

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592065  
 研究課題名（和文）モノアミントランスポーター細胞膜発現の新規制御機構：  
 ヒスタミンH3受容体の関与  
 研究課題名（英文）A new regulative mechanism for monoamine transporter expression in  
 plasma membrane：The participation of histamine H3 receptor  
 研究代表者  
 十川 紀夫（SOGAWA NORIO）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号：30236153

## 研究成果の概要（和文）：

モノアミントランスポーターが細胞膜で機能するために必要な細胞膜への移行に対するヒスタミンH3受容体(H3R)関与を確認するため、H3Rとノルアドレナリントランスポーター(NET)両遺伝子の共発現細胞系を用いて検討した結果、H3Rが蛋白質-蛋白質相互作用によりNETを細胞内に留め、細胞膜への発現を抑制する機構の存在を示唆する結果が得られた。

## 研究成果の概要（英文）：

To study the participation of histamine H3 receptor (H3R) on the transition of monoamine transporters into plasma membrane which is necessary to exert their function as transporters, we investigated the relation between H3R and noradrenaline transporter (NET) expression by using coexpressing cell system for both H3R and NET. The results which obtained from this experiment were suggested that there was a mechanism by which H3R inhibited the NET expression into the plasma membrane by binding to NET and making it fit tightly in the cell.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000   | 2,210,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：歯科薬理学分野

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：ヒスタミンH3受容体(H3R)，モノアミントランスポーター，ノルアドレナリントランスポーター(NET)

## 1. 研究開始当初の背景

中枢ヒスタミンは動物の摂食行動に関与

しており、ヒスタミン神経系の活性化は摂食抑制を惹起する。ヒスタミンH3受容体(H3R)は、ヒスタミン神経終末において自己受容体として機能することから、これまで、その活性化は神経終末からのヒスタミン遊離を増加させ、ヒスタミンH1受容体を介して摂食抑制を導くと考えられていた。しかし、われわれは前検討課題遂行の結果、H3Rの活性化がノルアドレナリントランスポーター(NET)機能を抑制することを報告し、H3Rの新規機能とともにヒスタミンの摂食抑制作用にモノアミン神経系を介する新たな機序の可能性を見出した。

NETを始めとするモノアミントランスポーターは、シナプス間隙に遊離したモノアミンを細胞内に再取り込みすることにより神経伝達を終結させる役割を担う機能性膜蛋白質であるが、モノアミン類も摂食行動に深く関与しており、NET抑制によるシナプス間隙ノルアドレナリン量の増加は結果的に摂食を抑制することが知られている。したがって、H3Rを介するモノアミントランスポーター機能の制御機構(輸送活性制御および発現制御)の解明は、ヒスタミンの摂食調節作用に新たな視点を与えることになると考えられた。

また、当時、H3Rを介したモノアミン遊離制御に関しては他に多くの報告がある一方、モノアミントランスポーターの機能修飾に関しては、輸送活性機能の変化について検討したわれわれの前課題結果以外見当たらなかった。さらに、本申請課題であるヒスタミンH3受容体を始めとして、モノアミントランスポーターの細胞膜発現に対し、受容体による制御機構が存在することについては、これまで一切報告がなく、われわれの検討が機構解明の端緒となるものであった。なお、申請時、H3Rの細胞膜移動に細胞内クロライドチャンネル4、および未知の因子が関与していることが示唆されてきており、また、われわれは既に、H3R発現によりモノアミントランス

ポーターの膜発現が抑制されることを確認していたことから、モノアミントランスポーターの膜移動とH3R蛋白質、あるいはその輸送に関わる因子との相互作用が想定された。

## 2. 研究の目的

摂食行動における総括的なヒスタミン神経関与の機構を解明することを最終目標とし、本課題では、ヒスタミンH3受容体(H3R)を介したモノアミントランスポーターの発現を蛋白質レベルで詳細に検討することにより、モノアミントランスポーターが細胞膜で機能するために必要な膜移行の調節機構におけるH3R関与の機序を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒスタミンH3受容体(H3R)およびノルアドレナリントランスポーター(NET)による蛋白質相互作用の検討

①構築した遺伝子を培養細胞株COS-7にリポフェクション法で導入することにより、NETおよびH3R共発現細胞を作製した。

②それぞれの蛋白質の発現は、抗NET抗体(NET)、および抗c-Myc抗体あるいは抗H3R抗体(H3R)によるウエスタンブロッティング法により、蛋白質相互作用はそれぞれの抗体を用いた免疫沈降法により評価した。

(2) rH3RとrNETの細胞内局在の検討

rNET定常発現CHO細胞(CHO/rNET)にrH3Rを導入することにより同種(ラット)遺伝子の共発現細胞を構築し、抗rNET抗体および抗rH3R抗体を用いて細胞免疫組織学的に検討した。

## 4. 研究成果

(1) ヒスタミンH3受容体(H3R)およびノルアドレナリントランスポーター(NET)による蛋白質相互作用

H3Rには3種の機能的アイソフォームが報告されており、さらにわれわれはスプライシング位置の異なる新規アイソフォームを見

出しているため、これら4種のアイソフォームを検討に供した。その結果、H3Rを発現させると細胞内でH3RとNETが結合することにより、NETの膜発現が減少することが確認されるとともに、H3Rアイソフォーム間のスプライシング位置の違いにより、NET蛋白質との相互作用が異なることが明らかとなった。さらに、新規H3Rアイソフォームは、受容体活性を欠失しているものの細胞膜に移行/発現し、野生型アイソフォームの発現制御を介してH3R機能に影響している可能性を見出した。

また、上記の検討では、NET遺伝子とH3R遺伝子の由来種が異なっていたため、遺伝子の由来における種差による蛋白質相互作用に対する影響の可能性を排除するため、ラット由来トランスポーター定常発現細胞を利用して、検討した結果、同種由来NETおよびH3Rにおいても細胞質内で蛋白質相互作用が起こっていることを確認した。

#### (2)細胞免疫組織学的検討

rH3R遺伝子を導入することによる細胞増殖への影響は認められなかったものの、NETおよびH3Rが共発現する細胞のNET膜発現は抑制されており、また、共発現細胞においては、NETが細胞質内に凝集していることが認められた。このことは、H3Rがタンパク質-タンパク質相互作用によりNETを細胞内に留め、膜発現を抑制する機構を示唆する結果であると考えられた。

これらの知見はH3Rが小胞体あるいはトランス・ゴルジ網に留まる傾向があり、直接/間接的な蛋白相互作用によりNET発現にドミナントネガティブ的効果をもたらしていることを示唆しているものと考えられる。

H3Rは、摂食や覚醒に関与していることから肥満やナルコレプシーなどの治療創薬の標的として注目を集める一方、モノアミン類も摂

食や覚醒に関与していることが報告されている。また、H3Rとモノアミン神経系の関連は摂食行動ばかりでなく、注意欠陥/多動性障害などにおいても注目されており、その詳細な機序の解明が待たれている。本研究により、H3Rがノルアドレナリン神経系において蛋白-蛋白相互作用によりトランスポーターの発現を制御していることが明らかとなったが、このことは、H3Rの発現そのものが病態生理学的意義を有することを示すとともに、これまでの創薬で主流であったH3Rリガンドを意識したものではなく、H3R発現を標的とした新規薬物の開発に繋がるのではないかと考えられる。

#### 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6件)

(1) Sogawa N., Hirai K., Sogawa C., Ohyama K., Miyazaki I., Tsukamoto G., Asanuma M., Sasaki A. and Kitayama K., Protective effect of cepharanthin on cisplatin-induced renal toxicity through metallothionein expression, Life Sciences, 査読有, 92, 2013, 727-732.

(2) Sogawa N., Hazehara Y., Kunitomo M., Morita Y., Yoo B., Ohyama K., Sogawa C. and Kitayama S., Age-dependent changes in the susceptibility to thiopental anesthesia in mice: analysis of the relationship to the functional expression of GABA transporter, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 査読有, 103, 2012, 267-272.

(3) Gerile, Sogawa C., Ohyama K., Masuko T., Kusama T., Morita K., Sogawa N., Kitayama S., Inhibitory Action of Antidepressants on Mouse Betaine/GABA Transporter (BGT1) Heterologously

Expressed in Cell Culture, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 13(3), 2012, 2578-2589.

(4) Sogawa C., Sogawa N., Ohyama K., Kikura-Hanajiri Y., Goda Y., Sora I. and Kitayama K., Methylone and monoamine transporters: correlation with toxicity, Current Neuropharmacology, 査読有, 9(1), 2011, 58-62.

(5) Miyazaki I., Asanuma M., Kikkawa Y., Takeshima M., Murakami S., Miyoshi K., Sogawa N. and Kita T., Astrocyte-derived metallothionein protects dopaminergic neurons from dopamine quinone toxicity, Glia, 査読有, 9(3), 2011, 435-451.

(6) Norio Sogawa *et al.*, Expression and characterization a novel isoform of rat H3 receptor, Journal of Pharmacological Sciences, 査読無, 115, 2011, 201P.

[学会発表] (計 9 件)

(1) Ohyama K., Post-transcriptional regulation of noradrenaline transporter by nicotine, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 03 月 21 日~2013 年 03 月 23 日, 福岡市

(2) Sogawa C., Characterization of human noradrenaline transporter gene at 5' -flanking region, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 03 月 21 日~2013 年 03 月 23 日, 福岡市

(3) 十川紀夫, ヒスタミンH3 受容体によるノルアドレナリントランスポーターの機能および発現抑制, 第 33 回岡山歯学会, 2012 年 11 月 25 日, 岡山市

(4) 大山和美, ニコチンによるノルアドレナリントランスポーター発現の調節, 第 122 回近畿部会, 2012 年 11 月 16 日, 豊中市

(5) 北山滋雄, ヒトノルアドレナリントラン

スポーター遺伝子 5' プロモーター領域の解析, 第 122 回近畿部会, 2012 年 11 月 16 日, 豊中市

(6) Sogawa C., Nicotine regulation of the expression of noradrenaline transporter gene, The 11th Biennial Meeting of Asian-Pacific Society for Neurochemistry, 55th Annual Meeting of the Japanese Society

for Neurochemistry, 2012 年 09 月 30 日~2012 年 10 月 01 日, 神戸市

(7) 十川千春, GABA トランスポーターに対する抗うつ薬の阻害作用について, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 10 月 2 日, 岐阜市

(8) 十川紀夫, ヒスタミンH3 受容体が示す各種抑制機能, 第 14 回日本ヒスタミン学会, 2010 年 10 月 25 日, 横浜市

(9) 十川紀夫, ヒスタミンH3 受容体新規アイソフォームの発現と機能, 第 117 回日本薬理学会近畿部会, 2010 年 7 月 8 日, 徳島市

[図書] (計 2 件)

(1) Sogawa C., Sogawa N., Kitayama S., INTECH, Immunocytochemical approaches to the identification of membrane topology of the Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters, In: Applications of Immunocytochemistry., 2012, pp117-134 (Chapter 6).

(2) Kitayama, S., Sogawa, C., Sogawa, N., Nova Science Publishers, Molecular and Genetic Basis of the Regulation of Dopamine Transporter. In: *Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects*, 2012, pp141-168.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

十川 紀夫 (SOGAWA NORIO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授  
研究者番号：30236153

### (2) 研究分担者

大山 和美 (OHYAMA KAZUMI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助手  
研究者番号：00253021

十川 千春 (SOGAWA CHIHARU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：10253022

宮崎 育子 (MIYAZAKI IKUKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：40335633

北山 滋雄 (KITAYAMA SHIGEO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号：80177873

### (3) 連携研究者

該当なし