

L-DOPA 性神経伝達の生理学的意義

増 川 太 輝

横浜市立大学医学部 分子薬理神経生物学

要 旨: 新規生理活性物質の同定は医学・生物学研究における重要課題の一つである。L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, レボドパ, ドーパ) の薬理作用はドパミンへの変換を介してのみ発現し, それ自体は不活性のアミノ酸であると考えられてきた。一方, ドーパがある一定の刺激により遊離されること, ドパミンへの変換を介さない生体応答が存在し, その応答がドーパ類縁化合物により拮抗されること等, ドーパが神経伝達物質として機能するという知見が集積されてきた。その受容体の存在は長らく不明であったが, 筆者らは, ドーパ受容体としてGタンパク質連関型受容体の一つであるGPR143を同定し, その機能解析を進めている。本稿において, ドーパ神経伝達物質仮説の研究背景を踏まえ, これまで明らかにしてきたドーパの新たな生理機能について概説する。

Key words: L-DOPA, 神経伝達物質 (Neurotransmitter), GPR143

I. 緒 言

L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, レボドパ, ドーパ) の薬理作用は, 従来, 芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の触媒作用によりドパミン (DA) への変換を通じて, その作用を発揮すると考えられてきた。しかし, DA受容体作動薬などの様々な新薬が開発・使用されている中であっても, レボドパ療法は最も治療効果の高いパーキンソン病の治療法である。我々は, ドーパ神経伝達物質を提唱し, それを支持する知見を集積してきた。本稿においては, ドーパ神経伝達物質仮説の研究背景, ドーパ受容体の同定, ならびにその生理学的役割について概説する。

II. ドーパ神経伝達物質仮説

A. 神経伝達物質様のドーパ遊離

神経伝達物質としてのドーパ研究は, ラット脳スライス灌流標本からドーパが神経刺激により遊離され, Na^+ チャネル阻害薬感受性, 細胞外 Ca^{2+} 依存性であることを見出したことに始まる¹⁾。ドーパの遊離はドーパ合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の阻害により減弱す

ることから, 遊離されたドーパはTHにより合成されると考えられる²⁾。また, ラット線条体におけるドーパの遊離がシナプス小胞構成タンパクである syntaxin 1 の阻害により減弱することから, ドーパは開口放出により遊離されると考えられている³⁾。上記のような伝達物質と類似する性質を持つドーパ遊離は, 線条体, 下位脳幹孤束核 (NTS), 尾側腹外側延髄 (CVLM), 吻側腹外側延髄 (RVLM) などの部位において認められる⁴⁾。

B. 下位脳幹におけるドーパの薬理・生理作用

圧受容器情報は, 一次求心性神経からNTSに伝達され, さらには, CVLM-RVLM投射系を介して血圧・心拍数を制御する。従来, 一次求心性神経から遊離される神経伝達物質はグルタミン酸であると考えられてきたが, ドーパもこの系における神経伝達物質候補である⁵⁾。麻酔下ラットのNTSに微量注入したドーパは降圧・徐脈応答を起こす。この応答は, 中枢性AADC阻害薬により影響を受けず, 同用量のD-ドーパ, ドパミン, ノルアドレナリンによっても模倣されない。このようなドーパによる降圧・徐脈応答はシクロヘキシルエステル (DOPACHE) などのドーパ類縁化合物により抑制される^{6, 7)}。さらに, 大動脈神経刺激およびフェニレフリン静注によ

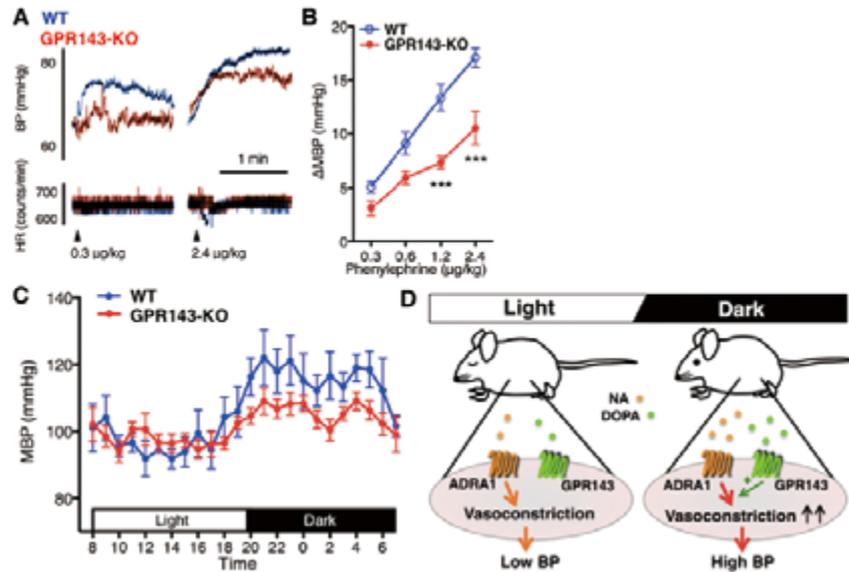


図1. GPR143は生理的な血圧制御を担う分子である

A, B. WT と GPR143-KO マウスにおけるフェニレフリンによる心血管応答の経時変化および定量グラフ. C. WT と GPR143-KO マウスにおける日内血圧変動. GPR143-KO マウスにおいて夜間-活動期血圧が低下している. D. GPR143による生理的な血圧調節の想定メカニズム. (文献11を一部改変)

る一次求心性神経刺激は、NTSからのドーパ遊離を促進し、心血管応答を起こす。また、この応答はドーパ類縁化合物により抑制される。最近、我々は、より多くの化合物スクリーニングを行い、このドーパ応答に必須な構造上の特徴（ファルマコフォアモデル）を求めつつある。このように、ドーパが圧受容器反射における一次求心性神経の神経伝達に関わることを支持する知見が集積されているが、実際に、ドーパがTH陽性細胞のシナプス前細胞から遊離され、シナプス後応答を起こすかどうかは未だ明らかとなっていない。今後、筆者らは、トランスジェニック動物作製や光遺伝学的、電気生理学的手法を用いて、圧受容器反射におけるドーパの生理的役割を解明する予定である。

Ⅲ. ドーパ受容体候補分子

A. ドーパ受容体分子の同定

GPR143は、1999年に ocular albinism 1 (OA 1/GPR143) の原因遺伝子産物として同定された⁸⁾。GPR143の同定当初から7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体(GPCR)であることが想定されていたが、長らくリガンドが不明なオーファンGPCRとして位置付けられてきた。その後、GPR143発現CHO細胞が、飽和可能な³H-ドーパ結合能を有し、その結合がDOPA CHEにより置換されることや、GPR143を強制発現させたARPE-19細胞にドーパを処置すると細胞内カルシウム応答が起こることが報告された^{6, 9)}。しかし、GPR143発現細胞株細胞株での³H-ドー

パ受容体結合実験で得られる解離定数や50%効果濃度が約10~70 nMと相対的に高い。したがって、GPR143が、生体内においてドーパを直接認識・結合してその活性を媒介するかどうか、リガンド認識に必要な未同定の因子があるかどうかは、今後さらなる検討が必要である。

B. ドーパ受容体の生理的な血圧調節機構

GPR143は、果たして従来見出されてきたドーパによる降圧・徐脈応答を媒介する受容体であろうか？確かに免疫組織化学的解析、およびin situ hybridization法により、GPR143はNTSに局在することが確認されている。また同部位のGPR143 shRNA ノックダウンは、ドーパ応答を消失した^{6, 10)}。このことから、ドーパの薬理作用はGPR143を媒介して生じると考えられた。もし、ドーパがNTSにおけるGPR143を媒介し、生理的に中枢性の心血管機能を調節するならば、GPR143-KOマウスにおいて圧受容器反射が抑制されると考えられる。 α_1 受容体作動薬のフェニレフリン静脈内投与による圧受容器反射を検討したところ、意外なことにフェニレフリンによる昇圧応答がGPR143-KOマウスにおいて、野生型(WT)と比較し、著減することを新たに見出した(図1)。この昇圧応答の減弱は、血管平滑筋特異的GPR143-KOマウスにおいても同程度認められる。また、ドーパ(1-10 nM)の前処置はフェニレフリンに対する動脈の血管収縮作用および培養血管平滑筋細胞の細胞内カルシウム応答を増強する。このドーパによる増強作用はGPR143-KOマウスでは認められなかった。このドーパの有効濃度は、マウス血

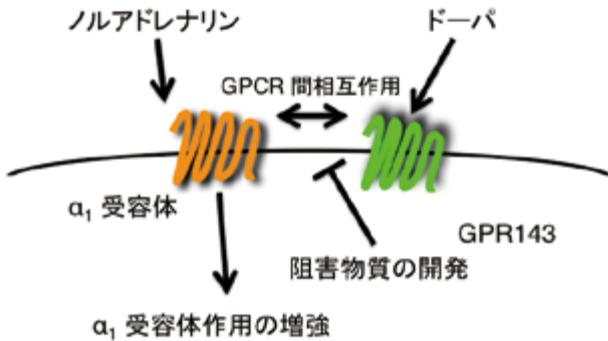


図2. GPR143はアドレナリン α_1 受容体と機能連関を持ち、その阻害物質の開発はドーパの生理学的意義解明の契機となる。(文献11を一部改変)

漿濃度と一致した。したがって、ドーパは血管平滑筋に発現するGPR143を介して α_1 受容体機能を制御すると考えられる。さらにGPR143が生理学的に血圧制御に関わるか否かを解析した。全身GPR143-KOおよび血管平滑筋特異的GPR143-KOマウスにおいて、それぞれのWTと比較し、痛覚刺激時および血圧の日内変動幅が低下する事が観察された(図1)。これらのマウス群の間に血漿中ドーパ、ノルアドレナリン、アドレナリン濃度に差は見られなかった。これらの結果は、血管平滑筋のGPR143が血管平滑筋 α_1 受容体機能を制御することにより、生理学に血圧調節に関わる事を示す¹¹⁾。

C. 受容体間相互作用を介したGPR143の α_1 受容体制御機構

次に、GPR143が、どのようにして α_1 受容体を介する血圧調節を制御しているのかを解明するために、受容体同士のヘテロオリゴマー形成に着目し、検討を行った。我々は、HEK293細胞発現系における、免疫沈降法、FRET解析およびin situ proximity ligation試験により、GPR143が α_1 受容体と物理的相互作用を示すことを明らかにした。この相互作用は、ドーパ(10 nM)により増強された¹¹⁾。この系におけるGPR143に対するドーパの50%効果濃度は、前述の受容体結合実験から得られる解離定数と比較し低値を示しているが、GPR143が他の受容体とヘテロオリゴマーを形成する場合、ドーパとの結合親和性が増加する可能性が考えられる。その他、二つの受容体が機能連関する証拠として、フェニレフリンによるERKのリン酸化応答が、 α_1 受容体単独発現細胞と比較し、

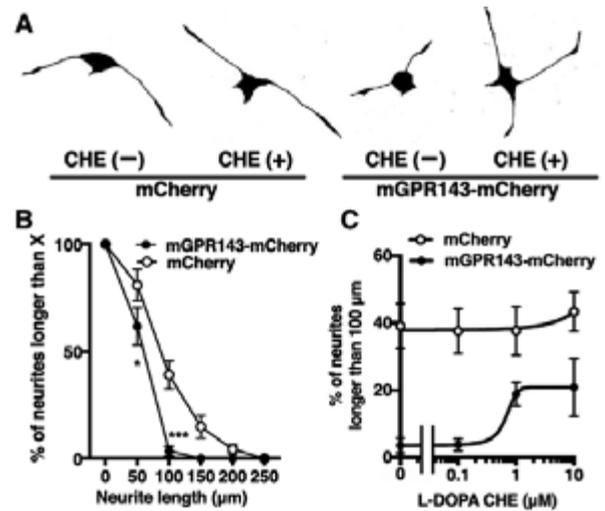


図3. GPR143は神経突起形成を抑制する

GPR143およびそのコントロールを導入したPC12細胞の形態をトレースしたもの。B. GPR143およびそのコントロールを導入したPC12細胞における神経突起の長さを計測したもの。C. DOPA CHEを処置した際の突起形成の変化。GPR143は神経突起形成を抑制し、その効果はDOPA CHEによって減弱する。(文献12を一部改変)

GPR143と α_1 受容体との共発現細胞において増強される知見がある。現在、我々は、GPR143と α_1 受容体のヘテロオリゴマー形成を阻害する物質を見出した。今後、これらを用い、受容体間の機能連関作動機構およびその生理学的意義をより詳細に検討する予定である(図2)。

IV. 新規GPR143リガンドの探索

神経伝達物質の生理機能を明らかにするためには、より安定な化合物の開発が必要である。我々は、最近、PC12細胞にGPR143を発現させることにより、GPR143非発現細胞と比較し、神経突起伸長が抑制されることを見出した(図3)。その抑制効果は、DOPA CHEの処置、およびG α_{13} タンパク質のノックダウンにより減弱した。DOPA CHEの効果は、アドレナリン α_1 、 β 、ドーパミンD₂受容体のそれぞれの拮抗薬であるプラゾシン、プロプラノロール、ハロペリドールにより模倣されなかったことから、GPR143依存的な応答であることが示唆される¹²⁾。筆者らは、この実験系を用いて、GPR143リガンドの新たな候補化合物を見いだしつつある。

V. 結 語

ドーパ受容体GPR143の発見により、今後はパーキンソン病の薬物治療の根幹をなすレドバ療法の評価や、中枢・末梢組織における生理活性物質ドーパの生理学的、病態生理学的意義の検討が課題となる。また、著者らはGPR143 KOマウスの解析を通じて、GPR143を介さない

ドーパの作用を見出し、新規ドーパ受容体の存在を裏付ける知見を集積しつつある¹³⁾。GPR143の機能解析に加え、新規ドーパ受容体の同定も今後の重要な検討課題の1つである。

VI. 謝 辞

横浜市立大学医学会医学研究奨励賞の受賞にあたり、選考委員の先生方に心より御礼申し上げます。本研究遂行にあたり、ご指導いただきました横浜市立大学分子薬理神経生物学教室の五嶋良郎教授と研究室の方々、中村史雄先生（現、東京女子医大教授）、橋本達夫先生（現、神奈川歯科大学教授）、古賀資和先生（現、麻酔科学助教）、そして本研究の遂行に多大なご協力をいただきました循環器・腎臓病・高血圧内科の田村功一教授、涌井広道講師、循環制御医学の横山詩子先生（現、東京医科大学教授）、石川義弘教授、順天堂大学細胞・分子薬理分野の上窪裕二准教授、櫻井隆教授、産業技術総合研究所の福西快文先生、さらに私が研究活動を始めるきっかけを作り、横浜市立大学の教員に推薦してくださった、星薬科大学鈴木勉名誉教授（現、医薬品適正使用・乱用防止推進会議代表理事）に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Goshima Y, Kubo T, Misu Y: Transmitter-like release of endogenous 3,4-dihydroxyphenylalanine from rat striatal slices. *J Neurochem*, **50** (6) : 1725 - 1730, 1988.
- 2) Yue JL, Okamura H, Goshima Y, Nakamura S, Geffard M, Misu Y: Baroreceptor-aortic nerve-mediated release of endogenous L-3,4-dihydroxyphenylalanine and its tonic depressor function in the nucleus tractus solitarii of rats. *Neuroscience*, **62** (1) : 145 - 161, 1994.
- 3) Zhu G, Okada M, Yoshida S, Hirose S, Kaneko S: Determination of exocytosis mechanisms of DOPA in rat striatum using in vivo microdialysis. *Neurosci Lett*, **367** (2) : 241 - 245, 2004.
- 4) Misu Y, Goshima Y, Miyamae T: Is DOPA a neurotransmitter? *Trends Pharmacol Sci*, **23** (6) : 262 - 268, 2002.
- 5) Misu Y, Goshima Y, Ueda H, Okamura H: Neurobiology of L-DOPAergic systems. *Prog Neurobiol*, **49** (5) : 415 - 454, 1996.
- 6) Hiroshima Y, Miyamoto H, Nakamura F, et al: The protein Ocular albinism 1 is the orphan GPCR GPR143 and mediates depressor and bradycardic responses to DOPA in the nucleus tractus solitarii. *Br J Pharmacol*, **171** (2) : 403 - 414, 2014.
- 7) Furukawa N, Goshima Y, Miyamae T, et al: L-DOPA cyclohexyl ester is a novel potent and relatively stable competitive antagonist against L-DOPA among several L-DOPA ester compounds. *Jpn J Pharmacol*, **82** (1) : 40 - 47, 2000.
- 8) Schiaffino MV, d'Addio M, Alloni A, et al: Ocular albinism: evidence for a defect in an intracellular signal transduction. *Nat Genet*, **23** (1) : 108 - 112, 1999.
- 9) Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS: L-DOPA is an endogenous ligand for OA 1. *PLoS Biol*, **6** (9) : e236, 2008.
- 10) Goshima Y, Nakamura F, Masukawa D, Chen S, Koga M: Cardiovascular actions of DOPA mediated by the gene product of ocular albinism 1. *J Pharmacol Sci*, **126** (1) : 14 - 20, 2014.
- 11) Masukawa D, Koga M, Sezaki A, et al: L-DOPA sensitizes vasomotor tone by modulating the vascular alpha 1 - adrenergic receptor. *JCI Insight*, **2** (18) , 2017.
- 12) Masukawa D, Yamada K, Goshima Y: Overexpression of the gene product of ocular albinism 1 (GPR143/OA 1) but not its mutant forms inhibits neurite outgrowth in PC12 cells. *J Pharmacol Sci*, **141** (1) : 41 - 48, 2019.
- 13) Ueda S, Masukawa D, Koga M, Goshima Y: 1-3,4-Dihydroxyphenylalanine induces ptosis through a GPR143-independent mechanism in mice. *J Pharmacol Sci*, **132** (1) : 109 - 112, 2016.

Abstract

PHYSIOLOGICAL ROLES OF L-DOPAERGIC NEUROTRANSMISSION

Daiki MASUKAWA

*Department of Molecular Pharmacology and Neurobiology,
Yokohama City University Graduate School of Medicine*

Identification of novel bioactive substances is an important issue in medical and biological research. Generally, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, DOPA, levodopa) is considered to be an inert amino acid. The pharmacological actions of DOPA have been believed to be caused through its conversion to dopamine by aromatic L-amino acid decarboxylase. On the other hand, accumulating evidence suggests that DOPA is a neurotransmitter. Recently, G-protein coupled receptor GPR143, the gene product of ocular albinism-1, was identified as a receptor for DOPA. Although the functional analysis of GPR143 shows novel actions of DOPA, the physiological roles of DOPA are not fully understood. This review summarizes the background of the DOPA neurotransmitter hypothesis and the current understanding of the physiological roles of DOPA.