



The Interaction between D-2 Dopamine Receptors and GTP-Binding Proteins

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大原, 浩一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/932

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 79号	学位授与年月日	平成 元年 3月27日
氏名	大原浩一		
論文題目	The Interaction between D-2 Dopamine Receptors and GTP-Binding Proteins (D2 ドパミン受容体と GTP 結合蛋白質の相互作用)		

The Interaction between D-2 Dopamine Receptors and GTP-Binding Proteins

(D2 ドパミン受容体と GTP 結合蛋白質の相互作用)

論文の内容の要旨

精神分裂病の病因として、D2 ドパミン受容体 (D2 受容体) の機能異常仮説が提唱されている。その根拠としては、現在臨床で使われている抗精神病薬のうち一群のものが D2 ドパミン受容体のアンタゴニストであり、D2 受容体に対する親和性と臨床に用いられる用量の間に相関があること、などがあげられる。

D2 受容体の機能に関して、主として膜標品を用いた研究から、現在までに次のことが明らかにされている。1) アデニル酸シクラーゼ活性と無関係であるか、あるいは活性を抑制する、2) アンタゴニストに対して一つの親和性を示すが、アゴニストに対しては高親和性、低親和性両方の形態をとり、グアニンヌクレオチドにより、アゴニスト高親和性結合は低親和性に移行する。

グアニンヌクレオチドの効果は D2 受容体と GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) の相互作用を意味すると考えられる。しかし、D2 受容体と G 蛋白質が相互作用することの直接の証拠は得られておらず、数種類ある G 蛋白質のうちどの G 蛋白質と D2 受容体が相互作用するかは全くわかっていない。本研究では、ブタ脳線条体から得た可溶性 D2 受容体と精製 G 蛋白質の再構成系でこの問題を検討した。

I. 実験方法

1. D2 受容体の部分精製: ブタ線条体膜分画を 0.3% コール酸・NaCl 混液を用いて可溶化し、Ultro-gel AcA34 によるゲル濾過で D2 受容体と G 蛋白質を分離した。
2. G 蛋白質の糖製: ブタ大脳から Sternweis and Robishaw の方法に準じて G 蛋白質混合物を調整し、DEAE トヨパールクロマトグラフィーにより Gi と Go を分離した。
3. G 蛋白質の ADP リボシル化: Bokoch らの方法に準じて、Gi、Go を IAP により ADP リボシル化した。
4. 再構成: 部分精製 D2 受容体、精製 G 蛋白質をリン脂質小胞と混合した後、Sephadex-G50 (fine) によるゲル濾過を行い、void volume 画分を再構成標品とした。
5. [³H] スピベロン結合活性の測定: 膜あるいは再構成標品と [³H] スピベロンを 30°C で 1 時間保温した後、結合した [³H] スピベロンをセルハーベスターによりガラス繊維濾紙に集めて測定した。

II. 結果および考察

D2 受容体と [³H] スピベロン (アンタゴニスト) との結合の解離定数は、膜標品 (65 pM) でも再構成標品 (85 pM) でも GTP、G 蛋白質の有無により影響されなかった。アゴニストとの結合は [³H] スピベロン結合に対するドパミンの阻害 (拮抗) 効果により間接的に測定した。膜標品での阻害曲線は GTP の添加で右側 (ドパミンの高濃度側) へ移行したが、部分精製 D2 受容体のみをリン脂質中に組み込んだ標品での阻害曲線は GTP の影響を受けなかった。部分精製 D2 受容体を精製 G 蛋白質と再構成すると、Gi、Go の場合とともに G 蛋白質の量に依存してドパミンによる阻害曲線は左側に移行した。すなわち、Gi、Go と結合した D2 受容体は受容体単独の時よりもアゴニストに対して高い親和性を持つことが示唆された。更にこの再構成標品の結合阻害曲線は GTP 存在下では右側に移行し、G 蛋白質を加えない時とほぼ同じになった。この結果は、GTP 存在下で D2 受容体と G 蛋白質が解離することを意味すると解釈される。ドパミンによる阻害曲線を 2 種類の親和性を持つ結合部位を仮定して非線型最小自乗法で解析した。高親和性部位の平行解離定数 (K_D) は 0.92 ~ 1.29 μ M、低親和性部位の K_D は 55.6 ~ 161.7 μ M、GTP 存在時の高親和性結合の割合は 7 ~ 15% で、これらの値は加える G 蛋白質の量に依存しないという結果が得られた。一方、GTP が存在しない時の高親和性結合の割合は G 蛋白質が存在しない時の 8% から G 蛋白質量の増加と共に 58 ~ 64% まで増大した。Gi に比べ Go の方がより低濃度で高親和性結合の増大をもたらし、D2 受容体は Go により高い親和性を持つことが示唆された。D2 受容体と IAP により ADP リボシル化した Gi、Go を

再構成した標品ではGTPの影響はみられなかった。D2受容体が、Gi、Goのいずれとも直接相互作用することは、生体内でドパミンとD2受容体が結合すると、GiのみでなくGoも活性化されることを示唆すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年脳の受容体の研究が盛んである。ドパミン受容体にはD1とD2サブタイプがある。本論文はブタ脳線条体からD2ドパミン受容体を部分精製し、その性質を調べたものである。その結果、スπιベロン結合活性の回収、GTPの効果、受容体とGタンパク質の分離、後者のSDS-PAGEによる解析、受容体系の再構成、後者のリガンド結合活性とGTP効果などを証明しえた点が評価された。

研究発表は質問を交えつつ行われ、発表後も質問が続行された。それらのうち主なものは以下のとおりである。

- 1 D2リセプター(D2R)の脳内局在
- 2 D2R精製のこれまでの報告
- 3 線条体の生理機能
- 4 Gタンパク質の精製法
- 5 スπιベロン結合実験の意味
- 6 スπιベロンとドパミンに対するKdの差
- 7 IAPとは
- 8 抗精神病薬とD2R量
- 9 D2リガンドの臨床効果
- 10 D2Rとhypersensitivity状態

申請者の以上の試問に対する回答はおおむね適切であり、本研究は医学博士の学位授与に値するものと審査員全員が一致して判断した。

論文審査担当者	主査	教授	藤田	道也			
	副査	教授	植村	研一	副査	教授	中島光好
	副査	教授	吉見	輝也	副査	助教授	鈴木修