学位論文題名

モルモット副腎髄質細胞におけるムスカリンおよびプリン受容体を介する
カテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇機構について

学位論文内容の要旨

モルモットの灌流副腎標本および副腎髄質分離細胞を用いて、ムスカリンおよびプリン受容体刺激のカテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度におよぼす作用を検討した。

1. 灌流副腎で、muscarine(1~300 μ M)と pilocarpine(10~300 μ M)は濃度依存性にカテコールアミン放出を引き起こした。放出効果は muscarine の方が著しく強かった。分離髄質細胞においても各種ムスカリン作動薬は濃度依存性にカテコールアミン放出を引き起こし、その力価は高力価の muscarine、methacholine と、低力価の oxotremorine、bethanechol、pilocarpine の二つのグループに分けられた。
2. 灌流副腎と分離細胞ともにムスカリン作動薬によるカテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、外液の Ca^{2+} を除去すると減少はしたが一部残存した。
3. ムスカリン受容体遮断薬のうち pirenzepine と 4-DAMP は muscarine によるカテコールアミン放出の濃度作用曲線を右方移動させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制した。これに対して、methoctramine は両者にほとんど影響を与えなかった。
4. 灌流副腎標本において、ATP(2 ~ 10mM)は濃度依存性のカテコールアミン放出を引き起こした。一方、ADP はわずかなカテコールアミン放出を起こしたが、adenosine、AMP には放出作用は認められなかった。
5. ATP によるカテコールアミン放出は外液 Na^+ の除去により影響を受けなかったが、 Ca^{2+} 除去により可逆的に抑制された。分離髄質細胞においても、ATP(500 μ M)は外液 Ca^{2+} 依存性のカテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こした。
6. 単一の分離髄質細胞に muscarine、nicotine および KCl を適用するといずれも細胞内 Ca^{2+} 濃度を急速に上昇させた。この上昇は徐々に減少はするが薬物が存

在している間持続した。持続相の経過中に外液 Ca^{2+} を除去するといずれの場合も可逆的に抑制された。一方、 Ca^{2+} 除去液下でこれら薬物を与えた場合は、muscarine のみが初期の一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を起こしたが他は無効であった。

7. Caffeine、あるいは caffeine と ryanodine の前処置により外液の Ca^{2+} 除去下での muscarine による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は抑制された。
8. 細胞内にイノシトール三リン酸(InsP_3)を適用すると一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を起こし、その後の muscarine の効果を抑制した。一方、nicotine や脱分極による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は影響を受けなかった。
9. Muscarine は一過性の脱分極や短い過分極にともなう程度の異なる持続的な脱分極を起こした。この muscarine による脱分極の大きさと持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇の間には正の相関が認められた。Muscarine による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の持続相は膜電位固定では抑制される傾向であった。
10. Muscarine による持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と Mn^{2+} 流入は電位依存性 Ca^{2+} チャンネル遮断薬の methoxyverapamil により抑制された。

以上の成績より、1) モルモット副腎髄質細胞においてムスカリン作動薬は M_1 単独あるいは M_1 と M_3 の両サブタイプを受容体を介してカテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とを起こすことが推察された。2) この細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は細胞内 Ca^{2+} ストアからの放出と細胞外 Ca^{2+} の流入によって生じることが明らかとなった。3) ムスカリン感受性 Ca^{2+} ストアのセカンドメセンジャーは InsP_3 と考えられ、その一部はカフェイン感受性ストアと重複していることが示唆された。4) ムスカリン受容体刺激による細胞外からの Ca^{2+} 流入には、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと非選択的陽イオンチャンネルの活性化が関与していることが示唆された。5) 一方、ATP はもっぱら細胞外からの Ca^{2+} 流入を促進しカテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を起こすことが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 菅 野 富 夫
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 助 教 授 伊 藤 茂 男

学位論文題名

モルモット副腎髄質細胞におけるムスカリンおよびプリン受容体を介する

カテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇機構について

申請者はモルモットの灌流副腎標本および副腎髄質分離細胞を用いて、ムスカリンおよびプリン受容体刺激によるカテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度におよぼす作用を検討し、以下の成果を納めた。

1. 各種ムスカリン作動薬は、副腎髄質細胞から濃度依存性にカテコールアミン放出を起こし、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた。これらの作用を起こす力価は、muscarineとmethacholineは高く、oxotremorine, bethanecholおよびpilocarpineは低かった。ムスカリン作動薬によるこれらの作用は、外液の Ca^{2+} 除去後も一部残存した。

2. ムスカリン受容体遮断薬のpirenzepineと1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxy piperidinium Iodideはmuscarineによるカテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制したが、methocitramineは無効であった。

3. ATPは細胞外 Ca^{2+} 依存性にカテコールアミン放出と細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を起こし、ADPもわずかに放出を起こしたが、adenosineとAMPは無効であった。

4. 単一細胞におけるmuscarineによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、nicotineやKClによるものと同様に急速な一過性の上昇相とその後徐々に減少はするが、muscarineが存在する間持続する相からなっていた。細胞外 Ca^{2+} 不在下ではmuscarineのみが一過性の Ca^{2+} 濃度の上昇を起こし、nicotineとKClは無効であった。muscarineによる一過性の Ca^{2+} 上昇はcaffeineまたはcaffeineとryanodineの前処置により一部抑制された。

5. イノシトール三リン酸の細胞内適用は一過性に Ca^{2+} 濃度を上昇させ、その後のmuscarineの効果を抑制したが、nicotineや脱分極による Ca^{2+} 濃度は影響を受けなかった。

6. 細胞外 Ca^{2+} 存在下では、muscarineによる持続的な脱分極の大きさと、持続的な Ca^{2+} 濃度上昇との間には正の相関が認められた。この Ca^{2+} 濃度の上昇相は膜電位固定下では抑制される傾向であった。さらに持続的な Ca^{2+} 濃度の上昇と Mn^{2+} 流入とは、 Ca^{2+} 遮断薬であるmethoxyverapamilによって抑制された。

以上の成果は、ムスカリンとプリン受容体を介するカテコールアミン放出と細胞内

Ca²⁺濃度上昇機構に関して多くの新知見を提供しており，審査委員一同浅野 忠氏は，博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。