

氏名(本籍)	岡本寛之(和歌山県)
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第174号
学位授与年月日	平成17年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Studies on Activation Mechanism for the Muscarinic Receptor-Operated Cationic Channel in Guinea-pig Intestinal Smooth Muscle (モルモット腸管平滑筋のムスカリン受容体作動性陽イオンチャンネルの活性化機構に関する研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 小森成一 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

腸管平滑筋には M2 と M3 サブタイプのムスカリン受容体が存在し、副交感神経の伝達物質であるアセチルコリンの作用を仲介している。M2 受容体刺激は G 蛋白質を介して陽イオンチャンネルの開口を引き起こす。同チャンネルは膜電位と細胞内カルシウム濃度を調節し、筋収縮の発生に重要な役割を果たしている。しかし、チャンネル開口に至る詳細な情報伝達機構は未だ明らかではない。

本論文は、この問題を究明する一環として、モルモット回腸平滑筋を用いて 1) 陽イオンチャンネルと連関する G 蛋白質のタイプの特定、2) 同チャンネル開口における M3 受容体の関与、3) ホスホリパーゼ C の役割、について薬理学的および電気生理学的手法により検討した成果をまとめたものである。

カルバコールをはじめ 10 種類のムスカリン受容体作動薬について、それぞれの陽イオン電流誘発効力、M2 受容体仲介性サイクリック AMP 抑制効力、および M3 受容体仲介性カルシウム放出効力を調べ比較すると、陽イオン電流誘発効力とサイクリック AMP 抑制効力の間には相関性がなく、電流誘発効力とカルシウム放出効力の間には相関性が認められた。この結果、M2 受容体と陽イオンチャンネルを仲介する G 蛋白質は同受容体とアデニレートシクラーゼ抑制を仲介する G 蛋白質と異なること、M2 受容体だけでなく M3 受容体の刺激も陽イオンチャンネルの開口に必要である

こと、が明らかになった。さらに、カルバコールにより生じる陽イオン電流に対する各種 G 蛋白質 (Gi、Gs、Go、Gq) 抗体の効果を調べると、Go 抗体のみ電流を抑制した。この結果、陽イオンチャンネルに連関する G 蛋白質のタイプは Go であることが明らかになった。また、ホスホリパーゼ C の関与を調べるために、M3 受容体/Gq 蛋白質/PLC 系が陽イオンチャンネルを増強する条件下で、ホスホリパーゼ C 阻害薬 U73122 と Gq 抗体のカルバコール誘発陽イオン電流に対する効果を調べると、U73122 は Gq 抗体で抑制されない陽イオン電流の成分をも抑制した。この結果から、Gq 蛋白質と連関した PLC とは別の PLC が陽イオンチャンネルの開口に関与することが明らかになった。

以上を総合すると、腸管平滑筋には単独で存在する M2 受容体および M3 受容体に加えて M2 と M3 からなる複合体様の受容体が存在し、この複合受容体が Gq 蛋白質非依存型 PLC および Go 蛋白質を介して陽イオンチャンネルを開口するという情報伝達モデルが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

中枢および末梢組織には、神経伝達物質やオータコイドなどの生理活性物質によって活性化される陽イオンチャンネルが存在する。このチャンネルは細胞内カルシウム濃度および膜電位の調節に重要な役割を担っている。腸管平滑筋には、副交感神経の伝達物質であるアセチルコリンが作用すると、M2 サブタイプのムスカリン受容体 (M2 受容体) を介して開口する陽イオンチャンネルが存在する。しかし、受容体刺激からチャンネル開口に至る情報伝達過程については、まだその詳細は明らかになっていない。

本論文は、この問題を解明する一環として、腸管研究のモデル標本として広く使われているモルモット回腸平滑筋を実験対象として、(1) ムスカリン受容体と陽イオンチャンネルの間に介在する GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) のタイプの特定、(2) チャンネル活性化における M3 サブタイプムスカリン受容体 (M3 受容体) の関与の可能性および (3) ホスホリパーゼ C の役割、について薬理学的および電気生理学的手法を用いて検討した成績をまとめたものである。

カルバコールをはじめ 10 種類のムスカリン受容体作動薬それぞれの陽イオン電流誘発効果、サイクリック AMP 抑制効果および M3 受容体仲介性 Ca 放出効果を測定・比較した実験において、M2 受容体と陽イオンチャンネルの間に介在する G 蛋白質が同受容体とアデニレートシクラーゼ間に介在する G 蛋白質とは異なること、陽イオンチャンネルの活性化には M2 受容体のみならず M3 受容体も必要であることを示した。さらに、カルバコールにより生ずる陽イオン電流に及ぼす各種 G 蛋白質 (Gi、Go、Gs、Gq) 抗体の影響を比較・解析することにより、陽イオンチャンネルに連関する G 蛋白質は Go であることを明らかにした。ホスホリパーゼ C の役割を検討した実験では、同酵素の阻害薬

U73122 や阻害活性を持たない類似体U73343、G q 蛋白質抗体などを武器としてカルバコール誘発陽イオン電流を薬理的に解析し、G q 蛋白質と連関する一般的なホスホリパーゼCとは異なる、別のホスホリパーゼCがチャネル開口に関わっていることを示唆した。これらの結果は、腸管平滑筋におけるムスカリン受容体作動性陽イオンチャネルの活性化機構を解明する上で、有益な情報であると考えられる。

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があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題目 : Muscarinic agonist potencies at three different effector systems linked to the M₂ or M₃ receptor in longitudinal smooth muscle of guinea-pig small intestine
著者 : Okamoto, H., Prestwich, S.A., Asai, S., Unno T., Bolton T.B. and Komori S.
学術雑誌名 : British Journal of Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 135(7) : 1765-1775, 2002

- 2) 題目 : Phospholipase C involvement in activation of the muscarinic receptor-operated cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle cells
著者 : Okamoto, H., Unno, T., Arima, D., Suzuki, M., Yan, H.-D., Matsuyama, H., Nishimura, M., and Komori, S.
学術雑誌名 : Journal of Pharmacological Science
巻・号・頁・発行年 : 95(2) : 203-213, 2004

既発表学術論文

- 1) 題目 : Effects of G-protein-specific antibodies and Gβγ subunits on the muscarinic receptor-operated cation current in guinea-pig ileal smooth muscle cells
著者 : Yan, H.-D., Okamoto, H., Unno, T., Tsytsyura Ya. D., Prestwich, S.A., Komori, S., Zholos, A.V. and Bolton T.B.
学術雑誌名 : British Journal of Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 139(3) : 605-615, 2003