

氏名	文学方
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第5119号
学位授与の日付	平成27年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合学研究所生体制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Co-expression of histamine H3 receptor (H <sub>3</sub> R) decreases uptake activity and membrane expression of NET (ヒスタミン H3 受容体の共発現はノルエピネフリントランスポーターの取り込み活性と膜発現を減少させる)
論文審査委員	久保田 聡 教授      杉本 朋貞 教授      松尾 龍二 教授

### 学位論文内容の要旨

ノルエピネフリン(NE)は中枢神経系、交感神経系における主要な神経伝達物質の1つであり、多くの生理機能に関わっている。このため、NEシステムの失調は、うつ病や注意欠如多動性障害、起立性調節障害など、さまざまな疾患に関与していると考えられ、これまでもシナプス間隙NE量の調節機構について多くの検討がなされてきた。しかし、その解明は未だ十分ではない。

NE神経系において、神経伝達終結機構の1つとして神経終末に存在するノルエピネフリントランスポーター(NET)が機能している。NETは、輸送促進タンパク質スーパーファミリーの1つであるNa<sup>+</sup>およびCl<sup>-</sup>依存性神経伝達物質トランスポーター遺伝子ファミリーに属し、シナプス間隙に遊離したNEを神経終末内に再取り込みする膜輸送タンパク質である。シナプス間隙のNE濃度は、神経終末からの遊離量と神経終末への再取り込み量の差で示されることから、トランスポーターを介する再取り込みは、NE細胞外量を調節する主要な機構であり、NE神経活動を調節する鍵であると考えられる。

一方、NE神経終末にはヒスタミンH3受容体(H3R)も存在する。H3Rはシナプス前膜に存在し、ヒスタミン(HA)神経終末からのHA遊離を抑制する自己受容体として同定されたが、さらに、他己受容体としての機能も見出され、神経伝達物質遊離を抑制することにより、HA神経ばかりでなく、NE神経の神経活動も制御していると考えられている。しかし、H3Rの制御下で、NETがシナプス間隙でのNE量を調節しているのか否かに関する情報は少なく、不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、NET制御におけるH3Rの関連を解明するため、細胞培養系を用い、NETの基質取り込みと細胞膜発現に対するH3R共発現の影響を検討した。

実験には、ラットNET(rNET)翻訳領域を遺伝子導入し、定常的にrNETを発現させたチャイニーズハムスター卵巣由来細胞(NET/CHO細胞)を用いた。このNET/CHO細胞に、リポフェクション法によりラットH3Rを遺伝子導入し、H3R共発現時のNETによるNEの取り込み量を定量

した。NE取り込み量の定量は、輸送基質として $[^3\text{H}]$ NEを用い、細胞溶解液中の放射活性をシンチレーションカウンターで測定することにより行った。また、細胞膜へのNET発現に対するH3R共発現の影響は、ビオチン化法により細胞膜タンパク質を標識・回収後、抗rNET抗体を用いたウエスタンブロッティング法により評価した。なお、H3Rを共発現させたNET/CHO細胞を培養スライド上でパラホルムアルデヒド固定し、抗rNET抗体および抗rH3R抗体を用いて免疫染色後、蛍光顕微鏡で観察することによりNETの細胞内移行を検討した。さらに、抗rNET抗体および抗rH3R抗体を用いた免疫沈降法により、NETおよびH3Rのタンパク質相互作用を評価した。

その結果、H3Rを共発現させたNET/CHO細胞において、NET基質取り込み量が対照群と比較して有意に減少していること、および、NET発現が細胞全体では変わらないものの、細胞膜では対照群と比較して有意に減少していることが示された。また、H3Rを共発現したNET/CHO細胞ではNET、H3R共に細胞質内に蓄積しており、さらにこれらが、タンパク質-タンパク質結合していることが認められた。

本研究の結果は、NETの膜発現が他己受容体により制御されていることを示した初めての報告であるとともに、本研究によりH3Rが細胞質内でNETとタンパク質-タンパク質結合することにより、NETを細胞質内に留まらせ、膜への移行を抑制していること、また、そのためにNETによるNE取り込みが抑制されていることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

ノルエピネフリン(NE)は中枢神経系、交感神経系における主要な神経伝達物質の1つであり、多くの生理機能に関わっていることから、シナプス間隙NE量の調節機構を解明することは重要である。近年、主要なNE量調節機構の1つであるノルエピネフリントランスポーター(NET)と他の機能分子との相互作用が報告されているが、他己受容体との相互作用は未だ明らかになっていない。このため、本研究はNE作動性神経における他己受容体の1つであるヒスタミンH3受容体(H3R)とNETとの関連を解明することを目的に実施された。

実験には、ラットNET(rNET)翻訳領域を遺伝子導入し、定常的にrNETを発現させたチャイニーズハムスター卵巣由来細胞(NET/CHO細胞)が用いられた。このNET/CHO細胞に、リポフェクション法によりラットH3R(rH3R)を遺伝子導入し、H3R共発現時のNETによるNE取込み量を定量している。また、細胞膜へのNET発現に対するH3R共発現の影響は、ビオチン化法により細胞膜タンパク質を標識・回収後、抗rNET抗体を用いたウエスタンブロッティング法により評価された。なお、H3Rを共発現させたNET/CHO細胞を培養スライド上で固定し、抗rNET抗体および抗rH3R抗体を用いて免疫染色後、蛍光顕微鏡で観察することによりNETとH3Rの発現状態が検討された。さらに、抗rNET抗体および抗rH3R抗体を用いた免疫沈降法により、NETおよびH3Rのタンパク質間相互作用が評価された。

その結果、H3Rを共発現させたNET/CHO細胞において、NET基質取込み量が対照群と比較して有意に減少していること、および、NET発現が細胞全体では変わらないものの、細胞膜では対照群と比較して有意に減少していることが示された。また、NET発現の局在部位は、H3Rを共発現した場合、H3Rと局在部位が同じであり、H3Rを共発現していない細胞には認められなかった、顆粒状のNETの蓄積が核周辺と見られる部位に認められた。さらにNETはH3Rとタンパク質間結合していることが示された。

以上の結果から、本論文はH3Rが細胞質内でNETとタンパク質間結合することにより、NETの膜への移行を抑制していること、また、そのためにNETによるNE取込みが抑制されていることを示唆している。本論文は、NETの膜発現がH3Rのような他己受容体により制御されていることを示した初めての報告であり、NE作動性神経の制御機構の解明と、疼痛に関連した歯科医学領域の進展に大きく寄与するものである。

よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。