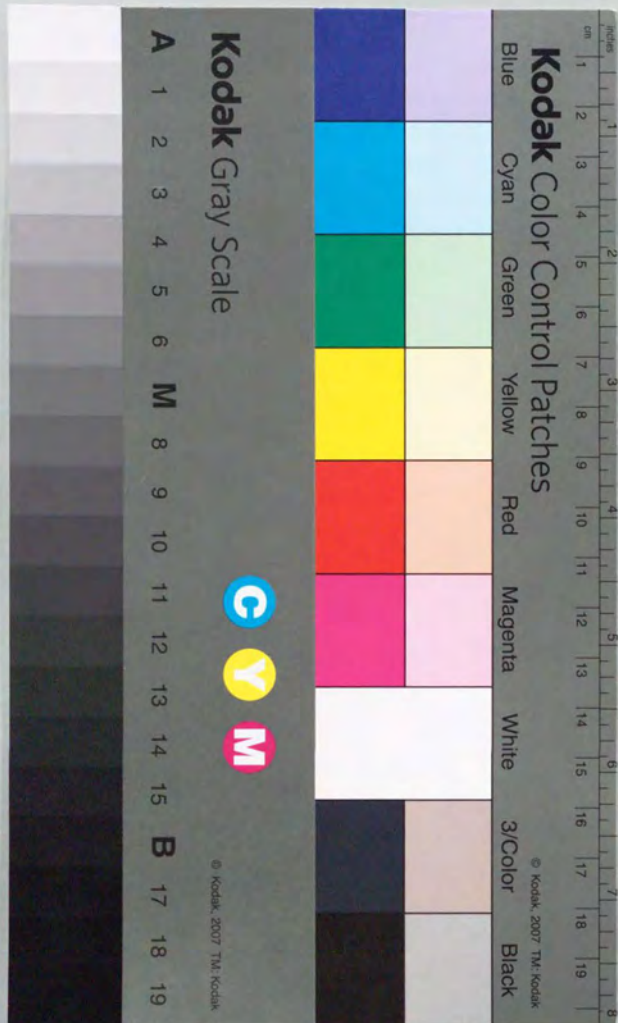


プリン受容体による巨核球の細胞質
カルシウムオシレーション

畝山 智香子



プリン受容体による巨核球の細胞質
カルシウムオシレーション

畝山智香子

目次

	page
第1章 序論	1
第2章 ラット巨核球のATP誘発性細胞質カルシウムオシレーションとプリン受容体の性質	6
2-1 緒言	6
2-2 実験方法	6
2-2-1 細胞の調製	
2-2-2 溶液	
2-2-3 電気生理学的測定	
2-2-4 薬物	
2-2-5 データ解析	
2-3 結果	8
2-3-1 巨核球の外向き電流の性質	
2-3-1-1 ATP誘発性外向き電流オシレーション	
2-3-1-2 conventional法とnystatin法との比較	
2-3-2 振動性電流はCa ²⁺ 依存性K ⁺ チャンネルにより運ばれる	
2-3-2-1 K ⁺ チャンネルブロッカーの影響	
2-3-2-2 Ca ²⁺ キレート剤の影響	
2-3-3 巨核球のプリン受容体	
2-3-3-1 ATP応答の濃度依存性	
2-3-3-2 各種プリン受容体アゴニストの影響	
2-3-3-3 プリン受容体刺激による細胞内ストアからのCa ²⁺ の動員	
2-3-3-4 外液中二価陽イオンの影響	
2-3-4 プリン受容体アンタゴニストの作用	
2-3-4-1 ATP応答に対するsuraminの影響	
2-3-4-2 ATP応答に対するreactive bluesの影響	
2-3-4-3 ADP応答に対するsuraminとreactive bluesの影響	
2-4 考察	24
2-5 小括	27
第3章 ラット巨核球のATP誘発性細胞質カルシウムオシレーションのメカニズム	29
3-1 緒言	29
3-2 実験方法	29

3-2-1 細胞の調製	
3-2-2 溶液	
3-2-3 電気生理学的測定	
3-2-4 薬物	
3-3 結果	31
3-3-1 オシレーションに関与するカルシウムプール	
3-3-2 Protein Kinase C と Calmodulin の関与	
3-3-3 GTP 結合蛋白質の関与と cAMP の影響	
3-4 考察	39
3-5 小括	42
第4章 ラット巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーション に与える細胞内 pH 及びミトコンドリア脱共役剤の影響	44
4-1 緒言	44
4-2 実験方法	44
4-2-1 細胞の調製	
4-2-2 溶液	
4-2-3 電気生理学的測定	
4-2-4 細胞内 pH の測定	
4-2-5 薬物	
4-3 結果	47
4-3-1 巨核球の細胞内 pH 変化の影響	
4-3-1-1 巨核球における細胞内 pH の変化	
4-3-1-2 ATP 誘発性 K ⁺ 電流オシレーションに与える細胞内 pH の影響	
4-3-1-3 IP ₃ 誘発性 K ⁺ 電流オシレーションに与える細胞内 pH の影響	
4-3-1-4 GTP-γ-S 誘発性 K ⁺ 電流オシレーションに与える細胞内 pH の影響	
4-3-2 ミトコンドリア脱共役剤の影響	
4-4 考察	53
4-5 小括	56
第5章 ラット巨核球のプリン受容体作用の adenine による修飾	58
5-1 緒言	58
5-2 実験方法	58
5-2-1 細胞の調製	
5-2-2 溶液	
5-2-3 電気生理学的測定	

5-2-5 薬物	
5-3 結果	59
5-4 考察	62
5-5 小括	62

第6章 ラット巨核球の形態変化のセカンドメッセンジャーは カルシウムではなく cAMP である	64
--	----

6-1 緒言	64
6-2 実験方法	64
6-2-1 細胞の調製	
6-2-2 溶液	
6-2-3 電気生理学的測定	
6-2-4 セロトニンの定量	
6-2-5 走査型電子顕微鏡による観察	
6-2-6 薬物	
6-3 結果	66
6-3-1 Ca ²⁺ 動員	
6-3-2 セロトニンの放出	
6-3-3 形態変化	
6-4 考察	70
6-5 小括	71

第7章 総括	72
--------	----

略号	74
----	----

主論文	76
-----	----

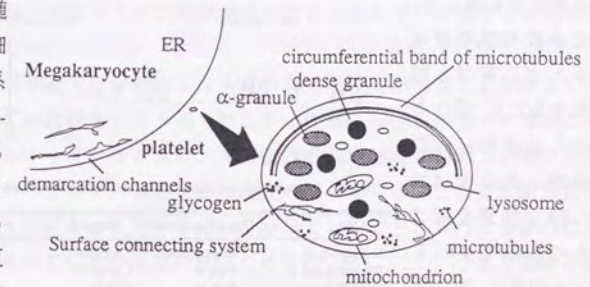
文献	77
----	----

謝辞	86
----	----

第1章 序論

人間をはじめとする動物は全身をめぐる血液によって各器官が維持されている。血液中には様々な細胞成分が含まれるが、中でも赤血球と並んで血中に特有かつ不可欠な成分が血小板である。血小板は血液凝固の主役であると同時に多数の細胞増殖因子などの生理活性物質を含み、生体が傷害を受けて出血をおこしたような場合に出血を止め、傷害部位の修復に関与する。さらに脳内出血や心筋梗塞などの重篤な循環系の疾患に関与することから、薬物治療のターゲットとしても注目されている。

血小板は骨髓の多分化能幹細胞から巨核球系の幹細胞 (CFU-M) を経て生じる巨核球からつくられるとされる (Fig. 1-1)。巨核球は骨髓中で成熟の際に細胞分裂を伴わない遺伝子複製により $2N$ から $64N$ にまで倍数性が増加し、細胞質もそれと同時に増



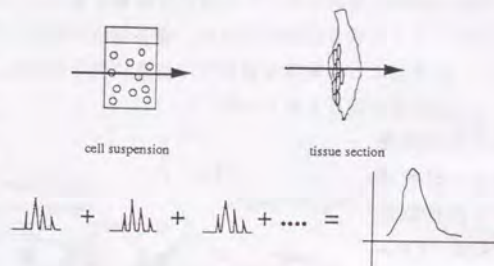
α-granule	dense granule	lysosome
platelet factor 4	adenine	acid hydrolase
PDGF	nucleotides	acid phosphatase
antiplasmin	serotonin	elastase
fibrinogen		etc.
etc.		

Fig.1-1 巨核球と血小板
巨核球の細胞質がちぎれる形で血小板が生成する。巨核球一個から約4000個の血小板が生じる。血小板の成分は巨核球由来である。血小板が活性化されると各種顆粒成分が放出される。

大するため、他の細胞と明確に判別できる直径 $50-70\ \mu\text{m}$ の巨大細胞になる。巨核球には細胞内に demarcation membrane system と呼ばれる発達した膜系が存在し、この膜はもともとは巨核球の細胞表面が陥落して生じたもので将来は血小

板の形質膜となるとされる¹⁾。従ってこの膜系は細胞外と連絡していて、巨核球の小胞体などの膜系とは異なる。生体内で巨核球は細長い偽足様の突起をのばし、それが切断されて血小板になるとされている²⁾。巨核球一つからはその大きさにもよるが4000-8000の血小板ができるとされる。しかし巨核球のdemarcation membrane systemが直ちに血小板の形質膜と同じ性質を持つとは限らず³⁾、血小板生成機構にはなお謎が多い。

血小板は核を持たないため自身で新規蛋白質を合成する能力は小さいとみなされること、血小板の膜の組成などが巨核球と類似すること⁴⁾などから基本的には巨核球と血小板は同じ様な性質を持つものとみなされることが多い。血小板の関与する病態の中でも血小板減少症は巨核球にその原因がある場合があり⁵⁾、巨核球の成長因子であるthrombopoietinやinterleukin-6などが血小板減少症治療薬として開発されつつある^{7,8)}。また近年神経伝達物質などの生理活性物質とし



(参考) Distribution and characteristics of cytosolic calcium oscillations

Cell	Detection system	stimulus	Period
Rat myocyte	Contraction	Caffeine	0.3-3
Parotid gland	Fura 2	Carbacol	5
Gonadotropes	Fura 2	GnRH	6
β cells	Fura 2	Carbamylcholine	12-25
Mouse oocyte	Aequorin	TPA	17-35
Rat hepatocytes	Aequorin	Vasopressin	18-240
Macrophages	Fura 2	Cell spreading	19-69
L cells	Ca^{2+} electrode	-	20
Smooth muscle	Fura 2	Phenylephrine or histamine	30-48
Fibroblasts(REF52)	Fura 2	Gramicidin + vasopressin	35-100
Endothelial cells	Fura 2	Histamine	40-125
B lymphocytes	Fura 2	Antigen	50-75
Hamster eggs	Aequorin	Fertilization	55
Sympathetic neurones	Fura 2	K^+ depolarization + caffeine	60-120
Sympathetic ganglion	K^+ current	Caffeine	ca. 120

From Berridge M. J. and Galione A., FASEB J., 2, 3074-3082, 1988

Fig. 1-2 single cell analysisとオシレーション
単一細胞レベルではオシレーションであっても総和として測定する
と一過性の反応として記録される

ても注目されるようになったアデニンヌクレオチド類の代謝においても血小板と巨核球が重要な役割を担っている⁹⁾。

さらに血小板は、動物やヒトから採取しやすいことなどもあって生化学的な解析の進んでいる細胞でもある。血小板は細胞内に蛋白質性の成分を多く含む α 顆粒と、アデニンヌクレオチド類やセロトニンなどを多く含むdense bodyとをもち、それらが刺激に応じて放出されて様々な生体反応を引き起こす。その分泌反応には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とprotein kinase Cの活性化が関与すること¹⁰⁻¹²⁾、アゴニストにはthrombinのような強いものやADPのような弱いものがあること、信号伝達経路にアラキドン酸代謝が関与することなどが知られている¹³⁾。このように血小板をめぐる話題は極めて多様で重要なものが多いが、血小板の性質から単一細胞レベルでの研究はわずかしかなか¹⁴⁾、必ずしも進んでいるとはいいがたい。

近年細胞の生理機能を単一細胞レベルで解析する技術が発達し、それまで全体としてとらえていた場合には予測されなかった様々な性質が個々の細胞にあることが知られるようになってきた。非興奮性細胞の細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度の周期的変化(オシレーション)もそうした現象の一つである。たとえば細胞懸濁液や組織の断片を試料として用いる場合、結果として得られるのは全体の総和としての反応であって個々の細胞の反応ではない(Fig. 1-2)。つまり個々の細胞ではオシレーションがおこっていても、周期が完全に一致しない限り総和としてみれば一過性の上昇になる。従ってこれまで単純に一過性の上昇といった反応が報告されてきた系でも単一細胞レベルで解析してみれば違った結果が得られる可能性がある。実際非興奮性細胞の Ca^{2+} オシレーションに関してはその報告は年々増えていて¹⁵⁻¹⁹⁾、現在では特殊な反応とはみなされていない。

Ca^{2+} オシレーションは細胞が刺激に応じて細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を周期的に繰り返す現象であり、筋細胞や神経細胞などの興奮性細胞ではかなり以前から認められていた。しかしこれらの興奮性細胞の場合は発達した Ca^{2+} チャンネルを介して細胞外から Ca^{2+} が流入するのがおもなメカニズムであり、非興奮性細胞の場合とは異なる。非興奮性細胞の Ca^{2+} オシレーションには IP_3 による細胞内 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} の放出が関わっていて、一般的には刺激の強さは振動の

頻度に換算され、 Ca^{2+} 濃度が特に高くなる訳ではない。つまり低濃度のアゴニストでも酵素などの活性化に十分な Ca^{2+} 濃度の上昇が確保され、高濃度でも細胞に毒性のあるようなレベルにまで Ca^{2+} 濃度が上昇することはないという点で極めて精巧なシステムといえる。この現象を説明するモデルもいくつかあり^{20,21)}、細胞により異なるものの典型的にはIP濃度が振動するかしないか、 Ca^{2+} プールが複数か単数かなどのパターンに分類できる。

ところで単一細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、 Ca^{2+} 感受性の色素を用いた画像解析法や微小電極を用いる whole-cell patch-clamp 法などで行われてきた。Whole-cell patch-clamp 法は Horn ら²²⁾により perforated patch 法が報告されたことでさらに洗練された技術になった。この方法は、従来の whole-cell 法で

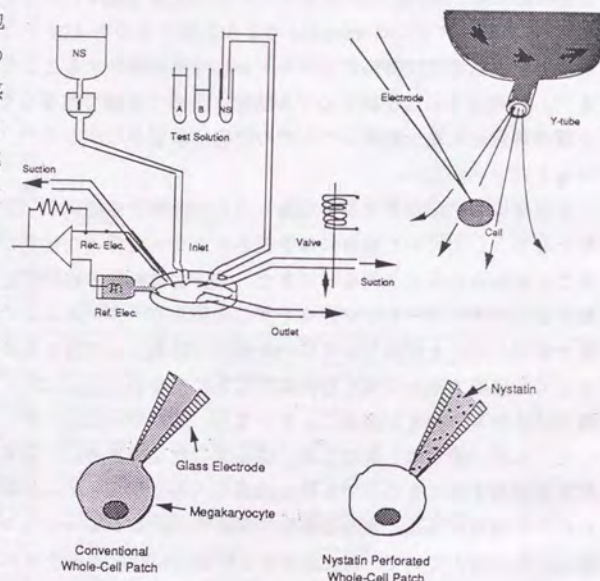


Fig. 1-3 実験方法
巨核球の電氣的応答を nystatin-perforated whole-cell patch clamp 法で記録した。薬物の投与は上の図に示した Y-tube 法で行った。Y-tube 法により細胞外液を 20ms 以内に交換できる。

は細胞膜を破って細胞内と電極内を通電させるのに対して、一価イオン透過性の ionophore である nystatin を電極内液に使うことで細胞膜に小孔を開けて電極と細胞を通電するもので、細胞内分子のピペット内への拡散による消失が起こらないという利点を持つ。従って nystatin perforated 法はこれまで研究しにくいとされてきたセカンドメッセンジャーを介する反応などに有効である。これまでどちらかといえば膜そのものの性質であるチャンネルなどが patch-clamp 法の得意分野であるとされてきたが、この方法により個々の細胞の生理的応答を、チャンネルの開閉を指標に解析できるようになったといえる。

さらに本研究では細胞に薬物を投与する方法として Y-tube 法 (Fig. 1-3) を採用した。この方法は神経細胞の早い応答を解析するために考案されたもので、細胞外液の交換が 20 ms で完了する^{23,24)}。Patch-clamp 法では画像解析法とは違って位置情報は得られないものの画像をとるための時間的な制約がないため、記録は連続的にできる。従って Y-tube との組み合わせで時間分解能の極めて高い測定が可能である。

こうした事情を背景に、本研究では巨核球のアゴニスト応答を、主に nystatin-perforated whole-cell patch-clamp 法を用いて解析した。なお巨核球の単一細胞レベルでの解析は他の方法で既にいくつか報告があり^{25,26)}、それらの結果との比較も焦点のひとつとなる。

第2章 ラット巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーションとプリン受容体の性質

2-1 緒言

血小板は血液凝固の必須因子で心血管系の疾病において極めて重要な役割を果たす¹⁾。しかしその大きさが小さいことやわずかの刺激で凝集してしまうことなどの性質により、単一細胞レベルでの研究は少ない²⁾。そこで血小板の代わりに、その前駆細胞である巨核球を用いることもある。血小板と巨核球はセロトニンの取り込み³⁾や食作用⁴⁾、アゴニスト^{5,6)}やプロテオグリカン組成⁷⁾などが共通であると報告されているためである。

本研究では perforated patch-clamp 法を巨核球に適用し、この細胞がプリン受容体刺激により周期的 K⁺電流の活性化を示すことを見いだした。この反応は細胞内 Ca²⁺の振動により引き起こされるものと考えられ、極めて興味深い。さらに受容体の性質について調べ、これまで知られていなかったプリン受容体が存在する可能性を示唆した。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞の調製

体重 250-300g の雌雄 Wistar ラットを過剰量のジエチルエーテルで麻酔し、頸動脈切断により屠殺した。大腿骨を単離し、注射筒と針を用いて標準外液で洗浄することにより骨髓液を得た。75 μ m のナイロンメッシュで濾過して細胞の塊をのぞいた後、細胞懸濁液を記録用チャンバー (Falcon, Primaria tissue culture dish) に移した。記録用チャンバーは室温で数時間放置し、細胞が底に固着するのを待った。巨核球は位相差顕微鏡下ではその大きさから (40-50 μ m) 容易に識別可能である。細胞の記録は単離後 8 時間以内に行った。

2-2-2 溶液

標準外液の組成は、150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM glucose, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperidine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) で、pH を tris(hydroxymethyl)aminoethane (Tris)-OH で 7.4 に調整した。カルシウムフリーの細胞外液には 2mM ethyleneglycol-bis-(β -aminoethylether)N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) を加えた。Perforated patch のピペット内液の組成は、50mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.2 で、conventional whole cell patch のピペット内液は、150mM KCl, 2mM ATP-Mg, 10 mM HEPES, 0.3 または 1mM EGTA である。Nystatin は 1N HCl で pH を 2 にした酸性メタノールに溶解し、KOH で pH を 7.2 に調整して 10mg/ml のストック溶液を作成した。このストック溶液をピペット内液に最終濃度 50-100 μ g/ml に溶解して実験に用いた。

2-2-3 電気生理学的測定

巨核球の全細胞電流は Horn らによる方法⁸⁾に従って室温 (21-24°C) で nystatin perforated 法により記録した。実験により conventional whole-cell patch clamp 法⁹⁾も用いた。ピペットは 1.5mm の細管 (ナリシゲ) から二段階にピペットブロー (ナリシゲ, PB-7) で引いて作成し、先端を fire polish した。ピペット溶液を満した記録電極とレファレンス電極との間の電気抵抗は 5-10 Ω であった。Perforated patch-clamp モードでのアクセス抵抗は 4min 以内には安定し、その値は conventional whole-cell モードの場合と同様であった。電流と電圧の測定にはパッチクランプアンプ (List, EPC7) を使い、同時にペンレコーダー (三栄, RECTI-HORIZ-8K) で記録し、電気信号をデジタルオーディオプロセッサでデジタル方式に変換した後ビデオカセットレコーダー (三菱, VH-F32) で記録・保管した。

2-2-4 薬物

ATP、ADP、ATP- γ -S、AMP、AMP-cpp、quinine、quinidine、iberiotoxin、apamin、及び nystatin は Sigma Chemical、adenosin は和光純薬工業製のものを使用した。UTP は Boehringer Mannheim、2-methylthioATP は RBI Biochemicals、HEPES、

1,2-bis(O-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA)-AM 及び sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI)-AM は同仁化学、pluronic F-127 は Molecular Probes (USA) から購入した。各薬物は標準外液に溶解してその日のうちに使った。ATP 及びその関連化合物は pH を調整し直してから使用した。

薬物の投与は Y-tube 法により行った^{14,15)}。実験中、薬物を投与するためのマイクロピペットの先端は細胞から約 500 μ m の距離に置いた。この方法により、単離巨核球の周辺の溶液を 20ms 以内に交換できる。

2-2-5 データ解析

EC50 値は薬物の用量-反応曲線から計算した。計算法の詳細は、中川らの論文¹²⁾による。pD2 は $-\log EC_{50}$ である。

ATP⁴⁻濃度の計算は Dahlquist ら¹³⁾のデータを用いた Cockcroft らの方法¹⁴⁾に基づき、温度条件の違いを Taqui Khan らの求めた平衡定数¹⁵⁾を利用して補正した。計算式は

$$[ATP^4] = [ATP(\text{total})] / (10^{3.97} [Ca^{2+}] + 10^{4.22} [Mg^{2+}]) \cdots (1)$$

式(1)はこの実験条件下で ATP が ATP⁴⁻として存在し、ATP⁴⁻ + M²⁺ (metal²⁺) \leftrightarrow (ATP-M)²⁻の反応に対し、 $\log K(Ca^{2+}) = 3.97$, $\log K(Mg^{2+}) = 4.22$ として求めた。式(1)は (ATP-M)²⁻ \equiv ATP(total), $Ca^{2+}(\text{free}) \equiv Ca^{2+}(\text{total})$, $Mg^{2+}(\text{free}) \equiv Mg^{2+}(\text{total})$ の近似を含む。この近似は $[ATP(\text{free})] \ll [(ATP-M)^{2-}]$, $[(ATP-Ca)^{2-}] \ll [Ca^{2+}(\text{free})]$ および $[(ATP-Mg)^{2-}] \ll [Mg^{2+}(\text{free})]$ の時に成り立つ。今回の実験条件下では ATP に対して二価陽イオンの濃度は大過剰なのでこれらの条件が成り立つ。

2-3 結果

2-3-1 巨核球の ATP 誘発性外向き電流の性質

2-3-1-1 ATP 誘発性外向き電流オシレーション

perforated patch 法の電流固定条件下では巨核球の平均静止電位は -45 ± 5 mV であった (n=11)。この値は河により conventional 法で報告されたもの¹⁶⁾ とほぼ等しい。10 μ M の ATP を投与すると膜電位は自発的に -43 ± 6 から -79 ± 5 mV に反復的に過分極した (n=5)。試験に用いた細胞 155 のうち 141 個が ATP に応

答して電圧固定条件下で振動性の外向き電流を生じた。Fig. 2-1A に ATP 誘発性電流の例を示す。この周期的外向き電流は ATP 投与直後にみられ、薬物の除去により直ちに消失する。希に ATP 刺激なしでも自発的に周期的過分極をおこす細胞がみられた。また Fig. 2-1 に示すように電流のベースラインが 50 pA 程度変動する場合もあった。河の報告にもあるように巨核球のアゴニスト感受性に差があるため、感受性の違う細胞のアゴニストに対する相対反応強度を比較するためデータは 10 μ M ATP で誘発される反応を 1 として補正したものである。Fig. 2-1A に示すように 'Iperiod' は各外向き電流スパイクの幅、'delay' は二つのスパイクの間隔を意味する。ATP を長時間投与すると delay が徐々に長くなる (Fig. 2-1D)。電流の大きさと Iperiod は最初の一分間ほどは減衰するがその後は比較的一定値を保つ (Fig. 2-1B,C)。ATP の長時間投与により反応が消失してもさらに高濃度の ATP を投与すれば振動性の反応が再度観察される。さらに ATP を除去して標準外液でしばらく放置することによっても反応性は回復する。従ってこうした減衰は受容体脱感作によるものと考えられる。

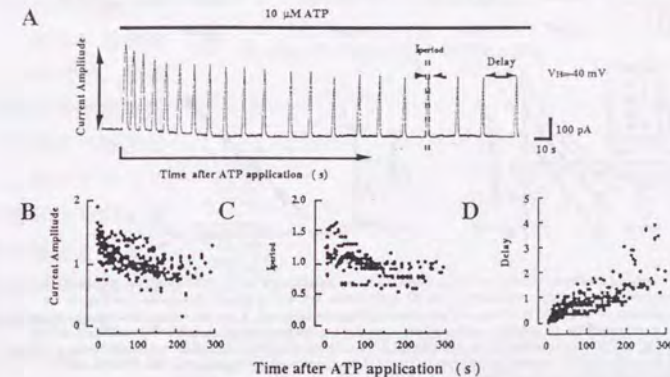


Fig. 2-1. ATP-induced oscillatory outward currents in rat megakaryocyte under voltage-clamp condition. A, oscillatory outward currents during a continuous application of 10 μ M-ATP. ATP was applied during a period shown by horizontal bar. The holding potential (V_h) was -40 mV. Double-heads arrows indicate the definition of current amplitude, delay and channel opening time (I_{period}). The ' I_{period} ' is the width of each current and the 'delay' is a time between two current peaks. B, relationship between current amplitude and ATP application time. C, relationship between I_{period} and ATP application time. D, relationship between delay and ATP application time. In B, C and D, each value was normalized to each value obtained by 10 μ M-ATP-application for 30 s. Data were obtained from seven cells.

Fig. 2-2A に外液 K^+ 濃度 5mM で保持電位 (V_H) を変えたときの ATP 誘発性電流 (I_{ATP}) を示す。周期的電流は V_H が -100、-60、-40、-20mV の時観察される。Fig. 2-2B には内液 K^+ 濃度が一定 ($[K^+]_i=150mM$) で外液 K^+ 濃度を変えたとき ($[K^+]_o=5, 10, 20, 50mM$) の電流-電圧 ($I-V$) 相関を示す。各 $I-V$ 曲線の電圧ゼロの値から I_{ATP} の反転電位 (E_{ATP}) を読みとると、 $[K^+]_o$ が 5, 10, 20, 50mM のときそれぞれ -82.3, -60.8, -45.5, -23.5mV であった。これらの E_{ATP} 値は Nernst の方程式から計算される K^+ の平衡電位 ($[K^+]_o$ が 5, 10, 20, 50mM のときそれぞれ $E_K=-85.0, -68.0, -50.0, -27.0mV$) に極めて近く、 $[K^+]_o$ が 10 倍変化したときの E_{ATP} の変化は 59.9mV であった (Fig. 2-2C)。以上の結果から巨核球の ATP 誘発性の振動性電流は K^+ により運ばれると結論できる。

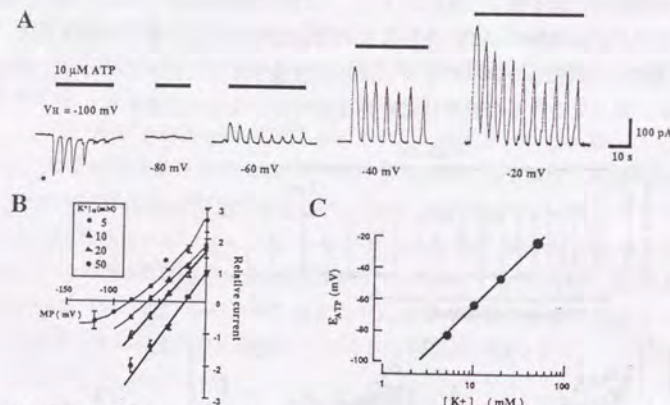


Fig. 2-2. ATP-induced oscillatory currents at various external K^+ concentration ($[K^+]_o$). A, ATP-evoked oscillatory currents recorded in standard external solution containing 5 mM K^+ at V_H s from -100 mV to -20 mV. Horizontal bars indicate the duration of application of 10 μM ATP. All records were obtained from the same cell. B, current-voltage ($I-V$) relationships for ATP response at various $[K^+]_o$. All current amplitudes were normalized to the peak amplitude of the first oscillatory current induced by 10 μM ATP in external solution containing 5 mM K^+ at a V_H of -40 mV (*). Each point represents the mean S.E.M. of four to five measurements. C, relationship between E_{ATP} and $[K^+]_o$. Each point is the average of five to seven cells. A straight line has a slope of 59.9 mV for a 10-fold change in $[K^+]_o$.

2-3-1-2 conventional 法と nystatin 法との比較

1990 年に河が conventional whole-cell 法でモルモット巨核球の ADP 誘発性外

向き電流について報告しているが、その形が nystatin perforated whole-cell 法で得られるものと異なり、一過性電流であるとされる。nystatin 法でモルモット巨核球の ATP または ADP 応答を記録するとラットの場合と同じ振動性電流が観察され、ラット巨核球は ATP でも ADP でも振動性電流を生じる。そこで河の用いたものと同じ EGTA を含むピペット内液を用いて conventional 法でラット巨核球の ATP 応答を記録してみた。結果を Fig. 2-3A に示す。

ピペット内液が

細胞内に十分拡散

するように、記録

は whole-cell モード

確立の 3 分後から

行った。この条件

下では ATP は河の

報告したような単

相性の電流を示し

た。さらに高濃度

の ATP では、単相

性電流の持続時間

と大きさが増加し

た。またピペット

内液中の EGTA 濃

度を増加させると

用量-反応曲線が高

濃度側に移動する。

さらに Fig. 2-3A の

矢印で示したよう

に、ATP 応答が比

較的大きいときは

ATP を洗浄した

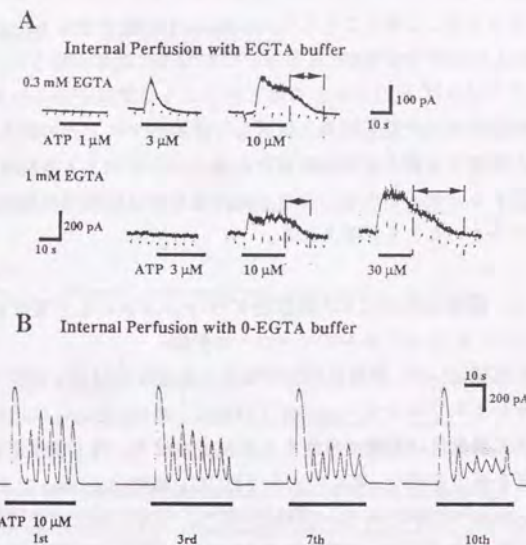


Fig. 2-3. Comparison of conventional (A) and nystatin-perforated (B) whole-cell patch preparations. A, current traces obtained by conventional whole-cell mode with pipette filled with internal solution containing 0.3 mM EGTA (upper panel) or 1.0 mM EGTA (lower panel). Recordings were obtained at least 3 min after establishment of whole-cell configuration. The V_H was -40 mV and hyperpolarizing pulses to -60 mV were superimposed every 4 s. Closed horizontal bars under the current traces indicate a period of ATP application. Application of ATP was repeated at 2 min interval. Double-headed arrows indicate the residual current after removal of ATP. The current traces in the same row were obtained from the same cell, and they are typical ones from 3 cells examined. B, current traces obtained by whole-cell mode with EGTA-free internal solution at a V_H of -40 mV. ATP was applied repeatedly during the period indicated by closed horizontal bars. The current traces shown here are from single cells and typical ones of four experiments.

後も電流がテイリングとして残存する。nystatin 法では K^+ 電流は薬物の洗浄により直ちに消失するのでこのような現象はみられない。

さらに細胞内を EGTA で灌流する事の影響を調べるため、EGTA を含まないピペット内液を用いて conventional 法で whole-cell 電流を記録した (Fig. 2-3B)。この条件では ATP は最初のうちは nystatin 法の場合とほとんど同じ振動性の電流を示した。繰り返し反応させるうちに徐々に電流の形は変化するが、これは細胞内高分子がピペット内に拡散していったための、いわゆる run-down 現象と考えられる。しかしこうして run-down した場合でも tailing はみられない。また EGTA の代わりに BAPTA を用いても同様の結果が得られ、EGTA 濃度を $30\mu M$ まで下げれば EGTA なしの時と同じような電流がみられる。EGTA や BAPTA は細胞内の Ca^{2+} 緩衝作用と拮抗して細胞内での Ca^{2+} の動きを阻害する。従って、河の報告と今回の実験の結果との違いは、ピペット溶液中の Ca^{2+} キレート剤に起因すると考えられる。またこの結果からは巨核球の細胞内 Ca^{2+} 緩衝能力が比較的小さいことも示唆される。

2-3-2 振動性電流は Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルにより運ばれる

2-3-2-1 K^+ チャンネルブロッカーの影響

巨核球の ATP 誘発性振動性電流の薬理学的性質を検討した。 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルブロッカー-quinine ($100\mu M$) は Fig. 2-4Aa に示すように ATP 誘発性電流の頻度には影響せず大きさを減少させた。同じ濃度範囲で quinidine もまた電流を減少させた。電流の大きさは $100\mu M$ の quinidine で $72 \pm 6\%$ ($n=4$)、 $100\mu M$ の quinine で $70 \pm 5\%$ ($n=4$)抑制された。一方で低伝導度 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルブロッカー-apamin は最大 $1mM$ まで使っても ATP 誘発性の K^+ 電流に影響を与えなかった (Fig. 2-4Ab)。高伝導度 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルブロッカー-iberiotoxin も $100nM$ で全く影響なかった。tetraethylammonium ($30nM$)、4-aminopyridine ($10\mu M$) も作用はなかった ($n=4$ データは図示しない)。

2-3-2-2 Ca^{2+} キレート剤の影響

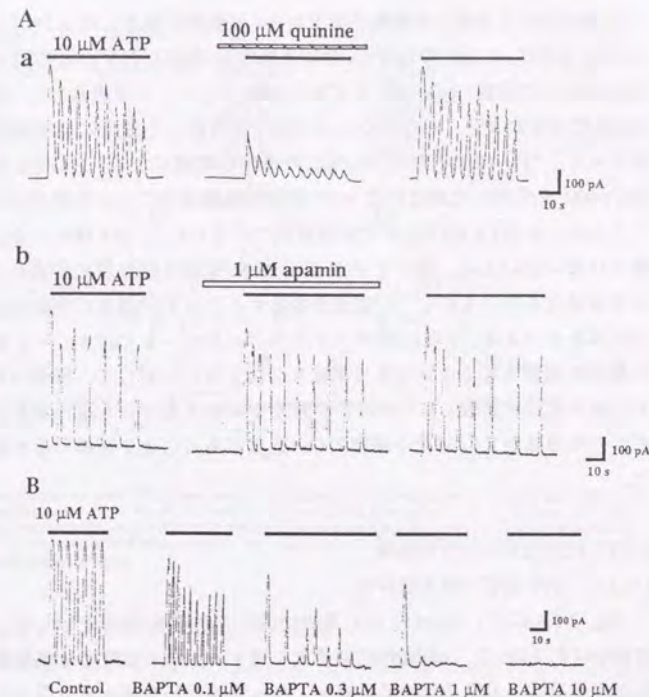


Fig. 2-4. Effects of Ca^{2+} -activated K^+ channel blockers (A) and BAPTA (B) on the ATP-induced oscillatory K^+ outward currents. Horizontal bars above each current trace indicate a period of drug application. A, the K^+ channel blockers were pretreated for 30 s before the simultaneous application with $10\mu M$ -ATP. Aa, inhibitory effects of $100\mu M$ -quinine. Ab, effect of $1\mu M$ -apamin. Recordings of a and b were obtained from different cells. B, each concentration of BAPTA-AM was loaded for 1 hr at room temperature. After wash out extracellular BAPTA-AM, megakaryocytes were left for at least 30 min to allow completely hydrolyze remaining acetoxymethyl ester. BAPTA-AM was dissolved with dimethylsulfoxide (DMSO) and mixed well with $1\mu l$ of surfactant (Pluronic) before adding to the standard external solution containing isolated megakaryocyte. Three to five cells in each dish were examined, and typical current traces were shown in this figure.

既に河が ADP 誘発性 K^+ 電流は細胞内 Ca^{2+} 依存性であることを示唆しているが、この K^+ 電流が細胞質の Ca^{2+} 濃度に依存することを確認する必要がある。そこでまず膜透過性の Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM で細胞内遊離 Ca^{2+} をキレート

した。BAPTAを負荷した細胞ではBAPTAの濃度に依存してATP応答が消失した (Fig. 2-4B)。0.1 μ MのBAPTAでは振動性K⁺電流はわずかに抑制され、0.3 μ Mではかなりの抑制、1 μ Mではわずかに最初のスパイクが残るのみで振動は消失、10 μ Mでは電流が全くみられない。BAPTAを負荷した細胞に高濃度のATPを投与すると、Fig. 2-3Aのような幅広の単相性電流になる。BAPTAの代わりにSBFI-AMを負荷した場合にはATP誘発性振動電流になんら変化がみられないことから、BAPTAの作用はCa²⁺結合性によるものでAM体による非特異的影響ではないといえる。従ってATP誘発性K⁺電流は細胞質Ca²⁺濃度の増加によって活性化されるもので、K⁺電流が振動するのはCa²⁺濃度の振動を反映するものであるといえる。さらにK⁺チャンネルブロッカーとCa²⁺キレート剤は前者がK⁺電流の頻度を変えないままに電流を抑制するのに対して、後者は電流の大きさにはそれほど影響しないが振動の頻度を抑制するという違いがあって、それぞれの作用点がK⁺伝導度と細胞内Ca²⁺動員にあることを明確に示す結果となった。

2-3-3 巨核球のプリン受容体

2-3-3-1 ATP応答の濃度依存性

Fig. 2-5Aに0.1-10 μ MのATP濃度で誘発されるK⁺電流を示した。この反応の閾値は約1 μ Mで、10 μ M付近で最大に達する。反応強度には細胞間でばらつきがあるため、ATP 10 μ Mでの値を1として補正したデータを用いて用量相関性について解析した。「頻度」は1秒あたりに観察される外向き電流の数、「最大電流 (I_{max})」は最大の電流値 (通常最初のスパイク)、「遅延時間 (latency)」はATP投与から最初の電流が観察されるまでの時間を意味する。ATP濃度の増加に依存して頻度が増加し、遅延時間は短縮し、最大電流は増加する (Fig. 2-5B,C,D)。変化の程度が最も大きいのは頻度で、反応強度の指標としては頻度が適当であると考えられる。

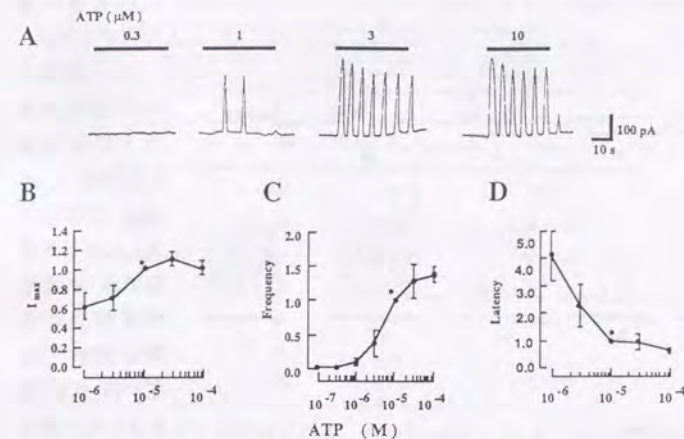


Fig. 2-5. Concentration-dependent ATP-induced oscillatory K⁺ currents. A, the oscillatory K⁺ currents induced by ATP at various concentrations at a V_H of -40 mV. The recordings were obtained from the same cell. In the lower panel, the maximum current amplitude (B), latency (C) and frequency (D) were plotted as a function of ATP concentration. Each point represents the mean normalized values of five to seven measurements. The point used as standard was indicated by a symbol (*) in the respective figures.

2-3-3-2 各種プリン受容体アゴニストの影響

ラット巨核球はADPにも応答するため、ADPの用量-反応性についても解析し、ATPの場合及び河の報告と比較した。Fig. 2-6Aに示すように用量に依存して頻度と最大電流が増加し、遅延時間が減少するというパターンはATPの場合と同様であった。しかしFig. 2-6Bに示すようにATPに比較してADPの作用強度は約30倍であった (ADPのEC₅₀は0.1 μ M、ATPのEC₅₀は3.1 μ M)。さらにその他のプリン受容体アゴニストの影響についてTable 2-1にまとめた。最も強力なアゴニストは2-methylthioATPで、次がADP、そしてATP- γ -Sと続く。Adenosine、UTP、AMP-CPPは1mMまで投与しても作用がみられなかった。ATPの非加水分解性の類似体であるATP- γ -SがATPより強い作用を示したことから、ATPが細胞表面でectoATPaseによりADPに変換されて作用しているという可能性は否定される。また有効なアゴニスト間で誘発される最大電流や最大頻度

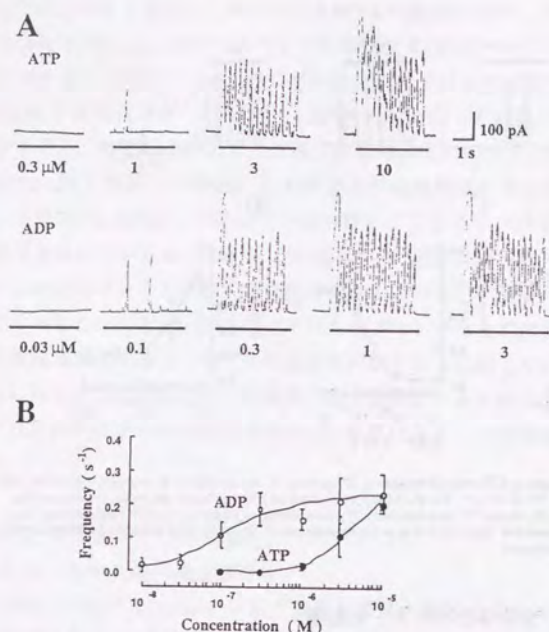


Fig. 2-6. Concentration-dependency of the oscillatory K^+ outward currents induced by ADP and ATP. A, typical oscillatory K^+ outward currents activated by ATP (upper panel) and ADP (lower panel). All recordings were obtained from the same cell. Horizontal bars indicate the application period of each agonist. B, concentration-response relationships of ATP (●) and ADP (○) to the maximum frequency. Each point and bar indicate the average frequency and the range of measured values, respectively. Number of measurements was four to seven for each point.

は種差によるものではない。

には有意の差はなかった。

河の報告によればモルモット巨核球は $1-100 \mu M$ の ADP に応答する。しかし本研究では K^+ 電流の活性化に必要な ADP の濃度は約 $1/30$ である。モルモットの巨核球を用いても今回の実験条件では $0.1 \mu M$ の ADP が K^+ 電流オシレーションを誘発できることを確認している。従って河の報告との結果の違い

Fig. 2-6 及び Table 2-1 のデータからは巨核球のプリン受容体の性質が既知の

Table 2-1. Oscillatory K^+ outward currents induced by purinoceptor agonists. Effects of various purinoceptor agonists on megakaryocytes. Frequency and amplitude of oscillatory K^+ outward currents were normalized to those of ATP ($10 \mu M$)-induced ones [max frequency, $0.21 \pm 0.02 \text{ sec}^{-1}$ ($n=7$), max amplitude, $637.5 \pm 68.8 \text{ pA}$ ($n=8$)]. Each value represents mean \pm S.E.M. from four to eight cells. pD₂ was calculated as described in Methods. n, number of cells.

	n	pD ₂	maximum frequency	I _{max}
ATP	8	5.51	1.0*	1.0*
ADP	8	6.98	1.07 ± 0.09	1.05 ± 0.06
2-methylthioATP	5	8.02	1.20 ± 0.17	0.95 ± 0.07
adenosine	5	<3	—	—
UTP	5	<3	—	—
AMP-CPP	5	<3	—	—
ATP-γ-S	4	5.90	1.30 ± 0.20	0.97 ± 0.02

ものとは異なることが示唆される。しかし ATP と ADP が別々の受容体を刺激しているという可能性があるため、ATP と ADP の cross-desensitization について調べた。Fig. 2-7A に示すように ATP や ADP を繰り返し投与することにより脱感作を起こさせ、そのあとで ADP または ATP を投与するといずれの場合も反応は見られない。ATP や ADP の投与の順番を変えても結果は同じである。一方 Fig. 2-7B に示すように ADP の連続投与で反応が消失した後、ATP をさらに投与してもなんの反応も見られないが、thrombin は K^+ 電流オシレーションを誘発する。従って Fig. 2-7 に示したような脱感作は細胞内 Ca^{2+} ストアのレベルで起こるのではなく、受容体レベルで起こっているといえる。これらの結果からは ATP と ADP は受容体を共有すると考えられる。なお Fig. 2-7 に示した細胞は比較的早く脱感作を起こす例で、通常の細胞は脱感作のためにはより長時間の投与を必要とする。

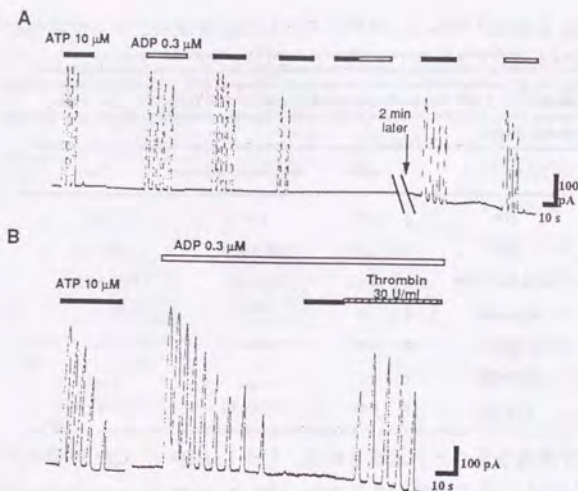


Fig. 2-7. Desensitization of purinergic receptor by ATP and ADP. A, ATP 10 μ M was applied repeatedly with little application interval. When the ATP response diminished, ADP 0.3 μ M was applied immediately. B, ADP was continuously applied till the response diminished, then ATP 10 μ M and thrombin 30 unit/ml was applied successively in the presence of ADP. Drugs were applied during the period indicated by each horizontal bars. Each current trace was a typical one from three experiments.

2-3-3-3 プリン受容体刺激による細胞内ストアからの Ca^{2+} の動員

Fig. 2-8 に示すように振動性の K^+ 電流は細胞外液中 Ca^{2+} が存在しないときにも観察される。この場合、振動性電流は通常の脱感作の時より早く消失し、消失後はたとえ長時間後でも、高濃度でも ATP の再投与による反応は見られない (Fig. 2-8B)。しかし細胞外液に Ca^{2+} を添加することにより反応性が回復する。また Fig. 2-8C に示すように Ca^{2+} チャンネルブロッカーである 10 mM LaCl_3 の存在下でも ATP 誘発性の K^+ 電流オシレーションは観察される。従って La^{3+} 感受性の Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} の流入は K^+ 電流の誘導には必要ではない。これらの結果からは、振動性の K^+ 電流は細胞内 Ca^{2+} ストアから放出された Ca^{2+} により活性化され、 Ca^{2+} ストアの Ca^{2+} を再補給するには細胞外の Ca^{2+} が必要で

あるといえる。

池田ら¹⁷⁾は巨核球の ADP 誘発性細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇を 5mM の Ni^{2+} が阻害することから Ni^{2+} 感受性の Ca^{2+} チャンネルが反応に関与すると報告している。本実験条件下でも Fig. 2-9A に示すように 5mM の Ni^{2+} と 100 μ M の La^{3+} は ATP 誘発性の K^+ 電流オシレーションを抑制する。しかしこの結果は必ずしも Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} の流入が反応に関与することを示さない。なぜならば Fig. 2-9B に示すように 100 μ M の La^{3+} は外液 Ca^{2+} がなくても ATP 誘発性の K^+ 電流オシレーションを抑制するからである。5mM Ni^{2+} も細胞外 Ca^{2+} フリーの条件下で反応を抑制する。従ってこれら金属イオンのプリン受容体応答の抑制作用は Ca^{2+} チャンネルの阻害活性とは関係がないと思われる。

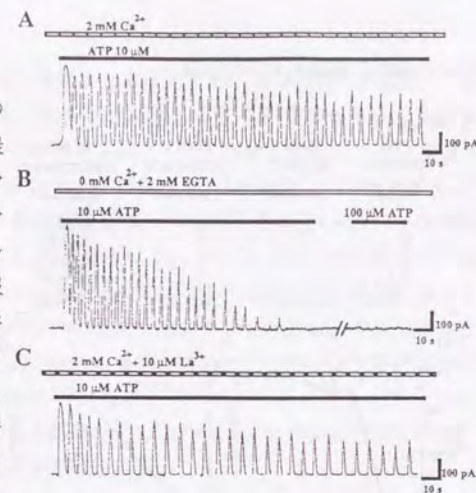


Fig. 2-8. Effect of extracellular Ca^{2+} influx on the ATP-induced oscillatory K^+ outward currents. Standard external solution was substituted by individual external solutions before the application of ATP. ATP was applied during a period indicated by filled horizontal bar. A, ATP-induced oscillatory K^+ outward currents in normal external solution containing 2 mM- Ca^{2+} . B, ATP responses in Ca^{2+} -free EGTA external solution. C, typical current trace in the presence of 10 μ M- La^{3+} .

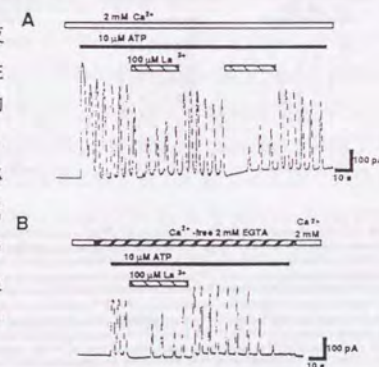


Fig. 2-9. Effect of high concentration of La^{3+} on ATP-induced currents in 2 mM- Ca^{2+} containing external solution (A) and in Ca^{2+} -free solution (B). The drugs were applied during a period indicated by each horizontal bars. Each current traces was a typical one from three experiments.

2-3-3-4 外液中二価陽イオンの影響

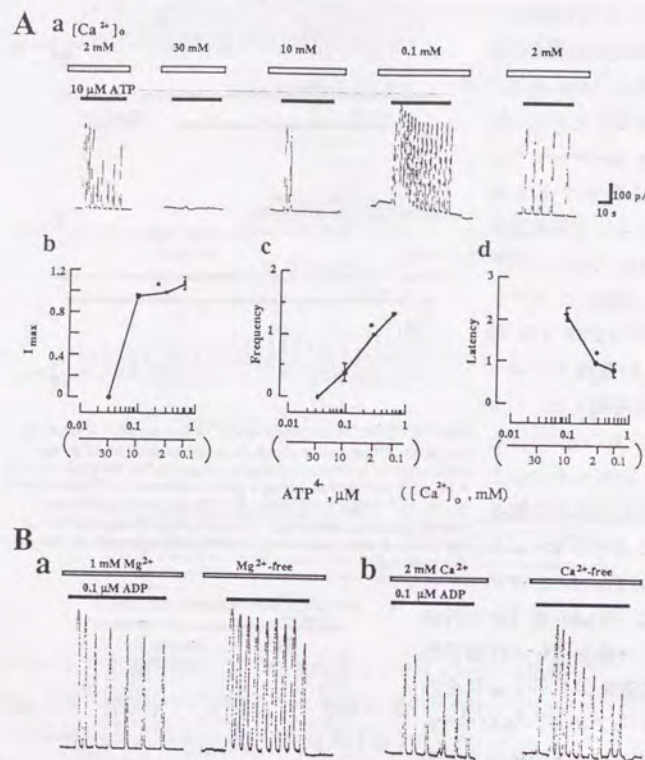


Fig. 2-10. A, Effect of extracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) on the ATP-induced oscillatory K^{+} currents. a, typical current traces in each condition from single cell. Standard external solution was substituted by test solutions which have various $[\text{Ca}^{2+}]_o$ before the application of ATP. b, relationship between maximum current amplitude (I_{max}) and $[\text{Ca}^{2+}]_o$. c, relationship between frequency and $[\text{Ca}^{2+}]_o$. d, relationship between latency and $[\text{Ca}^{2+}]_o$. In b, c and d, each point represents the mean normalized value of five to seven measurements. The point used as standard was indicated by a symbol (*) in the respective figures. The concentrations of ATP^{4-} were calculated by the equation described in Methods. B, Effect of extracellular Mg^{2+} (a) and Ca^{2+} (b) concentration on the ADP-induced oscillatory K^{+} current. Standard external solution containing 1 mM Mg^{2+} and 2 mM Ca^{2+} was substituted by test solutions without each of divalent cation before the application of ADP as indicated by open horizontal bars. ADP was applied during the period indicated by closed horizontal bars. The current traces indicated here are the typical ones from four experiments.

Fig. 2-8 で示したように外液 Ca^{2+} フリーでは ATP 応答が増強されるように見

える。そこで $10 \mu\text{M}$ ATP で誘発される反応に対する細胞外 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) の影響について検討した。Fig. 2-10 に示すように K^{+} 電流の I_{max} 、頻度、遅延時間のいずれもが $[\text{Ca}^{2+}]_o$ に依存して変化した。 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ の増加は ATP 濃度の減少に等しい作用を示す。同様の $[\text{Ca}^{2+}]_o$ 依存性が ATP^{4-} をアゴニストとする J744 マクロファージ¹⁸⁾ とラット腹腔肥満細胞¹⁴⁾ でも報告されているため、本実験条件での ATP^{4-} 濃度を計算した。その結果は Fig. 2-10 に示す。ATP 誘発性の反応は ATP^{4-} の濃度に依存していることがわかる。同様の結果が細胞外 Mg^{2+} 濃度を変えたときにもみられ、 $10 \mu\text{M}$ ATP の作用は細胞外に Ca^{2+} と Mg^{2+} の両方が存在しないときに最も強くなる。 $1 \mu\text{M}$ ADP の反応も細胞外二価陽イオン濃度が減少することにより増強され、二価陽イオン濃度がゼロのときにもやはり ATP よりも ADP の方が作用が強い。これらの結果からは ATP と ADP の実際のアゴニストの形は ATP^{4-} と ADP^{3-} であることが示唆される。

2-3-4 プリン受容体アンタゴニストの作用

2-3-4-1 ATP 応答に対する suramin の影響

プリン受容体アンタゴニストとして知られる薬物の巨核球プリン受容体に対する作用を検討した。Fig. 2-11 に示すように非選択的 P_2 受容体アンタゴニストとして知られる suramin は ATP 誘発性の K^{+} 電流オシレーションの頻度と電流を用量依存的に抑制する。suramin の作用は先に ATP を投与した場合でも直ちに観察され、細胞を長時間処理しても特に作用強度に変化はみられない。Fig. 2-11b には suramin の用量依存性を、Fig. 2-11c には suramin $3 \mu\text{M}$ による ATP の用量-反応曲線のシフトについて示した。suramin の $10 \mu\text{M}$ ATP に対する阻害作用は $1 \mu\text{M}$ からみられ、その作用は頻度に最も良く反映されるので頻度を指標にした場合の suramin の IC_{50} は $2.3 \pm 1.2 \mu\text{M}$ である。また suramin $3 \mu\text{M}$ 存在下では ATP の EC_{50} が $2.9 \pm 1.0 \mu\text{M}$ から $8.8 \pm 1.5 \mu\text{M}$ にシフトした。

2-3-4-2 ATP 応答に対する reactive blues の影響

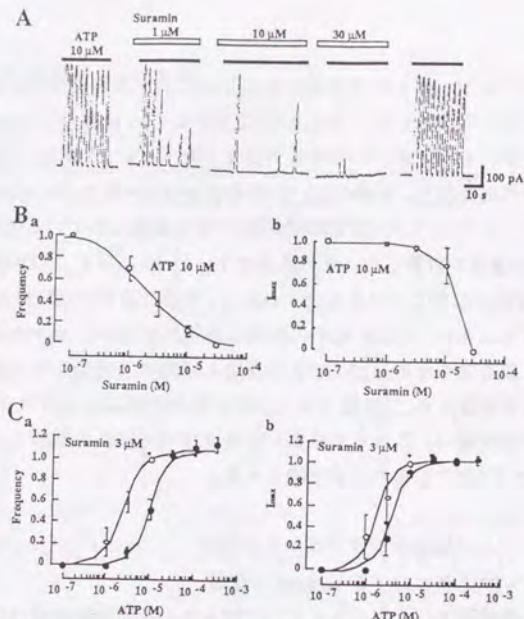


Fig. 2-11. Effect of suramin on ATP-induced K^+ current oscillation of rat megakaryocyte. A, effects of 1, 10 and 30 μM suramin on 10 μM ATP-induced K^+ current. ATP was applied during a period indicated by closed bars. Suramin at each concentration was applied 2 min prior to the application of ATP. The application was repeated at least 2 min after wash out. The current traces were obtained from single cell, and a typical one of 5 cells examined. B, concentration-dependency of the inhibitory effect of suramin on 10 μM ATP-induced K^+ current oscillation. The value of frequency and maximum current amplitude (I_{max}) were normalized to the value obtained by 10 μM ATP alone. Each value represents the mean \pm S.E.M. of five to seven cells. C, concentration-response relationships of ATP with (●) or without (○) 3 μM suramin. Each value represents mean \pm S.E.M. of normalized values of four or five cells. The mark (*) indicates the value used to normalization.

P_{2Y} サブタイプのプリン受容体アンタゴニストである RB-2 およびその構造類似体 RB-4、RB-5 についても巨核球プリン受容体に対する作用を検討した。結果を Fig. 2-12 に示す。10 μM ATP の誘発する K^+ 電流オシレーションに対して 30 μM の RB-2 と RB-5 は抑制作用を示したが RB-4 にはなんの作用も認められなかった。RB-2 はさらに低濃度でも抑制作用を示し、0.3 μM から効果が認められた。用量-反応曲線から求めた ATP 10 μM の反応に対する IC_{50} 値は RB-2 が 1.3 ± 0.3 、RB-5 が $10.2 \pm 1.1 \mu M$ であった。また RB-2 3 μM 存在下では ATP の

EC_{50} 値は $2.9 \pm 0.8 \mu M$ から $9.2 \pm 2.4 \mu M$ にシフトした。こうした RB-2 または RB-5 の作用も suramin の場合と同様可逆的で投与時間に依存せず、反応の最大値には影響しなかった。

なお非選択的 P_1 プリン受容体アンタゴニストである 7-chloroethyltheophylline は巨核球のプリン受容体にはなんの影響も与えなかった。

2-3-4-3 ADP 応答に対する suramin と reactive blues の影響

suramin (Fig. 2-13) 及び RB-2 は ADP 誘発性の K^+ 電流オシレーションに対しても ATP の場合と同様に抑制作用を示した。ADP の場合は ATP より低濃度で K^+ 電流オシレーションを誘発するがこれらアンタゴニストは同

程度の反応強度の時同程度の濃度範囲で抑制作用を示した。その他の、抑制の可逆性などの性質もすべて ATP の場合と同様であった。また図には示さないが thrombin のように全くタイプの違うアゴニストによって誘発される K^+ 電流オシレーションにはこれらプリン受容体アンタゴニストは影響を与えなかった。これらの結果から suramin や RB-2 は巨核球のプリン受容体のアンタゴニストとし

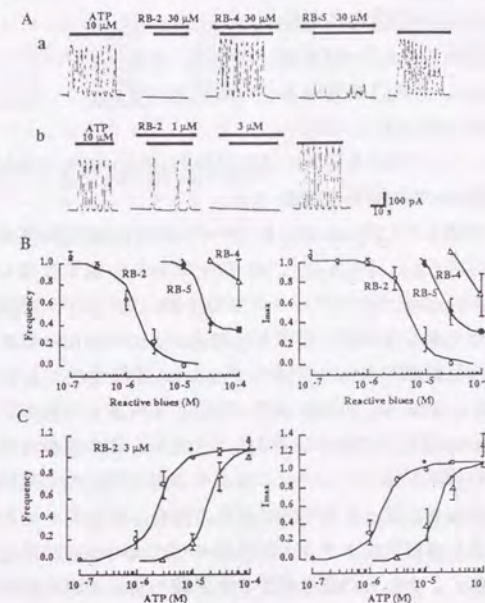


Fig. 2-12 Effects of Reactive Blue(RB)s on ATP-induced K^+ current oscillation of rat megakaryocyte. A, effects of 30 μM RBs (a) and lower concentrations of RB-2 (b) on 10 μM ATP-induced K^+ current oscillation. ATP was applied during a period indicated by closed horizontal bars. Each drug was applied 2 min prior to the application of ATP. Current traces in a and b were from single cell, respectively. B, concentration-dependent inhibitory actions of RBs. C, effect of 1 μM RB-2 on the concentration response relationships of ATP.

て作用すると考えられる。

2-4 考察

ラット巨核球は細胞外から投与した ATP に応答して周期的外向き電流を発生する (Fig.2-

1)。この外向き電流は細胞内 Ca^{2+} 濃度の振動

を反映した Ca^{2+} -activated K^{+} チャンネルを通る K^{+} 電流であることを明らかにした (Fig.2-2、Fig.2-4)。 K^{+} チャンネルの性質については、先に conventional whole-cell 法でモルモット巨核球を調べている河の報告とはほぼ一致している。わずかに異なるのは、河が $30 \mu\text{M}$ quinine が $10 \mu\text{M}$ ADP の反応を抑制しないことから巨核球の K^{+} チャンネルが quinine 非感受性だとしているが、本実験では $100 \mu\text{M}$ quinine は $10 \mu\text{M}$ ATP の反応を抑制するため巨核球の K^{+} チャンネルは quinine 感受性である点である。河の実験条件では本実験よりアゴニストの作用が強くアンタゴニストの作用が弱いため抑制がみられなかったものと思われる。従って基本的には河の報告したモルモット巨核球の Ca^{2+} -activated K^{+} 電流と本研究でのラット巨核球の Ca^{2+} -activated K^{+} 電流とは同じものであるといえる。しかしその他の性質で本実験の結果で河の報告と異なる点がなお存在する。一つにはアゴニストに応答して生じる電流がアゴニストの洗浄により速やかに消失し、テーリングはみられないこと (Fig.2-3A)、二つ目は全体的にアゴニスト濃度がかなり低いこと (Fig.2-3A)、最後は電流の形が一過性ではなくオシレーションであること (Fig.2-3B)、である。 Ca^{2+} キレート剤 EGTA を含まない電極内液を用いて conventional whole-cell 法で記録を取れば nystatin 法の場合と同様の結果が得られることから (Fig.2-3A)、こうした違いは Ca^{2+} キレート剤によるものと推測される。この結果から巨核球の細胞内 Ca^{2+} に対する緩衝能は比較的小さいということもいえる。おそらくそれが原因で fura-2 を負荷した巨核球の画像解析ではオシレーションが検出できず、一過性の上昇になる

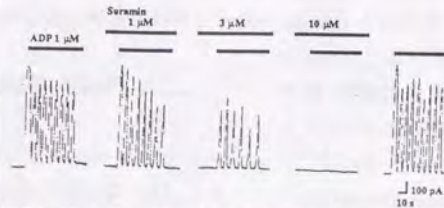


Fig. 2-13 Effect of suramin on $1 \mu\text{M}$ ADP-induced K^{+} current oscillation. Current traces were from single cell, typical one from four cells examined.

もの^{16,17)}と考えられる。 Ca^{2+} オシレーションの場合、細胞外からの信号の強さは頻度に換算されるため、一定の Ca^{2+} 濃度上昇で弱い反応から強い反応にまで幅広く、しかもかなり長時間にわたって対応できる。細胞にとっては細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は時に致命的であるため、一過性の上昇で応答する場合には上昇の程度に限度があるし、あまり長時間持続的に高濃度を維持することは不可能である。従ってオシレーションの方が信号伝達機能としては優れており、これが細胞の本来の生理機能であると考えられる。こうしたことから、巨核球の生理機能解明には nystatin perforated whole-cell patch-clamp 法が適しているといえよう。

巨核球の K^{+} 電流オシレーションはアゴニスト濃度が増加すると頻度が増加し、遅延時間が短縮されるが最大電流は比較的一定である (Fig.2-5)。オシレーションには細胞外 Ca^{2+} は必要ではないため (Fig.2-8、Fig.2-10)、 Ca^{2+} は細胞内プールから放出されるものと考えられる。 Ca^{2+} チャンネルブロッカーである 10 mM La^{3+} が ATP 誘発性のオシレーションに影響しないことからこのことがいえる。血小板では ADP が Ca^{2+} 電流を誘発するという報告がある¹⁹⁾が本実験条件では巨核球に Ca^{2+} 電流は検出されなかった。これは巨核球と血小板とで異なる点かもしれない。Fig.2-9 にみられるような 5 mM Ni^{2+} や高濃度の La^{3+} による抑制作用については、 Ni^{2+} が非常に強く ATP や ADP に結合するため、Fig.2-10 で示したように真のアゴニストであると考えられる ATP⁴⁺ や ADP³⁺ 濃度が減少するためと推測される。Taqui Kahn らの報告では ATP と Ni^{2+} の結合定数は ATP と Ca^{2+} の約 11 倍、ATP と Mg^{2+} の約 6 倍である。 La^{3+} についての ATP との結合定数は不明ながら何らかの相互作用はあると考えられる。

ATP を持続的に投与したときに徐々に各スパイクの間隔があいていって最後には電流が観察されなくなる現象については、高濃度のアゴニストを投与すれば反応は惹起されることと洗浄して間隔を開ければ反応性が回復することから、受容体の脱感作によると推定される。こうした脱感作現象は他の非興奮性細胞の Ca^{2+} オシレーションの場合でも観察されている²⁰⁻²³⁾。

巨核球のプリン受容体のアゴニスト選択性はこれまで知られているプリン受容体サブタイプに当てはまらず、独特のものである。既知のプリン受容体の中では血小板の $\text{P}_{2\text{T}}$ が ATP より ADP に親和性の高い唯一のものである²⁴⁾が、 $\text{P}_{2\text{T}}$

では ATP は ADP のアンタゴニストとして働き、アゴニストとしての作用はない。巨核球は血小板の前駆細胞であることから同じ受容体を持つものと考えられてきたが、ATP の作用については巨核球と血小板では全く違うことを明らかにした (Fig.2-1 - Fig.2-10、Table 2-1)。ATP と ADP がそれぞれ別々の受容体に作用している可能性は両アゴニストの間で交差脱感作がみられることから否定される (Fig.2-8)。

さらに ATP と ADP は、他の P_2 受容体でも報告のあるように実際には ATP^{4+} と ADP^{3+} として作用していることを示唆した。このことは河の実験では細胞外液に 10 mM Ca^{2+} を含んでいて、2 mM Ca^{2+} の場合に比較して ADP^{3+} 濃度が 1/2 以下になるため、河の報告でアゴニスト濃度が高い理由の一つでもあったと考えられる。

また ATP 10 μ M に対するアンタゴニスト suramin および RB-2 の EC_{50} が 10 μ M 以下である (Fig.2-11、Fig.2-12) という事実からも実際のアゴニストは ATP^{4+} と ADP^{3+} であることが示唆される。本来のアゴニストより親和性の高いアンタゴニストが見つかる可能性はそう高くはなく、本実験で用いた条件下では約 1/30 になる ATP^{4+} や ADP^{3+} が実際のアゴニストと考える方が自然である。suramin は非選択的 P_2 受容体アンタゴニスト^{25,26)}、RB-2 は P_{2Y} 受容体選択的アンタゴニスト²⁷⁾とされる。この両者が巨核球のプリン受容体のアンタゴニストとして働くことから、ADP の方が ATP より強いアゴニストであるという点をのぞいて、巨核球のプリン受容体は P_{2Y} に類似する。いずれにしても巨核球のプリン受容体の性質はこれまで知られていなかったものである。つけ加えるならばここで用いた ATP やアンタゴニストなどの濃度は他の実験系で用いられている濃度と比較してもかなり低く^{28,29)}、従って抑制作用が薬物の細胞毒性である可能性は極めて小さい。

最終的な受容体の同定には遺伝子のクローニングなどの方法が必要ではあるが巨核球と血小板とで受容体の性質が変わる仕組みなどにも興味を持たれる。

2-5 小括

1. nystatin perforated whole-cell patch clamp 法を用いてラット巨核球の細胞外 ATP への応答を解析した。
2. 保持電位 -40 mV で ATP は 1-100 μ M の濃度範囲で巨核球に周期的外向き電流を発生させた。この電流の反転電位が K^+ の平衡電位にはほぼ一致することや quinine や quinidine のような K^+ チャンネルブロッカーで抑制されることなどから K^+ 電流であると結論した。
3. 先に conventional whole-cell 法で ADP が巨核球に一過性の外向き電流を生じるという報告があるため、perforated 法と conventional 法とで得られる結果を比較した。その結果、先の報告との違いは細胞内 Ca^{2+} をキレートする EGTA を細胞内に投与することによって引き起こされるものであると結論した。
4. 膜透過性の Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM は濃度依存的に ATP 誘発性の K^+ 電流オシレーションを抑制する。従って K^+ 電流オシレーションは細胞内 Ca^{2+} 濃度の振動を反映するものと考えられる。
5. 投与する ATP の濃度を増加させると、 K^+ 電流オシレーションの頻度と最大電流は増加し、ATP を投与してから最初の電流が観察されるまでの時間は短縮される。
6. ADP、2-methylthioATP、ATP- γ -S も巨核球に K^+ 電流オシレーションを誘発するが、UTP、 α - β -methylene ATP にはそうした作用は認められなかった。アゴニスト強度としては 2-methylthioATP が最も強く、次いで ADP で、ATP は ADP の 1/10-1/30 の強さであった。また ATP と ADP の間には交差脱感作が認められたが、ATP や ADP と thrombin との間には交差脱感作はみられなかった。
7. ATP 誘発性 K^+ 電流オシレーションには細胞外からの Ca^{2+} の流入は必要ではないことから細胞内プールからの Ca^{2+} 放出が関与することを示唆した。さらに外液 Ca^{2+} 濃度を下げると反応が増強されることから真のアゴニストは ATP^{4+} と ADP^{3+} であると考えられる。
8. 非選択的 P_2 受容体アンタゴニスト suramin と P_{2Y} 選択的アンタゴニスト RB-2 は比較的低濃度で ATP 及び ADP 誘発性の反応を抑制するが、thrombin

による反応は抑制しなかった。

9. これらの結果からラット巨核球には細胞内 Ca^{2+} オシレーションを誘発する新しいタイプのプリン受容体が存在することを示した。

第3章 ラット巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーションのメカニズム

3-1 緒言

前章でラット巨核球の ATP 誘発性 K^{+} 電流オシレーションの受容体の性質について述べた。既に述べたとおり、この現象は非興奮性細胞の Ca^{2+} オシレーションの一例である。これまで非興奮性細胞の Ca^{2+} オシレーションについては肝細胞^{1,2)}、繊維芽細胞^{3,4)}、内皮細胞^{5,6)}、脾臓傍細胞^{7,8)}などで報告があるが、巨核球の場合は特に頻度が高いことが特徴である。細胞内 Ca^{2+} オシレーションという現象は一般的に起こるものとして認められるようになったがそのメカニズムについては複数のモデルが存在¹⁰⁻¹⁷⁾する。そこで巨核球の Ca^{2+} オシレーションのメカニズムについて検討することにした。

なお既に前章で説明したように巨核球は Fura-2 などの細胞内 Ca^{2+} キレート剤によりオシレーションが阻害される^{18,19)}ため、こうした蛍光色素を用いた画像解析による研究は極めて困難である。従ってパッチクランプ法により解析を行った。またアゴニストとしては ADP よりも凝集などが起こりにくいであろう ATP²⁰⁾を用いた。

3-2 実験方法

3-2-1 細胞の調製

体重 250-300g の雌雄 Wistar ラットを過剰量のジエチルエーテルで麻酔し、頚動脈切断により屠殺した。大腿骨を単離し、注射筒と針を用いて標準外液で洗浄することにより骨髓液を得た。75 μm のナイロンメッシュで濾過して細胞の塊をのぞいた後、細胞懸濁液を記録用チャンバー (Falcon, Primaria tissue culture dish) に移した。記録用チャンバーは室温で数時間放置し、細胞が底に固着するのを待った。巨核球は位相差顕微鏡下ではその大きさから (40-50 μm) 容易に識別可能である。細胞の記録は単離後 8 時間以内に行った。

3-2-2 溶液

標準外液の組成は、150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM glucose, 10 mM HEPES で、pH を Tris-OH で 7.4 に調整した。カルシウムフリーの細胞外液には 2mM EGTA を加えた。Perforated patch のピペット内液の組成は、50mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.2 で、conventional whole cell patch のピペット内液は、150mM KCl, 2mM ATP-Mg, 10 mM HEPES, 0.3 または 1mM EGTA である。Nystatin は 1N HCl で pH を 2 にした酸性メタノールに溶解し、KOH で pH を 7.2 に調整して 10mg/ml のストック溶液を作成した。このストック溶液をピペット内液に最終濃度 50-100 $\mu\text{g/ml}$ に溶解して実験に用いた。

3-2-3 電気生理学的測定

巨核球の全細胞電流は Horn らによる方法²¹⁾に従って室温 (21-24°C) で nystatin perforated 法により記録した。実験により conventional whole-cell patch clamp 法²²⁾も用いた。ピペットは 1.5mm の細管 (ナリシゲ) から二段階にピペットブロー (ナリシゲ、PB-7) で引いて作成し、先端を fire polish した。ピペット溶液を満した記録電極とレファレンス電極との間の電気抵抗は 5-10 Ω であった。Perforated patch-clamp モードでのアクセス抵抗は 4min 以内には安定し、その値は conventional whole-cell モードの場合と同様であった。電流と電圧の測定にはパッチクランプアンプ (List, EPC7) を用い、同時にペンレコーダー (三栄、RECTI-HORIZ-8K) で記録し、電気信号をデジタルオーディオプロセッサでデジタル方式に変換した後ビデオカセットレコーダー (三菱、VH-F32) で記録・保管した。

3-2-4 薬物

ATP 及び nystatin は Sigma Chemical 製のものを使用した。HEPES は同仁化学、pluronic F-127 は Molecular Probes (USA) から購入した。各薬物は標準外液に溶解してその日のうちに使った。ATP 及びその関連化合物は pH を調整し直してから使用した。

薬物の投与は Y-tube 法により行った^{23,24)}。実験中、薬物を投与するためのマ

イクロビペットの先端は細胞から約 500 μm の距離に置いた。この方法により、単離巨核球の周辺の溶液を 20ms 以内に交換できる。

3-3 結果

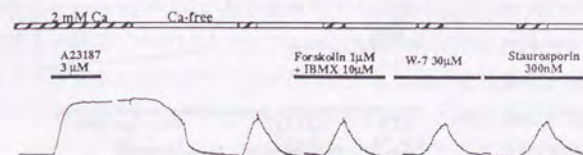


Fig. 3-1 This figure indicates drug effects on K^+ conductances of megakaryocyte. Megakaryocyte was permeabilized with A23187 3 μM . Then, the external solution was exchanged to Ca^{2+} -free and EGTA containing solution. The current returned to the basal level. This external Ca^{2+} -dependent K^+ current activation and deactivation were examined after drug treatments. The time constants of each currents were not altered by drug treatment.

本実験においては、 Ca^{2+} -activated K^+ チャンネルの活性化を細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とみなした。また各種薬物の K^+ チャンネルに対する直接作用については、巨核球を Ca^{2+} ionophore である A23187 で処理し、細胞外液の Ca^{2+} 濃度を変えたときにみられる K^+ 電流の活性化と不活性化のパターンを指標にして調べた (Fig. 3-1)。ここで用いた薬物はこの K^+ チャンネルの Ca^{2+} 感受性には影響しないことを確認してある。

3-3-1 オシレーションに関与するカルシウムプール

非興奮性細胞のアゴニスト誘発性細胞内 Ca^{2+} オシレーションのモデルは数種類あるが、はじめに Berridge らにより提唱された 2-pool モデル¹¹⁾が巨核球にも当てはまるかどうかを検証した。2-pool モデルでは IP_3 感受性の Ca^{2+} プール (ICR) のほかに caffeine や ryanodine に感受性の Ca^{2+} 感受性 Ca^{2+} プール (CICR) が存在するとされる。そこでこれらの薬物の作用を調べた。興奮性細胞の Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を放出させる活性のある ryanodine 10 μM ^{25,26)} または caffeine 10mM^{27,28)}、及び筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を抑制する局所麻酔薬 procaine 1mM²⁹⁾ はいずれも巨核球の ATP 誘発性 K^+ 電流オシレーションに全く影響しなかった。さらにこれら薬物単独では巨核球になんら反応を惹起しなかった (データは示

していない)。

さらに巨核球の Ca^{2+} プールについて検討した。 Ca^{2+} -ionophore である A23187 は $1\mu\text{M}$ で標準外液内の巨核球に不可逆的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こし、 I_{KCa} を直線状に活性化する。 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤で細胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を放出させる作用のある $30\mu\text{M}$ の thapsigargin も数回のスパイクを誘発した後、 A23187 と同様の直線状 I_{KCa} を誘発する。 $3\mu\text{M}$ 以上では thapsigargin の作用は A23187 と見分けがつかない。 $0.1\mu\text{M}$ 以下の thapsigargin は、単独では見かけ上巨

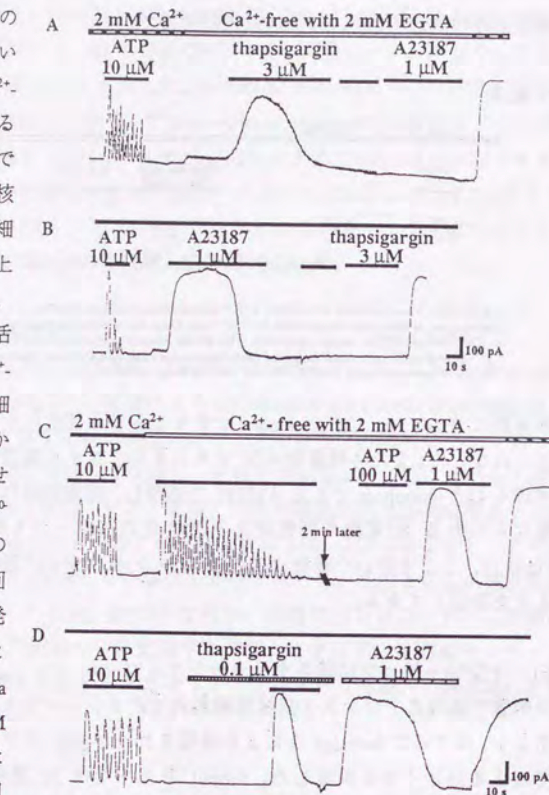


Fig.3-2 Effects of thapsigargin and A23187 on megakaryocyte perfused with external solution with or without 2 mM- Ca^{2+} . The current traces were obtained by nystatin perforated whole-cell patch-clamp mode under voltage-clamp condition at a holding potential (V_h) of -40 mV. Extracellular solution was exchanged as indicated by upper horizontal bars. Drugs were applied during a period shown by lower horizontal bars. In each experiment, the first application of ATP in standard external solution was to confirm the activity of the cell. Then, the external solution was exchanged to Ca^{2+} -free solution and the drugs were applied successively as indicated. The current traces are typical one of five experiments.

核球になんの影響もない。細胞外液を Ca^{2+} フリーにした場合、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は細胞内プールからの放出によると考えられるので、これら薬物の作用を Ca^{2+} フリーの条件で検討した。 Fig. 3-2 に示したように A23187 も thapsigargin も一過性の I_{KCa} を誘発し、巨核球内に Ca^{2+} プールが存在することを示す。 A23187 の投与後は thapsigargin は Ca^{2+} 放出を誘発できず、 thapsigargin の投与後は A23187 は Ca^{2+} 放出を誘発できない。従ってこれら薬物の作用点は共通である。どちらの薬物も作用は不可逆的なのでいったん投与した後は細胞外液を標準液にすれば持続的な I_{KCa} の活性化がみられる。外液 Ca^{2+} フリー条件で ATP を投与すると I_{KCa} オシレーションが観察されるが、細胞外から Ca^{2+} が補充されないためやがて減衰する。しかしこうして ATP による Ca^{2+} オシレーションが起きない状態でも A23187 や thapsigargin は一過性の I_{KCa} 活性化を誘発することができる (Fig.3-2C) ことから、細胞内プールは空にはなっていない。また単独ではなんの作用もみられない $0.1\mu\text{M}$ thapsigargin の存在下で ATP を投与するとオシレーションのパターンが一過性のものに変化する (Fig.3-2D)。これは Ca^{2+} ポンプの阻害作用によると考えられる。

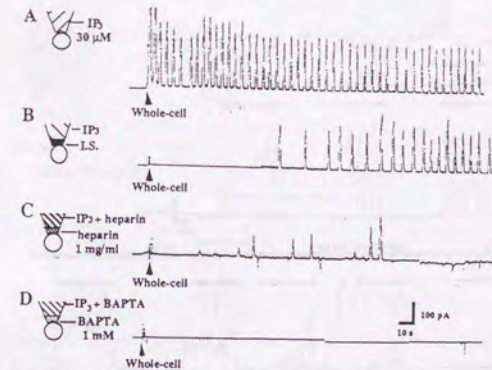


Fig.3-3 Effect of intracellular application of IP_3 . All current traces in this figure were obtained by conventional whole-cell recording at a V_h of -40 mV. Whole-cell recordings were started at the point indicated by arrows. In A, $30\mu\text{M}$ of IP_3 was dissolved in internal solution and recording pipette was filled with the solution containing IP_3 . In B, the pipette tip was filled with internal solution (I.S.) without IP_3 and the rest portion of pipette was filled with the internal solution containing $30\mu\text{M}$ IP_3 . In this configuration, IP_3 gradually diffused into the cell interior. In the same way, pipette tip was filled with internal solution containing 1 mg/ml heparin (C) or 1 mM BAPTA (D), and the rest portions of pipettes was filled with internal solution containing IP_3 plus heparin or IP_3 plus BAPTA, respectively. The current traces in A - D are typical ones from individual five cells.

次に IP_3 感受性プールについて検討した。Fig. 3-3 では記録はすべて conventional 法により行った。記録電極内液に 30mM の IP_3 を含ませて細胞内に拡散により投与すると Fig. 3-3A のようなオシレーションがみられる。ピペットの先端に IP_3 を含まない内液を入れて拡散を緩やかにしてやると Fig. 3-3B のように遅れてオシレーションが観察される。さらに IP_3 感受性 Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} の放出を阻害するとされる heparin を共存させると Fig. 3-3C のように IP_3 誘発性の I_{KCa} オシレーションは抑制される。 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA によってもオシレーションは抑制される (Fig. 3-3D)。従って巨核球には IP_3 感受性 Ca^{2+} プールが存在し、それがオシレーションに関与しているといえる。

3-3-2 Protein Kinase C と Calmodulin の関与

次いでオシレーションのメカニズムに関与することが他の細胞で報告されている PKC について検討した。PMA は多少のラグタイムの後 ATP 誘発性の I_{KCa}

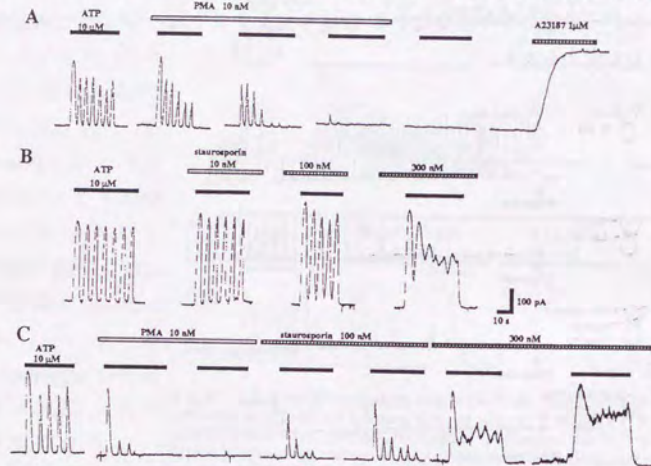


Fig. 3-4 Effects of PKC modulators on ATP-induced I_{KCa} oscillation. Recordings were made by nystatin-perforated mode. ATP and other drugs were applied during a period indicated by horizontal bars. Staurosporine and PMA were applied at least 30 sec prior to the application of ATP. The current traces during pretreatment time were excluded from the traces. The ATP application was made with 2 min intervals. The current traces in A are typical ones from six cells, and those in B and C are from five cells.

を不可逆的に抑制する (Fig. 3-4)。PKC 阻害剤 staurosporin は I_{KCa} の活性化には影響しないが、一旦活性化された I_{KCa} が完全に元のレベルにまで回復するのを阻害することによってオシレーションのパターンを阻害する。この作用は濃度に依存し、高濃度では一過性に近い形になる (Fig. 3-4B)。この形は低濃度の thapsigargin により誘発されるものと類似することから、 Ca^{2+} -ATPase の阻害によるものと推察される。staurosporin の作用も不可逆的で、一旦 ATP 誘発性のオシレーションが一過性の形に変化した細胞では、staurosporin を洗浄しても元の形のオシレーションはみられない。それでも ATP を投与してから最初の I_{KCa} の活性化が起こるまでの時間と ATP を洗浄したときの速やかな回復には変化は認められず、staurosporin は受容体機能そのものには影響していないと考えられる。そして Fig. 3-4C に示すように PMA によって抑制された反応は staurosporin によって回復する。さらに図には示さないが staurosporin の作用は PMA によって回復する。

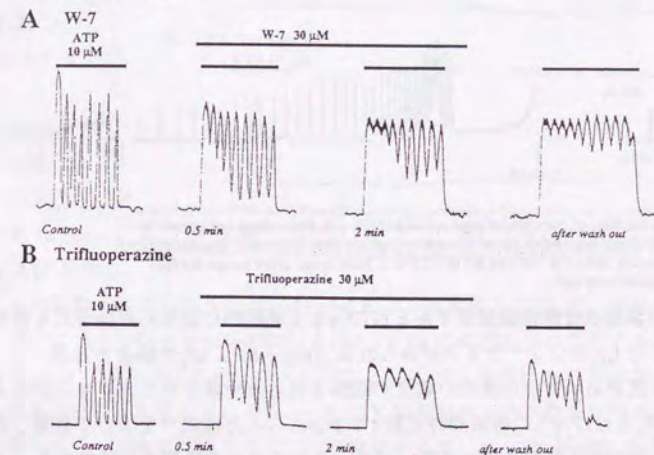


Fig. 3-5 Effects of CaM antagonists on ATP-induced I_{KCa} oscillation. Recordings were by nystatin-perforated mode. ATP was applied during a period indicated by horizontal bars. W-7 and trifluoperazine were applied at least 30 sec prior to the application of ATP. The application interval was 2 min. The current traces in A are typical ones from six cells, and those in B are from three cells.

また CaM 阻害剤である W-7 と trifluoperazine^{34,35)} も staurosporin と同様の振動性の消失をもたらす (Fig. 3-5)。CaM 阻害作用と K⁺チャンネル阻害作用を合わせ持つ chlorpromazine の場合には振動性と K⁺電流の両方の阻害により小さな一過性電流が観察される (データは示していない)。これら薬物の作用はすべて不可逆的であった。

3-3-3 GTP 結合蛋白質の関与と cAMP の影響

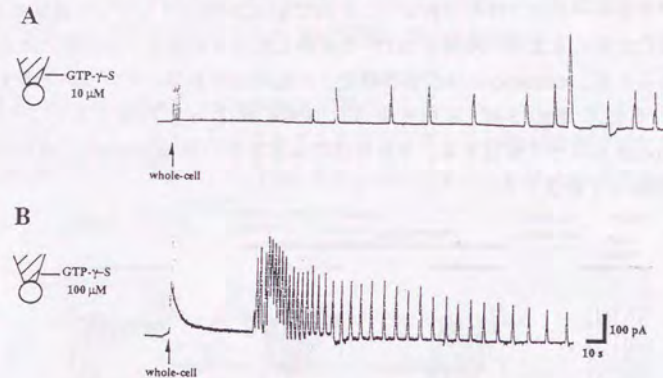


Fig.3-6 Effect of intracellular application of GTP- γ -S. Recordings were made by conventional whole-cell mode. Recording pipettes were filled with internal solution containing 30 (A) or 100 μ M (B) of GTP- γ -S. Note some delay before the first oscillation appeared.

GTP の非加水分解性類似体である GTP- γ -S を細胞内に投与した場合にも濃度に依存した I_{KCa} オシレーションがみられる (Fig. 4-6)。IP₃ の場合とは違って、細胞膜に穴があいてから最初の電流が観察されるまで多少のラグタイムがある。そこで IP₃ と GTP- γ -S の理論的時定数 τ を Pusch らの方程式³⁰⁾を用いて計算した。 τ は化合物の分子量と細胞の直径、ピペットのアクセス抵抗から計算でき、本実験の条件ではアクセス抵抗が 3-5 M Ω 、細胞の直径が 20-40 μ m であるから、IP₃ の場合で 54-714 s、GTP- γ -S の場合で 57-766 s である。細胞の直径とアクセス抵抗が等しい場合、GTP- γ -S の τ 値は IP₃ の τ 値よりわずかに 10% 程度大きいにす

ぎない。しかしながら IP₃ の細胞内投与の場合には τ 値が大きくなるような条件でも常に速やかな I_{KCa} の活性化がみられ、GTP- γ -S の細胞内投与の場合には常にいくらかの遅延が観察される。従って両者の I_{KCa} 活性化に要する時間の違いは、拡散速度の違いによるものではなくメカニズムの違いによるものであると考えられる。つまり IP₃ による細胞内 Ca²⁺ の動員は直接的なのに対して GTP- γ -S の場合は間接的またはより複雑な経路を経ると思われる。いずれにしても G 蛋白質の活性化が I_{KCa} オシレーションに関与するといえる。

次に ATP 誘

発性の I_{KCa} オシレーションに関与する G 蛋白質の種類について検討を加えた。

Fig.3-7 に示すように 500 ng/ml の百日咳毒素 (PTX) で 8 時

間前処理しても ATP 応答に

なんの影響も与えなかったが 100 ng/ml のコレラ毒素 (CTX) で 1 時間前処理した場合にはオシレーションが抑制された。PTX の処理条件は存在する基質の完全な ADP-リボシル化に十分である³⁷⁾ことから PTX 感受性の G 蛋白質はオシレーションに関与しないといえる。一方 CTX は細胞内 cAMP 量を増加させる作用のあることが知られており³⁷⁻³⁹⁾、この抑制が必ずしも CTX 感受性 G 蛋白質の関与を示すとはいえない。そこで cAMP の影響についても検討した。Adenylate cyclase を活性化する forskolin を投与すると Fig.3-8A のように I_{KCa} オシレーションが抑制される。Phosphodiesterase 阻害剤 IBMX も濃度依存的に I_{KCa} オシレーシ

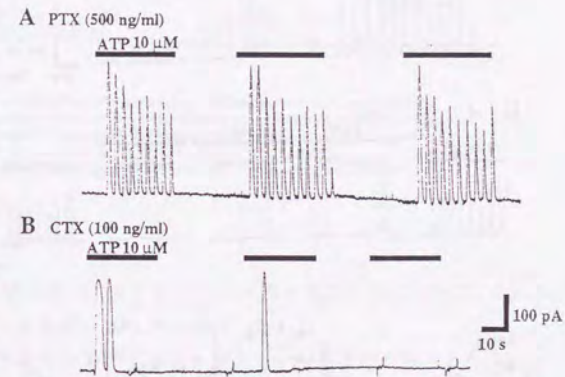


Fig.3-7 Effects of PTX and CTX on ATP-induced I_{KCa} oscillation. ATP was applied during a period shown by horizontal bars. A, Megakaryocytes were pretreated with 500 ng/ml PTX for 8 hours. Five cells tested showed ATP-induced I_{KCa} oscillation as in non-treated cells. B, Megakaryocytes were pretreated with 100 ng/ml CTX for one hour. One of typical current traces from four cells. All showed no oscillation.

オンを抑制する (Fig.3-8B)。さらにこれらの薬物は Fig.3-9 に示すように IP_3 誘発性のオシレーションも抑制する。IBMX による抑制作用が可逆的なものに対して forskolin の作用が非可逆的なのが両者の作用の違いである。従って巨核球の I_{KCa} オシレーションは cAMP によって抑制されると結論される。

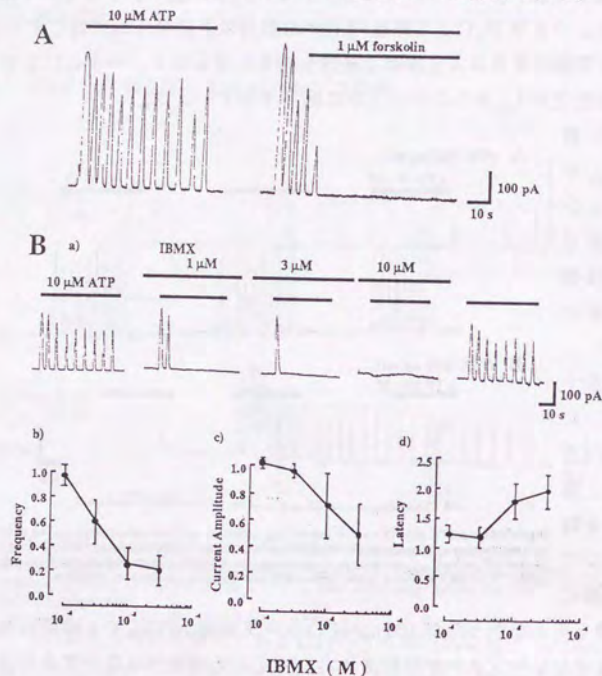


Fig. 3-8 Effect of cAMP on ATP-induced I_{KCa} oscillation. Drugs were applied during a period shown by horizontal bars. A, Effect of 1 μ M forskolin. B, Effect of IBMX. a, Typical current traces indicating the inhibitory effect of IBMX. b, c and d are concentration-dependent effect of IBMX on 10 μ M ATP-induced response. The frequency is the number of spikes observed per one second (b), the maximum current amplitude (I_{max}) is the largest current amplitude (c) and the latency is the period required to activate the K^+ channel after ATP application (d). Each value is normalized to that of 10 μ M-ATP-induced response (frequency, $0.21 \pm 0.02 \text{ sec}^{-1}$ ($n=7$); I_{max} , $63.7 \pm 6.8 \text{ pA}$ ($n=8$); latency, $0.96 \pm 0.19 \text{ sec}$ ($n=8$)) and represents mean \pm S.E.M. from five to seven cells.

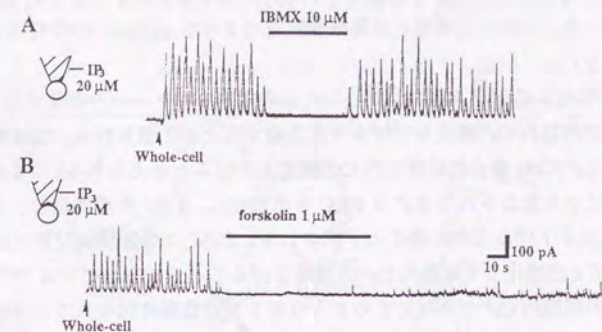


Fig. 3-9 Effect of cAMP on IP_3 -induced I_{KCa} oscillation. Recordings were made by conventional whole-cell mode. Recording pipettes were filled with internal solution containing 20 μ M IP_3 and IBMX and forskolin were applied extracellularly during a period shown by horizontal bars. A, Effect of 10 μ M IBMX. B, Effect of 1 μ M forskolin. The current traces in these figure are a typical one from five cells, respectively.

3-4 考察

巨核球の ATP 誘発性 Ca^{2+} オシレーションのメカニズムについて、これまでに提出されたモデルを参考にしながら検討した。

はじめに 2-プールモデルで必要とされる CICR の存在を調べたが、CICR に作用する薬物は巨核球にどのような影響も与えず、典型的な CICR は巨核球には存在しないことがわかった。しかし外液 Ca^{2+} フリーで ATP 誘発性の反応が消失した後でもなお Ca^{2+} -ATPase 感受性のプール内に Ca^{2+} が残存することから、巨核球の Ca^{2+} プールはオシレーションに関与するものとそうでないものの二種類があるか、オシレーションに関与する機能的に異なるプールが二種以上あってその容量が異なるという可能性が考えられる。いずれにしてもこれまでに報告されているモデルとは異なるようである。

IICR については Fig.3 に示すように明らかに巨核球の Ca^{2+} オシレーションに関与する。この場合、細胞内に投与している IP_3 の濃度は振動していない。従って、Cobbold らが肝細胞で¹⁵⁾、Harootunian らが繊維芽細胞で⁴⁾提唱しているような IP_3 濃度が振動しているというモデルは巨核球には当てはまらない。 IP_3

によるオシレーションに関しては涌井らが脾臓傍細胞で報告している¹³⁾ものとよく似ている。ただし巨核球には脾臓傍細胞のような caffeine 感受性のプールは存在しない。

PKC 活性化と阻害によるオシレーションの阻害とパターンの変化から、PKC の活性化が細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げる方向に働くことが予想される。CaM の場合も同様で Ca^{2+} /CaM 複合体は細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げると考えられる。つまり受容体活性化により放出された Ca^{2+} は PKC を活性化し、CaM を活性化し、これらが Ca^{2+} 濃度を下げる方向に働くと予測される。CaM は形質膜及び筋小胞体の Ca^{2+} ポンプを活性化して細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げることが知られている^{40,41)}。非興奮性細胞の細胞内 Ca^{2+} プールにそのようなポンプの存在は知られていないが、形質膜だけではなく細胞内貯蔵部位にもこうしたポンプがある可能性はあると考えられる。巨核球の場合は demarcation channel と呼ばれる発達した膜系が細胞質にあって、これらは将来血小板の形質膜になるとされる。Enyedi らの報告⁴²⁾によればヒト血小板には形質膜タイプと筋小胞体タイプの二種類の Ca^{2+} ポンプがあり、これらはいずれも巨核球由来である。さらに Pollock らの研究⁴³⁾では PKC は血小板形質膜の Ca^{2+} ポンプを活性化する事が示唆されており、これらのことと考え合わせると巨核球の細胞内 Ca^{2+} プールに PKC/CaM 感受性の Ca^{2+} ポンプが存在する可能性は高い。

次に巨核球の I_{KCa} オシレーションは細胞内に GTP- γ S を投与することでも惹起される。これは G 蛋白質の活性化が関与することを示すもので、その G 蛋白質の種類についても検討した。PTX 感受性の G 蛋白質の関与はないといえるが CTX 感受性 G 蛋白質については巨核球が cAMP により調節を受けるため断定できない。cAMP の作用点については、cAMP 量を上げる薬物が IP_3 誘発性のオシレーションも抑制することから、 IP_3 の作用点以後での作用、すなわち Ca^{2+} 貯蔵部位からの放出の阻害または Ca^{2+} 取り込みの活性化が考えられる。cAMP は血小板でも凝集や分泌を抑制することが知られており^{44,45)}、この cAMP による負の調節は血小板と巨核球で共通であるといえる。

以上の実験結果に基づいて、巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションのモデルを作成した (Fig.3-10)。細胞外から投与した ATP は受容体に結合して受容

体共役 G 蛋白質を活性化する。G 蛋白質は信号を phospholipase C に伝え、細胞

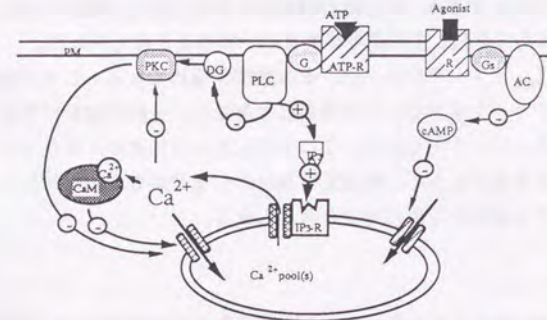


Fig. 3-10 Schematic representation for ATP-induced I_{KCa} oscillation in megakaryocyte. The + marks on the arrow indicate the signal which act to raise $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and - marks indicate the signal which act to reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$. This diagram does not depict entry and exit pathways for Ca^{2+} across the plasma membrane to avoid complexity. AC = adenylate cyclase, CaM = calmodulin, G = GTP-binding protein, DG = diacylglycerol, IP_3 = D-myo-inositol triphosphate, PKC = protein kinase C, PLC = phospholipase C, PM = plasma membrane, R = receptor.

膜磷脂質から IP_3 と diacylglycerol を産生する。 IP_3 は IP_3 感受性の細胞内 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} を動員する。こうして動員された Ca^{2+} は先に産生された diacylglycerol と協調して PKC を活性化し、PKC は細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げる方向に働く。 Ca^{2+} により活性化される Ca^{2+} /CaM 複合体もまた細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げる方向に働く。Payne らによって提唱されている⁴⁶⁾ように高い細胞内 Ca^{2+} 濃度による IP_3 への負のフィードバック機構も関与しているかもしれない。しかし IP_3 や GTP- γ S の濃度が振動しなくても I_{KCa} オシレーションはおきることから PKC による ATP 受容体のダウンレギュレーションは必ずしも必要ではない。この系に対して cAMP もまた負の調節を行い、その作用点は Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出の阻害または Ca^{2+} 取り込みの活性化であると推定される。なお血小板においては、ATP が cAMP 濃度を上げるにより凝集を阻害することが知られていて^{47,48)}、巨核球の場合と大きく異なる。

このモデルにおいては複数の Ca^{2+} プールは必ずしも必要ではないが、プール

が一つであるといえる証拠もない。巨核球は細胞内に複雑な膜系を持ち、その構成要素には少なくとも巨核球自身の小胞体と将来血小板の形質膜及び細胞内膜系になる部分とがある。これらの機能的に異なる膜系が機能の異なる細胞内 Ca^{2+} プールとして存在している可能性は大いにあると考えられる。

巨核球の I_{KCa} オシレーションは、その頻度が極めて大きいことが非興奮性細胞の Ca^{2+} オシレーションとしては特異的であるが、それが解析に要する時間が少ないというメリットでもある。ここで示したようにそのメカニズムには他の細胞と共通する部分も多く、再現性の良いことなどから Ca^{2+} オシレーションのモデルとしても極めて有用であると考えられる。

3-5 小括

1. Patch-clamp 法により Ca^{2+} -activated K^{+} 電流をモニターすることで巨核球の細胞内 Ca^{2+} オシレーションを検出する系を用いて、 Ca^{2+} オシレーションのメカニズムを解析した。
2. CICR から Ca^{2+} を放出させる caffeine や ryanodine、及び CICR 空の Ca^{2+} 放出の阻害剤 procaine は巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションには全く影響しなかった。 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤 thapsigargin や Ca^{2+} イオノフォア A23187 は細胞外 Ca^{2+} フリー条件下でも一過性の I_{KCa} を生じた。
3. 細胞内に直接 IP_3 や $\text{GTP-}\gamma\text{-S}$ を投与することによっても I_{KCa} オシレーションが観察された。
4. PKC 活性化剤 PMA は I_{KCa} オシレーションを完全に抑制するが、その抑制作用は PKC 阻害剤 staurosporin で解除された。staurosporin にはオシレーションのパターンを一過性に近いものに変える作用があった。staurosporin と同様の作用は CaM アンタゴニストである W-7 や trifluoperazine などにもみられた。
5. adenylate cyclase 活性化剤 forskolin や phosphodiesterase 阻害剤 IBMX などの cAMP 量を増やすような薬物はオシレーションを抑制する作用があった。
6. 以上の結果から巨核球の Ca^{2+} オシレーションのメカニズムとして、受容体と共役した G 蛋白質の活性化で phospholipase C によりつくられた IP_3 が細

胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を放出させ、一方で Ca^{2+} 依存性酵素である PKC や Ca^{2+} /CaM 複合体が細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げる方向に作用することが考えられる。cAMP もまたこの系に対しては負の調節因子として働く。

第4章 ラット巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーションに与える細胞内 pH 及びミトコンドリア脱共役剤の影響

4-1 緒言

前章までにラット巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションが、非興奮性細胞のアゴニスト作動性細胞内 Ca^{2+} オシレーションのモデルとして利用できることを明らかにした。そこでこの実験系を用いて、様々な因子の細胞内 Ca^{2+} 濃度調節機構に与える影響を検討してみた。

ある種の生物活性物質は細胞内の pH に影響を与えることが知られている。たとえば血液凝固因子 thrombin は血小板の細胞内 pH を最初は酸性側に、後にはアルカリ側にシフトさせる^{1,2)}。しかしこの細胞内 pH の変化が細胞の機能に与える影響については明らかではなく、血小板の Ca^{2+} 動員に与える影響については相反する報告がなされてもいる^{3,4)}。こうした混乱の原因の一つは血小板が非常に小さくて単一細胞レベルでの解析が難しく、血小板の懸濁液を用いての実験では凝集などの影響が混入してしまうことにあると考えられる。そこで血小板の前駆体で thrombin などには血小板と同様の反応性がある巨核球を用いて pH の影響の解析を試みた。

プロトンイオノフォアでミトコンドリア脱共役剤として知られている FCCP⁵⁾は、細胞に ATP の枯渇をもたらすため、虚血または低酸素細胞モデルをつくるのによく使われる⁶⁻⁸⁾。また FCCP には、ミトコンドリア内膜のプロトン勾配を破壊することにより単離ミトコンドリアから Ca^{2+} を放出させ、 Ca^{2+} 取り込みを阻害する作用がある⁹⁾。さらに小胞体膜のプロトン勾配も破壊するため¹⁰⁾、ATP の枯渇や脱分極以外にも生きている細胞に様々な影響があると考えられる。例えば神経細胞や脾細胞で FCCP がミトコンドリア以外の Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を放出させるという報告がある^{11,12)}。そこで FCCP の巨核球 Ca^{2+} オシレーションに対する影響についても検討した。

4-2 実験方法

4-2-1 細胞の調製

体重 250-300g の雌雄 Wistar ラットを過剰量のジエチルエーテルで麻酔し、頸動脈切断により屠殺した。大腿骨を単離し、注射筒と針を用いて標準外液で洗浄することにより骨髓液を得た。75 μ m のナイロンメッシュで濾過して細胞の塊をのぞいた後、細胞懸濁液を記録用チャンバー (Falcon, Primaria tissue culture dish) に移した。記録用チャンバーは室温で数時間放置し、細胞が底に固着するのを待った。巨核球は位相差顕微鏡下ではその大きさから (40-50 μ m) 容易に識別可能である。細胞の記録は単離後 8 時間以内に行った。

4-2-2 溶液

標準外液の組成は、150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 10mM glucose, 10 mM HEPES で、pH を Tris-OH で 7.4 に調整した。Perforated patch のピペット内液の組成は、50mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.2 で、conventional whole cell patch のピペット内液は、150mM KCl, 2mM ATP-Mg, 10 mM HEPES である。Nystatin は 1N HCl で pH を 2 にした酸性メタノールに溶解し、KOH で pH を 7.2 に調整して 10mg/ml のストック溶液を作成した。このストック溶液をピペット内液に最終濃度 50-100 μ g/ml に溶解して実験に用いた。

4-2-3 電気生理学的測定

巨核球の全細胞電流は Horn らによる方法¹³⁾に従って室温 (21-24°C) で nystatin perforated 法により記録した。実験により conventional whole-cell patch clamp 法¹⁴⁾も用いた。ピペットは 1.5mm の細管 (ナリシゲ) から二段階にピペットブーラー (ナリシゲ, PB-7) で引いて作成し、先端を fire polish した。ピペット溶液を満した記録電極とレファレンス電極との間の電気抵抗は 5-10 Ω であった。Perforated patch-clamp モードでのアクセス抵抗は 4min 以内には安定し、その値は conventional whole-cell モードの場合と同様であった。電流と電圧の測定にはパッチクランプアンプ (List, EPC7) を用い、同時にペンレコーダー (三栄、RECTI-HORIZ-8K) で記録し、電気信号をデジタルオーディオプロセッサで

デジタル方式に変換した後ビデオセットレコーダー（三菱、VH-F32）で記録・保管した。

4-2-4 細胞内 pH の測定

細胞内 pH の測定は蛍光 pH 指示薬 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF)を用いた画像解析により行った。単離した骨髓細胞を、ディッシュのなかに円形のカバーガラスを入れた容器で 5 mM の BCECF acetoxymethyl ester (AM)の存在下に 40 分間インキュベートし、カバーガラスを取り出して標準外液で三度洗浄して記録チャンバーにマウントしてから倒立蛍光顕微鏡のステージにセットした。細胞内 pH は、Argus 50 画像解析装置（浜松フォトニクス）を用いて、BCECF を 440nm と 490nm で励起した蛍光を 510nm ダイクロイックリフレクターと 520nm ロングパスフィルターを通過後に取り込んで、その蛍光比から求めた。このシステムでの最小記録間隔は 2 秒であった。BCECF の蛍光は実験の終了時に Paradiso らの方法¹⁵⁾で pH に換算した。細胞にガラス電極が接続してあることによる静止期の細胞内 pH 及び薬物による細胞内 pH の変化への影響はなかった。

4-2-5 薬物

ATP、nystatin 及び FCCP は Sigma Chemical 製のものを使用した。HEPES、IP₃ は同仁化学、BCECF-AM は Molecular Probes (USA)から購入した。各薬物は標準外液に溶解してその日のうちに使った。ATP 及びその関連化合物は pH を調整し直してから使用した。

薬物の投与は Y-tube 法により行った^{16,17)}。実験中、薬物を投与するためのマイクロビペットの先端は細胞から約 500μm の距離に置いた。この方法により、単離巨核球の周辺の溶液を 20ms 以内に交換できる。

4-3 結果

4-3-1 巨核球の細胞内 pH 変化の影響

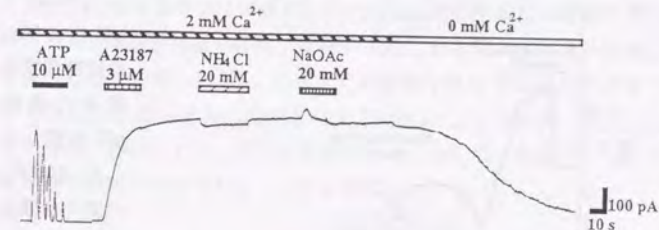


Fig. 4-1 Effects of NH_4Cl and NaOAc on the Ca^{2+} -activated K^+ channel itself. A23187-permeabilized megakaryocyte was treated with 20 mM NH_4Cl and NaOAc .

最初にここで用いる薬物の巨核球 K^+ チャンネルへの直接作用を検討した。巨核球を 3mM の ionomycin で処理すると標準の 2mM Ca^{2+} を含む細胞外液中では Ca^{2+} -activated K^+ チャンネルは完全に活性化される。このとき 20 mM の NH_4Cl は 5% 以内の弱い K^+ 電流抑制作用を示した (Fig. 4-1)。この抑制の程度は実験結果に重大な影響は与えないと判断した。20 mM NaOAc は全く影響がなかった。ionomycin 処理はこれら薬物による細胞内 pH の変化には影響しないことも確認した。

4-3-1-1 巨核球における細胞内 pH の変化

巨核球の細胞内 pH は静止状態では 7.29 ± 0.23 ($n=7$) であった。Fig. 4-2A に示すように 20 mM NH_4Cl は速やかなアルカローシスを誘発し、投与期間中持続する。細胞内 pH の上昇値は最大 0.81 ± 0.15 で、投与直後に最大に上昇した後、徐々に回復傾向を示す。 NH_4Cl を洗浄した後は酸性側に細胞内 pH が変化し、その後しばらくして元のレベルに回復する。このときの酸性側への pH 変化は静止レベルから 0.5-0.75 程度であった。 NH_4Cl 洗浄後のアシドーシスの程度は NH_4Cl の投与時間に依存する。一方 20 mM NaOAc は急速で一時的な細胞内 pH の酸性化を誘発する。pH の変化は最大 0.51 ± 0.05 ($n=4$) で、 NaOAc が持続

的に存在していても元のレベルに回復し、NaOAcを洗浄した後は特に変化はみられない。典型的には細胞内pHの酸性化は2-3分持続するがその回復の時間には細胞間でばらつきがある。

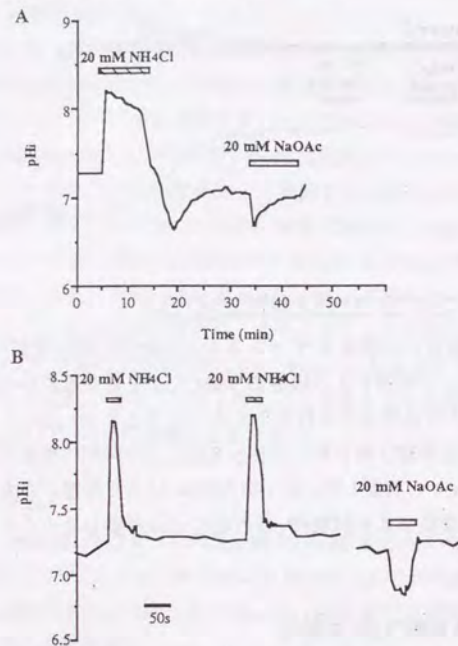


Fig. 4-2 The pH_i changes evoked by 20 mM NH_4Cl and 20 mM NaOAc in long (A) and short (B) time scale. The ratio images of single megakaryocyte loaded with BCECF were obtained with 20 s (A) and 2 s (B) interval and calibrated to pH_i . The drugs were applied during the period of each horizontal bar. The line represent a typical one from five (A) and three (B) experiments.

4-3-1-2 ATP誘発性 K^+ 電流オシレーションに与える細胞内pHの影響

ATP 10 μM により誘発される I_{KCa} オシレーションに対する20 mM NH_4Cl と

Fig. 4-2Bには NH_4Cl とNaOAcの短時間投与の場合の細胞内pHの変化を示した。細胞内pHの変化は薬物投与後2秒以内に起こり洗浄により速やかに回復している。さらに短時間投与の場合には NH_4Cl の洗浄後のアシドーシスはみられない。そこで NH_4Cl とNaOAcを短時間投与で用いることにした。なおATP 10 μM は細胞内pHにはなんら影響しなかった。

NaOAcの影響について検討した。Fig. 4-3Aに示すように20 mM NH_4Cl は振動性 K^+ 電流をほぼ完全に抑制した。その抑制作用は可逆的で洗浄により反応は完全に回復する。一方20 mM NaOAcはATP誘発性 K^+ 電流オシレーションを増強する。ATP 10 μM は通常はほぼ最大に近い反応を誘発するため増強作用は観察されにくい、反応性の悪い細胞では弱い反応しか惹起されないためFig. 4-3Bに示すような結果が得られる。この細胞では振動性の K^+ 電流は極めて早く減衰しているがそこに20 mM NaOAcを投与するとATP応答の回復(頻度と電流の大きさの増加)がみられる。同様の増強作用は1 μM ATPを投与したふつうの反応性を持つ細胞でもみられる(データは示していない)。

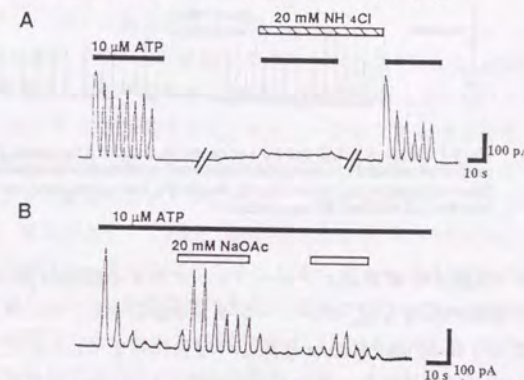


Fig. 4-3 Effects of 20 mM NH_4Cl and 20 mM NaOAc on the 10 μM ATP-induced oscillatory K^+ currents. The current traces were obtained by nystatin perforated patch recording configuration at a holding potential of -40 mV. Each drug was applied during a period indicated by horizontal bars. The current traces are typical ones from nine (A) and seven (B) experiments.

4-3-1-3 IP_3 誘発性 K^+ 電流オシレーションに与える細胞内pHの影響

細胞内pHの影響についてさらに細胞内に IP_3 を直接投与した場合の I_{KCa} オシレーションの系で検討した。この系では電極内液に3-10 μM の IP_3 を含む記録電極を用い、conventional法で生じる細胞膜上の小孔から細胞内へ IP_3 を拡散により投与するもので、細胞外からATPを投与した場合と同様に I_{KCa} オシレーシ

オンが観察される。Fig. 4-4A に示すように 20 mM NaOAc による細胞内の酸性化は IP_3 誘発性の I_{KCa} オシレーションにはなんら影響を与えなかった。一方 20 mM NH_4Cl は可逆的に IP_3 誘発性の I_{KCa} オシレーションを抑制した (Fig. 4-4B)。

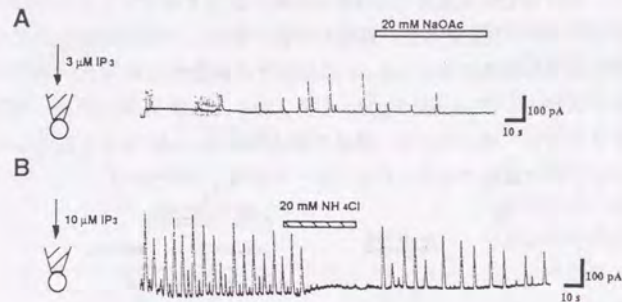


Fig. 4-4 Effects of NH_4Cl and NaOAc on the IP_3 -induced K^+ -currents. The current traces were obtained by conventional whole-cell patch mode with recording pipettes filled with internal solution containing 10 μM IP_3 . The current traces are typical ones from five (A) and four (B) experiments.

4-3-1-4 GTP- γ -S 誘発性 K^+ 電流オシレーションに与える細胞内 pH の影響

GTP- γ -S の細胞内投与も I_{KCa} オシレーションを誘発する。この系に対しては Fig. 4-5 に示すように 20 mM NaOAc は反応の増強作用を示した。ただしその増強の様子は ATP の細胞外投与の場合とは多少異なり、NaOAc の投与から反応が現れるまでわずかではあるが時間がかかることと洗浄後もすぐには効果が消失しないことが特徴といえる。20 mM NH_4Cl はこの系の場合でも可逆的に反応を抑制した。

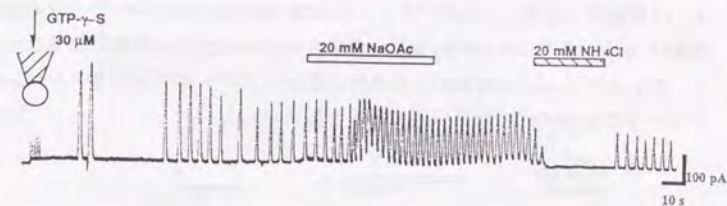


Fig. 4-5 Effects of NH_4Cl and NaOAc on the GTP- γ -S-induced K^+ -currents. The current traces were obtained by conventional whole-cell patch mode with recording pipettes filled with internal solution containing 10 μM GTP- γ -S. The current trace is a typical one from six experiments.

4-3-2 ミトコンドリア脱共役剤の影響

まず巨核球に対する FCCP 単独での作用を調べたが、0.1-1 μM の FCCP を最長で 10 分間投与したが、電気的応答は全く検出されなかった (データは示していない)。次いで ATP 誘発性の I_{KCa} オシレーションに対する影響を調べた。10 μM ATP で誘発される反応に対する 1 μM FCCP の作用は細胞により異なる。Fig. 4-6 に示すように最初スパイク以外の I_{KCa} 電流を抑制するタイプ(A)が 8 細胞中 5 細胞で、電流の大きさに加えて活性化された K^+ チャンネルのベースラインへの回復も抑制し、一過性の電流のような形に変えるタイプ(B)が 8 細胞中 3 細胞で観察された。このような電流の回復の阻害は Ca^{2+} -ATPase 阻害剤 thapsigargin によっても誘発されることを先の章で紹介している。FCCP は二番目以降のスパイクの大きさを対照群の $13 \pm 9\%$ に抑制した ($n=8$)。いずれのタイプでも FCCP の作用は可逆的で、洗浄後約 1 分で元の反応性が回復する。さらに ATP の濃度を変えて FCCP の作用について検討したのが Fig. 4-6C で、1 μM ATP の反応に対しては実験に用いた 6 細胞のすべてで完全な抑制、100 μM ATP の反応に対しては実験に用いた 6 細胞のすべてでオシレーションのパターンの阻害が観察された。

細胞内 IP_3 投与による I_{KCa} オシレーションに対する FCCP の影響についても検討した。Fig. 4-7 に示すように 10 μM IP_3 を含む電極内液を満たした記録電極を用いて細胞内に IP_3 を投与して誘発した I_{KCa} オシレーションを、FCCP は完全に抑制 (7 細胞中 5 細胞) または回復の抑制による持続的 I_{KCa} の活性化に変化させ

た(7細胞中2細胞)。このパターンはATP誘発性のオシレーションの場合と同様である。また100 μM IP_3 を用いた場合には4細胞中4細胞で後者のパターン(Fig. 4-7C)による修飾がみられた。従ってFCCP感受性のステップは細胞内プールからの Ca^{2+} の放出以降にあると考えられる。

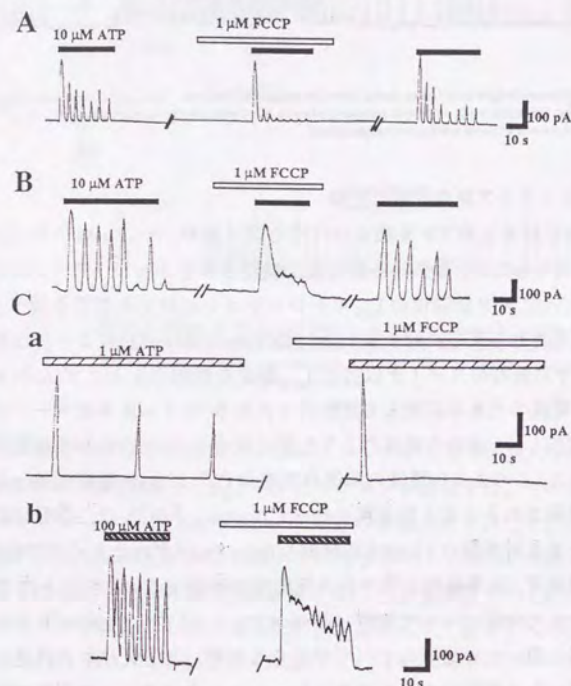


Fig. 4-6. Effects of FCCP on the ATP-induced repetitive I_{KCa} . Recordings were performed with nystatin perforated whole-cell configuration. V_{H} was -40 mV. FCCP (1 μM) was applied about 1 min before ATP application. A and B; Effects of FCCP on 10 μM -ATP-induced response. Current traces were obtained from two different cells. In A, FCCP suppressed reversibly only the rising phase of I_{KCa} spikes. In B, FCCP inhibited both rising and falling ones. C; Responses induced by low (a, 1 μM) and high (b, 100 μM) concentrations of ATP in the presence and absence of FCCP. Drugs were continuously applied for the period indicated by the horizontal bars above each current trace. Each current trace is typical of three to seven reproducible observations.

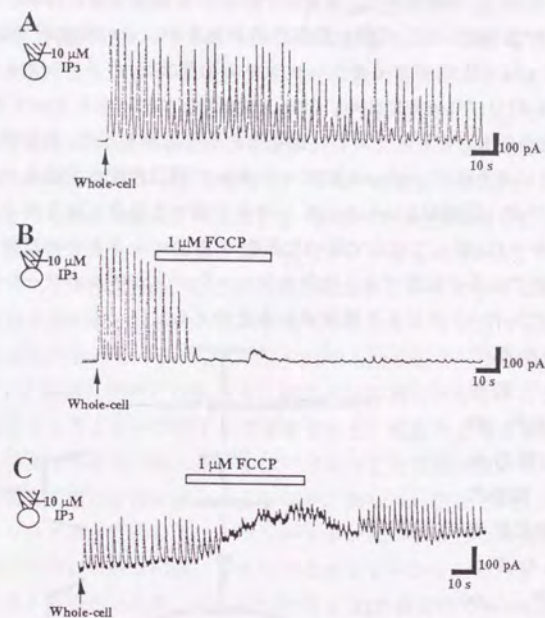


Fig. 4-7. Effect of FCCP on IP_3 -induced I_{KCa} oscillation. Recordings were performed by the conventional whole-cell mode. The recording pipette was filled with internal solution containing 10 μM IP_3 . Arrows indicate the start of internal perfusion with IP_3 -containing pipette solution. Intracellular application of IP_3 initiated repetitive I_{KCa} spikes (A) and application of FCCP (1 μM) modulated the current oscillation with different pattern (B and C). FCCP was applied extracellularly during a period indicated by horizontal bars. Each current trace is typical of three to five reproducible observations.

4-4 考察

巨核球のATP誘発性の I_{KCa} オシレーションに対する細胞内pH変化及びFCCPの影響について検討した。

20 mM NH_4Cl と NaOAc の短期投与により巨核球の細胞内pHを再現性良くアルカリ性化または酸性化することができた。20 mM NH_4Cl によるアルカロシ

スは ATP 及び IP_3 誘発性の I_{KCa} オシレーションをほぼ完全に抑制した。20 mM NH_4Cl は K^+ 伝導度に対して弱い阻害作用があるが、その程度が 5% と小さいことから 20 mM NH_4Cl によるオシレーションの阻害は K^+ チャンネルへの直接作用によるものではないといえる。20 mM $NaOAc$ によるアシドーシスは ATP 及び IP_3 誘発性の I_{KCa} オシレーションを増強する作用があった。ある種の細胞では酸性の pH により Ca^{2+} -activated K^+ チャンネルの開閉頻度が抑制されるという報告がある¹⁸⁾が、巨核球を whole-cell レベルで調べた場合にはそのような作用はみられなかった。従ってここで用いた薬物の K^+ チャンネルへの直接作用は無視できる程度であると結論でき、 Ca^{2+} オシレーションがアルカローシスにより抑制され、アシドーシスにより増強されるといえる。

種々の細胞でアゴニスト刺激による細胞内 pH の変化が報告されており、細胞内 pH の役割に関する考察もなされてきた^{19,20)}。しかし細胞内 pH の本当の作用点については明らかになってはいない。

Worley ら²¹⁾は細胞内 pH が IP_3 の受容体への結合に影響することを示唆しているが Dentbarn ら²²⁾は細胞内 pH は Ca^{2+} の放出に影響があると主張している。本研究では細胞内 pH の影響するポイントを同定することも目的とした。先の章で明らかにしたように巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションは、受容体刺激-G 蛋白質活性化- IP_3 産生-細胞内プールからの Ca^{2+} の放出- Ca^{2+} の再取り込みまたは排出という信号伝達経路を

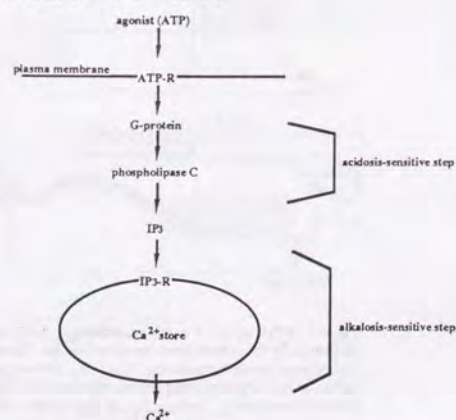


Fig. 4-8 Schematic representation of the pH sensitive steps in signal transduction system

介する。アシドーシスの場合は ATP 及び GTP- γ -S 誘発性の I_{KCa} オシレーションを増強するが IP_3 誘発性のオシレーションには影響しないため、酸性の pH で修飾されるのは IP_3 産生以前で G 蛋白質活性化以後の点であるといえる。一方アルカローシスの場合は ATP、GTP- γ -S、 IP_3 により誘発される I_{KCa} オシレーションのすべてに対して抑制作用を示したことから、アルカリ性の pH が影響するのは IP_3 産生以降の過程、つまり受容体への IP_3 の結合が細胞内ストアからの Ca^{2+} の放出そのものであるといえる (Fig. 4-8)。この結果は信号伝達経路には複数の pH 感受性ステップがあることを明らかにするものである。

さらにこうした細胞内 pH 変化の生理的意義について考察すると、例えば thrombin は血小板に最初酸性化、後にアルカリ化という細胞内 pH 変化をもたらすことが報告されている¹²⁾。もし巨核球でも血小板と同様の変化が起これば、 Ca^{2+} 応答は初期には促進され後半では抑制されることになる。これは細胞の反応をよりシャープにすることを意味し、出血のような迅速な反応が要求される場面では有利であろう。生体内でこうした機構が働いているかどうかはさらに研究を重ねなければわからないが、興味深い現象といえる。

FCCP については巨核球の I_{KCa} オシレーションに対する二つの異なる作用が観察された。一つは単純な抑制、もう一つはオシレーションのパターンを持続的な上昇に変えることである。どちらの作用も ATP 誘発性でも IP_3 誘発性のオシレーションでもみられたことから作用点は信号伝達経路の IP_3 以降にあるといえる。

後者と同様の作用は Ca^{2+} -ATPase 阻害剤を投与した場合にもみられる。またこの形になるのは ATP や IP_3 の濃度が高いときで、より多くの Ca^{2+} が短時間に動員される場合であることから Ca^{2+} -ATPase 阻害によることが示唆される。1 μ M FCCP による Ca^{2+} -ATPase 阻害作用がそれほど強くないために、影響が出るのは高レベルの Ca^{2+} が動員された場合のみになると考えられるからである。

一方単純な抑制は Ca^{2+} 動員の抑制か Ca^{2+} -ATPase の活性化がメカニズムとして推測されるが、既に述べたように FCCP に Ca^{2+} -ATPase 阻害作用があるとするれば Ca^{2+} -ATPase の活性化は除外されよう。従って Ca^{2+} 動員の抑制が考えられる。すなわち IP_3 受容体への IP_3 の結合を阻害するか貯蔵部位からの放出を阻害

するかである。

ところでこうした FCCP の作用はどういう性質からきているのであろうか。FCCP は細胞内各種器官のプロトン勾配を破壊するが、その結果としてエネルギー欠乏を引き起こす。エネルギー欠乏は様々な経路に影響を与え得るが、Fig. 4-7 のように細胞に電極内から持続的に ATP を供給しても ATP を供給しない場合 (Fig. 4-7) と結果がほとんど一緒であることから、この場合には関与していないといえる。FCCP にはアシドーシスを誘発する作用があるという報告²³⁾もあるが、この章の前半に示したようにアシドーシスはむしろ I_{KCa} オシレーションを増強するのでこれも関係がないようである。さらに Schulz ら²³⁾は IP_3 感受性の Ca^{2+} プールへの Ca^{2+} 取り込みは H^+ 勾配により活性化される Ca^{2+} - H^+ 交換体により行われることを示唆している。この説は本研究結果と矛盾せず、こうした機構が働いている可能性はある。いずれにしても細胞内 Ca^{2+} 調節機構に対する FCCP の作用は単純なものではなく、複数の作用部位が存在すると考えられる。そういう意味では FCCP やその他のプロトン透過性イオノフォアは生きている細胞の Ca^{2+} 調節機構を調べる道具としてはあまり適切ではないかもしれない。

以上のようにラット巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションは、細胞の生理機能を単一細胞レベルで解析するのに極めて有用である。この系を用いて研究を進めることでさらに細胞機能の理解が深まることを期待する。

4-5 小括

1. ラット巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションに対する細胞内 pH 及びミトコンドリア脱共役剤 FCCP の影響を調べた。
2. 20 mM NH_4Cl による細胞内のアルカリ性化は ATP、GTP- γ -S、 IP_3 誘発性の I_{KCa} オシレーションを抑制した。
3. 一方 20 mM $NaOAc$ による細胞内の酸性化は ATP、GTP- γ -S 誘発性の反応を増強し、 IP_3 誘発性の反応には影響しなかった。
4. 従って巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションには細胞内 pH に感受性のポイントが少なくとも二カ所存在する。
5. FCCP は低濃度の ATP により誘発される I_{KCa} オシレーションを抑制するが

高濃度の ATP により誘発される反応はオシレーションのパターンを持続的上昇に変える。

6. IP_3 を直接細胞内に投与した場合の I_{KCa} オシレーションに対しても FCCP の作用は基本的には同じで、作用点は IP_3 産生の後の Ca^{2+} 動員・排出機構にあると考えられる。

第5章 ラット巨核球のプリン受容体活性の adenine による修飾

5-1 緒言

これまでも述べてきたようにラット巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションは、非興奮性細胞の細胞質 Ca^{2+} オシレーションのモデルとして優れている。それと同時に巨核球のプリン受容体は既知のサブタイプとは異なり、特有の性質を持つ。これらの特徴により、この系を用いてこれまで全く知られていなかった、プリンそのものの生物活性を検出することに成功したので報告する。

5-2 実験方法

5-2-1 細胞の調製

体重 250-300g の雌雄 Wistar ラットを過剰量のジエチルエーテルで麻酔し、頚動脈切断により屠殺した。大腿骨を単離し、注射筒と針を用いて標準外液で洗浄することにより骨髓液を得た。75 μ m のナイロンメッシュで濾過して細胞の塊をのぞいた後、細胞懸濁液を記録用チャンバー (Falcon, Primaria tissue culture dish) に移した。記録用チャンバーは室温で数時間放置し、細胞が底に固着するのを待った。巨核球は位相差顕微鏡下ではその大きさから (40-50 μ m) 容易に識別可能である。細胞の記録は単離後 8 時間以内に行った。

5-2-2 溶液

標準外液の組成は、150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 10mM glucose, 10 mM HEPES で、pH を Tris-OH で 7.4 に調整した。Perforated patch のピペット内液の組成は、50mM KCl, 10mM Hepes, pH 7.2 である。Nystatin は 1N HCl で pH を 2 にした酸性メタノールに溶解し、KOH で pH を 7.2 に調整して 10mg/ml のストック溶液を作成した。このストック溶液をピペット内液に最終濃度 50-100 μ g/ml に溶解して実験に用いた。

5-2-3 電気生理学的測定

巨核球の全細胞電流は Horn らによる方法¹⁾に従って室温 (21-24°C) で nystatin perforated 法により記録した。ピペットは 1.5mm の細管 (ナリシゲ) から二段階にピペットブローラー (ナリシゲ, PB-7) で引いて作成し、先端を fire polish した。ピペット溶液を満たした記録電極とレファレンス電極との間の電気抵抗は 5-10 Ω であった。Perforated patch-clamp モードでのアクセス抵抗は 4min 以内には安定し、その値は conventional whole-cell モードの場合と同様であった。電流と電圧の測定にはパッチクランプアンプ (List, EPC7) を使い、同時にペンレコーダー (三栄、RECTI-HORIZ-8K) で記録し、電気信号をデジタルオーディオプロセッサでデジタル方式に変換した後ビデオカセットレコーダー (三菱、VH-F32) で記録・保管した。

5-2-4 薬物

ATP、adenine 及び nystatin は Sigma Chemical 製のものを使用した。HEPES は同仁化学、H-8 (N-[2-methyl(amino)ethyl]-5-isoquinoline sulphonamide dihydrochloride) は生化学工業から購入した。各薬物は標準外液に溶解してその日のうちに使った。ATP 及びその関連化合物は pH を調整し直してから使用した。

薬物の投与は Y-tube 法により行った²³⁾。実験中、薬物を投与するためのマイクロピペットの先端は細胞から約 500 μ m の距離に置いた。この方法により、単離巨核球の周辺の溶液を 20ms 以内に交換できる。

5-3 結果

初めに adenine、guanine、cytosine、uracil 各単独での巨核球に対する作用を調べたが最大 1mM まで用いてもなんの反応も惹起しなかった (データは示していない)。しかし adenine には 1 μ M ATP または 0.01 μ M ADP により誘発される I_{KCa} オシレーションを増強する作用があった。Fig. 5-1A に示すように、1 μ M adenine は再現性良く 1 μ M ATP の反応を増強した。guanine、cytosine、uracil には最大 1mM まで用いてもなんの修飾作用も認められなかった。adenine の作用

は投与後 14 ± 3 秒で観察され、洗浄後は 31 ± 11 秒で消失した (いずれも $n=7$)。

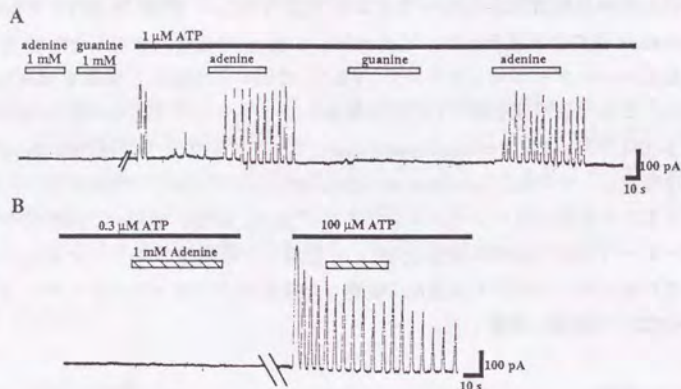


Fig. 5-1. A: Response of adenine and guanine in the presence and absence of ATP. Note that adenine (1 mM) alone evoked I_{KCa} spikes in the presence of 1 μM ATP. B: Effect of adenine on the responses induced by low (0.3 μM) and high (100 μM) of ATP. Megakaryocyte was voltage-clamped at a V_H of -40 mV. Drugs were continuously applied for the period shown by the bars above each response. Each current trace was obtained from two different cells.

先に報告したように ATP は単独では 1-10 μM のレンジで巨核球の I_{KCa} オシレーションを惹起する。そこでその範囲より低い 0.3 μM 及び高い 100 μM ATP の反応に対する adenine の修飾作用を検討したがいずれの場合も効果はみられなかった (Fig. 5-1B)。従って adenine の作用は ATP の濃度に依存している。

次に 3 μM ATP により誘発される I_{KCa} オシレーションに対する adenine の作用の用量-反応相関について検討した。結果を Fig. 5-2 に示す。adenine は 1 μM から I_{KCa} オシレーションの頻度を増強したが電流の大きさにはほとんど影響しなかった。adenine の ED50 値は約 80 μM であった。

また ATP 以外の受容体を刺激して巨核球に I_{KCa} オシレーションを誘発する thrombin 5 U/ml の反応に対しては adenine は全く影響を与えなかった。thrombin 5 U/ml は ATP 1 μM とほぼ同様の強さの反応を誘発する濃度である。そして adenine 300 μM による ATP 1 μM の反応の増強作用は cAMP 依存性 protein kinase 阻害剤である H-8 や adenylate cyclase 活性化剤である forskolin の存在下でも全く影響されない。さらに細胞外液中 Ca^{2+} や Mg^{2+} を除去した場合にも adenine の作

用に変化はみられなかった (図は示していない)。

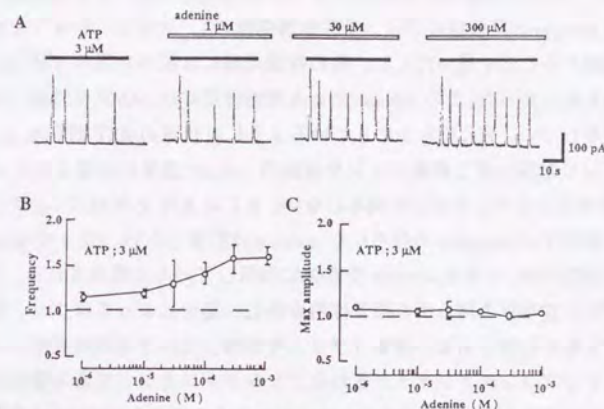


Fig. 5-2. Concentration-dependent enhance by adenine of the ATP-induced I_{KCa} oscillation. A: Typical current traces obtained from the same cell. V_H was -40 mV. Adenine at each concentration was applied 1 min prior to the application of ATP. The current traces were obtained from single cell, and a typical one of 5 cells examined. B: Quantitative results obtained from A. The value of frequency and maximum current amplitude (I_{max}) were normalized to the value obtained by 3 μM ATP alone. Each value represents the mean \pm S.E.M. of five to six cells.

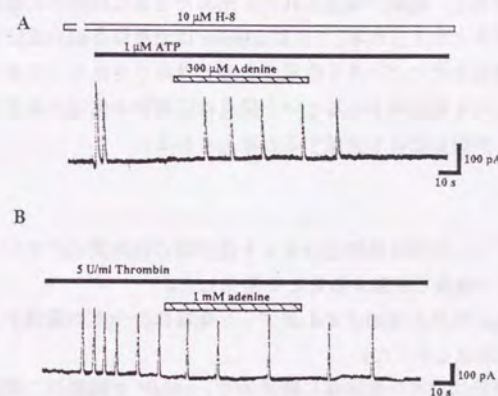


Fig. 5-3. Mechanism of the enhancing effect of adenine. A: Effect of adenine in the presence of H-8. B: Effect of adenine on thrombin-induced I_{KCa} oscillation.

5-4 考察

ここでは adenine が巨核球のプリン受容体誘発性の I_{KCa} オシレーションを濃度依存的に増強することを見いだした。他の核酸塩基には調べた限りではなんの作用も認められなかった。この adenine による修飾作用には cAMP や外液二価陽イオンは関与しない。先に明らかにしているように巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションは細胞外液二価陽イオンや細胞内 cAMP 濃度に影響されるが、adenine の作用にはこうした因子は関与しない。さらに ATP と同様に I_{KCa} オシレーションを誘発する thrombin の作用にも adenine は影響しない。従って adenine は巨核球の細胞表面、つまり adenine 受容体に作用していると推定される。この受容体はプリン受容体と何らかの相互作用を示し、場合によってはプリン受容体の一部である可能性もある。通常「プリン受容体」という単語は実際にはそのアゴニストがプリンヌクレオチドまたはプリンヌクレオシドである受容体に対して用いられてきたもの⁹⁾であるが、プリンそのものである adenine に反応する受容体があるとするこの用語は必ずしも適切とはいいがたくなることから、本発見はこの分野にとっても興味深い知見である。

Adenine は ATP や cAMP などの生理活性物質または DNA や RNA などの核酸の主要中間体であり、細胞が傷害されたり死んだときに細胞外に放出されたり細胞外で生成すると考えられる。さらに adenine は血液保存剤の成分として使われている⁹⁾が何らかのアゴニスト作用があるとはみなされてこなかった。したがって adenine に生理作用があるという発見は巨核球の生理のみならず血液凝固のメカニズム解明などにも貢献すると考えられる。

5-5 小括

1. adenine がプリン受容体誘発性のラット巨核球の細胞質 Ca^{2+} オシレーションを mM 以下の濃度で増強することを発見した。
2. adenine は反応強度を増加させるがプリン受容体の作用の発現する用量を減少させる作用はなかった。
3. adenine の作用はプリン受容体に特異的で、cAMP や細胞外二価陽イオンな

どの影響はなかった。

4. guanine などの他の核酸塩基にはこうした作用は認められなかった。

第6章 ラット巨核球の形態変化のセカンドメッセンジャーはカルシウムではなく cAMP である

6-1 緒言

前章まで巨核球の I_{KCa} オシレーションについて、主に ATP をアゴニストとして用いて解析を進めてきた。しかしこれまでに何度か言及したように thrombin にも巨核球の I_{KCa} オシレーションを誘発する作用がある。巨核球から生じる血小板では、thrombin は単独で強い凝集を誘発する「強いアゴニスト」、ADP は他の刺激が共存したときにのみ凝集や顆粒成分の放出を誘発する「弱いアゴニスト」として分類されている¹⁾。そこでここでは巨核球の場合について、ATP と thrombin の作用の違いを I_{KCa} の測定による Ca^{2+} 動員、蛍光分光法による 5-HT の放出、走査電子顕微鏡 (SEM) による形態観察の三点から解析した。

6-2 実験方法

6-2-1 細胞の調製

体重 250-300g の雌雄 Wistar ラットを過剰量のジエチルエーテルで麻酔し、頸動脈切断により屠殺した。大腿骨を単離し、注射筒と針を用いて標準外液で洗浄することにより骨髓液を得た。75 μ m のナイロンメッシュで濾過して細胞の塊をのぞいた後、細胞懸濁液を 5-HT 測定用と SEM 用ではそのまま用い、電気生理学的測定には記録用チャンバー (Falcon, Primaria tissue culture dish) に移した。記録用チャンバーは室温で数時間放置し、細胞が底に固着するのを待った。巨核球は位相差顕微鏡下ではその大きさから (40-50 μ m) 容易に識別可能である。細胞の記録は単離後 8 時間以内に行った。

6-2-2 溶液

標準外液の組成は、150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 10mM

glucose, 10 mM HEPES で、pH を Tris-OH で 7.4 に調整した。Perforated patch のピペット内液の組成は、50mM KCl, 10mM HEPES, pH 7.2 である。Nystatin は 1N HCl で pH を 2 にした酸性メタノールに溶解し、KOH で pH を 7.2 に調整して 10mg/ml のストック溶液を作成した。このストック溶液をピペット内液に最終濃度 50-100 μ g/ml に溶解して実験に用いた。5-HT 測定用緩衝液は 137mM NaCl, 12 mM $NaHCO_3$, 5.6mM glucose, 2.7mM KCl, 0.4mM NaH_2PO_4 , 2mM $MgCl_2$, 3.6mM $CaCl_2$, 5mM HEPES, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4 である。

6-2-3 電気生理学的測定

巨核球の全細胞電流は Horn らによる方法²⁾に従って室温 (21-24°C) で nystatin perforated 法により記録した。実験により conventional whole-cell patch clamp 法³⁾も用いた。ピペットは 1.5mm の細管 (ナリシゲ) から二段階にピペットプーラー (ナリシゲ, PB-7) で引いて作成し、先端を fire polish した。Perforated patch-clamp モードでのアクセス抵抗は 4 分以内には安定し、その値は conventional whole-cell モードの場合と同様であった。電流と電圧の測定にはパッチクランプアンプ (List, EPC7) を用い、同時にペンレコーダー (三栄, RECTI-HORIZ-8K) で記録し、電気信号をデジタルオーディオプロセッサでデジタル方式に変換した後ビデオカセットレコーダー (三菱, VH-F32) で記録・保管した。

6-2-4 セロトニンの定量

骨髓細胞は Ca^{2+} - Mg^{2+} -free の測定用緩衝液に 1.5×10^7 cells/ml に懸濁し、200 μ l ずつ試験管に分注した。そこに薬物を測定用緩衝液に溶解して 200 μ l ずつ加え、37°C でインキュベートし、600 μ l の氷冷した Ca^{2+} - Mg^{2+} -free の測定用緩衝液を加えて反応を停止させた。4°C、1000xg、5 分遠心した後、その上清をとって測定に用いた。上清中の蛋白質は 70% 過塩素酸を加えた後遠心して除去した。5-HT の測定は Nathenas らの方法⁴⁾により、日立 F-4010 蛍光光度計を用いて蛍光分光法で行った。各値は対照値で補正した。図中のデータは Student の t 検定で検定した。

6-2-5 走査型電子顕微鏡による観察

骨髓細胞懸濁液はポリリジンコートのスライドガラス（マツナミ）上で、CO₂ インキュベーター内で最低 30 分放置した。薬物の処理もスライドガラス上で行った。細胞は 1% glutaraldehyde (0.1M phosphate buffer, pH 7.4) で 2 時間前処理し、次いで 1% osmic acid (0.1M phosphate buffer, pH 7.4) で 1 時間固定した。固定後、細胞をエタノール系列で脱水し、臨界点乾燥法で乾燥後金蒸着を行い、JSM-840A JEOL 走査型電子顕微鏡（日本電子）で観察した。

6-2-6 薬物

ATP、thrombin、nystatin、IBMX、forskolin は Sigma Chemical 製のものを使用した。HEPES は同仁化学、H-8 は生化学工業から購入した。各薬物は標準外液に溶解してその日のうちに使った。ATP は pH を調整し直してから使用した。

薬物の投与は Y-tube 法により行った^{5,6)}。実験中、薬物を投与するためのマイクロピペットの先端は細胞から約 500μm の距離に置いた。この方法により、単離巨核球の周辺の溶液を 20ms 以内に交換できる。

6-3 結果

6-3-1 Ca²⁺動員

ATP と thrombin はいずれも保持電位 -43mV で巨核球に I_{KCa} オシレーションを誘発する。両タイプのアゴニストで誘発されるほぼ最大の反応について、Table 1 に

Table 6-1 Characteristics of oscillatory K⁺ current

Agonists	I _{max}	Frequency
ATP (30 μM)	1*	1*
ADP (1 μM)	1.05 ± 0.10	1.04 ± 0.06
Thrombin (30 U/ml)	1.02 ± 0.12	0.96 ± 0.16

The values indicated are normalized to those of 30 mM ATP-induced one(*) (I_{max}; 638.2 ± 71.1 pA (n=6), frequency; 0.20 ± 0.02/s (n=6)). Each value represents the mean ± S.E.M. from four to six cells.

まとめた。最大電流及び最大頻度両方のパラメーターで ATP、ADP、thrombin の間になんら違いは認められなかった。さらに forskolin 1μM または IBMX 10μM による抑制についても調べたが ATP と thrombin いずれの反応もこれら薬物により完全に抑制された（データは示していない）。

6-3-2 セロトニンの放出

次に巨核球のセロトニン (5-HT) 放出に対する ATP と thrombin の作用を検討した。巨核球は骨髓細胞中の約 0.2% を占めるにすぎず、極めて数が少ないため最初は Levine らの方法⁷⁾により精製することを試みた。しかし精製の段階でかなりの長時間 (30 分以上) Ca²⁺-free で cAMP 上昇薬を複数含んだ緩衝液にさらされるため、whole-cell patch-clamp 法でモニターした場合 ATP と thrombin に対する反応性が低下する。こうした処置は精製中の巨核球の凝集を防ぐために必

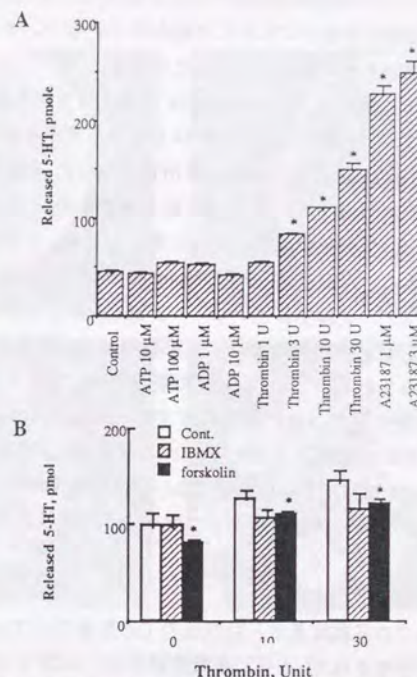


Fig. 6-1. 5-HT release from bone marrow cells (A). The released 5-HT from bone marrow cells 1.0×10^7 per tube. The incubation was for 60 min at 37 °C. B: Bone marrow cell suspension (1.5×10^7 cells/tube) was incubated at 37 °C for 30 min under mild shaking with 100 μM IBMX (shaded column) or 10 μM forskolin (closed column). Each value represents mean ± S.E.M. from three samples. * represent the significant level of $p < 0.05$ as tested for the difference between the experimental and corresponding control.

要で、この方法は形態的には無傷の巨細胞を得られるとしているが機能的には問題がある。また骨髓細胞そのものを用いて 5-HT 含量を測定したところ、 10^7 個あたり約 500 pmol の、ラット血小板では 10^7 個あたり 200 pmol の 5-HT が検出された。巨核球 1 つから 4.8×10^3 の血小板が産生され⁸⁾、骨髓細胞中の約 0.2% が巨核球でその中には小さなサイズのものも含まれるとすれば骨髓細胞中の 5-HT はほとんどが巨核球由来であるといえる。また巨核球以外に 5-HT を多量に含んだ細胞は骨髓中にはあまり知られていない。そこで精製は行わず、骨髓細胞懸濁液のまま実験に用いることにした。

Fig. 6-1A に示すように thrombin は 3 U/ml 以上から濃度依存的に 5-HT の放出を引き起こす。一方 ATP と ADP は全く作用がみられない。同じ動物から採取した血小板は ADP により凝集する活性があった。細胞内 Ca^{2+} 濃度を不可逆的に上昇させる A23187 は 5-HT 放出を起こさせるが、この場合は細胞がほとんど消失しているので細胞の融解によると考えられる。すなわち最大放出値とみなすことができる。ATP や ADP と thrombin を同時に投与しても相加作用はみられなかった（データは示していない）。thrombin には細胞内 Ca^{2+} 濃度を上げると同時に G_i を活性化することにより細胞内 cAMP 濃度を減少させる作用のあることが知られているので、cAMP 増加薬の影響についても調べた。Fig. 6-1B には thrombin 誘発性の 5-HT 放出に対する forskolin と IBMX の作用を示した。forskolin には対照群及び thrombin による 5-HT の放出を弱いながら抑制する活性があった。IBMX では有意差はないが抑制傾向があった。従って 5-HT の放出には cAMP が負の調節因子として関与する可能性が示唆された。

6-3-3 形態変化

これまでの実験結果から巨核球の Ca^{2+} 動員だけでは 5-HT の放出はおこなうことが示唆された。さらに超微形態学的に ATP と thrombin の作用を調べた。Fig. 2A に示すように骨髓から単離した巨核球は SEM で観察すると比較的表面のなだらかな球状をしている。細胞の大きさは様々であるが細胞表面の様子はいずれも同様であった。こうした性質は ATP の処理によってもほとんど変わらない (Fig. 6-2B) が thrombin では大きく変化する (Fig. 6-2C)。Thrombin は巨

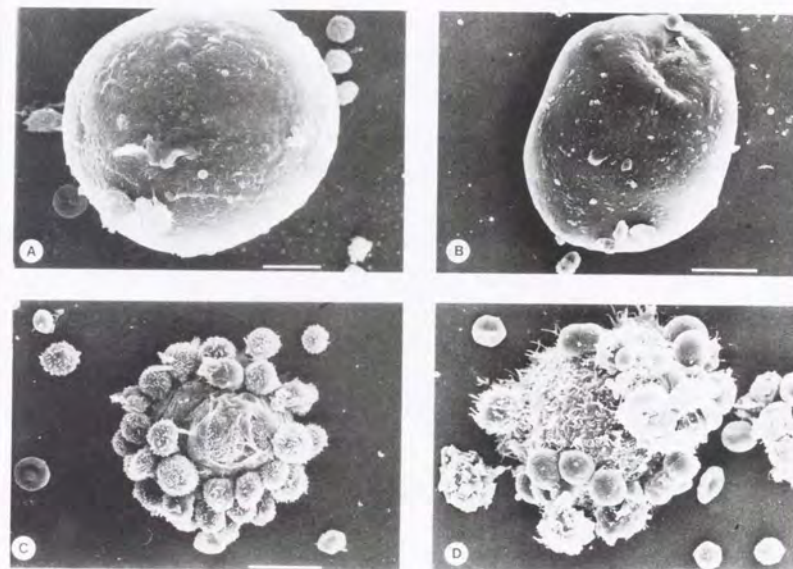


Fig.6-2. Scanning electron micrograph of megakaryocyte treated with agonists. The treatments were as follows: standard external solution for 30 min (A), ATP 30 μ M for 30 min (B), thrombin 10 U/ml for 30 min (C) and H-8 3 μ M for 2 hours (D). The horizontal bars in the each photomicrograph represent 10 μ m.

核球やその他の骨髓細胞の細胞表面に絨毛様の突起を生じさせ、凝集塊を形成する。こうした性質から thrombin 処理した骨髓細胞懸濁液中には中心の細胞が観察できないような細胞塊が多数存在し、対照群でみられたような巨核球単独での姿はほとんど観察できない。従って細胞塊の中で、他の細胞の隙間から巨核球を観察する事になるが、そうして観察される巨核球の細胞表面は極めて不規則な偽足様構造に変化したり、時には細胞質が不規則な小球を形成して核を裸にして凝集している様子が見られる。同様の形態変化は cAMP 依存性 protein kinase 阻害剤である H-8 で処理することによってもみられた (Fig.6-2D)。H-8 は thrombin の作用よりは弱いものの巨核球の細胞表面に不規則な絨毛または偽足様構造を誘発した。同様の形態変化は cAMP のアンタゴニストである Rp-cAMPS⁹⁾によっても誘発された (データは示していない)。したがって、巨核球の細胞形態変化には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇よりも cAMP 量の減少の方が重要な因子であるといえる。

6-4 考察

血小板は重要な血液成分で、その数はヒト及び動物で厳密に制御されている。しかしその機構については血小板について数多くの研究があるにも関わらず、明らかにされていない。血小板は巨核球の細胞質がちぎれて生じるとされるため、血小板数の制御に関しては巨核球の研究が欠かせない。ここでは二種類のアゴニストによる巨核球の応答について、patch-clamp 法による細胞内 Ca^{2+} 動員、蛍光法による 5-HT の放出、SEM による形態変化を調べることで検討した。これらの方法は巨核球に与えるダメージの少ないものを選んだもので、例えば蛍光色素を用いた画像解析は、色素の Ca^{2+} キレート作用のため巨核球の真の Ca^{2+} 動態をとらえることができない^{10,11)}。また通常用いられる放射能標識 5-HT をあらかじめ取り込ませてから放出をみる方法¹²⁾は、ここで用いた細胞が骨髓細胞全体であるため利用できなかった。骨髓細胞を使う理由は結果で示したように精製巨核球に反応性の違いがみられたためである。

ATP は I_{KCa} オシレーションを誘発するが放出反応や形態変化はおこさない。一方 thrombin は I_{KCa} オシレーション、放出反応、形態変化のすべてを誘発する。

ATP と thrombin により誘発される I_{KCa} オシレーションについてはその性質に大きな違いはなく、同じメカニズムによるものと考えられる (Table 1)。しかし放出反応と形態変化は thrombin に特異的である (Fig. 6-1, Fig. 6-2)。thrombin は G_q および G_i の両方を活性化することが知られており、ATP は G_q 様の G 蛋白質を活性化する。従ってこの ATP と違う thrombin の作用は G_i 蛋白質の活性化による細胞内 cAMP 濃度の減少によるものである可能性がある。実際に cAMP を増加させる forskolin や cAMP アンタゴニスト Rp-cAMPS、A-kinase 阻害剤 H-8 は thrombin の作用を抑制する方向に働いた (Fig. 6-1, Fig. 6-2)。

血小板を始め多数の細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と protein kinase C の活性化が放出反応を引き起こすことが報告されている^{13,14)}中で、巨核球の場合は Ca^{2+} が重要ではなく cAMP が重要だという結果は意外ともいえる。しかし巨核球の場合は ATP は確かに細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と protein kinase C の活性化を誘発するにも関わらず形態変化を誘発しないので、たとえある細胞とその直前の前駆細胞との間であっても細胞によりセカンドメッセンジャーの役割は異なるものと結論される。こうした違いは何らかの生理的役割の違いを反映するものと考えられるが現時点ではその意義までは明らかではない。しかし今後の研究課題として極めて興味深いものである。

6-5 小括

1. ATP と thrombin の巨核球に対する作用を、patch-clamp 法による Ca^{2+} 動員、蛍光法による 5-HT の放出、SEM による形態観察の三点で比較した。
2. Thrombin は Ca^{2+} 動員、5-HT の放出、形態変化のいずれも誘発したが ATP は Ca^{2+} 動員作用しか示さなかった。
3. 5-HT の放出と形態変化は、A-kinase 活性化により阻害されることから thrombin の cAMP 減少作用によるものと結論される。

第7章 総括

ラット巨核球の受容体作動性細胞質 Ca^{2+} オシレーションの性質について、nystatin-perforated whole-cell patch clamp 法を用いて明らかにした。

第1章では血小板やその前駆細胞である巨核球の性質、研究の現状について簡単に解説した。それと同時に近年の計測技術の発達に伴って報告が増えている非興奮性細胞のカルシウムオシレーションについても言及し、本研究のバックグラウンドを説明した。

第2章では nystatin-perforated whole-cell patch clamp 法で巨核球の ATP 応答を記録すると観察される外向き電流について、これが細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の振動を反映した Ca^{2+} -activated K^{+} チャンネルを通る K^{+} 電流であることを明らかにした。さらにこれまでの conventional whole-cell 法でこうした振動性電流が観察されにくかった理由について考察し、nystatin 法の特長を示した。また各種プリン受容体アゴニストの作用強度やアンタゴニストの作用について解析し、巨核球のプリン受容体がこれまで知られているサブタイプに当てはまらず、新しいものであることを示唆した。さらに実際のアゴニストが ATP^{4-} 及び ADP^{3-} であることも明らかにした。

第3章では巨核球の場合について、カルシウムオシレーションのメカニズムを解明することを試みた。これまでの各種モデルと比較しながら解析した結果、巨核球の ATP 誘発性 Ca^{2+} オシレーションは G 蛋白質活性化を介して産生された IP_3 が、 IP_3 感受性 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を放出させ、Protein kinase C や Ca^{2+} /Calmodulin 複合体が放出された Ca^{2+} の再取り込みを活性化することによるもので、GTP や IP_3 濃度は振動しないと結論できる。さらに cAMP による負の調節についても明らかにした。巨核球の Ca^{2+} オシレーションは非興奮性細胞の Ca^{2+} オシレーションのモデルとしても有用で、様々な薬物の影響などの解析に

利用できる。

第4章では巨核球の ATP 誘発性 I_{KCa} オシレーションに対する細胞内 pH とミトコンドリア脱共役剤 FCCP の影響を調べた。細胞内 pH はアルカリ性では I_{KCa} の抑制、酸性では促進と全く逆の作用があったが、その作用点は異なることを明らかにした。FCCP にも複数の作用があって、細胞の反応性によって反応を抑制したり増幅したりする。

第5章では巨核球に、これまで生理・薬理作用の知られていなかった adenine に反応する受容体のあることを明らかにした。この受容体は単独で何らかの反応を引き起こすことはないがプリン受容体の反応を増強する。

第6章では巨核球のタイプの異なるアゴニストである ATP と thrombin との作用を比較することによって、巨核球が形態変化をおこす引き金になるのは細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇ではなくて cAMP 量の減少であることを示唆した。

以上、巨核球の ATP 誘発性 Ca^{2+} オシレーションをめぐる、受容体や細胞内信号伝達経路、薬物による影響などの様々な点について解明した。こうした研究により巨核球及びその他の生きている細胞の生理機能に関する知見がますます深まることを期待する。

略号

本論文中で用いた略号は以下の通りである。

-AM : acetoxymethylester
 5-HT : 5-hydroxytryptamine
 ADP : adenosine 5'-diphosphate
 AMP-CPP : α - β -methylene adenosine 5'-triphosphate
 ATP : adenosine 5'-triphosphate
 ATP- γ -S : adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate)
 BAPTA : 1,2-bis(O-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid
 BCECF : 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein
 CaM : calmodulin
 cAMP : 3', 5'-adenosine monophosphate
 CICR : calcium-induced calcium release pool
 CTX : cholera toxin
 EC50 : half maximal effective concentration
 EGTA : ethyleneglycol-bis-(β -aminoethylether)N, N, N',N'-tetraacetic acid
 FCCP : carbonyl cyanide-p-trifluomethoxyphenyl-hydrazine
 GTP : guanosine triphosphate
 GTP- γ -S : guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)
 H-8 : N-2-(methylamino)-5-isoquinolinesulfonamide
 HEPES : N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethanesulfonic acid
 IBMX : isobutylmethylxanthine
 IC50 : half maximal inhibitory concentration
 IICR : IP₃-induced calcium release pool
 I_{KCa} : current through Ca²⁺-activated K⁺ channel
 I_{max} : maximum current
 IP₃ : D-*myo*-inositol triphosphate

NaOAc : sodium acetate
 NH₄Cl : ammonium chloride
 PKC : protein kinase C
 PMA : phorbol myristate acetate
 PTX : pertussis toxin
 RB-2 : reactive blue-2
 SBFI : sodium-binding benzofuran isophthalate
 Tris : tris(hydroxymethyl)aminoethane
 UTP : uridine 5'-triphosphate
 W-7 : N-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide

主論文

本論文は以下の報告をまとめたものである。

- 1) Uneyama, C., Uneyama, H., and Akaike, N. Cytoplasmic calcium oscillation of rat megakaryocyte evoked by novel type of purinoceptor. *J. Physiol. (Lond.)*, 470, 731-749, 1993.
- 2) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M., and Akaike, N. Cytoplasmic pH regulates ATP-induced Ca^{2+} dependent K^{+} current oscillation in rat megakaryocyte. *Biochem. J.*, 295, 317-320, 1993.
- 3) Uneyama, H., Uneyama, C., and Akaike, N. Intracellular mechanisms of cytoplasmic Ca^{2+} oscillation in rat megakaryocyte. *J. Biol. Chem.*, 268, 168-174, 1993.
- 4) Uneyama, H., Uneyama, C., Ebihara, S., and Akaike, N. Suramin and reactive blue 2 are antagonists for newly identified purinoceptor on rat megakaryocyte. *Br. J. Pharmacol.*, 111, 245-249, 1994.
- 5) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M., and Akaike, N. FCCP modulation of Ca^{2+} oscillation in rat megakaryocytes. *Euro. J. Pharmacol.*, 268, 455-458, 1994.
- 6) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M., and Akaike, N. Biological actions of purines on rat megakaryocytes: potentiation by adenine of the purinoceptor-operated cytoplasmic Ca^{2+} oscillation. *Br. J. Pharmacol.*, 112, 349-351, 1994.
- 7) Uneyama, C., Imazawa, T., Uneyama, H., Akaike, N., Kawanishi, T., and Takahashi, M. Not Ca^{2+} but cAMP is the second messenger for morphological changes in rat megakaryocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211, 282-288, 1995.

文献

第1章

- 1) Tavassoli, M. *Blood*, 55, 537-545, 1980.
- 2) Radly, J. M. and Scurfield, G. *Blood*, 56, 996-999, 1980.
- 3) Zucker-Franklin, D. and Petursson, S. *J. Cell Biol.*, 99, 390-402, 1984.
- 4) Schick, B. P., Schick, P. K. and Chase, P. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 663, 239-248, 1981.
- 5) Rabellino, E. M., Nachman, R. L., Williams, N., Winchester, R. J. and Ross, G. D., *J. Exp. Med.*, 149, 1273-1287, 1979.
- 6) Leven, R. M. and Tablin, F. *Am. J. Pathol.*, 132, 417-426, 1988.
- 7) Hill, R. J., Leven, R. M., Leven, F. C. and Levin, J., *Exp. Hematol.*, 17, 903-907, 1989.
- 8) Nagasawa, T., Orita, T., Matsushita, J.-i., Tsuchiya, M., Neichi, T., Imazeki, I., Imai, N., Ochi, N., Kanma, H. and Abe, T., *FEBS Letters*, 260, 176-178, 1990.
- 9) Shaw, T. *Mutat. Res.*, 200, 67-97, 1988.
- 10) Nishizuka, Y., *Nature*, 308, 693-698, 1984.
- 11) Walker, T. R. and Watson, S. P. *Biochem. J.*, 289, 277-282, 1993.
- 12) Rink, T. J. *Annu. Rev. Physiol.*, 52, 431-449, 1990.
- 13) Kroll, M. H. and Schafer, A. I. *Blood*, 74, 1181-1195, 1989.
- 14) Maruyama, Y., *J. Physiol. (Lond.)*, 391, 467-485, 1987.
- 15) Sanchez-Bueno, A., Dixon, C. J., Woods, N. M. and Cuthbertson, K. S. R., *Biochem. J.*, 268, 627-632, 1990.
- 16) Osipchuk, Y. V., Wakui, M., Yule, D. I., Gallacher, D. V. and Petersen, O. H., *EMBO J.*, 9, 697-704, 1990.
- 17) Jacob, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1052, 427-438, 1990.
- 18) Tse, A. and Hille, B., *Science*, 255, 462-464, 1992.
- 19) Sage, S. O., Adams, D. J. and Van Breemen, C., *J. Biol. Chem.*, 264, 6-9, 1989.

- 20) Wakui, M., Potter, B. V. L. and Petersen, O. H., *Nature*, 339, 317-320, 1989.
- 21) Meyer, T. and Stryer, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5051-5055, 1988.
- 22) Horn, R. and Marty, A., *J. Gen. Physiol.*, 92, 145-159, 1988.
- 23) Murase, K., Ryu, T. D. and Randic, M., *Neurosci. Lett.*, 103, 56-63, 1989.
- 24) Nakagawa, T., Komune, S., Uemura, T. and Akaike, N., *J. Neurophysiol.*, 65, 715-723, 1991.
- 25) Ikeda, M., Kurokawa, K. and Maruyama, Y., *J. Physiol.(Lond.)*, 447, 711-728, 1992.
- 26) Kawa, K., *J. Physiol.(Lond.)*, 431, 207-224, 1990.

第2章

- 1) Siess, W., *News Physiol. Sci.*, 6, 51-56, 1991.
- 2) Maruyama, Y., *J. Physiol.(Lond.)*, 391, 467-485, 1987.
- 3) Fedorko, M. E., *Lab. Invest.*, 36, 310-320, 1977.
- 4) Fedorko, M. E., *Lab. Invest.*, 36, 321-328, 1977.
- 5) Leven, R. M. and Nachmias, V. T., *J. Cell Biol.*, 92, 313-323, 1982.
- 6) Miller, J. L., *Blood*, 61, 967-972, 1983.
- 7) Schik, B. P., Walsh, C. J. and Jenkins-West, T., *J. Biol. Chem.*, 263, 1052-1062, 1988.
- 8) Horn, R. and Marty, A., *J. Gen. Physiol.*, 92, 145-159, 1988.
- 9) Marty, A. and Neher, E., Eds., *Tight-Seal Whole-Cell Recording*, Single-Channel Recording. New York, London, Plenum Press., 1983.
- 10) Murase, K., Ryu, T. D. and Randic, M., *Neurosci. Lett.*, 103, 56-63, 1989.
- 11) Nakagawa, T., Shirasaki, T., Wakamori, M., Fukuda, A. and Akaike, N., *Neurosci. Res.*, 8, 114-123, 1990.
- 12) Nakagawa, T., Komune, S., Uemura, T. and Akaike, N., *J. Neurophysiol.*, 65, 715-723, 1991.

- 13) Dahlquist, R. and Diamant, B., *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 34, 368-384, 1974.
- 14) Cockcroft, S. and Gomperts, B. D., *J. Physiol.(Lond.)*, 296, 229-243, 1979.
- 15) Taqui-Khan, M. M. and Martell, A. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 668-671, 1966.
- 16) Kawa, J. *Physiol.(Lond.)*, 431, 207-224, 1990.
- 17) Ikeda, M., Kurokawa, K. and Maruyama, Y., *J. Physiol. (Lond.)*, 447, 711-728, 1992.
- 18) Greenberg, S., Virgilio, F. D., Steinberg, T. H. and Silverstein, S. C., *J. Biol. Chem.*, 263, 10337-10343, 1988.
- 19) Sage, S.O., Mahaut-Smith, M. P. and Rink, T. J., *News Physiol. Sci.*, 7, 108-113, 1992.
- 20) Woods, N. M., Cuthbertson, K. S. R. and Cobbold, P. H., *Nature*, 319, 600-602, 1986.
- 21) Woods, N. M., Cuthbertson, K. S. R. and Cobbold, P. H., *Cell Calcium*, 8, 79-100, 1987.
- 22) Rooney, T. A., Sass, E. J. and Thomas, A. P., *J. Biol. Chem.*, 264, 17131-17141, 1989.
- 23) Harootunian, A. T., Kao, J. P. Y. and Tsien, R. Y., Cold Spring Harbor symp. Quam. Biol., 53, 935-943, 1989.
- 24) Gordon, J. L., *Biochem. J.*, 233, 309-319, 1986.
- 25) Hourani, S. M. O., Hall, D. A. and Nieman, C. J., *Br. J. Pharmacol.*, 105, 453-457, 1992.
- 26) Dunn, P. M. and Blakeley, A. G. H., *Br. J. Pharmacol.*, 93, 243-245, 1988.
- 27) Burnstock, G. and Warland, J. J. I., *Br. J. Pharmacol.*, 90, 383-391, 1987.
- 28) Hertog, A. D., Nelemans, A. and Akker, J. V. D., *Eur. J. Pharmacol.*, 166, 531-534, 1989.
- 29) Inoue, K., Nakazawa, K., Ohara-Imaizumi, M., Obama, T., Fujimori, K. and Takanaka, A., *Br. J. Pharmacol.*, 102, 581-584, 1991.

第3章

- 1) Rooney, T. A., Sass, E. J. and Thomas, A. P., *J. Biol. Chem.*, 264, 17131-17141, 1989.
- 2) Kawanishi, T., Blank, L. M., Harootunian, A. T., Smith, M. T. and Tsien, R. Y., *J. Biol. Chem.*, 264, 12859-12866, 1989.
- 3) Harootunian, A. T., Kao, J. P. Y., Paranjape, S. and Tsein, R. Y., *Science*, 251, 75-78, 1991.
- 4) Harootunian, A. T., Kao, J. P. Y. and Tsien, R. Y., *Cold Spring Harbor Symp. Quam. Biol.*, 53, 935-943, 1989.
- 5) Jacob, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1052, 427-438, 1990.
- 6) Sage, S. O., Adams, D. J. and Van Breemen, C., *J. Biol. Chem.*, 264, 6-9, 1989.
- 7) Wakui, M., Osipchuk, Y. V. and Petersen, O. H., *Cell*, 63, 1025-1032, 1990.
- 8) Tsunoda, Y., Stuenkel, E. L. and Williams, J. A., *Am. J. Physiol.*, 258, C147-C155, 1990.
- 9) Osipchuk, Y. V., Wakui, M., Yule, D. I., Gallacher, D. V. and Petersen, O. H., *EMBO J.*, 9, 697-704, 1990.
- 10) Parker, I. and Ivorra, I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 260-264, 1990.
- 11) Berridge, M. J. and Irvine, R. F., *Nature*, 341, 197-205, 1989.
- 12) Meyer, T. and Stryer, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5051-5055, 1988.
- 13) Wakui, M., Potter, B. V. L. and Petersen, O. H., *Nature*, 339, 317-320, 1989.
- 14) Goldbeter, A., Dupont, G. and Berridge, M. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1461-1465, 1990.
- 15) Woods, N. M., Cuthbertson, K. S. R. and Cobbold, P. H., *Cell Calcium*, 8, 79-100, 1987.
- 16) Sanchez-Bueno, A., Dixon, C. J., Woods, N. M. and Cuthbertson, K. S. R., *Biochem. J.*, 268, 627-632, 1990.
- 17) Harootunian, A. T., Kao, J. P. Y., Paranjape, S., Adams, S. R., Potter, B. V. L. and Tsien, R. Y., *Cell Calcium*, 12, 153-164, 1991.

- 18) Ikeda, M., Kurokawa, K. and Maruyama, Y., *J. Physiol.*, 447, 711-728, 1992.
- 19) Kawa, K., *J. Physiol. (Lond.)*, 431, 207-224, 1990.
- 20) Leven, R. M. and Nachmias, V. T., *J. Cell Biol.*, 92, 313-323, 1982.
- 21) Horn, R. and Marty, J. *Gen. Physiol.*, 92, 145-159, 1988.
- 22) Marty, A. and Neher, E., Eds., *Tight-Seal Whole-Cell Recording*. Single-Channel Recording. New York, London, Plenum Press., 1983.
- 23) Murase, K., Ryu, T. D. and Randic, M., *Neurosci. Lett.*, 103, 56-63, 1989.
- 24) Nagasawa, T., Orita, T., Matsushita, J.-i., Tsuchiya, M., Neichi, T., Imazeki, I., Imai, N., Ochi, N., Kanma, H. and Abe, T., *FEBS Letters*, 260, 176-178, 1990.
- 25) Bouchard, R. A., Hryshko, L. V., Saha, J. K. and Bose, D., *Br. J. Pharmacol.*, 97, 1279-1291, 1989.
- 26) Walton, P. D., Airey, J. A., Sutko, J. L., Beck, C. F., Mignery, G. A., Sudhof, T. C., Deernck, T. J. and Ellisman, M. H., *J. Cell Biol.*, 113, 1145-1157, 1991.
- 27) Palade, P., Dettbarn, C., Alderson, B. and Volpe, P., *Mol. Pharmacol.*, 36, 673-680, 1989.
- 28) Malgaroli, A., Fesce, R. and Meldolesi, J., *J. Biol. Chem.*, 265, 3005-3008, 1990.
- 29) Pike, G. K., Abramson, J. J. and Salama, G., *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 10, 337-349, 1989.
- 30) Kwan, C. Y., Takemura, H., Obie, J. F., Thastrup, O. and Putney, J. W., Jr., *Am. J. Physiol.*, 258, C1006-C1015, 1990.
- 31) Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. And Dawson, A. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2466-2470, 1990.
- 32) Thastrup, O., *Agents Actions*, 29, 8-15, 1990.
- 33) Ghosh, T. K., Eis, P. S., Mullaney, J. M., Ebert, C. L. and Gill, D. L., *J. Biol. Chem.*, 263, 11075-11079, 1988.
- 34) Hamatani, Y., Inoue, M., Kimura, K., Shiota, M., Ohta, M. and Sugano, T., *Am. J. Physiol.*, 261, E325-E331, 1991.
- 35) Tanaka, M., Muramatsu, M., Aihara, M., and Otomo, S., *Biochem. Pharmacol.*, 40,

- 991-996, 1990.
- 36) Pusch, M., and Neher, E., *Pflügers Arch.*, 411, 204-211, 1988.
 - 37) DuBourdieu, D. J. and Morgan, D. W., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1054, 326-332, 1990.
 - 38) Socorro, L., Alexander, R. Y. and Griendling, K. K., *Biochem. J.*, 265, 799-807, 1990.
 - 39) Ball, R. L., Tanner, K. D. and Carpenter, G., *J. Biol. Chem.*, 265, 12836-12845, 1990.
 - 40) Carafoli, E., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 12, S77-S84, 1988.
 - 41) Edes, I. and Kranias, E. G., *Membr. Biochem.*, 7, 175-192, 1987.
 - 42) Enyedi, A., Sarkadi, B., Földes-Papp, Z., Monostry, S. and Gárdos, G., *J. Biol. Chem.*, 261, 9558-9563, 1986.
 - 43) Pollock, W. K., Sage, S. O. and Rink, T. J., *FEBS Lett.*, 210, 132-136, 1987.
 - 44) Ushiyama, S., Handa, S. and Yamazaki, M., *Prostaglandins*, 36, 477-489, 1988.
 - 45) Kroll, M. H., Zavoico, G. B. and Schafer, A. I., *Biochim. Biophys. Acta.*, 970, 61-67, 1988.
 - 46) Payne, R., Flores, T. M. and Fein, A., *Neuron*, 4, 547-555, 1990.
 - 47) Krishnamurthi, S., Patel, Y. and Kakkar, V. V., *Biochem. J.*, 250, 209-214, 1988.
 - 48) Sosla, G. and Parker, J., *Blood*, 74, 984-993, 1989.

第 4 章

- 1) Sage, S. O., Jobson, T. M. and Rink, T. J., *J. Physiol.*, 420, 31-45, 1990.
- 2) Zavoico, G. B., Edward J. Cragoe, J. and Feinstein, M. B., *J. Biol. Chem.*, 261, 13160-13167, 1986.
- 3) Siffert, W. and Akkerman, J. W. N., *Nature*, 325, 456-458, 1987.
- 4) Zavoico, G. B. and Edward J. Cragoe, J., *J. Biol. Chem.*, 263, 9635-9639, 1988.
- 5) Heytler, P. G., *Meth. Enzymol.*, 55, 462-471, 1979.

- 6) Biscoe, T. J. and Duchon, M. R., *J. Physiol. (Lond.)*, 428, 39-59, 1990.
- 7) Duchon, M. R., Valdeolmillos, M., O'Neill, S. C. and Eisner, D. A., *J. Physiol.*, 424, 411-426, 1990.
- 8) Duchon, M. R. and Biscoe, T. J., *J. Physiol. (Lond.)*, 450, 33-61, 1992.
- 9) McLaughlin, S. G. A. and Dilger, J. P., *Physiol. Rev.*, 60, 825-863, 1980.
- 10) Galvan, A. and Lucas, M., *Biomed. Biochem. Acta*, 46, 677-682, 1987.
- 11) Jensen, J. R. and Rehder, V., *Brain Res.*, 551, 311-314, 1991.
- 12) Lucas, M., Galvan, A., Solano, P. and Goberna, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 731, 129-136, 1983.
- 13) Horn, R. and Marty, J. *Gen. Physiol.*, 92, 145-159, 1988.
- 14) Marty, A. and Neher, E., Eds., *Tight-Seal Whole-Cell Recording. Single-Channel Recording*. New York, London, Plenum Press., 1983.
- 15) Paradiso, A. M., Negulescu, P. A. and Machen, T. E., *Am. J. Physiol.*, 250, G524-G534, 1986.
- 16) Murase, K., Ryu, T. D. and Randic, M., *Neurosci. Lett.*, 103, 56-63, 1989.
- 17) Nakagawa, T., Shirasaki, T., Wakamori, M., Fukuda, A. and Akaike, N., *Neurosci. Res.*, 8, 114-123, 1990.
- 18) Kume, H., Takagi, K., Satake, T., Tokuno, H. and Tomita, T., *J. Physiol. (Lond.)*, 424, 445-457, 1990.
- 19) Ives, H. E. and Daniel, T. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1950-1954, 1987.
- 20) Danthuluri, N. R., Kim, D. and Brock, T. A., *J. Bio. Chem.*, 265, 19071-19076, 1990.
- 21) Worley, P. F., Baraban, J. M., Supattapone, S., Wilson, V. S. and Snyder, S. H., *J. Biol. Chem.*, 262, 12132-12136, 1987.
- 22) Dettbarn, C. and Palade, P., *J. Biol. Chem.*, 266, 8993-9001, 1991.
- 23) Yokota, K., Yanagihara, N., Izumi, F. and Wada, A., *J. Neurochem.*, 51, 246-251, 1988.
- 24) Schulz, I., Thevenod, M. and Dehlinger-Kremer, M., *Cell Calcium*, 10, 325-336,

1989.

第5章

- 1) Horn, R. And Marty, A., J. Gen. Physiol., 92, 145-159, 1988.
- 2) Murase, K., Ryu, T. D. and Randic, M., Neurosci. Lett., 103, 56-63, 1989.
- 3) Nakagawa, T., Shirasaki, T., Wakamori, M., Fukuda, A. and Akaike, N., Neurosci. Res., 8, 114-123, 1990.
- 4) Burnstock, G., Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach Eds. L. Bolis and R. W. Straub. New York, Raven Press. 107-118., 1978.
- 5) Mcshine, R. L., Sibinga, S. and Brozovic, B., Clin. Lab. Haematol., 12, 277-285, 1990.

第6章

- 1) Kroll, M. H. and Schafer, A. I., Blood, 74, 1181-1195, 1989.
- 2) Horn, R. and Marty, A., J. Gen. Physiol., 92, 145-159, 1988.
- 3) Marty, A. And Neher, E., Eds. (1983). Tight-Seal Whole-Cell Recording. Single-Channel Recording. New York, London, Plenum Press.
- 4) Nathenas, J., Dexter, J. and Katzman, R., Biochem. Med., 8, 259-267, 1973.
- 5) Murase, K., Ryu, T. D. and Randic, M., Neurosci. Lett., 103, 56-63, 1989.
- 6) Nakagawa, T., Komune, S., Uemura, T. and Akaike, N., J. Neurophysiol., 65, 715-723, 1991.
- 7) Levine, R. F. and Fedorko, M. E., J. Cell Biol., 69, 159-172, 1976.
- 8) Tavassoli, M., Blood, 55, 537-545, 1980.
- 9) Erneux, C., Van Sande, J., Jastorff, B., and Dumont, J., E., Biochem. J., 234, 193-197, 1986.
- 10) Ikeda, M., Kurokawa, K. and Maruyama, Y., J. Physiol., 447, 711-728, 1992.

- 11) Kawa, K., J. Physiol., 431, 207-224, 1990.

- 12) Walker, T. R., and Watson, S. P., Biochem. J., 289, 277-282, 1993.

- 13) Nishizuka, Y., Science, 225, 1365-1370, 1984.

- 14) Nishizuka, Y., Nature, 308, 693-698, 1984.

謝辞

終わりに臨み、御指導を賜りました東京大学薬学部 齊藤洋教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の機会を与えて下さいましたうえ、御厚意により御指導下さいました九州大学医学部 赤池紀扶教授に深く感謝いたします。さらに本研究の機会を与えて下さいました国立衛生試験所病理部 高橋道人部長に感謝いたします。

本研究の遂行に当たり御協力・助言をいただきました(株)味の素 畝山寿之氏、国立衛生試験所生物薬品化学部 川西徹室長、機能生化学部 手島玲子博士、東北大学医学部 河和義助教授、国立衛生試験所病理部員各位に深く感謝いたします。

1996年2月

