

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 笹邊 俊和

ドーパミン D2 受容体はドーパミン受容体の 5 つのサブタイプの中でも脳内に最も豊富に発現している主要な受容体であり、ドーパミン神経系は報酬効果、認知制御、随意運動の調節などを司っている。そのため、ドーパミン D2 受容体の発現の変化は、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様々な疾患の発症要因になると考えられている。

ドーパミン D2 受容体の発現制御に関しては、発現の全体量だけでなく、スプライスバリエーションの量比の制御も考慮する必要がある。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 番目のエクソンは選択的スプライシングによって挿入される場合と除外される場合があり、その結果、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ーションが生成される。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ーションは異なる機能を担っていることが知られている。

論文提出者は、ドーパミン D2 受容体遺伝子に存在するある一塩基多型 (rs1076560) のうち、アレル T を有する方がアルコール依存症になるリスクが高いことを以前に報告した (Sasabe et al., *Neuroscience Letters*, 2007)。その後、アレル T を有する方が D2S スプライスバリエーションの発現量の割合が少ないことも報告されている。

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り、その変化が薬物依存症などの疾患を発症する一要因になることが考えられるが、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かった。論文提出者は、学位請求論文において、ドーパミン D2 受容体の選択的スプライシング調節に重要な遺伝子配列と、選択的スプライシング調節を担うタンパク質の同定をおこなった。

論文提出者は、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。これを HEK293 細胞にトランスフェクションし、細胞内で産生される D2L と D2S の割合を求めた。

まず、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 をドーパミン D2 受容体の minigene と同時にトランスフェクションした。神経系において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 結合タンパク質を過剰発現させたところ、PTBP1 (polypyrimidine tract-binding protein 1) を発現させた時にのみ D2S の割合が有意に減少することが分かった。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 の効果を調べたところ、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、minigene をトランスフェクションした HEK293 細胞に、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も分かった。

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。そこで、本研究の結果から、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、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。

以上の結果は、ドーパミン D2 受容体の発現制御について新しい知見を加えたものであり、したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するのにふさわしいものと認定する。