

Inositol 1,4,5-Trisphosphate Formation and Oscillation of Cytosolic Free Ca²⁺ Concentration in NL308 Neuroblastoma x Fibroblast Hybrid Cells Expressing Muscarinic Acetylcholine Receptor

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/2297/8547

ムスカリン性受容体を発現する NL308 細胞における アセチルコリンによるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸の 生成および細胞内 Ca^{2+} オシレーション

金沢大学医学部眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

石坂 伸 人

m1, m2, m3 および m4 の四種類のムスカリン性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) を発現させた NL308 細胞 (神経芽細胞腫と線維芽細胞腫との雑種細胞) において細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を測定し, mAChR サブタイプ特異的な細胞内情報伝達機構について研究した. 四種のトランスフォーマントすべてにおいて $100\mu M$ アセチルコリン (acetylcholine, ACh) 投与によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した. m1/m3 トランスフォーマントでみられた $[Ca^{2+}]_i$ 上昇率は, m2/m4 トランスフォーマントでみられた $[Ca^{2+}]_i$ 上昇率よりもかなり高かった. m2/m4 トランスフォーマントでは洞性 (シヌソイダル) $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションが観察された. 細胞内 Ca^{2+} キレート剤である 1, 2-ビス (2-アミノフェノキシ) エタン-N, N', N'-四酢酸-アセトキシメチル処理によって ACh 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制された. 過剰のエチレンジグリコールビス (β -アミノエチルエーテル) N, N', N'-四酢酸 (ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA) により細胞外液の Ca^{2+} をキレートすることによって, 急峻な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は何ら影響されなかったのに対し, m1/m3 トランスフォーマントでみられたプラトー相は消失した. m2/m4 トランスフォーマントでは Ca^{2+} チャンネルブロッカーによっても $[Ca^{2+}]_i$ オシレーション周波数のわずかの低下を認めたのみだったので, $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションの起源は細胞内に求められることが判明した. ACh 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇およびイノシトール 1, 4, 5-三リン酸の生成は, m2/m4 トランスフォーマントにおいて $10ng/ml$ の百日咳毒素12時間処理で完全に抑制されたのに対し, m1/m3 トランスフォーマントでは影響されなかった. m2/m4 トランスフォーマントにおいてはカフェイン, リアノジンの細胞外投与またはサイクリック・アデノシン・ジスホスフェート-リボースの細胞内投与によって $[Ca^{2+}]_i$ は一時的に上昇した. リアノジン処理後の m2/m4 トランスフォーマントでは ACh 投与による $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションは観察されなかった. 以上の結果から, mAChR はそのセカンドメッセンジャーとして Ca^{2+} を用いており, m1/m3 および m2/m4 mAChR のサブタイプ間では異なった細胞内情報伝達経路を介していると推論された. また, m2/m4 mAChR で認められた $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションの機構には Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出の関与が示唆された.

Key words muscarinic acetylcholine receptor, NL308 cell, G-protein, Inositol 1, 4, 5-trisphosphate, Ca^{2+} oscillation

神経終末から放出されるアセチルコリン (acetylcholine, ACh) は, ニコチン性とムスカリン性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) に結合し, 信号が伝達される. mAChR を ACh で刺激すると, 異なったタイプの細胞に対し様々な膜イオンコンダクタンスの変化をもたらす¹⁾. mAChR を介する情報伝達は, 1914年 Dale により記述されるという古い歴史を持つにもかかわらず, その機構はニコチン性のそれに比較して, 充分には判明していない. その理由は, mAChR は薬理的に分類される三種類のサブタイプが存在するうえ, グアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate, GTP) 結合蛋白質を介する酵素反応によることにある²⁻⁵⁾. しかし五種類の mAChR の DNA が得られた⁶⁾ ことから, 異所性に発現させた純粋な mAChR の集団による研究が進み, 各

mAChR からの信号伝達様式がしだいに明らかになりつつある.

mAChR のサブタイプは, 脳や心臓の細胞や膜標品を使って薬理的に研究する場合には M1, M2, M3 のサブタイプに分類されている. それは, mAChR に対するアンタゴニストであるピレンゼピンが Hammer ら⁶⁾ によって発見されたことに依存している. ピレンゼピンに対し M1 は高親和性を示し, M2 は低親和性を示す. M2 は別のアンタゴニストである AFDX-116 に対する親和性の差でさらに分類され, 高親和性で主に心筋に存在する M2 心臓型と低親和性で分泌細胞に存在する M2 腺型 (もしくは M3) に細分類される.

ブタ大脳より精製された mAChR 蛋白質のトリプシンによる部分分解によって得られたペプチドの部分アミノ酸配列から

平成5年12月17日受付, 平成6年2月24日受理

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AM, acetoxymethyl; BAPTA-AM, 1, 2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N', N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular Ca^{2+} concentration; cADPR, cyclic adenosine diphosphateribose; CICR, Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; EGTA,

予想されたオリゴヌクレオチドが1986年に合成され、ブタ脳に存在する mAChR の核酸一次配列およびそれから推測されるアミノ酸配列が Kubo ら¹⁸⁾により明らかにされた。1987年には Bonner ら⁹⁾や Peralta ら¹⁰⁾により、まず m2 がクロスハイブリダイズ法により同定され、ハイブリダイゼーションの条件を弱めることによって、さらに三種以上の別の mAChR 遺伝子が同定された。その後、Bonner ら¹¹⁾はラットから、また Ashkenazi ら¹²⁾はヒト cDNA ライブラリーから mAChR をクローニングすることに成功し、mAChR に五種類の遺伝子上のサブタイプが存在することが明らかにされた。1989年には mAChR のサブタイプは、遺伝子構造およびそれに基づくサブタイプの蛋白質をさす場合には m1, m2, m3, m4, m5, 薬理学的分類によるサブタイプを意味する場合には M1, M2, M3 と呼称されることとなった。

mAChR の m1, m3, m5 のサブタイプは、百日咳毒 (*Pertussis toxin*, PTx) 非感受性の GTP 結合蛋白質を介する経路によりホスホイノシチド-特異的ホスホリパーゼ C 酵素 (phosphoinositid-specific phospholipase C, PLC) (おそらくその $\beta 1$ アイソザイム) を活性化する^{31)~20)}。その結果増加するイノシトール 1,4,5-三リン酸 (inositol (1,4,5)-trisphosphate, Ins (1,4,5) P_3) は、細胞内遊離カルシウム濃度 (intracellular Ca^{2+} concentration, $[Ca^{2+}]_i$) の上昇を引き起こす。この現象は卵母細胞においては Ca^{2+} 依存性 Cl^- 電流を発生し⁷⁾²¹⁾²²⁾、線維芽細胞²³⁾、上皮細胞²⁴⁾ および神経芽細胞腫雑種細胞¹³⁾²⁵⁾²⁶⁾ においては、主に Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流の反応として外向き電流を生じる。

m2 および m4 の mAChR サブタイプは GTP 結合蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼ活性と電位依存性 Ca^{2+} 電流を抑

制する。これらの反応は PTx によって阻害される¹³⁾²⁷⁾²⁸⁾。ところで生体内では心臓の細胞や様々な神経細胞において、M2 mAChR によって薬理的に K^+ 電流の増加がもたらされるといふ事実にもかかわらず、線維芽細胞や神経芽細胞腫に mAChR をトランスフェクションした細胞を用いて構成された実験系において、m2 mAChR が K^+ 電流を活性化するという報告が、遺伝子がクローニングされた直後の研究で無かったことは驚きに値する。m2 mAChR が培養腫瘍分泌細胞において K^+ 電流を増加するという報告²⁹⁾や、弱いながらも Ca^{2+} 依存性 Cl^- 電流を活性化するという卵母細胞での報告¹⁷⁾があるのみである。したがって、卵母細胞においては m2 mAChR と、m1 および m3 mAChR とでその効果発現の点において、なんらかのクロストークが存在することは明らかである。m2 mAChR 刺激により $[Ca^{2+}]_i$ 上昇も生じることが予測できるが、その時間的、空間的な性質は m3 mAChR により誘発される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とは異なっていると考えられる²²⁾²⁹⁾。そのようなクロストークは線維芽細胞、上皮細胞および筆者の属するグループが以前研究した神経芽細胞腫と神経膠腫との雑種細胞においては観察されていなかった¹³⁾²³⁾²⁴⁾³⁰⁾。

しかし最近筆者らは、m2 もしくは m4 mAChR を発現させた神経芽細胞腫と線維芽細胞腫との雑種細胞である NL308 細胞において、オンレーションを伴う外向き電流がしばしば観察され、この外向き電流が m1 もしくは m3 mAChR を発現させた NL308 細胞とは異なる経路を経て Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルが活性化されることによることを報告した²⁵⁾。そこでこの細胞系が、生体内で観察される m2 mAChR から K^+ チャンネルへの細胞内情報伝達の種々の機構の一つを再現していると考え、m2 mAChR に関する詳しい情報伝達機構を分析することを思いついた。

本研究においては、m2 および m4 mAChR を発現させた NL308 細胞において外向き電流を発生させる機構とともに、その外向き電流に伴うオンレーションの起源について、主に細胞内 Ca^{2+} を測定することにより検討した。

材料および方法

I. 材料

本研究において用いた細胞は、m1-m4 各サブタイプの mAChR をコードする cDNAs をトランスフェクションした培養神経細胞 NL308 (マウス神経芽細胞腫 (N18TG-2) とマウス線維芽細胞腫 (B-82) との雑種細胞) である³¹⁾。

mAChR 遺伝子のトランスフェクションには、哺乳動物細胞発現ベクターとして pkNHneo を用いた。このベクターは pBR322 と pBR327 を骨格にもち、クローニング部位の上流に SV40 の初期プロモーター、下流にポリアデニレーションの情報を含む β -グロビン遺伝子の一部が挿入されている。また形質転換細胞を選択できるように、ネオマイシン (G418) 耐性遺伝子が組み込まれている¹³⁾³²⁾ (図1)。

m1~m4 サブタイプに特異的なプローブを用いて、各サブタイプの mAChR をコードする cDNA をトランスフェクションした細胞に対しノーザンブロット・ハイブリダイゼーションを

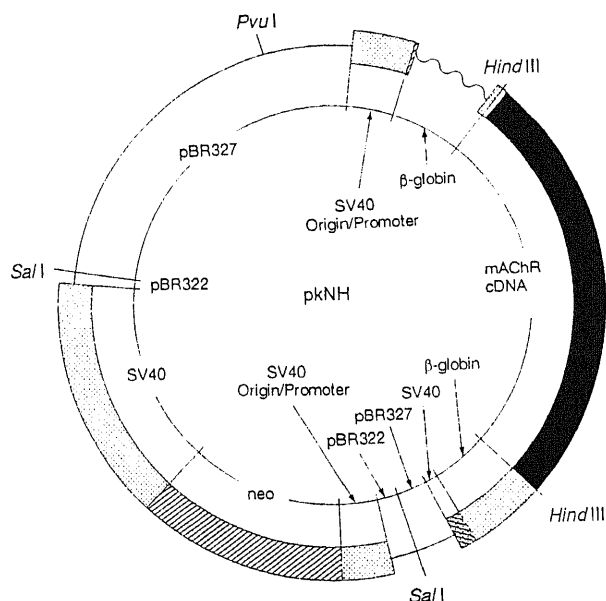


Fig. 1. Recombinant plasmid, pkNH for expression of the cloned mAChR genes in NL308 neuroblastoma x fibroblast hybrid cells.

ethylene glycol-bis (β -amino-ethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid; GTP, guanosine triphosphate; Ins (1,4,5) P_3 , inositol 1,4,5-trisphosphate; mAChR, muscarinic acetylcholin receptor; PLC, phosphoinositid-specific phospholipase C; PTx, *Pertussis toxin*; QNB, quinuclidinyl benzilate.

施行し、トランスフォーミングされたクローンが実際に m1~m4 サブタイプに一致する RNA を発現していることを確認した。トランスフェクションを行っていない細胞で、低いレベルではあるが m4 に特異的なプローブにのみハイブリダイズする RNA 種が認められ、NL308 細胞は内在的に m4 が存在することがわかった。しかし他の三種のサブタイプ特異的のプローブに対する RNA 種は認められなかった。また、実験に用いた細胞には、 $[^3\text{H}]$ キヌクリジニルベンジレート (quinclidinyl benzilate, QNB) 結合実験により、トランスフェクションしていない細胞が示した結合量よりも十分に多い $[^3\text{H}]$ QNB 結合量を示す細胞、すなわち mAChR 蛋白質を発現している細胞を選んだ (表 1)。

5% ウシ胎児血清 (Gibco, New York, USA) を含有するダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM, Gibco) にて、37°C, CO_2 濃度 10% の濃度下で細胞培養した。雑種細胞とその親株との混濁を防ぐ目的で培地にはさらに、100 μM ヒポキサンチン (hypoxanthine), 0.1 μM アミノプテリン (aminopterin) および 0.1 μM チミジン (thymidine) (HAT) も含まれている³⁹。細胞内 Ca^{2+} 濃度測定および電気生理学的測定に際し、ポリオルニチン (polyornithine) でコートした培養皿にて、1% ウシ胎児血清および 0.2mM ジブチリル (dybutyryl) cAMP を含んだ DMEM で細胞を 4~10 日分化誘導した³⁰。

II. 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

カバーガラス上で分化させた NL308 細胞を培養し、その細胞に Fura-2 を取り込ませ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。細胞は 10 μM の Fura-2-アセトキシメチル・エステル (acetoxymethyl, AM) を含む培地で 37°C にて 60 分間インキュベーター内に静置し、色素の脱エステル化を行う目的で、さらに 20 分間室温でインキュベーションを行った。このように前処置を施した NL308 細胞をのせたカバーガラスを倒立顕微鏡 OSP-3 (オリンパス, 東京) に固定した^{30,39}。

蛍光像は紫外線照射下で高感度撮像管 (silicon-intensified target, SIT) ビデオカメラ 2400-08 (浜松フォトニクス, 浜松) を用いて撮影した。蛍光輝度は 340nm および 380nm の二波長の励起光でモニターした。蛍光像は光ディスク ME-5U1 (三菱電機, 東京) 上に保存し、画像解析装置 Argus-50 (浜松フォトニクス) にて解析した。細胞内 Ca^{2+} の蛍光比から $[\text{Ca}^{2+}]$ 絶対値への変換法は前報に従った³⁰。

また、ACh による刺激には、HEPES DMEM 溶液で 100 μM になるよう調整した ACh 溶液 500 μl を記録用溶液に加

え、最終濃度が 50 μM となるようにした。

III. サイクリック・アデノシン・ジスホスフェイトリボース (cyclic adenosine disphosphate-ribose, cADPR) の細胞内注入

cADPR を細胞内注入液に溶解した。細胞内注入液は 150mM KCl, 1mM MgCl_2 , 1mM Na_2ATP , 10mM HEPES および 0.1mM Fura-2 よりなり、その pH を NaOH にて 7.2 に滴定した。先端径を 2 μm に調整した微小ガラス電極 Glass IBBL (World Precision Instruments, New Haven, USA) に細胞内注入液を満たし、NL308 細胞の細胞膜にホールセルモードのバッチクランプ法を施行した³⁰。cADPR の注入は、電極内に陰圧をかけバッチ膜を破った後、微小ガラス電極を通してインフュージョンにより行われた³⁰。

IV. 放射線 $\text{Ins} (1, 4, 5) \text{P}_3$ 結合実験

$\text{Ins} (1, 4, 5) \text{P}_3$ の測定は従来の方法^{30,40}に従った。mAChR を発現させた NL308 細胞をエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethilene diamine tetraacetic acid, EDTA) を加えた Dulbecco リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS (-)) にて培養用フラスコ壁より遊離させ、続いて溶媒 500 μl 当り細胞密度が $5.0 \times 10^6/\text{ml}$ になるように 10mM LiCl を含んだ DMEM にて再浮遊し、37°C にて 10 分間インキュベーションを行った。その後、100倍量の濃度となる ACh を添加し反応を開始し、20% 過塩素酸 80 μl を加えることによって反応を停止した。被検試量を 10N KOH によって pH7.5 に滴定し、滴定された被検試量を遠心することによって KClO_4 を沈殿させ、上清を $\text{Ins} (1, 4, 5) \text{P}_3$ 結合実験に用いた。1, 4, 5-アイソマーを特異的に認める $[^3\text{H}]$ イノシトール 1,4,5-三リン酸アッセイシステム (アマシャム・ジャパン, 東京) を用いることによって $\text{Ins} (1, 4, 5) \text{P}_3$ 量を測定した。

V. 薬品・機器名

実験に用いた薬品・機器類は下記より得た。アセチルコリン (第一製薬, 東京), Fura-2, Fura-2-AM および 1, 2, -ビス (2-アミノフェノキシ) エタン-N, N, N', N'-四酢酸-アセトキシメチル [1, 2, -bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl, BAPTA-AM] (同仁化学, 熊本および Molecular Probes Inc., Eugene, USA), 百日咳毒素 (フナコシ, 東京), 塩化ニッケル, カフェインおよびリアノジン (和光純薬, 大阪), cADPR (アマシャム・ジャパン), 塩化ランタン (ナカライ, 東京), 倒立顕微鏡 OSP-3 (オリンパス, 東京), SIT ビデオカメラ 2400-08 および画像解析装置 (浜松フォトニクス), 光ディスク ME-5U1 (三菱電機, 東京)。

Table 1. Properties of NL308 neuroblastoma x fibroblast clones transfected with DNA coding for m1, m2, m3 and m4 muscarinic acetylcholine receptors (mAChR)

Clone	Subtype of mAChR gene	Binding of ^3H -QNB ^{b)}
Control (non-transfected)	[m4]	n. d.
NLPM1-13	m1 (pig) ^{a)}	3645 \pm 472
NLPM2-301	m2 (pig)	810 \pm 146
NLPM3-16	m3 (pig)	1047 \pm 170
NLRM4-10	m4 (rat)	433 \pm 71

a) Source of gene.

b) Values are mean \pm s. e. m., n=6 fmoles per milligram protein.
n. d., not detectable.

成績

I. ACh 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇

四種の mAChR をそれぞれ独立に発現している NL308 細胞 (神経芽細胞腫と線維芽細胞腫との雑種細胞) に ACh を添加し、それぞれ異なる mAChR サブタイプを活性化することによって生じる $[Ca^{2+}]_i$ 変化を Fura-2 よりの蛍光量として測定した。最終濃度が $50\mu M$ となる ACh の投与により、四種の mAChR をそれぞれ発現させたすべてのトランスフォーマントで $[Ca^{2+}]_i$ が即座に上昇した。図 2 に ACh により引き起こされた Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流および $[Ca^{2+}]_i$ の時間的経過を示す。 $[Ca^{2+}]_i$ の基線は $50\sim 100nM$ のレベルであり、ACh 投与による $[Ca^{2+}]_i$ はそれより $100\sim 350nM$ 高いレベルに達した。m1, m2,

m3 および m4 をそれぞれ発現させた細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 基線レベル、ACh 投与後の $[Ca^{2+}]_i$ 最大値および $[Ca^{2+}]_i$ 上昇幅の平均値±標準誤差を表 2 に示す。m2 および m4 トランスフォーマント (NLPM2-301 および NLRM4-10) における ACh 投与後の平均 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇率は m1 トランスフォーマント (NLPM1-13) に対しそれぞれ 57 および 45% であり、m3 トランスフォーマント (NLPM3-16) に対してはそれぞれ 59 および 47% であった (図 3 A)。m2/m4 トランスフォーマントで観察された $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、m1/m3 トランスフォーマントでみられたそれらに比しかなり低かった ($P < 0.05$)。

m2 および m4 mAChR を発現させた細胞において $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はオシレーションを伴って生じ (図 4 B), それは m2/m4 トランスフォーマント NL308 細胞の 90% 以上で認められた。そ

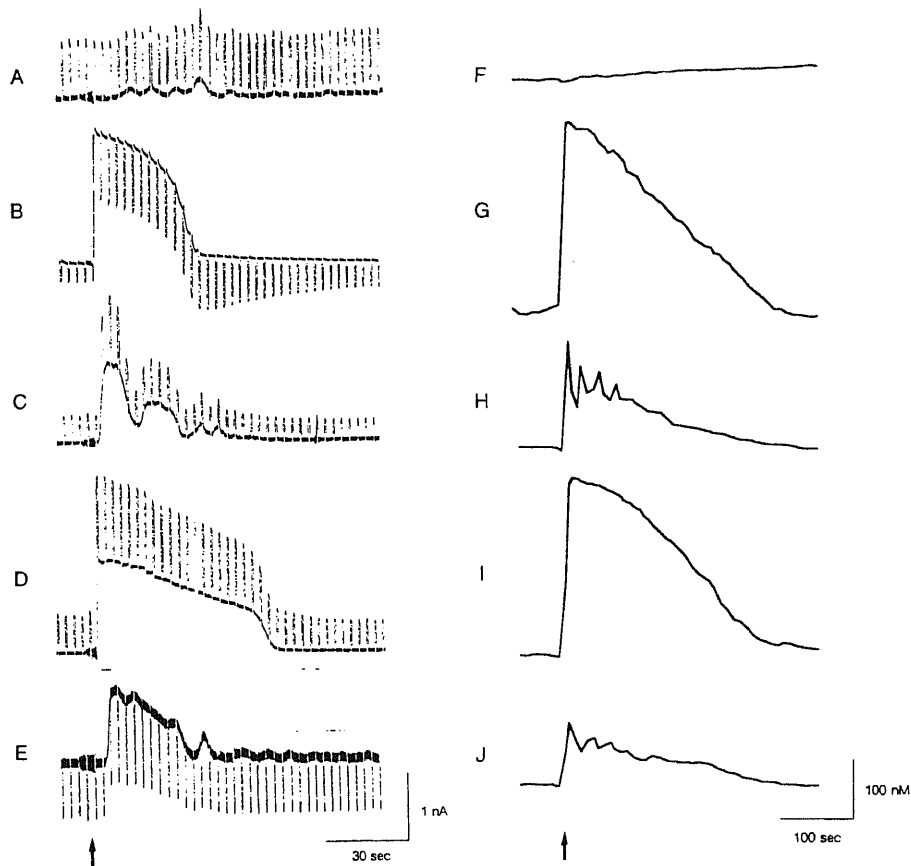


Fig. 2. Acetylcholine (ACh)-induced current (A~E) and $[Ca^{2+}]_i$ increase (F~J) in a non-transfected NL308 cell (A, F), and in m1 (B, G)-, m2 (C, H)-, m3 (D, I)- and m4 (E, J)-transformed NL308 cells. Arrows show the application time of ACh.

Table 2. The average $[Ca^{2+}]_i$ increase in m1, m2, m3 and m4-transformed NL308 cells

Clone	Subtype of mAChR gene	Number of experiments	Intracellular Ca^{2+} concentration (nM)		
			Base	Peak	$\Delta[Ca^{2+}]_i$
NLPM1-13	m1	20	83.1 ± 4.5	409.3 ± 56.1	326.2 ± 53.5
NLPM2-301	m2	20	88.2 ± 3.2	231.0 ± 16.0	142.8 ± 16.1
NLPM3-16	m3	20	92.4 ± 33.7	393.8 ± 33.7	301.5 ± 32.7
NLRM4-10	m4	20	72.8 ± 3.5	184.5 ± 8.3	111.8 ± 8.5

Values are mean \pm s. e. m.

のオシレーションは通常シヌソイダルタイプであり、その周波数は $0.040 \pm 0.002 \text{ Hz}$ (平均値 \pm 標準誤差) であった ($n=15$)。m2 および m4 を発現させた細胞では低濃度の ACh 刺激に対しても同様のオシレーションが観察された。加えて、m1 および m3 を発現させた細胞でも低濃度 ACh 刺激時には、同様のオシレーションが観察される場合があった。従って、オシレーションは、完全に受容体サブタイプ特異的というわけではなく、NL308 細胞特異的な可能性が示唆される。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、ACh 投与後 300~350 秒で基線レベルに戻り (図 2)、これは四種の mAChR を発現させたそれぞれの細胞で同様であった。また、濃度-反応曲線から観察されるように、m1/m3 トランスフォーマントでは濃度依存的に $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加したのに対し、m2/m4 トランスフォーマントでは 150nM 程度で $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i$ はほぼ飽和に達し、その後プラトー相を形成した (図 3 B)。

ACh による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が細胞のどの部位に生じているかを知る目的で、疑似カラー表示された画像を用いて空間的特性の解析を試みた。ACh に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の大部分は細胞体において引き起こされ、細胞突起が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に果たす役割は少ないことが認められた。NG108-15 雑種細胞におけるブラジキニンに対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇³⁰と同様に、NL308 細胞において認められる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は細胞の深部からまず発せられることが観察された。m2/m4 トランスフォーマントで認められた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ オシレーションは細胞全体で観察され、その部位局在は認められなかった (図 4)。そこで、 Ca^{2+} 貯蔵部位は細胞質全体にほぼ均等に分布していると推測される。

II. ACh により引き起こされる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対する BAPTA, EGTA および Ca^{2+} チャンネルブロッカーの影響

m2 および m3 mAChR を発現させた細胞において ACh により引き起こされる外向き電流はカルシウムキレーターであり細胞膜透過性を持つ BAPTA-AM 処理にて、細胞内 Ca^{2+} をキレートすることにより完全に抑制されることを我々は報

告²⁰したが、今回 10 μM BAPTA-AM で 60分間処理した細胞において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定を行った。m1, m2, m3 および m4 をそれぞれ発現させた細胞において ACh 投与による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は 10 μM BAPTA-AM によってほとんどもしくは完全に抑制された (図 5)。これらの結果から、四種の mAChR サブタイプを発現させた NL308 細胞において認められた ACh 誘発性の外向き電流や m2/m4 mAChR でみられる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ オシレーションもすべて細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に伴い引き起こされることが明らかとなった。

ACh により惹起される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を生じる Ca^{2+} の起源 (細胞外からの流入による Ca^{2+} によるか、もしくは細胞内貯蔵部位から放出された Ca^{2+} によるか) を検討するために、細胞膜を通しての Ca^{2+} 流入を阻害する条件下で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定した。

5mM エチレンジグリコールビス (β -アミノ-エチルエーテル) N, N, N', N'-四酢酸 (ethylene glycol-bis (β -amino-ethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA) により細胞外 Ca^{2+} をキレートすることによって、サブタイプに特異的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の変化がみられた。m1 を発現させた細胞では、最高濃度はほとんど減じなかったのに対し、プラトー相がかなり消失した (図 5) ($n=8$)。興味深いことに、m2 および m4 を発現させた細胞では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対する EGTA の影響はわずかであったが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ オシレーションの周波数は減少した (図 5) (それぞれ $n=8$ および 6)。m3 を発現させた細胞においては、EGTA 処理により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇には特記すべき変化は認められなかった (図 5)。

これらの結果から、四種のいずれのサブタイプを発現させた細胞においても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇における最初の最大値を示す時の Ca^{2+} 起源は細胞内に求められる。また、m2, m3 および m4 を発現させた細胞では、プラトー相が EGTA によりほとんど影響を受けなかったこと (図 5) から、その相の Ca^{2+} においても細胞内に起源を求めることができる。唯一の例外は m1 を発現させた細胞であり、そこに認められる二相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇において、そのプラトー相は細胞外 Ca^{2+} の流入によると考えられ

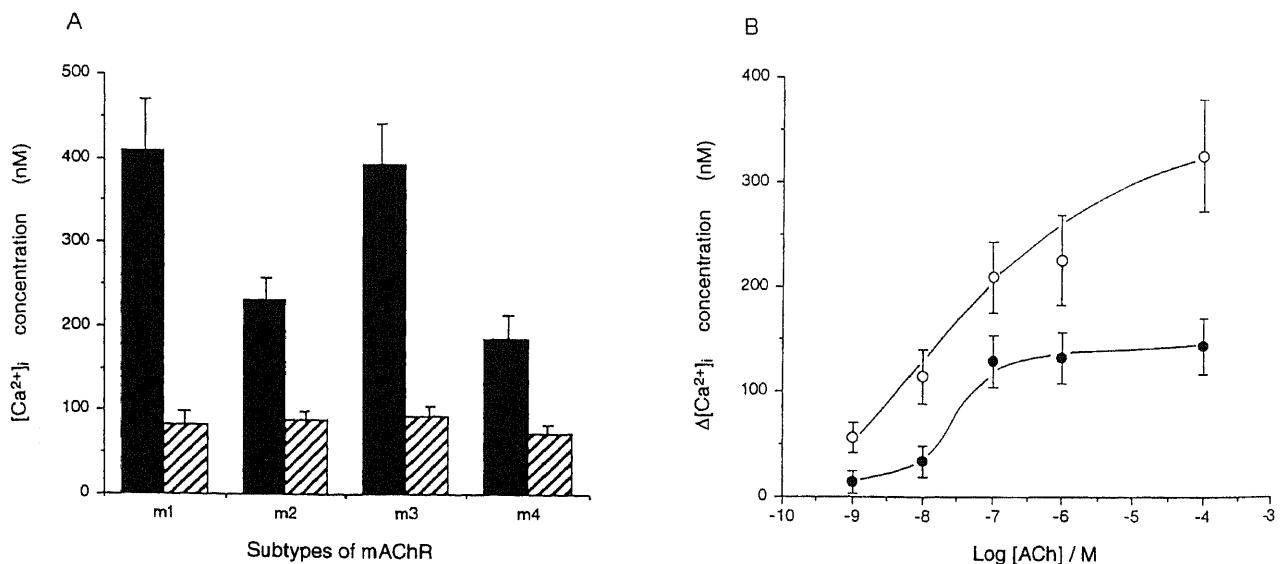


Fig. 3. ACh-induced increase in intracellular free Ca^{2+} . A) The average $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at peak level (closed bars) and basal level (striped bars) in m1-, m2-, m3- and m4 transformed cells. B) Dose-response curve for the ACh-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in m1-(○) and m2-(●) transformed cells. Error bars show the s.e.m.

る。

m2 を発現させた細胞における Ca^{2+} の細胞外からの流入をより詳細に検討するために、L-タイプの電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤であるニフェジピン (nifedipine) (1~100 μ M)、塩化ランタン ($LaCl_3$)⁽¹⁾⁽²⁾ (10~100 μ M) およびアゴニスト誘発性の Ca^{2+} の流入および T-タイプの Ca^{2+} チャンネルに阻害剤として作用する塩化ニッケル ($NiCl_2$)⁽²⁾ (1~10mM) を種々の濃度で作用させた。ACh による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、10 μ M ニフェジピンによって影響されず、100 μ M $LaCl_3$ によってもほとんど変化しなかったが、5mM $NiCl_2$ では減少した (図 6)。これらの成績から

次の二点の可能性が示唆される。第一点は、この細胞が T-タイプの電位依存性チャンネルを介する経路を持っているということであり、第二点は、この細胞がまだ明白ではないが Ca^{2+} 流入の経路を有するという可能性である。m2 を発現させた細胞において、低い閾値電位で一時的な内向き電流が引き起こされることは極めてまれであり、このことから考えられるのは、ACh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ についても受容体制御の Ca^{2+} 流入機構を介しての Ca^{2+} 流入による可能性が高いと考えられる。

以上より、細胞外からの流入による Ca^{2+} の動員の有無が、サブタイプ特異的な所見として観察されたわけであるが、 $[Ca^{2+}]_i$

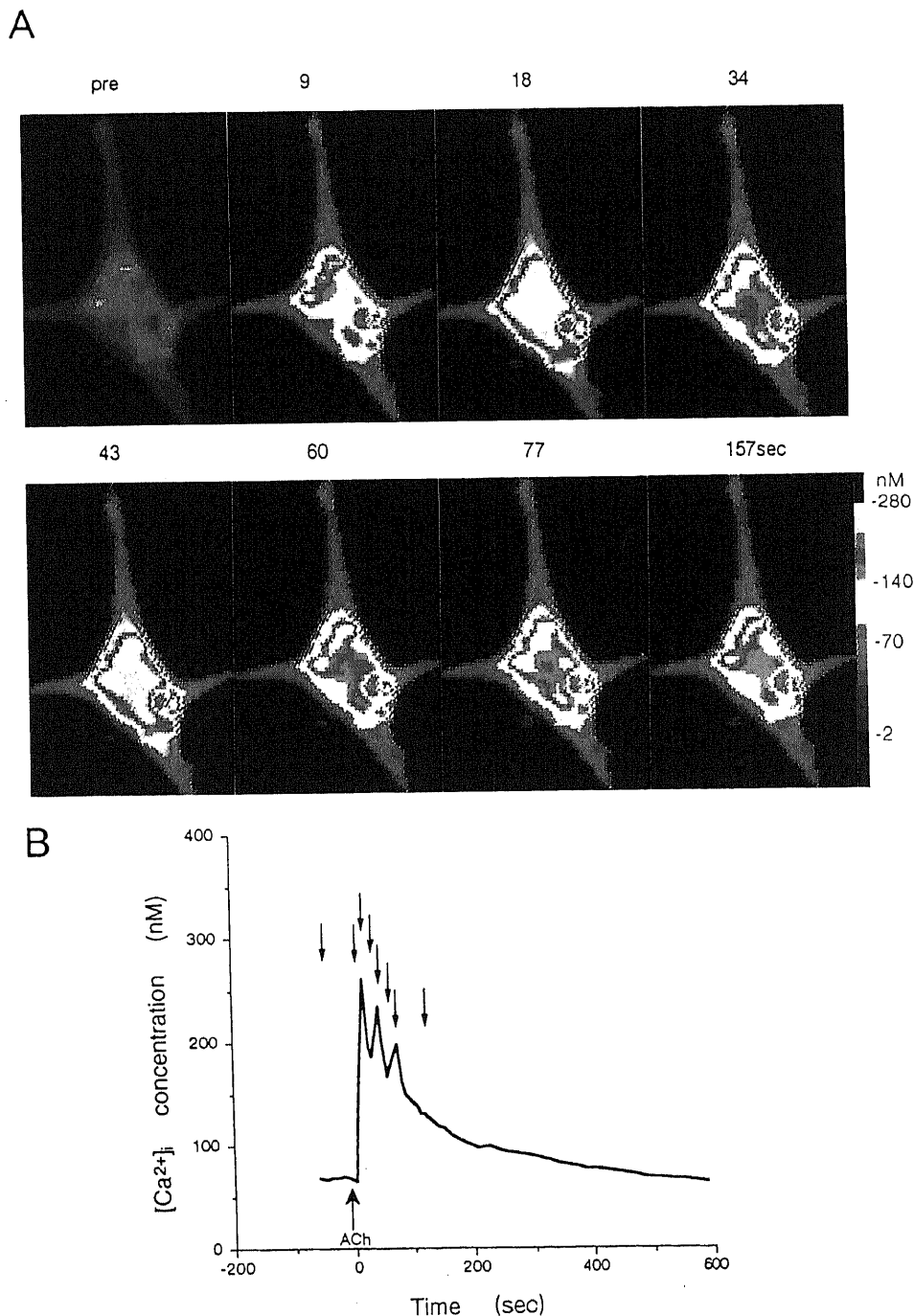


Fig. 4. Digital image analysis (A) and the time-course (B) of intracellular Ca^{2+} concentration changes in the same cell. Downward arrows in B refer to the time sequence in the image in A.

上昇の大部分は、その起源を細胞内に求めることができる。

次に、これらの四種類の mAChR を発現させた細胞において、細胞内 Ca^{2+} の動員に関するセカンドメッセンジャーとして Ins (1, 4, 5) P_3 が考えられるか否かを検討した。

Ⅲ. 異なったクローン間における Ins (1, 4, 5) P_3 の生成

図 7 にコントロール細胞および PTx 処理した細胞における ACh 誘発性細胞内 Ins (1, 4, 5) P_3 レベルの時間的経過を示す。m1 および m3 mAChR を発現させた細胞では、細胞内 Ins (1, 4, 5) P_3 は ACh 投与後 10 秒以内に早急に生成され最大値に達するのに対し、m2 および m4 mAChR を発現させた細胞では ACh 投与後徐々に上昇し、20 秒で最大値に達した。m2 および m4 を発現させた細胞における Ins (1, 4, 5) P_3 の最大値

は、それぞれ 30.2 ± 2.5 (平均値 \pm 標準誤差、以下同じ) および 24.3 ± 7.0 pmol/ 10^6 (各 $n=4$) であり、m1 および m3 mAChR を発現させた細胞の最大値はそれぞれ 38.7 ± 6.3 および 41.2 ± 10.2 pmol/ 10^6 (各 $n=4$) に比しかなり低かった ($p < 0.05$) (図 7 A)。ACh 投与により引き起こされる Ins (1, 4, 5) P_3 生成は、m2 および m4 を発現させた細胞では PTx 処理 (100 ng/ml, 12 時間) により完全に阻害された。多くの種類の細胞ですでに知られているように¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁹⁾²⁰⁾、m1 および m3 mAChR を発現させた細胞では ACh 誘発性の Ins (1, 4, 5) P_3 生成は、PTx-非感受性であった (図 7 B)。

Ⅳ. PTx の $[Ca^{2+}]_i$ に対する影響

従来の報告では¹³⁾、m2 および m4 mAChR を発現させた細胞

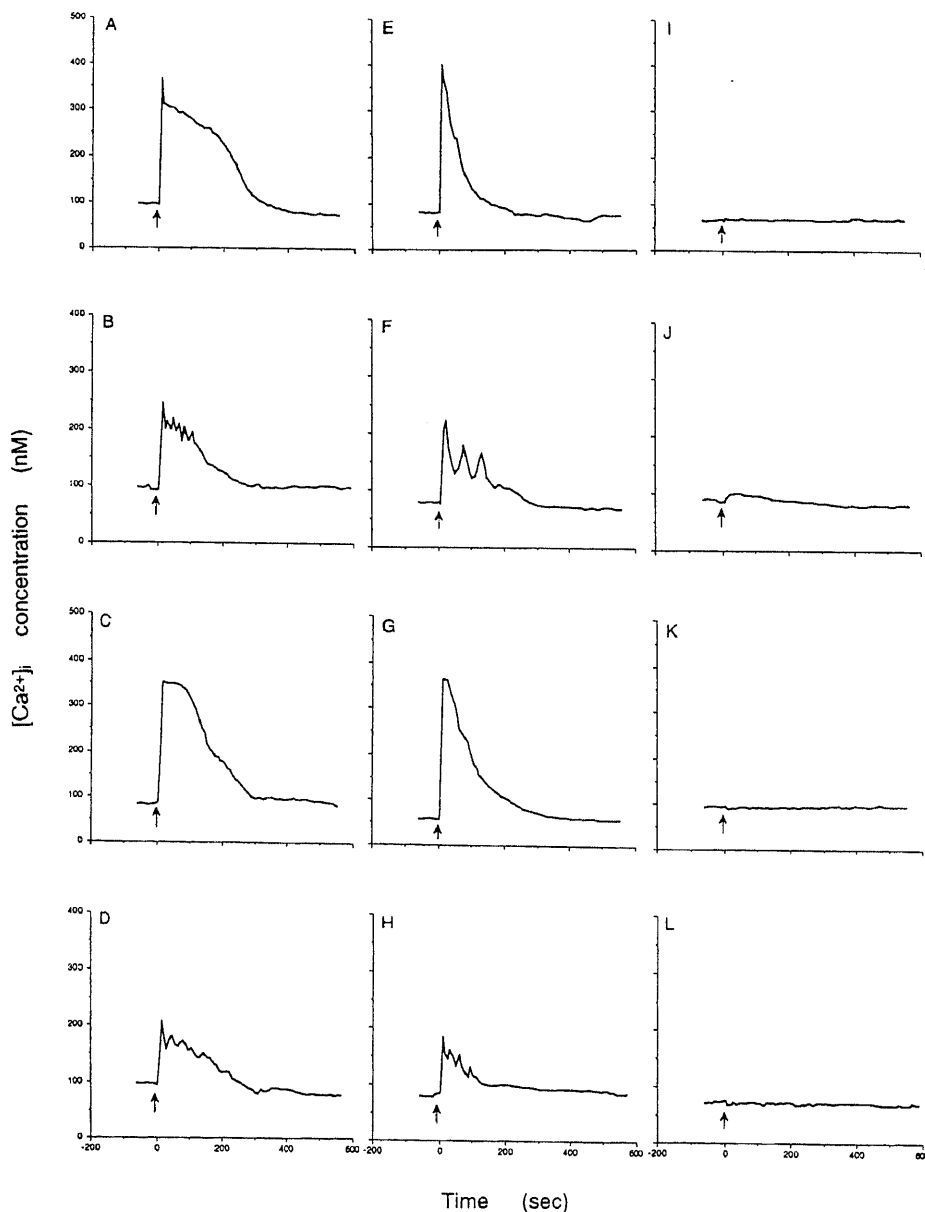


Fig. 5. Effects of ethylene glycol-bis (β -amino-ethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) (E~H) and 1,2, -bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid-acethoxyl methyl (BAPTA-AM) (I~L) on ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in m1 (A, E, I)-, m2 (B, F, J)-, m3 (C, G, K)- and m4 (D, H, L)-transformed NL308 cells. Records show $[Ca^{2+}]_i$ increase to application of ACh in m1 (A, E, I)-, m2 (B, F, J)-, m3 (C, G, K)- and m4 (D, H, L)-transformed NL308 cells in the absence of Ca^{2+} chelators (A~D) and in the presence of EGTA (E~H) or BAPTA-AM (I~L). Arrows show the application time of ACh.

においては、PTx 処理により外向き電流は完全に抑制されるのに対し、m1 および m3 mAChR を発現させた細胞で観察された外向き電流は PTx-非感受性であった。ここで $[Ca^{2+}]_i$ の PTx に対する感受性に関して検討を加えた。予想された如く、10ng/ml の PTx 12~15時間処理にて、ACh により引き起こされた $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、m1 mAChR を発現させた細胞では何ら影響されず、また m3 mAChR を発現させた細胞でもほとんど変

化しなかったが、一方 m2 および m4 mAChR を発現させた細胞では完全に抑制された (図 8)。

ここで得られた結果と前項の Ins (1, 4, 5) P_3 に関する知見とから考えられることは、四種の mAChR でみられた $[Ca^{2+}]_i$ 上昇および外向き電流は、すべてのサブタイプで Ins (1, 4, 5) P_3 および Ca^{2+} という同じセカンドメッセンジャーを介しているが、m1/m3 mAChR から起こる情報と m2/m4 mAChR から生じる

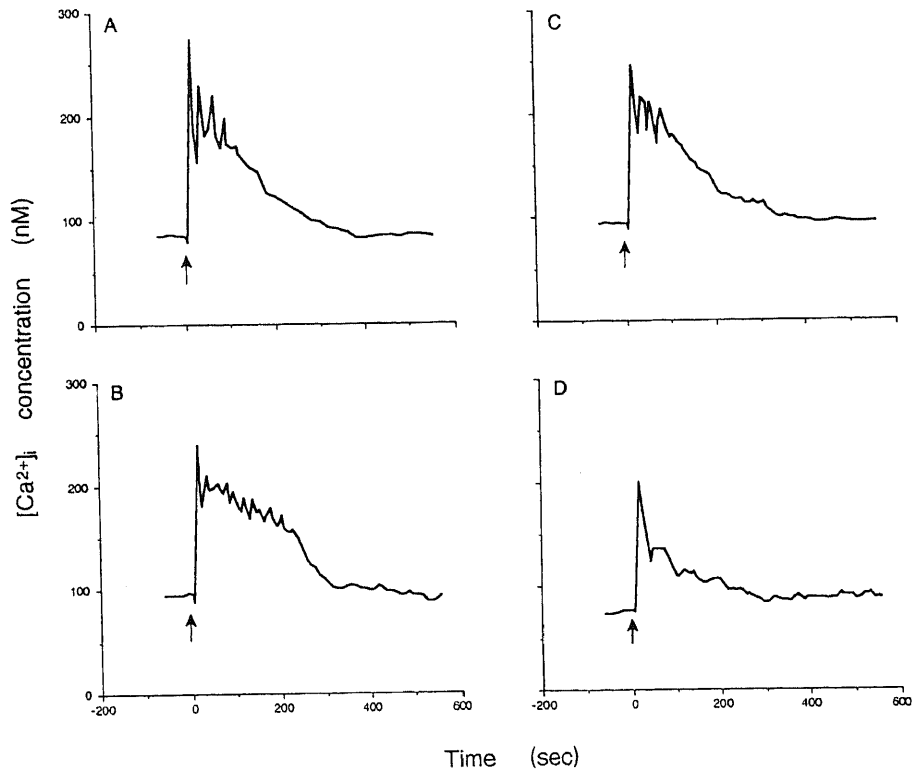


Fig. 6. Effects of $LaCl_3$ (B), nifedipine (C) and $NiCl_2$ (D) on ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in m2-transformed cells. Records show $[Ca^{2+}]_i$ increase to application of ACh in m2-transformed cells in the absence of Ca^{2+} channel blockers (A) and in the presence of $LaCl_3$ (B), nifedipine (C) or $NiCl_2$ (D), respectively. Arrows show the application time of ACh.

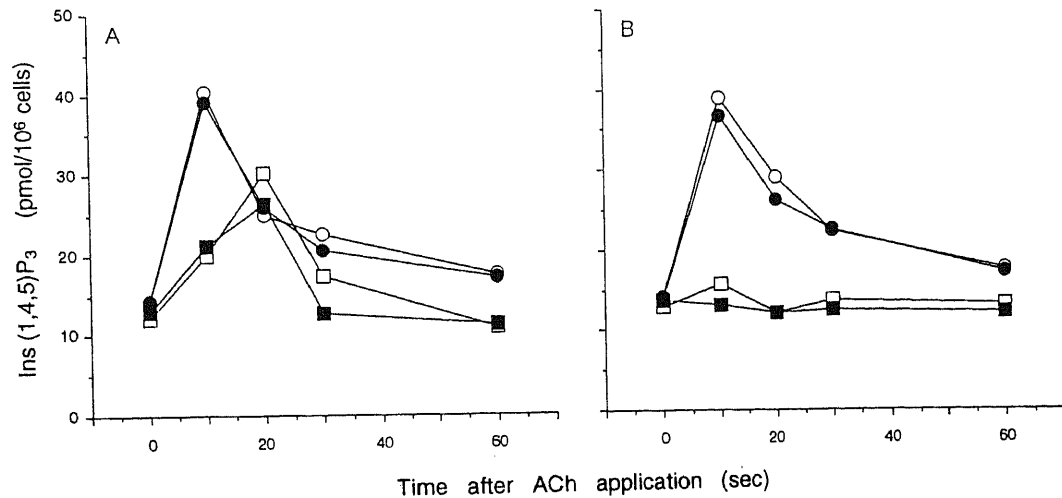


Fig. 7. Time course of ACh-induced formation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (Ins (1, 4, 5) P_3) in m1 (—○—), m2 (—□—), m3 (—●—) and m4 (—■—) transformed cells without (A) and with (B) *Pertussis* toxin (PTx)-pretreatment.

情報とでは、異なった GTP 結合蛋白質を介して伝達されるといふことである。

V. m2 mAChR を発現させた細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する細胞外カフェインおよび細胞内 cADPR の影響

次に検討すべき疑問点として、m2 および m4 mAChR を発現させた細胞では $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションがしばしば認められたのは何故か、またそのオシレーションはどのような機構によ

って惹起されたのであろうかという点がある。m2 および m4 を発現させた細胞では、上記の結果 [II] より、 Ca^{2+} 起源の大部分を細胞内に求めることができるので、Ins (1, 4, 5) P_3 -感受性 Ca^{2+} プールの関与が第一であるが、それだけではオシレーションの発現を説明できないので、Ins (1, 4, 5) P_3 -非感受性(おそらくはリアノジン感受性)の Ca^{2+} プールのような第二、第三の細胞内 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} 放出の可能性について検討した。

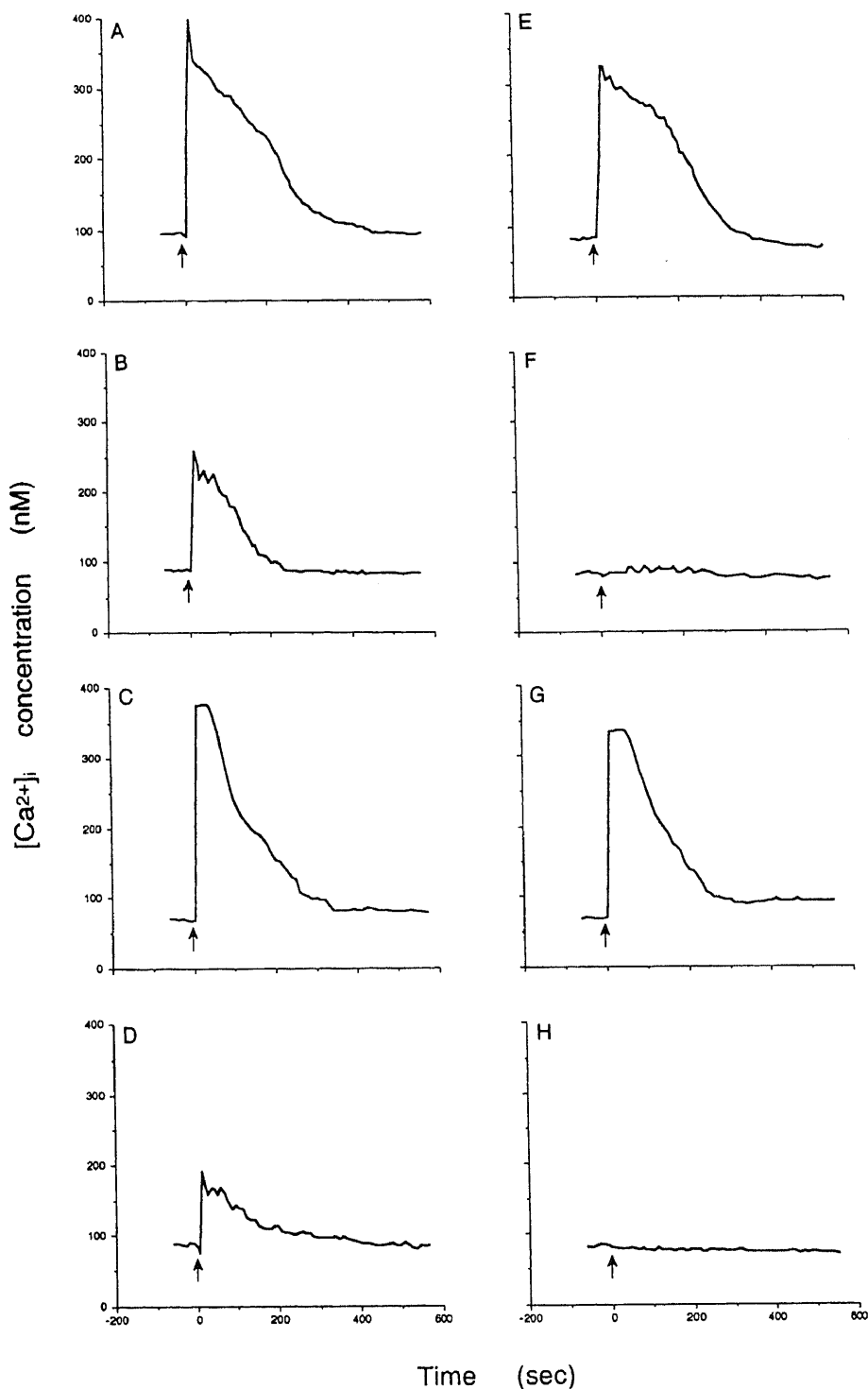


Fig. 8. Effects of PTx on ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in m1 (A, E)-, m2 (B, F)-, m3 (C, G)- and m4 (D, H)-transformed NL308 cells without (A~D) and with (E~H) PTx-pretreatment. Arrows show the application time of ACh.

m2 および m4 を発現させた細胞に 5mM のカフェインを細胞外から投与すると、一時的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がみられた。この反応は約30秒で完了し、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の最大値は、m2 および m4 を発現させた細胞でそれぞれ 163.7 ± 12.3 (平均値 \pm 標準誤差, 以下同じ) (n=6) および 151.5 ± 5.1 nM (n=6) であった。PTx 処理は、カフェインによる一時的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に影響をおよぼさなかったため、この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は GTP 結合蛋白質以降で生じていることがわかる (図9)。

以上のことから、カフェインにより誘発される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、GTP 結合蛋白質以降の Ca^{2+} プールに対する直接作用にて生じていることが判明した。また、パッチピペットから細胞内に投与された cADPR によっても一時的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされた (図9)。この上昇は、カフェインにより誘発された $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と時間経過および最大値において類似していた。 Ca^{2+} 上昇のパターンから、この細胞にカフェインや cADPR 感受性の Ca^{2+} プールが存在していると推測される。

VI. m2 トランスフォーマントにおける $[Ca^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションに対する細胞外リアニジンの影響

リアニジンは非筋肉細胞ではミクロゾームの Ins (1, 4, 5) P_3 -非感受性 Ca^{2+} チャンネルを開口して Ca^{2+} チャンネルを阻害することが知られている⁴⁹。100 μ M リアニジンを細胞外より NL308 細胞に投与することにより、オシレーションを伴う持続した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がしばしば観察された (図10)。その後引き続き ACh を投与すると (リアニジン投与後15~20分後に ACh 投与)、オシレーションを伴わない $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められた。リアニジン処理した m2/m4 mAChR を発現させた細胞で、ACh による $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションが消失した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の例をそれ

ぞれ図10に示す。

m2 トランスフォーマントにおける ACh によって惹起される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の最大値はリアニジン処理前では 216 ± 8 (平均値 \pm 標準誤差, 以下同じ) (n=6) およびリアニジン処理下では 231 ± 16 nM (n=6) であり、神経節細胞のそれと同程度であった。わずかなノッチは残っているものの、リアニジン処理によるオシレーションの消失は著明であった。

考 察

NL308 細胞は神経芽細胞腫由来の雑種細胞である。神経芽細胞腫 C1300 は、1940年に A/J マウス腹腔内に発見された交感神経節原発性の腫瘍である⁴⁴⁻⁴⁶。この腫瘍細胞は生体内移植 (マウス-マウス) により維持され、1968年に組織培養に移され長い細胞突起^{44,45}と興奮性の細胞膜^{46,47}をもつなどの神経細胞様の性質を有することが明らかとなった。さらにこの細胞はコリンアセチルトランスフェラーゼやタイロシンヒドロキシラーゼ活性を有する点^{48,49}から、生化学的にも神経細胞機能を備えていることが示され、神経機能研究のモデルとして広く用いられるようになった。これらの培養細胞を用いて、神経伝達物質合成酵素活性の面からコリン性、アドレナリン性、セロトニン性、無活性型などのクローン細胞^{44,45,50,51}が確立された。その後、米国 NIH の Nirenberg 研究室では、ニューロblastoma N18⁵² のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ活性を欠く変異株 N18TG-2 (チオグアニン抵抗性) 細胞⁴⁷と他の種々の細胞をセンダイウイルスを利用して細胞融合させて雑種細胞を作りだし、神経機能発現の遺伝的解析に使用した^{47,52,53}。本研究で筆者が用いた培養神経腫瘍細胞 NL308 はその中の一つであり、N18TG-2 細胞とマウス・ファイibro

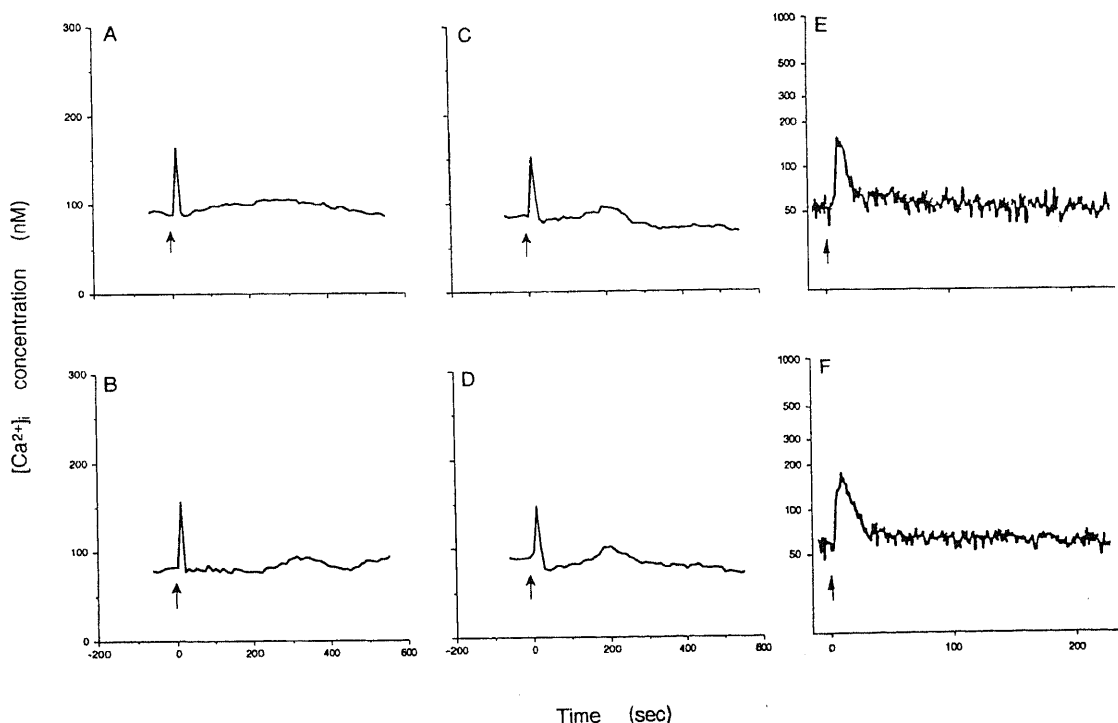


Fig. 9. $[Ca^{2+}]_i$ increase evoked by extracellular application of caffeine in m2- and m4-transformed cells without and with PTx-pretreatment, and $[Ca^{2+}]_i$ increase evoked by intracellular application of cyclic adenosine diphosphate-ribose (cADPR) in m2- and m4-transformed cells. Arrows show the application time of caffeine (A, B, C, D) or cADPR (E, F).

ブラスト (線維芽細胞) B-82 とをセンダイウイルスによって細胞融合させて作った雑種細胞である。NL308 雑種細胞の性質について報告された初期の研究において、膜興奮性についてはすでに記載されているが⁴⁰、本研究ではこのような細胞にさらに ACh レセプターの cDNA をトランスフェクションし、それぞれ m1~m4 mAChR サブタイプを特異的に発現している NL308 細胞を用いた。

本研究から、mAChR 遺伝子分類における m2 および m4 サブタイプは、NL308 細胞においてオシレーションを伴った $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をきたし得ることが判明した (図 2)。この現象で興味深い点は m2/m4 mAChR が PTx-感受性 GTP 結合蛋白質を活性化し、引き続き生じる Ins (1, 4, 5) P_3 生成増加に伴い

$[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされるという点である。さらに、m2/m4 mAChR を発現させた細胞において ACh により引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションは、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) の機構により制御されていることも明らかとなった。

以上の知見は、本研究における次の事実により実証された。

1) ACh による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞外への過剰な EGTA ならびに Ca^{2+} チャンネル阻害剤の投与により特に影響されなかった (図 5)。2) ACh により引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は BAPTA-AM で細胞内 Ca^{2+} を 0mM 近くにキレートすることにより完全に抑制された (図 5)。3) ACh による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は m2 および m4 を発現させた細胞を PTx で前処

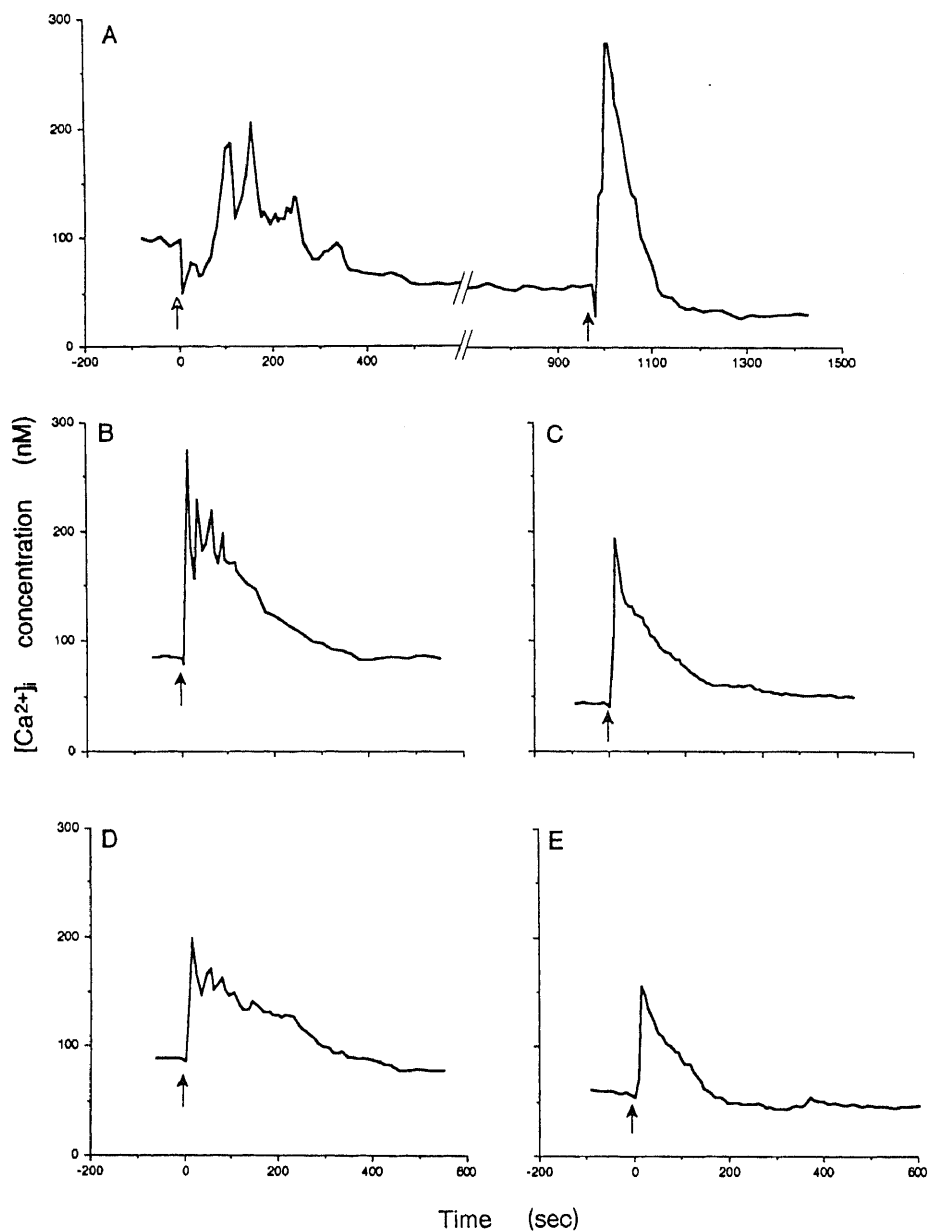


Fig. 10. Effects of ryanodine on ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in m2- and m4-transformed cells. Records show $[Ca^{2+}]_i$ increase in m2 (A, B, C)-and m4-(D, E) transformed NL308 cells before (B, D) and about 20 minutes after (C, E) addition of 100 μ M ryanodine. White head arrow shows the application time of ryanodine and black head arrows show the application time of ACh.

理することによって完全に抑制された (図 8). 4) Ins (1, 4, 5) P_3 濃度が ACh 投与により上昇した. 5) Ins (1, 4, 5) P_3 -非感受性 Ca^{2+} プールとしてカフェイン, リアリジンおよび cADPR に感受性を持った Ca^{2+} プールが確認されているが^{55,56}, 今回カフェインおよび cADPR 投与により, 神経節神経細胞で観察されていた現象³⁵と類似した一時的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められたことから (図 9), NL308 細胞が CICR のシステムを所有することが明らかとなった. 6) 細胞をリアノジンにより前処理することにより, 基本となる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に影響を与えることなく, $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションのみが消失した (図10).

アトロピン感受性の受容体を介することにより, ACh が NL308 細胞を過分極することは以前より報告されており³¹, また, NL308 細胞の親細胞となる線維芽細胞の株化細胞である L-細胞においても ACh がオシレーションを伴う持続した過分極を引き起こすことが報告されている^{57,58}. これらの細胞には m4 mAChR が存在することが知られており^{25,57,58}, 上記の反応はそれが活性化されることにより生じるものと考えられていた. 本研究を開始する前には, これらの細胞における mAChR のサブタイプと膜過分極との関係は, 膜過分極は m1/m3 サブタイプに特異的にみられるという我々のグループが先に報告⁵⁹した事実と矛盾し, 理解し難いものであったが, NL308 細胞においては m1/m3 のみならず m2/m4 サブタイプでも $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に伴う膜過分極がみられたこと (図 2) により, この疑問は氷解した.

mAChR を発現させた NL308 細胞において, m1/m3 mAChR 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の発現機構を Ins (1, 4, 5) P_3 の生成およびそれに引き続いて起こる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に帰して考えることができそうである. なぜなら, 1) m1/m3 mAChR 刺激によるイノシトールリン脂質の産生および $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はこれまでにもしばしば報告されており^{27,30}, 2) また実際 NL308 細胞における m1 および m3 mAChR 刺激に伴う $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はイノシトール代謝とカップルすることが報告されている²⁵. そして NL308 細胞における m1 および m3 mAChR 刺激に伴う $[Ca^{2+}]_i$ 上昇にみられる特徴は, ブラジキニン (bradykinin) が引き起こす $[Ca^{2+}]_i$ 上昇にみられる特徴とよく類似している⁵⁹. ま

た, 3) 同じく神経芽細胞腫由来の NG108-15 神経芽細胞と神経膠腫との雑種細胞において m1/m3 mAChR を発現させた細胞においても, ACh によってブラジキニンに対する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と同様の反応が生じることが報告されている³⁵. NG108-15 細胞においては, 受容体とカップリングした $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がどのような GTP 結合蛋白質により伝達されているかについてよく研究されており¹⁵⁻²⁰, ブラジキニン受容体や mAChR の m1, m3 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に G_q/G_{11} が関与していることが NG108-15 細胞⁶⁰ や他の実験系²⁰ で証明されている. また, G_q/G_{11} が活性化する PLC は $\beta 1^{20(61)}$ あるいは $\beta 3^{61}$ であることも証明されている. NL308 細胞においてもその類似性から, NG108-15 細胞と同様なリン脂質代謝が, 受容体刺激に引き続いて $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こしていることが考えられる.

興味あることに, これら二種類の神経芽細胞腫由来のクローン間に認められる主だった相異は, m2/m4 mAChR 刺激に対して示す $[Ca^{2+}]_i$ 上昇にみられる. NL308 細胞においては, m2/m4 mAChR の刺激により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められたが (図 2, 4), NG108-15 細胞では, m2/m4 mAChR の刺激によりそれに相当する反応は観察されなかった⁵⁹.

NL308 細胞の m2/m4 mAChR 刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と m1/m3 mAChR 刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の間には, いくつかの顕著な相異が認められた. まず第一に, m2/m4 mAChR 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は PTx で前処理することにより完全に抑制されたのに対し (図 8), PTx 処理は m1/m3 mAChR 刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には影響を与えなかった (図 8). これが意味するところは, 第一に m2/m4 mAChR と m1/m3 mAChR では異なる GTP 結合蛋白質により制御されているということである. NL308 細胞に存在する GTP 結合蛋白質については, いまだはっきりとした記述はない. しかし NG108-15 細胞との類似性から, m2/m4 mAChR 刺激による情報伝達は G_o もしくは G_i により制御されている可能性が高い⁶²⁻⁶⁴. 第二に, m2/m4 mAChR 活性化に伴い生成される Ins (1, 4, 5) P_3 量は, m1/m3 mAChR 刺激により生成される Ins (1, 4, 5) P_3 量に比べ少なかった (図 7). さらに, m2/m4 mAChR 活性化に伴い生成される Ins (1, 4, 5) P_3 が最大値に達するのに要する時間は, m1/m3 mAChR 活性化に伴い生成される Ins (1, 4, 5) P_3 が最大値に達する時間よりも長かった (図 7). m1/m3 と m2/m4 mAChR との間では生成される Ins (1, 4, 5) P_3 の最大値および最大値に達する時間に相違がみられたが, その理由をクローン細胞ごとに発現している受容体の数の違いに求めるよりも, 信号伝達を媒介する GTP 結合蛋白質の差による情報伝達経路に求める方が考えやすい. さらに, 分子的レベルでの考察として, m2/m4 mAChR により生じる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が, GTP 結合蛋白質を活性化し, それに伴い放出される GTP 結合蛋白質の $\beta\gamma$ -サブユニットにより活性化される PLC を介する可能性が考えられる⁶⁵⁻⁶⁹. PTx-感受性の GTP 結合蛋白質 (G_i もしくは G_o) の $\beta\gamma$ -サブユニットが活性化するのは PLC- $\beta 2^{65(67)}$ もしくは PLC- $\beta 3^{70(71)}$ であるということが実験的に最近解明された. これに対し, m1/m3 mAChR 受容体を介する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は従来通り, GTP 結合蛋白質 (G_q/G_{11}) の α -サブユニットにより制御されていると考えられる¹⁵⁽¹⁷⁾⁽²⁰⁾.

以上より, NL308 細胞に発現させた m2/m4 mAChR 刺激は PTx-感受性 GTP 結合蛋白質 (G_i もしくは G_o) の $\beta\gamma$ -サブユニットを活性化し, その $\beta\gamma$ -サブユニットは続いて PLC- $\beta 2$ も

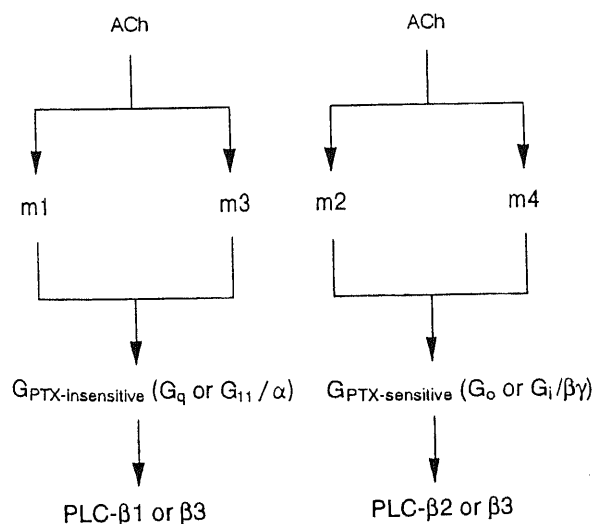


Fig. 11. Proposed signal transduction pathways in NL308 cells.

しくは PLC- β 3 の活性化を引き起こすと考えられる。活性 PLC- β 2 および PLC- β 3 はその後 Ins (1, 4, 5) P_3 の生成を導き、その結果として $[Ca^{2+}]_i$ が上昇すると推論される。これに対し、m1/m3 mAChR 刺激は PTx-非感受性 GTP 結合蛋白質 (G_o) を活性化し、続いて PLC- β 1 が活性化されることにより Ins (1, 4, 5) P_3 生成が導かれると考えられる。NL308 細胞におけるこのような mAChR 以降の情報伝達経路に関する筆者の仮説を図11に示す。

細胞内 Ca^{2+} 動員について、Ins (1, 4, 5) P_3 依存性の Ca^{2+} 放出機構²⁵⁾に加えて、Ins (1, 4, 5) P_3 非依存性 Ca^{2+} 放出もしくは CICR と呼ばれている別のタイプの Ca^{2+} 放出機構⁴⁰⁾⁷²⁾ が知られている。植物アルカロイドであるリアノジンは CICR によって細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇をきたすことが、従来の研究²⁵⁾ で明らかにされている。m2/m4 mAChR を発現させた細胞において ACh 刺激により認められる $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションはリアノジン処理により消失した (図10) という所見から、m2/m4 mAChR を発現させた NL308 細胞で認められる $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションは本来 NL308 細胞に備わっている CICR システムによるところが大きいことが示唆される。そして、m1/m3 mAChR を発現させた細胞では、オシレーションが、低濃度の ACh のみにしか起こらないのは、 $[Ca^{2+}]_i$ が高いレベルで推移することにより、CICR のシステムが脱感作を起こしていることによると推測される。

上記の m2/m4 mAChR 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇および $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションの発現機構についての仮説は、これまでに他の細胞で観察された事実すなわち m2/m4 mAChR が PTx-感受性の GTP 結合蛋白質を介してイノシトールリン脂質代謝を微弱ではあるが刺激し¹⁴⁾¹⁵⁾⁷³⁾、その結果として、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす²²⁾⁷⁴⁾ という事実²³⁾⁷⁴⁾ に合致する。筆者らは²⁵⁾、mAChR を発現させた NL308 雑種細胞で m2/m4 mAChR にカップルする Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流について報告しているが、卵母細胞において、m2/m4 mAChR 刺激が引き起こす $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と $[Ca^{2+}]_i$ 依存性 Cl^- 電流が、m1/m3 mAChR により起こされる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と Ca^{2+} 依存性 Cl^- 電流とは、時間的にも空間的にも非常に異なることを Lechleiter ら²²⁾ は報告している。以上、本研究と文献的に示した事実から、NL308 細胞では、m1/m3 および m2/m4 mAChR がそれぞれ異なった情報伝達の経路を介した上で、同一の Ca^{2+} をセカンドメッセンジャーとして使用するにいたることが判明した。この結果は以前筆者ら²⁵⁾ が報告した mAChR を発現させた NL308 雑種細胞で m1, m2, m3, m4 mAChR にカップルする Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流の発生を完全に説明し得る。

本研究において、各サブタイプの mAChR を NL308 細胞に発現させることにより、m1/m3 および m2/m4 mAChR 間でのその細胞内情報伝達の経路が異なることを証明したが、さらにより詳細な検討を行うことにより、m1, m3 および m5 mAChR 間、また m2, m4 mAChR 間での相違を明らかにできるかもしれない。実際、mAChR とイノシトールリン脂質を橋渡しする PLC には、PLC- β 1, β 2, β 3 のアイソザイム²⁰⁾⁶¹⁾⁶⁸⁾⁶⁷⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾ が報告されていたが、PLC- β 4 の存在が最近明らかにされた⁷⁵⁾。今後、PLC のアイソザイムがさらに新しく同定される可能性もあり、それらが細胞内でどのような動態を示すかは興味深いことであり、それらを明らかにすることで、mAChR の各サブタイプの情報伝達の経路がより明確にされる可能性もある。従って、図

11に示す反応経路も今後の発展により修正される可能性もある。また、mAChR の各サブタイプの作用が、実際に生体内でどのような違いを有しているのかということ、さらに mAChR が五種類ものサブタイプを有する意義等を詳細に検討することが今後の課題として重要と思われる。

結 論

m1~m4 の各 mAChR を NL308 細胞 (神経芽細胞腫と線維芽細胞腫との雑種細胞) にトランスフェクションし、これらの細胞において $[Ca^{2+}]_i$ を測定することにより、mAChR がもたらす情報伝達経路について以下の結果を得た。

1. ACh により、m1~m4 mAChR を発現させたすべての細胞で $[Ca^{2+}]_i$ は上昇したが、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇幅は m1/m3 mAChR を発現させた細胞に比し、m2/m4 mAChR を発現させた細胞ではかなり小さかった。

2. m2/m4 mAChR によって引き起こされた $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には試みなどの濃度の ACh によってもオシレーションを伴った。

3. m1/m3 mAChR は PTx-非感受性 GTP 結合蛋白質によって、m2/m4 mAChR は PTx-感受性 GTP 結合蛋白質によって制御されていることが判明した。

4. カフェイン、リアノジンおよび cADPR により PTx-非感受性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がみられたことから、Ins (1, 4, 5) P_3 -非依存性の Ca^{2+} 放出機構が NL308 細胞に存在することが判明した。

5. リアノジン処理により $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションが消失したことから、オシレーションを生ずる機構に CICR が含まれていることが判明した。

6. NL308 細胞においては m1/m3 mAChR と m2/m4 mAChR とでは異なる情報伝達経路を介してセカンドメッセンジャーである Ca^{2+} を動員することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲をいただきました恩師河崎一夫教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接の御指導をいただきました金沢大学神経情報施設神経毒性部門の東田陽博教授に心から感謝致します。また多大なる御協力をいただいた金沢大学眼科学教室並びに金沢大学神経情報施設神経毒性部門の先生方に感謝致します。

文 献

- 1) North, R. A.: Muscarinic cholinergic receptor regulation of ion channels. *in* The Muscarinic Receptors, J. H. Brown (ed.), p341-346, Humana Press, New Jersey, 1989.
- 2) Bonner, T. I.: The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.*, 12, 148-151 (1989).
- 3) Fukuda, K., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Bujo, J., Nakai, J., Mishina, M., Higashida, H., Neher, E., Marty, S. & Numa, S.: Selective effector coupling of muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, (Suppl. 4), 4-10 (1989).
- 4) Hulme, E. C., Birdsall, N. J. M. & Buckley, N. J.: Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 633-73 (1990).
- 5) Hosey, M. M.: Diversity of structure, signaling and

regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J.*, **6**, 845-852 (1992).

- 6) Hammer, R., Berrie, C. P., Birdsall, N. J. M., Burgen, A. S. V. & Hulme, E. C.: Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature*, **283**, 90-92 (1980).
- 7) Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S.: Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptors. *Nature*, **283**, 90-92 (1980).
- 8) Kubo, T., Maeda, A., Sugimoto, K., Akiba, I., Mikami, A., Takahashi, H., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kanagawa, K., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S.: Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.*, **209**, 367-372 (1986).
- 9) Bonner, T. I., Buckley, N. J., Young, A. C. & Brann, M. R.: Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*, **237**, 527-532 (1987).
- 10) Peralta, E. G., Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Smith, D. H., Ramachandran, J. & Capon, D. J.: Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.*, **6**, 3923-3929 (1987).
- 11) Bonner, T. I., Young, A. C., Brann, M. R. & Buckley, N. J.: Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*, **1**, 403-410 (1988).
- 12) Ashkenazi, A., Peralta, E. G., Winslow, J. W., Ramachandran, J. & Capon, D. J.: Functional diversity of muscarinic receptor subtypes in cellular signal transduction and growth. *Trends. Pharmac. Sci.*, **11**, (Suppl. 4), 16-22 (1989).
- 13) Fukuda, K., Higashida, H., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Bujo, H., Mishina, M. & Numa, S.: Selective coupling with K^+ currents of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in NG108-15 cells. *Nature*, **335**, 355-358 (1988).
- 14) Peralta, E. G., Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Ramachandran, J. & Capon, D. J.: Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature*, **334**, 434-437 (1988).
- 15) Ashkenazi, A., Peralta, E. G., Winslow, J. W., Ramachandran, J. & Capon, D. J.: Functionally distinct G proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cell. *Cell*, **56**, 487-493 (1989).
- 16) Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O. & Sternweis, P. C.: Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G_q . *Science*, **250**, 804-807 (1991).
- 17) Taylor, S. J., Chase, H. Z., Rhee, S. G. & Exton, J. H.: Activation of the β_1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the G_q class of G protein. *Nature*, **350**, 516-518 (1991).
- 18) Blank, J. L., Ross, A. H. & Exton, J. H.: Purification and characterization of two G-proteins that activate the β_1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18206-18216 (1991).
- 19) Strathmann, M. & Simon, M. I.: G protein diversity: A distinct class of α subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 9113-9117 (1990).
- 20) Berstein, G., Blank, J. L., Smrcka, A. V., Higashijima, T., Sternweis, P. C., Exton, J. H. & Ross, E. M.: Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, $G_q/11$, and phospholipase C- β_1 . *J. Biol. Chem.*, **267**, 8081-8088 (1992).
- 21) Fukuda, K., Kubo, T., Akiba, I., Maeda, A., Mishina, M. & Numa, S.: Molecular distinctions between muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Nature*, **327**, 623-625 (1987).
- 22) Lechleiter, J., Girard, S., Clapham, D. & Peralta, E.: Subcellular patterns of calcium release determined by G-protein-specific residues of muscarinic receptors. *Nature*, **350**, 505-508 (1991).
- 23) Jones, S. V. P., Barker, J. L., Buckley, N. J., Bonner, T. I., Collins, R. M. & Brann, M. R.: Cloned muscarinic receptor subtypes expressed in A9L cells differ in their coupling to electrical responses. *Mol. Pharmacol.*, **34**, 421-426 (1988).
- 24) Jones, S. V. P., Heilman, C. J. & Brann, M. R.: Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol. Pharmacol.*, **40**, 242-247 (1991).
- 25) Noda, M., Katayama, M., Brown, D. A., Robbins, J., Marsh, S. J., Ishizaka, N., Fukuda, K., Hoshi, N., Yokoyama, S. & Higashida, H.: Coupling of m2 and m4 muscarinic acetylcholine receptor subtypes to Ca^{2+} -dependent K^+ channels in transformed NL308 neuroblastoma x fibroblast hybrid cells. *Proc. R. Soc.*, **251**, 215-224 (1993).
- 26) Robbins, J., Trouslard, J., Marsh, S. J. & Brown, D. A.: Kinetics and pharmacological properties of the M-current in rodent neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Physiol.*, **451**, 159-185 (1992).
- 27) Higashida, H., Hashii, M., Fukuda, K., Caulfield, M. P., Numa, S. & Brown, D. A.: Selective coupling of different muscarinic acetylcholine receptors to neuronal calcium current in DNA-transfected cells. *Proc. Roy. Soc.*, **242**, 68-74 (1990).
- 28) Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Peralta, E. G., Peterson, G. L., Schmerlik, M. I., Capon, D. J. & Ramachandran, J.: A single M_2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science*, **238**, 672-675 (1987).
- 29) Jones, S. V. P.: Effects of muscarinic receptor

subtypes on an inward potassium conductance and on exocytosis. *Neurosci. Abstr.*, **17**, 67 (1991).

- 30) Robbins, J., Caufield, M. P., Higashida, H. & Brown, D. A.: Genotypic m3-muscarinic receptors preferentially inhibit M-current in DNA-transfected NG108-15 neuroblastoma x glioma cells. *Eur. J. Neurosci.*, **3**, 820-824 (1991).
- 31) Chalazonitis, A., Minna, J. D. & Nirenberg, M.: Expression and properties of acetylcholine receptors in several clones of mouse neuroblastoma x L cell somatic hybrids. *Exp. Cell Res.*, **105**, 269-280 (1977).
- 32) Nukada, T., Mishina, M. & Numa, S.: Functional expression of cloned cDNA encoding the α -subunit of adenylate cyclase-stimulating G-protein. *FEBS Lett.*, **211**, 5-9 (1987).
- 33) Littlefield, J. W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science*, **145**, 709-710 (1964).
- 34) Higashida, H. & Brown, D. A.: Two polyphosphoinositide metabolites control two K^+ currents in a neuronal cell. *Nature*, **323**, 333-335 (1986).
- 35) Ogura, A., Myojo, Y. & Higashida, H.: Bradykinin-evoked acetylcholine release via inositol trisphosphate-dependent elevation in free calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3577-3584 (1990).
- 36) Hashii, M., Nozawa, Y. & Higashida, H.: Bradykinin-induced cytosolic Ca^{2+} oscillations and inositol tetrakisphosphate-induced Ca^{2+} influx in voltageclamped *ras*-transformed NIH/3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **268**, 19403-19410 (1993).
- 37) Kudo, Y. & Ogura, A.: Glutamate-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration in isolated hippocampal neurones. *Br. J. Pharmacol.*, **89**, 191-198 (1986).
- 38) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cellfree membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100 (1981).
- 39) Fu, T., Okano, Y. & Nazawa, Y.: Bradykinin-induced generation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate in fibroblasts and neuroblastoma cells: Effects of pertussis toxin, extracellular calcium, and down-regulation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 1429-1435 (1988).
- 40) Kimura, Y. & Higashida, H.: Dissection of bradykinin-evoked responses by buffering intracellular Ca^{2+} in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Neurosci. Res.*, **15**, 213-220 (1992).
- 41) Bean, B. P.: Nitrendipine block of cardiac calcium channels: High-affinity binding to the inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 6388-6392 (1984).
- 42) Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F. X. & Catterall, W. A.: Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 5478-5482 (1987).
- 43) Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T. & Numa, S.: Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, **339**, 439-445 (1989).
- 44) Augusti-Tocco, G. & Sato, G.: Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **64**, 311-315 (1969).
- 45) Schubert, D., Humphreys, S., Baroni, C. & Cohn, M.: In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **64**, 316-323 (1969).
- 46) Nelson, P., Ruffner, W. & Nirenberg, M.: Neuronal tumor cells with excitable membranes grown in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **64**, 1004-1010 (1969).
- 47) Minna, J., Glazer, D. & Nirenberg, M.: Genetic dissection of neuronal properties using somatic cell hybrids. *Nature*, **235**, 225-231 (1972).
- 48) Nelson, P. G.: Nerve and muscle cells in culture. *Physiol. Rev.*, **55**, 1-61 (1975).
- 49) Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J. H., Culp, W. & Brandt, B. L.: Clonal cell lines from rat central nervous system. *Nature*, **249**, 224-227 (1974).
- 50) Narotzky, R. & Bondareff, W.: Biogenic amines in cultured neuroblastoma and astrocytoma cells. *J. Cell Biol.*, **63**, 64-70 (1974).
- 51) Amano, T., Richelson, E. & Nirenberg, M.: Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 258-263 (1972).
- 52) Minna, J. D., Yavelow, J. & Coon, H. G.: Expression of phenotypes in hybrid somatic cells derived from the nervous system. *Genetics*, **79** (Suppl.), 373-383 (1975).
- 53) Nirenberg, M., Wilson, S., Higashida, H., Rotter, A., Krueger, K., Busis, N., Ray, R., Kenimer, J. G. & Adler, M.: Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate. *Science*, **222**, 794-799 (1983).
- 54) Catterall, W. A. & Nirenberg, M.: Sodium uptake associated with activation of action potential ionophores of cultured neuroblastoma and muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**, 3759-3763 (1973).
- 55) Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., Liu, Q. Y. & Meissner, G.: Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, **331**, 315-319 (1988).
- 56) Schmid, A., Kremer, M. D., Schulz, I. & Gogelein, H.: Voltage-dependent $insP_3$ -insensitive calcium channels in membranes of pancreatic endoplasmic reticulum vesicles. *Nature*, **346**, 374-376 (1990).
- 57) Nelson, P. G. & Peacock, J. H.: Acetylcholine responses in L cells. *Science*, **177**, 1005-1007 (1972).
- 58) Ince, C., Leijh, P. C. J., Meijer, J., Bavel, E. V. & Ypey, D. L.: Oscillatory hyperpolarizations and resting membrane potentials of mouse fibroblast and macrophage cell lines. *J. Physiol.*, **352**, 625-635 (1984).
- 59) Higashida, H., Okano, Y., Hoshi, N., Yada, Y.,

- Yokoyama, S., Asaga, T., Fu, T. & Nozawa, Y.: Bradykinin induces inositol 1, 4, 5-trisphosphate-dependent hyperpolarization in K^+ M-current-deficient hybrid NL308 cells: Comparison with NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Glia*, **3**, 1-12 (1990).
- 60) Gutowski, S., Smrcka, A., Nowak, L., Wu, Q., Simon, M. & Sternweis, P. C.: Antibodies to the α_q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein α subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis by hormones. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20519-20524 (1991).
- 61) Lee, C. H., Park, D., Wu, D., Rhee, S. G. & Simon, M. I.: Members of the G_q α subunit gene family activate phospholipase C β isozymes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16044-16047 (1992).
- 62) Mullaney, I., Magee, A. I., Unson, C. G. & Milligan, G.: Differential regulation of amounts of the guanine-nucleotide-binding proteins G_i and G_o in neuroblastoma x glioma hybrid cells in response to dibutyryl cyclic AMP. *Biochem. J.*, **256**, 649-656 (1988).
- 63) McFadzean, I., Mullaney, I., Brown, D. A. & Milligan, G.: Antibodies to the GTP binding protein, G_s , antagonize noradrenaline-induced calcium current inhibition in NG108-15 hybrid cells. *Neuron*, **3**, 177-182 (1989).
- 64) McKenzie, F. R. & Milligan, G.: d-Opioid-mediated inhibition of adenylate cyclase is transduced specifically by the guanine-nucleotide-binding protein G_{i2} . *Biochem. J.*, **267**, 391-398 (1990).
- 65) Camps, M., Guifen, H., Siridopoulos, D., Stock, J. B., Jakobs, K. H. & Gierschik, P.: Stimulation of phospholipase C $\beta\gamma$ guanine-nucleotide-binding protein $\beta\gamma$ subunits. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 821-831 (1992).
- 66) Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P. J. & Gierschik, P.: Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β_2 by G protein $\beta\gamma$ subunit. *Nature*, **360**, 686-689 (1992).
- 67) Katz, A., Wu, D. & Simon, M. I.: Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate β_2 isoform of phospholipase C. *Nature*, **360**, 686-689 (1992).
- 68) Blank, J. L., Brattain, K. A. & Exton, J. H.: Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23069-23075 (1992).
- 69) Boyer, J. L., Waldo, G. L. & Harden, T. K.: $\beta\gamma$ -subunit activation of G-proteinregulated phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25451-25456 (1992).
- 70) Carozzi, A., Camps, M., Gierschik, P. & Park, P. J.: Activation of phosphatidylinositol lipid-specific phospholipase C- β_3 by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *FEBS lett.*, **315**, 340-342 (1993).
- 71) Park, D., Jhon, D. Y., Lee, C. W., Lee, K. H. & Rhee, S. G.: Activation of phospholipase C isozymes by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4573-4576 (1993).
- 72) Kuwajima, G., Futatsugi, A., Niinobe, M., Nakanishi, S. & Mikoshiba, K.: Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. *Neuron*, **9**, 1133-1142 (1992).
- 73) Lai, J., Waite, S. L., Bloom, J. W., Yamamura, H. I. & Roeske, W. R.: The m2 muscarinic acetylcholine receptors are coupled to multiple signaling pathways via pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**, 938-944 (1991).
- 74) Ransom, J. T., Cherwinski, H. M., Delmondo, R. E., Sharif, N. A. & Eglen, R.: Characterization of the m4 muscarinic receptor Ca^{2+} response in a subclone of PC-12 cells by single cell flow cytometry. *J. Biol. Chem.*, **266**, 11738-11745 (1991).
- 75) Lee, C. W., Park, D. J., Lee, K. H., Kim, C. G. & Rhee, S. G.: Purification, molecular cloning, and sequencing of phospholipase C- β_4 . *J. Biol. Chem.*, **269**, 21318-21327 (1993).

Inositol 1,4,5-Trisphosphate Formation and Oscillation of Cytosolic Free Ca^{2+} Concentration in NL308 Neuroblastoma x Fibroblast Hybrid Cells Expressing Muscarinic Acetylcholine Receptor Nobuto Ishizaka, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **103**, 474—490 (1994)

Key words muscarinic acetylcholine receptor, NL308 cell, G-protein, Inositol 1,4,5-trisphosphate, Ca^{2+} oscillation

Abstract

The responses of transformed NL308 cells were studied to answer questions as to the origin of Ca^{2+} for the $[Ca^{2+}]_i$ increase and the oscillatory nature in outward current. Muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtype (m1~m4)-specific cDNAs were transfected into NL308 neuroblastoma x fibroblast hybrid cells, and clones expressing each of the individual mAChR subtypes m1, m2, m3 and m4 were obtained. Intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) were measured in NL308 cells expressing each of the individual mAChR subtypes m1, m2, m3 and m4. Application of ACh produced the initial outward K^+ current and $[Ca^{2+}]_i$ increase in all four types of NL308 cells. The increased $[Ca^{2+}]_i$ levels were significantly higher in m1- and m3-transformed cells than those in m2- and m4-transformed cells. Most of m2- and m4-transformed cells showed sinusoidal oscillations by ACh stimulation at each concentration tested. ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ was completely abolished in cells by treatment with an intracellular Ca^{2+} chelator, 1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA). By removal of extracellular Ca^{2+} with 5mM ethylene glycol-bis (β -amino-ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) in the recording medium, the ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase was inhibited at the late $[Ca^{2+}]_i$ phase but not at the initial $[Ca^{2+}]_i$ phase in m1- and m3-transformed cells. The $[Ca^{2+}]_i$ increase was inhibited by 20~30%, and slowed the frequency of sinusoidal oscillations in m2- and m4-transformed cells. These resistant characteristics suggest oscillations are intracellular in origin. Furthermore, Ca^{2+} channel blockers, nifedipine, $LaCl_3$ and $NiCl_2$ did not significantly inhibit $[Ca^{2+}]_i$ increase in m2-transformed cells. The ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ and inositol 1,4,5-trisphosphate formations were completely suppressed by pretreatment with 10ng/ml *Pertussis* toxin (PTx) for 12 hours in m2- and m4-treated cells, but not in m1- and m3-treated cells. In m2- and m4-transformed cells, extracellular application of caffeine and ryanodine or intracellular application of cyclic adenosine diphosphate (ADP)-ribose produced $[Ca^{2+}]_i$ increase. Pretreatment with PTx did not suppress the $[Ca^{2+}]_i$ increase evoked by extracellular application of caffeine in m2- and m4-transformed cells. The $[Ca^{2+}]_i$ increase was not observed in ryanodine-treated m2-transformed cells. These results indicate that different mAChRs utilize Ca^{2+} as a common second messenger though along distinct intracellular signal pathways between m1/m3 and m2/m4.