

Title	ムスカリン様受容体のサブタイプの解析とその反応との連関
Author(s)	水島, 淳
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35295
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	みづ 水	しま 島	あつし 淳
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7 6 5 0	号
学位授与の日付	昭和 62 年 3 月 26 日		
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	ムスカリン様受容体のサブタイプの解析とその反応との連関		
論文審査委員	(主査) 教授	吉田	博
	(副査) 教授	和田	博 教授 津本 忠治

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

ムスカリン様アセチルコリン受容体(mAChR)の関与する反応には、アデニレートシクラーゼの抑制、P I代謝の亢進、グアニレートシクラーゼの促進、Kチャンネルの開閉が知られている。mAChRの分類は選択的アンタゴニストのピレンゼピンによりM₁とM₂に分けるものが一般的であり、上記反応との関連が多数報告されているが、統一的な見解は得られていない。

一方、mAChRには、アゴニストに対して親和性の異なる3つの結合部位(或いは結合状態)(super-high, high, low affinity agonist binding sites; SH, H, L)があり、GTP存在下では、SHが減少し、それに対応してLが増加することが知られている。これは、mAChRにGTP結合蛋白質が共役している事を示すが、GTP結合蛋白質の種類については不明である。そこで本研究では、モルモット心臓を用いて、3つのアゴニスト結合部位の生理的意義を検討し、M₁・M₂との関連、さらに反応との関連について検討した。

[材料及び方法]

1. 材 料 : 体重300~400gの雄性モルモットを全ての実験に用いた。
2. 放射性リガンド結合実験 : 膜試料を100mM NaCl, 1mM MgCl₂を含む50mMリン酸緩衝液中で、³H-QNBと37°C 1時間、或いは25°C 2時間incubate後、フィルター法にて、膜に結合した放射活性を分離、測定した。アゴニスト結合部位の解析をする場合は、アゴニストにて上記³H-QNB結合の阻害実験を行い、結果を非線形最小自乗法にて解析し、それぞれの存在比とK₀値を得た。
3. PrBCM処理 : propylbenzilylcholine mustard (PrBCM) は、50mMリン酸緩衝液中にて37°C30分

間活性化後、mAChRのアルキル化に供した。

4. 心筋収縮陰性変力効果：各種アゴニストによる陰性変力効果は、右房の自発収縮、左房及び乳頭筋での電気刺激による収縮に対してのものを測定した。陰性変力効果の K_D 値は、PrBCMにてスペアア受容体をアルキル化後、Furchgottの計算式より求めた。
5. アデニレートシクラーゼ抑制反応：心房膜分画におけるイソプロテレンール $100\mu\text{M}$ 、GTP $30\mu\text{M}$ 存在下でのアデニレートシクラーゼ活性に対する各種アゴニストによる抑制効果を測定した。
6. グアニレートシクラーゼ活性化反応： $0.5\times 0.5\text{mm}$ にチョップした心室筋をIBMX 10mM を含むKrebs-Hensereit液中にて、 37°C 2分間各種アゴニストで刺激し生成されたcGMPをラジオイムノアッセイにて測定した。

[結果及び考察]

1. ピレンゼピンに対する結合様式： $^3\text{H-QNB}$ 結合に対するピレンゼピンの阻害曲線を解析した。 K_D 値は、 836nM と低親和性で阻害様式は一相性であった。これは、モルモット心臓のmAChRは、全て M_2 であることを示す。
2. H及びLの選択的アルキル化：カルバコールは、PrBCMによるアルキル化を濃度依存的に阻害するが、カルバコール存在下でPrBCM処理後にアゴニスト結合部位を解析すると、カルバコールに低親和性の部位が選択的にアルキル化されていた。そこで、カルバコールに対する親和性を考慮した理論式より、HとLを全てアルキル化するカルバコール濃度を求め、PrBCM処理したところ、SHとHが等量存在した。GTPの非水解性アナグロのGppNHp $100\mu\text{M}$ 共存下では、SHが減少し、Hが増加した。Lは殆ど存在しなかった。未処理膜では、GppNHpによりSHが減少し、Lが増加することから、以上の結果は、モルモット心臓における3つのアゴニスト結合部位SH、H、LはそれぞれGTPにより調節される2つのタイプ；SH-Hタイプ ($M_2\alpha$)とH-Lタイプ ($M_2\beta$)；に分けられることを示唆している。近年、mAChRの介する反応の全てにGTP結合蛋白質の関与が示唆されており、この結果と良く一致する。
3. 反応との連関：右房・左房・乳頭筋の収縮において、各種アゴニストによる陰性変力効果の K_D 値は、それぞれのHの K_D 値に一致した。イソプロテレンール刺激によるアデニレートシクラーゼの抑制反応の IC_{50} 値は、Hの K_D 値に一致した。また、 $M_2\alpha$ のみ残る処理膜においても IC_{50} 値は変化せず、最大抑制率もほとんど減少しなかった。以上の結果より、陰性変力効果及びアデニレートシクラーゼの抑制に関与するmAChRは、 $M_2\alpha$ のみであると思われる。また、cGMPによる心筋収縮の調節機構を示唆する報告があるが、各種アゴニストによるcGMP上昇反応の ED_{50} 値は、Hに一致した。

[総括]

本研究により、mAChRの $M_1\cdot M_2$ 以外の分類の可能性が示唆された。即ち、モルモット心臓のmAChRは M_2 のみであるが、その中にGTP結合蛋白質と共役する2つのタイプ； $M_2\alpha\cdot M_2\beta$ があることが示唆された。また、mAChR刺激による心筋収縮陰性変力作用と、それに深く関わるアデニレートシクラーゼの抑制作用が、 $M_2\alpha$ を介して起こることが示された。

論文の審査結果の要旨

ムスカリン様受容体は、選択的アンタゴニストのピレンゼピンにより大きく M_1 と M_2 に分類されているが、本論文では、アゴニスト結合部位を詳細に解析し、心臓 M_2 受容体がさらに2つ分けられ、それぞれがGTP結合蛋白を介して反応に関与している可能性を示した。この結果は、ムスカリン様受容体の反応様式を研究する上で、重要な知見であり、且、より選択的な向ムスカリン様受容体薬の開発を可能にするものであり、学位に値するものと考えらる。