

生理研研究会

『病態と細胞外プリン —治療標的としての可能性を探る』

2008年9月4日(木)～9月5日(金)

自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター 中会議室

代表者: 慈恵医大・神経生理 加藤総夫

所内対応者: 生理研・生体恒常機能発達機構 銅倉淳一

抄録集

NIPS
NATIONAL INSTITUTE FOR PHYSIOLOGICAL SCIENCES

生理学研究所研究会『病態と細胞外プリン治療標的としての可能性を探る』

2008年9月4日(木)～5日(金)

自然科学研究機構岡崎カンファレンスセンター中会議室

代表者：慈恵医大・神経生理 加藤総夫

所内対応者：生理研・生体恒常機能発達機構 鍋倉淳一

1日目(9月4日木曜日)

12:50 Opening remarks (井上和秀)

ATP放出研究の最前線1(座長：加藤総夫)

13:00	Vesicular ATP transport: update and perspectives 森山芳則(岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・生体膜機能生化学研究室)
13:50	インスリン開口放出のリアルタイム可視化解析 今泉美佳(杏林大学・医学部・生化学)
14:30	Conductive release of ATP through the maxi-anion channel Sabirov Ravshan(生理学研究所・細胞器官研究系・機能協関)

15:10 – 15:25 Pause-Café

ATP放出研究の最前線2(座長：津田誠)

15:25	血管内皮細胞の流れずり応力依存的な内因性ATP放出 山本希美子 ^{1,2} 、古家喜四夫 ³ 、曾我部正博 ^{3,4} 、安藤譲二 ¹ (¹ 東京大学大学院・医学系研究科・システム生理学、 ² 科学技術振興機構さきがけ、 ³ 科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト、 ⁴ 名古屋大学大学院・医学系研究科・細胞生物物理学)
15:55	機械刺激によるATP放出のリアルタイムイメージング 古家喜四夫 ¹⁾ 、山本希美子 ²⁾ 、古家園子 ³⁾ 、安藤譲二 ²⁾ 、曾我部正博 ^{1),4),5)} (¹⁾ 科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト、 ²⁾ 東大・医・システム生理、 ³⁾ 生理研・脳機能計測センター、 ⁴⁾ 生理研・細胞内代謝、 ⁵⁾ 名大・医・細胞生物物理)
16:25	アストロサイトのATP情報発信 小泉修一、藤下加代子(山梨大学・医学部薬理)

16:55 – 17:25 Poster Session 1

細胞外ヌクレオチドの新たな機能(座長：小泉修一)

17:25	圧負荷による心臓の線維化におけるP2Y受容体の役割 西田基宏、上村綾、仲矢道雄、黒瀬等(九州大学大学院・薬学研究院・薬効安全性学分野)
18:05	眼の発生に関わる転写制御因子ネットワーク 大隈典子 (東北大学大学院医学系研究科・創生応用医学研究センター・形態形成解析分野)

18:45 事務連絡(鍋倉淳一)

19:00 懇親会 IUPS 2009 シンポジウムおよび2012 神経化学会について

2日目（9月5日金曜日）

内因性ヌクレオチドの生理機能と病態（座長：南 雅文）	
8:50	甘味を受容・伝達・調節機構とATP 吉田竜介、村田芳博、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三 (九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学)
9:30	睡眠調節におけるアデノシンの役割 裏出良博 ((財) 大阪バイオサイエンス研究所・分子行動生物学部門)
10:10	細胞外ATPによるASK1活性化が誘導する細胞応答 野口拓也、武田弘資、一條秀憲 (東京大学・大学院 薬学研究科 生命薬学専攻・細胞情報)

10:50 – 11:05 Pause-Café

ATPをめぐる諸問題1（座長：中塚映政）	
11:05	脊髄におけるシナプス可塑性 池田 弘 (福井大学大学院・工学研究科知能システム工学専攻・生体システム研究室)
11:35	神経因性疼痛発生における matrix metalloprotease の関与について 川崎康彦、中塚映政、藤田亜美、熊本栄一、Ji Ru-Rong (佐賀大学・医学部生体構造機能学講座・神経生理学分野、ハーバード医科大学疼痛研究所)
12:05	P2X4 受容体のポア開閉及びポア拡大に関連する構造変化の観察 篠崎陽一 ¹ 、住友弘二 ¹ 、津田誠 ² 、小泉修一 ³ 、井上和秀 ² 、鳥光慶一 ¹ (¹ NTT 物性科学基礎研究所・生体機能、 ² 九州大・院・薬・薬理、 ³ 山梨大・医・薬理)

12:35 – 13:35 Poster Session 2 + 昼食

ATPをめぐる諸問題2（座長：尾松万里子）	
13:35	Ca オシレーションの同期化機構 山下勝幸 (奈良県立医科大学・医学部・第一生理)
14:05	P2X2 受容体活性化で発生するマウス網膜コリン作動性アマクリン細胞のコリン電流 金田 誠 (慶應義塾大学・医学部・生理学教室)

14:35 Closing remarks (加藤総夫)

ポスターセッション

1	Vesicular nucleotide transporter (VNUT) in rodent: Gene organization, transporter function and localization 日浅未来、澤田啓介、森山芳則（岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・生体膜機能生化学）
2	新生ラット摘出脊髄における高炭酸によるアデノシン放出と反射電位抑制効果 乙黒兼一、伴 昌明、太田利男、伊藤茂男（北大・院獣医・薬理）
3	アデノシン A ₁ 受容体による NMDA 受容体活性修飾 関野祐子（東京大学医科学研究所神経ネットワーク分野）
4	後根神経節 P2X 受容体を介した神経因性疼痛発症機構 長谷川茂雄、津田 誠、井上和秀（九州大学大学院・薬学府・薬理学分野）
5	In vivo gene silencing 法による脳内シナプス前 P2X 受容体サブタイプの変換 田村友穂、加藤総夫（東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・神経生理学）
6	マウス網膜 P2X ₂ 受容体で見られる特異な生後発達様式 霜田幸雄 ¹ 、重松康秀 ¹ 、金田 誠 ² （ ¹ 東京女子医大・総研、 ² 慶応大・医・生理）
7	P2Y ₁₂ を介したインテグリンβ1 活性化によるミクログリア突起伸長調節 大澤圭子 ¹ 、中村泰子 ¹ 、入野康宏 ² 、鈴木恵理 ¹ 、佐柳友規 ¹ 、井上和秀 ³ 、高坂新一 ¹ （ ¹ 国立精神神経セ・神経研・代謝、 ² 神戸大・院・医・脂質生化学、 ³ 九州大・院・薬・薬理学）
8	ミクログリアにおける P2Y ₆ 受容体発現量増加に関わるメカニズムの解明 藤下加代子 ¹ 、中尾篤人 ² 、小泉修一 ¹ （山梨大学・医学部・ ¹ 薬理、 ² 免疫）
9	マウスマクロファージ J774 細胞における UDP による持続的な細胞内 Ca ²⁺ 濃度上昇に対するプロスタグランジン E2 の作用 伊藤政明、松岡 功（高崎健康福祉大学・薬学部・薬効解析）
10	マウス T 細胞における P2X ₇ 受容体を介した形質膜ブレブ形成と細胞死誘導 三坂 恒、前畑真知子、原田 均、出川雅邦（静岡県立大学・薬）
11	ヒト肺由来肥満細胞の IgE 受容体を介した脱顆粒に対する細胞外プリンの影響 西 晴久 ¹ 、Amir Pelleg ² 、Manfred Thile ³ 、Edward S. Schulman ² （ ¹ 東京慈恵会医科大学・薬理学講座、 ² Pulmonary & Critical Care Medicine, Drexel University College of Medicine, Philadelphia、 ³ Anästhesiologie, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.（東京慈恵会医科大学・薬理学））
12	ラット骨髄間質細胞の P2Y ₂ 受容体活性化による増殖効果と血清 市川 純（関西医科大学・医学部・第2生理）
13	ミクログリアからの ATP 誘発 MIP-2 放出のメカニズム 吉武麻衣、白鳥美穂、齊藤秀俊、津田 誠、井上和秀 （九州大学大学院薬学研究院 薬理学）
14	Up-regulation of cell surface P2X ₄ receptor by flow shear stress 小林 剛 ¹ 、Fernando Lopez-Redondo ¹ 、武田美江 ¹ 、田中瑞奈 ¹ 、古家喜四夫 ² 、山本希美子 ³ 、安藤譲二 ³ 、曾我部正博 ^{1, 2, 4} （ ¹ 名大院・医・細胞生物物理、 ² 科技振・ICORP/SORST・細胞力覚プロジェクト、 ³ 東大院・医・医用生体工学講座システム生理学、 ⁴ 生理研・分子生理）

Vesicular ATP transport: update and perspectives

森山 芳則

岡山大院医歯薬学・生体膜機能生化学研究室

プリン性の化学伝達においてATPなどのヌクレオチドがどのような機構によりプリン作動性細胞から放出されるのかは積年の問題であり、複数のメカニズムが提唱されている。一部の神経分泌細胞においてはATPが分泌小胞に蓄積され開口放出されることから、分泌小胞への濃縮を司る小胞型ATPトランスポーターとも呼ぶべきたんぱく質の存在が仮定されたが、その分子実体は不明であった。MRP4などのABCトランスポーターがATPの小胞内蓄積を司るとする証拠も提出されているが、それだけではこれまでの現象を説明できない。ABCトランスポーターとは異なるATPトランスポーターを仮定したとしても、果たしてその存在だけでATP, ADP, GTP, UTP, NADなどの多彩なヌクレオチドが小胞内に蓄積される機構を説明することができるのかはわからなかった。さらに、赤血球や味蕾の味細胞などでは、細胞膜上のチャネル様タンパクによりATPが透過・分泌されると考えられている。確かにこれらのチャネル様タンパクはATPを透過するのだが、生理的にその透過が起こるのか、仮にそうだとした場合これらのチャネルだけで説明できるのかなど、解決すべき課題は多い。唯一、**general consensus**を得ているATPの放出機構は、物理的な細胞損傷によるATPのリークではなからうか？このように我々のヌクレオチド放出の分子機構に対する理解は未だに混沌としており、プリン受容体の構造と機能ならびに受容体以後のシグナル伝達カスケード研究とは好対照をなす。

精製・再構成とは純化したトランスポーターをリポソームに組み込み輸送活性を測定することであり、酵素の活性測定に相当する基本的な測定技術である。20-30年前は頻繁に行われたが、現在では廃れているといってよい。私たちは、この精製・再構成法を徹底的に用いる事で仮想的な小胞型ATPトランスポーターの実体を手にすることに成功した。このトランスポーターはATPだけでなくADP, GTP, UTPなど小胞内に蓄積していることが知られているほとんどの(多分、全ての)ヌクレオチドを輸送することができることから**vesicular nucleotide transporter (VNUT)**と命名した。しかも、VNUTは神経やアストロサイトや血小板などヌクレオチドを分泌することが知られているほとんどの細胞に高発現していることがわかってきた。

今回、私は、細胞におけるヌクレオチドの分泌機構について、これまでの知見を整理する。そして、VNUTがヌクレオチドの小胞内蓄積と開口放出に関わる主要な分子装置であることについて述べたい。なお、今回、**rodent VNUT**の諸性質が当研究室の日浅によりポスター発表されることを付記する。

インスリン開口放出のリアルタイム可視化解析

今泉美佳

杏林大学・医学部・生化学

インスリンは膵β細胞内の分泌顆粒に貯蔵され、開口放出によって細胞外へ分泌される。この開口放出機構の解明には、インスリン分泌顆粒動態の画像解析が有力なアプローチとなる。私達は、全反射蛍光顕微鏡(Total internal reflection fluorescent microscopy: TIRFM)を用いた画像解析システムにより、グルコース刺激による2相性インスリン分泌における分泌顆粒の動態すなわち、顆粒の形質膜への供給、ドッキング、フュージョン/開口を時間的空間的に解析することに成功している。このシステムにより①インスリン分泌第1相はあらかじめ形質膜にドッキングしている顆粒(previously docked granules)からの放出であり、第2相は細胞内部に貯蔵されている顆粒(newcomer granules)からの放出により構成されていること、また、②インスリン分泌第1相は形質膜蛋白質 Syntaxin 1A 依存性であり、第2相は Syntaxin 1A 非依存性であることから、分泌第1相と第2相におけるインスリン開口放出は共通のメカニズムではなく、空間的にまた関与する分子が異なる機構であることを明らかにした (J. Cell Biol. 2007; Science 2007)。現在、分泌第2相の機構解明に向けて、インスリン顆粒の細胞内トラフィックを詳細に研究する有力な手法として、入射角可変式全反射顕微鏡 (Variable TIRF (VTIRF) 顕微鏡: レーザー入射角を高速に変化させることで、形質膜から約500nm細胞内部までを高速にZ scanさせながら経時蛍光測定する顕微鏡) を開発して解析を進めているので、合わせて報告する。

Conductive Release of ATP Through the Maxi-Anion Channel

Ravshan Z. Sabirov^{1,2} and Yasunobu Okada¹

¹*Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences, 444-8585 Okazaki, Japan;* ²*Laboratory of Molecular Physiology, Institute of Physiology and Biophysics, Acad. Sci. RUz and Department of Biophysics, National University, 100095 Tashkent, Uzbekistan*

The maxi-anion channel is widely expressed and found in almost every part of the body. Biophysically, the maxi-anion channel is characterized by a high single-channel amplitude of ~300-400 pS and a bell-shaped voltage-dependent open-channel probability with maximal opening at around 0 mV. The channel discriminates well between Na⁺ and Cl⁻, but is poorly selective for other halides exhibiting an Eisenman's selectivity sequence I. We found that this channel is closed in the resting state and opens in response to various ATP-releasing stimuli, such as osmotic, ischemic and hypoxic stresses. The cells tested include mammary C127 cells (Sabirov et al., *J. Gen. Physiol.* 2001, 118: 251-266), kidney macula densa cells (Bell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2003, 100: 4322-4327), cultured neonatal (Dutta et al., *J. Physiol.* 2004, 559: 799-812) and acutely isolated adult cardiomyocytes (Dutta et al., *Biophys. J.* 2008, 94: 1646-1655) and primary cultured astrocytes (Liu et al., *Glia* 2006, 54: 343-357). A weak ATP-binding site with K_d of 12-13 mM located in the middle of the pore together with a wide pore with a radius of ~1.3 nm (Sabirov and Okada, *Biophys. J.* 2004, 87: 1672-1685) provides suitable environment to accommodate and pass ATP⁴⁻ and MgATP²⁻ (~0.6-0.7 nm) with P_{ATP}/P_{Cl} and P_{MgATP}/P_{Cl} of around 0.1. Thus the maxi-anion channel perfectly fits its physiological function as an ATP-conductive channel. This inference was supported by the pharmacological profile of the maxi-anion channel, which resembled that of the stimulated ATP release, and the coincidence of spatial distribution of cardiac maxi-anion channel with that of ATP-releasing site.

血管内皮細胞の流れずり応力依存的な内因性 ATP 放出

山本 希美子^{1,2}、古家 喜四夫³、曾我部 正博^{3,4}、安藤 譲二¹

¹ 東京大学大学院医学系研究科システム生理学、² 科学技術振興機構 さきがけ、
³ 科学技術振興機構 細胞力覚プロジェクト、⁴ 名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物物理学

【緒言】 血管内面を一層に覆う内皮細胞は血流に直接接している為、血流に起因する流れずり応力や血圧、伸展張力などの機械的刺激が常に作用している。内皮細胞には、トーンズの調節や抗血栓性など、循環系の恒常性を保持する働きがあるが、近年、流れずり応力や伸展張力などの機械的刺激によっても調節を受けることが明らかになってきた。内皮細胞は血流の変化に伴い、細胞の形態を変化させ、生理活性物質を産生するなど、血管機能を維持する働きがあるが、内皮細胞が機械的刺激を感知する分子機構の詳細は明らかではない。最近、我々は内皮細胞における流れずり応力の感知に ATP 受容体である P2X4 チャンネルが関与し、循環生理機能調節に重要な役割を果たしていることを明らかとした。本研究では P2X4 が流れずり応力により活性化される分子機構について検討した。

【方法】 培養ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAECs) に平行平板型流れ負荷装置を用いて、ハンクス平衡塩溶液 (HBSS) の流れによる流れずり応力 ($3-15 \text{ dynes/cm}^2$) を負荷した。灌流液中に放出される ATP の濃度を luciferin-luciferase 反応により発生する化学発光量をルミノメータにより定量した。HPAECs における ATP 合成酵素と caveolin-1 の局在を免疫蛍光染色により観察した。密度勾配遠心により分離した細胞質と細胞膜、カベオラ膜に含まれるタンパクの発現量をウェスタンブロットティング法 (WB) により定量した。細胞内より放出する ATP を画像化する為に、HPAECs の細胞膜をビオチン化処理し、streptavidin を反応させた後、ビオチン化 luciferase 蛋白を固定した。細胞外 ATP と luciferase との反応により発生する化学発光を冷却型 EM-CCD カメラを用いて検出した。

【結果と考察】 HPAECs に流れずり応力を負荷すると、内因性 ATP が流れずり応力の大きさに依存して、灌流液中に放出された。ATP 合成酵素の中和抗体や阻害剤 (angiotatin) により、流れずり応力依存的な ATP 放出が約 20% に抑制されると共に、流れずり応力に伴う P2X を介した Ca^{2+} 流入反応が顕著に減少した。以上の結果は流れずり応力の感知に関与する P2X4 チャンネルの活性化に ATP 合成酵素に基づく内因性 ATP の放出反応が必要であることを示唆する。HPAECs における ATP 合成酵素の局在を調べる為に、免疫染色及び、カベオラ膜分画を用いた WB による検討を行った所、ATP 合成酵素と caveolin-1 の共局在が観察され、ATP 合成酵素が細胞膜のコレステロールを多く含む領域であるカベオラ/ラフト膜に存在することが明らかとなった。M β CD を HPAECs に作用させると、ATP 合成酵素と caveolin-1 の局在が一致なくなり、流れ依存的な ATP 放出及び、 Ca^{2+} 反応も有意に抑制された。更に、caveolin-1 の siRNA を HPAECs に導入し、発現を 1/10 以下に減少させると、細胞膜 ATP 合成酵素のタンパク発現量にはほとんど影響しないが、流れずり応力に伴う ATP 放出は抑制された。

【結論】 流れずり応力の Ca^{2+} シグナリングを介したトランスデューサーである P2X4 チャンネルの活性化には、流れ誘発性 ATP 放出が関与し、内因性 ATP 放出反応には、カベオラ/ラフトに局在する ATP 合成酵素の働きが必須であると考えられる。

機械刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング

古家喜四夫¹⁾、山本希美子²⁾、古家園子³⁾、安藤譲二²⁾、曾我部正博^{1),4),5)}

¹⁾科学技術振興機構・細胞力覚プロジェクト、²⁾東大・医・システム生理

³⁾生理研・脳機能計測センター、⁴⁾生理研・細胞内代謝、⁵⁾名大・医・細胞生物物理

ATP は普遍的な細胞外情報伝達物質として数多くの生理機能に関与していることが明らかになってきている。なかでも多くの細胞や組織において ATP 放出は伸展や流れなどの機械刺激によって起こり、メカノシグナリングとの深い関わりが示唆されている。われわれは機械刺激による ATP 放出の経路、制御機構を明らかにするため、放出 ATP のイメージングを中心に研究を進めてきた。Luciferin-Luciferase を溶液中に置き、顕微鏡下で放出された ATP による発光反応を高感度カメラによってリアルタイムでイメージングできるシステムを構築した。それを乳腺上皮細胞や小腸絨毛下線維芽細胞などの培養細胞や組織サンプルに適用し、タッチやストレッチといった機械刺激による ATP 放出のイメージングを行った。この ATP イメージングの時間分解能は 100ms、感度は 10nM 程度であり、ATP 放出部位からの発光の時間経過、ピーク値等を解析することにより ATP の放出濃度や持続時間を解析することができる。その結果、放出濃度は各種機械刺激および自発性による放出ともに数 μM から 10 μM であった。放出の持続時間は機械刺激によるものは 10 秒以下であり、自発性の放出の数十秒とは明らかに異なっていた。このことは同じ細胞でも刺激によって異なる放出機序が働いていることを示唆している。さらに空間解像度を上げるため、Luciferase を溶液中ではなく細胞表面に局在化させ ATP をイメージングする方法を用い、血管内皮細胞に流れズリ応力を与えたときに放出される ATP のリアルタイムイメージングにも成功した。

アストロサイトの ATP 情報発信

小泉修一、藤下加代子
山梨大学・医学部・薬理学

アストロサイトは液性因子「グリア伝達物質」を放出することにより、周囲のグリア細胞、神経細胞、血管系と積極的にコミュニケーションをとる。本研究会では、アストロサイトのグリア伝達物質 ATP による即時的或いは長期的な脳機能制御、さらに ATP 放出の分子メカニズムについて述べ、アストロサイトの情報発信の重要性を改めて見直して見たい。特に放出のメカニズムについては、これまで ATP, glutamate 及び D-serine 等放出現象そのものはからよく知られているものの、放出の分子メカニズムに関しては一致した見解が得られておらず、ATP の放出経路にも、Cl⁻ channel, connexin hemi-channel, P2X7 channel, maxi anion channel 及び開口放出等、様々な経路が報告されている。先ず ATP 放出の分子メカニズムの検討する目的から、Ca²⁺ wave 及び quinacrine 陽性シグナルの消失を指標とした間接法、並びに luciferin-luciferase 法による直接法、を指標としてアストロサイトの ATP 放出能を検出した。機械刺激、ionomycin 及び thrombin 刺激により、アストロサイトから Ca²⁺ 依存的な ATP 放出及び quinacrine 陽性小胞の開口放出様現象が観察され、開口放出機構の存在が示唆された。これまで、アストロサイトの ATP 含有小胞の存在は間接的に報告されていたが、小胞に ATP をパッキングするトランスポーターの存在は不明であった。本年 vesicular nucleotide transporter (VNUT) が発見され、その高発現部位の一つが脳であることが明らかとされた (Sawada et al., PNAS 2008)。初代培養アストロサイトには、強い VNUT 陽性シグナルが観察された。VNUT 陽性シグナルは、大型有芯小胞に含まれるグラニン蛋白、chromogranin A (CgA)、secretogranin II (SgII) と一部共存していた。また、ATP 含有小胞を染める quinacrine 陽性シグナルとも、共存が認められた。本研究会では Ca²⁺ 依存的なアストロサイトの ATP 放出に対する VNUT の関与についても考察する。アストロサイトは自由拡散よりも調節性・積極性に富んだ開口放出による ATP 情報発信機構を有しているようである。アストロサイトが複数の ATP 放出経路を、どの様に使い分けているかに関しては今後の課題である。

圧負荷による心臓の線維化における P2Y 受容体の役割

○西田基宏、上村綾、仲矢道雄、黒瀬等
九州大学・大学院薬学研究院・薬効安全性学分野

慢性的な高血圧や虚血によって生じる心臓の線維化（コラーゲンの蓄積）は、心機能不全を引き起こす要因の1つとして考えられている。心臓の病態形成における三量体 G₁₂ファミリー蛋白質（G₁₂/G₁₃）の役割を調べる過程で、我々は G タンパク質共役型 P2Y 受容体が圧負荷による線維化形成のトリガーとなる可能性を見出した。マウスの横行大動脈を狭窄し、6週間の圧負荷を行ったところ、野生型マウスと同程度の心重量の増大（心肥大）が確認された。ところが、圧負荷により誘発される間質の線維化、拡張機能の低下、および線維化促進因子の発現誘導は、心筋細胞の G α_{12} /G α_{13} の機能を阻害することで抑制された。一方、初代培養心筋細胞に機械的伸展刺激を行い、G α_{12} /G α_{13} シグナリングの活性化の指標として低分子量 G タンパク質 Rho の活性を測定した。その結果、プリン（P2Y）受容体が G α_{12} /G α_{13} シグナリング活性化の引き金となることを見出した。さらに、機械的伸展刺激による Rho の活性化は、P2Y₆ 受容体の阻害剤処置によって有意に抑制された。

以上の結果から、機械的圧負荷により心筋細胞から放出されたヌクレオチドが心筋細胞の P2Y 受容体を介して G α_{12} /G α_{13} シグナリングを活性化し、線維化促進因子を産生することで線維化を引き起こす可能性が示された。

眼の発生に関わる転写制御因子ネットワーク

大隅典子

東北大学大学院医学系研究科

osumi@mail.tains.tohoku.ac.jp

眼の原基は、表皮外胚葉 (epidermal ectoderm) と神経外胚葉 (neural ectoderm) の相互作用によって形成されるが、さらに中胚葉 (mesoderm) および神経堤 (neural crest) 由来の間葉 (mesenchyme) も眼の発生に貢献する。まず、器官形成 (organogenesis) のごく初期に神経外胚葉の前脳領域の一部が膨らんで眼胞 (optic vesicle) となり、表皮外胚葉に接するようになる。応答能 (コンピテンス competence) を有する表皮外胚葉は眼胞から分泌される誘導シグナル (inductive signal) を受けて水晶体プラコード (lens placode) を形成し (組織間相互作用)、やがて水晶体プラコードは陥入し表皮外胚葉から分離して水晶体胞 (lens vesicle) となる。一方、眼胞も陥入して眼杯 (optic cup) となり、後にその外側が網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium) に、内側が神経網膜 (neural retina) となる。神経網膜では徐々に神経分化が生じ、投射ニューロンである神経節細胞 (retinal ganglion cells) からの軸索 (axons) は眼の基部で合し、眼柄 (optic stalk) の中を中枢へと伸長する。神経網膜にはこの他、光刺激を受容する視細胞 (photoreceptors)、介在ニューロン (interneurons) およびグリア細胞 (Muller glia) などが分化し、これらは整然とした層構造を形成する。後に表皮外胚葉からは角膜上皮 (corneal epithelium) が分化する。中胚葉および神経堤に由来する間葉からは、角膜内皮および実質 (corneal endothelium and stroma)、強膜 (sclera)、脈絡膜 (choroid)、虹彩実質 (iris stroma)、毛様体 (ciliary body)、前隅角 (anterior chamber angle) などが形成される。

上記のような眼の発生は、多数の転写制御因子が作用し合うネットワークにより進行する。中でも、Pax6 はカスケードの上位にいて、Rx1, Six3, Six6, Lhx2, Hes1 など多数の転写制御因子の発現に関わるために、「眼の発生のマスターコントロール因子」と呼ばれることもある。実際に、ショウジョウバエやアフリカツメガエルを用いた実験により、Pax6 を強制発現させると、異所性に眼が形成されることが報告されている。本講演では、初期の誘導現象および網膜における神経幹細胞の維持と神経細胞のサブタイプ分化に関わる因子を中心にお話したい。

甘味の受容・伝達・調節機構と ATP

吉田竜介、村田芳博、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三

九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学

味覚は体内に取り込む物質を取捨選別するためのシグナルとして重要である。生体にとって必要なエネルギー源やミネラル（甘味、うま味、塩味）、忌避すべき腐敗物や毒物（酸味、苦味）は味細胞により検出され、その情報は味細胞から味神経を介し中枢へと伝えられる。これらの情報の中でも、甘味は糖などのエネルギー源のシグナルとして動物の嗜好行動を引き起こし、生活習慣病のリスクファクターである肥満との関連が深いと考えられる。我々はマウスを用いた以前の研究で、甘味感受性味細胞が体外のエネルギー源である糖などを受容するのみならず、その感受性が体内の貯蔵エネルギー量を示すレプチンにより減少し、外界の温度エネルギーにより増大することを示した。これらの結果は、個体の食行動が内外のエネルギー状況に応じて調節されている可能性を示唆する。我々は、ヒトにおいてレプチンと甘味感受性の間に関連性があるかを調べるため、ヒトの味覚認知閾値と血漿レプチン濃度を比較した。その結果、甘味の認知閾値は朝に最も低く夜に最も高くなり、レプチンと同様の日内変動を示した。ヒト甘味閾値と血漿レプチン濃度の日内変動の同期は、マウスでレプチンが末梢の甘味感受性の減少を引き起こすことと一致し、ヒトにおいても末梢の甘味感受性がレプチンにより調節されている可能性を示唆する。このように味細胞レベルで調節を受けた味覚情報は味神経に伝達される。ATP 受容体である P2X2 および P2X3 を共に欠損したマウスでは味刺激に対する味神経応答が消失することが報告されていることから、味細胞から味神経への情報伝達物質として ATP が関与することが示唆される。我々は ATP が味刺激に応じて味細胞から放出されるかを調べた。その結果、甘味感受性味細胞は活動電位頻度依存的に ATP を放出したことから、ATP 放出には活動電位が重要であることが示唆される。甘味感受性味細胞-味神経間で ATP が情報伝達に関与するならば、味細胞の ATP 放出機構や味神経の ATP 受容体は甘味シグナルを調節する新たなターゲットとなりうる。

睡眠調節におけるアデノシンの役割

裏出良博

(財)大阪バイオサイエンス研究所 分子行動生物学部門

アデノシンの脳内投与は睡眠を誘発し、大脳皮質と前脳基底部での濃度が断眠時間に依存して上昇し、断眠解除後の睡眠中に減少する。これらの実験結果から、アデノシンは睡眠物質の有力な候補と考えられてきた(1)。脳には4種類のアデノシン受容体(A_1 、 A_{2A} 、 A_{2B} 、 A_3)が存在する。この中で A_1 受容体と A_{2A} 受容体が睡眠に関係すると考えられてきたが、それぞれの関与について議論が続いている。

ハーバード大学のマッカーリー教授らのグループは、 A_1 受容体作動薬である N_6 -cyclopentyladenosine(CPA)をラットの脳室内に投与すると睡眠が増加し、脳波のslow-wave activityが上昇することや、前脳基底部に A_1 受容体アンチセンスを投与すると、ノンレム睡眠と脳波のデルタ波が減少することから、アデノシンは A_1 受容体を解して前脳基底部のコリン系および非コリン系神経を抑制して睡眠を誘発している(1)。一方、我々は A_{2A} 受容体作動薬(CGS21680)のラットやマウスへの脳内投与は強力な睡眠誘発を起こすが、 A_1 受容体作動薬(CPA)の投与は睡眠時間にほとんど影響しないことなどから、睡眠調節には A_{2A} 受容体が重要であると主張している(2)。

コーヒー、茶、コーラなどの覚醒作用の主成分であるカフェインは、様々な受容体やイオンチャンネルに結合するが、アデノシン A_1 受容体と A_{2A} 受容体に最も低濃度で結合して情報伝達を阻害する。我々は、カフェインの投与が A_1 受容体欠損マウスにも野生型マウスと同程度の覚醒を起こすが、 A_{2A} 受容体欠損マウスの睡眠には全く影響しないことを証明した(3)。この報告以来、 A_{2A} 受容体説が有力になっている。我々がコーヒー3杯を飲んだ場合に摂取する量に相当する15 mg/kgのカフェインを腹腔内投与すると、野生型マウスは投与後2時間程度、一睡もできない完全な不眠状態になる(3)。この事実は、アデノシン・ A_{2A} 受容体系が生理的な睡眠の維持に必須であることも示している。

- 1) Basheer R et al. Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog. Neurobiol.*, 2004, **73**: 379-396.
- 2) Urade Y et al. Sleep regulation in adenosine A_{2A} receptor-deficient mice. *Neurology*, 2003, **61**:S94-S96.
- 3) Huang ZL et al. Adenosine A_{2A} , but not A_1 , receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci*, 2005, **8**: 858-859.

細胞外 ATP による ASK1 活性化が誘導する細胞応答

野口 拓也、武田 弘資、一條 秀憲

東大・院薬・細胞情報

Takuya Noguchi, Kohsuke Takeda, and Hidenori Ichijo

Cell Signaling, Grad. Sch. Pharmaceut., Sci., Univ. of Tokyo

ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) は MAP3K ファミリーに属するセリン/スレオニンプロテインキナーゼである。ASK1 は様々なストレスによって活性化され、下流の JNK および p38 経路を選択的に活性化することで、さまざまな細胞応答を誘導している。特に活性酸素種(ROS)は ASK1 の強い活性化因子であることから、ROS によって誘導される細胞応答に ASK1 が重要な役割を担っていることが示唆されていた。実際、これまでに我々は、TNF や LPS (lipopolysaccharide)がそれぞれのレセプターの下流で ROS 産生を誘導し、ROS 依存的に活性化された ASK1 がアポトーシスや炎症性サイトカインの誘導に寄与していることを見いだしてきた。今回我々は、マクロファージにおいて細胞外 ATP が ASK1 を強く活性化することを見だし、その分子機構および生理的役割について検討した。その結果、細胞外 ATP によって誘導される ROS 産生により ASK1-p38 経路が活性化されることがわかった。さらに、NADPH オキシターゼファミリーのひとつである NOX2 のノックダウンにより ASK1-p38 経路の活性化が減弱するとともに ATP 誘導性アポトーシスに抵抗を示したことから、細胞外 ATP は NOX2 による ROS 産生を介して ASK1-p38 経路を活性化し、アポトーシスを誘導していることが示唆された。また、最近の解析から、ASK1 はアポトーシスのみならず、細胞外 ATP が誘導する炎症の誘導にも関与していることが示唆された。本会では、細胞外 ATP による ASK1 活性化が誘導する細胞応答について最新の知見を交えて議論したい。

脊髄におけるシナプス可塑性

池田 弘

福井大学大学院工学研究科知能システム工学専攻

シナプス可塑性は、入力線維への繰り返し刺激などの条件刺激をきっかけに、シナプス伝達の効率が長期的に増強（長期増強）あるいは低下（長期抑圧）する現象であり、脊髄における長期増強は、痛覚過敏の神経メカニズムの1つであると考えられている。

本研究では、P2X 受容体のアゴニストである $\alpha\beta$ -methylene ATP ($\alpha\beta$ meATP)の還流によって引き起こされる長期増強のメカニズム、および炎症ラットに見られる神経興奮の増強へのグリア細胞の関与について調べることを目的とした。

後根と共に摘出した脊髄スライス標本 (400 μ m) を、吸光性膜電位感受性色素 RH-482 で染色し、後根に刺激 (刺激強度 2.0mA, パルス幅 0.5ms) を与えると、脊髄膠様質を中心に神経興奮が計測される。この神経興奮は $\alpha\beta$ meATP を 50 分間還流することによって、4 時間以上持続する長期増強を起こした。この増強は、P2X 受容体のアンタゴニストである TNP-ATP, PPADS, A-317491 によって抑制された。さらに、グリア細胞の代謝活動の抑制剤であるモノフルオール酢酸によっても抑制された。また、この増強には、tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK)が関与していることがわかった。また、 $\alpha\beta$ meATP によって処理した脊髄スライスをマイクログリア、アストロサイトと活性化 p-38 MAPK の二重免疫染色によって、p38-MAPK はアストロサイトに見られることがわかった。

さらに、脊髄神経興奮の増強が、炎症動物で見られるかを、ノーマルラットと、CFA を注入した炎症ラットの脊髄スライス標本で見られる神経興奮の大きさを比較することによって調べた。その結果、CFA を注入してから 1 時間後、1 日後、3 日後のラットの神経興奮が脊髄膠様質の外側を中心にノーマルラットの神経興奮に比べて増大していることがわかった。さらに、CFA を注入してから早い段階での増大には、ギャップ結合が関与しており、遅い段階の増大には、マイクログリアが関与していることを示唆する結果が得られた。

神経因性疼痛発生における Matrix Metalloprotease の関与について

川崎康彦、中塚映政、藤田亜美、熊本栄一、Ji Ru-Rong

佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野、ハーバード医科大学疼痛研究所

臨床においてアロディニア症状など神経因性疼痛を呈する種々の難治性疼痛疾患があるが、神経因性疼痛に対する治療法は未だ確立していない。最近の知見により、脊髄での活性化されたグリア細胞が神経因性疼痛の発生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかしながら、どのようにしてグリア細胞が活性化されるかは不明である。近年、Matrix Metalloprotease (MMP) は、体内で広く発現している酵素で炎症時においてその発現が増加することが報告された。また、この MMP はサイトカインやケモカインなどの断片化 (cleavage) を行い、サイトカインの効果を引き起こす。今回、我々はラット及びマウス L5 脊髄神経結紮モデルを使用して、術後 1 日目に障害側脊髄後根神経節の神経細胞で MMP-9 の顕著な増加を、術後 10 日目には MMP-2 の一過性の発現の顕著な上昇を脊髄後根神経節のサテライト細胞、脊髄のアストロサイト細胞において観察した。また、行動薬理学実験で MMP-9 阻害薬の髄腔内前投与により神経因性疼痛の初期段階が阻害され、MMP-2 阻害薬投与では後期段階が抑制された。さらに、MMP-9 または MMP-2 の髄腔内投与により L5 脊髄神経結紮モデルと同様のアロディニア症状が観察された。以上の結果より、MMP-9 は神経因性疼痛の誘導に、MMP-2 は主に神経因性疼痛の維持に重要な役割を果たし、これら MMP の阻害により神経因性疼痛の異なる段階を対象とした新たな治療の可能性が示唆された。すなわち、神経因性疼痛の機序として疼痛発生初期には MMP-9 発現が上昇し、炎症性のサイトカインである IL- β や TNF- α の断片化を行い、このサイトカインにより脊髄においてミクログリア細胞の活性化が起こる。また疼痛発生後期においては後根神経節のサテライト細胞で MMP-2 発現が上昇し、同様にサイトカインは断片化を受けて活性化し、脊髄のアストロサイト細胞の活性化を引き起こす。さらに、これら活性化されたサイトカインは脊髄後角神経細胞でのシナプス伝達の増幅に影響を及ぼしていることが推察された。

P2X₄受容体のポア開閉及びポア拡大に関連する構造変化の観察

○ 篠崎陽一¹、住友弘二¹、津田誠²、小泉修一³、井上和秀²、鳥光慶一¹

¹NTT 物性研・生体機能、²九州大・院・薬・薬理、³山梨大・医・薬理

【目的】ATP は中枢神経系における重要な情報伝達物質であり、ATP 受容体は生理条件下及び病態時において多様な機能を発揮する事が知られている。ATP 受容体の機能的な重要性が明らかとなってきた反面、構造情報については不明な部分が多い。ATP 受容体のうち、特に P2X 受容体は受容体活性化に伴いその構造を変化させ、形質膜を貫通するポアを形成し、細胞外液中の陽イオンを細胞内へ流入させると考えられている。P2X サブファミリーの中でも P2X₄受容体はカルシウム非存在下では ethidium bromide (EtBr)などの色素を透過する巨大なポアを形成する事が知られている。同じく巨大なポアを形成すると考えられている P2X₇受容体ではこの巨大なポアは他のタンパク質への transactivation の結果であるという事も報告されており、P2X 受容体単体でそのようなポアが形成されるかについては未だ結論には至っていない。そこで、我々は上記のような P2X₄受容体の構造及び機能を原子間力顕微鏡(AFM)、カルシウムイメージング及び色素取り込みイメージング法を用いて明らかとする事を本研究の目的とした。

【方法】ラット P2X₄受容体タンパクはヒト 1321N1 アストロサイトーマ細胞に強制発現し、この膜画分より調製した。AFM を用いた解析では劈開したマイカ上に精製 P2X₄受容体タンパクを静置し、バッファー中にて観察を行った。単一 P2X₄受容体の機能解析ではプラスチックプレートに約 500 µm 径の孔を作製し、そこに DNA/fluo-3 を加え、孔の上下面を脂質で覆い、更にそこに P2X₄受容体を再構成した。カルシウムイメージングには CaCl₂、EtBr 及び ATP、色素取り込みには EtBr 及び ATP を含むバッファーを用いた。

【結果と考察】AFM 観察では無刺激時には P2X₄受容体は丸、もしくは三角形の形状であった。ATP 刺激後は、各パーティクルは三量体構造に変化した。無刺激時には各サブユニット間の距離は近い個々のサブユニットが検出できなかったが、ATP 刺激後には各サブユニット間の距離が大きくなったため三量体が観察できたと考えられる。高速 AFM を用いてタイムラプスイメージングを行ったところ、カルシウム非存在下では P2X₄受容体は ATP 刺激後速やかに三量体構造へと変化し、その後各サブユニット間の距離が大きくなっていった。この構造変化と機能との関係を明らかにするため、カルシウムイメージング及び色素取り込みイメージングによる機能解析を行った。カルシウム存在下では ATP 刺激後に fluo-3 蛍光の増加が観察されたものの、EtBr 取り込みは観察されなかった。一方、カルシウム非存在下では fluo-3 の蛍光増加は観察されず、EtBr 取り込みが観察された。以上、本研究より単一 P2X₄受容体の構造及び ATP 刺激による構造変化の直接観察とこの変化に相当する機能解析からカルシウム非存在下の P2X₄受容体のサブユニット間の距離の大きな増加は色素透過性の巨大ポア形成に相当する事が明らかとなった。

本研究の一部は厚生科学研究費補助金「グリア細胞をターゲットとした創薬のための評価科学基盤の確立」により助成された。

Ca オシレーションの同期化機構

山下勝幸

奈良医大 第一生理

Ca オシレーションは、細胞増殖、細胞運動、分泌など様々な細胞機能の制御に関与する。Ca オシレーションが多細胞で生じる場合、細胞間に ATP などの伝達物質を放出して伝播する時は Ca ウェーブとして観察される¹。一方、多細胞間で同期して Ca オシレーションが生じることが、発生初期の脳や網膜で観察されている²⁻⁴。このような同期化の説明として、もし興奮性細胞であれば活動電位が同期し、電位依存性 Ca チャネルを介する Ca 流入が同期化すると考えられる。しかし、細胞外からの Ca 流入に非依存的に Ca オシレーションが多細胞間で同期して生じることが報告されている²⁻⁴。この場合、細胞内 Ca ストアからの Ca 放出が多細胞間で同期していると考えられ、その同期化メカニズムは不明である。

近年、オルガネラを染色する電位感受性蛍光色素 [DiOC₃(3)] を用いて細胞内 Ca ストアの膜電位変化が測定され、Ca オシレーションの周期でストアの膜電位が変化することが報告された⁴。このようなストアの膜電位変化が細胞膜を介した容量性結合により細胞間で同期することが考えられ、新規な同期化モデルとして提唱された⁵。しかしながら、容量性結合では急速な電位変化しか同期しないことが指摘された。

今回、Ca ストアの膜電位変化にともなう蛍光強度変化をフォトマルチプライアによって高時間分解能で測定したところ、高周波数の変動がバースト状に繰り返し生じ、この時に一致して Ca 上昇が生じることが明らかになった⁶。従来カメラで捉えていた蛍光強度の周期的上昇は、このバースト状変動を反映すると思われた。これらの結果から、Ca ストアの膜電位の高周波数変動が容量性結合により細胞間で同期することが、Ca オシレーションの同期化メカニズムと考えられる⁶。

References

- 1 Bennett MR, Farnell L & Gibson WG (2005) A quantitative model of purinergic junctional transmission of calcium waves in astrocyte networks. *Biophys J* **89**, 2235-2250.
- 2 Owens DF & Kriegstein AR (1998) Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J Neurosci* **18**, 5374-5388.
- 3 Owens DF, Flint AC, Dammerman RS & Kriegstein AR (2000) Calcium dynamics of neocortical ventricular zone cells. *Dev Neurosci* **22**, 25-33.
- 4 Yamashita M, Sugioka M & Ogawa Y (2006) Voltage- and Ca²⁺-activated potassium channels in Ca²⁺ store control Ca²⁺ release. *FEBS J* **273**, 3585-3597.
- 5 Yamashita M (2006) 'Quantal' Ca²⁺ release reassessed — a clue to oscillation and synchronization. *FEBS Lett* **580**, 4979-4983.
- 6 Yamashita M (2008) Synchronous Ca²⁺ oscillation emerges from voltage fluctuations of Ca²⁺ stores. *FEBS J* **275**, 4022-4032.

P2X2 受容体活性化で発生する

マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞のコリン電流

金田 誠

慶應大・医・生理

P2X2 型プリン受容体陽イオンチャネルは、巨大陽イオンに対してもイオン透過性を有することが報告されている。本研究では、コリン作動性アマクリン細胞に存在する P2X2 型プリン受容体チャネルが、細胞外コリンに対する透過性を有するかどうかについてパッチクランプ法を用いて検討した。実験には GFP がコリン作動性アマクリン細胞特異的に発現する遺伝子改変マウス網膜の単離網膜神経細胞標本を用いた。逆転電位の観察は、電位依存性イオンチャネルをブロックする条件 (30mM tetraethylammonium Cl, 3mM 4-aminopyridine, 100 μ M CdCl₂) で行った。ホールセル条件下に細胞を -70mV に保持して 100 μ M の ATP を投与すると内向き電流が観察された。この内向き電流は、細胞外液中の NaCl を choline Cl に置換した条件でも choline acetate に置換した条件でも観察された。細胞外液中の choline acetate を等浸透圧の sucrose に置換して逆転電位を観察すると逆転電位の移動が観察された。ATP で誘発されるコリン電流の濃度反応曲線は EC50 が 46 μ M、Hill 係数が 1.9 の曲線でフィットできた。これらの値は NaCl 溶液を用いたときに ATP で誘発される陽イオン電流の EC50 (36 μ M)、Hill 係数 (1.8) に近い値を示した。しかしながら最大応答値は NaCl 存在下で記録される最大応答の 30% であった。コリン電流は ATP- γ -S で誘発することができたが、 α 、 β -methylene ATP や benzoyl, benzoyl ATP の投与では誘発されなかった。また ATP で誘発される choline 電流は PPADS 存在下では誘発されなかった。これらの薬理的性質はマウス網膜 P2X2 型プリン受容体の薬理的性質と一致するものであった。

コリンはアセチルコリン合成の前駆体であることから OFF 型コリン作動性アマクリン細胞では、P2X2 型プリン受容体の活性化にともなってコリンが細胞内に取り込まれる機構が存在する可能性が示唆された。

Poster Session

<p>P01</p>	<p align="center"> Vesicular nucleotide transporter (VNUT) in rodent: Gene organization, transporter function and localization 日浅未来、澤田啓介、森山芳則 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 生体膜機能生化学研究室 </p>
<p>ATP は生体内のエネルギー代謝に関わるだけでなく、細胞間における情報伝達物質として機能し、細胞表面にあるプリン受容体を介して様々な生理作用を現す。細胞外 ATP の由来は損傷細胞からの遊離だけでなく、神経終末からの神経伝達物質としての放出、種々の分泌細胞の脱顆粒等によるものが知られている。しかし、ATP が小胞に蓄積されるシステムは不明であった。</p> <p>最近我々はヒト SLC17 anion transporter family に属する新たな遺伝子を発見した。このトランスポーターは ATP を含む様々なヌクレオチドを基質とする小胞型のトランスポーターであった。我々はこのトランスポーターを vesicular nucleotide transporter、VNUT と命名した。RNA 干渉により VNUT の発現を特異的に抑制すると ATP 分泌が低下することから、VNUT は ATP の放出に重要であると考えられる (Sawada et al., <i>PNAS</i>, 2008)。今回我々は rodent VNUT の発現と機能について解析した。rodent VNUT のヌクレオチド輸送機能はヒトのそれと同じであった。また、rodent VNUT はプリン作動性の分泌細胞や神経に高発現している。</p>	
<p>P02</p>	<p align="center"> 新生ラット摘出脊髄における高炭酸による アデノシン放出と反射電位抑制効果 乙黒兼一、伴昌明、太田利男、伊藤茂男（北大・院獣医・薬理） </p>
<p>二酸化炭素は麻酔作用を持っており、素早い鎮静・鎮痛効果が得られるため動物の安楽殺に幅広く使用されている。最近、高炭酸が中枢神経系でアデノシンの蓄積を生じることがわかってきた。本研究では、高炭酸が脊髄の情報伝達経路に与える影響と、アデノシン放出のメカニズムについて検討した。</p> <p>新生ラットから摘出した脊髄の腰部後根を刺激し、対応する前根から脊髄反射電位を記録した。高炭酸は反射電位を素早く抑制し、この抑制効果はアデノシン A₁ 受容体拮抗薬 CPT によって有意に減少した。また高炭酸による抑制は、nucleoside transporters や gap junction hemichannels、anion channels、P2X7 receptors などに対する阻害薬では減少しなかった。高炭酸によって細胞外のアデノシン濃度の増加がみられたが、この反応は TTX や外液 Ca²⁺除去および ecto-ATPase 阻害薬 ARL67156 の影響を受けず、細胞内のアデノシン濃度上昇を抑制する homocysteine によって抑制された。以上のことから、高炭酸は細胞内のアデノシン濃度を上昇させ、これが細胞外に放出されていると考えられる。アデノシン A₁ 受容体の活性化が、高炭酸による脊髄情報伝達経路の抑制に関与していることが示され、脊髄レベルでの麻酔作用をもたらしていることが示唆された。</p>	

P03

アデノシン A1 受容体による NMDA 受容体活性修飾

関野祐子

東京大学 医科学研究所 神経ネットワーク

アデノシンは細胞間隙に存在し神経活動を強力に抑制する神経調節因子である。シナプス前終末の A1 アデノシン受容体 (ADOA1R) は伝達物質放出を抑制するが、シナプス後部の ADOA1R の機能は不明である。我々はこれまでの研究から、海馬 CA2 領域はシナプス後部 ADOA1 活性によりゲートとして機能しうるとの仮説を提唱している。昨年、海馬 CA2 領域では LTP が誘導されないことが明らかとなった (Zhao M. et al. J. Neurosci. 2007)。そこで本研究では、シナプス後部 ADOA1R による NMDA 受容体機能修飾を検証する。膜電位変化を計測する光学的測定法により、ADOA1R ノックアウトマウス海馬スライスで CA3-CA1 間の神経興奮を調べたところ、各領域 (CA3, CA2, CA1) で脱分極性光学応答の振幅と持続時間が野生型に比べて非常に長いことがわかった。さらに、CA3-CA1 間を Cut し Schaffer-CA1 シナプスの光学応答をピクロトキシン存在下で調べると、NMDA 受容体由来の光学応答の立ち上がり時間が遅くなり、持続時間が長くなった。ホールセルパッチクランプ法により、+40 mV に電位固定した CA1 錐体細胞から NMDA 電流を測定したところ、ADOA1R 阻害薬の 8-cyclopentyltheophylline (1 μ M) により振幅の増加のみならず、タウ値の増加が認められた。これらのデータ、NMDA 受容体活性がアデノシン A 1 受容体から直接または間接的に修飾を受けている可能性が示唆された。

P04

後根神経節 P2X 受容体を介した神経因性疼痛発症機構

長谷川茂雄, 津田誠, 井上和秀

九州大学大学院薬学研究院薬理学分野

近年、末梢の一次求心性神経に発現している P2X₃ および P2X_{2/3} 受容体と神経因性疼痛との関連が示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、Ca²⁺透過性を有する P2X₃/P2X_{2/3} 受容体を介した Ca²⁺依存性カスケードの活性化が痛覚伝達に変化を引き起こす可能性を想定し、痛覚修飾を担う脂質メディエーターの産生に重要な Ca²⁺依存性酵素である細胞質型ホスホリパーゼ A₂ (cytosolic phospholipase A₂: cPLA₂) の役割に注目した。ATP 処置後の初代培養 DRG ニューロンおよび神経因性疼痛病態モデルの損傷側 DRG ニューロンにおいて、リン酸化型 cPLA₂ の発現レベルの増加および細胞膜近傍へのトランスロケーションが観察され、これらは選択的 P2X₃/P2X_{2/3} 受容体アンタゴニストである A-317491 により抑制された。さらに、cPLA₂ 活性化の下流に存在する脂質メディエーターとして、血小板活性化因子 (platelet-activating factor: PAF) を候補に挙げて、神経因性疼痛との関連を検討した結果、PAF 受容体欠損マウスでは、神経損傷によるアロディニアが抑制されるとともに、損傷側 DRG において、炎症性サイトカインである TNF α および IL-1 β の発現上昇が抑制された。以上の結果より、P2X₃/P2X_{2/3} 受容体により活性化された cPLA₂ は PAF/PAF 受容体シグナルを介して神経因性疼痛に関与している可能性が考えられる。

<p>P05</p>	<p>In vivo gene silencing 法による脳内シナプス前 P2X 受容体サブタイプの変換 田村 友穂、加藤 総夫 東京慈恵会医科大学・神経生理学研究室</p>
<p>脳内における P2X 受容体の重要な機能の一つはシナプス前における伝達物質放出の制御である。しかし、P2X 受容体には異なるサブユニット構成からなるそれぞれ異なる性質を持つサブタイプが存在し、各シナプスにおいて特定の P2X 受容体サブタイプが発現することの機能的意義は大部分未解明である。我々は、内臓 1 次求心線維-孤束核 2 次ニューロン間シナプス (TS-NTS シナプス) のシナプス前タンパクの発現を in vivo gene silencing 法によって抑制する技術を確立している (Shigetomi et al., 2006)。TS-NTS シナプス前 P2X 受容体のサブタイプは P2X_{2/3} と想定されているが、そのサブユニット構成の人工的変換がグルタミン酸放出に及ぼす影響を検討した。幼若 Wistar ラット右頸部節状神経節 (rNG) に P2X₃ サブユニットに対する siRNA を導入した。導入 3 日後、rNG における P2X₃ mRNA の相対発現量は 4.7% まで減少し、7-15 日後、孤束核における抗 P2X₃ サブユニット免疫活性は導入側においてのみ顕著に減少した。導入約 15 日後、孤束核を含む急性脳スライス標本を作成し、興奮性シナプス後電流頻度に及ぼす P2X 受容体アゴニストの効果を解析したところ、導入側の孤束核では P2X₂ homomeric 受容体に近い薬理学的特性を示すニューロンが多く記録された。以上、in vivo における特定のサブユニットの gene silencing によってシナプス前 P2X 受容体の薬理学的表現型の変換に成功した。</p>	
<p>P06</p>	<p>マウス網膜 P2X2 受容体で見られる特異な生後発達様式 霜田 幸雄¹、重松 康秀¹、金田 誠² 1 東京女子医大・総研、2 慶応大・医・生理</p>
<p>網膜における各種受容体は生後開眼前に基本的な情報伝達経路の発生が終了する。これらの情報伝達経路は成長期には可塑性を持っており、開眼後の視覚入力に依存して情報伝達経路の組替えが起こることが報告されている。われわれはマウス網膜において P2X2 型プリン受容体が OFF 型コリン作動性アマクリン細胞に存在すること、また ATP が P2 型プリン受容体を活性化し OFF 型網膜神経節細胞における情報伝達を制御することを報告してきた。本研究では免疫組織化学的手法を用いて、P2X2 型プリン受容体の生後発達を検討した。また視覚入力に P2X2 型プリン受容体の生後発達にどのような影響を与えるか検討した。マウス網膜 P2X2 型プリン受容体は、1) 開眼前には存在せず開眼後に情報伝達経路の形成が起こること、2) 開眼後の形成初期には ON 型アマクリン細胞にも P2X2 受容体が多く発現すること、3) OFF 経路特異的な P2X2 型プリン受容体の分布は視覚入力依存的な調節を受けないことが明らかとなった。</p>	

<p>P07</p>	<p>P2Y₁₂ を介したインテグリンβ1 活性化によるミクログリア突起伸長調節 ○大澤圭子¹、中村泰子¹、入野康宏²、鈴木恵理¹、佐柳友規¹、井上和秀³、高坂新一¹ ¹国立精神神経セ・神経研・代謝、²神戸大・院・医・脂質生化学、³九州大・院・薬・薬理学</p>
<p>ミクログリアは、正常脳では長く多数に分岐した突起を持つラミファイド型であるが、脳障害時にはいち早く反応して形態を変化させ、障害部位へ移動・集積する。我々は、今までに、ATP が P2Y₁₂ を介してミクログリアの形態変化と遊走を引き起こすことを報告し、その調節分子機構の研究をおこなってきた。近年、組織障害時にラミファイドミクログリアは障害部位へ突起を伸長させ、それは ATP により P2Y₁₂ を介して引き起こされることが報告された。そこで、我々は三次元コラーゲンをういたラット初代培養ミクログリアの突起伸長アッセイ系を作成し、突起伸長を調節する分子について解析をおこなっている。今回、ATP が P2Y₁₂ を介してミクログリアのコラーゲンに対する細胞接着性を高めたことから、細胞接着分子であるインテグリンの関与について検討を行った。RGD ペプチドと抗インテグリンβ1 機能阻害抗体の影響を調べたところ、細胞接着および突起伸長の活性化は両者により抑制された。また、P2Y₁₂ 発現細胞において、ATP 刺激による活性化インテグリンβ1 の増大が活性化型インテグリンβ1 認識抗体を用いて確認された。以上のことから、P2Y₁₂ を介して引き起こされる inside-out なインテグリンβ1 の活性化が、細胞-細胞外マトリックス間接着を亢進することにより突起伸長を制御することが強く示唆された。</p>	
<p>P08</p>	<p>ミクログリアにおける P2Y₆ 受容体発現量増加に関わるメカニズムの解明 藤下 加代子¹、中尾篤人²、小泉修一¹ 山梨大学医学部¹薬理、²免疫</p>
<p>私達はこれまでに、カイニン酸 (kainic acid:KA) 投与ラットの海馬障害領域において、ミクログリア特異的に P2Y₆ 受容体発現が亢進すること、ミクログリアは傷害部位から放出される UDP をこの P2Y₆ 受容体で認識し、貪食作用を呈すること、を報告してきた (Koizumi et al., Nature, 2007)。しかしながら、静止型ミクログリアには殆ど認められない P2Y₆ 受容体が、活性型ミクログリア特異的に亢進するメカニズムは不明である。一方、KA 処置マウスの海馬神経細胞及びグリア細胞では、TGFβ 受容体下流シグナルの一つ、Smad2 の活性化が観察されており、そのタイムコースは P2Y₆ 受容体発現亢進のそれとよく一致する (Luo et al., PNAS, 2006)。活性化 Smad は遺伝子の転写制御因子として機能することから、今回、ミクログリアの P2Y₆ 受容体発現亢進における TGFβ-Smad シグナル経路の関与を検討した。</p> <p>ラット脳由来ミクログリアを TGF-β1 に暴露すると、処置時間及び濃度依存的に P2Y₆ 受容体 mRNA 発現量が増加した。TGF-β1 によるこの効果は TGFβ I 型受容体キナーゼ (TβRI) 阻害剤により抑制された。また、KA 処理後の神経細胞-グリア細胞共培養系上清中でミクログリアを培養すると P2Y₆ 受容体 mRNA 発現量が増加し、この効果は TβRI 阻害剤により抑制された。以上より、KA 障害を受けた神経細胞-グリア細胞由来の TGF-β1 が、その後惹起されるミクログリア P2Y₆ 受容体発現亢進を担う液性因子の一つである可能性が示唆された。</p>	

<p>P09</p>	<p style="text-align: center;">マウスマクロファージ J774 細胞における UDP による持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対するプロスタグランジン E_2 の作用 ○伊藤 政明、松岡 功 (高崎健康福祉大学・薬学部・薬効解析)</p>
<p>我々はこれまでにマウスマクロファージ J774 細胞において UDP が $P2Y_6$ 受容体を介して持続的に細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)を上昇させること、さらにはプロスタグランジン(PG)E_2 がその上昇を強力に抑制することを見出しており、今回はそのメカニズムを検討した。</p> <p>J774 細胞において UDP は持続的な$[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし、それは PGE_2 の前処理により抑制された。また、PGE_2 による抑制作用は UDP による持続的な$[Ca^{2+}]_i$ 上昇が誘発された後からの処理でも認められた。さらに、UDP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の持続相は、細胞外 Ca^{2+} のキレートや transient receptor potential(TRP)チャネル阻害剤の BTP-2 によっても抑制されたことから、TRP チャネルを介する細胞外 Ca^{2+} の流入が関与するものと考えられた。一方、シクロピアゾン酸を用いて TRP チャネルを活性化した場合の持続的な$[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対して、BTP-2 による抑制は認められたが PGE_2 では無効であった。さらに、UDP による持続的な$[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する後処理での抑制作用は、ホスホリパーゼ C(PLC)を阻害する U73122 やホルボールエステルの PMA でも確認された。したがって、PGE_2 による Ca^{2+} 抑制の作用点は、$P2Y_6$ 受容体から小胞体までのシグナルの間にある可能性が考えられた。UDP は持続的にホスファチジルイノシトール(PI) を加水分解し、PGE_2 は Ca^{2+} の抑制と同様に、後処理によってこの PI 加水分解を抑制したことから、その作用点は PLC よりも上流であると考えられた。J774 細胞には PGE_2 受容体として EP2 と EP4 の発現が認められた。以上のことから、UDP による持続的な$[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する PGE_2 の抑制は、EP2/EP4 受容体を介する PLC 抑制の関与が示唆された。</p>	
<p>P10</p>	<p style="text-align: center;">マウス T 細胞における $P2X_7$ 受容体を介した形質膜ブレブ形成と細胞死誘導 三坂恒、前畑真知子、原田均、出川雅邦 (静岡県立大学・薬)</p>
<p>$P2X_7$ 受容体は、免疫担当細胞を含む多くの細胞・組織に発現する。マウス T 細胞においては、分化・成熟に伴って発現が上昇し、その活性化はカチオンチャネルの開口 / 小孔の形成 / 形質膜のブレブ形成等を伴った細胞死を誘導する。今回、マウス脾臓由来 T 細胞における $P2X_7$ 受容体を介した細胞の形態学的変化と細胞死誘導との関連について検討した。</p> <p>マウス脾細胞における ATP によるエチジウムイオンの取り込み促進を小孔形成活性としてフローサイトメーターを用いて解析したところ、ATP (0.1mM) 10 分間処置により小孔形成が認められ、1mM では前方散乱光の低下を伴うより強い小孔形成が認められた。一方、細胞死の指標となるプロピジウムイオンの取り込みは、ATP (1mM) 処置 30 分以上においてのみ認められた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の形態学的変化を観察したところ、ATP 処置によるブレブ形成は、エチジウムイオンを強く取り込む細胞に認められることを見出した。</p> <p>以上の結果より、$P2X_7$ 受容体活性化による細胞死誘導の初期過程では、比較的弱い小孔が形成し、その後前方散乱光の低下・形質膜ブレブ形成を伴う強い小孔形成が認められるようになることが明らかとなった。今後、前方散乱光の低下と形質膜ブレブ形成との関連とそれらの細胞死誘導への役割を調べることが重要と考えられる。</p>	

<p>P11</p>	<p align="center">ヒト肺由来肥満細胞の IgE 受容体を介した脱顆粒に対する細胞外プリンの影響 ○西 晴久¹⁾, Amir Pelleg²⁾, Manfred Thile³⁾, Edward S. Schulman²⁾ ¹⁾東京慈恵会医科大学・薬理学講座, ²⁾Pulmonary & Critical Care Medicine, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, ³⁾Anästhesiologie, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.</p>
<p>【目的】造血幹細胞由来の肥満細胞 (MC)は哺乳類では各組織に存在し, 細胞表面の IgE 受容体の活性化によりヒスタミンをはじめとする多種の生理活性物質を含む顆粒を放出(脱顆粒)する. MC は粘膜下組織や結合組織など, 存在する組織の違いでその生理活性やタンパク発現が異なるが, 各組織由来の MC で複数種のプリン受容体の発現が報告されている. 既に我々はヒト肺組織から単離・初代培養した MC (cHLMC)を用い, 細胞外 ATP が同細胞の高親和性 IgE 受容体 (FcεRI)の活性化によるヒスタミン放出(HR)を強く亢進することを報告し, ヒト呼吸器において細胞外 ATP が喘息症状の増悪をもたらす可能性について指摘している. 今回我々は cHLMC の FcεRI 活性化を介した HR に対する種々の細胞外プリンの作用を比較し, 各種細胞外プリンが及ぼす呼吸器系アレルギー疾患への影響の可能性を検討した. また, ヒト MC に特異的に発現しているとされ, プリン受容体と塩基配列の相同性が高く, 5'-AMP がその内因性リガンドとして疑われたことがある G 蛋白共役型受容体 GPR80/GPR99 の発現とその機能についても cHLMC で検討したので報告する.</p> <p>【方法】ヒト肺組織を細切し, エルトリエータ細胞分離システムと percoll 濃度勾配法を用いて MC を単離後, 5-8 週間初代培養して cHLMC を得た. FcεRI の活性化には抗 FcεRI モノクローナル抗体である 22E7 を用い, 脱顆粒の指標として HR を定量した.</p> <p>【結果】cHLMC では, 複数種のプリン受容体の発現が認められたが, P2Y₁₁ 受容体の発現は認められなかった. 22E7 刺激による cHLMC の HR に対し, adenosine, inosine, および P2Y₁₁ 受容体阻害薬の AMPS は, それぞれ促進と抑制の二方向性, 促進, そして著明な抑制を, いずれも濃度依存的に示した. 5'-AMP は明らかな作用を示さなかった. cHLMC には GPR80/GPR99 の mRNA 発現が認められ, 22E7 刺激した cHLMC でその発現促進が認められた. また同受容体タンパクの発現は 22E7 刺激した cHLMC で著明であった. 一方, その内因性リガンドとされる α-ketoglutarate は高濃度域で弱い阻害作用を呈すにとどまった.</p> <p>【考察】AMPS は MC のプリン受容体に作用して I 型アレルギーを抑制する可能性が示唆された. これは気管支喘息の緩和・発作軽減といった臨床上的観点からも着目に値する.</p>	
<p>P12</p>	<p align="center">ラット骨髄間質細胞の P2Y₂ 受容体活性化による増殖効果と血清 市川純 (関西医科大学・第二生理)</p>
<p>ラット骨髄間質細胞は P2Y₂ 受容体を発現している. 骨髄間質細胞は体性幹細胞としての性質を持ち, 再生医療への応用課題の一つとして, より増殖効率の高い培養方法の開発が求められている. そこで P2Y₂ 受容体活性化が増殖に及ぼす影響について調べた. 10%牛胎児血清(FCS)を含む培地(通常培地)に ATP あるいは UTP を添加すると, 無添加群と比べて増殖率が向上した. この効果は無血清培地(FCS を無血清培地添加剤に置換したもの)では見られなかった. 無血清培地で培養した細胞は, 通常培地で培養した細胞と同様に P2Y₂ 受容体を発現し, ヌクレオチド刺激に応答して細胞内 Ca²⁺上昇を起こすことから, 無血清培地で増殖効果が得られない原因は, 無血清培養による P2Y₂ 受容体の機能減衰によるものではないと考えられる. これらの結果より, ATP や UTP は増殖因子としての働きはないものの, 血清による増殖を促進する効果を持つことがわかった. さらに, 蛍光色素を用いた細胞内 Ca²⁺濃度測定において, UTP と FCS で同時刺激した際に Ca²⁺オシレーションの発生が観察された. UTP あるいは FCS 単独の刺激では一過性の Ca²⁺上昇しか起こらず, また UTP と無血清培地添加剤の同時刺激でも Ca²⁺オシレーションは起こらなかった. 以上の結果から, 通常培地において P2Y₂ 受容体活性化がもたらす増殖促進効果は, Ca²⁺オシレーション発生と密接に関わるのではないかと推測される.</p>	

<p>P13</p>	<p align="center">ミクログリアからの ATP 誘発 MIP-2 放出のメカニズム 吉武麻衣、白鳥美穂、齊藤秀俊、津田誠、井上和秀 九州大学大学院薬学研究院 薬理学講座</p>
<p>ミクログリアは中枢神経系においてサイトカインやケモカインの放出及び産生ネットワークを制御する中心的な役割を担っている。</p> <p>本研究では、ATP 刺激がマウスミクログリア細胞株 BV-2 より CXC ケモカインの一つである MIP-2 mRNA の増加及び MIP-2 の放出を誘発することを新たに見出した。この MIP-2 産生増加・放出誘発作用は、高濃度 (800 μ M 以上) の ATP 刺激に対し特徴的であり、P2X₇ 受容体アゴニスト 2'- and 3'-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (Bz-ATP) によって顕著に認められること、更に P2X₇ 受容体アンタゴニスト Brilliant Blue G (BBG) により拮抗されることより、P2X₇ 受容体の関与が考えられた。また、BV-2 細胞において全てのサブタイプ(NFAT 1-5)の NFAT mRNA が確認され、その 1 つである NFAT1(NFATc2)は ATP 1mM 刺激後 30 分での核内移行が観察された。さらに、MIP-2 産生増加・放出促進はカルシニューリン阻害薬により抑制されたことから、MIP-2 産生・放出にはカルシニューリン依存性 NFAT が関与していることが示唆される。以上のことから、P2X₇ 受容体を介した MIP-2 産生増加及び放出誘発に NFAT が関与することが示唆された。</p>	
<p>P14</p>	<p align="center">Up-regulation of cell surface P2X4 receptor by flow shear stress 小林 剛¹⁾、Fernando Lopez-Redondo¹⁾、武田美江¹⁾、田中瑞奈¹⁾、古家喜四夫²⁾、 山本希美子³⁾、安藤譲二³⁾、曾我部正博^{1,2,4)} (¹⁾名大院・医・細胞生物物理、²⁾科技振・ICORP/SORST・細胞力覚プロジェクト、 ³⁾東大院・医・医用生体工学講座システム生理学、⁴⁾生理研・分子生理)</p>
<p>血管内皮細胞に発現した P2X4 チャンネルは、shear stress 変化に応じて誘起される Ca²⁺流入に中心的な役割を果たす。この反応では細胞外 ATP を必要とすることから、P2X4 は細胞膜上に局在し機能すると考えられた。しかし、定常状態ではほとんどの P2X4 は細胞内小胞に存在し、細胞膜上の発現量は極微少であった。従って、P2X4 は、定常状態では細胞内プールに存在し、血流センサーとして機能する際に細胞内小胞より細胞膜へ移行する、と考えられた。その仮説を検証するために、細胞膜上の P2X4 分子を biotin 化標識し特異的に検出したところ、リガンド刺激、あるいは、shear stress 負荷した場合、刺激数分後に細胞膜上の P2X4 量が約 1.5~2 倍に増加することがわかった。また、GFP 融合 P2X4 を細胞に発現させ、P2X4 を含む細胞内小胞が細胞膜と融合する様子を全反射蛍光顕微鏡により観察したところ、リガンド刺激や shear stress 負荷直後に融合頻度が顕著に上昇することがわかった。さらに、刺激後に細胞膜上へ移行した P2X4 が機能していること、すなわち、チャンネル電流が増加することが、電気生理学的にも確認された。以上の結果から、P2X4 による血量感知において、膜移行の亢進により細胞膜上の P2X4 分子の数を増加させる正のフィードバック調節機構の存在が示唆された。</p>	