



|                     |                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 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                                    |
| Author(s)           | 乙黒, 兼一                                                                            |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                             |
| Degree Name         | 博士(獣医学)                                                                           |
| Dissertation Number | 甲第4457号                                                                           |
| Issue Date          | 1998-03-25                                                                        |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.11501/3137173">https://doi.org/10.11501/3137173</a>   |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/51476">https://hdl.handle.net/2115/51476</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                   |
| File Information    | 000000322363.pdf                                                                  |



①

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—

乙黒 兼一



## 目次

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| 序文                                               | 1  |
| モルモット副腎髄質細胞                                      |    |
| I 緒言                                             | 4  |
| II 実験方法                                          | 7  |
| A 標本                                             | 7  |
| B 膜電流測定                                          | 7  |
| 1 実験装置                                           | 7  |
| 2 実験手順                                           | 8  |
| C 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の測定                     | 8  |
| D Catecholamine 分泌の測定                            | 9  |
| E 使用薬物                                           | 10 |
| F 統計処理                                           |    |
| III 実験結果                                         | 11 |
| A ATP による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇              | 11 |
| B $I_{\text{Ca}}$ に対する ATP の効果                   | 11 |
| C ATP による $I_{\text{Ba}}$ 抑制に対する GTP 結合蛋白質の関与    | 14 |
| D ADP, AMP 及び adenosine の $I_{\text{Ba}}$ に対する影響 | 17 |
| E Catecholamine 分泌に与える影響                         | 21 |
| IV 考察                                            | 23 |
| A $\text{Ca}^{2+}$ による $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの抑制  | 23 |
| B GTP 結合蛋白質を介した $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの抑制         | 25 |
| C Adenosine 及び adenine nucleotide の効果とその受容体      | 26 |



## ラット胃輪走筋

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| I 緒言                                      | 28 |
| II 実験方法                                   | 32 |
| A 標本                                      | 32 |
| B 張力測定                                    | 32 |
| 1 マグヌス法                                   | 32 |
| 2 弛緩反応                                    | 33 |
| 3 収縮反応                                    | 33 |
| C 使用薬物                                    | 34 |
| D 統計処理                                    | 35 |
| III 実験結果                                  | 36 |
| A Purine 及び pyrimidine nucleotide による弛緩反応 | 36 |
| 1 ATP 及び ATP 類似物質による弛緩反応                  | 36 |
| 2 プリン受容体拮抗薬の効果                            | 38 |
| 3 Apamin の効果                              | 46 |
| B Purine 及び pyrimidine nucleotide による収縮反応 | 46 |
| 1 ATP 及び ATP 類似物質による収縮反応                  | 46 |
| 2 プリン受容体拮抗薬の効果                            | 51 |
| 3 Nucleotide による脱感作の効果                    | 55 |
| 4 外液 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性                 | 60 |
| IV 考察                                     | 64 |
| A 弛緩反応に関与するプリン受容体                         | 64 |
| B 収縮反応に関与するプリン受容体                         | 65 |
| C Pyrimidine nucleotide の作用する受容体          | 66 |
| D Nucleotide による収縮, 弛緩反応の機序について           | 68 |



|      |    |
|------|----|
| 総括   | 70 |
| 謝辞   | 73 |
| 参考文献 | 74 |
| 英文抄録 | 85 |



## 序文

ATP は高エネルギー化合物であり、生体内エネルギー源として働いている。これに加えて、細胞外の ATP やその分解物質が伝達物質としての働きを持つことが報告されてきた。ほとんどの細胞は細胞質に高濃度の ATP を含んでいるため、細胞が損傷を受けると細胞外に ATP が放出される。また細胞内の ATP が膜を介して放出されることや、分泌顆粒の中に貯蔵され開口放出によって放出されることも知られている

(Gordon, 1986; Dubyak & El-Moatassim, 1993)。この様に細胞外に放出された adenine nucleotide や adenosine は、プリン受容体 (purinoceptors) と呼ばれる細胞膜表面に存在する受容体を介して様々な反応を引き起こす (Gordon, 1986; El-Moatassim *et al.*, 1992)。プリン受容体は adenosine > AMP > ADP > ATP という力価の順序で作用する  $P_1$  受容体 (adenosine 受容体) と、ATP > ADP > AMP > adenosine の順序である  $P_2$  受容体 (ATP 受容体) に大きく分類され、 $P_2$  受容体はさらに  $P_{2X}$  受容体 (力価順が  $\alpha, \beta$ -methylene ATP > ATP = 2-methylthio ATP) と  $P_{2Y}$  受容体 (力価順は 2-methylthio ATP > ATP >  $\alpha, \beta$ -methylene ATP) に分類された (Burnstock & Kennedy, 1985; Kennedy, 1990)。現在  $P_2$  受容体は、薬理学的に  $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2U}$ ,  $P_{2T}$ ,  $P_{2Z}$ ,  $P_{2D}$  受容体の 6 つのサブタイプに分類され (Fredholm *et al.*, 1994)、遺伝子レベルでは 14 種類のサブタイプがクローニングされている (Abbracchio & Burnstock, 1994; Fredholm *et al.*, 1997)。

$P_2$  受容体は多種多様な細胞に発現しており、循環系や神経系、呼吸器系、免疫系、内分泌系など様々な機能に関連していることが報告されているが (El-Moatassim *et al.*, 1992; Dubyak & El-Moatassim, 1993)、その中でも神経系興奮性細胞における研究は最も進んでいる分野の一つである (Illes & Nörenberg, 1993)。ニューロンや副腎髄質細胞にはイオンチャネルと共役した  $P_{2X}$  受容体が存在し、細胞に脱分極性の興奮作用をもたらすことが知られている (Bean, 1992a)。神経系細胞における ATP の効果は、ラットクロム親和性細胞腫 (PC12 cell) において、チャネルのイオン透過性や、



電位依存性, 及びクローニングによる受容体構造やサブタイプの同定など多くの報告がなされている (Inoue *et al.*, 1989; 1992; Fasolato *et al.*, 1990; Nakazawa *et al.*, 1990; 1991; Ifune & Steinbach, 1991; Neuhaus *et al.*, 1991; Sela *et al.*, 1991; Clementi *et al.*, 1992; Majid *et al.*, 1992; Nakazawa & Inoue, 1992; Nakazawa & Hess, 1993; Brake *et al.*, 1994; Nikodijevic *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Gollasch & Haller, 1995; Koizumi *et al.*, 1995ab; Oda *et al.*, 1996). これに対して, ウシ副腎髄質細胞では,  $P_{2X}$  受容体を介した興奮作用と共に, GTP 結合蛋白質と共役した  $P_{2Y}$  受容体による電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネル抑制作用についても報告されており, ATP の catecholamine 分泌に与える影響に関しては意見が分かれている (Chern *et al.*, 1987; 1992; Kim & Westhead, 1989; Diverse-Pierluissi *et al.*, 1991; Gandía *et al.*, 1993; Mateo *et al.*, 1995). モルモット副腎髄質細胞では, ATP によって catecholamine 分泌が生じ, この反応には  $P_{2X}$  受容体が関与していることを既に報告したが (Asano *et al.*, 1995), ウシで報告されている様な  $P_{2Y}$  受容体を介した抑制効果に関しては報告がない.

またこの様な神経系の細胞における研究に比較して, 消化管平滑筋における ATP の作用は, その機序だけでなく受容体サブタイプに関しても今だ不明な点が多い. Burnstock & Kennedy (1985) は,  $P_{2Y}$  受容体を介する反応としてモルモット盲腸紐における ATP の弛緩反応をその典型的な例として報告しているが, 最近のプリン受容体に関する総説には, 消化管平滑筋における ATP の作用やその受容体サブタイプについてほとんど記載されていないが (Dubyak & El-Moatassim, 1993; Fredholm *et al.*, 1994), これは ATP の研究が他の組織に比べ思う様に進んでいないためと考えられる. 胃平滑筋における ATP の作用も古くから報告されているが (Burnstock *et al.*, 1970), その反応に関与するプリン受容体の分類については意見が一致していない (Lefebvre & Burnstock, 1990; Matharu & Hollingsworth, 1992). また最近モルモット盲腸紐の弛緩反応に, 複数のプリン受容体が関与しているとの報告がなされ

(Dudeck *et al.*, 1995; Bültmann & Starke, 1995; Windscheif *et al.*, 1995; Bültmann *et al.*, 1996), 他の消化管平滑筋でも, 従来の分類によって同定されていた受容体とは異なる



る, より多くの受容体が反応に関与している可能性がある。

以上のことから本実験ではモルモット副腎髄質細胞を用いて, ATP の抑制性作用として考えられている電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  電流の抑制効果について検討した。またラット胃輪走筋標本を用いて, ATP の平滑筋の機械的反応に与える影響と, その受容体の分類について検討した。



## I 緒論

副腎髄質細胞の分泌顆粒には catecholamine とともに高濃度の ATP (adenosine 5'-triphosphate) が貯蔵されており (Winkler & Westhead, 1980), 開口放出によって放出されるため (Douglas *et al.*, 1965; Ito, 1983; Cena & Rojas, 1990; Rojas *et al.*, 1990), ATP やその分解物質である ADP, AMP 及び adenosine が副腎髄質細胞に対して何らかの作用を持つのではないかと考えられてきた. 腫瘍化した副腎髄質細胞であるラットクロム親和性細胞腫 (PC12 cell) では, ATP による catecholamine 分泌作用とその機序について詳細な研究がなされている. PC12 cell では, ATP によって内向き電流反応 ( $I_{ATP}$ ) と noradrenaline 分泌が生じ, これら ATP に対する反応は nicotine による反応の約 5 倍と報告されている (Inoue *et al.*, 1989). また, ATP による分泌反応は細胞外  $Ca^{2+}$  に依存しているが, 電位依存性 L 型  $Ca^{2+}$  チャネル遮断薬や  $Cd^{2+}$  の影響を受けないとも報告された. その後,  $I_{ATP}$  は非選択的陽イオンチャネルの開口によるものであり (Nakazawa *et al.*, 1990), このチャネル自体が高い  $Ca^{2+}$  透過性を持つため,  $I_{ATP}$  によって流入した  $Ca^{2+}$  によって分泌が起き得ることが示唆された. PC12 cell で報告されている ATP の効果は,  $P_{2X}$  受容体を介する反応であり, すでに受容体のクローニングも行われている (Brake *et al.*, 1994).

一方, ウシ副腎髄質細胞では, ATP による catecholamine 分泌作用 (Kim & Westhead, 1989; Majid *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1995) と共に, ATP が分泌に対して抑制作用を示すことも報告されている. Chern *et al.*, (1987) は ATP, ADP 及び adenosine が acetylcholine による catecholamine 分泌を抑制することを報告した. 彼らは ATP や ADP は分解された後, adenosine として作用していると考えたが, その後 adenosine が  $P_1$  受容体を介して分泌抑制効果を示し, この分泌抑制効果には電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの抑制が関与していることが示唆された (Chern *et al.*, 1992; Mateo *et al.*, 1995).



これに対して同じウシ副腎髄質細胞で、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  電流 ( $I_{\text{Ca}}$ ) 抑制効果は  $\text{P}_1$  受容体に作用する adenosine や 2-chloro-adenosine では見られないと報告されている

(Gandía *et al.*, 1993; Currie & Fox, 1996) . また Diverse-Pierluissi *et al.* (1991) はウシ副腎髄質細胞でも PC12 cell と同様に、ATP が  $I_{\text{ATP}}$  を引き起こすことと、 $I_{\text{Ca}}$  に対する抑制効果を持つことを示した. ATP は  $\text{P}_{2\text{Y}}$  受容体を介して  $I_{\text{Ca}}$  を抑制すると考えられているが、 $\text{P}_{2\text{X}}$  受容体を介する  $I_{\text{ATP}}$  の誘発は全く見られないとの報告もされている

(Gandía *et al.*, 1993; Currie & Fox, 1996) . Lin *et al.* (1995) は、ウシ副腎灌流標本では、ATP が carbachol や DMPP (1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium) よりも強い catecholamine 分泌を引き起こすが、単離直後の分離細胞では ATP による分泌効果はほとんど見られず、培養日数を経るにつれ分泌効果が増強されていくことを報告しており、上述の実験結果の相違も、ウシ副腎髄質細胞の培養条件が異なることなどが原因と考えられる.

モルモット膀胱平滑筋では、ATP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇によって  $I_{\text{Ca}}$  が抑制されることが示されている (Schneider *et al.*, 1991) . 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇による  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの不活化の機序としては、 $\text{Ca}^{2+}$  による直接的な遮断や、チャネルの磷酸化の関与が提唱されている (Eckert & Chad, 1984) .

またウシ副腎髄質細胞では、百日咳毒素 (pertussis toxin) の処置により catecholamine 分泌が生じ (Brocklehurst & Pollard, 1988) , その作用部位が電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルであることが報告された (Cena *et al.*, 1991) . 百日咳毒素は G 蛋白 (GTP 結合蛋白質)  $\alpha$  サブユニットの  $\text{G}_i/\text{G}_o$  を ADP リボシル化することによって G 蛋白の活性を抑制することが知られており、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが G 蛋白によって調整を受けることが示された. また様々な伝達物質が、G 蛋白と共役した受容体を介して電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを抑制することが報告されている (Holz *et al.*, 1986; Lewis *et al.*, 1986; Grassi & Lux, 1989; Kasai & Aosaki, 1989; Aicardi *et al.*, 1991; Scholz & Miller, 1991; Baidan *et al.*, 1995) . ウシ副腎髄質細胞においても、ATP による  $I_{\text{Ca}}$  抑制が G 蛋白を介して生じ (Diverse-Pierluissi *et al.*, 1991) , この抑制効果には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は関



与していないと報告されている (Gandía *et al.* 1993; Currie & Fox, 1996) .

ウシ副腎髄質細胞での報告と異なり, モルモット副腎髄質細胞では分離直後の細胞でも, ATP が細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こすことによって, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇と catecholamine 分泌を引き起こす (Asano *et al.*, 1995) . 従って, この様な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が  $I_{\text{Ca}}$  の抑制を生じているかもしれない. また, ウシ副腎髄質細胞で報告されている様に, ATP が G 蛋白を介して  $I_{\text{Ca}}$  抑制効果を示す可能性も考えられる. そこで本実験ではモルモット副腎髄質細胞における, ATP とその類似物質の  $I_{\text{Ca}}$  抑制の有無とその作用機序について検討した.

なお, 本実験結果の大部分は既に公表されている (Otsuguro *et al.*, 1995; 1996b) .



## II 実験方法

### A 標本

Hartley 系の雌雄モルモット (体重 350-550 g) を用いた。モルモットは後頭部を殴打後、頸動脈切断によって放血死させ、左右両副腎を摘出した。副腎髓質細胞の分離は Hochman & Perlman (1976) の方法に準じ、一部改良して行った。氷冷した  $\text{Ca}^{2+}$  除去溶液 ( $\text{Ca}^{2+}$  を含まない標準溶液) 中で摘出した副腎から周辺組織を除去した後、約 1mm の厚さに薄切し、さらに実体顕微鏡下で髓質部分をくり抜いた。この小片を 200 units/ml collagenase 及び 5 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin) を含む  $\text{Ca}^{2+}$  除去溶液中で 20 分間、37℃ で振盪した。酵素処理後溶液を氷中で冷却し、先端を焼いたパスツールピペットで穏やかにピペッティングを繰り返し機械的分離を促した。以上の分離過程を 3-4 回行った。得られた細胞浮遊液を  $500\times g$  で 2 分間遠心し、collagenase を含む上清液を除去した。細胞分離過程で用いるガラス器具には、細胞のガラス面への付着を防ぐため、全てシリコン加工 (シリコナイズ L-25, 富士システムズ) を施した。標準溶液は以下の組成のものを用いた (mM) : 134 NaCl, 6 KCl, 1.2  $\text{MgCl}_2$ , 1.7  $\text{CaCl}_2$ , 14 glucose, 10 HEPES (pH = 7.2, NaOH で滴定)。

### B 膜電流測定

#### 1 実験装置

分離髓質細胞は 0.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  を含む標準溶液に懸濁し、カバーガラス上に 4℃ で保存した。測定時に倒立位相差顕微鏡 (MD-MSD, Nikon) のステージに設置したバス (容量約 1 ml) に移し、細胞外液を常時灌流した。膜電流測定はパッチクランプ増幅器



(CEZ-2300, 日本光電) を用い, Hamill *et al.* (1981) のパッチクランプ法に準じて行った. パッチピペット抵抗は 2-5 M $\Omega$ , 細胞膜容量は 5-12 pF であった. 細胞内外液の液間電位 (約 +3 mV) を補正した. データの表示及び分析は, AD/DA コンバーターを介して接続したコンピューター (Macintosh, Apple Computer, Inc.) 上で, ソフトウェア (MacLab/2e, AD Instruments) を用いて行った. 細胞外液の組成は以下の通りである (mM) : 134 NaCl, 6 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 5 CaCl<sub>2</sub> あるいは 10 BaCl<sub>2</sub>, 14 glucose, 10 HEPES, (pH = 7.2, NaOH で滴定). 細胞内液の組成は以下の通りである (mM) : 140 CsCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.1 GTP (pH = 7.2, NaOH で滴定). 細胞内液には実験に応じて 0.1, 1 又は 10 mM の EGTA を加えた (本文中に記載). なお実験は全て室温 (約 25°C) で行った.

## 2 実験手順

本実験では主に電位依存性 Ca<sup>2+</sup> 又は Ba<sup>2+</sup> 電流 ( $I_{Ca}$  又は  $I_{Ba}$ ) に対する ATP の効果を検討した. そのため細胞内液には 140 mM Cs<sup>+</sup> を, また細胞外液には 0.1  $\mu$ M tetrodotoxin を加え電位依存性 K<sup>+</sup> 及び Na<sup>+</sup> 電流をそれぞれ遮断した.  $I_{Ca}$  ( $I_{Ba}$ ) は保持電位 -70 mV から脱分極刺激を与えることによって引き起こした. ATP によって誘発される内向き電流 ( $I_{ATP}$ ) の成分を除去するため,  $I_{ATP}$  の逆転電位である 0 mV へ脱分極刺激を与え,  $I_{Ca}$  ( $I_{Ba}$ ) を引き起こした. この様な脱分極刺激を繰り返し与えながら薬物を投与し, また  $I_{Ca}$  ( $I_{Ba}$ ) の抑制率は薬物投与前後の  $I_{Ca}$  ( $I_{Ba}$ ) の大きさに対する百分率で表し, 投与中の最大抑制値をその薬物の抑制値とみなした. なお実験はパッチ膜破壊から約 3 分後より開始した.

### C 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の測定

細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の測定は, Ca<sup>2+</sup> 蛍光指示薬である fura-2 を用いて測定した



(Grynkiewicz *et al.*, 1985) . 細胞への fura-2 の負荷は、膜透過性の高い fura-2/AM ( $5\text{ }\mu\text{M}$ ) を含む栄養液で 30 分間室温で行った. Fura-2 を負荷した細胞はカバーガラス上で  $4^{\circ}\text{C}$ , 暗所で保存した. 測定時に落射蛍光装置 (TMD-EF2, Nikon) を取り付けた倒立顕微鏡 (DIAPHOT-TMD, Nikon) のステージ上のバス (容量約 1 ml) に移し, 細胞外液を常時灌流した. Fura-2 蛍光は細胞内カルシウム測定システム (CAM-200, 日本分光) を用い測定した. Fura-2 蛍光は 500 nm における蛍光を, 340 ( $F_{340}$ ) 及び 380 nm ( $F_{380}$ ) の二波長励起で記録し (波長切り替え周波数: 400 Hz), その蛍光比 ( $F_{340}/F_{380}$ ) を細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルとし, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の指標とした. なお実験は全て室温 (約  $25^{\circ}\text{C}$ ) で行った.

#### D Catecholamine 分泌の測定

分離副腎髄質細胞を BSA ( $5\text{ mg/ml}$ ) を含む標準溶液に懸濁し,  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間振盪した. その後細胞懸濁液を薬物存在下または非存在下で  $37^{\circ}\text{C}$ , 20 分間振盪した. またその間氷中に保存したサンプルの adrenaline 分泌量を全ての実験で得られた adrenaline 分泌量から差し引いた. 細胞懸濁液はその後氷中で冷却し, 遠心によって上清とペレットに分け, それぞれの adrenaline 含量を測定した. サンプルの処理は Salzman & Sellers (1982) の方法に準じて行った. Adrenaline は高速液体クロマトグラフィー (Jasco) によって分離し, 電気化学的検出器 (CB-100, EICOM) で検出した. Adrenaline 分泌量は総細胞含量に対する百分率で表示し, これを catecholamine 分泌量とした. 標準溶液の組成は以下の通りである (mM): 134 NaCl, 6 KCl, 1.2  $\text{MgCl}_2$ , 1.7  $\text{CaCl}_2$ , 14 glucose, 10 HEPES (pH = 7.2, NaOH で滴定) .

#### E 使用薬物

本実験では以下の薬物を使用した.



Adenosine (Sigma) , ADP (adenosine 5'-diphosphate, sodium salt) (Sigma) , AMP (adenosine 5'-monophosphate, sodium salt) (Sigma) , ATP (adenosine 5'-triphosphate, disodium salt) (Boehringer Mannheim) , ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin) (Boehringer Mannheim) , GTP (guanosine 5'-triphosphate, dilithium salt) (Boehringer Mannheim) , GDP $\beta$ S (guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate), trilithium salt) (Boehringer Mannheim) , GTP $\gamma$ S (guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), trilithium salt) (Boehringer Mannheim) , collagenase (type 1) (Worthington) , EGTA (ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)*N,N'*-tetraacetic acid) (同仁) , fura-2/AM (同仁) , HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid) (同仁) , nicotine (nicotine bi-(+)-tartrate) (東京化成) , tetrodotoxin (三共) .

その他の薬物は全て和光純薬の特級を用いた.

ATP や ADP, AMP の水溶液は pH が酸性であるため, NaOH で pH を 7.2 に滴定した高濃度溶液を作製した. また adenosine は, 直接標準溶液で用いる濃度に希釈し実験に使用した.

#### F 統計処理

各実験で得られた値は, 平均値 $\pm$ 標準誤差( $n$  = 例数)で表した. 有意差検定は paired 又は unpaired Student's *t*-test を用い, 有意水準を  $P < 0.05$  とした.



### Ⅲ 実験結果

#### A ATP による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇

当教室では以前モルモット副腎髄質細胞で、ATP が細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を生じ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き起こすことを報告した (Asano *et al.*, 1995) . その  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路としては、ATP チャネル (非選択的陽イオンチャネル) と電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの二つが考えられる. Whole-cell voltage-clamp 下、即ち膜電位が固定 (-70 mV) された条件下では、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入は生じない. 最初にこの様な条件下で ATP が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き起こすか否かについて  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬である fura-2 を用いて検討した. 図 1 に示す様に、ATP (500  $\mu\text{M}$ ) は  $I_{\text{ATP}}$  と同時に、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き起こした. この結果から、ATP チャネルを介して  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が生じることが示された.

#### B $I_{\text{Ca}}$ に対する ATP の効果

$\text{Ca}^{2+}$  チャネルは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇によって不活化され、この不活化は細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤の適用によって抑制されることが知られている (Eckert & Chad, 1984) . モルモット副腎髄質細胞では、 $I_{\text{ATP}}$  の誘発に伴い細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が生じたことから、 $I_{\text{Ca}}$  が抑制を受けている可能性がある. そこで細胞外液に 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  を、また細胞内液には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調節するために、0.1, 1 又は 10 mM EGTA をそれぞれ含む溶液を用い、ATP による  $I_{\text{ATP}}$  の誘発と  $I_{\text{Ca}}$  への影響について検討した. ATP (500  $\mu\text{M}$ ) は試みた 40 細胞中 38 細胞で  $I_{\text{ATP}}$  を誘発した.  $I_{\text{ATP}}$  の大きさは細胞間で大きく変化した (6.3 から 812.5 pA) , この変化は細胞内 EGTA 濃度とは無関係であった. また ATP (500  $\mu\text{M}$ ) はいずれの EGTA 濃度においても、投与後素早く生じ ATP の存在中持続する可逆的な  $I_{\text{Ca}}$  の抑制効果を示した (図 2) .



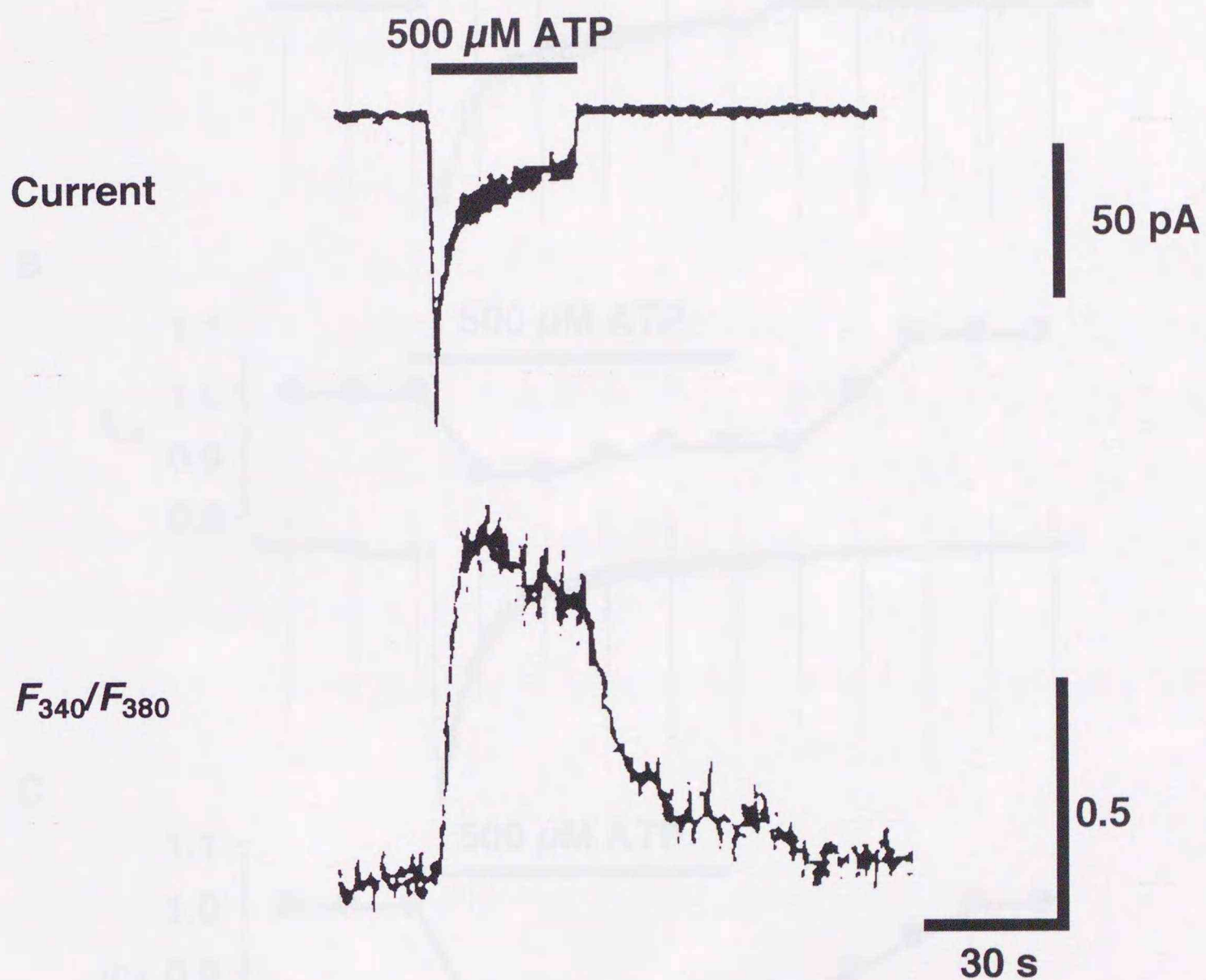


図1 膜電位固定下のモルモット単一副腎髄質細胞における $I_{\text{ATP}}$ 及び細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇

保持電位 $-70\text{ mV}$ で、ATP ( $500\text{ }\mu\text{M}$ ) を30秒間投与した。上段は膜電流反応 (Current;  $I_{\text{ATP}}$ )，下段は細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $F_{340}/F_{380}$ ) 変化を示している。同様の結果を他の7細胞より得た。



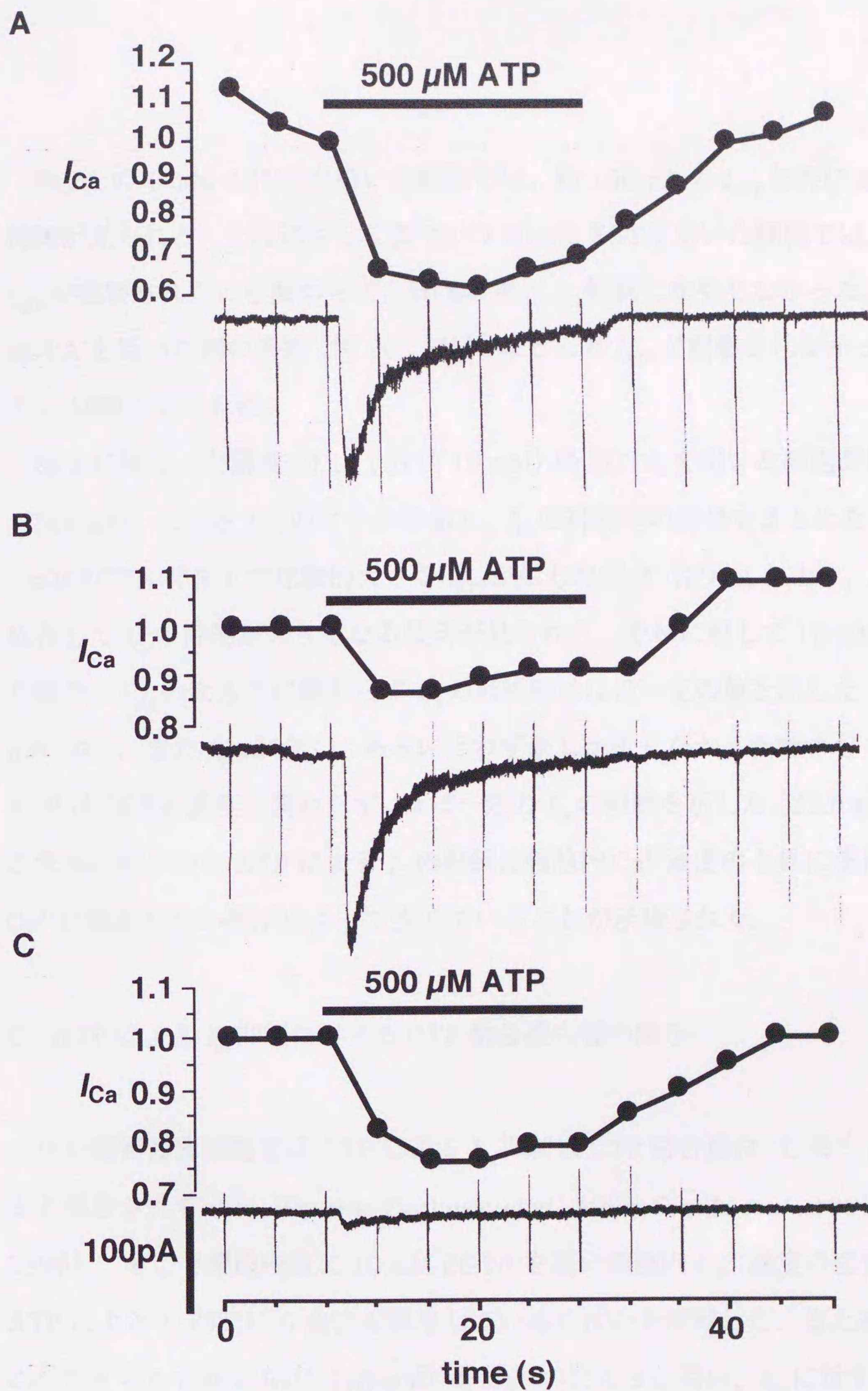


図2 ATPによる $I_{ATP}$ と $I_{Ca}$ の抑制

細胞外液には5 mM  $Ca^{2+}$ を，細胞内液には1 mM (A) 又は10 mM EGTA (B, C) をそれぞれ用いた． $I_{Ca}$ は保持電位-70 mVから0 mVへ持続時間25 msの脱分極刺激を，4秒間隔で繰り返し与えることによって記録した．上段に $I_{Ca}$ の大きさ(●)をATP (500  $\mu$ M) 投与直前の値の相対値で示した．下段はその時の $I_{ATP}$ 及び $I_{Ca}$ の実際の記録を示した．



図 2A の 1 mM EGTA を用いた細胞では、約 150 pA の  $I_{ATP}$  と共に 30 % 程度の  $I_{Ca}$  抑制が見られた。それに対して図 2B の 10 mM EGTA を用いた細胞では、約 200 pA の  $I_{ATP}$  が観察されたにも関わらず、10 % 程度の  $I_{Ca}$  抑制しか生じなかった。また、10 mM EGTA を用いた別の細胞（図 2C）では、ほとんど  $I_{ATP}$  が観察されなかったが、約 20 % の  $I_{Ca}$  抑制が見られた。

図 3 に異なった濃度 (0.1, 1 及び 10 mM) の EGTA を用いた細胞群について、ATP (500  $\mu$ M) による  $I_{ATP}$  のピークの値と、 $I_{Ca}$  の抑制率の関係をまとめた。0.1 あるいは 1 mM EGTA 存在下で比較的大きな  $I_{ATP}$  が生じた場合 (20 pA 以上),  $I_{ATP}$  の大きさに依存して  $I_{Ca}$  の抑制が大きくなる傾向が見られた。それに対して 10 mM EGTA を用いた場合,  $I_{ATP}$  の大きさに関わらず  $I_{Ca}$  の抑制率はほぼ一定の値を示した ( $19.4 \pm 1.3$  %,  $n = 16$ )。また  $I_{ATP}$  が全く、あるいはわずかしかなかった時でも (20 pA 以下), ATP は EGTA 濃度に関わらず、ほぼ一定の  $I_{Ca}$  の抑制を示した ( $22.0 \pm 2.4$  %,  $n = 11$ )。これらの結果から ATP による  $I_{Ca}$  の抑制は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に依存する機序と、 $Ca^{2+}$  に依存しない機序によって生じていることが示唆された。

#### C ATP による $I_{Ba}$ 抑制に対する GTP 結合蛋白質の関与

ウシ副腎髄質細胞では ATP による  $I_{Ca}$  抑制に GTP 結合蛋白 (G 蛋白) が関与していると報告されている (Diverse-Pierluissi *et al.*, 1991; Gandía *et al.*, 1993; Currie & Fox, 1996)。そこで細胞内液に 10 mM EGTA を用い細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化を抑制して、ATP による  $I_{Ca}$  抑制に G 蛋白が関与しているか否かを検討した。また細胞外液には  $Ca^{2+}$  チャンネルを通る  $Ba^{2+}$  (10 mM) を  $Ca^{2+}$  の代わりに用い、 $I_{Ba}$  に対する ATP の効果を検討した。図 4 に示す様に、脱分極刺激を繰り返し与えながら、ATP (100  $\mu$ M) を 20 秒間、2-3 分間隔で適用すると、 $I_{Ba}$  は可逆的に繰り返し抑制された。細胞内液の GTP を、非分解型の GTP 類似物質で G 蛋白の活性化を抑制する GDP $\beta$ S (1 mM) に置換すると、ATP による  $I_{Ba}$  の抑制は時間とともに減少し、ATP の 3 度目の投与時



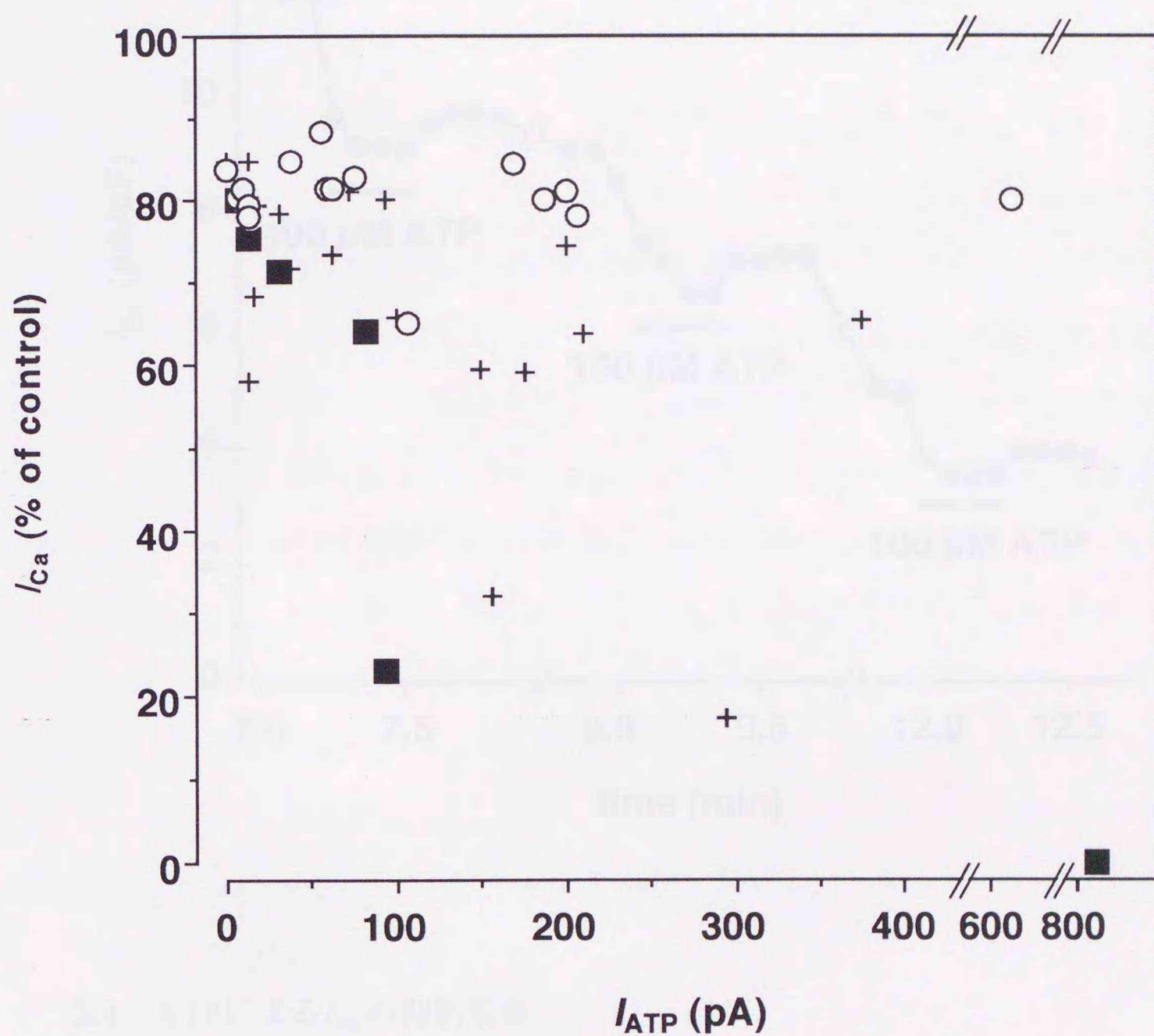


図3  $I_{ATP}$ の大きさと $I_{Ca}$ 抑制関係

ATP (500  $\mu$ M) を細胞外5 mM  $Ca^{2+}$ 存在下で投与した。その時の $I_{Ca}$ の大きさを、 $I_{ATP}$ の大きさに対してプロットした。細胞内液にはそれぞれ0.1 (■), 1 (+) 及び10 mM EGTA (○) を用いた。数値はそれぞれの細胞で最も抑制された時の $I_{Ca}$ の値をATP非存在下での値に対する百分率で示している。実験方法は図2で述べた通りである。



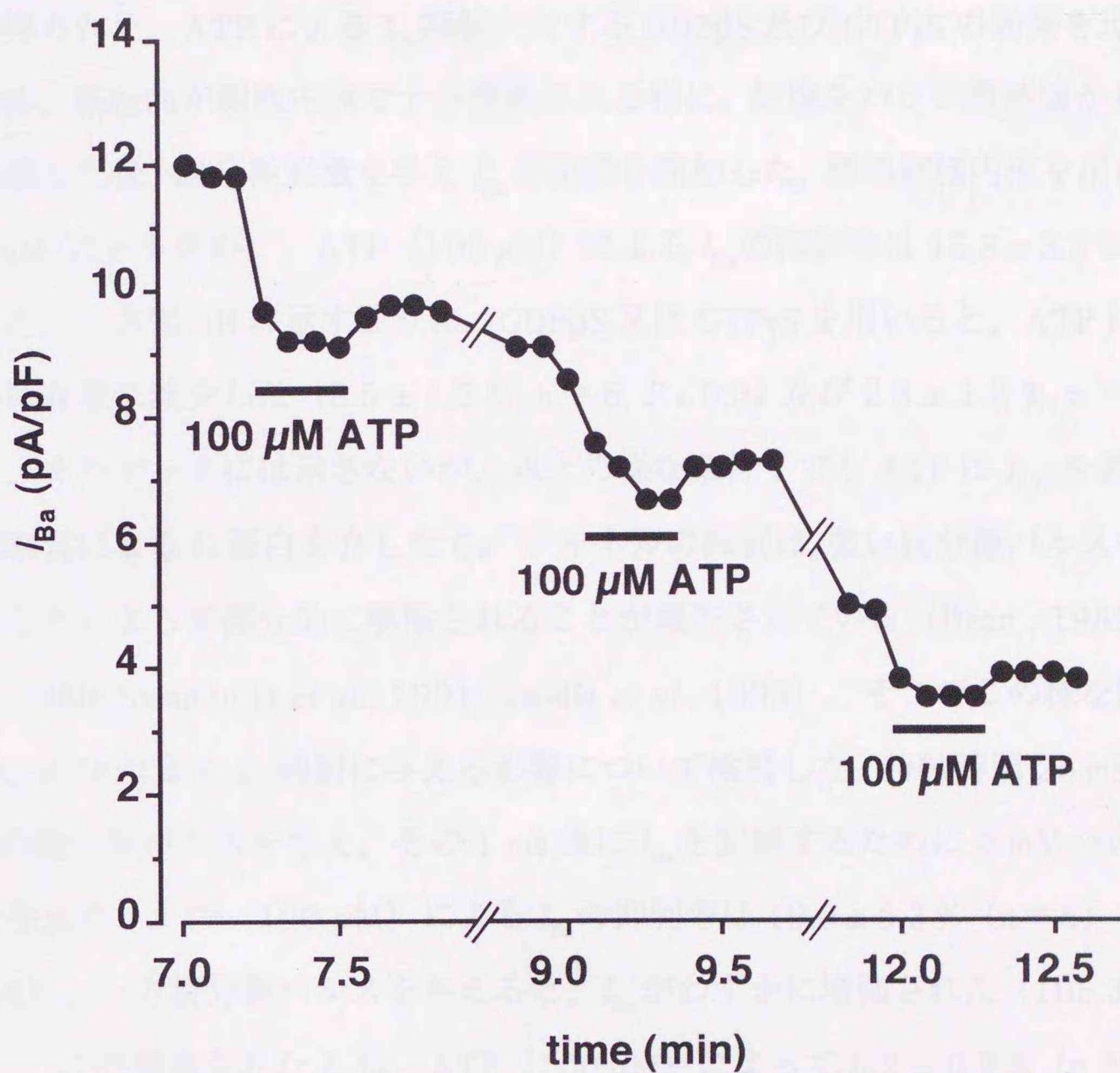


図4 ATPによる $I_{Ba}$ の抑制効果

細胞外液10にM Ba<sup>2+</sup>を用い、 $I_{Ba}$ は保持電位-70 mVから0 mVへ持続時間25 msの脱分極刺激を、5秒間隔で繰り返し与えることによって記録した。ATP (100  $\mu$ M) は20秒間、2~3分間隔で投与した。横軸はパッチ膜破壊からの時間経過を示している。



にはほぼ消失した (図 5A) . また図には示さないが, 同じく非分解型の GTP 類似物質で G 蛋白の活性化を促進する GTP $\gamma$ S (100  $\mu$ M) を細胞内液に用いた場合も同様の結果が得られた. ATP による  $I_{Ba}$  抑制に対する GDP $\beta$ S 及び GTP $\gamma$ S の効果を比較検討するため, 細胞内が細胞内液で十分置換される様に, 細胞をパッチ膜破壊から 9 分以上経過した後, 脱分極刺激を与え  $I_{Ba}$  の記録を開始した. 標準細胞内液を用いた場合 (0.1 mM GTP を含む) , ATP (100  $\mu$ M) による  $I_{Ba}$  の抑制率は  $15.8 \pm 3.3 \%$  ( $n = 5$ ) であった. 一方図 5B に示すように, GDP $\beta$ S 又は GTP $\gamma$ S を用いると, ATP による  $I_{Ba}$  の抑制は有意に減少した ( $3.5 \pm 1.2 \%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.01$  及び  $2.5 \pm 1.2 \%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ) . またデータには示さないが, 以上の様な条件下でも ATP は  $I_{ATP}$  を誘発した.

伝達物質による G 蛋白を介した  $Ca^{2+}$  チャンネルの抑制は, 強い脱分極パルス直前にかけることによって部分的に解除されることが報告されている (Bean, 1989; Grassi & Lux, 1989; Swandulla *et al.*, 1991; Gandía *et al.*, 1993) . そこでこの様な脱分極パルスの, ATP による  $I_{Ba}$  抑制に与える影響について検討した. 持続時間 25 ms で +100 mV への脱分極パルスを与え, その 1 ms 後に  $I_{Ba}$  を記録するために 0 mV への脱分極刺激を与えた. ATP (100  $\mu$ M) による  $I_{Ba}$  の抑制率は  $19.0 \pm 5.3 \%$  ( $n = 5$ ) であった (図 6A) . 一方脱分極パルスを与えると,  $I_{Ba}$  がわずかに増強された ( $105.3 \pm 1.1 \%$ ,  $n = 7$ ) . この増強された  $I_{Ba}$  は, ATP (100  $\mu$ M) によって  $5.2 \pm 0.9 \%$  ( $n = 7$ ) しか抑制されなかった (図 6B) . この様な結果は, 脱分極パルスが ATP の抑制効果を減少させることを示している.

#### D ADP, AMP 及び adenosine の $I_{Ba}$ に対する影響

ADP, AMP 及び adenosine の  $I_{Ba}$  に与える影響を, 細胞内液に 10 mM EGTA を加えて検討した. 図 7 に示す様に, 3 分間隔で 20 秒間それぞれの薬物を投与した. 100  $\mu$ M の ADP, AMP 及び adenosine はそれぞれ ATP 同様可逆的に  $I_{Ba}$  を抑制した. 薬物投与順を無作為に変えて行った実験から得られた  $I_{Ba}$  抑制率をまとめると, ATP, ADP,



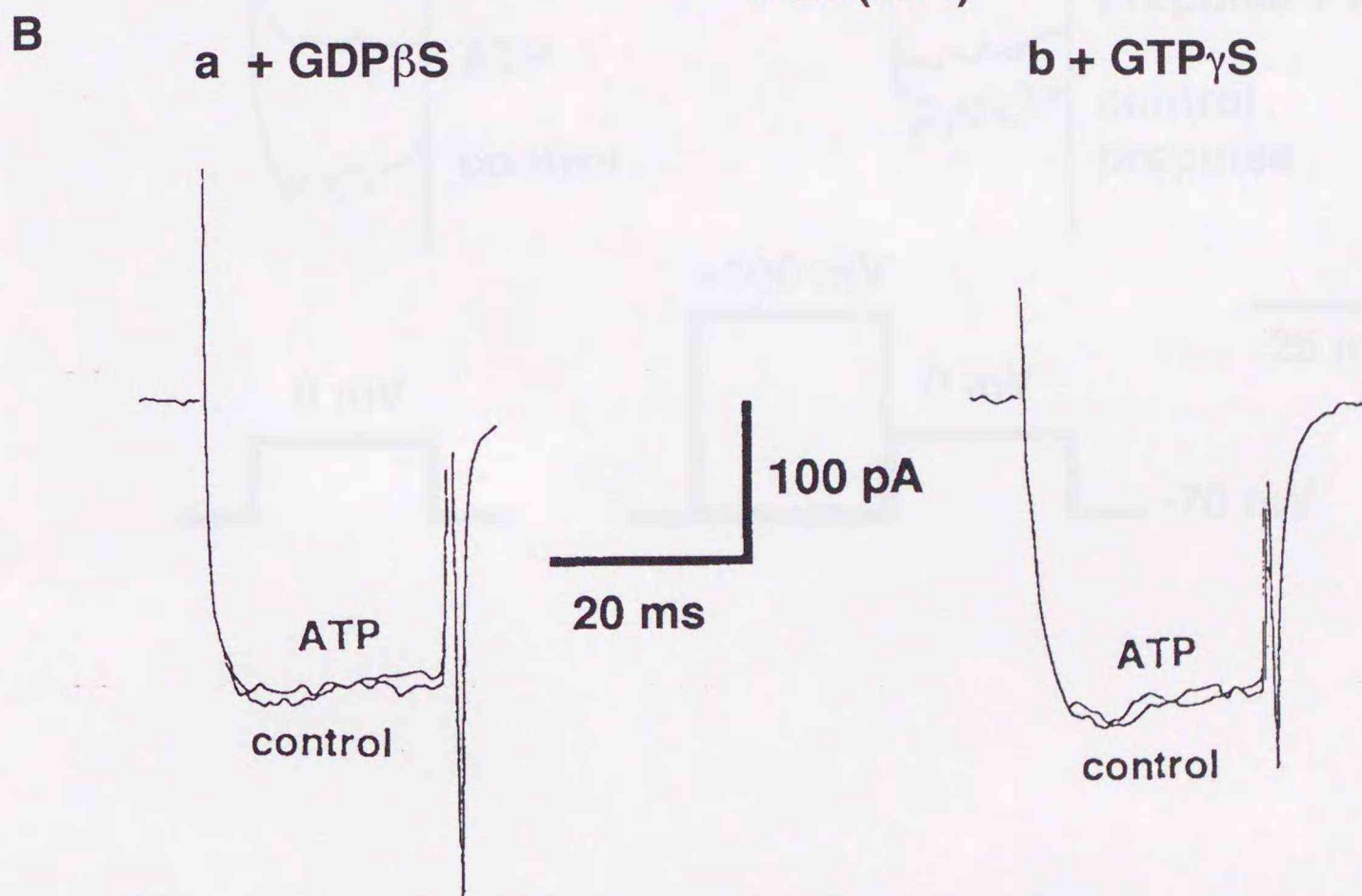
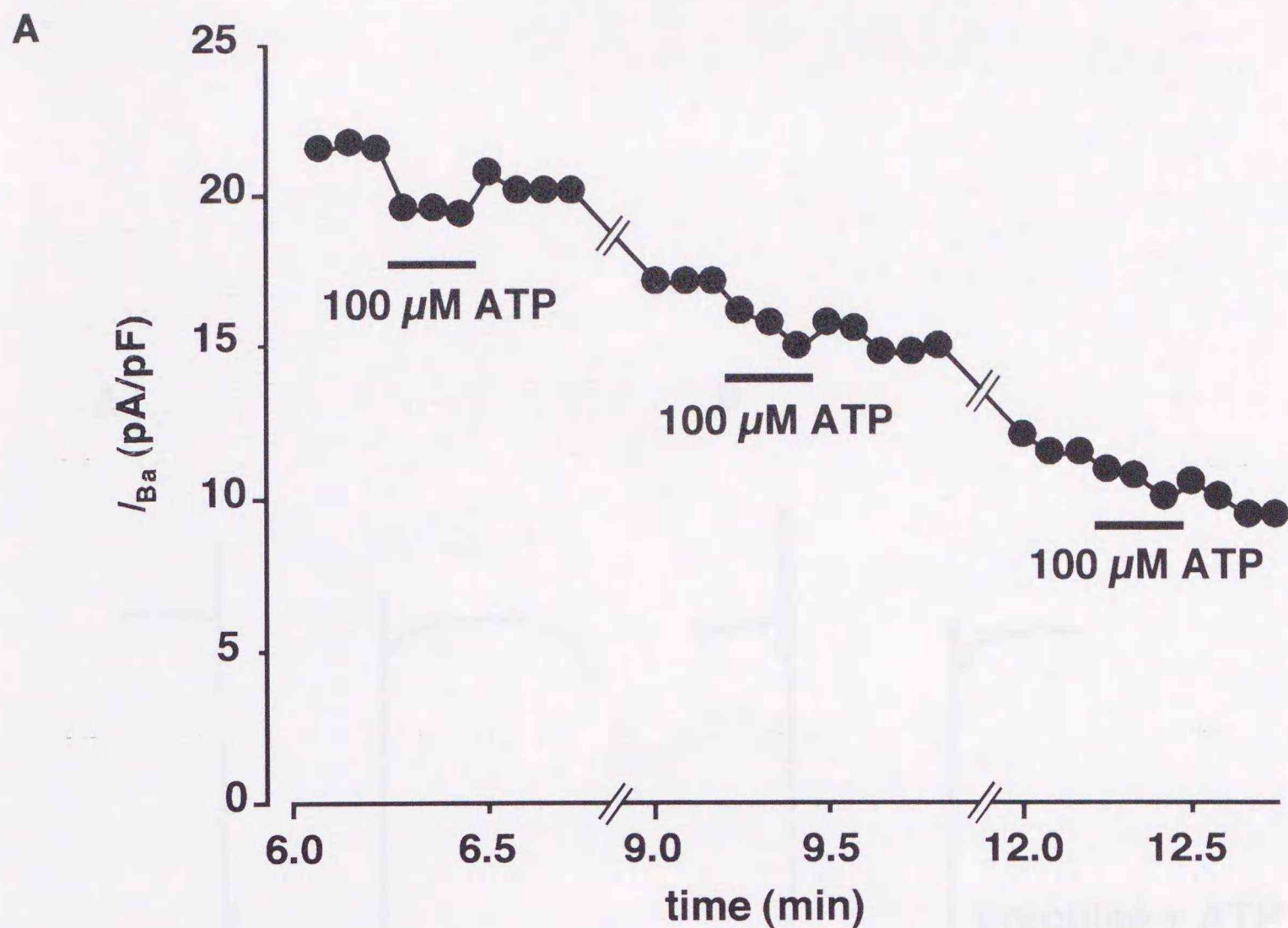


図5 ATPによる $I_{Ba}$ 抑制に対する細胞内GTP類似物質の影響

細胞外液に10 mM  $Ba^{2+}$ を用い、 $I_{Ba}$ は保持電位-70 mVから0 mMへ持続時間25 msの脱分極刺激を、5秒間隔で繰り返し与えることによって記録した。ATP (100  $\mu$ M)は20秒間、2-3分間隔で投与した。A、細胞内液の0.1 mM GTPを1 mM GDP $\beta$ Sで置換した。横軸はパッチ膜破壊からの時間経過を示している。B、細胞内液に1 mM GDP $\beta$ S (a)あるいは100  $\mu$ M GTP $\gamma$ S (b)を用いた時の、 $I_{Ba}$ に対するATP (100  $\mu$ M)の効果の実際の記録を示した。



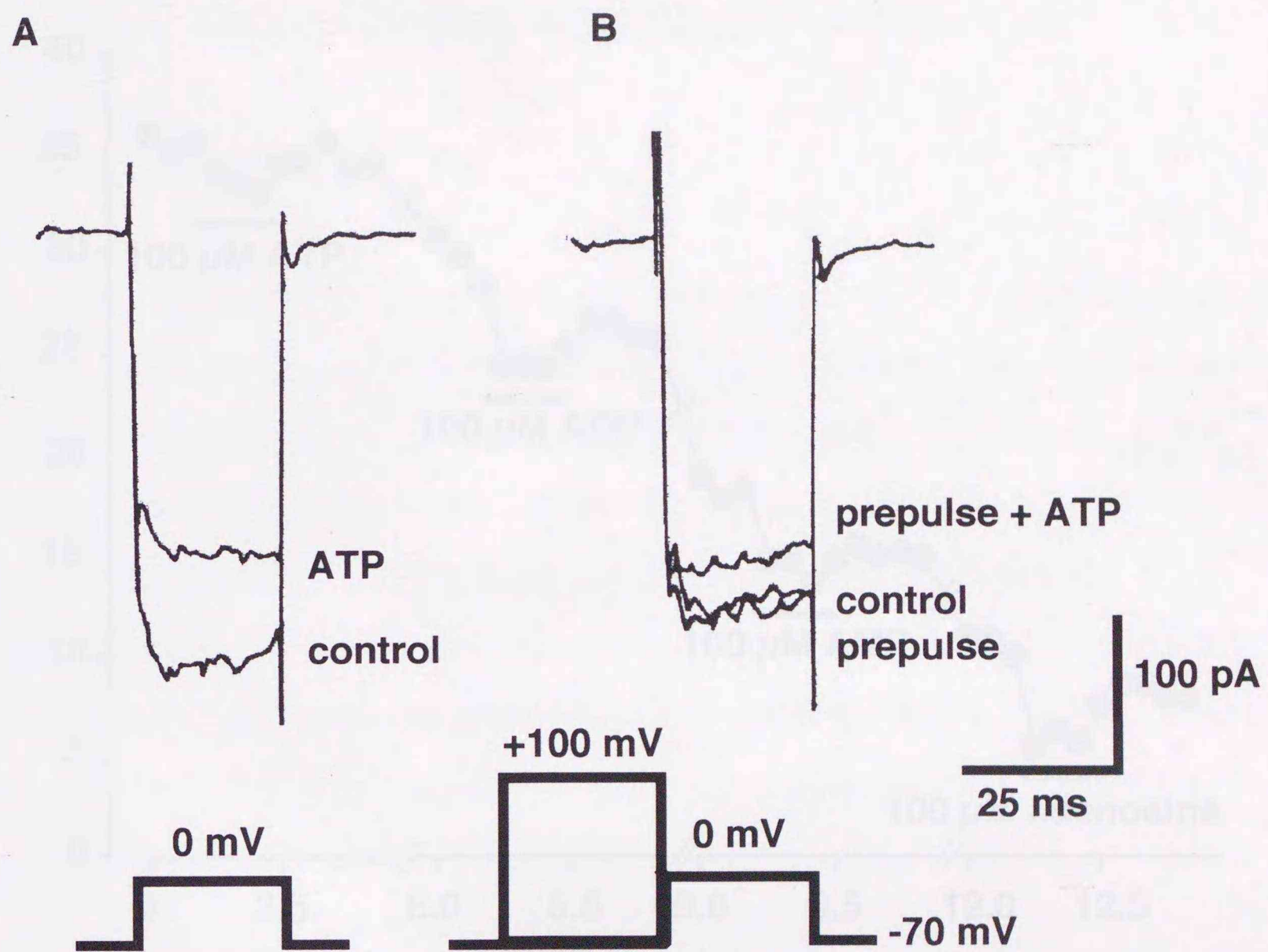


図6 ATPによる $I_{Ba}$ 抑制に対する脱分極パルスの効果

細胞外液に10 mM  $Ba^{2+}$ を用い、 $I_{Ba}$ は保持電位-70 mVから0 mVへ持続時間25 msの脱分極刺激を、5秒間隔で繰り返し与えることによって記録し、100  $\mu$ M ATPを投与した (A)。この脱分極刺激の1 ms前に、+100 mVへ持続時間25 msの脱分極パルス (prepulse) を与えた (B)。



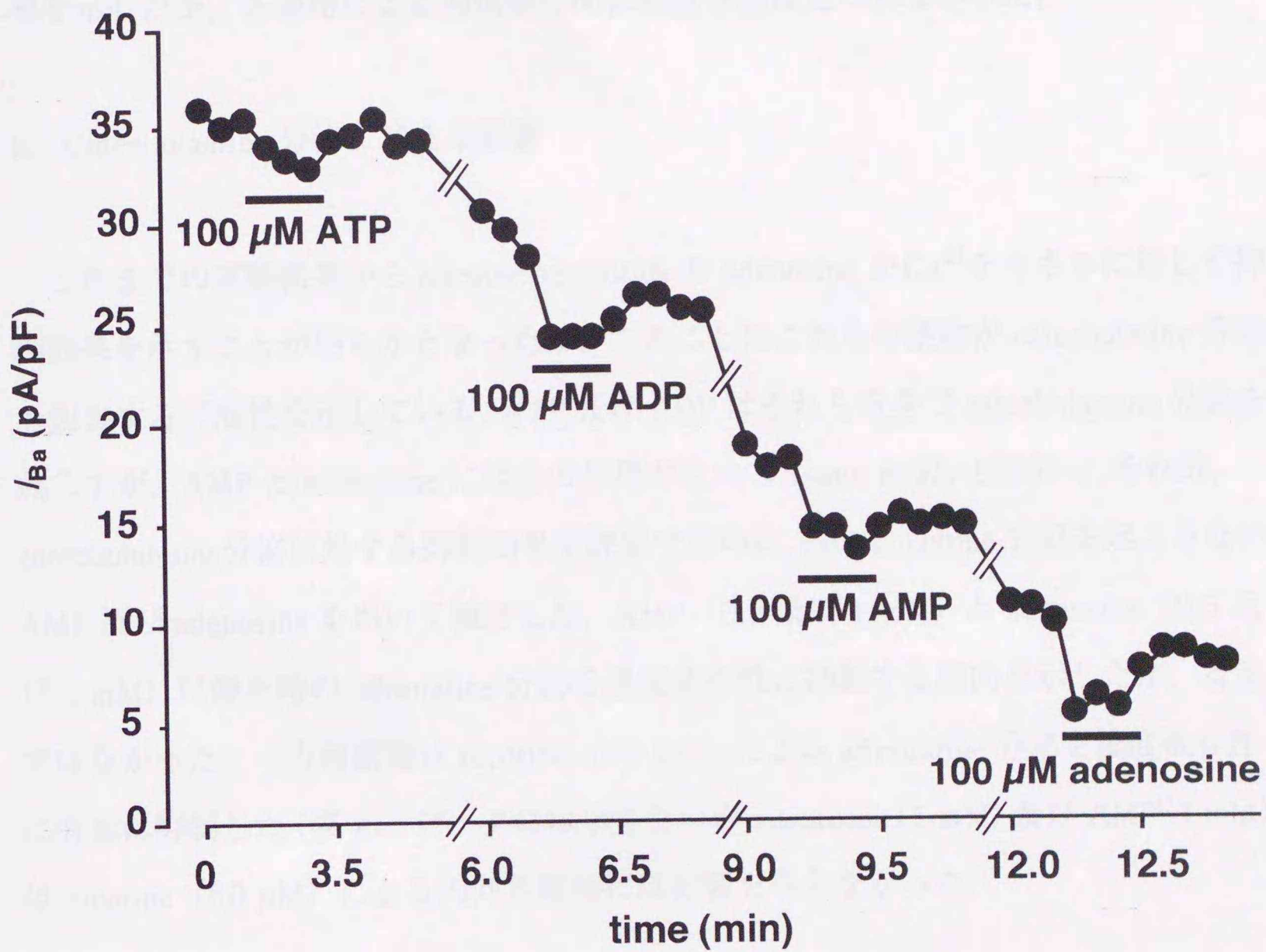


図7  $I_{Ba}$ に対するATP, ADP, AMP及びadenosineの効果

細胞外液に10 mM  $Ba^{2+}$ を用い,  $I_{Ba}$ は保持電位-70 mVから0 mVへ25 msの脱分極刺激を, 5秒間隔で繰り返し与えることによって記録した. 各薬物は100  $\mu$ Mを, 同一細胞に20秒間, 3分間隔で投与した.



AMP 及び adenosine はそれぞれ  $11.2 \pm 2.7\%$  ( $n = 9$ ) ,  $15.5 \pm 1.3\%$  ( $n = 10$ ) ,  $11.1 \pm 0.9\%$  ( $n = 8$ ) 及び  $23.6 \pm 4.4\%$  ( $n = 6$ ) となった. Adenosine が最も強い抑制率を示したが, 各薬物による抑制率の間に有意な差は見られなかった.

#### E Catecholamine 分泌に与える影響

これまでの実験結果から adenine nucleotide や adenosine が  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルに対して抑制効果を示すことが明らかとなったが, このことはこれらの薬物が catecholamine 分泌を阻害する可能性を示している. ATP 及び ADP はそれら自身で catecholamine 分泌を起こすが, AMP と adenosine にはその作用がない (Asano *et al.*, 1995). それ故, catecholamine 分泌に対する抑制効果を評価するのに, catecholamine 分泌を起こさない AMP 及び adenosine を用いて検討した. AMP (0.5 及び 1 mM) と adenosine (0.5 及び 1 mM) は静止時の adrenaline 分泌を濃度依存性に抑制する傾向を示したが, 有意ではなかった. 一方両薬物は nicotine (50  $\mu\text{M}$ ) による adrenaline 分泌を濃度依存性に有意に抑制した (表 1). データには示さないが adenosine (1 mM) 及び AMP (1 mM) は nicotine (50  $\mu\text{M}$ ) による内向き電流には影響を与えなかった.



表1 Adrenaline分泌に対するAMP及びadenosineの効果

| <i>Agonists</i>  |        | <i>Adrenaline secretion (% of content)</i> |                                        |
|------------------|--------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
|                  |        | <i>Resting</i>                             | <i>Nicotine (50 <math>\mu</math>M)</i> |
| <i>Control</i>   |        | $2.13 \pm 0.22$ (5)                        | $11.24 \pm 1.67$ (5)                   |
| <i>AMP</i>       | 0.5 mM | $1.89 \pm 0.45$ (5)                        | $9.60 \pm 1.51$ (5)*                   |
|                  | 1 mM   | $1.74 \pm 0.15$ (5)                        | $8.52 \pm 1.60$ (5)*                   |
| <i>Control</i>   |        | $1.73 \pm 0.41$ (5)                        | $11.61 \pm 0.92$ (5)                   |
| <i>Adenosine</i> | 0.5 mM | $1.41 \pm 0.33$ (5)                        | $8.69 \pm 0.54$ (5)*                   |
|                  | 1 mM   | $1.21 \pm 0.40$ (5)                        | $7.58 \pm 0.61$ (5)*                   |

それぞれの薬物存在下及び非存在下での20分間のadrenaline分泌量を表している。数値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 例数) で示されている。\*はそれぞれのControlに対して、統計的に有意差 ( $P < 0.05$ ) があることを表している。



#### IV 考察

本実験結果から、モルモット副腎髄質細胞において ATP が2種類の機構を介して電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを抑制することが示された。一つは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存した経路であり、他方は G 蛋白に依存した経路である。高濃度の ATP (2-15 mM) を細胞内液に適用すると、 $I_{\text{Ca}}$  ( $I_{\text{Ba}}$ ) の減衰 (rundown) が抑制されることが知られている (Bean, 1992b)。しかしながら、パッチピペット内液に ATP が存在していると、記録開始前に細胞が高濃度の ATP に曝されてしまい、その後の ATP の反応に影響を与える可能性が考えられる。それ故本実験では比較的強い減衰が  $I_{\text{Ca}}$  ( $I_{\text{Ba}}$ ) に見られたが、ATP を含まない細胞内液を用いて実験を行った。

##### A $\text{Ca}^{2+}$ による $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの抑制

モルモット副腎髄質細胞では、ATP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇及び catecholamine 分泌は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ を除去することによって消失する (Asano *et al.*, 1995)。また、ATP が高い  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を持つ ATP チャネル (非選択的陽イオンチャネル) を活性化することから、ATP チャネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$ 流入によって、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が生じることが示唆されたが (Otsuguro *et al.*, 1995)、今回 ATP チャネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$ 流入によって、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇することを直接的に示した。PC12 cell においても、ATP による分泌反応が電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを抑制する nicardipine や  $\text{Cd}^{2+}$ の影響を受けないことや (Inoue *et al.*, 1989)、ATP チャネルが高い  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を持っていることから (Nakazawa *et al.*, 1990)、脱分極による電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの活性化が無くても、ATP チャネルを介して分泌に十分な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が起こると報告されている。

モルモット膀胱平滑筋では、ATP が細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を引き起こし、その結果細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇するため、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが抑制されることが報告



されている (Schneider *et al.*, 1991) . また Eckert & Chad (1984) はその総説の中で,  $\text{Ca}^{2+}$  による  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの不活化は細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤 EGTA の適用によって抑制されることを述べている. 本実験では細胞内に適用した EGTA 濃度が低い時には (0.1 あるいは 1 mM) , ATP による  $I_{\text{Ca}}$  の抑制率が  $I_{\text{ATP}}$  の大きさに依存することが示された. このことから, モルモット副腎髄質細胞においても,  $I_{\text{ATP}}$  によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇し, その結果  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの不活化が起きていることが示唆される.

一方高濃度 EGTA (10 mM) を用いた場合, ATP によってほぼ一定の  $I_{\text{Ca}}$  抑制効果が見られた. EGTA の  $\text{Ca}^{2+}$  への結合速度は比較的遅いことから,  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル近傍における急激な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は防ぎきれない可能性がある (Eckert & Chad, 1984) . モルモット膀胱平滑筋では, 40 mM EGTA 及び 10 mM BAPTA (1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) 存在下でも  $I_{\text{Ca}}$  抑制が見られたことから, この様な高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤を用いても細胞膜近傍の領域の  $\text{Ca}^{2+}$  を完全に制御できないことが示唆されている. また  $\text{Ba}^{2+}$  は  $\text{Ca}^{2+}$  に比べて  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを不活化する効力は低いと報告されている (Schneider *et al.*, 1991) . 一方ウシ副腎髄質細胞では, 高濃度の EGTA (10-14 mM) を用いていること,  $I_{\text{Ba}}$  に対する抑制が  $I_{\text{Ca}}$  に対する抑制と同じ程度であること, 及び  $I_{\text{ATP}}$  が全く見られなかったこと等から, ATP による  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの抑制は  $\text{Ca}^{2+}$  に起因する不活化が原因ではないと報告されている

(Gandía *et al.*, 1993) . 本実験においても 10 mM EGTA 存在下での ATP による  $I_{\text{Ca}}$  と  $I_{\text{Ba}}$  の抑制率の間にはほとんど差が見られず, また全く  $I_{\text{ATP}}$  が観察されない場合でも  $I_{\text{Ca}}$  の抑制が見られた. さらに 10 mM EGTA 存在下では  $I_{\text{ATP}}$  が誘発されても  $I_{\text{Ca}}$  の抑制率が一定であったことから, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の緩衝が十分に起きていると考えられる. 以上のことからモルモット副腎髄質細胞の ATP による  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル抑制には,  $\text{Ca}^{2+}$  による不活化に加え, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存しない機構も存在していると考えられる.



## B GTP 結合蛋白質を介した $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの抑制

Holz *et al.* (1986) はラット背根神経節における noradrenaline 及び GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) による電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの抑制が、また Lewis *et al.* (1986) も下垂体細胞 cell line における somatostatin による抑制が G 蛋白質を介した反応であることを初めて報告した。その後 G 蛋白質を介した  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの抑制は、ヒナ感覚ニューロンにおける GABA (Grassi & Lux, 1989) や adenosine (Kasai & Aosaki, 1989), ラット膵島細胞腫における noradrenaline (Aicardi *et al.*, 1991), ウシ副腎髄質細胞における ATP (Diverse-Pierluissi *et al.*, 1991; Gandía *et al.*, 1993; Currie & Fox, 1996) など様々な伝達物質によって引き起こされることが示されている。

G 蛋白質の活性を抑制する GDP $\beta$ S を細胞内液に適用しても  $I_{\text{ATP}}$  が誘発されたことから、ATP チャネルは nicotine チャネルの様な ligand-gated channel の一種であると考えられる。それに対して ATP による  $I_{\text{Ba}}$  抑制は GDP $\beta$ S の適用によって著しく減少した。これは GDP $\beta$ S が ATP による G 蛋白質の活性を抑制したためと考えられ、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する抑制効果に G 蛋白質が関与していることを示唆している。同様の結果はウシ副腎髄質細胞の ATP (Gandía *et al.*, 1993) 又はヒナ背根神経節の GABA や noradrenaline (Holz *et al.*, 1986; Grassi & Lux, 1989) による  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル抑制でも報告されている。

一方 G 蛋白質の活性化を促す GTP $\gamma$ S の適用によっても、ATP による  $I_{\text{Ba}}$  の抑制効果が減少し、また同様の結果がヒナ背根神経節の GABA の効果でも報告されている

(Grassi & Lux, 1989)。これは GTP $\gamma$ S によって G 蛋白質の活性化と、恐らくはその結果起こるであろう  $I_{\text{Ba}}$  に対する抑制効果が最大に達しており、単に ATP がそれ以上の抑制を起こす余地がなくなったためと考えられる。本実験では  $I_{\text{Ba}}$  が徐々に減衰

(rundown) していることや、細胞間で  $I_{\text{Ba}}$  の大きさが異なったことから、GTP $\gamma$ S 自体の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する効果を詳細に評価することができなかったが、ウシ副腎髄質細胞 (Gandía *et al.*, 1993) や他の組織において (Kasai & Aosaki, 1989; Aicardi *et al.*,



1991), GTP $\gamma$ S の適用によって  $I_{Ca}$  が減少し, その後の ATP による  $I_{Ca}$  の抑制率が減少することが報告されている.

G 蛋白を介した神経伝達物質による  $Ca^{2+}$  チャンネルの抑制効果は, 予め強い脱分極パルスを与えることによって部分的に解除されることが知られている (Bean, 1989; Grassi & Lux, 1989; Gandía *et al.*, 1993). 本実験でもこの様な強い脱分極パルスを与えたところ ATP による  $I_{Ba}$  の抑制効果が減少した. この様な脱分極パルスは, GTP $\gamma$ S の処置によって G 蛋白が活性化された細胞で,  $I_{Ca}$  や  $I_{Ba}$  を増強することが報告されている (Grassi & Lux, 1989; Aicardi *et al.*, 1991; Gandía *et al.*, 1993). 強い脱分極パルスによる  $I_{Ca}$  や  $I_{Ba}$  の増強は, G 蛋白にある  $Ca^{2+}$  チャンネルの抑制効果に何らかの電位依存性機構が関与しているためと考えられている (Swandulla *et al.*, 1991).

G 蛋白を介した  $Ca^{2+}$  チャンネル抑制には, protein kinase C や cyclic AMP が関与する間接的な抑制と (Tsien *et al.*, 1988), 他の細胞内セカンドメッセンジャーを介さない直接的な抑制が報告されている (Brown *et al.*, 1989; Swandulla *et al.*, 1991). また Diverse-Pierluissi & Dunlap (1993) はヒナ感覚ニューロンにおいて, noradrenaline は protein kinase C を介して  $Ca^{2+}$  チャンネルを抑制するが, GABA はそれとは異なる経路を介していると報告し, 単一の細胞における抑制にも複数の経路が存在することを示唆している. 副腎髄質細胞や他の組織でも,  $Ca^{2+}$  チャンネルの活性調節の細胞内経路を明らかにするには, さらに詳細な検討が必要である.

### C Adenosine 及び adenine nucleotide の効果とその受容体

ウシ副腎髄質細胞では adenosine やその類似物質が電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルを抑制することによって catecholamine 分泌を阻害することが示唆された (Chern *et al.*, 1992; Mateo *et al.*, 1995). これに対して  $I_{Ca}$  抑制の力価の順序は ATP  $\gg$  ADP  $\gg$  AMP  $\gg$  adenosine = 0 であり (Gandía *et al.*, 1993), また  $P_1$  受容体に作用する adenosine 類似物質の 2-chloro-adenosine を用いても  $I_{Ca}$  の抑制が見られないとも報告されている



(Currie & Fox, 1996) . 一方ヒナ感覚ニューロン, ラット海馬錐体ニューロン及びモルモット腸筋間ニューロンでは, 2-chloro-adenosine が G 蛋白を介して  $I_{Ca}$  を抑制することが見いだされている (Kasai & Aosaki, 1989; Scholz & Miller, 1991; Baidan *et al.*, 1995) . 本実験でも, adenosine は  $I_{Ba}$  を抑制し, また nicotine による adrenaline 分泌に対して阻害効果を示した. また, ウシ副腎髄質細胞での報告と同様に (Diverse-Pierluissi *et al.*, 1991; Gandía *et al.*, 1993; Currie & Fox, 1996) , ATP による  $Ca^{2+}$  チャネル抑制効果も見られたことから, モルモット副腎髄質細胞では複数のプリン受容体 ( $P_1$  及び  $P_2$  受容体) が存在していると考えられる. Adenosine と ATP 両者に対して親和性をもつ  $P_3$  受容体の存在も報告されているが (Shinozuka *et al.*, 1988; Forsyth *et al.*, 1991; Barajas-Lopez *et al.*, 1995) , まだ不明な点が多く, 今後の検討が必要である.



## I 緒言

ATP は、消化管平滑筋における非アドレナリン—非コリン性 (NANC; nonadrenergic noncholinergic) の抑制性神経伝達物質の一つとして考えられてきた (Hoyle & Burnstock, 1989) . Burnstock *et al.* (1970) は ATP やその関連物質が、モルモットやガマの胃から迷走神経刺激によって放出されること、また外因性の ATP によって消化管平滑筋に神経刺激時と同様の弛緩反応が生じることを示し、ATP が NANC の抑制性神経伝達物質であることを示唆した (Burnstock, 1972) . その後 NANC 神経の抑制性伝達物質の候補として、VIP (vasoactive intestinal polypeptide) や NO (nitric oxide) , CO (carbon monoxide) 等様々な物質が挙げられ、ATP も NANC 神経の伝達物質の一つとして考えられている (Crist *et al.*, 1992; Ohno *et al.*, 1996; Rae & Muir, 1996; Smits & Lefebvre, 1996) . ATP の消化管平滑筋での弛緩作用は、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネルを抑制する apamin (Banks *et al.*, 1979; Vogalis & Goyal, 1997) によって抑制されることから (Maas *et al.*, 1980; Costa *et al.*, 1986; Hoyle & Edwards, 1992) ,  $\text{K}^+$  チャネルの開口に伴う過分極によるものと考えられている (Den Hertog, 1982; Den Hertog *et al.*, 1985a; Crist *et al.*, 1992; Ohno *et al.*, 1996) . しかしながら、ネコ胃底部の ATP による弛緩反応は apamin によって抑制されないという報告もあり (Lefebvre *et al.*, 1991) , 他の機序の関与も示唆される.

Burnstock & Kennedy (1985) は平滑筋組織における  $\text{P}_2$  受容体サブタイプを、収縮反応は  $\text{P}_{2X}$  受容体、弛緩反応は  $\text{P}_{2Y}$  受容体と分類し、モルモット盲腸紐において  $\text{P}_{2Y}$  受容体の ATP 類似物質の力価順を 2-methylthio ATP  $\gg$  ATP  $>$   $\alpha, \beta$ -methylene ATP と報告した. ラットの結腸縦走筋や十二指腸縦走筋でも  $\text{P}_{2Y}$  受容体を介した弛緩反応が (Bailey & Hourani, 1992; Johnson & Hourani, 1994) , また十二指腸粘膜筋板では  $\text{P}_{2X}$  受容体を介した収縮反応が報告されている (Johnson *et al.*, 1996) . これに対して,



モルモット回腸 (Wiklund & Gustafsson, 1988; Kennedy & Humphrey, 1994) やラット結腸粘膜筋板 (Bailey & Hourani, 1990; Hourani *et al.*, 1993) では  $P_{2Y}$  受容体が収縮反応に関与していると報告されている。またラット胃底部では ATP は弛緩と収縮の2種類の反応を引き起こす (Burnstock *et al.*, 1970)。これらの反応を引き起こす  $P_2$  受容体は明らかではなく, Lefebvre & Burnstock (1990) は, 弛緩反応に関与するプリン受容体は  $P_{2X}$  とも  $P_{2Y}$  受容体とも異なる可能性があり, 収縮反応は弛緩反応に付随した二次的な反応であると報告した。それに対して Matharu & Hollingsworth (1992) は収縮は  $P_{2Y}$  受容体, 弛緩は  $P_{2X}$  受容体を介して生じると報告している。

近年 purine nucleotide ばかりでなく, UTP や UDP 等の pyrimidine nucleotide も細胞の機能調節に関与していると報告された。これらの nucleotide はクロマフィン細胞や血小板の顆粒の中に含まれていることが知られている (Anderson & Parkinson, 1997)。また UTP の作用する受容体は以下の4種類が報告されている。即ち UTP はラット結腸粘膜筋板 (Hourani *et al.*, 1993) やマウス精管 (von Kügelgen *et al.*, 1990) で,  $P_{2X}$  や  $P_{2Y}$  受容体に作用するが, その力価は ATP に比べて弱く両受容体に対する親和性は低い。これに対して,  $P_{2U}$  受容体 (ヌクレオチド受容体: nucleotide receptors) は UTP と ATP に同等の親和性を持っていることが知られており (O'Connor *et al.*, 1991; Dubyak & El-Moatassim, 1993; Fredholm *et al.*, 1994),  $P_{2U}$  受容体を介する収縮反応がラット十二指腸粘膜筋板で報告されている (Johnson *et al.*, 1996; Brownhill *et al.*, 1997)。さらに UTP の反応が adenine nucleotide による脱感作 (desensitization) の影響を受けないことから, UTP が  $P_2$  受容体とは異なる受容体に作用していることが報告された (Häussinger *et al.*, 1987; von Kügelgen *et al.*, 1987)。この受容体はピリミジン受容体 (pyrimidinoceptors) と呼ばれ, UTP や UDP によって活性化されるが, ATP に対する親和性は低い (Seifert & Schultz, 1989; Communi & Boeynaems, 1997)。ラット十二指腸標本では, UTP がピリミジン受容体を介して収縮を引き起こすことが報告されている (Johnson & Hourani, 1994)。従って UTP による反応では, これらの受容体を区別することが重要である。



ATP や UTP の受容体の分類は、必ずしも特異性の高い拮抗薬が存在しないこともあり、主に nucleotide による力価順 (Burnstock & Kennedy, 1985) と各薬物の相互の脱感作 (cross-desensitization) の有無によって行われていた (Meldrum & Burnstock, 1983)。しかしながら、幾つかの薬物がプリン受容体拮抗薬として用いられている。染料の reactive blue 2 とドリパノゾーマ治療薬である suramin は、現在最も広く用いられている  $P_2$  受容体拮抗薬であるが、これらは  $P_2$  受容体拮抗薬としての選択性があまり良くない。Reactive blue 2 はウサギ腸間膜動脈において、 $P_{2X}$  受容体による収縮反応には影響を与えず、 $P_{2Y}$  受容体の弛緩反応を抑制すると報告されたが (Burnstock & Warland, 1987)、ラット胃底部では adenosine や isoproterenol による弛緩反応に対しても抑制効果を示し (Matharu & Hollingsworth, 1992)、その特異性を示す濃度範囲の狭さや、阻害作用が不可逆性であることが指摘されている (Kennedy, 1990)。また suramin も、 $P_2$  受容体に比較的特異性は高いが、 $P_{2X}$  受容体と  $P_{2Y}$  受容体を区別することはできない (Hoyle *et al.*, 1990)。Lambrecht *et al.* (1992) はウサギ精管平滑筋で、PPADS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid) が  $P_2$  受容体拮抗薬として使用できる可能性を示し、その後 PPADS は  $P_{2Y}$  受容体を介する反応よりも  $P_{2X}$  受容体を介する反応に強い抑制効果を示すことが報告された (Ziganshin *et al.*, 1993; 1994; McLaren *et al.*, 1994)。また陰イオン輸送 (anion transport) 阻害薬である DIDS (4,4'-diisothiocyanatostillbene-2,2'-disulphonic acid) (Cabantchik & Greger, 1992) が、 $P_2$  受容体拮抗薬としての効果を示すことも報告されている (Soltoff *et al.*, 1993; Bültmann & Starke, 1994a)。

最近この様なプリン受容体拮抗薬を複数用いることによって、より細かな受容体の分類が出来ることが報告されている。ラット精管平滑筋では、主に ATP 類似物質の力価順から ATP による収縮反応は  $P_{2X}$  受容体を介して生じていると報告されていたが、Bültmann & Starke (1994b) は、収縮反応にはプリン受容体拮抗薬の感受性が異なる 3 種類の  $P_2$  受容体が関与していることを示唆した。また既に述べた様にモルモット盲腸紐では  $P_{2Y}$  受容体を介して弛緩反応が生じると考えられていたが、プリン受容



体拮抗薬を用いた実験から、弛緩に関して複数の  $P_2$  受容体が存在することが示唆されている (Bültmann & Starke, 1995; Dudeck *et al.*, 1995; Windscheif *et al.*, 1995; Bültmann *et al.*, 1996) .

本実験では、ラット胃縦走筋標本において ATP, UTP 及びその関連物質が収縮又は弛緩反応を生じるか否か検討すると共に、その反応に関与する受容体を同定するため、ATP 類似物質の力価順序、脱感作及びプリン受容体拮抗薬である reactive blue 2, suramin, PPADS, DIDS を用いて実験を行った。また nucleotides によって生じる収縮及び弛緩反応の機序についての検討も行った。

なお、本実験結果の一部は既に公表されている (Otsuguro *et al.*, 1996a) .



## II 実験方法

### A 標本

7週齢の雄ラット (Wistar rat) を用いた。ラットの後頭部を殴打後、頸動脈切断によって放血死させた。胃を摘出した後、前胃部 (無腺部) と腺胃部 (腺部) の境界で切断し、さらに前胃部先端を切断し小彎に沿って前胃部を切り開き、内容物を除去した。栄養液を満たしたシャーレに移し、実体顕微鏡下で輪走筋層より粘膜を除去した。この筋層より輪走筋切片 (幅 1.0-1.5 mm, 長さ 5-8 mm) を作成した。なお胃底部は縦走筋層が密なため、できるだけこの部分を避け、縦走筋層が粗な部分を用いて標本作製した。

### B 張力測定

#### 1 マグヌス法

切片標本をマグヌス管 (1-3 ml) の中に吊し、一端を張力トランスデューサー (FORCE TRANSDUCER, type 45196, 三栄測器) に接続し等尺性に張力を測定した。張力は増幅器 (BIOPHYSIOGRAPH, system 18759, 三栄測器) を介して記録用紙上に記録した (RECTI-HORIZ-8K, 三栄測器)。栄養液の温度は 37℃とし、初期張力として 1 g を標本に負荷した。実験は標本に初期張力を負荷してから 1 時間の平衡時間をおいた後に開始した。用いた溶液の組成は以下の通りである (mM) : NaCl 144, KCl 5.8, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, HEPES 5, glucose 11.1 (pH = 7.4, NaOH で滴定)。また全ての実験は prostaglandins の関与を除くため indomethacin (10 μM) 存在下で行った。



## 2 弛緩反応

弛緩反応は acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) によって張力を増加させた標本を用いて記録した。Acetylcholine は一過性の収縮に続き持続的な収縮を引き起こした。薬物はこの持続収縮の間に投与し、弛緩の大きさは薬物投与直前の acetylcholine の収縮高に対する抑制の百分率で表した。弛緩の濃度依存性曲線は、各薬物の非累積的投与によって得た。薬物投与間隔は 10-15 分とした。

弛緩反応に対する拮抗薬の効果を検討するため、まず拮抗薬非存在下で濃度依存性反応を記録した。ついで所定の時間拮抗薬存在下で標本をインキュベーションし

(suramin 60 分間, reactive blue 2, PPADS 及び DIDS 30 分間, apamin 及び 8-phenyltheophylline 20 分間), 各拮抗薬存在下で再度濃度依存性反応を記録した。同じ動物から得た標本で、所定の時間溶媒 (蒸留水又はエタノール) でインキュベーションしたものをコントロール (time-matched control) とした。

## 3 収縮反応

収縮反応は静止張力の標本を用いて記録し、各薬物による収縮の大きさは標本毎に実験の最初に投与した carbachol ( $1\ \mu\text{M}$ ) または acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) の収縮高に対する百分率で表した。収縮の濃度依存性曲線は各薬物の非累積的投与によって得た。各薬物は 10-15 分の間隔を置き約 2 分間投与した。

収縮反応は弛緩反応と異なり繰り返し刺激によって非常に減衰 (脱感作) しやすかったので、濃度依存性反応は各標本毎に一回限りとした。従って拮抗薬の作用は、拮抗薬で予め所定の時間 (弛緩実験の項参照) インキュベーションした標本で濃度依存性反応を記録し、溶媒で所定の時間インキュベーションした別の標本 (コントロール) における濃度依存性反応と比較することで評価した。

脱感作 (desensitization) 実験は、薬物を持続的に適用することによって行った。脱



感作に用いた薬物の濃度は、最大反応を引き起こすのに十分な濃度を用いた。大抵の場合、薬物投与による収縮反応が静止レベルまで戻るのに 5-8 分間を要した。その後脱感作に用いた薬物の存在下で試験薬を投与し、その効果を検討した。

### C 使用薬物

本実験では以下の薬物を使用した。

Adenosine (Sigma), ADP (adenosine 5'-diphosphate, sodium salt) (Sigma), AMP (adenosine 5'-monophosphate, sodium salt) (Sigma), apamin (Sigma), carbachol (carbamylcholine chloride) (Sigma), indomethacin (Sigma),  $\alpha,\beta$ -methylene ATP ( $\alpha,\beta$ -methylene adenosine 5'-triphosphate, lithium salt) (Sigma), reactive blue 2 (cibacron blue 3GA) (Sigma), uridine (Sigma), suramin (suramin sodium) (Biomol Research Laboratories), 2-methylthio ATP (tetrasodium salt) (Research Biochemicals), 8-phenyltheophylline (Research Biochemicals), PPADS (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid, tetrasodium salt) (Research Biochemicals), ATP (disodium salt) (Boehringer Mannheim), ATP $\gamma$ S (adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), tetralithium salt) (Boehringer Mannheim), CTP (cytidine 5'-triphosphate, trisodium salt) (ヤマサ醤油), UTP (uridine 5'-triphosphate, trisodium salt) (ヤマサ醤油), L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) (第一製薬), acetylcholine (acetylcholine chloride) (第一製薬), guanethidine (guanethidine sulfate) (東京化成), EGTA (ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether) $N,N'$ -tetraacetic acid) (同仁), HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid) (同仁), DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid, disodium salt) (同仁), UDP (uridine 5'-diphosphate, disodium salt) (和光), UMP (uridine 5'-monophosphate, disodium salt) (和光), nifedipine (和光), tetrodotoxin (三共)。

その他の薬物は全て和光純薬の特級を用いた。



Adenosine は直接標準溶液で用いる濃度に希釈し実験に使用した。8-Phenyltheophylline は 80 % methanol, 0.2 M NaOH 溶液を, indomethacin は ethanol をそれぞれ溶媒として高濃度溶液 (10 mM) を作成した。他の薬物は高濃度溶液を蒸留水で作成した。

#### D 統計処理

$pD_2$  値 ( $-\log_{10} ED_{50}$ ) はそれぞれの  $\log$  濃度反応曲線の直線部分の回帰分析 (linear regression analysis) によって求めた。ATP による弛緩反応は 1 mM まで用いても最大反応が得られなかったため, acetylcholine ( $1 \mu M$ ) による収縮に対して 50 %弛緩を起こした濃度を  $EC_{50}$  値と見なした。弛緩反応における拮抗薬の効果を評価するため, 標本毎に最初の濃度反応曲線の  $EC_{50}$  値に対する 2 回目の濃度反応曲線の  $EC_{50}$  値の割合から  $\log_{10} CR$  (concentration ratio: 濃度比) 値を算出し, 拮抗薬処置の標本と溶媒処置のコントロールの標本の  $\log_{10} CR$  値を有意差検定した。収縮反応では,  $\log_{10} CR$  値を得ることができなかったため, 拮抗薬処置標本と溶媒処置標本の  $pD_2$  値を有意差検定し, 拮抗薬の効果を検討した。有意差検定は, paired あるいは unpaired Student's  $t$ -test を用い, 有意水準を  $P < 0.05$  とした。結果は平均値  $\pm$  標準誤差 ( $n =$  例数) で示した。



### Ⅲ 実験結果

#### A Purine 及び pyrimidine nucleotide による弛緩反応

##### 1 ATP 及び ATP 類似物質による弛緩反応

Acetylcholine の投与によって張力の増加した標本を用いて, ATP 及び各種 ATP 類似物質による弛緩反応について検討した. Acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) は投与後素早く立ち上がる一過性の収縮に引き続き, 持続的な収縮を引き起こした. Acetylcholine による持続的な収縮反応が生じている間に, 各種薬物を投与した. 図 8 に ATP, 2-methylthio ATP 及び  $\alpha,\beta$ -methylene ATP による弛緩反応の典型的な例を示す. ATP 及び 2-methylthio ATP は一過性の弛緩反応を生じた. それに対して,  $\alpha,\beta$ -methylene ATP は持続的な弛緩反応を引き起こした. データには示していないが,  $\alpha,\beta$ -methylene ATP による弛緩反応は, 繰り返し投与や持続的な投与によっても, ラット胃底部縦走筋標本 (Lefebvre & Burnstock, 1990; Matharu & Hollingsworth, 1992) で報告されている様な反応の減衰をほとんど示さなかった.

ATP ( $300\ \mu\text{M}$ ) 及び  $\alpha,\beta$ -methylene ATP ( $3\ \mu\text{M}$ ) による弛緩反応 (それぞれ  $48.3 \pm 2.5\%$ ,  $n = 12$  及び  $51.4 \pm 2.3\%$ ,  $n = 12$ ) は, adrenaline 作動性神経遮断薬である  $1\ \mu\text{M}$  guanethidine ( $42.5 \pm 6.2\%$ ,  $n = 4$  及び  $41.4 \pm 3.8\%$ ,  $n = 4$ ), NO 合成酵素阻害薬である  $100\ \mu\text{M}$  L-NAME ( $48.2 \pm 5.3\%$ ,  $n = 4$  及び  $51.4 \pm 5.3\%$ ,  $n = 4$ ) 及び電位依存性  $\text{Na}^+$ チャネル遮断薬である  $0.3\ \mu\text{M}$  tetrodotoxin ( $44.8 \pm 7.5\%$ ,  $n = 4$  及び  $49.6 \pm 6.3\%$ ,  $n = 4$ ) によって有意な抑制を受けなかった. 以上の結果から, ATP 及び  $\alpha,\beta$ -methylene ATP による弛緩反応は, 平滑筋組織に対する直接作用と考えられる.

プリン受容体を薬理学的に分類するため, ATP 類似物質による弛緩反応とその力価について検討した (Burnstock & Kennedy, 1985; Kennedy, 1990; Dubyak & El-Moatassim, 1993; Fredholm *et al.*, 1994) .



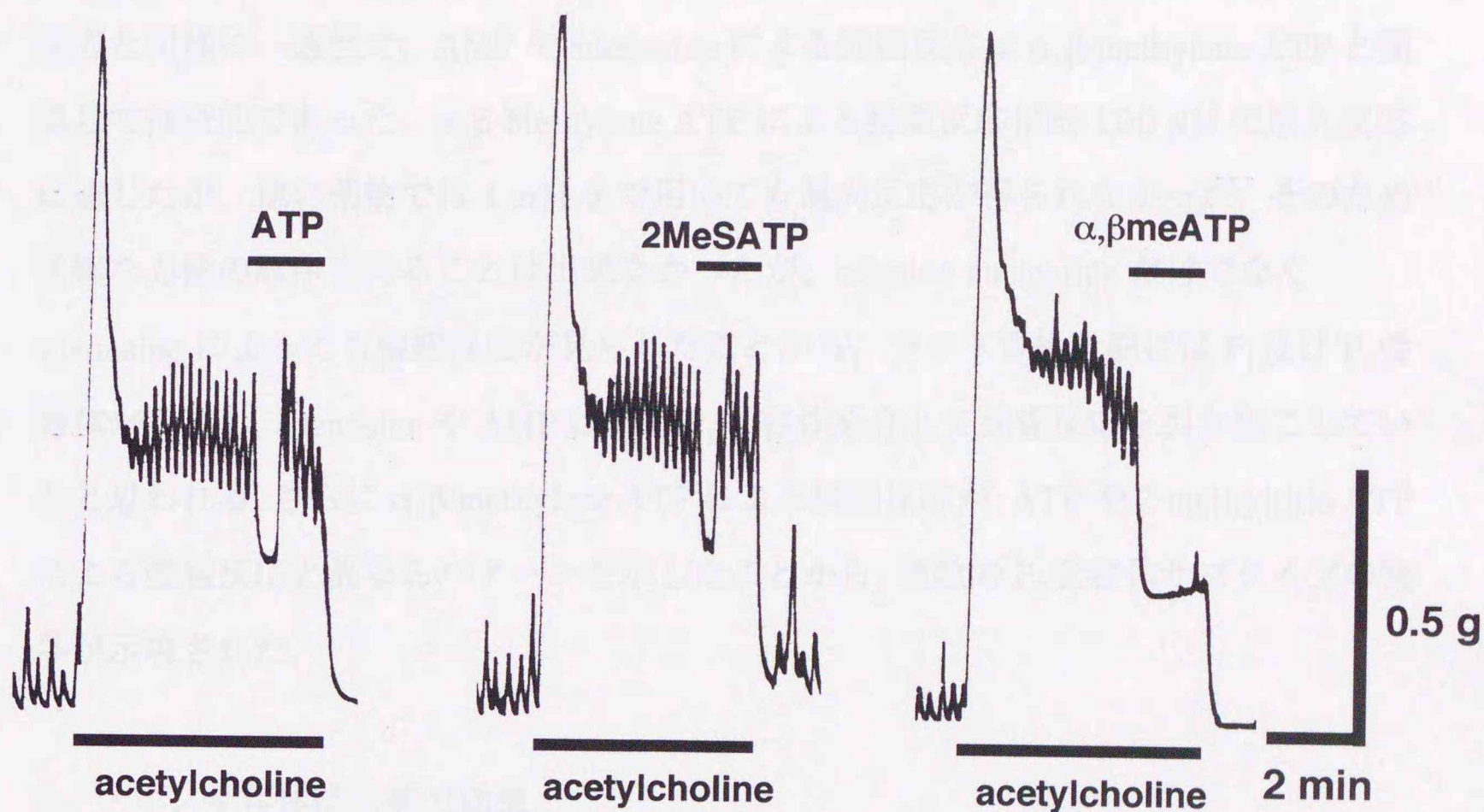


図8 ATP, 2-methylthio ATP及び $\alpha,\beta$ -methylene ATPによる弛緩反応

Acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) を投与し収縮反応が安定した後, ATP ( $100\ \mu\text{M}$ ) , 2-methylthio ATP (2MeSATP,  $30\ \mu\text{M}$ ) 及び $\alpha,\beta$ -methylene ATP ( $\alpha,\beta\text{meATP}$ ,  $10\ \mu\text{M}$ ) をそれぞれ投与した. 同一標本から得られた典型的な例を示す.



Acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) の投与によって張力を増加させた標本で, ATP, ADP, AMP, 2-methylthio ATP,  $\alpha,\beta$ -methylene ATP 及び adenosine はそれぞれ濃度依存性に, UTP 及び CTP は高濃度 ( $100\ \mu\text{M}$  以上) を用いた時のみ弛緩反応を引き起こした (図 9). また図には示していないが, ADP による弛緩反応は ATP や 2-methylthio ATP の弛緩反応と同様に一過性で, AMP や adenosine による弛緩反応は  $\alpha,\beta$ -methylene ATP と類似して持続的であった.  $\alpha,\beta$ -Methylene ATP による弛緩反応は約  $100\ \mu\text{M}$  で最大反応に達したが, 他の薬物では  $1\ \text{mM}$  まで用いても最大反応が得られなかった. そのため正確な力価の順序を得ることは出来なかったが, adenine nucleotide だけでなく adenosine によっても弛緩反応が見られたことから, ラット胃輪走筋には  $P_1$  及び  $P_2$  受容体が混在し, adenosine や AMP は主に  $P_1$  受容体を介して弛緩反応を引き起こしていると思われる. さらに  $\alpha,\beta$ -methylene ATP による弛緩反応が, ATP や 2-methylthio ATP による弛緩反応と異なるパターンを示したことから, 複数の  $P_2$  受容体サブタイプの関与が示唆された.

## 2 プリン受容体拮抗薬の効果

モルモット盲腸紐の弛緩反応では, プリン受容体拮抗薬に対する感受性が異なる複数の  $P_2$  受容体の関与が示唆されている (Dudeck *et al.*, 1995; Bültmann & Starke, 1995; Windscheif *et al.*, 1995; Bültmann *et al.*, 1996). そこで  $P_1$  受容体拮抗薬の 8-phenyltheophylline,  $P_2$  受容体拮抗薬の reactive blue 2, suramin, PPADS 及び DIDS を用いて, adenosine, ATP 及び  $\alpha,\beta$ -methylene ATP の弛緩反応にたいするプリン受容体拮抗薬の効果を検討した. この実験では同一標本から 2 回濃度依存性反応を記録したが, 最初の adenosine, ATP 及び  $\alpha,\beta$ -methylene ATP の弛緩反応の  $pD_2$  値は, それぞれ  $4.20 \pm 0.04$  ( $n = 42$ ),  $3.52 \pm 0.05$  ( $n = 36$ ) 及び  $5.80 \pm 0.03$  ( $n = 123$ ) であった. これに対して溶媒処置後の 2 回目の濃度依存性反応における  $pD_2$  値は, adenosine では  $4.17 \pm 0.06$  ( $n = 21$ ), ATP では  $3.34 \pm 0.09$  ( $n = 18$ ) 及び  $\alpha,\beta$ -methylene ATP



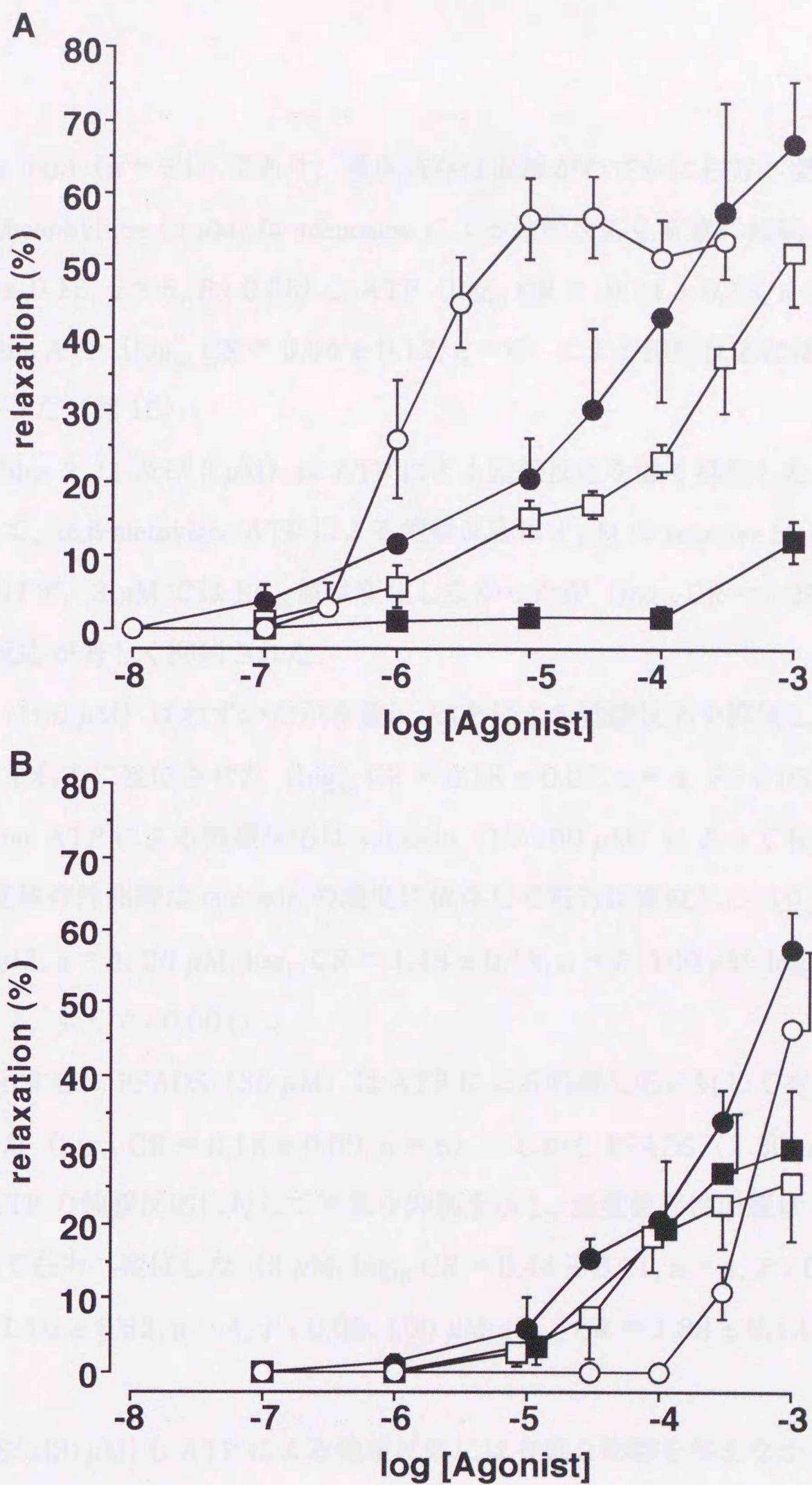


図9 ATP及び各種関連物質による弛緩反応の濃度依存性曲線

Acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) で収縮させた標本に、(A)  $\alpha, \beta$ -methylene ATP (○), 2-methylthio ATP (●), ATP (□), UTP (■) 及び (B) CTP (○), ADP (●), AMP (□) adenosine (■) をそれぞれ投与した。縦軸は acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) 収縮に対する抑制の百分率で、横軸は各薬物濃度を対数値で表している。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4-6$ ) で示している。



では  $5.62 \pm 0.03$  ( $n = 54$ ) であり, 濃度依存性曲線がわずかに右方へ変位した.

8-Phenyltheophylline ( $3 \mu\text{M}$ ) は adenosine による弛緩反応を有意に抑制したが ( $\log_{10} \text{CR} = 0.39 \pm 0.15, n = 5, P < 0.05$ ), ATP ( $\log_{10} \text{CR} = -0.14 \pm 0.15, n = 4$ ) 及び  $\alpha, \beta$ -methylene ATP ( $\log_{10} \text{CR} = 0.04 \pm 0.12, n = 6$ ) による弛緩反応には有意な影響を与えなかった (図 10) .

Reactive blue 2 (1 及び  $3 \mu\text{M}$ ) は ATP による弛緩反応を強く抑制した (図 11) . それに対して,  $\alpha, \beta$ -methylene ATP による弛緩反応は  $1 \mu\text{M}$  の reactive blue 2 では有意な影響を受けず,  $3 \mu\text{M}$  では  $\text{EC}_{50}$  値は変化しなかったが ( $\log_{10} \text{CR} = 0.29 \pm 0.19, n = 6$ ), 最大反応が著しく抑制された.

Suramin ( $100 \mu\text{M}$ ) はわずかだが有意に ATP による弛緩反応を抑制し, その濃度依存性曲線を右方に変位させた ( $\log_{10} \text{CR} = 0.18 \pm 0.07, n = 4, P < 0.05$ ) (図 12) .  $\alpha, \beta$ -Methylene ATP による弛緩反応は suramin ( $10$ - $100 \mu\text{M}$ ) によって有意に抑制され, その濃度依存性曲線は suramin の濃度に依存して右方に変位した ( $10 \mu\text{M}$ :  $\log_{10} \text{CR} = 0.91 \pm 0.02, n = 4$ ;  $30 \mu\text{M}$ :  $\log_{10} \text{CR} = 1.48 \pm 0.18, n = 5$ ;  $100 \mu\text{M}$ :  $\log_{10} \text{CR} = 2.30 \pm 0.16, n = 5$ , 全て  $P < 0.001$ ) .

図 13 に示す様に PPADS ( $30 \mu\text{M}$ ) は ATP による弛緩反応に対して有意な影響を与えなかった ( $\log_{10} \text{CR} = 0.18 \pm 0.09, n = 6$ ) . しかし PPADS ( $3$ - $30 \mu\text{M}$ ) は  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の弛緩反応に対して有意な抑制を示し, 濃度依存性曲線は PPADS の濃度に依存して右方へ変位した ( $3 \mu\text{M}$ :  $\log_{10} \text{CR} = 0.44 \pm 0.11, n = 4, P < 0.05$ ;  $10 \mu\text{M}$ :  $\log_{10} \text{CR} = 1.10 \pm 0.33, n = 4, P < 0.05$ ;  $100 \mu\text{M}$ :  $\log_{10} \text{CR} = 1.88 \pm 0.13, n = 4, P < 0.005$ ) .

また DIDS ( $100 \mu\text{M}$ ) も ATP による弛緩反応には有意な影響を与えなかったが ( $\log_{10} \text{CR} = 0.20 \pm 0.10, n = 4$ ) (図 14) ,  $\alpha, \beta$ -methylene ATP による弛緩反応は有意な抑制を受け, その濃度依存性曲線は DIDS ( $30$ - $100 \mu\text{M}$ ) の濃度に依存して右方へ変位した ( $30 \mu\text{M}$ :  $\log_{10} \text{CR} = 1.68 \pm 0.27, n = 4, P < 0.01$ ;  $100 \mu\text{M}$ :  $\log_{10} \text{CR} = 1.88 \pm 0.13, n = 4, P < 0.005$ ) .



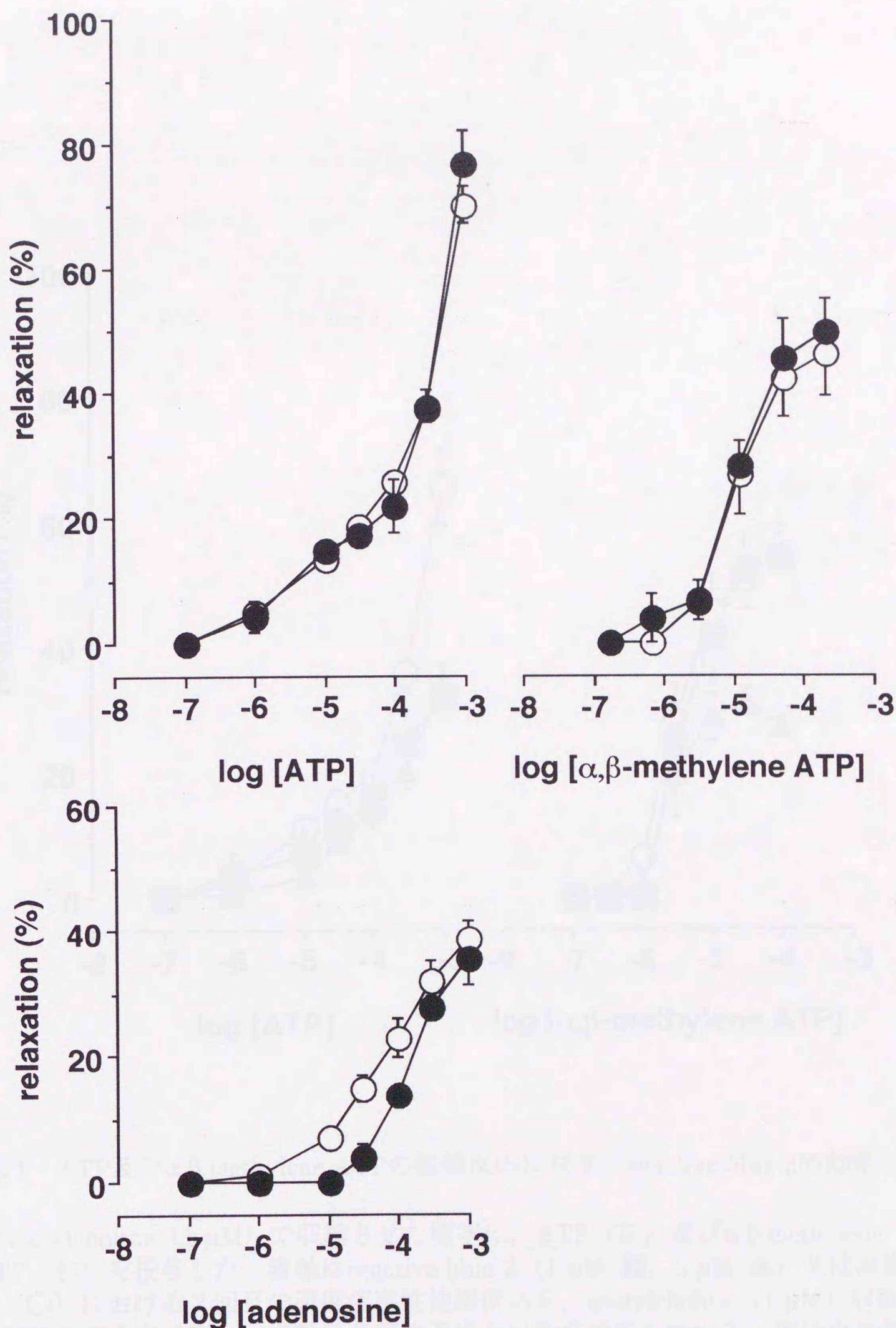


図10 ATP,  $\alpha,\beta$ -methylene ATP及びadenosineの弛緩反応に対する8-phenyltheophyllineの効果

Acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) で収縮させた標本に, ATP (左上段),  $\alpha,\beta$ -methylene ATP (右上段) 及びadenosine (下段) を投与した. 縦軸は8-phenyltheophylline ( $3\ \mu\text{M}$ ) (●) 又は溶媒存在下 (○) における2回目の濃度依存性弛緩反応を, acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) 収縮に対する抑制の百分率で表し, 横軸は各薬物濃度を対数値で表している. 値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4-6$ ) で示している.



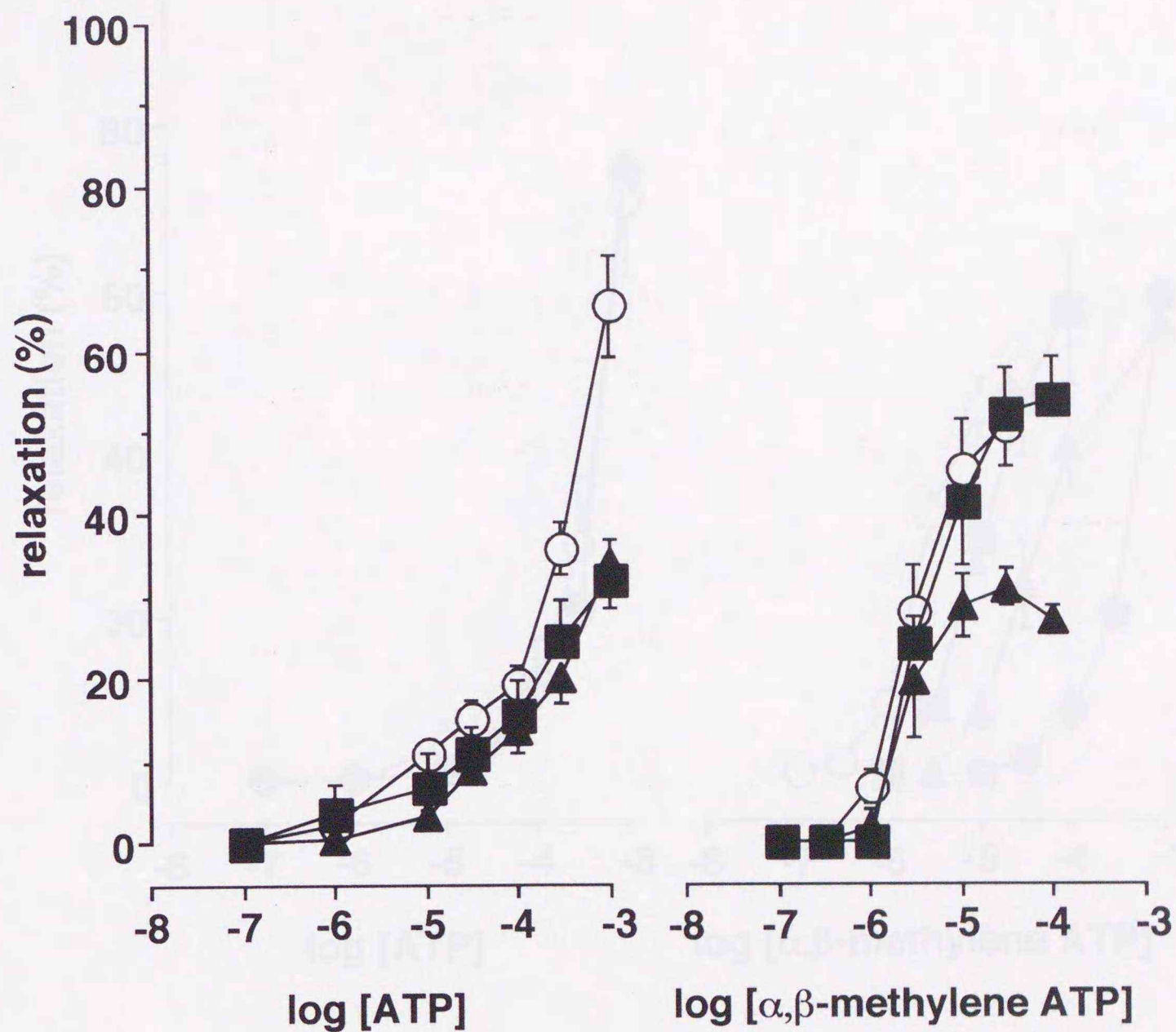


図11 ATP及び $\alpha,\beta$ -methylene ATPの弛緩反応に対するreactive blue 2の効果

Acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) で収縮させた標本に, ATP (左) 及び $\alpha,\beta$ -methylene ATP (右) を投与した. 縦軸はreactive blue 2 ( $1 \mu\text{M}$ : ■,  $3 \mu\text{M}$ : ▲) 又は溶媒存在下 (○) における2回目の濃度依存性弛緩反応を, acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) 収縮に対する抑制の百分率で表し, 横軸は各薬物濃度を対数値で表している. 値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4-6$ ) で示している.



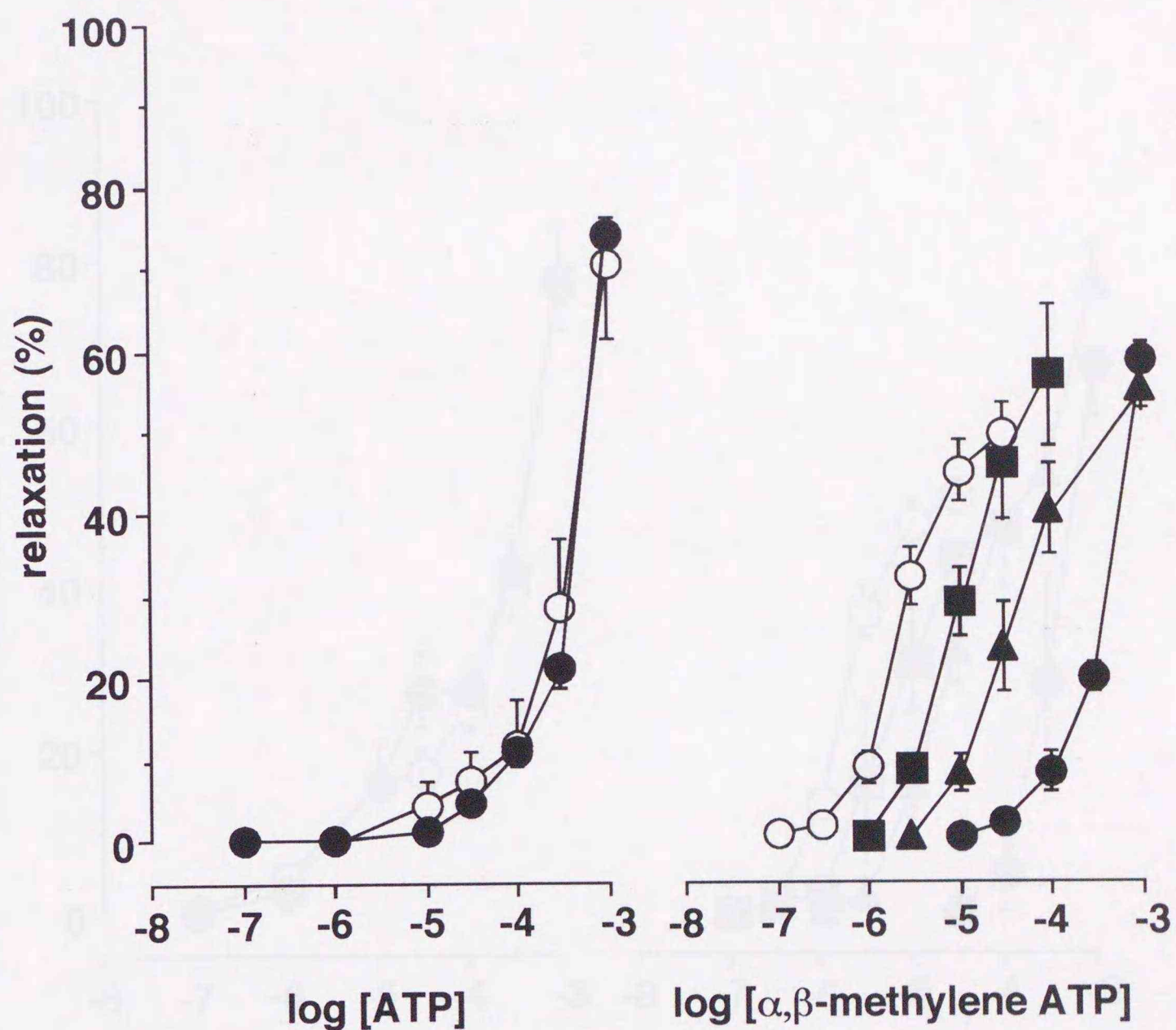


図12 ATP及び $\alpha,\beta$ -methylene ATPの弛緩反応に対するsuraminの効果

Acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) で収縮させた標本に, ATP (左) 及び $\alpha,\beta$ -methylene ATP (右) を投与した. 縦軸はsuramin ( $10 \mu\text{M}$ : ■,  $30 \mu\text{M}$ : ▲,  $100 \mu\text{M}$ : ●) 又は溶媒存在下 (○) における2回目の濃度依存性弛緩反応を, acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) 収縮に対する抑制の百分率で表し, 横軸は各薬物濃度を対数値で表している. 値は平均値  $\pm$  標準誤差 ( $n = 4-5$ ) で示している.



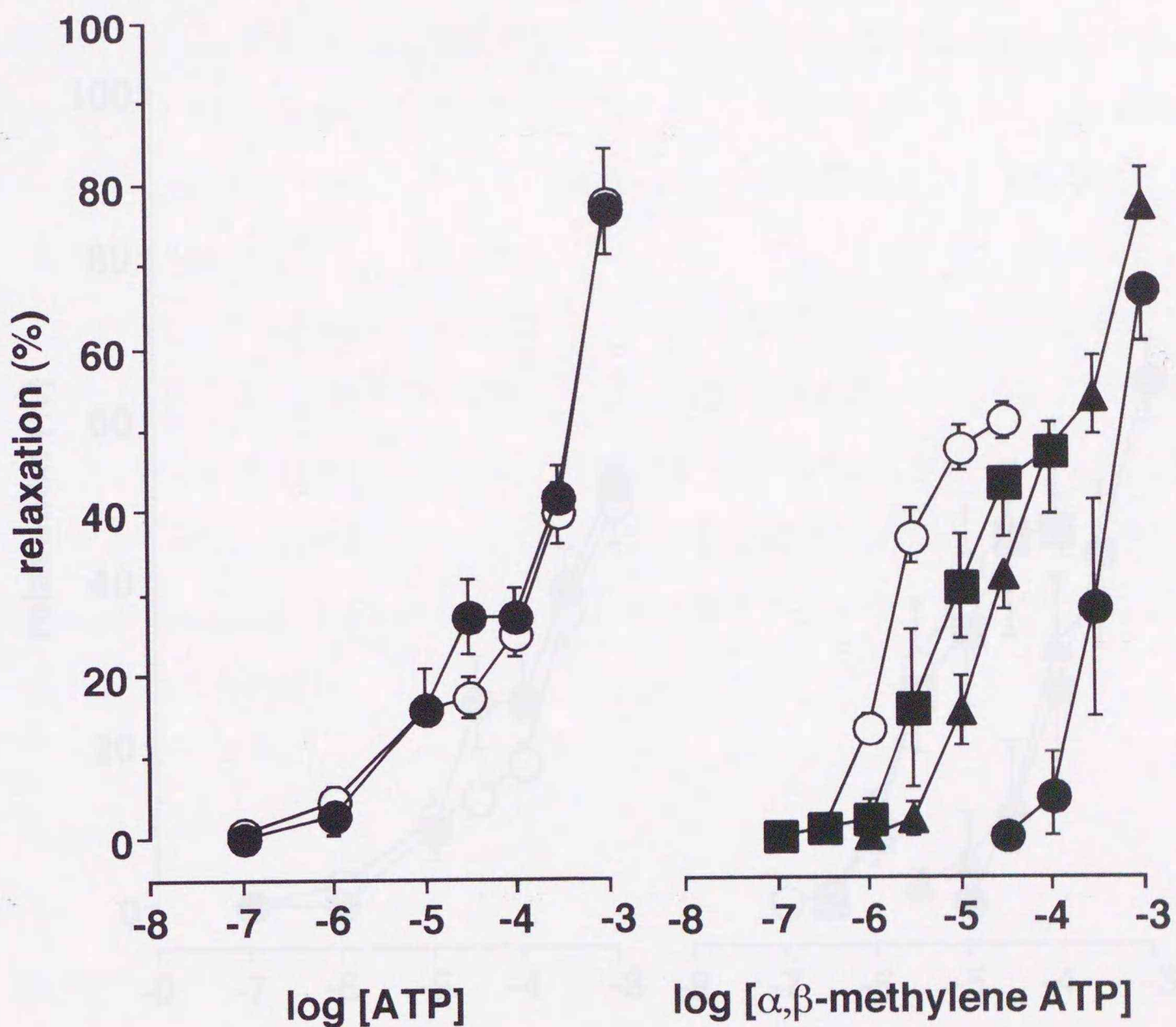


図13 ATP及び $\alpha,\beta$ -methylene ATPの弛緩反応に対するPPADSの効果

Acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ )で収縮させた標本に、ATP (左) 及び $\alpha,\beta$ -methylene ATP (右)を投与した。縦軸はPPADS ( $3\ \mu\text{M}$ : ■,  $10\ \mu\text{M}$ : ▲,  $30\ \mu\text{M}$ : ●)又は溶媒存在下 (○)における2回目の濃度依存性弛緩反応を、acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ )収縮に対する抑制の百分率で表し、横軸は各薬物濃度を対数値で表している。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4-18$ )で示している。



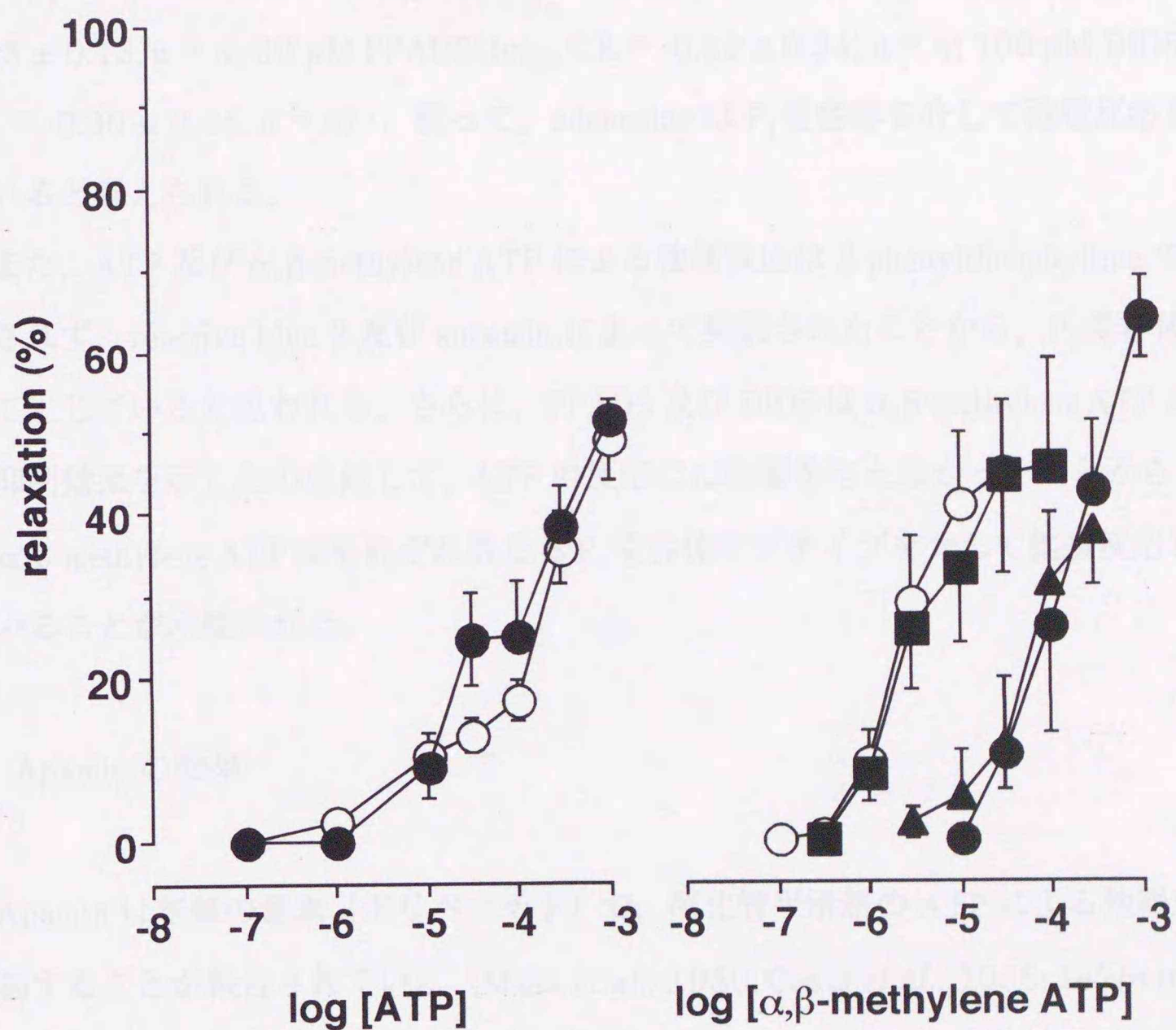


図14 ATP及び $\alpha,\beta$ -methylene ATPの弛緩反応に対するDIDSの効果

Acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) で収縮させた標本に, ATP (左) 及び $\alpha,\beta$ -methylene ATP (右) を投与した. 縦軸はDIDS ( $10\ \mu\text{M}$ : ■,  $30\ \mu\text{M}$ : ▲,  $100\ \mu\text{M}$ : ●) 又は溶媒存在下 (○) における2回目の濃度依存性弛緩反応を, acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) 収縮に対する抑制の百分率で表し, 横軸は各薬物濃度を対数値で表している. 値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4$ ) で示している.



Adenosine による弛緩反応は、 $P_1$  受容体拮抗薬である 8-phenyltheophylline によって抑制されたが、今回用いた 4 種類の  $P_2$  受容体拮抗薬によって有意な抑制を受けなかった ( $3 \mu\text{M}$  reactive blue 2:  $\log_{10} \text{CR} = -0.11 \pm 0.12$ ,  $n = 6$ ;  $100 \mu\text{M}$  suramin:  $\log_{10} \text{CR} = 0.13 \pm 0.13$ ,  $n = 4$ ;  $30 \mu\text{M}$  PPADS:  $\log_{10} \text{CR} = -0.32 \pm 0.34$ ,  $n = 4$ ;  $100 \mu\text{M}$  DIDS:  $\log_{10} \text{CR} = -0.30 \pm 0.44$ ,  $n = 4$ )。従って、adenosine は  $P_1$  受容体を介して弛緩反応を生じていると考えられる。

また、ATP 及び  $\alpha, \beta$ -methylene ATP による弛緩反応は 8-phenyltheophylline では抑制されず、reactive blue 2 及び suramin によって抑制されたことから、 $P_2$  受容体を介して生じていると思われる。さらに、PPADS 及び DIDS は  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の反応に抑制効果を示したのに対して、ATP の反応には影響を与えなかったことから、ATP と  $\alpha, \beta$ -methylene ATP はそれぞれ異なる  $P_2$  受容体サブタイプを介して弛緩反応を生じていることが示唆された。

### 3 Apamin の効果

Apamin は蜜蜂の毒素 (ポリペプチド) で、消化管平滑筋の ATP による弛緩効果を抑制することが報告されている (Maas *et al.*, 1980; Costa *et al.*, 1986; Lefebvre *et al.*, 1991)。図 15 に示すように、ATP 及び  $\alpha, \beta$ -methylene ATP による弛緩反応は apamin ( $0.3 \mu\text{M}$ ) によって著しく抑制された。Apamin は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャンネルを抑制するので (Banks *et al.*, 1979; Vogalis & Goyal, 1997)，両薬物による弛緩反応が、 $\text{K}^+$  チャンネルの開口による過分極によって生じていることが示唆された。



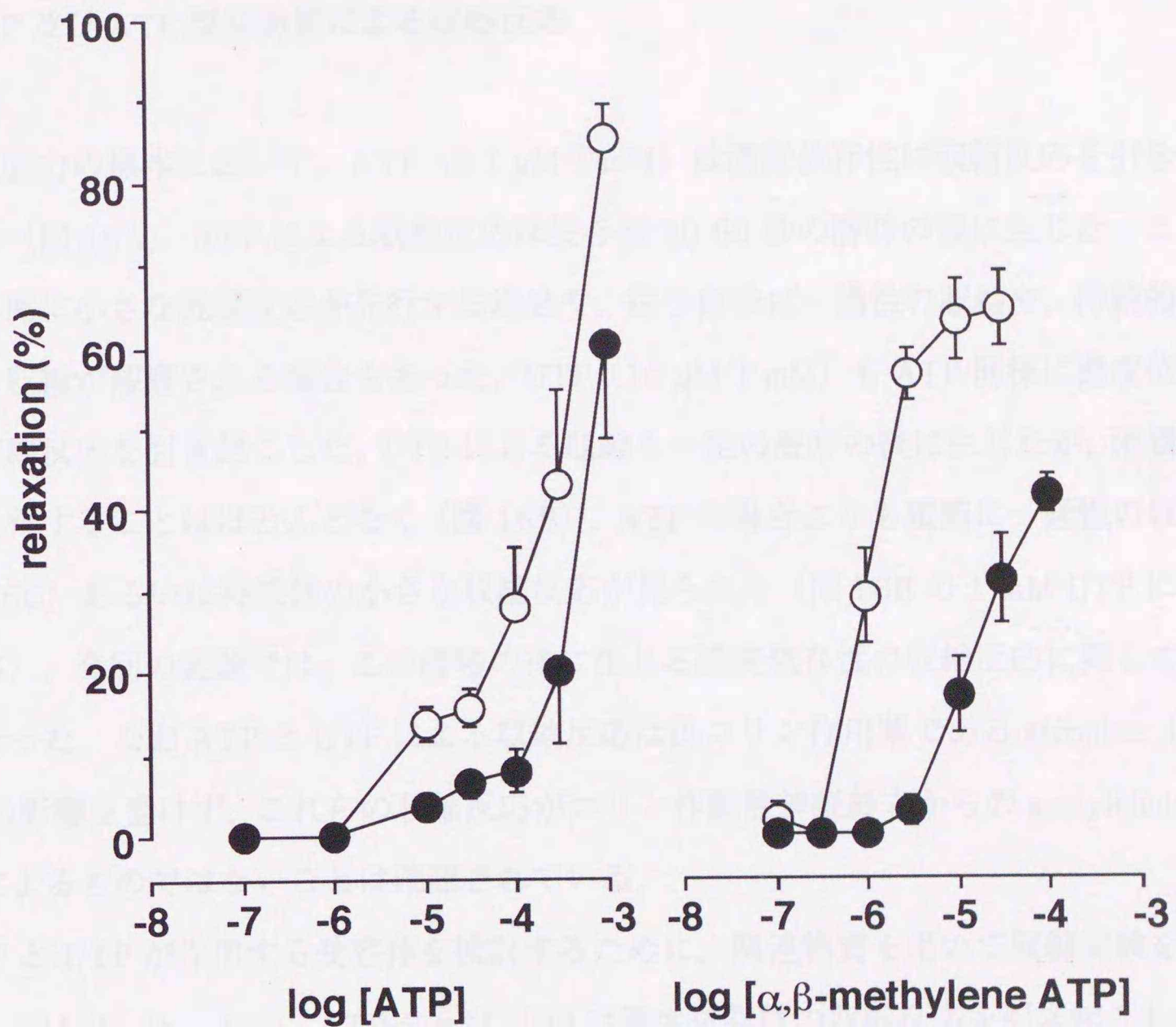


図15 ATP及び $\alpha,\beta$ -methylene ATPの弛緩反応に対するapaminの効果

Acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) で収縮させた標本に, ATP (左) 及び $\alpha,\beta$ -methylene ATP (右) を投与した. 縦軸はapamin ( $0.3\ \mu\text{M}$ : ●) 又は溶媒存在下 (○) における2回目の濃度依存性弛緩反応を, acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) 収縮に対する抑制の百分率で表し, 横軸は各薬物濃度を対数値で表している. 値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n=4$ ) で示している.



## B Purine 及び pyrimidine nucleotide による収縮反応

### 1 ATP 及び ATP 類似物質による収縮反応

静止張力の標本において、ATP ( $0.1 \mu\text{M}$ - $1 \text{ mM}$ ) は濃度依存性に収縮反応を引き起こした (図 16A)。ATP による収縮反応は投与後 20-60 秒の潜時の後に生じた。この潜時の間に小さな弛緩反応が先行する場合や、投与直後に一過性の収縮や、持続的な小さな収縮が観察される場合もあった。UTP ( $10 \mu\text{M}$ - $1 \text{ mM}$ ) も ATP 同様に濃度依存性の収縮反応を引き起こした。UTP による収縮も一定の潜時の後に生じたが、弛緩反応が先行することはほとんどなく (図 16B)，ATP の場合よりも頻繁に一過性の収縮 (図 16C) あるいは持続性の小さな収縮反応が見られた (図 16B の  $1 \text{ mM}$  UTP による反応)。今回の実験では、この潜時の後に生じる濃度依存性の収縮反応に関して検討を行った。なお ATP と UTP による収縮反応は抗コリン作用薬である atropine ( $1 \mu\text{M}$ ) の影響を受けず、これらの収縮反応がコリン作動性神経終末からの acetylcholine 放出によるものではないことは確認されている。

ATP と UTP が作用する受容体を検討するために、関連物質を用いて収縮実験を行った。2-Methylthio ATP, ATP $\gamma$ S 及び UDP は濃度依存性の収縮反応を引き起こした (図 17)。それぞれの薬物による  $\text{pD}_2$  値は、2-methylthio ATP では  $8.89 \pm 0.13$  ( $n = 6$ )，ATP では  $6.06 \pm 0.14$  ( $n = 4$ )，UDP では  $5.84 \pm 0.29$  ( $n = 5$ )，UTP では  $5.78 \pm 0.31$  ( $n = 5$ )，ATP $\gamma$ S では  $5.43 \pm 0.27$  ( $n = 5$ ) であった。 $\alpha, \beta$ -Methylene ATP, UMP 及び CTP はわずかな収縮反応しか起こさず，uridine 及び adenosine は  $1 \text{ mM}$  まで用いても全く収縮反応を引き起こさなかった。ATP 類似物質の力価の順序は、2-methylthio ATP  $\gg$  ATP  $\geq$  UDP = UTP  $\geq$  ATP $\gamma$ S  $\gg$  UMP  $\succ$  CTP =  $\alpha, \beta$ -methylene ATP  $\succ$  adenosine = uridine = 0 となった。

Adenosine が全く収縮反応を生じなかったことから、 $\text{P}_1$  受容体は関与していないと考えられる。また力価の順序から、収縮反応には  $\text{P}_{2Y}$  受容体が関与していることが示



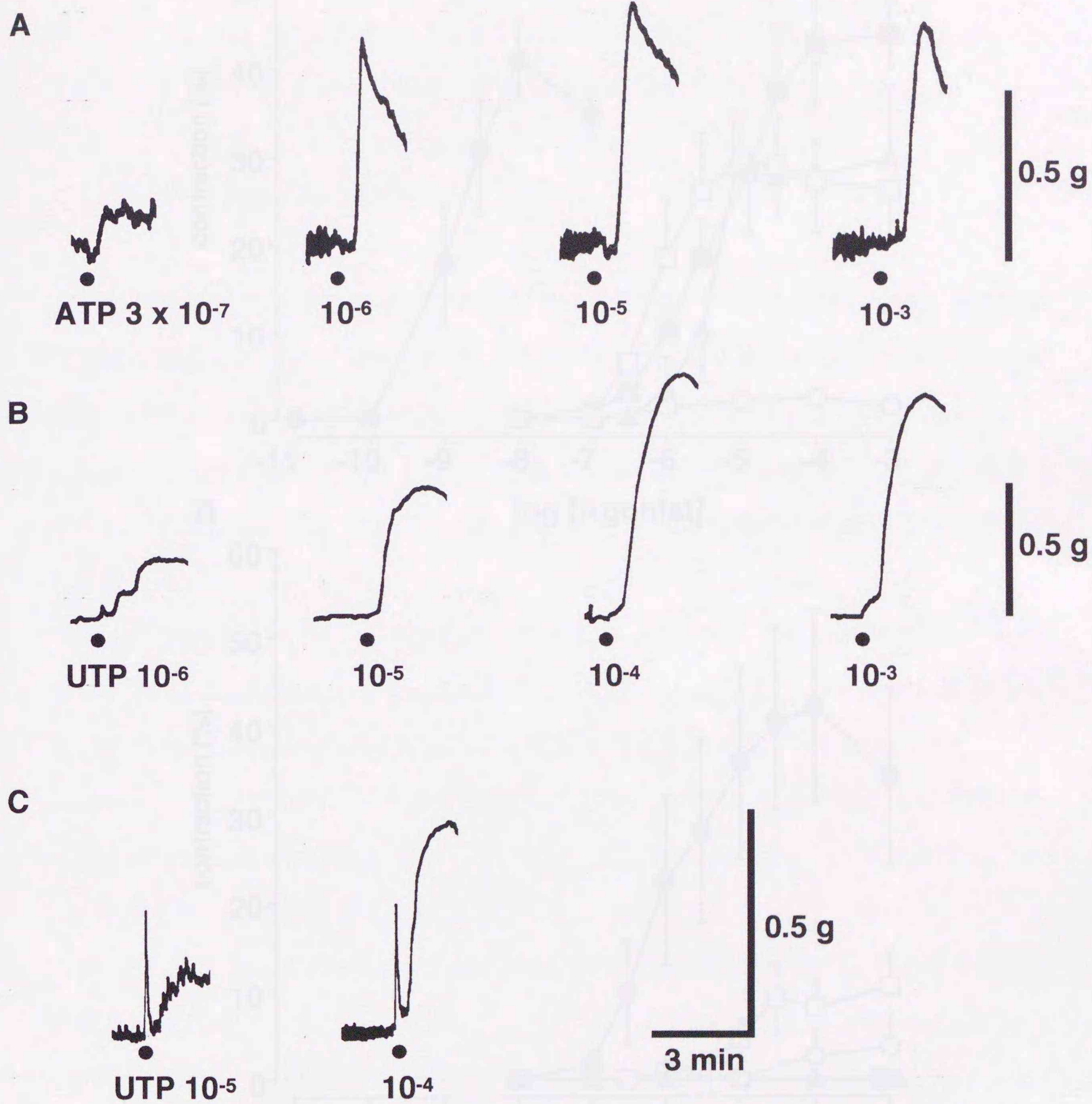


図16 ATP及びUTPによる収縮反応

静止張力の標本に、ATP (A) 及びUTP (B, C) を投与した (●) . 数字は投与した薬物の濃度 (M) を表している. 反応はそれぞれ異なる3つの標本より得た.



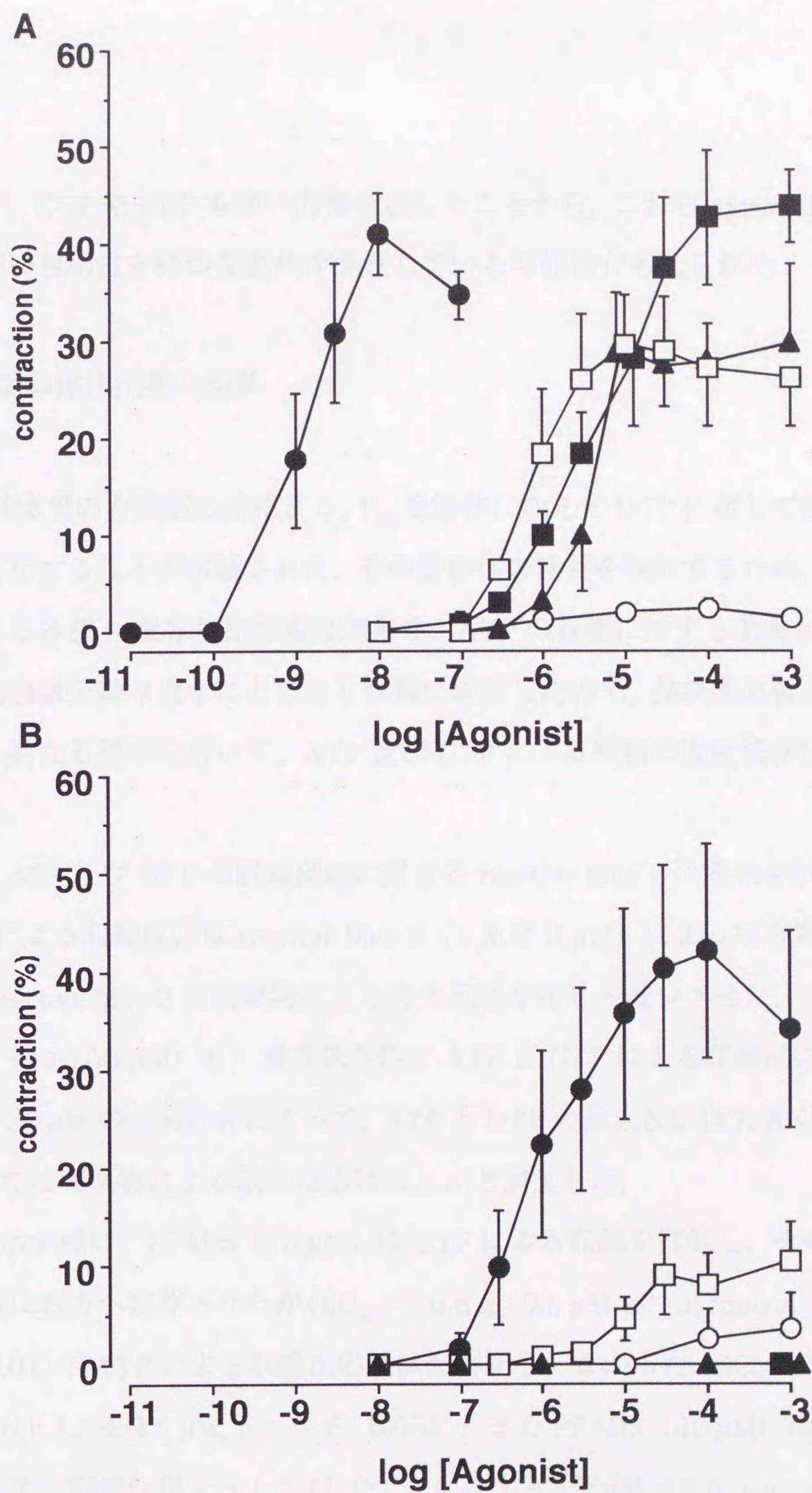


図17 ATP, UTP及び各種関連物質による収縮反応の濃度依存性曲線

静止張力の標本に, (A) 2-methylthio ATP (●), ATP (□), ATP $\gamma$ S (▲), UTP (■),  $\alpha,\beta$ -methylene ATP (○) 及び (B) UDP (●), UMP (□), CTP (○), uridine (▲), adenosine (■) をそれぞれ投与した. 縦軸は carbachol (1  $\mu$ M) 収縮に対する百分率で, 横軸は各薬物濃度を対数値で表している. 値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 4-6) で示している.



唆されたが、UTP や UDP も強い力価を示したことから、これら pyrimidine nucleotide に対して高い親和性を持つ受容体が混在している可能性が考えられた。

## 2 プリン受容体拮抗薬の効果

ATP 類似物質の力価順の結果より、 $P_{2Y}$  受容体に加えて UTP に対して親和性の高い受容体が存在することが示唆された。その受容体の性質を検討するため、UTP の収縮反応に対する各種  $P_2$  受容体拮抗薬の効果を、ATP の収縮に対する効果と比較した。収縮反応は刺激を繰り返すことにより容易に減衰したので、拮抗薬処置と溶媒処置下でそれぞれ異なる標本を用いて、ATP 及び UTP による収縮の濃度依存性反応を記録し比較した。

図 18 に ATP 及び UTP の収縮反応に対する reactive blue 2 の効果を示した。ATP 及び UTP による収縮反応は reactive blue 2 (1 及び 3  $\mu\text{M}$ ) によって有意に抑制された。また reactive blue 2 は両薬物による最大反応を著しく減少させた。

Suramin (10-100  $\mu\text{M}$ ) も、濃度依存性に ATP と UTP による収縮反応を抑制した (図 19)。30  $\mu\text{M}$  の suramin によって、ATP と UTP の最大反応は大きく減少し、100  $\mu\text{M}$  存在下では両薬物による収縮反応はほとんど消失した。

図 20 に示す様に、PPADS (30  $\mu\text{M}$ ) は UTP による収縮を抑制し、その濃度依存性曲線を有意に右方へ変位させたが ( $EC_{50} = 50.6 \pm 10.5 \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ; control:  $6.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ) , ATP による収縮反応には影響を与えなかった ( $EC_{50} = 2.7 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ; control:  $1.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ,  $P > 0.05$ ) 。また PPADS (30  $\mu\text{M}$ ) は UDP の収縮反応に対しても抑制作用を示したが ( $EC_{50} = 48.6 \pm 8.7 \mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ; control:  $13.9 \pm 4.7 \mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ) , 2-methylthio ATP の収縮反応にはほとんど影響を与えなかった ( $EC_{50} = 6.1 \pm 0.4 \text{ nM}$ ,  $n = 5$ ; control:  $4.8 \pm 1.3 \text{ nM}$ ,  $n = 5$ ,  $P > 0.05$ ) 。

以上に述べた様に、ATP 及び UTP による収縮反応は、reactive blue 2 及び suramin によって抑制を受け、その感受性に大きな差は見られなかった。それに対して PPADS



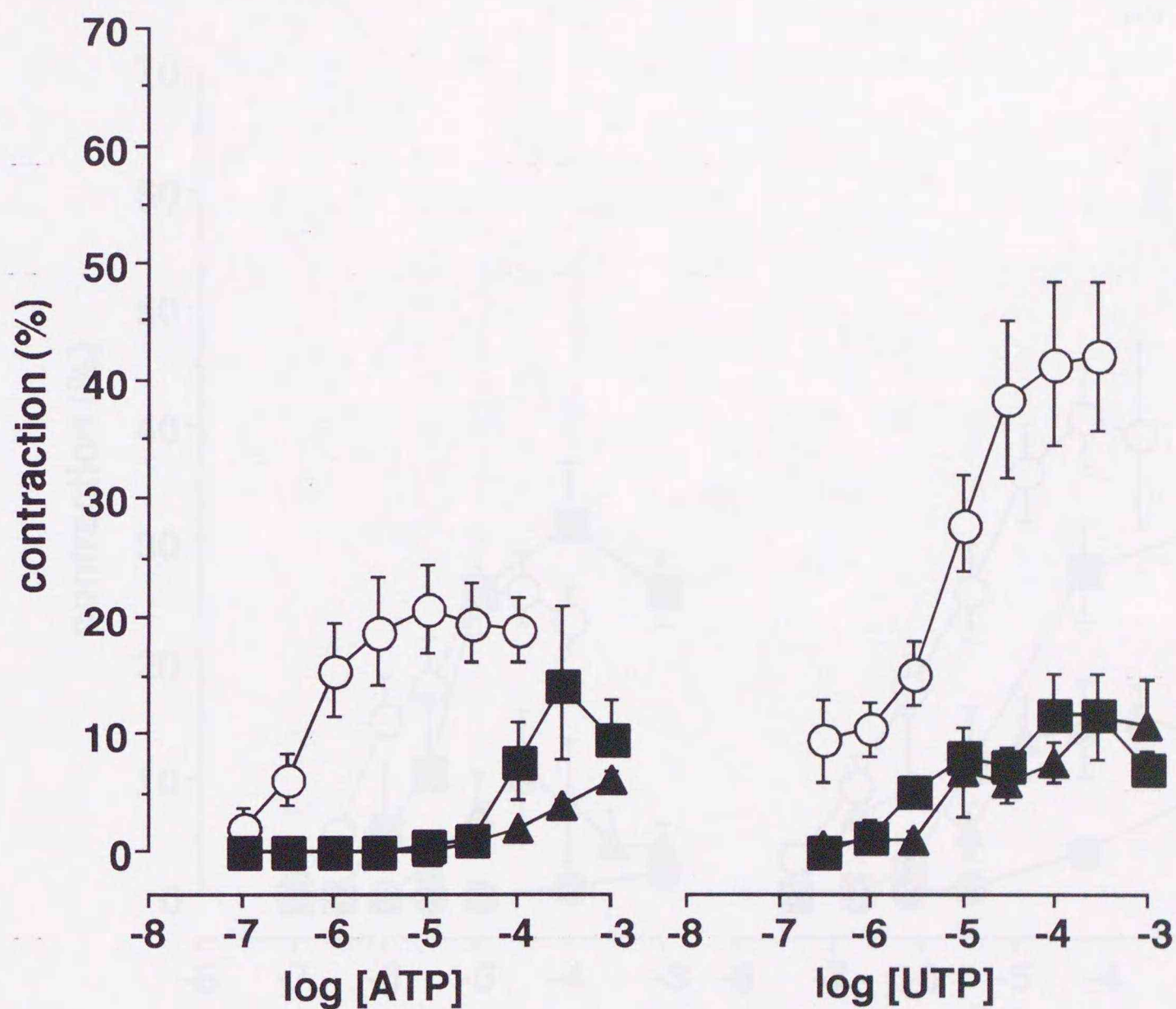


図18 ATP及びUTPの収縮反応に対するreactive blue 2の効果

静止張力の標本に、reactive blue 2 ( $1 \mu\text{M}$ : ■,  $3 \mu\text{M}$ : ▲) 又は溶媒存在下 (○) で、ATP (左) 及びUTP (右) を投与した。縦軸はacetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) 収縮に対する百分率で、横軸は各薬物濃度を対数値で表している。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4-9$ ) で示している。



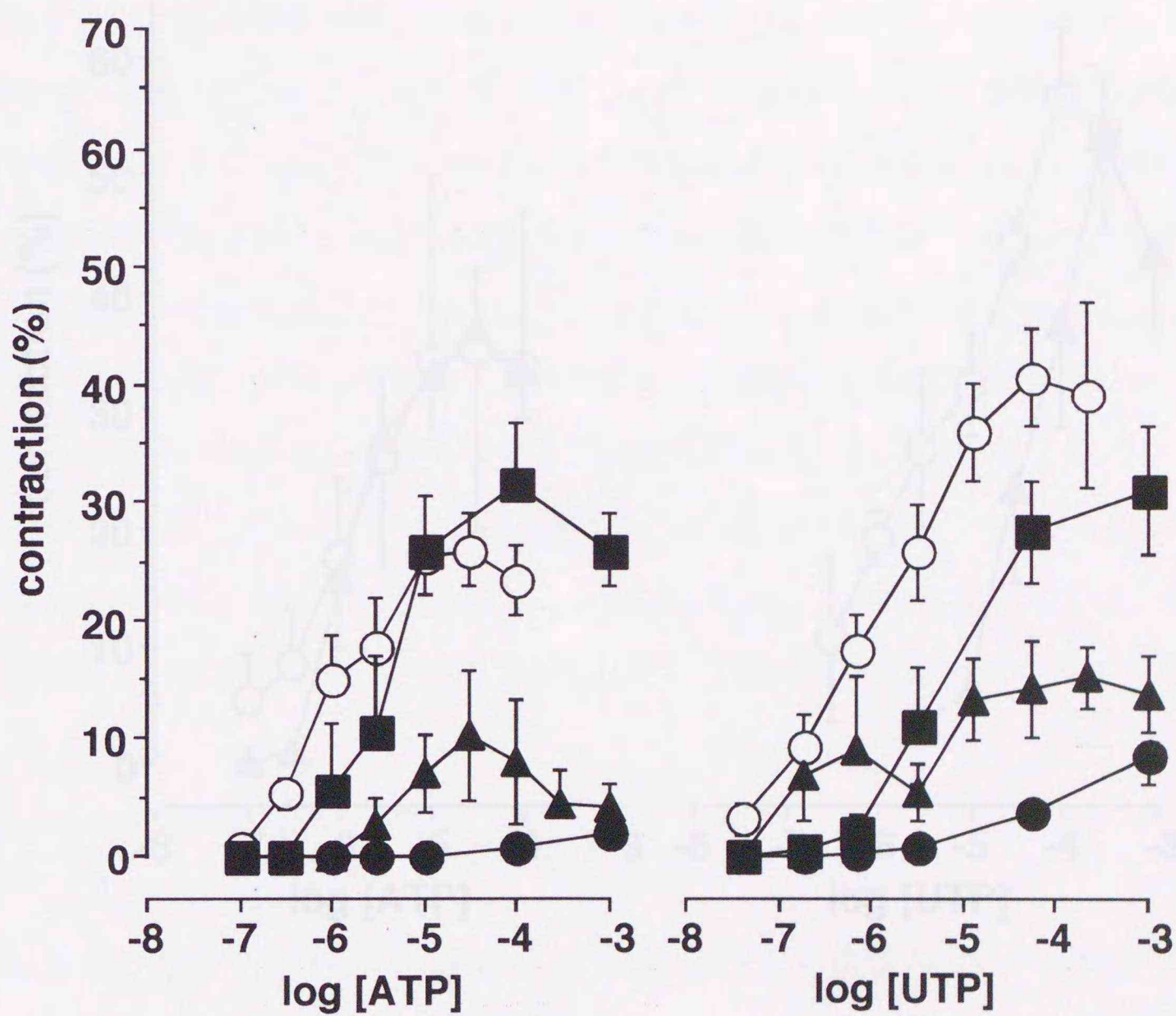


図19 ATP及びUTPの収縮反応に対するsuraminの効果

静止張力の標本に、suramin (10  $\mu$ M: ■, 30  $\mu$ M: ▲, 100  $\mu$ M: ●) 又は溶媒存在下 (○) でATP (左) 及びUTP (右) を投与した。縦軸はcarbachol (1  $\mu$ M) 収縮に対する百分率で、横軸は各薬物濃度を対数値で表している。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 3-10) で示している。



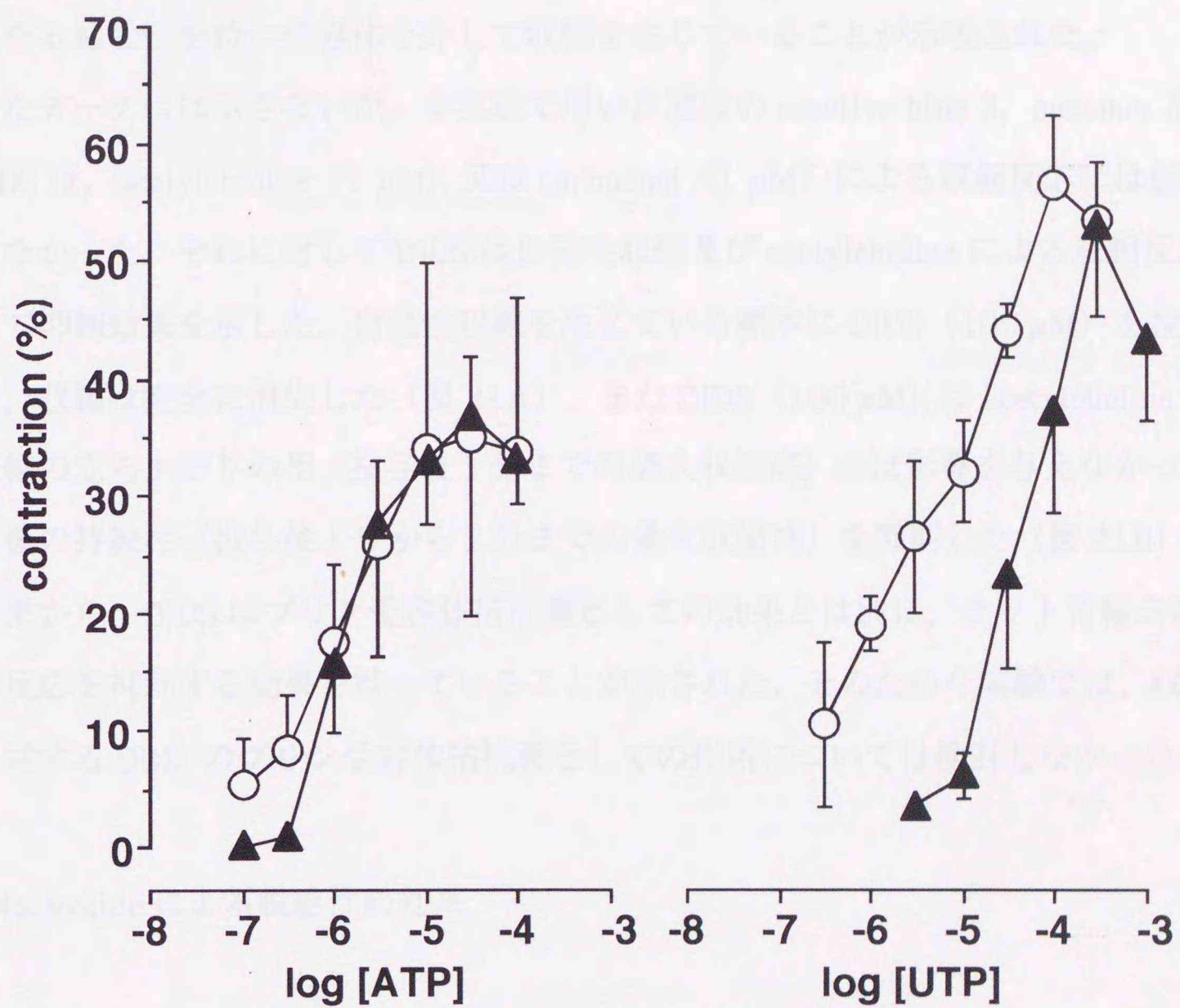


図20 ATP及びUTPの収縮反応に対するPPADSの効果

静止張力の標本に、PPADS (30  $\mu$ M:  $\blacktriangle$ ) 又は溶媒存在下 ( $\circ$ ) で、ATP (左) 及びUTP (右) を投与した。縦軸はacetylcholine (1  $\mu$ M) 収縮に対する百分率で、横軸は各薬物濃度を対数値で表している。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 5) で示している。



は UTP による収縮反応に対して抑制効果を示したが, ATP の収縮反応には影響を与えず, さらに PPADS は 2-methylthio ATP の収縮には影響を与えずに UDP の収縮を抑制したことから, adenine nucleotide と pyrimidine nucleotide がそれぞれ PPADS に対して異なる感受性を持つ受容体を介して収縮を生じていることが示唆された。

またデータには示さないが, 本実験で用いた濃度の reactive blue 2, suramin 及び PPADS は, acetylcholine ( $1\ \mu\text{M}$ ) 又は carbachol ( $1\ \mu\text{M}$ ) による収縮反応には影響を与えなかった。それに対して DIDS は自発性収縮及び acetylcholine による収縮反応に対して抑制効果を示した。自発性収縮を生じている標本に DIDS ( $100\ \mu\text{M}$ ) を投与すると, 収縮は完全に消失した (図 21A)。また DIDS ( $100\ \mu\text{M}$ ) は acetylcholine による収縮の立ち上がりの相 (投与後 1 分までの最大収縮高) には影響を与えなかったが, その後の持続相 (投与後 1 分から 2 分までの最大収縮高) を抑制した (図 21B)。この結果から, DIDS はプリン受容体拮抗薬としての効果とは別に, ラット胃輪走筋の収縮反応を抑制する効果を持っていることが示された。そのため今実験では, 収縮反応に対する DIDS のプリン受容体拮抗薬としての作用については検討しなかった。

### 3 Nucleotide による脱感作の効果

これまでの実験結果から, nucleotide による収縮反応に複数の受容体が関与していることが示唆された。UTP や UDP はこれら pyrimidine nucleotide に親和性の高い受容体, 即ち ATP と UTP に同程度の親和性を持つ  $P_{2U}$  受容体 (O'Connor *et al.*, 1991; Conigrave & Jiang, 1995) か, あるいは adenine nucleotide に対してはほとんど親和性を持たず pyrimidine nucleotide に特異的な親和性を持つピリミジン受容体 (Seifert & Schultz, 1989; Anderson & Parkinson, 1997; Communi & Boeynaems, 1997) かに作用していると考えられる。ピリミジン受容体を介する反応では, UTP の反応は adenine nucleotide による脱感作 (desensitization) に影響を受けない (Häussinger *et al.*, 1987; von Kügelgen *et al.*, 1987; von Kügelgen & Starke, 1990; Johnson & Hourani, 1994;



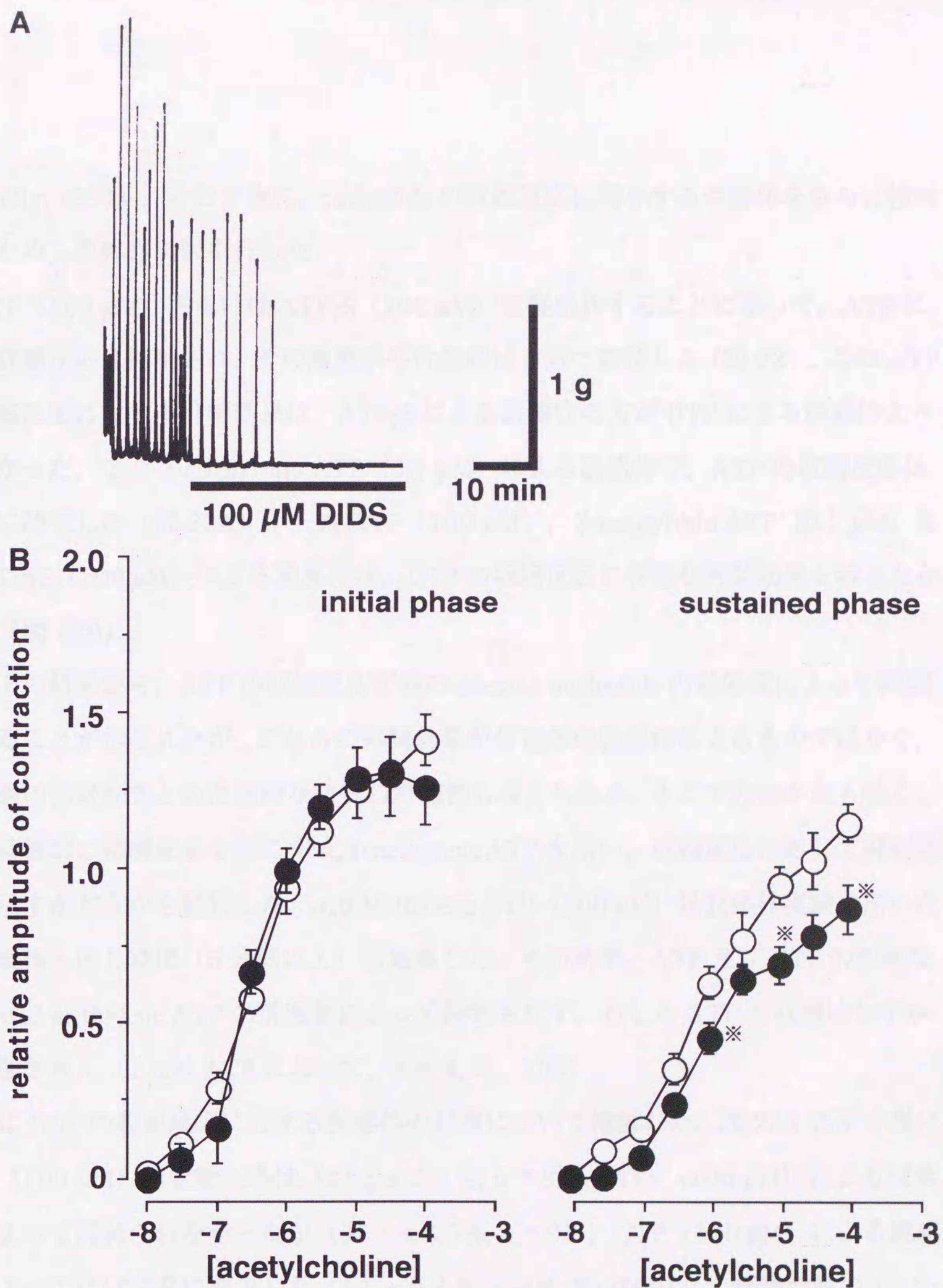


図21 自発性及びacetylcholine収縮に対するDIDSの効果

(A) 自発性収縮が生じている標本に、DIDS ( $100 \mu\text{M}$ ) を投与した。代表的なデータを示す。他の3標本でも同様の結果が得られた。(B) 静止張力の標本に投与したacetylcholineによる収縮反応の、立ち上がりの相 (initial phase; 投与後1分までの最大収縮高) 及び持続相 (sustained phase; 投与後1分から2分までの最大収縮高) の収縮高を示す。縦軸はDIDS ( $100 \mu\text{M}$ : ●) 又は溶媒存在下 (○) における2回目の濃度依存性収縮反応を、一回目の濃度依存性反応のacetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) 収縮に対する相対値で表した。横軸はacetylcholineの濃度を対数値で表している。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4$ ) で示している。※は統計的有意 ( $P < 0.05$ ) を表している。



Connolly, 1994) . そこで次に, nucleotide の収縮反応に関与する受容体をさらに検討するため, 脱感作実験を行った.

UTP ( $100\ \mu\text{M}$ ) あるいは  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  ( $100\ \mu\text{M}$ ) で脱感作することによって, ATP による収縮反応は抑制され, その濃度依存性曲線は右方へ変位した (図 22) . この ATP の収縮反応に対する抑制効果は,  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  による脱感作の方が UTP による脱感作よりも強かった. また 2-methylthio ATP ( $0.1\ \mu\text{M}$ ) による脱感作で, ATP の収縮反応は完全に消失した (図 22A) . 一方 ATP ( $100\ \mu\text{M}$ ) , 2-methylthio ATP ( $0.1\ \mu\text{M}$ ) 及び  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  ( $100\ \mu\text{M}$ ) による脱感作は, UTP の収縮反応に有意な抑制効果を示さなかった (図 22B) .

以上の結果から, ATP の収縮反応が他の adenine nucleotide の前処置によって抑制されることが示されたが, これらの抑制効果が受容体の脱感作によるものではなく, 各薬物の弛緩効果との生理的な拮抗の可能性も考えられる. そこで力価が最も強く, かつ持続的に弛緩反応を起こす  $\alpha,\beta$ -methylene ATP を用い, 収縮反応に対して抑制効果を示すかどうかを検討した.  $\alpha,\beta$ -Methylene ATP ( $100\ \mu\text{M}$ ) は脱感作実験に用いた他の薬物と同じ時間 (5 分間以上) 前処置した. その結果, ATP 及び UTP の収縮反応は  $\alpha,\beta$ -methylene ATP の前処置によって抑制されず, むしろ ATP の収縮はわずかに増強された ( $1\ \text{mM}$  ATP において,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) .

次に UDP の収縮反応に対する脱感作の影響について検討した. 図 23A に示す様に, UDP ( $100\ \mu\text{M}$ ) の収縮反応は ( $31.5 \pm 3.3\%$ ,  $n = 9$ ) , ATP ( $100\ \mu\text{M}$ ) による脱感作によって抑制されなかったが ( $31.1 \pm 6.0\%$ ,  $n = 9$ ) , UTP ( $100\ \mu\text{M}$ ) による脱感作によってほぼ完全に消失した ( $1.1 \pm 0.7\%$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.001$ ) . 薬物洗浄の 15 分後では, UDP の収縮は部分的に回復した ( $17.4 \pm 4.4\%$ ,  $n = 9$ ) . また, ATP ( $100\ \mu\text{M}$ ) の収縮反応は ( $25.9 \pm 6.6\%$ ,  $n = 9$ ) , 2-methylthio ATP ( $0.1\ \mu\text{M}$ ) による脱感作でほとんど消失したが ( $0.3 \pm 0.2\%$ ,  $n = 9$ ) , UDP の収縮反応は ( $33.6 \pm 6.5\%$ ,  $n = 9$ ) , 2-methylthio ATP による脱感作では有意な抑制を受けなかった ( $37.1 \pm 7.5\%$ ,  $n = 9$ ) .

次に UTP と UDP の収縮反応に対する, 2-methylthio ATP ( $0.1\ \mu\text{M}$ ) と  $\alpha,\beta$ -methylene



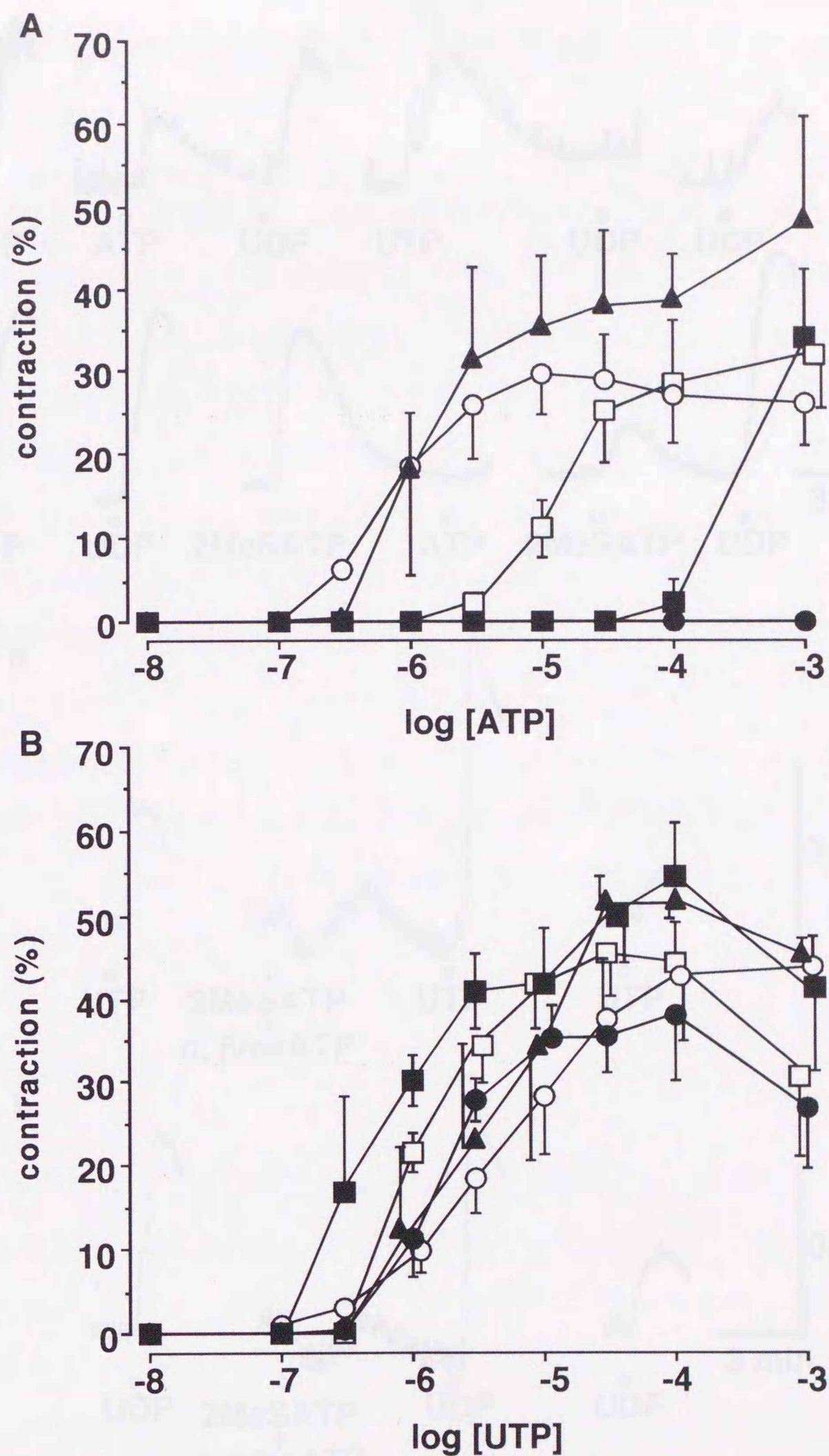


図22 ATP及びUTPの収縮反応に対する脱感作の効果

静止張力の標本に、ATP (A) 又はUTP (B) を投与した。縦軸はコントロール (○) 又は100  $\mu$ M UTP (A: □), 100  $\mu$ M ATP (B: □), 100  $\mu$ M ATP $\gamma$ S (■) 及び0.1  $\mu$ M 2-methylthio ATP (●) で脱感作あるいは100  $\mu$ M  $\alpha,\beta$ -methylene ATP (▲) で前処置した標本における収縮反応を、acetylcholine (1  $\mu$ M) 収縮に対する百分率で表している。横軸は各薬物濃度を対数値で表している。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 4-6) で示している。



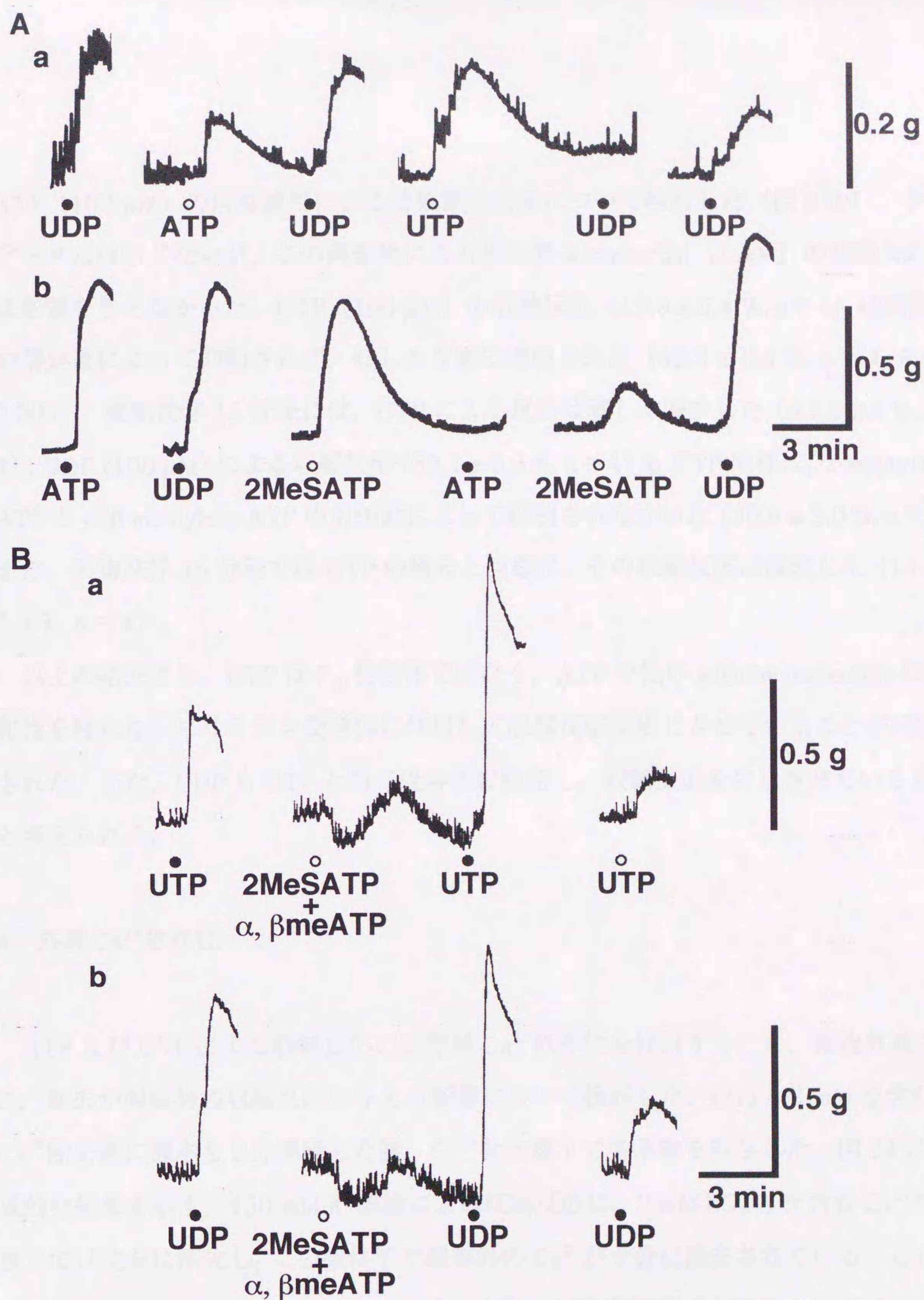


図23 Pyrimidine nucleotideの収縮反応に対する脱感作の効果

(A) 100  $\mu$ M ATP, 100  $\mu$ M UTP (a) あるいは0.1  $\mu$ M 2-methylthio ATP (2MeSATP, b) で脱感作した標本におけるUDP (100  $\mu$ M) の収縮反応の、それぞれ異なる2つの標本から得られた代表的な結果を示す。(B) 0.1  $\mu$ M 2-methylthio ATP (2MeSATP) 及び100  $\mu$ M  $\alpha, \beta$ -methylene ATP ( $\alpha, \beta$ meATP) を同時に前処置した標本における100  $\mu$ M UTP (a) 及び100  $\mu$ M UDP (b) の収縮反応の、それぞれ異なる2標本から得られた代表的な結果を示す。



ATP (100  $\mu$ M) の同時適用による前処置の効果について検討した (図 23B) . なおデータには示さないが, この両薬物による前処置は carbachol (1  $\mu$ M) の収縮反応には影響を与えなかった. UTP (100  $\mu$ M) の収縮反応 ( $19.9 \pm 5.4$  %,  $n = 4$ ) は両薬物の前処置によって抑制されず, むしろ有意に増強された ( $42.3 \pm 8.4$  %,  $n = 4$ ,  $P < 0.005$ ) . 薬物洗浄 15 分後には, UTP による反応は著しく減少した ( $6.2 \pm 2.3$  %,  $n = 4$ ) . UDP (100  $\mu$ M) による収縮反応 ( $33.1 \pm 6.3$  %,  $n = 4$ ) も UTP 同様に, 2-methylthio ATP と  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の前処置によって抑制されなかった ( $30.6 \pm 3.0$  %,  $n = 4$ ) . また, 薬物洗浄 15 分後では UTP の場合と同様に, その収縮反応は減衰した ( $14.2 \pm 2.4$  %,  $n = 4$ ) .

以上の結果より, UTP は  $P_{2U}$  受容体ではなく, ATP や他の adenine nucleotide に親和性を持たないピリミジン受容体に作用して収縮反応を生じさせていることが示唆された. また, UDP も UTP と同じ受容体に作用し, 収縮反応を生じさせているものと考えられる.

#### 4 外液 $Ca^{2+}$ 依存性

ATP 及び UTP による収縮反応の細胞外  $Ca^{2+}$  依存性を検討するため, 細胞外液の  $Ca^{2+}$  除去が両薬物の収縮反応に与える影響について検討した. EGTA 2 mM を含む  $Ca^{2+}$  除去液に標本を 2 分間曝した後,  $Ca^{2+}$  除去液下で各薬物を投与した. 図 24 に代表的な結果を示す. 150 mM  $K^+$  溶液による収縮反応は, 2 mM EGTA を含む  $Ca^{2+}$  除去液下では完全に消失し, この条件下で細胞外の  $Ca^{2+}$  が十分に除去されていることが示された. 一方, carbachol (100  $\mu$ M) は, 外液  $Ca^{2+}$  非存在下でも細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  放出によると考えられる, 小さな一過性の収縮反応を引き起こした. これに対して UTP (100  $\mu$ M) 及び ATP (100  $\mu$ M) は,  $Ca^{2+}$  除去液下で収縮反応を全く起こさなかった.

ATP 及び UTP の収縮反応は細胞外の  $Ca^{2+}$  に依存していることが示されたので, 次



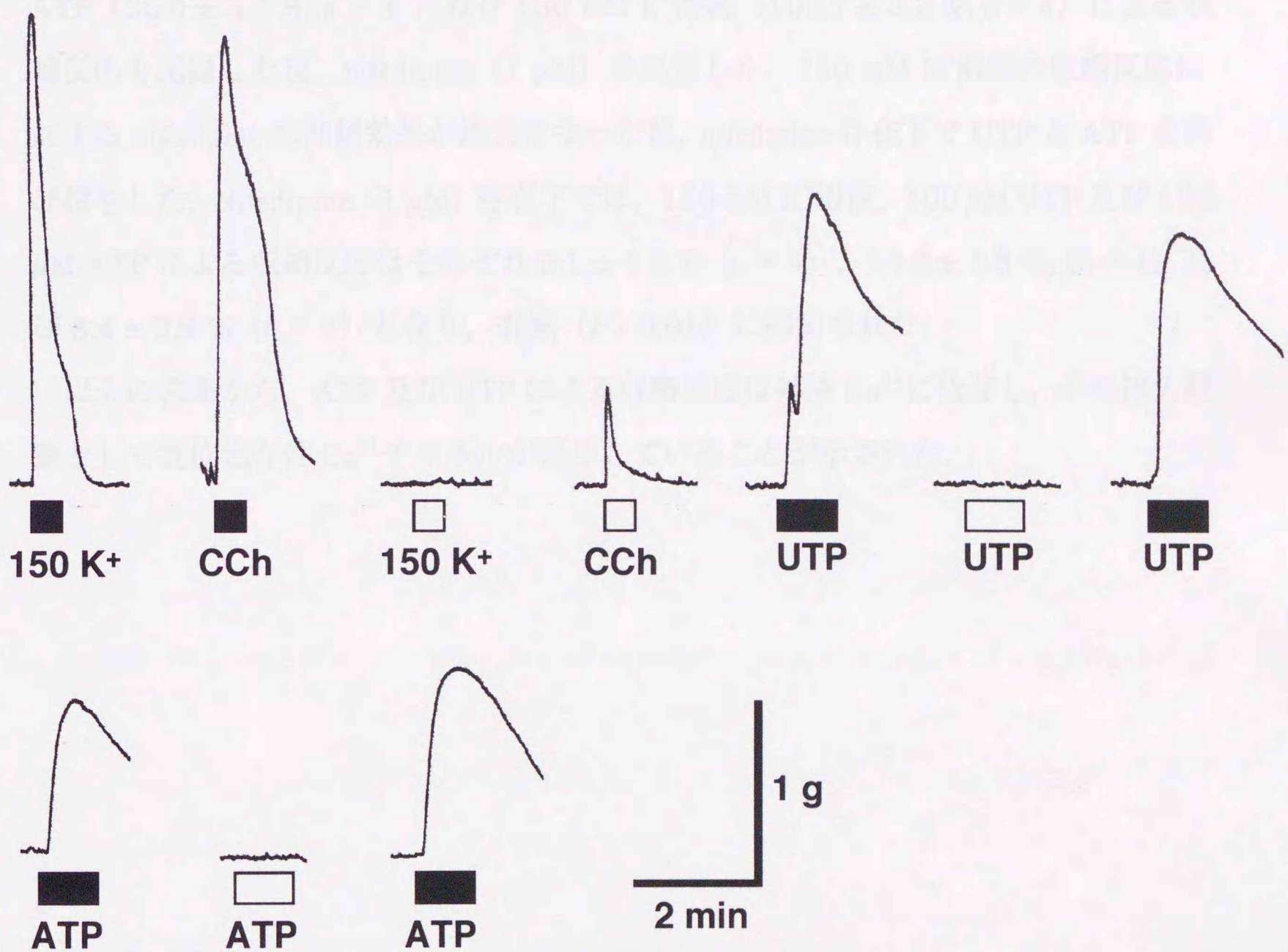


図24 ATP及びUTPの収縮反応に対する外液Ca<sup>2+</sup>除去の影響

外液Ca<sup>2+</sup>存在下 (■) 又は非存在下 (□) における150 mM K<sup>+</sup> (150 K<sup>+</sup>) , 100  $\mu$ M carbachol (CCh) , 100  $\mu$ M UTP (UTP) 及び100  $\mu$ M ATP (ATP) による収縮反応の, 同一標本から得られた典型的なデータを示す. 外液Ca<sup>2+</sup>の除去は, 標本を2 mM EGTAを含むCa<sup>2+</sup>除去溶液に2分間曝すことによって行った. 同様の結果が他の6標本から得られた.



に電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル遮断薬である nifedipine の影響について検討した。図 25 に示す様に、nifedipine 非存在下での  $100\text{ }\mu\text{M}$  UTP ( $42.0 \pm 6.7\%$ ,  $n = 4$ ) ,  $100\text{ }\mu\text{M}$  ATP ( $35.0 \pm 3.7\%$ ,  $n = 4$  ) 及び  $150\text{ mM}$   $\text{K}^+$  溶液 ( $105.7 \pm 8.2\%$ ,  $n = 4$ ) による収縮反応を記録した後、nifedipine ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ) を処置した。  $150\text{ mM}$   $\text{K}^+$  溶液の収縮反応に対する nifedipine の抑制効果が最大になった後、nifedipine 存在下で UTP と ATP を再び投与した。 Nifedipine ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ) 存在下では、  $150\text{ mM}$   $\text{K}^+$  溶液、  $100\text{ }\mu\text{M}$  UTP 及び  $100\text{ }\mu\text{M}$  ATP による収縮反応はそれぞれ  $5.1 \pm 1.3\%$  ( $n = 4$ ) ,  $14.2 \pm 1.8\%$  ( $n = 4$ ) 及び  $8.4 \pm 3.9\%$  ( $n = 4$ ) となり、有意 ( $P < 0.01$ ) に抑制された。

以上の結果から、ATP 及び UTP による収縮反応は外液  $\text{Ca}^{2+}$  に依存し、その流入経路として電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが関与していることが示された。



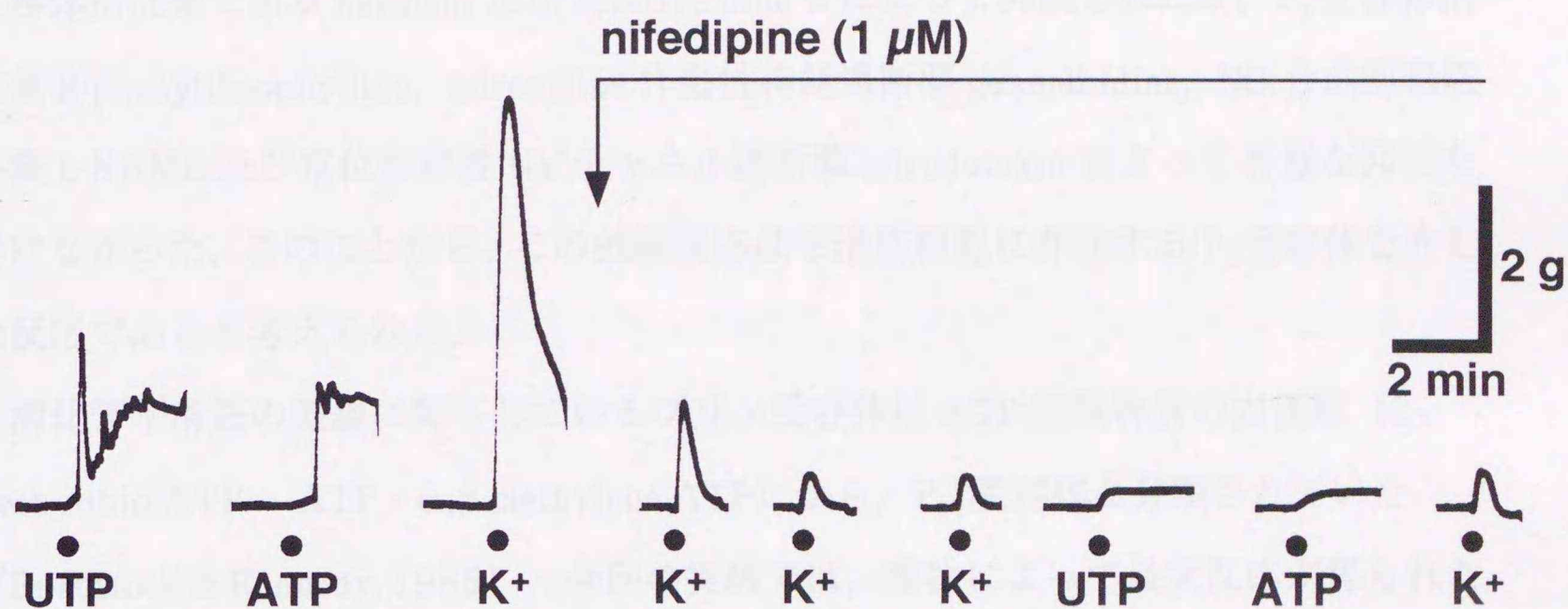


図25 ATP及びUTPの収縮反応に対するnifedipineの効果

100  $\mu\text{M}$  UTP (UTP), 100  $\mu\text{M}$  ATP (ATP) 及び150 mM  $\text{K}^+$ 溶液 ( $\text{K}^+$ ) をそれぞれ投与 (●) した後, nifedipine (1  $\mu\text{M}$ ) を処置した (↓). Nifedipineによる150 mM  $\text{K}^+$ 溶液による収縮反応に対する抑制効果が最大になった後, nifedipine存在下でUTP及びATPを再び投与した. 同一標本から得られた典型的なデータを示す. 同様の結果が他の3標本から得られた.



#### IV 考察

##### A 弛緩反応に関与するプリン受容体

ATP はラット胃輪走筋で弛緩反応を引き起こすことが示された。この弛緩反応は  $P_2$  受容体拮抗薬である suramin 及び reactive blue 2 によって抑制されたが、 $P_1$  受容体拮抗薬 8-phenyltheophylline, adrenaline 作動性神経遮断薬 guanethidine, NO 合成酵素阻害薬 L-NAME 及び電位依存性  $Na^+$  チャンネル遮断薬 tetrodotoxin によって有意な抑制を受けなかった。このことから、この弛緩反応は平滑筋細胞に存在する  $P_2$  受容体を介した反応であると考えられる。

消化管平滑筋の弛緩に関与しているプリン受容体は ATP 類似物質の力価順 (2-methylthio ATP  $\gg$  ATP  $\succ$   $\alpha,\beta$ -methylene ATP) から、 $P_{2Y}$  受容体と分類されていた (Burnstock & Kennedy, 1985)。今回の実験では、薬物によって最大反応が得られないものもあり正確な力価の順序を決定することができなかったが、 $EC_{50}$  を基準にすると  $\alpha,\beta$ -methylene ATP が最も強い弛緩反応を示した。 $\alpha,\beta$ -Methylene ATP が比較的強い力価を示す弛緩反応には、ラット胃底部縦走筋ではその力価順 (2-methylthio ATP  $\succ$   $\alpha,\beta$ -methylene ATP  $\succ$  ATP) から  $P_{2X}$  (Matharu & Hollingsworth, 1992)、あるいは  $P_{2X}$  や  $P_{2Y}$  とは異なる受容体 (Lefebvre & Burnstock, 1990) が関与していると報告されている。またいずれの報告においても、 $\alpha,\beta$ -methylene ATP による脱感作によって ATP の弛緩反応が抑制されることから、ATP と  $\alpha,\beta$ -methylene ATP は同じ受容体に作用していると考えられている。ラット胃輪走筋では、 $\alpha,\beta$ -methylene ATP の弛緩反応は容易に脱感作することがなかったため、脱感作による影響を検討することが出来なかった。しかし  $P_2$  受容体拮抗薬を用いた実験で、suramin, PPADS 及び DIDS は、 $\alpha,\beta$ -methylene ATP の弛緩反応に対して濃度依存性の抑制効果を示したが、ATP の弛緩反応に対しては、suramin は高濃度でのみわずかな抑制を示し、また PPADS と DIDS は高濃度を用いても全く抑制効果を示さなかったことから、ATP と  $\alpha,\beta$ -methylene ATP



は異なる受容体を介して弛緩反応を起こすことが示唆された。

一方 suramin と PPADS は ectonucleotidase の活性を阻害し ATP の分解を抑制することが知られているが (Hourani & Chown, 1989; Khakh *et al.*, 1995), suramin が ATP の収縮反応を完全に抑制していることや, PPADS の ectonucleotidase 阻害効果は弱いことから (Windscheif *et al.*, 1995), 本実験での酵素阻害効果の影響はほとんどないと考えられる。モルモット盲腸紐においても, PPADS と DIDS が  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の弛緩反応を強く抑制するが, ATP や 2-methylthio ATP あるいは ADP $\beta$ S の弛緩反応に対する抑制は弱い (Windscheif *et al.*, 1995; Dudeck *et al.*, 1995), あるいは抑制しないことが示されている (Piper & Hollingsworth, 1995)。さらに, 2-methylthio ATP と  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の弛緩反応の間に脱感作による抑制が見られないこと (Dudeck *et al.*, 1995), XAMR0721 (8-(3,5-dinitro-phenylenecarbonylimino)-1,3,5-naphthalenetrisulphonic acid) は  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の弛緩反応を強く抑制するが ADP $\beta$ S の弛緩反応に対する抑制は弱いこと (Bültmann *et al.*, 1996), またこれとは逆に reactive red 2 は,  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の弛緩反応よりも ADP $\beta$ S の弛緩反応を強く抑制すること (Bültmann & Starke, 1995) 等の報告から, 弛緩に関して 2 種類のプリン受容体が存在することが示唆されている。

ラット胃輪走筋においても, 弛緩反応には PPADS と DIDS に感受性の受容体と, これらの拮抗薬に対して耐性の受容体という 2 種類のプリン受容体が存在していると考えられる。PPADS と DIDS に耐性の受容体は恐らく古くから報告されている  $P_{2Y}$  受容体と考えられる。一方,  $\alpha, \beta$ -methylene ATP によって活性化され, PPADS 及び DIDS に抑制を受ける受容体サブタイプに関しては, その薬理学的特性は  $P_{2X}$  受容体に類似しているが, 正確な分類同定には今後更なる検討が必要である。

## B 収縮反応に関与するプリン受容体

ラット胃輪走筋において, ATP は弛緩反応に加えて, 収縮反応も引き起こすことが



示された。収縮反応における ATP 関連物質の力価順は、2-methylthio ATP  $\gg$  ATP  $\geq$  UDP = UTP  $\geq$  ATP $\gamma$ S  $\gg$  UMP  $\succ$  CTP =  $\alpha,\beta$ -methylene ATP  $\succ$  adenosine = uridine = 0 であり、P<sub>2Y</sub>受容体の関与が示唆された (Dubyak & El-Moatassim, 1993; Fredholm *et al.*, 1994)。ATP による収縮反応は reactive blue 2 と suramin によって抑制を受けたが、PPADS では抑制されなかった。PPADS は P<sub>2Y</sub>受容体に対する抑制効果が低いことが示されており (Ziganshin *et al.*, 1993; 1994; McLaren *et al.*, 1994)，このことから P<sub>2Y</sub>受容体の関与が示唆される。P<sub>2Y</sub>受容体を介した収縮反応はラット結腸粘膜筋板や胃底部縦走筋、新生ラット十二指腸粘膜筋板でも報告されている (Bailey & Hourani, 1990; Matharu & Hollingsworth, 1992; Hourani *et al.*, 1993; Brownhill *et al.*, 1997)。またラット胃輪走筋では pyrimidine nucleotide である UTP 及び UDP によっても収縮反応が生じた。UTP はマウス精管では P<sub>2X</sub>受容体 (von K gelgen *et al.*, 1990)，ラット結腸粘膜筋板では P<sub>2Y</sub>受容体にそれぞれ作用し、その力価は ATP に比べてかなり弱いことが示されている。UTP による小さな弛緩反応や、UTP の脱感作による ATP 収縮のわずかな抑制は、UTP の P<sub>2Y</sub>受容体に対する親和性が低いためだと考えられる。しかしながら、UTP 及び UDP による収縮反応は ATP とほぼ同じ力価で生じたことから、P<sub>2X</sub>や P<sub>2Y</sub>受容体以外のこれら pyrimidine nucleotide に高い親和性をもつ受容体が存在することが示唆された。

### C Pyrimidine nucleotide の作用する受容体

プリン受容体のサブタイプには、UTP と ATP に高い親和性を持つ P<sub>2U</sub>受容体 (ヌクレオチド受容体: nucleotide receptors) と呼ばれるサブタイプが存在し、この受容体では UTP の反応は adenine nucleotide による脱感作によって抑制される (O'Connor *et al.*, 1991; O'Connor, 1992; Fredholm *et al.*, 1994)。しかしながら、本実験では、ATP の収縮反応が 2-methylthio ATP や ATP $\gamma$ S の脱感作によって著しく抑制されたにもかかわらず、UTP の収縮反応は ATP 等の adenine nucleotide の脱感作によって全く抑制



されず、UTP が作用する受容体は  $P_{2U}$  受容体ではないことが示唆された。なお、脱感作実験において ATP や UTP の収縮反応の増強が一部観察されたが、ラット胃底部でも  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の脱感作によって ATP や 2-methylthio ATP の収縮反応が増強されることが報告されている (Matharu & Hollingsworth, 1992)。この増強の機構は明らかではないが、弛緩反応の部分的な脱感作によって生じているのではないかと考えられる。

ラット灌流肝標本 (Häussinger *et al.*, 1987) またはウサギ耳動脈 (von Kügelgen *et al.*, 1987) では、UTP が ATP とは全く異なる受容体に作用することが報告され、ピリミジン受容体 (pyrimidinoceptors) の存在が提唱された (Seifert & Schultz, 1989)。ラット上頸神経節においても、ATP による脱分極が  $\alpha, \beta$ -methylene ATP の脱感作によって抑制されるにも関わらず、UTP の脱分極は影響を受けないことからピリミジン受容体の存在が示唆されている (Connolly *et al.*, 1993; Connolly, 1994)。ラット胃輪走筋で UTP や UDP による収縮反応が adenine nucleotide の脱感作によって抑制されなかったことから、これら pyrimidine nucleotide はピリミジン受容体を介して収縮を生じている可能性が考えられる。

Suramin と reactive blue 2 は UTP と ATP の収縮反応をどちらも抑制したが、PPADS は UTP の反応だけを抑制した。現在ピリミジン受容体は 2 種類がクローニングされており (Communi & Boeynaems, 1997)、そのうちの一つは reactive blue 2, suramin 及び PPADS によって抑制されることが示されている (Chang *et al.*, 1995; Robaye *et al.*, 1997)。ラット十二指腸及び上頸神経節のピリミジン受容体を介する反応は、suramin や reactive blue 2 で抑制されないと報告されているが (Connolly *et al.*, 1993; Connolly & Harrison, 1994; Johnson & Hourani, 1994)、恐らくこれは異なったサブタイプのピリミジン受容体が関与しているためだと考えられる。

以上の結果より、ラット胃輪走筋では UTP や UDP は  $P_2$  受容体とは異なるピリミジン受容体を介して収縮反応を生じ、この受容体は  $P_2$  受容体拮抗薬である reactive blue 2, suramin 及び PPADS に感受性であることが示された。



#### D Nucleotide による弛緩, 収縮反応の機序について

ATP は消化管平滑筋で過分極を生じることが報告されている (Den Hertog *et al.*, 1985a; Crist *et al.*, 1992; Ohno *et al.*, 1996) . また ATP の弛緩反応は,  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネルを抑制する apamin (Banks *et al.*, 1979; Vogalis & Goyal, 1997) によって抑制されるため (Maas *et al.*, 1980; Costa *et al.*, 1986; Lefebvre *et al.*, 1991) , ATP は  $\text{K}^+$  チャネルを開口し, 過分極を引き起こすと考えられている. 本実験においても, ATP の弛緩反応が apamin によって抑制されたことから, 弛緩に関して同様の機序が関与していると考えられる. またモルモット盲腸紐では, ATP が細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を引き起こし, この  $\text{Ca}^{2+}$  によって  $\text{K}^+$  の透過性が高まり過分極が生じる (Den Hertog, 1982) . しかし  $\alpha, \beta$ -methylene ATP は  $\text{Ca}^{2+}$  を介さずに, 直接 apamin 感受性の  $\text{K}^+$  チャネルを活性化できると報告され (Den Hertog *et al.*, 1985b) , ATP と  $\alpha, \beta$ -methylene ATP は異なった経路を介して弛緩反応を起こすことが示唆されている. さらに最近 Blottière *et al.* (1996) による単一平滑筋細胞を用いた実験から, ラット消化管 (胃, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸) 縦走筋では,  $\alpha, \beta$ -methylene ATP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇はほとんど, あるいは全く見られないことが示された. ラット胃輪走筋における報告はまだ無く, ATP や他の nucleotide の弛緩作用機序に関してはさらに検討する必要がある.

Lefebvre & Burnstock (1990) はラット胃底部の ATP による収縮が indomethacin によって抑制されることや, 薬物投与から収縮が生じるまで潜時があることから, この収縮反応は prostaglandin 合成によるものと, 弛緩反応に付随する二次的なリバウンドであると報告した. 胃輪走筋でも ATP や他の nucleotide は, 潜時を伴う収縮反応を示したが, 実験は全て indomethacin 存在下で行っており, またラット胃底部においても, indomethacin 存在下で ATP が収縮反応を生じることが報告されているため (Matharu & Hollingsworth, 1992) , これらの収縮反応に prostaglandin の関与は無いと考えられる. また nucleotide による弛緩反応と収縮反応の間に相関性が見られないことから,



単純なリバウンド反応ではないと思われる。即ち、2-methylthio ATP による収縮反応は 0.1-1 nM から生じ 10 nM でほぼ最大に達しているにも関わらず、弛緩反応が生じるのは 0.1-1  $\mu$ M からであり 1 mM まで用いても最大反応は得られなかった。さらに suramin (100  $\mu$ M) は ATP の弛緩反応をわずかに抑制しなかったのに対して、ATP による収縮反応は suramin (100  $\mu$ M) 存在下でほぼ消失した。又 reactive blue 2 にも弛緩反応に比して収縮反応に強い抑制効果を示す傾向が見られた。このようなことから収縮反応が一定の潜時の後に生じるのは、薬物投与直後は弛緩反応の作用が優位に現れるためではないかと考えられるが、弛緩反応が小さい UTP でも潜時があることから、その他の機序も関与しているかもしれない。

ATP 及び UTP による収縮反応は外液  $\text{Ca}^{2+}$  に依存し、その  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路として電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが関与していることが示され、これら nucleotide によって脱分極が生じていることが示唆された。

最近、受容体の分子構造とその機能によるプリン受容体の新たな分類法が提唱され (Abbracchio & Burnstock, 1994; Fredholm *et al.*, 1997),  $\text{P}_2$  受容体はイオンチャネル型である  $\text{P}_2\text{X}$  受容体と G 蛋白共役型である  $\text{P}_2\text{Y}$  受容体に大別された。この分類ではピリミジン受容体も  $\text{P}_2\text{Y}$  受容体のサブタイプ ( $\text{P}_2\text{Y}_4$  及び  $\text{P}_2\text{Y}_6$ ) として分類されている (Communi & Boeynaems, 1997)。消化管平滑筋のプリン受容体に関しては、このような細胞レベルまたは分子レベルの報告がまだ少なく、新たな分類法を適用するには今後さらなる詳細な検討が必要である。



## 総括

ATP 及び関連物質の機能的役割とそれらの受容体に関して、副腎髄質細胞及び胃平滑筋標本を用いて検討した。即ちモルモット分離副腎髄質細胞では ATP の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  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、whole-cell voltage-clampによって膜電位固定 ( $-70 \text{ mV}$ ) した細胞で、ATP ( $500 \mu\text{M}$ ) は内向き電流反応 ( $I_{\text{ATP}}$ )、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇及び電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  電流 ( $I_{\text{Ca}}$ ) の抑制を引き起こした。
2. 低濃度 EGTA ( $0.1$  又は  $1 \text{ mM}$ ) を含む細胞内液を用いると、ATP ( $500 \mu\text{M}$ ) は  $I_{\text{ATP}}$  の大きさに相関して  $I_{\text{Ca}}$  を抑制したが、 $I_{\text{ATP}}$  が誘発されない時でもある程度の  $I_{\text{Ca}}$  抑制が見られた。一方高濃度 EGTA ( $10 \text{ mM}$ ) を用いると、ATP は  $I_{\text{ATP}}$  の大きさに関わらずほぼ一定の割合で  $I_{\text{Ca}}$  を抑制した。
3. 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を  $\text{Ba}^{2+}$  で置換した条件下で、ATP ( $100 \mu\text{M}$ ) は可逆的に電位依存性  $\text{Ba}^{2+}$  電流 ( $I_{\text{Ba}}$ ) を抑制した。細胞内液の GTP を  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) または  $\text{GDP}\beta\text{S}$  ( $1 \text{ mM}$ ) に置換すると、ATP ( $100 \mu\text{M}$ ) による  $I_{\text{Ba}}$  抑制効果は減少した。また ATP の  $I_{\text{Ba}}$  抑制効果は、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も減少した。
4.  $I_{\text{Ba}}$  に対する抑制効果は ADP ( $100 \mu\text{M}$ )、AMP ( $100 \mu\text{M}$ )、adenosine ( $100 \mu\text{M}$ ) でも見られ、adenosine が最も強い力価を示した。また adenosine と AMP ( $0.5$  及び  $1 \text{ mM}$ ) は、nicotine ( $50 \mu\text{M}$ ) による adrenaline 分泌を濃度依存性に抑制した。



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),  $\alpha,\beta$ -methylene ATP ( $\alpha,\beta\text{meATP}$ ) 及び adenosine は濃度依存性に弛緩反応を引き起こし,  $\alpha,\beta\text{meATP}$  が最も強い力価を示した. UTP は高濃度 ( $1\ \text{mM}$ ) を用いても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  $\alpha,\beta\text{meATP}$  の弛緩反応には影響を与えなかった. Reactive blue 2 (RB2: 1 及び  $3\ \mu\text{M}$ ) と suramin ( $10\text{-}100\ \mu\text{M}$ ) は ATP と  $\alpha,\beta\text{meATP}$  の弛緩反応を抑制した. PPADS ( $3\text{-}30\ \mu\text{M}$ ) と DIDS ( $10\text{-}100\ \mu\text{M}$ ) は ATP の弛緩反応に影響を与えなかったが,  $\alpha,\beta\text{meATP}$  の弛緩反応を抑制した.
7. ATP と  $\alpha,\beta\text{meATP}$  の弛緩反応は apamin ( $0.3\ \mu\text{M}$ ) で抑制された.
8. 静止張力の標本で, ATP 及び関連物質は収縮反応を引き起こした. その力価の順序は  $2\text{MeATP} \gg \text{ATP} \geq \text{UDP} = \text{UTP} \geq \text{ATP}\gamma\text{S} \gg \alpha,\beta\text{meATP} > \text{adenosine} = 0$  であった.
9. RB2 (1 及び  $3\ \mu\text{M}$ ) 及び suramin ( $10\text{-}100\ \mu\text{M}$ ) は ATP と UTP の収縮反応を抑制した. それに対して, PPADS ( $30\ \mu\text{M}$ ) は ATP の収縮反応には影響を与えず, UTP の収縮反応を抑制した.
10. ATP の収縮反応は 2MeATP ( $0.1\ \mu\text{M}$ ) 又は  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  ( $100\ \mu\text{M}$ ) による脱感作で強く抑制されたが, UTP ( $100\ \mu\text{M}$ ) 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 の収縮反応は ATP ( $100\ \mu\text{M}$ ), 2MeATP ( $0.1\ \mu\text{M}$ ) 又は  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  ( $100\ \mu\text{M}$ ) の脱感作によって全く抑制を受けなかった.
11. ATP ( $100\ \mu\text{M}$ ) と UTP ( $100\ \mu\text{M}$ ) の収縮反応は外液  $\text{Ca}^{2+}$  除去, 又は nifedipine ( $1\ \mu\text{M}$ ) の適用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が非選択的陽イオンチャネルを開口し $\text{Ca}^{2+}$ 流入を引き起こすことによって、電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの不活化が生じていることが示された。加えて、ATPはGTP結合蛋白質を介した機構によって電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを抑制することが示唆された。また $I_{\text{Ca}}$ の抑制作用はadenosineで最も強かったことから、モルモット副腎髄質細胞には $\text{P}_1$ 受容体と $\text{P}_2$ 受容体が混在していると考えられる。

一方ラット胃輪走筋標本を用いた実験では、ATPと $\alpha, \beta\text{meATP}$ はそれぞれ異なる $\text{P}_2$ 受容体サブタイプを介して弛緩反応を起こし、両薬物による弛緩反応にはapamin感受性の $\text{K}^+$ チャネルが関与していることが示唆された。また、ATPは $\text{P}_{2Y}$ 受容体、UTPはピリミジン受容体を介してそれぞれ収縮を生じ、このピリミジン受容体は $\text{P}_2$ 受容体拮抗薬であるRB2, suramin及びPPADSの抑制を受けることが示された。両薬物による収縮反応は電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介する $\text{Ca}^{2+}$ 流入によって生じていることが示唆された。

これらを統合すると、副腎髄質細胞及び胃平滑筋細胞にはプリン受容体やピリミジン受容体が複数存在しており、ATPやその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。



## 謝辞

稿の終わりに臨み、終始御指導とご御高配を賜り、御校閲頂きました中里幸和教授に心から厚く御礼申し上げます。

本論文を御校閲頂きます北海道大学獣医学部比較形態機能学講座解剖学教室 岩永敏彦教授、同生理学教室 葉原芳昭教授、同薬理学教室 伊藤茂男教授に心から感謝致します。

本論文作製に当たり、終始御助言と御協力を頂いた同診断治療学講座臨床分子生物学教室 太田利男助教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、本論文作製に御協力頂きました薬理学教室の皆様に心より感謝致し、厚く御礼申し上げます。



## 参考文献

1. Abbracchio, M.P. & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?. *Pharmacol. Ther.*, **64**, 445-475.
2. Aicardi, G., Pollo, A., Sher, E. & Carbone, E. (1991). Noradrenergic inhibition and voltage-dependent facilitation of  $\omega$ -conotoxin-sensitive Ca channels in insulin-secreting RINm5F cells. *FEBS Lett.*, **281**, 201-204.
3. Anderson, C.M. & Parkinson, F.E. (1997). Potential signalling roles for UTP and UDP: sources, regulation and release of uracil nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 387-392.
4. Asano, T., Otsuguro, K., Ohta, T., Sugawara, T., Ito, S. & Nakazato, Y. (1995). Characteristics of ATP-induced catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells of the guinea-pig. *Comp. Biochem. Physiol.*, **112 C**, 101-108.
5. Baidan, L.V., Zholos, A.V. & Wood, J.D. (1995). Modulation of calcium currents by G-proteins and adenosine receptors in myenteric neurones cultured from adult guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 1882-1886.
6. Bailey, S.J. & Hourani, S.M.O. (1990). A study of the purinoceptors mediating contraction in the rat colon. *Br. J. Pharmacol.*, **100**, 753-756.
7. Bailey, S.J. & Hourani, S.M.O. (1992). Effects of purines on the longitudinal muscle of the rat colon. *Br. J. Pharmacol.*, **105**, 885-892.
8. Banks, B.E.C., Brown, C., Burgess, G.M., Burnstock, G., Claret, M., Cocks, T.M. & Jenkinson, D.H. (1979). Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature*, **282**, 415-417.
9. Barajas-López, C., Muller, M.J., Prieto-Gómez, B. & Espinosa-Luna, R. (1995). ATP inhibits the synaptic release of acetylcholine in submucosal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**, 1238-1245.
10. Bean, B.P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature*, **340**, 153-156.
11. Bean, B.P. (1992a). Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**, 87-90.
12. Bean, B.P. (1992b) Whole-cell recording of calcium channel currents. In *Methods in Enzymology: Ion Channels*. ed. Rudy, B & Iverson L.E. volume 207, pp. 181-193. New York: Academic Press.



13. Blotti re, H.M., Loirand, G. & Pacaud, P. (1996). Rise in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induced by  $\text{P}_2$ -purinoceptor activation in isolated myocytes from the rat gastrointestinal tract. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 775-780.
14. Brake, A.J., Wagenbach, M.J. & Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, **371**, 519-523.
15. Brocklehurst, K.W. & Pollard, H.B. (1988). Pertussis toxin stimulates delayed-onset,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent catecholamine release and the ADP-ribosylation of a 40 kDa protein in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **234**, 439-445.
16. Brown, A.M., Yatani, A., Imoto, Y., Codina, J., Mattera, R. & Birnbaumer, L. (1989). Direct G-protein regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **560**, 373-386.
17. Brownhill, V.R., Hourani, S.M.O. & Kitchen, I. (1997). Ontogeny of  $\text{P}_2$ -purinoceptors in the longitudinal muscle and muscularis mucosae of the rat isolated duodenum. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 225-232.
18. B ltsmann, R. & Starke, K. (1994a). Blockade by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonate (DIDS) of  $\text{P}_{2\text{x}}$ -purinoceptors in rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 690-694.
19. B ltsmann, R. & Starke, K. (1994b).  $\text{P}_2$ -purinoceptor antagonists discriminate three contraction-mediating receptors for ATP in rat vas deferens. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **349**, 74-80.
20. B ltsmann, R. & Starke, K. (1995). Reactive red 2: a  $\text{P}_{2\text{y}}$ -selective purinoceptor antagonist and an inhibitor of ecto-nucleotidase. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **352**, 477-482.
21. B ltsmann, R., Dudeck, O. & Starke, K. (1996). Evaluation of  $\text{P}_2$ -purinoceptor antagonists at two relaxation-mediating  $\text{P}_2$ -purinoceptors in guinea-pig taenia coil. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **353**, 445-451.
22. Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.*, **24**, 509-581.
23. Burnstock, G. & Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of  $\text{P}_2$ -purinoceptor? *Gen. Pharmacol.*, **16**, 433-440.
24. Burnstock, G. & Warland, J.J. (1987).  $\text{P}_2$ -purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery: reactive blue 2 selectively inhibits responses mediated via the  $\text{P}_{2\text{y}}$ -but not the  $\text{P}_{2\text{x}}$ -purinoceptor. *Br. J. Pharmacol.*, **90**, 383-391.
25. Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. & Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.*, **40**, 668-688.



26. Cabantchik, Z.I. & Greger, R. (1992). Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol.*, **262**, C803-827.
27. Cena, V. & Rojas, E. (1990). Kinetic characteristics of calcium-dependent, cholinergic receptor controlled ATP secretion from adrenal medullary chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 213-222.
28. Cena, V., Brocklehurst, K.W., Pollard, H.B. & Rojas, E. (1991). Pertussis toxin stimulation of catecholamine release from adrenal medullary chromaffin cells: mechanism may be by direct activation of L-type and G-type calcium channels. *J. Membr. Biol.*, **122**, 23-31.
29. Chang, K., Hanaoka, K., Kumada, M. & Takuwa, Y. (1995). Molecular cloning and functional analysis of a novel P<sub>2</sub> nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26152-26158.
30. Chen, C.C., Akopian, A.N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G. & Wood, J.N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, **377**, 428-431.
31. Chern, Y.J., Herrera, M., Kao, L.S. & Westhead, E.W. (1987). Inhibition of catecholamine secretion from bovine chromaffin cells by adenine nucleotides and adenosine. *J. Neurochem.*, **48**, 1573-1576.
32. Chern, Y.J., Bott, M., Chu, P.J., Lin, Y.J., Kao, L.S. & Westhead, E.W. (1992). The adenosine analogue N<sup>6</sup>-L-phenylisopropyladenosine inhibits catecholamine secretion from bovine adrenal medulla cells by inhibiting calcium influx. *J. Neurochem.*, **59**, 1399-1404.
33. Clementi, E., Scheer, H., Raichman, M. & Meldolesi, J. (1992). ATP-induced Ca<sup>2+</sup> influx is regulated via a pertussis toxin-sensitive mechanism in a PC12 cell clone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 1184-1190.
34. Communi, D. & Boeynaems, J.M. (1997). Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 83-86.
35. Conigrave, A.D. & Jiang, L. (1995). Ca<sup>2+</sup>-mobilizing receptors for ATP and UTP. *Cell Calcium*, **17**, 111-119.
36. Connolly, G.P. (1994). Evidence from desensitization studies for distinct receptors for ATP and UTP on the rat superior cervical ganglion. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 357-359.
37. Connolly, G.P. & Harrison, P.J. (1994). Reactive blue 2 discriminates between responses mediated by UTP and those evoked by ATP or  $\alpha,\beta$ -methylene ATP on rat sympathetic ganglia. *Eur. J. Pharmacol.*, **259**, 95-99.



38. Connolly, G.P., Harrison, P.J. & Stone, T.W. (1993). Action of purine and pyrimidine nucleotides on the rat superior cervical ganglion. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 1297-1304.
39. Costa, M., Furness, J.B. & Humphreys, C.M. (1986). Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **332**, 79-88.
40. Crist, J.R., He, X.D. & Goyal, R.K. (1992). Both ATP and the peptide VIP are inhibitory neurotransmitters in guinea-pig ileum circular muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, **447**, 119-131.
41. Currie, K.P.M. & Fox, A.P. (1996). ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron*, **16**, 1027-1036.
42. Den Hertog, A. (1982). Calcium and the action of adrenaline, adenosine triphosphate and carbachol on guinea-pig taenia caeci. *J. Physiol. (Lond.)*, **325**, 423-439.
43. Den Hertog, A., Pielkenrood, J. & Van den Akker, J. (1985a). Responses evoked by electrical stimulation, adenosine triphosphate, adenosine and 4-aminopyridine in taenia caeci of the guinea-pig. *Eur. J. Pharmacol.*, **109**, 373-380.
44. Den Hertog, A., Pielkenrood, J. & Van den Akker, J. (1985b). Effector mechanisms for  $\alpha, \beta$ -methylene ATP and ATP derivatives in guinea-pig taenia caeci. *Eur. J. Pharmacol.*, **110**, 95-101.
45. Diverse-Pierluissi, M. & Dunlap, K. (1993). Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron*, **10**, 753-760.
46. Diverse-Pierluissi, M., Dunlap, K. & Westhead, E.W. (1991). Multiple actions of extracellular ATP on calcium currents in cultured bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 1261-1265.
47. Douglas, W.W., Poisner, A.M. & Rubin, R.P. (1965). Efflux of adenine nucleotides from perfused adrenal glands exposed to nicotine and other chromaffin cell stimulants. *J. Physiol. (Lond.)*, **179**, 130-137.
48. Dubyak, G.R. & El-Moatassim, C. (1993). Signal transduction via  $\text{P}_2$ -purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.*, **265**, C577-606.
49. Dudeck, O., Bültmann, R. & Starke, K. (1995). Two relaxation-mediating  $\text{P}_2$ -purinoceptors in guinea-pig taenia caeci. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **351**, 107-110.
50. Eckert, R. & Chad, J.E. (1984). Inactivation of Ca channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **44**, 215-267.



51. El-Moatassim, C., Dornand, J. & Mani, J.C. (1992). Extracellular ATP and cell signalling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1134**, 31-45.
52. Fasolato, C., Pizzo, P. & Pozzan, T. (1990). Receptor-mediated calcium influx in PC12 cells. ATP and bradykinin activate two independent pathways. *J. Biol. Chem.*, **265**, 20351-20355.
53. Forsyth, K.M., Bjur, R.A. & Westfall, D.P. (1991). Nucleotide modulation of norepinephrine release from sympathetic nerves in the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 821-826.
54. Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P. & Williams, M. (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.*, **46**, 143-156.
55. Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Dubyak, G.R., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Schwabe, U. & Williams, M. (1997). Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 79-82.
56. Gandía, L., García, A.G. & Morad, M. (1993). ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **470**, 55-72.
57. Gollasch, M. & Haller, H. (1995). Multiple pathways for ATP-induced intracellular calcium elevation in pheochromocytoma (PC12) cells. *Renal Physiol. Biochem.*, **18**, 57-65.
58. Gordon, J.L. (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.*, **233**, 309-319.
59. Grassi, F. & Lux, H.D. (1989). Voltage-dependent GABA-induced modulation of calcium currents in chick sensory neurons. *Neurosci. Lett.*, **105**, 113-119.
60. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
61. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **391**, 85-100.
62. Häussinger, D., Stehle, T. & Gerok, W. (1987). Actions of extracellular UTP and ATP in perfused rat liver. A comparative study. *Eur. J. Biochem.*, **167**, 65-71.
63. Hochman, J. & Perlman, R.L. (1976). Catecholamine secretion by isolated adrenal cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **421**, 168-175.
64. Holz, G.G., Rane, S.G. & Dunlap, K. (1986). GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature*, **319**, 670-672.



65. Hourani, S.M.O. & Chown, J.A. (1989). The effects of some possible inhibitors of ectonucleotidases on the breakdown and pharmacological effects of ATP in the guinea-pig urinary bladder. *Gen. Pharmacol.*, **20**, 413-416.
66. Hourani, S.M.O., Johnson, C.R. & Bailey, S.J. (1993). Desensitization of the P<sub>2</sub>-purinoceptors on the rat colon muscularis mucosae. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 501-505.
67. Hoyle, C.H.V. & Burnstock, G. (1989). Neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract. In *Handbook of Physiology, Section 6: The gastrointestinal system*, ed. Schultz S. G., volume 1, part 1, pp. 435-464. Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
68. Hoyle, C.H.V. & Edwards, G.A. (1992). Activation of P<sub>1</sub>- and P<sub>2Y</sub>-purinoceptors by ADP-ribose in the guinea-pig taenia coli, but not of P<sub>2X</sub>-purinoceptors in the vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, **107**, 367-374.
69. Hoyle, C.H.V., Knight, G.E. & Burnstock, G. (1990). Suramin antagonizes responses to P<sub>2</sub>-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. *Br. J. Pharmacol.*, **99**, 617-621.
70. Ifune, C.K. & Steinbach, J.H. (1991). Voltage-dependent block by magnesium of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels in rat pheochromocytoma cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **443**, 683-701.
71. Illes, P. & Nörenberg, W. (1993). Neuronal ATP receptors and their mechanism of action. *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**, 50-54.
72. Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K. & Takanaka, A. (1989). Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked norepinephrine secretion not relating to voltage-gated Ca channels in pheochromocytoma PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, **106**, 294-299.
73. Inoue, K., Nakazawa, K., Watano, T., Ohara-Imaizumi, M., Fujimori, K. & Takanaka, A. (1992). Dopamine receptor agonists and antagonists enhance ATP-activated currents. *Eur. J. Pharmacol.*, **215**, 321-324.
74. Ito, S. (1983). Time course of release of catecholamine and other granular contents from perfused adrenal chromaffin cells of guinea-pig. *J. Physiol. (Lond.)*, **341**, 153-167.
75. Johnson, C.R. & Hourani, S.M.O. (1994). Contractile effects of uridine 5'-triphosphate in the rat duodenum. *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 1191-1196.
76. Johnson, C.R., Charlton, S.J. & Hourani, S.M.O. (1996). Responses of the longitudinal muscle and the muscularis mucosae of the rat duodenum to adenine and uracil nucleotides. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 823-830.



77. Kasai, H. & Aosaki, T. (1989). Modulation of Ca-channel current by an adenosine analog mediated by a GTP-binding protein in chick sensory neurons. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **414**, 145-149.
78. Kennedy, C. (1990). P1- and P2-purinoceptor subtypes--an update. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **303**, 30-50.
79. Kennedy, I. & Humphrey, P.P.A. (1994). Evidence for the presence of two types of P<sub>2</sub> purinoceptor in the guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle preparation. *Eur. J. Pharmacol.*, **261**, 273-280.
80. Khakh, B.S., Michel, A.D. & Humphrey, P.P.A. (1995). Inhibition of ectoATPase and Ca-ATPase in rat vas deferens by purinoceptor antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 2P.
81. Kim, K.T. & Westhead, E.W. (1989). Cellular responses to Ca<sup>2+</sup> from extracellular and intracellular sources are different as shown by simultaneous measurements of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and secretion from bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 9881-9885.
82. Koizumi, S., Nakazawa, K. & Inoue, K. (1995a). Inhibition by Zn<sup>2+</sup> of uridine 5'-triphosphate-induced Ca<sup>2+</sup>-influx but not Ca<sup>2+</sup>-mobilization in rat pheochromocytoma cells. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 1502-1508.
83. Koizumi, S., Ikeda, M., Inoue, K., Nakazawa, K. & Inoue, K. (1995b). Enhancement by zinc of ATP-evoked dopamine release from rat pheochromocytoma PC12 cells. *Brain Res.*, **673**, 75-82.
84. Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Bäumer, H.G., Spatz-Kümbel, G. & Mutschler, E. (1992). PPADS, a novel functionally selective antagonist of P<sub>2</sub> purinoceptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.*, **217**, 217-219.
85. Lefebvre, R.A. & Burnstock, G. (1990). Effect of adenosine triphosphate and related purines in the rat gastric fundus. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **303**, 199-215.
86. Lefebvre, R.A., de Beurme, F.A. & Sas, S. (1991). Effect of apamin on the responses to VIP, ATP and NANC neurone stimulation in the rat and cat gastric fundus. *J. Auton. Pharmacol.*, **11**, 73-83.
87. Lewis, D.L., Weight, F.F. & Luini, A. (1986). A guanine nucleotide-binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium current by somatostatin in a pituitary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 9035-9039.



88. Lin, L.F., Bott, M.C., Kao, L.S. & Westhead, E.W. (1995). ATP stimulated catecholamine secretion: response in perfused adrenal glands and a subpopulation of cultured chromaffin cells. *Neurosci. Lett.*, **183**, 147-150.
89. Maas, A.J., Den Hertog, A., Ras, R. & Van den Akker, J. (1980). The action of apamin on guinea-pig taenia caeci. *Eur. J. Pharmacol.*, **67**, 265-274.
90. Majid, M.A., Okajima, F. & Kondo, Y. (1992). Characterization of ATP receptor which mediates norepinephrine release in PC12 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1136**, 283-289.
91. Mateo, J., Castro, E., Zwiller, J., Aunis, D. & Mirasportugal, M.T. (1995). 5'-(N-ethylcarboxamido) adenosine inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  influx and activates a protein phosphatase in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, **64**, 77-84.
92. Matharu, M.S. & Hollingsworth, M. (1992). Purinoceptors mediating relaxation and spasm in the rat gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.*, **106**, 395-403.
93. Meldrum, L.A. & Burnstock, G. (1983). Evidence that ATP acts as a co-transmitter with noradrenaline in sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.*, **92**, 161-163.
94. McLaren, G.J., Lambrecht, G., Mutschler, E., Bäumert, H.G., Sneddon, P. & Kennedy, C. (1994). Investigation of the actions of PPADS, a novel  $\text{P}_{2\text{X}}$ -purinoceptor antagonist, in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 913-917.
95. Nakazawa, K. & Inoue, K. (1992). Roles of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through ATP-activated channels in catecholamine release from pheochromocytoma PC12 cells. *J. Neurophysiol.*, **68**, 2026-2032.
96. Nakazawa, K. & Hess, P. (1993). Block by calcium of ATP-activated channels in pheochromocytoma cells. *J. Gen. Physiol.*, **101**, 377-392.
97. Nakazawa, K., Fujimori, K., Takanaka, A. & Inoue, K. (1990). An ATP-activated conductance in pheochromocytoma cells and its suppression by extracellular calcium. *J. Physiol. (Lond.)*, **428**, 257-272.
98. Nakazawa, K., Fujimori, K., Takanaka, A. & Inoue, K. (1991). Comparison of adenosine triphosphate- and nicotine-activated inward currents in rat phaeochromocytoma cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **434**, 647-660.
99. Neuhaus, R., Reber, B.F. & Reuter, H. (1991). Regulation of bradykinin- and ATP-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Neurosci.*, **11**, 3984-3990.
100. Nikodijevic, B., Sei, Y., Shin, Y. & Daly, J.W. (1994). Effects of ATP and UTP in pheochromocytoma PC12 cells: evidence for the presence of three  $\text{P}_2$  receptors, only



100. Nikodijevic, B., Sei, Y., Shin, Y. & Daly, J.W. (1994). Effects of ATP and UTP in pheochromocytoma PC12 cells: evidence for the presence of three  $P_2$  receptors, only one of which subserves stimulation of norepinephrine release. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **14**, 27-47.
101. O'Connor, S.E. (1992). Recent developments in the classification and functional significance of receptors for ATP and UTP, evidence for nucleotide receptors. *Life Sci.*, **50**, 1657-1664.
102. O'Connor, S.E., Dainty, I.A. & Leff, P. (1991). Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 137-141.
103. Oda, H., Murayama, T. & Nomura, Y. (1996).  $G_o$  Protein does not regulate ATP-stimulated  $[Ca^{2+}]_i$  elevation or noradrenaline release in PC12 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **332**, 1-7.
104. Ohno, N., Xue, L., Yamamoto, Y. & Suzuki, H. (1996). Properties of the inhibitory junction potential in smooth muscle of the guinea-pig gastric fundus. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 974-978.
105. Otsuguro, K., Ito, S., Ohta, T. & Nakazato, Y. (1996a). Influence of purines and pyrimidines on circular muscle of the rat proximal stomach. *Eur. J. Pharmacol.*, **317**, 97-105.
106. Otsuguro, K., Ohta, T., Ito, S. & Nakazato, Y. (1996b). Modulation of calcium current by ATP in guinea-pig adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **431**, 402-407.
107. Otsuguro, K., Asano, T., Ohta, T., Ito, S. & Nakazato, Y. (1995). ATP-Evoked membrane current in guinea pig adrenal chromaffin cells. *Neurosci. Lett.*, **187**, 145-148.
108. Piper, A.S. & Hollingsworth, M. (1995). The purinoceptors of the guinea-pig isolated taenia caeci. *Eur. J. Pharmacol.*, **280**, 125-134.
109. Rae, M.G. & Muir, T.C. (1996). Neuronal mediators of inhibitory junction potentials and relaxation in the guinea-pig internal anal sphincter. *J. Physiol. (Lond.)*, **493**, 517-527.
110. Robaye, B., Boeynaems, J.M. & Communi, D. (1997). Slow desensitization of the human  $P2Y_6$  receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **329**, 231-236.
111. Rojas, E., Cena, V., Stutzin, A., Forsberg, E. & Pollard, H.B. (1990). Characteristics of receptor-operated and membrane potential-dependent ATP secretion from adrenal medullary chromaffin cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **603**, 311-322.



112. Salzman, S.K. & Sellers, M.S. (1982). Determination of norepinephrine in brain perfusates using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatography*, **232**, 29-37.
113. Schneider, P., Hopp, H.H. & Isenberg, G. (1991).  $\text{Ca}^{2+}$  influx through ATP-gated channels increments  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and inactivates  $I_{\text{Ca}}$  in myocytes from guinea-pig urinary bladder. *J. Physiol. (Lond.)*, **440**, 479-496.
114. Scholz, K.P. & Miller, R.J. (1991). Inhibition of synaptic transmission and calcium currents in cultured hippocampal neurons. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **635**, 167-176.
115. Seifert, R. & Schultz, G. (1989). Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 365-369.
116. Sela, D., Ram, E. & Atlas, D. (1991). ATP receptor. A putative receptor-operated channel in PC-12 cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17990-17994.
117. Shinozuka, K., Bjur, R.A. & Westfall, D.P. (1988). Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **338**, 221-227.
118. Smits, G.J.M. & Lefebvre, R.A. (1996). ATP and nitric oxide: inhibitory NANC neurotransmitters in the longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the rat ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 695-703.
119. Soltoff, S.P., McMillian, M.K., Talamo, B.R. & Cantley, L.C. (1993). Blockade of ATP binding site of  $\text{P}_2$  purinoceptors in rat parotid acinar cells by isothiocyanate compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1936-1940.
120. Swandulla, D., Carbone, E. & Lux, H.D. (1991). Do calcium channel classifications account for neuronal calcium channel diversity? *Trends Neurosci.*, **14**, 46-51.
121. Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R. & Fox, A.P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.*, **11**, 431-438.
122. Vogalis, F. & Goyal, R.K. (1997). Activation of small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum. *J. Physiol. (Lond.)*, **502**, 497-508.
123. von Kügelgen, I. & Starke, K. (1990). Evidence for two separate vasoconstriction-mediating nucleotide receptors, both distinct from the  $\text{P}_{2\text{X}}$ -receptor, in rabbit basilar artery: a receptor for pyrimidine nucleotides and a receptor for purine nucleotides. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **341**, 538-546.



- 124.von Kügelgen, I., Häussinger, D. & Starke, K. (1987). Evidence for a vasoconstriction-mediating receptor for UTP, distinct from the  $P_2$  purinoceptor, in rabbit ear artery. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **336**, 556-560.
- 125.von Kügelgen, I., Bültmann, R. & Starke, K. (1990). Interaction of adenine nucleotides, UTP and suramin in mouse vas deferens: suramin-sensitive and suramin-insensitive components in the contractile effect of ATP. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **342**, 198-205.
- 126.Wiklund, N.P. & Gustafsson, L.E. (1988). Indications for  $P_2$ -purinoceptor subtypes in guinea pig smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, **148**, 361-370.
- 127.Windscheif, U., Pfaff, O., Ziganshin, A.U., Hoyle, C.H.V., Bäumert, H.G., Mutschler, E., Burnstock, G. & Lambrecht, G. (1995). Inhibitory action of PPADS on relaxant responses to adenine nucleotides or electrical field stimulation in guinea-pig taenia coli and rat duodenum. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 1509-1517.
- 128.Winkler, H. & Westhead, E. (1980). The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neurosci.*, **5**, 1803-1823.
- 129.Ziganshin, A.U., Hoyle, C.H.V., Lambrecht, G., Mutschler, E., Bäumert, H.G. & Burnstock, G. (1994). Selective antagonism by PPADS at  $P_{2X}$ -purinoceptors in rabbit isolated blood vessels. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 923-929.
- 130.Ziganshin, A.U., Hoyle, C.H., Bo, X., Lambrecht, G., Mutschler, E., Bäumert, H.G. & Burnstock, G. (1993). PPADS selectively antagonizes  $P_{2X}$ -purinoceptor-mediated responses in the rabbit urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 1491-1495.



Responses and pharmacological classification of purinoceptors

- Studies in guinea-pig adrenal chromaffin cells  
and rat gastric circular smooth muscle -

Ken-ichi OTSUGURO

Laboratory of Pharmacology

Department of Biomedical Sciences

Graduate School of Veterinary Medicine

Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

The effects of extracellular ATP on voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels were examined using the whole-cell voltage-clamp technique in guinea-pig isolated adrenal chromaffin cells, and those of ATP and its related compounds on contractile and relaxant responses were studied to characterize the purinoceptor subtypes in rat gastric circular smooth muscle.

1. In guinea-pig isolated adrenal chromaffin cells, ATP (500  $\mu\text{M}$ ) evoked an inward current ( $I_{\text{ATP}}$ ) and a rise of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration under the whole-cell voltage-clamped (-70 mV) condition.
2. When the intracellular solution contained 0.1 or 1 mM EGTA, the inhibitory effect of ATP (500  $\mu\text{M}$ ) on  $I_{\text{Ca}}$  tended to depend on the peak amplitude of  $I_{\text{ATP}}$ . However, this inhibitory effect was also seen even in the cells that  $I_{\text{ATP}}$  was not evoked. When the concentration of EGTA was increased to 10 mM, the inhibitory effect became independent of the amplitude of  $I_{\text{ATP}}$ .
3. In the presence of 10 mM  $\text{Ba}^{2+}$ , ATP (100  $\mu\text{M}$ ) reduced  $\text{Ba}^{2+}$  currents ( $I_{\text{Ba}}$ ) in a manner similar to  $I_{\text{Ca}}$ . This reduction was decreased by dialysis of cells with the internal solution containing GDP $\beta$ S (1 mM) or GTP $\gamma$ S (100  $\mu\text{M}$ ). A depolarizing prepulse to +100 mV partly relieved ATP-induced reduction of  $I_{\text{Ba}}$ .
4. ADP (100  $\mu\text{M}$ ), AMP (100  $\mu\text{M}$ ) and adenosine (100  $\mu\text{M}$ ) also reduced  $I_{\text{Ba}}$  and the effect of adenosine was the most potent. Adenosine and AMP (0.5 and 1 mM) inhibited adrenaline secretion induced by nicotine (50  $\mu\text{M}$ ).
5. In rat gastric circular smooth muscle tissues contracted by acetylcholine (1  $\mu\text{M}$ ), ATP, 2-methylthio ATP (2MeSATP),  $\alpha,\beta$ -methylene ATP ( $\alpha,\beta$ -meATP) and adenosine each caused relaxation in a dose-dependent manner.  $\alpha,\beta$ -MeATP was the most potent and



UTP was a weak agonist inducing relaxation.

6. 8-Phenyltheophylline (3  $\mu\text{M}$ ) inhibited the relaxant response to adenosine but not that to ATP or  $\alpha,\beta$ -meATP. Reactive blue 2 (RB2: 1 and 3  $\mu\text{M}$ ) and suramin (10-100  $\mu\text{M}$ ) inhibited the relaxant responses to ATP and  $\alpha,\beta$ -meATP. PPADS (3-30  $\mu\text{M}$ ) and DIDS (10-100  $\mu\text{M}$ ) inhibited the relaxation caused by  $\alpha,\beta$ -meATP but not by ATP.
7. Both ATP- and  $\alpha,\beta$ -meATP-induced relaxations were inhibited by apamin (0.3  $\mu\text{M}$ ).
8. In tissues at resting tone, ATP and its related compounds caused contractions with the rank order of potency; 2MeSATP  $\gg$  ATP  $\geq$  UDP = UTP  $\geq$  ATP $\gamma$ S  $\gg$   $\alpha,\beta$ -meATP  $>$  adenosine = 0.
9. RB2 (1 and 3  $\mu\text{M}$ ) and suramin (10-100  $\mu\text{M}$ ) inhibited both ATP- and UTP-induced contractions. On the other hand, PPADS (30  $\mu\text{M}$ ) inhibited the contraction caused by UTP but not by ATP.
10. Desensitization with 2MeSATP (0.1  $\mu\text{M}$ ) or ATP $\gamma$ S (100  $\mu\text{M}$ ) decreased contraction caused by ATP but not by UTP. Desensitization with UTP (100  $\mu\text{M}$ ) slightly decreased ATP-induced contraction. UTP-induced contraction was not inhibited by desensitization with 2MeSATP (0.1  $\mu\text{M}$ ), ATP $\gamma$ S (100  $\mu\text{M}$ ) or ATP (100  $\mu\text{M}$ ).
11. ATP (100  $\mu\text{M}$ )- and UTP (100  $\mu\text{M}$ )-induced contractions were inhibited by the removal of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or the application of nifedipine (1  $\mu\text{M}$ ).

In guinea-pig adrenal chromaffin cells, these results suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  entry through ATP-activated non-selective cation channels results in the inactivation of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels, in addition, that ATP modulates  $\text{Ca}^{2+}$  channels via the pathway related to GTP-binding protein. Since adenosine is the most potent agonist in inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  channels,  $\text{P}_1$  and  $\text{P}_2$  receptors seem to coexist in guinea-pig adrenal chromaffin cells.

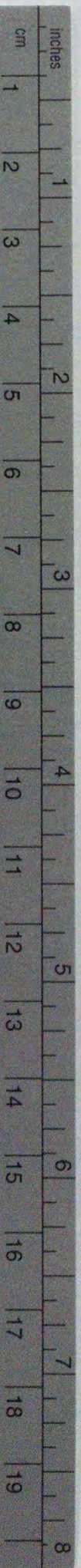
On the other hand, in rat gastric circular muscle, these results suggest that there are two purinoceptors mediating relaxation, PPADS and DIDS-resistant  $\text{P}_{2Y}$  receptors, and PPADS and DIDS-sensitive  $\text{P}_2$  receptors activated by  $\alpha,\beta$ -methylene ATP, and that apamin-sensitive  $\text{K}^+$  channels are involved in the relaxant responses to these adenine nucleotide. In addition, it was suggested that ATP and UTP caused contractions via  $\text{P}_{2Y}$  receptors and pyrimidinoceptors, respectively, and that these contractions were caused by the  $\text{Ca}^{2+}$  entry through voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. The pyrimidinoceptors were inhibited by  $\text{P}_2$  receptor antagonists, RB2, suramin and PPADS in rat stomach.

In summary, there are some purino- and pyrimidinoceptors in both chromaffin cells and smooth muscle cells. ATP and its related compounds may play a role as a transmitter in these tissues.





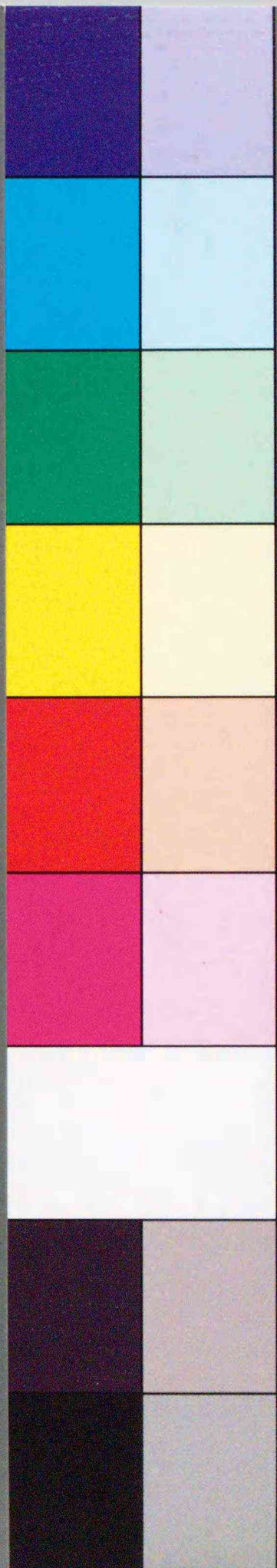




# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

