

Title	Dopamine transporter mRNA : dense expression in ventral midbrain neurons
Author(s)	島田, 昌一
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38614
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	しま だ しょう いち 島 田 昌 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 9 0 0 号
学位授与年月日	平成 5 年 7 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Dopamine transporter mRNA: dense expression in ventral midbrain neurons (ドーパミントランスポーターの cDNA の単離とその脳内分布)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 津本 忠治 教授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

ドーパミントランスポーターは、ドーパミン作動性ニューロンの神経終末よりシナプス間隙に放出されたドーパミンを、速やかに細胞内へ取り込む膜蛋白で、その主な役割はドーパミンによる神経伝達を終了させることにある。麻薬のコカインは、ドーパミントランスポーターと特異的に結合し、ドーパミンの取り込みを阻害する。またパーキンソン病誘発毒 MPP⁺ は、ドーパミントランスポーターを介して、特異的に細胞内に取り込まれ、黒質のドーパミン作動性ニューロンを選択的に変性させる。このようにドーパミントランスポーターは、脳のドーパミン神経系に関連する疾患や病態と密接な関わりを持つ分子である。しかし、この蛋白質の高い疎水性と希少性から、精製、単離には困難を要していた。本研究ではドーパミントランスポーターの cDNA を単離し、アミノ酸の一次構造を明らかにするとともに、その脳内分布と薬理学的特徴を解析した。

【方法ならびに結果】

ドーパミン作動性ニューロンが最も豊富に存在するラット中脳の黒質と腹側被蓋野から mRNA を抽出し、λZAP を vector とする cDNA ライブラリーを作成した。GABA トランスポーターとノルアドレナリントランスポーターに共通なアミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして、この cDNA ライブラリーをスクリーニングし、27個のクローンを得た。それぞれのクローンの cRNA を、アフリカツメガエル卵母細胞に注入し、発現させ、[³H] ドーパミンの細胞内への取り込みを測った。その中で、1つのクローンの cRNA を注入した卵母細胞が、非常に高い特異的なドーパミンの取り込みを示し、かつこの取り込みはコカイン存在下で阻害された。このクローンの塩基配列を決定したところ、全長3.4kb で619個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。またこの蛋白質には、疎水性アミノ酸20数個よりなる膜貫通部位と考えられる領域が、12箇所存在した。そのアミノ酸配列は GABA トランスポーターとは45%、ノルアドレナリントランスポーターとは67%の相同性を示した。アフリカツメガエル卵母細胞発現系や COS 細胞発現系を用いて、さらに詳細な薬理学的解析を行った結果、[³H] ドーパミンの取り込みに関する親和性 Km は1.19 μM で、この取り込みは Na⁺、Cl⁻、温度に依存性であった。またコカインの類似体で

ある [^3H] CFT の結合における解離定数 K_d は 46.5nM であった。これらの結果は実際ラット脳の線条体のシナプトゾーム分画や膜分画を用いた実験におけるドーパミントランスポーターの薬理学的特性とよく一致していることから、このクローンがドーパミントランスポーターであることを確認した。次にノーザンブロット解析を行ったところ、中脳で 3.7kb の 1 本のバンドが認められるのに対して、大脳皮質や小脳ではドーパミントランスポーターの mRNA は、検出されなかった。さらに詳しい脳内局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討したところ、このトランスポーターの mRNA は、脳内に数カ所存在するドーパミン神経細胞群の中でも、中脳の黒質と腹側被蓋野のドーパミン細胞群にのみ限局して発現しており、視床下部や嗅球などのドーパミン細胞系ではその発現はほとんど認められなかった。また中脳のドーパミン細胞群の中では、黒質の *pars compacta*、腹側被蓋野の *parabrachialis pigmentosus* の細胞で特に強い発現が観察された。

【総括】

ドーパミントランスポーターの cDNA を単離し、その一次構造を明かにした。さらに、アフリカツメガエル卵母細胞発現系や COS 細胞発現系を用いて、コカインが実際にドーパミントランスポーターに直接結合し、ドーパミンの取り込みを阻害することを示した。また *in situ* ハイブリダイゼーションによって、このトランスポーターの mRNA が脳内のドーパミン細胞群の中でも、黒質と腹側被蓋野に限局して発現していることを明らかにした。この結果は、MPTP などの選択的神経毒により作成されたパーキンソン病モデル動物やヒトのパーキンソン病患者において、黒質のドーパミン細胞が、他の領域のドーパミン細胞に比べて、選択的に強く変性しているという病理学的所見と何らかの関係があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ドーパミントランスポーターは麻薬のコカインやパーキンソン病誘発毒素 MPP^+ の標的分子である。本研究はこのドーパミントランスポーターの cDNA を単離し、そのアミノ酸の一次構造を初めて明かにすると同時に、COS 細胞や、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、コカインが実際にこのトランスポーターに結合して、ドーパミンの取り込みを阻害することを証明した。更にはドーパミントランスポーターの mRNA は脳内のドーパミン細胞群の中でも、中脳の黒質や腹側被蓋野に限局して発現していることを明らかにした。これらの知見は、ドーパミンによる神経伝達の停止機序のみならず、コカイン中毒やパーキンソン病等のドーパミン神経系に関わる疾患や病態の解明に貢献するものであり、学位に値する。