

氏 名 Amal Kumar Dutta

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第706号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 ATP-conductive channel and ATP release:Regulation by  
arachidonic acid and activation in ischemic  
conditions

論文審査委員 主 査 教授 河西 春郎  
教授 岡田 泰伸  
教授 森 泰生  
教授 曾我部 正博（名古屋大学）  
助教授 挾間 章博（岡崎国立共同研究機構統合バイ  
オサイエンスセンター）

## 論文内容の要旨

Mouse mammary C127 cells responded to hypotonic stimulation with activation of the volume-dependent ATP-conductive large-conductance (VDACL) anion channel and massive release of ATP. Arachidonic acid down-regulated both VDACL currents and swelling-induced ATP release in the physiological concentration range with the  $K_d$  value of 4 - 6  $\mu\text{M}$ . The former effect observed in the whole-cell or excised patch-clamp mode was more prominent than the latter effect observed in intact cells. The arachidonate effects were direct and not mediated by downstream metabolic products, as evidenced by their insensitivity to inhibitors of arachidonate-metabolizing oxygenases and by the mimicking effect of *cis*-unsaturated fatty acids, which are not substrates for oxygenases. A membrane-impermeable arachidonate analog, arachidonyl coenzyme A, was effective only when applied from the cytosolic side of membrane patches, suggesting that the binding site is localized intracellularly. Non-charged arachidonate analogs as well as *trans*-unsaturated and saturated fatty acids had no effect on VDACL currents and ATP release, indicating the importance of arachidonate's negative charges and a specific hydrocarbon chain conformation in the inhibitory effect. VDACL anion channels were inhibited by arachidonic acid in two different ways: channel shutdown ( $K_d$  of 4 - 5  $\mu\text{M}$ ) and reduced unitary conductance ( $K_d$  of 13 - 14  $\mu\text{M}$ ) without affecting voltage dependence of open probability. ATP<sup>4-</sup>-conducting inward currents measured in the presence of 100 mM ATP in the bath were also reversibly inhibited by arachidonic acid. Thus, he concludes that swelling-induced ATP release and its putative pathway, the VDACL anion channel, are under a negative control by intracellular arachidonic acid signaling in mammary C127 cells.

From neonatal rat cardiomyocytes in primary culture, ATP was found to be massively released by hypotonic stress or chemical ischemia produced by application of metabolic inhibitors. The release of ATP both in ischemic and hypotonic conditions was time-dependent and displayed an initial peak followed by a sustained phase as detected by a luciferine/luciferase ATP assay method. The local concentration of ATP near the cell surface during hypotonic or ischemic stimulation was found to exceed micromolar levels estimated by a biosensor technique. In the cell-attached configuration of patch-clamp, either hypotonic or ischemic stimulation activated an anion channel of large conductance after a lag period of 5-8 min. The currents displayed voltage- and time-dependent inactivation at potentials larger than  $\pm 20$  mV. The single-channel conductance was app. 400 pS, with a linear current-voltage relationship. The channel was anion-selective and exhibited ATP permeability with  $P_{\text{ATP}}/P_{\text{Cl}}$  of  $\sim 0.1$ . The maxi-Cl channel activity and swelling-induced ATP release were both inhibited by NPPB, SITS,  $\text{Gd}^{3+}$ , and arachidonic acid, but not by glibenclamide. The biophysical as well as pharmacological profiles of large-

conductance channels in cardiomyocytes were essentially identical to those of VDACL channel in C127 cells.

Both massive release of ATP and activation of large-conductance anion channel were observed also when cardiomyocytes were subjected to hypoxia. In this experimental condition, in addition to the full-amplitude of VDACL unitary current, cell-attached patches contained single-channel events with unitary conductance of app. half of large-conductance channel size (~250-200 pS). Voltage dependency, anion selectivity and ATP permeability of this half-sized channel event were similar to these parameters of full-sized VDACL channel event. He concludes that this smaller amplitude represents a sub-state of fully open VDACL channel. The sub-state channel activity was predominant in the cell-attached patch mode (especially in hypoxic conditions) than in the inside-out mode. Thus, it is concluded that ATP is released from cardiomyocytes in response to pathophysiological situations, like cell swelling and ischemia or hypoxia, and the VDACL channel serves as the conductive pathway for ATP release from cardiomyocytes.

## 論文の審査結果の要旨

多くの細胞は細胞膨張刺激に対して活性化して大量の ATP を細胞外に放出し、放出された ATP はプリン受容体を介して様々の組織応答を引き起こすことが知られている。この ATP 放出機構には不明の点が多い。Dutta Amal Kumar 君は、この放出には容積依存性 ATP 透過性アニオンチャンネル(VDACL)が関与することを乳腺由来の C127 株細胞で初めて見出し、チャンネルの特徴づけを行った。続いて、初代心筋細胞においても、同様な特性を持つチャンネルを見出し、細胞の膨張や虚血時の ATP 放出への関与を初めて明らかにした。

まず、ATP 放出を起こすアニオンチャンネルの種類について、C127 細胞で調べた結果、容積増大に伴い、400 pS の大きなコンダクタンスを持ち、整流性がなく、膜電位・時間依存的な不活性化を示すチャンネルが開口することが、単一チャンネルレベルで突き止められた。このチャンネルは ATP を塩素イオンの一割くらいの通しやすさで透過することが電気生理学的に確認され、容積依存性 ATP 透過性アニオンチャンネル(VDACL) と命名した。このチャンネルは、NPPB, SITS,  $Gd^{3+}$  で阻害されたが、他の代表的なアニオンチャンネルで ATP 透過チャンネルの候補であった CFTR や外向き整流性塩素イオンチャンネル(VSOR)の阻害剤である glibenclamide で阻害されなかった。更に、アラキドン酸は、VDACL チャンネル及び ATP 放出を同様に阻害することが明らかになった。これらのことは VDACL の ATP 放出への関与を支持する。アラキドン酸は、細胞膜内側より作用し、その作用はシス不飽和脂肪酸に特異的であり、アラキドン酸代謝酵素群の阻害剤の影響を受けないので、アラキドン酸の VDACL への直接作用が示唆された。

続いて、初代培養の心筋細胞において同様な研究を行った結果、容積増大及び酸素欠乏によって VDACL チャンネルが開口することをはじめで見出した。その特性は、単一チャンネルコンダクタンス、薬理学的特徴など C127 細胞のそれとほとんど同一であった。この標本においては、PC12 細胞を用いたバイオセンサー法を用いて、ATP 放出を測定した結果、ATP の局所濃度がマイクロモルに達することがわかった。また、この放出はアラキドン酸で強く抑制され、VDACL チャンネルが ATP 放出に大きく関与していることが強く示唆された。

博士論文の内容は既に二つの原著論文になっており、もう一つは準備中である。審査委員会はこれらのことから本研究が生理学専攻の博士論文に十分なものと判断した。

公開の発表会とそれに続く非公開の審査委員会で、Dutta 君は様々の質問に適切に答えたので、専門および周辺分野の知識や理解力については、博士号取得に十分と判断した。

英語の実力は、英文要旨の他に Dutta 君が書いた学位論文を審査委員全員で見て、十分と判断した。