

学 位 論 文 題 名

Dopamine receptors in fish retinae: Molecular studies
of receptor subtype expression in retinae

（魚類網膜のドーパミン受容体：網膜における受容体
サブタイプ発現に関する分子生物学的研究）

学位論文内容の要旨

数多くの動物はその生活において外界からの視覚情報に多分に依存している。脊椎動物の網膜は、外界の光の強度に応じてその光感度を順応させることができ、その調節の幅は、常用対数単位で10におよぶ（つまり10億倍以上の幅をカバーする）。この網膜の明暗順応は、網膜神経活動の連続的な変化によって行われ、多くの因子がその順応過程を制御していることが知られている。ドーパミンはそのなかでも最も効果の強い因子の一つとして知られており、特に明所視での明暗順応において明信号としての効果を持つ。また、ドーパミンは網膜において神経伝達物質ならびに神経制御因子として、ほぼ全ての網膜神経細胞に対する効果を持つ。ドーパミンの網膜における効果は、特に冷血脊椎動物（魚類、両生類）において最もよく研究されており、細胞レベルでの効果の機構が解明されている。それらの効果は、網膜運動反応における錐体視細胞の明期縮小、水平細胞間ギャップ結合の脱共役、視細胞から水平細胞への入力（グルタミン酸）の増強、水平細胞シナプスにおける小突起の形成等があり、どれもドーパミンと網膜明暗順応の密接な関係を示唆している。

ドーパミンの細胞に対する効果は、大きく分けて2種あるドーパミン受容体（D₁-likeおよびD₂-like）によって介在される。これら2種のドーパミン受容体

は、一般に細胞内酵素アデニル酸シラーゼに対して相反する薬理学的な効果によって分類される。すなわち、 D_1 -like受容体はGsクラスのGタンパク質を介し、アデニル酸シラーゼを活性化して細胞内cAMPの濃度を上昇させる。一方、 D_2 -like受容体はGi/GoクラスのGタンパク質を介し、アデニル酸シラーゼの活性を抑制して細胞内cAMPの濃度を低下させる。また、脊椎動物においてそれぞれ D_1 -likeおよび D_2 -likeに分類されるいくつかの受容体サブタイプの存在が報告され、それらの受容体はドーパミンに対する感受性の差や、その細胞内情報伝達機構にも異なる性質を持つことが知られている。現在まで5つのサブタイプが脊椎動物では単離され、その性質が調べられている。それらは2サブタイプ (D_{1A}/D_1 , D_{1B}/D_5) が D_1 -like、3サブタイプ (D_2 , D_3 , D_4) が D_2 -likeに属している。近年さらに D_1 -likeの2サブタイプ (D_{1C} , D_{1D}) が魚類、両生類、鳥類から単離され、また、別のサブタイプの存在も示唆されている。このように、近年の分子生物学の発展とともに、多数のドーパミン受容体サブタイプが単離同定され、それらの神経系における分布、薬理学的な効果が解明されつつある。しかし、細胞レベルでのドーパミン効果における受容体サブタイプの役割については、依然として不明な点が多い。また、網膜においてはドーパミン効果に関する詳細な知見はあるが、受容体サブタイプに関する分子生物学的知見は少ない。

本研究では、脊椎動物視覚系モデルとして詳細に研究されている魚類網膜に注目し、ドーパミン受容体サブタイプの情報伝達系における機能、および網膜明暗順応機構においてドーパミン受容体サブタイプが果たす制御の役割を明らかにする事を目的とし、網膜において発現されるドーパミン受容体サブタイプの単離同定、発現細胞ならびに発現調節機構に関する研究を行い、以下の知見を得た。

(1) コイ網膜より8ドーパミン受容体様cDNAクローンを、ヨーロッパウ

ナギ網膜より4ドーパミン受容体様cDNAクローンを単離した。DNA塩基配列より推測されたアミノ酸配列の解析の結果、これらのcDNAクローンはこれまでに単離同定されているドーパミン受容体サブタイプと非常に高い相同性を示した。これらのドーパミン受容体様cDNAクローンは、アミノ酸配列の類似性および分子系統樹を用いた解析から、コイ網膜からの5サブタイプ (D_{1A3} , D_{1A4} , D_{1B} , D_{1C} , D_{1X}) およびウナギ網膜からの4サブタイプ (D_{1A1} , D_{1A2} , D_{1B} , D_{1C}) は、 D_1 -likeドーパミン受容体、コイ網膜の3サブタイプ (D_2 , D_{4A} , D_{4B}) は D_2 -likeドーパミン受容体と推定された。ウナギ網膜からは D_2 -likeドーパミン受容体は単離されなかった。これらの受容体サブタイプの中で、コイ D_{1A3} と D_{1A4} 、コイ D_{4A} と D_{4B} 、ウナギ D_{1A1} と D_{1A2} の対は非常に高い相同性を示した。コイ D_{1X} の第3細胞質ループは他の D_1 -likeと異なり、異なる細胞内情報伝達系と共役する可能性が示唆された。

(2) (1) で単離同定されたドーパミン受容体サブタイプのmRNAを発現する網膜神経細胞を同定するため、これら受容体サブタイプのRNAプローブを用いインシトゥハイブリダイゼーションをコイ網膜凍結切片上で行った。 D_{1A} , D_{1B} , D_{1C} 受容体サブタイプのハイブリダイゼーションシグナルは、全ての網膜顆粒層に検出された。 D_{1X} のハイブリダイゼーションシグナルは内顆粒層に細胞体を持つ一部の細胞に見られ、 D_2 , D_{4A} のmRNAは強いハイブリダイゼーションシグナルが外顆粒層で検出された。この結果、ほぼ全ての網膜神経細胞において、少なくとも1サブタイプのドーパミン受容体mRNAが発現されていることが明らかとなった。以上の結果は、これまでに知られている網膜におけるドーパミンの効果が、数多くの受容体サブタイプによって介在されているとともに、これまで効果の詳細が不明であったアマクリン細胞や神経節細胞も直接ドーパミンの影響下にあることが示唆された。

(3) 脊椎動物の神経系において、ドーパミン産生細胞の破壊はドーパミン

受容体の反応性を高めることが知られており、この現象は"receptor upregulation"と呼ばれる。網膜においてもこの現象は報告されているが、そのメカニズムに関する知見は乏しい。そこでドーパミン産生細胞を選択的に破壊する神経毒（6-OHDA）を眼球内注射して、ドーパミン受容体mRNAの発現量をQuantitative PCR法を用い定量的分析を行った。その結果、発現量を検出することに成功した全ての受容体サブタイプのmRNA発現量に有意な差はなかった。しかし、 D_{1A4} と D_{4A} サブタイプは増加の傾向を示し、サブタイプによって異なる発現調節機構の存在の可能性が示唆された。

（４）魚類網膜におけるドーパミンの明暗順応に対する様々な効果は、数多くの受容体サブタイプにより介在されていることが示唆された。本研究の結果およびこれまでに報告されている知見を基に、網膜の明暗順応における神経細胞間のギャップ結合の役割、ドーパミンの制御因子のとしての性質、各網膜神経細胞に対するドーパミンの効果と受容体サブタイプの役割を考察した。

以上の結果から、本研究ではこれまで不明であった網膜におけるドーパミン受容体サブタイプの多様性を明らかにしたのみでなく、脊椎動物神経系全体におけるドーパミンの効果を調べる上で新たな知見を提供した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 崎 健 二

副 査 教 授 山 崎 文 雄

副 査 教 授 麦 谷 泰 雄

副 査 教 授 Mustafa B. A. Djamgoz

学 位 論 文 題 名

Dopamine receptors in fish retinae: Molecular studies of receptor subtype expression in retinae

(魚類網膜のドーパミン受容体：網膜における受容体
サブタイプ発現に関する分子生物学的研究)

脊椎動物の網膜は、外界の光の強度に応じてその光感度を順応させる。この明暗順応は、多くの因子より制御されており、ドーパミンはそのなかでも最も効果の強い因子の一つとして知られており、特に明所視での明暗順応において明信号としての効果を持つ。ドーパミンの脊椎動物網膜における効果は、網膜運動反応における錐体視細胞の明期縮小、水平細胞間ギャップ結合の脱共役、視細胞から水平細胞への入力（グルタミン酸）の増強、水平細胞シナプスにおける小突起の形成等があり、どれもがドーパミンと網膜明暗順応の密接な関係を示唆している。

ドーパミンの細胞に対する効果は、大きく分けて2種あるドーパミン受容体 (D_1 -likeおよび D_2 -like) によって介在される。 D_1 -like受容体は、アデニル酸シラーゼを活性化して細胞内cAMPの濃度を上昇させ、 D_2 -like受容体は、アデニル酸シラーゼの活性を抑制して細胞内cAMPの濃度を低下させる。現在まで5つのサブタイプが脊椎動物では単離され、その性質が調べられている。4サブタイプ (D_{1A}/D_1 , D_{1B}/D_5 , D_{1C} , D_{1D}) が D_1 -like、3サブタイプ (D_2 , D_3 , D_4) が D_2 -likeに属している。また、別のサブタイプの存在も示唆されている。多数のドーパミン受容体サブタイプが単離同定され、それらの神経系における分布、薬理的な効果は解明されつつあるが、細胞レベルでのドーパミン効果における受容体サブタイプの役割については、依然として不明な点が多い。また、網膜においてはドーパミン効果に関する知見はあるが、受容体サブタイプに関する分子生物学的知見は極めて少ない。

本研究では、脊椎動物視覚系モデルとして詳細に研究されている魚類網膜に注目し、ドー

パミン受容体サブタイプの情報伝達系における機能、および網膜明暗順応機構においてドーパミン受容体サブタイプが果たす制御の役割を明らかにする事を目的とし、網膜において発現されるドーパミン受容体サブタイプの単離同定、発現細胞ならびに発現調節機構に関する研究を行い、以下の知見を得た。

(1) コイ網膜より8、ヨーロップウナギ網膜より4ドーパミン受容体様cDNAクローンを単離した。アミノ酸配列の解析の結果、これらのcDNAクローンはこれまでに単離同定されているドーパミン受容体サブタイプと非常に高い相同性を示した。これらのドーパミン受容体様cDNAクローンは、コイ網膜からの5サブタイプ (D_{1A3} , D_{1A4} , D_{1B} , D_{1C} , D_{1X}) およびウナギ網膜からの4サブタイプ (D_{1A1} , D_{1A2} , D_{1B} , D_{1C}) は、 D_1 -likeドーパミン受容体、コイ網膜の3サブタイプ (D_2 , D_{4A} , D_{4B}) は D_2 -likeドーパミン受容体と推定された。特にコイ D_{1X} の第3細胞質ループは他の D_1 -likeと異なり、異なる細胞内情報伝達系と共役する可能性が示唆された。

(2) (1) で単離同定されたコイ網膜ドーパミン受容体サブタイプのmRNAを発現する網膜神経細胞を同定するため、これら受容体サブタイプのRNAプローブを用いインシトゥハイブリダイゼーションを行った。受容体サブタイプのハイブリダイゼーションシグナルは、全ての網膜顆粒層に検出された。以上の結果は、これまでに知られている網膜におけるドーパミンの効果が、数多くの受容体サブタイプによって介在されているとともに、これまで効果の詳細が不明であったアマクリン細胞や神経節細胞も直接ドーパミンの影響下にあることが示唆された。

(3) 網膜におけるドーパミン受容体の"receptor upregulation"現象は報告されているが、そのメカニズムに関する知見は乏しい。そこでドーパミン産生細胞を選択的に破壊する神経毒(6-OHDA)を眼球内注射して、ドーパミン受容体mRNAの発現量をQuantitative PCR法を用い定量的分析を行った。その結果、受容体サブタイプのmRNA発現量に有意な差はなかったものの、 D_{1A4} と D_{4A} サブタイプは増加の傾向を示し、サブタイプによって異なる発現調節機構の存在の可能性が示唆された。

(4) 魚類網膜におけるドーパミンの明暗順応に対する様々な効果は、数多くの受容体サブタイプにより介在されていることが示唆された。本研究の結果およびこれまでに報告されている知見を基に、網膜の明暗順応における各網膜神経細胞に対するドーパミンの効果と受容体サブタイプの役割を考察した。

以上の分子生物学的解析に基づく研究成果は、これまで不明であった網膜におけるドーパミン受容体サブタイプの多様性を明らかにしたのみでなく、脊椎動物神経系全体におけるドーパミンの効果を調べる上で新たな視点をもたらしたものと高く評価され、本論文が博士(水産学)の学位請求論文として相当の業績であると認定した。