



# Adenosine activates the potassium channel via a P2 purinoceptor but not via an adenosine receptor in cultured rat superior colliculus neurons

池内, 祐司

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1468

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001468>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	池内裕司 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第999号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成8年3月31日
学位論文題目	Adenosine activates the potassium channel via a P <sub>2</sub> purinoceptor but not via an adenosine receptor in cultured rat superior colliculus neurons (ラット培養上丘神経細胞におけるアデノシンのP <sub>2</sub> プリン受容体を介したK <sup>+</sup> チャンネルの活性化)
審査委員	主査 教授 岡田安弘 教授 住野公昭 教授 龍野嘉紹

## 論文内容の要旨

### I. はじめに

アデノシンは、中枢神経系においては、抑制性および興奮性のneuromodulatorとして作用することが知られている。本研究室におけるモルモットの海馬切片を用いた研究では、低濃度のアデノシン (<1  $\mu$ M) が海馬錐体細胞の神経伝達に対して興奮性作用を持ち、高濃度 (>10  $\mu$ M) では抑制性作用を持つこと、さらに上丘においては、濃度の変化 (10nM-100  $\mu$ M) に左右されず、アデノシンが上丘浅灰白質の細胞神経伝達に対し興奮性作用を持つことを報告している。この興奮性神経伝達作用は、アデノシンがシナプス前神経終末よりアデノシンA<sub>2</sub>受容体を介して興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を増強させることによると考えられている。一方、海馬におけるアデノシンの抑制効果は、ひとつにはA<sub>1</sub>アデノシン受容体を介するシナプス前終末からの興奮性神経伝達物質の放出抑制、さらにはシナプス後神経細胞のK<sup>+</sup>コンダクタンス増強によると考えられている。しかし、上丘におけるアデノシンのシナプス後神経細胞に対する作用については明らかにされていない。そこで本論文において、ラット培養上丘神経細胞を用い、アデノシンがシナプス後性にどのような作用を持つか、それがどのようなイオンチャンネルに関与するかについてwhole-cell patch clamp法を用い研究し、アデノシンがP<sub>2</sub>受容体を介してK<sup>+</sup>チャンネルを活性化していることを明らかにした。

### II. 実験方法と結果

#### (1) 上丘神経細胞におけるアデノシン誘発電流

生後1日のラット脳から上丘を分離し、トリブシン (0.25%) 処理後、上丘細胞を分離し培養した。この培養上丘神経細胞の膜電流をAxopatch-200Aアンプにてwhole-cell voltage clamp法を用いて記録した。細胞外液は標準液としてNaCl145, KCl 5, CaCl<sub>2</sub>2.4, glucose1.8, HEPES10, tetrodotoxin $3 \times 10^{-4}$  (mM) 溶液 (pH7.4) を用い、細胞内液はKCl150, EGTA 5, HEPES10 (mM) 溶液 (pH7.2) を用いた。誘発電流を標準化するために、各細胞の保持電位は+60mVとし、静電容量を測定し電流密度 (頂点の電流振幅/静電容量) を計算した。この条件下でアデノシンがど

のようなチャンネルを活性化するかを調べるため以下の実験を行った。

まず標準パッチ電極内溶液においてアデノシンを投与し、アデノシン誘発電流を測定した結果、アデノシン (10  $\mu$ M) は、膜電位を+60mVに保持した状態で外向き電流を誘発した。次に塩化カリウムを $K^+$ チャンネルを抑制することで知られている塩化セシウムで置換えしたパッチ電極内溶液を使用し、アデノシン誘発電流を測定すると、細胞内 $Cs^+$ はアデノシンによる誘発電流をブロックした。アデノシンの投与後の電流/電圧 (I/V) 相関はアデノシン存在、非存在下で-120mVから+120mVまで20mV間隔で20ms巾の電圧パルスを与えることにより求めた。その結果、アデノシンから得られた電流/電圧 (I/V) 相関は外向き整流性を示す直線で、その逆転電位は $-80 \pm 10$ mVであった。この値は $K^+$ に対するNernstの平衡電位とよく一致していた。これらの結果からアデノシンが、外向き整流性 $K^+$ チャンネルを活性化することが証明された。

#### (2) $P_1$ プリン受容体アゴニスト、アンタゴニストの誘発電流に対する効果

(1) で示されたアデノシン誘発電流がこれまでアデノシンの選択的受容体として知られている $P_1$ アデノシン受容体によって仲介されているのかどうかを調べるために、 $A_1$ および $A_2$ アデノシン受容体アゴニストおよびアンタゴニストを細胞に投与した。選択的 $A_1$ アデノシン受容体アゴニストであるCHA (0.1-1  $\mu$ M) 或いは選択的 $A_2$ アデノシン受容体アゴニストであるCGS21680 (0.01-1  $\mu$ M) によって電流は誘発されなかった。一方、アデノシンによる誘発電流は、選択的 $A_1$ アデノシン受容体アンタゴニストである8-CPT (10  $\mu$ M)、選択的 $A_2$ アデノシン受容体アンタゴニストであるDMQX (0.1  $\mu$ M)、非選択的アデノシン受容体アンタゴニストであるテオフィリン (100  $\mu$ M) によっては抑制されなかった。この結果より、アデノシン誘発電流は、これまで言われていた $P_1$ プリン受容体を介したのではなく、それ以外の受容体を介していることが示唆された。

#### (3) $P_2$ , $P_3$ プリン受容体アゴニストによって誘発される電流

$P_1$ 以外のプリン受容体がアデノシン誘発電流に関与しているかを決定するために、 $P_2$ ,  $P_3$ プリン受容体アゴニストの効果を検討した。2-methylthio ATP, ATP, ADP, AMP,  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene ATP,  $\beta$ ,  $\gamma$ -methyleneATP, UTPを10  $\mu$ Mの濃度で細胞に投与し、それらのアゴニストによって誘発された電流を測定した。 $P_2$ プリン受容体アゴニストである2-methylthioATP, ATP, ADP, AMPは類似した $K^+$ 電流を誘発し、それらのアゴニストの電流振幅に対する効果は2-methylthioATP > ADP > アデノシン > ATP >> AMPの順であった。一方、 $\alpha$ ,  $\beta$ -methyleneATP, UTP,  $\beta$ ,  $\gamma$ -methyleneATPは反応を示さなかった。

### III. 結論

本実験結果では、アデノシンが上丘においても、シナプス後膜で $P_2$ プリン受容体のサブタイプの一つである $P_{2Y}$ プリン受容体を介して外向き整流性 $K^+$ チャンネルを活性化することにより抑制性作用を有することが示された。このアデノシンの抑制性神経伝達作用は、上丘においては、外見上、シナプス前性の興奮性作用の方が強く、シナプス後性の抑制効果が隠蔽されていると考えられる。このようにアデノシンは、上丘神経細胞において、シナプス前神経終末での興奮性神経伝達作用とシナプス後膜での $P_{2Y}$ プリン受容体を介した $K^+$ チャンネル活性化による抑制作用の二つの異なった作用を持つことが結論づけられた。

### IV. 考察

$P_2$ プリン受容体は $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2Z}$ ,  $P_{2T}$ ,  $P_{2U}$ プリン受容体の5つのサブタイプに分類されている。

$\alpha$ ,  $\beta$ -methylene ATPに反応する $P_{2X}$ プリン受容体はligand-gated受容体の一つとして特徴づけられている。 $P_{2Z}$ プリン受容体は肥満細胞に発現しておりATP<sup>4-</sup>が選択的アゴニストである。 $P_{2T}$ プリン受容体は血小板において認められ、ADPによって活性化されるが、ATPによって抑制される。 $P_{2U}$ プリン受容体はG-蛋白と連結しており、UTPを含むさまざまなヌクレオチドによって活性化されるが、AMP、アデノシン、 $\beta$ ,  $\gamma$ -methylene ATP, CTPによっては活性化されない。また、 $P_3$ プリン受容体は $\beta$ ,  $\gamma$ -methylene ATPによって活性化されるが、 $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene ATPはこの受容体のアンタゴニストとして働く。以上の可能性を考慮にいれ、本研究の結果では、上丘神経細胞のK<sup>+</sup>チャンネルが2-methylthio ATP, ADP, アデノシン, ATP, AMP (効果の程度は2-methylthio ATP > ADP > アデノシン > ATP >> AMPの順) によって活性化されることから、アデノシンが、 $P_{2Y}$ プリン受容体を介して外向き整流性K<sup>+</sup>チャンネルを活性化している可能性がもっとも高いと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

アデノシンは、中枢神経系においては、抑制性および興奮性のneuromodulatorとして作用することが知られている。すなわち海馬切片を用いた研究では、低濃度のアデノシン (< 1  $\mu$ M) が、海馬錐体細胞の神経伝達に対して興奮性作用を持ち、高濃度 (> 10  $\mu$ M) では抑制性作用を持つこと、さらに上丘においては、濃度の変化 (10nM–100  $\mu$ M) に左右されず、アデノシンが上丘浅灰白質層の細胞神経伝達に対し興奮性作用を持つことが明らかにされている。

海馬におけるアデノシンの抑制効果は、一つにはアデノシン受容体を介するシナプス前終末からの興奮性神経伝達物質の放出抑制、さらにはシナプス後神経細胞膜のK<sup>+</sup>コンダクタンス増強によるとされている。海馬および上丘における興奮作用については、その興奮作用として神経終末のアデノシン受容体を介して興奮性伝達物質であるグルタミン酸の放出の増大されることによることが明らかにされている。しかし、上丘におけるアデノシンのシナプス後神経細胞に対する作用については明らかにされていない。そこで本論文において、ラット培養上丘神経細胞を用い、アデノシンがシナプス後性にどのような作用を持つか、それがどのようなイオンチャンネルに関与するかについてwhole-cell patch clamp法を用い研究した。

ラット培養上丘神経細胞のアデノシン誘発電流をパッチクランプ法によって測定した結果、アデノシン (10  $\mu$ M) は、膜電位を+60mVに保持した状態で外向き電流を誘発し、この電流はK<sup>+</sup>チャンネルを特異的に抑制するセシウム (Cs<sup>+</sup>) によって減少、消失した。またアデノシンの投与によって得られた電流/電圧 (I/V) 相関は外向き整流性を示す直線で、その逆転電位は $-80 \pm 10$ mVであった。この値はK<sup>+</sup>に対するNernstの平衡電位とよく一致していた。これらの結果からアデノシンが、外向き整流性K<sup>+</sup>チャンネルを活性化することが証明された。

次に、アデノシン誘発電流がこれまでアデノシンの選択的受容体として知られている $P_1$ アデノシン受容体によって仲介されているのかどうかを調べる目的で、 $A_1$ および $A_2$ アデノシン受容体アゴニストおよびアンタゴニストを細胞に投与した。アデノシン受容体アゴニストの投与によっては、電流は誘発されなかった。このことによりアデノシンによる誘発電流は、これまで言われていた $P_1$ プリン受容体を介したのではなく、それ以外の受容体を介していることが示唆された。

そこで、 $P_1$ 以外のどのようなプリン受容体がアデノシン誘発電流に関与しているかを決定するために、 $P_2$ ,  $P_3$ プリン受容体アゴニストの効果を検討した。すなわち、2-methylthio-ATP, ATP, A

DP, AMP,  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene-ATP,  $\beta$ ,  $\gamma$ -methylene-ATP, UTPを10  $\mu$ Mの濃度で培養上丘神経細胞に投与し, それらのアゴニストによって誘発された電流を測定した。P<sub>1</sub>プリン受容体アゴニストである 2-methylthio-ATP, ATP, ADP, AMPはアデノシンと類似したK<sup>+</sup>電流を誘発し, それらのアゴニストの電流振幅に対する効果は2-methylthio-ATP > ADP > アデノシン > ATP >> AMPの順であった。一方,  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene-ATP, UTPおよびP<sub>3</sub>プリン受容体アゴニストである $\beta$ ,  $\gamma$ -methylene-ATPでは効果がみられなかった。これらの結果よりアデノシンは, 上丘シナプス後神経細胞において, P<sub>1</sub>アデノシン受容体を介してではなく, P<sub>2</sub>プリン受容体のサブタイプの一つであるP<sub>2Y</sub>プリン受容体を介して外向き整流性K<sup>+</sup>チャンネルを活性化することにより抑制性作用を有することが示された。

アデノシンは, 上丘神経細胞においても, シナプス前神経終末での興奮性神経伝達作用とシナプス後膜でのP<sub>2Y</sub>プリン受容体を介したK<sup>+</sup>チャンネル活性化による抑制作用の二つの異なった作用を持つが, アデノシンの抑制性神経伝達作用は上丘においては, 外見上シナプス前性の興奮性作用の方が強く, シナプス後性の抑制効果は隠蔽されていると結論づけられた。

本研究は, 中枢神経系におけるアデノシンおよびその誘導体の作用について検討を加えたものであるが, 培養上丘神経細胞においてアデノシンによるK<sup>+</sup>電流の発生を確認したのち, それがプリン受容体のサブタイプであるP<sub>2Y</sub>受容体を介していることを明らかにした点で, 従来ほとんど報告のなかったプリン誘導体の中枢機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。