

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18590216
 研究課題名（和文） 受容体エンドサイトーシス関連蛋白質 CIN85 の機能欠失による行動量変化の解析
 研究課題名（英文） Analysis of behavioral quantity by the loss of function of CIN85 related to receptor endocytosis
 研究代表者
 下川 哲昭（SHIMOKAWA NORIAKI）
 群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：90235680

研究成果の概要：CIN85 ノックアウト(KO)マウスの「多動」の原因としてドーパミン及びその受容体の量的、質的变化に焦点をあてて解析した。電気化学検出器（本科研費にて購入）を備えた高速液体クロマトグラフィーで KO マウスの線条体ドーパミン含量を測定した結果、KO マウスでは野生型に比べて線条体ドーパミン含量が 170%高値であった。さらに線条体初代培養細胞においてドーパミン刺激後、膜表面に存在するドーパミン受容体は野生型由来で約 25%、KO マウスでは 70%であった。このエンドサイトーシスの異常がドーパミン刺激の過剰を招き「多動」を誘発している原因の一つと考えられる。本研究から「多動」という行動異常の原因の一つが受容体の膜輸送を司る複合体の分子欠損によることが明らかになった。これは受容体によるシグナルの調節が受容体単一ではなく、多様な膜蛋白質の複合体形成によってもたらされている事を示している点で意義ある成果と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：CIN85、ドーパミン受容体、多動性、エンドサイトーシス、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上に存在する受容体はリガンドと結合した後、その情報を細胞内に伝える。情報伝達を終えた受容体は、細胞膜上から細胞内に引きずり込まれ（インターナライゼーション）、エンドゾームを経てリソゾームでの分解やリサイクル過程に選別される。この機構は過剰な情報の暴露から細胞機能を守る情報伝達のダウンレギュレーションとして極めて重要

な仕組みである。この一連の受容体の細胞膜を介した輸送は様々な分子と機構が複雑かつ精巧に関わっている。本申請者の下川らは、上皮増殖因子 (epidermal growth factor; EGF) の刺激後、上皮増殖因子受容体 (EGF receptor) が細胞膜上から細胞内へと取り込まれ分解に至る機構に、CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa) が関与している新しいメカニズムを報告した。

CIN85は受容体のエンドサイトーシスを制御することで情報伝達を調節する蛋白質であることを明らかにした (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002)。さらにこの機構の個体における意義を明らかにする目的で、CIN85欠損動物の作製に着手し、CIN85ノックアウトマウスの作製に成功した。このノックアウトマウスは行動学的解析(総移動量、移動速度、回転数、新規環境探索頻度等)のほぼ全ての項目において、野生型に比べて明らかな行動量の上昇を示し、表現型が「多動」であると認められた。

2. 研究の目的

「多動」の原因として様々な脳内生理活性アミンの関与が報告されている。特にドーパミンの伝達系の量的、質的变化が挙げられる。CIN85はドーパミン受容体の膜輸送に関与するダイナミンと結合することやドーパミン-黒質線条体系は運動の協調や開始に関係し、この系の変性はパーキンソン病を引き起こすことなどから、CIN85が脳内ドーパミン系を介して「多動」の形質発現に抑制的に関与していると考えている。

本研究は、ドーパミン受容体のエンドサイトーシスの抑制を原因とする「多動」のメカニズムと「多動」におけるCIN85の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

CIN85ノックアウトマウス(CIN85^{-/-})とドーパミン伝達系の解析

(1) ノックアウトマウスの解析

CIN85遺伝子欠損マウスの生理的・病理的特性の詳細を明らかにする。

① 個体の発育の程度、骨格・臓器の異常、内分泌学的所見、生殖能力の優劣等を解析する。

② CIN85ノックアウトマウスはCIN85遺伝子のプロモーターの下流にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子が導入されている。この活性を指標として胚発生から成体までのCIN85遺伝子発現を解析する。

(2) 脳内ドーパミン伝達系を中心とした生理活性アミン動態の解析

ドーパミン神経の約75%は、黒質に存在し線条体に投射されている。この黒質-線条体系のドーパミン神経は運動機能に深く関わっている。また、中脳の腹側被蓋野から辺縁系及び前頭皮質に投射するドーパミン神経は、動機づけ行動に関与している。これらの知見から、CIN85ノックアウトマウスにおけ

る脳内ドーパミン及びドーパミン受容体、トランスポーターの動態解析を行う。受容体のエンドサイトーシス及び分解が正常に機能しているか否かを検討することで、「多動」との関連を解析する。

①: 脳内生理活性アミンの測定

[I] CIN85ノックアウトマウスと野生型マウスからそれぞれ、線条体、辺縁系及び前頭皮質をマウス脳アトラスを参考にして摘出する。

[II] ホモゲナイズ後、蛋白質を除き、モノアミンおよびそれらの代謝物を抽出する。

[III] 電気化学検出器を備えた高圧液体クロマトグラフィーでドーパミンをはじめ、セロトニン、エピネフリン、ノルエピネフリン等の脳内モノアミンおよびそれらの代謝物を測定する。(設備備品として申請した電気化学検出器を用いて解析する)

②: ドーパミン受容体の解析 1-ドーパミン受容体の発現とリガンドとの結合に関する解析

[I] CIN85ノックアウトマウスと野生型マウスからそれぞれ、脳切片を作製する。

[II] ドーパミン受容体抗体を使って免疫組織化学的手法によりドーパミン受容体の分布と存在の差を検討する。

[III] [³H]-スペピロン([³H]-spiperone)はドーパミン受容体(D2受容体)のアンタゴニストとしてD2受容体と特異的に結合することが知られている。この放射性リガンドと脳切片を反応させ、得られたオートラジオグラムからリガンドとの結合量を解析する。

③: ドーパミン受容体の解析 2-ドーパミン受容体の機能と分解に関する解析

[I] CIN85ノックアウトマウスおよび野生型マウスの黒質緻密部の神経細胞を培養する。

[II] この培養細胞をドーパミンで刺激後、細胞膜と細胞質に分離する。

[III] それぞれのフラクションに存在するドーパミン受容体を測定し、インターナリゼーション及び分解能を解析することでCIN85の機能を評価する。

4. 研究成果

(1) 平成18年度

CIN85ノックアウトマウスの作成と

解析結果

- ① CIN85 ノックアウトマウスは行動学的解析のほぼ全ての項目において、野生型に比べて有意な行動量の上昇を示し表現型が「多動」であると認められた。その傍証としてこのマウスはエネルギー摂取量が高いにもかかわらず、赤身の割合が高く体脂肪率は低下していた。またノックアウトマウスでは野生型に比べて線条体ドーパミン含量が170%高値であった。
- ② CIN85 はマウス脳において海馬と扁桃体に強く発現していたので、それぞれ記憶・学習能力の解析のために Social discrimination test と Object recognition test を、恐怖に対する記憶能力の解析のために Fear-potentiated startle test を行った。Social discrimination test, Object recognition test では KO と WT との間で有意な差は見られなかったが、Fear-potentiated startle test では KO は WT に比べて恐怖に対する記憶を有意(約3倍)に保持していることがわかった。

(2) 平成19年度

受容体膜輸送における CIN85 の分子メカニズムの解析

- ① ドーパミン作動性システムにおける CIN85 の役割を明らかにする目的でドーパミン受容体の挙動を調べた。線条体初代培養細胞においてドーパミン刺激後、膜表面に存在するドーパミン受容体は WT 由来で約25%、KO では70%であった。これは CIN85 KO マウスの線条体におけるドーパミン受容体はドーパミン刺激でエンドサイトーシスされにくいことを意味する。このエンドサイトーシスの異常がドーパミン刺激の過剰を招き「多動」を誘発している原因の一つと考えられる。さらに1)CIN85 はドーパミン受容体の膜輸送に関与するダイナミンと結合する、2)CIN85 は膜蛋白質の Scaffold protein である PSD-95 と結合する、等の結果を得た。
- ② 神経細胞における CIN85 は Dendritic spine で PSD-95 と共存

していることを明らかにした。さらに、CIN85 は X 連鎖精神疾患遺伝子である Oligophrenin-1 と共存していることを見いだした。CIN85 は X 連鎖精神疾患や、Dendritic spine の形成に関与している可能性が強く示唆された。

(3) 平成20年度

- ① CIN85 ノックアウトマウスと野生型マウスの線条体初代培養においてドーパミン刺激後、細胞膜表面に存在する2型ドーパミン受容体を同定した。ドーパミン受容体の細胞内へのインターナリゼーションは野生型に比べノックアウトマウスでは有意に減少していた。しかし1型ドーパミン受容体のインターナリゼーションは野生型と比べて変化はなかった。CIN85の機能は2型ドーパミン受容体に特異的であることが分かった。
- ② CIN85はSynaptosomeでエンドサイトーシスに関する制御タンパク質である Endophilin と結合している。CIN85の欠損によりEndophilinがリクルートされずドーパミン受容体の細胞内へのインターナリゼーションが減少することが明らかになった。
- ③ トリチウム標識したドーパミン受容体アンタゴニストである [³H]Spiperone を用いた解析においてもドーパミン受容体の細胞内へのインターナリゼーションは野生型に比べCIN85 ノックアウトマウスでは有意に減少していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計20件)

1. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, Koibuchi N. Increase in Cerebellar Neurotrophin-3 and Oxidative Stress Markers in Autism. *Cerebellum*, in press, 2009. 査読有.
2. Rokutanda N, Iwasaki T, Odawara H, Nagaoka R, Miyazaki W, Takeshita A, Koibuchi Y, Horiguchi J, Shimokawa N, Iino Y, Morishita Y, Koibuchi N. Augmentation of estrogen receptor-mediated transcription by steroid and xenobiotic receptor. *Endocrine*, in press, 2008. 査読有.
3. Miyazaki W, Iwasaki T, Takeshita A,

- Tohyama C, Koibuchi N. Identification of the functional domain of thyroid hormone receptor responsible for polychlorinated biphenyl-mediated suppression of its action in vitro. *Environ Health Perspect.* 116, 1231-1236, 2008. 査読有.
4. Seki T, Shimokawa N, Iizuka H, Takagishi K, Koibuchi N. Abnormalities of vertebral formation and *Hox* expression in congenital kyphoscoliotic rat. *Mol. Cell. Biochem.* 312, 193-199, 2008. 査読有.
 5. Koibuchi N, Qiu CH, Miyazaki W, Iwasaki T, Shimokawa N. The role of thyroid hormone in developing cerebellum. *Cerebellum* 7, 499-500, 2008. 査読有.
 6. Mahani SE, Shimokawa N, Javan M, Maghsodi N, Motamedi F, Koibuchi N, Ahmadiani A. Low-dose morphine induces hyperalgesia through activation of *Gαs*, protein kinase C and L-type Ca^{2+} channels in rats. *J. Neurosci. Res.* 86, 471-479, 2008. 査読有.
 7. Qiu CH, Shimokawa N, Iwasaki T, Parhar IS, Koibuchi N. ROR α mutation in *Staggerer* mouse induces alteration of mRNA levels of neurotrophin family in developing cerebellum. *Endocrinology* 148, 1745-1753, 2007. 査読有.
 8. Shimokawa N, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. Low dose hydroxylated PCB induces c-Jun expression in PC12 cells. *Neurotoxicology* 27, 176-183, 2006. 査読有.
 9. Sugama S, Wang N, Shimokawa N, Koibuchi N, Fujita M, Hashimoto M, Dhabhar FS, Conti B. The adrenal gland is a source of stress-induced circulating IL-18. *J. Neuroimmunol.* 172, 59-65, 2006. 査読有.
 10. Nagaoka R, Iwasaki T, Rokutanda N, Takeshita A, Koibuchi Y, Horiguchi J, Shimokawa N, Iino Y, Morishita Y, *Koibuchi N. Tamoxifen activates *CYP3A4* and *MDR-1* genes though steroid and xenobiotic receptor in breast cancer cells. *Endocrine* 30, 261-268. 2006. 査読有.

[学会発表] (計 38 件)

1. Koibuchi N, Qiu C.H., Miyazaki W., Shimokawa N, Iwasaki T. Crosstalk between thyroid hormone receptor and retinoid receptor-related orphan receptor (ROR) α , and its modulation by

polychlorinated biphenyl. 36th Annual Meeting, Society for Neuroscience. October 14-18, 2006, Atlanta, GA, USA

[図書] (計 9 件)

1. 下川哲昭 生殖機能 In: 集中講義「生理学」(岡田隆夫編) メジカルビュー社, pp. 276-289, 2008
2. 鯉淵典之 内分泌生理症例問題 他 In: 症例問題から学ぶ生理学(鯉淵典之編) 丸善, 369, 2006

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 哲昭 (SHIMOKAWA NORIAKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90235680

(2) 研究分担者

鯉淵 典之 (KOIBUCHI NORIYUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80234681