



Effect of the Lipid Environment on the Differential Affinity of Cerebral and Atrial Muscarinic Acetylcholine Receptors for Pirenzepine

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: ガブリエル, ベルステイン メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/948

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 95号	学位授与年月日	平成 2年 3月26日
氏名	Gabriel Berstein		
論文題目	Effect of the Lipid Environment on the Differential Affinity of Cerebral and Atrial Muscarinic Acetylcholine Receptors for Pirenzepine (大脳および心房ムスカリン性アセチルコリン受容体のピレンゼピンに対する選択的親和性に及ぼす脂質環境の影響)		

医学博士 ガブリエル ベルステイン
論文題目 Gabriel Berstein

Effect of the Lipid Environment on the Differential
Affinity of Cerebral and Atrial Muscarinic Acetylcholine
Receptors for Pirenzepine

(大脳および心房ムスカリン性アセチルコリン受容体のピレンゼピンに対する選択的親和性に及ぼす脂質環境の影響)

論文の内容の要旨

ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) は、ピレンゼピンのような選択的アンタゴニストに対する親和性に基いて薬理的サブタイプに分類されている。ピレンゼピンに高親和性を示す mAChR (M_1 サブタイプ) は哺乳類の大脳皮質、交感神経節に豊富に存在している。他方、ピレンゼピンに低親和性を示す mAChR (M_2 サブタイプ) は後脳、心房、平滑筋、外分泌腺に存在している。近年、mAChR をコードしている相補的 DNA や遺伝子のクローン化、塩基配列決定、その発現実験により、薬理的に分類されたサブタイプがそれぞれ異なる一次構造のタンパク質であること、および少なくとも 5 種類の mAChR サブタイプが存在することが明らかにされた。しかし、 M_1 と M_2 を区別するピレンゼピンに対する親和性は、mAChR (特に M_1 サブタイプ) を可溶化、精製すると著しく低下する。このことは受容体のこの選択的アンタゴニストに対する親和性が細胞膜成分により左右される可能性を示唆している。この点を明らかにするために本研究を行った。

(方法)

mAChR は、ブタ大脳 (M_1 サブタイプが主に存在) および心房 (M_2 サブタイプ) の膜分画からジギトニン、コール酸を用いて可溶化し、3-(2'-アミノベンズ) トロパンのアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。受容体のピレンゼピンに対する親和性は、アンタゴニストである [^3H] キヌクリジニルベンジレートとの結合阻害実験で検討し、結果を非線形最小二乗法で解析した。

(結果)

(1) 未処理の細胞膜分画への結合実験では、大脳の mAChR 標品のピレンゼピンに対する解離定数 (K_d) は心房のそれの約 1/30 であった。しかし、受容体を精製すると、特に大脳 mAChR のピレンゼピンに対する親和性が低下し、そのために両受容体はこの選択的アンタゴニストにより識別されなくなった (K_d の比は 3 以下)。ついで、プロピルベンジルコリンマスタード (非可逆的 mAChR アンタゴニスト) によるアルキル化で受容体を不活性化させた大脳および心房の細胞膜に精製受容体を組み込むと、一旦低下していたピレンゼピンに対する親和性が回復した。このことは、精製した受容体のピレンゼピンに対する親和性が細胞膜構成成分と相互作用して回復したことを示唆している。(2) [^3H] キヌクリジニルベンジレートとピレンゼピンの受容体への結合に対する受容体と脂質構成成分との相互作用の影響を更に解析する目的で、精製した大脳および心房の受容体を脂質構成成分を変えた脂質混合物 (人工膜) に再構成し結合実験を行った。 [^3H] キヌクリジニルベンジレートおよびピレンゼピンに対する親和性は、両受容体をコレステロールヘミサクシネイトに組み込んだ場合に、未処理の細胞膜分画での親和性に最も近い値を示した。ホスファティジルコリンに組み込んだ場合には、コレステロールヘミサクシネイトに組み込んだ場合に比べそれぞれのリガンドに対する K_d は、7 および 50-60 倍も高い値を示した。コレステロールヘミサクシネイトとホスファティジルコリンを 80:20 (w/w)、50:50 (w/w) の構成比率にすると大脳受容体のピレンゼピンに対する高親和性部位の親和性は、心房受容体に比べわずかに (K_d は 1/3-1/5) 高かった。コレステロールヘミサクシネイトとホスファティジルコリンを 20:80 (w/w)、あるいはコレステロールヘミサクシネイト、ホスファティジルコリン、ホスファティジリノシトールを 4:48:48 (w/w) の割合に混合した脂質混合物中では、大脳受容体のピレンゼピンに対する K_d は、心房受容体のそれに比べそれぞれ 1/20 ないし 1/60 であった。

(結論)

選択的アンタゴニストであるピレンゼピンに対するムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプの親和性は細胞膜脂質環境の影響下にある。

論文審査の結果の要旨

ムスカリン性アセチルコリン受容体(以下mAChR)は細胞膜に存在して機能するタンパク質の一つである。したがって、受容体のキネティックスが同膜脂質の影響を受けたとしてもふしぎではない。本論文はmAChRのリガンドとして[³H] quinuclidinyl benzilate(以下QNBと略)とpirenzepine(PZ)を用い、これらリガンドに対する親和性が脂質組成によってどのような影響をうけるかを調べたものである。ちなみに、PZは膜標品中のmAChRM1サブタイプとは高親和性で、M2サブタイプとは低親和性で結合する識別性アンタゴニストであり、QNBはmAChRのサブタイプによらず高親和性を示す非特異性アンタゴニストである。

従来も、mAChRに対する膜脂質の影響について2、3の報告があるが、それらに比べて本研究の新しいところは、以前の研究がホスホリパーゼなどによってインタクトな膜を処理するなどの間接的な方法を用いているのに対し、本研究では精製したmAChRを脂質混合物に組み込むことにより、直接脂質の影響を調べた点にある。用いられた脂質はcholesteryl hemisuccinate(CHS)とphosphatidyl choline(PC)それにphosphatidyl inositol(PI)である。mAChRはブタ大脳皮質-尾状核および心房より精製した。得られた主な結果は以下のようである。

1 精製・可溶化により著しく低下した大脳mAChR(大部分M1)のQNBおよびPZに対する親和性は脂質(特にCHSを含む脂質)に組み込むことによって大幅に改善されたが、これはコレステロールが細胞膜の特徴的な脂質成分であることを考慮すると、興味深い。

2 一方、膜標品中ではQNBに対しては高親和性を、PZに対しては低親和性を示す心房mAChR(M2)を可溶化・精製すると、QNBに対する親和性は著しく低下したが、PZに対する親和性はさらに低下するという事はなかった。これを脂質混合物に組み込むと、QNBに対する高親和性は大脳mAChRの場合と同様に回復したが、PZに対する親和性には変化が認められなかった。

以上の結果は膜標品の脂質環境がmAChRのリガンド結合特性に影響を及ぼすこと、および識別性アンタゴニストであるPZがM1とM2を識別するのは、M1の親和性のみが脂質環境により顕著に影響されるためであることを示している。とくにコレステロールが高親和性の回復に有効であったことは、これまで同脂質が細胞膜に特徴的に存在しながらその機能的役割が分かっていたに、興味深く、評価される。

引きつづき関連質問を行なった。

- 1 大脳皮質以外になぜ尾状核を用いたのか。
- 2 左心房と右心房のmAChRに違いはないか。
- 3 加えたCHSとPCのモル比
- 4 ニコチン性アセチルコリン受容体の脂質結合部位
- 5 結合のキネティックス解析に用いた式は正確かつ信頼できるか。
- 6 本研究のオリジナリティー

以上の試問に対する申請者の回答はおおむね的確であり、研究意欲の深さと今後の発展の可能性が窺われた。これらにより、申請論文は学位授与にふさわしい内容を備えたものであると、全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	藤田	道也	副査	教授	山崎	昇
	副査	教授	中島	光好	副査	講師	田港	朝彦
	副査	教授	吉見	輝也	副査			