

46. 思春期モノアミン系発達の分子・細胞生理・行動解析

東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター構造生理学部門 講師 柳下 祥

概要

精神疾患の好発期である「思春期」に着目し、脳機能に重要なモノアミン（ドーパミン・セロトニン）の発達過程を多階層から解明することを目指した実験系を構築した。特に、最新の cAMP 蛍光センサーや近位依存ラベル技術 TurboID により、従来困難であったマウス側坐核における細胞内シグナル動態計測とプロテオミクスが可能となりつつある。まず、側坐核の P50 において cAMP 動態を調べたところ、意外な発見があった。ドーパミン応答は D1 受容体発現細胞と D2 受容体発現細胞で逆になることが知られており、これを確認した。次にセロトニンを投与したところ、同一細胞内であるにもかかわらず「樹状突起では cAMP が上昇（シナプス可塑性の増強）」し、「軸索では cAMP が低下（神経伝達物質の放出抑制）」するという、部位によって相反する作用を世界で初めて確認した。また、特定の細胞局所にも TurboID を発現させる解析システムの構築と、目的タンパク質の精製にも成功している。今後は質量分析を用いて、GPCR（G タンパク質共役受容体）が樹状突起と軸索という極性の違いで逆のシグナル制御を行うという、この全く新しい細胞現象のメカニズムを解明する。さらに、思春期という発達段階において本現象がどのように変化するのか、詳細な調査を進める予定である。

背景および目的

本研究はドーパミンとセロトニンという主要なモノアミン系が、思春期時期に発達する過程を分子・細胞生理・行動の多階層においてマウスを用いて研究することを目的とする。

ドーパミンやセロトニンを含むモノアミンは中脳から全脳に投射し、情動、学習、意欲、意思決定、注意、覚醒といった脳機能を制御している。モノアミンは抗精神病薬や抗うつ薬の主要な標的であることから精神疾患の病態にも関与する。特に精神疾患の好発年齢は思春期以降であることから、思春期のモノアミン発達過程は重要と考えられる。実際、行動発達に着目した研究からは思春期発達過程でモノアミン関連行動が変化することが現象として知られている。しかし、モノアミン思春期発達過程の分子・細胞生理的な基盤は殆どわかっていない。過去のモノアミン作用の分子細胞基盤や神経回路研究は成獣における学習や意欲の研究、または胎生期における神経発生過程における研究が主であった。申請者もこれまでドーパミン一過性動態がシナプス可塑性と学習行動に与える機序を成獣において明らかにし、世界に先駆けて報告してきた(Yagishita et al., Science 2014; Iino et al., Nature 2020)。

近年、モノアミン系を研究する上でいくつかの重要な技術革新があり、従来の遺伝学や薬理学的手法だけでは調べるのが難しかったモノアミン動態やタンパク質の網羅的解析が可能になってきている。まず各モノアミン神経特異的に光感受性オプシンを導入する光遺伝学操作により、モノアミン神経活動のオン・オフ制御ができるようになった。さらには、各モノアミンの放出を GPCR(G-protein coupled receptors)改変センサーにより蛍光検出できるようになり、モノアミン放出の可視化が可能になったインパクトが非常に大きい。ドーパミンおよびセロトニン受容体の多くは Gs または Gi/o 共役型の G タンパク質であるため、モノアミンは投射先の標的細胞内で cAMP シグナルを制御する。この cAMP センサーの開発も近年大きく進展している。申請者は以前よりドーパミンによる細胞内シグナル評価を行ってきたが(Yagishita et al., Science 2014)シグナルは弱く困難な点が多かつ

た。ところが最近共著者として評価に関わったセンサー (Yokoyama et al., Nature Methods, accepted in principle) など格段に高感度になった cAMP 蛍光センサーが開発されてきている。加えて、関連する技術進展として TurboID などの近位依存ラベルにより細胞内の垂区域のプロテオミクスが可能になり、分子的な探索の幅も広がってきた。

そこで本研究ではこれら最近の技術を組み合わせ、これまで探索されてこなかったドーパミンとセロトニンという主要なモノアミン系が思春期時期に発達過程における機能変化を分子・細胞生理・行動の多階層において探索する。

方法

側坐核の cAMP 動態計測

細胞内下流シグナル cAMP の最新の光センサー cAMPing1(Nature Methods 2024)を AAV を用いて側坐核に発現させる。この際、D1, D2 受容体発現細胞を特異的に標識するために最近アレン研究所から報告された特異的なエンハンサーを用いる。具体的には D1-MSN: AiE0779m_3xC2, D2-MSN: AiE0452h の下流に活性を落とした Cre を発現させる。この状態でドーパミンやセロトニンの応答特性を調査する。

軸索終末プロテオミクス

軸索終末に TurboID によりモノアミン神経細胞の軸索終末のプロテオミクスを行う。具体的には軸索への mRNA 運送を促進する 3' UTR と軸索膜移行性のあるタンパク質 Gap43 のドメイン結合により TurboID をモノアミン神経軸索に効率的に発現させる。こののち、ビオチンを腹腔投与して TurboID 周辺 10nm 程度のタンパク質をビオチン化する。脳を取り出し、側坐核の領域を取得する。取得した脳部位に含まれるビオチン化タンパク質をストレプトアビジンにより精製し、質量分析を行う。これにより軸索に含まれるタンパク質の網羅的な解析が可能となる。

この方法により生理的な特性をしえる候補タンパクをリストする。

結果とまとめ

側坐核の cAMP 動態計測

P50 のマウスで側坐核の D1-SPN, D2-SPN に cAMPing を発現させた。この際にエンハンサー Cre を希釈することで、樹状突起や細胞体が同定できる濃度条件を得たまず、この系の確認として cAMP 産生を刺激する Forskolin による刺激を行ったところ、cAMPing 信号の上昇が樹状突起、細胞体、軸索で観察された。なお、組織中における軸索の cAMP 動態の観察はこれが初めてであると考えている。さらにアデニル酸シクラーゼの阻害によりこの信号は低下した。これらにより、cAMPing が動作していることが分かった。

次に D1/D2 enhancer の動作を確認するためにドーパミンを投与した。Gs 共役型のドーパミン受容体を発現する D1 細胞においては cAMPing 信号の上昇が樹状突起、細胞体、軸索で観察された。一方、Gi/o 共役型のドーパミン受容体を発現する D2 細胞では cAMPing 信号の低下が樹状突起、細胞体、軸索で観察された。これらのことからエンハンサーにより確かに2つの細胞種を区別できているものと考えられた。

次にセロトニンを投与した。ドーパミン受容体が D1/D2 細胞ごとに Gs 共役型と Gi/o 共役型が分離しているのに対してセロトニン受容体は Gs 共役型と Gi/o 共役型が同じ細胞に発現していることが RNAseq から知られている。この実効的な意味については全く不明であった。そこでセロトニンを投与したところ、驚いたことに樹状突起では cAMP の上昇、軸索では cAMP の減少が見られた。このように細胞内の局在ごとにセロトニンの作用が逆になるという新しい現象を見出した。これらの変化は Gs 共役型と Gi/o 共役型それぞれの阻害薬で抑制され

た。GPCR が神経細胞の樹状突起と軸索という極性により作用が違うということは知られておらず、重要な発見であると考えている。

このセロトニン上昇や低下に生理的な意味があるかを確認したところ、樹状突起における cAMP 上昇はシナプス可塑性増強に、軸索における cAMP 低下は軸索放出の抑制に作用していたと考えらる予備データを得た。今後データを追加していく。

プロテオミクス

軸索に TurboID を発現する系を構築した。3' UTR と軸索膜移行性のあるタンパク質 Gap43 のドメイン結合により TurboID をモノアミン神経軸索に効率的に発現させる方法に加えて、予備として LCK による膜ドメイン移行の系も構築した。さらに上記のように樹状突起と軸索の作用の違いをみるために樹状突起・細胞内への移行シグナルを付加した TurboID の構築を試みた。PSD95 があまり局在がきれいにみられなかったが、Homer1 との融合によりシナプス・樹状突起局在が見られた。

この状態でビオチン化することで、ビオチン化タンパクを western blot により検出できた。そこでアビジン・ビーズを用いることでビオチン化タンパクを精製した。現在、質量分析に向けた準備中である。

まとめ

以上より cAMP 動態の観察により新規の GPCR により制御される cAMP 動態の細胞現象が見つかった。この細胞現象の機序解明のために近接依存性プロテオミクスを用いる手法の構築が完了し、標的タンパクの同定へと進めている。今後、この細胞現象の発達期依存的な特性について調査を進めていく。

(完)

発表論文

- 1) M Tajiri, H Omi, A Inoue, H Etani, T Sawada, Y Iino, S Yagishita
Microglia regulate developmental transitions in synaptic plasticity rules in the medial prefrontal cortex
bioRxiv, 2025.06. 16.659241 (Science Advances in revision)
- 2) Sazhina T, Tsurugizawa T, Mochizuki Y, Saito A, Joji-Nishino A, Ouchi K, Yagishita S, *Emoto K, *Uematsu A:
Time- and sex-dependent effects of juvenile social isolation on mouse brain morphology. NeuroImage. 2025,
310:121117
- 3) Kawamura A, Fujii K, Tamada K, Abe Y, Nitahara K, Iwasaki T, Yagishita S, Tanaka KF, Takumi T, Takao K,
*Nishiyama M. Duplication of the autism-related gene Chd8 leads to behavioral hyperactivity and
neurodevelopmental defects in mice. Nat Commun. 2025, 16(1):4641
- 4) Morishima R, Usami S, Kanehara A, Okada N, Noguchi H, Yagishita S, Fukuda M, *Kasai K. Classroom-Level
and Individual-Level Prosociality and Help-Seeking Behaviors Among Adolescents. JAMA Netw Open. 2025,
8:e2510319
- 5) Tada M, Yagishita S, Uka T, Nishimura R, Kishigami T, Kirihara K, Koshiyama D, Usui K, Fujioka M, Araki T,
Kasai K: From the laboratory to the real-world: the role of mismatch negativity in psychosis. Clin EEG
Neurosci. 2025, 56:60-71.