

消化管に発現するムスカリン受容体種とその機能： ムスカリン受容体ノックアウトマウスを用いての検討

北澤 多喜雄

Physiological roles of muscarinic acetylcholine receptor in the gastrointestinal tract:
Functional study using muscarinic receptor knockout mice

Takio KITAZAWA
(Accepted 8 December 2023)

1. はじめに

哺乳類の胃腸管運動は、平滑筋、カハール介在細胞、神経および消化管ホルモン（セロトニン、モチリン、グレリンなど）の相互作用によって調節を受けている。なかでも中枢（脳）が起始部となる自律神経による調節は重要であり、交感神経系は胃腸管運動を抑制し、副交感神経系は運動を亢進する。胃腸管壁には内在性神経が集まる筋間神経叢（myenteric plexus）と粘膜下神経叢（submucosal plexus）が存在し、運動調節系神経が多く存在する筋間神経叢に対し、外来性の交感神経節後線維（アドレナリン作動性）と副交感神経節前神経（コリン作動性）がシナプスを形成し、最終的にはコリン作動性の副交感神経節後線維から放出されるアセチルコリンが消化管運動調節に重要な役割を果たしている。また、粘膜下神経叢には知覚系の神経細胞が多く分布し消化管内腔の物理的、化学的刺激を受容し筋間神経叢に伝え運動を調節している（伸展反射など）。筋間神経叢にコリン作動性、アドレナリン作動性以外の内在性神経が存在する可能性については、atropine（ムスカリン受容体遮断薬）と guanethidine（アドレナリン作動性神経遮断薬）処置下で数多くの研究がなされており、胃腸管壁内に非アドレナリン、非コリン作動性神経（nonadrenergic, noncholinergic, NANC）が存在することが明らかになっている（Burnstock, 1986）。興奮性 NANC 神経の伝達物質候補としてはセロトニン、substance P, neurokinin, 抑制性 NANC 神経の伝達物質候補としては血管作動性ペプチド（vasoactive intestinal polypeptide）、アデノシン三リン酸（ATP）、一酸化窒素（NO）などが報告されている（Burnstock, 1986;

Barthó and Lefebvre, 1995; Currò and Preziosi, 1998）。

しかしながら、胃腸管を支配する外来性神経や内在性神経刺激で誘起される収縮反応はその大部分が atropine によりほぼ完全に消失すること（モルモット回腸、ウサギ胃、マウス胃, Radomirov et al., 1988; Depoortere et al., 2003, Kitazawa et al., 2005）、筋間神経叢に存在する運動系神経の 65% はコリン作動性であることから（Schemann and Schaaf, 1995）、収縮調節に関与する神経は主にコリン作動性神経系と考えられている。また、グレリンやモチリンなどの消化管ホルモンも最終的にはコリン作動性神経からアセチルコリンを放出させ収縮を誘起する（Kitazawa and Kaiya, 2019）。放出されたアセチルコリンは平滑筋上のムスカリン受容体に作用して収縮を誘起するが、ムスカリン受容体は分子クロニング研究により 7 つの膜貫通領域を持つ G タンパク質共役受容体であり、哺乳動物にはアミノ酸構造が異なる 5 種のムスカリン受容体サブタイプ（M₁–M₅）が存在することが報告されている（Caulfield and Birdsall, 1998）。それぞれのムスカリン受容体の細胞内情報伝達系も明らかになっており、奇数番号の M₁, M₃, および M₅ 受容体は G_{q/11} タンパク質と共役し、ホスホリパーゼ C（PLC）を活性化してイノシトール三リン酸（IP₃）およびジアシルグリセロール（DAG）を産生し、小胞体から Ca²⁺ を遊離して細胞内 Ca²⁺ 濃度を増加させる。一方、偶数の M₂ と M₄ 受容体はアデニル酸シクラーゼを抑制して細胞内 cyclic AMP 濃度を減少させる（Caulfield and Birdsall, 1998）（表 1）。

下痢や腹痛などは胃腸管の急激な収縮により誘起されるが、これらを鎮める目的の薬物として鎮痙薬

表1 ムスカリン受容体サブタイプの情報伝達系, 機能および遮断薬親和性の比較

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Signal transduction					
G-protein	G _{q/11}	G _{i/o}	G _{q/11}	G _{i/o}	G _{q/11}
PI hydrolysis	+++	+	+++	+	+++
ADC inhibition	+	+++	-	+++	-
PLC stimulation with PI hydrolysis	+++	+	+++	+	+++
PLA2 stimulation with AA release	+++	±	+++	±	+++
Increase in Ca ²⁺	+++	+	+++	+	不明
Physiological function					
Smooth muscle contraction	不明	収縮 (弱)	収縮 (強)	不明	不明
Cardiac contraction	増加	減少	増加	不明	不明
Slowing of heart rate	-	+++	+	±	不明
Antagonist affinity (pKb)					
Atropine	9	8.7	9.2	8.9	8.9
Pirenzepine	8	6.3	6.8	7.1	6.9
AF-DX116	6.9	7.2	6.6	7	6.6
4-DAMP	9.2	8.1	9.2	8.5	8.9
p-F-HHSiD	7.3	6.6	7.7	7.2	6.7
Himbacin	6.7	8	6.9	7.8	6.1

+++ : 強作用 ; + : 弱作用 ; - : 作用なし ; ± : 過剰発現で弱作用, 生理的レベルでは作用なし.

AA, arachidonic acid; ADC, adenylyl cyclase; PI, phosphoinositide; PLA2, phospholipase A2; PLC, phospholipase C; 4-DAMP, 4-diphenylacetoxymethylpiperidinemethiodide; p-F-HHSiD, hexahydro-sila-difenidol hydrochloride, p-fluoro analog

表は Wang et al (2004) を参考に作成した。

(臭化ブチルスコポラミンなどの抗ムスカリン薬)がある。しかしながら, スコポラミンや atropine はすべてのムスカリン受容体サブタイプをほぼ同じ親和性で遮断するため口喝や排尿困難, 頭痛などの副作用が起きる。それゆえ, 胃腸管に存在するムスカリン受容体サブタイプの解明とそれら受容体に対する選択的な遮断薬の開発が待たれている。5種のムスカリン受容体サブタイプはアミノ酸構造が似ている上に, ひとつの器官には複数の受容体が存在する。また, その細胞内情報伝達系も偶数番号の受容体, 奇数番号の受容体の中では類似しているため, 1種類の遮断薬を用いての解析や細胞内情報伝達物質の解析だけではそれぞれの器官に存在する受容体種を特定すること難しい(表1)。消化管平滑筋では, M₂とM₃の両方の受容体種が主に発現していることが, 放射性リガンド結合 (Giraldo et al., 1987), mRNA ハイブリダイゼーション (Maeda et al., 1988) および免疫沈降研究 (Wall et al., 1992) などにより明らかになっているが, それぞれの受容体がアセチルコリンによる胃腸管収縮にどのような関与をしているか, およびその細胞内情報伝達系については不明な点が少なくない。

本総説では, 胃腸管平滑筋に収縮を誘起するムスカリン受容体種に着目し, その機能を解析した従来の薬理学的研究に加え特定のムスカリン受容体の発現を抑制したムスカリン受容体ノックアウト (KO) マウスを用いた収縮実験および電気生理学的実験の成果について述べ, 胃腸管収縮におけるムスカリン受容体の機能的役割を紹介する。また, 平滑筋以外の部位に存在するムスカリン受容体の機能についても知見を紹介する。なお, 本総説に述べられている機能的実験の結果 (胃, 回腸および結腸) はすでにその多くが公表されている (Unno et al., 2005; 2006; Kitazawa et al., 2007; Sakamoto et al., 2007; Suguro et al., 2010; Kondo et al., 2011; Matsuyama et al., 2013; Tanahashi et al., 2009; 2013; 2021)。

2. 消化管に存在するムスカリン受容体種

これまで各生体組織に存在するムスカリン受容体種は, 選択的な遮断薬を用いた機能的検討 (受容体結合実験や胃腸管収縮実験), 受容体に特異的な抗体を用いた免疫組織化学的検討, 受容体コード遺伝子の発現を解析する in situ ハイブリダイゼーションおよび real time PCR 法を用い明らかにされてき

た。これらの解析により、①ムスカリン受容体は幅広い臓器に存在すること、②ひとつの臓器に複数の受容体サブタイプが存在すること、③優勢に存在する受容体種には臓器特異性があることが明らかになっている。即ち、M₁受容体は主に脳に分布し、M₂受容体は脳、心臓および平滑筋組織に、M₃受容体は脳、平滑筋組織、外分泌腺と眼に、M₄受容体は脳と肺に分布し、M₅受容体は神経細胞と非神経細胞の両方に存在している (Maeda et al., 1988; Caulfield and Birdsall, 1998; Dörje et al., 1994; Eglén et al., 1996; Ehlert et al., 1997)。

胃腸管ではアセチルコリンによる収縮が atropine で抑制されること、ムスカリン受容体標識化合物 (³H)-quinuclidinyl benzilate [(³H)-QNB] の特異的な結合部位があることから (Morisset et al., 1981)、ムスカリン受容体が存在することは古くから知られていた。Zhang et al. (1991) や Gómez et al. (1992) は、ラットやヒトの結腸から作成した細胞膜標本で ³H で標識したメチルスコポラミンの結合解離実験を行い、(S)-11-(2-(2-((diethylamino)methyl) piperidin-1-yl) acetyl)-5H-benzo [e] pyrido [3,2-b][1,4]diazepin-6(11H)-one (AF-DX116, Micheletti et al., 1987) の解離曲線が 1 結合部位モデルよりも 2 結合部位モデルに適合することから、解離曲線が 2 つの曲線の和であり 2 種類のムスカリン受容体種が存在する可能性を示した。その後、各種ムスカリン受容体の抗体が作成され免疫組織化学的検討が行われた (Levey, 1993; Dörje et al., 1994)。また、それぞれのムスカリン受容体の遺伝子発現を検討する分子生物学的な解析 (Maeda et al., 1988; Lin et al., 1997) も行われ、消化管には複数のムスカリン受容体種が存在し、その 70% 以上が M₂ タイプ、約 20% が M₃ タイプであることが報告された (残りの 10% が M₁, M₄ と M₅)。このような事実は、我々の検討においても確認されており、M₁ から M₅ の受容体に特異的な primer を作成して real time PCR を行うと脳では、M₁ (45.1%), M₄ (35.3%) の発現が多く次いで M₂ (8.5%) と M₃ (10.6%) であること、心房筋ではラットでの成績 (Myslivecek et al., 2006) に一致して殆どが M₂ タイプ (99.8%) であり他のサブタイプの発現は極めて少ないこと、胃では M₂ (68.6%), M₃ (25.9%) がともに優勢に存在し、その比率はおおよそ 3 : 1 であることを確認している。同じ内臓平滑筋である子宮においても M₂ (49.4%) が多く、次いで M₃ (12.8%), M₁ (9.9%), M₄ (9.9%) となり、M₂ と M₃ が主に発現しているサブタイプであることがわかっている (北澤, 未発表成績)。

アセチルコリンの収縮作用に関連するムスカリン受容体は平滑筋細胞上に主に存在すると考えられていたが、Harrington et al. (2007, 2008, 2010) は、分子生物学的手法と免疫組織化学的方法を用い、M₁受容体が筋間神経叢や粘膜下神経叢の腸神経 (コリン作動性神経, NO 神経) にも存在していることを明らかにした。この神経性 M₁ 受容体については機能的な研究からも存在が示唆されている (Hamrouni et al., 2006)。加えて Harrington et al. (2008) は、M₂ 受容体の抗体と神経因子、神経伝達物質の抗体を用いて 2 重染色を行い、神経叢のコリン作動性神経、substance P 神経、NO 神経などに放出調節性の M₂ 神経が存在していることを明らかにしている。即ち、M₂ 受容体はコリン作動性神経および他の腸管内在性神経においてシナプス前受容体として機能し、神経伝達物質放出を調節していると考えられている。加えて、Epperson et al. (2000) および Iino and Nojyo (2006) は、M₂ と M₃ 受容体が平滑筋や神経細胞だけでなくカハール介在細胞にも発現していることを示した。これらの事実は、アセチルコリンが平滑筋や腸神経だけでなく、介在細胞の機能にも影響を与え、腸神経を介し自発性収縮リズムの調節にも関与している可能性を示している。

3. 胃腸管収縮に関するムスカリン受容体の解析

3.1. 遮断薬を用いての解析

アセチルコリンによる胃腸管収縮に関するムスカリン受容体種の解析は、初期にはそれぞれのムスカリン受容体に対して異なる親和性を有する遮断薬を用いた収縮抑制実験や結合阻害実験により行われ、正常組織では M₃ 受容体がムスカリン作動薬の収縮に関与していると言われていた (Thomas and Ehlert, 1996; Ehlert et al., 1997)。例えばムスカリン受容体遮断薬、atropine (サブタイプ選択性なし)、AF-DX116 (M₂ 選択的)、N-(2-chloroethyl)-4-piperidinyl diphenylacetate (4-DAMP, M₃ 選択的)、himbacine (M₂, M₄ 選択的)、pirenzepine (M₁ 選択的) (表 1) のラット回腸アセチルコリン収縮に対する抑制の程度 (濃度反応曲線の右方移動の程度) からムスカリン受容体に対する遮断薬の親和性 (pA₂) を計算するとそれぞれ、8.9, 5.9, 9.1, 7.14, 6.76 となる。この値を横軸に、縦軸には各遮断薬の 5 種類のムスカリン受容体に対する親和性の文献値 (Wang et al., 2004) をプロットしその相関性を調べると相関係数 (係数の確率, 回帰直線の傾き) は、M₁ では 0.87 (p=0.06, 0.98), M₂ では 0.76 (p=0.14, 1.08), M₃ では 0.98 (p=0.004, 0.97), M₄

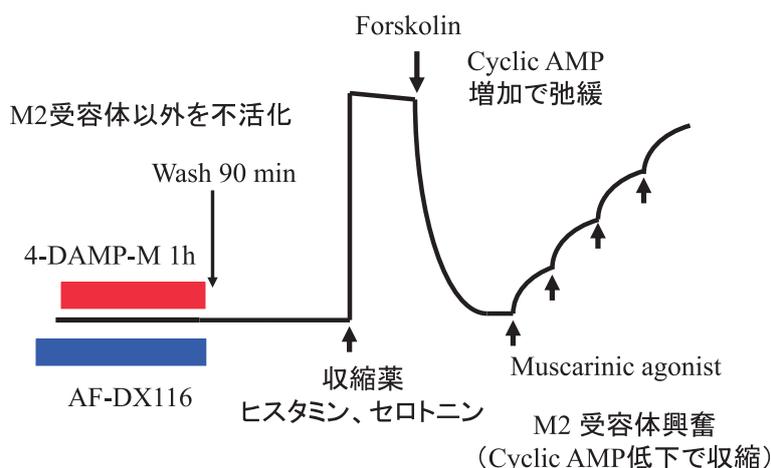


図 1. M_2 受容体を介する収縮反応の解析方法

胃腸管標本をまず M_2 選択的遮断薬の AF-DX116 (3 μ M) で前処理しその後 4-DAMP-mustard (10 nM) で一時間処理する。この処置で 4-DAMP は AF-DX116 が予め結合している M_2 以外の受容体に不可逆的に結合する。両遮断薬を洗浄すると AF-DX116 は M_2 から解離するが、4-DAMP mustard は M_2 以外のムスカリン受容体から解離できないので、標本は M_2 受容体のみが正常な状態となる。 M_2 受容体を介する反応として cyclic AMP の低下に注目し、収縮薬 (ヒスタミンまたはセロトニン) の反応を cyclic AMP を増大させる forskolin で抑制 (弛緩) し、次いで M_2 受容体を作動薬で刺激すると cyclic AMP が減少し抑制されていた収縮薬による反応 (M_2 受容体関与) が発現する。

では 0.97 ($p=0.007, 1.52$), M_5 では 0.91 ($p=0.03, 0.9$) となり, M_3 の相関係数が高くなった。同様な遮断薬を用いた解析はラット胃 (Lin et al. 1997), モルモット回腸 (Honda et al., 1993) やイヌ回腸 (Shi and Sarna, 1997) でも行われており, 胃腸管のアセチルコリン収縮には M_3 受容体が関与していると考えられていた。細胞内では M_3 受容体の興奮により IP_3 産生が増加するが, この増加作用を抑制する遮断薬の力価順は, 4-DAMP = atropine > pirenzepine > AF-DX116 であり, M_3 に選択的な 4-DAMP の抑制作用が pirenzepine (M_1), AF-DX116 (M_2) に比較し強いことから IP_3 の産生には M_3 受容体が関与していると推察されている (Honda et al., 1993)。即ち, 正常状態で遮断薬を用いた機能的な解析からは, M_2 受容体の存在やその収縮への関与は明らかにすることはできなかった。その後の検討で M_2 受容体の機能を明らかにするためには選択的に M_3 受容体の機能を減弱させることが必要であることが知られるようになった。

Eglen and Harris (モルモット回腸, 1993), Thomas and Ehlert (ラット胃, 1996), Sawyer and Ehlert (モルモット結腸, 1998) は, M_2 受容体の機能を観察するために興味深い方法を報告した。この方法のポイントは 4-DAMP mustard の使用である。4-DAMP mustard は, oziridinium イオンを介すすべてのムスカリン受容体サブタイプと不可逆的な共

有結合を形成するが, その親和性は M_1, M_3, M_4, M_5 が 7nM であるのに比較して M_2 に対しては 6 倍低いことがわかっている。それゆえ, 予め M_2 受容体を保護しておき最適な 4-DAMP mustard 濃度を使用すれば, M_2 以外の受容体の機能を選択的に消失させることができる (Ehlert, 1996; Ehlert and Griffin, 1998)。実験方法の概略を図 1 に示した。選択的な M_2 受容体遮断薬である AF-DX116 の存在下で 4-DAMP mustard 処置を行うと, 4-DAMP mustard は AF-DX116 が結合している M_2 受容体以外のムスカリン受容体に不可逆的に結合しそれら受容体を不活性化する。その後, 4-DAMP mustard と AF-DX116 を洗浄すると, AF-DX116 は M_2 受容体から解離するが 4-DAMP mustard は解離できないために M_2 受容体のみが機能できる平滑筋標本を作り出すことができる。この標本をヒスタミンで収縮させた後にフォルスコリンを適用するとアデニル酸シクラーゼが活性化し cyclic AMP が増加して弛緩が誘起される。この状態でムスカリン受容体作動薬 (oxotremorine-M) を適用すると M_2 受容体/ $G_{i/o}$ 系が活性化されアデニル酸シクラーゼが抑制されることにより cyclic AMP が減少し収縮が誘起される (ヒスタミン収縮の再出現)。この収縮を p-F-HHSiD (p-Fluoro-hexahydrosila-difenidol, M_3 選択的) は抑制しなかったが, AF-DX116 (M_2 選択的) は濃度反応曲線を右方に移動させ, その pA_2 値が M_2 受容体

に対する親和性と一致していた。このことから、収縮には M_2 受容体の興奮が関与することが確認できた。また、 M_2 受容体とカップルする $G_{i/o}$ は百日咳毒素により阻害されるが、Sawyer and Ehlert (1999) は、4-DAMP mustard 処置下でのムスカリン作動性収縮が百日咳毒素処置で抑制されることを確認している。このように M_2 , M_3 受容体は胃腸管には不均一 ($M_2 > M_3$) に分布しているが、通常の標本ではムスカリン受容体作動薬の収縮は M_3 受容体の興奮の性質を示し、優勢に存在する M_2 受容体の機能は M_3 受容体を抑制した特殊な条件下のみで観察される。

3.2. ムスカリン受容体ノックアウト (KO) マウスでの解析

5 種類のムスカリン受容体は構造的に類似しており、作動薬や遮断薬を用い薬理的に正確に区別するのは難しい。作動薬には選択性があるものは殆どなく、McN-A-343 (Mitchelson, 2012) が M_1 選択性のある作動薬として知られているのみである。一方、遮断薬では M_1 受容体に選択性が高い pirenzepine の M_1 から M_5 受容体に対する親和性 (pK_d) は、それぞれ 8.0, 6.3, 6.8, 7.1 および 6.9, M_2 受容体に選択性が高い AF-DX116 ではそれぞれ 6.9, 7.2, 6.6, 7.0 および 6.6, M_3 受容体に選択性の高い 4-DAMP では、9.2, 8.1, 9.2, 8.5 および 8.8 であり (Wang et al., 2004, 表 1), これらの遮断薬が使用する濃度によりすべての受容体サブタイプに結合する可能性は否定できない。また、すでに述べたように胃腸管では 3 種類のムスカリン受容体サブタイプ (M_1 , M_2 および M_3) が平滑筋に加えて神経、カハール介在細胞や粘膜にも存在している。加えて、細胞内情報伝達系は奇数番号の受容体 (膜リン脂質加水分解, 細胞内 IP_3 , Ca^{2+} 増加), 偶数番号の受容体では (アデニル酸シクラーゼ抑制, cyclic AMP 減少) 類似しているので (Wang et al., 2004), 胃腸管において遮断薬や情報伝達系の解析により M_1 , M_2 および M_3 受容体の機能を個別に調べることは難しいと考えられた。

この問題を克服するため 2000 年代になり作出されたのがムスカリン受容体のノックアウト (KO) マウスであり、従来の遮断薬を用いた薬理的解析と組み合わせることにより各器官におけるムスカリン受容体の役割が明らかになってきている (Ehlert, 2003; Matsui et al., 2004; Wess et al., 2003; Wess, 2004)。例えば、Stengel et al. (2000) は、 M_2 または M_4 受容体 KO マウスの心房筋と胃条片を用い、作動薬カルバコール (carbachol, CCh) による心拍数

低下作用は M_2 KO マウスでは消失するが M_4 KO では変化しないこと、一方、胃条片では M_2 KO でも収縮は発現するが感受性が低下することを示し、ムスカリン作動薬による心拍数の低下には主に M_2 受容体が関与すること、胃収縮にも部分的に M_2 受容体が関与することを示した。同様に M_3 KO マウスを用いて Stengel et al. (2002) は、心臓では M_3 の機能は確認できないが、胃、膀胱および気管支平滑筋のムスカリン作動薬による収縮には M_3 受容体が関与しその関与の程度には臓器差があることを示した。即ち、 M_3 KO で膀胱ではムスカリン作動薬による収縮は完全に消失したが、胃や気管支では収縮は部分的に抑制されたのみであった。このことは、胃や気管支では M_2 の興奮でも収縮が起きることを示している。その後、1 種類だけでなく 2 種類のムスカリン受容体を欠損したダブル KO マウスも作製され、ムスカリン受容体研究に大きなパラダイムシフトが起きた。

以下に、 M_2 受容体 KO (M_2 KO), M_3 受容体 KO (M_3 KO) および M_2/M_3 受容体ダブル KO (M_2/M_3 KO) マウスの胃、回腸および結腸で行った機能的実験 (収縮実験) の成績を紹介する。

3.2.1 胃

すでに述べたように胃の CCh 誘発性収縮は M_2 KO, M_3 KO マウスの胃条片 (fundus, 胃底部) ではともに減弱することが知られていた (Stengel et al., 2000; 2002)。我々はこの 2 種類の KO マウスに M_2/M_3 KO マウスを加え、胃底部輪走筋に加えて幽門部輪走筋でも解析を行い、CCh 誘発性収縮への M_2 , M_3 受容体の関与を明らかにした (Kitazawa et al., 2007)。

胃底部：CCh の単適用は濃度依存的に野生型、 M_2 KO および M_3 KO マウスの胃底部条片を収縮させた (図 2)。しかしながら M_2/M_3 KO マウスでは収縮は誘起されず、高濃度では逆に弛緩が起きた。この弛緩は atropine, テトロドトキシンまたは L-nitroarginine methylester (L-NAME, NO 合成酵素阻害薬) によって抑制された。このことは、収縮を誘起する受容体は、 M_2 と M_3 サブタイプであること、収縮が抑制された状態では M_2 と M_3 以外のムスカリン受容体を介した神経性弛緩作用が顕在化することを示している。

収縮が誘起された野生型と M_2 KO, M_3 KO で収縮反応の時間経過を比較すると野生型と M_2 KO では CCh 適用後、収縮は素早く立ち上がり (phasic 相) その後は維持された (tonic 相)。一方、 M_3 KO マウ

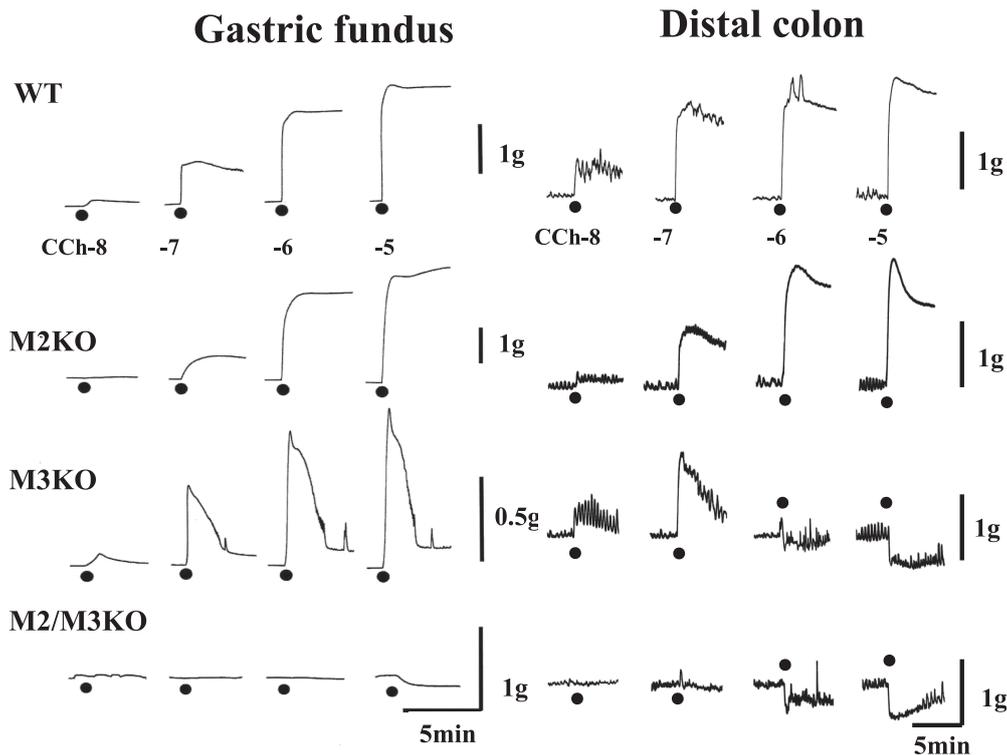


図2. 各種ノックアウトマウスの胃および遠位結腸条片におけるカルバコール誘発性収縮の典型例。野生型 (WT), M_2 KO, M_3 KO および M_2/M_3 KO マウスの胃底部 (gastric fundus) と遠位結腸 (distal colon) 標本にカルバコール (CCh) を適用した時の典型的な収縮反応を示している。収縮曲線の下に数字は濃度 \log (mol/L) を示す。野生型と M_2 KO の収縮は素早い立ち上がり (phasic 収縮) のあと維持されたが (tonic 収縮), M_3 KO での収縮は一過性であり (phasic 収縮), 結腸標本では高濃度で弛緩のみを呈した。Kitazawa et al. (2007) および Kondo et al. (2011) から作成した。

スでは CCh 収縮は素早く立ち上がるものの維持はされず一過性の収縮となった (図2, M_3 KO マウスの収縮)。このことは収縮の持続相の形成には M_3 受容体が関与していることを示している。CCh 収縮の持続相は M_3 受容体の興奮により産生された IP_3 により細胞内 Ca^{2+} store が空になりそれを補うために細胞内に Ca^{2+} を動員する store-operated Ca^{2+} チャネルと同じく M_3 受容体興奮により産生される DAG にリンクした非選択的陽イオンチャネルが関与していると報告されているので (Ohta et al., 1995; Lee et al., 2003), M_2 受容体のみが興奮する M_3 KO では tonic 相が形成されなかったものと考えられた。

M_2 KO, M_3 KO マウスでの CCh 収縮にはそれぞれ, M_3 , M_2 受容体が関与していると推察されるので, AF-DX116 (M_2 選択的, pK_d は M_2 で 7.2, M_3 で 6.6) および 4-DAMP (M_3 選択的, pK_d は M_2 で 8.1, M_3 で 9.2) (Wang et al., 2004) の CCh 濃度反応曲線に与える影響を検討した。 M_2 KO マウスでの CCh 誘発性収縮は, AF-DX116 (1 μ M), 4-DAMP (10nM) のいずれによっても競合的に拮抗

され濃度反応曲線は右方に移動した。半分効果濃度 (EC_{50}) はそれぞれ 2.3 倍 (AF-DX116) および 10.8 倍 (4-DAMP) に増加し, pK_d 値はそれぞれ 5.95 および 9.03 と計算された。同様な検討を M_3 KO マウスで行うと AF-DX116 および 4-DAMP の pK_d 値は, 7.37, 8.4 となった。 M_3 KO での AF-DX116 と 4-DAMP の親和性は M_2 受容体に対する値と, M_2 KO での値は M_3 受容体に対する値と類似していたので, M_2 KO における CCh 誘発性収縮には M_3 受容体が, M_3 KO における収縮には M_2 受容体が関与することが確認できた (Kitazawa et al., 2007)。

野生型, M_2 KO および M_3 KO での CCh 誘発性収縮の濃度反応曲線の変化の概要を図3に示した。野生型の濃度反応関係と比べると M_2 KO マウスでは最大収縮高には差がないものの親和性 (pEC_{50}) は, 野生型に比べて低下し濃度反応曲線は右方平行移動した。一方, M_3 KO マウスでは親和性には野生型と差がなかったが, 最大収縮高は著明に低下した。この結果, M_3 KO では CCh の親和性は変わらず濃度反応曲線は下方にシフトした (Kitazawa et al., 2007)。

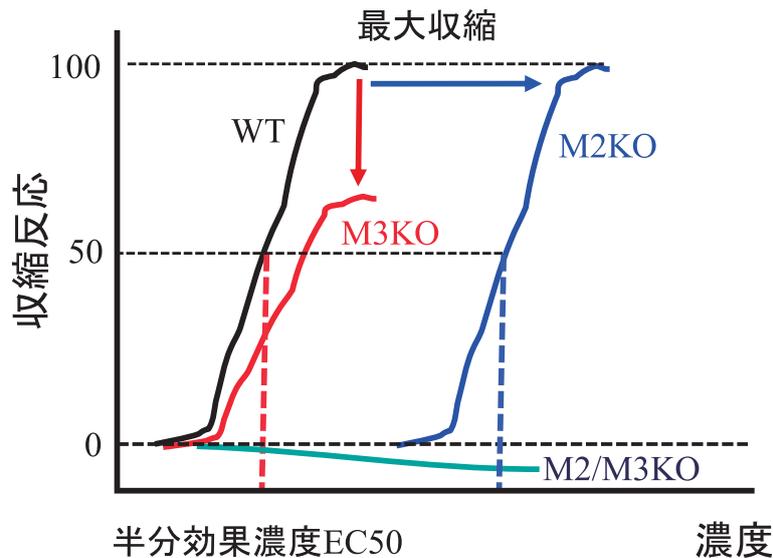


図3. ノックアウトマウス胃腸管標本でのカルバコール濃度反応曲線の比較 (Kitazawa et al., 2007) と回腸 (Unno et al., 2005) での成績を基にカルバコールの濃度反応曲線がムスカリン受容体 KO マウスでどのように変化するのかを示した。野生型 (WT) で得られた濃度反応曲線と比較し, M_2 KO (M_3 が収縮に関与) では右方に平行移動した (親和性の低下, 最大収縮不変)。一方, M_3 KO (M_2 が収縮に関与) では曲線は右方には移動せず下方に移動した (親和性不変, 最大収縮低下)。 M_2/M_3 KO では収縮が起きずに弛緩が誘起された。

同様な収縮実験を幽門部から作成した輪走筋標本でも行ったが, 得られた成績は同じであった。即ち, ① M_2 KO, M_3 KO では CCh 誘発性収縮が誘起されるが M_2/M_3 KO では弛緩が誘起される。②野生型, M_2 KO の収縮は phasic と tonic 相から成るが, M_3 KO では phasic 相のみの一過性収縮である。③ M_2 KO では最大収縮は変わらないが親和性が低下する。 M_3 KO では親和性は変わらないが最大収縮が低下する。総括すると M_2 , M_3 がともに発現する野生型では作動薬は高親和性で強い収縮を誘起するが, M_2 KO では収縮高は変わらないが親和性が低下, M_3 KO では親和性は変わらないが収縮力が低下した。これらの結果は, M_2 受容体は M_3 受容体媒介性収縮の親和性を増加させ, M_3 受容体は M_2 受容体媒介性収縮の大きさに影響を与えることを示唆している。即ち, M_2 受容体興奮は低濃度から収縮を発生させ, M_3 受容体との協調により強い収縮が発生するという生体に有益な現象が起きていると推察された (Kitazawa et al., 2007)。

3.2.2. 回 腸

M_2 KO, M_3 KO および M_2/M_3 KO マウスの回腸標本を用いても CCh の収縮作用が検討されている (Unno et al., 2005)。得られた成績は前述の胃標本での成績と同じであり, ① M_2 KO および M_3 KO マウスでは CCh 誘発性収縮が誘起されたが M_2/M_3 KO マウスでは収縮でなく弛緩が起きる。

② M_2 KO では濃度反応曲線は右方平行移動, M_3 KO では濃度反応曲線は下方に移動した。加えて M_2 KO (M_3 関与), M_3 KO (M_2 関与) マウスでの CCh 収縮に対する Ca^{2+} free 液, 脱分極, 百日咳毒素, Ca^{2+} チャネル遮断薬の影響を比較すると, M_2 受容体を介する収縮は百日咳毒素, Ca^{2+} free 液, 脱分極筋および電位依存性 Ca^{2+} チャネル遮断薬によりほぼ完全に消失した。このことは, M_2 受容体の興奮により脱分極が起き電位依存性 Ca^{2+} チャネルから細胞外 Ca^{2+} が流入し収縮が起きることを示唆している。一方, M_3 受容体を介する収縮は, 百日咳毒素処置では全く影響を受けず, Ca^{2+} free 液, 脱分極筋および Ca^{2+} チャネル遮断薬では部分的に抑制されたに過ぎなかった。このことは, M_3 受容体興奮による収縮には, 細胞外 Ca^{2+} および細胞内 Ca^{2+} のいずれもが動員されること, 細胞外からの Ca^{2+} 流入には電位依存性 Ca^{2+} チャネルと非電位依存性 Ca^{2+} チャネルが関与していることを示唆している。即ち, M_2 および M_3 受容体がカップルする G タンパク質の差により両受容体の収縮作用のメカニズムが異なっていた。百日咳毒素処理をした野生型マウス回腸の CCh の濃度反応曲線は右方に移動し, 各濃度での抑制を比較すると低濃度の CCh の収縮が

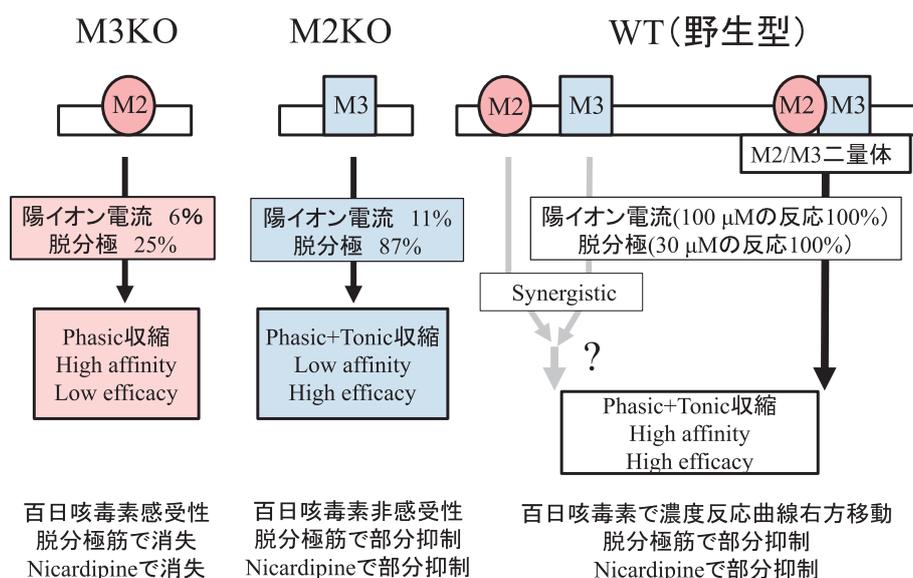


図 4. 野生型, M_2 KO および M_3 KO マウス胃腸管におけるカルバコール誘発性収縮の比較
 M_2 受容体が関与する収縮は高親和性だが低収縮活性であり, phasic 相のみからなっていた。この収縮は百日咳毒素処置, 脱分極筋, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの遮断薬で抑制された。 M_2 受容体興奮では $G_{\beta\gamma}$ を介し細胞膜の脱分極が起き, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化して収縮が起きた。一方, M_3 受容体興奮では収縮発現に要する濃度は野生型よりも高かったが, 同じ最大収縮が起きた。この収縮は, 百日咳毒素処置では影響を受けず脱分極筋, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル遮断薬で部分的に抑制された。このことは, M_3 受容体興奮では M_2 と同様に脱分極が誘因となり電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通り細胞外から Ca^{2+} が動員されるが, それに加え電位依存性 Ca^{2+} チャンネル以外の細胞外からの Ca^{2+} 流入経路, 細胞内 Ca^{2+} の動員経路, および Ca^{2+} 感受性増大経路などが収縮に関与している。野生型では, 両受容体のシグナルが細胞内で協力するか, 細胞膜上で M_2/M_3 複合体が形成され, 高親和性で高収縮性の反応が誘起される可能性が考えられる。非選択陽イオンチャンネルや脱分極の研究から, M_2 と M_3 のシグナルが細胞内で統合されるというよりは, 細胞膜上で両受容体が二量体を形成し細胞膜に発現する陽イオンチャンネルを制御し収縮反応が誘起されると考えた方が実験成績を説明しやすい。なお, 本図は Unno et al. (2005), Kitazawa et al. (2007), Sakamoto et al. (2007), Tanahashi et al. (2009), および Tanahashi et al. (2021) の論文を参考に作成した。

大きく抑制されていた。このことは, 低濃度のムスカリン受容体作動薬の収縮には M_2 受容体の関与が大きいことを示唆する (Unno et al. 2005)。

3.2.3 内在性神経刺激により誘起される反応

内因性アセチルコリンによる収縮反応における M_2 および M_3 受容体の関与を調べるために, 胃および小腸の平滑筋標本に electrical field stimulation (EFS) を加え胃腸管壁の内在性神経細胞を刺激し誘起される反応を比較した (Unno et al. 2006; Kitazawa et al. 2007)。

胃底部: 野生型のマウスの胃底部標本に EFS (0.5 Hz から 32 Hz, 5 分間隔で 10 秒間刺激) を加えると低頻度では刺激中に弛緩が誘起されたが, 8 Hz からは弛緩後にゆっくりしたりバウンド収縮が発現した。Physostigmine 処置では弛緩反応は消失し頻度に依存した収縮に反転した。この状態に NO 合成酵素阻害薬の L-NAME を加えると収縮反応はさらに増大した。Atropine は, Physostigmine と L-

NAME 処置標本の EFS 誘発性収縮を著明に抑制したが, 高頻度で誘起される収縮は一部残存した。このことから電気刺激により少なくともコリン作動性神経, NO 作動性抑制神経, 非コリン作動性興奮神経の 3 種類が興奮すると考えられた。Physostigmine と L-NAME 処置胃標本で観察される atropine 感受性収縮をコリン作動性収縮成分と考え, この収縮の大きさを 80 mM K^+ 刺激誘発性収縮に対する相対値に換算し M_3 KO, M_2 KO, M_2/M_3 KO マウスで比較した (表 2)。 M_3 KO, M_2 KO のいずれにおいてもコリン作動性収縮成分は野生型に比較し減少していた。また M_2/M_3 KO では, コリン作動性収縮成分は認められなかった (表 2)。

Atropine 下で残存する収縮成分は, 高頻度刺激 (16 Hz および 32 Hz) で著明に出現し M_3 野生型と M_3 KO の比較で収縮高は, それぞれ $18.8 \pm 7.4\%$ と $45.6 \pm 6.6\%$ (16 Hz) ($n = 5$), $32.6 \pm 11.5\%$ と $63.7 \pm 6.9\%$ (32 Hz) ($n = 5$) と M_3 KO で有意に増大していた。同様に M_2/M_3 野生型と M_2/M_3 KO の

表2 M₂KO, M₃KO および M₂/M₃KO マウス胃における電気刺激誘発性コリン作動性収縮成分の比較

Mice	Choline 作動性収縮成分 (80 mM K ⁺ 収縮に対する相対値)						
	0.5	1	2	4	8	16	32 Hz
M ₂ WT	19±5	41±12	67±15	94±14	112±10	115±9	112±11
M ₂ KO	11±4	24±8	38±11a	56±14a	70±13a	75±13a	80±14
減少率 (%)	42	41	43	40	38	35	29
M ₃ WT	26±10	52±17	75±19	94±18	105±13	105±11	95±12
M ₃ KO	21±5	44±9	65±9	80±9	86±13	73±5a	67±48a
減少率 (%)	19	15	13	15	20	30	30
M ₂ /M ₃ WT	4±1	9±2	19±4	29±3	47±17	55±4	68±10
M ₂ /M ₃ KO	0±0a	0±0a	1±1a	-1±2a	-4±4a	-1±1a	2±2a
減少率 (%)	100	100	95	100	100	100	97

それぞれの数値は5例の実験の平均±標準誤差である。コリン作動性の収縮成分は、physostigmine (300 nM) と L-NAME (100 μM) 処置した胃底部標本に電気刺激を加え収縮を確認した後、atropine (1 μM) で処置し消失した収縮の高さを 80 mM K⁺ 収縮に対する相対値で示した。a: 野生型と比較して有意差があることを示している (p<0.05)。減少率はコリン作動性収縮がノックアウトマウスで野生型に比べてどの程度減少したかを示した。尚、M₂/M₃KO のマイナスの値は0とし計算したので減少率は100%となっている。表は Kitazawa et al. (2007) を改変した。

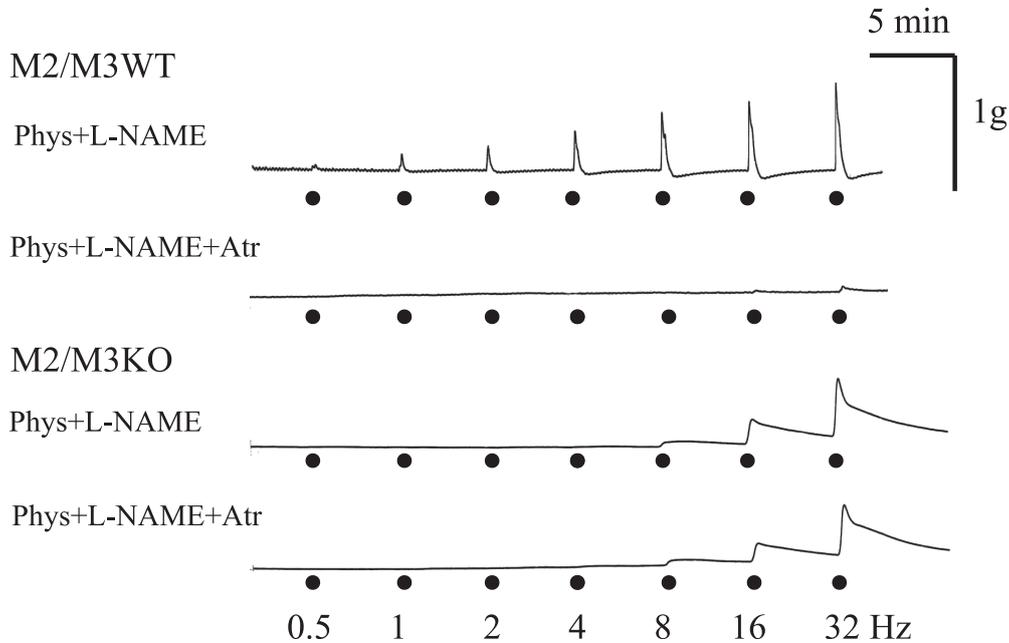


図5. M₂/M₃KO マウスにおける atropine 耐性収縮の増加

野生型マウスと M₂/M₃ KO マウスで atropine 耐性収縮を比較した。いずれのマウスの胃底部標本でも physostigmine と L-NAME の処置下では刺激頻度に依存した収縮が誘起された。Atropine はこの収縮を野生型では著明に抑制したが、M₂/M₃KO マウスでは atropine 処置でも収縮は殆ど変わらなかった。Atropine 下の収縮反応の比較より M₂/M₃ KO では atropine 耐性収縮 (非コリン作動性) が増大していることがわかる。

比較では 1.8±0.5%と 20.2±15.3% (16 Hz) (n=5), 2.9±0.7%と 30±17.6% (32 Hz) (n=5) であり 32 Hz の収縮反応が著明に増加していた (図5)。このことは、コリン作動性収縮成分が減弱する M₃KO, M₂/M₃KO では神経性胃収縮を補填するために非コリン性収縮が増加すると考えられた。一方、コリン作動性収縮が減弱する M₂KO では atropine 耐性収縮の増加は認められなかった。この理

由は不明であるが、EFS 誘発性コリン作動性収縮には M₂ よりも M₃ 受容体がより強く関与することを示しているのかもしれない。

以上の電気刺激による検討の結果は神経から放出される内在性アセチルコリンによる収縮にも M₂, M₃ 受容体が関与していることを示している。どちらかという低頻度の刺激による収縮には M₂ が、高頻度の刺激による収縮には M₃ が関与している可

能性があった(表2)。また、コリン作動性収縮が大きく消失したM₃KOやM₂/M₃KOマウスでは収縮の減少を補うために非コリン作動性の興奮成分が増加していた。胃排出能を検討した実験において、M₂/M₃KOでも胃排出能は野生型と比較して差が認められなかった(Kitazawa et al., 2007)。それゆえ、非コリン作動性収縮の増加が胃排出能の恒常性に関与している可能性がある。

回腸：同様に野生型、M₂KO、M₃KOおよびM₂/M₃KOマウスから作製した回腸標本でも電気刺激を加え、収縮高とその波形を比較した(Unno et al., 2006)。EFSを2, 5, 10, 20, 50 Hzの頻度で5秒間加えると、刺激中に素早い立ち上がりの収縮が起き、刺激終了後にはゆっくりとした経過の持続性収縮が観察された。Atropineは刺激期間中に誘起される素早い立ち上がりの初期収縮を消失させたが、持続性収縮には影響を与えなかった。このことは、初期の素早い収縮にはコリン作動性神経、その後出現するゆっくりした収縮には非コリン作動性神経が関与していることを示している(Unno et al., 2006)。同様な収縮パターンはM₂KOまたはM₃KOマウスの回腸でも認められたが、M₂/M₃KOマウスの標本ではコリン作動性(刺激中)収縮は全く認められず、ゆっくりした非コリン作動性収縮のみが発現した。M₂KO、M₃KOマウスのコリン作動性収縮成分はいずれでも野生型の80%程度に減弱していた。百日咳毒素処置はM₃KOのコリン作動性収縮を消失させたが、M₂KOの収縮には影響を与えなかった。Atropine下で認められ非コリン作動性収縮の大きさを野生型、M₂KO、M₃KOおよびM₂/M₃KOと比較してみると、M₂/M₃KOでのみ非コリン作動性収縮が有意に増大しているのが観察された。これら回腸での成績は胃底部標本での成績と類似しており、M₂およびM₃受容体がコリン作動性収縮の発現に関与すること(その中でもM₃受容体の関与がより大きい)、M₂およびM₃受容体が欠如した小腸では非コリン作動性興奮性神経支配のup regulationが起きていることが示された(Unno et al., 2006)。

3.2.4 腸神経に存在するムスカリン受容体の機能

①M₁受容体：これまで述べてきたように、M₂/M₃KOの胃、回腸条片では、高濃度CChにより弛緩作用が認められた。この弛緩作用はatropine、テトロドトキシン、L-NAMEで抑制されることから、M₂/M₃受容体以外のムスカリン受容体の興奮が抑制性NO神経を興奮させた結果と推察されている(Unno et al., 2005; Kitazawa et al., 2007)。

Harrington et al. (2007)は、免疫組織学的手法を用い、ヒトやモルモット消化管でM₁受容体がコリン作動性神経やNO神経に存在することを報告している。さらに彼らはヒト結腸で詳細な検討を行いM₁受容体が筋間神経叢や粘膜下神経叢に多く、一部粘膜上皮にも発現すること、M₂やM₃受容体は平滑筋細胞上だけではなく腸神経要素にも発現していることを報告している(Harrington et al. 2010)。このような形態学的な結果も踏まえ、M₁受容体がM₂/M₃KOで認められる胃腸管の弛緩に関与すると考えられている(Unno et al., 2005; Kitazawa et al., 2007)。

KOマウス結腸標本のCCh誘発性収縮においても胃条片、回腸条片と同じような結果が得られているが(Kondo et al., 2011)、異なる点としてM₃KOで低濃度CChでは収縮が起きるものの、高濃度CChでは弛緩作用のみが誘起され(図2)、濃度反応曲線はベル型を呈した。即ち、結腸では他の消化管部位に比べてM₃が欠損し収縮力が減弱した場合に弛緩反応が強く発現すると考えられる。結腸収縮におけるM₁受容体の機能的な意義を明らかにするために、M₁選択性の高い作動薬McN-A-343とM₁選択性が高い遮断薬pirenzepineを用い解析を行った。McN-A-343は野生型マウスの結腸に一過性の小さな収縮を誘起したが、この反応はpirenzepine、テトロドトキシン、L-NAMEのいずれの処置によって増大し持続性収縮反応に変化した。この持続性McN-A-343収縮はatropineで消失した。このことから、この収縮増大の機序は以下のように考えられた。まず、M₁作動薬であるMcN-A-343は弛緩を誘起するM₁受容体の他に平滑筋のM₂/M₃受容体にも作用し、後者の反応が優位であることから一過性の小さな収縮(M₂/M₃関与)が起きた。PirenzepineはM₁受容体を遮断することにより、テトロドトキシンは抑制性神経を麻痺させることにより、L-NAMEは抑制性NO神経の機能を減弱させることにより、M₁受容体を介する弛緩作用が消失しMcN-A-343のM₂/M₃受容体興奮による収縮が増大したと考えられる。McN-A-343は、M₂/M₃KOマウス結腸では弛緩反応のみを誘起し、この弛緩作用もpirenzepine、テトロドトキシン、L-NAME処置で抑制された。結腸は糞便を滞留させるため、NO神経などの抑制性神経支配が強いと推察され、これが要因となりM₃KOにおいて回腸、胃とは異なるベル型の濃度反応関係になったものと考えられる(Kondo et al., 2011)。

②M₂とM₄受容体：神経終末にはシナプス前受容

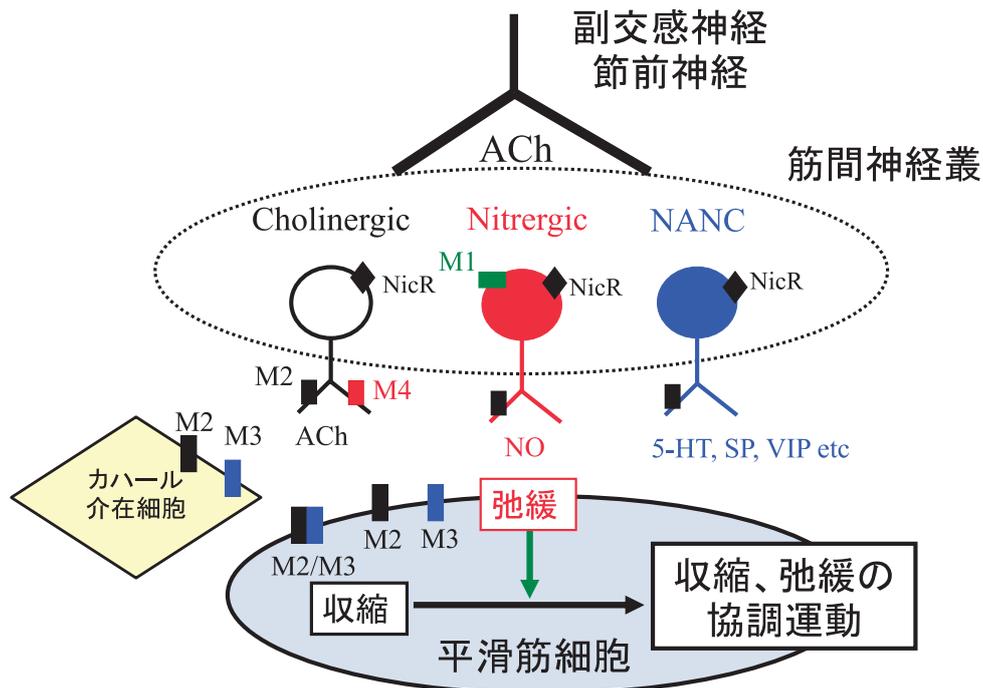


図 6. 消化管運動におけるムスカリン受容体サブタイプ的作用

副交感神経節前神経から放出されるアセチルコリン (ACh) は筋間神経叢のニコチン受容体 (NicR) に作用し副交感神経後線維 (コリン作動性神経) を興奮させ、放出された ACh は平滑筋の M₂ と M₃ および M₂/M₃ 複合受容体に作用して収縮を誘起する。また、カハール介在細胞上の M₂, M₃ にも作用しこの細胞の機能を調節する。一方、コリン作動性神経終末には M₂ と M₄ 受容体が存在し、ACh の放出を抑制的に調節している。免疫組織化学的検討では M₂ 受容体は NO 神経や非アドレナリン、非コリン作動性 (NANC) 神経にも存在すると言われている。胃腸管収縮を抑制的に調節する NO 神経上には M₁ 受容体が存在し、興奮により NO を放出し消化管運動を抑制的に制御する。アセチルコリンの平滑筋収縮/弛緩作用とカハール介在細胞への作用により蠕動運動のような協調性のある収縮/弛緩運動が誘起される。

体があり、神経伝達物質の放出を抑制的に調節していることは古くから知られていた。その例としてアドレナリン作動性神経終末の α₂ アドレナリン受容体がある (Starke et al., 1989)。このような negative feedback に関わる放出制御系はコリン作動性神経でも存在が推察されていたが (Somogyi and de Groat, 1999)、詳細な検討は行われていなかった。すでに述べたように免疫組織化学的解析では M₂ や M₃ 受容体が腸神経 (コリン作動性神経, NO 神経, substance P 神経) にも発現していることが報告されているので (Harrington et al. 2008, 2010)、消化管でもムスカリン受容体がコリン作動性神経からのアセチルコリン放出を調整している可能性がある。Takeuchi et al. (2005) は、7 種類のムスカリン受容体 KO マウス (M₁ KO, M₂ KO, M₃ KO, M₄ KO, M₅ KO, M₂/M₃ KO, M₂/M₄ KO) の回腸標本で電気刺激により放出されるアセチルコリン量を測定し以下の結果を得ている。野生型マウス回腸で電気刺激

を行うとアセチルコリン放出が誘起されるが、この放出は atropine 処置で増加した。この現象は、シナプス前ムスカリン受容体が atropine で遮断され、放出抑制機構が消失したため起きると推察された。この atropine による放出増大作用は、M₁ から M₅ までのシングル KO マウスでも野生型と同程度に認められたので、放出抑制に関与する受容体は 1 種類ではない可能性が示唆された。そこで 2 種類のダブル KO マウスで検討を行ったところ、M₂/M₃ KO では atropine による放出増大作用は認められたが、M₂/M₄ KO では放出増大作用は消失していた。また、M₂/M₄ KO で観察されるアセチルコリン放出量は atropine 処置野生型マウスでの値と一致していた。免疫組織化学的検討により M₂ は平滑筋とコリン作動性神経に存在すること、M₄ はコリン作動性神経で M₂ と共存していることが確認された。これらの成績から、腸のコリン作動性神経終末にはシナプス前 M₂/M₄ 受容体が存在し、放出の抑制性制御

に関わっていることが明らかになった (Takeuchi et al., 2005)。

3.3. 平滑筋の Ca^{2+} 感受性増大作用

一般に平滑筋は、細胞外や細胞内から供給される Ca^{2+} がカルモジュリンと複合体を作りこの複合体がミオシン軽鎖キナーゼを活性化し、生成されたリン酸化ミオシンとアクチンとの相互作用により収縮すると考えられている。即ち、 Ca^{2+} 濃度—リン酸化ミオシン量—収縮力の3者は相関する (ミオシンリン酸化説)。しかし、リン酸化ミオシン量はミオシン軽鎖ホスファターゼ (脱リン酸化酵素) によっても調節されているので、この酵素が抑制されると Ca^{2+} 濃度に関係なくリン酸化ミオシン量が増加し、収縮が増大する可能性がある (Somlyo and Somlyo, 2003)。アセチルコリンは、通常 G タンパク質共役受容体である M_2 および M_3 受容体を活性化させ細胞内への Ca^{2+} 動員を促進し収縮を誘起するが、Rho キナーゼとプロテインキナーゼ C (PKC) が関連する経路は脱リン酸化酵素を抑制し細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を伴わずに収縮を増強する。この現象では、平滑筋の Ca^{2+} 濃度—収縮曲線が作動薬の存在下では、左方にシフトするので Ca^{2+} 感作と呼ばれている (Karaki, 1989; Kitazawa et al., 1989; Somlyo and Somlyo, 2003)。これまで胃腸管平滑筋でもアセチルコリンや CCh のようなムスカリン作動薬で Ca^{2+} 感作が起きることが知られているが (Itagaki et al., 1995; Unno et al., 2003)、この現象に M_2 、 M_3 受容体のどちらが関与しているかは不明のままであった。

Suguro et al. (2010) は、野生型、 $M_2\text{KO}$ 、 $M_3\text{KO}$ および $M_2/M_3\text{KO}$ マウスの小腸標本を α -toxin で処置してスキンド標本を作製し、 Ca^{2+} 濃度と収縮との関係がムスカリン受容体作動薬でどのように変化するか検討した。 α -Toxin 処置は、平滑筋細胞膜に微小な穴をあけるので各種イオンは膜の内外を自由に透過することができ、人為的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を変えることが可能である。加えてイオンが透過する穴が微小なため細胞膜の受容体機能は維持されるので、受容体の興奮による Ca^{2+} 濃度—収縮曲線の変化を観察することができる。野生型マウス回腸での Ca^{2+} 濃度—収縮曲線から得られた半分効果 Ca^{2+} 濃度 ($p\text{Ca}^{2+}$) は 6.0 であり、この値は CCh (100 μM) 存在下では 6.2 と有意に増加した。同様に CCh 処置前と処置後の $p\text{Ca}^{2+}$ 値は、 $M_2\text{KO}$ では 5.9 と 6.2 (有意な増加)、 $M_3\text{KO}$ では 6.0 と 5.9 (有意差なし)、 $M_2/M_3\text{KO}$ では 6.0 と 6.0 (有意差なし) となった。

また、この Ca^{2+} 感受性の増加作用は、 $G_{q/11}$ の阻害薬である YM-254890 によって抑制された (Suguro et al., 2010)。 Ca^{2+} 感受性の増加には Rho キナーゼと PKC を介した経路が関与しているとされているが^s (Karaki, 1989; Kitazawa et al., 1989; Somlyo and Somlyo, 2003)、 $G_{q/11}$ の興奮は PLC を活性化して IP_3 と DAG を産生する。このうち IP_3 は Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を誘起するが、DAG は PKC を活性化しミオシン軽鎖を脱リン酸化する CPI-17 をリン酸化して抑制するので Ca^{2+} 感受性を増大すると考えられている (Kitazawa et al., 1989)。一方、Rho を介する系は $G_{12/13}$ タイプの G タンパク質で活性化されるが、Booden et al. (2002) や Vogt et al. (2003) は、 $G_{q/11}$ タイプであっても PLC 非依存性に Rho/Rho キナーゼ系が活性化されると報告している。Rho キナーゼは、myosin phosphatase targeting protein (MYPT) を介しミオシン軽鎖脱リン酸化酵素を抑制する。以上のことから Ca^{2+} 感受性の増加には M_3 受容体とそれにカップルした $G_{q/11}$ 、その下流にある PKC および Rho キナーゼによるミオシン軽鎖脱リン酸化酵素の抑制が関与すると考えられる。

4. ムスカリン受容体による消化管平滑筋イオンチャネルの制御

消化管をはじめとする平滑筋組織でムスカリン受容体刺激は、①非選択的陽イオンチャネル、② K^+ チャネル、③ Cl^- チャネル、および④電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化または抑制を起こすことが報告されている (Carl et al., 1996; Bolton et al., 1999)。これらのイオンチャネルの制御がどの種の受容体サブタイプの興奮によるのかについても KO マウスを用いて研究が進んでいる (Sakamoto et al., 2007; Tanahashi et al., 2009; 2021)。

4.1. 非選択的陽イオンチャネル

非選択的陽イオンチャネルの活性化は、平滑筋細胞の脱分極とそれに続く電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化と収縮を誘起するが、KO マウスを用いた検討からこのチャネルの活性化には M_2 と M_3 受容体の両方 (M_2/M_3 複合体) が必要であることが明らかになった。Sakamoto et al. (2007) は、野生型、 $M_2\text{KO}$ 、 $M_3\text{KO}$ および $M_2/M_3\text{KO}$ の回腸平滑筋でパッチクランプ法で陽イオンチャネルの電流を測定し、CCh によって $M_2\text{KO}$ および $M_3\text{KO}$ では野生型で観察されるイオン電流のそれぞれ 11% および 6% の電流変化しか起きないこと、 $M_2/M_3\text{KO}$ では電

流反応が起きないことを示した。即ち、野生型平滑筋の非選択的陽イオンチャンネルを流れる電流は単純に M_2 電流と M_3 電流の総和ではなく（単純合計で 17%）、両受容体が存在することで複合体が形成され協同的な電流が流れると考えられた。単イオンチャンネル解析の結果、 M_2 受容体の興奮では電導度が 70 pS のチャンネルが活性化され、このチャンネルには 3 種類の開口時間があつた (0.25, 1.1, 13.2 ms, 開口確率 0.042)。一方、 M_3 受容体の興奮では 70 pS と 120 pS、2 種類のチャンネルが活性化されるが、開口時間は 1 種類でそれぞれ、0.55 ms（開口確率 0.08）と 0.23 ms（開口確率 0.02）であつた。野生型では主に 70 pS の電流が観察され開口時間には、0.62, 2.7, 16.9 および 121.1 ms の 4 つの状態があつた（開口確率 0.14）。 M_2 または M_3 の興奮により 2 種類の陽イオンチャンネルが (70 ps と 120 ps) 活性化されるが、開口時間と開口確率が低いために多くの電流は流れない。しかし、 M_2 と M_3 が共発現する場合は M_2/M_3 複合体が制御する 70 ps チャンネルが高確率で長時間開口することで多くの電流が流れると推察された。なお、その後の研究で 70 pS チャンネルは transient receptor potential canonical 4 (TRPC4) チャンネル、120 pS チャンネルは TRPC6 チャンネルであることが明らかになった (Tsvilovskyy et al., 2009)。 M_2 KO では $M_3/G_{q/11}$ が TRPC4, TRPC6 を制御するがいずれのチャンネルも開口時間は極めて短い。 M_3 KO では $M_2/G_{i/o}$ が TRPC4 を制御しているが、開口時間は M_3 の興奮時に比べて長くなるものの野生型ほどではない。 M_2 と M_3 が共発現する野生型では、TRPC4 を $M_3/G_{q/11}$ と $M_2/G_{i/o}$ の両方 (M_2/M_3 複合体) が制御し、加えて M_3 系により産生された IP_3 により筋小胞体から放出される Ca^{2+} が TRPC4 をさらに活性化し強い電流が流れると考えられている (Sakamoto et al., 2007; Tanahashi et al., 2021)。

4.2. K^+ チャンネル

K^+ チャンネルの活性化は過分極、抑制は脱分極を起こすことから、このチャンネルは平滑筋細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。ムスカリン受容体の興奮が K^+ チャンネル機能に影響を与えることは良く知られていた (Beech, 1997; Zholos, 1999)。Sakamoto et al. (2007) は、CCh により活性化される large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) チャンネルの性質を KO マウスで検討し、このチャンネルを通る電流は筋小胞体から放出される Ca^{2+} 依存性に活性化され、野生型や M_2 KO では認められるが、

M_3 KO, M_2/M_3 KO では消失することを報告した。このことは、 M_3 受容体が活性化し産生される IP_3 により筋小胞体から放出される Ca^{2+} が BK チャンネルの制御に関与することを示している。

一方、ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) チャンネルは ATP やグリベンクラミドによって抑制され脱分極を起こし種々の平滑筋を興奮（収縮）させる。このチャンネルの興奮薬、クロマカリムは過分極を起こし平滑筋を弛緩させる。ムスカリン受容体刺激が K_{ATP} チャンネルを抑制することは、膀胱 (Bonev and Nelson, 1993) や気管支平滑筋 (Nuttall and Farley, 1997) で既に明らかにされていた。Wang et al. (2018) は、野生型や M_2 KO マウスの回腸平滑筋ではクロマカリムによって活性化された K_{ATP} 電流は CCh で抑制されるが、 M_3 KO, M_2/M_3 KO の標本では抑制されないことを示した。加えて CCh による K_{ATP} チャンネル抑制作用は $G_{q/11}$ の阻害薬 YM-254890 や PLC の阻害薬の U73122 によっても減弱するので、 K_{ATP} チャンネルの活性は $M_3/G_{q/11}/PLC$ 系により調節されていると考えられている。

4.3. Cl^- チャンネル

Cl^- チャンネルは種々の平滑筋細胞に存在し、その平衡電位が静止膜電位よりも高いために、活性化は脱分極を起こし平滑筋機能に影響する可能性がある (Zholos, 1999)。BK チャンネルと同様に Cl^- チャンネルは、細胞内からの Ca^{2+} 放出により活性化される (Ca^{2+} 感受性 Cl^- チャンネル)。気管支平滑筋では、ムスカリン作動薬により誘起される Cl^- チャンネル電流が M_3 に選択性が高い遮断薬や $G_{q/11}$ 抗体により抑制されることがわかっており、 $M_3/G_{q/11}$ 系がこのチャンネルの調節に関与していると考えられている (Wang and Kotlikoff, 1997; Wang et al., 1997)。

4.4. 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル

ムスカリン受容体の興奮により非選択的陽イオンチャンネルから細胞内に流入した陽イオン（主として Na^+ ）によって脱分極が起き、これにより平滑筋に Ca^{2+} が流入して収縮が誘起される。即ち、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (Voltage dependent Ca^{2+} channel, VDCC) の興奮は平滑筋収縮に必要な細胞外からの Ca^{2+} 動員に最も重要な役割を果たしている (Bolton et al., 1999)。しかしながら Beech (1997) は、ムスカリン受容体興奮により VDCC が抑制されることを見出した。この抑制機構は細胞への Ca^{2+} overload を防ぐ生理的な意義があると考えられている。モルモット回腸においてムスカリン受容

体刺激による VDCC の抑制は持続が 10 秒程度の一過性抑制相とそれに続く持続性抑制相に分けられた (Unno et al., 1995)。一過性抑制には、 $M_3/G_{q/11}$ /PLC/IP₃ 経路が関与していると考えられているが (Komori and Bolton, 1991; Unno et al., 1995), 持続性抑制相には、 $M_2/G_{i/o}$ が関与するという報告 (Pucovsky et al., 1998) と $M_3/G_{q/11}$ が関与するという相反する報告がなされていた (Unno et al., 1995)。

Tanahashi et al. (2009) は、ムスカリン受容体 KO マウスの回腸分離平滑筋細胞を用い VDCC を抑制する受容体種の解析を行った。野生型マウスでは既報 (Unno et al., 1995) に一致して CCh により 2 相性の VDCC 電流の抑制が認められたが、 M_2 KO マウスでは初期相に変化はなかったが、持続相は著明に減弱した。一方、 M_3 KO マウスで初期相は消失し、持続相も著明に減弱していた。 M_2/M_3 KO では CCh による VDCC の抑制は認められなかった。このことから、初期抑制相には M_3 、持続抑制相には M_2 と M_3 の両方の受容体が関与していることがわかった。 M_3 KO での持続相の抑制は百日咳毒素処置で消失したが YM-254890 では抑制されなかった。また、 M_2 KO での抑制は百日咳毒素処置では影響を受けず YM-254890 で抑制された。しかしながら、野生型で持続相の抑制率を 100% とした場合、 M_2 受容体と M_3 受容体が単独発現した時の抑制率の合計は 44% であり、残りの 56% の抑制には M_2/M_3 受容体の共発現が必要と推察された。野生型での VDCC の持続抑制相は、細胞内 Ca^{2+} を EGTA でキレートすると部分的に減弱し、残存する抑制の程度は M_2 と M_3 受容体がそれぞれ単独で興奮した時の抑制率の和と一致していた。以上の成績から、VDCC の抑制には M_2 , M_3 , M_2/M_3 (Ca^{2+} 依存性) の 3 つの受容体機構が関与していることが明らかになった。

以上のムスカリン受容体 KO マウスの回腸筋細胞における電気生理学的研究より、 M_2 受容体は TRPC4 チャンネルと VDCC の抑制性制御に関与するが、TRPC6 チャンネル、 K^+ チャンネル (BK, K_{ATP}) または Cl^- チャンネルの制御には関与していないことがわかった。一方、 M_3 受容体は上記のすべてのイオンチャンネルの制御に関与していた。また、 M_2 と M_3 が共発現する野生型では M_2/M_3 受容体が複合体を構成し TRPC4 チャンネル電流の増大と VDCC の抑制性制御に関わっていると考えられた (表 3)。

5. ムスカリン受容体興奮による平滑筋の脱分極

ムスカリン受容体刺激による細胞膜電位変化に関する検討も KO マウスを用いて行われている (Sakamoto et al., 2007)。野生型では 0.1–0.3 μ M CCh より脱分極が誘起され (10–20 mV), 1 μ M ではさらに大きな脱分極が認められた (40–50 mV)。 M_2 KO では脱分極の発現には野生型より高濃度 (1 μ M) の CCh が必要であり、30–100 μ M で野生型の最大反応とほぼ同じ大きさの脱分極が誘起された。このことから、 M_3 受容体興奮では感受性が低下するものの十分に大きな脱分極が誘起されることがわかった。一方、 M_3 KO では野生型と類似する濃度より脱分極が誘起されるが、その大きさは最大でも 10 mV 程度であり、野生型や M_2 KO の最大反応に比べ明らかに小さかった。また、 M_2/M_3 KO では CCh により脱分極は誘起されなかった (Sakamoto et al., 2007)。この脱分極の解析結果は、胃や回腸での収縮実験の成績 (Unno et al., 2005; Kitazawa et al., 2007) と類似している。即ち、 M_3 受容体の興奮では脱分極が発現するのに高濃度が必要であるが、濃度を上昇させると野生型と類似する最大反応に達した (濃度反応関係は右方平行移動)。一方、 M_2 受容体の興奮では野生型と類似の濃度から脱分極は発現するが、反応は小さかった (濃度反応関係下方移動)。これらの成績から M_2 は低濃度からの反応の誘起、 M_3 は誘起される脱分極の大きさに影響を与えると推察される。先に述べたように M_3 を介した経路は K^+ チャンネルの抑制、 Cl^- チャンネルの活性化、 Ca^{2+} 感受性の増大なども誘起するために誘起される脱分極 (収縮) が大きくなると考えられた (表 3)。

Matsuyama et al. (2013) は、マウス回腸縦走筋で腸神経の興奮による脱分極である excitatory junction potential (EJP) を微小電極で測定し、ムスカリン受容体欠損の影響を観察している。電気刺激誘発性の EJP はテトロドトキシン、atropine で抑制され、コリンエステラーゼの阻害薬で増大したことから、コリン作動性であることが確認された。TRPC チャンネルの遮断薬である SK & F 96365 および百日咳毒素は、野生型で見られる EJP をそれぞれ部分的に抑制した。一方、 M_2 KO マウスでは EJP は野生型の 20%–30% に減弱し、この EJP も SK & F 96365 によって抑制された。しかしながら、電気刺激によるコリン作動性 EJP は、 M_3 KO や M_2/M_3 KO マウス平滑筋では観察されなかった。この結果は、野生型でのコリン作動性 EJP は M_2 反応と M_3 反応の単純な相加ではなく、両受容体の複合体が興

表 3 消化管平滑筋における M₂, M₃および M₂/M₃ 複合体経路の比較

	M ₂		M ₃		M ₂ /M ₃ 複合体
	M ₂ /G _{i/o}	G _{q/11}	M ₃ /G _{q/11}	G _{q/11} /と G _{i/o}	
Gタンパク質					
陽イオンチャネル電流 (pA)	12.9 pA (6%)	24 pA (11%)		G _{q/11} /と G _{i/o} 209 pA (100%)	
陽イオンチャネル (conductance)	TRPC4 (70 ps)	TRPC4 (70 ps), TRPC6 (120 ps)		TRPC4 (70 ps)	
チャネル開口様式とそのパターン	3種類 (0.25, 1.1, 13.2 ms)	TRPC4 (0.55 ms), TRPC6 (0.23 ms) 共に1種類		4種類 (0.62, 2.7, 16.9, 121.1 ms)	
チャネル開口確率	0.042 (0.03 - 0.05)	TRPC4 (0.08), TRPC6 (0.02)		0.14 (0.01 - 0.23)	
細胞内情報伝達系	M ₂ /G _{i/o} が TRPC4 を制御 Adenylate cyclase 抑制 細胞内 cyclic AMP 低下	IP ₃ と diacylglycerol 産生 IP ₃ は細胞内 store からの Ca ²⁺ 放出 PLC は TRPC4 を制御 Diacylglycerol は TRPC6 を活性化		G _{i/o} および G _{q/11} /PLC が TRPC4 を制御 両受容体が複合体を形成 ムスカリン受容体興奮で流れる電流の主体 M ₃ の興奮による細胞内 Ca ²⁺ 増加で活性化	
イオンチャネルの制御					
BK (large conductance K ⁺) チャネル活性化 (細胞内 Ca ²⁺ 放出で誘起)	無	有	有	有	
ATP 感受性 K ⁺ チャネル抑制	無	有	有	有	
Cl ⁻ チャネル活性化 (細胞内 Ca ²⁺ 放出で誘起)	無	有	有	有	
電位依存性 Ca ²⁺ チャネル抑制 (初期相と持続相からなる 2 相性抑制)	持続相に部分関与	初期相に関与, 持続相に部分関与	初期相 (M ₃ 関与) と持続相 (M ₂ + M ₃ 関与)		
機能的実験					
カルバコール濃度収縮曲線	親和性不変, 最大反応低下	親和性低下, 最大反応不変	高親和性, 高収縮高		
Phasic 相と tonic 相	Phasic 相のみ	Phasic 相と tonic 相	Phasic 相と tonic 相		
百日咳毒素感受性	有	無	有 (低濃度側)		
脱分極筋	消失	部分的抑制	部分的抑制		
Ca ²⁺ free 液	消失	部分的抑制	部分的抑制		
電位依存性 Ca ²⁺ チャネル遮断薬	消失	部分的抑制	部分的抑制		
Ca ²⁺ 感受性の増加	無	有	有		

本表は, Sakamoto et al. (2007), Kitazawa et al. (2007) および Tanahashi et al. (2021) を参考に作成した。

奮したことにより陽イオンチャネルが相乗的に活性化され大きな電位変化 (EJP) が誘起されること、EJP の発現には主として M_3 受容体が関与していることを示している。

6. カハール介在細胞

カハール介在細胞 (Interstitial Cells of Cajal, ICC) は、消化管の筋間神経叢、粘膜下神経叢および縦走筋/輪走筋の筋層内の3か所に主に存在している。ICCの主な機能は蠕動運動のペースメーカーとしての役割と神経-筋層間の信号伝達の調節であるが、筋間神経叢、粘膜下神経叢に存在するICCは前者の平滑筋層内に存在するICCは後者の役割を有していると考えられている。すでに述べたように Epperson et al. (2000) および Iino and Nojyo (2006) は、ICC に M_2 や M_3 受容体が発現していることを形態学的に証明しているが、Johnston et al. (2008) は ICC の興奮を細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化から解析しアセチルコリンが主として M_3 受容体を介し ICC を興奮させることをモルモット膀胱で報告している。同様に M_3 受容体の興奮が ICC を興奮させることは、Drumm et al. (2020) によってマウス結腸でも報告されている。Tanahashi et al. (2013) は、摘出マウス小腸標本の規則的な収縮に注目し、 M_3 KO ではその収縮周期が変化すること、この変化と同様な現象が筋間神経叢の ICC を欠いたマウスでも認められることを示した。これらの成績は、アセチルコリン/ M_3 受容体系が ICC の機能調節に関わっていることを示唆するが、ICC 機能とアセチルコリン/ M_3 受容体の関連性を明らかにするには、今後更なる研究が必要である。

7. 粘膜におけるムスカリン受容体の機能

これまで、消化管運動に関連する平滑筋、内在性神経や ICC のムスカリン受容体について述べてきたが、ムスカリン受容体は腸陰窩の幹細胞にも存在し胃腸管粘膜機能を調節している (Lundgren et al., 2011)。腸粘膜機能が正常であることは動物の生命維持 (物質の分泌, 吸収・代謝, 生体防御) に不可欠であり、粘膜の恒常性は複数の要因によって制御されている。その中でもアセチルコリン/ M_3 受容体系が腸粘膜の恒常性の維持に関与しているという報告がある (Greig and Cowles, 2017)。この報告では M_1 KO から M_5 KO までのムスカリン受容体 KO マウスの腸管から組織切片を作成し、粘膜の絨毛の高さ、陰窩の深さおよび陰窩増殖指数を測定して野生型と比較している。その結果、すべての

KO マウスにおいて野生型との差異が認められ、特に M_2 KO, M_3 KO および M_5 KO マウスでの組織変化が著明だったことが報告されている。このことは、全てのムスカリン受容体サブタイプが腸管粘膜形態と陰窩細胞増殖を調節していること、その中でも特に M_2 , M_3 および M_5 受容体の寄与が大きいことを示している。最近、ムスカリン受容体が腸上皮の恒常性維持に重要であり、胃腸管の炎症病態にも関与するとの総説がある (Uwada et al., 2023)。これまで消化管の平滑筋や神経が標的と考えられていたアセチルコリン/ M_3 受容体系が粘膜機能も調節するという新しい視点からの研究は今後発展していく分野として注目される。

8. ムスカリン受容体複合体 (オリゴマー)

これまでのライフサイエンスでは、Gタンパク質共役型受容体である M_2 や M_3 受容体はリガンドと下流のシグナル伝達が1対1の関係で機能する単量体 (モノマー) として捉えられ、その受容体の情報伝達系などの特徴が詳細に明らかされてきた (表1)。しかしながら、受容体 KO マウスから作成した平滑筋細胞の陽イオン電流の解析により、 M_2 と M_3 受容体が二量体 (ダイマー, M_2/M_3 複合受容体) を形成し陽イオンチャネルを高い確率で長時間開口させている可能性や VDCC を調節している可能性が提示された (表3)。このようにムスカリン受容体をはじめとする受容体同士が相互作用しダイマーなどのオリゴマーを形成し生理的に機能する可能性を示す研究成果が近年増えてきている (Goin and Nathanson, 2006; McMillin et al., 2011; Marsango et al., 2018; Milligan et al., 2019)。ムスカリン受容体では、HEK293細胞に M_1 , M_2 , M_3 受容体をそれぞれ発現させると単量体ではなくホモ二量体の状態で存在すること、また3つの受容体のうち2つを選んで細胞に発現させるとそれぞれ M_1/M_2 , M_2/M_3 , M_1/M_3 のヘテロダイマーが産生されることがわかっている。また、ホモダイマーに比べてヘテロダイマーでは、各々の受容体のリガンド親和性が少し低下することからヘテロダイマー形成は受容体の機能を相互に調節すると考えられている (Goin and Nathanson, 2006)。ホモダイマーの分子基盤については、 M_3 受容体では7つの膜貫通部位 (transmembrane region, TM, TM1-TM7) のうち TM5-TM5, TM6-TM7, TM4-TM5, TM1-TM2 が結合してダイマーを作ることが明らかになっているが (McMillin et al., 2011), 異なるムスカリン受容体サブタイプによる相互作用 (複合体) の分子基盤 (M_2

と M₃), 立体配置またオリゴマー形成の機能的な重要性については今後さらなる研究が必要と思われる。

9. ま と め

脊椎動物の生体諸器官(臓器)は自律神経(交感神経および副交感神経)により2重拮抗支配を受けているが,副交感神経を介した調節にはアセチルコリン/ムスカリン受容体が関与している。生体には5種類のムスカリン受容体(M₁-M₅)が存在するので,アセチルコリンによる生理・病態生理的調節機構の解明の第一歩として各々の器官に存在するムスカリン受容体サブタイプとその機能を解明することは重要である。

消化管に存在するムスカリン受容体の解析は初期には選択的に作用する遮断薬を用いて行われ M₃ 受容体が収縮に関与するとされていたが,分子生物学的手法や免疫組織化学的手法により M₃ 受容体だけでなく M₂ 受容体も発現していることが明らかになり, M₂ 受容体の機能に注目が集まった。しかしながら,遮断薬の選択性に限界があること,奇数の受容体,偶数の受容体では細胞内情報伝達系が類似していることなどが研究進展の妨げとなっていた。しかし,ここ20年余りで消化管における M₂ 受容体, M₃ 受容体の研究は飛躍的に進歩した。その要因のひとつに受容体 KO マウスが開発され生理学・薬理学研究に用いられるようになったことがある。野生型と KO マウス(M₂KO, M₃KO, M₂/M₃KO)の胃腸管でムスカリン作動薬により誘起される収縮反応やイオンチャネル電流を比較することにより M₂ および M₃ 受容体興奮と陽イオンチャネル活性を結びつける3経路(M₂/G_{i/o}, M₃/G_{q/11} および M₂/M₃ G_{q/11}/G_{i/o}) が野生型では機能していることが明らかにされた。3経路の興奮により誘起される電気生理学的現象および収縮実験の結果は表3に示した。M₂ および M₃ 受容体それぞれの興奮による電気生理学的現象の大きさと性質には差異が認められ, M₂/M₃ 受容体(ヘテロダイマー)が興奮した場合は,単純な M₂ と M₃ 受容体反応の和では説明できない相乗作用が観察された。即ち, M₂/G_{i/o} および M₃/G_{q/11} 系はそれぞれ陽イオンチャネルを調節しているが,両受容体で形成される M₂/M₃ G_{q/11}/G_{i/o} 系はイオンチャネルを高確率で長時間開口させ,陽イオンの流入が増加し大きな脱分極そして収縮を起こすと考えられた。

ムスカリン受容体 KO マウスを用いた検討は欠損した受容体の役割を推察するのに有用であるが,

欠損により他のムスカリン受容体の作用が顕在化することも明らかになった。M₂/M₃KO マウスでの解析から消化管の内在性 NO 神経上に M₁ 受容体が存在し消化管運動の抑制に関与することがわかり,アセチルコリン/ムスカリン受容体が胃腸管運動を興奮性にも抑制性にも調節していることが示された。

消化管においてムスカリン受容体は粘膜,カハール介在細胞および内在性コリン作動性神経にも発現している。この中でも内在性コリン作動性神経には M₂/M₄ 受容体が分布しアセチルコリン放出を抑制的に調節している。一方,粘膜上やカハール介在細胞上のムスカリン受容体についても研究が開始されムスカリン受容体が消化管粘膜の恒常性や収縮運動の歩調取りに関与することが明らかにされつつある。

コリン作動性神経—アセチルコリン—ムスカリン受容体経路は生体の機能を調節する基本的な神経経路であり多くの研究が現在でも行われている。中でもムスカリン受容体 KO マウスを用いた研究と発現細胞でのムスカリン受容体複合体に関する研究は大きなパラダイムシフトをもたらした。今後,この遺伝子改変動物や受容体発現細胞を用いた解析により,平滑筋や腸神経だけでなく粘膜やカハール介在細胞の機能調節におけるアセチルコリン/ムスカリン受容体系の理解や生体内での複合体の実体と機能に関しての研究がさらに進むと考えられる。

参 考 文 献

1. Barthó L, Lefebvre RA. Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1995; 329: 53-66.
2. Beech DJ. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca²⁺ channels and K⁺ channels in smooth muscle cells. *Pharmacol Ther.* 1997; 73: 91-119.
3. Booden MA, Siderovski DP, Der CJ. Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 4053-4061.
4. Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, Gordienko DV. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol.* 1999; 61: 85-115.
5. Bonev AD, Nelson MT. Muscarinic inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels by protein-kinase-C in urinary-bladder smooth muscle. *Am J Physiol.* 1993; 265: C1723-C1728.

6. Burnstock G. The non-adrenergic non-cholinergic nervous system. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1986; 280 (2 Suppl): 1-15.
7. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 279-290.
8. Carl C, Lee HK, Sanders KM. Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. *Am J Physiol.* 1996; 271: C9-C34.
9. Currò D, Preziosi P. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the rat stomach. *Gen Pharmacol.* 1998; 31: 697-703.
10. Depoortere I, Thijs T, Thielemans L, Robberecht P, Peeters TL. Interaction of the growth hormone-releasing peptides ghrelin and growth hormone-releasing peptide-6 with the motilin receptor in the rabbit gastric antrum. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305: 660-667.
11. Dörje F, Levey AI, Brann MR. Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m₁-m₅) in rabbit peripheral tissues. *Mol Pharmacol.* 1994; 40: 459-466.
12. Drumm BT, Rembetski BE, Huynh K, Nizar A, Baker SA, Sanders KM. Excitatory cholinergic responses in mouse colon intramuscular interstitial cells of Cajal are due to enhanced Ca²⁺ release via M₃ receptor activation. *FASEB J.* 2020; 34: 10073-10095.
13. Eglen RM, Harris GC. Selective inactivation of muscarinic M₂ and M₃ receptors in guinea-pig ileum and atria in vitro. *Br J Pharmacol.* 1993; 109: 946-952.
14. Eglen RM, Hegde SS, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev.* 1996; 48: 531-565.
15. Ehlert FJ. The interaction of 4-DAMP mustard with subtypes of the muscarinic receptor. *Life Sci.* 1996; 58: 1971-1978.
16. Ehlert FJ. Pharmacological analysis of the contractile role of M₂ and M₃ muscarinic receptors in smooth muscle. *Recept Channels.* 2003; 9: 261-277.
17. Ehlert FJ, Griffin MT. The use of irreversible ligands to inactivate receptor subtypes: 4-DAMP mustard and muscarinic receptors in smooth muscle. *Life Sci.* 1998; 62: 1659-1664.
18. Ehlert FJ, Ostrom RS, Sawyer GW. Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle. *Life Sci.* 1997; 61: 1729-1740.
19. Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 2000; 279: C529-C539.
20. Giraldo E, Monferini E, Ladinsky H, Hammer R. Muscarinic receptor heterogeneity in guinea pig intestinal smooth muscle: binding studies with AF-DX116. *Eur J Pharmacol.* 1987; 141: 475-477.
21. Goin J.C., Nathanson N.M. Quantitative analysis of muscarinic acetylcholine receptor homo- and heterodimerization in live cells: regulation of receptor down-regulation by heterodimerization. *J Biol Chem.* 2006; 281: 5416-5425.
22. Gómez A, Martos F, Bellido I, Marquez E, Garcia AJ, Pavia J, Sanchez de la Cuesta F. Muscarinic receptor subtypes in human and rat colon smooth muscle. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43: 2413-2419.
23. Greig CJ, Cowles RA. Muscarinic acetylcholine receptors participate in small intestinal mucosal homeostasis. *J Pediatr Surg.* 2017; 52: 1031-1034.
24. Hamrouni AM, Gudka N, Broadley KJ. Investigation of the mechanism for the relaxation of rat duodenum mediated via M₁ muscarinic receptors. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006; 26: 275-284.
25. Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR. Immunohistochemical localization of cholinergic muscarinic receptor subtype 1 (M₁r) in the guinea pig and human enteric nervous system. *J Chem Neuroanat.* 2007; 33: 193-201.
26. Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR. Immunohistochemical localization of pre-synaptic muscarinic receptor subtype-2 (M₂r) in the enteric nervous system of guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* 2008; 332: 37-48.
27. Harrington AM, Peck CJ, Liu L, Burcher E, Hutson JM, Southwell BR. Localization of muscarinic receptors M₁R, M₂R and M₃R in the human colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;

- 22: 999-1008.
28. Honda K, Takano Y, Kamiya H. Pharmacological profiles of muscarinic receptors in the longitudinal smooth muscle of guinea pig ileum. *Jpn J Pharmacol.* 1993; 62: 43-47.
29. Iino S, Nojyo Y. Muscarinic M₂ acetylcholine receptor distribution in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience.* 2006; 138: 549-559.
30. Itagaki M, Komori S, Unno T, Syuto B, Ohashi H. Possible involvement of a small G-protein sensitive to exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum* in the regulation of myofilament Ca²⁺ sensitivity in beta-escin skinned smooth muscle of guinea pig ileum. *Jpn J Pharmacol.* 1995; 67: 1-7.
31. Johnston L, Carson C, Lyons AD, Davidson RA, McCloskey KD. Cholinergic-induced Ca²⁺ signaling in interstitial cells of Cajal from the guinea pig bladder. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 294: F645-F655.
32. Karaki H. Ca²⁺ localization and sensitivity in vascular smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci.* 1989; 10: 320-325.
33. Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuti K, Somlyo A. V. and Somlyo A. P. Receptor-coupled, permeabilized smooth muscle. Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca²⁺. *J Biol Chem.* 1989; 264: 5339-5342.
34. Kitazawa T, Kaiya H. Regulation of gastrointestinal motility by motilin and ghrelin in vertebrates. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 278.
35. Kitazawa T, De Smet B, Verbeke K, Depoortere I, Peeters TL. Gastric motor effects of peptide and non-peptide ghrelin agonists in mice in vivo and in vitro. *Gut.* 2005; 54: 1078-1084.
36. Kitazawa T, Hashiba K, Cao J, Unno T, Komori S, Yamada M, Wess J, Taneike T. Functional roles of muscarinic M₂ and M₃ receptors in mouse stomach motility: studies with muscarinic receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 2007; 554: 212-222.
37. Komori S, Bolton TB. Inositol trisphosphate releases stored calcium to block voltage-dependent calcium channels in single smooth-muscle cells. *Pflug Arch Eur J Physiol.* 1991; 418: 437-441.
38. Kondo T, Nakajima M, Teraoka H, Unno T, Komori S, Yamada M, Kitazawa T. Muscarinic receptor subtypes involved in regulation of colonic motility in mice: functional studies using muscarinic receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol.* 2011; 670: 236-243.
39. Lee YM, Kim BJ, Kim HJ, Yang DK, Zhu MH, Lee KP, So I, Kim KW. TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am J Physiol.* 2003; 284: G604-G616.
40. Levey AI. Immunological localization of m₁-m₅ muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci.* 1993; 52: 441-448.
41. Lin S, Kajimura M, Takeuchi K, Kodaira M, Hanai H, Kaneko E. Expression of muscarinic receptor subtypes in rat gastric smooth muscle: effect of M₃ selective antagonist on gastric motility and emptying. *Dig Dis Sci.* 1997; 42: 907-914.
42. Lundgren O, Jodal M, Jansson M, Ryberg AT, Svensson L. Intestinal epithelial stem/progenitor cells are controlled by mucosal afferent nerves. *PLoS One.* 2011; 6: e16295.
43. Maeda A, Kubo T, Mishina M, Numa S. Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Lett.* 1988; 239: 339-342.
44. Marsango S, Ward RJ, Alvarez-Curto E, Milligan G. Muscarinic receptor oligomerization. *Neuropharmacology* 2018; 136: 401-410.
45. Matsui M, Yamada S, Oki T, Manabe T, Taketo MM, Ehlert FJ. Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice. *Life Sci.* 2004; 75: 2971-2981.
46. Matsuyama H, Tanahashi Y, Kitazawa T, Yamada M, Komori S, Unno T. Evidence for M₂ and M₃ muscarinic receptor involvement in cholinergic excitatory junction potentials through synergistic activation of cation channels in the longitudinal muscle of mouse ileum. *J Pharmacol Sci.* 2013; 121: 227-236.
47. McMillin S.M., Heusel M., Liu T., Costanzi S., Wess J. Structural basis of M₃ muscarinic receptor dimer/oligomer formation. *J Biol*

- Chem. 2011; 286: 28584–28598.
48. Micheletti R, Montagna E, Giachetti A. AF-DX 116, a cardioselective muscarinic antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987; 241: 628–634.
 49. Milligan G, Ward RJ, Marsango S. GPCR homooligomerization. *Curr Opin Cell Biol.* 2019; 57: 40–47.
 50. Mitchelson FJ. The pharmacology of McN-A-343. *Pharmacol Ther.* 2012; 135: 216–245.
 51. Morisset J, Geoffrion L, Larose L, Lanøe J, Poirier GG. Distribution of muscarinic receptors in the digestive tract organs. *Pharmacology.* 1981; 22: 189–195
 52. Myslivecek J, Nováková M, Palkovits M, Krizanová O, Kvetnanský R. Distribution of mRNA and binding sites of adrenoceptors and muscarinic receptors in the rat heart. *Life Sci.* 2006; 79: 112–120.
 53. Nuttle LC, Farley JM. Muscarinic receptors inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in swine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 1997; 273: L478-L484.
 54. Ohta T, Kawai K, Ito S, Nakazato Y. Ca²⁺ entry activated by emptying of intracellular Ca²⁺ stores in ileal smooth muscle of the rat. *Br J Pharmacol.* 1995; 114: 1165–1170.
 55. Pucovsky V, Zholos AV, Bolton TB. Muscarinic cation current and suppression of Ca²⁺ current in guinea pig ileal smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1998; 346: 323–330.
 56. Radomirov R, Venkova K, Ilieva E. Non-cholinergic, non-adrenergic tonic component of the electrically-evoked contractions of guinea pig ileum. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1988; 10: 227–229.
 57. Sakamoto T, Unno T, Kitazawa T, Taneike T, Yamada M, Wess J, Nishimura M, Komori S. Three distinct muscarinic signalling pathways for cationic channel activation in mouse gut smooth muscle cells. *J Physiol.* 2007; 582 (Pt 1): 41–61.
 58. Sawyer GW, Ehlert FJ. Contractile roles of the M₂ and M₃ muscarinic receptors in the guinea pig colon. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284: 269–277.
 59. Sawyer GW, Ehlert FJ. Muscarinic M₃ receptor inactivation reveals a pertussis toxin-sensitive contractile response in the guinea pig colon: evidence for M₂/M₃ receptor interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 289: 464–476.
 60. Schemann M, Schaaf C. Differential projection of cholinergic and nitrooxidergic neurons in the myenteric plexus of guinea pig stomach. *Am J Physiol.* 1995; 269: G186–G195.
 61. Shi XZ, Sarna SK. Inflammatory modulation of muscarinic receptor activation in canine ileal circular muscle cells. *Gastroenterology.* 1997; 112: 864–874.
 62. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1325–1358.
 63. Somogyi GT, de Groat WC. Function, signal transduction mechanisms and plasticity of presynaptic muscarinic receptors in the urinary bladder. *Life Sci.* 1999; 64: 411–418.
 64. Starke K, Gothert M, Kilbinger H. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev.* 1989; 69: 864–989.
 65. Stengel PW, Gomeza J, Wess J, Cohen ML. M₂ and M₄ receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292: 877–885.
 66. Stengel PW, Yamada M, Wess J, Cohen ML. M₃ receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea. *Am J Physiol. Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: R1443-R1449.
 67. Suguro M, Matsuyama H, Tanahashi Y, Unno T, Kitazawa T, Yamada M, Komori S. Muscarinic receptor subtypes mediating Ca²⁺ sensitization of intestinal smooth muscle contraction: studies with receptor knockout mice. *J Vet Med Sci.* 2010; 72: 443–451.
 68. Takeuchi T, Fujinami K, Goto H, Fujita A, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Hata F. Roles of M₂ and M₄ muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum. *J Neurophysiol.* 2005; 93: 2841–2848.
 69. Tanahashi Y, Unno T, Matsuyama H, Ishii T, Yamada M, Wess J, Komori S. Multiple muscarinic pathways mediate the suppression

- of voltage-gated Ca^{2+} channels in mouse intestinal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2009; 158: 1874–1883.
70. Tanahashi Y, Waki N, Unno T, Matsuyama H, Iino S, Kitazawa T, Yamada M, Komori S. Roles of M_2 and M_3 muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 2013; 25: e687–697.
71. Tanahashi Y, Komori S, Matsuyama H, Kitazawa T, Unno T. Functions of muscarinic receptor subtypes in gastrointestinal smooth muscle: a review of studies with receptor-knockout mice. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 926.
72. Thomas EA, Ehler FJ. Involvement of the M_2 muscarinic receptor in contractions of the guinea pig trachea, guinea pig esophagus, and rat fundus. *Biochem Pharmacol.* 1996; 51: 779–788.
73. Tsvilovskyy VV, Zholos AV, Aberle T, Philipp SE, Dietrich A, Zhu MX, Birnbaumer L, Freichel M, Flockerzi V. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology.* 2009; 137: 1415–1424.
74. Unno T, Komori S, Ohashi H. Inhibitory effect of muscarinic receptor activation on Ca^{2+} channel current in smooth-muscle cells of guinea-pig ileum. *J Physiol. Lond.* 1995; 484: 567–581.
75. Unno T, Kwon SC, Okamoto H, Irie Y, Kato Y, Matsuyama H, Komori S. Receptor signaling mechanisms underlying muscarinic agonist-evoked contraction in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2003; 139: 337–350.
76. Unno T, Matsuyama H, Izumi Y, Yamada M, Wess J, Komori S. Roles of M_2 and M_3 muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse ileum studied with receptor knockout mice. *Br J Pharmacol.* 2006; 149: 1022–1030.
77. Unno T, Matsuyama H, Sakamoto T, Uchiyama M, Izumi Y, Okamoto H, Yamada M, Wess J, Komori S. M_2 and M_3 muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. *Br J Pharmacol.* 2005; 146: 98–108.
78. Uwada J, Nakazawa H, Muramatsu I, Masuoka T, Yazawa T. Role of muscarinic acetylcholine receptors in intestinal epithelial homeostasis: insights for the treatment of inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 6508.
79. Vogt S, Grosse R, Schultz G, Offermanns S. Receptor-dependent RhoA activation in G_{12}/G_{13} -deficient cells: genetic evidence for an involvement of G_q/G_{11} . *J Biol Chem.* 2003; 278: 28743–28749.
80. Wall SJ, Yasuda RP, Li M, Ciesla W, Wolfe BB. The ontogeny of m_1 - m_5 muscarinic receptor subtypes in rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res.* 1992; 66: 181–185.
81. Wang YX, Kotlikoff MI. Muscarinic signaling pathway for calcium release and calcium-activated chloride current in smooth muscle. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 1997; 273: C509–C519.
82. Wang YX, Fleischmann BK, Kotlikoff MI. M_2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: Calcium and G_i/G_o requirements. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 1997; 273: C500–C508.
83. Wang B, Murakami Y, Ono N, Fujikawa S, Matsuyama H, Unno T, Naitou K, Tanahashi Y. Muscarinic suppression of ATP-sensitive K^+ channels mediated by the $M_3/G_q/11$ /phospholipase C pathway contributes to mouse ileal smooth muscle contractions. *Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2018; 315: G618–G630.
84. Wang Z, Shi H, Wang H. Functional M_3 muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. *Br J Pharmacol.* 2004; 142: 395–408.
85. Wess J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 423–450.
86. Wess J, Duttaroy A, Zhang W, Gomeza J, Cui Y, Miyakawa T, Bymaster FP, McKinzie L, Felder CC, Lamping KG, Faraci FM, Deng C, Yamada M. M_1 - M_5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Recept Channels.* 2003; 9: 279–290.

87. Zhang LB, Horowitz B, Buxton IL. Muscarinic receptors in canine colonic circular smooth muscle. I. Coexistence of M_2 and M_3 subtypes. *Mol Pharmacol.* 1991; 40: 943-951.
88. Zholos AV. Muscarinic effects on ion channels in smooth muscle cells. *Neurophysiology.* 1999; 31: 173-187.

Summary

Acetylcholine (ACh) released from parasympathetic postganglionic nerves regulates the function of visceral organs such as gastrointestinal (GI) tract through activation of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs). Five mAChR subtypes (M_1 - M_5) are identified in mammals. Although conventional pharmacological analysis suggested the involvement of M_3 subtype in the ACh-induced contraction of GI smooth muscles, mAChRs population in GI tract has been demonstrated to consist of M_2 and M_3 subtypes (7:3). Roles of dominant M_2 receptor for GI function (motility) have not been well determined because of lack of subtype selective agonists and antagonists, and similarity of intercellular signaling of odd number of mAChRs (M_1 , M_3 and M_5) or even number of mAChRs (M_2 and M_4). In this article, we review recent studies on muscarinic function in GI smooth muscle contraction using mAChR subtype deficient mice (knockout (KO) mice). Since M_2 and M_3 receptors are dominantly expressed in the GI tract, M_2 KO, M_3 KO and M_2/M_3 double KO mice markedly contributed to understand the function of mAChRs. Using these KO mice, in addition to activation of individual $M_2R/G_{i/o}$ and $M_3R/G_{q/11}$ pathways, $M_2R/G_{i/o}$ $M_3R/G_{q/11}$ (M_2R/M_3R heterodimer) pathway might be also stimulated by ACh and three pathways produce a complex cascade of biochemical and electrical events in smooth muscle cell, finally leading to GI smooth muscle contraction. Cellular signaling events induced by mAChRs include adenylyl cyclase inhibition (M_2), phosphoinositide hydrolysis (M_3), intracellular Ca^{2+} mobilization (M_3), Ca^{2+} sensitization (M_3), activation of non-selective cationic channel (M_2 , M_3 and M_2/M_3), and modulation of Cl^- or K^+ channel (M_3), inhibition/potentialiation of voltage-dependent Ca^{2+} channel (M_2 , M_3 and M_2/M_3) and membrane depolarization (M_2 , M_3 and M_2/M_3). mAChRs are also expressed in the enteric cholinergic neurons, intestinal mucosal cells, and interstitial cells of Cajal, and negative feedback of ACh release, homeostasis of mucosal function and regulation of peristalsis by ACh/mAChRs have been suggested. In addition, use of mAChRs KO mice unmasks M_1 -mediated nitrergic pathway causing GI relaxation. Therefore, various types of mAChR KO mice show valuable insights for physiological roles of ACh/mAChR signaling system in GI tract and other organs.