

# 論文内容要旨

$\alpha 3\alpha 5$  型ニコチン受容体機能の cAMP による調整

主指導教員：入船 正浩教授

(統合健康科学部門歯科麻酔学)

副指導教員：杉田 誠教授

(基礎生命科学部門口腔生理学)

副指導教員：杉山 勝教授

(統合健康科学部門公衆口腔保健学)

宇野 珠世

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 論文内容要旨

論文題目  $\alpha 3\alpha 5$  型ニコチン受容体機能の cAMP による調整

学位申請者 宇野 珠世

【目的】ニコチン受容体(nAChR)は 5 量体構造をとるイオンチャネル内蔵型受容体であり、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , および  $\delta$  サブユニットから構成され、サブユニットの組み合わせにより薬理学的特性が各々異なっている。中枢神経系においては主に  $\alpha 2\sim 10$ ,  $\beta 2\sim 4$  のサブタイプから構成される。中枢神経系のニコチン受容体は、痛みの調節やニコチン依存形成に寄与するといわれている。内側手綱核から脚間核に投射する経路には、 $\alpha 3$  と  $\alpha 5$  サブユニットを含む nAChR が豊富に発現しており、ニコチン依存の忌避反応に関与していることが知られている。一方、GPR3 は、Gs と結合し cAMP を恒常的に上昇させる G タンパク質共役型受容体であり、内側手綱核、海馬、皮質、小脳に発現し、神経突起伸長、生存、分化に関わる重要な因子である。GPR3 は内側手綱核で  $\alpha 3\alpha 5$  型 nAChR と共発現していることから、GPR3 により上昇する cAMP が nAChR の制御を介してニコチン依存形成に関与している可能性がある。そこで、本研究では、内側手綱核に共局在する  $\alpha 3\alpha 5$  型 nAChR と GPR3 に着目し、 $\alpha 3\alpha 5$  nAChR の cAMP 及び GPR3 による機能制御について検討した。

【方法】 $\alpha 3\alpha 5\alpha 7$  型 nAChR と GPR3 が内在性に発現している SH-SY5Y 細胞株と、 $\alpha 3\alpha 5\beta 4$  型 nAChR 安定発現 CHO 細胞を用いた。Fluo-4-AM を用い細胞内カルシウムイオン濃度( $[Ca^{2+}]$ )を観察した。観察終了時にイオノマイシンを添加し、細胞内  $[Ca^{2+}]$  が最大限に上昇した状態を観察することにより Fluo-4-AM のローディング状態を確認した。各検討の  $[Ca^{2+}]$  上昇はイオノマイシンによる  $[Ca^{2+}]$  上昇に対する比率を取ることで定量化した。ニコチン誘発電流の測定は、SH-SY5Y 細胞にホールセルパッチを施し、膜電位を  $-70mV$  に固定し、ニコチン、各種拮抗薬を灌流液中に投与し、ニコチン誘発電流を 10 秒ごとに観察した。各種 nAChR の遺伝子発現解析には Real-Time PCR 法を用いた。

【結果と考察】まず、SH-SY5Y 細胞におけるニコチン誘発性  $[Ca^{2+}]$  上昇の基本的性質を検討した。SH-SY5Y 細胞では、ニコチン  $100\sim 500\mu M$  で濃度依存性に細胞内  $[Ca^{2+}]$  上昇がみられた。ニコチンによる  $[Ca^{2+}]$  上昇は、細胞外  $Ca^{2+}$  を除去した状態でもみられた。また、細胞外  $Ca^{2+}$  を除去し、さらに細胞内  $Ca^{2+}$  ストアを枯渇させると  $[Ca^{2+}]$  上昇は完全に消失した。このことから、ニコチンによる  $[Ca^{2+}]$  上昇には細胞外からの流入と細胞内からの動員の二つの成分があることがわかった。次に、非選択的ニコチン受容体拮抗薬(メカミラミン・ツボ

クラリン)の影響を検討したところ、ニコチンによる $[Ca^{2+}]$ 上昇は、メカミラミンでは抑制されず、ツボクラリンでは部分的に抑制された。一方、ニコチン誘発電流は非選択的ニコチン受容体拮抗薬により完全に抑制された。これらの結果から、ニコチンによる $[Ca^{2+}]$ 上昇には、細胞外からの流入と膜を透過したニコチンによる細胞内からの動員があると考えられた。また、L型 $Ca^{2+}$ チャネル拮抗薬(ニフェジピン)とN型 $Ca^{2+}$ チャネル拮抗薬( $\omega$ コノトキシン)投与によりニコチンによる $[Ca^{2+}]$ 上昇が有意に抑制されたことから、細胞外からの流入にはnAChRを介する成分と $Ca^{2+}$ チャネルを介する成分があることがわかった。次に、膜透過性のないアセチルコリンを用いて形質膜のnAChRのみを介する $[Ca^{2+}]$ 上昇を記録することを試みた。その際、ムスカリン受容体の影響を排除するため、アトロピンも同時に使用した。アセチルコリンとアトロピンによる $[Ca^{2+}]$ 上昇は、 $\alpha 7$ 特異的拮抗薬(MLA)により有意に抑制されたことから、 $\alpha 7$ nAChRを介する成分が含まれることがわかった。そこで、形質膜の $\alpha 3 \alpha 5$ nAChRを介する $Ca^{2+}$ 流入の成分のみを抽出するために、アトロピン、ニフェジピン、 $\omega$ コノトキシン、MLA存在下にアセチルコリンを投与し、 $[Ca^{2+}]$ 上昇を観察した。この形質膜の $\alpha 3 \alpha 5$ nAChRを介する $[Ca^{2+}]$ 上昇は、cAMPアナログであるdbcAMP1mMを15分間処置しても変化はなかったが、48時間処置にて減少し、 $\alpha 3 \beta 4$ nAChR mRNA発現も有意に減少した。これらの結果から、SH-SY5Y細胞では、長期間のcAMP上昇は転写レベルで $\alpha 3 \beta 4$ nAChRの機能を抑制的に制御すると考えられた。次に、 $\alpha 3 \alpha 5 \beta 4$ nAChR安定発現CHO細胞での検討を行った。この細胞では、ニコチンによる $[Ca^{2+}]$ 上昇は観察されるが、ニコチン誘発電流は観察されない。また、アセチルコリンとアトロピンによる $[Ca^{2+}]$ 上昇は観察されない。つまり、この細胞の形質膜には $\alpha 3 \alpha 5 \beta 4$ nAChRが発現しておらず、観察される $[Ca^{2+}]$ 上昇は細胞内の $\alpha 3 \alpha 5$ nAChRを介する反応であると考えられた。この細胞にdbcAMP1mMを15分間処置するとニコチンによる $[Ca^{2+}]$ 上昇は有意に増加したが、48時間処置では変化がなかった。これらの結果より、 $\alpha 3 \alpha 5$ nAChRはcAMPによる機能制御を受け、その制御機構は形質膜に存在する受容体と細胞内に存在する受容体で異なっている可能性が示唆された。最後にGPR3とニコチン誘発性 $[Ca^{2+}]$ 上昇との関係をSH-SY5Y細胞で検討した。GPR3をノックダウンすると、ニコチン誘発性 $[Ca^{2+}]$ 上昇は有意に増加したことから、GPR3はニコチンに対する反応を負に制御している可能性が示唆された。