

令和元年5月24日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06772

研究課題名(和文) 神経回路における細胞種特異的な細胞内シグナル解析

研究課題名(英文) Cell type specific analysis of intracellular signal in neural circuit

研究代表者

黒田 啓介 (Kuroda, Keisuke)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：80631431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳側坐核のD1R-MSNにおいてドーパミンはD1受容体、G_sを介してPKAを活性化する。一方、D2R-MSNにおいてドーパミン/D2受容体/G_i経路はアデノシン/A2A受容体/G_s経路と拮抗している。D2受容体はドーパミンによって常時活性化されており、ドーパミン分泌が低下すると抑制が解除されD2R-MSNにおけるPKAが活性化する。活性化したPKAはRap1の活性化因子GEFであるRasGRP2をリン酸化し活性化するとともに、Rap1の不活性化因子GAPであるRap1GAPをリン酸化し不活性化する。これによりRap1/MAPKシグナルが活性化し、神経細胞の興奮性が亢進する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗精神病薬や抗うつ薬がドーパミンやセロトニンなどのモノアミンの作用を制御していることはよく知られているが、脳内においてどのような分子メカニズムによってその作用を発揮しているかは驚くほどわかっていない。本研究により側坐核の中型有棘神経細胞においてドーパミン受容体の下流で低分子量G蛋白質Rap1が神経細胞の興奮性を制御することで、情動を生み出すスイッチとして働いていることが明らかになった。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、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)：Dopamine activates PKA via D1 receptor / G_s pathway in D1R-MSN of the nucleus accumbens. On the other hand, the adenosine / A2A receptor / G_s pathway and the dopamine / D2 receptor / G_i pathway are antagonized in D2R-MSN. The D2 receptor is constantly activated by dopamine, and when dopamine secretion decreases, repression is released and PKA is activated in D2R-MSN. Activated PKA phosphorylates and activates RasGRP2, which is an activator of Rap1 (GEF), and phosphorylates and inactivates Rap1GAP, which is an inactivator of Rap1 (GAP). PKA activates Rap1 / MAPK signals and enhances neuronal excitability.

研究分野：神経化学

キーワード：細胞内情報伝達 シグナル解析 細胞種特異的 リン酸化 アデノ随伴ウイルス ドーパミン アデノシン 側坐核

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで細胞内シグナル研究は、試験管内や培養細胞内で行われてきた。ガン細胞由来のセルラインは均質であるため、多数の細胞を集めて行った実験の結果と、個々の細胞内で起こる現象は同じと考えることが出来た。培養細胞を用いたシグナル分子の機能解析には、薬剤刺激や遺伝子導入など様々な方法が考案されている。

一方、脳を構成する神経細胞やグリア細胞は、形態や機能により細かく分類される。細胞の種類毎に、発現する蛋白質の種類や時期が異なるため、それぞれの細胞内シグナルは異なると考えられる。そのため、脳組織を用いた実験結果は、個々の神経細胞・グリア細胞内で起こっている現象と必ずしも一致しない。また、薬剤投与実験では、ヘテロな細胞集団に対して同時に薬剤が作用するため、個々の細胞で起こっている現象を捉えられない。遺伝子改変マウスや、組換えウイルスを用いた実験は、細胞特異性を確保できるが、これらは、作製や解析に多くの時間と費用がかかるため、細胞実験のように様々な組み合わせを次々に行うことは現実的に難しかった。

研究代表者は、これまで統合失調症の疾患メカニズムの解明を目指して研究を行ってきた。統合失調症脆弱性因子 *DISC1* について、培養細胞を用いてその機能解析を行うと共に、ノックアウトマウスを作製し、行動解析や電気生理学解析を行い、*DISC1* ノックアウトマウスが統合失調症様の表現型を示すことを報告した (Kuroda et al. *Hum Mol Genet.* 2011)。その後、*DISC1* の分子機能と *DISC1* ノックアウトマウスの表現型との関係を解明するために、*DISC1* コンディショナルノックアウトマウスを作製すると共に、時期や部位特異的に *DISC1* の発現を制御するための方法を検討するなかで、AAV ベクターと Cre-Flex システムを用いた神経細胞種特異的な解析を行う実験系を確立した (黒田 平成 25~26 年 若手研究 (B))。とくに AAV は他のウイルスと比べ、細胞・個体に対する毒性が低く、発現が強いため、非常に強力なツールである。

研究代表者の所属する研究室では、過去 20 年近く細胞内シグナル伝達の解析を行っており、細胞実験について多くのノウハウや分子ツールを備えている。本研究では、この2つのノウハウを組み合わせる事で、個体内における神経細胞種特異的な細胞内シグナルの解析を目指した。

ドーパミンは運動機能や意欲、快情動、報酬行動などを担う神経伝達物質であり、パーキンソン病や統合失調症、うつ病などの精神・神経疾患の病因や病態と関連していると考えられている。ドーパミン作動性神経の多くは中脳の黒質や腹側被蓋野に神経核を形成し、線条体(背側線条体)および側坐核(腹側線条体)、前頭前皮質に投射している。この中で黒質線条体経路は運動機能を、腹側被蓋野と側坐核を結ぶ中脳辺縁系経路は意欲や快感を制御している。このことから側坐核は快情動に関わる行動や記憶を司る中心と考えられている。側坐核はおもに GABA を産生し腹側淡蒼球に投射する中型有棘神経細胞 (MSN) と、アセチルコリンを産生する介在神経細胞が存在する。中型有棘神経細胞は側坐核神経細胞の 95% を占めており、ドーパミン D1 受容体 (D1R) を発現する神経細胞 (D1R-MSN) とドーパミン D2 受容体 (D2R) を発現する神経細胞 (D2R-MSN) の 2 種類が存在し、D1R-MSN が報酬行動に、D2R-MSN が忌避行動に関与している。D1R および D2R はどちらも GPCR であり、D1R が $G\alpha_s$ と共役し “cAMP” - “PKA” シグナルを活性化するのに対し、D2R は $G\alpha_i$ と共役し “cAMP” - “PKA” シグナルを抑制する。このことからドーパミンは D1R-MSN の PKA を活性化し、D2R-MSN の PKA を抑制すると考えられている。

2. 研究の目的

ドーパミンの脳神経回路における生理機能については、これまで盛んに解析されている。しかしながら、ドーパミンの神経細胞内の分子メカニズム、特に PKA の下流でどのような分子メカニズムでその作用を発揮しているかはあまり解析されていない。研究代表者は、ドーパミンの細胞内シグナル伝達機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

研究代表者は、側坐核における PKA の基質を網羅的に同定することで、ドーパミン受容体の下流シグナルが解明できると考え実験を行った。マウス脳から用意した側坐核のスライス培養に D1 アゴニストを投与し D1R を活性化した脳サンプルを作製した。このサンプルについてリン酸化プロテオミクス解析を行い、D1R の下流で 100 種類以上の蛋白質がリン酸化されることを同定した。得られたリン酸化データについてパスウェイ解析を行ったところ、Rap1 の制御因子である RasGRP2 と Rap1GAP が D1R の下流でリン酸化されていることを見出した。Rap1 は Ras ファミリーに属する低分子量 G 蛋白質であり、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって活性化され GTP 結合型 Rap1 となり、GTPase 活性化蛋白質 (GAP) によって不活性化され GDP 結合型 Rap1 となることで、細胞内分子スイッチとして働く。Rap1 の活性を測定し、D1R 刺激によって Rap1 が活性化することを見出した。Rap1 の活性化因子 GEF である RasGRP2 の解析を行い、ドーパミンが PKA を介して RasGRP2 の 116、117、554、586 番目のセリン残基をリン酸化し、それによって RasGRP2 が活性化することを見出した。また Rap1 の不活性化因子 GAP である Rap1GAP については PKA によるリン酸化によって不活性化されることが 2009 年に Nairn らのグループから報告されている。これらの結果から、D1R-MSN においてドーパミンは、D1R、 $G\alpha_s$ を介して PKA を活性化し、リン酸化によって RasGRP2 を活性化し Rap1GAP を不活性化することで、Rap1 を活性化することが明らかになった。

活性化した Rap1 はエフェクターと呼ばれる蛋白質と結合することで上流からのシグナルを下流へと伝達する。Rap1 は個々のエフェクターを介し様々なシグナルを調整しているが、エフェ

クターの1つとしてB-Rafがあり、“Rap1”-“B-Raf”-“MAPK活性化キナーゼ(MAPKK)”-“MAPK”パスウェイにより、MAPKが活性化することが知られている。“D1R”-“PKA”-“Rap1”-“MAPKK”-“MAPK”経路の活性化がマウスの脳機能にどのような影響を与えるかを検証するため、PKAやRap1、MAPKKをD1R-MSN特異的に活性化・不活性化させたマウスを作製し解析を行った。D1R-MSN特異的にCreリコンビナーゼを発現するD1R-Creトランスジェニックマウスを米国GENSATプロジェクトより入手した。またCreリコンビナーゼ依存的に活性型のPKAやRap1、MAPKKを発現するアデノ随伴ウイルス(aden-associated virus, AAV)を作製した。D1R-Creマウスの側坐核にAAVを注入し側坐核のD1R-MSN特異的にPKAやRap1、MAPKKを活性化させたところ、D1R-MSNの興奮性が高まり、コカイン嗜好性が増強されることを見出した。一方、側坐核のD1R-MSN特異的にRap1を欠損したマウスや、MAPKKの活性を抑制するAAVを注入したマウスではD1R-MSNの興奮性が低下し、コカイン嗜好性が抑制された(Nagai, Kuroda et al. Neuron, 2016)。

研究代表者はさらに、ドーパミンD2受容体(D2R)によって制御されるD2R-MSNに興味を持ち、D1R-MSNとD2R-MSNの比較を行った。D2R-MSNにおいては、アデノシンがA2A受容体/G α sを介しPKAを活性化させる経路と、ドーパミンがD2受容体/G α iを介しPKAを抑制する経路が拮抗している。研究代表者はRap1のGEFであるRasgrp2およびRap1のGAPであるRap1gapのリン酸化抗体と、D1R-mVenusおよびD2R-mVenusマウスを用いて、D1R-MSNおよびD2R-MSN特異的なドーパミンおよびアデノシンの作用機序を解明した。D1R-MSNからD2R-MSNへ、またはその逆への活性シフトが、主にドーパミン濃度の変化に依存するというモデルを提案した。これらの知見について論文報告(Zhang, Kuroda et al. Neurochem Int., 2018)した。

4. 研究成果

通常時の側坐核のドーパミン濃度は低い。D1Rはドーパミンへの親和性が低く“D1R”-“PKA”シグナルは活性化されない。この状態においてD1R-MSNは、大脳皮質や海馬からの興奮性(グルタミン酸作動性)神経細胞の投射を受けて感覚情報を受容しても、細胞膜の興奮性が低くなかなか発火しないため快情動が発現しない(OFF状態)。ドーパミン濃度が上昇し“D1R”-“PKA”シグナルがD1R-MSNの興奮性を高めることにより、グルタミン酸刺激による発火が起こりやすくなり、快情動が処理される(ON状態)。

一方、D2Rはドーパミンへの親和性が高く、通常時のドーパミン濃度において活性化されている。そのためD2R-MSNにおいてA2ARとD2Rの作用は拮抗しておりD2R-MSNは興奮性が低い(OFF状態)。ドーパミン濃度が低下し、D2Rによる抑制が解除されるとD2R-MSNにおけるPKAが活性化し興奮性が高まる(ON状態)。

本研究により側坐核の中型有棘神経細胞においてドーパミン受容体の下流で低分子量G蛋白質Rap1が神経細胞の興奮性を制御することで、情動を生み出すスイッチとして働いていることが明らかになった。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、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15件)

- ① Comprehensive analysis of kinase-oriented phospho-signalling pathways
Amano Mutsuki, Nishioka Tomoki, Tsuboi Daisuke, Kuroda Keisuke, Funahashi Yasuhiro, Yamahashi Yukie, Kaibuchi Kozo
JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 165(4) 301-307 2019年4月 doi: 10.1093/jb/mvy115. (査読有り)
- ② Balance between dopamine and adenosine signals regulates the PKA/Rap1 pathway in striatal medium spiny neurons
Zhang Xinjian, Nagai Taku, Ahammad Rijwan Uddin, Kuroda Keisuke, Nakamuta Shinichi, Nakano Takashi, Yukinawa Naoto, Funahashi Yasuhiro, Yamahashi Yukie, Amano Mutsuki, Yoshimoto Junichiro, Yamada Kiyofumi, Kaibuchi Kozo
NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 122 8-18 2019年1月 doi: 10.1016/j.neuint.2018.10.008. (査読有り)
- ③ Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinase in D1 receptor-expressing neurons of the nucleus accumbens potentiates stimulus-reward learning in mice
Bin Saifullah Md. Ali, Nagai Taku, Kuroda Keisuke, Wulaer Bolati, Nabeshima Toshitaka, Kaibuchi Kozo, Yamada Kiyofumi
Scientific Reports 8 2018年12月 doi: 10.1038/s41598-018-32840-1. (査読有り)
- ④ Repetitive and compulsive-like behaviors lead to cognitive dysfunction in Discl Δ 2-3/ Δ 2-3 mice

Wulaer B., Nagai T., Sobue A., Itoh N., Kuroda K., Kaibuchi K., Nabeshima T., Yamada K.

GENES BRAIN AND BEHAVIOR 17(8) 2018年11月 doi: 10.1111/gbb.12478. (査読有り)

- ⑤ 基礎研究で活躍する精神科医の魂はいずこに宿るか? 5. 精神疾患の分子メカニズム解明への挑戦 ドーパミンの細胞内シグナル伝達機構解析について
黒田啓介
日本生物学的精神医学会誌 28(3) 127 - 131 2017年9月 (査読なし)
<http://jglobal.jst.go.jp/public/201702254647414012>
- ⑥ Neuropeptide Y neuronal network dysfunction in the frontal lobe of a genetic mouse model of schizophrenia
Morosawa Shunsuke, Iritani Shuji, Fujishiro Hiroshige, Sekiguchi Hirotaka, Torii Youta, Habuchi Chikako, Kuroda Keisuke, Kaibuchi Kozo, Ozaki Norio
Neuropeptides 62 27-35 2017年4月 doi: 10.1016/j.npep.2016.12.010. (査読有り)
- ⑦ Immunohistochemical evaluation of the GABAergic neuronal system in the prefrontal cortex of a DISC1 knockout mouse model of schizophrenia
Umeda Kentaro, Iritani Shuji, Fujishiro Hiroshige, Sekiguchi Hirotaka, Torii Youta, Habuchi Chikako, Kuroda Keisuke, Kaibuchi Kozo, Ozaki Norio
Synapse 70(12) 508-518 2016年12月 doi: 10.1002/syn.21924. (査読有り)
- ⑧ Phosphorylation Signals in Striatal Medium Spiny Neurons
Nagai Taku, Yoshimoto Junichiro, Kannon Takayuki, Kuroda Keisuke, Kaibuchi Kozo
Trends in Pharmacological Sciences 37(10) 858-871 2016年10月 doi: 10.1016/j.tips.2016.07.003. (査読有り)
- ⑨ Survival of corticostriatal neurons by Rho/Rho-kinase signaling pathway
Kobayashi Kenta, Sano Hiromi, Kato Shigeki, Kuroda Keisuke, Nakamuta Shinichi, Isa Tadashi, Nambu Atsushi, Kaibuchi Kozo, Kobayashi Kazuo
Neuroscience Letters 630 45-52 2016年9月 doi: 10.1016/j.neulet.2016.07.020. (査読有り)
- ⑩ Stimulation of Synaptic Vesicle Exocytosis by the Mental Disease Gene DISC1 is Mediated by N-Type Voltage-Gated Calcium Channels.
Tang Willcyn, Thevathasan Jervis Vermal, Lin Qingshu, Lim Kim Buay, Kuroda Keisuke, Kaibuchi Kozo, Bilger Marcel, Soong Tuck Wah, Fivaz Marc
Frontiers in synaptic neuroscience 8 15 2016年6月 doi: 10.3389/fnsyn.2016.00015. (査読有り)
- ⑪ Catecholaminergic neuronal network dysfunction in the frontal lobe of a genetic mouse model of schizophrenia.
Iritani Shuji, Sekiguchi Hirotaka, Habuchi Chikako, Torii Youta, Kuroda Keisuke, Kaibuchi Kozo, Ozaki Norio
Acta neuropsychiatrica 28(2) 117-123 2016年4月 doi: 10.1017/neu.2015.51. (査読有り)
- ⑫ Phosphoproteomics of the Dopamine Pathway Enables Discovery of Rap1 Activation as a Reward Signal In Vivo.
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
Neuron 89(3) 550-565 2016年2月 doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.019. (査読有り)
- ⑬ Focused Proteomics Revealed a Novel Rho-kinase Signaling Pathway in the Heart.
Yura Yoshimitsu, Amano Mutsuki, Takefuji Mikito, Bando Tomohiro, Suzuki Kou, Kato Katsuhiko, Hamaguchi Tomonari, Hasanuzzaman Shohag Md, Takano Tetsuya, Funahashi Yasuhiro, Nakamuta Shinichi, Kuroda Keisuke, Nishioka Tomoki, Murohara Toyooki, Kaibuchi Kozo
Cell structure and function 41(2) 105-120 2016年 doi: 10.1247/csf.16011. (査読有り)
- ⑭ Potential involvement of kinesin-1 in the regulation of subcellular localization

of Girdin.

Muramatsu A, Enomoto A, Kato T, Weng L, Kuroda K, Asai N, Asai M, Mii S, Takahashi M

Biochemical and biophysical research communications 463(4) 999-1005 2015年8月
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.049. (査読有り)

- ⑮ Disrupted-in-schizophrenia 1 regulates transport of ITPR1 mRNA for synaptic plasticity.
Tsuboi D, Kuroda K, Tanaka M, Namba T, Iizuka Y, Taya S, Shinoda T, Hikita T, Muraoka S, Iizuka M, Nimura A, Mizoguchi A, Shiina N, Sokabe M, Okano H, Mikoshiba K, Kaibuchi K
Nature neuroscience 18(5) 698-707 2015年5月 doi: 10.1038/nn.3984. (査読有り)

[学会発表] (計9件)

- ① KANPHOS (Kinase-Associated Phospho-Signaling) Platform - A comprehensive database for kinase-associated neural phosphorylation signaling
Keisuke Kuroda, Taku Nagai, Mutsuki Amano, Junichiro Yoshimoto, Takayuki Kannon, Tomoki Nishioka, Shiro Usui, Kozo Kaibuchi
第92回薬理学会年会 2019年3月
- ② What kind of intracellular signals are controlled by the antipsychotics in the brain?
Keisuke Kuroda
第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 合同年会 2018年9月
- ③ RhoA activity regulates spine morphology and memory associated behavior.
K. Kuroda, X. Zhang, K. Oda, Y. Nakanose, M. Yoshikawa, T. Nagai, K. Kaibuchi
ASCB | EMBO 2017 Meeting
- ④ Cell - type - specific isolation of 14 - 3 - 3 associated phosphoprotein from complex brain tissues.
M. Yoshikawa, K. Kuroda, T. Nagai, K. Kaibuchi
ASCB | EMBO 2017 Meeting
- ⑤ KANPHOS (Kinase-Associated Phospho-Signaling) Platform - 新規リン酸化DBプラットフォーム -
黒田啓介, 永井拓, 天野睦紀, 吉本潤一郎, 観音隆幸, 西岡朋生, 臼井支朗, 貝淵弘三
第90回日本薬理学会年会 2017年3月
- ⑥ RhoA はスパイン形態と行動を制御する
中ノ瀬友稀, 黒田啓介, 張心健, 織田海秀, 永井拓, 貝淵弘三
第90回日本薬理学会年会 2017年3月
- ⑦ 14-3-3 を用いた細胞種特異的リン酸化タンパク質の単離
吉川麻里奈, 黒田啓介, 永井拓, 貝淵弘三
第90回日本薬理学会年会 2017年3月
- ⑧ 精神疾患の分子メカニズム解明への挑戦 ドーパミンの細胞内シグナル伝達機構解析について
黒田啓介
第38回日本生物学的精神医学会大会・第59回日本神経化学会大会 合同年会 2016年9月
- ⑨ Analysis of effect of RhoA activity on spine morphology and memory formation
黒田啓介, 張心健, 織田海秀, 永井拓, 貝淵弘三
第89回日本薬理学会年会 2016年3月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

〔その他〕

○名古屋大学大学院医学系研究科 プレスリリース
大規模リン酸化プロテオミクス解析で快感を生み出すメカニズムを解明 ～脳科学研究のブレークスルーにより精神・神経疾患創薬への道を拓く～
https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Rap1_20160122jp.pdf

○学部生の指導

名古屋大学医学部学生研究会

<http://med.nagoya-u.ac/nsam/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。