transcriptional suppression of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene by stress via the binding of agonist-bound glucocorticoid receptor to its promoter. *J Neurochem*, 123, 866-875 (2012).
  - 28) Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yun J, Yamada K. Stress increases DNA methylation of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene. *Neuroreport*, 26, 827-832 (2015).
  - 29) Yun J, Nagai T, Furukawa-Hibi Y, Kuroda K, Kaibuchi K, Greenberg ME, Yamada K. Neuronal

- Per Arnt Sim (PAS) domain protein 4 (NPAS4) regulates neurite outgrowth and phosphorylation of synapsin I. *J Biol Chem*, 288, 2655-2664 (2013).
- 30) Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci*, 23, 185-215 (2000).
- 31) 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*, 89, 550-565 (2016).
- 32) Morozov A, Muzzio IA, Bourtchouladze R, VanStrien N, Lapidus K, Yin D, Winder DG, Adams JP, Sweatt JD, Kandel ER. Rap1 couples cAMP signaling to a distinct pool of p42/44MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron*, 39, 309-325 (2003).
- 33) Pan BX, Vautier F, Ito W, Bolshakov VY, Morozov A. Enhanced cortico-amygdala efficacy and suppressed fear in absence of Rap1. *J Neurosci*, 28, 2089-2098 (2008).
- 34) Stornetta RL, Zhu JJ. Ras and Rap signaling in synaptic plasticity and mental disorders. *Neuroscientist*, 17, 54-78 (2011).
- 35) Nagai T, Yoshimoto J, Kannon T, Kuroda K, Kaibuchi K. Phosphorylation signals in striatal medium spiny neurons. *Trends Pharmacol Sci*, 37, 858-871 (2016).
- 36) Dephore N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 10762-10767 (2008).
- 37) Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, Gnad F, Cox J, Jensen TS, Nigg EA, Brunak S, Mann M. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*, 3, ra3 (2010).
- 38) PhosphoSitePlus: <http://www.phosphosite.org/>