

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300132

研究課題名 (和文) 新規ドーパリガンドの構造決定とドーパ応答の電気生理学的解析

研究課題名 (英文) Identification of novel DOPA ligands and electrophysiological analysis of DOPA-induced response

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

研究成果の概要 (和文)：ドーパは中枢神経系における新しい神経伝達物質候補である。その特異的受容体の実体を明らかとするため、選択的なりガンドを見出すことは重要なアプローチの一つである。本研究実績は、ドーパリガンド溶液中に新規な活性画分を見出した事、脳スライス NTS におけるドーパ応答を捉える新しいアッセイ系、Multiple electrode array system (MED64) において、NTS 領域においてドーパの二相性作用を捉えることに成功した。本研究途上、新たにドーパ受容体候補分子を見出した。

研究成果の概要 (英文)：DOPA is a novel neurotransmitter candidate in the central nervous system. In an attempt to identify a specific receptor(s) for DOPA, we have searched for selective and stable DOPA ligands. We found a positive fraction in L-threo-dihydroxyphenylserine-containing solution to induce depressor and bradycardic response when microinjected into the nucleus tractus solitarii (NTS) of anesthetized rats. In multiple electrode array system, we also found biphasic response to DOPA in NTS area of rat brain stem slices. While conducting this project, we newly identified a receptor candidate for DOPA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学／神経薬理学

キーワード：神経伝達物質、受容体、自律神経系、ドーパ、電気生理学

1. 研究開始当初の背景

生体内活性物質の同定とその受容体分子の実体解明は薬理学における最重要課題の一つである。ドーパは従来ドパミンの前駆体として位置付けられ、それ自体は不活性であると考えられてきた。我々は1986年以来、神経興奮に基づく伝達物質様のドーパ遊離と

ドパミンへの変換を介さない薬理作用を明らかにし、ドーパ伝達物質仮説を提起してきた。しかし、ドーパ受容体のクローニングは国内外において複数のグループが試行しているが、未だ成功に至っていない。ドーパ様アゴニストであるドプス由来の活性リガンドとして、非アミン代謝物である

3,4-dihydroxybenzaldehyde (DHBALD)を同定し、3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBA)を推定している。DHBALD 類縁化合物のbenzaldehyde (BALD)は線虫に対し忌避反応を惹起し、C06H5.7 欠損変異体 *nj66*においてこの忌避反応は減弱した。線虫 C06H5.7 リガンドである非アミン DHBALD、DHBA および HPLA は、ラットにおける血圧下降活性はドーパ自体に比し極めて弱いことが明らかとなり、線虫と哺乳類ではドーパおよびその類縁化合物に対して異なる応答系を備えている可能性が示唆された。事実、ドーパ溶液中に産生されるドーパ誘導体中に、ドーパおよび非アミン代謝物とは異なる強力な血圧下降作用を示す作動活性画分が存在することを突き止めた。

従来、受容体の同定には応答を模倣あるいは阻害する関連化合物のスクリーニングと構造活性相関が威力を発揮してきた。ドーパ応答に関連する作動薬、拮抗薬は極めて乏しく、受容体結合実験が可能な高親和性ドーパリガンドは皆無である。従って、ラットにおける薬理的応答を指標とし一連のドーパ関連化合物の同定および構造決定は哺乳動物におけるドーパ受容体同定の契機となる可能性が高い。ここに至り、従来のドーパ神経伝達物質仮説をドーパのみならずドパミン変換以外の経路を介して産生される代謝物にも解析の対象を広げ、線虫、ラットにおいてそれらをリガンドとする化学受容および圧受容に関わる受容体の同定を視野に研究を施行する必然性が生じた。こうした状況を踏まえ、ラット NTS 領域を中心に、多電極による population spike の変化の有無、スライスパッチによるドーパ応答の単一細胞レベルの解析を用いた電位変化の *in vivo* イメージング、ならびに新規ドーパ関連化合物の構造決定を進め、ドーパ応答解析のための新たなツールの開発を行うことが受容体クローニングにつながる最も近い道筋であるとの着想に至った。

2. 研究の目的

麻酔下ラット NTS、吻側腹外側延髄 (RVLM)、尾側腹外側延髄 (CVLM) にドーパを微量注入すると各々血圧下降、上昇、下降応答を惹起する。この作用はドーパ拮抗薬である DOPA ME、DOPA CHE により拮抗され、ドパミンでは模倣されない。これに加え、平成 18~19 年度基盤研究 B の計画遂行の中で見出された海馬におけるドーパの抑制効果はシナプス伝達におけるドーパ自体の作用を強く示唆する。本研究は期間内に、i) 線虫 GPCR、C06H5.7 の遺伝学的解析ならびに構造にもとづくホモロジー検索を行いその細胞内機序、生理学的意義等を明らかとする。ii) ドーパあるいはドブス溶液より見出された

関連化合物の同定・構造解析を行い、活性成分の構造決定を行う。iii) NTS スライス標本を中心に電気生理学的解析を行いドーパ応答の単一細胞レベルにおける機序を明らかとする。

3. 研究の方法

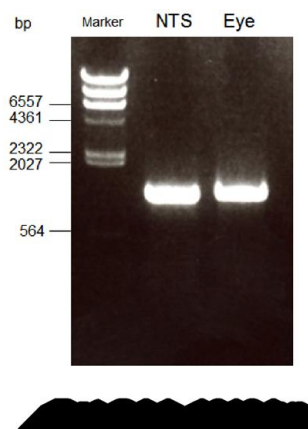
本研究計画は、平成 18, 19 年度基盤研究 B において行った新規 GPCR である C06H5.7 の線虫における役割の解析を継続して検討するとともに、哺乳動物であるラットを中心にドーパ関連化合物の構造決定とそれらが惹起する血圧応答、細胞応答を電気生理学的に検討することに重点を置く。現時点においてドブス溶液における高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分離操作により得られた数多くの活性画分の内の一つにつき構造決定に至る予備的知見を得ており、その最終的な構造決定に加え、ドブスおよびドーパ溶液のその他の活性成分の分離・精製の完了と構造決定、ならびにドーパ応答の電気生理学的解析が主要な研究計画となる。

4. 研究成果

調製直後のドブス溶液をラット弧束核に微量注入しても血圧および心拍数に影響を与えなかったが、2 週間後には降圧・徐脈活性が検出された。10 週間後のドブス溶液を、逆相カラムを用い酸性条件下で分画し、第一段階で 4 画分得た。溶出時間 7.5 分の第一画分 (S1) をラット弧束核に微量注入すると血圧下降応答を示した。第二段階では、S1 を逆相カラムを用い中性条件下で分画し、3 画分得た。溶出液時間 8.2 分の第 2 画分 (S12) に降圧・徐脈活性が検出された。第三段階では、S12 を分子排除型カラムを用い水で分画し、3 画分得た。この 3 画分のうち、溶出時間 21.7 分の第 3 画分 (S123) はドブスの溶出時間 21.7 分と近似していた。溶出時間 16.8 分の第 2 画分 (S122) をラット弧束核に微量注入すると他の S121 や S123 に比べて有意に降圧・徐脈応答を引き起こした。この S122 の活性は、ドーパ拮抗薬、L-DOPA cyclohexyl ester、DOPA CHE により遮断された。この活性画分の構造決定を試みたがベンゼン環を有する特定の化学構造を同定するに至らなかった。一方、MED64 において、ドーパは増強および抑制の二相性作用を示した。この二相性の作用は DOPA CHE により拮抗される傾向を示した。

一方、最終年度になり、本研究と密接に関連する取組を通じて、ドーパ受容体候補となる OA-1 (ocular albinism-1) を見出すことに成功した。OA-1 は、ドーパ作用が認められる NTS 領域に確かに発現しており (図 1)、OA-1 を発現する CHO 細胞においては、特異的ドーパ結合が検出される (図 2)。昨年度、本受

容体候補を中心とした研究計画を基盤Bとして申請したが不採択となった。このため、他の民間等の助成を得て、今後も継続して同分子を中心とした計画を遂行する計画である。



特異的³H]-L-DOPA 結合

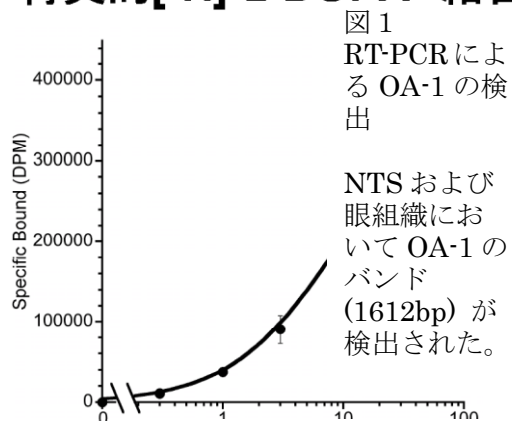
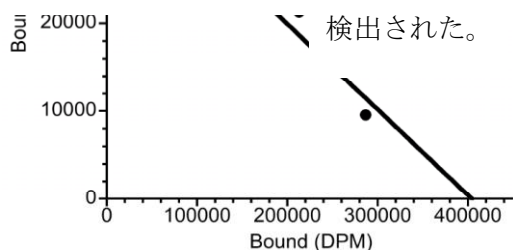


図2 OA-1の特異的³H-DOPA結合



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5件)

- ① 五嶋良郎, 喫煙の生理学, 臨床と研究, 743-746, 2010.
- ② Asakura T, Waga N, Ogura K, Goshima Y., Genes required for cellular UNC-6/netrin localization in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 185 : 573-585, 2010.
- ③ Goshima Y., Usui H, Shiozawa T, Hida T, Kuraoka S, Takeshita S, Yamashita N, Ichikawa Y, Kamiya Y, Gotoh T, Gotoh T., Computational analysis of the effects of antineoplastic agents on axonal transport. *J Pharmacol Sci.* 114 : 168-179, 2010.
- ④ Matsushita N, Misu Y, Goshima Y. In vivo antagonism of the behavioral responses to L-3-, 4-dihydroxyphenylalanine by L-3-, 4-dihydroxyphenylalanine cyclohexyl ester in conscious rats. *Eur J Pharmacol.* 605:109-113, 2009.
- ⑤ Murota Y, Fujii M, Sugiyama Y, Funabashi T, Yagami T., Takahashi T., Goshima Y., DOPA cyclohexyl ester, a DOPA antagonist, blocks the depressor responses elicited by microinjections of nicotine into the nucleus tractus solitarius of rats. *Neurosci Lett* 442:114-117, 2008.

〔学会発表〕(計5件)

- ① 五嶋良郎, 竹居光太郎, 中村史雄, 小倉頭一, 山下直也: ドーパ関連リガンドの同定ならびにニコチン・ドーパ応答の解析, 喫煙科学財団研究発表会, 2010年7月, 東京.
- ② 青木令奈, 矢上達郎, 小倉頭一, 笹倉寛之, 宮前丈明, 中村史雄, 梶原康宏, 山本直毅, 森郁恵, 五嶋良郎: 新規7回膜貫通型受容体 DCAR-1 は水溶性物質に対する忌避行動に関与する. 第82回薬理学会年会, 2009年3月, 横浜.
- ③ 藤井桃, 室田裕大, 紙谷義孝, 五嶋良郎: ラット孤束核のシナプス活動に対するL-DOPAの影響. 第82回薬理学会年会, 2009年3月, 横浜.
- ④ Fujii M, Murota Y, Yagami T., Aoki R, Kajihara Y, Yamamoto N, Goshima Y. Some DOPS derivatives mimic DOPAergic cardiovascular responses in rats. 第31回日本神経科学学会大会, 2008年7月, 東京.

- ⑤ Aoki R, Yagami T, Kajihara Y, Miyamae T, Ogura K, Nakamura F, Sasakura H, Mori I, Goshima Y. Chemical biology in C. elegans: a novel seven transmembrane domain receptor C06H5.7 mediates avoidance response to both volatile and water-soluble receptors in C. elegans. 第81回日本薬理学会年会, 横浜, 2008年3月.

[その他]

ホームページ等

<http://pharmac.med.yokohama-cu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

高橋 琢哉 (TAKAHASHI TAKUYA)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：20423824

矢上 達郎 (YAGAMI TATSURO)
姫路独協大学・薬学部・教授
研究者番号：00363812

梶原 康宏 (KAJIWARA YASUHIRO)
横浜市立大学・国際総合科学部・教授
研究者番号：50275020

由良 敬 (YURA KEI)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹
研究者番号：50252226