

ATP 受容体刺激で発生した外向き電流応答の性質

藤田(岩渕) 玲子, 平野 浩子, 渡辺 修二*,
川崎 敏*, 木村 眞吾*, 松本 光比古**

(受付 2004年11月1日)

Properties of the ATP-induced slow outward current response
in *Xenopus* oocyte follicular cells

Reiko FUJITA, Hiroko HIRANO, Shuji WATANABE*, Satoshi KAWASAKI*,
Shingo KIMURA* and Mitsuhiro MATSUMOTO**

Summary

Properties of the ATP-induced outward current response were investigated under voltage-clamp and compared with those of the adenosine (Ade)-induced outward current response in the folliculated oocyte of *Xenopus laevis*. The reversal potential of ATP- and Ade-induced responses corresponded with the equilibrium potential of K^+ , suggesting the opening of K^+ channels produced these responses. Either glibenclamide or phentolamine significantly inhibited both responses, showing an involvement of K_{ATP} channels in these responses. The application of UTP selectivity depressed the Ade-induced response without affecting the response to ATP. These results suggested that the ATP response could be produced via an intrinsic ATP receptor but not Ade receptor.

1. Introduction

ATPは生体内でエネルギー供給源の役割以外に多様な作用を持っている。細胞内でATPはABC transporter super family 蛋白質や K_{ATP} -channel¹⁾などのイオンチャネルの開閉を制御し、細胞の膜電位変化を引き起こしている。このような直接作用の他に、各種kinaseのリン酸基供与体として、また、adenylate cyclaseの作用によりセカンドメッセンジャーcAMPとなって作用している。また、副交感神経終末から細胞外に放出されるATPは細胞膜にあるP2(ATP)受容体と結合してこの受容体を活性化さ

せる²⁾。

中枢神経系で放出されたATPはP2受容体を活性化すると共に、細胞外膜の酵素の働きによりATPから産生されたadenosine (Ade)となってP1(Ade)受容体を活性化する^{3),4)}。これまでATPで発生するslow outward current応答はAde受容体が活性化して発生する応答と考えられてきた^{5)~7)}。そこで著者らは5,6期のアフリカツメガエルを用いATPで発生するslow outward current応答とAdeで発生するslow outward current応答⁸⁾を同一のfolliculated oocyteで比較した。UTPを前投与するとAde

岩手医科大学 教養部 化学科

* 岩手医科大学医学部, 生理学第一講座

**弘前大学医学部, 保健学科

応答は抑制されるが, UTP を前投与しても ATP で発生する slow outward current は抑制されなかった. 両応答の発生メカニズムを詳細に検討した.

2. Method

・標本と灌流液

アフリカツメガエル (成熟雌) を0.15%トリカインで麻酔後, 腹部をわずかに切開し, 卵巣から一房の卵母細胞を取り出した. 卵細胞の房を摘出後直ちに, 顕微鏡下でピンセットを使って卵巣内上皮細胞層 (ovarian epithelial layer) を切り開いて卵胞細胞のついた卵母細胞 (follicle-oocyte) を取り出した. これらを Barth's solution⁹⁾ 中に15°C で保存し, 4日以内に実験した. Barth's solution の塩類組成は, NaCl 88 mM, KCl 1 mM, Trisbase 7.5 mM, MgSO₄ 0.82 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, CaCl₂ 0.41 mM, Ca (NO₃)₂ 0.33 mM であり, HCl で pH 7.6 に調整した. 使用直前に Na pyruvate 550 mg/l を添加して pH 7.6 に調整した. また, Penicillin G 25 mg

/l, Gentamicin 50 mg/l を添加して細菌の繁殖を防いだ.

この follicle-oocyte を灌流用 chamber に固定し, frog Ringer solution⁹⁾ で灌流した. frog Ringer solution の塩類組成は, NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 5 mM であり, pH は NaOH で pH 7.5 に調整した. 灌流用 chamber の容積は0.12ml で, 灌流流速 3~4 ml/min とした.

・電気生理学的測定

oocyte と follicular cell は gap junction でつながっていて, その穴を通して分子量1,000程度のイオンや分子は自由に通過できるため, follicular cells で発生した電気的応答は oocyte を介して記録できる. このため, 今回の実験では電極を oocyte に刺入して follicular cell に発生する電気的な応答を間接的に測定した.

3M KCl をつめた二本のガラス微小電極 (電気抵抗 3~4 MΩ) を実体顕微鏡下で follicle-oocyte に刺した. 一本の電極は膜電位を測定す

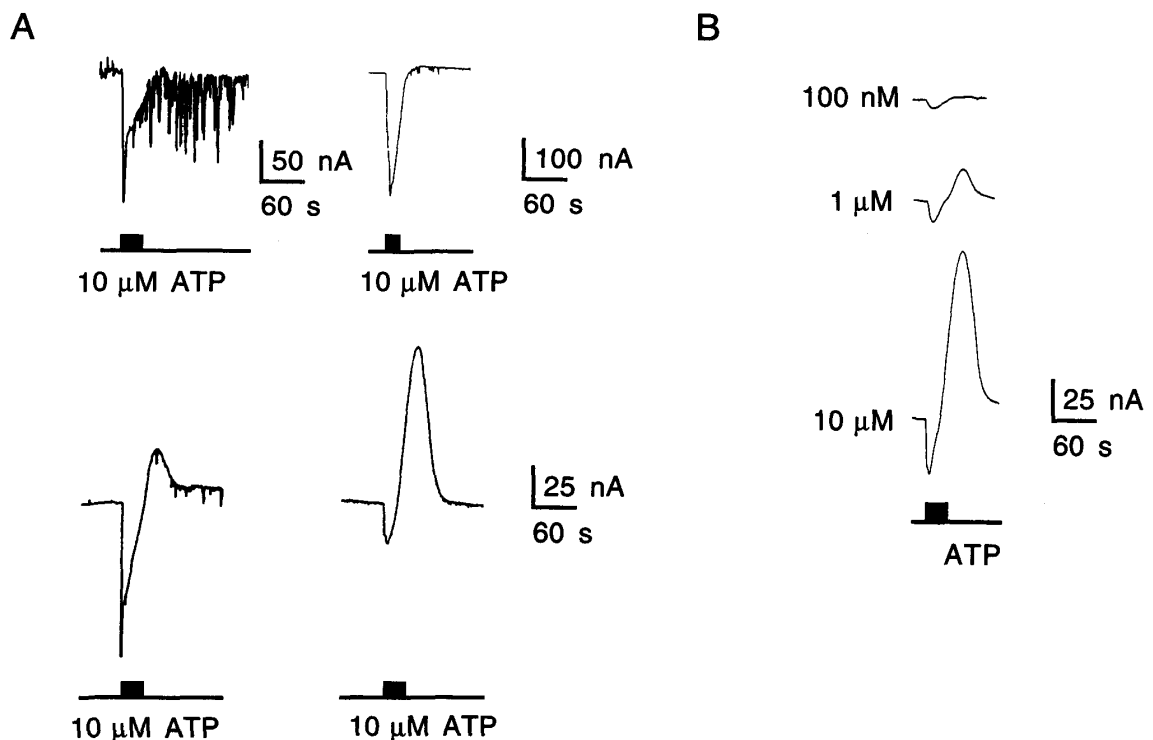


図1. アフリカツメガエル follicular cell で記録された ATP 応答

A: 異なる細胞から記録された典型的な ATP 応答. B: 同じ細胞から記録された ATP 応答の濃度による変化

るため、もう一本は1細胞膜を横切って電流を流すために使用した。Dagan 8500膜電位固定装置により膜を静止膜電位に固定してAdeやATPを灌流したときに発生する電流応答を測定した。応答の逆転電位は電圧固定法で求めた。電圧を任意に変化させて各膜電位の電流応答を測定した。これらの値から逆転電位を求めた。

・試薬

Uridine 5'-triphosphate (UTP) は和光純薬社製(大阪)を用いた。Adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine (Ade), glibenclamide と phentolamine は SIGUMA 社製 (St. Louis, USA) を用いた。Glibenclamide は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解後、frog Ringer solution で希釈し、DMSO の最終濃度を0.01%とした。

・薬剤の投与の仕方

Ade, UTP, ATP は frog Ringer solution に溶かし、細胞の外側から投与した。投与時間は、その濃度で応答の最大値が現れるまでの最小時間となるように調節した。

3. Results

3-1 ATP 応答の多様性

アフリカツメガエルの follicle-oocyte に $10\mu\text{M}$ のATPを投与すると、Fig. 1 Aのような様々な応答パターンが得られた。このATP応答はfast inward current 成分, slow inward current 成分, slow outward current 成分に大別され、細胞によって様々な強度で発生した。しかし、fast inward current 成分はすべての応答で見られた。Fig. 1 Bに、同じ細胞から得られたATP応答を示した。inward current 成分, outward current 成分共に濃度依存性に増大しているが、outward current 成分の増大率がinward current 成分より大きかった。図には示していないが、P2Y agonist のUTP投与ではfast, slow inward current 成分が主成分であり、outward current 成分がfast inward current 成分より絶対値currentで大きくなる応答は記録されなかった。

3-2 ATP slow outward current 成分とAde応答のI-V曲線

Fig. 2 にATP slow outward current 成分とAde応答のI-V曲線を示した。 $100\mu\text{M}$ ATP のslow

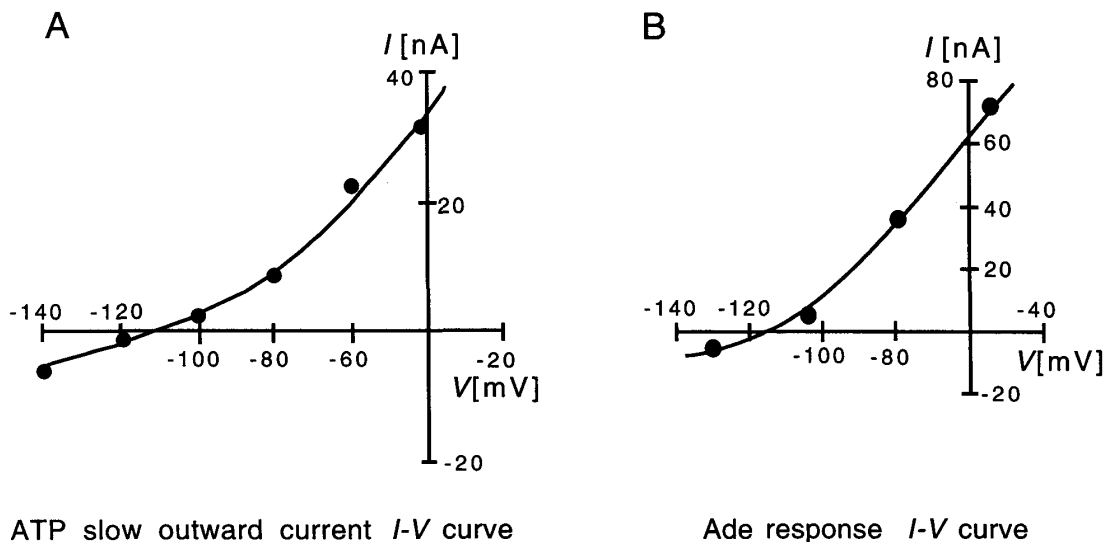


図2. ATP 外向き電流応答とAde 応答の電流-電圧曲線 (I-V curve)

A: $100\mu\text{M}$ ATP 投与で発生したATP slow outward current 成分のI-V curve. 逆転電位は約 -100mV であった。
B: $100\mu\text{M}$ Ade 投与で発生した応答のI-V curve. 逆転電位は約 -115mV であった。AとBは別々の細胞から記録された。

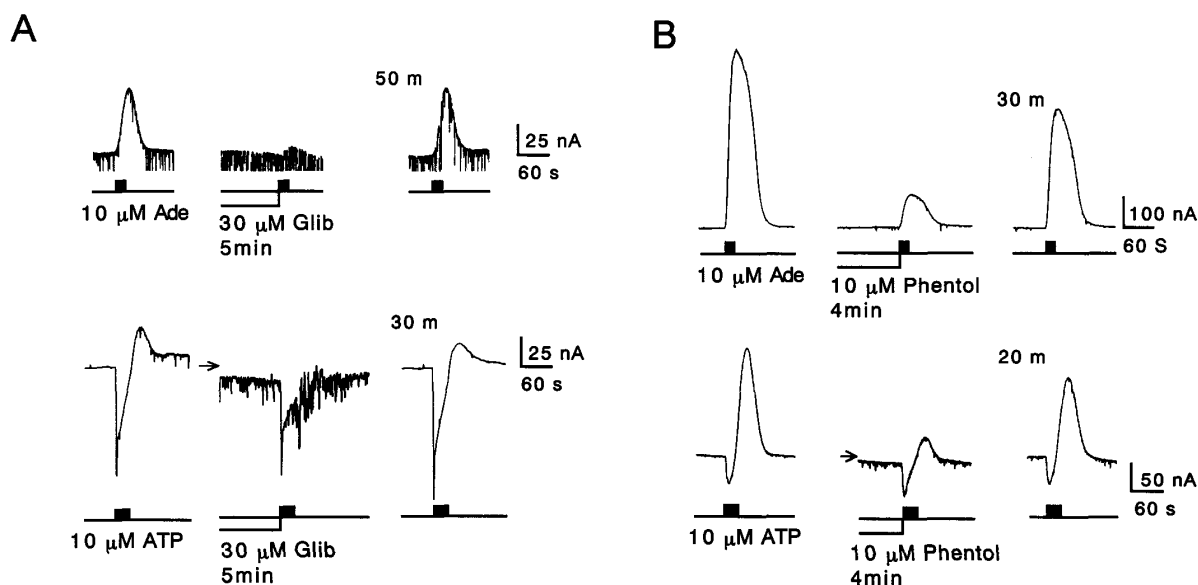


図3. Ade 応答と ATP 外向き電流応答に対する K_{ATP} -channel blocker の効果

A 上段: $10 \mu\text{M}$ Ade 応答に対する $30 \mu\text{M}$ glibenclamide 5 分間前投与の影響. 右側の Ade 応答は wash out 50 分後の応答. 下段: $10 \mu\text{M}$ ATP 応答に対する $30 \mu\text{M}$ glibenclamide 5 分間前投与の効果. 右側の ATP 応答は wash out 30 分後の応答. A 上段と下段の応答は同じ細胞から記録された.

B 上段: $10 \mu\text{M}$ Ade 応答に対する $10 \mu\text{M}$ phentolamine 4 分間前投与の効果. 右側の Ade 応答は wash out 30 分後の応答. 下段: $10 \mu\text{M}$ ATP 応答に対する $10 \mu\text{M}$ phentolamine 4 分間前投与の効果. 右側の ATP 応答は wash out 20 分後の応答. B 上段と下段の応答は同じ細胞から記録された.

outward current 成分の $I-V$ 曲線は外向き整流性を示した. 逆転電位は約 -110mV であった. また, $100 \mu\text{M}$ の Ade 応答の $I-V$ 曲線も外向き整流性を示し, 逆転電位は約 -115mV であった. これらの二つの応答の逆転電位はアフリカツメガエル follicular cell の K^+ current の逆転電位 (-105mV) にほぼ一致した¹⁰⁾. 以上の結果から, ATP slow outward current 成分と Ade 応答は K^+ channel が開いて発生していることが示唆された.

3-3 ATP slow outward current の性質

アフリカツメガエル follicular cell には A_2 受容体が存在している⁹⁾. Ade は細胞外膜上の ecto-5'-nucleotidase で ATP から分解供給されると考えられている¹¹⁾. したがって, ATP slow outward current 成分が Ade 受容体を刺激して発生している可能性があるため, ATP slow

outward current 成分と A_2 受容体応答の性質を比較した.

1) K_{ATP} channel blocker の作用

著者達の研究⁹⁾で Ade 受容体刺激により開く K^+ channel 応答が K_{ATP} channel blocker で抑制されたことから sulfonylurea 薬 glibenclamide (K_{ATP} channel blocker) の作用を調べた. Fig. 3 A に示したように $30 \mu\text{M}$ glibenclamide の前投与で $10 \mu\text{M}$ の Ade 応答も $10 \mu\text{M}$ の ATP slow outward current 成分も共に強く抑制された. 30~50 分の wash out で control 応答まで回復した. sulfonylurea 薬でない K_{ATP} channel blocker の phentolamine の作用を Fig. 3 B に示した. $10 \mu\text{M}$ の phentolamine 4 min の前投与で Ade 応答も ATP slow outward current 成分も共に強く抑制された. 20~30 分の wash out でコントロール近くまで回復した. ATP fast inward current 成

分は glibenclamide や phentolamine 投与で全く影響を受けなかった。これらの結果から ATP slow outward current 成分は K_{ATP} channel が開いて発生していることが示唆された。

2) UTP の作用

著者らはアフリカツメガエル follicular cell の細胞膜にある Ade 受容体刺激応答が P2Y agonist の UTP 投与後に抑制されることを報告した⁹⁾。そこで ATP slow outward current 成分に対する UTP の作用を検討した。Fig. 4 上段に示すように $10\ \mu\text{M}$ UTP 投与後、 $10\ \mu\text{M}$ の ATP fast inward current 成分は15%まで抑制されたが ATP slow outward current 成分は117%に少し増大した。ATP fast inward current 成分は desensitization が起きやすい応答であることから、UTP 投与後の ATP fast inward current 成分の抑制は UTP に続く ATP 投与により同一受容体が持続的に刺激を受けて desensitization が起きた結果と考えられる。一方、同じ細胞で記録された $10\ \mu\text{M}$ の Ade 応答は56%まで抑制された (Fig. 4 下段)。ATP 応答、Ade 応答とも20分の wash out でコントロール応答近くまで回復し

た。ATP slow outward current 成分と Ade 応答の性質の類似性を指摘する報告⁵⁻⁷⁾が多く、UTP で P2Y 受容体刺激後に ATP slow outward current 成分と Ade 応答に影響の違いが観測されたことは興味深い。

4. Discussion

アフリカツメガエル follicular cell に ATP を投与すると3成分からなる応答が発生した。この各成分の強度は細胞によって違っていた。 $1\ \mu\text{M}$ の ATP を投与して発生した fast inward current 成分の中には $500\ \text{nA}$ (resting potential clamp) を越える電流が記録されることもあった。この fast inward current 成分は G 蛋白と couple する P2Y 受容体が刺激された結果、細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増大して Ca^{2+} activated Cl^- channel が開いて発生する^{12), 13)}。一方、ATP slow outward current 成分は逆転電位と K_{ATP} -channel blocker の結果から K_{ATP} -channel が開いて発生する事が示された。

Follicular cell にある $A_2(P1)$ 受容体が刺激されると couple している G_s が活性化して cAMP dependent kinase A (PKA) が活性化する。続いて PKA が K_{ATP} -channel をリン酸化すると K_{ATP} -channel が開き易くなり、静止膜電位で clamp すると outward current が発生する^{8), 14)} (Fig. 3 A 上段など)。

アフリカツメガエル follicular cell の ATP slow outward current 成分と Ade 応答は同じ受容体を刺激して発生しているという報告が多い⁵⁻⁷⁾。しかし、この仮説は UTP による ATP slow outward current 成分と Ade 応答に対する作用の相違を説明できない。従って、これらの応答は開く K_{ATP} -channel は同じでもそれ以前の細胞内伝達経路が違っていることが考えられる。そこ

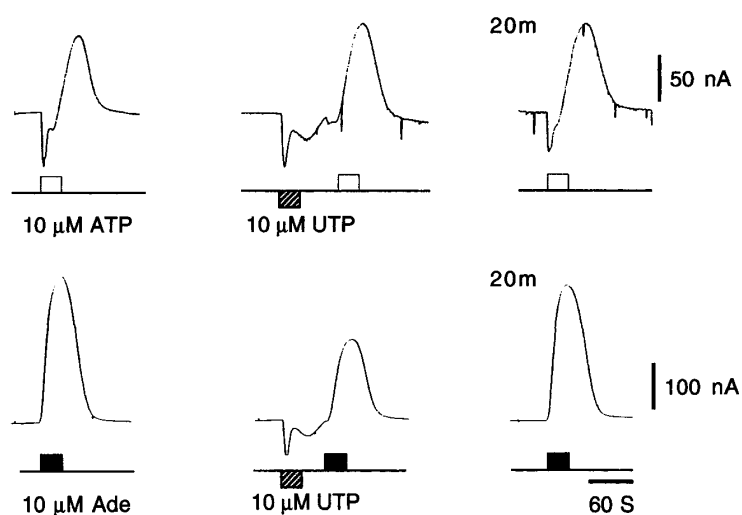


図4. ATP 応答と Ade 応答に対する UTP の作用

上段: $10\ \mu\text{M}$ ATP 応答に対する $10\ \mu\text{M}$ UTP 前投与の作用。
右側の ATP 応答は wash out 20分後の応答。
下段: $10\ \mu\text{M}$ Ade 応答に対する $10\ \mu\text{M}$ UTP 前投与の作用。
右側の Ade 応答は wash out 20分後の応答。

で次に ATP slow outward current 成分を発生させている受容体について検討した。

・ **Ecto-5'-nucleotidase** によって産生された Ade が Ade 受容体を刺激して発生している可能性。

Ade の供給量に直接影響する ecto-5'-nucleotidase の follicular cell の細胞外膜での酵素活性はあまり高くないという報告がある⁷⁾。また、図には示していないが同じ細胞から得られた $1 \mu\text{M}$ の inward current 成分のみの ATP 応答と Ade 応答の電流の絶対値比は ATP inward current 成分が Ade outward current 成分の約10倍の大きさであった。さらに、 $1 \mu\text{M}$ ATP で P2Y 受容体刺激後は $10 \mu\text{M}$ Ade 応答がコントロール応答の10%まで抑制された⁹⁾。従って、ATP から Ade が産生されて Ade 受容体と結合・刺激しても Fig. 1 A 下段右のような絶対値で ATP inward current 成分を超える ATP slow outward current 成分は発生しないと考えられる。以上の結果から ecto-5'-nucleotidase によって産生された Ade が Ade 受容体を刺激して発生している可能性は低いと推察される。

・ **ATP が直接 Ade 受容体を刺激して発生している可能性。**

ATP が Ade とともに Ade 受容体を刺激して応答を発生しているという報告がある⁷⁾。もし、ATP が直接 Ade 受容体を刺激しているのであれば、follicular cell の ATP 応答には ATP slow outward current 成分が発生するはずである。しかし、著者らは Ade 受容体刺激応答の発生を確認している細胞に ATP を投与すると Fig. 1 A の上段左のような ATP slow outward current 成分が全く発生しない細胞を多数確認している。従って、ATP が直接 Ade 受容体を刺激して発生している可能性は低いと考えられる。

・ **ATP slow outward current 成分が P2受容体を刺激して発生している可能性。**

図には示していないが P2X 受容体 agonist の

α, β -methylene ATP $1 \mu\text{M}$ 投与ではほとんど膜電位に変化が見られなかった。この結果は follicular cell に P2X 受容体が存在しないことを示唆している。さらに、アフリカツメガエル follicular cell に ATP を投与すると発生する inward current は P2Y 受容体を刺激して発生している応答であり、agonist の応答強度から P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ のいずれかと考えられている¹²⁾。従って、ATP slow outward current 成分は ATP inward current 成分とは異なる type の P2Y 受容体を刺激して発生しているのかもしれない。ATP slow outward current 成分は K_{ATP}-channel が開いて発生していることから、その受容体は A₂ 受容体と同様に Gs と couple している可能性がある。P2Y 受容体 subtype の P2Y₁₁ 受容体が Gs と couple しているという報告¹³⁾があり、ATP slow outward current 成分が P2Y₁₁ 受容体を活性化して発生している応答かもしれない。いずれにしても様々な agonist や antagonist を用いた検討が必要である。

最近、astrocyte (グリア細胞) から放出された ATP が海馬培養細胞のシナプス伝達を間接的に制御している現象が見つかった⁴⁾。このことから神経細胞間のシナプス伝達概念が「前シナプスから放出された化学物質が後シナプスの受容体を刺激・興奮させ、情報を伝達する現象」に加え astrocyte による制御を含めた「tripartite synapse」という概念が提唱されている¹⁵⁾。しかし、purine 受容体の生理的 agonist の化学構造の類似性から purine 受容体の selective agonist や antagonist が少なく受容体の性質や機能は十分には解明されていない。著者らがこの報告で示した UTP 投与に依る作用の違いで受容体を区別する方法が purine 受容体の機能解明の一助となるかもしれない。

謝 辞

本論文を作成するにあたり研究機材および研究室利用の機会を与えていただき、さらに、多岐にわたり御指導いただいた本学医学部生理学

第一講座佐々木和彦教授に衷心より感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は文部科学省ハイテクリサーチセンター補助金による研究助成金を受けて行われた。

引用文献

- 1) Bryan J, Aguilar-Bryan L: Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K^+ channels. *Biochim Biophys Acta* 1461 : 285-303, 1999
- 2) Burnstock G: Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. *J Physiol Pharmacol.* 46 : 365-384, 1995
- 3) 加藤総夫: 「一粒で二度おいしい」細胞外メッセンジャーとしてのATP—細胞外ATPとプリン受容体による脳内シナプス伝達の多重制御—脳機能の解明 生命科学の源流 赤池紀扶他監修: 75-81, 2002
- 4) Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K: Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 11023-11028, 2003
- 5) Lotan I, Dascal N, Cohen S, Lass Y: Adenosine-induced slow ionic currents in the *Xenopus* oocyte. *Nature* 298 : 572-574, 1982
- 6) Matsuoka T, Nishizaki T, Nomura T, Mori M, Okada Y: ATP produces potassium currents via P3 purinoceptor in the follicle cell layer of *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 248 : 130-132, 1998
- 7) King BF, Pintor J, Wang S, Ziganshin AU, Ziganshina LE, Burnstock G: A novel P1 purinoceptor activates an outward K^+ current in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *J Pharmacol Exp Ther* 276 : 93-100, 1996
- 8) Greenfield LJ Jr, Hackett JT, Linden J: *Xenopus* oocyte K^+ current. I. FSH and adenosine stimulate follicle cell-dependent currents. *Am J Physiol.* 259 : C775-783, 1990.
- 9) Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Takashima K, Matsumoto M, Hirano H, Sasaki K: ATP suppresses the K^+ current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. *Jpn J Physiol.* 51 : 491-500, 2001
- 10) Kusano K, Miledi R, Stinnakre J: Cholinergic and catecholaminergic receptors in *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol (Lond)* 328 : 143-170, 1982
- 11) Ohkubo S, Kumazawa K, Sagawa K, Kimura J, Matsuoka I: β , γ -methylene ATP-induced cAMP formation in C6Bu-1 cells: involvement of local metabolism and subsequent stimulation of adenosine A_{2B} receptor. *J Neurochem* 76 : 872-880, 2001
- 12) King BF, Wang S, Burnstock G: P2 purinoceptor-activated inward currents in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *J Physiol.* 494 : 17-28, 1996
- 13) Communi D, Robaye B, Boeynaems J-M: Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor. *Br J Pharmacol* 128 : 1199-1206, 1999
- 14) Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Hirano H, Matsumoto M, Sasaki K: P2Y-receptor induced inhibition of K^+ -current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. *Jpn J Physiol.* 53(suppl) : S212, 2003
- 15) Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG: Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22 : 208-215, 1999