

(様式5)

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ドーパミン神経回路の細胞質-核間輸送制御機構の解明

研究代表者 板倉 誠¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾，齊藤 奈英²⁾

1) 北里大学医学部生化学 2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

ドーパミン神経回路は、不安や恐怖といった情動に深く関与している。中脳黒質緻密部や腹側被蓋野にはドーパミン作動性神経細胞が存在し、線条体，扁桃体，側坐核などに投射している。分泌されるドーパミンは、投射先のドーパミン受容体を介して、短期的・長期的な作用をもたらす。また神経前終末にもドーパミン受容体は存在し、ドーパミン作動性神経細胞の機能制御に関与する。

嫌悪記憶の形成では、ドーパミン神経回路に長期的な変化が起きると考えられるが、その際にはドーパミン受容体シグナルによって核内への情報伝達が起き、転写制御が行われていると示唆される。本研究では、ドーパミン神経回路を形成する神経細胞の細胞質-核間輸送タンパク質の翻訳後修飾の変化を同定し、この翻訳後修飾がドーパミン依存的な嫌悪記憶形成の細胞質-核間物質輸送をどのように制御しているかを、ドーパミン受容体遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。

A. 研究目的

嫌悪記憶は、不安障害や心的外傷後ストレス障害などの精神疾患の発症と密接な関係がある。これら精神疾患の治療法の開発には、嫌悪記憶の形成や想起の分子メカニズムを詳細に理解する必要がある。近年、ドーパミン神経回路が嫌悪記憶に関与することが明らかになりつつある。そこで、本研究ではドーパミン神経回路の嫌悪記憶形成に、転写を制御している細胞質-核間輸送タンパク質(インポーチンファミリー，低分子量Gタンパク質 Ran 制御分子など)の翻訳後修飾がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. 神経モデル細胞を用いた細胞質-核間輸送タンパク質の翻訳後修飾の同定

ドーパミンを分泌する神経モデル PC12 細胞を

用いて、細胞質-核間輸送タンパク質が、記憶形成に関与する一酸化窒素(NO)シグナルによって、どのような変化を起こすのかを検討する。

PC12 細胞を NO ドナー (Sodium Nitroprusside, SNP など)で処理し、ウェスタンブロットにより NO シグナルによって、細胞質-核間輸送タンパク質に変化が生じるかを明らかにする。次に NO シグナルが、細胞質-核間輸送タンパク質の翻訳後修飾をどう変化させるのかを、LC-MS/MS (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific)を用いて同定する。

2. ドーパミン受容体ノックアウトマウスおよびノックダウンマウスの翻訳後修飾の定量プロテオーム解析

新潟大学脳研究所・笹岡教授が作成したドーパミン受容体ノックアウトマウスやノックダウンマウスおよび野生型マウスの脳スライスを、NO ドナー SNP で処理する。その脳スライス(大脳皮質，

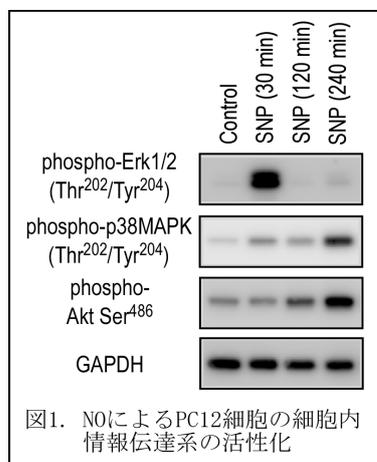
海馬，線条体)をサンプルとして、LC-MS/MS (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific) を用いた定量プロテオーム解析を行い、細胞質-核間輸送タンパク質の翻訳後修飾の変化を同定する。

次に、恐怖条件付けテスト装置を用いてマウス足への電気刺激を行い、嫌悪記憶を形成させる。嫌悪記憶を形成した野生型マウスおよびドーパミン受容体遺伝子改変マウスの脳内において、細胞質-核間輸送タンパク質の翻訳後修飾が起きているかを、翻訳後修飾部位の抗体（翻訳後修飾ペプチドを抗原としてウサギで作成する。）を用いて確認する。野生型マウスと遺伝子改変マウスで差のある翻訳後修飾が見つければ、その翻訳後修飾は、ドーパミン受容体シグナルに関連していると考えられる。

C. 研究結果

1. NOシグナルによるPC12細胞の細胞内情報伝達系の活性化

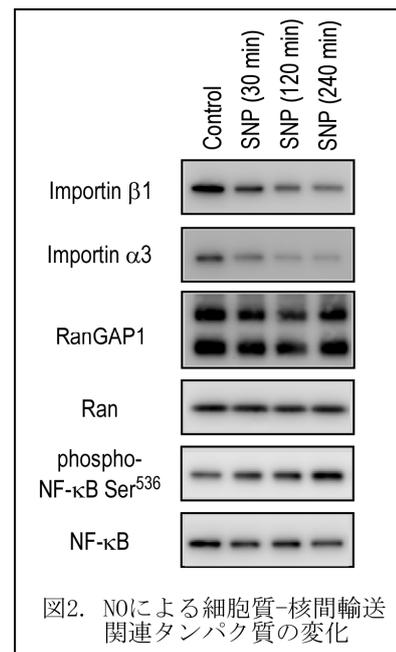
PC12細胞をNOドナー(0.5 mM SNP)で処理し、ウエスタンブロットにより細胞内情報伝達系が活性化しているかを検討した(図1)。



その結果、MAPキナーゼ Erk1/2は、30 minのSNP処理で一過的に活性化が見られるのに対して、p38MAPKおよびAktキナーゼについては、240 minで活性化されるのが明らかになった。

2. NOシグナルによるPC12細胞の細胞質-核間輸送タンパク質の変化

次にNOドナー(0.5 mM SNP)で処理したPC12細胞の細胞質-核間輸送タンパク質および転写制御因子であるNF-κB (p65)に変化が起きるかの検討を行った。



その結果、SNP処理によって核輸送タンパク質インポーチンβ1およびα3の発現量が減少した。インポーチンの機能制御に関わる低分子量Gタンパク質Ranの発現量は、ほとんど変化が見られないのに対して、RanのGTPase活性化因子RanGAP1の発現量は、一過的に減少し、240 min後に再び上昇した。またアポトーシスを抑制するとされる転写制御因子NF-κBのリン酸化が徐々に亢進していくことが観察された。

D. 考察

記憶形成に関与するNOシグナルは、神経モデルPC12細胞の細胞内情報伝達系を経時的に活性化し、細胞質-核間輸送タンパク質の発現量に影響を与えることが明らかになった。今後は、発現量だけでなく、NOシグナルが細胞質-核間輸送タンパク質の翻訳後修飾に変化をもたらすのかを明らかにする必要がある。

E. 結論

記憶形成を制御しているNOシグナルの活性化は、PC12細胞において細胞質-核間輸送タンパク質の発現量を変化させた。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表
0件
2. 学会発表

0 件

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

0 件