

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	安井 文智
学位論文題目			
Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using a G _{q11} protein-inhibitor, YM-254890 (ウシ毛様体筋におけるムスカリン性反応に関与する信号伝達機構の G _{q11} -タンパク阻害剤, YM-254890, の応用による検討)			
共著者名			
宮津 基、吉田晃敏、成瀬恵治、高井 章			
(未公表)			
研究目的			
<p>哺乳動物の視覚遠近調節は内眼筋の一つである毛様体筋の収縮によって引き起こされる水晶体の厚みまたは位置の微妙な変化によって実現されている。この筋は副交感神経支配の平滑筋であり筋細胞膜表面に存在する M₃ サブタイプのムスカリン受容体(M₃R)の刺激に応じて迅速に張力を発生し(収縮初期相)、その収縮の強さを一定に持続する(収縮持続相)という特性がある。筋収縮にはCa²⁺供給が必須であるが、初期相においては G_{q11}-タンパクに共役する信号伝達経路を介して細胞内小胞からCa²⁺が放出され、持続相においては細胞外液からCa²⁺が流入していると考えられている。しかしヒトやウシの毛様体筋細胞においては電位依存性のCa²⁺流入経路は存在しない。我々はウシ毛様体を用いた過去の実験で、ムスカリン刺激により発生する膜電流のノイズ解析によるコンダクタンスの違いから、2つの種類の非選択的陽イオンチャネル(NSCC)を同定した。これら NSCCL (35 pS)と NSCCS (100 fS)は M₃R の刺激により開口し、収縮持続相に必要な Ca²⁺の流入を引き起こすことがわかっている。しかし M₃R から NSCC の活性化に至る信号伝達経路に関しては従来ほとんど調べられていない。最近、細菌由来 depsipeptide の一種 YM-254890(YM)が G_{q11}-タンパクのαサブユニット(Gα_{q11})に特異的に結合し、その働きを抑制することが報告された。今回、ウシ毛様体筋においてカルバコール(CCh)によるムスカリン刺激で誘発される収縮、細胞内Ca²⁺濃度上昇、NSCCの膜電流に対する、このG_{q11}-タンパク阻害剤の効果を検討した。また、筋細胞内におけるM₃RとGα_{q11}の局在を観察するため、免疫蛍光染色をおこなった。</p>			

材料・方法

屠殺場から供与された新鮮ウシ眼球から毛様体筋を摘出した。等尺性張力は、 $1 \times 5\text{mm}$ に切り出した平滑筋束を用い U-gauge トランスデューサにより記録した。全細胞膜電流はコラゲナーゼによる酵素処理で単離したのち数日培養した毛様体筋細胞を用い、膜電位固定法(固定電位 -50 mV)により測定した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動は単離した毛様体筋細胞を用い Fluo-4 蛍光法により記録した。またフィブロネクチンをコーティングしたガラスの上で毛様体筋細胞を数日間培養し、超音波で細胞質を取り除きパラホルムアルデヒドで固定後、 $\text{G}\alpha_{q/11}$ 、 $\alpha\text{-actin}$ 、 M_3R にそれぞれ特異的な抗体を用い免疫蛍光染色を行った。

成績

$\text{G}_{q/11}$ -タンパク阻害剤 YM ($0.01\text{-}1\ \mu\text{M}$)は CCh ($2\ \mu\text{M}$)によって誘発される持続相の収縮力を濃度依存性、時間依存性に抑制した。YM ($1\ \mu\text{M}$)により完全に収縮が抑制された状態でカルシウムイオノフォアであるイオノマイシン($10\ \mu\text{M}$)を灌流するとふたたび収縮がみられたことから YM の収縮蛋白系に対する影響はほとんどないものと考えられた。YM には温度依存性があり、 25°C と 37°C での測定において 25°C の条件で抑制効果が減弱していた。 37°C においては $10\ \text{nM}$ の YM で抑制効果が観察され、 $100\ \text{nM}$ の YM で 90 分以内に完全に収縮を抑制した。一方、 25°C においては $10\ \text{nM}$ および $30\ \text{nM}$ の YM では明らかな抑制効果を認めず、 $300\ \text{nM}$ の YM が完全に収縮を抑制するまで 120 分を要した。低温において形質膜の物質透過性は低下することが知られており YM の効果にある程度影響しているものと考えられた。YM により完全に収縮を抑制した直後に CCh 刺激を加えても収縮は起こらないことから YM は持続相だけでなく初期相も抑制することがわかった。また YM を持続的に洗い流すと収縮初期相、収縮持続相ともに時定数 $140\ \text{min}$ でゆっくりと回復した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度測定は 25°C の条件で行った。YM($5\ \mu\text{M}$)は CCh($2\ \mu\text{M}$)により誘発される Ca^{2+} 濃度上昇の持続相を約1分で静止期のレベルに抑制した。YM の細胞外投与後5分以内に明らかな抑制効果を観察するためには比較的高濃度($>1\ \mu\text{M}$)の YMが必要だった。測定は 25°C の条件で行われており YMの温度依存性によるものと考えられた。また YM($10\ \mu\text{M}$)を 10 分間にわたり細胞外投与後すぐに CCh($2\ \mu\text{M}$)を投与しても Ca^{2+} 濃度に変動がみられないことから、YM が Ca^{2+} 濃度上昇の持続相だけでなく初期相も抑制することがわかった。

全細胞膜電流測定は 30°C の条件で行った。電極液には GTP($180\ \mu\text{M}$)を含む溶液を用い、CCh($2\ \mu\text{M}$)により誘発される内向き電流を観察した。我々は過去に、NSCCLと NSCCS の2種類の NSCC が開口することでこの内向きが発生していることを報告した。振れ幅の大きなノイズ波形は NSCCL の開口により、下方への基線のずれを生じさせるのは主に NSCCS の開口による。YM($5\ \mu\text{M}$)は CCh により誘発された内向き電流

のうち NSCCL と NSCCS の両方の成分を完全に抑制した。細胞内 Ca^{2+} 濃度測定と同様、5分以内に明らかな抑制効果を観察するためには比較的高濃度 ($>0.5 \mu\text{M}$) の YM が必要だった。また、電極液中に GTP の代わりに $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ($180 \mu\text{M}$) を含む溶液を用いた。ホールセル記録開始後、1~2分で NSCC の開口を示す内向き電流を観察し、ノイズから NSCCL および NSCCS の成分を解析した。YM ($10 \mu\text{M}$) は $\text{GTP}\gamma\text{S}$ によって引き起こされる NSCC の内向き電流には抑制効果を示さなかった。YM の作用点は $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ の GDP/GTP 変換反応であるといわれており、 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ が $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ と結合し続けたため YM が $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ に作用できなかったのであろう。

ウシ毛様体筋組織を用いたウエスタンブロットにおいて抗 $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ 抗体が示す 42 kDa のバンドは $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ の理論上の分子量と一致した。処理した筋細胞の形質膜に抗 $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ 抗体と抗 α -actin 抗体で同時に免疫染色を施し、形質膜内面に $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ と α -actin の両方が発現していることを確認した。同様に、抗 $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ 抗体と抗 M_3R 抗体で同時に免疫染色を施し、 $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ と M_3R の両方が発現していることを確認した。ここでパラホルムアルデヒドでの固定の処理を省くと、固定処理したものと比べ、抗 $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ 抗体による蛍光のスポットは著しく減少していた。 M_3R は7回膜貫通型のタンパクであるのに対し、 $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ は形質膜の内側に緩やかに繫留されているのみであるとされているので、これは当然予想される結果といえる。

考案

収縮力測定および Ca^{2+} 濃度測定において $\text{G}_{\text{q}11}$ 阻害剤 YM はその初期相と持続相の両方を抑制した。毛様体筋の副交感神経刺激による初期相は M_3R 、 $\text{G}_{\text{q}11}$ -タンパクを介した細胞内小胞からの Ca^{2+} 放出であることが報告されているので、初期相における YM の抑制効果は予想できる結果であった。一方、持続相は細胞外液からの Ca^{2+} 流入である。電位作動性 Ca^{2+} チャンネルを欠くウシ毛様体筋細胞において持続的な筋収縮を維持するために必要な Ca^{2+} は受容体作動性の NSCC からの流入により供給されている。ウシ毛様体筋には2種類の NSCC (NSCCL と NSCCS) が知られているが、今回の実験で M_3R からの信号は $\text{G}_{\text{q}11}$ -タンパクに共役した経路を通過してこれら両方のチャンネルに到達しそれらの開口を起こす可能性が示唆された。

ウシ毛様体筋細胞の形質膜あるいはその近傍に M_3R および $\text{G}\alpha_{\text{q}11}$ が高密度に局在していることを免疫蛍光染色により確認した。過去の報告では、ウシ眼球だけでなくヒト眼球、サル眼球においても M_3R (あるいは少なくともその mRNA) が同様に高密度に存在することが確認されている。またヒトやイヌの毛様体筋細胞において電位依存性の Ca^{2+} 流入経路は存在しないか、もしくは著しく少ないことが証明されている。

我々は過去に少なくとも4種類以上の TRP タンパクファミリー (TRPC1、TRPC3、TRPC4、TRPC6) がウシ毛様体筋細胞の形質膜に発現していることを確認した。NSCCL および NSCCS の分子本体がこれら TRPC 型チャンネルのヘテロ重合体である

可能性を示唆する状況的証拠もいくつか得られている。TRPC (特に TRPC3 と TRPC6) が、ホスホリパーゼ C に触媒される分解産物のひとつであるジアシルグリセロール (DAG) により活性化されるという報告が数多くなされている。しかし、膜透過性 DAG アナログである 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG; 1-100 μ M) を用いた実験を行ったが、毛様体筋の静止状態にも CCh 誘発収縮に対しても明らかな効果を示さなかった。

今回の実験により、YM は、ある信号伝達経路に $G_{q/11}$ -タンパクが関与しているかどうか判定するためにきわめて有用な試薬であることが示された。しかし、 $G_{q/11}$ -タンパクより下流の信号伝達経路の解明について更なる研究が必要である。

結語

ウシ毛様体筋を用いてカルバコール誘発刺激に対する $G_{q/11}$ -タンパク阻害剤 YM-254890 の抑制効果を検討した。毛様体筋のムスカリン受容体刺激による収縮には、初期相のみならず持続相においても $G_{q/11}$ -タンパクに共役した信号伝達経路が関与していることが強く示唆された。

引用文献

1. Sugawara R., Takai Y., Miyazu M., Ohinata H., Yoshida A. & Takai A. Agonist and antagonist sensitivity of non-selective cation channel currents evoked by muscarinic receptor stimulation in bovine ciliary muscle cells. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*. **26(3)**:285-292, July 2006.
2. Takai Y., Sugawara R., Ohinata H. & Takai A. Two types of non-selective cation channel opened by muscarinic stimulation with carbachol in bovine ciliary muscle cells. *J Physiol*. **559**: 899-922, 2004
3. Takasaki J., Saito T., Taniguchi M., Kawasaki T., Moritani Y., Hayashi K. & Kobori M. A Novel $G_{\alpha_{q/11}}$ -selective Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **Vol. 279, Issue 46**: 47438-47445, November 12, 2004

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	安井文智
審査委員長 柏 柳 誠 ㊞ 審査委員 鈴 木 裕 ㊞ 審査委員 高 井 章 ㊞ 審査委員 石 子 智 士 ㊞			
学 位 論 文 題 目 Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using a $G_{q/11}$ protein-inhibitor, YM-254890 (ウシ毛様体筋におけるムスカリン性反応に関与する信号伝達機構の $G_{q/11}$ -タンパク阻害剤, YM-254890, の応用による検討)			
哺乳動物の視覚遠近調節は、毛様体筋の収縮により引き起こされる水晶体の厚みの変化により行われている。毛様体筋は、ムスカリン M_3 受容体 (M_3R) を介して副交感神経により支配されている。我々がシャープな像を見続けるために、毛様体筋は持続的に収縮している。持続的な筋収縮には細胞外からの Ca^{2+} 供給が必須であり、ムスカリン刺激により開口する 2 種類の非選択的陽イオンチャネル (NSCC) が重要な役割を演じているが明らかにされている。しかしながら、ムスカリン受容体の活性化がどのような機構でこれらのイオンチャネルを開口させるかは不明だった。一方、細菌由来 depsipeptide の一種 YM-254890 (YM) が $G_{q/11}$ -タンパク質の α サブユニット ($G\alpha_{q/11}$) に特異的に結合し、その働きを抑			

制することが報告されている。そこで、学位提出者は、YM を用いて M_3R と共役する $G_{q/11}$ がウシ毛様体筋の持続的な収縮に関与するか否かを解析した。

$G_{q/11}$ 阻害剤 YM は、カルバコールにより生ずる収縮を濃度依存的に抑制した。また、カルバコールにより生ずる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加も $G_{q/11}$ 阻害剤 YM により抑制された。さらに、カルバコールによる NSCC の開口に起因する内向き電流は、 $G_{q/11}$ 阻害剤 YM により抑制された。また、免疫蛍光染色法を用いた解析は、ウシ毛様体筋細胞の形質膜あるいはその近傍に M_3R および $G_{\alpha q/11}$ が高密度に局在していることを示した。これらの本研究で得られた結果は、遠近調節に必要な持続的な毛様体筋の収縮は、 $G_{q/11}$ を介していることを明らかにした。また、 $G_{q/11}$ 阻害剤 YM は、細胞内情報伝達経路に $G_{q/11}$ が関与しているか否かを判定するためにきわめて有用な試薬であることも示した。本研究の成果は、生理学的な研究として非常に重要な知見をもたらすとともに、 $G_{q/11}$ 阻害剤の薬理作用を明らかにしたことから薬理学的にも重要である。

論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。