

学位論文題名

灌流ラット心臓におけるG蛋白質 β サブユニットの
 β アドレナリン受容体刺激による細胞内局在の変化

学位論文内容の要旨

G蛋白質は、細胞膜内側にあり細胞膜上にある受容体からの情報伝達を制御する α 、 β 、 γ 三量体構造からなる機能蛋白質である。現在までに α サブユニットは17種類、 β サブユニットは5種類、 γ サブユニットは6種類同定されている。従来、G蛋白質 α サブユニット($G\alpha$)が効果器に対して能動的な機能を司り、G蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニット($G\beta\gamma$)は $G\alpha$ の機能を補助する付加的なものであると考えられてきた。しかし最近になって、 $G\beta\gamma$ も効果器と直接に相互作用し、 $G\beta\gamma$ が情報伝達系において重要な役割を果たすことが明らかになった。また最近心臓において、G蛋白質 β サブユニット($G\beta$)のアイソフォーム特異的な発現と細胞内局在が、当研究室より報告された。

本研究の目的は、慢性心不全時にみられるカテコラミンによる β アドレナリン受容体過剰刺激状態が、心臓に特異的に存在する $G\beta$ の細胞内局在にどのような変化を引き起こすかを検討し、その分子レベルのメカニズムと意義を明らかにすることである。

【方法】

1. 実験動物

雄性Sprague-Dawleyラット(9週齢、体重約350g)を用いた。

2. 抗 $G\beta$ 抗体

抗 $G\beta$ ポリクローナル抗体(β -636, β -637, β -638)は、ヒト $G\beta$ のアイソフォーム間で最も相同性の低いN末端から26~39番目のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドである、ADATLSQITNNIDP, GDSTLTQITAGLDP, ADVTLAELVSGLEVをそれぞれウサギに接種し作製したもので、 β -636は β_1 に、 β -637は β_2 に、 β -638は β_3 に特異的なポリクローナル抗体であることがすでに証明されている。

3. 灌流心臓作成

心臓はランゲンドルフ法により60mmHgのK-H(Krebs-Henseleit bicarbonate)緩衝液

で10分間予備灌流した後、 $10\ \mu\text{M}$ のイソプロテレノール（非選択的 β 受容体刺激薬）を含んだ緩衝液、あるいは 0.1mM のエピネフリンを含んだ緩衝液を用いて30分間灌流した。また β アドレナリン受容体拮抗薬の影響をみる実験では、10分間予備灌流した後、 0.1mM のプロプラノロール（非選択的 β 受容体拮抗薬）または $10\ \mu\text{M}$ のCGP20712A（ β_1 受容体選択的拮抗薬）を含んだ緩衝液を5分間灌流した後、 $10\ \mu\text{M}$ のイソプロテレノールの存在下に 0.1mM のプロプラノロールまたは $10\ \mu\text{M}$ のCGP20712A同時投与した緩衝液を用いて30分間灌流した。灌流後の心臓は迅速に液体窒素にて凍結し、 -80°C に保存した。

4. 心臓細胞分画の調整

心臓全体のホモジェネートを $1000\times g$ で10分間遠心し、得られた上清を $105,000\times g$ で1時間遠心し、得られた上清を細胞質分画、沈殿物を粗膜標本とした。蛋白の定量にはLowry法を使用した。

5. ウェスタンブロッティングによるG β 蛋白量の比較

各心臓の細胞質および粗膜標本をそれぞれ $60\ \mu\text{g}$ あるいは $180\ \mu\text{g}$ ずつ、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離した後、PVDF(polyvinylidene difluoride)膜に電氣的に転写した。そのPVDF膜を3%ウシ血清アルブミンを含むTTBS液にて3時間ブロッキングし、各G β アイソフォームに特異的な一次抗体を室温にて8時間反応させた後、二次抗体として抗ウサギ・ヤギ抗体を1時間反応させた。あらかじめ1時間反応させておいたStreptavidinとBiotinylated Alkaline Phosphataseを加え、さらに1時間反応させた。次に発色液により5分間反応させて発色させた後、反応を止めた。

【結果】

(1)細胞質分画G β 量のイソプロテレノールによる変化

灌流ラット心臓の細胞質分画のG蛋白質 β_3 サブユニット(G β_3)量の変化を、ウェスタンブロット法によって解析した結果、 $36\sim 37\text{kDa}$ にG β_3 が検出された。イソプロテレノール灌流心臓、エピネフリン灌流心臓のG β_3 量は、ともにコントロールに比較して有意な減少を認めた。G蛋白質 β_1 サブユニット(G β_1)、G蛋白質 β_2 サブユニット(G β_2)はそれぞれ 36kDa 、 35kDa に検出され、イソプロテレノール灌流、エピネフリン灌流による有意な量的変化は認めなかった。

(2)細胞膜分画G β 量のイソプロテレノールによる変化

灌流心臓の細胞膜分画におけるG β_3 が、 $36\sim 37\text{kDa}$ に検出された。イソプロテレノール灌流、エピネフリン灌流心臓のG β_3 量は、ともにコントロールに対して有意な増加を認めた。G β_1 、G β_2 はそれぞれ 36kDa 、 35kDa に検出され、イソプロテレノール灌流、エピネフリン灌流による有意な変化は認めなかった。

(3) イソプロテレノールにより減少した細胞質分画 $G\beta_3$ 量のプロプラノロールあるいはCGP20712A 同時投与の影響

イソプロテレノール灌流と、イソプロテレノールとCGP20712A 両方を含んだ灌流心臓細胞質 $G\beta_3$ 量は、コントロールに比べ有意な減少を認めた。またイソプロテレノールとプロプラノロール両方を含んだ灌流心臓の $G\beta_3$ 量は、コントロールに比較して有意な変化を認めなかった。

(4) イソプロテレノールにより増加した細胞膜分画 $G\beta_3$ 量のプロプラノロールあるいはCGP20712A 同時投与による影響

イソプロテレノール灌流心臓では、コントロールに比べ細胞膜 $G\beta_3$ 量が有意に増加した。またイソプロテレノールとプロプラノロール、あるいはイソプロテレノールとCGP20712A を含んだ灌流心臓の $G\beta_3$ 量はコントロールに比較して有意な変化を認めなかった。

【考察】

$G\alpha$ と $G\beta\gamma$ が細胞膜に局在しているという従来の概念とは異なり、心臓における $G\beta_3$ が細胞膜分画ではなく、ほとんど細胞質分画に存在していることを当研究室が最近報告した。

本研究において β アドレナリン受容体刺激により、細胞質分画、細胞膜分画の $G\beta_1$, $G\beta_2$ 量は変化をせず、 $G\beta_3$ のみ特異的に細胞質分画において減少し、細胞膜分画において増加した。さらに 非選択的 β 受容体拮抗薬によりこれらの変化は遮断され、 β_1 受容体選択的拮抗薬により細胞質分画の減少のみを認めた。これらの実験結果は β アドレナリン受容体刺激により $G\beta_3$ の一部が細胞質分画から細胞膜分画に移行した可能性を示唆する。

$G\beta$ は常に G 蛋白質 γ サブユニット ($G\gamma$) と会合して $G\beta\gamma$ 二量体として細胞内に存在する。 $G\gamma$ はイソプレニル化による脂質修飾を受け、細胞膜に存在している。これとは対照的に $G\beta_3$ が細胞質に局在する生化学的理由の一つとして、 $G\beta_3$ と結合している $G\gamma$ が通常脂質修飾を受けていない可能性がある。その根拠は、網膜より精製した $G\beta_3$ と結合している $G\gamma$ の N 末端の配列は、従来の $G\gamma$ のアミノ酸配列とは異なっており、新しい $G\gamma$ である可能性が高いという Fung 等の報告である。 $G\beta_3$ の細胞内移動はこのような脂質修飾の変化によるのか、他のメカニズムにより $G\beta_3$ 自身が細胞質から細胞膜へ移行する機能をもっているのか不明である。今後、どのような分子メカニズムが $G\beta_3$ の細胞内移動と局在に関わっているのかが興味深く、検討が必要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学位論文題名

灌流ラット心臓におけるG蛋白質 β サブユニットの β アドレナリン受容体刺激による細胞内局在の変化

G蛋白質は、細胞膜内側にあり細胞膜上にある受容体からの情報伝達を制御する α 、 β 、 γ 三量体構造からなる機能蛋白質である。現在までに α サブユニットは17種類、 β サブユニットは5種類、 γ サブユニットは6種類同定されている。従来、G蛋白質 α サブユニットが効果器に対して能動的な機能を司り、 β γ サブユニットは α サブユニットの機能を補助する付加的なものであると考えられてきた。しかし最近になって、 β γ サブユニットも効果器と直接に相互作用し、情報伝達系において重要な役割を果たすことが明らかになってきている。本研究では、慢性心不全などにみられる β アドレナリン受容体刺激状態が、心臓に特異的に存在するG蛋白質 β サブユニットの細胞内局在にどのような変化を引き起こすかを検討した。

方法としてはSprague-Dawley 雄性ラットの心臓を用いて、ランゲンドルフ法により、クレブスヘンセライト緩衝液で10分間予備灌流した後、10 μ Mのイソプロテレノール、あるいは100 μ Mのエピネフリンを用いて30分間灌流した。また β アドレナリン受容体拮抗薬の影響をみる実験では、10分間予備灌流した後、100 μ Mのプロプラノロールまたは10 μ Mの β_1 アドレナリン受容体選択的拮抗薬であるCGP20712Aを5分間灌流した後、10 μ Mのイソプロテレノールと100 μ Mのプロプラノロール存在下または10 μ Mのイソプロテレノールと10 μ MのCGP20712A存在下で30分間灌流した。これらの心臓全体のホモジェネートを1000 \times gで10分間遠心し、得られた上清を105,000 \times gで1時間遠心し、得られた上清を細胞質分画、沈殿を粗膜標本とした。各心臓の細胞質および粗膜標本を用いてウエスタンブロット法にて β_1 、 β_2 、 β_3 各サブユニット量を比較した。ウエスタンブロット法には、各アイソフォームに対する特異性が証明されている抗 β サブユニットポリクローナル抗体を

用いた。

その結果、細胞質分画におけるイソプロテレノール灌流心臓、エピネフリン灌流心臓の β_3 サブユニット量は、ともにコントロールと比較して有意な減少を認めた。また β_1 サブユニット、 β_2 サブユニットはそれぞれイソプロテレノール灌流、エピネフリン灌流による有意な量的変化を認めなかった。これに対して細胞膜分画におけるイソプロテレノール灌流心臓、エピネフリン灌流心臓の β_3 サブユニットは、ともにコントロールと比較して有意な増加を認めた。また β_1 サブユニット、 β_2 サブユニットはそれぞれ、イソプロテレノール灌流、エピネフリン灌流による有意な変化は認めなかった。イソプロテレノールにより減少した細胞質分画 β_3 サブユニット量のプロプラノロールあるいはCGP20712Aによる β アドレナリン受容体遮断の影響を検討した結果、イソプロテレノール、イソプロテレノールとCGP20712A存在下の β_3 サブユニット量は、コントロールに比べ有意な減少を認めた。またイソプロテレノールとプロプラノロール存在下の β_3 サブユニット量は、コントロールと比較して有意な変化を認めなかった。これに対して、イソプロテレノールにより増加した細胞膜分画 β_3 サブユニット量のプロプラノロールあるいはCGP20712Aによる β アドレナリン受容体遮断の影響を検討した結果、イソプロテレノールでは、コントロールに比べ、 β_3 サブユニット量は有意に増加した。またイソプロテレノールとプロプラノロール、あるいはイソプロテレノールとCGP20712A存在下の β_3 サブユニット量はコントロールと比較して有意な変化を認めなかった。

これらの結果より、 β_1 アドレナリン受容体刺激により β_3 サブユニットの一部が細胞質から細胞膜に移行した可能性が示唆された。

口頭発表の審査会において、菅野教授よりG蛋白質 β_3 サブユニットの量的変化が β アドレナリン受容体以外の受容体刺激で起こるかどうかについて、 β_3 サブユニットと相互作用している可能性のある他の蛋白質についての質問がなされた。石橋教授より、 β_3 サブユニットと会合している γ サブユニットも同時に細胞膜に移行しているかどうか、また γ サブユニットの脂質修飾について、 β_3 サブユニットが細胞質から細胞膜へ移動する機構について、 β アドレナリン受容体刺激時間についての質問がなされた。これらに対し、申請者はおおむね妥当な回答を行った。その後行った菅野、石橋両審査教授との試問においても、概ね妥当な回答がなされた。

本研究は、 β アドレナリン受容体刺激によりG蛋白質 β_3 サブユニットが細胞質から細胞膜に一部移行した可能性を示唆したものであり、このことはG蛋白質においては初めての報告であり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。