

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390068

研究課題名（和文） 受容体作動性Caイオン流入機構の分子メカニズムと
中枢神経伝達物質遊離機序

研究課題名（英文） Receptor-operated Ca influx and transmitter release

研究代表者

村松 郁延 (MURAMATSU IKUNOBU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10111965

研究成果の概要（和文）： $\alpha 1A$ アドレナリン受容体を安定発現させた PC12 細胞において、 $\alpha 1A$ アドレナリン受容体を刺激すると一過性の細胞内 Ca 遊離に続いて、細胞外からの持続的な Ca 流入が惹起された。後者の Ca 流入は、snapin 過剰発現で増強され、TRPC ノックダウンで抑制された。この Ca 濃度変化と関連して、内在性 dopamine の遊離が惹起された。したがって、培養細胞では、GqPCR 刺激で上昇する細胞内 Ca により、伝達物質は遊離することが観察された。一方、ラット大脳皮質スライスからの 3H -dopamine 遊離は、GqPCR 刺激では惹起されなかった。ラット大脳皮質および N1E-115 神経芽細胞では、M1 ムスカリン受容体は細胞膜だけでなく細胞内にも存在し、前者は IP_3 -Ca 系を活性化するのに対し、後者は MAPkinase 系と特異的に共役していた。

研究成果の概要（英文）：In PC12 cells expressing $\alpha 1A$ -adrenoceptor, methoxamine evoked intracellular Ca release which was followed by Ca influx. The Ca influx was mediated via receptor-operated Ca channel, and was enhanced by overexpression of snapin but was reduced by knockdown of TRPC. The change in intracellular Ca ion was greatly associated with the release of endogenous dopamine, suggesting a direct relationship between GqPCR-mediated intracellular Ca increase and transmitter release in culture cells. However, in rat striatum slices preloaded with 3H -dopamine GqPCR-mediated dopamine release was not observed. M1-muscarinic acetylcholine receptor occurs at both plasma membrane and intracellular sites in rat cerebral cortex and N1E-115 neuroblastoma cells, coupled to two distinct signaling systems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：受容体・チャネル・輸送系・シグナル情報伝達系

1. 研究開始当初の背景

(1) 受容体刺激により引き起こされる細胞増殖や平滑筋収縮など多くの生理反応に、Ca

がセカンドメッセンジャーとして働いていることはよく知られている。神経伝達物質遊離にも細胞内 Ca イオンの上昇が必須である

が、この場合は P/Q 型電位依存性 Ca チャネルを介する Ca イオン流入が引き金となって開口分泌を引き起こすと説明されている。したがって、受容体刺激による Ca 上昇が、神経伝達物質遊離にどの程度関与するは不明である。

(2) ムスカリン受容体やアドレナリン受容体は、細胞膜にのみ存在する膜受容体の代表として考えられてきた。しかし、本当に細胞膜だけに分布するのか、その他の細胞内局在とシグナルの違いは不明である。

2. 研究の目的

(1) Gq タンパクにカップルする受容体 GqPCR を刺激すると、細胞内 Ca イオン濃度が上昇する。この Ca イオン上昇が、神経伝達物質遊離に関与するのか、電気刺激で惹起される電位依存性 Ca イオン上昇による伝達物質遊離と比較する。

(2) 膜受容体の代表であるムスカリン受容体に着目し、細胞内局在を調べ、そのシグナリングを比較する。

3. 研究の方法

(1) PC12 細胞に、GqPCR の $\alpha 1A$ アドレナリン受容体と snapin を安定発現させ、 $\alpha 1A$ アドレナリン受容体を刺激したときの細胞内 Ca イオンの変動を fura2 にて測定した。内在性 dopamine の遊離は、HPLC にて測定した。また、ラット線条体スライスに 3H -dopamine をあらかじめ取り込ませ、電気刺激および受容体刺激による 3H -dopamine 遊離を、当教室が考案した超微量表面還流装置で測定した。

(2) ラット大脳皮質および N1E-115 神経芽細胞におけるムスカリン受容体の細胞内局在を、 3H -NMS および 3H -QNB を用いた結合実験法、抗体を用いた組織化学的方法で調べた。また、細胞膜と細胞内受容体の機能を、Ca イオンおよび MAPkinase 系を指標にして調べた。

4. 研究成果

(1) $\alpha 1A$ アドレナリン受容体を安定発現させた PC12 細胞を、 $\alpha 1$ アゴニスト methoxamine で刺激すると、一過性の Ca 上昇(初期相)に続いて軽度の持続的 Ca 増加(後期相)が観察され、これと同時に内在性 dopamine の遊離が惹起された。ここに snapin を過剰発現すると、後期相の Ca 上昇は著しく増強され、dopamine 遊離も増加した(図 1)。しかし、snapin の単独発現や空ベクターは、細胞内 Ca および dopamine 遊離に影響しなかった。

外液 Ca を除去すると、初期の細胞内 Ca 上昇と dopamine 遊離は観察されたが、後期の Ca 反応は著しく抑制された。後期の Ca 上昇と dopamine 遊離は、La で抑制され、TRPC のノックダウンで減少した。以上の結果から、 $\alpha 1A$ アドレナリン受容体活性化による細胞内 Ca 上昇には、細胞内ストアからの Ca 遊離と細胞外からの Ca 流入の 2 種類があり、いずれも dopamine 遊離を惹起し得ることが培養細胞レベルで明らかになった。

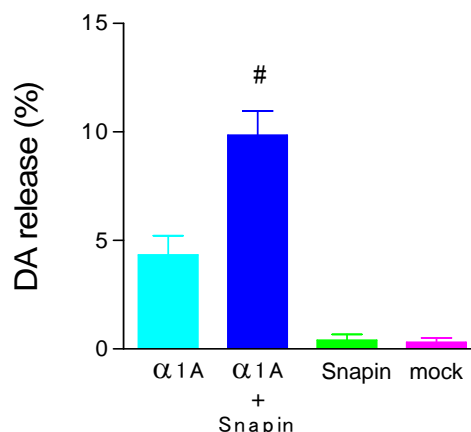


図1 PC12 細胞からの dopamine(DA)遊離

(2) 生体レベルで、GqPCR 刺激により伝達物質遊離がどのように影響を受けるかを、あらかじめ 3H -dopamine を取り込ませたラット線条体スライス標本を超微量表面還流することより検討した。対照に用いた電気刺激による 3H -dopamine は、10 分毎の繰り返し刺激で 40 分間に亘り再現性良く惹起され、tetrodotoxin や外液 Ca 除去で抑制された。同様に、ニコチンも 3nM から 100nM という低濃度で、濃度に依存した 3H -dopamine を惹起した。しかし、methoxamine による $\alpha 1$ アドレナリン受容体刺激は 3H -dopamine 遊離を引き起こさず、電気刺激や nicotine による遊離反応にも影響しなかった。これらの結果は、先の培養細胞の場合と異なり、GqPCR 活性化により上昇した Ca では生体レベルでは単独で神経伝達物質遊離を惹起し得ないことを示唆した。

(3) ラット大脳皮質および N1E-115 神経芽細胞では、ムスカリン受容体は細胞膜だけでなく細胞内にも存在した。細胞内に分布する受容体は、組織・細胞がインタクトなときは油溶性のリガンド 3H -QNB によってのみ認識され、親水性の 3H -NMS は結合できなかった。M1 選択的なペプチドトキシシン MT-7 は、組織・細胞がインタクトなとき細胞膜の M1 サブタイプのみ結合したが、ホモジナイズ

すると細胞内の受容体にも結合した。これら一連の結果から、M1 ムスカリン受容体サブタイプは、細胞内にも存在することが明らかになった。M1 サブタイプはGqPCRであり、細胞膜の受容体を刺激すると IP₃-Ca 系が選択的に活性化された。これに対し、細胞内 M1 サブタイプは、ERK 系を活性化し、細胞膜と異なるシグナル系に共役していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Iwamoto M., Shimizu H., Muramatsu I., Oiki S. A cytotoxic peptide from a marine sponge exhibits ion channel activity through vectorial-insertion into the membrane. *FEBS Lett.* vol.584, 3995-9, 2010. (査読有)
2. Nishimune A., Suzuki F., Yoshiki H., Morishima S., Muramatsu I. Identification of Cysteine-Rich Epidermal Growth Factor-Like Domain 1 α (CRELD1 α) as a Novel α_{1A} -Adrenoceptor-Down-Regulating Protein and Establishment of an α_{1L} -Adrenoceptor-Expressing Cell Line. (* equal contribution) *J. Pharmacol. Sci.* vol.113, 169-181, 2010. (査読有)
3. 西宗敦史, 村松郁延, α_1 アドレナリン受容体—その病態生理および生体内表現型 α_{1L} 受容体に関する最近の見知から. *医学のあゆみ* Vol.233:857-862, 2010. (査読無)
4. Lee KS., Nishimune A., Yoshiki H., Anisuzzaman ASM., Suzuki F., Wang MH., Cheng JT., Muramatsu I. Assessment of novel muscarinic acetylcholine receptors in rat cerebral cortex by a tissue segment binding method. *J. Pharmacol. Sci.* 112: 444-451, 2010. (査読有)
5. Nishimune A., Suzuki F., Yoshiki H., Morishima S., Muramatsu I. α_1 -Adrenoceptor pharmacome: α_{1L} -adrenoceptor and α_{1A} -adrenoceptor in the lower urinary tract. *Inter. J. Urol.* 17, 31-37, 2010. (査読無)
6. Muramatsu I., Suzuki F., Nishimune A., Anisuzzaman ASM., Yoshiki H., Su TH., Chang CK., Morishima S. Expression of distinct α_1 -adrenoceptor phenotypes in the iris of pigmented and albino rabbits *Br. J. Pharmacol.* 158:354-360, 2009. (査読有)
7. Horinouchi T., Morishima S., Tanaka Y., Koike K., Miwa S., Muramatsu I. Pharmacological evaluation of ocular α_1 -adrenoceptors in rabbit by tissue segment binding method. *Life Sci.* 84:181-187, 2009. (査読有)
8. Anisuzzaman ASM., Morishima S., Suzuki F., Tanaka T., Yoshiki H., Muramatsu I. Identification of M₁ muscarinic receptor subtype in rat stomach using a tissue segment binding method, and the effects of immobilization stress on the muscarinic receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 599:146-151, 2008. (査読有)
9. Muramatsu I., Morishima S., Suzuki F., Yoshiki H., Anisuzzaman ASM., Tanaka T., Rodrigo MC., Myagmar BE., Simpson PC. Identification of α_{1L} -adrenoceptor in mice and its abolition by α_{1A} -adrenoceptor gene knockout. *Br. J. Pharmacol.* 155:1224-34, 2008. (査読有)
10. Su TH., Morishima S., Suzuki F., Yoshiki H., Anisuzzaman ASM., Tanaka T., Cheng JT., Muramatsu I. Native profiles of α_{1A} -adrenoceptor phenotypes in rabbit prostate. *Br. J. Pharmacol.* 155:906-12, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 西宗敦史, A. S. M. Anisuzzaman, 吉木はつみ, 宇和田淳介, 村松郁延, 大脳皮質に特異的なムスカリン受容体の生体内表現型, 第 84 回日本薬理学会年会, ハシフニコ横浜会議センター, 2011年3月23日 (一般口演)
2. 宇和田淳介, A. S. M. Anisuzzaman, 西宗敦史, 吉木はつみ, 村松郁延, 神経芽細胞腫 N1E-115 における細胞内局在性ムスカリン M1 受容体の機能解析, 第 84 回日本薬理学会年会, ハシフニコ横浜会議センター, 2011年3月23日 (ポスター)
3. Atsushi Nishimune, Hatsumi Yoshiki, Ikunobu Muramatsu, *In vitro* reconstitution of α_{1L} -adrenoceptor phenotype via co-expression of α_{1A} -adrenoceptor and CRELD1. The 20th Japan-Korea Joint Seminar on

Pharmacology, 鹿児島, 2010年11月26日
(ポスター)

4. 村松郁延, 多様化する受容体の機能・表現型-Phenotype Pharmacology への展開, 第 38 回 薬物活性シンポジウム, 北海道, 2010 年 11 月 12 日 (特別講演)
5. Ikunobu Muramatsu, Atsushi Nishimune, alpha-1 adrenoceptors in the lower urinary tract. 16th World Congress of Basic Clinical Pharmacology, Denmark, July 18th, 2010. (symposium aural)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日: 年 月 日
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 郁延 (MURAMATSU IKUNOBU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 10111965

(2) 研究分担者

西宗 敦史 (NISHIMUNE ATSUSHI)
福井大学・医学部・学内講師
研究者番号: 40311310
(H21-H22)

宇和田淳介 (UWADA JUNSUKE)
福井大学・医学部・助教
研究者番号: 70580314
(H22)

森島 繁 (MORISHIMA SHIGERU)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号: 50290911
(H20-H21)

鈴木 史子 (SUZUKI FUMIKO)
福井大学・医学部・助教
研究者番号: 80291376
(H20-H21)

(3) 連携研究者

なし