

Title	Different pathways for Ca ²⁺ influx and intracellular release of Ca ²⁺ 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	https://hdl.handle.net/11094/37968
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	おう しょう へい 王 小 兵
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 1 4 1 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	Different pathways for Ca^{2+} influx and intracellular release of Ca^{2+} mediated by muscarinic receptors in ileal longitudinal smooth muscle (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 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 Ca^{2+} 濃度の上昇を介している。この Ca^{2+} 上昇は細胞内 Ca^{2+} プールからの遊離 (Ca^{2+} 遊離) との細胞外からの流入 (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 Ca^{2+} に依存しており、 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 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、 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 Ca^{2+} 流入と 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 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300g) 回腸縦走筋標本を $5 \mu M$ Acetoxymethyl-fura-2, 0.08% Cremophor を含む Krebs 氏液中で $20^{\circ}C$ 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 8×5 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 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 Maclwain tissue chopper にて 0.25×0.25 mm の細片にし、 3H -inositol と $30^{\circ}C$, 3 hr incuba

てした。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 ($<10^{-6}\text{M}$) 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+} 流入を起こすにも関わらず 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 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ であり、細胞内プールより Ca^{2+} 遊離促進の ED_{50} ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) 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-IP₃-細胞内プールからのCa²⁺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 A₂-アラキドン酸-細胞外からのCa²⁺流入

の二つの独立した系によって細胞内Ca²⁺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Ca²⁺を上昇させるが、この反応は細胞外Ca²⁺流入と細胞内Ca²⁺遊離によるものである。本研究はこのCa²⁺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Ca²⁺遊離にphospholipase Cが関与するのに対して、細胞外Ca²⁺流入にはphospholipase A₂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蛋白質を介してphospholipase A₂を活性化し、生成されたアラキドン酸が膜のCa²⁺チャンネルに作用してCa²⁺の流入を起こすことを初めて示した。本研究はCa²⁺流入機構の解明及びphospholipase A₂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。