

平成 28 年 1 月 22 日

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 ～ 脳科学研究のブレイクスルーにより精神・神経疾患創薬への道を拓く ～

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）神経情報薬理学の貝淵弘三（かいぶちこうぞう）教授（責任著者）と医療薬学の永井拓（ながいたく）准教授（筆頭著者）の研究グループは、独自に手法を開発した大規模リン酸化プロテオミクス解析によって、脳内でドーパミンが快感を生み出すメカニズムを明らかにしました。本研究成果は、米国科学誌「ニューロン」（米国時間 1 月 21 日付の電子版）に掲載されました。

ドーパミンは運動機能、意欲および快感に関連する行動を担っている神経伝達物質で、パーキンソン病や統合失調症など種々の精神・神経疾患の病態と関連していると考えられています。脳が興奮すると線条体という脳の特定の場所でドーパミンが大量に放出されます。線条体には、ドーパミン D1 受容体（D1R）を発現する神経細胞（D1R-細胞）とドーパミン D2 受容体（D2R）を発現する細胞（D2R-細胞）の異なる 2 種類の神経細胞が存在します。これまでの研究から、ドーパミンが、リン酸化酵素であるプロテインキナーゼ A（PKA）を活性化することと、神経細胞の興奮性を制御することは分かっていました。しかし、D1R-細胞と D2R-細胞を個別に解析することは困難とされていたことから、D1R-細胞の PKA が細胞の興奮性や報酬関連行動を制御しているのかどうかは実際に証明されておらず、そのメカニズムも不明でした（図 1）。

本研究グループは、高感度で網羅的にリン酸化タンパク質を解析する方法を独自に開発することで、D1R の下流に存在する 100 種類以上の PKA のリン酸化基質をマウスの脳で新たに同定することに成功しました。細胞や動物レベルの詳細な解析を行った結果、ドーパミンによる D1R の刺激は PKA-Rap1 シグナルを活性化して D1R-細胞の興奮性を高め、報酬（快感）関連行動を引き起こすことが分かりました（図 2）。すなわち、Rap1 シグナルが報酬（快感）シグナルとして機能することを本研究グループは世界で初めて明らかにしました（図 3）。

本研究により発見された報酬シグナルは、従来の解析手法では同定することが困難であり、脳科学研究にブレイクスルーを起こしました。また、ドーパミンの機能不全が認められる様々な精神・神経疾患の病態解明や治療法の開発に繋がることが大いに期待されます。

本研究は、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED）「脳科学研究戦略推進プログラム」（平成 27 年度に文部科学省より移管）の「脳科学研究を支える集約的・体系的な情報基盤の構築（課題 G）＜拠点長 貝淵弘三＞」の一環として行われました。

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
—脳科学研究のブレイクスルーにより精神・神経疾患創薬への道を拓く—

ポイント

- 快感を引き起こす神経伝達物質ドーパミンの刺激で活性化されるタンパク質を網羅的に解析し、100種類以上の候補をマウスの脳で見つけました。
- 報酬（快感）関連行動を制御する新しいメカニズムとして Rap1 シグナルを発見しました。
- ドーパミンの機能不全が認められる精神・神経疾患の病態解明に繋がることが期待されます。

1. 背景

ドーパミンは運動機能、意欲および快感に関連する行動を担っている神経伝達物質です。脳が興奮すると線条体という脳の特定の場所でドーパミンが大量に放出されます。線条体にはドーパミン D1 受容体 (D1R) を発現する神経細胞 (D1R-細胞) とドーパミン D2 受容体 (D2R) を発現する細胞 (D2R-細胞) の異なる 2 種類の神経細胞が存在します。D1R は、プロテインキナーゼ A (PKA) と呼ばれるリン酸化酵素を活性化し、D2R は逆に PKA を抑制します。PKA は細胞の興奮性や報酬（快感）関連行動に関係していることから、ドーパミンは 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ました。しかし、過去の報告では活性化薬や阻害薬を使用した実験であり、これらの薬物は D1R-細胞と D2R-細胞の両方に作用してしまうために神経細胞の機能を個別に解析することは困難でした。したがって、ドーパミンによる 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ません。世界中の研究者がこの問題に

取り組み、PKA が作用する数種類のタンパク質（基質）を発見していますが、いずれの基質もドーパミンによる神経細胞の興奮性と報酬（快感）関連行動に至るまでのメカニズムを説明することは困難でした。貝淵教授の研究グループは、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（快感）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ました（図 1）。

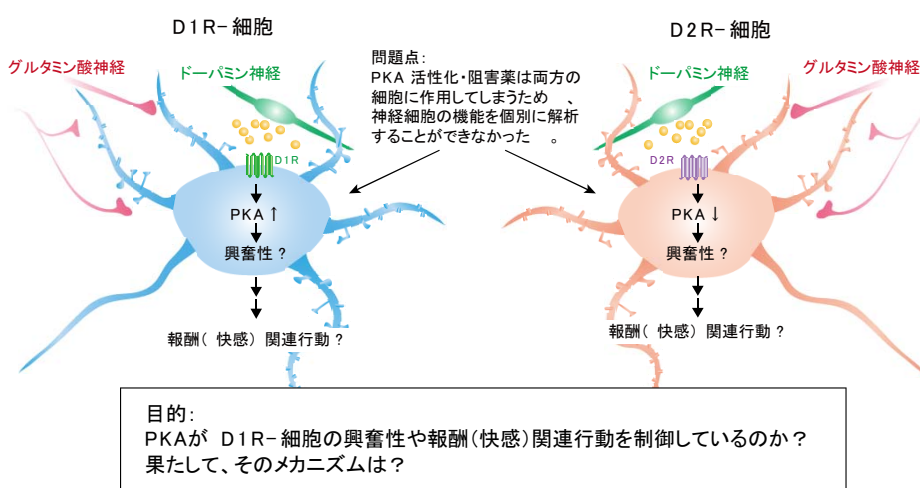


図 1. 本研究の背景

2. 研究成果

1. D1R の下流に存在するプロテインキナーゼ A のリン酸化基質を新たに同定した

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ました。同定した基質のほとんどがドーパミンのシグナルとして報告されていない新規のタンパク質やリン酸化部位でした。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ました。

2. PKA による Rasgrp2 のリン酸化は Rap1 の活性化に必要である

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 Rasgrp2 と Rap1 不活性化因子である Rap1gap がありました。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す。本研究グループは、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 の解析を行いました。その結果、ドーパミンは 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することが分かりました。また、Rasgrp2 のリン酸化は Rap1 の活性化に必要であることも分かりました。さらに、ドーパミンを増加させるコカインを投与したマウスの側坐核（線条体の一部を構成する脳領域）では、D1R-細胞で Rasgrp2 のリン酸化が増加し、Rap1 の活性化も観察されました。

3. Rap1 の活性化は MAPK を介して神経の興奮性と報酬関連行動を制御する

本研究グループは、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普通のマウスと比べて増加することを示しました（図 2）。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普通のマウスよりも減少することを確認しました（図 2）。さらに、Rap1 の下流には MAPK と呼ばれる分子が関係していることも見つけました。以上の結果から、Rap1 シグナルは報酬（快感）シグナルとして機能することを本研究グループは世界で初めて明らかにしまし

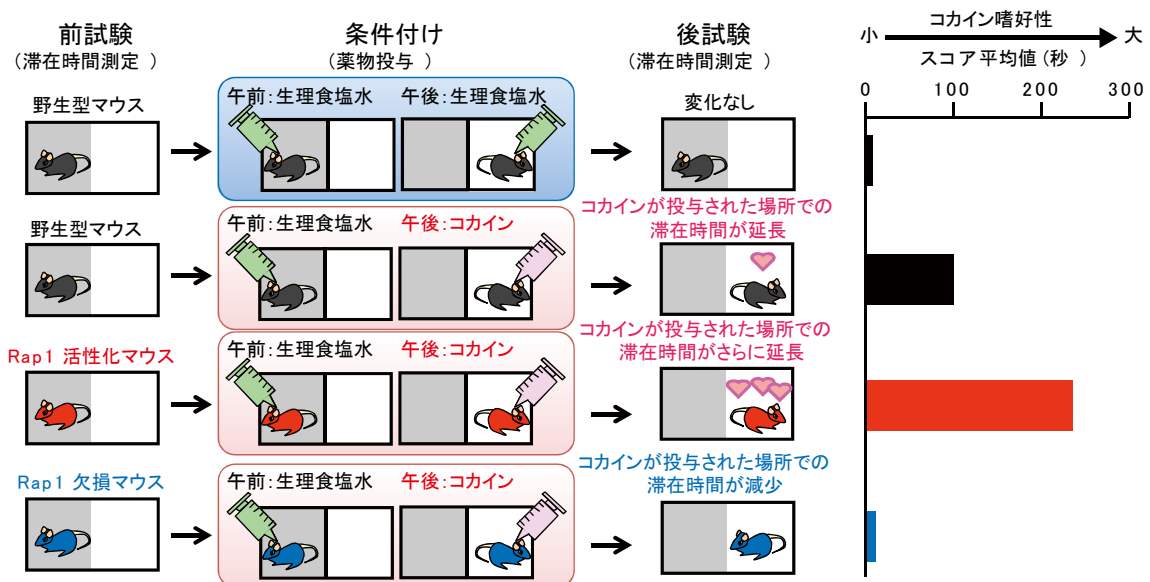


図 2. Rap1 の活性を操作するとコカインの嗜好性を制御できる

た。つまり、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（快感）関連行動は起こりません（図 3A）。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ります。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のです（図 3B）。

3. 今後の展開

本研究によりドーパミンによる D1R-細胞の興奮性と報酬（快感）関連行動の制御については Rap1 シグナルが必要であることが分かりました。線条体には D1R-細胞の他にも D2R-細胞が存在していますが、その興奮性の制御機構は依然として不明です。今後は Rap1 シグナルとの関連性や他のメカニズムが関係しているのかを調べる予定です。さらに、ドーパミンの機能不全は様々な精神・神経疾患で見られます。薬物やギャンブル依存症はドーパミンによる快感を異常に求める

状態です。ドーパミンの過剰状態は統合失調症、注意欠陥・多動性障害および強迫性障害に関係しています。うつ病やパーキンソン病では、ドーパミンの不足状態であることが知られています。今後はこれら精神・神経疾患との関わりについても調べていく予定です。

4. 用語説明

リン酸化とは、タンパク質にリン酸という物質が結合することです（図 4）。生体内化学反応の一つで、細胞の特性を変化させます。また、病気の発症や促進あるいは抑制にも関わっています。リン酸化酵素は、特定のタンパク質にリン酸を結

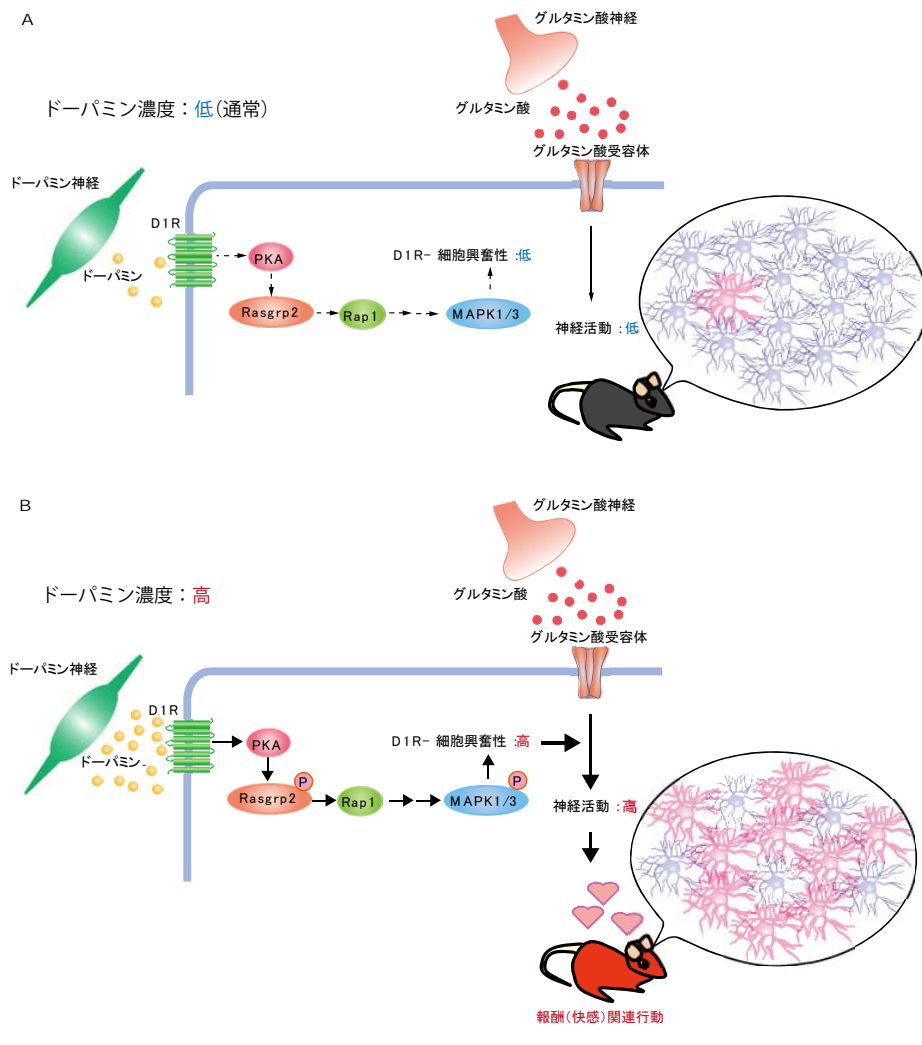


図 3. 本研究の成果

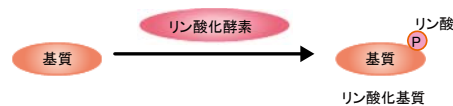


図4. タンパク質のリン酸化反応

合させる酵素のことです。リン酸化基質とは、酵素が特異的に作用してリン酸化反応を起こす物質の総称です。

5. 発表雑誌

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. Phospho-proteomics of the dopamine pathway enables discovery of Rap1 activation as a reward signal *in vivo*. *Neuron*;Jan.21,2016.

English ver.

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps_data/material/nu_medical/en/res/ResearchTopics/2015/Rap1_20160122en.pdf