

須藤 結香 論文内容の要旨

主 論 文

GABA_B Receptors Do Not Internalize After Baclofen Treatment, Possibly Due to a Lack of β -Arrestin Association: Study With a Real-Time Visualizing Assay

GABA_B受容体は β アレスチンと会合しないため、
バクロフェン処置後のインターナリゼーションを起こさない
-リアルタイム可視化実験による解析-

須藤結香、北條美能留、安藤優子、高田正史、村田寛明、
倉田眞治、西田教行、上園保仁

(Synapse, in press 2012 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：西田 教行 教授)

【緒言】

GABA_B受容体のアゴニストであるバクロフェンは、髄腔内に投与すること (Intrathecal Baclofen Therapy; ITB) により、脳脊髄疾患に由来する重度痙性麻痺を緩和させる治療薬として用いられている。しかし長期投与は GABA_B受容体の脱感作を引き起こし、バクロフェンが効きにくくなることが臨床的に問題となっている。

GABA_B受容体は G 蛋白共役型受容体 (GPCR) に属している。一般に GPCR の脱感作機構として、アゴニスト刺激後、受容体が GPCR リン酸化酵素 (GRK) によるリン酸化を受けると、 β アレスチン蛋白が受容体に接近して複合体を形成し、細胞内陥入 (インターナリゼーション) を引き起こすことが知られている。しかし GABA_B受容体のインターナリゼーション機構については多くの議論があり、 β アレスチンの関与についても明らかとなっていない。以前我々は GABA_B受容体の脱感作には GRK4 が関与し、GRK4 と受容体が複合体を形成することを証明した。そこで今回バクロフェン刺激による GABA_B受容体のインターナリゼーション、及び β アレスチンとの会合の有無を明らかにするために、受容体及び β アレスチンの挙動を蛍光蛋白を用いて可視化し検討した。

【対象と方法】

GABA_{B1a}サブユニット、並びに蛍光蛋白 Venus 融合 GABA_{B2}サブユニット、GRK4、蛍光蛋白 Cerulean 融合βアレスチン(サブタイプ 1 及び 2)を Baby Hamstar Kidney (BHK) 細胞に発現させた。バクロフェンで刺激した際の Venus 融合 GABA_{B2}サブユニットのインターナリゼーションの有無とβアレスチンの動態を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。比較対象として Venus 融合μオピオイド受容体、GRK2 並びに Cerulean 融合βアレスチンを共発現させ、μ受容体アゴニストである DAMGO*にて刺激した際の受容体インターナリゼーションならびにβアレスチンの動態を解析した。

次に GABA_{B2}サブユニットとβアレスチンの複合体形成の有無、ならびにμ受容体とβアレスチンの複合体形成の有無を FRET アッセイ法を用いて調べた。また各アゴニスト刺激後 60 分までの FRET 効率の経時的变化を比較した。

【結果】

Venus 融合μオピオイド受容体と Cerulean 融合βアレスチンを共発現させた細胞においては、DAMGO 処置 5 分後にβアレスチンは一過性に細胞膜へ移行し、次いで細胞膜上のμオピオイド受容体は顆粒状に変化しながら細胞内へ移行し、アゴニスト刺激による受容体インターナリゼーションが観察された。一方、Venus 融合 GABA_B受容体と Cerulean 融合βアレスチンを共発現させた細胞においては、バクロフェン刺激後、βアレスチン 1 及び 2 の膜移行、ならびに GABA_{B2}サブユニットのインターナリゼーションは観察されなかった。

DAMGO 処置 5 分後において Venus 融合μオピオイド受容体と Cerulean 融合βアレスチン 2 の FRET が認められたものの、バクロフェン処置による Venus 融合 GABA_{B2}サブユニットと Cerulean 融合βアレスチン 2 の FRET は認められなかった。

【考察】

我々は以前、バクロフェン刺激に対する GABA_B受容体の脱感作は GRK4 を介して起きることを明らかにした。しかし今回の実験において、バクロフェン刺激では GABA_B受容体とβアレスチンとの複合体形成は起きず、インターナリゼーションも観察されなかったことから、ITB 療法におけるバクロフェン耐性には、βアレスチン依存的な GABA_B受容体インターナリゼーション過程は関与しないと推察される。

近年、βアレスチンは GPCR のリン酸化部位をパターン認識し、パターンに対応して異なるシグナルを伝える「バーコード様機能」を有することが提唱されている。本研究ではバクロフェン刺激後の GABA_B受容体のリン酸化を確認するには至っていないが、GABA_B受容体と GRK4 は複合体を形成した際、受容体は GRK4 によりリン酸化されない、もしくは GRK4 によるリン酸化はβアレスチンとの結合を誘発しないタイプのものである可能性が考えられる。

ITB 療法におけるバクロフェン耐性化機序の解明には、βアレスチン非依存的な受容体インターナリゼーション機構や、インターナリゼーションとは異なる耐性化機序についてさらなる研究が必要と思われる。

略語 : DAMGO* : D-Ala(2)-N-MePhe(4)-Gly-ol(5)-enkephalin