

受容体を介したCa動員とCa透過型陽イオンチャネル

井上, 隆司
九州大学医学部薬理学教室 : 助教授

<https://doi.org/10.15017/7238780>

出版情報 : 福岡医学雑誌. 87 (4), pp.92-96, 1996-04-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :



受容体を介した Ca 動員と Ca 透過型陽イオンチャネル

九州大学医学部薬理学教室助教授

井 上 隆 司

消化管・尿管の蠕動運動、血圧・気道内圧の変動、膀胱・子宮の伸展と律動性収縮による排出運動等、生体内の袋状・管状臓器の多彩な機能の発現や調節にはその主要な構成要素である平滑筋の収縮-弛緩サイクルが重要な役割を果たしている。このサイクルは神経伝達物質・オートコイド・ホルモン等の受容体を介した制御下に精緻で動的な調節を受けており、その量的・質的異常が高血圧・気管支喘息・腸管運動異常・排尿障害等の病的状態発現の基礎過程として働いている可能性がある。本稿では、このような受容体と平滑筋の基本的な関わりあいについて細胞内 Ca 動態調節の面に焦点をあて、その研究の歴史的経緯と現状について概説する。

1. は じ め に

平滑筋の収縮状態を規定する最も重要な因子は細胞内遊離 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) である。

$[Ca^{2+}]_i$ が上昇すると細胞内の主要な Ca 受容蛋白であるカルモジュリンと複合体を形成し、ミオシン燐酸化酵素 (myosin light chain kinase; MLCK) を活性化する。その結果ミオシン軽鎖の ser¹⁹ が燐酸化され、アクチンとクロスブリッジを形成して張力が発生する。

一方、 $[Ca^{2+}]_i$ が減少に転じると、ミオシン脱リン酸化酵素 (myosin light chain phosphatase; MLC-P) 活性が減少しつつある MLCK の活性を凌駕し、ミオシンの脱リン酸化が進行して張力は再び下降する。このように、平滑筋の発生張力 (収縮状態) と $[Ca^{2+}]_i$ には、MLCK と MLC-P の動的平衡によって決定されるミオシンのリン酸化量を介した正の相関がみられる¹³⁾。

$[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる機序として、次の二つの機構が知られている。

(1) 興奮収縮連関 (excitation-contraction coupling): 消化管・尿管など自発運動を有する平滑筋では、細胞膜の反復興奮 (活動電位) に伴って律動的な収縮が発生する。活動電位の頻度や様式は動物種や組織によって大きく異なるが (種・部位特異性)、発生する収縮の大きさとそれに対応する活動電位の数や持続時間には良い相関がみられ、したがって活動電位によって生じた Ca 流入自身が収縮発生の原因と考えられ、興奮-収縮連関機構と呼ばれてきた。近年パッチ固定法の登場を契機として膜電流の測定が可能になると、この範疇に属する平滑筋のいずれの場合にも Ca 拮抗薬 (ジヒドロピリジン・ベラパミル等) に感受性を示す電位依存性 Ca チャンネル (voltage-dependent Ca channel; VDCC) の活性化が観察され、VDCC を介した Ca 流入量と収縮の大きさの直接の関連を示す証拠が得られるようになった。しかしながら骨格筋や心筋の場合と異なり、平滑筋の興奮収縮連関における二次的な筋小胞体からの Ca 放出機構 (Ca-induced Ca release) の寄与は極くわずかであると考えられる研究者が多い。

(2) 薬物収縮連関 (pharmaco-mechanical coupling)

自発運動を有する組織とは対照的に、他の多くの平滑筋 (例えば抵抗血管、気管) では周期的な膜興奮なしに一定の筋緊張が保たれている。このような興奮性の低い平滑筋は、神経伝達物質・オートコイド・ホルモン (以下アゴニストと略す) によって受容体が刺激されると、膜の電気現象とはほぼ無関係に収縮を発生する。この現象は興奮収縮連関機構との対比から薬物収縮連関機構と名付けられた¹³⁾。例えばウサギ腸間膜動脈に比較的低濃度のノルアドレナリンを作用させると、静止膜電位を殆ど変化させずに (したがって活動電位を発生することなく) 収縮をひきおこす。この収縮の初期に現れる一過性成分は Ca 欠除

液中でも誘発することができるので、細胞内貯蔵部位からのCa放出によって生じたものと推測されていた。これに対して一過性成分に引き続く持続性収縮成分は、Ca欠除液中では消失するがVDCC阻害薬であるジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の存在下でも発生することから、部分的には電位非依存性Ca流入を反映した結果であると考えられた。時代が下り生物学の研究手法も刷新され細胞膜の脂質代謝回転の精密な測定や蛍光色素を指示薬とした $[Ca^{2+}]_i$ の経時的測定が可能になると、Ca欠除液中で発生する一過性収縮は、イノシトールリン脂質の代謝回転促進の結果増加したイノシトール3リン酸(IP_3)が筋小胞体の IP_3 受容体に結合しCa放出チャネルを活性化した結果であることが判明した。そしてこれが契機となり、それまで非興奮性非筋肉細胞でしか認められていなかった IP_3 による細胞内Ca動員機構が、アゴニストによる平滑筋収縮の普遍原理として受け入れられるようになった。一方Ca拮抗薬に抵抗性を示す“電位非依存性”収縮に対しては、Boltonによって“受容体作動性Ca流入”(receptor-operated Ca influx; ROC)という概念が提唱され、受容体刺激で開口する電位非依存性Caチャネル(receptor-operated Ca-permeable channels; ROCC)の存在が示唆された³⁾。そして1980年代半ばに平滑筋研究にもパッチクランプ法が導入されるに至り、ROCCの本格的な探索が始められた。

II. ROC機構と受容体作動性陽イオンチャネル

ROCCの満たすべき最小限の基準として、(a)静止膜電位付近で開口する、(b)Ca流入経路として働く、(c)電位依存性Caチャネルの阻害薬で抑制されない、という3条件を挙げることができる。この条件をすべて充足するイオンチャネルとして世界で最初に注目を集めたのは、プリン作動性受容体(P_{2x} サブタイプ)活性化に伴って開口する非特異的陽イオンチャネル(non-selective cation channel; NSCC)であった²⁾。それまで P_2 受容体の生理的なアゴニストであるATPは、輸精管、抵抗血管、膀胱などに分布する自律神経終末のシナプス小胞にノルエピネフリンやアセチルコリンと共に貯蔵されており(cotransmitter)、神経興奮時に興奮性伝達物質として放出されると考えられていた(非アドレナリン性、非コリン性興奮性神経伝達; non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) excitatory transmission)。ATPで活性化されるNSCCは投与後数ms以内に活性化されその後急速に脱感作されることから、骨格筋神経終末のニコチン受容体活性化で開口するNSCCと同様のligand-gated channel familyに属すると考えられた。さらにこの陽イオン電流は、(a)内向整流特性を有し(過分極するほど電流が流れやすくなる)、(b)Caに対する選択性がNaの約3倍高く、(c)ジヒドロピリジン系Ca拮抗薬や Cd^{2+} などの無機VDCCブロッカーで抑制を受けない、といったROCCの基準に適合する性質を有していた。後にIndo-1を指示薬としたCa蛍光測定により、この陽イオン電流に伴う $[Ca^{2+}]_i$ 上昇分は数百nMに達することが示されるに至り、ROC仮説はこのチャネルの発見によって証明されたかにみえた。しかし皮肉なことに、最も古典的な機能実験法である張力測定によって、外来性に投与したATPや自律神経刺激で惹起したNANC収縮がCa拮抗薬の前処理によってほぼ完全に抑制されることが報告され、ROCCの探索は再び暗礁に乗り上げてしまった。その後種々の平滑筋組織で受容体刺激時に開口するCa透過型NSCCの報告が相次いでなされたが、これらのチャネルを介して流入したCaが張力増加に直接寄与することを支持する証拠は得られていない⁴⁾。現在NSCCの役割として確立しているのは、Na流入経路として働く結果膜脱分極を起し、自発運動を有する平滑筋(例えば消化管)では活動電位の放電頻度を増加させ、持続型緊張を有する平滑筋(例えば抵抗血管などの興奮性の低い組織)ではVDCCを介したnon-inactivating Ca influxを増加させることによって収縮発生に寄与している点だけである。しかし他方後述するように、NSCCを介して直接流入するCaにも何らかの重要な生理的意義がある可能性も指摘されている。

III. 受容体作動性NSCCの制御機構

平滑筋の受容体作動性NSCCのうち、 P_{2x} 受容体を介するもの以外はすべてGTP結合蛋白質と共役する受容体と関係している(アセチルコリン、ノルアドレナリン、ヒスタミン、エンドセリン、アンジオテンシンなど)。これらのNSCC電流は数百ミリ秒の潜時後に活性化され、分単位の緩やかな脱感作を示す。この性質は P_{2x} 受容体活性化時に開口するNSCCと対照をなし、異なるNSCC familyに属してい

ることを示唆している。実際モルモット回腸縦走筋から記録されたムスカリン受容体作動性陽イオンチャネル (muscarinic NSCC; mNSCC) は、百日咳毒素感受性 G 蛋白を介して活性化されることが電気生理学的検討によって明らかになった⁵⁾。

このような持続活性を示す NSCC のうち、その生物物理学的・薬理学的特徴の詳細が最も詳しく検討されているのはモルモット回腸の mNSCC である。mNSCC の研究を通してその複雑な制御機構の存在が次第に明らかになり、受容体作動性 Ca 動員の新たな側面が知られるようになった。以下ではこの制御機構についてわれわれの実験結果を中心に解説する⁴⁾。

(1) 電位依存性

ROCC の古典的定義の一つはその活性が電位に依存しない点にあった。しかし mNSCC の活性は脱分極によって増加し過分極で減少する⁶⁾。すなわち mNSCC 活性と脱電位には、Boltzmann 式：

$$p = 1 / \{1 + \exp[(V_m - V_h)/k]\}$$

p；開口確率，V_m；膜電位，V_h；50%活性化電位，k；傾斜因子

で記述される S 字状の関係がある。この曲線が最大傾斜を示す V_h の値はこの筋細胞の静止膜電位 -55 mV 付近に位置している。このことは、静止膜電位を変化させる因子、例えば消化管のペースメーカー電位として知られる徐波による膜電位の緩やかな振動や β 刺激薬・K チャネル開口薬などで誘発された過分極によって、ムスカリン受容体活性化で生じる脱分極が無視できない影響を受けることを示唆している。実際、電氣的・化学的に起こした数 mV 程度の膜過分極によってムスカリン受容体作動薬による脱分極の立ち上がり速度・最大振幅・持続時間が有意に減少することが、パッチクランプ法を用いた単一細胞の電流固定実験で確かめられた⁴⁾⁶⁾。さらに最近になって、mNSCC の電位依存性はその共役する G 蛋白質の活性化状態（すなわち受容体刺激の強さや脱感作の程度）や細胞内エネルギー代謝状態によって規定されている可能性が報告された¹⁵⁾。もしこれらの効果が平滑筋全般に当てはまる普遍的な現象であるとすれば、従来電位依存性が弱いと報告されている他の NSCC についても再検討する余地があると言えよう。

(2) [Ca²⁺]_i 依存性

mNSCC 活性は [Ca²⁺]_i の変動にしたがって速やかに変化する。例えば電位依存性 Ca 流入 (voltage-dependent Ca entry; VDC) や筋小胞体からの Ca 放出に伴って mNSCC 電流の振幅は著しく増大する⁷⁾。パッチ電極を介して [Ca²⁺]_i を様々なレベルに固定し [Ca²⁺]_i と mNSCC 活性の関係を調べると、50% および 90% 増強の起こる濃度がそれぞれ 100 nM および 1 μ M であった。これらの値はモルモット回腸平滑筋細胞の静止時および最大上昇時の [Ca²⁺]_i に相当し、したがって生理的変動範囲の [Ca²⁺]_i が mNSCC 活性を非常に効果的に制御し得ることを示唆している。実際 VDC によって運搬される Ca 電荷量と mNSCC 増強率の関係の解析から、50% 増強を起こすのに必要な Ca 電荷量は 2-4 pC であることが実験的に知られている。この数値は活動電位当たりの Ca 流入量 (3-5 pC；活動電位の平均振幅を 60 mV、平滑筋細胞の平均膜容量を 50-80 pF として算出) とほぼ一致する。また IP₃ 受容体の選択的拮抗薬であるヘパリンを細胞内灌流し IP₃ を介した Ca 放出を抑制すると、mNSCC 電流は著しく減少する。これらの事実から、活動電位や筋小胞体からの Ca 放出は [Ca²⁺]_i 上昇を介した mNSCC への正のフィードバックによって受容体刺激で生ずる脱分極を遷延させ、その結果 VDC を増加させてアゴニストによる収縮を増強していることが予想される。またこれと反対のことが、膜を過分極させる薬物 (cAMP, cGMP 増加薬, K チャネル開口薬など) の作用として期待される。

[Ca²⁺]_i による mNSCC 増強機序の詳細は依然不明である。しかし mNSCC と多くの点で類似性を示す Ca 依存性 NSCC (Ca-activated cation channels; CAN, 上皮細胞に多い) の [Ca²⁺]_i 感受性がパッチ膜を細胞から切り取る操作で急速に消失していく事実から類推すると、何らかの細胞質内制御因子 (酵素・調節蛋白など) で制御されている可能性も考えられる⁴⁾。

(3) リン酸化による制御

モルモット回腸平滑筋細胞を ATP 欠除液で灌流すると、mNSCC 電流振幅が次第に減少する。同様の現象は Mg のみを除去しても観察され、最大活性化濃度のアゴニストを用いても克服できない⁸⁾。このことから mNSCC を “functional state” に維持するためには、何らかのエネルギー代謝に関与した細胞内機構

(おそらくリン酸化)が必要であると推定される。Bakhrarov は細胞内エネルギー代謝に関与する幾つかの化合物をパッチ電極から細胞内へ灌流し、mNSCC 電流振幅に与える効果を検討した¹⁾。驚くべきことに、mNSCC 電流を最も強く増強したのはクレアチンリン酸 (Phosphocreatine; PCr) であった。これに対して ATP は 2 mM 以上になるとむしろ mNSCC 電流を減少させることが明らかになった。しかしこの実験結果は短い細胞内灌流 (5 分間) の後アゴニストを単回投与することによって得られたもので、Mg 要求性などデータの解釈に不可欠な情報に矛盾点や曖昧な点が散見される。そこでわれわれは、アゴニスト (カルバコール) を繰り返し投与し上記実験の結果を再検討してみた。その結果、(1) PCr は Mg 存在下でのみ mNSCC 電流活性を維持できること、(2) 解糖系のエネルギー産生における最初の key step の基質、フルクトース 1,6 2 リン酸を NAD^+ , PO_4^{2-} , ADP と共にパッチ電極内へ加えると mNSCC の活性が長時間維持されること、(3) ATP にも Mg 依存性の mNSCC 維持作用があること、(4) (1), (2) の効果はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を抑制した条件下でも観察できること、などを確認した。さらに mNSCC 電流は高い Q_{10} 値 (15~25°C の範囲で約 5) を有し⁸⁾, tyrosine kinase 阻害薬である genistein, lavendustin A, tyrphostin A 25 など濃度依存性に抑制され¹⁰⁾, protein Kinase A や C の阻害薬, H 7, calphostin C, staurosporin でも影響を受けることが判明した。最近の生化学的研究によると、解糖系の key enzyme である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase は細胞質より形質膜の分画により多く存在しているという。また、異なる isoform の creatine kinase がミトコンドリアと細胞膜直下の効果器の両方に局在し PCr を介した速やかなエネルギー運搬に寄与しているという仮説 (phosphocreatine circuit) も提出されている¹⁴⁾。以上のことを考えあわせると、mNSCC の活性維持には解糖系によるエネルギー産生系や PCr を介したエネルギー分配系によるエネルギー供給が必要不可欠であり、これにリン酸化酵素による修飾が様々な形で関わっている可能性が高い。実際、解糖系を介したエネルギー産生に対する強い依存性は、Na/K ATPase, VDCC, 表在性筋小胞体の Ca-ATPase などでもみられ、細胞膜に局在する効果器の制御機構を理解するうえで興味深い将来の研究課題である。

(4) 細胞膜伸展に伴う mNSCC 活性増加

細胞膜に加えられた種々の機械刺激 (細胞の伸展, ずり応力, 細胞膨張) は細胞機能に多彩な修飾効果を表すことが良く知られている。最近われわれはモルモット回腸の mNSCC 活性が低浸透圧負荷による細胞膨張に伴って増大することを見いだした⁹⁾。この効果は他の膜コンダクタンス (Ca 依存性 K 電流や電位依存性 Ca 電流など) に対する効果に比べて著しく、消化管壁の伸展に伴う反射性収縮に関与している可能性があるが、その分子機序は不明である。

終 わ り に

IP_3 の細胞内 Ca 動員における明確な重要性とは対照的に、ROCC 機構の実体はパッチクランプ法による探索にもかかわらずますます不明瞭になりつつある。これまで平滑筋の Ca 動員型受容体の活性化時に観察された ROCC はすべて NSCC であり、その低い Ca 透過性と張力増加を結びつける積極的な証拠はまったく得られていない⁴⁾。一方、一部の NSCC の多様な制御系の検討から、Ca 動員に関わる細胞効果器群 (電位依存性 Ca チャネル, 種々の K チャネル, 筋小胞体など) との複雑なフィードバックを介したクロストークの存在が明らかになってきた (文献 4 の図 5 参照)。また最近、血球や分泌細胞で注目を集めている容量性 Ca 流入機構 (capacitative Ca entry mechanism) に似た現象が、平滑筋の NSCC を介した Ca 流入によって生じている可能性も報告されている。すなわち、アゴニストによって細胞内 Ca 貯蔵部位が枯渇すると NSCC を経て流入した Ca がその再充填に使われるという考えである。最近の共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織免疫学的研究によれば、イオンチャネルやイオン輸送・交換系は細胞膜上に一様に分布しているのではなく、表在性筋小胞体 (peripheral SR; p-SR) の近くに局在し機能的に連動しているという¹¹⁾。たとえばラット脳動脈では p-SR から放出された Ca が近傍の Ca 依存性 K チャネルを活性化して膜過分極を起こし、電位依存性 Ca 流入を減少させて筋弛緩を起こす可能性があるという¹²⁾。このような観点から平滑筋の ROCC と他の効果器群の関係を追求してみるのも将来の魅力的な課題の一つであろう。今後の展開によっては、ROCC を介したアゴニストによる Ca 動員の真の意義は、収縮の為の Ca 流入

経路 (ROC) というよりむしろ, 他の Ca 動員に関わる効果器群が有効に作動するための “back up” 的な役割にあることが明らかにされていくのかも知れない。

文 献

- 1) Bakhramov A: Effects of high-energy phosphates on carbachol-evoked cationic current in single smooth muscle cells from guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 485: 659-669, 1995.
- 2) Benham CD and Tsien RW: A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 328: 275-278, 1987.
- 3) Bolton TB: Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59: 606-718, 1979.
- 4) 井上隆司: 平滑筋における受容体作動性チャネル電流の特性とその制御機構. *日薬理誌* 105: 11-22, 1995.
- 5) Inoue R and Isenberg G: Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea-pig ileum through a G-protein. *Am. J. Physiol.* 262: C1173-C1178, 1990.
- 6) Inoue R and Isenberg G: Effect of membrane potential on acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 424: 57-71, 1990.
- 7) Inoue R and Isenberg G: Intracellular calcium modulate acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 424: 73-92, 1990.
- 8) Inoue R and Waniishi Y: Critical requirement of phosphorylation for the regulation of receptor-operated nonselective cation channels in smooth muscle. *Proceedings of the International Symposium "Smooth Muscle"*, Korean Society for Smooth Muscle Research pp46-51, 1995.
- 9) Inoue R, Waniishi Y and Ito Y: Multiplicity of regulatory mechanisms for receptor-operated cation-permeable channels in guinea-pig ileum. -a possible role of mechanical forces. *Recent Advances in Basic Mechanisms of Smooth Muscle Excitation*. Academic Press, 1996 in press.
- 10) Inoue R, Waniishi Y, Yamada K and Ito Y: A possible role of tyrosine kinases in the regulation of muscarinic receptor-activated cation channels in guinea-pig ileum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 1392-1397, 1994.
- 11) Moore ED, Etter EF, Philipson KD, Carrington WA, Fogarty KE, Lifschitz LM and Fay FS: Coupling of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, Na^+/K^+ pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature* 365: 657-660, 1993.
- 12) Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ and Lederer WJ: Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270: 633-637, 1995.
- 13) Somlyo AP and Somlyo AV: Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-236, 1994.
- 14) Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K and Eppenberger HM: In tracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 281: 21-40, 1992.
- 15) Zholos AV and Bolton TB: G-protein control of voltage-dependence as well as gating of muscarinic metabotropic channels in guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 478: 195-202, 1994.