

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	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37176
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【17】

氏名・(本籍)	みや	わき	あつ	し
学位の種類	宮	脇	敦	史
学位記番号	医	学	博	士
学位授与の日付	第	9	6	8
学位授与の要件	号			
学位論文題目	平成	3	年	3
	月	26	日	
	医学研究科	生理系専攻		
	学位規則第5条第1項該当			
	Expressed Cerebellar-Type Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate			
	Receptor, P400 ; Has Calcium Release Activity in a Fibroblast			
	L Cell Line			
	マウス繊維芽細胞内で 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 IP₃ 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, IP₃ 受容体は IP₃ 依存性 Ca 放出に如何に関わるのか。IP₃ 受容体は IP₃ 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。IP₃ 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 IP₃ 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, IP₃ 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, IP₃ 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 IP₃ 受容体 cDNA を大量に発現させることにより, IP₃ 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 IP₃ 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 IP₃ 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 IP₃ 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 IP₃ 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 IP₃ 結合実験を行ったところ, cDNA 由来 IP₃ 受容体は,

小脳 I P 3 受容体に等しい I P 3 結合様式 (親和性, 容量, 特異性) を有していた。

- (2) I P 3 受容体の Ca チャネル形成: 細胞内 Ca プールは, I P 3 受容体の存在の有無によって, I P 3 感受性プールと I P 3 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 I P 3 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 (I P 3 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, I P 3 依存性 Ca 放出実験 (^{45}Ca filtration assay) を行い, I P 3 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 I P 3 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 I P 3 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 I P 3 感受性 Ca プールを持つ事になる。これは恐らくL細胞の I P 3 非感受性 Ca プールが cDNA 由来の I P 3 受容体を獲得して, I P 3 感受性プールに変化した為と考えられる。次に EC_{50} (最大 Ca 放出量の半分量の Ca 放出を起こす I P 3 濃度) に関しては, L15細胞が 0.1 μM , 対照L細胞が 1 μM であり, 約 10 倍の差が認められた。 EC_{50} の減少は, I P 3 感受性プールの I P 3 に対する感受性の増大と解釈される。即ち, cDNA 由来の I P 3 受容体が, L細胞内因性の I P 3 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 I P 3 感受性 Ca プールが, 対照L細胞のそれより高密度の I P 3 受容体を有する為に, 感受性の差が現れた可能性もあろう。I P 3 依存性 Ca 放出実験により観察されている EC_{50} は, 小脳組織を使った場合に低く (約 0.1 μM 以下), 小脳以外の組織, 細胞を使った場合に高く (約 1 μM) 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 I P 3 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 I P 3 依存性 Ca 放出を再現する事ができた訳である。

(総括)

I P 3 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 I P 3 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 (I P 3) は, 小胞体膜上に存在する I P 3 受容体を介して, 小胞体内腔に貯蔵されている Ca^{++} を放出させると考えられている。本研究は, 小脳 I P 3 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 I P 3 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, $^{45}\text{Ca}^{++}$ 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 EC_{50} (最大放出量の50%の放出を起こすべき IP3 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、IP3 受容体の有無により、IP3 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 IP3 受容体の導入によって、L 細胞の IP3 非感受性プールが IP3 感受性になった事。また、IP3 感受性プールについても、その IP3 感受性が高まった事を示唆させる。

以上の成果は IP3 受容体が生理的膜上で、IP3 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。