



Synergistic activation of brain adenylate cyclase by calmodulin, and either GTP or catecholamines including dopamine

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 夏莉, 直己 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/965

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 1 1 2 号	学位授与年月日	平成 3 年 3 月 2 6 日
氏 名	夏 莉 直 己		
論文題目	<p>Synergistic activation of brain adenylate cyclase by calmodulin, and either GTP or catecholamines including dopamine (カルモジュリンと GTP、ないし、カルモジュリンとドーパミンを含むカテコールアミン類による、脳アデニル酸シクラーゼの相乗的活性化について)</p>		

医学博士 夏 莉 直 己

論文題目

Synergistic activation of brain adenylate cyclase by calmodulin, and either GTP or catecholamines including dopamine

(カルモジュリンとGTPないしドーパミンその他のカテコールアミンによる脳アデニル酸シクラーゼの相乗的活性化について)

論文の内容の要旨

カルモジュリン (calmodulin; CaM) は、多くの細胞内酵素の活性化因子として知られるカルシウム (Ca) 結合蛋白質である。脳の情報伝達系においてもその生理的意義が明らかになってきている。とりわけ、神経シナプス膜における神経伝達物質感受性アデニル酸シクラーゼのCaMによる制御は、サイクリックAMP (cAMP) とCaをセカンドメッセンジャーとするふたつの情報伝達系のクロストーク (cross-talk) として注目される。脳のドーパミン系においては、CaMの関与を示唆する行動薬理学的、生化学的報告が蓄積されつつある。しかし、*in vitro*での成績は必ずしも一致していない。すなわち、神経伝達物質ないしGTP結合蛋白質を介するアデニル酸シクラーゼの活性化と、CaMによるこの酵素の活性化とは独立であるとする報告と、これらのアクチベーターによる活性化には相乗的效果があるとする報告がある。本研究では、GTP存在下でのCaM単独、およびCaMとドーパミン、CaMとD₁レセプター特異的アゴニストであるSKF38393の組合せが、ラット線条体アデニル酸シクラーゼ活性に及ぼす効果について検討した。同時に、大脳皮質β-アドレナリン系での活性化についても検討を加えた。これらの異なった情報伝達路の活性化にCaMが共通して関与する可能性を示した。

ラットの線条体と大脳皮質から、EGTAで洗浄してCa²⁺結合性の内因性CaMを除去したシナプス膜標品を調製して実験に供した。種々の活性化因子存在下に、本膜標品のアデニル酸シクラーゼ活性のCa濃度依存性を調べた。GTPは基礎活性をほぼ一様に増加させた。CaM刺激時の活性はpCa 6.2で最大となり、高濃度Caでは活性は抑制された。CaMとGTP同時刺激では、pCa 6.2および5.7でそれぞれの単独刺激時の和より活性は有意な増加を示した。cAMP分解酵素であるフォスフォジエステラーゼ (PDE) 活性はCaMの有無で変化せず、GTPとCaMによるアデニル酸シクラーゼに対する相乗的效果はPDE活性の変化によるものではないことがわかった。線条体と大脳皮質ではCa濃度依存性が若干異なったが、両方の膜にこの相乗的效果は認められた。外から加えたCaMは、アデニル酸シクラーゼの活性を増強させた (pCa 6.2) ばかりでなく、GTP存在下に、線条体ではドーパミンアゴニストと、大脳皮質ではβ-アドレナリンアゴニストと相乗的に作用してその活性を高めた。最も著明な増強は、線条体のSKF38393刺激による活性化と、大脳皮質でのイソプロテレノール刺激による活性化であった。ドーパミンの用量-反応曲線は、CaMを加えることにより左方移動を示した。こうした相乗的な活性化効果は、フォルスコリンとCaMの場合にも認められた。以上の結果から、次のように推論した。(1) CaMはアデニル酸シクラーゼのカタリストに直接作用するばかりでなく、促進性GTP結合蛋白質であるGsを介した系にも作用する。(2) GTPとCaM、およびGTP存在下での神経伝達物質とCaMとでみられたアデニル酸シクラーゼの相乗的活性化は、共通の機序に基づくようである。(3) CaMは大脳皮質β-アドレナリン系のみならず、線条体のドーパミン系活性化機構にも関与している。

論文審査の結果の要旨

精神分裂病に有効な向精神薬の多くがドーパミン拮抗薬であることから特に精神科医に注目されているドーパミン受容体はG蛋白質共役受容体のひとつである。G蛋白質共役受容体と作動薬の結合にはじまる情報刺激伝達機構は近年極めて活発に研究され、現在までに二つの代表的な機構、すなわち、アデニル酸シクラーゼ (AC) の活性化を介する機構とホスファチジルイノシトール-4, 5-ビスリン酸 (PIP₂) ホスホオリパーゼCの活性化を介する機構が明らかにされた。後者では、ホスホオリパーゼCの作用によりPIP₂から生成されたイノシトール-1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) が小胞体からのCa²⁺の遊離を促進し、このCa²⁺とカルシウム結合調節蛋白質であるカルモジュリン (CaM) の複合体が様々な機能蛋白質と結合してその活性を制御する。

しかし、これらcAMPと Ca^{2+} をそれぞれセカンドメッセンジャーとする二つの情報伝達系は完全に独立したものではなく、両者が複雑に入り組んで機能していることが示唆されている。たとえば、ドーパミン作動薬の作用により膜結合CaMが可溶分画へ移行し、拮抗薬の作用や神経遮断によっては逆に膜結合CaMが増加すること、および現象的にはこのCaMの細胞内分布の変動と関連してドーパミン感受性AC活性も変動することが認められている。また、脳のACがドーパミンやアドレナリン β 作動薬のみならず Ca^{2+} -CaM複合体によっても活性化されることが以前から知られている。

以上の背景の下に、申請者は「ドーパミン作動機構へのCaMの関与の解明」を最終目的として一連の実験を行った。学位申請論文はその中の一つで、ラット脳シナプス膜標品（予め2 mM EGTAによる洗浄で大部分の内在性膜結合CaMを除去したもの）中のACの Ca^{2+} -CaMによる活性化とGTPによる活性化やGTP存在下でのドーパミン作動薬あるいはアドレナリン β 作動薬による活性化の相互関係を解析したものである。ドーパミン作動薬の効果を検討する場合には線条体から、アドレナリン β 作動薬の効果を検討する場合には大脳皮質から得たシナプス膜標品が用いられた。得られた主な結果は次のとおりである。

- (1) 膜標品中のACの Ca^{2+} -CaMとGTPの両者による活性化の度合いは、それぞれ単独での活性化の和より有意に大であった。すなわち、 Ca^{2+} -CaMとGTPの効果は相加的ではなく相乗的であった。
- (2) Ca^{2+} -CaMは10 μM GTP存在下でのドーパミン作動薬やアドレナリン β 作動薬によるACの活性化を更に増強した。ドーパミン作動薬の中では、 D_1 、 D_2 両受容体に作用するドーパミンよりも D_1 受容体に特異的なSKF38393の効果がより顕著に Ca^{2+} -CaMにより増強された。
- (3) Ca^{2+} -CaMはフォルスコリン（ACの触媒ユニットに直接作用して活性化するとされているジテルペン）によるACの活性化も有意に増強した。

申請者は以上の結果より、CaMはACの触媒ユニットに直接作用するばかりでなく、AC促進性G蛋白質であるGsを介した系にも作用することによりドーパミン系、 β アドレナリン系でのACの活性化に関与していると推論した。

論文審査会では、以上の学位申請論文の内容に加えて、副論文として提出されたCaMおよび抗CaMの免疫学的簡易測定法の開発およびEGTA処理ラット大脳シナプス膜の特性についての研究結果が口答で発表され、これら発表と関連して以下の質問がなされた。

- (1) Ca^{2+} 結合CaMの機能蛋白質との結合機構および膜との結合機構または結合様式
- (2) 精製CaMは Ca^{2+} を結合していないのか
- (3) Ca^{2+} -CaMによるACのドーパミンおよびアドレナリン β 作動薬に対する感受性増大の機構
- (4) CaMがG蛋白の $\beta\gamma$ サブユニットと Ca^{2+} 依存的に結合してACの触媒サブユニットを持続的に活性化させるというモデルは、基本的にコレラ毒素による活性化機構と同じと考えて良いか
- (5) Ca^{2+} -CaMによるACのフォルスコリンに対する感受性増大の機構
- (6) Ca^{2+} -CaM存在下でドーパミン感受性AC活性が増加したのはACの基礎活性が増加したためで、基礎活性に対する活性増加の割合を問題にするならば必ずしも活性が相乗的に増加したとは言えないのではないか
- (7) 実験で用いられているドーパミン作動薬やアドレナリン β 作動薬の濃度と臨床使用濃度の差についての考察

以上のように、申請者の研究は内容的に立派であり、加えて質疑応答において申請者はよく考えた回答をし、申請者が自らの研究領域の背景に十分精通した上で本研究を行ったことを伺わせた。よって本研究は学位授与に価すると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市 山	新			
	副査	教授	五十嵐	良 雄	副査	教授	中 島 光 好
	副査	教授	山 崎	昇	副査	助教授	宮 里 勝 政