

G 蛋白による神経型電位依存性 Ca^{2+} チャネルの制御機構

木下真理子

Binding of $G\alpha_o$ N-Terminus is Responsible for the Voltage-Resistant Inhibition of α_{1A} (P/Q-Type, $\text{Ca}_v2.1$) Ca^{2+} Channels

Mariko KINOSHITA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received April 1, 2002)

G-protein-mediated inhibition of presynaptic voltage-dependent Ca^{2+} channels is comprised of voltage-dependent and -resistant components. The former is caused by a direct interaction of Ca^{2+} channel α_1 subunits with $G\beta\gamma$, whereas the latter has not been well characterized. Here, we show that the N-terminus of $G\alpha_o$ is critical for the interaction with the C-terminus of the P/Q-type channel subunit, and that the binding induces voltage-resistant inhibition. A P/Q-type C-terminal peptide, an antiserum raised against the $G\alpha_o$ N-terminus, and a $G\alpha_o$ N-terminal peptide all attenuated the voltage-resistant inhibition of P/Q-type currents. Furthermore, the N-terminus of $G\alpha_o$ bound to the C-terminus of α_{1A} *in vitro*, which was prevented either by the P/Q-type channel C-terminal or $G\alpha_o$ N-terminal peptide. Although the C-terminal domain of the N-type channel showed similar ability to binding with $G\alpha_o$ N-terminus, the above-mentioned treatments were ineffective in the N-type channel current. These findings demonstrate that the voltage-resistant inhibition of the P/Q-type channel is caused by the interaction between the C-terminal domain of the Ca^{2+} channel α_{1A} subunit and the N-terminal region of $G\alpha_o$.

Key words—voltage-dependent Ca^{2+} channel; P/Q type; $G\alpha_o$; voltage-resistant inhibition; *Xenopus* oocyte

1. はじめに

電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) は興奮性細胞, 非興奮性細胞を問わず多くの細胞で発現しており, 細胞外からの Ca^{2+} 流入機能を担っている。電位依存性 Ca^{2+} チャネルは α_1 , α_2 - δ , β , γ の各サブユニットからなるヘテロオリゴマーで構成され, 異なる α_1 サブユニットは生理学的及び薬理的に性質の異なるチャネルを形成する (Table 1)。また, 各 α_1 サブユニットは発現部位が異なり, 多種多様な生理機能の調節・制御に重要な役割を果たしていることが知られている。

神経細胞のシナプス前膜に存在する P/Q 型 (α_{1A}) 及び N 型 (α_{1B}) 電位依存性 Ca^{2+} チャネルは, 神経伝達物質遊離の制御に関わる膜蛋白質である。神

経細胞が興奮し脱分極すると Ca^{2+} チャネルが開口し, 細胞外から Ca^{2+} が流入することによって小胞輸送蛋白が活性化して神経伝達物質の遊離が起こる。さらにそうして放出された多くの神経伝達物質はシナプス前膜にある受容体を活性化し, いわゆる抑制性 G 蛋白 G_i/G_o を介して Ca^{2+} チャネル活性, ひいては伝達物質の遊離を負にフィードバック制御する。この抑制は 2 つの成分からなり, 強い脱分極パルス直前に与えることにより解除される電位依存性の成分と, 脱分極パルスで解除されない電位抵抗性の成分が存在する。¹⁾ 電位依存的な抑制は培養神経細胞²⁾や強制発現系細胞³⁾での研究から短期シナプスの可塑性に関与しているらしい。これに対して, 電位抵抗性の抑制は発火頻度やシナプスでの持続的な脱分極に関係なく神経伝達物質遊離の調節を行っているものと考えられる。

電位依存性の抑制は受容体の活性化を介して $G_{\beta\gamma}$ が直接 Ca^{2+} チャネルに結合することによって起こる。⁴⁾ しかし電位抵抗性抑制のメカニズムは全く明

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: marix@marine.email.ne.jp

*本総説は, 平成 13 年度日本薬学会近畿支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Table 1. Voltage-Dependent Ca²⁺ Channel Family

生理学的分類	対応する α_1 サブユニット	部 位
P/Q	α_{1A}	脳, 神経系 (シナプス前膜)
N	α_{1B}	脳, 神経系 (シナプス前膜)
L	$\alpha_{1C}, \alpha_{1D}, \alpha_{1F}, \alpha_{1S}$	脳, 心臓, 骨格筋, 膵臓など
R	α_{1E}	脳, 神経系 (細胞体, 樹状突起)
T	$\alpha_{1G}, \alpha_{1H}, \alpha_{1I}$	脳, 心臓, 腎臓, 肝臓など

らかになっていない。本総説では P/Q 型 α_{1A} チャネルにおける電位抵抗性抑制の分子メカニズムに関する著者らの知見を紹介したい。⁵⁾

2. α_{1A} C 末ペプチド PPQT1 による G 蛋白を介する電位抵抗性の抑制の P/Q 型チャネル特異的拮抗作用

以前の研究において,⁶⁾ α_{1A} C 末領域ペプチド PPQT1 (アミノ酸 2028–2046 に相当) は $G\alpha_{o1}$ を介する δ オピオイド受容体の活性化による P/Q 型チャネル電流の抑制を減少させた。本研究では $G\alpha_{o1}$ を介する κ オピオイド受容体の活性化による P/Q 型チャネル電流の抑制に対するデコイペプチド PPQT1 の効果を調べるために, α_{1A} 又は α_{1B} サブユニットとともに β_{1b} サブユニット, $G\alpha_{o1}$, κ オピオイド受容体を共発現させた卵母細胞を使用し, VDCCs の GPCR を介する調節に対する PPQT1 の効果を検討した (Fig. 1)。この実験では, アフリカツメガエル $G\alpha_o$ に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (5 μ g) を測定 12–16 時間前に注入し内在性の $G\alpha_o$ の寄与を最小限に止めたために, 以降の実験よりもコントロールの抑制の大きさが小さくなった。

P/Q 型チャネルは, κ オピオイドアゴニスト U50488H (1 μ M) によって I_{Ba} のピーク電流が活性化の遅延化を伴って可逆的に $15.0 \pm 1\%$ 抑制された。この遅延化は典型的波形の下矢印と上矢印の差で示されているように, 増幅のピーク時間の遅れによって評価される (Fig. 1A, 48.1 ± 6 ms)。P/Q 型チャネルは U50488H 適用による G 蛋白活性化時において脱分極プレパルスで解除されない電位抵抗性の抑制成分が主体であった。テストパルスの 20 ms 前に強い脱分極プレパルス (+100 mV, 100 ms 間) をかけると, アゴニストによる抑制は $13.0 \pm 2\%$ まで減少した (Fig. 1B) が, ピーク時間の遅延は全

く見られなくなった (0.7 ± 1 ms)。このことは, 脱分極プレパルスが $G\beta\gamma$ を介する電位依存性の抑制に伴う活性化の遅延化を除去していることを表している。プレパルスによる電流抑制の減少が P/Q 型チャネルではあまり起こらないことから, P/Q 型チャネルの制御においては電位抵抗性でかつピーク時間の遅延を伴わない抑制が優位に占めている (87%) ことを示唆している。PPQT1 をあらかじめ細胞内注入した卵母細胞では, アゴニストによる抑制はプレパルス有り無しどちらにおいても有意に減少した。 α_{1B} C 末領域のアミノ酸 1931–1949 にあたるペプチド PB3T4 を注入した卵母細胞においては, プレパルスの有り無しに関わらず, 電流抑制又はピーク時間の遅延に影響しなかった。

N 型チャネルでは (Fig. 1C, D), U50488H による I_{Ba} の抑制は P/Q 型チャネルより大きく ($44.8 \pm 8.5\%$, $n=4$), 顕著な活性化の遅延化が観察された。ピーク時間の遅れは 93.0 ± 13 ms で P/Q 型チャネル電流におけるピーク時間の遅延よりも有意であった。プレパルスをかけると, アゴニストによる抑制は $27.3 \pm 6\%$ まで減少した。これは N 型チャネルでは $G\beta\gamma$ による電位依存性の抑制が多く占めている (40%) ことを反映している。アゴニスト存在下でプレパルスをかけるとピーク時間の遅延が完全になくなった (-5.90 ± 0.6 ms)。さらに, N 型チャネルの電流は κ オピオイド受容体刺激無しでプレパルスによって増加することから, N 型チャネルは卵母細胞での $G\beta\gamma$ の自発的な活性によって抑制を受けていることを表している。N 型チャネル電流の抑制制御においては, PPQT1 も PB3T4 もピーク電流及びピーク時間の遅延に有意な効果はなかった。以上をまとめると, これらの発見から α_{1A} C 末ペプチド PPQT1 の抑制効果は P/Q 型チャネル電流の $G\alpha_o$ を介する電位抵抗性の抑制に選択

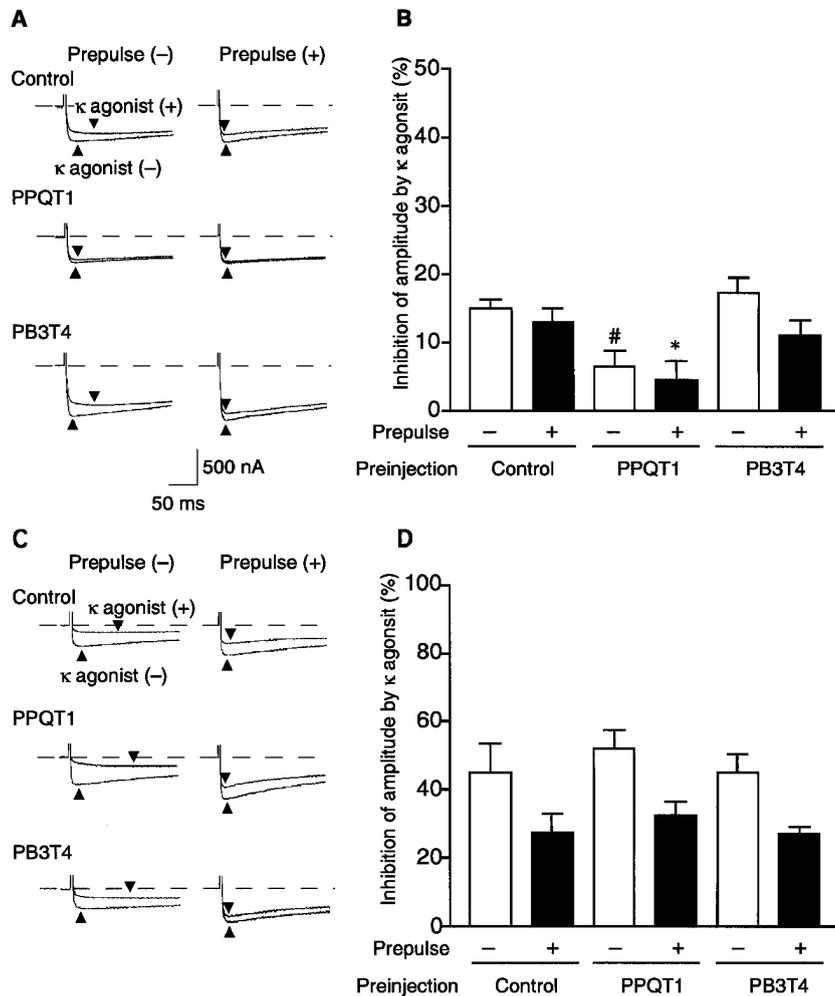


Fig. 1. Effects of the α_{1A} and α_{1B} C-Terminal Peptides on the κ -Opioid Receptor-Mediated Inhibition of P/Q- and N-Type Channel Currents

A: Macroscopic Ba^{2+} currents, I_{Ba} : recorded from oocytes coexpressing $\alpha_{1A}\beta_{1b}$ with $G\alpha_o$ and κ -opioid receptor. Current traces were recorded by 200 ms step depolarization from -60 mV to $+20$ mV at 30 s intervals alternately without (*left*) and with (*right*) a conditioning 100 ms prepulse to $+100$ mV, which preceded the test pulse by 20 ms. Superimposed traces are I_{Ba} s recorded in the presence of the κ -opioid agonist U50488H ($1 \mu M$). Currents were similarly recorded either with PPQT1 or PB3T4 injected 15 h before the recording in a volume of 50 nl, postulated as an intracellular concentration of $10 \mu M$. Triangles indicate the time to peak of the current amplitude. Anti-*Xenopus* $G\alpha_o$ antisense ODN ($5 \mu g$) was injected 12–16 h prior to the recording, which was considered to induce a decrease in the amount of $G\alpha_o$ in oocytes. B: Summary of the effects of injected peptides on the U50488H-induced inhibition of P/Q-type current (mean \pm S.E.M., $n=5$) without (open column) and with (filled column) conditioning prepulses. Significant differences at $p < 0.05$ vs. individual controls are shown as # and *. C: Representative current traces recorded from oocytes coexpressing $\alpha_{1B}\beta_{1b}$ with $G\alpha_o$ and κ -opioid receptor. Recording and drug application procedures were identical to those in the case of the P/Q-type channel. D: Summary of the effects of injected peptides on N-type current inhibition by U50488H ($n=4$).

的であることがわかった。

3. 抗 $G\alpha_o$ 抗体は P/Q 型及び N 型チャネル電流の電位抵抗性の抑制を減少させる

抗 $G\alpha_o$ N 末抗体である GC/2 はラット一次求心性神経^{7,8)}や、N 型チャネルと κ オピオイド受容体を共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞において、⁴⁾ κ オピオイド受容体による N 型チャネル電流の抑制を減少させた。今回の実験では、P/Q 型及び N 型チャネル電流の κ オピオイドによる抑制について、プレパルスプロトコルを用い電位感受性

と抵抗性の成分を分離して、それぞれに対する GC/2 及び EC/2 の 2 種類の抗 $G\alpha_o$ 抗体の効果を調べた (Fig. 2)。GC/2 又は EC/2 は以前に $G\alpha_o$ のそれぞれ N 末又は C 末に結合することが示されている。^{9,10)}

Figure 2A, B で示されているように、細胞内に GC/2 (anti- $G\alpha_o$ (N), 1 : 50 希釈, 50 nl/cell, 測定 2 時間前) を注入したところ、P/Q 型チャネル電流における U50488H による抑制を減少させた。プレパルス無しの場合の抑制は有意でなかったが、プレ

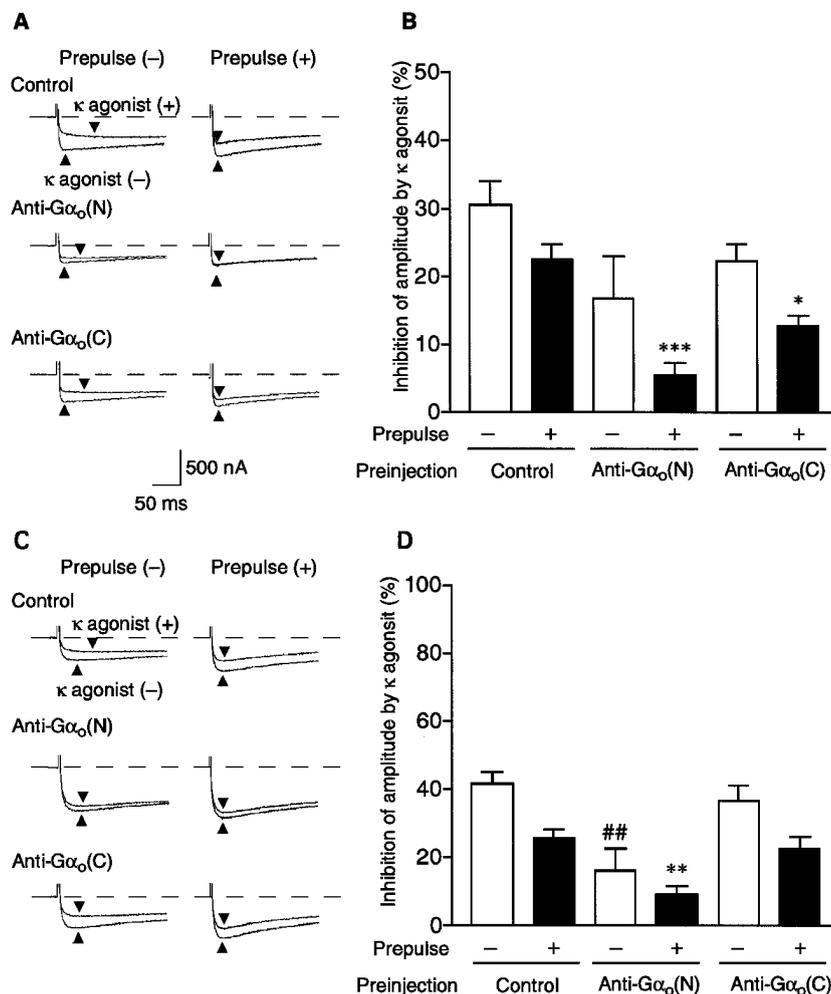


Fig. 2. Effects of the Anti-G α_0 -N-Terminal Antiserum, GC/2, and the Anti-G α_0 -C-Terminal Antiserum, EC/2, on the κ -Opioid Receptor-Mediated Inhibition of P/Q- and N-Type Channel Currents

A: Representative P/Q-type channel current traces recorded from oocytes coexpressing $\alpha_{1A}\beta_{1B}$, G α_0 and κ -opioid receptors in response to a step depolarization from -60 mV to $+20$ mV. The test pulses were applied at an interval of 30 s alternately without (*left*) and with (*right*) a conditioning 100 ms prepulse to $+100$ mV that preceded the test pulse by 20 ms. Antisera were diluted to 1 : 50 with water and injected in a volume of 50 nl into the oocytes 2 h before measurements. Superimposed traces are I_{Ba} s in the presence of the κ -opioid agonist U50488H ($1 \mu\text{M}$). B: Summary of the effects of injected antisera on U50488H-induced P/Q current inhibition ($n=4$) in the presence (filled column) and absence (open column) of prepulses. *: $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs. control with prepulse. C: Representative current traces recorded from oocytes coexpressing $\alpha_{1B}\beta_{1B}$, G α_0 and κ -opioid receptors. Recording and drug application procedures were identical to those in the case of P/Q-type channel. D: Summary of the effects of injected antisera on U50488H-induced N-type current inhibition ($n=6$) in the presence (filled column) and absence (open column) of a prepulse. #: $p<0.01$ vs. control without a prepulse, ** $p<0.01$ vs. control with a prepulse.

パルスをかいた場合の抑制の減少は有意であった ($p<0.001$)。この結果は電位抵抗性の抑制が選択的に阻害されたことを示している。同様にプレパルス無しでのアゴニストによる活性化の遅延化は anti-G α_0 (N)によって減少したものの完全ではなかった(対照細胞; 31.5 ± 13 ms, anti-G α_0 (N)注入細胞; 11.4 ± 8 ms, $n=4$)。同量の熱変性させた anti-G α_0 (N)の全処置では電流やピーク時間の遅延には影響なかった。また、抗 G α_0 C 末抗体の EC/2 (anti-G α_0 (C))は G α_{13} C 末ポリペプチドをエピトープとして作成した抗体であるが、G α_0 に対して同

様な活性がある。¹⁰ Anti-G α_0 (C)は anti-G α_0 (N)に比べ P/Q 型チャネルに対してわずかな効果しかなかった。プレパルス無しでは、anti-G α_0 (C)はピーク電流の抑制に対してもピーク時間の遅延に対しても有意な効果がなかった (35.2 ± 16 ms, $n=4$)。しかしながら、anti-G α_0 (C)全処置によって P/Q 型チャネル電流の電位抵抗性の抑制の有意な減少が起こった。これは遊離 G α_0 とともに三量体会合 G 蛋白も抗体の結合によって移動できなくなっているためかもしれない。

N 型チャネルにおいては (Fig. 2C, D) anti-G α_0

(N)の全処置により、プレパルス無し有りのどちらにおいてもアゴニストによる I_{Ba} の抑制が減少したことから、電位感受性の抑制も抵抗性の抑制も減少したことを示している。アゴニストによるピーク時間の遅延も 12.6 ± 4 ms まで減少した。N型チャンネルの電位感受性の抑制における anti- $G\alpha_o$ (N)の効果は神経細胞を使用した以前の研究においても見られた。^{7,8)} Anti- $G\alpha_o$ (N)の前処置によってプレパルスによる電流増加率も 1.30 ± 0.05 から 1.16 ± 0.06 まで低下し、これは anti- $G\alpha_o$ (N)によって $G\beta\gamma$ の遊離が抑制され電位感受性の抑制が減少しているためであると考えられる。Anti- $G\alpha_o$ (C)前処置はN型チャンネル電流のアゴニストによる抑制やプレパルスによる電流増加に有意な影響を与えなかった。

以上の結果はP/Q型及びN型チャンネル電流のG蛋白を介する制御が anti- $G\alpha_o$ (N)による $G\alpha_o$ N末端の機能の阻害によって不能になることを意味している。 $G\alpha_o$ のN末領域は $G\beta\gamma$ の結合に関与しているので、¹¹⁾ 効果の一部は三量体G蛋白からの $G\beta\gamma$ の遊離量の減少によるものかもしれない。しかしながら、 $G\alpha_o$ はP/Q型及びN型チャンネルのC末領域に結合するので、⁶⁾ これらの発見は、P/Q型の電位抵抗性の制御に寄与する $G\alpha_o$ とVDCCのC末領域の相互作用に対する $G\alpha_o$ のC末領域よりもむしろ $G\alpha_o$ のN末領域の重要性を示しているのかもしれない。

4. $G\alpha_o$ N末ペプチド PGON1はP/Q型チャンネル電流の電位抵抗性の抑制を減少させる

Anti- $G\alpha_o$ (N)はVDCC C末と $G\alpha_o$ N末間の相互作用を抑制し、かつ、G蛋白を介するVDCC電流の抑制を阻害することから、anti- $G\alpha_o$ (N)の作成にエピトープとして用いた合成ペプチドがVDCC結合部位に対するデコイペプチドとして阻害効果をもつかもしれない。この可能性を確かめるために、GC/2及びEC/2作成時にウサギの免疫化に用いたペプチドと同じ配列の、 $G\alpha_o$ N末ペプチドPGON1 (GCTLSAGEAALERSK)と $G\alpha_o$ C末ペプチドPGOC1 (KNNLKECGLY)を合成し、P/Q型及びN型チャンネルにおける電位感受性及び抵抗性の抑制に対する効果を検討した (Fig. 3)。

P/Q型チャンネルでは (Fig. 3A, B), PGON1 (細胞内濃度 $10 \mu\text{M}$) の注入により、 κ オピオイドによるピーク電流の抑制はプレパルス無し有りどちらに

においても、部分的だが有意に抑制した。しかしながら、ピーク時間の遅延はPGON1による影響はなかった (対照細胞; 72.2 ± 12 ms, $n=7$, PGON1注入細胞; 63.3 ± 4 ms, $n=8$)。このことから、PGON1の効果は電位抵抗性の抑制に特異的であると考えられた。PGON1の前処置はP/Q型チャンネルのプレパルスによる電流増加をわずかに減少させた (対照細胞; 1.25 ± 0.06 , PGON1注入細胞; 1.34 ± 0.1)。このことはPGON1によって遊離 $G\beta\gamma$ が増加したことを意味している。PGON1のこれらの効果は低い濃度では濃度依存的だが、高い濃度では部分的であった。対照ペプチドであるPGOC1はラット $G\alpha_{i3}$ (350-359) の配列部分で、ウシ $G\alpha_o$ の同じ領域 (ANNLRGCGLY) と3アミノ酸異なっている。プレパルス有り無しかかわらず、PGOC1はアゴニストによる抑制に影響しなかった。

N型チャンネルでは (Fig. 3C, D), プレパルス無しでアゴニストによる抑制がPGON1によってわずかだが有意に減少した。ピーク時間の遅延は対照細胞とPGON1の間に差は見られなかった。プレパルスによる電流増加率はP/Q型チャンネルの場合と同様、増加がみられた (対照細胞; 1.46 ± 0.09 , PGON1注入細胞; 1.74 ± 0.1)。しかしながら、P/Q型チャンネルの場合と違い、N型チャンネルの電位抵抗性の抑制成分は有意な影響はなかった。これらの結果から、 $G\alpha_o$ N末はP/Q型チャンネルの電位抵抗性の抑制を引き起こすVDCC C末領域との相互作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、プレパルスによる電流増加によって示されるように、PGON1は $G\alpha_o$ N末の $G\beta\gamma$ 結合を阻害して遊離した $G\beta\gamma$ の量を増やしていることが考えられた。

5. PGON1は $G\alpha_o$ N末とVDCC C末間の相互作用を抑制する

$G\alpha_o$ N末とVDCC C末間の相互作用におけるPGON1の効果を検討する目的で、maltose-binding protein (MBP) タグをつけた2つの $G\alpha_o$ N末蛋白、MBP- $G\alpha_o$ (1-88), MBP- $G\alpha_o$ (7-88)を合成し、P/Q型及びN型チャンネルのC末領域の glutathione S-transferase (GST) 融合蛋白 (α_{1A} サブユニットのアミノ酸配列 1975-2424 をコードする GST-B1T; α_{1B} サブユニットの 1912-2339 をコードする GST-B3T⁶⁾) との結合能を *in vitro* で調べた。さらに、

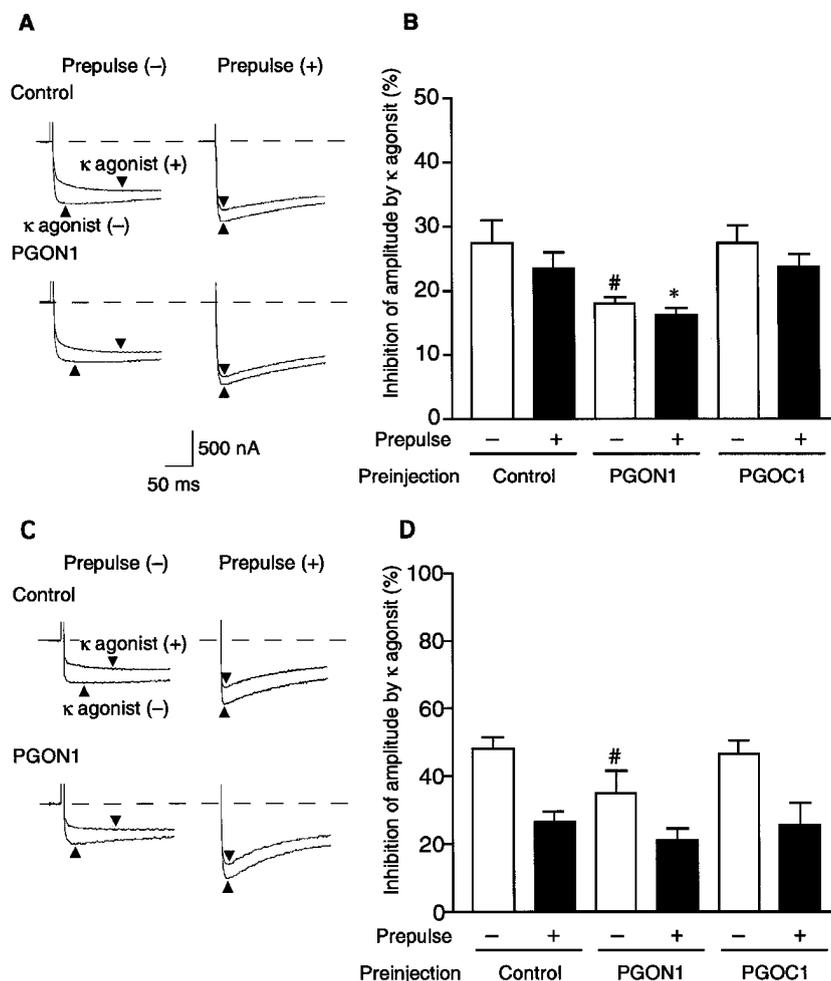


Fig. 3. Effects of the $G\alpha_o$ N-Terminal and C-Terminal Peptides, PGON1 and PGOC1, on the κ -Opioid Receptor-Mediated Inhibition of the P/Q- and N-Type Channel Currents

A: Representative P/Q-type channel current traces recorded from oocytes coexpressing $\alpha_{1A}\beta_{1B}$, $G\alpha_o$ and κ -opioid receptors by applying step depolarization from -60 mV to $+20$ mV. Test pulse was applied at an interval of 30 s alternately without (*left*) and with (*right*) a conditioning 100 ms prepulse to $+100$ mV that preceded the test pulse by 20 ms. Synthetic peptides PGON1 and PGOC1 were dissolved at $100 \mu\text{M}$ in water and the aliquot of 50 nl (approximately 10% of oocyte volume) was injected into oocytes 15 h prior to the measurements. Superimposed traces are $I_{B,8}$ in the presence of the κ -opioid agonist U50488H ($1 \mu\text{M}$). B: Summary of the effects of injected peptides on U50488H-induced P/Q-type current inhibition ($n=7-8$) in the presence (filled column) and absence (open column) of prepulses. #: $p < 0.05$ vs. control without prepulse, * $p < 0.05$ vs. control with prepulse. C: Representative current traces recorded from oocytes coexpressing $\alpha_{1B}\beta_{1B}$, $G\alpha_o$ and κ -opioid receptors. Recording and drug application procedures were the same as those in the case of the P/Q-type channel. D: Summary of the effects of injected peptides on U50488H-induced N-type current inhibition ($n=4$) in the presence (filled column) and absence (open column) of a prepulse. #: $p < 0.05$ vs. control without a prepulse.

VDCC C 末ペプチド, PPQT1 及び PB3T4 がその結合と競合するかについて検討した (Fig. 4).

対照として 52 kD の 2 つの MBP 融合蛋白, MBP- $G\alpha_o(1-88)$ 及び MBP- $G\alpha_o(7-88)$ が検出された (レーン 1, 2, 9, 10). GST 蛋白のみでは MBP 融合蛋白とは結合を示さなかった (レーン 3, 4, 11, 12). P/Q 型の C 末領域をコードする GST-B1T 存在下では, MBP- $G\alpha_o(1-88)$ は検出されたが (レーン 5), MBP- $G\alpha_o(7-88)$ は検出されなかったことから (レーン 6), N 末の 6 アミノ酸残基が結合に重要であることが示唆された. PGON1 又は PPQT1 を電気生

理学的実験に用いた細胞内濃度の 5 倍に相当する $50 \mu\text{M}$ 加えたところ, これらの MBP 融合蛋白との結合は完全に阻害された (レーン 7, 8). PGON1 及び PPQT1 はそれぞれ $G\alpha_o(2-17)$ 及び $\alpha_{1A}(2028-2046)$ に対応していることから, $G\alpha_o$ N 末と P/Q 型の C 末が $G\alpha_o$ と P/Q 型の結合に重要であることを示唆している. さらに, N 型の C 末領域をコードする GST-B3T を使った実験においても同様の結果が得られた. MBP- $G\alpha_o(7-88)$ ではなく MBP- $G\alpha_o(1-88)$ のみが GST-B3T と結合を示した (レーン 13, 14). 電気生理学的には効果を示さなかった

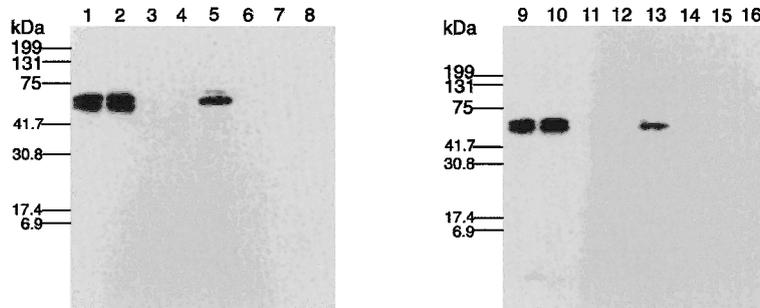


Fig. 4. Binding of $G\alpha_0$ N-Terminal Peptides with the C-Termini of the P/Q- and N-Type Channels and their Competition by the $G\alpha_0$ N-Terminal Peptide PGON1 and VDCC C-Terminal Peptides PPQT1 and PB3T4

Left: The MBP-tagged $G\alpha_0$ N-terminal peptides MBP- $G\alpha_0$ (1-88) (lanes 3, 5, 7 and 8) and MBP- $G\alpha_0$ (7-88) (lanes 4 and 6) were incubated with the blank GST (lanes 3 and 4), GST-B1T (lanes 5 and 6), GST-B1T + 50 μ M PGON1 (lane 7), and GST-B1T + 50 μ M PPQT1 (lane 8) in the presence of glutathione 4B Sepharose beads at 4°C for 1 h. The beads were washed, and the bound peptides were eluted with a glutathione-containing elution buffer. The samples and 5 ng of the control peptides MBP- $G\alpha_0$ (1-88) (lane 1) and MBP- $G\alpha_0$ (7-88) (lane 2) were separated on a 12% SDS-PAGE gel. Immunoblotting was probed by ECL detection with the first anti-MBP antiserum and the second anti-rabbit IgG antibody that had been diluted at 1 : 10,000 and 1 : 4,000, respectively. Right: Reaction and detection were carried out in tubes where MBP- $G\alpha_0$ (1-88) (lanes 11, 13, 15 and 16) and MBP- $G\alpha_0$ (7-88) (lanes 12 and 14) were incubated with the blank GST (lanes 11 and 12), GST-B3T (lanes 13 and 14), GST-B3T + 50 μ M PGON1 (lane 15), and GST-B3T + 50 μ M PB3T4 (lane 16) in the presence of glutathione 4B Sepharose beads. Lanes 9 and 10 are the control MBP- $G\alpha_0$ (1-88) and MBP- $G\alpha_0$ (7-88), respectively. These results are typical of 5 independent experiments.

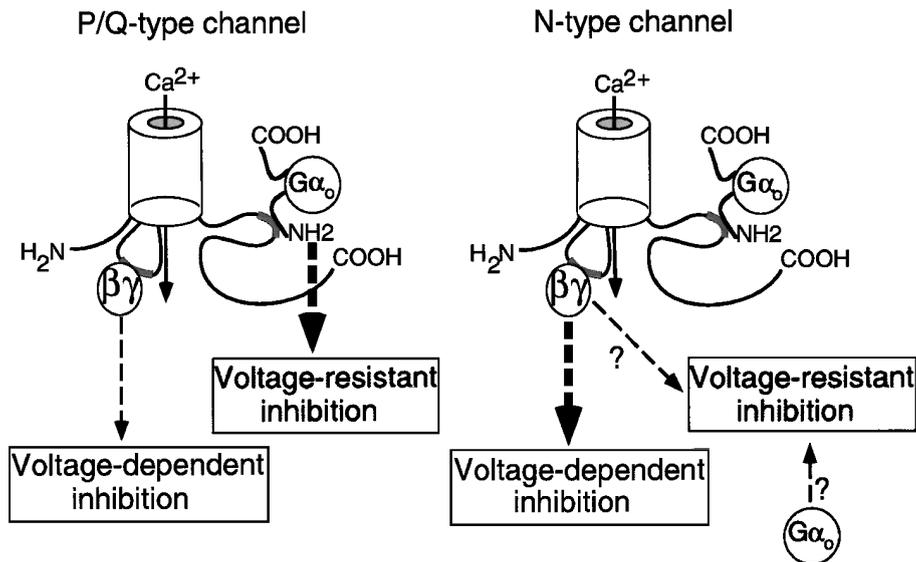


Fig. 5. Dual Regulation of Presynaptic P/Q-Type Ca^{2+} Channel by G-Proteins

PGON1 又は PB3T4 を 50 μ M 加えることによって、結合が阻害された (レーン 15, 16)。

6. おわりに

著者らは、受容体による G 蛋白を介した Ca^{2+} チャネルの抑制的制御の新たなメカニズムを解明した。P/Q 型チャネルで見られる電位抵抗性の抑制は $G\alpha_0$ が結合することによって生じるのであろう。つまり P/Q 型チャネルは $G\alpha_0$ と $G\beta\gamma$ の両方によって二重の制御を受けていることが明らかになった (Fig. 5)。一方、N 型チャネルの電位抵抗性の抑制

には $G\alpha_0$ が関与しないか、¹²⁾ あるいは N 型チャネルの C 末の $G\alpha_0$ 結合部位以外に $G\alpha_0$ の結合調節領域が存在することが考えられる。¹³⁾ N 型チャネル電流の電位抵抗性の抑制の分子メカニズムの解明についてはさらなる研究が必要である。

$G\alpha_0$ の N 末領域が効果器である P/Q 型チャネルの細胞内 C 末領域との結合に関与することが初めて示された。 $G\alpha_0$ の N 末は静止状態で $G\beta\gamma$ との結合に関与するというこれまでの知見を考え合わせると、 $G\alpha_0$ の N 末は受容体刺激に続く G 蛋白の活性

化に伴って $G\beta\gamma$ との結合から Ca^{2+} チャネルとの結合によるチャネル活性の抑制へとスイッチする機能を果たしていると考えられる。

P/Q型及びN型チャネルは中枢神経系に広く存在しており、個々のシナプス終末で神経伝達物質の調節を協調して行っている。本研究で明らかにしたP/Q型及びN型チャネルの受容体を介する調節様式の違いが、神経回路におけるシナプスの様々な特性の違いに寄与していると考えられる。 $G\alpha_o$ による電位抵抗性の抑制は神経活動に依存しない様式で過剰な神経活動を抑える働きをするものと思われ、今後は記憶学習に関連したシナプス可塑性やてんかんなどの異常神経活動において、このような調節様式がもつ意味合いを解明する必要があると考えられる。

謝辞 本研究は京都大学大学院薬学研究科 医療薬理学分野において行われたものであり、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 金子周司助教授に謹んで感謝の意を表します。また、終始有益な御助言と御指導をいただきました京都大学大学院薬学研究科 佐藤公道教授、赤池昭紀教授に深く感謝いたします。さらに、本研究にあたり有益な御助言及び御協力いただきました東京都精神医学総合研究所 額田敏秀博士、岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター 森泰生教授、愛知県精神障害者コロニー発達障害研究所 浅野富子博士に深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Currie K. P. M., Fox A. P., *J. Neurosci.*, **17**, 4570–4579 (1997).
- 2) Brody D. L., Yue D. T. J., *Neurosci.*, **20**, 889–898 (2000).
- 3) Brody D. L., Patil P. G., Mulle J. G., Snutch T. P., Yue D. T., *J. Physiol. Lond.*, **499**, 637–644 (1997).
- 4) Kaneko S., Akaike A., Satoh M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **81**, 324–331 (1999).
- 5) Kinoshita M., Nukada T., Asano T., Mori Y., Akaike A., Satoh M., Kaneko S., *J. Biol. Chem.*, **276**, 28731–28738 (2001).
- 6) Furukawa T., Miura R., Mori Y., Strobeck M., Suzuki K., Ogihara Y., Asano T., Morishita R., Hashii M., Higashida H., Yoshii M., Nukada T., *J. Biol. Chem.*, **273**, 17595–17603 (1998).
- 7) Wiley J. W., Moises H. C., Gross R. A., Macdonald R. L., *J. Neurophysiol.*, **77**, 1338–1348 (1997).
- 8) Moises H. C., Rusin K. I., Macdonald R. L., *J. Neurosci.*, **14**, 3842–3851 (1994).
- 9) Padrell E., Carty D. J., Moriarty T. M., Hildebrandt J. D., Landau E. M., Iyengar R., *J. Biol. Chem.*, **266**, 9771–9777 (1991).
- 10) Simonds M. F., Goldsmith P. K., Codina J., Unson C. G., Spiegel A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 7809–7813 (1989).
- 11) Denker B. M., Neer E. J., Schmidt C. J., *J. Biol. Chem.*, **267**, 6272–6277 (1992).
- 12) Diversé-Pierluissi M. A., Remmers A. E., Neubig R. R., Dunlap K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 5417–5421 (1997).
- 13) Kammermeier P. J., Ruiz-Velasco V., Ikeda S. R., *J. Neurosci.*, **20**, 5623–5629 (2000).