

腸管神経叢に発現している消化管運動制御受容体と、それらをターゲットにした消化管機能改善薬

Receptors expressing on the enteric plexus and clinically used drugs acting on their receptors



上園保仁(写真) 須藤結香

Yasuhito Uezono¹ and Yuka Sudo^{1,2}

国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野¹,
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学²

◎腸管などの消化管の運動は中枢より交感神経、副交感神経の二重支配を受けると同時に、消化管壁内に存在する神経叢によっても調節されている。この神経叢には数々の神経伝達物質ならびにその受容体が存在する。消化管運動機能改善薬は、腸管をはじめとして消化管神経叢に発現している受容体機能を修飾することで作用を發揮するものが多い。そのなかでもセロトニン受容体に作用するもの、ドパミン受容体に作用するもの、オピオイド受容体に作用するものがよく知られている。これらの受容体は、壁内コリン作動性神経の神経終末より分泌されるアセチルコリン(ACh)の遊離を増加あるいは減少させることで消化管機能を調節している。近年著者らは、消化管神経叢にGABA_B受容体が存在し、GABA_B受容体作動薬も腸管運動機能調節にあずかる可能性を示した。腸管神経叢の解剖学的構造ならびに薬理学的性質を理解したうえで薬物の働きを考えると、その作用を理解しやすい。

Key word : 腸管神経叢, カハールの介在細胞(ICC), セロトニン受容体, ドパミン受容体, オピオイド受容体, GABA_B受容体

腸管などの消化管の運動はその臓器を支配する神経により制御されているが、通常の臓器と違い自動能を有している。消化管運動には脳からの命令に基づく外来性神経によるものと内在性神経によるものがあり、この内在性神経の存在により、外来性神経が遮断されても独自の運動が可能となっている。

外来性神経は交感神経と副交感神経からなり、消化管運動は二重支配を受ける。一方、内在性の神経は壁内神経系ともよばれ、ここでは数多くの神経伝達物質がつくられ、それに対応する受容体が刺激されることにより消化管運動の調節が行われている。この神経叢には自律調節をつかさどる信号を発するカハールの介在細胞(interstitial cells of Cajal: ICC)が局在しており、このことが消化管が自動能をもつゆえんとなっている。腸管神経叢に存在するICCはペースメーカーの役割を果たし、平滑筋筋層に存在するICCは入力された

刺激を平滑筋に伝達する役割をもつと考えられている。

腸管神経叢には数々の神経伝達物質ならびにその受容体が存在するが、消化管運動機能改善薬はおもに腸管など消化管神経叢に発現している受容体機能を修飾することで作用を發揮するものが多い。以下、それらの受容体をターゲットとしてつくられた、あるいは開発されつつある薬物について簡単に紹介する。

● セロトニン(5-HT)受容体に作用する薬物

5-HTは5-HT受容体に結合し多彩な生体反応を引き起こす。この多様性は、5-HT受容体が14種類にもものぼり、それぞれの受容体が多様な作用を引き起こすことによる¹⁾。消化管運動は交感神経系、副交感神経系、壁内神経叢により調節されているが、これらの神経系のなかで胃腸管運動に中心的に働いているのは、副交感神経節後神経のコ

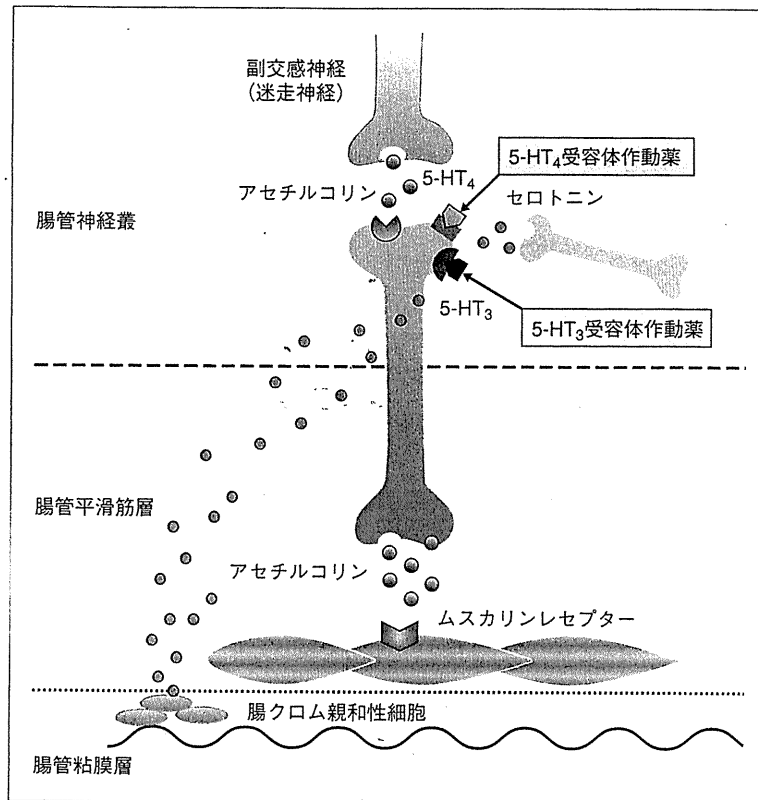


図 1 5-HT₃, 5-HT₄受容体作動薬の作用点

リン作動性神経である。腸管壁内神経叢には多種類の 5-HT 受容体が存在し、5-HT はそれらを通じて巧妙にアセチルコリン(ACh)遊離を調節し、消化管運動を制御している。消化管運動機能に関与するおもな 5-HT 受容体は 5-HT₃, 5-HT₄受容体であり、臨床で用いられている消化管運動調整薬もこれらをターゲットとして開発されたものである。

5-HT₃受容体は壁内コリン作動性神経上に存在する。5-HT₃受容体が活性化されると、ACh の遊離が促進され、その結果、消化管運動は促進される。ストレス下においては腸管クロム親和性細胞から 5-HT が多量に分泌され、5-HT₃受容体が過剰に刺激されることにより下痢型過敏性腸症候群をきたす。したがって、5-HT₃受容体阻害薬(ラモセトロン)は過敏性腸症候群を和らげる。加えて抗がん剤投与はクロム親和性細胞より多量に 5-HT を分泌させることが知られている。分泌された大量の 5-HT は求心性神経に存在する 5-HT₃受容

体を刺激し、その結果、求心性に信号が送られ、嘔吐中枢が刺激され、嘔吐をきたす。したがって、5-HT₃受容体阻害薬(グラニセトロン、オンダンセトロンなど)は制吐作用を有し、難治性の嘔吐の症状緩和に用いられる(図 1)。

副交感神経終末に存在する 5-HT₄受容体は、刺激により ACh 遊離を促進することで消化管活動を促進させる。臨床において、5-HT₄受容体アゴニスト(モサプリド)は胃腸管運動促進および調整薬として用いられている(図 1)。

● オピオイド受容体に作用する薬物

内因性オピオイドであるエンドルフィンやエンケファリンは、消化管において神経伝達物質として存在している。オピオイド受容体には μ , δ , κ の 3 種類が存在するが、これらの受容体のうち腸管神経叢に発現して運動調節にかかわっているのは主として μ 受容体である²⁾。 μ 受容体は交感神経、副交感神経終末にも発現している。消化管に

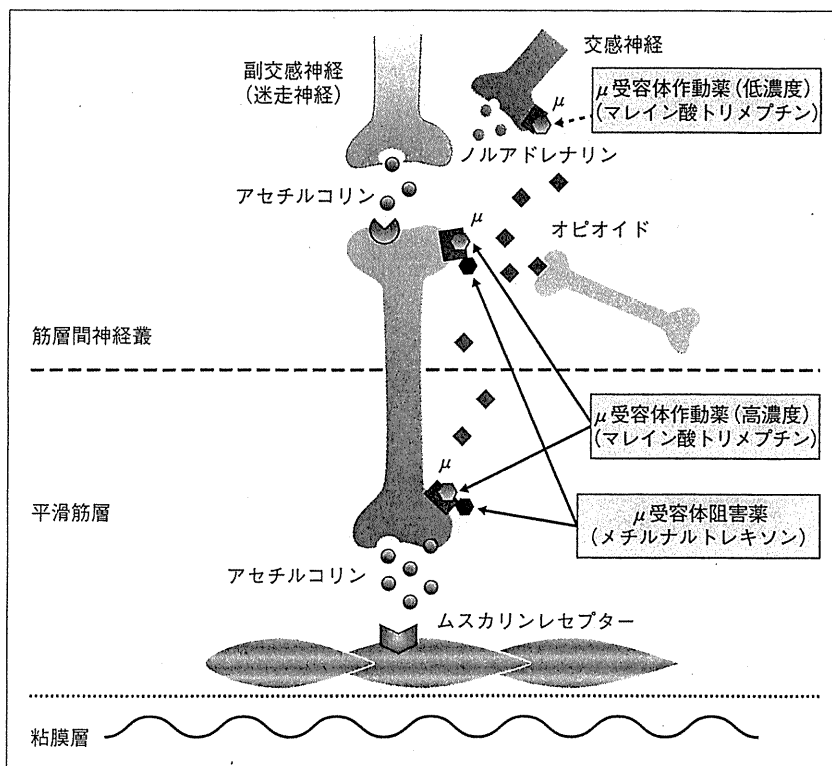


図 2 オピオイド μ 受容体作動薬の作用点

発現している μ オピオイド受容体に作用する消化器機能調節薬としてマレイン酸トリメプチンがあげられる。この薬物は、低濃度では交感神経終末にある μ 受容体を刺激し、交感神経終末よりノルアドレナリンの遊離を抑制する(図 2)。その結果、交感神経系の消化管に対する抑制がとれ、運動が促進することになる。一方、高濃度のマレイン酸トリメプチンは腸管神経叢の μ オピオイド受容体を活性化するため(図 2)、ACh の分泌が抑制され、消化管運動は低下する。この二面性が、消化器運動亢進時は運動を抑制し、運動低下の際は消化器運動を亢進させるという効果として現れる³⁾。

消化管に発現するオピオイド受容体作用薬として近年注目されているのが、末梢性 μ 受容体のみを抑制し中枢神経の μ 受容体には影響を与えない薬物、メチルナルトレキソンである。がん疼痛に用いられるモルヒネやオキシコドンなどのオピオイド製剤は μ オピオイド受容体に作用し、痛みを止める。しかし、消化管に発現している μ 受容体にも作用するため、腸管神経叢の μ 受容体刺激が

コリン作動性神経からの ACh の分泌を抑制することになり、副作用として便秘が必発する。メチルナルトレキソンは中枢移行の少ない μ 受容体アンタゴニストであるため、末梢 μ 受容体だけを抑制することができ、したがって、オピオイドの鎮痛効果を保ったままオピオイドによる便秘を改善できる(図 2)。わが国では未承認であるが、欧米ではオピオイド製剤の便秘改善薬として用いられている⁴⁾。わが国においてもがん性疼痛でオピオイド製剤を投与されている患者のなかには便秘に難渋する人も少なくないので、ぜひ承認していただきたい薬物である。

● ドパミン受容体に作用する薬物

胃や腸管神経叢にはドパミン D_2 受容体が発現している⁵⁾。ドパミン D_2 受容体が刺激されると、コリン作動性神経終末からの ACh 分泌が低下し、その結果、消化管運動は抑制される⁵⁾(図 3)。したがって、消化管運動賦活剤として、 D_2 受容体アンタゴニストが用いられる。代表的な薬物はドンペ

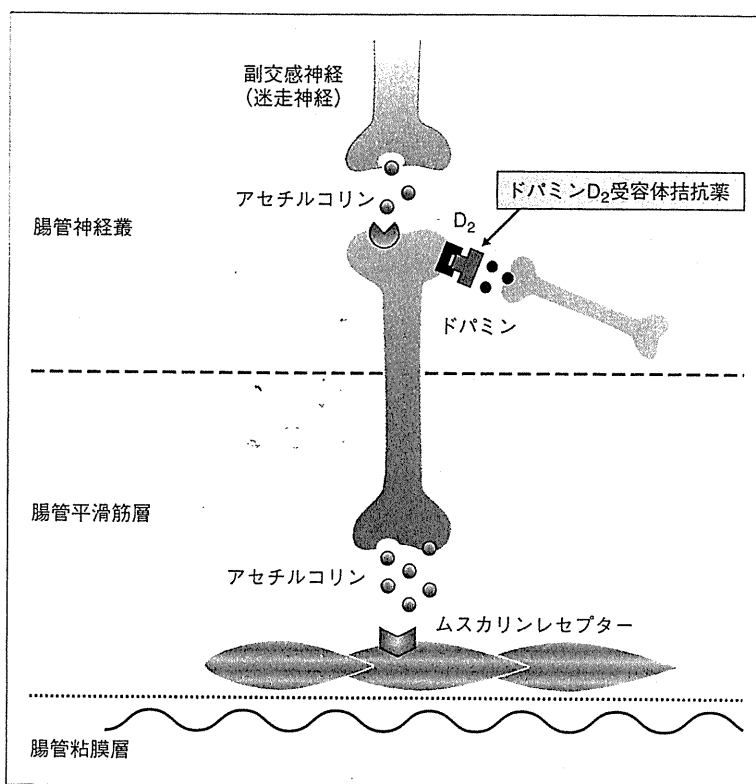


図 3 ドパミンD₂受容体作動薬の作用点

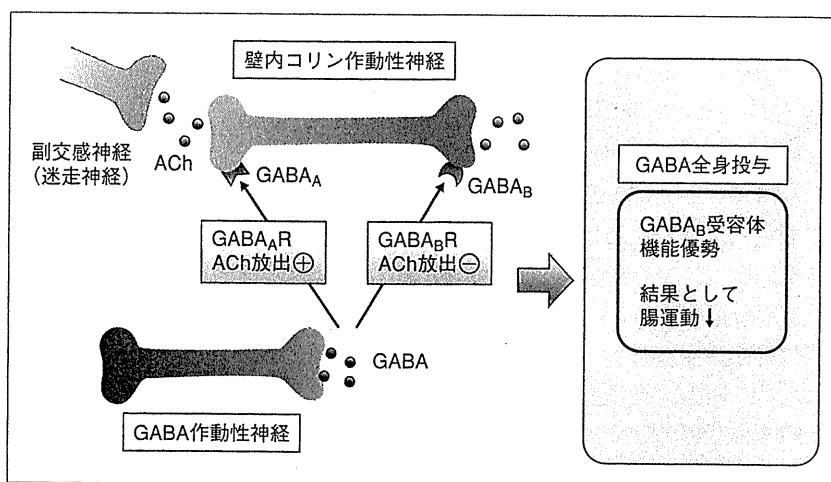


図 4 腸管壁内GABA受容体作動性神経およびGABA受容体

リドン、ロトクロプラミド、イトプリドである。おもに胃の神経叢に発現している D₂受容体に働き、胃運動を活発にするが、腸管神経叢の D₂受容体にも働いて腸管運動も促進させる(図 3)。

GABA_B受容体作動薬の薬物としての可能性

近年、腸管神経叢にある GABA_A、GABA_B受容体に作用する薬物についてもその作用機構が明らかになってきた。GABA_A、GABA_B受容体の両者とも腸管神経叢を含む消化管神経叢に存在してい

る^{6,7)}。GABA_A受容体は神経細胞体から樹状突起に、GABA_B受容体は神経終末に発現している(図4)。ACh遊離に対して、GABA_A受容体は促進的に、GABA_B受容体は抑制的に働くことが、摘出臓器を用いた著者らの研究などからわかってきている⁶⁾。

実際のGABAの作用について、麻酔をしたイヌの小腸の動きを直接測定することにより検討を行ったところ、GABA_Aアゴニストによる腸管運動の亢進ならびにACh遊離の増加、GABA_Bアゴニストによる腸管運動の抑制ならびにACh遊離の低下がみられた⁸⁾。同実験においてGABAを投与すると、ACh遊離ならびに腸管運動の抑制がみられた⁸⁾。このことはGABAの作用においてはGABA_B受容体が優位に働いていることを示唆する(図4)。GABA_B受容体は中枢神経系にも広範に発現しているが、著者らはある種のGABA_B受容体サブタイプが特異的に消化管で発現していることを見出した。このGABA_B受容体に特異的な薬物を開発することで新たな消化管特異的GABA_B作動薬を開発できる可能性がある⁹⁾。

おわりに

消化管神経叢の消化管運動における重要な役割について、また腸管神経叢に発現している種々の受容体に作用する薬物が消化管機能調整薬として

用いられていることを概説した。腸管神経叢の解剖学的構造ならびに神経叢に発現している種々の受容体の薬理学的性質を理解したうえで消化管作動薬の働きを考えると、その作用を理解しやすことがわかる。また、末梢のオピオイド受容体のみを抑制するオピオイド依存性便秘の改善薬や、GABA_B受容体作動薬の臨床開発など、腸管神経叢に存在する受容体に作用するあらたな薬物の開発・上市にも注目したい。

文献

- 1) Alexander, S.P.H. et al.: *Br. J. Pharmacol.*, **158** (Suppl. 1): S1-S254, 2009.
- 2) Nakayama, S. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254**: 792-798, 1990.
- 3) Taniyama, K. et al.: *Gastroenterology*, **101**: 1579-1587, 1991.
- 4) Thomas, J. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **358**: 2332-2343, 2008.
- 5) Shichijo, K. et al.: *Am. J. Physiol.*, **273**: G1044-G1050, 1997.
- 6) Tanaka, C. and Taniyama, K.: The role of GABA in the peripheral nervous system. In: *GABA outside the CNS* (ed. by Erdo, S.L. and Bowery, N.G.). Springer-Verlag, Berlin, 1991, pp.3-17.
- 7) Uezono, Y. et al.: *J. Pharmacol. Sci.*, **94**: 211-213, 2004.
- 8) Kawakami, S. et al.: *J. Pharmacol. Sci.*, **94**: 368-375, 2004.
- 9) Torashima, Y. et al.: *J. Pharmacol. Sci.*, **111**: 253-259, 2009.

* * *

パクリタキセル誘発性末梢神経障害のメカニズム

宮野加奈子¹⁾

上園保仁¹⁾、仲田義啓²⁾

¹⁾国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野

²⁾広島大学大学院医歯薬学総合研究科薬効解析科学

要 旨

パクリタキセルは、乳がんなどの化学療法に用いられるが、末梢神経障害を引き起こす。中でも、痛みに対して効果的な予防や軽減の方法が確立されていない。そのため、その重篤さから化学療法を中止せざるを得ないことがあり、有益ながん治療を受けることが困難になる場合すらある。パクリタキセル治療による末梢神経障害発生メカニズムを明らかにし、その対策を確立することはがん患者の quality of life (QOL) の向上に極めて重要である。今回はパクリタキセル誘発性末梢神経障害のメカニズムの一端を紹介する。

(ペインクリニック 32: 1491-1498, 2011)

キーワード：パクリタキセル、末梢神経障害、サブスタンス P

はじめに

パクリタキセルは、太平洋イチイ (*taxus brevifolia*) から単離された薬物である。この薬物は、チューブリンの重合により構成されている微小管に作用し、細胞分裂に必要な紡錘体の正常な形成を阻害する結果、がん細胞などの増殖を抑制する。現在、パクリタキセルは卵巣がんや乳がんをはじめ様々な固形がんの化学療法に用いられる優れた抗がん剤である。しかし、その一方で様々な副作用を引き起こすことが知られている。中でも末梢神経障害は、がん患者にとって重篤な副作用の一つであり、末梢神経（感覚神経、運動神経、自律神経）のうち感覚神経が障害されやすい^{1,2)}。そのため、パクリタキセル投与 24~72 時間後から、感覚異常、知覚麻痺、刺痛、灼熱痛、ならびに機械刺激や

冷刺激などに対するアロディニアが現れ始める²⁾。これらの症状は四肢末端から生じ、一般的には可逆的であるが、回復するまでには時間がかかることが多く、不可逆的になる場合もある。実際に、パクリタキセルによる化学療法を受けたがん患者の 59~78% に末梢神経障害が認められ²⁾、そのうちの約 30% は日常生活に支障をきたすことが報告されている³⁾。そのため、パクリタキセル投与による末梢神経障害は、がん患者の QOL に大いに影響を与える。しかしながら、パクリタキセルによる末梢神経障害発生メカニズムについては現段階で不明な点が多く、効果的な予防法や症状軽減の方法は確立されていない。パクリタキセル治療を受けているがん患者の中には、しばしばその重篤さから化学療法の変更あるいは中止を余儀なくされることがあり、有益ながん治療の継続が困難になることがある。これらのことから、パクリタキセ

〈Special Article〉 Essentials of neuropathic pain which support clinical data

The mechanism of paclitaxel-induced peripheral neuropathy

Kanako Miyano, et al

Division of Cancer Center Pathophysiology, National Cancer Center Research Institute

ル治療による末梢神経障害の発生メカニズムを明らかにし、その予防や軽減の方法を開発することは非常に重要である。

本稿では、パクリタキセルの末梢神経障害発生メカニズムについて、これまでの知見、ならびに筆者らの行った研究から得られた成果を紹介する。

1. パクリタキセルは一次感覚神経に蓄積する

パクリタキセルによる神経障害は、中枢神経より末梢神経に発生しやすいことが知られている^{1,2)}。実際、パクリタキセルは血液-脳関門 (blood-brain barrier) を通過しにくく、血漿中のパクリタキセル量は脳脊髄液中の約 500 倍にも及ぶ⁴⁾。また、パクリタキセルは、一次感覚神経の細胞体が存在する脊髄後根神経節 (dorsal root ganglia : DRG) と末梢神経に蓄積しやすい⁵⁾。血漿中のパクリタキセル量と比較し、DRG では約 200 倍、末梢神経では約 20 倍の量のパクリタキセルが蓄積することが報告されている⁵⁾。パクリタキセル治療による末梢神経障害の発生メカニズムの詳細は今のところ明らかにされていないが、少なくともパクリタキセルは、DRG と末梢神経、中でも一次感覚神経に作用することにより末梢神経障害を発生する可能性が考えられる。

2. パクリタキセルによる末梢神経障害の発生メカニズム

1) 一次感覚神経における病態生理

一次感覚神経は、 $A\beta$ 、 $A\delta$ 、C 線維の 3 つに大別される。 $A\beta$ 線維は太い有髄線維であり、触覚や圧覚などの非侵害性刺激情報を伝達する。一方、 $A\delta$ 線維は有髄、C 線維は細い無髄の線維であり、ともに侵害性疼痛を伝達する。前者は刺された時に感じるような即時性の痛み

を、後者は灼けつくような鈍い痛みを伝達する。パクリタキセル投与による末梢神経障害モデル動物の病態時では、 $A\beta$ と $A\delta$ 線維の軸索変性およびシュワン細胞の形態学的変化が観察される⁶⁾。加えて、神経線維には脱髄が生じることも認められており、これが神経伝導速度の低下の要因の一つと考えられている⁶⁾。上記の $A\beta$ 、 $A\delta$ 線維に認められる病態変化は、パクリタキセルが軸索の微小管を凝集させることにより生じることが示唆されている⁷⁾。一方、C 線維では、パクリタキセルがミトコンドリアに直接作用し、脱分極と異所性発火を誘導することが報告されている^{7,8)}。しかし、C 線維については知見が少なく不明な点が多い。

2) パクリタキセルは一次感覚神経から痛覚伝達物質サブスタンス P を遊離させる

サブスタンス P (substance P : SP) は、ニューロキニン類 (neurokinin : NK) に属する神経ペプチドの一つである。SP は、一次感覚神経のうち C 線維に多く発現しており、熱、酸、機械刺激などの様々な侵害刺激により遊離される。C 線維から遊離された SP は、脊髄後角の二次感覚神経に発現する SP 受容体 (NK 受容体) を活性化し、痛みを中枢へ伝達する。さらに、SP は神経障害性疼痛の形成にも重要な役割を果たしており、パクリタキセル投与によるアロディニアの発症に関与することが、最近、明らかとなった⁹⁾。また、がん患者の血漿中 SP 量がパクリタキセル投与後 30 分で増加することも報告されている¹⁰⁾。これらの事実は、C 線維から遊離させる SP がパクリタキセル投与による末梢神経障害に重要な役割を果たす可能性を示唆する。そこで、まず筆者らは、ラット DRG 初代培養細胞を作製し、ラジオイムノアッセイを用いてパクリタキセル処置による SP 遊離量を測定した。化学療法時の血漿中パクリタキセル濃度は最大で約 $10 \mu\text{M}$ となるため¹¹⁾、測定濃度は $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ に設定した。そ

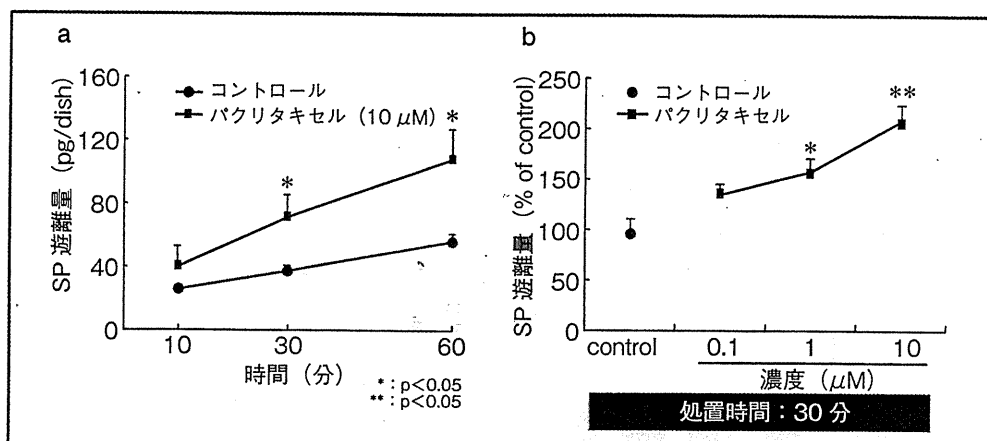


図1 パクリタキセルによるSP遊離量の変化 (文献12より引用改変)

の結果, パクリタキセルはラット DRG 細胞から SP を時間・濃度依存的に遊離させることが明らかとなった (図1)。したがって, パクリタキセルを用いたがんの化学療法時には, 一次感覚神経から SP が遊離されている可能性が考えられる。

3. パクリタキセルによる SP 遊離機構

1) パクリタキセルはプロテインキナーゼ C 活性を介して SP を遊離させる

プロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) は, 制御領域の違いにより, 在来型 PKC (conventional PKC: cPKC), 新型 PKC (novel PKC: nPKC) および非典型 PKC (atypical PKC: aPKC) の3つに大別される。筆者らは, これまでに, DRG 細胞からの SP 遊離に cPKC および nPKC が関与することを報告している^{13,14)}。そこで, パクリタキセル処置による SP 遊離に対する各種 PKC 阻害薬の効果について検討した。パクリタキセル処置による SP 遊離量の増加が, cPKC および nPKC 阻害薬ビスインドールマレイミド (bisindolylmaleimide: BIM, 10 μM) および cPKC 阻害薬 Gö 6976 (1 μM)

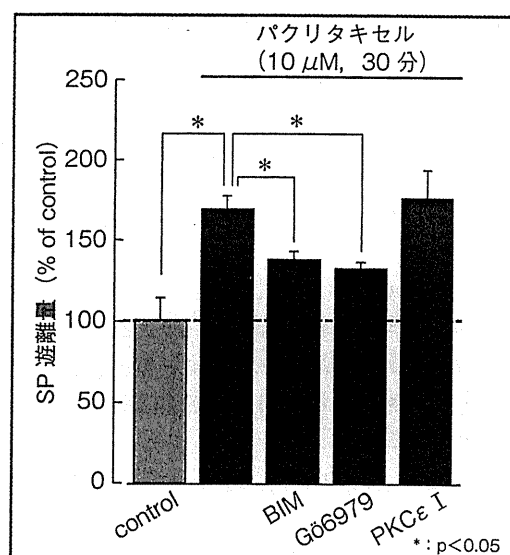


図2 パクリタキセル処置による SP 遊離に対する PKC 阻害薬の効果 (文献12より引用改変)

の前処置 (15分間) により抑制され, その抑制効果は同等であった (図2)。

また, 筆者らは, nPKC のうち PKCε サブタイプが DRG 細胞からの SP 遊離に関与していることを明らかにしている^{13,14)}。しかし, PKCε 阻害薬 PKCε translocation inhibitor pep-

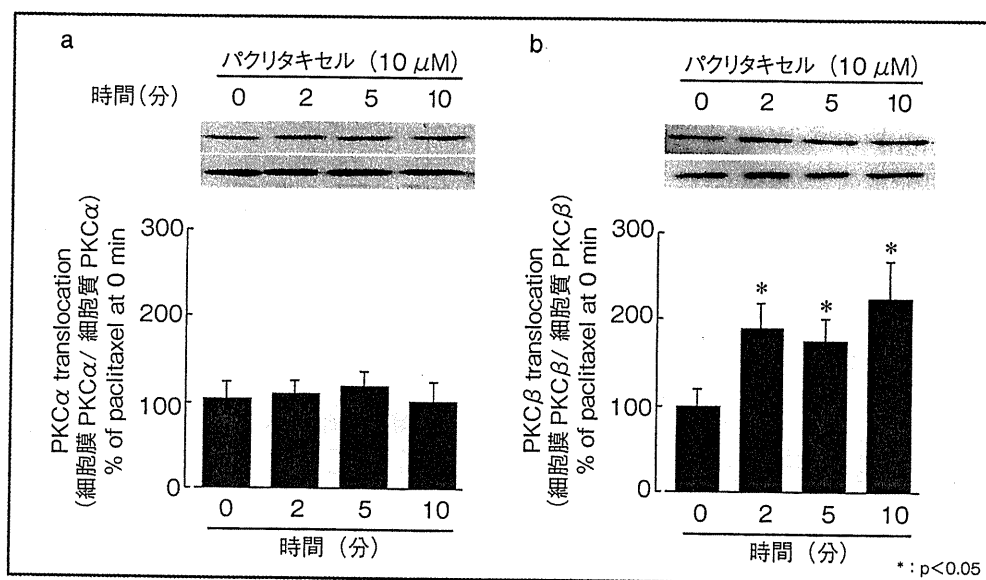


図3 パクリタキセル処置によるcPKCの細胞質から細胞膜へのトランスロケーション (文献12より引用改変)

tid (PKCε I, 200 μM) は、パクリタキセル処置によるSP遊離量の増加に影響を及ぼさなかった(図2)。以上の結果より、cPKCがパクリタキセル処置によるSP遊離に重要であることが示唆された。

cPKCは、PKCα、βおよびγの3つのサブタイプに分類され、活性化されると細胞質から細胞膜へトランスロケートされる。ラットDRG細胞には、PKCαおよびβが発現しているので、パクリタキセル処置によるPKCαおよびβの細胞膜へのトランスロケーションをウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、PKCαの有意なトランスロケーションは認められなかったが(図3a)、PKCβの持続的なトランスロケーションが観察された(図3b)。この結果は、PKCβの活性化がパクリタキセル処置によるSP遊離に関与することを示唆している。パクリタキセルがPKCβを活性化するメカニズムについては、今後の検討が必要である。

2) パクリタキセルは transient receptor potential (TRP) チャネルファミリーを介してSPを遊離させる

筆者らは、transient receptor potential (TRP) チャネルの活性化による細胞内へのCa²⁺流入を介してDRG細胞からSPが遊離されることを報告してきた^{14,15}。そこで、まずパクリタキセル処置によるSP遊離量増加に及ぼす細胞外Ca²⁺の影響について検討した。パクリタキセル処置によるSP遊離量の増加は、細胞外Ca²⁺の除去によりほぼ完全に抑制された(図4a)。また、この増加は、細胞外Ca²⁺の細胞内への流入を阻害するLaCl₃存在下(300 μM)においてもほぼ完全に抑制された(図4a)。これらのことから、パクリタキセル処置によるSP遊離に、細胞外から細胞内へのCa²⁺流入が不可欠であることが明らかとなった。

次に、パクリタキセル処置で起こるSP遊離量の増加に対する各種TRPチャネル阻害薬の効果を検討した。パクリタキセル処置による

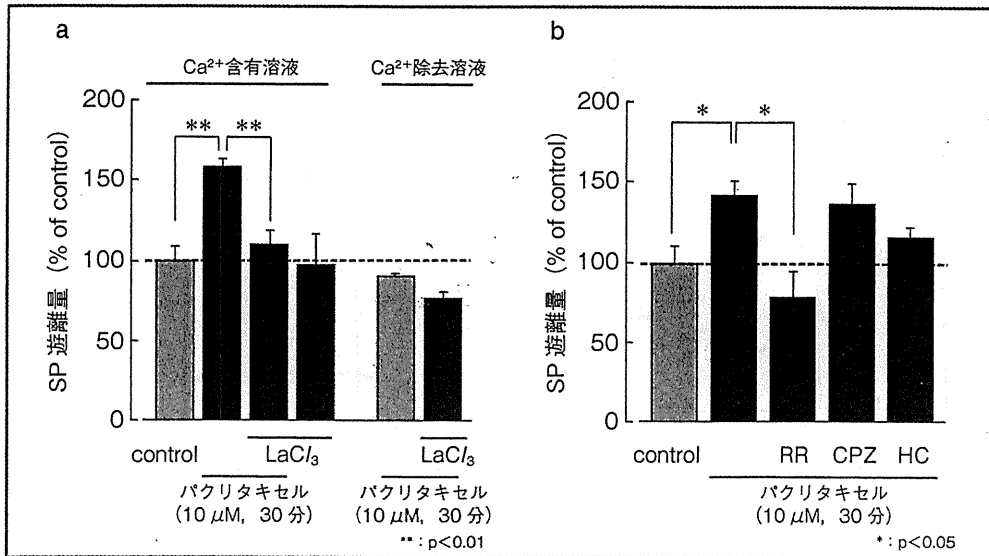


図4 パクリタキセル処置によるSP遊離に及ぼす細胞外Ca²⁺ならびにTRPチャンネル阻害薬の影響 (文献12より引用改変)

SP遊離量の増加は、TRPチャンネル阻害薬ルテニウムレッド (ruthenium red: RR, 50 μM, 15分間) 前処置により有意に抑制された (図4b)。筆者らは、TRPチャンネルサブファミリーのうちTRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) がDRG細胞からのSP遊離を調節していることを報告している^{14,15)}。また、DRGにおいて、TRPV1はTRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) と共発現しており^{16,17)}、TRPA1はTRPV1と類似した作用を有する可能性が示唆されている^{18,19)}。そこで、TRPV1およびTRPA1が、パクリタキセル処置によるSP遊離を制御するTRPチャンネルの候補の一つとして考えられた。しかし、TRPV1阻害薬カプサゼピン (capsazepine: CPZ, 1 μM) およびTRPA1阻害薬HC-030031 (HC, 10 μM) では有意な抑制効果は認められなかったことから (図4b)、この遊離にはTRPV1およびTRPA1以外のTRPチャンネルが関与している可能性が考えられた。TRPV1およびTRPA1以外のルテニウムレッド感受性のTRPチャンネルとして

は、TRPV3、TRPV4などがあり²⁰⁾、これらのチャンネルはSP含有DRG細胞と共発現している²¹⁾。以上の結果を統合すると、パクリタキセルはTRPV1およびTRPA1以外のルテニウムレッド感受性TRPチャンネルを介してSPを遊離させることが考えられる。どのようなTRPチャンネルのサブタイプがパクリタキセル処置によるSP遊離に関与するかについては、今後の検討を要する。

上述した結果より、パクリタキセルによるSP遊離に、TRPチャンネルを介した細胞外から細胞内へのCa²⁺の流入が関与することが示唆された。そこで、ラットDRG細胞におけるパクリタキセル処置による細胞内Ca²⁺濃度変化をCa²⁺イメージングアッセイにより測定した。その結果、パクリタキセル処置 (10 μM) 数分後から持続的な細胞内Ca²⁺濃度の上昇が観察された (図5a)。また、この上昇は、細胞外Ca²⁺の除去、ならびにルテニウムレッドの前処置によりほぼ完全に抑制された (図5b, c)。これらの結果より、パクリタキセルはTRP

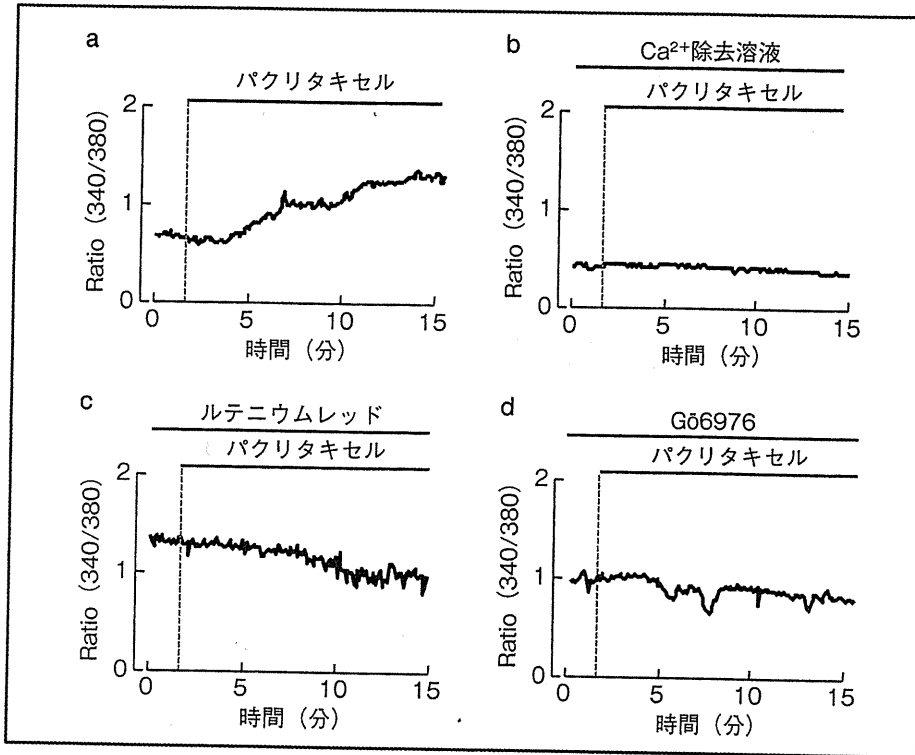


図5 パクリタキセル処置による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (文献12より引用改変)

チャンネルを介して細胞外からの Ca^{2+} 流入を引き起こすことが示唆された。さらに、パクリタキセル処置による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、G6976によりほぼ完全に抑制されたことから(図5d)、パクリタキセルは、まず $\text{PKC}\beta$ を活性化させ、その結果、細胞外から細胞内へ Ca^{2+} 流入が起こり、SPを遊離させることが示唆された。近年、 PKC は温度感受性 TRP チャンネルをリン酸化することにより温度閾値を低下させ、TRP チャンネルを開口させる可能性が示されている^{20,22,23}。したがって、パクリタキセルは、 $\text{PKC}\beta$ による TRP チャンネルのリン酸化を介してチャンネルを開口させる可能性が考えられる。しかし、パクリタキセルにより活性化された $\text{PKC}\beta$ が TRP チャンネルを実際にリン酸化するののかについては、今後の検討を待たなければ

ならない。

おわりに

パクリタキセルによる末梢神経障害は、一次感覚神経の $A\beta$, $A\delta$ 線維の脱髄などを引き起こすことにより生じると考えられてきたが、C線維から遊離される SP もその成因に関与することが、近年の研究により明らかとなってきた。筆者らは、パクリタキセルによる一次感覚神経からの SP 遊離機構を明らかにし、パクリタキセルが $\text{PKC}\beta$ 活性化を介した TRP チャンネルの開口により、SP を遊離させることを示した(図6)。また、近年の報告では、パクリタキセルの末梢神経障害にマクロファージ、脊髄ミクログリアおよびアストロサイトなども関与するこ

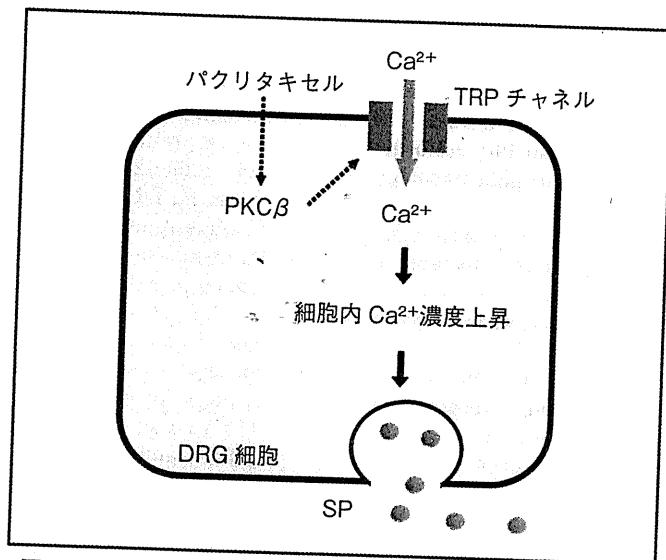


図6 DRG細胞におけるパクリタキセルによるSP遊離機構

とが示唆されている²⁴⁾。これらの知見を統合すると、今後はパクリタキセル投与による末梢神経障害の発生メカニズムの解明には、感覚神経だけでなく非神経細胞の関与も考慮に入れて検討する必要があるだろう。

文献

- 1) Balayssac D, Ferrier J, Descoeur J, et al: Chemotherapy-induced peripheral neuropathies: From clinical relevance to preclinical evidence. *Expert Opin Drug Saf* 10 : 407-417, 2011
- 2) Roeinsky EK, Chaudhry V, Cornblath DR, et al: Neurotoxicity of taxol. *J Natl Cancer Inst Monogr* 15 : 107-115, 1993
- 3) Lee JJ, Swain SM: Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. *J Clin Oncol* 24 : 1633-1642, 2006
- 4) Glants MJ, Choy H, Kearns CM, et al: Paclitaxel disposition in plasma and central nervous systems of human and rats with brain tumors. *J Natl Cancer Inst* 87 : 1077-1081, 1995
- 5) Cavaletti G, Cavaletti E, Oggioni N, et al: Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration. *Neurotoxicology* 21 : 389-393, 2000
- 6) Authier N, Gillet JP, Fialip J, et al: Description of a short-term taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain Res* 887 : 239-249, 2000
- 7) Flatters SJ, Bennett GJ: Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain* 122 : 245-257, 2006
- 8) Jin HW, Flatters SJ, Xiao WH, et al: Prevention of paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy by acetyl-L-carnitine: Effects on axonal mitochondria, sensory nerve fiber terminal arbors, and cutaneous Langerhans cells. *Exp Neurol* 210 : 229-237, 2008
- 9) Tatsushima Y, Egashira N, Kawashiri T, et al: Involvement of substance P in peripheral neuropathy induced by paclitaxel but not oxaliplatin. *J Pharmacol Exp Ther* 337 : 226-235, 2011
- 10) Sendo T, Itoh Y, Goromaru T, et al: Role of substance P in hypersensitivity reactions induced by paclitaxel, an anticancer agent. *Peptides* 25 : 1205-1208, 2004
- 11) Tamura T, Sasaki Y, Nishiwaki Y, et al: Phase I study of paclitaxel by three-hour infusion: Hypotension just after infusion is one of the major dose-limiting toxicities. *Jpn J Cancer*

- cer Res 86 : 1203-1209, 1995
- 12) Miyano K, Tang HB, Nakamura Y, et al: Paclitaxel and vinorelbine, evoked the release of substance P from cultured rat dorsal root ganglion cells through different PKC isoform-sensitive ion channels. *Neuropharmacology* 57 : 25-32, 2009
 - 13) Tang HB, Li YS, Arihiro K, et al: Activation of the neurokinin-1 receptor by substance P triggers the release of substance P from cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* 3 : 42, 2007
 - 14) Tang HB, Li YS, Miyano K, et al: Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* 55 : 1405-1411, 2008
 - 15) Tang HB, Nakata Y: The activation of transient receptor potential vanilloid receptor subtype 1 by capsaicin without extracellular Ca^{2+} is involved in the mechanism of distinct substance P release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 377 : 325-332, 2008
 - 16) Kondo T, Obata K, Miyoshi K, et al: Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats. *Gut* 58 : 1342-1352, 2009
 - 17) Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN: TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: Interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci* 29 : 1568-1578, 2009
 - 18) Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, et al: TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124 : 1269-1282, 2006
 - 19) Nilius B: TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772 : 805-812, 2007
 - 20) Patapoutian A, Peier AM, Story GM, et al: ThermoTRP channels and beyond: Mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4 : 529-539, 2003
 - 21) Facer P, Casula MA, Smith GD, et al: Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. *BMC Neurol* 7 : 11, 2007
 - 22) Venkatachalam K, Montell C: TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76 : 387-417, 2007
 - 23) Grant AD, Cottrell GS, Amadesi S, et al: Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J Physiol* 578 : 715-733, 2007
 - 24) Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Kuskowski MA, et al: An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Brain Res* 1168 : 46-59, 2007

※ ※ ※

GABA_B Receptors Do Not Internalize After Baclofen Treatment, Possibly Due to a Lack of β -Arrestin Association: Study With a Real-Time Visualizing Assay

YUKA SUDO,^{1,2} MINORU HOJO,³ YUKO ANDO,³ MASAFUMI TAKADA,³ HIROAKI MURATA,³ SHINJI KURATA,⁴ NORIYUKI NISHIDA,¹ AND YASUHITO UEZONO^{1,2*}

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8523, Japan

²Division of Cancer Pathophysiology, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan

³Department of Anesthesiology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8501, Japan

⁴Department of Clinical Physiology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8588, Japan

KEY WORDS β -arrestin; GABA_B receptor; internalization; endocytosis; GRK

ABSTRACT The mechanism of agonist-induced GABA_B receptor (GABA_BR) internalization is not well understood. To investigate this process, we focused on the interaction of GABA_BR with β -arrestins, which are key proteins in the internalization of most of the G protein-coupled receptors, and the agonist-induced GABA_BR internalization and the interaction of GABA_BR with β -arrestin1 and β -arrestin2 were investigated in real time using GABA_BR and β -arrestins both of which were fluorescent protein-tagged. We then compared these profiles with those of μ -opioid receptors (μ OR), well-studied receptors that associate and cointernalize with β -arrestins. When stimulated by the specific GABA_BR agonist baclofen, GABA_BR composed of GABA_{B1a}R (GB_{1a}R) and fluorescent protein-tagged GABA_{B2}R-Venus (GB₂R-V) formed functional GABA_BR; they elicited G protein-activated inwardly rectifying potassium channels as well as nontagged GABA_BR. In cells coexpressing GB_{1a}R, GB₂R-V, and β -arrestin1-Cerulean (β arr1-C) or β -arrestin2-Cerulean (β arr2-C), real-time imaging studies showed that baclofen treatment neither internalized GB₂R-V nor mobilized β arr1-C or β arr2-C to the cell surface. This happened regardless of the presence of G protein-coupled receptor kinase 4 (GRK4), which forms a complex with GABA_BR and causes GABA_BR desensitization. On the other hand, in cells coexpressing μ OR-Venus, GRK2, and β arr1-C or β arr2-C, the μ OR molecule formed μ OR/ β arr1 or μ OR/ β arr2 complexes on the cell surface, which were then internalized into the cytoplasm in a time-dependent manner. Fluorescence resonance energy transfer assay also indicated scarce association of GB₂R-V and β -arrestins-C with or without the stimulation of baclofen, while robust association of μ OR-V with β -arrestins-C was detected after μ OR activation. These findings suggest that GABA_BRs failure to undergo agonist-induced internalization results in part from its failure to interact with β -arrestins. **Synapse 00:000-000, 2012.** © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

GABA_B receptors (GABA_BRs) play important roles in controlling inhibitory neurotransmission by GABA in the central and peripheral nervous system (Bettler et al., 2004). The receptors belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) family and are the first discovered obligatory heterodimer consisting of GABA_{B1} receptor (GB₁R) and GABA_{B2} receptor (GB₂R) (Agnati

Contract grant sponsors: Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan; National Cancer Research and Development Fund; Foundations for Daiichi-Sankyo Co. Ltd.; Showa-Yakuhin Kako, Co. Ltd.; Nippon Shinyaku Co. Ltd.; Asbio Pharma Co. Ltd.; Tsumura Co. Ltd.; and Ministry of Education, Culture, Sports Science, and Technology of Japan

*Correspondence to: Yasuhito Uezono, Division of Cancer Pathophysiology, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan. E-mail: yuezono@ncc.go.jp

Received 24 February 2012; Accepted 11 April 2012

DOI 10.1002/syn.21565

Published online 20 April 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

et al., 2003; Bettler et al., 2004; Gainetdinov et al., 2004; Uezono et al., 2006). This GB₁R/GB₂R heterodimerization is indispensable for the molecule to locate within the plasma membrane (Couve et al., 1998). Additionally, the two molecules have different functions within the dimers: agonists bind only to GB₁R, while GB₂R transduces the signal through the trimeric G proteins (G α and G $\beta\gamma$ subunits) to downstream molecules (Galvez et al., 2001; Uezono et al., 2006).

Desensitization and subsequent internalization of these receptors by agonist stimulation is important to avoid their overstimulation and to terminate their agonist-induced signaling (Kelly et al., 2008). The initial step in this process is thought to involve phosphorylation of the receptors by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) or second-messenger-regulated kinases, such as protein kinase C or A (Kelly et al., 2008). β -arrestins, composed of β -arrestin1 (β arr1) and β -arrestin2 (β arr2), were identified as proteins that have the ability to desensitize GPCR, and further recognized as endocytic adapters and trafficking mediators of a variety of cell-surface receptors, including GPCRs (Shenoy and Lefkowitz, 2011). Once receptors are phosphorylated by several kinases, β arr1 or β arr2 bind to the phosphorylated receptors, forming the receptor/ β -arrestin complex, which is then internalized (Gainetdinov et al., 2004).

Phosphorylation of GABA_BR is unique compared with that of common GPCRs such as β -adrenergic receptor and the μ -opioid receptors (μ OR). We and others have previously shown that GRK4 and GRK5 but not GRK2, GRK3, or GRK6 are involved in the GABA- or baclofen-mediated GABA_BR desensitization processes (Ando et al., 2011; Kanaide et al., 2007; Perroy et al., 2003). However, the receptors were not phosphorylated by these kinases (Kanaide et al., 2007; Perroy et al., 2003). Accordingly, GRK4 and GRK5 seem to function solely as anchoring proteins, not as kinases (Kanaide et al., 2007; Perroy et al., 2003; Terunuma et al., 2010).

There are contradictory reports regarding agonist-induced GABA_BR internalization, with recent studies demonstrating that GABA_BR is not internalized by agonist stimulation (Fairfax et al., 2004; Grampp et al., 2007; Perroy et al., 2003; Vargas et al., 2008), while earlier studies showed the opposite. In addition, one report has shown that GABA_BR is constitutively internalized and that this process is accelerated by GABA_BR-agonist stimulation (Wilkins et al., 2008).

Although β -arrestins are key proteins in most GPCR internalization, baclofen did not recruit β -arrestins to the plasma membrane and failed to form a complex with GABA_BR (Fairfax et al., 2004; Perroy et al., 2003). However, the studies reporting these results were not performed in real time. More recent reports have shown that GABA_BR is constitutively internalized into the cytosol without receptor activa-

tion (Grampp et al., 2007; Vargas et al., 2008; Wilkins et al., 2008). Although investigation of activation and inactivation steps of GABA_BR are necessary to understand GABA-induced regulation in the central and peripheral nervous systems, one of the most important receptor-mediated signaling such as interaction of GABA_BR and β -arrestins is not well understood.

In this study, we focused on the interaction of GABA_BR with β -arrestins. We used a real-time analysis with and without stimulation of the agonist. Additionally, we visually analyzed protein-complex formation using fluorescent protein-fused GABA_BR with fluorescent protein-fused β -arrestins in a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay developed by our laboratory (Ando et al., 2011; Kanaide et al., 2007; Uezono et al., 2006). FRET is a useful tool to quantify molecular dynamics in biophysics and biochemistry, such as protein-protein interactions and protein conformational changes (Miyawaki and Tsien, 2000). We compared results from real-time visualization and FRET efficiency of fluorescent protein-tagged GABA_BR complexed to β -arrestins with corresponding results from fluorescent protein-tagged μ OR combined to β -arrestins. μ OR is well known to interact with β -arrestins and consequently be internalized (Gainetdinov et al., 2004; Groer et al., 2011). This analysis showed that GABA_BR did not associate with β -arrestin, regardless of agonist stimulation.

MATERIALS AND METHODS

Drugs and chemicals

Baclofen was purchased from Tocris Cookson (Bristol, UK). DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin) was purchased from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals used were of analytical grade and were obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan).

Construction of cDNAs

Human GB_{1a}R and GB₂R clones were generously provided by Dr. N.J. Fraser (Glaxo Wellcome, Stevenage, UK). Cerulean, a brighter variant of cyan fluorescent protein (Rizzo et al., 2004) was provided by Dr. D.W. Piston (Vanderbilt University, Nashville, TN), and Venus, a brighter variant of yellow fluorescent protein (Nagai et al., 2002), was provided by Dr. T. Nagai (Hokkaido Univ., Sapporo, Japan). Human GRK4 was provided by Dr. A. De Blasi (Neuromed, IRCCS, Pozzilli, Italy); bovine GRK2 were provided by Dr. J.L. Benovic (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA). Rat β arr1 and β arr2 were provided by Dr. Nagayama (Nagasaki Univ., Nagasaki, Japan). Rat μ OR was provided by Dr. N. Dascal (Tel Aviv Univ., Tel Aviv, Israel). Venus-fused GABA_BR and μ OR, and Cerulean-fused β arr1 and β arr2 were created by ligating their cDNA sequences into the *NotI* I sites of the corresponding Venus or Cerulean sites, as reported previously (Ando

et al., 2011; Kanaide et al., 2007; Uezono et al., 2006). All cDNAs for transfection into cells were subcloned into pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA).

Cell culture and transfection

BHK cells were grown in Dulbecco's modified eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) at 37°C and 5% CO₂. For transfection experiments, BHK cells were seeded at a density of $1-2 \times 10^5$ cells/35-mm in glass-bottomed culture dishes (World Precision Instrument, Sarasota, FL) for 24 h. Transient transfection was then performed with Hilymax transfection reagent (Dojindo, Kumamoto, Japan) using a total of 0.6 μ g cDNA, according to the manufacturer's protocol. Cells were analyzed under confocal microscopy 24 h after transfection.

Real-time monitoring of the mobilization of receptors and β -arrestins fused to fluorescence proteins

We constructed fluorescent-protein-fused GB₂R-V, μ OR-V, β arr1-C, and β arr2-C molecules to visually monitor mobilization of receptors and β -arrestins. BHK cells that coexpressed GB₂R-V with β arr1-C or β arr2-C were treated with baclofen for the indicated periods, then placed in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-buffered saline. Translocation or complex formation of GB₂R-V and β arr-C was observed for 120 min. Cells coexpressing μ OR-V and β arr1-C or β arr2-C were treated with the μ OR agonist DAMGO in the same manner. For visualization, a 63 \times magnification and 1.25 numerical aperture oil immersion objective with pinhole was used. Both, Cerulean and Venus were excited by a 458-nm laser, and images were obtained by placing the dish onto a stage in a Zeiss LSM510 META confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), as described previously (Kanaide et al., 2007; Uezono et al., 2006).

Confocal microscopy for FRET analysis

For the analysis of protein-complex formation of GB₂R-V and μ OR-V with β -arr1-C or β -arr2-C, we used the FRET assay. GB_{1a}R or GB₂R-V was coexpressed with either β -arr1-C or β -arr2-C in BHK cells. These BHK cells were cultured in 35-mm glass-bottomed dishes and cotransfected with each of DNA. Both, Cerulean and Venus were excited by a 458-nm laser, and images were obtained by placing the dish onto a stage in a Zeiss LSM510 META confocal microscope.

Photobleaching and calculation of FRET efficiency

To confirm FRET to find association of Cerulean- and Venus-fused proteins, we monitored acceptor pho-

to-bleaching analysis in BHK cells that coexpressed GB_{1a}R, GB₂R-V, β arr2-C, and GRK4, or cells that coexpressed μ OR-V, β arr2-C, and GRK2. FRET was measured by imaging Cerulean before and after photobleaching Venus with 100% intensity from a 514-nm argon laser for 1 min, a duration that efficiently bleached Venus with little effect on Cerulean. An increase of donor fluorescence (Cerulean) was interpreted as evidence of FRET from Cerulean to Venus. All experiments were analyzed from at least six cells with three independent regions from their plasma membranes. As a control, we examined the FRET efficiency of the unbleached area of plasma membranes from at least three areas in the same cell. In some cases, we performed the photobleaching assay using BHK cells coexpressing Venus + Cerulean, or GB_{1a}R-C + GB₂R-V + β arr2 + GRK4 as negative and positive controls of FRET, respectively. The photobleaching assay was performed as previously described (Kanaide et al., 2007).

FRET efficiency was calculated using emission spectra before and after acceptor photobleaching of Venus (Miyawaki and Tsien, 2000). According to this procedure, if FRET is occurring, then photobleaching of the acceptor (Venus) should yield a significant increase in fluorescence of the donor (Cerulean). Increase of donor spectra due to desensitized acceptor was measured by the Cerulean emission (at 488 nm) from spectra before and after acceptor photobleaching. FRET efficiency was then calculated using the equation $E = 1 - I_{DA}/I_D$, where I_{DA} is the peak of donor (Cerulean) emission in the presence of the acceptor, and I_D is the peak in the presence of the sensitized acceptor, as previously described (Riven et al., 2003). Before and after this bleaching, Cerulean images were collected to assess changes in donor fluorescence.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Differences between two groups were examined for statistical significance using paired *t* test. GraphPad Prism software (San Diego, CA) was used to analyze data for statistical significance and to fit curves. For comparisons between multiple groups, one-way analysis of variance was used, followed by Scheffe's test. A *P* value of less than 0.05 was classified as statistically significant.

RESULTS

Fluorescence-tagged GABA_BR activation of GIRK channels

In this study, we used fluorescence protein-tagged GABA_BR instead of wild type GABA_BR. This is because, as we previously showed, fluorescence-tagged GB_{1a}R-Venus or GB₂R-Venus behave like non-tagged, wild type GABA_BR. That is, they display G

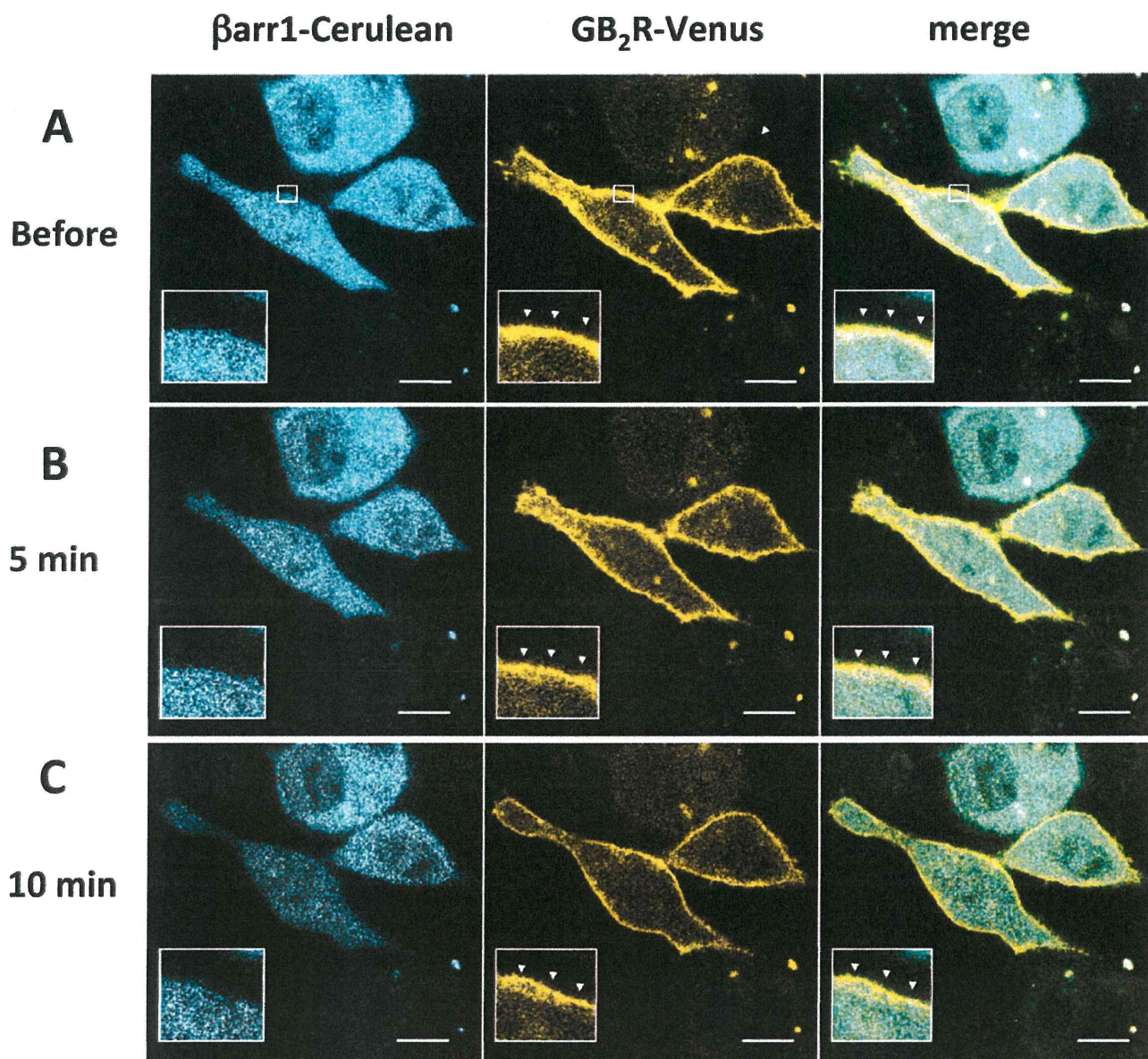


Fig. 1. Confocal imaging of the translocation of GB₂R-V and β arr2-C in BHK cells expressing GB_{1a}R, GB₂R-V, β arr2-C, and GRK4. Visualization of GB₂R-V and β arr2-C in BHK cells before (A), and 5 min (B) and 10 min (C) after stimulation with 10^{-4} M baclofen. Arrowheads show GB₂R-V on the plasma membranes. Similar results were obtained in at least six independent experiments. Calibration bar = 10 μ m.

protein-activated inwardly rectifying potassium-channel activation, channels known to be activated by GABA_BR stimulation (Ando et al., 2011; Kanaide et al., 2007; Uezono et al., 1998, 2006).

Activation of GABA_BR did not induce receptor internalization

We first determined the distribution and translocation of functional GABA_BR and β -arrestins in BHK cells and examined whether β -arrestins were able to associate with GABA_BR in response to receptor stimulation. In living BHK cells, coexpressing

GB_{1a}R/GB₂R-V and GRK4 with β arr1-C or β arr2-C, both β arr1 and β arr2 proteins were diffusely distributed in the cytosol (Figs. 1 and 2). GB₂R-V was expressed exclusively on the plasma membrane (Figs. 1 and 2). Although expression of GB_{1a}R on the plasma membrane was not found, our previous reports showed that GB_{1a}R and GB₂R formed heterodimers on the plasma membranes during the same experimental procedure (Uezono et al., 2006). In this study, when cells expressing GB_{1a}R/GB₂R-V, β arr2-C, and GRK4 received baclofen at 10^{-4} M for 5 min or GABA at 10^{-4} M for 5 min (data not shown), both agonists failed to mobilize β arr1-C from the cytosol to plasma

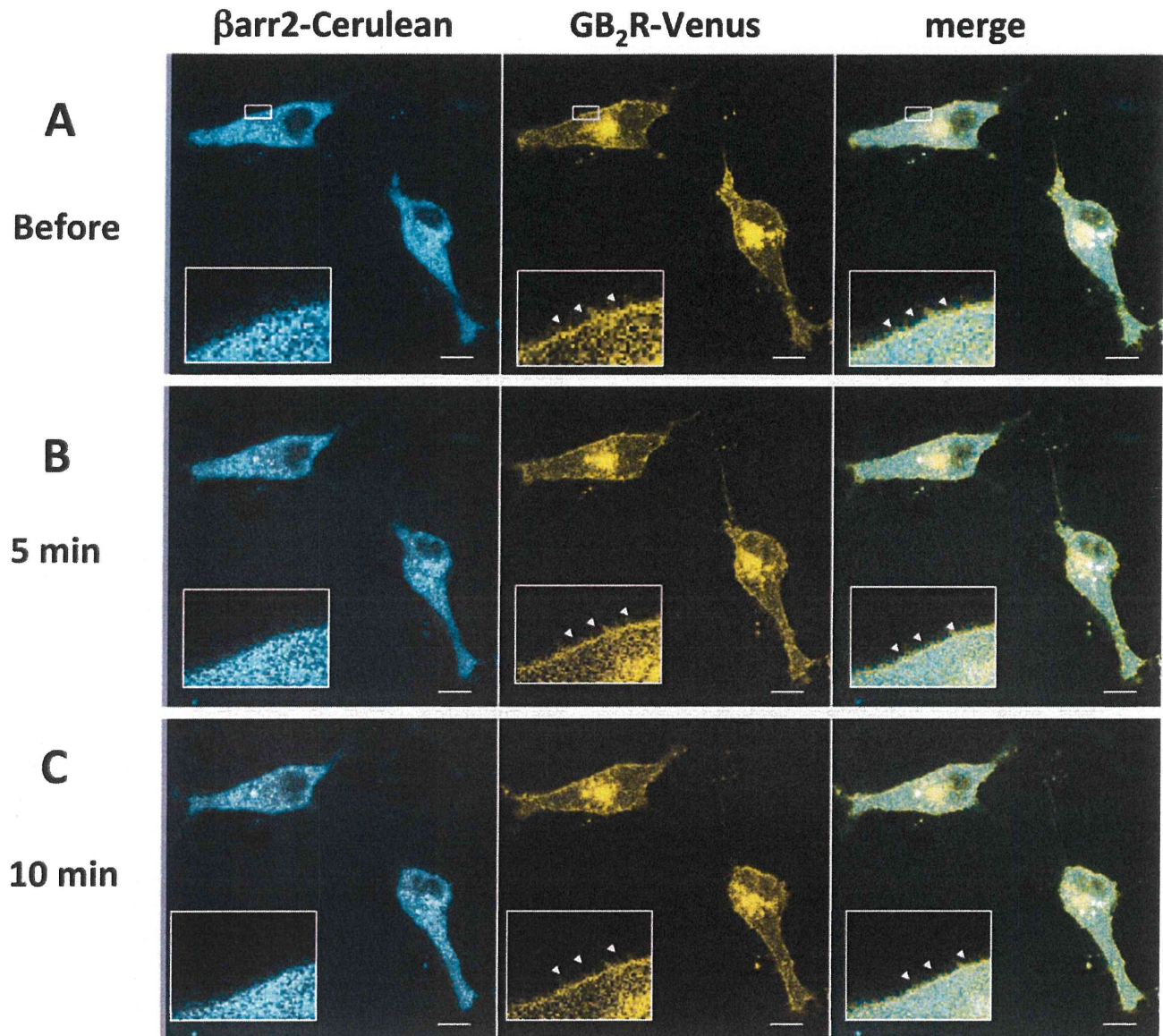


Fig. 2. Confocal imaging of the translocation of GB₂R-V and β arr1-C in BHK cells expressing GB_{1a}R, GB₂R-V, β arr1-C, and GRK4. Visualization of the GB₂R-V and β arr1-C in BHK cells before (A), and 5 min (B) and 10 min (C) after stimulation with 10^{-4} M baclofen. Arrowheads show GB₂R-V on the plasma membranes. Similar results were obtained in at least six independent experiments. Calibration bar = 10 μ m.

membranes (Fig. 1) for up to 120 min (data not shown). The concentration of baclofen and GABA and duration chosen were those causing submaximal cellular responses and the translocation of GRK4 to the plasma membrane, with subsequent formation of the GB₂R/GRK4 complex that would desensitize GABA_BR (Ando et al., 2011; Kanaide et al., 2007; Uezono et al., 1998, 2006). Similar results were observed in cells coexpressing β arr2-C instead of β arr1-C (Fig. 2).

For the real-time critical measurement of the intensity of GB₂R-V combined with β arr2-C or β arr1-C, we calculated the intensity strength within the cytosolic area, shown as the red line in Figure 3A. Results showed that, when activated by baclofen at 10^{-4} M,

intensities of both GB₂R-V and β arr2-C gradually decreased. This was possibly due to quenching by exposure to laser power (Fig. 3). As shown in Figure 3C, there were almost no changes, for up to 120 min, in the intensities of GB₂R-V and β arr2-C after stimulation by baclofen (data not shown), indicating no internalization of GB₂R-V into the cytosol and no movement of β arr2-C at any time examined. Similar results were observed in cells expressing GB₂R-V with β arr1-C (Fig. 3D). We also examined constitutive internalization of GB₂R in BHK cells coexpressing GB_{1a}R/GB₂R-V, β arr2-C, and GRK4; for up to 120 min, we were unable to detect any internalization profiles of GB₂R-V or any mobilization of β arr2-C (data not shown).

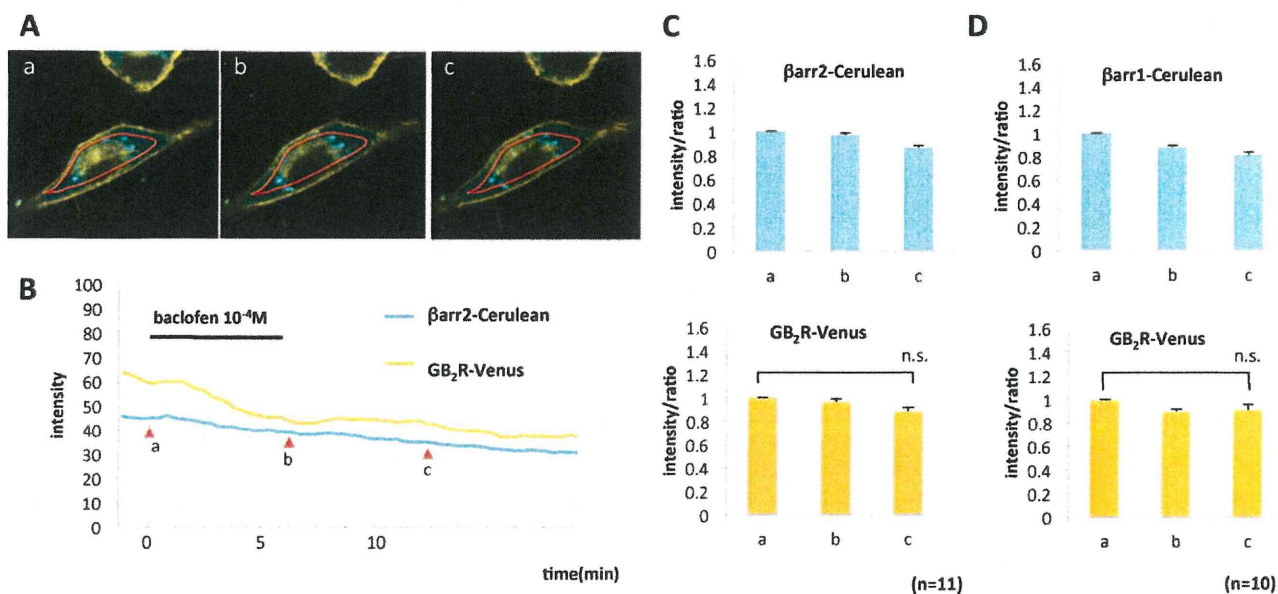


Fig. 3. Time courses of changes in intensities of GB₂R-V, betaarr2-C, or betaarr1-C in BHK cells. **A:** Confocal imaging of the BHK cells expressing GB_{1a}R, GB₂R-V, betaarr2-C, and GRK4. For calculation, intensities of the areas within the red line (cytosol) were measured. **B:** Changes in intensities before (a), and 5 min (b) and 10 min (c) after stimulation of baclofen (10^{-4} M) in real time. **C:** Intensity ratio of betaarr2-C and GB₂R-V at the indicated points as in (B). **D:** Intensity ratio of betaarr1-C and GB₂R-V at the indicated points as in (B). Data were expressed as intensity ratio of the level at “b” or “c”/the level at “a.”

We then investigated μ OR internalization induced by the μ OR agonist DAMGO. In cells expressing μ OR-V, GRK2, and betaarr1-C or betaarr2-C, we applied DAMGO at 10^{-7} M for 5 min, the concentration and duration that cause submaximal μ OR activation and receptor desensitization. This resulted in dramatic translocation of betaarr1-C and betaarr2-C into the plasma membranes and subsequent internalization with μ OR-V (Figs. 4 and 5). In the same cells, betaarr1-C or betaarr2-C were translocated and concentrated into dot-like shapes on the plasma membranes for the first 4–5 min stimulation by DAMGO, as indicated by arrowheads. Consequently, betaarr1-C or betaarr2-C was eventually internalized into the cytosol (Figs. 4 and 5).

DAMGO-induced betaarr1-C or betaarr2-C internalization and translocation into the cells were also measured, as shown in Figure 6. The intensity of μ OR-V was increased by application of DAMGO, and small granules were observed, shown within the area of the red line (Fig. 6A). In addition, corresponding decreases of betaarr2-C intensity were also detected. As shown in Figures 6B and 6C, increases in the intensities of μ OR-V and decreases in betaarr2-C were detected in a time-dependent manner (Figs. 6B and 6C). Similar results were observed in cells expressing μ OR-V, GRK2, and betaarr1-C instead of betaarr2-C (Fig. 6D).

FRET and acceptor photobleaching analysis of BHK cells coexpressing GB_{1a}R and GB₂R-V with betaarr2-C

Because betaarr1-C or betaarr2-C was translocated into the plasma membranes following μ OR activation, but

not following GABA_BR activation, we used FRET analysis to determine whether betaarr2-C interacts and forms a protein complex with GB₂R. We used BHK cells that coexpressed GB_{1a}R, GB_{B2}R-V, betaarr2-C, and GRK4 or cells that coexpressed μ OR-V, betaarr2-C, and GRK2.

In such cells, photobleaching analysis of baclofen-stimulated cells demonstrated that FRET efficiency at the cell membranes was not remarkably changed at 5 min after stimulation with baclofen at 10^{-4} M (Fig. 7A). FRET efficiency before stimulation, and 1, 2, 5, 10, 30, and 60 min (and 120 min, data not shown) after stimulation was not significantly changed (Fig. 7B). Similar results were obtained when we used betaarr1-C instead of betaarr2-C (data not shown). In contrast, photobleaching analysis of DAMGO-stimulated BHK cells demonstrated that FRET efficiency was increased 1 min after stimulation and reached maximal value at 5 min, then gradually decreased for 30 min (Fig. 7B), demonstrating that the receptor/betaarr2-C complex was formed by stimulation of the agonist.

DISCUSSION

Recent study has shown that DAMGO activation of μ OR recruited both betaarr1 and betaarr2 to the μ OR then cause robust internalization in mouse embryonic fibroblasts (mef; Groer et al., 2011). They showed no internalization profiles of μ OR by DAMGO in mef derived from betaarr1/betaarr2 knockout mice. Furthermore, betaarr1 or betaarr2 reintroduction into these mef

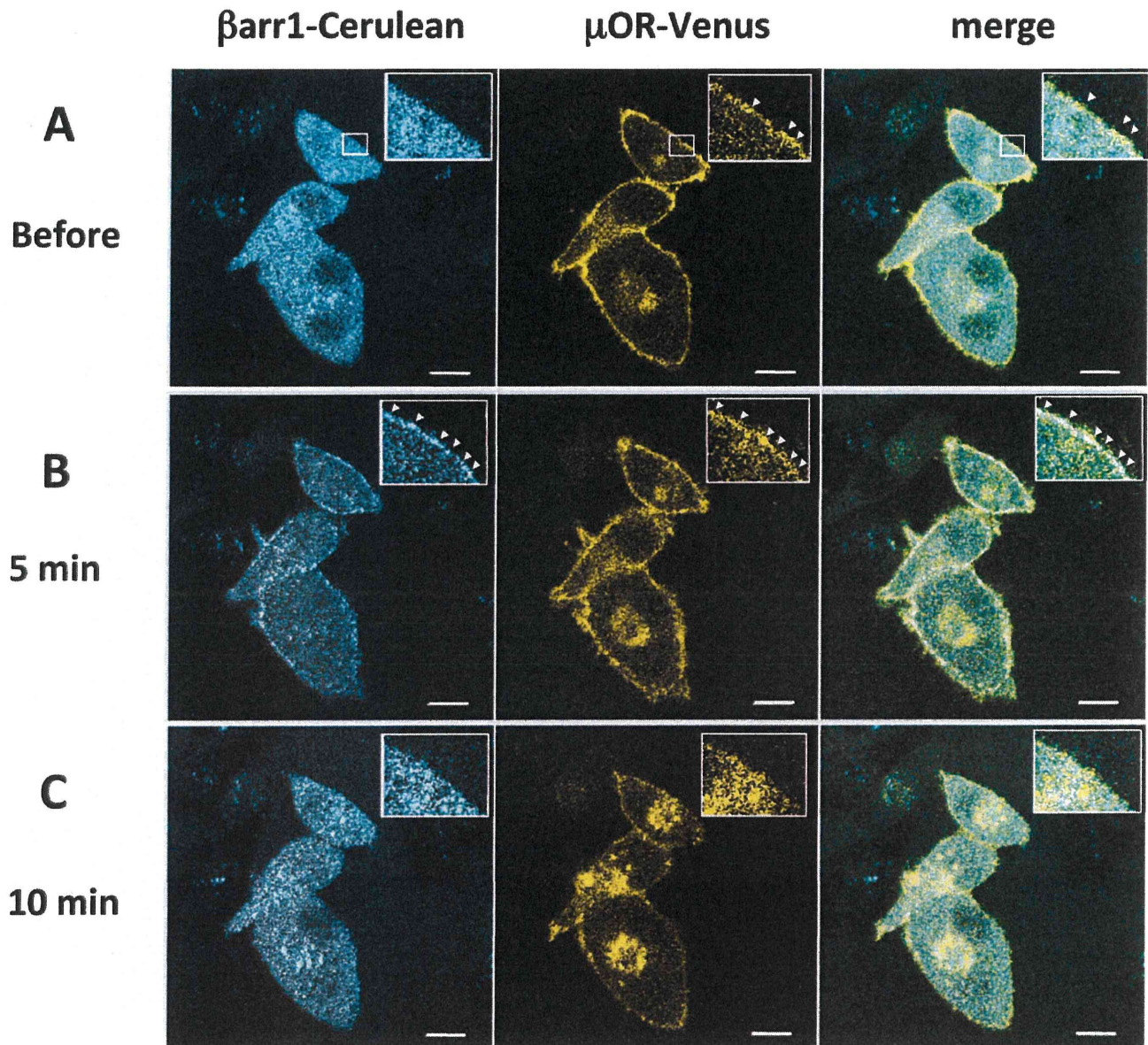


Fig. 4. Confocal imaging of the translocation of μ OR-V and β arr1-C and in BHK cells expressing μ OR-V, β arr1-C, and GRK2. Visualization of μ OR-V and β arr1-C in BHK cells before (A) and 5 min (B) and 10 min (C) after stimulation with 10^{-7} M DAMGO. Arrowheads show μ OR and β arr1-C on the plasma membranes. Similar results were obtained in at least six independent experiments. Calibration bar = 10 μ m.

rescued DAMGO-induced μ OR internalization (Groer et al., 2011), demonstrating that interaction of β arr1 or β arr2 with μ OR is required for μ OR internalization.

In this study, we showed that fluorescent protein-tagged GABA_BR failed to internalize on stimulation by the GABA_BR agonist baclofen or GABA. This was true in the presence of β arr1, β arr2, and even GRK4, one of the kinases that causes GABA_BR desensitization (Kanaide et al., 2007; Perroy et al., 2003). We also showed that neither β arr1 nor β arr2 were able to form a GB₂R-V/ β -arrestins-C complex on the plasma membrane before or after stimulation with

baclofen, which was determined by FRET analysis. By contrast, using the same experimental system, μ OR-Venus was found to internalize to the cytosol on stimulation by μ OR agonist DAMGO, with the formation of μ OR/ β -arrestin complex on the cell surface in the presence of GRK2, as previously shown by Groer et al. (2011). These results suggest lack of β -arrestin association with GABA_BR correlated with in the lack of internalization of GABA_BR by baclofen.

We further showed, with a real-time assay, that stimulation with baclofen for up to 120 min failed to cause the internalization of GABA_BR into the cytosol. This result is in accordance with several previous