

金出政人論文内容の要旨

主論文

Desensitization of GABA_B receptor signaling by formation of protein complexes of GABA_{B2} subunit with GRK4 or GRK5.

GABA_B 受容体脱感作の機序に、G 蛋白共役型受容体リン酸化酵素 (GRK) サブタイプの GRK4 または GRK5 と、GABA_B 受容体サブユニットの GABA_{B2} 蛋白との複合体形成が関与する。

金出政人、上園保仁、松本正順、北條美能留、安藤優子、須藤結香、澄川耕二、谷山紘太郎

Journal of Cellular Physiology. 2007 Jan; 210(1):237-245

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：澄川耕二教授)

緒 言

GABA_B 受容体は GABA_{B1} と GABA_{B2} の二つの異なるサブユニットから構成される G 蛋白共役型受容体 (GPCR) である。GPCR を長期間、アゴニストで刺激し続けると反応性が弱められる。この反応性低下を脱感作 (desensitization) という。

GABA_B 受容体アゴニストであるバクロフェンは痙縮の治療薬として臨床使用されているが、バクロフェンを慢性投与すると耐性が起こる。最近、G 蛋白共役型受容体リン酸化酵素 (GRK) のサブタイプである GRK4 が GABA_B 受容体脱感作を引き起こすことが報告された。GRK サブタイプは GRK1 ~ GRK7 まであり、GRK1 と GRK7 は網膜に特異的に発現していることが知られている。我々は、バクロフェン耐性の分子メカニズムを解明するために、網膜以外の組織に発現している GRK2 ~ GRK6 の GABA_B 受容体脱感作関与の検討を行った。

対象と方法

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的検討

卵母細胞に GABA_{B1}、GABA_{B2}、内向き整流性 K チャンネル (GIRK1/2)、および各 GRK サブタイプ (GRK2 ~ 6) をそれぞれ共発現させてバクロフェンの繰り返し刺激を行い、脱感作を引き起こす GRK サブタイプの同定を行った。また、その脱感作は GRK 発現量依存性かどうかの検討も行った。

共焦点レーザー、Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) による可視化実験

Baby Hamster Kidney (BHK) 細胞に GABA_{B1}/GABA_{B2}、および GRK に蛍光蛋白を融合させたものを共発現させ、バクロフェン刺激前後での GRK-蛍光蛋白の発現様式の比較検討を行った。さらに GABA_{B1}-蛍光蛋白、GABA_{B2}-蛍光蛋白を作製し、FRET 解析を行うこ

とで、バクロフェン刺激前後の GABA_BR-GRK 蛋白複合体形成の有無を検討した。

免疫沈降および Western Blot 解析

BHK 細胞においてバクロフェン刺激前後の GABA_BR-GRK 蛋白複合体形成の有無を検討した。

結 果

方法 : GABA_{B1}、GABA_{B2} および GIRK1/2 のみを発現させた細胞ではバクロフェンによる脱感作は起こらなかった。しかし GRK4 または GRK5 を同時に発現させた細胞では 2 回目の刺激で有意な脱感作を認めた。またその脱感作は GRK4 または GRK5 の発現量に依存していた。一方、GRK2, GRK3 および GRK6 は GABA_B 受容体脱感作に関与していなかった。

方法 : GRK4 は細胞質内に一様に発現したが、バクロフェン刺激により細胞膜へ移行し、GABA_{B2} 蛋白と複合体を形成することが FRET 解析により証明された。同様に GRK5 も GABA_{B2} 蛋白と複合体を形成することがわかった。一方、GRK2, GRK3 および GRK6 は複合体を形成しなかった。

方法 : バクロフェン刺激によって GRK4-GABA_{B2} 蛋白複合体および GRK5-GABA_{B2} 蛋白複合体の形成は有意に増加した。

考 察

今回我々は、GRK4 に加えて GRK5 も GABA_B 受容体脱感作に関与していることを初めて報告した。GABA_B 受容体は中枢神経や末梢神経に加え、下垂体、膵臓、胃などの内分泌細胞にも広く発現しているが、GRK4 は精巣、小脳、腎臓などその発現が限られている。従ってほぼ全ての組織に発現していると考えられている GRK5 が、GRK4 の発現していない細胞における GABA_B 受容体脱感作に関与している可能性が示唆される。

GABA_B 受容体は二量体で機能する受容体であり、GABA_{B1} にバクロフェンが作用し、GABA_{B2} は下流の G 蛋白と共役する。今回の実験で、GRK4 および GRK5 は GABA_{B2} と複合体を形成することが判明したため、GRK4 と GRK5 は GABA_{B2} と G 蛋白との共役を阻害することで受容体脱感作を引き起こしている可能性が示唆された。

抗痙縮薬として使用されるバクロフェンの長期使用時の耐性の原因として、GABA_B 受容体蛋白や mRNA 発現量の低下、薬剤親和性の低下などが示唆されているが、バクロフェン耐性には GRK4 または GRK5 蛋白や mRNA の発現量の変化が関与する可能性があり、今後の検討が必要である。