

# イソアワモチニューロンのホモシステイン酸によるシナプス受容膜のイオン機構およびその化学的分子構造について

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4611">http://hdl.handle.net/2297/4611</a>

# イソアワモチニューロンのホモシステイン酸による シナプス受容膜のイオン機構 およびその化学的分子構造について

金沢大学大学院医学研究科生理学第二講座 (主任 : 山本長三郎教授)

谷 川 孝 子

(受付昭和50年3月31日)

DL-ホモシステイン酸 (HCA) は、哺乳類中枢系において、強力な興奮剤として知られている。ネコの脊髄では、HCAは細胞外投与により、興奮剤として知られているアミノ酸のうちで、最も強い作用を起こす<sup>1)</sup>。この効果は、脊髄運動ニューロン、Renshaw細胞、他の介在ニューロンだけでなく、外側膝状体ニューロン、視床全域ニューロン<sup>2)</sup>、外側前庭核ニューロン<sup>3)</sup>などでも同じである。このように、HCAは哺乳類中枢系で、機能の異なる種々のタイプのニューロンにたいし、非特異的に興奮作用をもたらす。したがって、HCAはニューロンのシナプス部以外の受容部に作用しているのではないかと考えられている。

海肺類イソアワモチの脳である、食道環神経節中26個のニューロンでは、HCAにより、膜コンダクタンス (Gm) 増大を伴い、数10mV脱分極する、HCA-脱分極型ニューロンと、Gm増大を伴い、数10mV過分極する、HCA-過分極型ニューロンの2タイプがみられる。電気泳動的投与により、HCAは細胞体よりシナプス部に作用する。これは、HCAがイソアワモチニューロンでは、シナプス部に作用することを示している。

生理条件下で、HCAは両性にイオン化している。HCA受容部の蛋白分子構造は、どのような構成であろうか。おそらく、HCAは受容部蛋白質側鎖とイオン結合すると考えられる。

本実験では、イソアワモチのHCA-脱分極型および過分極型ニューロンを用い、HCA反応に関与するイオン機構の相違、およびHCA受容部分子構造の相違を、蛋白質側鎖の化学修飾剤で処理したニューロンで調べた。本実験の一部は、昭和48年度生理学中部談話会で発表した。

## 方 法

海肺類イソアワモチ (*Onchidium verruculatum*) の食道環神経節を取り出し、その巨大ニューロン (直径150-500 $\mu$ m) を使用した。表面をおおう結合組織を注意深く除去し、容量約0.4cm<sup>3</sup>のアクリル樹脂容器に固定した。実験中5 ml/minの速度で人工海水で灌流した。細胞内電位記録および細胞内通電用に、3 M-KClおよび0.6M-K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>をそれぞれつめた微小ガラス電極を使用した (DC抵抗、10~20M $\Omega$ )。不関電極は、容器に埋めこまれた銀板で、海水寒天でおおった。ニューロンの膜コンダクタンスGmは、矩形波電流 (持続時間、1 sec; 頻度、0.1Hz) によって発生する膜電位降下から測定した。膜電位および膜電流は2現象オシロスコープおよび2現象ペンレコーダーで記録した。実験設備は、Oomuraら<sup>4)</sup>と同様のものを用いた。

人工海水 1l中の組成は、NaCl : 457.6mM, KCl : 9.6mM, CaCl<sub>2</sub> : 10.4mM, MgCl<sub>2</sub> : 48.5mMであった。

pHは、Tris-HCl か Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)-NaOH で常に7.5に調節した。高K海水は、NaをKで置換した等張K海水 (その他の組成は正常海水 (NSW) と同じ) とNSWとの混合により、低K海水は、KをNaで置換した等張Na海水とNSWとの混合によって作成した。低Cl海水は、全Clを acetate イオンで置換した等張 acetate 海水とNSWとの混合により目的の濃度にした。Na欠除海水は、NaClを Tris-Cl で置換した。高Mgおよび高Ca海水は、NaをMgおよびCaで等張に置換した。

Receptor mechanism for the effect of homocysteic acid on the *Onchidium* neurons.  
Takako Tanikawa, Department of Physiology (II), (Director : Prof. C. Yamamoto), School of medicine, Kanazawa University.

実験には、DL-HCA (Fluka AG, Chemical Fabrik, CH9470 Buchs SG) と、L-HCA (岡山大・薬学教室大森合成) を0.1~20mMの濃度で用いた。両者のニューロンに対する効果には、差はなかった。電気泳動的投与の場合には、20mMHCAをつめたガラス電極(DC抵抗、60M $\Omega$ )に通電した。実験の際、HCA投与にさきだち、10mMアセチルコリン(ACh, Sigma), 10mMグルタミン酸(Glut, Sigma), 10mMシステイン酸(Sigma)による、そのニューロンの反応をみえた。電気泳動以外の実験に使用した薬物は、全て目的の濃度になるよう海水に溶かした。

ニューロン膜の蛋白質側鎖修飾剤として、Diisopropyl-fruorophosphate (DFP) (Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook Buchs England), 2,4,6-Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (Daiichi Kagaku), Para-nitrothiophenol (p-NTP) (Tokyo Kasai) を用いた。化学修飾剤は、適当な濃度、至適pHで必要時間ニューロンに作用し、その後余分の修飾剤はNSWを5~10分灌流して取り除いた。ニューロンのGmが修飾剤処理前とかわりないことを確認した後、HCA効果を調べた。一方、化学修飾剤それ自身では、ニューロンの興奮性およびGmには、変化を与えなかった。必要に応じ、10 $\mu$ M neostigmine (Sigma) を使用した。実験は17~22 $^{\circ}$ Cで行った。

## 結 果

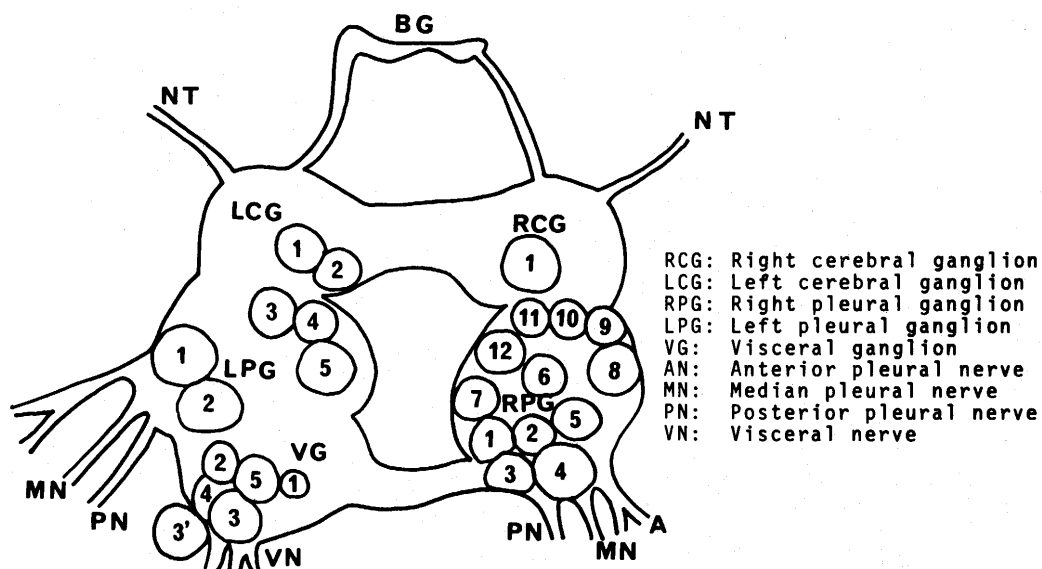
イソアワモチ食道環神経節は、背面観察で、図1のように、左右1対の脳神経節(Cerebral ganglia, C G), 外套神経節(Pleural ganglia, PG) および1個の内臓神経節(Visceral ganglion, VG) からなる。各神経節には、直径150~500 $\mu$ mのニューロンがあり、背面で26個数えられた。ニューロンの細胞体はneurone pileの結締織から突出しているが、軸索および起始部は、その中にうずもれている。シナプス下膜は、ニューロン起始部に存在している<sup>9)</sup>。HCA効果を膜電位(Em)とGm変化から、これらニューロンを大きく2タイプにわけることができた。HCA効果は、両タイプとも、閾値濃度は約0.1mMであり、5mM以上で最大の反応を示した。

### HCA効果

**HCA-脱分極型ニューロン**：背面にある約77%、20個のニューロンは、HCAで数10mV脱分極し2~3倍のGm増大を示した(図2A)。

**HCA-過分極型ニューロン**：26個のニューロン中6個(VG-5, RPG-1, LCG-1, RCG-1, VG-3, 3'このあとの2ニューロンは脱感受性を示した。)は、HCAにより、約2~3倍のGm増大を伴い

Fig. 1 Dorsal view of the esophageal ganglia of *Onchidium*.



数10mV過分極した(図3A)。このタイプのニューロンは、各神経節中に1個か2個分散している。しかし、HCA濃度の高い時(5~20mM)、著しい過分極ののち、Gm増大をわずかに伴う脱分極(静止電位から数mV)がみられる場合があった。このタイプについては、2個のニューロン(VG-5, RPG-1)にかぎり、特にHCA過分極の部分进行分析した。

**HCA感受部位:** 海水中のMgを2倍にして、周囲のニューロンからの入力を抑制して、HCA効果を観察した。HCA効果は、脱分極型および過分極型ともNSW中と同様であった。すなわちHCAは、記録しているニューロン自身に直接作用している。さらにHCAの感受性はニューロンのどの部位であるか、電気泳動

的にHCAを投与して調べた。図4は、その一例を示した。HCA含有電極の先端を、HCA-過分極型ニューロンの細胞体(上)と起始部(下)にできるだけ接近させて、-70nA通電でHCAを投与している。Emは、後者の場合にだけ約40mV過分極している。すなわち、HCAはシナプス下膜に直接作用している。脱分極型ニューロンについても、同様の結果が得られた。

**量-反応関係:** HCA濃度に対するGm変化は、ほぼ正比例するが3mM以上では、飽和した。図5は、脱分極型および過分極型ニューロンについての2例ずつの平均である。Gm増大が、HCA分子によって占有される受容膜部位の数に比例すると仮定する。これから1受容部位と反応するHCA分子数nが推定できる。

Fig. 2 HCA-D type cell. Effect of 5.0mM DL-homocysteic acid (HCA). Downward displacements (negative) of Em indicated the Gm produced by 0.25Hz square constant current pulses with a duration of 1sec (lower trace). Upward displacements (positive) are action potentials (amplitudes distorted by limited high frequency response of the pen). A: Continuous depolarization with increased membrane conductance (Gm). B: Voltage-current relationship during HCA application. R.P., original resting potential (-30mV). The intersection of the two V-I curves indicates the point of membrane potential reversal for HCA depolarization in normal sea water and in HCA sea water. C: Different neuron. Amplitude of HCA-induced responses against shifts of membrane potential. EHCA (where the line crosses the abscissa) is the membrane reversal potential for HCA depolarization. R.P., original resting potential (-49mV).

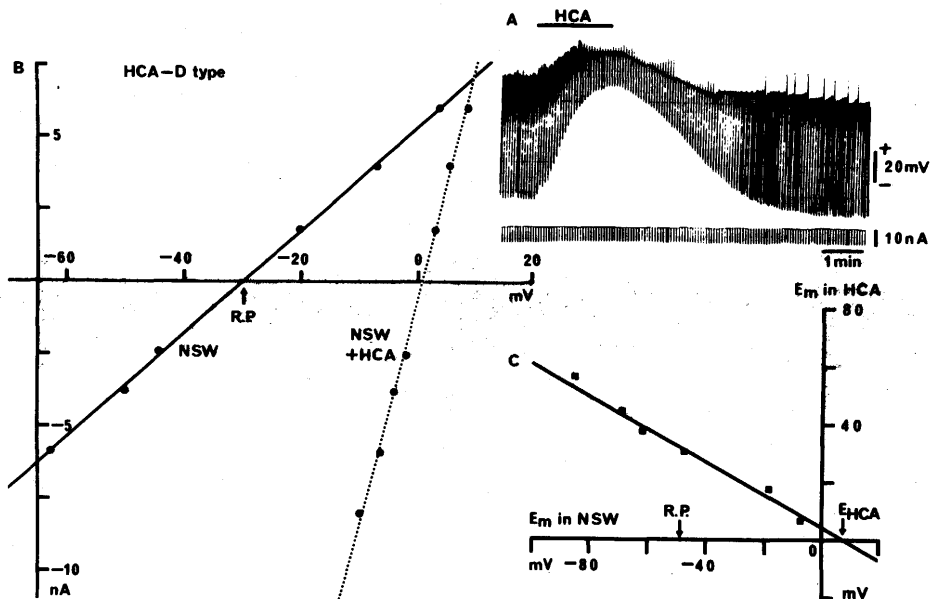


Fig. 3 HCA-H type cell. Effect of 5.0mM HCA. A: Continuous hyperpolarization with increased Gm. B: Voltage-current relationship during HCA application. R.P., original resting potential (-45mV). The membrane potential where intersection of the two V-I curves in normal and HCA sea water indicates the point of membrane potential reversal for HCA hyperpolarization. C: Different neuron. Amplitude of HCA-induced responses against shifts of membrane potential. EHCA (where the line crosses the abscissa) is the membrane reversal potential for HCA hyperpolarization. R.P., original resting potential (-40mV).

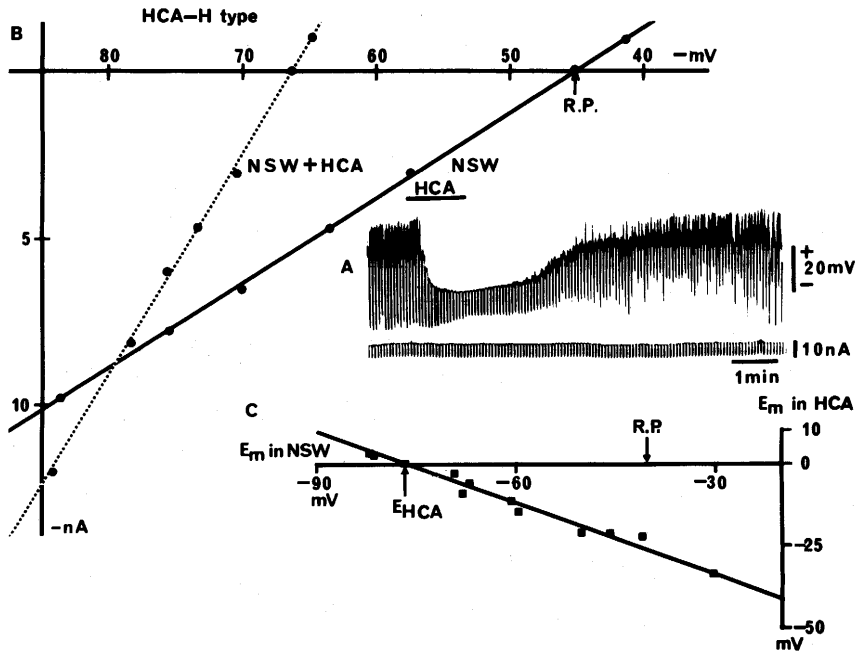
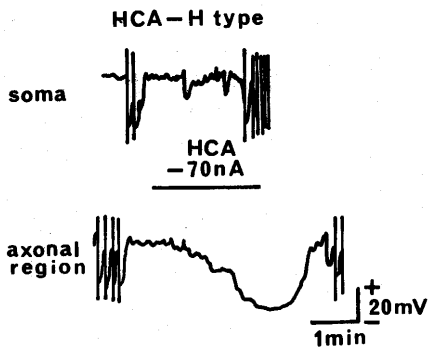


Fig. 4 HCA-H type cell. 20mM HCA. Electrophoretic HCA application on the somatic region (upper) and on the initial segment region (lower).

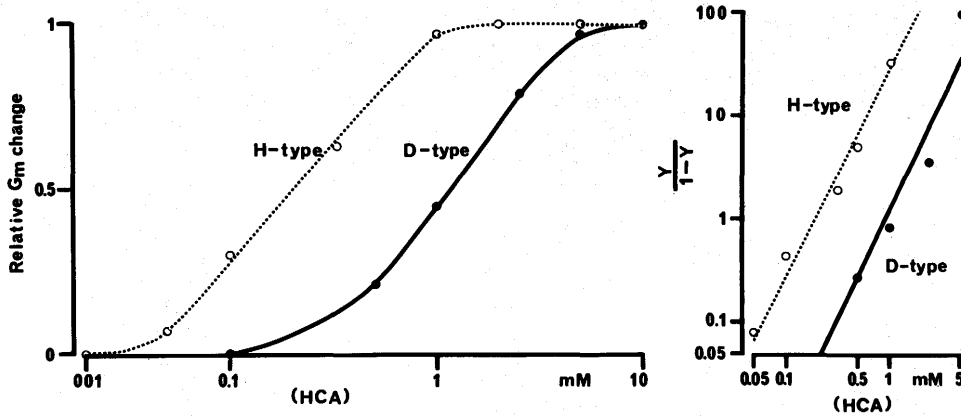


この場合、各ニューロンによって利用する受容部位数が異っているから、Gmの相対値を用い、nの計算は Hill プロットで行った<sup>4)</sup>。  
相対Gmの変化Yは次式に従った。

$$Y = (G_m - G_{m0}) / (G_{max} - G_{m0})$$

ここで、G<sub>m0</sub>およびG<sub>m1</sub>はそれぞれNSW中および各HCA濃度でのGmであり、G<sub>max</sub>は、HCAによる最大値である。図5左に示すように、HCA-脱分極型ニューロンでは、Gmは、約1.2mMで50%変化し、5mM以上では飽和している。HCA-過分極型ニューロンでは、Gmは、約0.2mMで50%変化し、1mM以上で飽和している。図5右に Hill プロットを示しているが、両タイプとも2.2の勾配で直線である。すなわち、HCA 2分子が1受容部位と反応することを示している。

Fig. 5 Effect of HCA concentration on relative Gm change (left) and a corresponding Hill plot (right) for HCA-D type cell and HCA-H type cell. See text for definition of Y.



HCA反応に関するイオン機構

**HCA-脱分極型ニューロン**：図2Aは、5mM HCAで約33mV脱分極し約3倍のGm増大を示したニューロンの1例(RPG-11)である。図2BにNSW中および5mM HCA作用中で、ニューロン膜に与えた電流値と発生した電圧降下の大きさをプロットした。両直線の交点が、HCAの逆転電位( $E_{HCA}$ )を示し、 $E_m$ より正の方向にあった。図2Cには、通電により、 $E_m$ をあらかじめ変化させ、その時生じたHCA脱分極の大きさを示している。 $E_m$ 減少により、HCA脱分極は小となり、一定の $E_m$ で消失し、さらに $E_m$ を減少すると、HCA分極は逆転した。一方、 $E_m$ 増加では、HCA分極は、正常 $E_m$ の場合より大きくなった。これから測定できる $E_{HCA}$ は、20個のニューロンで、 $+7.0 \pm 2.1$  mV ( $M \pm S.D.$ )であった。

静止電位より平衡電位の低いCa, NaのHCA効果におよぼす影響をRPG-11ニューロンでみた。NSW中のCa濃度を3倍に増加した時、このニューロンに対するHCA効果は、NSW中のそれとかわりなかった。

[Na]<sub>o</sub>を変化し、Na平衡電位を完全に移動した状態(約10分後)で、[Na]<sub>o</sub>に対する $E_{HCA}$ 変化とGm変化をプロットすると、図6のようになる。0.1[Na]<sub>o</sub>(45.8mM)と正常[Na]<sub>o</sub>間で $E_{HCA}$ とGmは、直線的に変化し、10[Na]<sub>o</sub>変化に対する $E_{HCA}$ 変化は、平均44mVであった。海水中Kを2倍および3倍にしたり、Clを0.1および0.05倍(29mM)に変化した時、HCA脱分極には、無関係であった。

以上のことより、HCAによる促進効果は、主としてシナプス下膜でのNa透過性増大の結果である。

Fig. 6 HCA-D type cell. 10.0mM HCA. Effect of [Na]<sub>o</sub> on reversal potential for HCA ( $E_{HCA}$ ) and Gm. Abscissa: Relative Na concentration. Ordinate: left, change in  $E_{HCA}$  ( $E_{HCAx} - E_{HCA1}$ ; x, [Na]<sub>o</sub> at x; 1, [Na]<sub>o</sub> at 1); right, change in Gm ( $G_{mx} - G_{m1}$ ; x, [Na]<sub>o</sub> at x; 1, [Na]<sub>o</sub> at 1).

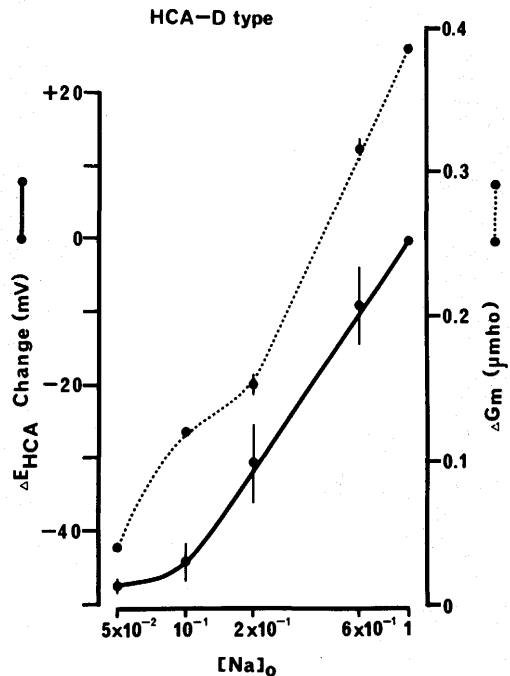
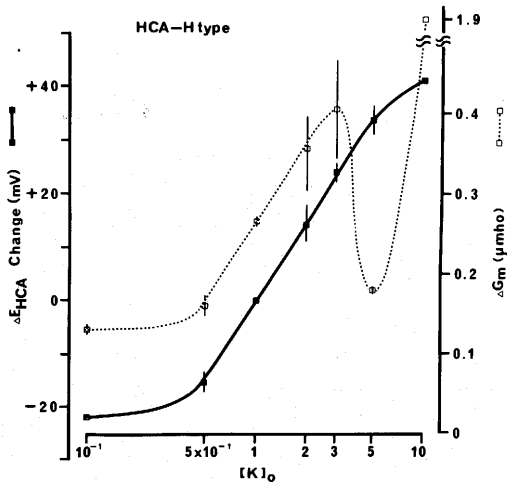


Fig. 7 HCA-H type cell. 10.0mM HCA. Effect of  $[K]_0$  on the reversal potential for HCA and Gm. Abscissa: Relative K concentration. Ordinate: left, change in  $E_{HCA}$  ( $E_{HCAx} - E_{HCA1}$ ; x,  $[K]_0$  at x; l,  $[K]_0$  at l); right, Gm change ( $G_{mx} - G_{ml}$ ; x,  $[K]_0$  at x; l,  $[K]_0$  at l in normal sea water).



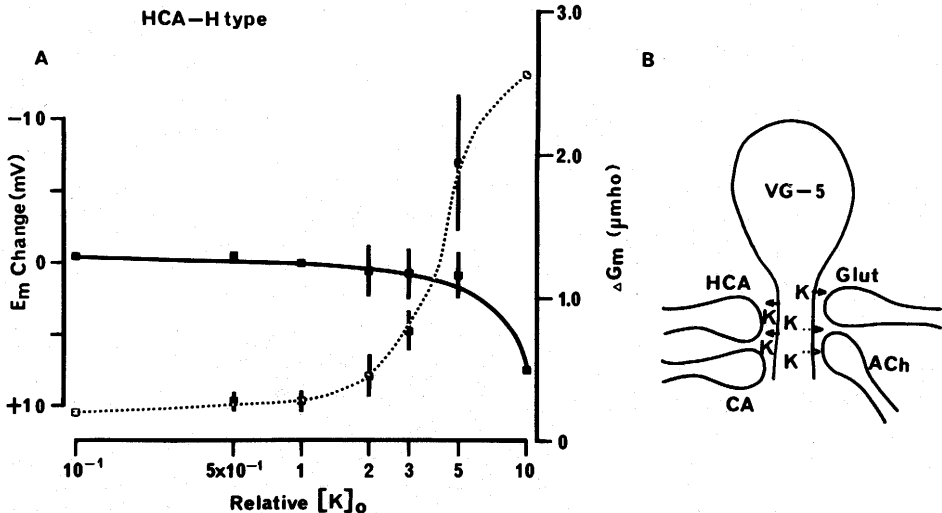
**HCA-過分極型ニューロン:** 図3Aは、5 mM HCAで約20mV過分極し、約2倍のGm増大を示したVG-5ニューロンである。図3Bは、NSW中および5 mM HCA作用中でのニューロン膜に与えた電流値と電圧降下をプロットしたものである。これから得られる $E_{HCA}$ は、 $E_m$ より約30mV過分極側にあった。図3Cは、 $E_m$ を変化させた時のHCA分極の大きさをプロットしたものである。すなわち、 $E_m$ 約-77mVでHCA-分極は逆転している。

$E_{HCA}$ が $E_m$ より過分極側にあることから、海水中のKとCl濃度を変化させ、HCA効果に対する影響を同じニューロンで調べた。ClをNSWの0.05 (29mM)にした時、 $E_{HCA}$ は-75.7mVでHCA効果は変化しなかった。

図7は、 $[K]_0$ を変化しK平衡電位を完全に移動した状態で、各 $[K]_0$ での $E_{HCA}$ 変化とGm変化を調べたものである。 $[K]_0$ が20から100mMに増加すると、 $E_{HCA}$ は減少し、5から50mM  $[K]_0$ 変化で、 $E_{HCA}$ 変化は、約48mVである。HCAによるGmは $[K]_0$ 増加に伴って直線的に増大している。従ってHCA過分極は、主としてK透過性増大の結果と結論できる。

図7に示すように5  $[K]_0$ で、著しいHCAによるGm増大がみられなかった。これを説明するために、海水中の $[K]_0$ 変化だけによる、 $E_m$ とGm変化をプロ

Fig. 8 HCA-H type cell. A: Effect of  $[K]_0$  on the membrane potential ( $E_m$ ) and Gm. Abscissa: Relative K concentration. Ordinate: left,  $E_m$  change ( $E_{mx} - E_{ml}$ ; x,  $[K]_0$  at x; l,  $[K]_0$  at l), right, Gm change ( $G_{mx} - G_{ml}$ ; x,  $[K]_0$  at x; l,  $[K]_0$  at l). B: Schematic diagram illustrating the axonal region in a HCA-H type cell (VG-5).



ットしてみた(図8A), [K]<sub>o</sub>を減少あるいは増加した場合, Emは0から8mV程度変化したが, Gmは高K海水中で2から5倍増大している. Nernstの理論式から, 5[K]<sub>o</sub>でEmは29mV脱分極するはずであるが, 実際は1mVの変化しかなかった. 一方, Gmは5[K]<sub>o</sub>で急激な増大が起っている. これは, 次のように説明されるであろう. このニューロンは, HCA以外に ACh, Glut およびシスチン酸に応ずる. AChによって, このニューロンは, Gm減少を伴い脱分極する. HCAをはじめとして, Glutやシスチン酸は, このニューロンに数10mVの過分極とGm増大をもたらした. これから, VG-5ニューロンには,興奮性および抑制性シナプスが多数存在すると考えられる. 実際, 電顕観察によると, イソアワモチニューロンでは, 軸索起始部にそれぞれ形態的に異なった数個のシナプスが集中している(図8B). [K]<sub>o</sub>増加は, これらのシナプス前線維末端を脱分極し, 各種の伝達物質の放出を促進する. 細胞体も脱分極するはずであるが, 実際1mV程度の脱分極しか起こらないのは, 結果として抑制性シナプスの効果が強いいため, Gm増大は生じて, 細胞体でのEm変化は, おさえられるためと考えられる. このため5[K]<sub>o</sub>の時のHCAによるGm増大がめだたないのであろう. 同様のことは, G-H細胞でもみられている<sup>4)</sup>.

**HCA反応と受容部分子構造について**

イソアワモチでは, ACh<sup>4)-6)</sup>, Glut<sup>4)6)7)</sup>, グリシン<sup>8)</sup>の伝達物質としての可能性が, すでに報告されている. これら薬物は, 同一ニューロンに対し, それぞれ特有の効果をもたらすから, 各受容部が平行に特有のイオン機構を備えていることになる. これら受容部が, 各薬物に独特のものであるかどうかを, 現在まで一番明らかになっているACh作用を指標にして, 個々のニューロンに対するAChとHCAとの関係から調べてみた.

まず, HCA脱分極型と過分極型ニューロンについて, ACh作用中のEmとGm変化およびその反応に関与するイオンの分析結果を, HCAのそれと比較検討した(表1). その結果は, 次の通りである.

**HCA-脱分極型ニューロン:** i) AChによりGm増大を伴い過分極するH-細胞<sup>9)</sup>. ii) AChでは一過性に, Glut では持続的に, Gm増大を伴い過分極するG-H細胞<sup>4)</sup>. iii) AChによりGm増大を伴い脱分極するD-細胞<sup>5)</sup>. AChによるこれら3タイプの反応は, すべてCl透過性増大による. つまりH-細胞はE<sub>Cl</sub>(-60mV)がEmより深いため過分極する. D-細胞は[Cl]<sub>o</sub>が高くE<sub>Cl</sub>(-30mV)がEmより浅い所にあるため脱分極する<sup>5)6)9)</sup>.

**HCA-過分極型ニューロン:** i) AChによりGm増

Table 1 Pharmacological classification of 26 *Onchidium* neurons according to HCA- and ACh- induced response. Left: Classification by HCA-induced response. D type, depolarized. H type, hyperpolarized. Right: Classification by ACh-induced responses. H cell, hyperpolarized. G-H cell, hyperpolarized by ACh (also by glutamate in which case Gm increases due to K permeability increase). D cell, depolarized. Pseud D1 cell, depolarized. D1 cell, depolarized. In all cases the arrow in the Gm column indicates the direction, increase (up) decrease (down), of change of both Gm and permeability to the indicates ion which causes the Gm change.

HCA				ACh			
Cell type	Em	Gm	Ion	Cell type	Em	Gm	Ion
D-Cell	Depo	↓	Na	H-Cell	Hyper	↓	Cl
				GH-Cell	Hyper	↓	Cl
				D-Cell	Depo	↓	Cl
H-Cell	Hyper	↓	K	pseud D1-Cell	Depo	↑	K
				D1-Cell	Depo	↓	Na



大を伴い脱分極するD<sub>1</sub>-細胞。ii) AChによりG<sub>m</sub>減少を伴い脱分極する偽D<sub>1</sub>-細胞である。D<sub>1</sub>-細胞はシナプス下膜受容部のNa透過性増大による。偽D<sub>1</sub>-細胞は、シナプス下膜以外の静止膜のK透過性減少による<sup>9)10)</sup>。これら2タイプニューロンに対するHCA作用は、抑制であるが、本論文では、主として偽D<sub>1</sub>-細胞に関して分析した。

以上より明らかに、1個のニューロンは、異なる薬物に対応し、それぞれ特有の反応を起す。これは、ニューロンのシナプス下膜(偽D<sub>1</sub>-細胞では静止膜)には、それぞれ特有の陰および陽イオンチャンネルを備えた受容部が複数個独立あるいは一部を共有して存在することを示している。一方、同一薬物でもニューロンによって異なる効果がみられた。このことは、薬物に対応する受容部分と、それに特異的に結合する薬物作用基が、ニューロンによって全くあるいは一部異なることを示している。この受容部と薬物との結合は、受容部が蛋白質からなること<sup>11)12)</sup>、および生理条件下で本実験で使用した薬物がイオン化していることより、イオン結合と考えられる。受容部と薬物との結合と同時に働くであろう受容部近傍のイオンチャンネルも蛋白質より構成されていると仮定すると、陰イオンあるいは陽イオンチャンネルであるかは、そのチャンネルの

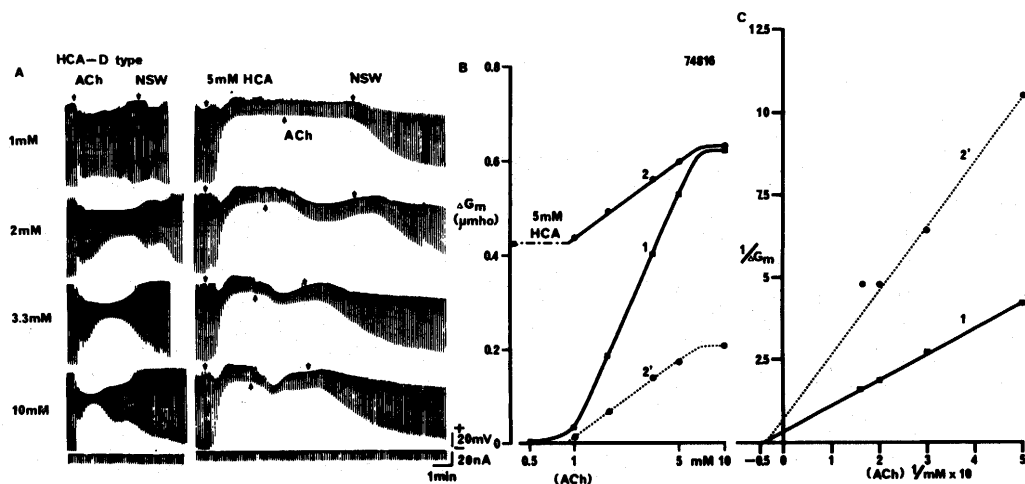
作用基であるアミノ酸あるいは他の分子構造の荷電の仕方によるであろう。

これらの仮定を確めるため、HCA-脱分極および過分極型ニューロンについて、HCA-受容部およびイオンチャンネルの分子構造を次の方法で分析した。i)すでに明らかになっているACh受容部との関係のみを、およびii)蛋白質側鎖の化学修飾剤を用い、シナプス部の種々のアミノ酸を修飾した。そして、EmおよびG<sub>m</sub>変化を指標としてHCA効果をみた。

**HCA-脱分極型ニューロンの分析:** HCAがACh受容部を共有するか検討した。図9Aに、その1例を示した。このニューロンは、10mM AChによって、飽和のG<sub>m</sub>増大を伴った過分極が、一過性に起こるG・H細胞である。ACh作用中2つの plateau がみられるが、早い方の反応を使用した。5mM HCAは、G<sub>m</sub>増大と脱分極を起こすが、その反応の安定なところで、種々濃度のAChを加えてみた。HCA脱分極は、AChの共存によって過分極側に一過性に移動している。低濃度AChでは、HCAと共存させた場合、G<sub>m</sub>増大は増強した。10mM AChでは、HCAの存在にもかかわらず、G<sub>m</sub>増大は対照のそれとほぼ一致した。

以上の結果は、図9Bに示している。曲線1は、ACh単独(G<sub>ACh</sub>)、2は5mM HCAとACh共存下でのG<sub>m</sub>

Fig. 9 HCA-D type cell. Effect of ACh on responses induced by 5.0mM HCA. Arrows indicate beginning of application of ACh, HCA or normal sea water. A: left, ACh alone; right, Application of ACh to the same neuron during peak of HCA response. B: 1, ACh only, 2, 5.0mM HCA plus ACh, 2', observed G<sub>m</sub> increase from addition of ACh in the presence of HCA. C: Plots of 1/ΔG<sub>m</sub> vs 1/[ACh] for ACh-induced responses. 1, ACh only, 2', observed G<sub>m</sub> increase by addition of ACh in the presence of HCA.



変化 ( $G_{HCA+ACh}$ ) である。1の曲線をもとに Hill プロットを計算すると、1.5mM以上のAChでは、 $n=2.3$ である。ACh 2分子が1受容部位と反応する。これは、沢田の結果と一致している<sup>6)</sup>。HCAとACh共存下では、AChによるGm変化は、明らかに抑制を受ける。5 mM HCA反応が一定と仮定して、HCA存在下でのみかけのAChによるGm変化 ( $G'_{ACh}$ ) をプロットした。それが図9B2'の曲線である。 $G'_{ACh}$ と $G_{ACh}$ について、 $\Delta Gm$ を速度、ACh濃度を基質濃度と仮定して、LINEWEAVER-Burkのプロットを行った(図9C)。x軸上で二直線が交るから、HCAがAChに対し非競合的に阻害していることを示すものである。

ACh受容部の構成分子の1要素であるセリン残基<sup>(13)(14)</sup>を、その特異的修飾剤であるDFP<sup>(15)(16)</sup>で修飾した後、HCA反応に対する影響をみた(図10A)。DFPはACh Eの活性部位にあるセリン残基も抑えるため<sup>(15)(20)</sup>、このニューロンを前もって、10 $\mu$ M neostigmineで10分間処理した後、実験を行った。この前処理によって、DFPによるACh E抑制作用が取り除かれた。

図10Aが10mM ACh、Bが10mM HCA反応である。10mM DFP (pH7.5) 1分間作用後、10分間NSWで灌流しAChを作用させると、ACh反応は、明らかにGm増大の減少がみられた。しかし、HCA反応には無効であった。DFP作用時間を30分にしても、HCA反応は、対照とかわりなかった。このことは、セリン残基が、HCA受容部には関係ないことを示している。

イオン機構として、HCA反応にNaが、AChにはClが関係することから、HCA受容部およびイオンチャンネルは、AChのそれらとは全く異なる分子構造であろう。

HCAの化学構造式から、薬物作用基として、 $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>、 $\alpha$ -COO<sup>-</sup>およびSO<sub>3</sub><sup>-</sup>基があげられる(図13)。AChとACh-受容部は、AChの正電荷を帯びた4級窒素原子と、それから約5.9Å離れたCO基が、それぞれ受容部の帯電部と結合する。これから、HCAのこれら3つの作用基と受容部も、HCAの薬物構造の主軸に沿って、両端に約6.4Å離れた作用基2個が、HCA受容部の構成分子と結合すると考えられる。これら薬物作用基と容易に結合できるニューロン膜のいくつかのアミノ酸分子を、それに特異的な修飾剤で抑えた時のHCA効果を、Gm変化を指標として調べた。

HCAの $\alpha$ -COO<sup>-</sup>とSO<sub>3</sub><sup>-</sup>基のような陰性帯電分子と容易に結合できるものとして、正電荷のNH<sub>3</sub><sup>+</sup>基が考えられる。したがって、NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基を特異的に修飾するTNBS<sup>(21)(26)</sup>を作用させた(図11A, B)。5 mM TNBS (pH8.2)を必要時間作用後、HCAによるGm増大は作用時間と共に減少した。この減少は、最初急激に後ゆるやかな直線になった。このことは、受容部NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基として、TNBSとの反応速度の速いものと、遅いものとの2種類の存在を示している(図11A)。TNBSの各作用時間におけるHCAによる1/Gmを、各作用時間に対してプロットすると(図11B)、直線となる。す

Fig. 10 Effect of diisopropyl fluorophosphate (DFP) (10.0mM, pH 7.5) on ACh- and HCA-induced responses. HCA-D type cell. A: hyperpolarization by 10.0mM ACh. B: Depolarization by 10.0mM HCA. ACh (or HCA) applied during time between two arrows.

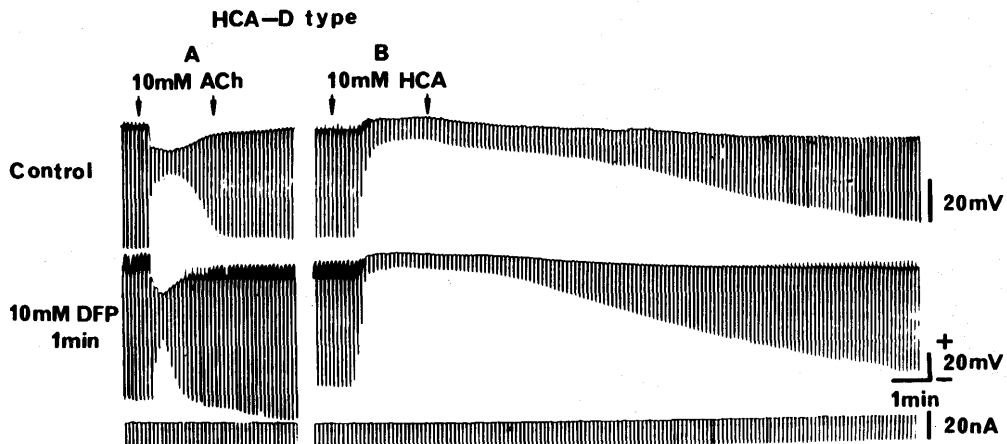
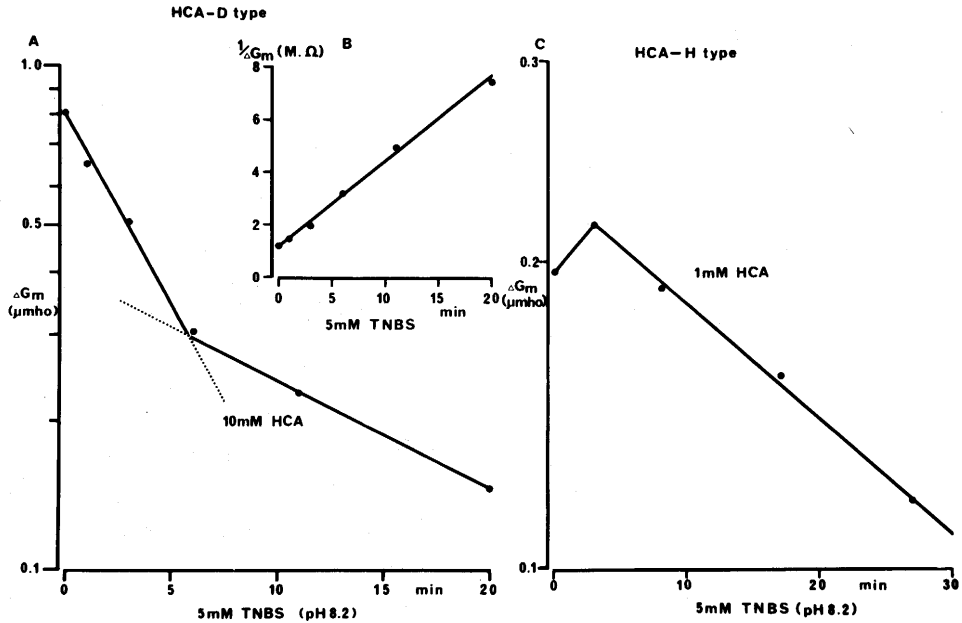


Fig. 11 Effect of 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (-5.0mM, pH 8.2) on HCA-induced responses. A: Reduction in HCA-induced Gm increase as a function of time perfused in TNBS in HCA-D type. B: Increase in HCA-induced resistance ( $1/G_m$ ) vs perfusion time in TNBS in HCA-D type. C: Reduction in HCA-induced Gm increase vs perfusion time in TNBS in HCA-H



なわち、二次反応的な $1/G_m$ の増加がみられるわけである。これらのことから、TNBSと反応速度の異なる2種の $\text{NH}_3^+$ 基が、HCA効果に関係すると考えられる。

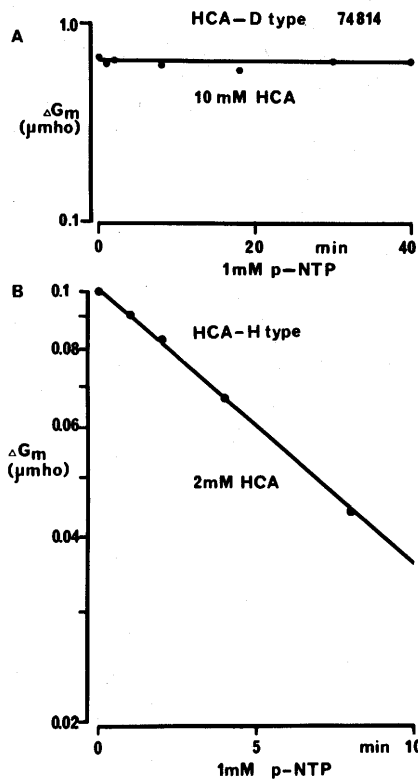
HCA-脱分極型ニューロンのNa透過性増大には、陰イオンチャンネルが関与するであろう。したがって、HCA効果に必要な2種類の $\text{NH}_3^+$ 基は、ともにHCA受容部のものであろう。また、生体膜の種々の機能に関与する $\text{NH}_3^+$ 基を有するアミノ酸として、リジン残基が一番考えられる<sup>26)</sup>。その結果、HCAの $\alpha\text{-COO}^-$ 基と $\text{SO}_3^-$ 基は、それぞれニューロン膜上に一定の距離で存在している $\text{NH}_3^+$ 基、おそらくリジン残基の $\epsilon\text{-NH}_3^+$ 基と結合するであろう(図13)。

陰イオンチャンネルの作用基として、 $\text{COO}^-$ 基が予想できるため、これを特異的に修飾するp-NTP<sup>27)~29)</sup>をニューロンに作用し、10mM HCAによる $G_m$ 増大に対する影響をみた。図12Aは、p-NTP作用時間に対するHCAによる $G_m$ 増大の変化を示している。40分間1mM p-NTP (pH7.5)を作用しても、HCA効果には何の変化もみられなかった。Na透過性増大に関

与するイオンチャンネルは、グルタミン酸やアスパラギン酸の $\alpha\text{-COO}^-$ 基、 $\gamma\text{-COO}^-$ 基<sup>29)</sup>ではないと思われる。それ以外のチャンネルの作用基として、恐らくチャンネルをつくっているヘリックス主鎖の $\text{CO}^-$ 基の可能性が考えられる。しかし、これに対する適当な修飾剤がないため、この点を確認することは、できなかった。ACh反応に対して、p-NTPは無効であった。ACh反応に関与するのは、陽イオンチャンネルであるから、これは、当然である。

**HCA-過分極型ニューロンの分析：** HCA-過分極型ニューロンについて、図14に、HCA効果単独(曲線1)および5mM ACh存在下でのHCA効果(曲線2)を示した。このニューロンは、偽D<sub>1</sub>細胞(VG-5)で、AChは $G_m$ 減少を起こす。低濃度HCAでは、5mM AChによるHCA効果の抑制がみられる。HCA濃度上昇により $G_m$ 増大は増加する。が、AChによる抑制は、やはり起っている。HCA-脱分極型ニューロンで行ったと同様、ACh存在下でのみかけの $G'_m$ を図14Aの曲線2'に示している。HCA単独およびACh存在下での効果からLINEWEAVER-BURKのプロット

Fig. 12 Effect of para-nitrothiophenol (p-NTP) (1.0mM, pH 7.5) on HCA response. A: HCA-D type cell. B: HCA-H type cell.



を行った (図14B). その結果, HCAとAChは競合的に阻害することが明らかとなった.

HCA-脱分極型ニューロンと同様10 $\mu\text{M}$ neostigmineで処理したのち, 10mM DFPを作用させた. DFP作用30分後に, HCAによるGm増大は, 40%の減少がみられた (図15). そして, DFP作用時間を延ばした時, Gm増大は徐々に減少した. 一方, ACh効果は, H-細胞と同様DFP作用時間と共に一次反動的に減少した. このため, DFPは, HCA受容部にも作用していると考えられる.

HCA反応に必要な受容部およびチャネルの分子構造を調べた. HCA-脱分極型ニューロンでは, HCAの $\alpha\text{-COO}^-$ 基,  $\text{SO}_3^-$ 基に対し $\text{NH}_3^+$ 基が必要であった. したがって, 5 mM TNBSを作用させた. 図11Cに示すように, HCAによるGm増大はわずかに増加したが, 作用時間を増すと一次反動的に減少している. これから, HCA受容部には, 1個の $\text{NH}_3^+$ 基が必要と考えられる. この $\text{NH}_3^+$ 基は, 脱分極型ニューロンと同様リジン残基の $\epsilon\text{-NH}_3^+$ 基であろう. TNBS作用中3分で一時的にGm増大の増加がみられる. これについては不明である. HCAの $\alpha\text{-NH}_3^+$ 基がニューロン膜の $\text{NH}_3^+$ 基と普段競合的に作用しあっていたのが, 除去されたためかもしれない.

もう一つの受容部あるいはチャネル分子として, 生体膜作用基として,  $\text{NH}_3^+$ 基以外に $\text{COO}^-$ 基が考えられる. ニューロン膜の $\text{COO}^-$ 基を p-NTPを修飾した時

Fig. 13 Possible binding reaction between HCA and HCA-receptor. A: HCA-D type. B: HCA-H type.

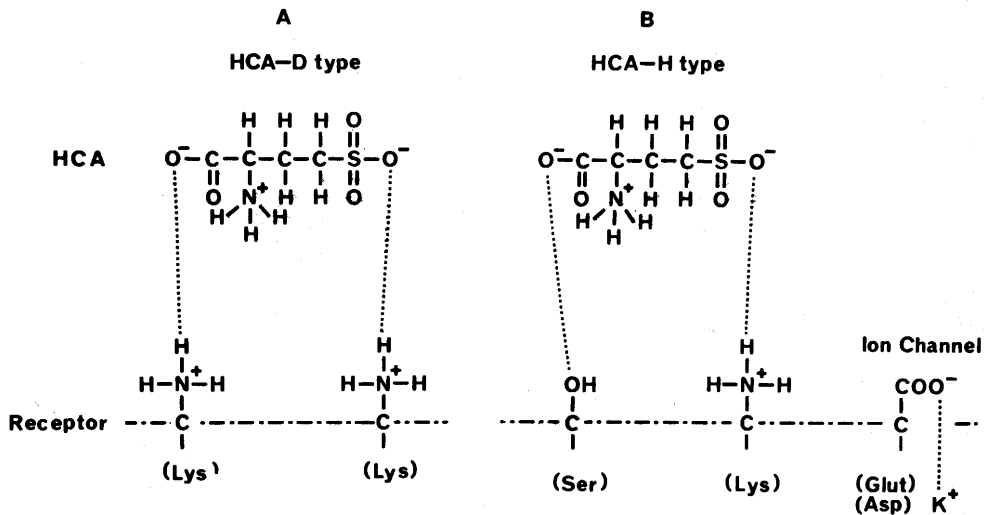


Fig. 14 Effect of HCA on response by 5.0mM ACh induced. A: 1, HCA only. 2, 5.0mM ACh plus HCA. 2', observed Gm increase from addition of HCA in presence of ACh. B: Plot of  $1/\Delta G_m$  vs  $1/[HCA]$  for HCA-induced responses. 1, HCA only. 2', observed Gm increase from addition of HCA in the presence of ACh.

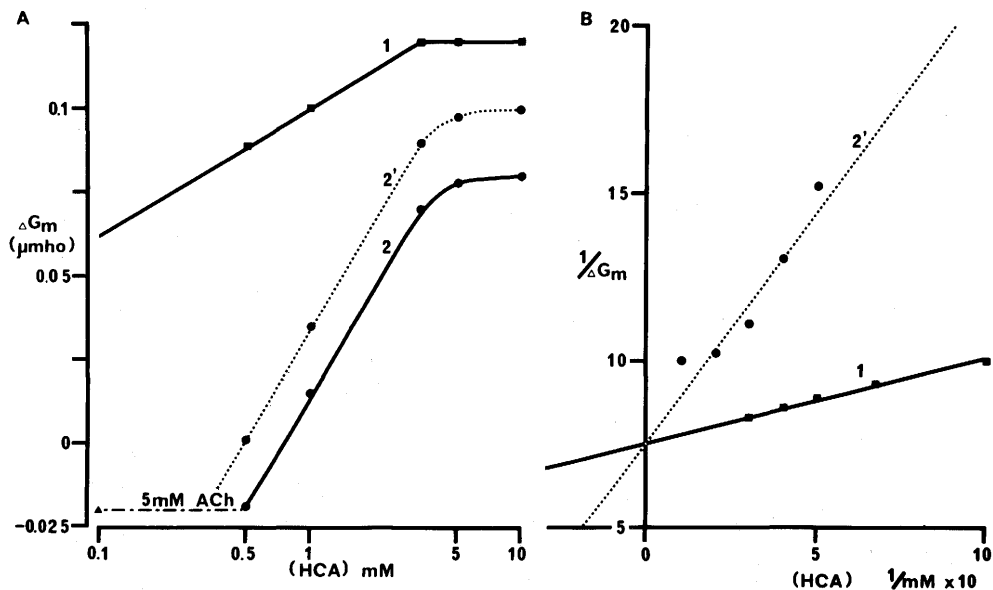
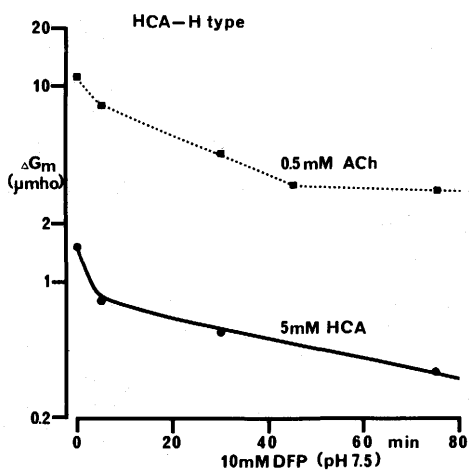


Fig. 15 Effect of diisopropyl fluorophosphate (DFP) (10.0mM, pH 7.5) on ACh- and HCA-induced Gm increase of HCA-H type cell. DFP reduced Gm increase in both cases as perfusion time increased.



のHCA効果を示したのが図12Bである。1mM p-NT P (pH7.5) 作用時間に伴って、HCAによるGm増大は、一次反応的に減少した。この結果、HCA-過分極型ニューロンでは、HCA反応に $\text{COO}^-$ 基も必要であることがわかった。しかし、HCAチャンネルの作用基は、陰性帯電を持つため、この $\text{COO}^-$ 基は、チャンネル構成分子内のもと考えられる。AChに関しては、p-NT Pは何らの効果もなかった。AChは静止膜のK透過性減少、HCAはシナプス下膜におけるK透過性増大である。したがって、Kチャンネルは、分子構造的に性質の異なるものであろう。かりに、ACh効果も p-NT Pが抑制したとすると、 $\text{COO}^-$ 基は、むしろ受容部分子の1つと考える可能性がでてくることになる。

結果として、HCA-過分極型ニューロンの受容部は、リジン残基の  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  基とセリン残基のOHが主構成要素である。そして、受容部のリジン残基の  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  基とセリン残基のOH基が、HCAの $\text{SO}_3^-$ 基および  $\alpha\text{-COO}^-$ 基とそれぞれ反応する可能性が強い(図13)。これは、分子間距離の長い薬物の受容部との結合の仕方は、薬物の主軸方向で結合すると考えられるためである。イオンチャンネルの作用基については、グルタミン酸やアスパラギン酸の $\text{COO}^-$ 基が主構成要素である

う。

## 考 察

HCA は哺乳類中枢神経系で、一般的興奮剤として使用されている<sup>1)</sup>。ニューロンに対する HCA の細胞外投与は、グルタミン酸、アスパラギン酸等の興奮性アミノ酸に比し、一番強い興奮作用を持っている。このHCA作用は、運動ニューロン、Renshaw ニューロン、介在ニューロン等に同程度に現われる、全く非特異的なものである。このことから、HCA はシナプス以外の細胞膜受容部で作用すると考えられる<sup>1)-3)</sup>。

### HCA 効果

イソアワモチニューロンでは、HCA はシナプス下膜に直接作用し(図4)、著明な Gm 増大を誘起する。そして Em の変化から2タイプのニューロン、脱分極型(図2)および過分極型(図3)に分けられる。Gm 増大を指標にした量-反応曲線から両ニューロンとも、HCA 2分子がシナプス下膜の1受容部位と反応することが判明した(図5)。本実験で、使用薬物濃度が一般に高いのは、ニューロン膜上に tropospongium cell 層が密着し、共に細胞内へ彎入しているためである<sup>4)</sup>。

**HCA-脱分極型ニューロン：**神経節ニューロン26個のうち20個は、HCA で数10mV脱分極した。これらニューロンは、白色光による双眼顕微鏡観察では、黄色色素を有し全体として褐色を呈する比較的小型のニューロンが大部分であった。EHCA は +7mV で、[Na]<sub>o</sub> を変化した場合の HCA 効果(図6)から、脱分極は、主として Na 透過性増大の結果と考えられる。

**HCA-過分極型ニューロン：**26個中6個のニューロン(VG-5, RPG-1, RCG-1, VG-3, とくにVG-3')が、HCAで数10mV過分極した。HCA 5mM以上では、Gm 増大を伴う過分極後、数mV脱分極した。アメフラシの単一シナプス前ニューロンが後ニューロンに対し、このように興奮性について抑制性という2相性反応を引き起こす<sup>20)21)</sup>。この場合、興奮性および抑制性反応は、それぞれ Na および Cl 透過性増大による。さらに薬物作用から、このアメフラシニューロンは、明らかに同一伝達物質に対し2種類の受容部が平行してあると考えられる。関与するイオンは異なるが、イソアワモチでも、このようなシナプス構造が存在するであろう。

これら6個のニューロンのうち、特に2個(VG-5, RPG-1)について、HCA 分極を分析した。こ

の2ニューロンは、細胞上層が白濁化した巨大ニューロン(直径500 $\mu$ m)で自発放電およびシナプス入力がある。グルタミン酸とシステイン酸によっても、HCAと同様の過分極効果が起こる。EHCAは約-77mVで、[K]<sub>o</sub> 変化の実験からKだけが、この過分極に関係している(図7)。G-H細胞のグルタミン酸による抑制も、K透過性増大である<sup>4)</sup>。

HCA-脱分極および過分極型ニューロンにおいて、[Na]<sub>o</sub> あるいは [K]<sub>o</sub> 10倍変化に対し EHCA 変化は、それぞれ44mVおよび48mVで、58mVと相違している。これは、シナプス部での電位変化を電気緊張的に、かなり離れた細胞体で記録しているためである<sup>4)</sup>。

### HCA およびACh 効果

HCA-脱分極および過分極型ニューロンについて、HCA と ACh 作用を比較検討した。すなわち、(i) HCA-脱分極型ニューロン：ACh によって、H-細胞、D-細胞およびG-H細胞に分類できた。(ii) HCA-過分極型ニューロン：ACh によって偽D<sub>1</sub>-細胞と D<sub>1</sub>-細胞に分類できた。さらに、これら2タイプのニューロンで HCA と ACh は両者ともシナプス下膜の受容部位に相互に関係しあうことが判明した(図9, 図14)。すなわち同一薬物を作用させても、ニューロンによって、その効果とそれに関与するイオンが全く異なる場合があること、同一ニューロンでも薬物構造によって、種々の反応を示すこと等が明らかになった。各ニューロン膜には、薬物と特異的に結合する受容部とその近傍に、受容部と密接な関係を持つイオンチャネルがあることを示している。受容部は、一個のニューロンに何種類か存在し、それぞれ特有のアミノ酸側鎖が構成要素になっているであろう。各薬物作用の相違は、ニューロン膜のどの受容部分子を薬物が選ぶか、あるいは選ぶことができるかによって決まる。この受容部分子の選択は、薬物作用基と受容部分子の蛋白質側鎖の結合のしやすさによるであろう。薬物と受容部分子との結合は、同時にイオンチャネルのイオン透過性変化をもたらすであろう。

HCA は、その化学構造から作用基として、 $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 基と  $\alpha$ -COO<sup>-</sup> 基および主軸にそって、約6.4Å 離れた SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 基があげられる(図13)。一方、ACh の N<sup>+</sup> と CO 基は、約5.9Å 離れているが、これが受容部分子と結合する状態から、HCA も  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 基と SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 基とが、あるいは、 $\alpha$ -COO<sup>-</sup> 基と SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 基が、受容部分子と結合すると考えられる。このため、受容部にもそれぞれ作用基に対応する2種のアミノ酸側鎖が、約6Åの距離

をもって、存在するであろう。この点を明らかにするため種々の蛋白質鎖鎖を特異的に修飾する化学修飾剤を用い、膜上の作動アミノ酸を修飾した時の HCA 効果のみた。化学修飾剤自体は、ニューロン膜に対し無効であった。

**HCA-脱分極型ニューロン**：HCA の  $\text{SO}_3^-$  基と  $\alpha\text{-COO}^-$  基がニューロン膜上の 2 個の  $\text{NH}_3^+$  基とそれぞれ結合する (図11)。一方、イオンチャンネルとして  $\text{Na}^+$  を取り込むアミノ酸として、 $\text{COO}^-$  基が考えられたが、結果はそうではなかった (図12)。 $\text{COO}^-$  基以外としては、膜蛋白ヘリックス鎖の  $\text{CO}^-$  基も考えられたが、適当な修飾剤がないため、この点を確認することはできなかった。

ACh 受容部のセリン残基の OH を修飾する DFP は、ACh 作用を抑制したが、HCA 作用に対しては無効であった。ACh と HCA が、非競合的な抑制をすること (図9B) も、このことを支持している。非競合的な抑制はまた ACh と HCA が、それぞれの受容部そのものを共有するのではなく、イオンチャンネルに関係する分子構造に作用していることを示すものである。

**HCA過分極型ニューロン**：このタイプのニューロンでは、ACh と HCA が競合的に作用し (図14)、DFP が程度の差はあるが ACh と HCA の作用を抑制し、また TNBS が一次反応的に作用した。一方、HCA が関係するシナプス下膜の陰イオンチャンネルとして、グルタミン酸やアスパラギン酸の末端  $\text{COO}^-$  基が、構成要素の一つとなっている。したがって、HCA の  $\alpha\text{-COO}^-$  基と  $\text{SO}_3^-$  基とが、それぞれニューロン膜上のセリン残基の OH とリジン残基の  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  基と結合する。ACh の関係する Kチャンネルは、静止膜のコンダクタンスを維持しているもので、HCA の Kチャンネルとは、性質の異なるものであろう。HCA と ACh が受容部に対し競合的な抑制を示した。このことは、両者の反応に、その受容部分子構造の一部を共有することを示すものである。この点脱分極型のイオンチャンネルに関係する受容部を共有するものと異なるわけである。

稿を終るに臨み終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った九大医学部生理学教室大村裕教授並びに熊大教育学部丸橋寿郎教授に深甚なる謝意を表します。また金沢医科大学生理学教室大山浩教授並びに金大医学部生理学教室山本長三郎教授の御指導、御助言に対し、御礼申し上げます。また教室の諸兄姉の御親切な御援助に対し御礼申し上げます。

実験動物採集に御協力いただいた鹿児島大医学部生理学教室の橋村三郎教授、前野巖助教授、安楽満男助手を

はじめ教室の皆様方に対し深く感謝します。

本研究の一部は文部省科学研究費 (811022)、NIH (NB-07201-01-02-03)、および Muscular Dystrophy Associations of America, Inc.) の援助によっています。

## 文 献

- 1) Curtis, D. R. & Watkins, J. C. : J. Physiol., 166, 1 (1963).
- 2) McLennan, H., Huffman, R. D., & Marshall, K. C. : Nature, 319, 387 (1968).
- 3) Obata, K., Takeda, K. & Shinozaki, H. : Exp. Brain Res., 11, 327 (1970).
- 4) Oomura, Y., Ooyama, H. & Sawada, M. : J. Physiol., 243, 321 (1974).
- 5) Oomura, Y., Ooyama, H. & Sawada, M. : Intern. Congr. Physiol. Sci., 23rd, Tokyo Abstr., 389 (1965).
- 6) 沢田正史 : 日本生理誌, 31, 491 (1969).
- 7) Ooyama, H., Oomura, Y. & Sawada, M. : Congr. Physiol. Sci., 23rd, Tokyo Symp. on Comp. Neurophysiol. Abstr., 33, (1965).
- 8) Oomura, Y., Sawada, M., Tanikawa, T. & Ooyama, H. : Nature, 250, 258 (1974).
- 9) Oomura, Y., Ooyama, H. & Sawada, M. : Intern. Congr. Physiol. Sci., 24th Washington, D. C. Abstr., 330 (1968).
- 10) Freeman, A. R. : J. Neurobiol., 4, 567 (1973).
- 11) Edwards, C., Bunch, W., Marfey, P., Marois, R. & Meter, D. : J. Membrane Biol. 2, 119 (1970).
- 12) Stuesse, S. & Katz, N. L. : Am. J. Physiol. 224, 55 (1973).
- 13) Hinterbuchner, L. P. & Nachmansohn, D. : Biochem. Biophys. Acta., 44, 554 (1960).
- 14) 丸橋寿郎, 佐藤 誠, 谷川孝子, 大村 裕. : 熊本大学教育学部紀要, 23, 91 (1974).
- 15) Wilson, L. B. & Cabid, E. : J. Am. Chem. Soc., 78, 202 (1956).
- 16) Nelson, W. L. & Barnum, C. P. : J. Neurochem., 6, 43 (1960).
- 17) Morgan, P. H., Robinson, N. C., Walsh, K. A. & Neurath, H. : Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 3312 (1972).

- 18) Means, G. E. & Feeney, R. E. : タンパク質の化学修飾法 (石井信一監訳) 東京, 広川書店 1973.
- 19) Goldstein, A., Aronow, L. & Kalman, S. M. : Principles of Drug Action, New York, Harper & Row 1968.
- 20) Matheja, J. & Degens, E. T. : Advances in Enzymology, New York, Tohnwily & Son 34, 1 (1971).
- 21) Sato, C., Titani, K. & Narita, K. : J. Biochem, 60, 682 (1966).
- 22) Tokuyama, H., Kubo, S. & Tonomura, Y. : J. Biochem, 60, 701 (1966).
- 23) Freedman, R. B. & Radda, G. K. : Biochem, J., 108, 383 (1968).
- 24) Loverde, A. & Strittmatter, P. : J. Bio. Chem., 243, 5779 (1968).
- 25) Kasai, H., Takahashi, K. & Ando, T. : J. Biochem, 66, 591 (1969).
- 26) Sato, M. & Maruhashi, J. : Fedn. Proc., 31, 509 (1972).
- 27) Tonomura, Y., Nakamura, H., Kinoshita, N., Onishi, H. & Shigekawa, M. : J. Biochem., 66, 599 (1966).
- 28) Kinoshita, N., Kubo, S., Onishi, H. & Tonomura, Y. : J. Biochem., 65, 285 (1969).
- 29) Sato, M. & Maruhashi, J. : Soc. Neurosci., 3rd Annual Meeting 308 (1973).
- 30) Blankenship, J. E., Wachtel, H. & Kandel, E. R. : J. Neurophysiol., 34, 76 (1971).
- 31) Levitan, H. & Tauc, L. : J. physiol., 222, 537 (1972).

#### Abstract

Two kinds of neurons of *Onchidium*, i. e. depolarization (D) and hyperpolarization (H) types responding to applications of DL-homocysteic acid (HCA) were studied by intracellular microelectrodes. The changes in membrane potentials ( $E_m$ ) were accompanied with membrane conductance ( $G_m$ ).

1. Electrophoretically applied HCA produced both changes at the initial segment where the presynaptic terminal was localized.

2. The relationship between the HCA concentration and the  $G_m$  change was suggestive of two HCA molecules reacting with a single receptor site.

3. The reversal levels for the depolarization and hyperpolarization were at +7 and -77mV respectively. By changing the external ion composition, the D-and H-types were the result of an increased permeability of the subsynaptic membrane to Na and K respectively.

4. ACh produced both  $E_m$  and  $G_m$  changes in both types. Either HCA or ACh reduced the response produced by one alone.

5. Diisopropyl fluorophosphate (DFP) which modified the serine residues, one of the molecular compositions of the ACh-receptor, reduced the ACh-response. DFP did not affect the HCA-depolarization but the HCA-hyperpolarization. The HCA-receptor may be different from the ACh-receptor in the D-type but partly common in the H-type in the molecular configuration. This shows that one molecular structure of the HCA-receptor in the H-type neuron may consist of the serine residue.

6. After modification of  $NH_3^+$  groups in the receptor membrane by trinitrobenzenesulphonic acid, the HCA response in both D- and H-types decreased. The poss-



ible binding fashion of HCA molecule on the receptor membrane in the D- and H-type neurons were discussed.

7. After modification of  $\text{COO}^-$  groups in the receptor membrane by para-nitrothiophenol, the HCA response decreased not in the D-type but in the H-type neuron. The possibility of modification of negative charged ionic channel for K was considered.

---