

## プリン受容体による巨核球の細胞質カルシウムオシレーション

畝山智香子<sup>#</sup>

## Purinoreceptor-induced cytoplasmic calcium oscillation in megakaryocytes

Chikako Uneyama<sup>#</sup>

Megakaryocytes isolated from rat bone marrow respond to externally applied ATP and ADP, showing a periodic K<sup>+</sup> current that reflects oscillation in cytoplasmic calcium concentration. The agonist selectivity of the purinoreceptor on the megakaryocyte is unique. In addition, the intracellular mechanism of calcium oscillation and the effects of many modulating factors were investigated.

**Keywords:** megakaryocytes, patch-clamp, Ca<sup>2+</sup> oscillation

(Received May 30, 1997)

## 1. はじめに

人間をはじめとする動物は全身をめぐる血液によって各器官が維持されている。血液中には様々な細胞成分が含まれるが、その中でも赤血球と並んで血中に特有かつ不可欠な成分が血小板である。血小板は血液凝固の主役であると同時に多数の細胞増殖因子などの生理活性物質を含み、生体が傷害を受けて出血をおこしたような場合に出血を止め、傷害部位の修復に関与する。さらに脳内出血や心筋梗塞などの重篤な循環系の疾患に関与することから、薬物治療のターゲットとしても注目されている。

血小板は骨髄の多分化能幹細胞から巨核球系の幹細胞(CFUM)を経て生じる巨核球からつくられるとされる。巨核球は骨髄中での成熟の際に細胞分裂を伴わない遺伝子複製により2Nから64Nにまで倍数性が増加し、細胞質もそれと同時に増大するため、他の細胞と明確に判別できる直径50-70μmの巨大細胞になる。巨核球には細胞内に demarcation membrane system と呼ばれる発達した膜系が存在し、この膜はもともとは巨核球の細胞表面が陥落して生じたもので将来は血小板の形質膜となるとされる<sup>1)</sup>。従ってこの膜系は細胞外と連絡していて、巨核球の小胞体などの膜系とは異なる。生体内で巨核球は細長い偽足様の突起をのびし、それが切断されて血小板になるとされている<sup>2)</sup>。巨核球一つからはその大きさにもよるが4000-8000の血小板ができることとされる。しかし巨核球の demarcation membrane system が直ちに血小板の形質膜と同じ性質を持つと

は限らず<sup>3)</sup>、血小板生成機構にはなお謎が多い。

血小板は核を持たないため自身で新規蛋白質を合成する能力は小さいとみなされること、血小板の膜の組成などが巨核球と類似すること<sup>4,5)</sup>などから基本的には巨核球と血小板は同じ様な性質を持つものとみなされることが多い。血小板の関与する病態の中でも血小板減少症は巨核球にその原因がある場合があり<sup>6)</sup>、巨核球の成長因子であるトロンボポエチンやインターロイキン-6などが血小板減少症治療薬として開発されつつある<sup>7,8)</sup>。また近年神経伝達物質などの生理活性物質としても注目されるようになったアデニンヌクレオチド類の代謝においても血小板と巨核球が重要な役割を担っている<sup>9)</sup>。

さらに血小板は動物やヒトから採取しやすいことなどもあって生化学的な解析の進んでいる細胞でもある。血小板は細胞内に蛋白質性の成分を多く含むα顆粒と、アデニンヌクレオチド類やセロトニンなどを多く含む dense body とをもち、それらが刺激に応じて放出されて様々な生体反応を引き起こす。その分泌反応には細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇とプロテインキナーゼCの活性化が関与すること<sup>10,12)</sup>、アゴニストにはトロンビンのような強いものやADPのような弱いものがあること、信号伝達経路にアラキドン酸代謝が関与することなどが知られている<sup>13)</sup>。このように血小板をめぐる話題は極めて多様で重要なものが多いが、血小板の性質から単一細胞レベルでの研究はわずかしかなか<sup>14)</sup>、必ずしも進んでいるとはいいがたい。

近年細胞の生理機能を単一細胞レベルで解析する技術が発達し、それまで全体としてとらえていた場合には予測されなかった様々な性質が個々の細胞にあることが知られるようになってきた。非興奮性細胞の細胞質遊離Ca<sup>2+</sup>濃度の周期的変化(オシレーション)もそうした現象の一つで

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Chikako Uneyama, Ph. D. Division of Pathology, Kamiyoga 1-18-1 Setagaya-Ku, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3700-2348; E-mail: uneyama@nihs.go.jp

ある。たとえば細胞懸濁液や組織の断片を試料として用いる場合、結果として得られるのは全体の総和としての反応であって個々の細胞の反応ではない。つまり個々の細胞ではオシレーションがおこっていても、周期が完全に一致しない限り総和としてみれば一過性の上昇になる。従ってこれまで単純に一過性の上昇といった反応が報告されてきた系でも単一細胞レベルで解析してみれば違った結果が得られる可能性がある。実際非興奮性細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションに関してはその報告は年々増えていて<sup>15-19)</sup>、現在では特殊な反応とはみなされていない。

$\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは細胞が刺激に応じて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を周期的に繰り返す現象であり、筋細胞や神経細胞などの興奮性細胞ではかなり以前から認められていた。しかしこれらの興奮性細胞の場合は発達した  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介して細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入するのがおもなメカニズムであり、非興奮性細胞の場合とは異なる。非興奮性細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションには  $\text{IP}_3$  による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールからの  $\text{Ca}^{2+}$  の放出が関わっていて、一般的には刺激の強さは振動の頻度に換算され、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が特に高くなる訳ではない。つまり低濃度のアゴニストでも酵素などの活性化に十分な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が確保され、高濃度でも細胞に毒性のあるようなレベルにまで  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することはないという点で極めて精巧なシステムということができる。この現象を説明するモデルもいくつかある<sup>20,21)</sup>。

ところで単一細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の測定は、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性の色素を用いた画像解析法や微小電極を用いるホールセルパッチクランプ法などで行われてきた。この方法は Horn ら<sup>22)</sup> により穿孔パッチ法が報告されたことでさらに洗練された技術になった。この方法は、従来のホールセル法では細胞膜を破って細胞内と電極内を通電させるのに対して、一価イオン透過性のイオノフォアであるニスタチンを電極内液に使うことで細胞膜に小孔を開けて電極と細胞を通電するもので、細胞内分子のピペット内への拡散による消失がおこらないという利点を持つ。従ってニスタチン穿孔法はこれまで研究しにくいとされてきたセカンドメッセンジャーを介する反応などに有効である。これまでどちらかといえば膜そのものの性質であるチャンネルなどがパッチクランプ法の得意分野であるとされてきたが、この方法により個々の細胞の生理的応答を、チャンネルの開閉を指標に解析できるようになったといえる。

さらに本研究では細胞に薬物を投与する方法として Y-チューブ法を採用した。この方法は神経細胞の早い応答を解析するために考案されたもので、細胞外液の交換が 20ms で完了する<sup>23,24)</sup>。パッチクランプ法では画像解析法とは違って位置情報は得られないものの画像をとるための時間的な制約がないため、記録は連続的にできる。従って Y-チューブとの組み合わせで時間分解能の極めて高い測定が可

能である。こうした事情を背景に、本研究では巨核球のアゴニスト応答を、主にニスタチン穿孔ホールセルパッチクランプ法を用いて解析した。なお巨核球の単一細胞レベルでの解析は他の方法で既にいくつか報告があり<sup>25,26)</sup>、それらの結果との比較も焦点のひとつとなる。

## 2. 実験方法

### i. 細胞の調製

体重 250 - 300g の雌雄 Wistar ラットを過剰量のジエチルエーテルで麻酔し、頸動脈切断により屠殺した。大腿骨を単離し、注射筒と針を用いて標準外液で洗浄することにより骨髓液を得た。75 $\mu\text{M}$  のナイロンメッシュで濾過して細胞の塊をのぞいた後、細胞懸濁液を記録用チャンバー (Falcon, Primaria tissue culture dish) に移した。記録用チャンバーは室温で数時間放置し、細胞が底に固着するのを待った。巨核球は位相差顕微鏡下ではその大きさから (40 - 50  $\mu\text{M}$ ) 容易に識別可能である。

### ii. 溶液

標準外液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化カリウム、2mM 塩化カルシウム、1mM 塩化マグネシウム、10mM グルコース、10mM N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) で、pH を tris (hydroxymethyl) aminoethane (Tris) -OH で 7.4 に調整した。穿孔パッチのピペット内液の組成は、150mM 塩化カリウム、10 $\mu\text{M}$  HEPES, pH 7.2 で、コンベンショナルホールセルパッチのピペット内液は、150mM 塩化カリウム、2mM ATP-Mg, 10mM HEPES, 0.3 または 1mM EGTA である。ニスタチンはピペット内液に最終濃度 50 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  に溶解して実験に用いた。

### iii. 電気生理学的測定

巨核球の全細胞電流は Horn らによる方法<sup>22)</sup> に従って室温 (21 - 24 $^{\circ}\text{C}$ ) で nystatin perforated 法により記録した。実験により conventional whole-cell patch clamp 法<sup>27)</sup> も用いた。電流と電圧の測定にはパッチクランプアンプ (List, EPC 7) を用い、同時にペンレコーダー (三栄, RECTI-HORIZ - 8K) で記録し、電気信号をデジタルオーディオプロセッサでデジタル方式に変換した後ビデオカセットレコーダー (三菱, VH-F32) で記録・保管した。

### iv. 薬物

UTP は Boehringer Mannheim, 2-メチルチオ ATP は RBI Biochemicals, HEPES, 1,2-bis (O-aminophenoxy) ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) -AM 及び sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI) -AM は同仁化学, pluronic F-127 は Molecular Probes 社, 他の試薬は和光純薬工業または Sigma Chemical 社 (USA) から購入した。

薬物の投与は Y-チューブ法により行った<sup>23,24)</sup>。この方法により、単離巨核球の周辺の溶液を 20ms 以内に交換でき

る。

#### v. データ解析

EC<sub>50</sub>値は薬物の用量-反応曲線から計算した。計算法の詳細は、中川らの論文<sup>21)</sup>による。pD<sub>2</sub>は $-\log EC_{50}$ である。

ATP<sup>i</sup>-濃度の計算は Dahlquist ら<sup>28)</sup>のデータを用いた Cockcroft らの方法<sup>29)</sup>に基づき、温度条件の違いを Taqui Khan らの求めた平衡定数<sup>30)</sup>を利用して補正した。計算式は

$$[ATP^i] = [ATP(\text{total})] / (103.97[Ca^{2+}] + 104.22[Mg^{2+}]) \dots (1)$$

式(1)はこの実験条件下で ATP が ATP<sup>i</sup>として存在し、 $ATP^i + M^{2+}(\text{metal}^{2+}) \leftrightarrow (ATP-M)^{2-}$ の反応に対し、 $\log K(Ca^{2+}) = 3.97$ ,  $\log K(Mg^{2+}) = 4.22$ として求めた。式(1)は $(ATP-M)^{2-} \cong ATP(\text{total})$ ,  $Ca^{2+}(\text{free}) \cong Ca^{2+}(\text{total})$ ,  $Mg^{2+}(\text{free}) \cong Mg^{2+}(\text{total})$ の近似を含む。この近似は $[ATP(\text{free})] \ll [(ATP-M)^{2-}]$ ,  $[(ATP-Ca)^{2-}] \ll [Ca^{2+}(\text{free})]$  および  $[(ATP-Mg)^{2-}] \ll [Mg^{2+}(\text{free})]$ の時に成り立つ。今回の実験条件下では ATP に対して二価陽イオンの濃度は大過剰なのでこれらの条件が成り立つ。

#### vi. 細胞内 pH の測定

細胞内 pH の測定は蛍光 pH 指示薬 2', 7' -bis- (2-carboxyethyl) - 5 (6) -carboxyfluorescein (BCECF) と Argus 50画像解析装置 (浜松フォトニクス) を用いて行った。このシステムでの最小記録間隔は 2 秒であった。

#### vii. セロトニンの定量

5-HT の測定は Nathenas らの方法<sup>31)</sup>により、日立 F-4010 蛍光光度計を用いて蛍光分光法で行った。各値は対照値で補正した。

#### viii. 走査型電子顕微鏡による観察

細胞は 1% グルタルアルデヒド (0.1M リン酸バッファー, pH7.4) で 2 時間前処理し、次いで 1% オスミウム酸 (0.1M リン酸バッファー, pH7.4) で 1 時間固定した。固定後、細胞をエタノール系列で脱水し、臨界点乾燥法で乾燥後金蒸着を行い、JSM-840A JEOL 走査型電子顕微鏡 (日本電子) で観察した。

### 3. 結 果

#### i. ラット巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーション 巨核球の ATP 誘発性外向き電流の性質

穿孔パッチ法の電流固定条件下では巨核球の平均静止電位は  $-45 \pm 5$  mV であった (n=11)。この値は河によりコンベンショナル法で報告されたもの<sup>36)</sup>とほぼ等しい。10 $\mu$ M の ATP を投与すると膜電位は自発的に  $-43 \pm 6$  から  $-79 \pm 5$  mV に反復的に過分極した (n=5)。試験に用いた細胞 155 のうち 141 個が ATP に応答して電圧固定条件下で振動性の外向き電流を生じた。この周期的外向き電流は ATP 投与直後にみられ、薬物の除去により直ちに消失する。希に ATP 刺激なしでも自発的に周期的過分極をおこす細胞

がみられた。河の報告にもあるように巨核球のアゴニスト感受性に差があるため、感受性の違う細胞のアゴニストに対する相対反応強度を比較するためデータは 10 $\mu$ M ATP で誘発される反応を 1 として補正したものである。ATP を長時間投与すると delay が徐々に長くなる。電流の大きさと Iperiod は最初の一分間ほどは減衰するがその後は比較的一定値を保つ。ATP の長時間投与により反応が消失してもさらに高濃度の ATP を投与すれば振動性の反応が再度観察される。さらに ATP を除去して標準外液でしばらく放置することによっても反応性は回復する。従ってこうした減衰は受容体脱感作によるものと考えられる。

Fig. 1 に外液 K<sup>+</sup>濃度 5 mM で保持電位 (VH) を変えたときの ATP 誘発性電流 (I<sub>ATP</sub>) を示す。周期的電流は VH が -100, -60, -40, -20 mV の時観察される。Fig. 1B には内液 K<sup>+</sup>濃度が一定 ([K<sup>+</sup>]<sub>i</sub> = 150 $\mu$ M) で外液 K<sup>+</sup>濃度を変えたとき ([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> = 5, 10, 20, 50 $\mu$ M) の電流-電圧 (I-V) 相関を示す。各 I-V 曲線の電圧ゼロの値から I<sub>ATP</sub> の反転電位 (E<sub>ATP</sub>) を読みとると、[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が 5, 10, 20, 50 $\mu$ M のときそれぞれ -82.3, -60.8, -45.5, -23.5 mV であった。これらの E<sub>ATP</sub> 値は Nernst の方程式から計算される K<sup>+</sup>の平衡電位 ([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が 5, 10, 20, 50 $\mu$ M のときそれぞれ E<sub>K</sub> = -85.0, -68.0, -50.0, -27.0 mV) に極めて近く、[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が 10 倍変化したときの E<sub>ATP</sub> の変化は 59.9 mV であった (Fig. 1C)。以上の結果から巨核球の ATP 誘発性の振動性電流は K<sup>+</sup>により運ばれると結論できる。

1990年に河がコンベンショナルホールセル法でモルモット巨核球の ADP 誘発性外向き電流について報告しているが、その形はニスタチン穿孔ホールセル法で得られるものと異なり、一過性電流であった。一方ニスタチン法でモルモット巨核球の ATP または ADP 応答を記録するとラットの場合と同じ振動性電流が観察され、ラット巨核球は ATP でも ADP でも振動性電流を生じた。そこで河の用いたものと同じ EGTA を含むピペット内液を用いてコンベンショナル法でラット巨核球の ATP 応答を記録してみた。結果を Fig. 2 に示す。ピペット内液が細胞内に十分拡散するように、記録はホールセルモード確立の 3 分後から行った。この条件下では ATP は河の報告したような単相性の電流を示した。さらに高濃度の ATP では、単相性電流の持続時間と大きさが増加した。またピペット内液中の EGTA 濃度を増加させると用量-反応曲線が高濃度側に移動する。さらに Fig. 2A の矢印で示したように、ATP 応答が比較的大きいときには ATP を洗浄した後も電流がテイリングとして残存する。ニスタチン法では K<sup>+</sup>電流は薬物の洗浄により直ちに消失するのでこのような現象はみられない。

さらに細胞内を EGTA で灌流する事の影響を調べるため、EGTA を含まないピペット内液を用いてコンベンショナル法でホールセル電流を記録した (Fig. 2B)。この条件

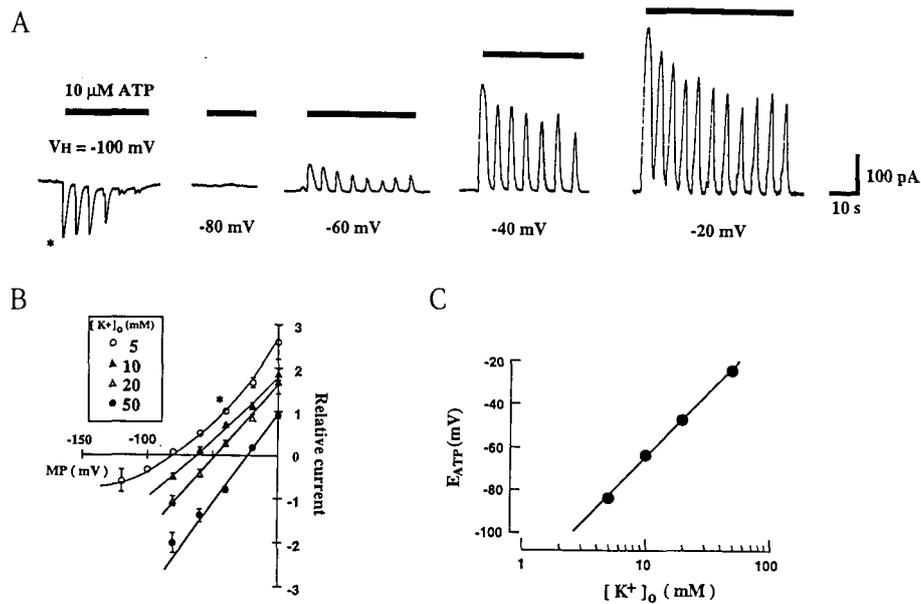


Fig. 1. ATP-induced oscillatory currents at various external  $K^+$  concentration ( $[K^+]_o$ ). A, ATP-evoked oscillatory currents recorded in standard external solution containing 5 mM- $K^+$  at VHs from -100mV to -20mV. Horizontal bars indicate the duration of application of 10mM-ATP. All records were obtained from the same cell. B, current-voltage (I-V) relationships for ATP response at various  $[K^+]_o$ . All current amplitudes were normalized to the peak amplitude of the first oscillatory current induced by 10mM ATP in external solution containing 5 mM  $K^+$  at a VH of -40mV (\*). Each point represents the mean S.E.M. of four to five measurements. C, relationship between  $E_{ATP}$  and  $[K^+]_o$ . Each point is the average of five to seven cells. A straight line has a slope of 59.9mV for a 10-fold change in  $[K^+]_o$ .

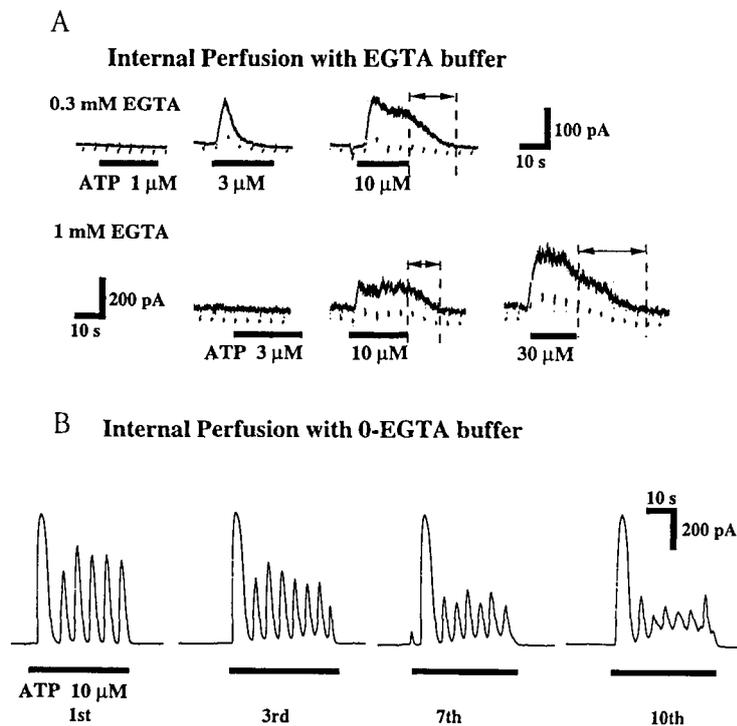


Fig. 2. Comparison of conventional (A) and nystatin-perforated (B) whole-cell patch preparations. A, current traces obtained by conventional whole-cell mode with pipette filled with internal solution containing 0.3 (upper panel) or 1.0 (lower panel) mM of EGTA. Recordings were obtained at least 3 min after establishment of whole-cell configuration. The VH was -40mV and hyperpolarizing pulses to -60mV were superimposed every 4 s. Closed horizontal bars under the current traces indicate a period of ATP application. Application of ATP was repeated at 2 min interval. Double-headed arrows indicate the residual current after removal of ATP. The current traces in the same row were obtained from the same cell, and they are typical ones from 3 cells examined. B, current traces obtained by whole-cell mode with EGTA-free internal solution at a VH of -40mV. ATP was applied repeatedly during the period indicated by closed horizontal bars. The current traces shown here are from single cells and typical ones of four experiments.

では ATP は最初のうちはニスタチン法の場合とほとんど同じ振動性の電流を示した。繰り返し反応させるうちに徐々に電流の形は変化するが、これは細胞内高分子がピペット内に拡散していったための、いわゆるランダウン現象と考えられる。しかしこうしてランダウンした場合でもテーリングはみられない。また EGTA の代わりに BAPTA を用いても同様の結果が得られ、EGTA 濃度を 30 $\mu$ M まで下げれば EGTA なしの時と同じような電流がみられる。EGTA や BAPTA は細胞内の  $Ca^{2+}$  緩衝作用によって細胞内の  $Ca^{2+}$  の動きを阻害する。従って、河の報告と今回の実験の結果との違いは、ピペット溶液中の  $Ca^{2+}$  キレート剤に起因すると考えられる。またこの結果からは巨核球の細胞内  $Ca^{2+}$  緩衝能力が比較的小さいことも示唆される。

#### 振動性電流は $Ca^{2+}$ 依存性 $K^+$ チャンネルにより運ばれる

巨核球の ATP 誘発性振動性電流の薬理的性質を検討した。 $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネルブロッカー、キニーネ (100  $\mu$ M) は ATP 誘発性電流の頻度には影響せず大きさを減少させた。同じ濃度範囲でキニジンもまた電流を減少させた。電流の大きさは 100 $\mu$ M のキニジンで  $72 \pm 6\%$  ( $n=4$ ), 100 $\mu$ M のキニーネで  $70 \pm 5\%$  ( $n=4$ ) 抑制された。一方で低伝導度  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネルブロッカー、アパミンは最大 1 mM まで使っても ATP 誘発性の  $K^+$  電流に影響を与えなかった。高伝導度  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネルブロッカー、イベリオトキシンも 100nM で全く影響なかった。テトラエチルアンモニウム (30nM), 4-アミノピリジン (10 $\mu$ M) も作用はなかった。

既に河が ADP 誘発性  $K^+$  電流は細胞内  $Ca^{2+}$  依存性であることを示唆しているが、この  $K^+$  電流が細胞質の  $Ca^{2+}$  濃度に依存することを確認する必要がある。そこでまず膜透過性の  $Ca^{2+}$  キレート剤 BAPTA-AM で細胞内遊離  $Ca^{2+}$  をキレートした。BAPTA-AM を負荷した細胞では BAPTA-AM の濃度に依存して ATP 応答が消失した。0.1 $\mu$ M の BAPTA-AM では振動性  $K^+$  電流はわずかに抑制され、0.3 $\mu$ M ではかなりの抑制、1 $\mu$ M ではわずかに最初のスパイクが残るのみで振動は消失、10 $\mu$ M では電流が全くみられない。BAPTA-AM を負荷した細胞に高濃度の ATP を投与すると、幅広の単相性電流になる。BAPTA-AM の代わりに SBFI-AM を負荷した場合には ATP 誘発性振動電流になんら変化がみられないことから、BAPTA-AM の作用は  $Ca^{2+}$  結合性によるもので AM 体による非特異的影響ではないといえる。従って ATP 誘発性  $K^+$  電流は細胞質  $Ca^{2+}$  濃度の増加によって活性化されるもので、 $K^+$  電流が振動するのは  $Ca^{2+}$  濃度の振動を反映するものであるといえる。さらに  $K^+$  チャンネルブロッカーと  $Ca^{2+}$  キレート剤は前者が  $K^+$  電流の頻度を変えないままに電流を抑制するのに対して、後者は電流の大きさにはそれほど影響しないが振動の頻度を抑制するという違いがあって、それぞれの作用点が  $K^+$  伝導度と細胞

内  $Ca^{2+}$  動員にあることを明確に示す結果となった。

#### 巨核球のプリン受容体

Fig. 3 に ATP で誘発される  $K^+$  電流を示した。この反応の閾値は約 1  $\mu$ M で、10 $\mu$ M 付近で最大に達する。反応強度には細胞間でばらつきがあるため、ATP 10 $\mu$ M での値を 1 として補正したデータを用いて用量相関性について解析した。「頻度」は 1 秒あたりに観察される外向き電流の数、「最大電流 ( $I_{max}$ )」は最大の電流値 (通常最初のスパイク)、「遅延時間 (latency)」は ATP 投与から最初の電流が観察されるまでの時間を意味する。ATP 濃度の増加に依存して頻度が増加し、遅延時間は短縮し、最大電流は増加する。変化の程度が最も大きいのは頻度で、反応強度の指標としては頻度が適当であると考えられる。

ラット巨核球は ADP にも応答するため、ADP の用量-反応性についても解析し、ATP の場合及び河の報告と比較した。Fig. 3 に示すように用量に依存して頻度と最大電流が増加し、遅延時間が減少するというパターンは ATP の場合と同様であった。しかし ATP に比較して ADP の作用強度は約 30 倍であった (ADP の  $EC_{50}$  は 0.1 $\mu$ M, ATP の  $EC_{50}$  は 3.1 $\mu$ M)。さらにその他のプリン受容体アゴニストの影響について Table 1 にまとめた。最も強力なアゴニストは 2-メチルチオ ATP で、次が ADP、そして ATP- $\gamma$ -S と続く。アデノシン、UTP、AMP-CPP は 1  $\mu$ M まで投与しても作用がみられなかった。ATP の非加水分解性の類似体である ATP- $\gamma$ -S が ATP より強い作用を示したことから、ATP が細胞表面でエクト ATP アーゼにより ADP に変換されて作用しているという可能性は否定される。また有効なアゴニスト間で誘発される最大電流や最大頻度には有意の差はなかった。

河の報告によればモルモット巨核球は 1-100 $\mu$ M の ADP に応答する。しかし本研究では  $K^+$  電流の活性化に必要な ADP の濃度は約 1/30 である。モルモットの巨核球を用いても今回の実験条件では 0.1 $\mu$ M の ADP が  $K^+$  電流オシレーションを誘発できることを確認している。従って河の報告との結果の違いは種差によるものではない。

Fig. 3 及び Table 1 のデータからは巨核球のプリン受容体の性質が既知のものとは異なることが示唆される。しかし ATP と ADP が別々の受容体を刺激しているという可能性があるため、ATP と ADP の交叉脱感作について調べた。ATP や ADP を繰り返し投与することにより脱感作を起こさせ、そのあとで ADP または ATP を投与するといずれの場合も反応は見られない。ATP や ADP の投与の順番を変えても結果は同じである。一方 ADP の連続投与で反応が消失した後、ATP をさらに投与してもなんの反応も見られないが、トロンピンは  $K^+$  電流オシレーションを誘発する。従って脱感作は細胞内  $Ca^{2+}$  ストアのレベルで起こるのではなく、受容体レベルで起こっているといえる。これ

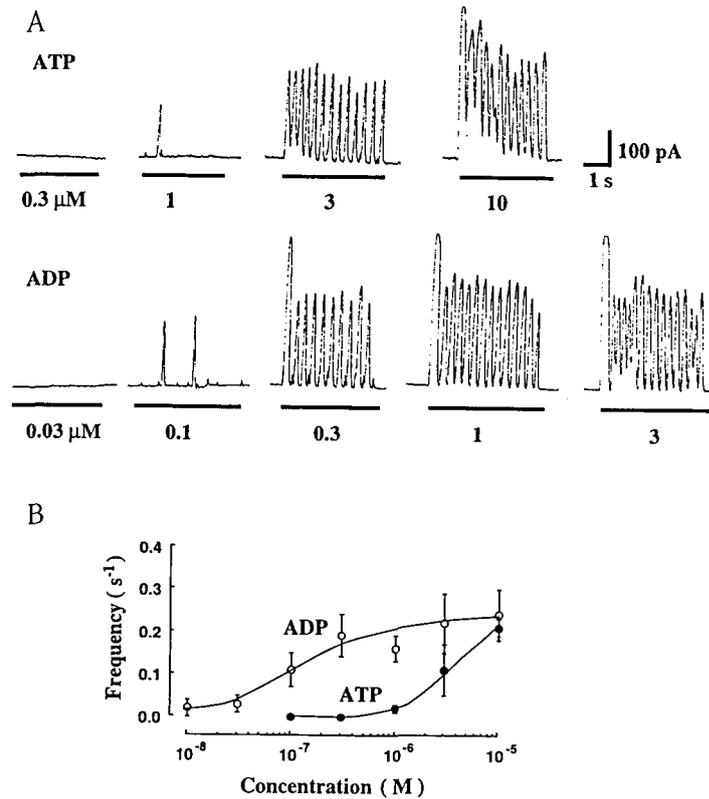


Fig. 3. Concentration-dependency of the oscillatory K<sup>+</sup> outward currents induced by ADP and ATP. A, typical oscillatory K<sup>+</sup> outward currents activated by ATP (upper panel) and ADP (lower panel). All recordings were obtained from the same cell. Horizontal bars indicate the application period of each agonist. B, concentration-response relationships of ATP (●) and ADP (○) to the maximum frequency. Each point and bar indicate the average frequency and the range of measured values, respectively. Number of measurements was four to seven for each point.

Table 1. Oscillatory K<sup>+</sup> outward currents induced by purinoceptor agonists

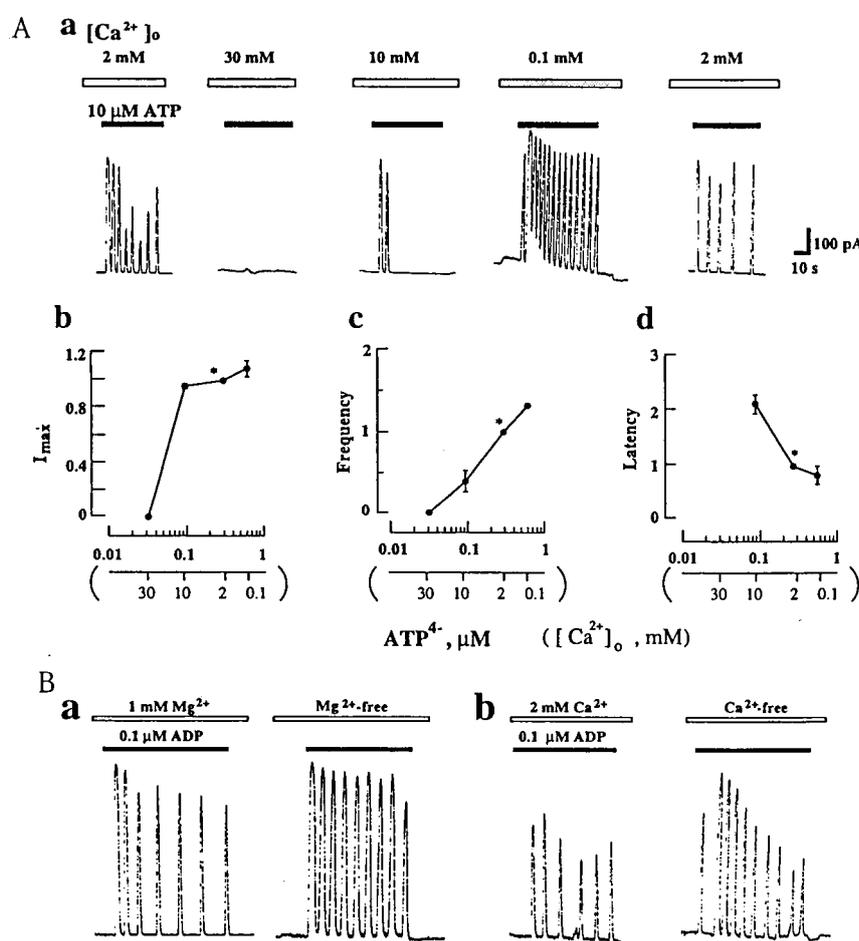
	n	pD <sub>2</sub>	maximum frequency	I <sub>max</sub>
ATP	8	5.51	1.0*	1.0*
ADP	8	6.98	1.07±0.09	1.05±0.06
2-methylthioATP	5	8.02	1.20±0.17	0.95±0.07
adenosine	5	< 3	—	—
UTP	5	< 3	—	—
AMP-CPP	5	< 3	—	—
ATP-γ-S	4	5.90	1.30±0.20	0.97±0.02

Effects of various purinoceptor agonists on megakaryocytes. Frequency and amplitude of oscillatory K<sup>+</sup> outward currents were normalized to those of ATP(10μM)-induced ones [max frequency, 0.21±0.02sec<sup>-1</sup>(n=7), max amplitude, 637.5±68.8pA(n=8)]. Each value represents mean±S.E.M. from four to eight cells. pD<sub>2</sub> was calculated as described in Methods. n, number of cells.

らの結果からは ATP と ADP は受容体を共有すると考えられる。

振動性の K<sup>+</sup>電流は細胞外液中 Ca<sup>2+</sup>が存在しないときにも観察される。この場合、振動性電流は通常の脱感作の時より早く消失し、消失後はたとえ長時間後も、高濃度でも ATP の再投与による反応は見られない。しかし細胞外液に Ca<sup>2+</sup>を添加することにより反応性が回復する。また Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーである 10mM LaCl<sub>3</sub>の存在下でも ATP 誘発性の K<sup>+</sup>電流オシレーションは観察される。従って La<sup>3+</sup>感受性の Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介する Ca<sup>2+</sup>の流入は K<sup>+</sup>電流の誘導には必要ではない。これらの結果からは、振動性の K<sup>+</sup>電流は細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアから放出された Ca<sup>2+</sup>により活性化され、Ca<sup>2+</sup>ストアの Ca<sup>2+</sup>を再補給するには細胞外の Ca<sup>2+</sup>が必要であるといえる。

また外液 Ca<sup>2+</sup>フリーでは ATP 応答が増強されるように見えることから 10 μM ATP で誘発される反応に対する細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>) の影響について検討した。Fig. 4 に示すように K<sup>+</sup>電流の I<sub>max</sub>, 頻度, 遅延時間のいずれもが [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> に依存して変化した。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> の増加は ATP<sup>+</sup>濃度の減少に等しい作用を示す。同様の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> 依存性が ATP 4- をアゴニストとする J744 マクロファージ<sup>32)</sup> とラット腹腔肥満細胞<sup>29)</sup> でも報告されているため、本実験条件での ATP<sup>+</sup>濃度を計算した。その結果は Fig. 4 に示す。ATP 誘発性の反応は ATP<sup>+</sup>の濃度に依存していることがわかる。同様の結果が細胞外 Mg<sup>2+</sup>濃度を変えたときにもみられ、10 μM ATP の作用は細胞外に Ca<sup>2+</sup>と Mg<sup>2+</sup>の両方が存在しないときに最も強くなる。1 μM ADP の反応も細胞外二価陽イオン濃度が減少することにより増強され、二価陽イオ



**Fig. 4.** A, Effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>) on the ATP-induced oscillatory K<sup>+</sup> currents. a, typical current traces in each condition from single cell. Standard external solution was substituted by test solutions which have various [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> before the application of ATP. b, relationship between maximum current amplitude (I<sub>max</sub>) and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>. c, relationship between frequency and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>. d, relationship between latency and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>. In b, c and d, each point represents the mean normalized value of five to seven measurements. The point used as standard was indicated by a symbol (\*) in the respective figures. The concentrations of ATP<sup>+</sup> were calculated by the equation described in Methods. B, Effect of extracellular Mg<sup>2+</sup> (a) and Ca<sup>2+</sup> (b) concentration on the ADP-induced oscillatory K<sup>+</sup> current. Standard external solution containing 1 mM Mg<sup>2+</sup> and 2 mM Ca<sup>2+</sup> was substituted by test solutions without each of divalent cation before the application of ADP as indicated by open horizontal bars. ADP was applied during the period indicated by closed horizontal bars. The current traces indicated here are the typical ones from four experiments.

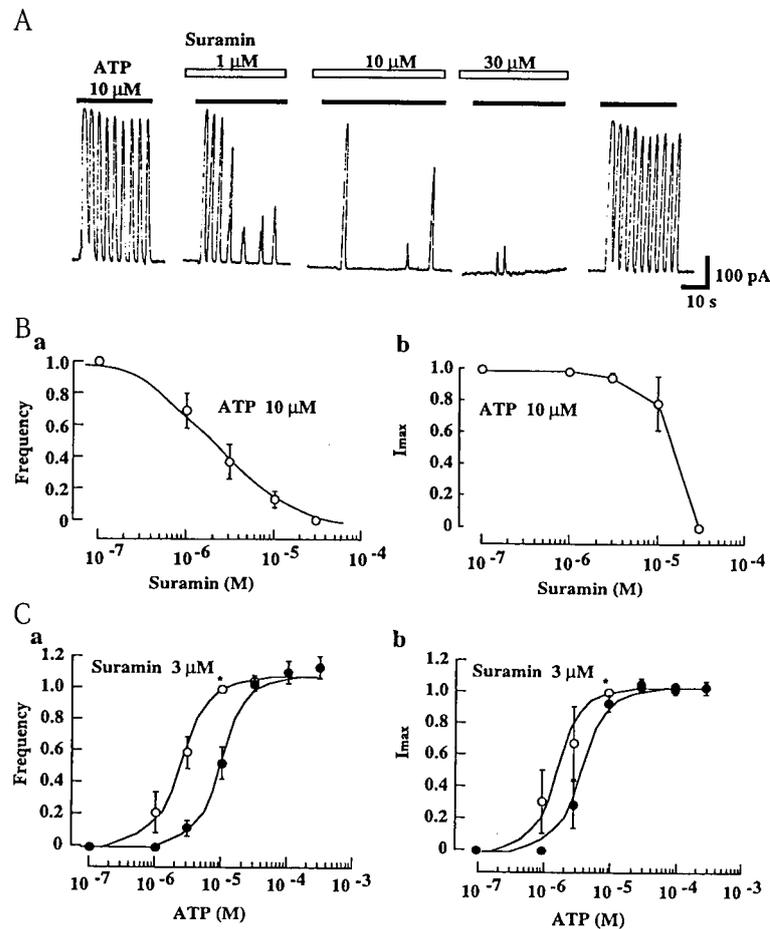
ン濃度がゼロの時にもやはり ATP よりも ADP の方が作用が強い。これらの結果からは ATP と ADP の実際のアゴニストの形は  $ATP^+$  と  $ADP^3$  であることが示唆される。

#### プリン受容体アンタゴニストの作用

プリン受容体アンタゴニストとして知られる薬物の巨核球プリン受容体に対する作用を検討した。Fig. 5 に示すように非選択的  $P_2$  受容体アンタゴニストとして知られるスラミンは ATP 誘発性の  $K^+$  電流オシレーションの頻度と電流を用量依存的に抑制する。スラミンの作用は先に ATP を投与した場合でも直ちに観察され、細胞を長時間処理しても特に作用強度に変化はみられない。Fig. 5b にはスラミンの用量依存性を、Fig. 5c にはスラミン  $3 \mu M$  による ATP の用量-反応曲線のシフトについて示した。スラミンの  $10 \mu M$  ATP に対する阻害作用は  $1 \mu M$  からみられ、その作用は頻度に最も良く反映されるので頻度を指標にした場

合のスラミンの  $IC_{50}$  は  $2.3 \pm 1.2 \mu M$  である。またスラミン  $3 \mu M$  存在下では ATP の  $EC_{50}$  が  $2.9 \pm 1.0 \mu M$  から  $8.8 \pm 1.5 \mu M$  にシフトした。

また  $P_{2Y}$  サブタイププリン受容体アンタゴニストである RB-2 およびその構造類似体 RB-4, RB-5 についても巨核球プリン受容体に対する作用を検討した。結果を Fig. 6 に示す。  $10 \mu M$  ATP の誘発する  $K^+$  電流オシレーションに対して  $30 \mu M$  の RB-2 と RB-5 は抑制作用を示したが RB-4 にはなんの作用も認められなかった。RB-2 はさらに低濃度でも抑制作用を示し、  $0.3 \mu M$  から効果が認められた。用量-反応曲線から求めた ATP  $10 \mu M$  の反応に対する  $IC_{50}$  値は RB-2 が  $1.3 \pm 0.3$ , RB-5 が  $10.2 \pm 1.1 \mu M$  であった。また RB-  $23 \mu M$  存在下では ATP の  $EC_{50}$  値は  $2.9 \pm 0.8 \mu M$  から  $9.2 \pm 2.4 \mu M$  にシフトした。こうした RB-2 または RB-5 の作用もスラミンの場合と同様可逆的で投与時間に依存せ



**Fig. 5.** Effect of suramin on ATP-induced  $K^+$  current oscillation of rat megakaryocyte. A, effects of 1, 10 and  $30 \mu M$  suramin on  $10 \mu M$  ATP-induced  $K^+$  current. ATP was applied during a period indicated by closed bars. Suramin at each concentration was applied 2 min prior to the application of ATP. The application was repeated at least 2 min after wash out. The current traces were obtained from single cell, and a typical one of 5 cells examined. B, concentration-dependency of the inhibitory effect of suramin on  $10 \mu M$  ATP-induced  $K^+$  current oscillation. The value of frequency and maximum current amplitude ( $I_{max}$ ) were normalized to the value obtained by  $10 \mu M$  ATP alone. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of five to seven cells. C, concentration-response relationships of ATP with ( $\Delta$ ) or without ( $\circ$ )  $3 \mu M$  suramin. Each value represents mean  $\pm$  S. E. M. of normalized values of four or five cells. The mark (\*) indicates the value used to normalization.

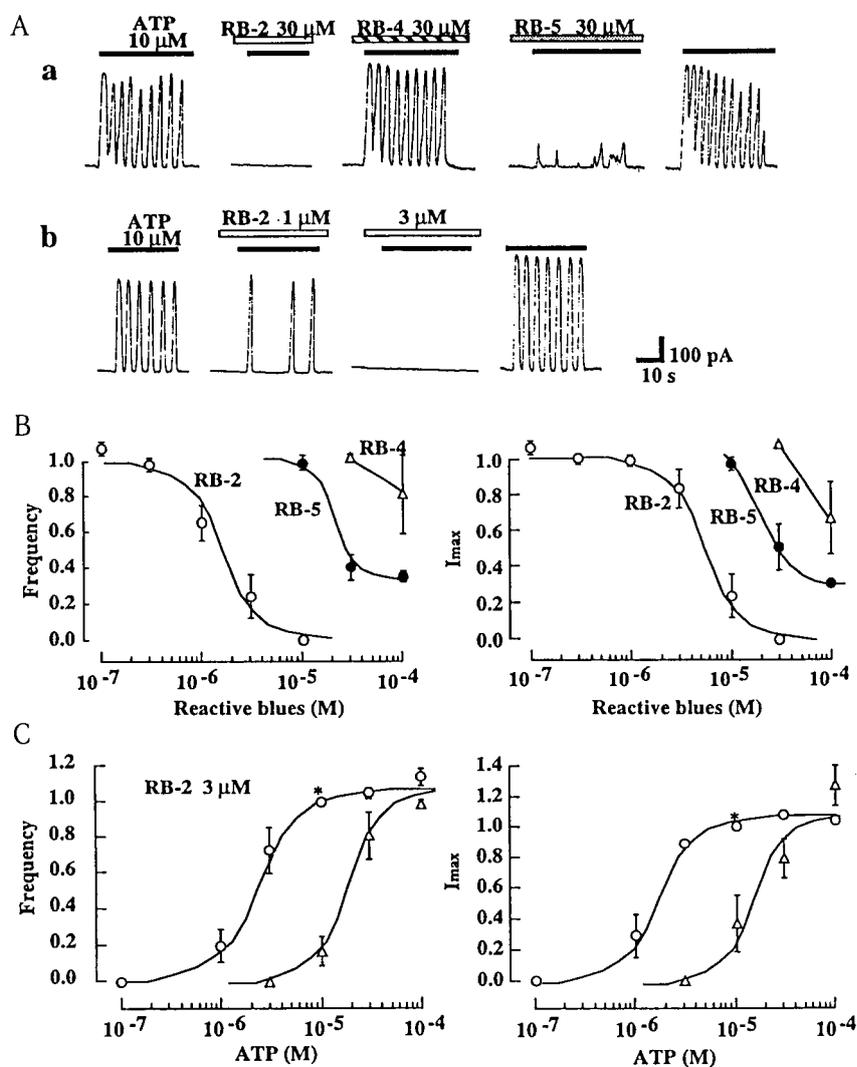
ず、反応の最大値には影響しなかった。なお非選択的 P<sub>1</sub> プリン受容体アンタゴニストである 7-クロロエチルテオフィリンは巨核球のプリン受容体にはなんの影響も与えなかった。

スラミン及び RB-2 は ADP 誘発性の K<sup>+</sup> 電流オシレーションに対しても ATP の場合と同様に抑制作用を示した。ADP の場合は ATP より低濃度で K<sup>+</sup> 電流オシレーションを誘発するがこれらアンタゴニストは同程度の反応強度の時間程度の濃度範囲で抑制作用を示した。その他の、抑制の可逆性などの性質もすべて ATP の場合と同様であった。また図には示さないがトロンピンのように全くタイプの違うアゴニストによって誘発される K<sup>+</sup> 電流オシレーションにはこれらプリン受容体アンタゴニストは影響を与えなかった。これらの結果からスラミンや RB-2 は巨核球のプリン受容体のアンタゴニストとして作用すると考えられる。

## ii. 巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーションのメカニズム

### オシレーションに関するカルシウムプール

非興奮性細胞のアゴニスト誘発性細胞内 Ca<sup>2+</sup> オシレーションのモデルは数種類あるが、はじめに Berridge らにより提唱された 2-プールモデル<sup>39</sup>が巨核球にも当てはまるかどうかを検証した。2-プールモデルでは IP<sub>3</sub> 感受性の Ca<sup>2+</sup> プール (ICR) のほかにカフェインやリアノジンに感受性の Ca<sup>2+</sup> 感受性 Ca<sup>2+</sup> プール (CICR) が存在するとされる。そこでこれらの薬物の作用を調べた。興奮性細胞の Ca<sup>2+</sup> プールから Ca<sup>2+</sup> を放出させる活性のあるリアノジン 10 μM またはカフェイン 10 μM, 及び筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 放出を抑制する局所麻酔薬プロカイン 1 μM はいずれも巨核球の ATP 誘発性 K<sup>+</sup> 電流オシレーションに全く影響しなかった。さらにこれら薬物単独では巨核球になんら反応を惹



**Fig. 6.** Effects of Reactive Blue (RB) s on ATP-induced K<sup>+</sup> current oscillation of rat megakaryocyte. A, effects of 30 μM RBs (a) and lower concentrations of RB-2 (b) on 10 μM ATP-induced K<sup>+</sup> current oscillation. ATP was applied during a period indicated by closed horizontal bars. Each drug was applied 2 min prior to the application of ATP. Current traces in a and b were from single cell, respectively. B, concentration-dependent inhibitory actions of RBs. C, effect of 1 μM RB-2 on the concentration response relationships of ATP.

起しなかった。

さらに巨核球の  $\text{Ca}^{2+}$  プールについて検討した。  $\text{Ca}^{2+}$ -イオノフォアである A23187は  $1\ \mu\text{M}$  で標準外液内の巨核球に不可逆的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を引き起こし、  $\text{I}_{\text{KCa}}$  を直線状に活性化する。  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 阻害剤で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールから  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させる作用のある<sup>31)</sup>  $1\ \mu\text{M}$  のタプシガルジンも数回のスパイクを誘発した後、 A23187と同様の直線状  $\text{I}_{\text{KCa}}$  を誘発する。  $3\ \mu\text{M}$  以上ではタプシガルジンの作用は A23187と見分けがつかない。  $0.1\ \mu\text{M}$  以下のタプシガルジンは、単独では見かけ上巨核球になんの影響もない。細胞外液を  $\text{Ca}^{2+}$  フリーにした場合、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は細胞内プールからの放出によると考えられるので、これら薬物の作用を  $\text{Ca}^{2+}$  フリーの条件で検討した。 Fig. 7に示したように A23187もタプシガルジンも一過性の  $\text{I}_{\text{KCa}}$  を誘発し、巨核球内に  $\text{Ca}^{2+}$  プールが存在することを示す。 A

23187の投与後はタプシガルジンは  $\text{Ca}^{2+}$  放出を誘発できず、タプシガルジンの投与後は A23187は  $\text{Ca}^{2+}$  放出を誘発できない。従ってこれら薬物の作用点は共通である。どちらの薬物も作用は不可逆的なのでいったん投与した後は細胞外液を標準液にすれば持続的な  $\text{I}_{\text{KCa}}$  の活性化がみられる。外液  $\text{Ca}^{2+}$  フリー条件で ATP を投与すると  $\text{I}_{\text{KCa}}$  オシレーションが観察されるが、細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が補充されないためやがて減衰する。しかしこうして ATP による  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが起きない状態でも A23187やタプシガルジンは一過性の  $\text{I}_{\text{KCa}}$  活性化を誘発することができる (Fig. 7C) ことから、細胞内プールは空にはなっていない。また単独ではなんの作用もみられない  $0.1\ \mu\text{M}$  タプシガルジンの存在下で ATP を投与するとオシレーションのパターンが一過性のものに変化する (Fig. 7D)。これは  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの阻害作用によると考えられる。

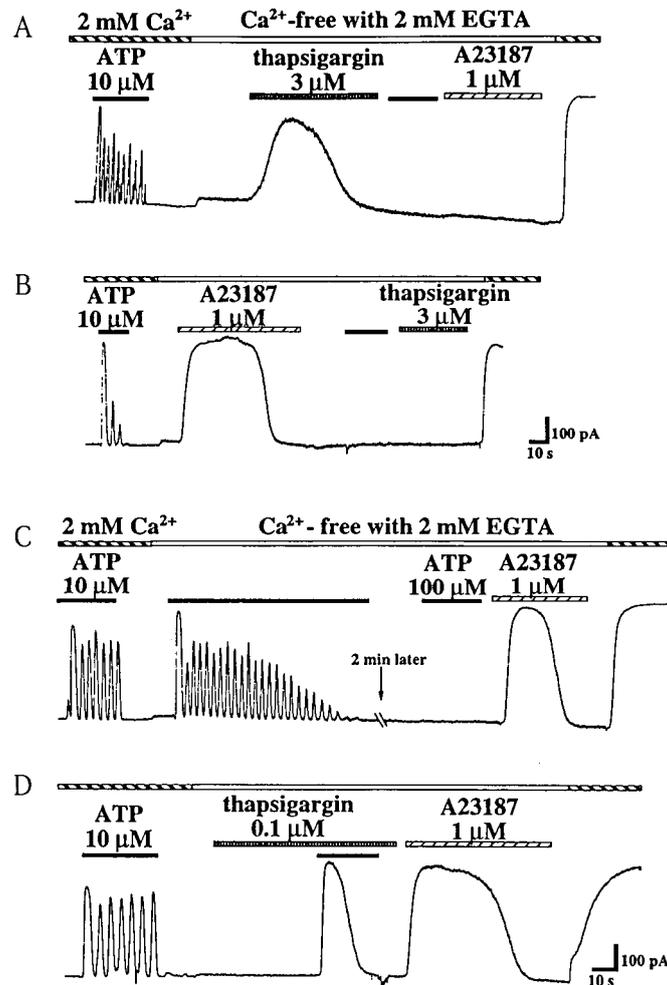


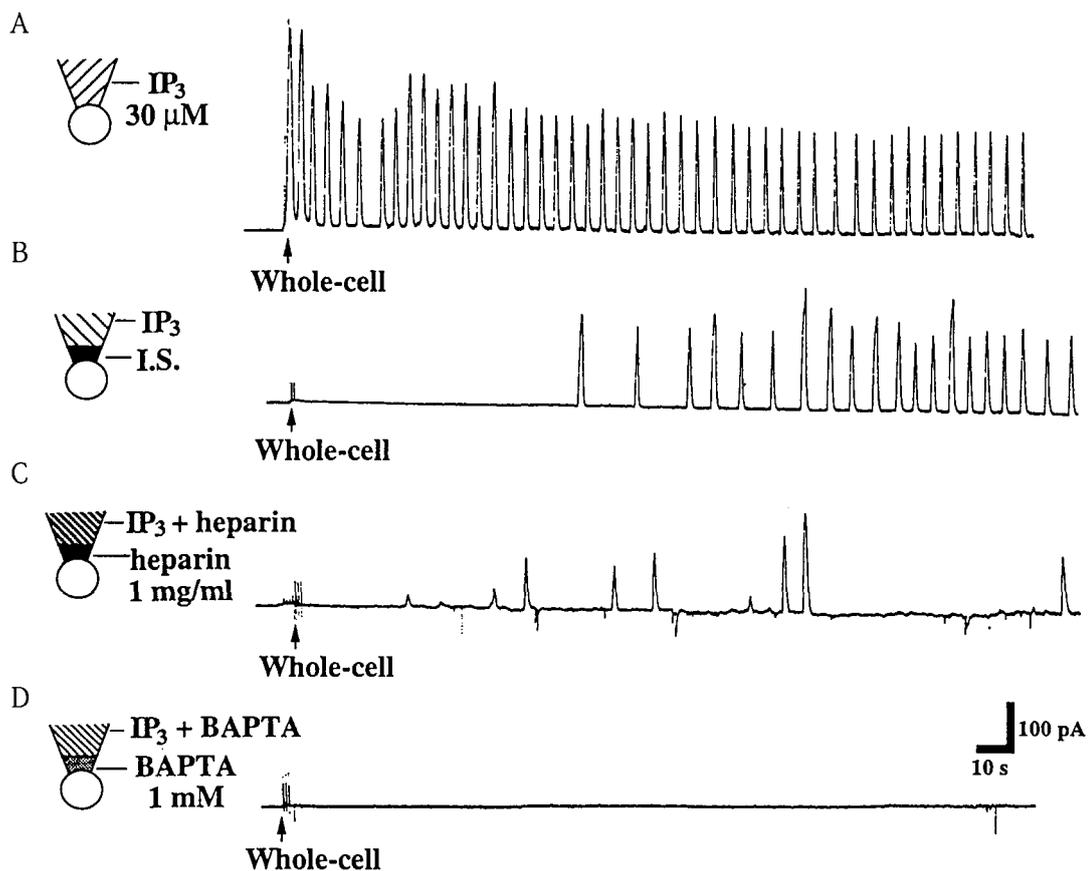
Fig. 7. Effects of thapsigargin and A23187 on megakaryocyte perfused with external solution with or without  $2\ \text{mM}\text{-Ca}^{2+}$ . The current traces were obtained by nystatin perforated whole-cell patch-clamp mode under voltage-clamp condition at a holding potential (VH) of  $-40\ \text{mV}$ . Extracellular solution was exchanged as indicated by upper horizontal bars. Drugs were applied during a period shown by lower horizontal bars. In each experiment, the first application of ATP in standard external solution was to confirm the activity of the cell. Then, the external solution was exchanged to  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution and the drugs were applied successively as indicated. The current traces are typical one of five experiments.

次に  $IP_3$  感受性プールについて検討した。Fig. 8では記録はすべてコンベンショナル法により行った。記録電極内液に  $30\mu M$  の  $IP_3$  を含ませて細胞内に拡散により投与すると Fig. 8A のようなオシレーションがみられる。ピペットの先端に  $IP_3$  を含まない内液を入れて拡散を緩やかにしてやると Fig. 8B のように遅れてオシレーションが観察される。さらに  $IP_3$  感受性  $Ca^{2+}$  プールからの  $Ca^{2+}$  の放出を阻害するとされるヘパリンを共存させると Fig. 8C のように  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションは抑制される。  $Ca^{2+}$  キレート剤 BAPTA によってもオシレーションは抑制される (Fig. 8 D)。従って巨核球には  $IP_3$  感受性  $Ca^{2+}$  プールが存在し、それがオシレーションに関与しているといえる。

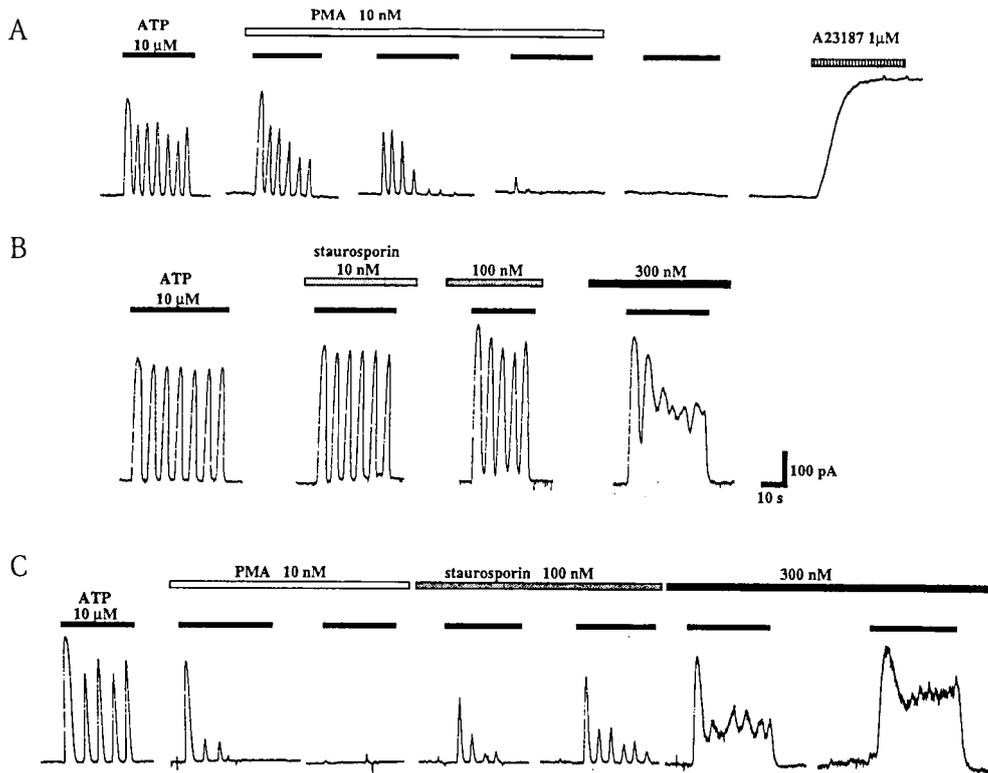
**プロテインキナーゼ C とカルモジュリンの関与**

次いでオシレーションのメカニズムに関与することが他の細胞で報告されている PKC について検討した。PMA は多少のラグタイムの後 ATP 誘発性の  $I_{KCa}$  を不可逆的に抑

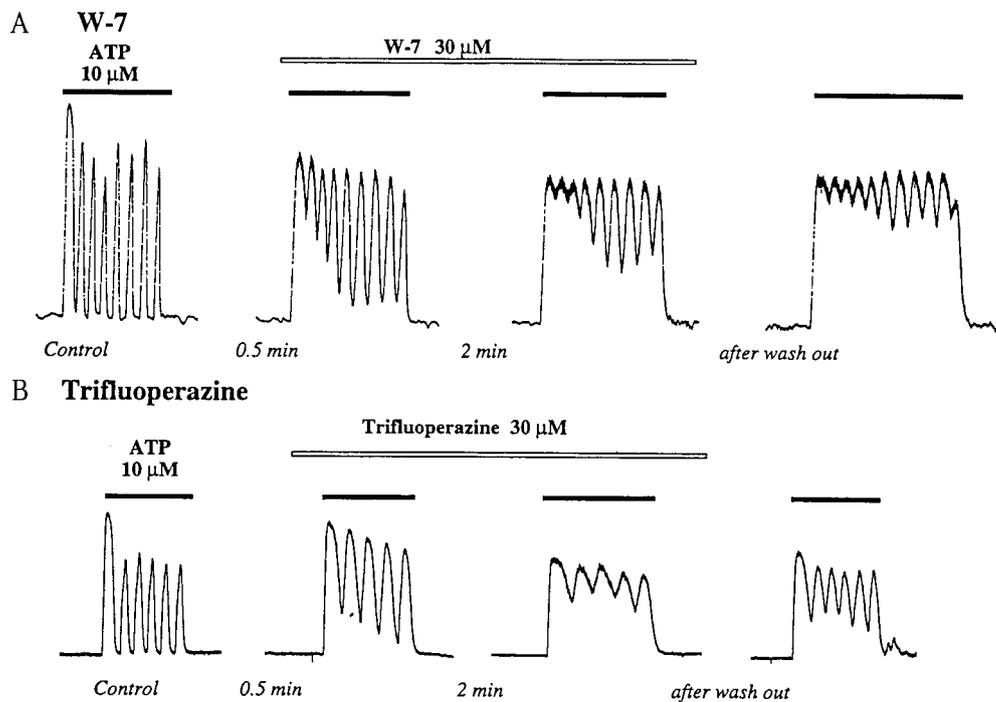
制する (Fig. 9)。PKC 阻害剤スタウロスポリンは  $I_{KCa}$  の活性化には影響しないが、一旦活性化された  $I_{KCa}$  が完全に元のレベルにまで回復するのを阻害することによってオシレーションのパターンを変化させる。この作用は濃度に依存し、高濃度では一過性に近い形になる (Fig. 9B)。この形は低濃度のタブシガルジンにより誘発されるものと類似することから、  $Ca^{2+}$ -ATP アーゼの阻害によるものと推察される。スタウロスポリンの作用も不可逆的で、一旦 ATP 誘発性のオシレーションが一過性の形に変化した細胞では、スタウロスポリンを洗浄しても元の形のオシレーションはみられない。それでも ATP を投与してから最初の  $I_{KCa}$  の活性化が起こるまでの時間と ATP を洗浄したときの速やかな回復には変化は認められず、スタウロスポリンは受容体機能そのものには影響していないと考えられる。そして Fig. 9C に示すように PMA によって抑制された反応はスタウロスポリンによって回復する。さらに図には示さない



**Fig. 8.** Effect of intracellular application of  $IP_3$ . All current traces in this figure were obtained by conventional whole-cell recording at a  $V_H$  of  $-40mV$ . Whole-cell recordings were started at the point indicated by arrows. In A,  $30\mu M$  of  $IP_3$  was dissolved in internal solution and recording pipette was filled with the solution containing  $IP_3$ . In B, the pipette tip was filled with internal solution (I.S.) without  $IP_3$  and the rest portion of pipette was filled with the internal solution containing  $30\mu M$   $IP_3$ . In this configuration,  $IP_3$  gradually diffused into the cell interior. In the same way, pipette tip was filled with internal solution containing  $1 mg/ml$  heparin (C) or  $1 mM$  BAPTA (D), and the rest portions of pipettes were filled with internal solution containing  $IP_3$  plus heparin or  $IP_3$  plus BAPTA, respectively. The current traces in A-D are typical ones from individual five cells



**Fig. 9.** Effects of PKC modulators on ATP-induced  $I_{KCa}$  oscillation. Recordings were made by nystatin-perforated mode. ATP and other drugs were applied during a period indicated by horizontal bars. Staurosporin and PMA were applied at least 30 sec prior to the application of ATP. The current traces during pretreatment time were excluded from the traces. The ATP application was made with 2 min intervals. The current traces in A are typical ones from six cells, and those in B and C are from five cells.



**Fig.10.** Effects of CaM antagonists on ATP-induced  $I_{KCa}$  oscillation. Recordings were by nystatin-perforated mode. ATP was applied during a period indicated by horizontal bars. W-7 and trifluoperazine were applied at least 30 sec prior to the application of ATP. The application interval was 2 min. The current traces in A are typical ones from six cells, and those in B are from three cells.

がスタウロスポリンの作用はPMAによって回復する。

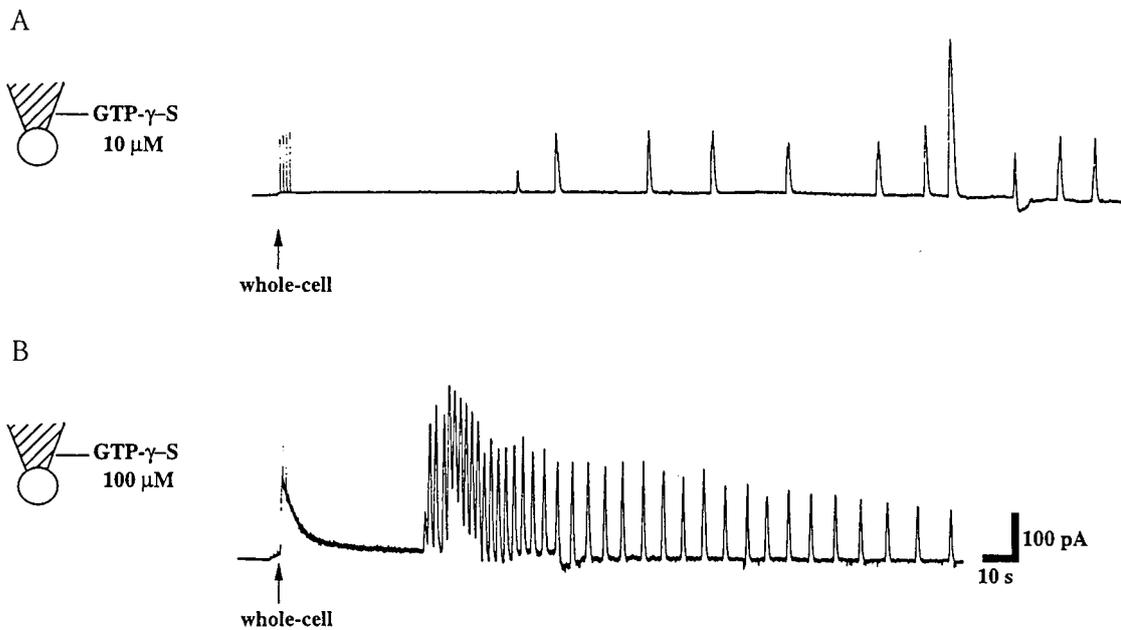
またCaM阻害剤であるW-7とトリフルオペラジンもスタウロスポリンと同様の振動性の消失をもたらす(Fig. 10)。CaM阻害作用とK<sup>+</sup>チャンネル阻害作用を合わせ持つクロロプロマジンの場合には振動性とK<sup>+</sup>電流の両方の阻害により小さな一過性電流が観察される。これら薬物の作用はすべて不可逆的であった。

**GTP結合蛋白質の関与とcAMPの影響**

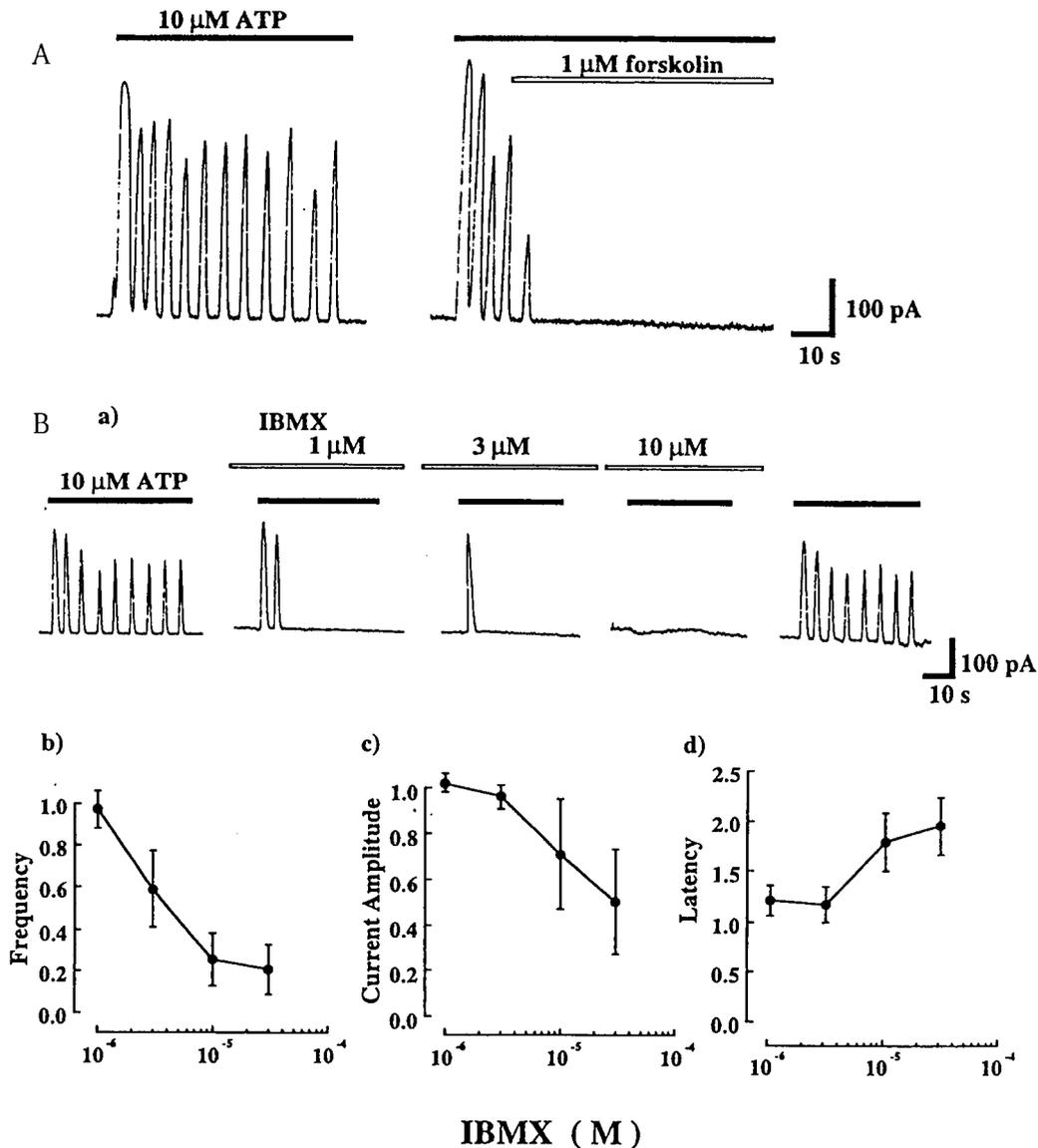
GTPの非加水分解性類似体であるGTP-γ-Sを細胞内に投与した場合にも濃度に依存したI<sub>KCa</sub>オシレーションがみられる(Fig. 11)。IP<sub>3</sub>の場合とは違って、細胞膜に穴があいてから最初の電流が観察されるまで多少のラグタイムがある。そこでIP<sub>3</sub>とGTP-γ-Sの理論的時定数τをPuschらの方程式<sup>39)</sup>を用いて計算した。τは化合物の分子量と細胞の直径、ピペットのアクセス抵抗から計算でき、本実験の条件ではアクセス抵抗が3-5 MΩ、細胞の直径が20-40μMであるから、IP<sub>3</sub>の場合で54-714s、GTP-γ-Sの場合で57-766sである。細胞の直径とアクセス抵抗が等しい場合、GTP-γ-Sのτ値はIP<sub>3</sub>のτ値よりわずかに10%程度大きいにすぎない。しかしながらIP<sub>3</sub>の細胞内投与の場合にはt値が大きくなるような条件でも常に速やかなI<sub>KCa</sub>の活性化がみられ、GTP-γ-Sの細胞内投与の場合には常にいくらかの遅延が観察される。従って両者のI<sub>KCa</sub>活性化に要する時間の違いは、拡散速度の違いによるものではなくメカニズムの違い

によるものであると考えられる。つまりIP<sub>3</sub>による細胞内Ca<sup>2+</sup>の動員は直接的なのに対してGTP-γ-Sの場合は間接的またはより複雑な経路を経ると思われる。いずれにしてもG蛋白質の活性化がI<sub>KCa</sub>オシレーションに関与するといえる。

次にATP誘発性のI<sub>KCa</sub>オシレーションに関与するG蛋白質の種類について検討を加えた。500 ng/mlの百日咳毒素(PTX)で8時間前処理してもATP応答になんの影響も与えなかったが100ng/mlのコレラ毒素(CTX)で1時間前処理した場合にはオシレーションが抑制された。PTXの処理条件は存在する基質の完全なADP-リボシル化に十分であることからPTX感受性のG蛋白質はオシレーションに関与しないといえる。一方CTXは細胞内cAMP量を増加させる作用のあることが知られており、この抑制が必ずしもCTX感受性G蛋白質の関与を示すとはいえない。そこでcAMPの影響についても検討した。アデニル酸シクラーゼを活性化するホルスコリンを投与するとFig. 12AのようにI<sub>KCa</sub>オシレーションが抑制される。ホスホジエステラーゼ阻害剤IBMXも濃度依存的にI<sub>KCa</sub>オシレーションを抑制する(Fig. 12B)。さらにこれらの薬物はIP<sub>3</sub>誘発性のオシレーションも抑制する。IBMXによる抑制作用が可逆的なのに対してホルスコリンの作用が非可逆的なのが両者の作用の違いである。従って巨核球のI<sub>KCa</sub>オシレーションはcAMPによって抑制されると結論される。



**Fig. 11.** Effect of intracellular application of GTP-γ-S. Recordings were made by conventional whole-cell mode. Recording pipettes were filled with internal solution containing 30 (A) or 100μM (B) of GTP-γ-S. Note some delay before the first oscillation appeared.



**Fig.12.** Effect of cAMP on ATP-induced  $I_{kca}$  oscillation. Drugs were applied during a period shown by horizontal bars. A, Effect of 1mM forskolin. B, Effect of IBMX. a, Typical current traces indicating the inhibitory effect of IBMX. b, c and d are concentration-dependent effect of IBMX on 10mM ATP-induced response. The frequency is the number of spikes observed per one second (b), the maximum current amplitude ( $I_{max}$ ) is the largest current amplitude (c) and the latency is the period required to activate the  $K^+$  channel after ATP application (d). Each value is normalized to that of 10mM-ATP-induced response (frequency,  $0.21 \pm 0.02 \text{ sec}^{-1}$  ( $n=7$ );  $I_{max}$ ,  $637.5 \pm 68.8 \text{ pA}$  ( $n=8$ ); latency,  $0.96 \pm 0.19 \text{ sec}$  ( $n=8$ )) and represents mean  $\pm$  S.E.M. from five to seven cells.

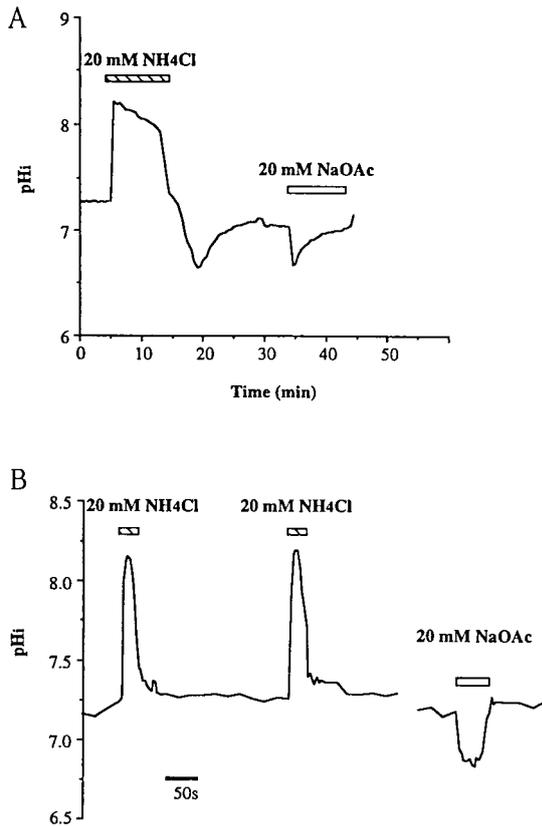
### iii. ラット巨核球の ATP 誘発性細胞質カルシウムオシレーションに与える各種因子の影響

前章までにラット巨核球の ATP 誘発性  $I_{kca}$  オシレーションが、非興奮性細胞のアゴニスト作動性細胞内  $Ca^{2+}$  オシレーションのモデルとして利用できることを明らかにした。そこでこの実験系を用いて、様々な因子の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度調節機構に与える影響を検討してみた。

#### 巨核球の細胞内 pH 変化の影響

ある種の生物活性物質は細胞内の pH に影響を与えること

が知られている。たとえば血液凝固因子トロンビンは血小板の細胞内 pH を最初は酸性側に、後にはアルカリ側にシフトさせる<sup>36,37)</sup>。しかしこの細胞内 pH の変化が細胞の機能に与える影響については明らかではなく、血小板の  $Ca^{2+}$  動員に与える影響については相反する報告がなされてもいる<sup>38,39)</sup>。こうした混乱の原因の一つは血小板が非常に小さくて単一細胞レベルでの解析が難しく、血小板の懸濁液を用いての実験では凝集などの影響が混入してしまうことにあると考えられる。そこで血小板の前駆体でトロンビンな

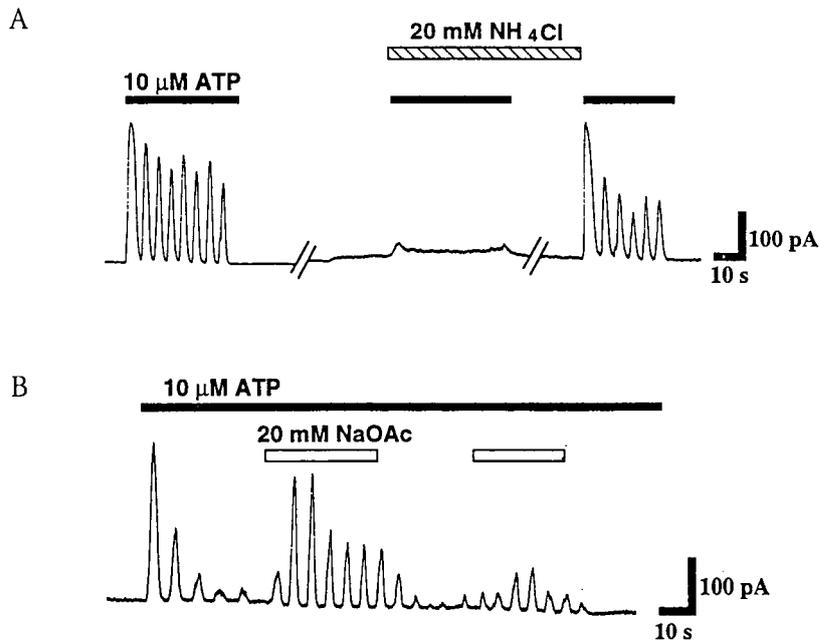


**Fig.13.** The  $pH_i$  changes evoked by 20mM  $NH_4Cl$  and 20mM  $NaOAc$ . The ratio images of single megakaryocyte loaded with BCECF were obtained with 20s interval and calibrated to  $pH_i$ . The drugs were applied during the period of each horizontal bar. The line represent a typical one from five experiments.

どには血小板と同様の反応性がある巨核球を用いて  $pH_i$  の影響の解析を試みた。

巨核球の細胞内  $pH_i$  は静止状態では  $7.29 \pm 0.23$  ( $n = 7$ ) であった。Fig. 13A に示すように 20mM 塩化アンモニウムは速やかなアルカローシスを誘発し、投与期間中持続する。細胞内  $pH_i$  の上昇値は最大  $0.81 \pm 0.15$  で、投与直後に最大に上昇した後、徐々に回復傾向を示す。塩化アンモニウムを洗浄した後は酸性側に細胞内  $pH_i$  が変化し、その後しばらくして元のレベルに回復する。このときの酸性側への  $pH_i$  変化は静止レベルから 0.5-0.75 程度であった。塩化アンモニウム洗浄後のアシドーシスの程度は塩化アンモニウムの投与時間に依存する。一方 20mM 酢酸ナトリウムは急速で一時的な細胞内  $pH_i$  の酸性化を誘発する。 $pH_i$  の変化は最大  $0.51 \pm 0.05$  ( $n = 4$ ) で、酢酸ナトリウムが持続的に存在していても元のレベルに回復し、酢酸ナトリウムを洗浄した後は特に変化はみられない。典型的には細胞内  $pH_i$  の酸性化は 2-3 分持続するがその回復の時間には細胞間でばらつきがある。

Fig. 13B には塩化アンモニウムと酢酸ナトリウムの短時間投与の場合の細胞内  $pH_i$  の変化を示した。細胞内  $pH_i$  の変化は薬物投与後 2 秒以内におこり洗浄により速やかに回復している。さらに短時間投与の場合には塩化アンモニウムの洗浄後のアシドーシスはみられない。そこで塩化アンモニウムと酢酸ナトリウムを短時間投与で用いることにした。なお ATP 10 $\mu$ M は細胞内  $pH_i$  にはなんら影響しなかった。



**Fig.14.** Effects of 20mM  $NH_4Cl$  and 20mM  $NaOAc$  on the 10 $\mu$ M ATP-induced oscillatory  $K^+$ -currents. The current traces were obtained by nystatin perforated patch recording configuration at a holding potential of -40mV. Each drug was applied during a period indicated by horizontal bars. The current traces are typical ones from nine (A) and seven (B) experiments.

ATP 10 $\mu$ M により誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションに対する pH の影響について検討した。Fig. 14 に示すように 20 $\mu$ M 塩化アンモニウムは振動性  $K^+$  電流をほぼ完全に抑制した。その抑制作用は可逆的で洗浄により反応は完全に回復する。一方 20 $\mu$ M 酢酸ナトリウムは ATP 誘発性  $K^+$  電流オシレーションを増強する。ATP 10 $\mu$ M は通常はほぼ最大に近い反応を誘発するため増強作用は観察されにくい。反応性の悪い細胞では弱い反応しか惹起されないため Fig. 14B に示すような結果が得られる。この細胞では振動性の  $K^+$  電流は極めて早く減衰しているがそこに 20 $\mu$ M 酢酸ナトリウムを投与すると ATP 応答の回復（頻度と電流の大きさの増加）がみられる。同様の増強作用は 1 $\mu$ M ATP を投与したふつうの反応性を持つ細胞でもみられる（データは示していない）。

細胞内 pH の影響についてさらに細胞内に  $IP_3$  を直接投与した場合の  $I_{KCa}$  オシレーションの系で検討した。この系では電極内液に 3-10 $\mu$ M の  $IP_3$  を含む記録電極を用い、コンベンショナル法で生じる細胞膜上の小孔から細胞内へ  $IP_3$  を拡散により投与するもので、細胞外から ATP を投与した場合と同様に  $I_{KCa}$  オシレーションが観察される。20 $\mu$ M 酢酸ナトリウムによる細胞内の酸性化は  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションにはなら影響を与えなかった。一方 20 $\mu$ M 塩化アンモニウムは可逆的に  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションを抑制した。

GTP- $\gamma$ S の細胞内投与も  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発する。この系に対しては 20 $\mu$ M 酢酸ナトリウムは反応の増強作用を示した。ただしその増強の様子は ATP の細胞外投与の場合とは多少異なり、酢酸ナトリウムの投与から反応が現れるまでわずかではあるが時間がかかることと洗浄後もすぐには効果が消失しないことが特徴といえる。20 $\mu$ M 塩化アンモニウムはこの系の場合でも可逆的に反応を抑制した。

#### ミトコンドリア脱共役剤の影響

プロトンイオンフォアでミトコンドリア脱共役剤として知られている FCCP<sup>40)</sup> は、細胞に ATP の枯渇をもたらすため、虚血または低酸素細胞モデルをつくるのによく使われる<sup>41-43)</sup>。また FCCP には、ミトコンドリア内膜のプロトン勾配を破壊することにより単離ミトコンドリアから  $Ca^{2+}$  を放出させ、 $Ca^{2+}$  取り込みを阻害する作用がある<sup>44)</sup>。さらに小胞体膜のプロトン勾配も破壊するため<sup>45)</sup>、ATP の枯渇や脱分極以外にも生きている細胞に様々な影響があると考えられる。例えば神経細胞や膵細胞で FCCP がミトコンドリア以外の  $Ca^{2+}$  プールから  $Ca^{2+}$  を放出させるという報告がある<sup>46,47)</sup>。そこで FCCP の巨核球  $Ca^{2+}$  オシレーションに対する影響についても検討した。

まず巨核球に対する FCCP 単独での作用を調べたが、0.1-1 $\mu$ M の FCCP を最長で 10 分間投与したが、電気的応答は

全く検出されなかった。次いで ATP 誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションに対する影響を調べた。10 $\mu$ M ATP で誘発される反応に対する 1 $\mu$ M FCCP の作用は細胞により異なる。最初のスパイク以外の  $I_{KCa}$  電流を抑制するタイプが 8 細胞中 5 細胞で、電流の大きさに加えて活性化された  $K^+$  チャンネルのベースラインへの回復も抑制し、一過性の電流のような形に変えるタイプが 8 細胞中 3 細胞で観察された。このような電流の回復の阻害は  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害剤タプシガルジンによっても誘発されることを先の章で紹介している。FCCP は二番目以降のスパイクの大きさを対照群の 13 $\pm$ 9% に抑制した (n=8)。いずれのタイプでも FCCP の作用は可逆的で、洗浄後約 1 分で元の反応性が回復する。さらに ATP の濃度を変えて FCCP の作用について検討すると 1 $\mu$ M ATP の反応に対しては実験に用いた 6 細胞のすべてで完全な抑制、100 $\mu$ M ATP の反応に対しては実験に用いた 6 細胞のすべてでオシレーションのパターンの阻害が観察された。

細胞内  $IP_3$  投与による  $I_{KCa}$  オシレーションに対する FCCP の影響についても検討した。10 $\mu$ M  $IP_3$  を含む電極内液を満たした記録電極を用いて細胞内に  $IP_3$  を投与して誘発した  $I_{KCa}$  オシレーションを、FCCP は完全に抑制（7 細胞中 5 細胞）または回復の抑制による持続的  $I_{KCa}$  の活性化に変化させた（7 細胞中 2 細胞）。このパターンは ATP 誘発性のオシレーションの場合と同様である。また 100 $\mu$ M  $IP_3$  を用いた場合には 4 細胞中 4 細胞で後者のパターンによる修飾がみられた。従って FCCP 感受性のステップは細胞内プールからの  $Ca^{2+}$  の放出以降にあると考えられる。

#### 巨核球のプリン受容体活性のアデニンによる修飾

アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル各単独での巨核球に対する作用を調べたが最大 1 $\mu$ M まで用いてもなんの反応も惹起しなかった。しかしアデニンには 1 $\mu$ M ATP または 0.01 $\mu$ M ADP により誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションを増強する作用があった。グアニン、シトシン、ウラシルには最大 1 $\mu$ M まで用いてもなんの修飾作用も認められなかった。アデニンの作用は投与後 14 $\pm$ 3 秒で観察され、洗浄後は 31 $\pm$ 11 秒で消失した（いずれも n=7）。3 $\mu$ M ATP により誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションに対するアデニンの作用の用量-反応相関について検討した。結果を Fig. 15 に示す。アデニンは 1 $\mu$ M から  $I_{KCa}$  オシレーションの頻度を増強したが電流の大きさにはほとんど影響しなかった。アデニンの  $ED_{50}$  値は約 80 $\mu$ M であった。

また ATP 以外の受容体を刺激して巨核球に  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発する トロンビン 5 U/ml の反応に対してはアデニンは全く影響を与えなかった。トロンビン 5 U/ml は ATP 1 $\mu$ M とほぼ同様の強さの反応を誘発する濃度である。そしてアデニン 300 $\mu$ M による ATP 1 $\mu$ M の反応の増強作用は cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤である H

-8やアデニル酸シクラーゼ活性化剤であるホルスコリンの存在下でも全く影響されない。さらに細胞外液中  $Ca^{2+}$  や  $Mg^{2+}$  を除去した場合にもアデニンの作用に変化はみられなかった。

ラット巨核球の形態変化のセカンドメッセンジャー

巨核球の  $I_{KCa}$  オシレーションについては、主にATPをアゴニストとして用いて解析を進めてきた。しかしこれまでも何度か言及したようにトロンピンにも巨核球の  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発する作用がある。巨核球から生じる血小板では、トロンピンは単独で強い凝集を誘発する「強いアゴニスト」、ADPは他の刺激が共存したときにのみ凝集や顆粒成分の放出を誘発する「弱いアゴニスト」として分類されている<sup>19)</sup>。そこでここでは巨核球の場合について、ATPとトロンピンの作用の違いを  $I_{KCa}$  の測定による  $Ca^{2+}$  動員、蛍光分光法による5-HTの放出、走査電子顕微鏡(SEM)による形態観察の三点から解析した。

$Ca^{2+}$  動員：ATPとトロンピンはいずれも保持電位-43mVで巨核球に  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発する。最大電流及び最大頻度両方のパラメーターでATP, ADP, トロンピンの間になんら違いは認められなかった。さらにホルスコリン

1  $\mu M$  または IBMX 10  $\mu M$  による抑制についても調べたがATPとトロンピンいずれの反応もこれら薬物により完全に抑制された。

セロトニンの放出：次に巨核球のセロトニン(5-HT)放出に対するATPとトロンピンの作用を検討した。トロンピンは3 U/ml以上から濃度依存的に5-HTの放出を引き起こす。一方ATPとADPは全く作用がみられない。同じ動物から採取した血小板はADPにより凝集する活性があった。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を不可逆的に上昇させるA23187は5-HT放出を起こさせるが、この場合は細胞がほとんど消失しているので細胞の融解によると考えられる。すなわち最大放出値とみなすことができる。ATPやADPとトロンピンを同時に投与しても相加作用はみられなかった。トロンピンには細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上げると同時に  $G_i$  を活性化することにより細胞内cAMP濃度を減少させる作用のあることが知られているので、cAMP増加薬の影響についても調べた。ホルスコリンには対照群及びトロンピンによる5-HTの放出を弱いながら抑制する活性があった。IBMXでは有意差はないが抑制傾向があった。従って5-HTの放出にはcAMPが負の調節因子として関与する可能性が示唆

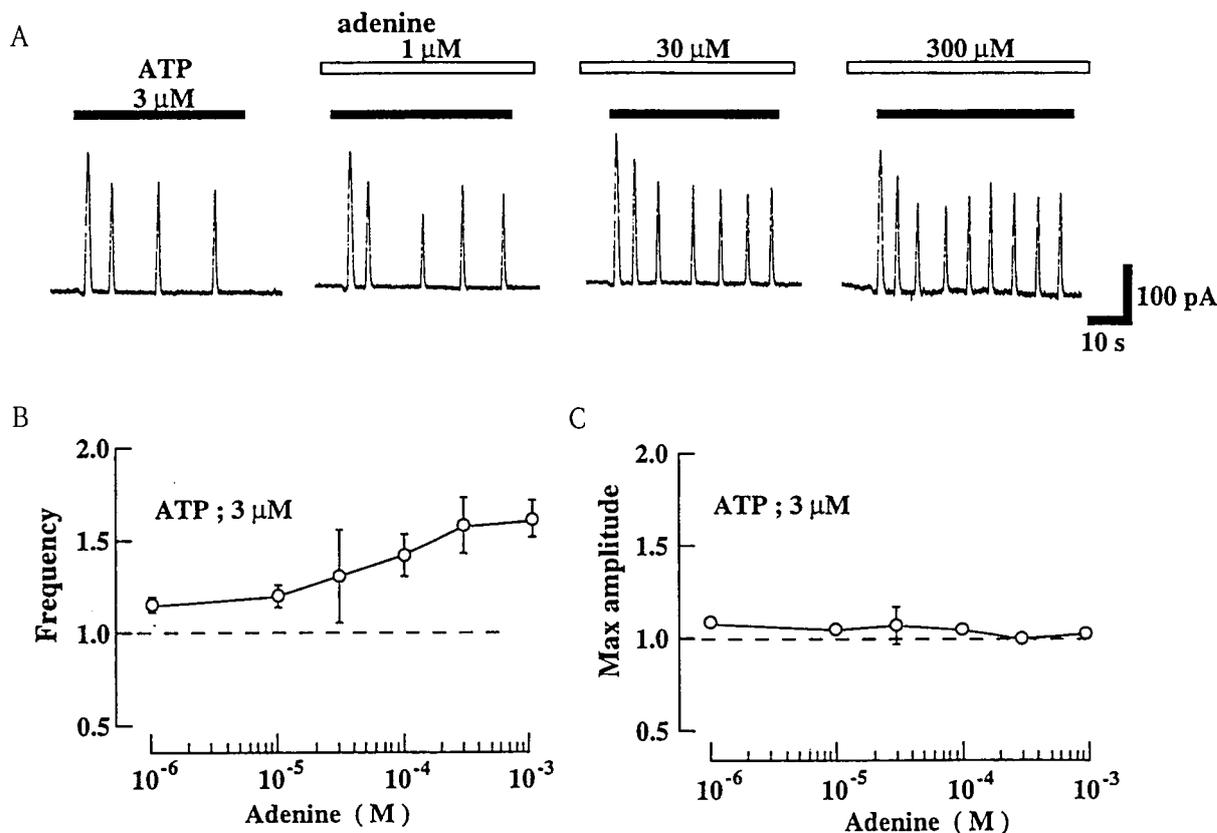


Fig.15. Concentration-dependent enhance by adenine of the ATP-induced  $I_{KCa}$  oscillation. A; Typical current traces obtained from the same cell.  $V_{H}$  was -40mV. Adenine at each concentration was applied 1 min prior to the application of ATP. The current traces were obtained from single cell, and a typical one of 5 cells examined. B; Quantitative results obtained from A. The value of frequency and maximum current amplitude ( $I_{max}$ ) were normalized to the value obtained by 3  $\mu M$  ATP alone. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of five to six cells.

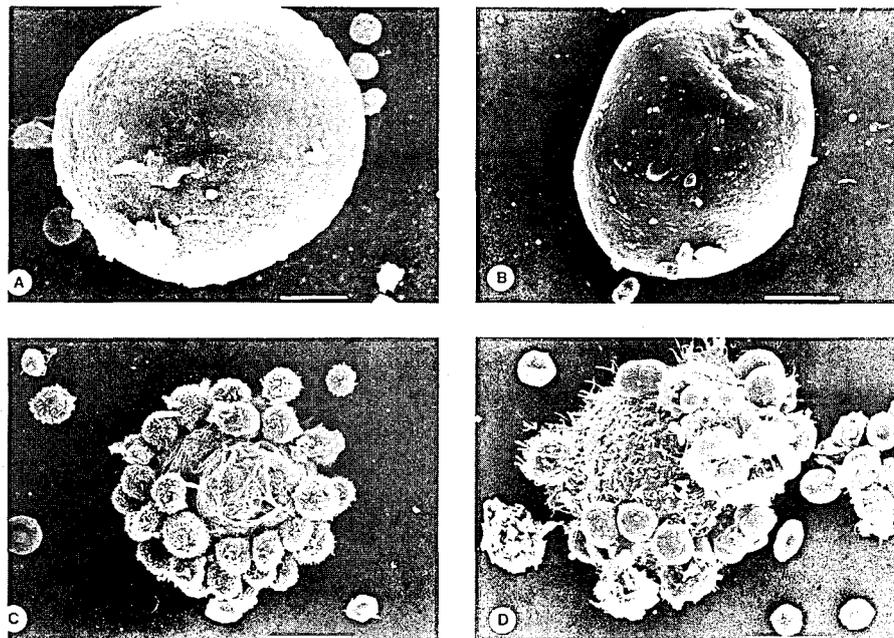


Fig.16. Scannig electron micrograph of megakaryocyte treated with agonists. The treatments were as follows: standard external solution for 30 min (A), ATP 30  $\mu$ M for 30 min (B), thrombin 10U/ml for 30 min (C) and H-8 3  $\mu$ M for 2 hours (D). The horizontal bars in the each photomicrograph represent 10 $\mu$ m.

された。

形態変化：これまでの実験結果から巨核球の  $Ca^{2+}$  動員だけでは5-HTの放出はおこらないことが示唆された。さらに超微形態学的にATPとトロンビンの作用を調べた。Fig. 16に示すように骨髄から単離した巨核球はSEMで観察すると比較的表面のなだらかな球状をしている。細胞の大きさは様々であるが細胞表面の様子はいずれも同様であった。こうした性質はATPの処理によってもほとんど変わらない (Fig. 16B) がトロンピンでは大きく変化する (Fig. 16C)。トロンピンは巨核球やその他の骨髄細胞の細胞表面に絨毛様の突起を生じさせ、凝集塊を形成する。こうした性質からトロンピン処理した骨髄細胞懸濁液中には中心の細胞が観察できないような細胞塊が多数存在し、対照群でみられたような巨核球単独での姿はほとんど観察できない。従って細胞塊の中で、他の細胞の隙間から巨核球を観察する事になるが、そうして観察される巨核球の細胞表面は極めて不規則な偽足様構造に変化したり、時には細胞質が不規則な小球を形成して核を裸にして凝集している様子が見られる。同様の形態変化はcAMP依存性プロテインキナーゼ阻害剤であるH-8で処理することによってもみられた (Fig. 16D)。H-8はトロンピンの作用よりは弱いものの巨核球の細胞表面に不規則な絨毛または偽足様構造を誘発した。同様の形態変化はcAMPのアンタゴニストであるRp-cAMPS<sup>9)</sup>によっても誘発された。したがって、巨核球の細胞形態変化には細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇よりもcAMP量の減少の方が重要な因子であるといえる。

#### 4. 考 察

ラット巨核球は細胞外から投与したATPに反応して周期的外向き電流を発生する。この外向き電流は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の振動を反映した  $Ca^{2+}$ -依存性  $K^+$  チャンネルを通る  $K^+$  電流であることを明らかにした。  $K^+$  チャンネルの性質については、先にコンベンショナルホールセル法でモルモット巨核球を調べている河の報告とほぼ一致している。しかし本実験の結果で河の報告と異なる点がいくつか存在する。一つにはアゴニストに反応して生じる電流がアゴニストの洗浄により速やかに消失し、テーリングはみられないこと、二つ目は全体的にアゴニスト濃度がかなり低いこと、最後は電流の形が一過性ではなくオシレーションであること、である。  $Ca^{2+}$  キレート剤EGTAを含まない電極内液を用いてコンベンショナルホールセル法で記録を取ればニスタチン法の場合と同様の結果が得られることから、こうした違いは  $Ca^{2+}$  キレート剤によるものと推測される。この結果から巨核球の細胞内  $Ca^{2+}$  に対する緩衝能は比較的小さいということもいえる。たぶんそれが原因でfura-2を負荷した巨核球の画像解析ではオシレーションが検出できず、一過性の上昇になる<sup>25,26)</sup>ものと考えられる。  $Ca^{2+}$  オシレーションの場合、細胞外からの信号の強さは頻度に換算されるため、一定の  $Ca^{2+}$  濃度上昇で弱い反応から強い反応にまで幅広く、しかもかなり長時間にわたって対応できる。細胞にとっては細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は時に致命的であるため、一過性の上昇で応答する場合には上昇の

程度に限度があるし、あまり長時間持続的に高濃度を維持することは不可能である。従ってオシレーションの方が信号伝達機能としては優れており、これが細胞の本来の生理機能であると考えられる。こうしたことから、巨核球の生理機能解明にはニスタチン穿孔ホールセルパッチクランプ法が適しているといえよう。

巨核球の $K^+$ 電流オシレーションはアゴニスト濃度が増加すると頻度が増加し遅延時間が短縮されるが、最大電流は比較的一定である。オシレーションには細胞外 $Ca^{2+}$ は必要ではないため、 $Ca^{2+}$ は細胞内プールから放出されるものと考えられる。 $Ca^{2+}$ チャンネルブロッカーである $10\mu M$   $La^{3+}$ がATP誘発性のオシレーションに影響しないことからこのことがいえる。血小板ではADPが $Ca^{2+}$ 電流を誘発するという報告があるが本実験条件では巨核球に $Ca^{2+}$ 電流は検出されなかった。これは巨核球と血小板とで異なる点かもしれない。

ATPを持続的に投与したときに徐々に各スパイクの間隔があいていって最後には電流が観察されなくなる現象については、高濃度のアゴニストを投与すれば反応は惹起されることと洗浄して間隔を開ければ反応性が回復することから、受容体の脱感作によると推定される。こうした脱感作現象は他の非興奮性細胞の $Ca^{2+}$ オシレーションの場合でも観察されている<sup>48-51</sup>。

巨核球のプリン受容体のアゴニスト選択性はこれまで知られているプリン受容体サブタイプに当てはまらず、独特のものである。既知のプリン受容体の中では血小板の $P_{2T}$ がATPよりADPに親和性の高い唯一のものである<sup>52</sup>が、 $P_{2T}$ ではATPはADPのアンタゴニストとして働き、アゴニストとしての作用はない。巨核球は血小板の前駆細胞であることから同じ受容体を持つものと考えられてきたが、ATPの作用については巨核球と血小板では全く違うことを明らかにした。ATPとADPがそれぞれ別々の受容体に作用している可能性は両アゴニストの間で交差脱感作がみられることから否定される。さらにATPとADPは、他の $P_2$ 受容体でも報告のあるように実際には $ATP^{i4}$ と $ADP^3$ として作用していることを示唆した。またATP  $10\mu M$ に対するアンタゴニスト、スラミンおよびRB-2の $EC_{50}$ が $10\mu M$ 以下であるということからも、実際のアゴニストは $ATP^{i4}$ と $ADP^3$ であることが示唆される。本来のアゴニストより親和性の高いアンタゴニストが見つかる可能性はそう高くはなく、本実験で用いた条件下では約1/30になる $ATP^{i4}$ や $ADP^3$ が実際のアゴニストと考える方が自然である。スラミンは非選択的 $P_2$ 受容体アンタゴニスト<sup>53,54</sup>、RB-2は $P_{2T}$ 受容体選択的アンタゴニスト<sup>55</sup>とされる。この両者が巨核球のプリン受容体のアンタゴニストとして働くことから、ADPの方がATPより強いアゴニストであるという点のぞいて、巨核球のプリン受容体は $P_{2T}$ に類似する。い

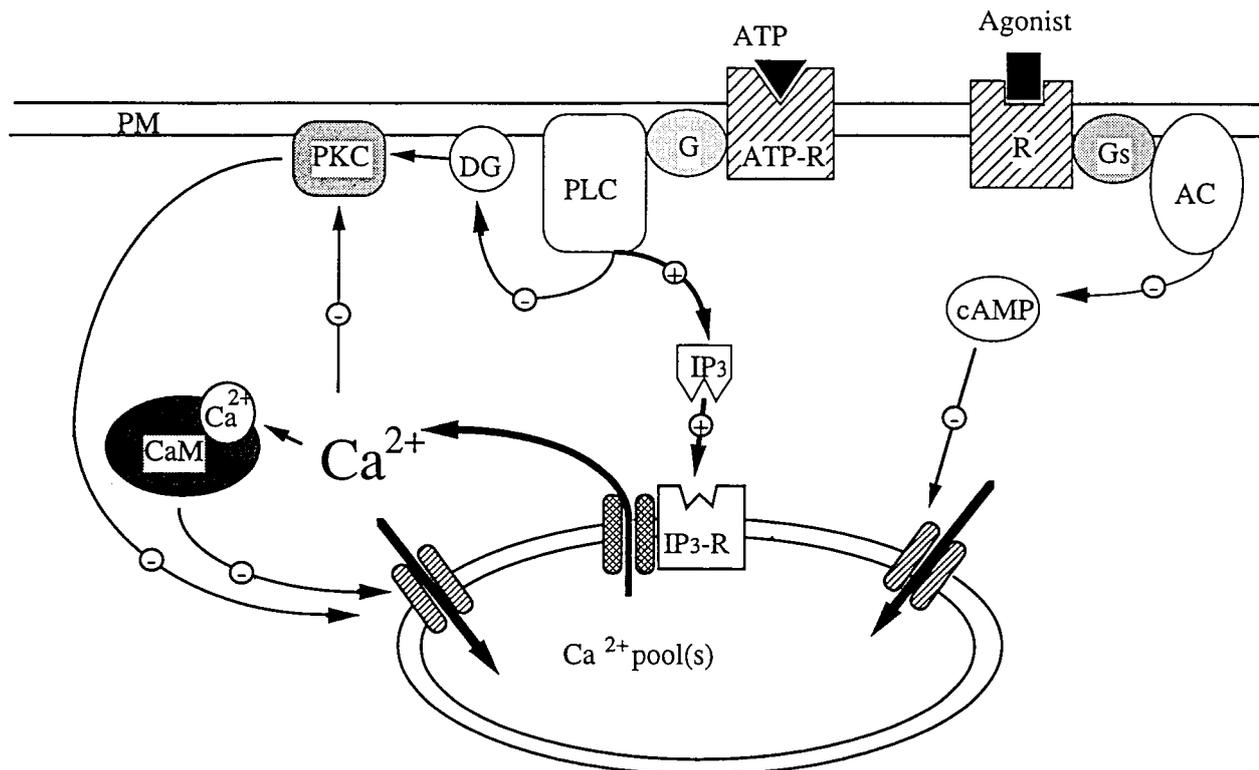
ずれにしる巨核球のプリン受容体の性質はこれまで知られていなかったものである。つけ加えるならばここで用いたATPやアンタゴニストなどの濃度は他の実験系で用いられている濃度と比較してもかなり低く<sup>56,57</sup>、従って抑制作用が薬物の細胞毒性である可能性は極めて小さい。

最終的な受容体の同定には遺伝子のクローニングなどの方法が必要ではあるが巨核球と血小板とで受容体の性質が変わる仕組みなどにも興味を持たれる。

次に巨核球のATP誘発性 $Ca^{2+}$ オシレーションのメカニズムについて、これまでに提出されたモデルを参考にしながら検討した。はじめに2-プールモデルで必要とされるCICRの存在を調べたが、CICRに作用する薬物は巨核球になんの影響も与えず、典型的なCICRは巨核球には存在しないことがわかった。しかし外液 $Ca^{2+}$ フリーでATP誘発性の反応が消失した後でもなお $Ca^{2+}$ -ATPase感受性のプール内に $Ca^{2+}$ が残存することから、巨核球の $Ca^{2+}$ プールはオシレーションに関与するものとそうでないものとの二種類があるか、オシレーションに関与する機能的に異なるプールが二種以上あってその容量が異なるという可能性が考えられる。いずれにしてもこれまでに報告されているモデルとは異なるようである。

IICRについてはFig. 8に示すように明らかに巨核球の $Ca^{2+}$ オシレーションに関与する。この場合、細胞内に投与している $IP_3$ の濃度は振動していない。従って、Cobboldらが肝細胞で<sup>49</sup>、Harootunianらが繊維芽細胞で<sup>50</sup>提唱しているような $IP_3$ 濃度が振動しているというモデルは巨核球には当てはまらない。 $IP_3$ によるオシレーションに関しては涌井らが膵腺傍細胞で報告している<sup>20</sup>ものによく似ている。ただし巨核球には膵腺傍細胞のようなカフェイン感受性のプールは存在しない。

PKC活性化と阻害によるオシレーションの阻害とパターンの変化から、PKCの活性化が細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を下げる方向に働くことが予想される。CaMの場合も同様で $Ca^{2+}$ /CaM複合体は細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を下げると考えられる。つまり受容体活性化により放出された $Ca^{2+}$ はPKCを活性化し、CaMを活性化し、これらが $Ca^{2+}$ 濃度を下げる方向に働くと予測される。CaMは形質膜及び筋小胞体の $Ca^{2+}$ ポンプを活性化して細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を下げることが知られている<sup>58,60</sup>。非興奮性細胞の細胞内 $Ca^{2+}$ プールにそのようなポンプの存在は知られていないが、形質膜だけではなく細胞内貯蔵部位にもこうしたポンプがある可能性はあると考えられる。巨核球の場合はdemarcation channelと呼ばれる発達した膜系が細胞質にあって、これらは将来血小板の形質膜になるとされる。Enyediらの報告<sup>61</sup>によればヒト血小板には形質膜タイプと筋小胞体タイプの二種類の $Ca^{2+}$ ポンプがあり、これらはいずれも巨核球由来である。さらにPollockらの研究<sup>62</sup>ではPKCは血小板形質膜の $Ca^{2+}$



**Fig.17.** Schematic representation for ATP-induced  $I_{kCa}$  oscillation in megakaryocyte. The + marks on the arrow indicate the signal which act to raise  $[Ca^{2+}]_i$ , and - marks indicate the signal which act to reduce  $[Ca^{2+}]_i$ . This diagram does not depict entry and exit pathways for  $Ca^{2+}$  across the plasma membrane to avoid complexity. AC = adenylate cyclase, CaM = calmodulin, G = GTP-binding protein, DG = diacylglycerol,  $IP_3$  = D-myoinositol triphosphate, PKC = protein kinase C, PLC = phospholipase C, PM = plasma membrane, R = receptor.

ポンプを活性化することが示唆されており、これらのことを考えあわせると巨核球の細胞内  $Ca^{2+}$  プールに PKC/CaM 感受性の  $Ca^{2+}$  ポンプが存在する可能性は高い。

巨核球の  $I_{kCa}$  オシレーションは細胞内に GTP- $\gamma$ -S を投与することでも惹起される。これは G 蛋白質の活性化が関与することを示すもので、その G 蛋白質の種類についても検討した。PTX 感受性の G 蛋白質の関与はないといえるが CTX 感受性 G 蛋白質については巨核球が cAMP により調節を受けるため断定できない。cAMP の作用点については、cAMP 量を上げる薬物が  $IP_3$  誘発性のオシレーションも抑制することから、 $IP_3$  の作用点以後での作用、すなわち  $Ca^{2+}$  貯蔵部位からの放出の阻害または  $Ca^{2+}$  取り込みの活性化が考えられる。cAMP は血小板でも凝集や分泌を抑制することが知られており<sup>63,64</sup>、この cAMP による負の調節は血小板と巨核球で共通であるといえる。

以上の実験結果に基づいて、巨核球の ATP 誘発性  $I_{kCa}$  オシレーションのモデルを作成した (Fig. 17)。細胞外から投与した ATP は受容体に結合して受容体共役 G 蛋白質を活性化する。G 蛋白質は信号をホスホリパーゼ C に伝え、細胞膜磷脂質から  $IP_3$  とジアシルグリセロールを産生する。 $IP_3$  は  $IP_3$  感受性の細胞内  $Ca^{2+}$  ストアから  $Ca^{2+}$  を動員

する。こうして動員された  $Ca^{2+}$  は先に産生されたジアシルグリセロールと協調して PKC を活性化し、PKC は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を下げる方向に働く。 $Ca^{2+}$  により活性化される  $Ca^{2+}$ /CaM 複合体もまた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を下げる方向に働く。Payne らによって提唱されている<sup>65</sup> ように高い細胞内  $Ca^{2+}$  濃度による  $IP_3$  への負のフィードバック機構も関与しているかもしれない。しかし  $IP_3$  や GTP- $\gamma$ -S の濃度が振動しなくても  $I_{kCa}$  オシレーションはおきることから PKC による ATP 受容体のダウンレギュレーションは必ずしも必要ではない。この系に対して cAMP もまた負の調節を行い、その作用点は  $Ca^{2+}$  貯蔵部位からの  $Ca^{2+}$  放出の阻害または  $Ca^{2+}$  取り込みの活性化であると推定される。なお血小板においては ATP が cAMP 濃度を上げることにより凝集を阻害することが知られていて<sup>66,67</sup>、巨核球の場合と大きく異なる。

このモデルにおいては複数の  $Ca^{2+}$  プールは必ずしも必要ではないが、プールが一つであるといえる証拠もない。巨核球は細胞内に複雑な膜系を持ち、その構成要素には少なくとも巨核球自身の小胞体と将来血小板の形質膜及び細胞内膜系になる部分とがある。これらの機能的に異なる膜系が機能の異なる細胞内  $Ca^{2+}$  プールとして存在している

可能性は大いにあると考えられる。

巨核球の  $I_{KCa}$  オシレーションは、その頻度が極めて大きいことが非興奮性細胞の  $Ca^{2+}$  オシレーションとしては特異的であるが、それが解析に要する時間が少ないというメリットでもある。ここで示したようにそのメカニズムには他の細胞と共通する部分も多く、再現性の良いことなどから  $Ca^{2+}$  オシレーションのモデルとしても極めて有用であると考えられる。

20mM 塩化アンモニウムと酢酸ナトリウムの短期投与により巨核球の細胞内 pH を再現性良くアルカリ性化または酸性化することができた。20mM 塩化アンモニウムによるアルカローシスは ATP 及び  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションをほぼ完全に抑制した。20mM 塩化アンモニウムは  $K^+$  伝導度に対して弱い阻害作用があるが、その程度が 5% と小さいことから 20mM 塩化アンモニウムによるオシレーションの阻害は  $K^+$  チャンネルへの直接作用によるものではないといえる。20  $\mu$ M 酢酸ナトリウムによるアシドーシスは ATP 及び  $IP_3$  誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションを増強する作用があった。ある種の細胞では酸性の pH により  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  チャンネルの開閉頻度が抑制されるという報告がある<sup>68)</sup>が、巨核球を whole-cell レベルで調べた場合にはそのような作用はみられなかった。従ってここで用いた薬物の  $K^+$  チャンネルへの直接作用は無視できる程度であると結論でき、 $Ca^{2+}$  オシレーションがアルカローシスにより抑制され、アシドーシスにより増強されるといえる。

種々の細胞でアゴニスト刺激による細胞内 pH の変化が報告されており、細胞内 pH の役割に関する考察もなされてきた<sup>69,70)</sup>。しかし細胞内 pH の本当の作用点については明らかになってはいない。Worley ら<sup>71)</sup>は細胞内 pH が  $IP_3$  の受容体への結合に影響することを示唆しているが Dettbarn ら<sup>72)</sup>は細胞内 pH は  $Ca^{2+}$  の放出に影響があると主張している。本研究では細胞内 pH の影響するポイントを同定することも目的とした。先の章で明らかにしたように巨核球の ATP 誘発性  $I_{KCa}$  オシレーションは、受容体刺激-G 蛋白質活性化- $IP_3$  産生-細胞内プールからの  $Ca^{2+}$  の放出- $Ca^{2+}$  の再取り込みまたは排出という信号伝達経路を介する。アシドーシスの場合は ATP 及び GTP- $\gamma$ -S 誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションを増強するが  $IP_3$  誘発性のオシレーションには影響しないため、酸性の pH で修飾されるのは  $IP_3$  産生以前で G 蛋白質活性化以後の点であるといえる。一方アルカローシスの場合は ATP, GTP- $\gamma$ -S,  $IP_3$  により誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションのすべてに対して抑制作用を示したことから、アルカリ性の pH が影響するのは  $IP_3$  産生以降の過程、つまり受容体への  $IP_3$  の結合か細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  の放出そのものであるといえる。この結果は信号伝達経路には複数の pH 感受性ステップがあることを明らかにするものである。

FCCP については巨核球の  $I_{KCa}$  オシレーションに対する二つの異なる作用が観察された。一つは単純な抑制、もう一つはオシレーションのパターンを持続的な上昇に変えることである。どちらの作用も ATP 誘発性でも  $IP_3$  誘発性のオシレーションでもみられたことから作用点は信号伝達経路の  $IP_3$  以降にあるといえる。

さらにアデニンが巨核球のプリン受容体誘発性の  $I_{KCa}$  オシレーションを濃度依存的に増強することを見いだした。他の核酸塩基には調べた限りではなんの作用も認められなかった。このアデニンによる修飾作用には cAMP や外液二価陽イオンは関与しない。先に明らかにしているように巨核球の ATP 誘発性  $I_{KCa}$  オシレーションは細胞外液二価陽イオンや細胞内 cAMP 濃度に影響されるが、アデニンの作用にはこうした因子は関与しない。さらに ATP と同様に  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発するトロンビンの作用にもアデニンは影響しない。従ってアデニンは巨核球の細胞表面、つまりアデニン受容体に作用していると推定される。この受容体はプリン受容体と何らかの相互作用を示し、場合によってはプリン受容体の一部である可能性もある。通常「プリン受容体」という単語は実際にはそのアゴニストがプリンヌクレオチドまたはプリンヌクレオシドである受容体に対して用いられてきたもの<sup>73)</sup>であるが、プリンそのものであるアデニンに反応する受容体があるとするこの用語は必ずしも適切とはいいがたくなることなどから、本発見はこの分野にとっても興味深い知見である。

また ATP とトロンビンの作用の違いを、パッチクランプ法による細胞内  $Ca^{2+}$  動員、蛍光法による 5-HT の放出、SEM による形態変化を調べることで検討した。ATP は  $I_{KCa}$  オシレーションを誘発するが放出反応や形態変化はおこさない。一方トロンビンは  $I_{KCa}$  オシレーション、放出反応、形態変化のすべてを誘発する。ATP とトロンビンにより誘発される  $I_{KCa}$  オシレーションについてはその性質に大きな違いはなく、同じメカニズムによるものと考えられる。しかし放出反応と形態変化はトロンビンに特異的である。トロンビンは  $G_q$  および  $G_i$  の両方を活性化することが知られており、ATP は  $G_q$  様の G 蛋白質を活性化する。従ってこの ATP と違うトロンビンの作用は  $G_i$  蛋白質の活性化による細胞内 cAMP 濃度の減少によるものである可能性がある。実際に cAMP を増加させるホルスコリンや cAMP アンタゴニスト Rp-cAMPS, A-キナーゼ阻害剤 H-8 はトロンビンの作用を抑制する方向に働いた。

血小板を始め多数の細胞で細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇とプロテインキナーゼ C の活性化が放出反応を引き起こすことが報告されている<sup>13,14)</sup>中で、巨核球の場合は  $Ca^{2+}$  が重要ではなく cAMP が重要だという結果は意外ともいえる。しかし巨核球の場合は ATP は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇とプロテインキナーゼ C の活性化を誘発するにも関わらず形態

変化を誘発しないので、たとえある細胞とその直前の前駆細胞との間であっても細胞によりセカンドメッセンジャーの役割は異なるものと結論される。こうした違いは何らかの生理的役割の違いを反映するものと考えられるが現時点ではその意義までは明らかではない。しかし今後の研究課題として極めて興味深いものである。

以上、巨核球のATP誘発性Ca<sup>2+</sup>オシレーションをめぐって、受容体や細胞内信号伝達経路、薬物による影響などの様々な点について解明した。こうした研究により巨核球及びその他の生きている細胞の生理機能に関する知見がいつそう深まることを期待する。

本稿は以下の報告を要約したものである。

- i) Uneyama, C., Uneyama, H. and Akaike, N.: Cytoplasmic calcium oscillation of rat megakaryocyte evoked by novel type of purinoceptor. *J. Physiol. (Lond)*, **470**, 731~749 (1993)
  - ii) Uneyama, H., Uneyama, C., Ebihara, S. and Akaike, N.: Suramin and reactive blue2 are antagonists for newly identified purinoceptor on rat megakaryocyte. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 245~249 (1994)
  - iii) Uneyama, H., Uneyama, C. and Akaike, N.: Intracellular mechanisms of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillation in rat megakaryocyte. *J. Biol. Chem.*, **268**, 168~174 (1993)
  - iv) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M. and Akaike, N.: Cytoplasmic pH regulates ATP~induced Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> current oscillation in rat megakaryocyte. *Biochem. J.*, **295**, 317~320 (1993)
  - v) Uneyama, C., Imazawa, T., Uneyama, H., Akaike, N., Kawanishi, T. and Takahashi, M.: Not Ca<sup>2+</sup> but cAMP is the second messenger for morphological changes in rat megakaryocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 282~288 (1995)
  - vi) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M. and Akaike, N.: FCCP modulation of Ca<sup>2+</sup> oscillation in rat megakaryocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **268**, 455~458 (1994)
  - vii) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M. and Akaike, N.: Biological actions of purines on rat megakaryocytes: potentiation by adenine of the purinoceptor~operated cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillation. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 349~351 (1994)
- さらに関連論文として以下のものがある
- viii) -kaike, N., Uneyama, H., Kawa, K. and Yamashita, Y.: Existence of rolipram-sensitive phosphodiesterase in rat megakaryocyte. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 1020~1023 (1993)
  - ix) Akaike, N. and Uneyama, H.: ATP-induced K<sup>+</sup> current oscillation in megakaryocytes: A unique purinoceptor. *News In Physiological Sciences*, **9**, 49~53 (1994)
  - x) Uneyama, C., Uneyama, H., Takahashi, M. and Akaike, N.: Pharmacological studies on mechanisms involved in Ca<sup>2+</sup> oscillations in rat megakaryocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **291**, 381~386 (1995)
  - xi) Uneyama, C., Uneyama, H., Narisawa, K., Takahashi, M. and Akaike, N.: Kinetic characteristics of thrombin

receptor-mediated responses in rat megakaryocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **319**, 299~305 (1997)

## 文 献

- 1) Tavassoli, M.: *Blood*, **55**, 537-545 (1980)
- 2) Radly, J. M. and Scurfield, G.: *Blood*, **56**, 996~999 (1980)
- 3) Zucker-Franklin, D. and Petursson, S.: *J. Cell Biol.*, **99**, 390~402 (1984)
- 4) Schick, B. P., Schick, P. K. and Chase, P. R.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **663**, 239~248 (1981)
- 5) Rabellino, E. M., Nachman, R. L., Williams, N., Winchester, R. J. and Ross, G. D.: *J. Exp. Med.*, **149**, 1273~1287 (1979)
- 6) Leven, R. M. and Tablin, F.: *Am. J. Pathol.*, **132**, 417~426 (1988)
- 7) Hill, R. J., Leven, R. M., Leven, F. C. and Levin, J.: *Experimental Hematology*, **17**, 903~907 (1989)
- 8) Nagasawa, T., Et Al.: *FEBS Letters*, **260**, 176~178 (1990)
- 9) Shaw, T.: *Mutat. Res.*, **200**, 67~97 (1988)
- 10) Nishizuka, Y.: *Nature*, **308**, 693~698 (1984)
- 11) Walker, T. R. and Watson, S. P.: *Biochem. J.*, **289**, 277~282 (1993)
- 12) Rink, T. J.: *Annu. Rev. Physiol.*, **52**, 431~449 (1990)
- 13) Kroll, M. H. and Schafer, A. I.: *Blood*, **74**, 1181~1195 (1989)
- 14) Maruyama, Y.: *J. Physiol.*, **391**, 467~485 (1987)
- 15) Sanchez-Bueno, A., Dixon, C. J., Woods, N. M. and Cuthbertson, K. S. R.: *Biochem. J.*, **268**, 627~632 (1990)
- 16) Osipchuk, Y. V., Wakui, M., Yule, D. I., Gallacher, D. V. and Petersen, O. H.: *EMBO J.*, **9**, 697-704 (1990)
- 17) Jacob, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1052**, 427~438 (1990)
- 18) Tse, A. and Hille, B.: *Science*, **255**, 462~464 (1992)
- 19) Sage, S. O., Adams, D. J. and Van Breemen, C.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 6~9 (1989)
- 20) Wakui, M., Potter, B. V. L. and Petersen, O. H.: *Nature*, **339**, 317~320 (1989)
- 21) Meyer, T. and Stryer, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5051~5055 (1988)
- 22) Horn, R. and Marty, A.: *J. Gen. Physiol.*, **92**, 145~159 (1988)
- 23) Murase, K., Ryu, T. D. and Randic, M.: *Neurosci. Lett.*, **103**, 56~63 (1989)
- 24) Nakagawa, T., Komune, S., Uemura, T. and Akaike, N.: *J. Neurophysiol.*, **65**, 715~723 (1991)
- 25) Ikeda, M., Kurokawa, K. and Maruyama, Y.: *J. Physiol.*, **447**, 711~728 (1992)
- 26) Kawa, K.: *J. Physiol.*, **431**, 207~224 (1990)
- 27) Marty, A. and Neher, E. Tight-Seal Whole-Cell Recording. 1-107-122 (Plenum Press, New York, London, 1983).
- 28) Dahlquist, R. and Diamant, B.: *Acta Pharmacologica Et Toxicologica*, **34**, 368~384 (1974)
- 29) Cockcroft, S. and Gomperts, B. D.: *J. Physiol.*, **296**, 229~243 (1979)
- 30) Taqui-Khan, M. M. and Martell, A. E.: *Journal Of American Chemical Society*, **88**, 668~671 (1966)
- 31) Nathenas, J., Dexter, J. and Katzman, R.: *Biochem. Med.*, **8**, 257~267 (1973)
- 32) Greenberg, S., Virgilio, F. D., Steinberg, T. H. and Silver-

- stein, S. C.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 10337~10343 (1988)
- 33) Berridge, M. J. and Irvine, R. F.: *Nature*, **341**, 197~205 (1989)
- 34) Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. and Dawson, A. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2466~2470 (1990)
- 35) Pusch, M. and Neher, E.: *Pflügers Arch*, **411**, 204~211 (1988)
- 36) Sage, S. O., Jobson, T. M. and Rink, T. J.: *J. Physiol.*, **420**, 31~45 (1990)
- 37) Zavoico, G. B., Edward J. Cragoe, J. and Feinstein, M. B.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 13160~13167 (1986)
- 38) Siffert, W. and Akkerman, J. W. N.: *Nature*, **325**, 456~458 (1987)
- 39) Zavoico, G. B. and Edward J. Cragoe, J.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 9635~9639 (1988)
- 40) Heytler, P. G.: *Meth. Enzymol.*, **55**, 462~471 (1979)
- 41) Biscoe, T. J. and Duchen, M. R.: *J. Physiol.*, **428**, 39~59 (1990)
- 42) Duchen, M. R., Valdeolillos, M., O'Neill, S. C. and Eisner, D. A.: *J. Physiol.*, **424**, 411~426 (1990)
- 43) Duchen, M. R. and Biscoe, T. J.: *J. Physiol.*, **450**, 33~61 (1992)
- 44) Mclaughlin, S. G. A. and Dilger, J. P.: *Physiol. Rev.*, **60**, 825~863 (1980)
- 45) Galvan, A. and Lucas, M.: *Biomed. Biochem. Acta*, **46**, 677~682 (1987)
- 46) Lucas, M., Galvan, A., Solano, P. and Goberna, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **731**, 129~136 (1983)
- 47) Jensen, J. R. and Rehder, V.: *Brain Res.*, **551**, 311~314 (1991)
- 48) Woods, N. M., Cuthbertson, K. S. R. and Cobbold, P. H.: *Nature*, **319**, 600~602 (1986)
- 49) Woods, N. M., Cuthbertson, K. S. R. and Cobbold, P. H.: *Cell Calcium*, **8**, 79~100 (1987)
- 50) Rooney, T. A., Sass, E. J. and Thomas, A. P.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 17131~17141 (1989)
- 51) Harootunian, A. T., Kao, J. P. Y. and Tsien, R. Y.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **53**, 935~943 (1989)
- 52) Gordon, J. L.: *Biochem. J.*, **233**, 309~319 (1986)
- 53) Hourani, S. M. O., Hall, D. A. and Nieman, C. J.: *Br. J. Pharmacol.*, **105**, 453~457 (1992)
- 54) Dunn, P. M. and Blakeley, A. G. H.: *Br. J. Pharmacol.*, **93**, 243~245 (1988)
- 55) Burnstock, G. and Warland, J. J. I.: *Br. J. Pharmacol.*, **90**, 383~391 (1987)
- 56) Hertog, A. D., Nelemans, A. and Akker, J. V. D.: *Eur. J. Pharmacol.*, **166**, 531~534 (1989)
- 57) Inoue, K., Nakazawa, K., Ohara-Imaizumi, M., Obama, T., Fujimori, K. and Takanaka, A.: *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 581~584 (1991)
- 58) Harootunian, A. T., Kao, J. P. Y., Paranjapse, S., Adams, S. R., Potter, B. V. L. and Tsien, R. Y.: *Cell Calcium*, **12**, 153~164 (1991)
- 59) Carafoli, E.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12**, S77-S84 (1988)
- 60) Edes, I. and Kranias, E. G.: *Membr. Biochem.*, **7**, 175~192 (1987)
- 61) Enyedi, A., Sarkadi, B., Foldes-Papp, Z., Monostry, S. and Gardos, G.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 9558~9563 (1986)
- 62) Pollock, W. K., Sage, S. O. and Rink, T. J.: *FEBS Lett.*, **210**, 132~136 (1987)
- 63) Ushiyama, S., Handa, S. and Yamazaki, M.: *Prostaglandins*, **36**, 477~489 (1988)
- 64) Kroll, M. H. and Schafer, A. I.: *Blood*, **74**, 1181~1195 (1989)
- 65) Payne, R., Flores, T. M. and Fein, A.: *Neuron*, **4**, 547~555 (1990)
- 66) Krishnamurthi, S., Patel, Y. and Kakkar, V. V.: *Biochem. J.*, **250**, 209~214 (1988)
- 67) Soslau, G. and Parker, J.: *Blood*, **74**, 984~993 (1989)
- 68) Kume, H., Takagi, K., Satake, T., Tokuno, H. and Tomita, T.: *J. Physiol.*, **424**, 445~457 (1990)
- 69) Ives, H. E. and Daniel, T. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1950~1954 (1987)
- 70) Danthuluri, N. R., Kim, D. and Brock, T. A.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 19071~19076 (1990)
- 71) Worley, P. F., Baraban, J. M., Supattapone, S., Wilson, V. S. and Snyder, S. H.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 12132~12136 (1987)
- 72) Dettbarn, C. and Palade, P.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 8993~9001 (1991)
- 73) Burnstock, G. In Cell Membrane Receptors For Drugs And Hormones: A Multidisciplinary Approach (Eds. Bolis, L. & Straub, R. W.) 107~118 (Raven Press, New York, 1978).