



Effects of Magnesium on the Interaction of Atrial Muscarinic Acetylcholine Receptors and GTP-binding Regulatory Proteins.

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: 塩崎, 一昌 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/986

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 133号	学位授与年月日	平成 4年 3月26日
氏 名	塩 崎 一 昌		
論文題目	Effects of Magnesium on the Interaction of Atrial Muscarinic Acetylcholine Receptors and GTP-binding Regulatory Proteins. (心房ムスカリン性アセチルコリン受容体と GTP 結合蛋白質の相互作用に対するマグネシウムの効果)		

医学博士 塩崎 一 昌
論文題目

Effects of Magnesium on the Interaction of Atrial Muscarinic Acetylcholine Receptors and GTP-binding Regulatory Proteins.

(心房ムスカリン性アセチルコリン受容体と GTP 結合蛋白質の相互作用に対するマグネシウムの効果)

論文の内容の要旨

〔目的〕: ムスカリン性アセチルコリン受容体は、7箇所の細胞膜貫通領域を持つ G 蛋白質共役受容体の一種で、5種類の分子種 (m1-m5) が cDNA あるいは遺伝子として同定されている。ムスカリン受容体と GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) の相互作用は精製標品の試験管内再構成系で調べられてきた。両者の相互作用は GTP 又は GDP の添加により消失する高親和性アゴニスト結合の出現、およびアゴニストによる GDP (GTP) 放出促進として観察されてきた。本研究では、ムスカリン受容体と G 蛋白質の相互作用の分子的機構、特に Mg イオンの作用機構を、試験管内再構成系で明らかにすることを目的としている。

〔実験方法〕: ムスカリン受容体はブタ心房より、G 蛋白質 (Gi, Go, Gn) はブタ脳より精製し、両者を粗脂質に再構成したのち、結合実験に用いた。心房には m2 サブタイプのみが発現している。G 蛋白質としては、Go を主に用いたが、Gi、Gn についても基本的に同じ結果が得られた。遊離 Mg 濃度は、5 mM EDTA 存在下に MgCl_2 の濃度を変化させ、pH 8 での EDTA と Mg の見かけの解離定数 $0.37 \mu\text{M}$ を用いて計算した。

〔結果〕: 受容体と G 蛋白質の再構成標品について、遊離 Mg 濃度が 40 nM と 10 mM の時の [^3H] QNB (ムスカリン性アンタゴニスト) 結合のカルバミルコリン (アゴニスト) による阻害効果を検討した。その結果 GTP 感受性の高親和性アゴニスト結合が Mg 濃度に関わらず観察され、そのカルバミルコリンに対する見かけの親和性は Mg のあるときに増加することがわかった。その阻害曲線は、カルバミルコリンに対する親和性の異なる 2 成分を仮定した式によく合致し、非線形最小二乗法で解析すると、約 70% が高親和性約 30% が低親和性 ($K_d = 100 \mu\text{M}$) であると解釈できた。高親和性成分の K_d 値は、10 mM Mg 存在時 64 nM、40 nM Mg 存在時 $1.6 \mu\text{M}$ であった。

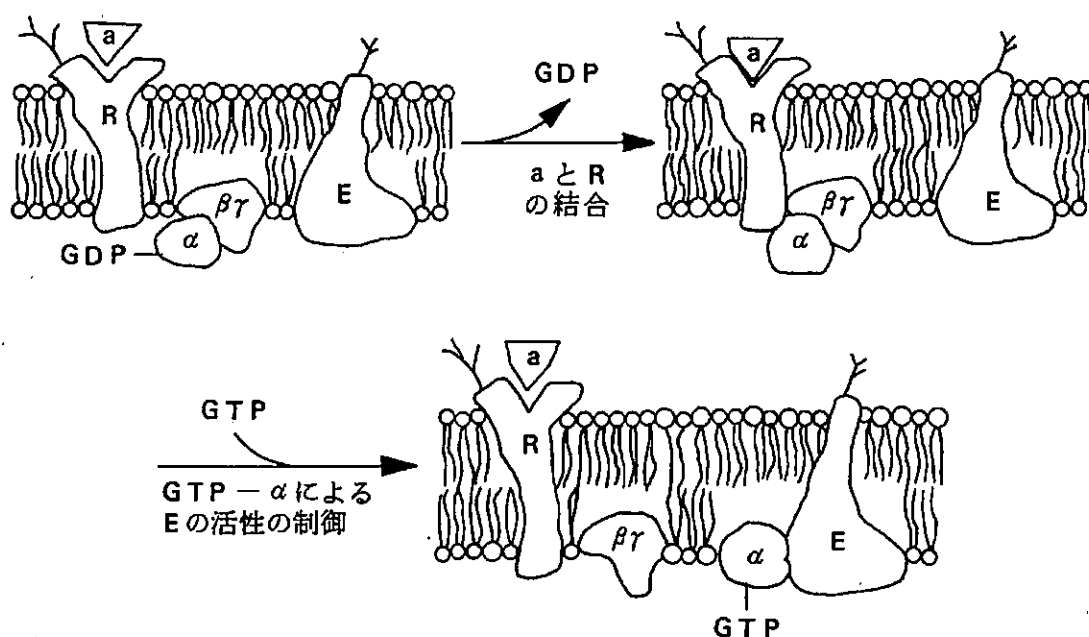
〔 ^{35}S] GTP γS 結合に対するカルバミルコリンの効果を調べると、促進効果は Mg 存在時にのみ観察され、この効果を明瞭に観察するためには GDP を同時に添加することが必要であった。また、〔 ^{35}S] GTP γS 結合の GDP または GTP による結合阻害実験において、GDP に対する親和性が、Mg 存在下にカルバミルコリンにより低下する事実として確認された。GTP γS に対する K_d 値は、遊離 Mg 濃度やカルバミルコリンの影響を受けずば一定の値であった。GTP に対する親和性もカルバミルコリン存在の影響をほとんど受けなかった。またカルバミルコリンに対する高親和性を消失させるのに必要な、GTP と GDP の濃度を比較したところ、Mg 存在下に GDP のみ高濃度 (20 倍) が必要であった。

〔結論〕: QNB 結合実験の結果は、Mg が存在しなくても受容体の約 70% は G 蛋白質と複合体を生成しアゴニストに高親和性を示すようになること、しかし Mg の存在による受容体・G 蛋白質複合体のアゴニストに対する親和性が約 20 倍増大することを示している。GTP γS 結合実験の結果は、受容体へのアゴニスト結合が G 蛋白質の GDP 結合に影響する為には、Mg の存在が必要であることを示している。Mg のない時にも受容体・G 蛋白質複合体は生成しているが、この複合体は機能的にカップルした状態ではないと推測される。Mg 存在下でのアゴニスト・受容体・G 蛋白質複合体が、受容体の G 蛋白質に対する作用の反応中間体と考えられる。

論文審査の結果の要旨

G 蛋白質共役受容体は、 α および β -アドレナリン受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) 等一群の神経伝達物質受容体、ホルモン受容体、および網膜の光受容蛋白質であるロドプシン

を含む大きな受容体ファミリーである。いずれも糖鎖結合部位がある N 末端を細胞外に、C 末端を細胞内側に出すという配向で膜を 7 回横切る膜貫通蛋白質であり、受容体へのアゴニストの分子的結合等として細胞外からもたらされた信号情報を G 蛋白質の活性化を介して細胞内へ伝達する。すなわち、アゴニストと結合した受容体はまず形質膜内面に存在する G 蛋白質と相互作用し、その α サブユニットからの GDP の解離を引き起こす。この時、受容体とグアニンヌクレオチドを持たない G 蛋白質の複合体が過渡的に生じ、この複合体はアゴニストに対して高い親和性を持つことが反応過程の解析から明らかにされている。次いで、 α サブユニットと GTP の結合が起こり、生じた GTP 結合 α サブユニットは $\beta\gamma$ サブユニットから解離し、同じく形質膜に存在するアデニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼ C- β 1、イオンチャネル等に作用して、細胞内メッセンジャーの生成や膜を介するイオンの流れを調整する（以上図参照）。



a : アゴニスト, R : 受容体, α , β , γ : G 蛋白質の α , β , γ サブユニット, E : エフェクター (アデニル酸シクラーゼ, ホスホリパーゼ C- β 1, イオンチャネルなど)

以上の G 蛋白質共役受容体と G 蛋白質の相互作用への Mg^{2+} の関与が、主として分離膜標品を用いた実験結果から推定されていた。しかし、 Mg^{2+} の効果についてのこれまでの報告は断片的で総合的な見解を与えるものではなく、しかも、 Mg^{2+} の作用機構解明のために必要な、精製受容体と G 蛋白質標品の脂質膜への再構成系を用いた解析がまだなされていなかった。そこで申請者は精製ブタ心房 mAChR (m2) と各種 G 蛋白質 (G_i , G_o , G_n) を混合脂質ベジグルに組み込んだ再構成系を用いて、mAChR と G 蛋白質の相互作用に対する Mg^{2+} の影響を総合的に解析した。その結果、 Mg^{2+} がなくても mAChR と G 蛋白質の相互作用は起こるが、mAChR を介する情報刺激伝達において中間体として働く mAChR-G 蛋白質複合体、すなわちカルバコール (mAChR のアゴニスト) に対し高い親和性を持ち、GDP の解離を促進する複合体の形成に Mg^{2+} が必要であるという結論が得られた。この結論の根拠は次の二点である。

(1) G 蛋白質と共に混合脂質ベジグルに再構成した m2-AChR のグアニンヌクレオチド感受性高親和性カルバコール結合は Mg^{2+} の有無 (10mM と 40nM) にかかわらず全結合部位の約 67% であったが、この高親和性結合の K_d が Mg^{2+} により著しい影響を受けた (Mg^{2+} が 10mM と 40nM の時のカルバコールに対する K_d はそれぞれ 64nM, 1600nM)。 (2) mAChR と共に混合脂質ベジグルに再構成した G 蛋白質の GDP に対する親和性が Mg^{2+} により著しく低下した (Mg^{2+} が 10mM と 40nM の時の GDP に対する K_d はそれぞれ 2770nM, 24nM)。

以上の内容の申請者の本研究は、G 蛋白質共役受容体を介する情報伝達機構解明に本質的に寄与するもので、興味ある優れた研究と高く評価された。

本論文と関連して次の質問がなされた。

- (1) 再構成に用いた混合脂質ベジクルは閉鎖型ベジクルを形成しているのか。またそのベジクルは right side out か inside out か
- (2) mAChR のリガンド結合部位はどこにあるのか。またアゴニストとアンタゴニストの結合はどう違うのか。両者が同じ部位に結合するとすればアゴニストが結合した時のみ G 蛋白質の活性化が起こるのは何故か
- (3) mAChR 分子内の G 蛋白質と相互作用する部位について
- (4) Mg^{2+} が存在する時の mAChR-G 蛋白質複合体と存在しない時の同複合体の機能の違いは何に由来するのか。 Mg^{2+} はどこに結合するのか
- (5) グアニンヌクレオチドを持たない G 蛋白質と mAChR の複合体がアゴニストに対し高親和性であることが G 蛋白質の活性化にどのように関与するのか
- (6) アゴニスト結合 mAChR と G 蛋白質の相互作用による G 蛋白質からの GDP の解離に引き続いて起こる GTP の結合は自然に起こるのか、あるいは mAChR の作用下に起こるのか。またこれと関連して細胞内 GTP 濃度と GDP 濃度について

これらの質問に対する申請者の解答は概ね適切であった。

以上により、本研究は博士（医学）の学位授与に値すると審査委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	中	島	光 好	副査	教授	吉 見 輝 也
	副査	助教授	太	田	英 彦	副査	助教授	宮 里 勝 政