

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 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700347

研究課題名（和文）中枢ドーパミンシナプスの作動機構および維持・可塑性

研究課題名（英文） Regulation, maintenance, and plasticity of central dopaminergic synapses

研究代表者 徳岡 宏文（TOKUOKA HIROFUMI）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：10452020

研究成果の概要（和文）：

脳内ドーパミンは自発運動機能や報酬依存的学習など、脳の重要な機能を調節する神経伝達物質である。本研究では脳内ドーパミン量の調節機構を調べるために、ドーパミン合成に必須なチロシン水酸化酵素（TH）の遺伝子を、成体マウス中脳において部分欠損させた。その結果、投射先である線条体において、THの減少に対するドーパミンの減少は緩やかであった。これらの結果から、成体脳におけるドーパミン量の代償的維持機構の存在が遺伝学的手法により初めて示された。

研究成果の概要（英文）：

The tyrosine hydroxylase (TH) gene, essential for dopamine synthesis, is partially ablated in adult nigrostriatal projection. TH reduction in axon terminals is slower than in soma, and dopamine is better maintained than TH. Our data suggest striatal dopamine is compensatorily regulated by axonal TH level and L-DOPA synthesis activity per TH level. This regulation has potential relevance to pathogenesis of Parkinson disease and other dopamine-related psychiatric disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：ドーパミン、黒質、線条体、大脳基底核、チロシン水酸化酵素、遺伝子ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経伝達物質ドーパミンは脳内のごく

限られた神経細胞から放出されるが、様々な脳機能、特に報酬依存的な行動・学習や随意

運動の調節に関与している。また、神経難病であるパーキンソン病は、黒質神経細胞の変性と、それに伴う線条体へのドーパミン放出の減少が原因とされる。さらに、ドーパミンは統合失調症への関与も示唆されている。このように、ドーパミンは社会問題にもなっている精神・神経疾患との関わりが深い。

(2)しかし、ドーパミンの量がどのように調節されているのかについては十分理解されていない。パーキンソン病においては、ドーパミン系において様々な代償的变化が報告されている。しかし、非変性モデルにおけるドーパミン量の調節機構はほとんど調べられていない。

(3)ドーパミン神経伝達を人為的に操作する方法としては、これまでほとんど薬理的な方法がとられてきたが、用量、副作用、特異性の問題が存在していた。これに対し、我々は Cre-loxP 法により、成体マウスの中脳でドーパミン合成経路を阻害する方法を開発してきた。

2. 研究の目的

(1) まず本研究では、成体脳におけるドーパミン量の制御機構について調べる事を大きな目標とした。特に主要なドーパミン投射系である、中脳黒質から線条体へのドーパミン投射経路(黒質線条体経路)に注目した。

(2) より具体的には、ドーパミン生合成における律速酵素と考えられている、チロシン水酸化 (TH) について、その遺伝子を成体脳で部分的に破壊する系の確立を目指した。

(3) さらに、TH量が減少した際に、ドーパミン量にどのような影響が見られるかを明らかにしようとした。

(3)さらに、ドーパミン生合成経路における変化について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) これまでに作成していた floxTH マウスを使用した。このマウスは、TH 遺伝子座に loxP 配列を挿入してあり、Cre 組換え酵素により TH 遺伝子を破壊できるように設計されている。このマウスの中脳に、Cre を発現させるアデノ随伴ウイルスを微量注入し、遺伝子破壊を行った。ウイルスの投与後 2-8 週間にかけて経時的に、線条体における TH の量を。ウエスタンブロッティングおよび免疫染色により検討した。線条体は中脳黒質ドーパミン作動性神経細胞の主たる投射先である。

(2) さらに、線条体ドーパミン量を HPLC により調べた。この際に、TH量を測定したのと同じサンプルを使用した。また免疫染色によってもドーパミン量の変化を検討した。

(3)さらに、生体内 L-DOPA 合成活性を調べた。具体的には、TH の下流で L-DOPA よりドーパミンを合成する AADC 酵素の阻害剤、NSD-1015 を腹腔投与し、L-DOPA の蓄積を HPLC で調べた

(4)ドーパミンシナプスに重要である vMAT2 および DAT の発現量をウエスタンブロッティングにより調べた。

4. 研究成果

(1) Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを成体マウス中脳に微量注入したところ、中脳における TH 遺伝子の組換えが確認された。また、THタンパク質陽性の細胞数を免疫染色法により調べたところ、その減少が確認された。一方、別のドーパミン神経細胞のマーカーである芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) を発現する細胞数に変化は認められなかった。このことから、ドーパミンはドーパミン神経細胞の生存に必須ではないことが示唆された。

(2) さらに、ウエスタンブロッティングにより THタンパク質量の減少を経時的に調べた。中脳に比べて線条体における TH量の減少が遅れることが見いだされた。このことから、THタンパク質量の制御は細胞体と軸索終末で異なることが示唆された。

(3) 線条体を免疫染色により調べたところ、TH陽性の軸索が大幅に減少していた。しかし、AADC 陽性の軸索に明らかな変化は認められなかった。従って、THを欠損した細胞ではTH発現を失ったものの、軸索自体は特に変性することなくそのまま存在していることが示唆された。

(4) 線条体ドーパミン量を測定したところ、減少が認められたが、その程度はTHタンパク質量の減少と比べてずっと緩やかであった。このことから、THタンパク質はドーパミンの合成に必要ではあるが、ドーパミン量は代償的な調節を受けていることが示唆された。

(5) さらに、in vivo の L-DOPA 合成能を評価したところ、THタンパク質当りで標準化した場合、L-DOPA の合成能が亢進している k とが認められた。従って、ドーパミン量の代償機構の一つが、残存の TH の活性が亢進であることが示唆された。

(6) 一方、ドーパミンの分布や貯蔵についても検討した。これまでの知見から、TH遺伝子の部分破壊後におけるドーパミン貯蔵様式の変化として、(i) TH遺伝子を失った軸索においてもドーパミンを再取り込みして貯蔵・再使用している、(ii)残存の TH 陽性軸索においてドーパミン含有シナプス小胞が増加している、(iii)またはシナプス小胞当りのドーパミン含有量が増加している、などの可能性が考えられた。

そこでまず、線条体ドーパミンの分布を免疫染色により調べたところ、ドーパミン陽性の強いシグナルの数が減少していた。したがって、THの遺伝子破壊に伴い、ドーパミンを多量に含む軸索が減少していると考えられた。一方で、残存のシナプスにおけるドーパミン含有量の変化は明瞭ではなかった。これは免疫染色の定量性の限界もあり、今後さらに検討が必要である。

さらに、ドーパミン含有シナプス小胞の量、およびドーパミン作動性シナプスの量の大きな変化を知るために、小胞性モノアミントランスポーター2 (VMAT2) およびドーパミントランスポーター (DAT) の発現量をウェスタンブロットングにより調べた。その結果、いずれもTHの遺伝子破壊に伴った変化を示さなかった。従って、ドーパミン量の代償的維持の際に、特にドーパミン作動性シナプスや小胞の量の変動するとの知見は得られなかった。さらに詳細な解析が必要ではあるが、以上の結果から、上記の可能性のうち、(i) THを失った軸索でもドーパミンを細胞外から取り込み、使用している可能性が主に考えられ、また(ii)、(iii)についても関与の可能性が残された。

- (7) 以上の結果は次のような意義がある。
遺伝学的に成体マウスの中脳にてドーパミン合成系を阻害する系を確立した。この方法を応用することで、今後さらに黒質線条体投射におけるドーパミン量の調節機構について解析が出来る。
ドーパミン量の調節機構について、代償的な維持を成体脳の遺伝学的手法により示した。これまでの薬理学的な手法や、発生初期からの遺伝子欠損とは異なり、より特異的な検証を行うことが出来た。ドーパミン量の調節について、細胞体と軸索末端で異なる事が in vivo で初めて示された。
線条体のドーパミン量の代償的維持について、ドーパミン合成系の亢進が関与していることが in vivo で示唆された。今後はTH量を逆に過剰発現させた系でもドーパミン量の調節機構について調べる。また、パーキンソン病や統合失調症などの多くの精神・神経疾患でドーパミン量の変動が関与していると考えられている。今後さらに脳内ドーパミン量調節機構の解明していくことにより、これらの疾患の発症メカニズムを詳しく理解することが出来ると考えられる。

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. Tokuoka H*, Muramatsu S, Sumi-Ichinose C, Sakane H, Kojima M, Aso Y, Nomura T, Metzger D, Ichinose H* (2011) Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection. J Biol Chem, published on-line Oct 25, 2011 as doi:10.1074 (*Co-corresponding authors) 査読有り
2. Koshiha S, Tokuoka H, Yokoyama T, Horiuchi E, Ichinose H, Hasegawa K (2011) Biopterin levels in the cerebrospinal fluid of patients with PARK8 (I2020T). J Neural Transm 118:899-903. 査読有り
3. Homma D, Sumi-Ichinose C, Tokuoka H, Ikemoto K, Nomura T, Kondo K, Katoh S, Ichinose H (2011) Partial biopterin deficiency disturbs postnatal development of the dopaminergic system in the brain. J Biol Chem 286:1445-1452. 査読有り
4. Kawahata I, Tokuoka H, Parvez H, Ichinose H (2009) Accumulation of phosphorylated tyrosine hydroxylase into insoluble protein aggregates by inhibition of an ubiquitin-proteasome system in PC12D cells. J Neural Transm 116:1171-1578. 査読有り

[学会発表](計8件)

1. 徳岡宏文 「線条体におけるドーパミン合成調節機構について」 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 3班合同公開シンポジウム 2012年2月19日 帝京大学
2. 門脇 広樹、徳岡 宏文、細谷 悟史、大野 敏、横川 隆志、西川 一八、林宣宏、一瀬 宏 「初代培養海馬ニューロンへの蛍光標識カルモジュリンの導入とライブイメージング」 第84回日本生化学会大会2011年9月24日 国立京都国際会館
3. 畑中 貴之、畑中 康人、伊藤 岳人、五十嵐 孝幸、徳岡 宏文、村松 真一、遠藤 毅、廣崎 賢、高崎 昭彦、林宣宏、Daniel Metzger、一瀬 宏 「成熟脳におけるNurr1、Nur77の機能解析に用いる遺伝子改変マウスの作成」 第34回日本神経科学大会2011年9月16日 パシフィコ横浜

4. 徳岡 宏文、村松 慎一、鷲見-一瀬 千穂、Daniel Metzger、一瀬 宏 「黒質線条体ドーパミン投射における経軸索的ドーパミン量の代償」 第34回日本神経科学大会 2011年9月15日 パシフィコ横浜
5. 徳岡 宏文、村松 慎一、一瀬 宏 「黒質-線条体ドーパミン投射系におけるドーパミン量の制御機構」 第33回日本神経科学大会 2010年9月2日 神戸国際会議場
6. 徳岡 宏文、一瀬 宏 「黒質-線条体投射におけるドーパミン量制御機構」 包括脳ワークショップ 2010年7月29日 ホテルさっぽろ芸文館
7. 徳岡 宏文、一瀬 宏 「中枢神経黒質-線条体系ドーパミン投射の恒常性維持 - チロシン水酸化酵素とドーパミン量の代償的制御」 日本神経科学学会 2009年年会 平成21年9月16日 名古屋国際会議場
8. Tokuoka H, Ichinose H "Regulation of tyrosine hydroxylase protein level and DA content in nigrostriatal dopaminergic projection" Gordon Research Conference 2009, Catechol Amine 平成21年8月9-14日 University of New England, ME, USA

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.bh4.bio.titech.ac.jp/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳岡 宏文 (TOKOKA HIROFUMI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・

助教

研究者番号：19800012