

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860150

研究課題名(和文) コリン作動性ニューロンにおける新たなコリン代謝経路の解明

研究課題名(英文) Novel choline metabolic pathway via P2X receptor

研究代表者

石井 俊行 (Ishii, Toshiyuki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10643140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：コリン作動性ニューロンはコリンからアセチルコリンを合成しており、従来コリントランスポーターが唯一のコリン取り込み経路であると考えられてきた。しかし、P2X受容体がコリンに対する透過性を有するならば、チャネルを介した新たなコリン取り込み経路が存在することになる。そのため本研究は、P2X受容体がコリン透過性を有するかどうかを明らかにすることを目的とし実施した。HEK293細胞にP2X2受容体を発現させた標本、ならびにP2X2受容体を発現するコリン作動性ニューロンにてコリンの透過性が認められた。これらの結果、コリン作動性ニューロンは、コリンの取り込みにP2X2受容体も利用している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Choline uptake into the presynaptic terminal of cholinergic neurons is mediated by the high affinity choline transporter and is essential for acetylcholine synthesis. Under specific conditions, P2X2 purinoceptors acquire permeability to large cations, and therefore potentially could act as a non-canonical pathway for choline entry into neurons. We tested this hypothesis in cholinergic neurons which express P2X2 purinoceptors. ATP-induced choline currents were observed in the cholinergic neurons. Pharmacological analysis confirmed that the cation channels mediating ATP-activated choline currents were P2X2 purinoceptors. Accordingly, P2X2-purinoceptors expressed in HEK293 cells were permeable to choline and similarly functioned as a choline uptake pathway. These findings support the hypothesis that P2X2 purinoceptors function as a novel choline transport pathway and may provide a new regulatory mechanism for cholinergic signaling transmission at synapses of cholinergic neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：P2X cholinergic neuron retina starburst amacrine cell

1. 研究開始当初の背景

ATP は、生命において代謝や合成などのエネルギー源として広く用いられている。従来からよく知られているこれらの役割に加え、ATP による細胞外シグナル伝達が近年注目されている。ATP の受容体の一つである P2X 受容体は非選択的陽イオンチャネルであり、ナトリウムを始め、コリンよりも分子量が大きな N-メチル-D-グルカミン等、様々な大きさの陽イオンへの透過性を有している。このことは、P2X 受容体が巨大陽イオンであるコリンに対しても透過性を示すことを示唆するものである。

しかしながら、これまでに *in vitro* の発現系で P2X 受容体を介した様々な巨大陽イオンの透過性が調べられてきたにもかかわらず、生体内で広く利用されているコリンの透過性は明らかにされてこなかった。また、*in vitro* の実験系で観察された P2X2 受容体の巨大陽イオンに対する透過性が生体組織においても機能している機構なのかどうかについても報告がなかった。

コリン作動性ニューロンは、コリンをコリントランスポーターを介して取り込み、アセチルコリンを合成している。しかし、もし網膜のコリン作動性ニューロンに発現している P2X 受容体が、細胞内へのコリン流入経路となっているならば、チャネルを介して流入したコリンもアセチルコリンの合成に使われている可能性がある。網膜には 2 種類のコリン作動性ニューロンが知られており、外界が明るくなった時に情報を伝達する ON 型と、外界が暗くなった時に情報を伝達する OFF 型が存在する。申請者らは、予備的研究として網膜内のコリン作動性ニューロンにおけるコリントランスポーターの分布を免疫組織化学的染色により確認したところ、OFF 型よりも ON 型コリン作動性アマクリン細胞で強い免疫反応がみられた。一方、P2X2 受容体の分布はコリントランスポーターの分布と対称的であり、ON 型よりも OFF 型で強い免疫反応が認められた。このことから、OFF 型コリン作動性ニューロンの P2X2 受容体がイオンチャネルを介してコリンを取り込むことで、トランスポーターを介した取り込みの不足分を補っている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

- (1) P2X 受容体がコリンを透過するかどうかを検討する。
- (2) 細胞内コリン取り込み経路として、コリントランスポーターと P2X 型プリン受容体を比較検討する。

3. 研究の方法

予備的検討より得られた免疫組織化学的染色の結果及び、以降の薬理的検討の結果、網膜におけるコリン作動性ニューロンで主

に発現している P2X 受容体サブタイプは、7 種類 (P2X1~P2X7) のうち、P2X2 受容体であったことから、以降、P2X2 受容体をターゲットとして検討した。

- (1) P2X2 受容体のコリン透過性
 - ① 網膜におけるコリン作動性ニューロンが有する P2X 受容体のサブタイプを薬理的に検討した。
 - ② HEL293 細胞に P2X2 受容体を発現させ、ATP の暴露時にコリンに対する透過性を示すかどうかをパッチクランプ法ならびに高速液体クロマトグラフィーにて検討した。
 - ③ P2X2 受容体を有するコリン作動性ニューロンが ATP の暴露時にコリンに対する透過性を示すかどうかを検討するため、網膜単離神経細胞標本作製し、パッチクランプ法にて検討した。
- (2) コリントランスポーターと P2X2 受容体の比較
 - ① 予備的検討でみられた P2X2 受容体とコリントランスポーターの分布の違いを確認した。
 - ② P2X2 受容体の発現量が多い OFF 型コリン作動性ニューロンと、P2X2 受容体の発現量が少ない ON 型コリン作動性ニューロンの中で、P2X2 受容体を介して細胞内に流入するコリン電流の量に差がみられるかどうかについて検討するため、形態学的な位置情報が保持されている網膜薄切切片標本作製し、パッチクランプ法にて検討した。

4. 研究成果

- (1) HEK293 細胞に P2X2 受容体を発現させた標本、ならびに P2X2 受容体を有するコリン作動性ニューロンにて、ATP の暴露時にコリンの透過性が認められた。
- (2) ATP の暴露時におけるコリン電流の量は OFF 型コリン作動性ニューロンの方が ON 型コリン作動性ニューロンよりも多く、免疫組織化学的検討の結果と一致した。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

- [雑誌論文] (計 4 件)
- ① Ichinohe S., Ishii T., Takahashi H., and Kaneda M. (2016) Physiological contribution of P2X receptors in postreceptor signal processing in the mouse retina. *Neurosci. Res.* 115: 5-12.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2016.09.012>

- ② Komuta Y., Ishii T.**, Kaneda M., Ueda Y., Miyamoto K., Toyoda M., Umezawa A., and Seko Y. (2016) In vitro transdifferentiation of human peripheral blood mononuclear cells to photoreceptor-like cells. *Biol. Open*. 5: 709-719.
DOI:http://dx.doi.org/10.1242/bio.016477
- ③ Ishii T., Iwasawa S., Kurimoto R., Maeda A., Takiguchi Y., and Kaneda M. (2015) Crizotinib-induced abnormal signal processing in the retina. *PLoS One*. 10(8):e0135521.
DOI:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135521
- ④ Ishii T. and Kaneda M. (2014) ON-pathway-dominant glycinergic regulation of cholinergic amacrine cells in the mouse retina. *J Physiol. (Lond.)*, 592:4235-4245.
DOI:http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2014.271148

* corresponding author

** co-first author

[学会発表] (計 12 件)

- ① Kaneda M., Ishii T., Homma K., Mano A., Shigematsu Y., Shimoda Y., and Kakinuma Y. Choline transport through P2X2-purinergic receptors in the mouse retina. *Society for neuroscience, San Diego* (2016, 11. 13).
- ② Ichinohe S., Ishii T., Takahashi H., and Kaneda M. Physiological contribution of P2X-purinoreceptor at postreceptor processing in the mouse retina. *日本神経科学大会, 横浜* (2016. 7. 20).
- ③ Ishii T., and Kaneda M. The breakdown of the symmetric signal processing by pathway-dependent synaptic inputs to cholinergic amacrine cells in the retina. *日本生理学会大会, 札幌* (2016. 3. 23).
- ④ 小牟田縁, 石井俊行, 金田誠, 上田泰次, 豊田雅士, 梅澤明弘, 世古裕子. 末梢血単核細胞から網膜視細胞様細胞への直接的分化誘導 Derivation of human differential photoreceptor-like cells from peripheral blood mononuclear cells. *日本分子生物学会年会 日本生化学会大会 合同大会, 神戸* (2015. 12. 1).
- ⑤ 石井俊行, 岩澤俊一郎, 栗本遼太, 前田朱美, 鈴木千晶, 碓井澄子, 滝口裕一, 金田誠. マルチ電極法を用いたマウス網膜光応答に対する ALK 阻害薬の作用評価. *日本肺癌学会学術集会, 横浜* (2015. 11. 28).
- ⑥ Ishii T., Iwasawa S., Kurimoto R., Maeda A., Takiguchi Y., and Kaneda M. Crizotinib disrupt visual processing in the mouse retina. *Society for neuroscience, Chicago* (2015. 10. 18).
- ⑦ Ishii T., Homma K., Mano A., Shigematsu Y., Shimoda Y., Kakinuma Y., and Kaneda M. Transporter-independent choline uptake in the mouse retina. *日本神経科学大会, 神戸* (2015. 7. 28).
- ⑧ Ishii T., Homma K., Shigematsu Y., Shimoda Y., and Kaneda M. Transporter-independent choline uptake in the mouse retina. *日本生理学会大会, 神戸* (2015. 3. 23).
- ⑨ Ishii T. and Kaneda M. Pathway-specific inputs of starburst amacrine cells in the mouse retina. *日本神経科学大会 横浜* (2014. 9. 12)
- ⑩ 世古裕子, 東範行, 石井俊行, 小牟田縁, 金田誠, 梅澤明弘, ヒト培養誘導網膜視細胞の光応答について, *視覚科学フォーラム, 前橋* (2014. 8. 18)
- ⑪ 金田誠, 石井俊行, 本間耕平, 重松康秀, 霜田幸雄, 井上浩義, マウス網膜 OFF 型コリン作動性ニューロン P2X 型プリン受容体陽イオンチャネルを介したコリン取り込み機構, *視覚科学フォーラム, 前橋* (2014. 8. 18)
- ⑫ Ishii T., and Kaneda M. Pathway-specific inputs of starburst amacrine cells and its implication on light responses to ganglion cells in the mouse retina. *FASEB - Retinal Neurobiology and Visual Processing -, Saxtons River, VT* (2014. 6. 24).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 : なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 俊行 (ISHII Toshiyuki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10643140