

## 三環系抗うつ薬 desipramine のラット大脳皮質 $\beta$ -adrenaline 受容体 adenylate cyclase 共役機構への影響

土屋文明 齋藤利和

札幌医科大学神経精神医学講座 (主任 高畑直彦 教授)

### Effect of Chronic Desipramine Administration on $\beta$ -adrenoceptor Adenylate Cyclase Coupling in Rat Cerebral Cortex

Fumiaki TSUCHIYA and Toshikazu SAITO

Department of Neuropsychiatry, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. N. Takahata)

**ABSTRACT** The effects of desipramine (DMI) treatment on a rat cortical beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase (AC) system were investigated. Continuous treatment (1-3 days) of rats with desipramine (10 mg/kg, twice per day) caused a decrease in guanyl-5'-yl-imidodiphosphate [Gpp(NH)p]-stimulated AC activity in the cerebral cortical membrane. The decrease in the [Gpp(NH)p]-stimulated AC activity was more rapid and greater than the decrease in the number of beta-receptors in the cerebral cortical membrane of desipramine treated rats, indicating that the decrease in the enzyme activity, occurring at an early stage of the treatment, was not accounted for solely by the decrease in the receptor number. Although AC activity in the presence of a saturated level of Gpp(NH)p ( $V_{max}$ ) was not altered, the concentration of Gpp(NH)p required for the half-maximal activation of AC ( $EC_{50}$  for activation) was shifted from 0.73  $\mu$ M to 1.62  $\mu$ M in the membrane of 3 day-DMI treated rats. However, the concentration of Gpp(NH)p required for the half maximal inhibition of forskolin-stimulated AC ( $EC_{50}$  for inhibition) was not altered by 3 day-DMI treatment. The time course of activation of cortical AC activity by Gpp(NH)p was altered and the  $T_{1/2}$  for activation increased from 1.3 minutes to 2.0 minutes by the 3 day-DMI treatment. Three day-DMI treatment caused a decrease in the  $EC_{50}$  value for isoproterenol activation of AC from 30.7 nM to 22.9 nM in the rat cortical membrane. These results suggest that DMI decreases the affinity of Gs-protein to guanine nucleotides and consequently inhibits the high-affinity state breakdown process of beta-adrenergic receptor in the receptor-AC coupling system of the rat cerebral cortex. However, DMI has no or little effect on Gi protein. (Received November 2, 1988 and accepted December 1, 1988)

**Key words:** Desipramine,  $\beta$ -adrenoceptor, Adenylate-cyclase, G-proteins

#### Abbreviations:

AC	: adenylate cyclase	Gi 蛋白質	: 抑制性 G 蛋白質
ATP	: adenosine-5'-triphosphate	Gs 蛋白質	: 促進性 G 蛋白質
cAMP	: cyclic adenosin-3',5'-monophosphate	Gpp(NH)p	: guanyl-5'-yl-imidodiphosphate
DMI	: desipramine	GTP	: guanosine triphosphate
EGTA	: ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N, N'-tetraacetic acid	ISP	: isoproterenol
G 蛋白質	: guanine nucleotide 結合制御蛋白質	NE	: norepinephrine
		Tris	: Tris (hydroxy methyl) aminomethane

## 1 緒 言

抗うつ薬の慢性投与後に、ラット大脳皮質における $\beta$ -adrenaline 受容体 ( $\beta$  受容体) の数の減少と、それに伴う norepinephrine (NE) 感受性 adenylate cyclase (AC) 活性の低下が生じる事はこれまでいくつかの報告がなされている<sup>1,2,3,4,5)</sup>。

このような $\beta$  受容体数の減少は定型三環系抗うつ薬の長期投与後や電気けいれん療法<sup>1,4)</sup>の反復処置でもみられ、抗不安薬や抗精神病薬では見られないこと<sup>6)</sup>から、抗うつ効果の生化学的指標と考えられてきた。

抗うつ薬によって変化が生じる受容体—AC の共役機構は 1970 年代後半になって少しずつその実態が解明されてきた。これまでの報告によれば<sup>7,8)</sup> 受容体—AC 共役機構は三つの蛋白質により構成されている。即ち、神経伝達物質の結合部位である受容体、受容体刺激を触媒部位に伝達する guanine nucleotide 結合制御蛋白質 (G 蛋白質)、そして Mg-ATP を基質として、cyclic AMP を生成する触媒部位である。尚、G 蛋白質は促進性の Gs 蛋白質と抑制性の Gi 蛋白質があり、各々触媒部位の活性を促進あるいは抑制している<sup>9,10,11)</sup>。

これまでの多くの報告では、抗うつ薬による $\beta$  受容体や AC 活性の低下は、抗うつ薬によりシナプス間隙に、NE 濃度の高まりを生ずることによって agonist induced-subsensitivity が生じる事に起因するとする説が有力だった<sup>3)</sup>。従って、受容体を介さずに共役系の他の蛋白質である G 蛋白質や触媒部位に抗うつ薬が作用する可能性についてはほとんど考慮がなされていなかった。しかしながら、こうした従来の見解によっては、非定型抗うつ薬 mianserin の投与でみられるような $\beta$  受容体数の減少を伴わない AC 活性の低下<sup>6)</sup>の機序を説明できない。換言すれば、これまでの研究においては、向精神薬の作用機序について、受容体を介して作用することにあまりに多くの関心が向けられていたと言える。しかしある種の薬物、たとえば ethanol においては受容体を介さずに直接 Gs 蛋白質や触媒部位に作用する事が知られている<sup>12,13)</sup>。抗うつ薬の多くは脂溶性であり、従って ethanol と同様の作用機序を持つ可能性も考慮しなければならぬと思われる。こうした立場から、今回我々は三環系抗うつ薬の desipramine (DMI) を用いて、DMI のラット大脳皮質 $\beta$  受容体—AC 系に及ぼす影響、特にその作用点と作用様式とに関して、検討したので報告する。

## 2 材料及び方法

### 2.1 試 薬

Tris (hydroxy methyl) aminomethane (Tris), disodium adenosine-5'-triphosphate (ATP), sodium-cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate (cAMP), guanyl-5'-yl-imidodiphosphate [Gpp(NH)p], phosphocreatine di-Tris salt, creatine phosphokinase, ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N, N'-tetraacetic acid (EGTA), Dowex 50WX4 (200-400 mesh: hydrogen form), (-)-isoproterenol hydrochloride (ISP), digitonin, neutral alumina は Sigma Chemical Company 製のものを用いた。[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (10-30 Ci/mmol) は New England Nuclear 製のものを用い、使用前に Dowex 50WX4 にて精製した。[8-<sup>3</sup>H]cyclicAMP (10-20 Ci/mmol) は、Research Products International 製のものを使用し、Dowex 50WX4 にて精製した。シンチレーションカクテルは Aquasol-2 (NEN Research Products) を用いた。

### 2.2 DMI 処置

Wistar 系雄性ラット (体重 180—220 g) に DMI 体重 kg あたり 10 mg を 1 日 2 回 (午前 9 時と午後 5 時) 連続 1—3 日間腹腔内投与した (連続投与群)。最終投与より 16 時間後に断頭し、大脳皮質を取り出した。急性投与群は、同容量の DMI を腹腔内に、断頭 4 時間前と 2 時間前に 2 回投与した。対照群には生理食塩水を各々同様な方法で投与した。

### 2.3 大脳皮質粗膜分画調製法

粗膜分画の調製は以前報告した方法<sup>12,13)</sup>により行った。即ち断頭後直ちに大脳をとり出し、氷上で大脳皮質を切り出した。大脳皮質は 2mM EGTA を含む 2mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジネート後、4°C で 600 xg にて 10 分間遠沈した。分離した上清を 48,000 xg で 20 分間遠沈し、粗膜分画を得た。同様の操作を 2 回繰り返して洗浄した後、粗膜分画を約 30 倍容の上記低張 Tris 緩衝液に懸濁させ、蛋白質量が 2.3mg/ml から 2.5 mg/ml となるように調製し、実験に用いた。

### 2.4 AC 測定法

AC の測定は以前に報告した方法<sup>12,13)</sup>に従った。即ち、10 mM theophylline, 0.4 mM EGTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM creatine phosphate, 0.1 mg/ml creatine phosphokinase, 0.5 mM ATP (約 4×10<sup>6</sup> cpm の [<sup>32</sup>p]-ATP を含む) を含んだ 25 mM Tris-HCl

緩衝液 (pH 7.4) 中に大脳皮質粗膜分画 (約 120  $\mu$ g protein) を添加して, (総量 0.5 ml) 反応を開始させた。30°C で 5 分間インキュベーション後, 反応を煮沸によって停止させ, ついで氷水中で冷却し, 8 mM の ATP と, 0.28 mM の cAMP, (約 20,000 cpm の [ $^3$ H]-cAMP を含む) を含む溶液を 0.5 ml ずつ各試験管に加えた。生成された [ $^{32}$ P]-cAMP を Salomon の方法<sup>14)</sup>に従って, Dowex と Alumina のカラムで分離した後, 10 ml のシンチレーションカクテルを加え, 液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

### 2.5 Gpp(NH)p の前処置法

前述した方法により得た大脳皮質粗膜分画を ATP を含まない AC 測定用 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で 1  $\mu$ M ISP, 10  $\mu$ M Gpp(NH)p を添加して, 10 分間インキュベートした。インキュベーション後直ちに氷水中で冷却し, 48,000 xg で 20 分間遠沈し, 沈査を 20 倍の EGTA 2 mM を含む 2 mM Tris-HCl 緩衝液にて再懸濁し, 測定に供した。

### 2.6 Digitonin による大脳皮質粗膜分画可溶化処理法

可溶化処理はすでに報告した方法<sup>13)</sup>により行った。即ち, 前述した方法で得た大脳皮質粗膜分画を 1% digitonin と 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で再懸濁した後, 氷水中で 30 分間放置した。放置後 105,000 xg で 60 分間 4°C で遠沈し, 上清を可溶化分画として測定に用いた。

### 2.7 $\beta$ 受容体数の測定

受容体の測定は [ $^{125}$ I]-iodopindolol をリガンドとして O'Donnell らの方法<sup>15)</sup> に準じて行った。即ち, 120 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA, 1 mM ascorbate を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液中に組織 (100  $\mu$ l, 70  $\mu$ g protein) を加え (総量 0.5 ml) 30°C で 50 分間インキュベートした後, 組織に結合したリガンドと遊離のリガンドの分離 (B-F 分離) をセルハーベスターの分離装置により行った。フィルターをポリエチレン製試験管に入れ, ガンマーカウンターで放射活性を測定した。なお, 非特異的結合はあらかじめ 250 nM の propranolol を添加して求めた。受容体数及び解離定数は Scatchard plot<sup>16)</sup> を用いて算出した。

### 2.8 蛋白質定量と統計処理

蛋白質の定量は Lowry らの方法<sup>17)</sup> により牛血清アルブミンを標準試料として行った。測定値は平均  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SEM) で表示し, 有意差検定は Student's t-test によって行った。

## 3 結果

### 3.1 DMI による $\beta$ 受容体数の変化

$\beta$  受容体の antagonist である [ $^{125}$ I]-iodopindolol を用いた受容体数 (Bmax) の測定結果は, 対照群 (DMI 投与前) で, 81.2  $\pm$  2.35 fmol/mg protein (n=4) であった。DMI の急性投与, 及び 1 日投与では, 有意の低下は認められなかったが, DMI 投与 2 日目では 69.4  $\pm$  1.25 fmol/mg protein (n=4) と対照群に比べ 14.5% 減少し, 初めて有意の低下を示した (p < 0.05)。投与 3 日目では 58.0  $\pm$  1.05 fmol/mg protein (n=4) と 28.5% の減少を示した (Fig. 1)。

なお, 解離定数 (Kd) は, 対照群で 178.56  $\pm$  4.20 pM, DMI 3 日投与群で 176.88  $\pm$  3.25 pM であり, 有意の変化を認めなかった。

### 3.2 DMI による AC 活性の変化

対照群における AC 活性は非水解性 GTP アナログである Gpp (NH) p 非存在下で 58.2  $\pm$  2.51 pmol/min/mg protein (n=12) であった。1  $\mu$ M Gpp(NH)p 存在下では AC 活性は 275.5  $\pm$  8.35 pmol/min/mg protein (n=12) と上昇した。このことは Gpp(NH)p によって活性化された Gs 蛋白が触媒部位を活性化して AC 活性の上昇をもたらしたと考えることができる。Gpp(NH)p 存在下で ISP 1  $\mu$ M を添加すると AC 活性は 410.7  $\pm$  12.56 pmol/min/mg protein (n=12) とさらに上昇を示した。こうした対照群の値を 100% として

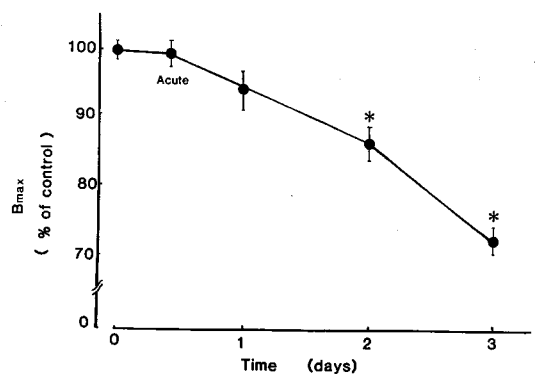
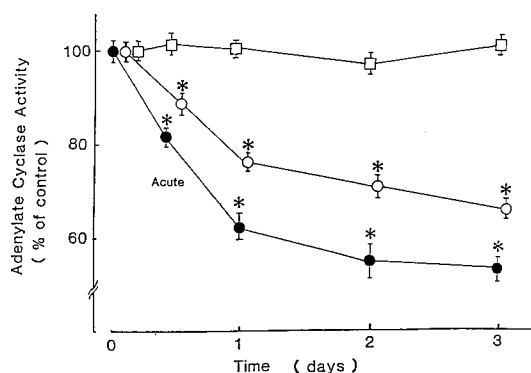


Fig. 1 The beta-adrenergic receptor number after desipramine (DMI) administration. Beta-receptor was assayed as described in the text, in cerebral cortical membranes of control Wistar rats or rats treated with desipramine. The values obtained in the desipramine treated rats are expressed in percentage of the control value. Data represent the means  $\pm$  SEM of four animals.

\* Significantly different from control, p < 0.05.



**Fig. 2** Changes in the activation of adenylate cyclase due to  $EC_{50}$  level of Gpp(NH)p ( $1 \mu\text{M}$ ) after desipramine (DMI) administration. Adenylate cyclase activity was assayed as described in the text, in cerebral cortical membranes of control Wistar rats or rats treated with desipramine. The values obtained in the desipramine treated rats are expressed in percentage of the control value. Data represent the means  $\pm$  SEM of four animals.

\* Significantly different from control,  $p < 0.05$ .  
 (□), No additions (in the absence of Gpp(NH)p); (●),  $1 \mu\text{M}$  Gpp(NH)p; (○),  $1 \mu\text{M}$  isoproterenol plus  $1 \mu\text{M}$  Gpp(NH)p.

DMI 投与後におけるそれぞれの条件下での AC 活性の推移を示したものが、Fig. 2 である。

Gpp(NH)p 非存在下では、DMI 投与後の AC 活性に有意の変化は観察されなかった。一方、Gpp(NH)p 存在下では、DMI 急性投与ですでに  $225.9 \pm 11.35$  pmol/min/mg protein ( $n=12$ ) と約 18% の有意の低下を示した ( $p < 0.05$ )。DMI 投与により減少はさらに続き、1 日投与で  $174.9 \pm 6.85$  pmol/min/mg protein ( $n=11$ ) 2 日投与で  $162.5 \pm 7.27$  pmol/min/mg protein ( $n=11$ )、3 日投与で  $158.2 \pm 8.34$  pmol/min/mg protein ( $n=9$ ) と約 43% の減少を示していた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2)。

$\beta$  受容体数は、DMI 投与 2 日目ではじめて有意に減少を示したのに比べ、Gpp(NH)p により賦活化された AC 活性は急性投与ですでに有意の低下を示し、かつ投与後の各時間における低下の程度も著しかった。

Gpp(NH)p と ISP を同時に添加した群でも、急性投与ですでに  $368.3 \pm 10.25$  pmol/min/mg protein ( $n=12$ ) と対照群に比べ約 10% 有意の減少を示した ( $p < 0.05$ )。1 日投与で  $327.1 \pm 4.45$  pmol/min/mg protein ( $n=11$ )、2 日投与で  $305.7 \pm 6.66$  pmol/min/mg protein ( $n=11$ )、3 日投与で  $278.6 \pm 7.50$  pmol/min/mg protein ( $n=9$ ) とさらに減少を示

した ( $p < 0.05$ )。しかしながら、Gpp(NH)p のみ添加した時に比べ、DMI 投与後の AC 活性の減少の割合は少なかった (Fig. 2)。

### 3.3 蛋白質の guanine nucleotide 及び Mg 結合親和性に対する DMI の影響

Gpp(NH)p 非存在下では DMI 投与によって AC 活性に変化がなく Gpp(NH)p 存在下で DMI 投与により AC 活性が有意に低下したことから DMI が Gs 蛋白質の活性化の過程に作用点をもっていることが示唆された。G 蛋白質はその表面に存在する結合部位に GTP あるいは Mg が結合することによって活性化されると考えられている<sup>18)</sup>。従って、DMI の G 蛋白質の機能に及ぼす影響に関してさらに検討するために Gpp(NH)p 及び Mg に対する Gs 蛋白質の結合親和性を検索した。

Gpp(NH)p による AC 活性の用量反応曲線より、 $V_{max}$ 、 $EC_{50}$  値を Hanes Woolf plot<sup>19)</sup> により算出した。Gs 蛋白質の Gpp(NH)p に対する結合親和性を反映すると考えられる  $EC_{50}$  ( $EC_{50}$  for activation) 値は、対照群で  $0.83 \mu\text{M}$  であり、DMI 3 日投与群では  $1.77 \mu\text{M}$  と有意に増加を示していた ( $p < 0.05$ )。即ち、DMI 3 日間投与により Gs 蛋白質の GTP (本実験の場合は Gpp(NH)p) に対する親和性が低下していると考えられた。 $V_{max}$  に関しては、対照群と DMI 3 日投与群との間に有意の差はなかった (Table 1)。

Mg に対する  $EC_{50}$  値と  $V_{max}$  も同様に測定したが、 $EC_{50}$  値は DMI 3 日投与で対照群と有意の差は認められなかった (Table 2)。

**Table 1** Effect of DMI on  $EC_{50}$  and  $V_{max}$  for Gpp(NH)p

	$EC_{50}$ <sup>a</sup>	$V_{max}$ <sup>b</sup>
Control	$0.83 \pm 0.128$ (5)	$193.4 \pm 5.94$ (5)
DMI treated (3 days)	$1.77 \pm 0.297$ <sup>c</sup> (5)	$203.4 \pm 11.71$ (5)

The assay constituents were membrane protein (about  $120 \mu\text{g}$ ), Tris-HCl (25 mM, pH7.4), 10 mM theophylline, 0.4 mM EGTA, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 0.5 mM ATP. Gpp(NH)p was added concentration ranging from  $0.1 \mu\text{M}$  to  $50 \mu\text{M}$ .

<sup>a</sup> $EC_{50}$  was expressed as mean  $\pm$  SEM of  $\mu\text{M}$ .

<sup>b</sup> $V_{max}$  was expressed as mean  $\pm$  SEM of pmol cAMP formed/minute/mg protein over the basal activity. Numbers in parentheses refer to the number of separate determinations.

<sup>c</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) when compared with control.

**Table 2** Effect of DMI on  $EC_{50}$  and  $V_{max}$  for Magnesium

	$EC_{50}^a$	$V_{max}^b$
Control	2.14 ± 0.159 (4)	421.96 ± 16.33 (4)
DMI treated (3 days)	2.18 ± 0.265 (3)	269.31 ± 37.56 <sup>c</sup> (3)

The assay constituents were membrane protein (about 120  $\mu$ g), Tris-HCl (25 mM, pH7.4), 10 mM theophylline, 0.4 mM EGTA, 1  $\mu$ M Gpp(NH)p and 0.5 mM ATP.  $MgCl_2$  was added in concentrations ranging from 0.5 mM to 50 mM.

<sup>a</sup> $EC_{50}$  was expressed as mean ± SEM of mM.

<sup>b</sup> $V_{max}$  was expressed as mean ± SEM of pmol cAMP formed/minute/mg protein. Numbers in parentheses refer to the number of separate determinations.

<sup>c</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) when compared with control.

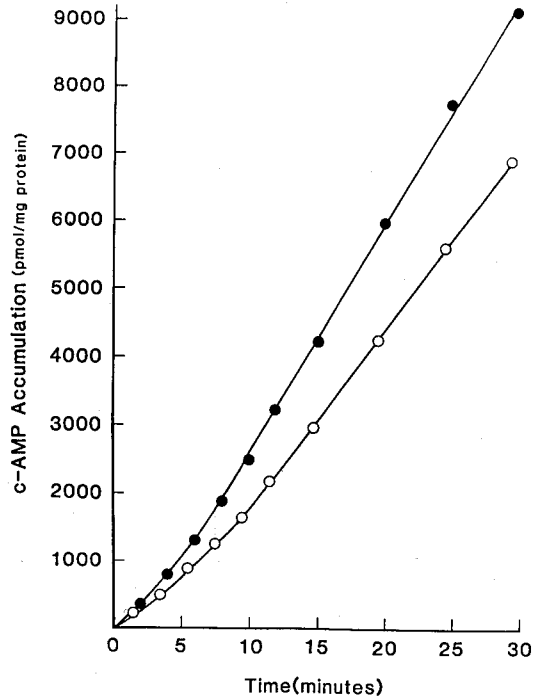
### 3.4 Guanine nucleotide による AC 活性の潜時への DMI の影響

G 蛋白質の GTP (本実験の場合は Gpp(NH)p) に対する親和性が変化しているとすれば, その結果として Gs 蛋白質の活性化の速度が低下していることが推察されたので, Gpp(NH)p による AC 活性の潜時への影響を検討した。

Gpp(NH)p を *in vitro* で添加すると著明な AC 活性の上昇が認められることは前述したが, この AC の活性化は Gpp(NH)p 添加後ただちに生ずるのではなく, 添加後一定時間 (潜時) を経て AC の活性は最大活性に達する。このことは Gpp(NH)p による AC の活性化に律速段階が存在することを意味し, これまでの研究からその律速段階は G 蛋白質上における GDP と GTP (本実験の場合は Gpp(NH)p) との交換反応であると考えられている<sup>20,21</sup>。この Gpp(NH)p による AC 活性化は, 次式にあてはまることがすでに Frieden<sup>22</sup>) により明らかにされている。

$$V_t = V_s - (V_s - V_i) e^{-kt}$$

この場合  $V_i$  は Gpp(NH)p 非存在下の AC 活性,  $V_s$  は AC 活性の最大値,  $V_t$  は任意時間の AC 活性を示す。また,  $k$  は  $V_t$  から  $V_s$  まで AC 活性が変化する際の見かけ上の定数である。この式に従って AC の時間反応曲線から各々の kinetic parameter を計算すると  $k$  は対照群で  $10.96 \text{ sec}^{-1}$  であったが, DMI により  $6.54 \text{ sec}^{-1}$  と有意の減少を示した。また, 最大活性に達するまでの半分の時間, 即ち  $T_{1/2}$  は DMI により 1.27 分から 1.96 分へと有意に延長した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3, Table 3)。



**Fig. 3** Time course for Gpp(NH)p activation of cyclic AMP accumulation after desipramine administration. Adenylate cyclase activity was assayed as described in the text, in cerebral cortical membranes of control (●) or 3 days desipramine treated rats (○). Results are from a typical experiments, performed in duplicate.

### 3.5 $\beta$ -Agonist, ISP の受容体結合に及ぼす DMI の影響

Antagonist の受容体結合に対して DMI 投与が影響を与えないことは, 3.1 で前述した。しかしながら, 3.2 から 3.4 まで明らかにしたように, Gs 蛋白質の活性化の過程に DMI は影響を及ぼしている。Gs 蛋白質は, 受容体と結合することによって高親和性受容体となるが, G 蛋白質の活性化の過程が DMI 投与により変化することによって agonist に対する受容体の親和性が変化している可能性が考えられる。Fig. 2 に示したように ISP を添加すると DMI による AC 活性の低下の割合が低くなっていることから同様のことが推定された。この点を更に詳細に検討する目的で ISP に対する AC 活性の用量反応曲線を Hanes Woolf plot で解析して  $V_{max}$ ,  $EC_{50}$  値を求めた。ISP の受容体への親和性を反映すると思われる  $EC_{50}$  は対照群で 30.7 nM であった。DMI 3 日間投与群で, 22.9 nM と対照群に比べ有意に

**Table 3** Kinetic Constants for the Time-lag in Activation of Cortical Adenylate Cyclase Activity

	k(s <sup>-1</sup> )	Maximal V <sup>a</sup>	T <sub>1/2</sub> <sup>b</sup>
None	10.96±0.89	347.9±10.26	1.27±0.096
DMI Treated (3 days)	6.54±0.79 <sup>c</sup>	283.1±37.67	1.96±0.25 <sup>c</sup>

The assay constituents were membrane protein (about 120 μg), Tris-HCl (25 mM, pH7.4), 5 mM theophylline, 0.4 mM EGTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Gpp(NH)p and 0.5 mM ATP.

<sup>a</sup>Maximal V is expressed as pmol cyclic AMP formed/minute/mg protein.

<sup>b</sup>T<sub>1/2</sub> is expressed as minutes.

<sup>c</sup>Significantly different (p<0.05) when compared with control.

**Table 4** Effect of DMI Treatment on EC<sub>50</sub> and V<sub>max</sub> for Isoproterenol

	EC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	V <sub>max</sub> <sup>b</sup>
Control	30.7±3.47 (6)	111.3±15.08 (6)
DMI treated (3 days)	22.9±2.17 (6) <sup>c</sup>	72.91±14.46 (5) <sup>c</sup>

The assay constituents were membrane protein (about 70 μg), Tris-HCl (25 mM, pH7.4), 10 mM theophylline, 0.4 mM EGTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, and 0.1 mg/ml creatine phosphokinase. All assays also contained 1 μM Gpp(NH)p. Isoproterenol was added in concentrations ranging from 0.01 μM to 10 μM.

<sup>a</sup>EC<sub>50</sub> was expressed as mean±SEM of nM.

<sup>b</sup>V<sub>max</sub> was expressed as mean±SEM of pmol cAMP formed/minutes/mg protein over the basal activity. Numbers in parentheses refer to the number of separate determinations.

<sup>c</sup>Significantly different (p<0.05) when compared with control.

低下していた(p<0.05). 即ち, agonist である ISP の受容体への親和性は DMI 投与群で, 上昇することが示唆された (Table 4).

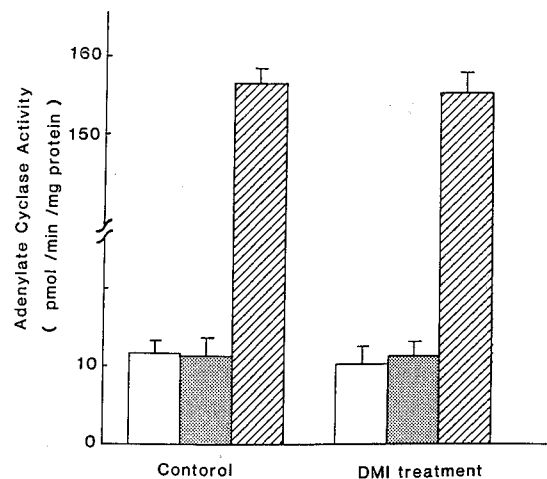
### 3.6 DMI による触媒部位への影響

Fig. 2 に示したように Gpp(NH)p 非存在下における AC 活性は, 対照群と DMI 投与群において, 有意の差はなかった. このことは DMI が触媒部位に作用点を持たないことを示唆するが, この点をさらに詳細に検討するために, 大脳皮質粗膜分画を digitonin を用いて可溶化処理し, 触媒部位への DMI 投与による影響を検討した (Fig. 4). 可溶化した膜における AC 活性は, Gpp(NH)p を in vitro で添加しても AC 活性に変化がなく, このことは G 蛋白質と触媒部位が脱共役の状態にある事を示している. 又, 触媒部位に結合し, その活性を著明に増加させる<sup>23)</sup> MnCl<sub>2</sub> (2 mM) 添加により

AC 活性が著明な上昇を示すことから, 触媒部位は比較的 intact な状態であると思われた. こうした条件下で AC 活性を測定すると対照群で 156.2±11.3 pmol/min/mg protein であった. DMI による影響を検討したが, DMI 3 日投与後でも AC 活性は 155.6±13.2 pmol/min/mg protein と, 有意の差は認められなかった (Fig. 4).

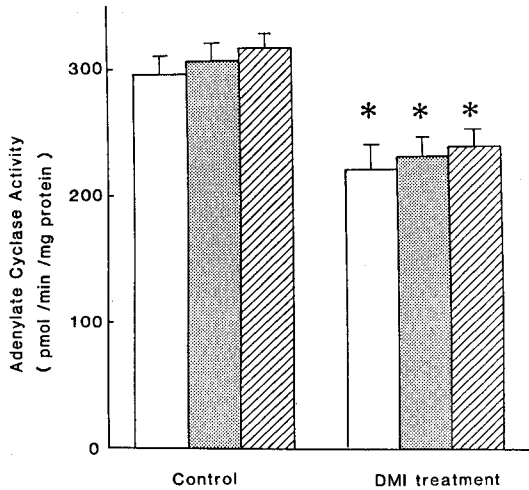
### 3.7 Gs 蛋白質活性化状態での AC 活性への DMI の影響

Gpp(NH)p 前処置膜に, 1 μM の Gpp(NH)p を加え更に Gs 蛋白質の活性化を試みても, 1 μM の



**Fig. 4** The effect of desipramine treatment (3 days) on digitonin solubilized adenylate cyclase activity. Cerebral cortical membranes from control or 3 days desipramine treated rats were solubilized and adenylate cyclase activity was determined as described in the text. Effect of Gpp(NH)p and MnCl<sub>2</sub> on solubilized adenylate cyclase activity were determined.

□, no additions; ■, 1 μM Gpp(NH)p; ▨, 2 mM MnCl<sub>2</sub>. Results represent of mean±SEM from three experiments.



**Fig. 5** The effect of 3 days desipramine treatment on adenylate cyclase activity in the membranes preloaded with Gpp(NH)p. Membranes were preincubated for 10 minutes with Gpp(NH)p and isoproterenol as described in Materials and Methods. Adenylate cyclase activity was assayed in the cerebral cortical membranes from control or desipramine treated rats in the absence ( $\square$ ) or presence of Gpp(NH)p ( $\text{hatched}$ ) and isoproterenol ( $\text{stippled}$ ). Results represent of mean  $\pm$  SEM from three experiments.  
\* Significantly different from control,  $p < 0.05$ .

Gpp(NH)p と  $1 \mu\text{M}$  の ISP を加え Gs 蛋白質の活性化率を更に上昇させようとしても、AC 活性の上昇は認められなかった (Fig. 5). 即ち、Gpp(NH)p 前処置膜では Gs 蛋白質が最大活性に達しているために、更に Gs 蛋白質を活性化する処置は無効であった。こうした Gs 蛋白質が最大活性に達している条件下で AC 活性を測定することにより、Gs 蛋白質の活性化の過程以降に DMI が作用点を持っているか否かを検討した。Fig. 5 に示したように AC 活性は、対照群  $306.2 \pm 22.5$  pmol/min/mg protein であり、DMI 3 日投与群で、 $230.7 \pm 8.7$  pmol/min/mg protein と、有意の低下を示していた ( $p < 0.05$ )。

### 3.8 抑制性 G 蛋白質に対する DMI の影響

Forskolin を添加して大脳皮質粗膜分画の AC 活性を測定すると AC 活性の著明な上昇が認められた ( $58.2 \pm 2.51$  vs  $793.4 \pm 91.43$  pmol/min/mg protein;  $p < 0.05$ ). こうした Forskolin を添加した条件下で Gpp(NH)p を添加すると Gpp(NH)p による AC 活性の用量依存性の阻害曲線が得られた。この曲線より AC 活性を最大阻害の 50% 阻害する Gpp(NH)p の濃度

**Table 5** Effect of DMI on the Concentration of Gpp(NH)p Required for Half-maximal Inhibition of Adenylate Cyclase

	EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> for Inhibition
Control	39.01 $\pm$ 7.289 (5)
DMI treated (3 days)	37.33 $\pm$ 3.80 (5)

The assay constituents were membrane protein (about  $120 \mu\text{g}$ ), Tris-HCl (25 mM, pH7.4), 10 mM theophylline, 0.4 mM EGTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 mM ATP and  $100 \mu\text{M}$  forskolin. Gpp(NH)p was added concentration ranging from 0.1 nM to  $50 \mu\text{M}$ .

<sup>a</sup>EC<sub>50</sub> for inhibition was expressed as mean  $\pm$  SEM of nM.

(EC<sub>50</sub> for inhibition) を求めると、対照で  $39.0 \pm 7.29$  nM であった。DMI 3 日投与群でのそれは  $37.3 \pm 3.80$  nM であり両者の間に有意差は認められなかった (Table 5)。

## 4 考 察

今回の実験においては、従来の報告と同様に DMI 投与による  $\beta$  受容体の減少と  $\beta$ -adrenalin 感受性 AC 活性の低下を観察した (Fig. 1, Fig. 2)。

$\beta$  受容体の低下が DMI 投与によるシナプス間隙の NE 濃度に伴う 2 次的な変化なのか、抗うつ薬による直接的变化なのかは論議があるところである。Wolfe ら<sup>3)</sup> は、ラットに DMI を 7 から 21 日間投与して、 $\beta$  受容体数の減少を観察したが、AC 活性の ISP に対する EC<sub>50</sub> に変化がなかった事、また生後すぐに 6-hydroxy dopamine を投与し、NE 神経終末の発達を抑制したラットにおいては、こうした DMI による  $\beta$  受容体数の減少が観察されなかったことから DMI による  $\beta$  受容体の低下は、シナプス間隙の NE 上昇による代償的な変化であると結論づけている。しかしながら、彼らの実験においては、EC<sub>50</sub> レベルの 300 倍の濃度の GTP を使用しており、実験条件に難がある。一方、C<sub>6</sub> 細胞に  $10 \mu\text{M}$  の DMI を暴露すると  $\beta$  受容体は、1 時間後で約 20%、12 時間後では約 25%、5 日後で約 45% の減少が認められると渡辺ら<sup>24)</sup> は報告しており、DMI が受容体に直接作用することを示唆している。山岡ら<sup>25)</sup> も、DMI を *in vitro* でラット大脳皮質スライスに添加した結果から  $\beta$  受容体-AC 系に直接作用していることを示唆している。今回の我々の結果で、特に興味深いことは、Gpp(NH)p で賦活化された DMI による AC 活性の低下が  $\beta$  受容体数の減少よりも早期におこり、その程度も著しかったことである。

Okada ら<sup>26)</sup>は、ラットに DMI を投与し、ISP で賦活された AC 活性の低下が  $\beta$  受容体数の減少よりも早期に起こり、その程度も著しいことを観察し、DMI による  $\beta$  受容体減少と AC 活性の低下は、それぞれ独立した減少であると述べている。更に DMI の作用機序について彼らは、ISP で賦活された AC 活性が DMI 投与により変化を受けていないことから、DMI は受容体と Gs 蛋白質との脱共役をひきおこしていると結論している。今回の我々の結果では、Okada らの報告とは異なり、DMI 投与が Gpp(NH)p に対する EC<sub>50</sub> 値を増加させ (Table 1)、かつ、Gpp(NH)p による Gs 活性化の潜時を延長することから (Table 3, Fig. 3)、DMI は Gs 蛋白質活性化の過程に作用することが推察された。このことは ISP に対する EC<sub>50</sub> が DMI により変化した結果 (Table 4) から支持される。即ち、G 蛋白質の機能は単に受容体刺激を触媒部位に伝えるだけではなく、受容体と結合することによって、agonist に対する高親和性を獲得することにある。この高親和性受容体は、Gs 蛋白質の活性化の過程で崩壊して、低親和性受容体に戻る<sup>27)</sup>。DMI 投与により Gs 蛋白質の Gpp(NH)p に対する親和性が低下し、Gs 蛋白質の活性化の速度が遅くなることはすでに述べた。この Gs 蛋白質の活性化の過程は、同時に高親和性受容体の崩壊過程である<sup>27)</sup>。従って Gs 蛋白質の DMI による変化は、受容体側からみれば、高親和性受容体の崩壊速度が DMI 投与により遅くなることを意味し、その結果として、高親和性受容体の割合が高くなり Table 4 に示したように、agonist に対する親和性が高くなったと考えられる (Table 4)。

Okada ら<sup>26)</sup>と我々の DMI 投与の条件が全く同じにもかかわらず、異なった結果が生じたのは、Okada ら<sup>26)</sup>の実験においては EC<sub>50</sub> の 100 倍という高濃度の Gpp(NH)p を添加していること、あるいは 37°C で 10 分という長時間のインキュベーションをしていることが挙げられる。即ち、こうした条件下ではインキュベーション後、早期に Gs 蛋白質が最大活性に達してしまうために DMI による Gs 蛋白質活性化の過程の変化が覆い隠されてしまう可能性がある。

Okada ら<sup>26)</sup>が DMI の作用機序として主張する DMI による受容体と Gs 蛋白質との脱共役に関して、O'Donnell ら<sup>28)</sup>は  $\beta$ -agonist である clenbuterol と抗うつ薬の慢性投与後の [<sup>125</sup>I]-iodopindolol 結合に対する ISP の阻害曲線を検討して、clenbuterol では受容体と G 蛋白質との脱共役がおこっているが、抗うつ薬によってはおこっていないと報告している。前述した山岡ら<sup>25)</sup>も、ラット大脳皮質スライスを用いて、DMI を *in vitro*

で添加し、DMI による Gs 蛋白質の機能変化を示唆している。

一方、Table 5 で示したように EC<sub>50</sub> for inhibition に DMI 投与は影響を与えなかった。このことは、Gs 蛋白質とは対照的に Gi 蛋白質の機能に DMI 投与は影響を与えないことを示していると考えられた。Gpp(NH)p 前処置膜では Gs 蛋白質がすでに最大活性状態に達しているため DMI 投与による Gs 蛋白質活性化の過程の変化は覆い隠されてしまう。即ち、こうした条件下で DMI 投与による変化が生じれば、それは Gs 蛋白質活性化の過程以降の段階、即ち、Gs 蛋白質と触媒部位との interaction、あるいは触媒部位に DMI の作用点が存在することを意味する。今回 Gpp(NH)p 前処置膜を用いて、DMI による AC 活性への影響を検討したが、Fig. 5 に示したように DMI 3 日間投与により AC 活性の有意な低下が観察された。Gpp(NH)p 非存在下における AC 活性が DMI により変化がみられなかったこと (Fig. 2)、および可溶性化した AC 活性が DMI 投与により影響を受けなかったこと (Fig. 4) より、DMI は触媒部位に作用点を持たないことが示唆される。このことは間接的ではあるが G 蛋白質と触媒部位の interaction に DMI が影響を与えていることを示唆していると思われた。この点について Menkes ら<sup>29)</sup>も、DMI が G 蛋白質と触媒部位との interaction に影響を与えることを示唆している。

以上述べてきたように、DMI は、Gs 蛋白質の機能に直接影響を及ぼしていることが示唆されるが、現在のところその機序については不明である。しかし、いくつかの興味深い報告がある。膜脂質は  $\beta$  受容体機能の重要な役割を担っていることが知られている<sup>30,31)</sup>。一方 DMI は、膜の構成脂質である sphingolipid や phospholipid の代謝の変化を起こすことが知られており<sup>32,33)</sup>、こうした脂質代謝の変化は比較的早く出現する。従って、こうした脂質代謝の変化が DMI の作用機序に関連する可能性も考えられ、今後この方面の膜脂質に関する詳しい報告が期待される。

## 5 結 論

本研究により、DMI は  $\beta$  受容体 adenylate cyclase 機構において受容体の他、Gs 蛋白質活性化の過程及び Gs 蛋白質と触媒部位との interaction に直接作用することが明らかにされた。このように DMI の作用の一部が受容体を介さずに発現することは、抗うつ薬と生体膜そのものとの関係の重要性を示唆するものであろう。



## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を頂きました神経精神医学講座高畑直彦教授、薬理学講座大鹿英世教授、並びに御助言を頂いた薬理学講座、八田慎一博士に深謝致します。

## 文 献

- Vetulani, J., Stawarz, R. J., Dingell, J. V. and Sulser, F.: A possible common mechanism of action of antidepressant treatments. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** **293**, 109-114 (1976).
- Banerjee, S.P., Kung, L.S., Riggi, S.J. and Chanda, S. K.: Development of  $\beta$ -adrenergic receptor subsensitivity by antidepressants. **Nature** **268**, 455-456 (1977).
- Wolfe, B. B., Harden, T. K., Sporn, J. R. and Molinoff, P. B.: Presynaptic modulation of beta adrenergic receptors in rat cerebral cortex after treatment with antidepressants. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **207**, 446-457 (1987).
- Sulser, F., Janowsky, A. J., Okada, F., Manier, D. H. and Mobley, P. L.: Regulation of recognition and action function of the norepinephrine (NE) receptor-coupled adenylate cyclase system in brain: Implications for the therapy of depression. **Neuropharmacology** **22**, 425-431 (1983).
- Sulser, F., Gillespie, D. D., Mishra, R. and Manier, D. H.: Desensitization by antidepressants of central norepinephrine receptor systems coupled to adenylate cyclase. **Ann. NY. Acad. Sci.** **430**, 91-101 (1984).
- Asakura, M., Tsukamoto, T. and Hasegawa, K.: Modulation of  $\alpha_2$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor sensitivity following long-term treatment with antidepressants. **Brain Res.** **235**, 192-197 (1982).
- Rodbell, M.: The role of hormone receptors and GTP regulatory proteins in membrane transduction. **Nature** **284**, 17-22 (1980).
- Ross, E. M. and Gilman, A. G.: Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. **Annu Rev. Biochem.** **49**, 533-564 (1980).
- Katada, T., Bokoch, G. M., Smigel, M. D., Ui, M. and Gilman, A. G.: The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. **J. Biol. Chem.** **259**, 3586-3595 (1984).
- Katada, T., Northup, J.K., Bokoch, G.M., Ui, M. and Gilman, A. G.: The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. **J. Biol. Chem.** **259**, 3578-3585 (1984).
- Katada, T., Bokoch, G.M., Northup, J.K., Ui, M. and Gilman, A. G.: The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. **J. Biol. Chem.** **259**, 3568-3577 (1984).
- Luthin, G. R. and Tabakoff, B.: Activation of adenylate cyclase by alcohols requires the nucleotide-binding protein. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **288**, (3) 579-587 (1984).
- Saito, T., Lee, J. M. and Tabakoff, B.: Ethanol's effects on cortical adenylate cyclase activity. **J. Neurochem.** **44**, 1037-1044 (1985).
- Salomon, Y.: Adenylate cyclase assay, In: Brooken, G., Greengard, P. and Robinson, G.: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*. Vol. 10, 35-54, Raven Press, New York (1979).
- O'Donnell, J. M., Wolfe, B. B. and Frazer, A.: Agonist interactions with beta adrenergic receptors in rat brain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **228**, 640-647 (1984).
- Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. **Ann. NY. Acad. Sci.** **51**, 660-672 (1949).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**, 265-275 (1951).
- Iyengar, R. and Birnbaumer, L.: Hormone receptor modulates the regulatory component of adenylate cyclase by reducing its requirement for  $Mg^{2+}$  and enhancing its extent of activation by guanine nucleotides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**, 5179-5183 (1982).
- Hanes, C. S.: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **Biochem. J.** **26**, 1406-1421 (1932).
- Cassel, D. and Selinger, Z.: Mechanism of adenylate cyclase activation through the  $\beta$ -adrenergic receptor: Catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **75**, 4155-4159 (1978).
- Lad, P. M., Nielsen, T. B., Preston, M. S. and Rodbell, M.: The role of the guanine nucleotide exchange reaction in the regulation of the beta-adrenergic receptor and in the actions of catecholamines and cholera toxin on adenylate cyclase in turkey erythrocyte membranes. **J. Biol. Chem.** **225**, 988-995 (1980).

22. Frieden, C.: Slow transitions and hysteretic behavior in enzymes. **Annu. Rev. Biochem.** **48**, 471-489 (1979).
  23. Smokuti, S. G., Hildebrandt, J. D., Herberg, J. T. and Iyengar, R.: Divalent cation regulation of adenylate cyclase: an allosteric site on the catalytic component. **J. Biol. Chem.** **257**, 6387-6393 (1982).
  24. 渡辺義文, 樋口輝彦, 山崎 潤, 守屋朝夫, 山内俊雄: C6細胞における抗うつ薬の直接作用の検討— $\beta$ 受容体の down-regulation をめぐって— **精神薬療基金研究年報** **18**, 137-143 (1987).
  25. 山岡功一, 野村総一郎, 中澤恒幸: 抗うつ薬による  $\beta$ 受容体機能変化: *in vitro* 反応系を用いての検討. **精神薬療基金研究年報** **19**, 77-83 (1988).
  26. Okada, F., Tokumitsu, Y. and Ui, M.: Desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase in cerebral cortex after *in vitro* treatment of rats with desiplamine. **J. Neurochem.** **47**, 454-459 (1986).
  27. Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., Michel, T. and Stadel, J. M.: Mechanisms of hormon receptor-effector coupling: the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase. **Fed. Proc.** **41**, 2664-2670 (1982).
  28. O'Donnell, J. M. and Frazer, A.: Effects of clenbuterol and antidepressant drugs on beta adrenergic receptor/N protein coupling in the cerebral cortex of the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **234**, 30-36 (1985).
  29. Menkes, D. B., Rasenick, M. M., Wheeler, M. A. and Bitensky, M. W.: Guanosine triphosphate activation of brain adenylate cyclase: Enhancement by long-term antidepressant treatment. **Science** **219**, 65-67 (1983).
  30. Kirilovsky, J. and Schramm, M.: Delipidation of a  $\beta$ -adrenergic receptor preparation and reconstitution by specific lipids. **J. Biol. Chem.** **258**, 6841-6849 (1983).
  31. Kirilovsky, J., Steiner-Mordoch, S., Selinger, Z. and Schramm, M.: Lipid requirements for reconstitution of the delipidated  $\beta$ -adrenergic receptor and the regulatory component. **FEBS Lett.** **183**, 75-80 (1985).
  32. Albauz, S., Vanier, M., Hauw, J., de Sarx, F., Boutry, J. and Baumann, N.: Effect of tricyclic antidepressants on sphingomyelinase and other sphingolipid hydrolases in C<sub>6</sub> cultured glioma cells. **Neurosci. Lett.** **36**, 311-315 (1983).
  33. Leli, V. and Hauser, G.: Chlorpromazine induces accumulation of inositol phosphates in C<sub>6</sub> glioma cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **135**, 465-472 (1986).
- 
- 別刷請求先:  
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目  
札幌医科大学神経精神医学講座 土屋文明