

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790072

研究課題名（和文）ドパミンD2L受容体の細胞内小器官におけるシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of the intracellular dopamine D2 receptor

研究代表者 塩田 倫史（SHIODA NORIFUMI）

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00374950

研究成果の概要（和文）：ドパミン D2 受容体には選択的スプライシングにより D2LR と D2SR のアイソフォームが存在し、D2LR のシグナル伝達機構にはチロシンキナーゼ受容体の活性化が関与することが示唆されている。私達は D2SR は主に細胞膜に局在し、D2LR は細胞膜だけでなくゴルジ体にも局在することを報告した。しかしながら、ゴルジ体に存在する D2LR の活性化機構とその役割に関しては未だ明らかとされていない。そこで本研究では、細胞内 D2LR と PDGF 受容体の細胞内シグナル伝達機構における関連性について検討した。HEK293T 細胞に D2LR と PDGFR β を共発現した細胞では、ドパミン刺激による ERK と PDGFR β の持続的な活性化が見られた。さらに、リボソームタンパク質 S6 の持続的なリン酸化によりドパミン D2 受容体の蛋白質合成が促進された。それらの活性化は pertussis-toxin, PDGFR 阻害剤、dynamin inhibitor により有意に抑制された。また、PDGFR β 遺伝子欠損マウスの線条体において、ドパミン D2 受容体の蛋白質発現量は有意に減少した。これらの結果より、細胞内ドパミン D2L 受容体は PDGFR β を介して持続的な ERK の活性化を引き起こし、ドパミン D2 受容体の蛋白質合成を促進することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It exists as two alternatively spliced isoforms, termed D₂LR and D₂SR. In D₂LR, but not D₂SR, its activation involves in the transactivation of receptor tyrosine kinase (RTK) pathways. We previously demonstrated that D₂SR is predominantly expressed in the plasma membrane, whereas D₂LR is mostly retained in the Golgi apparatus. However, the molecular mechanisms and physiological roles of the intracellular D₂LR remain unclear. Interestingly, persistent ERK activation and D₂R protein synthesis is enhanced by dopamine in D₂LR transfected cells with PDGFR β , but not in D₂SR. The persistent kinase activation and protein synthesis are completely blocked by pertussis-toxin, PDGFR inhibitor and dynamin inhibitor, suggesting the dopamine-induced receptor internalization is involved in the activation of intracellular D₂LR-RTK signaling. In neuron specific *Pdgfr β* knockout (*Pdgfr β ^{-/-}*) mice, D₂R protein expression significantly decreased in the striatum. Taken together, the dopamine-induced internalization of D₂R and PDGFR β elicits persist activation of ERK pathways, thereby enhancing D₂R protein synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ドパミン D2 受容体、細胞内小器官、シグナル伝達機構

1. 研究開始当初の背景

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。ドパミン D2 受容体はほとんどの抗精神病薬が D2 受容体遮断作用を有しており、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関連していることから、統合失調症と関連している。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。さらに、遺伝子解析から、D2 受容体には統合失調症患者に共通する遺伝子多型が見出されている。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は不明である。

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、D2L 受容体 (D2LR) と D2S 受容体 (D2SR) 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 D2L 受容体は主に辺縁系、線条体中型有棘ニューロンの後シナプスに発現する。一方、D2S 受容体は自己受容体として黒質-線条体系ドパミンニューロンの神経終末に発現しており、ドパミン放出に抑制的に働く。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 Gi 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。これまで、D2L 受容体と D2S 受容体の cAMP 抑制を介する細胞内シグナル伝達に大きな違いはないとされてきた。

研究代表者は D2L 受容体細胞内第 3 ループの 29 アミノ酸残基に特異的に結合するタンパク質であり、細胞内小器官に局在する脂肪酸結合タンパク質 3 (Fatty acid binding protein 3; FABP 3) が D2L 受容体の機能を制御することを明らかにした (Shioda et al., *J Neurosci.* 2010)。D2 受容体作用薬での Gi からチロシンキナーゼ系を介する extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化において、D2S 受容体発現細胞は ERK 活性が一過性に上昇したが、D2L 受容体発現細胞は持続的な活性化が見られた。これらの結果は、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ことを示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ドパミン D2L 受容体の

細胞内小器官におけるシグナル伝達機構を明らかにすることである。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関連を持つ重要な受容体であり、D2L 受容体の細胞内小器官における新しい細胞内シグナル伝達機構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。

3. 研究の方法

D2L 受容体及び D2S 受容体を発現させた発現 HEK293T 細胞を用いて、D2L 受容体特異的な ERK 活性化機構を解析した。HEK293T 細胞を用いて、ドパミン刺激によりドパミン D2L 受容体を介して統合失調症原因分子のひとつである PDGFRβ が活性化されるか検討した。また、PDGFRβ 欠損マウスにおけるドパミン受容体の発現量を検討した。

4. 研究成果

HEK293T 細胞に D2LR と PDGFRβ を共発現した細胞では、ドパミン刺激による ERK と PDGFRβ の持続的な活性化が見られた。さらに、リボソームタンパク質 S6 の持続的なリン酸化によりドパミン D2 受容体の蛋白質合成が促進された。それらの活性化は pertussis-toxin, PDGFR 阻害剤、dynamin inhibitor により有意に抑制された。また、PDGFRβ 遺伝子欠損マウスの線条体において、ドパミン D2 受容体の蛋白質発現量は有意に減少した。これらの結果より、細胞内ドパミン D2L 受容体は PDGFRβ を介して持続的な ERK の活性化を引き起こし、ドパミン D2 受容体の蛋白質合成を促進することが示唆された。これまでの研究において、PDGFRβ 遺伝子の一塩基多型とハプロタイプが統合失調症との関連を示すことが報告されている。また、中枢神経特異的 PDGFRβ 欠損マウスでは、プレパルス抑制の低下等、統合失調症様行動が見られる。当研究室では、学習記憶障害と海馬 LTP の低下、及び海馬 CA1 神経細胞の樹状突起スパイン密度低下が見られることを報告している (Shioda et al., *Hippocampus.* 2012)。細胞内ドパミン D2L 受容体/PDGFRβ の持続的 ERK 活性化と病態との関連性について今後解析を続ける予定である。

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 14 件)

1. Shioda N, Ishikawa K, Tagashira H,

- Ishizuka T, Yawo H, Fukunaga K: Expression of a truncated form of the endoplasmic reticulum chaperone protein, sigma-1 receptor, promotes mitochondrial energy depletion and apoptosis. *J Biol Chem.* 287(28): 23318-31. doi: 10.1074/jbc.M112.349142. (2012) 査読有
2. Moriguchi S, Shioda N, Yamamoto Y, Tagashira H, Fukunaga K. The T-type voltage-gated calcium channel as a molecular target of the novel cognitive enhancer ST101: enhancement of long-term potentiation and CaMKII autophosphorylation in rat cortical slices. *J Neurochem.* 121(1):44-53. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07667.x. (2012) 査読有
 3. Shioda N, Moriguchi S, Oya T, Ishii Y, Shen J, Matsushima T, Nishijo H, Sasahara M, Fukunaga K: Aberrant hippocampal spine morphology and impaired memory formation in neuronal platelet-derived growth factor beta-receptor lacking mice. *Hippocampus.* 22(6):1371-8. doi: 10.1002/hipo.20973. (2012) 査読有
 4. Fukunaga K, Shioda N: Novel dopamine D2 receptor signaling through proteins interacting with the third cytoplasmic loop. *Mol Neurobiol.* 45(1):144-52. (2012) 査読有
 5. Shioda N, Fukunaga K: Abnormal dendritic spine morphology and its signal transduction mechanisms in mental retardation. *Seikagaku.* 83(12):1113-7. (2012) 査読有
 6. Yamamoto Y, Shioda N, Owada Y, Fukunaga K: Regulation of Dopaminergic Neuronal Activity by Heart-type Fatty Acid Binding Protein in the Brain. *Yakugaku Zasshi.* 131, 497-501. (2011) 査読有
 7. Shioda N, Yamamoto Y, Han F, Moriguchi S, Fukunaga K: Neurochemical mechanisms of a novel Alzheimer's disease therapeutics on improvement of cognition and depressive behavior. *Yakugaku Zasshi.* 131, 505-511. (2011) 査読有
 8. Shioda N, Fukunaga K: [Functional roles of constitutively active calcineurin in delayed neuronal death after brain ischemia]. *Yakugaku Zasshi.* 131, 13-20. (2011) 査読有
 9. Shioda N, Yamamoto Y, Owada Y, Fukunaga K: Dopamine D2 receptor as a novel target molecule for heart-type fatty acid binding protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 31(3):125-30. (2011) 査読有
 10. Shioda N, Beppu H, Fukuda T, Li E, Kitajima I, Fukunaga K: Aberrant calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity is associated with abnormal dendritic spine morphology in the ATRX mutant mouse brain. *J Neurosci.* 31, 346-358. (2011) 査読有
 11. Moriguchi S, Oomura Y, Shioda N, Han F, Hori N, Aou S, Fukunaga K: Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C activities mediate extracellular glucose-regulated hippocampal synaptic efficacy. *Mol Cell Neurosci.* 46, 101-107. (2011) 査読有
 12. Tagashira H, Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K: Distinct cardioprotective effects of 17beta-estradiol and dehydroepiandrosterone on pressure overload-induced hypertrophy in ovariectomized female rats. *Menopause.* 18(12):1317-26. (2011) 査読有
 13. Nogami T, Beppu H, Tokoro T, Moriguchi S, Shioda N, Fukunaga K, Ohtsuka T, Ishii Y, Sasahara M, Shimada Y, Nishijo H, Li E, Kitajima I: Reduced expression of the ATRX gene, a chromatin-remodeling factor, causes hippocampal dysfunction in mice. *Hippocampus.* 21, 678-687. (2011) 査読有
 14. Lu YM, Huang J, Shioda N, Fukunaga K, Shirasaki Y, Li XM, Han F: CaMK II δ B mediates aberrant NCX1 expression and the imbalance of NCX1/SERCA in transverse aortic constriction-induced failing heart. *PLoS One.* 6, e24724. (2011) 査読有
- [学会発表] (計 3 件)
1. 塩田倫史、澤井優広、福永浩司 ドパミン D2 受容体を介した CaMKII δ 3 核内移行制御機構第 86 回日本薬理学会年会 (平成 25 年 3 月 21 日~23 日、福岡)
 2. 塩田倫史、福永浩司: 神経細胞死における新規シグマ-1 受容体スプライスバリエントの機能的役割第 39 回 日本脳科学学会 (平成 24 年 10 月 6 日 ~ 7 日、福岡)

3. N. Shioda, K. Ishikawa, K. Fukunaga :
Identification and characterization of a novel
sigma-1 receptor splicing variant in mouse
brain Society for neuroscience, Neuroscience
meeting 2011 (Nov. 12-16, 2011,
Washington, DC, USA)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○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

http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~yakuri/yakuri_top.html

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・助教

研究者番号 : 00374950

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :