



Title	神経伝達物質遊離に対するキナクリンの抑制機構に関する研究
Author(s)	太田, 章
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35135
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【2】

氏名・(本籍)	お　　た　　あきら 太　　田　　章
学位の種類	薬　　学　　博　　士
学位記番号	第　　7　0　7　9　号
学位授与の日付	昭　和　61　年　2　月　4　日
学位授与の要件	薬学研究科　応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	神経伝達物質遊離に対するキナクリンの抑制機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教　授　岩田平太郎 (副査) 教　授　近藤　雅臣　　教　授　三浦　喜温　　教　授　猪木　令三

論　文　内　容　の　要　旨

抗マラリア薬として開発されたquinacrine (QC) は、その作用機作に関する検討の過程で, phospholipase A₂ (PLA₂) を阻害することが明らかにされた。近年, QCが種々の細胞における刺激応答反応や分泌を抑制することが示され、これらの過程への PLA₂ の関与が示唆されている。

一方、神経終末部からの脱分極による神経伝達物質の遊離に神経終末内部のカルシウムイオン(Ca²⁺)の濃度の上昇が必要であることが知られているが、Ca²⁺の濃度の上昇からどのようにして神経伝達物質の遊離に至るかは未だ明らかにされていない。その機構の有力な候補として PLA₂ の関与が考えられている。そこで、PLA₂ 阻害作用の知られているQCの神経伝達物質候補 acetylcholine (ACh) の神経終末からの遊離に対する作用を検討したところ、QCが脱分極によるAChの遊離を抑制するという知見を得た。そこで、本研究では、QCの神経伝達物質遊離の抑制機構を明らかにする目的で、神経終末部が小胞状となりその機能を保持しているシナプトゾームを用いて、QCが脱分極から神経伝達物質の遊離に至る過程のどの過程に作用しているのか、さらに親和性標識試薬を用いQCの作用部位について検討した。また、神経終末部の PLA₂ 活性の測定を行ない、その活性に対する脱分極刺激の影響を調べ、QCの神経伝達物質遊離阻害作用と PLA₂ 阻害作用の関連について考察した。

＜本　論＞

第1章 神経膜 phospholipase A₂ 活性と神経伝達物質遊離過程に対する quinacrine の作用

2 - [¹⁴C] - linoleoylphosphatidylethanolamine ([¹⁴C] - PE) からの [¹⁴C] - linoleic acid ([¹⁴C] - LA) の遊離量を調べ、神経膜 PLA₂ 活性の性質を調べた。神経膜 PLA₂ はその活性の発現に 1 mM以上のCa²⁺を必要とし、その至適 pHは 8.5~9.0であった。Calmodulinを

添加した場合にも活性の発現に 1 mM以上のCa²⁺が必要であった。QCは神経膜PLA₂を30μM, 100μMでそれぞれ約10%, 約25%阻害した。

シナプトゾームからのAChの遊離は, 56mM KCl-Krebs Ringer buffer (Highk⁺-KR)あるいは50μM veratridineの脱分極刺激, またcalcium ionophore A 23187により著明に増加した。Highk⁺とveratridineによる遊離を100μM QCはそれぞれ約30%, 約50%抑制したが, A 23187による遊離に対しては影響しなかった。

次に, シナプトゾームへのCa²⁺の流入に対するQCの効果について検討した。Highk⁺とveratridineによってCa²⁺の流入は増加した。100μM QCはこれらのCa²⁺の増加に対しそれぞれ約40%, 約85%の抑制作用を示した。しかし, 脱分極しないときのCa²⁺の流入あるいは, Ca²⁺チャンネル以外のCa²⁺の流入を反映すると思われるNa⁺ freeでのCa²⁺の流入を抑制しなかった。Highk⁺とveratridineによるCa²⁺の流入に対するQCの阻害は, 10μMの濃度からみとめられた。

これらの結果は, QCが電位依存性Ca²⁺チャンネルを特異的に阻害し, 脱分極したシナプトゾーム内でのCa²⁺濃度の上昇を抑制することによりAChの遊離を抑制していることを示している。また, A 23187によるAChの遊離をQCが抑制しなかったことから, QCがCa²⁺流入以後の過程に影響しないことが考えられる。

第2章 Quinacrine mustardによるquinacrineの作用部位についての検討

Quinacrine mustard (QCM)はQCと同様にhighk⁺とveratridineによるシナプトゾームへのCa²⁺の流入を阻害した。一方, QCあるいはQCMで前処置した後洗浄したシナプトゾームへのCa²⁺の流入を調べたところ, QCの場合にはその阻害が70%消失したのに対し, QCMの場合には洗浄しなかったものと比べ変化はみられなかった。これらの結果から, QCMが, QCと同じ作用点に働きCa²⁺の流入を阻害し, さらにその作用点に不可逆的に結合していることが考えられた。

そこで, 30μM QCMで処置したシナプス膜をSDS-polyacrylamide gel electrophoresisで分析したところ, 分子量約37,000と約32,000の位置にQCMの蛍光がみられた。この蛍光が蛋白分解酵素による処置で消失したことから, QCMが蛋白に結合していることが明らかとなった。QCMがシナプス膜の特定の蛋白に作用しており, これらの蛋白への作用を介してCa²⁺の流入を抑制しているのではないかと考えられた。また, QCの作用もこれらの蛋白が関与していることが示唆された。

第3章 シナプトゾームのphospholipase A₂活性

シナプトゾームに単に[¹⁴C]-PEを加えた場合には, [¹⁴C]-LAの遊離がみとめられたが, highk⁺あるいはveratridineを添加しても[¹⁴C]-LAの遊離量は変化しなかった。しかし, phospholipid transfer proteinを用い, シナプトゾームの膜中に[¹⁴C]-PEを組み入れたとき, [¹⁴C]-LAの遊離はhighk⁺, veratridine, A 23187により有意に増加した。また, この増加は外液のCa²⁺に依存していた。

一方, ガスクロマトグラフィーによりシナプトゾーム中の5種類の脂肪酸の含量を測定したところ, いずれの脂肪酸の含量も脱分極刺激により変化しなかった。しかし, [³H]-arachidonic acidでリゾリン脂質を標識する方法を用いてリゾリン脂質含量の変化を調べた場合, veratridineによる脱分

極により lysophosphatidylethanolamine のみが増加していた。またこの増加は外液の Ca^{2+} に依存していた。

これらの結果は、シナプトゾームに脱分極により活性化される PLA_2 の存在を示唆しており、その活性化が Ca^{2+} の流入により起こることを示している。

< 結 論 >

- 1, Quinacrine は、電位依存性カルシウムチャンネルを特異的に阻害することにより、脱分極によるシナプトゾームからの $[^3\text{H}]\text{-acetylcholine}$ の遊離を阻害した。
- 2, Quinacrine mustard は quinacrine と同様にカルシウムチャンネルを阻害し、その阻害は不可逆的であった。Quinacrine mustard はシナプス膜に特異的な分子量約 37,000 と約 32,000 の蛋白に結合し、この蛋白が quinacrine の作用点であることが考えられた。
- 3, シナプトゾームに脱分極刺激によるシナプトゾーム内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化される phospholipase A_2 活性がみとめられた。
- 4, Quinacrine の $[^3\text{H}]\text{-acetylcholine}$ 遊離抑制作用は、quinacrine の phospholipase A_2 阻害作用によるものではなく、電位依存性カルシウムチャンネルに対する阻害によることが示された。

論 文 の 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、キナクリンのアセチルコリン遊離抑制作用が、ホスホリパーゼ A_2 阻害作用によるものではなく、電位依存性カルシウムチャンネルに対する阻害によることを明らかにしたもので、薬学博士の称号を授与するに値するものである。