

神経情報伝達の分子機構

新潟大学脳研究所神経薬理学部門 三品昌美

Molecular Basis of Neural Signalling

Masayoshi MISHINA

*Department of Neuropharmacology, Brain Research Institute,
Niigata University*

The nicotinic acetylcholine receptor (AChR) is an archetypal neurotransmitter-gated ionic channel. Structure-function relationships of the nicotinic AChR have been studied by analysing the functional properties of receptors of different subunit compositions produced by expression of the corresponding cDNAs and those of mutant receptors produced by expression of the cDNAs altered by site-directed mutagenesis. For example, the single-channel properties of bovine nicotinic AChRs of different subunit compositions, in conjunction with the developmental changes observed in the muscular contents of the subunit mRNAs, suggest that replacement of the γ -subunit by the ϵ -subunit is responsible for the functional alteration of the nicotinic AChR during muscle development. Furthermore, functional analysis of nicotinic AChR mutants generated by site-directed mutagenesis indicates that three clusters of negatively charged and glutamine residues neighbouring the hydrophobic segment M2 of the α -, β -, γ - and δ -subunits, probably forming the three anionic rings, are major determinants of the rate of ion transport through the channel.

The muscarinic AChR mediates a variety of cellular responses through the action of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. The existence and the primary structures of multiple muscarinic AChR species have been revealed by cloning and sequence analysis of the cDNAs. The antagonist-binding properties of the individual muscarinic AChR species expressed from cDNAs (or genomic DNAs), together with the differential tissue location of the mRNAs encoding them, indicate that the muscarinic AChR heterogeneity in tissues with respect to antagonist binding can be accounted for

Reprint requests to: Masayoshi MISHINA,
Department of Neuropharmacology, Brain
Research Institute, Niigata University,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経薬理学部門

三品昌美

by the presence of individual molecularly distinct muscarinic AChR species or various combinations of them. The agonist-induced responses in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells and *Xenopus* oocytes expressing the individual muscarinic AChR species provide evidence that the molecularly defined muscarinic AChR subtypes are selectively coupled with different effector systems, albeit not exclusively.

Key words: Nicotinic acetylcholine receptor, Muscarinic acetylcholine receptor,

Ionic channel, Subtype

ニコチン性アセチルコリン受容体, ムスカリン性アセチルコリン受容体,

イオンチャンネル, サブタイプ

神経伝達物質受容体はシナプスでの情報伝達に中心的役割を担っている膜蛋白であり, その構造, 機能及び調節機構の解明は脳・神経系の理解に必須である. 我々は, 代表的な神経伝達物質受容体であるニコチン性ならびにムスカリン性アセチルコリン受容体について, クローン化した cDNA から機能を有する受容体を発現させる系を開発し, さらに cDNA の site-directed mutagenesis により種々の変異を受容体に導入し, これらの cDNA より発現させた受容体の機能を電気生理学的, 薬理学的ならびに生化学的に解析することにより, アセチルコリン受容体の構造と機能の関係を分子レベルで追求してきた. これらの研究は, 従来個別に進められてきた脳・神経系の生化学, 生理学, 薬理学などの諸分野を統合して総合的に脳・神経系を研究する道を開くことになった.

アセチルコリン受容体は脳・神経系の情報伝達に中心的役割を果す神経伝達物質受容体の典型であり, ニコチン性とムスカリン性に大別される. ニコチン性アセチルコリン受容体はアセチルコリン依存性イオンチャンネルであり, 細胞膜のイオン透過性を直接調節することにより神経筋接合部の情報伝達を担っている. 一方, ムスカリン性アセチルコリン受容体は GTP 結合性制御蛋白 (G 蛋白) を介して情報を伝達し, イノシトールリン脂質代謝回転の促進, アデニレートシクラーゼの抑制, K チャンネル開閉の調節などの作用を通じて中枢神経細胞の興奮, 心筋収縮の抑制, 平滑筋収縮の促進, 外分泌腺の分泌促進を始め多様な生理機能を示す. 本研究の目的は, ニコチン性アセチルコリン受容体チャンネルによるイオン透過調節の分子機構を明らかにすることならびにムスカリン性アセチルコリン受容体の機能的多様性の分子的基盤を明らかにすることである.

ニコチン性アセチルコリン受容体の α , β , γ および δ サブユニット cDNA の in vitro 転写により調製した mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞において翻

訳させることにより, 本受容体の四種類のサブユニットを可能な全ての組み合わせで発現させ, これらの機能を電気生理学的および生化学的に解析した結果, α サブユニットが γ サブユニットまたは δ サブユニットと組み合わせることが有効なアゴニスト結合部位の形成に必要であることおよび本受容体は β , γ , δ サブユニットのいずれか一つを欠損させてもある程度アセチルコリン依存性イオンチャンネル活性を示し得ることが明らかとなった.

またウシ骨格筋アセチルコリン受容体の 5 番目のサブユニットを cDNA のクローニングにより発見し, ϵ サブユニットと命名した. 5 種類のサブユニットを卵母細胞で発現させたところ, 単一チャンネルの性質が異なる 2 種類の受容体が生成し, 一方が α , β , γ および δ サブユニットより成り, 他方が α , β , ϵ および δ サブユニットより成ることが示された. 両者の単一チャンネルの性質を牛胎児骨格筋の非シナプス型受容体および成牛骨格筋のシナプス型受容体の性質と比較するとともに骨格筋の発生過程における 5 種類のサブユニット mRNA の変動を調べることにより, 神経支配に伴って起こるニコチン性アセチルコリン受容体の機能的変化は γ サブユニットから ϵ サブユニットへの切り換えに基づくことが明らかとなった.

さらに cDNA の改変と発現によりニコチン性アセチルコリン受容体 α サブユニットの疎水性領域 M1, M2, M3, M4 のそれぞれを他の膜蛋白の疎水性膜貫通領域で置換し, これらの変異が受容体機能に及ぼす影響を解析した結果, M4 領域は他の異なるアミノ酸配列を有する疎水性膜貫通領域で機能的に代替され得るのに対し, M1, M2 および M3 領域はその機能的役割を果すために疎水性のみでは不十分であることが明らかとなった. また, cDNA の site-directed mutagenesis により透過イオンに直接影響を与えると考えられる推定膜貫通領域近傍

の荷電アミノ酸残基に点変異を導入し、これらの変異が単一チャンネルコンダクタンスに及ぼす影響を cDNA の発現系とパッチクランプ法を用いて解析した。その結果、疎水性領域 M2 近傍の三箇所の負電荷を有するアミノ酸残基を、電荷を持たないアミノ酸残基あるいは正電荷を有するアミノ酸残基に置換した場合に、イオン透過速度が大きく減少し、またその膜電位依存性が変化するのを見出した。さらに、膜の外側あるいは内側に添加した Mg^{2+} の阻害効果を解析することにより、上記三箇所のアミノ酸残基の細胞膜に対する位置関係を決定した。これらの結果から、各サブユニットの疎水性領域 M2 近傍の負電荷を有するアミノ酸残基およびグルタミン残基が三つの環状構造を形成して、アセチルコリン受容体チャンネルのイオン透過速度を制御していることおよびこれらの環状構造と疎水性領域 M2 がイオンチャンネルの内壁を形成していることが明らかとなった。

cDNA のクローニングによりムスカリン性アセチルコリン受容体には一次構造を異にするサブタイプが複数個存在することを示した。さらに、クローン化した cDNA および遺伝子から四種類のムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ (mAChRI-IV) をそれぞれアフリカツメガエル卵母細胞などに *neuroblastoma-glioma* 雑種細胞 NG108-15 に発現させ、これらの細胞のアゴニストに対する応答ならびに発現させた各サブタイプの薬理学的性質を解析することにより、ムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプが別個の遺伝子産物であること、これらのサブタイプが組織分布を異にし、ま

たそれぞれが特有のアンタゴニスト結合特性を有することが従来言われてきた本受容体の薬理学的不均一性の分子的基盤となっていること、さらに本受容体サブタイプが異なる効果器と選択的に共役することが明らかとなった。また、脊椎動物神経細胞のムスカリン性興奮には M 電流の抑制を介してサブタイプ mAChRI と mAChRIII が関与していることが示唆された。さらに mAChRI と mAChRII との間のキメラ受容体を作製し、これらを実験動物細胞に発現させ、アセチルコリンに対する細胞応答を解析した。その結果、疎水性領域 V と VI と間の領域がムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプの効果器との選択的共役に関与していることが明らかとなった。

最近、GABA_A 受容体、グリシン受容体およびグルタミン酸受容体のサブユニットの一次構造が決定された結果、これら一群の神経伝達物質依存性イオンチャンネルは基本構造においてニコチン性アセチルコリン受容体に類似していることが示された。またムスカリン性アセチルコリン受容体の基本構造は、ロドプシン、アドレナリン受容体、セロトニン受容体、サブスタンス K 受容体、アンジオテンシン受容体などの G 蛋白を介して情報を伝達する受容体のそれに類似していることが明らかとなった。したがって、神経伝達物質受容体はその構造と機能から二つの大きなファミリーに分類され、ニコチン性およびムスカリン性アセチルコリン受容体の構造と機能に関する知見は、広く二群の神経伝達物質受容体の構造と機能に普遍化し得るものと考えられる。