

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

精神疾患の病態における G 蛋白を介する情報伝達
— ラット脳およびヒト死後脳を用いて —

研究代表者 小田垣 雄二 (大学病院 神経精神科・心療内科)

緒 言

精神医学における生物学的研究は最近の科学技術の急速な発展にともなって飛躍的に進歩し、多くの有益な知見が蓄積されてきた。特に、この数十年の間、中枢神経における細胞間および細胞内情報伝達系の分子機構の詳細が明らかにされるに従い、抗精神病薬や抗うつ薬の作用機序も分子レベルで説明されるようになってきている。しかし、このような精神薬理学の進歩にもかかわらず、精神疾患の病態についてはなお明らかでない点が多い。また、現在の向精神薬は副作用や効能の面でなお不十分と言わざるを得ない。

筆者は、精神疾患のモノアミン仮説や向精神薬の作用機序に関わる神経伝達が、ほとんど全て三量体G蛋白結合型受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) を介するものであることに着目し、GPCRによるG蛋白の機能的活性化機構に関しての研究を行ってきた。当初は受容体刺激によるhigh-affinity GTPase活性¹⁾を指標に検討を重ねていたが、方法論的な制約のため、最近では実験手技としてはもっぱら $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験を用い、主にラットの脳膜標品における様々な受容体とG蛋白との共役に関する検討²⁻¹³⁾を行ってきた。

この方法は、三量体G蛋白が受容体刺激により活性化され、GTP結合部位に非水解性の $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ が結合する反応を利用したもので、簡便で応用範囲が広いことから現在広く用いられているが、 $G_{i/o}$ 以外の G_s や $G_{q/11}$ の反応を検出することは困難であった。そこで、最近では $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験に抗 $G\alpha$ 抗体による免疫反応を組み合わせた新たな方法を試み、ラット脳膜標品における5-HT_{2A}受容体およびM₁ムスカリン性アセチルコリン受容体と $G\alpha_q$ との機能的共役の検出に成功している¹⁴⁻¹⁷⁾。本研究においては、これまでの研究をさらに発展させ、精神疾患の病態解明や治療薬の開発に資するべく、ラットおよびヒト死後脳より調整した膜標品を用い、各種受容体とG蛋白の機能的共役について一連の検討を行った。

材料と方法

200~250 gのSprague-Dawley系雄性ラットを断頭後、氷上で速やかに脳を切り出し、既報に従って大脳皮質、海馬、線条体各部位の膜標品を調整した。一方、ヒト死後脳に関しては、共同研究者であるJ. Javier Meana教授 (バスク大学薬理学教室)より提供を受けた背外側前頭前野を用い、ラット脳の場合とほぼ同様の手順で膜標品を調整した。現時点では、神経精神疾患のない対照群の40サンプルを入手し検討を続けている。

$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験は、従来の吸引濾過法による方法 (以下、方法①) と、抗 $G\alpha$ 抗体をコートした帯磁気ビーズによる免疫沈降法を組み合わせた方法¹⁷⁾ (以下、方法②) のいずれかを用いて行った。

結 果

1) ラット脳膜標品における xanomeline および N-desmethylozapine による $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合に関する薬理的検討

方法①を用いた従来の検討¹³⁾のなかで、両薬物がラット脳膜標品における $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合を濃度依存的に増加させることをすでに報告した。いずれの薬物も、従来の抗精神病薬では効果のない統合失調症の陰性症状や認知障害などに対する効果が期待されており、その薬理作用を詳細に検討することは、新たな作用機序に基づく向精神薬の開発に資するものと思われる。現在までの検討では、両薬物による反応には5-HT_{1A}受容体が関与していることが明らかとなっている。さらに方法②を用いた検討により、xanomelineがM₁タイプのムスカリン性アセチルコリン受容体の部分作動薬であることも示されている。また、N-desmethylozapineの反応の一部にオピオイド受容体、特に δ -オピオイド受容体が関与している可能性を示す結果を得ており、これについては現在さらに検討を進めている。現時点でのこれらの結果については、学会にて発表した (学会発表1 および4)。

2) ラット脳膜標品における方法②を用いた検討

ラット脳膜標品における5-HT_{2A}受容体およびM₁ムスカ

リン性アセチルコリン受容体を介した $G\alpha_q$ の活性化反応についてはすでに報告した¹⁷⁾。現在、他の受容体とG蛋白各サブタイプとの機能的共役についての探索的研究を継続している。

3) ヒト死後脳膜標品における方法①を用いた検討

ヒト死後脳膜標品を用いた従来の濾過法による $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合については、実験条件の至適化をほぼ終了し、複数の作動薬による反応について現在データを集積中である。現時点までの結果については、すでに国際学会で報告した(学会発表3)。

4) ヒト死後脳膜標品における方法②を用いた検討

ヒト死後脳膜標品においても、ラットでの結果と同様、5-HT_{2A}受容体およびM₁ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した $G\alpha_q$ の活性化反応が検出可能であることを確認した(学会発表3)。すでに40サンプルでの測定も終了したが、その結果、M₁ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した $G\alpha_q$ の活性化の程度が年齢と負の相関関係にあることが明らかとなった。また、アデノシンA₁受容体との機能的共役が、G_{i/o}に属する各Gαサブタイプのうち、Gα_{i-3}に選択的に認められることを発見し(学会発表2)、これについては現在、論文を投稿中である(論文1)。

考 察

複雑な精神現象を単一の神経伝達物質の働きだけで説明することは困難であるが、これまでの精神薬理学における膨大な知見から、ある種の精神機能と特に関連の深い神経伝達系が明らかにされている。また、それらの多くは、同時に精神疾患の治療薬の作用機序にも関与していることが知られている。本研究で示されたxanomelineおよびN-desmethylozapineの5-HT_{1A}受容体の部分作動薬としての作用は、多くの非定型抗精神病薬に共通して認める作用であり⁹⁾、今後の抗精神病薬の開発においてひとつのターゲットになるものと思われる。また、xanomelineのM₁ムスカリン性アセチルコリン受容体の作動薬としての作用、およびN-desmethylozapineのオピオイド受容体の作動薬としての作用も、それぞれの薬物の臨床効果との関連を考えるうえで興味深い知見である。精神科治療薬の今後の開発を考えるうえでは、各種受容体に対する(部分)作動薬やallosteric modulatorの有効性について検討していくことが必要である¹⁸⁾。

ラットの脳膜標品における方法②による検討では、検出が可能な受容体とG蛋白サブタイプの組み合わせをさらに探究することにより、これまでの濾過法による $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合実験では検出し得なかった情報伝達系に関する新たな情報を提供できるものと期待される。

ヒト死後脳におけるM₁ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する $G\alpha_q$ の活性化反応が年齢に伴い低下する現象は、加齢に伴う認知機能の低下を反映したのと考え

られる。また、この結果からは、今後の精神疾患と対照群との比較検討では、年齢についてのマッチングに特段の注意が必要になると考えている。現在すでに入手している40サンプルでの測定を終了後には、いよいよ対照群と精神疾患罹患患者群との比較検討のプロジェクトを開始する予定であり、精神疾患の病態生理にせまる結果を得ることができると期待している。

参考文献

- 1) Odagaki Y, Fuxe K. Agonist-induced high-affinity GTP hydrolysis as an index of receptor-mediated G protein activation in mammalian brain membranes. In: Challis RAJ, editor. Methods in molecular biology, vol. 83, Receptor signal transduction protocols. Totowa: Humana Press; 1997. p. 133-41.
- 2) Odagaki Y, Yamauchi T. γ -Hydroxybutyric acid, unlike γ -aminobutyric acid, does not stimulate G_i/G_o proteins in rat brain membranes. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004;94:89-94.
- 3) Odagaki Y, Toyoshima R, Yamauchi T. Lack of G protein-coupled sigma receptors in rat brain membranes: receptor-mediated high-affinity GTPase activity and $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding studies. J Neural Transm 2005;112:873-83.
- 4) Odagaki Y, Toyoshima R, Yamauchi T. Trazodone and its active metabolite *m*-chlorophenylpiperazine as partial agonists at 5-HT_{1A} receptors assessed by $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding. J Psychopharmacol 2005;19:235-41.
- 5) Odagaki Y, Toyoshima R. Detailed pharmacological characterization of 5-HT_{1A} receptor-mediated $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding in rat hippocampal membranes. J Pharmacol Sci 2005;98:66-76.
- 6) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT_{1A} receptor-mediated G protein activation assessed by $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding in rat cerebral cortex. Eur J Pharmacol 2005;521:49-58.
- 7) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT-stimulated $[^{35}\text{S}]\text{guanosin-5'-O-(3-thio)triphosphate}$ binding as an assay for functional activation of G proteins coupled with 5-HT_{1B} receptors in rat striatal membranes. Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol 2006;372:335-45.
- 8) Odagaki Y, Toyoshima R. Dopamine D₂ receptor-mediated G protein activation assessed by agonist-stimulated $[^{35}\text{S}]\text{guanosine 5'-O-(}\gamma\text{-thiotriphosphate)}$ binding in rat striatal membranes. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat 2006;30:1304-12.
- 9) Odagaki Y, Toyoshima R. 5-HT_{1A} receptor agonist properties of antipsychotics determined by $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding in rat hippocampal membranes. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007;34:462-6.
- 10) Odagaki Y, Toyoshima R. Pharmacological characterization of α_{2D} -adrenergic receptor-mediated

- [³⁵S]GTPγS binding in rat cerebral cortical membranes. *Pharmacol Res* 2008;57:435-44.
- 11) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional coupling between metabotropic glutamate receptors and G-proteins in rat cerebral cortex assessed by guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate ([³⁵S]GTPγS) binding assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;109:175-85.
 - 12) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Group II metabotropic glutamate receptor-mediated activation of G-proteins in rat hippocampal and striatal membranes. *Neurosci Lett* 2013;539:22-6.
 - 13) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional activation of G-proteins coupled with muscarinic acetylcholine receptors in rat brain membranes. *J Pharmacol Sci* 2014;125:157-68.
 - 14) Odagaki Y, Toyoshima R. Muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of Gq in rat brain membranes determined by guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate ([³⁵S]GTPγS) binding using an anti-G protein scintillation proximity assay. *J Neural Transm* 2012;119:525-32.
 - 15) Odagaki Y, Toyoshima R. Activation of Gq proteins coupled with 5-HT₂ receptors in rat cerebral cortical membranes assessed by antibody-capture scintillation proximity assay (SPA)/[³⁵S]GTPγS binding. *Pharmacology* 2013;92:2-10.
 - 16) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Pharmacological characterization of M₁ muscarinic acetylcholine receptor-mediated Gq activation in rat cerebral cortical and hippocampal membranes. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2013;386:937-47.
 - 17) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R. Functional activation of Gα_q via serotonin_{2A} (5-HT_{2A}) and muscarinic acetylcholine M₁ receptors assessed by guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate ([³⁵S]GTPγS) binding/immunoprecipitation in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol* 2014;726:109-15.
 - 18) Odagaki Y. Agonists and allosteric modulators of G protein-coupled receptors as promising psychotropic drugs. In: Atta-ur-Rahman, editor. *Frontiers in clinical drug research-central nervous system*, vol. 1. Bentham Science; 2013. p. 3-43.
- 研究成果リスト (論文, 学会発表, 特許出願等)**
- 論文**
- 1) Odagaki Y, Kinoshita M, Ota T, Meana JJ, Callod LF, García-Sevilla JA. Adenosine A₁ receptors are selectively coupled to Gα_{i,3} in human brains: guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate [³⁵S]GTPγS binding/immunoprecipitation study. *Eur J Pharmacol* (in press)
- 学会発表**
- 1) 小田垣雄二, 木下雅一, 豊嶋良一. ラット大脳各部位における xanomeline による G 蛋白活性化の薬理学的検討, 第 43 回日本神経精神薬理学会年会, 平成 25 年 10 月, 沖縄
 - 2) 小田垣雄二, 木下雅一, 太田敏男, Meana JJ, Callod LF, García-Sevilla JA. ヒト死後脳膜標品において アデノシン受容体は G_{i/o} 蛋白のうち G_{i-3} と選択的に共役する, 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会, 平成 26 年 11 月, 名古屋
 - 3) Odagaki Y, Kinoshita M, Toyoshima R, Meana JJ, Callod LF, García-Sevilla JA. Receptor-mediated [³⁵S]GTPγS binding in postmortem human brain membranes: optimization of assay conditions for future studies. 27th ECNP Congress, Oct. 2014, Berlin
 - 4) 小田垣雄二, 木下雅一, 太田敏男. ラット脳膜標品における xanomeline および N-desmethyloclozapine による [³⁵S]GTPγS 結合の薬理学的性質, 第 88 回日本薬理学会年会, 平成 27 年 3 月, 名古屋
- 特許出願**
- なし