

quences and therapeutic opprtunities. *in* Wall and Melzack's textbook of pain (5th ed.), ed by McMahon SB, Koltzenburg M. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 1087-1097, 2006

4) Shimoyama M, TanakaK, Hasue F, et al : A

mouse model of neuropathic cancer pain. *Pain* **99** : 167-174, 2002

5) 佐々木淳, 倉石 泰 : 種々の神経因性疼痛モデル. *日薬理誌* **127** : 151-155, 2006

がん対策推進基本計画に基づく 緩和ケア推進・研究の今後

独立行政法人国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究部部長
上園 保仁

はじめに

前号第2回セミナーでは、がんの痛みをなくすための基礎研究についてその一端を紹介いたしました。今回は、多くの進行がん患者にみられる疲労倦怠感、やせ、食思不振の症状をきたすがん悪液質改善のための基礎研究のお話をしようと思いましたが、それは次回に譲ります。2010年6月に厚生労働省より、2007年に策定されたがん対策推進基本計画の中間報告が発表されました。今回は、そのうち緩和ケアに関する内容を紹介するとともに、緩和ケア推進ならびに緩和ケア研究の今後の流れについて紹介させていただきます。

わが国におけるがん対策のあゆみ

わが国では1981年からがんが死亡原因の第1位となり、がん撲滅対策が国家プロジェクトとなりました。政府は、1984年より「対がん10か年総合戦略」、1994年より「がん克服新10か年戦略」を策定・実施し、さらに2004年から「第3次対がん10か年総合戦略」を策定し、現在その施策を推進中です。厚生労働省としても2005年にがん対策全般を総合的に推進するため「がん対策推進本部」を設置し、同年8月にはがん対策の飛躍的な向上を目的とした「がん対策推進アクションプラン2005」が公表されました(表1)。

このように、政府としてがん対策に取り組んで

表1. わが国におけるがん対策施策の歩み

1963年	厚生省がん研究助成金制度の発足
1981年	悪性新生物が死亡原因の第1位となる
1984年	対がん10か年総合戦略の策定(～平成5(1993)年度)
1994年	がん克服新10か年戦略の策定(～平成15(2003)年度)
2004年	第3次対がん10か年総合戦略の策定(～平成25(2013)年度)
2005年5月	がん対策推進本部の設置(厚生労働省)
2005年8月	がん対策推進アクションプラン2005の公表
2006年4月	がん対策推進室の設置(厚生労働省健康局総務課)
2006年6月	がん対策基本法の成立
2007年4月	がん対策基本法の施行
2007年6月	がん対策推進基本計画の策定(閣議決定)

(厚生労働省健康局総務課がん対策室資料(http://ganjoho.ncc.go.jp/data/public/statistics/backnumber/lisaa000000068m-att/cancer_control.pdf)より一部改変)

いるものの、国民の3人に1人はがんで死亡し、一生の間に国民の2人に1人ががんに罹患するという状況、今後は2人に1人ががんで死亡すると推計されるに至り、さらに手厚いがん対策が望まれてきました。そうしたなか、がん患者を中心としてがん対策に関わる法律の制定が叫ばれ、2006年6月「がん対策基本法」が成立し、2007年4月に施行されました。さらに、本法律に基づき2007年6月に「がん対策推進基本計画」が策定されたのは皆さんも記憶に新しいことと思いません(表1)。

推進、②がん医療を日本中どこでも同じように受けることができる均てん化の促進、③その他がん研究促進などを掲げています。また、本法律は国と地方公共団体との密接な関連のもとに協議され実施されることを求めています。そして、本法律に基づいて策定されたのが、「がん対策推進基本計画」(図2)です。これは、がん患者およびその家族が委員として参画している「がん対策推進協議会」で議論された意見をもとに策定(2007年6月)された計画です。

がん対策基本法の概略

がん対策基本法の概略を、図1に示します。これは、がん対策を総合的に策定し実施するための基本法律であり、①がんの予防および早期発見の

がん対策推進基本計画の概要

具体的には、平成19(2007)年度～平成23(2011)年度までの5年間で、がん対策基本法に基づき行うがん対策の総合的指針を掲げたものです。その基本方針は、①「がん患者を含めた国民」の視点

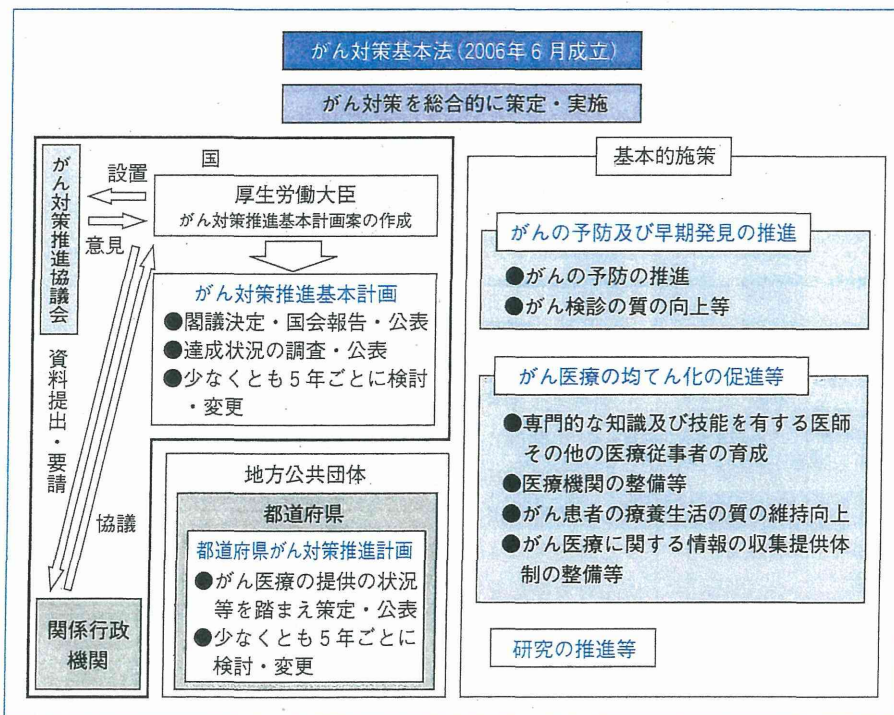


図1. がん対策基本法の概略

(厚生労働省ホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/seisaku/24.html>)より)



1 趣旨

がん対策推進基本計画は、がん対策基本法に基づき政府が策定するものであり、具体的には、長期的視点に立ちつつ、平成19(2007)年度から平成23(2011)年度までの5年間を対象として、がん対策の総合的かつ計画的な推進を図るため、がん対策の基本的方向について定めるとともに、都道府県がん対策推進計画の基本となるものである。

今後は、「がん患者を含めた国民が、がんを知り、がんと向き合い、がんに負けることのない社会」の実現を目指すこととする。

2 基本方針

- 「がん患者を含めた国民」の視点に立ったがん対策を実施すること。
- 全体目標の達成に向け、重点的に取り組むべき課題を定め、分野別施策を総合的かつ計画的に実施すること。

3 重点的に取り組むべき課題

(1)放射線療法及び化学療法の推進並びにこれらを専門的に行う医師等の育成

我が国のがん医療については、手術の水準が世界の中でもトップクラスであるのに対して、相対的に放射線療法及び化学療法の提供体制等が不十分であることから、これらの推進を図り、手術、放射線療法及び化学療法を効果的に組み合わせた集学的治療を実現する。

(2)治療の初期段階からの緩和ケアの実施

がん患者の多くは、がんと診断された時から身体的な苦痛や精神心理的な苦痛を抱えており、また、その家族も様々な苦痛を抱えていることから、治療の初期段階から緩和ケアが実施されるようにする。

(3)がん登録の推進

がん登録は、がん対策の企画立案や評価に際しての基礎となるデータを把握・提供するために必要不可欠なものであるが、我が国では、諸外国と比較してもその整備が遅れていることから、がん登録を円滑に行うための体制を整備する。

がん患者のうち放射線治療(併用も含む)を実施している患者数

国	実施している患者数 (%)
米国	66%
ドイツ	60%
英国	56%
日本	25%

出典) 第3回がん対策推進協議会における中川恵一委員(東京大学)からの提出資料をもとに作成

治療の初期段階からの緩和ケアの実施

〈現状〉

がん治療 (診断) 緩和ケア (死亡)

↓

〈今後〉

がん治療 (診断) 緩和ケア (死亡)

(WHO, 1990)

4 全体目標【10年以内】

- がんによる死亡者の減少(75歳未満の年齢調整死亡率の20%減少)
- すべてのがん患者及びその家族の苦痛の軽減並びに療養生活の質の維持向上

図2. がん対策推進基本計画の概要

(厚生労働省ホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/06/dl/s0615-1b.pdf>)より)

に立ったがん対策を実施すること、②全体目標達成のために重点的に取り組む課題を具体的に定め、最終的に(1)75歳未満のがん年齢調整死亡率の20%減少、(2)すべてのがん患者およびその家族の苦痛を軽減することと療養生活の質(QOL)の維持向上を目指すものです。

さらに、がん対策推進基本計画では重点的に取り組むべき3課題が取り上げられました。

- ①放射線療法及び化学療法の推進並びにこれらを専門的に行う医師等の育成
- ②治療の初期段階からの緩和ケアの実施
- ③がん登録の推進

このなかで、特に②治療の初期段階からの緩和ケアの実施とそれに加えて全体目標であるすべてのがん患者とその家族の苦痛軽減とQOL向上の達成に至る計画を紹介し、5年計画の3年が過ぎた2010年6月15日に発表されたがん対策推進基本計画中間報告書を通して、緩和ケア推進ならびに緩和ケア研究の何が順調に進捗しており何が未達成なのか、そして今後の計画(第二次がん対策推進基本計画)立案にあたっての課題などについて、中間報告書をもとに話を進めていきたいと思いをします。

がん対策推進基本計画中間報告書

がん対策推進基本計画中間報告書においては、基本計画で掲げた大きな2つの全体目標についての進捗度、3つの重点課題についての進捗度などが報告され、それらの結果に基づいた今後のあり方についての提言が行われています。そのなかで、緩和ケア領域に絞って内容を簡単に説明します。まず、全体目標については、

- ・75歳未満のがん死亡率については、おおむね順調に減少していること
- ・がん患者とその家族の苦痛軽減ならびにがん患

者のQOL向上については、まずその評価法を確立し、それに基づき評価を行うべきであること、また目標達成には緩和ケアの推進および医療と介護の連携といった生活支援が重要であること

が挙げられました。

また、3つの重点項目のうちの②治療の初期段階からの緩和ケアの実施については、

個別目標①：緩和ケア研修を行うこと

個別目標②：10年以内に緩和ケアの知識、技術を習得した医師を増やすこと

個別目標③：医療用麻薬の消費量の増加を緩和ケアの提供体制の整備状況を計るための参考指標とすること

が挙げられました。

個別目標①、②については、

- ・10年以内(運用において5年以内と定められた)にすべてのがん診療に関わる医師が研修会などで緩和ケアの基本知識を得るための方策として、緩和ケア研修会の回数と質を確保するための「がん診療に携わる医師に対する緩和ケア研修会の開催指針」が策定され、それに沿った研修会が実施されました。研修会の修了証書を取得した医師は、2010年3月で11,254人にのぼりました。
- ・2008年3月にがん拠点病院の指定要件を見直し、身体症状緩和に携わる医師、精神症状の緩和に携わる医師および看護師などから構成される緩和ケアチームを整備し、組織上明確にすることが定められました。さらに、外来において専門的な緩和ケアを行うこと、緩和ケア医師と主治医が話し合えるカンファレンスを開催すること、緩和ケア相談窓口を開設すること、緩和ケア研修を毎年行うことが指定要件に位置づけられました。また、2007年に286施設であったがん拠点病院は2010年4月には377施設に達しました。



- ・緩和ケア研修会の指導者育成を目指した研修会が、独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センターにより行われました。
- ・診療報酬改定において、がん緩和ケア関連の診療加算項目が増えたこと、さらに緩和ケア研修会修了の医師が配属されていることがその算定条件となりました。
- ・国立がん研究センターならびに日本緩和医療学会が開催する緩和ケア指導者研修会、精神腫瘍学指導者研修会での2010年5月末での修了者が、それぞれ836人、445人にのぼりました。
- ・緩和ケアチーム設置医療機関数が、2007年5月で326施設であったものが、2008年10月で612施設に増えました。

個別目標③については、

- ・わが国でのモルヒネ換算消費量が、2007年は3,835kgであったものが2008年には4,152kgに増えたことが報告されました。

また、緩和ケア推進に関連した在宅医療の推進においては、在宅療養支援診療所数が2008年7月時点で11,450施設に増えたこと、がん患者の在宅での死亡割合が2005年は自宅5.7%、老人ホーム0.5%、介護老人保健施設0.1%であったものが、2008年ではそれぞれ7.3%、0.8%、0.2%と増えたことなどが報告されました。

■ 中間報告を受けての緩和ケア施策の今後と基本計画の見直し

中間報告を受け、そのうちで緩和ケアに関する施策では、改善点、見直しとして、

- ・5年以内の緩和ケアに関する基本的知識の習得については、さらに研修を増やしていかないと間に合わないため、普及をさらに促すべきである
- ・緩和ケア研修の質そのものを向上させることが重要である(座学から実地研修へ)

- ・緩和ケアチーム設置数を増やすとともに、在宅医療における緩和ケアの推進を行うこと。このことにより、病院から地域への切れ目ない緩和ケア体制の確保を行う
 - ・医師に加え、薬剤師、看護師などの育成を行うことが重要である。また、在宅医療では「家での看取り」は最終ではなく、「患者の希望する療養場所」を提供できることが重要であること。その達成のため、地域医療連携体制を整備することが必須である
 - ・地域ごとに在宅医療推進協議会を置き、在宅医療に関する提供者など、関係者と当事者が集まり、地域におけるネットワークを構築することが重要である
 - ・訪問看護ステーションの充実
 - ・がん患者の療養生活の向上という点から、がん患者の就労支援に関する取り組みを行うべきである
- などが挙げられました。

■ 中間報告提言を受けての今後のがん研究について

がん対策推進基本計画のなかで謳われているがん研究は、「がんによる死亡者の減少、すべてのがん患者およびその家族の苦痛の軽減ならびにQOLの維持向上を実現するためのがん対策に資する研究」を推進することを目標として掲げました。

今後の研究推進については、以下のような指摘がなされました。

- ・がん研究については予算がつけられ、基礎研究は進んでいるが、その結果ががん医療開発、革新的がん予防の確立につながっていない。したがって、研究予算の充実に加え、研究進展、発展についてわかりやすい評価指標を示すべきである。
- ・がん研究をさらに推進するために、がん対策推進協議会とリンクしたがん研究特化国家戦略的

調整機能が不可欠である。

- ・国内のがん研究全体を把握し、それに応じて国家レベルのがん研究戦略を立案できるシステムが必要である。
- ・がん研究推進のため、基礎研究の成果をシーズとしてがん医療のイノベーションを起こせる基礎→臨床の橋渡し機能を強化することが必要である。
- ・がん研究の成果発表にがん患者を含む国民が参加する機会を設け、がん医療推進に患者、市民の視点を取り入れることが重要である。

■ おわりに

がん対策を総合的に推進するためには、関係者の連携・協力を進めることのできる体制整備や、

都道府県による計画策定を充実させること、またがん対策関係者の意見を集約し把握できる体制を整備すること、さらにはがん登録などにおける国民の協力も不可欠であることが提言されています。加えて、緩和ケアにおいては特に、緩和ケア自身をしっかりと評価できる系を策定すること、そしてその進捗管理を行うことが必須であると提言されています。

中間報告で挙げられた未達成の部分、重要と思われる新たな施策提言への対応、「取り組むべき課題」の推進など、修正し行うべきことはたくさんあります。これらのことを勘案しながら、2012年から始まる「第二次がん対策推進基本計画」を実効あるものにし、国民のがんからの解放を目指してさらに注意深く、積極的に計画を進めていく必要があると考えます。

S(+)-Ketamine Suppresses Desensitization of γ -Aminobutyric Acid Type B Receptor-mediated Signaling by Inhibition of the Interaction of γ -Aminobutyric Acid Type B Receptors with G Protein-coupled Receptor Kinase 4 or 5

Yuko Ando, M.D.,* Minoru Hojo, M.D.,† Masato Kanaide, M.D., Ph.D.,‡
Masafumi Takada, M.D., Ph.D.,† Yuka Sudo, B.S.,§ Seiji Shiraishi, M.D., Ph.D.,||
Koji Sumikawa, M.D., Ph.D.,# Yasuhito Uezono, M.D., Ph.D.**

ABSTRACT

Background: Intrathecal baclofen therapy is an established treatment for severe spasticity. However, long-term management occasionally results in the development of tolerance. One of the mechanisms of tolerance is desensitization of γ -aminobutyric acid type B receptor (GABA_BR) because of the complex formation of the GABA_{B2} subunit (GB₂R) and G protein-coupled receptor kinase (GRK) 4 or 5. The current study focused on S(+)-ketamine, which reduces the development of morphine tolerance. This study was designed to investigate whether S(+)-ketamine affects the GABA_BR desensitization processes by baclofen.

Methods: The G protein-activated inwardly rectifying K⁺

* Graduate Student, † Assistant Professor, ‡ Staff Member, # Professor, Department of Anesthesiology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan. § Graduate Student, Department of Molecular and Cellular Biology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, and Trainee, Cancer Pathophysiology Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan. || Section Head, ** Chief, Cancer Pathophysiology Division, National Cancer Center Research Institute.

Received from the Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan. Submitted for publication December 27, 2009. Accepted for publication October 6, 2010. Supported by the Alumni Association of Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan (Dr. Ando); grants for Scientific Research 20591834 (Dr. Hojo), 00404244 (Dr. Takada), 60028660 (Dr. Sumikawa), and 2160009 and 19500325 (Dr. Uezono) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Tokyo, Japan; the Public Health Research Foundation, Tokyo (Dr. Kanaide); Daiichi-Sankyo Co, Ltd, Tokyo (Drs. Sumikawa and Uezono); Grant-in-Aid 21150801 for the Third Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control and Cancer Research and Grant-in-Aid for Cancer Research 21-9-1 from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, Tokyo (Dr. Uezono). Presented at the 55th Annual Meeting of the Japanese Society of Anesthesiologists, June 12, 2008, Yokohama, Japan, and the 60th Meeting of the Seinan Regional Chapter of Japanese Pharmacological Society, November 22, 2007, Miyazaki, Japan.

Address correspondence to Dr. Uezono: 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. yuezono@ncc.go.jp. Information on purchasing reprints may be found at www.anesthesiology.org or on the masthead page at the beginning of this issue. ANESTHESIOLOGY's articles are made freely accessible to all readers, for personal use only, 6 months from the cover date of the issue.

Copyright © 2011, the American Society of Anesthesiologists, Inc. Lippincott Williams & Wilkins. Anesthesiology 2011; 114: 401-11

What We Already Know about This Topic:

- Tolerance to intrathecal baclofen for treatment of spasticity is produced by desensitization of the γ -aminobutyric acid type B receptor (GABA_BR).

What This Article Tells Us That Is New:

- In cell culture, S(+)-ketamine suppressed the desensitization of GABA_BR-mediated signaling at least in part through inhibition of formation of protein complexes of GABA_{B2} subunit (GB₂R) with GRK 4 or 5.

channel currents induced by baclofen were recorded using *Xenopus* oocytes coexpressing G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel 1/2, GABA_{B1a} receptor subunit, GB₂R, and GRK. Translocation of GRKs 4 and 5 and protein complex formation of GB₂R with GRKs were analyzed by confocal microscopy and fluorescence resonance energy transfer analysis in baby hamster kidney cells coexpressing GABA_{B1a} receptor subunit, fluorescent protein-tagged GB₂R, and GRKs. The formation of protein complexes of GB₂R with GRKs was also determined by coimmunoprecipitation and Western blot analysis.

Results: Desensitization of GABA_BR-mediated signaling was suppressed by S(+)-ketamine in a concentration-dependent manner in the electrophysiologic assay. Confocal microscopy revealed that S(+)-ketamine inhibited translocation of GRKs 4 and 5 to the plasma membranes and protein complex formation of GB₂R with the GRKs. Western blot analysis also showed that S(+)-ketamine inhibited the protein complex formation of GB₂R with the GRKs.

Conclusion: S(+)-Ketamine suppressed the desensitization of GABA_BR-mediated signaling at least in part through inhibition of formation of protein complexes of GB₂R with GRK 4 or 5.

BACLOFEN, a selective γ -aminobutyric acid type B receptor (GABA_BR) agonist, has been widely used as an antispasticity agent. Intrathecal baclofen (ITB) therapy is an established treatment for severe spasticity of both spinal and

cerebral origin.¹ Recently, increasing reports have shown that ITB therapy has powerful antinociceptive effects in patients with spasticity and in patients without spasticity who experience chronic pain,¹ such as somatic pain,² central pain,^{2,3} and complex regional pain syndrome.^{4,5}

However, long-term management of ITB therapy occasionally results in the development of tolerance,⁶ which makes treatment difficult with respect to both pain and spasticity. Such decreased responsiveness to baclofen, so-called baclofen tolerance, is, in part, because of the desensitization of GABA_BR.^{7,8} In addition, the desensitization of GABA_BR occurred by the formation of complexes of GABA_BR and either G protein-coupled receptor kinase (GRK) 4^{7,8} or 5,⁷ which is a member of the GRK family consisting of GRKs 1 through 7.⁹

Until today, several agents (*e.g.*, morphine, baclofen, ketamine, clonidine, and local analgesics) have been administered intrathecally for effective chronic pain management or spinal anesthesia clinically.^{10,11} Among them, intrathecal ketamine coadministration has a synergistic analgesic effect with opioids.¹² In addition, ketamine administration prevented the development of tolerance against morphine in several animal models,^{13,14} although the mechanism has not yet been clearly elucidated. Regulation of tolerance of μ -opioid receptor-mediated cellular signaling, receptors to which morphine mainly act, is known to be mediated by GRKs, particularly GRK 2¹⁵ or 3.^{16,17} GRKs 2 and 3 are reported to play in desensitization processes of μ -opioid receptors^{15,17} or development of tolerance to opioids in an animal model.¹⁶ In case of GABA_BR, it was previously demonstrated that the desensitization of GABA_BR-mediated responses was associated with the formation of protein complexes of GABA_{B2} receptor subunit (GB₂R) with GRK 4 or 5.⁷ Our hypothesis is that ketamine would interact with GRK 4 or 5. Thus, we focused on the effects of ketamine on the modification of GRKs 4 and 5 in GABA_BR-mediated desensitization processes. Ketamine consists of two enantiomers, S(+)-ketamine and R(-)-ketamine, that have distinct pharmacologic properties.¹⁸ S(+)-Ketamine has a three times higher anesthetic potency than that of the racemic mixture, the incidence of adverse effects is equal at the same concentration for both enantiomers,¹⁸ and both are clinically available.¹⁸ Thus, in the current study, we used S(+)-ketamine and investigated whether S(+)-ketamine has effects on GABA_BR desensitization and the formation of complexes of GABA_BR with GRK 4 or 5.

Materials and Methods

Drugs and Chemicals

Baclofen was purchased from Tocris Cookson, Bristol, United Kingdom; and S(+)-ketamine, gentamicin, and sodium pyruvate were obtained from Sigma, St Louis, MO. All other chemicals used were of analytic grade and were obtained from Nacalai Tesque, Kyoto, Japan.

Construction of Complementary DNA and Preparation for Complementary RNAs

Complementary DNA (cDNA) for rat G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel (GIRK) 1 and mouse GIRK2 were provided by Henry A. Lester, Ph.D. (Professor of Biology, Caltech, Pasadena, CA). GABA_{B1a} receptor subunit (GB_{1a}R), GB₂R, and anti-hemagglutinin (HA)-tagged GB₂R were provided by Niall J. Fraser, Ph.D. (Glaxo Wellcome, Stevenage, United Kingdom). Cerulean, a brighter variant of cyan fluorescent protein, was obtained from David W. Piston, Ph.D. (Professor of Molecular Physiology and Biophysics, Vanderbilt University, Nashville, TN); and Venus, a brighter variant of yellow fluorescent protein, was obtained from Takeharu Nagai, Ph.D. (Professor of Nanosystems Physiology, Hokkaido University, Sapporo, Japan). Human GRK4 was provided by Antonio De Blasi, Ph.D. (Professor of Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed, Pozzilli, Italy); and rat GRK5 was obtained from Yuji Nagayama, M.D., Ph.D. (Professor of Medical Gene Technology at Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University, Nagasaki, Japan). For receptor construction, the N-DYKDDDDK-C (FLAG) epitope tag (5'-GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATGTG-3') was engineered to ligate the N-terminus of GRK 4 or 5 by using standard molecular approaches that use polymerase chain reaction. Venus-fused GB₂R was created by ligating the receptor cDNA into *Hind*III sites into the corresponding sites of Venus cDNA. Venus- or Cerulean-fused GRKs 4 and 5 were created by ligating the GRK cDNA sequences into the *Not*I or *Bam*HI sites of corresponding Venus or Cerulean sites. All cDNAs for transfection in baby hamster kidney (BHK) cells were subcloned into pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA). For expression in *Xenopus* oocytes, all cDNAs for the synthesis of complementary RNAs (cRNAs) were subcloned into the pGEMHJ vector, which provides 5'- and 3'-untranslated regions of the *Xenopus* β -globin RNA, ensuring a high concentration of protein expression in the oocytes.¹⁹ Each of the cRNAs was synthesized with a messenger RNA kit (mCAP messenger RNA Capping Kit; Ambion, Austin, TX) and with a T7 RNA polymerase *in vitro* transcription kit (Ambion) from the respective linearized cDNAs.²⁰

Oocyte Preparation and Injection

Immature V and VI oocytes from *Xenopus* were enzymatically dissociated, as previously described.^{21,22} Isolated oocytes were incubated at 18°C in ND-96 medium (containing 96-mM NaCl, 2-mM KCl, 1-mM CaCl₂, 1-mM MgCl₂, and 5-mM HEPES, pH 7.4) containing 2.5-mM sodium pyruvate and 50- μ g/ml gentamicin. For measurement of GIRK currents induced by baclofen, cRNAs of GIRKs 1 and 2 (0.2 ng each) and GB_{1a}R and GB₂R (5 ng each) were coinjected into the oocytes, together with or without GRKs (4 or 5) or FLAG-tagged GRKs (FLAG-GRK4 or FLAG-GRK5) (3 ng each). The final injection volume was less than 50 nl in all

cases. Oocytes were incubated in ND-96 medium and used 3–8 days after injection, as previously reported.²¹

Electrophysiologic Recordings

Electrophysiologic recordings were performed using the two-electrode voltage clamp method with an amplifier (Geneclamp 500; Axon Instruments, Foster City, CA) at room temperature. Oocytes were clamped at -60 mV and continuously superfused with ND-96 medium or 49 mM K^+ (high potassium) solution, in which tonicity was adjusted to reduce concentrations of NaCl (48 -mM NaCl, 49 -mM KCl, 1 -mM $CaCl_2$, 1 -mM $MgCl_2$, and 5 -mM HEPES, pH 7.4) in a 0.25 -ml chamber at a flow rate of 5 ml/min. Then, baclofen alone or $S(+)$ -ketamine and baclofen were added to the superfusion solution. Voltage recording microelectrodes were filled with 3 M potassium chloride, and their tip resistance was 1.0 – 2.5 M Ω . Currents were continuously recorded and stored with a data acquisition system (PowerLab 2/26; AD Instruments, Castle Hill, Australia) and a computer (Macintosh; Apple, Cupertino, CA), as previously described.^{21,22} All test compounds applied to oocytes were dissolved into the ND-96 medium or 49 -mM K^+ media.

Cell Culture and Transfection

The BHK cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) at 37° C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% carbon dioxide. For confocal microscopic assay, BHK cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/ 35 -mm glass-bottomed culture dish (World Precision Instruments, Sarasota, FL) and cultured for 24 h. Transient transfection was then performed with a transfection reagent (Effectene; Qiagen, Tokyo, Japan) in 0.2 μ g each cDNA, as previously described,^{7,20} and according to the protocol provided by the manufacturer. Cells were used in confocal microscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis 16 – 24 h after transfection.

Confocal Fluorescence Microscopy

For translocation studies of GRKs and protein complex formation of GABA_BR with each GRK (4 or 5) using confocal microscopy and the FRET assay, GB₂R and each of the GRKs (4 and 5) were fused through the carboxyl terminus to Cerulean or Venus. The BHK cells cultured in 35 -mm glass-bottomed dishes were cotransfected with 0.2 μ g Venus-fused GABA_BR and Venus- or Cerulean-fused GRKs. A $\times 63$ magnification 1.25 -numerical aperture oil immersion objective was used with the pinhole for visualization. Both Venus and Cerulean were excited by a 458 -nm laser, and images were obtained by placing the dish onto a stage in a confocal microscope (Zeiss LSM510 META; Carl Zeiss, Jena, Germany).

Photobleaching and Calculation of FRET Efficiency

To confirm FRET between Venus and Cerulean, we monitored acceptor photobleaching analysis in BHK cells that

coexpressed GB_{1a}R, Venus-fused GB₂R, and Cerulean-fused GRKs. FRET was measured by imaging Cerulean before and after photobleaching Venus with the 100% intensity of 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 the evidence of FRET from Cerulean to Venus. All experiments were analyzed from at least six cells with three independent regions of interest. As a control, we examined the FRET efficiency of the unbleached area of membrane in the same cells in at least three areas. In some cases, we performed a photobleaching assay using fixed BHK cells. Cells were fixed as previously described.²³

FRET efficiency was calculated using emission spectra before and after acceptor photobleaching of Venus.²⁴ 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 because of desensitized acceptor was measured by taking the Cerulean emission (at 488 nm) from spectra before and after acceptor photobleaching. FRET efficiency was then calculated using the following 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.²⁵ Before and after this bleaching, Cerulean images were collected to assess changes in donor fluorescence.

Coimmunoprecipitation and Western Blotting

Monoclonal anti-FLAG M2 was obtained from Sigma; monoclonal anti-HA (12CA5), from Roche, Mannheim, Germany; and polyclonal anti-HA (Y-11), from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. The BHK cells were transiently cotransfected with each of the FLAG-tagged GRK cDNAs, HA-tagged GB₂R (HA-GB₂R), and nontagged GB_{1a}R cDNAs. Twenty-four hours later, the cells were harvested, sonicated, and solubilized in a protein extraction buffer containing a combination of protease inhibitor cocktail (PRO-PREP; iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea) for 1 h at 4° C. The mixture was centrifuged (at $15,000$ rpm for 30 min), and the supernatants were incubated with FLAG or HA (12CA5) antibody at 5 μ g/ml overnight at 4° C. The mixture was centrifuged, and the pellets were washed five times by centrifugation and resuspension. Immunoprecipitated materials were dissolved in sample buffer (Lammeli) containing 0.1 -M dithiothreitol subjected to 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to polyvinylidene fluoride membranes, and subjected to immunoblotting using monoclonal antibodies against FLAG (1:10,000) and polyclonal HA (Y-11) (1:10,000); then, bovine mouse or goat rabbit anti-IgG was conjugated with horseradish peroxidase at 1:5,000 and reacted with chemiluminescence Western blot detection reagents (Nacalai Tesque).