

魚類の水晶体筋収縮に關与するムスカリン性受容体サブタイプの生理学的検討

藤本正昭, 須山真由美, 山本純士

A pharmacological study of the muscarinic receptors mediating the contraction of teleost lens muscle

Fujimoto, M., Suyama, M. and Yamamoto, J.

Abstract The teleost uses a lens muscle, the retractor lentis, for accommodation to change the distance between the lens and retina. It is innervated by the parasympathetic nerve and regulated with a muscarinic cholinergic receptor. However, the receptor subtype mediating the muscarinic contraction is unknown. In the present work, we examined the subtype in the receptor of the bluegill (*Lepomis macrochirus*) lens muscle. The enucleated eye was hemisected and the anterior segment was set in a perfusing chamber equipped with two Ag/AgCl electrodes for electrical stimulation. The image of contraction of the lens muscle was displayed on a video screen with a CCD camera via a binocular microscope and simultaneously stored on tape. The degree of contraction was measured directly on the display.

We tested the effect of adiphénine or pirenzepine (M1 subtype antagonists) gallamine (M2 subtype antagonist) and 4-DAMP (M3 subtype antagonist) on the contraction elicited by carbachol (a nonselective agonist) or electrical stimulation of the nerve in vitro. The muscle contraction was elicited by carbachol or inhibited by these antagonists in a dose-dependent manner. Among the inhibitors, 4-DAMP was the most potent, while the other two antagonists showed about 10-fold weaker effects. From these results, we concluded that the subtype of the muscarinic receptor mediating the contraction of the bluegill lens muscle is M3. The mammalian ciliary muscle has also been reported to have the M3 receptor. It is intriguing that the homologous organ for accommodation both in the mammals and in teleosts has the same muscarinic receptor subtype.

Keywords: bluegill, lens muscle, muscarinic ACh receptor, subtype

はじめに

動物の行動においては、感覚器としての視覚器が重要な役割を果たしており、特に狩猟・捕食・逃避等においては対象物の迅速な認知が必要とされる。その最初の段階は遠近調節すなわち視覚器による対象物への焦点合わせである。哺乳類等の高等脊椎動物では一般に毛様体による水晶体の厚みの調節により遠近調節を行う。一方、魚類では、水晶体筋の収縮により球状の水晶体と網膜との位置間隔が変化し、それにより遠近調節が行われる。水晶体は背側部に付着している懸垂靭帯によりつりさげられており、腹側部に水晶体筋 retractor lentis が付着している (Beer 1894)。水晶体筋は平滑筋よりなり、副交感神

経に属する動眼神経の節後繊維により神経支配を受け、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する神経筋伝達が行われていると考えられている (Meader 1936; Sivac 1974; Somiya 1987)。

ムスカリン性アセチルコリン受容体は分子生物学的解析により現在5種のサブタイプ(分子種)、すなわち m1・m5、に分類されている。一方特異的なリガンドを用いた生理学的あるいは薬理的解析では4種のサブタイプ、すなわち M1 - M4 が確立されている (Ramachandran et al. 1989)。また、魚類の水晶体筋は、その収縮が遠近調節の主役となっていることから、哺乳類の毛様体筋に対応するものであると考えられる。哺乳類毛様体筋の受容体サブタイプについても基礎的実験が行われており (Suzuki 1983; Poyer et al. 1994; Takai et al. 1997)、その同定によ

り臨床眼科における診断あるいは副作用の少ない治療薬の開発が期待されている (Goyal, 1989)。

Fujimoto ら (1995) は、種々の伝達物質を水晶体筋の発達しているブルーギル (魚類, バス科) の眼球に灌流投与し, その水晶体筋の収縮に及ぼす効果をビデオにより直接測定・分析し, 実際にムスカリン性アセチルコリン受容体を介する神経支配を受けていることを明らかにしている。本研究ではさらに, ブルーギルの水晶体筋のムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプを生理・薬理的に検証し, 特に哺乳類の毛様体や虹彩との比較の観点から論じる。

材料と方法

実験には松江市内の池で採集した体長 10 - 15cm のブルーギル, *Lepomis macrochirus*, を用いた。魚は実験に供するまでの間, プラスチック製の水槽に入れ, 市販のキンギョ用の粒餌を与えて飼育した。実験では先ず, 魚を水中にいれ氷冷麻酔を施した後, 断頭及び脊髄穿刺を行い眼球の摘出を行った。次いで眼球を角膜と平行に赤道面で半切し, 水晶体および水晶体筋を含む前半分 (角膜側) の眼盃標本 (水晶体筋系標本) を作製し, 眼盃内の硝子体をアスピレーターで吸引除去し, 角膜側を下にして記録容器に固定した。総数約 80 匹のブルーギルを用い, 2 - 3 匹の動物から 3 - 4 個の標本作製し用いた。

実験に用いた記録容器と関連装置は前報とほぼ同様である (Fujimoto et al. 1995 の Fig. 1 参照)。容器は次に示すリンガー液 (正常リンガー液) に酸素ガスを飽和し継続的に灌流した。(mM): NaCl, 128.0; KCl, 2.6; CaCl₂, 1.8; Tris-HCl, 5.0; pH 7.4。灌流は拍動式ポンプ (ペリスタポンプ, アトー SJ-1211 型) により 0.5 ml min⁻¹ の流速で行った。薬物は所定の濃度になるようにこのリンガー液に溶解した。

水晶体筋の収縮は実体顕微鏡で観察すると共に, その映像を CCD カメラにより通常の VHS ビデオテープに記録し後の解析に供した。電気刺激による収縮は, 電気刺激装置 (日本光電, SEN-3301) からの矩形波パルスを用いて通電し, 水晶体筋を支配している神経を刺激することにより惹起した。このパルス (電圧 5V, 持続時間 5ms) は 50/秒の割合で 2 秒間連続的に与えた。

標本セット後, 生理学的に水晶体筋が安定するまで, 正常リンガー液で約 30 分置き, 実験を開始した。最初に正常リンガー液中で対照データを 3 分間撮影記録し

た。次に, 試験薬物を溶解したリンガー液 (試験液) に切り替え, その 3 分後に再び記録を行った。その後同様の時間配分で試験液の薬物濃度を 10 倍ずつ上げていき, それぞれデータを記録した。終了後は回復を調べるため正常リンガー液に戻し, 30 分後に再度記録を行った。収縮量の解析では, モニターのディスプレイ上に映像を再生し, 管面上での長さ変化を直読した。データは各濃度における薬物間の効果の差を t-test により検定し, 有意レベルを $P < 0.05$ に設定した。

リンガー液に溶解した試験薬物は, 非選択的アゴニストとしてはカルバコールを, M1 アンタゴニストとしてはフィザレミンあるいはピレンゼピンを, M2 アンタゴニストにはギャラミンを, M3 アンタゴニストには 4-DAMP を用いた (SIGMA 社)。薬物の切り替えはプラスチック製のバルブを用いて手動で行った。

結 果

最初にムスカリン性アセチルコリン受容体のアゴニストであるカルバコールの作用を調べた。カルバコールでは濃度依存的に 10^{-7} M あたりから水晶体筋の収縮が促進され始め, 10^{-5} M では最初の正常リンガー液中の長さの 50 パーセントまでの収縮が観察された。

次にムスカリン性アセチルコリン受容体の M1 アンタゴニストの一種, アディフェニンのカルバコールによる筋収縮に及ぼす作用を調べた。まずカルバコールの濃度を 10^{-6} M 一定とし, 加えてアディフェニンの 10^{-9} 乗モルから

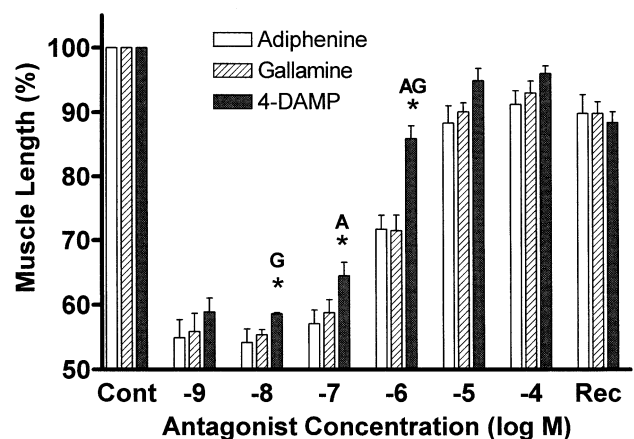


図1 10^{-6} M のカルバコール収縮に及ぼすアンタゴニストの効果。横軸は対数で目盛った濃度 (M) を, 縦軸は筋の長さを%で示す。ただし, Cont は静止時の筋長を, Rec は正常リンガー液に戻して 30 分後の筋長を示す。A* は Adiphenine に対して, G* は Gallamine に対して, 4-DAMP の効果に有意差があることを示す。

-4乗モル迄をそれぞれ溶解したリンガー液に3分ずつ切り替え収縮の変化を観察した。結果は、正常リンガー液中での筋の静止長を100%とし、各溶液中での収縮の度合いを計算した。全く同様にして、M2アンタゴニストの一種、ギャラミン及びM3アンタゴニストの一種、4-DAMPのカルバコールによる筋収縮に及ぼす作用を調べた。これら3種のアンタゴニストによる収縮抑制効果をまとめて図1に示す。Recは正常リンガー液に戻した後30分後の値を示す。それぞれ 10^{-7} Mあたりから抑制作用が観察され、アディフェニンとギャラミンの効果はほぼ同様であったが、 10^{-6} Mでは4-DAMPは他の二者よりも高い効果を示した。

図2は逆に、一定濃度のアンタゴニスト存在下における各種濃度のアゴニストによる収縮を示す。 10^{-6} Mのアンタゴニストを共存させ、カルバコールの濃度を-9乗モルから-4乗モルまで変化させると、アディフェニンとギャラミンではカルバコール濃度が-7乗モル以上になると明らかな収縮が観察されたが、4-DAMPでは-6乗モル以上からであり、その収縮も軽度であった。

次に電気刺激によって引き起こされる収縮に及ぼすアンタゴニスト作用について調べた。先ず十分な刺激強度で一度電気刺激を行い、このときの収縮高を100%とした。その後 10^{-9} から 10^{-4} Mのアンタゴニストを溶解したリンガー液を順に3分ずつ灌流し、同じ強度の電気刺激による収縮への影響を調べた。図3はM1アンタゴニストの一種、ピレンゼピン、M2アンタゴニストの一種、ギャラミン及びM3アンタゴニストの一種、4-DAMPによる抑制効果を示したものである。ピレンゼピン及びギャラミンでは、-5乗モル以上の濃度で電気刺激による収縮に対する抑制効果が顕著となったが、4-DAMPでは-6乗モ

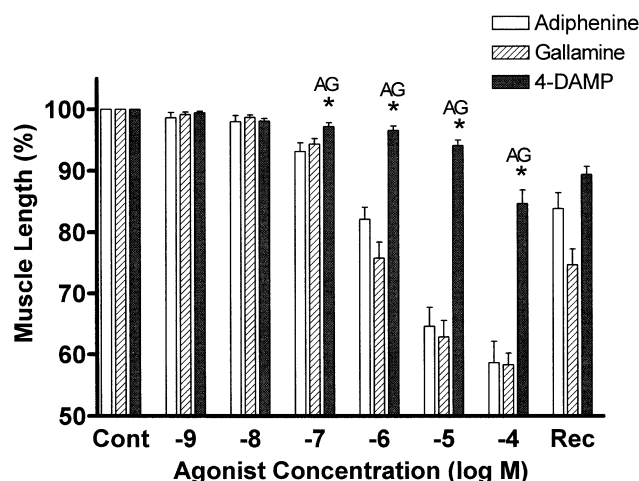


図2 種々の濃度のカルバコール収縮に及ぼす 10^{-6} Mのアンタゴニストの効果。他は図1と共通。

ル以上で明らかな抑制効果が生じた。また、ピレンゼピン及びギャラミンでは、-4乗モルになると収縮がほとんど見られなくなったが、4-DAMPでは-5乗モルですでに完全に収縮しなくなった。このようにアンタゴニストの作用には約10倍の開きがあることが示された。また、前二者では、正常リンガー液に戻すと30分後には50%以上の回復を示したが、4-DAMPでは、いまだ回復の兆候が見られなかった。

考 察

硬骨魚の視覚の遠近調節は水晶体筋により行われている。水晶体筋の発達は、その魚の摂餌行動と関係しているといわれる (Sivak 1968)。すなわち、一般にコイやアユなどの草食性魚の水晶体筋は発達が悪く細い糸状を呈している。一方、スズキや本研究で用いたブルーギルなどは非常に発達した大きい水晶体筋をそなえている (Somiya and Tamura 1973; Somiya 1987)。肉食魚では餌の小動物や小魚を追うのに迅速で正確な遠近調節が要求されるためと考えられている。

水晶体筋は短毛様体神経の支配を受けており、その細胞体は毛様体神経節中にある。水晶体筋の収縮はアトロピンで阻害されることから、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する神経筋伝達が行われていることが知られていた (Sivak 1968; Fujimoto et al. 1995)。本研究ではさらに、ブルーギル水晶体筋標本(神経終末部を含む)

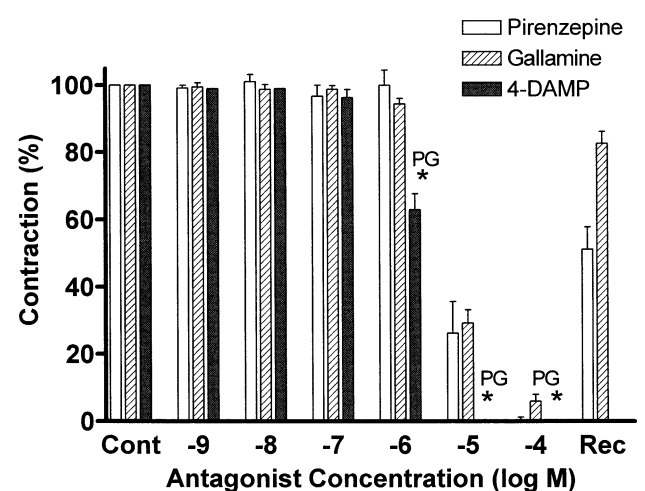


図3 神経の電気刺激による収縮に及ぼすアンタゴニストの効果。横軸は対数で目盛った濃度(M)を、縦軸は正常リンガー液中における収縮高を100%(Cont)として正規化した各濃度における収縮率を示す。Recは実験後正常リンガー液に戻して30分後の収縮率を示す。P*はPirenzepineに対して、G*はGallamineに対して、4-DAMPの効果に有意差があることを示す。

を用いて、ムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプに対応するアゴニストやアンタゴニストを用いて生理・薬理的に調べた。一般に哺乳類では、中枢神経にはすべてのサブタイプが発現しているが、自律神経節ではM1が、分泌腺ではM1・M3が、そして平滑筋ではM2・M3が発現されている。この事実を基に、本研究ではM1・M2・M3に対応する3種類のアンタゴニストを用いた。

その結果M1及びM2アンタゴニストに比較した場合、M3サブタイプのアンタゴニストは、アゴニストであるカルバコールによる収縮をより低濃度で抑制することが判明した(図1及び2)。しかしながらこれらの場合は、筋に分布する神経終末から実際に放出されるAChによる収縮を調べているわけではない。この関係を調べるためには、神経刺激を行い、水晶体筋に線維を送っている短毛様体神経の終末から放出される内因性のAChとの拮抗作用を検討する必要がある。その方法については既にSomiya(1987)やFujimotoら(1995)の報告がある。

結果は図3に示されており、この実験においてもカルバコールの投与による収縮に対する抑制作用の場合と同様に、4-DAMPによる抑制効果が最も強かったことから、ブルーギル水晶体筋のムスカリン性アセチルコリン受容体のサブタイプはM3であると結論される。

進化的にみると、両生類のカエルの眼においてもその背腹側には二つの水晶体筋が存在しその収縮により水晶体は前方に突出する(Walls 1942)。爬虫類になると、陸上生活に適応し、遠近調節筋は横紋筋へと変化し、調節機構は水晶体自身の変形へと変わっていった。このように水生脊椎動物と哺乳類とでは遠近調節の原理そのものは全く異なっている。しかしながら、哺乳類の遠近調節を制御している毛様体筋は平滑筋であり、その点ではむしろ魚類や両生類と同じであると言える。Poyerら(1994)はアカゲザルの毛様体筋のアセチルコリン性リセプターのサブタイプがM3タイプであることを報告している。またTakaiら(1997)はウシの毛様体平滑筋細胞について同様にM3タイプであることを示している。

毛様体と同様に眼球内に装置された筋肉調節系では、網膜に入射する光量を調節している虹彩がある。Woldemussieら(1993)はヒトの培養虹彩括約筋で、Masudaら(1995)はラットの虹彩散大筋で、それぞれM3サブタイプのムスカリン性伝達がおこなわれていることを報告している。本研究の結果は、魚類の眼内筋の収縮が哺乳類の相同器官と類似の伝達機構により制御されていることを明らかにしており、脊椎動物の遠近調節を進

化の観点から検討する上で非常に興味深いものである。今後、さらに多くの動物種について遠近調節機構の比較を行うことにより、その進化の様子がよりいっそう明らかとなるにちがいない。

謝 辞

本研究の基礎的予備実験を行った安井直美氏、田中潤二氏に感謝いたします。

引用文献

- Beer, T. (1894) Die Accommodation des Fischeauges. Pflügers Arch. ges. Physiol. 58: 523-650.
- Fujimoto, M., Kunioka, H. and Katayama, H. (1995) Pharmacology of the retractor lentis muscle of the bluegill (*Lepomis macrochirus*). J. Comp. Physiol. A, 176: 673-677.
- Goyal, R. K. (1989) Muscarinic receptor subtypes: Physiology and clinical implications. N. Engl. J. Med., 321: 1022-1029.
- Masuda, Y., Yamahara, N.S., Tanaka, M., Ryang, S., Kawai, T., Imaizumi, Y. and Watanabe, M. (1995) Characterization of muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rat iris dilator muscle. Br. J. Pharmacol., 114: 769-776.
- Meador, R. G. (1936) The innervation of the muscle of accommodation in the eye of the teleost *Holocentrus*. J. Morph., 59: 163-172.
- Poyer, J. F., Gabelt, B.T. and Kaufman, P.L. (1994) The effect of muscarinic agonists and selective receptor subtype antagonists on the contractile response of the isolated Rhesus monkey ciliary muscle. Exp. Eye Res., 59: 729-736.
- Ramachandran, J., Peralta, E. G., Ashenazi, A., Winslow, J. W. and Capon, D. J. (1989) The structural and functional interrelationships of muscarinic acetylcholine receptor subtypes. BioEssays, 10: 54-57.
- Sivak, J. G. (1968) Interrelation of feeding behavior and accommodative lens movements in some species of North American freshwater fishes. J. Fish. Res. Board Can., 30: 1141-1146.
- Sivak, J. G. (1974) The refractive error of the fish eye. Vision Res., 14: 209-213.

- Somiya, H. (1987) Dynamic mechanism of visual accommodation in teleost: structure of the lens muscle and its nerve control. Proc. R. Soc. Lond. B, 230: 77-91 .
- Somiya, H. and Tamura, T. (1973) Studies on the visual accommodation in fishes. Jpn. J. Ichthyol., 20: 193-206.
- Suzuki, R. (1983) Neuronal influence on the mechanical activity of the ciliary muscle. Br. J. Pharmacol., 78: 591-597.
- Takai, Y., Awaya, S, and Takai, A. (1997) Activation of non-selective cation conductance by carbachol in freshly isolated bovine ciliary muscle cells. Pflügers Arch., 433:705-712.
- Walls, G. L. (1942) The vertebrate eye and its adaptive radiation. Hafner Publ. Co., New York, N.Y. [1962]
- Woldemussie, E., Feldmann, B. J. and Chen, J. (1993) Characterization of muscarinic receptors in cultured human iris sphincter and ciliary smooth muscle cells. Exp. Eye Res., 56: 385-392.

抄 録

硬骨魚の遠近調節は水晶体筋により，水晶体と網膜との距離を変化させることにより行われている．水晶体筋は短毛様体神経を通じて副交感神経支配を受けており，

ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する神経筋伝達が行われている．神経終末部を含むブルーギル水晶体筋標本を用いて，ムスカリン性アセチルコリン受容体の薬理的サブタイプの同定を試みた．筋長の測定は，実体顕微鏡による像をビデオディスプレイ画面上に拡大し行った．アゴニスト及びアンタゴニストは灌流により投与し，一定濃度のアゴニスト存在下でのアンタゴニストの効果及び電気刺激応答のアンタゴニストによる抑制効果を指標とした．アゴニストとしてはカルバコールを，M1 アンタゴニストとしてはフィザレミンあるいはピレンゼピンを，M2 アンタゴニストにはギャラミンを，M3 アンタゴニストには4-DAMPを用いた．筋収縮はこれらのアンタゴニストによって濃度依存的に阻害された．一定濃度のアゴニスト存在下では，サブタイプM3のアンタゴニストである4-DAMPが最も高い阻害効果を示した．また，電気刺激による筋収縮も4-DAMPにより最も強く阻害されることが判明した．これらの結果から，この水晶体筋の受容体サブタイプはM3サブタイプであると結論された．哺乳類の遠近調節を司る毛様体筋や虹彩筋の収縮などもM3サブタイプのムスカリン性アセチルコリン受容体を介しているとの報告があり，脊椎動物の進化の観点からも非常に興味深い．