



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Inhibitory Mechanisms of Voltage-gated Calcium Channel Current by Muscarinic Receptor Activation in Single Smooth Muscle Cells of Guinea-pig Ileum

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 海野, 年弘 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/1992

氏名（本籍）	海野年弘（静岡県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博乙第8号
学位授与年月日	平成9年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Inhibitory Mechanisms of Voltage-gated Calcium Channel Current by Muscarinic Receptor Activation in Single Smooth Muscle Cells of Guinea-pig Ileum
審査委員	主査 岐阜大学 教授 大橋 秀法 副査 帯広畜産大学 教授 西村 昌数 副査 岩手大学 教授 小林 晴男 副査 東京農工大学 教授 小久江 栄一 副査 岐阜大学 教授 武脇 義

論文の内容の要旨

電位依存性カルシウムチャンネルは、平滑筋細胞の膜興奮性を担うばかりでなく、細胞内へのカルシウム（Ca）イオンの流入経路としての役割も果たしており、収縮をはじめとした多くの細胞内Caイオン依存性機能の維持調節に関わっている。このチャンネル活動は、神経伝達物質やホルモンによる調節を受けている。本論文は、モルモット回腸縦走平滑筋細胞におけるムスカリン受容体刺激によるこのイオンチャンネルの調節機構を明らかにする目的で、同チャンネル電流に対するカルバコール（CCh）の効果と効果発現に至るまでの細胞内情報伝達経路をホールセルパッチクランプ法を用いて検討した結果について述べている。

最初に、電位依存性カルシウムチャンネルを流れるCaイオン電流（ICa）或いはバリウムイオン電流（IBa）に対するCChの抑制効果は、一過性成分とその後の持続性成分から成る二相性であることを明らかにし、次いで、抑制効果のそれぞれの成分についての細胞内情報伝達経路を検討している。さらに、アラキドン酸が持続性抑制効果に関与しているという説が提唱されているので、この点についても検討している。

申請者は、結果に基づいて考察し、モルモット回腸平滑筋細胞におけるムスカリン受容体刺激によって生じる電位依存性カルシウムチャンネルの抑制効果のうち、① 一過性成分は、

百日咳毒素非感受性のGTP結合タンパク質を介するフォスホリパーゼCの活性化、生成されたイノシトール三リン酸による細胞内貯蔵部からのCa²⁺イオンの放出、Ca²⁺イオンによるチャネル活動の阻害という経路をたどる、そして、② 持続性成分は、百日咳毒素非感受性のGTP結合タンパク質を介するものの、フォスホリパーゼC・イノシトール三リン酸代謝経路及びフォスホリパーゼA₂・アラキドン酸経路とは別の経路をたどり、そこにはCa²⁺イオン依存性過程が介在している、という結論を得ている。

審 査 結 果 の 要 旨

電位依存性カルシウムチャネルは平滑筋細胞の膜興奮性を担うばかりでなく、細胞内へのCa²⁺流入経路としての役割も果たしており、収縮をはじめとした多くの細胞内Ca²⁺依存性機能の維持調節に関わっている。そのチャネル活動は神経伝達物質やホルモンによる調節を受けることが知られている。海野年弘君の論文は、モルモット回腸縦走平滑筋細胞におけるムスカリン受容体刺激による電位依存性カルシウムチャネルの調節機構を明らかにすることを目的として、チャネル電流に対するcarbacholの効果、およびその効果発現に至るまでの細胞内情報伝達経路をホールセルパッチクランプ法を用いて検討した結果について述べたものである。論文内容は以下のようにまとめられる。

1) 電位依存性カルシウムチャネルを流れるCa²⁺電流(I_{Ca})を、-60 mVの保持電位から0 mVに達する脱分極パルス(持続時間: 25 ms)により誘発した。脱分極パルスは0.25 Hzの頻度で反復して加えた。細胞外性に適用したcarbachol(10 μM)は内向き電流を誘発するとともにI_{Ca}を抑制した。Carbacholの内向き電流(I_{CCCh})およびI_{Ca}抑制効果は、最初の一過性成分とその後の持続性成分から成る二相性であった。

2) 電位依存性カルシウムチャネルのチャージキャリアーとしてCa²⁺の代わりにBa²⁺を用いた場合にも、carbachol(10 μM)はBa²⁺電流(I_{Ba})を二相性に抑制した。CarbacholのI_{Ba}抑制効果は、EGTA(20 mM)を細胞内性に適用した細胞では発現しなかった。

3) G蛋白質へのGTP結合を阻害するGDP-β-S(1 mM)を細胞内性に適用した細胞では、I_{CCCh}もI_{Ba}抑制効果も発現しなかった。GTPの非水解性アナログであるGTP-γ-S(10 μM)を細胞内性に適用した細胞では、I_{Ba}抑制効果のうち持続性成分はcarbacholを洗浄除去した後も回復しなかった。百日咳毒素(2 μg/ml)を前処置した細胞ではI_{CCCh}は発現しなかったが、一過性および持続性のI_{Ba}抑制効果は無処置細胞におけるものほとんど変わらなかった。

4) フォスホリパーゼCを抑制するneomycin(100 μM)あるいは、イノシトール三リン酸(IP₃)受容体遮断薬のheparin(5 mg/ml)を細胞内性に適用した細胞で、二相性のI_{CCCh}およびI_{Ba}抑制効果のうち一過性成分は発現しなかった。プロテインキナーゼCの阻害剤であるstaurosporine(1 μM)およびH-7(100 μM)はI_{Ba}抑

制効果に何ら影響を及ぼさなかった。プロテインキナーゼ C を活性化する phorbol ester は I_{Ba} を抑制しなかった。

5) Arachidonic acid (0.3–30 μM) は I_{Ba} を濃度依存性に抑制した。Arachidonic acid の効果は持続性であり、3 μM arachidonic acid は 10 μM carbachol による持続性抑制とほぼ同程度の効果を生じた。

6) Arachidonic acid の I_{Ba} 抑制効果は EGTA (20 mM) を細胞内性に適用した細胞で対照とほとんど変わらなかった。Arachidonic acid と carbachol は I_{Ba} の電位依存性不活性化曲線を過分極側に移動させたが、arachidonic acid の効果は曲線のスロープも緩やかにする点で carbachol とは異なっていた。 I_{Ca} と電位依存性 K^+ 電流 (I_K) を同時に記録するという条件下で、arachidonic acid は両者の電流を抑制したが、carbachol は I_K に対してほとんど効果を示さなかった。

7) Carbachol の I_{Ba} 抑制効果は、フォスホリパーゼ A_2 を抑制する 4-bromophenacyl bromide (10 μM) で前処置した細胞、あるいはシクロオキシゲナーゼを抑制する indomethacin とリポキシゲナーゼを抑制する nordihydroguaiaretic acid を併用処置した細胞でも対照細胞におけるものとほとんど変わらなかった。

以上の結果に基づいて、モルモット回腸平滑筋細胞における電位依存性カルシウムチャンネル電流はムスカリン受容体刺激により二相性に抑制される（一過性とその後の持続性抑制）ことを明らかにするとともに、受容体刺激からこれらの抑制効果が発現するまでの細胞内情報伝達機構として以下のことを示唆している。すなわち、一過性抑制は百日咳毒素非感受性の G 蛋白質を介するフォスホリパーゼ C の活性化、生成された IP_3 による細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出、 Ca^{2+} によるチャンネル活動の阻害という経路をたどる、そして、持続性抑制は百日咳毒素非感受性の G 蛋白質を介するものの、フォスホリパーゼ C-イノシトールリン脂質代謝経路およびフォスホリパーゼ A_2 -アラキドン酸代謝経路とは別の経路をたどり、そこには Ca^{2+} 依存性過程が介在している。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。