

主題（２）オピオイド受容体機能

2-1

DAMGOによる μ/κ オピオイド受容体間識別に関与する受容体構造

○家永裕賀、南 雅文、勝又清至、関 貴弘、
青木康英、片尾謙利、小野木達弘、佐藤公道
京都大学薬学部分子作用制御学教室

緒言

オピオイド受容体の3つのサブタイプ μ , δ , κ 間のアミノ酸配列の相同性は60%と非常に高いものであるにもかかわらず、DAMGOに代表される μ 選択的リガンドは、 δ や κ 受容体に対する親和性が非常に低い。このサブタイプ選択性と受容体構造の関係については、ほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、種々の μ/κ キメラ受容体を作製し、 μ 選択的リガンドDAMGOの μ/κ 受容体間識別に関与する受容体構造について検討した。

実験方法

μ/κ キメラ受容体の作製には制限酵素 Afl III、Bgl II、BanII および Pvu II を用いた (Fig. 1)。 κ 受容体には部位特異的 point mutation 導入により Pvu II サイトを導入

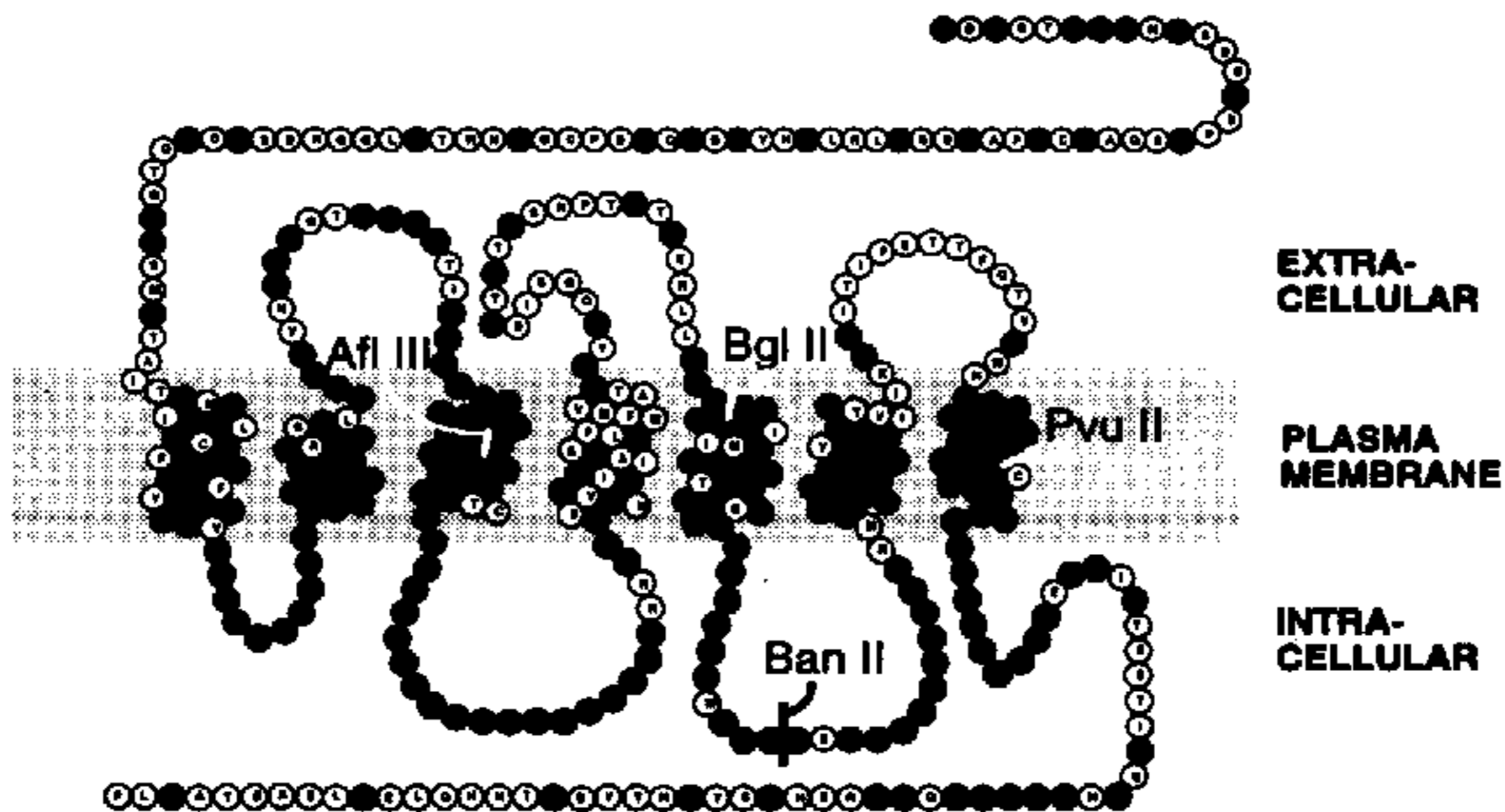
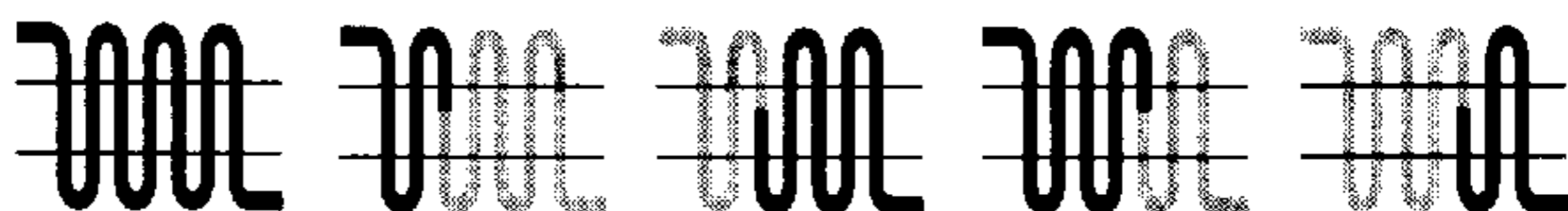


Fig. 1 Structure of the μ -OPR. Black circles indicate the residues conserved between the μ - and κ -OPRs. White circles indicate the residues specific for the μ -OPR. Noted are the unique restriction enzyme sites used to construct the chimeric receptors.

入した。各受容体 cDNA を適当な制限酵素で切断し、そのフラグメントを発現ベクター pcDNA3 に組み込み、得られたキメラ受容体あるいは野生型受容体 cDNA を含むプラスミドを DEAE-dextran 法により COS-7 細胞にトランスフェクトし 65 時間培養の後細胞を回収した。得られた細胞を Tris 緩衝液中でホモジナイズし、30,000g で 20 分間遠心した後、ペレットを緩衝液に再懸濁し、これを粗膜標品として以後の実験に用いた。 $[^3\text{H}]$ DAMGO および $[^3\text{H}]$ bremazocine を用い飽和結合実験を行った。

実験結果および考察

DAMGO の μ/κ 受容体間識別に関与する受容体構造を明らかにするため、まず最初に、 μ 受容体を第 3 膜貫通部位の途中で切断し以後を κ 受容体の対応する部位で置き換えた MMKK キメラ受容体と、その逆の KKMM キメラ受容体を作製した。 $[^3\text{H}]$ DAMGO の飽和結合実験を行い、スキッチャード解析した結果、 $[^3\text{H}]$ DAMGO は KKMM に対し高い親和性 ($K_d=4.38\pm 0.90\text{nM}$) で結合したにもかかわらず、MMKK に対する親和性は低いものであった (Table 1)。この結果よりこの結果より DAMGO の μ/δ 受容体間の識別に関与する受



	μ	MMKK	KKMM	MMMκ	KKKM
DAMGO	3.46 ± 0.84	Low affinity	4.38 ± 0.90	Low affinity	3.56 ± 0.92
Bremazocine	2.68 ± 0.22	1.58 ± 0.45	1.09 ± 0.04	3.11 ± 0.71	2.56 ± 1.00

Table 1. K_d values of $[^3\text{H}]$ DAMGO and $[^3\text{H}]$ bremazocine binding to the cell membrane preparations from COS-7 cells expressing the wild type μ - and chimeric μ/κ opioid receptors (OPRs). Each chimeric receptor is given the name on the basis of the origins (namely μ - (M) and κ - (K) receptors) of its four extracellular domains. 'Low affinity' means impossible to calculate the K_d values due to very little or no specific binding of tritiated ligands to the receptors.

容体構造は受容体の後半部分に存在すると考えられたので、後半部分をさらに第5膜貫通部位に存在するBglIIサイトを用いて2分しつなぎ換えることにより MMMK と KKKM、キメラ受容体を作製し結合実験を行った。 $[^3\text{H}]$ DAMGO は、KKKM に対して高い親和性 ($K_d=3.56\pm 0.92$ nM) で結合したが、MMMK に対する親和性は低いものであった。非選択的オピオイドリガン

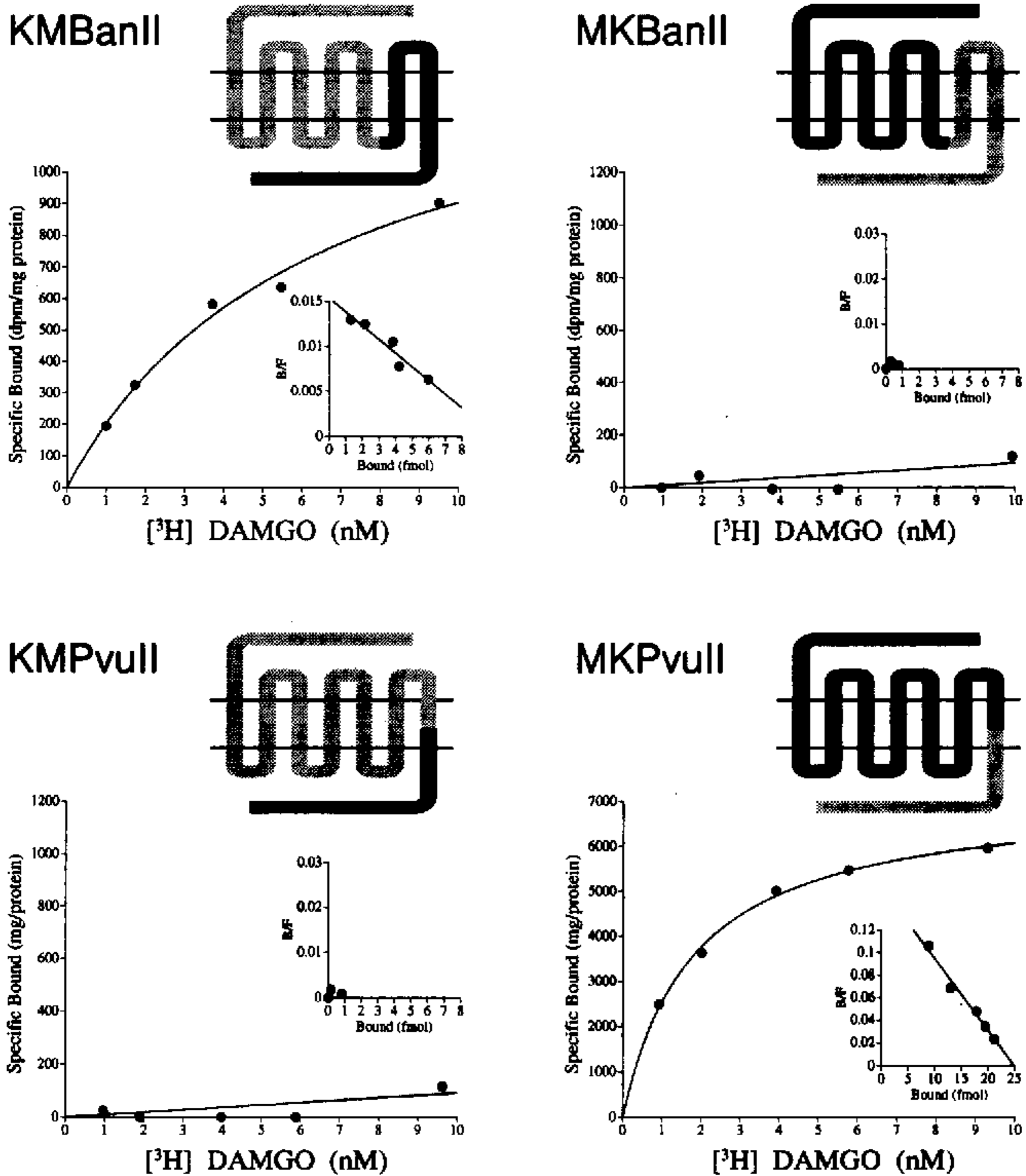


Fig. 2 Saturation binding of $[^3\text{H}]$ DAMGO to the membrane of COS-7 cells which express chimeric KMBanII, MKBanII, KMPvuII or MKPvuII receptor. Insets show the scatchard analyses of $[^3\text{H}]$ DAMGO binding.

ドである [³H] bremazocine は、MMKK 及び MMMK 受容体に対し、野生型 μ -受容体と同程度の親和性で結合したことより、MMKK 及び MMMK 受容体に対する [³H] DAMGO の低親和性は、受容体の高次構造形成不良や発現不良が原因ではないと考えられる。以上の結果より、DAMGO による μ/κ 受容体間の識別には、第 5 膜貫通部位より下流領域の受容体構造が重要であることが明らかとなった。

DAMGO による μ/κ 受容体間識別に重要な受容体構造の同定のため、さらに、Ban II および Pvu II サイトを用いキメラ受容体を作製した (Fig. 2)。[³H] DAMGO は、KMBanII に対して高い親和性 ($K_d=4.37\pm 1.21$ nM) で結合したが、MKBanII に対する親和性は低いものであった。また、MKPvuII には高い親和性 ($K_d=1.12\pm 0.15$ nM) で結合したが、KMPvuII に対する親和性は低いものであった。非選択的オピオイドリガンドである [³H] bremazocine の、KMBanII、MKBanII、MKPvuII および KMPvuII キメラ受容体に対する親和性は、各々、 $K_d=7.56\pm 0.42$ 、 3.94 ± 0.48 、 7.38 ± 0.50 および 6.30 ± 0.99 nM であり、野生型 μ -受容体と同程度の親和性であったことより、MKBanII および KMPvuII 受容体に対する [³H] DAMGO の低親和性は、受容体の高次構造形成不良や発現不良が原因ではないと考えられる。以上の結果は、DAMGO による μ/κ 受容体間の識別に、第 3 細胞内ループ途中に存在する Ban II サイトから第 7 膜貫通部位中程にある Pvu II サイトまでの領域が重要であることを示唆している。本領域には、 μ/κ 受容体間で異なっているアミノ酸残基が 21 残基あり、今後、 μ/κ 受容体間識別に関与しているアミノ酸残基を同定するためには、それらアミノ酸残基を置換した変異型受容体を作製し、結合実験を行う必要があるものと考えられる。

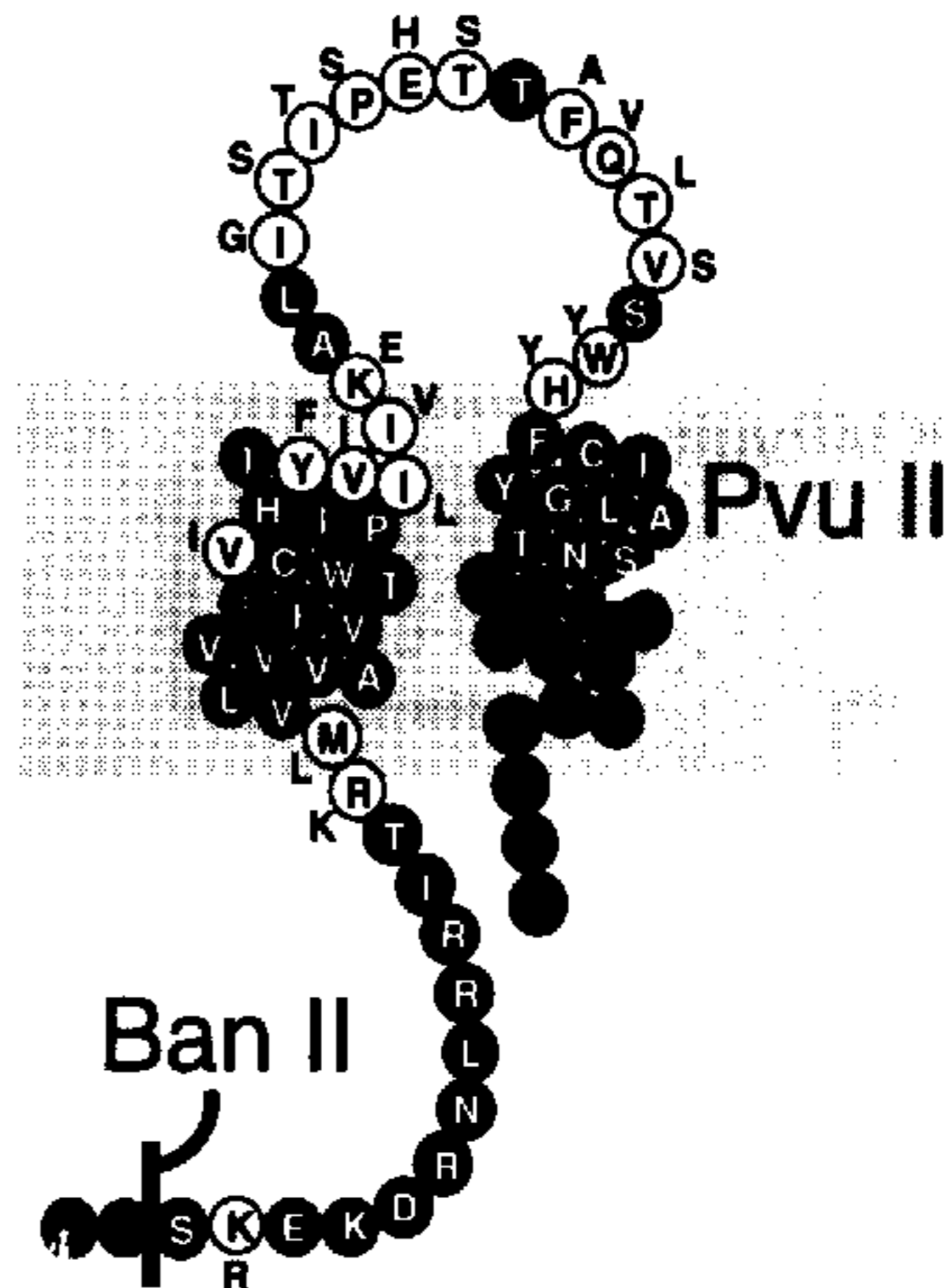


Fig. 3 Structure of the region around the third extracellular loop of the μ -OPR. Black circles indicate the residues conserved between the μ - and κ -OPRs. White circles indicate the residues specific for the μ -OPR. The corresponding residues found in the κ -OPR are indicated. Noted are the unique restriction enzyme sites, Ban II and Pvu II sites, used to construct the chimeric receptors.

2-2 DAMGOによる μ/δ オピオイド受容体間識別に関与する受容体構造

○南 雅文、中川貴之、関 貴弘、小野木達弘、
青木康英、片尾謙利、勝又清至、佐藤公道
京都大学薬学部分子作用制御学教室

緒言

オピオイド受容体の3つのサブタイプ μ , δ , κ 間のアミノ酸配列の相同性は60%と非常に高いものであるにもかかわらず、DAMGOに代表される μ 選択的リガンドは、 δ や κ 受容体に対する親和性が非常に低い。このサブタイプ選択性と受容体構造の関係については、ほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、種々の μ/δ キメラ受容体および点変異受容体を作製し、 μ 選択的リガンドDAMGOの μ/δ 受容体間識別に関与する受容体構造について検討した。

実験方法

μ/δ キメラ受容体の作製には制限酵素 Afl III と Bbs I を用いた。部位特異的 point 変異導入は、CLONTECH 社の Transformer™ Site-directed Mutagenesis Kit を用いて行った。各受容体 cDNA を適当な制限酵素で切断し、そのフラグメントを発現ベクター pcDNA3 に組み込み、得られたキメラ、点変異型あるいは野生型受容体 cDNA を含むプラスミドを DEAE-dextran 法により COS-7 細胞にトランスフェクトし 65 時間培養の後細胞を回収した。得られた細胞を Tris 緩衝液中でホモジナイズし、30,000g で 20 分間遠心した後、ペレットを緩衝液に再懸濁し、これを粗膜標品として結合実験を行った。結合実験は [3 H] DAMGO、[3 H] DADLE、及び [3 H] bremazocine を用い、飽和結合実験あるいは非標識リガンドによる置換実験を行った。一部の実験では、受容体を安定的に発現させた CHO 細胞を用い、膜標品による結合実験および生細胞における cAMP 産生に対するオピオイドの効果検討を行った。

実験結果および考察

DAMGO の μ/δ 受容体間識別に関与する受容体構造を明らかにするため、まず最初に、 μ 受容体を第 3 膜貫通部位の途中で切断し以後を δ 受容体の対応する部

位で置き換えたMMDDキメラ受容体と、その逆のDDMMキメラ受容体を作製した。[³H] DAMGOの飽和結合実験を行い、スキッチャード解析した結果、[³H] DAMGOはMMDDに対し高い親和性 ($K_d=2.14\pm 0.40\text{nM}$) で結合したにもかかわらず、DDMMに対する親和性は低いものであった。この結果よりDAMGOの μ/δ 受容体間の識別に関与する受容体構造は受容体の前半部分に存在すると考えられたので、前半部分をさらに細胞内第1ループの途中の位置で2つに分けてつなぎ換えることによりMDDD、DMMM、MDMM、DMDDキメラ受容体を作製し結合実験を行った。結果をTable 1に示す。N末から細胞内第1ループ途中までを交換したキメラに関しては、[³H] DAMGOは、DMMMに対して高い親和性 ($K_d=3.16\pm 0.91\text{ nM}$) で結合したが、MDDDに対する親和性は低いものであった。一方、細胞内第1ループ途中から第3膜貫通部位途中までを交換したキメラに関しては、[³H] DAMGOはDMDDに対して高い親和性 ($K_d=5.24\pm 0.86\text{ nM}$) で結合したが、MDMMに対する親和性は低いものであった。非選択的オピオイドリガンドである[³H] bremazocineは、MDDD及びMDMM受容体に対し、野生型 μ -あるいはDMMM、DMDD受容体と同程度の親和性で結合したことより、MDDD及びMDMM受容体に対する[³H] DAMGOの低親和性は、受容体の高次構造形成不良や発現不良が原因ではないと考えられる。以上の結果より、DAMGOによる μ/δ 受容体間の識別には、細胞外第1ループ周辺を受容体構造が重要であることが明らかとなった。この領域には μ/δ 受容体間で異なるアミノ酸残基が7残基しかなく (Fig.1)、これらのアミノ酸残基のいずれかがDAMGOによる μ/δ 受容体間識別に重要であると考えられた。そこで点変異導入により δ 受容体のこれらアミノ酸



	μ	MDDD	DMMM	MDMM	DMDD
DAMGO	3.46 ± 0.84	Low affinity	3.16 ± 0.91	Low affinity	5.24 ± 0.86
Bremazocine	2.68 ± 0.22	4.71 ± 0.66	0.95 ± 0.17	1.35 ± 0.18	2.29 ± 0.19

Table 1. K_d values of [³H]DAMGO and [³H]bremazocine binding to the cell membrane preparations from COS-7 cells expressing the wild type μ - and chimeric μ/δ opioid receptors (OPRs). Each chimeric receptor is given the name on the basis of the origins (namely μ - (M) and δ - (D) receptors) of its four extracellular domains. 'Low affinity' means impossible to calculate the K_d values due to very little or no specific binding of tritiated ligands to the receptors.

残基を μ 受容体の対応するアミノ酸残基に置換した変異型受容体を作製して DAMGO の結合親和性を検討した (Table 2)。 $[^3\text{H}]$ DADLE の置換実験より、DAMGO の μ 、 δ および DMDD 受容体に対する K_i 値は、各々、4.37nM、1405nM および 23.77nM であった。変異型受容体では、 δ 受容体の 108 番目のリジンをアスパラギンに置換した δK108N のみが DAMGO に対し高い親和性 ($K_i = 18.68\text{nM}$) を示し、他の変異型受容体の DAMGO に対する親和性は低く、 K_i 値は 708 - 1432nM であった。この結果より、DAMGO による μ/δ 受容体間識別には δ 受容体 108 番目のリジン残基とそれに対応する μ 受容体 127 番目のアスパラギン残基の 1 アミノ酸残基の違いが重要であること

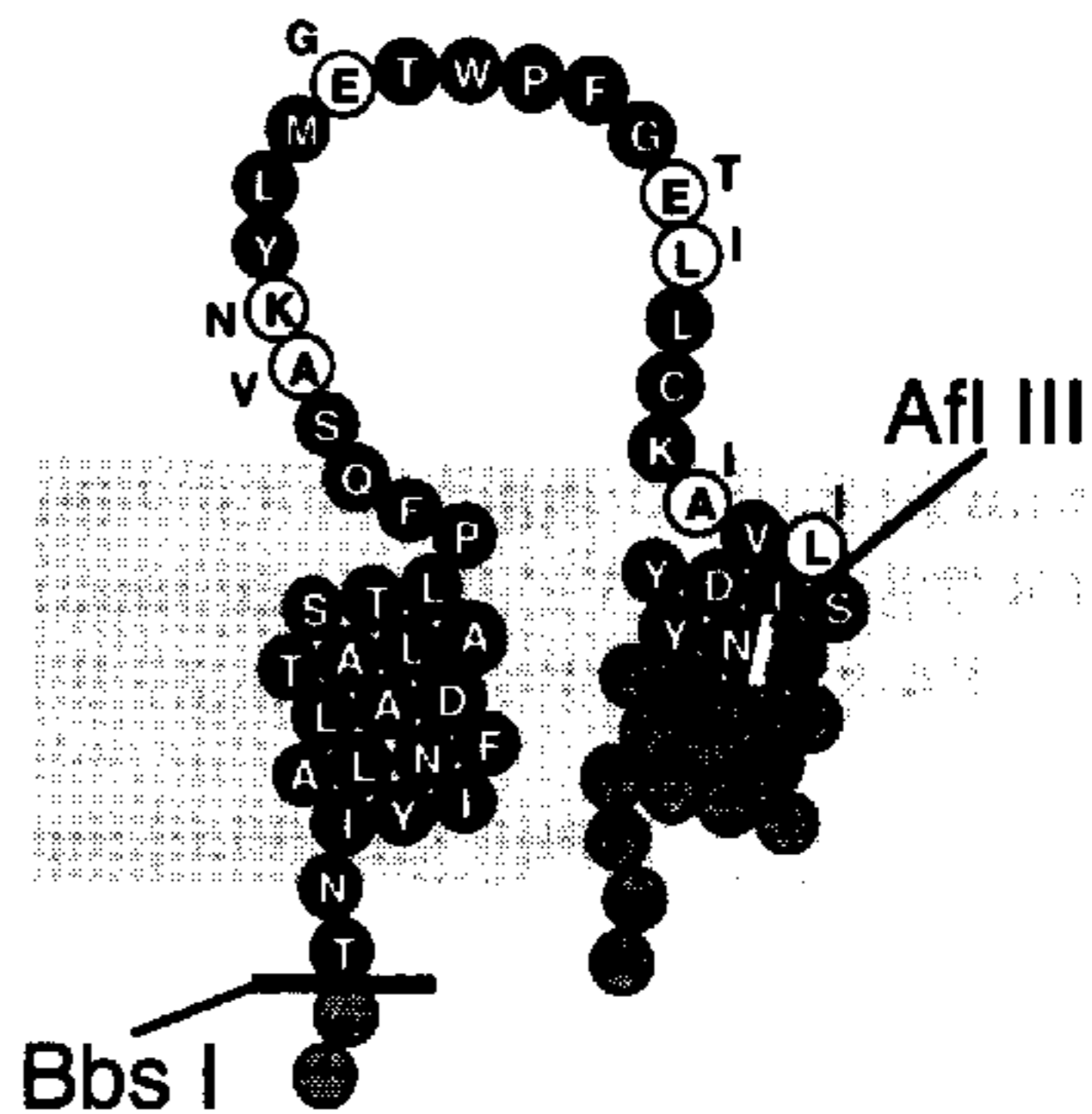


Fig. 1 Structure of the region around the first extracellular loop of the δ -OPR. Black circles indicate the residues conserved between the μ - and δ -OPRs. White circles indicate the residues specific for the δ -OPR. The corresponding residues found in the μ -OPR are indicated. Noted are the unique restriction enzyme sites, Bbs I and Afl III sites, used to construct the DMDD chimeric receptor.

Table 2 Ligand binding properties of the mutant receptors

Data are expressed as mean \pm S.E. of 3-5 experiments. K_d and B_{max} values for DADLE were determined by scatchard analysis using $[^3\text{H}]$ DADLE. K_i values for DAMGO were determined by displacement of $[^3\text{H}]$ DADLE binding with unlabeled DAMGO followed by calculation in accordance with $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [\text{DADLE}] / K_d)$.

	$[^3\text{H}]$ DADLE		DAMGO	
	B_{max} (fmol/mg protein)	K_d (nM)	K_i (nM)	
μ	1712 \pm 221	8.67 \pm 3.71	4.37 \pm 0.24	
δ	1319 \pm 288	1.91 \pm 0.18	1405 \pm 161	
DMDD	1884 \pm 169	2.24 \pm 0.25	23.77 \pm 4.27	
δA107V	909 \pm 92	1.12 \pm 0.06	1198 \pm 182	
δK108N	1383 \pm 225	4.06 \pm 1.26	18.68 \pm 5.27	
δE112G	1682 \pm 220	3.57 \pm 0.36	1432 \pm 199	
δE118T	1460 \pm 242	3.33 \pm 0.92	1077 \pm 74	
δL119I	1230 \pm 362	2.96 \pm 0.53	708 \pm 205	
δA123I	1576 \pm 279	3.10 \pm 0.85	1007 \pm 94	
δL125I	1323 \pm 298	0.83 \pm 0.11	1158 \pm 193	

が明らかとなった。

DAMGOによる μ/δ 受容体間識別に、 μ 受容体127番目のアスパラギン残基が必要であるのか、あるいは δ 受容体108番目のリジン残基がDAMGOの δ 受容体への結合を阻害しているのかを検討するため、 δ 受容体108番目のリジン残基を種々のアミノ酸に置換した変異型受容体を作製し結合実験を行った (Table 3)。 δ 受容体108番目のリジン残基を他のアミノ酸に置換することにより得られた19種類の変異型受容体の全てにおいて、DAMGOの親和性の上昇が見られたが、アルギニン、グルタミン酸、グリシンおよびトリプトファンに置換したミュータントでは

Table 3 Ligand binding properties of the mutant receptors

Data are expressed as mean \pm S.E. of 3-5 experiments. K_d and B_{max} values for DADLE were determined by scatchard analysis using [3 H]DADLE. K_i values for DAMGO were determined by displacement of [3 H]DADLE binding with unlabeled DAMGO followed by calculation in accordance with $K_i = IC_{50} / (1 + [DADLE] / K_d)$.

	[3 H]DADLE		DAMGO	
	B_{max} (fmol/mg protein)	K_d (nM)	K_i (nM)	
μ	1712 \pm 221	8.67 \pm 3.71	4.37 \pm 0.24	
δ (δ K108K)	1319 \pm 288	1.91 \pm 0.18	1405 \pm 161	
DMDD	1884 \pm 169	2.24 \pm 0.25	23.77 \pm 4.27	
δ K108R	501 \pm 279	3.22 \pm 0.32	375 \pm 72	
δ K108D	474 \pm 37	6.27 \pm 0.70	21.70 \pm 3.01	
δ K108E	246 \pm 163	4.75 \pm 0.75	155 \pm 45	
δ K108N	1383 \pm 225	4.06 \pm 1.26	18.68 \pm 5.27	
δ K108Q	1394 \pm 489	4.57 \pm 1.73	74.00 \pm 10.64	
δ K108S	577 \pm 132	3.68 \pm 0.71	30.31 \pm 8.45	
δ K108T	1713 \pm 339	6.94 \pm 0.60	31.65 \pm 3.03	
δ K108C	469 \pm 75	5.09 \pm 0.99	29.79 \pm 6.59	
δ K108M	943 \pm 129	1.65 \pm 0.19	31.91 \pm 5.55	
δ K108A	2144 \pm 181	7.06 \pm 0.81	43.38 \pm 14.53	
δ K108V	1230 \pm 111	8.23 \pm 0.28	32.57 \pm 6.79	
δ K108L	486 \pm 33	3.12 \pm 0.51	7.24 \pm 1.88	
δ K108I	473 \pm 92	5.22 \pm 1.07	12.25 \pm 2.54	
δ K108P	622 \pm 118	2.34 \pm 0.51	4.44 \pm 0.58	
δ K108G	554 \pm 21	3.31 \pm 0.85	146 \pm 42	
δ K108F	915 \pm 45	2.36 \pm 0.12	4.20 \pm 1.23	
δ K108Y	1093 \pm 132	2.08 \pm 0.14	11.54 \pm 1.27	
δ K108H	901 \pm 372	3.93 \pm 1.21	32.30 \pm 12.09	
δ K108W	469 \pm 115	6.10 \pm 0.83	136 \pm 57	

親和性の上昇があまり顕著でなく、特にアルギニンに置換したものでは $K_i = 375\text{nM}$ と野生型 δ 受容体と比較し 4 倍程度しか親和性の上昇が見られず、野生型 μ 受容体の 86 倍低い親和性であった。一方、19 種類の変異型受容体のうち 14 種類において DAMGO に対する親和性の顕著な上昇が見られ、 K_i 値は 4.20-43.38nM と野生型 μ 受容体の K_i 値の 10 倍以内の範囲であった。特に、ロイシン、プロリン、フェニルアラニンに置換したミュータントは、野生型 μ 受容体と同程度の高い親和性で DAMGO に結合した。以上の結果から、DAMGO の μ/δ 受容体間識別には、 μ 受容体 127 番目のアスパラギン残基は必ずしも必要ではなく、むしろ δ 受容体 108 番目のリジン残基が DAMGO の δ 受容体への結合を阻害している可能性が示唆された。

さらに、 $\delta K108N$ および $\delta K108A$ を各々安定的に発現する CHO 細胞において、フォスコリン刺激による cAMP 産生が、野生型 μ 受容体を発現する CHO 細胞での場合と同様、低濃度の DAMGO で抑制されたことより、アゴニスト活性発現にもアスパラギン残基は必須でないことが示された (Fig. 2)。

以上の結果より、DAMGO に対する結合親和性を有し、さらに DAMGO のアゴニスト活性発現にも関与する受容体構造 (Fig. 3; "binding pocket") は、 μ/δ 受容体間で保存されていると考えられる。一方、DAMGO の選択性は、それとは別の受容体構造 (Fig. 3; "selectivity domain") により規定されており、その機構として δ 受容体 108 番目のリジン残基による DAMGO の結合阻害が考えられる。我々は、 δ 受容体 108 番目のリジン残基のアスパラギンへの置換が、モルヒネなどの非ペプチド性リガンドの親和性を、DAMGO などのペプチド性リガンドの場合ほど上昇させないというデータも得ており、リガンド選択性を決定する "selectivity domain" がリガンドにより異なっている可能性が考えられる。

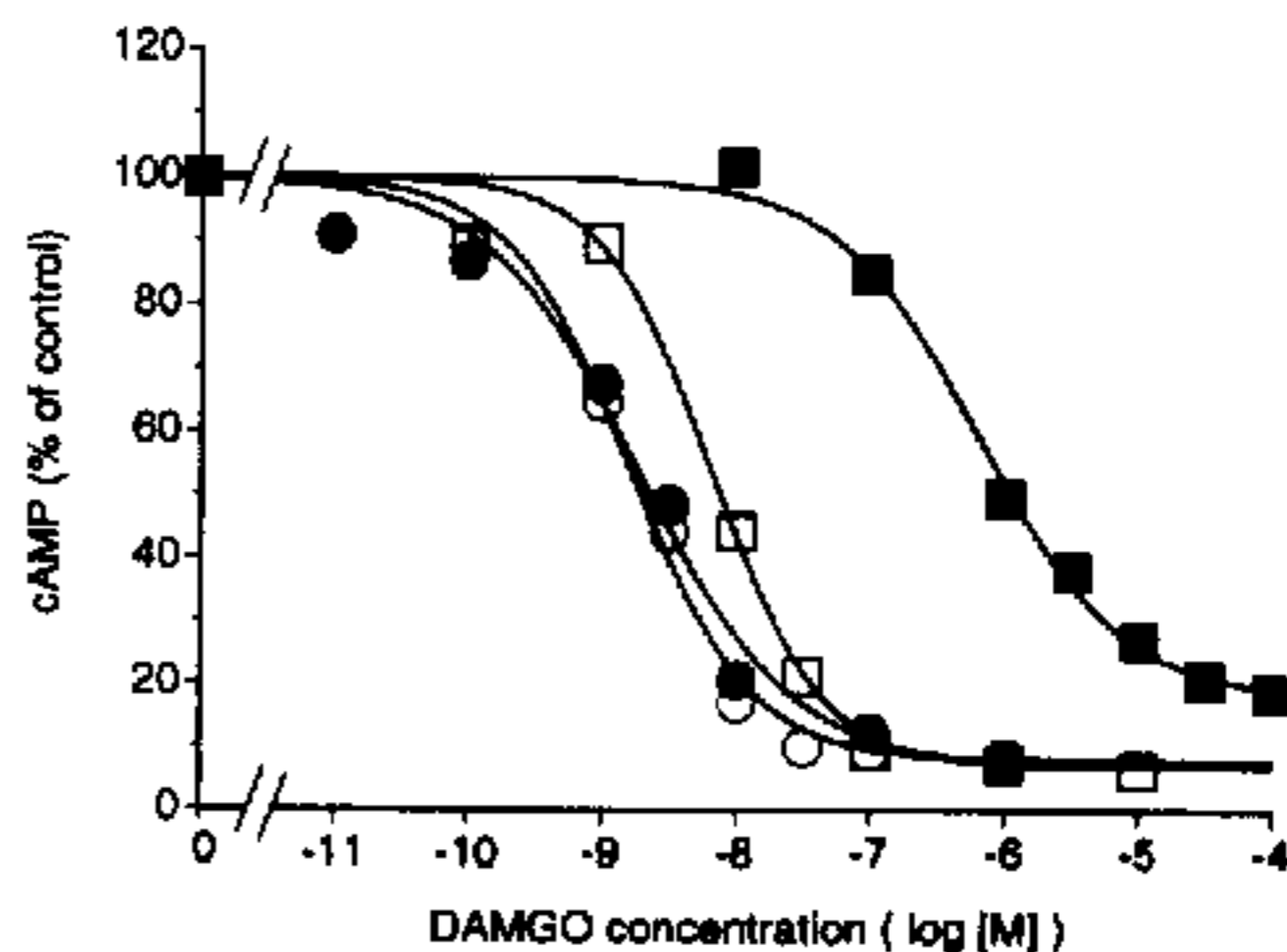


Fig. 2 Agonistic activity of DAMGO in the wild type μ - and δ -OPRs and mutant receptors. Effects of DAMGO on forskolin-stimulated cAMP accumulation in the CHO cells expressing the wild type μ - and δ -OPRs and mutant receptors $\delta K108N$ and $\delta K108A$.

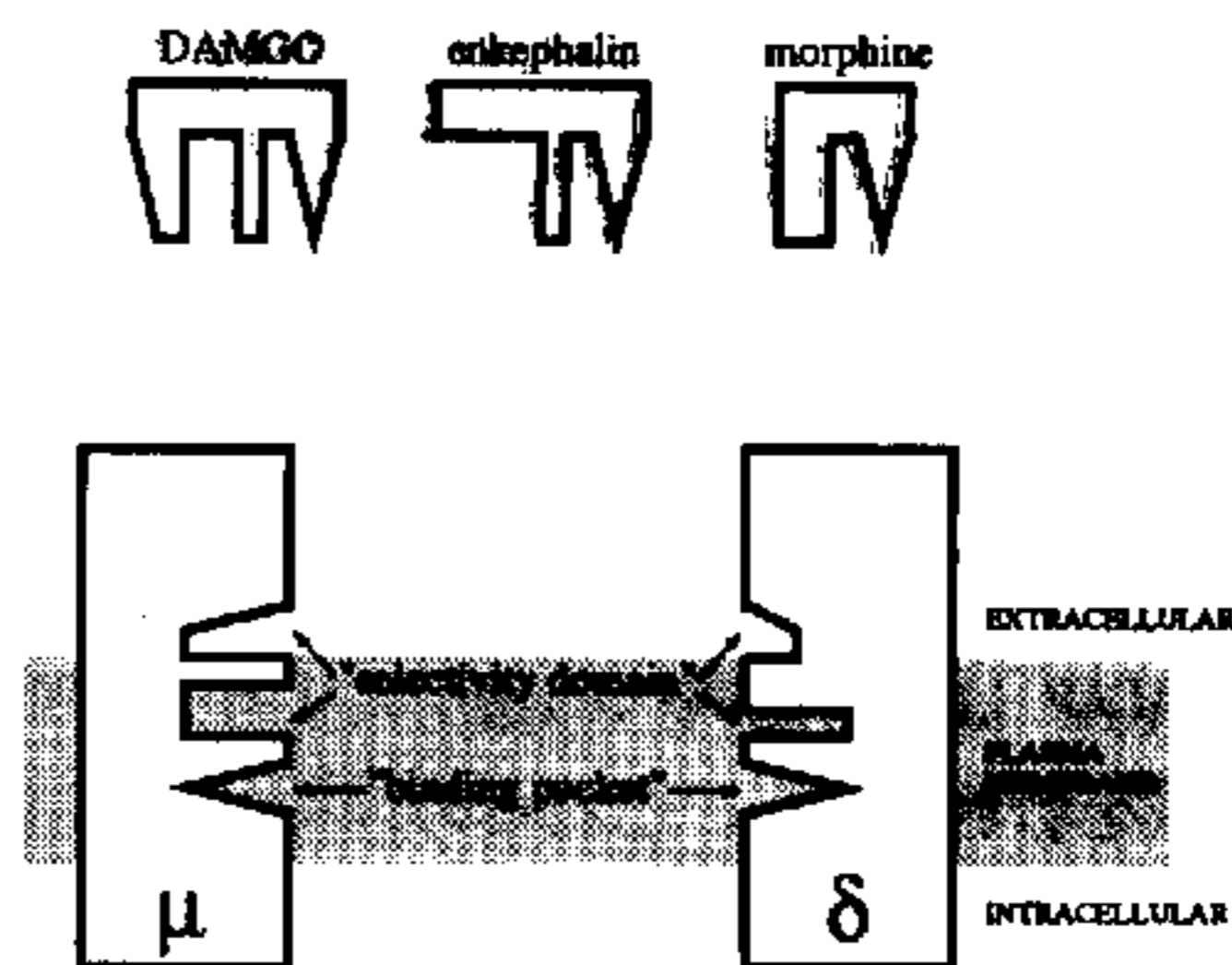


Fig. 3 Hypothetical model explaining the binding selectivity and agonistic activity of μ -opioid agonists.

2-3 オピオイド受容体脱感作と受容体代謝回転

○成田 年、溝口広一、Leon F. Tseng

Medical College of Wisconsin, Dept. of Anesthesiology

近年、脊髄障害あるいは仮性疼痛反応時に、脊髄細胞内のプロテインキナーゼ C (PKC) のレベルが上昇することが報告され、これらの報告は侵害効果発現における PKC の関与を示唆するものとなっている (1)。また、脊髄内に存在する内因性侵害物質であろう substance P の後シナプス反応にも、PKC の関与が報告されている (2)。演者らは、マウスならびにラット脊髄内に存在する内因性物質で、その侵害効果が substance P と同様あるいはそれ以上であるペプチドを同定し、その侵害効果に対する PKC の関与を明らかにした。演者らはウシの視床下部で最初に発見された pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) の特異的抗体を使用して、免疫組織学的手法によって、マウスならびにラット脊髄における PACAP の存在を確認した (3)。脊髄後角 superficial layer において、密集した PACAP の神経繊維を確認し、これらの神経繊維は、capsaicin の前処置で完全に消失した。PACAP は、脊髄内への適用により、マウスおよびラット両種において激しい疼痛様症状を引き起こし、これらの作用は PKC 阻害薬の前処置により用量依存的に抑制された。さらに興味深いことに、非常に低用量の PACAP の脊髄内前処置は、オピオイド受容体作動薬誘発の鎮痛効果を著しく抑制した。以上の結果は、PKC の疼痛発現への関与を裏付けると共に、PKC によるオピオイド受容体に対する異種脱感作を示唆するものである。これら PACAP のオピオイド受容体作動薬に対する効果を参考に、演者らは脊髄オピオイド受容体、特に δ オピオイド受容体における PKC の関与のさらなる検討を行った。

まず、PKC の選択的活性化薬であるホルボルエステル (PDBu) を使用し、選択的 δ オピオイド受容体作動薬である [D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛効果に対する影響を tail-flick test によって検討したところ、PDBu のマウス脊髄内への前処置によって、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛効果は、著しく抑制された。またこの効果は、PKC 阻害薬である calpostin C の脊髄併用前投与によって消失した (4)。

[D-Ala²]deltorphan II 誘発 GTPase 活性促進作用に対する PDBu の効果を検討するために、マウス脊髄粗シナプス膜分画を作成した。GTPase 活性は、50mM Tris-HCl (pH=7.4), 0.5mM App(NH₂), 1mM ATP, 1mM ouabain, 5mM creatine phosphate,

2.5U creatine phosphokinase, 0.01% BSA, 120mM NaCl, 200nM okadic acid, 0.2mM DTT, 0.4mM EGTA, 1あるいは50 μ M GTP という組成反応液中で行った。脊髓膜標品を [γ - 32 P]GTP と 30 $^{\circ}$ C 20 分間インキュベートし、5% 活性炭を加えることにより反応を停止して、遠心後、上清中の遊離した 32 P の放射活性を測定した。低濃度 GTP 存在下での遊離量から高濃度 GTP 存在下での遊離量を差し引いて高親和性 GTPase 活性とした。高親和性 GTPase 活性は、[D-Ala 2]deltorphin II の用量に依存して増強し、この効果は、 δ オピオイド受容体拮抗薬である NTB の併用により消失した。一方、PDBu は単独で高親和性 GTPase 活性になんら有意な影響を与えなかった。この条件下で、[D-Ala 2]deltorphin II による高親和性 GTPase 活性の増強効果は、PDBu の用量に依存して抑制された (5)。クローニングされた δ オピオイド受容体は、その分子構造の細胞内領域に、プロテインキナーゼによりリン酸化を受ける部位をいくつも有していることが報告されている (6)。以上の結果は、PKC による δ オピオイド受容体のリン酸化により、おそらく δ オピオイド受容体と G 蛋白とのカップリング状態が影響を受け、その結果、 δ オピオイド受容体作動薬の内活性の低下が引き起こる可能性を示唆している。

膜受容体蛋白質は、強くリン酸化を受けることによって、インターナリゼーションを引き起こす可能性を有している。そこで、膜標品における δ オピオイド受容体作動薬および拮抗薬結合能に対する PDBu の影響を検討した。結合実験の反応溶液はマウス脊髓粗シナプス膜分画に各濃度の PDBu を含む 50mM Tris-HCl (pH=7.4) 緩衝液、総量は 1ml とした。リガンドとしては、[3 H] [D-Ala 2]deltorphin II、[3 H]DSLET および [3 H]NTI を使用した。反応は、25 $^{\circ}$ C 2 時間のインキュベーションを行った後、氷冷した過剰の 50mM Tris-HCl (pH=7.4) 緩衝液を加えることにより停止され、結合リガンドと遊離リガンドはグラスフィルターを用いて cell harvester によって分離した。作動薬である [3 H] [D-Ala 2]deltorphin II および [3 H]DSLET をリガンドとした結合実験では、それぞれの結合量は、PDBu の用量に依存して低下した。スクヤッチャード解析において、PDBu 存在下では、[3 H]DSLET 結合の K_d 値は全く変化がなかったが、 B_{max} 値は著しく低下した (4)。また、非水解性 GTP analog である GTP γ S 存在下 (反応溶液: 3mM MgCl $_2$, 0.2mM EGTA および 100mM NaCl を含んだ 50mM Tris-HCl (pH=7.4) 緩衝液) においても、両リガンド結合量は、著しく低下した。一方、拮抗薬である [3 H]NTI をリガンドとした結合実験において、GTP γ S 存在下では、[3 H]NTI 結合は全く抑制されなかったが、PDBu は [3 H]NTI 結合を著明かつ有意に抑制した。また、[D-Ala 2]deltorphin II および DSLET は [3 H]PDBu 結合に全く影響を及ぼさなかったことを確認している。これは、PDBu によるオピオイド受容体結合抑制効果が、膜上における単純な置換反応ではないことを意味している。以上の結果から PKC による δ オピオイド受容体のリン酸化は、単なる可逆的なリン酸化に留らず、最

最終的に受容体の細胞質内へのインターナリゼーションを引き起こすという可能性が考えられる。

オピオイド受容体作動薬の作用発現におけるホスホリパーゼ (PLC) 系の関与に関する研究は、比較的反主流の域を抜け出せずにはいたが、1990年代に入ってから、むしろその関与を考えていかなければ理論的に説明しにくい現象が報告されてきている。演者らの研究室においても、マウス δ オピオイド受容体作動薬誘発鎮痛効果発現に、このカスケードが一部関与していることを見い出している。このようにオピオイドの主たる作用である鎮痛効果発現に PLC を介した細胞内情報伝達機構が関与するという知見は大変興味深い、これはまさに、オピオイド受容体刺激によって PLC を介した PKC の活性化が誘導され、オピオイド受容体自身の脱感作を引き起こす、いわゆる“同種脱感作”の可能性を示唆する知見でもあった。

演者らは脊髄内に [D-Ala²]deltorphan II を投与し、3 時間後に急性鎮痛耐性が形成されていることを確認した。急性鎮痛耐性形成時に、 δ オピオイド受容体の結合実験を行ったところ、生食前投与群に対し、[D-Ala²]deltorphan II 前投与群においては 3 時間後に [³H] [D-Ala²]deltorphan II および [³H]NTI 結合の有意な減少が見られた。また、[³H]PDBu 結合の増加傾向も観察された。そこでさらに、この鎮痛耐性形成に対する PKC 阻害薬の併用前適用による効果を *in vivo* において検討した。単独投与ならびに [D-Ala²]deltorphan II との併用適用によってなんら作用を示さない calphostin C の用量を設定し、これを [D-Ala²]deltorphan II と併用前適用して、3 時間後に [D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛効果を測定したところ、calphostin C の用量に依存して、急性鎮痛耐性の形成が抑制された。一方、プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害薬併用前適用においては、急性鎮痛耐性形成の抑制は、全く観察されなかった (4)。これらの結果は、PKC のマウス脊髄 δ オピオイド受容体の同種脱感作における関与を強く示唆している。

近年、高度な分子生物学的な手法を背景に、オピオイドペプチドの作用機序を分子レベルでとらえる研究が、数多くの研究室によって盛んに行われている。それらのデータを基礎にしてオピオイド受容体に選択的なアンチセンスを合成し、*in vivo* においてそれらを適用することにより、オピオイドによって引き起こされる種々の薬理学的効果における分子レベルでのオピオイド受容体の関与を示唆する研究がブームとなった。アンチセンス法の原理は極めてシンプルで、遺伝子が機能を発現する際、DNA の転写される領域あるいは、RNA の翻訳される領域に相補的な塩基配列を持つ核酸あるいはその誘導体（これをアンチセンス分子と呼ぶ）を作用させれば、その遺伝子に由来する領域の機能は制御されることになる。演者らの研究室では比較的早い時期に、アンチセンス法の原理を取入れ、Mol. Res. Lab. の Dr. Richard と共にこの研究に着手し、各種オピオイド受容体に選択的なアンチセンスを作成することに成功した。

それらの作用機構の詳細は未だ充分明らかにされていないが、細胞内に取込まれたオピオイド受容体アンチセンス分子は細胞質内器官および核内に到達し、受容体を構成する蛋白質の合成を制御し、その結果、受容体機能を消失させると考えられる。オピオイド受容体アンチセンスは、通常、マウスやラットに *in vivo* で適用される場合、1 日数 μg を 1-2 回、3-4 日間の局所投与で有効である (7)。演者らは、マウス δ オピオイド受容体アンチセンスを使用し、受容体代謝回転の意外な事実を見つけ出した。

δ オピオイド受容体作動薬である [D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛耐性は、マウス脊髄投与後 3 時間以内に形成されるが、24 時間後に、その鎮痛効果はほぼ完全に回復した。しかしながら、マウス δ オピオイド受容体アンチセンスを [D-Ala²]deltorphan II と併用適用した群においては、24 時間後においても、鎮痛の減弱は維持されたままであった。また逆に、マウス δ オピオイド受容体アンチセンスの効果発現までの時間は、enkephalinase 阻害薬および [D-Ala²]deltorphan II などの併用によって著明に短縮され、選択的な enkephalin 抗体の併用によって、延長された。さらに、[D-Ala²]deltorphan II 単独およびマウス δ オピオイド受容体アンチセンス単独投与 24 時間後では、[³H]DSLET 結合は、生食投与群と比べ有意な変化は認められなかったが、マウス δ オピオイド受容体アンチセンスを [D-Ala²]deltorphan II と併用適用した群においては、投与 24 時間後においても [³H]DSLET 結合の有意な減少が、観察された。

本研究の結果から、一度受容体作動薬によって強く反応を受けたマウス脊髄 δ オピオイド受容体は、自身の刺激により PKC を活性化させ、それによってリン酸化を受け、結果としてインターナリゼーションを引き起こす。さらに、その δ オピオイド受容体全体の早期機能回復には、リン酸化を受けた受容体のリサイクルよりも新規に合成される δ オピオイド受容体蛋白質の補充が重要な役割を示している可能性が示唆された。

【参考文献】

- (1) Yashpal et al., J. Neurosci., 15, 3263 (1995)
- (2) Coderre and Yashpal, Eur. J. Neurosci., 6, 1328 (1994)
- (3) Narita et al., Eur. J. Pharmacol., in press
- (4) Narita et al., Br. J. Pharmacol., in press
- (5) Narita et al., Eur. J. Pharmacol., in press
- (6) Evans et al., Science, 258, 1952 (1992)
- (7) Narita and Tseng, Eur. J. Pharmacol., 284, 185 (1995)

2-4 ミューオピオイド受容体に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの効果

○吉川正信、北村 憲、谷口隆雄、金井昌之、
小林智美、横上功一、岩尾佳代子、岡 哲雄

東海大・医学部・薬理

A. 緒言

モルヒネを代表とするオピオイドの鎮痛作用やその他の作用の発現には、脳内のオピオイド受容体が関与する。オピオイド受容体は、ミュー、デルタおよびカッパなどに分類され、最近それらの遺伝子がクローニングされた。しかし、オピオイドの薬理作用と受容体遺伝子の発現レベルを直接結びつける研究は、これまでほとんど行われていない。近年、特定の遺伝子に特異的に結合する分子を使って、特定の遺伝子の発現を抑制することが可能となってきた。つまり、特定の遺伝子がクローン化された場合、その遺伝子と相補的な配列を持つアンチセンス核酸 (Antisense oligodeoxynucleotides: AS oligo) を合成し、それを細胞に導入する、いわゆるアンチセンス法である。このAS oligoを用いた特定遺伝子の抑制法は、塩基配列の相補性という極めて高い特異性に基づいているため、各オピオイド受容体のタイプを認識できる。

我々はミューオピオイド受容体(MOR)遺伝子(GenBank accession number L13069; Chen, Y *et al.*)に対するAS oligoをラット脳のperiaqueductal gray (PAG) あるいは側脳室に投与し、鎮痛などのオピオイドの薬理作用とMOR遺伝子の発現レベルとの関係について検討した。

B. 実験材料および方法

1. 使用動物

Wistar系雄性ラット、8~10週齢を恒温(21±1℃)で明期12時間(8:00a.m.~8:00p.m.)の明暗サイクルにコントロールされ

た動物舎において飼育し、実験に供試した。

2. Antisense oligo

ミューオピオイド受容体遺伝子(GenBank accession number L13069; Chen, Y *et al.*)に対するAS oligoは、開始コドンの上流域(position -88 ~ -70: 5' AGA GGA AGA GGC TGG GGC G 3') に対して相補的な配列(CGC CCC AGC CTC TTC CTC T)を選択した。AS oligoならびにSense oligoはいずれもphosphorothioate修飾したものをを用いた。

3. 脳内投与

ネンブータル麻酔下、ステンレス・スチール製のガイドカニューレ(24 gauge, 13 mm)をPaxinos&Watsonの脳図譜に従い、PAGにおいては(A -6.7 mm, V +2.7 mm, L -0.6 mm)、側脳室においては(A -0.8 mm, V +2.7 mm, L -0.6 mm)に挿入した。1週間後よりカニューレ(30 gauge, PAG 16 mm; 側脳室 15 mm)を通じAS oligo、Sense oligo、生理的食塩液を投与した(流速: PAG 0.27 μ l/min, 側脳室 3.1 μ l/min)。

4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA 4 μ gより逆転写酵素(Super Script II)を用いてcDNAを合成した。MOR遺伝子に対するプライマーは(sense orientation; position 53-73, 5' CCT GCC GCT CTT CTC TGG TTC 3')と(antisense orientation; position 826-846, 5' CFCT GCC TGT ATT TTG TGG TTG 3')を用いた。RT-PCR産物は電気泳動後、ゲルより抽出しDNAシーケンサー373S(Applied Biosystems)によりMOR遺伝子の配列を確認した。また、各サンプル間のcDNA量の斉一性を確認するため、ハウスキーピング遺伝子のglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)をコントロールとして用いた。

C. 実験結果および考察

PAGにおけるAS oligoの効果

MOR遺伝子に対するAS oligo(10 μ g in 1 μ l)、Sense oligo(10 μ g in 1 μ l)、および生理的食塩液(1 μ l)を1日おきに3回PAGに投与した。最終投与後1日目にモルヒネ(10 nmol)をPAG

に投与した結果、AS oligo投与群でモルヒネによる鎮痛効果が生理的食塩液投与群に対し有意に減弱した。一方、Sense oligo投与群では、生理的食塩液投与群に対し有為な差は見られなかった。また、鎮痛効果試験で使用したラットを断頭後、脳を摘出し、PAGを分画した後、RT-PCR法によりMOR mRNA量を検討した。その結果、AS oligo投与群において生理的食塩液およびSense oligo投与群にくらべ顕著にMOR mRNA量が減少した。

AS oligoのモルヒネ鎮痛効果減弱作用は、1回投与、3回投与のいずれの場合でも初回投与後5~7日目に最大となった。AS oligoを3回投与した後、MOR mRNA量をRT-PCR法により観察した結果、初回投与後7日目には生理的食塩液投与群のmRNA量に復帰した。

AS oligoによるモルヒネ鎮痛効果に対する減弱作用は、1回投与では最終投与後9日目、3回投与では5日目に消失した。

側脳室におけるAS oligoの効果

MOR遺伝子に対するAS oligo(10 μ g)を1日2回、5日間側脳室に投与した。その結果、生理的食塩液投与群に対しAS oligo投与群において、モルヒネ(200 nmol)による鎮痛効果の減弱、ならびにモルヒネによるカタレプシーの発現および正向反射の消失などの持続時間の有意な短縮が認められた。鎮痛効果などの試験に供試したラットより、小脳を取り除いた全脳よりtotal RNAを抽出し、PAGで用いたRT-PCR産物をプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。AS oligoを投与したラットのMOR mRNA量は、生理的食塩液を投与したラットに比べ、約50分の1に減少した。

モルヒネ(200 nmol)による鎮痛効果の減弱、ならびにモルヒネによるカタレプシーの発現および正向反射の消失などの持続時間の有意な短縮は、初回投与後5~7日目に最大となり、9日目に消失した。

以上の結果より、AS oligoのPAGおよび側脳室内投与によるモルヒネの薬理作用に対する減弱作用は、MOR mRNA量の減少、すなわち転写レベルでの発現抑制によるものと考えられる。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドはオピオイド受容体の研

究において有効な手段として、今後さらに用いられると考えられる。

D. 参考文献

Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J.A. and Yu, L. (1993)

Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44, 8-12.

Paxinos, G. and Watson, C. (1982)

Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, Sydney, New York, London.

2-5

オピオイド受容体を介した反応におけるイオンチャネルの関与

○溝口広一、成田 年、長瀬 博*、Leon F. Tseng

Medical College of Wisconsin, Dpt. of Anesthesiology

*東レ、基礎研究所

オピオイド受容体を介した細胞内および細胞膜応答に関しては、これまで幾多の報告がなされているが、オピオイド受容体を介した鎮痛作用発現におけるこれら細胞内および細胞膜応答の直接的関与は、いまだ明らかになっていない。そこで本研究においては、オピオイド受容体特に脊髄 δ_2 受容体を介した鎮痛作用発現の機序について、細胞内情報伝達およびイオンチャネルの制御を中心に検討を行った。

実験方法

1. 鎮痛試験

実験には ICR 系雄性マウスを用いた。鎮痛試験は tail-flick 法により行い、鎮痛効力は最大有効反応率 (% MPE) により評価した。薬物処置はすべて脊髄内投与とし、 δ_2 agonist, K^+ channel openers および Ca^{2+} channel blockers の投与 10 分後に鎮痛試験を行った。また、併用薬物の処置は pertussis toxin (96 時間前) および thapsigargin (70 分前) を除いてすべて鎮痛試験の 20 分前に行った。

2. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

実験にはモルモット心臓を用い、Langendorf 法により 0.3 ~ 5 mM の Ca^{2+} を灌流した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、Fujita et al. (1996) の方法に従い、Indo-1 を用い蛍光法により行った。また、左心室にバルーンを挿入し、左心室圧を測定した。

3. Ca^{2+} 電流の測定

実験にはモルモット心室単離細胞を用いた。 Ca^{2+} 電流の測定は、Rehmert et al. (1996) の方法に従い、whole cell patch-clamp 法により、-50 ~ +70 mV の電圧によって誘発される L-type voltage dependent Ca^{2+} channel における内向き Ca^{2+} 電流を測定した。

実験結果

1. 鎮痛試験

1.1. 脊髄 δ_2 受容体を介した鎮痛における Gi/Go 蛋白の関与

[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛は、pertussis toxin の前処置により用量依存的に抑制された。

1.2. 脊髄 δ_2 受容体を介した鎮痛における細胞内 Ca²⁺ 動態の関与

[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛は、phospholipase C inhibitor neomycin の前処置により用量依存的に抑制された。また、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛は、小胞体への Ca²⁺ uptake inhibitor thapsigargin の前処置により、小胞体内の Ca²⁺ を枯渇させることによっても抑制された。これに対し、protein kinase A inhibitor KT 5720 および protein kinase C inhibitor calphostin C の前処置は、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛に影響を与えなかった。

1.3. 脊髄 δ_2 受容体を介した鎮痛における K⁺ channel の関与

[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛は、Ca²⁺ activated K⁺ channel blockers charybdotoxin, apamine の前処置により用量依存的に抑制され、非選択的 K⁺ channel blocker tetraethylammonium 高用量の前処置により僅かに抑制された。一方、ATP-sensitive K⁺ channel blocker glibenclamide および voltage-sensitive K⁺ channel blocker 4-aminopyridine の前処置は、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛に影響を与えなかった。また、Ca²⁺ activated K⁺ channel opener NS-1619 は用量依存的に有意な鎮痛作用を発現したが、ATP-sensitive K⁺ channel opener diazoxide は全く鎮痛作用を発現しなかった。

1.4. 脊髄 δ_2 受容体を介した鎮痛における Ca²⁺ activated Cl⁻ channel の関与

[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛は、Ca²⁺ activated Cl⁻ channel blocker R(+)-IAA-94 の前処置によって用量依存的に抑制された。

1.5. 鎮痛発現における voltage dependent Ca²⁺ channel の関与

T-type voltage dependent Ca²⁺ channel blocker flunarizine は用量依存的に強い鎮痛作用を発現したが、L- および N-type voltage dependent Ca²⁺ channel blocker nimodipine および ω -conotoxin GVIA は全く鎮痛作用を発現しなかった。また、L-type voltage dependent Ca²⁺ channel opener S(-)-Bay K 8644 の前処置は、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛に影響を与えなかった。

2. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

[D-Ala²]deltorphan II は、心臓収縮期の細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させたが、心臓拡張期の細胞内 Ca^{2+} 濃度は逆に増加させた。また、[D-Ala²]deltorphan II により左心室圧は上昇した。これに対し、L-type voltage dependent Ca^{2+} channel blocker nifedipine は、心臓収縮期・拡張期ともに細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させ、左心室圧を下降させた。

3. Ca^{2+} 電流の測定

L-type voltage dependent Ca^{2+} channel における内向き Ca^{2+} 電流は、[D-Ala²]deltorphan II により強く抑制された。

考察

δ 受容体が G 蛋白と coupling していることは従来知られており、演者らも脊髄 δ_2 受容体への [³H]DSLET の結合は非水解性 GTP analog である GTP γ S により抑制されることを報告している (Mizoguchi et al., 1995)。本研究において、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛は pertussis toxin の脊髄内前処置により用量依存的に抑制されたことから、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛は δ_2 受容体と coupling している Gi/Go 蛋白を介して発現することが示唆された。

G 蛋白と coupling した受容体の刺激により、phospholipase C および protein kinase C の活性化など様々な細胞内応答が発現することは、すでに数種の受容体において明らかとされている。本研究において、phospholipase C 阻害作用により IP₃ 代謝回転を抑制する neomycin は、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛を抑制した。IP₃ により小胞体から Ca^{2+} が放出されることは一般によく知られており、また thapsigargin の前処置により小胞体内の Ca^{2+} を枯渇させることによって [D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛が抑制されたことから、[D-Ala²]deltorphan II は小胞体からの Ca^{2+} の放出を促進することにより、鎮痛作用を発現する可能性が考えられる。また、[D-Ala²]deltorphan II は、心臓収縮期 (小胞体内への Ca^{2+} 取込み期) の細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させたが、心臓拡張期 (小胞体からの Ca^{2+} 放出期) の細胞内 Ca^{2+} 濃度は逆に増加させた。Patch-clamp 法の実験結果から明らかな様に、[D-Ala²]deltorphan II は L-type voltage dependent Ca^{2+} channel の強い閉口作用を有しており、心臓収縮期に細胞内 Ca^{2+} 濃度が減少したのはそのためであると考えられる。この様に [D-Ala²]deltorphan II は、L-type voltage dependent Ca^{2+} channel の閉口作用を有しているにもかかわらず、心臓拡張期の細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ、左心室圧を上昇させたことから、小胞体からの Ca^{2+} の放出を促進する可

能性が考えられる。この現象は、前述した脊髄における [D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛作用の発現機序に関する仮説を強く支持するものと考えられる。

また本研究において、[D-Ala²]deltorphan II 誘発鎮痛は Ca²⁺ activated K⁺ channel blockers および Ca²⁺ activated Cl⁻ channel blocker により抑制され、Ca²⁺ activated K⁺ channel opener 単独投与により鎮痛作用が発現したことから、[D-Ala²]deltorphan II は Ca²⁺ activated K⁺ channel および Ca²⁺ activated Cl⁻ channel を開口することによって鎮痛作用を発現するものと考えられる。一方、3種の voltage dependent Ca²⁺ channel blockers の内、T-type voltage dependent Ca²⁺ channel blocker の単独投与によってのみ、強力な鎮痛作用が発現したことから、[D-Ala²]deltorphan II は間接的あるいは直接的に voltage dependent Ca²⁺ channel を抑制するが、おそらく T-type voltage dependent Ca²⁺ channel のみが鎮痛作用発現に直接的に関与しているものと思われる。

本研究の結論として、[D-Ala²]deltorphan II は脊髄 δ₂ 受容体に結合後、Gi/Go 蛋白を介して phospholipase C を活性化し、IP₃ 代謝回転を促進することにより小胞体からの Ca²⁺ の放出を促進する。小胞体から放出された Ca²⁺ により Ca²⁺ activated K⁺ channel および Ca²⁺ activated Cl⁻ channel が開口し、またこれらの応答に伴って、T-type voltage dependent Ca²⁺ channel が閉口することによって、脊髄後根における上行性痛覚伝導が抑制され、その結果鎮痛作用が発現する可能性が示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御協力下さいました Dr. W.M. Kwok、Dr. S. Fujita、Dr. D.F. Stowe、Dr. Z.J. Bosnjak (Medical College of Wisconsin, Dpt. of Anesthesiology) に深く感謝致します。

引用文献

G.C. Rehmert, Z.J. Bosnjak and W.M. Kwok (1996) American Society of Physiology, Abstract

S. Fujita, E. Novalija, S.C. Smart, D.F. Stowe (1996) American Society of Anesthesiology, Abstract

H. Mizoguchi, M. Narita, R. Quock, H. Nagase and L.F. Tseng (1995) Society of Neuroscience, Abstract