

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23774

研究課題名（和文）RhoA Rho-kinaseシグナルの個体脳神経回路における作用機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the brain function and the molecular mechanisms of RhoA/Rho-kinase signaling in neural circuits

研究代表者

張 心健 (Zhang, Xinjian)

藤田医科大学・その他部局等・助教

研究者番号：10850430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、RhoA-“Rho-kinase”シグナルについて個体内での生理機能と分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。RhoAやRho-kinaseの活性型変異体やドミナントネガティブ変異体、及びノックアウトマウスを使用して解析したところ、側坐核のD1R-MSNにおいて、RhoA-“Rho-kinase”シグナルが報酬学習・記憶に関与すること、側坐核のD2R-MSNにおいて、RhoA-“Rho-kinase”シグナルが忌避学習・記憶に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、側坐核のD1R-MSNにおいて、RhoA-“Rho-kinase”シグナルが報酬学習・記憶に関与すること、側坐核のD2R-MSNにおいて、RhoA-“Rho-kinase”シグナルが忌避学習・記憶に関与することを明らかにした。本研究のようなアプローチで細胞内シグナル伝達機構を解明することによって、報酬記憶と関連する薬物依存症や恐怖記憶と関連するPTSDのような精神疾患の新たな治療ターゲットの発見に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the physiological function and the molecular mechanism of RhoA-“Rho-kinase” signaling in individuals. By using constitutively-active RhoA mutant, dominant-negative Rho-kinase mutant, or Rho-kinase knockout mice, we demonstrated that RhoA-“Rho-kinase” signaling was involved in reward-related learning and memory in dopamine D1 receptor-expressing medium spiny neurons of the nucleus accumbens. On the other hand, RhoA-“Rho-kinase” signaling was involved in aversive learning and memory in dopamine D2 receptor-expressing medium spiny neurons of the nucleus accumbens.

研究分野：神経科学

キーワード：Rho Rho-kinase 脳機能 リン酸化 ノックアウトマウス 行動解析

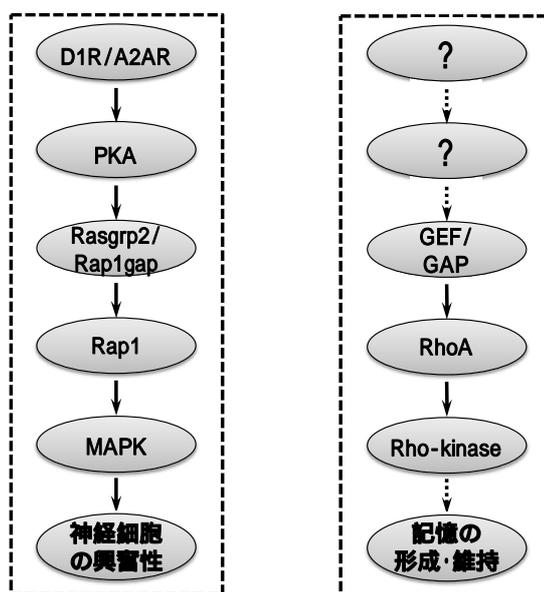
1. 研究開始当初の背景

私達の脳は様々な細胞集団からなり、神経伝達物質などが細胞膜にある受容体に結合し、細胞内にある蛋白質や酵素が活性化され、細胞内でシグナルが連鎖的に伝達され、最終的に細胞機能が発揮される。シグナル伝達に異常が発生すると、生体に病的状態が引き起こされる。細胞内シグナル伝達機構を分子レベルから個体レベルで解明することは、生命現象の理解だけでなく、病因や病態の解明、分子を標的とした創薬にも非常に重要である。

これまで細胞内シグナル解析は試験管内や培養細胞内で多く行われてきた。しかしながら細胞内シグナル伝達は細胞種または時期により異なる。特に、脳は様々な種類の神経細胞やグリア細胞から構成され、互いに作用しているため、単一の細胞種を培養した実験系は個体脳内における個々の神経細胞やグリア細胞の環境を模倣できない。また、個体に薬剤投与した実験系は様々な種類の細胞に作用し、単一の細胞種的作用を捉えられない。よって、細胞内シグナル解析を個体レベルで細胞種毎に行う方法を用いる必要がある。

我々は、シグナル分子を Cre 依存的に発現させる AAV ベクターと細胞種特異的に Cre を発現する Tg マウスを用いて、時期や部位特異的に標的蛋白質の発現や活性を制御する実験系を立ち上げた。研究代表者は本実験系を用いて、ドーパミン D1 受容体を発現する中型有棘神経細胞 (D1R-MSN) 内シグナル解析を行い、ドーパミンが D1R-MSN において、PKA を介して低分子量 G 蛋白質 Rap1 の活性化因子 (GEF) である Rasgrp2 をリン酸化することで Rap1 を活性化し、神経細胞の興奮性とマウスの報酬行動を制御するメカニズムを明らかにしている (図 1 左、Nagai, Zhang et al. Neuron 2016 ; Zhang et al. Neurochem Int., 2019)

しかしながら、本研究において解明された細胞内シグナルは全体の一部であると考えられ、まだメカニズムが不明なリン酸化基質は多数存在している。研究代表者は、マウスの側坐核で同定されたリン酸化蛋白質 100 種類以上の中に、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 RhoA の GEF 及び不活性化因子 (GAP) が多数含まれていることに着目した。RhoA-“ Rho-kinase ”シグナルはアクチン細胞骨格を介して細胞の形態を制御していることが知られており、神経細胞においては神経発生に関与するとともに、シナプスの形態を制御していると考えられている。研究代表者は RhoA-“ Rho-kinase ”シグナルが記憶の形成や維持に関与しているとの仮説を立てた (図 1 右)。



(Nagai, Zhang et al. Neuron, 2016)
(Zhang et al. Neurochem Int., 2019)

(研究活動スタート, 2019)

図1 個体内におけるRap1シグナル及び未知のRhoA-Rho-kinaseシグナルの生理機能及び分子メカニズムの解析

2. 研究の目的

本研究では、RhoA-“ Rho-kinase ”シグナルについて個体内での生理機能と分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

条件付け場所嗜好性試験

条件付け場所嗜好性試験装置は、白・黒の二つのボックスから成る。黒のボックスは平らな床面、白のボックスは凹凸のある床面で構成されており、ボックスの視覚および触覚の違いが条件刺激となっている。

前試験 (1日目) : マウスが自由に白・黒の二つのボックスを行き来させた。白・黒ボックスの滞在時間を 15 分測定し、Pre 値とした。

条件付け訓練 (2日目~4日目) : 午前中に生理食塩水をマウスに腹腔内投与し、一方のボックスに 30 分間閉じ込めた。午後にはコントロール群には生理食塩水を、薬物投与群にはコカイン (10mg/kg) を投与し、他方のボックスに 30 分間閉じ込めた。これらの操作は 3 日間繰り返した。

後試験 (5日目) : 1 日目と同じく、マウスが自由に白・黒の二つのボックスを行き来させた。白・黒ボックスの滞在時間を 15 分測定し、Post 値とした。薬物を投与した側の post 値から Pre 値を差し引いた値を CPP スコアとし、報酬学習を評価した。

受動回避試験

マウスが明室から暗室に進入した際に嫌悪刺激 (電気刺激) を与えることにより、暗室への進入と痛みである恐怖を関連付けて学習・記憶させる試験である。

馴化 (1 日目): マウスを明室に入れ、マウスが暗室に入ったらマウスを箱から取り出す。

条件付け (2 日目): マウスを明室に入れ、暗室に入るまでの時間を測定する。進入と同時に扉を閉めると共に電気刺激 (0.7 mA、3 秒) を与える。

(3 日目) 試験: 1 日後、明室にマウスを入れ、明室に留まった時間を最大 300 秒として測定した。

4. 研究成果

側坐核には D1R を発現する D1R-MSN と D2R を発現する D2R-MSN の異なる 2 種類の神経細胞が存在する。D1R-MSN は主に黒質 (網様部) や腹側被蓋野に投射して報酬 (快情動) 行動・学習を促進し、D2R-MSN は主に腹側淡蒼球に投射して報酬行動を抑制するとともに、忌避 (不快情動) 行動・学習を促進すると考えられている。

本研究では、側坐核の D1R-MSN において、RhoA-“Rho-kinase”シグナルが報酬学習・記憶に関与するかどうかを検討した。D1R-MSN 特異的に RhoA-“Rho-kinase”シグナルを活性化するため、cre リコンビナーゼ依存的に RhoA の活性型を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV-Flex-RhoA-CA) を作製した。AAV-Flex-RhoA-CA を *Drd1-cre* マウスの側坐核に注入し、D1R-MSN 特異的に RhoA シグナルを活性化させた。側坐核への AAV の注入から 3 週間後に条件付け場所嗜好性試験を行った。その結果、EGFP を発現させた対照マウスでは、生理食塩水が投与された場所での滞在時間 (CPP スコア) に変化はなく、コカインが投与された場所での滞在時間が優位に延長した。一方、RhoA の活性型を発現させたマウスでは、対照マウスと比較して、薬剤が投与された場所での滞在時間がさらに増加した。したがって、側坐核 D1R-MSN 特異的に RhoA シグナルを活性化すると報酬学習・記憶が強化されることが示唆された。

また、側坐核の D2R-MSN において、RhoA-“Rho-kinase”シグナルが忌避学習・記憶に関与するかどうかを受動回避学習試験により検討した。Rho-kinase の特異的阻害剤である Fasudil (20mg/kg) を電気ショックの訓練をする 15 分前に C57BL/6J マウスに腹腔内投与し、受動回避学習試験を行ったところ、学習・記憶能力が有意に低下した。一方、Fasudil (20mg/kg) を訓練した直後に C57BL/6J マウスに腹腔内投与し、受動回避学習試験を行ったところ、学習・記憶能力に有意な差は認められなかった。次に、D2R-MSN 特異的に Rho-kinase の活性を抑制するため、cre リコンビナーゼ依存的に Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV-Flex-DN-Rho-kinase) を作製した。AAV-Flex-DN-Rho-kinase を *Adora2a-cre* マウスの側坐核に注入し、D2R-MSN 特異的に Rho-kinase の活性を抑制し、受動回避学習試験を行ったところ、学習・記憶能力が有意に低下した。一方、AAV-Flex-DN-Rho-kinase を *Drd1-cre* マウスの側坐核に注入し、D1R-MSN 特異的に Rho-kinase の活性を抑制し、受動回避学習試験を行ったところ、学習・記憶能力に有意な差は認められなかった。

さらに、Rho-kinase の 2 つのアイソフォーム Rock1 と Rock2 のダブルコンディショナルノックアウトマウス (Rock1^{loxP/loxP} Rock2^{loxP/loxP}) を作製し、RhoA-“Rho-kinase”シグナルと学習・記憶の関係を受動回避学習試験により検討した。Rock1^{loxP/loxP} Rock2^{loxP/loxP} マウスの側坐核にアデノ随伴ウイルス AAV-CaMK^{-Cre} を注入し、受動回避学習試験を行ったところ、学習・記憶能力が有意に低下した。

また、受動回避学習試験において、電気ショック訓練後のマウスの側坐核を採取し、Rho-kinase の基質である MYPT1 のリン酸化レベルをウェスタンブロットにて解析したところ、電気ショック負荷により側坐核における MYPT1 のリン酸化レベルが有意に上昇した。Rho-kinase の特異的阻害剤 (Fasudil) が電気ショック負荷における Rho-kinase の活性上昇を阻害するかどうかを検証したところ、電気ショック訓練の際の MYPT1 のリン酸化は Fasudil (20mg/kg) の前投与により抑制された。最近、我々の研究室では NMDA 受容体の下流で CaMK が RhoA の制御因子である ARHGEF2 や ARHGAP21、ARHGAP39 をリン酸化することを見出している。受動回避学習試験において、電気ショック訓練後のマウスの側坐核を採取し、ARHGEF2 や ARHGAP21、ARHGAP39 のリン酸化レベルをウェスタンブロットにて解析したところ、電気ショック負荷により側坐核における ARHGEF2 や ARHGAP21、ARHGAP39 のリン酸化レベルが有意に上昇した。

以上の結果より、側坐核 D2R-MSN において、RhoA/Rho-kinase シグナルが忌避学習・記憶に関与することが示唆された (図 2)。

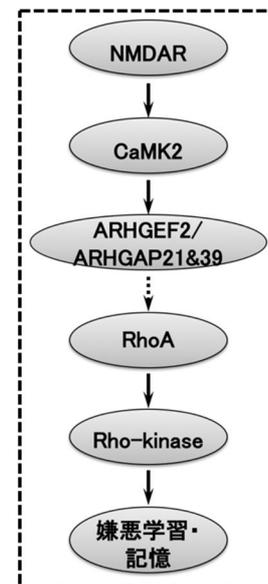


図2 側坐核D2R-MSNにおけるRhoA-“Rho-kinase”シグナルの生理機能及び可能な分子メカニズム

本研究では、側坐核 D1R-MSN において、RhoA-“Rho-kinase”シグナルが報酬学習・記憶に関

与すること、側坐核 D2R-MSN において、RhoA-“ Rho-kinase ” シグナルが忌避学習・記憶に関与することを明らかにした。本研究のようなアプローチで細胞内シグナル伝達機構を解明することによって、報酬記憶と関連する薬物依存症や恐怖記憶と関連する PTSD のような精神疾患の新たな治療ターゲットの発見に繋がると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lin You-Hsin, Yamahashi Yukie, Kuroda Keisuke, Faruk Md. Omar, Zhang Xinjian, Yamada Kiyofumi, Yamanaka Akihiro, Nagai Taku, Kaibuchi Kozo	4. 巻 143
2. 論文標題 Accumbal D2R-medium spiny neurons regulate aversive behaviors through PKA-Rap1 pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104935 ~ 104935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2020.104935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 張心健、永井拓	4. 巻 -
2. 論文標題 薬物依存症の神経精神薬理学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本神経精神薬理学会 創立50周年 記念誌	6. 最初と最後の頁 140-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Xinjian Zhang, Taku Nagai, Keisuke Kuroda, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 Dopamine and adenosine signaling pathways are analyzed in striatal medium spiny neurons using kinase-associated neural phospho-signaling (KANPHOS) database
3. 学会等名 SfN 2019 第49回ニューロサイエンス会議（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rijwan Uddin Ahammad, Yasuhiro Funahashi, Xinjian Zhang, Emran Hossen, Md. Omar Faruk, Md Hasanuzzaman Shohag, Shinichi Nakamuta, Daisuke Tsuboi, Mutsuki Amano, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 Phosphoproteomics of NMDA pathway leads to Rho-Kinase mediated synaptic plasticity through Shank3 phosphorylation.
3. 学会等名 第1回 CIBoG リトリート（第12回NAGOYAグローバルリトリート）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	黒田 啓介 (Kuroda Keisuke)		
研究協力者	船橋 靖広 (Funahashi Yasuhiro)		
研究協力者	永井 拓 (Nagai Taku)		
研究協力者	天野 睦紀 (Amano Mutsuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------