

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金—中国人研究者・技術者招聘—報告書

2001 年 3 月 9 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 桂木 猛 

所属機関名： 福岡大学

所属部署： 医学部 職名： 教授

所在地： 〒 814-0180 福岡市城南区七隈 7-45-1

電話： 092-801-1011 内線： 3323

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ ATPのオートクリン/パラクリン放出とその痛みシグナルへの関与

3. 成果の概要 (100字程度)
細胞外へ放出されるATPの起源が小胞体 (ER) であることを明らかにするための研究を行った。ATP transporter (VNUT) の抗体を用いNIH3T3およびNRK細胞のERへの発現について検討し、いずれも特異的な発色が認められた。またATPの蛍光アナログであるMant ATPのMDCK細胞への取り込み実験を行ないERでのこのマーカーの蛍光染色が確認された。今後は単離ERからATP放出実験および痛みシグナルへのATPの関与について検討を行う予定である。

4. 被招聘者
氏名： 孙 竞 職名： 講師
所属機関： 中国上海同济大学 部署： 口腔医学院

5. 滞在日程概要 (日付、主な活動・工程等)

H20年7月～9月、MDCK細胞の大量培養を行い、さらにこれより高速遠心分離を行ない最終的にマイクロゾーム分画を採取した。しかしマイクロゾームのダメージが大きく、これを用いたATP放出実験を断念。現在、小胞体抽出キットによる方法を検討中である。

H20年10月～12月、ATP transporter (VNUT)抗体を入手し、本抗体のNIH3T3細胞の小胞体への発現の有無を検討した。

H21年1月～3月、MDCK細胞、小胞体のATP蛍光アナログのMant ATPの取り込み実験を行った。

ATPのオートクリン/パラクリン放出とその痛みシグナルへの関与

研究者氏名 孫 競
中国所属機関 上海同済大学 講師
日本研究機関 福岡大学医学部
指導責任者 教授 桂木 猛、講師 緒方 繁憲

要 旨

近年、ATPはシグナル伝達物質として、広く細胞外へ放出されることが知られている。

そこで、放出されるATPの細胞内起源を探る目的で、小胞体(ER)に着目し、先ず、ATP transporter(VNUT)が小胞体内に存在するか否かについて、cell lineを用いて検討を行った。その結果、マウス由来のNIH3T3細胞の小胞体においてVNUTによる蛍光が発現し、これが小胞体であることはER蛋白であるPDIの蛍光と全く一致した。しかし、ゴルジ体の蛋白のGM130の蛍光とは、重ならなかった。次いで、ATPの蛍光アナログであるMant ATPについてMDCK細胞への取り込み実験を行った。0.5 mM ATPにより膜透過性を亢進させてMant ATPをloadしたところ、MDCK細胞内が蛍光染色された。この蛍光部位が小胞体であることは、ER-Tracker Redによる染色とのmergeにより確認された。

以上の結果、放出されるATPの細胞内起源が小胞体である可能性が、示唆された。

Key Words ATP, ATP transporter, NIH3T3細胞, 小胞体, MantATP.

緒 言 :

ATPはエネルギー供給系としての細胞内での役割に加え、近年、オートクリン/パラクリン物質として細胞外へ放出され、細胞膜上の種々のATP受容体を介して、痛み、炎症、さらに免疫などの広汎な細胞機能の調節物質である事が、明らかにされてきた(1)。しかしながら、現在、ATPの細胞外輸送のメカニズム、そこに至る細胞内シグナル機構、さらにその細胞内放出部位についてはほとんど不明のままである。

報告者のグループは、ATP放出機構について長年研究を重ね、caffeine(2)やadenosine(3)、に加え、bradykinin(4)、angiotensin II(5)などのペプチド類が有効なATP放出物質であることを見出し、その放出に至る細胞内シグナル経路について検討し、Ins(1,4,5)P₃経路の重要性を明らかにしてきた(4,5)。Caged Ins(1,4,5)P₃をloadした培養細胞からフォトフラッシュによりATPが放出されること、また、過塩素酸処理培養細胞からのATP放出が小胞体に由来する可能性を示す結果が得られた(4)。

そこで、本研究では、最近、同定されたATP transporter(VNUT)抗体を入手したので、これによる小胞体への特異的な発現が見られるか否か、また、ATPの蛍光アナログのMant ATPが小胞体に取り込まれるかについて検討し、ATP放出の細胞内起源が小胞体である可能性を明らかにする。

方 法 :

細胞培養

MDCK細胞を始めNIH3T3細胞などのcell lineはDullbecco's modified Eagle medium (D-MEM)にペニシリン-G、ストレプトマイシン、10%FCSを加えた培養液中で、37℃のCO₂インキュベーターにて1-2日間培養した。

ATP transporter (VNUT)の同定

Cover glass 上で NIH3T3 細胞などの培養を行い、これを 16%パラホルムアルデヒド、0.1% Saponin で処理した後、VNUT などの第 1 抗体を 1 時間浸漬し、さらに洗浄後 Alexa Fluor 4884 などの第 2 抗体を加え、現れる蛍光を蛍光顕微鏡（カールツワイス製）にて観察した。また、蛍光部位を特定するために、ゴルジマーカは GM130 を、小胞体マーカは PDI の各蛋白をそれぞれ第 1 抗体として用いた。なお、VNUT 抗体は、岡山大学、守山教授より譲り受けた(6)。

MantATP の取り込み実験

MDCK 細胞を glass bottom dish に培養し、膜透過性を亢進させるために以下の実験を行った。培養液を A 液 (NaCl、136.9 ; KCl、5.9 ; ATP、0.5 ; glucose、5.6 ; HEPES、4.2 (mM)) に替え、10 分間浸漬し、1 mM MgCl₂ を加えた後、洗浄し、B 液 (NaCl、136.9 ; KCl、5.9 ; CaCl₂、1.5 ; MgCl₂、1.2 ; glucose、5.6 ; HEPES、4.2 (mM)) に替え、2-2.5 時間浸漬した。この細胞への 360nm および 446nm の励起および蛍光波長で現れる MantATP の蛍光は、蛍光顕微鏡(ニコン製)にて観察した。データ処理は Metahmorph にて行われた。なお、これが小胞体由来である事の同定は、ER Tracker Red (励起、568nm ; 蛍光、590nm) によって確認した。

結果と考察 :

ATP transporter (VNUT) の小胞体における発現

入手した VNUT 抗体は、マウス由来のポリクロナール抗体であるため、マウス由来の NIH3T3 細胞における本抗体の蛍光の発現について検討した。その結果、NIH3T3 細胞で VNUT 抗体の明瞭な発現が見られ、これが小胞体であるか否かの確認のため、小胞体の特異蛋白である PDI 抗体での蛍光染色の結果、VNUT 抗体は確かに小胞体の特異的に染色したことが明らかになった。一方、ゴルジ体の特異抗体である GM130 の発現部位は VNUT のそれとは全く異なっていた (Fig. 1)。この結果から、小胞体には ATP を取り込む蛋白が存在することが明らかとなり、それにより、ATP が小胞体内へ蓄積する可能性が示唆される。

MantATP の小胞体への取り込み。

ATP の蛍光アナログである MantATP を ATP を含む膜透過液で処理した後、MDCK 細胞に取り込ませた。その結果、細胞内に MantATP の蛍光が現れ、これが小胞体であることは小胞体のマーカである ER Tracker Red による merge により確認された (Fig. 2)。

現在、小胞体に ATP が存在すかどうかは、明らかにされていないが、これらの結果は、ATP が小胞体内に存在する可能性を強く支持するもので、計画中の単離小胞体を用いた ATP 放出実験の結果が大いに期待される。

参考文献 :

1. 桂木 猛、右田 啓介:オートクリン/パラクリン分子としてのATPの放出機構、日本薬理学雑誌、Vol. 123、382-388 (2004).
2. Katsuragi, T., Sato, C., Usune, S., Ueno, S., Segawa, M., Migita, K. : Caffeine-inducible ATP release is mediated by Ca²⁺-signal transducing system from endoplasmic reticulum to mitochondria. Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 378, 93-101 (2008).
3. Migita, K., Zhao, Y., Katsuragi, T. : Mitochondria play an important role in adenosine-induced ATP release from Median-Darby canine kidney cells. Biochem. Pharmacol. 73, 1676-1682 (2007).
4. Zhao, Y., Migita, K., Sato, C., Usune, S., Iwamoto, T., Katsuragi, T. : Endoplasmic reticulum is a key organelle in bradykinin-triggered ATP release from cultured smooth muscle cells. J. Pharmacol. Sci. 105, 57-66 (2007).
5. Katsuragi, T., Sato, C., Lou, G., Honda, K. : Inositol(1,4,5)trisphosphate signal triggers a

receptor-mediated ATP release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 686-690 (2002).

6. Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., Moriyama, Y.: Identification of vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 5683-5686 (2008).

作成日 : 2009年3月9日