



# PROTEIN SYNTHESIS IS REQUIRED FOR THE GENERATION OF OSCILLATORY CURRENT RESPONSES IN XENOPUS OOCYTE

中町, 容子

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-02-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1350

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001350>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	なか まち よう こ 中 町 容 子	（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第937号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成7年2月28日	
学位論文題目	PROTEIN SYNTHESIS IS REQUIRED FOR THE GENERATION OF OSCILLATORY CURRENT RESPONSES IN XENOPUS OOCYTE （卵母細胞内の情報伝達系活性化により生じるオシレーションを伴う 電気応答と蛋白合成抑制剤の効果）	
審査委員	主査 教授 山 本 節 教授 前 田 盛 教授 片 岡 徹	

### 論文内容の要旨

#### 〔緒言〕

受容体を介する細胞内情報伝達系活性化による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 放出機構については盛んに研究が行われている。レセプターが活性化されると多くの細胞で周期的な細胞内カルシウム濃度( $[\text{Ca}^{2+}]$ )の上昇がみられる( $\text{Ca}^{2+}$ オシレーション)。アフリカツメガエル卵母細胞は $\text{Ca}^{2+}$ を介する情報伝達機構の研究に広く用いられている。卵母細胞内にRNAを注入し、 $\text{Ca}^{2+}$ を動員する種々のレセプターを発現させると、GTP結合蛋白質(G蛋白質)を介して、フォスホリパーゼC(PLC)を活性化し、イノシトール3リン酸( $\text{IP}_3$ )が産生され、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストアから $\text{Ca}^{2+}$ が放出される。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は $\text{Ca}^{2+}$ 依存性クロライド( $\text{Cl}^-$ )電流を測定することによって間接的に、また $\text{Ca}^{2+}$ 結合性蛍光物質をつかって直接測定することができる。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のオシレーションを反映して、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性 $\text{Cl}^-$ 電流も周期的な振幅変動(電気応答のオシレーション)を示すことが知られている。しかし、常にオシレーションを示すのではなく、カエル母胎から摘出直後の卵母細胞ではオシレーションは見られず、培養を続ける課程でオシレーションが徐々に出現してくることがわかった。そこで、 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションの出現に関与する因子につき検討した。

#### 〔実験方法〕

成熟アフリカツメガエルを開腹し、卵巣を取り出し、鑷子および眼科剪刀にて卵母細胞を個々に分離した。卵母細胞はMBS液中に $20^\circ\text{C}$ にて保存した。室温下にてリンゲル液を灌流させたチャンバーに卵母細胞を置き実験を開始した。 $\text{Ca}^{2+}$ 伝達系を調べるために、 $\text{IP}_3$ 応答、アセチルコリン(ACh)および $\text{A1F}_4$ 応答をいずれも二電極法によるボルテージクランプ法にて測定記録した。 $\text{IP}_3$ 応答は電気泳動的に $\text{IP}_3$ を卵母細胞内に注入し測定した。AChおよび $\text{A1F}_4$ 応答は、AChおよび $\text{A1F}_4$ を含むリンゲル液を灌流させ測定した。

## [実験結果, 考按]

### 1) $\text{A1F}_4$ 応答

$\text{A1F}_4$ は、GTPの $\gamma$ -phosphate groupと構造が似ており、G蛋白質を活性化することが知られている。 $\text{A1F}_4$ を含む灌流液を30秒間灌流させるとオシレーションに重畳された持続期間の長い内向き電流が生じた。この電流の逆転電位は約 $-20\text{mV}$ でClの平衡電位とほぼ等しく、この内向き電流はClの流出によって主に生じたと考えられる。また、このClの流出は $\text{Ca}^{2+}$ 依存性 $\text{Cl}^-$ チャンネルが $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇により活性化され生じることより、 $\text{A1F}_4$ により引き起こされるこの内向き電流は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の経時的变化を反映すると考えられる。(この応答は、 $1\mu\text{M}$ の $\text{A1F}_4$ 投与より認められ、濃度を上げるとともに、応答は顕著となった。)

カエル母胎から摘出後MBS液中で24時間培養した卵母細胞では上述のオシレーションを伴う応答がみられた。しかし摘出直後の卵母細胞での応答はオシレーションを伴わない平滑な内向き電流であった。培養時間を長くしていくと、徐々にオシレーションを重畳する応答が得られた。蛋白合成抑制剤であるシクロヘキシミド(CHX,  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )を含むMBS液で培養した卵母細胞では、培養時間にかかわらず、オシレーションはみられなかった。

培養時間とともに徐々に顕著になってるオシレーション成分を平滑な波形より分離し定量化するために、応答のパワー・スペクトルを調べると、オシレーション成分は $0.05\text{--}0.3\text{Hz}$ の範囲であることが判明したので、この範囲のスペクトルを積分し数値化し、“オシレーション量”と定義した。このオシレーション量は摘出直後の卵母細胞での応答では小さいが培養時間とともに徐々に増大した。CHXで処理した卵母細胞ではこのようなオシレーション量の増加は認められなかった。一方、オシレーション成分をさしひいた平滑な応答の最大振幅は、培養時間やCHX等の処理により影響を受けなかった。

### 2) ACh 応答

卵母細胞膜上のムスカリニックレセプターをAChで刺激するとオシレーションを伴う電気応答が得られることが知られている。ACh応答( $1\text{mM}$ )でも、 $\text{A1F}_4$ 応答と同様に、オシレーション量は培養時間とともに増加していったが、CHX処理細胞ではオシレーション量は小さいままであった。

### 3) $\text{IP}_3$ 応答

$\text{A1F}_4$ 応答もACh応答も、 $\text{IP}_3$ 産生が増加することによって生じる。一方、 $\text{IP}_3$ を直接卵母細胞に注入するとオシレーションを伴う電気応答が生じることが知られている。そこで、 $\text{IP}_3$ ( $1\text{mM}$ )を直接卵母細胞に注入し得られた電気応答のオシレーション量についても検討した。上記2応答と同様に、摘出直後の卵母細胞ではオシレーション量は非常に小さく平滑な波形応答を示すが、培養時間の延長とともに、オシレーション量は徐々に増加しCHXはこのような増加を抑制した。応答の最大振幅には、変化はみられなかった。 $\text{IP}_3$ 応答に関して、細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ の関与につき調べた。細胞外灌流液には $\text{Ca}^{2+}$ 除外リングルを、あるいは $\text{Mn}^{2+}$ を含むリングルを使用することにより、細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入を抑制しその影響を調べたところ、最大振幅は減少したが、培養時間とともに徐々にオシレーション成分は増加していき、CHX処理細胞ではこのような増加はみられなかった。

### 4) コラゲナーゼ処理

卵母細胞がオシレーション成分を伴う応答をひきおこすことに関して多くの報告がなされているが、我々の実験で示したような、ある条件下ではオシレーション成分が欠如することは報告されていない。個々の卵母細胞を分離するさい、我々は眼科剪刀を用い機械的に分離したが、他の報告の多くはコラゲナーゼで処理することにより、卵母細胞を分離している。我々のおこなった分離方法では、卵母細胞

胞の寿命は長く、摘出直後より電気応答記録を開始できるという利点がある。コラゲナーゼは卵母細胞をとりまく濾胞細胞を消滅させるが、濾胞細胞はアデノシンによって誘発される、Gs蛋白質を介する $K^+$ 電流産生に関与しているといわれている。摘出後はしばらくの応答ではオシレーション量が非常に少ないという現象に濾胞細胞が関与しているかどうか調べるために、コラゲナーゼで卵母細胞を処理し同様の実験をおこなった。コラゲナーゼ処理細胞ではアデノシン応答はみられなくなったが、オシレーション量については未処理細胞と差はなく、いずれも培養時間とともに増大する傾向を示し、コラゲナーゼ処理はオシレーション量の変化に影響をおよぼさなかった。

$[Ca^{2+}]_i$ の周期的な変動すなわちオシレーションは、 $Ca^{2+}$ の周期的な放出と取り込みを反映している。アフリカツメガエル卵母細胞においては、 $IP_3$ レセプターを活性化させると細胞内 $Ca^{2+}$ ストアから $Ca^{2+}$ が放出され、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが引き金となって、近隣の $Ca^{2+}$ ストアからの $Ca^{2+}$ 放出を促進する。一方 $Ca^{2+}$ を放出したストアはしばらく不応期に入った後、再び $Ca^{2+}$ 放出能を獲得する。この間細胞内に放出された $Ca^{2+}$ の一部は、 $Ca^{2+}$ -ATPaseにより再吸収される。このような周期的な $Ca^{2+}$ の放出と取り込みが $Ca^{2+}$ のオシレーションとなってあらわれると考えられている。

今回我々は、母胎より摘出後間もない卵母細胞やCHXで処理した卵母細胞では、 $IP_3$ レセプターを活性化しても $[Ca^{2+}]_i$ のオシレーションはほとんどみられないことを示した。このような条件下の卵母細胞でみられるオシレーションを伴わない平滑な応答は、 $IP_3$ レセプター活性化により $Ca^{2+}$ はストアから放出されているが、その後の周期的な再吸収、再放出が起こっていないことを示唆している。摘出後数時間培養している間に、 $Ca^{2+}$ の情報伝達系のうち、 $IP_3$ レセプターより下流にある何らかの物質が変化し、応答がオシレーション成分を伴うものに変化していったものと思われる。CHXがこのような変化を抑制したことより、何らかの蛋白質がオシレーション現象に必要であることが示唆された。以上の結果より、カエル母胎卵巣からの卵母細胞の分離が、 $Ca^{2+}$ の周期的な放出および取り込みのシステムを調節する蛋白質の合成を引き起こすのではないかと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

### 【審査の要旨】

多くの細胞で周期的な細胞内カルシウム濃度の上昇がみられる( $Ca^{2+}$ オシレーション)ことは報告されているがその生理的意義は不明な点が多い。アフリカツメガエル卵母細胞において、 $Ca^{2+}$ を動員する種々のレセプターを発現させると、これらは、GTP結合蛋白質(G蛋白質)を介して、フォスホリパーゼC(PLC)を活性化し、イノシトール三リン酸( $IP_3$ )が産生され、細胞内 $Ca^{2+}$ ストアから $Ca^{2+}$ が放出される。 $[Ca^{2+}]_i$ の変化は $Ca^{2+}$ 依存性クロライド( $Cl$ )電流を測定することによって間接的に測定することができるが、 $[Ca^{2+}]_i$ のオシレーションを反映して、 $Ca^{2+}$ 依存性 $Cl$ 電流も周期的な振幅変動(電気応答のオシレーション)を示すことが知られている。本研究者は、これらの応答が常にオシレーションを示すのではなく、カエル母胎から摘出直後の卵母細胞ではオシレーションは見られず、培養を続ける過程でオシレーションが徐々に出現してくることを発見し、 $Ca^{2+}$ オシレーションの出現に関与する因子につき検討した。

### 【方法】

成熟アフリカツメガエルを開腹し、卵母細胞を個々に機械的に分離し、 $IP_3$ 応答、アセチルコリン(ACh)および $A1F_4$ 応答を二電極法によるボルテージクランプ法にて測定記録した。 $IP_3$ 応答は電気泳動的に $IP_3$ を卵母細胞内に注入し、AChおよび $A1F_4$ 応答は、AChおよび $A1F_4$ を含むリンゲル液を

灌流させ測定した。徐々に顕著になってくるオシレーション成分を平滑な波形より分離し定量化するために、応答のパワー・スペクトルを調べ、オシレーション成分の範囲のスペクトルを積分し数値化し“オシレーション量”と定義した。蛋白合成抑制剤であるシクロヘキシミド（CHX）を含むMB S液で培養した卵母細胞でも同様に各応答を記録した。

#### 【結果】

A1F<sub>4</sub>は、GTPの $\gamma$ -phosphate groupと構造が似ており、G蛋白質を活性化することが知られている。A1F<sub>4</sub>応答のオシレーション量は摘出直後の卵母細胞では小さく平滑な応答が得られるが、培養時間とともに徐々に増大し、CHXで処理した卵母細胞ではこのようなオシレーション量の増加は認められなかった。一方、オシレーション成分をさしひいた平滑な応答の最大振幅は、培養時間やCHX等の処理により影響を受けなかった。卵母細胞膜上のムスカリニックレセプターをAChで刺激し得られた応答でも、A1F<sub>4</sub>応答と同様の結果が得られた。IP<sub>3</sub>を直接卵母細胞に注入し得られた電気応答のオシレーション量についても検討した。上記2応答と同様の結果であった。また、細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入を抑制しその影響を調べたところ、最大振幅は減少したが、培養時間とともに徐々にオシレーション成分は増加していき、CHX処理細胞ではこのような増加はみられなかった。このようなオシレーション量の変化に濾胞細胞は関与しているかどうか調べるために、コラゲナーゼで卵母細胞を処理し同様の実験を行った。コラゲナーゼ処理細胞ではアデノシン応答はみられなくなったが、オシレーション量については未処理細胞と差はなく、いずれも培養時間とともに増大する傾向を示し、コラゲナーゼ処理はオシレーション量の変化に影響をおよぼさなかった。

#### 【結論】

本研究者は、母胎より摘出後間もない卵母細胞やCHXで処理した卵母細胞では、IP<sub>3</sub>レセプターを活性化してもオシレーションはほとんどみられず、IP<sub>3</sub>レセプター活性化によりCa<sup>2+</sup>はストアから放出されているが、その後の周期的な再吸収、再放出が起こっていないこと、摘出後培養している間にCa<sup>2+</sup>の情報伝達系のうちIP<sub>3</sub>レセプターより下流にある何らかの物質が変化し、応答がオシレーション成分を伴うものに変化していったこと、また、CHXがこのような変化を抑制したことより、カエル母胎卵巣からの卵母細胞の分離が、Ca<sup>2+</sup>の周期的な放出および取り込みのシステムを調節する何らかの蛋白質の合成をひきおこし、その蛋白質がオシレーション現象に必要であることを示唆した。卵母細胞がオシレーション成分を伴う応答をひきおこすことに関して多くの報告がなされているが、本研究者が示したように、ある条件下ではオシレーション成分が欠如することは報告されておらず、重大な発見が本研究において示されており、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>のオシレーションのメカニズムの解明への重要な知見を得たものとして、非常に価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）として学位を得る資格があると認める。