

心筋細胞における GTP 結合蛋白質の循環制御機構

— 循環器病態における最近の知見 —

松田直之*, 服部裕一**

緒言

重症患者の急性期循環管理ではドブタミンなどのアドレナリン作動性 β 受容体刺激で十分な心収縮力の回復を期待できない場合がある。心循環改善薬としてアデニル酸シクラーゼ活性薬やホスホジエステラーゼ (PDE) 抑制薬, Ca^{2+} 感受性増強薬などが臨床応用されるようになった。したがって, アドレナリン作動性 β 受容体刺激を中心とした従来の循環管理においても, アドレナリン β 受容体の下流に位置する細胞内情報伝達系, すなわち, 三量体 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) の機能, アデニル酸シクラーゼ活性, cyclic AMP (cAMP) 産生, 細胞内 Ca^{2+} 動態, 収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性などを十分に理解し, 考慮することが大切であろう。アドレナリン作動性 β 受容体をはじめとする心筋細胞膜に存在する7回膜貫通型受容体は G 蛋白質を介して細胞内情報伝達を行う。本稿では, 既知とされてきた G 蛋白質の機能を整理し, 心筋細胞の収縮性に関与する細胞内情報伝達がさまざまな病態でどのように修飾されているかについて, 最近の研究を紹介しながら概説していきたい。

G 蛋白質の活性化と不活性化の機構

G 蛋白質は3つのサブユニットからなるヘテロ3量体であり, 分子量の大きい順に α , β , γ と命名されている。 β と γ は生理的条件下で $\beta\gamma$ 複合体を形成し, α サブユニットとともに機能蛋白として働く。G 蛋白質が解離して機能蛋白と

して働くには, G_{α} 上に存在する GDP が GTP に置換されることが必要である¹⁾。

三量体を形成し活性化されていない状態の G_{α} には GDP と, GTP を GDP に変換する GTPase が存在する。細胞膜上に存在する7回膜貫通型受容体にホルモンやアゴニストが結合すると G_{α} が構造変化し GDP を放出することで, 細胞内の GTP が受動的に G_{α} に結合する。すなわち, G 蛋白質結合型受容体のシグナルはグアニンヌクレオチド交換因子として働き, GDP- G_{α} を GTP- G_{α} に変換させることで G_{α} と $G_{\beta\gamma}$ との親和性を低下させる。このようにして解離した G_{α} と $G_{\beta\gamma}$ が生理活性を持ち効果器に作用することになる。一方, G_{α} 上に存在する GTPase は regulator of G protein signaling (RGS) により活性化され, G_{α} 上の GTP を GDP に変換することで, 再び G_{α} と $G_{\beta\gamma}$ が会合し, G 蛋白質は不活性化される (図1参照)。

G_{α} の GTPase を活性化させる GTPase 活性化蛋白質 (GAP) である regulator of G protein signaling (RGS) は, G 蛋白質を介した受容体情報伝達を負に制御する因子である²⁾。現在, RGS は20種類以上が同定されており, 約120のアミノ残基からなる RGS ドメインを共通構造とし, GTP 結合型 G_{α} に結合して G_{α} 上の GTPase を活性化する。 G_{α} はさまざまな組織に広範に分布するが, RGS は組織特異的に発現しているため, G タンパク質を介した細胞内情報伝達系のシグナル強度を各組織で異なったものとすると考えられている。また, 後述する G タンパク質のサブタイプである $G_{s\alpha}$ ファミリーの RGS は未だ発見されておらず, 活性化されたアデニル酸シクラーゼ (特にサブタイプ V) が特異的に $G_{s\alpha}$ ファミリーの GAP として

*北海道大学大学院医学研究科侵襲制御医学講座

** 同 細胞薬理学講座

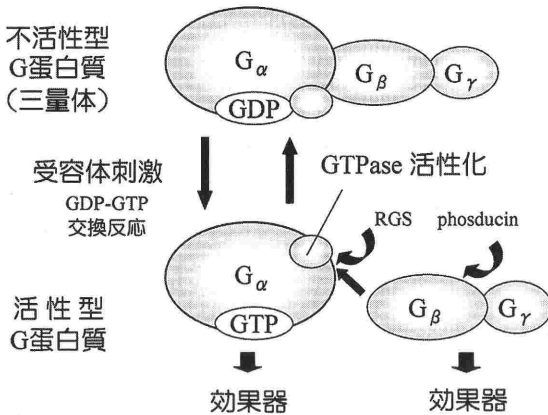


図1 G蛋白質の活性調節機構

G蛋白質は α , β , γ の三量体として存在し, この状態では生理活性を持たない. G蛋白質結合型受容体の刺激により, GDP結合型 G_α がGTP結合型 G_α に変換されると G_α と $G_{\beta\gamma}$ が解離し, 効果器に作用する. 現在20種類以上が同定されている regulator of G protein signaling (RGS) により G_α 上のGTPaseが活性化されると, GTP結合型 G_α がGDP結合型 G_α に変換され, 解離した G_α と $G_{\beta\gamma}$ が再会合し不活性化される. $G_{\beta\gamma}$ 上に結合する phosphodiucinなどもGTPaseを活性化させ, G蛋白質活性を抑制する. このようなGTPase activating protein (GAP)も同定されてきている.

働くことが知られている³⁾. $G_{\beta\gamma}$ 上に結合する phosphodiucinなどもGAP機能を持ち, Gタンパク質活性を抑制することが知られている¹⁾.

このようにして活性調節されているG蛋白質はどのアミノ酸配列にも細胞膜結合を担う疎水性領域が存在しないため, 細胞膜に固定されて受容体情報を受けるには, 翻訳後に脂質修飾を受け脂肪酸と共有結合することが必要となる. G_α はN末端がミリスチル化やパルミトイル化を受け, G_γ はC末端のシステイン残基のSH基がファルネシル基やゲラニル基と結合するイソプレニル化を受ける. このような翻訳後脂質修飾により細胞膜内側に局在し, 受容体情報を下流に伝達する.

活性化G蛋白質の機能

G_α は現在16の遺伝子でコードされる20種以上のサブタイプが同定されており, アミノ酸配列の相同性と標的とする効果器の違いにより G_s , G_i , G_q , G_{12} の大きく4つのサブファミリーに分類されている⁴⁾. X線構造解析によりGTP/GDP結合

ポケットを形成するGTPaseドメイン, N末端部で $G_{\beta\gamma}$ との結合に関与する α ヘリックス構造をもつ α Nドメイン, 三量体型 G_α に特異的なヘリックスドメインの3領域を特徴とすることが解明されている. 近年は, G_α のみならず $G_{\beta\gamma}$ も細胞内情報伝達を担う重要な情報伝達物質と考えられている.

(1) $G_{s\alpha}$ ファミリー

コレラ毒素に感受性があることで知られる $G_{s\alpha}$ ファミリーはmRNAが選択的スプライシングを受けることで4つのスプライシングバリエーションより少なくとも45 kDaと52 kDaの2つのアイソフォームが生成される⁵⁾. $G_{s\alpha}$ をコードする遺伝子は20q13.11に存在し, GNAS-1と呼ばれている. GNAS-1の変異で生じる疾患群として, 多発骨繊維異形性, カフェオレ斑, 内分泌機能亢進を3徴とするMcCune-Albright症候群が知られている^{6,7)}.

$G_{s\alpha}$ ファミリーは心筋細胞に豊富に発現しており, 心収縮力増強, 心拍数増加に関与する重要な細胞内情報伝達蛋白である⁸⁾. 心筋細胞膜ではアドレナリン作動性 β 受容体, ヒスタミン H_2 受容体, プロスタノイド E_2 受容体, 5-HT $_4$ 受容体, アデノシン A_2 受容体, VIP受容体などより活性化を受ける⁹⁻¹¹⁾. $G_{s\alpha}$ からのシグナルはアデニル酸シクラーゼの活性化とcAMP産生を介してcAMP-dependent kinase (PKA)を活性化させ, L型 Ca^{2+} チャネルの α_{1c} サブユニットのリン酸化によりチャネル開口確率を上昇させ, 心筋細胞内へ Ca^{2+} 流入を生じさせる. このような間接的な Ca^{2+} 流入作用以外に, $G_{s\alpha}$ はL型 Ca^{2+} チャネルを直接開口させ心筋細胞内へ Ca^{2+} 流入を促すことも知られている¹²⁾. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はリアノジン受容体2を介して筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を高め, この Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release機構(CICR)により収縮が惹起される. 心筋細胞では血管平滑筋細胞と同様にアゴニスト依存性にinositol 1,4,5-trisphosphate (IP $_3$)の産生が認められるものの, 心筋細胞でのIP $_3$ 受容体を介したIP $_3$ induced Ca^{2+} release機構(IICR)は充分なものではなく, 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は主にIICRではなくCICRに依存する¹³⁾. GTP- $G_{s\alpha}$ の寿命は1分程度と考えられているが, その間, アデニル酸シク

ラーゼを1000回程度活性化する能力を持ち、数百万分子の cAMP を産生するという。以上のように $G_{s\alpha}$ ファミリーは心筋細胞内へ Ca^{2+} 流入をもたらす、心臓の興奮収縮連関を高める重要な蛋白である。

(2) $G_{i\alpha}$ ファミリー

百日咳毒素に感受性を持つ $G_{\alpha i}$ ファミリーは G_i , G_o , G_t , G_z , G_{ust} に分類されるが⁸, 心筋細胞では転写段階での発現調節により主に G_i と G_o が機能している。

このうち $G_{i\alpha}$ は心筋細胞の $G_{s\alpha}$ を介した収縮刺激性に負のシグナルを与える蛋白である^{14,15}。現在、分子量40-41 kDa の3つのサブタイプがクローニングされており、それぞれ、 $GNAI-1$, $GNAI-2$, $GNAI-3$ 遺伝子によりコードされている⁴。中枢に発現の多い $G_{i\alpha 1}$ に対し、心臓に高発現しているのは $G_{i\alpha 2}$ と $G_{i\alpha 3}$ である。心筋細胞膜上にはムスカリン M_2 受容体、アデノシン A_1 受容体¹⁶、ニューロペプチド Y 受容体¹⁷などが存在し、主に $G_{i\alpha 2}$ を活性化させアデニル酸シクラーゼを抑制する^{14,15,18}。 $G_{i\alpha 3}$ は細胞質内、細胞内小器官にも多く存在し、蛋白合成に関与することが知られている。また、 $G_{i\alpha}$ はアセチルコリン感受性 K^+ チャネル (K_{ACh}) を直接に活性化することで心筋細胞を過分極させ、細胞内への Ca^{2+} 流入を減少させ、心収縮力低下を導く¹⁹。このような $G_{i\alpha}$ は加齢とともに増加することが知られており、高齢者の交感神経緊張に伴う頰脈や心収縮性増加を抑制していると考えられている。

一方、 $G_{o\alpha}$ は全長140 kb の遺伝子より選択的スプライシングを経て2種類のサブタイプを形成する²⁰。脳や網膜に比べ心臓における分布は非常に低く、胎児期では $G_{i\alpha}$ と同等な発現であるものの、成熟に伴い減少する^{21,22}。 $G_{i\alpha}$ と同様の受容体刺激によりホスホリパーゼ C (PLC) の活性化²³、 Ca^{2+} チャネル抑制²⁴を導くことが知られているが、加齢により $G_{o\alpha}$ の機能は $G_{\alpha i}$ に委ねられる。我々は成人開心術で摘出された心房筋と心室筋標本を用いて $G_{o\alpha}$ mRNA 発現をノーザンブロット法で調べた結果、心房筋では非常に弱い発現が認められたが、心室筋では検出することができなかった。一方、 $G_{i\alpha 2}$ と $G_{i\alpha 3}$ は心房筋と心室筋でともに強い発現を認めた。このようにヒトで

の $G_{s\alpha}$ を介した収縮刺激性に負のシグナルを与える G 蛋白質の中心は $G_{o\alpha}$ ではなく $G_{i\alpha}$ であると考えている。

(3) $G_{q\alpha}$ ファミリー

コレラ毒素や百日咳毒素に感受性を持たない $G_{q\alpha}$ ファミリーは $G_{q\alpha}$, $G_{11\alpha}$, $G_{14\alpha}$, $G_{15\alpha}$, $G_{16\alpha}$ のサブタイプに分類され、PLC を活性化させ、細胞膜上のイノシトールリン脂質を分解して IP_3 と 1, 2-diacylglycerol (DG) を産生する。血管平滑筋では IP_3 が IP_3 受容体を介して $IICR$ を誘発し、DG は protein kinase C (PKC) を介して、ともに血管平滑筋収縮に働くことが知られているが、心臓では $G_{q\alpha}$ ファミリー、 IP_3 , PKC を介した収縮を認めない¹³。心筋細胞膜にはアドレナリン作動性 α_1 受容体、エンドセリン受容体、アンジオテンシン AT_1 受容体、ブラジキニン受容体などが発現しており、これらは主に一過性外向き K^+ 電流 (I_{to}) を抑制することで活動電位幅を延長させ、心収縮性を増大させることができるが、これら受容体の慢性刺激ではむしろ心肥大を惹起し、心収縮性を損なうことが知られている。 $G_{q\alpha}$ ファミリーは心筋の線維芽細胞にも多く発現しており、上記受容体刺激により線維芽細胞を増殖させる可能性がある^{25,26}。 $G_{q\alpha}$ ファミリーのノックアウトマウスでは、心室中隔欠損、単心室、頭蓋顔面奇形、運動失調、血小板凝固障害などを合併する。心筋の正常な発達が損なわれることから、心筋の発達と成長に $G_{q\alpha}$ ファミリーが不可欠なものと考えられている⁴。

(4) $G_{\beta\gamma}$ の作用

従来、活性化された G_{α} に対するスカベンジャーとして働き G_{α} 活性を抑制すると考えられていた $G_{\beta\gamma}$ も、 G_{α} と解離した後に独自に細胞内情報伝達に関与することが様々な細胞で報告されてきた。その作用を表にまとめた。

心筋細胞に存在するアデニル酸シクラーゼはそのアイソフォームが現在9つ知られているが、心臓に高発現しているのは AC_5 と AC_6 である。 AC_1 , AC_8 は $G_{\beta\gamma}$ で活性化され、一方、 AC_2 , AC_4 , AC_5 , AC_6 , AC_7 は $G_{\beta\gamma}$ で抑制されることが知られており、特に AC_5 と AC_6 は $\beta_1\gamma_2$ により抑制されることが知られている。このように

表 $G_{\beta\gamma}$ の主な細胞内情報伝達機構

効果器	作用
アデニル酸シクラーゼ	
タイプII, IV, VII, (V, VI)	抑制
タイプI, VIII	促進
ホスホリパーゼC (β タイプ)	促進
Gタンパク質共役型受容体キナーゼ	促進
イノシトールリン脂質3-キナーゼ (PI3-キナーゼ)	促進
電位依存性 Ca^{2+} チャネル	抑制
内向き整流性 K^+ チャネル	促進

β , γ のサブタイプの組み合わせによりアデニル酸シクラーゼの選択性が異なることもさまざまな細胞で検討されている²⁷⁾。また、受容体脱感作に関与するG蛋白質共役型受容体キナーゼ (G protein regulatory kinase: GRK) はアゴニストと結合したG蛋白質結合型受容体をリン酸化するセリン/スレオニンキナーゼであるが、 $G_{\beta\gamma}$ はこのGRKを細胞膜に局在させ、G蛋白質結合型受容体をリン酸化させる働きをもつ²⁸⁾。GRKによりリン酸化された受容体はG蛋白質との共役が抑制され、細胞内への陥入を受けやすくなる。このことはアドレナリン作動性 β 受容体²⁸⁾、アドレナリン作動性 α_1 受容体²⁹⁾、アドレナリン作動性 α_2 受容体³⁰⁾、ムスカリンM2受容体³¹⁾、オピオイド δ 受容体³²⁾などで検証され、受容体脱感作に $G_{\beta\gamma}$ 活性が関与することが証明されている。また、肥中心が生じる一因として、 $G_{\beta\gamma}$ によりイノシトールリン脂質3-キナーゼ (PI3-キナーゼ) が活性化され、細胞増殖のシグナルが増強することが知られている³³⁾。心筋細胞のアドレナリン作動性 β 受容体の慢性刺激が β 受容体の脱感作と、心肥大を導く要因として、 $G_{\beta\gamma}$ の活性化が関与していると想定される。

現在、 β サブユニットは少なくとも6種類、 γ サブユニットは少なくとも12種類が同定されているが、これらの組み合わせにより作用する効果器や刺激効果が異なる³⁴⁾。心筋細胞のL型 Ca^{2+} チャネルの促進には $\beta_2\gamma_3$ が強く関与するなどの $G_{\beta\gamma}$ を構成するサブタイプの特異性が知られており³⁵⁾、心筋細胞における $G_{\beta\gamma}$ 機能とその明確な役割については現在も詳細な検討が行われている。

心筋細胞における収縮力調節機構

心筋細胞の収縮性に関与する細胞内情報伝達は未ださまざまな機序の追加が行われているものの、その細胞内情報伝達の本流が定まり、受容体レベルで議論されていた薬物反応性はG蛋白質をはじめとする受容体下流の細胞内情報伝達に照準を絞った細かな検討が必要となった^{36,37)}。

心筋の収縮性調節機構は $G_{s\alpha}$ の項で触れたように、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動により規定される³⁶⁻³⁹⁾ (図2参照)。この心筋細胞内の Ca^{2+} 上昇をもたらす代表的な系は、アドレナリン作動性 β_1 受容体を介するものであり、 $G_{s\alpha}$ 活性化によりアデニル酸シクラーゼを活性化させる^{8,36)}。成人ヒト心室筋細胞のアドレナリン作動性 β 受容体の分布は80%が β_1 受容体、20%が β_2 受容体だが、加齢とともに β_2 受容体の比率が増加する。また、心室筋細胞におけるアドレナリン作動性 β 受容体と G_s タンパクとアデニル酸シクラーゼの存在比は、約1:200:3と評価されている^{40,41)}。これらアドレナリン β 受容体は $G_{s\alpha}$ を介して収縮力増加を導くが、そのためのアゴニストの β 受容体占拠率は最大で30%、通常は10%弱で充分と評価されており^{36,37)}、また、 β 受容体発現を20倍から200倍に増加させてもcAMP産生は約2倍の増加に過ぎないとされている⁴²⁾。したがって、心筋細胞の収縮力低下が生じる場合、 β 受容体数の減少より $G_{s\alpha}$ とのカップリングや $G_{s\alpha}$ の不活性化の影響が強いと考えられる^{43,44)}。また、アデニル酸シクラーゼが活性化された状態では、ムスカリンM2受容体、アデノシンA1受容体、ニューロペプチドY受容体などの $G_{i\alpha}$ とカップリングする受容体が $G_{i\alpha}$ の活性化を介してアデニル酸シクラーゼに強い抑制をかける^{14,15,8)}。さらに、受容体にアゴニスト刺激がない状態でも $G_{i\alpha}$ アデニル酸シクラーゼを抑制することも知られている⁴⁵⁾。以上より、 $G_{s\alpha}$ からシグナルを受けるアデニル酸シクラーゼの活性がどの程度 $G_{i\alpha}$ を介したシグナルで抑制されるかを考慮することが循環管理において大切である。

このようにして活性化調節を受けたアデニル酸シクラーゼは、次にcAMP産生、PKA活性化を介して、細胞膜表面のL型 Ca^{2+} チャネルや筋小胞体膜のホスホランバンをリン酸化し、L型 Ca^{2+}

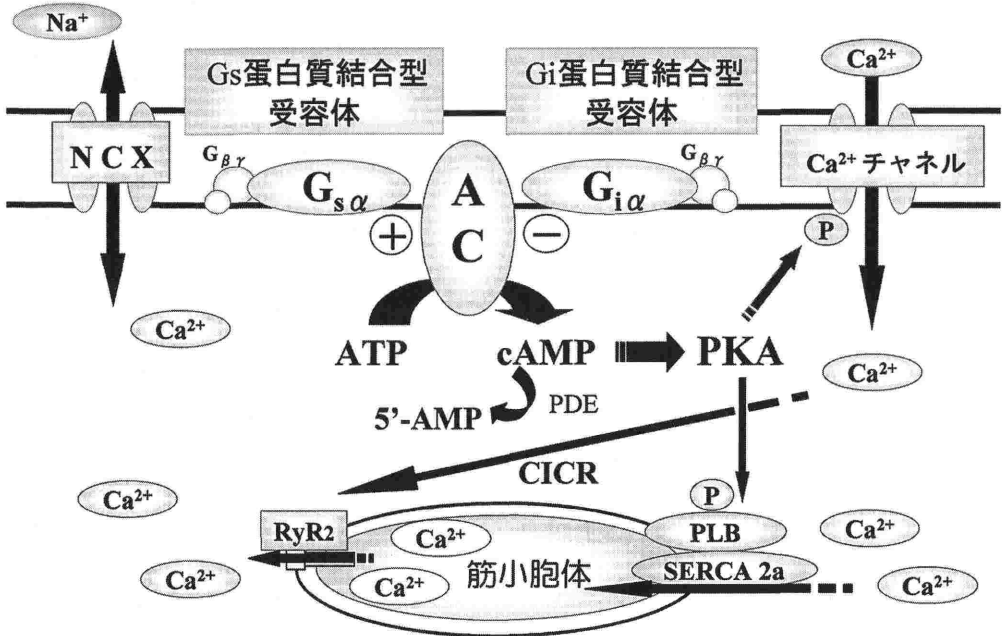


図2 心筋細胞の収縮性に関与する細胞内情報伝達機構

G_s蛋白質結合型受容体（アドレナリン作動性β受容体など）はG_{sα}蛋白質の活性化を介してアデニル酸シクラーゼ（AC）を活性化させ、cyclic AMP（cAMP）の産生を高める。このcAMP産生にG_i蛋白質結合型受容体刺激（ムスカリンM₂受容体など）はG_{iα}蛋白質を介して抑制をかける。また、ホスホジエステラーゼ（PDE）活性によりcAMP産生レベルが制御される。このようなAC活性調節、cAMP産生調節により活性化されたプロテインキナーゼA（PKA）が、L型Ca²⁺チャネルと筋小胞体ホスホランパンをリン酸化させる。L型Ca²⁺チャネルの開口確率が上昇することでCa²⁺流入が増加し、これをトリガーとして筋小胞体のリアノジン受容体2（RyR2）よりCa²⁺放出が生じる。これをCa²⁺-induced Ca²⁺ release（CICR）と呼ぶ。このようにして生じたCa²⁺スパイクは、Ca²⁺ウエーブとして隣接する心筋細胞にもgap junctionを介して伝播される。一方、リン酸化されたホスホランパンは筋小胞体Ca²⁺-ATPase（SERCA2a）の抑制効果を失い、SERCA2aの作用により筋小胞体内に十分なCa²⁺が再取り込みされるようになる。また、Ca²⁺の細胞外放出にはNa⁺-Ca²⁺交換系（NCX）が中心的な役割を担う。細胞内Ca²⁺濃度上昇に対する緩衝系として筋小胞体とNCXが働き、細胞内Ca²⁺濃度の調節を促し、心臓の興奮収縮連関を調節している。

チャネルを介して細胞内へCa²⁺を流入させ、リアノジン受容体2を介して筋小胞体でのCICRを促す^{38,43}。これらは蛍光色素を用いた心筋細胞内モニターでCa²⁺スパイクとして捕らえることができる。

筋小胞体はこうしたCICRに備えて、十分なCa²⁺を筋小胞体に貯蔵させるCa²⁺取り込み装置として働く。筋小胞体膜状にはCa²⁺-ATPase（SERCA2a）が存在しCa²⁺取り込みを促進しており、ホスホランパンがSERCA2aに構造抑制をかけ、Ca²⁺取り込みを制御している。ホスホランパンの3つのリン酸化部位のうち、活性化されたPKAは16位のセリンをリン酸化し、ホスホランパンの構造変化が生じるとSERCA2aに対する

抑制が解かれ、筋小胞体内に十分なCa²⁺が保持されるようになる⁴⁶。筋小胞体はCICRに備えて、十分なCa²⁺を筋小胞体に貯蔵させ、また、細胞内Ca²⁺濃度上昇に対する緩衝装置として働いている^{38,43}。このような心収縮性を調節している心筋細胞内情報伝達系に様々な病態が修飾を加えることが報告されている。

循環器病態におけるG蛋白質の心収縮力調節

(1) G_{sα}蛋白質と循環器病

G_{sα}蛋白質はイムノブロットで主に52 kDaと45 kDaの2つのバンドとして検出されるが、ラットでは加齢により52 kDa G_{sα}の比率が増加し⁴⁷、全体量としてG_{sα}が減少することが報告

されている⁴⁸⁾。動静脈シャントによるラット肥大心モデル⁴⁹⁾、volume-overload モデル⁵⁰⁾、慢性低酸素ラット⁵¹⁾、甲状腺機能低下⁵²⁾などでも $G_{s\alpha}$ 蛋白が減少することが報告されている。

我々はグラム陰性桿菌の表面抗原である lipopolysaccharide 100 μ g/kg を静脈内投与して作成したウサギ敗血症モデルを用いて、アドレナリン作動性 β 受容体を介した収縮力増強作用が減弱する機序を報告した⁴⁴⁾。心室筋より膜標品を作成し、GTP 存在下に isoproterenol (アドレナリン作動性 β 受容体刺激薬)、GppNHp ($G_{s\alpha}$ 蛋白質活性化物質)、colforsin daropate (アデニル酸シクラーゼ活性化薬) で刺激した際の cAMP 産生を定量した結果、敗血症作成の初期段階より β 受容体数とその親和性には変化が認められないにもかかわらず、isoproterenol と GppNHp による cAMP 産生量が有意に減少していた。このことより、敗血症作成の初期段階でアドレナリン作動性 β 受容体とアデニル酸シクラーゼの間に障害が生じると評価した。そこでイノブロット法とノーザンブロット法で G 蛋白質を解析した結果、 $G_{i\alpha}$ と $G_{\beta\gamma}$ には変化が認められなかったが、 $G_{s\alpha}$ 蛋白質が転写段階で対照群の 50% 以下に減少していることを見出した。このような $G_{s\alpha}$ の転写段階での調節は、様々な転写因子やそれを制御しているサイトカインの影響によると考えられるが、この点については未だ明らかでない¹⁰⁾。敗血症病態では神経内分泌反応が促進し交感神経緊張状態に移行するため、その進行に伴い心臓では $G_{\beta\gamma}$ 作用が増強され、受容体数低下や脱感作現象を導く可能性がある。このように $G_{s\alpha}$ の質や量に異常が認められる場合、ドブタミンなどによる受容体刺激では十分な収縮力増強が期待できないばかりか、過度な受容体刺激により $G_{\beta\gamma}$ 作用が増強され、受容体数低下や脱感作を導く可能性があると考えられた。

不全心に対して $G_{s\alpha}$ を過剰発現させる遺伝子治療の検討がなされているが、 $G_{s\alpha}$ を過剰発現されたマウスでは心収縮性増加が期待できるものの、拡張型心筋症を惹起することが示唆されている^{4, 53)}。 $G_{s\alpha}$ が増加する病態としては甲状腺機能亢進症が知られているが、 $G_{s\alpha}$ 増加は合併する頰脈や心筋症の一要因と考えられている⁵²⁾。

(2) $G_{i\alpha}$ 蛋白質と循環器病

$G_{i\alpha}$ 蛋白質はイムノブロットで 40/41 kDa の単一のバンドとして検出されるが、加齢により増加し、甲状腺機能低下で増加することが知られている^{47, 52)}。高齢者ではノルエピネフリン活性が高められていることが知られているが、ノルエピネフリン慢性刺激で心筋細胞の $G_{i\alpha 2}$ が転写段階で増加することが知られている⁵⁴⁾。ヒト不全心でも甲状腺機能と無関係に $G_{i\alpha}$ が増加することが知られているが^{36, 37, 55, 56)}、 $G_{i\alpha}$ の増加によりアドレナリン作動性 β 受容体を介した心収縮力増加が抑制される。

我々は臍 β 細胞をストレプトゾトシンで選択的に破壊した糖尿病ラットモデルを用いて、糖尿病病態で心収縮性が低下する機序の研究を行ってきた^{9, 14, 38, 39, 43, 57)}。糖尿病病態ではアドレナリン作動性 β 受容体数が転写段階で約 50% に低下しているが⁹⁾、 $G_{s\alpha}$ に変化は認められず、mRNA および蛋白レベルで $G_{i\alpha 2}$ 、 $G_{i\alpha 3}$ がそれぞれ対照群の約 80%、約 45% に減少していた¹⁴⁾。しかし、アデニル酸シクラーゼ活性の測定実験では cAMP 産生能は保たれており⁴³⁾、カテコラミン反応性の低下を説明する細胞内情報伝達機序は cAMP 産生より下流に存在すると考えられた。糖尿病心筋では筋小胞体機能が低下していること、 Ca^{2+} の細胞外放出をつかさどる Na^+ - Ca^{2+} 交換系が発現レベルと機能レベルで低下していることから、カテコラミン刺激により心筋細胞内で Ca^{2+} 過負荷が進行し、心筋の拡張不全が導かれやすいと結論した^{38, 39)}。このことは周術期を含めた生体侵襲の極期で糖尿病患者が心不全に移行しやすい要因と考えられる。糖尿病心筋細胞で cAMP 産生が保たれている理由は、アドレナリン作動性 β 受容体、 $G_{s\alpha}$ を介したシグナルの低下が、 $G_{i\alpha}$ 発現量の減少によりアデニル酸シクラーゼ活性を高めるように代償されているためと考えられた¹⁴⁾。

一方、現在検討を加えている冠動脈結紮ウサギ心筋梗塞モデルでは、ヒト不全心のこれまでの報告と同様に非梗塞層に $G_{i\alpha 2}$ の増加が認められた。このように、心筋梗塞に伴う心不全では $G_{i\alpha 2}$ の増加が著明に認められるが、糖尿病性心不全では $G_{i\alpha 2}$ の低下が認められるのが特徴となる。しかし、糖尿病心では $G_{i\alpha 3}$ に比べ $G_{i\alpha 2}$ の低下が軽度にとどめられ、この要因として、不全心に見られ

るような G_{i2} を増加させようとする別の転写段階での機転が糖尿病で同時に進行している可能性が推測される。

$G_{i\alpha}$ ノックアウトマウスによる検討では G_{i2} ノックアウトのみ生存できず、潰瘍性大腸炎に類似する炎症性腸炎を合併し、インスリン非依存性糖尿病が進行することが示唆されている^{4,58)}。このような $G_{i\alpha}$ の転写調節機構も $G_{s\alpha}$ と同様に未だ詳細が解明されておらず、今後の更なる研究が待たれる。

(3) $G_{q\alpha}$ 蛋白質と循環器病

エピネフリン、エンドセリン-1、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 、アンジオテンシン II などの刺激は $G_{q\alpha}$ ファミリーの項で前述したように、心収縮性増強よりむしろ、その慢性刺激により肥大心と心収縮性不全を導く。 $G_{q\alpha}$ ファミリーの慢性刺激や過剰発現により、2次的にアドレナリン作動性 β 受容体と $G_{s\alpha}$ とのカップリングの障害、 $G_{i\alpha}$ の増加、アデニル酸シクラーゼ (特にサブタイプ V) の mRNA レベル、蛋白レベルでの低下を導き、心収縮性低下を惹起する可能性がある⁵⁹⁾。冠動脈結紮による心筋梗塞動物モデルでは、心筋梗塞層と境界域に転写段階から $G_{q\alpha}$ が2倍以上に増加することが報告されており⁶⁰⁾、梗塞巣周辺の再構成に関与する可能性がある。また、我々は前述の糖尿病ラットモデルで $G_{q\alpha}$ の発現を検討し、大動脈で約2倍に増加することを見出し、糖尿病動脈が収縮に転じやすいと評価した⁵⁷⁾。しかし、本モデルでの心筋細胞では $G_{q\alpha}$ の発現増加を認めず、組織によりその発現調節機構が異なる可能性が示唆された。 $G_{q\alpha}$ ファミリーの病態における転写調節機構も他の G 蛋白質と同様に解明されておらず、今後の研究が待たれる。

結 語

正常な生体環境から逸脱した患者の循環管理には、様々な病態因子が細胞内情報伝達に修飾を加えることを考慮する必要がある。動物モデルを用いた研究はそれのみでヒトの病態に適用することは危険であるが、臨床に多くの示唆を与えてくれる。本稿では G 蛋白質を中心に心筋細胞の収縮性調節について再考した。種々の循環器病における細胞内情報伝達系の修飾、とりわけ、G 蛋白質

の転写調節機構の一層の解明が望まれる。

文 献

- 1) Martin JL : G-proteins and their regulators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360 : 3-4, 1999
- 2) Burchett SA : Regulators of G protein signaling: a bestiary of modular protein binding domains. *J Neurochem* 75 : 1335-1351, 2000
- 3) Scholich K, Mullenix JB, Wittpoth C, et al : Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase. *Science* 283 : 1328-1331, 1999
- 4) Offermanns S : New insights into the in vivo function of heterotrimeric G-proteins through gene deletion studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360 : 5-13, 1999
- 5) Ishikawa Y, Bianchi C, Nadal-Ginard B, et al : Alternative promoter and 5' exon generate a novel $G_{s\alpha}$ mRNA. *J Biol Chem* 265 : 8458-8462, 1990
- 6) McCune DJ, Bruch H : Osteodystrophia fibrosa. *Am J Dis Child* 54 : 806, 1937
- 7) Albright F, Butler AM, Hampton AO, et al : Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas of pigmentation and endocrine dysfunction, with precocious puberty in females. *N Engl J Med* 216 : 727, 1937
- 8) Robishaw JD, Foster KA : Role of G proteins in the regulation of the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 51 : 229-244, 1989
- 9) Matsuda N, Hattori Y, Gando S, et al : Diabetes-induced down regulation of β_1 -adrenoceptor mRNA expression in rat heart. *Biochem Pharmacol* 58 : 881-885, 1999
- 10) Matsuda N, Hattori Y, Kemmotsu O, et al : Pathological significance of over-production of histamine and altered transcriptional regulation of H_1 - and H_2 -receptors during septic shock. In *Histamine Research at the New Millennium* eds. by T. Watanabe and K. Yanai. Elsevier Science 173-178, 2001
- 11) Hershberger RE, Anderson FL and Bristow MR : Vasoactive intestinal peptide receptor pharmacology in nonfailing and failing human heart. *Heart Failure* 5 : 51-61, 1989
- 12) Yatani A, Okabe K, Polakis P, et al : ras p21 and GAP inhibit coupling of muscarinic receptor to atrial K^+ channels. *Cell* 61 : 769-776, 1990
- 13) Movesian MA, Thomas AP, Selak M, et al : Inositol triphosphate does not release Ca^{2+} from permeabilized cardiac myocytes and sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 185 : 328-332, 1985
- 14) Matsuda N, Hattori Y, Gando S, et al : Differential gene transcriptional regulation of G_i isoforms and G_s protein expression in diabetic rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361 : 53-60, 2000
- 15) Grimm M, Gsell S, Mittmann C, Nose M, et al : Inactivation of $G_{i\alpha}$ proteins increases arrhythmogenic effects of β -adrenergic stimulation in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 30 : 1917-1928, 1998
- 16) Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, et al : Functional evidence for the existence of adenosine receptors in the

- human heart. *Eur J Pharmacol* 116 : 323-326, 1985
- 17) Michel MC : Receptors for neuropeptide Y: multiple subtypes and multiple second messengers. *TIPS* 12 : 389-396, 1991
 - 18) Nagata K, Ye C, Jain M, et al : $G_{\alpha 2}$ but not $G_{\alpha 3}$ is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ Res* 87 : 903-909, 2000
 - 19) Brown AM and Birnbaumer L : Direct G protein gating of ion channels. *Am J Physiol* 254 : H401-410, 1988
 - 20) Bartrand P, Sanford J, Rudolph U, et al : At least three alternatively spliced mRNAs encoding two alpha subunits of the G_o GTP-binding protein can be expressed in a single tissue. *J Biol Chem* 265(30) : 18576-18580, 1990
 - 21) Rapijko PJ, Watkins DC, Ros M, et al : G-protein subunit mRNA levels in rat heart, liver, and adipose tissues: analysis by DNA-excess solution hybridization. *Biochem Biophys Acta* 1052 : 345-350, 1990
 - 22) Asano T, Kamiya N, Senba R, et al : Ontogeny of the GTP-binding protein G_o in rat brain and heart. *J Neurochem* 51 : 1711-1716, 1988
 - 23) Moriarty TM, Padrell E, Carty DJ, et al : G_o protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. *Nature* 343 : 79-82, 1990
 - 24) Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, et al : Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* 353 : 43-48, 1991
 - 25) LaMorte VJ, Thorburn J, Absher D, et al : G_q - and Ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 269 : 13490-13496, 1994
 - 26) Meszaros JG, Gonzalez AM, Endo Y, et al : Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between G_q and G_s . *Am J Physiol* 278 : C154-162, 2000
 - 27) Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various forms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol* 279 : F400-416, 2000
 - 28) Freedman NJ, Liggett SB, Brachman DE, et al. Phosphorylation and desensitization of the human adrenergic receptor. *J Biol Chem* 270 : 17953-17961, 1995
 - 29) Diviani D, Lattion AL, Larbi N, et al : Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 271 : 5049-5058, 1996
 - 30) Kurose H and Lefkowitz RJ : Differential desensitization and phosphorylation of three cloned and transfected α_2 -adrenergic receptor subtypes. *J Biol Chem* 269 : 10093-10099, 1994
 - 31) Debburman SK, Kunapuli P, Benovic JL, et al : Agonist-dependent phosphorylation of human muscarinic receptors in *Spodoptera frugiperda* insect cell membranes by G protein-coupled receptor kinases. *Mol Pharmacol* 47 : 224-233, 1995
 - 32) Hasbi A, Polastron J, Allouche S, et al : Desensitization of the δ opioid receptor correlates with its phosphorylation in SK-N-BE cells: involvement of a G protein-coupled receptor kinase. *J Neurochem* 70 : 2129-2138, 1998
 - 33) Naga-Prasad SV, Esposito G, Mao L, et al : Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J Biol Chem* 275 : 4693-4698, 2000
 - 34) Lefkowitz RJ : The subunit story thickens. *Nature* 358 : 372, 1992
 - 35) Diverse-Pierluissi M, McIntire WE, Myung CS, et al : Selective coupling of G protein $\beta\gamma$ complexes to inhibition of Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 275 : 28380-28385, 2000
 - 36) Brodde OE : β_1 - and β_2 -adrenergic receptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43 : 203-254, 1991
 - 37) Brodde OE, Michel MC and Zerkowski HR : Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 30 : 570-584, 1995
 - 38) Tamada A, Hattori Y, Houzen H, et al : Effects of β -adrenoceptor stimulation on contractility, $[Ca^{2+}]_i$, and Ca^{2+} current in diabetic rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 274:H1849-H1857, 1998
 - 39) Hattori Y, Matsuda N, Kimmura J, et al : Diminished function and expression of the cardiac Na^+Ca^{2+} exchanger in diabetic rats: implication in Ca^{2+} overload. *J Physiol* 527.1 : 85-94, 2000
 - 40) Alousi AA, Jasper JR, Insel PA, et al : Stoichiometry of receptor-Gs-adenylate cyclase interactions. *FSAEB J* 5 : 2300-2303, 1992
 - 41) Post SR, Hilal-Dandan R, Urasawa K, et al : Quantification of signalling components and amplification in the beta-adrenergic-receptor-adenylate cyclase pathway in isolated adult rat ventricular myocytes. *Biochem J* 311 : 75-80, 1995
 - 42) Drazner MH, Peppel KC, Dyer S, et al : Potentiation of beta-adrenergic signaling by adenoviral-mediated gene transfer in adult rabbit ventricular myocytes. *J Clin Invest* 99 : 288-299, 1997
 - 43) Gando S, Hattori Y, Akaishi Y, et al : Impaired contractile response to *beta* adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in *beta* adrenoceptors-G protein-adenylate cyclase system and phospholamban phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 282 : 475-484, 1997
 - 44) Matsuda N, Hattori Y, Akaishi Y, et al : Impairment of cardiac β -adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of G_{sa} in Septic Rabbits. *Anesthesiology* 93 : 1465-1473, 2000
 - 45) Akaishi Y, Hattori Y, Kanno M, et al : Agonist-independent tonic inhibitory influence of G_i on adenylyl cyclase activity in rabbit ventricular myocardium and its removal by pertussis toxin: a role of empty receptor-mediated G_i activation. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 765-775, 1997
 - 46) Hagemann D, Xiao RP : Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 12 : 51-56, 2002
 - 47) Novotny J, Bourova L, Kolar F, et al : Membrane-bound and cytosolic forms of heterotrimeric G proteins in young

- and adult rat myocardium: influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. *J Cell Biochem* 82 : 215-224, 2001
- 48) Miyamoto A, Kawana S, Kimura H, et al : Impaired expression of G_s alpha protein mRNA in rat ventricle myocardium with aging. *Eur J Pharmacol* 266 : 144-154, 1994
- 49) Fusco FD, Hashim H, Anand-Srivastava MB, et al : Volume overload cardiac hypertrophy exhibits decreased expression of $G_{s\alpha}$ and not $G_{i\alpha}$ in heart. *Am J Physiol* 279 : C990-998, 2000
- 50) Hammond HK, Roth DA, Insel PA, et al : Myocardial β -adrenergic receptor expression and signal transduction after chronic volume-overload hypertrophy and circulating congestion. *Circulation* 85 : 269-280, 1992
- 51) Pei JM, Yu XC, Fung ML, et al : Impaired $G_{s\alpha}$ and adenylyl cyclase cause β -adrenoceptor desensitization in chronically hypoxic rat heart. *Am J Physiol* 279 : C 1455-1463, 2000
- 52) Levine MA, Feldman AM, Robishaw JD, et al : Influence of thyroid hormone status on expression of gene encoding G protein subunits in the rat heart. *J Biol Chem* 265 : 3553-3560, 1990
- 53) Iwase M, Uechi M, Vatner D, et al : Cardiomyopathy induced by cardiac $G_{s\alpha}$ overexpression. *Am J Physiol* 272 : H585-589, 1997
- 54) Zhou Y, Friedman E, Roberts J, et al : Modulation of aorta and cardiac G protein alpha subunits and their mRNAs during norepinephrine infusion in rats. *J Vasc Res* 32 : 16-32, 1995
- 55) Feldmann AM, Cates AE, Veazey WB, et al : Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 82 : 189-197, 1988
- 56) Neumann J, Schmitz W, Scholz H, et al : Increase in myocardial G_i -proteins in heart failure. *Lancet* 2 : 936-937, 1988
- 57) Hattori Y, Matsuda N, Satou A, et al : Predominant contribution of the G protein-mediated mechanism to NaF-induced vascular contractions in diabetic rats: association with an increased level of $G_{q\alpha}$ expression. *J Pharmacol Exp Ther* 292 : 761-768, 2000
- 58) Moxham CM, Malbon CC : Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit G_i alpha 2. *Nature* 379 : 840-844, 1996
- 59) Tepe NM, Liggett SB : Transgenic replacement of type V adenylyl cyclase identifies a critical mechanism of beta-adrenergic receptor dysfunction in the G alpha q over-expressing mouse. *FEBS Lett* 458 : 236-240, 1999
- 60) Ju H, Zhao S, Tappia PS, et al : Expression of $G_{q\alpha}$ and PLC- β in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. *Circulation* 97 : 892-899, 1998