
細胞外ATPによる 容量性カルシウム流入抑制機構の解明

(課題番号：12670038)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 尾松万里子

(滋賀医科大学医学部助教授)

Ca²⁺は収縮, 分泌, 分化, 増殖などの細胞機能を調節する最も普遍的な細胞内メッセンジャーであり, 通常, 細胞内においては極めて低い濃度に保たれている. 細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇は細胞内ストアからの Ca²⁺遊離と細胞外からの Ca²⁺流入の2種類の経路によって引き起こされる. スストアからの Ca²⁺放出を引き起こす主要なセカンドメッセンジャーは, 受容刺激により phospholipase C を介してイノシトールリン脂質代謝が亢進して生成したイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) であると考えられている. 細胞外からの Ca²⁺流入経路については, 神経や筋などのような興奮性細胞では脱分極によって開口する膜電位依存性 Ca²⁺チャネルを通して Ca²⁺の流入が起こることが知られている. 一方, 電位依存性チャネルを持たない多くの非興奮性細胞においてどのように Ca²⁺流入が調節されているかについては古くから活発に議論されてきた. その中で, Putney (1986) が提唱した「容量性 Ca²⁺流入(store-operated Ca²⁺ entry)機構」はアゴニストによる刺激で細胞内 Ca²⁺ストアが枯渇すると, 何らかのメカニズムによって細胞膜の Ca²⁺チャネルが開口し, その結果, 細胞外からの Ca²⁺流入が起こるとする説であり, 非興奮性細胞における Ca²⁺流入を説明する最も一般的なモデルとして現在認められている. 実験的に容量性 Ca²⁺流入を引き起こすには, IP₃ を介してストアからの Ca²⁺放出を促進させるアゴニストの他に小胞体 (ER) の Ca²⁺ポンプ阻害剤である thapsigargin などがよく用いられている. また, Hoth & Penner (1992)が容量性 Ca²⁺流入をパッチクランプ法により直接イオン電流として検出することに成功してからは, その膜電位非依存性, 高い Ca²⁺選択性, 過分極側における強い内向き整流性などの電気生理学的特徴が種々の細胞を用いて明らかにされてきている.

ショウジョウバエにおいて, 光受容器を刺激すると phospholipase C が活性化し, IP₃ の生成を介してストアからの Ca²⁺遊離と細胞外からの Ca²⁺流入が起こることが知られている (Jardie & Minke, 1993). この Ca²⁺流入により受容器の膜電位の持続的な脱分極が起こることから, *trp* (Transient Receptor Potential) 遺伝子は持続的な Ca²⁺流入に関与する細胞膜の Ca²⁺チャネル (Trp 蛋白質) をコードしていると考えられている. 哺乳類の容量性 Ca²⁺チャネルと Trp 蛋白質が相同性である可能性が指摘されて (Berridge, 1995) 以来, *trp* 遺伝子を導入して Ca²⁺流入のカイネティクスを解析する研究がさまざまな細胞で行われている. また, 容量性 Ca²⁺流入を引き起こすアゴニストの薬理的な探索も盛んである. しかし, 容量性 Ca²⁺流入を抑制するメカニズムに関してはストアの Ca²⁺充足によって流入が止まるという基本的な考えからあまり発展はみられていなかった. また, 容量性 Ca²⁺流入の研究はストアから細胞膜 Ca²⁺チャネルへの情報伝達機構及びチャネル分子構造の解明が中心であり, Ca²⁺流入を引き起こすメカニズムに集中して行われてきた. 容量性 Ca²⁺流入の阻害については HL60(human leukemia)細胞で phorbol ester による protein kinase C (PKC)活性化が関与している (Song *et al.*, 1998) ことなどが報告されているが, PKC の活性化は容量性 Ca²⁺流入を惹起するという報告も多く, 詳細は明らかではない. 一方, jasplakinolid などの薬物を用いて細胞骨格蛋白であるアクチンを細胞膜周辺に重合させると容量性 Ca²⁺流入が阻害されるという報告がなされて以来 (Patterson *et al.*, 1999), 細胞骨格と容量性 Ca²⁺流入の関係について関心が持たれ始めている. そこで本研究課題において, 非興奮性細胞であり比較的大きな容量性 Ca²⁺流入が観察できる褐色脂肪細胞を用いて実験を行い, 細胞内 Ca²⁺濃度の変化を測定すると共にアクチンフィラメントの染色を行うことによって ATP による容量性 Ca²⁺流入阻害機構を検討した.



研究組織

研究代表者： 尾松万里子 (滋賀医科大学医学部助教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	2,500	0	2,500
平成13年度	1,400	0	1,400
総計	3,900	0	3,900

研究発表

(1) 学会誌等

Sanada,M., Yasuda,H., Omatsu-Kanbe,M., Sango,K., Isono,H., Matsuura,H. and Kikkawa,R..

Increase in intracellular Ca^{2+} and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons.

Neuroscience (in press) (平成14年印刷中)

Matsuura,H., Ehara,T., Ding,W.-G., Omatsu-Kanbe,M. and Isono,T.

Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K^+ current in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells.

J. Physiol. (in press) (平成14年印刷中)

(2) 口頭発表

真田 充, 安田 斎, 尾松万里子, 松浦 博, 吉川隆一

ラット脊髄後根神経節細胞の細胞内カルシウム濃度に及ぼす高濃度グルコースの影響と Na^+/K^+ ポンプの役割

第43回日本糖尿病学会総会 平成12年5月

真田 充, 安田 斎, 尾松万里子, 松浦 博, 吉川隆一

ラット脊髄後根神経節細胞に対するノルアドレナリン/ATP の効果：細胞内カルシウム濃度からの検討

第41回日本神経学会総会 平成12年5月

尾松万里子, 松浦 博

PPADS感受性ATP受容体による容量性 Ca^{2+} 流入機構の抑制

平成12年度生理学研究所研究会「ATP受容体による生体制御とその分子的メカニズム」

平成12年8月24日～25日

真田 充, 安田 斎, 尾松万里子, 松浦 博, 吉川隆一

痛覚の情報伝達における ATP 受容体の役割：ラット脊髄後根神経節細胞の細胞内カルシウム濃度からの検討

第 53 回日本自律神経学会総会 平成 12 年 10 月

Sanada,H., Yasuda,H., Omatsu-Kanbe,M., Matsuura,H. and Kikkawa,R.

Increased depolarization-induced cytosolic Ca^{2+} signal in rat dorsal root ganglion neurons under high glucose with suppressed Na^+/K^+ pump activity.

Fifth Diabetic Neuropathy Satellite (平成 12 年 10 月 31 日～44 月 4 日)

Omatsu-Kanbe,M. and Matsuura,H.

Neuronal regulation of the mobilization of intracellular Ca^{2+} in brown adipocytes.

Jon. J. Physiol. 51, S97, 2001 (第 78 回日本生理学会大会シンポジウム 平成 13 年 3 月)

尾松万里子, 松浦 博

ATP 受容体刺激による細胞骨格の再構築

平成 13 年度生理学研究所研究会「ATP 研究会」

平成 13 年 8 月 22 日～23 日

柴田 大, 尾松万里子, 磯野高敬, 松浦 博

P2 受容体刺激によるアクチン再重合

第 94 回近畿生理学談話会 平成 13 年 9 月 8 日

豊田 太, 丁 維光, 尾松万里子, 松浦 博, 鷹野 誠, 堀江稔

膜伸展による心筋緩徐活性化型遅延整流性 K^+ チャネル(IK_d)の増大機構

平成 13 年度生理学研究所研究会「イオンチャネルの構造機能連関と制御機能に学ぶ心血管疾患の病態生理学」

平成 13 年 11 月 27 日～28 日

研究成果

本研究課題の成果を要約すると以下の通りである。一部の詳細は添付した論文に記載する。

ラット褐色脂肪組織から酵素（コラゲナーゼと DNase）を用いて得られた単離細胞を DMEM 培地中で 1~3 日間初代培養した褐色脂肪細胞を実験に用いた。細胞内 Ca^{2+} 濃度は、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 fura-2 を細胞に取り込ませて単一細胞における二波長励起一波長蛍光測定（励起波長：340nm, 380nm, 蛍光波長：510nm）を行い、得られた蛍光強度の比（340nm/380nm）を記録し、Grynkiewicz *et al.* (1985)の式を利用して計算した。容量性 Ca^{2+} 流入は小胞体の Ca^{2+} ポンプ阻害剤である thapsigargin (100 nM)を作用させて引き起こした。ATP (10 μ M)による容量性 Ca^{2+} 流入阻害実験の条件は、 Ca^{2+} 濃度測定の場合は 3~4 分間の灌流、固定実験の前処置の場合は 4 分間のインキュベートとした。また、RT-PCR は褐色脂肪組織から total RNA を抽出し、既報の P2 受容体サブタイプの配列を元に作製したプライマーを用いて行った。アクチンフィラメントの同定は、定法に従って培養細胞をホルマリンで固定した後、蛍光標識したアクチンの脱重合阻害剤である phalloidin で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

1. 細胞外 ATP による容量性 Ca^{2+} 流入阻害と P2 受容体の関与に関する実験

- (1) 細胞外 ATP が ecto-protein kinase のような ecto-enzymes の基質となり容量性 Ca^{2+} 流入阻害を引き起こしているかどうかを調べた。ATP が酵素の基質となるためには Mg^{2+} が必要であるので、細胞外 Mg^{2+} を除去してみたが ATP の阻害作用に影響はなかった。
- (2) P2 受容体阻害剤である suramin 及び PPADS は細胞外 ATP による容量性 Ca^{2+} 流入阻害を濃度依存性に抑制した。
- (3) RT-PCR の結果からラット褐色脂肪組織にはイオンチャネル一体型 P2X 受容体サブタイプのうち、P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₇ が、G 蛋白関連型 P2Y 受容体サブタイプのうち、P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ が発現していることがわかった。

2. 細胞外 ATP によるアクチンフィラメント再重合と容量性 Ca^{2+} 流入阻害について

- (1) ATP 処理により、細胞骨格蛋白であるアクチンフィラメントは細胞膜周囲に重合し、無処理のもの比べてその分布が変化していた。また、細胞膜周囲において不規則に厚く重合するため、細胞の形が変化しているように観察された。
thapsigargin はアクチンフィラメントの分布に影響を与えなかった。ATP は thapsigargin 存在下でもアクチンフィラメントの細胞膜周囲への再重合を促進した。
- (2) このようなアクチンフィラメントの細胞膜周囲への再重合を促進したものは ATP 及び ATP γ S であり、ADP, AMP, UTP, α, β -methylene ATP はそのような作用は示さなかった。
- (3) ATP によるアクチンフィラメントの細胞膜周囲への再重合促進は P2 受容体阻害剤である suramin 及び PPADS によって抑制された。
- (4) アクチンの脱重合剤である cytochalasin D で細胞を処理すると、アクチンは細胞内に点在するように染色され、重合が阻害された。このような細胞においては ATP によるアクチンフィラメントの再重合は起こらなかった。
- (5) cytochalasin D で前処理した細胞について細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、ATP による容量性 Ca^{2+} 流入阻害は見られなかった。

これらの結果から、細胞外 ATP は P2 受容体を介してアクチンフィラメントの細胞膜周囲への再構築を促進し、 Ca^{2+} チャンネルを細胞質側からブロックすることによって Ca^{2+} 流入を抑制していることが示唆された。今後、P2 受容体刺激からアクチン重合に至る細胞内情報伝達機構の解明を行い、関連蛋白を同定することによって、この現象が褐色脂肪細胞に特異的であるかどうかを明らかにしていきたい。