

学 位 論 文 題 名

心筋ムスカリン受容体刺激非依存性の抑制性 GTP 結合蛋白質 Gi の基礎活性に関する研究

—心筋における β 受容体機構に対する Gi 基礎活性による抑制性調節発現の機序およびその生理的意義—

学位論文内容の要旨

β アドレナリン受容体 (β AR) 機構は、生体内で心筋収縮力を増強させる主要な情報伝達系であるが、この系で中心的役割を担うアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性は刺激性 GTP 結合蛋白質 (Gs) 活性により促進される一方、ムスカリン (M) 受容体刺激により亢進する抑制性 GTP 結合蛋白質 (Gi) 活性により抑制されるという二重制御を受けている。Gi による AC 活性抑制系については、M 受容体に対するアゴニスト刺激がない場合にも Gi がその基礎活性により、緊張性に AC 活性に抑制性のシグナルを発していることが従来より試験管内の培養心筋細胞を用いた実験系で示唆されている。しかしながら、生体位心臓においても Gi が受容体刺激が存在しなくても緊張性に AC 活性を抑制しているかどうかは明らかにされていない。また、この緊張性抑制の原因となる Gi の基礎活性が生じる機序については十分には解明されていない。試験管内での実験で Gi の α サブユニット (Gi_α) を ADP リボシル化することにより Gi と受容体とを脱共役状態にする PTX が Gi による緊張性抑制を消失させることから、アゴニストが結合していない Gi 共役型受容体 (いわゆる empty receptor) による Gi の活性化が、Gi の基礎活性の本態である可能性が提唱されている。

そこで本研究ではこの Gi による緊張性抑制について以下のような詳細な検討を加えてみた。PTX の静注という *in situ* の PTX 処置を施したウサギより得た心室筋膜蛋白標品を用いて、1) 種々の刺激下での心筋 AC 活性が増大しているかどうか、また心筋 β AR 機能に変化が生じているかどうかについて評価し、Gi 基礎活性が心筋 AC 活性さらには心筋 β AR 機能に及ぼす影響の検討、2) ウサギ心室筋膜蛋白標品における種々の刺激下での AC 活性に及ぼす M 受容体拮抗薬単独添加の影響を *in vitro* で評価し、empty な M 受容体による Gi 活性化を介した AC 活性抑制現象の有無の検討、3) 最近 β_2 AR が Gs 以外に PTX 感受性 G 蛋白質 (Gi/Go) と共役していることを示唆する報告もあるので、AC 活性に与える β_2 AR 拮抗薬の影響についても 2) と同様の手法で評価し、 β_2 AR による Gi 活性化を介した AC 活性抑制現象の有無の検討をおこなった。

すなわち、ウサギに PTX $10 \mu\text{g/kg}$ (PTX 群)、あるいは生理的食塩水 (対照群) を静注し、40 時間後に心室筋の膜蛋白標品を作製し、 $[^{125}\text{I}]$ iodocyanopindolol ($[^{125}\text{I}]$ ICYP) および Isoproterenol (ISO) を用いた受容体結合実験により β 受容体機能を、Salomon の方法により AC 活性を測定して両群間で比較検討した。対照群の膜標品を用いて $1 \mu\text{M}$ の atropine (AT: 非選択的 M 受容体拮抗薬)、 $1 \mu\text{M}$ の AF-DX 114 (AF: M_2 選択的 M 受容体拮抗薬) あるいは 10 nM の ICI 118,551 (ICI: β_2 AR 選択的拮抗薬) 存在下で AC 活性を測定して、各受容体アゴニスト非存在下での各薬剤の AC 活性に与える直接作用を評価した。 $10 \mu\text{g/kg}$ の PTX 静注で生体位ウサギ心筋 Gi_α の十分な ADP リボシル化が生じることは、PTX 群の心室筋粗膜蛋白標品における *in vitro* での Gi_α の ADP リボシル化反応 (外来的に添加した PTX 触

媒下での、 G_i への $[^{32}P]$ NADからの $[^{32}P]$ ADP-riboseの取り込み反応)の程度が対照群の膜標品のそれと比較して著明に低下していることにより、あらかじめ確認した。

得られた結果は次のとおりである。AC活性基礎値は対照群とPTX群とで差がなかったが、GTP類似体である5'-guanylyl imidodiphosphate (GppNHp: $1.0 \times 10^{-6} \sim 10^{-3} M$)によるGs刺激下、およびISO($10^{-9} \sim 10^{-4} M$)による β AR刺激下でのAC活性上昇反応がPTX群では対照群と比較して有意に増強していた。すなわち、*in situ*のPTX処置によっても、Gsあるいは β AR刺激下でのAC活性に対して、 G_i がその基礎活性による緊張性の抑制的情報伝達信号を発していることが確認された。また、 $[^{125}I]$ ICYPの結合飽和曲線のScatchard解析により求めた β AR密度については、有意な増減は認められなかったが、PTX処置により β ARのISOに対する高親和性結合部位の有意な増加が認められた。 β ARのアゴニストに対する高親和性結合部位はGsと機能的共役状態にある分画とされているので、この受容体結合実験の結果は G_i がその基礎活性により β ARとGsとの機能的共役状態に抑制的影響を及ぼしていることを示唆している。一方、M受容体拮抗薬の*in vitro*の処置ではAT、AFのいずれについても、AC活性基礎値には影響せず、GppNHp ($10^{-4} \sim 10^{-3} M$)によるGs刺激下およびISO ($10^{-8} \sim 10^{-4} M$)による β AR刺激下でのAC活性上昇反応を増大させ、PTXの*in situ*処置の場合と類似の結果を示した。したがって、リガンドが結合していないemptyなM受容体にも G_i 活性化能があり、この機序によってAC活性に抑制性の調節を与えていることが示唆される。さらに、PTX群の膜蛋白標品についても、 $100 \mu M$ のGTP刺激下でのAC活性に与える $1 \mu M$ のATの影響を評価したところ、PTX処置で増大したAC活性は反応液中へのAT添加によっても何ら影響を受けなかった。このようにPTXおよびM受容体拮抗薬によるAC活性増大効果に相加性は認められず、PTXとM受容体拮抗薬によるAC活性増大効果はいずれも、emptyなM受容体による G_i 活性化を阻害することによりACを抑制性の調節から解放するという共通の機序を介していると考えられる。また β_2 AR拮抗薬ICIの*in vitro*の添加についてはPTX処置によるAC活性増強効果、および $100 \mu M$ のGTP、 $100 \mu M$ のGppNHp、 $10 \mu M$ のISOによるAC活性上昇反応のいずれに対する影響も認められなかった。ウサギ心室筋においては β_2 ARと G_i との共役の有無は不明であるが、少なくとも G_i の基礎活性発現への β_2 ARの関与はないものと結論される。

従来受容体拮抗薬は受容体へのアゴニストの結合を単に競合的に阻害するのみで、受容体とG蛋白質との相互作用には影響せず中立的であるとされてきたが、本研究で認められたM受容体拮抗薬の作用から示唆されるように、ある種の受容体拮抗薬の受容体への結合は受容体-G蛋白質間の相互作用に対して中立的ではなく、これを阻害し抑制的に作用すると考えられる。このようなM受容体拮抗薬の作用はM受容体への結合を介してM受容体のコンフォメーションの変化を惹起することにより発現すると考えられ、結果的に G_i のADPリボシル化によりそのコンフォメーションの変化を介してM受容体-Gi間の共役を阻害するとされるPTXと類似の効果が認められたものと推論される。

以上より、ウサギ心室筋においては G_i 共役型受容体に対するアゴニストによる刺激がなくても、 G_i はACおよび β AR-Gs間の機能的共役状態に対して緊張性の抑制性シグナルを発していること、この G_i の基礎活性発現には主としてリガンドと結合していないemptyなM受容体による G_i の活性化が寄与していること、が示唆された。不全心ではM受容体密度および G_i の蛋白量が増加しているとされていることを考慮すれば、不全心における β AR反応の脱感作現象に、このemptyなM受容体により惹起される抑制性の G_i の基礎活性が寄与している可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顯
副 査 教 授 菅 野 盛 夫
副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

心筋ムスカリン受容体刺激非依存性の抑制性 GTP 結合 蛋白質 Gi の基礎活性に関する研究

—心筋における β 受容体機構に対するGi基礎活性による抑制性調節発現の機序およびその生理的意義—

本研究では、従来より培養心筋細胞を用いた実験系で示唆されているように、生体位心臓においても抑制性GTP結合蛋白質(Gi)がその基礎活性によりムスカリン(M)受容体刺激に依存せずに、 β アドレナリン受容体(β AR)機構を緊張性に抑制しているかどうかを確認し、この緊張性抑制の原因となるGiの基礎活性発現の機序について検討した。

方法としては、ウサギにGi機能を阻害する百日咳毒素(PTX)10 μ g/kg(PTX群)、あるいは生理的食塩水(対照群)を静注し、40時間後に心室筋の膜蛋白標品を作製して、[¹²⁵I]iodocyanopindolol([¹²⁵I]ICYP)およびisoproterenol(ISO)を用いた受容体結合実験により β 受容体機能を、Salomonの方法によりアデニレートサイクレース(AC)活性を測定して両群間で比較検討した。また、両群の膜標品のAC活性について、M受容体アゴニスト非存在下で、1 μ Mのatropine(AT: 非選択的M受容体拮抗薬)および1 μ MのAF-DX 114(AF: M₂選択的M受容体拮抗薬)のassay mediumへの添加の影響を評価した。

GTP類似体である5'-guanylyl imidodiphosphate (GppNHp)によるGs刺激下、およびISOによる β AR刺激下でのAC活性上昇反応がPTX静注群およびM受容体拮抗薬添加群では対照群と比較して有意に増強していた。アゴニストが結合していないemptyなM受容体にもGi活性化能があり、M受容体拮抗薬のemptyなM受容体への結合はこのGi活性化を阻害するとされているので、ウサギ心室筋においてもemptyなM受容体がGiの活性化を介してAC活性を緊張性に抑制していると考えられる。さらにこのAC活性に対するPTXおよびM受容体拮抗薬による増大効果に相加性は認められず、両者のAC活性増大効果はいずれも、emptyなM受容体によるGi活性化を阻害するという共通の機序を介していると考えられた。 β AR機能については、PTX処置により β ARのISOに対する高親和性結合部位の有意な増加が認められた。 β ARのアゴニストに対する高親和性結合部位はGsと機能的共役状態にある分画とされているので、Giはその基礎活性により β ARとGsとの機能的共役状態にも抑制的影響を及ぼしていると考えられた。このように本研究により、ウサギの生体位心室筋においても、GiはM受容体に対するアゴニスト刺激に依存することなく、ACおよび β AR-Gs間の機能的共役状態に対して緊張性の抑制性シグナルを発しており、このGi

の基礎活性発現にはリガンドと結合していないemptyなM受容体によるGiの活性化が寄与していることが示唆された。

公開発表は約30名の聴衆の前で行われ、最初に副査の川口教授より*in situ*の百日咳毒素処置によるGi機能阻害の方法論、Gi活性が β 受容体機能に影響する機序、およびemptyな受容体による三量体G蛋白質活性化現象の生理的意義についての質問がなされた。その後、主査の北畠教授からGi基礎活性の心不全病態における意義を問う質問がなされ、さらに副査の菅野教授よりemptyな受容体による三量体G蛋白質活性化現象の理論モデルおよび受容体-G蛋白質間の相互作用の際の両蛋白質の構造変化、Gi活性が β 受容体-Gs相互作用に影響する機序などについての質問がなされた。また、臨床検査医学講座の村上講師からはemptyな受容体による三量体G蛋白質活性化現象の普遍性・一般性について、Giによる緊張性抑制の存在の臓器特異性とそれを規定する因子について、さらにはGoなどGi以外の百日咳毒素感受性G蛋白質のAC活性に対する緊張性抑制への関与についての質問がなされた。申請者はこれらの質問に対して、実験状況の説明を的確に行い、実験結果の解釈やその生理的および病態生理的意義に関しては他の論文や自己の研究・臨床経験を引用し、豊富な知識に基づいて明解に回答した。

本研究で示された、生体内においてemptyなM受容体によりGiが活性化され β 受容体機構に対して緊張性の抑制シグナルを発しているという現象は、M受容体密度およびGi蛋白量が増加するとされる不全心における β 受容体反応の脱感作の新たな機序として注目され、臨床的にも心不全病態の究明に貢献するものと思われる。審査担当者一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。