



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P I代謝促進に対するhigh K ⁺ の効果
Author(s)	周, 暁明
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37133
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら 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

【 4 】

氏名・(本籍)	しゅう 周	ぎょう 暁	めい 明
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	8 8 5 9	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 P I 代謝促進に対する high K ⁺ 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ン様アセチルコリン受容体 (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と考えられている。mACh-R は G T P 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 I) 代謝促進、イオンチャン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⁺ による脱分極の条件下にムスカリン様アゴニスト、carbachol によるアデニレートシクラーゼ抑制と P I 代謝促進を研究した。

(方 法)

1. 雄のモルモット大脳皮質の前頭葉を 0.35×0.35mm にクロスチョップしたスライスを Krebs-Ringer 液中、95%O₂/5%CO₂ 混合ガスで bubbling した。
2. 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℃、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。
3. P I 代謝の測定：スライスを ³H イノシトール (5 μCi/ml) で 37℃、3 時間プレロードした後、洗浄した。スライスは 10mM の Li⁺ が含まれた溶液中種々の条件下で 37℃、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 IP₁, IP₂, IP₃ を Berridge の方法にて分離、測定した。

4. ムスカリン受容体の測定：最大結合量 (Bmax) と carbachol の K_i 値はスライスを $^3\text{H-N-methylscopolamine}$ (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, $10\mu\text{M}$ アトロピン共存下での結合を求めた。

(成績)

1. ムスカリン様アゴニスト, 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 ($50\mu\text{M}$) による cAMP の生成はそれぞれ20%, 25%抑えられた。high K^+ (42 mM) 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 1.5 mM から $0.5\mu\text{M}$ に低下させると high K^+ による cAMP の生成は basal content の170%に下がると同時に carbachol の抑制効果が回復した。カルシウムチャンネルブロッカー, $1\mu\text{M}$, 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 ($100\mu\text{M}$), TFP ($200\mu\text{M}$) による前処置は basal cAMP content に影響しないが, high K^+ 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, プロテインキナーゼC阻害剤, H-7 ($50\mu\text{M}$), ホスホリパーゼC阻害剤, neomycin ($100\mu\text{M}$) は high K^+ 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_2 , IP_3 共に140%の上昇が認められ, high K^+ による脱分極は carbachol による IP_2 , IP_3 生成を相乗的に (250-300%) 増加させた。 IP_2 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_3 生成は外液のカルシウムに依存せず, これらの処理であまり変化しなかった。high K^+ 単独処理においても, IP_2 , IP_3 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_2 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_3 生成は抑制されなかった。Neomycin ($100\mu\text{M}$) は high K^+ 及び carbachol による P I 代謝促進を抑制した。high K^+ により, mACh-R の Bmax, K_d 値, さらに IP_2 , IP_3 生成の ED_{50} 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^+ 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^+ による IP_2 と IP_3 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役した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ン様アセチルコリン受容体 (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経機能の解明に重要である。本論文はムスカリン様受容体活性化によるアデニレ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。