

学位論文題名

Pharmacological Studies on the Role of Calcium and  
cAMP in Vitellogenin Induction by Estradiol-17  $\beta$   
in the Primary Hepatocyte Culture in the  
Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

(ニジマスの初代培養肝細胞におけるビテロゲニンの合成に及ぼす  
カルシウムおよび cAMP の影響に関する薬理学的研究)

学位論文内容の要旨

硬骨魚類は卵生動物であり、卵黄成分は胚発生時および仔魚期の栄養源として利用されている。この卵黄は、エストラジオール-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)の刺激により肝臓でビテロゲニン(VTG)として合成され、血液を経てリポビチリン、ホスピチン、および $\beta$ -component に分離された後、卵に蓄積されたものである。したがってVTGの合成機構を明らかにすることは水産学上重要な課題である。

VTGはカルシウム、リン酸、糖及び脂質などを含む複合蛋白質であり、ニジマスにおいては、0.7%のカルシウムを含有することが報告されている。VTG結合カルシウムは、そのほとんどがホスピチンに結合されており、胚胎のカルシウム供給源として機能しているものであると考えられている。

一般にカルシウムは蛋白質の合成、分泌に関与していることが知られている。例えば、ラットの培養肝細胞において、細胞外カルシウムを減少させることにより蛋白質の合成が抑制されることが報告されている。このような蛋白質合成の抑制は、細胞内カルシウムの欠乏によりポリペプチド開始因子の一つであるeIF-2の $\alpha$ -サブユニットのリン酸化によるものであると推察されている。

一方、カルシウムアゴニストA23187による細胞内貯蔵カルシウムの枯渇によっても、カルシウム依存性翻訳開始が抑制されることが知られている。このような抑制作用はA23187による脱リン酸化によるものであると考えられている。

蛋白質のリン酸化および脱リン酸化はプロテインキナーゼCを含む種々のカルシウム依存性プロテインキナーゼにより調節されることが知られている。これらのカルシウム依存性プロテインキナーゼは細胞外および細胞内貯蔵カルシウムの動員による細胞内カルシウムの上昇により活性化される。VTGはリンおよびカルシウムを多量に含んでいるため、VTGの合成および分泌過程にはカルシウムが特異的に働く可能性が高い。しかし、このようなVTGの合成および分子統合にカルシウムがどのように関わっているのかに関する研究は未だない。

一方、近年、ラットにおけるE<sub>2</sub>によるサイクリックAMP(cAMP)およびアデニルシクラーゼの活性が蛋白質合成の転写因子の調節に関わることが報告されている。同様に、E<sub>2</sub>によるcAMPの活性化により核結合蛋白質がリン酸化されることが報告されている。さらに、ウナギにおいてVTG合成の促進作用を持つことが知られている成長ホルモン(GH)の投与においても細胞内cAMPを介した蛋白質合成の調節が報告されている。このことはE<sub>2</sub>の刺激により合成されるVTGにおいてcAMPによる二次的効果が予想されるが、VTG合成におけるcAMPの役割は不明である。

そこで本研究では、ニジマス培養肝細胞を用い、VTG合成に対するカルシウムアンタゴニスト、アゴニストおよびcAMP関連試薬などの影響を電気泳動的な手法により調べ、VTG合成におけるカルシウムおよびcAMPの影響について調べた。さらに、*in vivo*におけるVTGへのカルシウム結合能についても調べた。

ニジマスにおける肝細胞培養はその改善法が検討されており、本研究においても、ポジティブチャージを施したプラスチックデッシュを用いることにより培養肝細胞は7日間の培養において単層に伸展し、約80%の高い生存率と共にDNA量の維持が確認された。しかし、培地カルシウム濃度0mMでの肝細胞はその伸展が見られなかった。E<sub>2</sub>投与によるVTGの合成は3日目に検出され、11日目まで徐々に増加した。本研究におけるVTG合成はE<sub>2</sub>投与後7日目の培地を回収し、5~20%のSDS-濃度勾配電気泳動により分離し、各バンドの吸光度を測定し、全蛋白質に対するVTGの割合を算出することにより分析を行った。

VTG結合カルシウムは*in vivo*および*iv vitro*条件下でそれぞれ限外濾過法により算出した。その結果、VTGにおけるカルシウム結合能は*in vitro*に比べ、*in*

*vivo*において約3倍の高い値を示した。また、VTGの合成割合も*in vitro*に比べ、約2.5倍の値を示し、有意に高かった。このことから、*in vivo*におけるVTG合成において、E<sub>2</sub>以外の因子により促進されることが考えられる。

さらに、E<sub>2</sub>の投与によるカルシウムの取り込みは90分後有意に高い値を示した。また、VTG合成誘導時の細胞内カルシウム濃度においてもE<sub>2</sub>の添加により約12%高い値を示した。このことから細胞内への細胞外カルシウムの流入がVTG合成に重要な役割を果たしていると考えられる。

培養肝細胞におけるVTG合成は培地のカルシウム濃度依存的に増加し、カルシウム2.5mMで最も高い値を示した。培地のカルシウム0.25mM以下では、VTG合成は有意に減少し、0mMではほとんど認められなかった。

7日間のE<sub>2</sub>によるVTG合成の誘導後、培地カルシウム0mMの条件で培養を行うことにより、その合成は3日後約30%減少し、E<sub>2</sub>を取り除いた群より急激な減少傾向を示した。このことから、細胞外カルシウムはVTG合成において重要であり、またVTG合成の最終段階である翻訳および翻訳後調節の段階に関わる可能性が示唆された。

カルシウムアンタゴニストの投与によるVTG合成はランタン(全カルシウムチャネルの阻害剤)、ベラパミル(電位依存性カルシウムチャネル阻害剤)およびリアクティブブルー(レセプター依存性カルシウムチャネル阻害剤)の添加において有為に減少した。このことから、肝臓におけるカルシウム輸送機構はベラパミルおよびレセプター依存性カルシウムチャネルであり、VTG合成において機能していると考えられる。

細胞内貯蔵カルシウムを枯渇させることが知られているカルシウムアゴニストであるA23187( $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$ M)およびカフェイン( $10^{-4}$ ~ $10^{-2}$ M)の投与によってもVTG合成は濃度依存的に減少した。また、リアノチン( $10^{-4}$ M)においてもその合成は有意に抑制された。小胞体(ER)のカルシウムを特異的に枯渇させるタプシガルギン( $10^{-7}$ ~ $10^{-6}$ M)では濃度依存的にVTG合成は減少したが、ミトコンドリア内のカルシウムを特異的に枯渇させるオリゴマイシン(1~10 $\mu$ g/ml)では変化が見られなかった。さらに、5日間のE<sub>2</sub>によるVTG合成の誘導後、A23187の投与によりVTG合成は培地カルシウム0mMに比べ、急激な減少傾向が見られた。

このことから、VTG合成には細胞内貯蔵カルシウム、特に、ER内の貯蔵カルシウムが重要な役割を果たしており、その役割の過程はVTG合成の最終段階である翻訳または翻訳後調節の段階であると考えられる。

脳下垂体および甲状腺ホルモン( $T_3$ )によるVTG合成への影響はGHの100ng/mlの高濃度において約21%の増加が認められた。しかし、プロラクチン(100~500ng/ml)および $T_3$ ( $10^{-8}$ ~ $10^{-6}$ M)においては、いずれの濃度においてもVTG合成に対する影響は認められなかった。また、ニジマスの下垂体抽出液(0.75 pituitary/dish)の投与においてもその影響は認められなかった。このことから、VTG合成に及ぼすホルモン作用は種によって異なるものであると思われる。

近年、GHによる細胞内cAMPの上昇は蛋白質合成を調節していると報告されている。本研究ではcAMPおよびG蛋白質関連試薬を用い、細胞内cAMP濃度を上昇させることによりVTG合成が促進された。cAMPはプロテインキナーゼAの活性を促進させることにより、蛋白質のリン酸化または脱リン酸化を調節する。このことから、リン蛋白であるVTGの合成は細胞内cAMPに依存しているものであると考えられる。

以上のように、ニジマスにおけるVTG合成には肝細胞のER内の貯蔵カルシウムの調節が重要な役割を果たしており、さらに、卵黄形成期においてGHの刺激により肝細胞内のcAMPが上昇し、その結果VTGの合成が促進されるものであると推察される。しかし、カルシウムおよびcAMPの効果はVTGのリン酸化の促進によるものであると考えられるが、本研究ではリン酸化および脱リン酸化にどの程度関わっているのかについては不明であり、今後検討すべき課題である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 麦 谷 泰 雄

副 査 教 授 山 崎 文 雄

副 査 教 授 原 彰 彦

## 学 位 論 文 題 名

### Pharmacological Studies on the Role of Calcium and cAMP in Vitellogenin Induction by Estradiol-17 $\beta$ in the Primary Hepatocyte Culture in the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

(ニジマスの初代培養肝細胞におけるビテロゲニンの合成に及ぼすカルシウムおよびcAMPの影響に関する薬理学的研究)

魚類の卵黄成分の前駆体であるビテロゲニン(VTG)はエストロゲンの刺激により肝臓で合成され、血液を介して卵に蓄積する。したがってVTGの合成機構を明らかにすることは、健全な魚類の再生産機構の維持に極めて重要であるが、このことを肝細胞培養系を用いて直接調べた研究は少ない。

申請者はVTGがCa結合タンパク質であることに着目し、VTG合成におけるCaの役割を種々のCa関連試薬を用いてin vitroで薬理的に調べ、また合わせて成長ホルモン、cAMPなどがVTG合成に及ぼす影響を電気泳動により調べた。得られた結果の概要は次の通りである。

1. 肝細胞培地にエストロゲンを添加することにより活発なVTGの合成が誘導されたが、合成に先立ち細胞内へのCa流入が増加することを示し、このことがVTG合成誘導の発端の一つになっていることを示唆した。

2. VTGの合成は培地の[Ca]に依存しており、[Ca] 2.5 mMで最高を示し、0.25 mM以下ではVTGはほとんど合成されなかった。

3. 種々のCaアンタゴニストによりCaチャネルを阻害すると、VTGの合成は顕著に抑制され、受容体依存性およびベラパミル感受性Caチャネルを介してのCa流入がVTG合成に関与していた。

4. 細胞内貯蔵Caを枯渇させる作用のある種々のCaアゴニストにより、VTGの

合成は抑制された。特に小胞体のCa枯渇に特異作用のあるタブシガルギンにより、VTGの合成は濃度依存的に抑制されたが、ミトコンドリアに特異的なオリゴマイシンは抑制効果がなかった。

5. これらの作用はVTGに特異的であり、肝細胞由来の他のタンパク質の合成は用いたCa関連試薬によりほとんど影響されなかった。

6. 高濃度の成長ホルモン(100 ng/ml)によりVTGの合成は促進されたが、プロラクチンおよび甲状腺ホルモン (T<sub>3</sub>) による影響はなかった。

7. Gタンパク質の機能促進試薬 (コレラ毒素) などにより細胞内cAMP濃度を上昇させると、VTGの合成は増加した。

以上の研究成果はVTGの合成にCaが特異的に必要なことを示し、特に細胞内 (小胞体) の貯蔵CaがVTGの合成に重要な機能を果たしている事を明らかにしたものである。また成長ホルモンが細胞内cAMP濃度を上昇させることにより、VTGの合成に関与していることを示唆したものであり、魚卵の成熟機構の解明に貢献するものである。よって審査員一同は本論文が博士 (水産学) の学位論文として相当の業績であると認定した。