

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14816

研究課題名（和文）個体脳神経回路におけるRhoA Rho-kinase細胞内シグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of RhoA/Rho-kinase signals in neuronal circuit

研究代表者

黒田 啓介（KURODA, Keisuke）

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：80631431

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Rhoファミリー低分子量G蛋白質RhoAおよびその下流分子であるRho-kinaseシグナルについて脳神経細胞内での細胞内シグナル伝達を解析した。RhoAの活性化因子GEFや不活性化因子GAPが神経活動依存的にリン酸化状態が変化していることを確認した。RhoAおよびRho-kinaseの活性を制御するAAVを注入したマウスや、Rho-kinase(Rock1, Rock2)のダブルコンディショナルノックアウトマウスにおいてシナプス形態や行動の変化を確認した。これらから神経細胞はRhoA、Rho-kinaseシグナルを介してシナプス形態や行動を制御していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞種特異的にCreを発現するトランスジェニック（Tg）マウスやアデノ随伴ウイルス（AAV）を組み合わせ、特にRhoファミリー低分子量G蛋白質RhoAおよびその下流分子であるRho-kinaseシグナルについて個体内での細胞内シグナル伝達を解析し、その生理機能を明らかにした。研究代表者の参加する研究グループでは、ARHGAP10というRhoAのGAPが新たな統合失調症リスク遺伝子であること、Rhoシグナルが統合失調症治療の有望な創薬ターゲットであることを報告している。これらの成果から、精神疾患の病態解明や新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the intracellular signaling of RhoA, a Rho family low molecular weight G protein, and its downstream molecule, Rho-kinase, in neurons. We found that the activator (GEF) and inactivator (GAP) of RhoA were phosphorylated in a neural activity-dependent manner. We observed changes in synaptic morphology and behavior in mice injected with AAV, which regulates the activity of RhoA and Rho-kinase, and in double-conditional knockout mice of Rho-kinase (Rock1 and Rock2). These findings suggest that neurons regulate synaptic morphology and behavior via RhoA and Rho-kinase signaling.

研究分野：神経科学

キーワード：シグナル伝達機構 神経科学 Rho kinase RhoA 神経回路 シナプス 行動解析 細胞種特異的

## 1. 研究開始当初の背景

多くの疾患は正常な細胞内シグナルが働かなくなるか、異常な細胞内シグナルが活性化することにより引き起こされており、細胞内シグナル伝達機構を分子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、治療法の開発に非常に重要である。しかしながら細胞内シグナルを担う蛋白質の構成が細胞の種類や時期毎に異なるため、細胞内シグナル解析はそれぞれの細胞種毎に行う必要がある。これまでライフサイエンスの多くの分野において、細胞内シグナル研究は試験管内や培養細胞内で盛んに行われてきた。その際、がん細胞由来のセルラインは、その性質が均質であるため、たくさん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を同じように考えることができた。一方、脳は様々な種類の神経細胞とグリア細胞から構成されそれらが互いに相互作用しているため、単一の細胞種を培養した実験結果や脳組織を用いた実験結果は、脳内において個々の神経細胞・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。そのほかにも、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。また遺伝子改変マウスを用いた実験は細胞特異性を確保できるが作製や解析に多くの時間と費用がかかるため、1つの現象に対し複数の細胞内シグナル分子を迅速かつ詳細に操作・解析することは現実的に難しかった。

研究代表者は、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、および Cre-Flex システムを用いて、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確立することで(黒田、2013~2014 年 若手研究 B、2015~2017 年 基盤研究 C) 個体内における細胞種特異的な細胞内シグナル伝達機構の解析に取り組んできた。

中脳のドーパミン作動性神経は線条体および側坐核に多く投射しており、線条体において運動機能を、側坐核において意欲や快感を制御している。側坐核においてドーパミン D1 受容体(D1R)は Gs と共役し cAMP-PKA シグナルを活性化する。このことからドーパミンは D1R を発現する側坐核 D1R-中型有棘神経細胞(D1R-MSN)の PKA を活性化すると考えられている。

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、独自に開発したリン酸化プロテオミクス法(Amano et al. JCB 2015)により、マウスの側坐核で起こるリン酸化反応を網羅的に解析し、リン酸化タンパク質を 100 種類以上同定している。研究代表者は上記の実験系を用いて、D1R-MSN においてドーパミンによって引き起こされるシグナルの解析を行い、Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rap1 がドーパミンの下流で活性化され、神経細胞の興奮性を制御するメカニズムを明らかにした(Nagai, Kuroda et al. Neuron 2016)。

しかしながら、解明された細胞内シグナルは、側坐核において働いているシグナル全体の一部であると考えられ、未だメカニズムの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したリン酸化タンパク質 100 種類以上の中に、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 RhoA の活性化因子( 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。Rho-kinase は RhoA の下流分子であり研究代表者が所属する研究室において発見されたリン酸化酵素である(Matsui et al. EMBO 1996)。RhoA および 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。

## 2. 研究の目的

RhoA および Rho-kinase シグナルの機能については、これまで特に細胞レベルで盛んに研究されている。しかしながら、個体内における細胞内シグナル伝達機構についてはいまだ解析されていない。研究代表者は、個体内での細胞内シグナル伝達を解析し、その生理機能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

RhoA の活性化因子 GEF や不活性化因子 GAP についてリン酸化状態を検討した。行動実験を行ったマウス脳側坐核や、薬物刺激を行ったマウス脳側坐核から蛋白質ライセートを作製し、いくつかの GEF や GAP においてリン酸化状態が変化していることを見出した。

RhoA および Rho-kinase の活性を制御する AAV を作製し、マウス脳側坐核に注入した際の発現を確認した。Rho-kinase(Rock1, Rock2)のダブルコンディショナルノックアウト(Rock1/2 dck0)マウスを作製し、交配と繁殖を行った。

AAV-RhoA/Rho-kinase をマウス脳側坐核に注入したマウスや、Rock1/2 dck0 マウスを用いて行動解析を行い、記憶に関わる行動実験にて行動が変化することを見出した。

AAV-RhoA/Rho-kinase を注入したマウスや、Rock1/2 dck0 マウスのシナプス形態を観察し、RhoA, Rho-kinase シグナルがシナプス形態を変化させることを見出した。

## 4. 研究成果

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 RhoA およびその下流分子である Rho-kinase シグナルについて脳神経細胞内での細胞内シグナル伝達機構を明らかにした。脳神経細胞内において RhoA の活

性化因子 GEF や不活性化因子 GAP が神経活動依存的にリン酸化状態が変化することで RhoA および Rho-kinase の活性を制御し、シナプス形態を変化させることで行動を制御していると考えられる。

研究代表者の参加する研究グループでは、ARHGAP10 という RhoA の GAP が新たな統合失調症リスク遺伝子であること、Rho シグナルが統合失調症治療の有望な創薬ターゲットであることを報告している (Sekiguchi et al. Translational Psychiatry 2020)。  
脳神経細胞内における RhoA, Rho-kinase シグナルの細胞内シグナル伝達を解析し、その生理機能を明らかにすることで、精神疾患の病態解明や新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nagaoka Koki, Nagashima Takuya, Asaoka Nozomi, Yamamoto Hiroki, Toda Chihiro, Kayanuma Gen, Siswanto Soni, Funahashi Yasuhiro, Kuroda Keisuke, Kaibuchi Kozo, Mori Yasuo, Nagayasu Kazuki, Shirakawa Hisashi, Kaneko Shuji	4. 巻 6
2. 論文標題 Striatal TRPV1 activation by acetaminophen ameliorates dopamine D2 receptor antagonist-induced orofacial dyskinesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 145632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.145632	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 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 Sekiguchi Mariko, Sobue Akira, Kushima Itaru, Wang Chenyao, Arioka Yuko, Kato Hidekazu, Kodama Akiko, Kuroda Keisuke, Ikeda Masashi, Iwata Nakao, Shimamura Teppei, Nagai Taku, Nabeshima Toshitaka, Kaibuchi Kozo, Yamada Kiyofumi, Mori Daisuke, Ozaki Norio et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 ARHGAP10, which encodes Rho GTPase-activating protein 10, is a novel gene for schizophrenia risk	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-00917-z	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 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	4. 巻 122
2. 論文標題 Balance between dopamine and adenosine signals regulates the PKA/Rap1 pathway in striatal medium spiny neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 8 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2018.10.008	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 Funahashi Yasuhiro, Ariza Anthony, Emi Ryosuke, Xu Yifan, Shan Wei, Suzuki Ko, Kozawa Sachi, Ahammad Rijwan Uddin, Wu Mengya, Takano Tetsuya, Yura Yoshimitsu, Kuroda Keisuke, Nagai Taku, Amano Mutsuki, Yamada Kiyofumi, Kaibuchi Kozo	4. 巻 29
2. 論文標題 Phosphorylation of Npas4 by MAPK Regulates Reward-Related Gene Expression and Behaviors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3235 ~ 3252.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.116	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 Wulaer B., Nagai T., Sobue A., Itoh N., Kuroda K., Kaibuchi K., Nabeshima T., Yamada K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Repetitive and compulsive-like behaviors lead to cognitive dysfunction in Disc1<sup>2-3/2-3</sup>mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes, Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 e12478 ~ e12478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gbb.12478	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 Bin Saifullah Md. Ali, Nagai Taku, Kuroda Keisuke, Wulaer Bolati, Nabeshima Toshitaka, Kaibuchi Kozo, Yamada Kiyofumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinase in D1 receptor-expressing neurons of the nucleus accumbens potentiates stimulus-reward learning in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-32840-1	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 Amano Mutsuki, Nishioka Tomoki, Tsuboi Daisuke, Kuroda Keisuke, Funahashi Yasuhiro, Yamahashi Yukie, Kaibuchi Kozo	4. 巻 165
2. 論文標題 Comprehensive analysis of kinase-oriented phospho-signalling pathways	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 301 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy115	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 You-Hsin Lin, Taku Nagai, Yukie Yamahashi, Keisuke Kuroda, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 Suppressed dopamine release caused by aversive stimulus activates PKA-Rap1 signaling in accumbal D2R-medium spiny neuron
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会・第62回日本神経化学学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Kuroda, Mutsuki Amano, Junichiro Yoshimoto, Taku Nagai, Takayuki Kannon, Tomoki Nishioka, Shiro Usui, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 KANPHOS (Kinase-Associated Phospho-Signaling) Platform - A comprehensive database for kinase-associated neural phosphorylation signaling
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会・第62回日本神経化学学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xinjian Zhang, Taku Nagai, Ahammad Rijwan Uddin, Keisuke Kuroda, Takashi Nakano, Junichiro Yoshimoto, Kiyofumi Yamada, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 Balance between dopamine and adenosine signals regulates the PKA/Rap1 pathway in striatal medium spiny neurons
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会・第62回日本神経化学学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Funahashi, Anthony Ariza, Ryosuke Emi, Yifan Xu, Shan Wei, Ko Suzuki, Sachi Kozawa, Tetsuya Takano, Yoshimitsu Yura, Keisuke Kuroda, Taku Nagai, Mutsuki Amano, Kiyofumi Yamada, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 Phosphorylation of Npas4 by MAPK regulates reward-related gene expression and behaviors
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会・第62回日本神経化学学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

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 Neuroscience2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Kuroda, Taku Nagai, Mutsuki Amano, Junichiro Yoshimoto, Takayuki Kannon, Tomoki Nishioka, Shiro Usui, Kozo Kaibuchi
2. 発表標題 KANPHOS (Kinase-Associated Phospho-Signaling) Platform - A comprehensive database for kinase-associated neural phosphorylation signaling
3. 学会等名 第92回薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Kuroda
2. 発表標題 What kind of intracellular signals are controlled by the antipsychotics in the brain?
3. 学会等名 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 (招待講演)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------