

学 位 論 文 題 名

ラット大脳皮質における代謝型グルタミン酸受容体と
G 蛋白の機能的連関についての検討

学位論文内容の要旨

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)は哺乳類の中樞神経に広く分布し、記憶や学習等の生理機能に重要な役割を果たす。また一方で、脳外傷、神経変性疾患、てんかん、神経症、精神分裂病等の病態への関与も指摘されている。mGluRは現在までに8つのサブタイプ(mGluR1 - mGluR8)が同定され、アミノ酸配列の相同性、二次メッセンジャー系、作働薬選択性等により3つのグループ(グループ I - III)に分類されている。mGluRと共役する細胞内情報伝達系としては、グループ I 受容体(mGluR1, mGluR5)とフォスホリパーゼ C (PLC)系、グループ II (mGluR2 - 3)及びグループ III (mGluR4, mGluR6 - 8)とアデニル酸シクラーゼ(AC)系の共役が知られており、受容体の薬理特性の研究はIP₃やcAMP等の二次メッセンジャーを指標として行われる事が多い。しかし、最近指摘されているようにmGluRはその他の細胞内情報伝達系やイオンチャネルとも共役する可能性があり、培養細胞によって二次メッセンジャーの反応が異なるという報告もある。従って、mGluRの複雑な細胞内情報伝達機構を知るためには、二次メッセンジャー以外の指標も必要と思われる。

筆者は、受容体からの情報伝達において、二次メッセンジャーの前段階に位置するG蛋白の機能に注目した。リガンドと結合したmGluRはまずG蛋白の α サブユニット(G α)と結合し、これへのGTPの結合を促進(活性化)するが、G α 自体が高親和性GTPaseであるので、GTPは加水分解されGDPに変化する。この反応を標識GTP($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$)の存在下で行わせると³²Pの定量によりG蛋白活性が評価できる。この手法は、Cassel & Selingerの手法の応用であり、当教室では様々なG蛋白共役型受容体の研究にこの手法を適用してきたが、本研究ではmGluRについて検討を行った。

実験の対象には6週齢の雄性S-Dラットの大脳皮質切片を用いた。ホモジナイズ後、膜分画を遠心分離し、これに様々な濃度の作働薬を加え、0.3 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を含む反応液とよく混和し、30℃で通常15分間インキュベートした。速やかに冷却し、活性炭を含む20 mMリン酸を加えて反応を停止させ、遠心後に上清中の遊離³²Pを定量した。測定されるGTP水解反応は、G蛋白に位置する高親和性GTPase活性と、その他の低親和性GTPase活性の和であるため、充分量の非標識GTPを加えて後者を別に測定し、前者を算出した。この高親和性GTPase活性を作働薬の存在下、非存

在下で比較する事で、mGluR刺激による活性の増加率を算出し、濃度反応曲線から最大反応およびEC₅₀値を求めた。最初に1 mMのL-グルタミン酸刺激を用いて、反応時間、反応液中のGTPやMgCl₂の濃度の影響を検討し、これらの条件を決定した後、種々のmGluR選択的作働薬、拮抗薬を用いて測定を行った。

結果は次の通りであった。反応時間を5 - 20分に設定した場合、L-グルタミン酸による高親和性GTPase活性の増加率は37 - 43 %ではほぼ一定であった。次に[γ-³²P]GTPの濃度を一定(0.1 μM)とし、非標識GTPの量を変えて測定した結果、100 μMのGTP濃度で高親和性GTPaseが飽和状態となり、低親和性GTPase活性が測定できた。高親和性GTPase活性はMgCl₂濃度に依存的で、2 - 5 mMの時に最大になった。以上より、以後の測定では反応時間を15分、MgCl₂濃度を2 mMとし、低親和性GTPase活性測定には100 μMの非標識GTPを用いた。非特異的なmGluR作働薬であるL-グルタミン酸、及びグループ II mGluR親和性が高いとされる(2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl)-glycine (DCG-IV), (2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate ((2R,4R)-APDC)), trans-(1S,3R)-Amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate ((1S,3R)-ACPD), (2S,1'S,2'S)-2-(carboxycyclopropyl)glycine (L-CCG-I)は高親和性GTPase活性を上昇させ、濃度反応曲線はS字状を呈した。力価の高い順に並べると(括弧内はEC₅₀値, μM), DCG-IV (0.21), L-CCG-I (0.90), L-グルタミン酸 (4.8), (2R,4R)-APDC (6.8), (1S,3R)-ACPD (10)の順であった。一方、グループ I および III mGluR作働薬に対する反応は乏しく、選択的グループ I mGluR作働薬である(S)-3-hydroxyphenylglycineは1 mMでも活性の上昇を示さず、キスカル酸, (RS)-3,5-dihydroxyphenylglycine, イボテン酸は軽度の反応があったが、いずれもEC₅₀値は100 μM以上であった。グループ III mGluRの強力な作働薬であるL-(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4), L-serine-O-phosphate (L-SOP)もまた高親和性GTPase活性を上昇させず、mGluR2拮抗薬でもあるL-SOPは反対に活性を低下させた。他のグループ II mGluR拮抗薬も同様に高親和性GTPase活性を低下させた。

mGluR2発現細胞でAC活性を測定した場合のmGluR作働薬のEC₅₀値の報告と、今回高親和性GTPase活性を指標にした場合のEC₅₀値は、有意な正の相関を示した(Pearson $r = 0.96$, $p < 0.002$, 傾き1.03)。ラット大脳皮質にはグループ I - III 全てのmGluRが発現しているが、高親和性GTPase活性の評価では、グループ I, III を介した反応は捉えられなかった。グループ I mGluRはG_q/G₁₁およびG_sと共役するが、これらのG蛋白は脳内での発現量が少ないため、水解反応も小さかったのかもしれない。しかし、グループ III mGluRは、グループ II と同じくG_i/G_o共役型であり、発現量も豊富である。主にAC系に共役するグループ II mGluRと異り、グループ III は生体では少量のG蛋白しか活性化せず、主にイオンチャネル等の他の情報伝達系に共役しているのかもしれない。この点について、グループ III 受容体のうち大脳皮質に多く分布するmGluR7 - 8は、AC系への共役は少なくGIRKチャネル活性化作用が強いという報告があり、今回の結果はそれを裏付けるものかもしれない。本研究では、少なくとも大脳皮質においては、mGluRグループ間でG蛋白との共役

機構に違いがある事が示唆された。今後、さらに選択性の高い作働薬、拮抗薬を用いる事により、mGluRの情報伝達機構をさらに解明できると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 司

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 渡 邊 雅 彦

学 位 論 文 題 名

ラット大脳皮質における代謝型グルタミン酸受容体と G蛋白の機能的連関についての検討

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)は、記憶や学習等の高次脳機能に関与し、また、脳外傷、神経変性疾患、てんかん、神経症、精神分裂病等の病態生理との関係が指摘され、現在注目されている受容体である。mGluRはグループI-IIIに分類され、その薬理特性の研究は、主に受容体強制発現系を用いてグループIはフォスホリパーゼC、グループII、IIIはアデニル酸シクラーゼ(AC)等の二次メッセンジャー系の活性を指標として進められた歴史がある。しかし、最近指摘されたようにmGluRは複数の細胞内情報伝達系、イオンチャネルと共役する可能性があり、その複雑な細胞内情報伝達機構の解明には二次メッセンジャー以外の指標が必要と思われる。筆者は、受容体からの情報伝達において、二次メッセンジャーの前段階に位置するG蛋白の機能に注目し、G蛋白に含まれる高親和性GTPaseの活性を評価した。対象には雄性S-Dラット大脳皮質切片を用い、作成した膜標品に様々な濃度のmGluR作働薬を加え、高親和性GTPaseにより加水分解を受け $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ から遊離する ^{32}P を定量した。また、反応時間、GTP濃度、 MgCl_2 濃度の影響についても検討した。非特異的なmGluR作働薬であるL-グルタミン酸、及び4種のグループII選択的作働薬は高親和性GTPase活性を濃度依存的に30-40%上昇させ飽和に達し、得られた EC_{50} 値は、mGluR2発現細胞でAC活性を測定した場合のmGluR作働薬の EC_{50} 値と有意な正の相関を示した。一方、選択的グループI、III作働薬に対する反応は二次メッセンジャーを指標にした場合と比較すると著しく小さく、測定感度以下であった。ラット大脳皮質にはグループI-III全てのmGluRが発現しているため、グループ間の反応の差異は受容体分布量の違いでは説明できず、グループImGluRについては共役する G_q/G_{11} 、 G_i 蛋白の性質や発現量による影響と考えられた。グループIIImGluRについては、グループIIと同じく G_q/G_{11} 共役型であるため、共役の効率の違い等、いくつかの原因が推測された。いずれにせよ、生体膜を対象にした場合に、高親和性GTPase活性は特にグループII受容体を介した細胞内情報伝達の良い指標となる事が判明し、また大脳皮質においては、mGluRグループ間でG蛋白との共役機構に違いがある事が示唆された。以上の発表に際し、質問を受け解答した。石橋輝雄教授。(1)この測定法では酵素反応の初速を捉えているか—測定中に酵素活性が次第に低下する事は避けられず、初速の正確な評価は困難であった。(2)濃度反応曲線が飽和しない場合 EC_{50} 値を評価できないのではないか—その場合は EC_{50} 値を算出する事を避けた。(3)さらに高濃度ま

で作働薬を濃度展開すべきではないか—高濃度では薬物が溶解しない場合があるため避けた。(3)G蛋白への共役が強いほど治療薬として効果があるといえるか—選択的グループII受容体作働薬に関しては示唆する報告がある。渡邊雅彦教授。(1)グループ別の反応の差は、シナプス前、後等の受容体分布の違いで説明できるか—グループIのみ後シナプスへの分布が主であるが、グループII、IIIはいずれも前シナプスに主に分布するので、反応の違いは説明できない。むしろそれぞれのシナプス膜に発現する情報伝達系の構成要素の差、あるいは受容体と結合するG蛋白のスペクトラムの差が影響すると考えられる。(2)研究の展望として分子レベルのアプローチにはどのような可能性があるか—ノックアウト動物を作り、電気生理学、行動薬理学的な手法で受容体機能を調べた研究がいくつか報告されている。ノックアウト動物の脳を用いたり、あるいは別に受容体、G蛋白を再構成した細胞を作成すれば、本研究と同じ方法で細胞内情報伝達の機構を調べる事が可能と思われる。小山司教授。向精神薬としての標的にはどのようなものがあるか—モデル動物では変性疾患、脳損傷、てんかんのモデルでグループII作働薬の効果が確認された。精神分裂病モデルでも最近行動薬理による評価が発表された。不安モデルについては演者も現在追試を試みているが、海外では既に人を対象に臨床試験が行われている。質疑応答は以上。

この論文は、生体における代謝型グルタミン酸受容体の機能解明に寄与する事が高く評価され、今後、精神疾患の病態生理の解明や、向精神薬の開発への応用が期待される。審査員一同はこれらの成績を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。