卵母細胞 Messenger Ribonucleic Acid 発現系による脳刺激応答機構の研究

野村靖幸

北海道大学薬学部, 〒060 札幌市北区北12条西 6 丁目

Studies on the Transmembrane Signalling Mechanism of the Brain Using *Xenopus* Oocytes

Yasuyuki NOMURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,
Kita-ku, Sapporo 060, Japan

Xenopus oocytes have been used as an efficient and convenient expression system of messenger ribonucleic acid (mRNA) exogenously injected. The transmembrane signalling mechanism of acetylcholine (ACh)- and serotonin (5-HT)-evoked inward current and properties of voltage-sensitive Ca channel (VSCC) current were studied using the oocytes injected with rat brain mRNA. M_1 ACh or $5-HT_{1C}$ receptor stimulation causes Cl^- current via G-protein activation, inositol phosphate formation, an increase of free Ca^{2+} and finally gating of Cl channels via Ca^{2+} -calmodulin. Protein kinase C seems to modulate the responses negatively. In addition, N type VSCC was also expressed and regulated by both protein kinases A and C. Limitations of the expression system as well as advantages are discussed.

Keywords—*Xenopus* oocyte; brain mRNA; transmembrane signalling; acetylcholine receptor; serotonin receptor; inward current; G protein; inositol phosphate; calmodulin; voltage-sensitive Ca channel

はじめに

細胞は各種の刺激を受容し応答する。化学的刺激としての神経伝達物質, ホルモンや薬物に対する細胞膜や細胞内に存在する受容体とそれに共役する情報伝達系を介し一般的に行われる。細胞膜受容体を介する情報伝達機構は, 赤血球, 血小板, 脂肪細胞や各種培養細胞において検討され, 受容体・guanosine triphosphate (GTP) 結合蛋白質・エフェクター共役系における各機能因子の分子構造, 共役機構, 2 次メッセンジャー産生調節, イオンチャネル開口制御, プロテインキナーゼによる蛋白質リン酸化の役割などに関し, 近年次々と重要な知見が得られている。脳のニューロンでの情報受容伝達機構に関しても広く研究されているが不明の点が多い。我々もこれまで acetylcholine (ACh), noradrenaline, dopamine, serotonin (5-HT), histamine, glutamic acid, adenosine のニューロン受容体応答機構に関し, 脳切片, 脳細胞, 培養ニューロン, 脳シナプス膜などの標本を用いて神経化学的, 分子薬理学的研究を行ってきた。これらの研究の一端として, 脳由来 messenger ribonucleic acid (mRNA) を移入することにより脳細胞受容体応答系を再構成したアフリカツメガエル卵母細胞 (*Xenopus laevis* oocyte, 卵母細胞) を使用し, ACh や 5-HT に対する受容体応答機構, 電位依存 Ca チャネル開口制御機構について電気生理学的, 分子薬理学的アプローチを進めている。¹⁾

本総説では, ラット脳より抽出精製した poly(A)⁺mRNA を移入した卵母細胞における ACh, 5-HT 応答機構, 並びに電位依存 N 型 Ca チャネルの性質について我々の得た知見を中心に記述する。

1. 細胞の刺激応答系解析に有用な卵母細胞

1971 年, Gurdon ら²⁾が卵母細胞を細胞内移入 mRNA の効率よい発現系として確立して以来, 本細胞は外来性遺伝情報の発現のための翻訳装置として利用されてきている。^{3,4)} さらに近年, 遺伝子工学的技術とも結びついてその有用性が注目されている。⁵⁾ 例えば, 全一次構造の解明されたニコチン性 ACh 受容体サブユニットをコードする mRNA を注入し再構成に成功した研究,⁵⁾ ムスカリン性 ACh 受容体に関し行われた同様の研究⁶⁾も報告されている。また, 受容体やイオンチャネルの遺伝子をスクリーニングする測定系として使用しそのクローニング

により遺伝子工学的に構造解析に成功したサブスタンス K 受容体,⁷⁾ 5-HT_{1C} 受容体⁸⁾及び腎 K チャネル⁹⁾などがある。

この卵母細胞を外来性遺伝情報発現系として使用するのに次のような多くの利点がある。すなわち、①mRNA の翻訳が生きた細胞内で行われるため、ウサギ網状赤血球ライセートのような cell free の蛋白合成系よりもアーチファクトが少ない、②合成された蛋白質に特異的な修飾が細胞内で行われるため、例えば膜蛋白質をコードする mRNA ならば細胞膜に機能的に組み込まれ発現を生物活性で測定できる、③どのような細胞由来の mRNA でも翻訳される可能性がある、④mRNA の翻訳が効率よくしかも長時間にわたって行われる、⑤細胞内で合成される蛋白質又は核酸を、放射標識化合物で比較的容易に標識できる、⑥発生学における実験材料として長く使用されてきたのでその生化学的性質がよく知られている、などである。さらに電気生理学の実験に適当である理由として、①球形の細胞であるためスペースクランプ条件が得られる、②大きいサイズのため電極の刺入が容易である、③大きいため電位固定下で細胞内に薬物注入が可能である点があげられる。また、アフリカツメガエルの飼育が簡単で卵母細胞の調製が容易であり、細胞単位で操作できることも有利な点である。

上記のような多くの有利な点をもつ卵母細胞に脳 mRNA を移入し発現させた脳の刺激応答系が、この細胞でどのように再構成され機能を発現するか、脳の受容体応答機構やイオンチャネル活性調節機構にどのように反映するかに関し検討を加えた。

2. ACh, 5-HT 受容体応答系の発現

生後 2—3 週の若齢ラット全脳よりグアニジン/熱フェノール法¹⁰⁾により抽出した RNA 画分からオリゴ (dT) セルロースアフィニティカラムクロマトにより精製した poly(A)⁺ mRNA を、コラゲナーゼ処理により離散、ろ胞を除去した卵母細胞に約 50 nl (mRNA 量として約 50 ng) を注入した。23°C 下、1—数日間静置後の卵母細胞を電気生理学的並びに生化学的実験に供した。

Fig. 1A は、脳 mRNA 移入 2 日後の 1 個の卵母細胞を -60 mV の電位固定下、0.1 μ M 5-HT を 2 分間灌流適用したとき観察される内向き電流の典型例を示す。一過性の鋭いピーク電流 (T 成分) に伴って持続性の振動電流 (F 成分) がみられた。¹¹⁾ mRNA 未移入卵母細胞では 5-HT 誘発電流は全く認められなかった (Fig. 1B) ので、5-HT 応答電流は、脳由来の 5-HT 受容体応答系を介し生ずるものといえる。10 μ M ACh も同様の電流応答を引き起こすことより脳 ACh 受容体応答系も機能的に再構成されたと考えられる。Fig. 2 は mRNA 移入後の卵母細胞の ACh, 5-HT 応答の時間経過を示す。ACh, 5-HT 応答はそれぞれ 2—3, 1—2 日頃ピークになったので、移入後このような日時の卵母細胞を使って細胞内反応機構を検討した。ACh, 5-HT 応答電流への薬物の効果は、応答電流のうち T 成分に対する影響として表した。

Fig. 1. 5-HT-Evoked Inward Current in Oocytes Injected with Rat Brain mRNA

0.1 μ M 5-HT was perfused for 2 min. A) mRNA-injected oocytes, B) sterilized water-injected oocytes.

Fig. 2. Time Course of ACh-, 5-HT-, GTP γ S-Evoked Current and [³²P]ADP-Ribosylated 39K/41K Proteins Catalyzed by Pertussis Toxin at 1, 2 and 3 d after Injection of mRNA

Fig. 3. Concentration-Inhibition Curves of Antagonists to ACh- and 5-HT-current in mRNA-Injected Oocytes

各種受容体遮断薬の影響を検討したところ Fig. 3 に示すような濃度-抑制曲線が得られた。ACh 電流は atropine ($IC_{50}=0.23$ nM), pirenzepine ($IC_{50}=1.04$ nM), 5-HT 電流は methysergide ($IC_{50}=3.1$ nM), mianserin ($IC_{50}=8.0$ nM) により強く抑制されたことより ACh は M_1 受容体, 5-HT は $5-HT_{1C}$ 受容体といったサブタイプに作用し電流を誘発することが分かった。

ACh, 5-HT 電流に関与するイオンチャネルの同定を電気生理学的, 生化学的に試みた。ACh, 5-HT とも逆転電位は約 -20 — -26 mV で, Cl^- の平衡電位 (-23 mV) とほぼ一致したこと, また, ACh, 5-HT 誘発電流ともアニオンチャネル阻害薬 ethacrynic acid (1 mM) や 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS, 0.1 mM) によって抑制されたが, 1 mM tetrodotoxin, 10 μ M tetraethylammonium では影響されなかったことより, ACh も 5-HT も Cl^- 電流を引き起こすと示唆された。5-HT が Cl^- チャネルを開口し実際に Cl^- を流出させるか否かをあらかじめ $^{35}Cl^-$ を注入した卵母細胞 (mRNA 移入) を使い 1 μ M 5-HT を 1 分間作用させた時の $^{35}Cl^-$ 流出量を測定することにより検討した。その結果 5-HT は $^{35}Cl^-$ 流出を引き起こし, その作用は mianserin, DIDS で抑制されることが分かった。^{12,18)} この実験事実より, mRNA 移入卵母細胞 (約 -40 mV に分極している) に 5-HT が作用し Cl^- チャネルを開口, Cl^- を流出させ脱分極を導くといえる。

3. ACh, 5-HT 誘発電流への G 蛋白質の関与

a) 百日咳毒素, コレラ毒素の効果 卵母細胞をあらかじめ百日咳毒素 (IAP) 処理すると ACh, 5-HT 誘発電流ともに抑制された (Fig. 4)。^{1,12,14,15)} 一方, コレラ毒素処理では両電流を増強する傾向を示したが未処理群との間に有意差は認められなかったため, ACh, 5-HT 誘発電流には百日咳毒素感受性の GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) が関与する可能性が示唆される。なお, 最終的結論に至っていないが, 5-HT 誘発電流には少なくとも Gi_α が関与するかもしれないと考えている。すなわち予備的にはあるが, Gi_α , Go_α (この場合多少の Gi_α の混在する標品) に対する抗体 (抗 Gi_α 抗体, 抗 Gi_α/Go_α 抗体) を卵母細胞に注入すると, 5-HT 電流は抗 Gi_α 抗体の

Fig. 4. Effects of Pertussis Toxin and Cholera Toxin on ACh- and 5-HT-Evoked Currents

The cAMP contents are also indicated. a) $p < 0.05$; NS, not significant.

Fig. 6. GTP γ S-, IP₃(1,4,5)- and Ca²⁺-Evoked Current in mRNA- and Sterilized Water-Injected Oocytes

Hatched column, mRNA-injected; open column, sterilized water-injected. The number of experiments is shown in parenthesis.

並びに 5-HT 応答電流を抑制するという結果からも支持される。GTP γ S 誘発電流は mRNA 移入群の方が未移入群より有意に大きいこと (Fig. 6), 移入後 1, 2, 3 日と日を経るにつれて大きくなること (Fig. 2) より, 脳由来の G 蛋白質が卵母細胞で合成されその機能を発現すると考えられる。その一部は ACh, 5-HT 誘起電流に関与するかもしれない。

c) 百日咳毒素, ボツリヌス毒素により Adenosine Diphosphate (ADP) リボシル化される G 蛋白質 卵母細胞の膜画分, [³²P]NAD, 百日咳毒素をインキュベート後, 可溶性蛋白質を sodium dodecylsulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動, オートラジオグラフィし, [³²P]ADP リボシル化蛋白質を調べたところ, 分子量 39K と 41K のものであることが分かった。39K と 41K の [³²P]ADP リボシル化活性は mRNA 移入後 1, 2, 3 日と次第に増加し, その増加の経日変化は GTP γ S 誘発電流の増加と併行した (Fig. 2)。脳由来の百日咳毒素感受性 G 蛋白質 Gi (Go も否定できない) が機能を有することを示すと同時に, ACh, 5-HT 誘起電流にも関わることを示唆するものである。最近, 我々はボツリヌス毒素 (C 並びに D 型) 処理卵母細胞では 5-HT 電流が抑制されること, また 22K 蛋白質が ADP リボシル化されることを見いだした。¹⁶⁾ ボツリヌス毒素の基質¹⁷⁾ も含め各種の低分子量 G 蛋白質が次々と発見されそれらの生理的意義が検討されている。¹⁸⁾ 5-HT 誘発電流機構

Fig. 5. Guanine Nucleotide-Evoked Current in mRNA-Injected Oocytes

A) 35 pmol GTP γ S, B) 35 pmol GTP and C) 350 pmol GDP.

注入の場合に強く抑制されたからである。

b) グアニンヌクレオチド注入の効果 AChや 5-HT に対する電流応答に G 蛋白質が関与することは, GTP, GppNHp 又は GTP γ S の細胞内注入 (35 pmol) が, ACh や 5-HT の細胞外からの作用の時と同様の電流を引き起こすが, GDP β S は 350 pmol という高濃度の注入でも何ら電流を生じさせない (Fig. 5), また 70 pmol GDP β S 注入は ACh

にボツリヌス毒素感受性低分子量 G 蛋白質がどう関与するか, 百日咳毒素感受性 G 蛋白質 Gi (Go も否定できない) との関連などが明らかにされなければならない点である。

4. ACh, 5-HT 電流誘発に關する 2 次メッセンジャー

a) 環状ヌクレオチド Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) の細胞内注入の効果を見ると, 70 pmol では作用なく, 350 pmol では外向き電流が観察された。mRNA 未移入卵母細胞での cAMP 注入効果は外向き K^+ 電流を生ずる¹⁹⁾ので, おそらく mRNA 移入卵母細胞でも細胞内 cAMP は, 外向き K チャネル電流を引き起こすのであろう。内向き Cl チャネル電流を導く ACh, 5-HT の灌流適用によって, cAMP 量は電流応答の時間経過と一致しては変化しなかった。ACh, 5-HT 誘發電流には cAMP は関与しないことを示している。百日咳毒素処理で ACh, 5-HT 誘發電流は抑制され, cAMP 含量は増加した (Fig. 4) が, 増加した cAMP が ACh, 5-HT 電流を抑制するのではないといえよう。

cGMP の細胞内注入は何ら電流を引き起こさず, 更に ACh, 5-HT の適用も cGMP 含量に影響なかった。

b) イノシトールリン酸 イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) を 10–35 pmol 細胞内注入すると, ACh や 5-HT 灌流適用時に観察されるのと同様の T と S 成分より成る電流が誘発された (Fig. 7A)。mRNA 未移入卵母細胞でも移入群と差のないピーク電流 (Fig. 6) であったので, IP_3 応答電流は元来卵母細胞の有する系を使用して生ずると考えられる。mRNA 未移入卵母細胞にイノシトール 1,3,4,5-四リン酸 (IP_4) を注入しても内向き電流が観察された (Fig. 7A)。²⁰⁾ IP_3 , IP_4 の誘發電流はいずれも Ca^{2+} 欠除のメジウム中でも認められたが (Fig. 7B), ethylene glycol bis(2-aminoethylether)*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) をあらかじめ注入しておくとも認められなくなった (Fig. 7C)。 IP_3 や IP_4 の電流には細胞内遊離 Ca^{2+} が関与することを示している。ウニ卵では IP_4 は細胞膜 Ca チャネルを開口し細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる²¹⁾という報告に対し今回の我々のツメガエル卵母細胞での結果は, IP_4 が Ca チャネルを開口せず, 細胞内貯蔵 Ca^{2+} 放出を引き起こすことを示唆しており興味深い。次に neomycin を 300 pmol 注入しておくとも ACh, 5-HT 応答電流も, $GTP\gamma S$ 注入応答電流も抑制された。Neomycin は phosphatidylinositol (PI) と結合しその酵素的分解を抑制する²²⁾ことより, ACh や 5-HT

Fig. 7. $IP_3(1,4,5)$ - and $IP_4(1,3,4,5)$ -Evoked Current in mRNA-Noninjected Oocytes

35 pmol IP_3 or IP_4 was injected. A) control. B) Ca^{2+} -free medium and C) 50 pmol EGTA injection.

Fig. 8. Time Course of IP_3 Formation by $100 \mu M$ ACh and $0.1 \mu M$ 5-HT

○—○, □—□, sterilized water-injected; ●—●, ■—■, mRNA-injected.

誘発電流には、PI の水解により生ずる IP_3 及び/又は IP_4 が関与することが推定される。

ACh や 5-HT を作用させると実際卵母細胞に IP_3 や IP_4 が生成されるか否かを、あらかじめ $[^3H]$ -inositol により PI を標識しておいた mRNA 移入卵母細胞を使用し検討した。その結果、ACh でも 5-HT でも電流誘発の時間経過に一致し、適用後 15—30 秒後に主として IP_3 (IP_2 , IP_4 も生成傾向があった) が生成されることがわかった¹¹⁾ (Fig. 8)。このように ACh や 5-HT は受容体、G 蛋白質を活性化後、PI よりイノシトールリン酸の生成を促進し、主として IP_3 (1, 4, 5) が細胞内貯蔵 Ca^{2+} を放出し、Cl チャネル電流を導くことが強く示唆される。

c) Ca^{2+} 細胞外液の Ca^{2+} 濃度を 0, 0.74, 5 mm と変化させても ACh, 5-HT の両応答は全く影響されなかった (Fig. 9)。A23187 で細胞外 Ca^{2+} を流入させると持続的内向き電流が観察されたので、 Ca^{2+} が流入し細胞内濃度が上昇すると Cl^- 電流を引き起こすが、ACh, 5-HT は細胞外 Ca^{2+} 流入を引き起こすことなしにおそらく細胞内貯蔵 Ca^{2+} を遊離しその Ca^{2+} が Cl^- 電流を誘起することが示された。このことは、70 pmol Ca^{2+} ($Ca(NO_3)_2$) の細胞内注入は一過性の Cl^- 電流を引き起こし (Fig. 10)、また、あらかじめ EGTA を注入した卵母細胞では、ACh や 5-HT などの細胞外適用、GTP γ S や IP_3 などの細胞内注入による誘発電流を完全に抑制したという実験事実により支持される。

次に細胞内 Ca^{2+} がどのような機構で Cl チャネル開口を導くかを明らかにしようとした。W-7 や trifluoperazine などの calmodulin (CaM) 拮抗薬であらかじめ処理した卵母細胞では ACh や 5-HT 誘発電流が抑制された²³⁾ので CaM の関与が示唆されるが、どのように CaM が Cl チャネルを開口させるのか不明である。現在とくに Ca^{2+} -CaM キナーゼによるリン酸化、細胞骨格蛋白質への CaM の作用といった点より更に検討を行っている。

5. ACh, 5-HT 電流抑制への C キナーゼの関与

a) ホルボールエステルの 5-HT 誘発電流に及ぼす影響 Fig. 1-A に示すように 5-HT を mRNA 移入卵母細胞に灌流適用するとき誘発される内向き電流は一過性である。また、一度 5-HT を適用し電流応答を示した卵母細胞は、約 30—40 分の間 5-HT 応答が減弱し脱感作状態が引き起こされる。この機構への C キナーゼの関与について次に検討した。脱感作の分子機構に、受容体応答系の機能蛋白質の C キナーゼによるリン酸化が関

Fig. 9. ACh- and 5-HT-Evoked Current in mRNA-Injected Oocytes Suspended in Medium without Ca^{2+} , Containing 0.74 mM Ca^{2+} and 5 mM Ca^{2+}

Fig. 10. Ca^{2+} -Evoked Current in Sterilized Water-Injected Oocytes

$Ca(NO_3)_2$ (70 pmol) was injected at arrows.

与することが示唆されているからである。²⁴⁾

まず、5-HT 応答電流に対するホルボールエステル 12-*O*-tetradecanoyl-4 β -phorbol-13-acetate (TPA) 前処理の効果を検討したところ、Fig. 11 に示すように 0.1, 1 μ M で有意に抑制を示した ($IC_{50}=58$ nM).¹⁵⁾ なお不活性型のホルボールエステル 4-*O*-methyl TPA は 1 μ M で有意の抑制を示さなかった。したがって TPA は C キナーゼ活性化を介し 5-HT 誘発電流を抑制すると考えられる。一方、GTP γ S 注入による誘発電流に対し、同様の TPA 処理はほとんど影響しなかったので、G 蛋白質及びその下流の応答系機能に C キナーゼが影響することは考えにくい。

b) ホルボールエステル処理による卵母細胞蛋白質のリン酸化

C キナーゼは 5-HT 受容体応答系に属するある機能蛋白質をリン酸化することにより、5-HT 誘発電流を抑制すると考えられるので次に我々は ³²Pi 存在下で卵母細胞をインキュベート後、10 μ M TPA で 8 分間処理し、全細胞蛋白質を二次元電気泳動 (SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動と等電点電気泳動) を行い、オートラジオグラフィで ³²Pi でラベルされる蛋白質を分析した。その結果 33K と 45K の蛋白質が無処理群に比較して強くラベルされることが分かった。²⁵⁾ この両蛋白質が 5-HT 受容体応答系においてどのような機能を担うのか、また 5-HT 応答に対し何らかのフィードバック制御に関与するのかわかるが、5-HT 応答における脱感作に対し、ホスホリパーゼ C により IP₃ とともに産生されたジアシルグリセロール (DG) が C キナーゼを活性化し、5-HT 受容体、G 蛋白質及び/又はこれら蛋白質の共役に関与する蛋白質をリン酸化することが関わる可能性が示唆された。

6. ACh, 5-HT の内向き Cl⁻ 電流誘発機構

ラット脳 mRNA を移入した卵母細胞での ACh 及び 5-HT 誘発電流の機構を Fig. 12 に示す。脳 mRNA を移入すると卵母細胞は、脳由来の M₁ ACh 受容体、5-HT_{1C} 受容体、G 蛋白質を生合成し、それらを細胞膜に組み込み機能を発現するようになる。脳由来の受容体、G 蛋白質は、元来卵母細胞の有する (一部脳由来のものも含まれる可能性はある) ホスホリパーゼ C、Ca²⁺ 貯蔵プール、CaM、Cl⁻ チャネルとともに機能的な情報伝達系を再構成する。

このような mRNA 移入卵母細胞に、ACh, 5-HT を作用させるとそれぞれ M₁ 受容体、5-HT_{1C} 受容体を刺激し、百日咳毒素 (及びボツリヌス毒素) 感受性の G 蛋白質の活性化を引き起こす。次いでホスホリパーゼ C

Fig. 11. Effects of TPA on 5-HT-Evoked Current

TPA was perfused for 8 min. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$. 4-*O*-MTPA, 4-*O*-methyl TPA.

Fig. 12. The Transmembrane Signalling Mechanism of ACh- and 5-HT-Evoked Current

による PI の水解で IP_3 と DG が生成する。 IP_3 は細胞内貯蔵 Ca^{2+} を放出し、その遊離 Ca^{2+} は CaM に結合し、何らかの機構で Cl チャネルを開口、 Cl^- を流出させることにより Cl^- 電流を導く。上昇した DG は、 Ca^{2+} とともに C キナーゼを活性化し、受容体、G 蛋白質及び/又はこれらの共役系の蛋白質をリン酸化し脱共役し、ACh, 5-HT 受容体応答系を脱感作状態に導く。

7. 電位依存 Ca チャネルの発現と制御

a) 細胞内 Ca^{2+} の機能的意義と Ca チャネル 細胞内の Ca^{2+} は細胞の諸種の生理機能の発現に重要な役割を果すことはいふをまたない。CaM と結合し、1) 細胞骨格蛋白質機能に影響したり、2) Ca^{2+} -CaM キナーゼ活性化を介し諸種蛋白質 (酵素も含め) 機能に影響する。²⁶⁾ C キナーゼ、ホスホリパーゼ A_2 、更に Ca^{2+} 依存性プロテアーゼ²⁷⁾なども Ca^{2+} により活性化され細胞機能をコントロールする。ニューロンにおいても Ca^{2+} はこれらの機構などにより、神経伝達物質の放出や長期増強などのシナプス可塑性²⁸⁾に関与すると推定されている。このニューロン内 Ca^{2+} 濃度は、1) 膜電位の脱分極にตอบสนองし開口する細胞膜電位依存 Ca チャネルを通る Ca^{2+} 流入、2) 神経伝達物質受容体の活性化により開口する Ca チャネルを通る Ca^{2+} 流入、及び 3) 受容体刺激に関連した PI 代謝促進による細胞内貯蔵 Ca^{2+} 放出、の 3 種により調節される。我々はニューロン膜の電位依存 Ca チャネルの性質、活性制御機構を明らかにする目的で、ラット脳 mRNA 移入卵母細胞を使用しそれに発現した Ca チャネルの性質を検討した。

b) 電位依存 N 型 Ca チャネルの発現 先に述べた方法¹⁰⁾で抽出精製したラット脳 mRNA を移入した卵母細胞を使用した。 Ca^{2+} を全く含まない液 (Ca^{2+} を Ba^{2+} で置換した液: 50 mM $Ba(OH)_2$, 5 mM CsCl, 50 mM Tris, 0.5 μ M tetrodotoxin (TTX), 20–500 μ M DIDS 含有液)²⁹⁾ で卵母細胞を灌流し、脱分極刺激に伴う Ca チャネル開口活性を Ba^{2+} 電流 (I_{Ba}) として測定した。

mRNA 移入卵母細胞をあらかじめ -100 mV に 5 秒間分極させておき、0 mV に 5 秒間脱分極させたところ Fig. 13A に示す内向きの一過性電流 I_{Ba} が認められた。この I_{Ba} は Cd の存在下では完全に抑制され、また mRNA 未移入卵母細胞では観察されなかったことより、脳組織由来の電位依存 Ca チャネルが発現すると考えられる。 I_{Ba} は mRNA 移入後 1–7 日と経日的に大きくなった (Fig. 13B)。また I_{Ba} に対する verapamil, nifedipine, diltiazem など有機 Ca 拮抗薬はいずれも低い抑制効果しか示さず、一方、 ω -conotoxin は強い効果を示した (Fig. 14) ので、卵母細胞には脳の N 型の電位依存 Ca チャネルが発現するといえる。

c) N 型 Ca チャネル開口制御 培養後根神経節ニューロンにおいて forskolin や TPA は、N 型 Ca チャネル活性を減弱させたり、³⁰⁾ A キナーゼ、C キナーゼが電位依存 Ca チャネル蛋白質をリン酸化したり³¹⁾することより、A キナーゼ、C キナーゼによる N 型 Ca チャネル制御へのキナーゼの関与の可能性が示唆されてい

Fig. 13. I_{Ba} Expressed in Oocytes

A) I_{Ba} in sterilized water- and mRNA-injected oocytes and effects of Cd. B) Time course of I_{Ba} expression at days after mRNA injection.

Fig. 14. Effects of Varapamil, Nifedipine, Diltiazem and ω -Conotoxin on I_{Ba}

TABLE I. Effects of Forskolin and Isoproterenol on I_{Ba} in mRNA-Injected Oocytes

	(n)	Peak amplitude I_{Ba}	Net current $\int^{5s} I_{Ba}$
Control	(8)	93 ± 9	105 ± 6
Forskolin (10 μ M)	(6)	113 ± 8	$139 \pm 8^{a)}$
Isoproterenol (100 μ M)	(5)	102 ± 9	$123 \pm 11^{a)}$

^{a)} Significantly different ($p < 0.05$) by paired Student's *t*-test.

Forskolin or isoproterenol was superfused for 10 min. I_{Ba} was recorded before and after the perfusion. Peak amplitudes and the integration of net I_{Ba} during the given 5 s-depolarization are shown as a percentage of initial values after 10 min treatment.

Fig. 15. Effects of TPA and H-7 on I_{Ba}

A) Time course of TPA effects and B) effects of TPA and H-7 on I_{Ba} .

るが、まだ詳細は不明である。我々は、mRNA 移入卵母細胞で観察される I_{Ba} への forskolin, isoproterenol 処理の効果を検討したところ、 I_{Ba} のピーク電流には影響はなかったが、 I_{Ba} の 5 秒間の積分値を有意に増加させることが分かった (Table I).³²⁾ 細胞内への cAMP 注入も I_{Ba} の持続を増加させ、その増加は A キナーゼ活性抑制薬 HA1004 により抑制されたことより、細胞内 cAMP は A キナーゼを介し N 型 Ca チャネル開口の持続 (不活性化の遅延) をもたらすと考えている。一方、 I_{Ba} は速く開口するチャネルによる電流と遅く開口するチャネル電流より成るとも考えられ、その場合は cAMP が遅いチャネル活性を増強するのかもしれない。

ホルボールエステル TPA 処理では、低濃度 (30, 100 nm) では I_{Ba} を増加させたが、高濃度 (300 nm, 1 μ M) では I_{Ba} に対し、初期 (3—6 分) に増強、その後 (12—15 分) では抑制という二相作用を示した (Fig. 15A). 300 nm TPA の初期増強効果は C キナーゼ活性抑制薬 H-7 により抑制されたが、抑制相は影響されなかった (Fig. 15B). N 型 Ca チャネルは C キナーゼによって制御されること、その促進的制御は可能性が高いが、抑制的制御の点も含め、C キナーゼによる制御については更に検討を要すると考えている。

おわりに

外来性 mRNA の効率よい翻訳系としての卵母細胞を使用して、脳 mRNA 移入後発現した ACh, 5-HT 受容体応答内向き電流の細胞内機構、並びに電位依存 N 型 Ca チャネル電流制御機構に関し電気生理学的、分子薬理学的検討を行った。脳 mRNA の移入により受容体、G 蛋白質が生合成され、膜に組み込まれ、元来卵母細胞に存在する情報伝達系、すなわちホスホリパーゼ C, IP_3 感受性 Ca^{2+} プール、CaM, Cl チャネルと機能的に

連結, 再構成され, ACh, 5-HT に応答して電流を誘発することが分かった. 脳の N 型 Ca チャネルも電位依存的に活性化され, A キナーゼ, C キナーゼにより制御されることも示された. しかし今回得られた ACh, 5-HT 応答電流の細胞内機構, N 型 Ca チャネル制御機構がそのまま脳細胞におけるそれを反映するとは限らない. 卵母細胞の本来有する細胞内情報系との“キメラ情報伝達系”ともいえるからである. さらに本研究において, 脳組織全部より抽出精製した mRNA, すなわちニューロン以外にグリア細胞由来, 血管細胞由来の mRNA を含んだ標品を卵母細胞に移入しており, M_1 ACh 受容体, 5-HT_{1C} 受容体, N 型 Ca チャネル以外に情報伝達系の蛋白質が当然発現され, それらが ACh, 5-HT 応答, Ca チャネル応答を修飾している可能性が考えられる. 事実, グリア細胞由来のプロテインキナーゼ, さらに受容体, イオンチャネルについては neurotensin, substance P, glutamate, GABA, glycine などの受容体や電位依存 Na チャネル, 電位依存 K チャネルなどが機能を有して発現する.⁴⁾ しかし, ACh, 5-HT 応答系や N 型 Ca チャネル応答系に比較しこれらでは活性の検出がやや困難であるようである. これは該当する特異的 mRNA が相対的に低濃度なため発現量が少ないこと (mRNA の翻訳とその機能発現に競合が起こることも発現量を低下させる), 翻訳後の修飾 posttranslational modification が起こりにくいこと, 膜への組み込みや機能的再構成などの難しいことなどによる可能性が考えられる. 各受容体, 各イオンチャネルに特異的な mRNA を調製, 移入することにより特異的に受容体やイオンチャネルを発現させることが必要である. それにより受容体やイオンチャネル応答機構の解析が容易となり, より信頼度の高い結果が得られるといえる.

今後, この極めて有用な卵母細胞を有効に活用し, 細胞の刺激応答系とその機構の分子レベルの研究が益々進展することを期待している.

謝辞 本研究は, 国立岡崎共同研究機構生理学研究所 山岸俊一教授, 杉山博之博士のご教示によって開始され, 富山医科薬科大学和漢薬研究所の金子周司博士 (現京都大学薬学部助手), 加藤憲一修士 (現北陸製薬株式会社中央研究所), さらに北海道大学薬学部の東田道久教務員, 高須俊行修士の研究協力によりなされたものである. また, 東京大学薬学部 宇井理生教授, 科研製薬株式会社中央研究所 矢島基之博士, 野木森克己博士よりは IAP (百日咳毒素), 愛媛大学工学部 尾崎庄一郎教授よりは各類イノシトールリン酸化合物の恵贈を受け, 更に, 研究費の一部は文部省科学研究費 [一般研究 (B), 重点領域研究「細胞膜調節」(班長東京大学医学部 遠藤 實教授), 総合研究 (A)「薬物応答と細胞内オルガネラ」(班長広島大学医学部 石橋貞彦教授)], 薬学研究奨励財団研究助成金によるもので, ここに感謝致します.

引用文献及び注

- 1) 野村靖幸, “ α 受容体の脳における情報伝達,” 医薬ジャーナル社, 1989, p. 11.
- 2) J. B. Gurdon, C. D. Lane, H. R. Woodland, G. Marbain, *Nature* (London), **233**, 177 (1971).
- 3) 野村靖幸, 日薬理誌, **93**, 321 (1989).
- 4) T. P. Snutch, *Trends Neurosci.*, **11**, 250 (1988).
- 5) M. Mishina, T. Kuroski, T. Tobimatsu, Y. Morimoto, M. Noda, T. Yamamoto, T. Terao, J. Lindstrom, T. Takahashi, M. Kuno, S. Numa, *Nature* (London), **307**, 604 (1984).
- 6) M. Mishima, T. Takai, K. Imoto, M. Noda, T. Takahashi, S. Numa, C. Methfessel, B. Sakmann, *Nature* (London), **321**, 406 (1986).
- 7) Y. Masu, K. Nakayama, H. Tamaki, Y. Harada, M. Kuno, S. Nakanishi, *Nature* (London), **329**, 836 (1987).
- 8) D. Julius, A. B. MacDermott, R. Axel, T. M. Jessel, *Science*, **241**, 558 (1988).
- 9) T. Takumi, H. Ohkubo, S. Nakanishi, *Science*, **242**, 1042 (1988).
- 10) T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, “A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, p. 188.
- 11) Y. Nomura, S. Kaneko, K. Kato, S. Yamagishi, H. Sugiyama, *Mol. Brain Res.*, **2**, 113 (1987).
- 12) Y. Nomura, M. Tohda, S. Kaneko, K. Kato, S. Yamagishi, H. Sugiyama, “Physiology and Pharmacology of Transmembrane Signalling,” Elsevier, Amsterdam, 1989, p. 125.
- 13) 東田道久, 高須俊行, 野村靖幸, 第 17 回薬物活性シンポジウム講演要旨集, 1989, p. 85.
- 14) S. Kaneko, K. Kato, S. Yamagishi, H. Sugiyama, Y. Nomura, *Mol. Brain Res.*, **3**, 11 (1987).

- 15) H. Sugiyama, Y. Hisanaga, C. Hirono, *Brain Res.*, **383**, 346 (1985).
- 16) T. Takasu, M. Tohda, Y. Nomura, *Jpn. J. Pharmacol.*, **52**, suppl., 230 p (1990).
- 17) 成宮 周, 実験医学, **6**, 43 (1988).
- 18) 河田正仁, 高井義美, 細胞工学, **8**, 761 (1989).
- 19) I. Lotan, N. Dascal, Y. Oron, S. Cohen, Y. Lass, *Mol. Pharmacol.*, **28**, 170 (1985).
- 20) T. Takasu, M. Tohda, Y. Watanabe, S. Ozaki, Y. Nomura, *Jpn. J. Pharmacol.*, **52**, suppl., 327 p (1990).
- 21) R. F. Irvine, R. M. Moore, *Biochem. J.*, **240**, 917 (1986).
- 22) J. Schacht, *J. Neurochem.*, **27**, 1119 (1976).
- 23) I. Ito, S. Hirono, S. Yamagishi, Y. Nomura, S. Kaneko, H. Sugiyama, *J. Cell Physiol.*, **134**, 155 (1988).
- 24) D. R. Sibley, J. L. Benovic, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Cell*, **48**, 913 (1987).
- 25) K. Kato, S. Kaneko, Y. Nomura, *J. Neurochem.*, **50**, 766 (1988).
- 26) P. Cohen, C. B. Klee, "Molecular Aspects of Cellular Regulation," 5, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- 27) K. Suzuki, *Trends in Biochem. Sci.*, **12**, 103 (1987).
- 28) R. Mailnow, D. V. Madison, R. W. Zien, *Nature (London)*, **335**, 820 (1988).
- 29) 本研究において使用した灌流液は, Ca^{2+} の代わりに Ba^{2+} を含む. その理由は, Ca^{2+} がチャネル開口により流入すると本卵母細胞では Ca^{2+} に依存し Cl^- 電流が誘発され, Ca チャネル活性の指標としての Ca^{2+} 電流が測定できない. 一方, Ba^{2+} は Ca チャネルを通過可能であり, Ca チャネル活性を Ba^{2+} 電流として測定可能であるからである. なお TTX は Na チャネルの抑制, DIDS は Cl チャネルの抑制のために添加する.
- 30) R. A. Gross, R. L. Macdonald, *Neurosci. Lett.*, **88**, 50 (1988).
- 31) W. A. Catterall, "α 受容体の脳における情報伝達," 医学ジャーナル社, 1989, p. 105.
- 32) S. Kaneko, Y. Nomura, *Neurosci. Lett.*, **83**, 123 (1987).