

氏名 加 藤 健 一

学位（専攻分野） 博士（学術）

学 位 記 番 号 総研大甲第147号

学位授与の日付 平成7年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Contractile Properties of the Guinea Pig Vas
Deferens

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 亘 弘

教 授 山 岸 俊 一

教 授 小 幡 邦 彦

教 授 岡 田 泰 伸

教 授 菅 野 富 夫（北海道大学）

The vas deferens smooth muscles play an essential role in the transport of spermatozoa and seminal emission from the testis to the urethra. However the mechanisms and regulatory factors of their contraction remained in almost unknown. Thus, the contractile responses to neurotransmitters and excess external K^+ in the guinea pig vas deferens have been studied in this thesis, with reference to cellular mechanisms of muscle innate contraction and relaxation.

In Chapter 2, the basic contractile properties of the guinea pig vas deferens were investigated. Contractile responses to $100 \mu M$ of noradrenaline (NA), adenosine triphosphate (ATP) and acetylcholine (ACh) were markedly altered by cooling the bath solution to $25^\circ C$.

The NA-induced contractions were inhibited by prazosin but not by propranolol or yohimbin, indicating that the α_1 -adrenoceptor was dominant in the vas deferens. Pirenzepine (M_1 antagonist) was more potent at inhibiting the ACh-induced contractions than antagonists of other muscarinic acetylcholine receptor subtypes, suggesting that the M_1 -muscarinic acetylcholine receptor was dominant. In the ATP responses, prior treatment with α, β -methylene ATP blocked ATP-induced contractile responses. Suramin, recently accepted as a P_{2x} purinergic receptor blocker, attenuated contractions induced by a high concentrations of ATP ($100 \mu M$) and completely abolished responses to the low concentration ($10 \mu M$).

NA-, ATP- and ACh-induced contractions were almost completely inhibited by deprivation of extracellular Ca^{2+} , although nifedipine (L-type Ca^{2+} channel blocker, $10 \mu M$) did not inhibit completely the tonic phase of the NA- and ACh-induced contractions. The ATP-induced responses were inhibited by nifedipine. These data suggest that the NA-, ATP- and ACh-induced contractions require the influx of Ca^{2+} from the extracellular space, and that a nifedipine-insensitive pathway, presumably receptor-operative Ca^{2+} -channels may contribute to the NA- and ACh-induced influx.

In Chapter 3, the contractile responses to various concentrations of NA, ATP and ACh, and to excess external K^+ in the epididymal, middle and prostatic portions of the guinea pig vas deferens were investigated by measuring the isotonic contraction and monitoring the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) using fura-2 fluorescence. In the epididymal portion, the contraction evoked by each of these agonists was biphasic comprising a transient followed by a tonic phase. In the middle portion, NA and ACh evoked biphasic contractions whereas the ATP-induced contraction was an almost monophasic transient. In contrast, in the prostatic portion, only transient contractions were evoked by

ACh and ATP, while the NA-induced contraction was oscillatory. The maximum responses of tonic contraction to each of the neurotransmitters were largest in the epididymal portion, decreased in the middle and were almost absent in the prostatic portion. These regional differences in the contractile properties of the vas deferens were also evident upon stimulation with excess external K^+ . Such regional differences in contraction may involve regional differences in the Ca^{2+} homeostasis and/or the sensitivity of the contractile apparatus to intracellular Ca^{2+} ions. The physiological relevance of the muscle innate regional contractile differences are unknown, however, it may contribute to the transport of spermatozoa by preventing back flow of the luminal contents, together with neuronal regulation.

In Chapter 4, the effects of caffeine, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and forskolin on the NA-induced contraction were investigated. All drugs reduced the tonic contraction induced by NA in a concentration-dependent manner. Methylxanthines (caffeine and IBMX), by inhibiting the phosphodiesterase activity, cause an increase in intracellular cAMP concentration. Forskolin, by directly stimulating adenylate cyclase, also causes an increase in intracellular cAMP concentration. It is thus suggested that the reduction of NA-induced tonic contraction by these drugs may be mediated by cAMP. Pretreatment with these drugs inhibited the NA-induced contraction in a concentration-dependent manner, suggesting that cAMP affected not only the tonic phase but also the initiation of contraction evoked by NA. The effects of cAMP on NA-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses were investigated using the same protocol as for the contractile responses. Forskolin ($10 \mu M$) did not have significant sustained effects on the NA-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise. In only the epididymal portion, a small transient $[Ca^{2+}]_i$ decrease was observed. In contrast, pretreatment with forskolin ($10 \mu M$) completely inhibited the $[Ca^{2+}]_i$ increase. With excess external K^+ stimulation, the same concentration of forskolin did not inhibit the $[Ca^{2+}]_i$ increase. However, although sufficient increases of $[Ca^{2+}]_i$ were observed, contractile responses to excess K^+ were attenuated by pretreatment with forskolin. The inhibiting effect of forskolin suggests that relaxation mechanism(s) independent of decrease in $[Ca^{2+}]_i$ exists in the smooth muscle and that cAMP may be involved in this Ca^{2+} -independent relaxation.

In summary, it is concluded as follows:

- 1) The contractile responses to neurotransmitters were demonstrated to be potentiated by cooling the ambient temperature, whereas such hypothermic potentiation was not observed for excess K^+ -induced contraction of guinea pig vas deferens.
- 2) The α_1 -adrenergic, M_1 -muscarinic acetylcholine and P_{2x} -purinergic receptors play essential roles in mediating the neurotransmitter-induced contractions of

the vas deferens.

3) Extracellular Ca^{2+} is necessary for the neurotransmitter-induced contraction of vas deferens. Nifedipine-insensitive Ca^{2+} influx pathways may be indispensably involved in the NA- and ACh-induced contractions.

4) In the guinea pig vas deferens, there are regional differences in the contractile responses to various neurotransmitters. These differences may involve variation in the mechanisms of Ca^{2+} homeostasis and the sensitivity of contractile apparatus to intracellular Ca^{2+} ions.

5) Increases of intracellular cAMP level may directly relax NA- and excess external K^+ -induced contractions by a mechanism independent of reduction in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Increased cAMP may also inhibit the NA-induced Ca^{2+} influx via nifedipine-insensitive Ca^{2+} pathways, thereby inhibiting NA-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise, and contraction.

審査結果の要旨

申請者、加藤健一君は、モルモット輸精管を構成する平滑筋を研究対象として、神経伝達物質（ノルアドレナリン、NA；アデノシン3リン酸、ATP；アセチルコリン、ACh）の収縮に果たす役割と弛緩の機構を、これらの神経伝達物質や外液高濃度 K^+ （high- K^+ ）による脱分極刺激に対する収縮応答、および細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）変化を測定することによって解析した。収縮は等張性収縮測定法によって解析し、 $[Ca^{2+}]_i$ は Ca^{2+} 感受性蛍光色素（fura-2）を用いた顕微鏡鏡画像解析法によって動的に測定した。この研究によって得られた主な結果は以下に示す通りである。

1. 輸精管平滑筋の前立腺側では、NA と ACh（各 $100\mu M$ ）によって引き起こされる収縮は速く立ち上がりすぐに弛緩する一過性の収縮であるが、辜丸側では遅く立ち上がりその後持続相をもった二相性の収縮であることが観察された。この部位による収縮特性の差は、神経伝達物質による影響を抑制した状態でhigh- K^+ 刺激を行うことによっても同様に観測されることから、輸精管平滑筋自体が持つ収縮機構の部位差であることが明らかにされた。

2. $[Ca^{2+}]_i$ 測定の結果からも、NA、ATP そして ACh によって引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ の変化に部位差が存在することが観察され、これが収縮機構の部位差をに關与している可能性が示唆された。

3. Ca^{2+} -free 溶液を用いた実験により NA によって引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と収縮には、今まで知られていた細胞内貯蔵 Ca^{2+} からの Ca^{2+} 放出よりも Ca^{2+} の流入経路を介した Ca^{2+} 流入による寄与が大きいこと、またそれはL型 Ca^{2+} チャネル阻害剤であるニフェジピンでは抑制されない Ca^{2+} の流入経路であることが示唆された。

4. 細胞内 cAMP の濃度を上昇させることが知られているカフェイン、イソブチルメチルキサンチン（IBMX）およびフォルスコリン（FK）は、濃度依存的に持続性収縮を弛緩させた。また前処理によって持続相は消失した。これらの弛緩作用と $[Ca^{2+}]_i$ の変動の比較から、両者が必ずしも一致しておらず、これらの cAMP による弛緩過程は $[Ca^{2+}]_i$ に依存しないものであることが明らかになった。また、この cAMP の働きは、cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素（PKA）の特異的な阻害剤であるH-89により影響されず、PKAを介さない過程であることが示唆された。

5. FKで前処置することによって、NA 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇及び二相性の収縮は完全に抑制される。しかし、同じ FK 前処置でも、high- K^+ 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制されず一過性の収縮が観測された。このことより、cAMP のもう一つの作用として（3）で述べた NA による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑えることによっても、収縮を抑制している可能性が示唆された。

この研究成果の1、2については投稿済みであり、3、4、5についても投稿の準備が完了している。

この研究は、収縮反応実験が盛んに行われていながら、正確な収縮特性が未だ明らかにされていなかったモルモット輸精管平滑筋において、部位によって収縮反応が異なることを明らかにしたことにとどまらず、この筋で細胞内 cAMP による収縮抑制をはじめて見だし、その機構に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制とそれとは独立した抑制作用の2つの機構の存在を

示唆し、今後のモルモット輸精管平滑筋収縮機構の研究に指針を示した点で大変重要なものである。よって、加藤君の論文は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認められる。

また、審査委員会は加藤健一氏の提出論文の内容及び、関連事項について質問した。発表内容は明快であり、かつ高い水準のものであった。質問に対しては的確な回答を行い、研究内容及び研究技術等の関連事項についてもよく把握しており、理解力が優れていることが示された。背景となる、研究分野の質問についても満足な回答が得られ、十分な学識を有すると判断された。博士論文の英語も適正であり、語学力も十分と判断された。

以上により、審査委員会は加藤健一氏の論文内容、学識、語学力ともに博士（学術）を授与するに値すると判定した。