

平成 21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500334
 研究課題名（和文）ドーパミン受容体D1/D2二重欠損マウスを用いた運動制御機構の解明
 研究課題名（英文）Study of molecular mechanism of motor control using double D1/D2 dopamine receptor mutant mice.
 研究代表者 笹岡 俊邦（SASAOKA TOSHIKUNI）
 基礎生物学研究所・神経生化学研究室・准教授
 研究者番号：50222005

研究成果の概要：

神経伝達物質のドーパミンは、運動制御に重要な役割を持つ。本研究はドーパミン受容体の主要分子であるD1受容体(D1R)およびD2受容体(D2R)に着目し、運動の制御機構の解明、さらに運動障害を示す疾患であるパーキンソン病の病態機構解明を目指している。

D1R/D2R二重欠損の遺伝背景に、テトラサイクリン系薬物(DOX)投与で発現制御可能なD1R遺伝子を持つ遺伝子操作マウスを作製した。このマウスは、DOXを投与すると、D1R発現が低下しD1R/D2R二重欠損状態となり、運動量低下を示し、動作の緩慢や姿勢異常等のパーキンソン病類似の運動異常が見られた。DOX投与を停止すると、一過性に運動過剰の状態を示し、DOX投与前の運動量に回復した。一方、D1R発現量は運動過剰の状態を示す時期には、DOX投与前の半分程度まで回復していたが、DOX投与中止後7日目以降にDOX投与前の発現量まで回復した。このことからD1R発現量と運動量は単に線型な関係ではなく、D1R発現量の変化により運動量を制御する新しい仕組みがあることが示唆された。今後、D1Rの標的分子と運動制御の仕組みを明らかにする。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学、神経科学

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：神経科学、遺伝子、神経伝達物質と受容体、マウス、運動遺伝子操作マウス、テトラサイクリン

1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質のドーパミンは、運動制御、情動、報酬系などに重要な役割を持つ。また、パーキンソン病や統合失調症などの疾患ではドーパミンの働きの低下/過剰の関与が考えられている。

米国の Palmiter らはドーパミン生合成酵素を欠失したドーパミン欠乏マウスを作成し、成熟期前に運動異常と摂食異常を示し致死となることを観察している。我々ならびにフランスの Borrelli らは、D1R および D2R の両方を欠損するマウス (D1R/D2R DKO マウス) を作成し、運動異常と摂食異常と致死を観察している。このことは、運動制御と摂食行動にドーパミンのシグナルが重要であり、D1R と D2R 両方のシグナルの関与を示唆している。Borrelli らは消化管異常が死亡の原因と報告している。我々は、D1R/D2R DKO マウスを

胃管栄養により延命させることに成功し、消化管異常は摂食出来ないための2次的変化であるという結果を得ている。

パーキンソン病の主な症状である運動異常は、黒質-線条体ドーパミン神経の変性によるドーパミンの減少が原因と考えられ、病態を説明するモデルが示されている (図 1, DeLong, 1990 を改変)。大脳基底核の神経回路には、線条体と淡蒼球内節を直接繋ぐ「直接路」と、介在部である淡蒼球外節と視床下核を経由して間接的に繋ぐ「間接路」が考えられている。パーキンソン病ではドーパミンが枯渇すると「直接路」細胞への D1R を介する興奮性入力消失し、淡蒼球内節は脱抑制され活動は亢進する。一方「間接路」細胞への D2R を介する抑制性入力も消失し、線条体から淡蒼球外節への抑制が亢進し視床下核が脱抑制され淡蒼球内節の活動は亢進

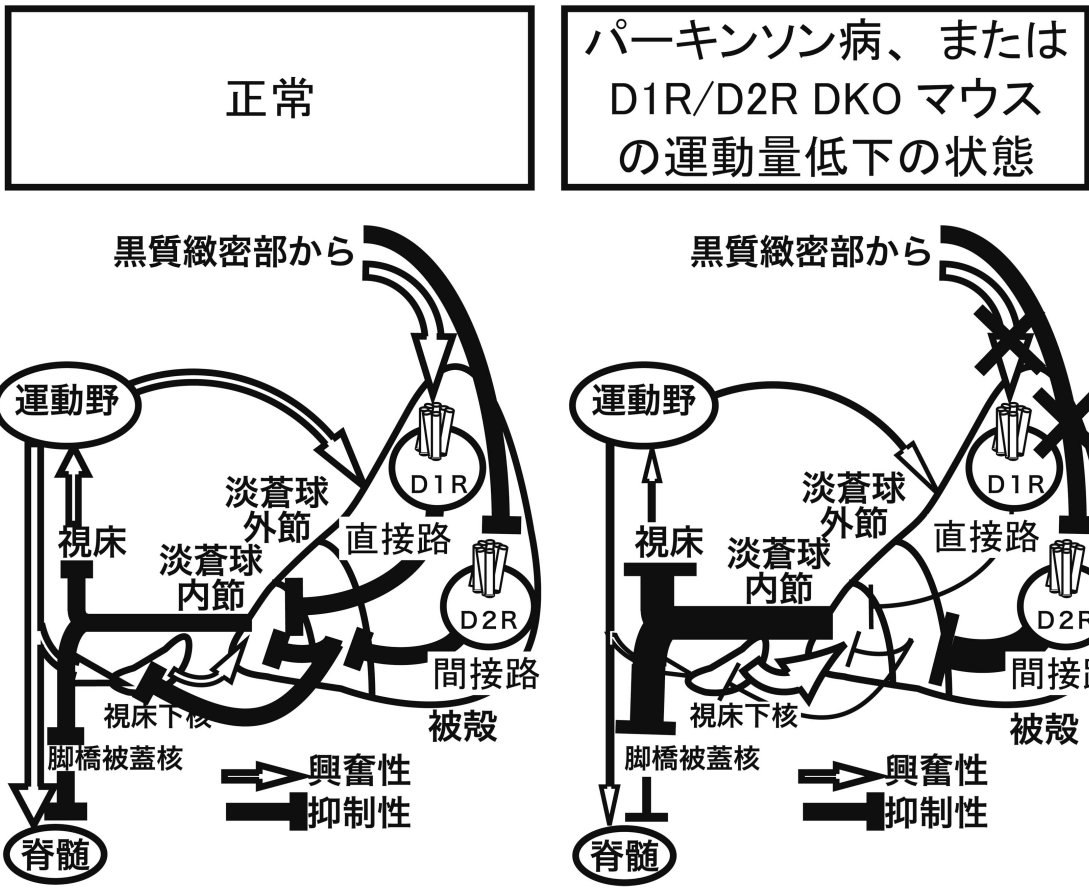


図1 大脳基底核の神経回路 (DeLong 1990を改変)

する。これらにより大脳皮質・視床の活動性が抑制されると考えられている。

本研究は、ドーパミンの機能をドーパミン受容体の観点から検討するため、D1R/D2R 二重欠損の遺伝背景に、テトラサイクリン系薬物ドキシサイクリン(DOX)で発現制御可能なD1R 遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作製した。このマウスは、導入された D1R の発現により、D1R/D2R 二重欠損マウスの発達の運動異常・摂食異常・致死性を回避でき、DOX を投与すると、D1R 発現が低下しD1R/D2R 二重欠損状態となり、DOX 投与を停止すると D1R 発現が回復することから、D1R 発現量変化と行動変化の観察が可能である。DOX 投与により自在に発現のON/OFFを行い、D1R を介する経路の役割を明確に理解することが期待される。

2. 研究の目的

本研究ではドーパミン受容体の主要分子であるD1受容体(D1R)およびD2受容体(D2R)を介する情報伝達に着目し、運動の制御機構の解明、および運動障害を示す疾患であるパーキンソン病の病態機構解明を目指す。

我々はD1RとD2Rの二重欠損マウスが、パーキンソン病類似の重症の運動異常を示し死亡することを見いだした。そこでD1R/D2R二重欠損の遺伝背景にテトラサイクリン制御系によりD1R発現が調節できるマウスを作成したところ、見事に運動異常と致死性がレスキューされた(D1R/D2R DKO-D1R レスキューマウス)。当該レスキューマウスではテトラサイクリン系薬剤の投与でD1R発現を抑制すると運動異常が出現し、薬剤投与中止で運動異常から完全に回復することを使い、D1R発現量変化と行動変化の観察により、D1Rを介する経路の運動制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、笹岡(研究代表者)と勝木元也(基礎生物学研究所 名誉教授、研究協力者)の両方のグループが日常的に連携をとり研究を遂行している。慈恵医大の靱山俊彦教授の協力により本マウスの電気生理学的解析を行った。

(1) D1R/D2R DKO-D1Rレスキューマウスの生産:

本研究に必要なD1R/D2R DKO-D1Rレスキューマウスを計画的に効率よく生産するため、体外受精・仮親マウスへの受精卵移植・受精卵凍結保存・融解・移植などマウス発生工学実験法を用いて行った。

(2) D1R/D2R DKO-D1R レスキューマウスの運動・摂食・飲水の観察:

Dox投与前後のマウスの行動を、ホームケージに赤外線投光機とCCDカメラを設置して24時間連続で数週間にわたり撮影し、運動障害、摂食・飲水行動を観察した。また摂食・飲水・自発運動量同時測定装置を用いて、自発運動量を活動量センサーにより単位時間あたりの運動量として記録した。一定時間ごとに摂食量・飲水量を計測できる装置で連続して計測した。

(3) D1R/D2R DKO-D1R レスキューマウスの導入D1R遺伝子の発現様式の解析:

D1R/D2R DKO-D1R レスキューマウスに導入されたD1R遺伝子は、Tet-OFFシステムによりD1Rと同様にマーカー遺伝子である β -ガラクトシダーゼが発現調節されるように設計してある。導入遺伝子の発現様式は、 β -ガラクトシダーゼのX-Gal染色にて発現場所と発現の強弱を解析した。

(4) 抗D1RおよびD2R抗体の作成と、免疫染色による発現様式の解析:

免疫染色およびウエスタンブロッティングによりD1RおよびD2Rのタンパクレベルの

発現様式・発現量を解析するため特異抗体が必須であるが、従来の抗体では適切なものがない。現在、新たに抗体を作成している。我々が作成したD1RおよびD2R欠損マウスを用いて、それぞれD1RまたはD2Rを抗原として免疫してモノクローナル抗体を作成した。既に得られたD1RおよびD2Rに対するELISA陽性クローンのうち解析目的に適するクローンを免疫染色により選抜した。

(5) D1Rの発現様式の解析：

D1R/D2R DKO-D1Rレスキューマウスの線条体サンプルのウェスタンブロット解析により、DOX投与後のD1Rの発現量変化を検討した。

4. 研究成果

D1R/D2R DKO-D1R レスキューマウスの運動量と D1R 発現量を経時的に解析したところ、DOX 投与後、D1R 発現量低下と運動量低下を示し、動作の緩慢や姿勢異常等のパーキンソン病類似の運動異常が見られた。DOX 投与を停止すると、3 日後に DOX 投与前の 10 倍以上の運動過剰の状態を示し、7 日後には DOX 投与前の運動量に回復した。D1R 発現量は DOX 投与中止後 3 日目の運動量過剰を示す時期には、DOX 投与前の半分程度まで回復していたが、DOX 投与前の発現量まで回復するのは、DOX 投与中止後 7 日目以降であった。このことから、D1R の発現量が低下すると、運動量の低下が見られることに加えて、特に発現量回復過程で運動量過剰が観察される。D1R 発現量と運動量は単に線型な関係ではなく、D1R 発現量の変化により運動量を制御する新しい仕組みがあることが示唆された。今後、D1R の標的分子と運動制御の仕組みを明らかにする。

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 3 件)

① Kawasaki, K., Watabe, T., Sase, H., Hirashima, M., Koide, H., Morishita, Y., Yuki, K., Sasaoka, T., Suda, T., Katsuki, M., Miyazono, K., Miyazawa, K. (2008) Ras signaling directs endothelial specification of VEGFR2+ vascular progenitor cells.

Journal of Cell Biology, **181**, 131-41. 査読有り

② Ohi, Y., Ishii, Y., Haji, A., Noguchi, S., Sasaoka, T., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Sasahara, M., Hattori, Y. (2007)

Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB inhibits AMPA receptor-mediated synaptic transmission via PDGF receptor-beta in murine nucleus tractus solitarius.

Brain Research, **1159**, 77-85. 査読有り

③ Watanabe, N., Sasaoka, T., Noguchi, S., Nishino, I., and Tanaka, T. (2007)

Cys669-Cys713 disulfide bridge formation is a key to dystroglycan cleavage and subunit association.

Genes to Cells, **12**, 75-88. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

① 榎山俊彦, 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 勝木元也

ドーパミン受容体ノックアウトマウス線条体の抑制性シナプス伝達解析

第 82 回日本薬理学会年会 2009 年 3 月 16-18 日、横浜市

② 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 荒川聡子, 森田智子,

勝木邦子, 勝木元也

D1/D2 ドーパミン受容体二重欠損マウスを用いた運動量の解析

第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会合同大会

2008 年 12 月 10 日 神戸 神戸国際展示場

③ 佐藤朝子, 笹岡俊邦, 荒川聡子, 森田智子, 勝木邦子, 勝木元也

マウス運動量に対するドーパミン D 1 受容体の発現変化の影響

第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会合同大会

2008 年 12 月 10 日 神戸 神戸国際展示場

④ 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 荒川聡子, 森田智子, 勝木邦子, 勝木元也

D1/D2 ドーパミン受容体二重欠損マウスを用いた運動制御機構の解明

第 31 回日本神経科学大会

2008 年 7 月 11 日 東京 東京国際フォーラム

⑤ 梶山俊彦, 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 勝木元也

ドーパミン受容体ノックアウトマウス線条体の GABA 性シナプス伝達解析

第 31 回日本神経科学大会

2008 年 7 月 9 日 東京 東京国際フォーラム

⑥ 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 小林聡子, 森田智子, 勝木邦子, 勝木元也

D1R/D2R ドーパミン受容体二重欠損マウスを用いた運動制御機構の解明

第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会 合同学会

2007 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜、神奈川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹岡 俊邦 (SASAOKA TOSHIKUNI)

基礎生物学研究所・神経生化学研究室・准教授

研究者番号：50222005

(2) 研究分担者

佐藤 朝子 (SATO ASAKO)

基礎生物学研究所・神経生化学研究室・特別協力研究員

研究者番号：10465932

(3) 研究協力者

勝木 元也 (KATSUKI MOTOYA)

基礎生物学研究所・名誉教授

研究者番号：20051732