



Title	Expressed Cerebellar-Type Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor, P400 ; Has Calcium Release Activity in a Fibroblast L Cell Line
Author(s)	宮脇, 敦史
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37176">https://hdl.handle.net/11094/37176</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	宮 脇 敦 史
学位の種類	医学 博士
学位記番号	第 9668 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Expressed Cerebellar-Type Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor, P400 ; Has Calcium Release Activity in a Fibroblast L Cell Line マウス線維芽細胞内で cDNA より発現させたイノシトール 3 リン酸受容体のカルシウム放出活性
論文審査委員	(主査) 教授 御子柴克彦 (副査) 教授 松本 圭史 教授 遠山 正彌

### 論文内容の要旨

#### (目的)

多くの細胞で, agonist の刺激に応じて I P 3 が形質膜より遊離し, 細胞内 Ca ストアから Ca イオンを動員する。さて, I P 3 受容体は I P 3 依存性 Ca 放出に如何に関わるのか。I P 3 受容体は I P 3 を認識した上で自ら Ca チャネル活性を発揮するのか。それとも Ca イオンの移動には他の分子の関与が必要なのか。I P 3 受容体がアミノ酸配列上, 骨格筋筋小胞体の Ca チャネルであるリアノジン受容体に似ている事, 精製した I P 3 受容体を電子顕微鏡で観察すると 4 量体構造が検出される事などから, I P 3 受容体が自ら Ca チャネルと成り得ると期待できる。実際, Ferris ら及び前田らは人工膜への再構成系を使い, I P 3 受容体が Ca イオンの移動を引き起こす事を証明した。我々は, 非神経系の培養細胞 (マウス線維芽細胞 L 細胞) 内で, マウス小脳よりとった I P 3 受容体 cDNA を大量に発現させることにより, I P 3 受容体が天然の膜上で生理的 Ca 放出に関与する事を証明しようと試みた。また I P 3 受容体と細胞内 Ca イオン動態との関係を考察する。

#### (方法ならびに成績)

(1) 細胞内膜系での発現: ネオマイシン耐性遺伝子の同時発現によりセレクションをかけた上で, cDNA 由来 I P 3 受容体を安定に大量発現しているクローンを得た (L15 細胞)。プロモーターにはベータアクチンのそれを用いた。L15 細胞を抗 I P 3 受容体抗体にて蛍光ラベルし, 共焦点レーザー顕微鏡で断層像を観ると, cDNA 由来 I P 3 受容体が細胞質全体に均一に網目状に分布する事がわかった。恐らく ER 膜など細胞内膜系に発現しているものと考えられる。L15 細胞の膜画分を用いて, Western Blotting 及び I P 3 結合実験を行ったところ, cDNA 由来 I P 3 受容体は,

小脳IP3受容体に等しいIP3結合様式（親和性、容量、特異性）を有していた。

- (2) IP3受容体のCaチャネル形成：細胞内Caプールは、IP3受容体の存在の有無によって、IP3感受性プールとIP3非感受性プールとに分けられるが、L15細胞のごとく大量のIP3受容体を人為的に発現させた場合に、これらプールの構成がどう影響されるのかを検討した。L15細胞と対照L細胞（IP3受容体cDNAを発現していない、ネオマイシン耐性クローン）の膜画分を用い、IP3依存性Ca放出実験（ $^{45}\text{Ca}$ filtration assay）を行い、IP3濃度-Ca放出量の相関を検討した。まずL15細胞画分においてIP3によって放出される最大Ca量は、対照L細胞膜画分におけるその約2倍に増加した事から、cDNAのトランスフェクションによりCaチャネルが発現する事が示された。
- (3) 非神経系細胞の、小脳タイプIP3誘導Ca放出能の獲得：L15細胞は対照L細胞と比べ、2倍の大きさのIP3感受性Caプールを持つ事になる。これは恐らくL細胞のIP3非感受性CaプールがcDNA由来のIP3受容体を獲得して、IP3感受性プールに変化した為と考えられる。次にEC<sub>50</sub>（最大Ca放出量の半分量のCa放出を起こすIP3濃度）に関しては、L15細胞が0.1uM、対照L細胞が1uMであり、約10倍の差が認められた。EC<sub>50</sub>の減少は、IP3感受性プールのIP3に対する感受性の増大と解釈される。即ち、cDNA由来のIP3受容体が、L細胞内因性のIP3受容体よりも高いCa放出能力を持つ事が考えられる。或いは、L15細胞のIP3感受性Caプールが、対照L細胞のそれより高密度のIP3受容体を有する為に、感受性の差が現れた可能性もある。IP3依存性Ca放出実験により観察されているEC<sub>50</sub>は、小脳組織を使った場合に低く（約0.1uM以下）、小脳以外の組織、細胞を使った場合に高く（約1uM）報告されており、我々の実験結果と合致する。小脳タイプのIP3受容体を発現させる事により、非神経系のL細胞にて、小脳タイプのIP3依存性Ca放出を再現する事ができた訳である。

（総括）

IP3受容体が生理的膜上でCa放出機能をもつ事が、L細胞におけるcDNA発現系により証明された。発現させたIP3受容体が、具体的にどの細胞内小器官に局在し、それによって細胞内Caプールの構成がどう変化したかをひきつづき検討中である。

### 論文審査の結果の要旨

イノシトール1, 4, 5-3リン酸（IP3）は、小胞体膜上に存在するIP3受容体を介して、小胞体内腔に貯蔵されているCa<sup>++</sup>を放出させると考えられている。本研究は、小脳IP3受容体cDNAを非神経系細胞に導入することにより、この蛋白質の構造、およびチャネル活性を明らかにしようとするものである。

マウス線維芽細胞L cell lineを用いてIP3受容体を安定に大量発現するトランスフォーマントを得、膜画分を調整し、 $^{45}\text{Ca}$ <sup>++</sup>放出実験を行ったところ、対照L細胞に比べて、カルシウム最大放出量が2倍

に、また  $E C_{50}$  (最大放出量の50%の放出を起こすべき I P 3 濃度) が  $1/10$  に変化していた。細胞内のカルシウムプールは、I P 3 受容体の有無により、I P 3 感受性及び非感受性プールに区別される。今回のデータは、大量の cDNA 由来の I P 3 受容体の導入によって、L 細胞の I P 3 非感受性プールが I P 3 感受性に変わった事。また、I P 3 感受性プールについてみても、その I P 3 感受性が高まった事を示唆させる。

以上の成果は I P 3 受容体が生理的膜上で、I P 3 に応答してカルシウム動員を引き起こす事を証明する貴重なもので、学位授与に価するものである。