モルモット結腸紐に対するアラニンと グリシンの収縮作用について

札幌医科大学 第二生理学教室

石 沢 光 郎, 宮 崎 英 策

STIMULATING EFFECTS OF ALANINE AND GLYCINE ON GUINEA-PIG TAENIA COLI

Mitsuo ISHIZAWA and Eisaku MIYAZAKI

Department of Physiology, Sapporo Medical College, Sapporo

Effects of alanine and glycine on the mechanical and electrical activities of guinea-pig taenia coli were investigated. Alanine (0.1–10 mM) and glycine (0.5–10 mM) produced a dose dependent contraction of guinea-pig taenia coli. The stimulating effects of alanine and glycine were not inhibited in the presence of atropine (5 μ M), tetrodotoxin (0.1 μ g/ml), diphenhydramine (4 μ M), methysergide (3 μ M), strychnine (10 μ M), and were not influenced by treatment with indomethacin (3 μ M). However, these effects were inhibited in the presence of a Ca antagonist, verapamil (10 μ M). When the electrical activities of the taenia coli were recorded by the single sucrose-gap method, alanine and glycine (5–10 mM) produced a reduction of membrane potential and increased spike heights and frequencies of action potential. In LiCl or Choline-Cl and in Na-isethionate solutions, the stimulating effect of alanine was not abolished, but was completely inhibited in KCl-depolarized preparation.

From these results, it is considered that both alanine and glycine may directly produce contraction by a depolarization of the cell membrane of guinea-pig taenia coli.

I. 緒 論

いくつかのアミノ酸が中枢神経系における神経伝達物質候補として注目されている (Curtis & Johnston, 1974; Krnjevic, 1974)

しかし、自律神経支配臓器におけるアミノ酸の作用については2, 3の報告をみるに過ぎない。たとえば、モルモット回腸に対する γ -aminobutyric acid (GABA) の反応は収縮ないし弛緩作用と一定の反応を示さない (Hobbiger, 1958)。またアラニンやグリシンなどの α -アミノ酸はいずれも回腸や子宮筋に対し収縮作用を示すが、これらの作用は自律神経を介する作用ではなく筋細胞への直接作用であると報告されている (Lewis ら, 1972;

Bedwani ら, 1977)。

著者は先に、摘出モルモット胃および腸管平滑筋に対する GABA, アラニン およびグリシンの反応を検討し、GABA は一般に弛緩作用を示すことが多いのに、アラニンとグリシンはいずれの平滑筋標本に対しても収縮作用を示し、中でも結腸紐における収縮作用が著明であると報告した (石沢 & 宮崎, 1978)。

それ故、本論文では摘出モルモット結腸紐におけるアラニンとグリシンの収縮作用とその機序について検討した。

II. 方 法

モルモット (300~400 g) の後頭部を叩打、瀉血後開腹し、結腸紐を摘出した。

37°C 恒温の浴槽 (10 ml) に浴液を満し、その中に長さ 20 mm の筋条片を吊し、strain gauge transducer (日本光電製) を用いて等尺性に収縮をインク書きオツシログラフにて記録した。

浴液の組成は NaCl 125, KCl 5.7, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 0.5, glucose 11.5, NaHCO₃ 15.5 (mM) とし、95% O₂+5% CO₂ ガスにて通気し、pH を 7.2 に保った。

アラニンとグリシンはそれぞれ脱イオン水に溶解 (1 M 原液) し、その微量を浴槽中に添加することにより所定の濃度になるようにした。アミノ酸の反応時間は原則として 4~5 分とし、少なくとも 30 分の間隔をおいて反応させた。また各種

拮抗遮断薬は 10 分以上前に浴槽に添加して標本を前処理した。なお内因性プロスタグランデインの影響をみるために、予め浴槽に indomethacin (3 μM) を添加し 60 分間の前処理を行った後、アミノ酸の反応をみた。電気現象の観察には single sucrose gap 法を用いた。また Na⁺ および Cl⁻ の影響を検討する場合は、それぞれ実験溶液中の NaCl を等モルの KCl, LiCl, Choline Cl および Na isethionate に置換した溶液を使用した。

使用した薬物:

Glycine (Sigma), L-alanine (Sigma), atropine sulphate (和光), diphenhydramine (田辺), strychnine (Merk), indomethacin (Sigma), methysergide (Sandoz), tetrodotoxin (三共), verapamil (Eisai), acetylcholine (半井)。

III. 実 験 結 果

A. 摘出モルモット結腸組に対するアラニンとグリシンの作用

アラニン (0.1~10 mM) およびグリシン (0.5~10 mM) は、ともに濃度依存性に結腸紐を収縮させるのみで、弛緩を起さなかった (図 1)。高濃度アミノ酸による収縮は概して 1 分以内に最大となり時間と共に低下する例が多かった。またこのように標本の収縮反応が低下した時点で同濃度のアミノ酸を再添加しても、収縮作用の増加はみられなかったが、アセチルコリン (0.1 mM) は著明な収縮作用を示した。

アラニンとグリシンの作用濃度閾値はそれぞれ 0.05~0.1 mM および 0.1~0.5 mM で、しかもアラニンの収縮はモル濃度比でみるとグリシンの約 2.7 倍の強さを示した (図. 2)。なお 10 mM アラニンとグリシンの作用はアセチルコリン (0.1 mM) が示す最大収縮のそれぞれ 70%, 60% であった (図. 2)。

B. アラニンとグリシンの収縮作用に対するアトロピンおよびテトロドトキシンの影響

アトロピン 5 μM の存在はアラニンおよびグリシン (5 mM) の収縮作用に何ら影響を与えな

図 1. モルモットの結腸紐に対するアラニンとグリシンの作用
Gly: グリシン (mM), Ala: アラニン (mM)

った(図3). 高濃度アトロピン ($50 \mu\text{M}$) の存在でも収縮作用はわずかに抑制される程度で, テトロドトキン $0.1 \mu\text{g/ml}$ もこれらアミノ酸による収縮作用に影響を与えなかった.

C. 抗ヒスタミン, 抗セロトリンおよび内因性プロスタグランディンの影響

抗ヒスタミン薬である diphenhydramine ($4 \mu\text{M}$) は結腸紐の自発性収縮およびアラニンとグリシン (5 mM) で生起された収縮に影響を与えなかった(図. 4). また抗セロトニン薬である methysergide ($3 \mu\text{M}$) も diphenhydramine と同様にこれらアミノ酸による収縮作用を抑制しなかった. さらにプロスタグランジン合成阻害薬の indomethacin ($3 \mu\text{M}$) 60 分処理によっても収縮作用は何ら抑制をうけなかった.

図 2. アラニンとグリシンの濃度作用曲線
Ala: アラニン Gly: グリシン.
アセチルコリン (0.1 mM), 収縮を 100% とした (4 例の平均)

図 3. アラニンとグリシンの収縮作用に対するアトロピンの影響
Ala: アラニン (5 mM), Gly: グリシン (5 mM),
アトロピン: $5 \mu\text{M}$.

D. ストリキニーネの影響

ストリキニーネは中枢神経系におけるグリシンの抑制作用に拮抗する (Curtis ら 1968). それ故, 結腸紐におけるアラニンやグリシンの収縮作用に対する影響を検討した. ストリキニーネ ($10 \mu\text{M}$ ~ 0.1 mM) はそれ自体筋の緊張を高めるが, アラニンとグリシン (5 mM) はさらに収縮作用を生起させた(図. 5).

E. Ca 拮抗薬の影響

Ca 拮抗薬である verapamil ($10 \mu\text{M}$) は結腸紐の自発収縮を抑制し, 20 分以内に完全に筋条片を弛緩させる. この状態でアセチルコリン 0.1 mM は収縮を起こさせるが, アラニンとグリシン (5 mM)

は何ら収縮作用を示さなかった.

F. 活動電位に対するアラニンとグリシンの作用

アラニンとグリシン ($5 \sim 10 \text{ mM}$) は膜電位を約 $3 \sim 5 \text{ mV}$ 減少するとともに活動電位の大きさおよび頻度を増加し, それに伴って収縮の増大がみられたが, アミノ酸濃度が徐々に増加する装置のため図 1 のような強い収縮はみられなかった(図. 6). また, このような脱分極作用は洗滌によっても約 $10 \sim 15$ 分間持続した.

G. Na^+ および Cl^- の影響

浴液中の NaCl を等モルの KCl に置換した iso-K 液中では, アラニン (5 mM) は何ら収縮作

図 4. アラニンとグリシンの収縮作用に対する diphenhydramine の影響
Ala: アラニン (5 mM), Gly: グリシン (5 mM)
Diphenhydramine (4 μ M).

図 5. アラニンとグリシンの収縮作用に対するストリキニーネの影響
Ala: アラニン (5 mM), Gly: グリシン (5 mM)
ストリキニーネ (10 μ M, 100 μ M)

用を生起しなかった。また浴液 K^+ 濃度を徐々に増加すると 30 mM でアラニンの収縮作用は消失した。しかし、同様に LiCl や Choline Cl で置換

した Na 欠如液中および Na isethionate で置換した Cl 欠如液中でもアラニン (5 mM) は収縮作用を生起した (図. 7)。

IV. 考

察

本実験で、 α アミノ酸であるアラニンとグリシンは濃度依存性に摘出モルモット結腸紐を収縮させた。この収縮作用の閾値はアラニン 0.05~0.1 mM, グリシン 0.1~0.5 mM で、前者の方が低

値を示した。また 10 mM アラニンとグリシンの収縮はアセチルコリン (0.1 mM) の最大収縮のそれぞれ 70%, 60% であった。高濃度アラニンの収縮時に同濃度のアラニンまたはグリシンを添加

図 6. アラニンとグリシンの結腸紐活動電位に対する作用
Ala: アラニン (5, 10 mM), Gly: グリシン (5, 10 mM)

図 7. アラニンの収縮作用に対する Na^+ および Cl^- の影響
Ala: アラニン (5 mM)

しても、もはや収縮の増大は起きなかったが、アセチルコリンは著明な収縮作用がみられた。またアセチルコリン収縮はK脱分極筋でもみられるとともに、アトロピンで抑制されることから、アセチルコリン受容器とこれらアミノ酸受容器とは別個であると考えられる。

Takahashi ら (1961) は、モルモット回腸においてグリシンや β アラニンは何ら収縮作用を示さないと報告したが、Lewis ら (1970) はいくつか

のアミノ酸が収縮作用を示すことを明らかにし、特に α アミノ酸の収縮が著明であるとした。また、 α アミノ酸の中でもL-アラニンが最も収縮作用が強く、グリシンの6～7倍であるという。Bedwani ら, (1977) はモルモット子宮筋で、各種アミノ酸の中でもアラニンとグリシンが比較的強い収縮作用を示すが、アラニンはグリシンの2倍程度の強さであると報告した。

石沢と宮崎 (1978) は、摘出モルモット胃、十

二指腸、回腸、結腸および結腸紐に対するアラニンとグリシンの反応を検討し、いずれの筋標本でもこれらアミノ酸は収縮作用を示し、つねにアラニンの方が強い反応を示すと報告した。また、本実験におけるアラニンの作用はモル濃度で比較するとグリシンの約 2.7 倍強いという成績がえられ、Bedwani ら、(1977) のモルモット子宮筋での成績とほぼ一致した。

Lewis ら、(1972) によると、モルモット回腸でのアラニンで誘発された収縮の形がヒスタミンのそれに似ているので、ヒスタミン受容器に作用する可能性を考えたが、抗ヒスタミン薬の影響をうけないこと、および濃度作用曲線が異なることからヒスタミンとは別の受容器に作用すると結論し、平滑筋細胞に α アミノ酸の結合する受容器の存在を推定した。一方、Bedwani ら、(1977) によって、モルモット子宮筋のアミノ酸の収縮作用はヒスタミン、セロトニン、アセチルコリン、ノルアドレナリンおよびプロスタグランディンの遊離機構などを介するものではないことが明らかにされている。

本実験でも、アラニンやグリシンの収縮作用はアトロピンやテトロドトキシンで抑制されないことから、少なくとも副交感神経を介する機構に由来するとは考えられない。また、抗ヒスタミンや抗セロトニンなどでアラニンによる収縮作用が抑制されないことから、ヒスタミンやセロトニンの遊離などを介する機構、またはこれらの受容器に対する作用とも考えられない。さらにプロスタグランディンの生合成を阻害する indomethacin の前処理によってもこれらアミノ酸の収縮作用は影響をうけないので、内因性プロスタグランディンの遊離または合成などを介する作用はないと推定される。以上の成績から、アラニンとグリシンは共通の α アミノ酸受容器に作用する可能性が大である。

中枢神経系におけるグリシンの抑制作用はストリキニーネで特異的に拮抗されるといわれている (Curtis ら 1968) が、本実験においてアラニンとグリシンの収縮作用はストリキニーネで消失しないので、中枢神経系でいわれるような拮抗関係はないと考えられる。

次に、結腸紐の活動電位に対するアラニンとグリシンの作用を sucrose gap 法で検討したところ、

膜は軽度で脱分極し、活動電位の大きさ、頻度の増加がみられた。このことから、 α アミノ酸の収縮機構は、ある種のイオン透過性が変化して膜が脱分極し、活動電位の増大とともに Ca イオンの流入が増加することにより収縮作用が生起すると考えられる。確かに Ca イオン流入を抑制する verapamil でアラニンとグリシンの収縮は抑制されることから上記の可能性が推測される。

このようなアミノ酸による膜の脱分極機構は明白ではないが、中枢神経系におけるグリシンの作用は Cl^- 透過性の亢進に基づく脱分極作用であるとの報告 (Homma & Rovainen, 1978) がある。一方、喜多ら (1976) によるとイソアワモチのグリシン感受性神経に対するグリシンの作用は Na^+ の透過性亢進が脱分極の原因であるとしている。それ故、平滑筋においてもアラニンやグリシンが膜における Na^+ あるいは Cl^- の透過性を亢進することにより脱分極を来とし、二次的に Ca^{++} の流入増加を起こすことが考えられる。ところが、本実験においてアラニンの収縮作用は、 LiCl 液、 Choline Cl 液や Na-isethionate 液中でも消失しないので、これらアミノ酸による収縮作用の発現には必ずしも Na^+ や Cl^- の膜透過性亢進に依らない機構が考えられる。

しかし、アラニンの収縮作用は浴液 K^+ 濃度増加とともに消失するので、多分これらアミノ酸は膜における K^+ flux を変化させることにより脱分極を起こすと推定される。

アラニンやグリシンは血液中に $0.4 \sim 0.5 \text{ mM}$ 程度存在しており特に前者の方が多い (Snodgrass ら 1969)。この濃度は本実験における収縮作用の閾値を超えているので、生体内の平滑筋に対し、生理的条件下でもある程度筋緊張を増加するように働いていると思われる。また、子宮筋においてグリシンはバズプレッシンの収縮作用を強める作用をもつ (Bedwani ら 1977) ので、 α アミノ酸は腸管の自働運動ないしは誘発された収縮運動の機能を高めるという作用があるのかも知れない。

以上、アラニンとグリシンの結腸紐に対する収縮作用は自律神経系や収縮物質の遊離などを介するのではなく、直接筋細胞に作用し、多分膜における K^+ 透過性を変えることにより脱分極を起こし、それによって収縮作用を生起すると考えられる。

V. 結 語

1) 摘出モルモット結腸紐に対するアラニンとグリシンの収縮作用について検討した。

2) アラニン (0.1~10 mM) よびグリシン (0.5~10 mM) は濃度依存性に収縮作用を示し、アラニンの収縮作用はグリシンの約 2.7 倍の強さであった。

3) アラニンおよびグリシン (5 mM) の収縮作用はアトロピン、テトロドトキシン、抗ヒスタミン、抗セロトニンやストリキニーネで抑制されず、また内因性プロスタグランデインの影響もうけなかった。

4) アラニンとグリシン (5~10 mM) は sucrose gap 法による活動電位に対し、膜電位を減少し、活動電位の大きさと頻度を増大した。

5) LiCl, Choline Cl, Na isethionate 液中でもアラニンの収縮作用は消失しないが、KCl 液中では消失した。

6) 以上、アラニンとグリシンの結腸紐に対する収縮作用は自律神経系や収縮物質の遊離などを介する作用ではなく、筋細胞に直接作用し、膜を脱分極することによって考えられる。

文 献

- Bedwani, J.R. *et al.* (1977). Spasmogenic and potentiating actions of some amino acids on the guinea-pig myometrium. *Brit. J. Pharmacol.* **61**: 217-222.
- Curtis, D.R. *et al.* (1968). The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Expl Brain Res.* **5**: 235-258.
- Curtis, D.R. & Johnston, G.A.R. (1974). Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebn. Physiol.* **69**: 97-188.
- Hobbiger, F. (1958). Effects of γ -aminobutyric acid on the isolated mammalian ileum. *J. Physiol.* **142**: 147-164.
- Homma, S. & Rovainen, C.M. (1978). Conductance increases produced by glycine and γ -aminobutyric acid in lamprey interneurons. *J. Physiol.* **279**: 231-252.
- 石沢光郎, 宮崎英策 (1978). モルモット結腸紐に対する Alanine および Glycine の収縮作用について. *日本生理誌* **40**: 476.
- 喜多孝子ら (1976). イソアワモチニューロンのグリシンおよび GABA 受容膜の化学構造比較. *日本生理誌* **38**: 84-85.
- Krnjević, K. (1974). Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* **54**: 418-540.
- Lewis, G.P. *et al.* (1970). An amino-acid receptor in the guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* **39**: 213-214 p.
- Lewis, G.P. *et al.* (1972). Isolation and identification of pharmacologically active amino acids in skin and their structure-activity relationship on the guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* **45**: 104-117.
- Snodgrass, S.R. *et al.* (1969). Transport of neutral amino acids from feline cerebrospinal fluid. *Am. J. Physiol.* **217**: 974-980.
- Takahashi, H. *et al.* (1961). Relationship between pharmacological action on the mammalian ileum and chemical structure of γ -aminobutyric acid. *Jap. J. Physiol.* **11**: 229-237.

(1979 年 4 月 14 日受付)