

Physiological and Biochemical Actions of Calcitonin Gene-related Peptide in Mammalian Skeletal Muscle with Special Attention to Acetylcholine Receptor Incorporation to Cell Membrane and Excitation-contraction Coupling

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8084

骨格筋におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチドの 生理, 生化学的作用に関する研究

—アセチルコリン受容体誘導および興奮収縮連関を中心として—

金沢大学医学部附属病院神経内科 (主任: 高守正治教授)

吉 川 弘 明

(昭和63年11月28日受付)

ニューロペプチドが古典的神経伝達物質とともに神経細胞に存在することが知られるようになって久しいが, その機能については不明な点が多い. 骨格筋を支配する運動神経終末にもアセチルコリン (acetylcholine, ACh) とともにカルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide, CGRP) が共存することが知られており, 本研究はその神経・筋に対する作用機序を明らかにすることを目的とした. ウィスター系ラットの下肢筋より筋膜を分離し, CGRP に対する特異的なレセプターの存在を調べたところ, 筋膜上には CGRP に特異的な一種類の結合部位が存在し, Scatchard 解析にて結合定数は $K_d = 6.3 \text{ nM}$, 結合量は $B_{\text{max}} = 94 \text{ fmol/mg protein}$ である事がわかった. 結合部位に GTP (guanosine 5'-triphosphate) 結合蛋白質 (G 蛋白質) が関与しているかどうかを調べるため 25 mM MgCl_2 存在下に $100 \mu \text{M}$ guanosine 5'-[γ -thio] triphosphate (GTP γ S) を加えたところ, 筋膜に対する CGRP の親和性は著明に低下したので CGRP 結合部位には G 蛋白質がカップリングしていることが示唆された. CGRP が細胞内セカンドメッセンジャーとして何を動かすのか調べるため, 培養骨格筋に CGRP (10^{-7} M) を添加し細胞内 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP), guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) の量を測定したところ cAMP 濃度が有意に上昇したが, cGMP 濃度には変化がなかった. 従って cAMP がセカンドメッセンジャーとして働いていることがわかった. 次にアセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) 誘導に及ぼす CGRP の効果を培養骨格筋を用いて調べたところ, AChR 誘導は促進的で, AChR 崩壊速度には影響を与えないことが示された. この AChR 誘導促進効果は蛋白合成阻害剤のピュロマイシンの添加により消失した. さらにセカンドメッセンジャーの AChR 誘導に及ぼす影響を調べたところ dibutyryl cAMP (db-cAMP), dibutyryl cGMP (db-cGMP), コレラトキシンはいずれも AChR 誘導を促進した. すなわち促進性 G 蛋白質 (G_s) にカップリングしたアデニレートシクラーゼの活性化, 細胞内 cAMP 濃度の増加は AChR 誘導増加をもたらすことが示唆された. 一方, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) と Ca^{2+} ionophore A23187 を併用すると AChR 誘導は低下したため, イノシトールリン脂質代謝回転系は AChR 誘導を抑えるものと考えられた. ラット横隔膜筋標本を用いた細胞内電極による電気生理実験では, CGRP は前, 後シナプス機能および筋表面膜機能には影響を与えず筋等尺性単収縮張力を増強したが強収縮張力は変わらなかった. この効果は CGRP が筋小胞体内の Ca^{2+} 濃度を高め, 結果的に引き続く刺激に反応する遊離 Ca^{2+} 量が増加したためと考えられた. ホスフォジエステラーゼ阻害剤であるテオフィリンは CGRP の効果をさらに増強させ, コレラトキシン処理筋でも CGRP の張力増強効果が大きくなったが, 百日咳トキシン (islet activating protein, IAP) 処理筋では CGRP の効果は変わらなかった. 以上の結果から CGRP は筋膜上の『特異的受容体・ G_s ・アデニレートシクラーゼ』という情報転換ユニットを介し, セカンドメッセンジャーとして cAMP を動かして早期細胞応答 (筋張力増強) と長期細胞応答 (AChR 誘導増加) をもたらしているものと考えられた.

Key words Calcitonin gene-related peptide (CGRP), GTP-binding protein, second messenger, acetylcholine receptor, muscle contraction

ひとつのニューロンには一種類の神経伝達物質が存在するという Dale の法則 (Eccles ら¹²⁾) は、近年多種のニューロンにおいて古典的神経伝達物質とニューロペプチドが共存することが知られるようになり、その再検討が求められている³⁴⁾。ニューロペプチドは古典的神経伝達物質の作用を修飾すると考えられており⁹⁾、骨格筋を支配する神経終末にもアセチルコリン (acetylcholine, ACh) とともにカルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide, CGRP) が共存することが明らかにされている⁹⁻¹⁰⁾。CGRP は37個のアミノ酸よりなる分子量約3800のペプチドで、カルシトニン遺伝子上にコードされており mRNA のスプライシングの過程で CGRP とカルシトニンの2種類の mRNA が作られ、それぞれのペプチドが臓器特異的に発現する^{10,11)}。これまで、免疫電子顕微鏡学的にシナプス前部に CGRP の存在が確認されており⁷⁾、その生理作用としては、1) 培養骨格筋細胞におけるアセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) の増加⁹⁾、2) 培養骨格筋細胞における AChR α -subunit mRNA の増加¹²⁾、3) ACh 存在下における筋収縮力の増強⁷⁾、4) 細胞内の cAMP の増加¹³⁾などが知られている。しかし、膜上の CGRP 受容体の解明、postreceptor signal transduction の詳細、筋収縮機構のどのステップに CGRP が作用するかなどは尚不明である。神経・筋の諸機能に対するニューロペプチドの作用を明らかにすることは神経・筋疾患の病態生理を理解するうえで重要と考え、著者は筋膜上における CGRP 結合部位を調べるとともに、GTP 結合蛋白質 (guanine nucleotide-binding regulatory protein, G蛋白質)、セカンドメッセンジャーに注目して CGRP の作用発現メカニズム、AChR 代謝回転と筋収縮ならびにシナプス機能における CGRP の影響を検討した。

材料および方法

I. 筋膜標本の作製

ウィスター系雄ラット (Charles River, 厚木) の下肢筋を採取し、Mickelson ら¹⁴⁾の方法に従い下記の操作により筋膜を分離した。筋100gをはさみで細切したのち500mlの250mM Tris-HCl 緩衝液 (250mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) を加え、ウルトラディスペルサー model LK-21 (ヤマト, 東京) にて粉

砕し、2,000×gで10分間遠心した。沈殿を500mlの0.4M リチウムプロマイド、LiBr (Merck, Darmstadt, Germany) 溶液 (0.4M LiBr, 20mM Tris-HCl, pH 8.5) に溶かし一晩ゆつくりと攪拌した。翌日この溶液を1,000×gで15分間遠心し上清を集め更に100,000×gにて30分間遠心した。沈殿を50mlの20mM Tris-HCl 緩衝液 (0.6M KCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.0) に溶かし、Dounce ホモジナイザー (loose-fitting) にて粉碎し10,000×gにて10分間遠心して上清を集めた。この操作はさらに2回繰り返すことにより筋膜標本の収率をたかめた。上清を100,000×gにて30分間遠心して沈殿を20mM Tris-HCl 緩衝液 (0.6M KCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.0) に攪拌し、10,000×gにて10分間遠心した。さらに蒸留水にて同じ操作を繰り返したのち、沈殿に少量の蒸留水を加えて分散した。これに同量の57%シヨ糖溶液 (57%シヨ糖 w/v, 20mM ヒスチジン, pH 7.0) を加え、15%シヨ糖溶液 (15%シヨ糖 w/v, 20mM ヒスチジン, pH 7.0) を重層シアングル型ローターにて150,000×g, 90分間遠心した。28.5%シヨ糖溶液と15%シヨ糖溶液の境界面に形成されたバンドを集め4倍量の蒸留水にて希釈したあと、100,000×g, 30分間遠心し沈殿を10%シヨ糖溶液に攪拌して筋膜標本とし、使用までは-80°Cにて保存した。以上の操作はすべて4°Cにておこない、遠心機は Model J2-21 (Beckman, California, U. S. A.), 超遠心機は Model L8-70 (Beckman, California, U. S. A.) を使用した。蛋白量の測定は Lowry ら¹⁵⁾の方法に従った。

II. 筋膜における CGRP の結合測定

筋膜標本における CGRP 結合部位の測定は、Fischer ら¹⁶⁾、Henke ら¹⁷⁾の方法にもとづいて以下のように求めた。筋膜標本 (蛋白量として50~210 μ g) に、標識 CGRP (ヒト [¹²⁵I]-CGRP, アマシャム・ジャパン, 東京) および非標識 CGRP (ヒト CGRP, ペプチド研究所, 大阪) を加え50mM Hepes/Tris 緩衝液 (pH 7.4, 1%牛血清アルブミン, Sigma, St. Louis, U. S. A.) にて総量を0.5mlとし、4°C, 4時間インキュベートした。インキュベーション終了後、50mM Hepes/Tris 緩衝液にて10倍に希釈し反応を停止させポリエチレンイミン¹⁸⁾ (Sigma, St. Louis, U. S. A.) で処理したグラスフィルター (Whatman GF/C) (Whatman, Maidstone, England) にて濾過した。グラ

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AChR, acetylcholine receptor; cAMP, adenosine 3',5'-cyclic monophosphate; α -BuTX, α -bungarotoxin; CGRP, Calcitonin gene-related peptide; D-TC, D-tubocurarine chloride; DG, diacylglycerol; db-cAMP, dibutyl cAMP;

スフィルターをさらに 5 ml の 50mM Hepes/Tris 緩衝液にて 2 回洗浄しガンマカウンター (Aloka Autowell gamma system ARC-600) (アロカ, 東京) にて筋膜に結合した放射活性を測定した. CGRP の結合に対する guanosine 5'-[γ -thio] triphosphate (GTP γ S) (Sigma, St. Louis, U. S. A.) の影響を調べる場合には, インキュベーション緩衝液に 25mM MgCl₂ を加えた.

III. 骨格筋細胞初代培養^{19)~22)}

骨格筋初代培養細胞は Devreotes²⁰⁾, Appel ら²¹⁾ の方法に従い以下のように調整した. 胎生 20 日目のウイスター系ラット胎児下肢筋を採取し, 神経, 血管, 結合組織を除去後, 実体顕微鏡下に細切し, 0.3% トリプシン (1:250) (Difco Laboratories, Detroit, U. S. A.) 処理により単細胞浮遊液を作った. これを 1% ゼラチン (Difco Laboratories, Detroit, U. S. A.) 液でコーティングした直径 60mm プラスチックペトリ皿 (岩城硝子, 東京) に 1×10^7 個となるように分注し, 24~48 時間培養した後 0.03% トリプシン処理により再度単細胞浮遊液とした. 筋芽細胞と繊維芽細胞の付着度の差を利用して繊維芽細胞を選択的に除去するためにコーティングしていないプラスチックペトリ皿にて 15~30 分間培養し筋芽細胞に富んだ上清を採取した. 最後にゼラチンコーティングした直径 35mm プラスチックペトリ皿 (岩城硝子, 東京) に 1×10^6 個となるように分注し, 5~6 日間筋芽細胞を発育させ実験に供した. 以上の操作はすべて無菌的に行い, 培養液は Dulbecco 改変 Eagle 培地 (Gibco, Grand Island, U. S. A.) に 10% 牛胎児血清 (Gibco, Grand Island, U. S. A.), 1% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (Gibco, Grand Island, U. S. A.) を加えたものを用い, 37°C, 5% CO₂, 95% air 下で培養し 2~3 日おきに培養液を交換した.

IV. セカンドメッセンジャーの定量

培養筋芽細胞内の cAMP, cGMP を以下の方法により測定した. この際, 繊維芽細胞の影響を極力少なくする目的で培養開始後 3 日目から 2 日間, 100 μ M ウリジン・10 μ M フルオロデオキシウリジン (Sigma, St. Louis, U. S. A.) 添加培養液で培養し分裂細胞を取り除き²³⁾, 筋回復のため 1 日間ウリジン・フルオロデオキシウリジン無添加培養液を加えて培養し実験に供した. 培養液に CGRP (10^{-7} M) を添加し 5~20 分間

インキュベーション後培養液を取り除き, 冷却した 6% トリクロロ酢酸 (和光, 大阪) 液 1 ml を加え反応を停止させラバーポリースマンにて細胞を集めた. 超音波ホモジナイザー Model US-300 (日本精機, 東京) にて細胞を破壊した後, 3,000 rpm, 10 分間遠心し上清を集めた. 水飽和エーテルを加え振盪した後, エーテル層をアスピレーターにて除去し水層のみを集めラジオイムノアッセイ (YAMASA Cyclic AMP, GMP Assay Kit, ヤマサ醤油, 銚子) にて cAMP, cGMP を定量した. 以上の操作はすべて 4°C にて行った.

V. AChR の誘導速度の定量

培養筋芽細胞を用いて筋細胞膜上の AChR の代謝回転を, 次の方法で調べた. 筋細胞の AChR は, 他の蛋白と同様に細胞内で合成された後, 細胞膜に組み込まれ表面に出てくる (誘導, incorporation) が, 筋細胞膜上の AChR には細胞内に取り込まれ分解されるものもあり (崩壊, degradation), ターンオーバーを繰り返している^{19)20)24)~27)}. この誘導と崩壊の差が見かけの細胞膜上の AChR 数の変化となっている. CGRP が AChR 誘導に及ぼす影響を検討するため, 培養 5~6 日目の筋芽細胞 (35mm ディッシュ) に, 2 μ M の α -ブンガロトキシン (α -bungarotoxin, α -BuTX) (Sigma, St. Louis, U. S. A.) を添加した培養液を加え 1 時間インキュベートし, あらかじめ存在していた細胞表面 AChR の α -BuTX 結合部位をブロックした. 過剰の α -BuTX はディッシュを培養液で 3 回洗うことにより除去し, CGRP 添加, 無添加の培養液に交換してインキュベートした. 4 時間もしくは 8 時間経過後, ディッシュを 4 nM の [¹²⁵I]- α -BuTX (アマシヤム・ジャパン, 東京) にて 1 時間インキュベートし, 新しく誘導された AChR をラベルした. ディッシュを培養液で 3 回洗うことにより過剰の [¹²⁵I]- α -BuTX を除去し, 細胞をラバーポリースマンにて集め, 放射活性を測定した²⁸⁾. AChR 誘導速度に対するセカンドメッセンジャーの影響を検討するため, 1 mM dibutyl cAMP (db-cAMP) (Sigma, St. Louis, U. S. A.), 1 mM dibutyl cGMP (db-cGMP) (Sigma, St. Louis, U. S. A.), 100 nM コレラトキシン (List Biological Laboratories, Campbell, U. S. A.), 50 ng/ml 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (LC Services, St. Woburn, U. S. A.)²⁹⁾, 0.4 μ M Ca²⁺

db-cGMP, dibutyl cAMP; EPP, endplate potential; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; cGMP, guanosine 3',5'-cyclic monophosphate; GTP, guanosine 5'-triphosphate; GTP γ S, guanosine 5'-[γ -thio] triphosphate; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; MEPP,

ionophore A23187 (Sigma, St. Louis, U. S. A.) を培養液に加えた系についても調べた。また, CGRP の効果をさらに検討するため, 培養液に蛋白合成阻害剤 $10 \mu\text{M}$ ピュロマイシン²⁰⁾²⁴⁾²⁵⁾ (Sigma, St. Louis, U. S. A.) を添加した系についても調べた。

VI. CGRP による AChR 崩壊速度の定量²⁰⁾²¹⁾²⁴⁾²⁵⁾

[¹²⁵I]- α -BuTX で標識された細胞表面の AChR は細胞内に取り込まれ分解されるため, 放射性ヨードで標識されたチロシンが細胞外に放出される。したがって, 培養液の [¹²⁵I] の放射活性を経時的に測定することにより AChR 崩壊速度を間接的に知ることができると²⁰⁾²¹⁾²⁴⁾²⁵⁾。培養筋芽細胞における CGRP の AChR 崩壊速度に及ぼす影響を以下の方法で調べた。4 nM [¹²⁵I]- α -BuTX を添加した培養液中で各ディッシュを2時間インキュベートし, 細胞表面の AChR を [¹²⁵I]- α -BuTX にて標識した後, ディッシュを3回培養液にて洗い過剰の [¹²⁵I]- α -BuTX を除去した。CGRP 添加, 無添加の培養液を加えた2群に分け以後一定時間ごとに各ディッシュの培養液を採取し, 新しい培養液を加えた。採取した培養液中の放射活性の総和 (A), ならびに最後の洗浄後も細胞に結合したまま残っている [¹²⁵I]- α -BuTX を調べるためラバーポリースマンで集めた細胞の放射活性 (B) を測定した。(A)+(B) を100%とし, 一定時間までに培養液に遊離した [¹²⁵I]-チロシンの放射活性 (At) を差し引いた値, 即ち細胞上に残っている [¹²⁵I]- α -BuTX の放射活性 $\{(A+B) - (At)\}$ を時間経過とともに片対数グラフにプロットし AChR 崩壊速度を測定した。

VII. 筋収縮の測定

1. 測定法並びにパラメーターの設定

ウイスター系雄ラットから横隔膜筋標本 (乾燥重量 19~28mg) を得, 等尺性筋張力計にセットし, ガス ($\text{O}_2 : \text{CO}_2 = 95 : 5$) 負荷 37°C リンゲル液 (122 mM NaCl , 4.7 mM KCl , 15.5 mM NaHCO_3 , 1.2 mM MgCl_2 , $1.2 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, 2.6 mM CaCl_2 , 11.5 mM glucose) にて灌流しつつ白金電極 (筋全体を同時刺激するために筋全長に接触する平板電極) により, 0.5 msec の矩形波にて筋を直接刺激した。この際, 筋内神経繊維刺激の可能性を除去するため, $6 \mu\text{g/ml}$ のクラール (D-tubocurarine chloride, D-TC 和光, 大阪) をリンゲル液に添加した。静止張力は最大単収縮張力がえられるように設定し (時定数, 3msec), 強縮張

力は 166 Hz 0.9秒間反復刺激にて求めた。薬理的に無処理の筋の収縮反応は灌流開始後60分間経過しても変化がないことを確認した。筋収縮の解析のため, 単収縮張力の一次微分 (時定数, 30msec), 二次微分 (時定数, 1 msec) を求め²⁹⁾, “active state” の概念にもとづき^{29)~31)} 以下のようにパラメーターを設定した。即ち, トロポニンとその活性化物質である Ca^{2+} によって調節されているアクチン-ミオシン架橋形成の動態を反映するパラメーターとして, 活動電位起生時から単収縮張力の一次微分ピーク値までの時間 (T_{apu}), 単収縮張力発生よりそのピークを経て1/2の張力まで弛緩する時間 ($T_{1/2}$) を測定した²⁹⁾。Active state intensity of shortening は, 単収縮張力の二次微分ピーク値 (最大加速度) ($d^2\text{Pt}/dt^2$) から求め, 興奮収縮連関 (excitation-contraction coupling) における筋小胞体から遊離される Ca^{2+} 量を表現するものとした。Intensity of load-bearing すなわち, アクチン-ミオシン架橋形成の数と intrinsic strength を表現するものとして最大強縮張力 (maximum tetanic force, P_0) を求めた²⁹⁾。

2. 筋収縮に及ぼす CGRP 並びに薬物の効果

CGRP 添加前と 10^{-7} M 添加10分後に単収縮張力, 強縮張力を記録した。テオフィリン (和光, 大阪) の効果は, その $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ 添加リンゲル液にて, 同時に CGRP (10^{-7} M) を添加または無添加の場合について灌流10分の前後に筋収縮力を記録し評価した。また, CGRP の効果がG蛋白質を介する可能性を調べるため, それぞれ促進性 GTP 結合蛋白質 (Gs), 抑制性 GTP 結合蛋白質 (Gi) のプローブであるコレラトキシン³²⁾³³⁾ (List Biological Laboratories, Campbell, U. S. A.), 百日咳トキシン (islet activating protein, IAP) (科研製薬, 東京)³⁴⁾³⁵⁾ を加えた系についてもそれぞれ以下のように測定した。 10^{-7} M コレラトキシンを1時間, 筋標本に作用させた後, CGRP (10^{-7} M) を添加して10分後に筋張力を測定した。百日咳トキシン ($5 \mu\text{g/kg}$) を3日前に静脈内投与したラットから得た筋標本については, CGRP (10^{-7} M) 添加前および10分後記録筋張力によって評価した³⁶⁾³⁷⁾。

VIII. 微小電極によるシナプス機能, 筋膜特性の測定
微小電極を用い静止膜電位, 刺入抵抗, 微小終板電位 (miniature endplate potential, MEPP), 終板電位 (endplate potential, EPP, クラール添加) を求めた。

miniature endplate potential; PIP_2 , phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; TCA, trichloroacetic acid; IAP, islet activating protein; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; G蛋白質, GTP 結合蛋白質; Gs, 促進性G蛋白質; Gi, 抑制性G蛋白質

MEPP と EPP の振幅は標準静止膜電位を -77mV として補正した。ACh quantum content は 1Hz 連続神経刺激による誘発 EPP 振幅 (11th~60th) の変異係数で表現³⁰⁾, immediatly releasable ACh store 量は Lambert らの方法³⁰⁾ に従い 100Hz 連続刺激による EPP 振幅 (1st~3rd) から算出する quantum content で表現, ACh mobilization rate は 100Hz 60 発連続神経刺激による EPP の最後の 12 発の quantum content で表現した。筋直接刺激による筋膜の反応の観察では、標本は収縮を防ぐために $20\mu\text{g/ml}$ ダントロレン・ナトリウム塩 (dantrolene sodium) を含んだリンゲル液に浸し³⁰⁾, 刺激電極を接触させた筋繊維に刺入した記録用微小電極で活動電位を記録, また時定数 30msec の微分回路を経てその一次微分 (dV/dt) を同時記録した。測定は, CGRP (10^{-7}M) 添加, 無添加について行った。

IX. 統計処理

得られた計量的データは Mean \pm S. D. (一部のみ S. E. M.) で表した。各データの有意差の検定には一次元または二次元配置分散分析後, Dunnett または Scheffé の多重比較法を用い, $p < 0.05$ 以下を有意とした。

X. 試薬

ヒト CGRP とラット CGRP では一部アミノ酸配列

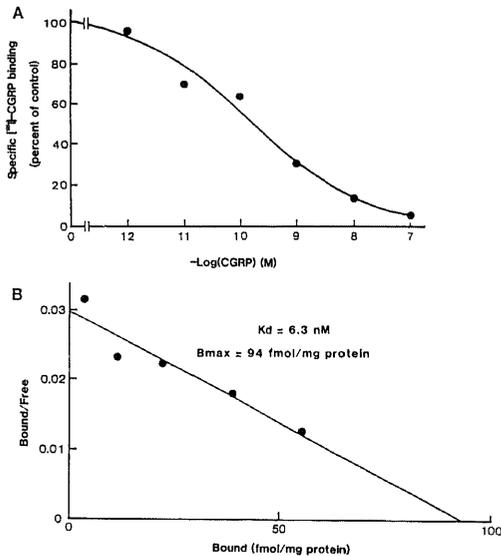


Fig. 1. Specificity of [¹²⁵I]-CGRP binding. Displacement of [¹²⁵I]-CGRP binding by nonradioactive CGRP in the sarcolemmal membrane (A) and Scatchard plots of [¹²⁵I]-CGRP binding in the sarcolemmal membrane (B). Each point is the mean of duplicate determinations.

が異なっているが受容体結合測定では同様の動態を示すことが Tschopp ら³⁰⁾ により確認されているため, 筋膜への CGRP 結合測定ではヒト CGRP を使用した。培養実験ではラット CGRP (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, England) を用い, 電気生理実験においてはラット CGRP (ペプチド研究所, 大阪) を使用した。

成 績

I. 骨格筋筋膜上における CGRP 結合部位の動態

筋膜標本に CGRP を加えインキュベーションすると, CGRP は筋膜に濃度依存性に結合する。その CGRP の膜への結合動態を, [¹²⁵I]-CGRP をリガンドとし, 非放射性 CGRP との displacement study によって調べた。筋膜標本とそれぞれ同量の [¹²⁵I]-CGRP を入れた複数のアッセイチューブに, 非放射性 CGRP の濃度を変えて加え, 4°C でインキュベーションした。4 時間後, グラスフィルター濾過にて筋膜に結合した放射活性を測定した。縦軸に結合量, 横軸に非放射性 CGRP の濃度をプロットすると筋膜上には CGRP に特異的結合部位があることが示された (図 1A)。非特異的な結合は全体の約 29% であった。次に, [¹²⁵I]-CGRP の濃度を変えて筋膜標本上への結合量を測定した binding study の結果を Scatchard 解析をすると (図 1B), 筋膜上には 1 種類の CGRP 結合部位があり結合定数は $K_d = 6.3\text{ nM}$ と高親和性を示し, 結合量は $B_{\text{max}} = 94\text{ fmol/mg protein}$ であった。この高親和性結合部位に G 蛋白質がカップリングし

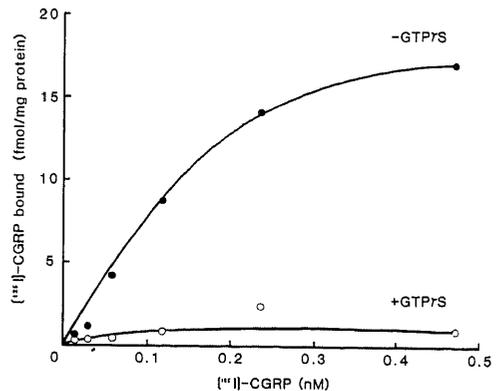


Fig. 2. Effect of $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ($100\mu\text{M}$) on [¹²⁵I]-CGRP binding. MgCl_2 (25mM) was added to the assay tube to minimize the dissociation of $\text{GTP}\gamma\text{S}$ from the α -subunit of G_s protein. \circ , in the presence of $\text{GTP}\gamma\text{S}$; \bullet , in the absence of $\text{GTP}\gamma\text{S}$.

CGRP に対する親和性を調節している可能性を調べるため、 $MgCl_2$ 存在下に $GTP\gamma S$ を添加すると筋膜と CGRP の親和性は著明に低下した (図 2). 従って、筋膜上の CGRP 高親和性結合部位は G 蛋白質にカップリングした CGRP 受容体であることがわかった.

II. CGRP 添加によるセカンドメッセンジャーの変化

培養液中に CGRP を添加し、5~20分後の培養筋細胞内の cAMP, cGMP 濃度をラジオイムノアッセイ

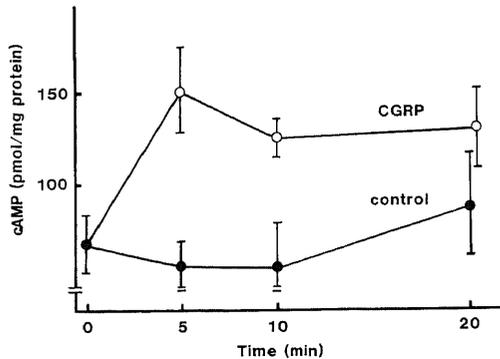


Fig. 3. Changes of the intracellular cAMP by the addition of CGRP. ○, in the presence of CGRP; ●, in the absence of CGRP. Circle and bars represent Means±S. D., respectively (n=5); $p < 0.01$ vs control by two-way ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.

にて測定した。cAMP は、CGRP 添加 5 分後より既に有意な上昇を認め、20 分後もほぼ同様の値を維持した (図 3). 一方、cGMP 濃度は CGRP 添加にても上昇しなかった。この結果から CGRP はセカンドメッセンジャーとして cAMP 濃度を上昇させ、その特異的効果をもたらすことがわかった.

III. AChR 誘導速度に対する CGRP 並びに種々のセカンドメッセンジャーの影響

培養筋細胞における AChR 誘導は CGRP 添加群ではインキュベーション開始後 4 時間で対照群と差が無

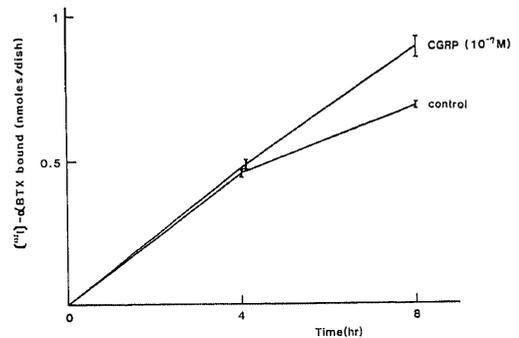


Fig. 4. Effect of CGRP ($10^{-7}M$) on AChR insertion into the cell membrane of cultured rat myotubes. Bars indicate Means±S. E. M., respectively (n=7); $p < 0.01$ vs control by two-way ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.

Table 1. Effect of CGRP and other substances on AChR insertion to the cell membrane

Addition	AChR insertion (% versus control)	
	4 hr	8 hr
CGRP($10^{-7}M$)	105.4±11.0	125.5±14.2 †
Puromycin($10\mu M$)	81.3±10.5 †	63.5±4.7 †
CGRP($10^{-7}M$)+Puromycin($10\mu M$)	90.0±8.3	66.7±5.1 †
db-cAMP(1mM)	98.7±8.0	108.0±4.5
CGRP($10^{-7}M$)+db-cAMP(1mM)	104.2±9.5	110.4±4.3
cholera toxin(100nM)	114.0±7.7 †	123.8±5.9 †
CGRP($10^{-7}M$)+cholera toxin(100nM)	120.0±7.5 †	128.0±8.5 †
db-cGMP(1mM)	100.1±11.8	108.6±5.7
CGRP($10^{-7}M$)+db-cGMP(1mM)	99.4±8.4	121.0±10.9 †
TPA(50ng/ml)	98.2±23.0	85.2±16.6
A23187($0.4\mu M$)	93.6±27.8	92.1±11.3
TPA(50ng/ml)+A23187($0.4\mu M$)	102.3±23.7	76.6±10.5 †

Means±S.D., n=7. †, $p < 0.05$; ‡, $p < 0.01$ vs control by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison.

かったが、8時間後には有意の増加を認めた(図4)。db-cAMPを添加した群も同様に4時間では対照群と差が無かったが、8時間後にはAChR誘導が増加する傾向を認めた(表1)。G_sのα-サブユニット(α_s)をADP-リボシル化することによりG_sにカップリングしたアデニレートシクラーゼを持続的に活性化し細胞内cAMP濃度を高める作用のあるコレラトキシン²⁰は、インキュベーション開始後4時間から既に有意なAChR誘導の増加を認めた。しかし、db-cAMP、コレラトキシンのいずれもCGRPとともに添加しても効果の相加作用は認められなかった。db-cGMPを添加した群も8時間後よりAChR誘導の増加傾向を認め

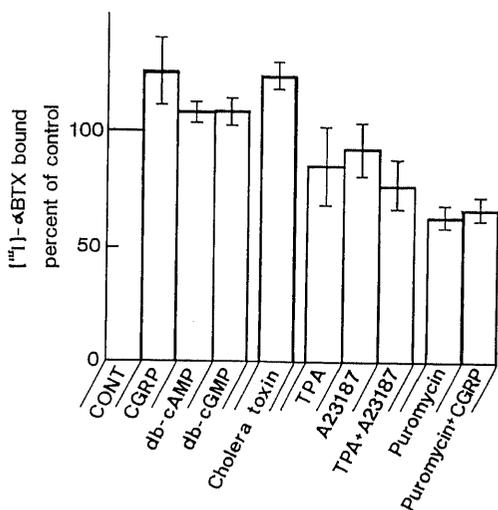


Fig. 5. Effects of various substances on [¹²⁵I]-α-BuTX binding of cell membrane after 8 hrs incubation. Bars indicate Means±S. E. M., respectively (n=7).

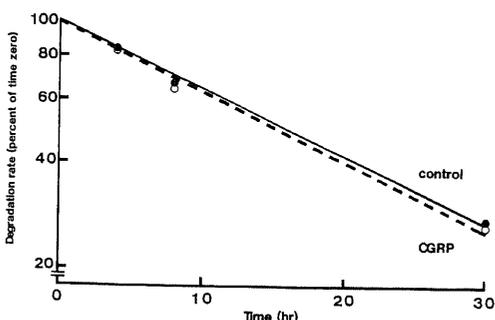


Fig. 6. Effect of CGRP (10⁻⁷ M) on AChR degradation of cell membrane from cultured rat myotubes. ○, in the presence of CGRP; ●, in the absence of CGRP. Circles represent Means respectively (n=7).

たが、CGRP との間に相加作用は認められなかった。さらにセカンドメッセンジャーによるAChR誘導の修飾を検討するため、Ca²⁺の存在下にCキナーゼを活性化させイノシトールリン脂質代謝回転系が促進した場合と同じ効果をもたらすTPA²⁰の影響を見たがTPA単独では有意の変化は見られなかった、しかし、やはり単独では変化がなかったCa²⁺ ionophore A23187とともに添加すると有意にAChR誘導が減少した。また、蛋白合成阻害剤のピロマイシンを添加するとCGRPの効果は消失した(表1)。比較を容易にするためインキュベーション開始8時間後の結果を

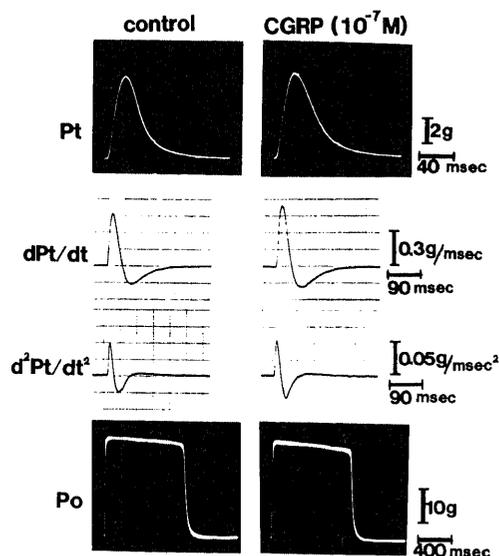


Fig. 7. Isometric twitch (Pt) and tetanus (Po) analyzed by differentiations in control and CGRP (10⁻⁷ M)-treated muscle. Measurements of each of the active state properties are depicted. Contractile responses were elicited by massive stimulation in the solution containing D-tubocurarine chloride (6 μg/ml).

Table 2. Effect of CGRP(10⁻⁷M) on active state properties determined by twitch analysis

Pt	dPt/dt	d ² Pt/dt ²	T _{dPt/dt}	T _{1/2R}
% of the pre-treated levels				
105 ± 2	110 ± 2 †	105 ± 3	109 ± 5 †	113 ± 7 †

Means±S.D. values are indicated; †, p<0.01 vs pre-treatment by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison. 7 muscles were tested. An example is shown in Fig. 7.

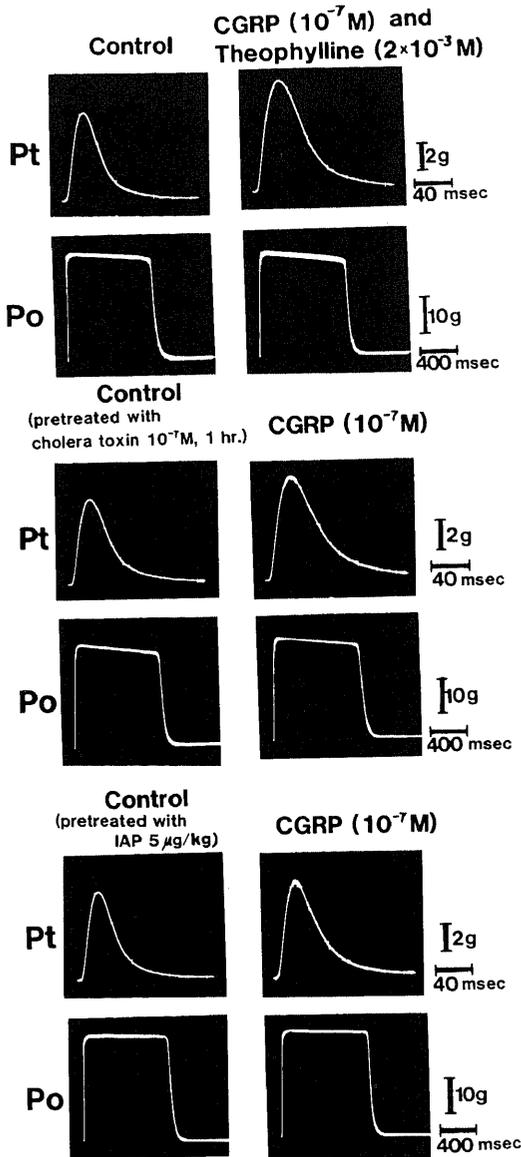


Table 3. Effects of pharmacologic agents on twitch (Pt)

Addition	Pt (% of the pre-treated levels)
CGRP(10^{-7} M) and theophylline(2×10^{-3} M)	$125 \pm 2^*$
Theophylline(2×10^{-3} M) alone	$112 \pm 3^{**}$
CGRP(10^{-7} M) and cholera toxin(10^{-7} M)	$130 \pm 1^{***}$
CGRP(10^{-7} M) and pertussis toxin(IAP)($5 \mu\text{g}/\text{kg}$)	$105 \pm 2^{****}$

Means \pm S.D. values are indicated; $p < 0.01$ vs pre-treatment by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison. 6 muscles were tested for each. An example is shown in Fig. 8.

* more potentiated than CGRP (Table 2) or theophylline alone;

** less potentiated than CGRP plus theophylline;

*** more potentiated than CGRP alone (Table 2);

**** not significantly different from CGRP alone (Table 2).

図5に示した。

IV. AChR 崩壊速度に与える CGRP の影響

AChR 崩壊速度は CGRP を添加しても対照と差が認められなかった (図6). よって CGRP は AChR の崩壊を緩和することにより見かけ上の AChR 誘導促進効果をもたらしているのではなく、実際に AChR 合成、筋膜へのとりこみを増加していることがわかった。

V. CGRP の筋収縮に与える影響

CGRP 含有灌流液で10分間処理すると筋標本の単収縮張力 (Pt) は灌流前に比べて増強し、二次微分ピーク値 ($d^2 \text{Pt}/dt^2$) の増加傾向と時間経過 ($T_{d^2 \text{Pt}/dt^2}$, $T_{1/2R}$) の延長を伴っていた (図7, 表2). しかし、強縮張力 (Po) には変化は認められなかった (図7). テオフィリンも単収縮張力 (Pt) を増強させたが、CGRP をともに加えることによりその効果はさらに増強した (図8, 表3). コレラトキシン処理においては無処理の場合よりも CGRP は単収縮張力 (Pt) をさらに大きく増強したが、百日咳トキシン (IAP) 処理筋にては CGRP 添加後の単収縮張力 (Pt) は無処理の場合と差がなかった (図8, 表3). しかし、これらの薬理的修飾物質は、強縮張力 (Po) にはいずれも変化を与えなかった (図7, 8).

VI. CGRP の筋膜の膜特性、シナプス機能に対する影響

CGRP は MEPP, EPP を指標としたシナプス機能の評価において神経・筋伝達には何ら影響を与えず、静止膜電位、刺入抵抗、直接筋刺激による活動電位と

Fig. 8. Alterations of twitch (Pt) by pharmacologic manipulations to modify CGRP effect. The CGRP-induced Pt potentiation was augmented by theophylline and cholera toxin, but was not modified by pertussis toxin (IAP). No change was seen in tetanus (Po).

その一次微分を指標とした受動的、能動的膜特性にも変化を来さなかった (図9)。よって、CGRPの筋張力増強効果は膜特性、シナプス機能の変化による二次的なものではないことがわかった。

考 察

神経伝達物質という概念が受け入れられてから久しいが、当初は一つのニューロンには一種類の神経伝達物質しか存在しないものとされてきた (Eccles ら¹²⁾。しかし、現在は一つの神経終末に古典的神経伝達物質とともに特定のニューロペプチドが存在することが明らかにされ³⁴⁾、その生理的役割、疾患における病態生理への関与が問われるようになってきている。また、神経伝達物質はシナプス後膜上の特定の受容体に結合し情報を伝えるものとされてきたが、さらにシナプス前膜上にも受容体が存在し神経伝達物質それ自身の放出を調節していることが明らかにされ⁹⁾、シナプスの機能は複雑に調節されていることがわかってきた。このような神経伝達物質における解明に加えて、近年、受容体活性化以降の情報伝達機構も次第に明らかにされるよ

うになった。すなわち、Robinsonら⁴⁰⁾によるセカンドメッセンジャーの提唱、Rodbellら⁴¹⁾によるG蛋白質の提唱である。さらに遺伝子工学の進歩は受容体蛋白質の構造解析を可能にし、その構造には、1) 一本鎖で細胞膜を7回貫通しG蛋白質とカップリングしているもの、2) 3~5量体蛋白質で各ペプチドは細胞膜を4~5回貫通し、これ自体がイオンチャンネルを形成しているもの、3) 一本、もしくは数本のペプチドからなり各ペプチドは細胞膜を一回貫通し膜の内側の部分にはチロシキナーゼ活性をもつものがあることなどが明らかにされている⁴²⁾。受容体蛋白質の多くは1)の構造を持ち、transducerとしてのG蛋白質を介しeffectorであるアデニレートシクラーゼ等のセカンドメッセンジャー生成酵素を活性化、あるいは抑制する。そして生成されたセカンドメッセンジャーが、その神経伝達物質に対する細胞の反応を引き起こすことになる。この受容体、transducer、effectorの3種類の蛋白質からなる細胞膜情報転換ユニットは多くの神経伝達物質の効果発現にかかわっている⁴³⁾。

著者はまず骨格筋上にCGRPに特異的な結合部位

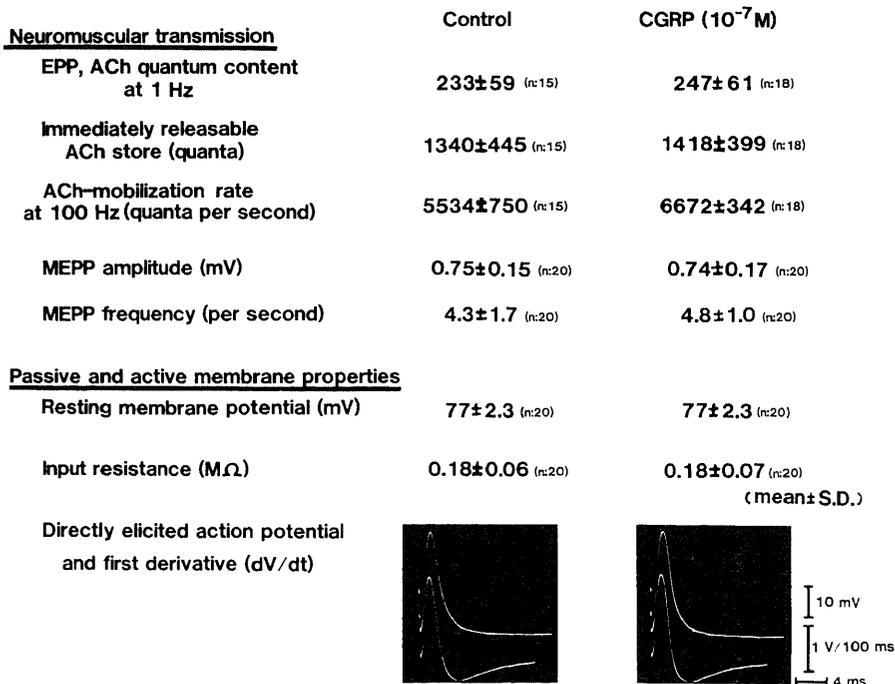


Fig. 9. Pre- and post-synaptic functions of neuromuscular transmission, and passive and active membrane properties in control and CGRP-treated muscle. Directly elicited muscle action potential and its 1st derivative (dV/dt) are shown as examples of results from 15 fibers in each muscle. Synaptic and cable properties were all unaffected by CGRP.

があるか、あるとすればどのような性質のものかを調べるため、骨格筋筋膜標本に対する CGRP の結合動態の解析を行った。骨格筋筋膜標本は Mickelson ら¹⁹⁾の方法により分離したが、この方法は多くの基礎的研究にもとづくものであり、精製物が筋膜であることについては十分に検討されている⁴⁰⁻⁴⁹⁾。その結果、筋膜上には高親和性 CGRP 特異的結合部位があることが示され(図1A)、Scatchard 解析による結合定数の $K_d = 6.3 \text{ nM}$ 、結合量の $B_{\text{max}} = 94 \text{ fmol/mg protein}$ という値(図1B)は、神経伝達物質としては妥当な値⁵⁰⁻⁵³⁾であり、他臓器における CGRP 結合実験でも同様な K_d 値をとっている⁵⁴⁾。この高親和性 CGRP 結合部位に G 蛋白質がカップリングしているかを調べるため非水解性の GTP アナログ (GTP γ S) をプローブとして使用した。G 蛋白質は α 、 β 、 γ のサブユニットから構成されており、 α は GTP (GDP) 結合部位を有し結合した GTP は GDP に水解される。通常は GDP $\cdot\alpha\cdot\beta\gamma$ の構造で受容体に結合し、受容体をリガンドに対し高親和性に保っている。 $\alpha\cdot\beta\gamma$ 3 量体に GTP γ S が結合すると、GTP γ S 結合型 α と $\beta\gamma$ に分かち、受容体から解離⁵⁵⁾、受容体はリガンドに対し低親和状態になる。 α からの GTP γ S の解離は $\beta\gamma$ によって促進されるが、 Mg^{2+} の存在下ではほとんど解離しない⁵⁶⁾。したがって、G 蛋白質とカップリングした受容体では Mg^{2+} の存在下に GTP γ S を添加するとリガンドに対する親和性が低下し、G 蛋白質とのカップリングを示すことができる。著者の実験では 25mM MgCl_2 存在下に 100 μM GTP γ S を添加すると CGRP に対する筋膜上の結合部位の親和性が著明に減少した(図2)。この事実から高親和性 CGRP 結合部位は G 蛋白質とカップリングした CGRP 受容体と考えられた。

$\alpha\cdot\text{GTP}$ または $\beta\gamma$ は、活性型 G 蛋白質として effector と結合し、その活性を制御してセカンドメッセンジャーを動かす。G 蛋白質と連関したセカンドメッセンジャーとしては cAMP^{40,42)}、cGMP⁵⁷⁾、イノシトールリン脂質代謝系^{28,58-61)} 中間体のイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (inositol 1, 4, 5-trisphosphate, IP₃) および 1,2-ジアシルグリセロール (1, 2-diacylglycerol, DG) などが知られている。ラット横隔膜を CGRP 含有灌流液にて処理すると cAMP 濃度が上昇することは Takami ら¹⁹⁾により示されているが、著者は培養骨格筋細胞を用いて、CGRP 添加後の細胞内 cAMP、cGMP 濃度を調べ、cAMP 濃度の上昇を見た(図3)。一方、cGMP については対照群と変化がなかった。これは、CGRP のセカンドメッセンジャーと

しては cAMP であることを支持する結果であった。

CGRP による受容体を介した情報伝達の結果、細胞内 cAMP 濃度の上昇をもたらす細胞内の一連の反応を引き起こすことになるが、著者はその効果を AChR 誘導と、筋収縮力に与える影響に注目しその変化を調べた。CGRP により培養骨格筋細胞表面の AChR 誘導が増加することは New ら⁹⁾、Fontaine ら⁹⁾により示されているが、著者は特にセカンドメッセンジャーとの関連に着目した。培養骨格筋細胞に CGRP を添加すると 4 時間後では対照と差がなかったが、8 時間後には AChR 誘導が有意に増加した(図3、表1)。Devreotes ら²⁹⁾によれば AChR は合成後、細胞膜上にあらわれるまで約 3 時間を要するとされており、この結果は CGRP が細胞内にあらかじめプールされている AChR の細胞表面への移行や clustering⁶²⁾ を促進させるのではなく AChR の合成を促進させていることを示すものと思われた。蛋白合成阻害剤のピュロマイシン添加⁶³⁾による CGRP 効果の消失(表1)は、この仮説を支持するものと考えられた。また、New ら⁹⁾、Fontaine ら⁹⁾により CGRP 添加によって総蛋白質合成量には変化が見られないことが示されており非特異的蛋白質合成促進による効果の一部を見ていたのではないと考えられた。次に cAMP、cGMP と CGRP の相互関係について調べた。本実験では環状ヌクレオチドが細胞膜を透過しやすくするため、dibutyryl 化合物を用いた^{64,65)}。db-cAMP は AChR 誘導を増加させ(図5、表1)、これは CGRP 添加後細胞内 cAMP が増加する(図3)ことから予想される結果であった。促進性 GTP 結合蛋白質 (Gs) の α -サブユニットを ADP-リボシル化し、GTP $\cdot\alpha_s$ を安定化させて Gs にカップリングしたアデニレートシクラーゼを活性化することが知られているコレラトキシン^{32,33)} を添加すると同様に AChR 誘導は増加した(図5、表1)。このことよりレセプター結合実験で関与が示唆された G 蛋白質は Gs^{42,43)} であると考えられた。以上の結果から筋膜には、『CGRP 受容体 \cdot Gs \cdot アデニレートシクラーゼ』という情報転換ユニットがあると考えられた。CGRP と db-cAMP もしくはコレラトキシンをともに添加しても、それぞれを単独で加えた以上の効果はなかった(図5、表1)。この理由として培養細胞は除神経された状態にあり通常でも AChR 誘導が亢進した状態であって、ある一定以上の AChR 誘導は起こらないためと考えられる。db-cGMP も AChR 誘導を増加させた(図5、表1)、CGRP 添加によつては cGMP の増加はないので、この増加は CGRP-cAMP 系とは別のシステムを介するものと考え

えられた。次に、AChR 誘導に対するイノシトールリン脂質代謝系の影響を調べた。イノシトールリン脂質代謝系はセカンドメッセンジャーの一つとして注目を集めており、ある特定の受容体の活性化に伴いホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, PIP₂) が分解され IP₃ と DG が生じ、IP₃ は小胞体などからの Ca²⁺ の遊離を促進⁵⁹⁾、DG は C キナーゼを活性化し、多種の蛋白質のリン酸化を起こし²⁸⁾⁵⁸⁾ 一定の細胞応答を引き起こす。TPA は DG と同様に C キナーゼを活性化し、A23187 は細胞外からの Ca²⁺ 流入をもたらす結果的に細胞内 Ca²⁺ 濃度を高め、イノシトールリン脂質代謝系と同じ効果をもたらすとされている²⁹⁾。TPA と A23187 は単独に培養系に添加しても、有意な反応は起こさなかったが併用することにより AChR 誘導は有意に減少した (図 5, 表 1)。これらの結果は、AChR 誘導に関して CGRP 受容体・Gs・アデニレートシクラーゼ・cAMP という一連の系および cGMP は AChR 誘導を促進し、イノシトールリン脂質代謝系は AChR 誘導抑制の方向に働くことを示すものであった。一方、CGRP は AChR 崩壊速度については影響を与えず (図 5)、AChR 誘導促進効果を持つことから、AChR の安定化をはかることによって AChR を増加させるのではなく AChR の合成速度および細胞膜上への発現を介して AChR を増加するものと考えられた。

微小電極を用いて前、後シナプス機能、筋膜の cable property を調べたが、CGRP は影響を与えず (図 8)、CGRP による筋収縮の増強は筋収縮機構に対する効果と考えられた。筋の単収縮張力を解析すると、active state intensity of shortening の増強と active state 持続時間の延長が明らかにみられた (図 6, 表 2)。active state の概念^{29)~31)} にもとづくと、CGRP が筋小胞体の Ca²⁺ ポンプを刺激し筋小胞体内の Ca²⁺ 濃度を増加させ、結果的に電気刺激に応じて過剰の Ca²⁺ が遊離され筋張力が増大することを意味する⁶⁰⁾。筋単収縮張力に対するエピネフリン効果²⁹⁾³¹⁾⁵⁶⁾⁶⁷⁾、CGRP 添加後の cAMP の増加 (図 3, Takami ら¹³⁾、また、ホスフォジエステラーゼ阻害剤のテオフィリンと CGRP の筋張力に対する相加作用 (図 7, 表 3) は、これが cAMP による効果であることを示すものと考えられた。さらに G 蛋白質に着目し、それぞれ G_s と G_i のプローブであるコレラトキシン³²⁾³³⁾ と百日咳トキシン (IAP)³⁴⁾³⁵⁾ 処理筋について検討した。コレラトキシン処理筋では CGRP の張力増強効果はさらに大きくなった (図 7, 表 3)。IAP は α_1 を

ADP-リボシル化し、受容体と $\alpha_1\beta\gamma$ の共役を阻害してアゴニストの効果を遮断するが、CGRP の張力増強効果に対しては影響を及ぼさなかった。(図 7, 表 3)。この結果は CGRP 受容体にカップリングする G 蛋白質が、少なくとも G_i では無いことを示すとともに、G_s である可能性を筋張力実験に於いても示すものであった。Takami ら¹³⁾ の筋張力に対する CGRP 効果の観察では、筋収縮段階のどのステップを介したものであるか明らかにされていないが、本研究はこの点を明らかにした上、諸薬理効果は単収縮張力解析で表現する興奮収縮連関に対してのみであり、アクチン-ミオシン架橋形成過程表現の強縮張力には何らの修飾をみないことを明らかにした。また、筋膜の脱分極反応修飾による二次的なものでないことも確認した (図 9)。

以上のことから CGRP は筋膜上の『CGRP 受容体・Gs・アデニレートシクラーゼ』という情報転換ユニットを介し、筋細胞の早い応答 (筋収縮力増強)、長時間にわたる応答 (AChR 誘導増加) をもたらしめていることがわかった。骨格筋における支配神経の役割は、単に興奮の伝達のみにとどまらず、筋の栄養因子 (trophic factor) の供給という点でも重要な意味をもっている。Pestronk ら⁶⁸⁾ は骨格筋の栄養因子としてアセチルコリンの重要性を指摘しているが、本研究の結果はそれに加え CGRP も栄養因子の一つであることを示した。骨格筋を支配する運動ニューロン、神経筋接合部、骨格筋を侵す疾患には多くのものが知られているが、その病因、病態生理については不明な点が少ない。本研究はこれらの疾患を少しでも理解していくうえで一つの新しい方向性を示したものと考えられる。

結 論

運動ニューロンにアセチルコリンと共存するニューロペプチド CGRP について、その受容体、G 蛋白質の関与、セカンドメッセンジャーに着目するとともに、AChR 代謝回転と筋収縮力を指標としその作用を検討して以下の結果を得た。

1. 筋膜上には一種類の CGRP 特異的結合部位が存在し、結合曲線を Scatchard 解析すると結合定数は Kd = 6.3 nM、結合量は Bmax = 9.4 fmol/mg protein であった。

2. GTP γ S をプローブに用い、筋膜上の CGRP 特異的結合部位に G 蛋白質がカップリングしていることを示した。

3. 培養骨格筋細胞において CGRP は細胞内

cGMP 濃度には影響を与えなかったが, cAMP 濃度を短時間のうちに上昇させた。

4. 培養骨格筋細胞において, CGRP は AChR 崩壊速度に影響を与えず, AChR 誘導速度を増加させた。この効果は, インキュベーション開始後 4 時間までは見られず 8 時間後に初めて明らかとなった。またこの効果は蛋白合成阻害剤のピロマイシン添加にて消失することより, CGRP は AChR 合成を促進しているものと考えられた。

5. セカンドメッセンジャーとしては, cAMP, cGMP 両方が AChR 誘導を促進し, イノシトールリン脂質代謝系は AChR 誘導を抑制することが示された。また, コレラトキシンも AChR 誘導を促進することから, G_s にカップリングしたアデニレートシクラーゼが存在するものと考えられた。

6. CGRP はシブナス機能の評価において, 神経・筋伝達には影響を与えなかった。

7. CGRP は筋単収縮張力を増強させ, active state intensity of shortening の増加と active state duration の延長をともなっていた。これは, 細胞内 cAMP 濃度の上昇に伴う筋小胞体への Ca^{2+} の過剰な蓄積と, その結果としておこる刺激に伴う Ca^{2+} 放出量の増加を示すものと考えられた。

8. ホスフォジエステラーゼ阻害剤のテオフィリンも筋単収縮張力を増強させ, CGRP の効果と相加的であった。また, G_s を介してアデニレートシクラーゼを活性化するコレラトキシンも CGRP の効果を増強したが, G_i に作用し受容体刺激を遮断する IAP は CGRP の効果に影響を与えなかったことより CGRP 受容体にカップリングした G 蛋白質は G_s と思われる。

以上の結果より, 筋膜には『CGRP 受容体・ G_s ・アデニレートシクラーゼ』という情報転換ユニットがあり, cAMP をセカンドメッセンジャーとして早期細胞応答(筋収縮力増強)と長期細胞応答(AChR 誘導増加)をもたらしているものと結論した。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師高守正治教授に深甚の謝意を表します。また, 本研究に際し御協力をいただきました教室員の皆様ならびに本学第一生化学教室松川茂講師に深く感謝申し上げます。

文 献

1) Eccles, J. C., Fatt, P. & Koketsu, K.: Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway

from motor-axon collaterals to motoneurons. *J. Physiol.*, **126**, 524-562 (1954).

2) Eccles, J. C.: Chemical transmission and Dale's principle. *Prog. Brain Res.*, **68**, 3-13 (1986).

3) Lundberg, J. M. & Hökfelt, T.: Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends NeuroSci.*, **6**, 325-333 (1983).

4) Hökfelt, T., Holtes, V. R., Staines, W., Meister, B., Melander, T., Schalling, M., Schultzberg, M., Freedman, J., Björklund, H., Olson, L., Lindh, B., Elfvin, L. G., Lundberg, J. M., Lindgren, J. Å., Samuelsson, B., Pernow, B., Terenius, L., Post, C., Everitt, B. & Goldstein, M.: Coexistence of neuronal messengers-an overview. *Prog. Brain Res.*, **68**, 33-70 (1986).

5) Jan, Y. N. & Jan, L. Y.: A LHRH-like peptidergic neurotransmitter capable of 'action at a distance' in autonomic ganglia. *Trends NeuroSci.*, **6**, 320-325 (1983).

6) Takami, K., Kawai, Y., Shirotsuka, S., Lee, Y., Girgis, S., Hillyard, C. J., Macintyre, I., Emson, P. C. & Tohyama, M.: Immunohistochemical evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide- and choline acetyltransferase-like immunoreactivity in neurons of the rat hypoglossal, facial and ambiguous nuclei. *Brain Res.*, **328**, 386-389 (1985).

7) Takami, K., Kawai, Y., Uchida, S., Tohyama, M., Shiotani, Y., Yoshida, H., Emson, P. C., Girgis, S., Hillyard, C. J. & MacIntyre, I.: Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse. *Neurosci. Lett.*, **60**, 227-230 (1985).

8) New, H. V. & Mudge, A. W.: Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature*, **323**, 809-811 (1986).

9) Fontaine, B., Klasfeld, A., Hökfelt, T. & Changeux, J. P.: Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes. *Neurosci. Lett.*, **71**, 59-65 (1986).

10) Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S. & Evans, R. M.: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates

- mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, **298**, 240-244 (1982).
- 11) **Rosenfeld, M. G., Mermond, J. J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., Vale, W. W. & Evans, R. M.:** Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, **304**, 129-135 (1983).
 - 12) **Fontaine, B., Klarsfeld, A. & Changeux, J. P.:** Calcitonin gene-related peptide and muscle activity regulate acetylcholine receptor α -subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. *J. Cell Biol.*, **105**, 1337-1342 (1987).
 - 13) **Takami, K., Hashimoto, K., Uchida, S., Tohyama, M. & Yoshida, H.:** Effect of calcitonin gene-related peptide on the cyclic AMP level of isolated mouse diaphragm. *Japan. J. Pharmacol.*, **42**, 345-350 (1986).
 - 14) **Mickelson, J. R. & Louis, C.:** Components of purified sarcolemma from porcine skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 112-126 (1985).
 - 15) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.:** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
 - 16) **Fischer, J. A., Sagar, S. M. & Martin, J. B.:** Characterization and regional distribution of calcitonin binding sites in the rat brain. *Life Sci.*, **29**, 663-671 (1981).
 - 17) **Henke, H., Tschopp, F. A. & Fischer, J.:** Distinct binding sites for calcitonin gene-related peptide and salmon calcitonin in rat central nervous system. *Brain Res.*, **360**, 165-171 (1985).
 - 18) **Bruns, R. F., Lawson-Wendling, K. & Pugsley, T. A.:** A rapid filtration assay for soluble receptors using polyethylenimine. *Anal. Biochem.*, **132**, 74-81 (1983).
 - 19) **Hartzell, H. C. & Fambrough, D. M.:** Acetylcholine receptor production and incorporation into membranes of developing muscle fibers. *Develop. Biol.*, **30**, 153-165 (1973).
 - 20) **Devreotes, P. N. & Fambrough, D. M.:** Acetylcholine receptor turnover in membrane of developing muscle fibers. *J. Cell Biol.*, **65**, 335-358 (1975).
 - 21) **Appel, S. H., Anwyl, R., McAdams, M. W. & Elias, S.:** Accelerated degradation of acetylcholine receptor from cultured rat myotubes with myasthenia gravis sera and globulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 2130-2134 (1977).
 - 22) **Drachman, D. B., Angus, C. W., Adams, R. M., Michelson, J. D. & Hoffman, G. J.:** Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1116-1122 (1978).
 - 23) **MacDermot, J., Higashida, H., Wilson, S. P., Matsuzawa, H., Minna, J. & Nirenberg, M.:** Adenylate cyclase and acetylcholine release regulated by separate serotonin receptors of somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 1135-1139 (1979).
 - 24) **Fambrough, D. M. & Devreotes, P. N.:** Newly synthesized acetylcholine receptors are located in the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.*, **76**, 237-244 (1978).
 - 25) **Devreotes, P. N., Card, D. J., Tepperman, K. G. & Fambrough, D. M.:** Metabolism of acetylcholine receptors in skeletal muscle, p97-110. *In* L. P. Rowland (ed.), *Pathogenesis of Human Muscular Dystrophy*. Excerpta Medica, Amsterdam, 1977.
 - 26) **Devreotes, P. N. & Fambrough, D. M.:** Turnover of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **40**, 237-251 (1976).
 - 27) **Pumplin, D. W. & Fambrough, D. M.:** Turnover of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, **44**, 319-335 (1982).
 - 28) **Nishizuka, Y.:** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, **308**, 693-698 (1984).
 - 29) **Takamori, M., Mori, K., Ide, Y. & Tsujihata, M.:** Contractile and chemosensitive properties of muscle treated with calcium ionophore A23187. *J. Neurol. Sci.*, **51**, 207-215 (1981).
 - 30) **Close, R. I.:** Dynamic properties of mammalian skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, **52**, 129-197 (1972).
 - 31) **Takamori, M., Hazama, R. & Tsujihata, M.:** Active state properties of denervated and immobilized muscle: comparison with dystrophic

muscle. *Neurology*, **28**, 603-608 (1978).

32) **Sahyoun, N. & Cuatrecasas, P.**: Mechanism of activation of adenylate cyclase by cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 3438-3442 (1975).

33) **Gill, D. M. & Meren, R.**: ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: Basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 3050-3054 (1978).

34) **Ui, M., Katada, T., Murayama, T., Kurose, H., Yajima, M., Tamura, M., Nakamura, & Nogimori, K.**: Islet-activating protein, pertussis toxin: A specific uncoupler of receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase. *In* P. Greengard, G. A. Robinson, R. Paoletti & S. Nicosia (eds.), *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*, vol. 17, p145-151, Raven Press, New York, 1984.

35) **Berridge, M. J. & Irvine, R. F.**: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**, 315-321 (1984).

36) **Yajima, M., Hosoda, K., Kanbayashi, Y., Nakamura, T., Takahashi, I. & Ui, M.**: Biological properties of islets-activating protein (IAP) purified from the culture medium of *Bordetella pertussis*. *J. Biochem.*, **83**, 305-312 (1978).

37) **Nogimori, K., Tamura, M., Yajima, M., Ito, K., Nakamura, T., Kajikawa, N., Maruyama, Y. & Ui, M.**: Dual mechanisms involved in development of diverse biological activities of islet-activating protein, pertussis toxin, as revealed by chemical modification of lysine residues in the toxin molecule. *Biochem. Biophys. Acta*, **801**, 232-243 (1984).

38) **Lambert, E. H., Lindstrom, J. M. & Lennon, V. A.**: End-plate potentials in experimental autoimmune myasthenia gravis in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **274**, 300-318 (1976).

39) **Tschopp, F. A., Henke, H., Petermann, J. B., Tobler, P. H., Janzer, R., Höpfel, T., Lundberg, J. M., Cuello, C. & Fischer, J.**: Calcitonin gene-related peptide and its binding sites in the human central nervous system and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 248-252 (1985).

40) **Robinson, G. A., Butcher, W. & Sutherland, E. W.**: Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **139**, 703-723 (1967).

41) **Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L. & Krans, H. J. K.**: The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1877-1882 (1971).

42) **堅田利明, 宇井理生**: アデニル酸シクラーゼ活性の調節. *蛋白質 核酸 酵素*, **31**, 1701-1714 (1986).

43) **宇井理生**: 情報のトランスジューサーとしての GTP 結合蛋白質. *代謝*, **25**, 205-212 (1988).

44) **Schapira, G., Dobocz, I., Piau, P. & Delain, E.**: An improved technique for preparation of skeletal muscle cell plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 348-358 (1974).

45) **Barchi, R. L., Weigle, J. B., Chalikian, D. M. & Murphy, L. E.**: Muscle surface membranes preparative methods affect apparent chemical properties and neurotoxin binding. *Biochim. Biophys. Acta*, **550**, 59-76 (1979).

46) **Seiler, S. & Fleischer, S.**: Isolation of plasma membrane vesicles from rabbit skeletal muscle and their use in ion transport studies. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13862-13871 (1982).

47) **Mitchell, R. D., Volpe, P., Palade, P. & Fleischer, S.**: Biochemical characterization, integrity, and sidedness of purified skeletal muscle triads. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9867-9877 (1983).

48) **Barchi, R. L.**: Protein components of the purified sodium channel from rat skeletal muscle sarcolemma. *J. Neurochem.*, **40**, 1377-1385 (1983).

49) **Mitchell, R. D., Palade, P. & Fleischer, S.**: Purification of morphologically intact triad structures from skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **96**, 1008-1016 (1983).

50) **Harden, T. K., Wolfe, B. B. & Molinoff, P. B.**: Binding of iodinated beta adrenergic antagonists to proteins derived from rat heart. *Mol. Pharmacol.*, **12**, 1-5 (1976).

51) **Williams, L. T., Mullikin, D. & Lefkowitz, R. J.**: Identification of α -adrenergic receptors in uterine smooth muscle membranes by [3 H] dihydroergocryptine binding. *J. Biol. Chem.*, **251**, 6915-6923 (1976).

52) **U'Prichard, D. C. & Snyder, S. H.**: Binding

- of ^3H -catecholamines to α -noradrenergic receptor sites in calf brain. *J. Biol. Chem.*, **252**, 6450-6463 (1977).
- 53) Taylor, D. P. & Pert, C. B.: Vasoactive intestinal polypeptide: specific binding to rat brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 660-664 (1979).
- 54) Nakamatsu, H., Fukuda, Y., Koida, M., Fujii, N., Otaka, A., Funakoshi, S., Yajima, H., Mitsuyasu, N. & Orłowski, R. C.: Binding sites of calcitonin gene-related peptide (CGRP): Abundant occurrence in visceral organs. *Japan. J. Pharmacol.*, **42**, 175-180 (1986).
- 55) Ferguson, K. M., Higashijima, T., Smigel, M. D. & Gilman, A. G.: The influence of bound GDP on the kinetics of guanine nucleotide binding to G proteins. *J. Biol. Chem.*, **261**, 7393-7399 (1986).
- 56) Higashijima, T., Ferguson, K. M., Sternweis, P. C., Smigel, M. D. & Gilman, A. G.: Effects of Mg^{2+} and the $\beta\gamma$ -subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J. Biol. Chem.*, **262**, 762-766 (1987).
- 57) 中根正樹, 出口武夫: 情報伝達系としての cGMP の役割. *蛋白質 核酸 酵素*, **31**, 1715-1727 (1986).
- 58) Nishizuka, Y.: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, **233**, 305-312 (1986).
- 59) Bansal, V. S., Inhorn, R. C. & Majerus, P. W.: The metabolism of inositol 1, 3, 4-trisphosphate to inositol 1, 3-bisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9444-9447 (1987).
- 60) 岡島史和: GTP 結合蛋白質とイノシトールリン脂質代謝. *代謝*, **25**, 237-248 (1988).
- 61) 竹縄忠臣: 受容体活性化とイノシトールリン脂質. *生化学*, **57**, 1-19 (1985).
- 62) Ping, H. B.: Elimination of preexistent acetylcholine receptor clusters induced by the formation of new clusters in the absence of nerve. *J. Neurosci.*, **6**, 581-589 (1986).
- 63) Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A. & Weiner, A. M.: *Molecular Biology of the Gene*, 4th ed., p417-418, Benjamin/Cummings, California, 1987.
- 64) Kentera, D. & Varagic, V. M.: The effects of cyclic N-2-O-dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate, adrenaline and aminophylline on the isometric contractility of the isolated hemidiaphragm of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **54**, 375-381 (1975).
- 65) Blosser, J. C. & Appel, S. H.: Regulation of acetylcholine receptor by cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1235-1238 (1980).
- 66) Gonzalez-Serratos, H., Hill, L. & Valle-Aguilera, R.: Effects of catecholamines and cyclic AMP on excitation-contraction coupling in isolated skeletal muscle fibers of the frog. *J. Physiol.*, **315**, 267-282 (1981).
- 67) Bowman, W. C. & Nott, M. W.: Effects of catecholamines, cyclic nucleotides and phosphodiesterase inhibitors on contractions of skeletal muscles in anaesthetized cats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **1**, 309-323 (1974).
- 68) Pestronk, A., Drachman, D. B., Stanley, E. F., Price, D. L. & Griffin, J. W.: Cholinergic transmission regulates extrajunctional acetylcholine receptors. *Exp. Neurol.*, **70**, 690-696 (1980).

Physiological and Biochemical Actions of Calcitonin Gene-related Peptide in Mammalian Skeletal Muscle with Special Attention to Acetylcholine Receptor Incorporation to Cell Membrane and Excitation-contraction Coupling Hiroaki Yoshikawa, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 19—34 (1989)

Key words Calcitonin gene-related peptide, GTP-binding proteins, second messengers, acetylcholine receptor, muscle contraction

Abstract

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a neuropeptide which coexists with acetylcholine (ACh) in the motor nerve terminal. The presence of CGRP specific binding sites on the purified skeletal muscle cell membrane were confirmed by displacement analysis with [¹²⁵I]-CGRP. From Scatchard analysis of receptor binding, a binding constant, $K_d=6.3$ nM and binding numbers, $B_{max}=94$ fmol/mg protein were obtained. The affinity of CGRP to the specific binding sites was significantly decreased by addition of guanosine-5'-[γ -thio] triphosphate (GTP γ S) in the presence of $MgCl_2$. To clarify the second messenger of CGRP, primary cultures of rat myotubes were examined, resulting in the CGRP-induced increase of intracellular cAMP by 2.9-folds versus controls; however, intracellular cGMP was not altered by CGRP. The physiological effect of CGRP on AChR turnover and muscle contraction were studied. Addition of CGRP into the culture medium accelerated insertion of AChR into the cultured rat myotube membrane by 1.3-fold. Addition of dibutyl cAMP as well as cholera toxin also increased insertion of AChR into the cell membrane. CGRP is therefore believed to stimulate G_s (G protein that stimulates adenylate cyclase) and activate adenylate cyclase via its specific receptor. Addition of puromycin, an inhibitor of protein synthesis, to the culture medium prevented the effect of CGRP on AChR insertion into the cell membrane, suggesting that CGRP increased insertion of AChR by inducing AChR synthesis. Increased insertion of AChR by addition of cGMP to the culture medium suggests the existence of another pathway that increases AChR insertion. Addition of 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and Ca^{2+} ionophore A23187 decreased the insertion of AChR to the cell membrane. This result suggests that enhancement of inositol lipid metabolism decreases AChR insertion into the cell membrane. In curarized rat skeletal muscle, CGRP increased the isometric twitch force, accompanied by an increase in the active state intensity of shortening, prolonged duration of the active state and additive effect of a phosphodiesterase inhibitor; the results reflect a potentiation in the sarcoplasmic calcium transport system. This CGRP effect was enhanced by cholera toxin, suggesting the activator of G_s in this signal transduction. The pertussis toxin (IAP), a factor to prevent the cAMP decrease by inactivating G_i (G protein that inhibits adenylate cyclase), gave no effect on the action of CGRP. CGRP did not modify the neuromuscular transmission and cable properties of the muscle membrane. These results clarified the existence of signal transduction system on the cell membrane, composed from CGRP receptor, G_s and adenylate cyclase. CGRP enhances muscle contractility and AChR insertion into the cell membrane via this system.