

## 神経伝達物質受容体の作用機構と作用発現調節機構の研究

### Function of neurotransmitter receptors and its regulation

- |       |   |              |
|-------|---|--------------|
| 代表研究者 | 東京大学医学部脳研生化学教授<br>Prof., Fac. of Med., Univ. of Tokyo<br>Tatsuya HAGA   | 芳賀達也         |
| 協同研究者 | 東京大学医学部脳研生化学<br>Fac. of Med., Univ. of Tokyo<br>Kazuko HAGA   | 芳賀和子         |
|       | 浜松医科大学脳外科, 日赤浜松病院<br>Hamamatsu Univ. School of Medicine<br>Haruaki UCHIYAMA   | 内山晴旦         |
|       | テキサス大学医学部<br>Dept. of Pharmacology, Univ. of Texas,<br>Southwestern Medical Center at Dallas<br>Gabriel BERSTEIN  | ガブリエル バースティン |
|       | 浜松医科大学内科, 志太病院内科<br>Hamamatsu Univ. School of Medicine and Shita Hospital<br>Terumasa NISHIYAMA   | 西山照正         |
|       | 浜松医科大学内科・カリフォルニア大学医学部生化学<br>ロスアンゼルス校<br>Hamamatsu Univ. School of Medicine and Dept. of<br>Med. and Physiol., Univ. of Calif. at Los Angeles,<br>School of Medicine<br>Masayoshi KAJIMURA | 梶村昌良         |
|       | 浜松医科大学精神科・トロント大学医学部<br>Hamamatsu Univ. School of Medicine and<br>Dept. of Pharm., Univ. of Tront Medical School<br>Koichi OHARA   | 大原浩一         |
|       | 浜松医科大学内科・ワシントン大学生化学<br>Hamamatsu Univ. School of Medicine and<br>Dept. of Pharmacol., Univ. of Washington<br>Takayoshi IKEGAYA  | 池ヶ谷貴愛        |
|       | 東京大学医学部脳研生化学<br>Fac. of Med., Univ. of Tokyo<br>Kazumasa SHIOZAKI   | 塩崎一昌         |
|       | 東京大学医学部脳研生化学<br>Fac. of Med., Univ. of Tokyo<br>Kimihiro KAMEYAMA   | 亀山仁彦         |

We have studied molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors (mAChR), which were purified from porcine atrium or cerebrum and then reconstituted with GTP-binding regulatory proteins (G proteins) into lipid vesicles. [I] Results obtained as to the structure of mAChR and their ligand binding activity include: (a) location of the [<sup>3</sup>H] PrBCM binding sites in the region including the second and third transmembrane segments (ref. 14), (b) demonstration of the presence of S-S bond between the second and the third extracellular loop (ref. 14) and effects of -SH reagents (ref. 2), (c) the subtype specific binding of pirenzepine to cerebral and atrial mAChR; no subtype-specificity of purified mAChR (ref. 9) but recovery of the specificity after their reconstitution with specific lipids (ref. 10), (d) demonstration of no effect of sugar moiety on the binding of mAChR with muscarinic ligands and G proteins (ref. 18). [II] Both cerebral (ref. 6) and atrial (ref. 15) mAChR were shown to interact with three kinds of G proteins with similar affinities in the reconstitution system of purified components. Atrial mAChR in membrane preparations also interacted with three kinds of G proteins (ref. 17). [III] Results obtained on the phosphorylation of mAChR include: (a) protein kinase C phosphorylates cerebral mAChR but not atrial mAChR (ref. 13), (b) atrial mAChR are better substrate of cAMP-dependent protein kinase rather than cerebral mAChR, (c) both cerebral and atrial mAChR are phosphorylated by receptor kinase depending on the presence of agonists (ref. 11), (d) the agonist-dependent phosphorylation by receptor kinase is activated by G protein  $\beta\gamma$  subunits (ref. 19), (e) the agonist-dependent phosphorylation is inhibited by G proteins ( $\alpha\beta\gamma$  trimer) in the absence of guanine nucleotides but not in the presence of GTP or GDP (ref. 11).

## 研究目的

最近数年間に神経伝達物質受容体の生化学的及び分子生物学的研究が進み、従来概念的に定義されていた受容体を分子として同定できるようになった。その結果、受容体はイオンチャネル受容体とG蛋白質共役受容体に大別されることが明らかにされた。本研究では、G蛋白質共役受容体の代表例の一つであるムスカリン性アセチルコリン受容体(以後mAChRと略記)について、その構造、機能、機能調節機構を明らかにすることを目的とした。

## 研究経過

我々は1983年にムスカリン性アセチルコリン受容体(以後mAChRと略記)のアフィニティークロマトグラフィー系を開発した<sup>20</sup>。それを用いてブタ脳および心房からmAChRが精製され<sup>21, 22</sup>、mAChRが分子量約7万の蛋白質であることが示された。精製mAChRのアミノ酸部分配列を用いてmAChRのcDNAが単離され、その塩基配列からmAChRの全一次構造が決定された<sup>23-25</sup>。アミノ酸配列の解析から、mAChRは細胞膜を7回貫通するセグメントを持ち、N末端付近に糖鎖を結合することが示唆された(図1)。これはロドプシン、 $\beta$ アドレナリン受容体など多

数の受容体に共通の構造で、同一の祖先から進化したものと考えられる<sup>7, 8</sup>。その後mAChRには5種のサブタイプ(m1-m5)があることが明らかになったが、いずれも共通の構造特性を持っている<sup>26, 27</sup>。mAChRの機能はG蛋白質(GTP結合制御蛋白質,  $\alpha\beta\gamma$ 3量体)を介して発現すると推測されていたが<sup>28</sup>、我々は1985年に精製受容体と精製G蛋白質をリン脂質中に再構成することによって両者が直接相互作用することを示した<sup>29-31</sup>。

1987-1989年度にわたる本研究においては、mAChRの(1)リガント結合、(2)G蛋白質との相互作用、(3)リン酸化、の三つに重点をおいて、ブタ大脳(主としてm1サブタイプ)又は心房(m2サブタイプ)から精製したmAChRを単独で、あるいはブタ大脳から精製したG蛋白質との再構成系を用いて、研究を行った。また、ドパミンD<sub>2</sub>受容体とG蛋白質の相互作用<sup>4</sup>及び胃酸分泌に関わるムスカリン受容体の研究<sup>16</sup>も行った。

5種類のmAChRサブタイプは、異なる部位に存在し、異なる生理機能に関わると考えられる<sup>32</sup>。サブタイプ特異的なリガントを開発すれば副作用の少ない薬物になることが期待される。受容体の一次構造が決まれば特異的なリガントも理論

的に予測可能なのか、あるいは翻訳後の変化(糖鎖結合、リン酸化など)やリン脂質など他成分との相互作用がリガント結合に影響するのか、という問題が生ずる。これらの点につき、大脳と心房から得た可溶化精製受容体あるいは受容体を脂質に組み込んだ系で、リガント結合活性を調べた<sup>2,9,10</sup>。また、リガント結合部位を不可逆的標識化合物 [<sup>3</sup>H] PrBCM ([<sup>3</sup>H] Propylbenzylcholine mustard)を用いて同定した<sup>14</sup>。

アゴニスト(a)と結合した受容体(R)はaRG複合体を作ることにより、G蛋白質からのGDPの放出を促進し、GTPの結合を可能にする。GTPの結合したG<sub>GTP</sub>が活性型で、G<sub>GTP</sub>は $\alpha_{GTP}$ と $\beta\gamma$ に解離し、それ自身のGTP分解活性により不活性型の $\alpha_{GDP}\beta\gamma$ に変換すると考えられる<sup>7,8</sup>。G蛋白質の作用する相手を一般にエフェクターと称し、2次メッセンジャー合成または分解酵素とイオンチャネルである。m1, m3, m5 サブタイプによってはホスホリパーゼCが活性化され、m2とm4サブタイプによってはアデニル酸シクラーゼ活性が阻害されることが知られている<sup>8,33,34</sup>。また、mAChR刺激によってホリホリパーゼA<sub>2</sub>の活性化やK<sup>+</sup>イオンチャネルの開口が起こることも知られている。何種類かのG蛋白質が単離蛋白質あるいはcDNAとして同定されているが、mAChRとエフェクター間を仲介するG蛋白質はまだ同定されていない。我々は、大脳と心房から精製したmAChRと大脳から精製した3種のG蛋白質との再構成系で、それぞれが相互作用するか否か、組合せに何らかの特異性があるか否かを検討した<sup>6,16,17</sup>。また、mAChRとG蛋白質の相互作用の様式について検討した<sup>1,15</sup>。

脱感受性(Desensitization)の分子機作として、受容体のリン酸化が想定されている。脱感受性は、特定の受容体だけに働く同種脱感受性(Homologous Desensitization)と複数の受容体系に働く異種脱感受性(Heterologous Desensitization)に分けられる。同種脱感受性は受容体に、異種脱感受性はG蛋白質以降に変化が生じたものと考えられる。受容体にアゴニストが結合しているかどうかを見分けるキナーゼがあれば、それは

同種脱感受性に働く有力な候補となる。ロドプシンキナーゼは照射されたロドプシンを、 $\beta$ アドレナリン受容体キナーゼはアゴニストと結合した $\beta$ アドレナリン受容体をリン酸化することが知られている。mAChRは蛋白質キナーゼCやcAMP依存性蛋白質キナーゼでサブタイプ特異的にリン酸化されるが、アゴニストを必要としない<sup>3,13</sup>。そこで、mAChRをアゴニスト依存的にリン酸化するキナーゼの存在を検索し、その性質を調べた。その結果、このリン酸化がG蛋白質によって2重に調節されていることが明らかになった<sup>11,19</sup>。

## 研究成果

### 1. ムスカリン受容体の構造とリガント結合

#### 1.1 糖鎖除去の効果<sup>18</sup>

精製受容体をエンドグリコシダーゼFで30°C 1時間処理してアスパラギンに結合した糖を切断すると、SDS電気泳動で見積もられる見かけの分子量が約7万からアミノ酸列から計算した値と同じ約5万に低下する。糖鎖除去によって、[<sup>3</sup>H]キヌクリジニルベンジレート([<sup>3</sup>H]QNB)、アトロピン、ピレンゼピン、アセチルコリン、オキントレモリンという5種のムスカリン性リガントに対する親和性は影響されなかった。またG蛋白質との再構成によりGTP依存性高親和性アゴニスト結合が酵素処理の有無によらず観察され、mAChRの糖部分はアセチルコリン及びG蛋白質の結合に寄与しないことが示された。

#### 1.2 [<sup>3</sup>H]PrBCM 結合部位の同定<sup>14</sup>

ブタ大脳より精製したmAChRを[<sup>3</sup>H]PrBCMで標識、あるいは蛋白質キナーゼCを用いて[<sup>32</sup>P]ATPでリン酸化した。この標識標品をそのまま、あるいはエンドグリコシダーゼFを作用させた後プロテアーゼにより限定分解した。糖鎖はN末端付近のアスパラギンに結合していると考えられるので、エンドグリコシダーゼFにより分子量が減少するペプチドはN末端を含むと考えられる。標品の一部は電気泳動後メンブレンフィルターに転写し、mAChRの部分ペプチドに対する抗体と反応させた。抗体は部分ペプチド(アミノ酸約20個)をヘモシアニンに架橋したものを

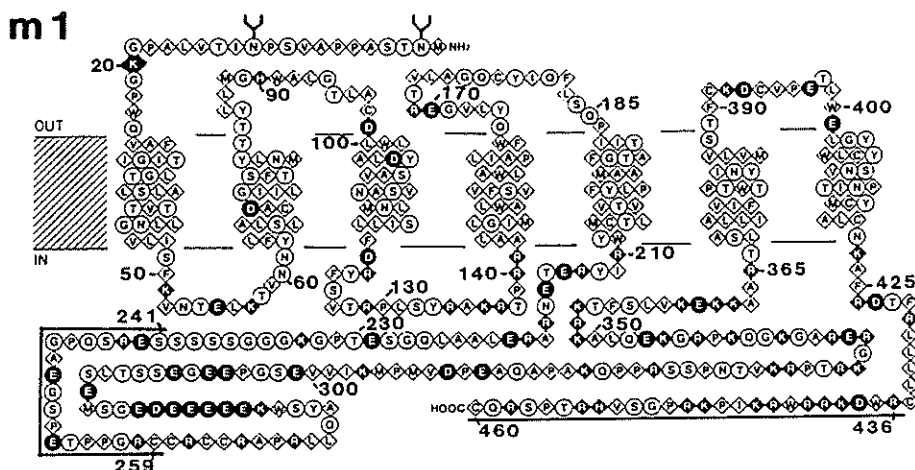


図1. mAChR m1 サブタイプのアミノ酸配列。

下線部分のペプチドに対する抗体を調製した。Y は糖鎖結合の可能性があるアスパラギン残基を示す。白抜き丸は酸性、白抜き四角は塩基性、白丸は中性親水性、白四角は疎水性アミノ酸残基を示す。

抗原としてウサギに免疫して作成した。選んだペプチドは、m1 の C 末端部分、および N 末端より数えて 3 番目の細胞内ループの部分ペプチドである (図 1 参照; 得られた抗体を抗 C 末抗体、抗 i3 抗体とする)。電気泳動上の分子量、糖鎖の有無、抗体との反応性より、N 末端あるいは C 末端からリガンド結合部位やリン酸部位までの距離を推測した。

大脳の mAChR をトリプシンにより部分消化すると、抗 i3 抗体に反応する分子量 52-64 kDa の断片と抗 C 末抗体に反応する分量 12-14 kDa の断片にわかれた。mAChR は 3 番目の細胞内ループの C 末端側で二つに分かれたものと推測される。N 末端側の 52-64 kDa の断片は  $^3\text{H}$  PrBCM を含むが、C 末端側の 12-14 kDa の断片は含まなかった。大脳の mAChR を蛋白質キナーゼ C でリン酸化した後同様にトリプシンで部分消化すると、抗 C 末抗体に反応する分子量 12-14 kDa に一致して  $^{32}\text{P}$  標識断片が得られた。これにより主要なリン酸化部位は、3 番目の細胞内ループの C 末端側と C 末端の間であると推測された。より高濃度のトリプシンで十分消化すると、分子量 30 kDa の  $^3\text{H}$  PrBCM を含む断片が得られた。この断片はエンドグリコシダーゼ F の処理により分子量 16 kDa の断片に変わった。こ

の 16 kDa は N 末端よりの蛋白質部分の分子量と考えられ、この断片の C 末端は 136 番目のリジンと推定された。

酸性アミノ酸の C 末端側を選択的に切る V8 プロテアーゼを十分働かせると (0.5 mg/ml, 30°C), 1-6 時間では分子量 40 kDa の、12 時間では 17 kDa の  $^3\text{H}$  PrBCM を含む断片が得られる。40 kDa 断片はエンドグリコシダーゼ F 処理により 26 kDa に縮小し、糖鎖の結合した N 末端を含む断片と考えられる。この断片の C 末端は 216 番目のグルタミン酸と推定された。17 kDa の断片はエンドグリコシダーゼ処理の影響を受けず、26 kDa の切れたものでその N 末端は 56 番目のロイシンと推定された。V8 プロテアーゼによる 17 kDa の断片は  $\beta$ メルカプトエタノールの処理によりその一部が 12 kDa の断片に変わった。これは 17 kDa の断片の中に S-S 結合が存在することを示唆しており、98 番目のシステインと 178 番目のシステインの間に S-S 結合があることが推測された (図 2)。ロドプシンや  $\beta$  アドレナリン受容体でも、同じ位置に S-S 結合があることが示唆されている。

以上をまとめると、(a)  $^3\text{H}$  PrBCM 結合部位は N 末端より数えて 2 番目と 3 番目の細胞膜貫通部分を含む 56 番目のロイシンと 136 番目のリジ

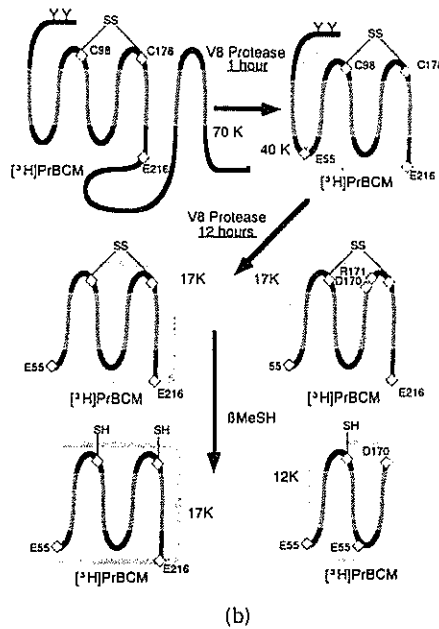
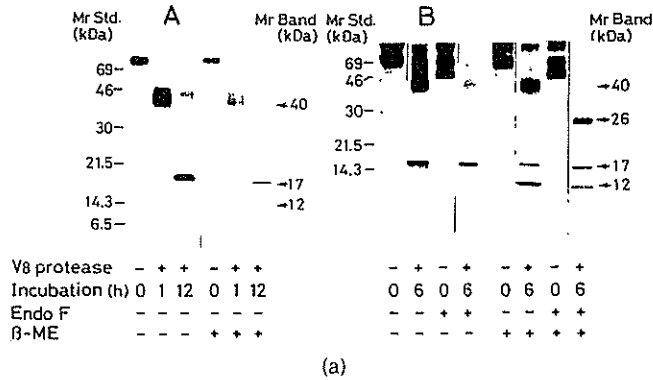


図2.  $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$  結合ペプチド及びS結合部位の同定。大脳から精製した受容体を、(1)  $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$  で標識、(2) V8プロテアーゼで処理、(3) エンドグリコシダーゼ F で処理または処理せず、(4)  $\beta$ メルカプトエタノール有無で SDS 電気泳動、を行った。図2bは切断位置と S-S 結合位置の推測図 (文献 14 より転載)。

ンの間にあり、(b)N 末端より数えて 2 番目と 3 番目の細胞外ループ間 (Cys98-Cys178) に S-S 結合があり、(c)3 番目の細胞内ループの C 末端側より C 末端までの分子量 12-14 kDa のペプチド鎖にリン酸化部位があると推測される (図3)。最近 Curtis らは、PrBCM 結合部位が 3 番目の細胞膜貫通部位のアスパラギン酸にあることを報告している<sup>35)</sup>。

### 1.3 酸化還元の効果<sup>2)</sup>

精製 mACHR を DTT (dithiothreitol) で処理するとリガントに対する親和性が低下する。この減少は大脳、心房いずれの mACHR にも見られるので、m1 と m2 サブタイプに共通したシステイン残基の還元の結果と考えられる。5 種類の mACHR サブタイプに共通のシステインは九つあるが、架橋していることが分かっているのは先に述べた 2 番目と 3 番目の外側ループ間の S-S

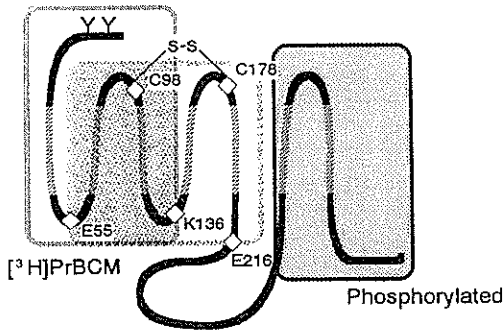
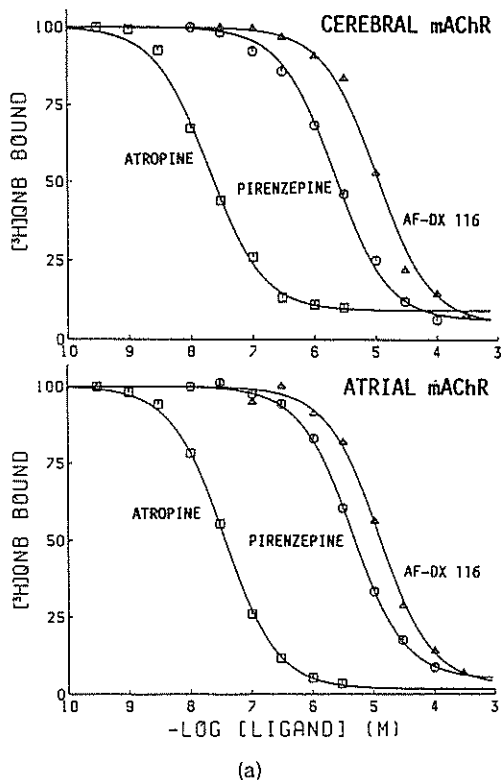


図3.  $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$  結合部位, リン酸化部位, S-S 結合同定のまとめ.



結合である。

一方, DTNB (dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) あるいは NEM (*N*-ethylmaleimide) で処理すると, mACHR のアゴストに対する親和性が増大する。この現象は膜受容体を使った実験で知られていたが, 精製 mACHR を用いた実験で作用部位が mACHR そのものであることが分かった。大脳, 心房いずれの mACHR でも見られるので, 共通のシステインが関与すると考えられるが, まだ同定されていない。mACHR と G 蛋白質を再構成させるとアゴストに対する親和性が増加するので, 同じシステインが関与する可能性が考えられた。しかし, NEM 処理後 G 蛋白質と再構成すると, アゴストに対する親和性が相加的に増加することが分かった<sup>17)</sup>。

#### 1.4 サブタイプ特異的ピレンゼピン結合<sup>9, 10)</sup>

m1 と m2 サブタイプのピレンゼピンに対する親和性は 30-50 倍異なる。大脳膜標品中の mACHR の約 80% はピレンゼピンに高親和性を示し 20% だけが低親和性を示すが, 心房膜標品の mACHR はすべて低親和性を示す<sup>10)</sup>。ところが

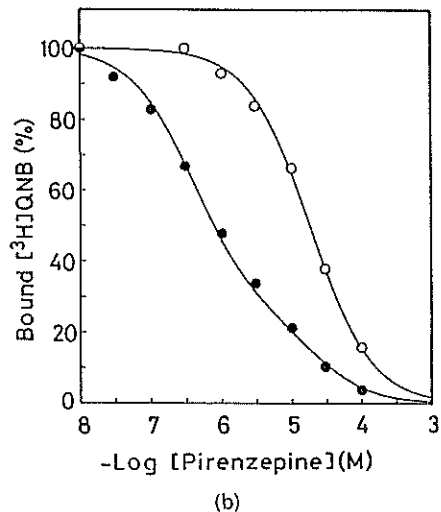


図4. 大脳と心房 mACHR のピレンゼピンに対する親和性.

(a) 精製受容体の  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  結合のムスカリン性アンタゴニストによる阻害 (文献9より転載).

(b) 大脳 (黒丸) または心房 (白丸) からの精製受容体をリポド (フォスファチジルコリン, フォスファチジルイノシトール, コレステロールヘミサクシネート (48:48:4)) に組み込んだのち  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  結合のピレンゼピンによる阻害を調べた (文献10より転載).

大脳と心房から精製した mAChR は、ピレンゼピンに対してほとんど等しい親和性を示した<sup>9)</sup> (図 4a)。そこで、大脳あるいは心房からの精製 mAChR を、本来膜にある mAChR を PrBCM で前処理して失活させた大脳あるいは心房膜標品に再構成させた。すると、用いる膜標品の種類によらず、心房から精製した mAChR はピレンゼピンに低親和性を示し大脳から精製した mAChR の約 80% はピレンゼピンに高親和性を示すようになった。精製 mAChR を脂質と再構成させると、脂質の種類によりサブタイプ特異的親和性が見られる場合と見られない場合があった。図 4b に差が見られた例を示す。これらの結果は、(a) ピレンゼピンに対する親和性は mAChR サブタイプによって決定されること、(b) しかし mAChR がサブタイプ特異的な構造をとるためには特定の脂質と相互作用することが必要であること、を示している。

## 2. mAChR と G 蛋白質の相互作用

### 2.1 精製受容体と精製 G 蛋白質の再構成<sup>6, 15)</sup>

ブタ大脳あるいはブタ心房から精製した mAChR と、ブタ大脳から精製した 3 種の G 蛋白質 ( $G_i(\alpha_{10}\beta\gamma)$ ,  $G_o(\alpha_{39}\beta\gamma)$ ,  $G_n(\alpha_{10}\beta\gamma)$ ) をリン脂質中で再構成させ、以下の様な結果が得られた。(a) G 蛋白質と再構成した mAChR は G 蛋白質を加えない時に比べアゴニストに対し高親和性を示し、高親和性結合の割合は全 mAChR の 10-20% から 60-80% に増加した<sup>6, 15)</sup> (図 5a)。(b) GTP 又は GDP の添加により高親和性の割合は再び 10-20% に低下し、この実験中に GDP から GTP への変換は観察されなかった<sup>31)</sup>。(c) GTP 依存性高親和性結合の割合を G 蛋白質の濃度を変えて測定すると、 $G_o$ ,  $G_i$ ,  $G_n$  の順に低い濃度で効果が見られたが 3 種の間にそれほど大きな差はなかった (50% 効果を示す濃度は、順に 0.35, 0.49, 0.58 nM であった)<sup>6, 15)</sup>。また、2 種の G 蛋白質を同時に使っても、1 種類の G 蛋白質を使った時と差はなかった<sup>31)</sup>。(d) 再構成標品は [<sup>3</sup>H]GDP と可逆的に結合し、結合した [<sup>3</sup>H]GDP 量の約 25%、絶対モル量としては受容体量の 5-10 倍量の [<sup>3</sup>H]GDP が、ACh 存在下に速く遊離された<sup>1, 6)</sup> (図 5b)。(e)

ACh による GTP アーゼ活性の促進および [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S 結合の促進が観察された。ACh による [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S 結合の促進は従来あまりはっきりみられなかったが、GDP 存在下ではっきり観察されることが分かった<sup>15)</sup> (図 5c)。この効果は GDP に特異的で GTP ではよく見られなかった。

これらの結果より、大脳、心房いずれを出発材料とした場合も精製 mAChR の少なくとも 50% は 3 種の G 蛋白質と相互作用することが分かる。m1, m2 どちらのサブタイプにも 3 種類の G 蛋白質と相互作用しそれらを活性化し得ると推測される。高親和性 ACh 結合が G 蛋白質添加で現れ GDP または GTP 添加で消失するという結果から ACh-R $\cdot$ G 複合体の存在が示唆される<sup>1, 7)</sup>。ACh が R より R $\cdot$ G 複合体に高親和性であるか、ACh の ACh-R $\cdot$ G からの遊離速度が ACh-R からの遊離速度より遅いと考えられる。ACh-R は G-GDP に作用して GDP を遊離させて ACh-R $\cdot$ G が生成し、これに GTP が反応して ACh-R と G-GTP が生成する、という反応経路が考えられる。 [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S 結合に対する ACh の効果が GDP 存在下ではっきり見られるという実験結果は、 [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S の結合速度は G と ACh-R $\cdot$ G で変わらないが、ACh-R $\cdot$ G の GDP に対する親和性が G より低い (あるいは GDP の遊離速度が G-GDP からより ACh-R $\cdot$ G-GDP からの方が速い) と仮定すると説明できる。定性的には、G-GDP から G-GTP への変換の活性化エネルギーが G を經由する代わりに ACh-R $\cdot$ G を經由することによって低下する、というのが ACh-R の作用機構と考えられる<sup>1, 7)</sup>。ACh-R は G 蛋白質に対して、酵素が基質に作用するように、触媒的に作用すると考えられる<sup>3)</sup>。最近の結果から、ACh-R $\cdot$ G は Mg の有無によって二つの異なる状態をとり、Mg 存在下ではアゴニストに親和性がより高く、GDP への親和性が GTP への親和性よりずっと低くなることが示された (塩崎・芳賀、未発表)。

### 2.2 心房膜受容体と G 蛋白質の再構成<sup>17)</sup>

受容体と G 蛋白質以外の第 3 の成分が両者の相互作用に影響する可能性がある。より *in vivo* に近い条件として、精製 mAChR の代わりに心

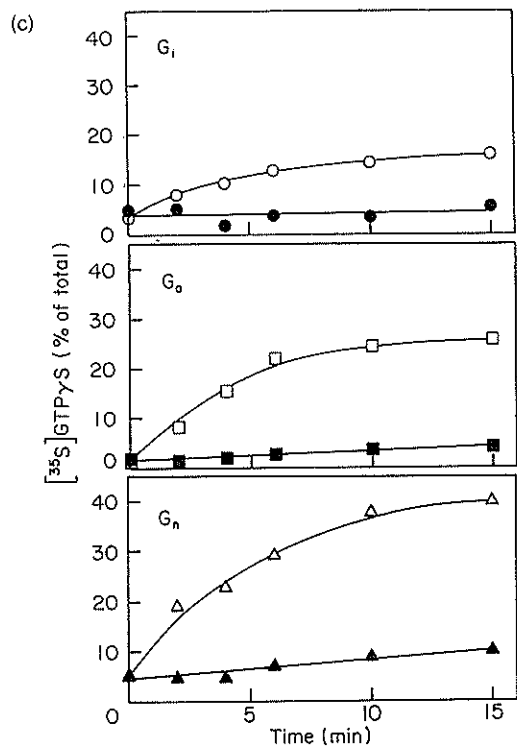
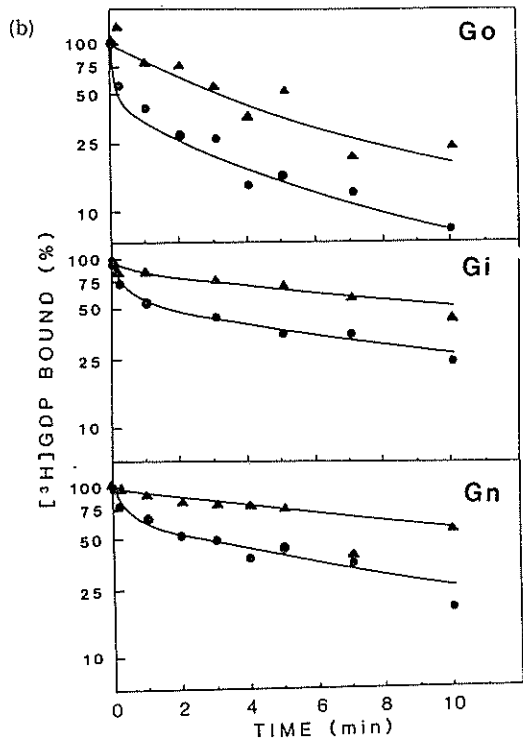
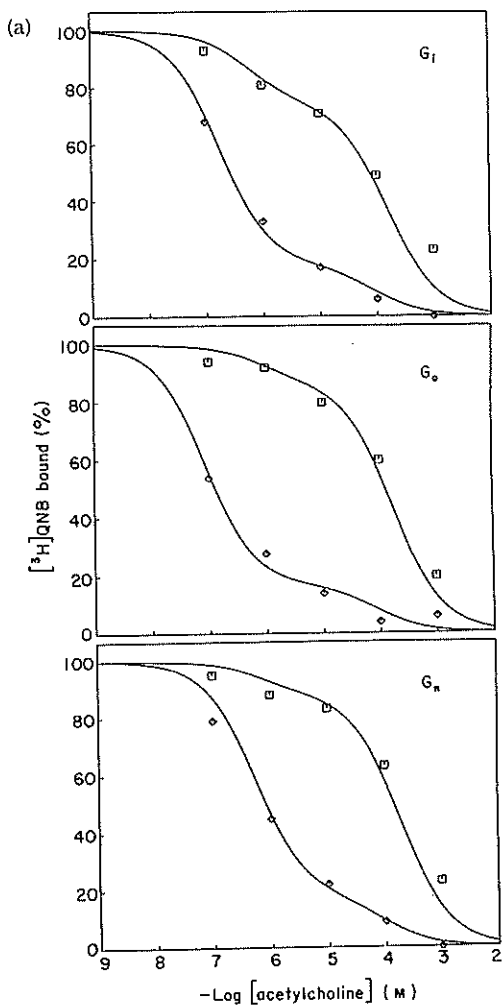


図5. 精製受容体と精製G蛋白質の相互作用。

(a) 心房から精製したmAChRとG蛋白質(Gi, Go, Gn)をリン脂質中に再構成させ、GTP有無の条件下でアセチルコリンによる $[^3\text{H}]\text{QNB}$ 結合の阻害効果を調べた(文献15より転載)。

(b) 大脳から精製したmAChRとG蛋白質(Gi, Go, Gn)をリン脂質中に再構成させ、 $\beta^3\text{H}$ GDPの遊離に対するアセチルコリン(●)とアトロピン(▲)の効果の違いを調べた(文献6より転載)。

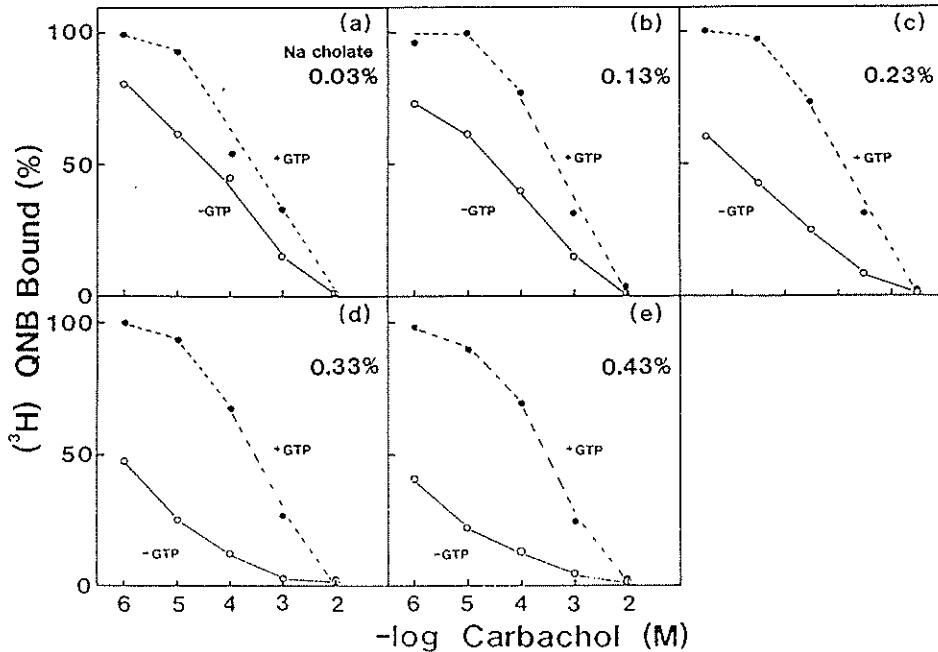
(c) 心房から精製したmAChRとG蛋白質(Gi, Go, Gn)をリン脂質中に再構成させ、 $1\mu\text{M}$   $[^{36}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ との結合を $100\mu\text{M}$ MGDP及びアセチルコリン(白)またはアトロピン(黒)存在下に調べた(文献15より転載)。



房膜標品を用いて、精製 G 蛋白質との再構成実験を行った（内在性 G 蛋白質は熱処理あるいは NEM 処理で失活させた）。受容体と G 蛋白質の相互作用を見るためには、コール酸存在下に膜標品と G 蛋白質を混合する必要があった（図 6a）。混合液を希釈後、アゴニストによる  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  結合阻害に対する GTP の効果、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  結合に対するカルバミルコリンの効果も調べた。心房膜標品の GTP 依存性高親和性アゴニスト結合は 0.3-0.4% コール酸存在下に混合した時最もよく認められ、その割合は G 蛋白質の濃度と共に増加し、この効果は 3 種の G 蛋白質 (Gi, Go, Gn) いずれを用いても認められた。また熱処理しない膜標品を用いた時も、3 種の G 蛋白質の種類によらず、いずれかの添加により高親和性結合の増加が認められた。また、NEM 処理後 G 蛋白質と再構成されると、アゴニストに対する親和性は相加的に増加した（図 6b）。 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  結合に対するカルバミルコリンの効果も、3 種の G 蛋白質いずれを用いても観察された。

これらの結果は、細胞膜内にある m2 サブタイ

プも 3 種の G 蛋白質とほとんど等しい親和性で相互作用することを示している。一方 *in vivo* 実験系では m1, m3, m5 は百日咳毒素非感受性に PI 代謝回転と、m2, m4 は百日咳毒素感受性にアデニル酸シクラーゼ阻害とよくカップルすることが示されており、それぞれが異なる G 蛋白質と相互作用するものと推測される<sup>33,34</sup>。それぞれのサブタイプは種々の G 蛋白質と相互作用し得るが、*in situ* では特異的相互作用だけを許す何らかの機構が働いている可能性が考えられる。もしそのような機構があるとすれば、それは細胞膜の調製、あるいは細胞膜の低濃度のコール酸処理で失活するような、不安定なものであることが予想される。mAChR と G 蛋白質の可溶性・精製中の artifacts によって非特異的相互作用が生じたという可能性も考えられる。一方、m1 と m2 両方のタイプで百日咳毒素感受性に PI 代謝回転と共役する例も報告されており、*in vivo* の条件でも 1 種類の mAChR サブタイプが複数の G 蛋白質と相互作用している可能性がある。



(a)

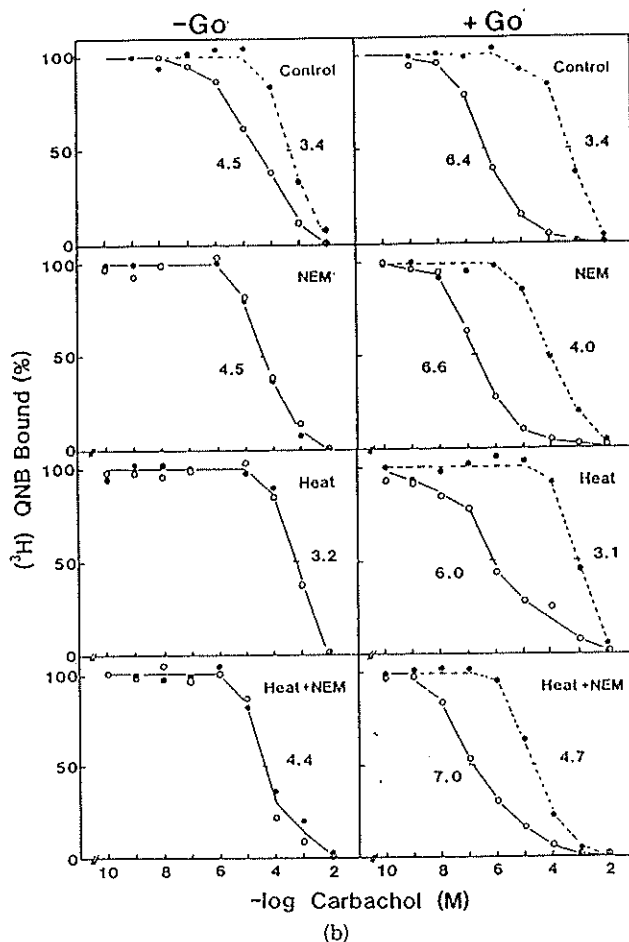


図 6. 心房膜受容体と精製 G 蛋白質 (Go) との相互作用。

(a) 熱処理により内在性 G 蛋白質を失活させた心房膜標品と精製 Go を種々の濃度のコール酸存在下で混ぜたのち、GTP 有無の条件でアセチルコリンによる  $[^3\text{H}]$ QNB 結合の阻害効果を調べた (文献 17 より転載)。(b) 熱処理、あるいは NEW 処理した、あるいはしない心房膜標品と精製 Go を再構成させ、GTP 有無の条件でアセチルコリンによる  $[^3\text{H}]$ QNB 結合の阻害効果を調べた (文献 17 より転載)。

### 3. ムスカリン受容体のリン酸化

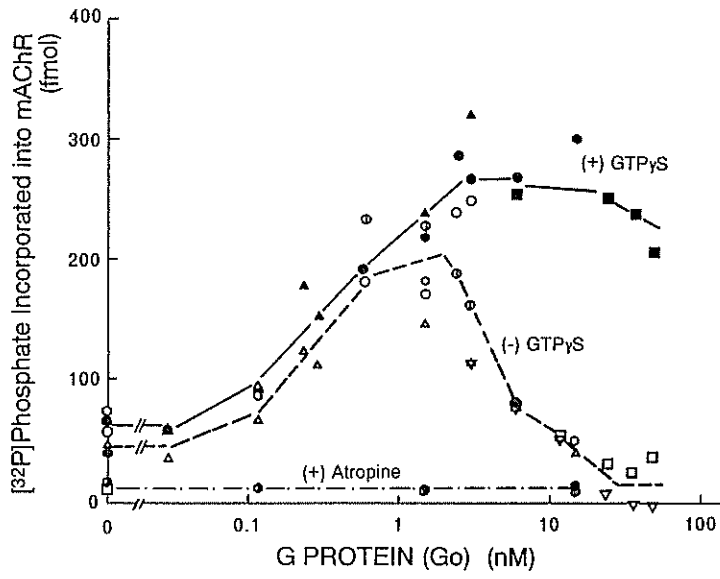
#### 3.1 蛋白質キナーゼ C によるリン酸化<sup>3, 13)</sup>

大脳から精製した mAChR は蛋白質キナーゼ C でリン酸化され、心房の mAChR は蛋白質キナーゼ C ではリン酸化されず cAMP 依存性蛋白質キナーゼによってリン酸化される。カルモジュリンキナーゼによるリン酸化はいずれの mAChR でもほとんど検出されない。これらのリン酸化はいずれも、アゴニストの有無によって影響されなかった。大脳受容体と G 蛋白質 (Go, Gi)

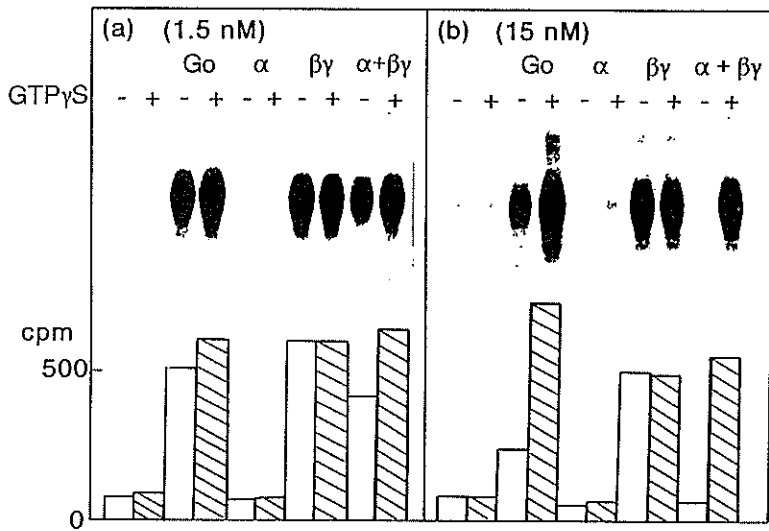
を C キナーゼでリン酸化した後、両者をリン脂質中に再構成して両者の相互作用を GTP 依存性高親和性 ACh 結合で調べると、リン酸化の有無によって全く影響されなかった。

#### 3.2 アゴニスト依存性リン酸化<sup>11)</sup>

mAChR をアゴニスト依存性にリン酸化するキナーゼを検索した結果、 $\beta$  アドレナリン受容体キナーゼの精製に準じた方法で部分精製できることが分かった。リン酸化はカルバミルコリンがない時にはほとんど見られず、またカルバミルコリ



(a)



(b)

図7. mACHRのアゴニスト依存性リン酸化のG蛋白質による調節。

(a) 種々の濃度のG蛋白質と再構成した心房mACHRをカルバミルコリン存在下にリン酸化した。

(b) GoあるいはαとβγサブユニットをmACHRと再構成させたのちリン酸化反応に供した(文献25)。

ンの効果はアトロピンによって抑えられた。このリン酸化はcAMPやcGMPによって影響されず、Caを必要としない。また、0.1 M程度の塩や低濃度のヘパリンによって阻害されるなどβアドレナリン受容体キナーゼと共通の性質を示し

た。実際 Kwatra らはβアドレナリン受容体キナーゼ標品で心房受容体のリン酸化が見られることを報告した<sup>36)</sup>。Kwatra らは培養胎児心臓標品のmACHRがアゴニスト依存性に酸化されることを報告し、このリン酸化が脱感受性に関わって

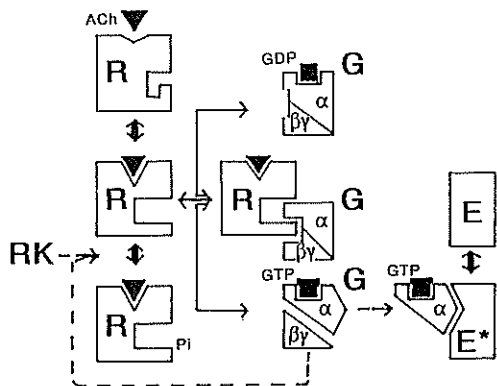


図8. mAChRのアゴニスト依存性リン酸化の、(1)G蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットによる活性化と、(2) $\alpha\beta\gamma$ ホロG蛋白質によるGTP及びGDP不活化での阻害、を説明する模式図。

いと推測している<sup>37)</sup>。

### 3.3 G蛋白質によるアゴニスト依存性リン酸化の阻害<sup>11, 19)</sup>

mAChRを種々の濃度のG蛋白質と構成したのち受容キナーゼでリン酸化すると、G蛋白質が低濃度の時はリン酸化を促進し高濃度で阻害することが分かった(図7(a))。高濃度G蛋白質による阻害は再構成標品にGTP又はGDPを加えると解除された。この阻害は、G蛋白質による高親和性アゴニスト結合の生成と下記のいくつかの点で平行する。(1)3種のG蛋白質(Gi, Go, Gn)のいずれを用いても観察される。(2)作用に必要なG蛋白質の濃度が大体等しい。(3)両作用ともGTPあるいはGDPで抑えられ、必要な濃度が大体等しい(50%の効果を示す濃度が0.1-0.8 $\mu$ M)。二つの作用を、アゴニスト・受容体・G蛋白質間に3量体が形成され、3量体がGTPあるいはGDPの存在下に受容体とG蛋白質に解離するという仮定によって説明することが可能である。アゴニスト結合で露出された受容体のリン酸化部位が、3量体の生成によって再度遮蔽されると考えるのである(図8)。

### 3.4 G蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットによるアゴニスト依存性リン酸化の促進<sup>19)</sup>

リン酸化の促進は高親和性アゴニスト結合が現れるより低い濃度で見られ、G蛋白質 $\beta\gamma$ サブユ

ニットで再現される(図7(b))。 $\beta\gamma$ サブユニットによる促進には $\alpha$ サブユニットは影響しない(ただし、 $\alpha$ と $\beta\gamma$ が高濃度に存在しグアニンヌクレオチドがない時は前述の阻害が表れる)。 $\beta\gamma$ の存在で、ATPに対する $K_m$ はあまり変わらないが、 $V_{max}$ が増加する。G蛋白質は受容体によって活性化されたのち $\alpha_{GTP}$ と $\beta\gamma$ に解離すると考えられる。 $\alpha_{GTP}$ はエフェクターに作用するのに対し、 $\beta\gamma$ はキナーゼに働いて受容体の不活性化を促進する、というモデルが考えられる(図8)。この作業仮説の検討が今後の課題である。

## 4. 今後の課題と発展

1914年にDaleによってニコチン作用とムスカリン作用の区別が提唱されてから75年が経過している。今やニコチン性アセチルコリン受容体もmAChRも操作的概念から化学構造の分かった蛋白質分子の名前ということになり、受容体の研究は新しい段階に入ろうとしている。受容体という概念は薬の作用を整理して理解するのに有用であったが、受容体の実体が分かってみると受容体サブタイプの種類は予測されたものより多種類であり、今までの整理の仕方が簡単すぎたことが分かる。受容体の化学構造から特異的薬物を予想すること、特に受容体の立体構造を決めることがこれからの大きな課題である。しかし、蛋白質分子だけでことは解決せず、受容体蛋白質とリポドとの相互作用も重要なファクターであることが、ザブタイプ特異的なピレンゼピン結合についての結果から示唆される。また、受容体サブタイプと複数のG蛋白質との間の相互作用の特異性も重要な課題である。我々は最近、Bacovirusを用いて昆虫のSf9細胞に発現させたmAChRサブタイプを使用する系を導入し(亀山・芳賀未発表)、この問題を更に追及する予定である。

受容体機能の調節の研究は、受容体の実体が明らかになってこれから本格的に始まるものと期待される。今回明らかになったアゴニスト依存性リン酸化、特にG蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットによる活性化を手懸かりとして、脱感受性の分子的機作の解明に取り組む予定である。また、本研究の予定に入っておりながら着手できなかった受容体遺伝子

の発現調節もこれからの大きな課題で、現在研究開始準備中である。

#### 謝 辞

本研究期間中、浜松医科大学市山新教授に全面的な支援を載しました。特に記して感謝致します。

#### 発表論文

- 1) T. Haga and K. Haga: Interaction of the muscarinic acetylcholine receptor and GTP-binding proteins. *Biomed. Res.*, **8**, 149-156 (1987).
- 2) G. Berstein, K. Haga, T. Haga and A. Ichiyama: Agonist and antagonist binding of muscarinic acetylcholine receptors purified from porcine brain: Interconversion of high and low affinity sites by sulfhydryl reagents. *J. Neurochem.*, **50**, 1687-1694 (1988).
- 3) T. Haga, K. Haga, G. Berstein, T. Nishiyama, H. Uchiyama and A. Ichiyama: Molecular properties of muscarinic receptors. *Trends in Pharmac. Sci.*, Supplement III, pp. 12-18 (1988).
- 4) K. Ohara, K. Haga, G. Berstein, T. Haga and A. Ichiyama: The interaction between D-2 dopamine receptors and GTP-binding proteins. *Mol. Pharmac.*, **33**, 290-296 (1988).
- 5) T. Haga, G. Berstein, T. Nishiyama, H. Uchiyama, K. Ohara and K. Haga: Biochemical studies on the muscarinic acetylcholine receptor. in "Neuroreceptors and Signal Transduction," ed. by S. Kito, T. Segawa, K. Kuriyama, M. Tohyama and R. W. Olsen, Plenum Publishing Company, New York, London and Washington D. C., pp. 239-254 (1988).
- 6) K. Haga, H. Uchiyama, T. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa and H. Matsuo: Cerebral muscarinic acetylcholine receptors interact with three kinds of GTP-binding proteins in a reconstitution system of purified components. *Mol. Pharmac.*, **35**, 286-294 (1989).
- 7) T. Haga: The structure and function of muscarinic acetylcholine receptors. in "Biosignal Transduction Mechanisms," ed. by M. Kasai, T. Yoshioka and H. Suzuki, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer Verlag, Berlin, pp. 115-138 (1989).
- 8) G. Berstein and T. Haga: Molecular aspects of muscarinic receptors. in "Current Aspects in the Neurosciences," Vol. 1, ed. by N. Osborne, Macmillan Press, London, pp. 245-284 (1989).
- 9) T. Nishiyama, G. Berstein, T. Ikegaya, T. Haga, A. Ichiyama, A. Kobayashi and N. Yamazaki:

Comparison between purified cerebral and atrial muscarinic acetylcholine receptors: Pirenzepine binding and the effect of sulfhydryl reagents. *Biomed. Res.*, **10**, 251-260 (1989).

- 10) B. Berstein, T. Haga and A. Ichiyama: Effect of the lipid environment on the differential affinity of purified cerebral and atrial muscarinic acetylcholine receptors for pirenzepine. *Mol. Pharmac.*, **36**, 601-607 (1989).
- 11) K. Haga and T. Haga: Agonist-dependent phosphorylation of cerebral and atrial muscarinic receptors: Blockade of the phosphorylation by GTP-binding regulatory proteins and its reversal by guanine nucleotides. *Biomed. Res.*, **10**, 293-299 (1989).
- 12) T. Haga, K. Haga, G. Berstein, H. Uchiyama, T. Nishiyama and T. Ikegaya: Molecular characterization of muscarinic acetylcholine receptors. in "Physiology and Pharmacology of Transmembrane Signalling," ed. by T. Segawa, M. Endoh, M. Ui and K. Kurihara, Elsevier Science Publishers B. V., pp. 105-113 (1989).
- 13) K. Haga, T. Haga and A. Ichiyama: Phosphorylation by protein kinase C of the muscarinic acetylcholine receptor. *J. Neurochem.*, **54**, 1639-1644 (1990).
- 14) H. Uchiyama, K. Ohara, K. Haga, T. Haga and A. Ichiyama: Location in muscarinic acetylcholine receptors of sites for [<sup>3</sup>H]propylbenzylcholine mustard binding and for phosphorylation with protein kinase C. *J. Neurochem.*, **54**, 1870-1881 (1990).
- 15) T. Ikegaya, T. Nishiyama, K. Haga, T. Haga, A. Ichiyama, A. Kobayashi and N. Yamazaki: Interaction of atrial muscarinic receptors with three kinds of GTP-binding proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **22**, 343-351 (1990).
- 16) M. Kajimura, T. Haga, A. Ichiyama, E. Kaneko and N. Honda: Carbachol-induced potentiation and inhibition of acid secretion by guinea pig gastric glands. *Eur. J. Pharmacol.*, **178**, 59-69 (1990).
- 17) T. Haga, T. Ikegaya and K. Haga: Muscarinic acetylcholine receptors in porcine atrial membranes interact with three kinds of G proteins. *Jap. Circulation J.*, **54**, 1176-1184 (1990).
- 18) K. Ohara, H. Uchiyama, K. Ohara, T. Haga and A. Ichiyama: Interaction of deglycosylated muscarinic receptors with ligands and G proteins. *Eur. J. Pharmacol.*, **189**, 341-346 (1990).
- 19) K. Haga and T. Haga: Dual regulation by G proteins of agonist-dependent phosphorylation

of muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS Lett.*, 268, 43-47 (1990).

#### 引用論文

- 20) K. Haga and T. Haga: Affinity chromatography of the muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.*, 258, 13575-13579 (1983).
- 21) G. L. Peterson, G. S. Herron, M. Yamaki, D. S. Fullerton and M. I. Schimerlik: Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 4993-4997 (1984).
- 22) K. Haga and T. Haga: Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine brain. *J. Biol. Chem.*, 260, 7927-7935 (1985).
- 23) T. Kubo, K. Fukuda, A. Mikami, A. Maeda, H. Takahashi, M. Mishina, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose and S. Numa: Cloning, Sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 323, 411-416 (1986).
- 24) T. Kubo, A. Maeda, K. Sugimoto, I. Akiba, A. Mikami, H. Takahashi, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa, H. Matsuo, T. Hirose and S. Numa: Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.*, 209, 367-372 (1986).
- 25) E. G. Peralta, J. W. Winslow, G. L. Peterson, D. H. Smith, A. Ashkenazi, J. Ramachandran, M. I. Schimerlik and D. J. Capon: Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science*, 236, 600-605 (1987).
- 26) T. I. Bonner, N. J. Buckley, A. C. Young and M. R. Brann: Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Sciences*, 237, 527-532 (1987).
- 27) T. I. Bonner, A. C. Young, M. R. Brann and N. J. Buckley: Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptors. *Neuron*, 1, 403-410 (1988).
- 28) V. A. Florio and P. C. Sternweis: Reconstitution of resolved muscarinic cholinergic receptors with purified GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 260, 3477-3483 (1985).
- 29) K. Haga, T. Haga, A. Ichiyama, T. Katada, H. Kurose and M. Ui: Functional reconstitution of purified muscarinic receptors and inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Nature*, 316, 731-733 (1985).
- 30) H. Kurose, T. Katada, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama and M. Ui: Functional interaction of purified muscarinic receptors with purified inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins reconstituted in phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.*, 261, 6423-6428 (1986).
- 31) K. Haga, T. Haga and A. Ichiyama: Reconstitution of the muscarinic acetylcholine receptor: Guanine nucleotide-sensitive high affinity binding of agonists to purified muscarinic receptors reconstituted with GTP-binding proteins (Gi and Go). *J. Biol. Chem.*, 261, 10133-10140 (1986).
- 32) N. J. Buckley, T. I. Bonner and M. R. Brann: Location of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J. Neurosci.*, 8, 4646-4652 (1988).
- 33) K. Fukuda, T. Kubo, A. Maeda, I. Akiba, H. Bujo, J. Nakai, M. Mishina, H. Hiogashida, E. Neher, A. Marty and S. Numa: Selective effector coupling of muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Trends Pharmac. Sci., Supplement IV*, pp. 4-10 (1989).
- 34) A. Ashkenazi, E. G. Peralta, J. W. Wislow, J. Ramachandran and D. J. Capon: Functional diversity of muscarinic receptor subtypes in cellular signal transduction and growth. *Trends Pharmac. Sci., Supplement IV*, pp. 16-22 (1989).
- 35) C. A. M. Curtis, M. Wheatley, S. Bansal, N. J. M. Birdsall, P. Wveleigh, E. K. Pedder, D. Poyner and E. C. Hulme: Propylbenzilylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor. *J. Biol. Chem.*, 264, 489-495 (1989).
- 36) M. M. Kwatra, J. L. Benovic, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and M. M. Hosey: Phosphorylation of chick heart muscarinic cholinergic receptors by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *Biochemistry*, 28, 4543-4547 (1989).
- 37) M. M. Kwatra, E. Leung, A. C. Maan, K. K. McMahon, J. Ptasienski, R. D. Green and M. M. Hosey: Correlation of agonist-induced phosphorylation of chick heart muscarinic receptors with receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*, 262, 16314-16321 (1987).