

学 位 論 文 題 名

プリン受容体の作用とその薬理学的分類

— モルモット副腎髄質細胞とラット胃輪走筋を用いた研究 —

学位論文内容の要旨

モルモット分離副腎髄質細胞では ATP の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに与える影響について、またラット胃輪走筋では ATP が平滑筋の機械的反応に与える影響とその受容体の薬理学的分類について検討し、それぞれ以下の成績を得た。

1. モルモット副腎髄質を用いた実験において、膜電位固定 (-70 mV) した細胞で、ATP ($500 \mu\text{M}$) は内向き電流反応 (I_{ATP})、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇及び電位依存性 Ca^{2+} 電流 (I_{Ca}) の抑制を引き起こした。
2. 0.1 又は 1 mM EGTA を含む細胞内液を用いると、ATP は I_{ATP} の大きさに相関して I_{Ca} を抑制したが、 10 mM EGTA を用いると、 I_{ATP} の大きさに関わらずほぼ一定の割合で I_{Ca} を抑制した。
3. ATP ($100 \mu\text{M}$) は電位依存性 Ba^{2+} 電流 (I_{Ba}) を抑制し、この抑制効果は細胞内への GTP γ S ($100 \mu\text{M}$) 又は GDP β S (1 mM) の適用、あるいは直前に $+100 \text{ mV}$ への強い脱分極パルスを与えることによって減少した。
4. I_{Ba} に対する抑制効果は ADP, AMP, adenosine でも見られ、adenosine が最も強い力価を示した。また adenosine と AMP は、nicotine ($50 \mu\text{M}$) による adrenaline 分泌を抑制した。
5. ラット胃輪走筋を用いた実験において、acetylcholine ($1 \mu\text{M}$) で収縮させた標本で、ATP, 2-methylthio ATP (2MeATP), α, β -methylene ATP (α, β meATP) 及び adenosine は濃度依存性に弛緩反応を引き起こし、 α, β meATP が最も強い力価を示した。UTP は小さな弛緩反応しか生じなかった。
6. 8-Phenyltheophylline ($3 \mu\text{M}$) は adenosine の弛緩反応を抑制したが、ATP と

α,β meATP の弛緩反応は抑制しなかった。Reactive blue 2 (RB2: 1 及び 3 μ M) と suramin (10-100 μ M) は ATP と α,β meATP の弛緩反応を抑制した。PPADS (3-30 μ M) と DIDS (10-100 μ M) は ATP の弛緩反応に影響を与えず、 α,β meATP の弛緩反応を抑制した。

7. ATP と α,β meATP の弛緩反応は apamin (0.3 μ M) で抑制された。

8. 静止張力の標本で、ATP 及び関連物質は、 $2\text{MeATP} \gg \text{ATP} \geq \text{UDP} = \text{UTP} \geq \text{ATP}\gamma\text{S} \gg \alpha,\beta\text{meATP} > \text{adenosine}$ の力価順で収縮反応を引き起こした。

9. RB2 (1 及び 3 μ M) 及び suramin (10-100 μ M) は ATP と UTP の収縮反応を抑制した。PPADS (30 μ M) は ATP 収縮は抑制せず、UTP 収縮を抑制した。

10. ATP 収縮は 2MeATP 又は ATP γ S による脱感作で強く抑制されたが、UTP による脱感作ではわずかな抑制しか見られなかった。一方、UTP 収縮は ATP, 2MeATP 又は ATP γ S の脱感作によって全く抑制をされなかった。

11. ATP と UTP の収縮反応は外液 Ca^{2+} 除去, 又は nifedipine (1 μ M) によって抑制された。

以上の結果よりモルモット副腎髄質細胞では、ATP は Ca^{2+} による電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの不活化と、GTP 結合蛋白質を介する Ca^{2+} チャンネルの抑制を引き起こすことが示唆された。また、モルモット副腎髄質細胞には、 P_1 と P_2 受容体が混在していると考えられる。ラット胃輪走筋では、ATP と α,β meATP はそれぞれ異なる P_2 受容体を介して弛緩反応を起こし、この反応には apamin 感受性 K^+ チャンネルが関与していることが示唆された。また ATP は P_{2Y} 受容体、UTP はピリミジン受容体を介して収縮を生じ、この収縮反応は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} 流入によって生じていることが示唆された。

副腎髄質細胞及び胃平滑筋細胞にはプリン及びピリミジン受容体が複数存在し、ATP や関連物質が伝達物質としての機能を果たしていると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 助 教 授 伊 藤 茂 男

学 位 論 文 題 名

プリン受容体の作用とその薬理学的分類

—モルモット副腎髄質細胞とラット胃輪走筋を用いた研究—

1. モルモット分離副腎髄質細胞とラット胃輪走筋を用い、それぞれATPの電位依存性 Ca^{2+} チャネルに対する作用、及びATPによる機械的反応と受容体の薬理学的分類について検討し、以下の成績を得た。

2. 膜電位固定 (-70 mV) したモルモット副腎髄質細胞で、ATP ($500 \mu\text{M}$) は内向き電流反応 (I_{ATP})、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇及び電位依存性 Ca^{2+} 電流 (I_{Ca}) の抑制を引き起こした。細胞内に 0.1 又は 1 mM EGTAを適用すると、ATPは I_{ATP} の大きさに相関して I_{Ca} を抑制したが、 10 mM EGTAを用いると、 I_{ATP} の大きさに関わらず一定の割合で I_{Ca} を抑制した。ATP ($100 \mu\text{M}$) は電位依存性 Ba^{2+} 電流 (I_{Ba}) を抑制し、この抑制効果は細胞内への $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ($100 \mu\text{M}$) 又は $\text{GDP}\beta\text{S}$ (1 mM) の適用、又は $+100 \text{ mV}$ への脱分極パルスを与えることで減少した。

3. Acetylcholine ($1 \mu\text{M}$) で収縮させた胃輪走筋標本で、ATP、2-methylthio ATP (2MeATP)、 α,β -methylene ATP ($\alpha,\beta\text{meATP}$) は濃度依存性の弛緩反応を生じ、 $\alpha,\beta\text{meATP}$ が最も強い力価を示した。Reactive blue 2 (RB2, 1 及び $3 \mu\text{M}$) と suramin (10 – $100 \mu\text{M}$) はATPと $\alpha,\beta\text{meATP}$ の弛緩を抑制した。PPADS (3 – $30 \mu\text{M}$) とDIDS (10 – $100 \mu\text{M}$) はATPの弛緩に影響を与えず、 $\alpha,\beta\text{meATP}$ の弛緩を抑制した。

4. 静止張力の胃輪走筋標本では、 $2\text{MeATP} \gg \text{ATP} \geq \text{UTP} \geq \text{ATP}\gamma\text{S} \gg \alpha,\beta\text{meATP}$ の力価順で収縮反応が生じた。RB2 (1 及び $3 \mu\text{M}$) 及びsuramin (10 – $100 \mu\text{M}$) はATPとUTPの収縮を抑制した。PPADS ($30 \mu\text{M}$) はATP収縮は抑制せず、UTP収縮を抑制した。ATP収縮は2MeATP又は $\text{ATP}\gamma\text{S}$ による脱感作で強く抑制されたが、UTPによる脱感作ではわずかな抑制しか見られなかった。UTP収縮はATP、2MeATP又は $\text{ATP}\gamma\text{S}$ の脱感作によって全く抑制をされなかった。

以上本論文では、副腎髄質細胞と胃輪走筋で、それぞれATPは Ca^{2+} による不活化と、GTP結合蛋白を介する電位依存性 Ca^{2+} チャネルの抑制を起こすこと、ATPと

α, β meATPはそれぞれ異なる P_2 受容体を介して弛緩を、 P_{2Y} 受容体およびUTPはピリミジン受容体を介して収縮を生じることが初めて示された。よって審査委員一同は、乙黒兼一氏は、博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。