1PA029

変異線虫を用いたリアノジン受容体の制御機構解析

○浜田智代、作部保次、香川弘昭（岡山大・理）

筋小胞体上のリアノジン受容体は Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 放出チャネルであり、そのチャネル活性は Ca^{2+} の他に、 Mg^{2+} 、リアノジン、リン酸化酵素などの多数の因子によって調節される。線虫リアノジン受容体は一個の遺伝子 $unc-68$ のみにコードされており、欠失変異体は致死にならず、弱い運動不良になる。前大会で我々は免疫組織学的解析により、 $unc-68$ 欠失変異体はリアノジン受容体をもたないことを示した。 $kh30$ 株は麻酔薬ケタミン中で、痙攣と麻痺を繰り返す変異体として単離され、リアノジン受容体の1444番目のSerがAsnに置換している。この変異部位が周辺配列から、リアノジン受容体のリン酸化機能に関与していると推定されるが、実験的証拠はない。

今回、リアノジン受容体のSer¹⁴⁴⁴がリン酸化に関与しているかどうかを調べるために、SerをAsp（疑似リン酸化）に置換した変異をPCRにより導入した。 $unc-68$ 欠失変異体に、作成した変異遺伝子を顕微注入し、得られた形質転換体を解析しようとしている。運動性およびカフェイン、ケタミンやレバミゾールなどの薬剤応答性について報告する予定である。

Analysis on the regulation mechanism of the ryanodine receptor in *C. elegans*

Tomoyo Hamada, Yasuji Sakube and Hiroaki Kagawa

1PA030

乳腺上皮細胞においてスラミンによって誘発される細胞内 Ca^{2+} 振動一内に秘められたる能力一○古家 喜四夫、奥田 晃子、清原 壽一
（京都工芸繊維大学・応用生物）

乳腺上皮細胞はATP受容体を持ちATPを細胞間情報伝達物質として使っている。スラミンはATP受容体の阻害剤として知られており、機械的刺激によって発生する Ca^{2+} 波（ATPが細胞外に放出されまわりに拡散することで伝播する）を抑制する。しかしスラミンを培養乳腺上皮細胞に単独で投与したところ数分ないし十数分後に Ca^{2+} 振動が誘発された。10%低張液中ではこの作用が促進された。 Ca^{2+} 振動は数十分にわたって持続し、 Ca^{2+} あるいは Na^{+} 除去液中でも見られたが、Thapsigargin 処理によって小胞体内の Ca^{2+} を枯渇させると抑制された。これらのことはこの振動が細胞内 Ca^{2+} ストアからの遊離に依っていることを示している。さらに Ca^{2+} 除去液中での持続時間の長さは Ca^{2+} を供給できる大きな細胞内ストアの存在を示唆している。ミトコンドリアに作用するCCCPやClonazepamで処理することによってこの振動は阻害され、ミトコンドリアが小胞体に対する Ca^{2+} 供給源であることが示唆された。 β -Escinによってpermeabilizeした細胞系で測定した結果、スラミンは小胞体からのゆっくりとした Ca^{2+} 放出を引き起こした。以上の結果から、スラミンは細胞内に作用することにより Ca^{2+} 濃度のバランスを崩し Ca^{2+} 振動を誘起すると考えられる。

K. Furuya, A. Okuda, T. Kiyohara: Suramin induced Ca^{2+} oscillations in cultured mammary epithelial cells. - Ca^{2+} spring in the cell -

1PA031

HeLa 細胞においてATP刺激によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 振動一内から外から、移ろいゆく状態一○奥田 晃子、古家 喜四夫、清原 壽一
（京都工芸繊維大学・応用生物）

多くの細胞系において、細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）が周期的かつ持続的に増減を繰り返す Ca^{2+} 振動（ Ca^{2+} Oscillation）がみられる。 Ca^{2+} 振動の発生には Ca^{2+} の細胞外からの流入と排出、小胞体、ミトコンドリアでの放出と取り込みのバランスが関与していると考えられている。 Ca^{2+} 振動は細胞内 Ca^{2+} シグナリングにおいて重要な働きをしているが、その詳細な機序および機能はまだ明らかではない。

HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）は、Histamine 刺激により Ca^{2+} 振動を起こすこと、また、ATP刺激により一過性の Ca^{2+} 上昇反応を示すことが報告されている。本研究において我々は、ATP・UTPなどのヌクレオチドの刺激によりHeLa細胞が Ca^{2+} 振動を起こすことを見いだした。この振動は1時間以上持続することもあり、時間経過とともに振動のパターンに変化が現れた。ATP・UTP及びそのアナログによる振動のパターン、時間経過に伴い変化する振動のパターン及びATP受容体ブロッカー存在下での振動のパターンから、この振動には複数の受容体が関与しており、それぞれの受容体が異なった Ca^{2+} 振動のパターンを発生させているのではないかと考えられる。

今回は、 Ca^{2+} イメージング法を主に用いて得られた以上の結果について議論する。

A. Okuda, K. Furuya, T. Kiyohara: ATP induced Ca^{2+} oscillations in HeLa cells. - Inside and outside stories -

1PA032

副腎皮質細胞におけるATPとACTHの相乗効果の研究

○青鹿謙司、和田真伸、太田善浩
東京農工大学・工学部・生命工学科

【目的】脳下垂体前葉から分泌される副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）は、副腎皮質細胞におけるステロイドホルモン合成の生理的な刺激物質である。この刺激の際に、細胞内ではカルシウム信号（カルシウムイオン濃度の経時変化）が生じ、ステロイドホルモンが合成される。ATPは血中に存在しカルシウム信号とステロイドホルモン合成を促進する。本研究ではATP、ACTHがカルシウム信号に対する互いの効果を高めあっているという仮説をたて、細胞外にATPとACTHとが単独で存在する時と共存する時とで細胞内カルシウムイオン動員の観察、比較検討することからATPとACTHとの関係を研究する。

【実験方法】細胞はウシ副腎皮質束状層の初代培養細胞を用い、培養4日目のものを使用した。カルシウム信号を観察するために、カルシウムイオン感受性色素Calcium Green-1で染色した。刺激にはATPとACTHを用い、1.2mMの CaCl_2 を含む観察用培地に加えた。蛍光はCCDカメラで検出し、単一細胞レベルで一定時間ごとにカルシウム信号の有無やパターンを解析した。

【実験結果】ACTH存在下でのATPに対する刺激を見るために、予めACTHをインキュベーションした。インキュベーションするACTH濃度を変えて実験したところ、ATP刺激に対してカルシウム信号が生じる細胞の割合に変化が見られた。1nMのATP刺激に対して反応する細胞の割合はACTH非存在下では15.9%と少ないが、ACTH存在下では44.3%まで増加した。そのうち、初めからカルシウム信号を生じている細胞でも、ATPを加え刺激すると信号のパターンに変化が見られ、その割合もACTH存在下では増加した。これとは逆に、ATP存在下におけるACTH刺激に対する応答については現在検討中である。

K. Aoshika, M. Wada, Y. Ohta: Enhancement of ATP-induced Calcium Signaling by ACTH