

学位論文題名

Enhanced GRK5 Expression in the Hearts
of Cardiomyopathic Hamsters, J2N-k

(J2N-k, 心筋症ハムスターの心臓における GRK5 の発現亢進)

学位論文内容の要旨

G蛋白質共役型受容体は持続的刺激により脱感作といわれる応答の減弱が引き起こされるが、この過程にはG蛋白質共役型受容体キナーゼ(GRK)による受容体のリン酸化が関与するといわれている。GRKは1から6まで6種類がクローニングされており、心筋ではGRK2(β ARK1)、GRK5、GRK6が発現しており、そのうちGRK2、GRK5が β アドレナリン受容体をリン酸化すると考えられている。近年心不全患者や心不全モデル動物でGRK2の発現および活性が亢進していることが報告されており、またGRK2を過剰発現させたトランスジェニックマウスではカテコラミンに対する反応が低下することが報告されている。これらのことからGRK2が心臓の β アドレナリン受容体を介する情報伝達に大きく関係していると考えられるが、不全心筋におけるGRK5の変化については、現在までほとんど検討されていない。本研究は、(1)GRK5のcDNAをハムスター心筋よりクローニングし、全塩基配列を決定すること、(2)心筋症モデル動物であるJ2N-kハムスターを用いて、心不全時のGRK5 mRNAを半定量し、心機能の変化との関連性について検討することを目的とした。健常シリアハムスター心室筋よりtotal RNAを抽出した後、逆転写酵素でcDNAを作成し、ヒトGRK5 cDNA配列に対し合成した4組のPCR primerを用いてハムスターGRK5 cDNA全長を4つのDNA断片として増幅した。得られた各DNA断片の塩基配列はDideoxy法にて決定した。ハムスター心筋GRK5 cDNAの翻訳領域は1770塩基よりなり、590のアミノ酸をコードしていた。塩基での相同性はウシのGRK5と88.0%、ヒトのGRK5とは89.6%であり、アミノ酸でのヒトGRK5との相同性は96.1%であった。GRK5 mRNAの発現量は4週齢と20週齢のJ2N-kハムスター、および同週齢の健常対象ハムスターJ2N-nで、半定量的RT-PCR法を用いて測定した。J2N-kは新しい心筋症ハムスター種であり、永野らによりゴールデンハムスターとBIO14.6心筋症ハムスターを交配して作成された。J2N-nコントロールハムスターは、交配の過程で心筋症ハムスターより分離されたもので、体重、毛色などの外見はJ2N-kと同じだが心不全を発症しない。20週齢では平均体重と心重量はJ2N-kとJ2N-nでは同じであるが、組織病理的には心筋の線

維性変化をきたしていた。またM-モードエコーでは、20週齡のJ2N-kは左室収縮性はJ2N-nに比べ著しく低下しており、左室内径もJ2N-kで拡大していた。これらのデータより、J2N-kは心不全過程での膜のシグナル伝達機構の変化を調べるのに適したモデルといえる。20週齡J2N-kのGRK5mRNA発現量は 60.3 ± 13.3 (AU)でコントロールの 25.8 ± 17.2 (AU)に比べ著しく増加していた。一方、心不全発症前の4週齡では、GRK5mRNAはJ2N-kとJ2N-nとの間に有意差は認められなかった。上記の結果から、GRK2に加えてGRK5の発現亢進は、心不全時の各種細胞膜受容体の脱感作現象に関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 輪 聡 一

副 査 教 授 川 口 秀 明

副 査 教 授 北 島 顕

学 位 論 文 題 名

Enhanced GRK5 Expression in the Hearts of Cardiomyopathic Hamsters, J2N-k

(J2N-k, 心筋症ハムスターの心臓における GRK5 の発現亢進)

G 蛋白質共役型受容体は持続的刺激により down-regulation といわれる応答の減弱が引き起こされるが、この過程には G 蛋白質の受容体キナーゼ (GRK) によるリン酸化が関与するといわれている。GRK は 1 から 6 まで 6 種類がクローニングされており、そのうち GRK2、GRK5 が β アドレナリン受容体をリン酸化すると考えられている。近年心不全患者で GRK2 の発現及び活性が亢進していることが報告されており、また GRK2 を過剰発現させた transgenic mice では catecholamine に対する反応が低下することが報告されている。これらのことから、GRK2 が心臓の β アドレナリン受容体を介する情報伝達に大きく関係していると考えられるが、不全心筋における GRK5 の変化については、現在までほとんど研究されていない。本研究は (1) GRK5 の cDNA をハムスター心筋よりクローニングし、全塩基配列を決定すること、(2) 心筋症モデル動物である J2N-k ハムスターを用いて、心不全時の GRK mRNA を半定量し、心機能の変化との関連性について検討すること、(3) ラットに catecholamine を持続投与して心不全と同じ体内環境を作りだし、GRK2、GRK5 mRNA の発現の変化を検討することを目的とした。健常シリアハムスター心室筋より total RNA を抽出した後、逆転写酵素で cDNA を作成し、Dideoxy 法にて GRK5 の sequence を決定した。ハムスター心筋 GRK5 cDNA の翻訳領域は 1770 塩基よりなり、590 のアミノ酸をコードしていた。ヒト GRK5 との homology は塩基レベルで 89.6%、アミノ酸レベルで 96.1% であった。GRK5 mRNA の発現量は 4 週齢と 20 週齢の J2N-k ハムスター、及び同週齢の健常対象ハムスター J2N-n で半定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。J2N-k は新しい心筋症ハムスター種であり、永野らによりゴールデンハムスターと BIO14.6 心筋症ハムスターとを交配して作成された。J2N-n コントロールハムスターは、交配の過程で心筋症ハムスターより分離されたもので、

体重、毛色などの外見は J2N-k と同じだが心不全を発症しない。20週齢では平均体重と心重量は J2N-k と J2N-n では同じであるが、組織病的には心筋の繊維性変化をきたしていた。また M-mode echo では、20週齢の J2N-k では左室収縮性は J2N-n に比べ著しく低下しており、左室内径も J2N-k で拡大していた。これらのデータより、20週齢 J2N-k の心不全モデルとしての妥当性が示された。20週齢 J2N-k ハムスターの GRK5mRNA の発現量は 60.3 ± 13.3 (AU)で、コントロールの 25.8 ± 17.2 (AU)に比べ著しく増加していた。一方、心不全前の4週齢では、GRK5mRNA は J2N-k と J2N-n の間に有意差は認められなかった。上記の結果から心不全では GRK2 ばかりでなく GRK5mRNA も増加していることが明らかとなった。ラットの背に浸透圧ポンプを植え込み、Norepinephrine を $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で、Isoproterenol を $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の dose で2週間持続的に投与することで、心不全と同じ catecholamine 過剰の状態を作りだし、その際の GRK2、GRK5mRNA の変化を調べた。GRK2、GRK5 いずれも Norepinephrine、Isoproterenol の投与により増加しており、Isoproterenol でより顕著であった (GRK2mRNA ; control 1.98 ± 0.19 AU、Norepinephrine 2.32 ± 0.46 AU、Isoproterenol 2.94 ± 0.34 AU、GRK5mRNA ; control 1.05 ± 0.11 AU、Norepinephrine 1.31 ± 0.17 AU、Isoproterenol 1.92 ± 0.20 AU)。主に β 受容体を介する Isoproterenol で mRNA の増加が著しいことから、GRK2、GRK5 の増加は α 受容体よりも β 受容体を介する系で優位に働いていると考えられた。以上の結果から心不全では代償的に交感神経系が亢進し、 β 、 α 受容体に catecholamine が結合することで second messenger が増加し、PKA、PKC の活性化がおこり、これにより GRK2、GRK5 の遺伝子の promoter 領域に結合する転写因子が活性化されて、GRK2、GRK5 の up-regulation が生じ、その結果ますます β 受容体のリン酸化が進み、down-regulation が生ずるという、強い negative feedback 機構が形成されているものと考えられた。

学位論文の公開発表に際して、主査の三輪教授から、mRNA の測定に際し RT-PCR 法を用いた理由、mRNA の変化に伴う GRK 活性、蛋白量の変化についての質問が、副査の川口教授から、GRK2 と GRK5 の働きの違いについて、GRK2、GRK5 の β 受容体、PKA、PKC への binding が確認されているか、心不全治療による GRK2、GRK5 及び β 受容体の変化についての質問が、また、副査の北島教授から、心不全で β -blocker が効くメカニズム、実験の clinical implication を含めた今後の展望について質問があったが、申請者は実験結果に基づき、また文献的知識を用いて、概ね適切に回答し得た。

この論文は β 受容体の機能修飾に関して、GRK2、GRK5 に着目した分子生物学的研究であり、心不全における down-regulation のメカニズムの解明に一助を与えるという点で高く評価され、今後、心不全の重症度診断や新しい治療法の開発につながることを期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)を受けるに十分な資格を有するものと判定した。