

R N A プロセッシングによる神経伝達物質
トランスポーターの機能発現調節

(研究課題番号：11680756)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 北山滋雄

(広島大学歯学部 助教授)

は し が き

神経伝達物質トランスポーターは神経終末より遊離された神経伝達物質の再取込みを行い、シナプス伝達を速やかに終結させる役割を担う細胞膜機能蛋白である。我々はドーパミントランスポーターをはじめこれら神経伝達物質トランスポーターcDNA をクローニングし、これらが一つの遺伝子ファミリーを形成することを明らかにしてきた。これまでの機能発現実験から、これら神経伝達物質トランスポーターはリン酸化などの蛋白レベルでの短期機能修飾とmRNA 発現調節など長期修飾機構により複雑に調節されており、これにより様々な状態で神経伝達に関与していることが予想された。

向精神薬など脳神経系に作用する薬物の一部はこれらトランスポーターに作用することが知られており、このことからトランスポーター機能の変化とうつ病などの中枢神経疾患との関連が予想されている。モノアミントランスポーターの機能がこれら疾患においてどの様に関わるのかをさらに詳しく検討する目的でラットノルエピネフリントランスポーターcDNA を脳よりクローニングした結果、選択的RNA スプライシングにより生じると思われる3'領域において異なるアイソフォームを同定した。このアイソフォームの1つは輸送活性を持たず、今一つのアイソフォームと共発現させることによりその輸送活性を抑制するdominant negative 効果を有する。

選択的RNA スプライシングにより生じたアイソフォームがdominant negative 効果を有する例として、最近Rothsteinらのグループはグルタミン酸トランスポーターの一つGLT-1のmRNA スプライシングの異常がALS患者に見られ

ることを報告し、この異常RNAが dominant negative 効果を示すことによりグルタミン酸輸送が障害され、その結果グルタミン酸興奮毒性により運動神経が変性するというメカニズムを提唱している (Neuron, 20, 589-602, 1998)。しかしこれに対しては正常人においてもこの種の選択的RNAスプライシングが認められ、ALS の病因には直接結びつかないとする反対意見もある。我々の見いだした選択的RNA スプライシングにより生じるノルエピネフリントランスポーターアイソフォームが dominant negative 効果を有することから、このメカニズムにより神経伝達物質再取込み機構ひいてはシナプス伝達が調節される可能性が示唆される。

本研究ではRNA プロセッシングを介したトランスポーター機能発現調節のメカニズムが生理的にどのような意味を持つのか、あるいは神経疾患と結びつく可能性があるのか否かを明らかにするために企てられた。このためノルエピネフリントランスポーターを発現するラット副腎髄質由来PC12 細胞をモデル系に用い、ノルエピネフリントランスポーターアイソフォームの発現パターンの異なる変異株を単離することにより、それら細胞間のRNA プロセッシングに関わる特異的メカニズムを明らかにしようとするものである。

研究組織

研究代表者： 北山滋雄（広島大学歯学部 助教授 ）

研究経費

平成 1 1 年度 2,100 千円

平成 1 2 年度 1,600 千円

計 3,700 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. S. Kitayama, T. Ikeda, C. Mitsuhata, T. Sato, K. Morita and T. Dohi (1999) Dominant negative isoform of rat norepinephrine transporter produced by alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.*, 274, 10731-10736.
2. T. Sato, S. Kitayama, C. Mitsuhata, T. Ikeda, K. Morita and T. Dohi (2000) Selective inhibition of monoamine neurotransmitter transporters by synthetic local anesthetics. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 361, 214-220.
3. T. Sato, S. Kitayama, K. Morita, T. Ikeda and T. Dohi (2000) Changes in seizure susceptibility to local anesthetics by repeated administration of cocaine and

nomifensine but not GBR12935: possible involvement of noradrenergic system. *Jpn. J. Pharmacol.*, 83, 265-268.

4. T. Ikeda, S. Kitayama, K. Morita and T. Dohi (2001) Nerve growth factor down-regulates the expression of norepinephrine transporter in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mol. Brain Res.*, 86, 90-100.

(2) 口頭発表

1. 北山滋雄、池田哲朗、森田克也、土肥敏博「ラットノルエピネフリントランスポーターアイソフォーム間の相互作用機序について」第22回日本神経科学大会 1999,7 (大阪)
2. S. Kitayama, T. Ikeda, K. Morita and T. Dohi "Multiplicity of norepinephrine transporters at carboxy terminal tail" Gordon Research Conference on Catecholamines, 1999, 7 (Oxford, UK)
3. 北山滋雄、森田克也、土肥敏博「ヒトノルエピネフリントランスポータースプライシングバリエーションのクローニングと機能発現」第29回日本神経精神薬理学会年会 1999,9 (広島)
4. 池田哲朗、北山滋雄、森田克也、土肥敏博「ラットノルエピネフリントランスポーター遺伝子のプロモーター領域の解析」第41回歯科基礎医学会学術大会 1999,10 (東京)

5. 池田哲朗、北山滋雄、森田克也、土肥敏博「PC12細胞におけるラットノルエピネフリントランスポーター発現調節の解析」第96回日本薬理学会近畿部会 1999,11 (京都)
6. S. Kitayama, K. Morita and T. Dohi "Molecular cloning and functional expression of human norepinephrine transporter isoforms produced by alternative RNA splicing" 29th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 1999, 10 (Miami Beach, Florida U.S.A.)
7. 北山滋雄、森田克也、土肥敏博「選択的RNAスプライシングにより生じるヒトノルエピネフリントランスポーターアイソフォームの同定」第73回日本薬理学会年会 2000,3 (横浜)
8. 池田哲朗、北山滋雄、森田克也、土肥敏博「PC12細胞におけるラットノルエピネフリントランスポーター発現調節」第73回日本薬理学会年会 2000,3 (横浜)
9. 北山滋雄、森田克也、熊谷圭、池田哲朗、土肥敏博「種特異的RNAスプライシングにより生じるノルエピネフリントランスポーターアイソフォーム」第23回日本神経科学大会 2000,9 (横浜)
10. S. Kitayama, K. Morita and T. Dohi "Cell-specific regulation of RNA splicing for norepinephrine transporter" 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2000, 11 (New Orleans, Louisiana, U.S.A.)

(3) 出版物

1. 北山滋雄、土肥敏博 「d.ノルエピネフリントランスポーター」薬物動態・作用と遺伝子多型 医薬ジャーナル 2001、印刷中。

研究成果

(概要)

ラットノルエピネフリントランスポーター(rNET) cDNAをクローニングした結果、mRNA 前駆体の選択的スプライシングにより生じる3'領域で異なるアイソフォームを同定した。そのうちのひとつ(rNETb)はこれまで報告のないC末アミノ酸配列を有し、輸送活性を示さないが、今一つの機能を有するアイソフォーム(rNETa)と共発現することによりその輸送活性を抑制するドミナントネガティブ効果を有することを見出した。

選択的スプライシングがNETアイソフォームrNETa, rNETbどちらの方向に傾くかによってノルエピネフリン(NE)取込みは亢進・抑制のいずれかに変化する。したがってこのスプライシングの調節を介してNET発現は変化を受け、機能的に調節されていることが考えられた。これまでの研究では転写レベルでNET発現が調節されることは調べられてきたがそれ以降のRNA プロセッシングに関しては全く調べられていない。実際に各バリエーションのmRNA発現パターンは細胞間あるいは個体間で異なっているのだろうか。以上の観点から我々はNETを発現するPC12細胞でバリエーションmRNA発現がどの様に調節されているか異なるクローン株を樹立して解析した。

野性株PC12細胞にpcDNA3ベクターの導入後G418非感受性株を選択した。異なる24種のクローンでNGF感受性並びにドーパミン、NE、コリン、グルタミン酸輸送活性の程度を調べ、性質の様々な異なる12種のクローンを選び、さらに検討を加えた。

rNETa, rNETb mRNA発現量をRT-PCR法により調べた結果、ドミナントネガティブ効果を持つrNETbの発現パターンはこれら12種のクローンで様々な異なり、NE輸送活性の低いクロー

ンでrNETb mRNA 発現の高い例も見られたが、必ずしも両者の間に逆相関は認められなかった。したがって先に述べたようにrNETbの発現はNE 取込み能を抑制的に調節しているものの、以上の結果はその発現が一次的にNET機能発現を決定している訳ではないことを示唆している。

一方、rNETa mRNAの発現量とNE取込み量との間には正の相関が認められた。またノーザンブロット法による解析からも5.8kbのメッセージの量とNE取込み能との間に相関が認められた。したがってNET遺伝子の転写調節などによるNET mRNAのバリエーションを含めた全体としての発現量が、NE機能発現調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次にNET遺伝子3'領域の選択的スプライシングにおける役割を調べるため、ラットNET遺伝子のこの領域をクローニングし、塩基配列を決定した。ヒトで認められるようなスプライスバリエーションがラットで認められなかったことから、両者の塩基配列を比較した結果、スプライシングに影響を与えると思われる両者で異なる配列がいくつか見つかった。例えばヒトNET遺伝子で認められるエキソン14下流のポリAデニレーションシグナル配列がラットでは一部認められない。このクローニングしたラットNET遺伝子3'領域を哺乳動物発現ベクターに組み込み種々の細胞に一過性に発現させ、スプライシングの動態を観察した。その結果、ヒトNET発現SK-N-SH細胞を含むいずれの細胞でもrNETa、rNETbいずれへのスプライシングが認められた。したがって種特異的なスプライシングによるNETアイソフォームの発現は主としてそれぞれのNET遺伝子塩基配列の違いに基づき調節されていることが示唆された。