

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	菅 原 亮 一
-------	-----	-----	---------

学 位 論 文 題 目

Agonist- and antagonist-sensitivity of non-selective cation channel currents  
evoked by muscarinic receptor stimulation in bovine ciliary muscle cells

(ウシ毛様体筋細胞においてムスカリン受容体刺激により誘発される非選択性  
陽イオンチャネル電流のアゴニストおよびアンタゴニスト感受性)

共 著 者 名

高井佳子, 吉田晃敏, 宮津基, 大日向浩, 高井章

未 公 表

研 究 目 的

毛様体筋は視覚における遠近調節に関わる平滑筋で、ムスカリン受容体を介して収縮することが知られている。焦点を合わせ維持するためにその収縮には微妙な制御機構がはたらいっていると考えられるが、それはいまだ明らかにされていない。我々はこれまでウシの毛様体平滑筋細胞には単位コンダクタンスの異なる2種類の非選択性陽イオンチャネル(NSCCLとNSCCS)が存在し、 $\text{Ca}^{2+}$ の流入経路として収縮に関与していることを報告してきた。本研究では、この2種類のチャネルそれぞれの毛様体平滑筋の収縮制御における役割を明らかにするためにアゴニスト濃度とチャネル開口との関係、チャネル開口に関わる受容体の種類について検討を行った。

材 料 ・ 方 法

(1) 実験標本の作成

ウシ眼球より摘出した毛様体から平滑筋組織を摘出した。さらに0.4%コラゲナーゼおよび0.02%パパインによる処理にて平滑筋細胞を単離した。

(2) 電気生理学的実験

全細胞モードのパッチクランプ法による記録を行った。電極は硼珪酸ガラス製のものを用いた。増幅器としてAxonpatch200Bを用い、デジタルデータの取り込みはdigidata1200を介しコンピュータ上にインストールしたソフトウェアpCLAMPを用いて行った。正常細胞外灌流液(mM)としてNaCl, 127; KCl, 5.9;

CaCl<sub>2</sub>, 2.4; MgCl<sub>2</sub>, 1.2; glucose, 11.8; HEPES, 10を含むKrebs液(pH7.4, 30°C)を用い、細胞内灌流液(電極液)として(mM) NaCl, 5; Cs aspartate, 100; MgCl<sub>2</sub>, 5; ATP, 5; HEPES, 20; BAPTA, 5; GTP, 180 $\mu$ M含む液(pH7.0, 30°C)を用いた。電極内の遊離Ca<sup>2+</sup>濃度はCa/BAPTA比を変えることにより調節した。アゴニストとしてはカルバコール(carbamylcholine chloride; CCh)を用いた。カルバコールによって引き起こされる全細胞電流のノイズ成分については非定常分散分析を行い、平均電流値と分散値の関係からチャンネルの単位コンダクタンスを推定した。

### (3) アゴニスト濃度とNSCCSおよびNSCCLの開口との関係

同一の細胞においてCChの濃度を変化させながら繰り返し刺激し、反応電流を記録した。

### (4) ムスカリン受容体サブタイプの同定

ムスカリン受容体遮断薬存在下でCChによって刺激し、その反応電流を記録した。NSCCSの開口由来の内向き電流のみを分離、記録するために陽イオンを全てバリウムイオンで置換した外灌流液を用いた。遮断薬としては, atropine, pirenzepine, 1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide (4-DAMP), 5,11-Dihydro-11-[(2-diethylaminomethyl-piperidino)acetyl]-6H-pyrido[2,3- $\beta$ ][1,4]benzodiazepine-6-one (AF-DX116)を用いた。

### (5) 蛍光免疫染色

上記のように単離したウシ毛様体筋細胞をフィブロネクチンでコートしたガラス面上において無結成HAM F12培地で4-5日培養したのち、低浸透圧下で短い超音波処理を行い細胞体を除去し、ガラス面に接着して残った細胞膜を用いた。膜の細胞質側をTRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6およびM<sub>3</sub>型ムスカリン受容体(MR<sub>3</sub>)のそれぞれ細胞内ドメインを特異的に認識する一次抗体(ウサギポリクローナルIgG)、およびAlexa Fluor 546 蛍光色素(Invitrogen)で標識した二次抗体(ヒツジ抗ウサギIgGポリクローナルIgG)で染色した。平滑筋細胞の同定の目的で、同じ膜標品を抗 $\alpha$ アクチン抗体(マウスモノクローナルIgG2a; Progen Biotek)とAlexa Fluor 488蛍光色素で標識した二次抗体(ヒツジ抗ウサギIgGポリクローナル)でも染色した。蛍光画像の撮影にはオリンパスのデジタルCCD顕微蛍光画像解析システムを使用した。

### (6) 統計学的解析

数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表す。濃度抑制関係についてはHill関数を非線形最小二乗回帰し、見かけの解離定数KとHill係数hとを推定した。

### 1. アゴニスト濃度とNSCCSおよびNSCCLの開口との関係

膜電位を-50 mVに固定し、2  $\mu$ Mのカルバコールで刺激すると、内向き電流が観察された。この電流は大半の細胞では著明なノイズ成分を伴う基線の動きとして観察されるが、非定常分散分析による平均電流値と分散値の関係からNSCCS（単位コンダクタンス, 100 fS）とNSCCL(35 pS)の両者の開口に由来することが推定された。外灌流の速度を低下させた条件下では、カルバコール濃度が比較的低いと推測される時点ではNSCCLよりもNSCCS由来と推定される電流が著明であり、濃度が高まるにつれNSCCL由来と推定される成分が増加する様子が観察された。様々な濃度のカルバコール（0.01-200  $\mu$ M）で刺激したときに記録された内向き電流の積分値から、NSCCS由来の反応は $K = 0.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ,  $h = 0.98 \pm 0.57$  ( $n = 31$ ), NSCCL由来の反応は  $K = 8.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ,  $h = 1.04 \pm 0.06$  ( $n = 58$ )の濃度反応曲線が得られた。

### 2. NSCCSの開口に関わるムスカリン受容体サブタイプの同定

膜電位を-50 mVに固定し、陽イオンを全てバリウムイオンで置換した外灌流液で灌流しながら数種類のムスカリン受容体遮断薬存在下においてカルバコール（2  $\mu$ M）で刺激したときに記録される内向き電流の積分値を遮断薬非存在下での値と比較すると、遮断作用の強さはatropine ( $K = 0.6 \pm 0.3$ ,  $n = 22$ )  $\sim$  4-DAMP ( $K = 0.7 \pm 0.3$ ,  $n = 23$ )  $\gg$  pirenzepine ( $K = 239 \pm 98$ ,  $n = 19$ )  $>$  AF-DX116 ( $K = 611 \pm 361$ ,  $n = 21$ )の順となり、カルバコール刺激によるNSCCS由来の反応が $M_3$ 受容体を介して起きていることが推定された。

### 3. TRPCチャネルおよび $MR_3$ の蛍光抗体法による同定

特異抗体を用いた蛍光抗体染色後の細胞膜標本（「材料・方法参照」）の顕微鏡像において、どの抗体についても、 $\alpha$ アクチン陽性領域にTRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6および $MR_3$ の結合に基づく蛍光スポット（密度約1 spot/ $\mu\text{m}^2$ ）を認めた。

本研究では、最近我々が報告したウシ毛様体平滑筋細胞に存在する単位コンダクタンスの異なる2種類の非選択性陽イオンチャネルのうち、単位コンダクタンスの小さいチャネル（NSCCS）が単位コンダクタンスの大きいチャネル（NSCCL）に比べ低濃度のアゴニストの刺激で開口することが示唆された。そこで、NSCCSとNSCCLそれぞれの開口に関わるムスカリン受容体サブタイプの相違

の有無に着目し、薬理学的検討を行った。カルバコール刺激による内向き電流が $M_3$ 受容体を介して生じることは過去の報告において示されているが、これは正常外灌流液を用いての実験であり2種のチャンネルを区別しての検討はなされていない。本研究では、NSCCSがNSCCLに比べ二価の陽イオンの透過性が良好であることから外灌流液の陽イオンを全てバリウムイオンに置換し可能な限りNSCCS由来の電流のみを記録するという条件下で実験を行ったが、この条件下でもカルバコール刺激による反応が $M_3$ 受容体を介していることを示唆する結果が得られた。この結果はNSCCSが $M_3$ 受容体を介して開口することを示しており、つまりはNSCCSとNSCCLがともに $M_3$ 受容体を介して開口することを示唆するものである。これら2種のチャンネルは、 $M_3$ 受容体からチャンネルに至るシグナル伝達経路に何らかの相違点があると推測される。

今回の蛍光免疫染色による実験で、以前われわれがRT-PCR法でmRNAを検出したTRPC1, TRPC3, TRPC4およびTRPC6の蛋白質が、毛様体筋細胞の形質膜に発現していることが確かめられた。今後これらとNSCCLおよびNSCCSとの関連に興味を持たれる。また、 $MR_3$ も形質膜に相当密に存在することが示されたことは、上記のアンタゴニストを用いた実験の結果とも符合するものといえる。

## 結

## 論

今回の研究は、ウシ毛様体平滑筋に存在する単位コンダクタンスの異なる2種類の非選択性陽イオンチャンネルNSCCSとNSCCLの相違点および類似点を新たに示し、それぞれが遠近調節において果たす機能的意義について重要な情報を新たに提供した。NSCCLやNSCCSの様な「受容体作動性非選択性陽イオンチャンネル」の分子候補として最近注目されているTRPC蛋白の毛様体筋細胞膜における発現が確認できたことは、今後、両チャンネルの分子本体を解明する上で大いに参考になる知見といえる。

## 引用文献

- 1) Takai Y, Awaya S & Takai A. Activation of non-selective cation conductance by carbachol in freshly isolated bovine ciliary muscle cells. *Pflugers Arch.* 433:705-12, 1997.
- 2) Takai Y, Miyake Y, Takai A. Non-selective Cation Channels and possible involvement in regulation of contraction in bovine ciliary smooth muscle. *Neuro-ophthalmology Japan* 20: 163-73, 2003.

## 参考文献

- 1) 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.

## 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	菅原 亮一
<div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> <u>審査委員長</u>     柏 柳 誠     ㊞ </div> <div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> <u>審査委員</u>         原 明 義     ㊞ </div> <div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> <u>審査委員</u>         高 井 章     ㊞ </div> <div style="text-align: right;"> <u>審査委員</u>         吉 田 晃 敏   ㊞ </div>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Agonist- and antagonist-sensitivity of non-selective cation channel currents evoked by muscarinic receptor stimulation in bovine ciliary muscle cells</b></p> <p>(和訳)</p> <p>(ウシ毛様体筋細胞においてムスカリン受容体刺激により誘発される非選択性陽イオンチャネル電流のアゴニストおよびアンタゴニスト感受性)</p>			
<p>毛様体筋は視覚における遠近調節に関わる平滑筋で、ムスカリン受容体刺激により収縮することが知られている。しかしながら、毛様体筋がどのような機構で収縮が調節されているかは分子レベルでいまだに明らかにされていない。学位論文提出者は、毛様体筋に数多く存在し、収縮の制御に主体的な役割を演じている非選択性陽イオンチャネル (NSCCS) が <math>M_3</math> 型ムスカリン受容体(<math>MR_3</math>)を介して開口することを生理学および薬理学的に明らかにした。また、NSCCS の分子的候補として予想される TPR チャネルが形質膜に存在するかを免疫組織化学的に解析した。形質膜のみを観察する先進的手法を適用することにより、<math>MR_3</math> と TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 が形質膜で機能的に連関する可能</p>			

性を示した。

毛様体筋は、遠近調節のみならず、眼房水の流出の調節にも重要な役割を演じている。緑内障が眼房水の流出の阻害による眼圧の上昇に起因することを考えると、NSCCS そのものあるいは、NSCCS の働きを調節する分子を標的とするという、全く新しい概念の緑内障の治療薬の開発につながる医学的に重要な研究であるといえる。

今回、この論文をまとめるに当たり、提出者は生理学の分野では最高と評価を得ている *Journal of Physiology* に本論文で詳細に検討したウシ毛様体筋細胞の NSCCL と NSCCS がムスカリン受容体で制御されていることを共著者として発表している。これは、提出者の研究能力が世界的なレベルで認められていることを端的に示している。

また、論文提出者にその内容および関連領域について試問したところ、適切で明確な解答が得られた。このように、医学博士として十分な科学的素養、論理的な思考能力および問題解決能力を有していることから、学位論文提出者が本学医学博士の学位を取得する十分な資格を有すると考えられる。