

培養骨格筋細胞膜のアセチルコリン受容体発達過程に関する phospholipase A₂-Ca系に対するグリチルリチンの 拮抗作用機序

木村 正康*, 鹿田 謙一, 藤原 満博, 高橋健太郎

富山医科薬科大学薬学部薬品作用学教室

Possible Mechanisms of Glycyrrhizin-inhibitory Action on Phospholipase A₂-Ca Sequence Related to the Developing Acetylcholine Receptor on the Cell Membrane of Cultured Skeletal Muscle in Mouse

Masayasu KIMURA*, Ken-ichi SHIKADA,
Mitsuhiro FUJIHARA and Kentaro TAKAHASHI

*Department of Chemical Pharmacology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Toyama Medical and Pharmaceutical University*

(Received September 17, 1984)

Abstract

Effects of Ca ions, phospholipase A₂, glycyrrhizin and EGTA were investigated on the developing acetylcholine receptor in the cultured skeletal muscle of mouse. Ca ions and phospholipase A₂ respectively inhibited in the time course both the relative peak fluorescence and the amount of fluorescence expressive of the development of acetylcholine receptor marked with fluorescence-labeled α -bungarotoxin. However glycyrrhizin antagonized the phospholipase A₂-induced blocking of the developing acetylcholine receptor. The possible mechanism of antagonistic action of glycyrrhizin was suggested to inhibit directly phospholipase A₂ activity in the phospholipase A₂-Ca sequence on the cell membrane, because the antagonism of glycyrrhizin was not observed in the presence of EGTA.

Keywords Ca ion, phospholipase A₂, glycyrrhizin, EGTA, developing acetylcholine receptor, cultured muscle

Abbreviations α -BuTX; α -bungarotoxin, BSS; balanced salt solution, BSA; bovine serum albumin, EGTA; ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, FITC; fluorescein isothiocyanate, MEM; minimal essential medium, PBS; phosphate buffered saline

緒 言

甘草の主成分であるグリチルリチンは熊谷らの生化学的研究^{1,2)}を端緒に、その後薬理学的にも有効な活

性をもっていることが明らかになってきた。甘草を含む漢方の基本方剤である芍薬甘草湯が神経筋系の疾患に古来から使用され、その効果は現代の臨床的治療でも検証されているが、³⁾その要因にグリチルリチンが役割を演じていることも裏付けられている。^{4,5,6,7)}

* 〒930-01 富山市杉谷2630
2630, Sugitani, Toyama, 930-01, Japan

最近、グリチルリチンがphospholipase A₂に拮抗的に作用する可能性を示す報告がみられるようになった。当研究はグリチルリチンの神経筋接合部における遮断作用の惹起機序にphospholipase A₂が関与している可能性を仮定し、グリチルリチンのphospholipase A₂に対する拮抗作用を実証し、更にその作用機序を検討することを目的にしている。

神経筋接合部における機構はアセチルコリン受容体を中心として考察するのが順当なので、当論文では骨格筋の組織培養下におけるアセチルコリン受容体の発達過程を背景にしたphospholipase A₂-Ca系に対するグリチルリチンの作用に焦点をしばって検討した。

材料と方法

培養標本

胎生13日目のマウス (ddY系) から得た脊髄切片と脊椎近傍の筋切片をあらかじめコラーゲン塗布した円形ガラス上に接触させて植え付けた。培養はマキシモ二重カバーガラス法^{10,11)}により、35℃~37℃の温度で行った。培養液はGey塩類溶液 (BSS)、Eagle MEM、馬血清、マウス胚抽出液、10%グルコース溶液からなり、それぞれ9:9:9:9:2の割合で、これを標準培養液とした。

この標準培養液を用いた条件では、9日目からクラスターを捉えることができるので、以後、11日目、13日目の発達過程を対象に観察して経日変化を検討した。

アセチルコリン受容体の指標

アセチルコリン受容体の指標には、 α -bungarotoxin (α -BuTX; Biotoxins Inc.)の蛍光誘導体を用いた。 α -BuTXとfluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma)の結合は、Anderson and Cohen¹²⁾の方法に従った。FITCと結合した α -BuTX (FITC- α -BuTX)の分離にはphosphate buffered saline (PBS)で調製したSephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals)カラムを用いた。培養標本を2.5% (v/v) のglutaraldehydeで10分間固定し、PBSで洗浄後、5~6 mg/mlのbovine serum albumin (BSA)を含むPBSで、20 μ g/mlに希釈したFITC- α -BuTXで染色した (37℃, 30分間)。PBSで洗浄後、9:1に希釈したglycerin-PBS溶液の1滴を標本に加え、カバーガラスをかけ蛍光顕微鏡 (Leitz Diavert)にて観察した。

蛍光観測値の定量化

培養筋細胞の蛍光分布および蛍光強度は蛍光光度

計 (Leitz MPV compact microscope photometer) で測定した。解析の対象とした筋細胞はBloch¹³⁾によるアセチルコリン受容体のクラスターの判定規準に従い、筋細胞の一端から他端まで明瞭に観察できるものだけを対象に選び、他の筋細胞が重なっているものは除外した。

測定方法は倍率200の視野内に蛍光染色した筋細胞を位置させ、蛍光光度計でその領域の蛍光を筋細胞表面に沿って移動させて格子内の蛍光を測定し、蛍光染色した部分に隣接する格子内の値を対照にして、それに対する蛍光比を各格子内のrelative fluorescence値として表わした。そのうち最大のものをrelative peak fluorescence値にして、その標本におけるアセチルコリン受容体のクラスター形成の指標にした。これらの値の培養日数-relative peak fluorescence曲線からクラスター形成におけるアセチルコリン受容体の動態を判定した。同時にrelative fluorescence値から対照値を差引いた値の総和を蛍光染色部分全体の蛍光量としてamount of fluorescenceで表わし、アセチルコリン受容体の増量の判定に用いた。

カルシウムイオン濃度調整

標準培養液のカルシウム濃度は原子吸光法で2.0 mMであった。これに適量のCaCl₂ · 2H₂Oを加えて、2.9, 4.3, 6.8, 10.0mMの各カルシウムイオン濃度に調製した。1.5mMのカルシウムイオン濃度は標準培養液中のBSSをCa free BSSにすることで調整した。

薬物投与

薬物はいずれの場合も標準培養液条件下の培養標本に投与した。グリチルリチンモノアンモニウム塩 (ミノファージェン製薬)、phospholipase A₂ (Boehringer Mannheim)は培養2日目から、ethylene glycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA; Nakarai)は培養8日目から投与した。

結 果

培養骨格筋細胞膜のアセチルコリン受容体発達におよぼすカルシウムイオン濃度の影響

培養骨格筋細胞膜上のアセチルコリン受容体に結合させたFITC- α -BuTXを指標にして、経日変化による蛍光の分布移動状態と強度変化を測定した。蛍光の分布移動は、9日、11日、13日の各日の最高蛍光度をプロットして得た曲線で示した。同時に、蛍光の強度変化は各日の蛍光度の総和をカラムで示

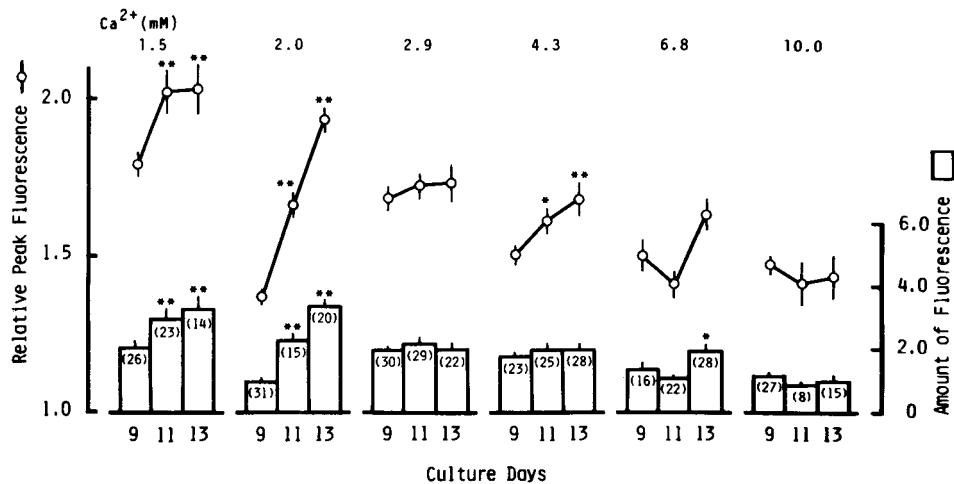


Fig. 1 Effects of external Ca^{2+} in a various concentration on the relative peak fluorescence and amount of fluorescence with the developing acetylcholine receptor in the cultured muscle of mouse. Values are means $\pm$ S.E. Figures in parenthesis indicate the observed numbers of cultured muscle. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with 9th day in each experiment.

し、その結果をFig. 1にまとめた。

蛍光の分布移動の結果から、アセチルコリン受容体のクラスター化を推測し、また蛍光の強度変化の結果から、アセチルコリン受容体の筋表面上での増量を推測することにした。Fig. 1に示すように、外液カルシウム濃度を標準培養液の含有量よりも増大してゆくと、アセチルコリン受容体発達過程において、アセチルコリン受容体のクラスター形成および増量性は減少することが明らかになった。しかし、更にカルシウムを過剰量追加すると、培養標本が変性を来して死滅するに至った。

一方、カルシウム濃度の減量はアセチルコリン受容体のクラスター形成も増量も共に若干亢進する傾向はうかがわれたが、総体的にはアセチルコリン受容体の正常な発達には、カルシウム濃度2.0mM程度の至適濃度が必要であることが示唆された。

Phospholipase A_2 の阻害効果に対するグリチルリチンの影響

一定カルシウム濃度を含む標準培養液下で培養された骨格筋細胞上のアセチルコリン受容体は正常な発達を示すが、これに0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のphospholipase A_2 を培養液中に添加するとアセチルコリン受容体のクラスター化および増量性が完全に阻害されることを見出した。この培養液中に30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (36mM)のグリチルリチンを共存しておくと、Fig. 2に示すように、phospholipase A_2 による阻害効果は抑制されて、アセチルコリン受容体のクラスター化と増量性

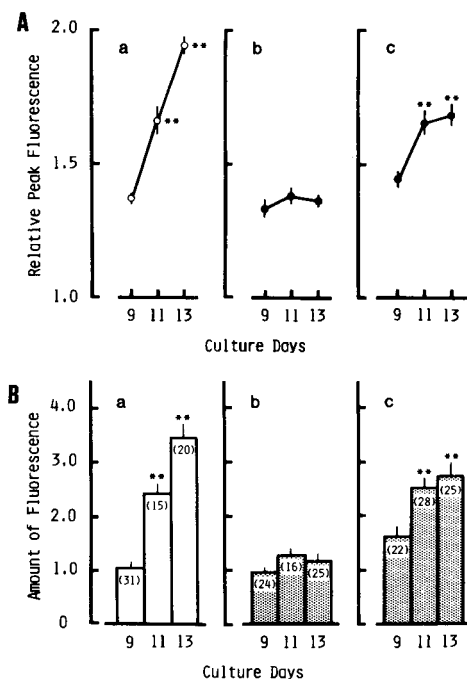


Fig. 2 Effects of phospholipase A_2 in the absence (b) and presence (c) of glycyrrhizin compared by the control (a) on the relative peak fluorescence (A) and on the amount of fluorescence (B) with the developing acetylcholine receptor in the cultured muscle of mouse. Values are means $\pm$ S.E. Figures in parenthesis indicate the observed number of cultured muscle. *** $P < 0.01$, compared with 9th day in each experiment.

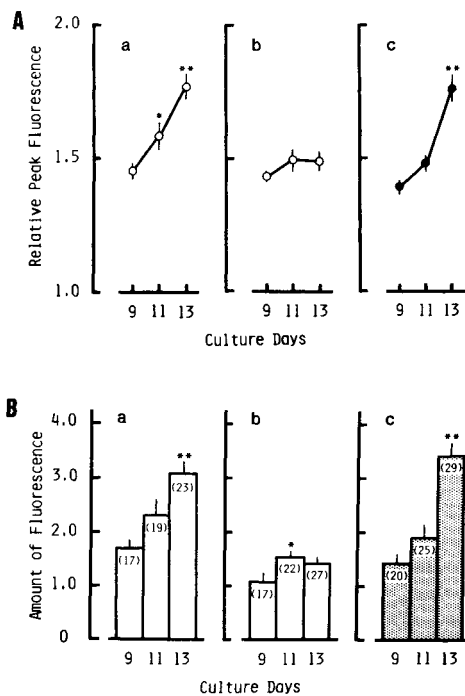


Fig. 3 Effects of glycyrrhizin in the concentration of 30 µg/ml (a) and 100 µg/ml without (b) and with EGTA (c) on the relative peak fluorescence (A) and on the amount of fluorescence (B) with the developing acetylcholine receptor in the cultured muscle of mouse. Values are means ± S.E. Figures in parenthesis indicate the observed numbers of cultured muscle.
*P<0.05 and **P<0.01, compared with 9th day in each experiment.

が再び開始されて来ることを明らかにした。

このことはグリチルリチンがphospholipase A₂の作用に対して、何らかの形で拮抗することを確認し得たことになる。しかし、この際のグリチルリチンの効果がphospholipase A₂に直接関与しているのか、あるいは、phospholipase A₂の効果発現に必須と考えられているカルシウムによる影響に関与しているのかは不明である。

グリチルリチンの phospholipase A₂-Ca 系における拮抗作用

先に示したphospholipase A₂の添加によるアセチルコリン受容体の発達阻害にグリチルリチンが抑制効果をもつことは、視点を変えればグリチルリチン

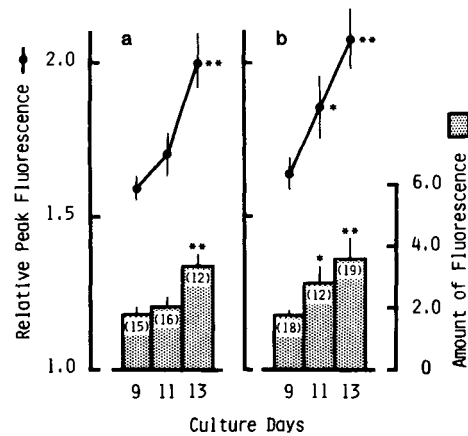


Fig. 4 Effects of EGTA in the concentration of 1 mM (a) and 2 mM (b) on the relative peak fluorescence and amount of fluorescence with the developing acetylcholine receptor in the cultured muscle of mouse. Values are means ± S.E. Figures in parenthesis indicate the observed numbers of cultured muscle.
*P<0.05 and **P<0.01, compared with 9th day in each experiment.

の防御作用と考えることが出来る。そこで、その際のグリチルリチン濃度では、正常なアセチルコリン受容体の発達に何ら影響を来たさないことを、Fig. 3に示すように確認し得た。しかしながら、その無効濃度の約3倍量にあたる100 µg/ml (122 mM) のグリチルリチン濃度では、その単独作用によって明らかにアセチルコリン受容体のクラスター化と増量を共に抑制し出した。

そこで、100 µg/mlのグリチルリチンを培養液に投与した後、その1週間後に更にカルシウム拮抗剤のEGTA (2 mM) を追加添加すると、Fig. 3に示すようにグリチルリチンの抑制作用が完全に消失し、アセチルコリン受容体のクラスター化と増量性が再び明らかに正常時の発達過程に回復した。

この場合のEGTAによる単独作用は、1 mMおよび2 mMの濃度では共にアセチルコリン受容体の発達過程にほとんど影響を来たさないことも確認しておいた (Fig. 4)。

以上の結果から、過剰のグリチルリチンは筋細胞膜表面に存在するphospholipase A₂-Ca系に働き、phospholipase A₂酵素を直接的に阻害し、その結果遊離するカルシウムによって抑制効果を発現するも

のと推測される。従ってこのカルシウムと結合するEGTAが存在すると、遊離カルシウムが減少しアセチルコリン受容体発達の正常化が再現したものと考えられる。

考 察

培養骨格筋細胞膜におけるアセチルコリン受容体の発達過程については、アセチルコリン受容体分子が集合してクラスターを形成し、それが神経筋接合部を構築する前提段階になりうるだろうという示唆をNirenberg¹⁴⁾らによって報告されて以来、この面の研究の核心課題になっている。この過程において、追試検討中phospholipase A₂を添加すると、阻害効果が出現しアセチルコリン受容体の発達を中止させ、クラスター形成を始めアセチルコリン受容体の細胞表面膜上の増量性まで阻止されることを著者らは偶然見出した。

この現象は、当然考えられるアラキドン酸生成の結果によると判断できるので、アラキドン酸を添加し検討したが、phospholipase A₂と同様な効果は得られなかったことを観察している（未発表）。従って細胞膜表面に残存しているであろうphospholipidのlyso体の影響によることも充分考えられるが、今後の問題として残してある。いずれにしても、phospholipase A₂の活性化にはカルシウムが必要なことは公知のことなので、この視点から本研究が着手され、この際グリチルリチンがphospholipase A₂に拮抗するならば、如何なる機序に基づき、特にカルシウムとの関係を明らかにすることが研究の動機であった。

そこで、先づphospholipase A₂によるアセチルコリン受容体の発達阻害効果は、phospholipase A₂が活性化されるために取込まれるカルシウムの濃度異常増大によるかも知れぬと仮想して、カルシウムの裏付的検討が当論文の前段にあたる。その結果、確かにカルシウムイオンの増大はアセチルコリン受容体の正常発達に好ましくないことがうかがわれ、同時にまた、カルシウムイオンの至適濃度が必要であることが示唆された。

phospholipase A₂によるアセチルコリン受容体の発達阻害をグリチルリチンの添加が抑制したことは、グリチルリチンがphospholipase A₂に拮抗した結果、アセチルコリン受容体の発達回復が示されたものと思われる。しかし、グリチルリチン自体も高濃度になるとアセチルコリン受容体の正常発達に影響を来すことを知った。この際、EGTA存在下

ではグリチルリチンの阻害効果は消失することから、グリチルリチンの高濃度による阻害はカルシウムイオンの過剰化によるものと推定できる。しかも、EGTAはカルシウムのキレート化合物として働くが、EGTA自体にはその濃度で阻害効果はみうけられない。このことは、グリチルリチンの拮抗作用がカルシウムに対するよりも、phospholipase A₂の方に直接作用する結果によることを裏付けていると云えよう。

結論として、グリチルリチンの作用は細胞膜上のphospholipase A₂-Ca系に対して、phospholipase A₂に直接拮抗することによって放出されるカルシウムが過剰になると、阻害作用を惹起する要因となろうと推論した。

文 献

- 1) Kumagai, A., Yano, S., Otomo, M. and Takeuchi, K.: Study on the corticoid-like action of glycyrrhizin and the mechanism of its action. *Endocrinol. Jpn.* 4, 17-27, 1957
- 2) Kumagai, A., Yano, S., Takeuchi, K., Nishino, K., Asanuma, Y., Nanahoshi, M. and Yamamura, Y.: An inhibitory effect of glycyrrhizin on the antigranulomatous action of cortisone. *Endocrinology* 74, 145-148, 1964
- 3) 山本 巖: 芍薬甘草湯とその展開. 漢方研究 162-168, 1981
- 4) Kimura, I. and Kimura, M.: Program and Abstract of World Congress of Chinese Medicine and Pharmacy. (Taipei) 2, 1980
- 5) Kimura, M., Kimura, I. and Nojima, H.: Advances in Pharmacology and Therapeutics II. (Ed. by H. Yoshida et al.) Pergamon Press, Oxford and New York. 6, pp 245-250, 1982
- 6) 木村正康, 木村郁子, 野島浩史, 高橋和義: 芍薬甘草湯による骨格筋の弛緩作用機構. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* 15, 157-161, 1982
- 7) Kimura, M., Kimura, I., Takahashi, K., Muroi, M., Yoshizaki, M., Kanaoka, M. and Kitagawa, I.: Blocking effects of blended paeoniflorin or its related compounds with glycyrrhizin on neuromuscular junctions in frog and mouse. *Jpn. J. Pharmacol.* 36, 275-282, 1984
- 8) 沖増英治, 白石則之, 渡辺定博, 森本保子, 内海耕造: グリチルリチンによるホスホリパーゼA₂活性阻害. *医学のあゆみ* 122, 174-177, 1982
- 9) 志気保子, 白井厚治, 齋藤 康, 吉田 尚, 若新政史, 熊谷 朗: 遊離肝細胞からのトランスアミナーゼ遊出に及ぼすグリチルリチンの影響. 和漢医薬学会誌 1, 11-14, 1984
- 10) Bornstein, M., Iwanami, H., Lehrer, G. and Breitbart, L.: Observations on the appearance of neuromuscular

- relationship in cultured mouse tissues. *Z. Zellforschung* **92**, 197-206, 1968
- 11) Crain, S.M.: Bioelectric interactions between cultured fetal rodent spinal cord and skeletal muscle after innervation in vitro. *J. Exp. Zool.* **173**, 353-370, 1970
- 12) Anderson, M.J., and Cohen, M.W.: Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle. *J. Physiol. (London)* **237**, 385-400, 1974
- 13) Bloch, R.J.: Dispersal and reformation of acetylcholine receptor clusters of cultured rat myotubes treated with inhibitors of energy metabolism. *J. Cell Biol.* **82**, 626-634, 1979
- 14) Vogel, Z., Sytkowski, A.J. and Nirenberg, M.W.: Acetylcholine receptors of muscle grown in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 3180-3184, 1972