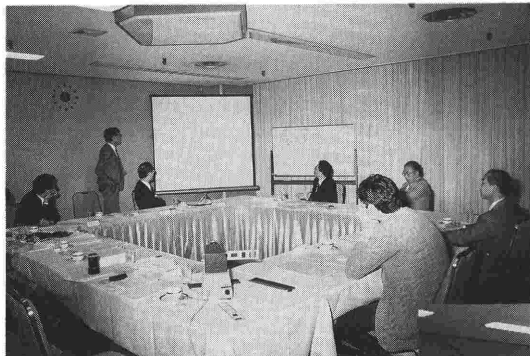


「循環制御」誌上シンポジウム

レセプターをめぐって



シンポジスト	遠藤政夫先生
	平田雅人先生
	小川靖男先生
	三浦哲嗣先生
	中山仁先生
モデレーター	岡田和夫先生
	安孫子保先生

日 時：平成5年9月25日（土）  
場 所：経団連会館

**安孫子 (旭川医科大学・薬理)** 最初に自己紹介ということですので、私から始めさせていただきます。

私は、旭川医科大学で薬理学をやっております安孫子といます。「循環制御」の編集委員をやらされています。岡田先生が今日のシンポジウムの企画をしたんですが、薬理の先生もたくさん来られることだし、おまえも来いということで、本日出席させていただいた次第です。

それでは小川先生の方からお願いします。

**小川 (順天堂大学医学部・薬理)** 順天堂大学・薬理の小川でございます。

私が大学院に入りまして研究を始めましたときに、筋肉の収縮弛緩の制御はCaによって行われていることは定性的には間違いないけれども、定量的にはまだ十分な説明がついていない。特に筋肉の弛緩速度を考えると十分には説明ができていないので、その点を検討しなさいと最初に言われました。

当時名古屋の理学部におりました大西先生がつくられた二波長分光光度計というのが教室にたまたまありました。特別な意味合いでChance machineと言われておりました。即ちB. chanceが最初につくった機械ということと、パイチャンスにしかはかれないというニュアンスを含んでおりました。これを改良して、測定しなさいということで始めました。

時間経過が非常に速いfreeのCa<sup>2+</sup>濃度変化を、大体10数ミリ秒から分オーダーの間に起る変化をはからなければならないわけです。その当時はムレキサイドという色素しかなかったわけです。最近はいろいろなのが出ていますけれども、その辺の方法論的なことから研究を始めました。

筋小胞体のCa取り込みとか、その機構、特にin vivoの条件を考慮して実験をしております、一方ではCa<sup>2+</sup> releaseも研究していました。SRのCa取り込みだとか、いろいろな薬物によるCa<sup>2+</sup> releaseについて実験しておりましたが、それだけではわからなくて、収縮系の性質も知らないといけないということで、トロポニンCだとか、カルモデュリンだとか、パルプアルブミンのCa結合の性質なども検討致しました。

きょうのお話のリアノジン受容体について、今までに、骨格筋と心筋にisoformがあり、別々の

遺伝子により発現されていることがわかっていました。骨格筋は温血の場合ですと1種類しかなかったわけですが、ニワトリ以下の動物ですと、骨格筋でも2種類あるんです。私はカエルでずっとやっていましたが、カエルでもそれに相当するバンドが2本ないしは3本ということで、どれがリアノジン結合たんぱくだろうかということで検討を始めました。結論的には2種類あって、性質は非常によく似ている部分が多いが、Ca<sup>2+</sup>感受性など違う部分もあるということで、今、少しその辺の生理的な意味合いなどの検討を進めております。

**遠藤 (山形大学医学部・薬理)** 私は山形大学医学部・薬理の遠藤です。

私は、今、薬理学をやっていますけれども、最初は心臓外科医をやろうかと思って外科に入ったんです。2年の予定で薬理学を始めまして、いまだに薬理にいるわけです。そんな関係で心筋の収縮に興味を持ってずっと研究を続けてきております。

最初は、東北大学医学部の薬理学教室の故橋本虎六教授のところ、イヌの血液灌流乳頭筋標本を開発しました。小動物の心筋は摘出して器官浴槽中で実験できるんですけども、イヌの乳頭筋は過ぎてそういう実験はできないということで、イヌを2頭使って乳頭筋を灌流する方法を開発して、大体10年ぐらい強心薬、あるいは心筋収縮抑制機序の研究をいろいろしてきました。

薬理学で学位を取った後、西ドイツに留学しまして、そこで心筋の $\alpha$ 受容体と $\beta$ 受容体の研究を始めました。 $\beta$ 受容体の細胞内情報伝達物質はcAMPということで、そのころからほぼ確立されつつあったわけですけども、 $\alpha$ 受容体の方は細胞内セカンドメッセンジャーが全くわからないということで、その辺のところに興味を持って $\alpha$ と $\beta$ の比較を研究してきました。

きょうは、自己紹介ということなのでそのスライドもお見せしたいと思って用意してきました。最近の10年ぐらいは心筋細胞内のCaと心筋収縮との関係の分析ということで研究をしてきております。

きょう、お集まりの皆様はみんな親しいというか、いつも顔を合わせる機会の多い先生方で、論文も読ませていただきました。今は、小川先生が

リアノジン・レセプターについて話されましたけれども、細胞レベルにおける signal transduction ということでみんな領域がオーバーラップして近くなってきていますので、きょうは非常に楽しみにして参加させていただきました。よろしく願いいたします。

**平田 (九州大学歯学部・生化学)** 九大の平田です。よろしく願いします。

私は、昭和51年に九大の歯学部を卒業しまして歯医者になったんですけれども、当時、うちの生理学教室の教授が栗山熙先生であられまして、その大学院にすぐ入りました。そうしましたら、まだ何にも知らないうちにすぐ「おまえは江橋先生のところで勉強してこい」ということで、大学院に入った年の5月から江橋先生のところで研究をさせてもらいました。何にも知らない中で、当時小川先生はもう既に順天堂にお出になっておられました。

**小川** まだです。

**平田** そうでしたか。51年です。多分もう出ておられたと思いますが。

**小川** 51年でしたらそうですね。

**平田** 小川先生が時々見えていまして、ピペットの扱い方とかよく怒られていました。小川先生は随分丁寧な方ですので、お陰様で今はその経験が随分役に立っています。

江橋先生のところに3年近くいまして、何にも役に立てないまま、大槻先生が当時助教授であられて、九大の新設の臨床薬理の初代教授におなりになって赴任されるのに一緒について帰りました。大学院を終わって大槻先生のところの助手をやり、その後今おります歯学部生化学に配置がえになって今日まできております。

Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> とのかかわりなんですけど、今の生化学にうつりましたときに免疫の教室でありまして、教授が何をやってもいいけれども、免疫系の細胞を使ってくださいということをおっしゃったので、マクロファージを使うことにしたわけです。走化性因子というのはマクロファージが動くのを誘導する因子ですけれども、それでマクロファージを刺激したときにCaが上がる。小胞体からCaが出る。何がメディエートしているんだろうかということがIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub> とのかかわりです。もう既に10年たちましたけれども、

大したこともできないまま今日にきています。

小玉(株)の方から送っていただいたほかの先生方の原稿を見まして、皆さん、「循環制御」という雑誌の特異性といいますか、分野をお考えになって書かれているのを見まして、私は何も考えずに書いてしまったなと思って、随分恥ずかしい思いをしたんですけれども、循環に関しては何にも知りません。ただIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub> のことをちょっと知っているというだけですので、どうかよろしく願いします。

**三浦 (札幌医科大学・内科)** 札幌医大・第二内科の三浦です。

自己紹介をいたしますと、昭和55年に札幌医大を卒業しまして、その後横須賀のアメリカ軍の海軍病院で1年間研修しました。その当時はピュアに臨床医に生きるつもりで頑張っていたんですけれども、大学に戻って3年ほどたちまして、1984年に教授が留学のチャンスを与えてくれたものですから、南アラバマ大学のJames Downey教授のところで、虚血心筋障害を全くの素人のところから始めまして、1984年はちょうど心筋虚血再灌流障害における活性酸素の役割に関して、非常にアクティブなリサーチが行われていまして、私がもらったテーマもその関連であったんですけれども、やればやるほどネガティブなデータがたまりまして、残念な思いをして帰ってきたわけです。

帰国して3年ぐらいたして、活性酸素による再灌流障害は少なくとも虚血細胞壊死には関与しないだろうというところまできていたときに ischemic preconditioning という現象が発表されました。それを追試しますと、薬物ではモデファイされないようなレベルまで虚血障害が抑制されることを私たちが確かめることができました。そのメカニズムについて調べているうちに、ちょうどDowney教授のところからアデノシンがメディエーターだということを指示するようになりレポートが出たものですから、それを追試したのがアデノシンとの初めての接点だったんです。

ということで、アデノシンを勉強し始めまして、たかだか二、三年にして今回のようなテーマをいただいたものですから、必死で勉強してきたんですけれども、どこまでお役に立てるかわかりません。そういうことでレセプターは本当に正直申し上げて素人なので、虚血障害について少しお話し

できればというぐあいに思っております。どうぞよろしくお願いいたします。

**中山 (熊本大学薬学部・薬科学科)** この6月に北海道大学から熊本大学に移りました中山です。どうぞよろしくお願いいたします。

私のバックグラウンドは有機化学ですが、恩師の金岡先生は、「有機化学は本来生体というものがあって出てきた学問だと思う。だから、有機化学を使って何か生体の役に立つようなことを研究したいんだ」というお考えで、生物有機化学といいますが、bio-organic chemistry と言っているんですけども、そういった方面の研究をされました。私も先生のご指導をいただくときから、それまでのクラシックな有機化学ではなくて、生化学とかけ橋になるような研究をしたいなと生意気なことを考えていまして、最初は酵素たんぱくの化学修飾といったような仕事をさせていただき、その後で当時盛んになってきましたレセプター分子が扱えるようになってきましたので、特にオピオイド・レセプターの化学修飾を手がけました。

それがきっかけで十数年前にアメリカに留学させていただいたときに、たまたま現在の研究につながっていますイオン channel といった仕事をそこで教えてもらいました。それは特殊な臓器（発電器官）の Na channel の仕事だったんですけども、それがきっかけになりましてイオン channel タンパクの精製、構造と機能の関連を探る仕事を続けています。

「三つ子の魂百まで」ではないんですけども、生物有機化学というのは低分子と分子量の大きい生体高分子との相互作用・分子認識が興味の中心でありますので、イオン channel の中でも特にトキシンとか、薬物の結合部位といったところが、今の時点で私の大変興味のあるところです。そんなようなことを今回は少し書かせていただきました。

**岡田 (帝京大学医学部・麻酔)** 帝京大学の麻酔科の岡田でございます。

きょうは、お忙しいところを各分野のオーソリティーの先生に寄稿していただき、その次に本日のシンポジウムに参加していただき、本誌の目玉であります「誌上シンポジウム」がこの号に限っても非常に立派なものになると期待して司会させていただきます。

レセプターは他誌にも発表されていますが、数年前のシンポジウムとか特集がもう今の時点ではそれがかなり変わり、古くなっていることを考えますと、本誌においてもレセプターを循環を制御する立場で取り上げてみるのもいいのではないかなと思った次第であります。

レセプターは新しいのがどんどん出現して循環関係以外でも多くみられます。各所に散らばったレセプターを改めて「循環制御」という立場でまとめることで、このシンポジウムを意義あるものにしたいなということで、お願いしたいと思います。

私は麻酔科の立場で、安孫子先生に今回はお世話なつたのでありますけれども、アドレノセプターに関しましては遠藤先生もおっしゃいましたように、臨床におきまして、これの使用はほとんど日常茶飯事になっていますが、それがどういう立場で、またはどういう意義があって使うか、それからまた遠藤先生が言われていますような、心筋においての効きが悪いという状態のときの解釈なども現場に直結することだと思ひながら、お話をいただければと思います。

リアノジン・レセプターに関しましては、小川先生にお願いできたことは非常に光栄だと思っています。私ども麻酔科の分野では、例えば横紋筋に関しては悪性高熱といったことがひっかかってきまして、筋の収縮が起こるのにリアノジン・レセプターの一つのモディフィケーションがあったときに悪性高熱が起こるのではないかなという討議もなされていると承っています。もう一つは、循環機能において、心筋において麻酔薬が心筋抑制を来す機序の中に、Ca は transsarcolemma なのか、または sacroplasmic reticulum からの放出なのかということも関係すると思います。リアノジン・レセプターは麻酔をやる者も興味を持っていい時代じゃないかと考えています。

アドノシンに関しましては、低血圧麻酔との関係で興味があります。Ca<sup>2+</sup> ブロッカー、節遮断薬、ATP と市販されているものを応用しています。ATP に類似したプリンまたはアデノシン・レセプターに対する作用を期待して開発されている薬を、たまたま phase 1 でみているので、そういうことも含めてアデノシン・レセプターというものをもう一度勉強したいということで、安孫子先生



岡田先生

にお世話になって三浦先生にご登場願った次第です。

Na channel は、局所麻酔薬の作用機序が今はカリウムから Na channel に最近なってきたという程度の知識しかないので、非常に高分子であるトキシンに関する Na channel の役割などを先生にお伺いできることは、非常に興味のある、楽しいトピックスだと思っています。

Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> (イノシトール 3 リン酸) に関しましても、Ca との関係におきまして論文を拝見させていただきまして、こういう分野まで話が進むことは、このシンポジウムに関して非常に楽しいことだと思っています。よろしくお願いたします。

安孫子先生と 2 人で司会をしたいと思っておりますけれども、最初の二つは私の分担ということで、小川先生から始めていただけますか。

Overview をやっていただき、こういう点はポイントであるということを一緒に含めていただければと思います。

小川 それでは早速のご指名ですので。

きょうは、私はスライドを用意してきておりませんが、原稿が皆さんのお手元にいっていると思いますので、その図表を使って説明をさせていただくような形にさせていただきたいと思っております。

リアノジン受容体 (RyR) というのは、現在ではもう皆さん十分ご存じだと思いますけれども、横紋筋の Ca<sup>2+</sup> release channel 蛋白であるということがわかっております。

リアノジン (Ry) そのものに関して、まずリアノジンの作用ということについて言いますと、リアノジンはイイギリ科 (Flacourtiaceae) からとりましたアルカロイドで、ほかの皆さん方が書いておられるのは、割合と何々受容体といったときの結合するものはピュアなんですけれども、リアノジンの化学構造は決められているんですけれ

ども、現実として手に入る試薬はかなりピュアリティの悪いものが多いので、実験のときに気をつけないといけませんということで、最初にちょっとリアノジンのことに関して述べてあります。

化学構造としましては、図 1 A の (1) の化学構造式を持っているものを「リアノジン」と言っております。私にはよくわからないんですけども、中山先生なんかはこういうのを見られると、すぐさっとわかるのではないかと思います。

図 1 B というのは、インピュアなものが結構あることはよくわかっていたんですけども、ある会社のカタログによると分光学的には九十%以上のピュアリティがあるというリアノジンを HPLC で分析した結果、結局ピーク (1) がピュアなリアノジンでして、全体で見えますと、その含量が 16% ぐらいというわけで、随分インピュアなものがあります。

それで簡単に見分けられるのは水に溶けるか溶けないかということで、水に溶けるものが純度が高いのですが、それでもピュアな (1) と、化学構造的には 9, 21-didehydroryanodine と言われているもののミックスチャーの場合が多い。

どうしてその点が問題になるかと言いますと、表 1 の Ryanodine 誘導体の活性比較というのを見ていただきますと、これでかなり問題だと思えますのは、リアノジンと、その次の 9, 21-didehydroryanodine というのがありますけれども、骨格筋の小胞体に対する作用はほぼ同じなんですけれども、私が引用させていただいた人のデータで見ますと、9, 21-didehydroryanodine の方が心筋の小胞体に対する作用がリアノジンよりもかなり強いということになります。ただ、私はこれを投稿した後で知ったんですけども、現在リアノジンをよく研究しております Sutko という人がいます。彼らの結果では、心筋に対しても作用はリアノジンと 9, 21-didehydroryanodine とは同じぐらいだというデータが出ていますので、その点はちょっと確認しないとイケないんですけども、要するに研究するのにこういうインピュアなものでやっているのは結果がばらつきますので、その辺のところは十分気をつけていただきたいというのが、まず最初の点であります。

リアノジンは、1940年代の中ごろぐらいは殺虫薬として使われておりまして、そのときまでにわ



小川先生

かっておりました作用は、哺乳類とか脊椎動物の骨格筋の収縮、昆虫類や節足動物の横紋筋の弛緩、哺乳類心筋の収縮力抑制ということが知られていたわけです。

1980年代後半

になりまして、リアノジンの結合たんぱくが解析されてくるようになりまして、それが骨格筋の  $\text{Ca}^{2+}$  release channel たんぱくであることが同定されるようになりました。

それと同時に、心筋でも調べてみますと、心筋にもリアノジン結合たんぱく、骨格筋のそれに相当するようなたんぱくがある。ほかの臓器についても調べると、あと脳にもあるということで、現在では大きく分けますと、3種類のリアノジン受容体があることがわかっております。

アミノ酸の組成のホモロジーは、大体それぞれ60~70%ぐらいのホモロジーであります。

その取り出した性質について、骨格筋と心筋とで単離しましたリアノジン受容体といいますが、 $\text{Ca}^{2+}$  放出 channel の性質について、骨格筋と心筋とで見てみますと、表4に掲げてあるのが今まで報告されているデータをまとめたものであります。 $\text{Ca}^{2+}$  release channel の性質としてもよく似ておりますし、リアノジンを結合する特性もよく似ております。それからいろいろな修飾因子による影響などもよく似ている。

そうしますと、骨格筋では結局どういうことかといえますと、リアノジンが結合すると、 $\text{Ca}^{2+}$  release channel が開いたままの状態に固定されるということです。

その場合に骨格筋の収縮は、それでずっと収縮状態というのはわかるんですけども、心筋に関しては収縮力抑制がどういうふうに説明されるかという、現在ところはよくわかっていない。どちらかといえますと、まるごとの心筋ないしは skinned fiber で実験している人たちに言わせると、リアノジンがかえって  $\text{Ca}^{2+}$  release を抑制す

る性質があるんだというデータが出ておりますし、一方では、生化学的にリアノジン結合たんぱくを単離している研究者達の説明は、心筋の場合には、 $\text{Ca}^{2+}$  が release されたときに今度は sarcoplasmic membrane にある Na-Ca エクスチェンジだとか、sarcoplasmic membrane にある Ca-AT Pase によって  $\text{Ca}^{2+}$  が全部細胞外に出されてしまうから小胞体内の Ca が枯渇して、その結果として心筋の収縮力の抑制が起こるんだという説明をなされておりますけれども、現在までのところ、それのどちらが正しいかということに関してはまだわかっておりません。

あとリアノジン受容体に関しての関連としましては、平田先生が Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> (イノシトール3リン酸) 受容体のことを非常によく解説しておられまして、私も随分勉強させていただいたんですが、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体の方は、どちらかといいますと、平滑筋ないしは心筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  release channel というようになっておりまして、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体のどこに Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> が結合してとかいうことが大分わかっているようですけれども、リアノジン受容体に関して言いますと、まだそこまで十分にわかっていない。リアノジンの結合部位がどこかとか、Ca だとか、アデニンヌクレオチドによってモジュレートされるわけですけども、そういう部分の結合部位がどこであるかということに関してもまだわかっておりません。

ただ、現在までわかっていますのは、先ほど岡田先生がご紹介のときにちらっと言われましたけれども、悪性高体温症というのが確かに骨格筋の筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  release channel protein の先天的な異常によるということが言われておりまして、現在わかっていますのは、最初にブタでわかったんです。ブタですと615番目の Arg (R) が Cys (C) に変異しているためということですが、ヒトの骨格筋の場合には一つ順位がずれてまして、614番目のところに同じ変異が起こっているということが言われております。ただ、ここが本当に Ca 親和性に影響を及ぼしているのかどうかということに関しては、今までのところはそういうデータがありませんから、このところがどうなっているかというのはわかりません。

ヒトの場合には、そのほかに248番目のとこ

ろの Gly (G) が Arg (R) に変異している例が報告されております。いずれにしても、全部で約5,000アミノ酸の巨大な分子なんですけれども、むしろN端側がCa感受性に影響があることを示唆しておりますが、アミノ酸配列の面から推定されているのは、Caによってモジュレーションを受ける部位としてC端側が重要だということが言われているということです。

**岡田** ありがとうございます。

「リアノジン」という言葉を私どもが知ったのは、悪性高熱を契機にしてであります。心筋と横紋筋は、片一方がキュッと硬直が起こるのに心筋の方は収縮が抑制されているということが、たしか7ページあたりに示されています。先生のご意見だと、CaがSRから出てきたのが横紋筋ではそのままとどまってしまうけれども、心臓の方では生化学的な立場とおっしゃった、外にほうり出されるということで sarcoplasm の中のCaが減っていった枯渇が起こり心臓の抑制があると説明されましたが、そうではない説も心臓にはあるのでしょうか。

**小川** 私はどちらが正しいかはよくわかりませんので、均等に書いたつもりだったんです。私自身としては、例えば Wier という人なんかは、収縮力が落ちている状態のときに本当に枯渇が起きているかといいますと、実際には小胞体中にまだCaがあるということを言っておりますし、Fabiato なんかは skin ned fiber でやって、リアノジンを作用させると、かえって  $Ca^{2+}$  release を抑制するということがあります。ですから、その辺のところはどちらがどちらなのかよくわかりません。

**岡田** 基本的な話で、リアノジンということに関して教えていただきたいと思えます。先生のご意見の前にちょっと申しわけないんですけれども、例えばアドレノセプターというのは私たちの体の中にカテコールアミンがあって、それがレセプターにひつつくというプロセスがあるのですが、リアノジンはとんでもない物質がありまして、それが feet structure (SRの近接部) という構造と同じだと言う発言がありますね。リアノジン・レセプターは Isolation したらアイデンティティとしては同じだとかいう論文を、乾さんかなんかが出しているのを見たことがあるんですけども、

そんな大きなものが私たちの体の中に突然ひょこっと出てきて、リアノジンが特別にアフィニティーがあって、しかもこれがCaの放出を抑えるというのと、どんどん出すというのと両方あるとおっしゃったんですね。

**小川** それは心筋に関してはですね。心筋に関してはそうなんです。

**岡田** 心筋に関してCaは本当はオープンになって、横紋筋はどんどん出ていくということがあるから硬直が起こるんだと。ところが、心筋に関してはクローズかもしれないという意見もある。そうすると、リアノジン自身が、何であんな大きなものが突然出てきたのかということの一つ教えていただきたいことと、心筋に関してはクローズになるのと、オープンになるというのと全く相反することが意見としてなぜ出てくるのかということも教えていただきたいんです。

**小川** 最初にリアノジンが世に出てきたのは、Merch Sharp and Dohme の研究所の研究者によって発見されたことからして、そのときに骨格筋(脊椎動物)の収縮と心筋の収縮力抑制がある。その当時(1970年)のときの論文で、リアノジンの総説のところでもわかっておりました大きな事柄としては、骨格筋の収縮、硬直、心筋の収縮力抑制ということだったわけです。

効果の発現までに非常に時間がかかるものから、なかなか作用機序がよくわからなかった。事実、私も大学院学生のときに release を調べていまして、こういうリアノジンがあるということを知りまして、つてを頼ってもらって作用を調べてみたんですけれども、結局わからなくてやめてしまったことがあるんです。

そういうことをやっていたときに、一方では少しずつ昆虫やなんかの方の駆虫薬として研究している人たちが調べておりました、Pessah と Casida という人たちが筋小胞体の中にリアノジンを結合する成分があることを見つけ出しまして、それを追跡していったら、そのたんぱくを単離したり、電子顕微鏡で見えますと、foot 構造というものとサイズやなんかがよく似ているということで、そういうものだろうということがわかってきたわけです。そういうことでよろしいでしょうか。

**岡田** 小川先生のお話に対してご意見などをいただきたいと思えます。

**平田** 心臓と比べたときにアミノ酸のホモロジが70~80%もありながら、リアノジンがくっついたときに、今の岡田先生の質問に先生は答えられていないと思うんですけれども、どうして心臓と骨格筋はそんなに違うんでしょうか。channelの性質そのものがリアノジンをくっつけた状態で。

**小川** ですから、それぞれをpurifyして人工膜に組み込んでchannel活性を見ている限りにおいては余り差がないんです。それは表に書いてあるとおりほとんど性質に差がない。ですから、リアノジンをやってやれば開口固定なわけです。

**平田** 心臓からのやつもですね。

**小川** 心臓のものでも。ですけども、結果としては心筋の収縮力を見てみますと、図に書いてあるとおりに、なにしろ心筋の収縮力を抑制して、これは動物種差がかなりあるということなわけです。

しかも、その収縮力は結局活動電位には影響がないわけです。Ca<sup>2+</sup>のrelease量が違っているということです。それでなぜ差があるのかということはまだわかっていないということなわけです。そこのところはちゃんとやらないといけないだろうと思っています。というか、それは明らかにすべきだろうと思います。でも、残念ながらわからないから答えようがないんです。

**遠藤** 私も小川先生がおっしゃられるとおりでと思うんです。

一つは、リアノジンchannelに同じことが起こっても、骨格筋と心筋ではSRの量がものすごく違いますから、同じようにドッとCa<sup>2+</sup>が出たときに骨格筋ではSRが多いからものすごく出る。そうすると、細胞質内からクリアできなくて収縮が起こる。心筋の方は主としてNa-Ca交換機構が非常に効率よくCa<sup>2+</sup>をかい出すので、出てきたCa<sup>2+</sup>がむしろ細胞外へかい出されるということで収縮がなくなってしまう。こういう説明が私自身は妥当ではないかと思っております。

もう一つ、小川先生が言われましたけれども、同じリアノジンchannelでも骨格筋と心筋では、Ca<sup>2+</sup> induced-Ca<sup>2+</sup> releaseの点で、調節は恐ろしくかなり違うだろうと思われます。最近心筋のリアノジンchannelは骨格筋のchannelとかなり違う可能性があるという報告が出ました。サイクリッ

クADP riboseがある細胞に発現させた心筋のchannelからはCa<sup>2+</sup>遊離を起しますが、骨格筋のchannelを発現させた細胞では何も起こらないということです。このようなことでリアノジンchannelに差異が有るということが少しずつわかってきていますけれども、究極的にはどこに結合して何が起こっているのかというところはこれからの課題じゃないかと思えます。

**安孫子** 同じ骨格筋でも昆虫の方はリラクゼーションなんですね。

**小川** そうなんです。

**安孫子** その辺はどういうふうに説明されますか。

**小川** それはわからないんです。昆虫のはまた見てみますと、リラクゼーションするものと収縮するものがあるようです。それも同じ個体があっても部位によっても違うみたいですね。でも、実際に殺虫薬の作用はむしろ弛緩の方で行っているようです。収縮ではないようです。だから、このところはよくわかりません。

**岡田** それは昆虫ですね。

**小川** 昆虫です。

**岡田** 殺虫薬の効果として。

**小川** はい、そうです。温血は骨格筋は全部収縮です。

**岡田** 「Anesthesia Analgesia」というのは、私も麻酔の医者としてはよく読む雑誌なんですけれども、リアノジンをやっておきまして、笑気ガスを加えてCaがどこからくるかということをやっていました。Sarcolenmaからくるのか、それともSarcoplasmic reticulumかということをやっている論文がありまして、リアノジンに関してCaが出るといって、片一方は抑えるといっているものですから、先生にちょっとご意見をお伺いしようと思っておりましたから、どっちの意見もあるということで、この論文はうそじゃないということが今わかったと思うんです。

それでここの中で、種によってものすごく違うというんです。例えばカエルというの、これはおかしいんじゃないか。カエルはほとんどSRがないと書いてあるんですよ。それでよろしいんですか。

**小川** そうなんですよ。実を言いますと、この表に書いてありますリアノジンの効果が動物種差



があるということでありませけれども、これは結局SRの含量と相関関係があるんだといっているデータもあるんです。ただ、含量というか、SRのコントリビューションですね、収縮するときCa<sup>2+</sup> influx によるのか、ストアからのCa<sup>2+</sup> release によるのかということをやってみますと、コントリビューションで言うと、小胞体のコントリビューションが大きいものほど抑制が強くなるといっているのがあるんですけれども、私自身はSRのコントリビューションの測定の仕方が十分まだ納得がいていませんので、本当かどうかはわかりませけれども、心筋をやっている方々の大体の意見は同意見のようです。

そういうことで言いますと、カエルに関しては、カエルの心筋は小胞体が非常に少ないようできて、私も少し心筋でどうなっているんだろうと思ってやってみたんですけども、マイクロソーム画分をとってきて、SDS ポリアクリルアミドゲルでやってみますと、骨格筋とは全然パターンが違って、相当するところにバンドはないんです。

もう一つは、SRのCa-AT Paseに相当するメッセンジャーもないんだといっている人もいるくらいで、そこのところはよくわかりませ。ただ、1例だけ toad でもヒキガエルのたぐいですが、リアノジンの効果があるんだというのが1例報告がありますけれども、大体はカエルの心筋に対してはリアノジンの効果はないというのが全体的な意見です。

生化学的に単離したマイクロソーム画分、人工膜を用いた実験結果では一般的に言って少量のリアノジンでは開口固定、大量では逆にチャネルを閉じると言われています。先生の引用された論文をみますと、濃度は開口固定の濃度です。今迄の私の説明も開口固定の濃度範囲での議論です。

**岡田** 時間の都合もありますから、ご意見はまたまとめてできると思うので、遠藤先生の方へ移らせていただきます。

**遠藤** 私のテーマはアドレノセプターですけれども、心臓循環器系といえますと、心臓と血管ということがありますが、限られた時間内に両方について述べることはできませんし、私自身は先ほども言いましたように、心筋の受容体に興味を持って研究をしておりますので、きょうは心筋の方を中心にやらせていただきたいと思います。

最初のスライドをお願いします。

[スライド開始]

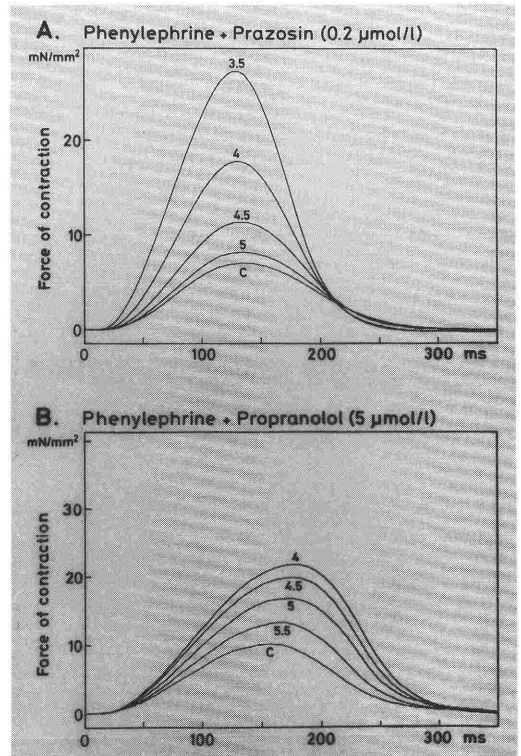


図1

○グラフ

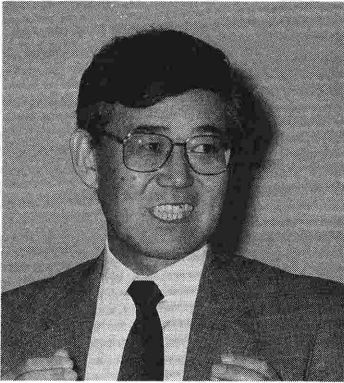
A : Phenylephrine Force of contraction prazosin (0.2 μmol / l)

B : Phenylephrine Force of contraction Propranolol (5 μmol / l)

今、リアノジンも話に出ましたけれども、心筋は収縮・弛緩を繰り返すということで、これが基本的状態としてあるわけですから、骨格筋とはかなり働き方が違うわけです。

上 (A) がβ受容体を刺激したときの陽性変力作用、下 (B) がα受容体を刺激したときの陽性変力作用なんですけれども、一目見ていただただけで収縮曲線の形が非常に異なるということが判ると思います。

最初は何でこんなに違うんだろうという素朴な疑問からスタートしたわけです。β受容体の方は、これは現在ほぼ確立されておまして、β受容体



遠藤先生

には、現在、 $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ と3つのサブタイプが見つかっております。心臓の受容体はほとんど $\beta_1$ で、最近の文献ですと $\beta_2$ も心室筋に20~30%ぐらいは存在すると言われて居ります。心

房筋の方が心室筋より $\beta_2$ サブタイプが多く、心房筋ですと全受容体数の50%ぐらいという報告もあります。 $\beta$ 受容体を介する情報伝達機構は、恐らく受容体を介する情報伝達機構の中で一番よく解明されている系ではないかと思ひます。

$\beta$ 受容体に $\beta$ アゴニストが結合しますと、Gsを介してアデニル酸シクラーゼが活性化し、cAMPが蓄積します。 $\beta$ 受容体刺激効果は基本的には全てcAMPで説明できるということです。cAMPはプロテインキナーゼAを活性化することによって、膜のCa channelタンパク、あるいはSRのホスホランバン、収縮タンパクのトロポニンI、あるいはCタンパクをリン酸化して、それによってこれらの機能タンパクにconformational changeが起こることによって、スライドAのような収縮性の変化が起こるわけです。

この陽性変力作用のピークは、SRから遊離されたCaによって形成され、この遊離はリアノジンchannelから起るわけです。しかし、 $\beta$ 受容体刺激によってリアノジンchannelがどのような修飾を受けるかということは現在わかっておりません。 $\beta$ 受容体刺激により弛緩が促進される。この弛緩促進はSRのホスホランバンのリン酸化でCa-ATPaseが活性化され、Caが速く取り込まれるために弛緩の促進が起こる。

もう一つ、トロポニンIのリン酸化と関連してトロポニンCのCa感受性が減少する。その二つの機序で弛緩促進が起こると考えられています。このように $\beta$ 刺激によりSRにより多く取り込まれたCaはより多くCa release siteに運ばれて、その結果Ca遊離量が増える。

先ほどの小川先生のお話にもありましたけれど

も、CaがSRにup takeされてからrelease siteに運ばれてreleaseされるまでのプロセスは現在まだわかっていません。いずれにしても、 $\beta$ 受容体刺激効果は、主としてcAMPを介して起こる。

それに対して $\alpha$ 受容体刺激(Bのグラフ)の場合は、弛緩速度がむしろ遅くなる。 $\alpha$ 受容体刺激による収縮増強の特徴。

これはウサギの乳頭筋における結果です。エクオリン(aequorin)というCa感受性発光タンパクを心筋細胞に注入しまして、細胞内Ca変化と収縮変化を同時に記録するという方法です。この方法でCaと収縮変化の関係を調べてみますと、収縮力増強作用は $\beta$ 受容体刺激効果の最大反応を100とすると、 $\alpha$ 受容体刺激効果は大体60%ぐらいです。細胞内Ca transient(興奮に引き続いて起る細胞内Caの上昇・下降)のピークの高さを比べると、 $\alpha$ 受容体刺激は $\beta$ の最大反応の10%以下ぐらいしか細胞内のCaを増やしません。

それで我々は心筋 $\alpha$ 受容体刺激は細胞内Ca transientを少しは増加させるけれども、それと同時に収縮タンパクのCa感受性を上げるのではないか。そういうことを提唱したわけです。ほぼ7~8年になりますけれども、その可能性はいろいろな心筋標本、あるいは血管平滑筋でも確認されています。ただ、どうしてそういうことが起こるのかということに関しては現在わかっておりません。

$\alpha$ 受容体刺激は、ホスホリパーゼCを活性化してIP<sub>3</sub>(Ins(1, 4, 5)P<sub>3</sub>)とジアシルグリセロールを産生します。ほとんどの哺乳類の心筋、ことにラットとウサギとモルモット等で実験が行われています。

IP<sub>3</sub>の心筋細胞機能調節における意義というのはほとんどわかっていなくて、恐らくもう一方のジアシルグリセロールによるプロテインキナーゼC活性化を介する系が調節に関与しているのではないかと考えられております。でも、詳細な機序に関してはよくわかっていないわけです。

○ Myocardial  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated modulation (図2)

$\beta$ 受容体の刺激の特徴は、cAMP-phosphorylationという割合と直感的にすっきりした系のようなんですけども、 $\alpha$ 受容体刺激の特徴は、いろ

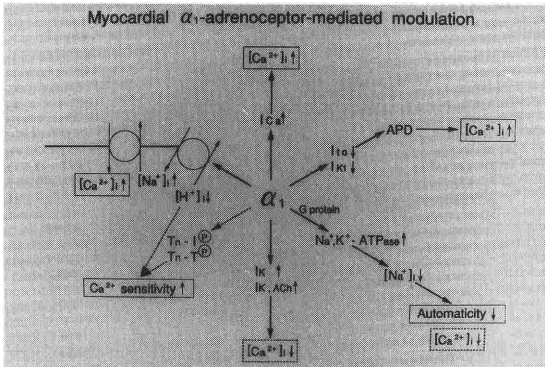


図 2

いろいろなカップリングがある。先ほど言いましたように、一つの重要な作用は細胞内Caを上げる作用であるわけです。細胞内Caを上げるといってもいろいろな上げ方がありまして、一つは、L型Ca<sup>2+</sup> channelの活性化があります。80年代の初めごろはこれが重要だと思われていましたが、単離心筋細胞で実験してみますと現在はα受容体刺激によるL型Ca<sup>2+</sup> channelの促進はほとんどないと言われています。むしろα受容体刺激をしますと、K<sup>+</sup> channel, IKとか、Itoが抑制される。これは活動電位持続時間を延長しますから、活動電位の延長を介して細胞内のCa<sup>2+</sup>が間接的に上がる。これが一つ非常に重要な機序ではないかと考えられています。

もう一つは、Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> 交換機構というのがあります。これが恐らくα受容体刺激によるプロテインキナーゼCの活性化を介してアクチベイトされるだろうと考えられる。そうすると、H<sup>+</sup>がかい出されてNa<sup>+</sup>が入ってくる。入ってきたNa<sup>+</sup>は、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交換機構を介して細胞内Ca<sup>2+</sup>を高める。ですから、α受容体を介して[Ca<sup>2+</sup>]が上昇する機序としてはスライドに示すようないくつかの可能性があるのであると思われる。

それでは、収縮タンパクCa sensitivityの増強は何で起こるか。これはわかっていないんですけども、現在、可能性としてはH<sup>+</sup>がかい出されて、その結果細胞内アルカリ化が起こると、これが収縮タンパクCa感受性を上昇させるということによく知られております。これはあくまでも可能性ですからスライドには点線で書いてあります。

それから試験管内in vitroでプロテインキナーゼCがトロポニンI、トロポニンTのリン酸化を起こすことがわかっております。トロポニンIの

リン酸化の部位はPKAで起こるリン酸化との部位は別であることもわかっておりますけれども、biochemicalなデータと機能観察の間にはまだ橋渡しが無い。この実験をしているグループの人たちはホルボエステルやPKCを使うわけですが、これらの化合物はnegative inotropic acionを出すので、リン酸化はむしろnegative inotropic acionに関係しているのではないかと考えているわけです。

α<sub>1</sub>受容体刺激が収縮タンパクCa<sup>2+</sup> sensitivityを上昇させるということは非常に興味深い現象ですが、その細胞レベルにおける機序はわかっておりません。

さらにα<sub>1</sub>受容体刺激は、K<sup>+</sup> channelを活性化作用があることも報告されております。たとえばα<sub>1</sub>刺激はI<sub>k</sub>あるいはI<sub>KACH</sub>を活性化しますが、これは主にモルモットの心室筋で見つかっているわけです。この機序が作用すると活動電位持続時間は短縮しますから、細胞内Ca<sup>2+</sup>はむしろ減少方向の変化を受けます。モルモット心筋においてはα<sub>1</sub>受容体を刺激したときに陽性変力作用が出るという結果もあるし、出ないという結果もあるので、恐らくこういう系が非常に発達していると、陽性変力作用が拮抗されるということで、controversialな結果が出ているのではないかと私自身は考えております。

またイヌのPurkinje fiberでは、α<sub>1</sub>受容体刺激はNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseを活性化させることが、ニューヨークのコロンビア大学のグループによって報告されております。α<sub>1</sub>受容体刺激によるNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの活性化は、百咳毒素(PTX)感受性Gタンパク活性化を介して起ると言われております。それはPTX処置により、この作用が遮断されるからです。この系が活性化されれば細胞内Na<sup>+</sup>は減少します。その結果Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換機構を介して細胞内Ca<sup>2+</sup>も下がるものと思われる。

このように心筋細胞α<sub>1</sub>受容体刺激は非常に多岐に渡る調節系に共役されているわけです。血管平滑筋細胞の方でもα受容体刺激によるCa<sup>2+</sup>感受性増加など、現在現象としてはいろいろなことがわかってきておりますが、情報伝達機序という点からはまだこれからの研究課題であると考えられています。

○ Putative topology of human  $\beta_2$ -adrenoceptor  
(資料図 3)

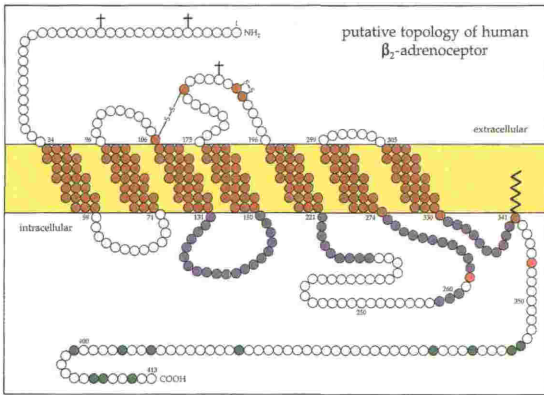


図 3

$\beta$  受容体の一次構造は非常によくわかってきています。細胞膜を 7 回貫通する受容体のスーパーファミリーがあって、その中の代表的なものがアドレノセプターです。site-directed mutagenesis とキメラ受容体を発現させるという分子レベルにおける研究で、機能に關与するアミノ酸も同定されて来ております。茶色の主として経膜領域のアミノ酸がポケットをつくってリガンドを結合するのに重要な役割を演じていることがわかって居ります。

一方、Gタンパクへの結合には [3~4] と [5~6] の細胞内ループおよび C 末端のアミノ酸 (紫) が非常に重要であることもわかって居ります。

この後でお話ししますが、先ほど小川先生がちょっと言われましたように、心不全のときには、 $\beta$  受容体の down-regulation が起こったり、あるいはそれ以降の過程で  $\beta$  受容体を介する情報伝達が非常に抑制されてしまうわけですが、そういうときには緑の部位のアミノ酸がリン酸化されることがわかっています。これは  $\beta$  アドレノセプター・キナーゼ ( $\beta$ ARK) という酵素でリン酸化されるわけです。

また赤 (図の右端) の部位のアミノ酸は PKA でリン酸化されます。そういう部位にリン酸化が起こると受容体を介する共役が起こらなくなってしまいうところまでわかっています。

○  $\beta_2$ -Adrenoceptor activation and inactivation (資料図 4)

図 2 は  $\beta$  受容体が刺激されて、感受性低下

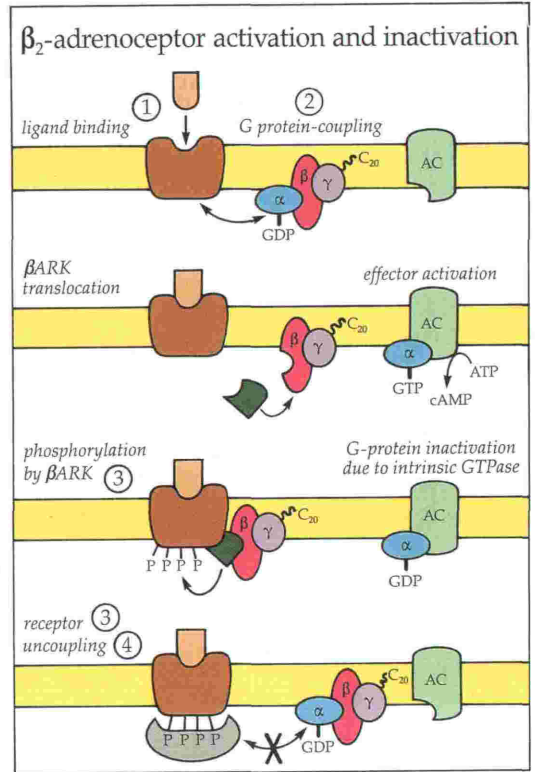


図 4

(desensitization) が起こる過程を模式的に示したものです。

受容体非刺激的には G タンパクの  $\alpha$  サブユニットが GDP を結合しています。受容体にアゴニストが結合しますと、 $\alpha$  サブユニットの GDP が GTP に置きかわり、G タンパクが活性化されます。 $\alpha$ -GTP は  $\beta\gamma$  サブユニットから解離して、AC (アデニル酸シクラーゼ) を活性化し、その結果、ATP から cAMP が生成されます。 $\beta$  アドレノセプター・キナーゼ ( $\beta$ ARK) はアゴニスト結合型受容体に結合して、 $\beta$  レセプターのリン酸化を起こします。(図 2-①, ②, ③) さらに、 $\beta$  アレスチンというタンパク質が、受容体に結合してアンカップリングを起こします。これらの一連の過程が受容体脱感作の機序の一つであると考えられます。(図 1-④)

こういう状態になると、レセプターは細胞表面から細胞の中に取り込まれます。この状態を receptor sequestration と呼びます。さらに受容体刺激が続くと、最終的にはレセプターはリゾソームで壊されて、receptor down-regulation 起ります。

以上、最近アトロセプターについて興味をもたれている点と解明されつつある問題について簡単に述べさせていただきます。

[スライド終了]

**岡田** ありがとうございます

遠藤先生のお原稿を私も読ませていただいたんですけど、非常によく up to date のことが書いてあって、こんなに知らないことが世の中に出てきたのかと感心もしおどろいたのですが、先生方、いかがですか。

今のスライドの内容もごらんになって、非常に初歩的な話を聞かせていただきますが、先生が一番最後におっしゃった down-regulation の話なんです。一番最後のスライドで  $\beta$ ARK がなんか出てきたところは、あれはインターナリゼーションの説明になりますね。

**遠藤** そうです。あの状態でさらに刺激が続くか、あそこで刺激が止むかで、その受容体の運命が決まるんですけど、刺激が止めば  $\beta$ ARK が離れて、レセプターは sequestration の状態から、元の状態に戻ります。一方刺激が続けば、internalization の状態から最終的には分解されてしまう。

**岡田** 私どもの教室で、いわゆる down-regulation が起こるかどうかというのを見たことがあったんですけど、 $K_D$  と  $B_{max}$  を見ながら、勾配は変わらないで数が減ってくるんです。

**遠藤** そうです。 $K_D$  が変わらないで数が変わるというのが一般的に起る現象です。

**岡田** そうすると、この現象 (スライド) みたいなことですね。

**遠藤** そういう現象ですね。勾配が変わるということは、恐らくレセプターの conformation が変わってということですから、そういうことは起こらないで、レセプターは同じ分子構造を維持したまま細胞内に取り込まれてしまうということです。

**岡田** 今のことが起こった。(スライド)

**遠藤** そういうことです。

**岡田** down-regulation というのはどちらが多いですか。数が減るインターナリゼーションですか。

**遠藤** 一般的には数が減る方向だと思います。internalization と言っても、その間のステップが

ありまして、sequestration の状態では、細胞内には入っているけれども、まだ internalization までは行かないで、中途半端な状態にある。そういう状態もつかまえております。その状態から down-regulation に移行してしまうか、あるいはまたもとに戻るかということです。

**岡田** それは例えば機能とか、それともまだ differentiate する方法って何かあるのでしょうか。機能としてそこで差があるかどうかということですよ。

**遠藤** それは非常に重要なポイントなんですけれども、動物ですと、 $\beta$ 受容体はスペアレセプターが非常にたくさんあって、down-regulation が起こっても、実際に  $\beta$  刺激したときに収縮が影響を受けることはないと言われていました。殊にラット心室筋などは10倍近くスペアレセプターがあると言われております。ところが、ヒトの心臓にはスペアレセプターがありません。ですから、down-regulation が起こると、それが直ちに機能の低下につながるかと考えられているようです。

ですから、ヒトの心臓で down-regulation が起こると、カテコールアミンの陽性変力効果は顕著に抑制されます。

**岡田** 今のセクレトリレーションか、本当に中に入ってしまったらリゾームが壊れてしまう。そのポイントというのは何かわかる方法はないのでしょうか。

**遠藤** 私が自分で実験したことはないのですが、論文を読むと、膜を分画するときに、sequestration の状態にあるレセプターは light microsomal fraction の画分に移行することで細胞膜表面のレセプターと識別できるようです。

**岡田** 心臓で  $\alpha$  というのは、今、先生はかなり強調なさったと思うんですけど、 $\alpha$  の役と  $\beta$  の役は、どういうときに  $\alpha$  は大きな役をするのでしょうか。

**遠藤** 心筋  $\alpha$  受容体の生理的意義は非常に問題なんですけれども、最近臨床でも非常に興味を持たれてきたのは、 $\alpha$  受容体刺激が心筋細胞肥大に関係しているのではないかということが一つあり、これは胎児ラットの培養心筋細胞モデルですから、本当にヒトでそういうことがあるかどうかということはまた別の問題なんですけれども、少なくともある実験モデルでは  $\alpha$  受容体刺激が心筋細胞の肥

大促進に関係している。

それから一つおもしろいのは、虚血後再灌流時に $\alpha$ 受容体数がふえる。そういう報告もあります。しかし、それが障害促進に働いているか、それとも改善方向に働いているかはわかって居りません。この後の三浦先生のお話にも出てくるかもしれませんが、 $\alpha$ 受容体がもしアデノシンの遊離に関係していれば改善の方向ですが、悪いという報告もあります。かなり長い間、心筋 $\alpha$ 受容体は全く顧みられないで、心筋は $\beta$ のみであるということで、薬理学の教科書もずっとそれでできていたんですけども、最近のバージョンでは心筋 $\alpha$ 受容体のこともちゃんと書いてありますので、認知されてきたということじゃないかと思います。

もう一つおもしろいのは、平田先生の方とも関係があるんですけども、 $\alpha_1$ 受容体刺激はPI hydrolysisを促進する。そういう受容体が心臓では例えばエンドセリン受容体とか、アンジオテンシン受容体とか、一連のものが見つかってきているんです。そういう関係で、signal transductionという観点からの興味も非常に強いわけです。そのクラスの受容体刺激はみんな心筋細胞肥大を促進するということがわかってきました。

**岡田** もう一つ、サブタイプとしていろいろな分類をなさって、臨床的に $\beta_2$ セレクトティブなものとしてドベキサミンというのがちょっと注目されつつあるんですけども、 $\beta_2$ の意義はどう考えていらっしゃるでしょうか。

**遠藤** 動物実験では、例えばネコなんかで実験しますと、 $\beta_1$ と $\beta_2$ のセレクトイビティーがきれいに出て、心拍数を上げずに気管支平滑筋だけ弛緩する。これをヒトに当てはめることができれば、 $\beta_2$ 選択性アゴニストは気管支ぜん息のときには非常にいいわけです。一方 $\beta_1$ アンタゴニストは、気管の方の $\beta$ 受容体は遮断しないで心臓作用だけを遮断するという効果がみられます。

ところが、残念なことにヒトではセレクトイビティーがそれ程良くないということが判っております。殊に $\beta_2$ 受容体の分布はヒトの場合もsinus nodeに多いと言われております。ですから、例えば $\beta_2$ セレクトティブ・アゴニストをやっても心拍数が上昇してしまうことが観察されて居ります。相対的にはノンセレクトティブ・アゴニストに比較すれば、幾分は良いのではないかと思います。

ヒトでは期待したほどの効果は出なかったと言ってもいいのではないのでしょうか。

**岡田** sinus nodeに多いとなると、例えばクロノトロープとイノトロープというのを解離して作用することになるのでしょうか。

**遠藤** ええ。実際にそういうデータもあります。 $\beta_1$ セレクトティブなアゴニストではイノトロープ(強心作用)の方が強く出て、 $\beta_2$ セレクトティブなアゴニストではクロノトロープ(心拍上昇作用)が、強く出るという報告がイヌ心臓で、信州大学医学部薬理の千葉茂俊教授のグループからJPETに報告されて居ります。相対的ではありますが、濃度反応曲線を調べてみますと、両作用の曲線の位置が逆になっておりますから、イノトロープとクロノトロープの選択性はあると思います。

**安孫子** ちょっと質問なんですけれども、さっきの一番最後の絵で、 $\beta$ ARKによってレセプターがリン酸化される。しかし、アデニル酸シクラーゼ方面ですね。そこのところに $\alpha$ サブユニットがついていますね。GTPがGTPaseによってGDPになると書いてありますね。そこの辺の酵素の活性がリン酸化されたときに高まるのでしょうか。その辺のメカニズムはどうなっているんですか。

**遠藤**  $\alpha$ サブユニットは、内因性GTPase活性を持っていて、シグナルの停止には、重要な役割を演じております。cyclic AMPによってGTPase活性は抑制されるというデータは有ります。しかし、アデニル酸シクラーゼ活性化のために、 $\beta$ レセプターからは離れてしまっていますから、G<sub>s</sub> $\alpha$ はむしろ作用発現のために重要な役割を演じているものと思われまます。

**安孫子** 直接はレセプターのリン酸化とは関係がないということですね。それでいいんですね。

**遠藤** ええ。そうでいいと思います。

**安孫子** つまり、アゴニストがついてもそれ以上効果が続かないということだけの説明ですよ。自然の成り行きでこういうふうには。

**遠藤** 例えばレセプターとは関係なく、G<sub>s</sub> $\alpha$ のGTPaseをcholera toxinで阻害すると持続的なアデニル酸シクラーゼの活性化がずっと続きます。受容体は関係なく持続的活性化が起るわけですから。

**安孫子** それは特別にこのリン酸化とは直接には関係ないですね。

遠藤 ええ。

安孫子  $\alpha$  刺激でも多分 desensitization (DSZ) が起ると思うんですが、そのときのメカニズムと、 $\beta$  レセプター刺激による DSZ のメカニズムとはかなり違うと思われませんが、いかがでしょうか。

遠藤 確かにそのとおりだと思います。  $\beta$  受容体でも  $\beta_1$  と  $\beta_2$  で違います。うっ血性心不全のとき、例えば DCM のとき、 $\beta_1$  受容体の down-regulation は起るけれども、 $\beta_2$  の down-regulation は起らないということがわかっています。そういう状態のときには  $\alpha$  受容体の down-regulation も起らないんです。

逆に虚血状態に、 $\alpha$  受容体を介する伝達がよくなるという実験結果もあります。それは変わらないというのもありますし、心筋に関しては controversial な状態なんですけれども、少なくとも down-regulation は起らない。したがって  $\alpha$  受容体を介するシグナル伝達がそういう病的状態で悪くなることはないということです。ですから先生が言われましたように、 $\beta$  受容体と  $\alpha$  受容体の desensitization の差異は確実に存在します。

安孫子 例えば  $\alpha_1$  刺激をして、 $IP_3$  (Ins (1, 4, 5)  $P_3$ ) が出てくる。その  $IP_3$  の出方は、刺激されたすぐのときはうんと出るでしょうけれども、ずっと出ているのではなくてまたもとに戻るのではないかと思いますか……。

遠藤 そのとおりなんです。

安孫子 多分そうなんです。

遠藤 ただ、収縮力増強で見ていると  $\alpha$  受容体刺激が続く限りずっと続いております。一方  $IP_3$  の増加は一過性です。ですから、先程ちょっと触れましたが、私は自身は  $IP_3$  よりむしろ DAG による PKC activation の方が機能調節に重要なのではないかと考えております。これもまだ実験的証拠が不十分ですので、 $\alpha$  細胞レベルの機構を解明する方向で実験を進めているところなんです。

岡田 ありがとうございます。

シンポジストの先生方、お互い同士の先生方で討論をやっていただければ意味があるものですから、どうぞよろしく願っています。

安孫子 それでは、時間も少したっておりますので、中山先生にその次をお願いします。

中山 きょうのシンポジウムは「レセプターをめぐって」という題なんです

けれども、私がきょうお話する論文は、その「レセプター」という名前が全くついていないんです。あえて Na channel に「レセプター」という名前をつければ、例えばテトロドトキシンのレセプターであるとか、アコニチンのレセプターであるとか、そういう名前になるかと思えます。

ここで若干整理させていただきますと、きょうのレセプターの先生方のお話のトピックスの中で、私の分類で言いますと、純粋に「レセプター」という名前をつけるのは、例えば遠藤先生がお話になったアドレノセプターであるとか、三浦先生のお話になるアデノシン・レセプターといったものが、いわゆる「レセプター」というものでありまして、それはどういうことかという、生体内になる物質がまさにリガントとなって結合するのがレセプター。そういうカテゴリーでいいますと、私の Na channel というのは分類すると最も反対側にある、いわゆるイオン channel といったものになります。

ですから、小川先生が話されたリアノジン受容体というのも言いかえてみますと、Ca 誘発性の  $Ca^{2+}$  channel となりますし、平田先生の  $IP_3$  (Ins (1, 4, 5)  $P_3$ ) 受容体、これは確かにナチュラルな  $IP_3$  を結合する受容体であるとともに、 $IP_3$  で誘発される  $Ca^{2+}$  channel、こういうことになるかと思えます。

前置きが長くなりましたけれども、Na channel と申しますか、イオン channel の最も大きな特徴といえますのは、細胞膜の膜電位を感じて channel 分子が開いたり閉じたりするということかと思えます。ですから、その意味でこの膜電位を感じたときにどのような channel が conformation



安孫子 先生

をとるか. 言ってみれば, channel 状態をとるかということ, その channel 状態といろいろなトキシンの結合. それはトキシンによって違うわけですので, ここのところが一つ大事な点かと思えます.

channel の状態は図の 2 に漫画でかいてありますけれども, 左の方から, 一番下の方に (open) ①, (open) ②とか書いてありますけれども, 一番左は channel は閉じている状態ですので, これは静止状態にある. R (レスティング) の状態です. その次の (open) ②と書いてあるところ, ことその次の (semi-closed) ③と書いてあるところは, open 状態の①と open 状態の②, この二つを合わせて活性化された状態にあるという意味で activated の A という状態です.

その右にいきまして (closed) ④というところは, ここのところでは既に channel は閉じておりますので, 不活性化された状態という意味で, inactivated (I) となっていますし, 一番右にいきますと, またこれは m ゲートも h ゲートももとの状態に戻っていますから, 静止の状態の R という状態です.

こういった幾つかの channel 状態があって, それぞれ表の 1 に挙げましたような幾つかのグループのトキシンがあるわけですが, それがどのような channel 状態に結合するのかといったところをまとめてみたわけです.

トキシンの結合という観点から言いますと, channel たんぱくも生体膜の脂質二重層の中に埋まっているたんぱくでありますから, トキシンが外側から結合するのか, 内側から結合するのかといったような点が, トキシン, あるいは薬物の結合部位と channel のファンクションの点に興味を持つ者としては一つの大事な点になるわけです.

これについては幾つかのものについてはわかっておりますけれども, 幾つかのトキシンにおいてはまだ不明です. 例えばわかっている例としましては, 第 1 群のトキシンに分類されるテトロドトキシン (TTX) とか, サキシトキシン (STX), あるいはペプチド性の  $\mu$  コリトキシン ( $\mu$ -CTX) といったものについては, 種々の薬理的, あるいは生理学的な実験結果, 最近の生化学的手法によりまして, 昔から言われているように channel の外側から働いて, channel のイオン透過口

の部分ブロックするということがわかっております.

第 3 群のペプチド性のトキシンで, 北アメリカ産の  $\alpha$ -サソリ毒 ( $\alpha$ Sctx) というのがあるんですけれども, これも外側から作用するといったことがわかっております.

しかし, 同じ外側から作用しても, 先ほどのテトロドトキシンとかサキシトキシンの場合には, 生理学的な効果はイオンを通さなくなるといったはっきりした効果なんですけれども, この  $\alpha$ -サソリ毒の場合には, トキシンの結合による効果は, 不活性化過程を遅らせて, channel を開いた状態に長く保つといった点に違いがあります. こういった意味でただ単に内・外でもってトキシンの性質が全部わかるということではなくて, もっと細かな理解をしていかなければならないことになるかと思えます.

トキシンの結合と生理的な役割の観点で, 最近のモレキュラー・バイオロジーのテクニックを使った実験結果から得られた知見で一つのトピックスになっておりますのは, テトロドトキシンの結合部位についてです. 先ほど申しましたように, テトロドトキシンは channel の外側から作用してある構造部にフィットするわけですが, その部分はただ単にトキシンの結合部位を構成しているのみならず, Na channel の Na イオン透過性を決める, いわゆる「透過性フィルター」といわれる機能部なんですけれども, その部分とも密接に関連しているといったことが最近明らかになってきました. これは最近の大きな成果だと思います.

Na channel を循環器系の, 特に心筋との関連で見えますと, 表 1 に, 未同定と書いてありますけれども, リドカインとかメキシレチン, キニジンといった, いわゆる人工的な薬物の作用であります.

これは神経とか骨格筋等の Na channel に対しては局所麻酔薬という形で作用しますが, 心筋の場合にはむしろより積極的に抗不整脈薬という形で用いられているという点の一つ特徴です.

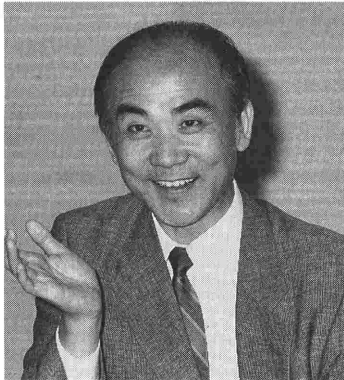
この抗不整脈薬も薬物によって, あるいはその作用によって大きく三つに分類されてますが, 特にこの論文で私が申すのは, Na channel に作用する抗不整脈薬であります. それは活動電位持続



時間を延長させるもの (Ia)、短縮させるもの (Ib)、変化させないもの (Ic) と分けるクラシックな Vaughan Williams の分類法です。

この抗不整脈薬を作用させたときには、心筋の場合には特に use-dependent block, あるいは frequency-dependent block といった効果が見られるという点も一つの特徴です。そしてここから得られている結果は、少なくともこのような抗不整脈薬の作用部位は恐らくは外側からではなくて、channel の内側、言ってみれば、細胞質側の方から作用しているのではないかと推定されているわけですが、これについてはまだ科学的なはっきりした証拠がありませんので、私どもとしてはこここのところに少し興味を持っております。

この抗不整脈薬のもう一つの最近の話題としましては、テキスト



中山先生

のように、CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial) の調査というのがありまして、その結果では、むしろクラス I の抗不整脈薬を心筋梗塞の患者さんに与えた場合に、今までの例ですと、「抗不整脈薬」という言葉から想定されるように薬として用いられるということが前提にあったわけですが、実際にこの CAST の調査では、薬物によってはかえってその症状を悪化させるといったこともわかってきました。したがって、このクラス I 抗不整脈薬については見直しが必要とされているといったことになるかと思えます。この点でも、従来から高く評価されていたクラス I の抗不整脈薬よりもクラス III の抗不整脈薬といった点が注目されてきているということが言えるかと思えます。大体そんなようなところであります。

**安孫子** どうもありがとうございました。

それでは討論に移りたいと思います。いかがでしょうか、何かご質問はないでしょうか。

**岡田** 私が一番最初に小川先生に質問したんですけど、今、中山先生がおっしゃって

くださったんですけども、要するにレセプターというのが体の中にあるから、それはひとつもおかしくなかったんですけども、リアノジンというところでもないのがきているんですね。それがなぜそういうところで突然出てきたかということは疑問に思っていたんですが、先生の言われたことで非常に明快に理解できたと思えました。ありがとうございました。

**安孫子** Na レセプターの中でも、いわばテトロドトキシンのような動物の毒がつくところ、ベラトリジン (VTD) のような植物の毒がつくところは違うんですね。生体がなぜそういうものの構造を知っているのか。これは生物の起源と関係があるのでしょうか。オピオイド・レセプターは我々にある。我々の体は生れた時からオピウムを知っていたということになり、非常に面白いと思うんです。

**中山** 今、安孫子先生が生物がなぜ知っているかという形で提起されましたけれども、私は例えばこんなふうには理解したらどうかかなと思っているんです。たまたま今オピオイド・レセプターの例が出ましたけれども、オピオイド・ペプチドというのは生体内にある内在性物質なわけですから、それに対してあるレセプターがある。これは十分理解できるわけです。モルフィンとか、コデインとか言われているような麻酔、ああいったものはオピオイド・ペプチドがレセプターで認識される立体的な構造がたまたま似ているから、そういうところで認識される。こういうことではないかなと思います。

ですから、これは本当に哲学的になってわかりませんが、ケシが本当に動物のオピオイド・レセプターをブロックしようと思って作り出しているのかどうか。これはちょっと違うのではないかという気がいたします。

**安孫子** テトロドトキシンのレセプターはフグにはあるんでしょう。

**中山** はい。これは大変おもしろいところなんですけれども、確かに Na channel はフグにももちろんあるんです。では、なぜフグは麻痺をしまわれないかということがあるんですけども、これは現在まだちゃんとわかっていませんけれども、恐らく Na channel の構造が違うのだろう。テキストにも少し書きましたけれども、骨格筋、

あるいは神経の Na channel と心筋の Na channel ではテトロドトキシンやサキシトキシンに対する感受性が全く違うんです。ご存じのように、心筋の方ではテトロドトキシンがほとんどブロックされない。こういったことがあるわけです。その分子メカニズムがモレキュラー・バイオロジーの結果からわかってまいりまして、トキシシンが結合する場所のごく近傍のアミノ酸に変異が起きているといったことでもって十分説明できるだろう。こうなっております。

ですから、今のフグはなぜ麻痺しないかというところに話を戻しますと、フグの Na channel も全体ではなくて、恐らくある限られた場所の、それも大事なトキシシンが結合されると考えられる場所のアミノ酸が変わってきた。こういうふうになるところは推定されているようです。

**小川** それに関してなんですけれども、フグのテトロドトキシンはもともとからフグにあったわけではないんですね。微生物の共生なんですね。そうしますと、進化論的に言いますと、そういう変異したものが共生したときに生き延びてああいうフグみたいなものが出てきたんでしょうかね。

だから、逆に言うと、進化のセレクションに関係しているのかどうかという問題ですね。その辺はどうなんでしょうね。

**中山** 私がシンプルに考えますと、先生が今おっしゃったように、このごろはフグも養殖できるんですけれども、養殖したフグにはああいうテトロドトキシンがないようですね。ですから、おっしゃったように、プランクトン由来のプランクトンがつくり出すトキシシンなわけです。

天然のフグはテトロドトキシンをある限られた臓器、それはオーバリーですけれども、そういったところに持っているんですね。ですから、小川先生が言われたように、もう進化の段階でテトロドトキシン非感受性の channel だから、ああいう形の体内にテトロドトキシンを持っている。私はどっちかというところをそう考えたいと思うんです。

**遠藤** フグ以外にもテトロドトキシンを持っている魚がいるという話を聞いておりますが。

**中山** 正確には知らないんですが、何とかいうオコゼのたぐいとか、あとはテトロドトキシンじゃないんですけれども、サキシトシンに近いような毒を持っている。これは南米産のカエルとか、

カエルの皮膚とかからも……。

**安孫子** カリフォルニアアイモリの卵にありますね。

**中山** はい。ああいったものがあるんですね。

**遠藤** どうして蓄積するのでしょうか。どういう経路でそこにいくかというのはわかっているんですか。

**中山** それは興味のあるところですから、多分研究がされていると思うんですけれども、私は不勉強でそこのところはよく知らないんです。

**平田** 神経と筋の Na channel で、近ごろは高校でも習うみたいですけれども、私達の時代には専門課程に上がって一番最初に生理で習って、すごく新鮮な言葉で、生理学をやっとパスした私でも覚えているんですけれども、「オール・オア・ナッシング」というのがありますね。このものの Na channel の分子機構はわかっているんですか。

**中山** 今おっしゃったのはトキシシンが効くか効かないか。

**平田** いやいや、トキシシンの話じゃなくて Na channel の話です。

**中山** これはわかっていることなんじゃないでしょうか。刺激を与えたときにある膜電位のところまでいかなければチャンネルが開かないとか。

**平田** Na channel 分子学的に。

**中山** これは大変難しい。

**三浦** テキストの中でメキシレチンを投与すると Na channel の数が増加するとありますが、このメカニズムはどの様なものでしょうか。といいますのは、もしこれが人間でもそうだとすると、投与しているとだんだん効かなくなってしまうということになるかなと思うんですけれども、その投与量がどれくらいか。例えば臨床的に用いる量に比してとてつもなく多い量というのでもないのでしょうか。

**中山** これは実は私は遠藤先生がお書きになったニュースからとらせていただきました。これは去年のアメリカの心臓学会で報告があったことのようなんです。私は詳細なメカニズムがどうなっているかということについて、多分まだそのところはわかっていないのではないかなと思いますけれども、遠藤先生から補足していただけるとありがたいんですが……。

**遠藤** 基本的に、先ほど何が本来のレセプター

であるかの、channelはレセプターではないか、という話がありました。もうちょっとレセプターの概念を一般化して考えると、例えばレセプターを阻害するようなものはレセプター up-regulationを起こすわけですね。そういう意味でNa<sup>+</sup> channelを抑制するような薬物は、Na<sup>+</sup> channelの up-regulationを起こす。そのような基本的な考え方は、今まではありませんでしたので、Na<sup>+</sup> channelでそういう可能性が示唆されたという点で、私は非常におもしろいと思ったんです。

ですから、channelでも、レセプターでも、持続的に刺激するとか、阻害するとかいうことが、分子レベルでより一般的なレギュレーションを起こすという可能性があります。薬物の長期投与に際しては、そういうことがあり得るという可能性を常に念頭におかないといけないと思うんですね。

中山先生のお示しになった図2は activation gateと inhibition gateがあつてと非常にわかりやすく描かれております。こういうモデルが実際に図1の分子レベルとどのように対応しているのかということはある程度わかってきているんでしょうか。

**中山** 最終的に確定したわけではありませんけれども、mゲートとかhゲートというのは、これこそさっきの平田先生のお話ではありませんが、生理のときに一番最初に習うようなことですね。これは Hodgkin-Huxley が提唱した物理学的なモデルを図式化すると、こういう活性化するmゲートというのと、不活性化のhゲートというものに分かれるわけですが、実際にストラクチャーの面から見ましても、活性化ゲートは、図の1で見ていただきますと、S4(セグメント4)+++++つてありますね。これはセンサーであると同時に、正電荷の部分は当然はだかでは存在できないわけですから、対イオンとしてマイナスのイオンがその周辺にあるわけで、これは恐らくカルボキシル基を持つようなアスパラギン酸とか、グルタミン酸といった残基がこの周辺にある立体構造でもって取り囲んでいると考えたわけです。

この部位が膜電位を感じると一木ネジをほどく方向にねじってやると上に上がっていきますね。円運動を直線上の方向に動かすという形になるわけですが、ちょうどこのセンサー部分はヘリックス構造をとっておりますので、膜電位

を感じると、それがねじれるような形で上へ上がっていく。そうすると、ここには図がかいてありませんけれども、ちょうど中にあるようなプラスの電荷1個が、結果的には1個外側に出ていったような形になる。それでもって今まで言われていますゲート電流というのがあるんですけど、これはchannelが開くときに内側から外側に向かって電荷の移動がある。これは電気生理学的な結果です。それがまず一つ説明できる。

それからchannelが活性化されて、mゲートというのは、図2では真ん中にあるところからスルスルッと引っ込んでいっているように見えますけれども、これは言ってみれば、今のこのようなネジ運動を起こすと立体構造の変化につながりますから、そこでイオンに穴があくような形になる。ですから、今のようなS4を中心にしたようなところをmゲートと考えたらよかろうという考えになっております。

それでは不活性化ゲートのhゲートはどこかといいますと、このモデルで書いてありますように、mゲートとhゲートというのは独立した形で書いてあります。これまでわかっている生化学的、あるいは分子生物学研究の結果から言いますと、これはchannelのちょうど内側の方にhゲートは相当します。上の方が外側で下が中側なんです。それに相当するように、ちょうど図の1で申しますと、このリピートのⅢとⅣの間をつなぐ短い、ほかのⅠとかⅡではネジがグルグルとした形で書いてありますが、ⅢとⅣだけは短くスルスルッと書いてありますね。このところが恐らくは不活性化ゲート(hゲート)のかなり本質的なところだろうと考えられているわけです。

といいますのは、これも分子生物学研究の成果ですけれども、このところにニックを入れるとか、ミューテーションをかけるといった処理を行うと、電気生理学的に不活性化過程に大きな変化が起こる。それ活性化過程には影響を与えずに不活性化の過程にだけ影響を与えるということから、このリピートのⅢとⅣをつなぐ細胞の内側の部分がhゲートに相当する重要な部分だろうと現在ではわかっております。

**遠藤** そのところが海洋毒(marine toxin)とかの結合する部位にも相当するんですか。一連の不活性化を抑制するようなtoxinがありますね。

**中山** はい。恐らくそう考えられると思います。ただ、今のところはまだそれに対する証拠はありません。

**遠藤** それがきちんとつながるとすばらしいと思うんですけども。

**中山** そうですね。

**安孫子** リゾホスファチジルコリンが Na チャネルの不活性化を抑制するという電気生理学的な実験があるんですね。そうすると、先生、こういうこととつながってくるかもわかりませんね。どうですか。

**中山** そうですね。私も今安孫子先生からご質問のあったリゾホスファチジルコリンとか、カルニチンですとか、そういったような両親媒性のリピッド由来のものです。こういったものが虚血性不整脈を発生する一つの要因ではなからうかということが近年言われてきているわけですが、そのメカニズムとしてはまだはっきりはしていないと思いますが、そのうちの一つは、今、安孫子先生がおっしゃられたように、不活性化過程を抑制するという過程があると思いますし、もう一つ言われているのは、このようなりピッドの中間代謝体が心筋に、特にさっきのように虚血性不整脈の時に顕著に出てくるわけです。その場合には、この脂質の中間代謝体が心筋 Na channel の活性化膜電位を著しく深い方、言ってみれば、よりネガティブ電位の方でも開きやすくするといったような効果があることを、アメリカのグループが報告しています。

**安孫子** センションのあれがちょっと変わってくるわけですね。

**中山** そうです。普通ですと、静止電位のマイナス数十 mV のところから少し上がった脱分極のところ channel がポッと開くようになるわけです。ところが、今のようなりピッドの代謝体の効果はもっと深い膜電位のところでもって活性化してしまうといったことではないかということがあられるようなんです。

**安孫子** それでは時間がたってまいりましたので、次に三浦先生にお願いしたいと思います。

**三浦** それではアデノシン受容体と冠循環についてお話をさせていただきます。

まずアデノシン・レセプターのガイダンスでありますアデノシンの産生ですけれども、アデノシ

ンの産生経路は図 1 に Schutz の図をとってお示しましたが、アデノシンの直接の前駆物質は nucleotidase である AMP と S-adenosylhomocysteine (SAH) であります。



三浦先生

種々の条件下でこの両者がアデノシン産生に関与するかということについては、なかなか定量が難しくて明らかになっていないのが現状ですが、ベースラインといいますか、特別虚血がない状態でのアデノシン release には、Schutz たちは二つのうち主に S-adenosylhomocysteine 由来のものを挙げております。

その根拠としましては、彼らが計算した methylation pathway を通るアデノシンの産生量から間質アデノシンレベルとして推定されているアデノシンが大体説明がつくであろうという点です。

一方、Olsson らは、5<sup>1</sup>-nucleotidase を介した AMP 由来のものを心筋におけるアデノシンの主たる産生源であると考えています。その根拠には、アデノシンの生理学的な意義を説明するのに都合が良いことで、後ほど述べますけれども、coronary blood flow regulation は心臓の心筋の metabolism とよく関連しています。心筋の ATP ポテンシャルを考えたときに、心筋の ATP ポテンシャルがわずかでも減少しますと、myokinase pathway を通って free の AMP が増加し、それが 5<sup>1</sup>-nucleotidase によって分解されてアデノシンが出て、冠血管を拡張させると考えますと、冠血流と心筋代謝の関連をよく説明できます。

それからテキストにも述べましたけれども、心筋での free の AMP はトータルの AMP のわずか 1% にも満たないナノモルオーダーであるのに対して、少なくとも生理的な条件下での cytosolic 5<sup>1</sup>-nucleotidase の Km はけた違いに大きいということがありまして、Olsson たちは myokinase pathway がメインだろうというぐあいに考えてお

ります。

ただ、最近、大阪大学の堀先生のグループは長時間虚血、すなわち数十分の単位以上の虚血時間の際には、ecto 5'-nucleotidase の活性が上昇しまして、それがアデノシンの産生に大きく関与するというレポートも出されております。

アデノシン・レセプターの機能を考えます上でやはり大事なものは、心筋間質アデノシン濃度ということになるわけですが、直接的に間質アデノシンの濃度を測定することは方法論的に非常に困難でありまして、現在まで例えば心のうにカニューラーを入れまして一定量の生理食塩水を入れて留置した後で、それを吸い上げてアデノシンを測定するすとか、ろ紙を心外膜に張りつけ、吸着されたアデノシン含量を測定することが行われています。また最近では microdialysis を使って心筋間質のアデノシン含量を測定しようという試みが行われていますけれども、いかんせんリカバリーや、時間分解能の点で欠点があって、正確な測定とアデノシンの生理的な意義を解明する上に大きな障害になっております。

心筋間質アデノシンのレベルを規定するものとしましては、先ほど述べました、細胞内におけるアデノシンの産生と、細胞膜内外へのシンプル・ディフュージョン、もう一つは nucleoside transporter による輸送があります。

代謝の点で一つ興味深いのは、adenosine kinase は adenosine deaminase に比して Km は小さいですけれども、Vmax はむしろ adenosine deaminase の方が大きいということでありまして、このため、細胞内アデノシンレベルが上昇するとリン酸化よりも脱アミノ化が優位となるということになっております。

今お話しした adenosine kinase, adenosine deaminase を介したアデノシンの代謝、それともう一つアデノシン間質レベルを規定するものとしての機構として nucleoside transporter による細胞内外への輸送がありますけれども、これは両方向性に non-concentrative な輸送を行う仕組みでありまして、これを抑制する薬剤つまり、nucleoside transporter inhibitor として dipyridamole とか、diazepam ですとかいったような薬剤があります。最近ジャセンから R75231 といったようなより specific な薬剤も出てきております。

ただ、いずれの薬剤も両方向性にブロックしてしまうものですから、果たしてこの薬剤を投与した際に心筋間質のアデノシンがどちらの方向に動くかということに関しては、metabolism に加えて washout の問題も加わってきますし、必ずしもこの薬剤が心筋間質のアデノシン含量を、こちらの意図した方向に作用するといったような道具としては使えないという欠点の一つがあります。

次に、アデノシン・レセプターの分類ということをお話しますけれども、アデノシン・レセプターは、そのアクチベーションが, adenylylate cyclase を stimulate するものを A<sub>2</sub> レセプター、その刺激によって adenylylate cyclase が抑制されるものを A<sub>1</sub> レセプターというぐあいに分類されております。最近では7種類のアデノシン・レセプターがクローニングされるに至っております。

A<sub>1</sub> レセプターに関しては、ウシとイヌとラットの3種類について、それからラット、イヌの A<sub>2a</sub> レセプター、ラットでは A<sub>2b</sub> レセプター、それから去年ペーパーが出ましたけれども、A<sub>3</sub> レセプターというレセプターがクローニングされて一次構造が明らかにされております。

クローニングされたレセプターは、残念ながら心臓系から得られたものではありませんけれども、例えば *Xenopus* の oocyte に express された場合の薬理学的な特徴は、先ほど述べました adenylylate cyclase 活性への影響などは心臓系のアデノシン・レセプターと同様なことが示めされております。

signal transduction の面から言いますと、A<sub>1</sub> レセプターが G<sub>i</sub> プロテイン、A<sub>2</sub> レセプターが G<sub>s</sub> プロテインとカップリングすることがわかっております。表に A<sub>1</sub> レセプターの一部の effector について要約いたしましたけれども、G<sub>i</sub> プロテインとカップリングしていると報告されています A<sub>1</sub> レセプターにしましても、非常にさまざまな effector とカップリングしております。これが同一、あるいは少なくとも同様なレセプターが組織によって異なった G プロテイン、あるいは effector を作動しているという可能性と、A<sub>1</sub> レセプターにまだはっきり分けられていないけれども、A<sub>1</sub> レセプター自体にサブタイプが存在するという可能性、二つの可能性が残っております。

元来アデノシン・レセプター、あるいはアデノシンの臓器循環におけるアデノシンの役割が、もともとアデノシンの生理学的な意義として注目されてまいりまして、特に局所血流に関しては冠動脈循環における役割が注目されてきたわけです。

ロバート・バーンが仕事を始めてもう20年以上にもなるかと思えますけれども、アデノシンの血管拡張作用が冠循環調節にどういう条件で、どういうぐあいに役割を担っているかというのは、まだ必ずしもわかっておりません。ただ、少なくとも現時点ではある一定の方法で心筋酸素消費量を増加させた場合、例えばノルエピネフリン等ですとか、心臓のペースングなどによるような心筋酸素需要の増加の場合にアデノシンが関与する。ただ、そのアデノシンの release が起きて血管拡張が起こるとい現象の中でも、その初期相といいますが、アデノシン心筋酸素需要を増加させた際に心筋酸素増加の程度と、冠血流量との相関が少なくとも冠拡張の初期にははっきりとしたものが認められる。ただし、ノルエピネフリンにいたしましても、持続的にそれを投与した際には冠拡張は認められるけれども、アデノシンの release はむしろ低下してしまうということから、アデノシン冠拡張の初期相には、initiation には働いているけれども、冠拡張を sustaine される機序には関与していないのではないかと。むしろそういった後の方の現象には EDRF ですとか、カリウム、pH ですとか、そういったような metabolic なファクターが関与するのかもしれないというぐあいに考えられております。

最後に、簡単に虚血/再灌流障害におけるアデノシン、あるいはアデノシン・レセプターの話させていただきます。

生理的な条件に見られるさまざまなアデノシンの役割と同様に虚血心筋障害におけるアデノシンの役割も大変に多様でありまして、例えば虚血が起きた場合に局所で産生されるアデノシンが血小板に作用して、血小板の凝固を抑制して微小循環を保つ効果ですとか、多核白血球のフリーラディカルの産生を A2 レセプターを介して抑制するといったような作用、つまり、心筋細胞以外の微小循環を介した作用から心筋細胞に対して保護的に働くことが一つ挙げられます。

ただ、最近最も注目しております現象として

ischemic preconditioning という現象があります。これは例えばウサギの冠動脈を30分間閉塞しますと、虚血域が50%ほど心筋梗塞に陥ってしまうわけですが、それに先立ちまして5分間虚血を一たん施しておきますと、心筋細胞は虚血に対してはるかにレジスタントになりまして、30分の虚血でも梗塞量が20%以下に抑制されるという現象が見られます。

短時間虚血による心筋虚血耐性の増強という現象が、アデノシン・レセプターのアンタゴニストであります 8-phenyltheophylline, あるいは 8-sulfo-phenyltheophylline でほとんどブロックされてしまうという現象が見られまして、短時間虚血の際に心筋内に産生されるアデノシンが何らかのメカニズムで心筋虚血耐性を生むということが考えられております。

当初これは A1 レセプターアゴニストで mimic されることから、A1 レセプターを介した現象ではなかろうかと判断されましたけれども、実際にその後のテキストには書きませんでしたけれども、追試してみますと、例えば A1 セレクティブなアンタゴニストである DPCPX ではブロックされないということも見出されております。従いまして果たして preconditioning にかかわるアデノシン・レセプターのサブタイプが一体何であるかということについてはまだ確定はしておりません。

それではアデノシン・レセプターを介してどのような心筋代謝の変化が虚血耐性を増強するかということについてもまだ明らかになっておりませんけれども、一つの可能性は A1 レセプターを介して ATP sensitive K channel が開くことが重要であるという仮説と、もう一つは phospholipase C が活性化されて、C キナーゼを介して心筋細胞内の中の何らかのたんぱくがリン酸化されることが虚血耐性につながるという二つの考え方が最近出ております。

いずれの仕事もそれぞれのブロッカー、例えば ATP sensitive K channel であればグリベンクラマイドですとか、トリプタマイドで preconditioning がブロックされるということ。

C キナーゼに関しては、スタロスポリン、ポリミキシン B で前処置をすると preconditioning が見られなくなるというような、いずれも間接的な証拠に基づいた考え方でありまして、いずれの可

能性についてもさらに詳細に調べてみななければはっきりしたことが言えないというのが現状です。簡単ですが。

**安孫子** どうもありがとうございます。

それではご討論をお願いしたいんですけども、いかがでしょうか。

特に最近 preconditioning にアデノシンが関係しているということで、もう一度アデノシンのストーリーが浮上してきました。

**遠藤** preconditioning の効果に種差があるという話を伺ったんですけども、どの程度種差があるんでしょうか。

**三浦** preconditioning にアデノシンが関与するという仮説が最初に出たのは、ウサギを用いた実験です。ウサギで心筋梗塞をつくったモデルでは虚血心筋細胞壊死に対する preconditioning 効果がアデノシン・レセプター・アンタゴニストでブロックされたわけですけども、ラットでやってみますとブロックされない。あるいはイヌを用いた心筋梗塞モデル、再灌流不整脈、虚血由来の不整脈に対する preconditioning 効果はアデノシン・レセプター・アンタゴニストで切れるにもかかわらず、ラットを用いると不整脈に対する preconditioning 効果がブロックされないということで、ラットはどうも preconditioning におけるアデノシンの役割が小さいのではないかというデータが出ております。それが種差の一つであります。

もう一つは、グリベンクラマイドを投与すると preconditioning がブロックされるので、アデノシン・レセプターを介した ATP sensitive K channel が重要であるというのは、もともとイヌを用いた実験で提唱されたんですけども、このストーリーはウサギには当てはまらないデータが出まして、ラットでやっても当てはまらないというデータが出ていますので、そこのところは何とも混んとして説明がついておりません。

**遠藤** preconditioning というのはどんな動物でも起るのでしょうか。

**三浦** はい。今まで試された動物で preconditioning にかからなかったというレポートはないと思います。

ただ、心筋梗塞を小さくするという、それから虚血性の不整脈を抑制する、再灌流不整脈を抑制する、あるいは心筋スタニング、即ち一過性

虚血による壊死を伴わない収縮力の低下、この四つのターゲットに対して preconditioning は抑制効果があるわけですけども、その機序は必ずしも同じではなさそうです。例えば不整脈の一つとってみますと、サイクロキネース阻害薬でプロスタグランジンを抑えてやると、不整脈に対する preconditioning 効果は消えてしまうけれども、心筋梗塞サイドに対する効果はそのような効果が見られないということがありますので、必ずしも preconditioning イコールアデノシン・レセプターとはいかない面も随分あるようです。

**遠藤** アデノシン・レセプターが A 1 ではないということを先生は言われましたけれども、そうすると、新しいタイプのアデノシン・レセプターか、あるいは A 2 ということになりますよね。

**三浦** 少なくともウサギを考えてウサギのモデルでやっている範囲では、A 2 アゴニストを使っても preconditioning は mimic されないということがありますので、A 2 ではないだろうと思います。いわゆる A 1 アゴニスト、CCPA ですか、PIA でミミックされるけれども、より A 1 に選択性の高い PPCPX がブロックされないということがありますので、恐らく A 1、A 2 でもなくて、もう一つ別なサブタイプがあるのではないかと思います。

それが A 3 レセプターの可能性もあります。Steiles のところでクローニングから同定された A 3 レセプターと Riberiro が言っている A 3 レセプターとは果たして同じものかどうかというのはまだはっきりしていませんので、何とも言えませんけれども、ただ、Steiles のところでクローニングされた A 3 レセプターが心筋にもあるということは見つかっていますので、それが関与する可能性はあると思います。殊に A 3 は DPCPX でブロックされないことがわかっていますので。

**遠藤** 8-phenyltheophylline は。

**三浦** A 3 レセプターをブロックします。

**遠藤** そうですか。

**安孫子** preconditioning にアデノシンがかかわっているというのは、adenosine receptor の inhibitor を使った実験からですね。そうであればアデノシンの分解を抑制する inhibitor を入れておいてアデノシンをやれば、アデノシンの作用がもっと強くなるのではないかと考えられます。

このような処置で虚血障害は少なくなってもいいのではないかと思うんですけども、その辺の情報はどうなんでしょうか。

**三浦** 一番臨床的なデータとしてあるのは、開心術のときのカルデオプレジアの solution の中にアデノシンを入れた場合の効果です。アデノシンはご承知のようにすぐ分解されてしまいますから、カルデオプレジアのようなものが非常に理想的で、心臓を停止させて再開させるところには心筋保護液を washout してしまえば短時間でアデノシンの negative inotropic action が消えてしまいます。つまり、虚血のときのプロテクションだけできるメリットがあります。ウィスコンシン大学の UW solution という心筋保護液中にアデノシンが入っています。UW solution はアデノシンだけではなくて、Ca アンタゴニストも入っていたと思いますけれども、鹿児島大学の先生だと思いましたが、アデノシンを入れたのと入れない UW solution を比較しますと、入っていた方が心機能のリカバリーが有意によかったというレポートがあります。

**安孫子** 動物実験ではいかがですか。アデノシンだけ入れるという実験ができると思いますけれども。

**三浦** それは Downey たちが一番最初にやった実験の中の一つのシリーズの中に intra coronary、ただそれは摘出心臓なものですから、虚血壊死の評価が果たしてどこまで正確かという問題がありまして何とも言えませんけれども、5分間アデノシンをインフュージョンしてリカバリー時間を設けてやると、つまり、アデノシンで虚血による preconditioning を mimic させてやると、同じような心筋保護が得られると報告しています。

**安孫子** ただ、心筋の収縮力を落としてしまうぐらいの濃度ですと、エナジースペアリング効果が出てきますね。その辺はどうなっているんでしょうか。そのぐらいたくさん入れないとアデノシンの効果はみられないのですか。

**三浦** そこまでは細かい検討はしていないと思います。ただ、エナジースペアリング効果は Ca アンタゴニストですとか、 $\beta$  ブロッカーが割とよく認められるわけですけども、虚血細胞壊死という点で見ますと、これらはいずれもエナジースペリアニング効果がある薬剤にもかかわらず、虚

血細胞壊死を抑制しませんし、短時間虚血による preconditioning はむしろ ATP を減らしてしまうにもかかわらず障害を抑制しますので、同じエナジースペリアニング・エフェクトが preconditioning のメインのメカニズムになっているとは思っていないんですが。

**安孫子** ischemia ではなくても hypoxia でも preconditioning はかかりますね。

**三浦** はい。

**安孫子** そのほか何かございませんか。

**岡田** 一番基本的な話をお聞きしたいんですけども、アデノシン・レセプターは P 1, P 2 というふうに分かれる。今の先生のおっしゃったのは、P 1 の中でサブタイプとして A 1, A 2 というふうに話をされてきましたね。P 2 というのはこの場合に全く関係ないんですか。

**三浦** preconditioning という意味ですか。

**岡田** ええ。

**三浦** P 2 レセプターのアンタゴニストを使った実験がありませんので、関与していないとは言えないと思いますけれども、ただ、まだプレリミナリーなレポートとして 6-hydroxy dopamine でケミカルにデナーベーションした心臓で、交感神経末端から ATP が release されないような条件にしても preconditioning がかかるというレポートがありますので、preconditioning に関しては P 2 レセプターは大きな作用を持っていないだろうと思います。プレリミナリーなデータなので何とも言えないんです。

**岡田** 私のお聞きしたのは、P 1 というのはアデノシンがメインであって、P 2 は ATP がメインであるということであると、今の話の中では ATP は全然考えなくてもいいかなと。

**三浦** preconditioning についてですか。

**岡田** ええ。そういうデータを言われましたね。

**三浦** 直接的に ATP が P 2 レセプターを刺激しているという経路は考えなくてもいいのではないかというぐあいに思います。ただ、hypoxia にすると、細胞内の ATP も細胞外に出てくるといふレポートもありますので、細胞間質に出てきた ATP が ATPase によって壊されて、 $5' \text{-nucleotidase}$  を通ってアデノシンになって、それがアデノシン・レセプターの P 1 レセプターを介して心筋保護効果に働く。そういう経路は重



要かもしれませんけれども、ATPがダイレクトに心筋保護効果に作用するというのは、ちょっと考えにくいのではないかと思います。

**遠藤** 心筋細胞レベルで考えると、アデノシン受容体を介した情報伝達系は、ムスカリン受容体を介した情報伝達系と非常によく似ているんです。もし同じような情報伝達系で preconditioning を起こしているとするれば、ムスカリン受容体を刺激してやっても preconditioning が起こるのではないかと思うんですけれども、そういう研究はあるんでしょうか。

**三浦** おっしゃるとおりで、Downeyは摘出心標本でカルボコールで刺激すると、preconditioning 効果がかかると言っています。ただ、もちろん反論もありまして、心室筋に本当にムスカリンレセプターがあるのかという、電気生理をやっておられる方は、心房にはあるけれども、心室にはないというようなことを。

**遠藤** いや、受容体はあると思います。心房筋ほど多くないですけれども、かなりの数の受容体は心室筋にもあります。

ただ、AChで活性化される  $K^+$  channel ( $I_{KACH}$ ) がないですから、実際に  $K^+$  channel の調節ということになると、どうであるかという問題があります。しかし、その  $K^+$  channel はアデノシンでも同じように activate されるわけですから、条件は同じではないかと思えます。

**三浦** 私の記憶間違いでした。  $I_{KACH}$  は心室筋にはない。

**安孫子** それでは少し時間もたってまいりましたので、一番最後の発表になりましたけれども、平田先生、お願いします。

**平田** イノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (Ins (1, 4, 5)  $P_3$ ) の作用と受容体について簡単にまとめさせていただきます。初めに Ins (1, 4, 5)  $P_3$  の作用について話をし、それから作用が発揮されるために必要である受容体の話を簡単に触れたいと思います。

初めの方は  $Ca$  イオンが細胞反応を惹起するのにどういうふうに重要かという話をしていますけれども、これは改めて言うまでもないので、ここでは話をしません。

Ins (1, 4, 5)  $P_3$  が初めて出たのは1983年の11月の「Nature」でありました。このことがむ

しろ、PI代謝回転の研究に火をつけた、それを刺激したという形になって、それからPIハイドロリシスの研究が随分盛んになってきたように思います。

この Ins (1, 4, 5)  $P_3$  は

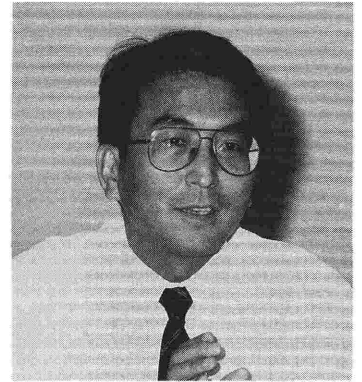
ご承知のように非常に微量なんです、膜のリン脂質のホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸というのがホスホリパーゼCによって加水分解されて出てくるものであります。

ホスホリパーゼCなんかの研究も近ごろ随分おもしろいんですが、これは本題と関係ありませんので触れません。

そういうふうにしてできた Ins (1, 4, 5)  $P_3$  は水溶性でありますから、リン脂質のポーヘッドを形成している部分で水溶性でありますから、細胞質を拡散していく。後で触れます小胞体上に存在する特異的な受容体にくっつくことによって  $Ca^{2+}$  放出をするわけです。

この Ins (1, 4, 5)  $P_3$  作用で今日のトピックスは、現象的には  $Ca^{2+}$  オシレーションという現象です。一過性に  $Ca^{2+}$  が上がったただ落ちるというだけではなくて、また次のスパイクが起こって  $Ca^{2+}$  が上がるという  $Ca^{2+}$  の増減を繰り返すオシレーションが起こるということ、それが時間的にオシレーションを起こすということ、一つの細胞だけとってみますと、 $Ca^{2+}$  ウェーブ ( $Ca^{2+}$  波) という形で表現されます  $Ca$  の上昇が細胞内を空間的に移動していく。そういうふうには  $Ca^{2+}$  がオシレートしたり、あるいはウェーブを起こしたりするような現象は、必ずプライマリーに Ins (1, 4, 5)  $P_3$  の存在が必須であるということ、これが明らかでありますから、Ins (1, 4, 5)  $P_3$  の作用の今日のトピックスはどのようにして  $Ca^{2+}$  のオシレーションが起こったり、ウェーブが起こったりするかということだろうと思えます。

その機構に関連したことになるかと思えますけ



平田先生

れども、Ca イオンそのものが Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 作用を二相性に調節しております。それを模式的にあらわしたのが図2でありまして、大体 300nM 付近までの Ca<sup>2+</sup> 濃度は Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 効果を非常に増強します。それを超えますと、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 効果が途端に抑制されるという現象が起こります。

改めて言うまでもありませんが、非刺激状態の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は 100nM 前後でありますから、非常に二相性の制御を受けやすい状況にあるとってよかろうと思います。

このような Ca イオンによる二相性の Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 作用の調節機構が今日、さっき触れました Ca<sup>2+</sup> オシレーションとか、Ca<sup>2+</sup> ウエーブの原因になっているのではなからうかということで、これは全く Ca イオンによって二相性に制御されているという現象と、細胞内の Ca<sup>2+</sup> をはかったときにオシレートしたり、ウエーブが見られるという現象を直接的に証明するものではないと思いますけれども、二つをカップルさせて現象を説明しようという試みがなされているところだと思えます。

Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体に入りたいと思います。Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体が初めて精製されましたのは 1988 年の 5 年前でありました。Snyder たちがラットの小脳にこの受容体が非常に多いことを見出しまして、いろんな性質を明らかにしました。例えばヘパリンに依存しているとか、糖たんぱくであるとかいういろんな性質を明らかにしまして、その性質を非常にうまく利用して、つまり糖たんぱくですからコンカナバリー A の親和性カラムを使ったり、ヘパリンの親和性カラムも使ったりして精製をいたしました。それが 1988 年です。

一方で御子柴先生たちは、それよりも 10 年以上も前から遺伝的に運動障害を起こすマウスのストレーンの研究をなさっておりまして、P<sub>400</sub> と名づけられていたんですけれども、そのたんぱくがスタゲラーというマウスにはほとんどないというのを見出しておられまして、このたんぱくが何をしているものだろうかという研究をずっとなさっていたようです。

Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体の話が出てきて、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体ではなからうかとい

う観点から御子柴先生たちが検討し直したところ、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体そのものであったということがわかりまして、随分以前からそのことに関しておやりになっていたものですから、抗体なんかも既にお持ちでして、その抗体をうまく使ってモレキュラー・クローニングに初めて成功なさいました。これは 1989 年 11 月の「Nature」に出たんだと思います。

今度はそういうふうにして精製されて構造もわかった Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体なんですけど、これが受容体というか、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> というリガンドをくっつけるだけのものか、あるいは Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> が Ca<sup>2+</sup> を放出するという作用があるわけですから、Ca<sup>2+</sup> を放出するという作用をも担っているものかということを検討されました。それはすなわち受容体の再構成実験になるわけです。これも一番最初に受容体を精製しました Snyder のグループが初めてやりました。

精製した受容体を再構成してみますと、リガンドとしての Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> を結合することはもちろんなんですけれども、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> にインデュースされた Ca<sup>2+</sup> 放出活性も有していることがわかりまして、受容体分子として精製してきたものはリガンド結合と channel をついているものが、両方の性質を担っていることがわかりました。

そういうふうにくローンがとれているものですから、モレキュラー・バイオロジー的にいろんな研究がなされていまして、図 3 a) に示しますように、大体 N 末端から 480 個ぐらいの付近にリガンドを結合する領域、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> を結合する領域があるということ。それから C 末端付近に膜を貫通する領域が 8 カ所あるということ。それからリガンドを結合する領域と Ca<sup>2+</sup> channel を形成する領域との間に A キナーゼとか、C キナーゼとか、あるいは CaM キナーゼ II とか、そういったようなものでリン酸化をされるサイトもある。それから ATP 自身を結合するサイトもあるということがわかっています。そういうわけですから、その間を調整する領域、レギュラトリー・ドメインというふうになづけられております。

実際に二次元的にどういうふうの小胞体に配しているかというのを示したのが図の 3・b) になります。

リアノジン・レセプターもそのようですけれども、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub>レセプターもホモテトラマーでして、四つそろって初めて一つのCa<sup>2+</sup> channelとして作用をいたします。

こういうふうにして構造も明らかになったIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub>受容体なんですけれども、1種類だけではありませんで、スプライシングを受けていろんな種類が存在し得ます。スプライシングを受ける部位は2カ所ありまして、リガンドを結合する領域と、調節領域でリン酸化を受けるサイトが2カ所ありますけれども、その真ん中付近にありまして、スプライシングを受ける箇所が2カ所あります。それでスプライシングを受けたり受けなかったりとか、それから受けるところでも微妙に異なりまして、多種類の受容体が存在し得るようです。

こういうふうの一つの遺伝子から出てくるIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub>レセプター、それからスプライシングによって出てくる多様性だけではなくて、全く異なった遺伝子から出てくるIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub>受容体も存在するようでありまして、近ごろ、一番最初精製されモレキュラー・クローニングされたものをタイプIとしますと、タイプIIとかタイプIIIとか名づけていいようなIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub>受容体の存在もクローンの方から明らかになってきております。

最後に「循環」の観点から話をしますと、これは最初に小川先生が触れられたと思いますけれども、むしろ血管に作用をして血管が薬物によって収縮を起こすという現象の細胞内の本当の生理的なメディエーターではなかろうかということは多分コンセンサスが得られているのではなかろうかと思えます。

「制御」の観点から見ますと、非常に残念ながら今日までにこのIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub>受容体に特異的に作用するような薬物類は見出されておられません。実験的には例えばヘパリンが有効であるとか、そういうことがありますけれども、それは多分薬物的には使えないものなんだろうと思えます。

ただ、まだ詳しい話は聞いてないんですが、ことしの生化学学会に三共製薬の方が、酵母かなにかの培養液の中からアデノフォスチンと名づけられまして、もう構造も明らかになっているようで

すが、これがIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub>アゴニストとして作用することを見出し、発表するようです。Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub>そのものよりも10倍か100倍ぐらい低濃度で作用したように抄録からは判断しましたがけれども、そういうふうなものがことしの生化学学会で発表されるようであります。

以上です。

**安孫子** どうもありがとうございました。それではご討論をいただきたいと思えます。

**小川** 私は知らなくて、平田先生のを読んで知ったんですけれども、先ほども平田先生はおっしゃいましたけれども、ホモテトラマーということで、リアノジン・レセプターのプロテインというのも実は約560kDaが四つくっついているんです。リアノジン・レセプターはその四つで1個リアノジンがくっつくんですけれども、先生のこのIns (1, 4, 5) P<sub>3</sub>の方は1分子のままでも1個つくんですね。

**平田** はい。

**小川** だから、その点で似ているようですけれども、随分違うなということも思ったのと、その次に興味を持ったのは、原稿に書いてあって触れられていないんですけれども、Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub>の作用がcooperativeなのかどうかということで、生体膜と人工膜に組み込んだのとで結果が違うようですけれども、それは私もリアノジン・レセプターのところで少し口ごもって言っているのは、いつも疑問に感じているんですけれども、人工膜にたんぱくを埋め込んでchannelをやるときのリピットの種類ですね。それによっても随分活性が違うんじゃないかという感じがするんです。その点はどうなんでしょうか。

**平田** 最初のはご質問ではなかったんですけれども、それにちょっと追加させていただきたいんです。

ホモテトラマーとして一つのchannelを形成して、リガンドそのものは四つくっつくんですね。後半の御質問とも関連するんですけれども、cooperativityの話で、確かに多くの報告で、例えばpermeabilizeした細胞とかいうのを使うとcooperativityがあるという報告が多いんです。精製した受容体を人工膜に組み込んだ形ではcooperativityはなくてという報告が多いんです。ところが、近ごろSomlyoのグループが1報と、

Casteels からの報告が1報, 合計2報, permeabilizeした細胞で cooperativity がないという報告があるんです。だから, cooperativity に関しては, 私はどっちが本当かちょっとわかりません。飯野さんなんかはあると言っているわけですね。

小川 私は, Ca 結合のたんぱくで cooperativity というのも実験の精度を考えますと, 本当がいいのかどうかというのはかなり疑問のところもあるんです。こことは違いますが, シミュレーションすると, 確かに cooperativity があるように思うけれども, 実験の精度を考えると, こんなのを言っているのかなと思うようなところもありまして, そういうことを含めると, かなり難しいんですけども, それはそれで置くとして, 私はその点に非常に興味を持ちました。

だから, リアノジン・レセプターのは人工膜に埋め込むというのも人工膜をつくるための組成は限られちゃっているんですね。それは生体では絶対起こり得ないようなリビッドなんです。そういうところに埋め込んだデータが本当に生体の中で起こっているものなのかどうかというのは非常に疑問を感じているんです。だから, 自分自身の考え方としてデータを見るときにどういうふうに見えるのかなというところなんです。

平田 それは私も賛成です。データを見るときに, シミュレーションをして線を引いてありますけれども, 見ていたら, ちょっとずれたらもう cooperative になるんですね。

小川 そうなんです。

平田 実験の精度が本当に正しければずれないでしょうからいいんでしょうけれどもね。

小川 特に Hill 係数が1か2かは割と区別できるんですけども, 2以上幾つかというのは本当は区別できないんですね。それは信じてこういう答えを出すという感じでしかない気がするんです。

もう一つ, これは非常に実験が難しいと思うんですけども, 1個だけ, ですから, 膜貫通部分があって, モノマーで Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> を結合し得るとした場合に, そういうのでやったときに channel 活性というのは出るんでしょうか。実験はかなり難しい。

平田 実験はほとんど不可能に近いと思いますが, channel 活性は多分出ないと思います。例え

ばアセチルコリンのニコチン型受容体でも M1, M2, M3, M4 ってあって MA というのが間にある。これが5つ集まって初めて channel 活性を出すんです。そういったようなものが Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> 受容体にもあるんですよ。だから, 一つではそういうのはつくり得ないだろうと思うんです。

小川 だけど, M1, M2, M3, M4 の Ma というのは多分中山先生のこのスキームでいきますと, SS 幾つというやつですか, S5 と S6 の間が点線になっているのは, 実は膜の中に, 本当は最初はループだったんだけど, 実は膜の中に入っていて, これがフィルターをなしているんだというのが最近の考え方ですね。そういうのとよく似ているようなあれですね。

だから, そういう意味ではその不明確さというのはまさにリアノジン・レセプターでもそうできて, 沼先生のところは四つの膜貫通部分, Ins (1, 4, 5) P<sub>3</sub> は八つですね。ですけども, MacLennan のグループは12個可能性があると言っています。それをちゃんと丁寧にはかかってみますと確かに, だから, どのくらいの疎水性を持ったら膜貫通とかという基準がはっきりしないんですね。

平田 これもわが国ですから8個にしたんですけども, サウスウエスタン大学の人は6個だと言っているんです。

小川 6個なんですね。最初は7個だったんですね。

平田 御子柴先生も最初は7個だった。7個が8個になって。

小川 それが8個になった。その7個と8個はすごく意味が大きいんですね。

平田 それはもう全然違います。偶数個だというのはまず間違いないということです。

小川 だから, N端とC端が同じ側にあるかどうかというので偶数個か奇数個かによって変わりますから, それは随分違うんですけども, あれを見てみますと, 本当に今は私は興味があってやっているんですけども, 膜貫通部分というのは, 例えば中山先生ので S4 なんていうのは疎水性は低いということ。Kyte-Doolittle のスコアが非常に低いですよ。

中山 そうなんですけれども, これはたまたま

プラスのところは三つ置きにあるからで、それ以外の二つずつは疎水性は高いです。だから、 $\alpha$ ヘリックスをつくって、一方にだけチャージが集まることになっているんですね。

**小川** だから、そういうのを自分なりに考えてやってみて勉強していますと、わからないんですよ。ウーンと思ったりなんかして。

**遠藤**  $Ca^{2+}$  Oscillationとか、 $Ca^{2+}$  waveというのはどういう細胞で、どのくらいの種類の細胞で見られているんですか、血管平滑筋とか。

**平田** すみません。血管平滑筋は覚えていないんですが、一番きれいに見えるのは卵なんです。だけど、肝細胞とかなんかをフェニレフリンなどで刺激しても出ます。

**遠藤** 肝臓ですか。

**平田** ヘパトサイト。それからパankレアトームなどの腫瘍細胞でも出ます。血管平滑筋はちょっと覚えてないんですが。

**遠藤** もし血管だとすると、血管で spontaneous activityを示すところは門脈平滑筋とか比較的限られています。Oscillationを示さない細胞においても受容体刺激で Ins (1, 4, 5)  $P_3$  はふえるわけですから、調節の仕方は様式がちょっと違うのかもしれないですね。

**平田** そうですね。

**遠藤** プライマリーに関与しているところと、情報伝達あるいは modulatory に関与している組織が有るということでしょうか。

**平田** 起こる、起こらないというのは、血管でも例えばプライマリーにしてもセンシティブティが違えば起こりにくいような状況というのはできているんだろうと思います。例えば血管は Ins (1, 4, 5)  $P_3$  に対する親和性が低い。そういうふうなのは起きにくいということはあるような気がするんですけども。

**遠藤** Ins (1, 4, 5)  $P_3$  のレセプターが違うということは、先ほど先生が言われた、スプライシングの違いでそういうことは起こり得るんですか。

**平田** スプライシングで違うというのは起こり得るんですけども、それが機能的にどう違うかというのはまだ全然わかっていないんです。いろいろな多様性はあるけれども、でも、それは起こっていないのではないかという気がするんです。ち

ょうどリガンドを結合するサイトにスプライシングが起こるし、調整を受けるところにもスプライシングは起こる。

**中山** とりとめもない質問をしますけれども、またまた今 Ins (1, 4, 5)  $P_3$  レセプターと、小川先生が話されたリアノジン・レセプターが割と構造的に似ており、両者共 Ca 放出という類似の機能をもつことから思いついたつまらない質問です。リガンドは一方は Ca ですし、一方は Ins (1, 4, 5)  $P_3$  と違いがあるから、例えば同じ細胞にリアノジン・レセプターと Ins (1, 4, 5)  $P_3$  が共存するような場合、それですとある役割分担を持っているとかいったことでいいのかなと思います。ところで、小川先生からさっきご紹介があったように、カエルの心筋では、割とほかの動物ではたくさんあると思われるようなリアノジン・レセプターがなくてというお話をされたんですけれども、そういった動物の組織ではむしろ Ins (1, 4, 5)  $P_3$  レセプターがなくてたくさんあるのかなということをお聞きしたい。これはおかしな質問かもしれませんが……。

**平田** いえ、おかしくはないと思いますけれども、二つを比べながらやった仕事はないような気がします。ありますか。

**小川** 脳で、イミノヒストケミストリーで、Ins (1, 4, 5)  $P_3$  レセプターとリアノジン・レセプターと検出しているのがあるんですね。両方ともあるものもありまして、ある部分ですと、多分同じサイトに検出されます。

**平田** 同じ小胞体でということですね。

**小川** ええ。検出されるなというのものもあることはあるんですよ。だけど、それ以外の細胞でどうか。例えば心筋でどうかと言われるとわかりません。

**平田** たしか心臓の話は小胞体そのものが少ないという話だったんですね。

**遠藤** カエル心筋の場合にはそういうストアがなくて少しはあるんですけども、膜から入ってくる Ca が比較的直接的に収縮調節に関与していると言われておりますね。

**岡田** 私も中山先生が質問されたことと同じような疑問を持ったんです。もしも今みたいに SR があるとして、両レセプターというか、その機能が一体 Ca にどういうふうに関与して

っているのかということが、どうもわかったよう  
でわからないので、何かお答えがあったら教えて  
いただきたいと思います。

**平田** しかし、イムノヒストケミストリーでは  
なくて、現象的には  $\text{Ca}^{2+}$  induced,  $\text{Ca}^{2+}$  release  
があって、なおかつ Ins (1, 4, 5)  $\text{P}_3$  も作用  
するような細胞って平滑筋なんかにはいっぱいあり  
そうな気がしますね。多分イムノヒストケミスト  
リーをやったら両方出てくるような気がしますね。

それが実際細胞の Ca 動態とどう関係するかと  
いうのは、かつてオシレーションとかなんかを  
説明するときにそういう話があったんです。とい  
うのは、まず最初に薬物がきて Ins (1, 4, 5)  
 $\text{P}_3$  ができて Ca を出す。その Ca が今度は Ins (1,  
4, 5)  $\text{P}_3$  レセプターを持たない小胞体に作用  
して、 $\text{Ca}^{2+}$  induced,  $\text{Ca}^{2+}$  release, リアノジン・  
レセプターを刺激して Ca を出す。それでこっち  
をやって、次にこっちに置くというふうにして時  
間的にオシレーションが起こるという話はあった  
んです。しかし、Ins (1, 4, 5)  $\text{P}_3$  受容体そ  
のものが Ca 感受性を持っている。要するに Ca  
が多くなればなるほど Ins (1, 4, 5)  $\text{P}_3$  作用  
が出やすい。Ca が多くなりすぎれば出にくくな  
るという話が出てきたので、今度はそれだけで説  
明しようという話になってくるんです。

だから、先生がおつしゃったような現象が起こ  
って、それがオシレーションの説明として死んだ  
わけではないと思っています。

**小川** だから、二つレセプターがあって、それ  
がオシレーションの説明だということを否定した  
ことにはならないんですね。

**平田** にはならないんですね。ただ、Ins (1,  
4, 5)  $\text{P}_3$  だけで説明できるようになったので  
都合がいいから。

**小川** そうなったときにちょっとお聞きしたい  
んですけれども、例えば卵での  $\text{Ca}^{2+}$  ウェーブや  
なんかでは、Ins (1, 4, 5)  $\text{P}_3$  のディフュー  
ジョンみたいなものでは説明できるんでしょうか、  
波のずっと。

**平田** いえいえ、それでは説明できないんです。  
Ins (1, 4, 5)  $\text{P}_3$  はもうすぐなくなってしまう  
んです。ずっと最後までいくことはないと思  
います。

**小川** いくことはないんですね。

**平田** はい。だから、リアノジン・レセプター  
みたいなのも関係しているのかもしれませんが  
ども。

**安孫子** その周期の間隔はどのくらいなんです  
か。

**小川** 大体あれですね、データで見えていますと、  
一番短いので数秒ないしは十数秒とかなんかぐら  
いのゆっくりなんですよ。だから、fura-2では  
かれる程度の速さですから非常に遅いんです。

**遠藤** 肝細胞や卵細胞の機能調節という点で、  
Ca は何をしているんですか。例えば筋細胞とか  
分泌細胞だと E-C カップリングとか、E-S カ  
ップリングと、割合とその機能がはっきりしてい  
ますけれども、それ以外の細胞ではどの程度わか  
っているんでしょうか。

**平田** 卵細胞の場合は多性というんですか、それ  
を防ぐための受精膜をつくるのに Ca があるこ  
とが必須のようですね。肝細胞なんかは Ca で制  
御されるような酵素があるんじゃないですかね。  
少なくともホスホリラーゼキナーゼは Ca で制  
御されますから、それはあると思いますけれど、  
ほかにも何かもっとありそうな気がします。

**三浦** 肝臓のバイルカナリキュラが収縮したり  
するのとは関係ないんでしょうか。

**小川** それは非常に関係は大きいと思うんです  
けれども、そういうところだけでもないんです。  
だから、そういう意味では何をやっているのかわ  
かりません。

**岡田** 今の最後のところで Ca というのはなる  
べくあった方がいいというお話を聞いたと思うん  
ですけれども、私ども蘇生というのをやっている  
んです。患者さんを助けるのに成功しても脳では  
delayed neural death 遅延性脳障害が問題になり  
ます。そのときには Ca が中に入り過ぎると、そ  
れでアタックが起こって、ハイポキシアがあった  
直後に起こるのではなくて、十数時間から数十時  
間のオーダーで起こる。それには MMDA とか、  
グルタメイト・レセプターがアクチビエートされ  
て Ca が流れ込む。これはいろんなところで言わ  
れているんですけれども、細胞は Ca が入り過ぎ  
ると悪いから、それをどうやって防ぐか。私ども  
は治療の面から気にしているんですけれども、き  
ょうのお話しだと、Ca というのはやはりなくて  
はいけないか。ある程度以上になるとどうかとい

うことにあるんじゃないかと思えますけれども、その辺は今後の問題としまして、全体の討論をというところでいかがでしょうか。先生方、言いそびれたこととか、コメントしておきたいことがございましたから言っていたきたいと思うんです。

私にとりましての印象は、私はやはり臨床で麻酔をやっているものですから、基礎の先生方のお話を聞けるというのはどこかの学会に行くよりも、はるかに学際的というか、集学的なもので勉強に

なつたと思えますし、今回の論文も私なりに一生懸命読んできたつもりなんですけれども、生のお話を聞くというのはいかに貴重かということが非常に印象として残ったシンポジウムでありました。

**安孫子** 全くそのとおりでして、先生方のいろいろな話を聞かせていただきまして非常に勉強になりました。

それではどうもありがとうございました。