

氏 名 (本 籍)	安 田 洋 (大阪府)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 0 8 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 7 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	Regulation of the muscarinic K ⁺ channel by extracellular ATP through membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig atrial myocytes (モルモット心房筋細胞における細胞外 ATP による膜ホスファチジルイノシトール 4, 5 -二リン酸を介したムスカリン性 K ⁺ チャンネルの調節機構)
審 査 委 員	主 査 教 授 岡 村 富 夫 副 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 工 藤 基

論文内容要旨

※整理番号	514	(ふりがな) 氏名	やすだ よう 安田 洋
学位論文題目	Regulation of the muscarinic K ⁺ channel by extracellular ATP through membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig atrial myocytes (モルモット心房筋細胞における細胞外 ATP による膜ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸を介したムスカリン性 K ⁺ チャネルの調節機構)		
<p>「研究目的」</p> <p>ムスカリン性 K⁺チャネル($I_{K_{ACh}}$)は心臓において陰性変時および変力反応を生じ、迷走神経伝達物質であるアセチルコリン(ACh)により活性化される。細胞外 ATP は血中ですぐにアデノシンに分解されるが ATP、アデノシンともに $I_{K_{ACh}}$ を活性化し、それぞれ P2Y 受容体、A₁ 受容体とチャネルに直接結合している百日咳毒素(PTX)感受性 G 蛋白を介していることが報告されている。また細胞外 ATP による $I_{K_{ACh}}$ の活性化は一過性でありすぐに抑制機構が働く特徴がある。しかしながら抑制機構に関しては PTX 非感受性 G 蛋白を介していることは判明しているがそれ以下の細胞内伝達系は明らかにされていない。これらを明らかにするためにモルモットの心臓より単離した心房筋細胞にパッチクランプ法を用いて検討した。</p> <p>「方法」</p> <p>ハートレイ系モルモット(250~350g)の心臓をランゲンドルフ灌流による酵素法を用いて心房より細胞を単離した。L 型 Ca チャネルのブロッカーであるニソルジピン (0.4 μM) を含む Normal Tyrode solution を細胞外に灌流し、パッチクランプ法を用いて -40 mV の電位固定下に全細胞膜電流を測定した。細胞外、細胞内(電極内)に各種薬剤を投与し細胞外 ATP による $I_{K_{ACh}}$ の調節機構を検討した。Normal Tyrode solution および pipette solution (電極内液) の組成は以下のとおりである。</p> <p>Normal Tyrode solution ; NaCl 140 mM; KCl 5.4 mM; CaCl₂ 1.8 mM; MgCl₂ 0.5 mM; Glucose 5.5 mM; HEPES 5 mM (pH=7.4 with NaOH)</p> <p>pipette solution ; K-aspartate 70 mM; KCl 50 mM; KH₂PO₄ 10 mM; MgSO₄ 1 mM; Na₂-ATP 3 mM; Li₂-GTP 0.1 mM; EGTA 5 mM; HEPES 5 mM (pH=7.2 with KOH)</p> <p>「結果」</p> <p>モルモットの心房筋細胞において細胞外への ATP (50 μM) 投与により $I_{K_{ACh}}$ の活性化に引き続き基線レベルへの急激な減衰が生じた。ATP による減衰過程は phospholipase C(PLC)のブロッカーである compound 48/80 (100 μM)、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(PtdIns(4,5)P₂) (50 μM) の細胞内投与により有意に減弱した。すなわち PLC 活性化により生じた細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ の枯渇が ATP による $I_{K,ACh}$ の減衰過程に関与していた。PtdIns(4,5)P₂ 産生に必要な PI4-K のブロッカーである Wortmannin (50 μM) を ATP (50 μM) 投与後すぐに開始したところ ATP (50 μM) 再投与による $I_{K,ACh}$ の活性化が有意に抑制された。またアデノシン (100 μM) により活性化された $I_{K,ACh}$ に対しても ATP (100 μM) の前投薬により PtdIns(4,5)P₂ を枯渇させると有意に減弱した。また ATP (100 μM) と Wortmannin (50 μM) を同時に前投薬し、ATP による PtdIns(4,5)P₂ の枯渇後、再合成を Wortmannin (50 μM) により阻害するとアデノシンによる $I_{K,ACh}$ の活性化はほとんど消失した。

「考察」

細胞外 ATP は以前より P2Y 受容体-PTX 非感受性 G 蛋白 (おそらく Gq) を介して $I_{K,ACh}$ の抑制を生じることが判明していたが今回の結果より PLC を介した細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ の枯渇が関与していることが明らかになった。P2Y 受容体以外にも α_1 受容体刺激と ET_A 受容体刺激は膜 PtdIns(4,5)P₂ を枯渇し $I_{K,ACh}$ を抑制するが M₁ ムスカリン性受容体による膜 PtdIns(4,5)P₂ の枯渇は $I_{K,ACh}$ 抑制作用を持たないことが報告されている。 $I_{K,ACh}$ の活性化に必要な膜 PtdIns(4,5)P₂ と各受容体との共存が関係していると考えられる。また ATP による $I_{K,ACh}$ の抑制作用は非常に強くリエントリー性不整脈治療時だけでなく自律神経、特に副交感神経作用時に心臓電気生理学的に重要な役割を果たしている可能性がある。

「結論」

モルモットの心房筋細胞において細胞外 ATP は ATP およびアデノシンによる $I_{K,ACh}$ 活性化に必要な細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ を PLC を介して枯渇することにより $I_{K,ACh}$ を抑制していることが示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	514	氏名	安田 洋
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>心筋細胞膜に存在するイオンチャネルの制御機構の解明は、不整脈の理解に有用である。本研究では、モルモット単離心房筋細胞を用い、ムスカリン性 K^+チャネル ($I_{K, ACh}$) に対する細胞外 ATP による抑制機構をパッチクランプ法により検討した。</p> <p>細胞外 ATP による $I_{K, ACh}$ の抑制は、ホスホリパーゼ C (PLC) 阻害薬の前処置及びホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (PtdIns(4, 5)P₂) の細胞内投与により有意に減弱した。したがって、PLC 活性化による膜 PtdIns(4, 5)P₂ 含量低下が、その主要な抑制機序と考えられる。また細胞外 ATP による膜 PtdIns(4, 5)P₂ 含量低下は、アデノシンによる $I_{K, ACh}$ 活性化を抑制した。</p> <p>本論文は、心房筋細胞膜に存在する $I_{K, ACh}$ の細胞外 ATP による調節機構を明らかにした研究であり、博士(医学)の学位論文に値すると評価された。</p> <p>なお、本学位授与申請者は 2005 年 8 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 17 年 9 月 7 日)			