

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460090

研究課題名(和文)細胞内小器官におけるドパミンD2L受容体活性化機構の解明

研究課題名(英文)Research on mechanisms of intracellular D2LR signaling

研究代表者

塩田 倫史(Shioda, Norifumi)

東北大学・薬学研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：00374950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ドパミン D2 受容体には D2L 受容体と D2S 受容体が存在する。本研究では、D2L 受容体特異的な細胞内シグナル伝達系に着目し研究を行った。D2L 受容体に結合するタンパク質として、Rabex5 が同定された。ドパミンにより GTP 型 Rab5 が有意に増加し、D2L 受容体と PDGFR を内包した初期エンドソームの形成が促進された。また、D2LR ヘテロマウスで見られたハロペリドール投与によるカタレプシーの減弱が Rab5 の過剰発現により有意に改善した。これらの結果より、D2L 受容体は Rabex5/PDGFR を介した行動制御回路に関与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aberrant dopamine D2 receptor (D2R) activity is associated with neuropsychiatric disorders, making those receptors targets for antipsychotic drugs. We found that novel signaling through the intracellularly localized D2R long isoform (D2LR) elicits ERK activation and dendritic spine formation through Rabex-5/PDGFR-mediated endocytosis in mouse striatum. We found that D2LR directly binds to and activates Rabex-5, promoting early endosome formation. In addition, dendritic spine density in striatopallidal MSNs significantly increased following treatment of striatal slices from wild-type mice with quinpirole, a D2R agonist, but those changes were lacking D2LR knockout mice. Moreover, intracellular D2LR signaling mediated effects of a typical antipsychotic drug, haloperidol, in inducing catalepsy behavior. Taken together, intracellular D2LR signaling through Rabex-5/PDGFR is critical for ERK activation and neuronal activity in striatopallidal MSNs of mice.

研究分野：薬学、薬理学、神経科学

キーワード：精神疾患 ドパミン D2 受容体 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や注意欠陥多動性障害などの重篤な精神疾患の発症や、情動や認知機能などの精神活動にはドパミン神経系が深く関与している。ドパミン受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体であり、アデニル酸シクラーゼを活性化するD₁様受容体群(D₁, D₅受容体)と、その活性を抑制するD₂様受容体群(D₂, D₃, D₄受容体)の2グループに大別される。D₁様受容体群は細胞内C末端が長く、D₂様受容体群は細胞内第3ループが長い構造をしている。D₂受容体と統合失調症との関連はほとんどの抗精神病薬がD₂受容体遮断作用を有すること、線条体でのD₂受容体遮断作用が統合失調症の陽性症状改善効果と相関することからも明らかである。D₂受容体作用薬を用いた画像診断によると、統合失調症患者ではD₂受容体結合能が帯状回皮質で低下している。しかし、D₂受容体のどのシグナル伝達系の異常が統合失調症を引き起こすのか未だ明らかとされていない。

2. 研究の目的

D₂受容体には細胞内第3ループの29アミノ酸残基の有無により、D_{2L}受容体とD_{2S}受容体のアイソフォームが存在する。これまでの免疫組織化学的解析からD_{2L}受容体は主に辺縁系、線条体中型有棘神経細胞(MSニューロン)の後シナプスに発現する。一方、D_{2S}受容体は自己受容体として黒質-線条体系ドパミン神経終末に発現しており、ドパミン放出に抑制的に働くことが示唆されている。細胞内シグナル伝達において、D₂受容体はGタンパク質のG_iを活性化し、アデニル酸シクラーゼ活性を抑制、cAMPの産生を減少させる。cAMP量の減少は、protein kinase A活性を低下させ、Ca²⁺やK⁺チャネルのリン酸が低下する結果、Ca²⁺の流入抑制やK⁺の流入促進を引き起こし、シナプス伝達を抑制する。しかしながら、D₂受容体のシグナル伝達系の異常と精神疾患との詳細な関与は不明である。本研究では、D_{2L}受容体アイソフォーム特異的な細胞内シグナル伝達系に着目し研究を行った。

3. 研究の方法

D_{2S}受容体とD_{2L}受容体の局在をHEK293T細胞に発現し、検討した。D_{2L}受容体特異的に結合するタンパク質を質量分析により検討した。マウス線条体においてドパミンやD₂受容体作用薬Quinpirole処置を行い、D_{2L}受容体特異的シグナル伝達系を検討した。マウス線条体培養神経細胞を用いて、D_{2L}受容体の神経活動、スパイン密度、及びシナプス数に対する影響を検討した。

4. 研究成果

D_{2S}受容体が細胞膜表面にのみ局在するのに対し、D_{2L}受容体は細胞膜表面に加えて、ゴルジ体を含めた細胞内小器官にも存在することを明らかにした。そこで、D_{2L}受容体アイソフォーム特異的な細胞内シグナル伝達系に着目し研究を行った。D_{2L}受容体特異的に結合するタンパク質を質量分析により検討し、Rabex-5が同定された。Rabex-5は初期エンドソームの形成に関与する低分子量GTP結合タンパク質であるRab5のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)である。また、Rab5の活性化は、受容体型チロシンキナーゼの活性化に関与している。興味深いことに、マウス線条体においてドパミンやD₂受容体刺激薬QuinpiroleによりGTP型Rab5が有意に増加し、D_{2L}受容体とPDGF受容体-β(PDGFRβ)を内包した初期エンドソームの形成が促進された。さらに、エンドソームがゴルジ体に局在するD_{2L}受容体と複合体を形成し、MAPK/ERKシグナルの持続的活性化を引き起こすことを明らかにした。私が見出したD_{2L}R/Rabex5/PDGFRβシグナル伝達系はMAPK/ERKの持続的活性化に関与することが明らかになった。ERKの活性化は神経細胞の樹状突起シナプスリモデリングに深く関与する。D_{2R}をsiRNAでknockdownしたマウス線条体培養神経細胞では神経活動が低下し、スパイン密度、及びシナプス数も低下すること、D_{2L}受容体ノックアウトマウス、D_{2L}受容体ヘテロマウスのD₂受容体発現中型有棘ニューロンではスパインの密度

が減少することを見出した。中枢神経特異的 *PDGFRβ* ノックアウトマウスでは八口ペリドール誘発性カタレプシーが見られないこと、*D₂L* 受容体ヘテロマウスで見られたカタレプシーの減弱が *Rab5* アデノ随伴ウイルス処置により有意に改善することを明らかにした。これらの結果より、*D₂L* 受容体にはこれまでの報告とは異なる細胞内小器官における新しいシグナル伝達機構が存在すること、また、線条体において *D₂L* 受容体は *Rabex5*/*PDGFRβ* を介した行動制御回路に関与すると考えられる。ドパミン *D₂* 受容体は統合失調症をはじめとした精神疾患において重要な役割を担う受容体であり、*D₂L* 受容体の行動制御回路における機能的役割を明らかにすることは今後の精神疾患の原因解明と治療薬の開発に貢献できる。

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8件)

1. Shioda N., Sawai M., Ishizuka Y., Shirao T. and Fukunaga K. (2015) Nuclear translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIδ3 promoted by protein phosphatase-1 enhances brain-derived neurotrophic factor expression in dopaminergic neurons. *J Biol Chem.* **290**, 21663-21675. doi: 10.1074/jbc.M115.664920. 査読有
2. Yabuki Y., Shinoda Y., Izumi H., Ikuno T., Shioda N. and Fukunaga K. (2015) Dehydroepiandrosterone administration improves memory deficits following transient brain ischemia through sigma-1 receptor stimulation. *Brain Res.* **1622**, 102-113. doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.006. 査読有
3. Shioda N., Yabuki Y., Kobayashi Y., Onozato M., Owada Y. and Fukunaga K. (2014) FABP3 promotes alpha-Syn oligomerization associated with MPTP-induced neurotoxicity. *J Biol Chem.* **289**, 18957-18965. doi: 10.1074/jbc.M113.527341. 査読有
4. Yabuki Y., Shioda N., Maeda T., Hiraide S.,

- Togashi H. and Fukunaga K. (2014) Aberrant CaMKII activity in the medial prefrontal cortex is associated with cognitive dysfunction in ADHD model rats. *Brain Res.* **1557**, 90-100. doi: 10.1016/j.brainres.2014.02.025. 査読有
5. Tagashira H., Shinoda Y., Shioda N. and Fukunaga K. (2014) Methyl pyruvate rescues mitochondrial damage caused by SIGMAR1 mutation related to amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* **1840**, 3320-3334. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.08.012. 査読有
 6. Tagashira H., Bhuiyan M.S., Shioda N. and Fukunaga K. (2014) Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through σ(1)-receptor in hypertrophic cardiomyocytes. *Life Sci.* **95**, 89-100. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.019. 査読有
 7. Yabuki Y., Shioda N., Yamamoto Y., Shigano M., Kumagai K., Morita M. and Fukunaga K. (2013) Oral L-citrulline administration improves memory deficits following transient brain ischemia through cerebrovascular protection. *Brain Res.* **1520**, 157-167. doi: 10.1016/j.brainres.2013.05.011. 査読有
 8. Yabuki Y., Nakagawasai O., Moriguchi S., Shioda N., Onogi H., Tan-No K., Tadano T. and Fukunaga K. (2013) Decreased CaMKII and PKC activities in specific brain regions are associated with cognitive impairment in neonatal ventral hippocampus-lesioned rats. *Neuroscience.* **234**, 103-115. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.048. 査読有

[学会発表](計7件)

塩田 倫史、杉本 航、福永 浩司: ドパミン *D_{2L}* 受容体機能低下はセロトニン神経過活動によりストレス脆弱性を引き起こす 第89回日本薬理学会年会 2016年3月9-11日・横浜

塩田 倫史、福永 浩司: 細胞内小器官におけるドパミン *D₂* 受容体の機能解析 第66回日本薬理学会北部会 2015年9月18日・富山

Norifumi Shioda, Kohji Fukunaga: Novel intracellular *D_{2L}R* signaling is critical

for dendritic spine formation. 第 58 回
日本神経化学学会大会 2015 年 9 月 11-13 日・
さいたま

塩田 倫史: ドパミン神経関連疾患における
脂肪酸結合蛋白質 FABP3 の役割 生化学
会東北支部 81 回例会・シンポジウム 2015
年 5 月 9 日 仙台

塩田 倫史、福永 浩司: 細胞内ドパミン D2
受容体活性化は樹状突起スパイン形成に必
須である 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年
3 月 18-20 日・名古屋

塩田 倫史、福永 浩司: ドパミン D2L 受容
体を介した新しいシグナル伝達機構 第 16 回
応用薬理シンポジウム 2014 年 12 月 5-6 日
仙台

塩田 倫史、福永 浩司: ゴルジ体における
細胞内ドパミン D2L 受容体活性化機構 第 87
回日本生化学学会大会 2014 年 10 月 15-18 日
京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 神経発達障害改善剤

発明者: 田中徹、和田敬仁、福永浩司、塩田
倫史、石塚昌宏、高橋究

権利者: S B I ファーマ株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2015-229058

出願年月日: 平成 27 年 11 月 24 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩田 倫史 (SHIODA, Norifumi)

東北大学・大学院薬学研究科・特任准教授
研究者番号: 00374950

(2) 研究分担者

福永 浩司 (FUKUNAGA, Kohji)

東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 90136721

(3) 連携研究者

()

研究者番号: