



Title	Ca ²⁺ 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

氏 名	すぎおかみほ 杉岡美保
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 9 7 0 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 応答が発生過程に伴ってどのように変化する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 Ca²⁺ 濃度を調節しうることを明らかにし、さらに 2) ATP による Ca²⁺ 応答の細胞内メカニズム、3) ATP による Ca²⁺ 応答の発生段階による変化を明確にするため、細胞内 Ca²⁺ 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; E 3) の網膜神経層 (直径 400 μ m, 厚さ 40 μ m) を剥離して、Ca²⁺ 感受性蛍光色素 Fura-2 AM を負荷した。網膜神経層はナイロンワイヤー (直径 20 μ m) 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 50 μ m 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 Ca²⁺ 濃度は一過性に上昇した (EC₅₀: 128 μ M, n=11)。ATP (500 μ M) による Ca²⁺ 応答は、細胞外液の Ca イオンを除去し EGTA (1 mM) 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 Ca²⁺ ストアに貯蔵された Ca²⁺ を細胞質へ放出させることが示唆された。

次に、Ca²⁺ 応答に関わる ATP 受容体の薬理学的性質を調べた。P₁ プリノセプターのアゴニスト (アデノシン) (500 μ M) では Ca²⁺ 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 500 μ M) では Ca²⁺ 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) (500 μ M) は、ATP (500 μ M) による Ca²⁺ 応答よりも振幅の大きな Ca²⁺ 応答を引き起し (132.5 $\pm$ 8.8 %, n=5), UTP による Ca²⁺ 応答の EC₅₀ は 24 μ M (n=7) であった。ATP (500 μ M), UTP (200 μ M) に対する Ca²⁺ 応答の振幅はいずれも、P₂ 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 $100\mu\text{M}$ ， $50\mu\text{M}$ ）存在下ではほぼ完全に抑制された。以上により， $\text{P}_{2\text{U}}$ 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，E 3 から E 13 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 E 3 で最も大きく，E 8 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 E 7 から E 12 と報告されており，シナプス構造の形成は E 14 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 $\text{P}_{2\text{U}}$ 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-2 AM を負荷して細胞内 Ca^{2+} 濃度を蛍光測定した。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 $\text{P}_{2\text{U}}$ 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 $\text{P}_{2\text{U}}$ 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。