

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |   |
|-------------------|---|
| 題目(和文)            | D1-D2ヘテロ多量体を介したドーパミンによるマウス膵 細胞の機能調節の解明  |
| Title(English)    |   |
| 著者(和文)            | 上船史弥  |
| Author(English)   | Fumiya Uefune   |
| 出典(和文)            | 学位:博士(理学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第12172号,<br>授与年月日:2022年9月22日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:糸 昭苑,白木 伸明,木村 宏,廣田 順二,徳永 万喜洋,北口 哲也  |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science),<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第12172号,<br>Conferred date:2022/9/22,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner:,,,,, |
| 学位種別(和文)          | 博士論文  |
| Type(English)     | Doctoral Thesis   |

学位論文

D1-D2 ヘテロ多量体を介したドーパミンによる  
マウス膵  $\beta$  細胞の機能調節の解明

上船 史弥

東京工業大学生命理工学院生命理工学系生命理工学コース

2022年9月

## 目次

|                     |    |
|---------------------|----|
| 要旨 .....            | 1  |
| 略語一覧 .....          | 3  |
| 第 1 章 研究背景.....     | 5  |
| 第 2 章 実験方法.....     | 13 |
| 第 3 章 実験結果.....     | 20 |
| 第 4 章 考察.....       | 42 |
| 第 5 章 結語.....       | 48 |
| 学位論文の骨格となる参考論文..... | 49 |
| 謝辞.....             | 50 |
| 参考文献 .....          | 51 |

## 要旨

### 【背景・目的】

膵臓の膵 β 細胞はインスリンを産生・分泌することで血糖値を下げる役割を有する。遺伝的あるいは環境的要因によってインスリンの機能不全・分泌不全が生じると、慢性的な高血糖を呈する糖尿病を発症する。β 細胞は食後の血中グルコース濃度の上昇に応答して 2 相性のインスリン分泌を示す。急峻な第 1 相と持続的な第 2 相からなる 2 相性インスリン分泌は血糖値の急激な上昇を防ぐとともに、安定的に保つ働きがある。このような規則的な β 細胞のインスリン分泌は内分泌細胞間のパラクラインやオートクラインが重要な役割を持つ。神経伝達物質の 1 つであるドーパミン (DA) はインスリン分泌を負に調節することが知られている。β 細胞自身が DA の合成・貯蔵能を有することから、パラクラインやオートクラインを介して β 細胞の機能を調節すると考えられている。私の所属研究室ではこれまでに DA の正常な分泌小胞への貯蔵が β 細胞の機能を長期間維持するために重要であることを明らかにした。一方で、β 細胞が合成・貯蔵した DA がインスリン分泌を調節する詳細な機構には不明な点も多く、本研究では DA によるインスリン分泌調節機構解明を目的とした。

### 【方法】

本研究では主にマウス生体から単離した膵島、および膵島を分散培養したマウス初代 β 細胞を用いた。β 細胞のインスリン分泌を調べるため、アデノウイルスを用いてヒト preproinsulin と蛍光タンパク質 Venus の融合タンパク質をマウス膵島の分散培養系において強制発現させ、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いて分泌小胞の開口放出を観察した。また、インスリン分泌を引き起こすセカンドメッセンジャーである  $Ca^{2+}$  および cAMP の動態をそれぞれの可視化プローブを用いて生きた細胞で蛍光観察により解析した。さらに DA および DA 受容体による調節機構を探るため、受容体に対する特異的なアゴニストとアンタゴニストを添加し、応答性を調べた。

### 【結果】

まず、マウス膵臓組織の免疫組織化学により、DA 合成酵素の tyrosine hydroxylase は一部の β 細胞で、Aromatic L-amino acid decarboxylase はほとんどの β 細胞で発現することを確認した。また、DA は β 細胞のインスリン分泌小胞に局在していた。TIRFM によるインスリン分泌動態実験から、β 細胞内で生合成・貯蔵された DA がインスリン分泌 2 相目を抑制することがわかった。DA による分泌調節機構を調べたところ、細胞外に DA を添加すると細胞内  $Ca^{2+}$  および cAMP 蓄積量が減少し、インスリンの開口放出数を減少させた。さらに、DA

の作用はドーパミン D1 受容体アンタゴニストによって阻害されたことから、D1 の関与が示唆された。そこで、DA 受容体のうち、D1 受容体 (D1) と D2 受容体 (D2) の効果を調べるため、マウス  $\beta$  細胞に対してアデノウイルスを用いて強制発現した。D1 強制発現 (D1OE) はグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) 能を示したが、DA を添加しても分泌阻害を示さなかった。一方で D2OE により GSIS 能は失われた。異種の G タンパク質共役型受容体同士が会合することで下流のシグナルが変化し調節されることが知られており、神経細胞などでは D1 と D2 がヘテロ多量体を形成し、その下流には新たなシグナルを活性化することが報告されている。今回、野生型と D1OE の DA に対する応答の違いから、D1 と D2 の相互作用に着目した。D1-D2 ヘテロ多量体を特異的に活性化することが知られている SKF83959 を 10  $\mu$ M の濃度で加えると細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  とインスリンの開口放出数が一過性的に減少した。D1-D2 同時に強制発現 (D1D2OE) させると、濃度依存的に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を減少することが確認された。また、 $\beta$  細胞における D1-D2 ヘテロ多量体形成が Duolink in-situ 近接アッセイによって確認されたことから、 $\beta$  細胞内での D1-D2 ヘテロ多量体の形成がインスリン分泌を調節することを示した。さらに、D1 および D2 が  $\beta$  細胞の維持に関わるかを調べたところ、DA 10  $\mu$ M は D2OE において細胞死を誘導するが、D1 を同時に発現させると細胞死が防がれることが分かった。

#### 【考察】

$\beta$  細胞内の DA 生合成・貯蔵がインスリン分泌 2 相目を抑制することが示され、DA がインスリンとともに放出され、パラクライン/オートクラインを介して分泌を調節することが示唆された。長期的な D2 ホモ多量体の活性化は  $\beta$  細胞の機能不全と細胞死を引き起こし、D1 が発現して D1-D2 ヘテロ多量体を形成することで  $\beta$  細胞の機能を維持していることが示唆された。

#### 【結論】

本研究により、マウス  $\beta$  細胞における DA 生合成と貯蔵によるインスリン分泌調節を示した。DA による分泌調節機構には D1 と D2 の 2 種類の受容体が関与し、D1-D2 ヘテロ多量体の形成を示した。D1-D2 ヘテロ多量体の活性化は一過性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  減少を介してインスリン分泌を阻害するとともに、D2 ホモ多量体の過剰な活性化による細胞死から防ぐ作用を持つことを明らかにした。

## 略語一覽

|        |   |
|--------|---|
| AADC   | Aromatic L-amino acid decarboxylase                     |
| ADP    | Adenosine diphosphate                                   |
| AMPT   | $\alpha$ -methyl-DL-tyrosine methyl ester               |
| ANOVA  | Analysis of variance                                    |
| ATP    | Adenosine triphosphate                                  |
| AUC    | Area under curve  |
| BCH    | 2-Amino-2-norbornanecarboxylic acid                     |
| CaMKII | Calcium calmodulin-dependent protein kinase II          |
| cAMP   | 3', 5'-Cyclic adenosine monophosphate                   |
| cDNA   | complementary DNA                                       |
| D1     | Dopamine D1 receptor                                    |
| D2     | Dopamine D2 receptor                                    |
| DA     | Dopamine  |
| DAPI   | 4', 6-diamino-2-phenylindole                            |
| DAT    | Dopamine transporter                                    |
| DMEM   | Dulbecco's modified eagle medium                        |
| DMSO   | Dimethyl sulfoxide                                      |
| DNA    | Deoxyribonucleotide                                     |
| DPD    | Domperidone   |
| ELISA  | Enzyme-linked immunosorbent assay                       |
| Epac2A | Exchange proteins activated by cyclic AMP 2 A           |
| F      | Fluorescent   |
| FBS    | Fetal bovine serum                                      |
| FRT    | Flippase recognition target                             |
| Fsk    | Forskolin   |
| GABA   | gamma-Aminobutyric acid                                 |
| GCG    | Glucagon-like peptide 1                                 |
| GIP    | Glucose-dependent insulinotropic polypeptide            |
| GIRK   | G protein-activated inward rectifying potassium channel |
| GLP-1  | Glucagon-like peptide 1                                 |
| GLUT2  | Glucose transporter 2                                   |
| GPCR   | G protein-coupled receptor                              |
| GSIS   | Glucose-stimulated insulin secretion                    |

|          |   |
|----------|---|
| HBSS     | Hanks' balanced salt solution   |
| HEK293A  | Human embryonic kidney cells 293A                                     |
| HRP      | Horseradish peroxidase  |
| INS      | Insulin   |
| IQR      | Interquartile range   |
| KRB      | Krebs Ringer bicarbonate  |
| LAT1     | L-type amino acid transporter 1                                       |
| L-Dopa   | L-3,4-dihydroxyphenilalamine  |
| MAO      | Monoamine oxidase   |
| MIN6     | Mouse insulinoma 6  |
| PBS      | Phosphate buffered saline   |
| PCR      | Polymerase chain reaction   |
| PFA      | Paraformaldehyde  |
| PLA      | Proximity ligation assay  |
| PTX      | Pertussis toxin   |
| PVDF     | Polyvinylidene difluoride   |
| RNA      | Ribonucleotide  |
| ROI      | Region of interest  |
| RT-PCR   | Reverse transcription PCR   |
| SD       | Standard deviation  |
| SDS      | Sodium dodecyl sulfate  |
| SDS-PAGE | SDS Polyacrylamide gel electrophoresis                                |
| SEM      | Standard error of the mean  |
| SLMV     | Synaptic-like microvesicle  |
| SNARE    | Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor |
| SUR      | Sulfonyl urea receptor  |
| Syn      | Synaptophysin   |
| TBZ      | Tetrabenazine   |
| TH       | Tyrosine hydroxylase  |
| TIRFM    | Total internal reflection fluorescent microscopy                      |
| TUNEL    | Terminal transferase dUTP nick end labeling                           |
| VDCC     | Voltage-dependent calcium channel                                     |
| VMAT2    | Vesicular monoamine transporter 2                                     |

## 第1章 研究背景

### 1-1. 糖尿病と膵β細胞の概要

膵臓にはホルモンを分泌する内分泌細胞で構成された膵島あるいはランゲルハンス島と呼ばれる構造が存在し、インスリンを分泌するβ細胞がげっ歯類では70~80%程度、ヒトでは60%程度を占め、グルカゴンを分泌するα細胞がげっ歯類では20%程度、ヒトでは40%程度を占める。そのほか、ソマトスタチンを分泌するδ細胞やε細胞、PP細胞などが存在する。β細胞から分泌されるインスリンは血中グルコース濃度を下げる作用を持ち、体内の血糖恒常性を保つ重要なホルモンである。食後に食物が消化吸収され血中グルコース濃度が増加するとβ細胞からインスリンが分泌される。インスリンは肝臓や骨格筋、脂肪細胞に作用し、グルコースの細胞内取り込みと肝臓におけるグリコーゲン分解の抑制を促すことで血中グルコース濃度を減少させる。

糖尿病は慢性的な高血糖状態とそれに伴う合併症を発症する疾患であり、主に遺伝的要因と環境的要因の2つの要因によって発症する。糖尿病はその発症機序によって分類される。自己免疫反応によってインスリンを分泌するβ細胞が破壊されることを主原因とする1型糖尿病、遺伝的要因と生活習慣を起因としてインスリン分泌能とインスリンに対する感受性の低下によって発症する2型糖尿病、その他、妊娠中に妊婦で発症する妊娠糖尿病や特定の遺伝子の機能異常が原因として同定されて発症する糖尿病がある。後者に関しては、インスリン自体やインスリン受容体の遺伝子異常、ミトコンドリア遺伝子異常を原因とするものや、糖代謝に関わる単一遺伝子の異常によって発症する若年発症性成人型糖尿病(MODY)が知られる。

食習慣などによって血糖値の高い状態が続くとインスリンの要求性が高まる。インスリン要求性を満たすため、β細胞ではインスリンの産生と分泌が増加する。さらにこの状態が継続すると、肝臓などのインスリン応答組織や細胞において糖毒性などを原因としてインスリン感受性が低下するインスリン抵抗性が生じる。これによって益々インスリン要求性が高まり、β細胞は疲弊して脱分化や細胞死が進行する(Alejandro et al., 2015)。そのためインスリン分泌量の変化が食後に始まり一定の分泌量が必要でありながらも高値にならずに制御されることは、膵臓としての機能を保つ上でとても重要である。

### 1-2. インスリン分泌機構

食後血糖値を一定に調節するために、インスリン分泌は2相性を示す(図1)。1相目は急峻で分泌量が多い特徴を持ち、食後の急激な血糖上昇を抑える。2相目は緩やかで長時間持続的に分泌する特徴を持ち、血糖値を一定に保つ役割

を有する。β 細胞は次のような機構で、グルコース濃度の増加に応答してインスリンを分泌する (図 2)。グルコースはグルコース輸送体 2 (GLUT2) によって β 細胞内に取り込まれ、解糖系によって分解され ATP が産生される。これによって細胞内 ATP/ADP 比が増加すると、ATP 感受性カリウムチャネル (KATP チャネル) の開口が阻害されて細胞内に K<sup>+</sup>が蓄積するため、細胞膜が脱分極する。脱分極は電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル (VDCC) を開口するため、細胞内に Ca<sup>2+</sup>が流入する。Ca<sup>2+</sup>がインスリン分泌小胞の開口放出を引き起こすことで、インスリンが細胞外に分泌される。Ca<sup>2+</sup>の流入は急速な 1 相目の開口放出を引き起こす (惹起経路) といわれており、2 相目は分泌を増幅する機構 (増幅経路) として ATP 産生以外のシグナルが関与する。Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) は 2 相目の分泌に関与する。小腸から分泌されるホルモン・インクレチンの 1 種である GLP-1 は 2 型糖尿病の治療標的である。GLP-1 が G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の 1 つである GLP-1 受容体と結合すると、Gαs が活性化され、アデニル酸シクラーゼを活性化することで cAMP 合成を促進する。cAMP の増加は Epac2A 経路を介して、分泌 2 相目を増幅させる (S. Seino et al., 2009; Shibasaki et al., 2007)。2 型糖尿病の進行は、早期に 1 相目の分泌を喪失させ、また 2 相目も含め全体のインスリン分泌量を減少させるなど、β 細胞の正常な機能を失わせる (Seino et al., 2011)。そのため、β 細胞の正常な 2 相性インスリン分泌能を維持する機構は、血糖恒常性を長期的に維持するために重要である。

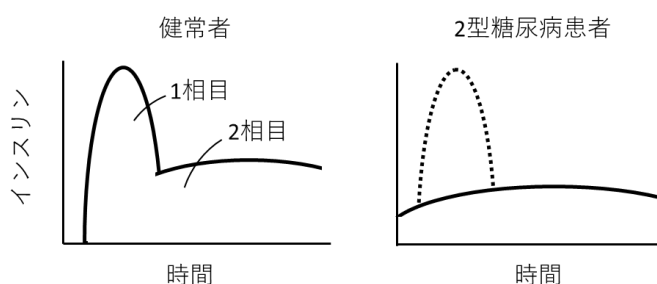


図 1: 膵臓 β 細胞の 2 相性インスリン分泌の模式図  
 健常者 (左) では食後の血糖上昇に反応してインスリンは急峻な 1 相目と穏やかな 2 相目の分泌様式を持つ。2 型糖尿病患者 (右) では 1 相目分泌が喪失するとともに、全体的な分泌量が減少する (Seino et al., 2011 を参考に作成)。

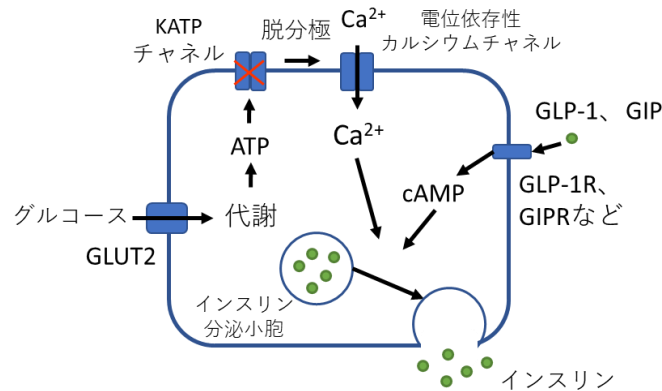


図 2:  $\beta$  細胞のグルコース応答性インスリン分泌機構  
 グルコース代謝による  $\text{Ca}^{2+}$  の流入がインスリン分泌を惹起する。インクレチンは cAMP を介して分泌を増幅する。

### 1-3. 膵島内分泌細胞間相互作用による機能調節

膵島を構成する内分泌細胞はそれぞれが放出する物質を介したパラクライン/オートクラインによって周囲の細胞を同調することで、ホルモン分泌を厳密に調節している (図 3) (Arrojo e Drigo et al., 2015; Di Cairano et al., 2016)。例えば、インスリンは  $\alpha$  細胞に作用してグルカゴン分泌を阻害する (Kawamori et al., 2009)。グルカゴンは  $\beta$  細胞に作用して cAMP 合成を介してインスリン分泌を増幅する (Huypens et al., 2000; Kieffer et al., 1996)。ソマトスタチンは  $\alpha$  細胞と  $\beta$  細胞の両方に作用してグルカゴンとインスリンの分泌を抑制する (Brunicardi et al., 2001; Hauge-Evans et al., 2009)。これらのホルモンに加えて、グルタミン酸やアセチルコリン、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)、ATP などの神経伝達物質がパラクライン/オートクラインシグナルに重要な働きを持つことが知られている。

例えば、副交感神経伝達物質として知られるアセチルコリンは、ヒト  $\alpha$  細胞でその合成酵素が発現し、 $\beta$  細胞や  $\delta$  細胞を刺激してホルモンの放出を増加させる (Rodriguez-Diaz, Dando, et al., 2011)。

GABA は  $\beta$  細胞でその合成酵素が発現が知られている (Reetz et al., 1991)。げっ歯類では  $\beta$  細胞に  $\text{GABA}_B$  受容体が発現し、インスリン分泌を減少させる (Bonaventura et al., 2008)、ヒトでは  $\text{GABA}_A$  受容体がグルカゴンやソマトスタチンの分泌を介してインスリン分泌を制御する (Braun et al., 2010)。

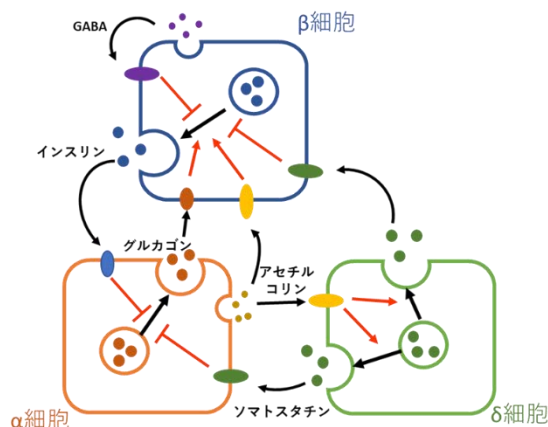


図 3: 膵内分泌細胞はオートクライン/パラクラインによって分泌を制御している (Arrojo e Drigo et al., 2015 を参考に作成)。

#### 1-4. 膵島におけるドーパミンの機能

##### 膵島におけるドーパミン合成遺伝子の発現

交感神経性の神経伝達物質の 1 つであるドーパミン (DA) も  $\beta$  細胞の機能を調節する。

DA はアミノ酸の 1 つである L-チロシンから 2 段階の反応を経て生合成される。L-チロシンは tyrosine hydroxylase (TH) によって前駆体である L-3,4-dihydroxyphenylamine (L-Dopa) に変換され、この反応は律速反応とされる。その後、Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) によって DA へと変換される。DA は Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) によって分泌小胞へと輸送され、細胞質中に残存する DA は monoamine oxidase (MAO) によって分解される(図4)。

$\beta$  細胞において DA の生合成、貯蔵、代謝にかかわる遺伝子の発現と機能が知られている (Ustione et al., 2013b)。マウス膵島において AADC の活性 (Lindström, 1986; Teitelman et al., 1981) と MAO の活性 (Lundquist et al., 1991) が検出されている。VMAT2 はヒトおよびげっ歯類の  $\beta$  細胞で発現することが知られており、インスリン分泌を抑制する (Raffo et al., 2008; Saisho et al., 2008)。私の所属研究室において、坂野らは、VMAT2 がマウスの膵  $\beta$  細胞で血糖値に応じて発現することを明らかにした (Sakano et al., 2020)。 $\beta$  細胞において AADC や VMAT2 が発現することは、 $\beta$  細胞が他の細胞や組織から L-Dopa や DA を受け取り、あるいは自身で生合成し、その DA を貯蔵することが可能であることを示唆するものである。一方で、 $\beta$  細胞内に貯蔵された DA がどの組織・細胞で生合成されたものであるかについていくつかの由来があり、以下に説明する。

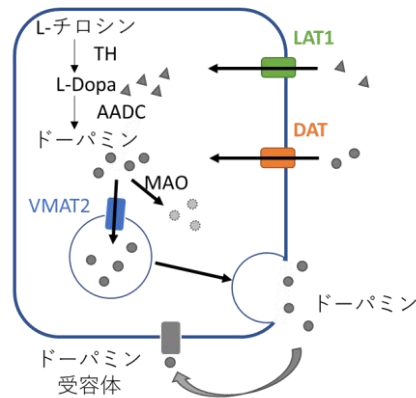


図 4: DA の合成・貯蔵・輸送の模式図

### 膵島に対する DA の供給源

膵島およびβ細胞への DA の供給源として交感神経や血液、β細胞自身がある (Ustione et al., 2013b)。マウス膵島の周囲には TH 陽性神経終末が存在し、DA の 1 つの供給源として考えられている。膵島に対する交感神経の神経支配は膵島発生において正常な構造を構築するのに重要であることが分かっているが、マウス成獣における交感神経の除去は耐糖能に影響を及ぼさない (Borden et al., 2013)。また、交感神経による神経支配はヒトとげっ歯類では異なることが知られ (Rodriguez-Diaz, Abdulreda, et al., 2011)、特にヒトでは交感神経は血管に接続しており、β細胞への直接的な神経の影響は乏しいと考えられている。

一方、前腸には TH の発現に富む細胞が存在し、食後の血中 L-Dopa と DA 量を制御するとされる。β細胞は L-Dopa の輸送体である L-type amino acid transporter 1 (LAT1) と L-Dopa を DA に変換する AADC を発現しており、また DA 輸送体 DAT、VMAT2 の働きによって、腸由来の DA を受け取っているというモデルが提唱されている (Korner et al., 2019)。

他方で、膵島を構成するβ細胞の一部に TH 陽性細胞が存在することも以前から知られている (Persson-Sjögren et al., 2002)。マウスの系統を比較した研究では、β細胞の TH 陽性率が高い系統が存在し、インスリン分泌や血糖値の調節に関与することが報告されている (Mitok et al., 2018)。単離されたヒト膵島でも膵島内の TH による DA 生合成がインスリン分泌を抑制していることが明らかにされており (Simpson et al., 2012)、膵島自身による DA 生合成もβ細胞の機能調節に密接にかかわっていると考えられている。

### VMAT2 による DA 貯蔵とβ細胞の関係性

VMAT2 はβ細胞が自身あるいは膵島外から受け取った DA を貯蔵する役割を持つため、β細胞での VMAT2 の発現は DA によるオートクライン/パラクライン

の存在を示す根拠の1つと考えられる (Ustione et al., 2013b)。

坂野らはこれまでに、VMAT2が $\beta$ 細胞の発生過程において膵前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化を調節することをマウスES細胞の分化により明らかにした(Sakano et al., 2014)。また、VMAT2の阻害は細胞内DAを減らし、インスリン分泌を増加させることが知られている(Raffo et al., 2008)。近年、 $\beta$ 細胞特異的にVMAT2を欠損したマウスでは細胞内DAが減少し、インスリン分泌が増加する。しかし、分泌小胞にDAを貯蔵できないため、細胞質内DAがMAOによって分解される。その際に活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)を生じ、またDAによる $\beta$ 細胞のインスリン分泌抑制機構が働かなくなることにより、高脂肪食による食事負荷を与えると $\beta$ 細胞の細胞死と脱分化の進行が早まりより短期間で2型糖尿病を発症する(Sakano et al., 2020)。これらのVMAT2による $\beta$ 細胞の調節機構は1つは前述の細胞内での分解が関与するが、他方で放出されたDAが受容体を介する調節シグナルが関与する。

#### ドーパミン受容体による $\beta$ 細胞の機能調節

DAはGPCRに分類されるDA受容体と結合することが知られており、下流シグナルの違いからD1様受容体とD2様受容体の2つに分類される。D1様受容体はGasとの親和性が高く、アデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMPの合成を促進する。一方でD2様受容体はGai/oとの親和性が高く、アデニル酸シクラーゼの活性を阻害する(J. M. Beaulieu et al., 2015)。膵内分泌細胞におけるDA受容体の発現については意見が分かれている。ChenらやZhangらはラットあるいはヒト $\beta$ 細胞でD1が発現していることを報告している(Chen et al., 2014; Zhang et al., 2015)が、D1がインスリン分泌を調節しているかは分かっていない。

一方で、DAとD2受容体間のシグナルが $\beta$ 細胞の糖応答性インスリン分泌を抑制することが複数の文献で報告されている。Rubiらはラット膵島およびラット膵 $\beta$ 細胞株INS-1EにおいてD1、D2、D3が発現していること、特にラット $\beta$ 細胞でD2が発現しインスリン分泌を抑制することを明らかにした(Rubi et al., 2005)。その後、Ustioneらはマウス $\beta$ 細胞およびマウス膵 $\beta$ 細胞株MIN6においてD3がインスリン分泌を制御することを報告した(Ustione & Piston, 2012)。Simpsonらはヒト $\beta$ 細胞でD2が発現し、インスリン分泌を抑制することを報告している(Simpson et al., 2012)。

DAがインスリン分泌を抑制する一方で、D2受容体を全身で欠損したマウスでは耐糖能の低下と $\beta$ 細胞量の減少が起こり(García-Tornadú et al., 2010)、 $\beta$ 細胞特異的にD2を欠損したマウスでは食後のインスリン量が過剰となることが報告されている(Farino et al., 2019)。このようにD2を介してDAによるインスリン分泌抑制機構が存在すると考えられ、 $\beta$ 細胞による正常な血糖調節に重要であ

るように思われる。また、坂野らが発見したように VMAT2 の欠損により  $\beta$  細胞内 DA が減少するとインスリン分泌は亢進するため糖尿病の発症を予防するように思われるが、実際にはむしろ糖尿病の進行が早まる(Sakano et al., 2020)。 $\beta$  細胞において  $\text{Ca}^{2+}$ はインスリン分泌に必要である一方、長期的に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ が高い状態にさらされることでアポトーシスを誘導するが(Fei et al., 2008; Yang et al., 2018)、適度な濃度の DA は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ を減少させ、アポトーシスを抑制することが知られている (Maffei et al., 2015)。これらのことを総合すると、DA のインスリン分泌に対するブレーキとしての作用が  $\beta$  細胞の過剰な分泌によるストレス発生を防ぐ作用があるのではないかと考えられる。

### 1-5. 目的

これらの先行研究から  $\beta$  細胞自身が DA を生合成、貯蔵していること、DA を放出することでパラクライン/オートクラインによって  $\beta$  細胞自身のインスリン分泌を制御していると考えられる。私は本研究においてまず、膵島における DA の生合成、輸送、貯蔵を確認した。そして、 $\beta$  細胞が貯蔵している DA がどのように放出されて、2 相性インスリン分泌を制御するかを詳細に調べるため、全反射照明蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescent microscopy; TIRFM) によってインスリンの開口放出を観察するイメージング法を用いた (図 5A)。TIRFM は細胞膜近傍 100 nm 以内の限定的な範囲を観察することを可能とする顕微鏡である。インスリンと蛍光タンパク質の融合タンパク質を用いることによって、インスリンがエキソサイトーシスによって細胞外に放出される現象を高時間分解能で捉えることができる (Ohara-Imaizumi et al., 2002; Shibasaki et al., 2007)。

さらに、DA が受容体を介してどのようにインスリン分泌を制御するかを明らかにすることを目的とした。DA および DA 受容体に特異的なアゴニストやアンタゴニストを用いて、これらの化合物に対する  $\beta$  細胞の応答を、インスリン分泌に関わる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態と cAMP の生合成、そしてインスリン分泌小胞のエキソサイトーシスの動態をイメージング法により解析した。そして、これまで  $\beta$  細胞におけるドーパミンシグナルは D2 が主体として注目されてきたが、D1 がどのような役割を持つかはわかっていなかった。本研究により D1 が D2 とヘテロ多量体を形成しており、D1-D2 ヘテロ多量体の活性化によってインスリン分泌を調節することを明らかにした。さらに、単離膵島を用いた *ex vivo* 培養実験によって、DA を介したシグナルおよび D1-D2 ヘテロ多量体形成が  $\beta$  細胞の生存に対してどのような役割を有するかを調べた。

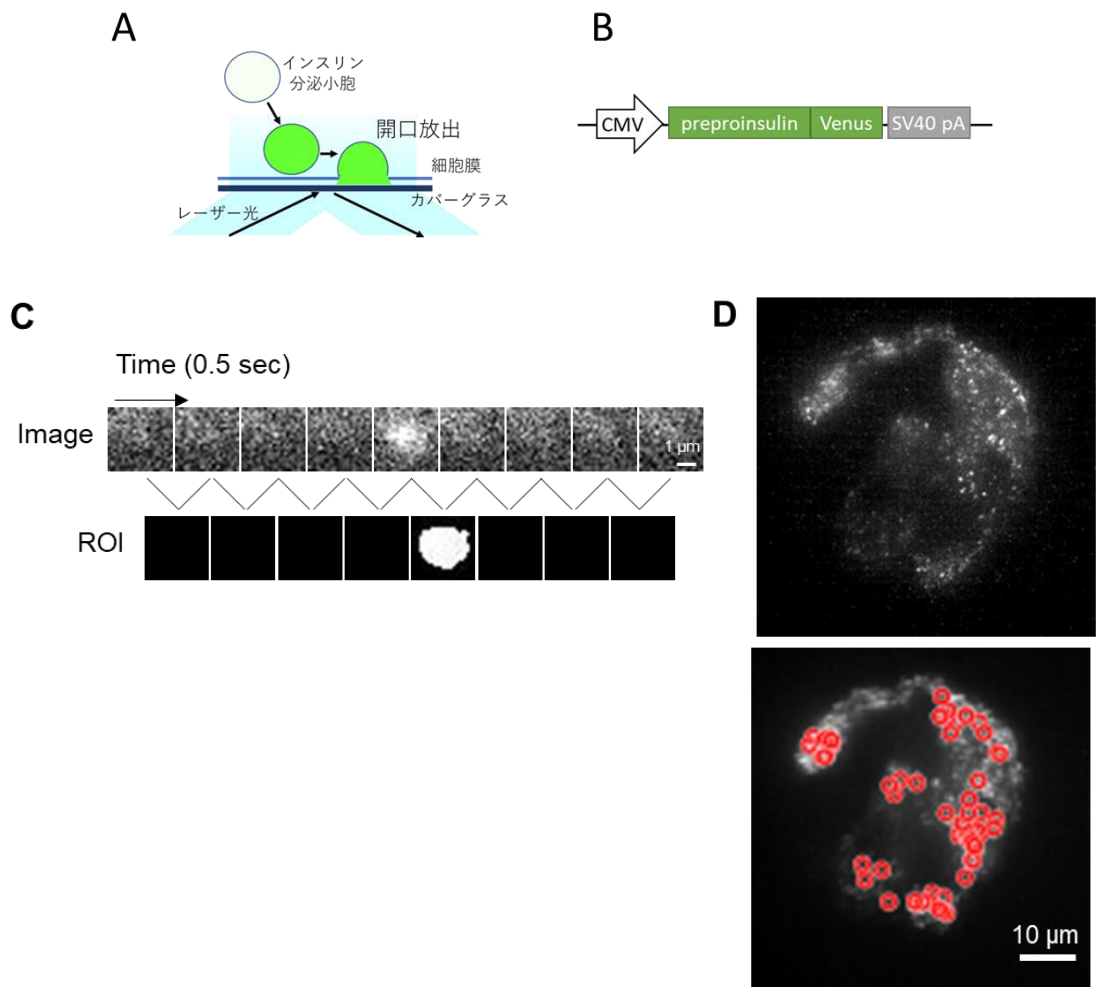


図 5: TIRFM を用いたインスリン開口放出実験の概要  
 (A) TIRFM を用いることで、細胞膜近傍に recruit され docking しているインスリン分泌小胞が励起される。Insulin-Venus が開口放出されると、pH 変化に伴う輝度の増加と拡散が観察される。(B) ヒトプレプロインスリンと Venus の融合遺伝子 (Insulin-Venus) を強制発現させた。(C) 上図は TIRFM を用いてインスリン開口放出を捉えた様子。画像は 0.5 秒ごとに撮影した連続画像を示す。スケールバー; 1  $\mu\text{m}$ 。下図は連続画像を元に Matlab を用いて解析した結果で、開口放出イベントが起きた箇所が ROI として検出される。(D) TIRFM の観察像を Matlab で解析した結果。開口放出が起きた箇所を赤丸(下図)で示している。スケールバー; 10  $\mu\text{m}$ 。

## 第2章 実験方法

### 2-1. 供試動物

実験には 8-12 週齢の雄性 C57/BL6 マウスを用いた。C57/BL6 マウスは日本チャールス・リバーより購入し、12 時間明暗サイクルにて繁殖飼育した。すべての動物実験は東京工業大学実験動物ガイドラインに従って行った。

### 2-2. 化合物

使用した化合物は以下の表に記した。

| 化合物  | 作用             | 購入元                            | 溶媒   |
|--|----------------|--------------------------------|------|
| Tetrabenazine (TBZ)                              | VMAT2 阻害剤      | Tocris Bioscience              | DMSO |
| DA   |                | Tocris Bioscience              | DMSO |
| Domperidone (DPD)                                | D2 アンタゴニスト     | Tocris Bioscience              | DMSO |
| Haloperidol                                      | D2 アンタゴニスト     | Tocris Bioscience              | DMSO |
| $\alpha$ -methyl-DL-tyrosine methyl ester (AMPT) | TH 阻害剤         | Sigma Aldrich                  | DMSO |
| GBR12909   | DAT 阻害剤        | Sigma Aldrich                  | DMSO |
| SCH23390   | D1 アンタゴニスト     | Abcam                          | DMSO |
| SKF38393   | D1 アゴニスト       | R&D Systems                    | DMSO |
| SKF83566   | D1 アンタゴニスト     | R&D Systems                    | DMSO |
| SKF83959   | D1-D2 アゴニスト    | Cayman Chemical                | DMSO |
| Tolbutamide                                      | SUR 阻害剤        | Fujifilm Wako Pure Chemical Co | DMSO |
| Forskolin (Fsk)                                  | アデニル酸シクラーゼ活性化剤 | Fujifilm Wako Pure Chemical Co | DMSO |
| Nifedipine                                       | L型カルシウムチャネル阻害剤 | Fujifilm Wako Pure Chemical Co | DMSO |
| Pertussis toxin (PTX)                            | Gai/o 阻害剤      | List Biological Laboratories   | 水    |
| L-Dopa   | DA 前駆体         | Nacalai Tesque                 | 水    |
| Amino-2-norbornanecarboxylic acid (BCH)          | LAT1 阻害剤       | Sigma Aldrich                  | 水    |

### 2-3. 免疫組織化学、免疫細胞化学

マウスはPBSを灌流し、脱血したのち、4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定を行った。臍臓組織を取り出し、4 °Cにて一晩固定した。その後、15%スクロース、30%スクロース/PBS に順に一晩ずつ浸漬し、OCT コンパウンドで包

埋・凍結した後 Leica CM1860 (Leica) を用いて 8  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した。

培養細胞は PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) に交換し、室温 15 分間固定した。

凍結切片および固定後の培養細胞は 0.1% Tween-20 (Nacalai Tesque)/PBS (PBS-T) で洗浄し、1% Triton X-100/PBS で室温 10 分間透過処理を行った後、Blocking One (Nacalai Tesque) を PBS-T により 5 倍希釈したブロッキング液中で室温 1 時間静置した。その後、1 次抗体と 4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩反応し、PBS-T で洗浄後、2 次抗体と室温にて 2 時間反応させた。

抗体反応後の凍結切片は Mountant PermaFluor (Thermo Fisher Scientific) で封入した。凍結切片の画像は AxioObserverZ1 および LSM780 (ZEISS) を用いて取得した。また、培養細胞の画像は ImageXpress micro scanning system と MetaXpress (Molecular Devices) を用いて取得、解析を行った。

| 1 次抗体                                | 希釈倍率 | メーカー                                | Cas No.     |
|--------------------------------------|------|-------------------------------------|-------------|
| Guinea pig anti-insulin              | 10   | DAKO                                | A0564       |
| Mouse anti-glucagon                  | 1000 | SIGMA Aldrich                       | G2654       |
| Rabbit anti-TH                       | 1000 | Pel-Freez                           | P40101-0    |
| Goat anti-AADC                       | 1000 | R&D Systems                         | AF3564      |
| Rabbit anti-DA                       | 100  | ImmuSmol                            | IS1005      |
| Rabbit anti-DRD2                     | 100  | Synaptic Systems GmbH               | 376203      |
| Goat anti-DRD1                       | 100  | Santa Cruz                          | sc-31479    |
| Mouse anti-Synaptophysin             | 100  | Abcam                               | Ab8049      |
| 2 次抗体                                | 希釈倍率 | メーカー                                | Cas No.     |
| Alexa 488 Donkey anti-Guinea pig IgG | 1000 | Jackson ImmunoResearch Laboratories | 706-546-158 |
| Alexa 568 Donkey anti-Rabbit IgG     | 1000 | Invitrogen                          | A10037      |
| Alexa 568 Donkey anti-Goat           | 1000 | Invitrogen                          | A11057      |
| Alexa 647 Donkey anti-Mouse IgG      | 1000 | Jackson ImmunoResearch Laboratories | 715-606-150 |
| Alexa 647 Donkey anti-Rabbit IgG     | 1000 | Jackson ImmunoResearch Laboratories | 711-606-152 |
| DAPI                                 | 1000 | Roche Diagnostics                   |             |

#### 2-4. 膵島単離と分散培養

マウスを頸椎脱臼で安楽死させ、十二指腸へ通じる総胆管をクランプした。

次に膵臓に通じる総胆管へ HBSS (Hank's balanced salt solution) (Sigma Aldrich) に溶解した 2 mg/mL のコラゲナーゼタイプ IV (Fujifilm Wako Pure Chemical Co) を 3 mL 注入した後、膵臓を回収した。回収した膵臓を恒温槽で 37 °C 30 分間インキュベートした後、冷 HBSS を加え、10 秒間勢いよく振り、次に 300-400 μm 径ナイロンメッシュに通し、未消化組織および脂肪を除去した。遠心 (190 x g、10 分) 後、上清を捨て、洗浄液 (HBSS) を加え懸濁し、膵島をのみを分離した。

単離した膵島は PBS で洗浄後、Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc.) を用いて 37 °C 5 分間反応させ、軽くピペッティングすることで分散した。分散した細胞を所定のプレートに播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。培養には以下の培地を用いた:

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)

10% fetal bovine serum (FBS)

100 μM non-essential amino acids

2 mM L-glutamine

50 units/mL penicillin

50 μg/mL streptomycin

100 μM 2-mercaptoethanol

## 2-5. アデノウイルスベクター構築とウイルス産生

マウス D1 と D2 遺伝子の Open reading frame (ORF) はマウス膵島から RT-PCR にて増幅し、N 末端に 3xFLAG (3xFLAG-mD1) または 6xHis (6xHis-mD2) を融合した。ヒト TH 遺伝子はヒト膵島から RT-PCR にて増幅し、T2A-mCherry と融合した。これらの遺伝子カセットおよび、cAMP インジケーター PinkFlamindo (東京工業大学北口哲也先生より供与、Harada et al., 2017) は pENTR1A ベクター (A10462、Invitrogen) のマルチクローニングサイトにそれぞれ挿入した。その後、pAd/CMV/V5-DEST ベクター (493-20、Invitrogen) に Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) を用いて組み換えた。pENTR-preproinsulin-Venus (神戸大学清野進先生より供与、Shibasaki et al., 2007) も同様に pAd/CMV/V5-DEST ベクターに組み換えた。

作製したアデノウイルス産生ベクターは HEK293A に Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて導入し、2 週間程度培養した。培養細胞を回収し、凍結融解を繰り返して細胞を破碎、遠心後上清を回収し、1 次ウイルス液を粗精製した。1 次ウイルス液を再び HEK293A に感染させ、2 日間程度培養した後に凍結融解を繰り返して細胞を破碎、遠心後上清から 2 次ウイルス液を得た。β 細胞への強制発現にはこの 2 次ウイルス液を用いた。

## 2-6. ウェスタンブロット

マウス膵β細胞株 (MIN6) は hTH-T2A-mCherry または mCherry を有するアデノウイルスを感染させ、2晩培養した後、12% 2-mercaptoethanol 含有サンプルバッファー (0.1 M Tris-HCl [pH 6.8]、4% SDS、20% Glycerol) に溶解後、95 °Cで5分間煮沸した。サンプル1 μgを8% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて分離した。PVDF 膜に転写した後、3% スキムミルク/0.1% PBS-T でブロッキングし、rabbit anti-TH 抗体 (1/1,000) と 4 °Cで一晩反応させた。

マウス初代膵島は分散させたのち、1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^6$  細胞の濃度で 6-ウェルプレートに播種し、3xFLAG-mD1 または 6xHis-mD2 含有アデノウイルスを感染させた。2晩培養後、膵島細胞は1% Triton X-100/PBSに溶解した後、12% 2-mercaptoethanol 含有サンプルバッファーを加え、37 °Cにて10分間インキュベートした。サンプル 25 ng または 100 ng を 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離した。PVDF 膜に転写し、3% スキムミルク/0.1% PBS-T でブロッキングした後、1次抗体として mouse anti-D1 抗体 (ab78021、1/1,000; Abcam) または rabbit anti-D2 抗体 (1/5,000) と 4 °Cで一晩反応させた。メンブレンは 0.1% PBS-T で洗浄した後、2次抗体として、HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) (12-348、1/10,000、Merck Millipore) または goat anti-mouse IgG (H+L) (AP308P、1/10,000、Merck Millipore) と室温 90 分反応させた。その後、Immunobilon Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore) と反応させ、FUSION-SOLO.4S.WL (M&S instruments) を用いて検出した。

## 2-7. 細胞内モノアミン測定

膵島は本文中に記した化合物で処理した後、3% Triton X-100/PBS に溶解した。その後、細胞内ドーパミン量を DA ELISA kit (ImmuSmol) を用いて測定し、総タンパク質量で標準化した。総タンパク質量は Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

## 2-8. TIRF イメージング

分散したマウス膵島を Easy iMatrix-511 (Nippi)  $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  でコートした 35 mm φ glass-bottom dish (屈折率  $n = 1.52$ 、Matsunami) に1枚当たり  $1.0 \times 10^5$  個ずつ播種し、Preproinsulin-Venus (Shibasaki et al., 2007) 発現アデノウイルス (図 5B) を感染させた。TH 強制発現実験においては、一部の分散膵島をヒト TH (hTH)-T2A-mCherry 含有アデノウイルス存在下で 37 °C 1時間培養し、その後培地で洗浄した。このアデノウイルス感染膵島細胞を非感染膵島細胞と混合し 35 mm φ glass-bottom dish に播種した。48 時間培養後、細胞を低グルコース (2.5mM) Hepes Krebs-Ringer buffer (KRB) 中で、Stage Top Incubator (Tokai hit) 上にて 37 °Cで前

培養を行った。その後、グルコース溶液や化合物を本文中に示した最終濃度になるように加えた条件下でのエキソサイトーシスの観察を行った。観察には倒立顕微鏡 (IX83) と Olympus total internal reflection system を用い、対物レンズ (UAPON 100x HOTIRF NA = 1.49, Olympus) と IMMERSION OIL TYPE-F (Olympus) を用いた。焦点は IX3 Z-Drift Compensator (Olympus) で調整した。細胞は 488 nm アルゴンレーザー入射角 73.5° (しみ出し光 65.1 nm) で励起し、画像は Zyla sCMOS カメラ (Andor) で MetaMorph (Molecular device) 制御下で 500 ミリ秒ごとに取得した。

### 2-9. cAMP イメージング

分散したマウス膵島を 1 ウェル当たり  $7.5 \times 10^3$  個ずつ Easy iMatrix-511 ( $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) でコートした 384 ウェルプレートに播種し、PinkFlamindo (Harada et al., 2017) 含有アデノウイルスを感染させた。48 時間培養後、細胞を KRB バッファーで洗浄した。低グルコース (2.5mM) KRB バッファーで 5 分間前培養した。その後、グルコースと Fsk および本文中に記載した化合物を添加し、細胞内 cAMP 動態を倒立顕微鏡 IX83 により 3 秒ごとに画像を取得した。また、画像処理には Metamorph にて解析した。

### 2-10. カルシウムイメージング

分散したマウス膵島を 1 ウェル当たり  $7.5 \times 10^3$  個ずつ Easy iMatrix-511 ( $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) でコートした 384 ウェルプレートに播種した。強制発現実験においてはアデノウイルスを感染させ、48 時間培養後、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の観察を行った。細胞を KRB バッファーで洗浄し、 $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 4.6 mmol/L Fluo-4 AM、0.25 mmol/L Probenecid、0.08% Pluronic F-127 (Dojindo Molecular Technologies, Inc) を加えた KRB バッファーで 37 °C 1 時間前培養した。前培養後、KRB で洗浄し、倒立顕微鏡 IX83 にて 1 秒ごとに画像を取得した。画像処理には Metamorph にて解析した。

### 2-11. Duolink in situ proximity ligation assay (PLA)

タンパク質間の直接相互作用を Duolink In Situ Detection Reagents Red (Sigma Aldrich) を用いて調べた。分散培養したマウス膵島は、強制発現時はアデノウイルス感染し 48 時間した後、PBS で洗浄し、4% PFA で室温 15 分間固定した。次に 1% Triton X/PBS で透過処理を行い、5 倍希釈 Blocking One で室温 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、1 次抗体としてヤギ抗 D1 抗体 (sc-31479、1/100)、ウサギ抗 D2 抗体 (376203、1/100) と 4 °C 16 時間反応した。その後、1 次抗体を PBS-T で洗浄し、マニュアルに従って、Duolink In Situ PLA プローブ

抗ウサギ PLUS と抗ヤギ MINUS と 37 °C 1 時間反応させ、続いてプローブ同士のライゲーション反応を 37 °C 30 分、増幅反応を 37 °C 100 分を行った。細胞核を DAPI、 $\beta$  細胞を抗インスリン抗体により染色し、画像は ImageXpress micro scanning system と MetaXpress (Molecular Devices) を用いて取得、解析した。

## 2-12. TUNEL 染色

分散したマウス膵島の細胞死の検出には *In Situ Cell Death detection Kit, Fluorescein* (Roche Applied Science) を用いた。細胞は 4% PFA で室温 15 分間固定し、0.1% クエン酸ナトリウム + 0.1% Triton X-100/PBS で氷上 2 分間透過処理した。その後 PBS で洗浄し、TUNEL 反応液で 37 °C 60 分間反応させた。また、細胞核を DAPI で、 $\beta$  細胞を抗インスリン抗体により染色した。画像は ImageXpress micro scanning system と MetaXpress (Molecular Devices) を用いて取得、解析した。

## 2-13. 画像解析

TIRFM、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング、cAMP イメージングの実験により取得した連続画像は Matlab (MathWorks) を用いて解析した。

TIRFM の画像解析は次のように行った。連続画像を重ね合わせ、ピクセルごとの最大値を投影した画像から、細胞ごとにマニュアルで輪郭を選択することで関心領域 (ROI) を作成した。Insulin-Venus が分泌小胞から細胞外に放出されると拡散されるとともに、小胞内の酸性条件から細胞外の中性条件に pH が変化することに伴って蛍光強度が増加する。より高感度に蛍光強度の変化を捉えるため、 $n+1$  枚目の画像と  $n$  枚目の画像の差分を作成し、一定の値以上の輝度を有する領域を抽出した。抽出された領域のうち、一定の面積以上を有する領域を Venus の拡散を伴う領域であると考えて選抜し、開口放出イベントとした。そして、各細胞における 30 秒ごとのイベント数を集計した (図 4C、D)。

$\text{Ca}^{2+}$  および cAMP のイメージング画像については次のように解析した。連続画像を重ね合わせ、ピクセルごとの最大値を投影した画像を作成した。この画像を用いて、細胞ごとに輝度が異なることを用いて分水嶺によって細胞集団を 1 細胞ごとに分離し、ROI を作成した。連続画像における ROI 内の輝度を記録し、刺激前の平均輝度を  $F_0$  とし、各時間における輝度の変化を  $(F-F_0)/F_0$  とし計算した。AUC (Area Under Curve) は、刺激後の輝度  $F$  の合計を時間で標準化した値 (AUC of  $F$ ) を、刺激前の輝度の合計を時間で標準化した値 (AUC of  $F_0$ ) で除算することにより算出した。

## 2-14. D1 欠損マウス作製

D1 欠損マウス作製のため、*Drd1*<sup>Tm1a(KOMP)<sup>Wtsi</sup></sup> ノックイン ES 細胞 (#EPD0507\_1\_H11、C57BL/6、Mouse Genome Informatics [MGI] ID:99578) を the Trans-National Institutes of Health (NIH) Knockout Mouse Project(KOMP) で樹立より購入した。これは *FRT* サイトと *lacZ* 配列、*loxP* から成る DNA カセットがエクソン 2 上流にあたる Chromosome 13 の position 54209082 に、さらに *loxP* が標的遺伝子下流の position 54209082 に挿入されている (MGI ID: 4451251)。この ES 細胞を C57BL/6 マウス胚盤胞に注入することで *Drd1*<sup>Tm1a/WT</sup> キメラマウスを得た。キメラマウスは C57BL/6 マウスとの戻し交配を 5 回繰り返した。ジェノタイピングは以下のように行った。マウスから尾を 1-2 mm 程度採取し、DNA 抽出バッファー (0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8.0、10mM EDTA、1% SDS、0.5 mg/mL プロテイナーゼ K (Nacalai Tesque) ) を加え 55 °C で溶解した。溶解液からフェノール・クロロホルム法とエタノール沈殿法によりゲノム DNA を得た。ゲノム DNA から *LacZ* 遺伝子を標的としたプライマーを用いて PCR により増幅した。プライマー配列; Fw ACCATGGAAGATCCCGTCG、Rev TCGTGACGGTTAACGCCTCGAA、PCR 産物 1064 bp。PCR には KOD Fx Neo (Toyobo) を用いた。熱変性 98 °C 10 秒、融解反応 60 °C 30 秒、伸長反応 68 °C 30 秒の 35 サイクルで行った。

単離臍島から RNeasy micro kit を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を PrimeScript (Takara) を用いて逆転写を行い、cDNA を得た。リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて、StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で行った。PCR 反応は、熱変性反応 95 °C 3 秒、アニーリング及び伸長反応 60 °C 30 秒の 40 サイクル、融解反応 95 °C 15 秒、60 °C 1 分、95 °C 15 秒で行った。プライマーの配列は、*Drd1* (Fw; CTGCCCTACAACGAATAATG、Rev; CATAGTCCAATATGACCGATAAG)、内部標準として *β-actin* (Fw; GTGATGGTGGGAATGGGTCA、Rev; TTTGATGTCACGCACGATTTCC) を用いた。

## 2-15. 統計解析

データは特に表記したものを除いて、平均値 (Mean) ±標準偏差 (SD) または中央値を箱ひげ図を用いて表記した。また有意差は一部特に表記したものを除いて、one-way ANOVA と Dunnett's multiple comparison test を用いて検定し、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$  と表記した。

## 第3章 実験結果

### 3-1. $\beta$ 細胞における DA の合成、貯蔵、局在

マウス膵臓における DA 合成酵素の発現を免疫組織化学的手法により確認した (図 6A)。L-チロシンから DA の前駆体である L-Dopa を合成する酵素 TH は一部のインスリン陽性の  $\beta$  細胞で発現していた (図 6B)。L-Dopa から DA を合成する酵素 AADC はインスリン陽性の  $\beta$  細胞、グルカゴン陽性の  $\alpha$  細胞の両方で発現していた (図 6C)。

DA の局在を免疫組織化学により調べたところ、インスリンと重なっていることが確認された (図 6D)。 $\beta$  細胞にはインスリンを貯蔵するインスリン分泌小胞のほかにシナプス小胞様小胞 (Synaptic-like microvesicle: SLMV) もあり、GABA などが内包されていることが知られている。SLMV のマーカーとして知られる Synaptophysin と共染色したところ、インスリンと DA とともに Synaptophysin とは一致しなかった (図 6E)。

DA とその前駆体 L-Dopa は細胞膜上の輸送体によって細胞内に取り込まれる。DA は DAT によって細胞内に取り込まれ、L-Dopa は LAT1 によって取り込まれる。マウス膵島において DAT を介した DA の取り込みを調べた。DA 存在下でマウス膵島を培養したのち溶解し、溶解液を用いて細胞内 DA 量を ELISA 法で測定したところ、有意に増加した。DAT 阻害剤 GBR12909 存在下で膵島内 DA の増加は阻害された (図 6F)。同様に L-Dopa 存在下で培養した後、ELISA 法により細胞内 DA を測定したところ、細胞内 DA 量は大きく増加し、LAT1 阻害剤 BCH によって取り込みが阻害される傾向がみられた (図 6G)。

### 3-2. $\beta$ 細胞内在性 DA がインスリン分泌を阻害する

$\beta$  細胞はグルコース濃度の増加に対して 2 相性のインスリン分泌を示す。インスリンの開口放出を TIRFM によって計測することで、 $\beta$  細胞の分泌能を調べた。はじめに  $\beta$  細胞内の DA の貯蔵がインスリン分泌能に影響するか調べた。VMAT2 阻害剤 TBZ で一晩培養すると膵島内 DA は減少した (図 7A)。 $\beta$  細胞の開口放出イベント数は低グルコース (2.5 mM) 条件から、高グルコース (16.7 mM) 条件にすることで増加した。高グルコース条件下での開口放出は、刺激後 5 分までにイベント数のピークがみられ (1 相目)、その後、穏やかな 2 相目が観察された。TBZ 存在下ではコントロールと比較し、グルコース刺激後 0-5 分までの 1 相目のイベント数には差はみられなかったが、5-20 分までの 2 相目のイベント数が有意に増加した (図 7B、C)。

次に、 $\beta$  細胞内在性の DA 生合成がインスリン分泌を調節するかを調べるため、TH 阻害剤  $\alpha$ -Methyl-p-tyrosine (AMPT) 処理下での開口放出を TIRFM により

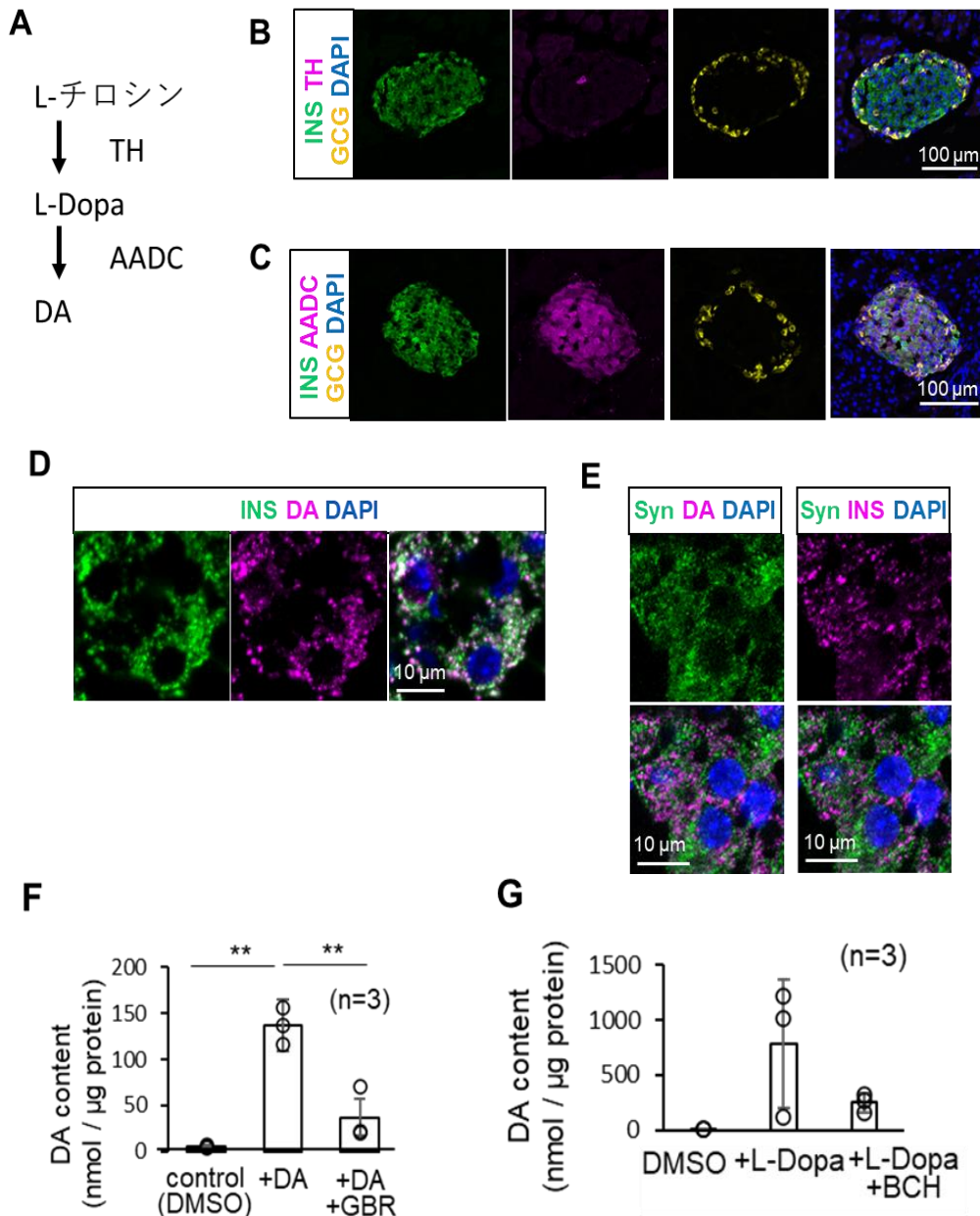


図 6: マウス膵島における DA と合成酵素の発現、輸送体の機能が確認された。(A) DA の合成経路。(B、C) マウス膵臓における DA 合成酵素の発現を免疫組織化学により調べた結果。(B) INS: インスリン (緑)、TH (マゼンタ)、GCG: グルカゴン (黄)、DAPI (青)、スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。(C) INS (緑)、AADC (マゼンタ)、GCG (黄)、DAPI (青)。スケールバーは 100  $\mu$ m。(D、E) 膵  $\beta$  細胞における DA の局在。(D) INS (緑)、DA (マゼンタ)、DAPI (青)。(E) Syn: Synaptophysin (緑)、INS (左図、マゼンタ)、DA (右図、マゼンタ)、DAPI (青)。スケールバーは 10  $\mu$ m。(F) 細胞外に DA 10  $\mu$ M または DA と GBR12909 10  $\mu$ M を添加した時の細胞内 DA 量 (コントロール; DMSO)。(G) 細胞外に L-Dopa 5  $\mu$ M または L-Dopa と BCH 10 mM を添加した時の細胞内 DA 量。値は mean  $\pm$  SD。統計学的解析は one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test を用いた。

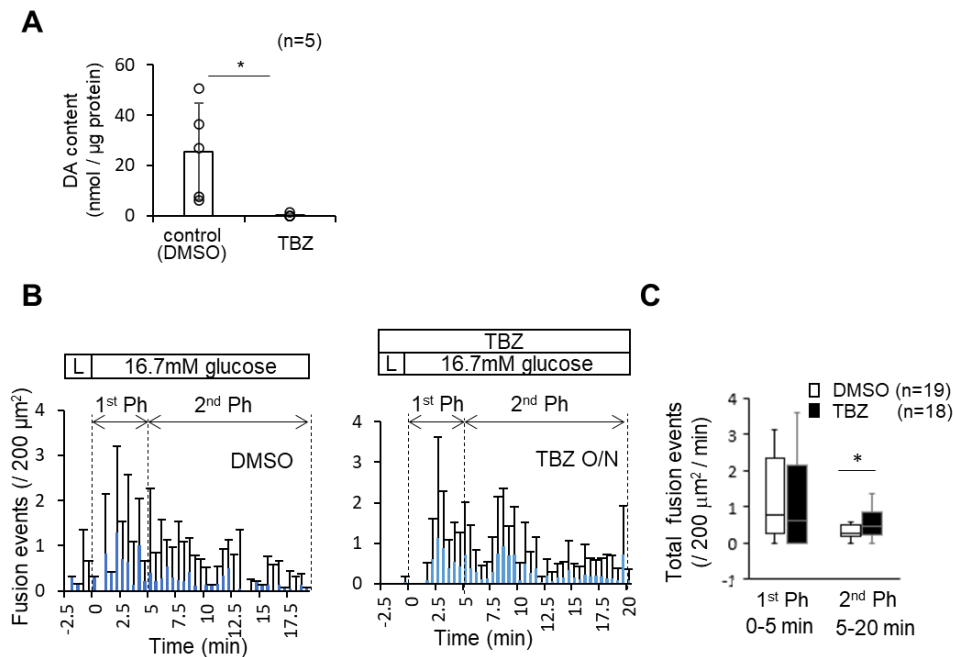
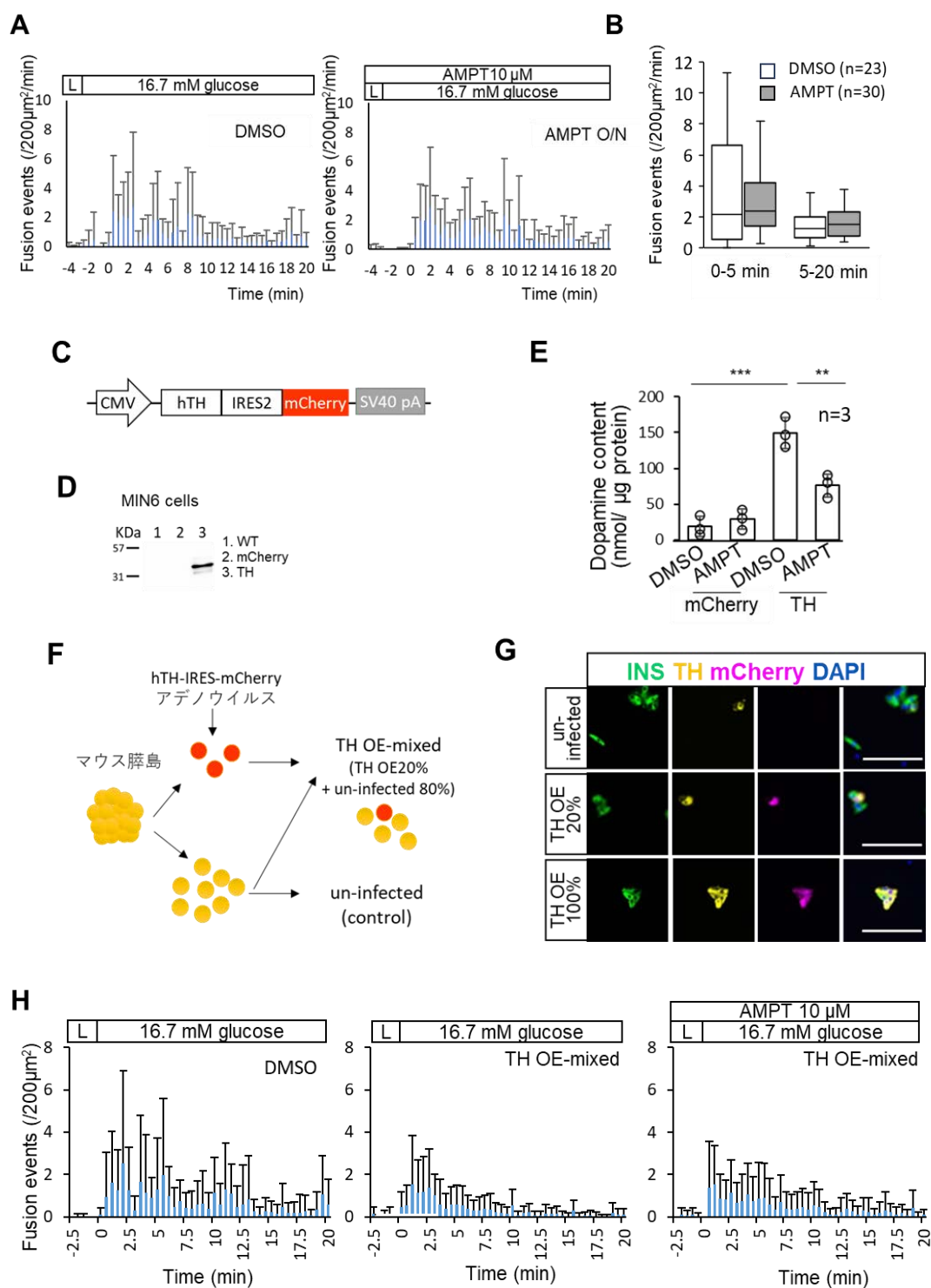


図 7: VMAT2 阻害するとインスリン分泌 2 相目が増加した  
 (A) TBZ 10  $\mu\text{M}$  を 24 時間処理した条件下での細胞内 DA 量。値は mean  $\pm$  SD。統計学的解析は Student's *t*-test を用いた。(B、C) TBZ 10  $\mu\text{M}$  24 時間処理における TIRFM を用いたインスリン分泌動態解析の結果。(B) 30 秒ごとの分泌イベント数のヒストグラム。値は mean  $\pm$  SD。(C) 1 相目(0-5 分)と 2 相目(5-20 分)の平均分泌イベント数を箱ひげ図を用いてプロットした。値は median (IQR)。統計学的解析は one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test を用いた。

調べたところ、AMPT 存在下でのイベント数の増加はみられなかった (図 8A、B)。分散培養下で  $\beta$  細胞における TH 陽性率は  $0.95 \pm 0.39\%$ であったため、TIRFM で観察を行った細胞集団中に TH 陽性細胞が含まれる確率が低いために TH の効果をうまく捉えられていないと考えた。そのため、作為的に TH 強制発現細胞を混合することで、DA 生合成の効果について調べた。ヒト TH-IRES-mCherry 発現アデノウイルスをマウス  $\beta$  細胞株 MIN6 に感染させると、TH の発現が確認された (図 8C、D)。また、TH 強制発現によって細胞内 DA 量が有意に増加し、これは TH を阻害することで減少した (図 8E)。分散したマウス膵島細胞のうち 20%に対して TH-IRES-mCherry 強制発現アデノウイルス存在下で 1 時間培養することで感染させたのち、アデノウイルスを感染させなかった細胞群 (un-infected) と再び混合して播種した (図 8F、G)。顕微鏡下で蛍光タンパク質 mCherry 陽性細胞を含む細胞群を選択し、TIRFM を用いて GSIS を調べたところ、コントロール (DMSO) と比較して 2 相目の分泌イベント数が有意に減少した。一方で、AMPT 処理群ではコントロール (DMSO) と比較して有意な差は

みられなくなった (図 8H、I)。これにより、 $\beta$  細胞の一部に発現させた TH の活性によってインスリン分泌 2 相目が阻害されていることが示された。これらの結果から、一部の TH 陽性  $\beta$  細胞が存在して DA 生合成を行うことで、細胞集団におけるインスリン分泌 2 相目を抑制することで調節していると考えられる。



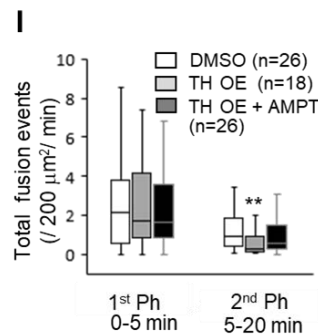


図 8: TH 強制発現  $\beta$  細胞はインスリン分泌 2 相目を抑制する (A、B) AMPT 10  $\mu$ M 16 時間処理条件における TIRFM を用いたインスリン分泌動態解析の結果。(C) hTH 強制発現アデノウイルスの概要図。(D) THOE した MIN6 細胞抽出液のウエスタンブロットの結果。抗 TH 抗体を用いて、約 56.3 kDa のバンドを確認した。コントロールとして野生型 (WT)、mCherry-OE を用いた。(E) THOE した MIN6 の細胞内 DA 量。コントロールとして mCherry-OE を用いた。使用した AMPT は 10  $\mu$ M。(F) THOE20%混合培養実験の概要。(G) THOE した分散培養マウス膵島の免疫細胞化学の結果。上から、非感染 (コントロール)、THOE20%混合、THOE100%。INS: インスリン (緑)、TH (黄)、mCherry (マゼンタ)、DAPI (青)、スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。(G、H) THOE マウス膵島における TIRFM を用いたインスリン分泌動態解析の結果。THOE マウス膵島を 20% の割合で野生型マウス膵島と混合して培養した。AMPT は 10  $\mu$ M で 16 時間処理した。(H) 30 秒ごとの分泌イベント数のヒストグラム。(I) 1 相目 (0-5 分) と 2 相目 (5-20 分) の平均分泌イベント数を箱ひげ図を用いてプロットした。値は mean  $\pm$  SD (A、E、H) または median (IQR) (B、I)。統計学的解析は one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test を用いた。

### 3-3. ドーパミンは細胞内 $Ca^{2+}$ と cAMP を減少させ、インスリン分泌を阻害する

DA によるインスリン分泌阻害機構を調べるため、培地中に DA を添加してインスリン分泌への影響を TIRFM により調べた。DA 10  $\mu$ M を高グルコース条件下 5 分時点で添加すると分泌イベント数が有意に減少した (図 9A、B)。さらに、1 相目分泌への影響を調べるため、DA 存在下でグルコースを添加したところ、1 相目分泌が消失した (図 9C、D)。このため、細胞外の高濃度 DA は 1 相目 2 相目の区別なく高グルコース条件下でのインスリン分泌を阻害しうることが示された。

DA によるインスリン分泌阻害機構を明らかにするため、インスリン分泌を制御する cAMP と  $Ca^{2+}$  の 2 つのシグナルに着目し、イメージング技法により調べた。赤色蛍光タンパク質を基に作製された PinkFlamindo は細胞内 cAMP 動態の観察を可能にする (Harada et al., 2017)。マウス膵島を分散し、アデノウイルスを用いて PinkFlamindo を強制発現させ、DA による cAMP 動態への影響を調べた。高グルコース条件下で Forskolin (Fsk) を加えると、赤色蛍光強度が増加し cAMP の合成が観察された。Fsk 存在下で DA 10  $\mu$ M を加えると cAMP が減少し

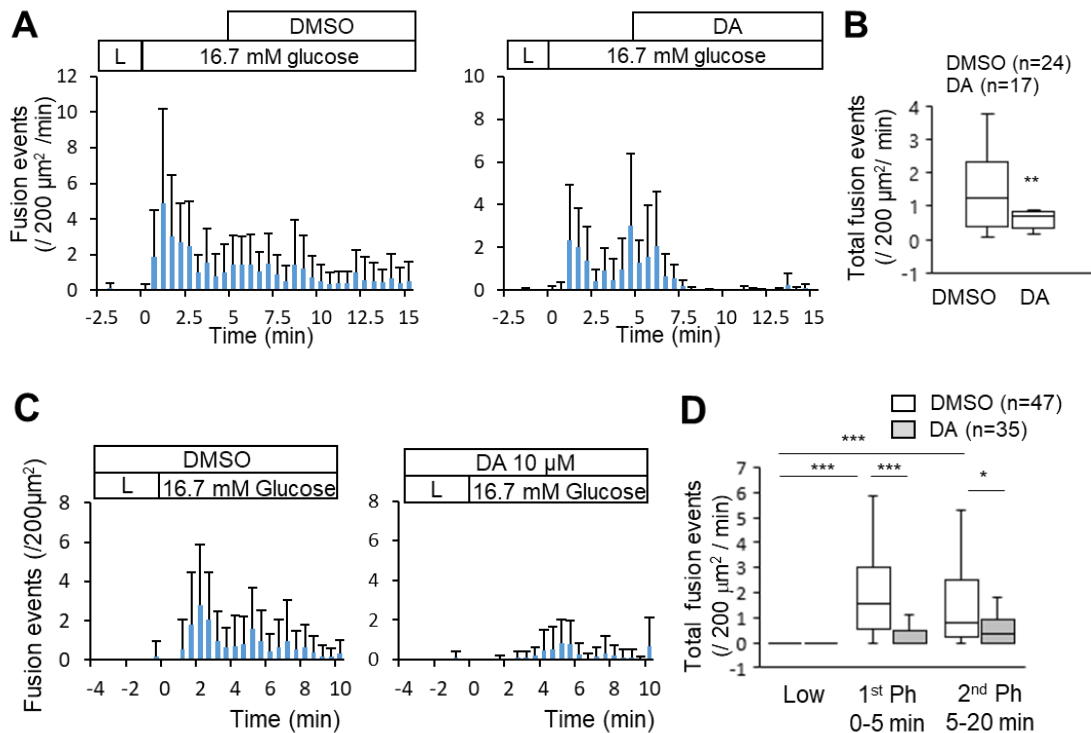


図 9: 細胞外への DA 添加はインスリン分泌 1 相目 2 相目ともに阻害する。(A、B) 高グルコース条件 5 分における DA 10  $\mu\text{M}$  添加条件での TIRFM を用いたインスリン分泌動態解析の結果。(A) 30 秒ごとの分泌イベント数のヒストグラム。(B) DA 10  $\mu\text{M}$  (コントロールとして DMSO) 添加後 10 分間の平均分泌イベント数を箱ひげ図を用いてプロットした。(C、D) DA 10  $\mu\text{M}$  (コントロールとして DMSO) 存在下にグルコース刺激を与えた条件での TIRFM を用いたインスリン分泌動態解析の結果。(A) 30 秒ごとの分泌イベント数のヒストグラム。値は  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。(B) 低グルコース、1 相目 (0-5 分) と 2 相目 (5-20 分) の平均分泌イベント数を箱ひげ図を用いてプロットした。値は  $\text{mean} \pm \text{SD}$  (A、C) または  $\text{median}$  (IQR) (B、D)。統計学的解析は Student's *t*-test (B) または one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test (D) を用いた。

た。Gi 阻害作用を持つ PTX 存在下で培養した細胞では DA による cAMP 減少の効果は見られなくなった (図 10A)。

次に、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態をカルシウム指示薬 Fluo-4 AM を用いて調べた。高グルコース濃度下では VDCC が開き細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入するため、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は増加する。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が増加した条件において DA を 0.1  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  の各濃度で添加すると、濃度依存的に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が減少し、1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  で有意に減少した (図 10B、C)。PTX による Gi 阻害条件下で DA の効果は阻害された (図 10D、E)。これらの結果より、既報通り、DA による  $\text{Ca}^{2+}$  と cAMP の減少は PTX 感受性の Gi 共役型 D2 受容体に関与することが確認された。

さらに、スルホニルウレア受容体 (SUR) を活性化する tolbutamide 100  $\mu\text{M}$  を添加すると低グルコース条件下 (2.5 mM) でも細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が増加するが、tolbutamide 存在下で DA 10  $\mu\text{M}$  を添加すると細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が減少した (図 10F)。

SURはATP依存性 $K^+$ チャンネルと結合しており、tolbutamideは糖代謝に依存せずKATPチャンネルを閉じることで脱分極とそれに続く $Ca^{2+}$ の流入を引き起こす。L型カルシウムチャンネル阻害剤nifedipineはtolbutamideによる $Ca^{2+}$ 流入を阻害することが確認された(図10G)。これらの結果により、DAがグルコース代謝によらず、KATPチャンネルの下流を阻害することで細胞内 $Ca^{2+}$ を減少させることが示唆された。また、DAによる $Ca^{2+}$ の減少には、PTX感受性とPTX非感受性の両方のシグナルが関与していることが示唆された。

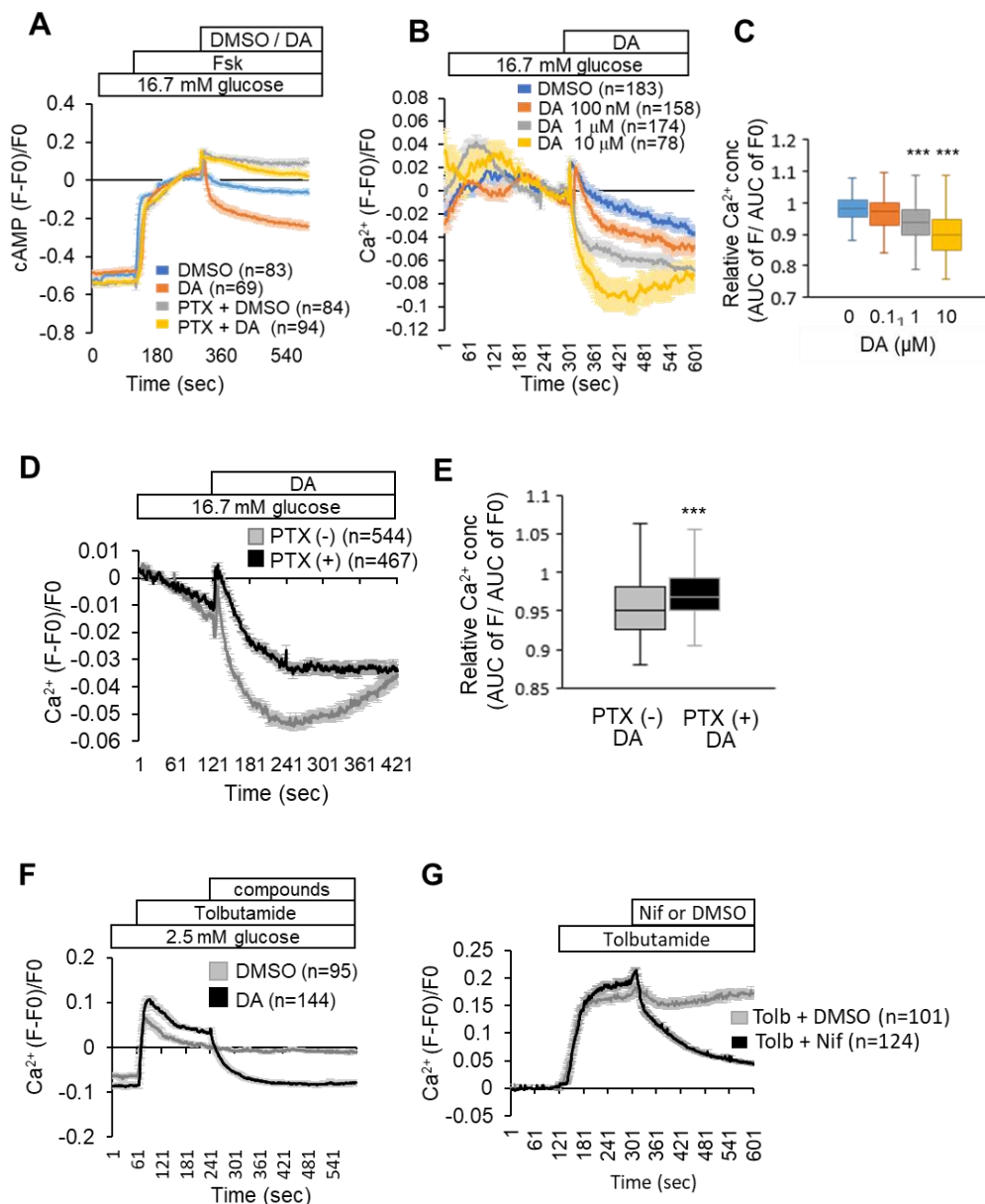


図 10: DA は Gai 依存的に Ca<sup>2+</sup>と cAMP を減少させる

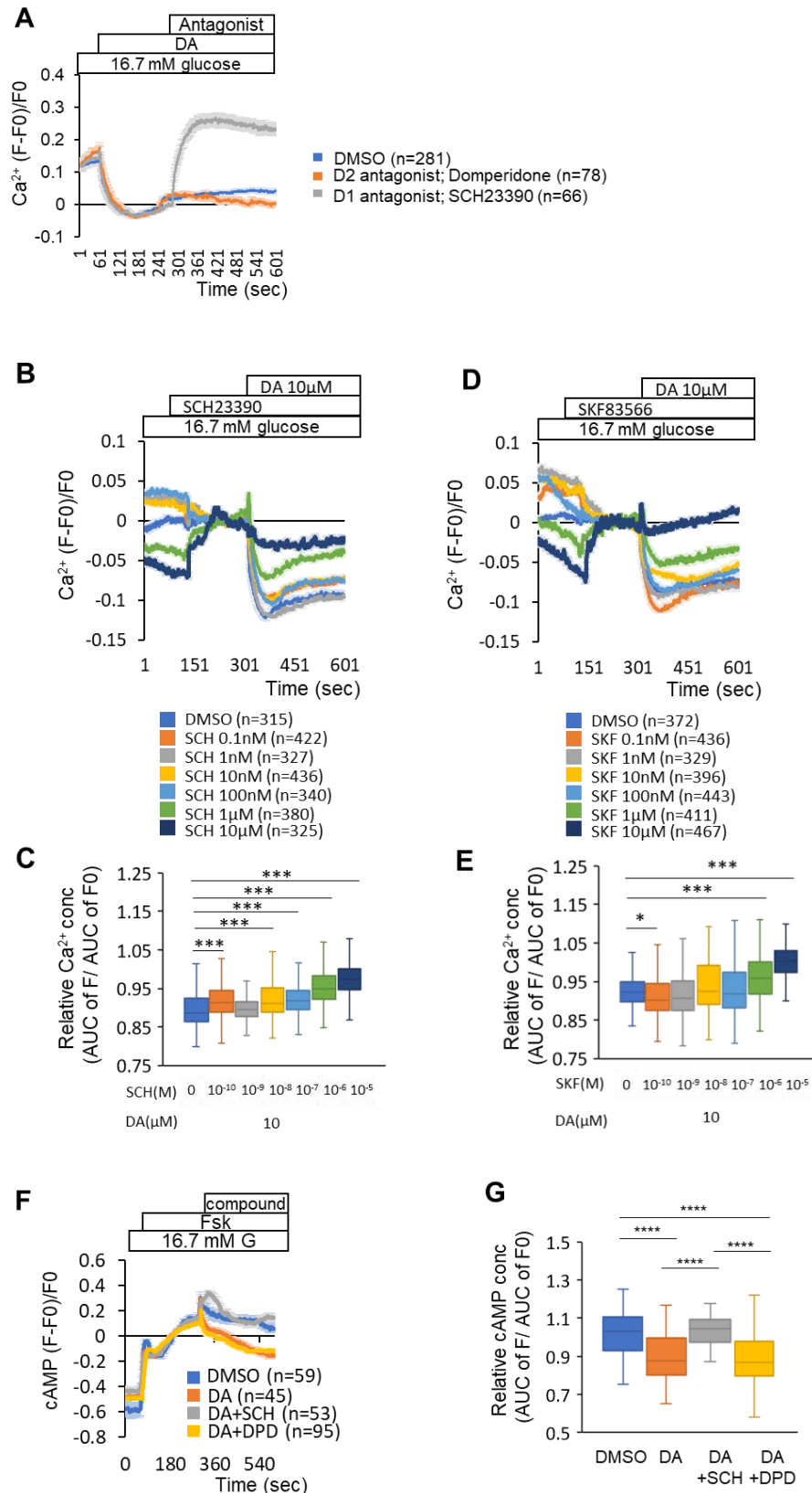
(A) cAMP インジケータ PinkFlamindo を用いた細胞内 cAMP 動態解析の結果。PTX 100 ng/mL またはコントロール条件で 48 時間培養した分散培養マウス膵島において高グルコース条件下で 120 秒後に Fsk 10 μM、300 秒後に DA 10 μM (コントロールとして DMSO) を添加した。値は Fsk 添加後を F0 として標準化した。(B-G) Ca<sup>2+</sup> 指示薬 Fluo-4 AM を用いた細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態解析の結果。(B、C) 高グルコース条件 300 秒において DA を 0、0.1、1、10 μM で添加した。(B) 細胞内 Ca<sup>2+</sup> の時間推移。値は DA 添加前を F0 として標準化した。(C) DA (コントロールとして DMSO) 添加後 5 分間の Ca<sup>2+</sup> 時間推移の AUC を箱ひげ図を用いてプロットした。(D、E) PTX 100 mg/mL で 48 時間培養した分散培養マウス膵島において高グルコース条件下で DA 10 μM を添加した。(D) 細胞内 Ca<sup>2+</sup> の時間推移。値は DA 添加前を F0 として標準化した。(E) DA (コントロールとして DMSO) 添加後 5 分間の Ca<sup>2+</sup> 時間推移の AUC を箱ひげ図を用いてプロットした。(F、G) Tolbutamide に対して DA および Nifedipine を添加したときの細胞内 Ca<sup>2+</sup> の時間推移。低グルコース条件下で 60 秒後に Tolbutamide 100 μM を添加し、300 秒後に DA 10 μM (F) または Nifedipine 10 μM (Nif) (G) を添加した。値は mean ± SEM (A、B、D、F、G) または median (IQR) (C、E)。統計学的解析は Student's *t*-test (E) または one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test (C) を用いた。

### 3-4. D1 受容体アンタゴニストはインスリン分泌を促進する

DA によるインスリン分泌の阻害がどのタイプの DA 受容体を介しているかを調べた。一般的に D1 は Gas と結合し、D2 は Gai/o と結合することから、DA のインスリン分泌に対する抑制性の作用には D2 が関与すると思われる。そのため、D2 アンタゴニスト存在下で DA の効果は阻害されると予想される。しかしながら、高グルコース濃度下の細胞内 Ca<sup>2+</sup> が高い条件に対し DA 添加後に D1 様受容体アンタゴニストである SCH23390 10 μM または D2 様受容体アンタゴニストである DPD 10 μM を加えたところ、SCH23390 は細胞内 Ca<sup>2+</sup> を回復させたが、DPD は回復させなかった (図 11A)。SCH23390 または、別の D1 アンタゴニストである SKF83566 を先に添加した条件に後から DA 10 μM を添加したところ、SCH23390、SKF83566 とともに濃度依存的に DA の効果を減弱した (図 11B-E)。また、Fsk 存在下で DPD と DA を同時に添加した条件は DA だけを添加した条件同様に細胞内 cAMP が減少したが、SCH23390 と DA を同時に添加すると細胞内 cAMP は減少しなかった (図 11F、G)。これらの結果は、D2 を介したシグナルが DA によるインスリン分泌の抑制を媒介しているという予想と異なるものであった。

DA 非添加条件において高グルコース濃度の細胞内 Ca<sup>2+</sup> が高い条件下で SCH23390 を 10 nM-10 μM の濃度で添加すると、1 μM および 10 μM において濃度依存的に細胞内 Ca<sup>2+</sup> を増加させた (図 11H、I)。さらにインスリン分泌への影響を TIRFM により確認すると、高グルコース下で D1 アンタゴニスト SKF83566 10 μM は分泌イベント数を増加させた。一方で D1 アゴニスト SKF38393 は分泌を阻害しなかった (図 11J、K)。この結果は D1 アンタゴニストが β 細胞内在性の DA シグナルを阻害していることを示唆している。

腺島を分散したことで DA への応答性が変化していないかを確認するため、



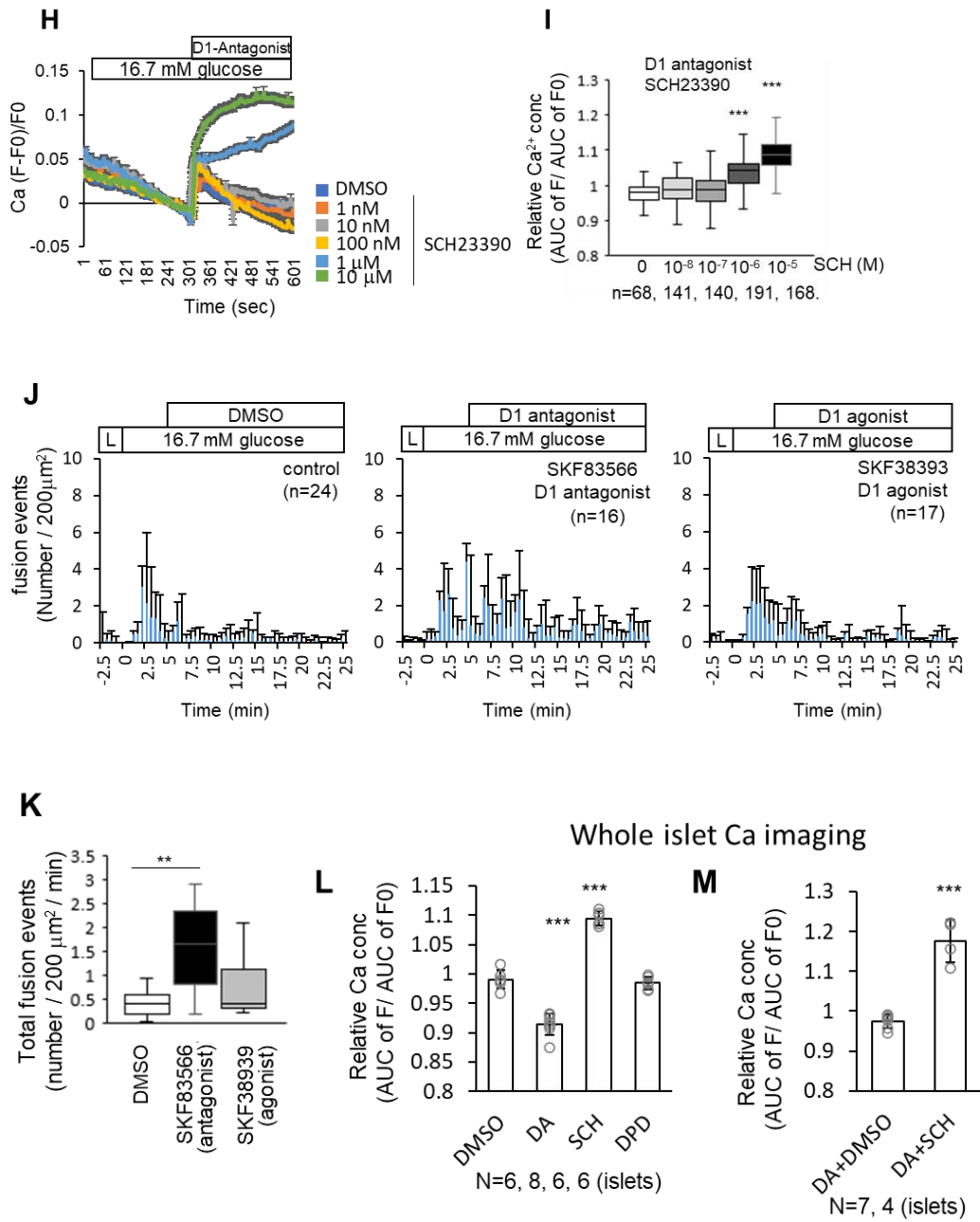


図 11: D1 アンタゴニストが DA を阻害してインスリン分泌を増加させる。  
(A-E、H-I、L-M)  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 Fluo-4 AM を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態解析の結果。(A) 高グルコース条件において 60 秒後に DA 10  $\mu\text{M}$ 、300 秒後に SCH23390 10  $\mu\text{M}$  または DPD 10  $\mu\text{M}$  (コントロールとして DMSO) を添加した。値は DA 添加後を F0 として標準化した。(B-E) 高グルコース条件において 120 秒後に D1 アンタゴニスト SCH23390 または SKF83566 を 0.1 nM から 10  $\mu\text{M}$  の濃度で添加し、300 秒後に DA 10  $\mu\text{M}$  を添加した。値は D1 アンタゴニスト添加後を F0 として標準化した。(F、G) cAMP インジケーター PinkFlamindo を用いた細胞内 cAMP 動態解析の結果。高グルコース条件下で 60 秒後に Fsk 10  $\mu\text{M}$ 、300 秒後に DMSO、DA、DA+DPD、DA+SCH23390 をそれぞれ 10  $\mu\text{M}$  で添加した。(F) 細胞内 cAMP の時間推移。値は Fsk 添加後を F0 として標準化した。(G) DA とアンタゴニスト添加後の cAMP 時間推移の AUC を添加前の AUC で標準化した。(H、I) 高グルコース条件下で SCH23390 10 nM-10  $\mu\text{M}$  の濃度で添加した条件での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態解析の結果。(H) 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の時間推移。値は DA 添加前を F0 として標準化した。(I) SCH23390 添加後 5 分間の  $\text{Ca}^{2+}$  時間推移の AUC を添加前の AUC で標準化し、箱ひげ図を用いてプロットした。(J、K) グルコース刺激 5 分後に化合物 SKF83566 10  $\mu\text{M}$  または SKF38393 10  $\mu\text{M}$  (コントロールとして DMSO) を添加した条件での TIRFM を用いたインスリン分泌動態解析の結果。(J) 30 秒ごとの分泌イベント数のヒストグラム。(K) 化合物添加後の平均分泌イベント数を箱ひげ図を用いてプロットした。(L-M) whole islet における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態観察実験の結果。(L) DA、SCH23390、DPD 各 10  $\mu\text{M}$  (コントロール; DMSO) を添加した時の  $\text{Ca}^{2+}$  の時間推移の AUC を添加前の AUC で標準化した。(M) DA 10  $\mu\text{M}$  添加後に SCH23390 10  $\mu\text{M}$  (コントロール; DMSO) を添加し、SCH23390 添加後の AUC を添加前の AUC で標準化した。値は mean  $\pm$  SEM (A-H、L、M) または mean  $\pm$  SD (J)、median (IQR) (I、K)。統計学的解析は Student's *t*-test (M) または one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test (C、E、G、I、K、L) を用いた。

分散前の whole islet においても SCH23390 が DA に対する阻害作用を示すかを調べた。高グルコース濃度の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が高い条件下で DA 10  $\mu\text{M}$  は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を減少させた。DPD 10  $\mu\text{M}$  は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を変化しなかったが、SCH23390 10  $\mu\text{M}$  は有意に増加させた (図 11L)。DA 添加後に SCH23390 を添加すると DA の作用が打ち消された (図 11M)。この結果は分散した膵島と一致した。これらの結果はマウス  $\beta$  細胞において DA が D2 よりもむしろ D1 に依存しているという意外な結果を示すものであった。

SCH23390 は D1 に対して高いアフィニティを示すが D2 様受容体に対しても結合しうる (D1;  $K_i \leq 0.12$  nM, D2;  $K_i \sim 1100$  nM, D3;  $K_i \sim 800$  nM) (Bourne, 2001; Neumeyer et al., 2003)。SCH23390 によるインスリン分泌亢進が D1 に依存することを確かめるため、D1 ヘテロ欠損マウス (*Drd1*<sup>Tmla/WT</sup>) を作製した (図 12A)。全身での D1 ホモ欠損マウスは発育不全を呈することが知られており (Kobayashi et al., 2004)、本実験においては D1 ヘテロ欠損マウスを用いた。D1 ヘテロ欠損マウスより単離した膵島の *Drd1* 発現量は野生型 (*Drd1*<sup>WT/WT</sup>) の半分程度に減少していた (図 12B)。高グルコース濃度の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が高い条件において、SCH23390 の濃度依存的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の変化を比較したところ、50 nM、100 nM、500 nM の濃度において D1 ヘテロ欠損マウスの膵島のほうが有意に小さかった (図 12C、D)。この結果から、マウス  $\beta$  細胞に対する SCH23390 の効果が D1 に

依存することを確認した。

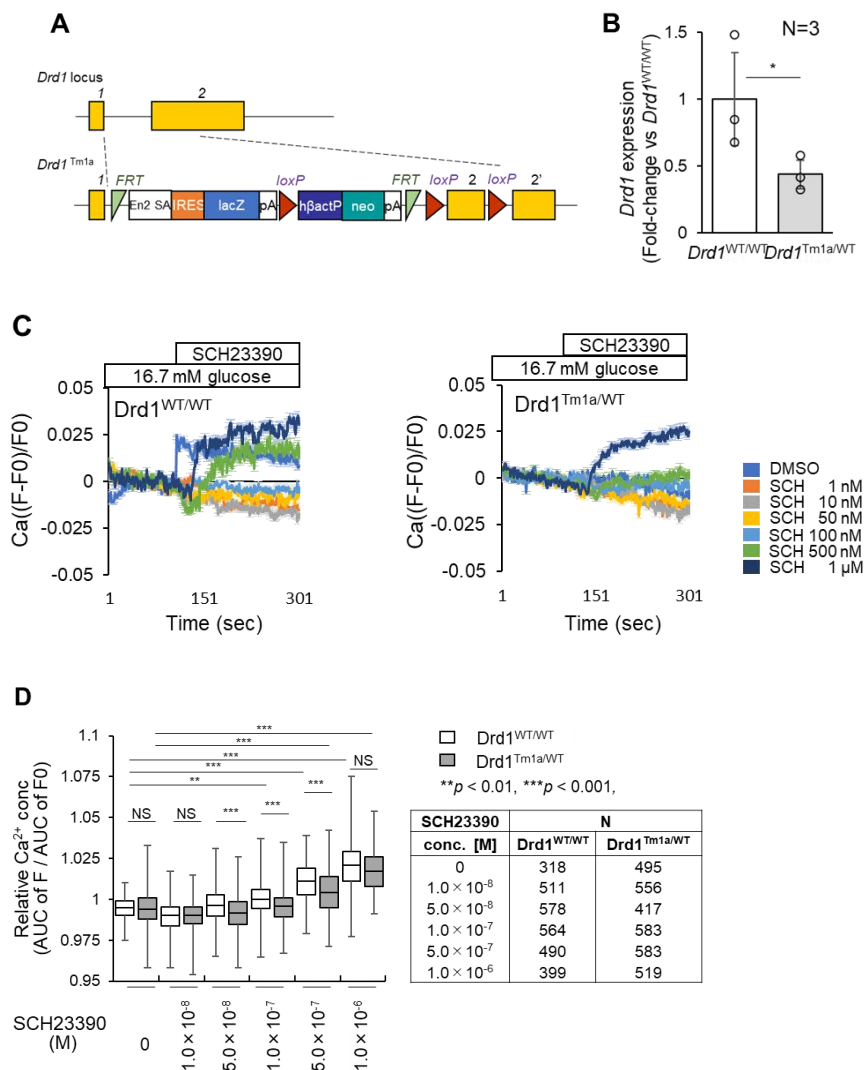


図 12: D1 ヘテロ欠損マウス膵島では SCH23390 による Ca<sup>2+</sup> 応答性が低い (A) D1 欠損マウスのゲノムマップ。(B) 単離膵島の cDNA における *Drd1* の発現量を RT-qPCR により定量した結果。内部標準として  $\beta$ -actin を用いて、*Drd1<sup>WT/WT</sup>* マウス膵島における発現量の平均値を 1 とした。値は mean  $\pm$  SD。(C、D) Ca<sup>2+</sup> 指示薬 Fluo-4 AM を用いた細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態解析の結果。(C) *Drd1<sup>WT/WT</sup>* マウス(左)と *Drd1<sup>Tm1a/WT</sup>* マウス(右)の分散培養した膵島について、高グルコース条件において 150 秒後に D1 アンタゴニスト SCH23390 を 1 nM から 1  $\mu$ M の濃度で添加したときの細胞内 Ca<sup>2+</sup> の時間推移。値は添加前を F0 として標準化した。(D) SCH23390 添加後の Ca<sup>2+</sup> 時間推移の AUC を添加前の AUC で標準化し、箱ひげ図を用いてプロットした。値は mean  $\pm$  SD (B)、median(IQR) (D)。統計学的解析は Student's *t*-test (B) または one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test (D) を用いた。NS は not significant を示す。

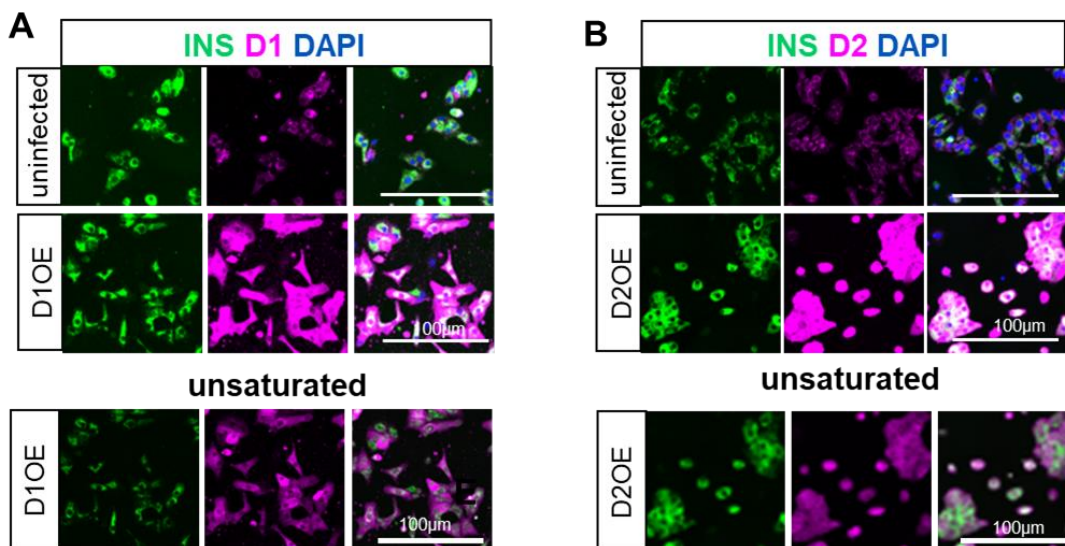
### 3-5. D1 または D2 強制発現は糖応答性と DA 応答性を変化させる

D1 と D2 がインスリン分泌に示す影響を調べるため、分散したマウス膵島細胞に対してアデノウイルスによって 3xFlag-mD1 または 6xHis-mD2 を強制発現

した。免疫細胞化学によりマウス初代培養  $\beta$  細胞での D1 と D2 の発現が確認された。また、強制発現によってそれぞれの発現が増加しているのが確認された (図 13A、B)。

D1 または D2 を強制発現した  $\beta$  細胞におけるグルコース応答性細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を調べた。コントロール条件ではグルコース刺激によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が増加し、DA を添加すると減少した。D1 強制発現細胞は、グルコースの刺激に対して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が確認されたが、DA による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の減少はみられなかった。一方で D2 強制発現細胞ではグルコースに対する応答性がみられなかった (図 13C)。

さらに TIRFM を用いたインスリン分泌について調べた。D1 強制発現では低グルコース条件での分泌イベント数が有意に増加した。高グルコース条件でのインスリン分泌に有意な差はみられなかったが、DA 添加時のイベント数の減少はコントロールと比べて有意に小さかった。一方で D2 強制発現細胞ではグルコース刺激に応答したインスリン分泌が見られなかった。第 1 相インスリン分泌すら喪失し、また、DA に対する応答も観察されなかった (図 13D、E)。これらの結果から、 $\beta$  細胞への D1 あるいは D2 の単独の強制発現はいずれも、DA による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  減少とインスリン分泌抑制を引き起こさないことが分かった。



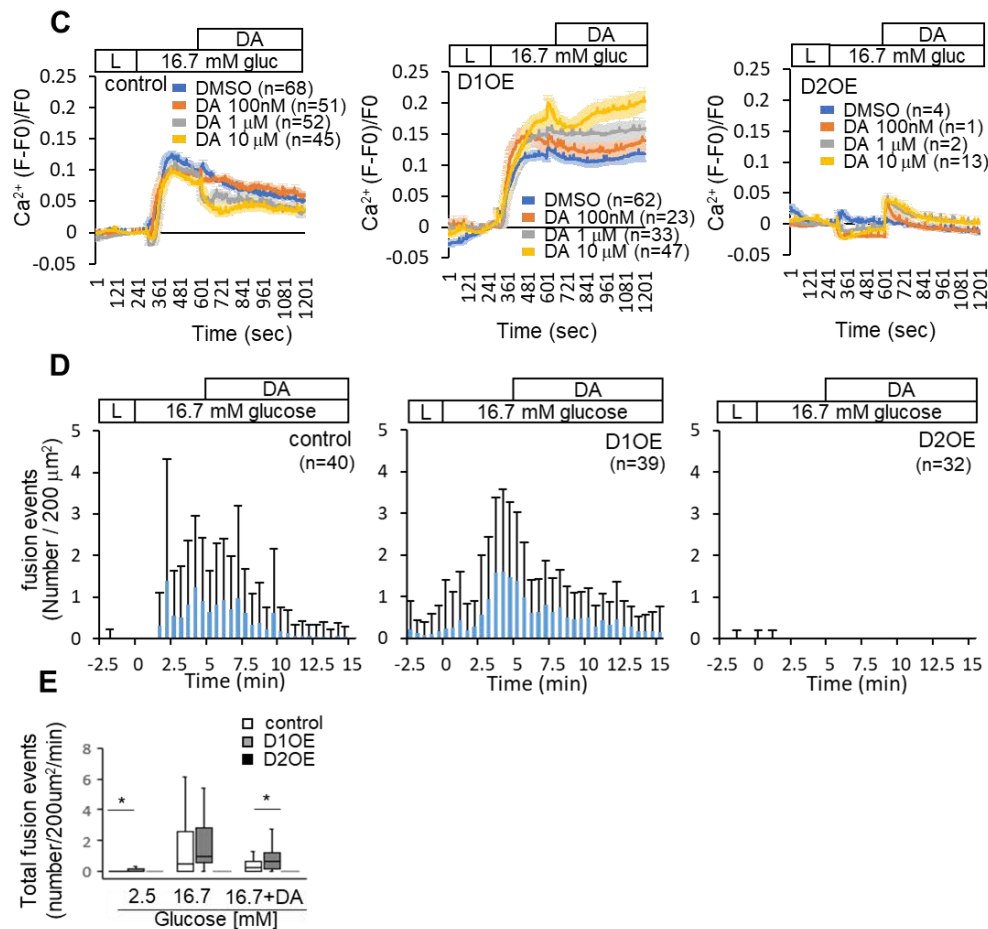


図 13: D2OE は糖応答性を失う

(A、B) 分散培養したマウス膵島における D1 と D2 の発現の免疫細胞化学の結果。(A) アデノウイルス非感染細胞 (上図)、D1OE (中、下図 (unsaturated))。(B) アデノウイルス非感染細胞 (上図)、D2OE (中、下図 (unsaturated))。INS: インスリン (緑)、D1 または D2 (マゼンタ)、DAPI (青)、スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。(C)  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 Fluo-4 AM を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態解析の結果。コントロール (左)、D1OE (中)、D2OE (右)。300 秒でグルコース刺激を、600 秒で DA を 0.1、1、10  $\mu\text{M}$  の濃度で添加を行った。値はグルコース刺激前を F0 として標準化した。(D、E) TIRFM を用いたインスリン分泌動態解析の結果。(D) 30 秒ごとの分泌イベント数のヒストグラム。コントロール (左)、D1OE (中)、D2OE (右) を示し、0 分時点でグルコース刺激を行い、5 分で DA 10  $\mu\text{M}$  を添加した。(E) 低グルコース、高グルコースおよび DA 添加後の平均分泌イベント数を箱ひげ図を用いてプロットした。値は  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  (C) または  $\text{mean} \pm \text{SD}$  (D)、median (IQR) (E)。統計学的解析は one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test (E) を用いた。

### 3-6. D1-D2 ヘテロ多量体アゴニスト SKF83959 はインスリン分泌を一過的に減少させる

これまでの結果から、DA が D1 を介してインスリン分泌を制御していることがアンタゴニストを用いた結果を通して分かったものの、D1 アゴニストはイン

スリン分泌を抑制せず、また D1 あるいは D2 単独の強制発現においても DA はインスリン分泌を抑制しなかった。坂野らはマウス  $\beta$  細胞において D2 がアデノシン A2A 受容体と会合することで cAMP の生合成を調節することを以前に見出している(Sakano et al., 2016)。多種の GPCR 同士は会合することでその下流シグナルを変化させ調節することがあり、D1 は D2 とヘテロ多量体を形成することが知られている(Lee et al., 2004)。そこで私は D1-D2 ヘテロ多量体が  $\beta$  細胞のインスリン分泌に関わっているのではないかと考えた。D1-D2 ヘテロ多量体に対するアゴニストとして知られている SKF83959 (Rashid et al., 2007)を用いて、その影響を調べた。高グルコース濃度の細胞内  $Ca^{2+}$ が高い条件下において、SKF83959 を添加すると、10  $\mu$ M において細胞内  $Ca^{2+}$ が急激に減少し、その後、添加 120 秒後までに元のレベルまで回復した(図 14A、B)。D1 と D2 を同時に強制発現したマウス膝島 (D1D2OE) に SKF83959 を添加すると、1 nM から 10  $\mu$ M まで濃度依存的に細胞内  $Ca^{2+}$ の一時的な減少を示した(図 14C、D)。また、D1 アンタゴニスト、D2 アンタゴニスト存在下で SKF83959 の細胞内  $Ca^{2+}$ に対する効果は阻害されたため(図 14E)、SKF83959 は D1 および D2 を介して細胞内  $Ca^{2+}$ を減少していると考えられる。内在性の SKF83959 の効果が DA に対する競合作用によるものでないことを確かめるため、DA 存在下で SKF83959 の効果を調べたところ、野生型 (WT) と D1D2OE の両条件とも DA の有無で変わらなかった(図 14F)。そのため、SKF83959 の効果は内在性の DA シグナルに対する競合作用ではないと思われる。

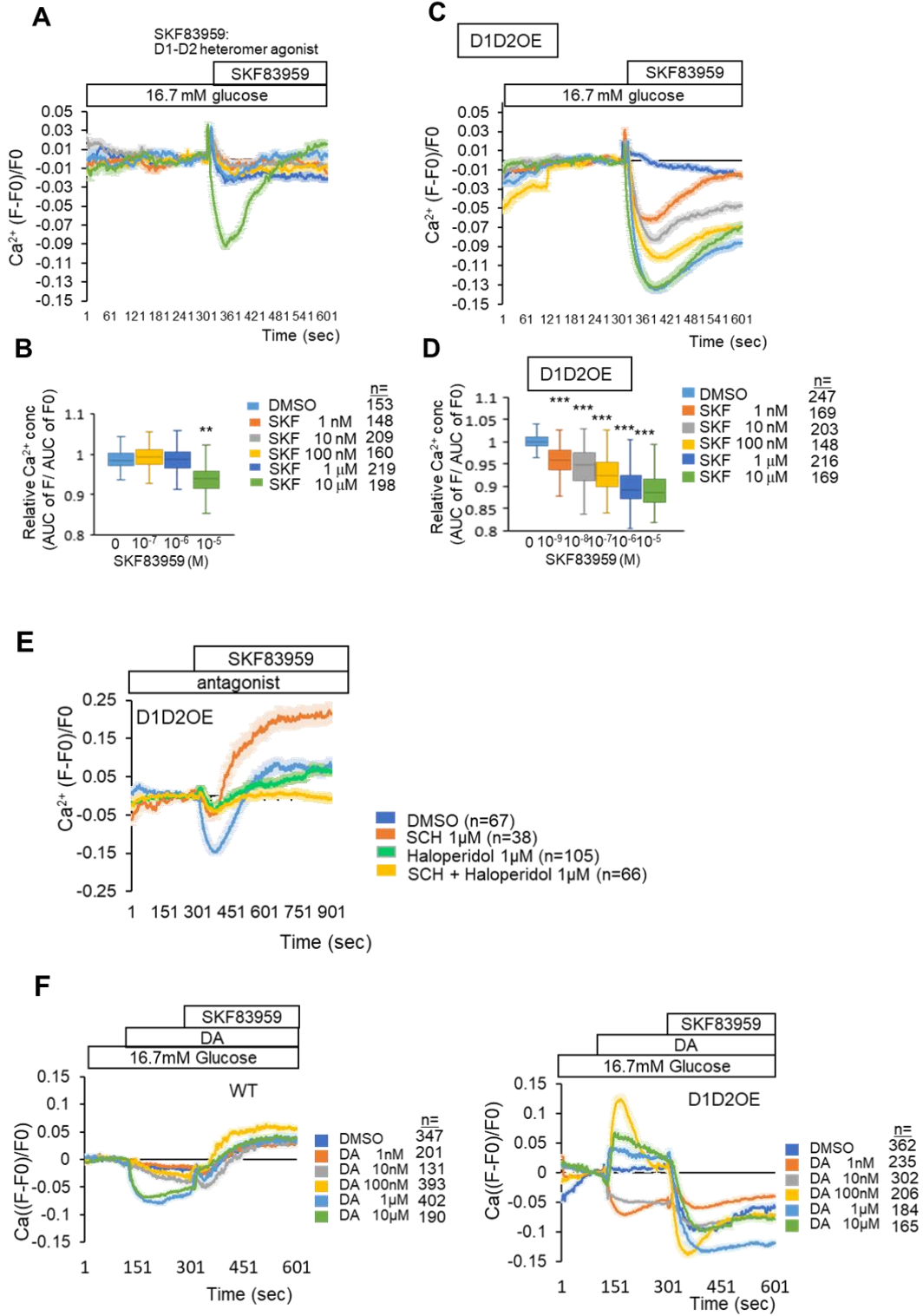
次に、SKF83959 による細胞内  $Ca^{2+}$ の減少がインスリン分泌にも影響を与えるかを TIRFM により調べた。グルコース刺激後 5 分に SKF83959 または DA (コントロールとして DMSO) を添加したところ、DA が添加後から分泌を阻害し続けたのに対し、SKF83959 は一過性のインスリン分泌阻害を示した(図 14G)。添加後から 2.5 分間ずつに区切って分泌イベント数を集計、比較したところ、SKF83959 添加後 0-2.5 分において有意に分泌イベント数を減少させたが、以降は分泌が回復していた。一方で DA は 2.5 分以降も有意に分泌イベント数を減少させた(図 14H)。

さらに、cAMP 合成に対する D1-D2 ヘテロ多量体の影響を調べたところ、DA と異なり SKF83959 は Fsk 依存的な cAMP の増加を阻害しなかった(図 14I)。これらの結果から、D1-D2 ヘテロ多量体の活性化は下流シグナルとして cAMP に影響を及ぼさず、細胞内  $Ca^{2+}$ を減少させることでインスリン分泌を一過的に抑制することが分かった。

### 3-7. マウス $\beta$ 細胞で D2 の発現が D1-D2 ヘテロ多量体形成を制御する

D1-D2 ヘテロ多量体が  $\beta$  細胞において形成されているかを調べるため、

Duolink 近接ライゲーションアッセイ (PLA) を用いた。この手法は、2つのタンパク質同士が 40 nm 以内に近接して存在する場合において、それぞれのタンパ



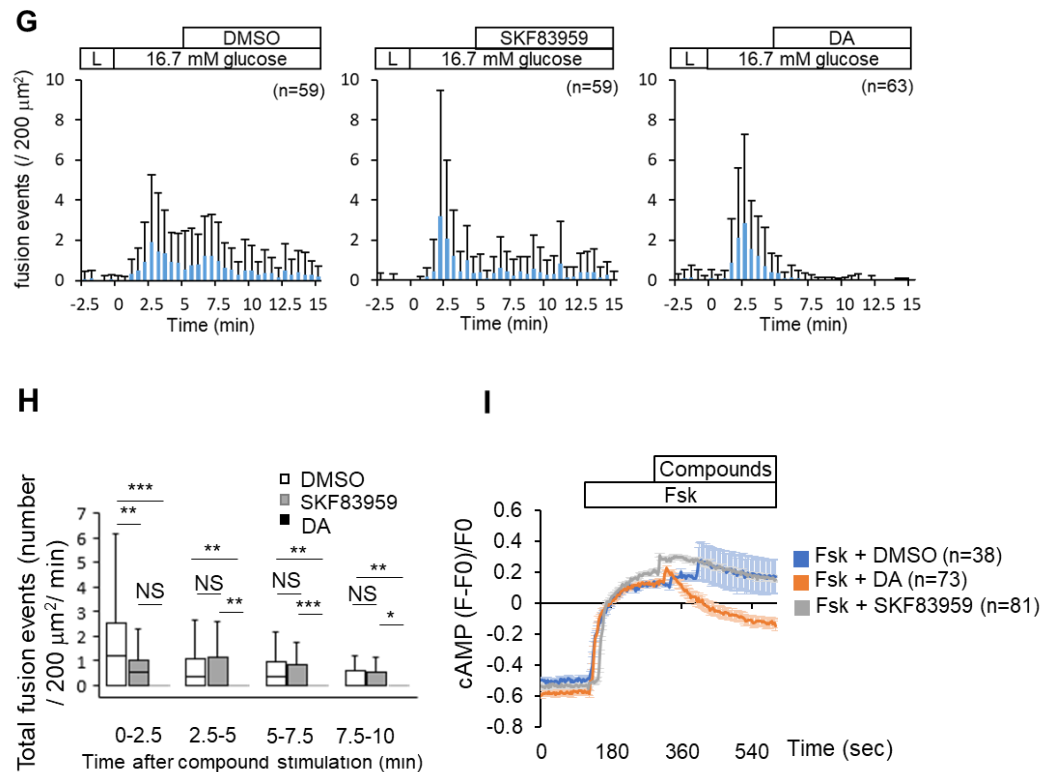


図 14: SKF83959 は D1-D2 ヘテロ多量体を活性化してインスリン分泌を短期的に抑制する。

(A-F)  $Ca^{2+}$  指示薬 Fluo-4 AM を用いた細胞内  $Ca^{2+}$  動態解析の結果。(A、C) 分散培養したマウス膵島細胞に対し、高グルコース条件下で SKF83959 を 1 nM-10  $\mu$ M の濃度で添加した細胞内  $Ca^{2+}$  動態。(A) 野生型、(C) D1D2OE、300 秒で SKF83959 を添加した。値は SKF83959 添加前を F0 として標準化した。(B、D) SKF83959 添加後の  $Ca^{2+}$  時間推移の AUC を添加前の AUC で標準化し、箱ひげ図を用いてプロットした。(E) SCH23390 1  $\mu$ M、Haloperidol 1  $\mu$ M またはその両方の存在下で、300 秒時点で SKF83959 10  $\mu$ M を添加した。値は SKF83959 添加前を F0 として標準化した。(F) DA 1 nM-10  $\mu$ M 存在下で SKF83959 10  $\mu$ M を添加した。左は野生型で右は D1D2OE。値は DA 添加前を F0 として標準化した。(G、H) TIRFM を用いたインスリン分泌動態解析の結果。(G) 30 秒ごとの分泌イベント数のヒストグラム。コントロール (DMSO、左)、SKF83959 10  $\mu$ M (中)、DA 10  $\mu$ M (右) を示し、0 分時点でグルコース刺激を行い、5 分で化合物を添加した。(K) 化合物添加後 10 分間までの平均分泌イベント数を 2.5 分ごとに集計し、箱ひげ図を用いてプロットした。(I) 細胞内 cAMP の時間推移。120 秒で Fsk 10  $\mu$ M を添加、300 秒で DA 10  $\mu$ M または SKF83959 10  $\mu$ M を添加した。値は Fsk 添加後を F0 として標準化した。値は mean  $\pm$  SEM (A、C、E、F、I) または mean  $\pm$  SD (G)、median (IQR) (B、D、H)。統計学的解析は one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test (B、D、H) を用いた。NS は not significant を示す。

ク質特異的な 2 種類の抗体を用いることで検出することができる手法である。Duolink-PLA 法により、 $\beta$  細胞で D1-D2 ヘテロ体が観察された (図 15A)。また、DA あるいは SKF83959 を加えた条件において D1-D2 ヘテロ多量体の蛍光強度が増加した (図 15B)。この結果は、D1-D2 の活性化がヘテロ多量体形成を促進し

ていることを示唆する。次に、D1、D2 またはその両方を強制発現した  $\beta$  細胞でのヘテロ多量体形成を Duolink-PLA 法で調べた。D1 と D2 を同時に強制発現した D1D2OE では大きく蛍光強度が増加した。D1OE はアデノウイルス感染コントロール (scramble) と比較してわずかに蛍光強度が増加したものの有意差はみられなかった。一方で D2OE により蛍光強度が有意に増加した (図 15C、D)。この結果から、 $\beta$  細胞において D2 の発現量が D1-D2 ヘテロ多量体形成を制御していると推察される。

次にウエスタンブロットによる D1-D2 ヘテロ多量体の検出を試みた。マウス初代  $\beta$  細胞に D1、D2 あるいはその両方を強制発現し、2 日後に細胞を溶解し、溶解液を用いてウエスタンブロットを行った。アデノウイルス未感染の単離脾臓細胞抽出液に対して、抗 D1 抗体を用いておよそ 48 kDa のバンドが検出された (図 15E) が、抗 D2 抗体ではバンドが確認できなかった。D1OE 細胞抽出液から抗 D1 抗体を用いて、D1 のホモ二量体と推察される約 100 kDa のバンドが観察された。一方で、D2OE と D1D2OE の細胞抽出液から、抗 D1 抗体と抗 D2 抗体の両方の条件で 86 kDa 付近にバンドが観察された。これは D1-D2 ヘテロ二量体であると推察される。また、D2OE と D1D2OE の細部抽出液から、抗 D2 抗体によって D2 単量体と予想される 37 kDa 付近のバンドと、D2 ホモ二量体と予想される 74 kDa 付近のバンドが観察された (図 15F、G)。これらの結果は Duolink 近接ライゲーションアッセイにおいて D2OE で D1-D2 ヘテロ多量体の蛍光強度の増加がみられた結果とも一致している。

次に、SKF83959 に対する応答性が D1、D2 どちらの受容体に依存するかを調べた。D1OE、D2OE、D1D2OE の 3 条件に対し SKF83959 を高グルコース濃度下の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が高い条件下で加えると、D2OE と D1D2OE で 10 nM、100 nM の SKF83959 に対して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の減少を示したが、D1OE は同濃度の SKF83959 に対して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の減少は示さなかった (図 15H)。以上の結果より、マウス  $\beta$  細胞における D1-D2 ヘテロ多量体の存在が確認された。強制発現の結果から、D1-D2 ヘテロ多量体の形成は D2 の発現量に依存することが示唆され、SKF83959 に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答性も同様に D2 の発現量に依存することが示唆された。

### 3-8. D1-D2 ヘテロマー形成が D2 受容体活性化による細胞毒性から $\beta$ 細胞を保護する

これまでに坂野らは DA が D2 受容体とアデノシン A2A 受容体の相互作用を介して  $\beta$  細胞のアポトーシスを誘導することも明らかにしている (Sakano et al., 2016)。そこで、D1-D2 ヘテロ多量体が  $\beta$  細胞の生存に対してどのような作用を持つかを調べた。分散培養したマウス初代  $\beta$  細胞にアデノウイルス感染により

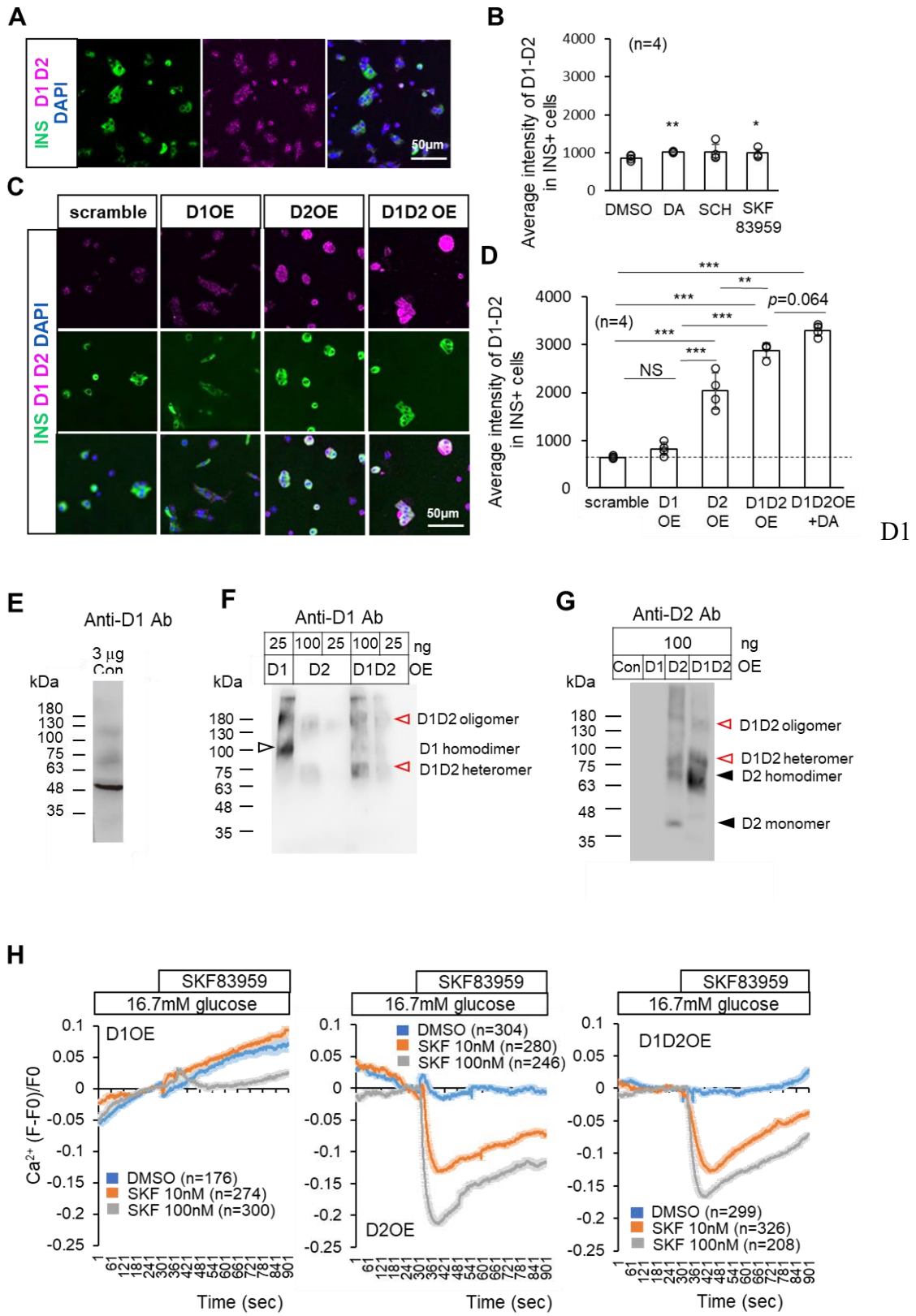


図 15: マウス  $\beta$  細胞で D2 の発現が D1-D2 ヘテロ多量体形成を制御する。  
(A-D) 分散培養したマウス膵島で D1-D2 多量体形成を Duolink-PLA 法により調べた結果。(A、B) INS: インスリン (緑)、D1-D2 ヘテロ多量体 (マゼンタ)、DAPI (青)、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。(B) アデノウイルス感染コントロール (scramble、左)、D1OE (左から 2 番目)、D2OE (右から 2 番目)、D1D2OE (右)。(C) 化合物添加条件でのインスリン陽性細胞における D1-D2 ヘテロ多量体の輝度。DMSO (コントロール)、DA 10  $\mu\text{M}$ 、SCH23390 10  $\mu\text{M}$ 、SKF83959 10  $\mu\text{M}$ 。(D) コントロール (scramble)、D1OE、D2OE、D1D2OE のインスリン陽性細胞における D1-D2 ヘテロ多量体の平均輝度。DA は 10  $\mu\text{M}$  で添加した。値は  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。(E-G) マウス膵島におけるウエスタンブロットの結果。(E) サンプルはマウス膵島細胞抽出液 3  $\mu\text{g}$  を用い、抗 DRD1 抗体によりバンドを検出した。(F) サンプルとして左から D1OE 100 ng、D2OE 100 ng、25 ng、D1D2OE 100 ng、25 ng を用い、抗 DRD1 抗体により複数のバンドを検出した。(G) サンプルとして左から、アデノウイルス感染コントロール、D1OE、D2OE、D1D2OE をそれぞれ 100 ng 用い、抗 DRD2 抗体により複数のバンドが検出された。(H)  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 Fluo-4 AM を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態解析の結果。D1OE (左)、D2OE (中央)、D1D2OE (右) において、300 秒で SKF83959 10 nM または 100 nM を添加した。値は SKF83959 添加前を F0 として標準化し、 $\text{mean} \pm \text{SEM}$  で示した。NS は not significant を示す。

(D1OE)、D2 (D2OE) またはその両方 (D1D2OE) を感染させ、感染 2 日後を day 0 (d0) として d5 まで 5 日間培養した (図 16A)。d0 と比較して d1、d3、d5 と全体の細胞数およびインスリン陽性  $\beta$  細胞数は徐々に減少した (図 16B、C)。D2OE において細胞数の減少は大きく、d5 において d1 よりも有意に全細胞数と  $\beta$  細胞数が減少した。さらに、DA 10  $\mu\text{M}$  存在下で D2OE では細胞数が顕著に減少した。D1OE では DA 存在下で細胞数に有意差はみられず、D1D2OE では細胞数の減少に対する保護効果を示した。TUNEL 陽性率を調べたところ、d4 においてコントロール (DMSO) 条件下では D1OE、D2OE、D1D2OE ともに 5% 程度であったのに対し、D2OE のみ DA 存在下での TUNEL 陽性率が有意に大きかった (図 16D) ことから、D2OE において DA がアポトーシスを誘導することが示唆された。また、D2OE において 10  $\mu\text{M}$  の SKF83959 存在下では DA 10  $\mu\text{M}$  と異なり、コントロール (DMSO) 条件と比較して細胞数の減少はみられなかった (図 16E、F)。以上の結果から、D2 が過剰な条件において DA は細胞死を誘導するが、SKF83959 によって D1-D2 ヘテロ多量体を活性化しても細胞死は起こらないことが分かった。さらに、D1D2OE では DA 存在下でも細胞死は誘導されなかったことから、D2 ホモ多量体の活性化が細胞死を誘導すること、D1 が十分に発現していることで D1-D2 ヘテロ多量体が形成されて D2 ホモ多量体の過剰な活性化を防ぎ、細胞死から保護していることが推察される。

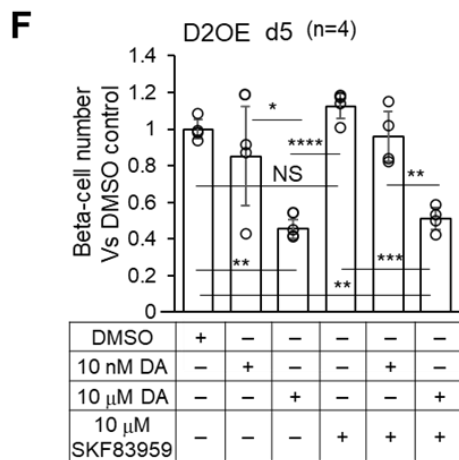
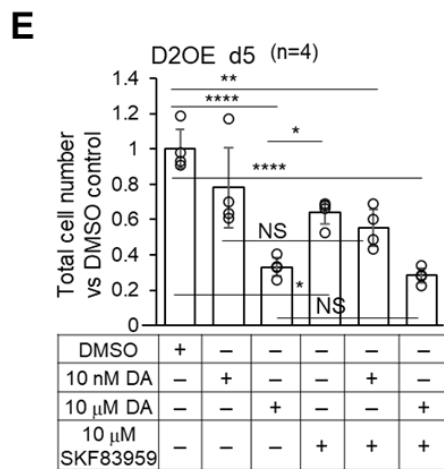
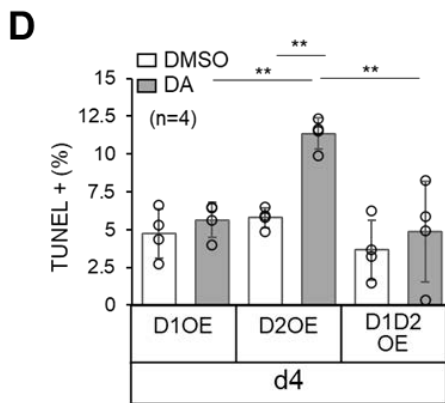
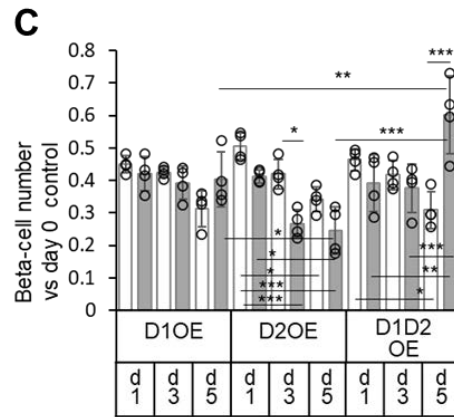
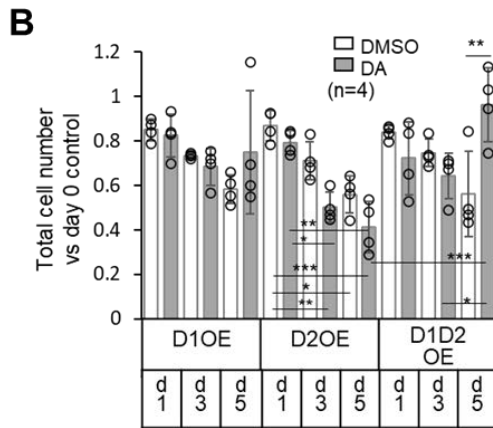
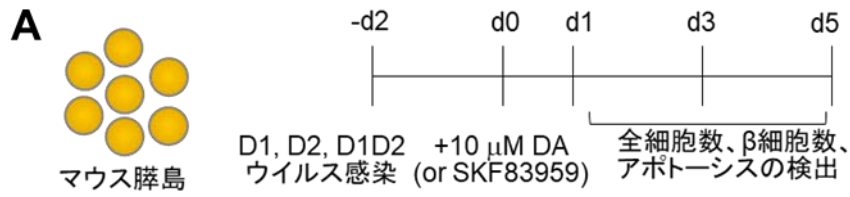


図 16: D2OE は DA 存在下で細胞死を誘導するが、D1D2OE は細胞死を誘導しない  
(A) 分散培養したマウス膵島を用いた実験の概略図。(B、C) D1OE、D2OE、D1D2OE において、d0 を基準として d1、d3、d5 における細胞数 (DAPI 陽性) (B) と  $\beta$  細胞数 (インスリン陽性) (C) を示した。DA は 10  $\mu$ M (コントロールとして DMSO) を添加した。(D) d4 における TUNEL 陽性細胞数。(E、F) D2OE に対して DA 10 nM または 10  $\mu$ M あるいは SKF83959 10  $\mu$ M を添加した条件での細胞数 (DAPI 陽性) (E) と  $\beta$  細胞数 (インスリン陽性) (F)。コントロールである DMSO 条件の細胞数を 1 とした。値は mean  $\pm$  SD で示した。統計学的解析は one-way ANOVA および Dunnett's multiple comparisons test を用いた。NS は not significant を示す。

## 第4章 考察

マウス  $\beta$  細胞において DA 合成酵素の発現が確認された。細胞外 L-Dopa と DA を増加させると細胞内 DA が増加したこと、VMAT2 の発現と DA 貯蔵能が確認されたことから、膵島内あるいは膵島外から供給される DA を  $\beta$  細胞が保有し、オートクラインやパラクラインによって第 2 相インスリン分泌の制御に用いていることが示唆された。DA が SLMV ではなくインスリンと同じ分泌小胞に貯蔵されていることが分かったが、VMAT2 とインスリン分泌小胞の局在が一致する (Pecic et al., 2019)、高グルコース条件において培地中のインスリン量と DA 量の挙動が一致する (Simpson et al., 2012) という先行報告とも一致する。高グルコース条件下における  $\beta$  細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  とインスリン分泌は増加と減少を繰り返すパルス状を示し、神経伝達物質などを介したオートクラインとパラクラインはパルス状のインスリン分泌機構に関与するのではないかとされている (Gylfe & Tengholm, 2014)。インスリンとともに DA が放出されることで、急峻なインスリンが必要とされる第 1 相に対する抑制よりも、血糖値を安定的に保つ役割を持つ第 2 相に対して抑制的に働き、過剰なインスリン分泌を防ぐとともに、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を減少させることでパルス状インスリン分泌様式の調節に関与するのではないかと推察される。

一方で、TH 阻害は TIRFM において分泌を増加させず、TH 強制発現  $\beta$  細胞を混合させることでインスリン分泌が抑制された。培地中の DA 量は ELISA の検出限界以下であったので、DA は TH 陽性細胞を中心として局所的な濃度勾配を有するのではないかと考えられる。中枢神経において DA は単純拡散と DAT による取り込みによって 'spill over' を防ぎ、特定の刺激に対して特定の細胞以外が活性化するのを防いでおり、分泌地点から 5  $\mu\text{m}$  径での局所的 DA 濃度は 0.5-100  $\mu\text{M}$  であるとされる (Cragg & Rice, 2004)。この範囲の濃度の DA は、先行報告や今回私が調べた結果においてインスリン分泌抑制する濃度と一致する。 $\beta$  細胞からインスリンとともに放出された DA は DAT により速やかに  $\beta$  細胞内に回収され、また、回収できなかった DA は単純拡散すると考えられる。実際に局所的な DA の濃度勾配が存在するか、 $\beta$  細胞自身によって放出される DA 濃度がどの程度であるかは現時点で直接的に解明できていない。

さらに、 $\beta$  細胞における TH 陽性率が高いマウス系統では高脂肪高炭水化物食給餌に誘導される肥満と糖尿病発症に耐性を有することが報告されている (Mitok et al., 2018)。また、マウス  $\beta$  細胞での TH 陽性率が発生期における膵島の血管新生によって変わること (Reinert et al., 2014) や、ラット  $\beta$  細胞では TH 活性が食事や細胞の周辺環境変化することが知られている (Borelli et al., 2003; Kozuka

et al., 2015; Persson-Sjögren et al., 2002)。これらの先行報告を踏まえると、 $\beta$  細胞における TH の発現が血糖調節に関与することが推察される。 $\beta$  細胞における TH 発現制御機構は分かっておらず、どのようにして  $\beta$  細胞におけるヘテロな TH 発現が形成されるのかは非常に興味深い。また、 $\beta$  細胞自身による DA 合成が糖尿病の発症にどのように関与するかについて、例えば遺伝子改変動物などを用いた *in vivo* の実験などを通じたさらなる研究が必要である。

一方で、DA および DA 受容体は中枢神経において重要な機能を有しており、また様々な研究が進んでいる。中枢神経において DA はおもに黒質線条体、中脳辺縁系、中脳皮質系、結核漏斗状の 4 つの経路で確認され、その働きは随意運動や摂食、報酬系、睡眠、記憶、学習など神経機能の多岐にわたる(J.-M. Beaulieu & Gainetdinov, 2011)。前シナプス終末から放出された DA は D1 から D5 まで存在する 5 つの DA 受容体をそれぞれ活性化することで機能を伝達する。そして、これらの受容体サブタイプはアデニル酸シクラーゼを活性化して cAMP 合成を促進する D1 様受容体 (D1 と D5) と、アデニル酸シクラーゼを抑制する D2 様受容体 (D2、D3 と D4) の 2 つに分類される(J.-M. Beaulieu & Gainetdinov, 2011)。

D1、D2 ともに脳で広く発現しているが、特に線条体や側坐核の中型有棘ニューロンで発現する。D1 は淡蒼球内節と黒質網様部に投射する直接経路で選択的に発現する。D1 の活性化は cAMP 合成を促進し細胞内  $Ca^{2+}$  を増加させ、神経細胞を興奮させることから興奮性経路とされる。一方で、D2 は淡蒼球外節や視床下核を経由して間接的に黒質網様部に投射する間接経路で選択的に発現し、D2 の活性化は cAMP 合成を抑制し神経細胞の活動を抑制するので、抑制性経路とされている(Gerfen et al., 1990; J.-M. Beaulieu & Gainetdinov, 2011)。これら 2 つの経路は受容体の発現パターンに加えて、それぞれの受容体は DA に対して異なるアフィニティを示すことで制御される。D1 は低アフィニティ( $\mu$ M オーダー)であるのに対し、D2 は高アフィニティ(nM オーダー)を示す(Richfield et al., 1989)。例えば、報酬系および忌避系は大脳基底核における黒質線条体経路において DA とその受容体によって制御される。欲求が満たされ快感を得るような報酬が期待される場合には興奮性の直接経路が活性化し、痛みや不快を伴うような避けるべき嫌悪刺激に対しては抑制性の間接経路が活性化する。ある外的刺激に対して、報酬を求めると危険を感じて忌避するかという意味決定にはこの 2 つの経路が関与するとされる(Nakanishi et al., 2014)。刺激のない状態では DA が低濃度で存在し、この状態では DA に高アフィニティである D2 が活性化することでアデニル酸シクラーゼが抑制され、間接経路は抑制されている。一方で DA に低アフィニティである D1 は活性化していないため直接経路も働いてい

ない。報酬刺激が生じるとドーパミン神経から DA が放出される。DA 濃度が D1 を活性化する閾値を超えるため、アデニル酸シクラーゼの活性化により cAMP が合成され、直接経路が働く。この時の D2 も活性化しており、アデニル酸シクラーゼが抑制されるため、間接経路は働かない。嫌悪刺激が生じると DA の放出が抑制され、DA 濃度が減少する。DA 濃度が D1 を活性化する閾値に達しないため直接経路は働かない。一方で D2 は不活性化し、また同時にアデノシン A2A が活性化する(Fuxe et al., 2007)ことでアデニル酸シクラーゼの抑制が外れ cAMP が合成され、間接経路が働く (Hikida et al., 2010, 2013, Nakanishi et al., 2014)。このように DA 濃度の増減と DA 受容体のアフィニティの差によって報酬系が制御されている (図 17)。

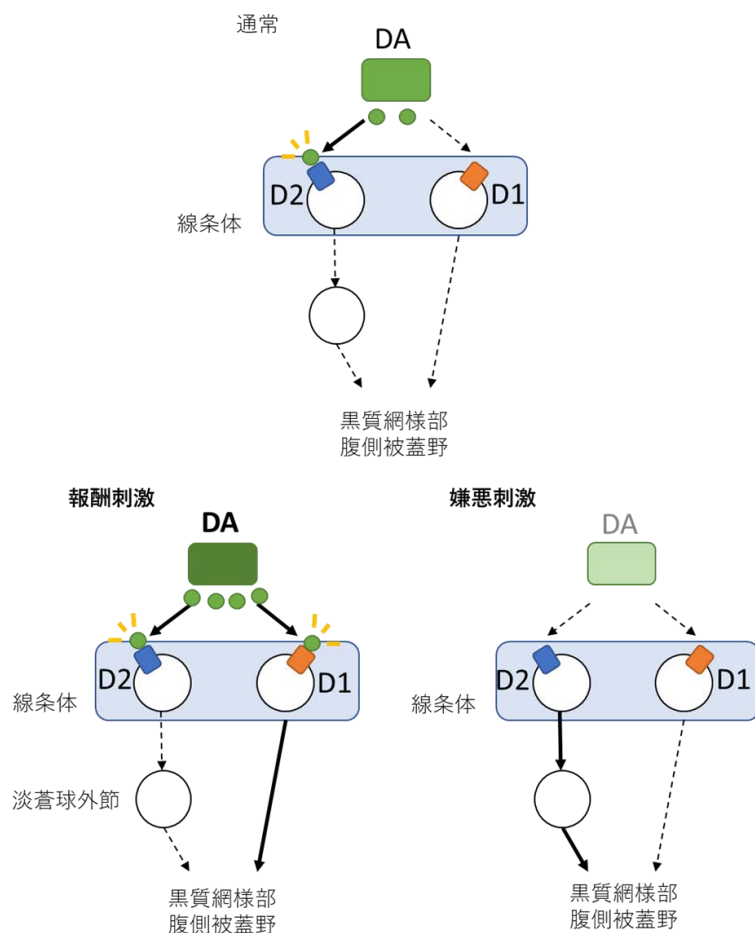


図 17: 報酬系および忌避系における D1 陽性ニューロンと D2 陽性ニューロンの活性化機構。通常、DA は低濃度で存在するため、高アフィニティの D2 のみが活性化されることで D2 陽性の間接経路は抑制される。報酬刺激は DA の放出を増加させるため、低アフィニティの D1 も活性化させ、D1 陽性直接経路を興奮させる。嫌悪刺激は DA の放出を減少させるため、D2 を不活性化し、D2 陽性間接経路は活性化する。図の点線は神経の抑制状態を示し、実線は興奮状態を示す。Nakanishi et al., 2014 を参考に作成。

他方で、一部の中型有棘ニューロンには D1 と D2 の両方を発現する細胞が存在し、D1-D2 ヘテロ多量体を形成している(Lee et al., 2004)。これは D1 経路と D2 経路に加え、第 3 の経路とも考えられている。DA によって活性化した D1-D2 ヘテロ多量体は Gαq/11 とホスホリパーゼ C を活性化し、小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 放出を引き起こすことで細胞内 Ca<sup>2+</sup> を増加させる(Hasbi et al., 2009; Rashid et al., 2007; So et al., 2009)。細胞内 Ca<sup>2+</sup> の増加は Calcium calmodulin kinase II (CaMKII) を活性化するとともに、側坐核と腹側被蓋野において D1-D2 ヘテロ多量体を介した CaMKII の活性化は脳由来神経伝達因子を増加させることが報告されている(Hasbi et al., 2009)。これらのシグナルは神経細胞の発生や成長などに関与し、その障害は統合失調症などの神経疾患の原因となる。ラットに対するアンフェタミンの慢性投与や統合失調症患者由来淡蒼球において D1-D2 アゴニストに対するアフィニティが増加することが知られており、薬物依存と統合失調症に関与すると考えられている(Perreault et al., 2010)。また、うつ病患者の線条体において D1-D2 ヘテロ多量体が増加することが報告されている(Pei et al., 2010)。D1-D2 ヘテロ多量体形成は D1 の C 末端<sup>404</sup>Glu および<sup>405</sup>Glu と D2 の第 3 細胞内ループの<sup>274</sup>Arg および<sup>275</sup>Arg による静電的結合に基づく(Hasbi et al., 2014)。D1 の<sup>404</sup>Glu および<sup>405</sup>Glu を含む C 末端ペプチドを導入することで D1-D2 ヘテロ多量体形成が阻害され、このペプチドをラットに投与するとうつ病の症状が改善することが報告されている(Shen et al., 2015)。このように、中枢神経において D1 と D2 はその発現パターンとアフィニティの違いによって異なる経路を活性化させて機能を制御しており、さらに D1-D2 共発現神経は特徴的な機構で活性化する神経経路としての役割を有している。

β細胞における DA がインスリン分泌を阻害する機構について、私の研究から D1 が関与することが分かった。D1 アンタゴニスト SCH23390 と SKF83566 が DA を阻害し、インスリン分泌を増加させることを示した。先行研究において β細胞では D2 様受容体がインスリン分泌抑制に関与することがよく知られていた(Rubi et al., 2005; Ustione et al., 2013a)。一方で Chen らはラット β細胞では D2 ではなく、むしろ D1 が発現していることを報告している(Chen et al., 2014)。ヒトと 2 つのマウス系統の膵島での DA 受容体の発現パターンが異なることも報告され(Amisten et al., 2017)、ICR 系統のマウス膵島で D1 と D2 の mRNA 発現が高く、ヒトでは D2 の mRNA 発現が高いことを示している。これまで特に D2 様受容体と β細胞の機能について注目されてきたが、異なる 2 つの D1 と D2 がどのような関係性で β細胞に働くか分かっていなかった。今回の研究により、D1 が DA による β細胞の機能調節に重要であること、D1-D2 がヘテロ多量体を形成することでシグナルを調節することを明らかにした。

本研究により D1-D2 ヘテロ多量体アゴニストとして知られている SKF83959 がインスリン分泌を抑制することを示した。SKF83959 は元々 D1 の部分的アゴニストとして知られ、D1 に対して高いアフィニティ ( $K_i \leq 1.10 \text{ nM}$ ) を持ち、D2 に対しては低アフィニティ ( $K_i \leq 920 \text{ nM}$ ) であることが知られている。さらに SKF83959 は D1-D2 ヘテロ多量体に結合し、D2 に対する結合部位はヘテロ多量体形成によって現れるとされる (Rashid et al., 2007)。D2OE が低濃度 (10 nM) の SKF83959 に応答して高グルコース条件における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を減少させる結果は、Duolink PLA assay と western blotting の結果とも一致している。SCH23390 によって DA または SKF83959 が阻害されたことから、DA と SKF83959 が D1-D2 ヘテロ多量体に作用していると解釈した。

DA は高グルコース条件下で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  と cAMP を減少させ、インスリンの開口放出を抑制するが、この機構には  $G_{ai/o}$  が重要であることを示した。 $G_{ai/o}$  はアデニル酸シクラーゼの活性を抑制することから、DA が  $G_{ai/o}$  の活性化を通して cAMP の合成を阻害していると考えられる。さらに、 $G_{ai/o}$  阻害剤が DA による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の減少を部分的に阻害したが、これには  $G_{ai/o}$  の活性化による  $G\beta\gamma$  の遊離が関与すると考えられる (Yim et al., 2018)。 $G\beta\gamma$  は G-protein-activated inward rectifying potassium (GIRK) channel を活性化することで  $\text{K}^+$  を細胞外へ排出させ、過分極させる (Dascal & Kahanovitch, 2015)。加えて、VDCC との直接的な作用や soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) の阻害も報告されている (Wells et al., 2012; Yoon et al., 2007)。一方で D1-D2 ヘテロ多量体は神経細胞において  $G_{aq/11}$  を活性化することで細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を増加させるが (Lee et al., 2004)、 $\beta$  細胞において今回得られた、D1-D2 ヘテロ多量体の活性化が一過性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  減少とその後の回復を引き起こす詳細な分子機構については未解明である。

D1OE では高グルコース条件において細胞内 DA 添加による  $\text{Ca}^{2+}$  とインスリン分泌の減少がほとんど見られなかった。D1 は一般的に  $G_{as}$  を活性化する。過剰な D1 の発現により D1 のシグナルが優勢になっているため、ヘテロ多量体を介した阻害が見られないのではないかと予想される。一方で D2OE では糖応答性が失われていた。これまでに坂野らは、D2 強制発現した  $\beta$  細胞株では cAMP の合成を阻害することで  $\beta$  細胞特異的な遺伝子の発現が減少する脱分化とアポトーシスが誘導されることを明らかにしている (Sakano et al., 2016)。前述の通り、培養中の  $\beta$  細胞間ではインスリン分泌と同時に局所的に DA シグナルが働いていることが推察される。D2 を介したシグナルが活性化されることで脱分化が進行しており、その過程で機能不全が生じたのだと考えられる。これは、2 型糖

尿病の進行する過程で、 $\beta$  細胞の脱分化や細胞死が起こるのに先立って 2 相性インスリン分泌という  $\beta$  細胞機能が低下が進行するという考え(Seino et al., 2011)に一致する。D2OE は D1-D2 ヘテロ多量体を増加させるが、D2 同士のホモ多量体も増加させ、むしろ D2 ホモ多量体のほうが分子数として優勢であることが推察される。過剰量の DA に対しては D2 ホモ多量体が優勢であるため細胞死が引き起こされる。一方で D2OE において D1-D2 ヘテロ多量体のみを SKF83959 によって活性化した場合には細胞死を引き起こさないことから、D2 ホモ多量体の活性化と D1-D2 ヘテロ多量体の活性化はシグナルが異なることを示唆している。これらの結果は D1 の D2 シグナルに対する調節機構としての役割を示している。 $\beta$  細胞における DA 受容体の発現や活性が  $\beta$  細胞の発生や老化、糖尿病の進行に関連して変動するかは現状ではわかっていないが、興味深い点である。

## 第5章 結語

GPCR は他の GPCR と多量体を形成することでシグナルが変化することが知られている (Ferré et al., 2014)。β細胞でも GPCR のヘテロ多量体形成によって典型的なシグナルと異なるシグナルを生じる場合が報告されており、例えばグレリン受容体 GHS-R1a は  $G\alpha_q/11$  と結合するとされているが、β細胞ではソマトスタチン受容体 SST5 と会合することで  $G\alpha_i/o$  を活性化することが知られている (Park et al., 2012)。また、D2 は他に多種の GPCR と会合する 'ハブ受容体' として働くことが知られている (Borroto-Escuela et al., 2014)。さらに、D1 は一般的に  $G\alpha_s$  を活性化することは広く知られているが、 $G\alpha_i$  と結合しうることが明らかになっている (Okashah et al., 2019)。近年では、D2 様受容体に加えて、アドレナリン受容体が DA と結合してインスリン分泌を阻害することが報告された (Aslanoglou et al., 2021; Sánchez-Soto et al., 2018)。今回、D1-D2 ヘテロ多量体に着目してその役割を明らかにしたが、これは β細胞における巨大な GPCR ネットワークの一端を発見したに過ぎず、今後、さらなる研究が期待される。

一方で、β細胞株において DA による細胞内への  $Ca^{2+}$  流入の阻害には抗アポトーシス作用があるため、前述の β細胞における TH 活性の役割と合わせて、DA が β細胞の機能を抑制するブレーキとしての作用が β細胞の機能を生涯にかけて長期的に維持するために重要であることが示唆されている。本研究の成果は、β細胞における D1 は D1-D2 ヘテロ多量体形成を介して D2 のシグナルが過剰にならないよう調節する役割を有するということを提唱するものであり、DA による細胞間シグナルの解明が糖尿病の発症予防および治療に貢献することが期待される (図 18)。

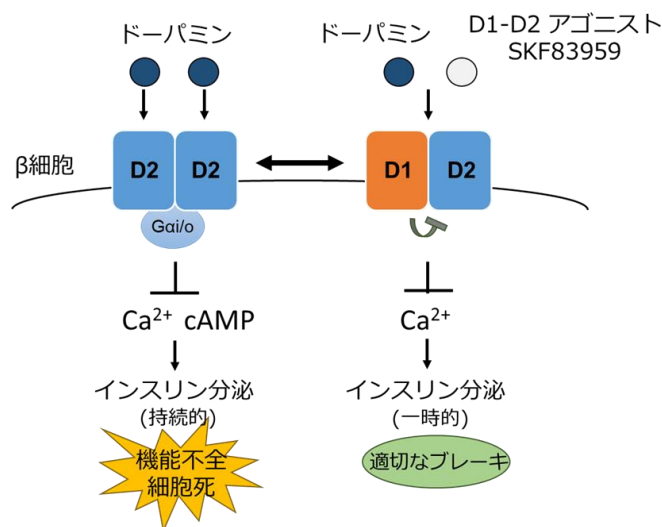


図 18: D1-D2 ヘテロ多量体と D2 ホモ多量体の β細胞における役割。DA は D2 ホモ多量体を介して細胞内  $Ca^{2+}$  と cAMP を減少させることでインスリン分泌を阻害するが、長期的かつ過剰に DA-D2 シグナルが活性化することは β細胞の機能不全や細胞死を引き起こす。一方で D1-D2 ヘテロ多量体は SKF83959 によって活性化し、一過的な  $Ca^{2+}$  の減少を引き起こし、インスリン分泌を阻害する。D1 が存在することで、DA 存在下で D1-D2 ヘテロ多量体が形成され、一過的にインスリン分泌を抑制するが、D2 ホモ多量体の過剰な活性化を防ぎ、細胞死から保護する役割を有すると考えられる。

## 学位論文の骨格となる参考論文

- ・ 主要関連論文

**Fumiya Uefune**, Toru Aonishi, Tetsuya Kitaguchi, Harumi Takahashi, Susumu Seino, Daisuke Sakano, Shoen Kume.

Dopamine Negatively Regulates Insulin Secretion Through Activation of D1-D2 Receptor heteromer. *Diabetes*. (in press). doi: 10.2337/db21-0644.

- ・ その他の関連論文

Daisuke Sakano, **Fumiya Uefune**, Hiraku Tokuma, Yuki Sonoda, Kumi Matsuura, Naoki Takeda, Naomi Nakagata, Kazuhiko Kume, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume.

Vmat2 safeguards b-cells against dopamine cytotoxicity under high-fat diet-induced stress. *Diabetes*. 69, 2377–2391. doi.org/10.2337/db20-0207.

- ・ 学会発表

○Fumiya Uefune, Yuki Sonoda, Daisuke Sakano, Toru Aonishi, Shoen Kume. Analysis of Vmat2 mediated regulation in insulin secretion. International Diabetes Federation 2017 Congress, 5<sup>th</sup> December 2017, Abu Dhabi, UAE.

○上船史弥、青西亨、北口哲也、高橋晴美、清野進、坂野大介、桑昭苑、舘β細胞におけるD1-D2ヘテロ多量体を介したドーパミンによるインスリン分泌抑制機構の解明、第44回日本分子生物学会、2021年12月3日、横浜

○**Fumiya Uefune**, Daisuke Sakano, Toru Aonishi, Harumi Takahashi, Shoen Kume. Dopaminestorage and production in pancreatic β-cells regulate insulin secretion in rodent. 53th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 22<sup>nd</sup> May, 2020, Kumamoto, Japan.

## 謝辞

本研究の実施に当たり、終始有益なご助言並びにご指導を賜りました東京工業大学生命理工学院の糸 昭苑教授、白木 伸明准教授、坂野 大介助教に心から感謝いたします。また、研究を遂行する上で助言並びにサポートしていただきました糸研究室の皆様には深く御礼申し上げます。

マウスの飼育にあたり東京工業大学生命理工学院廣田 順二教授ならびに東京工業大学オープンファシリティセンター動物実験施設の皆様にお世話になりました。深く感謝いたします。

DNA シークエンス解析にあたり東京工業大学オープンファシリティセンターバイオ部門の皆様にお世話になりました。深く感謝いたします。

免疫組織化学画像取得にあたり東京工業大学生命理工学院ライフサイエンス推進機器共同利用室の皆様にお世話になりました。深く感謝いたします。

TIRFM での画像解析にあたり東京工業大学情報理工学院青西 亨准教授にお世話になりました。深く感謝いたします。

pENTR/INS-Venus ベクターは神戸大学大学院医学研究科清野 進特命教授から供与されました。また、TIRFM でのインスリン分泌実験にあたり神戸大学大学院医学研究科高橋 晴美特命准教授にご助言賜りました。深く感謝いたします。

PinkFlamindo ベクターは東京工業大学科学技術創成研究院北口 哲也准教授から供与されました。深く感謝いたします。

遺伝子改変キメラマウスは熊本大学生命資源研究・支援センター技術開発分野竹田 直樹助教に作製していただきました。深く感謝いたします。

## 参考文献

- Alejandro, E. U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C., & Bernal-Mizrachi, E. (2015). Natural history of  $\beta$ -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*, 42, 19.  
<https://doi.org/10.1016/J.MAM.2014.12.002>
- Amisten, S., Atanes, P., Hawkes, R., Ruz-Maldonado, I., Liu, B., Parandeh, F., Zhao, M., Huang, G. C., Salehi, A., & Persaud, S. J. (2017). A comparative analysis of human and mouse islet G-protein coupled receptor expression. *Scientific Reports*, 7(April), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep46600>
- Arrojo e Drigo, R., Ali, Y., Diez, J., Srinivasan, D. K., Berggren, P. O., & Boehm, B. O. (2015). New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia* 2015 58:10, 58(10), 2218–2228.  
<https://doi.org/10.1007/S00125-015-3699-0>
- Aslanoglou, D., Bertera, S., Sánchez-Soto, M., Benjamin Free, R., Lee, J., Zong, W., Xue, X., Shrestha, S., Brissova, M., Logan, R. W., Wollheim, C. B., Trucco, M., Yechoor, V. K., Sibley, D. R., Bottino, R., & Freyberg, Z. (2021). Dopamine regulates pancreatic glucagon and insulin secretion via adrenergic and dopaminergic receptors. *Translational Psychiatry*, 11(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41398-020-01171-z>
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). *The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors*. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Beaulieu, J. M., Espinoza, S., & Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors – IUPHAR Review 13. *British Journal of Pharmacology*, 172(1), 1.  
<https://doi.org/10.1111/BPH.12906>
- Bonaventura, M. M., Catalano, P. N., Chamson-Reig, A., Arany, E., Hill, D., Bettler, B., Saravia, F., Libertun, C., & Lux-Lantos, V. A. (2008). GABAB receptors and glucose homeostasis: Evaluation in GABA B receptor knockout mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 294(1), 157–167.  
<https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00615.2006/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH10010852040008.JPEG>
- Borden, P., Houtz, J., Leach, S. D., & Kuruvilla, R. (2013). Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation. *Cell Reports*, 4(2), 287–301.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2013.06.019>
- Borelli, M. I., Rubio, M., García, M. E., Flores, L. E., & Gagliardino, J. J. (2003).

- Tyrosine hydroxylase activity in the endocrine pancreas: Changes induced by short-term dietary manipulation. *BMC Endocrine Disorders*, 3(1), 2–2.  
<https://doi.org/10.1186/1472-6823-3-2>
- Borroto-Escuela, D. O., Brito, I., Romero-Fernandez, W., Di Palma, M., Oflijan, J., Skieterska, K., Duchou, J., Van Craenenbroeck, K., Suárez-Boomgaard, D., Rivera, A., Guidolin, D., Agnati, L. F., & Fuxe, K. (2014). The G Protein-Coupled Receptor Heterodimer Network (GPCR-HetNet) and Its Hub Components. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8570.  
<https://doi.org/10.3390/IJMS15058570>
- Bourne, J. A. (2001). SCH 23390: The First Selective Dopamine D1-Like Receptor Antagonist. *CNS Drug Reviews*, 7(4), 399. <https://doi.org/10.1111/J.1527-3458.2001.TB00207.X>
- Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Clark, A., Walker, J. N., Johnson, P. R., & Rorsman, P. (2010).  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Is an Autocrine Excitatory Transmitter in Human Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes*, 59(7), 1694–1701.  
<https://doi.org/10.2337/DB09-0797>
- Brunnicardi, F. C., Kleinman, R., Moldovan, S., Nguyen, T. H. L., Watt, P. C., Walsh, J., & Gingerich, R. (2001). Immunoneutralization of somatostatin, insulin, and glucagon causes alterations in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas. *Pancreas*, 23(3), 302–308. <https://doi.org/10.1097/00006676-200110000-00012>
- Chen, Y., Hong, F., Chen, H., Fan, R. F., Zhang, X. L., Zhang, Y., & Zhu, J. X. (2014). Distinctive expression and cellular distribution of dopamine receptors in the pancreatic islets of rats. *Cell and Tissue Research*, 357(3), 597–606.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-014-1894-9>
- Cragg, S. J., & Rice, M. E. (2004). DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends in Neurosciences*, 27(5), 270–277. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2004.03.011>
- Dascal, N., & Kahanovitch, U. (2015). The Roles of G $\beta\gamma$  and G $\alpha$  in Gating and Regulation of GIRK Channels. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 123, pp. 27–85). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.06.001>
- Di Cairano, E. S., Moretti, S., Marciani, P., Sacchi, V. F., Castagna, M., Davalli, A., Folli, F., & Perego, C. (2016). Neurotransmitters and Neuropeptides: New Players in the Control of Islet of Langerhans' Cell Mass and Function. *Journal of Cellular Physiology*, 231(4), 756–767. <https://doi.org/10.1002/JCP.25176>
- Farino, Z. J., Morgenstern, T. J., Maffei, A., Quick, M., De Solis, A. J., Wiriyasermkul, P., Freyberg, R. J., Aslanoglou, D., Sorisio, D., Inbar, B. P., Free, R. B.,

- Donthamsetti, P., Mosharov, E. V., Kellendonk, C., Schwartz, G. J., Sibley, D. R., Schmauss, C., Zeltser, L. M., Moore, H., ... Freyberg, Z. (2019). New roles for dopamine D2 and D3 receptors in pancreatic beta cell insulin secretion. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0344-6>
- Fei, H., Zhao, B., Zhao, S., & Wang, Q. (2008). Requirements of calcium fluxes and ERK kinase activation for glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *315*(1–2), 75–84. <https://doi.org/10.1007/S11010-008-9791-8>
- Ferré, S., Casadó, V., Devi, L. A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M. J., Milligan, G., Pin, J. P., & Guitart, X. (2014). G Protein–Coupled Receptor Oligomerization Revisited: Functional and Pharmacological Perspectives. *Pharmacological Reviews*, *66*(2), 413. <https://doi.org/10.1124/PR.113.008052>
- Fuxe, K., Ferré, S., Genedani, S., Franco, R., & Agnati, L. F. (2007). Adenosine receptor–dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiology & Behavior*, *92*(1–2), 210–217. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2007.05.034>
- García-Tornadú, I., Ornstein, A. M., Chamson-Reig, A., Wheeler, M. B., Hill, D. J., Arany, E., Rubinstein, M., & Becu-Villalobos, D. (2010). Disruption of the dopamine D2 receptor impairs insulin secretion and causes glucose intolerance. *Endocrinology*, *151*(4), 1441–1450. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0996>
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, *250*(4986), 1429–1432. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2147780>
- Gylfe, E., & Tengholm, A. (2014). Neurotransmitter control of islet hormone pulsatility. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *16*(S1), 102–110. <https://doi.org/10.1111/DOM.12345>
- Harada, K., Ito, M., Wang, X., Tanaka, M., Wongso, D., Konno, A., Hirai, H., Hirase, H., Tsuboi, T., & Kitaguchi, T. (2017). Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07820-6>
- Hasbi, A., Fan, T., Alijaniam, M., Nguyen, T., Perreault, M. L., O’Dowd, B. F., & George, S. R. (2009). Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(50), 21377–21382.

- [https://doi.org/10.1073/PNAS.0903676106/SUPPL\\_FILE/0903676106SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0903676106/SUPPL_FILE/0903676106SI.PDF)
- Hasbi, A., Perreault, M. L., Shen, M. Y. F., Zhang, L., To, R., Fan, T., Nguyen, T., Ji, X., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2014). A peptide targeting an interaction interface disrupts the dopamine D1-D2 receptor heteromer to block signaling and function in vitro and in vivo: effective selective antagonism. *The FASEB Journal*, 28(11), 4806–4820. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-254037>
- Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Carmignac, D., Richardson, C. C., Robinson, I. C. A. F., Low, M. J., Christie, M. R., Persaud, S. J., & Jones, P. M. (2009). Somatostatin Secreted by Islet  $\delta$ -Cells Fulfills Multiple Roles as a Paracrine Regulator of Islet Function. *Diabetes*, 58(2), 403. <https://doi.org/10.2337/DB08-0792>
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., & Nakanishi Shigetada, S. (2010). Distinct Roles of Synaptic Transmission in Direct and Indirect Striatal Pathways to Reward and Aversive Behavior. *Neuron*, 66(6), 896–907. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.05.011>
- Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Sasaoka, T., Wang, Y., & Nakanishi, S. (2013). Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), 342–347. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1220358110/ASSET/BAD5BAEE-5037-4019-9A87-495EB8973490/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.1220358110FIG06.JPEG>
- Huypens, P., Ling, Z., Pipeleers, D., & Schuit, F. (2000). Glucagon receptors on human islet cells contribute to glucose competence of insulin release. *Diabetologia* 2000 43:8, 43(8), 1012–1019. <https://doi.org/10.1007/S001250051484>
- Kawamori, D., Kurpad, A. J., Hu, J., Liew, C. W., Shih, J. L., Ford, E. L., Herrera, P. L., Polonsky, K. S., McGuinness, O. P., & Kulkarni, R. N. (2009). Insulin Signaling in  $\alpha$ -cells Modulates Glucagon Secretion in vivo. *Cell Metabolism*, 9(4), 350. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.02.007>
- Kieffer, T. J., Heller, R. S., Unson, C. G., Weir, G. C., & Habener, J. F. (1996). Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology*, 137(11), 5119–5125. <https://doi.org/10.1210/ENDO.137.11.8895386>
- Kobayashi, M., Iaccarino, C., Saiardi, A., Heidt, V., Bozzi, Y., Picetti, R., Vitale, C., Westphal, H., Drago, J., & Borrelli, E. (2004). Simultaneous absence of dopamine D1 and D2 receptor-mediated signaling is lethal in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11465. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0402028101>

- Korner, J., Cline, G. W., Slifstein, M., Barba, P., Rayat, G. R., Febres, G., Leibel, R. L., Maffei, A., & Harris, P. E. (2019). A role for foregut tyrosine metabolism in glucose tolerance. *Molecular Metabolism*, 23, 37–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.02.008>
- Kozuka, C., Sunagawa, S., Ueda, R., Higa, M., Ohshiro, Y., Tanaka, H., Shimizu-Okabe, C., Takayama, C., Matsushita, M., Tsutsui, M., Ishiuchi, S., Nakata, M., Yada, T., Miyazaki, J. I., Oyadomari, S., Shimabukuro, M., & Masuzaki, H. (2015). A novel insulinotropic mechanism of whole grain-derived  $\gamma$ -oryzanol via the suppression of local dopamine D2 receptor signalling in mouse islet. *British Journal of Pharmacology*, 172(18), 4519. <https://doi.org/10.1111/BPH.13236>
- Lee, S. P., So, C. H., Rashid, A. J., Varghese, G., Cheng, R., Lança, A. J., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2004). Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35671–35678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401923200>
- Lindström, P. (1986). Aromatic-l-amino-acid decarboxylase activity in mouse pancreatic islets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 884(2), 276–281. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90174-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90174-1)
- Lundquist, I., Panagiotidis, G., & Stenstrom, A. (1991). Effect of L-dopa administration on islet monoamine oxidase activity and glucose-induced insulin release in the mouse. *Pancreas*, 6(5), 522–527. <https://doi.org/10.1097/00006676-199109000-00004>
- Maffei, A., Segal, A. M., Alvarez-Perez, J. C., Garcia-Ocaña, A., & Harris, P. E. (2015). Anti-incretin, Anti-Proliferative action of dopamine on B-Cells. *Molecular Endocrinology*, 29(4), 542–557. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1273>
- Mitok, K. A., Freiberger, E. C., Schueler, K. L., Rabaglia, M. E., Stapleton, D. S., Kwiecien, N. W., Malec, P. A., Hebert, A. S., Broman, A. T., Kennedy, R. T., Keller, M. P., Coon, J. J., & Attie, A. D. (2018). Islet proteomics reveals genetic variation in dopamine production resulting in altered insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 293(16), 5860–5877.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001102>
- Nakanishi, S., Hikida, T., & Yawata, S. (2014). Distinct dopaminergic control of the direct and indirect pathways in reward-based and avoidance learning behaviors. *Neuroscience*, 282, 49–59.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.04.026>
- Neumeyer, J. L., Kula, N. S., Bergman, J., & Baldessarini, R. J. (2003). Receptor affinities of dopamine D1 receptor-selective novel phenylbenzazepines. *European*

- Journal of Pharmacology*, 474(2–3), 137–140. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)02008-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)02008-9)
- Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Ishida, H., & Nagamatsu, S. (2002). Imaging Exocytosis of Single Insulin Secretory Granules with Evanescent Wave Microscopy: DISTINCT BEHAVIOR OF GRANULE MOTION IN BIPHASIC INSULIN RELEASE. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 3805–3808. <https://doi.org/10.1074/JBC.C100712200>
- Okashah, N., Wan, Q., Ghosh, S., Sandhu, M., Inoue, A., Vaidehi, N., & Lambert, N. A. (2019). Variable G protein determinants of GPCR coupling selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(24), 12054–12059. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1905993116/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Park, S., Jiang, H., Zhang, H., & Smith, R. G. (2012). Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 19003–19008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209590109>
- Pecic, S., Milosavic, N., Rayat, G., Maffei, A., & Harris, P. E. (2019). A novel optical tracer for VMAT2 applied to live cell measurements of vesicle maturation in cultured human  $\beta$ -cells. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-41891-X>
- Pei, L., Li, S., Wang, M., Diwan, M., Anisman, H., Fletcher, P. J., Nobrega, J. N., & Liu, F. (2010). Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nature Medicine*, 16(12), 1393–1395. <https://doi.org/10.1038/nm.2263>
- Perreault, M. L., Hasbi, A., Alijaniam, M., Fan, T., Varghese, G., Fletcher, P. J., Seeman, P., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2010). The dopamine D1-D2 receptor heteromer localizes in dynorphin/enkephalin neurons: Increased high affinity state following amphetamine and in schizophrenia. *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36625–36634. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.159954/ATTACHMENT/CA8BE8B4-3D26-49E3-AF9B-A741B1F022EC/MMC1.ZIP>
- Persson-Sjögren, S., Forsgren, S., & Täljedal, I. B. (2002). Tyrosine hydroxylase in mouse pancreatic islet cells, in situ and after syngeneic transplantation to kidney. *Histology and Histopathology*, 17(1), 113–121. <https://doi.org/10.14670/HH-17.113>
- Raffo, A., Hancock, K., Polito, T., Xie, Y., Andan, G., Witkowski, P., Hardy, M.,

- Barba, P., Ferrara, C., Maffei, A., Freeby, M., Goland, R., Leibel, R. L., Sweet, I. R., & Harris, P. E. (2008). Role of vesicular monoamine transporter type 2 in rodent insulin secretion and glucose metabolism revealed by its specific antagonist tetrabenazine. *Journal of Endocrinology*, *198*(1), 41–49.  
<https://doi.org/10.1677/JOE-07-0632>
- Rashid, A. J., So, C. H., Kong, M. M. C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2007). D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(2), 654–659.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0604049104>
- Reetz, A., Solimena, M., Matteoli, M., Folli, F., Takei, K., & De Camilli, P. (1991). GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *The EMBO Journal*, *10*(5), 1275.  
<https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1991.TB08069.X>
- Reinert, R. B., Cai, Q., Hong, J. Y., Plank, J. L., Aamodt, K., Prasad, N., Aramandla, R., Dai, C., Levy, S. E., Pozzi, A., Labosky, P. A., Wright, C. V. E., Brissova, M., & Powers, A. C. (2014). Vascular endothelial growth factor coordinates islet innervation via vascular scaffolding. *Development (Cambridge)*, *141*(7), 1480–1491. <https://doi.org/10.1242/DEV.098657/VIDEO-5>
- Richfield, E. K., PENNEY-f, J. B., & YOUNGt, A. B. (1989). ANATOMICAL AND AFFINITY STATE COMPARISONS BETWEEN DOPAMINE D<sub>1</sub> AND D<sub>2</sub> RECEPTORS IN TI-IE RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM maximal number of binding sites. *30*(3), 167–777.
- Rodriguez-Diaz, R., Abdulreda, M. H., Formoso, A. L., Gans, I., Ricordi, C., Berggren, P. O., & Caicedo, A. (2011). AUTONOMIC AXONS IN THE HUMAN ENDOCRINE PANCREAS SHOW UNIQUE INNERVATION PATTERNS. *Cell Metabolism*, *14*(1), 45. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.05.008>
- Rodriguez-Diaz, R., Dando, R., Jacques-Silva, M. C., Fachado, A., Molina, J., Abdulreda, M. H., Ricordi, C., Roper, S. D., Berggren, P. O., & Caicedo, A. (2011). Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming human beta cell function. *Nature Medicine*, *17*(7), 888.  
<https://doi.org/10.1038/NM.2371>
- Rubi, B., Ljubicic, S., Pournourmohammadi, S., Carobbio, S., Armanet, M., Bartley, C., & Maechler, P. (2005). Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic

- beta cells and mediate inhibition of insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 36824–36832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505560200>
- Saisho, Y., Harris, P. E., Butler, A. E., Galasso, R., Gurlo, T., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2008). Relationship between pancreatic vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and insulin expression in human pancreas. *Journal of Molecular Histology*, 39(5), 543–551. <https://doi.org/10.1007/s10735-008-9195-9>
- Sakano, D., Choi, S., Kataoka, M., Shiraki, N., Uesugi, M., Kume, K., & Kume, S. (2016). Dopamine D2 Receptor-Mediated Regulation of Pancreatic  $\beta$  Cell Mass. *Stem Cell Reports*, 7(1), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.015>
- Sakano, D., Shiraki, N., Kikawa, K., Yamazoe, T., Kataoka, M., Umeda, K., Araki, K., Mao, D., Matsumoto, S., Nakagata, N., Andersson, O., Stainier, D., Endo, F., Kume, K., Uesugi, M., & Kume, S. (2014). VMAT2 identified as a regulator of late-stage  $\beta$ -cell differentiation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 141–148. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1410>
- Sakano, D., Uefune, F., Tokuma, H., Sonoda, Y., Matsuura, K., Takeda, N., Nakagata, N., Kume, K., Shiraki, N., & Kume, S. (2020). Vmat2 safeguards b-cells against dopamine cytotoxicity under high-fat diet–induced stress. *Diabetes*, 69(11), 2377–2391. <https://doi.org/10.2337/db20-0207>
- Sánchez-Soto, M., Casadó-Anguera, V., Yano, H., Bender, B. J., Cai, N. S., Moreno, E., Canela, E. I., Cortés, A., Meiler, J., Casadó, V., & Ferré, S. (2018).  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2C-Adrenoceptors as Potential Targets for Dopamine and Dopamine Receptor Ligands. *Molecular Neurobiology*, 55(11), 8438. <https://doi.org/10.1007/S12035-018-1004-1>
- Seino, S., Takahashi, H., Fujimoto, W., & Shibasaki, T. (2009). Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. In *Diabetes, Obesity and Metabolism* (Vol. 11, Issue SUPPL. 4, pp. 180–188). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01108.x>
- Seino, Susumu, Shibasaki, T., & Minami, K. (2011). Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2118. <https://doi.org/10.1172/JCI45680>
- Shen, M. Y. F., Perreault, M. L., Bambico, F. R., Jones-Tabah, J., Cheung, M., Fan, T., Nobrega, J. N., & George, S. R. (2015). Rapid anti-depressant and anxiolytic actions following dopamine D1–D2 receptor heteromer inactivation. *European Neuropsychopharmacology*, 25(12), 2437–2448. <https://doi.org/10.1016/J.EURONEURO.2015.09.004>
- Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M.,

- Zhang, C., Tamamoto, A., Satoh, T., Miyazaki, J., & Seino, S. (2007). Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(49), 19333. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0707054104>
- Simpson, N., Maffei, A., Freeby, M., Burroughs, S., Freyberg, Z., Javitch, J., Leibel, R. L., & Harris, P. E. (2012). Dopamine-mediated autocrine inhibitory circuit regulating human insulin secretion in vitro. *Molecular Endocrinology*, *26*(10), 1757–1772. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1101>
- So, C. H., Verma, V., Alijaniam, M., Cheng, R., Rashid, A. J., O’Dowd, B. F., & George, S. R. (2009). Calcium signaling by dopamine D5 receptor and D5-D2 receptor hetero-oligomers occurs by a mechanism distinct from that for dopamine D1-D2 receptor hetero-oligomers. *Molecular Pharmacology*, *75*(4), 843–854. <https://doi.org/10.1124/mol.108.051805>
- Teitelman, G., Joh, T. H., Reis, D. J., Gershon, \*, Teitelman, M., Rothman, G., & Reis, T. H. &. (1981). Transformation of catecholaminergic precursors into glucagon (A) cells in mouse embryonic pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(8), 5225. <https://doi.org/10.1073/PNAS.78.8.5225>
- Ustione, A., & Piston, D. W. (2012). Dopamine synthesis and D3 receptor activation in pancreatic  $\beta$ -cells regulates insulin secretion and intracellular  $[Ca^{2+}]$  oscillations. *Molecular Endocrinology*, *26*(11), 1928–1940. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1226>
- Ustione, A., Piston, D. W., & Harris, P. E. (2013a). Minireview: Dopaminergic regulation of insulin secretion from the pancreatic islet. In *Molecular Endocrinology* (Vol. 27, Issue 8, pp. 1198–1207). Mol Endocrinol. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1083>
- Ustione, A., Piston, D. W., & Harris, P. E. (2013b). Minireview: Dopaminergic Regulation of Insulin Secretion from the Pancreatic Islet. *Molecular Endocrinology*, *27*(8), 1198. <https://doi.org/10.1210/ME.2013-1083>
- Wells, C. A., Zurawski, Z., Betke, K. M., Yim, Y. Y., Hyde, K., Rodriguez, S., Alford, S., & Hamm, H. E. (2012). G $\beta\gamma$  inhibits exocytosis via interaction with critical residues on soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-25. *Molecular Pharmacology*, *82*(6), 1136–1149. <https://doi.org/10.1124/mol.112.080507>
- Yang, J. K., Lu, J., Yuan, S. S., Asan, Cao, X., Qiu, H. Y., Shi, T. T., Yang, F. Y., Li, Q., Liu, C. P., Wu, Q., Wang, Y. H., Huang, H. X., Kayoumu, A., Feng, J. P., Xie,

- R. R., Zhu, X. R., Liu, C., Yang, G. R., ... Xu, A. (2018). From Hyper- to Hypoinsulinemia and Diabetes: Effect of KCNH6 on Insulin Secretion. *Cell Reports*, 25(13), 3800-3810.e6.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.12.005/ATTACHMENT/461FB4BA-6B6A-4B97-A790-A4BC987EF022/MMC1.PDF>
- Yim, Y. Y., Zurawski, Z., & Hamm, H. (2018). GPCR Regulation of Secretion. *Pharmacology & Therapeutics*, 192, 124.  
<https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2018.07.005>
- Yoon, E. J., Gerachshenko, T., Spiegelberg, B. D., Alford, S., & Hamm, H. E. (2007). Gβγ interferes with Ca<sup>2+</sup>-dependent binding of synaptotagmin to the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex. *Molecular Pharmacology*, 72(5), 1210–1219.  
<https://doi.org/10.1124/mol.107.039446>
- Zhang, Y., Zheng, R., Meng, X., Wang, L., Liu, L., & Gao, Y. (2015). Pancreatic endocrine effects of dopamine receptors in human islet cells. *Pancreas*, 44(6), 925–929. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000357>