

# ADP-ribosyl cyclase coupled with dopamine receptors: Application to Parkinson's disease

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Higashida, Haruhiro メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00049434">https://doi.org/10.24517/00049434</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.





---

ドーパミン受容体とカップルする  
ADPリボース環状化酵素：  
パーキンソン病脳への応用

---

(課題番号:15300124)

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金  
( 基盤研究(B) )研究成果報告書

金沢大学附属図書館



0700-03168-5

平成18年5月

研究代表者 東田 陽博  
金沢大学大学院医学系研究科・教授

## 目 次

1. はしがき .....	1
2. 研究組織 .....	2
3. 研究経費 .....	3
4. 研究発表 (1) 学会誌等 .....	4
(2) 口頭発表 .....	7
(3) 出版物 .....	10
5. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況 .....	11
6. 研究成果 (日本語版) .....	12
6-1 研究の背景	
6-2 cADPR	
6-3 ADP-ribosyl cyclase	
6-4 cADPR 産生の調節機構	
6-5 受容体-ADP-ribosyl cyclase のカップリング	
6-6 脳線条体のドーパミン受容体	
6-7 線条体プレシナプスのドーパミン受容体と CD38	
6-8 おわりに	
7. 研究成果 (英語版) .....	21
7-1 Research Summary	
7-2 ADP-Ribosyl Cyclase as a Therapeutic Target for Central Nervous System Diseases	
7-3 Overexpression of human CD38/ADP-ribosyl cyclase enhances acetylcholine-induced Ca <sup>2+</sup> signaling and M/KCNQ-current inhibition in rodent NG108-15 neuroblastoma cells	
8. 謝辞と展望 .....	22

金沢大学附属図書館



0700-03168-5

## 1. はしがき

私達は 20 年来、受容体からイオンチャンネルに到るシグナル伝達について研究している。ことにムスカリン性アセチルコリンやブラジキニン両受容体刺激により、イオンコンダクタンスを減少させ膜を興奮させるMタイプのカリウム ( $K^+$ ) イオン (KCNQ2/3 Kv7.2) チャンネルに興味を持っている。最近は KCNQ チャンネルが足場蛋白質 AKAP と複合体を形成してチャンネル活性を制御していることを報告した (N. Hoshi, H. Higashida, et al., Nature Neuroscience, 2003)。

またカリウムチャンネルの新しい発現機能調節因子である cADPR を cADPR 産生酵素 (ADP-ribosyl cyclase) 活性を持つリンパ球細胞膜表面抗原であるヒト CD38 cDNA の大量発現細胞を作り研究している。

ここでは、CD38 を大量発現した細胞の性質調査するとともに、脳線条体における、ドーパミンの効果とドーパミンの遊離に注目して実験した成果についてのべる。究極の目標である、新分子の同定は、まだ見るべき成果をあげていない現実である。

## 2. 研究組織

研究代表者 : 東田陽博 (金沢大学大学院医学系研究科・教授)

研究分担者 : 横山 茂 (金沢大学大学院医学系研究科・助教授)

### 3. 研究経費

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	5,800,000	0	5,800,000
平成16年度	4,700,000	0	4,700,000
平成17年度	3,700,000	0	3,700,000
総計	14,200,000	0	14,200,000

#### ◎ 購入した設備備品

マイクロダイアリス

（エイコム HTEC500 脳アミノ酸分析用）

#### 4. 研究発表

##### (1) 学会誌等

1. Hagiwara N, Ikeda K, Higashida H, Tomita K, Yokoyama S. : Induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  in Schwann cells after gradual elongation of rat sciatic nerve.  
J Orthop Sci. 10: 614-621, 2005.
2. Zhang JS, Jin D, Higashida H. : Acetylcholine stimulates cyclic ADP-ribose formation via M1 muscarinic receptors in rat superior cervical ganglion.  
Biochem Biophys Res Commun. 335 : 920-924, 2005.
3. Hashii M, Shuto S, Fukuoka M, Kudoh T, Matsuda A, Higashida H. : Amplification of depolarization-induced and ryanodine-sensitive cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation by synthetic carbocyclic analogs of cyclic ADP-ribose and their antagonistic effects in NG108-15 neuronal cells.  
J Neurochem. 94 : 316-323, 2005.
4. Kudoh T, Fukuoka M, Ichikawa S, Murayama T, Ogawa Y, Hashii M, Higashida H, Kunerth S, Weber K, Guse AH, Potter BV, Matsuda A, Shuto S. : Synthesis of stable and cell-type selective analogues of cyclic ADP-ribose, a Ca(2+)-mobilizing second messenger. Structure-activity relationship of the N1-ribose moiety.  
J Am Chem Soc. 127 : 8846-8855, 2005.
5. Koizumi K, Sugimoto N, Jia-Sheng Z, Kuraishi T, Murotani E, Yamamoto N, Higashi S, Furuhashi K, Ota K, Iwasaki K, Ozaki T, Kobayashi H, Higashida H. : [Genome-wide analysis by RNA interference of genes that affect *Drosophila* nervous system development]  
Fukuoka Igaku Zasshi. 96 : 67-75, 2005.
6. Osamura N, Ikeda K, Ito T, Higashida H, Tomita K, Yokoyama S. : Induction of interleukin-6 in dorsal root ganglion neurons after gradual elongation of rat sciatic nerve.  
Exp Neurol. 195 : 61-70, 2005.
7. Johansson JU, Lilja L, Chen XL, Higashida H, Meister B, Noda M, Zhong ZG, Yokoyama S, Berggren PO, Bark C. : Cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39 facilitate formation of functional synapses.  
Brain Res Mol Brain Res. 138: 215-227, 2005.

8. Higashida H, Hoshi N, Zhang JS, Yokoyama S, Hashii M, Jin D, Noda M, Robbins J. : Protein kinase C bound with A-kinase anchoring protein is involved in muscarinic receptor-activated modulation of M-type KCNQ potassium channels.  
Neurosci Res. 51 : 231-234, 2005.
9. Yamaguchi M, Shimizu M, Ino H, Terai H, Hayashi K, Kaneda T, Mabuchi H, Sumita R, Oshima T, Hoshi N, Higashida H. : Compound heterozygosity for mutations Asp611→Tyr in KCNQ1 and Asp609→Gly in KCNH2 associated with severe long QT syndrome.  
Clin Sci (Lond). 108: 143-150, 2005.
10. Ivanov, Andrija, Rovescalli, Alessandra, Pozzi, A., Mozer, Brian, Yoo, Seung, Li, Hsi-Ping, Yu, Seng-Hou, Hishida, Haruhiro, Guo, Vickey, Spencer, Mike and Nirenber, Marshall. : Identification of genes that affect Drosophila nervous system development by RNA interference screening.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 101 : 16216-16221, 2004.
11. Manaka, Junko, Kuraishi, Takayuki, Shiratsuchi, Akiko, Nakai, Yuji, Higashida, Haruhiro, Henson, Peter and Nakanishi, Yoshinobu : Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by Drosophila hemocytes/macrophages.  
J Biol Chem. 279 : 48466-48476, 2004.
12. Hayashi, Kenshi, Shimizu, Masami, Ino, Hidekazu, Yamaguchi, Masato, Terai, Hidenobu, Hoshi, Naoto, Higashida, Haruhiro, Terashima, Nariaki, Uno, Yoshihide, Kanaya, Honin and Mabuchi, Hiroshi: Probucol aggravates long QT syndrome associated with a novel missense mutation M124T in the N terminus of HERG.  
Clin Sci (Lond). 107: 175-182, 2004.
13. Noda, Mami, Higashida, Haruhiro, Aoki, Shunsuke and Wada Keiji: Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors.  
Mol. Neurobiol. 29: 31-39, 2004.
14. Hoshi, Naoto, Zhang, Jia-Sheng, Omaki, Miho, Takeuchi, Takahiro, Yokoyama, Shigeru, Wanaverbecq, Nicolas, Langeberg, Lorene K., Yoneda, Yukio, Scott, John D., Brown, David A. and Higashida, Haruhiro: AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists.  
Nature Neurosci. 6: 564-571, 2003.
15. Higashida, Haruhiro, Zhang, Jia-Sheng, Mochida, Sumiko, Chen, Xiao-Liang, Shin, Yeonsook, Noda, Mami, Hossain, Kazi Z., Hoshi, Naoto, Hashii, Minako, Shigemoto, Ryyuichi, Nakanishi, Shigetade, Fukuda, Yutaka and Yokoyama, Shigeru: Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate



receptors in retina, cervical superior ganglion and NG108-15 cells.

J. Neurochem. 85: 1148-1158, 2003.

16. Yamaguchi, Masato, Shimizu, Masami, Ino, Hidekazu, Terai, Hidenobu, Hayashi, Kenshi, Mabuchi, Hiroshi, Hoshi, Naoto and Higashida, Haruhiro: Clinical and electrophysiological characterization of a novel mutation (F193L) in the *KCNQ1* gene associated with long QT syndrome.

Clinical Science 104: 377-382, 2003.

17. Noda, Mami, Yasuda, Satsuki, Okada, Mitsuko, Higashida, Haruhiro, Shimada, Aki, Iwata, Nakao, Ozaki, Norio, Nishikawa, Kaori, Shirasawa, Sakiko, Uchida, Mayumi, Aoki, Shunsuke and Wada, Keiji: Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways.

J. Neurochem. 84: 222-232, 2003.

## (2) 口頭発表

1. Higashida H., Zhang, J.-S., Chen, X.-L., Shin, Y., Noda, M., Hoshi, N., Hashii, M., Zhong, Z.-G., Egorova, A., Jin D. and Yokoyama, S.: Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate and muscarinic acetylcholine receptors in retina and cervical superior ganglion.  
The 4th International symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug (国際受容体シンポジウム) (2003. 5. 22-23) (福井)
2. 東田陽博, 横山 茂, 中西義信: ゲノムワイド RNAi によるショウジョウバエ中枢神経及び末梢神経ネットワーク形成遺伝子の探索  
日米科学技術協力事業「脳研究」分野研究報告会 (2003. 6. 25, 26) (岡崎)
3. Ivanov, A., Rovescalli, A. C., Pozzi, P., Mozer, B., Yoo, S., Li, H.-P., Yu, S.-H., Higashida, H., Guo, V., Spencer, M. and Nirenberg, M.: Identification of genes that affect *Drosophila* nervous system development by RNA interference screening.  
Neurobiology of *Drosophila* Preference-Poster (2003. 7. 1) (USA)
4. Higashida, H., Zhang J.-S., Mochida, S., Chen, X.-L., Shin, Y., Noda, M., Hossain K. Z., Hoshi, N., Hashii, M., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Fukuda, Y. and Yokoyama, S.: Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate receptors in retina, cervical superior ganglion and NG108-15 cells.  
(代謝型グルタミン酸受容体と ADP リボシルシクラーゼとのサブタイプ特異的なカップリング)  
第 26 回神経科学大会 (2003. 7. 23-25) (名古屋)
5. Higashida, H., Mochida, S., Chen, X.-L., Shin, Y., Zhang, J.-S., Noda, M., Hossain, K. Z., Hoshi, N., Hashii, M., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Fukuda, Y. and Yokoyama, S.: Subtype-specific coupling with ADP-ribosyl cyclase of metabotropic glutamate receptors in retina, cervical superior ganglion and NG108-15 cells.  
第 76 回日本生化学会大会 (2003. 10. 15-18) (横浜)
6. 東田陽博: ○ゲノムワイド RNAi によるショウジョウバエ胚神経発生の研究  
○中・高校生のためのショウジョウバエを用いた遺伝子研究公開講座  
○神経細胞における A キナーゼ係留タンパク (AKAP150) 依存的修飾様式の解明  
平成 14 年度重点化経費実施結果報告会 (2003. 10. 30) (金沢)
7. Higashida, H., Kamiyama, S., Zhang, J.-S., Jin, D., Hashii, M., Sugimoto, N., Shimizu, N.: Pre- and post-synaptic roles of cyclic ADP-ribose in dopaminergic neurotransmission in rodent Caudate Putamen (1)

第 77 回日本薬理学会年会 (2004. 3. 7-10) (大阪)

8. 檜木 茂, 池田和夫, 橋本典之, 船木清人, 伊藤貴明, 富田勝郎, 東田陽博, 横山 茂 :  
軸索切断後のラット座骨神経における VI 型プロコラーゲン $\alpha$  1 の mRNA の誘導  
第 47 回日本手の外科学会学術集会 (2004. 4. 22, 23) (大阪)
9. 東田陽博 : 平成 16 年度 21 世紀 COE プログラムへの申請「革新脳科学」について  
第 1 回「発達・学習・記憶と障害のブレインサイエンス」セミナー  
(Kanazawa University Innovative Brain Science Seminar (KUIBSS)) (2004. 4. 23)  
(金沢)
10. Higashida, H. : Perspective: Role of Cyclic ADP-ribose in Ca and non-Ca  
signaling.  
第 81 回日本生理学会大会 (2004. 6. 1-3) (札幌)
11. 星 直人, 東田陽博, John Scott : M カリウムチャンネルのムスカリン抑制に必要な  
AKAP79/150 の最小機能部位の同定  
(Mapping essential domain of AKAP79/150 for muscarinic suppression of the  
M-current)  
第 47 回日本神経化学会・第 27 回日本神経科学会 合同大会 (2004. 9. 21-23)  
(大阪)
12. 東田陽博, 星 直人, 橋井美奈子, 横山 茂 : スロ-EPSP の発生機序 : AKAP に結合し  
た PKC による KCNQ/M カリウムチャネルのリン酸化  
「神経系の特異機能を制御する蛋白質の細胞分子機構」シンポジウム  
大阪大学蛋白質研究所セミナー (2004. 10. 21-22) (大阪)
13. 東田陽博 : ショウジョウバエ胚神経形成遺伝子のゲノムワイド探索  
平成 16 年度第 4 回先端研究フォーラム金沢大学フロンティア科学研究機構  
21 世紀 COE「発達・学習・記憶と障害の革新脳科学の創成」のスタートに当  
たって (2004. 11. 12) (金沢)
14. Haruhiro Higashida, Naoto Hoshi, Jia-Sheng Zhang, Shigeru Yokoyama, Minako Hashii,  
Duo Jin, Mami Noda, and Jon Robbins : PROTEIN KINASE C BOUND WITH A-KINASE  
ANCHORING PROTEIN IN MUSCARINIC OR BRADYKININ RECEPTOR-ACTIVATED MODULATION OF  
M-TYPE KCNQ POTASSIUM CHANNELS.  
The 1st International Conference on Exploring the Future of Local Vascular  
and Inflammatory Mediators. (局所血管炎症メディエーター国際会議)  
(2005. 5. 26-29) (Kingdom of Sweden)
15. Haruhiro Higashida, Naoto Hoshi, Jia-Sheng Zhang, Shigeru Yokoyama, Minako Hashii,  
Duo Jin, Mami Noda, and Jon Robbins : PROTEIN KINASE C BOUND WITH A-KINASE  
ANCHORING PROTEIN IN MUSCARINIC OR BRADYKININ RECEPTOR-ACTIVATED MODULATION OF

M-TYPE KCNQ POTASSIUM CHANNELS.

The 5st Japan-Korea Joint Symposium of Brain Science, and Cardiac and Smooth Muscles. (日韓合同脳科学・心筋・平滑筋シンポジウム) (2005. 7. 22-24) (北九州)

16. 東田陽博 : 短期・長期メモリーの基礎 (AKAP に結合したタンパクリン酸化酵素による KCNQ カリウムチャネル抑制による興奮性亢進と RNAi による神経形成に関与する新規遺伝子同定)

The 12st Japan-Russia Medical Exchange international Symposium (第12回日露医学医療交流国際シンポジウム) (2005. 9. 17-24) (Russia)

17. 東田陽博 : 生活活性ペプチドの新しい役割と創薬  
第79回日本薬理学会年会 (2005. 3. 8-10) (横浜)

(3) 出版物

なし

## 5. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権の 名称	発明者	権利者	工業所有権の 種類、番号	出願年月日	取得年月日
パーキンソン病の 治療のための医薬	東田陽博	金沢大学 TLO	特願 2005-189518	平成17年 7月15日	未

## 6. 研究成果（日本語版）

### 6-1 研究の背景

細胞内のカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ ) 上昇がシグナルとなって種々の細胞反応が生じる。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇 を生じる機構は、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入と細胞内貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞質への遊離の2つによる。後者は、細胞内微小器官、例えば、小胞体や核膜腔に貯えられていた  $\text{Ca}^{2+}$  が、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸( $\text{IP}_3$ )で  $\text{IP}_3$  受容体  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャネルの開口により、細胞質に放出され、細胞内の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) が高まる。又、その  $\text{Ca}^{2+}$  が更なる  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を生じる。後者の機構を  $\text{Ca}^{2+}$  -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) と呼ぶ。CICR は、小胞体に存在するリアノジンで開きっぱなしになることで不活性化する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャネルを含有するリアノジン受容体 (RyR) が関与している。

## 6-2 cADPR

cADPR は、ウニ卵にピリジンヌクレオチドである  $\text{NAD}^+$  や  $\text{NADP}^+$  を注入した時、 $\text{IP}_3$  とは独立に、HPLC により分離される、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の動員を生じる物質として見出された。cADPR は  $\text{NAD}^+$  の代謝産物中の活性物質で、cADPR の化学構造は、終末リボースの  $\beta$  位の C とアデニン環の 1 位の N が自身の分子内で結合し環状化している。cADPR は  $\text{NAD}^+$  からニコチンアミドが切り出され小さくなるが、ADPR より 1 水分子分大きい物質で、酸性下で容易に水解する。ウニ卵で、cADPR には  $\text{Ca}^{2+}$  遊離作用があり、 $\text{NAD}^+$  や ADPR にはないことが証明された。一方、交感神経節細胞等に cADPR を注入しても、 $\text{Ca}^{2+}$  遊離が生じない。



### 6-3 ADP-ribosyl cyclase

cADPR は酵素的に作られる。NAD<sup>+</sup> を基質として、ニコチンアミドの遊離と、アデニン環の 1 位の N とターミナルリボースの結合を行い環状化する。さらにこの cADPR は加水分解し ADPR となる。ADP-ribosyl cyclase はこの 2 つの酵素活性を含む両機能性の酵素である。酵素は可溶分画と膜分画両方に存在することが知られている。可溶分画の酵素は、2 量体で存在し、X 線解析から保存されたポケット構造に NAD<sup>+</sup> が入り込む二次構造が推測された。リンパ球表面抗原である CD38 が、本酵素活性を持つことが両者間のホモロジーから見出された。

#### 6-4 cADPR 産生の調節機構

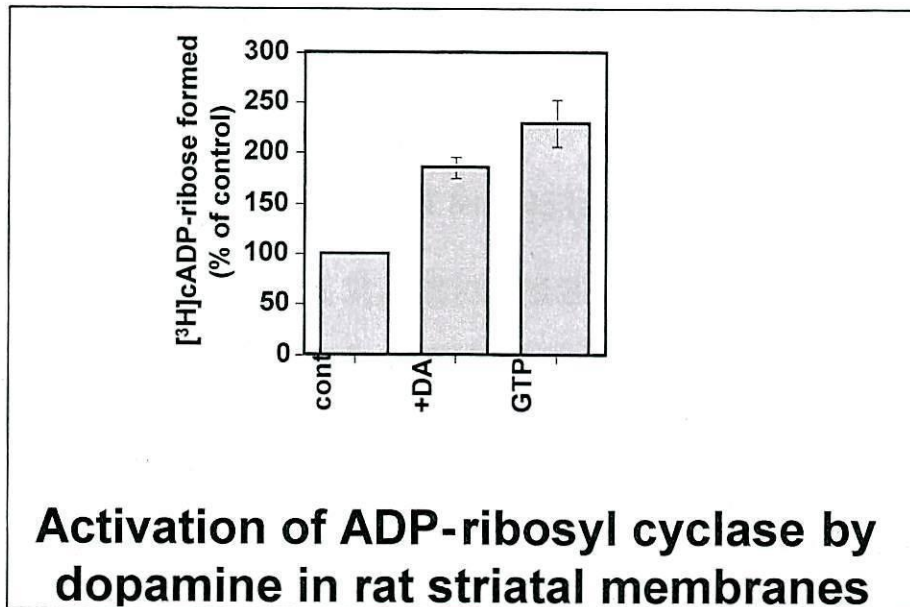
cADPR の産生調節に関して、膵臓ではグルコースの取り込みが上昇させる。グルコースから TCA サイクルの回転によりつくられる ATP の生成上昇が cADPR 水解酵素活性を抑制する結果 cADPR 産生量が増加する。Galione らは、細胞質の ADP-ribosyl cyclase 活性が NO や cGMP により上昇することを見出した。cGMP や NO 産生は、受容体のコントロールを受けているので、受容体による cyclase 制御も行われる。哺乳動物の PC12 褐色細胞腫では、アセチルコリンによる（たぶんニコチン受容体も含めた）受容体刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇と膜脱分極刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇がトリガーとなり、また、プロテインキナーゼ A を介して、cADPR 産生を上昇させることが報告された。

## 6-5 受容体-ADP-ribosyl cyclase のカップリング

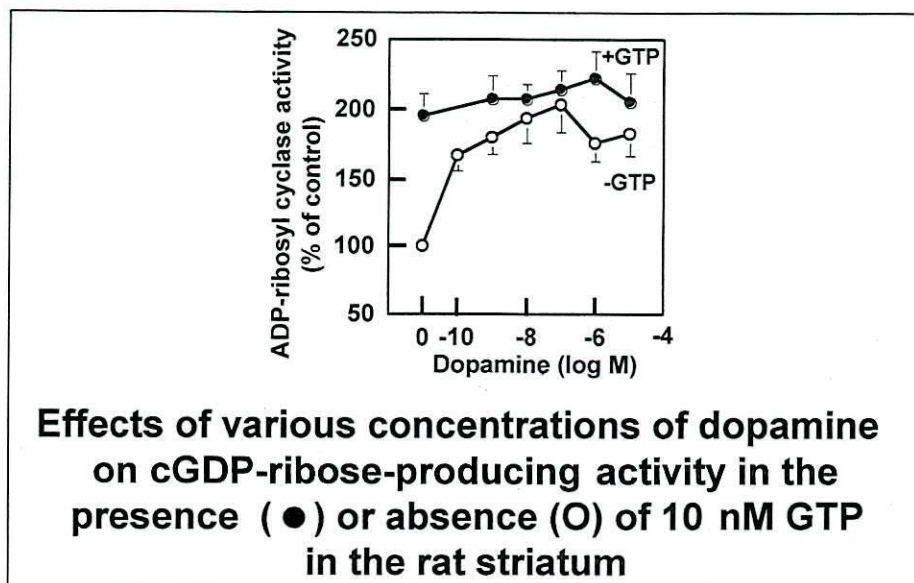
膜分画に存在する cyclase が、どのような受容体によりどのように制御されているか知ることが課題であった。まず、NG108-15 細胞は m4 サブタイプを内在性の mAChR として持っているが、この細胞膜分画をカルバミルコリン (CCh) とインキュベートすると活性は約半分に抑制された。脳型 M1 に対応する m1 mAChR を大量発現する (内在性の m4 も保持しているが) 細胞では、CCh の投与により、約 2.5~3 倍の活性上昇が生じた。さらに m2 と m4 サブタイプの大量発現により抑制、m3 サブタイプの発現により活性化を観察した。これはアデニレートシクラーゼと抑制的にカップルする m2/m4 とホスホリパーゼ C にカップルする m1/m3 mAChRs という以前この細胞で示されたカップリング様式と類似していた。m1/m3 による活性化と m2/m4 による抑制は、GTP によりそれぞれ再現されたので、GTP 結合タンパク質の関与が考えられた。そこで、コレラ毒素 (CTx) および百日咳毒素 (PTx) で前処理した細胞で、CCh の効果をみたところ、CTx により活性化は消失したが抑制には無影響であった。逆に PTx は抑制効果を消失させ、PTx に感受性のある活性化の程度は小さくなったが有意に上昇したままで保たれた。以上この結果の一番単純な解釈は、抑制には Gi/Go タイプの G タンパク質、活性化には CTx に感受性のある Gs タイプの G タンパク質が絡んでいることである。

## 6-6 脳線条体のドーパミン受容体

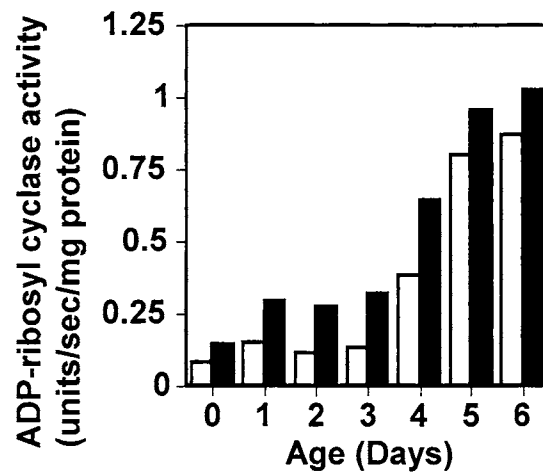
脳線条体のドーパミン受容体が ADP-ribosyl cyclase とカップルするか調査した。ドーパミンによる活性化が観察された。



活性化は GTP によっても生じたが、相加的な効かは認めなかった。



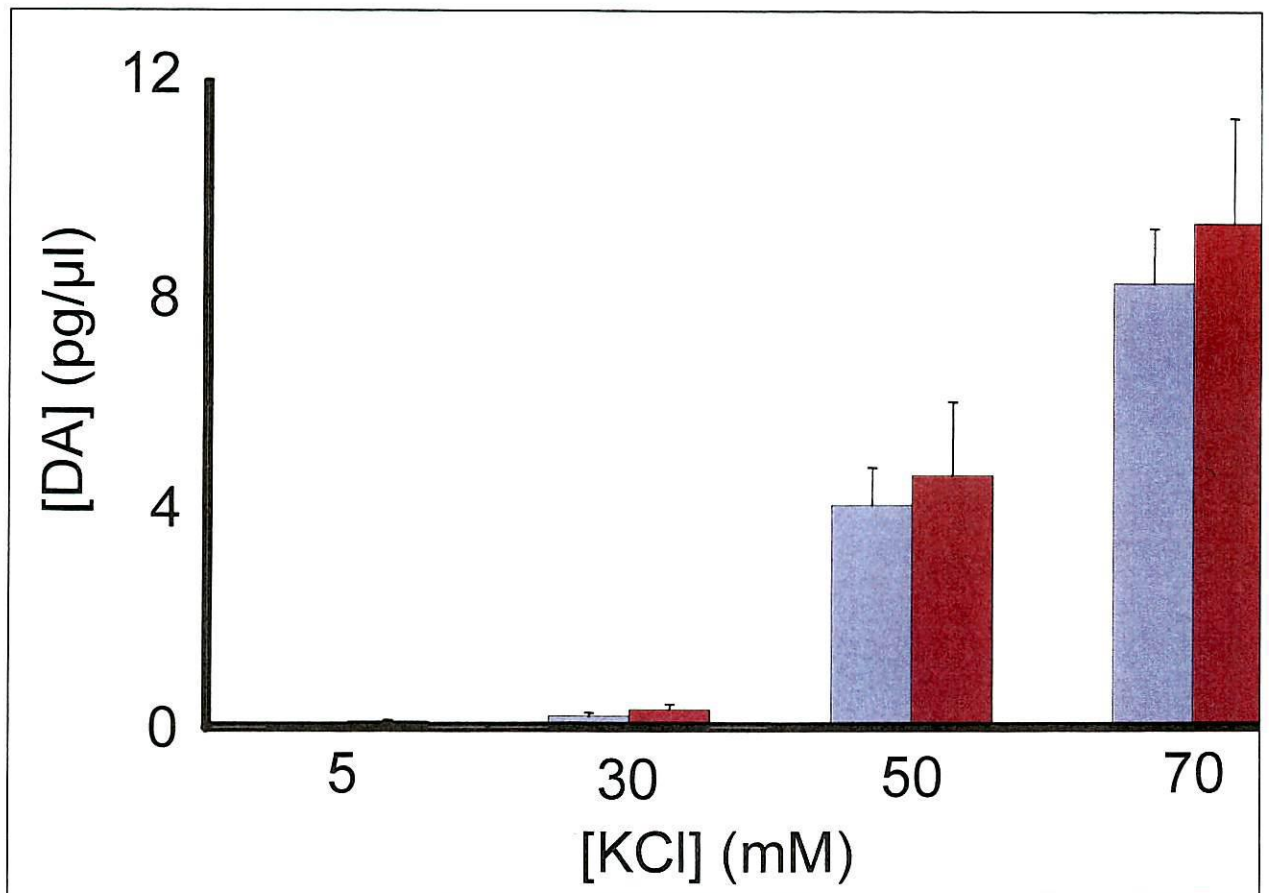
ドーパミンによる活性化は生後数日間の脳でのみ観察された。



**Developmental regulation in the basal and dopamine-dependent ADP-ribosyl cyclase activity in rat striatal membranes**

## 6-7 線条体プレシナプスのドーパミン受容体とCD38

線条体プレシナプスのドーパミン受容体の役割を、脱分極刺激によるドーパミン遊離測定から推察した。KCl 濃度の上昇にともないドーパミン遊離は増加した。しかし、その増加は、ADP-ribosyl cyclase 活性を有する CD38 分子ノックアウトマウスでも変化しなかった。このことから、プレシナプスのドーパミン受容体作用にたいする cADPR の影響は弱いと考えた。



## 6-8 おわりに

ドーパミンも細胞表面膜内で受容体-Gタンパク質-ADP-ribosyl cyclaseへと情報が伝わり、cADPRの産生をコントロールしていることが解った。しかし、生後の幼弱期のみに見られ、成長した後にはマスクされ、活性化が消える。これがなぜ生じるのか、分子種の問題をからめて、解決しなければならない。

## 7. 研究成果（英語版）

### 7-1 Research Summary

We examined the role of cyclic ADP-ribose (cADPR) as a second messenger downstream of receptors in the striatal cortex and NG108-15 cells. To address this question, ADP-ribosyl cyclase activity was measured in a crude membrane fraction of rat striatum and NG108-15 cells transfected with CD38. Dopamine (DA) stimulated the cyclase activity. The cyclase activity in overexpressed cells had various effects on neuronal function. The following two reports are the summary of the cADPR function written in a review form (7-2) and research report on CD38 transfection (7-3).