



Title	Different pathways for Ca <sup>2+</sup> influx and intracellular release of Ca <sup>2+</sup> mediated by muscarinic receptors in ileal longitudinal smooth muscle
Author(s)	王, 小兵
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37968">https://hdl.handle.net/11094/37968</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="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 href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	おう 王 しょう 小 へい 兵
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10141 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	<b>Different pathways for <math>\text{Ca}^{2+}</math> influx and intracellular release of <math>\text{Ca}^{2+}</math> mediated by muscarinic receptors in ileal longitudinal smooth muscle</b> (ムスカリン様アセチルコリン受容体刺激による腸管平滑筋 $\text{Ca}^{2+}$ 動員機構)
論文審査委員	(主査) 教授 三木 直正 (副査) 教授 岡本 光弘    教授 津本 忠治

### 論文内容の要旨

#### (目 的)

種々の伝達物質刺激による平滑筋収縮は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を介している。この  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールからの遊離 ( $\text{Ca}^{2+}$  遊離) との細胞外からの流入 ( $\text{Ca}^{2+}$  流入) によると考えられる。消化管平滑筋において、ムスカリン刺激による収縮はその大部分が細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  に依存しており、 $\text{Ca}^{2+}$  流入が主に関与すると考えられる。現在、受容体活性化による  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の機構については phospholipase C 活性化を介するいわゆる PI 代謝促進によることが明らかになっているが、 $\text{Ca}^{2+}$  流入促進がどのように受容体活性化と共役しているかについては不明である。

本研究はモルモット回腸縦走筋標本を用いて、ムスカリン刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  流入と  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が互いに独立した経路で起こっているか否かを知り、またムスカリン受容体と  $\text{Ca}^{2+}$  流入の共役機構を明らかにする目的で行われた。

#### (方 法)

##### Fura-2 による蛍光測定

モルモット (♂, 約 300 g) 回腸縦走筋標本を 5  $\mu\text{M}$  Acetoxymethyl-fura-2, 0.08% Cremophor を含む Krebs 氏液中で 20°C 3 hr の incubation によって fura-2 を負荷した。fura-2 を負荷した筋片は 8 x 5 mm のホルダーに展開固定し、2 波長蛍光測定 (日本分光, CAF-100) によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を 380/340nm 励起光比によってあらわした。

##### PI 代謝およびアラキドン酸遊離測定

縦走筋を MacIlwain tissue chopper にて 0.25x0.25mm の細片にし、 $^3\text{H}$ -inositol と 30°C, 3 hr incubation

te した。その後、スライスを10mM LiCl をふくむ Krebs 氏液中でムスカリン受容体を刺激し、生成された  $P_3$  を Berridge の方法で測定した。

スライスを  $^3H$ -arachidonic acid と incubate した後、ムスカリン刺激によって遊離する放射活性を測定した。

#### (結果と考察)

1) Muscarinic agonist による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇 細胞外  $Ca^{2+}$  存在下で、低濃度 ( $<10^{-6}M$ ) の carbachol (CCh) の刺激によって細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は持続的に上昇した。この反応は外液  $Ca^{2+}$  を除去すると消失し、 $IP_3$  合成の inhibitor である neomycin 前処理によって抑制されないことから細胞外からの  $Ca^{2+}$  を流入によるものと考えられる。一方、細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下では、低濃度 CCh による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇は見られないが、CCh の濃度を上げてはじめて一過性の小さな上昇が観察された。この上昇は neomycin 前処理によって約90%抑制されたことから、細胞内貯蔵部位からの  $Ca^{2+}$  遊離によるものと考えられる。他の muscarinic agonist, pilocarpine と oxotremorine は細胞内  $Ca^{2+}$  の遊離を起こさず細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入だけを起こした。以上の結果から Muscarinic receptor による細胞外  $Ca^{2+}$  の流入と細胞内の  $Ca^{2+}$  遊離は異なる機構を介することが示唆される。

2) muscarinic 刺激による PI 代謝促進と neomycin による抑制 低濃度の CCh は  $Ca^{2+}$  流入を起こすに関わらず  $IP_3$  生成促進を示さなかった。CCh による PI 代謝促進反応の  $ED_{50}$  は  $5 \times 10^{-5}M$  であり、細胞内プールより  $Ca^{2+}$  遊離促進の  $ED_{50}$  ( $3 \times 10^{-5}M$ ) と近い値を示した。また、neomycin 前処理によって、CCh による PI 代謝促進は約90%抑制された。

以上の様に、CCh 刺激による細胞内プールからの  $Ca^{2+}$  遊離と PI 代謝促進反応はその  $ED_{50}$  値が一致すること、両者の neomycin に対する感受性が同じである事実は、従来から言われているように、細胞内プールからの  $Ca^{2+}$  遊離は  $IP_3$  を介していることによく符合する。一方、細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入は  $IP_3$  と関係なく、全く別のシステムを介していることが強く示唆される。

3)  $Ca^{2+}$  流入における phospholipase  $A_2$  の関与 phospholipase  $A_2$  阻害剤である p-bromophenacylbromide (pBPB) で縦走筋を処理すると、CCh による細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入は消失するが、細胞内プールからの  $Ca^{2+}$  遊離は影響を受けなかった。またアラキドン酸投与は CCh による  $Ca^{2+}$  流入とよく似た反応を示した。以上の結果はアラキドン酸カスケード中の物質が  $Ca^{2+}$  流入に関与していることを示唆している。

アラキドン酸カスケードの代謝酵素である cyclooxygenase, lipoxygenase の阻害剤である morin, nordihydroguaiaretic acid は  $Ca^{2+}$  流入を増強することから、アラキドン酸または phospholipase  $A_2$  によって生成される脂肪酸が  $Ca^{2+}$  流入を起こしていると考えられる。

4)  $Ca^{2+}$  流入と  $Ca^{2+}$  遊離に対する百日咳毒素の影響 幾つかの受容体-phospholipase  $A_2$  共役系に百日咳毒素感受性 G 蛋白質の関与していることが報告されている。本実験においても、百日咳毒素感受性 G 蛋白質の関与の有無を検討した。百日咳毒素で前処理した縦走筋においては、CCh 刺激による phospholipase  $A_2$  活性化、 $Ca^{2+}$  流入反応は共に消失したが、phospholipase C 活性化、 $Ca^{2+}$  遊離反応は影響されなかった。

(総括)

以上の結果から、消化管平滑筋におけるムスカリン刺激は

- ① ムスカリン様受容体-百日咳毒素非感受性G蛋白質-phospholipase C-IP<sub>3</sub>-細胞内プールからのCa<sup>2+</sup>遊離,
- ② ムスカリン様受容体-百日咳毒素感受性G蛋白質-phospholipase A<sub>2</sub>-アラキドン酸-細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入

の二つの独立した系によって細胞内Ca<sup>2+</sup>を上昇させていると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

消化管平滑筋において、ムスカリン刺激はレセプターを介して細胞内Ca<sup>2+</sup>を上昇させるが、この反応は細胞外Ca<sup>2+</sup>流入と細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離によるものである。本研究はこのCa<sup>2+</sup>の流入と遊離が互いに独立した経路を介して起こることを証明し、さらに細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離にphospholipase Cが関与するのに対して、細胞外Ca<sup>2+</sup>流入にはphospholipase A<sub>2</sub>の活性化が関与することを示した。すなわちレセプターは百日咳毒素感受性G蛋白を介してphospholipase A<sub>2</sub>を活性化し、生成されたアラキドン酸が膜のCa<sup>2+</sup>チャンネルに作用してCa<sup>2+</sup>の流入を起こすことを初めて示した。本研究はCa<sup>2+</sup>流入機構の解明及びphospholipase A<sub>2</sub>の生理作用への新しい知見に重要な意味を持っており、学位に値するものと考えられる。