



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

氏 名・(本籍)	樋 口 宗 史
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 8 6 0 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—培養モルモット精管平滑筋を用いて—
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% O₂ 5 % CO₂ 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分以上洗淨した後，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 [³H]-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 [³H]-QNB 特異的結合を glass filter 上に吸引捕捉する事で求めた。phospholipase A₂

(PLase A₂)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 の質的变化の有無 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 NH₄ Cl 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) PLase A₂ 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 A₂ 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 PLase A₂ 阻害効果は培養中を通じて持続した。このことは PLase A₂ 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 A₂ が関与し，同時に [³H]-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 が質的变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 の質的变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 A₂ 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 NH₄Cl や protease inhibitors の効果がこの mAChR 崩壊に認められないことや, 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 A₂ がその [³H]-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 A₂ 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。