

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390062

研究課題名(和文)新規ドーパ受容体の機能解析

研究課題名(英文)Functional of GPR143, a novel G protein-coupled receptor for L-DOPA

研究代表者

五嶋 良郎 (Goshima, Yoshio)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00153750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ドーパは長らく単なるドパミンの前駆体として位置づけられてきた。我々は、1986年以来、ドーパ自体による薬理作用、ドーパの神経伝達物質様遊離、ドーパ拮抗薬の存在等を証明し、これらを通じて「ドーパ神経伝達物質仮説」を提起した(Misu and Goshima, 1993)。本研究は、眼白子症の原因遺伝子の1つ ocular albinism 1 (oa1)がコードする蛋白質 OA1がドーパ受容体として作動するとともに、中枢神経系及び末梢組織における発現を初めて明らかとした。

研究成果の概要(英文)：L-DOPA (DOPA) is generally considered to alleviate the symptoms of Parkinson's disease by its conversion to dopamine. We have proposed that DOPA is itself a neurotransmitter. However, specific receptors for DOPA have not been identified. In this study, we demonstrated that GPR143, the gene product of ocular albinism 1 (OA1), mediated DOPA-induced depressor and bradycardic response in the nucleus tractus solitarius. OA1 was expressed not only in the central nervous system such as substantia nigra, striatum, olfactory bulb, hypothalamic median eminence and lower brain stem, but also in peripheral tissues including liver, kidney, lung and spleen. These findings further add to the evidence for a neurotransmitter role for DOPA.

研究分野：神経生物学、分子薬理学

キーワード：ドーパ 眼白子症 神経伝達物質 G蛋白質連関型受容体 OA-1

1. 研究開始当初の背景

ドーパは長らく単なるドパミンの前駆体として位置づけられてきた。我々は、1986 年以来、ドーパ自体による薬理作用、ドーパの神経伝達物質様遊離、ドーパ拮抗薬の存在等を証明し、これらを通じて「ドーパ神経伝達物質仮説」を提起した (Misu and Goshima, 1993)。しかし、ドーパの特異的受容体の存在の有無は明らかではなかった。2006 年、Lopez らは眼白子症の原因遺伝子の 1 つ *ocular albinism1 (oa1)* がコードする蛋白質 OA1 がドーパをリガンドとして認識することを発表した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OA1 が我々が見出して来たドーパの薬理作用を担う受容体であるか否かを明らかにすることにある。また、OA1 の機能を検討するための糸口を得ることを目的として、特異的抗 OA1 抗体を作製し、免疫組織化学的検討を行う。

3. 研究の方法

OA1 を一定の細胞株 (CHO, ARPE-19) に発現させ、 $[^3\text{H}]$ -ドーパの特異的結合に及ぼすドーパシクロヘキシルエステル (DOPA cyclohexylester, DOPA CHE) (10 mM) の効果、およびドーパ (10 mM) による細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇効果および DOPA CHE による拮抗作用の有無を検討した。一方、Wistar 系ラットをウレタンで全身麻酔した。レスピレーターを用い人工換気した。大腿動脈へカニューレを挿入し、観血的に血圧 (Blood Pressure :BP) と心拍数 (Heart rate :HR) の測定を行った。ラット NTS 部位 (最後野より 0.6 mm 吻側、0.6 mm 外側、脳幹背側表面より 0.6 mm の深度) にガラス製のマイクロピペットを用いて薬液を微量注入し、血圧および心拍数を測定した。NTS の血圧下降部位における OA1 の発現を抑制するため、OA1 発現細胞株を用いてスクリーニングし、OA1 の発現を効果的に阻害するヘアピン RNA の配列を確定した。この配列のコード領域をアデノウイルスベクターに組み込み、NTS 部位に微量注入した。注入 3 日後、注入側および非注入側の NTS にドーパおよびグルタミン酸溶液を微量注入し、血圧・心拍数に及ぼす効果を比較検討した。有意差検定は、Student *t*-検定あるいは nonparametric Wilcoxon signed-rank 検定により行った。

ドーパ生合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) と OA1 に対する抗体を用い、NTS 領域を含む脳部位の免疫組織化学的検討を行った。ラットないし C57BL をホルマリンにより灌流固定して脳を摘出し、凍結して切片を作製した。抗 OA1 抗体、TH 抗体および蛍光二次抗体等を用いて、脳内 OA1 および TH の分布・局在を免疫組織化学的に検出した。

4. 研究成果

(1) OA1 発現細胞における特異的 $[^3\text{H}]$ -ドーパ結合活性：OA1 を発現する CHO 細胞から膜表品を調整し、 $[^3\text{H}]$ -DOPA を用いて、ドーパの特異的結合を検出した。同結合に対して、DOPA CHE は濃度依存性に阻害した。

(2) ARPE-19 細胞におけるドーパ応答：ドーパが OA1 を介して、何らかの細胞応答を示すか否かを検討するため、OA1 を発現する CHO 細胞において、カルシウム指示薬である Fura-2 を負荷した同細胞において、ドーパにより細胞内カルシウム上昇が起こるか否かを検討した。CHO 細胞においては、ドーパ応答に再現性が乏しかったため、本来、OA1 を高発現する網膜色素上皮由来の細胞株である ARPE-19 細胞に、OA1 を過剰発現して、ドーパ応答の有無を確認したところ、ドーパは再現性よくカルシウム応答を惹起した。この応答は、DOPA CHE の前処置により抑制された (図 1)。

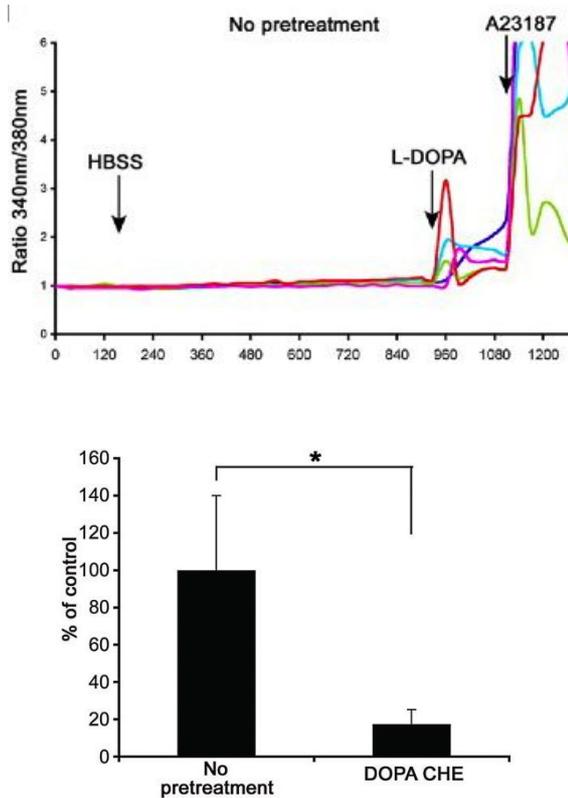


図1 OA-1 発現細胞 ARPE-19 においてドーパ(L-DOPA) 10 μM は、細胞内カルシウム濃度を上昇させる(上図)。A23187 はカルシウムイオノフォア。DOPA CHE は、この応答を抑制する(下図)。(文献より改変)

(3) OA1 を介するラット NTS におけるドーパ応答 : OA1 が、ドーパの *in vivo* における応答をも媒介する受容体であるか否かを検討するため、OA1 の発現を抑制する効果を有する配列を持つ shRNA ベクターを NTS 領域に微量注入し、ドーパおよびグルタミン酸に対する血圧・心拍応答を検討した。OA1 shRNA を注入した NTS 側において、ドーパ応答は血圧下降および徐脈応答ともに抑制された。一方、グルタミン酸による降圧・徐脈応答は OA-1 shRNA により全く修飾を受けなかった (図 2)。

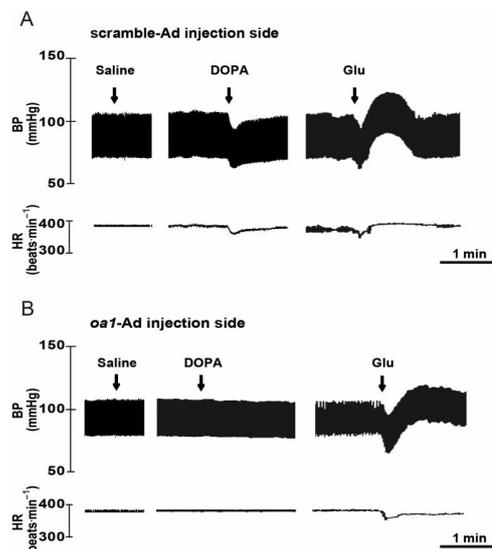


図 2 NTS に発現する OA1 はドーパの降圧・徐脈応答を媒介する。OA1 shRNA の NTS への処置は、ドーパ応答を抑制、グルタミン酸応答には無作用である。OA1 Bar, 1 min. (文献 より改変)

(4) OA1 の局在 : OA1 の NTS における局在を TH と OA1 に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析により、OA1 陽性細胞は、NTS の血圧下降領域に局在し、TH 陽性細胞の近傍に存在することが判明した。同シグナルは抗 OA1 抗体の作製に用いた抗原ペプチドの過剰処置によりブロックされた (文献)。OA1 の発現をさらに確認するため、*oa1* 遺伝子欠損マウスを作製 (*oa1*^{-/-})し、抗体染色を行って OA1 の特異的シグナルを検出した。その結果、OA1 は線条体、内側手綱核、海馬 CA1、延髄孤束核等に認められ、これらはすべてマウスにおいて消失した (図 3)。また OA1 は心臓、腎臓、脾臓、肝臓、肺などの末梢組織にも発現が認められた (文献)。なお、中枢神経系における OA1 の分布は、ラットとマウス間で一致した (文献、)。

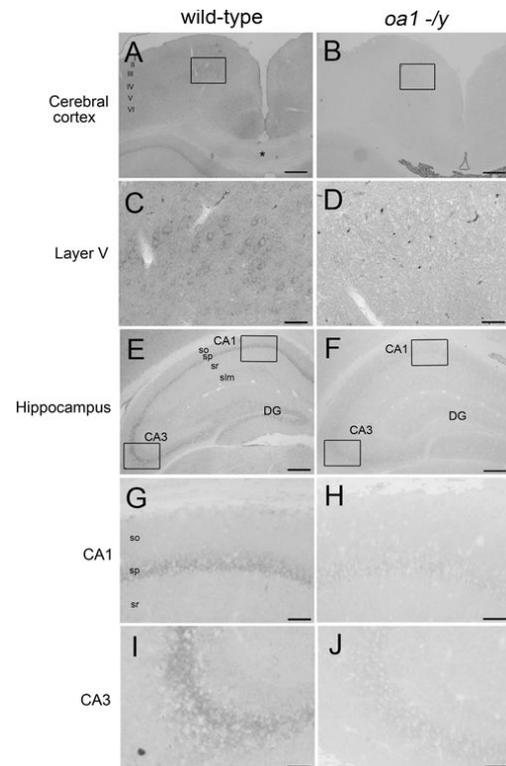


図 3 野生型 (wild-type) ならびに *oa1*^{-/-} マウスにおける抗 OA1 抗体を用いた中枢神経組織における免疫組織化学像。Scale bar= 250 μm in A, B; inset; 50 μm inset; 50 μm in C, D; 250 μm in E, F, I, J; 50 μm, inset; 50 μm in G, H. (文献 より改変)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Fukuda N, Nakamura F(9 番目), Goshima Y (10 番目) et al (10 名), Expression of ocular albinism1(OA1), 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine(DOPA)receptor, in both neuronal and non-neuronal organs, Brain Research, 査読有, Vol. 1602, 2015, pp. 62-74, DOI:10.1016/j.brainres.2015.01.020.

Masukawa D, Nakamura F(2 番目), Goshima Y(8 番目) et al (8 名), Localization of ocular albinism-1 gene product GPR143 in the rat central nervous system, Neuroscience Research, 査読有, Vol. 88, 2014, pp. 49-57, DOI:10.1016/j.neures.2014.07.008.

Hiroshima Y, Nakamura F(3 番目), Goshima Y(12 番目) et al (12 名), The protein Ocular albinism 1 is the orphan GPCR GPR143 and mediates depressor and bradycardic responses to DOPA in the nucleus tractus

solitariai, British Journal of Pharmacology, 査読有、Vol.171、2014、pp.403-414、DOI:10.1111/bph.12459.

〔学会発表〕(計12件)

Goshima Y, The gene product of ocular albinism 1 is the G protein-coupled receptor mediates depressor and bradycardic responses to DOPA in the nucleus tractus solitariai, World Congress of basic & clinical Pharmacology 2014, 2014年7月17日, ケープタウン(南アフリカ共和国)

Masukawa D, Nakamura F, Goshima Y, DOPA-induced depressor and bradycardic response in the oa1-deficient mice, World Congress of basic & clinical Pharmacology 2014, 2014年7月17日, ケープタウン(南アフリカ共和国)

Nakamura F, OA1 mediates L-DOPA induced Ca²⁺ response in cultured hippocampal neurons, 第87回日本薬理学会年会, 2014年3月21日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Kamiya M, Nakamura F, Goshima Y, 中枢神経系における新規 L-DOPA 受容体 OA-1 の発現分布, 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月21日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Goshima Y, Brainstem DOPAergic System, The 10th International Catecholamine Symposium, 2012年9月11日, パシフィックグループ(米国)

〔図書〕(計1件)

Goshima Y(Edited by Lee Eiden), Academic Press, Catecholamine Research in the 21st Century-Abstracts and Graphical Abstracts, 10th International Catecholamine Symposium, 2012、2013、328(18-18)

〔その他〕

横浜市立大学分子薬理神経生物学教室
ホームページ
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~pharmac/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

五嶋 良郎(GOSHIMA, Yoshio)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 00153750

(2)研究分担者

中村 史雄(NAKAMURA, Fumio)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 10262023

及川 雅人(OIKAWA, Masato)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授
研究者番号: 70273571

鈴木 勉(SUZUKI, Tsutomu)
星薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90130757

(3)連携研究者

岡部 隆義(OKABE, Takayoshi)
東京大学・創薬機構・特任教授
研究者番号: 80570671

福西 快文(FUKUNISHI, Yoshifumi)
独立行政法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・研究チーム長
研究者番号: 60357895