The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ムスカリン様アセチルコリン受容体のアゴニストによる崩壊機構 ： 培養モルモット精管平滑筋を用いて
Author(s)	樋口, 宗史
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/33536
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【68】

氏名・(本籍)	樋口宗史（ひぐち ひろし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5860 号
学位授与の日付	昭和57年12月21日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**ムスカリン様アセチルコリン受容体のアゴニストによる崩壊機構ー培養モルモット精管平滑筋を用いてー**
論文審査委員	(主査) 教授 吉田 博 (副査) 教授 垣内 史朗 教授 和田 博

論文内容の要旨

〔目　的〕

神経伝達物質やホルモンの刺激に対する組織（細胞）の反応性は生体内条件の生理的あるいは病的変動に適応して変化する。コリン作働性神経，特に副交感神経支配臓器の反応性も，種々の生理的条件変動下にそのムスカリン様アセチルコリン受容体（mAChR）量の変動を伴って変化するという知見が集まりつつある。これは主としてシナプス間隙のアセチルコリン（ACh）濃度を変化させる条件下に起こると考えられているが，その反応性変化の本体及び機構については殆ど解明されていない。

本研究では，平滑筋の器官培養を用い，その反応性の変動が主として生理的濃度の ACh により調節された表面膜上の mAChR 量の変動に依る事及び，この本体は agonist が mAChR を活性化した後におこる一連の崩壊過程（down regulation）に依る事を見い出した。更にこの現象を追求する事により，膜蛋白質である mAChR 代謝過程並びに，コリン作働性神経系の自己調節機構である mAChR 量調節機構を明らかにしようとした。

〔方　法〕

器官培養：無菌的に剔出したモルモット（300－350g）精管をEagle's MEM(＋5％ calf serum)液中で一定張力（320mg/筋）を負荷し，37℃，95％ O_2 5％ CO_2 下に1－3日間各種薬物と共に培養し，平滑筋各部位での mAChR の変動を観察した。収縮反応：培養後の平滑筋の反応性は，30分以上洗浄した後，ACh に対する収縮反応を37℃で等尺性に記録した。結合実験：細胞表面mAChR量は精管切片に対する[^{3}H]-QNB の特異的結合を指標に測定した。細胞全 mAChR 量は精管ホモジネートに対する[^{3}H]-QNB 特異的結合を glass filter 上に吸引捕捉する事で求めた。phospholipase A_2

(PLase A_2)活性：Sundaram らの方法に準じて測定した。データ解析：非線型最小二乗回帰法によりmAChRのagonist 結合部位を高親和性，低親和性（K_H, K_L）の二部位に解析した。

〔成　　績〕

① 平滑筋における mAChR の局在　平滑筋 mAChR はその大部分が細胞表面に局在していた。

② agonist による表面 mAChR の量的調節と筋の収縮性　表面 mAChR は生理的濃度の ACh により，receptor-activation をうけて一定の lag の後，時間，温度，エネルギー依存性に減少した。この時同時に平行した，ACh 収縮の減少を伴った。この mAChR 量の減少の程度は mAChR を占有する agonist の量により規定される事，また用いる agonist の efficacy（作用強度）に依存する事が示された，ACh を除去するとmAChR量はACh への反応性回復を伴って増加した。以上より，モルモット精管平滑筋の ACh 収縮性変化は表面 mAChR 量変動が主因であった。

③ agonist による mAChR の質的変化の有無　ACh により mAChR 量が20%まで減少する場合でも K_H, K_L 部位の比は約1：1で一定であった。この down regulation において mAChRは一つの受容体分子として挙動する事を示唆している。この時わずかに K_L 部位の親和性の低下が認められた。

④ mAChR の agonist による崩壊機構　蛋白合成阻害剤 cycloheximide 存在下にも AChによる mAChR 量の減少がみられる事から，この down regulation はagonistによるmAChRの崩壊促進によるものと考えられる。この崩壊は次の処理で抑制された。

(Ⅰ) transglutaminase 阻害作用を持つ anti-clustering agents (monodansylcadaverine, methylamine, ethylamine) 処理は表面 mAChR の崩壊を各々約60%抑制した。（Ⅱ）anti-endocytotic agent (paraformaldehyde) 処理はこの崩壊を70%まで有意に抑制した。（Ⅲ）微小管脱重合剤 (vinblastine, colchicine)処理はこの崩壊を80%まで抑制し，平滑筋表面に mAChR を残存させた。抗マイクロフィラメント剤は効果が無かった。（Ⅳ）lysosomotropic agents の一つである chloroquine はendocytosis の抑制作用を持つ。この chloroquine 処理は agonist による mAChR 崩壊促進を完全に抑制し，平滑筋表面に mAChR を貯留させた。（Ⅴ）lysosomotropic agent であるNH_4Cl や lysosome 酵素阻害作用を持つ leupeptin, antipain, chymostatin, pepstatin Aはごく僅かしか mAChR 崩壊を抑制しなかった。またこの時digitonin 処理，低張処理を加え，細胞内 mAChR を平衡透析で求めてもその増加は観察されなかった。（Ⅵ）PLaseA_2 阻害作用をもつ局所麻酔薬 (quinacrine, tetracaine) はこの mAChR 崩壊を著明に抑制し，平滑筋表面に mAChR を貯留させた。他の局所麻酔薬は効果がなかった。agonist による mAChR 崩壊時に PLase A_2 活性の有意の変動や，その調節因子の産生も認められなかったが，quinacrine, tetracaine の PLaseA_2 阻害効果は培養中を通じて持続した。このことは PLase A_2 処理が mAChR の QNB 結合能を消失させるという知見と共に，mAChR の endocytosis に膜結合性 PLase A_2 が関与し，同時に[^{3}H]-QNB 結合能消失に関与する可能性を示していた。

⑤ 表面 mAChR と収縮機構の coupling 障害　chloroquine あるいは vinblastine 処理で ACh による表面 mAChR の崩壊を抑制した時に，表面 mAChR が質的変化無しに存在するにもかかわらず，ACh 収縮性が低下していた。

［総　　括］

1）平滑筋表面に存在するmAChR量は，mAChRを占有するagonist(ACh)量により一義的に規定され，平滑筋のACh収縮性変化は主に表面mAChR量に依存していた。

2）生理的濃度のAChは平滑筋表面mAChRをactivateした後，温度，エネルギー依存性に崩壊を促進した。この時mAChRの質的変化はごく僅かであった。

3）agonistによるmAChR崩壊過程にはmAChRのclustering及びendocytosisが関与している可能性が示された。これらの過程には微小管やPLase A_2が働くと考えられる。chloroquineによる阻害部位もこの過程である。

4）lysosome機能を抑えるNH_4Clやprotease inhibitorsの効果がこのmAChR崩壊に認められない事や，種々の条件下に細胞内mAChRの増加が検出されない理由として，mAChR崩壊に関与する表面膜PLase A_2がその[^{3}H]-QNB結合能を消失させる事が推察される。

5）ACh反応性を規定するものとして，mAChRそのもの以外に，収縮系とのcoupling に影響を与える別の系も存在する。

論文の審査結果の要旨

本研究はムスカリニックレセプターを介するアセチルコリン反応性が表面膜ムスカリニックレセプターに主として依存している事，その表面膜ムスカリニックレセプター量が生理的濃度のアセチルコリンにより調節されている事を示した。さらにその本体が，アゴニストがムスカリニックレセプターを活性化した後におこる，微小管及びphospholipase A_2の関与するclustering，endocytosis を含むと考えられる一連の崩壊過程の促進であることを示した。

これら一連の研究は，コリン作働性神経伝達調節についての知見を与えただけでなく，広く膜レセプターの量的調節機構の解明に貢献したもので，極めて価値が高く，学位論文に十分値する。