

氏 名（本籍） 上^{うえ} 野^の 伸^{しん} 哉^や

学位の種類 博 士（医 学）

学位記番号 医 博 第 1 1 7 0 号

学位授与年月日 平 成 5 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学研究科
（博士課程）病態科学系専攻

学位論文題目 ATP-Gated Current in Dissociated Rat Nucleus Solitarii Neurons.
（ラット延髄孤束核神経細胞に対する細胞外 ATP の効果）

（主 査）

論文審査委員 教授 赤 池 紀 生 教授 平 則 夫

教授 西 山 明 徳

論文内容要旨

【導 入】

ATP は細胞内エネルギー源として重要な役割を担っていることが知られている。一方細胞外にも ATP が存在し、様々な生理作用をもつことがしだいに明らかとなってきた。ことに Burnstock によって ATP が非アドレナリン、非コリン作動性反応を司る伝達物質の候補であるとするプリン作動性神経説が提唱されて以来、ATP の伝達物質または共伝達物質としての役割、神経系伝達の調節物質としての役割が解明されてきた。また中枢神経系への ATP の作用として、主に抑制効果が観察されてきた。一方で末梢感覚神経細胞において Krishtal らが電位固定化に興奮性作用があることを発見した。そこで今回延髄孤束核より生理的機能を保った状態で単離した神経細胞への細胞外 ATP の効果を検討した。その一部の細胞が細胞外 ATP により電位固定化にて内向き電流が惹起され、この電流の性質を詳細に分析した。

【方 法】

生後 1 - 2 週齢の Wistar 系ラットを雌雄別なく用いた。エーテル麻酔下で断頭し脳幹を取りだし、マイクロスライサーを用い、厚さ 350 μm の脳切片を作製した。延髄孤束核を含む脳切片を 50 分インキュベートした。さらにこの脳切片をプロネース、サーモリジンで順次酵素処理した。酵素効果を止めるために、脳切片を Ca-free 溶液で洗浄した。脳切片より延髄孤束核部位を顕微鏡下にパンチアウトし、ピペッティングを行い孤束核神経細胞を機械的に単離した。この急性単離神経細胞は単離後 6 時間内に実験に用いた。

単離神経細胞に細胞内灌流法を適用し、電流記録は電位固定化に whole-cell clamp の条件下で行った。薬物投与や外液交感には、数 ms 内で細胞周囲の外液が完全におきかわる外液瞬時交換法を用いた。

【結 果】

延髄孤束核神経細胞においてその約 3 割の細胞が細胞外 ATP により興奮性反応が観察された。保持電位 -70mV において細胞外より 100 μM ATP 投与により一過性内向き電流惹起された。この ATP 惹起電流は濃度依存性に増大した。その域値は 10 μM で 1 mM で最大反応を示し、その Kd 値は 31 μM 、Hill 係数は 1.2 であった。ATP 誘導体の作用強度は、ATP \gg 2-methylthio-ATP \gg ADP \gg α , β -methylene ATP であり、adenosine, AMP では内向き電流は惹起されなかった。この結果からはこの部位での ATP 反応は P_{2y} 受容体を介すると考えられた。電流電圧

曲線は保持電位 -50mV 以上で内向き整流作用を示し、その逆転電位は $+13\text{mV}$ であった。この逆転電位から ATP によってカチオンチャンネルが開くことが考えられた。ATP 惹起電流の活性化、不活性化の時定数は共に ATP 濃度依存性を示し、濃度上昇にともないその値は減少した。ATP 惹起電流は、外液中に透過性カチオンとして Ca イオンのみ存在する条件下でも観察された。ATP 活性化チャンネルは Ca に対しても透過性を持ち、Ca 外液中では ATP 惹起電流は不活性化過程が促進された。Na, Ca の C_s に対する透過性はそれぞれ $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cs}} = 1.64$, $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Cs}} = 2.17$ であった。また陰イオンに対する透過性は見られなかった。

【考 察】

延髄孤束核に見られる ATP によって開くチャンネルはカチオン透過性を示し、 0mV 付近に逆転電位を持ち、興奮作用を示す。同様な性質を持つチャンネルはラット感覚細胞、心臓神経節細胞、PC12 細胞、モルモット外有毛細胞においても観察されている。

外液中の Na イオンをマニトール置換していくと、ATP 反応の逆転電位は過分極側に移動した。外液の Na イオン濃度が高い状態 ($45-150\text{mM}$) では、ATP 反応の逆転電位の変化は、ATP チャンネルを Na イオンのみが透過すると仮定したときに得られる予想値にほぼ等しいが、Na イオン濃度が低い状態 ($<15\text{mM}$) では予想値からずれてくる。むしろ外液中に同時に存在する 2mM Ca も透過すると仮定した予想値に近い。これから ATP チャンネルは Ca に対しても透過性を持つことが示唆された。

ラット延髄孤束核神経細胞において高濃度 Ca 外液中では ATP 惹起電流の不活性化過程を促進する。実際他の材料においても、細胞外 Ca が ATP 惹起電流を抑制することが知られており、ATP チャンネルに Ca の結合部位があると考えられた。ATP チャンネルは Ca に対して高い透過性を持ち、Ca 自体が ATP 反応を制御する。その制御機構として細胞外から直接作用する、または ATP チャンネルを透過した Ca が細胞内から作用するという 2 つの可能性が考えられた。

審査結果の要旨

細胞外に存在する ATP やアデノシン等のプリン化合物が平滑筋、末梢自律神経や感覚細胞などで生理活性を持つことが近年明らかにされた。細胞外 ATP は末梢自律神経系や神経筋接合部において非アドレナリン、非コリン作動性反応を司るところから、自律神経伝達物質の一つであるとしたプリナージック仮説が提唱されている。申請者の研究目的は中枢神経細胞でもこの ATP が細胞外から生理作用を発現することを明らかにすることであった。

実験では、呼吸や循環などの自律神経性制御を司る延髄弧束核より神経細胞を単離してこれに細胞外より ATP を作用させ、その時の細胞応答を電気生理学的に観察している。研究結果は延髄弧束核の神経細胞中に ATP に感受性を持つ細胞群があり、ATP は ATP 受容器・カチオンチャンネル複合体を賦活して興奮性の内向きイオン電流を惹起することを示唆した。このチャンネルはナトリウムだけでなくカルシウムに対しても高い透過性を有した。さらに薬理学的アプローチにより ATP 受容体のサブタイプは P2y であることがわかった。結論として、ATP は弧束核ニューロンにおいて興奮性伝達物質として働くことが明らかとなった。なお、本論文で得られた研究成果は中枢神経系における ATP の生理作用を初めて明らかにしたもので、学位授与に十分に値するものと考えられる。