



Title	神経受容体反応に対する膜脱分極の影響：モルモットの大脳皮質スライスにおけるムスカリン様受容体と共役するアデニレートシクラーゼ活性抑制及びPⅠ代謝促進に対するhigh K+の効果
Author(s)	周, 晓明
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37133">https://hdl.handle.net/11094/37133</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">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

氏名・(本籍)	周	曉	明
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	8859	号
学位授与の日付	平成元年9月28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	神経受容体反応に対する膜脱分極の影響——モルモットの大脳皮質スライスにおけるムスカリノン様受容体と共にアデニレートシクラーゼ活性抑制及びP <sub>I</sub> 代謝促進に対するhigh K <sup>+</sup> の効果——		
論文審査委員	(主査) 教授 和田 博		
	(副査) 教授 津本 忠治 教授 祖父江憲治		

### 論文内容の要旨

#### (目的)

中枢神経系に於けるムスカリノン様アセロコリン受容体(mACh-R)は、記憶、学習などの精神活動、運動機能の制御などに重要な役割を担っていると考えられている。mACh-RはGTP結合蛋白を介してアデニレートシクラーゼの抑制、イノシトールリン脂質(P<sub>I</sub>)代謝促進、イオンチャネルの制御などの種々の生理反応とカップルしていることが知られている。神経細胞に於ける受容体反応は脱分極の条件下で変化する可能性があり、これを明らかにすることは神経機能の解明に重要であると考えられる。本研究では、モルモットの大脳皮質スライスを用いて、high K<sup>+</sup>による脱分極の条件下にムスカリノン様アゴニスト、carbacholによるアデニレートシクラーゼ抑制とP<sub>I</sub>代謝促進を研究した。

#### (方法)

- 雄のモルモット大脳皮質の前頭葉を0.35×0.35mmにクロスショップしたスライスをKrebs-Ringer液中、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>混合ガスでbubblingした。
- cAMPの測定：スライスは0.5mMのIBMXが含まれた溶液中種々の条件下で37°C、5分間反応をさせたあと、最終濃度0.1N塩酸の添加で反応を止め、ホモジナイズ後、遠心、上層のcAMP量をradioimmunoassay法で測定した。
- P<sub>I</sub>代謝の測定：スライスを<sup>3</sup>Hイノシトール(5 μCi/ml)で37°C、3時間プレロードした後、洗浄した。スライスは10mMのLi<sup>+</sup>が含まれた溶液中種々の条件下で37°C、5分間反応をさせたあと、最終濃度6%のTCA添加で反応を止め、ホモジナイズ後、遠心、TCA可溶画分中のIP<sub>1</sub>、IP<sub>2</sub>、IP<sub>3</sub>をBerridgeの方法にて分離、測定した。

4. ムスカリノン受容体の測定：最大結合量（Bmax）と carbachol の Ki 値はスライスを <sup>3</sup>H-N-methylscopolamine（2 nM）と種々の濃度の carbachol の共存下に37°C、10分間インキュベートし、filtration の後、結合放射活性を測定して得た。特異的結合は、10 μM アトロピン共存下での結合を求めた。

(成 績)

1. ムスカリノン様アゴニスト、carbachol（1 mM）による mACh-R 活性化によって大脳皮質スライスの basal cAMP content と isoproterenol（50 μM）による cAMP の生成はそれぞれ20%，25% 抑えられた。high K<sup>+</sup>（42mM）溶液中では cAMP の生成は basal の330%に増加したが、carbachol による抑制はこの脱分極の条件下では消失した。溶液中のカルシウム濃度を Ca-EGTA Buffer で 1.5mM から 0.5 μM に低下させると high K<sup>+</sup> による cAMP の生成は basal contnt の170%に下がると同時に carbachol の抑制効果が回復した。カルシウムチャネルブロッカー、1 μM, nifedipine によっても同様な結果が得られた。カルモデュリン阻害剤、W-7（100 μM）、TFP（200 μM）による前処置は basal cAMP content に影響しないが、high K<sup>+</sup> による cAMP の生成は45%～48%におさえられカルバコールによる抑制が現れてきた。しかし、プロテンキナーゼC阻害剤、H-7（50 μM）、ホスホリパーゼC阻害剤、neomycin（100 μM）は high K<sup>+</sup> による cAMP の生成に影響せず、carbachol による抑制を回復しなかった。
2. Carbachol による P I 代謝促進反応は 5 分間の刺激で IP<sub>2</sub>、IP<sub>3</sub> 共に140%の上昇が認められ、high K<sup>+</sup> による脱分極は carbachol による IP<sub>2</sub>、IP<sub>3</sub> 生成を相乗的に（250～300%）増加させた。IP<sub>2</sub> の上昇は、低カルシウム、及び verapamil 処理に感受性が高く、50%抑制されたが、IP<sub>3</sub> 生成は外液のカルシウムに依存せず、これらの処理あまり変化しなかった。high K<sup>+</sup> 単独処理においても、IP<sub>2</sub>、IP<sub>3</sub> 共に有意な上昇が認められたが、カルシウム依存性に違いがあり、IP<sub>2</sub> 生成は低カルシウム条件下、及び verapamil により50%以上抑制されたが、IP<sub>3</sub> 生成は抑制されなかった。Neomycin（100 μM）は high K<sup>+</sup> 及び carbachol による P I 代謝促進を抑制した。high K<sup>+</sup> により、mACh-R の Bmax、Kd 値、さらに IP<sub>2</sub>、IP<sub>3</sub> 生成の ED<sub>50</sub> 値に有意な変化は認められなかった。また、W-7 によっては high K<sup>+</sup> による P I 代謝に著明な影響が見られなかった。

(総 括)

以上のデータから、1. 神経細胞においては膜脱分極によってカルシウムが細胞中に流入し、カルシウム—カルモデュリン系が活性化され、それが直接に又はレセプターを介するプロセスに影響することによって cAMP の生成の制御していることが示唆された。2. 膜脱分極によって流入したカルシウムはホスホリパーゼCを活性化し、mACh-R 活性化による P I 代謝に対して相乗的作用する。また、high K<sup>+</sup> による IP<sub>2</sub> と IP<sub>3</sub> 生成が異なる調節を受けている可能性も示唆された。3. 膜脱分極は主として細胞内へのカルシウム流入を介して受容体と共にアデニレートシクラーゼ系、P I 代謝系をそれぞれ異なった機構で制御していることが示された。

## 論文の審査結果の要旨

中枢神経系に於けるムスカリノ様アセルコリン受容体 (mACh-R) は、記憶、学習などの精神活動、運動機能の制御などに重要な役割を担っている。また、精神細胞に於ける受容体反応が脱分極の条件下でどう制御されているかを明らかにすることは神經機能の解明に重要である。本論文はムスカリノ様受容体活性化によるアデニレーシクラーゼの抑制とイノシトールリン脂質代謝促進に対する膜脱分極の影響について検討したものである。その結果、膜脱分極によってウルシウムが細胞内に流入し、カルシウム-カルモデュリン系が活性化され、それが直接に又はレセプターを介するプロセスに影響することによってcAMPの生成の抑制していることが示唆され、一方、流入したウルシウムは、ホスホリバーゼCを活性化し、mACh-R活性化によるP I代謝に対して相乗的に作用することを示した。

本論文は学位論文として十分価値あるものと認められる。