

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

ドーパミン D2 受容体の選択的スプライシング調節機構

## 氏名

笹邊 俊和

## 背景

ドーパミンは、報酬効果、情緒、注意や作業記憶などの認知機能、随意運動などの調節に中心的な役割を果たすモノアミン系の神経伝達物質である。そのため、ドーパミン神経系の障害は薬物依存、統合失調症、注意欠陥多動性障害（ADHD）、パーキンソン病などの多様な疾患の要因となっている。ドーパミンの受容体には5つのサブタイプがあり、中でも D2 受容体は脳内に最も豊富に発現している主要な受容体である。

ドーパミン D2 受容体の遺伝子は8つのエクソンから成るが、そのうち6番目のエクソンが選択的にスプライシングされるため、アミノ酸配列が長い D2L と短い D2S の2つのスプライスバリエントが生成される。このエクソン6は D2 受容体の細胞内第3ループ部分に相当する29残基のアミノ酸をコードしているため、D2L と D2S はタンパク質レベルで異なった性質を有することになる。例えば、D2L と D2S ではシグナルの下流に位置するタンパク質が異なることや、脳の部位によって発現量が異なることなどが報告されている。また、D2L と D2S の両方を持たないマウスでは薬物に対する嗜好性が低下するが、D2S のみを持っている場合では嗜好性が低下しないことなどから、個体レベルでも2つのスプライスバリエントは異なる機能を担っていることが知られている。

これらのことから、D2L と D2S の量比のバランスはドーパミン神経系の機能にとって重要であると考えられるが、それを規定している選択的スプライシングがどのように

調節されているかについてはほとんど分かっていない。そこで、本研究ではドーパミン D2 受容体の選択的スプライシングを調節している分子メカニズムを解明することを目的として実験を行った。

## 材料と方法

選択的スプライシングの調節機構を調べるため、minigene を用いた RT-PCR 法を行った。minigene とは、遺伝子配列の一部をイントロンを含んだ状態でクローニングしたものである。今回のドーパミン D2 受容体の minigene では、選択的なエクソン 6 と、その前後のエクソンまでを含む配列を用いた。また、ドーパミン D2 受容体の選択的スプライシングに関わるタンパク質を調べるために、過剰発現用のコンストラクトやノックダウン用の siRNA を用いた。

## 結果

まず、スプライシングを調節することが知られている 11 個の RNA 結合タンパク質をドーパミン D2 受容体の minigene とともに HEK293 細胞に発現させたところ、PTBP1 を発現させた時にのみ D2S の割合が減少することが分かった（次ページの図を参照）。次に、HEK293 細胞と SH-SY5Y 細胞を用いて、PTBP1 の発現を siRNA によってノックダウンさせたところ、D2S の割合が増加したため、内在の PTBP1 が確かにドーパミン D2 受容体の選択的スプライシングに影響していることが確認された。これらの PTBP1 による効果は SH-SY5Y 細胞における内在のドーパミン D2 受容体に対しても同様であることも確認した。また、minigene の配列の一部を欠失させた際の PTBP1 の効果を調べた所、選択的なエクソン 6 に隣接する上流と下流のイントロンを欠失させた場合には PTBP1 の効果が消失することが分かった。

さらに、外部刺激としてエタノールを添加したところ、PTBP1 を過剰発現させた際と同様に D2S の割合が減少することが分かった。

## 考察

本研究では、ドーパミン D2 受容体の選択的スプライシング調節に関与するタンパク質を初めて明らかにした。PTBP1 の過剰発現によって D2S の割合が減少し、PTBP1 のノックダウンで D2S の割合が増加することから、PTBP1 はエクソン 6 の挿入を促進していると考えられる。欠失を導入した結果からは、PTBP1 が作用しているドーパミン D2 受容体の配列が同定され、他のスプライシング調節タンパク質による関与も示唆された。

また、先行研究と同様に、エタノールによってもドーパミン D2 受容体の選択的スプライシングが変化することを示した。エタノールの添加によってリン酸化酵素 PKA が活性化されることが知られているが、加えて、PKA は PTBP1 をリン酸化することも報告されている。そのため、エタノールによる選択的スプライシング調節のメカニズムとして、PKA を介した PTBP1 のリン酸化状態の変化が考えられる。

先行研究の結果から、D2S の割合が低くなるとアルコール依存症などの薬物依存症になるリスクが高まることが予測される。そのため、エタノールや PTBP1 による D2S の減少が薬物依存症の発症メカニズムの一端を担っている可能性が考えられる。その場合、PKA や PTBP1 が薬物依存症の治療標的として利用できることが期待できる。

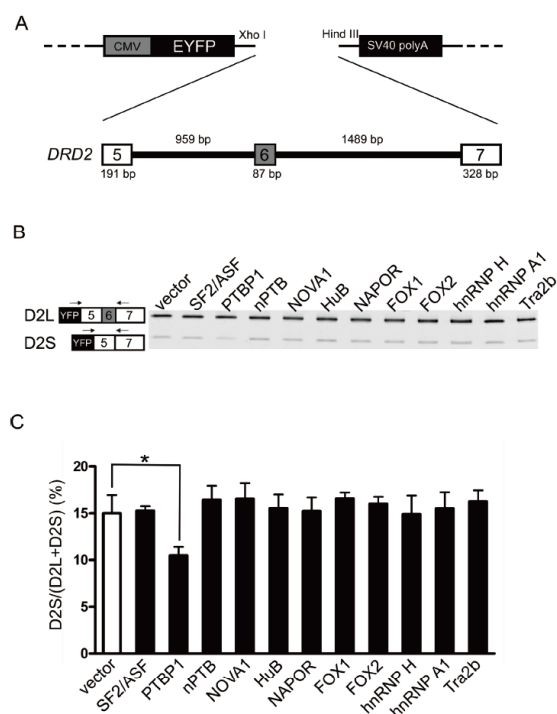


図. PTBP1 によるドーパミン D2 受容体の選択的スプライシングへの影響

A. ドーパミン D2 受容体の minigene. エクソン 5 からエクソン 7 までの配列が EYFP と融合して発現するように設計されている。B, C. スプライシング調節タンパク質と同時に minigene を発現させた際の RT-PCR の結果。PTBP1 を発現させた場合のみ D2S の割合が減少した。