輸送系の *Xenopus* 卵母細胞での発現

山口大学教養部化学教室 青 島 均

Xenopus oocytes were injected with exogenous mRNA prepared from rat small intestine and kidney and their electrical responses to glucose and amino acids were measured electrophysiologically. Na^+ /glucose, amino acid cotransporters were expressed in the oocytes by injection of small intestine mRNA, while facilitated diffusion carrier protein(s) (uniporter) were mainly expressed by injection of kidney mRNA.

cotransporter / facilitated diffusion carrier / translation of exogenous mRNA / *Xenopus* oocyte

1. はじめに

アフリカツメガエル卵母細胞は、外来の mRNA の良い翻訳系として知られている¹⁾。この系は、非細胞系では不可能な翻訳後の修飾を行い、機能を持った蛋白質を直径 1 mm 以上の球形の単細胞に発現させる²⁾。従って、不安定で小さく複雑な形をした神経細胞ではむづかしい電気生理学的測定も、卵母細胞では容易になる³⁾。すでに多数の神経伝達物質受容体やチャネルが発現され、同一の卵母細胞を用いて種々の薬物に対する応答が様々な条件下、繰返し長時間に渡って測定され、受容体やチャネルの機能の研究が進められている^{4),5)}。卵母細胞は大きいため、薬物の注入が可能となり、細胞内情報伝達物質のからんだ受容体の作用機構の研究にも大変便利である⁶⁾。図 1 に実験操作をまとめて示した。

最近、この発現系は cDNA のスクリーニングの手段としても用いられ、蛋白質の精製が不可能な存在量の少ない受容体もクローニングされている⁷⁾。また、クローニングした cDNA から mRNA を合成し卵母細胞に注入し、その cDNA が受容体に対応するものであることが確認されている。さらには、部位特異的変異と組み合わせ、受容体の作用機構の研究に大変有力な手法となっている⁸⁾。従って、卵母細胞での発現と活性測定法の確立は、蛋白質の精製と同様、蛋白質研究の第一歩とも言える重要性を持っている。

細胞は必要な物質を摂取し、不要物を排出するために、生体膜に数種類の輸送体蛋白質を持っている⁹⁾。

Expression of Transporters in *Xenopus* Oocytes

Hitoshi AOSHIMA

Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts,
Yamaguchi University

図 1 実験操作

図 2 グルコース (Glc) やアミノ酸 (A.A.) の上皮細胞での輸送モデル

例えば糖やアミノ酸などの栄養物を吸収する小腸や腎臓の上皮細胞においては、図 2 に示すような輸送系の存在が知られている。すなわち、 Na^+ や H^+ の濃度勾配を利用して物質を上皮細胞に取り込み (共輸送)、それを物質の濃度勾配に従って血液中に輸送 (促進拡散輸送) している。

私達は、小腸や腎臓の mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、糖やアミノ酸に対する細胞膜の電気的応答を測定した。輸送体蛋白質の卵母細胞での発現については、すでに Passow グループが、マウスの脾臓の mRNA 注入による Cl^- の輸送系（バンド 3 蛋白質）の発現を、 $^{36}\text{Cl}^-$ の取り込みや抗体を用いて確認している¹⁰⁾。

2. 小腸 mRNA 注入による糖輸送系の発現

ラット小腸からグアニジンチオシアネート/CsCl 法、オリゴ (dT) セルロースカラムによって調製したポリ(A)⁺RNA を卵母細胞に注入した。2 日間 20°C で恒温槽に放置した後、グルコース (Glc) やフルクトース (Fru) に対する電気的応答をカレントクランプ法で測定し、図 3 に示した。卵母細胞に二本の電極を刺して、一本の電極からは 5 秒ごとに図の下に示した大きさの内向き電流を流し、他の電極で膜電位を測定した¹¹⁾。従って、図に示された過分極の大きさは、膜抵抗の大きさに比例する。

図 3 小腸 mRNA を注入した卵母細胞の Ach, Glc, Fru に対する応答。cho は、 Na^+ をコリン⁺に置換したリンガー液。

すでに私達は、小腸 mRNA の注入によりアセチルコリン (Ach)、セロトニン、サブスタンス P 受容体の発現に成功している¹²⁾。次に、Glc を与えると急激に脱分極が起こり膜抵抗が減少することを見出した。リンガー液に戻すと、数分かかって元の状態に戻った。この応答は、Fru に対しては起こらず、またリンガー液の Na^+ をコリン⁺に置換すると Glc に対しても応答は失われた。応答の Glc 濃度依存性や Na^+ 濃度依存性は、高濃度では飽和し Michaelis-Menten 型を示した¹³⁾。これらの性質は、小腸やその膜ベシクルを用いた Na^+ /Glc 共輸送系の実験結果と一致する。従って、小腸 mRNA を注入した卵母細胞での電気的応答は、 Na^+ の濃度勾配を利用した Glc の共輸送体の発現

によるものと考えられる¹³⁾。

一方、Wright グループは、 ^{14}C で標識した Glc 誘導体の卵母細胞への取り込み量が、ウサギ小腸の約 2300 塩基の mRNA を注入すると増加することを見出した¹⁴⁾。この mRNA を用いて cDNA を調製し、卵母細胞の発現系を用いて cDNA のスクリーニングを行ない、Glc 共輸送系のクローニングに成功している¹⁵⁾。この蛋白質は、すでにクローニングされている赤血球膜の Glc 促進輸送蛋白質とは、全く異なるものであった。部位特異的変異など分子生物学的手法と卵母細胞発現系とも組みあわせて、Glc, Na^+ の結合部位などが明らかとなり、共輸送機構が分子レベルで解明されるだろう。

3. 小腸 mRNA を注入した卵母細胞の アミノ酸に対する応答

小腸の mRNA を注入したイモリやアフリカツメガエル卵母細胞は、種々のアミノ酸に対して図 4 に示すような応答をした¹⁶⁾。酸性アミノ酸や Cys に対する応答は見られず、また、L-Ala には応答したが、D-Ala や β -Ala には応答せず選択性があることがわかった。

mRNA を注入しなくても、卵母細胞は時々それ自

図 4 小腸 mRNA を注入した時(a)しない時(b)のイモリ卵母細胞のアミノ酸に対する応答

体の持つ輸送系に由来する電気的応答を示すことがある¹⁷⁾。しかし、mRNA を注入したものは、時間と共に応答が著しく増大することから、応答の大部分は小腸の mRNA 注入による輸送系の発現によるものと考えられる。応答電流は膜電位に直線的に依存し、逆転電位は 0 mV と推定された。応答は、5,5-ジチオビス (2-ニトロベンゾエイト) (MBTA) などの SH 修飾試薬によって阻害された¹⁶⁾。これらの性質は、小腸に数種類存在する Na^+ 依存性アミノ酸共輸送体の性質と一致する。

4. 腎臓の mRNA を注入した卵母細胞の アミノ酸に対する応答

ラット腎臓の mRNA を卵母細胞に注入し、種々のアミノ酸に対する応答を測定したところ、驚いたことには、過分極を引き起こすアミノ酸が見出された。様々な応答の例を図 5 に示した。これらの応答は、 Na^+ をコリン $^+$ に置換しても失われなかった。mRNA を注入しない卵母細胞には過分極応答は全く見られず、注入後応答が時間と共に増大することから、これらの応答は、腎臓 mRNA 注入により発現した蛋白質によるものと考えられる¹⁶⁾。

種々のアミノ酸に対する応答を詳しく検討したところ、応答の方向（脱分極か過分極か）は、アミノ酸の等電点によって決まることがわかった。等電点がリンガー液の pH7.2 より低い場合には過分極を、高い場合には脱分極を示した。これは、負の電荷を持ったアミノ酸が流入すると過分極を、正の電荷を持ったアミノ酸が流入すると脱分極を示すものと思われる。実際、過分極を示す Ala のカルボキシル基をエステル化すると脱分極応答になること、リンガー液の pH を 6.0

図 5 腎臓 mRNA を注入した卵母細胞のアミノ酸に対する応答

から 8.3 に上げると His（等電点 7.6）の応答は、脱分極から過分極応答に変わることが見出された。Ala 及び Lys によって引き起こされる電流の電位依存性を検討したところ（-90 から -30 mV），直線的に変化し、逆転電位はそれぞれ -132 mV，19 mV と推定された。

酸性アミノ酸に対しては応答が見られず選択性を持つこと、濃度応答曲線は高濃度で飽和を示す Michaelis-Menten 型になることなどから、卵母細胞に単に穴があいたわけではなく、輸送系蛋白質による応答と考えられる。すなわち、腎臓の mRNA を注入した場合、主に発現するのは、促進拡散輸送体蛋白質と思われる¹⁶⁾。 Na^+ 依存性の共輸送体もわずかに同時に発現しているらしいが、 Na^+ をコリン $^+$ に置換したり SH 修飾試薬を前もって加えておくと、促進拡散輸送体の応答だけを測定できる¹⁶⁾。

5. 利点と問題点

輸送系は、小腸や腎臓から調製した膜ベシクルと放射標識した物質とを用いて、測定されている。この方法は流入を直接測定できるという点では優れている。例えば、Glc の促進拡散のように電荷移動がない輸送系は、電気的応答は測定できない。しかし膜ベシクルは体積が小さいため、すぐに飽和し、短時間での流入量を測定しなければならない。それに対して、卵母細胞は直径 1 mm 以上あり、応答が長時間持続する¹⁸⁾。また流入量の測定だけでなく、電気生理学的測定も容易で、同じ細胞を用いて繰り返し長時間に渡って測定できる。ただ卵母細胞自体が Na^+ 依存性の輸送系を持っており、mRNA を注入しなくても応答が現われる場合があるので、注意する必要がある¹⁷⁾。卵母細胞の発現系は、輸送系のクローニングに役立つし、さらに部位特異的変異などと組みあわせると、輸送系の分子レベルでの機構解明に大変役立つものと思われる。

この研究は、山口大学理学部生、石井尚、阿南真、富田和郎、杉尾滋宣氏との協同行なしたものです。

文 献

- 1) Gurdon, J. B., Lane, C. D. and Woodland, H. R. (1971) *Nature*, **233**, 177-182.
- 2) Barnard, E. A., Miledi, R. and Sumikawa, K. (1982) *Proc. R. Soc. London B* **215**, 241-246.
- 3) 杉山博之 (1988) 神経情報伝達分子 (葛西, 吉岡, 木島, 塚原, 栗原, 鈴木編) 19-25, 培風館, 東京.
- 4) Gundersen, C. B., Miledi, R. and Parker, I. (1984) *Nature*, **308**, 421-424.
- 5) Aoshima, H., Anan, M., Ishii, H., Iio, H. and Kobayashi, S. (1987) *Biochemistry*, **26**, 4811-4816.
- 6) Sugiyama, H., Ito, I. and Hirono, C. (1987) *Nature*, **325**, 531-533.
- 7) Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M. and Nakanishi, S. (1987) *Nature*, **329**,

- 836-838.
- 8) Mishina, M., Tonimatsu, T., Imoto, K., Tanaka, K., Fujita, Y., Fukuda, K., Kurasaki, M., Takahashi, H., Morimoto, Y., Hirose, T., Inayama, S., Takahashi, H., Kuno, M. and Numa, S. (1985) *Nature*, 313, 364-369.
 - 9) 星 猛 (1987) 膜輸送の生理学 (星, 香川編) 106-119, 医学書院, 東京.
 - 10) Morgan, M., Hanke, P., Grygorczyk, R., Tintschl, A., Fasol, H. and Passow, H. (1985) *EMBO J.*, 4, 1927-1931.
 - 11) Kobayashi, S. and Aoshima, H. (1986) *Dev. Brain Res.*, 24, 211-216.
 - 12) Aoshima, H., Iio, H., Anan, M., Ishii, H. and Kobayashi, S. (1987) *Mol. Brain Res.*, 2, 15-20.
 - 13) Aoshima, H., Ishii, H. and Anan, M. (1987) *Mol. Brain Res.*, 2, 263-267.
 - 14) Hediger, M. A., Ikeda, T. S., Coady, M., Gundersen, C. B. and Wright, E. M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2634-2637.
 - 15) Hediger, M. A., Coady, M. J., Ikeda, T. S. and Wright, E. M. (1987) *Nature*, 330, 379-381.
 - 16) Aoshima, H., Tomita, K. and Sugio, S. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, 265, 73-81.
 - 17) Jung, D., Schwarz, W. and Passow, H. (1984) *J. Membr. Biol.*, 73-81.
 - 18) Aoshima, H., Iio, H. and Kobayashi, S. (1986) *Anal. Biochem.*, 156, 257-262.

あおしま ひとし

1974年10月京都大学大学院理学研究科化学専攻博士課程を中退して、山口大学教養部へ。現在助教授。趣味は、テニス、本の乱読、木や花を育てること。酵素反応機構の研究を行っていたが、1978年から2年間コーネル大学へス研究室にて、神経伝達物質受容体の作用機構の研究へ。最近、アフリカツメガエル卵母細胞の翻訳系を利用した研究を行っている。本年7月からス研究室再訪問中。

連絡先 〒753 山口市吉田1677の1 山口大学教養部

☎ 0839-22-6111 内線585

出張先 c/o Prof. G. P. Hess, Section of Biochemistry, Molecular and Cell Biology, Cornell University, 270 Clark Hall, Ithaca, New York 14853-2501 U.S.A.

■吉岡書店出版事業部より■

「自費出版」のご案内—印刷した立派な本が簡単につくれます—

記念論文集 / 予稿集 / リプリント / 旅行記 / 回顧録 / 詩歌句集
遺稿・追悼集 / 画・写真集 / その他

字くばり・印刷・製本・用紙・装丁・あらゆるご相談に応じます

案内書お送りします

■京都市左京区田中門前町87

郵便番号606 / 振替京都3-4624

■TEL-075-(781)4747

吉岡書店出版事業部