

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	石居信人
<p data-bbox="687 477 893 515">学位論文題目</p> <p data-bbox="376 551 1212 663">Endothelin-1 contracts bovine ciliary muscle via type A endothelin receptor coupled with the G_{q/11} protein</p> <p data-bbox="355 763 1240 871">(エンドセリン-1 は G_{q/11} と共役した A 型エンドセリン受容体を介してウシ毛様体筋を収縮させる)</p> <p data-bbox="730 981 861 1016">共著者名</p> <p data-bbox="595 1052 999 1088">宮津 基、吉田晃敏、高井 章</p> <p data-bbox="735 1196 858 1232">(未公表)</p> <p data-bbox="726 1413 868 1449">研究目的</p> <p data-bbox="233 1485 1366 1619">毛様体筋は視覚遠近調節と房水流出率の調節を司る特殊化した平滑筋である。神経支配はほぼ純粋に副交感性であり、伝達物質アセチルコリンは、G_{q/11}-タンパクと共役する M₃ 型ムスカリン受容体を介して収縮を起す[1,2]。</p> <p data-bbox="233 1655 1366 1789">一方、眼内には、ほとんどの平滑筋に強力な収縮作用を示すペプチドとして知られるエンドセリン-1 (ET1) が広く存在し、房水動態の調節に関与する可能性が考えられているが、詳細は不明である。</p> <p data-bbox="233 1825 1366 1906">本研究では ET1 の毛様体筋収縮に対する作用と、その発現機構を明らかにすることを目的とした実験を行った。</p>			

方法

【材料】 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。

【等尺性張力記録】 張力は、顕微鏡下で 1×5 mm に切出した平滑筋束において、U-gauge トランスデューサにより等尺性に記録した。

【細胞内 Ca^{2+} 濃度測定と全細胞膜電流記録】 ET1 によって引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) と膜電位固定法(固定電位 -50 mV)による全細胞膜電位記録には、コラゲナーゼによる酵素処理で単離したのちフィブロネクチンをコーティングしたガラス表面上で数日培養した毛様体筋細胞を用いた。 Ca^{2+} 蛍光指示薬としては Fluo-4 を用いた。

【免疫蛍光染色】 同じく単離培養した細胞を低張液中で超音波処理し、細胞質を除去した。ガラス表面に細胞質側を外に向けて付着して残存する膜標品に対し抗体を作用させた。一次抗体としては、抗 ETA 受容体抗体とともに、膜が平滑筋細胞由来であることの確認のため、抗 α -actin 抗体を混合して用いた。膜に結合した抗体の可視化のため、Alexa-Fluor を結合した二次抗体を用いた。

結果

ET1 (1 - 200 nM)は、 M_3 ムスカリン受容体刺激による速やかな収縮弛緩とは異なり、立上がりが非常に緩徐で持続的な収縮を引き起した。ET1除去後の弛緩も、時定数 60分程度ときわめて緩徐であった。このET1収縮作用はムスカリン作動薬であるカルバコールの作用と相加的であった。

ET1による収縮は、初期相、持続相とも、ETA受容体阻害剤であるBQ610、BQ123によって濃度依存性に抑制された($K_i=30-40 \mu\text{M}$)。一方、ETB受容体阻害剤であるBQ788 (1 - 10 μM) は、ET1により誘発された収縮を、わずかながら有意に増強した。ET1による収縮は $\text{G}_{q/11}$ 阻害剤であるYM-254890 (500 nM)によっても、完全に抑制された。

ET1による収縮の初期相は細胞外 Ca^{2+} 除去でかなり減弱したものの存続したが、その持続相は細胞外 Ca^{2+} 除去で完全に消失した。

ET1 (30 nM)はまた、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を二峰性に上昇させた。この応答は、特異的 $\text{G}_{q/11}$ 阻害剤YM-254890 (500 nM)による細胞の前処理により完全に消失した。 Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシンは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に伴って収縮を発生させたが、ET1 (30 nM)の添加はこの収縮を40-50 %増強した。ET1添加による増強分は、Rho kinase 阻害剤であ

るY-27632 (20 μM)によって完全に抑制された。

全細胞膜電流測定において、ET1 (30 nM)は、ノイズ様成分の多い内向き電流を誘発した。非定常分散分析により、この電流が、 M_3 受容体刺激によって開口することが知られている、2種類の非選択性陽イオンチャネル(単位コンダクタンス100 fSと30 pS)の開口によるものであることが確認された。

免疫蛍光染色において、毛様体筋細胞膜の細胞内側への抗ETA抗体の密な結合が観察された。

考案

今回の実験により、ET1が細胞膜表面に発現する主にETA受容体を介して収縮を引き起こすことが明らかとなった。ET1投与時の収縮、除去後の弛緩ともにきわめて遅い時間経過を示すのは、ET1のETA受容体結合および解離速度定数が非常に小さいという報告[3]と符合する。

一方、ETB受容体阻害剤がET1による収縮を有意に増強したことは、ETB受容体を介する弛緩促進機構が存在し、これがETA受容体による収縮機構と、少なくとも部分的には、同時に働いている可能性を示唆する。

ET1により起る収縮と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が、ともに $G_{q/11}$ 阻害剤によって完全に阻害されたことは、毛様体筋ETA受容体が、 M_3 受容体[1,2]と同様に、 $G_{q/11}$ と共役していることを示している。

今回の実験結果から想定される $G_{q/11}$ 以降の信号の流れは次の3点に要約でき、 M_3 受容体刺激による収縮の場合[1,2]と同一の系が使われている可能性が高い。

- (1) ETA/ $G_{q/11}$ からの信号は、収縮初期相では、細胞内貯蔵部位からの遊離により、持続相では細胞外からの流入により、収縮に必要な Ca^{2+} を動員する。
- (2) また、ETA/ $G_{q/11}$ からの信号は、収縮持続相における Ca^{2+} 流入として機能する2種類の非選択性陽イオンチャネルを開口させる。そのチャネル開口の一部は、初期相における Ca^{2+} 放出にともなう細胞内貯蔵部位の枯渇により活性化される、いわゆる store-operated mechanism [2]によっている可能性が考えられる。
- (3) さらに、信号の一部はRhoA/Rho kinase系[2]にも流れ込んで Ca^{2+} 感受性増強を起こす。

結語

ET1 による収縮は主として ETA/G_{q/11} を介する信号伝達系を介して発生する。G_{q/11} 以降の信号の流れに関しては、M₃ 受容体刺激による収縮の場合と同一の系が共用されているらしい。M₃ 受容体を介する毛様体筋の素早い収縮は遠近調節に必要であるが、ETA 受容体を介する緩徐な収縮は長期的に安定した房水流出の調節に寄与している可能性が考えられる。




引用文献

1. Takai Y, Sugawara R, Ohinata H & Takai A (2004). Two types of non-selective cation channel opened by muscarinic stimulation with carbachol in bovine ciliary muscle cells. *J Physiol.* **559**: 899-922.
2. Yasui F, Miyazu M, Yoshida A, Naruse K & Takai A (2008). Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using YM-254890, an inhibitor of the G_{q/11} protein. *Br J Pharmacol.* **154**: 890-900.
3. Desmarests J, Gresser O, Guedin D & Frelin C (1996). Interaction of endothelin-1 with cloned bovine ETA receptors: biochemical parameters and functional consequences. *Biochemistry* **35**: 14868-14875.

参考文献

1. Yasui F, Miyazu M, Yoshida A, Naruse K & Takai A (2008). Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using YM-254890, an inhibitor of the G_{q/11} protein. *Br J Pharmacol.* **154**: 890-900.

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	石居 信人
審査委員長 柏柳 誠  審査委員 鈴木 裕  審査委員 高井 章 			
学 位 論 文 題 目 Endothelin-1 contracts bovine ciliary muscle via type A endothelin receptor coupled with the G_{q/11} protein (エンドセリン-1 は G _{q/11} と共役した A 型エンドセリン受容体を介してウシ毛様体筋を収縮させる)			
<p>平滑筋である毛様体筋は、視覚系において遠近調節と房水流出率の調節を行っている。眼内には、平滑筋に強力な収縮作用を引き起こすエンドセリン-1 (ET1)が広く存在している。ET1 は房水動態の調節に関与する可能性が考えられているが、詳細は不明である。提出者は、ET1 の毛様体筋収縮に対する作用と、その発現機構を明らかにすることを目的として、ウシ毛様体を用いて実験を行った。</p> <p>ET1 は、ムスカリン作動薬であるカルバコールの作用に相加的で緩徐な収縮を引き起こした。この収縮は、初期相、持続相とも、ET_A 受容体阻害剤によって抑制された。また、ET1 による収縮は G_{q/11} 阻害剤によっても、完全に抑制された。これらの結果は、ET1 は ET_A 受容体で受容され、G_{q/11} を介して収縮を引き起こすことを示した。細胞外の Ca²⁺を除去しても、初期には ET1 による収縮が見られ、その後、完全に消失した。これらの結果は、ET1 は細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺の放出を引き起こすとともに細胞外からの Ca²⁺流入を引き起こすことを示した。さらに、電気</p>			

生理学的解析から、ET1 が 2 種類の非選択性陽イオンチャネルを開口させることが示された。また、免疫染色から毛様体筋細胞膜の細胞内に ET_A 受容体が存在することが示された。提出者は、ムスカリン受容体を介する毛様体筋の素早い収縮は遠近調節に必要であるが、ET_A 受容体を介する緩徐な収縮は長期的に安定した房水流出の調節に寄与している可能性があると考えしている。本論文は、視覚遠近調節と房水流出率の調節を司る毛様体筋において、ET1 による収縮活性化の機序を明らかにした。

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。