

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02580

研究課題名(和文)ドーパミン神経伝達機構とそれに関わるトランスポーター分子の解析

研究課題名(英文)Roles of L-DOPA as a neurotransmitter and L-DOPA reuptake systems involved

研究代表者

五嶋 良郎 (GOSHIMA, Yoshio)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00153750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体内活性物質を見出し、その役割を明らかにすることは重要な課題の一つである。私たちは、神経伝達物質ドーパミンの前駆体であるL-ドーパが、それ自体で生理活性を持ち、伝達物質としての役割を持つことを支持する知見を集積してきた。本研究で、以下の知見を得た。1) L-ドーパの細胞内への再取り込みに関わる分子の候補として、Slc7A9とSlc3A1が脳内で発現しており、これらがL-ドーパの取り込みに関わる可能性があること。2) L-ドーパ受容体GPR143が、ドーパミンの作用を調節する機能を持つこと。3) GPR143が、パーキンソン病の患者剖検脳に発現し、その病態に関わるレビー小体に集積すること等である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病の特効薬であるL-ドーパは、それ自体では活性がなく、その薬効は、生体内でドーパミンに変換して生ずると考えられている。私たちは、それに加えて、L-ドーパ自体にもドーパミンとは異なる作用があることを示してきた。私たちはこの研究で、L-ドーパを細胞内に取り込む作用を持つトランスポーター候補分子が存在すること、L-ドーパ受容体であるGPR143がドーパミンの作用に関与すること、L-ドーパとGPR143がパーキンソン病の病態に関わる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the roles of neurotransmitters is one of the most important studies in the field of life sciences and medicine. We propose that L-DOPA, a precursor of dopamine, by itself could act as a neurotransmitter in the central and peripheral nervous system. In this study, we obtained the following results: 1) We found that solute carrier (Slc) proteins, Slc7A9 and Slc3A1 were both expressed in the brain including substantia nigra, striatum, cortex, hypothalamus and other brain areas. 2) In Gpr143 gene-deficient mice, acute and chronic effect of nicotine were attenuated. 3) GPR143-positive immunoreactivities were localized in Lewy body in Parkinson's disease (PD). These findings further suggest the role of L-DOPA as a neurotransmitter, and L-DOPA and its receptor GPR143 might be involved in the pathogenesis of PD.

研究分野：薬理学

キーワード：L-ドーパ 受容体 GPR143 トランスポーター ドーパミン作動性神経伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は 1986 年以来、従来は神経伝達物質ドパミンの前駆体に過ぎないとされてきた L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA、ドーパ)が、神経伝達物質のように神経刺激により遊離され、ドパミンへの変換を介さずにそれ自体で応答を惹起することを見出し、ドーパ神経伝達物質仮説として提起した。ドーパ受容体は長らく未同定であったが、ヒト眼白子症の遺伝学的解析から同定された G 蛋白質連関型受容体 (GPCR)、OA1 (ocular albinism-1)/GPR143 がドーパ受容体として生体内で機能することを発見した。

2. 研究の目的

本研究では、ドーパ神経伝達物質仮説検証の最終段階として、(1) ドーパ含有小胞の存在を証明すること、(2) ドーパの再取込に関わる小胞性ならびに細胞膜トランスポーターを同定すること、(3) GPR143 がどのような分子間相互作用を介してシグナル伝達を担うかを明らかにすること、(4) パーキンソン病 (PD) との関連性を検討する事であった。

3. 研究の方法

(1) ドーパの再取込に関わる小胞性ならびに細胞膜トランスポーターの解析：①上記の解析を行うための予備的検討として、L-ドーパに対するモノクローナル抗体の取得を行った。L-ドーパにキーホールリンペットヘモシアニン (Keyhole limpet hemocyanin, KLH) を定法に従って結合させ、抗原として用いる L-ドーパ-KLH を作製した。マウス 5 匹に抗原を接種し、一定帰還後に血清抗体価を評価し、抗体価の上昇が認められた 3 匹のマウスから B 細胞を調整し、ミエロマ細胞と融合させ、抗体陽性を示すクローン株を単離した。この抗体産生株をマウスに移植し、これらのマウスから腹水を採取した。これらの検体について、ドットブロット法、及び免疫組織化学的解析を行った。②細胞膜 L-ドーパトランスポーターの解析：我々は、ウサギ小腸、ラット脳切片において、Na⁺-依存性のドーパ取込活性を検出した。アフリカツメガエル卵母細胞における小腸由来の取り込み活性は、rBAT(Slc3A1)のアンチセンス cRNA により顕著に抑制された。また、Camargo ら (J Pharmacol Exp Ther, 351, 114, 2014) は、Slc3A1 と Slc7A9 が L-ドーパ取り込み活性を示すことを報告した。これらの知見を踏まえ、中性大型アミノ酸輸送の関わる可能性のあるドーパトランスポーターの候補分子を、Slc3A1 と相互作用を示す分子の一つである Slc7A9 に絞り、脳内でこれら二つのトランスポーター分子を発現する細胞が存在するか否かを RT-PCR 法及び免疫組織化学的方法により解析した。

(2) GPR143 局在の解析：すでに抗 GPR143 抗体を用いた免疫組織化学的解析により、GPR143 の発現部位を明らかにした。本研究では、GPR143 のリボプローブを作製し、GPR143 mRNA の

検出を試みた。また L-ドーパを産生し含有すると考えられるチロシン水酸化酵素(TH)陽性細胞・線維の局在性と GPR143 mRNA 陽性細胞との局在関係を解析した。

(3) GPR143 シグナル伝達機構の解析：①GPR143 と他の GPCRs との相互作用：我々はすでに、GPR143 と α_1 アドレナリン受容体 (α_1 AR) との相互作用がドーパ存在下に増強すること、ドーパは GPR143 を介して α_1 AR を介する細胞応答を増強することを見出した。本研究では、さらに GPR143 と α_1 AR との相互作用部位を絞り込むことを目指した。そのため、GPR143 と類似の構造と細胞内局在を示す GPR37 との間で様々なキメラ受容体を作成し、 α_1 AR との相互作用部位を特定することを試みた。さらに、配列情報を参考に、DA 受容体 D₁、D₂ 等との相互作用の有無を検討した。また、PC12 細胞における GPR143 シグナルの解析を行った。②Gpr143 遺伝子欠損マウス(GPR143-KO)マウスの薬物応答性の解析：ラットにおけるニコチンの行動に対する効果の発現に内在性ドーパが関わることを報告した。また、ドーパの薬効と DA 受容体との機能関連の有無を検討するため、野生型、並び GPR143-KO マウスに、D₁ 作動薬 (SKF81297) 及び D₂ 受容体作動薬 (クインピロール)を投与し、行動、その他を指標として各効果を比較・検討した。

(4) パーキンソン病 (PD) との関連性の有無：GPR143 と PD における L-ドーパ療法並びに PD の病態との関連性を検討するため、特異的ヒト GPR143 抗体を作製し、PD 脳検体と正常組織における GPR143 陽性シグナルを比較・検討した。

4. 研究成果

(1) ドーパの再取込に関わる小胞性ならびに細胞膜トランスポーターの解析

ドットブロット法解析を行った (図 1)。このうち、9F と名付けたクローン株について、L-ドーパに対する特異的な陽性シグナルを検出することができた。これを用いて、免疫組織化学的解析を行ったところ、TH 陽性細胞と、ほぼ一致する陽性染色像を得ることができた (図 2)。

図1 ドットブロットによるL-ドーパ抗体の特異性の検討

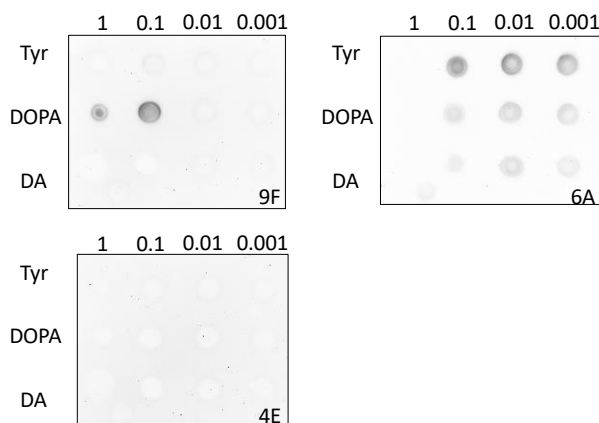
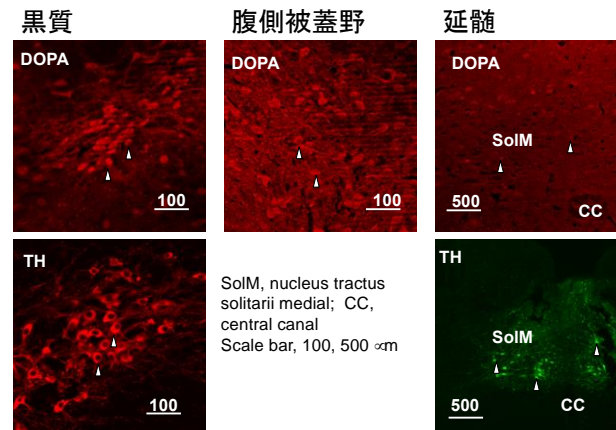


図2 抗L-ドーパ抗体とTH抗体による免疫染色



今後、この抗体の特異性を組織レベルで確認すると共に、免疫電顕による解析を試みる。また、細胞膜ドーパトランスポーター候補である Slc7A9・Slc3A1 複合体が形成される可能性のある組織・細胞局在を検討する最初の取り組みとして、これらの分子が、脳内に存在するかどうか、どのような発現分布を示すかを RT-PCR 及び免疫組織化学的に解析した。その結果、いずれも脳内に発現することを見出した。Slc7A9 が脳内に発現することは報告がなく、本研究が初めての知見となる。Slc7A9 及び Slc3A1 はいずれも免疫組織化学的解析においても、脳内に広く分布しており、特に GPR143 の mRNA や免疫陽性シグナルが認められる線条体、側坐核、海馬などの脳領域において、ほぼ同様な形態を示す細胞に発現していた。これらの結果は、この二つの分子が同一の細胞において共発現することを示唆する。

(2) GPR143 局在の解析：本研究でデザインした GPR143 のリボプローブにより、センスプローブで陰性、アンチセンスプローブで明確な陽性像を得ることに成功した。また、これらのシグナルの脳内分布は概ね GPR143 抗体陽性シグナルと一致した。今回、検出に用いたリボプローブの濃度は、グルタミン酸受容体、ドパミン受容体などの検出に必要な量に比べて数十倍高いものであり、この事は、GPR143 の発現量が他の GPCRs に比べ、相対的に低いものであることを示唆する。

(3) GPR143 シグナル伝達機構の解析：GPR143-GPR37 キメラ体を利用し、GPR143 と α_1 AR との相互作用部位を見出した（未発表データ）。また、ドパミン受容体をはじめとする他 GPCRs についても相互作用の有無を解析しつつある。一方、GPR143 を PC12 細胞株に強制発現したところ、神経突起伸長が著しく抑制された。この抑制効果は、ドーパ拮抗薬の L-ドーパシクロヘキシルエステル(DOPA CHE)によって抑制された。さらに、すでにヒト遺伝子解析で明らかとなってい

る複数の GPR143 変異体で、同様な活性が現れるかどうかを解析したところ、変異体では野生型 GPR143 に見られた突起伸長抑制効果は認められなかった。さらに、三量体 G タンパク質 G α 13 の siRNA ノックダウンは、GPR143 の伸長抑制効果を抑制した。これらの結果は、GPR143 のシグナル伝達が突起抑制経路に関わること、この過程に G α 13 が関与することを示唆する。一方、GPR143-KO と野生型マウスの薬物応答の相違の有無を解析した。その結果、GPR143-KO マウスにおいて、ニコチンの急性及び慢性効果の双方が、野生型に比して、その効果が減弱することを見出した。また、ヒトゲノムワイド関連解析により、GPR143 遺伝子多型 (rs6640499) が、男性の喫煙行動 (喫煙期間、本数など) と有意に相関することが明らかとなった。

(4) パーキンソン病 (PD) との関連性の有無：ヒト GPR143 を認識する抗 GPR143 抗体を作製し、PD 剖検脳における免疫組織化学的解析を行った。その結果、GPR143 陽性シグナルが、PD 脳組織の特徴的な病理学的形態像の一つであるレビー小体に局在すること、リン酸化 α -シヌクレイン (S129) 陽性シグナルがハロー (halo) のように GPR143 陽性シグナルを取り囲む染色像が得られた。

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 3件）

1. 著者名 Masukawa Daiki, Nishizawa Daisuke, Kanai Kaori, Kitamura Satoshi, Kasahara Yuka, Hashimoto Tatsuo, Takahagi Ryo, Hasegawa Junko, Nakayama Kyoko, Sato Naomi, Tanioka Fumihiko, Sugimura Haruhiko, Ikeda Kazutaka, Goshima Yoshio	4. 巻 144
2. 論文標題 Genetic associations of single nucleotide polymorphisms in the l-DOPA receptor (GPR143) gene with severity of nicotine dependence in Japanese individuals, and attenuation of nicotine reinforcement in Gpr143 gene-deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 89～93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.07.003	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 Kasahara Yuka, Masukawa Daiki, Nakamura Yoshie, Murata Koshi, Hashimoto Tatsuo, Takizawa Kohtaro, Koga Motokazu, Nakamura Fumio, Fukazawa Yugo, Funakoshi Kengo, Goshima Yoshio	4. 巻 -
2. 論文標題 Distribution of mRNA for GPR143, a receptor of 3,4-L-dihydroxyphenylalanine, and of immunoreactivities for nicotinic acetylcholine receptors in the nigrostriatal and mesolimbic regions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masukawa Daiki, Yamada Kaisei, Goshima Yoshio	4. 巻 141
2. 論文標題 Overexpression of the gene product of ocular albinism 1 (GPR143/OA1) but not its mutant forms inhibits neurite outgrowth in PC12 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 41～48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2019.09.002	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 Goshima Yoshio, Watanabe Shuya, Seki Erika, Koga Motokazu, Masukawa Daiki, Nakamura Fumio, Komori Takashi, Arai Nobutaka	4. 巻 148
2. 論文標題 Immunoreactivity of a G protein-coupled l-DOPA receptor GPR143, in Lewy bodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 49 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goshima Yoshio, Masukawa Daiki, Kasahara Yuka, Hashimoto Tatsuo, Aladeokin Aderemi Caleb	4. 巻 10
2. 論文標題 l-DOPA and Its Receptor GPR143: Implications for Pathogenesis and Therapy in Parkinson's Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1119 ~ 1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2019.01119	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 増川太輝, 五嶋良郎	4. 巻 36
2. 論文標題 分子から迫る神経薬理学 ドーパ神経伝達物質仮説: ドーパ受容体は存在するか?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 878 ~ 879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 増川太輝, 五嶋良郎	4. 巻 36
2. 論文標題 分子から迫る神経薬理学 ドーパ受容体の生理学および薬理学的作用.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1004 ~ 1005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 増川太輝, 五嶋良郎	4. 巻 36
2. 論文標題 分子から迫る神経薬理学 ドーパ受容体候補分子からみるドーパ療法の応用および問題点.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1130 ~ 1132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 増川太輝、五嶋良郎 他
2. 発表標題 ニコチンの効果における GPR143の関与および喫煙患者におけるGPR143 の一塩基多型解析
3. 学会等名 第43回神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笠原由佳、五嶋良郎
2. 発表標題 発達期海馬神経新生におけるL-ドーパ受容体GPR143の関与
3. 学会等名 第43回神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増川太輝、五嶋良郎
2. 発表標題 Functional analysis of GPR143, an L-DOPA receptor, in GPCRs hetero-oligomers
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五嶋良郎
2. 発表標題 L-DOPAの存在、遊離と作用
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masukawa D, Nakao Y, Muneto H, Kim R, Bito H, Goshima Y
2. 発表標題 An optogenetic approach for functional analysis of L-DOPAergic neurotransmission in the nucleus tractus solitarii.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増川太輝, 西澤大輔, 笠原由佳, 北村慧, 金井香央里, 池田和隆, 五嶋良郎
2. 発表標題 ドーパ受容体 GPR143 遺伝子欠損マウスにおけるニコチンの効果 および喫煙患者における GPR143 の一塩基多型解析.
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakano M, Hashimoto T, Koga M, Masukawa D, Oku S, Mizuno Y, Goto T, Tamura K, Goshima Y
2. 発表標題 GPR143, a L-DOPA receptor, is involved in monocrotaline-induced pulmonary hypertension
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shibata R, Kasahara Y, Goshima Y
2. 発表標題 Involvement of GPR143 in the hippocampal pathophysiological alteration after limb
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goshima Y, Masukawa D, Koga M, Hashimoto T
2. 発表標題 The role of L-DOPA as a neurotransmitter.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashimoto T, Hamaguchi S, Masukawa D, Koga M, Nakano M, Tanaka H, Tamura K, Goshima Y
2. 発表標題 L-DOPA cyclohexyl ester, an L-DOPA antagonist, protects neurostimulated contractile response in mice heart.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takizawa K, Koga M, Masukawa D, Nakamura F, Goshima Y
2. 発表標題 Immunoreactive signals of GPR143 in the tegmental area, substantia nigra and their trajectories. Immunoreactive signals of GPR143 in the tegmental area, substantia nigra and their trajectories.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masukawa D, Nakao Y, Goshima Y
2. 発表標題 Tyrosine hydroxylase and/or rBAT positive neuron in primary afferent innervates in the nucleus tractus solitarii.
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五嶋良郎, 増川太輝, 古賀資和, 橋本達夫, 小倉頭一
2. 発表標題 ドーパ受容体候補分子の同定とニコチン作用における役割.
3. 学会等名 公益財団法人喫煙科学研究財団・第33回平成29年度助成研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masukawa D, Nakao Y, Goshima Y
2. 発表標題 The localization and innervation of rBAT and tyrosine hydroxylase positive neuron in the nucleus tractus solitarii.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧澤光太郎, 古賀資和, 増川太輝, 中村史雄, 五嶋良郎
2. 発表標題 L-DOPA受容体候補分子GPR143の中脳ドーパミン神経核及びその投射野における分布.
3. 学会等名 第139回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増川太輝, 中尾友香, 宗藤大樹, 金亮, 尾藤晴彦, 五嶋良郎
2. 発表標題 延髄孤束核におけるL-DOPA神経伝達機構の解明.
3. 学会等名 第139回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五嶋良郎
2. 発表標題 ADRA1を介した血圧の昼夜変動の新たな制御機構 - L-ドーパは交感神経応答を制御する -
3. 学会等名 第54回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hashimoto T, Nakano M, Suzuki S, Yamada T, Masukawa D, Koga M, Ito R, Haruhara K, Wakui H, Tamura K, Goshima Y
2. 発表標題 GPR143, an L-DOPA receptor, may help control inflammation in adenine-induced chronic kidney disease.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masukawa M, Nakao Y, Muneto H, Kim R, Bito H, Goshima Y
2. 発表標題 An optogenetic approach to identify L-DOPA as a neurotransmitter in the nucleus tractus solitarii.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学分子薬理神経生物学教室ホームページ
www-user.yokohama-cu.ac.jp/~pharmac

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
研究分担者	増川 大輝 (Masukawa Daiiki) (10711898)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	
研究分担者	小池 正人 (Koike Masato) (80347210)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (32620)	
研究分担者	新井 信隆 (Arai Nobutaka) (10167984)	公益財団法人東京都医学総合研究所・病院等連携研究センター・参事研究員 (82609)	

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