

中枢神経系の dopamine 受容体に関する研究

第 1 編

dopamine 受容体の生化学的ならびに薬理学的検討

岡山大学医学部第三内科学講座（指導：大藤 眞教授）

山 脇 泰 秀

（昭和56年11月25日受稿）

Key words : dopamine 受容体, spiroperidol 受容体
[³H]-dopamine, [³H]-spiroperidol,
molecular weight, central nervous system

緒 言

dopamine は哺乳動物の中枢神経系に存在することが古くより知られていた。しかし中枢神経系の dopamine は noradrenaline の前駆物質として存在しているのであって、生理機能は持たないと考えられていた時代もあった。ところが、Carlsson¹⁾や Sano²⁾によって、中枢各部位で dopamine と noradrenaline の含量に差異があることが報告され、dopamine が神経伝達物質である可能性が示唆された。即ち、noradrenaline が視床下部、橋背側部、延髄網様体に多く見い出されるのに対して、dopamine は被殻、尾状核、赤核などの錐体外路系諸核および視床下部、視床に高濃度に検出される。さらに、その後の研究により、現在では dopamine を含有する神経細胞体は、黒質、中脳被蓋腹内側部、視床下部の3つの部位に集中していることが明らかにされている³⁾。そして、これらの dopamine 神経細胞体は、黒質線条体路、中脳辺縁系および中脳皮質系、視床下部正中隆起漏斗系と呼ばれる神経路を形成し、運動機能、情動活動、内分泌機能に重要な役割を果たしていることが知られている。

従来、dopamine 作動機構の研究には、中枢神経各部位の dopamine の量の測定が行なわれ、その増減をもって dopamine 作動機構をとらえ

ようとする研究が主流を占めて来た⁴⁾。しかしシナプス後膜の物質の量は生成、貯蔵、放出の総和であり、dopamine 作動機構を必ずしも充分にとらえているとは言い難い。dopamine が神経伝達物質であることから dopamine の作用する作用点である受容体の研究の重要性が増しつつある。

近年、dopamine 受容体の検索を目的として、dopamine radioreceptor assay（以下RRAと略す）が開発されたが、dopamine-RRAを行なう際に、抗精神病薬が dopamine 受容体を遮断することによりその作用を発揮するという仮説⁵⁻⁷⁾に従って、従来、標識抗精神病薬をトレーサーとした RRA が行なわれ、それから得られた成績が dopamine 受容体を具現しているものとして論じられてきた⁸⁾⁻¹¹⁾。しかしながら、抗精神病薬は数種の内因性物質に対する受容体に作用するという報告が増しつつあり、トレーサーとして抗精神病薬を用いた場合の受容体結合がはたして dopamine 受容体結合と同じものであるか否か疑問が持たれ始めている¹²⁾⁻¹⁶⁾。

著者は dopamine の作用する受容体と抗精神病薬の作用する受容体との差異を比較検討するために、[³H]-dopamine をトレーサーとする dopamine-RRA と butyrophenon 系の抗精神病薬である [³H]-spiroperidol をトレーサーとする spiroperidol-RRA との2種類の RRA 系を

確立し、薬理学的ならびに生化学的に検討を加え、両受容体の間に差異のあることを明らかにしたので報告する。

実験方法

I. dopamine-RRA の基礎的検討

1) receptor preparation の作成

Sprague-Dawley 系雄ラット(体重200—250 g)を断頭屠殺し、すみやかに脳を取り出して、次の2種類の方法で receptor preparation を作成した。なお、蛋白質の定量は、牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法¹⁷⁾に従った。

①P₂分画(ミトコンドリア・シナプトソーム分画)の作成

De-Robertis らの方法¹⁸⁾に準じて前脳を10容量の氷冷0.32M sucrose 中でホモゲナイズ(Brikman Polytron PT-10, dial set 7, 10秒×2回)した後、かるくガラスホモジナイザーでホモゲナイズ(5 strokes)し、900×g, 4℃で10分間遠心、上清をさらに11,500×g, 4℃で20分間遠心した。その沈渣(P₂分画:ミトコンドリア・シナプトソーム分画)を氷冷Tris緩衝液(50mM Tris/HCl 緩衝液, pH7.6)で懸濁して、11,500×g, 4℃で20分間遠心し、その沈渣を150容量の Tris 緩衝液で再懸濁したものを receptor preparation として、標準dopamine-RRA に用いた。

②ホモジネート(粗膜分画)の作成

中枢神経系各部における dopamine 受容体の分布を調べるのに、ホモジネートを使用した。ラット前脳を150容量の氷冷 Tris 緩衝液(50mM Tris/HCl 緩衝液, pH7.6)中でホモゲナイズ(Brikman Polytron PT-10, dial set 7, 10秒×2回)し、さらに、ガラスホモジナイザーでホモゲナイズ(5 strokes)した後、50,000×g, 4℃で20分間遠心後沈渣を同量の Tris 緩衝液で再懸濁し、再び50,000×g, 4℃で20分間遠心して、その沈渣を同量のTris緩衝液で再懸濁したものを receptor preparation とした。

2) dopamine-RRA

RRA は氷水につけたガラス試験管中で行なった。RRA 用の標準稀釈液としては Tris 緩衝液(50mM Tris/HCl 緩衝液, 12.5μM nialamide

および12.5μM disulfiram 含有, pH7.6)を用いた。0.5ml の receptor preparation (200 μg protein/tube), 0.3ml の Tris 緩衝液, 0.1ml の試料または標準 dopamine 液, 0.1ml の [³H]-dopamine (specific activity 14.78Ci/m mole: 最終濃度7.5×10⁻⁹M)とを混じて、90分間氷水中でインキュベートした。受容体結合型トレーサーと遊離型トレーサーの分離にはグラスファイバー・ペーパー(Whatman GF/C)を用いた吸引濾過法によった。即ち、インキュベート後メジウムをグラスファイバー・ペーパーにのせて吸引濾過し、3ml の氷冷 Tris 緩衝液で2回洗滌し、グラスファイバー・ペーパーごとカウンティングバイアルに入れ、シンチレーターを加えてβカウンターにより測定した。10⁻³M の dopamine の存在下と非存在下での [³H]-dopamine の receptor preparation への結合の差を特異的結合とし、受容体結合能の指標とした。また、標準曲線を描く場合には同様に10⁻³M の dopamine の存在下での結合型放射エネルギーを非特異的結合としてすべての結果から差し引いた。butyrophenon 系の抗精神病薬である [³H]-spiroperidol 用いた RRA 系は、 [³H]-dopamine のかわりに [³H]-spiroperidol (specific activity 20.0 Ci/m mole: 最終濃度3.5×10⁻⁹M)を用いた他は、dopamine-RRA と全く同様の方法によった。非特異的結合としては10⁻⁴M の spiroperidol の存在下における結合型放射エネルギーをすべての結果から差し引いた。

測定は triplicate で行なったが、その変動は12%以下であり、結果はすべて平均値で示した。

II. 陽イオンの効果

ラット前脳の P₂分画を receptor preparation とした標準 RRA を用い、メジウム中に1価の陽イオン(Na⁺, K⁺, Li⁺, Rb⁺)の場合は最終濃度25mM, 50mM, 100mM, 2価の陽イオン(Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Mn⁺⁺, Ni⁺⁺)の場合は最終濃度2.5mM, 5mM, 10mMとなるように陽イオン(いずれもCl塩)を加えて RRA を行ない、特異的結合の増減を検討して dopamine 受容体結合能に対する影響をみた。

III. タンパク質修飾薬の影響

ラット前脳 P₂分画を receptor preparation と

した標準 RRA を用い, 3 種類の thiol reagent 即ち free の sulfhydryl 基を保護する dithiothreitol (以下 DTT と略す) および mercaptoethanol (以下 MCE と略す), さらに sulfhydryl 基を非可逆的に block するといわれている p-chloromercuriphenyl sulfonic acid (以下 PCMPS と略す) を最終濃度 5 mM となるように assay tube に加えて, それらの影響をみた。次に, 上記 3 種類の thiol reagent と共にラット前脳 P₂ 分画を 25°C で 30 分間インキュベートした後, 遠心 (50,000×g, 20 分) により薬剤を洗い流し, 沈渣を Tris 緩衝液に再懸濁して dopamine-RRA を行ない特異的結合を比較した。さらに 100 μM の PCMPS とラット前脳 P₂ 分画とを 25°C で 15 分間インキュベートし, さらに Tris 緩衝液, または 5 mM の DTT, または 5 mM の MCE を添加後 15 分間インキュベートし, ついで遠心し (50,000×g, 20 分), 沈渣を Tris 緩衝液に再懸濁して dopamine-RRA を行ない特異的結合を比較検討した。

IV. ラット中枢神経系各部における dopamine 受容体の分布

断頭屠殺したラットの脳・脊髄をすみやかにとり出し, 脳については Glowinski & Iversen

の方法¹⁹⁾に準じて大脳皮質, 線条体, 視床下部, 海馬, 中脳, 脳幹, 小脳の各部を切り出して, それぞれのホモジネートを receptor preparation として dopamine-RRA を行ない, Scatchard 分析²⁰⁾によりラット中枢神経系各部における dopamine 受容体の性状ならびに受容体数を比較検討した。

V. dopamine 受容体および spiroperidol 受容体の薬理

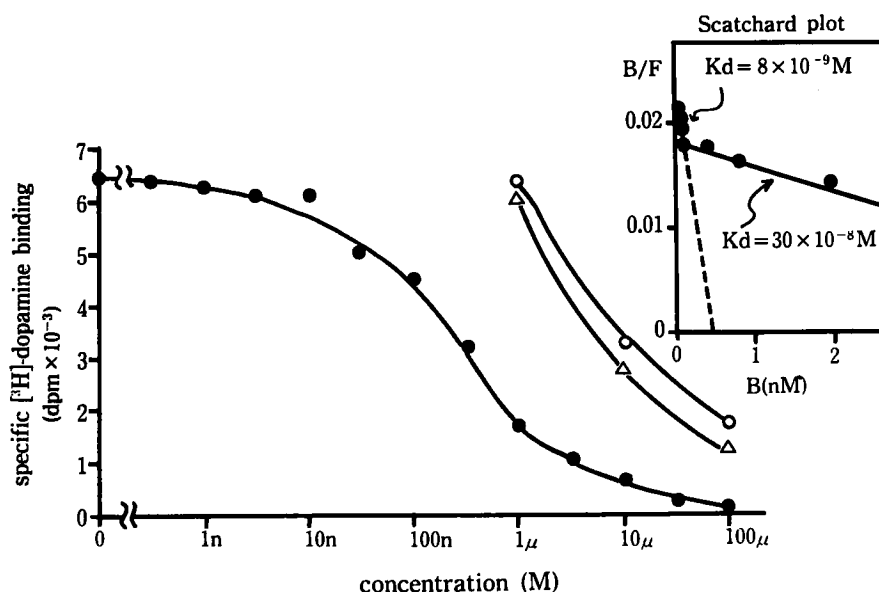
Table 1 に示すような各種中枢神経作用薬を最高 1 mM となるように種々の濃度 4 ~ 6 点でこの dopamine-RRA 系(または, spiroperidol-RRA 系)に入れ, トレーサーの受容体結合への阻害をみた。結果は log-probit 分布によりトレーサーの結合を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀) で表示した。また, dopamine-RRA 系(または spiroperidol-RRA 系)で作用のみられた薬剤については別の日に実験をくりかえし, 同様の結果が得られることを確認した。

VI. dopamine 受容体および spiroperidol 受容体の可溶性

Sprague-Dawley 系雄ラット前脳 P₂ 分画を氷冷 Tris 緩衝液 (50 mM Tris/HCl 緩衝液, pH 7.6) で再ホモゲナイズし, 15,000×g, 4

Fig. 1 The standard curve and cross reactivity of dopamine-radioreceptor assay. The insert shows the same data plotted as Scatchard plot.

●—● dopamine, △—△ noradrenalin, ○—○ adrenalin



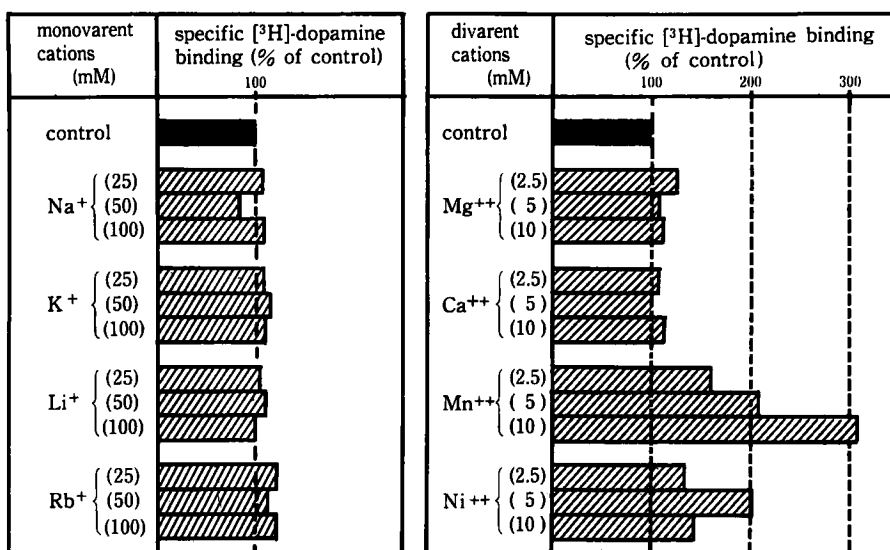


Fig. 2 Effects of monovalent cations and divalent cations on specific [^3H]-dopamine binding.

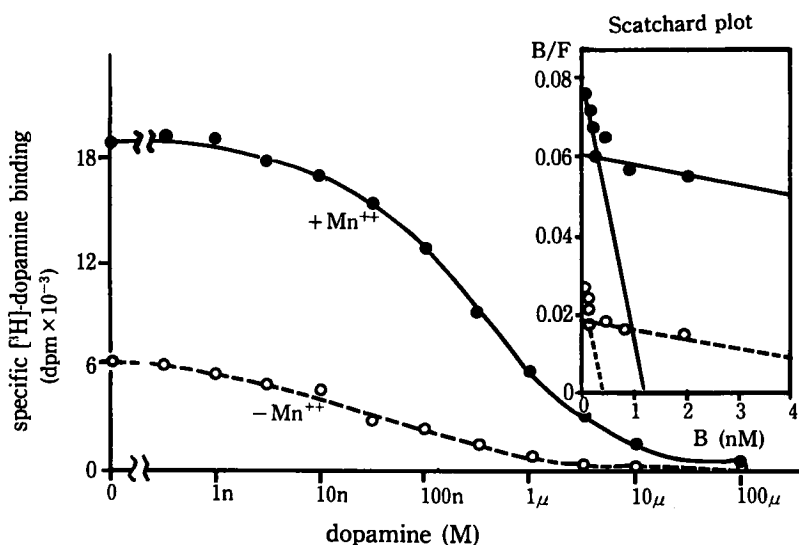


Fig. 3 The standard curve and Scatchard analysis of dopamine-radioreceptor assay in the presence or the absence of 10 mM Mn^{++} .

○-----○ - Mn^{++} , ●-----● + Mn^{++}

℃で20分間遠心し、その沈渣を10容量の Tris 緩衝液で再懸濁したものをreceptor preparationとして用いた。このreceptor preparation 4.5ml (6 mg protein/ml)に、0.5mlのTris 緩衝液もしくは0.5mlのdopamine (最終濃度1 mM) (spiroperidol-RRA の場合は最終濃度100 μ M のspiroperidol), 7.5×10^{-9} M の [^3H]-dopamine (または 3.5×10^{-9} M の [^3H]-spiroperidol) を

加え、氷水中で90分間インキュベートした後、Triton X-100 を50 μ l加え、スターラーを用いて4℃で30分間攪拌して可溶化後、200,000 \times g, 4℃で60分間遠心し、上澄3 mlをSephacrose 6B カラム (1 \times 70cm)にapplyし、0.1% Triton X-100を含むTris 緩衝液 (50mM Tris/HCl緩衝液, pH 7.6) で溶出し、1 mlずつ分画採取した。各溶出液のうち0.1mlをとりシンチレーターを加

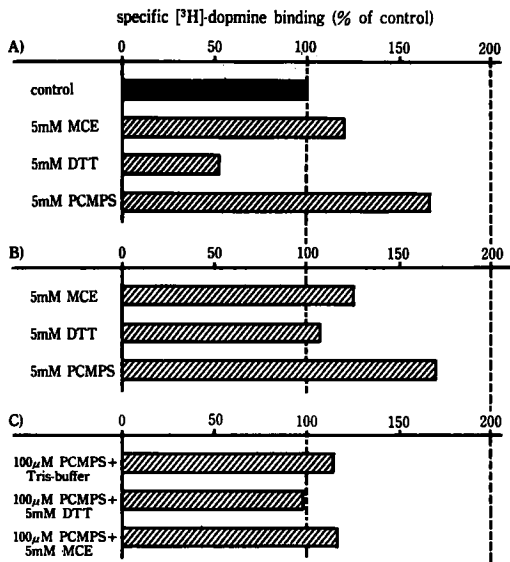


Fig. 4 Effects of thiol reagents on specific $[^3\text{H}]$ -dopamine binding.

A) Each reagents was added to the assay buffer of standard dopamine-radioreceptor assay.

B), C) Receptor membranes were treated for 30 min at 25°C with various reagents at the concentrations shown in the figure. Treated receptor membranes then centrifuged at 50,000×G for 20min, and the pellet was resuspended in the original volume of Tris/HCl buffer. The binding activity of $[^3\text{H}]$ -dopamine was determined in this resuspension.

A receptor preparation that was not exposed to reagents but incubated in the same manner in Tris/HCl buffer and centrifuged for the same period was used as a control.

MCE: mercaptoethanol, DTT: dithiothreitol, PCMPS: p-chloromercuriphenyl sulfonic acid

えてβカウンターにより放射能を測定し、可溶化受容体の溶出パターンを比較検討した。さらに同一のカラムに7種の既知のマーカ蛋白をapplyしてその溶出volumeを調べた結果と比較して、可溶化受容体の見かけの分子サイズを決定した。

次に10mMとなるようにインキュベーション緩衝液中に Mn^{++} を添加した場合についても同様にして検討し、 Mn^{++} 存在下での可溶化dopa-

mine受容体と可溶化 spiroperidol受容体の分子サイズを決定した。同時に日立ゼーマン原子分光光度計(170-70型)を用いて溶出液中の Mn^{++} 濃度も計定し比較検討した。

結 果

I. dopamine-RRA の基礎的検討

1) receptor preparation 量

dopamine-RRA 系において、receptor preparationとしてのラット前脳 P_2 分画を100μg protein/mlから12mg protein/mlまで増量すると、それに比例して特異的結合は直線的に増加したので、以後すべての実験はその直線部分である400μg protein/mlを使用した。

2) インキュベーション時間

特異的結合は時間とともに増加したが、氷水中で40分間のインキュベーションではほぼ極大になり、以後180分間までは不変であった。従って標準dopamine-RRAは氷水中で90分間で行った。

3) pH

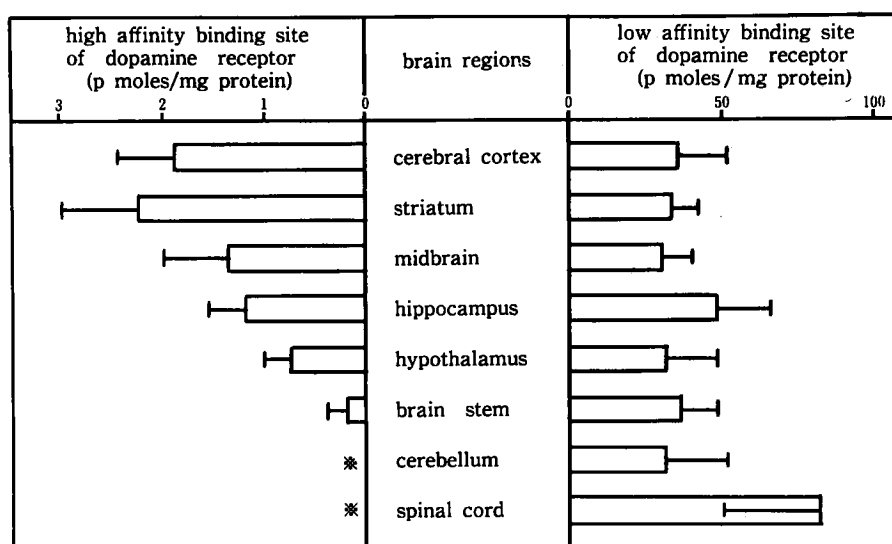
pHの検討のためには緩衝液として200mM Tris緩衝液を用い、HClによりpHを調整した。特異的結合はpH7.4—pH8.0を峰とする山型を示したが、ことに酸性では特異的結合が著しく低かった。

4) 標準曲線

$[^3\text{H}]$ -dopamineをトレーサーとし、非標識dopamineを標準とし、最も特異的結合の高いラット前脳線条体をreceptor preparationとした場合のdopamine-RRAの標準曲線をFig.1に示す。Scatchard分析からすると、 $K_d = 8 \times 10^{-9}\text{M}$ と $K_d = 30 \times 10^{-9}\text{M}$ の2つのaffinity constantを有する結合部位が存在することが明らかとなった。Fig.1に示すようにdopamineの IC_{50} は約300mMで、noradrenalineの交叉反応性は10%以下であった。

II) 陽イオンの効果

ラット前脳 P_2 分画をreceptor preparationとしたdopamine-RRAを用い、ナジウムに25mM、50mM、100mMとなるように1価の陽イオンを添加した場合、あるいは2.5mM、5mM、10mMとなるように2価の陽イオンを添加した



* : not detectable

Fig. 5 Regional distribution of dopamine receptor in rat brain. Values were shown as means \pm SD of 4 animals.

Table 1 Effects of various CNS acting drugs on specific [3 H]-dopamine binding and specific [3 H]-spiroperidol binding to P₂-fraction of rat forebrain.

CNS acting drugs	IC ₅₀ (μ M)	
	[3 H]-dopamine	[3 H]-spiroperidol
dopamine	0.3	100
neuroleptics		
spiroperidol	800	0.002
haloperidol	600	0.02
chlorpromazine	100	1
pimozide	*	1000
antiparkinson drugs		
L-dopa	2	*
bromocriptine	800	100
amantadine	*	*
methixene hydrochloride	*	4
apomorphine	0.5	100
antidepressants		
imipramine	*	4
psychoanaleptics		
methylphenidate	*	*
CDP choline	*	*
antianxiotics		
diazepam	*	*

* : no effect at 1 mM

場合の特異的結合を、無添加の場合と比較すると Fig. 2 のようになった。Fig. 2 から明らかのように 10mM の Mn^{++} を加えた場合に特異的結合は著しく大きくなり、対照の3倍にも増加した。

$[^3H]$ -dopamine をトレーサーとし、非標識 dopamine を標準とし、特異的結合を著しく増加する作用のある Mn^{++} を 10mM 加えた場合と、加えない場合それぞれについて dopamine-RRA を行ない標準曲線を求めた (Fig. 3)。Scatchard 分析からすると、 $K_d = 8 \times 10^{-9} M$ と $K_d = 30 \times 10^{-9} M$ の2つの affinity constant を有する結合部位が存在し (Fig. 3 右上)、 Mn^{++} の存在下での特異的結合の増加は高親和性結合部位数が約2倍に増加すること起因し、affinity constant は不変であることが判明した。

Ⅲ. タンパク質修飾薬の影響 (Fig. 4)

3種類の thiol reagent, DTT, MCE および PCMPS を最終濃度 5mM となるように assay tube に加えて準曲線を描くと、DTT および MCE が dopamine の特異的結合を抑制するのに対し、PCMPS は逆に dopamine の特異的結合を高めた。Scatchard 分析によるとこの PCMPS の効果は affinity には影響せず、結合部位の数が増加したことによるものと思われた。このいわゆる thiol reducing reagent と PCMPS の dopamine 受容体への作用の差の起因を知る目的で、これらの組み合わせ実験を行なった。Fig. 4-A は dopamine-RRA の assay tube に 5mM の thiol reagent を入れた場合の特異的結合を見たもので、標準曲線の場合と同様に PCMPS で特異的結合が大きくなり、DTT, MCE により特異的結合が小さくなった。Fig. 4-B は同様の thiol reagent と共にラット前脳 P₂ 分画を 25℃ で 30 分間インキュベートした後、遠心により薬剤を洗い流し、沈渣を Tris 緩衝液に再懸濁して dopamine の特異的結合を見たもので、DTT, MCE は効果が消失し、PCMPS は洗滌後も特異的結合が大きく不可逆性の変化が受容体に起っていることが示唆された。Fig. 4-C は 100 μ M の PCMPS と receptor preparation とを 25℃ で 15 分間インキュベートし、さらに Tris 緩衝液または 5mM の DTT または 5mM の MCE を添加してさらに 15 分間インキュベートし、次いで遠心し

沈渣を Tris 緩衝液に再懸濁して、dopamine-RRA を行ない特異的結合をみたものであるが、PCMPS の dopamine 結合増加作用は DTT, MCE 等の thiol reagent により中和されなかった。

一般に、dopamine 以外の物質の RRA の場合、各種の thiol reagent はいずれも受容体結合に同じ作用を示すのにもかかわらず、dopamine-RRA の場合には、いわゆる thiol reducing reagent と PCMPS の効果に解離がみられた。即ち、PCMPS の作用が SH 基に作用した結果であるとすれば、thiol reagent である DTT または MCE を過量に添加することによって、PCMPS の作用の一部は遮断ないし中和されるはずであるが、Fig. 4 に示したように、PCMPS の作用はこれらの薬剤によって全く影響されず、特異的結合は大きいままであり、PCMPS の特異的結合の増大作用が SH 基以外の基に作用した結果であることが示唆された。一般に重金属薬剤は SH 基のみならず carboxyl 基にも作用する可能性が示唆されているが、この PCMPS の dopamine 受容体結合増大作用が carboxyl 基への作用の可能性も考えられた。

Ⅳ. ラット中枢神経系各部における dopamine 受容体の分布

実験方法Ⅳ項に述べた方法で、ラット中枢神経各部における dopamine 受容体の分布を Scatchard 分析により、高親和性結合部位と低親和性結合部位とに分けて比較検討した (Fig. 5)。それらのうち、実際に生理的な dopamine 受容体としての脳機能にかかわりあっていると考えられる高親和性結合部位の数は大脳皮質が 1.9 pmoles/mg protein, 線条体が 2.25 pmoles/mg protein, 中脳が 1.35 pmoles/mg protein, 海馬が 1.2 pmoles/mg protein, 視床下部が 0.75 pmoles/mg protein, 脳幹が 0.2 pmoles/mg protein であったが、小脳、脊髄では高親和性結合部位は認められず、低親和性結合部位しか認められなかった。

Ⅴ. dopamine 受容体および spiroperidol 受容体の薬理

$[^3H]$ -dopamine をトレーサーとする dopamine-RRA 系において、トレーサーの結合を 50% 阻止する中枢神経作用薬の濃度 (IC₅₀) は Table 1 に

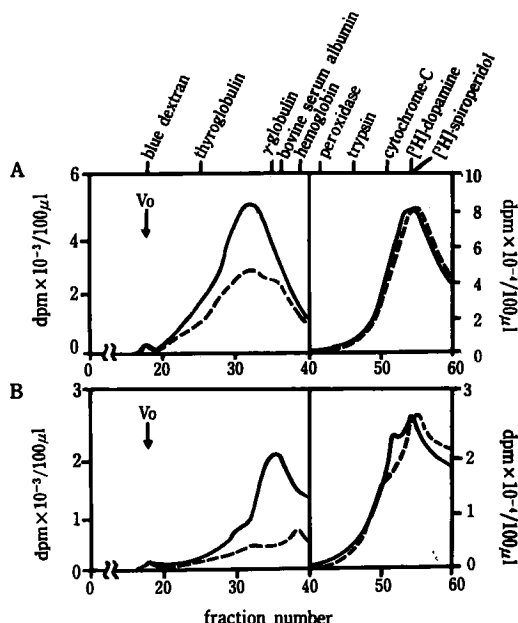


Fig. 6 Distribution of solubilized dopamine receptor (A) and solubilized spiroperidol receptor (B) on gel filtration of Sepharose 6B. Receptor membranes were incubated in glass vials with [³H]-ligands in the presence (—) or the absence (-----) of 1 mM unlabeled dopamine or 100 μM unlabeled spiroperidol. Vo: void volume

示すように chlorpromazine は 100 μM であり, butyrophenon 系の haloperidol および spiroperidol はそれぞれ 600 μM, 800 μM であった。また, apomorphine の IC₅₀ は 500 mM で dopamine と極めて強い交叉反応を示し, L-dopa は 2 μM, bromocriptine は 800 μM であったが, Table 1 に示したその他の薬剤は全く交叉反応を示さなかった。一方, [³H]-spiroperidol をトレーサーとする RRA においては, spiroperidol 自身の IC₅₀ は 2 mM, haloperidol の IC₅₀ は 20 μM, chlorpromazine の IC₅₀ は 1 μM と強い交叉反応性が認められたが, dopamine の交叉反応性は 0.5% にすぎず, apomorphine も同等であった。その他, dopamine-RRA で全く交叉反応を示さない imipramine, pimozone, methixene HCl も交叉反応が認められたが, 逆に dopamine-R-

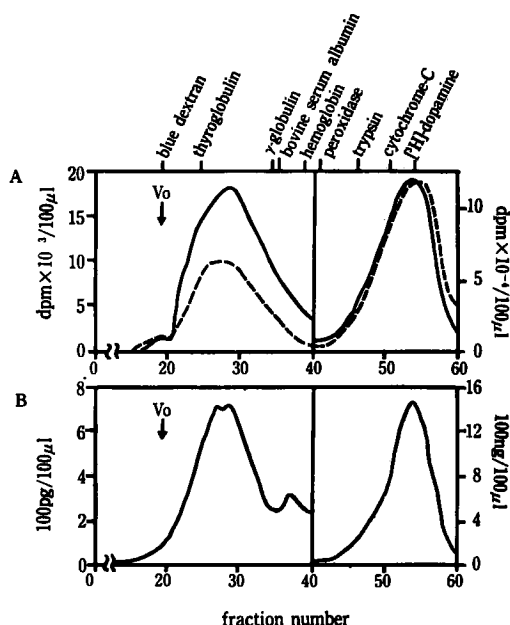


Fig. 7 Distribution of solubilized dopamine receptor in the presence of 10 mM Mn²⁺ (A). Receptor membranes were incubated in glass vials with [³H]-dopamine in the presence (—) or the absence (-----) of 1 mM unlabeled dopamine. Vo: void volume

RA で交叉反応を示した L-dopa には交叉反応は認められなかった。以上のように, 中枢神経作用薬の交叉反応性は著しく異っていた。

VI. dopamine 受容体および spiroperidol 受容体の可溶化

[³H]-dopamine をトレーサーとした RRA 系と, [³H]-spiroperidol をトレーサーとした RRA 系それぞれにおいて, dopamine, spiroperidol, haloperidol, chlorpromazine 等各種中枢神経作用薬それぞれの交叉反応性が異なることから, [³H]-dopamine をトレーサーとした場合の受容体と, [³H]-spiroperidol をトレーサーとした場合の受容体と異なっていると考えられるため, 各受容体の性状をより詳しく調べるために, 受容体を可溶化し分子サイズの比較を試みた。Fig. 6-A は可溶化 dopamine 受容体の溶出パターンを示すが, void volume に引き続き fraction number 33 と, 54 の 2 つの位置に peak が認められ, 1 mM の dopamine の添加により抑制され

ることにより, fraction number 33の peak が dopamine 受容体結合物と思われ, fraction number 54の peak は未反応の $[^3\text{H}]$ -dopamineと思われた。Fig. 6-B に示すように, マーカー蛋白の溶出部位と比較して分子サイズを計算すると, 約20万 (Stokes' radius 5.0nm)であった。同様に Fig. 6-B には spiroperidol受容体の溶出パターンを示すが, void volume に引き続き fraction number 36と54の2つの位置に peak が認められ, $100\mu\text{M}$ の spiroperidol の添加により peak が抑制されることより, fraction number 36の peak が spiroperidol受容体結合物と思われ, dopamine 受容体の場合と同様にして分子サイズを計算すると約12万 (Stokes' radius 4.3nm)であった。

Fig. 7-A は, 最終濃度10mMとなるようにインキュベーション緩衝液中に Mn^{++} を添加した時の可溶化 dopamine 受容体の溶出パターンを示すが, dopamine 受容体結合物は fraction number 28 に溶出され, 分子サイズは約40万 (Stokes' radius 6.1nm)であった。また, Fig. 7-B に示したように dopamine 受容体結合物の peak に一致して Mn^{++} 溶出された。

一方, spiroperidol 受容体は, Mn^{++} を添加しても分子サイズに変化は認められなかった。

考 按

現在までに中枢神経系の dopamine 受容体結合部位として, ラットの場合, 大脳皮質^{21)~24)}, 線条体^{22)~29)}, 黒質²³⁾, 嗅結節²¹⁾, 側坐核²⁸⁾, 海馬²³⁾, 視床下部²³⁾, 下垂体^{30), 31)}, 脳幹²³⁾や小脳²¹⁾, マウスの線条体³²⁾, ヒトの大脳皮質や線条体³³⁾等を用いたものが dopamine-RRA と称して報告されている。今回, 著者は, dopamine receptor preparation としては, in vivo や in vitro での種々の薬剤の影響を観察しやすいことから, Sprague-Dawley系雄ラット前脳P₂分画を用いた,

dopamine 受容体をラベルするためのトレーサーとしては, $[^3\text{H}]$ -dopamine³²⁾, $[^3\text{H}]$ -apomorphine^{25), 28)}などのdopamine agonistと, dopamine antagonist と一般に考えられている $[^3\text{H}]$ -spiroperidol^{21), 22), 24), 26), 27), 29)~31)}, $[^3\text{H}]$ -haloperidol²³⁾, $[^3\text{H}]$ -domperidone³³⁾などの抗

精神病薬ないしは中枢神経作用薬が使用されているが, 今回, 著者は dopamine-RRA にはトレーサーとして $[^3\text{H}]$ -dopamine自身を用い, 比較のために butyrophenon 系の抗精神病薬である $[^3\text{H}]$ -spiroperidol をトレーサーとした RRA も同時に行なった。

従来, 抗精神病薬は dopamine 受容体遮断剤として取り扱われており, いわゆる dopamine-RRA と称して行なわれている RRAに最もしばしば使用されるトレーサーは $[^3\text{H}]$ -neuroleptics である。抗精神病薬が DA 遮断作用を有する可能性を最初に提唱したのは Carlssonら⁵⁾で, 抗精神病薬を投与すると dopamine 代謝が促進するという現象を認め, これが dopamine 遮断からのフィードバック現象であろうと理解したものである。その後, Costallら⁶⁾も中隔側坐核に dopamine を局所投与した時起こる動物の行動変化を抗精神病薬が遮断することから, 抗精神病薬の dopamine 遮断作用を認めている。そのうえ, 受容体という言葉が概念として古くから薬理学の部門で用いられてきたために, 以上のような実験成績の結果から, 抗精神病薬が受容体に作用するとされてきたが, 受容体が生化学的に実体として捕えられるようになっている現在では, このような方法で受容体に作用するか, 受容体遮断剤であるとか述べることは正しくない場合もある。

著者は, より直接的な説明を行なうために RRA の手段を用いて検討したが, $[^3\text{H}]$ -dopamine をトレーサーとした真の意味での dopamine-RRA において, 受容体結合を50%阻害するのに必要な抗精神病薬の量は, dopamine 300nM, に対して spiroperidol $800\mu\text{M}$, haloperidol $600\mu\text{M}$, chlorpromazine $100\mu\text{M}$ と実に 100倍以上の濃度を必要とする。Burtらの実験成績³⁴⁾でも dopamine に対してこれらの抗精神病薬は50倍以上の濃度を必要とすることを報告している。即ち, これらの抗精神病薬は生体行動上は強い dopamine 遮断効果を示すにもかかわらず, dopamine 受容体への直接結合力は dopamine の 50~100分の1以下の力価しか示さないことになる。実際に, 電気生理学的な研究でも, haloperidol や chlorpromazineが直接的なdopamine

遮断効果がないとする報告もみられる³⁵⁾。

また、 $[^3\text{H}]$ -spiroperidolをトレーサーとした spiroperidol-RRA において spiroperidol 自身の IC_{50} は 2 nM, haloperidol は 20 nM, chlorpromazine は 1 μM と強い交叉反応性を認めたが, dopamine の IC_{50} は 100 μM と交叉反応性は弱く, dopamine-RRA に対する交叉反応性とは逆に, 抗精神病薬は dopamine の 100倍以上強力であった。Burt らは spiroperidol と同じ butyrophenon 系の抗精神病薬である $[^3\text{H}]$ -haloperidol をトレーサーとした haloperidol-RRA において, 抗精神病薬の交叉反応性は dopamine のその 60倍以上であったと報告³⁴⁾している。

以上のように dopamine-RRA, spiroperidol-RRA (もしくは haloperidol-RRA) 両者の RRA において中枢神経作用薬の交叉反応性は全く異なっていた。

一方, Keabadian ら⁷⁾はラット脳尾状核を用いた実験で, dopamine 神経のシナプスを介しての刺激の伝達の際に, dopamine 受容体における dopamine 感受性 adenylate cyclase が活性化し, ATP から cyclic AMP が生成されることを認め, 抗精神病薬が dopamine 感受性 adenylate cyclase 活性を低濃度で阻害し, この阻害作用は抗精神病薬の濃度に比例して増大することを認めている。ところが, phenothiazine 系の薬物では臨床薬用量と, この酵素活性阻害効果との間に比例関係が認められるのに対し, butyrophenon 系の薬物ではこのような関係は認められない^{36), 37)}。また, dopamine 感受性 adenylate cyclase は dopamine 受容体であるとする考え方もあり³⁸⁾, この酵素に対する抗精神病薬の阻害効果が, 抗精神病薬の種類によっては抗精神病作用と相関しないことから, 抗精神病薬が dopamine 受容体に直接作用して効果をあらわすとする考えには少し無理があるように思われる。

近年, 抗精神病薬は数種類の内因性物質に対する受容体に影響するらしいことを示唆する報告が増しつつあり¹²⁾⁻¹⁶⁾, 抗精神病薬は dopamine 受容体に直接作用することなく, ある種の内因性物質に対する受容体を介して結果的に dopamine 神経機構を遮断する作用をあらわしてい

るという報告, または, 数種類の受容体に作用した結果の総合として, dopamine 受容体遮断作用をあらわしているという報告が増えつつある³⁹⁾。

一方, Burt らは, 牛脳を receptor preparation とし $[^3\text{H}]$ -dopamine と $[^3\text{H}]$ -haloperidol をトレーサーとした実験において, それぞれに対する各種薬剤の交叉反応性の違いから dopamine と haloperidol は dopamine 受容体の違った部位か違った状態をラベルしたと推測し, agoist と antagonist とで 1 つの dopamine 受容体に異なった dopamine 受容体結合部位がある可能性, 1 つの dopamine 受容体が agoist とか antagonist とかに対し高親和性を有している構造物に可逆的に変化する可能性を報告³⁴⁾している。しかしながら, 彼らの報告にもみられるように, 例えば dopamine 受容体の agonist として知られている bromocriptine が $[^3\text{H}]$ -dopamine より $[^3\text{H}]$ -haloperidol に強い親和性を有しており, dopamine でラベルされる受容体が agonist 型で, 抗精神病薬でラベルされる受容体が antagonist 型であると単純に分けてしまうことには無理があるように思われる。

今回著者は, dopamine 受容体と spiroperidol 受容体の両受容体異なるものだとすることを, より明らかにするために, $[^3\text{H}]$ -dopamine および $[^3\text{H}]$ -spiroperidol を受容体に結合させたあとに detergent によって可溶化するという実験を行ない, dopamine 受容体結合物と spiroperidol 受容体結合物とを取り出しゲル濾過により分子サイズを決定することに成功した。dopamine や spiroperidol の分子サイズは 153 と 395 で今回得られた分子サイズと比較すれば無視しうるので, dopamine 受容体は分子サイズ約 20 万 (Stokes' radius 5.0 nm), spiroperidol 受容体の分子サイズは約 12 万 (Stokes' radius 4.3 nm) であると考えられ, 両者をゲル濾過上, 完全に分離することが可能であった。

すでに, いくつかの陽イオンは特定の中枢神経系の受容体に影響を及ぼすらしいという報告がいくつかみられる^{12), 39)}。著者らの実験では, 10 mM の Mn^{++} の存在下で dopamine 受容体の特異的結合は Mn^{++} 非存在下のその約 3 倍に

増加していたが, spiroperidol 受容体の場合, 特異的結合は10mM の Mn^{++} の存在下, 非存在下で不変であった。その上, 可溶性dopamine 受容体の分子サイズは10mM の Mn^{++} 存在下では約40万 (Stokes' radius 6.1nm) と Mn^{++} 非存在下に比べて著しく大きくなり, 可溶性dopamine 受容体の溶出部位に一致して Mn^{++} 溶出のピークがみられた。これらのことより, Mn^{++} と dopamine 受容体の結合したものがdopamine 受容体結合に強力な力を持っていると考えられた。しかしながら, 可溶性 spiroperidol 受容体の分子サイズは10mM の Mn^{++} の存在下, 非存在下に12万 (Stokes' radius 4.3nm) と変わらず, Mn^{++} の影響は認められなかった。

以上のように, 各種の中枢神経作用薬の交叉反応性に関する薬理的検討からも (Table 1), また生化学的手法による分子サイズの点からも, dopamine 受容体と spiroperidol 受容体とは異なった受容体である可能性が示唆された。

結 論

内因性物質である dopamine と抗精神病薬である spiroperidol をトレーサーとして用いた dopamine-RRA と spiroperidol-RRA とを確立し, 薬理的ならびに生化学的に研究を行ない, 両者の結合部位の性状が異なっていることを明らかにした。ことに両受容体の分子サイズが全く異なっていることを初めて明らかにした。

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜った恩師大藤 眞教授に深甚の謝意を表します。また終始多大な御指導と御援助をいただいた小川紀雄博士 (現岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門助教授) に深謝いたします。

なお, 本論文の主旨の一部は第23回日本神経学会 (松山), 第21回日本神経学会総会 (京都) および第28回国際生理学会議 (ハンガリー) において発表した。

文 献

1. Carlsson, A.: The occurrence distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 11, 490—493, 1959.
2. Sano, I., Gamo, T., Kakimoto, Y., Taniguchi, K., Takesada, M. and Nishinuma, K.: Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochem. Biophys. Acta.* 32, 586—587, 1959.
3. Livett, B.G.: Histochemical visualization of peripheral and central adrenergic neurones. *Br. Med. Bull.* 29, 93—99, 1973.
4. Ehringer, H. and Hornykiewicz, O.: Verteilung von Noradrenalin und Dopamine (3-Hydroxytryptamin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wschr.* 38, 1236—1239, 1960.
5. Carlsson, A. and Lindqvist, M.: Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 20, 140, 1963.
6. Costall, B. and Naylor, R.J.: Antagonism of the hyperactivity induced by dopamine applied intracerebrally to the nucleus accumbens septi by typical neuroleptics and by doxapine, sulpiride and thioridazine. *Eur. J. Pharmacol.* 35, 161, 1976.
7. Kebabian, J.W., Petzold, G.L. and Greengard, P.: Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2145—2149, 1972.
8. Fields, J.Z., Reisine, T.D. and Yamamura, H.I.: Loss of striatal dopaminergic receptors after intrastriatal kainic acid injection. *Life Sci.* 33, 569—574, 1978.
9. Seeman, P., Woodruff, G.N. and Poat, J.A.: Similar binding of 3H -ADTN and 3H -apomorphine to calf brain dopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 55, 137—142, 1979.

- 10) Seeman, P., Tedesco, J.L., Lee, T., Chau-Wong, M., Muller, P., Bowles, J., Whitaker, P.M., Mcmanus, C., Tittler, M., Weinreich, P., Friend, W.C. and Brown, G.M.: Dopamine receptors in the central nervous system. *Fed. Proc.* **37**, 130—135, 1978.
- 11) Schwarcz, R., Fuxe, K., Acnati, L.F. and Gustafsson, J.-Å.: Effects of bromocriptine on ^3H -spiroperidol binding sites in rat striatum. Evidence for actions of dopamine receptors not linked to adenylate cyclase. *Life Sci.* **23**, 465—470, 1978, 1978.
- 12) Creese, I., Prosser, T. and Snyder, S.H.: Dopamine receptor binding: Specificity, localization and regulation by ions and guanyl nucleotides. *Life Sci.* **23**, 495—500, 1978.
- 13) Creese, I. and Snyder, S.H.: ^3H -spiroperidol labels serotonin receptors in rat cerebral cortex and hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **49**, 200—202, 1978.
- 14) Creese, I., Stewart, K. and Snyder, S.H.: Species variations in dopamine receptor binding. *Eur. J. Pharmacol.* **60**, 55—66, 1979.
- 15) Marchais, D., Tassin, J.P. and Bockaert, J.: Dopaminergic component of ^3H -spiroperidol binding in the rat anterior cerebral cortex. *Brain Res.* **183**, 235—240, 1980.
- 16) 小川紀雄, 山脇泰秀, 大藤 眞: 中枢神経作用薬の opioid receptor 結合に対する影響. *神経内科*, **11**, 90—92, 1979.
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L. et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
- 18) De Robertis, E., Pellegrino De Iraldi, A., Rodriguez De Lores, G. et al.: Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in rat brain. 1. Isolation and subcellular distribution of acetylcholine and acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* **9**, 23, 1962.
- 19) Glowinski, J. and Iversen, L.L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain. — 1. The disposition of ^3H -norepinephrine, ^3H -dopamine and ^3H -dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.* **13**, 655—669, 1966.
- 20) Scatchard, D.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660—672, 1949.
- 21) Fur, G.L., Guilloux, F. and Uzan A.: In vivo blockade of dopaminergic receptors from different rat brain regions by classical and atypical neuroleptics. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 267—270, 1980.
- 22) Mullar, P., Britton, R.S. and Seeman, P.: The effects of long-term ethanol on brain receptors for dopamine, acetylcholine, serotonin and noradrenaline. *Eur. J. Pharmacol.* **65**, 31—37, 1980.
- 23) Misra, C.H., Shelat, H.S. and Smith, R.C.: Effect of age on adrenergic and dopaminergic receptor binding in rat brain. *Life Sci.* **27**, 521—526, 1980.
- 24) Fujita, N., Saito, K., Hirata, A., Iwatsubo, K., Noguchi, Y. and Yoshida, H.: Effects of dopaminergic agonists and antagonists on ^3H -apomorphine binding to striatal membranes: Sulpiride lack of interactions with positive cooperative ^3H -apomorphine binding. *Brain Res.* **199**, 335—342, 1980.
- 25) Hruska, R.E. and Silbergeld, E.K.: Increased dopamine receptor sensitivity after estrogen treatment using the rat rotation model. *Science* **208**, 1466—1468, 1980.
- 26) Reggiani, A., Barbaccia, M.L., Spano, P.F. and Trabucchi, M.: Dopamine metabolism and receptor function after acute and chronic ethanol. *J. Neurochem.* **35**, 34—37, 1980.
- 27) Robertson, H.A.: Stimulation of ^3H -apomorphine binding by dopamine and bromocriptine. *Eur. J. Pharmacol.* **61**, 209—211, 1980.
- 28) Usdin, T.B., Creese, I. and Snyder, S.H.: Regulation by cations of ^3H -spiroperidol binding associated with dopamine receptors of rat brain. *J. Neurochem.* **34**, 669—676, 1980.

29. Cronin, M.J., Faure, N., Martial, J.A. and Weiner, R.I.: Absence of high affinity dopamine receptors in GH₃ cells: A prolactin-secreting clone resistant to the inhibitory action of dopamine. *Endocrinology* 106, 718—723, 1980.
30. Stefanini, E., Devoto, P., Marchisio, A.M., Vernaleone, F. and Collu, R.: ³H-spiroperidol binding to a putative dopaminergic receptor in rat pituitary gland. *Life Sci.* 26, 583—587, 1980.
31. Steranka, L.R. and Sander -Bush, E.: Long-term effects of continuous exposure to amphetamine on brain dopamine concentration and synaptosomal uptake in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 65, 439—443, 1980.
32. Mackay, A.V.P., Doble, A., Bird, E.D., Spokes, E.G., Quik, M. and Iversen, L.L.: ³H-spiperone binding in normal and schizophrenic post-mortem human brain. *Life Sci.* 23, 527—532, 1978.
33. Engel, J. and Carlsson, A.: Catecholamines and behavior, In *Current Developments in Psychopharmacology*, ed, Essman, W.B. and Valzelli, L. Spectrum Publications, New York, Inc. vol. 4, p. 1, 1977.
34. Burt, D.R., Creese, I. and Snyder, S.H.: Properties of ³H-haloperidol and ³H-dopamine binding associated with dopamine receptors in calf brain membranes. *Mol. Pharmacol.* 12, 800—812, 1976.
35. Woodruff, G.N.: Dopamine receptors: a review. *Comp. Gen. Pharmacol.* 2, 439—455, 1971.
36. Clement-Cormier, Y.C., Kebabian, J.W., Petzold, G.L. and Greengard, P.: Dopamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain: A possible site of action of antipsychotic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1113—1117, 1974.
37. Miller, R.J., Horn, A.S. and Iversen, L.L.: The action of neuroleptic drugs on dopamine-stimulated adenosine 3', 5'-monophosphosphate production in rat neostriatum and limbic forebrain. *Mol. Pharmacol.* 10, 759—768, 1974.
38. Sano, K., Noshiro, O., Katsuda, K., Nishikori, K. and Maeno, H.: Dopamine receptors and dopamine-sensitive adenylate cyclase in canine caudate nucleus. *Biochem. Pharmacol.* 28, 3617—3627, 1979.
39. 小川紀雄, 山脇泰秀, 黒田広生, 大藤 眞: TRH, enkephalin および dopamine の中枢神経受容体. ホルモンと臨床. 28, 889—897, 1980.

A study of dopamine receptors in the rat central nervous system

Part 1. Biochemical and pharmacological properties of dopamine receptors.

Yasuhide YAMAWAKI

Third Department of Internal Medicine, Okayama University

Medical School, Okayama

(Director: Prof. T. Ofuji)

Until recently, it was widely accepted that neuroleptics act by blocking the dopamine receptor. Many investigators have done binding studies *in vitro* using [^3H]-neuroleptics as ligands. However, recent studies on rat brains suggest that [^3H]-neuroleptics label not only the dopamine receptor, but other receptors as well.

In this study, the cross reactivities of numerous centrally acting drugs in dopamine-radioreceptor assay were different from those in spiroperidol-radioreceptor assay. Manganese enhanced the specific binding of [^3H]-dopamine dramatically by 300 % even at low concentrations, although manganese did not influence the specific binding of [^3H]-spiroperidol. To differentiate dopamine and spiroperidol receptors in the rat brain, I solubilized these receptor molecules by treatment with detergent and examined the molecular weight by gel filtration. As compared with the elution volumes of marker proteins, the approximate molecular weight of solubilized dopamine receptors were about 200,000 dalton (Stokes'radius : 5.0 nm) in the absence of manganese, and about 400,000 dalton (Stokes'radius : 6.1 nm) in the presence of manganese. Moreover, manganese was found in the same fraction as the solubilized dopamine receptor. However, the molecular weight of the solubilized spiroperidol receptor was about 120,000 dalton (Stokes'radius : 4.3 nm) in both the presence and absence of manganese.

These data suggest that manganese couples specifically with manganese-free dopamine receptors, and that this manganese — dopamine receptor complex may have a strong capacity to bind dopamine. On the other hand, the receptor activities of spiroperidol were independent of manganese. These findings suggest that the site of action of spiroperidol is a receptor different from authentic dopamine receptor.