

氏名（本籍） 若^{わか} 森^{もり} 実^{みのる}

学位の種類 博 士 （ 医 学 ）

学位記番号 医 博 第 1 1 3 2 号

学位授与年月日 平 成 4 年 3 月 27 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学研究科
 （博士課程）病態科学系専攻

学位論文題目 HYPERPOLARIZING MUSCARINIC RES-
 PONSES OF FRESHLY DISSOCIATED RAT
 HIPPOCAMPAL CA 1 NEURONES
 （ラット海馬CA1錐体細胞におけるムスカリン性過分極応答）

（主 査）

論文審査委員 教授 赤池 紀生 教授 丹治 順

教授 小暮 久也

論文内容要旨

【目 的】

アセチルコリン (ACh) 受容体は薬理的にニコチン性 (nACh) とムスカリン性 (mACh) に分類される。nACh 受容体は受容体-チャンネル複合体であるが, mACh 受容体は G 蛋白共役体である。近年, 分子生物学的手法により 5 種類の mACh 受容体の分子種が同定され (m1~m5), その内の m1, m2 と m3 は薬理学的分類である M1, M2, M3 受容体に対応する。この m1 と m3 受容体を NG108-15 細胞や A9L 線維芽細胞に発現させると ACh により Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流が惹起され膜電位は過分極する。哺乳動物海馬 CA1 領域は本能, 情動, 感覚, 記憶などに重要な役割を持つ。その錐体細胞は内側中隔核からコリン作動性神経の入力を受け, *In Situ Hybridization* によれば m1 と m3 の mRNA が密に錐体細胞層に存在することが報告されている。しかし, M1 と M3 受容体を有する海馬錐体細胞において ACh による過分極応答に関する報告は少なく, その詳細については明らかでない。本研究では急性単離した海馬 CA1 錐体細胞にパッチクランプ法や微小蛍光測光法を適応し, ACh で惹起される過分極応答の生理学的, 薬理学的特性ならびにその細胞内機序を検討した。

【方 法】

2~3 週齢ウイスターラットの海馬を含む厚さ 350 μ m の脳薄切片を作製し, pronase 0.01%, Thermolysin 0.01% を含む 31°C のクレブス液でそれぞれ 20 分間処理した。その後, 薄切片標本より海馬 CA1 領域を摘出し, ピペティングにより機械的に錐体細胞を単離した。これらの錐体細胞にパッチクランプ法を適用し膜電位固定下に ACh 応答を記録した。従来の whole-cell 法では電極内液で細胞内液が急速に置換され, セカンドメッセンジャーを介する応答が経時的に消失する (「wash-out」効果) 為, イオノフォアである nystatin を電極内液に添加し, 細胞内からの高分子の流出を阻止した whole-cell 法 (「perforated patch-clamp 法」とも呼ぶ) を使用した。細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度は単離錐体細胞を 5 μ M fura 2-AM を含むタイロド液で 90 分間処理した後, 暗室にて 340 と 380nm の励起光を照射し測定した。実験は全て室温で行い, 薬液の投与は急速外液交換法 (「Y チューブ法」) を用いた。

【結 果】

海馬 CA1 領域より単離した錐体細胞は保持電位 -40mV で 3 種類の ACh 応答を惹起した。すなわち, 膜コンダクタンスの増加を伴う一過性外向き電流 (377 細胞中 191 細胞), コンダクタン

スの減少を伴う持続性内向き電流（3細胞）と内向き電流に先行する外向き電流（177細胞）である。なお、6細胞はAChに反応しなかった。今回は序に述べた様に一過性の外向き電流に焦点を当てて検討した。

AChは濃度依存性に一過性の外向き電流 (I_{ACh}) を惹起し、 I_{ACh} は K^+ の平衡電位で逆転した。muscarine と carbamylcholine は ACh と同様の応答を示したが、McN-A-343 (M1 agonist) および oxotremorine (M2 agonist) は無効であった。更に、ムスカリンアンタゴニストは、atropine > pirenzepine > AF-DX-114 の順で濃度依存性に I_{ACh} を可逆的に抑制した。無 Ca^{2+} 外液中では、初回の ACh 投与は I_{ACh} を惹起したが、2度目以降の投与では応答は見られなかった。fura 2 の実験においても細胞外液の Ca^{2+} の有無を問わず、初回の ACh 投与によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加した。カルモデュリンアンタゴニストは chlorpromazine > trifluoperazine > W-7 の順で濃度依存性に I_{ACh} を抑制したが、プロテインキナーゼ抑制剤 (H-7) は効果を示さなかった。ところで、現在5つのカルモデュリン依存性プロテインキナーゼが同定されているが、その一つの Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II の抑制剤 (KN-62) は可逆的に I_{ACh} を抑制した。「perforated patch-clamp 法」の性格上、電極内から細胞内へ高分子物質を還流できない。つまり、細胞膜非透過物質を細胞内に注入できない。従って、G 蛋白やセカンドメッセンジャーの同定は困難である。しかし、ACh 投与により細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度が上昇し、更に、リン脂質代謝カスケードに修飾作用を持つ Li^+ が I_{ACh} と細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を促進した。よって、イノシトール 3 リン酸 (IP_3) が細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離に重要な役割を有することが示唆された。なお、 I_{ACh} はコレラ毒素・百日咳毒素によって全く影響を受けなかった。以上の事から、ラット海馬 CA1 錐体細胞には M3 ムスカリン性受容体が存在し、 G_q 蛋白を介して PLC を活性化し IP_3 を産生する。この IP_3 が細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位に作用して Ca^{2+} を遊離し、この Ca^{2+} がカルモデュリンに結合する。更にその Ca^{2+} /カルモデュリン複合体が Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼを活性化する。その結果、 K^+ チャンネルが活性化され過分極応答を引き起こし、活動電位の発火頻度を減少させる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

ムスカリン性アセチルコリン (mACh) 受容体は中枢神経系に広く分布し、神経細胞の興奮性の調節に関与している。近年、分子生物学的手法により 5 種類の mACh 受容体の分子種が同定され (m1~m5)、組織学的に受容体の脳内分布も明らかになった。しかし、良好な生理機能を有する中枢神経細胞を用いてこれらの受容体を決定し、細胞応答に至るまでのその細胞内情報伝達路を解明することは、技術的困難さのため現在まで持ち越されていた。本論文はラット海馬 CA1 領域の錐体細胞を酵素ならびに機械的処理によって単離した後、これらの細胞にパッチクランプ法や微小蛍光測光法を適用し、mACh 応答の生理・薬理学的特性とその細胞内機序を解明したものである。

パッチクランプ法で膜電位を -40mV に保持して、ACh を投与すると濃度依存性に一過性の外向き電流 (I_{ACh}) が惹起され、この電流は K^+ の平衡電位 (E_{K}) で逆転した。また、mACh 受容体の分子種の決定にはより選択性を持つと思われる各種のアゴニストやアンタゴニストを用い、これらの親和性の差から I_{ACh} は M3 受容体を介することが示唆された。ところで、従来の「whole-cell 法」を用いる実験ではパッチ電極内液で細胞内液が置換されるため、 I_{ACh} は経時的に減少消失した。しかし、細胞内代謝関連物質を正常に維持できる「perforated patch-clamp 法」では、長時間安定した I_{ACh} の記録ができた。すなわち、 I_{ACh} の発生に可溶性の 2 次メッセンジャーが関与することを示唆した。そこで、電気生理学的手法、fura-2 顕微測光法や各種情報伝達関連試薬を併用した多角的研究を行い、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が I_{ACh} にとって重要であること、またこの細胞内 Ca^{2+} の上昇は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位に由来することも証明した。以上の結果の他に、M3 ムスカリン性受容体はコレラ毒素 (CTX) 非感受性で百日咳毒素 (PTX) 非感受性 G_q 蛋白を介してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化しイノシトール 3 リン酸 (IP_3) を産生する。 IP_3 は細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位に作用して Ca^{2+} を遊離し、これがカルモデュリン (CaM) に結合する。更に、その $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 複合体は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼ II を活性化する。その結果、 K^+ チャンネルが活性化され、細胞の過分極を惹起し、活動電位発火頻度を減少することを解明した。

このように、本論文は中枢神経系海馬領域における mACh 受容体の生理機能発現に至るまでの数々の細胞内情報伝達系に関する貴重な新知見を我々に提供しており、博士論文として申し分のない、優れたものであることを認める。