

## 論文の内容の要旨

# Developmental changes in calcium dynamics and ion channels in ascidian muscle blastomeres

(要約) ホヤ筋細胞におけるカルシウム動態とイオンチャネルの発達

氏名 中條浩一

筋細胞では、筋繊維が収縮するための最初のステップとして興奮収縮連関と呼ばれる一連の現象がよく知られている。これはまず脱分極により細胞膜上に存在する L 型の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが開き、細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入する。次にその流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が L 型の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルと共役しているリアノジン受容体を活性化して、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストア (筋小胞体) に貯蔵された  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞質中に放出することにより  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを増幅し、筋繊維を収縮させるという現象である。 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルとリアノジン受容体が機能的に共役するためには両者が物理的にかなり近い位置関係になければならないと考えられている。筋細胞の種類によっては、それらに加えて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を排除する機構や  $\text{Ca}^{2+}$  に感受性のあるイオンチャネルなどが存在し、それぞれが細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態や膜の興奮性を制御していると思われる。

脊椎動物の心筋や骨格筋などの生理学的な解析が進む一方で、イオンチャネル、受容体、イオン交換体などが発生に伴ってどのように発現し、生理的機能を獲得するメカニズムについては不明な点が多い。これは、脊椎動物の細胞を用いた研究では、発生の極めて初期から継続して生理学的な解析を行うことが困難であるからだと考えられる。

そこで本研究では、発生のごく初期の段階から各割球の発生運命が決まっているマボヤを用い、電気生理学的手法と  $\text{Ca}^{2+}$  感受性色素による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定を併せることによって、筋予定割球 B5.1 細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  動態および膜興奮性に関する膜分子の発達を解析した。

## 第1章 電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルとリアノジン受容体の機能的共役

はじめに、興奮収縮連関の最初のステップである電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルについて、その電流の発達を2電極膜電位固定法によって測定した。マボヤ筋割球を水温 10 度の海水中で培養すると、受精後約 48 時間で孵化して泳ぎますが、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの電流は受精後約 20 時間より発現しだし、発生が進むにしたがって増大した。

また L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは  $\text{Ca}^{2+}$  によって不活性化するという性質をもつが、この不活性化の度合いを指標にすると、脱分極時の  $\text{Ca}^{2+}$  流入による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が起こっているかどうかを判定できることが判明した。この方法を用いることで、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとリアノジン受容体の機能的な共役は受精の約 36 時間後に形成されることが明らかとなった。

## 第2章 蛍光指示薬による $\text{Ca}^{2+}$ 放出の解析と筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP アーゼポンプの発達

マボヤ筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  放出の性質について、Oregon Green や fura-2 等の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性色素を用いて解析をすすめた。マボヤ筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  放出は外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入に依存する  $\text{Ca}^{2+}$  放出 ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release; CICR) であることが確認され、哺乳類の心筋タイプに似ていることがわかった。また、この手法によると  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとリアノジン受容体の機能的な共役が受精の約 34 時間後に起こることがわかり、第1章の実験の結果を裏付けることができた。

一方、短時間 (10 ms) の脱分極で誘発される細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇後の減衰の時定数を測定したところ、受精後 48 時間 (孵化直後) では  $199 \pm 29$  ms ( $n=11$ ) であるが、受精後 72 時間で  $104 \pm 21$  ms ( $n=7$ ) となり、孵化後、細胞膜直下での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  排除機構がさらに発達していると考えられた。

次に膜直下での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  排除機構の発達が何によるものかを明らかにすることを試みた。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP アーゼポンプの阻害剤である CPA を投与すると、減衰の時定数は著しく大きくなった。一方で細胞外の  $\text{Na}^+$  を  $\text{Li}^+$  に置き換えることにより  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換体の役割についても検討したが、ほとんど影響が見られなかった。従って、膜直下での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を減少させる役割は、主に筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP アーゼポンプが担っていると結論された。

孵化したホヤの幼生が泳ぐ時の尾を振る速さも、孵化後徐々に速くなっていく現象が観察された。筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP アーゼポンプの発達が泳ぐ速さの発達に寄与している可能性が考えられた。

## 第3章 $\text{Ca}^{2+}$ 放出によって活性化される $\text{Ca}^{2+}$ 活性化 $\text{K}^+$ チャンネル

受精後 48 時間から 72 時間にかけて一過的な外向き電流が発達してくる現象が観察された。全細胞電流の解析とカフェインを用いた薬理学的な実験により、この一過的な外向き電流がリアノジン受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出によって活性化された  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャンネルであることが示唆された。

このチャンネルの性質と  $\text{Ca}^{2+}$  放出との関係を調べるため、ホヤ筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャンネルのシングルチャンネル電流の記録を試み、約 60pS のコンダクタンスを持つシングルチャンネル電流を得た。 $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャンネルと考えられるこのシングルチャンネル記録の解析とそのカフェイン感受性から、このチャンネルが CICR によって直接活性化されていることが強く示唆された。これにより  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャンネルとリアノジン受容体の位置関係が近いことが予想され、この共役が筋細胞の脱分極 (筋収縮) 時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇と連動し、細胞の再分極を促していると考えられた。

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP アーゼポンプの発達と同様、受精後 48 時間以降このチャンネルが発達してくることが、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  放出のパターンを調節し、泳ぎの周波数の増加に寄与していると考えられた。

