The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ca2+ responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina.
Author(s)	杉岡, 美保
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39993
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏　　名	杉　岡　美　保（すぎ おか み ほ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　12970　号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Ca^{2+} responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. （発生初期鶏胚の網膜神経層におけるアデノシン三リン酸による細胞内カルシウム応答）
	論文審査委員 （主査） 教　授　福田　　淳 （副査） 教　授　津本　忠治　　教　授　三木　直正

論文内容の要旨

【目的】

アデノシン三リン酸（ATP）は，成体の神経系ではシナプスを介して神経伝達物質として作用する。一方，発生過程においては，未分化な細胞や増殖期の細胞でATPが細胞内Ca^{2+}濃度を一過性に上昇させることが報告されている。細胞内Caイオンは，細胞増殖，細胞分化及び形態形成に重要な役割を果たしており，ATPによる細胞内Ca^{2+}濃度上昇が発生過程の細胞に特異的な生理的応答である可能性がある。しかしながら，ATPによるCa^{2+}応答が発生過程に伴ってどのように変化するのかを系統的に調べた研究はない。そこで本研究では，細胞分裂，細胞分化及びシナプス形成などの発生過程が明確にされている鶏胚の網膜神経層を用い，まず1）発生初期の神経系の細胞でATPが細胞内Ca^{2+}濃度を調節しうることを明らかにし，さらに2）ATPによるCa^{2+}応答の細胞内メカニズム，3）ATPによるCa^{2+}応答の発生段階による変化を明確にするため，細胞内Ca^{2+}濃度変化を蛍光測定法により調べた。

【方法ならびに成績】

鶏胚（孵卵3日目；E3）の網膜神経層（直径400μm，厚さ40μm）を剥離して，Ca^{2+}感受性蛍光色素Fura－2AMを負荷した。網膜神経層はナイロンワイヤー（直径20μm）製のリングでチャンバー底に固定し，網膜神経層中心部の直径50μmのスポットから測光した。

ATPをbath－application法により投与すると，細胞内Ca^{2+}濃度は一過性に上昇した（EC_{50}：128μM，n＝11）。ATP（500μM）によるCa^{2+}応答は，細胞外液のCaイオンを除去しEGTA（1mM）を加えた条件下でも，外液Caイオン存在下と同様に生じた。これにより，ATPは細胞内Ca^{2+}ストアに貯蔵されたCa^{2+}を細胞質へ放出させることが示唆された。

次に，Ca^{2+}応答に関わるATP受容体の薬理学的性質を調べた。P_1プリノセプターのアゴニスト（アデノシン）（500μM）ではCa^{2+}応答が見られなかった。P_{2X}プリノセプターのアゴニスト（α，β－メチレンATP，β，γ－メチレンATP），P_{2Y}プリノセプターのアゴニスト（2－メチルチオATP）（各々500μM）ではCa^{2+}応答は起こらなかった。P_{2U}プリノセプターのアゴニスト（ウリジン三リン酸；UTP）（500μM）は，ATP（500μM）によるCa^{2+}応答よりも振幅の大きなCa^{2+}応答を引き起し（132.5 ±8.8 %，n＝5），UTPによるCa^{2+}応答のEC_{50}は24μM（n＝7）であった。ATP（500μM），UTP（200μM）に対するCa^{2+}応答の振幅はいずれも，P_2プリノセプター

のアンタゴニスト（スラミン，リアクティブブルー２）（それぞれ100μM，50μM）存在下でほぼ完全に抑制された。以上により，P_{2U}プリノセプターがCa^{2+}応答に関与していることが明らかとなった。

ATPによるCa^{2+}応答の発生段階による変化を明らかにするため，Ｅ３からＥ13の鶏胚網膜からCa^{2+}応答を記録した。ATPによるCa^{2+}応答はＥ３で最も大きく，Ｅ８までに激減し，以後痕跡的となった。鶏胚網膜神経層の場合，細胞増殖の終了時期は細胞の種類により異なるがＥ７からＥ12と報告されており，シナプス構造の形成はＥ14から認められている。従って，ATP投与による細胞内Ca^{2+}上昇が顕著に起こる時期は，シナプス形成以前の細胞増殖期であることが明らかになった。

【総括】

孵卵３－13日目の鶏胚網膜神経層の灌流標本を用い，ATP投与による細胞内Ca^{2+}濃度変化を蛍光測定法により調べた。ATP投与により細胞内Ca^{2+}濃度が一過性に上昇すること，また孵卵３日目ではそのCa^{2+}応答は細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出により生じ，Ca^{2+}応答の薬理学的性質からP_{2U}プリノセプターがこの応答に関与していることが明らかになった。さらにこのCa^{2+}応答は，神経発生の初期で顕著に生じるが，細胞増殖が終了しシナプスが形成される以前に激減した。この事実から，発生初期の網膜神経層では，ATPはシナプスを介して神経伝達物質として作用するよりむしろ，Caイオン濃度を調節することで，細胞増殖や細胞分化を制御する細胞間メッセンジャーとして機能するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

成体の神経系では，ATPは神経伝達物質として作用することが知られているが，発生過程の未分化な細胞や増殖期の細胞に対しては，細胞内Ca^{2+}濃度の上昇を引き起こすことが報告されている。細胞内Caイオンは細胞増殖，細胞分化及び形態形成に重要な役割を果たすとされており，ATPによる細胞内Ca^{2+}濃度上昇が，発生過程の細胞に特異的な応答である可能性が考えられる。しかしこれまで，神経系・非神経系を問わず，ATPによるCa^{2+}応答の発生過程に伴う変化を系統的に調べた研究はない。

本研究では，細胞分裂，細胞分化及びシナプス形成などの発生過程が明確にされている鶏胚の網膜神経層を用い，その灌流標本にCa^{2+}感受性色素fura－２AMを負荷して細胞内Ca^{2+}濃度を蛍光測光した。その結果，１）ATPによる細胞内Ca^{2+}濃度上昇は，発生の初期（孵卵３日目）で最も顕著に生じるが，細胞増殖が終了するまで（孵卵７－12日目）に激減し，シナプスが形成される（孵卵14日目）以前に痕跡的となることを明らかにした。さらに，２）発生初期でのATPによるCa^{2+}濃度上昇は，細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出により生じ，Ca^{2+}応答の薬理学的性質からP_{2U}プリノセプターがこの応答に関与していることを明らかにした。１）の事実は，発生初期の網膜神経層の細胞では，ATPがCaイオン濃度を調節することで，細胞増殖や細胞分化を制御する細胞間メッセンジャーとして機能している可能性を示唆するものである。さらに，２）のP_{2U}プリノセプターを介するCa^{2+}濃度上昇の細胞内メカニズムは，上皮細胞や平滑筋細胞，腫瘍細胞，腺細胞などの非神経細胞で報告されているメカニズムと共通すると考えられ，この点は細胞生理学的に重要な所見である。

以上の研究成果は神経組織におけるATPの生理作用としてこれまでになかった新しい知見をもたらした。よって本研究は学位を授与するに値すると思われる。